



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

**«ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΗΣ ΑΠΟΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΗΣ Ε ΚΑΙ ΤΗΣ
ΧΟΛΗΣΤΕΡΟΛΗΣ ΣΤΗΝ ΠΑΘΟΓΕΝΕΣΗ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ ALZHEIMER'S ΣΕ
ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΑΚΑ ΠΟΝΤΙΚΙΑ»**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΛΟΥΚΙΑΣ ΚΑΤΣΟΥΡΗ
Βιολόγου

ΑΘΗΝΑ
2012



NATIONAL AND CAPODISTRIAN UNIVERSITY OF ATHENS
SCHOOL OF SCIENCE
DEPARTMENT OF BIOLOGY

**“STUDY OF THE ROLE OF APOLIPOPROTEIN E AND CHOLESTEROL IN
THE PATHOGENESIS OF ALZHEIMER’S DISEASE IN TRANSGENIC MICE”**

PHD THESIS

**LOUKIA KATSOURI
BIOLOGIST**

ATHENS
2012

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Δρ. Σπύρος Ευθυμιόπουλος, Αναπληρωτής Καθηγητής Ε.Κ.Π.Α., Επιβλέπων

Δρ. Αικατερίνη Γαϊτανάκη, Καθηγήτρια Ε.Κ.Π.Α.

Δρ. Διδώ Βασιλακοπούλου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ε.Κ.Π.Α.

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Δρ. Σπύρος Ευθυμιόπουλος, Αναπληρωτής Καθηγητής Ε.Κ.Π.Α.,

Δρ. Αικατερίνη Γαϊτανάκη, Καθηγήτρια Ε.Κ.Π.Α.

Δρ. Διδώ Βασιλακοπούλου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ε.Κ.Π.Α.

Δρ. Λουκάς Μαργαρίτης, Ομότιμος Καθηγητής, Ε.Κ.Π.Α.

Δρ. Φωτεινή Στυλιανοπούλου, Καθηγήτρια, Ε.Κ.Π.Α.

Δρ. Δημήτρης Στραβοπόδης, Επίκουρος Καθηγητής, Ε.Κ.Π.Α.

Δρ. Σπύρος Γεωργόπουλος, Ερευνητής Γ, Ι.Ι.Β.Ε.Α.Α.

«Η έγκριση διδακτορικής διατριβής από τη Σχολή Θετικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Αθηνών δεν υποδηλώνει αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα»

(Ν. 5343/1932, άρθρο 202)

Στην οικογένειά μου

Στον Έρικ

Πρόλογος

Το διδακτορικό αυτό έφτασε μετά από πολύ δρόμο στο τέλος του...Ήταν μια εμπειρία ζωής και πάνω απ' όλα μια πάλη με τον ίδιο μου τον εαυτό μέσα από την οποία έγινα καλύτερος άνθρωπος.

Καταρχήν θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Δρ. Σπύρο Γεωργόπουλο για την ευκαιρία που μου έδωσε να πραγματοποιήσω αυτή την διατριβή στο εργαστήριό του. Εκτός από την τεχνική κατάρτιση, απέκτησα υπομονή και επιμονή, αλλά κυρίως ζήλο για την καλή επιστήμη και με όπλισε με εφόδια με τα οποία μπορώ να δουλέψω στα καλύτερα ερευνητικά ιδρύματα του κόσμου.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τα μέλη της τριμελούς μου επιτροπής, τον Δρ. Ευθυμίοπουλο, τη Δρ. Γαϊτανάκη και τη Δρ. Βασιλακοπούλου, οι οποίοι μου έκανα τη τιμή να με καθοδηγούν και να με συμβουλεύουν όλα αυτά τα χρόνια. Ιδιαίτερη μνεία θα ήθελα να κάνω στη Δρ. Γαϊτανάκη, της οποίας η επιμονή της για τα σωστά ελληνικά με έκαναν να ξαναγαπήσω τη γλώσσα μου, την οποία την είχα παραμελήσει...Χωρίς τις συμβουλές και τις παροτρύνσεις όλων των καθηγητών μου αυτή η διατριβή δεν θα έφτανε ποτέ σε αυτή τη μορφή.

Στα χρόνια του διδακτορικού απέκτησα πολλούς φίλους, οι οποίοι ήταν και είναι πάντα δίπλα μου στις χαρές και στις λύπες μου. Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τη Θέμις Αλυσάφη, που με την αγάπη της για τη ζωή και το πάθος της για την έρευνα συμπαρέσυρε κι εμένα. Επίσης την Τερέζα Βογιατζή, που πολλές μέρες και νύχτες ήταν εκεί για μένα πάντα έτοιμη και που ακόμα και την ύστατη στιγμή, με βοήθησε να γράψω αυτή την διατριβή. Η Καλλιόπη Θανοπούλου, δίπλα μου όλα αυτά τα χρόνια ήταν ουσιαστικά το άλλο μου μισό στο εργαστήριο και μαζί στήσαμε τις περισσότερες τεχνικές, πάντα χαμογελαστή και θετική!

Είχαμε τη τιμή να έχουμε στο εργαστήριο εξαιρετικές προπτυχιακές και μεταπτυχιακές φοιτήτριες, οι οποίες ήταν απίστευτα ικανές. Ισμήνη Ροζάνη, Μαρίνα Κανακάρη, Μάντια Καραμπέτσου, Δήμητρα Σχίζα και Ελευθερία Αναστασοπούλου, σας ευχαριστώ για όλα!!

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω έναν εξαιρετικό φιλόλογο, το Νίκο Κάσσιο, ο οποίος είχε την υπομονή να μου εξηγήσει ξανά τα πως και τα γιατί της ελληνικής γλώσσας,

αλλά και την Ευθυμία Θυμιάκου, της οποίας η βοήθεια ήταν καταλυτική τους τελευταίους μήνες της συγγραφής του διδακτορικού.

Για τους γονείς μου τι να γράψω; Όλα φαίνονται μηδαμινά μπροστά στα τόσα που έκαναν για μένα..Στήριξαν το όνειρό μου και με βοήθησαν οικονομικά και κυρίως ψυχικά να κάνω αυτή τη διατριβή. Θα ήθελα επίσης να κάνω ιδιαίτερη μνεία στις αδερφές μου Ελένη, Άντρια και Μικαέλλα, οι οποίες πέρασαν μαζί μου τα χρόνια του διδακτορικού...Αδερφούλες να 'στε καλά και σας ευχαριστώ που με αντέξατε!!

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω το σύντροφό μου Έρικ, ο οποίος έμεινε μαζί μου όλα αυτά τα χρόνια και άντεξε τη γκρίνια και τα νεύρα που συνεπάγεται η μεγάλη πίεση που δέχεται ένας υποψήφιος διδάκτορας... Ο μεγαλύτερος μου σύμμαχος και ο καλύτερος μου φίλος... Σε ευχαριστώ από τα βάθη της ψυχής μου για όλα όσα έκανες και που ποτέ δεν έχασες την υπομονή και την πίστη σου σε μένα...

Συντμήσεις

α1-ACT= α1 αντιχυμοτροψίνη (α1-antichymotrypsin)

ΑΑΠ= Αλυσιδωτή αντίδρασης πολυμεράσης

Αβ= β-αμυλοειδές

ACAT= ακετυλοτρανσφεράση του ακετυλο-συνένζυμου Α (acetyl-Coenzyme A acetyltransferase)

AD= νόσος του Alzheimer (Alzheimer's disease)

AICD= ενδοκυττάριο τμήμα της APP (APP intracellular domain)

ALS= αμυοτροφική πλευρική σκλήρυνση (amyotrophic lateral sclerosis)

ANOVA (1-way) = ανάλυση της διακύμανσης κατά έναν παράγοντα (one way analysis of variance)

APH1= ομόλογη πρωτεΐνη του πρόσθιου φάρυγγα 1 (anterior pharynx defective homolog 1)

APOA-I= απολιποπρωτεΐνη Α 1 (apolipoprotein A 1)

APOA-II= απολιποπρωτεΐνη Α 2 (apolipoprotein A 2)

APOB= απολιποπρωτεΐνη Β (Apolipoprotein B)

APOC= απολιποπρωτεΐνη C (Apolipoprotein C)

ApoC-I= απολιποπρωτεΐνη C 1 (Apolipoprotein C 1)

APOE= απολιποπρωτεΐνη Ε (Apolipoprotein E)

ApoE-TR= ποντίκια με γενετικά τροποποιημένο το γονίδιο της ApoE το οποίο έχει αντικατασταθεί από το ανθρώπινο γονίδιο (Targeted replacement ApoE mice)

APOJ= απολιποπρωτεΐνη J (Apolipoprotein J)

APP= πρόδρομη πρωτεΐνη του αμυλοειδούς (amyloid precursor protein)

APP_s-α= διαλυτό τμήμα της APP μετά από την πρωτεόλυσή της από την α-εκκρίταση (APP soluble α)

APS= υπερθειικό αμμώνιο (ammonium persulfate)

Arg= αργινίνη (arginine)

bp= ζεύγη βάσεων (base pairs)

BSA= αλβουμίνη ορού του βοός (bovine serum albumin)

C3= παράγοντας C3 του συστήματος του συμπληρώματος (complement 3)

CAA= εγκεφαλική αμυλοειδική αγγειοπάθεια (cerebral amyloid angiopathy)

CE= εστέρας χοληστερόλης (cholesterol ester)

CNV= μεταβολή του αριθμού αντιγράφων (copy number variation)

COX= κυκλοοξυγενάση (cyclooxygenase)

CR1= υποδοχέας του συμπληρώματος 1 (complement receptor 1)

CTF= καρβοξυτελικά θραύσματα (carboxyterminal fragments)

Cy= κυανίνη (cyanine)

Cys= κυστεΐνη (cysteine)

Da= μονάδα μέτρησης μοριακού βάρους των πρωτεϊνών (Dalton)

DAB= 3, 3'-διάμινο-βενζιδίνη (diamino-benzidine)

DMSO= διμεθύλο-σουλφοξείδιο (dimethyl sulfoxide)

DNA= δεσοξυριβονουκλεϊκό οξύ (deoxy-ribonucleic acid)

dNTP= 5'-τριφωσφορικό δεοξυνουκλεοτίδιο (deoxynucleoside-5'-triphosphate)

ECL= ενισχυμένη χημειοφωταύγεια (enhanced chemiluminescence)

ΕΔ= ενδοπλασματικό δίκτυο

EDTA= αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό (ethylenediaminetetra-acetate)

ENY= εγκεφαλονωτιαίο υγρό

EGF= επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (epidermal growth factor)

EPR= Φασματοσκοπία με την τεχνική παλμικού ηλεκτρονικού παραμαγνητικού συντονισμού (electron paramagnetic resonance spectroscopy)

FBS= ορός εμβρύου βοός (fetal bovine serum)

FC= ελεύθερη χοληστερόλη (free cholesterol)

FCS= ορός εμβρύου μόσχου (fetal calf serum)

FRET= Φασματοσκοπία με την τεχνική μεταφοράς ενέργειας με συντονισμό φθορισμού (fluorescence resonance energy transfer spectroscopy)

FITC= ισοθειοκυανική φλουορεσκεΐνη (fluorescein isothiocyanate)

GFAP= όξινη ινιδιακή πρωτεΐνη των γλοιοκυττάρων (glial fibrillary acidic protein)

GFP= πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (GFP)

Glu= γλουταμινικό οξύ (glutamate)

GLT1= μεταφορέας του γλουταμινικού οξέος 1 (glutamate transporter 1)

GWAS= μελέτες συσχέτισης ασθενειών με τη χρήση ολόκληρου του γονιδιώματος (genome-wide associated studies)

HCHWA-C= κληρονομικές αιμορραγικές εγκεφαλικές αγγειοπάθειες με αμυλοείδωση (hereditary cerebrovascular hemorrhages with amyloidosis)

HDL= λιποπρωτεΐνη υψηλής πυκνότητας (high-density lipoprotein)

HMGCR= αναγωγάση του 3-υδροξυ-3-μεθυλγλουταρυλ-συνένζυμου-A (3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase)

HRP= υπεροξειδάση της αγριοραφανίδας

HSPG= θειική ηπαρινική πρωτεογλυκάνη 2 (heparan sulphate proteoglycan 2)

hu= ανθρώπινο/η (human)

ICD= ενδοκυττάρια επικράτεια (intracellular domain)

IDE= ένζυμο αποικοδόμησης της ινσουλίνης (insulin-degrading enzyme)

kbp= 1000 ζεύγη βάσεων (kilo base pairs)

kDa= 1000 Dalton

ΚΝΣ= κεντρικό νευρικό σύστημα

Ko= γενετικά τροποποιημένα ποντίκια στα οποία έχει αποσιωπηθεί ένα γονίδιο με κατευθυνόμενη απενεργοποίηση ή με μεταλλαξιγένεση ενδογενών γονιδίων σε όλα τα κύτταρα του οργανισμού, με αποτέλεσμα να μην εκφράζεται η αντίστοιχη πρωτεΐνη για την οποία αυτό κωδικοποιεί (knock-out).

LB=Luria Broth

LCAT= ακυλοτρανσφεράση λεκιθίνης-χοληστερόλης (lecithin-cholesterol acyltransferase)

LDL= λιποπρωτεΐνη χαμηλής πυκνότητας (low-density lipoprotein)

LDLR= υποδοχέας για τις λιποπρωτεΐνες χαμηλής πυκνότητας (low-density lipoprotein receptor)

LPL= λιποπρωτεϊνική λιπάση (lipoprotein lipase)

LPS= λιποπολυσακχαρίτες (lipopolysaccharides)

LRP-1= σχετιζόμενη με τον υποδοχέα LDLR πρωτεΐνη 1 (LDL receptor-related protein 1)

MHC-II= μείζων σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας (major histocompatibility complex II)

MMP9= μεταλλοπεπτιδάση του στρώματος 9 (matrix metalloproteinase 9)

mu= του ποντικού (murine)

mRNA= αγγελιαφόρο RNA (messenger RNA)

ΜΦ= μακροφάγα

NEP= νεπριλυσίνη (neprilysin)

NDS= φυσιολογικός ορός όνου (normal donkey serum)

NF-κB= πυρηνικός παράγοντας κB (nuclear factor kappa B)

NHS= φυσιολογικός ορός από άλογο (normal horse serum)

OD= οπτική απορρόφηση (optical density)

PAGE= ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης (polyacrylamide gel electrophoresis)

PBS= ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων (phosphate-buffered saline)

PFA= παραφορμαλδεΰδη (paraformaldehyde)

PSEN= πρεσινιλίνη (presenilin)

PEN2= ομόλογο του ενισχυτή της πρεσινιλίνης 2 (presenilin enhancer 2 homolog)

PgP= Ρ-γλυκοπρωτεΐνη (P-glycoprotein)

PICALM= φωσφατιδυλινοσιτολ-προσδεόμενη πρωτεΐνη συγκρότησης της κλαθρίνης (Phosphatidylinositol binding clathrin assembly protein)

RAGE= υποδοχέας για τελικά προϊόντα αυξημένης γλυκοζυλίωσης (receptor for advanced glycation products)

RAP= πρωτεΐνη η οποία σχετίζεται με τους υποδοχείς LDLR (receptor-associated protein)

RIP= ρυθμιζόμενη ενδομεμβρανική πρωτεόλυση (regulated intramembrane proteolysis)

RNA= ριβονουκλεϊκό οξύ (ribonucleic acid)

SDS= δωδεκυλ-υπερθειικό νάτριο (sodium dodecyl sulfate)

SDS-PAGE= ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης παρουσία SDS (polyacrylamide gel electrophoresis with SDS)

SEM= τυπικό σφάλμα του μέσου όρου (standard error mean)

SNP= πολυμορφισμός ενός νουκλεοτιδίου (single nucleotide polymorphism)

SREBP= πρωτεΐνη πρόσδεσης ρυθμιζόμενη από στερόλες (sterol regulatory element-binding protein)

SR-BI= υποδοχέας-εκκαθαριστής τάξης Β τύπου Ι (scavenger receptor class BI)

TAE= Tris-acetic acid-EDTA

TBE= Tris-Boric acid-EDTA

TBS= αλατούχο ρυθμιστικό διάλυμα Tris (Tris-buffered saline)

TBS-T= αλατούχο ρυθμιστικό διάλυμα Tris με Tween

TBS-Tx= αλατούχο ρυθμιστικό διάλυμα Tris με Triton X-100

TEMED= N,N,N',N'-τετραμεθυλ-αιθαν-1,2-διαμίνη (N,N,N',N'-tetramethyl-ethane-1,2-diamine)

Tg= διαγονιδιακό (transgenic)

Th= Τ-βοηθητικά κύτταρα (T-helper cells)

TLR= toll-like receptor

Tris= 2-άμινο-2-υδροξυμεθυλ-1,3-προπανοδιόλη (2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol)

Triton X-100= 4(1,1,3,3-τετραμεθυλβουτυρυλ)φαινυλοπολυαιθυλενογλυκόλη (4-(1,1,3,3-Tetramethylbutyl)phenyl-polyethylene glycol)

TTRI= τρανσθυρετίνη (transthyretin)

TUBB3= ισομορφή III της β-τουμπουλίνης (β-III tubulin)

Tween-20= Polyethylene glycol sorbitan monolaurate

VLDLR= υποδοχέας για τις λιποπρωτεΐνες πολύ χαμηλής πυκνότητας (very low-density lipoprotein receptor)

VLDL= λιποπρωτεΐνες πολύ χαμηλής πυκνότητας (very low-density lipoprotein)

v/v= συγκέντρωση κατ' όγκον (ml διαλυμένης ουσίας ανά 100ml διαλύματος)

w/v= συγκέντρωση κατά μάζα (gr διαλυμένης ουσίας ανά 100ml διαλύματος)

YFP= κίτρινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (yellow fluorescent protein)

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. Εισαγωγή.....	1
1.1. Δομικές και βιοφυσικές ιδιότητες της Απολιποπρωτεΐνης Ε.....	2
1.1.1. Βασική δομή της ΑΡΟΕ	3
1.1.2. Αλληλεπίδραση του αμινοτελικού και του καρβοξυτελικού άκρου της ΑΡΟΕ4.....	5
1.1.3. Η ετερογένεια στη διαμόρφωση της ΑΡΟΕ ανάλογα με την ισομορφή και τα προσδεδεμένα λιπίδια.....	7
1.2. Δομή και λειτουργία του υποδοχέα των χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεϊνών	7
1.3. Ο ρόλος της ΑΡΟΕ και του LDLR στο φυσιολογικό μεταβολισμό των λιποπρωτεϊνών.....	11
1.3.1. ΑΡΟΕ και μεταβολισμός λιπιδίων	11
1.3.2. Η λειτουργία του LDLR στο φυσιολογικό μεταβολισμό χοληστερόλης.....	15
1.4. Πολυμορφισμοί της ΑΡΟΕ και του LDLR σε χρονιες ασθeneies	16
1.4.1. ΑΡΟΕ και καρδιαγγειακές παθήσεις	16
1.4.2. LDLR και οικογενής υπερχοληστεριναϊμία	18
1.5. Η ΑΡΟΕ και ο LDLR στο Νευρικό Σύστημα	19
1.5.1. Η ΑΡΟΕ στο περιφερικό νευρικό σύστημα	19
1.5.2. Η ΑΡΟΕ στο κεντρικό νευρικό σύστημα.....	20
1.5.3. Ο ρόλος του LDLR στο ΚΝΣ.....	22
1.6. Γενετικά τροποποιημένα μοντέλα για την ΑρoE και τον Ldlr	22
1.6.1. Το μοντέλο ποντικού ΑρoE knock-out (ΑρoE-/-)	22
1.6.2. Το μοντέλο ποντικού Ldlr knock-out (Ldlr-/-)	24
1.7. Η νόσος του Alzheimer	26
1.7.1. Γενετική της νόσου του Alzheimer.....	27
1.7.2. Μεταλλαγές στην οικογενή μορφή της νόσου του Alzheimer	28
1.7.3. Πολυμορφισμοί γονιδίων ως παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση της σποραδικής μορφής της νόσου του Alzheimer.....	30
1.7.4. Πεπτίδιο Αβ και πρωτεΐνη Ταυ – Η υπόθεση του καταρράκτη του αμυλοειδούς.....	33
1.7.5. Ρυθμιζόμενη ενδομεμβρανική πρωτεόλυση της APP – Το αμυλοειδογενές και το μη αμυλοειδογενές μονοπάτι πρωτεόλυσης της APP	36
1.8. ΑΡΟΕ και νόσος του Alzheimer – Μελέτες σε μοντέλα ποντικών διαγονιδιακών για την ΑρoE και τον Ldlr	39
1.8.1. ΑΡΟΕ και νευροτοξικότητα	39
1.8.2. ΑΡΟΕ, παραγωγή και μεταφορά Αβ	40
1.8.3. ΑΡΟΕ και εναπόθεση του Αβ	41
1.8.4. ΑΡΟΕ και απομάκρυνση του Αβ.....	43
1.8.5. Επίπεδα των ισομορφών της ΑΡΟΕ στον εγκέφαλο	47
1.8.6. Ο LDLR και η επίδραση του στην παθοφυσιολογία της νόσου Alzheimer - Μελέτες σε διαγονιδιακά μοντέλα ποντικών	53
1.9. Φλεγμονώδης απόκριση στη νόσο του Alzheimer	54
1.9.1. Φλεγμονώδης απόκριση του νευρικού συστήματος.....	54
1.9.2. Μικρογλοία και αστροκύτταρα	56
1.9.3. Ο ρόλος των προερχόμενων από το μυελό των οστών μακροφάγων στη νόσο του Alzheimer	58
1.9.4. ΑΡΟΕ και φλεγμονώδης απόκριση	59
1.10. Σκοπός της μελέτης	61
2. Υλικά και μέθοδοι.....	63
2.1. Χημικά και αντισώματα	64
2.2. Ζώα.....	65
2.3. Κατασκευή διαγονιδίου σε πλασμίδιο-φορέα	65

2.4. Μετασχηματισμός δεκτικών βακτηρίων	68
2.4.1. Προετοιμασία δεκτικών βακτηρίων E.coli DH5α για ηλεκτροδιάτρηση.....	68
2.4.2. Μετασχηματισμός δεκτικών βακτηρίων E.coli DH5α με τη μέθοδο της ηλεκτροδιάτρησης	69
2.4.3. Προετοιμασία δεκτικών βακτηρίων E.coli DH5α για χημικό μετασχηματισμό με τη μέθοδο του CaCl ₂	69
2.4.4. Μετασχηματισμός δεκτικών βακτηρίων E.coli DH5α με χημική μέθοδο	70
2.4.5. Μετασχηματισμός δεκτικών βακτηρίων E.coli JC109 με χημική μέθοδο	70
2.5. Μέθοδοι απομόνωσης πλασμιδιακού DNA από καλλιέργειες βακτηρίων	71
2.5.1. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από μικρού μεγέθους καλλιέργεια (mini-prep)	71
2.5.2. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από μεσαίου μεγέθους καλλιέργειες (midi-prep)	72
2.6. Δημιουργία διαγονιδιακών ποντικών	72
2.6.1. Προετοιμασία του διαγονιδίου για ένεση σε γονιμοποιημένα ωάρια για την κατασκευή διαγονιδιακών ζώων	73
2.6.2. Προετοιμασία ωαρίων για ένεση DNA και δημιουργία διαγονιδιακών ποντικών.....	73
2.7. Απομόνωση DNA από βιοψίες ουράς	75
2.8. Γενετική ανίχνευση, ταυτοποίηση και γονοτυποποίηση διαγονιδιακών ποντικών	76
2.8.1. Ποσοτικός προσδιορισμός νουκλεϊκών οξέων με φωτομέτρηση.....	76
2.8.2. Ηλεκτροφόρηση νουκλεϊκών οξέων σε πήκτωμα αγαρόζης	77
2.8.3. Ανίχνευση και ταυτοποίηση διαγονιδιακών ποντικών με ανάλυση κατά Southern	78
2.8.4. Απομόνωση ιχνηθέτη για την ανάλυση κατά Southern των διαγονιδιακών ποντικών TTR1-huApoE4.....	81
2.8.5. Γενετικός χαρακτηρισμός των ποντικών με τη μέθοδο της Αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (ΑΑΠ)	81
2.9. Απομόνωση RNA και ανάλυση των επιπέδων έκφρασης mRNA των διαγονιδιακών μοντέλων σε μεταγραφικό επίπεδο.....	83
2.9.1. Απομόνωση RNA από ιστούς με Tri reagent [®]	84
2.9.2. Ραδιοσήμανση ιχνηθετών για την ανάλυση mRNA με τη μέθοδο της νουκλεάσης S1.....	85
2.9.3. Ανάλυση επιπέδων mRNA με τη μέθοδο της νουκλεάσης S1	86
2.10. Απομόνωση πρωτεϊνών και ανάλυση της πρωτεϊνικής έκφρασης των διαγονιδιακών μοντέλων ποντικών	87
2.10.1. Απομόνωση πρωτεϊνών από ιστούς για ανάλυση με τη μέθοδο του ανοσοστυπώματος	88
2.10.2. Απομόνωση ορού του αίματος των διαγονιδιακών ποντικών	88
2.10.3. Απομόνωση μακροφάγων	89
2.10.4. Απομόνωση πρωτεϊνών από εγκέφαλο ποντικού για ELISA.....	90
2.10.5. Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών (μέθοδος Bradford).....	91
2.10.6. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης (SDS-PAGE)	92
2.10.6.1. Πηκτώματα SDS-PAGE Tris-Γλυκίνης.....	93
2.10.6.2. Πηκτώματα SDS-PAGE Tris-Tricine	94
2.10.7. Γρήγη ηλεκτροφορητική μεταφορά πρωτεϊνών.....	95
2.10.8. Ανάλυση των πρωτεϊνικών επιπέδων έκφρασης με ανοσοδοκιμασία western (western blot).....	96
2.10.9. Αποδέσμευση αντισώματος από μεμβράνη νιτροκυτταρίνης ή PVDF (stripping)	98
2.11. Μέτρηση χοληστερόλης	99
2.12. Οργανοτυπική καλλιέργεια εγκεφάλου	99
2.13. Ενέσεις με LPS για ενεργοποίηση της μικρογλοίας.....	100
2.14. Χρώση με Θειοφλαβίνη-S σε τομές από εγκέφαλο ποντικών για ανίχνευση αμυλοειδών πλακών.....	100
2.15. Ανοσοϊστοχημεία και ανοσοφθορισμός.....	101
2.15.1. Ανοσοϊστοχημεία	102
2.15.2. Ανοσοφθορισμός	104

2.16. Ανοσοενζυμική μέθοδος-ELISA.....	106
2.17. Μεταμόσχευση μυελού των οστών.....	107
2.17.1 Πρωτόκολλο ακτινοβόλησης ποντικών.....	107
2.17.2 Απομόνωση κυττάρων μυελού των οστών.....	108
2.17.3 Μεταμόσχευση μυελού των οστών με ένεση στην ουραία φλέβα.....	109
2.18. Ποσοτικοποίηση της κάλυψης των αμυλοειδών πλακών.....	110
2.19. Στατιστική ανάλυση.....	110
3. Αποτελέσματα.....	111
3.1. Ανάλυση της παθολογίας τύπου Alzheimer σε ποντίκια στα οποία έχει αδρανοποιηθεί ο υποδοχέας των χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεϊνών (LDLR).....	112
3.1.1. Ποσοτικοποίηση της εναπόθεσης των αμυλοειδών πλακών σε ποντίκια στα οποία έχει αδρανοποιηθεί ο LDLR ή/και η APOE.....	113
3.1.2. Ανάλυση των πρωτεϊνικών επιπέδων της APOE στους εγκεφάλους διαγονιδιακών ποντικών με παθολογία τύπου Alzheimer σε σχέση με την απουσία του LDLR.....	115
3.1.4. Διερεύνηση της επίδρασης της απουσίας του LDLR στα επίπεδα της APP και των καρβοξυτελικών της θραυσμάτων.....	121
3.2. Ανάλυση της επίδρασης της απουσίας του LDLR στη φλεγμονώδη απόκριση στα διαγονιδιακά ποντίκια με παθολογία τύπου Alzheimer.....	121
3.2.1. Μελέτη της αστροκυττάρωσης στα διαγονιδιακά ποντίκια με παθολογία τύπου Alzheimer σε συσχετισμό με την απουσία του LDLR, παρουσία ή απουσία της APOE.....	122
3.2.2. Μελέτη της μικρογλοΐωσης στα διαγονιδιακά ποντίκια με παθολογία τύπου Alzheimer σε συσχετισμό με την απουσία του LDLR, παρουσία ή απουσία της APOE.....	125
3.3. Κατασκευή διαγονιδιακών ποντικών που εκφράζουν το ανθρώπινο αλληλόμορφο ApoE4 (TTRI-huApoE4).....	129
3.4. Ανάλυση της έκφρασης των διαγονιδιακών ποντικών TTRI-huApoE4 τα οποία εκφράζουν το αλληλόμορφο APOE4 της ανθρώπινης APOE.....	132
3.4.1. Ανάλυση επιπέδων mRNA με τη μέθοδο της νουκλεάσης S1.....	132
3.4.2. Ανάλυση έκφρασης της APOE4 στον ορό του αίματος των διαγονιδιακών ποντικών TTRI-huApoE4.....	135
3.4.3. Ανάλυση των επιπέδων χοληστερόλης στα διαγονιδιακά ποντίκια TTRI-huApoE4.....	136
3.4.4. Ανάλυση της ιστοειδικής έκφρασης της ανθρώπινης ApoE4 στα διαγονιδιακά ποντίκια TTRI-huApoE4;ApoE-/-.....	137
3.4.5. Ανάλυση της έκφρασης της ανθρώπινης APOE4 στα μακροφάγα των διαγονιδιακών ποντικών.....	139
3.4.6. Ανάλυση της έκφρασης της ανθρώπινης APOE4 στη μικρογλοΐα των διαγονιδιακών ποντικών με περιφερική έκφραση της ανθρώπινης APOE4 μετά από συστηματική επαγωγή φλεγμονής με LPS.....	140
3.5. Ανάλυση των διαγονιδιακών ποντικών που αναπτύσσουν τη νόσο του Alzheimer και εκφράζουν περιφερικά την ανθρώπινη APOE4.....	142
3.5.1. Ανάλυση της εναπόθεσης αμυλοειδών πλακών στα διαγονιδιακά ποντίκια TTRI-huApoE4 τα οποία εκφράζουν την APOE4 στην περιφέρεια.....	142
3.5.2. Ανάλυση της εναπόθεσης του Αβ στα διαγονιδιακά ποντίκια TTRI-huApoE4 τα οποία εκφράζουν την APOE4 στην περιφέρεια.....	146
3.5.3. Διερεύνηση της επίδρασης της ανθρώπινης APOE4 στα επίπεδα της APP και των καρβοξυτελικών της θραυσμάτων.....	149
3.5.4. Ανάλυση της επίδρασης της υπερέκφρασης της ανθρώπινης APP στα επίπεδα της χοληστερόλης.....	150
3.5.5. Ανάλυση της επίδρασης της περιφερικής έκφρασης της APOE4 στα πρωτεϊνικά επίπεδα της APOJ στα 5xFAD;TTRI-huApoE4;ApoE-/- ποντίκια.....	151
3.6. Ανάλυση της φλεγμονώδους απόκρισης στα διαγονιδιακά ποντίκια με παθολογία τύπου Alzheimer σε συσχέτιση με την περιφερική έκφραση της ανθρώπινης APOE4.....	151

3.6.1. Μελέτη της αστροκυττάρωσης στα διαγονιδιακά ποντίκια με παθολογία τύπου Alzheimer σε συσχέτισμό με την έκφραση της ενδογενούς APOE ή/και της ανθρώπινης APOE4	152
3.6.2. Μελέτη της μικρογλοΐωσης στα διαγονιδιακά ποντίκια με παθολογία τύπου Alzheimer σε συσχέτισμό με την έκφραση της ενδογενούς APOE ή/και της ανθρώπινης APOE4.....	156
3.6.3. Μελέτη της ικανότητας διήθησης των περιφερικών μακροφάγων στον εγκέφαλο των ποντικών με παθολογία τύπου Alzheimer.....	160
3.6.4. Μελέτη της αντιφλεγμονώδους δράσης της ανθρώπινης APOE4 στα ποντίκια με παθολογία τύπου Alzheimer	163
4. Συζήτηση	164
4.1. Η έλλειψη του LDLR οδηγεί στην αύξηση των αμυλοειδών εναποθέσεων στο διαγονιδιακό μοντέλο 5xFAD ανεξάρτητα από την παρουσία της APOE	166
4.2. Η έλλειψη του LDLR οδηγεί σε αύξηση των επιπέδων της APOE στον εγκέφαλο των διαγονιδιακών ποντικών 5xFAD;Ldlr-/-	168
4.3. Η απουσία του LDLR οδηγεί στην αύξηση του Αβ στον εγκέφαλο των διαγονιδιακών ποντικών 5xFAD	169
4.4. Η έλλειψη του LDLR δεν επηρεάζει τα επίπεδα της APP ή των CTF στον εγκέφαλο ενός διαγονιδιακού μοντέλου με παθολογία τύπου Alzheimer	170
4.5. Η αστροκυττάρωση είναι μειωμένη στον εγκέφαλο των 5xFAD διαγονιδιακών ποντικών απουσία του ενδογενούς LDLR.....	172
4.6. Μείωση της μικρογλοΐωσης στον εγκέφαλο των διαγονιδιακών 5xFAD στα οποία απουσιάζει ο LDLR	174
4.7. Το διαγονιδιακό ποντίκι TTRI-huApoE4 εκφράζει την ανθρώπινη APOE4 μόνο στην περιφέρεια και όχι στον εγκέφαλο.....	176
4.8. Τα μακροφάγα του διαγονιδιακού μοντέλου ποντικού TTRI-huApoE4 εκφράζουν υψηλές ποσότητες της ανθρώπινης APOE4 ανεξάρτητα από την ενεργοποίησή τους.....	179
4.9. Η ενεργοποιημένη μικρογλοΐα των διαγονιδιακών ποντικών TTRI-huApoE4 δεν εκφράζει την ανθρώπινη APOE4 μετά από συστηματική χορήγηση LPS.....	179
4.10. Η προερχόμενη από την περιφέρεια έκφραση της APOE4 οδηγεί σε αύξηση των αμυλοειδών πλακών, σε αλλαγή του προτύπου εναπόθεσης του Αβ και σε αύξηση των επιπέδων Αβ ₄₂ απουσία της ενδογενούς APOE	180
4.11. Τα επίπεδα των β-CTF μειώνονται στο διαγονιδιακό μοντέλο 5xFAD απουσία της ενδογενούς APOE του ποντικού με περαιτέρω μείωσή τους από την περιφερική έκφραση της ανθρώπινης APOE4.....	184
4.12. Η έλλειψη της APOE του ποντικού οδηγεί στη μείωση των επιπέδων της APOJ στο διαγονιδιακό μοντέλο 5xFAD – Επαναφορά στα φυσιολογικά επίπεδα από την περιφερική έκφραση της huAPOE4	186
4.13. Η περιφερική έκφραση της huAPOE4 δεν αλλάζει την αστροκυττάρωση στον ιππόκαμπο των 5xFAD;TTRI-huApoE;ApoE-/- αλλά μειώνει τη μικρογλοΐωση στον εγκέφαλο των διαγονιδιακών ποντικών απουσία της ενδογενούς APOE.....	187
4.14. Τα μακροφάγα των 5xFAD;TTRI-huApoE4;ApoE-/- ποντικών εισέρχονται στον εγκέφαλο και εκφράζουν huAPOE4	190
4.15. Τα ποντίκια 5xFAD;TTRI-huApoE4;ApoE-/- έχουν αυξημένη IL-10 γύρω από τις αμυλοειδείς πλάκες	193
4.16. Συμπεράσματα.....	193
4.17. Μελλοντικές μελέτες	194
5. Βιβλιογραφία	195
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	231
ABSTRACT.....	233

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α	235
Διαλύματα.....	236
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β	249

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. ΔΟΜΙΚΕΣ ΚΑΙ ΒΙΟΦΥΣΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΗΣ ΑΠΟΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΗΣ Ε

Η Απολιποπρωτεΐνη Ε (Apolipoprotein E, APOE) είναι μια πολυμορφική διαλυτή αμφιπαθής πρωτεΐνη, 299 αμινοξέων και μοριακής μάζας 34kDa και είναι μέλος της οικογένειας των διαλυτών απολιποπρωτεϊνών (Mahley and Rall, 2000). Στον άνθρωπο το γονίδιο βρίσκεται στο χρωμόσωμα 19 και η μεταγραφή του δίνει ένα πρόδρομο αγγελιαφόρο ριβονουκλεϊκό οξύ (messenger ribonucleic acid, mRNA) 1300 βάσεων (Mahley and Rall, 2000). Η πρωτεΐνη της APOE είναι μία από τις κυριότερες πρωτεΐνες του συστήματος μεταφοράς των λιποπρωτεϊνών και αποτελεί συστατικό των λιποπρωτεϊνών πολύ χαμηλής πυκνότητας (very low-density lipoprotein, VLDL), ενδιάμεσης πυκνότητας (intermediate-density lipoprotein, IDL) και υψηλής πυκνότητας (high-density lipoprotein, HDL) οι οποίες εμπλέκονται στο μηχανισμό μεταφοράς και ομοιόστασης της χοληστερόλης (Mahley and Rall, 2000).

Στον άνθρωπο υπάρχουν τρία αλληλόμορφα του γονιδίου της *ApoE*, το *ApoE2*, το *ApoE3* και το *ApoE4*, τα οποία διαφέρουν στα αμινοξέα 112 και 158. Το γονίδιο της *ApoE3*, που είναι το πιο κοινό αλληλόμορφο, έχει κατάλοιπο κυστεΐνης και αργινίνης στις θέσεις 112 και 158 αντίστοιχα, το *ApoE2* έχει δύο κυστεΐνες και το *ApoE4* έχει δύο αργινίνες. Το *ApoE3* θεωρείται το προγονικό γονίδιο λόγω της μεγάλης συχνότητάς του στον ανθρώπινο πληθυσμό. Κάποιοι ερευνητές υποθέτουν ότι τα αλληλόμορφα *ApoE2* και *ApoE4* προέκυψαν από μεταλλαγές του *ApoE3* (Mahley and Rall, 2000). Άλλοι υποστηρίζουν ότι το προγονικό αλληλόμορφο είναι το *ApoE4*, βασιζόμενες στο γεγονός ότι σχεδόν σε όλα τα ζώα η πρωτεΐνη της APOE έχει αργινίνη στην αντίστοιχη θέση με το αμινοξύ 112 της ανθρώπινης. Στους γορίλλες, το πιο κοντινό είδος στον άνθρωπο, η πρωτεΐνη έχει αργινίνη στη θέση 112 και δεν υπάρχουν ισομορφές της APOE, γεγονός που ενισχύει τη θεωρία υπέρ του *ApoE4* ως προγονικού αλληλομόρφου (Hanlon and Rubinsztein, 1995, Mahley and Rall, 2000, Weisgraber, 1994). Οι δύο αμινοξικές διαφορές προσδίδουν στα 3 αλληλόμορφα διαφορετικές βιοχημικές και μοριακές ιδιότητες με αποτέλεσμα να έχουν διαφορετική συγγένεια πρόσδεσης για τις HDL και για τα μέλη της υπεροικογένειας των υποδοχέων των λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας (low-density lipoprotein receptor, LDLR) (Zannis and Cohen, 2000).

Η APOE παράγεται κυρίως στο ήπαρ και τον εγκέφαλο και προσδένεται σε όλα τα μέλη της υπεροικογένειας των LDLR που εκφράζονται στον εγκέφαλο (Beffert et al., 2004,

Herz and Beffert, 2000, Herz and Bock, 2002). Επίσης, η APOE παράγεται σε υψηλές ποσότητες στα μακροφάγα (περιτοναϊκά και μακροφάγα των ιστών) και σε χαμηλότερες ποσότητες στο σπλήνα, το νεφρό, τον πνεύμονα, τα επινεφρίδια, τις ωοθήκες και τους μύες ενώ είναι απύσα από το λεπτό έντερο (Mahley, 1988).

Η APOE συμμετέχει στην αντίστροφη μεταφορά χοληστερόλης στα παρεγχυματικά ηπατοκύτταρα προς αποικοδόμηση και στη διατήρηση της ομοιόστασης της χοληστερόλης στα κύτταρα. Επιπλέον, η APOE έχει πιθανή αντι-αθηρογενετική δράση αποτρέποντας το σχηματισμό αφρωδών κυττάρων (foam cells) από τα μακροφάγα στις αθηρωματικές πλάκες (Greenow et al., 2005).

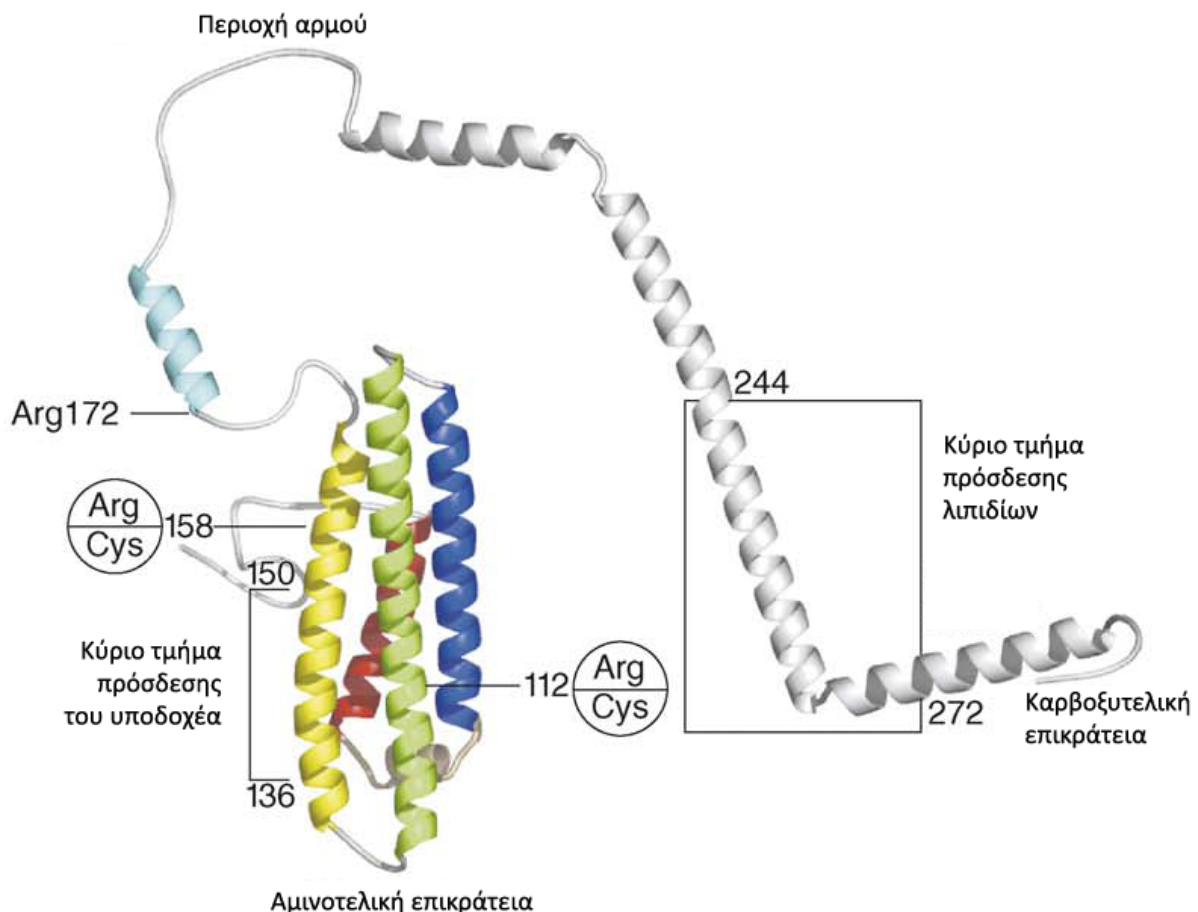
Η APOE έχει σημαντικό ρόλο στη μεταφορά λιπιδίων στο κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ) και είναι χαρακτηριστικό ότι ο εγκέφαλος είναι το δεύτερο όργανο σε παραγωγή APOE μετά το ήπαρ. Στο ΚΝΣ η APOE εκφράζεται και εκκρίνεται κυρίως από τα αστροκύτταρα και τη μικρογλοία και μεταφέρει χοληστερόλη και λιπίδια στους νευρώνες μέσω των μελών της υπεροικογένειας των LDLR (Han, 2004). Επιπρόσθετα, παίζει σημαντικό ρόλο στην επαγωγή της έκφυσης των νευριτών, την επιδιόρθωση τραυματισμένων νευρώνων και τη διατήρηση των αξονοδενδριτικών συνδέσεων (Hatters et al., 2006, Mahley and Rall, 2000).

Το πρωτεϊνικό μόριο της APOE έχει δύο διακριτές επικράτειες (domains), το αμινοτελικό και το καρβοξυτελικό άκρο (**Εικόνα 1.1**). Οι δύο επικράτειες πτυχώνονται ανεξάρτητα η μία από την άλλη και ενώνονται μεταξύ τους με μία ευέλικτη θηλιά (περιοχή αρμού) η οποία είναι ευαίσθητη σε κατάλυση από πρωτεάσες. Η APOE προσδένεται στις πρωτεΐνες της υπεροικογένειας των LDLR μέσω του αμινοτελικού άκρου, που είναι πλούσιο σε θετικά κατάλοιπα αργινίνης και λυσίνης. Επίσης, προσδένεται στα λιπίδια (λιποπρωτεΐνες και χυλομικρά) μέσω του καρβοξυτελικού της άκρου. Η APOE, όπως και άλλες διαλυτές απολιποπρωτεΐνες, περιέχει αμφιπαθείς α -ελικοειδείς περιοχές πρόσδεσης λιπιδίων οι οποίες της επιτρέπουν να αλλάζει αντιστρεπτά δομή μεταξύ της προσδεδεμένης με λιπίδια (λιπιδιωμένης) και της ελεύθερης (μη λιπιδιωμένης) κατάστασης (Pitas et al., 1980).

1.1.1. Βασική δομή της APOE

Η APOE έχει δύο διακριτές περιοχές με διαφορετικές λειτουργίες η κάθε μία. Το αμινοτελικό άκρο αποτελείται από τα κατάλοιπα 1-191 και περιέχει το τμήμα πρόσδεσης

στους LDLR. Το καρβοξυτελικό άκρο αποτελείται από τα αμινοξικά κατάλοιπα 225-299 και περιέχει το τμήμα πρόσδεσης των λιπιδίων (**Εικόνα 1.1**). Οι δύο επικράτειες αναδιπλώνονται ανεξάρτητα και η καμπύλη αποδιάταξής τους είναι ίδια με αυτήν της ολόκληρης πρωτεΐνης (Morrow et al., 2000b, Segrest et al., 1992).



Εικόνα 1.1. Μοντέλο της δομής της APOE. Οι κύριες δομικές περιοχές της APOE παρουσιάζονται στο σχήμα. Το αμινωτελικό της άκρο αποτελείται από μία δεσμίδα τεσσάρων ελίκων (έλικα 1 κόκκινη, έλικα 2 μπλε, έλικα 3 πράσινη και έλικα 4 κίτρινη) και περιέχει την περιοχή πρόσδεσης στους LDLR. Η μικρή γαλάζια έλικα στο τμήμα αρμού υπάρχει στην APOE του ποντικού αλλά όχι στην ανθρώπινη παρόλο που η αμινοξική ακολουθία είναι η ίδια (Hatters et al., 2005b). Το καρβοξυτελικό άκρο, με βάση την αμινοξική αλληλουχία, πιθανότατα έχει δομή α-έλικας. Στο καρβοξυτελικό άκρο βρίσκεται η περιοχή πρόσδεσης λιπιδίων. Για την υψηλή συγγένεια πρόσδεσης στους LDLR είναι απαραίτητη η αργινίνη 172 (Arg172) στο τμήμα αρμού το οποίο συνδέει το αμινωτελικό και το καρβοξυτελικό άκρο. Το αμινωτελικό άκρο περιέχει τις δύο πολυμορφικές θέσεις στα αμινοξέα 112 και 158 οι οποίες διακρίνουν τις τρεις ισομορφές της APOE. Προσαρμογή από Hatters D.M. et al., *Trends Biochem Sci*, 2006, 31 (8), 445-454.

Μελέτες κρυσταλλογραφίας με ακτίνες Χ έδειξαν ότι το αμινωτελικό άκρο αποτελείται από μία προεκτεινόμενη δέσμη τεσσάρων α-ελίκων (Wilson et al., 1991)

(**Εικόνα 1.1**). Οι έλικες είναι τοποθετημένες αντιπαράλληλα και έχουν τα εξής όρια: έλικα 1 αμινοξέα 24-42, έλικα 2 αμινοξέα 54-81, έλικα 3 αμινοξέα 87-122 και έλικα 4 αμινοξέα 130-164. Μία μικρή πρόσθετη έλικα που αποτελείται από τα αμινοξέα 44-53 ενώνει τις έλικες 1 και 2.

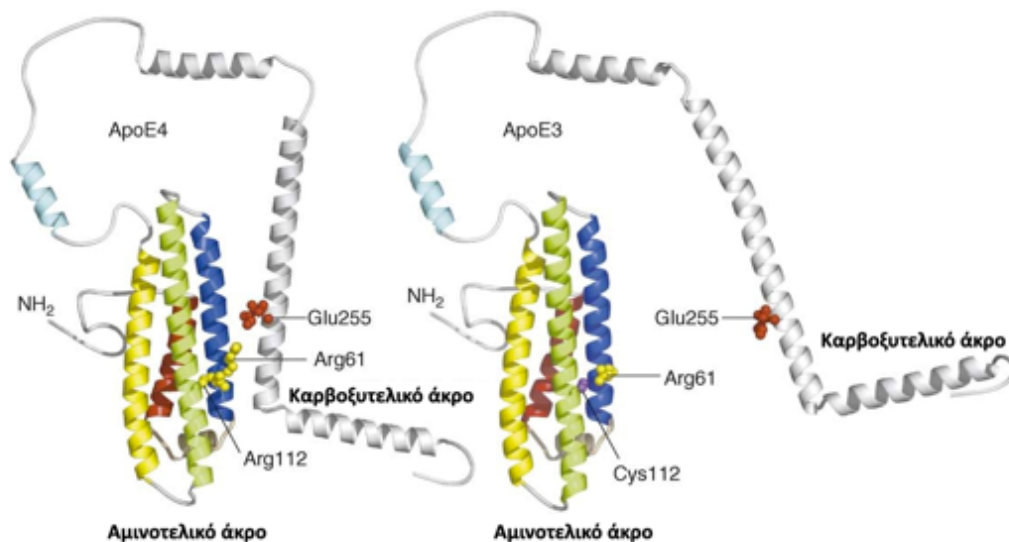
Η περιοχή πρόσδεσης στον LDLR βρίσκεται στην έλικα 4 (κατάλοιπα 136-150) και είναι πλούσια σε κατάλοιπα αργινίνης και λυσίνης. Αυτά αλληλεπιδρούν με ιονικούς δεσμούς με όξινα κατάλοιπα τα οποία βρίσκονται στην περιοχή πρόσδεσης του προσδέτη (ligand) στους LDLR (Weisgraber, 1994). Για να υπάρχει πλήρης πρόσδεση στον LDLR είναι απαραίτητη η συμμετοχή ενός κατάλοιπου αργινίνης στη θέση 172 (Arg172) που βρίσκεται στο τμήμα αρμού μεταξύ του αμινοτελικού και του καρβοξυτελικού άκρου (**Εικόνα 1.1**) (Morrow et al., 2000a).

Η μη λιπιδιωμένη APOE δεν έχει υψηλή συγγένεια πρόσδεσης για τους LDLR. Για την πρόσδεσή της στους υποδοχείς της οικογένειας αυτής, είναι απαραίτητη η σύνδεση της απολιποπρωτεΐνης με φωσφολιπίδια ή λιποπρωτεΐνες. Η κύρια περιοχή πρόσδεσης λιπιδίων βρίσκεται στο καρβοξυτελικό άκρο (κατάλοιπα 244-272, **Εικόνα 1.1**) (Mahley and Rall, 2000).

1.1.2. Αλληλεπίδραση του αμινοτελικού και του καρβοξυτελικού άκρου της APOE4

Όπως έχει αναφερθεί, οι τρεις ισομορφές της πρωτεΐνης της APOE προσδένουν διαφορετικού μεγέθους λιποπρωτεΐνες. Η APOE4 προσδένεται κατά προτίμηση σε μεγάλες, χαμηλότερης πυκνότητας λιποπρωτεΐνες VLDL και LDL, ενώ οι APOE2 και APOE3, προσδένονται σε μικρότερες, πιο πλούσιες σε χοληστερόλη, λιποπρωτεΐνες HDL (Weisgraber, 1990). Η προτίμηση της APOE4 για τις λιποπρωτεΐνες VLDL οφείλεται στην παρουσία ενός κατάλοιπου αργινίνης στη θέση 112 (Arg112) η οποία επηρεάζει τη διαμόρφωση της πλευρικής αλυσίδας της αργινίνης στη θέση 61 (Arg61) (Dong et al., 1994) (**Εικόνα 1.2**). Μελέτες της δομής της πρωτεΐνης με κρυσταλλογραφία έδειξαν ότι η παρουσία της Arg112 προσανατολίζει την Arg61 μακριά από τη δέσμη των τεσσάρων α-ελίκων. Αντίθετα στην APOE3, η οποία έχει κυστεΐνη στη θέση 112 (Cys112), η πλευρική αλυσίδα της Arg61 είναι «κρυμμένη» ανάμεσα σε δύο έλικες. Ο προσανατολισμός της πλευρικής αλυσίδας της Arg61 στην APOE4 επιτρέπει την αλληλεπίδραση με ένα όξινο κατάλοιπο που βρίσκεται στο καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης (Dong and Weisgraber, 1996). Η αλληλεπίδραση ανάμεσα στο αμινοτελικό και το καρβοξυτελικό άκρο στην APOE4,

εξηγεί γιατί η APOE3 και η APOE4 διαφέρουν ως προς την ικανότητα πρόσδεσης σε διαφορετικές λιποπρωτεΐνες. Μελέτες μεταλλαγής στα όξινα κατάλοιπα της καρβοξυτελικής περιοχής ταυτοποίησαν το γλουταμινικό στη θέση 255 (Glu255) ως το αλληλεπιδρών κατάλοιπο με την Arg61 (Dong and Weisgraber, 1996). Μεταλλαγή του Glu255 σε αλανίνη άλλαξε την προτίμηση της APOE4 για λιποπρωτεΐνες VLDL σε HDL.



Εικόνα 1.2. Αλλαγές στη δομή της πρωτεΐνης λόγω της αλληλεπίδρασης του αμινοτελικού και του καρβοξυτελικού άκρου στην APOE4. Στην APOE4 δημιουργείται μια ηλεκτρολυτική γέφυρα μεταξύ της Arg61 και του Glu255, η οποία οδηγεί στη στενή σύνδεση μεταξύ του αμινοτελικού και του καρβοξυτελικού άκρου. Αυτή η αλληλεπίδραση δεν υφίσταται στην APOE2 και στην APOE3, λόγω της παρουσίας του κατάλοιπου Cys112. Η Cys112 έχει ως αποτέλεσμα μια διαμόρφωση όπου η πλευρική αλυσίδα της Arg61 βρίσκεται ανάμεσα στις έλικες 2 και 3 και είναι λιγότερο προσιτή για τη δημιουργία ηλεκτρολυτικής γέφυρας με το Glu225. Προσαρμογή από Hatters D.M. et al., Trends Biochem Sci, 2006, 31 (8), 445-454.

Επιπρόσθετες μελέτες φασματοσκοπίας με την τεχνική μεταφοράς ενέργειας με συντονισμό φθορισμού (fluorescence energy transfer, FRET) και φασματοσκοπίας με την τεχνική παλμικού ηλεκτρονικού παραμαγνητικού συντονισμού (electron paramagnetic resonance spectroscopy, EPR) έδειξαν ότι η απόσταση μεταξύ του αμινοτελικού και του καρβοξυτελικού άκρου στη μη λιπιδιωμένη APOE διαφέρει ανάμεσα στις τρεις ισομορφές (**Εικόνα 1.2**) (Hatters et al., 2005a). Μελέτες FRET σε ζωντανούς νευρώνες οι οποίοι εξέφραζαν μια συντηγμένη πρωτεΐνη APOE4 που είχε το αμινοτελικό της άκρο σημασμένο

με GFP και το καρβοξυτελικό με κίτρινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (YFP), απέδειξαν ότι η αλληλεπίδραση των δύο περιοχών υφίσταται και σε ζωντανά κύτταρα (Xu et al., 2004).

Η APOE του ποντικού (murine, mu) έχει σε αντίστοιχες θέσεις τα αμινοξέα Arg112 και Glu225, αλλά δεν έχει την Arg61. Δομικά μοιάζει με την ανθρώπινη (human, hu) APOE3 και δεν υπάρχει αλληλεπίδραση μεταξύ του αμινοτελικού και του καρβοξυτελικού άκρου (Raffai et al., 2001).

1.1.3. Η ετερογένεια στη διαμόρφωση της APOE ανάλογα με την ισομορφή και τα προσδεδεμένα λιπίδια

Υπάρχουν πολλά δεδομένα τα οποία υποστηρίζουν ότι η APOE υιοθετεί διαφορετική διαμόρφωση ανάλογα με τη λιποπρωτεΐνη στην οποία είναι συνδεδεμένη. Αρχικές μελέτες έδειξαν ότι η συγγένεια πρόσδεσης της μη λιπιδιωμένης APOE για τους LDLR είναι πολύ χαμηλή, ενώ αντίθετα είναι υψηλή όταν η APOE είναι λιπιδιωμένη (Innerarity et al., 1979). Επόμενες μελέτες έδειξαν ότι η συγγένεια πρόσδεσης των λιπιδιωμένων μορφών της APOE στους LDLR εξαρτάται επίσης από το μέγεθος των λιποπρωτεϊνών (Gianturco et al., 1983), τη σύστασή τους σε λιπίδια (Ishikawa et al., 1988) καθώς και την παρουσία άλλων απολιποπρωτεϊνών σε αυτές (Kowal et al., 1990, Weisgraber et al., 1990). Η παρουσία των απολιποπρωτεϊνών C (Apolipoprotein C, ApoC), και κυρίως της APOC-I, στο σωματίδιο των λιποπρωτεϊνών VLDL μειώνει την ικανότητα πρόσδεσης δεύτερου μορίου της APOE (Narayanaswami and Ryan, 2000). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα η APOE να παίρνει διαφορετική διαμόρφωση και να έχει μικρότερη συγγένεια σύνδεσης με τους υποδοχείς LDLR. Τα παραπάνω ευρήματα οδήγησαν στην υπόθεση ότι η προσδεδεμένη σε λιποπρωτεΐνη APOE έχει διακριτές «ενεργοποιημένες» και «απενεργοποιημένες» διαμορφώσεις ως προς την πρόσδεση στους LDLR (Narayanaswami and Ryan, 2000).

1.2. ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΤΩΝ ΧΑΜΗΛΗΣ ΠΥΚΝΟΤΗΤΑΣ ΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

Ένας από τους κυριότερους υποδοχείς της APOE είναι ο υποδοχέας των χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεϊνών (low-density lipoprotein receptor, LDLR) ο οποίος είναι μια διαμεμβρανική γλυκοζυλιωμένη πρωτεΐνη με κύριο ρόλο την απομάκρυνση της

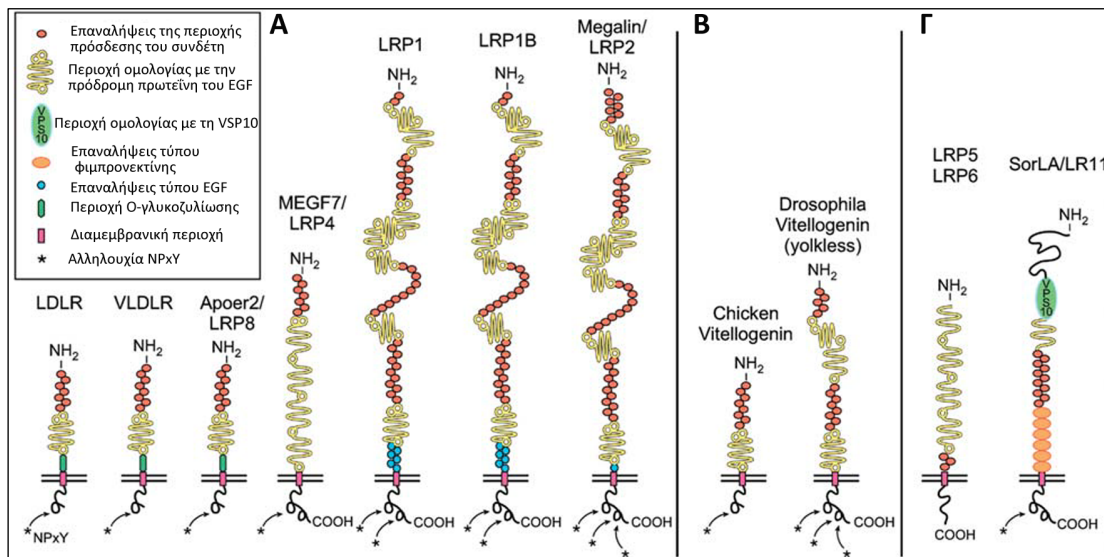
χοληστερόλης από την κυκλοφορία μέσω των λιποπρωτεϊνών, κυρίως LDL, και τη μεταφορά τους στο ήπαρ για αποικοδόμηση και απέκκριση (Brown and Goldstein, 1986, Herz and Bock, 2002). Για την υψηλή συγγένεια πρόσδεσης της APOE στον LDLR χρειάζεται η δέσμευση λιπιδίων από την APOE (Blacklow, 2007). Η ισομορφή APOE2 έχει ικανότητα πρόσδεσης στον LDLR 1-2% σε σχέση με το φυσιολογικό (οι ισομορφές APOE3 και APOE4 έχουν 100%), με αποτέλεσμα την εμφάνιση υπερχοληστεριναιμίας σε ορισμένους ομοζυγώτες για το αλληλόμορφο της *ApoE2* (Ruiz et al., 2005).

Ο LDLR είναι μέλος της υπερικογένειας των LDLR, οι οποίοι έχουν ως κοινό χαρακτηριστικό το ότι όλοι προσδένουν την APOE, και είναι ένας από τους σημαντικότερους υποδοχείς της APOE στον εγκέφαλο (**Εικόνα 1.3**) (Herz and Bock, 2002). Οι υποδοχείς αυτοί είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες που έχουν μία μοναδική περιοχή που διαπερνά τη μεμβράνη και μία σχετικά μικρή καρβοξυτελική ενδοκυτταρική περιοχή (πρωτεΐνες τύπου I). Οι υποδοχείς αυτοί έχουν τρία χαρακτηριστικά στοιχεία κοινά για όλα τα μέλη: (α) δύο εξωκυττάρια περιοχές, μία με επαναλήψεις που είναι υπεύθυνες για την πρόσδεση των προσδετών (ligand-binding repeats) και μία που παρουσιάζει ομολογία με τον πρόδρομο επιδερμικό αυξητικό παράγοντα (epidermal growth factor, EGF), και β) μια ενδοκυττάρια περιοχή η οποία περιέχει μία ή δύο φορές την αμινοξική αλληλουχία NPXY. Το μοτίβο NPXY είναι υπεύθυνο για την ενδοκυττάρωση των υποδοχέων μέσω κυστιδίων κλαθρίνης (Jeon and Blacklow, 2005).

Στον άνθρωπο το γονίδιο του *Ldlr* βρίσκεται στο χρωμόσωμα 19, έχει μέγεθος 44Kbp και περιέχει 18 εξώνια. Το πρόδρομο mRNA που μεταγράφεται είναι 5265 βάσεις. Η πρωτεΐνη LDLR έχει 840 αμινοξέα και μέγεθος 120KDa μετά την αποκοπή του πεπτιδίου-οδηγητή το οποίο κωδικοποιείται από το εξώνιο 1. Τα εξώνια 2-6 κωδικοποιούν την περιοχή πρόσδεσης του προσδέτη, τα εξώνια 7-14 την περιοχή ομολογίας με τον EGF και το εξώνιο 15 την περιοχή γλυκοζυλίωσης. Το εξώνιο 16 και ένα μέρος του εξωνίου 17 κωδικοποιούν την διαμεμβρανική περιοχή ενώ το υπόλοιπο μέρος του εξωνίου 17 μαζί με το εξώνιο 18 την κυτταροπλασματική περιοχή (Sudhof et al., 1985).

Τα μέλη της υπερικογένειας των LDLR (**Εικόνα 1.3**) προέκυψαν εξελικτικά σχεδόν ταυτόχρονα με ανακατανομή εξωνίων (Sudhof et al., 1985). Ορθόλογα γονίδια για τα περισσότερα από τα μέλη της οικογένειας των LDLR έχουν ανευρεθεί στο νηματώδη σκώληκα *C. elegans* και στη δροσόφιλα *D. melanogaster*, γεγονός που υποδηλώνει τη σπουδαιότητα του περίπλοκου αυτού βιοχημικού μονοπατιού (Dieckmann et al., 2010).

Πειραματικές μελέτες απέδειξαν ότι τα μέλη της υπερικογένειας των LDLR, εκτός από τον ρόλο τους στη ρύθμιση της χοληστερόλης, έχουν πολύ σημαντική συμμετοχή και στη μεταγωγή σήματος στα κύτταρα (Li et al., 2001, May et al., 2003).



Εικόνα 1.3. Οι υποδοχείς της υπερικογένειας των LDLR στα θηλαστικά. Α. ο κύριος πυρήνας της υπερικογένειας στα θηλαστικά. Β. Υποδοχείς σε μη θηλαστικά οι οποίοι είναι δομικά και λειτουργικά όμοιοι με τους LDLR των θηλαστικών (ορθόλογα γονίδια). Γ. Δύο ακόμα μέλη της υπερικογένειας των LDLR στα θηλαστικά τα οποία μοιράζονται τα περισσότερα αλλά όχι όλα τα δομικά χαρακτηριστικά της υπερικογένειας. Επίσης μπορεί να περιέχουν περιοχές οι οποίες δεν υπάρχουν στα μέλη του κύριου πυρήνα της οικογένειας. Τροποποιημένο από Dieckmann M et al., *Biol. Chem.*, 2010, 391: 1341–1363.

Ο LDLR θεωρείται το «αρχέγονο» μέλος της υπερικογένειας αυτής (Εικόνα 1.3). Στο εξωκυττάριο του μέρος (αμινοτελικό άκρο) περιέχει επτά επαναλήψεις της περιοχής πρόσδεσης του προσδέτη. Αυτές είναι περίπου 40 αμινοξέα με έξι κατάλοιπα κυστεΐνης η καθένα και αναδιπλώνονται ανεξάρτητα κατά την σύνθεσή τους. Η Απολιποπρωτεΐνη Β (Apolipoprotein B, APOB) χρειάζεται τις επαναλήψεις 3-7 για να προσδεθεί, ενώ η APOE χρειάζεται μόνο την 5^η επανάληψη για την πρόσδεση της στον LDLR. Επίσης, οι λιποπρωτεΐνες LDL έχουν μόνο ένα μόριο APOB προσδεμένο, ενώ οι VLDL έχουν προσδεμένα πολλά μόρια APOE τα οποία προσδίδουν στις VLDL μεγαλύτερη συγγένεια πρόσδεσης για τον LDLR. Η επανάληψη 5 θεωρείται η αρχική επανάληψη από την οποία προέκυψαν οι υπόλοιπες (Esser et al., 1988).

Στη συνέχεια ακολουθεί μία περιοχή η οποία έχει 35% ομολογία με τον πρόδρομο EGF, μία περιοχή με έξι επαναλήψεις της αμινοξικής αλληλουχίας YWTD (τυροσίνη,

τρυπτοφάνη, θρεονίνη και ασπαρτικό) μοτίβου β-προπέλας και μία ακόμα επανάληψη EGF η οποία είναι υπεύθυνη για την εξαρτώμενη από το pH απελευθέρωση του προσδέτη στο λυσόσωμα. Μεταλλαγές οι οποίες εξάλειψαν την πρώτη επανάληψη EGF οδήγησαν στη μείωση της πρόσδεσης των λιποπρωτεϊνών LDL κατά 50% ενώ δεν είχαν καμία επίδραση στην πρόσδεση των λιποπρωτεϊνών VLDL. Ακολουθεί μια περιοχή 58 αμινοξέων η οποία είναι Ο-γλυκοζυλιωμένη και σύμφωνα με πειράματα μεταλλαξιγένεσης σε ποντίκια, η απουσία της δεν αλλάζει τη λειτουργία της πρωτεΐνης (Jeon and Blacklow, 2005).

Η διαμεμβρανική περιοχή περιέχει πολλά υδρόφοβα αμινοξέα και η μικρή ενδοκυτταρική καρβοξυτελική ουρά περιέχει την αλληλουχία NPxY (ασπαραγίνη, προλίνη, ένα οποιοδήποτε αμινοξύ, τυροσίνη). Η αλληλουχία NPxY ευθύνεται για τη μεταγωγή σήματος και για την πρόσδεση πρωτεϊνών-προσαρμοστών συνδέοντας έτσι τον LDLR με ενδοκυττάρια μεταγωγικά μονοπάτια (Dieckmann et al., 2010, Howell and Herz, 2001) (**Εικόνα 1.3**). Η καρβοξυτελική περιοχή είναι επίσης απαραίτητη για την ενδοκυττάρωση του υποδοχέα μέσω κυστιδίων κλαθρίνης και τη σωστή διαλογή του στη βασοπλευρική περιοχή της μεμβράνης σε πολωμένα κύτταρα (Dieckmann et al., 2010, Herz, 1993, Herz and Beffert, 2000, Herz and Bock, 2002, Herz and Willnow, 1994, Howell and Herz, 2001). Η αλληλουχία NPxY βρίσκεται σε ένα ή περισσότερα αντίγραφα σε όλα τα μέλη της υπερικογένειας των LDLR καθώς και άλλων διαμεμβρανικών πρωτεϊνών (Chen et al., 1990).

Όταν οι LDLR προσδέσουν λιποπρωτεΐνες LDL, οι καλυμμένες με κλαθρίνη εσοχές της πλασματικής μεμβράνης αποκόπτονται και τα κυστίδια κλαθρίνης οδηγούνται στο λυσόσωμα. Μετά την ένωση του κυστιδίου κλαθρίνης με το λυσόσωμα, οι υποδοχείς απελευθερώνουν τον προσδέτη μετά από έκθεση στο χαμηλό pH του λυσοσώματος. Στη συνέχεια, ο LDLR είτε αποικοδομείται είτε ανακυκλώνεται προς την πλασματική μεμβράνη για ένα ακόμα κύκλο ενδοκυττάρωσης. Ο χρόνος ημιζωής του LDLR είναι είκοσι ώρες και σε αυτό το χρονικό διάστημα ανακυκλώνεται κάθε δέκα λεπτά. Κάθε λιποπρωτεϊνικό σωματίδιο LDL περιέχει περίπου 1600 μόρια χοληστερόλης με αποτέλεσμα η γρήγορη ανακύκλωση του LDLR να είναι ένας αποτελεσματικός μηχανισμός για την πρόσληψη της εξωγενούς χοληστερόλης (Goldstein and Brown, 2009).

Η ομάδα των Goldstein και Brown απέδειξε ότι ο LDLR ενδοκυτταρώνεται μέσω κυστιδίων κλαθρίνης με τη χρήση καλλιέργειών ινοβλαστών από έναν ασθενή με μία μεταλλαγή στο καρβοξυτελικό άκρο του υποδοχέα. Ο LDLR των ινοβλαστών από αυτόν τον

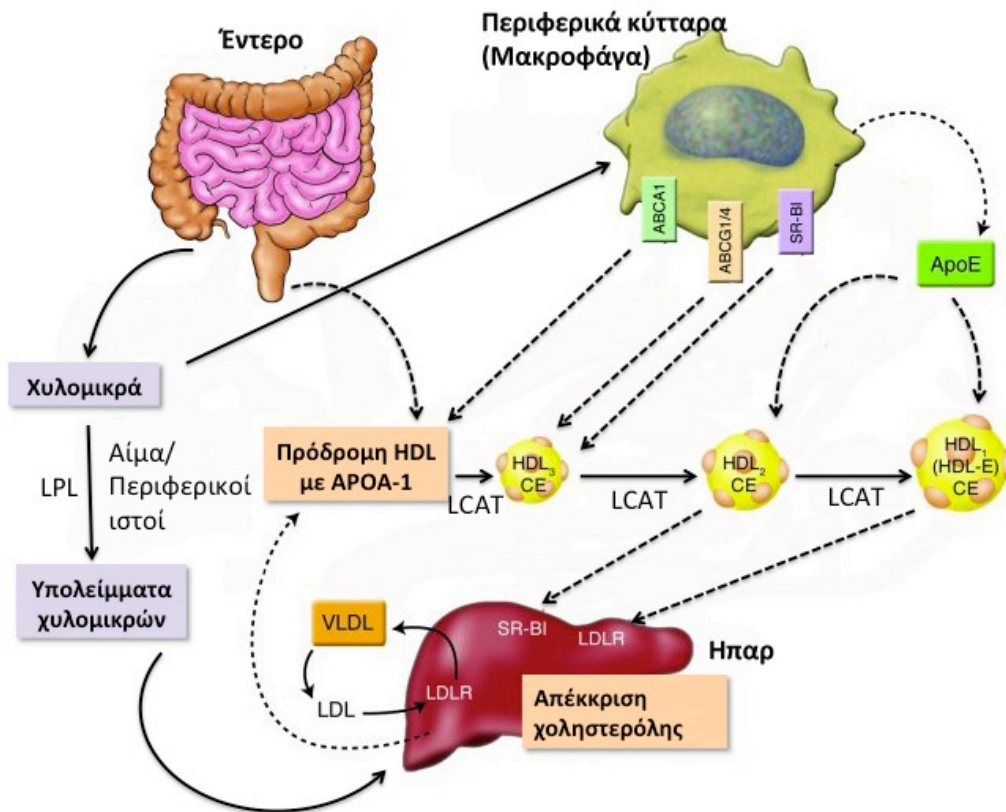
ασθενή μπορούσε να προσδένει τις λιποπρωτεΐνες LDL, αλλά αυτές δεν ενδοκυτταρώνονταν. Στη συνέχεια αποδείχτηκε ότι οι μεταλλαγμένοι LDLR απουσίαζαν από τις καλυμμένες με κλαθρίνη εσοχές της μεμβράνης (clathrin-coated pits) (Anderson et al., 1977).

1.3. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΑΡΟΕ ΚΑΙ ΤΟΥ LDLR ΣΤΟ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΟ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟ ΤΩΝ ΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

Η πιο γνωστή βασική λειτουργία της ΑΡΟΕ είναι ο μεταβολισμός των λιπιδίων ο οποίος πραγματοποιείται με τη βοήθεια των αντίστοιχων υποδοχέων της υπερικογένειας των LDLR (Mahley and Rall, 2000).

1.3.1. ΑΡΟΕ και μεταβολισμός λιπιδίων

Ένας από τους κυριότερους ρόλους της ΑΡΟΕ είναι η μεταφορά λιπιδίων ανάμεσα στους ιστούς (Mahley, 1988, Mahley and Huang, 1999, Mahley and Ji, 1999). Η ΑΡΟΕ είναι συστατικό των VLDL τα οποία εκκρίνονται από τα ηπατοκύτταρα. Επίσης δεσμεύεται από τα χυλομικρά αμέσως μετά τη σύνθεση και την έκκρισή τους από το λεπτό έντερο (ένας από τους λίγους ιστούς που δεν εκφράζει ΑΡΟΕ). Και οι δύο αυτοί τύποι των λιποπρωτεϊνών (VLDL και χυλομικρά), εμπλουτίζονται σε ΑΡΟΕ καθώς διακινούνται στα τριχοειδή αγγεία. Στην επιφάνεια των αγγειακών ενδοθηλιακών κυττάρων υπόκεινται σε λιπόλυση από την λιποπρωτεϊνική λιπάση (lipoprotein lipase, LPL). Η LPL υδρολύει τα τριγλυκερίδια ελευθερώνοντας λιπαρά οξέα τα οποία χρησιμοποιούνται ως πηγή ενέργειας από τα κύτταρα (**Εικόνα 1.4**) (Mahley and Rall, 2000). Με αυτό τον τρόπο η ΑΡΟΕ διευθύνει το μεταβολισμό τόσο των ενδογενών τριγλυκεριδίων και χοληστερόλης (VLDL) όσο και αυτών τα οποία λαμβάνονται από την τροφή (χυλομικρά). Η ΑΡΟΕ τα μεταφέρει είτε σε μη ηπατικά κύτταρα (μέσω των VLDL και των υπολειμμάτων τους) είτε στο ήπαρ (μέσω των χυλομικρών). Στο ήπαρ τα λιπαρά οξέα μπορούν να μεταβολιστούν ή να επανεκκριθούν ως VLDL ή η χοληστερόλη να μεταβολιστεί μέσω της χολής (ενδοκρινής δράση). Επίσης, η ΑΡΟΕ μπορεί να αναδιανέμει τα λιπίδια ανάμεσα στα διαφορετικά κύτταρα ενός ιστού (παρακρινής δράση) (Mahley and Rall, 2000).



Εικόνα 1.4. Διαγραμματική απεικόνιση του μεταβολισμού της χοληστερόλης. Τα συνεχόμενα βέλη περιγράφουν το μεταβολισμό της χοληστερόλης και τα διακεκομμένα την αντίστροφη μεταφορά χοληστερόλης. Τα λιπίδια τα οποία προέρχονται από την τροφή πακετάρονται στα χυλομικρά (πλούσιες σε τριγλυκερίδια λιποπρωτεΐνες). Στη συνέχεια αυτά προσλαμβάνονται από τους περιφερικούς ιστούς μέσω της κυκλοφορίας και ακολούθως τα υπολείμματα των χυλομικρών κατευθύνονται στο ήπαρ. Εκεί «φορτώνονται» στην APOB και επανεκκρίνονται ως λιποπρωτεΐνες VLDL και στη συνέχεια μεταβολίζονται σε LDL μέσω της υδρόλυσης από τη λιποπρωτεϊνική λιπάση (lipoprotein lipase, LPL). Οι πρόδρομες λιποπρωτεΐνες HDL παράγονται είτε από το ήπαρ είτε από το λεπτό έντερο και φέρουν απολιποπρωτεΐνη A 1 (apolipoprotein A, APOA-I). Στη συνέχεια, το ένζυμο ακυλοτρανσφεράση της λεκιθίνης-χοληστερόλης (lecithin-cholesterol acyl transferase, LCAT) μετατρέπει την ελεύθερη χοληστερόλη σε εστεροποιημένη χοληστερόλη (cholesterol ester, CE). Οι πρόδρομες HDL, HDL₃ και HDL₂, εμπλουτίζονται σε χοληστερόλη κατά την αντίστροφη μεταφορά χοληστερόλης (από τα περιφερικά κύτταρα στο ήπαρ για απέκκριση) και η παρουσία της APOE αντί της APOA-1 σε αυτές επιτρέπει στις λιποπρωτεΐνες αυτές να διαστέλλονται. Οι μεγαλύτερες HDL (HDL₂ ή HDL₁), μπορούν να μεταφέρουν χοληστερόλη στο ήπαρ απευθείας μέσω του LDLR., SR-BI, υποδοχέας εκκαθαριστής τάξης B τύπου I (scavenger receptor class B type II). Προσαρμογή από Mahley R.W et al., 2006, *J Clin Invest*, 116(5):1226 -1229.

Η APOE συμμετέχει στη μεταφορά λιπιδίων μέσω δύο μονοπατιών. Το πρώτο μονοπάτι είναι το αυστηρά ρυθμιζόμενο μονοπάτι του LDLR το οποίο συναντάται στα περισσότερα κύτταρα. Η APOE έχει πιο μεγάλη συγγένεια πρόσδεσης για τον LDLR δρώντας ανταγωνιστικά προς την APOB που είναι η κύρια απολιποπρωτεΐνη των λιποπρωτεϊνών LDL. Ως εκ τούτου, η APOE ρυθμίζει τις λιποπρωτεΐνες στις οποίες είναι προσδεμένη (VLDL και χυλομικρά) αλλά και τις λιποπρωτεΐνες στις οποίες είναι

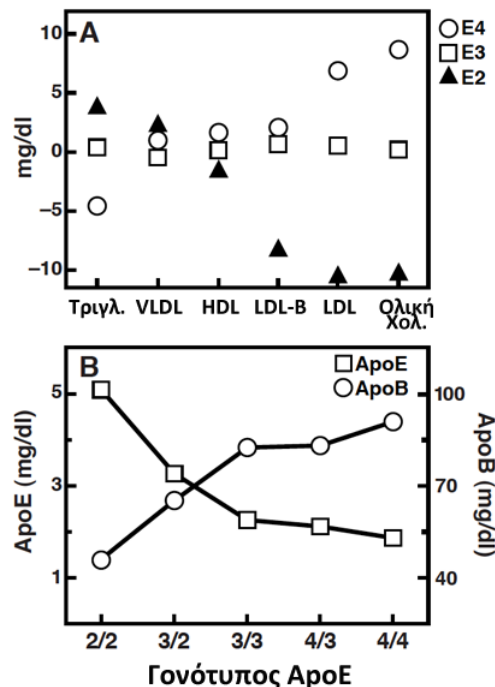
συνδεδεμένες άλλες απολιποπρωτεΐνες (LDL) (Mahley and Innerarity, 1983, Mahley and Ji, 1999).

Το δεύτερο μονοπάτι υποδοχέα, το οποίο ανακαλύφθηκε αργότερα, είναι το μονοπάτι το οποίο ρυθμίζεται από την θειική ηπαρινική πρωτεογλυκάνη 2 και την σχετιζόμενη με τον υποδοχέα LDLR πρωτεΐνη 1 (heparan sulphate proteoglycan/Low density lipoprotein receptor-related protein 1, HSPG/LRP-1). Ο LRP-1, ανήκει στην υπερικογένεια των LDLR και προσδένει μια πλειάδα μορίων συμπεριλαμβανομένης και της APOE (Beisiegel et al., 1989, Herz, 1993, Herz and Willnow, 1994). Το μονοπάτι HSPG/LRP-1 λειτουργεί κυρίως στο ήπαρ για το μεταβολισμό των καταλοίπων των λιποπρωτεϊνών (Cooper, 1997, Mahley and Ji, 1999). Οι λιποπρωτεΐνες προσδένονται μέσω της APOE στον HSPG, και λιπολύονται από τις λιπάσες της επιφάνειας. Τελικά είτε προσδένονται στον LDLR ή μεταφέρονται από τον HSPG στον LRP-1 για ενδοκυττάρωση (Mahley and Ji, 1999).

Πιο πάνω αναλύθηκε ο ρόλος της APOE ως προσδέτη στα μέλη της οικογένειας των LDLR. Η APOE, ωστόσο, επηρεάζει το μεταβολισμό των λιποπρωτεϊνών με τρόπους ανεξάρτητους του ρόλου της ως προσδέτη στους υποδοχείς αυτούς. Η παρουσία περίσσειας μορίων APOE στην επιφάνεια των λιποπρωτεϊνών μειώνει δραματικά το ρυθμό της λιπόλυσης των τριγλυκεριδίων από τις λιπάσες (Huang et al., 1999, Huang et al., 1998, Jong et al., 1996, Rensen and van Berkel, 1996). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη συσσώρευση λιποπρωτεϊνών και συνεπακόλουθα την εμφάνιση υπερλιπιδαιμίας. Επιπρόσθετα, ως συστατικό μιας υποτάξης των λιποπρωτεϊνών HDL (HDL₃), η APOE επηρεάζει την απέκκριση της χοληστερόλης από τα κύτταρα. Η αποβολή χοληστερόλης από τους περιφερειακούς ιστούς, η μεταφορά της στο πλάσμα, η πρόσληψη από το ήπαρ και η αποβολή προς τη χολή, είναι μια διαδικασία που ονομάζεται αντίστροφη μεταφορά της χοληστερόλης (reverse cholesterol transport). Μικρά σωματίδια λιποπρωτεϊνών HDL (πρόδρομη HDL και HDL₃) είναι πολύ καλοί δέκτες για την ελεύθερη κυτταρική χοληστερόλη (**Εικόνα 1.4**). Αυτά εμπλουτίζονται συνέχεια με χοληστερόλη η οποία εστεροποιείται και δημιουργούνται μεγαλύτερα σωματίδια HDL₂ και HDL₁. Η APOE προσδένεται στις λιποπρωτεΐνες HDL₁ και HDL₂ και δρα ως προσδέτης για τη μεταφορά τους στο ήπαρ με σκοπό την αποικοδόμηση και απέκκριση (Huang et al., 1994, Mahley and Innerarity, 1983).

Πληθυσμιακές μελέτες αποκάλυψαν τη διαφορετική επίδραση των τριών ισομορφών της APOE στη φυσιολογική διακύμανση των λιπιδίων του πλάσματος. Αυτές οι

μελέτες έχουν καθιερώσει ότι η APOE3 θα πρέπει να χρησιμοποιείται ως το σημείο αναφοράς για τη φυσιολογική λειτουργία της πρωτεΐνης, καθώς δεν προκαλεί μεγάλη διακύμανση των λιπιδίων του πλάσματος.



Εικόνα 1.5. Επίδραση της APOE στη φυσιολογική διακύμανση των λιπιδίων και στα επίπεδα των απολιποπρωτεϊνών στο πλάσμα. A. Η επίδραση των διαφορετικών ισομορφών της APOE στα επίπεδα των λιποπρωτεϊνών. Η APOE4 αυξάνει τα επίπεδα των λιποπρωτεϊνών LDL και της ολικής χοληστερόλης στο πλάσμα ενώ η APOE2 μειώνει τα επίπεδα των LDL-B, LDL και ολικής χοληστερόλης στο πλάσμα. Τριγλ. τριγλυκερίδια, VLDL πολύ χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες, υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες, LDL-B χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες με APOB, LDL χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες, Ολική Χολ. ολική χοληστερόλη. B. Συσχέτιση των γονότυπων της APOE με τα επίπεδα των 2 κύριων απολιποπρωτεϊνών του πλάσματος, της APOE και της APOB. Το αλληλόμορφο ApoE2 αυξάνει την συγκέντρωση APOE και μειώνει την συγκέντρωση APOB, ενώ το ApoE4 έχει αντίθετη επίδραση. Τροποποιημένο από Mahley RW et al., 2000, *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 2000, 01 :507-37.

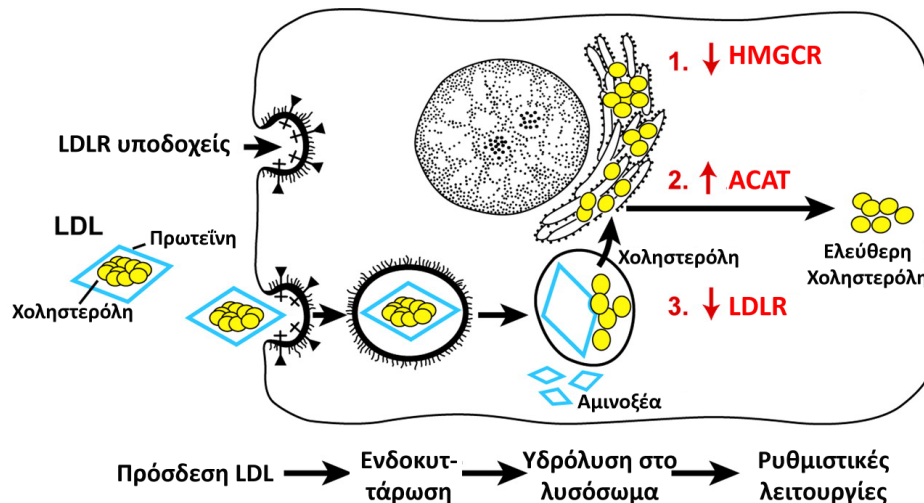
Στην **εικόνα 1.5** συνοψίζονται οι επιδράσεις των ισομορφών της APOE στα επίπεδα της ίδιας, των τριγλυκεριδίων VLDL, HDL και LDL και της ολικής χοληστερόλης του πλάσματος (Mahley and Rall, 2000). Η APOE2 τείνει να συσχετίζεται με υψηλά επίπεδα APOE και τριγλυκεριδίων και χαμηλά επίπεδα APOB και χοληστερόλης. Αντίθετα, η APOE4 τείνει να συσχετίζεται με χαμηλά επίπεδα APOE αλλά αυξημένη APOB και χοληστερόλη. Έχει υπολογιστεί ότι περίπου το 10% της συνολικής διακύμανσης των επιπέδων

χοληστερόλης στον πληθυσμό οφείλεται στις λειτουργικές διαφορές ανάμεσα στις ισομορφές της APOE (Davignon et al., 1988, Sing and Davignon, 1985).

1.3.2. Η λειτουργία του LDLR στο φυσιολογικό μεταβολισμό χοληστερόλης

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, ένα από τα κυριότερα μονοπάτια μεταβολισμού της χοληστερόλης είναι μέσω του LDLR. Ο LDLR προσδένει κατά κύριο λόγο τις λιποπρωτεΐνες LDL, οι οποίες φέρουν APOB, και τις πλούσιες σε APOE λιποπρωτεΐνες VLDL. Οι λιποπρωτεΐνες LDL φέρουν μόνο ένα μόριο APOB ενώ οι λιποπρωτεΐνες VLDL περιέχουν πολλά μόρια APOE.

Η αναγωγή του 3-υδρόξυ-3-μεθύλ-γλουταρύλ-συνένζυμου-A (3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase, HMGCR), ελέγχει το καταλυτικό βήμα για την ενδογενή σύνθεση της χοληστερόλης (μονοπάτι μεβαλονικού οξέος). Τα επίπεδα του ενζύμου αυτού είναι χαμηλά παρουσία χοληστερόλης στο πλάσμα του αίματος εξαιτίας της καταστολής της μεταγραφής του (Εικόνα 1.6). Από τις δύο κύριες τάξεις των λιποπρωτεϊνών, τις LDL και HDL, μόνο οι πρώτες μπορούν να μειώσουν τα επίπεδα του HMGCR (Goldstein and Brown, 2009).



Εικόνα 1.6. Διαδοχικά βήματα του μονοπατιού ενδοκυττάρωσης των λιποπρωτεϊνών LDL από τον LDLR. Η πρόσληψη χοληστερόλης από την περιφέρεια οδηγεί στη μείωση των επιπέδων του ενζύμου HMGCR και του LDLR και στην αύξηση των επιπέδων του ενζύμου της ακετυλοτρανσφεράσης του ακετυλο-συνένζυμου A (acetyl-Coenzyme A acetyltransferase, ACAT) με αποτέλεσμα τη μείωση τόσο της παραγωγής της ενδογενούς όσο και της πρόσληψης της εξωγενούς χοληστερόλης μέσω του LDLR. Προσαρμογή από Goldstein J.L. and Brown M.S., *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009, 29 (4): 431-438.

Η καταστολή του ενζύμου HMGCR πραγματοποιείται μέσω του μονοπατιού της πρωτεΐνης πρόσδεσης η οποία ρυθμίζεται από στερόλες (sterol regulatory element-binding protein, SREBP). Ο μεταγραφικός παράγοντας SREBP συντίθεται ως πρωτεΐνη που είναι προσδεδεμένη στη μεμβράνη του ενδοπλασματικού δικτύου. Στα κύτταρα που έχουν έλλειψη χοληστερόλης, ο SREBP μεταφέρεται στο σύμπλεγμα Golgi όπου πρωτεολύεται. Έτσι απελευθερώνεται ένα διαλυτό τμήμα το οποίο μεταναστεύει στον πυρήνα και ενεργοποιεί μεταξύ άλλων και την αναγωγή HMGCR. Όταν προσλαμβάνεται χοληστερόλη LDL από τον LDLR, η μεταφορά του SREBP στο σύμπλεγμα Golgi αναστέλλεται, εμποδίζοντας την απελευθέρωση της ενεργούς μορφής του. Κατά συνέπεια, η μεταγραφή των γονιδίων τα οποία ελέγχει ο SREBP μειώνεται, με αποτέλεσμα τη μείωση της παραγωγής της ενδογενούς χοληστερόλης (Brown et al., 1975, Brown and Goldstein, 1986, Brown and Goldstein, 1999, Gil et al., 1985). Ταυτόχρονα ο SREBP καταστέλλει και την έκφραση του LDLR, μειώνοντας με τον τρόπο αυτό την πρόσληψη της εξωγενούς χοληστερόλης (Brown and Goldstein, 1999). Το τελικό αποτέλεσμα είναι τα επίπεδα της ενδοκυττάριας χοληστερόλης να παραμένουν σταθερά παρά τις μεγάλες διακυμάνσεις της χοληστερόλης στο πλάσμα του αίματος.

1.4. ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ ΤΗΣ ΑΡΟΕ ΚΑΙ ΤΟΥ LDLR ΣΕ ΧΡΟΝΙΕΣ ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ

1.4.1. ΑΡΟΕ και καρδιαγγειακές παθήσεις

Όπως προαναφέρθηκε, οι τρεις ισομορφές της πρωτεΐνης της ΑΡΟΕ έχουν διαφορετικές λειτουργικές και δομικές ιδιότητες που οφείλονται στις δύο πολυμορφικές αμινοξικές θέσεις (112 και 158).

Η ισομορφή ΑΡΟΕ2 έχει συσχετιστεί με την υπερχοληστεριναμία τύπου III η οποία προκαλείται από υψηλά επίπεδα χοληστερόλης και τριγλυκεριδίων στο πλάσμα και συνδέεται με την εμφάνιση καρδιαγγειακής νόσου (Mahley et al., 1999). Εμφανίζεται σε ενήλικα άτομα, είναι συχνότερο στους άντρες σε σχέση με τις γυναίκες και σχεδόν σε όλες τις γυναίκες εμφανίζεται μετά την εμμηνόπαυση. Ένα κύριο κλινικό χαρακτηριστικό είναι τα ξανθώματα τα οποία είναι κιτρινωπές εναποθέσεις λιπιδίων πλούσιες σε μακροφάγα και που εμφανίζονται σε περισσότερους από τους μισούς ασθενείς. Οι ασθενείς αυτοί έχουν στο αίμα τους πολύ υψηλά επίπεδα λιποπρωτεϊνών β-VLDL που είναι εμπλουτισμένες σε χοληστερόλη και ΑΡΟΕ2. Για την εμφάνιση υπερχοληστεριναμίας

τύπου III, εκτός από την παρουσία της APOE2, είναι απαραίτητοι κι άλλοι γενετικοί και περιβαλλοντικοί παράγοντες (Mahley et al., 1999). Η έλλειψη οιστρογόνων, ο υποθυρεοειδισμός, η παχυσαρκία και ο διαβήτης έχουν ενοχοποιηθεί για την εμφάνιση της ασθένειας στους φορείς *ApoE2* (Huang, 2010, Huang et al., 1997a).

Το αλληλόμορφο *ApoE4* έχει συσχετιστεί με την αυξημένη εμφάνιση αθηροσκλήρωσης. Η παρουσία της πρωτεΐνης APOE4 οδηγεί σε υψηλά επίπεδα χοληστερόλης LDL, ολικής χοληστερόλης και τριγλυκεριδίων με συνεπαγόμενη αύξηση του κινδύνου για εμφάνιση καρδιοπαθειών. Στις ίδιες μελέτες δείχθηκε ότι οι φορείς *ApoE2* που δεν εμφανίζουν υπερχοληστεριναιμία τύπου III έχουν μειωμένες πιθανότητες εμφάνισης καρδιοπαθειών λόγω του ότι είναι υπολιπιδαιμικοί (Davignon et al., 1988, Menzel et al., 1983, Stengard et al., 1995, Utermann et al., 1984, Utermann et al., 1982). Πειράματα με καλλιέργειες ηπατοκυττάρων από διαγονιδιακά ποντίκια που φέρουν τα ανθρώπινα αλληλόμορφα *ApoE2* και *ApoE4* έδειξαν ότι η υπερέκφραση της APOE οδηγεί σε υπερτριγλυκεριδαιμία, αφενός λόγω επαγωγής της σύνθεσης των λιποπρωτεϊνών VLDL και αφετέρου λόγω της αναστολής της λιπόλυσής τους. Αντίθετα, η έκκριση των VLDL λιποπρωτεϊνών είναι μειωμένη στα ηπατοκύτταρα από γενετικά τροποποιημένα ποντίκια στα οποία το γονίδιο της *ApoE* έχει αδρανοποιηθεί με κατευθυνόμενη απενεργοποίηση (*ApoE* knock-out, *ApoE*^{-/-}) (Huang et al., 1997b).

Γενικά η APOE προστατεύει από την αθηροσκλήρωση αλλά αυτή η προστατευτική δράση της APOE εξαρτάται από τα επίπεδα της πρωτεΐνης στο πλάσμα και από την ισομορφή της APOE. Τα *ApoE*^{-/-} ποντίκια, τα οποία δεν έχουν καθόλου παραγωγή πρωτεΐνης APOE, έχουν πολύ υψηλά επίπεδα λιπιδίων και χοληστερόλης β-VLDL στο πλάσμα (όπως οι ασθενείς με τύπου III υπερχοληστεριναιμία). Τα ποντίκια αυτά έχουν αθηροσκλήρωση ακόμα και με φυσιολογική διαίτα (Nakashima et al., 1994, Reddick et al., 1994).

Είναι ξεκάθαρο ότι η απουσία της APOE οδηγεί σε αυξημένη πιθανότητα ανάπτυξης καρδιαγγειακών προβλημάτων και αθηροσκλήρωσης. Από την άλλη, το ίδιο αποτέλεσμα έχουν και τα υψηλά επίπεδα της APOE στο πλάσμα. Η συσχέτιση των υψηλών επιπέδων APOE με την αναστολή της λιπόλυσης καθώς και την αύξηση της παραγωγής VLDL υποδηλώνει μια αυξημένη πιθανότητα εμφάνισης αθηρωματικών πλακών. Οι πλούσιες σε τριγλυκερίδια λιποπρωτεΐνες VLDL συμβάλλουν στο σχηματισμό αθηρωματικών πλακών.

Από τα παραπάνω διαφαίνεται ότι υπάρχει μία βέλτιστη συγκέντρωση της APOE στο πλάσμα η οποία είναι ευεργετική ως προς την πρόληψη της αθηροσκλήρωσης.

Η αθηροσκλήρωση προκαλείται από τη μη αποτελεσματική απομάκρυνση των υπολειμμάτων χοληστερόλης και της χοληστερόλης LDL από τα μακροφάγα (Brown and Goldstein, 1983). Συγκεκριμένα, η υπερβολική πρόσληψη χοληστερόλης από τα μακροφάγα του αρτηριακού τοιχώματος δημιουργεί κύτταρα που αποκαλούνται «αφρώδη» καθώς είναι γεμάτα με χοληστερόλη και το κυτταρόπλασμα τους έχει αφρώδη όψη λόγω των σταγονιδίων από εστέρες της χοληστερόλης. Ένας μηχανισμός που προτείνεται για την ερμηνεία της δημιουργίας των «αφρωδών» κυττάρων είναι η ανισορροπία μεταξύ της πρόσληψης λιποπρωτεϊνών και της αποβολής χοληστερόλης από τα μακροφάγα. Η HDL μπορεί να δράσει ως δέκτης της χοληστερόλης κατά την αποβολή της από τα μακροφάγα (**Εικόνα 1.4**), γεγονός που εξηγεί εν μέρει τις αντι-αθηρογενετικές της ιδιότητες. Ο ευεργετικός ρόλος της προερχόμενης από τα μακροφάγα APOE έχει αποδειχτεί με μελέτες σε ποντίκια που εκφράζουν την APOE μόνο στα μακροφάγα και είναι προστατευμένα έναντι της αθηροσκλήρωσης, ακόμα και εάν τα επίπεδα της APOE στο πλάσμα είναι πολύ χαμηλά και τα ποντίκια είναι υπερχοληστεριναιμικά (Bellosta et al., 1995a). Επίσης, ποντίκια που εκφράζουν APOE φυσιολογικά σε όλους τους ιστούς εκτός από τα μακροφάγα είναι πιο επιρρεπή στην ανάπτυξη αθηροσκλήρωσης (Fazio et al., 1997). Αυτές και άλλες παρόμοιες μελέτες εισηγούνται ότι, εκτός από τα επίπεδα της APOE και την ισομορφή της, πολύ μεγάλο ρόλο παίζει και η κυτταρική της προέλευση.

1.4.2. LDLR και οικογενής υπερχοληστεριναιμία

Η οικογενής υπερχοληστεριναιμία (familial hypercholesterolemia) είναι μια κληρονομική ασθένεια η οποία χαρακτηρίζεται από υψηλά επίπεδα λιποπρωτεϊνών LDL στο πλάσμα των ασθενών. Η ασθένεια κληρονομείται με επικρατή τρόπο και είναι δοσοεξαρτώμενη. Οι ετεροζυγώτες έχουν δύο φορές περισσότερη χοληστερόλη LDL στο πλάσμα τους σε σχέση με τα φυσιολογικά επίπεδα και η συχνότητα στο γενικό πληθυσμό είναι 1 ανά 500. Οι ομοζυγώτες έχουν 6-10 φορές περισσότερη χοληστερόλη LDL από τα φυσιολογικά επίπεδα και είναι περίπου 1 ανά 10⁶ στο γενικό πληθυσμό (Goldstein and Brown, 2009).

Η υψηλή συγκέντρωση χοληστερόλη LDL στο πλάσμα έχει ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη ξανθωμάτων και την πρόωρη εμφάνιση καρδιοπαθειών. Οι ετερόζυγοι ασθενείς

έχουν τα πρώτα τους καρδιακά επεισόδια στην ηλικία των 30 ετών ενώ για τους ομόζυγους αυτά εμφανίζονται από την παιδική ηλικία. Οι Goldstein και Brown κέρδισαν το βραβείο Νόμπελ Φυσιολογίας και Ιατρικής το 1985 για την ανακάλυψή τους ότι η οικογενής υπερχοληστεριναίμια προκαλείται από μειωμένη ενδοκυττάρωση των λιποπρωτεϊνών LDL η οποία προέρχεται από μεταλλαγές στον LDLR. Έχουν ανιχνευθεί πάνω από 1100 μεταλλαγές στον LDLR οι οποίες κατανέμονται σε όλο το μήκος του γονιδίου αλλά και στον υποκινητή επηρεάζοντας έτσι τη μεταγραφή του γονιδίου (Heath et al., 2001, Stenson et al., 2003).

Οι ασθενείς με οικογενή υπερχοληστεριναίμια έχουν 50-100 φορές πιο υψηλή ενεργότητα του ενζύμου HMGCR. Σε αυτούς δεν υπάρχει καταστολή του ενζύμου παρουσία των λιποπρωτεϊνών LDL. Η θεραπεία που ακολουθείται περιλαμβάνει στατίνες οι οποίες καταστέλλουν την αναγωγή HMGCR, μειώνουν την παραγωγή της ενδογενούς χοληστερόλης και αυξάνουν τα επίπεδα του LDLR (**Εικόνα 1.6**) (Vuorio and Kovanen, 2011). Η έκβαση της ασθένειας επηρεάζεται και από περιβαλλοντικούς παράγοντες, καθώς δύο ασθενείς με την ίδια μεταλλαγή στον LDLR δεν έχουν ποτέ την ίδια απόκριση στις στατίνες.

1.5. Η APOE ΚΑΙ Ο LDLR ΣΤΟ ΝΕΥΡΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ

Η APOE συντίθεται σε πολύ μεγάλες ποσότητες στον εγκέφαλο από τα κύτταρα της γλοίας, κυρίως τα αστροκύτταρα και σε μικρότερο βαθμό από τη μικρογλοία (Mahley, 1988). Υπό φυσιολογικές συνθήκες οι νευρώνες, μέσω του LDLR, δεσμεύουν λιπιδιωμένη APOE η οποία εκκρίνεται από τα κύτταρα της γλοίας (Boyles et al., 1989, Herz and Beffert, 2000, Pitas et al., 1987a, Pitas et al., 1987b).

1.5.1. Η APOE στο περιφερικό νευρικό σύστημα

Στο περιφερικό νευρικό σύστημα (ΠΝΣ) η APOE παράγεται κυρίως από τα μη μυελινοποιητικά κύτταρα της γλοίας η οποία περιβάλλει τους αισθητικούς και τους κινητικούς νευρώνες (Mahley, 1988). Ένα από τα πιο σημαντικά ευρήματα που συνέδεσαν την APOE με το ΠΝΣ ήταν η παρατήρηση ότι στο τραυματισμένο ισχιακό νεύρο του αρουραίου τα επίπεδα της APOE αυξάνονται κατά 100-200 φορές (Boyles et al., 1989, Ignatius et al., 1986, Ignatius et al., 1987). Η APOE επανέρχεται στα φυσιολογικά επίπεδα μετά από οκτώ εβδομάδες, όταν η ανάπλαση του νεύρου έχει σχεδόν ολοκληρωθεί. Τα

μακροφάγα του ιστού (resident macrophages) καθώς και μακροφάγα που διεισδύουν από την κυκλοφορία (infiltrating macrophages) εκκρίνουν μεγάλες ποσότητες ΑΡΟΕ. Αυτή συσσωρεύεται στο εξωκυττάριο στρώμα μεταξύ του εκφυλιζόμενου εναπομείναντος άκρου και του αναγεννώμενου νεύρου (Mahley, 1988).

Μελέτες σε ΑροΕ-/- ποντίκια τα οποία είχαν υποστεί τραυματισμό του τουματισμού νεύρου εισηγήθηκαν ότι η φυσιολογική ανάπλαση του νεύρου μπορεί να επιτευχθεί απουσία της ΑΡΟΕ (Poroko et al., 1993). Παρόλα αυτά, προσεκτική παρατήρηση της υπερδομής των νευρώνων έδειξε μειωμένο αριθμό αξόνων και ατέλειες στη μορφολογία τους (Fullerton et al., 1998). Πιθανότατα άλλες απολιποπρωτεΐνες που βρίσκονται σε μεγάλες ποσότητες στην περιφέρεια όπως οι Απολιποπρωτεΐνες Α 1 και Α 2 (Apolipoprotein A 1, Apolipoprotein A 2, ΑΡΟΑ-I, ΑΡΟΑ-II) μπορούν να αντικαταστήσουν μερικώς την αναπλαστική δραστηριότητα της ΑΡΟΕ.

Επιπρόσθετα, η ΑΡΟΕ έχει, ανάλογα με την ισομορφή, διαφορετική επίδραση στην έκφυση νευριτών σε καλλιέργειες κυττάρων του γαγγλίου της ραχιαίας ρίζας κουνελιού (dorsal root ganglion) καθώς και κυττάρων Neuro-2a (Nathan et al., 1994).

1.5.2. Η ΑΡΟΕ στο κεντρικό νευρικό σύστημα

Η ΑΡΟΕ είναι η κύρια απολιποπρωτεΐνη στο κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ) καθώς οι λιποπρωτεΐνες LDL και η ΑΡΟΒ απουσιάζουν (Huang et al., 2004b, Mahley, 1988, Mahley and Huang, 1999, Mahley and Rall, 2000, Weisgraber, 1994) και βρίσκεται πάνω σε μικρά σωματίδια HDL ή σε δίσκους φωσφολιπιδίων (Pitas et al., 1987b). Οι λιποπρωτεΐνες οι οποίες φέρουν ΑΡΟΕ, μεταφέρουν λιπίδια στις περιοχές που υπέστησαν βλάβη για την επιδιόρθωση των νευρώνων.

Όπως έχει αναφερθεί, ο κύριος κυτταρικός τύπος που παράγει ΑΡΟΕ στο ΚΝΣ είναι τα αστροκύτταρα (Boyles et al., 1985, Pitas et al., 1987a). Παρόλα αυτά κάτω από παθολογικές, κυρίως, αλλά και φυσιολογικές συνθήκες και οι νευρώνες του ΚΝΣ εκφράζουν ΑΡΟΕ (Bao et al., 1996, Beffert and Poirier, 1996, Diedrich et al., 1991, Han et al., 1994, Harris et al., 2004, Metzger et al., 1996, Xu et al., 1999a, Xu et al., 1998, Xu et al., 1999b, Xu et al., 1996). Αγγελιαφόρο mRNA της ΑροΕ έχει ανιχνευθεί σε νευρώνες του φλοιού και του υπόκαμπτου στους ανθρώπους (Xu et al., 1999a) και σε γενετικά τροποποιημένα ποντίκια στα οποία το ενδογενές γονίδιο της *ΑροΕ* έχει αντικατασταθεί από τα ανθρώπινα

αλληλόμορφα του γονιδίου (Apolipoprotein E targeted replacement, ApoE-TR) (Xu et al., 1996).

Σε αντίθεση με τα παραπάνω, σε μια εργασία όπου τα ποντίκια εκφράζουν την πρωτεΐνη GFP καταρροϊκά του υποκινητή της APOE, δείχθηκε με ανοσοϊστοχημεία και με *in situ* υβριδοποίηση ότι οι νευρώνες δεν παράγουν APOE φυσιολογικά (Xu et al., 2006). Οι νευρώνες παράγουν APOE μόνο μετά από επαγωγή διεγερσιμοτοξικότητας (excitotoxicity) με καϊνικό οξύ. Στο ίδιο μοντέλο έχει δειχθεί ότι ένα ποσοστό αστροκυττάρων της τάξης του 10% δεν εκφράζει APOE (Xu et al., 2006).

Η APOE, επίσης, εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα σε εγκεφάλους ασθενών μετά από εγκεφαλικό επεισόδιο (Aoki et al., 2003a, Aoki et al., 2003b). Μία υπόθεση είναι ότι η έκφραση της APOE επάγεται για την προστασία των νευρώνων ή για να επιδιορθώσει τραυματισμένους νευρώνες (Huang et al., 2004b, Mahley, 1988, Mahley and Huang, 1999, Mahley and Rall, 2000, Weisgraber, 1994). Απ' ό,τι έχει δειχθεί με τις έως τώρα μελέτες, η APOE4 είναι λιγότερο ικανή σε σχέση με τις APOE2 και APOE3 σε αυτές τις διαδικασίες. Επιπλέον γίνεται παθολογική λόγω ενδονευρωνικής πρωτεόλυσης την οποία υφίσταται από μια ειδική για τους νευρώνες πρωτεάση.

Σε πειράματα τα οποία έγιναν σε καλλιέργειες νευρικών κυττάρων οι ισομορφές της APOE έχουν διαφορετική επίδραση στην έκφυση νευριτών (Bellosta et al., 1995b, DeMattos et al., 1998, Holtzman et al., 1995, Nathan et al., 1994, Sun et al., 1998). Παρουσία λιπιδίων η APOE3 αλλά όχι η APOE4 προκαλεί την έκφυσή τους *in vitro*. Έκφραση της APOE3 από αστροκύτταρα προκαλεί επίσης έκφυση νευριτών σε πρωτογενείς καλλιέργειες νευρώνων από ιππόκαμπο αρουραίου σε αντίθεση με την αστροκυτταρική APOE4 η οποία την αναστέλλει (Sun et al., 1998). Η αναστολή της έκφυσης νευριτών από την APOE4 φαίνεται να σχετίζεται με αλλαγές στον κυτταροσκελετό και επίδραση κυρίως στη σταθερότητα των μικροσωληνίσκων (Nathan et al., 1995). Η APOE3 προσδένεται στην πρωτεΐνη Tau *in vitro* προστατεύοντάς την από την υπερφωσφορυλίωση η οποία αναστέλλει την ικανότητα της Tau να σταθεροποιεί τους μικροσωληνίσκους. Αντίθετα, η APOE4 δεν προσδένεται στην Tau με αποτέλεσμα αυτή να είναι πιο επιρρεπής στην υπερφωσφορυλίωση και να δημιουργούνται ενδοκυττάριας εναποθέσεις της (νευροϊνιδιακά δεμάτια, neurofibrillary tangles) (Lovestone et al., 1996, Strittmatter et al., 1994, Tesseur et al., 2000).

1.5.3. Ο ρόλος του LDLR στο ΚΝΣ

Ο LDLR είναι ο κύριος υποδοχέας για το μεταβολισμό της χοληστερόλης στον εγκέφαλο. Τα γενετικά τροποποιημένα ποντίκια στα οποία έχει μεταλλαχθεί το γονίδιο του *Ldlr* και δεν εκφράζεται η πρωτεΐνη LDLR (*Ldlr* knock-out, *Ldlr*^{-/-}) έχουν αύξηση 150% στα επίπεδα της APOE στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό (ENY). Επιπρόσθετα, η έλλειψη του LDLR στον υπόκαμπο του ποντικού έχει ως αποτέλεσμα μειωμένο κυτταρικό πολλαπλασιασμό και προσυναπτική πυκνότητα (Mulder et al., 2007). Επιπλέον, πειράματα συμπεριφοράς στα ποντίκια *Ldlr*^{-/-} έδειξαν μειωμένη χωροταξική μνήμη (Mulder et al., 2004).

Η απόδειξη για το σημαντικό ρόλο του LDLR στο ΚΝΣ δόθηκε από την εξέταση ποντικών *Ldlr*^{-/-} τα οποία διασταυρώθηκαν με ποντίκια που εκφράζουν τις ανθρώπινες ισομορφές της APOE (ApoE targeted replacement, ApoE-TR). Τα ποντίκια ApoE3-TR και τα ApoE4-TR με αδρανοποιημένο τον LDLR (*Ldlr*^{-/-}) είχαν αύξηση 210% και 380% αντίστοιχα στα επίπεδα της APOE στο ENY. Στα ποντίκια ApoE2-TR ο LDLR δεν είχε καμία επίδραση λόγω της μειωμένης συγγένειας πρόσδεσης της APOE2 στον υποδοχέα (Fryer et al., 2005a). Στη μελέτη αυτή δείχθηκε επίσης ότι κύτταρα στα οποία απουσίαζε ο LDLR δεν μπορούσαν να ενδοκυτταρώσουν την αστροκυτταρική APOE *in vitro*. Αντίθετα, κύτταρα τα οποία υπερέκφραζαν τον LDLR είχαν αυξημένη ενδοκυττάρωση και αποικοδόμηση της APOE. Τα παραπάνω ευρήματα επιβεβαιώνουν ότι ο LDLR είναι ο κύριος υποδοχέας για τη APOE στο ΚΝΣΕ

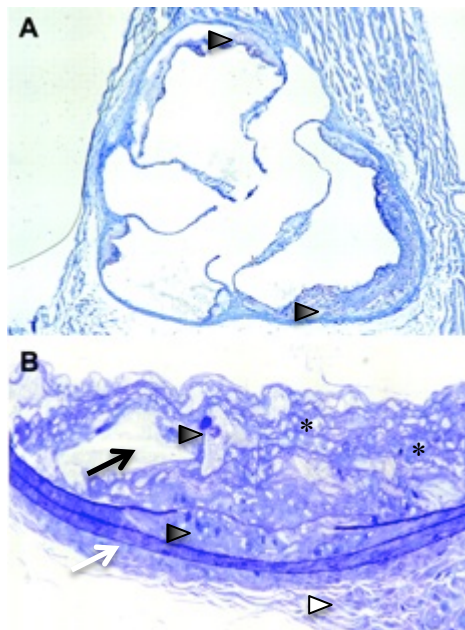
1.6. ΓΕΝΕΤΙΚΑ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΑ ΜΟΝΤΕΛΑ ΓΙΑ ΤΗΝ APOE ΚΑΙ ΤΟΝ LDLR

Τα γενετικά τροποποιημένα μοντέλα ποντικών στα οποία έχουν αδρανοποιηθεί με μεταλλαξιγένεση το γονίδιο της *ApoE* ή του *Ldlr*, είναι τα κύρια μοντέλα μελέτης της αθηροσκλήρωσης. Έχουν γίνει εκτεταμένες μελέτες και στα δύο κυρίως ως προς την απόκρισή τους σε στατίνες και διαίτα υψηλή σε λιπαρά.

1.6.1. Το μοντέλο ποντικού ApoE knock-out (ApoE^{-/-})

Το γενετικά τροποποιημένο μοντέλο ποντικού ApoE^{-/-} στο οποίο έχει αδρανοποιηθεί το γονίδιο της *ApoE* (Piedrahita et al., 1992) είναι το κυριότερο μοντέλο μελέτης της αθηροσκλήρωσης. Τα ποντίκια αυτά είναι υπερχοληστεριναιμικά και τα επίπεδα της χοληστερόλης στο αίμα τους είναι 600mg/dl ενώ τα φυσιολογικά επίπεδα για

τα ποντίκια είναι 100mg/dl (Maeda, 2011). Στο πλάσμα των ποντικών αυτών βρίσκονται κυρίως λιποπρωτεΐνες VLDL αντί για HDL που είναι το φυσιολογικό για το είδος τους. Επίσης, τα τριγλυκερίδια στην κυκλοφορία τους είναι δύο φορές περισσότερα από το κανονικό ακόμα και με φυσιολογική διαίτα και αναπτύσσονται αυθόρμητα αθηρωματικές πλάκες στις αρτηρίες τους, μετά την ηλικία των 3 μηνών (**Εικόνα 1.7**) (Guo et al., 2005, Hartley et al., 2000, Ma et al., 2008, Moghadasian et al., 2001, Qin et al., 2006, Stevens et al., 2008, Walker et al., 1997, Wang et al., 2000).



Εικόνα 1.7. Αθηρωματικές πλάκες σε ένα ApoE^{-/-}ποντίκι με φυσιολογική διαίτα. Α. Χρώση με Sudan IVB και αιματοξυλίνη σε τομή από την αορτική ρίζα ενός αρσενικού ποντικού ApoE^{-/-} ηλικίας 9 μηνών. Στην εικόνα δείχνονται αθηρωματικές πλάκες (αιχμές βέλους) επάνω στη βαλβίδα και κοντά στο τοίχωμα της αρτηρίας. Β. Χρώση με μπλε του Τολουιδινίου σε τομή από καρωτίδα του ίδιου ζώου. Στην εικόνα δείχνεται μια αθηρωματική πλάκα με αφρώδη κύτταρα (μακροφάγα, μαύρες αιχμές βέλους), χοληστερόλη (μαύρο βέλος) και ινώδεις πρωτεϊνικούς σχηματισμούς (αστερίσκοι). Υπάρχει αποδιοργάνωση της εσωτερικής ελαστικής μεμβράνης (άσπρο βέλος) και τα μυϊκά κύτταρα περιέχουν σταγονίδια χοληστερόλης (άσπρη αιχμή βέλους). Από Maeda N., *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011, 31:1957-1962.

Περίπου το 35% από τα ποντίκια ApoE^{-/-} πεθαίνουν πριν την ηλικία των 18 μηνών (Moghadasian et al., 2001). Το καρδιαγγειακό τους σύστημα παρουσιάζει πολλές ανωμαλίες τόσο στη μορφολογία των αγγείων όσο και στην ταχύτητα ροής του αίματος. Η καρδιά τους είναι υπερτροφική (59% μεγαλύτερη) και έχει αυξημένο βάρος (23% περισσότερο) σε σχέση με τα ποντίκια φυσικού τύπου (Hartley et al., 2000). Στους μύες

τους υπάρχει μειωμένη αγγειοδιαστολή, και μειωμένη αντίδρασή τους σε ακετυλοχολίνη (Guo et al., 2005, Wang et al., 2000). Το μήκος του σώματος και το βάρος τους είναι μειωμένα σε σχέση με τα φυσικού τύπου ποντίκια (Hartley et al., 2000, Massaro and Massaro, 2008, Wang et al., 2000) και έχουν σκελετικές ανωμαλίες (Schilling et al., 2005). Υπάρχουν, επίσης, ανωμαλίες και στο αιμοποιητικό σύστημα των ApoE^{-/-} ποντικών. Ο αιματοκρίτης είναι μειωμένος (Hartley et al., 2000) και ο σπλήνας βαρύτερος (Laskowitz et al., 2000). Στο ανοσοποιητικό σύστημα υπάρχει αυξημένος αριθμός T-λεμφοκυττάρων που εκκρίνουν κυτοκίνες, αυξημένος αριθμός CD4-θετικών T-λεμφοκυττάρων και αυξημένη αναλογία T-βοηθητικών κυττάρων τύπου 2 (T-helper 2, Th2) προς T-βοηθητικά κύτταρα τύπου 1 (T-helper 1, Th1) (Laskowitz et al., 2000). Επίσης, υπάρχει αύξηση ενεργοποιημένων B-λεμφοκυττάρων στο σπλήνα που έχουν αυξημένη έκφραση MHC-II, Fas και CD86 και μειωμένη έκφραση CD21, CD22 και CD23 (Ma et al., 2008).

Ο αιματοεγκεφαλικός φραγμός είναι διαταραγμένος, με αποτέλεσμα να εντοπίζονται στον εγκέφαλο πρωτεΐνες του ορού (Fullerton et al., 2001). Τα ApoE^{-/-} ποντίκια παρουσιάζουν νευρολογικές διαταραχές και διαταραχές της μνήμης και της μάθησης. Στον υδάτινο λαβύρινθο του Μόρις - ένα πείραμα χωροταξικής μνήμης - τα ποντίκια αυτά μαθαίνουν να βρίσκουν την πλατφόρμα πιο αργά από τα φυσικού τύπου ποντίκια και περνάνε λιγότερο χρόνο αναζητώντας την στο τεταρτημόριο-στόχο (Champagne et al., 2002). Επιπλέον τα ποντίκια αυτά έχουν προβλήματα ακοής με ανώμαλη μορφολογία του κοχλίου, εκφυλισμό του οργάνου του Corti ή και απώλεια της ακοής ακόμα και σε φυσιολογική δίαιτα (Guo et al., 2005).

(Πηγή: The Jackson Laboratory, Η έχο<http://jaxmice.org/strain/002052.html#pheno>, Σεπτέμβριος 2011).

1.6.2. Το μοντέλο ποντικού Ldlr knock-out (Ldlr^{-/-})

Το μοντέλο του ποντικού Ldlr^{-/-} στο οποίο αδρανοποιήθηκε το γονίδιο του Ldlr κατασκευάστηκε μετά από το μοντέλο ApoE^{-/-}. Ποντίκια στα οποία έχει αδρανοποιηθεί το γονίδιο είναι βιώσιμα αλλά υπερχοληστεριναιμικά (Ishibashi et al., 1993). Η συγκέντρωση της χοληστερόλης στο πλάσμα τους είναι 200-400mg/dl σε φυσιολογική δίαιτα (Ishibashi et al., 1993, Jones et al., 2003) αλλά με αθηρογενετική δίαιτα (δίαιτα υψηλή σε λιπαρά) μπορεί να ξεπεράσει τα 2000mg/dl (Mehta et al., 2007, Thirumangalakudi et al., 2008). Τα ποντίκια αναπτύσσουν αθηροσκλήρωση μόνο με υψηλή σε λιπαρά και όχι με φυσιολογική

δίαιτα (Nakaya et al., 2009, Shimada et al., 1996). Οι αθηρωματικές πλάκες που αναπτύσσονται είναι πλούσιες σε μακροφάγα και αφρώδη κύτταρα (Mehta et al., 2007). Η αύξηση στα τριγλυκερίδια και στη χοληστερόλη είναι εμφανής ήδη από την ηλικία των τριών μηνών (Hasty et al., 2001). Στο πλάσμα των ποντικών αυτών σε φυσιολογική δίαιτα η χοληστερόλη ισοκατανέμεται σε λιποπρωτεΐνες HDL και LDL σε αντίθεση με ό,τι συμβαίνει στα φυσικού τύπου ποντίκια που έχουν κυρίως HDL και τα ApoE^{-/-} που έχουν κυρίως LDL (Furbee et al., 2002). Οι λιποπρωτεΐνες LDL, απουσία της πρωτεΐνης του LDLR, δεν μπορούν να ενδοκυτταρωθούν και έτσι παραμένουν στη κυκλοφορία. Εκεί, επίσης σημειώνεται και αύξηση της απολιποπρωτεΐνης Β (apolipoprotein B, APOB) (Furbee et al., 2002).

Τα ποντίκια Ldlr^{-/-} έχουν κι άλλα προβλήματα μεταβολισμού και ομοιόστασης. Υπάρχει μειωμένη συγκέντρωση φαιτυλαλανίνης, βαλίνης, ισολευκίνης και λευκίνης στη κυκλοφορία (Bhasin et al., 2009). Ακόμη σημειώνεται αυξημένη συγκέντρωση ινσουλίνης και γλυκόζης και μειωμένα επίπεδα κορτικοστερόνης στο αίμα (Bernal-Mizrachi et al., 2003). Με δίαιτα χαμηλή σε χοληστερόλη τα ποντίκια αυτά έχουν μικρότερο βάρος από τα φυσικού τύπου ποντίκια αλλά με δίαιτα υψηλή σε λιπαρά για 12 εβδομάδες, το βάρος τους αυξάνεται (Bernal-Mizrachi et al., 2003, MacDonald et al., 2008). Η υψηλή σε λιπαρά δίαιτα οδηγεί επίσης σε αύξηση στα επίπεδα των προφλεγμονωδών κυτοκινών ιντερλευκίνη-1β, ιντερλευκίνη-6 καθώς και του παράγοντα TNF-α και σε μείωση της αντιφλεγμονώδους κυτοκίνης ιντερλευκίνης-10 (Mehta et al., 2007, Thirumangalakudi et al., 2008).

Στο ΚΝΣ υπάρχουν αλλοιώσεις στη μορφολογία του ιππόκαμπου (Mulder et al., 2007) και αύξηση του αριθμού των ενεργοποιημένων αστροκυττάρων και της μικρογλοίας μετά από υψηλή σε λιπαρά δίαιτα (Thirumangalakudi et al., 2008). Τα ποντίκια Ldlr^{-/-} παρουσιάζουν, επίσης, συναπτικές ανωμαλίες (Igbavboa et al., 1997, Mulder et al., 2007), μείωση του αριθμού των συναπτικών κυστιδίων και δυσκολίες στη μνήμη και στη μάθηση (πειράματα συμπεριφοράς με το λαβύρινθο του Μόρις) (Mulder et al., 2004). Τα ποντίκια αυτά είναι υπερκινητικά και έχουν αυξημένη δύναμη λαβής (Elder et al., 2008).

(Πηγή: The Jackson Laboratory, ΗΠΑ, <http://jaxmice.jax.org/strain/002207.html>, Σεπτέμβριος 2011).

1.7. Η ΝΟΣΟΣ ΤΟΥ ALZHEIMER

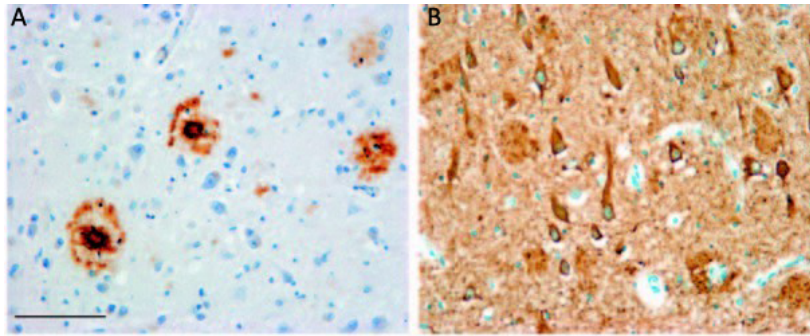
Η νόσος του Alzheimer (AD) είναι μια προοδευτική νευροεκφυλιστική πάθηση που επηρεάζει τις ανώτερες λειτουργίες του εγκεφάλου και αποτελεί την κύρια αιτία της γεροντικής άνοιας (Lobo et al., 2000, Selkoe, 1991, 2001).

Η συχνότητα της ασθένειας στον ανθρώπινο πληθυσμό υπολογίζεται περίπου σε 5-7% σε άτομα ηλικίας άνω των 65 ετών και σε πάνω από 22% σε ηλικίες μεγαλύτερες των 90 ετών (Lobo et al., 2000). Έχει εκτιμηθεί ότι 35,6 εκατομμύρια άνθρωποι έπασχαν από Alzheimer το 2010 και αυτός ο αριθμός αναμένεται να διπλασιαστεί μέχρι το 2030 (στοιχεία από Alzheimer's International Consortium (2010), AD International, World Alzheimer Report). Υπολογίζεται, όμως, ότι ο αριθμός των νοσούντων είναι μεγαλύτερος λόγω του ότι πολλά άτομα που πάσχουν από άνοια δεν έχουν ποτέ διαγνωστεί κλινικά. Η νόσος του Alzheimer συνοδεύεται από προοδευτική απώλεια μνήμης, δυσκολίες στην ομιλία και τον προσανατολισμό και δυσλειτουργία στα αισθητικό-κινητικά συστήματα. Τέτοιες συμπεριφορικές αλλαγές έχουν σοβαρές κοινωνικές και οικονομικές επιπτώσεις (Frisoni et al., 1999, Mega et al., 1996).

Τα κύρια ιστοπαθολογικά ευρήματα της νόσου είναι η απώλεια νευρώνων κυρίως στον υπόκαμπο, τον ενδορρινικό φλοιό, τον υπομέλανα τόπο και το βασικό πυρήνα του Meyenert. Απώλεια των χολινεργικών νευρώνων του βασικού πυρήνα του Meyenert επηρεάζει τη χολινεργική νέρωση του υπόκαμπου και του φλοιού. Επίσης παρατηρούνται βλάβες στις συνάψεις καθώς και σχηματισμός εξωκυττάρων αμυλοειδών πλακών (amyloid plaques) και ενδοκυττάρων νευροϊνιδιακών δεματίων (Blennow et al., 2006, Braak and Braak, 1991).

Ως αμυλοειδείς πλάκες ορίζονται οι σφαιρικές εξωκυττάρειες εναποθέσεις οι οποίες αποτελούνται κυρίως από το πεπτίδιο β-αμυλοειδές (Aβ) και παρατηρούνται στους εγκεφάλους όλων των ασθενών με τη νόσο του Alzheimer (**Εικόνα 1.8**) (Haass and Selkoe, 2007).

Ως νευροϊνιδιακά δεμάτια ορίζονται τα ενδονευρωνικά συσσωματώματα ινιδίων που αποτελούνται κατά κύριο λόγο από υπερφωσφορυλιωμένη πρωτεΐνη Ταυ η οποία παρατηρείται σε διάφορες νευροεκφυλιστικές ασθένειες συμπεριλαμβανομένης και της AD (**Εικόνα 1.8**) (Haass and Selkoe, 2007).



Εικόνα 1.8. Τα κύρια ιστοπαθολογικά ευρήματα της AD. Αυτά είναι οι εξωκυττάρια αμυλοειδείς πλάκες (A) και τα ενδοκυττάρια νευροϊνιδιακά δεμάτια (B). Οι εικόνες προέρχονται από ανοσοϊστοχημεία σε εγκεφάλους ασθενών με τη νόσο του Alzheimer. Χρησιμοποιήθηκαν αντισώματα για το πεπτιδίο Aβ (A) και την πρωτεΐνη Tau (B). Τα δύο αυτά χαρακτηριστικά ανευρίσκονται στους εγκεφάλους των ασθενών μετά θάνατον (post-mortem). Από Haass C. and Selkoe D.J., 2007, *Nature Rev. Molec. Cell Biol.*, 8: 101-112.

1.7.1. Γενετική της νόσου του Alzheimer

Υπάρχουν δύο μορφές της νόσου του Alzheimer, η οικογενής και η σποραδική (Selkoe, 2001). Για την οικογενή μορφή της νόσου έχουν ενοχοποιηθεί μεταλλαγές σε τρία γονίδια, της πρόδρομης πρωτεΐνης του αμυλοειδούς (amyloid precursor protein, APP), της πρεσινιλίνης 1 (presenilin 1, PSEN1) και της πρεσινιλίνης 2 (presenilin 2, PSEN2). Η ασθένεια εμφανίζεται πριν από την ηλικία των 45 ετών και κληρονομείται κατά κύριο λόγο με επικρατή τρόπο (Bettens et al., 2010).

Στη σποραδική της μορφή η ασθένεια εμφανίζεται μετά την ηλικία των 65 ετών και ο κυριότερος παράγοντας που την προκαλεί είναι το αλληλόμορφο ApoE4 του γονιδίου της ApoE το οποίο επηρεάζει την έναρξη αλλά και τη συχνότητα της ασθένειας (Coon et al., 2007). Κατοχή ενός αλληλομόρφου της ApoE4 αυξάνει κατά τέσσερις φορές την πιθανότητα εμφάνισης της νόσου. Όταν και τα δύο αλληλόμορφα είναι ApoE4, τότε η πιθανότητα εμφάνισης της νόσου αυξάνεται μέχρι και δώδεκα φορές (Corder et al., 1993, Roses, 1996). Η συσχέτιση της ApoE4 με τη νόσο του Alzheimer έχει επιβεβαιωθεί με πολλές επιδημιολογικές μελέτες ακόμα και σε πληθυσμούς όπου η ApoE4 είναι υποεκπροσωπούμενη (Corder et al., 1993, Farrer et al., 1997, Gomez-Isla et al., 1996, Kalaria et al., 2008, Mayeux, 2003, Saunders et al., 1993, Strittmatter et al., 1993a, Tang et al., 1998). Παρ' όλα αυτά, το αλληλόμορφο ApoE4 δεν ευθύνεται για όλες τις περιπτώσεις εμφάνισης της σποραδικής μορφής της νόσου, υποδηλώνοντας ότι πρόκειται για μια

πολυπαραγοντική ασθένεια που επηρεάζεται από πολλαπλές γενετικές και περιβαλλοντικές επιδράσεις (Daw et al., 2000, Slioter et al., 1998).

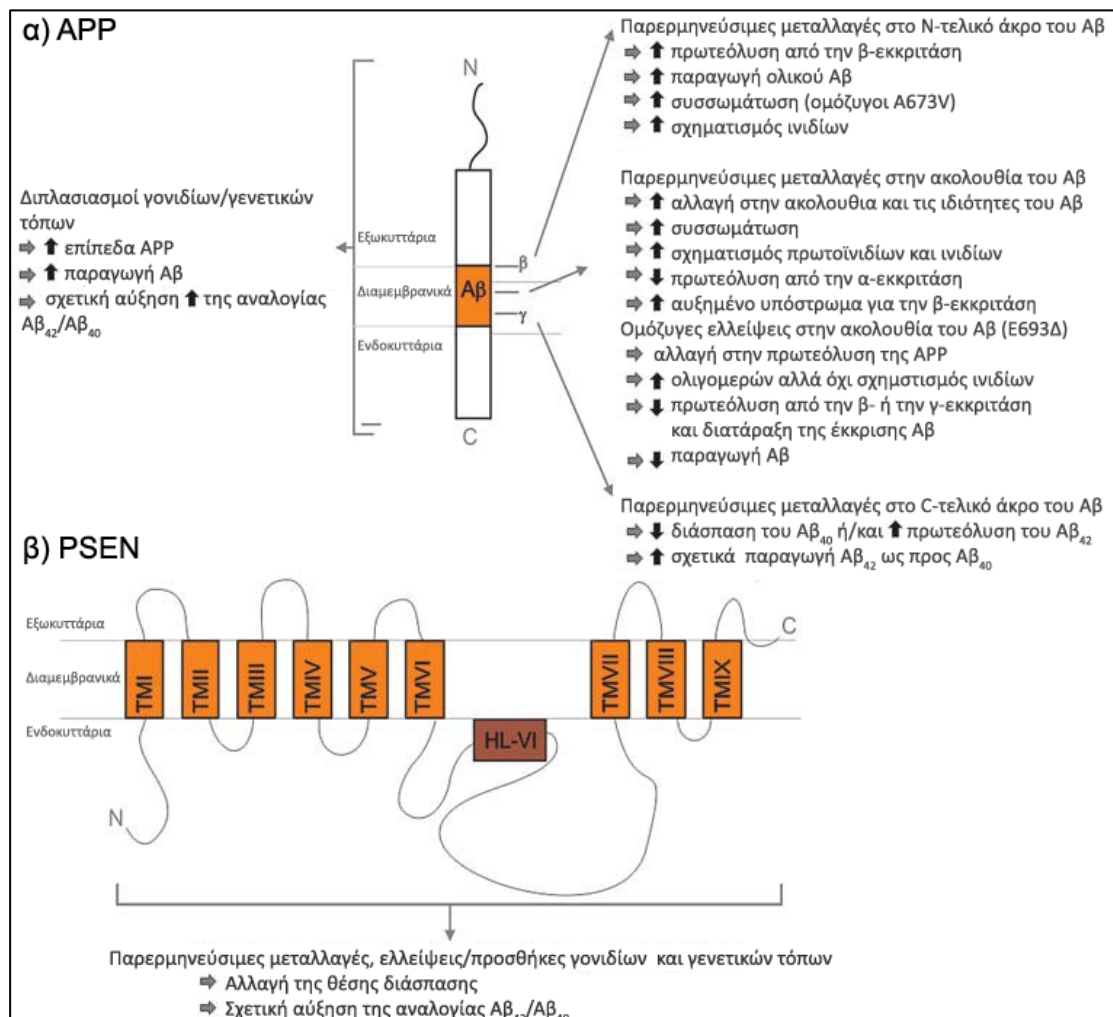
Πρόσφατα δύο πολύ μεγάλες επιδημιολογικές μελέτες υπέδειξαν άλλα τρία γονίδια, πολυμορφισμοί των οποίων είναι παράγοντες κινδύνου για τη νόσο του Alzheimer (*APOJ*, *CR1* και *PICALM1*) (Harold et al., 2009, Lambert et al., 2009).

1.7.2. Μεταλλαγές στην οικογενή μορφή της νόσου του Alzheimer

Μετά τον χαρακτηρισμό των πρώτων παρερμηνεύσιμων μεταλλαγών της APP στις κληρονομικές αιμορραγικές εγκεφαλικές αγγειοπάθειες με αμυλοείδωση (hereditary cerebrovascular hemorrhages with amyloidosis, HCHWA-C) (Levy et al., 1990), ακολούθησε χαρακτηρισμός 23 νέων μεταλλαγών στην APP που ανιχνεύθηκαν σε 77 οικογένειες με πρόωρη εμφάνιση της νόσου. Κατά το αμυλοειδογενές μονοπάτι η APP στους νευρώνες πρωτεολύεται πρώτα από τη β-εκκριτάση και στη συνέχεια από το σύμπλεγμα της γ-εκκριτάσης παράγοντας έτσι τα πεπτίδια Αβ₄₀ και Αβ₄₂ (Citron et al., 1996, Klafki et al., 1996). Το δεύτερο είναι πιο αμυλοειδογενές λόγω του ότι στο καρβοξυτελικό του άκρο, πέραν των δύο καταλοίπων βαλινών που περιέχονται στο αντίστοιχο του Αβ₄₀ υπάρχουν δύο επιπλέον υδρόφοβα αμινοξικά κατάλοιπα, μια ισολευκίνη και μια αλανίνη. Όλες οι παρερμηνεύσιμες μεταλλαγές επηρεάζουν την πρωτεόλυση της APP ως προς το Αβ δεδομένου ότι τοποθετούνται μέσα ή πολύ κοντά στην κωδική περιοχή του (εξώνια 16 και 17 της APP, **Εικόνα 1.9**). Η πλειονότητα των μεταλλαγών της APP κληρονομείται με επικρατή τρόπο εκτός από δύο υπολειπόμενες μεταλλαγές που προκαλούν την ασθένεια μόνο όταν βρεθούν σε ομοζυγωτία. Η πρώτη είναι μια τρινουκλεοτιδική έλλειψη, η E693D, η οποία έχει ανευρεθεί σε μία οικογένεια Ιαπώνων και προκαλεί μειωμένη παραγωγή Αβ₄₀ και Αβ₄₂ χωρίς αλλαγή στην αναλογία τους. Η δεύτερη είναι μία έλλειψη, η A673V, που εντοπίστηκε σε μία άλλη οικογένεια Ιαπώνων (**Εικόνα 1.9**) (Tomiyama et al., 2008) .

Μία άλλη ομάδα μεταλλαγών που προκαλεί πρόωρη εμφάνιση της νόσου είναι οι διπλασιασμοί. Διπλασιασμένες περιοχές ολόκληρου του γενετικού τόπου της APP (Kasuga et al., 2009, Rovelet-Lecrux et al., 2007, Rovelet-Lecrux et al., 2006) ή μόνο του γονιδίου της APP (Sleegers et al., 2006) συσχετίστηκαν με πρόωρη εμφάνιση της AD και εκτεταμένη εγκεφαλική αμυλοειδική αγγειοπάθεια (cerebral amyloid angiopathy, CAA) (Cabrejo et al., 2006). Αναλόγως προς την εθνική ομάδα υπό μελέτη, οι διπλασιασμοί της APP ήταν υπεύθυνοι για το 2-18% των επικρατών μεταλλαγών στις οικογένειες με πρόωρη εμφάνιση

της νόσου (**Εικόνα 1.9A**) (Blom et al., 2008, Kasuga et al., 2009, Lewis et al., 2003, Slegers et al., 2006).



Εικόνα 1.9. Επίδραση των διαφορετικών μεταλλαγών στα γονίδια τα οποία προκαλούν την οικογενή μορφή της AD. (A). Σχηματική απεικόνιση της πρωτεϊνικής δομής της APP. Δεξιά οι επιπτώσεις των μεταλλαγών της APP στην πρωτεόλυση και την επεξεργασία της APP δίνονται με βάση τη θέση τους ως προς το Αβ. Αριστερά δείχνεται το αποτέλεσμα των γενετικών διπλασιασμών του γονιδίου της APP ή ολόκληρου του γενετικού της τόπου. (B). Σχηματική απεικόνιση της πρωτεϊνικής δομής των πρεσινιλινών. Τα ορθογώνια απεικονίζουν τις διαμεμβρανικές περιοχές οι οποίες διαχωρίζονται από τις υδρόφοβες θηλιές. Αναγράφονται οι επιπτώσεις των μεταλλαγών σε όλο το μήκος της πρωτεΐνης. Προσαρμογή από Bettens K. et al, Hum. Mol. Genet. 2010, 19(R1):R4-R11.

Οι πρεσινιλίνες συμμετέχουν στο σύμπλεγμα της γ-εκκρίτασης (**Εικόνα 1.11**) το οποίο είναι υπεύθυνο για τη γ-πρωτεόλυση της APP (De Strooper et al., 1998). Μεταλλαγές στις πρεσινιλίνες μεταβάλλουν την πρωτεολυτική αυτή δραστηριότητα με αποτέλεσμα την

αύξηση της αναλογίας $A\beta_{42}/A\beta_{40}$. Αυτό μπορεί να οφείλεται είτε σε αυξημένη παραγωγή $A\beta_{42}$ είτε σε μείωση της παραγωγής $A\beta_{40}$. Τα εν λόγω αποτελέσματα έχουν επιβεβαιωθεί με μετρήσεις σε πλάσμα ασθενών και σε θρεπτικό μέσο από ινοβλάστες που φέρουν μεταλλαγές για τις PSEN (Martins et al., 1995, Scheuner et al., 1996). Έως τώρα έχουν ανιχνευθεί 178 διαφορετικές μεταλλαγές που σχετίζονται με τη νόσο του Alzheimer σε 393 οικογένειες για το γονίδιο *PSEN1* και 15 μεταλλαγές σε 23 οικογένειες για το γονίδιο της *PSEN2*. Η πλειονότητα των μεταλλαγών στις PSEN είναι μονο-νουκλεοτιδικές αντικαταστάσεις αλλά έχουν περιγραφεί και μικρές ελλείψεις ή προσθήκες. Οι μεταλλαγές είναι γενικά διασκορπισμένες σε όλη την πρωτεΐνη με μερικές να είναι συγκεντρωμένες στις διαμεμβρανικές περιοχές και στις υδρόφοβες θηλιές οι οποίες περιβάλλουν αυτές τις περιοχές (**Εικόνα 1.9B**) (Cruts and Van Broeckhoven, 1998).

Ένας άλλος τύπος γενετικής διαφοροποίησης που έχει υπο-εκπροσωπηθεί στις γενετικές μελέτες για τη νόσο του Alzheimer αλλά έχει αρχίσει να μελετάται επισταμένως τα τελευταία χρόνια, είναι η μεταβολή του αριθμού αντιγράφων (copy-number variations, CNV). Οι CNV συνεισφέρουν στη φαινοτυπική ποικιλία των πολυπαραγοντικών και περίπλοκων ασθενειών (Yang et al., 2007) και έχουν ενοχοποιηθεί για ένα μεγάλο αριθμό νευροεκφυλιστικών νοσημάτων (Lee and Lupski, 2006) συμπεριλαμβανομένης και της AD (Kasuga et al., 2009, Rovelet-Lecrux et al., 2007, Rovelet-Lecrux et al., 2006).

Συνολικά όλες οι μεταλλαγές που αναφέρθηκαν, είναι υπεύθυνες μόνο για ένα ποσοστό 5% από τους ασθενείς με τη νόσο του Alzheimer (Tanzi et al., 1996). Ανακεφαλαιώνοντας, και τα τρία γονίδια που προκαλούν την πρόωρη και οικογενή μορφή της AD υποστηρίζουν ένα κοινό παθολογικό μονοπάτι για τη νόσο με το $A\beta$ να έχει μείζονα ρόλο. Σύμφωνα με την υπόθεση του αμυλοειδούς οι νευροεκφυλιστικές επιπτώσεις είναι το αποτέλεσμα της έλλειψης ισορροπίας μεταξύ παραγωγής $A\beta$ και απομάκρυνσής του (**Εικόνα 1.10**) (Hardy and Allsop, 1991, Hardy and Higgins, 1992, Selkoe, 1991).

1.7.3. Πολυμορφισμοί γονιδίων ως παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση της σποραδικής μορφής της νόσου του Alzheimer

Υπάρχουν δύο τρόποι γενετικής προσέγγισης και εύρεσης πολυμορφισμών που αποτελούν παράγοντες πρόκλησης ασθενειών (Bettens et al., 2010). Ο πρώτος τρόπος στηρίζεται σε μια υπόθεση βασισμένη σε ένα γονίδιο ή σε ένα μονοπάτι. Ο δεύτερος

τρόπος είναι χωρίς υπόθεση (hypothesis-free) και χρησιμοποιεί μεθόδους συσχέτισης με ασθένειες χρησιμοποιώντας όλο το γονιδίωμα (genome-wide association studies, GWAS).

Μέχρι τώρα έχουν δημοσιευτεί δέκα μελέτες GWAS για τη νόσο του Alzheimer που διαφέρουν ως προς το σχεδιασμό τους (κάποιες είναι βασισμένες σε οικογένειες και άλλες σε ασθενείς), τη μέθοδο επιλογής και τον αριθμό των πολυμορφισμών ενός νουκλεοτιδίου (single nucleotide polymorphisms, SNP), την εθνική ομάδα, τον αριθμό των ασθενών και των φυσιολογικών ατόμων και την πλατφόρμα γονοτυποποίησης των πολυμορφισμών (Bertram and Tanzi, 2009).

Οι δύο τελευταίες μελέτες GWAS διαφέρουν κατά πολύ από τις προηγούμενες (Harold et al., 2009, Lambert et al., 2009). Κατ' αρχάς, έδειξαν ανεξάρτητα και με πολύ ισχυρή συσχέτιση ότι πολυμορφισμοί της Απολιποπρωτεΐνης J (Apolipoprotein J, ApoJ) προδιαθέτουν για τη νόσο του Alzheimer. Το *ApoJ* έγινε το πρώτο γονίδιο στην ιστορία της νόσου, μετά το αλληλόμορφο *ApoE4* του γονιδίου της *ApoE*, που συσχετίζεται με αυτήν. Επιπλέον, στις εν λόγω μελέτες χρησιμοποιήθηκε πολύ μεγάλος αριθμός ατόμων (13.000 άτομα στη μελέτη του Lambert και των συνεργατών του και 16.000 στη μελέτη του Harold και των συνεργατών του). Και οι δύο μελέτες προήλθαν από διεθνή συνεργασία και σε αυτές χρησιμοποιήθηκαν πολλές και διαφορετικές εθνικές ομάδες με αποτέλεσμα να ξεπεραστεί το εμπόδιο ανάλυσης που υπήρχε σε προηγούμενες μελέτες και είχε ως επακόλουθο τη μη αποτελεσματική εκτίμηση των πολυμορφισμών με μικρότερη επίδραση.

Ακόμα, ανακαλύφθηκαν δύο άλλα γονίδια που είναι παράγοντες πρόκλησης της AD, το γονίδιο του υποδοχέα του συμπληρώματος (complement receptor 1, *CR1*) και το γονίδιο που κωδικοποιεί τη φωσφατιδυλινοσιτολ-προσδεόμενη πρωτεΐνη συγκρότησης της κλαθρίνης (Phosphatidylinositol binding clathrin assembly protein, *PICALM*). Παρόλα αυτά, ακόμη κι αν προστεθούν τα τρία καινούργια γενεσιουργά γονίδια με την *ApoE4*, δεν εξηγείται όλη η γενετική ποικιλότητα εμφάνισης της σποραδικής μορφής της νόσου του Alzheimer (Goring et al., 2001). Στην παρούσα φάση γίνεται εκτεταμένη μετα-ανάλυση των αποτελεσμάτων και είναι πολύ πιθανό να ανακαλυφθούν και άλλα γονίδια με μικρότερη επίδραση στην εμφάνιση και την εξέλιξη της νόσου.

Τα τρία καινούργια γονίδια που ανιχνεύθηκαν συνηγορούν υπέρ των θεωριών που ήδη υπάρχουν για τη νόσο του AD. Πολλές ιδιότητες της APOJ, μίας απολιποπρωτεΐνης που εκφράζεται σε αφθονία στον εγκέφαλο, είναι άμεσα συνδεδεμένες με το Αβ. Η APOJ είναι παρούσα στις εναποθέσεις αμυλοειδούς (Choi-Miura et al., 1992) και έχει αυξημένη

έκφραση σε διάφορες περιοχές του εγκεφάλου με αυξημένη παθολογία Alzheimer (May et al., 1990). Η APOJ δρα ως πρωτεΐνη-συνοδός (chaperone) του Αβ εμποδίζοντας έτσι τη συσσωμάτωση των πεπτιδίων Αβ₄₂ (Oda et al., 1994, Oda et al., 1995). Επιπρόσθετα, ανάλογα με το ισοζύγιο Αβ και APOJ, η APOJ μπορεί είτε να αυξήσει είτε να παρεμποδίσει το σχηματισμό ινιδίων από το πεπτίδιο και κατ' επέκταση την κυτταροτοξικότητα *in vitro* (Yerbury et al., 2007), αν και παραμένει άγνωστο αν το ίδιο ισχύει και στους ασθενείς με τη νόσο του Alzheimer. Η APOJ διαμεσολαβεί στην απομάκρυνση του Αβ διαμέσου του αιματο-εγκεφαλικού φραγμού (Bell et al., 2007) καθώς και στην αυξημένη ενδοκυττάρωση του Αβ από τα κύτταρα της γλοίας (Bartl et al., 2001, Cole and Ard, 2000, Hammad et al., 1997).

Ο υποδοχέας CR1 συνδέεται με τη νόσο του Alzheimer μέσω της ενεργοποίησης του εξαρτώμενου από τον παράγοντα C3 του συστήματος του συμπληρώματος (complement 3, C3) μονοπατιού (C3-dependent pathway) που επάγεται από Αβ το οποίο βρίσκεται σε ινώδεις (fibrillar) σχηματισμούς (Webster et al., 1997). Το Αβ της κυκλοφορίας προσδένεται μέσω του παράγοντα C3b στον υποδοχέα CR1 στην επιφάνεια των ερυθροκυττάρων. Στους ασθενείς με τη νόσο του Alzheimer η πρόσδεση του Αβ στον υποδοχέα CR1 είναι μειωμένη σε σχέση με τα φυσιολογικά άτομα (Rogers et al., 2006). Αναστολή του εξαρτώμενου από τον παράγοντα C3 μονοπατιού σε διαγονιδιακά ποντίκια οδηγεί στην αυξημένη εναπόθεση του Αβ και σε νευροεκφυλισμό (Wyss-Coray et al., 2002). Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν έναν προστατευτικό ρόλο του συστήματος του συμπληρώματος στα ποντίκια με παθολογία τύπου Alzheimer .

Η πρωτεΐνη PICALM παίζει ρόλο στην επεξεργασία της APP μέσω του μονοπατιού ενδοκυττάρωσης από τα κυστίδια κλαθρίνης, τη σύντηξη των συναπτικών μεμβρανών κατά το σχηματισμό μνήμης κατά τη διάρκεια της μεταφοράς από την κυστιδιο-συσχετιζόμενη μεμβρανική πρωτεΐνη 2 (vesicle-associated membrane protein 2) (Harel et al., 2008). Προηγούμενες μελέτες έδειξαν συσχέτιση με το γονίδιο της πρωτεΐνης πρόσδεσης της δυναμίνης (dynamin-binding protein) (Bettens et al., 2009, Kuwano et al., 2006) υπογραμμίζοντας ότι η γενετική ποικιλότητα σε γονίδια τα οποία σχετίζονται με τη λειτουργία των συνάψεων μπορεί να συμβάλλει στην πρόκληση της νόσου του Alzheimer.

1.7.4. Πεπτιδίο Αβ και πρωτεΐνη Ταυ – Η υπόθεση του καταρράκτη του αμυλοειδούς

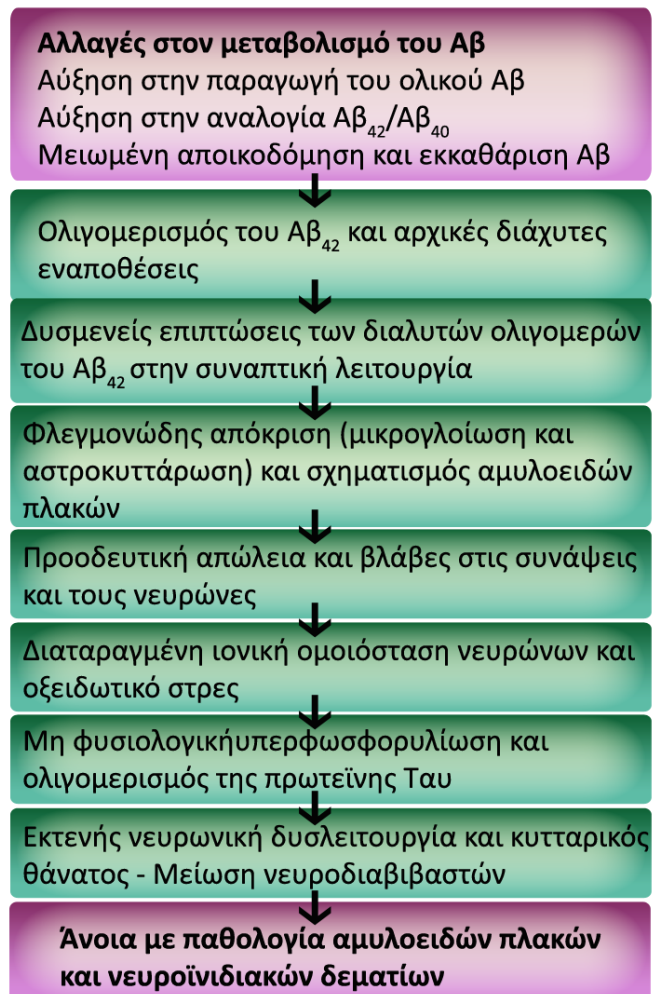
Στην περίπτωση της νόσου του Alzheimer η βιοχημική υπόθεση προηγήθηκε της γενετικής υπόθεσης και οδήγησε στην ανακάλυψη του πρώτου γονιδίου που προκαλεί την εμφάνιση της. Το προϊόν του γονιδίου *APP* είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη τύπου I η οποία έχει ομοιότητες με άλλες πρωτεΐνες-υποδοχείς. Η *APP* εκφράζεται ευρέως σε νευρικά και μη νευρικά κύτταρα (Haass and Selkoe, 2007). Μετά την παρουσίαση της πρώτης κλινικοπαθολογικής περίπτωσης ασθενούς από το Βαυαρό γιατρό Alois Alzheimer το 1906, έγινε σαφές ότι οι αμυλοειδείς πλάκες στον εγκεφαλικό φλοιό ήταν συνδεδεμένες με την ασθένεια. Στη δεκαετία του 1980 οι βιοχημικοί είχαν επικεντρωθεί στην απομόνωση του αμυλοειδούς. Οι Glenner και Wong απομόνωσαν μικρο-αγγειακές εναποθέσεις του Αβ από τις μήνιγγες ασθενών με Alzheimer και παρείχαν μια μερική αλληλουχία του πεπτιδίου το οποίο ονόμασαν β-αμυλοειδές (Αβ) (Glenner and Wong, 1984b). Πολύ σύντομα οι Masters, Beyreuther και οι συνεργάτες τους ταυτοποίησαν το ίδιο πεπτιδίο ως το κύριο συστατικό του πυρήνα των αμυλοειδών πλακών από εγκεφάλους ασθενών μετά θάνατον (Masters et al., 1985). Την ίδια περίοδο ταυτοποιήθηκε η πρωτεΐνη Ταυ ως το κύριο συστατικό των νευροϊνιδιακών δεματίων. Η πρωτεΐνη Ταυ συσσωρεύεται μέσα στο σώμα και τις απολήξεις των νευρώνων στους εγκεφάλους των AD ασθενών (Grundke-Iqbal et al., 1986, Kosik et al., 1986, Nukina and Ihara, 1986).

Από το 1969 ήταν γνωστό ότι σε άτομα μέσης ηλικίας με σύνδρομο Down ανευρίσκονταν αμυλοειδείς πλάκες και νευροϊνιδιακά δεμάτια (Olson and Shaw, 1969). Ο Glenner και οι συνεργάτες του έδειξαν, επίσης, ότι οι αμυλοειδείς αυτές εναποθέσεις στα άτομα με σύνδρομο Down αποτελούνταν από Αβ (Glenner and Wong, 1984a). Ακολούθησε η κλωνοποίηση του γονιδίου της *APP* από τον Beyreuther και τους συνεργάτες του το 1987 στο μακρύ βραχίονα του χρωμοσώματος 21, η οποία συμφωνούσε με την υπόθεση ότι η *APP* προκαλεί πρόωρη νόσο Alzheimer στους ασθενείς με τρισωμία 21/σύνδρομο Down (Kang et al., 1987). Την υπόθεση αυτή ενίσχυσε η παρατήρηση ότι ασθενείς με σύνδρομο Down που έχουν μερική μόνο τρισωμία στη χρωμοσωμική περιοχή 21q, αλλά το γονίδιο για την *APP* σε δύο μόνο αντίγραφα, δεν εμφανίζουν καθόλου νευροπαθολογία της νόσου (Prasher et al., 1998). Επιπρόσθετα, διπλασιασμός του γονιδίου *APP* χωρίς όμως τρισωμία 21/σύνδρομο Down οδηγεί στην εμφάνιση της νόσου του Alzheimer και αμυλοειδωσής (Cabrejo et al., 2006, Rovelet-Lecrux et al., 2006, Sleegers et al., 2006).

Αυτά τα βιοχημικά ευρήματα οδήγησαν τους γενετιστές σε ελέγχους για μεταλλαγές της APP σε οικογένειες οι οποίες παρουσίαζαν την οικογενή μορφή της νόσου. Η πρώτη μεταλλαγή ανακαλύφθηκε σε μια οικογένεια με κληρονομική εγκεφαλική αμυλοειδική αγγειοπάθεια (Levy et al., 1990) ενώ, στη συνέχεια, ανακαλύφθηκαν και άλλες μεταλλαγές (Chartier-Harlin et al., 1991, Goate et al., 1991, Mullan et al., 1992), το αποτέλεσμα των οποίων αναλύθηκε πιο πάνω (βλ. ενότητα 1.7.2).

Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα διατυπώθηκε η υπόθεση ότι τα συμπτώματα της AD προκαλούνται από την υπερβολική συσσώρευση και την εναπόθεση του Αβ που ενεργοποιεί μια περίπλοκη σειρά αλυσιδωτών μοριακών γεγονότων. Η υπόθεση αυτή ονομάστηκε υπόθεση του καταρράκτη του αμυλοειδούς (amyloid cascade hypothesis, **Εικόνα 1.10**) (Hardy and Higgins, 1992, Selkoe, 1991) .

Στην πιο πρόσφατη διατύπωσή της, η υπόθεση του καταρράκτη του Αβ δηλώνει ότι η σταδιακή συσσώρευση και συσσωμάτωση του μικρού υδρόφοβου πεπτιδίου Αβ ξεκινά έναν αργό αλλά θανατηφόρο μοριακό καταρράκτη (Hardy and Selkoe, 2002). Ο καταρράκτης αυτός οδηγεί σε συναπτικές μεταβολές και ενεργοποίηση της μικρογλοίας και των αστροκυττάρων. Η πρωτεΐνη Ταυ μετατρέπεται αρχικά σε ολιγομερή Ταυ και στη συνέχεια σε μη διαλυτά ζεύγη ελικοειδών ινιδίων (νευροϊνιδιακά δεμάτια). Το αποτέλεσμα είναι η προοδευτική απώλεια νευρώνων η οποία συνοδεύεται από πολλαπλές ελλείψεις νευροδιαβιβαστών και τελικά παρουσιάζεται απώλεια μνήμης και άλλων συνειδησιακών λειτουργιών (Selkoe, 2001).



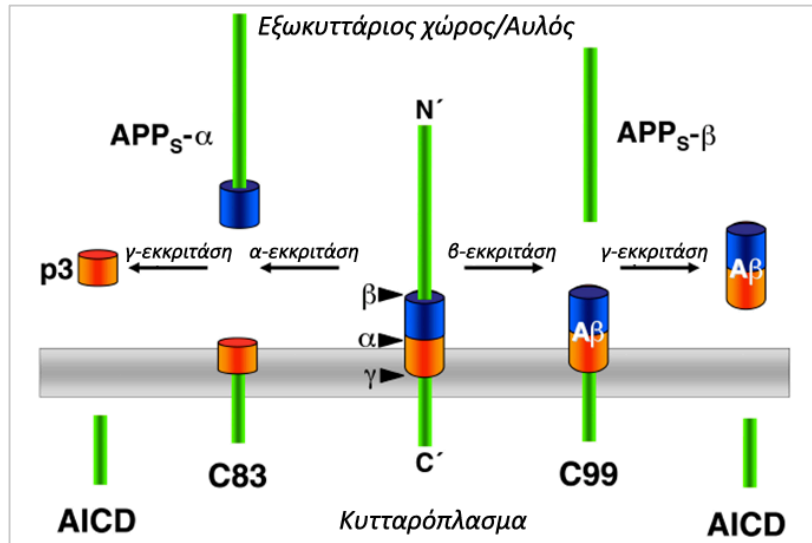
Εικόνα 1.10. Η υπόθεση του καταρράκτη του αμυλοειδούς. Η βαθμιαία αύξηση στα επίπεδα του Αβ στον εγκέφαλο πιστεύεται ότι δίνει το έναυσμα για τον καταρράκτη του αμυλοειδούς (Hardy and Selkoe, 2002, Hardy and Higgins, 1992, Selkoe, 1991). Η αύξηση κυρίως του πιο αμυλοειδογενούς πεπτιδίου Αβ₄₂ αυξάνει το σχηματισμό ολιγομερών και στη συνέχεια προκαλεί βαθμιαίες αλλοιώσεις στη συναπτική λειτουργία. Παράλληλα, το Αβ₄₂ δημιουργεί εναποθέσεις οι οποίες αρχικά είναι διάχυτες (μη ινιδιακές), στο παρέγχυμα του εγκεφάλου. Καθώς οι διάχυτες πλάκες αρχίζουν να συσσωρεύουν ινίδια Αβ, παρατηρείται τοπική φλεγμονώδης αντίδραση. Επίσης απαντώνται συναπτικές απώλειες και δυστροφικοί νευρίτες. Αυτά τα γεγονότα έχουν ως τελικό αποτέλεσμα οξειδωτικό στρες, αλλοιώσεις στην ιονική ομοιόσταση (π.χ. του ασβεστίου) και μια σωρεία άλλων βιοχημικών αλλαγών. Τα νευροϊνιδιακά δεμάτια συμβάλλουν σε περαιτέρω κυτταρικές αλλοιώσεις συμπεριλαμβανομένων και κάποιων διεργασιών της αξονικής μεταφοράς. Το τελικό στάδιο του καταρράκτη του αμυλοειδούς είναι η μεγάλη βαθμού συναπτική/νευρωνική δυσλειτουργία και ο κυτταρικός θάνατος, ο οποίος οδηγεί σε προοδευτική άνοια με εκτεταμένη παθολογία Αβ και Ταυ. Προσαρμογή από Haass C. and Selkoe D.J., 2007, Nature Rev. Molec. Cell Biol. ,8: 101-112.

1.7.5. Ρυθμιζόμενη ενδομεμβρανική πρωτεόλυση της APP – Το αμυλοειδογενές και το μη αμυλοειδογενές μονοπάτι πρωτεόλυσης της APP

Αρχικά ο μηχανισμός με τον οποίο η μερικώς ενδομεμβρανική περιοχή του Αβ απελευθερώνεται ως ελεύθερο πεπτίδιο από την πρόδρομη πρωτεΐνη ήταν αινιγματικός και οι επιστήμονες θεωρούσαν ότι ήταν απαραίτητη προηγούμενη μεμβρανική βλάβη. Υπέθεταν ότι το υδρόφοβο εσωτερικό της μεμβρανικής διπλοστοιβάδας έπρεπε να υποστεί βλάβη για να παράσχει πρόσβαση σε νερό και πρωτεάσες. Αυτή η ιδέα απορρίφθηκε όταν ανακαλύφθηκε ότι το Αβ παράγεται φυσιολογικά από την ενδομεμβρανική πρωτεόλυση της APP και ανιχνεύτηκε στα εξωκυττάρια υγρά συμπεριλαμβανομένων του ΕΝΥ και του πλάσματος (Busciglio et al., 1993, Haass et al., 1992, Seubert et al., 1992, Shoji et al., 1992).

Η δημιουργία του Αβ, όπως αποδείχθηκε, ήταν απλώς ένα παράδειγμα ενός γενικού φυσιολογικού μηχανισμού ο οποίος είναι πλέον γνωστός ως ρυθμιζόμενη ενδομεμβρανική πρωτεόλυση (regulated intramembrane proteolysis, RIP) (Brown et al., 2000, Haass, 2004, Weihofen and Martoglio, 2003). Σύμφωνα με το μηχανισμό αυτόν οι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες αρχικά επιδέχονται αποκοπή της εξωκυττάριας περιοχής τους από πρωτεάσες προσδεσμένες στην κυτταρική επιφάνεια, γνωστές ως εκκριτάσες (secretases ή sheddases). Οι μεγάλες εξωκυττάριας περιοχές τους απελευθερώνονται στα εξωκυττάρια υγρά. Το υπόλοιπο της πρωτεΐνης που βρίσκεται ακόμα μέσα στη μεμβράνη μπορεί να πρωτεολυθεί στη διαμεμβρανική περιοχή του. Το αποτέλεσμα είναι η απελευθέρωση μικρών υδρόφοβων πεπτιδίων στον εξωκυττάρια χώρο (π.χ. το Αβ στην περίπτωση της APP) και ενδοκυτταρικών επικρατειών (intracellular domain, ICD) στο κυτταρόπλασμα (**Εικόνα 1.11**). Οι ελεύθερες ICD είναι δυνατό να έχουν ειδικές λειτουργίες όπως η ενεργοποίηση πυρηνικών μεταγωγικών μονοπατιών (π.χ. η ICD της πρωτεΐνης Notch) (Mumm and Kopan, 2000).

Υποστηρίζοντας την υπόθεση του αμυλοειδούς καταρράκτη όλες οι μεταλλαγές της APP που έχουν βρεθεί έως τώρα και προκαλούν AD, είτε συμβαίνουν μέσα στην περιοχή του Αβ είτε το πλασιώνουν. Οι μεταλλαγές οι οποίες πλασιώνουν το Αβ αυξάνουν την παραγωγή του Αβ₄₂ ενώ οι μεταλλαγές που βρίσκονται μέσα στην περιοχή του Αβ αυξάνουν τον ολιγομερισμό του πεπτιδίου (Haass, 2004).



Εικόνα 1.11. Μονοπάτια πρωτεόλυσης της APP. Η πρωτεόλυση της διαμεμβρανικής πρωτεΐνης APP ακολουθεί 2 μονοπάτια, το μη αμυλοειδογενές (συμμετέχουν οι α- και γ-εκκριτάσες) και το αμυλοειδογενές (συμμετέχουν οι β- και γ-εκκριτάσες) που οδηγεί στη δημιουργία του πεπτιδίου Αβ. Η πρωτεόλυση της APP γίνεται σταδιακά σε διαφορετικά κυτταρικά διαμερίσματα. Κατά το μη αμυλοειδογενές μονοπάτι η πρωτεόλυση γίνεται αρχικά από την α-εκκριτάση (κυρίως μέλη της οικογένειας των μεταλλοπρωτεασών ADAM) στον εξωκυττάριο χώρο. Στη συνέχεια το σύμπλεγμα της γ-εκκριτάσης (PSEN1 ή PSEN2, APH1, NICASTRIN και PEN2) στο σύμπλεγμα Golgi και το ΕΔ πρωτεολύει ενδομεμβρανικά την APP, δίνοντας ένα μη αμυλοειδές πεπτιδίιο (p3). Κατά το αμυλοειδογενές μονοπάτι, η πρωτεόλυση από τη β-εκκριτάση (BACE) γίνεται στα ώριμα ενδοσώματα και στο σύμπλεγμα Golgi. Ακολούθως, το σύμπλεγμα της γ-εκκριτάσης πρωτεολύει το καρβοξυτελικό θραύσμα της APP (C99) με αποτέλεσμα την παραγωγή του πεπτιδίου Αβ. Το πεπτιδίιο αυτό είναι το κύριο συστατικό των αμυλοειδών πλακών οι οποίες ανευρίσκονται στους εγκεφάλους ασθενών με AD. Τα άλλα προϊόντα που παράγονται από αυτό το μονοπάτι (APP_S-α και AICD) συμμετέχουν σε μονοπάτια σηματοδότησης και διακυτταρικής επικοινωνίας. Προσαρμογή από Kaether C. and Haass C., 2004, *J Cell Biol*, 167 (5):809-812.

Ο μεταβολισμός της APP γίνεται κυρίως στο δίκτυο Golgi και σε ενδοσώματα που οδηγούνται προς και από την πλασματική μεμβράνη καθώς και σε περιοχές της πλασματικής μεμβράνης πλούσιες σε χοληστερόλη (Ehehalt et al., 2003). Η πρωτεόλυση της πρωτεΐνης ακολουθεί δύο μονοπάτια, το μη αμυλοειδογενές (συμμετέχουν οι α- και γ-εκκριτάσες) και το αμυλοειδογενές (συμμετέχουν οι β- και γ-εκκριτάσες). Το αμυλοειδογενές μονοπάτι οδηγεί στην παραγωγή του πεπτιδίου Αβ (Haass, 2004, Kaether and Haass, 2004) (**Εικόνα 1.11**). Κατά την πρωτεόλυσή της, σύμφωνα με το μη αμυλοειδογενές μονοπάτι, η APP πρωτεολύεται αρχικά από τις α-εκκριτάσες, που είναι εξωκυττάρια μεταλλοπρωτεάσες της οικογένειας ADAM (π.χ. ADAM10 και ADAM17 - αριστερό μέρος **Εικόνας 1.11**). Κατόπιν γίνεται ενδομεμβρανική πρωτεόλυση από το

σύμπλεγμα της γ-εκκριτάσης στον αυλό (lumen) του συμπλέγματος Golgi ή του ενδοπλασματικού δικτύου (ΕΔ) (Haass, 2004). Κατά το αμυλοειδογενές μονοπάτι (δεξί μέρος **Εικόνας 1.11**) η APP πρωτεολύεται από τη β-εκκριτάση που αποτελείται από την ενδοπρωτεάση BACE (Haass, 2004) στον αυλό του ΕΔ και στα ώριμα ενδοσώματα (late endosomes). Στη συνέχεια γίνεται πρωτεόλυση από το σύμπλεγμα της γ-εκκριτάσης. Το σύμπλεγμα της γ-εκκριτάσης, μίας ειδικού τύπου πρωτεάσης ασπαρτικού, έχει ένα ιδιόμορφο ενεργό κέντρο και μηχανισμό πρωτεόλυσης (Steiner et al., 2000, Wolfe et al., 1999). Αυτό το σύμπλεγμα αποτελείται από την PSEN1 ή την PSEN2, τη Nicastrin, την ομόλογη πρωτεΐνη του πρόσθιου φάρυγγα 1 (anterior pharynx defective homolog 1, APH1) και την ομόλογη πρωτεΐνη του ενισχυτή της πρεσινιλίνης 2 (presenilin enhancer 2 homolog, PEN2) (Edbauer et al., 2003, Haass, 2004, Kimberly et al., 2003, Takasugi et al., 2003). Και οι τέσσερις πρωτεΐνες είναι απαραίτητες για να συγκροτηθεί το σύμπλεγμα και η ενεργότητα της γ-εκκριτάσης (Edbauer et al., 2003).

Το αποτέλεσμα της πρωτεόλυσης της APP από το μη αμυλοειδογενές μονοπάτι όπου συμμετέχουν οι α- και γ-εκκριτάσες δίνει διαλυτά προϊόντα τα οποία συμμετέχουν σε μηχανισμούς σηματοδότησης και διακυτταρικών συνδέσεων. Το αμυλοειδογενές, στο οποίο συμμετέχουν οι β- και γ-εκκριτάσες, δίνει το πεπτίδιο Αβ που είναι το κύριο συστατικό των αμυλοειδών πλακών που παρατηρούνται στους εγκεφάλους των ασθενών με τη νόσο Alzheimer (Haass, 2004).

Σύμφωνα με πρόσφατες μελέτες υπάρχει μεγάλη συσχέτιση μεταξύ των αυξημένων επιπέδων χοληστερόλης στην κυκλοφορία και της μείωσης της ηλικίας εμφάνισης της νόσου του Alzheimer (Jick et al., 2000, Refolo et al., 2000, Sparks et al., 1994, Wolozin, 2004). Σε υπερχοληστεριναιμικούς ασθενείς, αλλά και σε γενετικά τροποποιημένα μοντέλα ζώων με μεταλλαγμένες μορφές της ανθρώπινης APP και των πρεσινιλινών, έχει δειχθεί ότι υπάρχει αυξημένος μεταβολισμός της APP μέσω του αμυλοειδογενούς μονοπατιού. Έτσι προκαλείται σχηματισμός αμυλοειδών πλακών και νευροϊνιδιακών δεματίων, συνέπεια των οποίων είναι η μείωση των συνειδησιακών λειτουργιών (Bales et al., 1999, Mucke et al., 2000, Refolo et al., 2000, Refolo et al., 2001, Sparks et al., 2000, Sparks et al., 2006).

1.8. ΑΡΟΕ ΚΑΙ ΝΟΣΟΣ ΤΟΥ ALZHEIMER – ΜΕΛΕΤΕΣ ΣΕ ΜΟΝΤΕΛΑ ΠΟΝΤΙΚΩΝ ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΑΚΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΡΟΕ ΚΑΙ ΤΟΝ LDLR

Στον εγκέφαλο ασθενών με τη νόσο του Alzheimer και σε διαγονιδιακά μοντέλα ποντικών της AD παρατηρείται έντονη ανοσοαντίδραση της ΑΡΟΕ σε αστροκύτταρα που περιβάλλουν τις αμυλοειδείς πλάκες (Bales et al., 1999, Holtzman et al., 1999). Επίσης, στα διαγονιδιακά ποντίκια με παθολογία τύπου Alzheimer με αδρανοποιημένη την ενδογενή ΑροΕ, (ΑρoE-/-), παρατηρείται σημαντική μείωση της ανάπτυξης των αμυλοειδών πλακών. Από τα παραπάνω συμπεραίνεται ότι η ΑΡΟΕ παίζει σημαντικό ρόλο στη παθογένεση και την εξέλιξη της νόσου.

1.8.1. ΑΡΟΕ και νευροτοξικότητα

Όπως έχει αναφερθεί και σε προηγούμενο κεφάλαιο, η ενεργοποίηση της σύνθεσης της ΑΡΟΕ από τους νευρώνες είναι ένας μηχανισμός που χρησιμεύει στην προστασία των νευρώνων από τις βλάβες, προάγει την επιδιόρθωση των νευρώνων και διατηρεί τις αξονοδενδριτικές συνάψεις (Mahley, 1988, Mahley and Rall, 2000, Weisgraber, 1994). Παρόλα αυτά, όταν η ΑΡΟΕ4 συντίθεται από τους νευρώνες, πρωτεολύεται από μια ειδική γι' αυτούς πρωτεάση σερίνης με ενεργότητα χυμοτρυψίνης. Η πρωτεάση αυτή πρωτεολύει την ΑΡΟΕ στο αμινοξικό κατάλοιπο της μεθειονίνη-272 ή/και στην λευκίνη-268 (Mahley et al., 2006). Τα πρωτεολυτικά τμήματα που δημιουργούνται είναι επιβλαβή στην κυτταρική ομοιόσταση (Brecht et al., 2004, Harris et al., 2003, Huang et al., 2001). Λόγω της μοναδικής της πρωτεϊνικής διαμόρφωσης η ΑΡΟΕ4 είναι πιο επιρρεπής στην πρωτεόλυση από την ΑΡΟΕ3. Στους εγκεφάλους των ασθενών με τη νόσο του Alzheimer και σε διαγονιδιακά ποντίκια που εκφράζουν την ΑΡΟΕ4 στους νευρώνες ανευρίσκεται ΑΡΟΕ4 της οποίας απουσιάζει το καρβοξυτελικό άκρο. Η ΑΡΟΕ αυτή έχει μοριακή μάζα 29kDa αντί 34 kDa και είναι νευροτοξική (Harris et al., 2003). Στα διαγονιδιακά ΑΡΟΕ4 ποντίκια η μέγιστη συγκέντρωση των θραυσμάτων ΑΡΟΕ4 παρατηρείται σε ηλικία 6-7 μηνών και συμπίπτει με την έναρξη νευροεκφυλιστικών αλλαγών στον εγκέφαλο και με σημαντικές μειώσεις στη μάθηση και στη μνήμη (Brecht et al., 2004). Το πρώτο σημείο πρωτεόλυσης δίνει ένα τμήμα μεγέθους 29-30 kDa από το οποίο λείπουν τα τελευταία 27 αμινοξέα. Στους εγκεφάλους των ασθενών με τη νόσο του Alzheimer και στα ποντίκια NSE-ΑρoE4 με έκφραση ΑΡΟΕ4 μόνο από νευρώνες (neuron-specific enolase, NSE) παρατηρούνται και

πρωτεολυτικά θραύσματα της πρωτεΐνης μεγέθους 15-20kDa (Brecht et al., 2004, Harris et al., 2003, Huang et al., 2001). Μεταλλαγή της Arg61 σε θρεονίνη ή του Glu255 (των δύο απαραίτητων αμινοξέων για την αλληλεπίδραση του αμινοτελικού με το καρβοξυτελικό άκρο της APOE4), μειώνει την πρωτεόλυση της ανθρώπινης APOE4 (Brecht et al., 2004). Μελέτες με ανοσοκυτταροχημικές τεχνικές σε καλλιέργειες νευρώνων έχουν δείξει ότι φυσιολογικά η APOE βρίσκεται στο ΕΔ και στο σύστημα Golgi και εκκρίνεται στον εξωκυττάριο χώρο μέσω του εκκριτικού μονοπατιού με κυστίδια (Chang et al., 2005) (Εικόνα 1.12). Παρόλα αυτά, υπάρχουν πολύ μικρές ποσότητες APOE και στο κυτταρόπλασμα.

Η έκφραση της APOE4 από τους νευρώνες και ειδικά της APOE4 της οποίας έχει αποκοπεί το καρβοξυτελικό άκρο (αμινοξέα 1-277 αντί για 299) έχει ως επακόλουθο αμινοτελικά νευροτοξικά θραύσματα της πρωτεΐνης να μετατίθενται στο κυτταρόπλασμα και τα μιτοχόνδρια και αυτά να συσσωματώνονται σε ινιδιακούς σχηματισμούς. Τα ινίδια APOE4 σχηματίζουν νευροϊνιδιακά δεμάτια προκαλώντας με αυτό τον τρόπο νευροτοξικότητα (Harris et al., 2003).

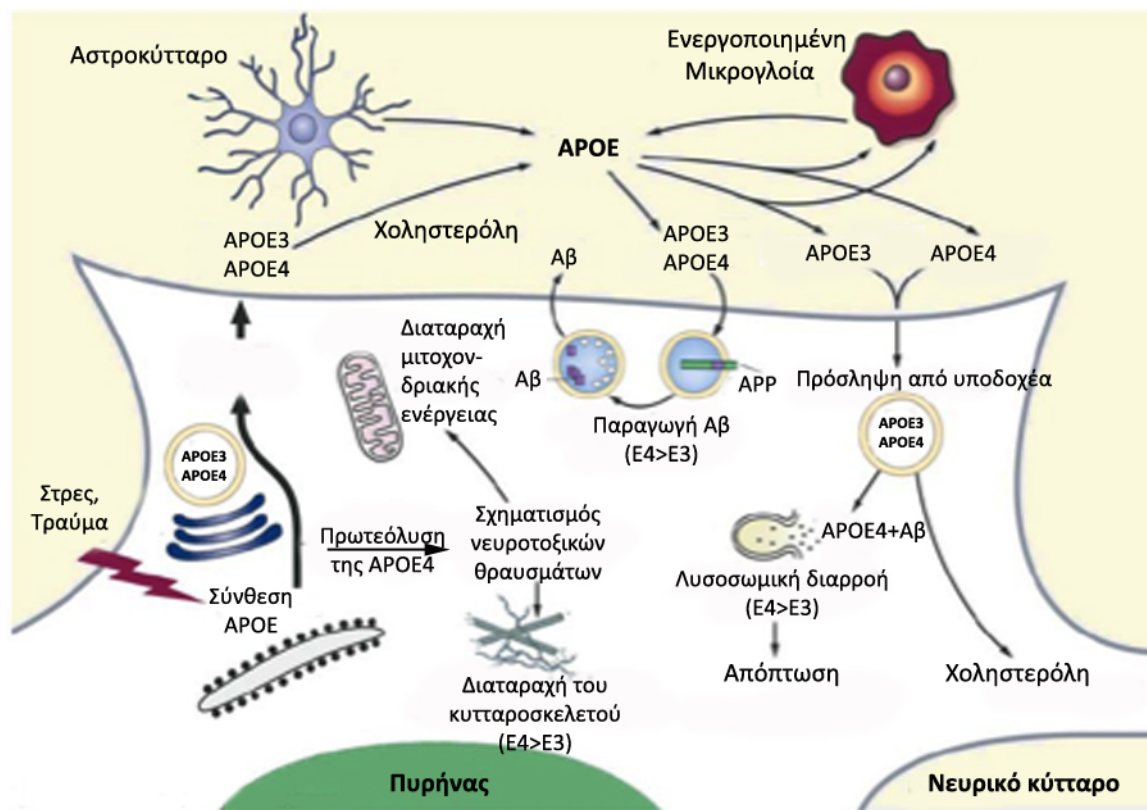
1.8.2. APOE, παραγωγή και μεταφορά Αβ

Ο ενδοκυττάριος μεταβολισμός και η αναδιανομή της χοληστερόλης η οποία διέπεται από την APOE επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό το μεταβολισμό της APP. Η APP βρίσκεται σε μεμβρανικές περιοχές πλούσιες σε χοληστερόλη και λιπίδια (lipid rafts) και η μεγαλύτερη ποσότητά της βρίσκεται στην πλασματική μεμβράνη.

Διάφοροι υποδοχείς για την APOE αλληλεπιδρούν με το Αβ επηρεάζοντας την τοπολογία και την παραγωγή του. Η πρωτεΐνη LRP-1 υφίσταται πρωτεόλυση από την BACE και συνεντοπίζεται με αυτή σε πλούσιες σε λιπίδια περιοχές της μεμβράνης (von Arnim et al., 2005) με μια διαδικασία παρόμοια με εκείνη της APP και της πρωτεΐνης Notch. Επίσης, προσδένει και ενδοκυττάρώνει κάποιες μορφές του διαλυτού αμινοτελικού πρωτεολυτικού θραύσματος της APP (APP soluble, APP_s) όπως επίσης και τα συμπλέγματα APOE-Αβ (Kounnas et al., 1995, Zerbinatti and Bu, 2005). Η πολύ γρήγορη ενδοκυττάρωση του υποδοχέα LRP-1 αυξάνει την ενδοκυττάρωση και την πρωτεόλυση της APP με αποτέλεσμα την αύξηση της παραγωγής τοξικών πεπτιδίων Αβ (Cam et al., 2005).

Η APOE4 προάγει το αμυλοειδογενές μονοπάτι πρωτεόλυσης της APP μέσω του LRP-1 σε καλλιέργειες νευρώνων αρουραίου που υπερεκφράζουν APP αυξάνοντας την

παραγωγή Αβ σε μεγαλύτερο βαθμό απ' όσο η ΑΡΟΕ3 (Ye et al., 2005). Με την ικανότητά του να προσδένει λιποπρωτεΐνες πλούσιες σε ΑΡΟΕ, ο LRP-1 συνδέει σε ένα μοναδικό μεταβολικό μονοπάτι την ΑΡΟΕ και το Αβ (Εικόνα 1.15) (Bu, 2009) .

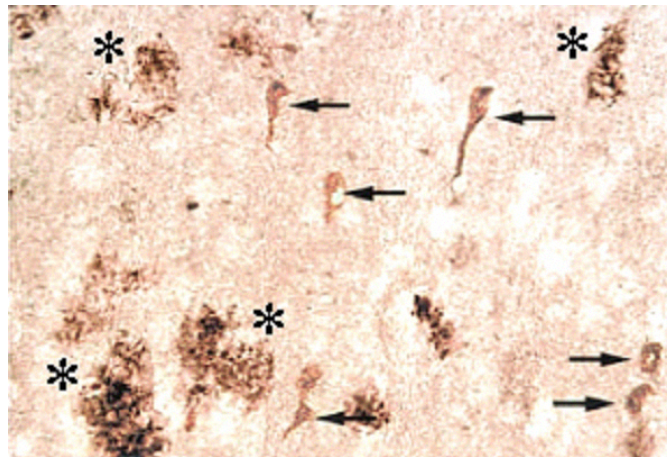


Εικόνα 1.12. Ο ρόλος της ΑΡΟΕ στα από το Αβ εξαρτώμενα και στα από το Αβ ανεξάρτητα μονοπάτια στην παθολογία Alzheimer. Οι επιβλαβείς επιπτώσεις της ΑΡΟΕ4 οφείλονται στις μοναδικές δομικές και βιοφυσικές ιδιότητες της ΑΡΟΕ4. Η ΑΡΟΕ συντίθεται από τα αστροκύτταρα και την ενεργοποιημένη μικρογλοία καθώς και από νευρώνες οι οποίοι έχουν υποστεί βλάβη. Υπάρχουν τρεις πιθανοί επιβλαβείς ρόλοι για την ΑΡΟΕ4: (1) αυξημένη παραγωγή Αβ, (2) ενίσχυση της επαγόμενης από το Αβ διαρροής του λυσοσώματος και συνεπακόλουθη επαγωγή απόπτωσης και (3) αυξημένη ενδονευρωνική πρωτεόλυση της ΑΡΟΕ4. Η τελευταία οδηγεί στη μεταφορά νευροτοξικών θραυσμάτων της ΑΡΟΕ4 στο κυτταρόπλασμα, με επακόλουθη αποδιάταξη του κυτταροσκελετού και μιτοχονδριακή δυσλειτουργία. Προσαρμογή από Robert W. Mahley et al., *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006.

1.8.3. ΑΡΟΕ και εναπόθεση του Αβ

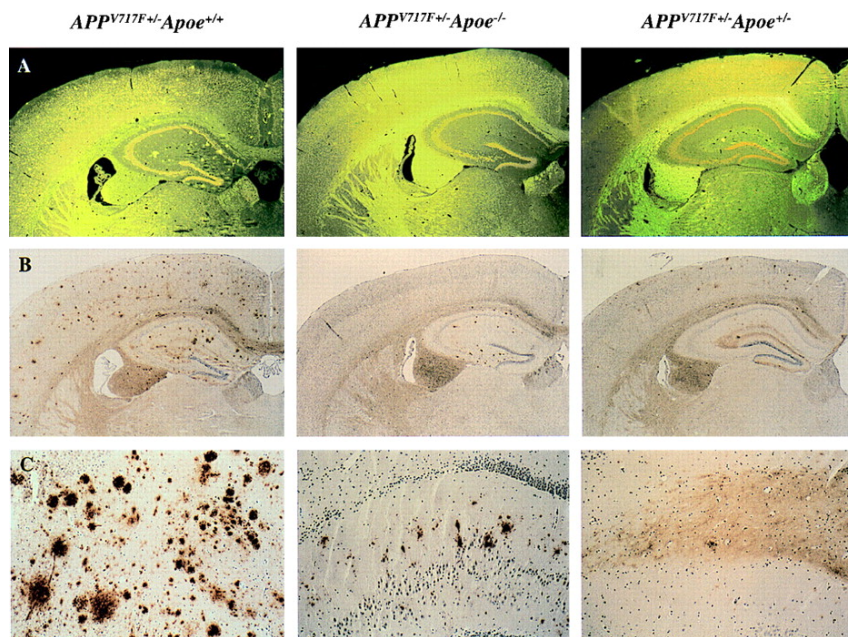
Σύμφωνα με την υπόθεση του καταρράκτη του αμυλοειδούς η συσσωμάτωση του Αβ στον εγκέφαλο είναι ο κύριος παράγοντας παθογένεσης της AD και προέρχεται από την έλλειψη ισορροπίας μεταξύ της παραγωγής και της απομάκρυνσης του πεπτιδίου (Hardy and Selkoe, 2002). Μελέτες *in vitro* και *in vivo* εισηγούνται διάφορους πιθανούς μηχανισμούς για το ρόλο της ΑΡΟΕ4 στην εμφάνιση και την εξέλιξη της νόσου. Τα

συμπλέγματα ΑΡΟΕ/Αβ αποτελούν κύρια συστατικά των αμυλοειδών εναποθέσεων στους εγκεφάλους των ασθενών με Alzheimer και ομοζυγωτία για την *ΑpoE4* στον άνθρωπο συσχετίζεται με αυξημένο σχηματισμό αμυλοειδών πλακών (Bales et al., 2002, Schmechel et al., 1993). Η ΑΡΟΕ συνεντοπίζεται τόσο με αμυλοειδείς πλάκες όσο και με νευροϊνιδιακά δεμάτια (**Εικόνα 1.13**).



Εικόνα 1.13. Η ΑΡΟΕ στον εγκέφαλο ασθενών με τη νόσο Alzheimer. Η ΑΡΟΕ στον εγκέφαλο παράγεται κυρίως από τα αστροκύτταρα και τη μικρογλία και μετά από επαγωγή στρες και από τους νευρώνες. Στον εγκέφαλο των ασθενών με AD, η ΑΡΟΕ συνεντοπίζεται τόσο με τις αμυλοειδείς πλάκες (αστερίσκοι) που βρίσκονται εξωκυττάρια όσο και με τα νευροϊνιδιακά δεμάτια (βέλη) τα οποία βρίσκονται ενδονευρωνικά.

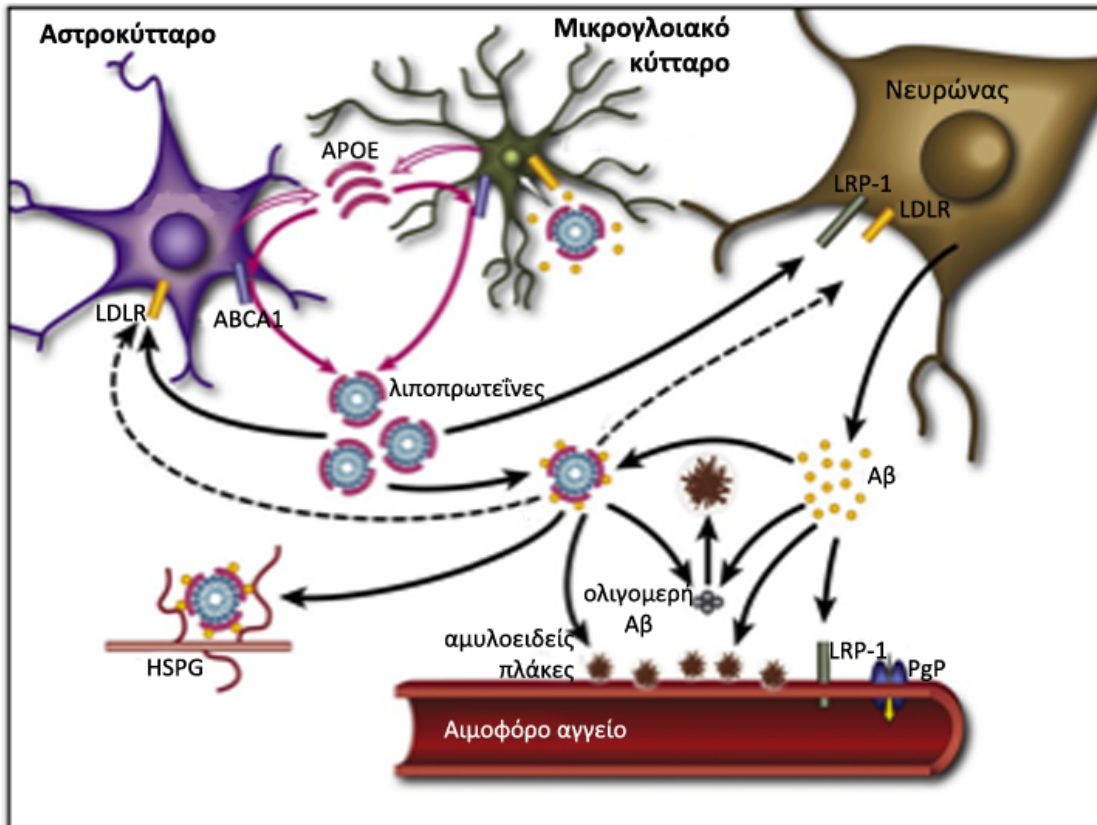
Ο ρόλος της ΑΡΟΕ στην εναπόθεση του Αβ δείχθηκε αρχικά με τη χρήση του διαγονιδιακού μοντέλου PDAPP που υπερεκφράζει μια μεταλλαγμένη μορφή της APP (μεταλλαγή V717F, Swedish) σε συνδυασμό με την ανθρώπινη ΑΡΟΕ (human ΑΡΟΕ, huΑΡΟΕ) και τη muΑΡΟΕ (Bales et al., 1999, Holtzman et al., 2000a). Τα αποτελέσματα αυτά έχουν επιβεβαιωθεί και σε άλλα διαγονιδιακά μοντέλα με παθολογία τύπου Alzheimer. Απουσία της muΑΡΟΕ ο σχηματισμός αμυλοειδών πλακών (**Εικόνα 1.14**) (Bales et al., 1999, Bales et al., 1997) είναι ελάχιστος ή και ανύπαρκτος. Η ανθρώπινη ΑΡΟΕ4 προάγει την εναπόθεση του Αβ αλλά και τη μετατροπή του στην ινιδιακή μορφή που οδηγεί στο σχηματισμό αμυλοειδών πλακών σε μεγαλύτερο βαθμό από όσο η ΑΡΟΕ3 (Bales et al., 2002, Bales et al., 1999, Holtzman et al., 2000a).



Εικόνα 1.14. Έλλειψη της *ApoE* μειώνει την ανοσοαντίδραση για *Aβ* και το σχηματισμό αμυλοειδών πλακών σε ένα διαγονιδιακό μοντέλο ποντικού *AD*. Στο **A** δείχνονται αμυλοειδείς πλάκες οι οποίες αντιπροσωπεύουν συσσωματωμένο *Aβ* (χρώση με Θειοφλαβίνη-*S*, χρωστική η οποία αναγνωρίζει συσσωματωμένο αμυλοειδές) και στο **B** δείχνονται ανοσοθετικές πλάκες για το *Aβ* το οποίο εντοπίζεται με ανοσοϊστοχημικές τεχνικές. Στην τελευταία σειρά δείχνονται εικόνες από τον υπόκαμπο των ποντικών με μεγαλύτερη μεγέθυνση. Σε ποντίκια *APP*^{V717F+/-} ηλικίας 21-22 μηνών τα οποία έχουν την *APOE* (*APP*^{V717F+/-} *ApoE*^{+/+}) παρατηρείται μεγάλος αριθμός θετικών για Θειοφλαβίνη-*S* πλακών (**A**, αριστερή στήλη) και ανοσοθετικών για το *Aβ* εναποθέσεων (**B**, αριστερή στήλη). Οι πλάκες είναι εμφανείς στον υπόκαμπο και στο φλοιό των ποντικών αυτών. Αντίθετα, σε γενετικά τροποποιημένα ποντίκια 21-22 μηνών τα οποία δεν έχουν την ενδογενή *APOE* (*APP*^{V717F+/-} *ApoE*^{-/-}) δεν παρατηρούνται καθόλου πλάκες θετικές για Θειοφλαβίνη-*S* σε καμία περιοχή του εγκεφάλου (**A**, μεσαία στήλη). Επιπλέον, οι εναποθέσεις *Aβ* (**B**, μεσαία στήλη) είναι λιγότερες και παρατηρούνται μόνο στον υπόκαμπο. Ποντίκια ετερόζυγα για την *ApoE* (*APP*^{V717F+/-} *ApoE*^{+/-}, δεξιά στήλη) έχουν ενδιάμεσο φαινότυπο. Από *Bales et al.*, 1999, *PNAS* 96(26):15233-15238.

1.8.4. *APOE* και απομάκρυνση του *Aβ*

Η *APOE* είναι επίσης υπεύθυνη για την απομάκρυνση του *Aβ* καθώς η πρόσδεση της σ' αυτό μειώνει την τοξικότητα του *Aβ* σε κυτταροκαλλιέργειες. Η προστασία από τη νευροτοξικότητα του *Aβ* δείχθηκε σε πρωτογενείς καλλιέργειες πυραμιδικών νευρώνων από αρουραίο στις οποίες προστέθηκε εξωγενώς *APOE3*. Πιθανότατα το *Aβ* απομακρύνεται μέσω του σχηματισμού συμπλέγματος *APOE3/Aβ* και της πρόσληψής του από τους υποδοχείς της *APOE* (Huang et al., 2004b, Jordan et al., 1998) (**Εικόνα 1.15**). Η ισχυρή πρόσδεση της *APOE3* στο *Aβ* και η συνακόλουθη απομάκρυνσή του μειώνει τη νευροτοξικότητα του αμυλοειδούς. Με αυτό τον τρόπο η *APOE3* προστατεύει από τον επαγόμενο από το *Aβ* κυτταρικό θάνατο και την απόπτωση (Jordan et al., 1998, LaDu et al., 1994, LaDu et al., 1995).



Εικόνα 1.15. Επίδραση της APOE στο μεταβολισμό και την εναπόθεση του Αβ. Η APOE από τα αστροκύτταρα και τη μικρογλοία λιπιδιώνεται από το μεταφορέα ABCA1. Στον εξωκυττάριο χώρο η APOE προσδέεται στο διαλυτό Αβ ανάλογα με την ισομορφή (APOE2>APOE3>APOE4). Η APOE ενδοκυτταρώνεται στους διάφορους κυτταρικούς τύπους μέσω του LRP-1 και του LDLR. Στον αιματοεγκεφαλικό φραγμό το διαλυτό Αβ μεταφέρεται πρωταρχικά από το μεσοκυττάριο υγρό στην κυκλοφορία του αίματος από τον LRP-1 και τη Ρ-γλυκοπρωτεΐνη (P-gP)(Cirrito et al., 2005, Zlokovic, 2008). Η APOE, επίσης, μειώνει την αποβολή του Αβ από τον εγκέφαλο μέσω του αιματοεγκεφαλικού φραγμού ανάλογα με την ισομορφή (APOE4>APOE3>APOE2)(Bell et al., 2007, Deane et al., 2008, Ito et al., 2007). Τροποποιημένο από Kim J. et al., 2009, Neuron 63:287-303.

Τα κύρια μονοπάτια απομάκρυνσης του Αβ περιλαμβάνουν απομάκρυνση από τα κύτταρα (νευρώνες και γλοία) του παρεγχύματος του εγκεφάλου διαμέσου του μονοπατιού αποστράγγισης του μεσοκυττάρια υγρού (interstitial fluid drainage pathway) ή του αιματοεγκεφαλικού φραγμού καθώς και από την πρωτεολυτική αποικοδόμηση από ενδοπεπτιδάσες (Bu, 2009).

Η πρόσληψη του Αβ και η απομάκρυνσή του, φαίνεται πως διέπεται από τους υποδοχείς της APOE που προσδέονται το Αβ άμεσα ή έμμεσα με την βοήθεια πρωτεϊνών-συνοδών (chaperones). Η APOE είναι η πιο καλά χαρακτηρισμένη πρωτεΐνη-συνοδός του Αβ και δρα ως πρωτεΐνη απομάκρυνσης του πεπτιδίου στον εξωκυττάριο χώρο. Η περιοχή

της πρωτεΐνης η οποία προσδένει το Αβ εντοπίζεται στην καρβοξυτελική περιοχή της όπου προσδένονται και οι λιποπρωτεΐνες (**Εικόνα 1.1**) (Iurescia et al., 2010) .

Η επίδραση των ισομορφών της ΑΡΟΕ στη συσσωμάτωση του Αβ μελετήθηκε αρχικά *in vitro*. Από τις μελέτες αυτές δείχθηκε ότι η ΑΡΟΕ σχηματίζει συμπλέγματα με το Αβ τα οποία δεν αποδιατάσσονται από SDS. Επίσης, δείχθηκε ότι η μη λιπιδιωμένη ΑΡΟΕ4 προσδένεται στο Αβ πιο γρήγορα από όσο η ΑΡΟΕ3 (Sanan et al., 1994, Strittmatter et al., 1993b). Ωστόσο, μεταγενέστερες μελέτες αναφέρουν ότι οι λιπιδιωμένες ΑΡΟΕ2 και ΑΡΟ3 σχηματίζουν συμπλέγματα με το Αβ, σταθερά στο SDS, σε πολύ μεγαλύτερο βαθμό σε σχέση με την ΑΡΟΕ4 (Aleshkov et al., 1997, LaDu et al., 1994, Yang et al., 1997). Οι περισσότερες μελέτες δείχνουν ότι η ταχύτητα σχηματισμού συμπλέγματος λιπιδιωμένης ΑΡΟΕ-Αβ ακολουθεί τη σχέση ΑΡΟΕ2>ΑΡΟΕ3>>ΑΡΟΕ4 (Tokuda et al., 2000). Εφόσον η ικανότητα πρόσδεσης των ισομορφών της ΑΡΟΕ με το Αβ είναι αντιστρόφως ανάλογη προς την πιθανότητα ανάπτυξης της νόσου AD, έχει διατυπωθεί η υπόθεση ότι η ΑΡΟΕ2 και η ΑΡΟΕ3 αυξάνουν την απομάκρυνση του Αβ περισσότερο συγκριτικά με την ΑΡΟΕ4. Τα κατάλοιπα 12-28 του Αβ φαίνεται να περιέχουν την περιοχή πρόσδεσης για την ΑΡΟΕ (Strittmatter et al., 1993a, Strittmatter et al., 1993b). Αυτή η περιοχή του Αβ έχει μελετηθεί επισταμένως ούτως ώστε να παρεμποδιστεί η αλληλεπίδραση μεταξύ ΑΡΟΕ και Αβ (Ma et al., 1996, Sadowski et al., 2006).

Όταν η ΑΡΟΕ είναι προσδεμένη σε λιποπρωτεΐνες, το Αβ εντοπίζεται μέσα στο λιπιδικό περιβάλλον του σωματιδίου της λιποπρωτεΐνης. Επομένως, η αλληλεπίδραση με το Αβ επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό την ικανότητα πρόσδεσης της ΑΡΟΕ με τα λιπίδια, γεγονός το οποίο έχει επιπτώσεις όχι μόνο στην εναπόθεση του πεπτιδίου αλλά και στη συσσώρευση χοληστερόλης στον εξωκυττάριο χώρο. Επιπρόσθετα, το Αβ επιδρά διαφορετικά στην πρόσδεση των ισομορφών της ΑΡΟΕ στους υποδοχείς της επηρεάζοντας τον κυτταρικό μεταβολισμό των λιποπρωτεϊνών και της χοληστερόλης (Hone et al., 2005, Martins et al., 2006).

Ο κύριος τρόπος απομάκρυνσης του κυκλοφορούντος Αβ διαμέσου του αιματοεγκεφαλικού φραγμού συμβαίνει μέσω πρόσληψης από τον LRP-1 και επηρεάζεται από την πρόσδεση μορίων-προσδετών όπως η ΑΡΟΕ και η α2-μακροσφαιρίνη (α2-macroglobulin). Οι αντιδράσεις αυτές είναι μειωμένες στη νόσο του Alzheimer (Martins et al., 2006, Shibata et al., 2000, Zlokovic, 2004). Η αποβολή του Αβ από τον εγκέφαλο είναι σημαντικά μειωμένη σε ποντίκια ApoE^{-/-} καθώς και σε γηρασμένα ποντίκια φυσικού τύπου

σε σχέση με αντίστοιχα ενήλικα (Shibata et al., 2000). Η APOE επηρεάζει την απομάκρυνση του Αβ από τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό ανάλογα με την ισομορφή. Πρόσδεση του Αβ στην APOE4 έχει ως συνέπεια η απομάκρυνση του Αβ από τον εγκέφαλο στην κυκλοφορία να γίνεται μέσω του υποδοχέα για τις λιποπρωτεΐνες VLDL (very low-density lipoprotein receptor, VLDLR) αντί μέσω του LRP-1 που είναι ο φυσιολογικός υποδοχέας απομάκρυνσης. Ο VLDLR μεταφέρει τα συμπλέγματα APOE4-Αβ διαμέσου του αιματοεγκεφαλικού φραγμού με πολύ πιο αργό ρυθμό σε σχέση με τον LRP-1. Αντίθετα η APOE2 και η APOE3 καθώς και τα συμπλέγματα APOE2-Αβ και APOE3-Αβ απεκκρίνονται στην κυκλοφορία διαμέσου του αιματοεγκεφαλικού φραγμού με μεγαλύτερη ταχύτητα απ' ό,τι τα συμπλέγματα APOE4-Αβ (Deane et al., 2008).

Το Αβ επηρεάζει τη βιωσιμότητα των νευρώνων ανάλογα με τη συσσωμάτωσή του. Τα ολιγομερή του Αβ₄₂ εμποδίζουν τη βιωσιμότητα των κυττάρων περισσότερο από τα ινίδια Αβ₄₂ και το μη συσσωματωμένο Αβ₄₂ (Dahlgren et al., 2002). Τα ολιγομερή του Αβ₄₂ που προέρχονται από εγκεφάλους ασθενών με Alzheimer και από διαγονιδιακά μοντέλα ποντικών τύπου Alzheimer είναι πολύ νευροτοξικά και αναστέλλουν τη συναπτική πλαστικότητα και τη μνήμη (Lesne et al., 2006, Shankar et al., 2008). Η νευροτοξικότητα που προκαλείται από τα ολιγομερή Αβ₄₂ επηρεάζεται από την APOE, με σειρά κατάταξης νευροτοξικότητας APOE4>APOE3>APOE2>APOE του ποντικού. Η APOE4 δρα συνεργιστικά με το ολιγομερές Αβ₄₂ ως προς την πρόκληση νευροτοξικότητας (Manelli et al., 2007).

Ένας δεύτερος μηχανισμός μείωσης του Αβ στα θηλαστικά είναι μέσω της αποικοδόμησης του πεπτιδίου από ενδοπεπτιδάσες. Η Νεπριλυσίνη (neprilysin, NEP), μια μεταλλοπρωτεάση η οποία αποικοδομεί το Αβ, και το ένζυμο αποικοδόμησης της ινσουλίνης (insulin-degrading enzyme, IDE), εκφράζονται στους νευρώνες, τη γλοία και τα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων του εγκεφάλου. Τα δύο ένζυμα διασπούν το Αβ εξωκυττάρια (NEP) και ενδοκυττάρια (IDE) και έχουν πολύ σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση των επιπέδων του Αβ στον εγκέφαλο (Leissring, 2008). Στη μελέτη από τους Jiang και συνεργάτες, η οποία έγινε σε διαγονιδιακά ποντίκια και καλλιέργειες από μικρογλοία και αστροκύτταρα, δείχθηκε ότι η APOE διευκολύνει την πρωτεολυτική αποικοδόμηση του διαλυτού Αβ μέσω διαφορετικής επίδρασης που έχει στη NEP και την IDE ανάλογα με την ισομορφή και τη λιπιδίωσή της. Η λιπιδιωμένη APOE προάγει την πρωτεόλυση του Αβ από τα δύο ένζυμα, ενώ η μη λιπιδιωμένη APOE προάγει τη συσσωμάτωσή του. Επίσης στην ίδια μελέτη δείχθηκε ότι η ισομορφή APOE4 προάγει σε μικρότερο βαθμό την πρωτεόλυση

του Αβ σε σχέση με τις ισομορφές ΑΡΟΕ2 και ΑΡΟΕ3 (Jiang et al., 2008). Επιπλέον, έχει δείχθει ότι φτωχή σε λιπίδια ΑΡΟΕ οδηγεί σε αύξηση σχηματισμού αμυλοειδών πλακών στους εγκεφάλους διαγονιδιακών ποντικών APP (Wahrle et al., 2004).

Η συσσωμάτωση του Αβ ήταν ιδιαίτερα αυξημένη στους εγκεφάλους ποντικών με στοχευόμενη αντικατάσταση της ΑΡΟΕ τους με ΑΡΟΕ4 (ποντίκια ΑροΕ4-TR) (Sullivan et al., 2004). Σε αυτά τα ποντίκια επάγεται αναστολή του ενζύμου ΝΕΡ το οποίο πρωτεολύει το Αβ. Τα συσσωματώματα της ΑΡΟΕ4 και του Αβ₄₂ πιθανότατα συνεισφέρουν αθροιστικά στην επαγωγή της λυσοσωμικής ενεργοποίησης και του νευροεκφυλισμού με αποτέλεσμα την αύξηση των γνωστικών δυσλειτουργιών στα ποντίκια ΑροΕ4-TR (Belinson et al., 2008).

Πρόσφατα ο ΑΡΟΕ4-εξαρτώμενος νευροεκφυλισμός ο οποίος διαμεσολαβείται από το Αβ συσχετίστηκε με φλεγμονώδη ενεργοποίηση ειδική για τον εγκέφαλο. Στα διαγονιδιακά ποντίκια που εκφράζουν τις ανθρώπινες ισομορφές της ΑΡΟΕ η ενεργοποίηση του καταρράκτη του αμυλοειδούς είχε ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της μικρογλοίας (μικρογλοίωση) και των αστροκυττάρων (αστροκυττάρωση) στον υπόκαμπο των ΑροΕ4-TR ποντικών αλλά όχι στα ΑροΕ3-TR ποντίκια (Belinson and Michaelson, 2009).

1.8.5. Επίπεδα των ισομορφών της ΑΡΟΕ στον εγκέφαλο

Δεδομένης της επίδρασης που έχει η ΑΡΟΕ στην εμφάνιση και την ανάπτυξη της νόσου AD, έγιναν πολλές μελέτες για να διαπιστωθεί εάν υπάρχουν διαφορές στα επίπεδα της ΑΡΟΕ μεταξύ ασθενών με Alzheimer και φυσιολογικών ατόμων. Έρευνες σε εγκεφάλους και σε ΕΝΥ ασθενών δεν έδωσαν σαφή αποτελέσματα λόγω διαφορών στη μεθοδολογία που ακολούθησε η κάθε ερευνητική ομάδα (Landen et al., 1996, Lefranc et al., 1996, Lehtimaki et al., 1995, Lindh et al., 1997, Mulder et al., 1998). Σε μια πρόσφατη μελέτη, όπου οι ερευνητές προσπάθησαν να τυποποιήσουν τον τρόπο συλλογής του ΕΝΥ, δε βρέθηκε καμία διαφορά στα επίπεδα της ΑΡΟΕ στο ΕΝΥ μεταξύ γνωστικά φυσιολογικών ατόμων και ασθενών με μέτρια ή σοβαρή άνοια (Wahrle et al., 2007). Οι μελέτες για τα επίπεδα της ΑΡΟΕ στο παρέγχυμα του εγκεφάλου είναι αντικρουόμενες λόγω αφενός του μικρού αριθμού ασθενών οι οποίοι κάνουν δωρεά τον εγκέφαλό τους και αφετέρου της διαφοράς στην καθυστέρηση που υπάρχει μετά το θάνατο στην επεξεργασία των δειγμάτων (Beffert et al., 1999, Bray et al., 2004, Growdon et al., 1999, Harr et al., 1996, Lambert et al., 1997, Pirttila et al., 1996a, Pirttila et al., 1996b).

Λόγω του περιορισμένου αριθμού και της δυσκολίας εξεύρεσης ανθρώπινων εγκεφάλων, τα επίπεδα των ισομορφών της APOE στον εγκέφαλο μελετήθηκαν σε ποντίκια ApoE-TR που εκφράζουν τις ισομορφές της APOE υπό τα ρυθμιστικά στοιχεία και τον υποκινητή της muAPOE (Hamanaka et al., 2000, Sullivan et al., 2008, Sullivan et al., 2004). Λόγω του ότι τα ποντίκια αυτά εκφράζουν την APOE υπό τη φυσιολογική ρύθμιση του ενδογενούς υποκινητή της, τα πρωτεϊνικά επίπεδά της αντικατοπτρίζουν τη φυσική σύνθεση και την ταχύτητα μεταβολισμού της στο ΚΝΣ του ποντικού.

Μια πρώιμη μελέτη έδειξε ότι δεν υπήρχαν διαφορές ανάμεσα στα επίπεδα των ισομορφών της APOE (Sullivan et al., 2004). Επόμενες, ωστόσο, μελέτες έδειξαν διαφορά στα επίπεδα της APOE στον εγκέφαλο και το ENY των ApoE-TR ποντικών ανάλογα με το γονότυπο (ApoE2>ApoE3>>ApoE4) (Fryer et al., 2005a, Mann et al., 2004, Ramaswamy et al., 2005, Riddell et al., 2008, Vitek et al., 2009). Μία πιθανή εξήγηση είναι ότι η αποικοδόμηση και η απομάκρυνση της APOE4 από το ΚΝΣ είναι αυξημένη σε σχέση με τις άλλες ισομορφές. Αυτό μπορεί να οφείλεται είτε στη διαφορική πρόσδεση της APOE4 για τους υποδοχείς της υπεροικογένειας των LDLR είτε στις δομικές διαφορές της που επηρεάζουν τη σταθερότητά της στο ΚΝΣ. Σε μια επόμενη μελέτη, *in vitro*, δείχθηκε ότι η APOE4 αποικοδομείται πολύ πιο γρήγορα συγκριτικά με την APOE2 και την APOE3 σε πρωτογενείς καλλιέργειες αστροκυττάρων ποντικού (Riddell et al., 2008).

Επίσης, διασταύρωση των ποντικών ApoE-TR που εκφράζουν τις τρεις ανθρώπινες ισομορφές της APOE με τα ποντίκια PDAPP, που εκφράζουν μια μεταλλαγμένη μορφή της ανθρώπινης APP και έχουν παθολογία τύπου Alzheimer, έδειξε ότι τα γηρασμένα PDAPP;ApoE4-TR ποντίκια είχαν τα υψηλότερα επίπεδα Αβ και αυξημένο σχηματισμό αμυλοειδών πλακών στον εγκέφαλο σε σχέση με τα PDAPP;ApoE3-TR και τα PDAPP;ApoE2-TR ίδιας ηλικίας (Bales et al., 2009). Επιπρόσθετα, τα PDAPP;ApoE4-TR είχαν μειωμένα επίπεδα APOE στο πλάσμα, τον εγκέφαλο και το ENY σε σχέση με τα άλλα ποντίκια (Bales et al., 2009, Riddell et al., 2008). Ακόμη, στα γηρασμένα PDAPP;ApoE4-TR ποντίκια το 90% της APOE βρισκόταν σε σύμπλεγμα με το Αβ, σε αντίθεση με μόλις 25% της πρωτεΐνης στα PDAPP;ApoE2-TR ποντίκια (Bales et al., 2009). Τα PDAPP;ApoE2-TR είχαν τα υψηλότερα επίπεδα διαλυτής APOE και τα χαμηλότερα επίπεδα Αβ₄₂. Σε νεαρά ποντίκια PDAPP;ApoE4-TR τα επίπεδα του διαλυτού Αβ₄₂ ήταν αυξημένα σε σχέση με τα άλλα δύο μοντέλα σε μια ηλικία όπου ακόμα δεν έχει αρχίσει ο σχηματισμός αμυλοειδών πλακών (Bales et al., 2009).

Επίσης στα ποντίκια PDAPP;ApoE2-TR υπήρχε μια μικρή αλλά στατιστικά σημαντική μείωση στα ολικά επίπεδα της APP στον ιππόκαμπο (Bales et al., 2009).

Τα επίπεδα του mRNA των τριών αλληλόμορφων της ApoE δεν είχαν διαφορά ανάμεσα στα ποντίκια ApoE-TR. Κατά συνέπεια οι διαφορές οφείλονται σε μετα-μεταφραστικούς μηχανισμούς. Από αυτό συνάγεται ότι τα μειωμένα επίπεδα της πρωτεΐνης στον εγκέφαλο των ποντικών ApoE4-TR οδηγούν σε αυξημένα επίπεδα Αβ και αμυλοειδών πλακών (Bales et al., 2009). Στον **πίνακα 1** παρατίθενται συνοπτικά τα κυριότερα ευρήματα απο γενετικά τροποποιημένα ποντίκια για την APOE σε σχέση με τη νόσο του Alzheimer.

Πίνακας 1. Συνοπτικά αποτελέσματα μελετών της ΑροΕ για τη νόσο του Alzheimer σε γενετικά τροποποιημένα ποντίκια

Μοντέλο ποντικού ΑροΕ	Διαγονιδιακό μοντέλο APP	Πρωτεΐνη Ταυ	Εναπόθεση αμυλοειδούς/ πλακών	Φλεγμονώδης απόκριση	Νευρο-εκφυλισμός
ΑροΕ4 (Δ272–299) (Harris et al., 2003)	Όχι	Αυξημένη p-Tau (Harris et al., 2003)	Δεν αναφέρθηκε	Δεν αναφέρθηκε	Αυξημένος νευροεκφυλισμός (Harris et al., 2003)
ΑροΕ4 (Δ241–299) (Harris et al., 2003)	Όχι	Φυσιολογικά επίπεδα (Harris et al., 2003)	Δεν αναφέρθηκε	Δεν αναφέρθηκε	Όχι (Harris et al., 2003)
ΑροΕ-/- (Piedrahita et al., 1992)	APP23 (Sturchler-Pierrat et al., 1997)	Απουσία νευροϊνιδιακών δεματίων	Ενδοκυττάριο Αβ	Μικρογλοΐωση στα ΑροΕ-/- στα ίδια επίπεδα με τα APPαΕ (Tibolla et al., 2010)	Όχι
ΑροΕ-/- (Piedrahita et al., 1992)	PDAPP (Games et al., 1995)	Απουσία νευροϊνιδιακών δεματίων	Καθόλου σχηματισμός αμυλοειδών πλακών μέχρι την ηλικία των 2 χρόνων (Bales et al., 1999, Bales et al., 1997, Holtzman et al., 1999), καθόλου CAA (Fryer et al., 2003)		Όχι
ΑροΕ-/- (Piedrahita et al., 1992)	Tg2576 (Hsiao et al., 1996)	Απουσία νευροϊνιδιακών δεματίων	Απουσία αμυλοειδών πλακών και CAA (Fryer et al., 2003, Holtzman et al., 2000b)		Όχι (Holtzman et al., 2000b)
GFAP-ΑροΕ3 (Sun et al., 1998)	PDAPP (Games et al., 1995)		Μειωμένη εναπόθεση σε μικρή ηλικία (Holtzman et al., 1999). Σε μεγαλύτερα ζώα υπήρχε εναπόθεση αλλά σε πολύ μικρότερο βαθμό σε σχέση με τα ποντίκια GFAP-ΑροΕ4;PDAPP (Holtzman et al., 2000a)		Δυστροφικοί νευρίτες γύρω από τις αμυλοειδείς πλάκες (Holtzman et al., 2000a)
GFAP-ΑροΕ4 (Sun et al., 1998)	PDAPP (Games et al., 1995)		Μειωμένη εναπόθεση σε μικρή ηλικία (Holtzman et al., 1999). Σε μεγαλύτερα ζώα υπήρχε τρεις φορές περισσότερη εναπόθεση σε σχέση με τα ποντίκια GFAP-ΑροΕ3;PDAPP (Holtzman et al., 2000a)		Δυστροφικοί νευρίτες γύρω από τις αμυλοειδείς πλάκες (Holtzman et al., 2000a)

GFAP-ApoE2(Fagan et al., 2002)	PDAPP (Games et al., 1995)		Καθόλου σχηματισμός αμυλοειδών πλακών. Η εναπόθεση του διαλυτού Αβ έχει το ίδιο πρότυπο με των ApoE-/- (Fagan et al., 2002)		Όχι
NSE-ApoE3 (Raber et al., 1998)	J9 (Hsia et al., 1999)	Όχι	Ελάχιστες πλάκες σε ηλικία 15 μηνών (Buttini et al., 2002)		Μειωμένη συναπτοφυσίνη μετά την ηλικία των 19 μηνών (Buttini et al., 2002)
NSE-ApoE4 (Raber et al., 1998)**	J9 (Hsia et al., 1999)	Όχι	Αυξημένη εναπόθεση αμυλοειδών πλακών σε σχέση με τα ποντίκια NSE-ApoE3 στην ηλικία των 15 μηνών (Buttini et al., 2002)		Μειωμένη συναπτοφυσίνη μετά την ηλικία των 12 μηνών (Buttini et al., 2002)
ApoE-/- (Piedrahita et al., 1992)	PDAPP x PSEN1 _{M146L} (Citron et al., 1997)		Αυξημένη εναπόθεση Αβ στον ιππόκαμπο των ποντικών ApoE-/- και μειωμένα επίπεδα θετικής ανοσοαντίδρασης στο φλοιό (ανοσοϊστοχημεία για το Αβαχ Ελάχιστες πλάκες στα ApoE-/- (Costa et al., 2004)		Όχι
ApoE-/- (Piedrahita et al., 1992)	TgSweDl (Davis et al., 2004)		Ελάχιστες πλάκες σε ποντίκια ApoE-/- ηλικίας 12 μηνών (Miao et al., 2005)	Μειωμένη αστροκυττάρωση και μικρογλοΐωση στα ποντίκια ApoE-/- (Miao et al., 2005)	
APOE3-TR (targeted replacement) (Sullivan et al., 1997)	Tg2576 (Hsiao et al., 1996)		Ελάχιστος σχηματισμός αμυλοειδών πλακών (σχεδόν παντελής απουσία πλακών) σε σχέση με τα Tg2576;APOE4-TR και τα Tg2576;ApoE+/+ (Fryer et al., 2005b)		
APOE4-TR (targeted replacement) (Knouff et al., 1999)	Tg2576 (Hsiao et al., 1996)		Μειωμένος σχηματισμός αμυλοειδών πλακών σε σχέση με τα Tg2576;ApoE+/+ (Fryer et al., 2005b). Η εναπόθεση του αμυλοειδούς μετατοπίστηκε από το παρέγχυμα στα αγγεία (CAA)		

APOE3-TR (targeted replacement) (Sullivan et al., 1997)	TgSweDI (Davis et al., 2004)		Μειωμένος σχηματισμός αμυλοειδών πλακών στα ποντίκια ApoE3-TR σε σχέση με τα ποντίκια TgSweDI τα οποία είχαν τη μ ApoE (Xu et al., 2008)	Αυξημένη αστροκυττάρωση στο θάλαμο σε σχέση με τα ποντίκια τα οποία έχουν τη μ ApoE, αλλά μειωμένη σε σχέση με τα ποντίκια ApoE4-TR. Αυξημένη μικρογλοΐωση στο μετωπιαίο και τον κροταφικό φλοιό, μειωμένη μικρογλοΐωση στο θάλαμο. Μειωμένη μικρογλοΐα γύρω από τα αγγεία αλλά αυξημένη μικρογλοΐα στο παρέγχυμα (Xu et al., 2008).	
APOE4-TR (targeted replacement) (Knouff et al., 1999)	TgSweDI (Davis et al., 2004)		Αυξημένος σχηματισμός αμυλοειδών πλακών σε όλες τις περιοχές του εγκεφάλου των ποντικών ApoE4-TR σε σχέση με ποντίκια TgSweDI τα οποία είχαν τη μ ApoE. Λιγότερος σχηματισμός πλακών σε σχέση με τα ποντίκια ApoE3-TR (Apo θάλαμο και το υπόθεμα του υποκάμπτου) (Xu et al., 2008)	Αυξημένη αστροκυττάρωση στο μετωπιαίο και τον κροταφικό φλοιό σε σχέση με τα ποντίκια TgSweDI/ApoE+/+ με τη μ ApoE. Αυξημένη μικρογλοΐωση μόνο στο μετωπιαίο και κροταφικό φλοιό. Μειωμένη μικρογλοΐωση γύρω από τα αγγεία αλλά αυξημένη παρεγχυματική μικρογλοΐωση (Xu et al., 2008)	
GFAP-ApoE4 (Tesseur et al., 2000)	APP London [V717I]	Καμία επίδραση στα επίπεδα της p-Tau	Η παρουσία της ApoE4 στους νευρώνες αύξησε το σχηματισμό αμυλοειδών πλακών σε σχέση με τα ποντίκια GFAP-ApoE4 στο APP γενετικό υπόβαθρο. Καμία διαφορά δεν παρατηρήθηκε στον αριθμό των αμυλοειδών πλακών (Van Dooren et al., 2006).	Δε μελετήθηκε	Δε μελετήθηκε
Thy1-ApoE4 (Tesseur et al., 2000)	και APP London [V717I]xPSEN1 [246E] (Dewachter et al., 2000)				

*Ο σχηματισμός αμυλοειδών πλακών είναι μ APOE>>APOE4>>APOE3>APOE2 στα διαγονιδιακά μοντέλα με παθολογία τύπου Alzheimer APP_{Swe} wezheim_{ind} (Fagan et al., 2002). **Τα ποντίκια NSE-E4 έχουν αυξημένο νευρωνικό θάνατο μετά από επαγωγή νευροτοξικότητας με καϊνικό οξύ σε σχέση με τα ποντίκια NSE-ApoE3. Επίσης έχουν αυξημένα επίπεδα υπερφοσφωρυλιωμένης πρωτεΐνης Ταυ στους εγκεφάλους τους (Brecht et al., 2004).

1.8.6. Ο LDLR και η επίδραση του στην παθοφυσιολογία της νόσου Alzheimer - Μελέτες σε διαγονιδιακά μοντέλα ποντικών

Δεδομένης της φυσιολογικής αλληλεπίδρασης μεταξύ της APOE και του Αβ οι λιποπρωτεΐνες που περιέχουν APOE πιθανότατα αλλάζουν τη μεταβολική μοίρα του Αβ. Έχουν γίνει εκτεταμένες μελέτες για τον πιθανό ρόλο που παίζουν οι υποδοχείς της υπεροικογένειας των LDLR και οι μεταφορείς ABCA1 (ABCA1 ATP-binding cassette, sub-family A, member 1) δεδομένου ότι η απομάκρυνση (clearance) του Αβ επηρεάζεται από τους υποδοχείς που προσδένουν την APOE.

Η επίδραση του LRP-1 στην APP και το Αβ έχει μελετηθεί επισταμένως και ο ρόλος του στην παθογένεση της νόσου του Alzheimer είναι αποδεδειγμένος. Η πιθανή εμπλοκή, όμως, του κυριότερου υποδοχέα της APOE στον εγκέφαλο, του LDLR, στην παθογένεση της AD δεν έχει μελετηθεί εκτεταμένα. Μερικοί πολυμορφισμοί του LDLR έχουν συσχετιστεί με αυξημένη πιθανότητα πρόκλησης AD σε σχέση με το φύλο (Lamsa et al., 2008, Zou et al., 2008).

Η έλλειψη του LDLR συσχετίστηκε με αυξημένη εναπόθεση αμυλοειδούς στο διαγονιδιακό μοντέλο ποντικού Tg2576 με παθολογία τύπου Alzheimer (Cao et al., 2006). Σε αυτή τη μελέτη βρέθηκε ότι τα Tg2576;Ldlr^{-/-} ποντίκια αναπτύσσουν και υπερχοληστεριναιμία. Προτού ακόμα να σχηματιστούν αμυλοειδείς πλάκες, τα ποντίκια αυτά ήταν υπερκινητικά και είχαν μειωμένη χωροταξική μνήμη. Με την αύξηση της ηλικίας και μετά από το σχηματισμό των αμυλοειδών πλακών η χωροταξική μνήμη των ποντικών αυτών μειώθηκε περαιτέρω. Δεν υπήρχε καμία διαφορά στα επίπεδα της APP στα ποντίκια αυτά, αλλά υπήρχε μια στατιστικά σημαντική αύξηση του σχηματισμού εναποθέσεων Αβ.

Αντίθετα, σε μια άλλη μελέτη της επίδρασης της απουσίας του LDLR στην οποία χρησιμοποιήθηκε το διαγονιδιακό μοντέλο ποντικού PDAPP, δείχθηκε ότι δεν υπήρχαν μεταβολές στα επίπεδα του Αβ σε νεαρά ή σε μεγάλης ηλικίας ζώα μολονότι υπήρχε μια τάση προς αυξημένη εναπόθεση αμυλοειδούς στα PDAPP;Ldlr^{-/-} (Fryer et al., 2005a). Στα εν λόγω ποντίκια η APOE ήταν αυξημένη τόσο στο ENY όσο και σε ομογενοποιημένα φλοιού. Επίσης η απουσία του LDLR οδήγησε σε αύξηση της χοληστερόλης της κυκλοφορίας αλλά δεν είχε καμία επίδραση στη χοληστερόλη του ιπτόκαμπου ή του ENY. Αυξημένη χοληστερόλη στο πλάσμα που προκλήθηκε από αθηρογενετική δίαιτα υψηλή σε λιπαρά σε διαγονιδιακά ποντίκια APP με έλλειψη του LDLR δεν επηρέασε τα επίπεδα του

Αβ στον εγκέφαλό τους (Elder et al., 2007) αν και επηρέασε την λειτουργική μνήμη των Ldlr-/- ποντικών σε μια άλλη μελέτη (Thirumangalakudi et al., 2008).

Μεταγενέστερη μελέτη στην οποία ο LDLR υπερεκφράστηκε στον εγκέφαλο του ποντικού οδήγησε στη μείωση των επιπέδων της APOE στον εγκέφαλο κατά 50-90% ανάλογα με τα επίπεδα έκφρασής του. Η υπερέκφραση του LDLR οδήγησε στη δραματική μείωση των επιπέδων Αβ και του σχηματισμού αμυλοειδών πλακών στον εγκέφαλο των ποντικών αυξάνοντας παράλληλα την απομάκρυνση του Αβ από τον εγκέφαλο. Στο ίδιο μοντέλο η τοπική φλεγμονώδης απόκριση γύρω από τις πλάκες ήταν μειωμένη (Kim et al., 2009b).

1.9. ΦΛΕΓΜΟΝΩΔΗΣ ΑΠΟΚΡΙΣΗ ΣΤΗ ΝΟΣΟ ΤΟΥ ALZHEIMER

Μία πολύ σημαντική παράμετρος που τελευταία βρίσκεται υπό έντονη μελέτη είναι η τοπική φλεγμονώδης απόκριση σε πολλές νευροεκφυλιστικές ασθένειες. Η φλεγμονή αυτή ορίζεται ως φλεγμονή του νευρικού συστήματος. Στην περίπτωση της νόσου του Alzheimer είναι γενικά αποδεκτό ότι η φλεγμονώδης απόκριση του νευρικού συστήματος συμβάλλει στην παθογένεσή της (Bales et al., 2000). Στους εγκεφάλους των ασθενών παρατηρείται μη φυσιολογική ενεργοποίηση της μικρογλοίας και των αστροκυττάρων (Kim et al., 2009a). Τα ενεργοποιημένα κύτταρα της γλοίας βρίσκονται γύρω από τις αμυλοειδείς πλάκες, υποδηλώνοντας ότι οι αμυλοειδείς πλάκες ή οι διαλυτές μορφές του Αβ (μη συσσωματωμένο) επάγουν φλεγμονώδη απόκριση.

1.9.1. Φλεγμονώδης απόκριση του νευρικού συστήματος

Η φλεγμονή (inflammation) είναι μια εξειδικευμένη ανοσολογική απόκριση του οργανισμού σε ένα παθογόνο-εισβολέα ή γενικά σε έναν επιβλαβή παράγοντα. Ο παράγοντας μπορεί να είναι ξένος ή εαυτός, όπως ένα νεκρωτικό κύτταρο, και η φλεγμονή μπορεί να είναι οξεία ή χρόνια. Η φλεγμονή υπό την κλασική της έννοια περιλαμβάνει έμφυτη και επίκτητη ανοσολογική απόκριση. Η έμφυτη φλεγμονώδης απόκριση περιλαμβάνει τυπικά τα μακροφάγα, τα φυσικά φονικά κύτταρα (natural killer cells), το σύστημα του συμπληρώματος, ένα μεγάλο αριθμό κυτοκινών, χημειοκινών, πρωτεϊνών οξείας φάσης (acute phase proteins) και μεταβολίτες αραχιδονικού οξέος (Akiyama et al., 2000, Eddleston and Mucke, 1993, Gasque et al., 2000, Mennicken et al., 1999). Η επίκτητη

φλεγμονώδης απόκριση χρησιμοποιεί τα ίδια διαλυτά μόρια-διαμεσολαβητές, T- και B-λεμφοκύτταρα και ειδικά αντισώματα.

Η ειδική φλεγμονώδης αντίδραση που παρατηρείται σχεδόν σε όλες τις νευροεκφυλιστικές ασθένειες, συμπεριλαμβανομένης και της νόσου του Alzheimer, ορίζεται ως φλεγμονή του νευρικού συστήματος και αποτελείται κυρίως από στοιχεία της έμφυτης ανοσολογικής απόκρισης. Η ενεργοποιημένη μικρογλοία και τα αστροκύτταρα είναι τα κύρια κύτταρα που λαμβάνουν μέρος σε αυτήν την απόκριση. Ουσιαστικά κάθε προσβολή του ΚΝΣ (π.χ. τραύμα, λοίμωξη, αυτοάνοσα νοσήματα και μεταβολικές δυσλειτουργίες) προκαλεί στα αστροκύτταρα και τη μικρογλοία την αύξηση της παραγωγής υποδοχέων και διαλυτών παραγόντων τα οποία φυσιολογικά παράγονται από τα λευκοκύτταρα, όπως το μείζον σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας II (MHC-II), οι υποδοχείς Toll, οι χημειοκίνες και οι κυτοκίνες (Hauwel et al., 2005). Η ανοσολογική απόκριση από τα μέλη του επίκτητου ανοσοποιητικού συστήματος και η διήθηση T-λεμφοκυττάρων και πολυμορφοπύρηνων στον εγκέφαλο είναι περιορισμένη στην AD αν και έχει αναφερθεί παρουσία T-λεμφοκυττάρων σε εγκεφάλους ασθενών και σε διαγονιδιακά μοντέλα ποντικών με παθολογία τύπου Alzheimer (Itagaki et al., 1988, Stalder et al., 2005).

Το 1948 ο Peter Medawar παρατήρησε ότι όταν ετερόλογοι ιστοί μεταμοσχεύονταν στο ΚΝΣ, αυτοί διέφευγαν της ανοσολογικής απόρριψης (Medawar, 1948). Αυτό το εύρημα τον οδήγησε στην υπόθεση ότι ο εγκέφαλος και το ανοσοποιητικό σύστημα υφίστανται ως δύο απομονωμένα μεταξύ τους συστήματα. Το δόγμα του εγκεφάλου ως «ανοσολογικά προνομιούχου» οργάνου, είχε γίνει γενικά αποδεκτό και οι ανοσολογικές αποκρίσεις στον εγκέφαλο γενικά μελετούνταν μόνο σε μερικές αυτοάνοσες ασθένειες. Παρόλα αυτά επιδημιολογικές μελέτες αποκάλυψαν ότι μακροχρόνια χρήση αντι-φλεγμονωδών φαρμάκων μειώνει την πιθανότητα πρόκλησης AD (McGeer et al., 1996, Vlad et al., 2008). Σήμερα ολοένα και περισσότερες έρευνες εισηγούνται ότι ο εγκέφαλος και το ανοσοποιητικό σύστημα διασυνδέονται μ' έναν περίπλοκο τρόπο και έχουν συνεχή ανταλλαγή πληροφοριών με σκοπό τη διατήρηση της ομοιόστασης. Πράγματι, κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος και διαβιβαστές βρίσκονται συχνά στο ΚΝΣ κάτω από φυσιολογικές και παθολογικές συνθήκες και οι νευρώνες είναι ικανοί να αλληλεπιδράσουν και να ρυθμίσουν τα κύτταρα του ανοσοποιητικού (Rogers et al., 1988, Syken and Shatz, 2003, Togo et al., 2002).

Μελέτες όπου συνδυάστηκαν μοντέλα ποντικών με διάφορες ανοσολογικές ελλείψεις με διαγονιδιακά μοντέλα ποντικών για νευροεκφυλιστικές νόσους έχουν ενισχύσει περαιτέρω τη θεωρία ότι το ανοσοποιητικό σύστημα παίζει σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη των νευρολογικών νόσων. Είναι ενδιαφέρον το γεγονός ότι η φυσιολογική γήρανση ενεργοποιεί επίσης ανοσολογική απόκριση και στρατολόγηση T- και B-λεμφοκυττάρων στον εγκέφαλο. Παρόλα τα ευρήματα ο ακριβής ρόλος του ανοσοποιητικού συστήματος στην εξέλιξη της AD παραμένει αδιευκρίνιστος.

1.9.2. Μικρογλοία και αστροκύτταρα

Η μικρογλοία είναι τα τοπικά μακροφάγα κύτταρα του εγκεφάλου και αποτελεί περίπου το 15% του συνόλου των κυττάρων του (Carson et al., 2006a). Τα κύτταρα αυτά προέρχονται από προγονικά κύτταρα της μυελοειδούς σειράς τα οποία μεταναστεύουν στο αναπτυσσόμενο ΚΝΣ κατά τα πολύ αρχικά στάδια της εμβρυογένεσης. Τα μικρογλοιακά κύτταρα έχουν μεσεγχυματική προέλευση (Ginhoux et al., 2010), σε αντίθεση με τα υπόλοιπα κύτταρα του ΚΝΣ που προέρχονται από το νευροεκτόδερμα (Carson et al., 2006b, Ransohoff and Perry, 2009). Υπό την επίδραση του μικροπεριβάλλοντος του ΚΝΣ τα πρόδρομα μικρογλοιακά κύτταρα ωριμάζουν και αναπτύσσουν λεπτές, μακριές απολήξεις που σχηματίζουν ένα τρισδιάστατο δίκτυο που καλύπτει όλο το παρέγχυμα του εγκεφάλου (Perry et al., 2010). Αν και αυτή η κυτταρική κατάσταση συχνά αναφέρεται στη βιβλιογραφία ως μικρογλοία «σε ηρεμία» (resting microglia), πρόσφατες μελέτες *in vivo* έδειξαν ότι οι απολήξεις της μικρογλοίας εξερευνούν συνεχώς και ελέγχουν το τοπικό περιβάλλον (Davalos et al., 2005, Nimmerjahn et al., 2005), όπως ακριβώς αναμένεται να κάνουν τα μακροφάγα των ιστών με λειτουργία επιτήρησης. Τοπική κυτταρική διαίρεση σε πολύ χαμηλά επίπεδα διατηρεί τους αριθμούς των κυττάρων στους εγκεφάλους των τρωκτικών (Lawson et al., 1992). Έχει δειχθεί ότι στα υγιή ζώα η μικρογλοία πολύ σπάνια αντικαθίσταται από κύτταρα προερχόμενα από το μυελό των οστών (Ajami et al., 2007, Mildner et al., 2007).

Παρουσία του Αβ η μικρογλοία «ενεργοποιείται», αποκτά αμοιβαδοειδές σχήμα και φαγοκυτταρικό χαρακτήρα με παράλληλη αύξηση της έκκρισης κυτοκινών και ενεργών ριζών οξυγόνου (reactive oxygen species, ROS). Πειραματικά δεδομένα υποστηρίζουν ότι αρχικά η μικρογλοία ενεργοποιείται από το πεπτίδιο και το φαγοκυτταρώνει αλλά σε πιο προχωρημένα στάδια της νόσου η μικρογλοία γίνεται μη λειτουργική με αποτέλεσμα να

μην μπορεί να φαγοκυτταρώσει άλλο Αβ ή να το αποικοδομήσει ενδοκυττάρια (Hickman et al., 2008).

Τα αστροκύτταρα είναι η δεύτερη ομάδα κυττάρων του εγκεφάλου τα οποία δρουν ως έμφυτα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος στον εγκέφαλο. Τα αστροκύτταρα εκτελούν κι άλλες λειτουργίες διατήρησης της ομοιόστασης στον εγκέφαλο συμπεριλαμβανομένων της σταθερότητας του εξωκυττάριου περιβάλλοντος και της σταθεροποίησης της κυτταρικής επικοινωνίας μέσα στο ΚΝΣ. Επιπρόσθετα, η ρύθμιση της ροής του αίματος στον εγκέφαλο και η διατήρηση της συναπτικής λειτουργίας είναι δύο ακόμη πολύ σημαντικές λειτουργίες τους. Επίσης, τα αστροκύτταρα έχουν κεντρικό ρόλο στη διατήρηση της ομοιόστασης του μεταβολισμού των νευρώνων και στη σύνθεση νευροδιαβιβαστών (Maragakis and Rothstein, 2006). Οι κυτταρικές λειτουργίες τους περιλαμβάνουν τη ρύθμιση του μεταβολισμού των αμινοξέων, των θρεπτικών συστατικών και των ιόντων του εγκεφάλου (Danbolt, 2001, Kofuji and Newman, 2004). Η πιο σημαντική μεταβολική λειτουργία τους είναι η μετατροπή του γλουταμινικού οξέος σε γλουταμίνη ούτως ώστε η γλουταμίνη να προσληφθεί από τους νευρώνες. Οι απολήξεις των αστροκυττάρων περιτυλίγουν τις νευρικές συνάψεις και οι τελικές απολήξεις τους βρίσκονται σε σύνδεση με τα αγγεία του εγκεφάλου. Με αυτό τον τρόπο υπάρχει συνεχής «επικοινωνία» μεταξύ νευρωνικής δραστηριότητας και ροής του αίματος η οποία διαμεσολαβείται από τα αστροκύτταρα μέσω της ενεργοποίησης μεταβολοτροπικών υποδοχέων του γλουταμινικού οξέος. Η ενεργοποίηση αυτών των υποδοχέων οδηγεί στην απελευθέρωση μεταβολιτών αραχιδονικού οξέος (Hirase, 2005). Το αποτέλεσμα είναι η τοπική αύξηση του ασβεστίου στις τελικές απολήξεις των αστροκυττάρων που με τη σειρά τους οδηγούν στη διαστολή των γειτονικών μικρών αρτηριών (Takano et al., 2006). Επίσης, τα αστροκύτταρα ελέγχουν τη διεγερσιμότητα μέσω ρύθμισης της μεταφοράς γλουταμινικού οξέος από τους υποδοχείς GLT1 και GLAST που εντοπίζονται κυρίως στις μεμβράνες των αστροκυττάρων (Chaudhry et al., 1995, Lehre et al., 1995).

Η ενεργοποίηση των αστροκυττάρων που προκαλείται από οποιαδήποτε επιβλαβή κατάσταση στον εγκέφαλο οδηγεί στην πάχυνση του κυτταρικού σώματος και στην αύξηση της έκφρασης της όξινης ινιδιακής πρωτεΐνης των αστροκυττάρων (glial fibrillary acidic protein, GFAP), ενός ενδιάμεσου ινιδίου ειδικού για τα αστροκύτταρα (Maragakis and Rothstein, 2006). Σε εγκεφάλους ασθενών με τη νόσο Alzheimer τα ενεργοποιημένα αστροκύτταρα βρίσκονται γύρω από τις αμυλοειδείς πλάκες στο μοριακό στρώμα του

φλοιού (Wisniewski and Wegiel, 1991). Τα αστροκύτταρα ενεργοποιούνται αφενός από το Αβ που παράγεται από τους νευρώνες και αφετέρου από τον τοπικό νευροεκφυλισμό (DeWitt et al., 1998). Το Αβ συσσωρεύεται και όταν υπερβεί μια κρίσιμη μάζα, τα αστροκύτταρα υφίστανται και αυτά κυτταρικό θάνατο με αποτέλεσμα τη δημιουργία αμυλοειδών πλακών θετικών για τη GFAP και το Αβ (Nagele et al., 2004). Πειραματικά δεδομένα υποστηρίζουν ότι η δυσλειτουργία των αστροκυττάρων οφείλεται στη διαταραχή της σηματοδότησης του ασβεστίου στα κύτταρα αυτά (Haughey and Mattson, 2003).

1.9.3. Ο ρόλος των προερχόμενων από το μυελό των οστών μακροφάγων στη νόσο του Alzheimer

Ιστολογικά τα μικρογλοιακά κύτταρα που εδρεύουν στο ΚΝΣ δεν μπορούν να διακριθούν από τα μακροφάγα που προέρχονται από το μυελό των οστών (bone marrow-derived macrophages) και εισέρχονται στο ΚΝΣ μετά από τραύμα. Και οι δύο κυτταρικοί τύποι εκφράζουν κλασικούς πρωτεϊνικούς δείκτες των μακροφάγων (IBA1, F4/80, mac-1) και επίσης αμφότεροι εκφράζουν επαγόμενα το MHC-II και άλλα συνδιεγερτικά μόρια (B7.1, B7.2 και CD40). Δύο πολύ σημαντικές ανακαλύψεις απέδειξαν το ρόλο των μακροφάγων που προέρχονται από το μυελό των οστών στο τραυματισμένο ΚΝΣ. Η πρώτη ανακάλυψη έγινε από τους Hickey και Kimura οι οποίοι έδειξαν ότι η παρεγχυματική μικρογλοία μπορεί να διαχωριστεί από τα περιφερικά ανοσολογικά κύτταρα, τα περιαγγειακά (perivascular) μακροφάγα/μικρογλοία, τα περικύτταρα και τα μακροφάγα του χοριοειδούς πλέγματος με βάση ένα μοναδικό χαρακτηριστικό γνώρισμα. Αυτό είναι ότι, σε αντίθεση με τα άλλα κύτταρα που ανανεώνονται κάθε μερικές εβδομάδες, η παρεγχυματική μικρογλοία σπάνια μόνο και με πολύ αργό ρυθμό αντικαθίσταται από κύτταρα προερχόμενα από το μυελό των οστών (Hickey and Kimura, 1988). Η δεύτερη ανακάλυψη προήλθε από τον Sedgwick και τους συνεργάτες του που έδειξαν ότι τα κύτταρα της μικρογλοίας, σε αντίθεση με τα περιφερικά μακροφάγα, εκφράζουν πολύ χαμηλότερα επίπεδα της πρωτεΐνης CD45, μιας φωσφατάσης τυροσίνης η οποία εκφράζεται από όλα τα εμπύρνηνα κύτταρα της αιμοποιητικής σειράς. Αυτή η διαφορά στην έκφραση είναι δύσκολο να διακριθεί ιστολογικά αλλά είναι αρκετά εμφανής όταν τα απομονωμένα κύτταρα του εγκεφάλου αναλυθούν με κυτταρομετρία ροής (Sedgwick et al., 1991). Η διαφορά αυτή στην έκφραση του CD45 πιθανότατα αντικατοπτρίζει διαφορές στη βιολογική λειτουργία μεταξύ μακροφάγων και μικρογλοίας.

Ο ρόλος των προερχόμενων από το μυελό των οστών μακροφάγων στην εξέλιξη της νόσου του Alzheimer μελετάται έντονα μετά τη δημοσίευση εργασιών που εισηγούνται ότι τα μακροφάγα εισέρχονται στο παρέγχυμα του εγκεφάλου ασθενών Alzheimer (Lee et al., 2009, Malm et al., 2005, Simard and Rivest, 2004, Simard et al., 2006). Επίσης έχει δειχθεί ότι αυτά είναι τα υπεύθυνα κύτταρα για τη φαγοκυττάρωση του Αβ αφού η μικρογλοία καθίσταται δυσλειτουργική στη νόσο (Hickman et al., 2008, Simard et al., 2006). Διάφορες ομάδες προσπαθούν να αναπτύξουν θεραπείες με στόχο να αυξήσουν τη διήθηση μακροφάγων από την περιφέρεια στον εγκέφαλο ασθενών με τη νόσο Alzheimer. Ένα πρόσφατο παράδειγμα είναι η μελέτη από τους Lebson και συνεργάτες οι οποίοι μεταμόσχευσαν σε ποντίκια κύτταρα μυελού των οστών θετικά για CD11b, τα οποία είναι κυρίως μονοκύτταρα, ως οχήματα μεταφοράς μιας εκκρινόμενης μορφής της NEP. Στη μελέτη αυτή έδειξαν ότι τα κύτταρα αυτά εισέρχονται στον εγκέφαλο των ζώων χωρίς τη χρήση ακτινοβολίας και εμποδίζουν την εναπόθεση αμυλοειδών πλακών. Σε αυτά τα ζώα ο εντοπισμός των θετικών για CD11b κυττάρων βρίσκεται μόνο σε ποντίκια με αμυλοειδείς εναποθέσεις και, επίσης, ο αριθμός των κυττάρων τα οποία εντοπίζονται στο παρέγχυμα είναι ανάλογος της πυκνότητας των αμυλοειδών πλακών (Lebson et al., 2010).

1.9.4. APOE και φλεγμονώδης απόκριση

Το Αβ προκαλεί φλεγμονώδη απόκριση από τα κύτταρα της γλοίας σε καλλιέργειες και σε ιστοπαθολογικά ευρήματα από ασθενείς (Hu et al., 1998). Επίσης το Αβ αυξάνει την παραγωγή της APOE και τα αυξημένα επίπεδα εκείνης μειώνουν τη φλεγμονή του νευρικού συστήματος που επάγεται από το Αβ, πιθανότατα δρώντας ως μηχανισμός ανάδρασης (Guo et al., 2004, LaDu et al., 2001). Επιπλέον, η έμφυτη φλεγμονώδης αντίδραση (innate immune response) ρυθμίζεται επίσης από την APOE και τον LRP-1 υποδηλώνοντας ότι η APOE έχει γενική αντιφλεγμονώδη δράση (LaDu et al., 2000). Σε συμφωνία με την αντιφλεγμονώδη δράση της APOE στα πειράματα *in vitro* έχει δειχθεί σε ζώα χωρίς ενδογενή APOE αυξημένη φλεγμονή και επαγωγή διάφορων κυτοκινών, καθώς και προφλεγμονωδών αντιδράσεων σε απόκριση στο Αβ και σε άλλα ενεργοποιητικά ερεθίσματα (LaDu et al., 2001, Lynch et al., 2001).

Η ενεργοποίηση της γλοίας και η συνεπακόλουθη επαγωγή της ApoE φαίνεται να ρυθμίζεται, τουλάχιστον εν μέρει, από το μεταγραφικό παράγοντα NF-κΒ (Bales et al., 2000). Οι διαφορές μεταξύ των ισομορφών της APOE ενδέχεται να εξηγούν και τη

διαφορετική επικινδυνότητα που ενέχει η κάθε ισομορφή ως προς την ανάπτυξη AD. Αυτή η υπόθεση υποστηρίζεται από διάφορες μελέτες που έδειξαν ότι η APOE4, η οποία δίνεται εξωγενώς, προκαλεί εντονότερη προφλεγμονώδη αντίδραση από τα αστροκύτταρα και τη μικρογλοία σε σχέση με την APOE3 (Barger and Harmon, 1997, Guo et al., 2004). Επιπλέον, οι ειδικές ως προς την ισομορφή επιδράσεις της APOE στη φλεγμονή του νευρικού συστήματος έχουν μελετηθεί *in vivo* στα ποντίκια που εκφράζουν τις διάφορες ισομορφές της ανθρώπινης APOE. Μετά από ενδοφλέβια χορήγηση λιποπολυσακχαριτών (lipopolysaccharides, LPS) τα ποντίκια ApoE4-TR είχαν εντονότερη φλεγμονώδη αντίδραση σε σχέση με τα ApoE3-TR (Colton et al., 2004, Lynch et al., 2003).

Μία πολύ πρόσφατη μελέτη όπου μακροφάγα από γενετικά τροποποιημένα ποντίκια ApoE-TR2, ApoE-TR3 και ApoE-TR4 επώαστηκαν με εγκέφαλο ποντικού με παθολογία τύπου Alzheimer (μοντέλο PDAPP), έδειξε ότι η ικανότητα των μακροφάγων να φαγοκυτταρώνουν και να αποικοδομούν το Αβ οξύνεται από την APOE με τρόπο ειδικό ως προς την ισομορφή (APOE2>APOE3>>APOE4). Η δράση αυτή της APOE παρεμποδίζεται μετά από επώαση με την πρωτεΐνη η οποία σχετίζεται με τους υποδοχείς LDLR (receptor-associated protein, RAP) που είναι ανταγωνιστής του LDLR, υποδηλώνοντας ότι η εν λόγω δράση της APOE γίνεται μέσω του LDLR. Εξίσου σημαντικό ήταν το εύρημα ότι η εξαρτώμενη από την ισομορφή δράση της APOE στην αποικοδόμηση του Αβ από τα μακροφάγα διαμεσολαβείται εν μέρει από την έκκριση της μεταλλοπεπτιδάσης του στρώματος 9 (matrix metalloproteinase 9, MMP9). Τα μακροφάγα από τα ποντίκια ApoE2-TR είχαν την περισσότερη MMP-9 και τα ApoE-/- τη λιγότερη (ApoE2-TR>ApoE3-TR>ApoE4-TR>ApoE-/-) (Zhao et al., 2009).

Συμπερασματικά, αυτά τα δεδομένα υποδεικνύουν ότι η APOE4 μπορεί να έχει είτε προ-φλεγμονώδη είτε λιγότερο αποτελεσματική αντι-φλεγμονώδη δράση. Επομένως, η συγκεκριμένη ισομορφή μπορεί να επιδεινώνει τη φλεγμονή του νευρικού συστήματος που υπάρχει στην AD ή να είναι ανεπαρκής για την αποτροπή της. Αν και έχει δειχθεί ότι η APOE είναι αναμεμιγμένη στην παρουσίαση εξωγενών λιπιδικών αντιγόνων (van den Elzen et al., 2005), ο τρόπος δράσης της APOE και η επίδρασή της στις ανοσολογικές αποκρίσεις παραμένουν ακόμα αδιευκρίνιστα.

1.10. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Με βάση όσα αναφέρθηκαν παραπάνω, ο σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν η περαιτέρω διερεύνηση του ρόλου της APOE στην παθογένεση της νόσου του Alzheimer σε διαγονιδιακά μοντέλα ποντικών. Συγκεκριμένα, μελετήθηκε η πιθανή ανάμιξη της APOE και του κύριου υποδοχέα της στον εγκέφαλο, του LDLR, στους μηχανισμούς εναπόθεσης του αμυλοειδούς Αβ και του σχηματισμού αμυλοειδών πλακών καθώς και στην τοπική φλεγμονώδη απόκριση από τα κύτταρα του ανοσοποιητικού του νευρικού συστήματος, στην εξέλιξη της νόσου.

Απαραίτητη προϋπόθεση για τη μελέτη του μηχανισμού δράσης των δύο πρωτεϊνών ήταν η εύρεση κατάλληλων μοντέλων διαγονιδιακών ποντικών. Στο πρώτο σκέλος της μελέτης χρησιμοποιήσαμε ένα γενετικά τροποποιημένο μοντέλο ποντικού όπου το γονίδιο του *Ldlr* αδρανοποιήθηκε με ομόλογο ανασυνδυασμό (*Ldlr*^{-/-}). Πειραματικά δεδομένα υποστηρίζουν ότι η απουσία του LDLR δεν επηρεάζει τη χοληστερόλη του εγκεφάλου, έτσι αναζητήσαμε το μηχανισμό δράσης του υποδοχέα στην παθογένεση της AD ανεξάρτητα από τη δράση του ως υποδοχέα λιποπρωτεϊνών. Το ποντίκι *Ldlr*^{-/-} διασταυρώθηκε με ένα διαγονιδιακό μοντέλο με παθολογία Alzheimer (5x*FAD*) και αναλύθηκε η επίδραση του υποδοχέα ως προς την εναπόθεση του Αβ και των αμυλοειδών πλακών καθώς και τη φλεγμονώδη απόκριση. Για να εμβαθύνουμε περισσότερο στο μηχανισμό δράσης του υποδοχέα, χρησιμοποιήσαμε ένα ακόμα γενετικά τροποποιημένο ποντίκι, όπου αποσιωπήθηκε το γονίδιο της *ApoE* (*ApoE*^{-/-}). Στη συνέχεια, συγκρίθηκαν τα διαγονιδιακά ποντίκια 5x*FAD* τα οποία δεν είχαν παραγωγή πρωτεΐνης APOE με αυτά στα οποία απουσίαζαν και οι δύο πρωτεΐνες για να διαπιστωθεί εάν ο μηχανισμός δράσης του LDLR είναι εξαρτώμενος από την APOE.

Η σημαντικότητα της προερχόμενης από τον εγκέφαλο APOE στην παθογένεση της νόσου του Alzheimer και γενικά στην ομοιόσταση του εγκεφάλου έχει αποδειχθεί. Σε καμία έρευνα, όμως, δεν έχει μελετηθεί ο ρόλος της προερχόμενης από τους περιφερικούς ιστούς APOE4. Ως εκ τούτου, στο δεύτερο σκέλος της διατριβής, μελετήθηκε ο ρόλος της προερχόμενης από την περιφέρεια APOE4 στην ανάπτυξη της νόσου του Alzheimer. Για να επιτευχθεί αυτός ο στόχος, κατασκευάσαμε ένα διαγονιδιακό μοντέλο ποντικού που εκφράζει την APOE4 μόνο στην περιφέρεια και όχι στον εγκέφαλο (TTRI-huApoE4). Ακολούθως, για να αποκλειστεί η επίδραση της ενδογενούς *ApoE*, το διαγονιδιακό μοντέλο

TTRI-huApoE4 διασταυρώθηκε με το γενετικά τροποποιημένο μοντέλο *ApoE*^{-/-} (TTRI-huApoE4;*ApoE*^{-/-}). Στη συνέχεια, αφού διαπιστώθηκε η απουσία πρωτεϊνικής έκφρασης της APOE4 στον εγκέφαλο του μοντέλου που δημιουργήσαμε, ακολούθησε διασταύρωση με ένα διαγονιδιακό μοντέλο ποντικού με παθολογία τύπου Alzheimer (5xFAD). Στα ποντίκια αυτά εξετάστηκε η επίδραση της προερχόμενης από την περιφέρεια APOE4 στη παθολογία Alzheimer και πιο συγκεκριμένα στον αριθμό των αμυλοειδών πλακών και την αύξηση της συγκέντρωσης του Αβ στον εγκέφαλο καθώς και στη τοπική φλεγμονώδη απόκριση. Παρατηρήσαμε ότι μετά το σχηματισμό των αμυλοειδών πλακών ανευρίσκεται APOE4 η οποία συνεντοπίζεται με μακροφάγα/μικρογλοιακά κύτταρα στα ποντίκια αυτά. Επομένως, το επόμενο βήμα ήταν η αναζήτηση του κυτταρικού τύπου ο οποίος εκφράζει APOE4 στο διαγονιδιακό μοντέλο TTRI-huApoE4 και διαπιστώθηκε ότι ήταν τα μακροφάγα. Γνωρίζοντας ότι η κυτταρική προέλευση της APOE επηρεάζει τη δράση της πρωτεΐνης, πραγματοποιήσαμε μεταμόσχευση μυελού των οστών από ποντίκια TTRI-huApoE4;*ApoE*^{-/-} σε ποντίκια 5xFAD;*ApoE*^{-/-} και αναλύθηκε η ικανότητα διήθησης των μακροφάγων στον εγκέφαλο με παθολογία Alzheimer. Επειδή η APOE μπορεί να έχει προφλεγμονώδη ή αντιφλεγμονώδη δράση ανάλογα με την ισομορφή και τον κυτταρικό τύπο από τον οποίο προέρχεται, εξετάσαμε την κύρια αντιφλεγμονώδη κυτοκίνη, την ιντερλευκίνη 10. Συνολικά, σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν να παρέχει νέα δεδομένα σχετικά με τους μηχανισμούς δράσης της APOE και του LDLR στην παθογένεση της νόσου Alzheimer.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. ΧΗΜΙΚΑ ΚΑΙ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ

Όλα τα κοινά χημικά ήταν μοριακής ή αναλυτικής καθαρότητας και προέρχονται από την Sigma-Aldrich ή από την Arlichem, εκτός εάν επισημαίνεται διαφορετικά.

Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες, οι DNA πολυμεράσες και η T4 λιγάση προμηθεύτηκαν από την New England Biolabs και την Minotech Molecular Biology Products. Η νουκλεάση S1 ήταν από την Promega. Τα ραδιενεργά νουκλεοτίδια dATP-[γ -P³²] και dGTP-[α -P³²] από την Perkin-Elmer.

Η αμπικιλίνη, πενικιλίνη, στρεπτομυκίνη, η πρωτεΐνωση K, η RNase A και το δεσοξυριβονουκλεϊκό οξύ (deoxy-ribonucleic acid, DNA) από σπέρμα σολωμού ήταν από την Sigma-Aldrich. Τέλος, οι λιποπολυσακχαρίτες (lipolysaccharides, LPS) ήταν από την Sigma και το θρεπτικό μέσο Θειογλυκολικό οξύ (Thioglycollate) ήταν από την Difco.

Πίνακας 2. Αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν

<i>Εμπορική ονομασία αντισώματος</i>	<i>Πρωτεΐνη/επίτοπος που αναγνωρίζει</i>	<i>Προέλευση</i>	<i>Εταιρεία</i>
V18	GAPDH	γίδα	Santa Cruz
M20	APOE (ποντικού)	γίδα	Santa Cruz
H330	APOJ	κουνέλι	Santa Cruz
3H1	APOE (ανθρώπου)	ποντίκι	Ottawa Heart Institute
6E10	αμινοτελικό άκρο του Αβ	ποντίκι	Signet/Covance
3D10	10BB0	ποντίκι	Sigma-Aldrich
IBA1	IBA1	κουνέλι	Wako
GFAP	GFAP	ποντίκι	Sigma-Aldrich
GFP	GFP	ποντίκι	Millipore
IL-10	IL-10	γίδα	R&D

Τα συζευγμένα με υπεροξειδάση από αγριοραφανίδα (HRP-horseradish peroxidase) δευτερογενή αντισώματα ήταν όλα από την Santa Cruz και τη Jackson Immunoresearch.

Τα δευτερογενή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν για τον ανοσοφθορισμό ήταν από την Sigma, την Invitrogen και τη Jackson Immunoresearch.

2.2. ΖΩΑ

Για τις ανάγκες της παρούσας διατριβής χρησιμοποιήθηκαν ποντίκια από τις φυλές C57Bl/6, CBA και CD1 τα οποία στεγάζονται στη μονάδα Διαγονιδιακών ποντικών του ΙΙΒΕΑΑ και είχαν αγοραστεί από το Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME, USA). Επίσης, χρησιμοποιήθηκαν τα γενετικά τροποποιημένα ποντίκια ApoE knock-out (ApoE^{-/-}) (Piedrahita et al., 1992) και Ldlr knock-out (Ldlr^{-/-}) (Ishibashi et al., 1993) στα οποία έχουν αδρανοποιηθεί με ομόλογο ανασυνδυασμό τα ενδογενή γονίδια της *ApoE* και του *Ldlr* αντίστοιχα.

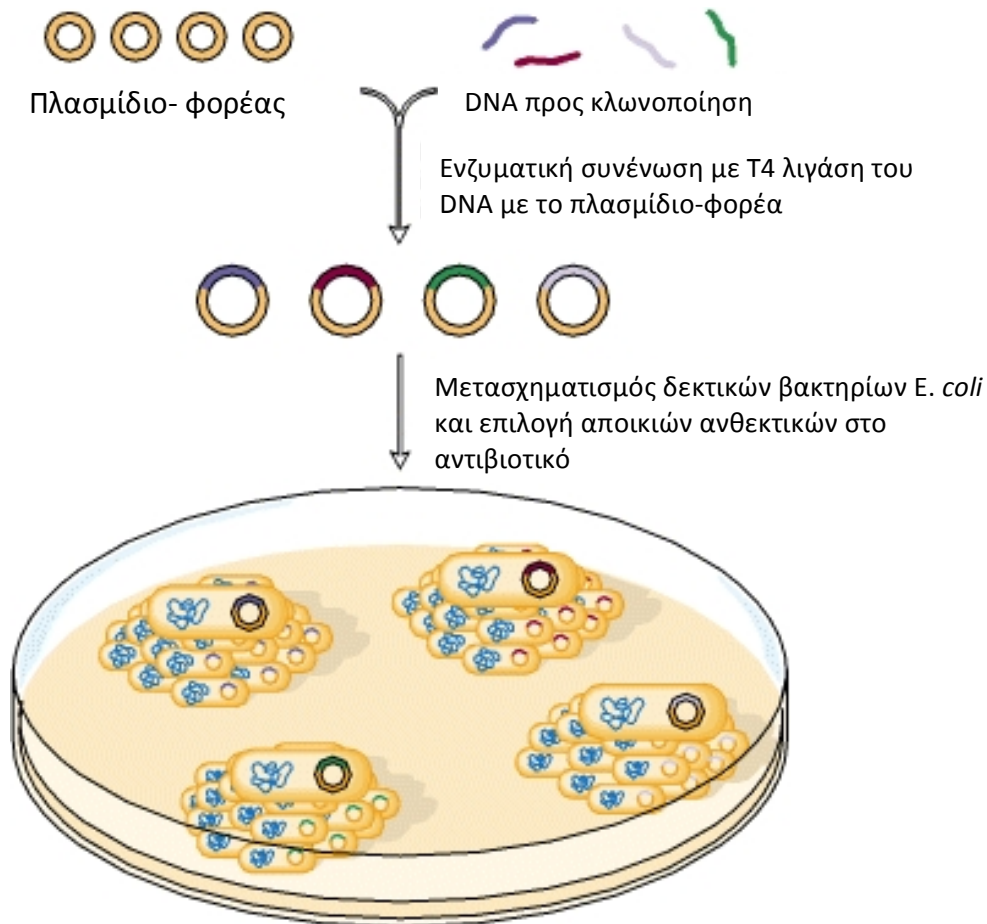
Για τη μελέτη της επίδρασης της APOE και του LDLR στην παθολογία της νόσου του Alzheimer έγινε χρήση του μοντέλου 5xFAD (Oakley et al., 2006) που εκφράζει πέντε οικογενείς μεταλλάξεις της νόσου του Alzheimer (τρεις στην APP: Swedish (K670N/M671L), Florida (I716V) και London (V717I) και δύο στην PSEN1: M146L και L286V). Σε αυτό το μοντέλο η εναπόθεση αμυλοειδών πλακών ξεκινά από την ηλικία των δύο μηνών στο υπόθεμα του ιππόκαμπου και στα βαθύτερα στρώματα του φλοιού. Στην ηλικία των τεσσάρων μηνών, οι αμυλοειδείς πλάκες εμφανίζονται σε όλο τον εγκέφαλο. Τα ποντίκια ApoE^{-/-}, τα Ldlr^{-/-} και τα 5xFAD προήλθαν επίσης από το Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME, USA). Για τη μεταμόσχευση μυελού των οστών χρησιμοποιήθηκαν ποντίκια Tg(CAG-EGFP)10sb/J τα οποία εκφράζουν την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (GFP) παντού εκτός από τις τρίχες και τα ερυθρά αιμοσφαίρια (ευγενική χορηγία του Δρυ Αρ Ευστρατιάδη, ΙΙΒΕΑΑ) (Okabe et al., 1997).

Η μονάδα διαγονιδιακών ποντικών του ΙΙΒΕΑΑ είναι ελεύθερη από παθογόνα (specific pathogen free) και τα ποντίκια παραμένουν σε συνθήκες δώδεκα ωρών φωτός και δώδεκα ωρών σκοταδιού. Όλες οι πειραματικές διαδικασίες οι οποίες αφορούσαν ζώα εγκρίθηκαν από την επιτροπή Βιοηθικής του Ιατροβιολογικού Ιδρύματος της Ακαδημίας Αθηνών καθώς και από τη νομαρχία Αθηνών και ήταν σύμφωνες με τις βιοηθικές υποδείξεις της Ευρωπαϊκής Ένωσης (European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC)).

2.3. ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΟΥ ΣΕ ΠΛΑΣΜΙΔΙΟ-ΦΟΡΕΑ

Η τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA επιτρέπει την παρασκευή μεγάλου αριθμού πανομοιότυπων μορίων DNA. Το DNA προς μελέτη συνδέεται με τη χρήση της T4

λιγάσης (Sambrook et al., 2001) (ένζυμο το οποίο καταλύει τη δημιουργία ενός 3'→5' φωσφοδιεστερικού δεσμού) με ένα πλασμιδιακό DNA φορέα ο οποίος μπορεί να πολλαπλασιάζεται όταν εισάγεται στο βακτήριο-ξενιστή. Τα πλασμίδια είναι εξωχρωμοσωμικές αλληλουχίες των βακτηρίων οι οποίες αντιγράφονται και πολλαπλασιάζονται ανεξάρτητα από το βακτηριακό χρωμόσωμα (Roth and Helinski, 1967). Έτσι, όταν το ανασυνδυασμένο DNA, που πλέον αποτελείται από το πλασμίδιο-φορέα συν το DNA προς μελέτη, εισέλθει σε ένα κύτταρο-ξενιστή αντιγράφεται και πολλαπλασιάζεται επιτρέποντας έτσι την παραγωγή μεγάλου αριθμού αντιγράφων του ανασυνδυασμένου DNA (Εικόνα 2.1). Τα πλασμίδια φέρουν γονίδια που προσδίδουν ανθεκτικότητα σε συγκεκριμένα αντιβιοτικά. Ως εκ τούτου η επιλογή γίνεται με την προσθήκη κατάλληλου αντιβιοτικού στο θρεπτικό μέσο (π.χ. αμπικιλίνη).



Εικόνα 2.1. Σχηματική απεικόνιση της κλωνοποίησης εξωγενούς DNA σε πλασμίδιο-φορέα και μετασχηματισμός δεκτικών βακτηρίων. Προσαρμογή από *Molecular Cell Biology*, 2008.

Η διαδικασία της ενοποίησης τμημάτων DNA στηρίζεται στην ιδιότητα της T4 DNA λιγάσης να συνδέει τμήματα με συμπληρωματικά (5' ή 3' προεξέχοντα) ή τυφλά άκρα. Η αντίδραση πραγματοποιείται σε όγκο 10 μl, με τελική συγκέντρωση νουκλεϊνικών οξέων 1-10 ng/μl. Σε φιαλίδιο erpendorf προστίθενται κατάλληλη ποσότητα ευθυγραμμισμένου πλασμιδιακού φορέα (συνήθως 50-100 ng) και η αντίστοιχη ποσότητα τμήματος DNA, ώστε να επιτυγχάνεται μοριακή αναλογία άκρων φορέα : τμήματος = 1:3. Για την αναλογία ισχύει ο τύπος:

$$\text{ng DNA} = \frac{\text{ng φορέα} \times \text{μέγεθος τμήματος DNA (Kb)}}{\text{μέγεθος φορέα (Kb)}} \times \text{αναλογία}$$

Προστίθεται κατάλληλη ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος (Ligation Buffer) 10x σε τελική συγκέντρωση 1x. Το μίγμα θερμαίνεται για 2-3 λεπτά στους 55°C για την αποφυγή τριτοταγών δομών που παρεμποδίζουν την ενοποίηση των τμημάτων. Στο μίγμα προστίθεται 1μl T4 DNA λιγάσης (6 Weiss units/μl, NEB) και ddH₂O, μέχρι συμπλήρωση του όγκου της αντίδρασης.

Το δείγμα αναμιγνύεται και τοποθετείται για 12 ώρες στους 16°C. Στη περίπτωση της κατασκευής πλασμιδιακών φορέων, πριν το μετασχηματισμό δεκτικών βακτηριακών κυττάρων που περιγράφεται στη συνέχεια, 5μl από την αντίδραση μπορούν να ηλεκτροφορηθούν σε πηκτή αгарόζης 0,8%, για τον οπτικό έλεγχο διαμορφώσεων που ισοδυναμούν με την επίτευξη κυκλικής δομής των νουκλεϊνικών οξέων, από την επιτυχή ενοποίηση των διαφορετικών τμημάτων DNA.

Για την κατασκευή του διαγονιδίου χρησιμοποιήθηκαν το πλασμίδιο-φορέας pBlsc (Stratagene) και το πλασμίδιο-φορέας pBlsc-TTRI που έχει κλωνοποιημένο τον υποδοχέα της τρανσθυρετίνης του ποντικού (TTRI). Δεκτικά βακτήρια *E.coli* από τα στελέχη DH5α (Invitrogen) και JC109 (Promega) μετασχηματίστηκαν με το επιθυμητό DNA και στη συνέχεια αυτό απομονώθηκε από υγρές καλλιέργειες μεσαίου όγκου. Ως θρεπτικό μέσο χρησιμοποιήθηκε Luria Broth (LB, Sigma). Ως παράγοντας επιλογής χρησιμοποιήθηκε και για τα δύο πλασμίδια η ανθεκτικότητα στην αμπικιλίνη.

2.4. ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΔΕΚΤΙΚΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ

Η τεχνική του μετασχηματισμού των βακτηρίων βασίζεται στη διάνοιξη πόρων στο κυτταρικό τοίχωμα με κατάλληλη προετοιμασία των κυττάρων ούτως ώστε το πλασμιδιακό DNA να εισέλθει στο βακτήριο ξενιστή υπό συνθήκες στρες (θερμικό σοκ ή ηλεκτρικός παλμός). Οι μέθοδοι αυτοί βασίζονται στις παρατηρήσεις των Mandel και Higa οι οποίοι έδειξαν ότι βακτήρια που είχαν κατεργαστεί με παγωμένο διάλυμα και στη συνέχεια είχαν θερμανθεί, μπορούσαν να μετασχηματιστούν με DNA από βακτηριοφάγο λ (Mandel and Higa, 1970). Η μέθοδος της ηλεκτροδιάτρησης (ηλεκτρικός παλμός) έχει δύο βασικά πλεονεκτήματα: 1) είναι αποτελεσματική σχεδόν σε όλους τους τύπους κυττάρων και 2) το ποσοστό των μετασχηματισμένων κυττάρων είναι πολύ υψηλό. Από την άλλη κατά τη χημική μέθοδο που βασίζεται στη διάνοιξη πόρων με CaCl_2 , τα κύτταρα υποβάλλονται σε θερμικό σοκ ούτως ώστε να εισέλθει το ανασυνδυασμένο DNA. Η συγκεκριμένη τεχνική υιοθετείται από πολλά εργαστήρια γιατί είναι απλούστερη και λιγότερο απαιτητική από πλευράς εξοπλισμού.

2.4.1. Προετοιμασία δεκτικών βακτηρίων *E.coli* DH5α για ηλεκτροδιάτρηση

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για την προετοιμασία των δεκτικών βακτηρίων βασίστηκε στο πρωτόκολλο 1.26 το οποίο δίνεται στον πρώτο τόμο του Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Sambrook et al., 2001) με ελάχιστες τροποποιήσεις και ήταν η εξής: Δεκτικά βακτήρια *E.coli* DH5α από μία μοναδική καλλιέργεια εμβολιάζονται σε 50ml θρεπτικού LB χωρίς αντιβιοτικό για 12-16 ώρες στους 37°C και με συνεχή ανακίνηση. Την επόμενη μέρα εμβολιάζεται 1 λίτρο θρεπτικού LB χωρίς αντιβιοτικό με 10ml από την καλλιέργεια (1/100 του όγκου). Τα κύτταρα αφήνονται να μεγαλώσουν στους 37°C με συνεχή ανακίνηση έως ότου φτάσουν σε οπτική απορρόφηση (optical density, OD) $\text{OD}_{600\text{nm}}=0,5-0,6$. Στη συνέχεια, αφού τα κύτταρα μείνουν για 15-20 λεπτά σε πάγο για να ψυχθούν, συλλέγονται με φυγοκέντρηση 15 λεπτών στα 4.000xg και στους 4°C. Αφαιρείται όλο το υπερκείμενο και τα κύτταρα επαναδιαλυτοποιούνται σε 1 λίτρο δις-απιονισμένου νερού. Τα κύτταρα φυγοκεντρούνται για 15 λεπτά, στα 4.000xg και σε θερμοκρασία 4°C. Εν συνεχεία αφαιρείται εκ νέου το υπερκείμενο και επαναδιαλυτοποιούνται σε μισό λίτρο παγωμένου νερού δις-απιονισμένου. Ακολουθεί νέα φυγοκέντρηση 15 λεπτών στα 4.000xg και 4°C, νέα αφαίρεση του υπερκειμένου και τα κύτταρα επαναδιαλυτοποιούνται σε 2-3ml

10% γλυκερόλης (Sigma). Τέλος, τα κύτταρα φυλάσσονται στους -80°C σε δείγματα των 80μl.

2.4.2. Μετασχηματισμός δεκτικών βακτηρίων *E.coli* DH5α με τη μέθοδο της ηλεκτροδιάτρησης

Σε 40μl δεκτικών βακτηρίων προστίθεται 0,5-1ng DNA διαλυτοποιημένο σε 0,5-1μl TE, pH 8 (10mM Tris, 1mM EDTA). Στη συνέχεια τα κύτταρα μεταφέρονται σε παγωμένη κυβέτα (BTX) και δίνεται ηλεκτρικός παλμός σε ειδικό μηχάνημα ηλεκτροδιάτρησης (BTX Electroporator ECM 830). Οι ρυθμίσεις για το συγκεκριμένο στέλεχος βακτηρίων, που δίνονται από τον κατασκευαστή, είναι οι εξής: 50μF σε υψηλή τάση (HV), 125 Ohms, 1400V και αποδεκτή διάρκεια παλμού 5-6 msec. Ακαριαία προστίθεται 1ml θρεπτικού μέσου SOC (Sigma) και τα κύτταρα αφήνονται για 45-60 λεπτά στους 37°C με συνεχή ανακίνηση. Στη συνέχεια τα κύτταρα κατακρημνίζονται και αφαιρείται σχεδόν όλο το υπερκείμενο. Περίπου 100μl υπερκείμενου αφήνεται, τα κύτταρα επαναδιαλυτοποιούνται με κομμένο ακρορύγχιο και επιστρώνονται σε άγαρ LB (Sigma) με αμπικιλίνη σε τρυβλία Petri. Τέλος τα τρυβλία αφήνονται σε επωαστήρα στους 37°C για 16-20 ώρες.

2.4.3. Προετοιμασία δεκτικών βακτηρίων *E.coli* DH5α για χημικό μετασχηματισμό με τη μέθοδο του CaCl_2

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε βασίστηκε στο πρωτόκολλο 1.25 το οποίο δίνεται στον πρώτο τόμο του Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Sambrook et al., 2001) καθώς και στη μελέτη των Mandel και Higa (Mandel and Higa, 1970) και ήταν η εξής: Δεκτικά βακτήρια *E.coli* DH5α από μία μοναδική καλλιέργεια εμβολιάζονται σε 10ml θρεπτικού LB χωρίς αντιβιοτικό για 12-16 ώρες στους 37°C με συνεχή ανακίνηση. Την επόμενη μέρα εμβολιάζονται 100ml θρεπτικού LB με 0,5ml από την καλλιέργεια. Τα κύτταρα αφήνονται να μεγαλώσουν στους 37°C με συνεχή ανακίνηση έως ότου φτάσουν σε $\text{OD}_{600\text{nm}}=0,5$. Εν συνεχεία εμβολιάζονται 220ml θρεπτικού LB με 20ml από την καλλιέργεια. Τα κύτταρα αφήνονται να μεγαλώσουν στους 37°C με συνεχή ανακίνηση έως ότου φτάσουν σε $\text{OD}_{600\text{nm}}=0,2$. Κατόπιν, αφού τα κύτταρα αφεθούν για 15 λεπτά σε πάγο για να ψυχθούν, συλλέγονται με φυγοκέντρηση 15 λεπτών, στα 3.500xg και στους 4°C . Αφαιρείται όλο το υπερκείμενο και τα κύτταρα επαναδιαλυτοποιούνται σε 100ml διαλύματος 100mM CaCl_2 και αφήνονται στον πάγο για 20 λεπτά. Τα κύτταρα

φυγοκεντρούνται στα 3.500xg για 15 λεπτά στους 4°C, αφαιρείται ξανά το υπερκείμενο και επαναδιαλυτοποιούνται σε 2,4ml 10mM CaCl₂ με 50% γλυκερόλη (1/100 του αρχικού όγκου). Τα κύτταρα φυλάσσονται στους -80°C σε δείγματα των 200μl.

2.4.4. Μετασχηματισμός δεκτικών βακτηρίων E.coli DH5α με χημική μέθοδο

Σε 100μl δεκτικών βακτηρίων προστίθενται 0,2-2ng DNA και 100μl διαλύματος το οποίο περιέχει 10mM Tris, 10mM MgCl₂ και 10mM CaCl₂, pH 7,5. Τα βακτήρια αφήνονται σε πάγο για 30 λεπτά. Στη συνέχεια τα κύτταρα μεταφέρονται σε υδατόλουτρο των 42°C για 45 δευτερόλεπτα (θερμικό σοκ) και μετά αμέσως σε πάγο για 2 λεπτά. Ύστερα τα κύτταρα κατακρημνίζονται και αφαιρείται σχεδόν όλο το υπερκείμενο. Περίπου 100μl υπερκείμενου αφήνεται, τα κύτταρα επαναδιαλυτοποιούνται με κομμένο ακρορύγχιο και επιστρώνονται σε άγαρ LB (Sigma) με αμπικιλίνη σε τρυβλία Petri. Τέλος τα τρυβλία αφήνονται σε επωαστήρα στους 37°C για 16-20 ώρες.

2.4.5. Μετασχηματισμός δεκτικών βακτηρίων E.coli JC109 με χημική μέθοδο

Για το μετασχηματισμό του βακτηριακού αυτού στελέχους, ακολουθείται το πρωτόκολλο του κατασκευαστή (Promega) το οποίο βασίζεται σε ένα τροποποιημένο πρωτόκολλο του Hanahan (Hanahan et al., 1991). Εν συντομία, αρχικά ψύχονται σωληνάρια πολυπροπυλενίου των 15ml σε πάγο. Στη συνέχεια 100μl δεκτικών βακτηρίων αφήνονται να ξεπαγώσουν σε πάγο, ανακινούνται ελαφρά, μεταφέρονται στα παγωμένα σωληνάρια πολυπροπυλενίου και επανατοποθετούνται στον πάγο για 10 λεπτά. Στη συνέχεια προστίθενται 0,1-50ng DNA στα κύτταρα και το δείγμα ανακινείται πολύ γρήγορα με ελαφρά χτυπήματα. Μετά τα κύτταρα αφήνονται σε πάγο για 10 λεπτά. Στη συνέχεια μεταφέρονται σε υδατόλουτρο των 42°C για 45 δευτερόλεπτα (θερμικό σοκ) και ακολούθως εναποτίθενται αμέσως σε πάγο για 2 λεπτά. Αμέσως μετά την πάροδο των 2 λεπτών προστίθενται 900μl παγωμένου (4°C) θρεπτικού μέσου SOC. Κατόπιν τα κύτταρα κατακρημνίζονται και αφαιρείται σχεδόν όλο το υπερκείμενο. Περίπου 100μl υπερκείμενου αφήνεται, τα κύτταρα επαναδιαλυτοποιούνται με κομμένο ακρορύγχιο και επιστρώνονται σε άγαρ LB (Sigma) με αμπικιλίνη σε τρυβλία Petri. Τέλος αφήνονται σε επωαστήρα στους 37°C για 16-20 ώρες.

2.5. ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA ΑΠΟ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ

2.5.1. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από μικρού μεγέθους καλλιέργεια (mini-prep)

Το πρωτόκολλο αυτό βασίζεται στη μέθοδο απομόνωσης DNA από βακτήρια με αλκαλική λύση [πρωτόκολλο 1.1 από Sambrook και Russell (Sambrook et al., 2001)] και χρησιμοποιείται για μικρής κλίμακας απομόνωση πλασμιδιακού DNA. Από ένα τρυβλίο Petri εμβολιάζουμε τυχαίες μετασηματισμένες αποικίες βακτηρίων σε σωληνάρια πολυπροπυλενίου με 2,5ml LB θρεπτικού μέσου. Οι καλλιέργειες επωάζονται για 12-14 ώρες στους 37°C με συνεχή ανάδευση (225 στροφές/λεπτό). Την επόμενη μέρα 1,5ml από την καλλιέργεια τοποθετείται σε σωληνάρια Eppendorf και τα βακτήρια κατακρημνίζονται στα 13.000xg για 30 δευτερόλεπτα και σε θερμοκρασία 4°C. Η υπόλοιπη καλλιέργεια φυλάσσεται στον πάγο. Στη συνέχεια το θρεπτικό μέσο αφαιρείται τελείως με αναρρόφηση ενώ το ίζημα των βακτηρίων διατηρείται όσο πιο στεγνό γίνεται.

Το ίζημα επαναδιαλυτοποιείται σε 100μl Διαλύματος I (50mM D-γλυκόζη, 25mM Tris-HCl pH 8, 1mM EDTA pH 8) με έντονο στροβιλισμό (vortex). Ακολούθως, προστίθενται 200 μl φρέσκου διαλύματος II (0,2N NaOH, 1% SDS) και το μείγμα ανακινείται γρήγορα με αναστροφή 3-5 φορές. Στη συνέχεια προστίθενται 150μl Διαλύματος III (1,33M οξικό κάλλιο, 11,5% παγωμένο οξικό οξύ). Το μείγμα αναδεύεται αρκετές φορές και αφήνεται στον πάγο για 3-5 λεπτά. Ακολουθεί φυγοκέντρηση 5 λεπτών, στα 13.000xg και σε 4°C.

Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε καθαρό σωληνάριο Eppendorf και προστίθεται ίσος όγκος φαινόλης/χλωροφορμίου/ισοαμυλικής αλκοόλης (25:24:1). Το μείγμα ανακατεύεται καλά με στροβιλισμό (vortex) και φυγοκεντρείται για 5 λεπτά, στα 13.000xg και στους 4°C. Η υπερκείμενη υδατική φάση μεταφέρεται σε καθαρό σωληνάριο Eppendorf και το DNA κατακρημνίζεται με την προσθήκη 100% αιθανόλης ίσης με 2 όγκους της φάσης και 3M οξικού νατρίου pH 5,2 ίσου με το 1/10 του όγκου της φάσης. Η κατακρήμνιση γίνεται στους 4°C. Απομακρύνεται προσεκτικά το υπερκείμενο και προστίθενται 200μl 70% αιθανόλης. Ακολουθεί φυγοκέντρηση 5 λεπτών, στα 13.000xg και σε θερμοκρασία 4°C. Αφαιρείται εκ νέου το υπερκείμενο και το ίζημα αφήνεται για 5 λεπτά να στεγνώσει με τον αέρα. Στη συνέχεια το ίζημα επαναδιαλύεται σε 30μl 1M TE pH 7,6 και τέλος προστίθεται RNase A σε τελική συγκέντρωση 20μg/ml.

2.5.2. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από μεσαίου μεγέθους καλλιέργειες (midi-prep)

Το πρωτόκολλο αυτό έχει απόδοση 100μg DNA και χρησιμοποιείται για απομόνωση υψηλής καθαρότητας DNA. Η διαδικασία που ακολουθήσαμε ήταν η εξής: Σε μια κωνική φιάλη των 500ml προστίθενται 100 ml θρεπτικού μέσου LB (μέγιστος όγκος καλλιέργειας το 20% του όγκου της κωνικής φιάλης). Στη συνέχεια εμβολιάζεται με 0,2ml μιας καλλιέργειας μικρού μεγέθους (1/500 του όγκου) ή με μια μοναδική αποικία από στερεή καλλιέργεια άγαρ. Η καλλιέργεια επωάζεται στους 37°C για περίπου 14-16 ώρες με συνεχή ανάδευση (225 στροφές/λεπτό). Τέλος το πλασμιδιακό DNA απομονώνεται με το Qiagen Plasmid Midi kit (#12143), σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή.

2.6. ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΑΚΩΝ ΠΟΝΤΙΚΩΝ

Τα διαγονιδιακά ποντίκια είναι γενετικά τροποποιημένα μοντέλα ποντικών που υπερεκφράζουν ένα εξωγενές DNA. Υπάρχουν δύο μέθοδοι δημιουργίας διαγονιδιακών ποντικών: η μικροένεση DNA (DNA micro-injection) η οποία βασίζεται στη μέθοδο του Gordon (Gordon and Ruddle, 1982) και η χρήση ρετροϊών (lentivirus) η οποία είναι πιο πρόσφατη και βασίζεται στη μέθοδο των Hofmann και συνεργατών (Hofmann et al., 2003).

Με τη μέθοδο της μικροένεσης, αν και υπάρχουν μικρότερα ποσοστά επιτυχούς διαγένεσης (transgenesis) σε σχέση με τη μέθοδο των ρετροϊών, μπορεί να εισαχθεί μεγαλύτερου μοριακού βάρους DNA στο ζυγωτό. Επίσης, το DNA που εισάγεται με τη μέθοδο των ρετροϊών υπόκειται σε επιγενετική αποσιωποποίηση λόγω των ικών στοιχείων που φέρει (Fassler, 2004, Ikawa et al., 2003, Park, 2007). Για τους παραπάνω λόγους, επιλέξαμε την μικροένεση ως τη μέθοδο δημιουργίας διαγονιδιακών ποντικών.

Κατά τη μέθοδο αυτή, το DNA εγχέεται στον ένα προπυρήνα του γονιμοποιημένου ωαρίου. Το εξωγενές αυτό DNA ενσωματώνεται στο γονιδίωμα του ποντικού και μεταφέρεται μέσω της γαμετικής σειράς (Gordon and Ruddle, 1982). Με τον τρόπο αυτό δημιουργούνται ποντίκια που χρησιμοποιούνται ως ιδρυτές για σειρές διαγονιδιακών ποντικών. Οι απόγονοι των ιδρυτών έχουν συνεχή και όμοια μεταξύ τους έκφραση του διαγονιδίου το οποίο φέρουν.

2.6.1. Προετοιμασία του διαγονιδίου για ένεση σε γονιμοποιημένα ωάρια για την κατασκευή διαγονιδιακών ζώων

Το DNA που πρόκειται να χρησιμοποιηθεί για την κατασκευή διαγονιδιακών ποντικών απομονώνεται πάντα από μεσαίου μεγέθους υγρή καλλιέργεια βακτηρίων με το Endofree maxi kit (Qiagen, #12362), σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή. Το kit αυτό αφαιρεί τις τοξικές για το ζυγωτό ενδοτοξίνες των βακτηρίων. Αφού το πλασμιδιακό DNA απομονωθεί, επιβεβαιώνεται η ορθότητά του μέσω διαγνωστικών πέψων με περιοριστικές ενδονουκλεάσες (NEB, Minotech).

Στη συνέχεια το DNA επωάζεται για 3 ώρες με τα κατάλληλα περιοριστικά ένζυμα ούτως ώστε να αφαιρεθούν οι τοξικές για τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς προκαρυωτικές αλληλουχίες. Αφού ολοκληρωθεί η πέψη, το DNA ηλεκτροφορείται σε 0,8% αγαρόζη χαμηλού σημείου τήξεως (SeaPlaque GTG, Cambrex Bio Science, βλέπε και 2.8.2). Ως διάλυμα ηλεκτροφόρησης χρησιμοποιείται 1x Tris-acetic acid-EDTA (TAE, 40mM Tris-acetate, 1mM EDTA).

Ακολούθως, το DNA απομονώνεται από την αγαρόζη ως εξής: Το τμήμα της αγαρόζης που περιέχει το διαγονίδιο επωάζεται για 10 λεπτά στους 65°C μαζί με ρυθμιστικό διάλυμα του ενζύμου β-Αγαράση I (NEB) μέχρι να λιώσει. Κατόπιν μεταφέρεται στους 42°C και προστίθεται 1μl ενζύμου για κάθε 100 μl αγαρόζης (πρωτόκολλο κατασκευαστή). Ακολουθεί κατακρήμνιση του DNA με ισοπροπανόλη, χωρίς αλάτι. Το DNA επαναδιαλυτοποιείται σε διάλυμα κατάλληλο για ενέσεις σε ζυγωτά (Embryomax Injection buffer, #MR-095-F Chemicon). Γίνεται επιπλέον καθαρισμός με το GENECLEAN Turbo Kit (QBiogene) σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή και το DNA ποσοτικοποιείται και αραιώνεται σε συγκέντρωση 2-3ng/μl στο διάλυμα Embryomax Injection buffer.

2.6.2. Προετοιμασία ωαρίων για ένεση DNA και δημιουργία διαγονιδιακών ποντικών

Η μέθοδος η οποία ακολουθήθηκε βασίζεται στα πρωτόκολλα των Kollias και συνεργατών (Kollias et al., 1986) και Nagy και συνεργατών (Nagy et al., 2003). Σε θηλυκά ποντίκια γενιάς F1 CBAx57Bl/6 και ηλικίας 4-6 εβδομάδων έγινε έγχυση με γοναδοτροπίνη (5iu/ζώο) από έγκυο φοράδα (PMS, Sigma) 2 ώρες πριν από την έναρξη του σκοτεινού κύκλου. Η PMS μιμείται την ωοθυλακιοτρόπο ορμόνη και προκαλεί υπερωορρηξία. Μετά από 46 ώρες στα ποντίκια αυτά εγχύθηκε ανθρώπινη χοριονική γοναδοτροπίνη (5iu/ζώο) (hCG, Sigma), η οποία μιμείται την ωχρινοτρόπο ορμόνη και

προκαλεί ωρίμανση των ωοθυλακίων. Τα θηλυκά ποντίκια στη συνέχεια ζευγαρώνουν με αρσενικά C57Bl/6 και την επόμενη μέρα ελέγχονται για γονιμοποίηση. Τα γονιμοποιημένα ζώα θυσιάζονται και αφαιρούνται οι ωοθήκες. Ακολούθως, διανοίγονται οι ωαγωγοί μέσα σε θρεπτικό μέσο M2 (Sigma) με 6% (w/v) πενικιλίνη (Sigma) και 5% (w/v) στρεπτομυκίνη (Sigma) από τους οποίους απομονώνονται τα ωάρια. Προστίθεται υαλουρονιδάση (300mg/ml, Sigma) για την απομάκρυνση των προσκολλημένων στα ωάρια θυλακοκυττάρων (follicle cells). Έπειτα τα ωάρια ξεπλένονται δύο φορές σε διαδοχικά καθαρά τρυβλία Petri με καθαρό θρεπτικό μέσο M2. Στη συνέχεια μεταφέρονται σε θρεπτικό μέσο M16 (Sigma) με 6% (w/v) πενικιλίνη και 5% (w/v) στρεπτομυκίνη, σε επωαστήρα με 5% διοξείδιο του άνθρακα και στους 37°C έως ότου να γίνει η ένεση με DNA. Στα γονιμοποιημένα ωάρια γίνεται μικρο-ένεση DNA (**Εικόνα 2.2**) με τη χρήση ειδικού ανάστροφου μικροσκοπίου LEICA ES TP (αυτοματοποιημένο ανάστροφο μικροσκόπιο Leica DM IRE2 με ηλεκτρικούς μικροχειριστές Eppendorf, όλα ελεγχόμενα από ένα κεντρικό πίνακα ελέγχου, **Εικόνα 2.3**).



Εικόνα 2.2. Μικροένεση DNA στον ένα εκ των δύο προπυρήνων του ζυγωτού ποντικού. Στην εικόνα, ο πυρήνας ο οποίος δέχτηκε το DNA φαίνεται διογκωμένος.

Ύστερα τα ωάρια τοποθετούνται και πάλι σε θρεπτικό μέσο M16 και την επόμενη μέρα όσα έχουν προχωρήσει στο στάδιο των δύο βλαστομεριδίων, μεταφέρονται σε ψευδοέγκυα θηλυκά ποντίκια CD1. Τα ποντίκια αυτά έχουν ζευγαρώσει την προηγούμενη μέρα με στείρα αρσενικά CD1 στα οποία έχει γίνει χειρουργική διακοπή του σπερματογωγού. Με την επαφή τα θηλυκά ποντίκια εισέρχονται σε ορμονικό κύκλο εγκυμοσύνης και η μήτρα τους καθίσταται δεκτική στην εμφύτευση των ωαρίων (ψευδοέγκυες). Να σημειωθεί εδώ ότι τα γονιμοποιημένα ωάρια προέρχονται από ποντίκια με μαύρο τρίχωμα ενώ οι ψευδοέγκυες είναι άσπρου τριχώματος ώστε να

αποκλειστεί το ενδεχόμενο να γονιμοποιηθούν από ένα αρσενικό CD1 στον οποίο δεν έχει γίνει πλήρης διακοπή του σπερματαγωγού.



Εικόνα 2.3. Σύστημα ειδικού ανάστροφου μικροσκοπίου *LEICA AS TP* το οποίο χρησιμοποιείται για την κατασκευή διαγονιδιακών ποντικών. Το σύστημα αποτελείται από αυτοματοποιημένο ανάστροφο μικροσκόπιο *Leica DM IRE2* και ηλεκτρικούς *Errendorf* μικροχειριστές, όλα ελεγχόμενα από ένα κεντρικό πίνακα ελέγχου. Το σύστημα ένεσης (*injector*) είναι επίσης *Errendorf*.

2.7. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA ΑΠΟ ΒΙΟΨΙΕΣ ΟΥΡΑΣ

Για την ταυτοποίηση των ποντικών χρησιμοποιήθηκε DNA το οποίο απομονώθηκε με τη μέθοδο της πρωτεΐνάσης K σύμφωνα με το πρωτόκολλο των Gross-Bellard και συνεργατών, οι οποίοι πρώτοι έδειξαν το 1973 ότι μπορούσε να απομονωθεί δίκλωνο ανέπαφο DNA υψηλού μοριακού βάρους (Gross-Bellard et al., 1973).

Πιο συγκεκριμένα, τμήμα 0,5-1 cm αφαιρείται από την ουρά ποντικών ηλικίας 2-3 εβδομάδων και επάζεται για 12-16 ώρες στους 55°C με 10 μl πρωτεΐνάσης K (10mg/ml, Sigma) και 500μl διαλύματος TENS (50mM Tris-HCl pH 8, 100mM EDTA, 100mM NaCl, 1% SDS). Την επόμενη μέρα προστίθεται 1μl RNase A (10mg/ml, Sigma) και τα δείγματα επάζονται για μία ώρα στους 37°C. Προστίθενται 500μl διαλύματος φαινόλης/χλωροφόρμιου/ισοαμυλικής αλκοόλης σε αναλογία 25:24:1 σε κάθε δείγμα και ακολουθεί φυγοκέντρηση για 15 λεπτά στα 13.000xg (Sorvall Heraeus). Με τη φυγοκέντρηση το δείγμα διαχωρίζεται σε 2 φάσεις. Στην επάνω φάση, την υδατική, βρίσκεται το DNA και στη μεσόφαση οι πρωτεΐνες. Τα οστά και οι τρίχες εναποτίθενται λόγω βάρους στον πυθμένα του σωληναρίου. Το υπερκείμενο που περιέχει το DNA μεταφέρεται σε καθαρό σωληνάριο και έπεται ακόμη ένας καθαρισμός με φαινόλη.

Εν συνεχεία η υπερκείμενη φάση μεταφέρεται ξανά σε καθαρό σωληνάριο, προστίθεται χλωροφόρμιο, το δείγμα αναδεύεται καλά και ακολουθεί φυγοκέντρηση για 10 λεπτά. Έπειτα, το υπερκείμενο μεταφέρεται σε καθαρό σωληνάριο και το DNA κατακρημνίζεται με 0,6 όγκους ισοπροπανόλης. Τέλος, το DNA επαναδιαλυτοποιείται σε διάλυμα TE pH 8, φωτομετρείται και φυλάσσεται στους 4°C για μερικούς μήνες. Για μακροχρόνια φύλαξη, το DNA φυλάσσεται στους -80°C.

2.8. ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ, ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΓΟΝΟΤΥΠΟΠΟΙΗΣΗ ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΑΚΩΝ ΠΟΝΤΙΚΩΝ

Ένα από τα πιο σημαντικά στάδια στην ανάλυση των διαγονιδιακών ποντικών είναι η ανίχνευσή τους. Η μέθοδος κατά Southern (Εικόνα 2.4) βασίζεται στο γεγονός ότι κάποιες περιοριστικές ενδονουκλεάσες έχουν μεγάλο αριθμό θέσεων αναγνώρισης μέσα στο γονιδιωματικό DNA, με αποτέλεσμα αυτό να μπορεί να κοπεί σε πολύ μικρότερα κομμάτια (Southern, 1975). Μετά την πέψη ακολουθεί ηλεκτροφόρηση του DNA και μεταφορά του σε ειδική μεμβράνη θετικά φορτισμένη όπου και μονιμοποιείται (Reed and Mann, 1985). Κατόπιν γίνεται επώαση με ραδιενεργό ιχνηθέτη ειδικό για το διαγονίδιο με αποτέλεσμα να μπορεί να ανιχνευθεί η υβριδοποιημένη αλληλουχία είτε με φωτογραφικό φιλμ είτε με ειδικούς σαρωτές (scanner-phosphorimager) που διαθέτουν λογισμικό για ανάλυση ραδιενεργού φωσφόρου.

Η μέθοδος Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (ΑΑΠ), βασίζεται στον επιλεκτικό πολλαπλασιασμό μιας αλληλουχίας DNA που ορίζεται από ένα ζευγάρι εκκινητών (primers) μέσω μιας αντίδρασης DNA πολυμερισμού (Mullis and Faloona, 1987). Χρησιμοποιούνται ειδικές θερμοανθεκτικές πολυμεράσες που προέρχονται από θερμοφιλά βακτήρια και είναι εμπορικά διαθέσιμες σε πολλές ποιότητες πιστότητας αντιγραφής.

2.8.1. Ποσοτικός προσδιορισμός νουκλεϊκών οξέων με φωτομέτρηση

Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην ικανότητα των νουκλεϊκών οξέων (DNA και RNA) να απορροφούν μέγιστα στα 260nm. Προκειμένου να υπολογιστεί η συγκέντρωση των νουκλεϊκών οξέων σε κάθε δείγμα, καταγράφεται η οπτική του πυκνότητα στα 260nm και στα 280nm χρησιμοποιώντας κυψελίδα χαλαζία. Διάλυμα DNA ή RNA με συγκέντρωση 50μg/ml αντιστοιχεί σε οπτική πυκνότητα (optical density, OD₂₆₀) ίση με 1 (Sambrook et al.,

2001). Με βάση αυτή την παραδοχή, υπολογίζεται η συγκέντρωση των νουκλεϊκών οξέων και η καθαρότητα υπολογίζεται από το λόγο OD_{260}/OD_{280} ο οποίος πρέπει να είναι πάνω από 1.8 για το DNA και πάνω από 2.0 για το RNA.

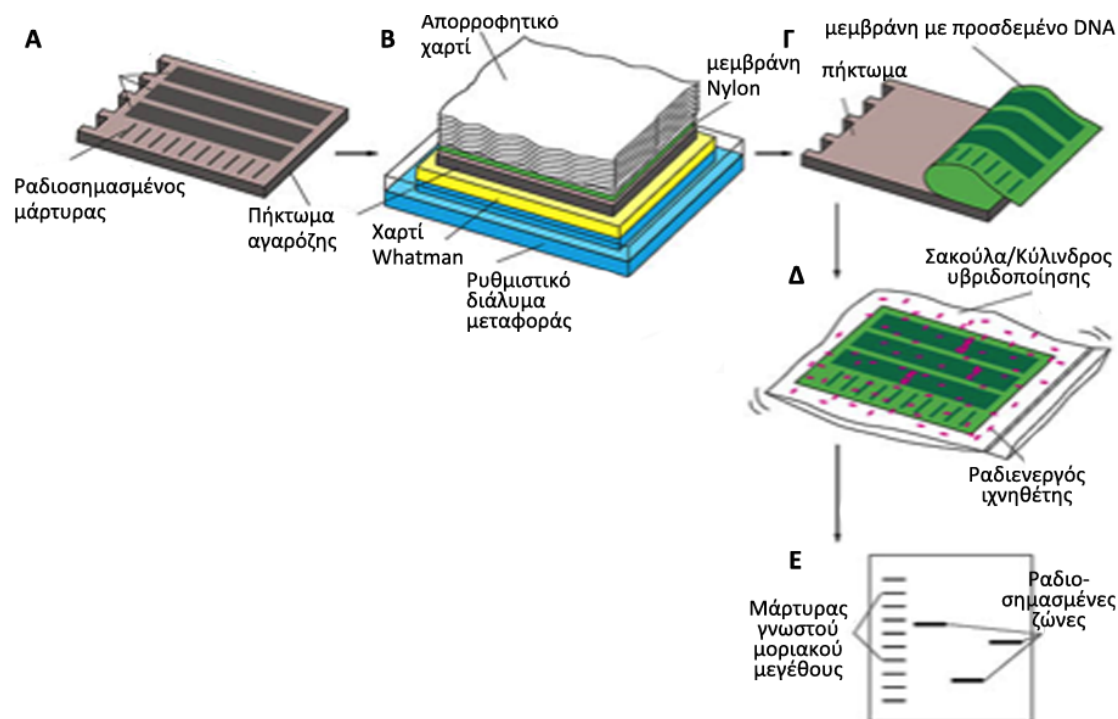
2.8.2. Ηλεκτροφόρηση νουκλεϊκών οξέων σε πήκτωμα αγαρόζης

Ο διαχωρισμός, η ταυτοποίηση, ακόμη και ο καθαρισμός των νουκλεϊκών οξέων γίνεται συνήθως με την ηλεκτροφόρησή τους σε πήκτωμα αγαρόζης. Τα μόρια των νουκλεϊκών οξέων είναι φορτισμένα αρνητικά και καθώς εφαρμόζεται ηλεκτρικό πεδίο στο πήκτωμα, αυτά μετακινούνται προς την άνοδο με βάση το μοριακό τους μέγεθος. Ανάλογα με το μέγεθος του DNA ή του RNA το οποίο εξετάζεται ή καθαρίζεται, παρασκευάζεται αναλόγου συγκεντρώσεως πήκτωμα αγαρόζης. Πιο συγκεκριμένα, για μεγάλου μοριακού μεγέθους νουκλεϊκά οξέα (2kbp) παρασκευάζεται πήκτωμα πυκνότητας 1% (w/v) και για μικρότερου μεγέθους (π.χ. ιχνηθέτες μήκους 150bp) πήκτωμα 2% (w/v) (Sambrook et al., 2001). Ως διάλυμα ηλεκτροφόρησης χρησιμοποιείται το 0,5xTBE (Tris/borate/EDTA) ή το 1xTAE (Tris/acetate/EDTA) ανάλογα με το πρωτόκολλο το οποίο ακολουθείται (βλέπε 2.8.3 και 2.6.1 αντίστοιχα). Το διάλυμα της αγαρόζης σε όλες τις περιπτώσεις θερμαίνεται σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρι να διαλυθεί η αγαρόζη. Όταν η υγρή αγαρόζη φτάσει σε θερμοκρασία 50-60°C, προστίθεται στο διάλυμα βρωμιούχο αιθίδιο σε τελική συγκέντρωση 1μg/ml και η αγαρόζη τοποθετείται στην ειδική υποδοχή της συσκευής ηλεκτροφόρησης. Σε αυτή έχει τοποθετηθεί προηγουμένως ειδικό κτενάκι ούτως ώστε κατά την πήξη του πηκτώματος να δημιουργηθούν τα ειδικά φρεάτια στα οποία θα τοποθετηθούν τα δείγματα. Όταν ολοκληρωθεί η πήξη, το πήκτωμα μεταφέρεται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης και προστίθεται διάλυμα 0,5xTBE ή 1xTAE ούτως ώστε να καλυφθεί πλήρως το πήκτωμα. Σε κάθε φρεάτιο τοποθετείται ίση ποσότητα δείγματος DNA ή RNA το οποίο βρίσκεται σε διάλυμα φόρτωσης (0,25% (w/v) κυανού της βρωμοφαινόλης και 30% (v/v) γλυκερόλη). Στη συνέχεια το πήκτωμα ηλεκτροφορείται σε σταθερή τάση 5 volts ανά εκατοστόμετρο (απόσταση μεταξύ των δύο ηλεκτροδίων). Όταν το μέτωπο της χρωστικής διανύσει περίπου τα δύο τρίτα της απόστασης, σταματάει η ηλεκτροφόρηση και το πήκτωμα μεταφέρεται σε ειδική συσκευή η οποία διαθέτει υπεριώδη ακτινοβολία και φωτογραφίζεται.

2.8.3. Ανίχνευση και ταυτοποίηση διαγονιδιακών ποντικών με ανάλυση κατά Southern

Στην ανάλυση Southern υπάρχουν τρία στάδια επεξεργασίας και ανάλυσης των δειγμάτων: (1) η κατεργασία του DNA προς ανίχνευση, (2) η μεταφορά του DNA και η πρόσδεση του σε ειδική θετικά φορτισμένη μεμβράνη και (3) η ανίχνευση των διαγονιδιακών ποντικών με τη χρήση ραδιενεργού ιχνηθέτη (Reed and Mann, 1985, Sambrook et al., 2001, Southern, 1975).

Στην παρούσα διατριβή επιλέχθηκε το πρωτόκολλο του κατασκευαστή της μεμβράνης (Hybond N+, Amersham), το οποίο βασίζεται στα πρωτόκολλα των Southern (Southern, 1975), Reed και Mann (Reed and Mann, 1985) και Sambrook (Sambrook et al., 2001).

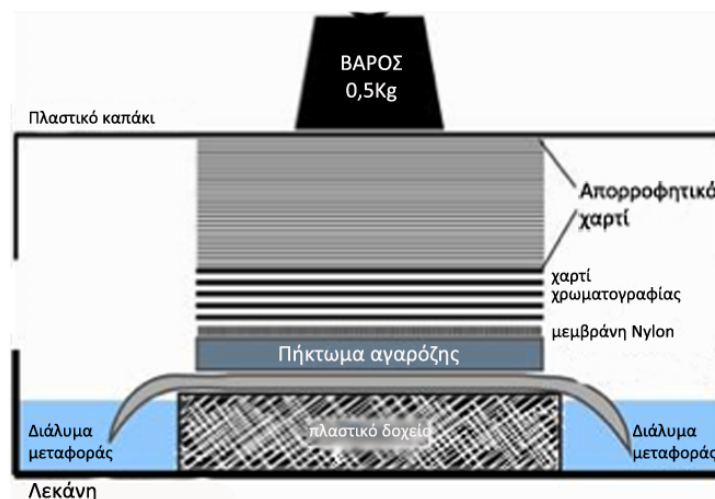


Εικόνα 2.4. Διαγραμματική απεικόνιση της μεθόδου ανάλυσης κατά Southern. A. Ηλεκτροφόρηση δειγμάτων σε πήκτωμα αγαρόζης, B. Μεταφορά του DNA σε μεμβράνη Nylon ή νιτροκυτταρίνης, C. Αφαίρεση της μεμβράνης από το πήκτωμα αγαρόζης, D. Υβριδοποίηση της μεμβράνης και κατ' επέκταση του διαχωρισμένου DNA με ραδιενεργό ιχνηθέτη και E. Ανάλυση αποτελέσματος με αυτοραδιογραφία.

Κατεργασία DNA προς ανίχνευση: 10μg γενωμικού DNA επωάζονται με μια περιοριστική ενδονουκλέαση για 12-16 ώρες στους 37°C. Στη συγκεκριμένη εργασία χρησιμοποιήσαμε την EcoRI για την ανίχνευση του διαγονιδίου. Το DNA ηλεκτροφορείται σε πήκτωμα αγαρόζης 0,8% (w/v) (Sigma) και η πλήρης πέψη διαπιστώνεται από την

παρουσία ζώνης δορυφορικού DNA (satellite DNA) μεγέθους 1500 ζευγών βάσεων. Ως διάλυμα ηλεκτροφόρησης χρησιμοποιείται 0,5x Tris-Boric acid-EDTA (TBE, 45mM Tris-borate, 1mM EDTA). Στη συνέχεια το DNA στο πήκτωμα αποδιατάσσεται με διάλυμα αποδιάταξης (1,5M NaCl, 0,5M NaOH) για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου με συνεχή ανάδευση. Ακολούθως, επωάζεται με διάλυμα ουδετεροποίησης (1,5M NaCl, 0,5M Tris-HCl pH 7,2 και 1mM EDTA) για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου με συνεχή ανάδευση. Το βήμα αυτό επαναλαμβάνεται και εν συνεχεία το πήκτωμα με το DNA αφήνεται σε διάλυμα 2x SSC (0,3M NaCl, 0,03M Na₃citrate) μέχρι να γίνει η μεταφορά.

Μεταφορά: Συναρμολογείται μια συσκευή τριχοειδούς μεταφοράς σε μια μικρή λεκάνη γεμάτη μέχρι τη μέση με διάλυμα μεταφοράς 20x SSC (3M NaCl, 0,3M Na₃citrate). Η συναρμολόγηση γίνεται με την εξής σειρά από κάτω προς τα πάνω: πλαστικό δοχείο υπερυψωμένο κατά 5-10cm, 3 φύλλα χαρτιού χρωματογραφίας Whatman 3mm (GE Healthcare) εκ των οποίων το πρώτο είναι εμβαπτισμένο στο διάλυμα μεταφοράς 20x SSC, το πήκτωμα με το DNA με την λεία πλευρά προς τα πάνω, μεμβράνη στυπώματος θετικά φορτισμένη (Hybond-N+, Amersham), ακόμα 3 φύλλα χαρτιού χρωματογραφίας Whatman 3mm και τέλος απορροφητικό χαρτί/χαρτοπετσέτες. Τοποθετείται στο τέλος ένα βάρος περίπου 1 Kg και ελέγχεται με αλφάδι η οριζόντια θέση. Η μεταφορά γίνεται για 4-16 ώρες (Εικόνα 2.5).



Εικόνα 2.5. Μεταφορά του DNA προς υβριδοποίηση σε μεμβράνη ειδική για την πρόσδεση DNA με τη μέθοδο της τριχοειδούς μεταφοράς.

Για να προσδεθεί μόνιμα το DNA στη μεμβράνη, αυτή ακτινοβολείται 2 φορές σε ειδικό μηχάνημα ακτινοβολίας UV (0,120 Joules). Εναλλακτικά μπορεί να επωαστεί σε

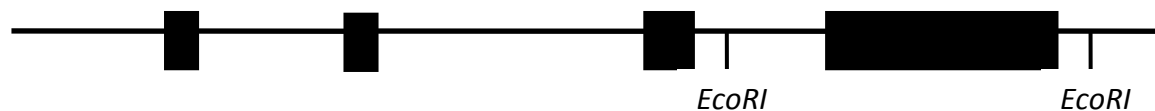
κλίβανο σε θερμοκρασία 80°C για 2 ώρες. Η μεμβράνη μπορεί να χρησιμοποιηθεί αμέσως ή να φυλαχθεί σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι το στάδιο της υβριδοποίησης με ραδιενεργό ιχνηθέτη.

Υβριδοποίηση με ραδιενεργό ιχνηθέτη: Η υβριδοποίηση γίνεται σε ειδικούς κυλίνδρους (Witeg). Αρχικά γίνεται ένα βήμα προ-υβριδοποίησης για 1-4 ώρες, χωρίς το ραδιενεργό ιχνηθέτη, σε 5-10ml διαλύματος υβριδοποίησης 5x SSPE (1,67M NaCl, 0,04M NaH₂PO₄, 5mM EDTA, 5x Denhardt's, 0,5% SDS), ανάλογα με το μέγεθος του κυλίνδρου. Στο διάλυμα προστίθενται επίσης 20μg DNA από όρχεις σολωμού ανά ml διαλύματος στους 65°C. Ακολούθως 1 μg από τον ιχνηθέτη σημαίνεται με ραδιενεργό dGTP-[α-P³²] με το Nick Translation kit (Invitrogen) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή για 1 ώρα και σε θερμοκρασία 16°C. Στη συνέχεια, ο ραδιενεργός ιχνηθέτης προστίθεται στο διάλυμα υβριδοποίησης και η υβριδοποίηση γίνεται για 16-20 ώρες στους 65°C. Την επόμενη μέρα η μεμβράνη ξεπλένεται δύο φορές με διάλυμα 2x SSC/0,1% SDS για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, στη συνέχεια με διάλυμα 1xSSC/0,1% SDS για 15 λεπτά 65°C και τέλος με 0,1x SSC/0,1% SDS για 10 λεπτά στους 65°C.

Μετά το πέρας της υβριδοποίησης το αποτέλεσμα παρατηρείται μετά από έκθεση σε ειδικό φιλμ για ραδιενέργεια (Kodak). Στη συνέχεια τα φιλμ εμφανίζονται σε σκοτεινό θάλαμο με ειδικά διαλύματα. Εναλλακτικά για την ταυτοποίηση των θετικών δειγμάτων μπορούν να χρησιμοποιηθούν ευαίσθητες σε εκπομπή β-ακτινοβολίας οθόνες (Amersham) οι οποίες μπορούν να επαναχρησιμοποιηθούν μετά από έκθεση σε ειδικές λάμπες λευκού φωτός. Οι οθόνες αυτές σαρώνονται από ένα ειδικό μηχάνημα (Phosphorimager, Typhoon 9200, Amersham), το οποίο, με κατάλληλο λογισμικό (ImageQuant®), αναλύει τη β-ακτινοβολία των δειγμάτων και μπορούν να χρησιμοποιηθούν αντί για φιλμ. Τα πλεονεκτήματα της εν λόγω μεθόδου εντοπίζονται στο ότι αφενός τα αποτελέσματα είναι διαθέσιμα σε πολύ μικρό χρονικό διάστημα (3 ώρες) και αφετέρου οι οθόνες επαναχρησιμοποιούνται και μπορεί να αυξομειωθεί η ένταση της ραδιενέργειας με τη χρήση του λογισμικού. Το μειονέκτημα έναντι της χρήσης φιλμ είναι η υψηλή τιμή του συστήματος.

2.8.4. Απομόνωση ιχνηθέτη για την ανάλυση κατά Southern των διαγονιδιακών ποντικών TTRI-huApoE4

Για την ανίχνευση των TTRI-huApoE4 διαγονιδιακών ποντικών χρησιμοποιήθηκε ως ιχνηθέτης το τμήμα EcoRI-EcoRI του DNA της ανθρώπινης ApoE4. Ολόκληρη η χρωμοσωμική θέση του γονιδίου της ανθρώπινης ApoE4 με όλα τα εξώνια και εσώνια ήταν κλωνοποιημένη στο πλασμίδιο-φορέα pBluescript (Stratagene). Επώαση με την περιοριστική ενδονουκλεάση EcoRI απελευθερώνει ένα τμήμα 1,9Kb το οποίο αντιστοιχεί σε μέρος του εσωνίου 3 και σε όλο το εξώνιο 4 (Εικόνα 2.6). Στη συνέχεια αυτό απομονώθηκε από πήκτωμα 0,8% αγαρόζης με τη χρήση του GeneClean Turbo kit® σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή.



Εικόνα 2.6. Σχηματική απεικόνιση του γονιδίου της ανθρώπινης ApoE4. Το γονίδιο έχει 2 περιοριστικές θέσεις για την περιοριστική ενδονουκλεάση EcoRI. Το τμήμα των 1,9Kbp που απελευθερώνεται, χρησιμοποιήθηκε ως ιχνηθέτης για την ταυτοποίηση των διαγονιδιακών ποντικών TTRI-huApoE4.

2.8.5. Γενετικός χαρακτηρισμός των ποντικών με τη μέθοδο της Αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (ΑΑΠ)

ApoE

DNA 300ng	1,0μl
10x Thermo Buffer NEB	2,5μl
MgSO ₄ 100mM NEB	1,5μl
dNTPs 2,5mM NEB	2,0μl
Εκκινητής 180 (50pmoles/μl)	1,0μl
Εκκινητής 181 (50pmoles/μl)	0,5 μl
Εκκινητής 182 (50pmoles/μl)	0,5 μl
TRITON-X	1,0μl
Polymerase (Deep Vent, NEB)	0,5μl
ddH ₂ O	14,5μl

Παράμετροι θερμοκυκλοποιητή

96°C	10 λεπτά	
96°C	1 λεπτό	} 35 κύκλοι
70°C	45 δευτερόλεπτα	
72°C	1 λεπτό	
72°C	10 λεπτά	
4°C	επ' άπειρον	

Εκκινητές (ITE, Κρήτη)

οIMR 180: 5' - GCC TAG CCG AGG GAG AGC CG-3' Tm=69.8°C

οIMR181: 5' – TGT GAC TTG GGA GCT CTG CAG C-3' Tm=67.4 °C

οIMR182: 5' – GCC GCC CCG ACT GCA TCT – 3' Tm=69.3°C

Τα δείγματα ηλεκτροφορούνται σε πήκτωμα αγαρόζης 2 %.

Οι εκκινητές 180 + 181 θα δημιουργήσουν πολλά αντίγραφα ενός τμήματος του DNA μεγέθους 155 br που θα αντιπροσωπεύουν το ενδογενές φυσικού τύπου γονίδιο.

Οι εκκινητές 180 + 182 θα δημιουργήσουν πολλά αντίγραφα ενός τμήματος του DNA μεγέθους 245 br που θα αντιπροσωπεύουν το αποσιωπημένο (knock-out) γονίδιο.

ΑΑΠ για την ανθρώπινη APP

DNA 200ng	0,2 l
5x HF buffer (Finnzymes)	4,0 l
MgCl ₂ 50mM Finnzymes	0,2 l
dNTPs 2,5mM (NEB)	1,6 l
Primer APPPS F (50pmoles/ml)	0,4 l
Primer APPPS R (50pmoles/ml)	0,4 l
DMSO (Finnzymes)	0,6μl
Hot start Phusion Polymerase	0,2μl
ddH ₂ O	11,8μl

Παράμετροι θερμοκυκλοποιητή

98°C	1 λεπτό	
98°C	10 δευτερόλεπτα	} 30 κύκλοι
65°C	30 δευτερόλεπτα	
72°C	20 δευτερόλεπτα	
72°C	2 λεπτά	
4°C	επ' άπειρον	

Εκκινητές (ITE, Crete)

APPforward: 5'-GAA TTC CGA CAT GAC TCA GG-3' Tm: 63,8°C

APPreverse: 5'-GTT CTG CTG CAT CTT GGA CA-3' Tm: 65,7°C

Τα δείγματα ηλεκτροφορούνται σε πήκτωμα αγαρόζης πυκνότητας 2% w/v.

Οι εκκινητές θα δημιουργήσουν πολλά αντίγραφα ενός τμήματος του DNA μεγέθους 245bp που θα αντιπροσωπεύουν το διαγονίδιο.

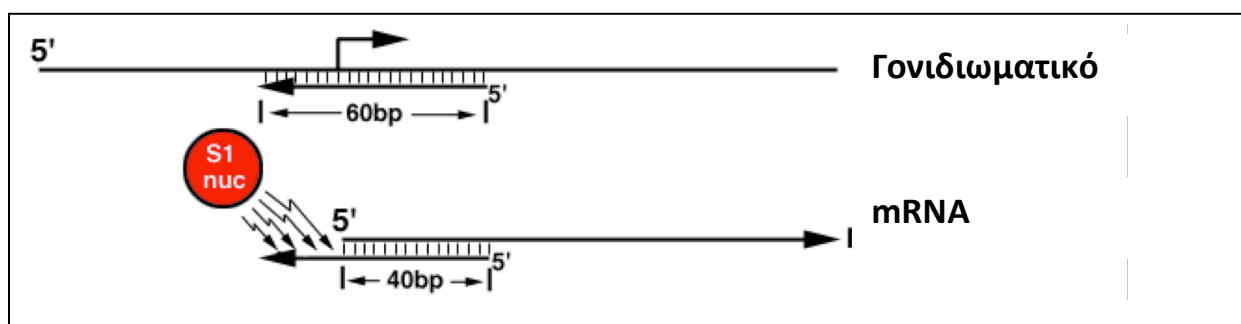
2.9. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ RNA ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΕΚΦΡΑΣΗΣ MRNA ΤΩΝ ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΑΚΩΝ ΜΟΝΤΕΛΩΝ ΣΕ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟ ΕΠΙΠΕΔΟ

Οι μέθοδοι απομόνωσης RNA διαχωρίζονται σε δύο κατηγορίες. Η πρώτη κατηγορία βασίζεται στη διαφορική απομόνωση του RNA με τη χρήση οργανικών διαλυτών όπως η φαινόλη (Stallcup and Washington, 1983) και η δεύτερη βασίζεται στη διαφορική κατακρήμνιση προκειμένου να διαχωριστούν το υψηλού μοριακού βάρους RNA από τα άλλα νουκλεϊκά οξέα (Birnboim, 1988).

Για την απομόνωση RNA από τους ιστούς ζώων στην παρούσα διατριβή επιλέχθηκε το αντιδραστήριο Tri reagent® (Ambion/Molecular research Corporation, Inc) το οποίο περιέχει φαινόλη και θειοκυανική γουανιδίνη (guanidine thiocyanate) και μπορεί να διαχωρίσει DNA, RNA και πρωτεΐνη με τρία διαδοχικά πρωτόκολλα απομόνωσης. Μετά την προσθήκη χλωροφορμίου στο μίγμα Tri reagent® και ιστού και επακόλουθη φυγοκέντρηση, το RNA παραμένει στην υδατική φάση, το DNA παραμένει στη μεσόφαση και οι πρωτεΐνες παραμένουν στην οργανική φάση.

Τα επίπεδα έκφρασης RNA στα διαγονιδιακά ποντίκια εξετάζονται με διάφορες τεχνικές, εκ των οποίων μία από τις πιο ακριβείς είναι η μέθοδος της νουκλεάσης S1. Η μέθοδος της νουκλεάσης S1 (**Εικόνα 2.7**) επιτρέπει την ποσοτικοποίηση των μεταγράφων mRNA και η μέθοδος που ακολουθήσαμε βασίστηκε στα πρωτόκολλα των Kollias και συνεργατών (Kollias et al., 1986) και Georgoroulos και συνεργατών (Georgoroulos et al., 2002).

Η διαδικασία που ακολουθήσαμε ήταν η εξής: Το μονόκλωνο RNA υβριδοποιείται με DNA ραδιενεργούς ιχνηθέτες ειδικούς για το διαγονίδιο. Η αλληλουχία τους είναι κατά μερικές δεκάδες βάσεις μεγαλύτερη από το mRNA. Οι ιχνηθέτες είναι συμπληρωματικοί είτε με το 5'-άκρο του mRNA και ραδιοσημασμένοι στο 5'-άκρο τους είτε με το 3'-άκρο του mRNA και ραδιοσημασμένοι στο 3'-άκρο τους. Η νουκλεάση S1 καταστρέφει τα μη υβριδοποιημένα μονόκλωνα τμήματα του DNA ιχνηθέτη και του mRNA. Το αποτέλεσμα είναι τα δίκλωνα υβριδοποιημένα μόρια RNA-ραδιοσημασμένου ιχνηθέτη να μπορούν να εντοπιστούν με αυτοραδιογραφία.



Εικόνα 2.7. Σχηματική απεικόνιση της πέψης με τη νουκλεάση S1.

2.9.1. Απομόνωση RNA από ιστούς με Tri reagent[®]

Το ζώο θυσιάζεται σε θάλαμο CO₂, γίνεται ενδοκαρδιακή έγχυση (perfusion) με παγωμένο 0,1M PBS, αφαιρούνται οι ιστοί και καταψύχονται ακαριαία σε υγρό άζωτο μέσα σε σωληνάρια Eppendorf. Στη συνέχεια ζυγίζεται ο κάθε ιστός και για κάθε 50mg ιστού (250-300 mg σύνολο) προστίθεται 1ml Tri reagent[®] (Ambion). Ο ιστός ομογενοποιείται ενώ είναι ακόμα παγωμένος με ομογενοποιητή Dounce και στη συνέχεια τα δείγματα αφήνονται για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου ώστε να διαλυθούν τα νουκλεοπρωτεϊνικά σύμπλοκα. Για την απομόνωση του ολικού RNA ακολουθείται το πρωτόκολλο της εταιρείας (Ambion).

Το RNA επαναδιαλυτοποιείται σε 50-100μl διαλύματος υβριδοποίησης για S1 (40mM PIPES pH 6,4, 400mM NaCl, 1mM EDTA, 80% (v/v) φορμαμίδιο) και τα δείγματα φυλάσσονται στους -20°C.

2.9.2 Ραδιοσήμανση ιχνηθετών για την ανάλυση mRNA με τη μέθοδο της νουκλεάσης S1

Αρχικά οι ιχνηθέτες απομονώνονται από πλασμιδιακό DNA μετά από πέψη με κατάλληλη περιοριστική ενδονουκλεάση. Οι ιχνηθέτες δυνητικά ραδιοσημαίνονται σε δύο σημεία, είτε στο 5'- είτε στο 3'-άκρο. Στην περίπτωση που οι ιχνηθέτες θα σημανθούν στο 5'-άκρο, την πέψη ακολουθεί επώαση με φωσφατάση (CIP, NEB) ώστε να αφαιρεθούν οι 5'-φωσφορικές ομάδες (Georgoroulos et al., 2002).

Για ραδιοσήμανση στο 5'-άκρο, 100ng ιχνηθέτη επωάζονται με 1μl T4 κινάση (T4 PNK, NEB) που προσθέτει στο άκρο αυτό ραδιενεργές φωσφορικές ομάδες, 1μl ρυθμιστικό διάλυμα της T4 κινάσης (NEB) και 5μl dATP-[γ -P³²] σε συνολικό όγκο 10μl στους 37°C για μισή ώρα. Για ραδιοσήμανση στο 3'-άκρο, 100ng ιχνηθέτη επωάζονται με 1μl πολυμεράσης Klenow (NEB) που προσθέτει ραδιενεργά νουκλεοτίδια στο 3'-άκρο, 1μl από οποιοδήποτε ρυθμιστικό διάλυμα περιοριστικής ενδονουκλεάσης (NEB) και 5μl dGTP-[α -P³²] σε συνολικό όγκο 10μl σε θερμοκρασία δωματίου για 20 λεπτά.

Στη συνέχεια προστίθεται σε κάθε αντίδραση TE pH 8 (10mM Tris, 1mM EDTA) μέχρι όγκου 100μl και 1μl tRNA συγκέντρωσης 10mg/ml (Sigma). Το tRNA διευκολύνει την κατακρήμνιση του ιχνηθέτη. Το μείγμα ιχνηθέτη-tRNA φορτώνεται σε κολώνα σεφαρόζης (Sephadex G-50, Roche) και φυγοκεντρείται για 4 λεπτά στα 800xg σε φυγόκεντρο Heraeus Multifuge 3-SR για την απομάκρυνση των νουκλεοτιδίων και του ενζύμου. Ο ιχνηθέτης συλλέγεται σε ένα σωληνάριο που βρίσκεται κάτω από την κολώνα. Εκεί προστίθεται νερό μέχρι όγκου 100μl, 2 όγκοι απόλυτης αιθανόλης (200μl) και 10% του αρχικού όγκου 3M οξικού νατρίου (NaAc) pH 5,2. Το μείγμα μεταφέρεται σε σωληνάριο Eppendorf με βιδωτό καπάκι και αφήνεται σε ξηρό πάγο για 15-20 λεπτά προκειμένου να κατακρημνιστεί το DNA. Έπειτα φυγοκεντρείται για 15 λεπτά στους 4°C στα 13.000xg. Αφού αφαιρεθεί όλο το υπερκείμενο, το ίζημα το οποίο περιέχει κατακρημνισμένο τον ιχνηθέτη επαναδιαλυτοποιείται σε διάλυμα υβριδοποίησης S1 (40mM PIPES pH 6,4, 400mM NaCl, 1mM EDTA, 80% φορμαμίδιο). Με τον ίδιο τρόπο ραδιοσημαίνεται και ο μάρτυρας γνωστού μοριακού βάρους (50bp marker, NEB), με τη διαφορά ότι μετά την κατακρήμνιση διαλυτοποιείται σε διάλυμα φόρτωσης S1 (7M ουρία, 5mM Tris-borate pH 8,3, 1mM EDTA,

0,1% xylene cyanol, 0,1% κυανού της βρωμοφαινόλης). Για να είναι ισχυρά σημασμένοι τόσο οι ιχνηθέτες όσο και ο μάρτυρας γνωστού μοριακού βάρους (marker), θα πρέπει 0,5μl από αυτά να είναι περίπου 50 Becquerel (Bq). Οι ιχνηθέτες που χρησιμοποιήθηκαν στην εργασία αυτή παρατίθενται στον πίνακα 3.

Πίνακας 3. Ραδιενεργοί ιχνηθέτες για τη μέθοδο της ανάλυσης mRNA με τη μέθοδο της νουκλεάσης S1

	<i>β-ακτίνη</i>	<i>muApoE</i> (<i>υροE</i> ποντικού)	<i>huApoE</i> (ανθρώπινη <i>ApoE</i>)
DNA	M30/BamHI+AvaI (pSPORT+β-Actin)	M10/SacI+XbaI (pBlsc+muApoE)	M60/EcoRI+NotI (pBlsc+huApoE)
T4 PNK	0,5 μl	0,5 μl	0,5 l
10x T4 PNK buffer	1 0l	1 μl	1 μl
dATP-[γ-P ³²]	5 2l	5 μl	5 μl
H ₂ O	Μέχρι τελικό όγκο 10 μl	Μέχρι τελικό όγκο 10 μl	Μέχρι τελικό όγκο 10 μl

2.9.3. Ανάλυση επιπέδων mRNA με τη μέθοδο της νουκλεάσης S1

Αναδιαλύονται 20μg ολικού RNA απομονωμένου από ιστό σε 10μl S1 διαλύματος υβριδοποίησης και επωάζονται μαζί με τους ραδιενεργούς ιχνηθέτες στους 85°C για 10-15 λεπτά (50-100Bq από κάθε ραδιενεργό ιχνηθέτη για κάθε δείγμα σε συνολικό όγκο 2,5 μl S1 διαλύματος υβριδοποίησης). Τα δείγματα μεταφέρονται ακαριαία σε υδατόλουτρο των 52°C και αφήνονται να υβριδοποιηθούν για 12-16 ώρες.

Την επόμενη μέρα προστίθενται σε κάθε δείγμα 300μl διαλύματος πέψης S1 (0,28mM NaCl, 30mM οξικό νάτριο NaAc pH 4,4 και 4,5mM οξικός ψευδάργυρος ZnAc₂) με 130 μονάδες από τη νουκλεάση S1 (Roche/Promega). Το δείγμα αναδεύεται καλά με στροβιλισμό (vortex), τοποθετείται στον πάγο και η ίδια διαδικασία επαναλαμβάνεται για κάθε δείγμα ξεχωριστά. Πολύ σημαντικό είναι τα δείγματα να υποβάλλονται στην εν λόγω διαδικασία το ένα μετά το άλλο. Στη συνέχεια τα δείγματα φυγοκεντρούνται για 30 δευτερόλεπτα ώστε να κατακρημνιστούν όλα τα μόρια και να είναι ομοιόμορφα κατανεμημένα στο διάλυμα η νουκλεάση S1. Ύστερα αφήνονται για δύο ώρες σε θερμοκρασία δωματίου ώστε να γίνει η πέψη με το προαναφερθέν ένζυμο. Μετά το πέρας των δύο ωρών, γίνεται προσθήκη ίσου όγκου φαινόλης, ανάδευση και δεκάλεπτη

φυγοκέντρωση στις 13.000 στροφές/λεπτό. Στη συνέχεια προστίθενται 750μl αιθανόλης 100% στην υπερκείμενη φάση και τα δείγματα τοποθετούνται σε ξηρό πάγο για 15-20 λεπτά (μέχρι να παγώσουν τελείως). Ακολούθως, αφήνονται να ξεπαγώσουν, φυγοκεντρώνονται για 15 λεπτά στις 13.000 στροφές/λεπτό και μετά την αφαίρεση του υπερκείμενου, το ίζημα επαναδιαλυτοποιείται σε 7μl διαλύματος φόρτωσης S1 (7M ουρία, 5mM Tris-borate pH 8,3, 1mM EDTA, 0,1% xylene cyanol, 0,1% κυανού της βρωμοφαινόλης).

Κατά τη διάρκεια της πέψης ετοιμάζεται το πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου (8M ουρία, 6% (w/v) Ακρυλαμίδη) ως εξής: σε 50ml απιονισμένου νερού προστίθενται 48g ουρίας και το μείγμα θερμαίνεται για να διαλυθεί η ουρία. Στη συνέχεια προστίθενται 5,7g ακρυλαμιδίου (Sigma), 0,2g bis-ακρυλαμιδίου (Sigma) και 20ml 1xTBE. Αφού διαλυτοποιηθούν, το μείγμα φιλτράρεται και προστίθεται σε αυτό απιονισμένο νερό μέχρι ο όγκος να φτάσει τα 100ml. Στη συνέχεια προστίθενται 500μl 20% (w/v) υπερθειικού αμμωνίου (APS) και 50 μl TEMED και το μείγμα εγχέεται αμέσως σε ειδικά τζάμια με επίστρωση σιλικόνης και αφήνεται να κρυώσει για περίπου 60 λεπτά. Τα δείγματα φορτώνονται και έπεται κάθετη ηλεκτροφόρηση με 1xTBE μέχρι το μέτωπο της πάνω χρωστικής (xylene cyanol) να φτάσει στα $\frac{3}{4}$ του πηκτώματος.

2.10. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΑΚΩΝ ΜΟΝΤΕΛΩΝ ΠΟΝΤΙΚΩΝ

Οι κύριοι ιστοί παραγωγής της ενδογενούς ΑΡΟΕ στο ποντίκι είναι το ήπαρ, ο εγκέφαλος και τα μακροφάγα. Διάφοροι ιστοί εξετάστηκαν ως προς την έκφραση του διαγονιδίου για να διαπιστωθεί η ιστο-ειδική έκφραση του υποδοχέα TTR1. Η παρουσία υψηλών επιπέδων mRNA συνήθως εξασφαλίζει και την πρωτεϊνική έκφραση στα διαγονιδιακά ποντίκια. Χαμηλή έκφραση mRNA, δεν δίνει συνήθως έκφραση σε πρωτεϊνικό επίπεδο. Έτσι εξετάζονται με ανοσοσύτρωμα (western blot) όλοι οι ιστοί που δείχνουν έκφραση RNA για εκτίμηση των πρωτεϊνικών επιπέδων.

Συνοπτικά, οι μέθοδοι ανάλυσης της πρωτεϊνικής έκφρασης των πρωτεϊνών περιλαμβάνει συλλογή και προετοιμασία των δειγμάτων, ηλεκτροφόρησή τους σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης με χρήση SDS, μεταφορά των πρωτεϊνών υπό συνθήκες αποδιάταξης σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης ή πολυ-βινυλο-δι-φθοριδίου (polyvinylidene

fluoride, PVDF), υβριδοποίηση της μεμβράνης με το αντίστοιχο κάθε φορά αντίσωμα και ανίχνευση πρωτεΐνης με σύστημα χημειοφωταύγειας (enhanced chemiluminescence, ECL).

2.10.1. Απομόνωση πρωτεϊνών από ιστούς για ανάλυση με τη μέθοδο του ανοσοοστυπώματος

Το πειραματόζωο θυσιάζεται αρχικά σε θάλαμο CO₂. Στη συνέχεια γίνεται ενδοκαρδιακή έγχυση (perfusion) με παγωμένο 0,1M PBS από την αριστερή κοιλία, αφαιρούνται οι ιστοί, τοποθετούνται σε σωληνάρια Eppendorf και καταψύχονται ακαριαία σε υγρό άζωτο. Οι μέθοδοι ανάλυσης των πρωτεϊνών, περιλαμβάνουν αρχικά την επώαση του ιστού με το κατάλληλο διάλυμα λύσης, το οποίο προκαλεί δομική καταστροφή των μεμβρανών με αποτέλεσμα την απελευθέρωση του κυτταρικού περιεχομένου. Μαζί με το κυτταρικό περιεχόμενο απελευθερώνονται και πρωτεάσες. Για την ανάλυση της έκφρασης της ανθρώπινης APOE4 στα διαγονιδιακά ποντίκια έγινε απομόνωση κυτοσολικών πρωτεϊνών σύμφωνα με το πρωτόκολλο των Georgopoulos και συνεργατών (Georgopoulos et al., 2002). Οι ιστοί ομογενοποιούνται σε διάλυμα εναιωρήματος (10mM Tris-Cl pH 7,6, 100mM NaCl, 1mM EDTA pH 8) παρουσία αναστολέων πρωτεασών (Roche). Για την απομόνωση πυρηνικών, μεμβρανικών πρωτεϊνών ή πρωτεϊνών του κυτταροσκελετού, οι ιστοί ομογενοποιούνται σε διάλυμα RIPA (50mM Tris, 150mM NaCl, 1% NP-40, 0,5% sodium deoxycholate, 0,1% SDS pH 8) παρουσία αναστολέων πρωτεασών (Roche). Η όλη διαδικασία γίνεται στον πάγο για να μειωθεί η πρωτεόλυση των πρωτεϊνών. Μετά την ομογενοποίηση ακολουθεί φυγοκέντρηση για 15 λεπτά στα 16.000xg και λαμβάνεται το υπερκείμενο το οποίο περιέχει τις πρωτεΐνες. Στο υπερκείμενο όγκου V προστίθεται 0,5V διαλύματος κατεργασίας των πρωτεϊνών (sample buffer) το οποίο περιέχει: 1% (w/v) SDS, 10 mM EDTA, 10 mM διάλυμα φωσφορικών αλάτων του νατρίου (sodium phosphate buffer) (pH 7) , 1% (v/v) μερκαπτοαιθανόλη , 15% (v/v) γλυκερόλη και 0,01% (w/v) κυανού της βρωμοφαινόλης. Τέλος, τα δείγματα βράζονται για πέντε λεπτά και φυλάσσονται στους -20°C μέχρι να χρησιμοποιηθούν. Η πυκνότητα της πρωτεΐνης που περιέχουν προσδιορίζεται με τη μέθοδο Bradford (βλέπε 2.10.5).

2.10.2. Απομόνωση ορού του αίματος των διαγονιδιακών ποντικών

Η APOE είναι μία εκ των κύριων πρωτεϊνών του ορού του αίματος και γι' αυτό τον λόγο συλλέχθηκε αίμα από τα ζώα είτε από την καρδιά είτε από τη φλέβα του λαιμού. Στην

πρώτη περίπτωση το ζώο θανατώνεται και το αίμα συλλέγεται με σύριγγα κατευθείαν από την καρδιά. Στη δεύτερη περίπτωση το ζώο περιορίζεται ώστε να μην μπορεί να μετακινήσει το κεφάλι του και να δαγκώσει τον πειραματιστή. Με μία βελόνα 19G τρυπιέται ακαριαία και επιφανειακά πίσω από τη σιαγόνα και κάτω από το μάγουλο.

Το αίμα που έχει συλλεχθεί αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για 20-30 λεπτά ώστε να γίνει η πήξη και στη συνέχεια φυγοκεντρείται στις 5.000 στροφές/λεπτό (1000xg, Sorvall Heraeus Fresco) για δέκα λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Η υπερκείμενη φάση που αποτελεί τον ορό του αίματος μεταφέρεται σε καθαρό σωληνάριο Eppendorf και φυλάσσεται στους -80°C μέχρι περαιτέρω ανάλυσης.

2.10.3. Απομόνωση μακροφάγων

Για την απομόνωση και τη μελέτη των μακροφάγων στη παρούσα διατριβή, χρησιμοποιήθηκε ένα θρεπτικό μέσο, το θειογλυκολικό νάτριο, το οποίο έχει τη δυνατότητα να συγκεντρώνει τα μακροφάγα στο σημείο του εμβολιασμού, χωρίς να τα ενεργοποιεί σύμφωνα με τα πρωτόκολλα της ομάδας του van Furth. Σε ποντίκια 3-μηνών έγινε ένεση 1-ml θειογλυκολικού 1% w/v (Thioglycollate, DIFCO) ενδοπεριτοναϊκά (Leijh et al., 1984). Μετά από 72 ώρες τα ζώα θυσιάζονται με αυχενική μετατόπιση και τα μακροφάγα απομονώνονται με την έγχυση 10ml αποστειρωμένου 0,1M PBS pH 7,4 στο περιτόναιο με σύριγγα συνδεδεμένη με βελόνα διαμέτρου 19G. Χωρίς να αφαιρεθεί η βελόνα από το ζώο, η περιοχή μαλάσσεται καλά ώστε να βεβαιωθούμε ότι έχουν αποκολληθεί όλα τα μακροφάγα (van Furth and Diesselhoff-den Dulk, 1980). Στη συνέχεια το PBS που τώρα περιέχει τα κύτταρα συλλέγεται πίσω στη σύριγγα και τοποθετείται σε ένα σωληνάριο Falcon των 15ml. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται για ακόμα μία φορά με 5ml 0,1M PBS. Ακολούθως, τα κύτταρα φυγοκεντρώνονται για 5 λεπτά στις 1200 στροφές/λεπτό (400xg) (Sorvall Multifuge 3-S-R). Το υπερκείμενο αφαιρείται και τα κύτταρα επαναδιαλυτοποιούνται σε RPMI (Gibco) με 10% ορό εμβρύου μόσχου (fetal calf serum, FCS) (Gibco) με αντιβιοτικά (πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη). Τα κύτταρα τοποθετούνται σε πιάτα με 6 κελιά και επώάζονται για 30 λεπτά σε επωαστήρα στους 37°C με παροχή 5%CO₂. Μετά το πέρας των 30 λεπτών το θρεπτικό μέσο συλλέγεται, προστίθενται σε αυτό αναστολείς πρωτεασών και φυλάσσεται στους -20°C μέχρι περαιτέρω ανάλυσης. Στα κύτταρα προστίθεται RPMI με 10%FCS, αντιβιοτικά και 1μg/ml λιποπολυσακχαρίτες (LPS, Sigma #L4005). Επώάζονται σε αυτό το θρεπτικό μέσο για 20 ώρες και την επόμενη μέρα

συλλέγεται τόσο το θρεπτικό μέσο όσο και τα ίδια τα κύτταρα. Να σημειωθεί εδώ ότι το θρεπτικό μέσο εξετάζεται πριν και μετά την προσθήκη LPS και επίσης γίνεται απομόνωση πρωτεϊνών από τα κύτταρα με RIPA (2.10.1). Σε όλα τα δείγματα γίνεται ανάλυση πρωτεϊνών με ανοσοσύτρωμα για την παρουσία ανθρώπινης APOE4 (2.10.8).

2.10.4. Απομόνωση πρωτεϊνών από εγκέφαλο ποντικού για ELISA

Για την ανάλυση των επιπέδων του Αβ στους εγκεφάλους διαγονιδιακών ποντικών με παθολογία τύπου Alzheimer ακολουθήθηκε η μέθοδος απομόνωση πρωτεϊνών σε τρία διαδοχικά στάδια όπως αυτή περιγράφηκε από τους Hirsch-Reinshagen και συνεργάτες (Hirsch-Reinshagen et al., 2005). Όλη η ανάλυση πρωτεϊνών έγινε στα αριστερά ημισφαίρια του εγκεφάλου των ζώων ενώ τα δεξιά ημισφαίρια χρησιμοποιήθηκαν για ανοσοϊστοχημεία.

Αρχικά ο ιστός ζυγίζεται και ομογενοποιείται με ομογενοποιητή Dounce σε οχτώ όγκους παγωμένου 0,1M PBS το οποίο περιείχε αναστολείς πρωτεασών. Στη συνέχεια το δείγμα φυγοκεντρείται για 45 λεπτά, στις 12.000 στροφές/λεπτό σε μικροφυγόκεντρο (Hereaus Sorvall) και στους 4°C. Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε καθαρό σωληνάριο Eppendorf. Το κλάσμα αυτό είναι το PBS-διαλυτό κλάσμα (PBS-soluble), το οποίο αποτελείται από τις υδατοδιαλυτές πρωτεΐνες του κυτοσολίου και του εξωκυττάριου χώρου (κυρίως εκκρινόμενες πρωτεΐνες). Σε αυτό το κλάσμα εξετάζεται με ανοσοσύτρωμα η παρουσία APOE, APOJ και IBA1.

Στο ένα εκ των δύο ιζημάτων που έμειναν μετά τη φυγοκέντρηση προστίθεται παγωμένο διάλυμα λύσης με αναστολείς πρωτεασών (Lysis buffer, 10% γλυκερόλη, 1% Triton X-100 σε PBS) ίσο με 2 όγκους του αρχικού βάρους του ιστού. Το δεύτερο ίζημα καταψύχεται στους -80°C για μελλοντική χρήση. Ακολουθεί ομογενοποίηση με ομογενοποιητή Dounce και φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 9.000 στροφές/λεπτό και σε θερμοκρασία 4°C. Το υπερκείμενο αποτελεί το κλάσμα λύσης (Lysis fraction). Στο διάλυμα λύσης βρίσκονται όλες οι μεμβρανικές πρωτεΐνες καθώς κι εκείνες που είναι εντός κυστιδίων. Αυτό το κλάσμα χρησιμοποιείται για την ανίχνευση των πρωτεϊνών APP και GFAP με τη μέθοδο του ανοσοστυπώματος. Επιπλέον, το κλάσμα λύσης (Lysis fraction) εξετάζεται στην ELISA για το Αβ το οποίο δε βρίσκεται συσσωματωμένο σε πλάκες και έχει τη μορφή διαλυτών ολιγομερών. Για την ELISA χρησιμοποιούνται 50-100μg ολικής πρωτεΐνης σε κάθε κελί.

Τέλος το ίζημα που μένει μετά τη φυγοκέντρηση και αποτελεί το μη διαλυτό (insoluble) κλάσμα, ζυγίζεται και αραιώνεται σε γουανιδίνη τελικής συγκέντρωσης 5M και pH. Τα δείγματα αφήνονται για 3-16 ώρες να περιστρέφονται σε θερμοκρασία δωματίου. Αφού διαλυτοποιηθούν εντελώς, προστίθενται σε αυτά αναστολείς πρωτεασών (Roche) και φυλάσσονται στους -80°C μέχρι την ανάλυσή τους. Σε αυτό το κλάσμα ανευρίσκονται όλες οι πρωτεΐνες που βρίσκονται πάνω στις αμυλοειδείς πλάκες (plaque-associated). Μεταξύ αυτών είναι η APOE που βρίσκεται σε συσσωματώματα στις πλάκες καθώς και τα συσσωματωμένα πεπτίδια του Αβ τα οποία αποτελούν τον κύριο πυρήνα των αμυλοειδών πλακών. Για την ELISA χρησιμοποιούνται 0,2-0,5μg ολικής πρωτεΐνης από το διαλυτό σε 5M Γουανιδίνης pH 8 κλάσμα για κάθε κελί. Τα επίπεδα του Αβ αναλύονται με ELISA (Covance #SIG-38956, βλέπε 2.16).

2.10.5. Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών (μέθοδος Bradford)

Προκειμένου να ποσοτικοποιηθεί η συγκέντρωση των πρωτεϊνών που περιέχεται σε ένα διάλυμα, χρησιμοποιείται η χρωματομετρική μέθοδος Bradford (Bradford, 1976). Η τεχνική αυτή βασίζεται στην ιδιότητα της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250 να συνδέεται με πρωτεΐνες σε όξινο περιβάλλον μεταβάλλοντας το χρώμα της. Το σύμπλοκο χρωστικής-πρωτεΐνης έχει μέγιστο απορρόφησης στα 595nm, ενώ η ελεύθερη χρωστική έχει μέγιστο απορρόφησης στα 465nm.

Για την ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών, απαιτείται η κατασκευή αρχικά μιας καμπύλης αναφοράς η οποία προκύπτει από τη μέτρηση της OD₅₉₅ γνωστών συγκεντρώσεων προτύπων διαλυμάτων αλβουμίνης από ορό βοός (bovine serum albumin, BSA συγκέντρωσης 1mg/ml). Τα διαλύματα της αλβουμίνης αραιώνονται στο διάλυμα με το οποίο εκχυλίστηκαν οι πρωτεΐνες για να αποκλειστεί η επίδραση του διαλύτη στην απορρόφηση. Ως πρότυπα διαλύματα χρησιμοποιούνται 10μl από τα 0, 200, 400, 600, 800 και 1000μg/ml από BSA στα οποία προστίθενται 500μl από το αντιδραστήριο Bradford (B6916, Sigma-Aldrich). Στη συνέχεια κατασκευάζεται η πρότυπη καμπύλη και οι τιμές απορρόφησης των άγνωστων δειγμάτων συγκρίνονται με αυτήν. Η μέθοδος αυτή είναι γραμμική και ποσοτική μόνο για ένα μικρό εύρος (συνήθως από 0 μg/ml μέχρι 2000 μg/ml), οπότε τα δείγματα συνήθως αραιώνονται 5-10 φορές. Επίσης, ένα άλλο μειονέκτημα της μεθόδου είναι ότι αναστέλλεται από την παρουσία απορρυπαντικών.

2.10.6. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτώματα πολυακρυλαμίδης (SDS-PAGE)

Για την ανάλυση των πρωτεϊνών τα δείγματα ηλεκτροφορούνται σε πηκτώματα SDS-πολυακρυλαμίδης (SDS-PAGE). Οι πρωτεΐνες έχουν την ιδιότητα να μετακινούνται υπό την επίδραση ενός ηλεκτρικού πεδίου όταν δεν βρίσκονται στο ισοηλεκτρικό τους σημείο. Οι πρωτεΐνες κινούνται ανάλογα με το λόγο του φορτίου το οποίο φέρουν ως προς τη μάζα τους και όσο μεγαλύτερος είναι ο λόγος αυτός με τόσο μεγαλύτερη ταχύτητα κινούνται.

Τα πηκτώματα αυτά περιέχουν επίσης δωδεκυλ-υπερθειικό νάτριο (sodium dodecyl sulphate, SDS) το οποίο φορτίζει αρνητικά τις πρωτεΐνες, με αποτέλεσμα αυτές να τρέχουν ανάλογα με το μοριακό τους μέγεθος. Τα πηκτώματα πολυακρυλαμίδης σχηματίζονται από τον πολυμερισμό δύο συστατικών, του ακρυλαμιδίου και του N,N-μεθυλέν-δισ-ακρυλαμιδίου. Ο πολυμερισμός καταλύεται από την προσθήκη APS και TEMED. Τα πηκτώματα είναι ουδέτερου pH, υδρόφιλα, τρισδιάστατα δίκτυα μακρών υδρογονανθράκων τα οποία διασταυρώνονται από ομάδες μεθυλενίου. Το μέγεθος των πόρων καθορίζει την ικανότητα διαχωρισμού του πηκτώματος, δηλαδή όσο πιο πυκνό είναι τόσο μεγαλύτερη διαχωριστική ικανότητα έχει για πρωτεΐνες μικρού μοριακού μεγέθους. Όπως αναφέρθηκε και πιο πάνω, στα δείγματα των πρωτεϊνών προστίθεται διάλυμα κατεργασίας δειγμάτων το οποίο περιέχει: α) β-μερκαπτοαιθανόλη, η οποία δημιουργεί αποδιατακτικές συνθήκες (αναγωγή δισουλφιδικών δεσμών), β) SDS, το οποίο προσδίδει αρνητικό φορτίο σε όλες τις πρωτεΐνες, γ) γλυκερόλη, η οποία βοηθάει στην τοποθέτηση του δείγματος στο πήκτωμα και δ) κυανούνη της βρωμοφαινόλης, η οποία βοηθάει στην τοποθέτηση του δείγματος στο πήκτωμα αλλά και στην παρακολούθηση της πορείας της ηλεκτροφόρησης. Το αποτέλεσμα είναι οι πρωτεΐνες μετά το βρασμό να αποκτούν τυχαία διαμόρφωση (αποδιατάσσονται) και αρνητικό φορτίο, οπότε ο διαχωρισμός τους πραγματοποιείται αποκλειστικά με βάση το μοριακό τους βάρος. Μικρού μεγέθους πρωτεΐνες κινούνται ταχύτερα κατά μήκος του πηκτώματος σε σχέση με πρωτεΐνες μεγάλου μοριακού βάρους (Reynolds and Tanford, 1970, Weber and Osborn, 1969). Στη μελέτη αυτή χρησιμοποιήθηκε το αλκαλικό ασυνεχές σύστημα SDS-ηλεκτροφόρησης, σε κάθετο πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου όπως αυτό περιγράφεται από τον Laemmli για πρωτεΐνες μεσαίας και μεγάλης μοριακής μάζας (Laemmli, 1970). Για την ανίχνευση μικρών πρωτεϊνών, μάζας 4-20kDa, χρησιμοποιήθηκε το ασυνεχές σύστημα SDS-PAGE το οποίο έχει περιγραφεί από τους Schagger και von Jagow όπου χρησιμοποιείται αντί γλυκίνης, η N-[τρις(υδροξυμεθυλο)μεθυλο]-γλυκίνη (Tricine) η οποία

επιτρέπει καλύτερο διαχωρισμό των μικρών πρωτεϊνών (Schagger and von Jagow, 1987). Το μειονέκτημα του πηκτώματος με Tricine είναι ότι χρειάζεται διαφορετικό διάλυμα ανόδου και καθόδου, που κάνει την τεχνική πιο επιρρεπή σε πειραματικά σφάλματα.

Στην παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκε συσκευή κάθετης ηλεκτροφόρησης (BioRad) όπου το πήκτωμα σχηματίζεται ανάμεσα σε δύο κάθετες γυάλινες πλάκες. Το πήκτωμα σχηματίζεται μετά από πολυμερισμό των μονομερών του ακρυλαμιδίου ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$), που συνδέονται μεταξύ τους με μόρια N,N-μεθυλενο-δισακρυλαμιδίου (bis ακρυλαμίδιο, $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}-\text{CH}_2$). Ο πολυμερισμός επιτυγχάνεται παρουσία APS και TEMED. Το μέγεθος των πόρων του πηκτώματος εξαρτάται από τη συγκέντρωση του ακρυλαμιδίου και του bis-ακρυλαμιδίου (**πίνακες 4 και 5**). Για το διαχωρισμό των πρωτεϊνών των δειγμάτων, χρησιμοποιείται πήκτωμα διαχωρισμού (separating gel) από 10% (v/v) μέχρι 16% (v/v) (**πίνακας 4**), ανάλογα με τη μοριακή μάζα της εξεταζόμενης πρωτεΐνης. Πριν την είσοδο τους στο πήκτωμα διαχωρισμού, οι πρωτεΐνες ευθυγραμμίζονται με τη βοήθεια του πηκτώματος επιστοιβάξης το οποίο έχει διαφορετική συγκέντρωση ακρυλαμίδης (4%) και διαφορετικό pH. Παράλληλα με τα δείγματα ηλεκτροφορείται και μίγμα πρωτεϊνών γνωστής μοριακής μάζας (marker), που χρησιμοποιούνται για την παρακολούθηση της πορείας της ηλεκτροφόρησης και για την αναγνώριση μιας πρωτεΐνης άγνωστης μοριακής μάζας. Στη συνέχεια περιγράφονται αναλυτικά τα υπόλοιπα στάδια για τα δύο διαφορετικού τύπου πηκτώματα τα οποία χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή.

2.10.6.1. Πηκτώματα SDS-PAGE Tris-Γλυκίνης

Αρχικά παρασκευάζεται το διάλυμα που θα σχηματίσει το πήκτωμα διαχωρισμού, στη συνέχεια εγχέεται ανάμεσα σε δύο ειδικές γυάλινες πλάκες και αφήνεται να πολυμεριστεί για 20-30 λεπτά (**πίνακας 4**). Για την αποφυγή εξάτμισης το πήκτωμα καλύπτεται με διάλυμα κορεσμένης με νερό ισοβουτανόλης. Μετά τον πολυμερισμό, αφαιρείται η ισοβουτανόλη και προστίθεται το διάλυμα που θα σχηματίσει το πήκτωμα επιστοιβάξης (**πίνακας 4**). Παράλληλα, τοποθετούνται σε αυτό τα ειδικά χτενάκια τα οποία θα δημιουργήσουν τα φρεάτια φόρτωσης.

Πίνακας 4. Σύνθεση πηκτωμάτων πολυακρυλαμιδίου SDS-PAGE (Tris-Γλυκίνη)

	Αντιδραστήρια	10%	12%	16%
Πήκτωμα διαχωρισμού	Διάλυμα διαχωρισμού (4x)	1ml	1ml	1ml
	40% (w/v) Ακρυλαμίδιο-Bis- Ακυλαμίδιο	1ml	1,2	1,6
	10% (w/v) APS	40μl	40μl	40μl
	TEMED	2,8 μl	2,8 μl	2,8 μl
	H ₂ O	1,978ml	1,778ml	1,378ml
	Σύνολο	4ml	4ml	4ml
Πήκτωμα επιστοίβαξης	Αντιδραστήρια	4%		
	Διάλυμα επιστοίβαξης (4x)	1ml		
	40% (w/v) Ακρυλαμίδιο-Bis- Ακυλαμίδιο	0,4ml		
	10% (w/v) APS	40μl		
	TEMED	4 μl		
	H ₂ O	2,576ml		
	Σύνολο	4ml		

Το πήκτωμα αφήνεται να πολυμεριστεί για 15 λεπτά και στη συνέχεια τα τζαμάκια τοποθετούνται μέσα στην κάθετη συσκευή ηλεκτροφόρησης, η οποία γεμίζεται με διάλυμα ηλεκτροφόρησης. Ακολουθως φορτώνονται οι πρωτεΐνες, οι οποίες έχουν πρώτα βράσει για 5 λεπτά, και ηλεκτροφορούνται για 60-90 λεπτά σε σταθερή τάση (100-150 Volts) με το διάλυμα ηλεκτροφόρησης (25mM Tris-HCl, 192mM γλυκίνη, pH 7,6). Η πορεία της ηλεκτροφόρησης παρακολουθείται μέσω της χρωστικής την οποία περιέχει το διάλυμα κατεργασίας δειγμάτων και τερματίζεται όταν η χρωστική φτάσει στο τέλος του πηκτώματος.

2.10.6.2. Πηκτώματα SDS-PAGE Tris-Tricine

Τα πηκτώματα αυτά βασίζονται στο χημικό αντιδραστήριο Tricine. Ως διάλυμα καθόδου χρησιμοποιείται το διάλυμα ηλεκτροφόρησης Tris/Tricine/SDS (0,5M Tricine, 0,5M Tris, 0,5%

(w/v) SDS pH 8,3) το οποίο τοποθετείται ανάμεσα στα πηκτώματα. Ως διάλυμα ανόδου χρησιμοποιείται Tris-HCl συγκέντρωσης 0,2M και pH 8,8 και τοποθετείται έξω από τα πηκτώματα. Η σύσταση των πηκτωμάτων είναι όπως περιγράφεται στον **πίνακα 5** και η υπόλοιπη διαδικασία είναι όμοια με το 2.10.6.1.

Πίνακας 5. Σύνθεση πηκτωμάτων πολυακρυλαμιδίου SDS-PAGE (Tris-Tricine)

	Αντιδραστήρια	12%
Πήκτωμα διαχωρισμού 15ml	3M Tris-HCl pH 8,45	5ml
	40% (w/v) Ακρυλαμίδιο-Bis-Ακυλαμίδιο	4,5ml
	Γλυκερόλη	1,5ml
	30% (w/v) APS	14μl
	TEMED	14μl
	H ₂ O	4ml
	Αντιδραστήρια	4%
Πήκτωμα επιστοιβάξης	3M Tris-HCl pH 8,45	1,55ml
	40% (w/v) Ακρυλαμίδιο-Bis-Ακυλαμίδιο	0,6ml
	30% (w/v) APS	14μl
	TEMED	14μl
	H ₂ O	4,1ml
	Σύνολο	6,278ml

Τα δείγματα των πρωτεϊνών σε αυτού του τύπου τα πηκτώματα, βράζουν σε ίσο όγκο διαλύματος κατεργασίας 2x Tris-Tricine (100mM Tris-HCl pH 6.8, 24% (v/v) γλυκερόλη, 8% (w/v) SDS, 0,02% (w/v) Coomassie Blue G-250 2% (v/v) β-μερκαπτοαιθανόλη) αντί του κανονικού διαλύματος.

2.10.7. Υγρή ηλεκτροφορητική μεταφορά πρωτεϊνών

Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, ακολουθεί ηλεκτροφορητική μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης ή PVDF με διάλυμα μεταφοράς για πρωτεΐνες (25mM Tris-HCl, 192mM γλυκίνη και 10% μεθανόλη). Οι πρωτεΐνες αποτυπώνονται όπως ακριβώς έχουν διαχωριστεί από την ηλεκτροφόρηση με SDS (Burnette, 1981, Towbin et al.,

1979). Συγκεκριμένα, μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης, το πήκτωμα, η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης ή PVDF καθώς και τέσσερα φύλλα Whatman 3mm (GE Healthcare) διαβρέχονται για 15 λεπτά στο διάλυμα μεταφοράς πρωτεϊνών. Για τη μεμβράνη PVDF πριν από αυτό το στάδιο, προηγείται μία εμβάπτιση για 20 δευτερόλεπτα σε απόλυτη μεθανόλη, η οποία ακολουθείται από μία εμβάπτιση για δύο λεπτά σε απιονισμένο νερό.

Ακολούθως, συναρμολογείται η «κασέτα» μεταφοράς, με την εξής σειρά: 2 φύλλα χαρτιού χρωματογραφίας τα οποία είναι εμβαπτισμένα στο διάλυμα μεταφοράς, το πήκτωμα με τις πρωτεΐνες, η μεμβράνη και τέλος άλλα 2 φύλλα χαρτιού χρωματογραφίας Whatman 3mm. Λαμβάνεται εξαιρετική προσοχή, ούτως ώστε να αποφευχθεί ο σχηματισμός φυσαλίδων. Στη συνέχεια η «κασέτα» τοποθετείται στη συσκευή μεταφοράς με την εξής σειρά από την άνοδο προς την κάθοδο: 2 χαρτιά Whatman-μεμβράνη-πήκτωμα-2 χαρτιά Whatman. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στο γεγονός ότι οι αρνητικά φορτισμένες από το SDS πρωτεΐνες οδεύουν προς το θετικό πόλο της συσκευής. Εφαρμόζεται ρεύμα συνεχούς έντασης 400mA και η μεταφορά ολοκληρώνεται σε 60-90 λεπτά.

2.10.8. Ανάλυση των πρωτεϊνικών επιπέδων έκφρασης με ανοσοδοκιμασία western (western blot)

Η ανάλυση με ανοσοδοκιμασία western αποτελεί μια πολύ διαδεδομένη τεχνική με την οποία αξιολογούνται τα επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών. Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στην ειδική πρόσδεση ενός αντισώματος στην πρωτεΐνη η οποία εξετάζεται πάνω στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης ή PVDF (Burnette, 1981). Στη συνέχεια ακολουθεί επώαση με ένα δευτερογενές αντίσωμα που αναγνωρίζει τη συντηρημένη περιοχή Fc του πρώτου αντισώματος. Το δευτερογενές αντίσωμα έχει προσδεδεμένη HRP και επιλέγεται ανάλογα με το είδος από το οποίο προέρχεται το πρώτο αντίσωμα (για παράδειγμα αντίσωμα έναντι ανοσοσφαιρινών κουνελιού, γίδας ή ποντικού). Ο εντοπισμός της πρωτεΐνης προς ανάλυση γίνεται μέσω εντοπισμού του δευτερογενούς αντισώματος με κατάλληλη μέθοδο, το οποίο στην παρούσα περίπτωση γίνεται μέσω της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας (enhanced chemiluminescence, ECL). Η μέθοδος αυτή βασίζεται στο φαινόμενο της φωταύγειας, δηλαδή στην εκπομπή φωτονίων από ένα μόριο, καθώς αυτό χάνει ενέργεια κατά τη μετάπτωσή του από τη διεγερμένη κατάσταση στη βασική. Το πιο γνωστό ίσως σύστημα είναι αυτό της HRP που καταλύει την οξειδωση της λουμινόλης, κάτω από αλκαλικές

συνθήκες. Αμέσως μετά την οξείδωσή της, η λουμινόλη βρίσκεται στη διεγερμένη κατάσταση και κατόπιν μεταπίπτει στη βασική κατάσταση μέσω της εκπομπής φωτός. Κατά την ενισχυμένη χημειοφωταύγεια, η παραπάνω αντίδραση πραγματοποιείται παρουσία χημικών ενισχυτών (Kricka and Whitehead, 1987).

Η διαδικασία που ακολουθείται είναι η εξής: Η μεμβράνη επωάζεται για μια ώρα σε θερμοκρασία δωματίου με 3 ή 5% (w/v) άπαχο γάλα (Regilait) ή με 5% (v/v) FCS σε TBS με 0,05% (v/v) Tween (TBS-T) με συνεχή ανακίνηση για να δεσμευτούν οι μη ειδικές θέσεις πρόσδεσης. Έπεται επώαση με το πρωτογενές αντίσωμα το οποίο αραιώνεται στο διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε για τη δέσμευση των μη ειδικών θέσεων πρόσδεσης, για μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου ή για 16 ώρες στους 4°C. Ακολουθούν τρία ξεπλύματα δέκα λεπτών το καθένα με TBS-T. Εν συνεχεία η μεμβράνη επωάζεται για μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου με το κατάλληλο δευτερογενές αντίσωμα το οποίο αναγνωρίζει την αλυσίδα Fc της ανοσοσφαιρίνης του πρώτου αντισώματος και είναι συζευγμένο με HRP, σε συγκέντρωση 0,08mg/ml μέσα σε διάλυμα TBS-T με 5% (w/v) άπαχο γάλα ή 5% (v/v) FCS για μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Στη μεμβράνη γίνονται άλλα τρία ξεπλύματα 10 λεπτών το καθένα, με διάλυμα TBS-T και ακολουθεί ανίχνευση με τη μέθοδο της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας (ECL, Amersham). Η ομάδα αντιδραστηρίων του ECL αποτελούνται από το αντιδραστήριο A, μέσα στο οποίο βρίσκεται το υπεροξείδιο το οποίο αποτελεί υπόστρωμα για το ένζυμο-ιχνηθέτη που είναι συζευγμένο με το δευτερογενές αντίσωμα, και το αντιδραστήριο B, που περιέχει λουμινόλη και τον ενισχυτή της χημειοφωταύγειας. Τα δύο αντιδραστήρια αναμιγνύονται σε αναλογία 1:1 αμέσως πριν τη χρήση και ακολούθως η μεμβράνη επωάζεται για δύο λεπτά, υπό συνεχή ανάδευση. Ακολούθως η μεμβράνη καλύπτεται με διαφανή μεμβράνη και ακολουθεί έκθεσή της σε ιατρικό φιλμ (Fugi) μέσα σε ειδική κασέτα (Amersham) (Kricka and Thorpe, 1986). Ο χρόνος έκθεσης εξαρτάται από την ποσότητα της πρωτεΐνης καθώς και από την καθαρότητα και την ποιότητα του αντισώματος. Στη συνέχεια το φιλμ εμφανίζεται με το κατάλληλο διάλυμα εμφανιστή (developer) και σταθεροποιείται μετά από επώαση σε ειδικό διάλυμα σταθεροποιητή (fixer).

Για την παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικές συνθήκες οι οποίες δίνονται αναλυτικά στον **πίνακα 6** για κάθε πρωτεΐνη. Η προέλευση των αντισωμάτων δίνεται αναλυτικά στον **πίνακα 2**.

Πίνακας 6. Συνθήκες ανοσοσύτωσης κατά western

Πρωτεΐνη προς ανίχνευση	Τύπος μεμβράνης	Είδος πηκτώματος	Δέσμευση μη ειδικών θέσεων	Διάλυση/ Επώαση αντισώματος
APOE (ανθρώπου) 3H1, Ottawa Heart Institute	PVDF	Tris-Glycine 12% (v/v)	5% (w/v) άπαχο γάλα σε TBS-T	0,5μg/ml 1 ώρα, 20 °C
APOE ποντικού SantaCruz #sc-6384	PVDF	Tris-Glycine ή Tris-Tricine 12% (v/v)	5% (w/v) άπαχο γάλα σε TBS-T	0,2μg/ml 16 ώρες, 4 °C
APOJ SantaCruz #sc-8354	PVDF	Tris-Glycine 10% (v/v)	5% (w/v) άπαχο γάλα σε TBS-T	0,4μg/ml 1 ώρα, 20 °C
GAPDH SantaCruz #sc-20357)	PVDF ή νιτροκυτταρίνη	Tris-Glycine ή Tris-Tricine 10-16% (v/v)	3% (w/v) άπαχο γάλα σε TBS-T	0,5μg/ml 1 ώρα, 20 °C
GFAP Sigma #G3893	PVDF	Tris-Glycine 10%	5% (w/v) άπαχο γάλα σε TBS-T	2,5μg/ml 1 ώρα, 20 °C
IBA1 Wako #019-19741	νιτροκυτταρίνη	Tris-Glycine 16%	3% (v/v) FCS σε TBS-T	1,67μg/ml 16 ώρες, 4 °C
APPώραP και β-CTF Dr. P. Mehta	νιτροκυτταρίνη	Tris-Tricine 12% (v/v)	5% (v/v) FCS σε TBS-T	0,4μg/ml 16 ώρες, 4 °C
β16 ώ Τουμπουλίνη Sigma #T8660	PVDF ή νιτροκυτταρίνη	Tris-Glycine ή Tris-Tricine 10-16% (v/v)	5% (w/v) άπαχο γάλα σε TBS-T	6μg/ml 1 ώρα, 20 °C

2.10.9. Αποδέσμευση αντισώματος από μεμβράνη νιτροκυτταρίνης ή PVDF (stripping)

Μια διαδικασία ιδιαίτερα χρήσιμη όταν χρειάζεται να επιβεβαιωθεί η ισόποση φόρτωση των δειγμάτων ή όταν τα δείγματα είναι σπάνια και δεν υπάρχει η δυνατότητα για παρασκευή πολλών μεμβρανών, είναι η αποδέσμευση του αντισώματος από τη μεμβράνη (Kaufmann et al., 1987, Legocki and Verma, 1981). Σε αυτές τις περιπτώσεις, είναι δυνατόν να αφαιρεθεί το αντίσωμα και αφού απομακρυνθούν πλήρως οι χημικές ουσίες που χρησιμοποιούνται για την παραπάνω διαδικασία, μπορεί να ακολουθήσει επώαση με διαφορετικό πρωτογενές αντίσωμα. Η διαδικασία περιλαμβάνει επώαση της μεμβράνης για μία ώρα υπό συνεχή ανάδευση, στους 55°C, σε διάλυμα αποδέσμευσης των αντισωμάτων το οποίο περιέχει: 100μM β-μερκαπτοαιθανόλη, 2% (v/v) SDS, 62,5mM Tris-

HCl pH 6,7. Ακολουθούν τέσσερις δεκάλεπτες πλύσεις με TBS-T υπό συνεχή ανάδευση, και ακολούθως επώαση με το πρωτογενές αντίσωμα όπως αυτό περιγράφεται στην ενότητα 2.10.8.

2.11. ΜΕΤΡΗΣΗ ΧΟΛΗΣΤΕΡΟΛΗΣ

Για τη μέτρηση της χοληστερόλης στον ορό του αίματος (blood serum) σε ποντίκια φυσικού τύπου, ApoE^{-/-}, TTRI-huApoE4;ApoE^{-/-} και 5xFAD;TTRI-huApoE4;ApoE^{-/-}, αφαιρείται η τροφή από αυτά έξι ώρες πριν από τη λήψη του αίματος. Το αίμα συλλέγεται και αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για μισή ώρα για να γίνει θρόμβωση σε αυτό. Στη συνέχεια το δείγμα φυγοκεντρείται για 10 λεπτά στα 800xg και το υπερκείμενο, που αποτελεί τον ορό του αίματος, μεταφέρεται σε καθαρό σωληνάριο Eppendorf. Οι οροί του αίματος που απομονώνονται φυλάσσονται στους -80°C μέχρι αναλύσεώς τους.

Οι μετρήσεις έγιναν με το Cholesterol/Cholesteryl Ester kit (Calbiochem) σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή και με τη μέθοδο της χρωματομετρίας. Μετρήθηκαν δύο ξεχωριστά δείγματα από κάθε ορό και οι ενδείξεις λήφθηκαν σε φωτόμετρο Spectra Max 190 (Molecular Devices). Το εύρος της μεθόδου αυτής είναι 0-10μg/κελί και για τις μετρήσεις χρησιμοποιήθηκε 0,5μl από ορό του αίματος εκάστου δείγματος.

2.12. ΟΡΓΑΝΟΤΥΠΙΚΗ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΕΓΚΕΦΑΛΟΥ

Η μέθοδος αυτή βασίζεται στο γεγονός ότι κύτταρα από εγκέφαλο μετά από διάσπαση του ιστού και τυχαία αναδιοργάνωση μέσα σε καλλιέργεια, είναι ικανά *in vitro* να σχηματίσουν συναπτικά δίκτυα τα οποία είναι λειτουργικά και έχουν τις φαρμακολογικές και βιοηλεκτρικές ιδιότητες οι οποίες είναι τυπικές για το όργανο (οργανοτυπική) (Crain and Bornstein, 1972).

Η διαδικασία που ακολουθήσαμε ήταν η εξής: Αρχικά προθερμαίνεται το τεχνητό εγκεφαλονωτιαίο υγρό (ENY, 147mM NaCl, 2,7mM KCl, 1,2mM CaCl₂, 0,85mM MgCl₂, pH 7,4) στους 37°C για περίπου 30 λεπτά. Το ζώο θυσιάζεται με αυχενική μετατόπιση και αφαιρείται πολύ γρήγορα ο εγκέφαλος. Στη συνέχεια τοποθετείται σε ένα τρυβλίο Petri, ξεπλένεται δύο φορές με προθερμασμένο τεχνητό ENY και κόβεται με αποστειρωμένο νυστέρι σε πολύ μικρά κομμάτια μέσα σε αυτό (περίπου 0,2-1mm). Ακολούθως ο ιστός μεταφέρεται σε δοχείο οργανοτυπικής καλλιέργειας Torbal και διατηρείται μέσα σε

τεχνητό ENY σε συνθήκες 95% O₂, 5% CO₂ στους 37°C για έξι ώρες. Μετά το πέρας των έξι ωρών το τεχνητό ENY συλλέγεται, προστίθενται σε αυτό αναστολείς πρωτεασών (Roche) και φυλάσσεται στους -80°C μέχρι την ανάλυση των πρωτεϊνών.

2.13. ΕΝΕΣΕΙΣ ΜΕ LPS ΓΙΑ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΜΙΚΡΟΓΛΟΙΑΣ

Σε ενήλικα ποντίκια ηλικίας 2-3 μηνών χορηγήθηκε δόση 10mg/Kg από LPS (*E. coli* ορότυπος 055:B5, Sigma) με ενδοπεριτοναϊκή ένεση. Η δόση του LPS επιλέχθηκε με πρόθεση να υπάρχει μέγιστη ενεργοποίηση της μικρογλοίας σε μικρό χρονικό διάστημα και να μην πεθάνουν τα ζώα (Chung et al., 2009, Masocha, 2009, Thompson et al., 2008). Ως πείραμα ελέγχου, χρησιμοποιήθηκαν ποντίκια που δέχθηκαν ίσο όγκο ένεσης με αλατούχο διάλυμα. Τα ζώα θυσιάζονται έξι ώρες μετά την ένεση και τους γίνεται ενδοκαρδιακή έγχυση με παγωμένο 0,1M PBS (2.10.4). Στη συνέχεια οι εγκέφαλοι αφαιρούνται και μονιμοποιούνται σε διάλυμα 4% (w/v) παραφορμαλδεΐδης σε 0,1M PBS για 48 ώρες. Τέλος μεταφέρονται σε διάλυμα 20% (w/v) σουκρόζης σε 0,1M PBS που είναι κρυοπροστατευτικό.

2.14. ΧΡΩΣΗ ΜΕ ΘΕΙΟΦΛΑΒΙΝΗ-S ΣΕ ΤΟΜΕΣ ΑΠΟ ΕΓΚΕΦΑΛΟ ΠΟΝΤΙΚΩΝ ΓΙΑ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΑΜΥΛΟΕΙΔΩΝ ΠΛΑΚΩΝ

Η Θειοφλαβίνη-S είναι μια χρωστική η οποία έχει την ιδιότητα να προσδένει αμυλοειδή, δηλαδή πρωτεΐνες οι οποίες είναι συσσωματωμένες και έχουν δομή β-πτυχωτής επιφάνειας. Η χρώση αυτή χρησιμοποιείται για την ανίχνευση των αμυλοειδών πλακών στα διαγονιδιακά μοντέλα και σε ασθενείς με παθολογία Alzheimer και τα πλεονεκτήματά της είναι ότι είναι πολύ απλή και γρήγορη (Kelenyi, 1967). Στην παρούσα διατριβή, η χρώση πραγματοποιήθηκε σε τομές από εγκέφαλο πάχους 40μm οι οποίες επιπλέουν σε πιάτα 12 κελιών (12-well plates). Οι τομές αυτές ξεπλένονται τρεις φορές με απεσταγμένο νερό. Ακολουθεί επώαση σε 1% (w/v) Θειοφλαβίνη-S (φρέσκο, φιλτραρισμένο) για οχτώ λεπτά και στη συνέχεια αφαιρείται η χρωστική και προστίθεται 80% (v/v) αιθανόλη για τρία λεπτά. Επαναλαμβάνεται το ξέπλυμα με 80% (v/v) αιθανόλη για τρία λεπτά και ακολουθεί ξέπλυμα με 95% (v/v) αιθανόλη για άλλα τρία λεπτά. Τέλος, οι τομές ξεπλένονται τρεις φορές με απεσταγμένο νερό, τοποθετούνται σε

αντικειμενοφόρους πλάκες και κλείνονται με υδατικό διάλυμα μικροσκοπίου (Vectashield, Vector).

2.15. ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΕΙΑ ΚΑΙ ΑΝΟΣΟΦΘΟΡΙΣΜΟΣ

Για να μελετηθεί πως κατανέμεται χωροταξικά μια πρωτεΐνη σε έναν ιστό (*in situ*), όπως και για την ανίχνευση της έκφρασης κυτταροειδικών δεικτών, χρησιμοποιούνται οι μέθοδοι της ανοσοϊστοχημείας και του ανοσοφθορισμού. Οι τεχνικές αυτές βασίζονται στον εντοπισμό αντιγόνων σε τομές ιστού με τη χρήση αντισωμάτων (πρωτογενή αντισώματα), τα οποία στη συνέχεια αναγνωρίζονται από δευτερογενή αντισώματα τα οποία είναι συζευγμένα είτε με μια φθορίζουσα χρωστική είτε με βιοτίνη (έμμεση ανοσοϊστοχημεία). Η βιοτίνη έχει την ιδιότητα να ενώνεται με αβιδίνη η οποία είναι συζευγμένη με HRP και στη συνέχεια το ένζυμο HRP δίνει αντίδραση χρώσης με το χρωμογόνο 3, 3'-διάμινο-βενζιδίνη (diamino-benzidine, DAB). Ο Albert H. Coons και οι συνεργάτες του ήταν οι πρώτοι που σήμαναν αντισώματα με μια φθορίζουσα ουσία και στη συνέχεια τα χρησιμοποίησαν για τον εντοπισμό αντιγόνων σε τομές ιστού (Coons, 1971, Coons and Kaplan, 1950). Στη συνέχεια, με τη ραγδαία ανάπτυξη της ανοσοϊστοχημείας, εισήχθησαν κι άλλες μέθοδοι σήμανσης των αντισωμάτων οι οποίες χρησιμοποιούσαν ένζυμα, όπως η HRP, τα οποία μπορούσαν να παρατηρηθούν με τη χρήση απλού οπτικού μικροσκοπίου (Avrameas and Uriel, 1966, Nakane and Pierce, 1966). Τέλος, εισήχθη η τεχνική της έμμεσης ανοσοϊστοχημείας, όπου αντί να σημαίνεται το πρωτογενές αντίσωμα, χρησιμοποιείται ένα συζευγμένο με φθορίζουσα χρωστική ή ένζυμο δευτερογενές αντίσωμα το οποίο αναγνωρίζει το πρωτογενές (Mason et al., 1969). Με αυτό τον τρόπο μειώθηκε κατά πολύ η προετοιμασία των αντισωμάτων, αφού το μόνο που χρειαζόταν πλέον ήταν να σημαίνονται τα δευτερογενή και όχι το κάθε πρωτογενές.

Προκειμένου οι εικόνες στον εγκέφαλο να είναι καθαρές, το ζώο θυσιάζεται σε θάλαμο CO₂ και γίνεται ενδοκαρδιακή διάχυση πρώτα με παγωμένο 0,1M PBS (25ml-35ml) ώστε να καθαριστούν από το αίμα όλοι οι ιστοί και στη συνέχεια με 4% (w/v) παραφορμαλδεΐδη (paraformaldehyde, PFA) σε PBS. Αφαιρείται προσεκτικά ο εγκέφαλος και μονιμοποιείται σε διάλυμα 4% (w/v) PFA σε PBS για 20-24 ώρες. Εναλλακτικά μπορεί να παραληφθεί η διάχυση (perfusion) με PFA και ο εγκέφαλος να παραμείνει για μονιμοποίηση 48 ώρες σε διάλυμα 4% (w/v) PFA σε PBS. Κατόπιν φυλάσσεται σε διάλυμα

σουκρόζης 20% (w/v) σε PBS. Λαμβάνονται τομές 40μm με vibratome και ακολουθεί ανοσοϊστοχημεία ή ανοσοφθορισμός σε τομές που επιπλέουν σε πιάτο δώδεκα κελιών.

Μετά το πέρας της ανοσοϊστοχημείας, οι τομές παρατηρούνται και φωτογραφίζονται με το μικροσκόπιο DMRLS2 (Leica microsystems) το οποίο είναι συνδεδεμένο με έγχρωμη κάμερα (DFC500, Leica microsystems). Αντίθετα, ο φθορισμός του δευτερογενούς αντισώματος γίνεται ορατός με παρατήρηση σε ειδικό ορθό μικροσκόπιο φθορισμού (DMRA2, Leica microsystems), μετά από έκθεση του μορίου της φθορίζουσας χρωστικής σε ακτινοβολία με μήκος κύματος ειδικό για κάθε χρωστική. Στη μελέτη αυτή χρησιμοποιήθηκαν τρεις χρωστικές, μια που απορροφά στο μπλε (492nm) και εκπέμπει στο πράσινο (520nm), μια που απορροφά στο πράσινο/ανοικτό κίτρινο (550nm) και εκπέμπει στο κίτρινο (570nm) και μια που απορροφά στο κόκκινο (650nm) και εκπέμπει στο υπέρυθρο (670nm). Οι φωτογραφίες λαμβάνονται με μονοχρωματική κάμερα η οποία είναι συνδεδεμένη με ηλεκτρονικό υπολογιστή (DFC350-FX, Leica microsystems).

Για να παρατηρηθεί η τρισδιάστατη κατανομή μιας πρωτεΐνης, καθώς και ο συνεντοπισμός της με άλλους πρωτεϊνικούς δείκτες ή με συγκεκριμένα κυτταρικά διαμερίσματα, χρησιμοποιήθηκε συνεστιακή μικροσκοπία (laser scanning confocal microscopy) (Minsky, 1988) και συγκεκριμένα το μικροσκόπιο TCS SP5 (Leica microsystems). Το συνεστιακό μικροσκόπιο λειτουργεί με τις βασικές αρχές της μικροσκοπίας φθορισμού και πραγματοποιεί πολλαπλές οπτικές τομές στο παρασκεύασμα, η σύνθεση των οποίων (με τη βοήθεια ηλεκτρονικού υπολογιστή) δίνει μια τρισδιάστατη εικόνα.

2.15.1. Ανοσοϊστοχημεία

Στην παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της ενισχυμένης έμμεσης ανοσοϊστοχημείας, όπου ένα βιοτινυλιωμένο δευτερογενές αντίσωμα αναγνωρίζει το πρώτο και στη συνέχεια ακολουθεί επώαση με σύμπλεγμα αβιδίνης-βιοτίνης (avidin biotin complex, ABC), όπου η αβιδίνη είναι συζευγμένη με HRP, με τελικό αποτέλεσμα την ενίσχυση του σήματος κατά 5 φορές.

Η διαδικασία που ακολοθήσαμε ήταν η εξής: Αρχικά γίνονται τρεις πλύσεις δέκα λεπτών με 0,1M PBS με 0,1% (v/v) Triton X-100 (PBS-Tx). Στη συνέχεια, επώάζονται σε διάλυμα υπεροξειδίου (H₂O₂, Sigma) σε PBS για 30 λεπτά και ξεπλένονται άλλες τρεις φορές με 0,1M PBS για 5 λεπτά προκειμένου να καταλυθεί η δράση της ενδογενούς

υπεροξειδάσης. Στην περίπτωση της ανοσοϊστοχημείας με το Αβ, ακολουθείται ένα επιπλέον βήμα όπου οι τομές επωάζονται για πέντε λεπτά σε 98% (v/v) μυρμηγκικό οξύ (formic acid, Applichem) για να γίνει ανάκτηση του αντιγόνου/επιτόπου. Ακολουθούν τρεις πεντάλεπτες πλύσεις με 0,1M PBS. Για να καλυφθούν οι μη ειδικές θέσεις πρόσδεσης, οι τομές επωάζονται για 45 λεπτά με 15% (v/v) φυσιολογικό ορό αλόγου (NHS) ή όνου (NDS) σε PBS-Tx 0,1%. Στη συνέχεια προστίθεται το πρωτογενές αντίσωμα αραιωμένο σε 5% (v/v) NHS ή NDS σε PBS-Tx 0,1% και οι τομές επωάζονται όλο το βράδυ στους 4°C με συνεχή ανακίνηση. Όλα τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν για την ανοσοϊστοχημεία, προέρχονταν από ποντίκι. Την επομένη μέρα, γίνονται πέντε πλύσεις πέντε λεπτών με PBS και ακολουθεί επώαση με το δευτερογενές αντίσωμα από άλογο το οποίο αναγνωρίζει ανοσοσφαιρίνες ποντικού (Vector) και είναι συζευγμένο με βιοτίνη, για μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Κατά τη διάρκεια της επώασης με το δευτερογενές παρασκευάζεται το σύμπλεγμα ABC ως εξής: επωάζονται μία σταγόνα από το αντιδραστήριο A και μία σταγόνα από το B σε 2,5ml PBS με 0,1% (v/v) Tween-20 και αφήνονται για μισή ώρα σε θερμοκρασία δωματίου πριν τη χρήση ώστε να δημιουργηθεί το σύμπλεγμα. Μετά το τέλος της επώασης με το δευτερογενές, η περίσσεια του αφαιρείται με πέντε πλύσεις πέντε λεπτών με PBS. Ακολούθως, τα δείγματα επωάζονται για 90 λεπτά με το σύμπλεγμα ABC (Vector). Ακολουθούν άλλες δύο δεκάλεπτες πλύσεις με PBS και ανίχνευση με DAB (Vector) για 2-10 λεπτά. Στη συνέχεια οι τομές τοποθετούνται σε αντικειμενοφόρους πλάκες και αφού αφυδατωθούν (50% (v/v) EtOH 1', 70% (v/v) EtOH 1', 80% (v/v) EtOH 1', 90% (v/v) EtOH 1', 100% (v/v) EtOH 1' 2 φορές, 50% (v/v) EtOH - 50% (v/v) Ξυλόλη 1' και 2 φορές 100% (v/v) Ξυλόλη 1') κλείνονται με DPX (BDH, μονιμοποιητικό με βάση την ξυλόλη). Στον **πίνακα 7** δίνονται αναλυτικά οι συνθήκες για κάθε αντίσωμα. Αρνητικοί μάρτυρες για τη μέθοδο αυτή αποτελούν τομές οι οποίες δεν επωάστηκαν με το πρωτογενές αντίσωμα ή δεν εκφράζουν την πρωτεΐνη που αναλύεται.

Πίνακας 7. Συνθήκες ανοσοϊστοχημείας

Πρωτεΐνη προς ανίχνευση/ Κωδικός	Ανάκτηση επίτοπου	Καταστολή ενδογενούς υπεροξειδάσης	Δέσμευση μη ειδικών θέσεων	Διάλυση/ Επώαση 1^ο αντισώματος	Διάλυση/ Επώαση 2^ο αντισώματος
Αβ (6E10) βιοτινιλωμένο Covance #Sig- 39340	98% (v/v) μυρμηγκικό οξύ, 5 λεπτά	0,6% (v/v) H ₂ O ₂ σε PBS	15% (v/v) NHS ή NDS σε PBS-Tx 0,01%	1μg/ml σε 5% (v/v) NHS ή NDS σε PBS-Tx 0,01% 16 ώρες, 4°C	όχι
huAPOE 3H1 Ottawa Heart Institute	όχι	10% (v/v) H ₂ O ₂ , 10% (v/v) μεθανόλη σε PBS	10% (v/v) NDS σε PBS-Tx 0,01%	2μg/ml σε 5% (v/v) NDS σε PBS-Tx 0,01% 16 ώρες, 4°C	1:500 σε 2% (v/v) NDS σε PBS-Tx 0,1% 1 ώρα, 20°C
GFP Millipore #MAB3580	όχι	3% (v/v) H ₂ O ₂ , 10% (v/v) μεθανόλη σε PBS	10% (v/v) NDS σε PBS-Tx 0,01%	1μg/ml σε 1% (w/v) BSA σε PBS-Tx 0,01% 16 ώρες, 4°C	1:500 σε 2% (v/v) NDS σε PBS-Tx 0,1% 1 ώρα, 20°C

2.15.2. Ανοσοφθορισμός

Στην παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκε η τεχνική του ανοσοφθορισμού, όπου ένα συζευγμένο με φθορίζουσα χρωστική δευτερογενές αντίσωμα αναγνωρίζει το πρωτογενές αντίσωμα. Αρχικά οι τομές ξεπλένονται τρεις φορές με 0,1M PBS σε πιάτα με 12-κελιά (τομές που επιπλέουν). Στη συνέχεια, επωάζονται με PBS-Tx 0,1% για μισή ώρα σε θερμοκρασία περιβάλλοντος ώστε να καταστούν διαπερατές. Ακολουθεί επώαση με 10% (v/v) φυσιολογικό ορό από μοσχάρι (FCS, Gibco), 1% (w/v) BSA σε PBS-Tx 0,1% ή με 5% (v/v) φυσιολογικό ορό από γίδα (normal goat serum, NGS) για δύο με τρεις ώρες σε θερμοκρασία περιβάλλοντος ώστε να καλυφθούν οι μη ειδικές θέσεις (**πίνακας 8**). Έπειτα οι τομές επωάζονται για 12-16 ώρες στους 4°C με το πρωτογενές αντίσωμα που αναγνωρίζει την πρωτεΐνη ενδιαφέροντος αραιωμένο σε 1% (v/v) FCS, 0,1% (w/v) BSA, PBS-Tx 0,1% ή 5% (v/v) NGS, ανάλογα με το αντίσωμα. Την επόμενη μέρα οι τομές ξεπλένονται πέντε φορές για 10 λεπτά την κάθε φορά με 0,1M PBS. Ακολούθως, επωάζονται με το

δευτερογενές αντίσωμα, που αναγνωρίζει ανοσοσφαιρίνες από το είδος στο οποίο είναι φτιαγμένο το πρωτογενές αντίσωμα και είναι συζευγμένο με μια φθορίζουσα ουσία, για μία ώρα και σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στη παρούσα διατριβή ήταν συζευγμένα με χρωστικές κυανίνης (cyanine, Cy) Cy3 ή Cy5 ή με ισοθειοκυανική φлуορεσκεΐνη (isothiocyanate fluorescein, FTIC). Εν συνεχεία οι τομές επωάζονται, εάν απαιτείται από το πρωτόκολλο, με υδατικό διάλυμα 1% (w/v) Θειοφλαβίνης-S για πέντε λεπτά και τους γίνονται δύο τρίλεπτες πλύσεις με 70% (v/v) αιθανόλη. Ύστερα ξεπλένονται άλλες τρεις φορές με 0,1M PBS pH 7,4, τοποθετούνται σε πλακάκια μικροσκοπίας και καλύπτονται με ειδικό μέσο για φθορισμό (Vectashield, Vector). Αρνητικοί μάρτυρες για τη μέθοδο αυτή αποτελούν τομές οι οποίες δεν επωάστηκαν με το πρωτογενές αντίσωμα ή που δεν εκφράζουν την πρωτεΐνη που αναλύεται.

Πίνακας 8. Συνθήκες ανοσοφθορισμού

<i>Πρωτεΐνη προς ανίχνευση/ Κωδικός</i>	<i>Δέσμευση μη ειδικών θέσεων/ Χρόνος επώασης</i>	<i>Διάλυση/ Επώαση 1^ο αντισώματος</i>	<i>Είδος που αναγνωρίζει το 2^ο αντίσωμα/ Χρωστική/ Κωδικός</i>	<i>Διάλυση/ Επώαση 2^ο αντισώματος</i>
GFAP Sigma #G9269	5% (v/v) NGS σε TBS-Tx 0,4% 2 ώρες, 20 °C	87μg/ml σε 5% (v/v) NGS σε TBS-Tx 0,4% 12-16 ώρες, 4°C	κουνέλι Cy3 Jackson Immunoresearch #111-165-144	5μg/ml σε 5% (v/v) NGS σε TBS-Tx 0,4% 1 ώρα, 20 °C
IBA1	10% (v/v) FCS, 1% (w/v) BSA σε PBS-Tx 0,1% 3 ώρες, 20 °C	40μg/ml σε 1% (v/v) FCS, 0,1% (w/v) BSA σε PBS-Tx 0,01% 16 ώρες, 4°C	κουνέλι Cy3 Jackson Immunoresearch #111-165-144	5μg/ml σε 1% (v/v) FCS, 0,1% (w/v) BSA σε PBS-Tx 0,01% 1 ώρα, 20 °C
huAPOE	10% FCS, 1% BSA σε PBS-Tx 0,1% 3 ώρες, 20 °C	1μg/ml σε 1% (v/v) FCS, 0,1% (w/v) BSA σε PBS-Tx 0,01% 16 ώρες, 4°C	ποντίκι FITC Sigma #F2012	2μg/ml σε 1% (v/v) FCS, 0,1% (w/v) BSA σε PBS-Tx 0,01% 1 ώρα, 20 °C
Ιντερλευκίνη-10 R&D #AF519	10% FCS, 1% BSA σε PBS-Tx 0,1% 3 ώρες, 20 °C	5μg/ml σε 1% (v/v) FCS, 0,1% (w/v) BSA σε PBS-Tx 0,01% 16 ώρες, 4°C	γίδα Cy5 Jackson Immunoresearch #305-175-003	1,5μg/ml σε 1% (v/v) FCS, 0,1% (w/v) BSA σε PBS-Tx 0,01% 1 ώρα, 20 °C

2.16. ΑΝΟΣΟΕΝΖΥΜΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΣ-ELISA

Το Αβ προέρχεται από την πρωτεόλυση της ανθρώπινης APP και είναι το κύριο συστατικό των αμυλοειδών πλακών. Το Αβ₄₂ είναι το πιο αμυλοειδογενές πεπτίδιο και στο μοντέλο που χρησιμοποιείται για την παρούσα μελέτη [5xFAD (Oakley et al., 2006)] παράγεται σε μεγαλύτερη ποσότητα από το Αβ₄₀. Για τη μέτρηση των επιπέδων του ανθρώπινου Αβ₄₂ χρησιμοποιήθηκε ο ποσοτικός ανοσοενζυματικός προσδιορισμός τύπου ELISA (Engvall and Perlmann, 1971). Υπάρχουν πολλές παραλλαγές της μεθόδου αυτής: η άμεση, η έμμεση, η συζευγμένη (sandwich), που μπορεί να είναι ανασταλτικές ή ανταγωνιστικές.

Για την παρούσα διατριβή, χρησιμοποιήθηκε η ELISA Αβ_{x-42} (Covance #38956) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή, το οποίο βασίζεται σε ένα τροποποιημένο πρωτόκολλο των Johnson-Wood και συνεργατών και είναι μιας στερεής φάσης συζευγμένη ELISA (Johnson-Wood et al., 1997). Αναλύθηκαν δείγματα από το κλάσμα λύσης και το μη διαλυτό κλάσμα (βλέπε **ενότητα 2.10.4**). Στο πρώτο κλάσμα βρίσκονται τα πεπτίδια Αβ που έχουν τη μορφή διαλυτών ολιγομερών και δε βρίσκονται πάνω στις πλάκες. Στο δεύτερο κλάσμα βρίσκονται τα πεπτίδια που είναι συσσωματωμένα, σχηματίζουν αμυλοειδή ινίδια (amyloid fibrils) και βρίσκονται στις αμυλοειδείς πλάκες (amyloid/senile plaques).

Τα δείγματα από το κλάσμα λύσης (διαλυτό Αβ) αραιώθηκαν περίπου δέκα φορές με PBS και μετά αραιώθηκαν άλλες δύο φορές με το διάλυμα για την ELISA (2x Αβ ELISA working solution). Τα δείγματα από το μη διαλυτό κλάσμα (μη διαλυτό Αβ που βρίσκεται πάνω στις πλάκες) αραιώθηκαν περίπου 2000 φορές με PBS και μετά άλλες δύο φορές με το διάλυμα για την ELISA (2x Αβ ELISA working solution). Η ELISA πραγματοποιήθηκε σε πιάτο με 96 κελιά και οι μετρήσεις έγιναν στα 620nm στο φωτόμετρο φθορισμού Spectra Max 190 (Molecular Devices).

Για το κλάσμα λύσης αναλύθηκαν 100μg ολικής πρωτεΐνης/κελί και για το μη διαλυτό κλάσμα αναλύθηκαν 0,150μg ολικής πρωτεΐνης/κελί. Όλα τα δείγματα αναλύθηκαν μέσα στη γραμμική περιοχή του εύρους της ELISA. Τα δείγματα γνωστής συγκέντρωσης, όπως και τα άγνωστα δείγματα προς μέτρηση, αναλύθηκαν εις διπλούν.

2.17. ΜΕΤΑΜΟΣΧΕΥΣΗ ΜΥΕΛΟΥ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ

Η μεταμόσχευση μυελού των οστών από ποντίκια γίνεται για να μελετηθεί η συμμετοχή των κυττάρων του περιφερικού ανοσοποιητικού συστήματος και κυρίως των μακροφάγων που εμπλέκονται στη φλεγμονή και τη φαγοκυττάρωση του Αβ στην παθογένεση της νόσου του Alzheimer. Η τεχνική αυτή πραγματοποιήθηκε για πρώτη φορά από τον E. Donall Thomas, ο οποίος το 1956 έκανε την πρώτη επιτυχημένη μεταμόσχευση μυελού των οστών ανάμεσα σε δύο ανθρώπους και πήρε το βραβείο Νόμπελ Φυσιολογίας και Ιατρικής το 1990 (Thomas, 1994).

Στη μέθοδο προβλέπονται τρία στάδια: Η ακτινοβόληση των ποντικών, η απομόνωση των κυττάρων του μυελού των οστών και η μεταμόσχευση μυελού των οστών σε ποντίκια-δέκτες (τα οποία έχουν ακτινοβοληθεί) με ένεση στην ουραία φλέβα (Duran-Struuck and Dysko, 2009). Για τη μεταμόσχευση του μυελού των οστών χρησιμοποιήθηκαν ποντίκια 5xFAD;ApoE-/- που δεν εκφράζουν καθόλου APOE.

2.17.1 Πρωτόκολλο ακτινοβόλησης ποντικών

Αρχικά τα ποντίκια αναισθητοποιούνται και ακτινοβολούνται σε γραμμικό ακτινοβολητή ακτινών X Varian Clinac 600C/D ενέργειας 6MV (υψηλής ενέργειας). Λαμβάνουν δόση των 10 Gray η οποία είναι θανατηφόρα (1Gy= η απορρόφηση ενός Joule ενέργειας υπό τη μορφή ιονίζουσας ακτινοβολίας από 1 Kg ύλης).

$$1 \text{ Gy} = 1 \frac{\text{J}}{\text{kg}} = 1 \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-2}$$

Στη συνέχεια τα ποντίκια μεταφέρονται πίσω στα κλουβιά τους και τους δίνεται τροφή και νερό αποστειρωμένο με pH 2,6. Το νερό είναι οξεοποιημένο για να αναστείλει την ανάπτυξη εντεροβακτηρίων και άλλων λοιμώξεων του πεπτικού. Επίσης στο νερό προστίθεται το αντιβιοτικό νεομυκίνη (neomycin sulphate, Sigma #N112). Τα ποντίκια παραμένουν σε αντιβίωση για δύο εβδομάδες και σε οξεοποιημένο νερό για το υπόλοιπο της ζωής τους.

2.17.2 Απομόνωση κυττάρων μυελού των οστών

Για την απομόνωση των κυττάρων χρησιμοποιήθηκαν θηλυκά ποντίκια ηλικίας 2-4 μηνών που είχαν το ίδιο γενετικό υπόβαθρο με τα ποντίκια δέκτες (congenic). Για την πειραματική αυτή μελέτη χρησιμοποιήθηκαν ποντίκια TTRI-huApoE4;ApoE-/- που δεν εκφράζουν την APOE του ποντικού και εκφράζουν στην περιφέρεια (αλλά όχι και στον εγκέφαλο) την ανθρώπινη APOE4.

Τα ποντίκια-δότες μυελού των οστών θανατώνονται με αυχενική μετατόπιση και αμέσως διαποτίζονται με 70% (v/v) αιθανόλη για να διατηρηθούν ασηπτικές συνθήκες. Το δέρμα στο κάτω μισό του ζώου αφαιρείται. Στη συνέχεια αφαιρούνται το μηριαίο οστό και το οστό της κνήμης και τοποθετούνται σε τρυβλίο Petri που περιέχει αποστειρωμένο 0,1M PBS. Το μεγαλύτερο μέρος του ιστού αφαιρείται (με χαρτοπετσέτες) και ειδικότερα από την άκρη του οστού γιατί, εάν μείνει ιστός, θα παρεμποδιστεί η συλλογή των κυττάρων. Αφού συλλεχθούν όλα τα οστά από τα ποντίκια, η απομόνωση συνεχίζεται σε απαγωγό εστία με συνεχή ροή που χρησιμοποιείται μόνο για πρωτογενείς καλλιέργειες κυττάρων ώστε να αποφευχθούν μολύνσεις. Τα οστά ξεπλένονται με 0,1M PBS και μεταφέρονται σε καθαρό τρυβλίο με 0,1M PBS. Στη συνέχεια τα δύο οστά περιστρέφονται ώστε να διαχωριστεί το μηριαίο από την κνήμη (προσεχτικά για να μην κοπεί οποιοδήποτε από τα οστά). Ακολούθως, κόβονται οι δύο άκρες από το καθένα και η μία άκρη κρατείται πάνω από ένα τρυβλίο με προθερμασμένο θρεπτικό μέσο DMEM (Gibco) στους 37°C. Στην άλλη άκρη προσαρμόζεται μια σύριγγα με βελόνα 27G. Το οστό κρατείται ψηλά με μία λαβίδα με λεπτά άκρα ώστε ο πειραματιστής να μπορεί να βλέπει το μυελό των οστών. Στη συνέχεια 5ml DMEM (Gibco) μεταγγίζονται στο οστό (το οστό ασπρίζει) και ο μυελός συλλέγεται μέσα στο τρυβλίο με θρεπτικό μέσο DMEM. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται μέχρι το οστό να φαίνεται τελείως άσπρο (περίπου 5-10ml για κάθε οστό).

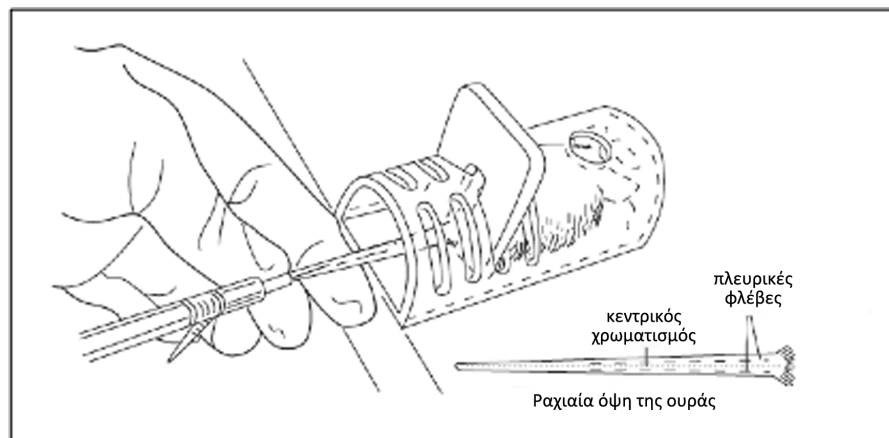
Έπειτα, τα κύτταρα επαναιωρούνται μέσω σύριγγας με βελόνα 22G ή στερεώνεται ένα ακρορύγχιο των 1000μl στην άκρη της πιπέτας ούτως ώστε να διαλυθούν τα τυχόν συσσωματώματα. Κατόπιν, φυγοκεντρούνται στα 400xg (Sorvall Multifuge 3-S-R) για επτά λεπτά και το υπερκείμενο απορρίπτεται. Ακολουθεί άλλη μια φυγοκέντρηση με 50ml DMEM, για να καθαριστούν και στη συνέχεια επαναδιαλυτοποιούνται σε 20ml 0,1M PBS. Ύστερα τοποθετούνται πάνω από ένα φίλτρο κυττάρων 100μm (cell strainer basket, BD #352360) για να απομακρυνθούν τυχόν κομμάτια οστού και συσσωματωμάτων κυττάρων. Μετά φυγοκεντρούνται για 5 λεπτά στα 400xg. Αφαιρείται και πάλι το υπερκείμενο και τα

κύτταρα επαναδιαλυτοποιούνται σε 1ml 0,1M PBS. Ακολούθως γίνεται καταμέτρησή τους με αιμοκυτταρόμετρο και αραιώση με 0,1M PBS σε συγκέντρωση περίπου 50×10^6 κύτταρα ανά ml.

2.17.3 Μεταμόσχευση μυελού των οστών με ένεση στην ουραία φλέβα

Την επόμενη μέρα (μέσα σε 24 ώρες από την ακτινοβόληση) τα ποντίκια δέχονται μεταμόσχευση του μυελού των οστών ($7,5 \times 10^6$ κύτταρα διαλυμένα σε 0,2ml PBS ανά ποντίκι) με ενδοφλέβια ένεση από την ουραία φλέβα.

Το ποντίκι αναισθητοποιείται και τοποθετείται σκεπασμένο κάτω από λάμπα πυρακτώσεως κόκκινου φωτός για περίπου 30 δευτερόλεπτα με μόνο την ουρά να είναι εκτεθειμένη. Μόλις η ουραία φλέβα γίνει ορατή, σκουπίζεται η ουρά με 70% (v/v) αιθανόλη και με μια σύριγγα ινσουλίνης (29 ½ G) τα κύτταρα εγχέονται στην κοιλότητα της φλέβας (2-4mm από την επιφάνεια, **Εικόνα 2.8**). Για να είναι επιτυχής η ένεση, θα πρέπει η φλέβα να φαίνεται άσπρη μετά την ένεση των κυττάρων. Η ουρά σκουπίζεται και πάλι με αιθανόλη και το ζώο τοποθετείται πίσω στο κλουβί του. Τα ζώα αναλύθηκαν οχτώ εβδομάδες μετά τη μεταμόσχευση. Εάν τα κύτταρα από το δότη δεν ενσωματωθούν στο ποντίκι-δέκτη, τα ποντίκια πεθαίνουν 12-14 μέρες μετά την ακτινοβόληση.



Εικόνα 2.8. Ενδοφλέβια ένεση στην ουραία φλέβα. Τροποποιημένο από *Current Protocols in Immunology-supplement 14*, σελίδα 1.6.5, 1995 John Wiley and Sons, Inc.

2.18. ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΚΑΛΥΨΗΣ ΤΩΝ ΑΜΥΛΟΕΙΔΩΝ ΠΛΑΚΩΝ

Για την ποσοτικοποίηση της κάλυψης των αμυλοειδών πλακών θετικών για Θειοφλαβίνη-S ή για Αβ χρησιμοποιήθηκαν 6-7 τομές από κάθε ποντίκι, οι οποίες απέχουν μεταξύ τους 240μm και καλύπτουν όλη τη δομή του ιππόκαμπου στο οβελιαίο/τοξοειδές επίπεδο (sagittal).

Για τη λήψη φωτογραφιών χρησιμοποιήθηκε ορθό μικροσκόπιο φθορισμού (DMAR 2, Leica) ή ορθό οπτικό μικροσκόπιο (DMRLS2, Leica) και φακοί μεγέθυνσης x2,5 για τους φλοιούς και x5 για τους ιππόκαμπους. Το πρόγραμμα λήψης φωτογραφιών που χρησιμοποιήθηκε ήταν το Leica Application Suite, version 2.8.1. (Leica). Οι φωτογραφίες αναλύθηκαν με το λογισμικό ImageJ (NIH). Λήφθηκαν, δε, σε κλίμακα του γκρι (grayscale), σε μέγεθος 8-bit και μετρήθηκε η περιοχή η οποία καλύπτεται από τις θετικές για Θειοφλαβίνη-S αμυλοειδείς πλάκες ή από τις θετικές για Αβ εναποθέσεις ανάλογα (%), αφού πρώτα ορίστηκε χειροκίνητα το όριο κάλυψης (threshold) (Jankowsky et al., 2007, Kocherhans et al., 2010). Για την ποσοτικοποίηση υπολογίστηκε ο μέσος όρος της ποσοστιαίας κάλυψης από το κάθε ποντίκι και οι ομάδες αναλύθηκαν με βάση το γονότυπό τους. Αναλύθηκαν τουλάχιστον πέντε ποντίκια για κάθε ομάδα.

2.19. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Όλα τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσος όρος \pm τυπικό σφάλμα του μέσου όρου (mean \pm standard error mean, SEM) και είναι αποτέλεσμα 5-8 ζώων τα οποία επαναλήφθηκαν τουλάχιστον τρεις φορές. Η στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δειγμάτων αναλύθηκε είτε με έλεγχο Student (Student's *t*-test) για σύγκριση δύο ομάδων είτε με ανάλυση της διακύμανσης κατά έναν παράγοντα (one-way analysis of variance, 1-way ANOVA) για σύγκριση περισσότερων από δύο ομάδων. Την ανάλυση ANOVA ακολουθούσε πάντα μετα-ανάλυση με το τεστ Student-Newman-Keuls ή Tukey για σύγκριση των επιμέρους ομάδων ανά δύο. Όλη η στατιστική ανάλυση έγινε με το λογισμικό GraphPad Prism 4.0. (GraphPad Software for Science Inc., San Diego, USA).

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1. ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ ΤΥΠΟΥ ALZHEIMER ΣΕ ΠΟΝΤΙΚΙΑ ΣΤΑ ΟΠΟΙΑ ΕΧΕΙ ΑΔΡΑΝΟΠΟΙΗΘΕΙ Ο ΥΠΟΔΟΧΕΑΣ ΤΩΝ ΧΑΜΗΛΗΣ ΠΥΚΝΟΤΗΤΑΣ ΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΩΝ (LDLR)

Ο υποδοχέας των χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεϊνών (LDLR) είναι ο κύριος υποδοχέας της APOE στον εγκέφαλο. Ως εκ τούτου, μία πρώτη προσέγγιση για τη μελέτη του ρόλου της APOE στην παθογένεση της νόσου του Alzheimer ήταν η μελέτη του LDLR. Για την πραγματοποίησή της, χρησιμοποιήθηκαν γενετικά τροποποιημένα ποντίκια στα οποία έχει αδρανοποιηθεί με κατευθυνόμενη απενεργοποίηση το ενδογενές γονίδιο του *Ldlr* (*Ldlr* knock-out, *Ldlr*^{-/-}) (Ishibashi et al., 1993). Τα ποντίκια *Ldlr*^{-/-} διασταυρώθηκαν με τα διαγονιδιακά ποντίκια 5xFAD (Oakley et al., 2006) που αναπτύσσουν παθολογία τύπου Alzheimer και δημιουργήθηκαν τα ποντίκια 5xFAD;*Ldlr*^{-/-}.

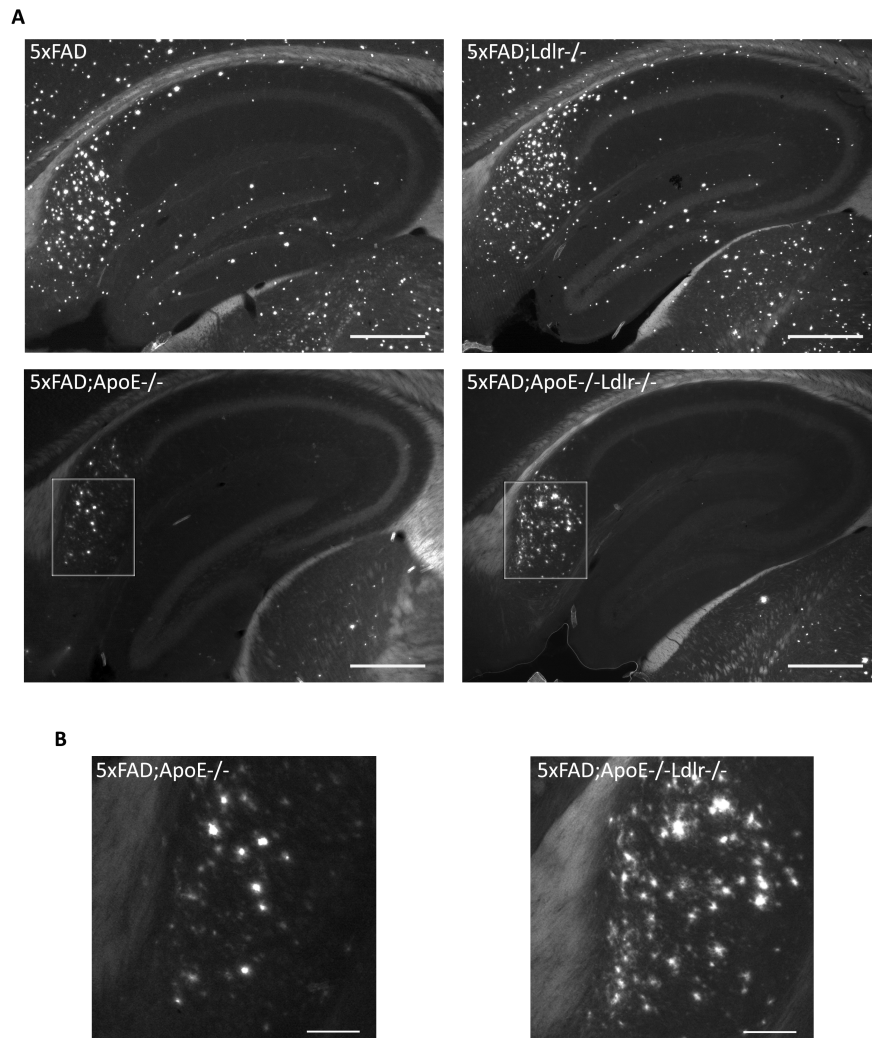
Τα διαγονιδιακά ποντίκια 5xFAD που αποκτήθηκαν από το Jackson Lab, εκφράζουν στον εγκέφαλο πέντε οικογενείς μεταλλάξεις οι οποίες προκαλούν την εμφάνιση της νόσου του Alzheimer στον άνθρωπο σε ηλικία μικρότερη των 45 ετών. Οι τρεις από τις οικογενείς μεταλλάξεις βρίσκονται στο διαγονίδιο για την ανθρώπινη APP [K670N/M671L (Swedish), I716V (Florida) και V717I (London)]. Οι δύο άλλες βρίσκονται στο διαγονίδιο για την ανθρώπινη PSEN1 (M146L και L286V). Τα ποντίκια αυτά αναπτύσσουν αμυλοειδείς πλάκες οι οποίες συνοδεύονται από θάνατο νευρικών κυττάρων, απώλεια μνήμης και φλεγμονώδη απόκριση από τα κύτταρα της γλοίας (Oakley et al., 2006). Η ανάλυση έγινε κυρίως σε θηλυκά ποντίκια γιατί αυτά παρουσιάζουν πιο έντονο φαινότυπο σε αυτό το μοντέλο με παθολογία τύπου Alzheimer (προκαταρκτικά αποτελέσματα). Όλα τα ποντίκια που αναλύθηκαν ήταν ηλικίας τεσσάρων μηνών. Επίσης, για να διερευνηθεί εάν η APOE επηρεάζει την επίδραση του LDLR στην παθοφυσιολογία Alzheimer, ποντίκια 5xFAD διασταυρώθηκαν με ζώα στα οποία είχαν αδρανοποιηθεί και τα δύο γονίδια. Οι ομάδες αυτές συγκρίθηκαν ως προς την εναπόθεση Αβ, το σχηματισμό αμυλοειδών πλακών και τη φλεγμονώδη απόκριση. Πιο συγκεκριμένα, αναλύθηκαν οι εξής ομάδες ποντικών (πίνακας 9):

Πίνακας 9. Ομάδες ανάλυσης

Ομάδα ποντικών	Γονότυπος ApoE	Γονότυπος Ldlr
5xFAD	+/+	+/+
5xFAD; <i>Ldlr</i> ^{-/-}	+/+	-/-
5xFAD; <i>ApoE</i> ^{-/-}	-/-	+/+
5xFAD; <i>ApoE</i> ^{-/-} ; <i>Ldlr</i> ^{-/-}	-/-	-/-

3.1.1. Ποσοτικοποίηση της εναπόθεσης των αμυλοειδών πλακών σε ποντίκια στα οποία έχει αδρανοποιηθεί ο LDLR ή/και η APOE.

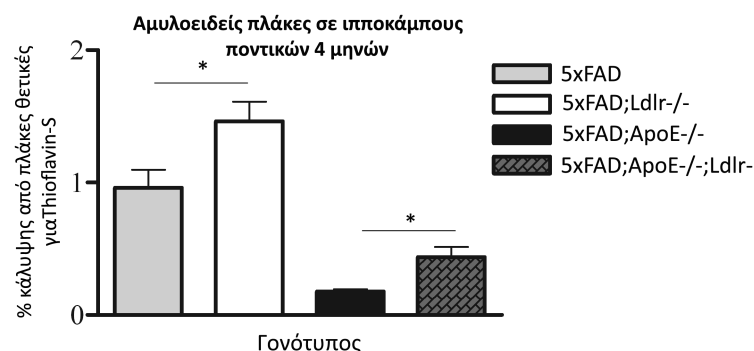
Αρχικά έγινε ανοσοϊστοχημική μελέτη με Θειοφλαβίνη-S η οποία είναι χρωστική που αναγνωρίζει τις αμυλοειδείς πλάκες (συσσωματωμένα αμυλοειδή) σε 5-7 θηλυκά ποντίκια ηλικίας τεσσάρων μηνών από όλους τους γονότυπους (**Εικόνα 3.1**).



Εικόνα 3.1. Ανάλυση των αμυλοειδών πλακών στα ποντίκια με παθολογία Alzheimer και η επίδραση της απουσίας του LDLR. Η εκτίμηση των αμυλοειδών πλακών έγινε με ανοσοϊστοχημεία για Θειοφλαβίνη-S, η οποία αναγνωρίζει αμυλοειδή, σε τομές 40 μ m από εγκεφάλους θηλυκών ποντικών τεσσάρων μηνών σε 5-7 ζώα από κάθε ομάδα. Α. Αντιπροσωπευτικές εικόνες από υποκάμπους ποντικών από κάθε γονότυπο. Η απουσία του LDLR (5xFAD;Ldlr-/-) έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση του σχηματισμού αμυλοειδών πλακών τόσο παρουσία της APOE (σύγκριση 5xFAD;Ldlr-/- με 5xFAD) όσο και απουσία της APOE (σύγκριση 5xFAD;ApoE-/-;Ldlr-/- με 5xFAD;ApoE-/-). Κλίμακα 500 μ m. Β. Μεγέθυνση των ένθετων από Α, από το υπόθεμα του υποκάμψου των 5xFAD;ApoE-/- και 5xFAD;ApoE-/-;Ldlr-/- ποντικών φανερώνει τη διαφορά τόσο στον αριθμό και το σχήμα των αμυλοειδών πλακών στα ποντίκια 5xFAD;ApoE-/-;Ldlr-/- σε σχέση με τα 5xFAD;ApoE-/- . Κλίμακα 100 μ m.

Τα ποντίκια στα οποία είχε αδρανοποιηθεί ο LDLR είχαν αύξηση του σχηματισμού αμυλοειδών πλακών (θετικών για Θειοφλαβίνη-S) τόσο παρουσία όσο και απουσία της APOE (5xFAD;Ldlr^{-/-} και 5xFAD;ApoE^{-/-};Ldlr^{-/-} αντίστοιχα) σε σχέση με τα ποντίκια που είχαν τον ενδογενή LDLR στο αντίστοιχο APOE γενετικό υπόβαθρο (**Εικόνα 3.1A**). Ένα αξιοσημείωτο εύρημα ήταν ότι στα ποντίκια 5xFAD;ApoE^{-/-};Ldlr^{-/-} η απουσία του LDLR οδήγησε και σε αλλαγή του σχήματος των αμυλοειδών πλακών σε σχέση με τα ποντίκια 5xFAD;ApoE^{-/-} (**Εικόνα 3.1B**). Οι αμυλοειδείς πλάκες στα 5xFAD;ApoE^{-/-} φαίνονται στρογγυλόμορφες ενώ στα 5xFAD;ApoE^{-/-};Ldlr^{-/-} είναι αστερόμορφες.

Στη συνέχεια έγινε ποσοτικοποίηση της κάλυψης των θετικών για Θειοφλαβίνη-S αμυλοειδών πλακών στους *ιππόκαμπους* των ποντικών των ομάδων ανάλυσης. Η ανάλυση έδειξε ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά (ανάλυση διακύμανσης κατά έναν παράγοντα, one-way analysis of variance, 1-way ANOVA $P < 0.0001$) μεταξύ των γονοτύπων που εξετάστηκαν (**Εικόνα 3.2**). Ακολούθησε έλεγχος Neuman-Keuls ανάμεσα στις ομάδες και τα αποτελέσματα παρατίθενται αναλυτικά για καθεμιά στον **πίνακα 10**.



Εικόνα 3.2. Ποσοτικοποίηση της % κάλυψης από αμυλοειδείς πλάκες σε ιππόκαμπους θηλυκών ποντικών 4 μηνών. Η ανάλυση της διακύμανσης κατά έναν παράγοντα έδειξε στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στις ομάδες που εξετάστηκαν ($P < 0,0001$). Στη συνέχεια ακολούθησε έλεγχος Neuman-Keuls και δείχθηκε ότι ο LDLR αυξάνει την εναπόθεση αμυλοειδών πλακών τόσο παρουσία της APOE (5xFAD σε σχέση με τα 5xFAD;Ldlr^{-/-} * $P=0,03$) όσο και απουσία της APOE (5xFAD;ApoE^{-/-} σε σχέση με τα 5xFAD;ApoE^{-/-};Ldlr^{-/-} * $P=0,0274$).

Πίνακας 10. Αποτελέσματα από τη στατιστική ανάλυση ανάμεσα στις ομάδες που εξετάστηκαν ως προς την εναπόθεση θετικών για Θειοφλαβίνη-S αμυλοειδών πλακών στον ιππόκαμπο

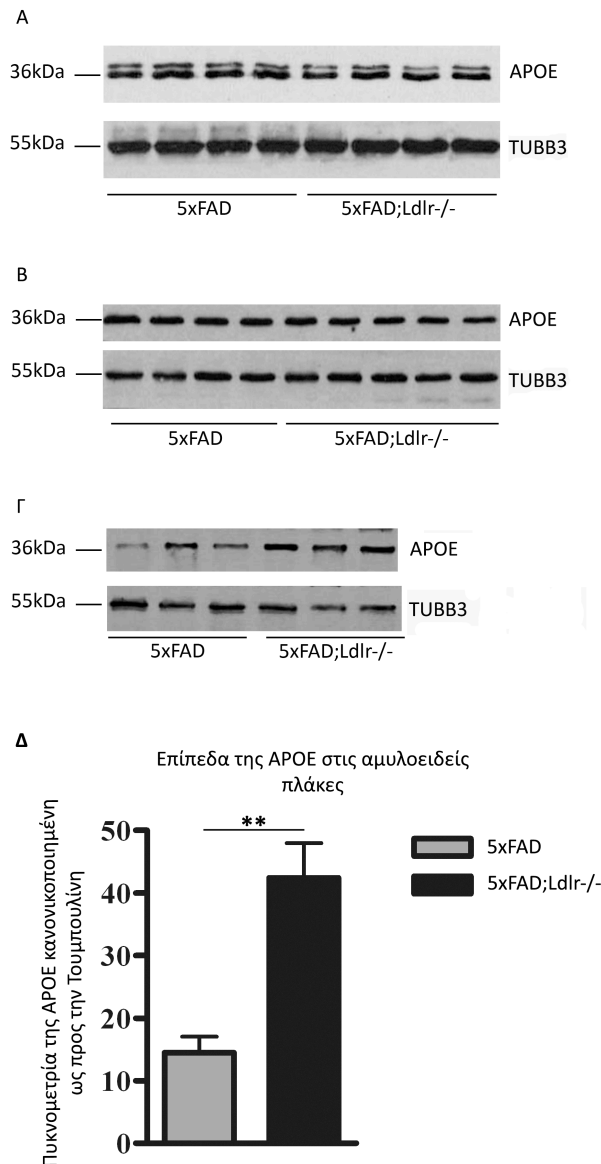
Ομάδα 1	Ομάδα 2	Τιμή P
5xFAD	5xFAD;Ldlr-/-	P=0,03 (*)
5xFAD;ApoE-/-	5xFAD;ApoE-/-Ldlr-/-	P=0,0274 (*)
5xFAD	5xFAD;ApoE-/-	P=0,013 (*)
5xFAD	5xFAD;ApoE-/-Ldlr-/-	P=0,0139 (*)
5xFAD;Ldlr-/-	5xFAD;ApoE-/-	P=0,0003 (***)
5xFAD;Ldlr-/-	5xFAD;ApoE-/-Ldlr-/-	P=0,0003 (***)

Από τα παραπάνω βγαίνει το συμπέρασμα ότι η απουσία του LDLR στο μοντέλο 5xFAD οδηγεί σε σημαντική αύξηση των αμυλοειδών πλακών στα ποντίκια 5xFAD;Ldlr-/- σε σχέση με τα 5xFAD (P=0,03). Το ίδιο αποτέλεσμα παρατηρείται και στα ποντίκια χωρίς APOE (5xFAD;ApoE-/-;Ldlr-/- σε σχέση με τα 5xFAD;ApoE-/-, P=0,0274). Η απουσία του LDLR οδηγεί στην αύξηση του σχηματισμού αμυλοειδών πλακών ανεξάρτητα από την APOE στο διαγονιδιακό μοντέλο 5xFAD .

Επίσης, ποσοτικοποιήθηκε ο σχηματισμός αμυλοειδών πλακών στο φλοιό των ποντικών 5xFAD και 5xFAD;Ldlr-/- και βρέθηκε και πάλι στατιστικά σημαντική αύξηση (P=0,0452) απουσία του LDLR. Τα χωρίς APOE ποντίκια είχαν ελάχιστο έως καθόλου σχηματισμό αμυλοειδών πλακών και έτσι δεν ποσοτικοποιήθηκαν.

3.1.2. Ανάλυση των πρωτεϊνικών επιπέδων της APOE στους εγκεφάλους διαγονιδιακών ποντικών με παθολογία τύπου Alzheimer σε σχέση με την απουσία του LDLR.

Σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες που έγιναν σε ποντίκια με παθολογία Alzheimer, η απουσία του LDLR αυξάνει τα πρωτεϊνικά επίπεδα της APOE στον εγκεφαλό τους (Cao et al., 2006, Elder et al., 2007, Fryer et al., 2005a) ενώ η υπερέκφρασή του τα μειώνει (Kim et al., 2009b). Η απουσία του LDLR δεν μελετήθηκε ως τώρα στο διαγονιδιακό μοντέλο 5xFAD. Γι' αυτό το λόγο, προκειμένου να εξακριβωθεί εάν αυτό συμβαίνει και στο δικό μας μοντέλο, αναλύθηκαν τα πρωτεϊνικά επίπεδα της APOE σε εγκεφάλους από ποντίκια 5xFAD και 5xFAD;Ldlr-/-.



Εικόνα 3.3. Ανάλυση των πρωτεϊνικών επιπέδων της APOE στον εγκέφαλο διαγονιδιακών ποντικών 5xFAD και 5xFAD;Ldlr-/-. Η εκτίμηση των πρωτεϊνικών επιπέδων έγινε με ανοσοστύπωμα για την APOE του ποντικού και η ισοφόρτωση επιβεβαιώθηκε με ανοσοστύπωμα για την β-III Τουμπουλίνη (TUBB3). Α. Κλάσμα διαλυτό σε PBS, Κλάσμα διαλυτό σε διάλυμα λύσης, Γ. Κλάσμα διαλυτό σε 5M Γουανιδίνης και Δ. Πυκνομετρία των ζωνών του ανοσοστυπώματος από το Γ, κανονικοποιημένων ως προς την Τουμπουλίνη. Στατιστική ανάλυση με το Student t-test (**P=0,0041) δείχνει στατιστικά σημαντική αύξηση της APOE στα 5xFAD;Ldlr-/- σε σχέση με τα ποντίκια 5xFAD στο διαλυτό σε 5M Γουανιδίνης κλάσμα. Για το Α φορτώθηκαν 10μg σε κάθε διαδρομή, για το Β 20μg και για το Γ 30μg ολικής πρωτεΐνης, λόγω της διαφορετικής συγκέντρωσης στην οποία βρίσκεται η APOE σε κάθε κλάσμα. Το πείραμα επαναλήφθηκε τουλάχιστον τρεις φορές και αναλύθηκαν 4-5 ζώα από κάθε γονότυπο.

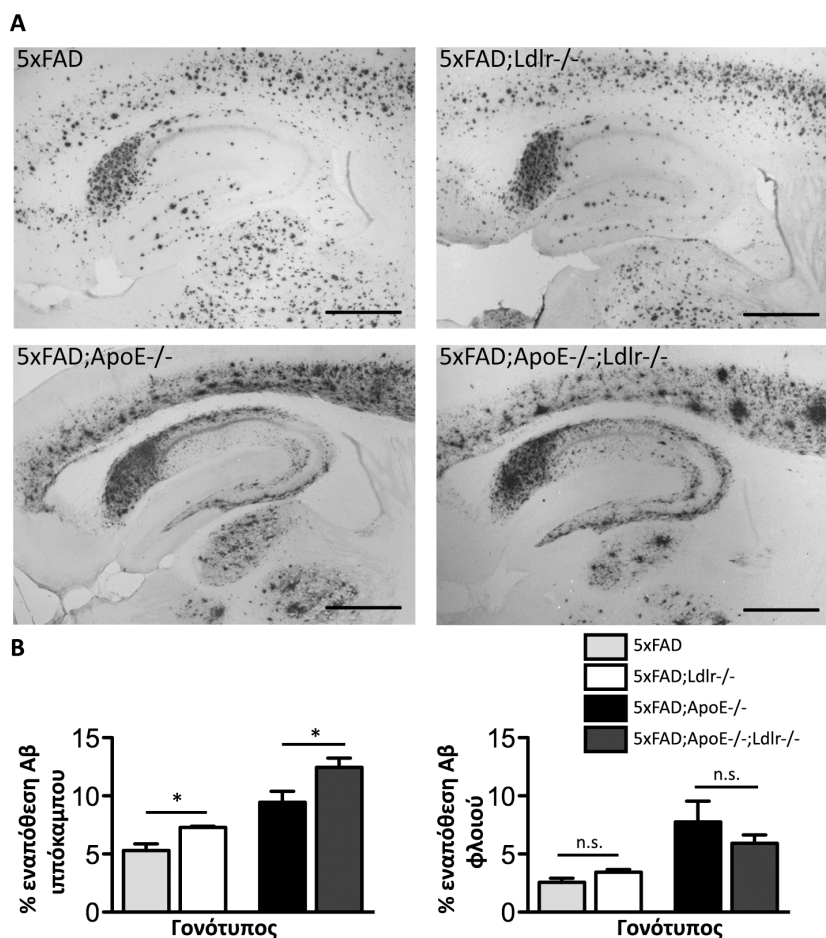
Όπως προαναφέρθηκε στην εισαγωγή, η APOE είναι μια διαλυτή, εκκρινόμενη πρωτεΐνη και φυσιολογικά η μεγαλύτερη συγκέντρωσή της βρίσκεται εξωκυττάρια. Στον εγκέφαλο με παθολογία Alzheimer συνδέεται με το Αβ με δεσμούς σταθερούς στο SDS

(ενδοκυττάρια) και επίσης βρίσκεται συσσωματωμένη στις αμυλοειδείς πλάκες. Οι τρεις αυτές διαφορετικές δεξαμενές της APOE έχουν διαφορετική βιολογική σημασία στην παθοφυσιολογία της νόσου. Αρχικά οι εγκέφαλοι ομογενοποιήθηκαν σε PBS (διαλυτό σε PBS κλάσμα, PBS-soluble fraction) για να ανακτηθεί η APOE του εξωκυττάριου χώρου. Στη συνέχεια, το ίζημα που έμεινε ομογενοποιήθηκε σε διάλυμα λύσης, το οποίο περιέχει ισχυρά απορρυπαντικά, για να ανακτηθεί η APOE που βρίσκεται ενδοκυττάρια ή είναι προσδεσμένη στα ολιγομερή του Αβ (διαλυτό σε διάλυμα λύσης κλάσμα, lysis-soluble fraction). Τέλος, προκειμένου να απομονωθεί η APOE που βρίσκεται συσσωματωμένη στις αμυλοειδείς πλάκες, το ίζημα από το προηγούμενο βήμα ομογενοποιήθηκε σε γουανιδίνη (διαλυτό σε γουανιδίνη κλάσμα, Guanidine-HCl fraction, Gu-HCl) (βλ. 2.10.5). Τα επίπεδα της APOE στο διαλυτό σε PBS κλάσμα (**Εικόνα 3.3Α**) και στο διαλυτό σε διάλυμα λύσης κλάσμα (**Εικόνα 3.3Β**) δεν είχαν στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στις ομάδες που εξετάστηκαν. Αντίθετα, στο διαλυτό σε Gu-HCl κλάσμα (**Εικόνα 3.3Γ**) βρέθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση στα επίπεδα της APOE στα ποντίκια 5xFAD;Ldlr-/- σε σχέση με τα 5xFAD (P= 0,0041, **Εικόνα 3.3Δ**)

3.1.3. Ανάλυση της εναπόθεσης του Αβ σε ποντίκια στα οποία έχει αδρανοποιηθεί ο LDLR ή/και η APOE

Στη συνέχεια εξετάστηκε η εναπόθεση του ολικού Αβ με ανοσοϊστοχημεία και με ELISA από όλους τους γονότυπους. Οι περιοχές του φλοιού και του ιππόκαμπου εξετάστηκαν ξεχωριστά.

Στο φλοιό και το θάλαμο των ζώων που αναλύθηκαν, το πρότυπο εναπόθεσης του Αβ είναι ίδιο ανάμεσα στα ποντίκια 5xFAD και στα 5xFAD;Ldlr-/- με την ενδογενή APOE . Αντιθέτως, στο φλοιό και το θάλαμο των ποντικών χωρίς APOE υπάρχουν διαφορές στο πρότυπο εναπόθεσης (5xFAD;ApoE-/- και 5xFAD;ApoE-/-;Ldlr-/-). Στα 5xFAD;ApoE-/-;Ldlr-/- η διάμετρος των περισσότερων εναποθέσεων Αβ είναι μεγαλύτερη σε σχέση με τα 5xFAD;ApoE-/- . Επίσης τα 5xFAD;ApoE-/- έχουν πιο διάχυτο πρότυπο εναπόθεσης Αβ (**Εικόνα 3.4Α**).



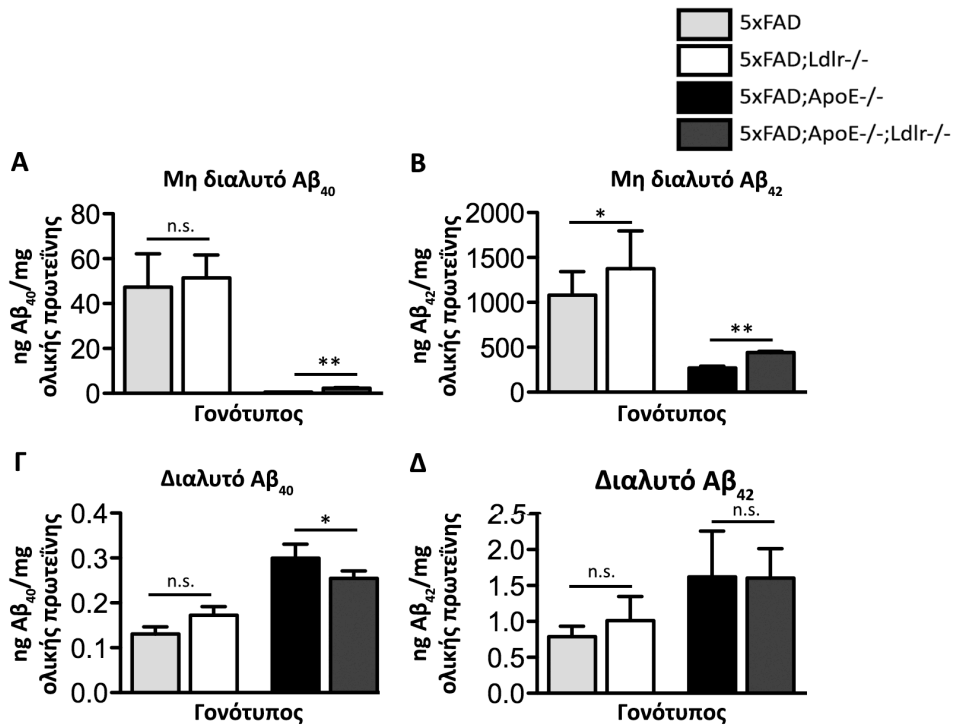
Εικόνα 3.4. Ανάλυση της κατανομής των εναποθέσεων Αβ. Α. Η απουσία του LDLR (5xFAD;Ldlr-/- σε σχέση με τα 5xFAD) οδηγεί σε αύξηση των εναποθέσεων Αβ. Επιπρόσθετα, η απουσία του LDLR απουσία και της APOE (5xFAD;ApoE-/-;Ldlr-/- σε σχέση με τα 5xFAD;ApoE-/-) οδηγεί σε αλλαγές τόσο στο μέγεθος των πλακών όσο και στην πυκνότητα της εναπόθεσης, όπως εξηγείται αναλυτικά και στο κείμενο. *Κλίμακα 500μm.* Β. Ποσοτικοποίηση της εναπόθεσης του Αβ στον φλοιό και τον ιππόκαμπο των ομάδων ανάλυσης. Η ανάλυση έγινε με Student t-test. *P<0,05, n.s. στατιστικά μη σημαντικό. Η εκτίμηση του Αβ έγινε με ανοσοϊστοχημεία (6E10, Covance) σε τομές 40μm από θηλυκά ποντίκια τεσσάρων μηνών σε 5-7 ποντίκια από κάθε ομάδα. Στην εικόνα παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικές εικόνες από κάθε γονότυπο.

Στον ιππόκαμπο, τα 5xFAD έχουν λιγότερο έντονη ανοσοαντίδραση για το Αβ σε σχέση με τα ποντίκια 5xFAD;Ldlr-/. Και οι δύο ομάδες έχουν έντονη εναπόθεση στο υπόθεμα του εγκεφάλου (subiculum), αλλά ελάχιστη στην ακτινωτή στοιβάδα (stratum radiatum) και στη στοιβάδα πολύμορφων κυττάρων του ιππόκαμπτου (oriens layer). Επίσης, έχουν μικρή εναπόθεση στη μοριακή στοιβάδα της οδοντωτής έλικας (molecular layer of the dentate gyrus) καθώς και στη βοτρυώδη στοιβάδα του ιππόκαμπτου (lacunosum moleculare layer of the hippocampus). Η απουσία της APOE αλλάζει το πρότυπο εναπόθεσης Αβ και τα ποντίκια 5xFAD;ApoE-/- και 5xFAD;ApoE-/-;Ldlr-/- έχουν έντονη

εναπόθεση στο υπόθεμα του εγκεφάλου (subiculum), στην ακτινωτή στοιβάδα του εγκεφάλου (stratum radiatum), στη στοιβάδα πολύμορφων κυττάρων του ιππόκαμπου (oriens layer) στις περιοχές CA1-CA3 καθώς και στο πολυμορφικό στρώμα της οδοντωτής έλικας (polymorph layer of the dentate gyrus). Δεν υπάρχει καθόλου εναπόθεση στη μοριακή στοιβάδα της οδοντωτής έλικας (molecular layer of the dentate gyrus). Επιπρόσθετα, στα ποντίκια από τα οποία λείπει τόσο ο LDLR όσο και η APOE (5xFAD;ApoE-/-;Ldlr/-/), υπάρχει πιο έντονη και πιο σπικτική εναπόθεση στο υπόθεμα του εγκεφάλου σε σχέση με τα ποντίκια στα οποία απουσιάζει μόνο η APOE (5xFAD;ApoE-/-) (**Εικόνα 3.4A**).

Η ποσοτικοποίηση της εναπόθεσης του Αβ κατέδειξε ότι στον ιππόκαμπο υπάρχει στατιστικά σημαντική αύξηση στα ποντίκια χωρίς LDLR ($P < 0,05$ μεταξύ 5xFAD και 5xFAD;Ldlr-/-, **Εικόνα 3.4B** αριστερό γράφημα). Η απουσία της APOE δεν επηρεάζει την αύξηση αυτή στον ιππόκαμπο των ποντικών 5xFAD;ApoE-/-;Ldlr-/- σε σχέση με τα 5xFAD;ApoE-/- ($P < 0,05$, **Εικόνα 3.4B** αριστερό γράφημα). Στο φλοιό δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων ανάλυσης (**Εικόνα 3.4B**, δεξί γράφημα).

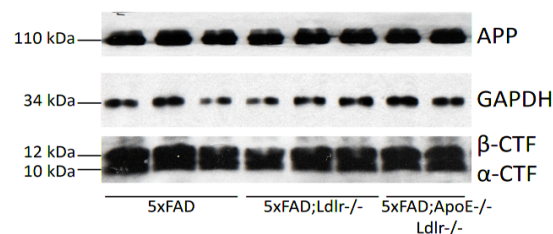
Το αντίσωμα που χρησιμοποιήσαμε αναγνωρίζει το αμινοτελικό άκρο του Αβ, με αποτέλεσμα η ανοσοϊστοχημεία να εξετάζει το ολικό Αβ ανεξαρτήτως μορφής και συσσωμάτωσης. Επίσης, το Αβ₄₂ είναι περισσότερο αμυλοειδογενές από το Αβ₄₀, οπότε είναι σημαντικό να γνωρίζουμε ποιο από τα δύο αυξήθηκε περισσότερο. Για να διαπιστωθεί σε ποιο κλάσμα βρίσκεται η παρατηρηθείσα διαφορά και ποιο αυξήθηκε περισσότερο, έγινε ELISA για το Αβ₄₀ το Αβ₄₂. Αναλύθηκαν αφενός το διαλυτό σε διάλυμα λύσης κλάσμα το οποίο αντιπροσωπεύει το διαλυτό, ολιγομερισμένο Αβ και αφετέρου το διαλυτό σε Γουανιδίνη κλάσμα, το οποίο αντιπροσωπεύει το συσσωματωμένο σε αμυλοειδείς πλάκες Αβ. Στατιστικά σημαντική αύξηση βρέθηκε κυρίως στο συσσωματωμένο σε πλάκες Αβ₄₂ (**Εικόνα 3.5Γ**), όπου η απουσία του LDLR αύξησε τα επίπεδα του Αβ τόσο απουσία όσο και παρουσία της APOE. Τα αποτελέσματα από την ELISA συμφωνούν και επιβεβαιώνουν τα ευρήματα της ανάλυσης για Θειοφλαβίνη-S (**Εικόνες 3.1 και 3.2**).



Εικόνα 3.5. Ποσοτικοποίηση των επιπέδων του Αβ στον εγκέφαλο των διαγονιδιακών ποντικών με παθολογία Alzheimer. Α-Β. Μέτρηση των επιπέδων Αβ₄₀ (Α) και Αβ₄₂ (Β) στο διαλυτό σε Γουανιδίνη κλάσμα από εγκέφαλο ποντικών, το οποίο αντικατοπτρίζει το Αβ που βρίσκεται συσσωματωμένο σε πλάκες. 0,2-0,5 μg ολικής πρωτεΐνης φορτώθηκαν σε κάθε κελί. Γ-Δ. Μέτρηση των Αβ₄₀ (Γ) και Αβ₄₂ (Δ) στο διαλυτό σε διάλυμα λύσης κλάσμα, το οποίο αντικατοπτρίζει το διαλυτό Αβ που δεν είναι συσσωματωμένο. Η ποσοτικοποίηση έγινε με ELISA για το πεπτίδιο Αβ_{x-40} και Αβ_{x-42} (Covance) και τα αποτελέσματα εκφράζονται σε ng αμυλοειδούς Αβ ανά mg ολικής πρωτεΐνης από ένα ημισφαίριο εγκεφάλου. *P<0,05 και n.s. στατιστικά μη σημαντικό. Η ανάλυση έγινε με Student t-test.

3.1.4. Διερεύνηση της επίδρασης της απουσίας του LDLR στα επίπεδα της APP και των καρβοξυτελικών της θραυσμάτων

Με βάση τα αποτελέσματα που έδειξαν αυξημένο σχηματισμό αμυλοειδών πλακών στα ποντίκια χωρίς τον LDLR, προχωρήσαμε στην ανάλυση των επιπέδων της ολικής APP και των πρωτεολυτικών της θραυσμάτων (α- και β-CTF μετά την πρωτεόλυσή της από τις α- και β-εκκρινάσες αντίστοιχα) για να διαπιστωθεί εάν η διαφορά που παρατηρήθηκε οφείλεται σε αλλαγές του μεταβολισμού της APP. Η εκτίμηση των επιπέδων τους έγινε με ανοσοσύτρωμα σε ομογενοποιημένα εγκεφάλων ποντικών και δεν υπήρχε διαφορά ούτε στα επίπεδα της ολικής APP ούτε στα επίπεδα των CTF (Εικόνα 3.6).



Εικόνα 3.6. Ανάλυση των επιπέδων της ολικής APP και CTF από εγκεφάλους ποντικών 5xFAD, 5xFAD;Ldlr-/- και 5xFAD;ApoE-/-;Ldlr-/-. Δεν παρατηρήθηκε διαφορά μεταξύ των επιπέδων της APP ή των CTF στα ποντίκια που αναλύθηκαν. Η εκτίμηση έγινε με ανοσοσύτρωμα για το αντίσωμα R1(57) που αναγνωρίζει το καρβοξυτελικό άκρο της APP. Η πρωτεΐνη GAPDH χρησιμοποιήθηκε για επιβεβαίωση της ισόποσης φόρτωσης των δειγμάτων. Εξετάστηκαν ομογενοποιημένα από 4-5 θηλυκά ποντίκια από κάθε ομάδα ανάλυσης και το πείραμα επαναλήφθηκε τρεις φορές. Σε κάθε διαδρομή φορτώθηκαν 10μg ολικής πρωτεΐνης από το διαλυτό σε διάλυμα λύσης κλάσμα (lysis buffer, βλ. 2.10.5).

3.2. ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΑΠΟΥΣΙΑΣ ΤΟΥ LDLR ΣΤΗ ΦΛΕΓΜΟΝΩΔΗ ΑΠΟΚΡΙΣΗ ΣΤΑ ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΑΚΑ ΠΟΝΤΙΚΙΑ ΜΕ ΠΑΘΟΛΟΓΙΑ ΤΥΠΟΥ ALZHEIMER

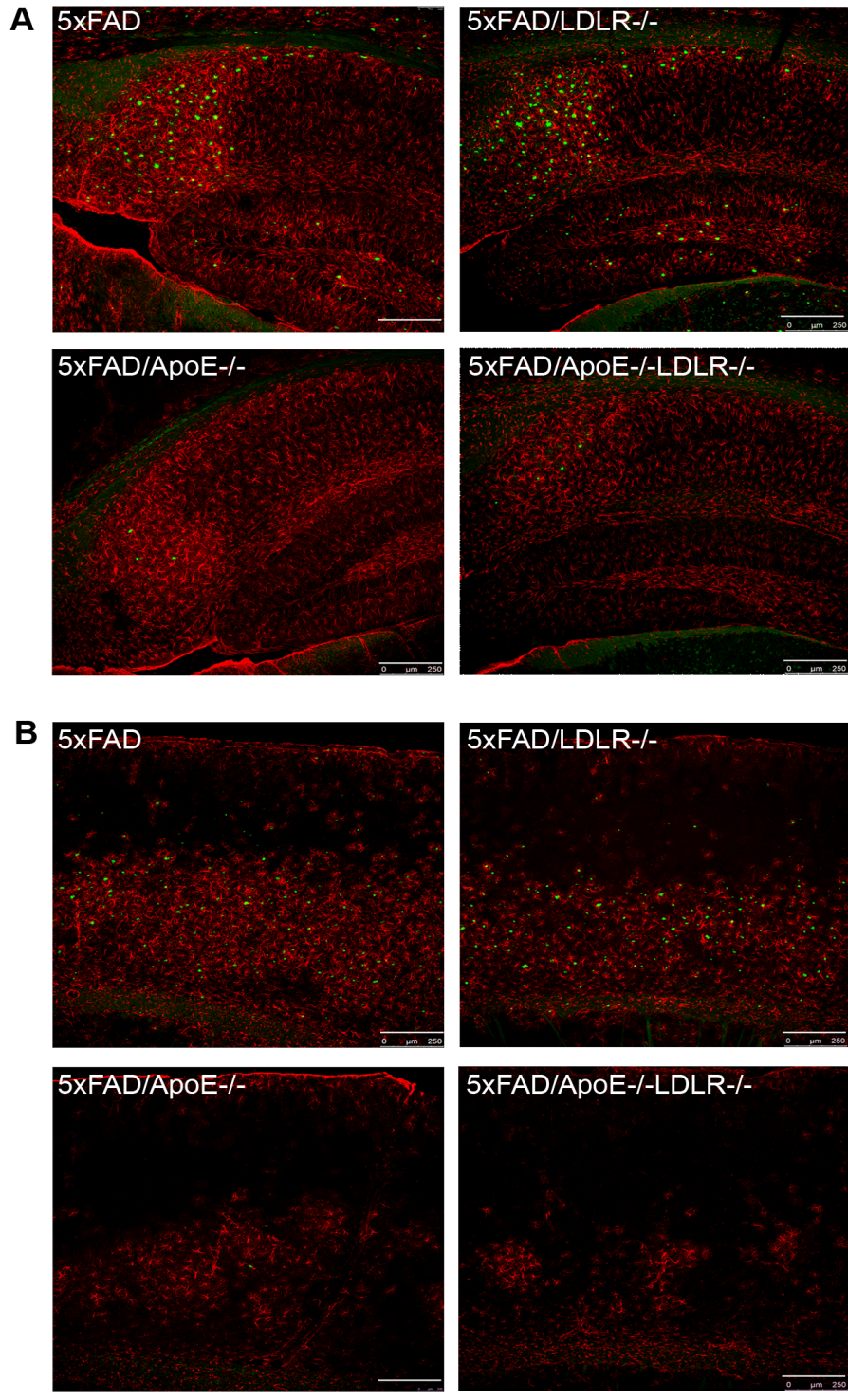
Ένα άλλο χαρακτηριστικό της νόσου είναι η έντονη φλεγμονώδης απόκριση στον εγκέφαλο των ασθενών και των διαγονιδιακών μοντέλων ποντικών με παθολογία τύπου Alzheimer. Αυτή χαρακτηρίζεται από ενεργοποίηση της γλοίας (αστροκυττάρωση και μικρογλοίωση), είσοδο κυττάρων του περιφερικού ανοσολογικού συστήματος (κυρίως μακροφάγων, αλλά και T-λεμφοκυττάρων), έντονη αύξηση προφλεγμονωδών κυτοκινών και ενεργοποίηση του συμπληρώματος (Cameron and Landreth, 2010, Forlenza et al., 2009,

Halle et al., 2008, Itagaki et al., 1988, Konsman et al., 2007, Landreth and Reed-Geaghan, 2009, Lee et al., 2009, McGeer et al., 1989, McGeer et al., 1988a, McGeer et al., 1988b, McGeer et al., 1988c, McGeer and McGeer, 2002, Monsonego et al., 2003, Rivest, 2009, Rota et al., 2006, Simard et al., 2006, Sokolova et al., 2009, Stalder et al., 2005, Town et al., 2005, Walker et al., 2009). Στο μοντέλο 5xFAD υπάρχει έντονη αστροκυττάρωση και μικρογλοίωση η οποία παρατηρείται από την ηλικία των δύο μηνών (βλ. ενότητα 3.6 και **εικόνες 3.34 και 3.38**) (Oakley et al., 2006). Τα εν λόγω παθοφυσιολογικά ευρήματα αναλύθηκαν στα ποντίκια χωρίς τον LDLR ή και χωρίς την APOE.

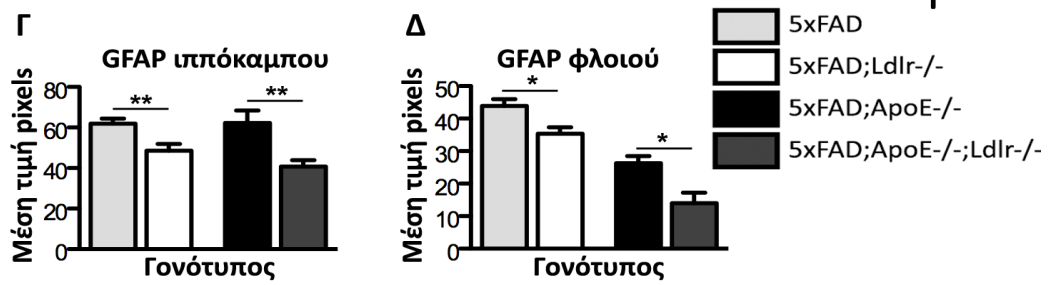
3.2.1. Μελέτη της αστροκυττάρωσης στα διαγονιδιακά ποντίκια με παθολογία τύπου Alzheimer σε συσχέτισμό με την απουσία του LDLR, παρουσία ή απουσία της APOE

Η αστροκυττάρωση, η οποία ορίζεται ως η ενεργοποίηση των αστροκυττάρων, χαρακτηρίζεται από πάχυνση του κυτταρικού σώματος και επιμήκυνση των κυτταρικών απολήξεων (feet processes). Χρησιμοποιείται ως δείκτης φλεγμονής σε εγκεφάλους ασθενών με τη νόσο του Alzheimer αλλά και σε εγκεφάλους διαγονιδιακών μοντέλων ποντικών μετά θάνατον. Οι εγκεφαλοί των ασθενών βρίθουν από ενεργοποιημένα αστροκύτταρα τα οποία περιβάλλουν τις αμυλοειδείς πλάκες και, σύμφωνα με πολλούς ερευνητές, σχηματίζουν «ουλή» για να περιορίσουν τη φλεγμονή (Canning et al., 1993, Fitch and Silver, 2008, Kashon et al., 2004, Prince et al., 1993, Simpson et al., 2010). Ως πρωτεΐνη-δείκτης χρησιμοποιείται η όξινη πρωτεΐνη των γλοιοκυττάρων (glial-fibrillary acidic protein, GFAP), ένα ενδιάμεσο ινίδιο ειδικό για τα αστροκύτταρα (Eng et al., 2000). Τα επίπεδα της πρωτεΐνης αυτής αυξάνονται κατακόρυφα στα ενεργοποιημένα αστροκύτταρα (Eng et al., 2000, Ridet et al., 1997).

Για τη μελέτη της αστροκυττάρωσης εξετάστηκαν θηλυκά ποντίκια τεσσάρων μηνών τα οποία αναπτύσσουν παθολογία τύπου Alzheimer. Στους εγκεφάλους αυτών έγινε ανοσοϊστοχημεία για τη GFAP σε συνδυασμό με τη χρώση για Θειοφλαβίνη-S, η οποία αναγνωρίζει τις αμυλοειδείς πλάκες, σε όλες τις ομάδες ανάλυσης.



GFAP/Θειοφλαβίνη-S



Εικόνα 3.7. Ανάλυση της επίδρασης του LDLR στην αστροκυττάρωση των διαγονιδιακών ποντικών 5xFAD. A-B. Ανοσοϊστοχημεία για GFAP και Θειοφλαβίνη-S σε τομές εγκεφάλων 40μm από θηλυκά ποντίκια 4 μηνών. Στην εικόνα δείχνονται αντιπροσωπευτικοί ιππόκαμποι (A) και φλοιοί (B) από τους 4 γονότυπους. Η απουσία του LDLR οδηγεί σε μείωση της αστροκυττάρωσης ανεξάρτητα από την παρουσία της APOE. Η αστροκυττάρωση τόσο στο φλοιό όσο και στον ιππόκαμπο είναι πιο έντονη στα 5xFAD και στα 5xFAD;ApoE-/- σε σχέση με τα 5xFAD;Ldlr-/- και τα 5xFAD;ApoE-/-;Ldlr-/- αντίστοιχα. Κλίμακα 250μm. Γ-Δ. Ποσοτικοποίηση της μέσης τιμής των *rixel* στον ιππόκαμπο (Γ) και το φλοιό (Δ) των παραπάνω ποντικών. Η στατιστική ανάλυση έγινε με έλεγχο Student. * $P < 0,05$ και ** $P < 0,01$.

Η απουσία του LDLR στον ιππόκαμπο των ποντικών 5xFAD;Ldlr-/- οδηγεί σε μείωση της αστροκυττάρωσης σε σχέση με των ποντικών 5xFAD. Αντίθετα, η απουσία της APOE στα ποντίκια 5xFAD;ApoE-/- δεν την επηρεάζει. Τα ποντίκια στα οποία απουσιάζει ταυτόχρονα και η APOE και ο LDLR (5xFAD;ApoE-/-;Ldlr-/-) έχουν λιγότερη αστροκυττάρωση από τα 5xFAD;ApoE-/- αν και έχουν περισσότερες πλάκες από αυτά (**Εικόνα 3.7A**). Σε όλα τα ποντίκια ανεξαρτήτως γονότυπου, η αστροκυττάρωση στον ιππόκαμπο εντοπίζεται κυρίως στο υπόθεμα του εγκεφάλου (subiculum).

Στο φλοιό των διαγονιδιακών ποντικών (**Εικόνα 3.7B**) η αστροκυττάρωση είναι πιο έντονη στα 5xFAD σε σχέση με τα ποντίκια 5xFAD;Ldlr-/. Αντίστοιχα, απουσία της ενδογενούς APOE, τα 5xFAD;ApoE-/-;Ldlr-/- έχουν λιγότερη αστροκυττάρωση από τα 5xFAD;ApoE-/. Και στις δύο περιοχές που εξετάστηκαν, η απουσία του LDLR οδηγεί στη μείωση της αστροκυττάρωσης ανεξάρτητα από την APOE (**Εικόνα 3.7**).

Η ποσοτικοποίηση της GFAP στον ιππόκαμπο και το φλοιό των ποντικών αυτών επιβεβαίωσε τα παραπάνω. Τα ποντίκια χωρίς τον ενδογενή LDLR είχαν στατιστικά σημαντική μείωση των επιπέδων GFAP παρουσία (5xFAD;Ldlr-/-) και απουσία της APOE (5xFAD;ApoE-/-;Ldlr-/-) σε σχέση με τα 5xFAD και τα 5xFAD;ApoE-/- αντίστοιχα (**Εικόνα 3.7Γ-Δ**).

3.2.2. Μελέτη της μικρογλοίωσης στα διαγονιδιακά ποντίκια με παθολογία τύπου Alzheimer σε συσχέτισμό με την απουσία του LDLR, παρουσία ή απουσία της APOE

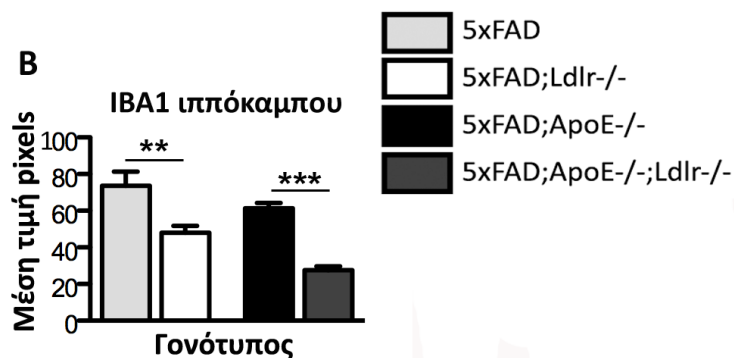
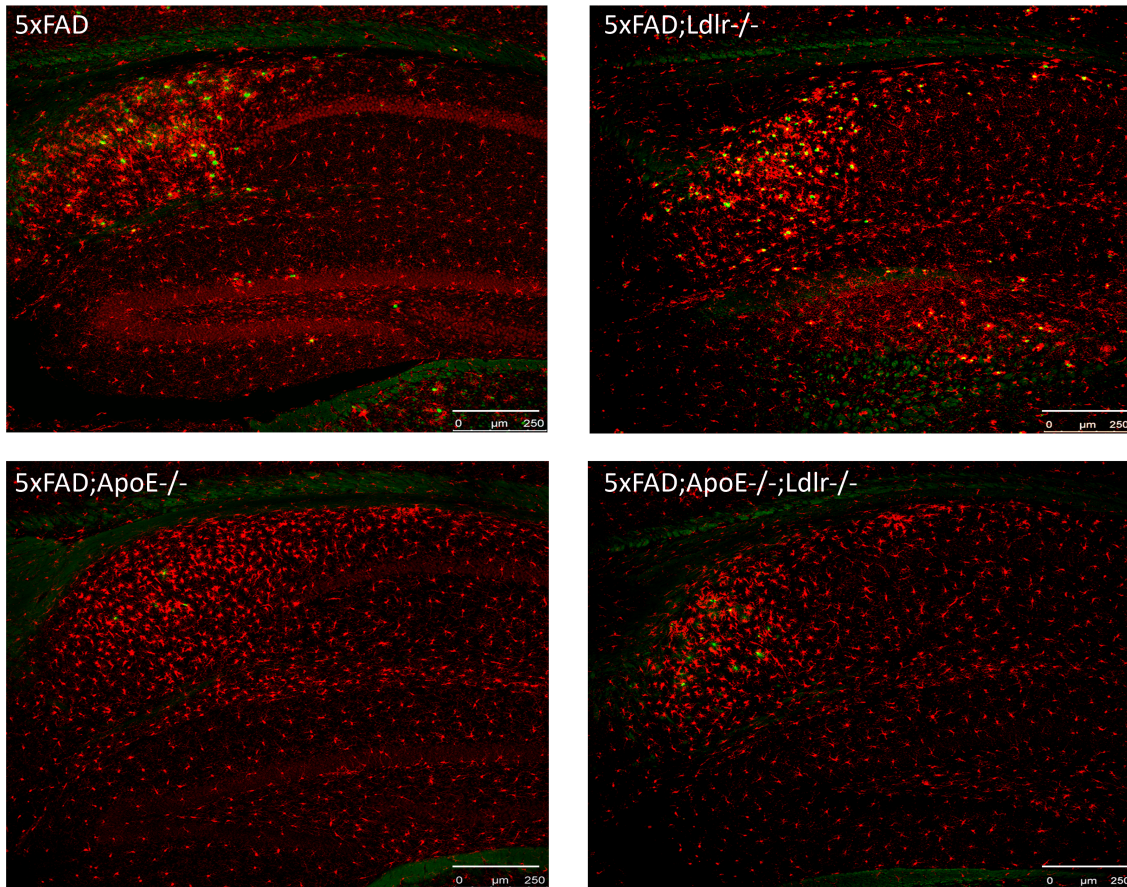
Ένας άλλος δείκτης φλεγμονής που χρησιμοποιείται στη νόσο του Alzheimer είναι η μικρογλοίωση η οποία ορίζεται ως η ενεργοποίηση της μικρογλοίας. Τα μικρογλοιακά κύτταρα είναι τα «φαγοκύτταρα» του εγκεφάλου. Η μικρογλοίωση χαρακτηρίζεται από πάχυνση του κυτταρικού σώματος και συρρίκνωση των κυτταρικών απολήξεων της μικρογλοίας (Perry et al., 2010). Στους εγκεφάλους των ασθενών, τα μικρογλοιακά κύτταρα βρίσκονται σε στενή επαφή με τις αμυλοειδείς πλάκες (Haga et al., 1989, Perlmutter et al., 1992). Στη μικρογλοία έχει αποδοθεί ρόλος τόσο νευροπροστατευτικός όσο και νευροεκφυλιστικός, ανάλογα με την εξεταζόμενη ασθένεια και το στάδιο στο οποίο βρίσκεται, και η μελέτη της βρίσκεται κάτω από έντονο επιστημονικό ενδιαφέρον (Cameron and Landreth, 2010, McGeer and McGeer, 2002, Rivest, 2009, Streit, 2002). Η μικρογλοίωση εξετάστηκε με την πρωτεΐνη-δείκτη IBA1 που είναι ειδική για τα μικρογλοιακά κύτταρα και τα μακροφάγα (Imai et al., 1996).

Για την ανάλυση της μικρογλοίωσης στη παρούσα μελέτη, πραγματοποιήθηκε ανοσοϊστοχημεία για IBA1 (πρωτεΐνη-δείκτης για μικρογλοία/μακροφάγα) σε συνδυασμό με χρώση για Θειοφλαβίνη-S (αμυλοειδείς πλάκες) σε θηλυκά ποντίκια τεσσάρων μηνών από όλες τις ομάδες ανάλυση.

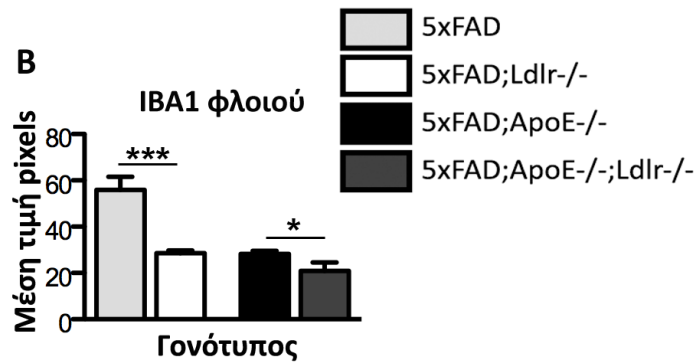
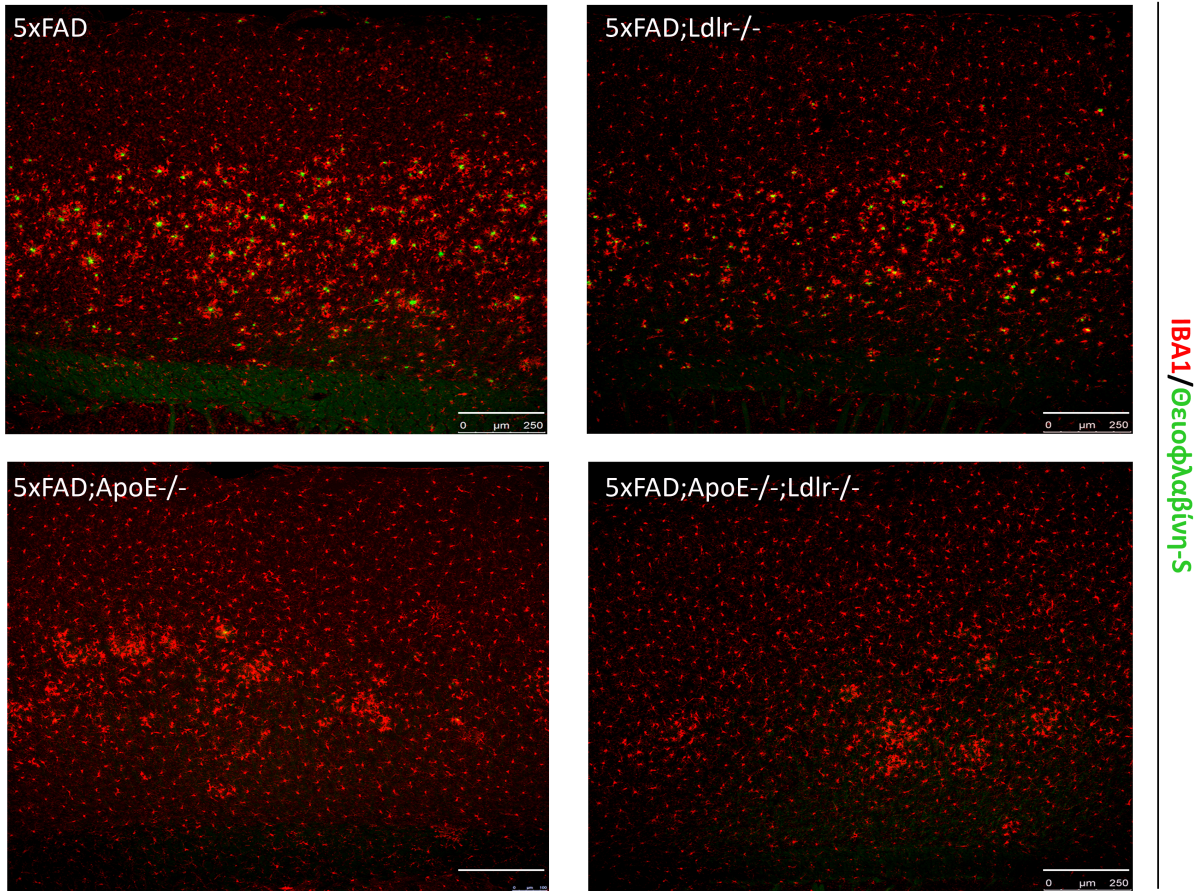
Τα ποντίκια χωρίς τον ενδογενή LDLR, είτε παρουσία (5xFAD;Ldlr^{-/-}) είτε απουσία της APOE (5xFAD;ApoE^{-/-};Ldlr^{-/-}) έχουν στατιστικά σημαντική μείωση της μικρογλοίωσης στον *ιππόκαμπο* σε σχέση με τα 5xFAD και τα 5xFAD;ApoE^{-/-} αντίστοιχα (**Εικόνα 3.8**). Στο *φλοιό* των ποντικών αυτών οι διαφορές είναι εντονότερες (**Εικόνα 3.9**).

Ένα ιδιαίζον φαινόμενο που παρατηρήθηκε είναι η δημιουργία συγκυτίων από μικρογλοιακά/μακροφάγα κύτταρα (θετικά για IBA1) γύρω από αμυλοειδείς πλάκες στο θάλαμο των ποντικών 5xFAD;Ldlr^{-/-} (**Εικόνα 3.10**). Το φαινόμενο αυτό δεν παρατηρήθηκε σε καμία άλλη ομάδα.

IBA1/Θειοφλαβίνη-S

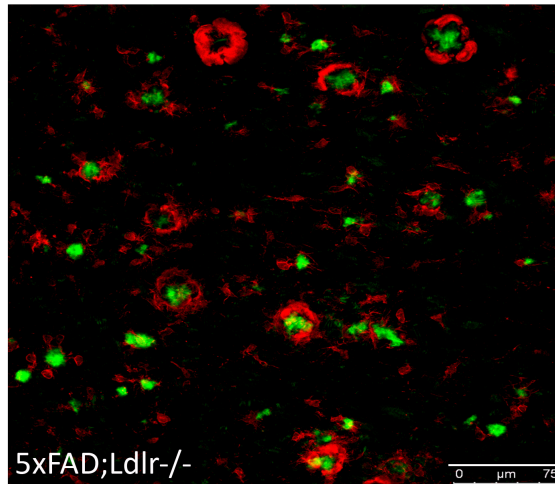


Εικόνα 3.8. Επίδραση του LDLR στη μικρογλοΐωση του ιππόκαμπου στο διαγονιδιακό μοντέλο 5xFAD. Η εκτίμηση έγινε με τη μέθοδο της ανοσοϊστοχημείας για IBA1 και Θειοφλαβίνη-S σε τομές 40μm από εγκεφάλους θηλυκών ποντικών τεσσάρων μηνών. Το πείραμα έγινε σε πέντε τομές από κάθε ποντίκι και για κάθε ομάδα ανάλυσης αναλύθηκαν 3-4 ποντίκια. Στην εικόνα παρατίθενται αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες από κάθε γονότυπο. Η απουσία του LDLR οδηγεί σε μείωση της μικρογλοΐωσης ανεξάρτητα από την παρουσία της APOE. Κλίμακα 250μm. B. Ποσοτικοποίηση της μέσης τιμής των pixel στις ομάδες ανάλυσης έδειξε στατιστικά σημαντική μείωση απουσία του LDLR. Η στατιστική ανάλυση έγινε με έλεγχο Student. ** $P < 0,01$ και *** $P < 0,001$.



Εικόνα 3.9. Η επίδραση του LDLR στη μικρογλοίωση του φλοιού στο διαγονιδιακό μοντέλο 5xFLAcy2. Η απουσία του LDLR οδηγεί σε μείωση της μικρογλοίωσης και τα 5xFLAcy2;Ldlr-/- και τα 5xFLAcy2;ApoE-/-;Ldlr-/- έχουν μείωση της μικρογλοίωσης στο φλοιό σε σχέση με τα 5xFLAcy2 και στα 5xFLAcy2;ApoE-/- αντίστοιχα. Η ανοσοϊστοχημεία για IBA1 και Θειοφλαβίνη-5 έγινε σε τομές 40μm από εγκεφάλους θηλυκών ποντικών 4 μηνών. Το πείραμα έγινε σε τέσσερις τομές από κάθε ποντίκι και για κάθε ομάδα ανάλυσης αναλύθηκαν 3-4 ποντίκια. Στην εικόνα παρουσιάζονται ενδεικτικές φωτογραφίες από φλοιό κάθε γονότυπου. Κλίμακα 250μm. **B.** Ποσοτικοποίηση της μέσης τιμής των pixel στις ομάδες ανάλυσης έδειξε στατιστικά σημαντική μείωση απουσία του LDLR. Η στατιστική ανάλυση έγινε με έλεγχο Student. * $P < 0,05$ και *** $P < 0,001$.

IBA1/Θειοφλαβίνη-S

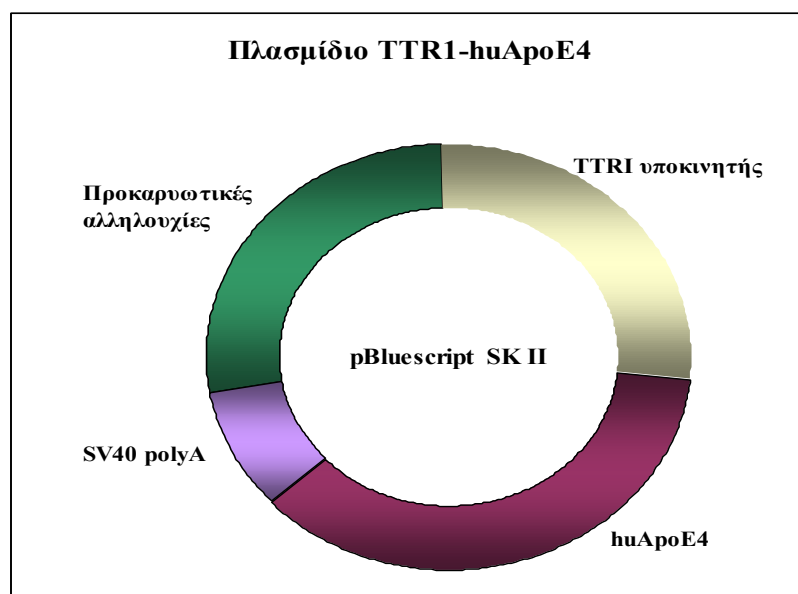


Εικόνα 3.10. Δημιουργία συγκυτίων στα διαγονιδιακά ποντίκια *5xFAD;Ldlr-/-*. Στην εικόνα παρουσιάζονται συγκύτια από μικρογλοιακά κύτταρα που δημιουργούνται γύρω από τις αμυλοειδείς πλάκες και παρατηρήθηκαν μόνο στο θάλαμο των ποντικών *5xFAD;Ldlr-/-*. Αντιπροσωπευτική εικόνα από ανοσοϊστοχημεία για IBA1 και Θειοφλαβίνη-S στο θάλαμο θηλυκού ποντικού *5xFAD;Ldlr-/-* ηλικίας τεσσάρων μηνών. Το πείραμα πραγματοποιήθηκε και επιβεβαιώθηκε σε πέντε ποντίκια. Κλίμακα 75μm.

3.3. ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΑΚΩΝ ΠΟΝΤΙΚΩΝ ΠΟΥ ΕΚΦΡΑΖΟΥΝ ΤΟ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟ ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΟ ΑΡΟΕ4 (TTRI-HUΑΡΟΕ4)

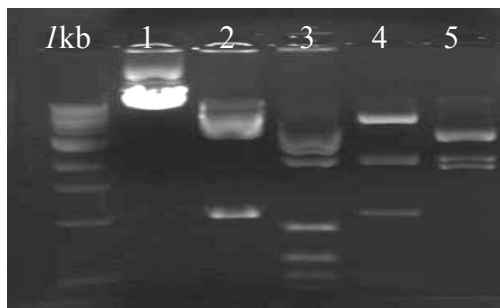
Ο δεύτερος στόχος της διατριβής που ήταν η διερεύνηση του ρόλου της προερχόμενης από την περιφέρεια ΑΡΟΕ στη νόσο του Alzheimer έγινε μέσω της κατασκευής και της μελέτης ενός διαγονιδιακού ποντικού που εκφράζει την ανθρώπινη ΑΡΟΕ4 μόνο στην περιφέρεια. Ως περιφέρεια ορίζονται όλοι οι ιστοί πλην του εγκεφάλου, δεδομένου ότι αυτός είναι απομονωμένος λόγω του αιματοεγκεφαλικού φραγμού. Το διαγονιδιακό μοντέλο που κατασκευάσαμε διασταυρώθηκε με διαγονιδιακά ποντίκια με παθολογία τύπου Alzheimer.

Για τη δημιουργία του διαγονιδιακού ποντικού χρησιμοποιήθηκε ο υποκινητής της τρανσθυρετίνης (transthyretin I, TTRI, ευγενική χορηγία του Δρ. Ταλιανίδη) που εξασφαλίζει έκφραση στο ήπαρ (Yan et al., 1990). Αρχικά κλωνοποιήθηκε το αλληλόμορφο 4 της ανθρώπινης απολιποπρωτεΐνης E (Apolipoprotein E4, *ApoE4*) στο πρώτο εξώνιο του TTRI καταροϊκά του υποκινητή. Η μοριακή κατασκευή που φτιάξαμε περιγράφεται σχηματικά στην **εικόνα 3.11**. Η αλληλουχία της ΑΡΟΕ που είναι κλωνοποιημένη αντιστοιχεί στο γονιδιωματικό DNA που εκτείνεται από το νουκλεοτίδιο 50100864 μέχρι το νουκλεοτίδιο 50105348 του χρωμοσώματος 19 και περιέχει όλα τα εσώνια και εξώνια της ΑΡΟΕ4 (αριθμός καταχώρησης NCBI NC_000019).

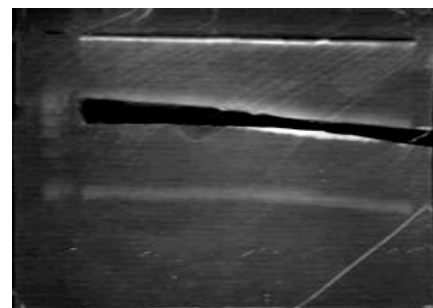


Εικόνα 3.11. Σχηματική απεικόνιση της μοριακής κατασκευής *pBlsc-TTRI-huApoE4*

Ακολούθως, δεκτικά βακτήρια *E.coli* DH5α μετασχηματίστηκαν με τη μοριακή κατασκευή pBlsc-TTRI-huApoE4 η οποία τους προσδίδει ανθεκτικότητα σε αμπικιλίνη. Στη συνέχεια το DNA απομονώθηκε από μεσαίου μεγέθους υγρές καλλιέργειες με το EndoFree Qiagen Midi prep kit που αφαιρεί τις ενδοτοξίνες οι οποίες είναι τοξικές για το ζυγωτό. Ο σωστός προσανατολισμός του κλωνοποιημένου γονιδίου της *ApoE4* σε σχέση με τον υποκινητή διαπιστώθηκε μέσω διαγνωστικών πέψεων με τα κατάλληλα περιοριστικά ένζυμα (**Εικόνα 3.12**).



Εικόνα 3.12. Επαλήθευση του σωστού προσανατολισμού του κλωνοποιημένου *ApoE4*. Στην εικόνα δείχνονται πέψεις με τα περιοριστικά ένζυμα *NotI*(1), *NotI+NcoI* (2), *EcoRI+SacII* (3), *SacII+NcoI* (4) και *EcoRI* (5).



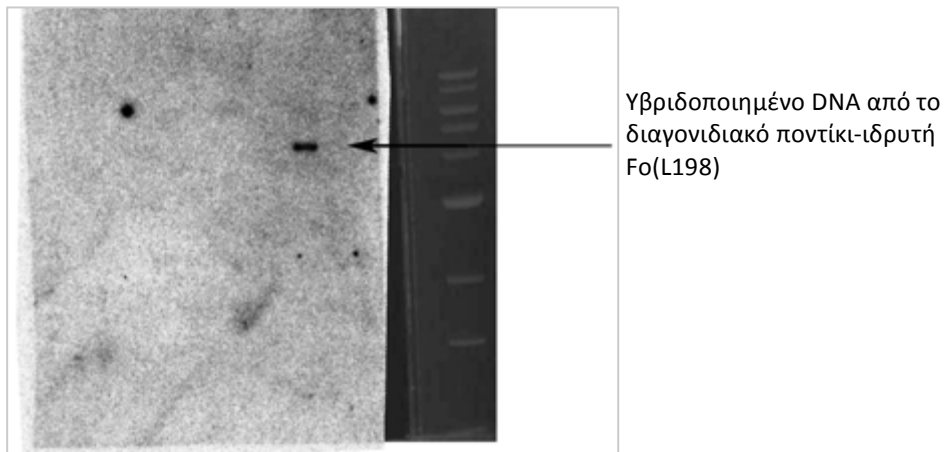
Εικόνα 3.13. Απομόνωση του ενέσιμου τμήματος του διαγονιδίου. Το DNA επώαστηκε με την περιοριστική ενδονουκλεάση *HindIII* και απομονώθηκε από αгарόζη χαμηλού σημείου τήξεως συγκέντρωσης 0.8%.

Οι προκαρυωτικές αλληλουχίες της μοριακής κατασκευής είναι τοξικές για τα ζυγωτά, οπότε για να αφαιρεθούν αυτές το DNA επώαστηκε με το περιοριστικό ένζυμο *HindIII* και απομονώθηκε από πήκτωμα αγαρόζης χαμηλού σημείου τήξεως (**Εικόνα 3.13**). Το ενέσιμο τμήμα (**Εικόνα 3.14**) ποσοτικοποιήθηκε σε πήκτωμα αγαρόζης και αραιώθηκε μέχρι την επιθυμητή συγκέντρωση των 3ng/μl σε διάλυμα κατάλληλο για ενέσεις σε ζυγωτά (Embryomax Injection buffer, Chemicon).

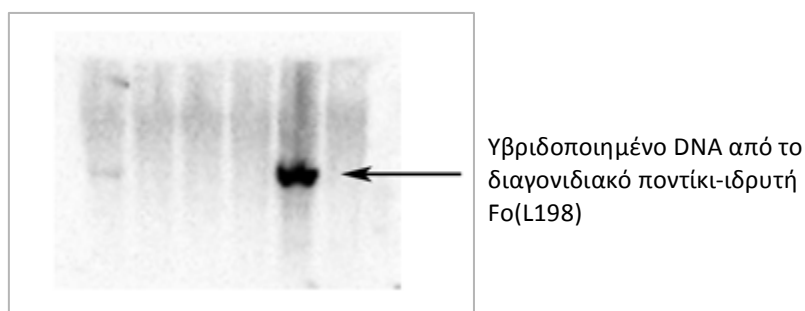


Εικόνα 3.14. Σχηματική απεικόνιση του ενέσιμου τμήματος. Το τμήμα αυτό χρησιμοποιήθηκε για τη δημιουργία των διαγονιδιακών ποντικών *TTRI-huApoE4*. Η ουρά πολυαλανίνης του ιού *SV40* (*SV40 polyA*), προσδίδει σταθερότητα στο μεταγραφόμενο *mRNA*, εξασφαλίζοντας έκφραση της πρωτεΐνης.

Από τα γονιμοποιημένα ωάρια τα οποία εγχύθηκαν με το διαγονίδιο TTRI-huApoE4, 52 έφτασαν στο στάδιο των δύο βλαστομεριδίων και μεταφέρθηκαν στους αγωγούς ψευδοεγκύων θηλυκών ποντικών από το στέλεχος CD1. Από αυτά γεννήθηκαν επτά ποντίκια και με ανάλυση κατά Southern διαπιστώθηκε η ύπαρξη δύο διαγονιδιακών ποντικών: το ποντίκι-ιδρυτής L198 (FoL198) και το ποντίκι-ιδρυτής L653 (FoL653).



Εικόνα 3.15. Ανίχνευση των πιθανών διαγονιδιακών-ποντικών. Στην εικόνα δείχνεται αυτοραδιογραφία όπου φαίνεται το θετικό σήμα στο DNA του διαγονιδιακού ποντικού-ιδρυτή Fo(L198). Γονιδιωματικό DNA (10μg) από βιοψίες ουρών επώαστηκε με την περιοριστική ενδονουκλεάση EcoRI και στη συνέχεια έγινε ανάλυση κατά Southern όπως αυτό περιγράφεται αναλυτικά στις μεθόδους (2.8.1 και 2.8.2). Για την ανίχνευση χρησιμοποιήθηκε ραδιοσημασμένος ιχνηθέτης ειδικός για το εσώνιο 3 και το εξώνιο 4 της huApoE4 ο οποίος υβριδοποιείται ειδικά μόνο στο διαγονίδιο.

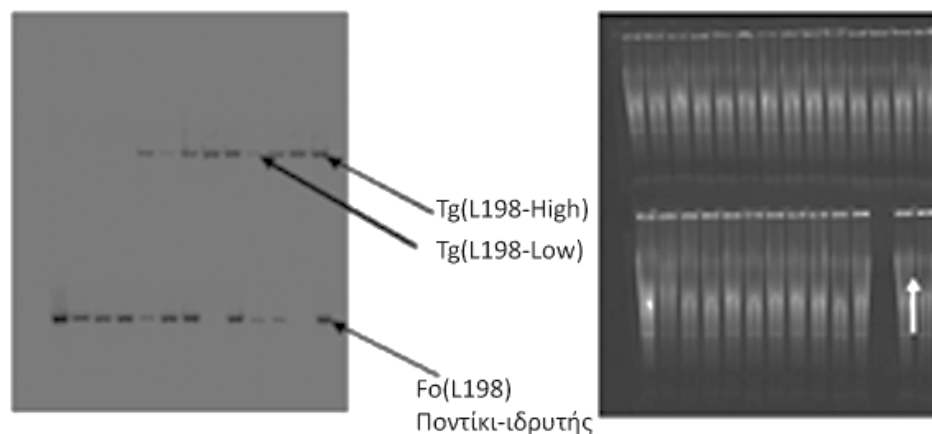


Εικόνα 3.16. Ανίχνευση με ανάλυση κατά Southern των πιθανών διαγονιδιακών-ποντικών TTRI-huApoE4. Στην αυτοραδιογραφία δείχνεται το θετικό σήμα από το DNA του διαγονιδιακού ποντικού-ιδρυτή Fo(L653).

Ως ιχνηθέτης χρησιμοποιήθηκε ένα τμήμα της ApoE μεγέθους 1,9Kb που περιέχει μέρος του εσωνίου 3 και όλο το εξώνιο 4 της APOE4 (**Εικόνα 2.6**). Στην αυτοραδιογραφία

εμφανίζεται μια ζώνη μεγέθους περίπου 5kbp στη διαδρομή που περιέχει το DNA του διαγονιδιακού ποντικού FoL198 (Εικόνα 3.15) και του Fo(L653) (Εικόνα 3.16). Ο ιχνηθέτης είναι ειδικός για την ανθρώπινη ApoE (huApoE) και δεν υβριδοποιείται με την ενδογενή ApoE (muApoE).

Το ποντίκι-ιδρυτής Fo(L198) είχε δύο περιοχές ενσωμάτωσης του διαγονιδίου. Αυτές διαχωρίστηκαν στους απογόνους της πρώτης θυγατρικής γενιάς (F1) και προέκυψαν δύο διακριτές σειρές, μία με υψηλό αριθμό αντιγράφων του διαγονιδίου Tg(L198-High) και μία με χαμηλό Tg(L198-Low) (Εικόνα 3.17).



Εικόνα 3.17. Ταυτοποίηση των απογόνων του διαγονιδιακού ποντικού Fo(L198). Α. Η ανάλυση για το διαγονίδιο TTRI-huApoE4 έγινε με ραδιοσημασμένο ιχνηθέτη ειδικό για το εσώνιο 3 και το εσώνιο 4 της huApoE4. 10μg γενωμικού DNA από βιοψίες ουρών επωάστηκαν με την περιοριστική ενδονουκλεάση EcoRI. Β. Στην εικόνα παρουσιάζεται το πήκτωμα αγαρόζης από τα αντίστοιχα δείγματα της αυτοραδιογραφίας όπου φαίνεται ότι ηλεκτροφορήθηκαν ισομοριακές ποσότητες από κάθε δείγμα ουράς. Ακριβώς πριν από το θετικό δείγμα Fo(L198) είναι ένα δείγμα από ένα φυσικού τύπου ποντίκι (λευκό βέλος) στο οποίο δείχνεται ότι η ενδογενής APOE δεν υβριδοποιείται με το ραδιενεργό ιχνηθέτη.

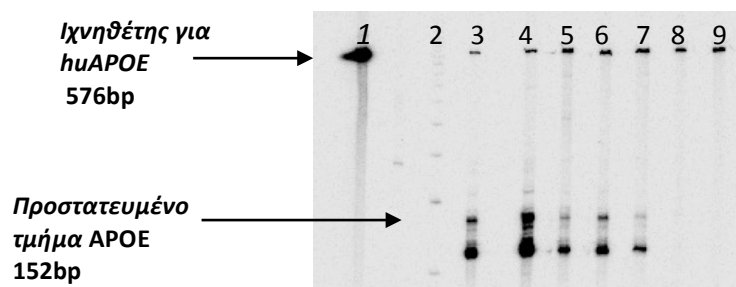
3.4. ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΑΚΩΝ ΠΟΝΤΙΚΩΝ TTRI-HUΑΡΟΕ4 ΤΑ ΟΠΟΙΑ ΕΚΦΡΑΖΟΥΝ ΤΟ ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΟ ΑΡΟΕ4 ΤΗΣ ΑΝΘΡΩΠΙΝΗΣ ΑΡΟΕ

3.4.1. Ανάλυση επιπέδων mRNA με τη μέθοδο της νουκλεάσης S1

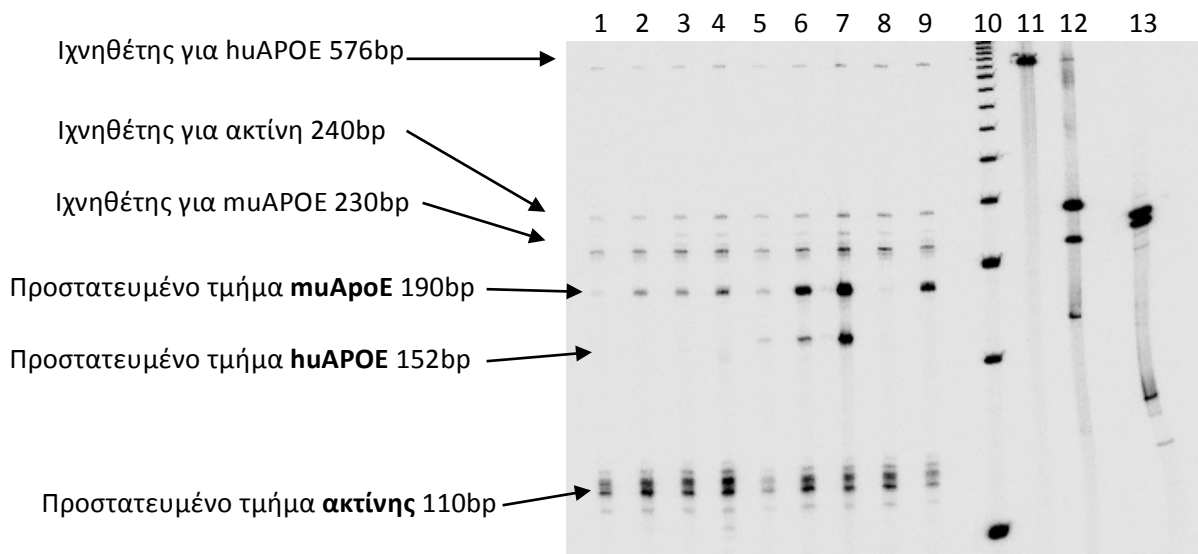
Για να εξεταστούν τα επίπεδα έκφρασης του διαγονιδίου της ΑΡΟΕ, αναλύθηκε αγγελιαφόρο RNA (messenger RNA, mRNA) από τις δύο σειρές που προέρχονται από το διαγονιδιακό ποντίκι Fo(L198) - (Tg(L198-High) και Tg(L198-Low) - και από τη σειρά Tg(L653). Οι τρεις διαγονιδιακές σειρές αναλύθηκαν με τη μέθοδο της νουκλεάσης S1. Ουκλεδιαπιστώθηκε ότι όλες εξέφραζαν υψηλά επίπεδα mRNA στο ήπαρ και τους σιελογόνους αδένες και περιορισμένα επίπεδα στον εγκέφαλο και τις γονάδες (εικόνες

3.18-3.21). Στη σειρά Tg(L198-Low) τα επίπεδα του mRNA της ανθρώπινης ApoE4 στο ήπαρ είναι περίπου δύο φορές χαμηλότερα από τα αντίστοιχα της σειράς Tg(L198-High). Στη σειρά Tg(L653) τα επίπεδα έκφρασης mRNA ήταν περίπου ίδια με εκείνα της σειράς Tg(L198-High). Η έκφραση του mRNA της ανθρώπινης ApoE4 στο ήπαρ των σειρών Tg(L198-High) gh4 Tg(L653) είναι αντίστοιχα 30% και 20% υψηλότερη από αυτήν της ενδογενούς APOE του ποντικού (**Εικόνες 3.20-3.21**). Αντίθετα, τα επίπεδα της ανθρώπινης ApoE4 (human ApoE, huApoE) στον εγκέφαλο είναι πολύ χαμηλότερα από αυτά της ενδογενούς ApoE (περίπου το 10% της ενδογενούς) σε όλες τις διαγονιδιακές σειρές. Στους σιελογόνους αδένες, τα επίπεδα mRNA του διαγονιδίου της huApoE4 είναι κατά πολύ υψηλότερα (περίπου 10 φορές) από αυτά του ενδογενούς γονιδίου. Τέλος, στις γονάδες τα επίπεδα είναι περίπου ίδια με αυτά της ενδογενούς ApoE.

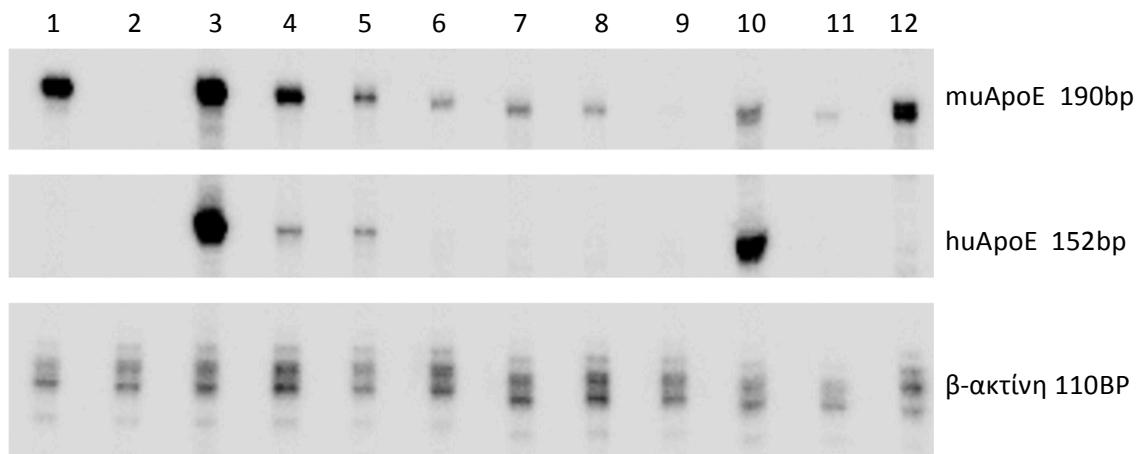
Για την παρούσα διατριβή επιλέχθηκε η σειρά Tg(L198-High) η οποία έχει πολύ υψηλή έκφραση mRNA στο ήπαρ και τη χαμηλότερη εκ των τριών στον εγκέφαλο. Η σειρά αυτή θα αναφέρεται πλέον ως TTRI-huApoE4. Σύμφωνα με την αρχική μελέτη που έγινε όταν κατασκευάστηκε ο υποκινητής TTRI, όταν ο αριθμός των αντιγράφων του διαγονιδίου είναι πολύ υψηλός (πάνω από 50 αντίγραφα DNA), το διαγονίδιο εκφράζεται στο χοριοειδές πλέγμα του εγκεφάλου (Yan et al., 1990). Όταν τα αντίγραφα DNA του διαγονιδίου που ενσωματώνονται στο γονιδίωμα του ποντικού είναι μεταξύ 10-20, το διαγονίδιο δεν εκφράζεται στον εγκέφαλο. Γι' αυτό το λόγο επιλέχθηκε η σειρά Tg(L198-High) που έχει χαμηλό αριθμό αντιγράφων DNA του διαγονιδίου (**Εικόνα 3.17**) και ελάχιστο mRNA (**Εικόνα 3.20**).



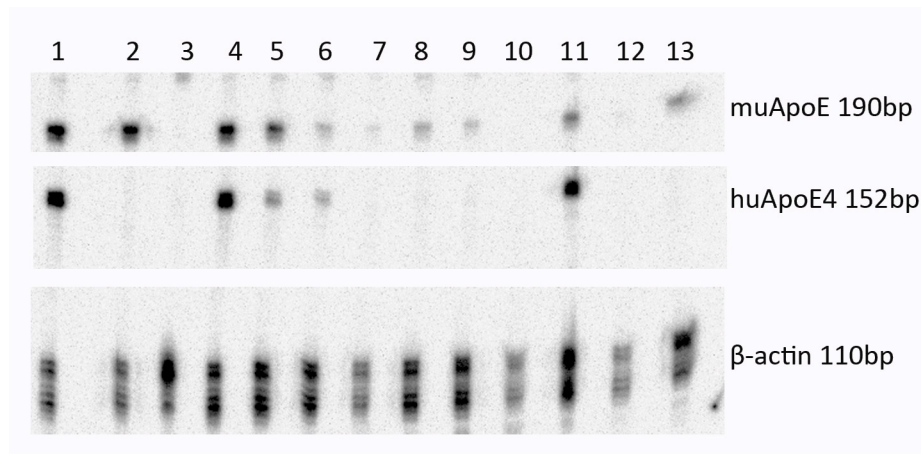
Εικόνα 3.18. Ανάλυση των επιπέδων mRNA των διαγονιδιακών για την ανθρώπινη ApoE4 ποντικών Tg(L198-High) και Tg(L198-Low). Η ανάλυση έγινε με τη μέθοδο της νουκλεάσης S1 όπου 20μg ολικού RNA από ιστούς επώαστηκαν με ιχνηθέτη για huAPOE και β-ακτίνη. Α. (1) ιχνηθέτης για ανθρώπινη APOE (huApoE), (2) μάρτυρας γνωστού μοριακού μεγέθους (50bp ladder, NEB), (3) RNA από ανθρώπινο ήπαρ (θετικό δείγμα), (4) ήπαρ από Tg(L198-High), (5) εγκέφαλος από Tg(L198-High), (6) ήπαρ από Tg(L198-Low), (7) εγκέφαλος από Tg(L198-Low), (8) ήπαρ από φυσικού τύπου ποντίκι και (9) εγκέφαλος από φυσικού τύπου ποντίκι.



Εικόνα 3.19. Ανάλυση των επιπέδων mRNA των διαγονιδιακών ποντικών Tg(L198-Low). 20μg ολικού RNA από ιστούς διαγονιδιακού ποντικού Tg(L198-Low), επωάστηκαν με ιχνηθέτες για huAPOE, muApoE και β-ακτίνη όπως περιγράφεται στις μεθόδους. (1) πνεύμονες, (2) λεπτό έντερο, (3) νεφροί, (4) σπλήνας, (5) γονάδες, (6) εγκέφαλος, (7) ήπαρ, (8) ήπαρ από ApoE^{-/-} ποντίκι, (9) ήπαρ από φυσικού τύπου ποντίκι, (10) μάρτυρας γνωστού μοριακού μεγέθους (50bp ladder, NEB), (11) ιχνηθέτης για ανθρώπινη APOE, (12) ιχνηθέτης για ακτίνη και (13) ιχνηθέτης για APOE ποντικού. Η ανάλυση έγινε με τη μέθοδο της νουκλεάσης S1.



Εικόνα 3.20. Ανάλυση RNA με τη μέθοδο της νουκλεάσης S1 των διαγονιδιακών ποντικών Tg(L198-High). 20μg ολικού RNA από ιστούς διαγονιδιακού ποντικού Tg(L198-High), επωάστηκαν με ιχνηθέτες για huAPOE, muApoE και β-ακτίνη όπως περιγράφεται στις μεθόδους, (1) εγκέφαλος από φυσικού τύπου ποντίκι (2) εγκέφαλος από ApoE^{-/-} ποντίκι, (3-12) ιστοί από διαγονιδιακό ποντίκι: (3) ήπαρ, (4) εγκέφαλος, (5) γονάδες, (6) σπλήνας, (7) νεφροί, (8) λεπτό έντερο, (9) πνεύμονες, (10) σιελογόνοι αδένες, (11) θύμος αδένας και (12) καρδιά.



Εικόνα 3.21. Ανάλυση RNA με τη μέθοδο της νουκλεάσης S1 των διαγονιδιακών ποντικών Tg(L653). 20μg ολικού RNA από ιστούς διαγονιδιακού ποντικού Tg(L653), επώαστηκαν με ιχνηθέτες για huAPOE, muApoE και β-ακτίνη όπως περιγράφεται στις μεθόδους, (1) εγκέφαλος από ποντίκι της σειράς Tg(L198-High), (2) εγκέφαλος από φυσικού τύπου ποντίκι, (3) εγκέφαλος από ApoE^{-/-} ποντίκι, (4-13) ιστοί από διαγονιδιακό ποντίκι: (4) ήπαρ, (5) εγκέφαλος, (6) γονάδες, (7) σπλήνας, (8) νεφροί, (9) λεπτό έντερο, (10) πνεύμονες, (11) σιελογόνοι αδένες, (12) θύμος αδένας και (13) καρδιά.

3.4.2. Ανάλυση έκφρασης της APOE4 στον ορό του αίματος των διαγονιδιακών ποντικών TTRI-huApoE4

Για να διαπιστωθεί εάν τα επίπεδα έκφρασης mRNA που παρατηρήθηκαν στο διαγονιδιακό ποντίκι που κατασκευάσαμε έχουν ως αποτέλεσμα την έκφραση ικανοποιητικών επιπέδων πρωτεΐνης, εξετάστηκε ορός αίματος από διαγονιδιακά ποντίκια TTRI-huApoE4 από τη σειρά Tg(L198-High) καθώς και από τη σειρά Tg(L653). Η APOE είναι εκκρινόμενη πρωτεΐνη και βρίσκεται σε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις στο πλάσμα ως μία από τις κυριότερες πρωτεΐνες των λιποπρωτεϊνών.

Στην **εικόνα 3.22** φαίνεται υψηλή έκφραση πρωτεΐνης της ανθρώπινης APOE στον ορό του αίματος διαγονιδιακών ποντικών Tg(L198-High) τα οποία είναι στο ApoE^{-/-} γενετικό υπόβαθρο (TTRI-huApoE4;ApoE^{-/-}). Τα υψηλά πρωτεϊνικά επίπεδα της APOE4 στον ορό του αίματος των ποντικών διασφαλίζουν το σκοπό της παρούσας διατριβής που είναι η μελέτη του ρόλου της προερχόμενης από την περιφέρεια APOE4.

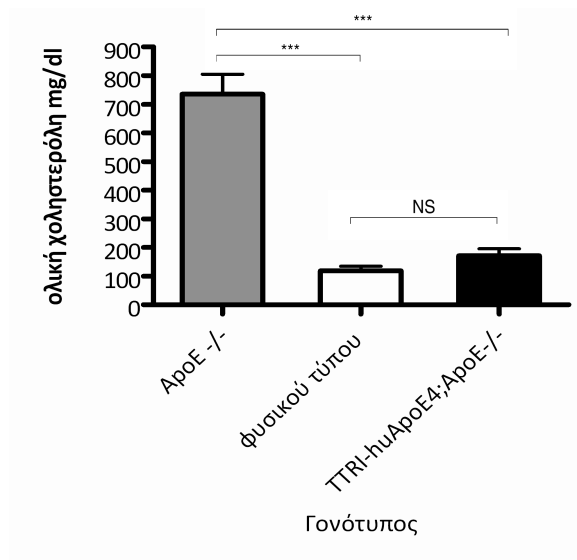


Εικόνα 3.22. Ανάλυση της έκφρασης της ανθρώπινης APOE4 στον ορό του αίματος ποντικών TTRI-huApoE4. Η έκφραση διαπιστώθηκε σε όλα τα ποντίκια τα οποία αναλύθηκαν. Στην πρώτη διαδρομή δείχνεται ένα δείγμα από φυσικού τύπου ποντίκι, το οποίο χρησιμοποιήθηκε σαν αρνητικός μάρτυρας. Συνολικά 2 μl ορού αίματος από κάθε ποντίκι φορτώθηκαν σε κάθε διαδρομή και η πρωτεΐνη ανιχνεύθηκε με το μονοκλωνικό αντίσωμα 3H1 που αναγνωρίζει ειδικά την ανθρώπινη APOE.

3.4.3. Ανάλυση των επιπέδων χοληστερόλης στα διαγονιδιακά ποντίκια TTRI-huApoE4

Όπως προαναφέρθηκε στην εισαγωγή, τα γενετικά τροποποιημένα ποντίκια ApoE knock-out (ApoE^{-/-}) είναι υπερχοληστεριναιμικά. Για να εξακριβωθεί εάν η έκφραση της ανθρώπινης APOE4 στα διαγονιδιακά ποντίκια TTRI-huApoE⁴;ApoE^{-/-} οδηγεί σε μείωση της χοληστερόλης, αναλύθηκε ορός αίματος από ποντίκια με το εμπορικό kit Cholesterol/Cholesteryl Ester (Calbiochem). Συνολικά αναλύθηκαν πέντε ποντίκια από κάθε ομάδα. Σ' αυτά είχε αφαιρεθεί η τροφή για έξι ώρες ώστε να γίνει μια ακριβής εκτίμηση των επιπέδων χοληστερόλης. Όλα τα ποντίκια που αναλύθηκαν ήταν ενήλικα ζώα ηλικίας 2-3 μηνών.

Στατιστική ανάλυση της διακύμανσης κατά ένα παράγοντα (1-way ANOVA) ανάμεσα στις τρεις ομάδες ανάλυσης έδειξε στατιστική διαφορά $P < 0,0001$ μεταξύ τους. Ακολούθησε μετα-ανάλυση με τον έλεγχο Tukey το οποίο έδειξε στατιστική διαφορά $P < 0,001$ μεταξύ των ποντικών ApoE^{-/-} και TTRI-huApoE⁴;ApoE^{-/-} και καμία στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ποντικών φυσικού τύπου και TTRI-huApoE⁴;ApoE^{-/-} (**Εικόνα 3.23**). Όπως ήταν αναμενόμενο, υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ποντικών φυσικού τύπου και ApoE^{-/-} γεγονός που συμφωνεί με προηγούμενες μελέτες άλλων ερευνητικών ομάδων (Lim et al., 2009, Naura et al., 2009, Piedrahita et al., 1992).



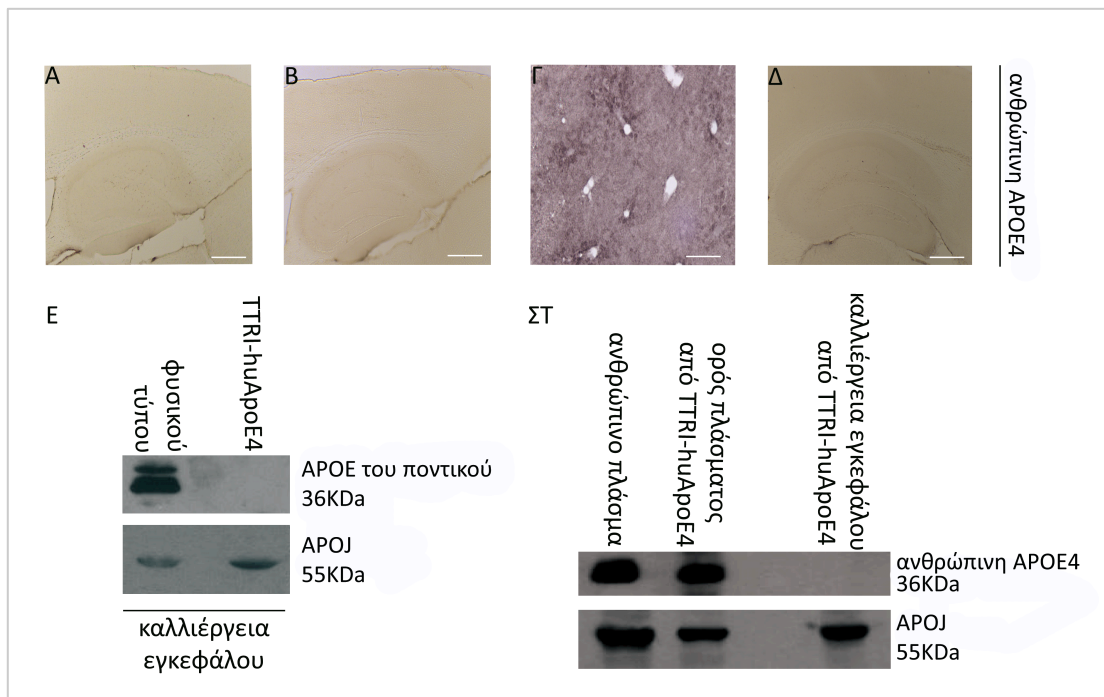
Εικόνα 3.23. Ανάλυση των επιπέδων χοληστερόλης στον ορό του αίματος των διαγονιδιακών ποντικών TTRI-huApoE4. Τα επίπεδα χοληστερόλης μετρήθηκαν σε ποντίκια φυσικού τύπου, ApoE^{-/-} και διαγονιδιακά ποντίκια TTRI-huApoE4;ApoE^{-/-}. Παρατηρείται στατιστικά σημαντική μείωση της χοληστερόλης στα ποντίκια τα οποία εκφράζουν την ανθρώπινη APOE4 στην περιφέρεια σε σχέση με τα ApoE^{-/-} στα οποία η ενδογενής ApoE είναι αδρανοποιημένη. Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν με ANOVA ($P < 0,001$) την οποία ακολούθησε έλεγχος Tukey (***) $P < 0,001$ και NS μη στατιστικά σημαντική διαφορά, non-statistical significant).

3.4.4. Ανάλυση της ιστοειδικής έκφρασης της ανθρώπινης ApoE4 στα διαγονιδιακά ποντίκια TTRI-huApoE4;ApoE^{-/-}

Η ιστοειδική έκφραση της APOE4 στο ήπαρ και όχι στον εγκέφαλο των κατασκευασμένων διαγονιδιακών ποντικών, επιβεβαιώθηκε με δύο μεθόδους ανάλυσης. Η πρώτη ήταν ανοσοϊστοχημεία για την ανθρώπινη APOE4 σε τομές από εγκεφάλους και ήπαρ ποντικών. Η δεύτερη ήταν οργανοτυπική καλλιέργεια εγκεφάλου σε ποντίκια φυσικού τύπου και διαγονιδιακά TTRI-huApoE4;ApoE^{-/-} (**Εικόνα 3.24**).

Θετική ανοσοαντίδραση στην ανοσοϊστοχημεία για την ανθρώπινη APOE4 διαπιστώθηκε μόνο σε τομές από ήπαρ ποντικών TTRI-huApoE4;ApoE^{-/-} (**Εικόνα 3.24Γ**) και όχι στους εγκεφάλους τους (**Εικόνα 3.24Δ**). Η ειδικότητα της ανοσοαντίδρασης εξακριβώθηκε με την απουσία χρωματισμού σε τομές από ποντίκι στο οποίο η APOE είναι αδρανοποιημένη (ApoE^{-/-}) γεγονός που αποδεικνύει ότι το δευτερογενές αντίσωμα δεν προσδένεται σε καμία άλλη πρωτεΐνη. Επιπρόσθετα, η απουσία ανοσοαντίδρασης σε τομές

από φυσικού τύπου ποντίκι αποδεικνύει ότι το αντίσωμα είναι ειδικό για την ανθρώπινη APOE4 (Εικόνα 3.24A-B).



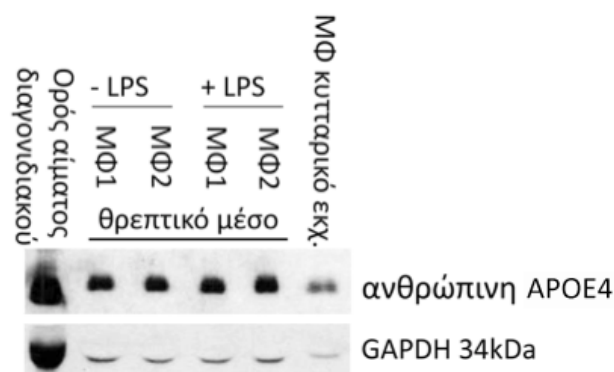
Εικόνα 3.24. Ανάλυση της ιστοειδικής έκφρασης της ανθρώπινης APOE4. A-Δ, Ανοσοϊστοχημεία για ανθρώπινη APOE4 με το αντίσωμα 3H1 (A, εγκέφαλος φυσικού τύπου ποντικού, B, εγκέφαλος από ποντίκι *ApoE^{-/-}*, Γ, ήπαρ από ποντίκι *TTRI-huApoE4;ApoE^{-/-}* και Δ, εγκέφαλος από ποντίκι *TTRI-huApoE4;ApoE^{-/-}*). Θετική ανοσοαντίδραση παρατηρείται μόνο στο ήπαρ (Γ) του διαγονιδιακού ποντικού *TTRI-huApoE4;ApoE^{-/-}*. Κλίμακα 500μm. E-ΣΤ, Ανοσοσύπωμα σε οργανοτυπική καλλιέργεια εγκεφάλων ποντικών (E, ανοσοσύπωμα για την APOE του ποντικού και ΣΤ, ανοσοσύπωμα για την ανθρώπινη (hu) APOE4). Η APOE του ποντικού εκκρίνεται στο θρεπτικό μέσο (ENY) ενώ δεν υπάρχει καθόλου APOE4 στην οργανοτυπική καλλιέργεια από το διαγονιδιακό ποντίκι *TTRI-huApoE4;ApoE^{-/-}* (ΣΤ). Και στα δύο ανοσοστυπώματα (E και ΣΤ) χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας το αντίσωμα H330 (Santa Cruz) το οποίο αναγνωρίζει και την ανθρώπινη και την APOJ του ποντικού, όπου και διαπιστώθηκε η έκκρισή της. Το αποτέλεσμα επιβεβαιώνει ότι οι εγκέφαλοι παρέμειναν ζωντανοί μέσα στην καλλιέργεια με το τεχνητό ENY. Η απουσία της APOE4 στον εγκέφαλο του διαγονιδιακού ποντικού επιβεβαιώθηκε και με τις δύο μεθόδους (ανοσοϊστοχημεία και οργανοτυπική καλλιέργεια).

Κατά τη δεύτερη πειραματική προσέγγιση, εγκέφαλοι από φυσικού τύπου και διαγονιδιακά ποντίκια *TTRI-huApoE4;ApoE^{-/-}* καλλιεργήθηκαν σε τεχνητό εγκεφαλονωτιαίο υγρό (ENY) για έξι ώρες με συνεχή παροχή οξυγόνου. Η APOE είναι εκκρινόμενη πρωτεΐνη και γι' αυτό εξετάστηκε η παρουσία της στο ENY με ανοσοσύπωμα. Η επιτυχία της μεθόδου επαληθεύθηκε με ανοσοσύπωση για την APOE του ποντικού σε οργανοτυπική

καλλιέργεια ποντικού φυσικού τύπου, όπου διαπιστώθηκε η έκκριση της APOE του ποντικού στο θρεπτικό μέσο (Εικόνα 3.24E). Αντίθετα, σε οργανοτυπική καλλιέργεια διαγονιδιακών ποντικών TTRI-huApoE4;ApoE-/- δε διαπιστώθηκε έκκριση της ανθρώπινης APOE4 στο τεχνητό ENY γεγονός που αποδεικνύει την απουσία έκφρασης στον εγκέφαλο (Εικόνα 3.24ΣΤ). Ως πρωτεΐνη-μάρτυρας για την επιτυχία της μεθόδου χρησιμοποιήθηκε η APOJ που επίσης είναι εκκρινόμενη πρωτεΐνη.

3.4.5. Ανάλυση της έκφρασης της ανθρώπινης APOE4 στα μακροφάγα των διαγονιδιακών ποντικών

Ως γνωστόν η APOE εκφράζεται φυσιολογικά στα μακροφάγα σε υψηλά επίπεδα (Basu et al., 1981). Για να εξετάσουμε εάν συμβαίνει το ίδιο και στα μακροφάγα από τα διαγονιδιακά ποντίκια που κατασκευάσαμε, εγχύθηκε ενδοπεριτοναϊκά Θειογλυκολικό οξύ (Thioglycollate) σε δύο ενήλικα αρσενικά ποντίκια TTRI-huApoE4;ApoE-/- ηλικίας δύο μηνών. Το Θειογλυκολικό οξύ συγκεντρώνει τα μακροφάγα στον τόπο της ένεσης (Leijh et al., 1984). Στη συνέχεια, τα μακροφάγα απομονώθηκαν και καλλιεργήθηκαν για 16 ώρες με λιποπολυσακχαρίτες από βακτήρια (lipopolysaccharides, LPS) που τα ενεργοποιούν ως προς προ-φλεγμονώδη M1 μακροφάγα (Martinez et al., 2008). Δείγμα από το θρεπτικό μέσο των μακροφάγων λήφθηκε πριν και μετά την προσθήκη LPS ώστε να διαπιστωθεί εάν η ενεργοποίηση από το LPS μεταβάλλει την έκφραση της ανθρώπινης APOE4.



Εικόνα 3.25. Τα μακροφάγα από τα διαγονιδιακά ποντίκια TTRI-huApoE4;ApoE-/- εκφράζουν ανθρώπινη APOE4 ανεξάρτητα από την ενεργοποίησή τους από LPS. Το θρεπτικό μέσο ήταν θετικό για APOE4 καθώς και το κυτταρικό εκχύλισμα από τα μακροφάγα των διαγονιδιακών ποντικών TTRI-huApoE4;ApoE-/-. Η εκτίμηση των επιπέδων της APOE4 έγινε σε θρεπτικό μέσο από τα μακροφάγα (-LPS, πριν από την προσθήκη και +LPS, μετά την προσθήκη του LPS) και σε κυτταρικό εκχύλισμα. Στην εικόνα αυτή παρουσιάζονται μακροφάγα από δύο ποντίκια, το κυτταρικό εκχύλισμα και ο ορός του αίματος του ενός εκ των δύο πειραματόζων.

Παρατηρήσαμε ότι η ενεργοποίηση από LPS δε μεταβάλλει την έκφραση της APOE. Τα μακροφάγα από τα διαγονιδιακά ποντίκια TTRI-huApoE4;ApoE-/- εκκρίνουν συνεχώς υψηλές ποσότητες ανθρώπινης APOE4. Ως θετικό δείγμα χρησιμοποιήθηκε ορός του αίματος από το ένα εκ των δύο διαγονιδιακών ποντικών που χρησιμοποιήθηκαν για το πείραμα (**Εικόνα 3.25**).

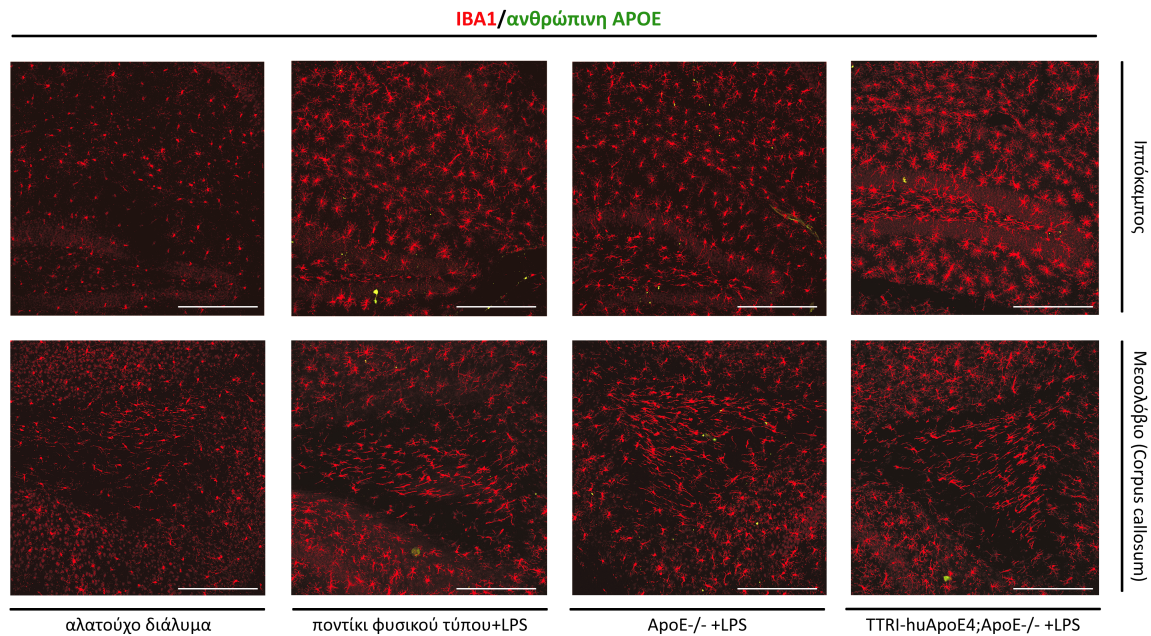
3.4.6. Ανάλυση της έκφρασης της ανθρώπινης APOE4 στη μικρογλοία των διαγονιδιακών ποντικών με περιφερική έκφραση της ανθρώπινης APOE4 μετά από συστηματική επαγωγή φλεγμονής με LPS

Τα μικρογλοιακά κύτταρα, όπως και τα μακροφάγα, προέρχονται από την μυελοειδή σειρά και μεταναστεύουν στο παρέγχυμα του εγκεφάλου πριν από την όγδοη εμβρυική μέρα του ποντικού (Ginhoux et al., 2010). Για να διευκρινιστεί εάν και τα μικρογλοιακά κύτταρα των διαγονιδιακών ποντικών TTRI-huApoE4 εκφράζουν APOE4 μετά από επαγωγή της φλεγμονής, έγινε ενδοπεριτοναϊκή έγχυση LPS σε ποντίκια φυσικού τύπου, ποντίκια ApoE-/- καθώς και σε διαγονιδιακά TTRI-huApoE4;ApoE-/- . Το LPS εκτός από συστηματική φλεγμονή προκαλεί και ενεργοποίηση της μικρογλοίας (Chung et al., 2009, Masocha, 2009, Thompson et al., 2008). Η δόση που επιλέχθηκε ήταν τέτοια ώστε να επαγάγει γρήγορα φλεγμονή, χωρίς να είναι θανατηφόρος.

Σε θηλυκά και αρσενικά ποντίκια ηλικίας δύο μηνών έγινε έγχυση με LPS δόσεως 10mg/Kg και τα ζώα θυσιάστηκαν έξι ώρες μετά την ένεση. Στη συνέχεια έγινε χρώση σε τομές 40μm για την ανθρώπινη APOE4 (αντίσωμα 3H1) και για IBA1 (πρωτεΐνη-δείκτης μικρογλοιακών κυττάρων/μακροφάγων).

Όπως δείχνεται και στα αποτελέσματα, η δοθείσα δόση του LPS είναι ικανή να επαγάγει φλεγμονή στα ποντίκια (σύγκριση ποντικού στο οποίο εγχύθηκε αλατούχο διάλυμα και δεν έχει καθόλου φλεγμονή, με ποντίκι φυσικού τύπου στο οποίο εγχύθηκε LPS, **Εικόνα 3.26**). Η φλεγμονή είναι πιο έντονη στα ποντίκια φυσικού τύπου και σε όσα εκφράζουν περιφερικά την ανθρώπινη APOE4 σε σχέση με τα ApoE-/- . Η μειωμένη φλεγμονώδης απόκριση από τα μικρογλοιακά κύτταρα των ποντικών ApoE-/- μετά από LPS, έχει δειχθεί και από άλλες ερευνητικές ομάδες (Ali et al., 2005, de Bont et al., 1999, Van Oosten et al., 2001). Παρόλο που υπάρχει φλεγμονή και τα μικρογλοιακά κύτταρα του διαγονιδιακού ποντικού TTRI-huApoE4;ApoE-/- είναι ενεργοποιημένα, δεν υπάρχει θετική ανοσοαντίδραση στην ανοσοϊστοχημεία για την ανθρώπινη APOE4 (**Εικόνα 3.26**). Από τα

αποτελέσματα προκύπτει ότι δεν υπάρχει έκφραση APOE4 στα μικρογλοιακά κύτταρα ή οπουδήποτε αλλού στον εγκέφαλο των διαγονιδιακών ποντικών TTRI-huApoE4;ApoE-/- (Εικόνα 3.26). Έτσι επιβεβαιώθηκε με μία ακόμη μέθοδο ότι η έκφραση της ανθρώπινης APOEσ είναι περιορισμένη μόνο στην περιφέρεια των διαγονιδιακών ποντικών που κατασκευάσαμε.



Εικόνα 3.26. Εξέταση της έκφρασης της APOE4 σε ενεργοποιημένα μικρογλοιακά κύτταρα του διαγονιδιακού ποντικού TTRI-huApoE4. Η εκτίμηση έγινε με ανοσοϊστοχημεία για μικρογλοία (IBA1) ρογλία ανθρώπινη APOE4 (αντίσωμα 3H1) σε ποντίκια στα οποία εγχύθηκε LPS (10mg/Kg) ενδοπεριτοναϊκά. Στα ποντίκια φυσικού τύπου και στα 5xAD;TTRI-huApoE4;ApoE-/- η μικρογλοίωση που προκαλείται από το LPS είναι πιο έντονη, ενώ τα ApoE-/- ποντίκια έχουν μειωμένη φλεγμονώδη αντίδραση σε σχέση με τους άλλους δύο γονότυπους. Η ανοσοϊστοχημεία για την ανθρώπινη APOE4 είναι αρνητική γεγονός που αποδεικνύει την απουσία έκφρασης της ανθρώπινης APOE4 στον εγκέφαλο των διαγονιδιακών ποντικών TTRI-huApoE4 καθώς και τη διακριτική ικανότητα του αντισώματος μεταξύ ποντικίσιας και ανθρώπινης APOE (ποντίκι φυσικού τύπου). Κλίμακα 250μm.

3.5. ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΑΚΩΝ ΠΟΝΤΙΚΩΝ ΠΟΥ ΑΝΑΠΤΥΣΣΟΥΝ ΤΗ ΝΟΣΟ ΤΟΥ ALZHEIMER ΚΑΙ ΕΚΦΡΑΖΟΥΝ ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΑ ΤΗΝ ΑΝΘΡΩΠΙΝΗ ΑΡΟΕ4.

Για να μελετηθεί η επίδραση της προερχόμενης από την περιφέρεια ΑΡΟΕ4, το διαγονιδιακό μοντέλο TTRI-huApoE4 διασταυρώθηκε αρχικά με τα ποντίκια ApoE-/- ώστε να αποκλειστεί η επίδραση της ενδογενούς ΑΡΟΕ και να μελετηθεί μόνο η προερχόμενη από την περιφέρεια ΑΡΟΕ4. Στη συνέχεια τα ποντίκια αυτά διασταυρώθηκαν με το διαγονιδιακό μοντέλο 5xFAD το οποίο αναπτύσσει παθολογία Alzheimer.

Οι ομάδες ανάλυσης που χρησιμοποιήθηκαν είναι: 5xFAD, 5xFAD;ApoE-/- και 5xFAD;TTRI-huApoE4;ApoE-/-. Η πρώτη ομάδα αποτελείται από ποντίκια με παθολογία τύπου Alzheimer τα οποία έχουν την ενδογενή ΑΡΟΕ. Τη δεύτερη ομάδα αποτελούν ποντίκια στα οποία έχει αδρανοποιηθεί η ενδογενής ΑΡΟΕ. Τέλος, την τρίτη ομάδα αποτελούν ποντίκια που εκφράζουν την ανθρώπινη ΑΡΟΕ4 μόνο στην περιφέρεια και δεν έχουν την ενδογενή ΑΡΟΕ. Ο γονότυπος των ποντικών ανιχνεύθηκε με αντίδραση αλυσιδωτής πολυμεράσης (ΑΑΠ) ως προς την ανθρώπινη APP και την ΑΡΟΕ του ποντικού και με ανάλυση κατά Southern για το διαγονίδιο της ανθρώπινη ΑΡΟΕ4, όπως αναφέρεται αναλυτικά στις μεθόδους.

3.5.1. Ανάλυση της εναπόθεσης αμυλοειδών πλακών στα διαγονιδιακά ποντίκια TTRI-huApoE4 τα οποία εκφράζουν την ΑΡΟΕ4 στην περιφέρεια

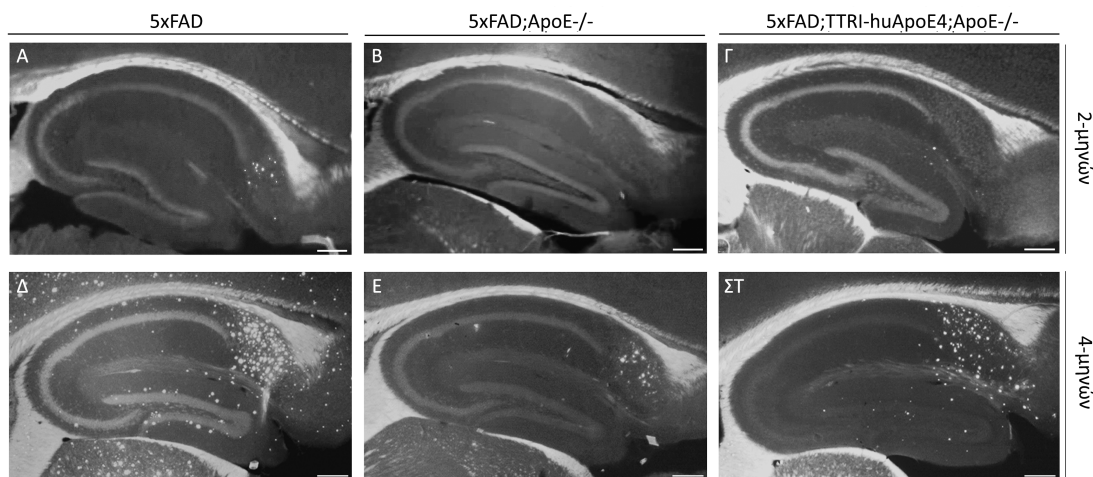
Οι τελικές ομάδες ανάλυσης αναλύθηκαν για το σχηματισμό αμυλοειδών πλακών με ανοσοϊστοχημεία για Θειοφλαβίνη-S (χρωστική η οποία προσδέεται σε β-ινίδια/αμυλοειδή) σε ηλικία δύο και τεσσάρων μηνών (**Εικόνα 3.27**). Από την ανάλυση προέκυψε ότι τα ποντίκια αυτά αναπτύσσουν πλάκες ανάλογα με την ηλικία και την παρουσία της ΑΡΟΕ.

Τα ποντίκια 5xFAD αρχίζουν να αναπτύσσουν πλάκες από την ηλικία των δύο μηνών στα βαθύτερα στρώματα του φλοιού και στο υπόθεμα του εγκεφάλου (**Εικόνα 3.27Α**). Στους τέσσερις μήνες έχουν πολύ έντονο σχηματισμό αμυλοειδών πλακών στο μεγαλύτερο μέρος του φλοιού και του υποθέματος του ιππόκαμπου (**Εικόνα 3.27Δ**). Επίσης, σχηματίζουν πλάκες στο θάλαμο, το στέλεχος του εγκεφάλου και τον οσφρητικό λοβό.

Τα ποντίκια 5xFAD;ApoE-/- δεν έχουν καθόλου πλάκες στους δύο μήνες (**Εικόνα 3.27Β**) και ελάχιστες στους τέσσερις μήνες (**Εικόνα 3.28Ε**). Σε μελέτες από άλλες ερευνητικές ομάδες

με διαφορετικά διαγονιδιακά μοντέλα με παθολογία τύπου Alzheimer και λιγότερο έντονο φαινότυπο, δε σημειώνεται καθόλου εναπόθεση αμυλοειδών πλακών στα γενετικά τροποποιημένα ποντίκια τα οποία έχουν αποσιωπημένο το γονίδιο της ApoE (Bales et al., 1999, Buttini et al., 1999, Buttini et al., 2002, Costa et al., 2004, Holtzman et al., 2000a, Holtzman et al., 1999, Holtzman et al., 2000b) ή εμφανίζονται ελάχιστες πλάκες σε ηλικίες μεγαλύτερες των είκοσι μηνών (Fagan et al., 2002).

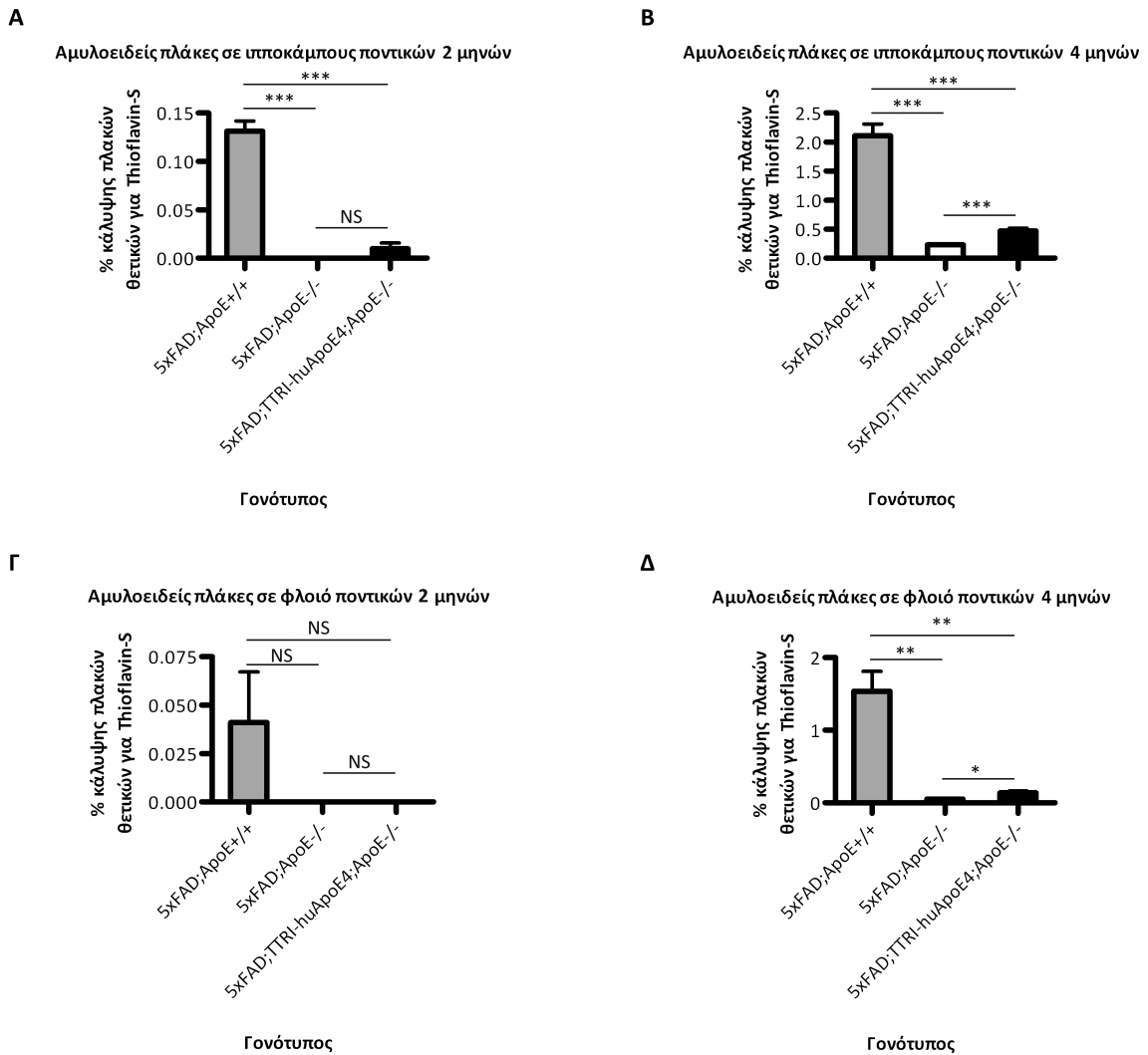
Αντίθετα, η παρουσία της APOE4 στην περιφέρεια οδηγεί στην αύξηση των πλακών στα διαγονιδιακά ποντίκια 5xFAD;TTRI-huApoE4;ApoE-/- σε σχέση με τα 5xFAD;ApoE-/- στην ηλικία των τεσσάρων μηνών (Εικόνα 3.27Γ και 3.28ΣΤ για τα ποντίκια δύο και τεσσάρων μηνών αντίστοιχα). Στα ηλικίας δύο μηνών υπάρχει πολύ μικρή εναπόθεση αμυλοειδών πλακών στο υπόθεμα του ιππόκαμπου και στα βαθύτερα στρώματα του φλοιού (Εικόνα 3.27Γ), αλλά στα ποντίκια ηλικίας τεσσάρων μηνών η παρουσία αμυλοειδών πλακών είναι πολύ έντονη και βρίσκεται κυρίως στο υπόθεμα του ιππόκαμπου (Εικόνα 3.27ΣΤ).



Εικόνα 3.27. Ανάλυση των αμυλοειδών πλακών στα ποντίκια με παθολογία Alzheimer και η επίδραση της από την περιφέρεια προερχόμενης ανθρώπινης APOE4. Η εκτίμηση των αμυλοειδών πλακών έγινε με χρώση για Θειοφλαβίνη-S σε τομές 40μm από εγκεφάλους θηλυκών ποντικών δύο (Α-Γ) και τεσσάρων μηνών (Δ-ΣΤ). Οι χρώση έγινε σε 5-6 τομές για 5-8 ζώα από κάθε ομάδα και παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικές εικόνες για κάθε γονότυπο. Στα ποντίκια δύο μηνών (εικόνες Α-Γ) υπάρχει έντονη εναπόθεση αμυλοειδών πλακών μόνο στα 5xFAD (Α), καθόλου εναπόθεση στα 5xFAD;ApoE-/- (Β) και ελάχιστη στα 5xFAD;TTRI-huApoE4;ApoE-/- (Γ). Στα ποντίκια τεσσάρων μηνών (εικόνες Δ-ΣΤ) υπάρχει έντονη αύξηση της εναπόθεσης αμυλοειδών πλακών σε όλους τους γονότυπους με πιο έντονη εναπόθεση στα 5xFAD (Δ). Υπάρχει διαφορά στην εναπόθεση αμυλοειδών πλακών στα 5xFAD;TTRI-huApoE4;ApoE-/- (ΣΤ) σε σχέση με τα 5xFAD; ApoE-/- (Ε) με πιο έντονη παρουσία αμυλοειδών πλακών στα ποντίκια που εκφράζουν περιφερικά την ανθρώπινη APOE4. Οι διαφορές που αναφέρθηκαν για τα ποντίκια τεσσάρων μηνών ισχύουν τόσο για το φλοιό όσο και για τον ιππόκαμπο. Κλίμακα 500μm.

Η διαφορά στις αμυλοειδείς πλάκες ανάμεσα στα 5xFAD;ApoE^{-/-} και τα 5xFAD;TTRI-huApoE4;ApoE^{-/-} (**Εικόνα 3.27**) επιβεβαιώθηκε με ποσοτικοποίηση της ποσοστιαίας (%) κάλυψης από αμυλοειδείς πλάκες. Η μέτρηση έγινε ξεχωριστά για τον ιππόκαμπο και το φλοιό των διαγονιδιακών ποντικών (**Εικόνα 3.28**). Μεταξύ των τριών ομάδων που αναλύθηκαν, τα ποντίκια με την ενδογενή APOE (5xFAD) έχουν τις περισσότερες πλάκες στο φλοιό και στον ιππόκαμπο (**Εικόνες 3.27 και 3.28**). Η αύξηση είναι στατιστικά σημαντική μόνο στον ιππόκαμπο στην ηλικία των δύο μηνών (**Εικόνα 3.28A**, $P < 0,0001$ και με τις δύο άλλες ομάδες ανάλυσης). Στην ηλικία των τεσσάρων μηνών τα ποντίκια αυτά έχουν επίσης αυξημένες πλάκες στον ιππόκαμπο σε σχέση με τις άλλες δύο ομάδες ανάλυσης (**Εικόνα 3.28B**, $P < 0,0001$ και με τις δύο άλλες ομάδες). Επίσης, διαπιστώθηκε ότι όντως τα 5xFAD;TTRI-huApoE4;ApoE^{-/-} έχουν στατιστικά σημαντική αύξηση στην κάλυψη από αμυλοειδείς πλάκες στον ιππόκαμπο σε σχέση με τα ποντίκια 5xFAD;ApoE^{-/-}.

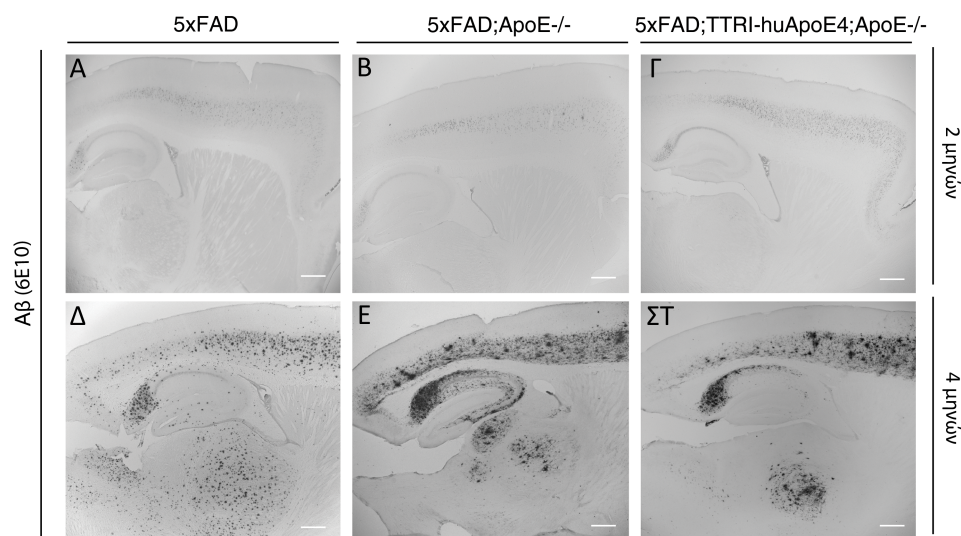
Στο φλοιό των 5xFAD, η αύξηση δεν είναι στατιστικά σημαντική στους δύο μήνες κι αυτό λόγω της μεγάλης ετερογένειας ανάμεσα στα ποντίκια που αναλύθηκαν (**Εικόνα 3.28Γ**, $P = 0,3022$). Στους τέσσερις μήνες (**Εικόνα 3.28Δ**), τα 5xFAD έχουν στατιστικά σημαντικά αυξημένο αριθμό πλακών στο φλοιό σε σχέση με τους άλλους δύο γονότυπους ($P = 0,0039$ με τα 5xFAD;ApoE^{-/-} και $P = 0,0030$ με τα 5xFAD;TTRI-huApoE4;ApoE^{-/-}). Η περιφερική έκφραση της APOE4 στα 5xFAD;TTRI-huApoE4;ApoE^{-/-} οδηγεί στην αύξηση των αμυλοειδών πλακών μόνο στην ηλικία των τεσσάρων μηνών ($P = 0,0127$ σε σχέση με τα 5xFAD;ApoE^{-/-}).



Εικόνα 3.28. Ποσοτικοποίηση των θετικών για *Θειοφλαβίνη-S* αμυλοειδών πλακών σε θηλυκά ποντίκια 2 και 4 μηνών. Αναλύθηκαν 5-8 ποντίκια από κάθε ομάδα. Α. Ποσοτικοποίηση στον υποκάμπος ποντικών 2 μηνών ($***P < 0,0001$, NS, στατιστικά μη σημαντικό). Β. Ποσοτικοποίηση στον υποκάμπος ποντικών 4 μηνών ($***P = 0,001$ μεταξύ 5xFAD;ApoE^{-/-} και 5xFAD;TTRI-huApoE4;ApoE^{-/-} και $***P < 0,0001$ ανάμεσα στις άλλες ομάδες ανάλυσης). Γ. Ποσοτικοποίηση στο φλοιό ποντικών 2 μηνών (NS, στατιστικά μη σημαντικό) και Δ. Ποσοτικοποίηση στο φλοιό ποντικών 4 μηνών ($*P = 0,0127$ μεταξύ των 5xFAD;ApoE^{-/-} και 5xFAD;TTRI-huApoE4;ApoE^{-/-}, $**P = 0,0039$ μεταξύ των 5xFAD και 5xFAD;ApoE^{-/-} και $**P = 0,0030$ μεταξύ των 5xFAD και των 5xFAD;TTRI-huApoE4;ApoE^{-/-}). Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν με έλεγχο Student.

3.5.2. Ανάλυση της εναπόθεσης του Αβ στα διαγονιδιακά ποντίκια TTRI-huApoE4 τα οποία εκφράζουν την APOE4 στην περιφέρεια

Τα επίπεδα του πεπτιδίου Αβ εξετάστηκαν με ανοσοϊστοχημικές τεχνικές σε ποντίκια ηλικίας δύο και τεσσάρων μηνών (Εικόνα 3.29) και σε τεσσάρων μηνών με ELISA (Εικόνα 3.30). Στην πρώτη περίπτωση το αντίσωμα αναγνωρίζει όλες τις μορφές του Αβ ενώ η ELISA έγινε μόνο για το Αβ₄₂, που είναι το πιο αμυλοειδογενές, και παράγεται σε πολύ μεγαλύτερη ποσότητα στο μοντέλο 5xFAD σε σχέση με το Αβ₄₀.



Εικόνα 3.29. Ποιοτική ανάλυση των επιπέδων του ολικού Αβ στους εγκεφάλους ποντικών με παθολογία Alzheimer. Η εκτίμηση έγινε με ανοσοϊστοχημεία για το Αβ (αντίσωμα 6E10, Covance) σε θηλυκά ποντίκια δύο και τεσσάρων μηνών. Για κάθε φαινότυπο αναλύθηκαν 5-6 τομές σε 5-8 ποντίκια από κάθε ομάδα. Στα ποντίκια δύο μηνών (εικόνες Α-Γ) φαίνεται μικρή εναπόθεση αμυλοειδούς κυρίως μέσα στους νευρώνες. Κλίμακα 250μm. Στα τεσσάρων μηνών (εικόνες Δ-ΣΤ) το πρότυπο εναπόθεσης είναι διαφορετικό για κάθε ομάδα ανάλυσης όπως επεξηγείται αναλυτικά στο κείμενο. Κλίμακα 250μm.

Η ανάλυση με ανοσοϊστοχημεία για το ολικό Αβ στα ποντίκια ηλικίας δύο μηνών έδειξε ότι σε αυτήν την ηλικία δεν υπάρχει διαφορά μεταξύ των ομάδων ανάλυσης στο πρότυπο εναπόθεσης του Αβ (Εικόνα 3.29Α-Γ). Το Αβ εντοπίζεται κυρίως στο φλοιό και στο υπόθεμα του ιππόκαμπου και ως επί το πλείστον βρίσκεται ενδονευρικά (intraneuronally).

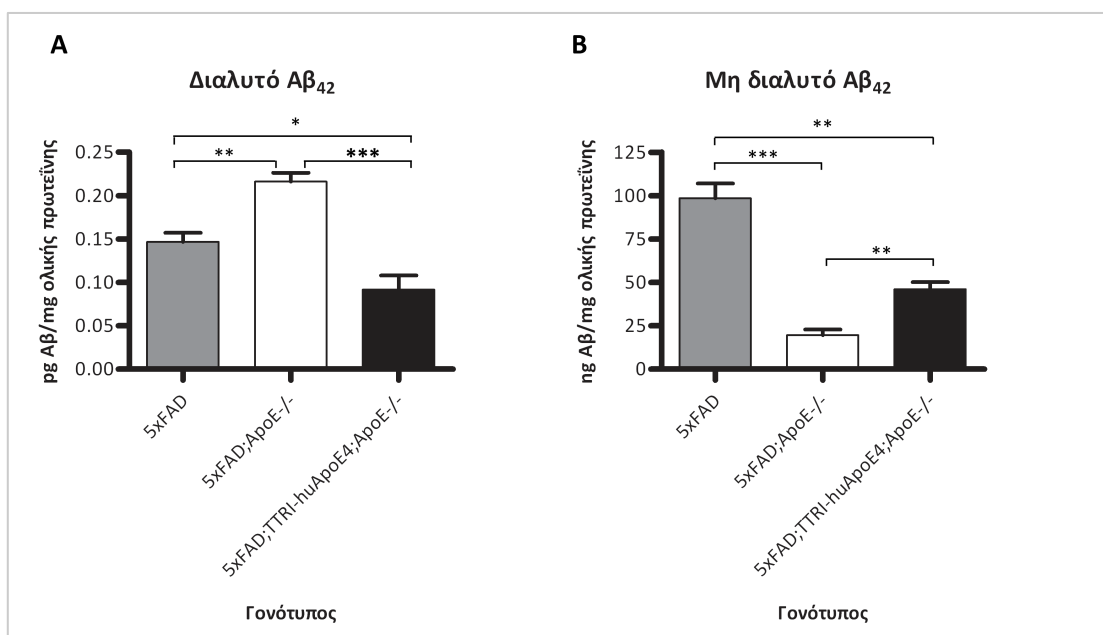
Στα ποντίκια τεσσάρων μηνών, το πρότυπο εναπόθεσης του Αβ είναι διαφορετικό ανάμεσα στις τρεις ομάδες ανάλυσης (Εικόνα 3.29Δ-ΣΤ). Τα 5xFAD;TTRI-huApoE4;ApoE-/- που εκφράζουν την ανθρώπινη APOE4 στην περιφέρεια έχουν πολύ διαφορετικό πρότυπο εναπόθεσης Αβ τόσο σε σχέση με τα 5xFAD που εκφράζουν παντού την ενδογενή APOE όσο

και με τα 5xFAD;ApoE-/- χωρίς καθόλου APOE (**Εικόνα 3.29Δ-ΣΤ**). Η διαφορά αυτή είναι εμφανής στο φλοιό και στο θάλαμο αλλά πιο έντονη στον ιππόκαμπο.

Στο φλοιό και το θάλαμο των ζώων που αναλύθηκαν, το πρότυπο ανοσοθετικότητας του Αβ στα 5xFAD;TTRI-huApoE4;ApoE-/- μοιάζει πάρα πολύ με το πρότυπο εναπόθεσης των 5xFAD;ApoE-/- και παρουσιάζεται πιο διάχυτο απ' όσο στα ποντίκια 5xFAD. Αντίθετα, στον *ιππόκαμπο* των ζώων το πρότυπο εναπόθεσης στον *ιππόκαμπο* των 5xFAD;TTRI-huApoE4;ApoE-/- είναι κυρίως διάχυτο όπως και στην 5xFAD;ApoE-/- αλλά χωροταξικά μοιάζει με το αντίστοιχο των 5xFAD. Τα 5xFAD;ApoE-/- (**Εικόνα 3.29Ε**) αναπτύσσουν έντονη εναπόθεση στο υπόθεμα του εγκεφάλου (subiculum), στην ακτινωτή στοιβάδα του εγκεφάλου (stratum radiatum), στη στοιβάδα πολύμορφων κυττάρων του ιππόκαμπου (oriens layer, περιοχές CA1-CA3) και ακόμη στο πολυμορφικό στρώμα της οδοντωτής έλικας (polymorph layer of the dentate gyrus). Δεν υπάρχει καθόλου εναπόθεση στη μοριακή στοιβάδα της οδοντωτής έλικας (molecular layer of the dentate gyrus).

Τα 5xFAD (**Εικόνα 3.29Δ**) και τα 5xFAD;TTRI-huApoE4;ApoE-/- (**Εικόνα 3.29ΣΤ**) παρουσιάζουν έντονη εναπόθεση στο υπόθεμα του εγκεφάλου (subiculum) αλλά ελάχιστη στην ακτινωτή στοιβάδα (stratum radiatum) και στη στοιβάδα πολύμορφων κυττάρων του ιππόκαμπου (oriens layer). Αμφότερα έχουν μικρή εναπόθεση στη μοριακή στοιβάδα της οδοντωτής έλικας (molecular layer of the dentate gyrus) καθώς και στη βοθριώδη στοιβάδα του ιππόκαμπου (lacunosum moleculare layer of the hippocampus) αλλά η εναπόθεση είναι πιο σπικτική και παρουσιάζεται αυξημένη στα 5xFAD.

Για την περαιτέρω ανάλυση και την ποσοτικοποίηση του Αβ έγινε ELISA για το Αβ σε δύο διαφορετικά κλάσματα τα οποία απομονώθηκαν από εγκεφάλους ποντικών με διαφορετικά διαλύματα απομόνωσης πρωτεϊνών. Το πρώτο είναι το διαλυτό κλάσμα το οποίο περιέχει το Αβ που δε βρίσκεται συσσωματωμένο στις πλάκες και απομονώθηκε με διάλυμα λύσης (0,1M PBS, 10% (v/v) γλυκερόλη και 1% (v/v) Triton X-100). Το δεύτερο κλάσμα περιέχει το συσσωματωμένο αμυλοειδές που απομονώθηκε με γουανιδίνη (Guanidine-HCl, Gu-HCl) και αντιπροσωπεύει το ευρισκόμενο στις αμυλοειδείς πλάκες Αβ. Τα δύο κλάσματα εξετάστηκαν ξεχωριστά (Hirsch-Reinshagen et al., 2005) γιατί έχουν διαφορετική βιολογική σημασία.



Εικόνα 3.30. Ποσοτικοποίηση των επιπέδων του Αβ₄₂. Πέντε θηλυκά ποντίκια 4 μηνών αναλύθηκαν από κάθε γονότυπο με ELISA για το ανθρώπινο Αβ₄₂ (Covance). Α. Διαλυτό (μη συσσωματωμένο αμυλοειδές) Αβ₄₂. Τα 5xFAD;ApoE^{-/-} έχουν το περισσότερο διαλυτό Αβ (μη ευρισκόμενο σε πλάκες). Το αποτέλεσμα εκφράζεται σε pg αμυλοειδούς ανά mg ολικής πρωτεΐνης. 50-100μg ολικής πρωτεΐνης αναλύθηκαν για κάθε δείγμα. Η ανάλυση έγινε με έλεγχο Student. * P=0,0291, ** P=0,0033 και *** P=0,0007. Β. Μη διαλυτό (συσσωματωμένο στις πλάκες) Αβ₄₂. Τα 5xFAD;TTRI-huApoE4;ApoE^{-/-} που εκφράζουν APOE4 στην περιφέρεια έχουν αύξηση του Αβ σε σχέση με αυτά χωρίς την ενδογενή APOE (5xFAD;ApoE^{-/-}). Το αποτέλεσμα εκφράζεται σε ng αμυλοειδούς ανά mg ολικής πρωτεΐνης. 0,2-0,5 μg ολικής πρωτεΐνης αναλύθηκαν για κάθε δείγμα. ** P=0,0015 για 5xFAD και 5xFAD;TTRI-huApoE4;ApoE^{-/-}, **P=0,0025 για 5xFAD;ApoE^{-/-} και 5xFAD;TTRI-huApoE4;ApoE^{-/-} και *** P=0,0001 μεταξύ των 5xFAD και 5xFAD;ApoE^{-/-}. Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν με έλεγχο Student.

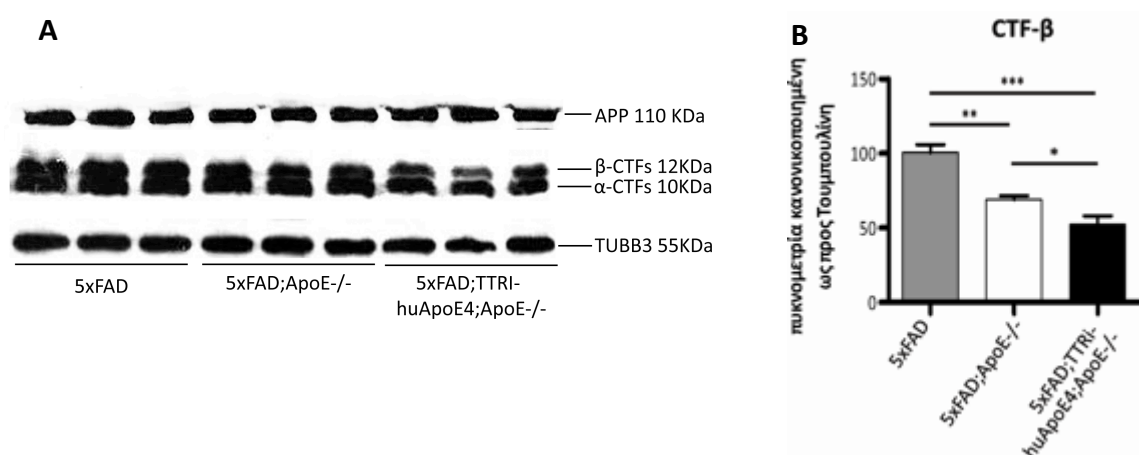
Στο διαλυτό κλάσμα του Αβ₄₂ (Εικόνα 3.30Α) τα 5xFAD;ApoE^{-/-} έχουν το περισσότερο αμυλοειδές ανάμεσα στους τρεις γονότυπους. Υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά με τους δύο άλλους γονότυπους (P=0,0033 με τα 5xFAD και P=0,0007 με τα 5xFAD;TTRI-huApoE4;ApoE^{-/-}). Η διαφορά είναι στατιστικά σημαντική και μεταξύ των 5xFAD και των 5xFAD;TTRI-huApoE4;ApoE^{-/-} (P=0,0291).

Στο μη διαλυτό κλάσμα (Εικόνα 3.30Β) τα 5xFAD έχουν το περισσότερο Αβ₄₂ από όλες τις ομάδες ανάλυσης, όπως ήταν αναμενόμενο, λόγω της παρουσίας της APOE (P=0,0015 με τα 5xFAD;TTRI-huApoE4;ApoE^{-/-} και P=0,0001 με τα 5xFAD;ApoE^{-/-}). Το πιο σημαντικό εύρημα, όμως, είναι ότι τα 5xFAD;TTRI-huApoE4;ApoE^{-/-} έχουν στατιστικά σημαντική αύξηση των επιπέδων Αβ₄₂ σε σχέση με τα 5xFAD;ApoE^{-/-} (P=0,0025). Το Αβ που βρίσκεται συσσωματωμένο στις αμυλοειδείς πλάκες είναι αυξημένο στα ποντίκια με

περιφερική έκφραση της APOE4 σε σχέση με αυτά που δεν έχουν την ενδογενή APOE του ποντικού.

3.5.3. Διερεύνηση της επίδρασης της ανθρώπινης APOE4 στα επίπεδα της APP και των καρβοξυτελικών της θραυσμάτων

Για να εξακριβωθεί εάν η διαφορά που παρατηρείται στα επίπεδα του αμυλοειδούς πεπτιδίου οφείλεται σε μειωμένη μετάφραση της APP ή σε αλλαγή της πρωτεόλυσής της, έγινε ανάλυση των επιπέδων της πρόδρομης πρωτεΐνης και των καρβοξυτελικών της θραυσμάτων (α - και β -CTF) με ανοσοσύτωση.



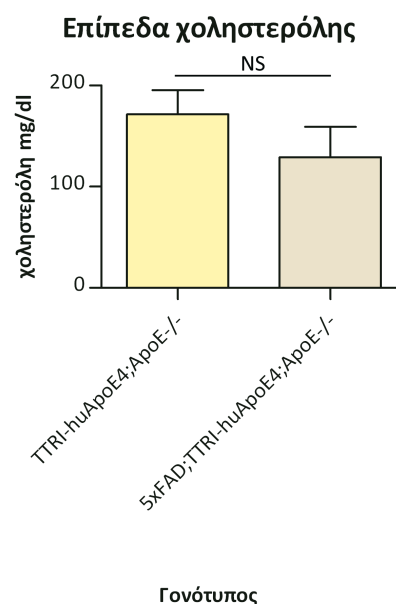
Εικόνα 3.31. Ανάλυση των επιπέδων της ολικής APP και των CTF σε εγκεφάλους. Α. Η εκτίμηση των πρωτεϊνικών επιπέδων έγινε μέσω ανοσοσύτωσης με το αντίσωμα R1(57) το οποίο αναγνωρίζει το καρβοξυτελικό άκρο της APP. Χρησιμοποιήθηκαν ομογενοποιημένα από τουλάχιστον 3 θηλυκά ποντίκια για κάθε ομάδα ανάλυσης και το πείραμα επαναλήφθηκε 3 φορές. Σε κάθε διαδρομή φορτώθηκαν 10μg ολικής πρωτεΐνης από το διαλυτό σε διάλυμα λύσης κλάσμα (Lysis buffer, βλ. 2.10.5). Β. Πυκνομετρία των ανοσοσύτωσης για β -CTF κανονικοποιημένα ως προς την TUBB3. Η στατιστική ανάλυση έγινε με one-way Anova ($P= 0,0011$) και ακολούθησε μετα-ανάλυση με το τεστ Tukey ($*P<0,05$, $**P<0,01$, $***P<0,001$).

Δεν παρατηρήθηκε καμία αλλαγή στα επίπεδα της ολικής APP ή του α -CTF που προκύπτει από τη μη αμυλοειδογενή πρωτεόλυση της APP από την α -εκκρίταση. Αντίθετα, παρατηρήθηκε μείωση των β -CTF στα 5xFAD;ApoE^{-/-} και περαιτέρω μείωση στα 5xFAD;TTRI-huApoE4;ApoE^{-/-} σε σχέση με τα 5xFAD (Εικόνα 3.31Α). Τα β -CTF προκύπτουν από την πρωτεόλυση της APP από τη β -εκκρίταση κατά το αμυλοειδογενές μονοπάτι. Η ποσοτικοποίηση των β -CTF (Εικόνα 3.31Β) έδειξε στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στις τρεις ομάδες ζώων. Η απουσία της APOE οδηγεί σε μείωση των επιπέδων των β -CTF και σε περαιτέρω μείωση στα ποντίκια που εκφράζουν στην περιφέρεια την

ανθρώπινη APOE4 (P<0,01 μεταξύ των 5xFAD και των 5xFAD;ApoE-/-, P<0,001 μεταξύ των 5xFAD και 5xFAD;TTRI-huApoE4;ApoE-/-). Επίσης τα 5xFAD;TTRI-huApoE4;ApoE-/- έχουν στατιστικά σημαντική μείωση σε σχέση με τα 5xFAD;ApoE-/- (P<0,05).

3.5.4. Ανάλυση της επίδρασης της υπερέκφρασης της ανθρώπινης APP στα επίπεδα της χοληστερόλης

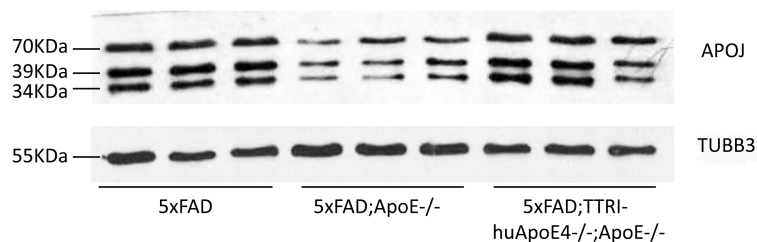
Προηγούμενες μελέτες έχουν αναφέρει ότι η APP επιδρά στα επίπεδα της χοληστερόλης μέσω του υποδοχέα LRP-1 (Liu et al., 2007). Για να διερευνηθεί εάν αυτό ισχύει και για το δικό μας μοντέλο, αναλύθηκαν τα επίπεδα χοληστερόλης σε ποντίκια TTRI-huApoE4;ApoE-/- και σε 5xFAD;TTRI-huApoE4;ApoE-/-. Συνολικά αναλύθηκε ορός του αίματος από πέντε ενήλικα ποντίκια (2-3 μηνών) για κάθε ομάδα, στα οποία είχε αφαιρεθεί η τροφή για έξι ώρες. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έδειξε ότι δεν υπήρχε καμία διαφορά στα επίπεδα της χοληστερόλης μεταξύ των δύο ομάδων (P=0,31, **Εικόνα 3.32**).



Εικόνα 3.32. Ποσοτικοποίηση των επιπέδων ολικής χοληστερόλης σε ποντίκια με παθολογία Alzheimer και περιφερική έκφραση της ανθρώπινης APOE4. Τα επίπεδα καταμετρήθηκαν στα TTRI-huApoE4;ApoE-/- (171,5 ± 23,85 mg χοληστερόλης/dl, n=5) και στα 5xFAD; TTRI-huApoE4;ApoE-/- (129,1 ± 30,03 mg χοληστερόλης/dl, n=5). Δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων (NS= μη στατιστικά σημαντικό, P=0,3010). Η στατιστική ανάλυση έγινε με το Student t-test.

3.5.5. Ανάλυση της επίδρασης της περιφερικής έκφρασης της APOE4 στα πρωτεϊνικά επίπεδα της APOJ στα 5xFAD;TTRI-huApoE4;ApoE-/- ποντίκια

Η APOJ είναι άλλη μια απολιποπρωτεΐνη η οποία σύμφωνα με δύο πρόσφατες επιδημιολογικές μελέτες αποτελεί παράγοντα κινδύνου για την εμφάνιση της νόσου του Alzheimer σε άτομα μεγάλης ηλικίας (Harold et al., 2009, Lambert et al., 2009). Η APOJ είναι εκκρινόμενη πρωτεΐνη και γι' αυτό εξετάστηκε η παρουσία της στο κλάσμα από εγκεφαλο το οποίο αντιπροσωπεύει τις εξωκυττάριες διαλυτές πρωτεΐνες (διαλυτό σε PBS κλάσμα). Στους εγκεφάλους των 5xFAD;ApoE-/- ποντικών, χωρίς την ενδογενή APOE, παρατηρήθηκε μείωση των επιπέδων της APOJ σε σχέση με τα 5xFAD. Όμως, τα επίπεδα της APOJ επανήλθαν στα φυσιολογικά επίπεδα στους εγκεφάλους των 5xFAD;TTRI-huApoE4;ApoE-/- διαγονιδιακών ποντικών που εκφράζουν την ανθρώπινη APOE4 στην περιφέρεια (Εικόνα 3.33).



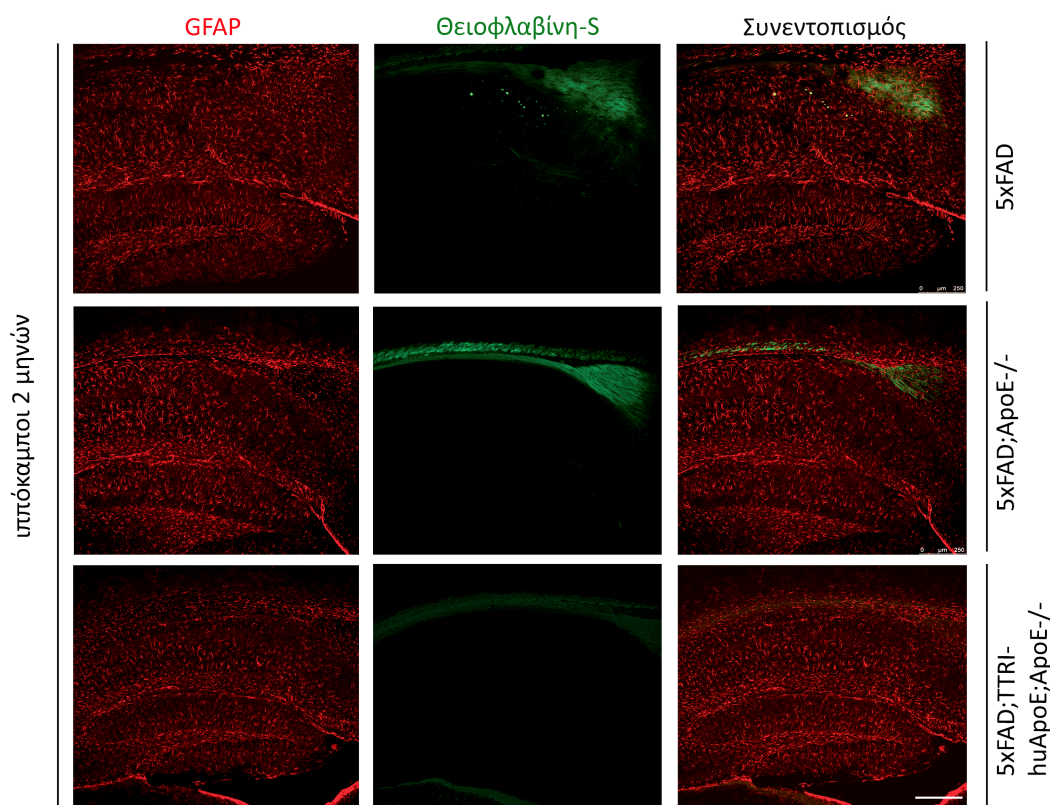
Εικόνα 3.33. Ανάλυση των επιπέδων της APOJ. Παρατηρήθηκε μείωση στα επίπεδα της APOJ στα ποντίκια 5xFAD;ApoE-/- χωρίς την ενδογενή APOE. Περιφερική έκφραση της ανθρώπινης APOE4 στα 5xFAD;TTRI-huApoE4;ApoE-/- επανέφερε τα επίπεδα της APOJ στα φυσιολογικά επίπεδα. Η ανάλυση έγινε με ανοσοστύπωμα για την APOJ (αντίσωμα H330) στο διαλυτό σε PBS κλάσμα των εγκεφάλων των ποντικών (πρωτεΐνες του εξωκυττάριου χώρου και του μεσοκυττάριου υγρού). Χρησιμοποιήθηκαν ομογενοποιημένα από τουλάχιστον τρία θηλυκά ποντίκια για κάθε ομάδα ανάλυσης και το πείραμα επαναλήφθηκε τρεις φορές. Σε κάθε διαδρομή φορτώθηκαν 10μg ολικής πρωτεΐνης. Ως μάρτυρας ισόποσης φόρτωσης των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε η TUBB3.

3.6. ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΦΛΕΓΜΟΝΩΔΟΥΣ ΑΠΟΚΡΙΣΗΣ ΣΤΑ ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΑΚΑ ΠΟΝΤΙΚΙΑ ΜΕ ΠΑΘΟΛΟΓΙΑ ΤΥΠΟΥ ALZHEIMER ΣΕ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΜΕ ΤΗΝ ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΗ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΗΣ ΑΝΘΡΩΠΙΝΗΣ APOE4

Όπως έχει δειχθεί και από προηγούμενα αποτελέσματα (βλ. Ενότητα 3.2), η απουσία της APOE επηρεάζει τη φλεγμονώδη απόκριση του διαγονιδιακού μοντέλου ποντικού 5xFAD στη περιοχή του φλοιού. Για να διερευνηθεί ο ρόλος της προερχόμενης από την περιφέρεια APOE4, εξετάστηκε η μικρογλοΐωση και η αστροκυττάρωση στο ποντίκι 5xFAD;TTRI-huApoE4;APOE-/- σε σχέση με τις δύο άλλες ομάδες ανάλυσης.

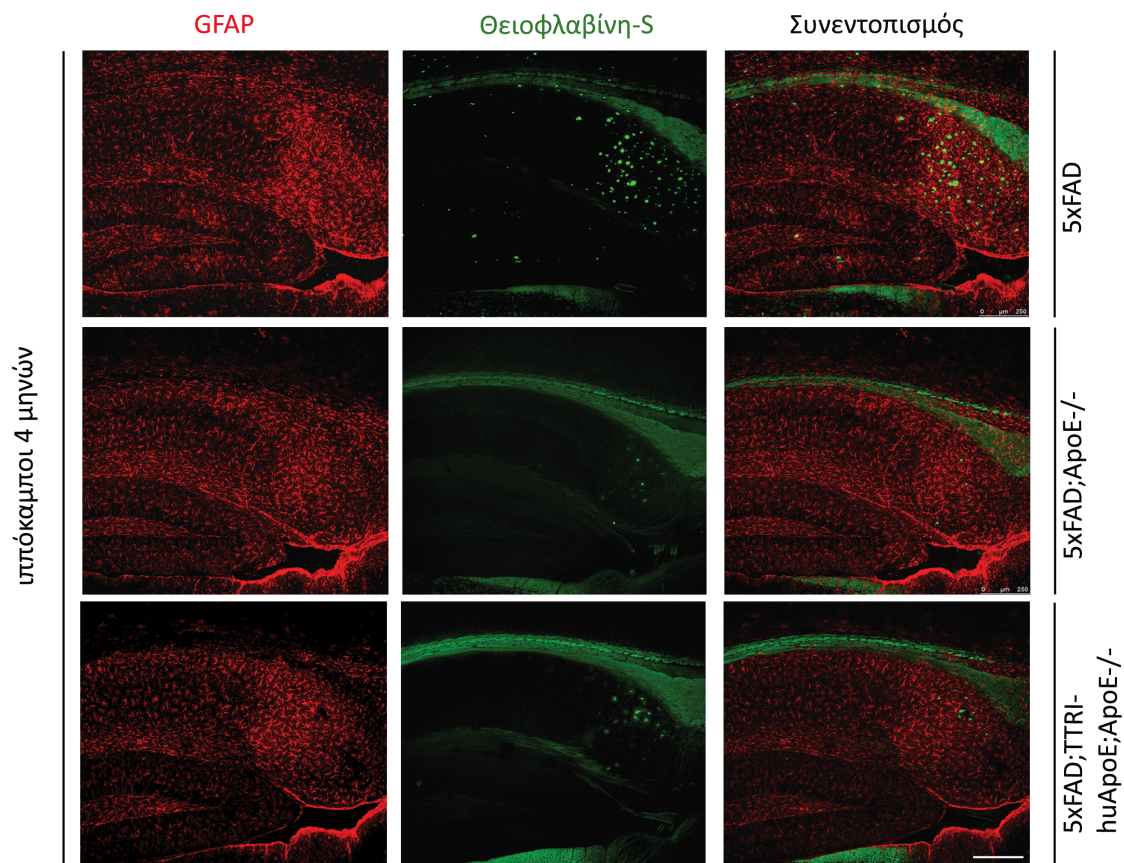
3.6.1. Μελέτη της αστροκυττάρωσης στα διαγονιδιακά ποντίκια με παθολογία τύπου Alzheimer σε συσχέτισμό με την έκφραση της ενδογενούς APOE ή/και της ανθρώπινης APOE4

Για τη μελέτη της αστροκυττάρωσης αναλύθηκαν θηλυκά ποντίκια δύο μηνών (έναρξη σχηματισμού αμυλοειδών πλακών) και ποντίκια τεσσάρων μηνών με πλήρη ανάπτυξη του φαινοτύπου και έντονο σχηματισμό αμυλοειδών πλακών. Στο μοντέλο 5xFAD δεν παρατηρείται σχεδόν καθόλου αστροκυττάρωση πριν την έναρξη του σχηματισμού των αμυλοειδών πλακών (Εικόνα 3.34, ποντίκια δύο μηνών). Τα ποντίκια με την ενδογενή APOE (5xFAD), που έχουν σχηματίζουν αμυλοειδείς πλάκες στην ηλικία αυτή, εμφανίζουν ελάχιστη ή και καθόλου αστροκυττάρωση και μόνο γύρω από κάποιες πλάκες. Τα ποντίκια χωρίς την ενδογενή APOE (5xFAD;ApoE^{-/-} και 5xFAD;TTRI-huApoE4;ApoE^{-/-}) έχουν ελάχιστες πλάκες στην ηλικία των δύο μηνών και καθόλου αστροκυττάρωση.



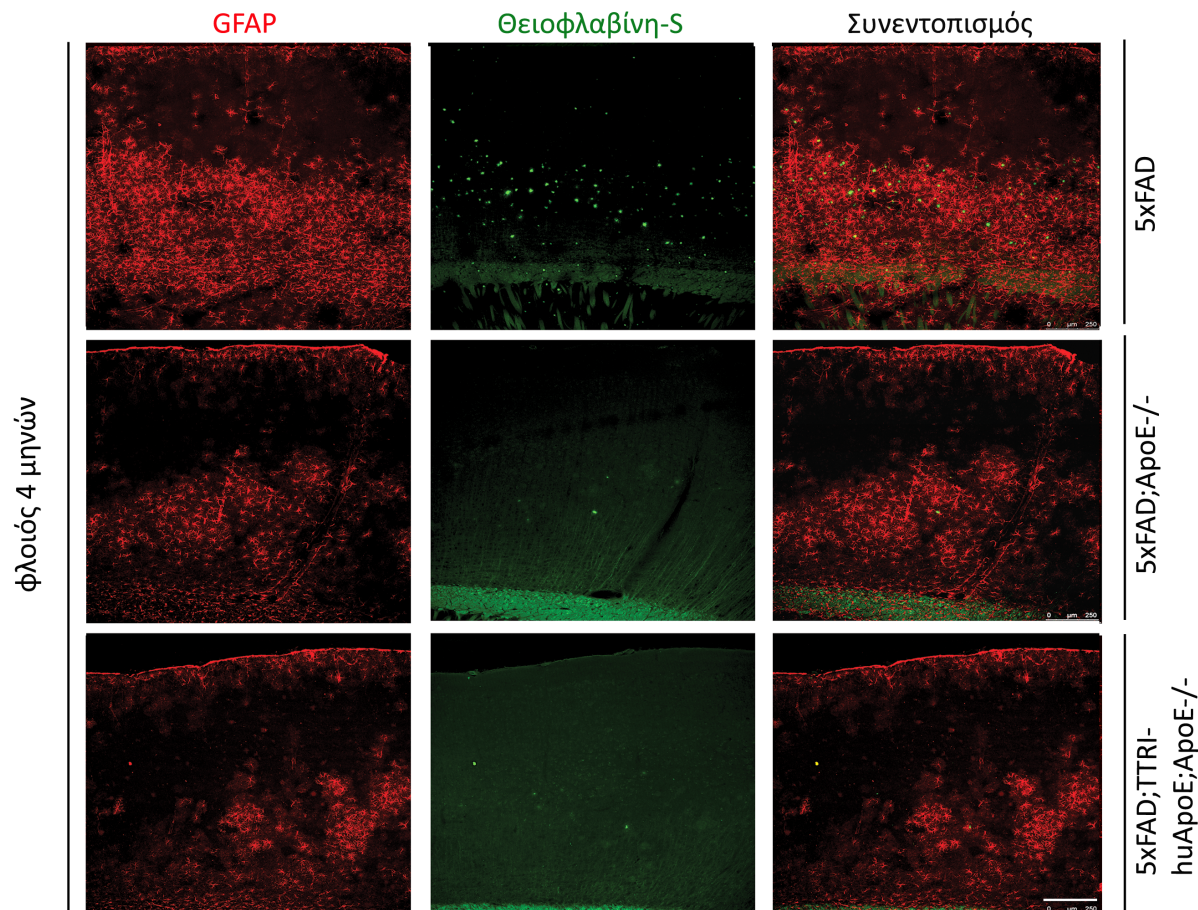
Εικόνα 3.34. Ανάλυση της αστροκυττάρωσης σε ποντίκια ηλικίας δύο μηνών. Σε αυτήν την ηλικία δεν υπάρχει αστροκυττάρωση στα ποντίκια 5xFAD;ApoE^{-/-} και 5xFAD;TTRI-huApoE4;ApoE^{-/-}. Στα ποντίκια 5xFAD, τα οποία έχουν την ενδογενή APOE, υπάρχει ελάχιστη αστροκυττάρωση που εντοπίζεται μόνο σε ορισμένα ζώα γύρω από κάποιες πλάκες στο υπόθεμα του εγκεφάλου. Η ανοσοϊστοχημεία για GFAP (αστροκύτταρα) και Θειοφλαβίνη-S (αμυλοειδείς πλάκες) έγινε σε 4-5 τομές 40μm από πέντε θηλυκά ποντίκια για κάθε γονότυπο. Κλίμακα 250μm.

Στη συνέχεια εξετάστηκαν τομές από εγκεφάλους θηλυκών ποντικών τεσσάρων μηνών. Παρατηρήθηκε ότι στους ιππόκαμπους όλων των ποντικών, ανεξαρτήτως γονοτύπου, υπάρχει πολύ έντονη αστροκυττάρωση κυρίως γύρω από τις πλάκες (**Εικόνα 3.35**). Δεν περιορίζεται, όμως, μόνο εκεί ούτε είναι ανάλογη με τον αριθμό των αμυλοειδών πλακών, καθώς στα ποντίκια 5xFAD;ApoE^{-/-} που έχουν πολύ λιγότερες πλάκες στον ιππόκαμπο σε σχέση με τα 5xFAD, η αστροκυττάρωση είναι εξίσου έντονη. Γενικά, η αστροκυττάρωση στον ιππόκαμπο των ποντικών τεσσάρων μηνών είναι εντοπισμένη κυρίως στο υπόθεμα του εγκεφάλου (subiculum) το οποίο έχει την πιο έντονη ανοσοαντίδραση στην ανοσοϊστοχημεία για το Αβ. Η αστροκυττάρωση στους ιππόκαμπους των διαγονιδιακών ποντικών είναι περίπου ίδια ανεξάρτητα από τον αριθμό των αμυλοειδών πλακών και το γονότυπο (**Εικόνα 3.35**).



Εικόνα 3.35. Ανάλυση της αστροκυττάρωσης στον ιππόκαμπο σε ποντίκια ηλικίας τεσσάρων μηνών. Παρατηρείται έντονη αστροκυττάρωση (GFAP) κυρίως στο υπόθεμα του ιππόκαμπου όπου και υπάρχει η περισσότερη εναπόθεση αμυλοειδών πλακών (Θειοφλαβίνη-S). Σε όλα τα ποντίκια η αστροκυττάρωση είναι περίπου ίδια ανεξαρτήτως γονοτύπου και αριθμού των αμυλοειδών πλακών. Η εξέταση έγινε με ανοσοϊστοχημεία σε 4-5 τομές 40 μm από πέντε θηλυκά ποντίκια για κάθε γονότυπο. Στην εικόνα δείχνονται αντιπροσωπευτικοί ιππόκαμποι και από τους τρεις γονότυπους. Κλίμακα 250μm.

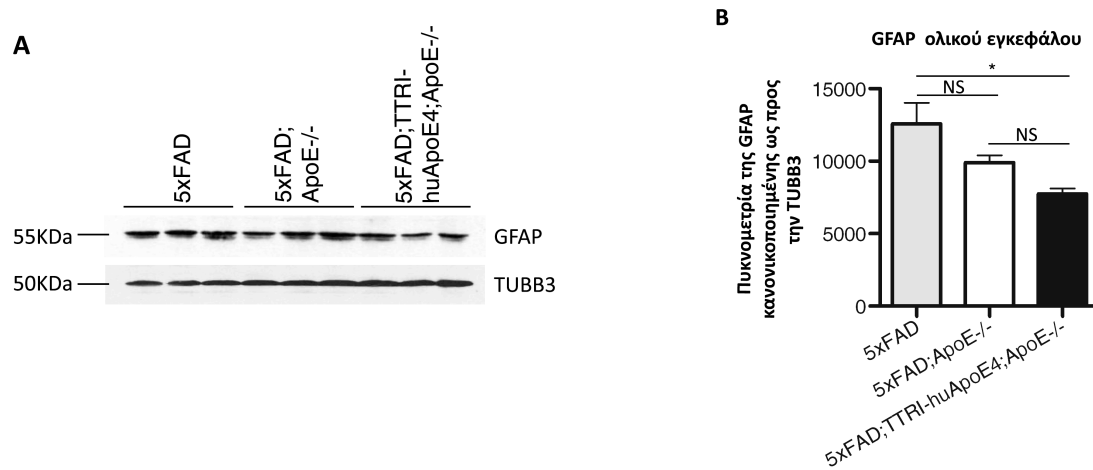
Αντίθετα, στο φλοιό των διαγονιδιακών ποντικών η αστροκυττάρωση είναι εντονότερη στα 5xFAD που έχουν τις περισσότερες αμυλοειδείς πλάκες στο φλοιό σε αντίθεση με αυτά που τους λείπει η APOE και έχουν πολύ λιγότερες πλάκες (Εικόνα 3.36, 5xFAD; ApoE^{-/-} και 5xFAD;TTRI-huApoE4;ApoE^{-/-}).



Εικόνα 3.36. Ανάλυση της αστροκυττάρωσης στο φλοιό ποντικών ηλικίας τεσσάρων μηνών. Παρατηρείται έντονη αστροκυττάρωση κυρίως στο 5xFAD ποντίκι το οποίο έχει τη μεγαλύτερη εναπόθεση αμυλοειδών πλακών. Αντίθετα στα ποντίκια απ'όπου απουσιάζει η ενδογενής APOE, ανεξάρτητα από το αν εκφράζεται η όχι περιφερικά η ανθρώπινη APOE4, η αστροκυττάρωση είναι μειωμένη σε σχέση με το 5xFAD. Η ανοσοϊστοχημεία για GFAP (αστροκύτταρα) και Θειοφλαβίνη-S (αμυλοειδείς πλάκες) έγινε σε 4-5 τομές 40μm από πέντε θηλυκά ποντίκια για κάθε γονότυπο. Στην εικόνα δείχνονται αντιπροσωπευτικοί υπόκαμποι και από τους τρεις γονότυπους. Κλίμακα 250μm.

Η ποσοτικοποίηση της αστροκυττάρωσης έγινε μέσω ανοσοστυπώματος για την πρωτεΐνη GFAP (Εικόνα 3.37A) και βρέθηκε ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μόνο μεταξύ των 5xFAD και των 5xFAD;TTRI-huApoE4;ApoE^{-/-}. Αυτή πιθανότατα οφείλεται στη μείωση της αστροκυττάρωσης του φλοιού που όπως φαίνεται και στην ανοσοϊστοχημεία για GFAP (Εικόνα 3.36) είναι πολύ μειωμένη σε σχέση με αυτήν των

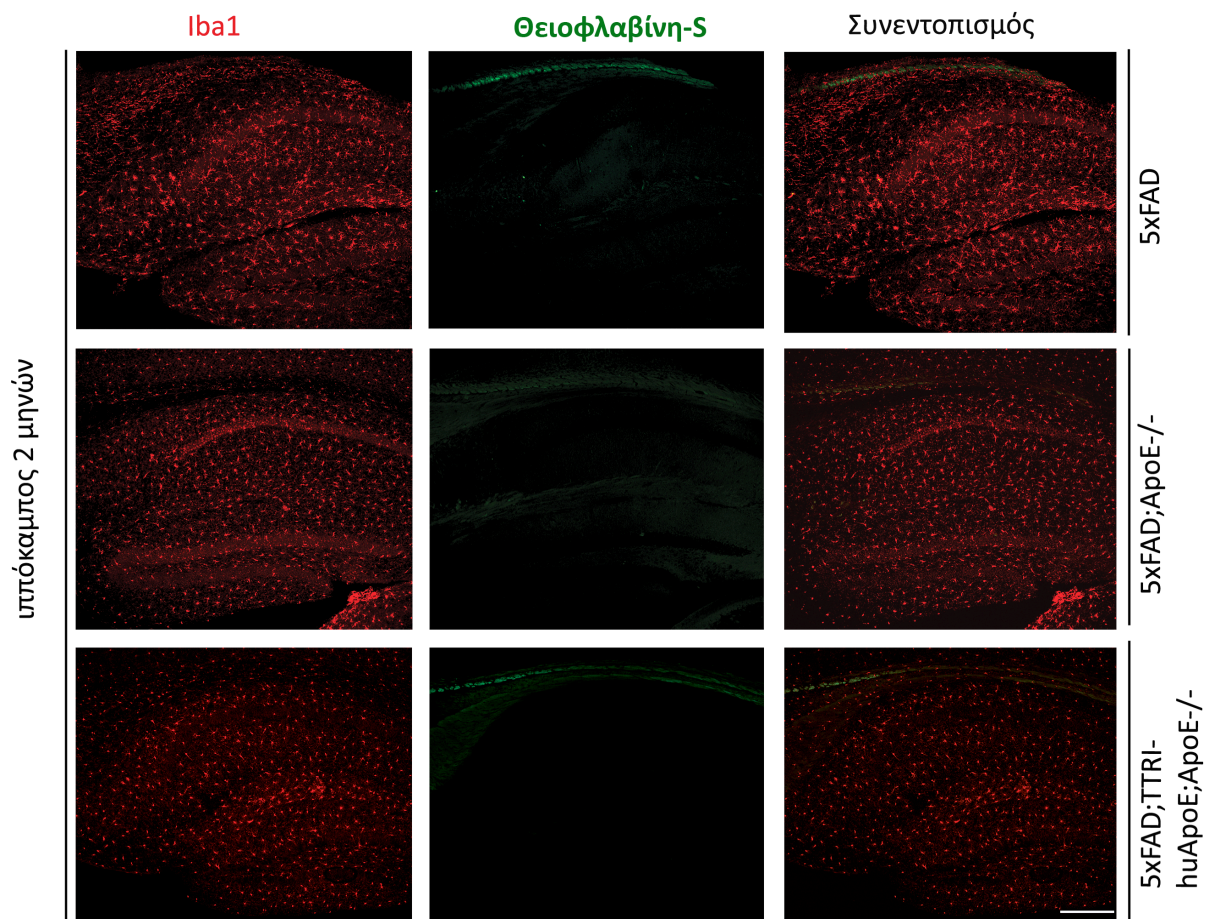
5xFAD ποντικών. Δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των 5xFAD και των 5xFAD;ApoE^{-/-} ή μεταξύ των 5xFADApoE^{-/-} και των 5xFAD;TTRI-huApoE4;ApoE^{-/-} (Εικόνα 3.37B).



Εικόνα 3.37. Επίδραση της από την περιφέρεια έκφρασης της APOE4 στα επίπεδα της GFAP. Α. Ανοσοστύπωμα για τη GFAP του ποντικού. 70μg ολικής πρωτεΐνης φορτώθηκαν σε κάθε διαδρομή και εξετάστηκαν τουλάχιστον τρία ζώα από κάθε γονότυπο. Το πείραμα επαναλήφθηκε τρεις φορές και ως μάρτυρας ισόποσης φόρτωσης των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε η TUBB3. Β. Πυκνομετρία των ζωνών του ανοσοστυπώματος για GFAP κανονικοποιημένων ως προς την TUBB3. Η ανάλυση έγινε με ANOVA και ακολούθησε μετα-ανάλυση με τον έλεγχο Tukey. * $P < 0,05$ και NS, στατιστικά μη σημαντικό.

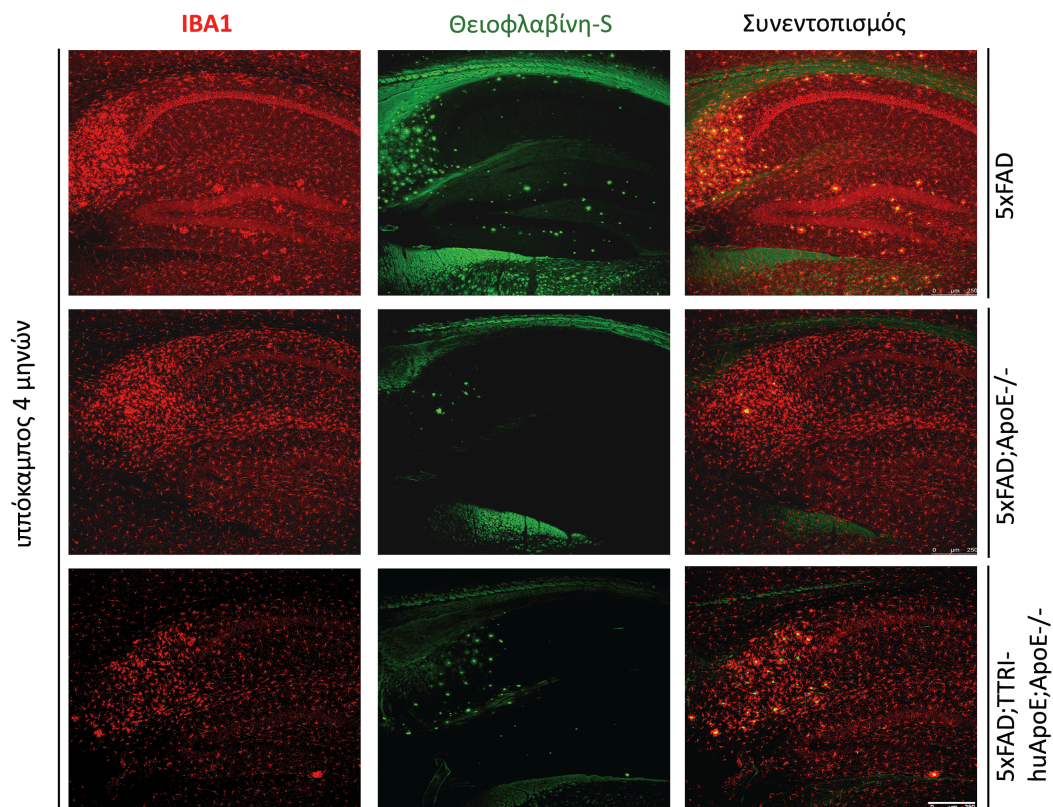
3.6.2. Μελέτη της μικρογλοίωσης στα διαγονιδιακά ποντίκια με παθολογία τύπου Alzheimer σε συσχέτισμό με την έκφραση της ενδογενούς APOE ή/και της ανθρώπινης APOE4

Στο μοντέλο 5xFAD, η μικρογλοίωση ξεκινά πολύ νωρίς και ακολουθεί το πρότυπο εναπόθεσης του Aβ (Oakley et al., 2006). Για την εκτίμησή της αναλύθηκαν ποντίκια από όλους τους γονότυπους ηλικίας δύο και τεσσάρων μηνών. Στα ποντίκια 5xFAD ηλικίας δύο μηνών εμφανίζεται μικρογλοίωση η οποία απουσιάζει από τους εγκεφάλους των αντίστοιχης ηλικίας 5xFAD;ApoE^{-/-} και 5xFAD;TTRI-huApoE4;ApoE^{-/-} (Εικόνα 3.38). Αυτή εντοπίζεται κυρίως στο υπόθεμα του εγκεφάλου αν και ενεργοποιημένα μικρογλοιακά κύτταρα ανιχνεύονται σε όλο τον ιππόκαμπο του διαγονιδιακού ποντικού 5xFAD.



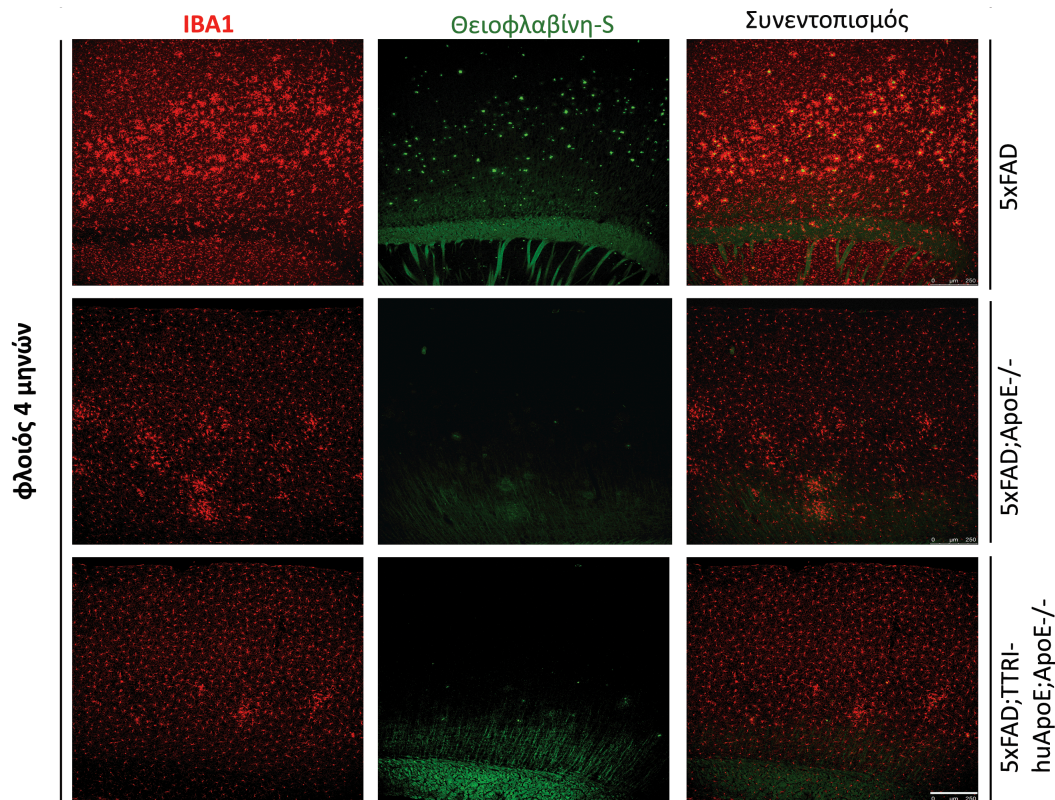
Εικόνα 3.38. Ανάλυση της μικρογλοίωσης στον ιππόκαμπο ποντικών ηλικίας δύο μηνών. Σε αυτή την ηλικία μικρογλοίωση παρουσιάζουν μόνο τα ποντίκια 5xFAD τα οποία έχουν την ενδογενή APOE του ποντικού και αναπτύσσουν πλάκες σε αυτή την ηλικία. Η ανοσοϊστοχημεία για IBA1 (μικρογλοία) και Θειοφλαβίνη-S (αμυλοειδείς πλάκες) έγινε σε 4-5 τομές 40μm από πέντε θηλυκά ποντίκια για κάθε γονότυπο. Στην εικόνα δείχνονται αντιπροσωπευτικοί ιππόκαμποι και από τους τρεις γονότυπους. Κλίμακα 250μm.

Στη συνέχεια εξετάστηκαν οι εγκεφαλοι θηλυκών ποντικών τεσσάρων μηνών και βρέθηκε ότι στον ιππόκαμπο η μικρογλοίωση δεν είναι ανάλογη του αριθμού των αμυλοειδών πλακών. Στον ιππόκαμπο των ποντικών 5xFAD και 5xFAD;ApoE^{-/-} ηλικίας τεσσάρων μηνών, η μικρογλοίωση είναι εξίσου έντονη (IBA1, κόκκινο χρώμα, **Εικόνα 3.39**). Παρόλο που τα 5xFAD;ApoE^{-/-} έχουν πολύ λιγότερες πλάκες από τα ποντίκια 5xFAD η μικρογλοίωση είναι ίδια (Θειοφλαβίνη-S, πράσινο χρώμα, **Εικόνα 3.39**). Αντίθετα, στα 5xFAD;TTRI-huApoE4;ApoE^{-/-} ποντίκια που δε διαθέτουν την ενδογενή APOE αλλά εκφράζουν περιφερικά την ανθρώπινη APOE4 η μικρογλοίωση είναι μειωμένη (**Εικόνα 3.39**, τρίτη σειρά εικόνων). Το ενδιαφέρον εντοπίζεται στο ότι μολονότι τα ποντίκια 5xFAD;TTRI-huApoE4;ApoE^{-/-} έχουν πολύ περισσότερες αμυλοειδείς πλάκες από τα 5xFAD;ApoE^{-/-}, η μικρογλοίωσή τους στον ιππόκαμπο είναι εμφανώς μειωμένη.



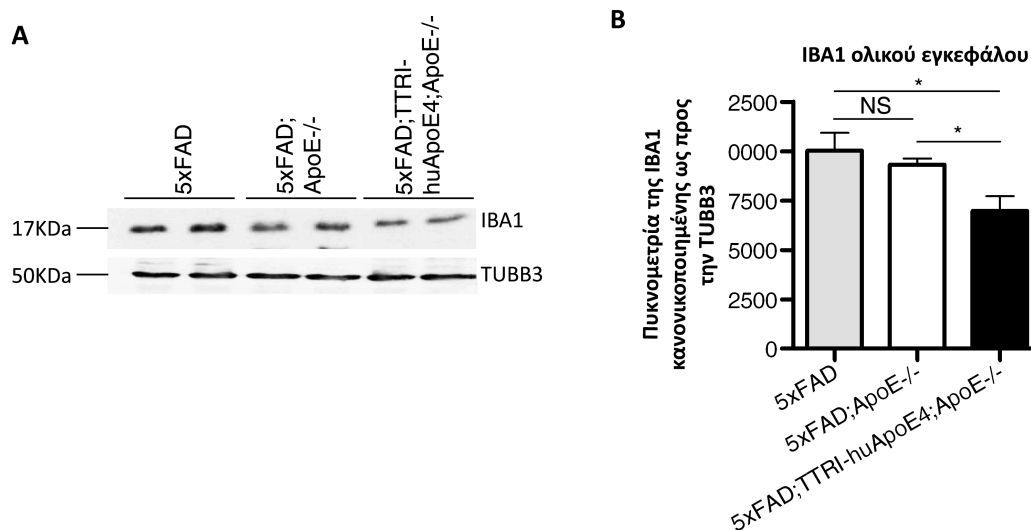
Εικόνα 3.39. Ανάλυση της μικρογλοίωσης στον ιππόκαμπο ποντικών ηλικίας τεσσάρων μηνών. Η μικρογλοίωση στα 5xFAD και στα 5xFAD;ApoE^{-/-} είναι εξίσου έντονη και δεν είναι ανάλογη του αριθμού των αμυλοειδών πλακών (Θειοφλαβίνη-S). Αντίθετα είναι μειωμένη στον ιππόκαμπο των 5xFAD;TTRI-huApoE4;ApoE^{-/-} σε σχέση και με τους δύο άλλους γονότυπους που εξετάστηκαν. Η ανοσοϊστοχημεία έγινε σε 4-5 τομές 40 μm από πέντε θηλυκά ποντίκια για κάθε γονότυπο. Στην εικόνα δείχνονται αντιπροσωπευτικοί ιππόκαμποι και από τους τρεις γονότυπους. Κλίμακα 250μm.

Στο φλοιό των ποντικών η μικρογλοίωση είναι μειωμένη στα ποντίκια που δεν έχουν την ενδογενή APOE (5xFAD;ApoE^{-/-}). Τα εν λόγω ποντίκια έχουν πολύ λιγότερες αμυλοειδείς πλάκες σε σχέση με τα 5xFAD. Η μικρογλοίωση στο φλοιό μειώνεται περαιτέρω στα ποντίκια με περιφερική έκφραση της ανθρώπινης APOE4 (5xFAD;TTRI-huApoE4;ApoE^{-/-}, **Εικόνα 3.40**).



Εικόνα 3.40. Ανάλυση της μικρογλοίωσης στο φλοιό ποντικών ηλικίας τεσσάρων μηνών. Η μικρογλοίωση στα 5xFAD είναι πιο έντονη απ' όσο στα 5xFAD;ApoE^{-/-} που δεν έχουν την ενδογενή APOE και μειώνεται περαιτέρω στα 5xFAD;TTRI-huApoE4;ApoE^{-/-} από τα οποία επίσης απουσιάζει η ενδογενής APOE και εκφράζουν περιφερικά την huApoE4. Η ανοσοϊστοχημεία για IBA1 (μικρογλοία) και Θειοφλαβίνη-S (αμυλοειδείς πλάκες) έγινε σε 4-5 τομές 40μm από πέντε θηλυκά ποντίκια για κάθε γονότυπο. Στην εικόνα δείχνονται αντιπροσωπευτικοί ιππόκαμποι και από τους τρεις γονότυπους. Κλίμακα 250μm.

Ανάλυση των πρωτεϊνικών επιπέδων της IBA1 επιβεβαίωσε τα παραπάνω ευρήματα καθώς έδειξε ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στα επίπεδα της IBA1 μεταξύ των 5xFAD και των 5xFAD;ApoE^{-/-} παρά το γεγονός ότι στα τελευταία σημειώνεται μια τάση μείωσης των επιπέδων της πρωτεΐνης λόγω της μειωμένης μικρογλοΐωσης στο φλοιό. Αντίθετα, τα επίπεδα της πρωτεΐνης είναι χαμηλότερα στα 5xFAD; TTRI-huApoE4;ApoE^{-/-} λόγω της μειωμένης μικρογλοΐωσης που παρουσιάζουν στον ιππόκαμπο και στο φλοιό σε σχέση με τις άλλες δύο ομάδες (Εικόνα 3.41).

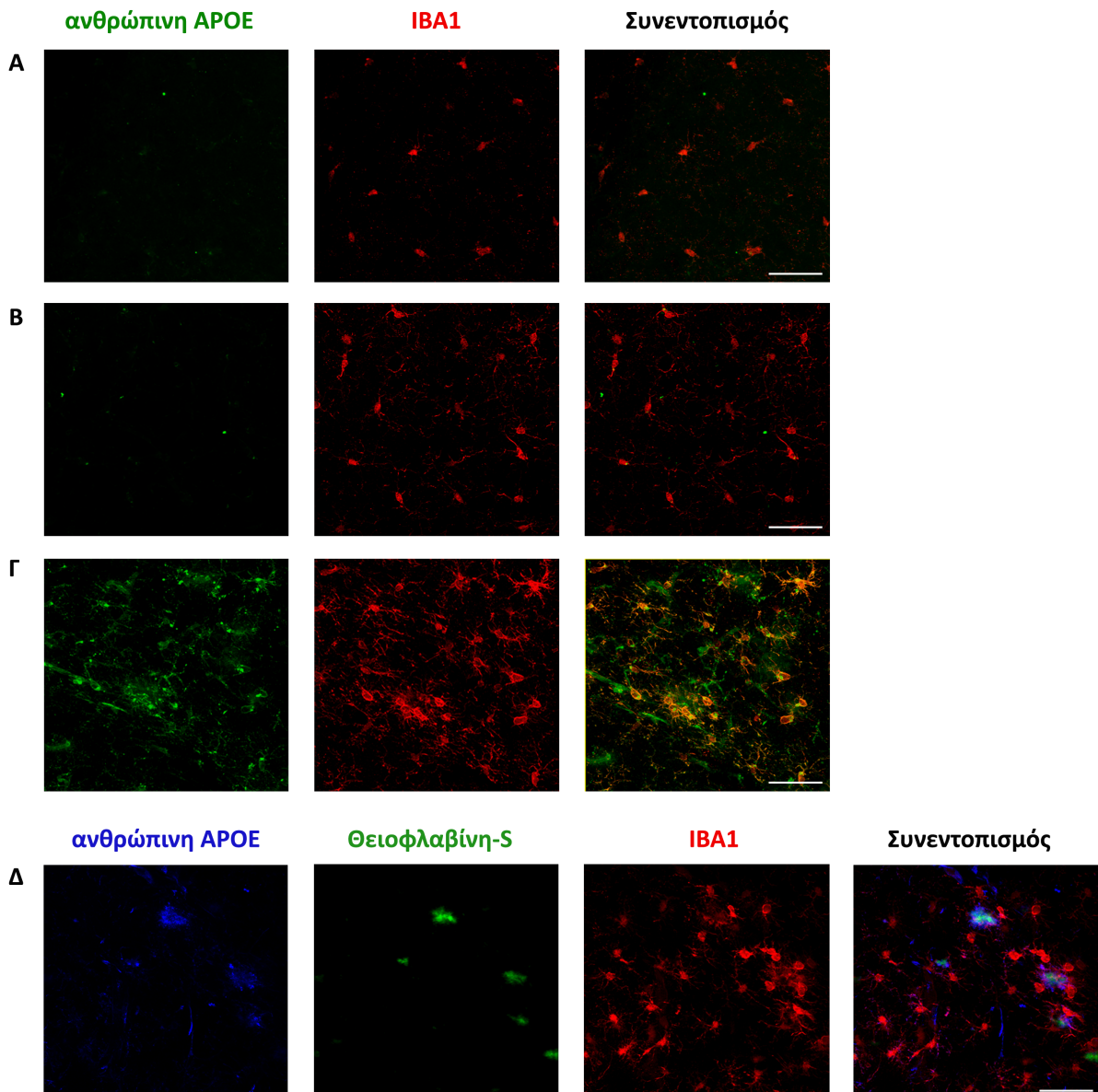


Εικόνα 3.41. Ανάλυση της επίδρασης της APOE4 στα επίπεδα της IBA1. Α. Ανοσοστύπωμα για την IBA1 του ποντικού. 70μg ολικής πρωτεΐνης φορτώθηκαν σε κάθε διαδρομή και εξετάστηκαν τουλάχιστον τρία ζώα από κάθε γονότυπο. Το πείραμα επαναλήφθηκε τρεις φορές και η επιβεβαίωση ισόποσης φόρτωσης των δειγμάτων έγινε με την TUBB3. Β. Πυκνομετρία των ζωνών του ανοσοστυπώματος για IBA1 κανονικοποιημένων ως προς την TUBB3. Δεν υπάρχει διαφορά μεταξύ των 5xFAD και 5xFAD;ApoE^{-/-}, ενώ υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά των 5xFAD;TTRI-huApoE4;ApoE^{-/-} και με τις δύο άλλες ομάδες. Η ανάλυση έγινε με ANOVA και ακολούθησε μετα-ανάλυση με τον έλεγχοTukey. * $P < 0,05$ και NS, στατιστικά μη σημαντικό.

3.6.3. Μελέτη της ικανότητας διήθησης των περιφερικών μακροφάγων στον εγκέφαλο των ποντικών με παθολογία τύπου Alzheimer

Όπως έχει δειχθεί σε προηγούμενο πείραμα τα μακροφάγα του διαγονιδιακού ποντικού TTRI-huApoE4 εκφράζουν την ανθρώπινη APOE4 σε υψηλά επίπεδα (**Εικόνα 3.25**). Έχει επίσης δειχθεί με ανοσοϊστοχημεία και με οργανοτυπική καλλιέργεια ότι ο εγκέφαλος των TTRI-huApoE4;ApoE-/- ποντικών δεν εκφράζει την ανθρώπινη APOE4 (**Εικόνα 3.24**). Επιπρόσθετα, η μικρογλοία των TTRI-huApoE4;ApoE-/- ποντικών δεν εκφράζει APOE4 μετά από φλεγμονή επαγόμενη από LPS (**Εικόνα 3.26**). Επίσης, έχει αποδειχθεί ότι κύτταρα από την περιφέρεια, κυρίως μακροφάγα, διαπερνούν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό και εισέρχονται στο παρέγχυμα του εγκεφάλου (Lebson et al., 2010).

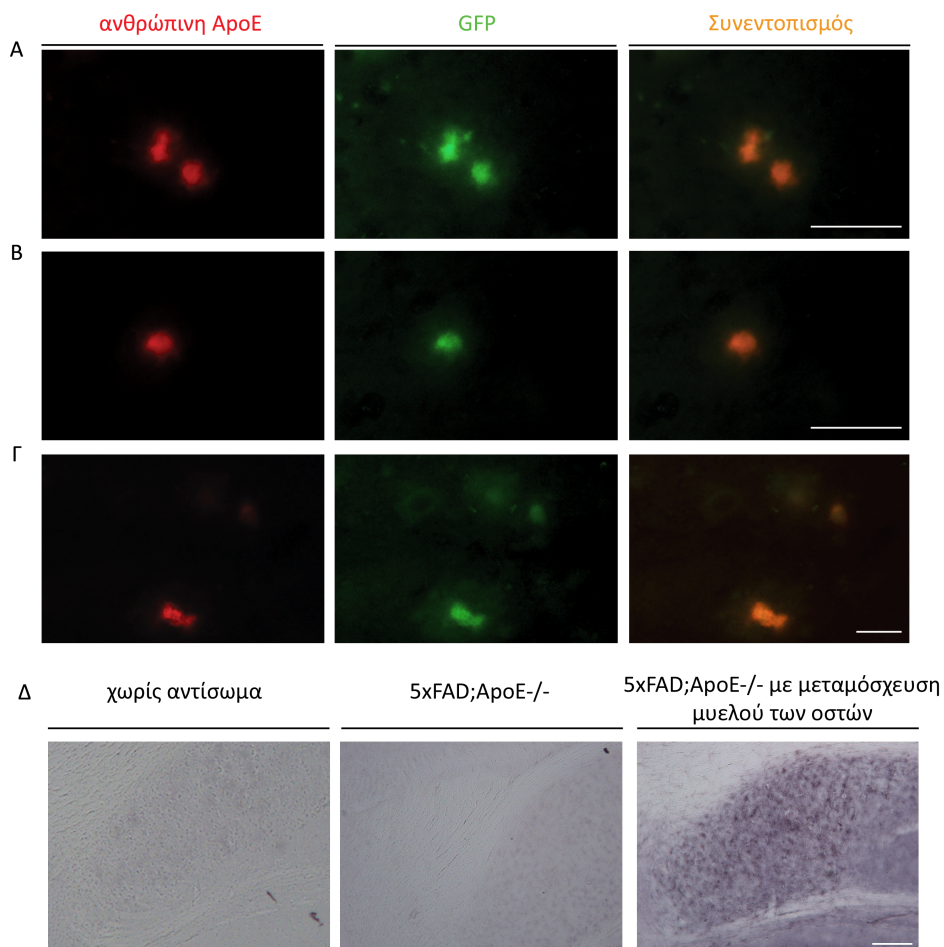
Εφόσον η φλεγμονώδης απόκριση της μικρογλοίας είναι μειωμένη στα 5xFAD;TTRI-huApoE4;ApoE-/- σε σχέση με τα 5xFAD;ApoE-/-, υποθέσαμε ότι η περιφερική APOE4 εισέρχεται στον εγκέφαλο των 5xFAD;TTRI-huApoE4;ApoE-/- ποντικών με κάποιο κύτταρο-όχημα και επηρεάζει την ενεργοποίηση της μικρογλοίας. Ο πιθανός κυτταρικός τύπος που μπορεί να επιτελέσει αυτή τη λειτουργία είναι τα μακροφάγα, οπότε για να διερευνηθεί εάν ισχύει η παραπάνω υπόθεση εξετάστηκαν οι εγκέφαλοι των ποντικών για την παρουσία της ανθρώπινης APOE4 σε συνδυασμό με IBA1 (πρωτεΐνη-δείκτης για μικρογλοία/μακροφάγα) και Θειοφλαβίνη-S (αμυλοειδείς πλάκες). Στα ποντίκια 5xFAD;TTRI-huApoE4;ApoE-/- ηλικίας δύο μηνών που έχουν ελάχιστο αριθμό αμυλοειδών πλακών δεν ανιχνεύθηκε καθόλου APOE4 (**Εικόνα 3.42A**). Επίσης, ούτε στα ποντίκια TTRI-huApoE4;ApoE-/- τεσσάρων μηνών χωρίς παθολογία τύπου Alzheimer δεν ανιχνεύτηκε APOE4 (**Εικόνα 3.42B**). Αντίθετα, τα 5xFAD;TTRI-huApoE4;ApoE-/- ηλικίας τεσσάρων μηνών, με έντονο σχηματισμό πλακών και μικρογλοίωση, έχουν APOE4 που συνεντοπίζεται τόσο με τις θετικές για Θειοφλαβίνη-S πλάκες όσο και με τα θετικά για IBA1 κύτταρα. Τα θετικά για IBA1 και APOE4 κύτταρα περιβάλλουν τις αμυλοειδείς πλάκες και είναι σε στενή επαφή με αυτές (**Εικόνα 3.42Γ-Δ**).



Εικόνα 3.42. Ανάλυση της παρουσίας ΑΡΟΕ4 στον εγκέφαλο ποντικών με παθολογία Alzheimer. Ανοσοϊστοχημεία για την ανθρώπινη ΑΡΟΕ4 και για IBA1 σε τομές εγκεφάλου 40μm (Α) διαγονιδιακού ποντικού 5xFAD;TTRI-huApoE4;ApoE-/- 2 μηνών, (Β) TTRI-huApoE4;ApoE-/- 4 μηνών και (Γ) 5xFAD;TTRI-huApoE4;ApoE-/- 4 μηνών. Έκφραση ανθρώπινης ΑΡΟΕ4 παρατηρείται μόνο στο ποντίκι 5xFAD;TTRI-huApoE4;ApoE-/- 4 μηνών, το οποίο έχει αμυλοειδείς πλάκες και ενεργοποιημένη μικρογλοία/μακροφάγα. Δεν παρατηρείται καθόλου ΑΡΟΕ στο ποντίκι 5xFAD;TTRI-huApoE4;ApoE-/- ηλικίας 2 μηνών το οποίο δεν έχει πλάκες, ούτε στο TTRI-huApoE4;ApoE-/- που δεν έχει παθολογία τύπου Alzheimer. (Δ) Ανοσοϊστοχημεία για huAPOE, IBA1 και Θειοφλαβίνη-S σε θηλυκό ποντίκι όπου φαίνεται ο συνεντοπισμός της ΑΡΟΕ με τις θετικές για Θειοφλαβίνη-S πλάκες, καθώς και με το IBA1. Κλίμακα 100μm.

Δεδομένου του αποτελέσματος αυτού, για να εξακριβωθεί εάν η παρουσία της ΑΡΟΕ4 η οποία παρατηρήθηκε στο ποντίκι 5xFAD;TTRI-huApoE4;ApoE-/- οφείλεται στην είσοδο κυττάρων από την περιφέρεια έγινε μεταμόσχευση μυελού των οστών σε ποντίκια

τεσσάρων μηνών 5xFAD;ApoE^{-/-} για να αποκλειστεί η επίδραση της ενδογενούς APOE. Ως δότες μυελού των οστών χρησιμοποιήθηκαν τα ποντίκια Tg(CAG-EGFP)10sb/J;TTRI-huApoE4;ApoE^{-/-} που προέκυψαν από τη διασταύρωση TTRI-huApoE4;ApoE^{-/-} με ποντίκια Tg(CAG-EGFP)10sb/J που εκφράζουν την GFP σε όλους τους ιστούς (Okabe et al., 1997). Τα ποντίκια-δέκτες αναλύθηκαν οχτώ εβδομάδες μετά την μεταμόσχευση και βρέθηκαν κύτταρα θετικά για την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (green fluorescent protein, GFP) στον εγκέφαλό τους (Εικόνα 3.43Δ). Τα κύτταρα αυτά, τα οποία κατά πάσα πιθανότητα είναι μακροφάγα, εξέφραζαν την ανθρώπινη APOE4 και προέρχονταν από το μυελό των οστών εφόσον ήταν θετικά για GFP (Εικόνα 3.43Α-Γ).

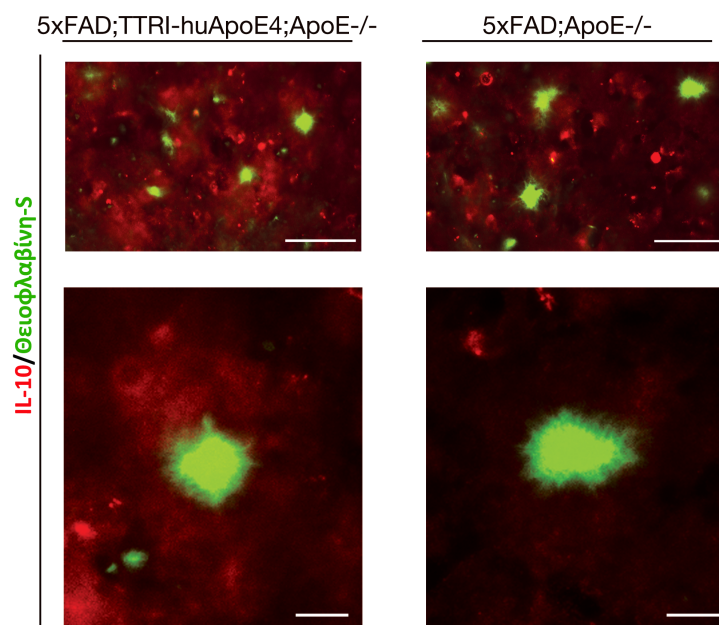


Εικόνα 3.43. Ανάλυση της διήθησης κυττάρων από την περιφέρεια σε ποντίκια με παθολογία Alzheimer. (Α-Γ) Ανοσοφθορισμός σε τομές 30µm από 5xFAD;ApoE^{-/-} έξι μηνών το οποίο έχει δεχτεί μεταμόσχευση μυελού των οστών από ποντίκι Tg(CAG-EGFP)10sb/J;TTRI-huApoE4;ApoE^{-/-}. Τα θετικά για GFP κύτταρα εκφράζουν την ανθρώπινη APOE4 (αντίσωμα 3H1) σε ποντίκια τα οποία θυσιάστηκαν οχτώ εβδομάδες μετά τη μεταμόσχευση. (Δ) Ανοσοϊστοχημεία για την GFP σε ποντίκια φυσικού τύπου, 5xFAD;ApoE^{-/-} χωρίς μεταμόσχευση και 5xFAD;ApoE^{-/-} τα οποία έχουν δεχτεί μεταμόσχευση μυελού των οστών. Θετικά για GFP κύτταρα παρατηρήθηκαν μόνο στο τελευταίο. Κλίμακα: Α-Β, 5µm, Γ, 10µm και Δ, 20µm.

3.6.4. Μελέτη της αντιφλεγμονώδους δράσης της ανθρώπινης APOE4 στα ποντίκια με παθολογία τύπου Alzheimer

Για να διαπιστωθεί εάν η μείωση στη μικρογλοΐωση που παρατηρείται στα 5xFAD;TTRI-huApoE4;ApoE^{-/-} σε σχέση με τα 5xFAD;ApoE^{-/-} ποντίκια οφείλεται στην αύξηση αντιφλεγμονωδών κυτοκινών επιλέξαμε να εξετάσουμε την ιντερλευκίνη 10 (interleukin10, IL-10). Ως εκ τούτου, αναλύσαμε εγκεφάλους θηλυκών ποντικών τεσσάρων μηνών για την παρουσία IL-10 σε συνδυασμό με χρώση για Θειοφλαβίνη-S (αμυλοειδείς πλάκες).

Τα αποτελέσματα έδειξαν αύξηση της έκφρασής της IL-10 στα διαγονιδιακά ποντίκια 5xFAD;TTRI-huApoE4;ApoE^{-/-} σε σχέση με τα 5xFAD;ApoE^{-/-}, η οποία ήταν πιο έντονη γύρω από τις αμυλοειδείς πλάκες (**Εικόνα 3.44**).



Εικόνα 3.44. Η ιντερλευκίνη-10 είναι αυξημένη στα ποντίκια 5xFAD;TTRI-huApoE4;ApoE^{-/-}. Τα 5xFAD;TTRI-huApoE4;ApoE^{-/-} ποντίκια έχουν πιο έντονη χρώση για IL-10 (αριστερά πάνω και κάτω) από τα 5xFAD;ApoE^{-/-} (δεξιά πάνω και κάτω). Στην εικόνα δείχνεται μέρος του υποθέματος του εγκεφάλου (subiculum). Η εκτίμηση της παρουσίας της IL-10 έγινε με ανοσοϊστοχημεία για IL-10 και Θειοφλαβίνη-S σε τομές κρουστάτη 20μm από εγκεφάλους θηλυκών ποντικών 4 μηνών. Οι εικόνες λήφθηκαν υπό τις ίδιες συνθήκες έντασης και φωτεινότητας σε ορθό μικροσκόπιο φθορισμού. Κλίμακα πάνω εικόνων 5μm και κάτω εικόνων 1μm.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η χοληστερόλη είναι ένα από τα σημαντικότερα δομικά συστατικά του κυττάρου. Η χοληστερόλη της κυκλοφορίας δε διαπερνά τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό και ως εκ τούτου ο εγκέφαλος βασίζεται στην τοπική παραγωγή (Dietschy and Turley, 2001, Wolozin, 2004). Ο εγκέφαλος έχει υψηλή περιεκτικότητα σε χοληστερόλη και περιέχει το 23% της ολικής χοληστερόλης του οργανισμού παρόλο που αποτελεί μόνο το 2,1% του βάρους του σώματος (Quan et al., 2003).

Ασθένειες οι οποίες προκαλούν διαταραχές στο μεταβολισμό της χοληστερόλης, όπως η νόσος Niemann Pick τύπου 3 και το σύνδρομο Smith-Lemli-Opitz, προκαλούν σοβαρές νευρολογικές δυσλειτουργίες (Cruz et al., 2000, Elias and Irons, 1995). Επίσης, σε ασθενείς με σκλήρυνση κατά πλάκας (multiple sclerosis) τα επίπεδα της 24S-υδροξυχοληστερόλης, η οποία προέρχεται από το μεταβολισμό της χοληστερόλης του εγκεφάλου, είναι μειωμένα (Leoni et al., 2002, Teunissen et al., 2003). Μη φυσιολογικός μεταβολισμός χοληστερόλης έχει αναφερθεί και σε ασθενείς με τη νόσο Alzheimer και τη νόσο Huntington (Pfrieger, 2003a, Valenza et al., 2005, Vance et al., 2006). Η χοληστερόλη του εγκεφάλου μειώνεται με την αύξηση της ηλικίας (Thelen et al., 2006) και παρουσιάζει περαιτέρω μείωση σε ασθενείς με AD (Puglielli et al., 2003).

Οι πρωτεΐνες οι οποίες είναι υπεύθυνες για την ομοιόσταση της χοληστερόλης, όπως οι υποδοχείς της οικογένειας του LDLR και οι απολιποπρωτεΐνες, έχουν εμπλακεί στη παθογένεση της AD (Wolozin, 2004). Η νόσος του Alzheimer είναι μία εκφυλιστική νόσος του ΚΝΣ η οποία χαρακτηρίζεται από προοδευτική απώλεια των ανώτερων νοητικών λειτουργιών, όπως η μνήμη, η σκέψη, ο λόγος, η κρίση και η συμπεριφορά (Holtzman et al., 2011). Η εμφάνισή της έχει αυξηθεί κατακόρυφα λόγω της αύξησης του προσδόκιμου επιβίωσης του ανθρώπου. Επιδημιολογικές και γενετικές μελέτες έχουν αποδείξει το σημαντικό ρόλο της APOE στη συγκεκριμένη νόσο. Υπάρχει σημαντική αύξηση της παρουσίας του αλληλομόρφου *ApoE4* σε ασθενείς που αναπτύσσουν τη νόσο, σε σχέση με το φυσιολογικό πληθυσμό. Η παρουσία της *ApoE4* αυξάνει την πιθανότητα εμφάνισης της νόσου και επιπρόσθετα μειώνει την ηλικία εμφάνισής της. Το εύρημα αυτό καθιστά την παρουσία του αλληλομόρφου *ApoE4* το σημαντικότερο παράγοντα κινδύνου ανάπτυξης της νόσου (Selkoe, 2001, Walsh and Selkoe, 2004).

Οι υποδοχείς της APOE, οι οποίοι ανήκουν στην υπερικογένεια των LDLR υποδοχέων, έχουν επίσης πολύ σημαντικό ρόλο στον εγκέφαλο και συμμετέχουν σε μηχανισμούς σηματοδότησης, ομοιόστασης της χοληστερόλης και κάθαρσης του πεπτιδίου

Αβ από τον εγκέφαλο (Bu, 2009, Hardy and Allsop, 1991, Herz and Beffert, 2000, Herz and Bock, 2002).

4.1. Η έλλειψη του LDLR οδηγεί στην αύξηση των αμυλοειδών εναποθέσεων στο διαγονιδιακό μοντέλο 5xFAD ανεξάρτητα από την παρουσία της APOE

Ο LDLR είναι είναι μια διαμεμβρανική γλυκοζυλιωμένη πρωτεΐνη τύπου I με κύριο ρόλο την απομάκρυνση της χοληστερόλης από την κυκλοφορία μέσω των λιποπρωτεϊνών και τη μεταφορά τους στο ήπαρ για αποικοδόμηση και απέκκριση (Brown and Goldstein, 1986, Herz and Bock, 2002). Ο LDLR είναι ένας από τους κυριότερους υποδοχείς της APOE στην περιφέρεια και ο κυριότερος υποδοχέας της στον εγκέφαλο (Fryer et al., 2005a). Τα αλληλόμορφα της APOE προσδέονται στον LDLR με διαφορετική συγγένεια, με το αλληλόμορφο *ApoE2* να έχει πολύ χαμηλή συγγένεια πρόσδεσης (2% σε σχέση με τα άλλα αλληλόμορφα) (Mahley, 1988). Οι διαφορές στην ικανότητα πρόσδεσης των αλληλόμορφων της APOE, οδήγησαν στη διαμόρφωση της θεωρίας κατά την οποία ο LDLR είναι ένας πιθανός διαμεσολαβητής στη διαφορετική επίδραση των τριών αλληλόμορφων (*ApoE2*, *ApoE3* και *ApoE4*) στην απομάκρυνση ή τη συσσωμάτωση του Αβ και κατά συνέπεια στην εξέλιξη της νόσου του Alzheimer (Bu, 2009). Ο μηχανισμός με τον οποίο επιδρά ο LDLR στην παθολογία Alzheimer παραμένει ωστόσο, άγνωστος.

Ως εκ τούτου, προχωρήσαμε στην ανάλυση της επίδρασης της έλλειψής του (ποντίκια *Ldlr*^{-/-}) στην παθογένεση της νόσου Alzheimer επιλέγοντας το διαγονιδιακό μοντέλο 5xFAD. Το μοντέλο αυτό εκφράζει διαγονίδια για την *huAPP* και *huPSEN1*, με πέντε οικογενείς μεταλλαγές για την πρώιμη μορφή της AD, εμφανίζει αμυλοειδείς πλάκες από την ηλικία των δύο μηνών και παρουσιάζει χωροταξικές μαθησιακές ελλείψεις (*spatial memory deficits*) (Oakley et al., 2006). Επίσης, παρουσιάζει διαφορές ανάμεσα στα δύο φύλα και τα θηλυκά ποντίκια παρουσιάζουν πιο εκτεταμένο φαινότυπο. Το φαινόμενο αυτό παρουσιάζεται και σε άλλα διαγονιδιακά μοντέλα της νόσου (Callahan et al., 2001, Kim et al., 2009b, Wang et al., 2003). Για τους παραπάνω λόγους, επιλέξαμε να κάνουμε την ανάλυση σε θηλυκά ποντίκια 5xFAD.

Ποντίκια χωρίς τον LDLR είχαν αυξημένο σχηματισμό αμυλοειδών πλακών (5xFAD;*Ldlr*^{-/-} σε σχέση με τα 5xFAD, **Εικόνα 3.1A**). Το ίδιο αποτέλεσμα βρέθηκε και σε ποντίκια με αδρανοποιημένα τόσο τον LDLR όσο την ενδογενή APOE (5xFAD;*ApoE*^{-/-};*Ldlr*^{-/-} σε σχέση με τα 5xFAD;*ApoE*^{-/-}, **Εικόνα 3.1A**) όπου αυξήθηκε ο αριθμός των πλακών και

άλλαξε η μορφολογία τους (**Εικόνα 3.1B**). Από τα παραπάνω συνάγεται ότι η έλλειψη του LDLR επιδεινώνει την παθολογία τύπου Alzheimer. Ποσοτικοποίηση της εναπόθεσης των αμυλοειδών πλακών στις ομάδες ανάλυσης επιβεβαίωσε την αύξηση των πλακών στον ιππόκαμπο και το φλοιό των ποντικών χωρίς τον LDLR και παθολογία τύπου Alzheimer (**Εικόνα 3.2**). Η διαφορά αυτή ήταν ανεξάρτητη από την παρουσία της APOE.

Τα αποτελέσματά μας συμφωνούν με μια προηγούμενη μελέτη στην οποία έκαναν χρήση των διαγονιδιακών μοντέλων ποντικών Tg2576 (Cao et al., 2006). Αντίθετα, σε μια άλλη μελέτη όπου χρησιμοποιήθηκαν τα ποντίκια PDAPP (Fryer et al., 2005a) δε βρέθηκε καμία μεταβολή στον αριθμό των αμυλοειδών πλακών. Τα μοντέλα Tg2576 και PDAPP είναι διαγονιδιακά μόνο για μια μεταλλαγμένη μορφή της ανθρώπινης APP (μεταλλαγή Swedish K670N/M671L και μεταλλαγή Indiana V717F αντίστοιχα). Στους εγκεφάλους τους παράγεται κυρίως το πεπτίδιο Αβ₄₀. Η μελέτη με τα ποντίκια PDAPP πραγματοποιήθηκε σε ποντίκια ηλικίας δέκα μηνών τα οποία δεν είχαν εκτεταμένη παθολογία Alzheimer. Στα ποντίκια αυτά, αν και δεν βρέθηκε διαφορά στο σχηματισμό των αμυλοειδών πλακών, σημειώθηκε μη στατιστικά σημαντική αυξητική τάση στον αριθμό των αμυλοειδών πλακών στα ποντίκια χωρίς LDLR (Fryer et al., 2005a). Είναι γνωστό ότι στα ποντίκια με παθολογία Alzheimer η εναπόθεση αυξάνεται με την ηλικία και εάν τα ποντίκια αυτά αφήνονταν να γεράσουν και να αναπτύξουν πλήρως την παθολογία Alzheimer (15-20 μηνών), η αύξηση στον αριθμό των πλακών πιθανότατα θα ήταν πιο εμφανής. Η επίδραση του LDLR στον αριθμό των αμυλοειδών πλακών επιβεβαιώνεται και από μια μεταγενέστερη μελέτη της ίδιας ομάδας, στην οποία δείχθηκε ότι η υπερέκφραση του LDLR στο μοντέλο APP^{swe}/PSEN1ΔE9 οδηγεί σε μείωση του σχηματισμού αμυλοειδών πλακών και των επιπέδων Αβ. Η μείωση είναι ανάλογη με τα επίπεδα έκφρασης του LDLR στον εγκέφαλο (Kim et al., 2009b).

Οι διαφορές που παρατηρούνται στη δικιά μας μελέτη σε σχέση με τις προαναφερόμενες, οφείλονται στο φαινότυπο του μοντέλου 5xFAD που χρησιμοποιήσαμε. Το μοντέλο αυτό φέρει εκτός από την ανθρώπινη μεταλλαγμένη μορφή της APP (μεταλλαγές Swedish K670N/M671L, Florida I716V και London V717I) και την ανθρώπινη PSEN1 (μεταλλαγές L286V and L286V). Στο μοντέλο 5xFAD παράγεται κυρίως Αβ₄₂ και η αναλογία Αβ₄₂/Αβ₄₀ είναι αυξημένη με αποτέλεσμα την ταχύτερη εξέλιξη της παθολογίας γεγονός που μας επέτρεψε να διακρίνουμε τις διαφορές οι οποίες στις προηγούμενες μελέτες δεν ήταν τόσο έντονες.

4.2. Η έλλειψη του LDLR οδηγεί σε αύξηση των επιπέδων της APOE στον εγκέφαλο των διαγονιδιακών ποντικών 5xFAD;Ldlr-/-

Οι υποδοχείς οι οποίοι εμπλέκονται στους μηχανισμούς μεταφοράς της χοληστερόλης παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στα επίπεδα της APOE στον εγκέφαλο. Στοχευμένη αδρανοποίηση του γονιδίου του LRP-1 στους νευρώνες του πρόσθιου φλοιού και του ιππόκαμπου ενός γενετικά τροποποιημένου ποντικού (conditional knock-out), αύξησε τα επίπεδα της APOE στις περιοχές αυτές (Liu et al., 2007). Επιπρόσθετα, η αδρανοποίηση του γονιδίου του μεταφορέα ABCA1, ο οποίος εμπλέκεται επίσης στο μεταβολισμό της χοληστερόλης, προκαλεί μείωση επιπέδων της APOE και αύξηση των επιπέδων Αβ στον εγκέφαλο των διαγονιδιακών ποντικών με AD (Koldamova et al., 2005, Wahrle et al., 2005).

Τα γενετικά τροποποιημένα ποντίκια Ldlr-/- έχουν αύξηση 150% στα επίπεδα της APOE στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό (ENY), μειωμένο κυτταρικό πολλαπλασιασμό και προσυναπτική πυκνότητα στον ιπποκαμπο (Mulder et al., 2007) και μειωμένη χωροταξική μνήμη (Mulder et al., 2004). Η απουσία του LDLR στον εγκέφαλο δεν φαίνεται να επηρεάζει την ποσότητα της χοληστερόλης (Quan et al., 2003) και ο υποδοχέας LRP1 είναι ικανός να ισοσταθμίσει την απουσία του (Bu, 2009, Zerbinatti et al., 2006, Zerbinatti et al., 2004). Η απουσία του LDLR επηρεάζει, ωστόσο, τη σύσταση της διπλοστοιβάδας στην πλασματική μεμβράνη των συνάψεων (Igbavboa et al., 1997). Ο διαφορικός ρόλος του LDLR ανάλογα με την ισομορφή της APOE του εγκεφάλου αποδείχτηκε με τη διασταύρωση των ποντικών Ldlr-/- με ποντίκια που εκφράζουν τις ανθρώπινες ισομορφές της APOE. Τα ποντίκια ApoE3-TR και τα ApoE4-TR είχαν αυξημένα επίπεδα APOE στο ENY. Στα ποντίκια ApoE2-TR ο LDLR δεν είχε καμία επίδραση λόγω της μειωμένης συγγένειας πρόσδεσης της APOE2 στον υποδοχέα (Fryer et al., 2005a). Επίσης, κύτταρα τα οποία δεν είχαν LDLR δεν μπορούσαν να ενδοκυτταρώσουν την αστροκυτταρική APOE *in vitro*, ενώ αντίθετα, κύτταρα τα οποία τον υπερέκφραζαν είχαν αυξημένη ενδοκυττάρωση και αποικοδόμηση της APOE (Fryer et al., 2005a). Τα παραπάνω αποδεικνύουν ότι ο LDLR είναι ο κυριότερος υποδοχέας της APOE στον εγκέφαλο και επίσης ότι ρυθμίζει τα επίπεδα της απολιποπρωτεΐνης.

Η ανάλυση των πρωτεϊνικών επιπέδων της APOE στους εγκεφάλους των ποντικών 5xFAD και 5xFAD;Ldlr-/- έδειξε αύξηση στον εγκέφαλο των ποντικών χωρίς τον LDLR σύμφωνα και με τα ευρήματα των προηγούμενων μελετών (Cao et al., 2006, Fryer et al., 2005a) (**Εικόνα 3.3**). Η αύξηση στην APOE η οποία βρήκαμε ήταν κυρίως στο κλάσμα το

οποίο αντιστοιχεί στις πρωτεΐνες οι οποίες βρίσκονται στις αμυλοειδείς πλάκες, υποστηρίζοντας τη θεωρία ότι αυτή αλληλεπιδρά με το Αβ (Iurescia et al., 2010). Από τα παραπάνω είναι προφανές ότι οι υποδοχείς οι οποίοι εμπλέκονται στους μηχανισμούς ομοιόστασης της χοληστερόλης ρυθμίζουν τα επίπεδα και το βαθμό λιπιδίωσης της ΑΡΟΕ, επηρεάζοντας με αυτό τον τρόπο τη δράση της απολιποπρωτεΐνης.

4.3. Η απουσία του LDLR οδηγεί στην αύξηση του Αβ στον εγκέφαλο των διαγονιδιακών ποντικών 5xFAD

Το αμυλοειδές πεπτίδιο Αβ βρίσκεται σε διαφορετικές δεξαμενές στον εγκέφαλο και ανάλογα με το βαθμό της συσσωμάτωσής του έχει διαφορετική τοξικότητα. Το πιο τοξικό είδος είναι τα διαλυτά εξωκυττάρια ολιγομερή Αβ τα οποία δεν είναι συσσωματωμένα στις αμυλοειδείς πλάκες (Haass and Selkoe, 2007).

Η αύξηση που παρατηρείται στον αριθμό των αμυλοειδών πλακών στα ποντίκια χωρίς τον LDLR, πιθανότατα οφείλεται στο ότι ο LDLR συμμετέχει στους μηχανισμούς κάθαρσης (clearance) του Αβ από τον εγκέφαλο, σε συνδυασμό με άλλους υποδοχείς (LRP-1 και P_gP) (Cirrito et al., 2005). Πειραματικά δεδομένα υποστηρίζουν τη θεωρία αυτή δεδομένου ότι τα επίπεδα του Αβ στο μεσοκυττάριο υγρό ήταν μειωμένα στον εγκέφαλο ποντικών με παθολογία AD τα οποία υπερέκφραζαν τον LDLR (Kim et al., 2009b). Η απομάκρυνση του Αβ γίνεται σε μεγάλο βαθμό μέσω της ΑΡΟΕ που δρα ως πρωτεΐνη-συνοδός για το Αβ (**Εικόνα 1.15**) (Deane et al., 2008, Zlokovic, 2008). Τα αυξημένα επίπεδα της ΑΡΟΕ που βρίσκεται «παγιδευμένη» στις αμυλοειδείς πλάκες και δεν μπορεί να αλληλεπιδράσει με αυτό, επιβεβαιώνουν τη θεωρία αυτή. Επίσης, βρέθηκε με πειράματα υβριδοποίησης *in situ* ότι ο LDLR εκφράζεται στα ενδοθηλιακά κύτταρα τα οποία αποτελούν μέρος του αιματοεγκεφαλικού φραγμού γεγονός που υποστηρίζει περαιτέρω το ρόλο του υποδοχέα στην απομάκρυνση του Αβ από τον εγκέφαλο (Dehouck et al., 1997, Meresse et al., 1989).

Για να επιβεβαιωθεί εάν η αύξηση που παρατηρήσαμε στο σχηματισμό των αμυλοειδών πλακών οφείλεται στην αύξηση των επιπέδων του Αβ πραγματοποιήσαμε εκτίμηση των επιπέδων του με μεθόδους ανοσοϊστοχημείας και ELISA.

Τα αποτελέσματα της ανοσοϊστοχημικής μελέτης έδειξαν ότι η έλλειψη του LDLR οδηγεί σε πιο έντονη ανοσοαντίδραση με το Αβ στον ιππόκαμπο σε ποντίκια με ΑΡΟΕ (5xFAD;Ldlr^{-/-}) αλλά επίσης και σε ποντίκια χωρίς την ΑΡΟΕ (5xFAD;ApoE^{-/-};Ldlr^{-/-}). Στο

φλοιό η διαφορά αυτή δεν ήταν στατιστικά σημαντική (**Εικόνα 3.4**). Αυτό εξηγείται από το πρότυπο έκφρασης του LDLR, ο οποίος εκφράζεται κυρίως στις περιοχές CA1 και CA3 του υπόκαμπου, ενώ δεν εκφράζεται σε μεγάλο βαθμό στο φλοιό, όπου ο κύριος υποδοχέας είναι ο LRP1. Επίσης ο LDLR εκφράζεται κυρίως από αστροκύτταρα και σε λιγότερο βαθμό από νευρώνες σε αντίθεση με τον LRP1 (Beffert et al., 1998, Dekroon and Armati, 2001, Pitas et al., 1987a, Pitas et al., 1987b, Swanson et al., 1988)

Για να επιβεβαιωθεί εάν αυτές οι διαφορές αντικατοπτρίζονται και στα επίπεδα του πεπτιδίου, έγινε ποσοτικοποίηση των επιπέδων του Αβ₄₀ και του Αβ₄₂ με ELISA. Βρήκαμε στατιστικά σημαντική αύξηση κυρίως στο Αβ που βρίσκεται συσσωματωμένο στις αμυλοειδείς πλάκες στα ποντίκια από τα οποία απουσιάζει ο LDLR (**Εικόνα 3.5**, μη διαλυτό Αβ). Τα αποτελέσματα της ELISA επιβεβαιώνουν την αύξηση που παρατηρήθηκε από την ποσοτικοποίηση του σχηματισμού αμυλοειδών πλακών στα ποντίκια δίχως LDLR (**Εικόνες 3.1-3.2**). Το αποτέλεσμα αυτό συμφωνεί με τη μελέτη των Cao και συνεργατών, οι οποίοι επίσης βρίσκουν αύξηση σε αυτό το κλάσμα και καμία μεταβολή στα επίπεδα του διαλυτού μη συσσωματωμένου σε πλάκες Αβ (Cao et al., 2006).

Συνοψίζοντας, η έλλειψη του LDLR οδηγεί σε αύξηση των επιπέδων Αβ και συνεπώς σε αύξηση του σχηματισμού αμυλοειδών πλακών και εναποθέσεων Αβ. Ο μηχανισμός δράσης του LDLR είναι ανεξάρτητος από την APOE αφού η απουσία της δεύτερης δεν επηρεάζει την αύξηση που προκαλεί η έλλειψη του πρώτου.

4.4. Η έλλειψη του LDLR δεν επηρεάζει τα επίπεδα της APP ή των CTF στον εγκέφαλο ενός διαγονιδιακού μοντέλου με παθολογία τύπου Alzheimer

Η APP μεταβολίζεται σε περιοχές οι οποίες είναι πλούσιες σε χοληστερόλη στη πλασματική μεμβράνη, στο σύστημα Golgi και στα ενδοσώματα (Ehehalt et al., 2003). Επίσης έχει δειχθεί ότι η APP ρυθμίζει τα επίπεδα της APOE και της χοληστερόλης μέσω του LRP-1 (Liu et al., 2007). Τα αυξημένα επίπεδα χοληστερόλης στην κυκλοφορία αυξάνουν την πιθανότητα εμφάνισης της AD και μειώνουν την ηλικία εμφάνισής της (Jick et al., 2000, Refolo et al., 2000, Sparks et al., 1994, Wolozin, 2004). Υπάρχουν, επίσης, πειραματικά αποτελέσματα τα οποία δείχνουν ότι σε υπερχοληστεριναιμικούς ασθενείς και σε γενετικά τροποποιημένα μοντέλα ζώων με μεταλλαγμένες μορφές της ανθρώπινης APP και των πρεσινιλινών υπάρχει αυξημένος μεταβολισμός της APP μέσω του αμυλοειδογενούς μονοπατιού. Τα αποτελέσματα είναι ο αυξημένος σχηματισμός αμυλοειδών πλακών και

νευροϊνδιακών δερματίων τα οποία οδηγούν στη μείωση των συνειδησιακών λειτουργιών (Bales et al., 1999, Mucke et al., 2000, Refolo et al., 2000, Refolo et al., 2001, Sparks et al., 2000, Sparks et al., 2006).

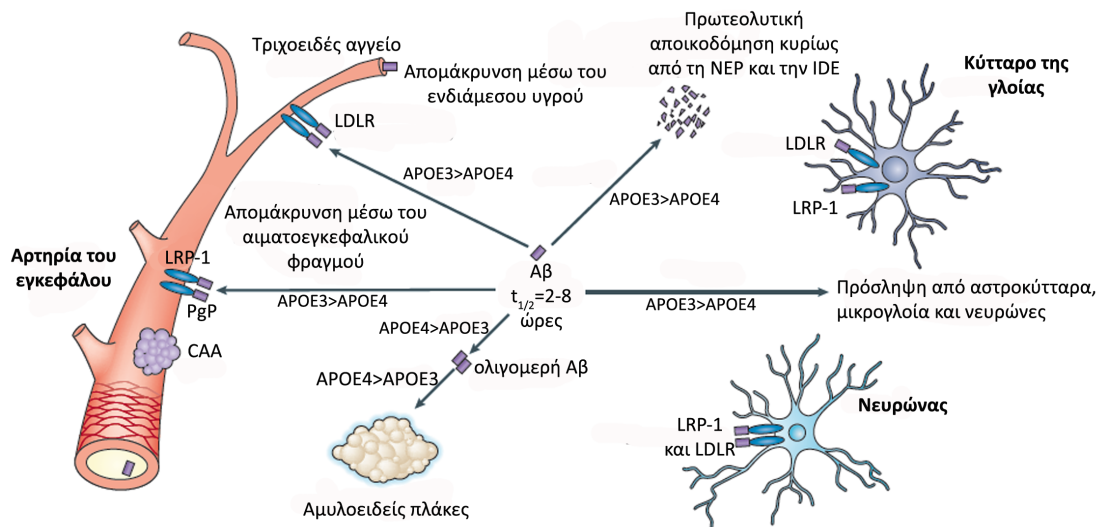
Οι στατίνες είναι φάρμακα τα οποία μειώνουν τα επίπεδα της χοληστερόλης μέσω της αύξησης των επιπέδων του LDLR. Τα φάρμακα αυτά χρησιμοποιούνται ευρέως για τη θεραπεία της υπερχοληστεριναιμίας. Δεδομένης της σχέσης η οποία βρέθηκε μεταξύ υπερχοληστεριναιμίας και καρδιαγγειακών παθήσεων και της εμφάνισης της AD (Notkola et al., 1998, Shepardson et al., 2011a, Yaffe et al., 2002), οι στατίνες παρουσίαζαν μία υποσχόμενη θεραπευτική αγωγή για την AD. Δύο μεγάλες κλινικές μελέτες με ατορβαστατίνη, μια στατίνη η οποία διαπερνά τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό και χαμηλώνει τα επίπεδα της χοληστερόλης μέσω της αύξησης της έκφρασης του LDLR, έδωσαν αντικρουόμενα αποτελέσματα. Η πρώτη έδειξε ότι οι ασθενείς οι οποίοι έλαβαν την στατίνη βελτιώθηκαν (Sparks et al., 2006) και η άλλη δεν έδειξε καμία διαφορά (Feldman et al., 2010). Αυτό μπορεί να οφείλεται σε διαφορές στο σχεδιασμό των δύο μελετών καθώς και στη διάρκεια χορήγησης του φαρμάκου. Εκτεταμένες βιβλιογραφικές ανασκοπήσεις (Shepardson et al., 2011b, a) δείχνουν ότι έχει ιδιαίτερη σημασία εάν η στατίνη διαπερνά καταρχάς τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό και κατά δεύτερον εάν αυτή δίνεται στα αρχικά στάδια της AD. Τα δεδομένα από τις μελέτες αυτές αποδεικνύουν ωστόσο τη σημασία που έχει ο LDLR στην εξέλιξη της νόσου.

Τα αυξημένα επίπεδα του αμυλοειδούς που παρατηρήθηκαν στη παρούσα μελέτη μπορεί να οφείλονται είτε σε αύξηση της παραγωγής της ολικής APP, λόγω διαταραχών των επιπέδων της χοληστερόλης στις μεμβράνες, είτε σε μείωση της απομάκρυνσης του Αβ από τον εγκέφαλο. Για να διευκρινιστεί ποια από τις 2 θεωρίες ισχύει, αναλύθηκαν τα επίπεδα της ολικής APP και των CTF αυτής (α - και β -CTF) στα ποντίκια με έλλειψη του LDLR. Δε βρέθηκε καμία διαφορά ανάμεσα στις ομάδες ανάλυσης γεγονός που καταδεικνύει ότι ο LDLR δεν προκαλεί αλλαγή στα επίπεδα της πρωτεΐνης ούτε και στο ρυθμό πρωτεόλυσής της από τις α - ή β -εκκριτάσες (**Εικόνα 3.6**).

Συνοψίζοντας, η απουσία του LDLR στο μοντέλο 5xFAD με παθολογία Alzheimer αυξάνει τις εναποθέσεις Αβ και το σχηματισμό αμυλοειδών πλακών αλλά δεν έχει καμία επίδραση στα ολικά επίπεδα της APP ή στην παραγωγή του Αβ (καμία αλλαγή στα β -CTF). Το αποτέλεσμα αυτό συμφωνεί με την έρευνα από τους Cao και συνεργάτες (Cao et al., 2006). Συνεπώς, ενισχύεται η θεωρία σύμφωνα με την οποία οι διαφορές που

παρατηρούνται στο ποντίκι χωρίς τον LDLR οφείλονται σε αλλαγές στην απομάκρυνση του αμυλοειδούς από τον εγκέφαλο.

Είναι γνωστό από προηγούμενες μελέτες ότι ο LRP-1 είναι ένας από τους κύριους υποδοχείς που συμμετέχουν στην απομάκρυνση του Αβ (Kanekiyo et al., 2011). Πιθανότατα, ο LDLR δρα παράλληλα με αλλά όχι επικαλυπτόμενα από τον LRP-1 (Εικόνα 4.1). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα η απουσία του LDLR να οδηγεί σε αύξηση των εναποθέσεων του Αβ σε συγκεκριμένες περιοχές του εγκεφάλου.



Εικόνα 4.1. Κύριοι μηχανισμοί απομάκρυνσης του Αβ. Η συσσωμάτωση του Αβ στο παρέγχυμα του εγκεφάλου οδηγεί στο σχηματισμό ολιγομερών Αβ και αμυλοειδών πλακών που είναι νευροτοξικά. Επίσης, στα αγγεία προκαλεί εγκεφαλική αμυλοειδική αγγειοπάθεια (CAA), που επιφέρει εγκεφαλικές αιμορραγίες και δυσλειτουργία των αγγείων. Τα κύρια μονοπάτια μείωσης των επιπέδων του Αβ στον εγκέφαλο περιλαμβάνουν απομάκρυνση μέσω υποδοχών από τα κύτταρα του παρεγχύματος (νευρώνες, αστροκύτταρα και μικρογλοία), από τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό, από το μονοπάτι αποστράγγισης του μεσοκυττάριου υγρού και επίσης μέσω της πρωτεολυτικής αποικοδόμησης από πεπτιδάσες (IDE και NEP). Σε όλα τα μονοπάτια απομάκρυνσης μέσω υποδοχών ο LRP-1 έχει κύριο ρόλο, είτε μέσω άμεσης πρόσδεσης του Αβ είτε μέσω της πρόσδεσης συμπλεγμάτων APOE-Αβ. Ο LDLR πιθανότατα δρα μέσω της πρόσδεσης συμπλεγμάτων APOE-Αβ. Προσαρμογή από Bu J., 2009, Nat Rev Neurosci 10(5):333-344.

4.5. Η αστροκυττάρωση είναι μειωμένη στον εγκέφαλο των 5xFAD διαγονιδιακών ποντικών απουσία του ενδογενούς LDLR

Τα αστροκύτταρα ανήκουν στα κύτταρα της γλοίας κι έχουν πολύ σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της ομοιόστασης του εγκεφάλου. Μεταξύ άλλων, συνθέτουν νευροδιαβιβαστές (Maragakis and Rothstein, 2006) και ρυθμίζουν το μεταβολισμό των αμινοξέων, των θρεπτικών συστατικών και των ιόντων του εγκεφάλου (Danbolt, 2001,

Kofuji and Newman, 2004). Επίσης, περιβάλλουν τους νευρώνες, υποβοηθώντας έτσι τη μεταγωγή ηλεκτρικού σήματος (Wang and Bordey, 2008) και ελέγχουν τη διεγερσιμότητα μέσω ρύθμισης της μεταφοράς γλουταμινικού οξέος από τους υποδοχείς GLUT1 και GLAST των αστροκυττάρων (Chaudhry et al., 1995, Lehre et al., 1995). Τα αστροκύτταρα είναι ο κύριος κυτταρικός τύπος ο οποίος παράγει χοληστερόλη στο ΚΝΣ (DeMattos et al., 2001). Οι νευρώνες βασίζονται στην πρόσληψη της χοληστερόλης, υπό τη μορφή λιποπρωτεϊνικών σωματιδίων, μέσω των υποδοχέων LRP1 και LDLR για να καλύψουν τις μεταβολικές τους ανάγκες (Pfrieger, 2003b, Poirier et al., 1993, Swanson et al., 1988). Προηγούμενες μελέτες έδειξαν ότι ο LDLR εκφράζεται κυρίως στα αστροκύτταρα και λιγότερο σε νευρώνες, ενώ ο LRP-1 (ο άλλος κύριος υποδοχέας της APOE στον εγκέφαλο) εκφράζεται κυρίως από τους νευρώνες και σε μικρότερο βαθμό από τα κύτταρα της γλοίας (Rapp et al., 2006, Rebeck et al., 1993).

Σε καταστάσεις φλεγμονής τα αστροκύτταρα «ενεργοποιούνται», πολλαπλασιάζονται και αυξάνουν το μέγεθος του κυτταρικού τους σώματος. Αυτό παρατηρείται σε ισχαιμικά επεισόδια, τραυματισμό του εγκεφάλου αλλά και στις νευροεκφυλιστικές νόσους (Carson et al., 2006b, Maragakis and Rothstein, 2006, Ridet et al., 1997). Σε εγκεφάλους ασθενών AD, τα ενεργοποιημένα αστροκύτταρα περιβάλλουν τις αμυλοειδείς πλάκες (Wisniewski and Wegiel, 1991) και ενεργοποιούνται από το Αβ και τον τοπικό νευροεκφυλισμό (DeWitt et al., 1998).

Από τα παραπάνω, είναι προφανές ότι ο LDLR παίζει σημαντικό ρόλο στη λειτουργία των αστροκυττάρων. Με ανοσοϊστοχημικές μελέτες βρήκαμε ότι η απουσία του LDLR οδηγεί στη μείωση της αστροκυττάρωσης, παρόλο που τα ποντίκια με έλλειψη LDLR έχουν αυξημένη εναπόθεση αμυλοειδών πλακών σε σχέση με τις ομάδες ελέγχου. Η μείωση αυτή ήταν ανεξάρτητη από την παρουσία της ενδογενούς APOE (**Εικόνα 3.7**). Δείχθηκε, επίσης, ότι η έλλειψη της APOE δεν επηρεάζει την αστροκυττάρωση του ιππόκαμπου στους εγκεφάλους του διαγονιδιακού μοντέλου 5xFAD με παθολογία τύπου Alzheimer (**Εικόνες 3.7A και 3.35**). Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι ο LDLR είναι ο κύριος παράγοντας που επηρεάζει την παρατηρούμενη στη νόσο του Alzheimer αστροκυττάρωση. Επώαση καλλιεργείων αστροκυττάρων με λοβαστατίνη προκάλεσε αύξηση της έκφρασης του LDLR εξηγώντας γιατί κάποιες μελέτες με στατίνες έδωσαν ενθαρρυντικά αποτελέσματα ως προς τη χρήση στατινών στην AD (Pavlon et al., 1995). Τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής

αποδεικνύουν το σημαντικό ρόλο του LDLR στην επαγωγή της αστροκυττάρωσης στον εγκέφαλο με παθολογία τύπου Alzheimer.

4.6. Μείωση της μικρογλοΐωσης στον εγκέφαλο των διαγονιδιακών 5xFAD στα οποία απουσιάζει ο LDLR

Τα μικρογλοϊακά κύτταρα ανήκουν κι αυτά στα κύτταρα της γλοΐας (Carson et al., 2006a), αλλά δεν προέρχονται από το νευρικό εκτόδερμα όπως τα υπόλοιπα γλοιοκύτταρα. Αντίθετα, τα κύτταρα αυτά προέρχονται από το μυελό των οστών και μεταναστεύουν στον εγκέφαλο σε πρώιμο εμβρυικό στάδιο (Ginhoux et al., 2010). Σχηματίζουν λεπτές, μακριές απολήξεις που καλύπτουν όλο το παρέγχυμα του εγκεφάλου (Perry et al., 2010) οι οποίες εξερευνούν συνεχώς και ελέγχουν το τοπικό περιβάλλον (Davalos et al., 2005, Nimmerjahn et al., 2005). Πολλαπλασιάζονται με πολύ χαμηλό ρυθμό (Lawson et al., 1992) και στα υγιή ζώα η μικρογλοΐα πολύ σπάνια αντικαθίσταται από κύτταρα προερχόμενα από το μυελό των οστών (Ajami et al., 2007, Mildner et al., 2007).

Η μικρογλοΐα μπορεί να έχει είτε φαγοκυτταρικό χαρακτήρα είτε να εκκρίνει προφλεγμονώδεις κυτοκίνες και ROS (Carson et al., 2006b, Ransohoff and Perry, 2009). Πειραματικά δεδομένα υποστηρίζουν ότι αρχικά η μικρογλοΐα ενεργοποιείται από το αμυλοειδές πεπτίδιο και το φαγοκυτταρώνει αλλά σε πιο προχωρημένα στάδια της νόσου η μικρογλοΐα γίνεται μη λειτουργική με αποτέλεσμα να μην μπορεί να φαγοκυτταρώσει άλλο Αβ ούτε να το αποικοδομήσει ενδοκυττάρια (Hickman et al., 2008).

Σύμφωνα με μελέτες που έγιναν με ποντίκια που δέχθηκαν μεταμόσχευση μυελού των οστών από ποντίκια *Ldlr^{-/-}*, δείχθηκε ότι αυτά είχαν λιγότερο σχηματισμό αθηρωματικών πλακών σε σχέση με εκείνα στα οποία μεταμοσχεύθηκε μυελός από φυσικού τύπου ποντίκια. Επίσης, δείχθηκε ότι ο LDLR παίζει σημαντικό ρόλο στο σχηματισμό αφρωδών κυττάρων από μακροφάγα στις αθηρωματικές πλάκες και ο αριθμός τους μειώνεται απουσία του LDLR (Herijgers et al., 2000, Linton et al., 1999). Δεδομένου ότι ο LDLR παίζει σημαντικό ρόλο στη λειτουργία των μακροφάγων και την επαγωγή των αθηρωματικών πλακών καθώς και ότι τα μικρογλοϊακά κύτταρα προέρχονται από την ίδια μυελοειδή σειρά με τα μακροφάγα, υποθέσαμε ότι πιθανότατα και η λειτουργία της μικρογλοΐας επηρεάζεται από την έλλειψη του υποδοχέα.

Στο πλαίσιο της ανάλυσης της φλεγμονώδους απόκρισης στα διαγονιδιακά ποντίκια 5xFAD αναλύθηκε και ο δεύτερος δείκτης φλεγμονής στον εγκέφαλο, η μικρογλοΐωση. Η

ανοσοϊστοχημική μελέτη έδειξε ότι και η μικρογλοίωση είναι μειωμένη στα χωρίς LDLR ποντίκια τόσο στον ιππόκαμπο (**Εικόνα 3.8**) όσο και στο φλοιό (**Εικόνα 3.9**). Η μείωση είναι ανεξάρτητη από την APOE και ήταν εντονότερη στο φλοιό.

Ένα ενδιαφέρον φαινόμενο που παρατηρήθηκε στο θάλαμο (thalamus) των διαγονιδιακών ποντικών 5xFAD;Ldlr^{-/-} είναι η δημιουργία συγκυτίων από τανμικρογλοιακά κύτταρα που περιβάλλουν τις αμυλοειδείς πλάκες (**Εικόνα 3.10**). Εξ όσων γνωρίζουμε αυτό δεν έχει αναφερθεί βιβλιογραφικά και θα ήταν πολύ ενδιαφέρον να μελετηθεί ο ρόλος του LDLR στη δημιουργία αυτών των συγκυτίων. Το φαινόμενο παρατηρήθηκε σε όλα τα ποντίκια 5xFAD;Ldlr^{-/-} τα οποία αναλύθηκαν και απ' ό,τι φαίνεται, για τη δημιουργία τους είναι απαραίτητη η APOE, δεδομένου ότι τα 5xFAD;ApoE^{-/-};Ldlr^{-/-} δεν είχαν αυτούς τους σχηματισμούς.

Σε μια μελέτη υπερέκφρασης του υποδοχέα στο διαγονιδιακό μοντέλο τύπου Alzheimer APP^{swe}/PSEN1^{ΔE9} (Kim et al., 2009b) δείχθηκε ότι η υπερέκφραση του LDLR οδήγησε στη μείωση της φλεγμονώδους αντίδρασης στον εγκέφαλο. Το αποτέλεσμα αυτό που είναι αντίθετο με τα δικά μας ευρήματα, πιθανότατα οφείλεται σε δύο λόγους: αφενός στη δραματική μείωση των αμυλοειδών πλακών που παρατηρείται στα διαγονιδιακά αυτά ποντίκια (50-80% ανάλογα με την περιοχή του εγκεφάλου και το φύλο των ζώων που αναλύθηκαν) και αφετέρου στο γεγονός ότι ο LDLR εκφράζεται εκτοπικά υπό τον έλεγχο του υποκινητή του *Prion* ο οποίος οδηγεί σε υπερέκφραση του διαγονιδίου από νευρώνες και αστροκύτταρα. Τα αποτελέσματα που αναλύονται στη μελέτη από τους Kim και συνεργάτες (Kim et al., 2009b) είναι από ποντίκια που υπερεκφράζουν τον LDLR τουλάχιστον δύο φορές περισσότερο από το φυσιολογικό ενώ, όπως προαναφέρθηκε, η έκφραση του LDLR από τους νευρώνες είναι φυσιολογικά πολύ χαμηλή. Από τα παραπάνω συμπεραίνεται ότι οποιαδήποτε μεταβολή των επιπέδων του LDLR από την ιδανική τους αναλογία και τοπολογία, έχει δραματική επίπτωση στη φλεγμονή του νευρικού συστήματος που υπάρχει στα διαγονιδιακά ποντίκια με παθολογία τύπου AD.

Συνοψίζοντας, τα αποτελέσματα από το πρώτο σκέλος της διατριβής καταδεικνύουν το σημαντικό ρόλο του LDLR στην εναπόθεση των αμυλοειδών πλακών, η οποία συνοδεύεται από αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων της APOE. Επίσης φαίνεται ο σημαντικός ρόλος του υποδοχέα στην απομάκρυνση του Αβ από τον εγκέφαλο καθώς και στη φλεγμονώδη απόκριση από τα κύτταρα της γλοίας που συνοδεύει την παθολογία τύπου Alzheimer.

4.7. Το διαγονιδιακό ποντίκι TTRI-huApoE4 εκφράζει την ανθρώπινη APOE4 μόνο στην περιφέρεια και όχι στον εγκέφαλο

Η APOE είναι μια πολυμορφική διαλυτή πρωτεΐνη, η οποία ανήκει στην οικογένεια των απολιποπρωτεϊνών (Mahley and Rall, 2000). Στον άνθρωπο υπάρχουν τρία αλληλόμορφα του γονιδίου της *ApoE*, τα *ApoE2*, *ApoE3* και *ApoE4*, τα οποία διαφέρουν στα αμινοξέα 112 και 158 και έχουν διαφορετικές βιοχημικές και μοριακές ιδιότητες (Zannis and Cohen, 2000).

Η APOE παράγεται κυρίως στο ήπαρ και τον εγκέφαλο και προσδένεται σε όλα τα μέλη της υπερικογένειας των LDLR που εκφράζονται στον εγκέφαλο (Beffert et al., 2004, Herz and Beffert, 2000, Herz and Bock, 2002). Η APOE συμμετέχει στην αντίστροφη μεταφορά χοληστερόλης στα παρεγχυματικά ηπατοκύτταρα προς αποικοδόμησή της και στη διατήρηση της ομοιόστασης της χοληστερόλης στα κύτταρα. Επιπλέον, η APOE έχει πιθανή αντι-αθηρογενετική δράση αποτρέποντας το σχηματισμό αφρωδών κυττάρων στις αθηρωματικές πλάκες (Greenow et al., 2005).

Η APOE είναι απαραίτητη για το φυσιολογικό μεταβολισμό της χοληστερόλης και οποιαδήποτε απόκλιση από τη φυσιολογική λειτουργία της πρωτεΐνης έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση υπερχοληστεριναιμίας (Mahley et al., 1999) και καρδιαγγειακής νόσου (Davignon et al., 1988, Menzel et al., 1983, Stengard et al., 1995, Utermann et al., 1984, Utermann et al., 1982). Η δράση της APOE εξαρτάται την ισομορφή και από τα επίπεδα της πρωτεΐνης στο πλάσμα. Η απουσία της APOE, τα υψηλά επίπεδα της απολιποπρωτεΐνης στο πλάσμα ή η παρουσία των μη «φυσιολογικών» αλληλομόρφων *ApoE2* και *ApoE4* οδηγούν σε αυξημένη πιθανότητα ανάπτυξης καρδιαγγειακών προβλημάτων και αθηροσκλήρωσης (Mahley and Rall, 2000).

Στο ΚΝΣ η APOE εκφράζεται και εκκρίνεται κυρίως από τα αστροκύτταρα και μεταφέρει χοληστερόλη και λιπίδια στους νευρώνες μέσω των μελών της υπερικογένειας των LDLR (Han, 2004). Επιπρόσθετα, παίζει σημαντικό ρόλο στους μηχανισμούς επιδιόρθωσης και αναγέννησης των νευρώνων (Hatters et al., 2006, Mahley and Rall, 2000). Πολυμορφισμοί της *ApoE* και ιδιαίτερα η παρουσία του αλληλόμορφου *ApoE4* έχουν ενοχοποιηθεί για την εμφάνιση της σποραδικής μορφής της AD (Corder et al., 1993, Diedrich et al., 1991) και τη μείωση της ηλικίας εμφάνισης της αμυοτροφικής πλευρικής σκλήρυνσης (amyotrophic lateral sclerosis, ALS) (Drory et al., 2001, Gaillard et al., 1998, Li et al., 2004, Moulard et al., 1996, Zetterberg et al., 2008). Το αλληλόμορφο *ApoE2*, που είναι

προστατευτικό για την AD, είναι παράγοντας κινδύνου για την εμφάνιση της νόσου του Parkinson (de Lau et al., 2005, Huang et al., 2004a, Williams-Gray et al., 2009). Οι φορείς *ApoE4* έχουν κακή πρόγνωση μετά από ανεύρυσμα ή εγκεφαλικό τραύμα, αλλά και φτωχή έκβαση με πιο συχνή εμφάνιση μόνιμης αναπηρίας, CAA και θανάτου (Alberts et al., 1995, Friedman et al., 1999, Jordan et al., 1997, Leclercq et al., 2002, McCarron et al., 1999a, McCarron et al., 1999b, Niskakangas et al., 2001, Teasdale et al., 1997). Οι μελέτες αυτές αποδεικνύουν το σημαντικό ρόλο της APOE στον εγκέφαλο και στις νευροεκφυλιστικές νόσους.

Το αλληλόμορφο *ApoE4* είναι, όπως αναφέρθηκε, ο σημαντικότερος παράγοντας κινδύνου εμφάνισης της νόσου του Alzheimer (Zhong and Weisgraber, 2009). Ο ρόλος του αλληλομόρφου *ApoE4* στη νόσο Alzheimer έχει μελετηθεί με τη χρήση διαγονιδιακών μοντέλων ποντικών κι έχουν κατασκευαστεί αρκετά μοντέλα που εκφράζουν τα τρία αλληλόμορφα της ανθρώπινης APOE στον εγκέφαλο (Buttini et al., 1999, Buttini et al., 2002, Holtzman et al., 1999) καθώς και μοντέλα που εκφράζουν τα ανθρώπινα αλληλόμορφα σε όλους τους ιστούς υπό τα ρυθμιστικά στοιχεία του ενδογενούς υποκινητή της μ ApoE (*ApoE-TR*) (Hamanaka et al., 2000, Sullivan et al., 2004) (**πίνακας 1**).

Η σημαντικότητα της προερχόμενης από τον εγκέφαλο APOE στην παθογένεση της νόσου του Alzheimer και γενικά στην ομοιόσταση του εγκεφάλου έχει αποδειχθεί. Σε καμία έρευνα, όμως, δεν έχει μελετηθεί ο ρόλος της προερχόμενης από τους περιφερικούς ιστούς APOE4, οπότε κρίθηκε απαραίτητη η διελεύκανση του ρόλου της στην παθογένεση της AD. Για την ολοκλήρωση του δεύτερου σκέλους της παρούσας διατριβής, ήταν απαραίτητη η δημιουργία ενός διαγονιδιακού μοντέλου ποντικού που να εκφράζει το αλληλόμορφο *ApoE4* της ανθρώπινης *ApoE* (*huApoE4*) παντού εκτός από τον εγκέφαλο (περιφέρεια). Έτσι, κλωνοποιήσαμε το γονίδιο της *ApoE4* καταρροϊκά του υποκινητή της τρανσθυρετίνης του ποντικού (**Εικόνες 3.11-3.14**) (Yan et al., 1990), ο οποίος εξασφαλίζει έκφραση του διαγονιδίου στο ήπαρ (**Εικόνα 3.14**). Στη συνέχεια προχωρήσαμε στη δημιουργία των διαγονιδιακών ποντικών TTRI-*huApoE4* και ανιχνεύσαμε δύο διαγονιδιακά ποντίκια-ιδρυτές, το Fo(L198) (**Εικόνα 3.15**) και το Fo(L653) (**Εικόνα 3.16**). Το διαγονιδιακό ποντίκι Fo(L198) είχε δύο περιοχές ενσωμάτωσης του διαγονιδίου οι οποίες διαχωρίστηκαν στην πρώτη θυγατρική γενιά (F1), με τους μισούς περίπου απογόνους να έχουν υψηλό και τους άλλους μισούς χαμηλό αριθμό αντιγράφων του διαγονιδίου (**Εικόνα 3.17**). Οι σειρές αυτές

διαχωρίστηκαν για τις ανάγκες της ανάλυσης σε Tg(L198-High) και Tg(L198-Low) αντίστοιχα και εξετάστηκαν ξεχωριστά.

Η ανάλυση των επιπέδων έκφρασης του mRNA έδειξε ότι και οι τρεις διαγονιδιακές σειρές εκφράζουν υψηλά επίπεδα mRNA της ανθρώπινης ApoE4 στο ήπαρ και τους σιελογόνους αδένες. Η έκφραση του mRNA ακολουθεί το πρότυπο έκφρασης του υποκινητή TTRI όπως αυτό έχει δημοσιευτεί (Yan et al., 1990) (**Εικόνες 3.18-3.21**). Η έκφραση της ανθρώπινης ApoE4 στο ήπαρ των σειρών Tg(L198-High) και Tg(L653) είναι κατά 30% και 20% αντίστοιχα περισσότερη από αυτήν της ενδογενούς ApoE του ποντικού (**Εικόνες 3.20-3.21**).

Ακολούθως, τα διαγονιδιακά ποντίκια των σειρών Tg(L198-High) και Tg(L653) διασταυρώθηκαν με ποντίκια ApoE^{-/-} για να αποκλειστεί η επίδραση της ενδογενούς APOE και εξετάστηκε η παρουσία της APOE4 και τα επίπεδα της χοληστερόλης στον ορό του αίματός τους. Σε αυτά τα ποντίκια βρέθηκε ότι τα επίπεδα της APOE4 στην κυκλοφορία είναι επαρκώς υψηλά (**Εικόνα 3.22**) ώστε να μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη μελέτη της επίδρασης της στην παθογένεση της νόσου Alzheimer. Ανάλυση των επιπέδων της χοληστερόλης έδειξε ότι τα ποντίκια αυτά έχουν φυσιολογικά επίπεδα στον ορό του αίματος και αυτά είναι μειωμένα σε σχέση με το ApoE^{-/-} ποντίκι το οποίο είναι υπερχοληστεριναιμικό (Piedrahita et al., 1992) (**Εικόνα 3.23**).

Για την περαιτέρω ανάλυση του νέου αυτού διαγονιδιακού μοντέλου το οποίο κατασκευάσαμε, επιλέχθηκε η διαγονιδιακή σειρά L198. Για να εξακριβωθεί η ιστοειδικότητα της έκφρασης της πρωτεΐνης, ακολουθήσαμε δύο πειραματικές προσεγγίσεις. Κατά την πρώτη, έγινε ανοσοϊστοχημική μελέτη για την ανθρώπινη APOE4 και διαπιστώθηκε ότι αυτή εκφράζεται μόνο στο ήπαρ των διαγονιδιακών ποντικών TTRI-huApoE4;ApoE^{-/-} (**Εικόνα 3.24A-Δ**). Κατά τη δεύτερη πειραματική προσέγγιση, έγινε οργανοτυπική καλλιέργεια εγκεφάλου διαγονιδιακού ποντικού TTRI-huApoE4;ApoE^{-/-} και επιβεβαιώθηκε ότι δεν παράγεται και δεν εκκρίνεται ανθρώπινη APOE4 από τον εγκέφαλο των διαγονιδιακών ποντικών TTRI-huApoE4;ApoE^{-/-} (**Εικόνα 3.24ΣΤ**). Με αυτό τον τρόπο επιβεβαιώσαμε ότι το διαγονιδιακό μοντέλο ποντικού που κατασκευάσαμε μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη της από την περιφέρεια προερχόμενης APOE4 στην παθογένεση της νόσου του Alzheimer.

4.8. Τα μακροφάγα του διαγονιδιακού μοντέλου ποντικού TTRI-huApoE4 εκφράζουν υψηλές ποσότητες της ανθρώπινης APOE4 ανεξάρτητα από την ενεργοποίησή τους

Ως γνωστόν τα μακροφάγα των φυσικού τύπου ποντικών εκφράζουν σε υψηλά επίπεδα την APOE (Basu et al., 1981). Τα μακροφάγα και η APOE που προέρχεται από αυτά παίζουν σημαντικό ρόλο στην αθηροσκλήρωση (Brown and Goldstein, 1983). Τα ApoE^{-/-} ποντίκια είναι υπερχοληστεριναιμικά και αναπτύσσουν αθηρωματικές πλάκες ακόμα και με φυσιολογική δίαιτα (Maeda, 2011). Επίσης, ποντίκια που εκφράζουν APOE που προέρχεται μόνο από μακροφάγα, είναι προστατευμένα από την αθηροσκλήρωση παρόλο που είναι υπερχοληστεριναιμικά (Bellosta et al., 1995a). Αντίστοιχα, ποντίκια φυσικού τύπου που εκφράζουν APOE σε όλους τους ιστούς εκτός από τα μακροφάγα, μετά από ακτινοβολία και μεταμόσχευση μυελού των οστών από ποντίκια ApoE^{-/-}, είναι πιο επιρρεπή στην αθηροσκλήρωση από τα φυσικού τύπου στα οποία δόθηκε μυελός των οστών από ApoE^{+/+} (Fazio et al., 1997). Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα που δείχνουν τη σημαντικότητα της έκφρασης της APOE από τα μακροφάγα, προχωρήσαμε στην ανάλυση των κυττάρων αυτών στο διαγονιδιακό μοντέλο TTRI-huApoE4;ApoE^{-/-}. Τα μακροφάγα απομονώθηκαν και καλλιεργήθηκαν με LPS που τα ενεργοποιεί και τα μετατρέπει σε προ-φλεγμονώδη τύπου μακροφάγα (M1) (Martinez et al., 2008). Με πειράματα ανοσοσύτωσης δείξαμε ότι τα μακροφάγα του διαγονιδιακού ποντικού TTRI-huApoE4 παράγουν ανθρώπινη APOE4 και ότι τα επίπεδά της δεν αλλάζουν μετά από προσθήκη LPS (**Εικόνα 3.25**). Εξ' όσων γνωρίζουμε, αυτή είναι η πρώτη φορά που δείχνεται ότι ο υποκινητής TTRI κατευθύνει έκφραση του διαγονιδίου από μακροφάγα.

4.9. Η ενεργοποιημένη μικρογλοία των διαγονιδιακών ποντικών TTRI-huApoE4 δεν εκφράζει την ανθρώπινη APOE4 μετά από συστηματική χορήγηση LPS

Τα μακροφάγα και η μικρογλοία προέρχονται, όπως έχει αναφερθεί, από την ίδια μυελοειδή σειρά (Ginhoux et al., 2010). Προηγούμενες έρευνες έδειξαν ότι με τη χρήση μεγάλων δόσεων LPS προκαλείται φλεγμονή στον εγκέφαλο που έχει ως αποτέλεσμα ενεργοποίηση της μικρογλοίας και αύξηση των προφλεγμονωδών κυτοκινών σε αυτόν (Chung et al., 2009, Masocha, 2009, Thompson et al., 2008).

Για να διαπιστωθεί αν τα μικρογλοιακά κύτταρα των ποντικών TTRI-huApoE4 εκφράζουν APOE4, εξετάστηκαν εγκέφαλοι μετά από επαγωγή συστηματικής φλεγμονής με LPS και φανερώθηκε ότι η μικρογλοία των διαγονιδιακών ποντικών TTRI-huApoE4;ApoE^{-/-}

και των φυσικού τύπου ποντικών ενεργοποιήθηκε πολύ περισσότερο από τη μικρογλοία των ApoE^{-/-} (**Εικόνα 3.26**). Σε προηγούμενες μελέτες δείχθηκε ότι η έλλειψη της APOE προκαλεί μειωμένη ενεργοποίηση των μακροφάγων σε ποντίκια ApoE^{-/-} (de Bont et al., 1999, Van Oosten et al., 2001). Μέχρι τη στιγμή που γραφόταν η παρούσα διατριβή, είχε γίνει μόνο μία μελέτη στην επαγόμενη από LPS φλεγμονή στον εγκέφαλο των ποντικών ApoE^{-/-} όπου είχε αναλυθεί μόνο η αστροκυττάρωση (Ophir et al., 2003). Τα αποτελέσματά μας δείχνουν για πρώτη φορά *in vivo* ότι η έλλειψη της APOE μειώνει την επαγωγή της ενεργοποίησης της μικρογλοίας από το LPS. Επίσης, με αυτό το πείραμα επιβεβαιώνεται ότι η μικρογλοία των TTRI-huApoE4;ApoE^{-/-} ποντικών δεν εκφράζει APOE4 (**Εικόνα 3.26**).

Συνοψίζοντας τα αποτελέσματα από την ανάλυση του διαγονιδιακού ποντικού, κατασκευάσαμε ένα γενετικά τροποποιημένο μοντέλο που εκφράζει την ανθρώπινη APOE4 σε υψηλά επίπεδα αποκλειστικά στην περιφέρεια και όχι στον εγκέφαλο. Ανάλυση του μοντέλου TTRI-huApoE4 έδειξε ότι τα μακροφάγα του εκφράζουν την ανθρώπινη APOE4 ανεξάρτητα από την ενεργοποίησή τους από LPS. Επίσης, η μικρογλοία αυτού του ποντικού δεν εκφράζει huAPOE4 μετά από επαγωγή φλεγμονής στον εγκέφαλο από LPS. Αυτό υποδηλώνει ότι ο υποκινητής TTRI εκφράζεται μόνο από ώριμα και διαφοροποιημένα μακροφάγα και όχι από όλη τη μυελοειδή σειρά που δίνει γένεση στα μακροφάγα και στη μικρογλοία.

4.10. Η προερχόμενη από την περιφέρεια έκφραση της APOE4 οδηγεί σε αύξηση των αμυλοειδών πλακών, σε αλλαγή του προτύπου εναπόθεσης του Αβ και σε αύξηση των επιπέδων Αβ₄₂ απουσία της ενδογενούς APOE

Σύμφωνα με την υπόθεση του καταρράκτη του αμυλοειδούς η συσσωμάτωση του Αβ είναι το αρχικό βήμα το οποίο προκαλεί την έναρξη της AD (Hardy and Selkoe, 2002). Στον εγκέφαλο των ασθενών με Alzheimer ή με Creutzfeldt-Jakob η APOE συνεντοπίστηκε με τις αμυλοειδείς πλάκες και με τα νευροϊνιδιακά δεμάτια (Kordek et al., 1999, Namba et al., 1991). Ο σημαντικός ρόλος της APOE στην εναπόθεση και τη συσσωμάτωση του Αβ φανερώθηκε από τη μελέτη των Bales και συνεργατών, στην οποία ποντίκια ApoE^{-/-} τα οποία διασταυρώθηκαν με το διαγονιδιακό μοντέλο PDAPP δεν είχαν καθόλου αμυλοειδείς πλάκες (Bales et al., 1997). Το αποτέλεσμα αυτό επιβεβαιώθηκε και σε άλλα γενετικά τροποποιημένα μοντέλα ποντικών με παθολογία τύπου AD που εκφράζουν διαφορετικές μεταλλαγμένες μορφές της ανθρώπινης APP (Bales et al., 1999, Buttini et al., 1999, Buttini

et al., 2002, Costa et al., 2004, DeMattos et al., 2004, Fagan et al., 2002, Holtzman et al., 2000a, Holtzman et al., 1999, Holtzman et al., 2000b).

Οι ανθρώπινες ισομορφές της APOE έχουν διαφορετικό ρόλο στην εμφάνιση αλλά και στην εξέλιξη της νόσου και ομοζυγωτία για την *ApoE4* στον άνθρωπο συσχετίζεται με αυξημένο σχηματισμό αμυλοειδών πλακών (Bales et al., 2002, Schmechel et al., 1993). Μία υπόθεση ήταν ότι τα επίπεδα της APOE στο ENY και στο παρέγχυμα του εγκεφάλου διαφέρουν ανάλογα με την ισομορφή η οποία εκφράζεται. Παλαιότερες μελέτες σε εγκεφάλους και σε ENY ασθενών έδωσαν αντικρουόμενα αποτελέσματα (Landen et al., 1996, Lefranc et al., 1996, Lehtimaki et al., 1995, Lindh et al., 1997, Mulder et al., 1998) και σε μια πρόσφατη, πιο εκτεταμένη μελέτη, δε βρέθηκε καμία διαφορά στα επίπεδα της APOE στο ENY μεταξύ ατόμων χωρίς άνοια και εκείνων με άνοια (Wahrle et al., 2007). Δυστυχώς, από αυτές τις μελέτες δεν μπορούν να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα λόγω του μικρού αριθμού εγκεφάλων οι οποίοι είναι διαθέσιμοι για βιοχημικές αναλύσεις.

Μελέτες στα γενετικά τροποποιημένα ποντίκια *ApoE-TR* τα οποία εκφράζουν τις ισομορφές της *huAPOE* αντί της *muAPOE*, έδειξαν ότι τα επίπεδα της πρωτεΐνης στον εγκέφαλο και το ENY των ποντικών *ApoE-TR* διέφεραν και τα *ApoE2-TR* είχαν τα υψηλότερα και τα *ApoE4-TR* τα χαμηλότερα επίπεδα (Fryer et al., 2005a, Mann et al., 2004, Ramaswamy et al., 2005, Riddell et al., 2008, Vitek et al., 2009). Όταν τα ποντίκια αυτά διασταυρώθηκαν με το μοντέλο PDAPP και εξετάστηκαν πριν από την έναρξη του σχηματισμού των αμυλοειδών πλακών, τα νεαρά ποντίκια PDAPP;*ApoE4-TR* είχαν τα υψηλότερα επίπεδα διαλυτού $A\beta_{42}$ (Bales et al., 2009). Σε μεγαλύτερη ηλικία είχαν επιπλέον αυξημένο σχηματισμό αμυλοειδών πλακών (Bales et al., 2009) και μειωμένα επίπεδα APOE στο πλάσμα, τον εγκέφαλο και το ENY σε σχέση με τα ποντίκια PDAPP;*ApoE3-TR* και τα PDAPP;*ApoE2-TR* ίδιας ηλικίας (Bales et al., 2009, Riddell et al., 2008). Έχει δειχθεί, επίσης, ότι η ανθρώπινη APOE4 προάγει το σχηματισμό ινιδιακού $A\beta$ περισσότερο απ' ό,τι η APOE3 (Bales et al., 2002, Bales et al., 1999, Holtzman et al., 2000a). Από τα παραπάνω συμπεραίνεται ότι η διαθέσιμη ποσότητα και η ισομορφή της APOE επηρεάζουν την εναπόθεση του $A\beta$.

Στις προαναφερόμενες μελέτες, εξετάστηκε είτε η απουσία της APOE από όλους τους ιστούς είτε η παρουσία της στον εγκέφαλο. Στην παρούσα μελέτη, στόχος ήταν να αναλυθεί η επίδραση της από την περιφέρεια προερχόμενης APOE4 στην παθογένεση και την εξέλιξη της νόσου. Για την επίτευξη αυτού του στόχου, επιλέξαμε να αναλύσουμε δύο

ομάδες ζώων ηλικίας δύο και τεσσάρων μηνών αντίστοιχα. Η πρώτη επιλέχθηκε επειδή στην ηλικία των δύο μηνών πρωτοεμφανίζεται η εναπόθεση των πλακών και η φλεγμονώδης απόκριση (Oakley et al., 2006). Η δεύτερη επιλέχθηκε επειδή τότε τα ποντίκια έχουν πλήρη ανάπτυξη της παθολογίας τύπου Alzheimer (Αβ, αμυλοειδείς πλάκες, μικρογλοίωση και αστροκυττάρωση). Οι ομάδες ανάλυσης ήταν: 5xFAD, 5xFAD;ApoE-/- (δεν έχουν την ενδογενή APOE) και 5xFAD;TTRI-huApoE4;ApoE-/- (εκφράζουν την ανθρώπινη APOE4 μόνο στην περιφέρεια, απουσία της ενδογενούς APOE).

Στην ηλικία των δύο μηνών, μόνο τα ποντίκια 5xFAD είχαν έντονο σχηματισμό πλακών (**Εικόνα 3.27Α-Γ**). Ποσοτικοποίηση της επιφάνειας που καλύπτεται από αμυλοειδείς πλάκες επιβεβαίωσε τα παραπάνω για τον ιππόκαμπο (**Εικόνα 3.28Α**) αν και δε βρέθηκε σημαντική διαφορά στο φλοιό (**Εικόνα 3.28Γ**). Στην ηλικία των τεσσάρων μηνών, τα διαγονιδιακά ποντίκια 5xFAD;TTRI-huApoE4;ApoE-/- είχαν πολύ περισσότερες πλάκες από τα 5xFAD;ApoE-/- τόσο στο φλοιό όσο και στον ιππόκαμπο (**Εικόνα 3.27Δ-ΣΤ**). Όπως αναμενόταν, τα ποντίκια με την ενδογενή APOE είχαν τον πιο έντονο σχηματισμό αμυλοειδών πλακών από όλες τις ομάδες ανάλυσης. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώθηκαν και με ποσοτικοποίηση της ποσοστιαίας κάλυψης από αμυλοειδείς πλάκες (**Εικόνα 3.28Β και Δ**). Από τα παραπάνω αποτελέσματα προκύπτει ότι η περιφερική έκφραση της APOE4, σε ποντίκια στα οποία λείπει η ενδογενής APOE, αυξάνει το σχηματισμό αμυλοειδών πλακών στο διαγονιδιακό μοντέλο 5xFAD.

Στο μοντέλο αυτό, όπως και στα άλλα μοντέλα Alzheimer, η εναπόθεση εξαρτάται κατά κύριο λόγο από την έκφραση ή όχι της ενδογενούς APOE. Ο σχηματισμός των πλακών μειώνεται πάρα πολύ απουσία του συγκεκριμένου γονιδίου. Ο λόγος για τον οποίο υπάρχει σχηματισμός αμυλοειδών πλακών σε αυτό το μοντέλο ακόμα και απουσία της ενδογενούς APOE, είναι, όπως προαναφέρθηκε, η παρουσία των τριών μεταλλαγών για την APP και των δύο μεταλλαγών για την PSEN. Η αύξηση της παραγωγής του πιο αμυλοειδογενούς $A\beta_{42}$ και συνεπακόλουθα της αναλογίας $A\beta_{42}/A\beta_{40}$ σε σχέση με τα άλλα μοντέλα που έχουν χρησιμοποιηθεί στο παρελθόν για τη μελέτη της APOE (Bales et al., 1999, Bales et al., 1997, Holtzman et al., 2000b) εξηγεί τις διαφορές οι οποίες παρατηρούνται μεταξύ αυτών των μοντέλων και του δικού μας. Σε μοντέλα τα οποία εκφράζουν εκτός από μια μεταλλαγμένη μορφή της huAPP και μια μεταλλαγμένη μορφή της ανθρώπινης PSEN, όπως τα μοντέλα TgSWDI και APP/PS1, τα ApoE-/- σχηματίζουν αμυλοειδείς πλάκες, όπως το δικό μας μοντέλο, αλλά πάντα σε πολύ μικρότερο βαθμό από τα ποντίκια τα οποία φέρουν την

ενδογενή APOE (Costa et al., 2004, Miao et al., 2005, Van Dooren et al., 2006, Xu et al., 2008). Τα παραπάνω επιβεβαιώνουν ότι κι άλλες πρωτεΐνες παίζουν ρόλο στη συσσωμάτωση του Αβ εκτός από την APOE, όπως η α1-αντιχυμοτροψίνη (α1-antichymotrypsin, α1-ACT) (Ma et al., 1994, Nilsson et al., 2004, Potter et al., 2001) και η APOJ (DeMattos et al., 2004).

Η πρόσδεση της APOE στο Αβ εξαρτάται από το βαθμό λιπιδίωσής της. Αρχικές μελέτες *in vitro* έδειξαν ότι η APOE σχηματίζει σταθερά στην αποδιάταξη από SDS συμπλέγματα με το Αβ και επίσης, ότι η μη λιπιδιωμένη APOE4 προσδένεται στο Αβ πιο γρήγορα από όσο η APOE3 (Sanan et al., 1994, Strittmatter et al., 1993b). Όταν η APOE είναι προσδεμένη με λιποπρωτεΐνες, τότε οι APOE2 και APOE3 σχηματίζουν πιο σταθερά συμπλέγματα με το Αβ σε σχέση με την APOE4 (APOE2>APOE3>>APOE4) (Aleshkov et al., 1997, LaDu et al., 1994, Tokuda et al., 2000, Yang et al., 1997). Υπό φυσιολογικές συνθήκες, η APOE στον εγκέφαλο λιπιδιώνεται από τον μεταφορέα ABCA1 (Wahrle et al., 2004). Η APOE προσδένει το Αβ μέσω του καρβοξυτελικού της άκρου που είναι και η περιοχή πρόσδεσης στις λιποπρωτεΐνες, με αποτέλεσμα το πεπτίδιο να εντοπίζεται μέσα στο λιπιδικό περιβάλλον του σωματιδίου της λιποπρωτεΐνης (Iurescia et al., 2010, Strittmatter et al., 1993a, Strittmatter et al., 1993b). Με αυτό το μηχανισμό, επάγεται προστασία από τη νευροτοξικότητα που προκαλεί το πεπτίδιο και η ισχυρή πρόσδεση της APOE3 σε σχέση με την APOE4 μειώνει το κυτταρικό θάνατο που προκαλείται από το Αβ (Jordan et al., 1998, LaDu et al., 1994, LaDu et al., 1995).

Στον εξωκυττάριο χώρο, όπως προαναφέρθηκε, η APOE προσδένεται στο διαλυτό Αβ ανάλογα με την ισομορφή (APOE2>APOE3>APOE4). Στον αιματοεγκεφαλικό φραγμό το διαλυτό Αβ μεταφέρεται πρωταρχικά από το μεσοκυττάριο υγρό στην κυκλοφορία του αίματος από τον LRP-1 και την Pgp (Cirrito et al., 2005, Zlokovic, 2008) αλλά και από τον LDLR όπως δείξαμε στην παρούσα διατριβή. Η πρόσδεση του Αβ στη λιπιδιωμένη APOE αλλάζει τη συγγένειά της για τους υποδοχείς της οικογένειας LDLR (Hone et al., 2005, Martins et al., 2006). Η APOE, επίσης, μειώνει την κάθαρση του Αβ από τον εγκέφαλο μέσω του αιματοεγκεφαλικού φραγμού ανάλογα με την ισομορφή (APOE4>APOE3>APOE2) (Bell et al., 2007, Deane et al., 2008, Ito et al., 2007). Η συγκέντρωση των συμπλεγμάτων APOE-Αβ στο μεσοκυττάριο υγρό στον εγκέφαλο ποντικών ApoE4-TR βρέθηκαν αυξημένα σε σχέση με τη συγκέντρωση στα ApoE2-TR και τα ApoE3-TR, επιβεβαιώνοντας ότι η ισομορφή της APOE επηρεάζει τους μηχανισμούς απομάκρυνσης του Αβ (Castellano et al., 2011). Με

βάση τα παραπάνω, είναι πλέον ευρέως αποδεκτό ότι η APOE έχει ανάμιξη: α) στους μηχανισμούς εναπόθεσης και β) στους μηχανισμούς κάθαρσης του πεπτιδίου Αβ από τον εγκέφαλο.

Για να διαπιστωθεί εάν η έκφραση της APOE μόνο στην περιφέρεια επηρεάζει αυτούς τους μηχανισμούς, αναλύσαμε τα ποντίκια με τις μεθόδους της ανοσοϊστοχημείας και της ELISA. Η ανοσοϊστοχημική μελέτη στους εγκεφάλους των ζώων έδειξε ότι στην ηλικία των δύο μηνών δεν υπάρχει καμιά ουσιαστική διαφορά στο πρότυπο εναπόθεσης του ολικού Αβ (**Εικόνα 3.29Α-Γ**) και το αμυλοειδές βρίσκεται κυρίως ενδονευρωνικά. Αντίθετα, στους τέσσερις μήνες, ηλικία κατά την οποία υπάρχει έντονη αύξηση του σχηματισμού αμυλοειδών πλακών, το πρότυπο εναπόθεσης του Αβ στον ιππόκαμπο είναι διαφορετικό ανάμεσα στους τρεις γονότυπους. Τα ποντίκια 5xFAD;TTRI-huApoE4;ApoE-/-, έχουν διάχυτο πρότυπο εναπόθεσης όπως τα 5xFAD;ApoE-/-, παρόλα αυτά, η χωροταξική κατανομή του Αβ μοιάζει με το πρότυπο εναπόθεσης των 5xFAD που έχουν την ενδογενή APOE (**Εικόνα 3.29Δ-ΣΤ**). Από τα παραπάνω συμπεραίνεται ότι η APOE είναι ένας από τους καταλυτικούς παράγοντες που διέπουν το σχηματισμό αμυλοειδών ή διάχυτων πλακών, αλλά το χωροταξικό πρότυπο δεν καθορίζεται από αυτήν.

Η βιοχημική ανάλυση με ELISA έδειξε ότι τα 5xFAD;ApoE-/- έχουν το περισσότερο μη συσσωματωμένο σε πλάκες Αβ₄₂ (διαλυτό Αβ, **Εικόνα 3.30Α**) και το λιγότερο συσσωματωμένο σε πλάκες Αβ₄₂ από όλες τις ομάδες ανάλυσης (μη διαλυτό Αβ, **Εικόνα 3.30Β**). Τα ποντίκια 5xFAD;TTRI-huApoE4;ApoE-/- έχουν στατιστικά σημαντική αύξηση των επιπέδων Αβ στο κλάσμα των πρωτεϊνών που αντιστοιχεί στις αμυλοειδείς πλάκες σε σχέση με τα 5xFAD;ApoE-/- (**Εικόνα 3.30Β**). Από αυτό συνάγεται ότι η περιφερική έκφραση της APOE4 οδηγεί σε αύξηση των επιπέδων του Αβ₄₂ στο ApoE-/- γενετικό υπόβαθρο. Αυτό μπορεί να οφείλεται είτε σε αυξημένη εναπόθεση είτε σε μειωμένη κάθαρση του Αβ από τον εγκέφαλο των ζώων 5xFAD;TTRI-huApoE4;ApoE-/-.

4.11. Τα επίπεδα των β-CTF μειώνονται στο διαγονιδιακό μοντέλο 5xFAD απουσία της ενδογενούς APOE του ποντικού με περαιτέρω μείωσή τους από την περιφερική έκφραση της ανθρώπινης APOE4

Όπως προαναφέρθηκε στην ενότητα 4.4, η APP βρίσκεται σε περιοχές πλούσιες σε λιπίδια (Ehehalt et al., 2003). Η απουσία της APOE δεν επηρεάζει τη χοληστερόλη του εγκεφάλου στα ποντίκια ApoE-/- (Quan et al., 2003) αλλά προκαλεί αλλαγές στη σύσταση

και στη δομή της διπλοστοιβάδας στην πλασματική μεμβράνη των συνάψεων (Igbavboa et al., 1997). Η στενή σχέση της APOE και της APP έχει αποδειχθεί από τους Liu και συνεργάτες οι οποίοι έδειξαν ότι η APOE μειώνεται απουσία της APP (Liu et al., 2007).

Για να διευκρινιστεί εάν οι διαφορές στα επίπεδα του Αβ που παρατηρήσαμε στα ποντίκια 5xFAD;TTRI-huApoE4;ApoE-/- σε σχέση με τα 5xFAD;ApoE-/- οφείλονται σε αύξηση των επιπέδων της APP ή σε αλλαγή στην πρωτεόλυση της, έγινε ανάλυση των πρωτεϊνικών επιπέδων της APP και των καρβοξυτελικών της θραυσμάτων με ανοσοσύτρωμα. Βρέθηκε ότι δεν υπάρχει αλλαγή στα επίπεδα της ολικής APP ή των α-CTF, αλλά υπάρχει μείωση στα επίπεδα των β-CTF στα 5xFAD;ApoE-/- και περαιτέρω μείωση στα 5xFAD;TTRI-huApoE4;ApoE-/- (**Εικόνα 3.31**). Από τα παραπάνω συμπεραίνεται ότι η παρουσία της APOE στον εγκέφαλο είναι καταλυτικός παράγοντας για την πρωτεόλυση της APP από τη β-εκκριτάση, η οποία λαμβάνει χώρα στα ενδοσώματα και στο σύμπλεγμα Golgi (Haass, 2004, Kaether and Haass, 2004). Τα αποτελέσματα μας φανερώνουν, επίσης, ότι στο ποντίκι TTRI-huApoE4 το μη αμυλοειδογενές μονοπάτι, κατά το οποίο η APP πρωτεολύεται αρχικά από την ADAM10 στον εξωκυττάριο χώρο, δεν επηρεάζεται εφόσον δεν παρατηρείται αλλαγή στα επίπεδα των α-CTF (Allinson et al., 2004, Hussain et al., 2003).

Εφόσον τα επίπεδα του Αβ είναι αυξημένα στα ποντίκια 5xFAD;TTRI-huApoE4;ApoE-/- ενώ τα β-CTF είναι μειωμένα σε σχέση με τα 5xFAD;ApoE-/-, συμπεραίνεται ότι η από την περιφέρεια προερχόμενη APOE4 επηρεάζει, εκτός από την εναπόθεση, την κάθαρση του πεπτιδίου από τον εγκέφαλο ή την πρωτεόλυσή του. Όπως δείχθηκε στην ενότητα 4.4, ο LDLR συμμετέχει σε μηχανισμούς απομάκρυνσης του Αβ ανεξάρτητα από την APOE. Επιπρόσθετα, ο LRP-1 απομακρύνει το Αβ από τον εγκέφαλο διαμέσου του αιματοεγκεφαλικού φραγμού μέσω πρόσδεσης των συμπλεγμάτων Αβ-APOE (Bu et al., 2006). Ο δεύτερος μηχανισμός μείωσης των επιπέδων Αβ στον εγκέφαλο είναι μέσω πρωτεόλυσής του από τη NEP και την IDE (Miners et al., 2008). Στους εγκεφάλους ασθενών με AD και CAA επιβεβαιώθηκε ότι τα επίπεδα των δύο αυτών ενζύμων είναι μειωμένα σε σχέση με υγιή άτομα της ίδιας ηλικίας. Οι ίδιες μελέτες έδειξαν, επίσης, ότι οι φορείς *ApoE2* είχαν τα υψηλότερα επίπεδα και οι φορείς *ApoE4* τα χαμηλότερα επίπεδα NEP και IDE (Miners et al., 2008, Miners et al., 2006), γεγονός που συμφωνεί με την παρουσία υψηλότερων επιπέδων Αβ στον εγκέφαλο του γενετικά τροποποιημένου ποντικού που δημιουργήσαμε. Πειράματα με ποντίκια επιβεβαίωσαν τα παραπάνω και έδειξαν ότι στα

ΑpoE4-TR επάγεται αναστολή της NEP (Sullivan et al., 2004). Επίσης, δείχθηκε ότι η λιπιδίωση της APOE επηρεάζει την αποικοδόμηση του Αβ από τη NEP και την IDE. Η λιπιδιωμένη APOE προάγει την πρωτεόλυση του Αβ από τα δύο ένζυμα, ενώ η μη λιπιδιωμένη APOE προάγει τη συσσωμάτωσή του (Jiang et al., 2008).

Σε προηγούμενη εργασία που έγινε στο μοντέλο PDAPP, δε βρέθηκε διαφορά στα β-CTF ανάμεσα στα ποντίκια με την ενδογενή ApoE και σε αυτά χωρίς το γονίδιο (DeMattos et al., 2004). Πιθανότατα η επίδραση που παρατηρείται στο μοντέλο 5xFAD οφείλεται στην υψηλότερη παραγωγή θραυσμάτων β-CTF σε σχέση με το μοντέλο PDAPP. Κατά συνέπεια, η διαφορά είναι εμφανής στο μοντέλο 5xFAD, ενώ δεν είναι σε άλλα μοντέλα με λιγότερη παραγωγή β-CTF.

Σε μια πρόσφατη μελέτη έχει δειχθεί ότι η APP, και συγκεκριμένα το ενδοκυττάριο τμήμα της (APP intracellular domain, AICD), ελέγχει το μεταβολισμό της χοληστερόλης στον εγκέφαλο μέσω του υποδοχέα LRP-1 (Liu et al., 2007). Έτσι, προχωρήσαμε στη μέτρηση της χοληστερόλης στο διαγονιδιακό μοντέλο 5xFAD το οποίο υπερεκφράζει την ανθρώπινη APP. Βρέθηκε ότι η υπερέκφραση της APP στο εν λόγω μοντέλο δεν επηρεάζει τα επίπεδα της χοληστερόλης (**Εικόνα 3.32**) και αυτή είναι στα φυσιολογικά για τον ποντικό επίπεδα.

4.12. Η έλλειψη της APOE του ποντικού οδηγεί στη μείωση των επιπέδων της APOJ στο διαγονιδιακό μοντέλο 5xFAD – Επαναφορά στα φυσιολογικά επίπεδα από την περιφερική έκφραση της huAPOE4

Η APOJ είναι μια άλλη σημαντική πρωτεΐνη που εμπλέκεται στην παθογένεση της νόσου του Alzheimer, και σύμφωνα με δύο πρόσφατες επιδημιολογικές μελέτες, οι πολυμορφισμοί που βρέθηκαν στο γονίδιο της την καθιστούν το δεύτερο μετά την ApoE γονίδιο που ταυτοποιείται επαναλαμβανόμενα ως παράγοντας κινδύνου για την AD (Harold et al., 2009, Lambert et al., 2009). Η APOJ βρίσκεται στις αμυλοειδείς πλάκες (Choi-Miura et al., 1992) και είναι αυξημένη σε περιοχές του εγκεφάλου με αυξημένη παθολογία Alzheimer (May et al., 1990). Δρα ως πρωτεΐνη-συνοδός του Αβ (Oda et al., 1994, Oda et al., 1995) και διαμεσολαβεί στην απομάκρυνση του Αβ διαμέσου του αιματο-εγκεφαλικού φραγμού (Bell et al., 2007). Επιπρόσθετα, με μελέτες *in vitro* δείχθηκε ότι ανάλογα με το ισοζύγιο Αβ και APOJ, η APOJ μπορεί είτε να αυξήσει είτε να παρεμποδίσει το σχηματισμό ινιδίων από το πεπτίδιο (Yerbury et al., 2007) αν και αναμένεται επιβεβαίωση αυτής της θεωρίας και σε ασθενείς με AD. Επιπλέον, η APOJ εμπλέκεται στους μηχανισμούς

ενδοκυττάρωσης του Αβ από τα κύτταρα της γλοίας (Bartl et al., 2001, Cole and Ard, 2000, Hammad et al., 1997).

Δεδομένου ότι είναι η δεύτερη πιο σημαντική συνοδός-πρωτεΐνη για το Αβ μετά την ΑΡΟΕ (Bell et al., 2007) προχωρήσαμε στην ανάλυση των επιπέδων της στους εγκεφάλους των διαγονιδιακών ποντικών. Η απουσία της ΑΡΟΕ στα διαγονιδιακά ποντίκια 5xFAD είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων της ΑΡΟJ στον εγκέφαλό τους. Περιφερική έκφραση της ΑΡΟΕ4 αποκατέστησε τα επίπεδα της ΑΡΟJ του εγκεφάλου στα φυσιολογικά για τον ποντικό επίπεδα (**Εικόνα 3.33**). Αυτό υποδεικνύει μία ακόμα σημαντική επίδραση της περιφερικής έκφρασης της ΑΡΟΕ4 στον εγκέφαλο των διαγονιδιακών ποντικών με παθολογία τύπου Alzheimer.

Τα αποτελέσματά μας συνάδουν με μία επιστημονική εργασία στο διαγονιδιακό μοντέλο PDAPP όπου δείχθηκε και σε αυτή ότι η απουσία της ΑΡΟΕ οδηγεί σε μείωση των επιπέδων της ΑΡΟJ στον εγκέφαλο των ποντικών PDAPP;ApoE-/- (DeMattos et al., 2004). Επίσης, στην ίδια μελέτη βρέθηκε ότι η απουσία και των δύο απολιποπρωτεϊνών (ΑΡΟΕ και ΑΡΟJ) οδηγεί στη δραματική αύξηση των επιπέδων τόσο του διαλυτού όσο και του μη διαλυτού Αβ με παράλληλη αύξηση της εναπόθεσής του. Από τα παραπάνω και με βάση και τα αποτελέσματα της δικιάς μας μελέτης, προκύπτει το συμπέρασμα ότι η ΑΡΟΕ επηρεάζει τα επίπεδα της ΑΡΟJ με προφανείς επιπτώσεις στη παθολογία τύπου Alzheimer στα διαγονιδιακά μοντέλα ποντικών AD.

4.13. Η περιφερική έκφραση της huΑΡΟΕ4 δεν αλλάζει την αστροκυττάρωση στον ιππόκαμπο των 5xFAD;TTRI-huApoE;ApoE-/- αλλά μειώνει τη μικρογλοΐωση στον εγκέφαλο των διαγονιδιακών ποντικών απουσία της ενδογενούς ΑΡΟΕ

Όπως έχει αναλυθεί στις ενότητες 4.5 και 4.6, τα αστροκύτταρα και η μικρογλοΐα είναι υπεύθυνα για την τοπική φλεγμονώδη απόκριση στο ΚΝΣ. Το Αβ προκαλεί φλεγμονώδη απόκριση από τα γλοιοκύτταρα σε καλλιέργειες και σε ιστοπαθολογικά ευρήματα από ασθενείς (Hu et al., 1998), αυξάνοντας παράλληλα την παραγωγή της ΑΡΟΕ με τελικό αποτέλεσμα τη μείωση της φλεγμονής στο ΚΝΣ (Guo et al., 2004, LaDu et al., 2001). Η αστροκυτταρικής προέλευσης ΑΡΟΕ επηρεάζει την ικανότητα φαγοκυττάρωσης του Αβ από τη μικρογλοΐα (Terwel et al., 2011). Επίσης, η έμφυτη φλεγμονώδης αντίδραση ρυθμίζεται από την ΑΡΟΕ και τον LRP-1 υποδηλώνοντας ότι η ΑΡΟΕ έχει γενική αντιφλεγμονώδη δράση στο νευρικό σύστημα (LaDu et al., 2000), πιθανότατα μέσω του

μεταγραφικού παράγοντα NF-κB (Bales et al., 2000). Εξίσου σημαντικό ήταν το εύρημα ότι η εξαρτώμενη από την ισομορφή δράση της APOE στην αποικοδόμηση του Αβ σε καλλιέργειες μακροφάγων διαμεσολαβείται εν μέρει από την έκκριση της μεταλλοπρωτεάσης MMP9 και μακροφάγα από τα ποντίκια ApoE4-TR είχαν αυξημένα επίπεδα MMP9 σε σχέση με τα ApoE-/- (Zhao et al., 2009). Επιπλέον, δείξαμε στην παρούσα μελέτη ότι η απόκριση της μικρογλοίας μετά την επαγωγή φλεγμονής με LPS στα ποντίκια ApoE-/- είναι μειωμένη σε σχέση με τα ποντίκια TTRI-huApoE4;ApoE-/- τα οποία εκφράζουν την APOE4 στο ήπαρ και στα μακροφάγα (**Εικόνα 3.26**).

Με βάση τα παραπάνω, υποθέσαμε ότι η ισομορφή της APOE4 καθώς και η κυτταρική της προέλευση παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην ανοσολογική απόκριση στο ΚΝΣ. Επίσης, δεδομένου ότι τα αστροκύτταρα είναι φυσιολογικά ο κυριότερος κυτταρικός τύπος παραγωγής της APOE στο ΚΝΣ, προχωρήσαμε στην ανάλυση της επίδρασης που έχει η εκτοπική έκφραση της APOE4 στο ποντίκι TTRI-huApoE4.

Για τη μελέτη της φλεγμονώδους αντίδρασης στα διαγονιδιακά ποντίκια με παθολογία τύπου Alzheimer, χρησιμοποιήσαμε τις μεθόδους της ανοσοϊστοχημείας και της ανοσοσύπωσης με δύο πρωτεΐνες-δείκτες (GFAP και IBA1 για τα αστροκύτταρα και τη μικρογλοία αντίστοιχα).

Με ανοσοϊστοχημικές μελέτες βρήκαμε ότι στην ηλικία των δύο μηνών δεν υπάρχει αστροκυττάρωση στα διαγονιδιακά ποντίκια 5xFAD, παρά την έναρξη της εναπόθεσης Αβ (**Εικόνα 3.34**). Στην ηλικία των τεσσάρων μηνών τα ποντίκια έχουν αναπτύξει πλήρως παθολογία τύπου Alzheimer, συμπεριλαμβανομένης και της φλεγμονώδους απόκρισης της γλοίας. Στους ιππόκαμπους των ποντικών τεσσάρων μηνών δε βρέθηκε καμία διαφορά στην αστροκυττάρωση του ιππόκαμπου η οποία είναι εντοπισμένη κυρίως στο υπόθεμα του εγκεφάλου (subiculum) (**Εικόνα 3.35**). Στο φλοιό, η περιφερική έκφραση της APOE4, απουσία της ενδογενούς APOE, δεν επηρεάζει την αστροκυττάρωση του φλοιού και δεν υπάρχει διαφορά στην αστροκυττάρωση μεταξύ των 5xFAD;ApoE-/- και των 5xFAD;TTRI-huApoE4;ApoE-/- (**Εικόνα 3.36**). Η ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνικών επιπέδων της GFAP επιβεβαίωσε τα παραπάνω και έδειξε ότι στατιστικά σημαντική διαφορά υπάρχει μόνο μεταξύ των 5xFAD και των 5xFAD;TTRI-huApoE4;ApoE-/- (**Εικόνα 3.37**). Αυτή κατά πάσα πιθανότητα οφείλεται στη μεγάλη διαφορά αστροκυττάρωσης που υπάρχει στο φλοιό μεταξύ των ποντικών αυτών αφού δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των 5xFAD και των 5xFAD;ApoE-/-.

Η παρατηρούμενη αύξηση στην αστροκυττάρωση του φλοιού των 5xFAD ποντικών οφείλεται στο ότι τα αστροκύτταρα αποτελούν ένα ετερογενή πληθυσμό κυττάρων με διαφορές τόσο στη μορφολογία όσο και στη φυσιολογία τους (Matyash and Kettenmann, 2010). Η επίδραση της APOE πιθανότατα διαφοροποιείται ανάλογα με τον πληθυσμό της εξεταζόμενης περιοχής. Σε εγκεφάλους ασθενών με Alzheimer έχει δειχθεί συσχέτιση της αστροκυττάρωσης και των αμυλοειδών πλακών στον ινιακό, το βρεγματικό και τον κροταφικό φλοιό. Δεν υπήρχε συσχέτιση αστροκυττάρωσης-αμυλοειδών πλακών στο μετωπιαίο φλοιό, γεγονός που υποδεικνύει τη διαφορετική απόκριση των διαφορετικών πληθυσμών των αστροκυττάρων (Kashon et al., 2004).

Αντίθετα με την αστροκυττάρωση, η μικρογλοΐωση εμφανίζεται ταυτόχρονα με την έναρξη του σχηματισμού των αμυλοειδών πλακών και είναι εμφανής στα ποντίκια τα οποία φέρουν την ενδογενή APOE στην ηλικία των δύο μηνών (**Εικόνα 3.38**). Στα μεγαλύτερης ηλικίας ποντίκια, η μικρογλοΐωση είναι μειωμένη στα 5xFAD;TTRI-huApoE4;ApoE-/- σε σχέση τόσο με τα 5xFAD όσο και με τα 5xFAD;ApoE-/- που δεν διαφέρουν μεταξύ τους παρά την έντονη διαφορά που έχουν στον αριθμό των αμυλοειδών πλακών (**Εικόνα 3.39**). Στο φλοιό, στα ποντίκια χωρίς την ενδογενή APOE (5xFAD;ApoE-/-), η μικρογλοΐωση είναι μειωμένη σε σχέση με τα 5xFAD και μειώνεται περαιτέρω στα 5xFAD;TTRI-huApoE4;ApoE-/- (**Εικόνα 3.40**). Από αυτά τα ευρήματα συμπεραίνεται ότι η APOE του ποντικού και η ανθρώπινη APOE4 έχουν διαφορετική επίδραση στη μικρογλοΐωση και πιθανότατα η APOE4 δρα κατασταλτικά στην ενεργοποίηση της μικρογλοΐας. Τα μικρογλοϊακά κύτταρα αποτελούν τα «φαγοκύτταρα» του εγκεφάλου (Perry et al., 2010) με αποτέλεσμα η μείωση της ενεργοποίησής τους να οδηγεί στην αύξηση του σχηματισμού των πλακών στα 5xFAD;TTRI-huApoE4;ApoE-/- σε σχέση με τα ποντίκια 5xFAD;ApoE-/-.

Έως τώρα δεν έχει δειχθεί ο κατασταλτικός ρόλος της APOE4 στη μικρογλοΐωση αυτή καθ' εαυτή, που για τους ασθενείς με τη νόσο Alzheimer κάθε άλλο παρά πλεονεκτικός είναι. Έχει δειχθεί, όμως, σε ποντίκια ο κατασταλτικός ρόλος της APOE στα επίπεδα των προφλεγμονωδών κυτοκινών στον εγκέφαλο (Laskowitz et al., 2001, Lynch et al., 2001, Lynch et al., 2003) επιβεβαιώνοντας ότι η APOE έχει ρυθμιστικό ρόλο στην ανοσολογική απόκριση στο ΚΝΣ. Ένας πιθανός λόγος για τον οποίο τα ποντίκια με την ενδογενή APOE (5xFAD) έχουν τόσο έντονη μικρογλοΐωση, σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας, είναι ότι όταν το συσσωματωμένο αμυλοειδές ξεπεράσει μια κρίσιμη μάζα, η muAPOE δεν είναι τόσο ικανή στο να καταστέλλει τη μικρογλοΐωση σε σχέση με τη huAPOE μετά από

κάποιο ορισμένο φορτίο συσσωματωμένου αμυλοειδούς. Ανάλυση της μικρογλοίας στο μοντέλο APP/PS1 έδειξε ότι αρχικά αυτή είναι ικανή να φαγοκυτταρώσει το Αβ, αλλά στη συνέχεια χάνει αυτή της την ικανότητα και εκκρίνει προφλεγμονώδεις κυτοκίνες (Hickman et al., 2008). Αυτό συνεπάγεται αυξημένη φλεγμονή με τις συνακόλουθες καταστροφικές συνέπειες για το μικροπεριβάλλον του εγκεφάλου. Από την άλλη, η πλήρης απουσία της ΑΡΟΕ του ποντικού είναι, όπως δείξαμε, εξίσου επιζήμια αφού δεν υπάρχει καθόλου καταστολή της μικρογλοίωσης. Τα αποτελέσματα αυτά ενισχύονται από δύο προηγούμενες μελέτες που έδειξαν ότι τα ποντίκια ApoE^{-/-} έχουν μειωμένη ενεργοποίηση των μακροφάγων σε σχέση με τα ποντίκια φυσικού τύπου (de Bont et al., 1999, Van Oosten et al., 2001). Η αλληλεπίδραση του Αβ με την ΑΡΟΕ του ποντικού και η συνακόλουθη εναπόθεσή τους έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της λειτουργικά διαθέσιμης δεξαμενής ΑΡΟΕ. Η μείωση της αντιφλεγμονώδους δράσης της ΑΡΟΕ, λόγω της μείωσης της «ελεύθερης ΑΡΟΕ», οδηγεί τελικά σε χρόνια φλεγμονή του νευρικού συστήματος. Αυτό προκύπτει από τα αποτελέσματα των ποντικών 5xFAD;ApoE^{-/-}, όπου η μικρογλοία είναι εξίσου ενεργοποιημένη με τη μικρογλοία στα ποντίκια με ενδογενή ΑΡΟΕ (5xFAD) παρά το ότι οι πλάκες είναι πολύ μειωμένες. Τα παραπάνω επιβεβαιώθηκαν και με ανάλυση των πρωτεϊνικών επιπέδων IBA1 με ανοσοσύτρωμα όπου δεν υπήρχε καμία στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ της μικρογλοίωσης των 5xFAD και των 5xFAD;ApoE^{-/-} ποντικών ενώ τα 5xFAD;TTRI-huApoE4;ApoE^{-/-} έχουν χαμηλότερα επίπεδα και από τους δύο άλλους γονότυπους (Εικόνα 3.41).

4.14. Τα μακροφάγα των 5xFAD;TTRI-huApoE4;ApoE^{-/-} ποντικών εισέρχονται στον εγκέφαλο και εκφράζουν huAPOE4

Οι διαφορές που βρήκαμε στο πρότυπο της εναπόθεσης του αμυλοειδούς, στα επίπεδα των αμυλοειδών πλακών, των β-CTF και του πεπτιδίου Αβ, υποδηλώνει ότι στα ποντίκια 5xFAD;TTRI-huApoE4;ApoE^{-/-} που δεν εκφράζουν την ενδογενή ΑΡΟΕ αλλά ούτε και την ανθρώπινη ΑΡΟΕ4 στον εγκέφαλο, η περιφερική ΑΡΟΕ4 καταφέρνει να διαπεράσει τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό. Φυσιολογικά η ΑΡΟΕ δεν μπορεί να τον διαπεράσει από μόνη της, κι αυτό έχει δειχθεί με πειράματα σε ινδικά χοιρίδια (Zlokovic et al., 1994). Το αποτέλεσμα αυτό επιβεβαιώνεται και από την απουσία ανιχνεύσιμης ηπατικής ΑΡΟΕ στον εγκέφαλο ασθενών οι οποίοι δέχτηκαν μεταμόσχευση ήπατος το οποίο εξέφραζε διαφορετικό αλληλόμορφο της ApoE από το δικό τους (Linton et al., 1991). Έτσι,

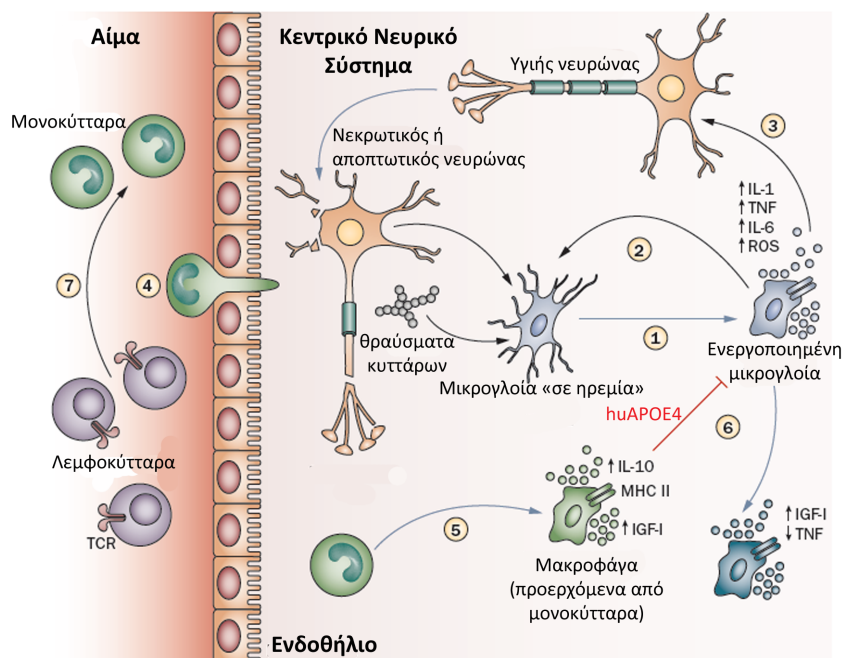
αναζητήσαμε τα πιθανά κύτταρα-οχήματα τα οποία θα μπορούσαν να οδηγήσουν την APOE4 μέσα στον εγκέφαλο με παθολογία τύπου Alzheimer.

Η ανοσολογική απόκριση από τα κύτταρα του επίκτητου ανοσοποιητικού συστήματος είναι περιορισμένη στην AD αν και υπάρχουν κάποιες αναφορές που δείχνουν ότι T-λεμφοκύτταρα εισέρχονται στον εγκέφαλο ασθενών και σε διαγονιδιακά μοντέλα της νόσου (Itagaki et al., 1988, Stalder et al., 2005). Προηγούμενες μελέτες έχουν επιβεβαιώσει ότι κύτταρα προερχόμενα από το μυελό των οστών εισέρχονται στον εγκέφαλο των διαγονιδιακών ποντικών με παθολογία τύπου Alzheimer και ότι αυτά είναι κυρίως μακροφάγα (Lee et al., 2009, Malm et al., 2005, Simard and Rivest, 2004, Simard et al., 2006, Stalder et al., 2005). Επίσης έχει δειχθεί ότι αυτά είναι τα υπεύθυνα κύτταρα για τη φαγοκυττάρωση του Αβ αφού η μικρογλοία καθίσταται δυσλειτουργική με την εξέλιξη της νόσου (Hickman et al., 2008, Simard et al., 2006).

Δείξαμε με προηγούμενα πειράματα ότι τα διαγονιδιακά ποντίκια TTRI-huApoE4;ApoE-/- δεν εκφράζουν φυσιολογικά την APOE4 στον εγκέφαλο (**Εικόνες 3.24 και 3.26**) ενώ εκφράζουν APOE4 στα μακροφάγα (**Εικόνα 3.25**). Έτσι υποθέσαμε ότι η APOE4 στον εγκέφαλο των διαγονιδιακών ποντικών 5xFAD;TTRI-huApoE4;ApoE-/- με παθολογία Alzheimer προέρχεται, πιθανότατα, από τα μακροφάγα που εισέρχονται στον εγκέφαλο από την περιφέρεια. Για να εξακριβωθεί εάν η υπόθεση αυτή ισχύει, έγινε ανοσοϊστοχημεία για την ανθρώπινη APOE4 και για IBA1 (πρωτεΐνη-δείκτης για μικρογλοία/μακροφάγα) και βρέθηκε ότι τα ποντίκια που δεν έχουν αναπτύξει ακόμα πλάκες (5xFAD;TTRI-huApoE4;ApoE-/- ηλικίας δύο μηνών), δεν έχουν καθόλου έκφραση της ανθρώπινης APOE4 (**Εικόνα 3.42A**). Αντίθετα, στα ποντίκια 5xFAD;TTRI-huApoE4;ApoE-/- τεσσάρων μηνών με πλήρη ανάπτυξη παθολογίας Alzheimer, υπήρχε ανθρώπινη APOE4 (**Εικόνα 3.42Γ-Δ**) που ήταν συνεντοπισμένη με αμυλοειδείς πλάκες και με μικρογλοία/μακροφάγα (κύτταρα θετικά για IBA1). Στα ποντίκια TTRI-huApoE4;ApoE-/- ίδιας ηλικίας (τεσσάρων μηνών), η ανθρώπινη APOE4 επίσης έλειπε (**Εικόνα 3.42B**) γεγονός που αποκλείει το ενδεχόμενο η APOE4 να εκφράζεται σε μεταγενέστερο στάδιο στα ποντίκια TTRI-huApoE4;ApoE-/-.

Ένα σοβαρό πρόβλημα στην ανίχνευση των μακροφάγων είναι ότι δεν υπάρχει κάποια συγκεκριμένη πρωτεΐνη-δείκτης η οποία να διαχωρίζει τη μικρογλοία από τα μακροφάγα και ούτε αυτά μπορούν να διαχωριστούν μορφολογικά. Έτσι, για να διαπιστώσουμε εάν η APOE4 προέρχεται από μακροφάγα, ποντίκια 5xFAD;ApoE-/-

δέχτηκαν μεταμόσχευση μυελού των οστών από ποντίκια Tg(CAG-EGFP)10sb/J;TTRI-huApoE4;ApoE^{-/-}. Προηγουμένως τα ποντίκια αυτά δέχτηκαν μια δόση β-ακτινοβολίας που κατέστρεψε το μυελό των οστών τους. Η ανάλυση των ποντικών αυτών οχτώ εβδομάδες μετά τη μεταμόσχευση έδειξε ότι κύτταρα από την περιφέρεια (θετικά για GFP) όντως εισήλθαν στον εγκέφαλο και επιπρόσθετα ότι αυτά τα κύτταρα έκφραζαν APOE4 (Εικόνα 3.43). Με τα παραπάνω πειράματα δείχθηκε για πρώτη φορά ότι η προερχόμενη από μακροφάγα APOE4 επιδρά τόσο στο σχηματισμό των αμυλοειδών πλακών όσο και στην εξέλιξη της φλεγμονώδους απόκρισης σε διαγονιδιακά ποντίκια με παθολογία τύπου Alzheimer (Εικόνα 4.2).



Εικόνα 4.2. Πιθανός μηχανισμός δράσης της προερχόμενης από τα μακροφάγα APOE4. Τα μαύρα βέλη υποδηλώνουν κυτταρική αλληλεπίδραση ενώ τα χρωματιστή βέλη κυτταρική μετατροπή. Τα κύτταρα τα οποία πεθαίνουν στο ΚΝΣ καθώς και η συσσωμάτωση πρωτεϊνών ενεργοποιούν τη μικρογλοία στο ΚΝΣ(1). Η ενεργοποιημένη μικρογλοία δρα φαγοκυτταρικά και επίσης εκκρίνει τοξικά είδη όπως προφλεγμονώδεις κυτοκίνες και ενεργά είδη οξυγόνου (ROS). Εάν η μικρογλοιακή απόκριση παραμείνει (όπως συμβαίνει στη νόσο του Alzheimer) αυτά τα τοξικά μόρια οδηγούνται σε ένα αυτοτροφοδοτούμενο νευροτοξικό κύκλο ο οποίος περιλαμβάνει την περαιτέρω ενεργοποίηση της μικρογλοίας (2) και το θάνατο των νευρώνων (3). Σε αυτό το στάδιο μονοκύτταρα από την περιφέρεια εισέρχονται από τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό στο τραυματισμένο παρέγχυμα (4) και διαφοροποιούνται τοπικά σε μακροφάγα (5). Αυτά τα κύτταρα ενδοκυτταρώνουν αποτελεσματικά τα κυτταρικά θραύσματα, εκκρίνουν αυξητικούς παράγοντες και αντιφλεγμονώδεις κυτοκίνες και καταστέλλουν την ενεργοποιημένη μικρογλοία (6). Σε αυτό το μονοπάτι δρα και η προερχόμενη από τα μακροφάγα της περιφέρειας huAPOE4, καταστέλλοντας τη μικρογλοία στα 5xFAD;TTRI-huApoE4;ApoE^{-/-} ποντίκια. Επίσης, T-λεμφοκύτταρα θετικά για CD4⁺ ενισχύουν τη διήθηση των μονοκυτταρων στο ΚΝΣ (7). Προσαρμογή από Schwartz M. and Shechter R., Nat Rev Neurol., 2010, 6(7):405-410.

4.15. Τα ποντίκια 5xFAD;TTRI-huApoE4;ApoE-/- έχουν αυξημένη IL-10 γύρω από τις αμυλοειδείς πλάκες

Διαφορετικές ερευνητικές ομάδες έχουν επιβεβαιώσει ότι τα μακροφάγα τύπου 2 (MΦ2) εκκρίνουν IL-10 η οποία έχει αντιφλεγμονώδη δράση (Couper et al., 2008, Gu et al., 2008, Pils et al., 2010, Prasse et al., 2007, Takada et al., 2010, Verreck et al., 2004, Xu et al., 2007). Επιπρόσθετα, σε ένα διαγονιδιακό μοντέλο με παθολογία τύπου Alzheimer στο οποίο επάχθηκε η είσοδος μακροφάγων μετά από ανοσοποίηση με ένα μεταλλαγμένο πεπτιδίιο της μυελίνης (MOG45), βρέθηκε ότι η μείωση των πλακών συνοδεύεται από αυξημένα επίπεδα της IL-10 και μειωμένα επίπεδα προφλεγμονωδών κυτοκινών (Korogoy-Hamaoui et al., 2009). Για να διευκρινιστεί εάν η μείωση που παρατηρείται στη μικρογλοΐωση οφείλεται στην αύξηση αντιφλεγμονωδών κυτοκινών έγινε μελέτη της IL-10 με ανοσοϊστοχημικές τεχνικές στα διαγονιδιακά αυτά ποντίκια. Παρατηρήσαμε ότι στα ποντίκια 5xFAD;TTRI-huApoE4;ApoE-/- υπάρχει αύξηση της IL-10 σε σχέση με τα 5xFAD;ApoE-/- και η IL-10 είναι πιο έντονη γύρω από τις αμυλοειδείς πλάκες (**Εικόνα 3.44**). Μπορούμε να υποθέσουμε ότι αυτό οφείλεται στην αντιφλεγμονώδη δράση της προερχόμενης από τα μακροφάγα της περιφέρειας APOE4. Η υπόθεση αυτή βασίζεται στα ευρήματα σε ζώα χωρίς ενδογενή APOE, όπου υπάρχει αυξημένη φλεγμονή και επαγωγή διάφορων κυτοκινών, καθώς και προφλεγμονωδών αντιδράσεων σε απόκριση στο Αβ και σε άλλα ενεργοποιητικά ερεθίσματα (LaDu et al., 2001, Lynch et al., 2001). Η αντιφλεγμονώδης δράση της APOE4 δεν είναι πάντα ωφέλιμη για τον οργανισμό και ειδικότερα στην περίπτωση της νόσου του Alzheimer, όπου υπάρχει περίσσεια του πεπτιδίου Αβ που είναι νευροτοξικό. Η άλλη πλευρά του νομίσματος είναι ότι αυξημένη φλεγμονή στο μικροπεριβάλλον του εγκεφάλου είναι επίσης καταστροφική αφού είναι νευροτοξική (**Εικόνα 4.2**). Συμπερασματικά, η κυτταρική πρόελευση της APOE και η διαθέσιμη ποσότητά της είναι εξίσου σημαντικές για την εξέλιξη της νόσου του Alzheimer.

4.16. Συμπεράσματα

Συνοπτικά, στην παρούσα διατριβή δείχθηκε ο σημαντικός ρόλος του LDLR στην εναπόθεση του Αβ. Η έλλειψη του LDLR οδηγεί στην αύξηση των αμυλοειδών εναποθέσεων και του σχηματισμού αμυλοειδών πλακών, επιβεβαιώνοντας ότι διαμεσολαβεί στην κάθαρση του Αβ από τον εγκέφαλο. Ταυτόχρονα οδηγεί στη μείωση της

φλεγμονώδους απόκρισης από τον εγκέφαλο. Εδραιώνεται έτσι η σημαντικότητα των υποδοχέων της APOE στην εξέλιξη και την παθογένεση της νόσου του Alzheimer.

Επίσης, στη μελέτη αυτή διαπιστώθηκε ότι η από την περιφέρεια προερχόμενη APOE4 έχει επίδραση τόσο στο σχηματισμό των αμυλοειδών πλακών όσο και στην εξέλιξη της φλεγμονώδους απόκρισης σε διαγονιδιακά ποντίκια με παθολογία τύπου Alzheimer. Η APOE4 εκφράζεται από μακροφάγα τα οποία εισέρχονται στο παρέγχυμα του εγκεφάλου και μειώνουν την προφλεγμονώδη δράση της μικρογλοίας μέσω της αύξησης της ιντερλευκίνης-10.

4.17. Μελλοντικές μελέτες

Με βάση την παρούσα μελέτη χρειάζεται να διασαφηνιστεί περαιτέρω ο ρόλος του LDLR στη φλεγμονώδη απόκριση του εγκεφάλου. Μια μελλοντική μελέτη θα μπορούσε να ασχοληθεί με την κυτταρο-ειδική έκφραση του LDLR (αστροκυτταρική ή μικρογλοιακή) και να διερευνήσει την επίδρασή της στην παθολογία τύπου Alzheimer.

Θα πρέπει, ακόμη, να μελετηθεί η επίδραση της περιφερικής έκφρασης των ανθρώπινων αλληλόμορφων της *ApoE* (*ApoE2*, *ApoE3* και *ApoE4*) στην παθολογία της νόσου καθώς και στην επίδραση που έχουν αυτά στα επίπεδα των προ- και των αντιφλεγμονωδών κυτοκινών.

Μία άλλη προσέγγιση θα ήταν η μεταμόσχευση από κύτταρα θετικά για CD11b (μονοκύτταρα) σε ποντίκια με παθολογία τύπου Alzheimer. Τα εν λόγω κύτταρα είναι ικανά να μεταφέρουν στον εγκέφαλο τις διαφορετικές ισομορφές της ανθρώπινης APOE κι έτσι μπορεί να μελετηθεί η επίδρασή τους. Επίσης θα μπορούσαν να μελετηθούν και κάποιες «βελτιωμένες», μέσω γενετικής μηχανικής, μορφές της πρωτεΐνης που δεν θα είχαν τις επιβλαβείς δράσεις της APOE4 και που θα μπορούσαν να έχουν πιο ισχυρή αντιφλεγμονώδη δράση.

Με την παρούσα μελέτη διασαφηνίζεται ο ρόλος της προερχόμενης από την περιφέρεια APOE4 και ειδικότερα αυτής που προέρχεται από τα μακροφάγα. Υποδεικνύεται έτσι ένας στόχος πιο προσβάσιμος στις παρούσες φαρμακευτικές αγωγές και με λιγότερες παρενέργειες από την APOE του εγκεφάλου. Μια προσέγγιση θα ήταν να στοχευθεί κυτταροειδικά η APOE ούτως ώστε να ενισχυθεί η αντιφλεγμονώδης δράση της και να μειωθεί η αλληλεπίδρασή της με το Αβ.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Ajami B, Bennett JL, Krieger C, Tetzlaff W, Rossi FM (2007) Local self-renewal can sustain CNS microglia maintenance and function throughout adult life. *Nat Neurosci* 10:1538-1543.
- Akiyama H, Barger S, Barnum S, Bradt B, Bauer J, Cole GM, Cooper NR, Eikelenboom P, Emmerling M, Fiebich BL, Finch CE, Frautschy S, Griffin WS, Hampel H, Hull M, Landreth G, Lue L, Mrak R, Mackenzie IR, McGeer PL, O'Banion MK, Pachter J, Pasinetti G, Plata-Salaman C, Rogers J, Rydel R, Shen Y, Streit W, Strohmeyer R, Tooyoma I, Van Muiswinkel FL, Veerhuis R, Walker D, Webster S, Wegrzyniak B, Wenk G, Wyss-Coray T (2000) Inflammation and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 21:383-421.
- Alberts MJ, Graffagnino C, McClenny C, DeLong D, Strittmatter W, Saunders AM, Roses AD (1995) ApoE genotype and survival from intracerebral haemorrhage. *Lancet* 346:575.
- Aleshkov S, Abraham CR, Zannis VI (1997) Interaction of nascent ApoE2, ApoE3, and ApoE4 isoforms expressed in mammalian cells with amyloid peptide beta (1-40). Relevance to Alzheimer's disease. *Biochemistry* 36:10571-10580.
- Ali K, Middleton M, Pure E, Rader DJ (2005) Apolipoprotein E suppresses the type I inflammatory response in vivo. *Circ Res* 97:922-927.
- Allinson TM, Parkin ET, Condon TP, Schwager SL, Sturrock ED, Turner AJ, Hooper NM (2004) The role of ADAM10 and ADAM17 in the ectodomain shedding of angiotensin converting enzyme and the amyloid precursor protein. *Eur J Biochem* 271:2539-2547.
- Anderson RGW, Goldstein JL, Brown MS (1977) A mutation that impairs the ability of lipoprotein receptors to localise in coated pits on the cell surface of human fibroblasts. *Nature* 270:695-699.
- Aoki K, Uchihara T, Nakamura A, Komori T, Arai N, Mizutani T (2003a) Expression of apolipoprotein E in ballooned neurons-comparative immunohistochemical study on neurodegenerative disorders and infarction. *Acta Neuropathol* 106:436-440.
- Aoki K, Uchihara T, Sanjo N, Nakamura A, Ikeda K, Tsuchiya K, Wakayama Y (2003b) Increased expression of neuronal apolipoprotein E in human brain with cerebral infarction. *Stroke* 34:875-880.
- Avrameas S, Uriel J (1966) [Method of antigen and antibody labelling with enzymes and its immunodiffusion application]. *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D* 262:2543-2545.
- Bales KR, Dodart JC, DeMattos RB, Holtzman DM, Paul SM (2002) Apolipoprotein E, amyloid, and Alzheimer disease. *Mol Interv* 2:363-375, 339.
- Bales KR, Du Y, Holtzman D, Cordell B, Paul SM (2000) Neuroinflammation and Alzheimer's disease: critical roles for cytokine/A β -induced glial activation, NF- κ B, and apolipoprotein E. *Neurobiol Aging* 21:427-432; discussion 451-423.
- Bales KR, Liu F, Wu S, Lin S, Koger D, DeLong C, Hansen JC, Sullivan PM, Paul SM (2009) Human APOE isoform-dependent effects on brain beta-amyloid levels in PDAPP transgenic mice. *J Neurosci* 29:6771-6779.
- Bales KR, Verina T, Cummins DJ, Du Y, Dodel RC, Saura J, Fishman CE, DeLong CA, Piccardo P, Petegnief V, Ghetti B, Paul SM (1999) Apolipoprotein E is essential for amyloid deposition in the APP(V717F) transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:15233-15238.
- Bales KR, Verina T, Dodel RC, Du Y, Altstiel L, Bender M, Hyslop P, Johnstone EM, Little SP, Cummins DJ, Piccardo P, Ghetti B, Paul SM (1997) Lack of apolipoprotein E dramatically reduces amyloid beta-peptide deposition. *Nat Genet* 17:263-264.

- Bao F, Arai H, Matsushita S, Higuchi S, Sasaki H (1996) Expression of apolipoprotein E in normal and diverse neurodegenerative disease brain. *Neuroreport* 7:1733-1739.
- Barger SW, Harmon AD (1997) Microglial activation by Alzheimer amyloid precursor protein and modulation by apolipoprotein E. *Nature* 388:878-881.
- Bartl MM, Luckenbach T, Bergner O, Ullrich O, Koch-Brandt C (2001) Multiple receptors mediate apoJ-dependent clearance of cellular debris into nonprofessional phagocytes. *Exp Cell Res* 271:130-141.
- Basu SK, Brown MS, Ho YK, Havel RJ, Goldstein JL (1981) Mouse macrophages synthesize and secrete a protein resembling apolipoprotein E. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78:7545-7549.
- Beffert U, Cohn JS, Petit-Turcotte C, Tremblay M, Aumont N, Ramassamy C, Davignon J, Poirier J (1999) Apolipoprotein E and beta-amyloid levels in the hippocampus and frontal cortex of Alzheimer's disease subjects are disease-related and apolipoprotein E genotype dependent. *Brain Res* 843:87-94.
- Beffert U, Danik M, Krzywkowski P, Ramassamy C, Berrada F, Poirier J (1998) The neurobiology of apolipoproteins and their receptors in the CNS and Alzheimer's disease. *Brain Res Brain Res Rev* 27:119-142.
- Beffert U, Poirier J (1996) Apolipoprotein E, plaques, tangles and cholinergic dysfunction in Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci* 777:166-174.
- Beffert U, Stolt PC, Herz J (2004) Functions of lipoprotein receptors in neurons. *J Lipid Res* 45:403-409.
- Beisiegel U, Weber W, Ihrke G, Herz J, Stanley KK (1989) The LDL-receptor-related protein, LRP, is an apolipoprotein E-binding protein. *Nature* 341:162-164.
- Belinson H, Lev D, Masliah E, Michaelson DM (2008) Activation of the amyloid cascade in apolipoprotein E4 transgenic mice induces lysosomal activation and neurodegeneration resulting in marked cognitive deficits. *J Neurosci* 28:4690-4701.
- Belinson H, Michaelson DM (2009) ApoE4-dependent Abeta-mediated neurodegeneration is associated with inflammatory activation in the hippocampus but not the septum. *J Neural Transm* 116:1427-1434.
- Bell RD, Sagare AP, Friedman AE, Bedi GS, Holtzman DM, Deane R, Zlokovic BV (2007) Transport pathways for clearance of human Alzheimer's amyloid beta-peptide and apolipoproteins E and J in the mouse central nervous system. *J Cereb Blood Flow Metab* 27:909-918.
- Bellosta S, Mahley RW, Sanan DA, Murata J, Newland DL, Taylor JM, Pitas RE (1995a) Macrophage-specific expression of human apolipoprotein E reduces atherosclerosis in hypercholesterolemic apolipoprotein E-null mice. *J Clin Invest* 96:2170-2179.
- Bellosta S, Nathan BP, Orth M, Dong LM, Mahley RW, Pitas RE (1995b) Stable expression and secretion of apolipoproteins E3 and E4 in mouse neuroblastoma cells produces differential effects on neurite outgrowth. *J Biol Chem* 270:27063-27071.
- Bernal-Mizrachi C, Weng S, Feng C, Finck BN, Knutsen RH, Leone TC, Coleman T, Mecham RP, Kelly DP, Semenkovich CF (2003) Dexamethasone induction of hypertension and diabetes is PPAR-alpha dependent in LDL receptor-null mice. *Nat Med* 9:1069-1075.
- Bertram L, Tanzi RE (2009) Genome-wide association studies in Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet* 18:R137-145.
- Bettens K, Brouwers N, Engelborghs S, De Pooter T, De Deyn PP, Sleegers K, Van Broeckhoven C (2009) DNMBP is genetically associated with Alzheimer dementia in the Belgian population. *Neurobiol Aging* 30:2000-2009.

- Bettens K, Slegers K, Van Broeckhoven C (2010) Current status on Alzheimer disease molecular genetics: from past, to present, to future. *Hum Mol Genet* 19:R4-R11.
- Bhasin KK, van Nas A, Martin LJ, Davis RC, Devaskar SU, Lusi AJ (2009) Maternal low-protein diet or hypercholesterolemia reduces circulating essential amino acids and leads to intrauterine growth restriction. *Diabetes* 58:559-566.
- Birnboim HC (1988) Rapid extraction of high molecular weight RNA from cultured cells and granulocytes for Northern analysis. *Nucleic Acids Research* 16:1487-1497.
- Blacklow SC (2007) Versatility in ligand recognition by LDL receptor family proteins: advances and frontiers. *Curr Opin Struct Biol* 17:419-426.
- Blennow K, de Leon MJ, Zetterberg H (2006) Alzheimer's disease. *Lancet* 368:387-403.
- Blom ES, Viswanathan J, Kilander L, Helisalmi S, Soininen H, Lannfelt L, Ingelsson M, Glaser A, Hiltunen M (2008) Low prevalence of APP duplications in Swedish and Finnish patients with early-onset Alzheimer's disease. *Eur J Hum Genet* 16:171-175.
- Boyles JK, Pitas RE, Wilson E, Mahley RW, Taylor JM (1985) Apolipoprotein E associated with astrocytic glia of the central nervous system and with nonmyelinating glia of the peripheral nervous system. *J Clin Invest* 76:1501-1513.
- Boyles JK, Zoellner CD, Anderson LJ, Kosik LM, Pitas RE, Weisgraber KH, Hui DY, Mahley RW, Gebicke-Haerter PJ, Ignatius MJ, et al. (1989) A role for apolipoprotein E, apolipoprotein A-I, and low density lipoprotein receptors in cholesterol transport during regeneration and remyelination of the rat sciatic nerve. *J Clin Invest* 83:1015-1031.
- Braak H, Braak E (1991) Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol* 82:239-259.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 7:248-254.
- Bray NJ, Jehu L, Moskvina V, Buxbaum JD, Dracheva S, Haroutunian V, Williams J, Buckland PR, Owen MJ, O'Donovan MC (2004) Allelic expression of APOE in human brain: effects of epsilon status and promoter haplotypes. *Hum Mol Genet* 13:2885-2892.
- Brecht WJ, Harris FM, Chang S, Tesseur I, Yu GQ, Xu Q, Dee Fish J, Wyss-Coray T, Buttini M, Mucke L, Mahley RW, Huang Y (2004) Neuron-specific apolipoprotein e4 proteolysis is associated with increased tau phosphorylation in brains of transgenic mice. *J Neurosci* 24:2527-2534.
- Brown MS, Dana SE, Goldstein JL (1975) Cholesterol ester formation in cultured human fibroblasts. Stimulation by oxygenated sterols. *Journal of Biological Chemistry* 250:4025-4027.
- Brown MS, Goldstein JL (1983) Lipoprotein metabolism in the macrophage: implications for cholesterol deposition in atherosclerosis. *Annu Rev Biochem* 52:223-261.
- Brown MS, Goldstein JL (1986) A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* 232:34-47.
- Brown MS, Goldstein JL (1999) A proteolytic pathway that controls the cholesterol content of membranes, cells, and blood. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96:11041-11048.
- Brown MS, Ye J, Rawson RB, Goldstein JL (2000) Regulated intramembrane proteolysis: a control mechanism conserved from bacteria to humans. *Cell* 100:391-398.
- Bu G (2009) Apolipoprotein E and its receptors in Alzheimer's disease: pathways, pathogenesis and therapy. *Nat Rev Neurosci* 10:333-344.

- Bu G, Cam J, Zerbinatti C (2006) LRP in amyloid-beta production and metabolism. *Ann N Y Acad Sci* 1086:35-53.
- Burnette WN (1981) "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem* 112:195-203.
- Busciglio J, Gabuzda DH, Matsudaira P, Yankner BA (1993) Generation of beta-amyloid in the secretory pathway in neuronal and nonneuronal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:2092-2096.
- Buttini M, Orth M, Bellosta S, Akeefe H, Pitas RE, Wyss-Coray T, Mucke L, Mahley RW (1999) Expression of human apolipoprotein E3 or E4 in the brains of ApoE^{-/-} mice: isoform-specific effects on neurodegeneration. *J Neurosci* 19:4867-4880.
- Buttini M, Yu GQ, Shockley K, Huang Y, Jones B, Masliah E, Mallory M, Yeo T, Longo FM, Mucke L (2002) Modulation of Alzheimer-like synaptic and cholinergic deficits in transgenic mice by human apolipoprotein E depends on isoform, aging, and overexpression of amyloid beta peptides but not on plaque formation. *J Neurosci* 22:10539-10548.
- Cabrejo L, Guyant-Marechal L, Laquerriere A, Vercelletto M, De La Fourniere F, Thomas-Anterion C, Verny C, Letournel F, Pasquier F, Vital A, Checler F, Frebourg T, Campion D, Hannequin D (2006) Phenotype associated with APP duplication in five families. *Brain* 129:2966-2976.
- Callahan MJ, Lipinski WJ, Bian F, Durham RA, Pack A, Walker LC (2001) Augmented senile plaque load in aged female beta-amyloid precursor protein-transgenic mice. *Am J Pathol* 158:1173-1177.
- Cam JA, Zerbinatti CV, Li Y, Bu G (2005) Rapid endocytosis of the low density lipoprotein receptor-related protein modulates cell surface distribution and processing of the beta-amyloid precursor protein. *J Biol Chem* 280:15464-15470.
- Cameron B, Landreth GE (2010) Inflammation, microglia, and Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis* 37:503-509.
- Canning DR, McKeon RJ, DeWitt DA, Perry G, Wujek JR, Frederickson RCA, Silver J (1993) [beta]-Amyloid of Alzheimer's Disease Induces Reactive Gliosis That Inhibits Axonal Outgrowth. *Experimental Neurology* 124:289-298.
- Cao D, Fukuchi K, Wan H, Kim H, Li L (2006) Lack of LDL receptor aggravates learning deficits and amyloid deposits in Alzheimer transgenic mice. *Neurobiol Aging* 27:1632-1643.
- Carson MJ, Doose JM, Melchior B, Schmid CD, Ploix CC (2006a) CNS immune privilege: hiding in plain sight. *Immunol Rev* 213:48-65.
- Carson MJ, Thrash JC, Walter B (2006b) The cellular response in neuroinflammation: The role of leukocytes, microglia and astrocytes in neuronal death and survival. *Clin Neurosci Res* 6:237-245.
- Castellano JM, Kim J, Stewart FR, Jiang H, DeMattos RB, Patterson BW, Fagan AM, Morris JC, Mawuenyega KG, Cruchaga C, Goate AM, Bales KR, Paul SM, Bateman RJ, Holtzman DM (2011) Human apoE isoforms differentially regulate brain amyloid-beta peptide clearance. *Sci Transl Med* 3:89ra57.
- Champagne D, Dupuy JB, Rochford J, Poirier J (2002) Apolipoprotein E knockout mice display procedural deficits in the Morris water maze: analysis of learning strategies in three versions of the task. *Neuroscience* 114:641-654.
- Chang S, ran Ma T, Miranda RD, Balestra ME, Mahley RW, Huang Y (2005) Lipid- and receptor-binding regions of apolipoprotein E4 fragments act in concert to cause

- mitochondrial dysfunction and neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:18694-18699.
- Chartier-Harlin MC, Crawford F, Houlden H, Warren A, Hughes D, Fidani L, Goate A, Rossor M, Roques P, Hardy J, et al. (1991) Early-onset Alzheimer's disease caused by mutations at codon 717 of the beta-amyloid precursor protein gene. *Nature* 353:844-846.
- Chaudhry FA, Lehre KP, van Lookeren Campagne M, Ottersen OP, Danbolt NC, Storm-Mathisen J (1995) Glutamate transporters in glial plasma membranes: highly differentiated localizations revealed by quantitative ultrastructural immunocytochemistry. *Neuron* 15:711-720.
- Chen WJ, Goldstein JL, Brown MS (1990) NPXY, a sequence often found in cytoplasmic tails, is required for coated pit-mediated internalization of the low density lipoprotein receptor. *Journal of Biological Chemistry* 265:3116-3123.
- Choi-Miura NH, Ihara Y, Fukuchi K, Takeda M, Nakano Y, Tobe T, Tomita M (1992) SP-40,40 is a constituent of Alzheimer's amyloid. *Acta Neuropathol* 83:260-264.
- Chung DW, Yoo KY, Hwang IK, Kim DW, Chung JY, Lee CH, Choi JH, Choi SY, Youn HY, Lee IS, Won MH (2009) Systemic Administration of Lipopolysaccharide Induces Cyclooxygenase-2 Immunoreactivity in Endothelium and Increases Microglia in the Mouse Hippocampus. *Cell Mol Neurobiol*.
- Cirrito JR, Deane R, Fagan AM, Spinner ML, Parsadanian M, Finn MB, Jiang H, Prior JL, Sagare A, Bales KR, Paul SM, Zlokovic BV, Pivnicka-Worms D, Holtzman DM (2005) P-glycoprotein deficiency at the blood-brain barrier increases amyloid-beta deposition in an Alzheimer disease mouse model. *J Clin Invest* 115:3285-3290.
- Citron M, Diehl TS, Gordon G, Biere AL, Seubert P, Selkoe DJ (1996) Evidence that the 42- and 40-amino acid forms of amyloid beta protein are generated from the beta-amyloid precursor protein by different protease activities. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:13170-13175.
- Citron M, Westaway D, Xia W, Carlson G, Diehl T, Levesque G, Johnson-Wood K, Lee M, Seubert P, Davis A, Kholodenko D, Motter R, Sherrington R, Perry B, Yao H, Strome R, Lieberburg I, Rommens J, Kim S, Schenk D, Fraser P, St George Hyslop P, Selkoe DJ (1997) Mutant presenilins of Alzheimer's disease increase production of 42-residue amyloid beta-protein in both transfected cells and transgenic mice. *Nat Med* 3:67-72.
- Cole GM, Ard MD (2000) Influence of lipoproteins on microglial degradation of Alzheimer's amyloid beta-protein. *Microsc Res Tech* 50:316-324.
- Colton CA, Needham LK, Brown C, Cook D, Rasheed K, Burke JR, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Vitek MP (2004) APOE genotype-specific differences in human and mouse macrophage nitric oxide production. *J Neuroimmunol* 147:62-67.
- Coon KD, Myers AJ, Craig DW, Webster JA, Pearson JV, Lince DH, Zismann VL, Beach TG, Leung D, Bryden L, Halperin RF, Marlowe L, Kaleem M, Walker DG, Ravid R, Heward CB, Rogers J, Papassotiropoulos A, Reiman EM, Hardy J, Stephan DA (2007) A high-density whole-genome association study reveals that APOE is the major susceptibility gene for sporadic late-onset Alzheimer's disease. *J Clin Psychiatry* 68:613-618.
- Coons AH (1971) The development of immunohistochemistry. *Ann N Y Acad Sci* 177:5-9.
- Coons AH, Kaplan MH (1950) Localization of antigen in tissue cells; improvements in a method for the detection of antigen by means of fluorescent antibody. *J Exp Med* 91:1-13.

- Cooper AD (1997) Hepatic uptake of chylomicron remnants. *J Lipid Res* 38:2173-2192.
- Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Small GW, Roses AD, Haines JL, Pericak-Vance MA (1993) Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science* 261:921-923.
- Costa DA, Nilsson LN, Bales KR, Paul SM, Potter H (2004) Apolipoprotein is required for the formation of filamentous amyloid, but not for amorphous Abeta deposition, in an AbetaPP/PS double transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 6:509-514.
- Couper KN, Blount DG, Riley EM (2008) IL-10: the master regulator of immunity to infection. *J Immunol* 180:5771-5777.
- Crain SM, Bornstein MB (1972) Organotypic bioelectric activity in cultured reagggregates of dissociated rodent brain cells. *Science* 176:182-184.
- Cruts M, Van Broeckhoven C (1998) Presenilin mutations in Alzheimer's disease. *Hum Mutat* 11:183-190.
- Cruz JC, Sugii S, Yu C, Chang TY (2000) Role of Niemann-Pick type C1 protein in intracellular trafficking of low density lipoprotein-derived cholesterol. *J Biol Chem* 275:4013-4021.
- Dahlgren KN, Manelli AM, Stine WB, Jr., Baker LK, Krafft GA, LaDu MJ (2002) Oligomeric and fibrillar species of amyloid-beta peptides differentially affect neuronal viability. *J Biol Chem* 277:32046-32053.
- Danbolt NC (2001) Glutamate uptake. *Prog Neurobiol* 65:1-105.
- Davalos D, Grutzendler J, Yang G, Kim JV, Zuo Y, Jung S, Littman DR, Dustin ML, Gan WB (2005) ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nat Neurosci* 8:752-758.
- Davignon J, Gregg RE, Sing CF (1988) Apolipoprotein E polymorphism and atherosclerosis. *Arteriosclerosis* 8:1-21.
- Davis J, Xu F, Deane R, Romanov G, Previti ML, Zeigler K, Zlokovic BV, Van Nostrand WE (2004) Early-onset and robust cerebral microvascular accumulation of amyloid beta-protein in transgenic mice expressing low levels of a vasculotropic Dutch/Iowa mutant form of amyloid beta-protein precursor. *J Biol Chem* 279:20296-20306.
- Daw EW, Payami H, Nemens EJ, Nochlin D, Bird TD, Schellenberg GD, Wijsman EM (2000) The number of trait loci in late-onset Alzheimer disease. *Am J Hum Genet* 66:196-204.
- de Bont N, Netea MG, Demacker PN, Verschueren I, Kullberg BJ, van Dijk KW, van der Meer JW, Stalenhoef AF (1999) Apolipoprotein E knock-out mice are highly susceptible to endotoxemia and *Klebsiella pneumoniae* infection. *J Lipid Res* 40:680-685.
- de Lau LM, Schipper CM, Hofman A, Koudstaal PJ, Breteler MM (2005) Prognosis of Parkinson disease: risk of dementia and mortality: the Rotterdam Study. *Arch Neurol* 62:1265-1269.
- De Strooper B, Saftig P, Craessaerts K, Vanderstichele H, Guhde G, Annaert W, Von Figura K, Van Leuven F (1998) Deficiency of presenilin-1 inhibits the normal cleavage of amyloid precursor protein. *Nature* 391:387-390.
- Deane R, Sagare A, Hamm K, Parisi M, Lane S, Finn MB, Holtzman DM, Zlokovic BV (2008) apoE isoform-specific disruption of amyloid beta peptide clearance from mouse brain. *J Clin Invest* 118:4002-4013.
- Dehouck B, Fenart L, Dehouck MP, Pierce A, Torpier G, Cecchelli R (1997) A new function for the LDL receptor: transcytosis of LDL across the blood-brain barrier. *J Cell Biol* 138:877-889.

- Dekroon RM, Armati PJ (2001) Synthesis and processing of apolipoprotein E in human brain cultures. *Glia* 33:298-305.
- DeMattos RB, Brendza RP, Heuser JE, Kierson M, Cirrito JR, Fryer J, Sullivan PM, Fagan AM, Han X, Holtzman DM (2001) Purification and characterization of astrocyte-secreted apolipoprotein E and J-containing lipoproteins from wild-type and human apoE transgenic mice. *Neurochem Int* 39:415-425.
- DeMattos RB, Cirrito JR, Parsadanian M, May PC, O'Dell MA, Taylor JW, Harmony JA, Aronow BJ, Bales KR, Paul SM, Holtzman DM (2004) ApoE and clusterin cooperatively suppress Abeta levels and deposition: evidence that ApoE regulates extracellular Abeta metabolism in vivo. *Neuron* 41:193-202.
- DeMattos RB, Curtiss LK, Williams DL (1998) A minimally lipidated form of cell-derived apolipoprotein E exhibits isoform-specific stimulation of neurite outgrowth in the absence of exogenous lipids or lipoproteins. *J Biol Chem* 273:4206-4212.
- Dewachter I, Van Dorpe J, Smeijers L, Gilis M, Kuiper C, Laenen I, Caluwaerts N, Moechars D, Checler F, Vanderstichele H, Van Leuven F (2000) Aging Increased Amyloid Peptide and Caused Amyloid Plaques in Brain of Old APP/V717I Transgenic Mice by a Different Mechanism than Mutant Presenilin1. *The Journal of Neuroscience* 20:6452-6458.
- DeWitt DA, Perry G, Cohen M, Doller C, Silver J (1998) Astrocytes regulate microglial phagocytosis of senile plaque cores of Alzheimer's disease. *Exp Neurol* 149:329-340.
- Dieckmann M, Dietrich MF, Herz J (2010) Lipoprotein receptors - an evolutionarily ancient multifunctional receptor family. *Biological Chemistry* 391:1341-1363.
- Diedrich JF, Minnigan H, Carp RI, Whitaker JN, Race R, Frey W, 2nd, Haase AT (1991) Neuropathological changes in scrapie and Alzheimer's disease are associated with increased expression of apolipoprotein E and cathepsin D in astrocytes. *J Virol* 65:4759-4768.
- Dietschy JM, Turley SD (2001) Cholesterol metabolism in the brain. *Curr Opin Lipidol* 12:105-112.
- Dong LM, Weisgraber KH (1996) Human apolipoprotein E4 domain interaction. Arginine 61 and glutamic acid 255 interact to direct the preference for very low density lipoproteins. *J Biol Chem* 271:19053-19057.
- Dong LM, Wilson C, Wardell MR, Simmons T, Mahley RW, Weisgraber KH, Agard DA (1994) Human apolipoprotein E. Role of arginine 61 in mediating the lipoprotein preferences of the E3 and E4 isoforms. *J Biol Chem* 269:22358-22365.
- Drory VE, Birnbaum M, Korczyn AD, Chapman J (2001) Association of APOE epsilon4 allele with survival in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci* 190:17-20.
- Duran-Struuck R, Dysko RC (2009) Principles of bone marrow transplantation (BMT): providing optimal veterinary and husbandry care to irradiated mice in BMT studies. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 48:11-22.
- Edbauer D, Winkler E, Regula JT, Pesold B, Steiner H, Haass C (2003) Reconstitution of gamma-secretase activity. *Nat Cell Biol* 5:486-488.
- Eddleston M, Mucke L (1993) Molecular profile of reactive astrocytes--implications for their role in neurologic disease. *Neuroscience* 54:15-36.
- Ehehalt R, Keller P, Haass C, Thiele C, Simons K (2003) Amyloidogenic processing of the Alzheimer beta-amyloid precursor protein depends on lipid rafts. *J Cell Biol* 160:113-123.

- Elder GA, Cho JY, English DF, Franciosi S, Schmeidler J, Sosa MA, Gasperi RD, Fisher EA, Mathews PM, Haroutunian V, Buxbaum JD (2007) Elevated plasma cholesterol does not affect brain Abeta in mice lacking the low-density lipoprotein receptor. *J Neurochem* 102:1220-1231.
- Elder GA, Ragnauth A, Dorr N, Franciosi S, Schmeidler J, Haroutunian V, Buxbaum JD (2008) Increased locomotor activity in mice lacking the low-density lipoprotein receptor. *Behav Brain Res* 191:256-265.
- Elias ER, Irons M (1995) Abnormal cholesterol metabolism in Smith-Lemli-Opitz syndrome. *Curr Opin Pediatr* 7:710-714.
- Eng LF, Ghirnikar RS, Lee YL (2000) Glial Fibrillary Acidic Protein: GFAP-Thirty-One Years (1969–2000). *Neurochemical Research* 25:1439-1451.
- Engvall E, Perlmann P (1971) Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* 8:871-874.
- Esser V, Limbird LE, Brown MS, Goldstein JL, Russell DW (1988) Mutational analysis of the ligand binding domain of the low density lipoprotein receptor. *Journal of Biological Chemistry* 263:13282-13290.
- Fagan AM, Watson M, Parsadanian M, Bales KR, Paul SM, Holtzman DM (2002) Human and murine ApoE markedly alters A beta metabolism before and after plaque formation in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis* 9:305-318.
- Farrer LA, Cupples LA, Haines JL, Hyman B, Kukull WA, Mayeux R, Myers RH, Pericak-Vance MA, Risch N, van Duijn CM (1997) Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease. A meta-analysis. APOE and Alzheimer Disease Meta Analysis Consortium. *JAMA* 278:1349-1356.
- Fassler R (2004) Lentiviral transgene vectors. *EMBO Rep* 5:28-29.
- Fazio S, Babaev VR, Murray AB, Hasty AH, Carter KJ, Gleaves LA, Atkinson JB, Linton MF (1997) Increased atherosclerosis in mice reconstituted with apolipoprotein E null macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:4647-4652.
- Feldman HH, Doody RS, Kivipelto M, Sparks DL, Waters DD, Jones RW, Schwam E, Schindler R, Hey-Hadavi J, DeMicco DA, Breazna A, Investigators ObotL (2010) Randomized controlled trial of atorvastatin in mild to moderate Alzheimer disease. *Neurology* 74:956-964.
- Fitch MT, Silver J (2008) CNS injury, glial scars, and inflammation: Inhibitory extracellular matrices and regeneration failure. *Experimental Neurology* 209:294-301.
- Forlenza OV, Diniz BS, Talib LL, Mendonca VA, Ojopi EB, Gattaz WF, Teixeira AL (2009) Increased serum IL-1beta level in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Dement Geriatr Cogn Disord* 28:507-512.
- Friedman G, Fromm P, Sazbon L, Grinblatt I, Shochina M, Tsenter J, Babaev S, Yehuda B, Groswasser Z (1999) Apolipoprotein E-epsilon4 genotype predicts a poor outcome in survivors of traumatic brain injury. *Neurology* 52:244-248.
- Frisoni GB, Rozzini L, Gozzetti A, Binetti G, Zanetti O, Bianchetti A, Trabucchi M, Cummings JL (1999) Behavioral syndromes in Alzheimer's disease: description and correlates. *Dement Geriatr Cogn Disord* 10:130-138.
- Fryer JD, Demattos RB, McCormick LM, O'Dell MA, Spinner ML, Bales KR, Paul SM, Sullivan PM, Parsadanian M, Bu G, Holtzman DM (2005a) The low density lipoprotein receptor regulates the level of central nervous system human and murine apolipoprotein E but does not modify amyloid plaque pathology in PDAPP mice. *J Biol Chem* 280:25754-25759.

- Fryer JD, Simmons K, Parsadanian M, Bales KR, Paul SM, Sullivan PM, Holtzman DM (2005b) Human apolipoprotein E4 alters the amyloid-beta 40:42 ratio and promotes the formation of cerebral amyloid angiopathy in an amyloid precursor protein transgenic model. *J Neurosci* 25:2803-2810.
- Fryer JD, Taylor JW, DeMattos RB, Bales KR, Paul SM, Parsadanian M, Holtzman DM (2003) Apolipoprotein E markedly facilitates age-dependent cerebral amyloid angiopathy and spontaneous hemorrhage in amyloid precursor protein transgenic mice. *J Neurosci* 23:7889-7896.
- Fullerton SM, Shirman GA, Strittmatter WJ, Matthew WD (2001) Impairment of the blood-nerve and blood-brain barriers in apolipoprotein e knockout mice. *Exp Neurol* 169:13-22.
- Fullerton SM, Strittmatter WJ, Matthew WD (1998) Peripheral sensory nerve defects in apolipoprotein E knockout mice. *Exp Neurol* 153:156-163.
- Furbee JW, Jr., Francone O, Parks JS (2002) In vivo contribution of LCAT to apolipoprotein B lipoprotein cholesteryl esters in LDL receptor and apolipoprotein E knockout mice. *J Lipid Res* 43:428-437.
- Gaillard O, Gervais A, Meillet D, Plassart E, Fontaine B, Lyon-Caen O, Delattre J, Schuller E (1998) Apolipoprotein E and multiple sclerosis: a biochemical and genetic investigation. *J Neurol Sci* 158:180-186.
- Games D, Adams D, Alessandrini R, Barbour R, Borthellette P, Blackwell C, Carr T, Clemens J, Donaldson T, Gillespie F, Guido T, Hagopian S, Johnson-Wood K, Khan K, Lee M, Leibowitz P, Lieberburg I, Little S, Masliah E, McConlogue L, Montoya-Zavala M, Mucke L, Paganini L, Penniman E, Power M, Schenk D, Seubert P, Snyder B, Soriano F, Tan H, Vitale J, Wadsworth S, Wolozin B, Zhao J (1995) Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F [beta]-amyloid precursor protein. *Nature* 373:523-527.
- Gasque P, Dean YD, McGreal EP, VanBeek J, Morgan BP (2000) Complement components of the innate immune system in health and disease in the CNS. *Immunopharmacology* 49:171-186.
- Georgopoulos S, McKee A, Kan H-Y, Zannis VI (2002) Generation and Characterization of Two Transgenic Mouse Lines Expressing Human ApoE2 in Neurons and Glial Cells. *Biochemistry* 41:9293-9301.
- Gianturco SH, Gotto AM, Jr., Hwang SL, Karlin JB, Lin AH, Prasad SC, Bradley WA (1983) Apolipoprotein E mediates uptake of Sf 100-400 hypertriglyceridemic very low density lipoproteins by the low density lipoprotein receptor pathway in normal human fibroblasts. *J Biol Chem* 258:4526-4533.
- Gil G, Faust JR, Chin DJ, Goldstein JL, Brown MS (1985) Membrane-bound domain of HMG CoA reductase is required for sterol-enhanced degradation of the enzyme. *Cell* 41:249-258.
- Ginhoux F, Greter M, Leboeuf M, Nandi S, See P, Gokhan S, Mehler MF, Conway SJ, Ng LG, Stanley ER, Samokhvalov IM, Merad M (2010) Fate Mapping Analysis Reveals That Adult Microglia Derive from Primitive Macrophages. *Science* 330:841-845.
- Glenner GG, Wong CW (1984a) Alzheimer's disease and Down's syndrome: sharing of a unique cerebrovascular amyloid fibril protein. *Biochem Biophys Res Commun* 122:1131-1135.

- Glenner GG, Wong CW (1984b) Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commun* 120:885-890.
- Goate A, Chartier-Harlin MC, Mullan M, Brown J, Crawford F, Fidani L, Giuffra L, Haynes A, Irving N, James L, et al. (1991) Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature* 349:704-706.
- Goldstein JL, Brown MS (2009) The LDL Receptor. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 29:431-438.
- Gomez-Isla T, West HL, Rebeck GW, Harr SD, Growdon JH, Locascio JJ, Perls TT, Lipsitz LA, Hyman BT (1996) Clinical and pathological correlates of apolipoprotein E epsilon 4 in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 39:62-70.
- Gordon JW, Ruddle FH (1982) Germ line transmission in transgenic mice. *Prog Clin Biol Res* 85:111-124.
- Goring HH, Terwilliger JD, Blangero J (2001) Large upward bias in estimation of locus-specific effects from genomewide scans. *Am J Hum Genet* 69:1357-1369.
- Greenow K, Pearce NJ, Ramji DP (2005) The key role of apolipoprotein E in atherosclerosis. *J Mol Med* 83:329-342.
- Gross-Bellard M, Oudet P, Chambon P (1973) Isolation of High-Molecular-Weight DNA from Mammalian Cells. *European Journal of Biochemistry* 36:32-38.
- Growdon WB, Cheung BS, Hyman BT, Rebeck GW (1999) Lack of allelic imbalance in APOE epsilon3/4 brain mRNA expression in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 272:83-86.
- Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Tung YC, Quinlan M, Wisniewski HM, Binder LI (1986) Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:4913-4917.
- Gu Y, Yang J, Ouyang X, Liu W, Li H, Bromberg J, Chen SH, Mayer L, Unkeless JC, Xiong H (2008) Interleukin 10 suppresses Th17 cytokines secreted by macrophages and T cells. *Eur J Immunol* 38:1807-1813.
- Guo L, LaDu MJ, Van Eldik LJ (2004) A dual role for apolipoprotein e in neuroinflammation: anti- and pro-inflammatory activity. *J Mol Neurosci* 23:205-212.
- Guo Y, Zhang C, Du X, Nair U, Yoo TJ (2005) Morphological and functional alterations of the cochlea in apolipoprotein E gene deficient mice. *Hear Res* 208:54-67.
- Haass C (2004) Take five--BACE and the gamma-secretase quartet conduct Alzheimer's amyloid beta-peptide generation. *EMBO J* 23:483-488.
- Haass C, Schlossmacher MG, Hung AY, Vigo-Pelfrey C, Mellon A, Ostaszewski BL, Lieberburg I, Koo EH, Schenk D, Teplow DB, et al. (1992) Amyloid beta-peptide is produced by cultured cells during normal metabolism. *Nature* 359:322-325.
- Haass C, Selkoe DJ (2007) Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:101-112.
- Haga S, Akai K, Ishii T (1989) Demonstration of microglial cells in and around senile (neuritic) plaques in the Alzheimer brain. *Acta Neuropathologica* 77:569-575.
- Halle A, Hornung V, Petzold GC, Stewart CR, Monks BG, Reinheckel T, Fitzgerald KA, Latz E, Moore KJ, Golenbock DT (2008) The NALP3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid-beta. *Nat Immunol* 9:857-865.
- Hamanaka H, Katoh-Fukui Y, Suzuki K, Kobayashi M, Suzuki R, Motegi Y, Nakahara Y, Takeshita A, Kawai M, Ishiguro K, Yokoyama M, Fujita SC (2000) Altered cholesterol metabolism in human apolipoprotein E4 knock-in mice. *Hum Mol Genet* 9:353-361.

- Hammad SM, Ranganathan S, Loukinova E, Twal WO, Argraves WS (1997) Interaction of apolipoprotein J-amyloid beta-peptide complex with low density lipoprotein receptor-related protein-2/megalin. A mechanism to prevent pathological accumulation of amyloid beta-peptide. *J Biol Chem* 272:18644-18649.
- Han SH, Einstein G, Weisgraber KH, Strittmatter WJ, Saunders AM, Pericak-Vance M, Roses AD, Schmechel DE (1994) Apolipoprotein E is localized to the cytoplasm of human cortical neurons: a light and electron microscopic study. *J Neuropathol Exp Neurol* 53:535-544.
- Han X (2004) The role of apolipoprotein E in lipid metabolism in the central nervous system. *Cell Mol Life Sci* 61:1896-1906.
- Hanahan D, Jessee J, Bloom FR (1991) Plasmid transformation of *Escherichia coli* and other bacteria. *Methods Enzymol* 204:63-113.
- Hanlon CS, Rubinsztein DC (1995) Arginine residues at codons 112 and 158 in the apolipoprotein E gene correspond to the ancestral state in humans. *Atherosclerosis* 112:85-90.
- Hardy J, Allsop D (1991) Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease. *Trends Pharmacol Sci* 12:383-388.
- Hardy J, Selkoe DJ (2002) The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 297:353-356.
- Hardy JA, Higgins GA (1992) Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* 256:184-185.
- Harel A, Wu F, Mattson MP, Morris CM, Yao PJ (2008) Evidence for CALM in directing VAMP2 trafficking. *Traffic* 9:417-429.
- Harold D, Abraham R, Hollingworth P, Sims R, Gerrish A, Hamshere ML, Pahwa JS, Moskva V, Dowzell K, Williams A, Jones N, Thomas C, Stretton A, Morgan AR, Lovestone S, Powell J, Proitsi P, Lupton MK, Brayne C, Rubinsztein DC, Gill M, Lawlor B, Lynch A, Morgan K, Brown KS, Passmore PA, Craig D, McGuinness B, Todd S, Holmes C, Mann D, Smith AD, Love S, Kehoe PG, Hardy J, Mead S, Fox N, Rossor M, Collinge J, Maier W, Jessen F, Schurmann B, van den Bussche H, Heuser I, Kornhuber J, Wiltfang J, Dichgans M, Frolich L, Hampel H, Hull M, Rujescu D, Goate AM, Kauwe JS, Cruchaga C, Nowotny P, Morris JC, Mayo K, Sleegers K, Bettens K, Engelborghs S, De Deyn PP, Van Broeckhoven C, Livingston G, Bass NJ, Gurling H, McQuillin A, Gwilliam R, Deloukas P, Al-Chalabi A, Shaw CE, Tsolaki M, Singleton AB, Guerreiro R, Muhleisen TW, Nothen MM, Moebus S, Jockel KH, Klopp N, Wichmann HE, Carrasquillo MM, Pankratz VS, Younkin SG, Holmans PA, O'Donovan M, Owen MJ, Williams J (2009) Genome-wide association study identifies variants at *CLU* and *PICALM* associated with Alzheimer's disease. *Nat Genet* 41:1088-1093.
- Harr SD, Uint L, Hollister R, Hyman BT, Mendez AJ (1996) Brain expression of apolipoproteins E, J, and A-I in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 66:2429-2435.
- Harris FM, Brecht WJ, Xu Q, Tesseur I, Kekoni L, Wyss-Coray T, Fish JD, Masliah E, Hopkins PC, Scarse-Levie K, Weisgraber KH, Mucke L, Mahley RW, Huang Y (2003) Carboxyl-terminal-truncated apolipoprotein E4 causes Alzheimer's disease-like neurodegeneration and behavioral deficits in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:10966-10971.
- Harris FM, Tesseur I, Brecht WJ, Xu Q, Mullendorff K, Chang S, Wyss-Coray T, Mahley RW, Huang Y (2004) Astroglial regulation of apolipoprotein E expression in neuronal cells. Implications for Alzheimer's disease. *J Biol Chem* 279:3862-3868.

- Hartley CJ, Reddy AK, Madala S, Martin-McNulty B, Vergona R, Sullivan ME, Halks-Miller M, Taffet GE, Michael LH, Entman ML, Wang YX (2000) Hemodynamic changes in apolipoprotein E-knockout mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 279:H2326-2334.
- Hasty AH, Shimano H, Osuga J, Namatame I, Takahashi A, Yahagi N, Perrey S, Iizuka Y, Tamura Y, Amemiya-Kudo M, Yoshikawa T, Okazaki H, Ohashi K, Harada K, Matsuzaka T, Sone H, Gotoda T, Nagai R, Ishibashi S, Yamada N (2001) Severe hypercholesterolemia, hypertriglyceridemia, and atherosclerosis in mice lacking both leptin and the low density lipoprotein receptor. *J Biol Chem* 276:37402-37408.
- Hatters DM, Budamagunta MS, Voss JC, Weisgraber KH (2005a) Modulation of apolipoprotein E structure by domain interaction: differences in lipid-bound and lipid-free forms. *J Biol Chem* 280:34288-34295.
- Hatters DM, Peters-Libeu CA, Weisgraber KH (2005b) Engineering conformational destabilization into mouse apolipoprotein E. A model for a unique property of human apolipoprotein E4. *J Biol Chem* 280:26477-26482.
- Hatters DM, Peters-Libeu CA, Weisgraber KH (2006) Apolipoprotein E structure: insights into function. *Trends Biochem Sci* 31:445-454.
- Haughey NJ, Mattson MP (2003) Alzheimer's amyloid beta-peptide enhances ATP/gap junction-mediated calcium-wave propagation in astrocytes. *Neuromolecular Med* 3:173-180.
- Hauwel M, Furon E, Canova C, Griffiths M, Neal J, Gasque P (2005) Innate (inherent) control of brain infection, brain inflammation and brain repair: the role of microglia, astrocytes, "protective" glial stem cells and stromal ependymal cells. *Brain Res Brain Res Rev* 48:220-233.
- Heath KE, Gahan M, Whittall RA, Humphries SE (2001) Low-density lipoprotein receptor gene (LDLR) world-wide website in familial hypercholesterolaemia: update, new features and mutation analysis. *Atherosclerosis* 154:243-246.
- Herijgers N, Van Eck M, Groot PH, Hoogerbrugge PM, Van Berkel TJ (2000) Low density lipoprotein receptor of macrophages facilitates atherosclerotic lesion formation in C57Bl/6 mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20:1961-1967.
- Herz J (1993) The LDL-receptor-related protein - portrait of a multifunctional receptor. *Current Opinion in Lipidology* 4:107-113.
- Herz J, Beffert U (2000) Apolipoprotein E receptors: linking brain development and Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci* 1:51-58.
- Herz J, Bock HH (2002) Lipoprotein receptors in the nervous system. *Annu Rev Biochem* 71:405-434.
- Herz J, Willnow TE (1994) Functions of the LDL receptor gene family. *Ann N Y Acad Sci* 737:14-19.
- Hickey WF, Kimura H (1988) Perivascular microglial cells of the CNS are bone marrow-derived and present antigen in vivo. *Science* 239:290-292.
- Hickman SE, Allison EK, El Khoury J (2008) Microglial dysfunction and defective beta-amyloid clearance pathways in aging Alzheimer's disease mice. *J Neurosci* 28:8354-8360.
- Hirase H (2005) A multi-photon window onto neuronal-glial-vascular communication. *Trends Neurosci* 28:217-219.
- Hirsch-Reinshagen V, Maia LF, Burgess BL, Blain JF, Naus KE, Mclsaac SA, Parkinson PF, Chan JY, Tansley GH, Hayden MR, Poirier J, Van Nostrand W, Wellington CL (2005) The absence of ABCA1 decreases soluble ApoE levels but does not diminish amyloid

- deposition in two murine models of Alzheimer disease. *J Biol Chem* 280:43243-43256.
- Hofmann A, Kessler B, Ewerling S, Weppert M, Vogg B, Ludwig H, Stojkovic M, Boelhaue M, Brem G, Wolf E, & Pfeifer A (2003) Efficient transgenesis in farm animals by lentiviral vectors *EMBO Rep* 4:1054-1060.
- Holtzman DM, Bales KR, Tenkova T, Fagan AM, Parsadanian M, Sartorius LJ, Mackey B, Olney J, McKeel D, Wozniak D, Paul SM (2000a) Apolipoprotein E isoform-dependent amyloid deposition and neuritic degeneration in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:2892-2897.
- Holtzman DM, Bales KR, Wu S, Bhat P, Parsadanian M, Fagan AM, Chang LK, Sun Y, Paul SM (1999) Expression of human apolipoprotein E reduces amyloid-beta deposition in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Clin Invest* 103:R15-R21.
- Holtzman DM, Fagan AM, Mackey B, Tenkova T, Sartorius L, Paul SM, Bales K, Ashe KH, Irizarry MC, Hyman BT (2000b) Apolipoprotein E facilitates neuritic and cerebrovascular plaque formation in an Alzheimer's disease model. *Ann Neurol* 47:739-747.
- Holtzman DM, Morris JC, Goate AM (2011) Alzheimer's disease: the challenge of the second century. *Sci Transl Med* 3:77sr71.
- Holtzman DM, Pitas RE, Kilbridge J, Nathan B, Mahley RW, Bu G, Schwartz AL (1995) Low density lipoprotein receptor-related protein mediates apolipoprotein E-dependent neurite outgrowth in a central nervous system-derived neuronal cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:9480-9484.
- Hone E, Martins LJ, Jeoung M, Ji TH, Gandy SE, Martins RN (2005) Alzheimer's disease amyloid-beta peptide modulates apolipoprotein E isoform specific receptor binding. *J Alzheimers Dis* 7:303-314.
- Howell BW, Herz J (2001) The LDL receptor gene family: signaling functions during development. *Current Opinion in Neurobiology* 11:74-81.
- Hsia AY, Masliah E, McConlogue L, Yu GQ, Tatsuno G, Hu K, Kholodenko D, Malenka RC, Nicoll RA, Mucke L (1999) Plaque-independent disruption of neural circuits in Alzheimer's disease mouse models. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:3228-3233.
- Hsiao K, Chapman P, Nilsen S, Eckman C, Harigaya Y, Younkin S, Yang F, Cole G (1996) Correlative memory deficits, A β elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. *Science* 274:99-102.
- Hu J, Akama KT, Krafft GA, Chromy BA, Van Eldik LJ (1998) Amyloid-beta peptide activates cultured astrocytes: morphological alterations, cytokine induction and nitric oxide release. *Brain Res* 785:195-206.
- Huang X, Chen PC, Poole C (2004a) APOE- ϵ 2 allele associated with higher prevalence of sporadic Parkinson disease. *Neurology* 62:2198-2202.
- Huang Y (2010) Mechanisms linking apolipoprotein E isoforms with cardiovascular and neurological diseases. *Curr Opin Lipidol* 21:337-345.
- Huang Y, Ji ZS, Brecht WJ, Rall SC, Jr., Taylor JM, Mahley RW (1999) Overexpression of apolipoprotein E3 in transgenic rabbits causes combined hyperlipidemia by stimulating hepatic VLDL production and impairing VLDL lipolysis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19:2952-2959.
- Huang Y, Liu XQ, Rall SC, Jr., Mahley RW (1998) Apolipoprotein E2 reduces the low density lipoprotein level in transgenic mice by impairing lipoprotein lipase-mediated lipolysis of triglyceride-rich lipoproteins. *J Biol Chem* 273:17483-17490.

- Huang Y, Liu XQ, Wyss-Coray T, Brecht WJ, Sanan DA, Mahley RW (2001) Apolipoprotein E fragments present in Alzheimer's disease brains induce neurofibrillary tangle-like intracellular inclusions in neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:8838-8843.
- Huang Y, Rall SC, Jr, Mahley RW (1997a) Genetic Factors Precipitating Type III Hyperlipoproteinemia in Hypolipidemic Transgenic Mice Expressing Human Apolipoprotein E2. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17:2817-2824.
- Huang Y, Schwendner SW, Rall SC, Jr., Sanan DA, Mahley RW (1997b) Apolipoprotein E2 transgenic rabbits. Modulation of the type III hyperlipoproteinemic phenotype by estrogen and occurrence of spontaneous atherosclerosis. *J Biol Chem* 272:22685-22694.
- Huang Y, von Eckardstein A, Wu S, Maeda N, Assmann G (1994) A plasma lipoprotein containing only apolipoprotein E and with gamma mobility on electrophoresis releases cholesterol from cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:1834-1838.
- Huang Y, Weisgraber KH, Mucke L, Mahley RW (2004b) Apolipoprotein E: diversity of cellular origins, structural and biophysical properties, and effects in Alzheimer's disease. *J Mol Neurosci* 23:189-204.
- Hussain I, Hawkins J, Shikotra A, Riddell DR, Faller A, Dingwall C (2003) Characterization of the ectodomain shedding of the beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme 1 (BACE1). *J Biol Chem* 278:36264-36268.
- Igbavboa U, Avdulov NA, Chochina SV, Wood WG (1997) Transbilayer distribution of cholesterol is modified in brain synaptic plasma membranes of knockout mice deficient in the low-density lipoprotein receptor, apolipoprotein E, or both proteins. *J Neurochem* 69:1661-1667.
- Ignatius MJ, Gebicke-Harter PJ, Skene JH, Schilling JW, Weisgraber KH, Mahley RW, Shooter EM (1986) Expression of apolipoprotein E during nerve degeneration and regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:1125-1129.
- Ignatius MJ, Shooter EM, Pitas RE, Mahley RW (1987) Lipoprotein uptake by neuronal growth cones in vitro. *Science* 236:959-962.
- Ikawa M, Tanaka N, Kao WWY, Verma IM (2003) Generation of Transgenic Mice Using Lentiviral Vectors: A Novel Preclinical Assessment of Lentiviral Vectors for Gene Therapy. *Mol Ther* 8:666-673.
- Imai Y, Iбата I, Ito D, Ohsawa K, Kohsaka S (1996) A Novel Gene in the Major Histocompatibility Complex Class III Region Encoding an EF Hand Protein Expressed in a Monocytic Lineage. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 224:855-862.
- Innerarity TL, Pitas RE, Mahley RW (1979) Binding of arginine-rich (E) apoprotein after recombination with phospholipid vesicles to the low density lipoprotein receptors of fibroblasts. *J Biol Chem* 254:4186-4190.
- Ishibashi S, Brown MS, Goldstein JL, Gerard RD, Hammer RE, Herz J (1993) Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice and its reversal by adenovirus-mediated gene delivery. *J Clin Invest* 92:883-893.
- Ishikawa Y, Fielding CJ, Fielding PE (1988) A change in apolipoprotein B expression is required for the binding of apolipoprotein E to very low density lipoprotein. *J Biol Chem* 263:2744-2749.
- Itagaki S, McGeer PL, Akiyama H (1988) Presence of T-cytotoxic suppressor and leucocyte common antigen positive cells in Alzheimer's disease brain tissue. *Neurosci Lett* 91:259-264.

- Ito S, Ohtsuki S, Kamiie J, Nezu Y, Terasaki T (2007) Cerebral clearance of human amyloid-beta peptide (1-40) across the blood-brain barrier is reduced by self-aggregation and formation of low-density lipoprotein receptor-related protein-1 ligand complexes. *J Neurochem* 103:2482-2490.
- Iurescia S, Fioretti D, Mangialasche F, Rinaldi M (2010) The pathological cross talk between apolipoprotein E and amyloid-beta peptide in Alzheimer's disease: emerging gene-based therapeutic approaches. *J Alzheimers Dis* 21:35-48.
- Jankowsky JL, Younkin LH, Gonzales V, Fadale DJ, Slunt HH, Lester HA, Younkin SG, Borchelt DR (2007) Rodent A beta modulates the solubility and distribution of amyloid deposits in transgenic mice. *J Biol Chem* 282:22707-22720.
- Jeon H, Blacklow SC (2005) Structure and physiologic function of the low-density lipoprotein receptor. *Annu Rev Biochem* 74:535-562.
- Jiang Q, Lee CY, Mandrekar S, Wilkinson B, Cramer P, Zelcer N, Mann K, Lamb B, Willson TM, Collins JL, Richardson JC, Smith JD, Comery TA, Riddell D, Holtzman DM, Tontonoz P, Landreth GE (2008) ApoE promotes the proteolytic degradation of Aβ. *Neuron* 58:681-693.
- Jick H, Zornberg GL, Jick SS, Seshadri S, Drachman DA (2000) Statins and the risk of dementia. *Lancet* 356:1627-1631.
- Johnson-Wood K, Lee M, Motter R, Hu K, Gordon G, Barbour R, Khan K, Gordon M, Tan H, Games D, Lieberburg I, Schenk D, Seubert P, McConlogue L (1997) Amyloid precursor protein processing and Aβ₄₂ deposition in a transgenic mouse model of Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:1550-1555.
- Jones C, Hammer RE, Li WP, Cohen JC, Hobbs HH, Herz J (2003) Normal sorting but defective endocytosis of the low density lipoprotein receptor in mice with autosomal recessive hypercholesterolemia. *J Biol Chem* 278:29024-29030.
- Jong MC, Dahlmans VE, van Gorp PJ, Breuer ML, Mol MJ, van der Zee A, Frants RR, Hofker MH, Havekes LM (1996) Both lipolysis and hepatic uptake of VLDL are impaired in transgenic mice coexpressing human apolipoprotein E*3Leiden and human apolipoprotein C1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 16:934-940.
- Jordan BD, Relkin NR, Ravdin LD, Jacobs AR, Bennett A, Gandy S (1997) Apolipoprotein E epsilon4 associated with chronic traumatic brain injury in boxing. *JAMA* 278:136-140.
- Jordan J, Galindo MF, Miller RJ, Reardon CA, Getz GS, LaDu MJ (1998) Isoform-specific effect of apolipoprotein E on cell survival and beta-amyloid-induced toxicity in rat hippocampal pyramidal neuronal cultures. *J Neurosci* 18:195-204.
- Kaether C, Haass C (2004) A lipid boundary separates APP and secretases and limits amyloid beta-peptide generation. *J Cell Biol* 167:809-812.
- Kalaria RN, Maestre GE, Arizaga R, Friedland RP, Galasko D, Hall K, Luchsinger JA, Ogunniyi A, Perry EK, Potocnik F, Prince M, Stewart R, Wimo A, Zhang ZX, Antuono P (2008) Alzheimer's disease and vascular dementia in developing countries: prevalence, management, and risk factors. *Lancet Neurol* 7:812-826.
- Kanekiyo T, Zhang J, Liu Q, Liu C-C, Zhang L, Bu G (2011) Heparan Sulphate Proteoglycan and the Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 1 Constitute Major Pathways for Neuronal Amyloid-β Uptake. *The Journal of Neuroscience* 31:1644-1651.
- Kang J, Lemaire HG, Unterbeck A, Salbaum JM, Masters CL, Grzeschik KH, Multhaup G, Beyreuther K, Muller-Hill B (1987) The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature* 325:733-736.

- Kashon ML, Ross GW, O'Callaghan JP, Miller DB, Petrovitch H, Burchfiel CM, Sharp DS, Markesbery WR, Davis DG, Hardman J, Nelson J, White LR (2004) Associations of cortical astrogliosis with cognitive performance and dementia status. *J Alzheimers Dis* 6:595-604; discussion 673-581.
- Kasuga K, Shimohata T, Nishimura A, Shiga A, Mizuguchi T, Tokunaga J, Ohno T, Miyashita A, Kuwano R, Matsumoto N, Onodera O, Nishizawa M, Ikeuchi T (2009) Identification of independent APP locus duplication in Japanese patients with early-onset Alzheimer disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 80:1050-1052.
- Kaufmann SH, Ewing CM, Shaper JH (1987) The erasable Western blot. *Anal Biochem* 161:89-95.
- Kelenyi G (1967) Thioflavin S fluorescent and Congo red anisotropic stainings in the histologic demonstration of amyloid. *Acta Neuropathol* 7:336-348.
- Kim J, Basak JM, Holtzman DM (2009a) The role of apolipoprotein E in Alzheimer's disease. *Neuron* 63:287-303.
- Kim J, Castellano JM, Jiang H, Basak JM, Parsadanian M, Pham V, Mason SM, Paul SM, Holtzman DM (2009b) Overexpression of low-density lipoprotein receptor in the brain markedly inhibits amyloid deposition and increases extracellular A beta clearance. *Neuron* 64:632-644.
- Kimberly WT, LaVoie MJ, Ostaszewski BL, Ye W, Wolfe MS, Selkoe DJ (2003) Gamma-secretase is a membrane protein complex comprised of presenilin, nicastrin, Aph-1, and Pen-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:6382-6387.
- Klafki H, Abramowski D, Swoboda R, Paganetti PA, Staufenbiel M (1996) The carboxyl termini of beta-amyloid peptides 1-40 and 1-42 are generated by distinct gamma-secretase activities. *J Biol Chem* 271:28655-28659.
- Knouff C, Hinsdale ME, Mezdour H, Altenburg MK, Watanabe M, Quarfordt SH, Sullivan PM, Maeda N (1999) Apo E structure determines VLDL clearance and atherosclerosis risk in mice. *The Journal of Clinical Investigation* 103:1579-1586.
- Kocherhans S, Madhusudan A, Doehner J, Breu KS, Nitsch RM, Fritschy JM, Knuesel I (2010) Reduced Reelin expression accelerates amyloid-beta plaque formation and tau pathology in transgenic Alzheimer's disease mice. *J Neurosci* 30:9228-9240.
- Kofuji P, Newman EA (2004) Potassium buffering in the central nervous system. *Neuroscience* 129:1045-1056.
- Koldamova R, Staufenbiel M, Lefterov I (2005) Lack of ABCA1 considerably decreases brain ApoE level and increases amyloid deposition in APP23 mice. *J Biol Chem* 280:43224-43235.
- Kollias G, Wrighton N, Hurst J, Grosveld F (1986) Regulated expression of human A gamma-, beta-, and hybrid gamma beta-globin genes in transgenic mice: manipulation of the developmental expression patterns. *Cell* 46:89-94.
- Konsman JP, Drukarch B, Van Dam AM (2007) (Peri)vascular production and action of pro-inflammatory cytokines in brain pathology. *Clin Sci (Lond)* 112:1-25.
- Kordek R, Hainfellner JA, Liberski PP, Budka H (1999) Deposition of the prion protein (PrP) during the evolution of experimental Creutzfeldt-Jakob disease. *Acta Neuropathol* 98:597-602.
- Koronyo-Hamaoui M, Ko MK, Koronyo Y, Azoulay D, Seksenyan A, Kunis G, Pham M, Bakhsheshian J, Rogeri P, Black KL, Farkas DL, Schwartz M (2009) Attenuation of AD-like neuropathology by harnessing peripheral immune cells: local elevation of IL-10 and MMP-9. *J Neurochem* 111:1409-1424.

- Kosik KS, Joachim CL, Selkoe DJ (1986) Microtubule-associated protein tau (tau) is a major antigenic component of paired helical filaments in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:4044-4048.
- Kounnas MZ, Moir RD, Rebeck GW, Bush AI, Argraves WS, Tanzi RE, Hyman BT, Strickland DK (1995) LDL receptor-related protein, a multifunctional ApoE receptor, binds secreted beta-amyloid precursor protein and mediates its degradation. *Cell* 82:331-340.
- Kowal RC, Herz J, Weisgraber KH, Mahley RW, Brown MS, Goldstein JL (1990) Opposing effects of apolipoproteins E and C on lipoprotein binding to low density lipoprotein receptor-related protein. *J Biol Chem* 265:10771-10779.
- Kricka LJ, Thorpe GH (1986) Photographic detection of chemiluminescent and bioluminescent reactions. *Methods Enzymol* 133:404-420.
- Kricka LJ, Whitehead TP (1987) Chemiluminescent and bioluminescent immunoassays. *J Pharm Biomed Anal* 5:829-833.
- Kuwano R, Miyashita A, Arai H, Asada T, Imagawa M, Shoji M, Higuchi S, Urakami K, Kakita A, Takahashi H, Tsukie T, Toyabe S, Akazawa K, Kanazawa I, Ihara Y (2006) Dynamin-binding protein gene on chromosome 10q is associated with late-onset Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet* 15:2170-2182.
- LaDu MJ, Falduto MT, Manelli AM, Reardon CA, Getz GS, Frail DE (1994) Isoform-specific binding of apolipoprotein E to beta-amyloid. *J Biol Chem* 269:23403-23406.
- LaDu MJ, Pederson TM, Frail DE, Reardon CA, Getz GS, Falduto MT (1995) Purification of apolipoprotein E attenuates isoform-specific binding to beta-amyloid. *J Biol Chem* 270:9039-9042.
- LaDu MJ, Shah JA, Reardon CA, Getz GS, Bu G, Hu J, Guo L, van Eldik LJ (2000) Apolipoprotein E receptors mediate the effects of beta-amyloid on astrocyte cultures. *J Biol Chem* 275:33974-33980.
- LaDu MJ, Shah JA, Reardon CA, Getz GS, Bu G, Hu J, Guo L, Van Eldik LJ (2001) Apolipoprotein E and apolipoprotein E receptors modulate A beta-induced glial neuroinflammatory responses. *Neurochem Int* 39:427-434.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- Lambert JC, Heath S, Even G, Campion D, Sleegers K, Hiltunen M, Combarros O, Zelenika D, Bullido MJ, Tavernier B, Letenneur L, Bettens K, Berr C, Pasquier F, Fievet N, Barberger-Gateau P, Engelborghs S, De Deyn P, Mateo I, Franck A, Helisalmi S, Porcellini E, Hanon O, European Alzheimer's Disease Initiative I, de Pancorbo MM, Lendon C, Dufouil C, Jaillard C, Leveillard T, Alvarez V, Bosco P, Mancuso M, Panza F, Nacmias B, Bossu P, Piccardi P, Annoni G, Seripa D, Galimberti D, Hannequin D, Licastro F, Soininen H, Ritchie K, Blanche H, Dartigues JF, Tzourio C, Gut I, Van Broeckhoven C, Alperovitch A, Lathrop M, Amouyel P (2009) Genome-wide association study identifies variants at CLU and CR1 associated with Alzheimer's disease. *Nat Genet* 41:1094-1099.
- Lambert JC, Perez-Tur J, Dupire MJ, Galasko D, Mann D, Amouyel P, Hardy J, Delacourte A, Chartier-Harlin MC (1997) Distortion of allelic expression of apolipoprotein E in Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet* 6:2151-2154.
- Lamsa R, Helisalmi S, Herukka SK, Tapiola T, Pirttila T, Vepsäläinen S, Hiltunen M, Soininen H (2008) Genetic study evaluating LDLR polymorphisms and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 29:848-855.

- Landen M, Hesse C, Fredman P, Regland B, Wallin A, Blennow K (1996) Apolipoprotein E in cerebrospinal fluid from patients with Alzheimer's disease and other forms of dementia is reduced but without any correlation to the apoE4 isoform. *Dementia* 7:273-278.
- Landreth GE, Reed-Geaghan EG (2009) Toll-like receptors in Alzheimer's disease. *Curr Top Microbiol Immunol* 336:137-153.
- Laskowitz DT, Lee DM, Schmechel D, Staats HF (2000) Altered immune responses in apolipoprotein E-deficient mice. *J Lipid Res* 41:613-620.
- Laskowitz DT, Thekdi AD, Thekdi SD, Han SK, Myers JK, Pizzo SV, Bennett ER (2001) Downregulation of microglial activation by apolipoprotein E and apoE-mimetic peptides. *Exp Neurol* 167:74-85.
- Lawson LJ, Perry VH, Gordon S (1992) Turnover of resident microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience* 48:405-415.
- Lebson L, Nash K, Kamath S, Herber D, Carty N, Lee DC, Li Q, Szekeres K, Jinwal U, Koren J, Dickey CA, Gottschall PE, Morgan D, Gordon MN (2010) Trafficking CD11b-positive blood cells deliver therapeutic genes to the brain of amyloid-depositing transgenic mice. *J Neurosci* 30:9651-9658.
- Leclercq PD, Graham DI, Nicoll JAR, Gentleman SM (2002) Influence of ApoE genotype on cerebral amyloid angiopathy after closed head-injury. *Neuropathology and Applied Neurobiology* 28:161-162.
- Lee JA, Lupski JR (2006) Genomic rearrangements and gene copy-number alterations as a cause of nervous system disorders. *Neuron* 52:103-121.
- Lee JK, Jin HK, Bae JS (2009) Bone marrow-derived mesenchymal stem cells reduce brain amyloid-beta deposition and accelerate the activation of microglia in an acutely induced Alzheimer's disease mouse model. *Neurosci Lett* 450:136-141.
- Lefranc D, Vermersch P, Dallongeville J, Daems-Monpeurt C, Petit H, Delacourte A (1996) Relevance of the quantification of apolipoprotein E in the cerebrospinal fluid in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 212:91-94.
- Legocki RP, Verma DP (1981) Multiple immunoreplica Technique: screening for specific proteins with a series of different antibodies using one polyacrylamide gel. *Anal Biochem* 111:385-392.
- Lehre KP, Levy LM, Ottersen OP, Storm-Mathisen J, Danbolt NC (1995) Differential expression of two glial glutamate transporters in the rat brain: quantitative and immunocytochemical observations. *J Neurosci* 15:1835-1853.
- Lehtimäki T, Pirttilä T, Mehta PD, Wisniewski HM, Frey H, Nikkari T (1995) Apolipoprotein E (apoE) polymorphism and its influence on ApoE concentrations in the cerebrospinal fluid in Finnish patients with Alzheimer's disease. *Hum Genet* 95:39-42.
- Leijh PC, van Zwet TL, ter Kuile MN, van Furth R (1984) Effect of thioglycolate on phagocytic and microbicidal activities of peritoneal macrophages. *Infect Immun* 46:448-452.
- Leissring MA (2008) The AbetaCs of Abeta-cleaving proteases. *J Biol Chem* 283:29645-29649.
- Leoni V, Masterman T, Diczfalussy U, De Luca G, Hillert J, Björkhem I (2002) Changes in human plasma levels of the brain specific oxysterol 24S-hydroxycholesterol during progression of multiple sclerosis. *Neurosci Lett* 331:163-166.
- Lesne S, Koh MT, Kotilinek L, Kaye R, Glabe CG, Yang A, Gallagher M, Ashe KH (2006) A specific amyloid-beta protein assembly in the brain impairs memory. *Nature* 440:352-357.

- Levy E, Carman MD, Fernandez-Madrid IJ, Power MD, Lieberburg I, van Duinen SG, Bots GT, Luyendijk W, Frangione B (1990) Mutation of the Alzheimer's disease amyloid gene in hereditary cerebral hemorrhage, Dutch type. *Science* 248:1124-1126.
- Lewis BP, Shih IH, Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Burge CB (2003) Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell* 115:787-798.
- Li Y, Cam J, Bu G (2001) Low-density lipoprotein receptor family. *Molecular Neurobiology* 23:53-67.
- Li YJ, Pericak-Vance MA, Haines JL, Siddique N, McKenna-Yasek D, Hung WY, Sapp P, Allen CI, Chen W, Hosler B, Saunders AM, Dellefave LM, Brown RH, Siddique T (2004) Apolipoprotein E is associated with age at onset of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurogenetics* 5:209-213.
- Lim HY, Rutkowski JM, Helft J, Reddy ST, Swartz MA, Randolph GJ, Angeli V (2009) Hypercholesterolemic mice exhibit lymphatic vessel dysfunction and degeneration. *Am J Pathol* 175:1328-1337.
- Lindh M, Blomberg M, Jensen M, Basun H, Lannfelt L, Engvall B, Scharnagel H, Marz W, Wahlund LO, Cowburn RF (1997) Cerebrospinal fluid apolipoprotein E (apoE) levels in Alzheimer's disease patients are increased at follow up and show a correlation with levels of tau protein. *Neurosci Lett* 229:85-88.
- Linton MF, Babaev VR, Gleaves LA, Fazio S (1999) A Direct Role for the Macrophage Low Density Lipoprotein Receptor in Atherosclerotic Lesion Formation. *Journal of Biological Chemistry* 274:19204-19210.
- Linton MF, Gish R, Hubl ST, Butler E, Esquivel C, Bry WI, Boyles JK, Wardell MR, Young SG (1991) Phenotypes of apolipoprotein B and apolipoprotein E after liver transplantation. *J Clin Invest* 88:270-281.
- Liu Q, Zerbinatti CV, Zhang J, Hoe HS, Wang B, Cole SL, Herz J, Muglia L, Bu G (2007) Amyloid precursor protein regulates brain apolipoprotein E and cholesterol metabolism through lipoprotein receptor LRP1. *Neuron* 56:66-78.
- Lobo A, Launer LJ, Fratiglioni L, Andersen K, Di Carlo A, Breteler MM, Copeland JR, Dartigues JF, Jagger C, Martinez-Lage J, Soininen H, Hofman A (2000) Prevalence of dementia and major subtypes in Europe: A collaborative study of population-based cohorts. Neurologic Diseases in the Elderly Research Group. *Neurology* 54:S4-9.
- Lovestone S, Anderton BH, Hartley C, Jensen TG, Jorgensen AL (1996) The intracellular fate of apolipoprotein E is tau dependent and apoE allele-specific. *Neuroreport* 7:1005-1008.
- Lynch JR, Morgan D, Mance J, Matthew WD, Laskowitz DT (2001) Apolipoprotein E modulates glial activation and the endogenous central nervous system inflammatory response. *J Neuroimmunol* 114:107-113.
- Lynch JR, Tang W, Wang H, Vitek MP, Bennett ER, Sullivan PM, Warner DS, Laskowitz DT (2003) APOE genotype and an ApoE-mimetic peptide modify the systemic and central nervous system inflammatory response. *J Biol Chem* 278:48529-48533.
- Ma J, Brewer HB, Jr., Potter H (1996) Alzheimer A beta neurotoxicity: promotion by antichymotrypsin, ApoE4; inhibition by A beta-related peptides. *Neurobiol Aging* 17:773-780.
- Ma J, Yee A, Brewer HB, Jr., Das S, Potter H (1994) Amyloid-associated proteins alpha 1-antichymotrypsin and apolipoprotein E promote assembly of Alzheimer beta-protein into filaments. *Nature* 372:92-94.

- Ma Z, Choudhury A, Kang SA, Monestier M, Cohen PL, Eisenberg RA (2008) Accelerated atherosclerosis in ApoE deficient lupus mouse models. *Clin Immunol* 127:168-175.
- MacDonald ML, Singaraja RR, Bissada N, Ruddle P, Watts R, Karasinska JM, Gibson WT, Fievet C, Vance JE, Staels B, Hayden MR (2008) Absence of stearyl-CoA desaturase-1 ameliorates features of the metabolic syndrome in LDLR-deficient mice. *J Lipid Res* 49:217-229.
- Maeda N (2011) Development of apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 31:1957-1962.
- Mahley RW (1988) Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science* 240:622-630.
- Mahley RW, Huang Y (1999) Apolipoprotein E: from atherosclerosis to Alzheimer's disease and beyond. *Curr Opin Lipidol* 10:207-217.
- Mahley RW, Huang Y, Rall SC, Jr. (1999) Pathogenesis of type III hyperlipoproteinemia (dysbetalipoproteinemia). Questions, quandaries, and paradoxes. *J Lipid Res* 40:1933-1949.
- Mahley RW, Innerarity TL (1983) Lipoprotein receptors and cholesterol homeostasis. *Biochim Biophys Acta* 737:197-222.
- Mahley RW, Ji ZS (1999) Remnant lipoprotein metabolism: key pathways involving cell-surface heparan sulfate proteoglycans and apolipoprotein E. *J Lipid Res* 40:1-16.
- Mahley RW, Rall SC, Jr. (2000) Apolipoprotein E: far more than a lipid transport protein. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 1:507-537.
- Mahley RW, Weisgraber KH, Huang Y (2006) Apolipoprotein E4: a causative factor and therapeutic target in neuropathology, including Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:5644-5651.
- Malm TM, Koistinaho M, Parepalo M, Vatanen T, Ooka A, Karlsson S, Koistinaho J (2005) Bone-marrow-derived cells contribute to the recruitment of microglial cells in response to beta-amyloid deposition in APP/PS1 double transgenic Alzheimer mice. *Neurobiol Dis* 18:134-142.
- Mandel M, Higa A (1970) Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *Journal of Molecular Biology* 53:159-162.
- Manelli AM, Bulfinch LC, Sullivan PM, LaDu MJ (2007) Abeta42 neurotoxicity in primary co-cultures: effect of apoE isoform and Abeta conformation. *Neurobiol Aging* 28:1139-1147.
- Mann KM, Thorngate FE, Katoh-Fukui Y, Hamanaka H, Williams DL, Fujita S, Lamb BT (2004) Independent effects of APOE on cholesterol metabolism and brain Abeta levels in an Alzheimer disease mouse model. *Hum Mol Genet* 13:1959-1968.
- Maragakis NJ, Rothstein JD (2006) Mechanisms of Disease: astrocytes in neurodegenerative disease. *Nat Clin Pract Neurol* 2:679-689.
- Martinez FO, Sica A, Mantovani A, Locati M (2008) Macrophage activation and polarization. *Front Biosci* 13:453-461.
- Martins IJ, Hone E, Foster JK, Sunram-Lea SI, Gnjec A, Fuller SJ, Nolan D, Gandy SE, Martins RN (2006) Apolipoprotein E, cholesterol metabolism, diabetes, and the convergence of risk factors for Alzheimer's disease and cardiovascular disease. *Mol Psychiatry* 11:721-736.
- Martins RN, Turner BA, Carroll RT, Sweeney D, Kim KS, Wisniewski HM, Blass JP, Gibson GE, Gandy S (1995) High levels of amyloid-beta protein from S182 (Glu246) familial Alzheimer's cells. *Neuroreport* 7:217-220.

- Masocha W (2009) Systemic lipopolysaccharide (LPS)-induced microglial activation results in different temporal reduction of CD200 and CD200 receptor gene expression in the brain. *J Neuroimmunol* 214:78-82.
- Mason TE, Phifer RF, Spicer SS, Swallow RA, Dreskin RB (1969) An immunoglobulin-enzyme bridge method for localizing tissue antigens. *J Histochem Cytochem* 17:563-569.
- Massaro D, Massaro GD (2008) Apoetm1Unc mice have impaired alveologenesis, low lung function, and rapid loss of lung function. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 294:L991-997.
- Masters CL, Simms G, Weinman NA, Multhaup G, McDonald BL, Beyreuther K (1985) Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82:4245-4249.
- Matyash V, Kettenmann H (2010) Heterogeneity in astrocyte morphology and physiology. *Brain Res Rev* 63:2-10.
- May P, Bock HH, Herz J (2003) Integration of Endocytosis and Signal Transduction by Lipoprotein Receptors. *Science Signaling* 2003:pe12.
- May PC, Lampert-Etchells M, Johnson SA, Poirier J, Masters JN, Finch CE (1990) Dynamics of gene expression for a hippocampal glycoprotein elevated in Alzheimer's disease and in response to experimental lesions in rat. *Neuron* 5:831-839.
- Mayeux R (2003) Apolipoprotein E, Alzheimer disease, and African Americans. *Arch Neurol* 60:161-163.
- McCarron MO, DeLong D, Alberts MJ (1999a) APOE genotype as a risk factor for ischemic cerebrovascular disease: a meta-analysis. *Neurology* 53:1308-1311.
- McCarron MO, Hoffmann KL, DeLong DM, Gray L, Saunders AM, Alberts MJ (1999b) Intracerebral hemorrhage outcome: apolipoprotein E genotype, hematoma, and edema volumes. *Neurology* 53:2176-2179.
- McGeer PL, Akiyama H, Itagaki S, McGeer EG (1989) Immune system response in Alzheimer's disease. *Can J Neurol Sci* 16:516-527.
- McGeer PL, Itagaki S, Boyes BE, McGeer EG (1988a) Reactive microglia are positive for HLA-DR in the substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains. *Neurology* 38:1285-1291.
- McGeer PL, Itagaki S, McGeer EG (1988b) Expression of the histocompatibility glycoprotein HLA-DR in neurological disease. *Acta Neuropathol* 76:550-557.
- McGeer PL, Itagaki S, Tago H, McGeer EG (1988c) Occurrence of HLA-DR reactive microglia in Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci* 540:319-323.
- McGeer PL, McGeer EG (2002) Innate immunity, local inflammation, and degenerative disease. *Sci Aging Knowledge Environ* 2002:re3.
- McGeer PL, Schulzer M, McGeer EG (1996) Arthritis and anti-inflammatory agents as possible protective factors for Alzheimer's disease: a review of 17 epidemiologic studies. *Neurology* 47:425-432.
- Medawar PB (1948) Immunity to homologous grafted skin; the fate of skin homografts transplanted to the brain, to subcutaneous tissue, and to the anterior chamber of the eye. *Br J Exp Pathol* 29:58-69.
- Mega MS, Cummings JL, Fiorello T, Gornbein J (1996) The spectrum of behavioral changes in Alzheimer's disease. *Neurology* 46:130-135.
- Mehta JL, Sanada N, Hu CP, Chen J, Dandapat A, Sugawara F, Satoh H, Inoue K, Kawase Y, Jishage K, Suzuki H, Takeya M, Schnackenberg L, Beger R, Hermonat PL, Thomas M,

- Sawamura T (2007) Deletion of LOX-1 reduces atherogenesis in LDLR knockout mice fed high cholesterol diet. *Circ Res* 100:1634-1642.
- Mennicken F, Maki R, de Souza EB, Quirion R (1999) Chemokines and chemokine receptors in the CNS: a possible role in neuroinflammation and patterning. *Trends Pharmacol Sci* 20:73-78.
- Menzel HJ, Kladetzky RG, Assmann G (1983) Apolipoprotein E polymorphism and coronary artery disease. *Arteriosclerosis* 3:310-315.
- Meresse S, Delbart C, Fruchart JC, Cecchelli R (1989) Low-density lipoprotein receptor on endothelium of brain capillaries. *J Neurochem* 53:340-345.
- Metzger RE, LaDu MJ, Pan JB, Getz GS, Frail DE, Falduto MT (1996) Neurons of the human frontal cortex display apolipoprotein E immunoreactivity: implications for Alzheimer's disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 55:372-380.
- Miao J, Vitek MP, Xu F, Previti ML, Davis J, Van Nostrand WE (2005) Reducing cerebral microvascular amyloid-beta protein deposition diminishes regional neuroinflammation in vasculotropic mutant amyloid precursor protein transgenic mice. *J Neurosci* 25:6271-6277.
- Mildner A, Schmidt H, Nitsche M, Merkler D, Hanisch UK, Mack M, Heikenwalder M, Bruck W, Priller J, Prinz M (2007) Microglia in the adult brain arise from Ly-6ChiCCR2+ monocytes only under defined host conditions. *Nat Neurosci* 10:1544-1553.
- Miners JS, Baig S, Palmer J, Palmer LE, Kehoe PG, Love S (2008) Abeta-degrading enzymes in Alzheimer's disease. *Brain Pathol* 18:240-252.
- Miners JS, Van Helmond Z, Chalmers K, Wilcock G, Love S, Kehoe PG (2006) Decreased Expression and Activity of Nephilysin in Alzheimer Disease Are Associated With Cerebral Amyloid Angiopathy. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* 65:1012-1021 1010.1097/1001.jnen.0000240463.0000287886.0000240469a.
- Minsky M (1988) Memoir on inventing the confocal scanning microscope. *Scanning* 10:128-138.
- Moechars D, Dewachter I, Lorent K, Revers^Γ D, Baekelandt V, Naidu A, Tesseur I, Spittaels K, Haute CVD, Checler Fd, Godaux E, Cordell B, Van Leuven F (1999) Early Phenotypic Changes in Transgenic Mice That Overexpress Different Mutants of Amyloid Precursor Protein in Brain. *Journal of Biological Chemistry* 274:6483-6492.
- Moghadasian MH, McManus BM, Nguyen LB, Shefer S, Nadji M, Godin DV, Green TJ, Hill J, Yang Y, Scudamore CH, Frohlich JJ (2001) Pathophysiology of apolipoprotein E deficiency in mice: relevance to apo E-related disorders in humans. *FASEB J* 15:2623-2630.
- Monsonogo A, Zota V, Karni A, Krieger JI, Bar-Or A, Bitan G, Budson AE, Sperling R, Selkoe DJ, Weiner HL (2003) Increased T cell reactivity to amyloid beta protein in older humans and patients with Alzheimer disease. *J Clin Invest* 112:415-422.
- Morrow JA, Arnold KS, Dong J, Balestra ME, Innerarity TL, Weisgraber KH (2000a) Effect of arginine 172 on the binding of apolipoprotein E to the low density lipoprotein receptor. *J Biol Chem* 275:2576-2580.
- Morrow JA, Segall ML, Lund-Katz S, Phillips MC, Knapp M, Rupp B, Weisgraber KH (2000b) Differences in stability among the human apolipoprotein E isoforms determined by the amino-terminal domain. *Biochemistry* 39:11657-11666.
- Moulard B, Sefiani A, Laamri A, Malafosse A, Camu W (1996) Apolipoprotein E genotyping in sporadic amyotrophic lateral sclerosis: evidence for a major influence on the clinical presentation and prognosis. *J Neurol Sci* 139 Suppl:34-37.

- Mucke L, Masliah E, Yu GQ, Mallory M, Rockenstein EM, Tatsuno G, Hu K, Kholodenko D, Johnson-Wood K, McConlogue L (2000) High-level neuronal expression of abeta 1-42 in wild-type human amyloid protein precursor transgenic mice: synaptotoxicity without plaque formation. *J Neurosci* 20:4050-4058.
- Mulder M, Jansen PJ, Janssen BJ, van de Berg WD, van der Boom H, Havekes LM, de Kloet RE, Ramaekers FC, Blokland A (2004) Low-density lipoprotein receptor-knockout mice display impaired spatial memory associated with a decreased synaptic density in the hippocampus. *Neurobiol Dis* 16:212-219.
- Mulder M, Koopmans G, Wassink G, Al Mansouri G, Simard ML, Havekes LM, Prickaerts J, Blokland A (2007) LDL receptor deficiency results in decreased cell proliferation and presynaptic bouton density in the murine hippocampus. *Neurosci Res* 59:251-256.
- Mulder M, Ravid R, Swaab DF, de Kloet ER, Haasdijk ED, Julk J, van der Boom JJ, Havekes LM (1998) Reduced levels of cholesterol, phospholipids, and fatty acids in cerebrospinal fluid of Alzheimer disease patients are not related to apolipoprotein E4. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 12:198-203.
- Mullan M, Crawford F, Axelman K, Houlden H, Lilius L, Winblad B, Lannfelt L (1992) A pathogenic mutation for probable Alzheimer's disease in the APP gene at the N-terminus of beta-amyloid. *Nat Genet* 1:345-347.
- Mullis KB, Faloona FA (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155:335-350.
- Mumm JS, Kopan R (2000) Notch signaling: from the outside in. *Dev Biol* 228:151-165.
- Nagele RG, Wegiel J, Venkataraman V, Imaki H, Wang KC (2004) Contribution of glial cells to the development of amyloid plaques in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 25:663-674.
- Nagy A, Gertsenstein M, Vintersten K, Behringer R (2003) *Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual (Third Edition)*: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Nakane PK, Pierce GB, Jr. (1966) Enzyme-labeled antibodies: preparation and application for the localization of antigens. *J Histochem Cytochem* 14:929-931.
- Nakashima Y, Plump AS, Raines EW, Breslow JL, Ross R (1994) ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree. *Arterioscler Thromb* 14:133-140.
- Nakaya H, Summers BD, Nicholson AC, Gotto AM, Jr., Hajjar DP, Han J (2009) Atherosclerosis in LDLR-knockout mice is inhibited, but not reversed, by the PPARgamma ligand pioglitazone. *Am J Pathol* 174:2007-2014.
- Namba Y, Tomonaga M, Kawasaki H, Otomo E, Ikeda K (1991) Apolipoprotein E immunoreactivity in cerebral amyloid deposits and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease and kuru plaque amyloid in Creutzfeldt-Jakob disease. *Brain Res* 541:163-166.
- Narayanaswami V, Ryan RO (2000) Molecular basis of exchangeable apolipoprotein function. *Biochim Biophys Acta* 1483:15-36.
- Nathan BP, Bellosta S, Sanan DA, Weisgraber KH, Mahley RW, Pitas RE (1994) Differential effects of apolipoproteins E3 and E4 on neuronal growth in vitro. *Science* 264:850-852.
- Nathan BP, Chang KC, Bellosta S, Brisch E, Ge N, Mahley RW, Pitas RE (1995) The inhibitory effect of apolipoprotein E4 on neurite outgrowth is associated with microtubule depolymerization. *J Biol Chem* 270:19791-19799.

- Naura AS, Hans CP, Zerfaoui M, Errami Y, Ju J, Kim H, Matrougui K, Kim JG, Boulares AH (2009) High-fat diet induces lung remodeling in ApoE-deficient mice: an association with an increase in circulatory and lung inflammatory factors. *Lab Invest* 89:1243-1251.
- Nilsson LN, Arendash GW, Leighty RE, Costa DA, Low MA, Garcia MF, Cracciolo JR, Rojiani A, Wu X, Bales KR, Paul SM, Potter H (2004) Cognitive impairment in PDAPP mice depends on ApoE and ACT-catalyzed amyloid formation. *Neurobiol Aging* 25:1153-1167.
- Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F (2005) Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science* 308:1314-1318.
- Niskakangas T, Ohman J, Niemela M, Ilveskoski E, Kunnas TA, Karhunen PJ (2001) Association of apolipoprotein E polymorphism with outcome after aneurysmal subarachnoid hemorrhage: a preliminary study. *Stroke* 32:1181-1184.
- Notkola IL, Sulkava R, Pekkanen J, Erkinjuntti T, Ehnholm C, Kivinen P, Tuomilehto J, Nissinen A (1998) Serum total cholesterol, apolipoprotein E epsilon 4 allele, and Alzheimer's disease. *Neuroepidemiology* 17:14-20.
- Nukina N, Ihara Y (1986) One of the antigenic determinants of paired helical filaments is related to tau protein. *J Biochem* 99:1541-1544.
- Oakley H, Cole SL, Logan S, Maus E, Shao P, Craft J, Guillozet-Bongaarts A, Ohno M, Disterhoft J, Van Eldik L, Berry R, Vassar R (2006) Intraneuronal beta-amyloid aggregates, neurodegeneration, and neuron loss in transgenic mice with five familial Alzheimer's disease mutations: potential factors in amyloid plaque formation. *J Neurosci* 26:10129-10140.
- Oda T, Pasinetti GM, Osterburg HH, Anderson C, Johnson SA, Finch CE (1994) Purification and characterization of brain clusterin. *Biochem Biophys Res Commun* 204:1131-1136.
- Oda T, Wals P, Osterburg HH, Johnson SA, Pasinetti GM, Morgan TE, Rozovsky I, Stine WB, Snyder SW, Holzman TF, et al. (1995) Clusterin (apoJ) alters the aggregation of amyloid beta-peptide (A beta 1-42) and forms slowly sedimenting A beta complexes that cause oxidative stress. *Exp Neurol* 136:22-31.
- Okabe M, Ikawa M, Kominami K, Nakanishi T, Nishimune Y (1997) 'Green mice' as a source of ubiquitous green cells. *FEBS Lett* 407:313-319.
- Olson MI, Shaw CM (1969) Presenile dementia and Alzheimer's disease in mongolism. *Brain* 92:147-156.
- Ophir G, Meilin S, Efrati M, Chapman J, Karussis D, Roses A, Michaelson DM (2003) Human apoE3 but not apoE4 rescues impaired astrocyte activation in apoE null mice. *Neurobiology of Disease* 12:56-64.
- Park F (2007) Lentiviral vectors: are they the future of animal transgenesis? *Physiological Genomics* 31:159-173.
- Pavlov OV, Bobryshev Yu V, Balabanov Yu V, Ashwell K (1995) An in vitro study of the effects of lovastatin on human fetal brain cells. *Neurotoxicol Teratol* 17:31-39.
- Perlmutter LS, Scott SA, Barron E, Chui HC (1992) MHC class II-positive microglia in human brain: Association with alzheimer lesions. *Journal of Neuroscience Research* 33:549-558.
- Perry VH, Nicoll JAR, Holmes C (2010) Microglia in neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurol* 6:193-201.

- Pfriegeer FW (2003a) Cholesterol homeostasis and function in neurons of the central nervous system. *Cell Mol Life Sci* 60:1158-1171.
- Pfriegeer FW (2003b) Outsourcing in the brain: do neurons depend on cholesterol delivery by astrocytes? *Bioessays* 25:72-78.
- Piedrahita JA, Zhang SH, Hagaman JR, Oliver PM, Maeda N (1992) Generation of mice carrying a mutant apolipoprotein E gene inactivated by gene targeting in embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:4471-4475.
- Pils MC, Pisano F, Fasnacht N, Heinrich JM, Groebe L, Schippers A, Rozell B, Jack RS, Muller W (2010) Monocytes/macrophages and/or neutrophils are the target of IL-10 in the LPS endotoxemia model. *Eur J Immunol* 40:443-448.
- Pirttila T, Mehta PD, Soininen H, Kim KS, Heinonen O, Paljarvi L, Kosunen O, Riekkinen P, Sr., Wisniewski HM (1996a) Cerebrospinal fluid concentrations of soluble amyloid beta-protein and apolipoprotein E in patients with Alzheimer's disease: correlations with amyloid load in the brain. *Arch Neurol* 53:189-193.
- Pirttila T, Soininen H, Heinonen O, Lehtimaki T, Bogdanovic N, Paljarvi L, Kosunen O, Winblad B, Riekkinen P, Sr., Wisniewski HM, Mehta PD (1996b) Apolipoprotein E (apoE) levels in brains from Alzheimer disease patients and controls. *Brain Res* 722:71-77.
- Pitas RE, Boyles JK, Lee SH, Foss D, Mahley RW (1987a) Astrocytes synthesize apolipoprotein E and metabolize apolipoprotein E-containing lipoproteins. *Biochim Biophys Acta* 917:148-161.
- Pitas RE, Boyles JK, Lee SH, Hui D, Weisgraber KH (1987b) Lipoproteins and their receptors in the central nervous system. Characterization of the lipoproteins in cerebrospinal fluid and identification of apolipoprotein B,E(LDL) receptors in the brain. *J Biol Chem* 262:14352-14360.
- Pitas RE, Innerarity TL, Mahley RW (1980) Cell surface receptor binding of phospholipid . protein complexes containing different ratios of receptor-active and -inactive E apoprotein. *J Biol Chem* 255:5454-5460.
- Poirier J, Baccichet A, Dea D, Gauthier S (1993) Cholesterol synthesis and lipoprotein reuptake during synaptic remodelling in hippocampus in adult rats. *Neuroscience* 55:81-90.
- Popko B, Goodrum JF, Bouldin TW, Zhang SH, Maeda N (1993) Nerve regeneration occurs in the absence of apolipoprotein E in mice. *J Neurochem* 60:1155-1158.
- Potter H, Wefes IM, Nilsson LN (2001) The inflammation-induced pathological chaperones ACT and apo-E are necessary catalysts of Alzheimer amyloid formation. *Neurobiol Aging* 22:923-930.
- Prasher VP, Farrer MJ, Kessling AM, Fisher EMC, West RJ, Barber PC, Butler AC (1998) Molecular mapping of alzheimer-type dementia in Down's syndrome. *Annals of Neurology* 43:380-383.
- Prasse A, Germann M, Pechkovsky DV, Markert A, Verres T, Stahl M, Melchers I, Luttmann W, Muller-Quernheim J, Zissel G (2007) IL-10-producing monocytes differentiate to alternatively activated macrophages and are increased in atopic patients. *J Allergy Clin Immunol* 119:464-471.
- Prince GL, Delaere P, Fages C, Duyckaerts C, Hauw J-J, Tardy M (1993) Alterations of glial fibrillary acidic protein mRNA level in the aging brain and in senile dementia of the Alzheimer type. *Neuroscience Letters* 151:71-73.

- Puglielli L, Tanzi RE, Kovacs DM (2003) Alzheimer's disease: the cholesterol connection. *Nat Neurosci* 6:345-351.
- Qin Z, Itoh S, Jeney V, Ushio-Fukai M, Fukai T (2006) Essential role for the Menkes ATPase in activation of extracellular superoxide dismutase: implication for vascular oxidative stress. *FASEB J* 20:334-336.
- Quan G, Xie C, Dietschy JM, Turley SD (2003) Ontogenesis and regulation of cholesterol metabolism in the central nervous system of the mouse. *Brain Res Dev Brain Res* 146:87-98.
- Raber J, Wong D, Buttini M, Orth M, Bellosta S, Pitas RE, Mahley RW, Mucke L (1998) Isoform-specific effects of human apolipoprotein E on brain function revealed in ApoE knockout mice: increased susceptibility of females. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:10914-10919.
- Raffai RL, Dong LM, Farese RV, Jr., Weisgraber KH (2001) Introduction of human apolipoprotein E4 "domain interaction" into mouse apolipoprotein E. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:11587-11591.
- Ramaswamy G, Xu Q, Huang Y, Weisgraber KH (2005) Effect of domain interaction on apolipoprotein E levels in mouse brain. *J Neurosci* 25:10658-10663.
- Ransohoff RM, Perry VH (2009) Microglial physiology: unique stimuli, specialized responses. *Annu Rev Immunol* 27:119-145.
- Rapp A, Gmeiner B, Huttinger M (2006) Implication of apoE isoforms in cholesterol metabolism by primary rat hippocampal neurons and astrocytes. *Biochimie* 88:473-483.
- Rebeck GW, Reiter JS, Strickland DK, Hyman BT (1993) Apolipoprotein E in sporadic Alzheimer's disease: allelic variation and receptor interactions. *Neuron* 11:575-580.
- Reddick RL, Zhang SH, Maeda N (1994) Atherosclerosis in mice lacking apo E. Evaluation of lesional development and progression. *Arterioscler Thromb* 14:141-147.
- Reed KC, Mann DA (1985) Rapid transfer of DNA from agarose gels to nylon membranes. *Nucleic Acids Research* 13:7207-7221.
- Refolo LM, Malester B, LaFrancois J, Bryant-Thomas T, Wang R, Tint GS, Sambamurti K, Duff K, Pappolla MA (2000) Hypercholesterolemia accelerates the Alzheimer's amyloid pathology in a transgenic mouse model. *Neurobiol Dis* 7:321-331.
- Refolo LM, Pappolla MA, LaFrancois J, Malester B, Schmidt SD, Thomas-Bryant T, Tint GS, Wang R, Mercken M, Petanceska SS, Duff KE (2001) A cholesterol-lowering drug reduces beta-amyloid pathology in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis* 8:890-899.
- Rensen PC, van Berkel TJ (1996) Apolipoprotein E effectively inhibits lipoprotein lipase-mediated lipolysis of chylomicron-like triglyceride-rich lipid emulsions in vitro and in vivo. *J Biol Chem* 271:14791-14799.
- Reynolds JA, Tanford C (1970) The gross conformation of protein-sodium dodecyl sulfate complexes. *J Biol Chem* 245:5161-5165.
- Riddell DR, Zhou H, Atchison K, Warwick HK, Atkinson PJ, Jefferson J, Xu L, Aschmies S, Kirksey Y, Hu Y, Wagner E, Parratt A, Xu J, Li Z, Zaleska MM, Jacobsen JS, Pangalos MN, Reinhart PH (2008) Impact of apolipoprotein E (ApoE) polymorphism on brain ApoE levels. *J Neurosci* 28:11445-11453.
- Ridet JL, Malhotra SK, Privat A, Gage FH (1997) Reactive astrocytes: cellular and molecular cues to biological function. *Trends Neurosci* 20:570-577.

- Rivest S (2009) Regulation of innate immune responses in the brain. *Nat Rev Immunol* 9:429-439.
- Rogers J, Li R, Mastroeni D, Grover A, Leonard B, Ahern G, Cao P, Kolody H, Vedders L, Kolb WP, Sabbagh M (2006) Peripheral clearance of amyloid beta peptide by complement C3-dependent adherence to erythrocytes. *Neurobiol Aging* 27:1733-1739.
- Rogers J, Lubner-Narod J, Styren SD, Civin WH (1988) Expression of immune system-associated antigens by cells of the human central nervous system: relationship to the pathology of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 9:339-349.
- Roses AD (1996) Apolipoprotein E alleles as risk factors in Alzheimer's disease. *Annu Rev Med* 47:387-400.
- Rota E, Bellone G, Rocca P, Bergamasco B, Emanuelli G, Ferrero P (2006) Increased intrathecal TGF-beta1, but not IL-12, IFN-gamma and IL-10 levels in Alzheimer's disease patients. *Neurol Sci* 27:33-39.
- Roth TF, Helinski DR (1967) Evidence for circular DNA forms of a bacterial plasmid. *Proc Natl Acad Sci U S A* 58:650-657.
- Rovelet-Lecrux A, Frebourg T, Tuominen H, Majamaa K, Campion D, Remes AM (2007) APP locus duplication in a Finnish family with dementia and intracerebral haemorrhage. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 78:1158-1159.
- Rovelet-Lecrux A, Hannequin D, Raux G, Le Meur N, Laquerriere A, Vital A, Dumanchin C, Feuillette S, Brice A, Vercelletto M, Dubas F, Frebourg T, Campion D (2006) APP locus duplication causes autosomal dominant early-onset Alzheimer disease with cerebral amyloid angiopathy. *Nat Genet* 38:24-26.
- Ruiz J, Kouivaskaia D, Migliorini M, Robinson S, Saenko EL, Gorlatova N, Li D, Lawrence D, Hyman BT, Weisgraber KH, Strickland DK (2005) The apoE isoform binding properties of the VLDL receptor reveal marked differences from LRP and the LDL receptor. *J Lipid Res* 46:1721-1731.
- Sadowski MJ, Pankiewicz J, Scholtzova H, Mehta PD, Prelli F, Quartermain D, Wisniewski T (2006) Blocking the apolipoprotein E/amyloid-beta interaction as a potential therapeutic approach for Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:18787-18792.
- Sambrook J, Russell DW, (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* Cold Spring Harbor Laboratories.
- Sanan DA, Weisgraber KH, Russell SJ, Mahley RW, Huang D, Saunders A, Schmechel D, Wisniewski T, Frangione B, Roses AD, et al. (1994) Apolipoprotein E associates with beta amyloid peptide of Alzheimer's disease to form novel monofibrils. Isoform apoE4 associates more efficiently than apoE3. *J Clin Invest* 94:860-869.
- Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel D, George-Hyslop PH, Pericak-Vance MA, Joo SH, Rosi BL, Gusella JF, Crapper-MacLachlan DR, Alberts MJ, et al. (1993) Association of apolipoprotein E allele epsilon 4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease. *Neurology* 43:1467-1472.
- Schagger H, von Jagow G (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* 166:368-379.
- Scheuner D, Eckman C, Jensen M, Song X, Citron M, Suzuki N, Bird TD, Hardy J, Hutton M, Kukull W, Larson E, Levy-Lahad E, Viitanen M, Peskind E, Poorkaj P, Schellenberg G, Tanzi R, Wasco W, Lannfelt L, Selkoe D, Younkin S (1996) Secreted amyloid beta-protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo

- by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease. *Nat Med* 2:864-870.
- Schilling AF, Schinke T, Munch C, Gebauer M, Niemeier A, Priemel M, Streichert T, Rueger JM, Amling M (2005) Increased bone formation in mice lacking apolipoprotein E. *J Bone Miner Res* 20:274-282.
- Schmechel DE, Saunders AM, Strittmatter WJ, Crain BJ, Hulette CM, Joo SH, Pericak-Vance MA, Goldgaber D, Roses AD (1993) Increased amyloid beta-peptide deposition in cerebral cortex as a consequence of apolipoprotein E genotype in late-onset Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:9649-9653.
- Sedgwick JD, Schwender S, Imrich H, Dorries R, Butcher GW, ter Meulen V (1991) Isolation and direct characterization of resident microglial cells from the normal and inflamed central nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:7438-7442.
- Segrest JP, Jones MK, De Loof H, Brouillette CG, Venkatachalapathi YV, Anantharamaiah GM (1992) The amphipathic helix in the exchangeable apolipoproteins: a review of secondary structure and function. *J Lipid Res* 33:141-166.
- Selkoe DJ (1991) The molecular pathology of Alzheimer's disease. *Neuron* 6:487-498.
- Selkoe DJ (2001) Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev* 81:741-766.
- Seubert P, Vigo-Pelfrey C, Esch F, Lee M, Dovey H, Davis D, Sinha S, Schlossmacher M, Whaley J, Swindlehurst C, et al. (1992) Isolation and quantification of soluble Alzheimer's beta-peptide from biological fluids. *Nature* 359:325-327.
- Shankar GM, Li S, Mehta TH, Garcia-Munoz A, Shepardson NE, Smith I, Brett FM, Farrell MA, Rowan MJ, Lemere CA, Regan CM, Walsh DM, Sabatini BL, Selkoe DJ (2008) Amyloid-beta protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. *Nat Med* 14:837-842.
- Shepardson NE, Shankar GM, Selkoe DJ (2011a) Cholesterol level and statin use in Alzheimer disease: I. Review of epidemiological and preclinical studies. *Arch Neurol* 68:1239-1244.
- Shepardson NE, Shankar GM, Selkoe DJ (2011b) Cholesterol level and statin use in Alzheimer disease: II. Review of human trials and recommendations. *Arch Neurol* 68:1385-1392.
- Shibata M, Yamada S, Kumar SR, Calero M, Bading J, Frangione B, Holtzman DM, Miller CA, Strickland DK, Ghiso J, Zlokovic BV (2000) Clearance of Alzheimer's amyloid-ss(1-40) peptide from brain by LDL receptor-related protein-1 at the blood-brain barrier. *J Clin Invest* 106:1489-1499.
- Shimada M, Ishibashi S, Inaba T, Yagyu H, Harada K, Osuga JI, Ohashi K, Yazaki Y, Yamada N (1996) Suppression of diet-induced atherosclerosis in low density lipoprotein receptor knockout mice overexpressing lipoprotein lipase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:7242-7246.
- Shoji M, Golde TE, Ghiso J, Cheung TT, Estus S, Shaffer LM, Cai XD, McKay DM, Tintner R, Frangione B, et al. (1992) Production of the Alzheimer amyloid beta protein by normal proteolytic processing. *Science* 258:126-129.
- Simard AR, Rivest S (2004) Bone marrow stem cells have the ability to populate the entire central nervous system into fully differentiated parenchymal microglia. *FASEB J* 18:998-1000.
- Simard AR, Soulet D, Gowing G, Julien JP, Rivest S (2006) Bone marrow-derived microglia play a critical role in restricting senile plaque formation in Alzheimer's disease. *Neuron* 49:489-502.

- Simpson JE, Ince PG, Lace G, Forster G, Shaw PJ, Matthews F, Savva G, Brayne C, Wharton SB, Function MRCC, Ageing Neuropathology Study G (2010) Astrocyte phenotype in relation to Alzheimer-type pathology in the ageing brain. *Neurobiol Aging* 31:578-590.
- Sing CF, Davignon J (1985) Role of the apolipoprotein E polymorphism in determining normal plasma lipid and lipoprotein variation. *Am J Hum Genet* 37:268-285.
- Sleegers K, Brouwers N, Gijselinck I, Theuns J, Goossens D, Wauters J, Del-Favero J, Cruts M, van Duijn CM, Van Broeckhoven C (2006) APP duplication is sufficient to cause early onset Alzheimer's dementia with cerebral amyloid angiopathy. *Brain* 129:2977-2983.
- Slooter AJ, Cruts M, Kalmijn S, Hofman A, Breteler MM, Van Broeckhoven C, van Duijn CM (1998) Risk estimates of dementia by apolipoprotein E genotypes from a population-based incidence study: the Rotterdam Study. *Arch Neurol* 55:964-968.
- Sokolova A, Hill MD, Rahimi F, Warden LA, Halliday GM, Shepherd CE (2009) Monocyte chemoattractant protein-1 plays a dominant role in the chronic inflammation observed in Alzheimer's disease. *Brain Pathol* 19:392-398.
- Southern EM (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 98:503-517.
- Sparks DL, Martin TA, Gross DR, Hunsaker JC, 3rd (2000) Link between heart disease, cholesterol, and Alzheimer's disease: a review. *Microsc Res Tech* 50:287-290.
- Sparks DL, Sabbagh M, Connor D, Soares H, Lopez J, Stankovic G, Johnson-Traver S, Ziolkowski C, Browne P (2006) Statin therapy in Alzheimer's disease. *Acta Neurol Scand Suppl* 185:78-86.
- Sparks DL, Scheff SW, Hunsaker JC, 3rd, Liu H, Landers T, Gross DR (1994) Induction of Alzheimer-like beta-amyloid immunoreactivity in the brains of rabbits with dietary cholesterol. *Exp Neurol* 126:88-94.
- Stalder AK, Ermini F, Bondolfi L, Krenger W, Burbach GJ, Deller T, Coomaraswamy J, Staufenbiel M, Landmann R, Jucker M (2005) Invasion of hematopoietic cells into the brain of amyloid precursor protein transgenic mice. *J Neurosci* 25:11125-11132.
- Stallcup MR, Washington LD (1983) Region-specific initiation of mouse mammary tumor virus RNA synthesis by endogenous RNA polymerase II in preparations of cell nuclei. *Journal of Biological Chemistry* 258:2802-2807.
- Steiner H, Kostka M, Romig H, Basset G, Pesold B, Hardy J, Capell A, Meyn L, Grim ML, Baumeister R, Fichtler K, Haass C (2000) Glycine 384 is required for presenilin-1 function and is conserved in bacterial polytopic aspartyl proteases. *Nat Cell Biol* 2:848-851.
- Stengard JH, Zerba KE, Pekkanen J, Ehnholm C, Nissinen A, Sing CF (1995) Apolipoprotein E polymorphism predicts death from coronary heart disease in a longitudinal study of elderly Finnish men. *Circulation* 91:265-269.
- Stenson PD, Ball EV, Mort M, Phillips AD, Shiel JA, Thomas NST, Abeyasinghe S, Krawczak M, Cooper DN (2003) Human Gene Mutation Database (HGMD): 2003 update. *Human Mutation* 21:577-581.
- Stevens HY, Melchior B, Bell KS, Yun S, Yeh JC, Frangos JA (2008) PECAM-1 is a critical mediator of atherosclerosis. *Dis Model Mech* 1:175-181; discussion 179.
- Streit WJ (2002) Microglia as neuroprotective, immunocompetent cells of the CNS. *Glia* 40:133-139.
- Strittmatter WJ, Saunders AM, Schmechel D, Pericak-Vance M, Enghild J, Salvesen GS, Roses AD (1993a) 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* 90:1977-1981.
- Strittmatter WJ, Weisgraber KH, Goedert M, Saunders AM, Huang D, Corder EH, Dong LM, Jakes R, Alberts MJ, Gilbert JR, et al. (1994) Hypothesis: microtubule instability and paired helical filament formation in the Alzheimer disease brain are related to apolipoprotein E genotype. *Exp Neurol* 125:163-171; discussion 172-164.
- Strittmatter WJ, Weisgraber KH, Huang DY, Dong LM, Salvesen GS, Pericak-Vance M, Schmechel D, Saunders AM, Goldgaber D, Roses AD (1993b) Binding of human apolipoprotein E to synthetic amyloid beta peptide: isoform-specific effects and implications for late-onset Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:8098-8102.
- Sturchler-Pierrat C, Abramowski D, Duke M, Wiederhold KH, Mistl C, Rothacher S, Ledermann B, Burki K, Frey P, Paganetti PA, Waridel C, Calhoun ME, Jucker M, Probst A, Staufenbiel M, Sommer B (1997) Two amyloid precursor protein transgenic mouse models with Alzheimer disease-like pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:13287-13292.
- Sudhof T, Goldstein J, Brown M, Russell D (1985) The LDL receptor gene: a mosaic of exons shared with different proteins. *Science* 228:815-822.
- Sullivan PM, Mace BE, Estrada JC, Schmechel DE, Alberts MJ (2008) Human apolipoprotein E4 targeted replacement mice show increased prevalence of intracerebral hemorrhage associated with vascular amyloid deposition. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 17:303-311.
- Sullivan PM, Mace BE, Maeda N, Schmechel DE (2004) Marked regional differences of brain human apolipoprotein E expression in targeted replacement mice. *Neuroscience* 124:725-733.
- Sullivan PM, Mezdour H, Aratani Y, Knouff C, Najib J, Reddick RL, Quarfordt SH, Maeda N (1997) Targeted Replacement of the Mouse Apolipoprotein E Gene with the Common Human APOE3 Allele Enhances Diet-induced Hypercholesterolemia and Atherosclerosis. *Journal of Biological Chemistry* 272:17972-17980.
- Sun Y, Wu S, Bu G, Onifade MK, Patel SN, LaDu MJ, Fagan AM, Holtzman DM (1998) Glial fibrillary acidic protein-apolipoprotein E (apoE) transgenic mice: astrocyte-specific expression and differing biological effects of astrocyte-secreted apoE3 and apoE4 lipoproteins. *J Neurosci* 18:3261-3272.
- Swanson LW, Simmons DM, Hofmann SL, Goldstein JL, Brown MS (1988) Localization of mRNA for low density lipoprotein receptor and a cholesterol synthetic enzyme in rabbit nervous system by in situ hybridization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:9821-9825.
- Syken J, Shatz CJ (2003) Expression of T cell receptor beta locus in central nervous system neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:13048-13053.
- Takada Y, Hisamatsu T, Kamada N, Kitazume MT, Honda H, Oshima Y, Saito R, Takayama T, Kobayashi T, Chinen H, Mikami Y, Kanai T, Okamoto S, Hibi T (2010) Monocyte chemoattractant protein-1 contributes to gut homeostasis and intestinal inflammation by composition of IL-10-producing regulatory macrophage subset. *J Immunol* 184:2671-2676.
- Takano T, Tian GF, Peng W, Lou N, Libionka W, Han X, Nedergaard M (2006) Astrocyte-mediated control of cerebral blood flow. *Nat Neurosci* 9:260-267.
- Takasugi N, Tomita T, Hayashi I, Tsuruoka M, Niimura M, Takahashi Y, Thinakaran G, Iwatsubo T (2003) The role of presenilin cofactors in the gamma-secretase complex. *Nature* 422:438-441.

- Tang MX, Stern Y, Marder K, Bell K, Gurland B, Lantigua R, Andrews H, Feng L, Tycko B, Mayeux R (1998) The APOE-epsilon4 allele and the risk of Alzheimer disease among African Americans, whites, and Hispanics. *JAMA* 279:751-755.
- Tanzi RE, Kovacs DM, Kim TW, Moir RD, Guenette SY, Wasco W (1996) The gene defects responsible for familial Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis* 3:159-168.
- Teasdale GM, Nicoll JA, Murray G, Fiddes M (1997) Association of apolipoprotein E polymorphism with outcome after head injury. *Lancet* 350:1069-1071.
- Terwel D, Steffensen KR, Verghese PB, Kummer MP, Gustafsson JA, Holtzman DM, Heneka MT (2011) Critical role of astroglial apolipoprotein E and liver X receptor-alpha expression for microglial Abeta phagocytosis. *J Neurosci* 31:7049-7059.
- Tesseur I, Van Dorpe J, Spittaels K, Van den Haute C, Moechars D, Van Leuven F (2000) Expression of human apolipoprotein E4 in neurons causes hyperphosphorylation of protein tau in the brains of transgenic mice. *Am J Pathol* 156:951-964.
- Teunissen CE, Dijkstra CD, Polman CH, Hoogervorst EL, von Bergmann K, Lutjohann D (2003) Decreased levels of the brain specific 24S-hydroxycholesterol and cholesterol precursors in serum of multiple sclerosis patients. *Neurosci Lett* 347:159-162.
- Thelen KM, Falkai P, Bayer TA, Lutjohann D (2006) Cholesterol synthesis rate in human hippocampus declines with aging. *Neurosci Lett* 403:15-19.
- Thirumangalakudi L, Prakasam A, Zhang R, Bimonte-Nelson H, Sambamurti K, Kindy MS, Bhat NR (2008) High cholesterol-induced neuroinflammation and amyloid precursor protein processing correlate with loss of working memory in mice. *J Neurochem* 106:475-485.
- Thomas ED (1994) The Nobel Lectures in Immunology. The Nobel Prize for Physiology or Medicine, 1990. Bone marrow transplantation--past, present and future. *Scand J Immunol* 39:339-345.
- Thompson WL, Karpus WJ, Van Eldik LJ (2008) MCP-1-deficient mice show reduced neuroinflammatory responses and increased peripheral inflammatory responses to peripheral endotoxin insult. *J Neuroinflammation* 5:35.
- Tibolla G, Norata GD, Meda C, Arnaboldi L, Uboldi P, Piazza F, Ferrarese C, Corsini A, Maggi A, Vegeto E, Catapano AL (2010) Increased atherosclerosis and vascular inflammation in APP transgenic mice with apolipoprotein E deficiency. *Atherosclerosis* 210:78-87.
- Togo T, Akiyama H, Iseki E, Kondo H, Ikeda K, Kato M, Oda T, Tsuchiya K, Kosaka K (2002) Occurrence of T cells in the brain of Alzheimer's disease and other neurological diseases. *J Neuroimmunol* 124:83-92.
- Tokuda T, Calero M, Matsubara E, Vidal R, Kumar A, Permanne B, Zlokovic B, Smith JD, Ladu MJ, Rostagno A, Frangione B, Ghiso J (2000) Lipidation of apolipoprotein E influences its isoform-specific interaction with Alzheimer's amyloid beta peptides. *Biochem J* 348 Pt 2:359-365.
- Tomiyama T, Nagata T, Shimada H, Teraoka R, Fukushima A, Kanemitsu H, Takuma H, Kuwano R, Imagawa M, Ataka S, Wada Y, Yoshioka E, Nishizaki T, Watanabe Y, Mori H (2008) A new amyloid beta variant favoring oligomerization in Alzheimer's-type dementia. *Ann Neurol* 63:377-387.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76:4350-4354.
- Town T, Tan J, Flavell RA, Mullan M (2005) T-cells in Alzheimer's disease. *Neuromolecular Med* 7:255-264.

- Utermann G, Kindermann I, Kaffarnik H, Steinmetz A (1984) Apolipoprotein E phenotypes and hyperlipidemia. *Hum Genet* 65:232-236.
- Utermann G, Steinmetz A, Weber W (1982) Genetic control of human apolipoprotein E polymorphism: comparison of one- and two-dimensional techniques of isoprotein analysis. *Hum Genet* 60:344-351.
- Valenza M, Rigamonti D, Goffredo D, Zuccato C, Fenu S, Jamot L, Strand A, Tarditi A, Woodman B, Racchi M, Mariotti C, Di Donato S, Corsini A, Bates G, Pruss R, Olson JM, Sipione S, Tartari M, Cattaneo E (2005) Dysfunction of the cholesterol biosynthetic pathway in Huntington's disease. *J Neurosci* 25:9932-9939.
- van den Elzen P, Garg S, Leon L, Brigl M, Leadbetter EA, Gumperz JE, Dascher CC, Cheng TY, Sacks FM, Illarionov PA, Besra GS, Kent SC, Moody DB, Brenner MB (2005) Apolipoprotein-mediated pathways of lipid antigen presentation. *Nature* 437:906-910.
- Van Dooren T, Muyliaert D, Borghgraef P, Cresens A, Devijver H, Van der Auwera I, Wera S, Dewachter I, Van Leuven F (2006) Neuronal or Glial Expression of Human Apolipoprotein E4 Affects Parenchymal and Vascular Amyloid Pathology Differentially in Different Brain Regions of Double- and Triple-Transgenic Mice. *The American Journal of Pathology* 168:245-260.
- van Furth R, Diesselhoff-den Dulk MM (1980) Method to prove investigation of particles by macrophages with light microscopy. *Scand J Immunol* 12:265-269.
- Van Oosten M, Rensen PC, Van Amersfoort ES, Van Eck M, Van Dam AM, Breve JJ, Vogel T, Panet A, Van Berkel TJ, Kuiper J (2001) Apolipoprotein E protects against bacterial lipopolysaccharide-induced lethality. A new therapeutic approach to treat gram-negative sepsis. *J Biol Chem* 276:8820-8824.
- Vance JE, Karten B, Hayashi H (2006) Lipid dynamics in neurons. *Biochem Soc Trans* 34:399-403.
- Verreck FA, de Boer T, Langenberg DM, Hoeve MA, Kramer M, Vaisberg E, Kastelein R, Kolk A, de Waal-Malefyt R, Ottenhoff TH (2004) Human IL-23-producing type 1 macrophages promote but IL-10-producing type 2 macrophages subvert immunity to (myco)bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:4560-4565.
- Vitek MP, Brown CM, Colton CA (2009) APOE genotype-specific differences in the innate immune response. *Neurobiol Aging* 30:1350-1360.
- Vlad SC, Miller DR, Kowall NW, Felson DT (2008) Protective effects of NSAIDs on the development of Alzheimer disease. *Neurology* 70:1672-1677.
- von Arnim CA, Kinoshita A, Peltan ID, Tangredi MM, Herl L, Lee BM, Spoelgen R, Hshieh TT, Ranganathan S, Battey FD, Liu CX, Bacskai BJ, Sever S, Irizarry MC, Strickland DK, Hyman BT (2005) The low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) is a novel beta-secretase (BACE1) substrate. *J Biol Chem* 280:17777-17785.
- Vuorio AF, Kovanen PT (2011) Do statins reduce the incidence of stroke in familial hypercholesterolemia? *Expert Rev Cardiovasc Ther* 9:349-353.
- Wahrle SE, Jiang H, Parsadanian M, Hartman RE, Bales KR, Paul SM, Holtzman DM (2005) Deletion of Abca1 increases Abeta deposition in the PDAPP transgenic mouse model of Alzheimer disease. *J Biol Chem* 280:43236-43242.
- Wahrle SE, Jiang H, Parsadanian M, Legleiter J, Han X, Fryer JD, Kowalewski T, Holtzman DM (2004) ABCA1 is required for normal central nervous system ApoE levels and for lipidation of astrocyte-secreted apoE. *J Biol Chem* 279:40987-40993.

- Wahrle SE, Shah AR, Fagan AM, Smemo S, Kauwe JS, Grupe A, Hinrichs A, Mayo K, Jiang H, Thal LJ, Goate AM, Holtzman DM (2007) Apolipoprotein E levels in cerebrospinal fluid and the effects of ABCA1 polymorphisms. *Mol Neurodegener* 2:7.
- Walker DG, Dalsing-Hernandez JE, Campbell NA, Lue LF (2009) Decreased expression of CD200 and CD200 receptor in Alzheimer's disease: a potential mechanism leading to chronic inflammation. *Exp Neurol* 215:5-19.
- Walker LC, Parker CA, Lipinski WJ, Callahan MJ, Carroll RT, Gandy SE, Smith JD, Jucker M, Bisgaier CL (1997) Cerebral lipid deposition in aged apolipoprotein-E-deficient mice. *Am J Pathol* 151:1371-1377.
- Walsh DM, Selkoe DJ (2004) Deciphering the molecular basis of memory failure in Alzheimer's disease. *Neuron* 44:181-193.
- Wang DD, Bordey A (2008) The astrocyte odyssey. *Prog Neurobiol* 86:342-367.
- Wang J, Tanila H, Puolivali J, Kadish I, van Groen T (2003) Gender differences in the amount and deposition of amyloid beta in APP^{swe} and PS1 double transgenic mice. *Neurobiol Dis* 14:318-327.
- Wang YX, Halks-Miller M, Vergona R, Sullivan ME, Fitch R, Mallari C, Martin-McNulty B, da Cunha V, Freay A, Rubanyi GM, Kauser K (2000) Increased aortic stiffness assessed by pulse wave velocity in apolipoprotein E-deficient mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 278:H428-434.
- Weber K, Osborn M (1969) The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J Biol Chem* 244:4406-4412.
- Webster S, Bradt B, Rogers J, Cooper N (1997) Aggregation state-dependent activation of the classical complement pathway by the amyloid beta peptide. *J Neurochem* 69:388-398.
- Weihofen A, Martoglio B (2003) Intramembrane-cleaving proteases: controlled liberation of proteins and bioactive peptides. *Trends Cell Biol* 13:71-78.
- Weisgraber KH (1990) Apolipoprotein E distribution among human plasma lipoproteins: role of the cysteine-arginine interchange at residue 112. *J Lipid Res* 31:1503-1511.
- Weisgraber KH (1994) Apolipoprotein E: structure-function relationships. *Adv Protein Chem* 45:249-302.
- Weisgraber KH, Mahley RW, Kowal RC, Herz J, Goldstein JL, Brown MS (1990) Apolipoprotein C-I modulates the interaction of apolipoprotein E with beta-migrating very low density lipoproteins (beta-VLDL) and inhibits binding of beta-VLDL to low density lipoprotein receptor-related protein. *J Biol Chem* 265:22453-22459.
- Williams-Gray CH, Goris A, Saiki M, Foltynie T, Compston DA, Sawcer SJ, Barker RA (2009) Apolipoprotein E genotype as a risk factor for susceptibility to and dementia in Parkinson's disease. *J Neurol* 256:493-498.
- Wilson C, Wardell MR, Weisgraber KH, Mahley RW, Agard DA (1991) Three-dimensional structure of the LDL receptor-binding domain of human apolipoprotein E. *Science* 252:1817-1822.
- Wisniewski HM, Wegiel J (1991) Spatial relationships between astrocytes and classical plaque components. *Neurobiol Aging* 12:593-600.
- Wolfe MS, Xia W, Ostaszewski BL, Diehl TS, Kimberly WT, Selkoe DJ (1999) Two transmembrane aspartates in presenilin-1 required for presenilin endoproteolysis and gamma-secretase activity. *Nature* 398:513-517.
- Wolozin B (2004) Cholesterol and the biology of Alzheimer's disease. *Neuron* 41:7-10.

- Wyss-Coray T, Yan F, Lin AH, Lambris JD, Alexander JJ, Quigg RJ, Masliah E (2002) Prominent neurodegeneration and increased plaque formation in complement-inhibited Alzheimer's mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:10837-10842.
- Xu F, Vitek MP, Colton CA, Previti ML, Gharkholonarehe N, Davis J, Van Nostrand WE (2008) Human apolipoprotein E redistributes fibrillar amyloid deposition in Tg-SwDI mice. *J Neurosci* 28:5312-5320.
- Xu PT, Gilbert JR, Qiu HL, Ervin J, Rothrock-Christian TR, Hulette C, Schmechel DE (1999a) Specific regional transcription of apolipoprotein E in human brain neurons. *Am J Pathol* 154:601-611.
- Xu PT, Gilbert JR, Qiu HL, Rothrock-Christian T, Settles DL, Roses AD, Schmechel DE (1998) Regionally specific neuronal expression of human APOE gene in transgenic mice. *Neurosci Lett* 246:65-68.
- Xu PT, Schmechel D, Qiu HL, Herbstreith M, Rothrock-Christian T, Eyster M, Roses AD, Gilbert JR (1999b) Sialylated human apolipoprotein E (apoEs) is preferentially associated with neuron-enriched cultures from APOE transgenic mice. *Neurobiol Dis* 6:63-75.
- Xu PT, Schmechel D, Rothrock-Christian T, Burkhart DS, Qiu HL, Popko B, Sullivan P, Maeda N, Saunders AM, Roses AD, Gilbert JR (1996) Human apolipoprotein E2, E3, and E4 isoform-specific transgenic mice: human-like pattern of glial and neuronal immunoreactivity in central nervous system not observed in wild-type mice. *Neurobiol Dis* 3:229-245.
- Xu Q, Bernardo A, Walker D, Kanegawa T, Mahley RW, Huang Y (2006) Profile and regulation of apolipoprotein E (ApoE) expression in the CNS in mice with targeting of green fluorescent protein gene to the ApoE locus. *J Neurosci* 26:4985-4994.
- Xu Q, Brecht WJ, Weisgraber KH, Mahley RW, Huang Y (2004) Apolipoprotein E4 domain interaction occurs in living neuronal cells as determined by fluorescence resonance energy transfer. *J Biol Chem* 279:25511-25516.
- Xu W, Schlagwein N, Roos A, van den Berg TK, Daha MR, van Kooten C (2007) Human peritoneal macrophages show functional characteristics of M-CSF-driven anti-inflammatory type 2 macrophages. *Eur J Immunol* 37:1594-1599.
- Yaffe K, Barrett-Connor E, Lin F, Grady D (2002) Serum lipoprotein levels, statin use, and cognitive function in older women. *Arch Neurol* 59:378-384.
- Yan C, Costa RH, Darnell JE, Jr., Chen JD, Van Dyke TA (1990) Distinct positive and negative elements control the limited hepatocyte and choroid plexus expression of transthyretin in transgenic mice. *EMBO J* 9:869-878.
- Yang DS, Smith JD, Zhou Z, Gandy SE, Martins RN (1997) Characterization of the binding of amyloid-beta peptide to cell culture-derived native apolipoprotein E2, E3, and E4 isoforms and to isoforms from human plasma. *J Neurochem* 68:721-725.
- Yang Y, Chung EK, Wu YL, Savelli SL, Nagaraja HN, Zhou B, Hebert M, Jones KN, Shu Y, Kitzmiller K, Blanchong CA, McBride KL, Higgins GC, Rennebohm RM, Rice RR, Hackshaw KV, Roubey RA, Grossman JM, Tsao BP, Birmingham DJ, Rovin BH, Hebert LA, Yu CY (2007) Gene copy-number variation and associated polymorphisms of complement component C4 in human systemic lupus erythematosus (SLE): low copy number is a risk factor for and high copy number is a protective factor against SLE susceptibility in European Americans. *Am J Hum Genet* 80:1037-1054.
- Ye S, Huang Y, Mullendorff K, Dong L, Giedt G, Meng EC, Cohen FE, Kuntz ID, Weisgraber KH, Mahley RW (2005) Apolipoprotein (apo) E4 enhances amyloid beta peptide

- production in cultured neuronal cells: apoE structure as a potential therapeutic target. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:18700-18705.
- Yerbury JJ, Poon S, Meehan S, Thompson B, Kumita JR, Dobson CM, Wilson MR (2007) The extracellular chaperone clusterin influences amyloid formation and toxicity by interacting with prefibrillar structures. *FASEB J* 21:2312-2322.
- Zannis VI, Cohen J (2000) Old and new players in the lipoprotein system. *Curr Opin Lipidol* 11:101-103.
- Zerbinatti CV, Bu G (2005) LRP and Alzheimer's disease. *Rev Neurosci* 16:123-135.
- Zerbinatti CV, Wahrle SE, Kim H, Cam JA, Bales K, Paul SM, Holtzman DM, Bu G (2006) Apolipoprotein E and low density lipoprotein receptor-related protein facilitate intraneuronal A β 42 accumulation in amyloid model mice. *J Biol Chem* 281:36180-36186.
- Zerbinatti CV, Wozniak DF, Cirrito J, Cam JA, Osaka H, Bales KR, Zhuo M, Paul SM, Holtzman DM, Bu G (2004) Increased soluble amyloid-beta peptide and memory deficits in amyloid model mice overexpressing the low-density lipoprotein receptor-related protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:1075-1080.
- Zetterberg H, Jacobsson J, Rosengren L, Blennow K, Andersen PM (2008) Association of APOE with age at onset of sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci* 273:67-69.
- Zhao L, Lin S, Bales KR, Gelfanova V, Koger D, DeLong C, Hale J, Liu F, Hunter JM, Paul SM (2009) Macrophage-mediated degradation of beta-amyloid via an apolipoprotein E isoform-dependent mechanism. *J Neurosci* 29:3603-3612.
- Zhong N, Weisgraber KH (2009) Understanding the Basis for the Association of Apoe4 with Alzheimer's Disease: Opening the Door for Therapeutic Approaches. *Curr Alzheimer Res* 6:415-418.
- Zlokovic BV (2004) Clearing amyloid through the blood-brain barrier. *J Neurochem* 89:807-811.
- Zlokovic BV (2008) The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders. *Neuron* 57:178-201.
- Zlokovic BV, Martel CL, Mackic JB, Matsubara E, Wisniewski T, McComb JG, Frangione B, Ghiso J (1994) Brain uptake of circulating apolipoproteins J and E complexed to Alzheimer's amyloid beta. *Biochem Biophys Res Commun* 205:1431-1437.
- Zou F, Gopalraj RK, Lok J, Zhu H, Ling IF, Simpson JF, Tucker HM, Kelly JF, Younkin SG, Dickson DW, Petersen RC, Graff-Radford NR, Bennett DA, Crook JE, Estus S (2008) Sex-dependent association of a common low-density lipoprotein receptor polymorphism with RNA splicing efficiency in the brain and Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet* 17:929-935.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η νόσος του Alzheimer (AD) είναι μια νευροεκφυλιστική νόσος που έχει ως αποτέλεσμα την προοδευτική απώλεια των ανώτερων γνωστικών λειτουργιών. Το αλληλόμορφο ε4 της Απολιποπρωτεΐνης E (Apolipoprotein E4, ApoE4) είναι ο κυριότερος παράγοντας κινδύνου για την εμφάνιση της σποραδικής μορφής της νόσου. Ο LDLR, το αρχέγονο μέλος αυτής της υπεροικογένειας, είναι ο κυριότερος υποδοχέας της APOE στον εγκέφαλο. Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκε ο ρόλος του LDLR και της προερχόμενης από την περιφέρεια APOE4 στην παθογένεση της νόσου σε ένα διαγονιδιακό μοντέλο ποντικού με παθολογία τύπου Alzheimer.

Για τη μελέτη του ρόλου του LDLR στη νόσο του Alzheimer αναλύθηκαν διαγονιδιακά ποντίκια με τη συγκεκριμένη παθολογία (ποντίκια 5xFAD) στα οποία είχε αποσιωπηθεί το γονίδιο του *Ldlr* (5xFAD;*Ldlr*^{-/-}). Στα ποντίκια 5xFAD;*Ldlr*^{-/-} επισημάνθηκε αύξηση της APOE στο συσχετιζόμενο με τις πλάκες κλάσμα από εκχύλισμα εγκεφάλων σε σχέση με τα ποντίκια 5xFAD που έχουν τον ενδογενή LDLR. Για να διασαφηνιστεί ο ρόλος της APOE σε σχέση με τον LDLR, χρησιμοποιήθηκαν επίσης ποντίκια 5xFAD και 5xFAD;*Ldlr*^{-/-} με αδρανοποιημένο το γονίδιο της ApoE (5xFAD;*ApoE*^{-/-} και 5xFAD;*ApoE*^{-/-};*Ldlr*^{-/-} αντίστοιχα). Η ανάλυση έδειξε ότι στα ποντίκια με αδρανοποιημένο τον LDLR υπήρξε αύξηση του σχηματισμού αμυλοειδών πλάκων καθώς και των επιπέδων του β-αμυλοειδούς (Αβ), ανεξάρτητα από την παρουσία της APOE. Δεν υπήρξε καμιά διαφορά στα πρωτεϊνικά επίπεδα των καρβοξυτελικών πρωτεολυτικών θραυσμάτων (CTF) της πρόδρομης πρωτεΐνης του αμυλοειδούς (APP) γεγονός που υποδηλώνει ότι μειώνεται η απομάκρυνση και όχι η παραγωγή του Αβ. Ανάλυση της φλεγμονώδους αντίδρασης στα ποντίκια αυτά έδειξε μείωση στην αστροκυττάρωση και τη μικρογλοΐωση απουσία του LDLR ανεξάρτητα από την παρουσία της APOE.

Για τη μελέτη του ρόλου της προερχόμενης από την περιφέρεια Απολιποπρωτεΐνης E στην παθογένεση της νόσου του Alzheimer, κατασκευάστηκαν τα διαγονιδιακά ποντίκια TTRI-huApoE4. Τα ποντίκια αυτά εκφράζουν το γενωμικό αλληλόμορφο ε4 της ανθρώπινης APOE υπό τον υποκινητή της τρανσθυρετίνης (TTRI), ο οποίος εξασφαλίζει έκφραση του διαγονιδίου στο ήπαρ και τα μακροφάγα. Τα TTRI-huApoE4 διασταυρώθηκαν αρχικά με ποντίκια ApoE^{-/-} και στη συνέχεια με το διαγονιδιακό μοντέλο 5xFAD. Η ανάλυση έδειξε ότι τα 5xFAD;TTRI-huApoE4;ApoE^{-/-} σχηματίζουν περισσότερες αμυλοειδείς πλάκες από τα

5xFAD;ApoE^{-/-} τόσο στο φλοιό όσο και στον ιππόκαμπο. Από ανοσοϊστοχημεία για το Αβ προέκυψε ότι τα 5xFAD;TTRI-huApoE4;ApoE^{-/-} ποντίκια, έχουν όμοιο πρότυπο με τα 5xFAD;ApoE^{-/-} ως προς το σχήμα των εναποθέσεων. Αντιθέτως, ως προς τις περιοχές στις οποίες το Αβ εναποτίθεται στα 5xFAD;TTRI-huApoE4;ApoE^{-/-}, το πρότυπο μοιάζει με αυτό των ποντικών 5xFAD που έχουν την ενδογενή ΑΡΟΕ.

Ανάλυση της φλεγμονώδους αντίδρασης έδειξε ότι η μικρογλοίωση είναι μειωμένη στα ποντίκια 5xFAD;TTRI-huApoE4;ApoE^{-/-} σε σχέση με τις ομάδες ελέγχου. Επίσης βρέθηκε ότι κύτταρα θετικά για IBA1 (μικρογλοιακά/μακροφάγα) συνεντοπίζονται με την ευρισκόμενη πάνω στις αμυλοειδείς πλάκες ΑΡΟΕ4. Για να διαπιστωθεί εάν αυτά τα κύτταρα προέρχονται από την περιφέρεια, ποντίκια 5xFAD;ApoE^{-/-} δέχτηκαν μεταμόσχευση μυελού των οστών από ποντίκια Tg(CAG-EGFP)10sb/J;TTRI-huApoE4;ApoE που εκφράζουν σε όλα τους τα κύτταρα την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (GFP). Ανοσοϊστοχημεία για GFP έδειξε ότι στα ποντίκια που υπέστησαν μεταμόσχευση, κύτταρα από την περιφέρεια διαπερνούν τον αιματο-εγκεφαλικό φραγμό και εκφράζουν ΑΡΟΕ4. Επίσης βρέθηκε αύξηση της αντιφλεγμονώδους κυτοκίνης ιντερλευκίνης-10 (IL-10) στα ποντίκια 5xFAD;TTRI-huApoE4;ApoE^{-/-} σε σχέση με τα ποντίκια 5xFAD;ApoE^{-/-}.

Στην παρούσα μελέτη, παρουσιάζεται η σημαντικότητα του ρόλου του LDLR στην εναπόθεση του Αβ και στο σχηματισμό των αμυλοειδών πλακών. Καταδεικνύεται, ακόμη, ότι ο LDLR ρυθμίζει τη φλεγμονώδη αντίδραση στον εγκέφαλο των ποντικών με παθολογία τύπου Alzheimer. Επιπρόσθετα, δείχνεται ότι η περιφερική έκφραση της ΑΡΟΕ4 επηρεάζει τόσο το σχηματισμό αμυλοειδών πλακών όσο και τη φλεγμονώδη απόκριση στο διαγονιδιακό μοντέλο με παθολογία τύπου Alzheimer κι έτσι υποδεικνύεται ένας στόχος πιο προσβάσιμος στις φαρμακευτικές αγωγές.

ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disease that is affecting the higher cognitive functions. It is the most common form of senile dementia and is mainly affecting people after the age of 65. Inheritance of the $\epsilon 4$ allele of Apolipoprotein E (ApoE4) is the major risk factor for the development of the sporadic form of AD. The LDLR is one of the main APOE receptors both in the circulation and in the CNS. In the present study the role of the LDLR was studied in a transgenic mouse model with Alzheimer's-like pathology (5xFAD). In addition, the role of the peripheral-derived (non-CNS) APOE4 was analysed.

To study the role of the LDLR in the pathogenesis of Alzheimer's disease we have generated transgenic mice that develop an Alzheimer's like phenotype (5xFAD transgenic mice) and lack the endogenous Ldlr gene (Ldlr^{-/-}). The 5XFAD;Ldlr^{-/-} mice were analysed for amyloid deposition and APOE levels and it was shown that amyloid plaques as well as amyloid β (A β) brain levels were increased irrespectively of the presence or the absence of APOE. The guanidine levels of APOE (plaque-associated fraction) were also increased in brain homogenates of 5XFAD;Ldlr^{-/-} mice. There was no difference in levels of the total amyloid precursor protein (APP) or its carboxy-terminal fragments (CTF) indicating that the increase in the A β levels is probably due to defective clearance of amyloid. Furthermore, analysis of the inflammatory response showed a significant decrease in astrogliosis and microgliosis in the absence of LDLR independently of APOE.

To study the role of peripheral-derived APOE in the pathogenesis of Alzheimer's disease we generated transgenic mice that express the genomic human allele $\epsilon 4$ of ApoE under the transthyretin (TTRI) promoter (TTRI-huApoE4 transgenic mouse model). These mice express the transgene only in the liver and macrophages and not in the brain. The TTRI-huApoE4 transgenic mice were crossed with a mouse model with Alzheimer-like pathology (5xFAD). Pathogenesis of the AD-like phenotype was analysed in mice of the genotypes 5xFAD, 5xFAD;ApoE^{-/-} and 5xFAD;TTRI-huApoE4;ApoE^{-/-} with immunoblotting, ELISA and immunohistochemistry methods. Histological analysis showed that 5xFAD;TTRI-huApoE4;ApoE^{-/-} had more hippocampal and cortical amyloid plaques than the 5xFAD;ApoE^{-/-} mice. The 5xFAD mice that have the endogenous ApoE, had the most abundant load of A β and amyloid plaques compared to the other genotypes. Immunohistochemistry for the A β peptide revealed that the 5xFAD mice had the most

intense and dense pattern of amyloid and the 5xFAD;ApoE^{-/-} the most diffused. The 5xFAD;TTRI-huApoE4;ApoE^{-/-} mice that express APOE4 only in the periphery and they don't have the endogenous ApoE had a diffused pattern like the 5xFAD;ApoE^{-/-} mice but the spatial distribution resembled the pattern of the 5xFAD's A β deposition.

Astrocytosis and microgliosis were also analysed in the aforementioned groups of mice. It was shown that microgliosis in the 5xFAD;TTRI-huApoE4;ApoE^{-/-} was decreased compared to both the 5xFAD and the 5xFAD;ApoE^{-/-} mice. In addition the microglia/macrophages (IBA1-positive cells) surrounding the amyloid plaques were also positive for huAPOE4 in the 5xFAD;TTRI-huApoE4;ApoE^{-/-} mice. In order to establish if these cells were blood-derived infiltrating microglia/macrophages, 5xFAD;ApoE^{-/-} mice received bone-marrow transplantation from Tg(CAG-EGFP)10sb/J;TTRI-huApoE4;ApoE mice which express the green fluorescent protein (GFP) in all cell types. We found that GFP-positive cells from the periphery infiltrated the blood-brain barrier and expressed APOE4. Also, the anti-inflammatory cytokine IL-10 was increased in the brains of 5xFAD;TTRI-huApoE4;ApoE^{-/-} compared to the 5xFAD;ApoE^{-/-}.

Our data demonstrate the importance of LDLR in the amyloid plaque formation and the inflammatory response in the brain with Alzheimer-like pathology. Moreover, this study showed that peripheral expression of huApoE4 in the 5xFAD;TTRI-huApoE4 mice results in increased amyloid deposition and reduced microglial activation compared to the 5xFAD;ApoE^{-/-} mice. Our proposed mechanism is that peripheral APOE promotes A β aggregation by modulating the activation of microglial cells through infiltration of huAPOE4-expressing macrophages in the brain, thus providing an accessible target to regulate in AD pathogenesis.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α

ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

TBE pH 8.3 5x (10x ELFO)

45 mM Tris-borate

1 mM EDTA

Σε 800ml από mQH₂O διαλυτοποιούνται 54g Trizma base και 27,5g Boric acid.

Προστίθενται 20ml EDTA 0,5M pH 8 στη συνέχεια προστίθεται mQH₂O μέχρι 1 λίτρο.

Το διάλυμα χρησιμοποιείται σε συγκέντρωση 0,5x για το πήκτωμα αγαρόζης και 1x για το πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου.

TAE 50x

40 mM Tris-acetate

1 mM EDTA.

Σε 800ml από mQH₂O διαλυτοποιούνται 242g Trizma base και 57,1ml οξικό οξύ.

Προστίθενται 100ml EDTA 0,5M pH 8 και στη συνέχεια προστίθεται mQH₂O μέχρι 1 λίτρο.

Το διάλυμα χρησιμοποιείται σε συγκέντρωση 1x.

Tris-HCl 1M

Σε 800ml από mQH₂O διαλυτοποιούνται 121,1 g Trizma base.

Το pH ρυθμίζεται στην επιθυμητή τιμή με την προσθήκη πυκνού HCl.

pH HCl

7,2 80 ml

7,6 60 ml

8,0 42 ml

Ο όγκος συμπληρώνεται με δις απεσταγμένο νερό αφού το διάλυμα επανέλθει σε θερμοκρασία δωματίου.

TE pH 7,6-8,0:

100mM Tris-Cl pH 7,6-8,0

10mM EDTA pH 8,0

EDTA 0,5 M pH 8,0

Σε 800 ml H₂O προστίθενται 186,1g disodium EDTA•2H₂O. Το μείγμα αναδεύεται έντονα και ταυτόχρονα προστίθενται μπαλάκια από στερεό NaOH έως ότου το pH γίνει 8 (περίπου 20g).

NaCl 5M

Σε 800ml H₂O προστίθενται 292,2g NaCl. Στη συνέχεια προστίθεται H₂O μέχρι όγκου 1 λίτρο.

NaOH 4N

Σε 800 ml H₂O προστίθενται με προσοχή (λίγη ποσότητα κάθε φορά) 160g από μπαλίτσες NaOH με συνεχή ανάδευση. Όταν αυτά έχουν διαλυθεί τελείως, ο όγκος συμπληρώνεται με H₂O μέχρι το 1 λίτρο.

Προσοχή: Η παρασκευή 4N NaOH είναι μια ισχυρά εξώθερμη αντίδραση. Το διάλυμα παρασκευάζεται προσεχτικά σε πλαστικά ποτήρια ζέσεως και φυλάσσεται πάντα σε πλαστικό δοχείο. Δεν χρειάζεται αποστείρωση.

Οξικό νάτριο (NaAc) 5M pH 5,2

Σε 800ml H₂O διαλυτοποιούνται 680,5g ένυδρου οξικού νατρίου (NaAcetate•3H₂O). Το pH προσαρμόζεται στο 5,2 με την προσθήκη ψυχρού (glacial) οξικού οξέος. Ο όγκος συμπληρώνεται με H₂O μέχρι το 1 λίτρο.

Οξικό νάτριο (NaAc) 3M pH 5,2

Σε 80ml H₂O διαλυτοποιούνται 40,835g ένυδρου οξικού νατρίου (NaAcetate•3H₂O). Το pH προσαρμόζεται στο 5,2 με την προσθήκη ψυχρού (glacial) οξικού οξέος. Ο όγκος συμπληρώνεται με H₂O μέχρι τα 100ml.

6x χρωστική φόρτωσης για πήκτωμα αγαρόζης

0,25% (w/v) Xylene cyanole

0,25% (w/v) Κυανούν της βρωμοφαινόλης

15% (v/v) γλυκερόλη

Αμπικιλίνη

Συγκεντρωμένο διάλυμα: 100mg/ml

Λειτουργικό διάλυμα: 50-100μg/ml

Φυλάσσεται στους -20°C σε δείγματα του 1ml

SOC medium (για υγρές καλλιέργειες βακτηρίων)

Τρυπτόνη 20 g (Tryptone, Difco)

Εκχύλισμα μαγιάς 5 g (Yeast extract, Difco)

NaCl 0,5 g

20mM Γλυκόζη

Σε 1 λίτρο H₂O διαλυτοποιούνται η τρυπτόνη, το εκχύλισμα μαγιάς και το NaCl. Στη συνέχεια το διάλυμα αποστειρώνεται και αφού αφεθεί να πέσει σε θερμοκρασία 60°C τουλάχιστον, προστίθενται 20ml από αποστειρωμένο διάλυμα 1M γλυκόζης.

10x Hogness' Modified Freezing medium (για φύλαξη βακτηρίων στους -80°C)

36mM K₂HPO₄•3H₂O

13mM KH₂PO₄

20mM Na₃citrate

10mM MgSO₄·7H₂O

44% (v/v) γλυκερόλη

Για 100ml 10x HMFH: Σε 30ml mQH₂O προστίθενται 0,822g K₂HPO₄·3H₂O, 0,177g KH₂PO₄, 0,588g Na₃citrate, 0,247g MgSO₄·7H₂O και 44ml γλυκερόλης. Το διάλυμα αποστειρώνεται σε αυτόκαυστο.

TCM pH 7,5 (διάλυμα για χημικό μετασχηματισμό βακτηρίων)

10mM Tris-Cl

10mM MgCl₂

10mM CaCl₂

Διαλύματα για απομόνωση πλασμιδιακού DNA από μικρού μεγέθους υγρές καλλιέργειες βακτηρίων (mini-preps)

Διάλυμα I:

50mM D-Glucose (filtered)

25mM Tris-Cl pH 8,0

1mM EDTA pH 8,0

Διάλυμα II (φρέσκο κάθε φορά):

0,2N NaOH

1% (w/v) SDS

Για 1ml διαλύματος προστίθενται 50μl NaOH 4N και 50μl 20% (w/v) SDS σε 900μl H₂O.

Διάλυμα III:

5M οξικό κάλιο (KAc) 60,0ml

Ψυχρό οξικό οξύ 11,5ml

ddH₂O 28,5ml

100ml

Διαλύματα QIAGEN για απομόνωση πλασμιδιακού DNA από μεσαίου μεγέθους υγρές καλλιέργειες (midi preps)

Buffer P1 (διάλυμα επαναδιαλυτοποίησης)

50mM Tris-Cl pH 8,0

10mM EDTA

100μg/ml RNase A

Αποθήκευση στους 4°C

Buffer P2 (διάλυμα λύσης):

0,2M NaOH

1% (w/v) SDS

Αποθήκευση σε θερμοκρασία δωματίου.

Buffer P3 (διάλυμα ουδετεροποίησης):

3M Potassium acetate pH 5,5

Buffer QBT (διάλυμα εξισορρόπησης κολώνας):

750mM NaCl

50mM MOPS pH 7.0

15% (v/v) isopropanol

0,15% (v/v) Triton X-100

Buffer QC (διάλυμα για πλύσεις):

1M NaCl

50mM MOPS pH 7,0

15% (v/v) isopropanol

Buffer QF (διάλυμα έκλουσης):

1,25M NaCl

50mM Tris-Cl pH 8,5

15% (v/v) ισοπροπανόλη

TENS BUFFER (ρυθμιστικό διάλυμα πρωτεϊνάσης K)

50mM Tris pH 8,0

100mM EDTA

100mM NaCl

1% (w/v) SDS

Proteinase K (Sigma, P 4850 διάλυμα, P 6556 κρυσταλλική μορφή)

Συγκεντρωμένο διάλυμα (Stock solution) 10mg/ml

Η πρωτεϊνάση K διαλύεται σε 50mM Tris pH 8

Φυλάσσεται σε δείγματα των 500μl στους -20°C.

Χρησιμοποιούνται 10μl για κάθε βιοψία ουράς (σε 500μl TENS buffer)

RNase A (Sigma, R 5503)

Συγκεντρωμένο διάλυμα (Stock solution) 10mg/ml

Διαλύεται σε 10mM οξικού νατρίου NaAc (pH 5.2). Στη συνέχεια το ένζυμο βράζει στους 100°C για 15 λεπτά, αφήνεται να κρυώσει σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια προστίθεται 10% του τελικού όγκου 1M Tris pH 7,4. Φυλάσσεται σε δείγματα των 100 στους -20°C. Χρησιμοποιείται 1μl για κάθε δείγμα.

SSC 20x

3M NaCl

0,3M Na₃citrate

Σε 800ml H₂O διαλυτοποιούνται 175,3g NaCl και 8,2g Na₃citrate. Το pH προσαρμόζεται στο 7,0 με την προσθήκη μερικών σταγόνων πυκνού HCl. Ο όγκος συμπληρώνεται με H₂O μέχρι το 1 λίτρο.

SSPE 20x pH 7,4

3M NaCl

0,2M NaH₂PO₄ (φωσφορικό νάτριο)

0,02M EDTA

Σε 800ml H₂O διαλυτοποιούνται 175,3g NaCl, 27,6g NaH₂PO₄ και 7,4g EDTA. Ο όγκος συμπληρώνεται με H₂O μέχρι το 1 λίτρο.

Διάλυμα υβριδοποίησης (για στυπώματα Southern/Northern)

5x SSPE

5x διάλυμα Denhardt's

0,5% (w/v) SDS

Για 50ml διαλύματος υβριδοποίησης, αναμιγνύονται 12,5ml 20xSSPE, 5ml 50x Denhardt's solution (Applichem #A2248), 1,25ml 20% (w/v) SDS και 31,75ml ddH₂O. Το διάλυμα ανακατεύεται καλά και φυλάσσεται στους -20°C.

Διάλυμα αποδιάταξης/denaturing solution (για στυπώματα Southern/Northern)

1,5 M NaCl

0,5M NaOH

Για 250ml διαλύματος αναμιγνύονται 75ml NaCl 5M και 31,25ml NaOH 4N σε 143,75ml ddH₂O. Το διάλυμα μπορεί να επαναχρησιμοποιηθεί μία φορά και φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου.

Διάλυμα ουδετεροποίησης/neutralizing solution (για στυπώματα Southern/Northern)

1,5M NaCl

0,5M Tris-HCl pH 7.2

1mM EDTA

Για 500ml διαλύματος αναμιγνύονται 75ml NaCl 5M, 250ml Tris-HCl 1M pH 7,2 και 1ml EDTA 0,5M pH 8 σε 124ml ddH₂O. Το διάλυμα μπορεί να επαναχρησιμοποιηθεί μία φορά και φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου.

TBS 10x pH 7,6

100mM Tris-Cl pH 7,6

1,5M NaCl

Για 1lt: Σε 700 ml δισ-απιονισμένου νερού προστίθενται 12,1g Trizma base και 87,66g NaCl. Το pH προσαρμόζεται στο 7,6 με HCl. Προστίθεται H₂O μέχρι όγκου 1 λίτρο. Αποστείρωση.

10x PBS (1M)

1,37 M NaCl

27 mM KCl

100 mM Na₂HPO₄

20 mM KH₂PO₄(Διάλυμα φωσφορικών αλάτων)

Για 1lt: Σε 800 ml δισ-απιονισμένου νερού προστίθενται 80g NaCl, 2g KCl, 14,4g Na₂HPO₄ και 2,4g KH₂PO₄. Το pH προσαρμόζεται στο 7,4 με HCl. Προστίθεται H₂O μέχρι όγκου 1 λίτρο. Αποστείρωση.

20% (w/v) Σουκρόζη σε PBS

Σε 800ml 0,1M PBS προστίθενται 200g σουκρόζης σε 800ml 0,1M PBS.

Προστίθεται PBS μέχρι όγκου 1 λίτρο. Το διάλυμα φιλτράρεται 0,45μm και αποθηκεύεται στους 4°C.

4% (w/v) PFA σε PBS

Σε 600ml 0,1M PBS προστίθενται 40g παραφορμαλδεΐδης (για 1lt). Το μείγμα θερμαίνεται στους 60°C για να διαλυτοποιηθεί (Προσοχή: σε απαγωγό εστία!!!)

Το διάλυμα αφήνεται να κρυώσει και ελέγχεται το pH να είναι περίπου 7,4. Προστίθεται PBS μέχρι όγκου 1 λίτρο. Παρασκευάζεται φρέσκια κάθε φορά.

Διάλυμα για αιώρηση κυττοσολικών πρωτεϊνών

0,1M NaCl

10 mM Tris-HCl pH 7,6

1 mM EDTA pH 8

RIPA (και για πυρηνικές πρωτεΐνες)

150 mM NaCl

1% (v/v) NP-40 ή Triton X-100

0,5% (w/v) sodium deoxycholate

0,1% (w/v) SDS

50 mM Tris, pH 8.0

Διάλυμα λύσης (Lysis buffer) για την ELISA του Αβ.

PBS 1x

10% (v/v) γλυκερόλη

1% (v/v) Triton X-100

Το διάλυμα αυτό χρησιμοποιείται για την ανάλυση των ολιγομερισμένων και των μεμβρανικών πρωτεϊνών, αφού πρώτα έχουν απομακρυνθεί οι διαλυτές πρωτεΐνες με ομογενοποίηση σε 1x PBS.

8,2M Guanidine-HCl pH 8 (stock)

8,2M Guanidine-hydrochloride

82mM Tris-HCl pH 8

Για 10ml διαλύματος, 7,8343g διαλύονται σε Tris-HCl 82mM pH 8. Ο όγκος προσαρμόζεται στα 10ml με Tris-HCl 82mM pH 8. Για τη διαλυτοποίηση του δείγματος, αυτό αραιώνεται 2,5x φορές σε διάλυμα 8,2M Guanidine-HCl pH 8, ούτως ώστε η τελική συγκέντρωση του διαλύματος να είναι 5M Guanidine-HCl (O'Connor et al., 2008).

Το διάλυμα αυτό χρησιμοποιείται για την ανάλυση των πρωτεϊνών οι οποίες βρίσκονται συσσωματωμένες στις αμυλοειδείς πλάκες και είναι εξαιρετικά υδρόφοβες.

20% (w/v) SDS

Σε 900ml H₂O διαλυτοποιούνται 200g SDS. Το μείγμα ζεσταίνεται στους 68°C και αναδεύεται συνεχώς. Το pH προσαρμόζεται στο 7,2 με μερικές σταγόνες HCl.

Διάλυμα για ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE

5x Running buffer Tris-glycine pH 8,3

Συγκεντρωμένο διάλυμα (Stock solution)

125 mM Tris

960mM glycine

Σε 800 ml H₂O διαλυτοποιούνται 15,1425g Trizma base και 72,067g glycine. Ο όγκος προσαρμόζεται στο 1 λίτρο. Το pH πρέπει να είναι περίπου 8,3.

Διάλυμα ηλεκτροφόρησης SDS-PAGE 1x

25mM Tris

192mM Glycine

0,1% (w/v) SDS

Σε 400 ml H₂O προστίθενται 100ml από το 5x Running buffer και 4ml SDS 20% (w/v).

10x Διάλυμα ανόδου (για πηκτώματα Tris-Tricine)

2M Tris pH 8,8

Για 100ml διαλύματος, 24,2g Trizma base διαλυτοποιούνται σε 70ml H₂O. Στη συνέχεια προστίθεται πυκνό υδροχλωρικό οξύ μέχρι το pH να γίνει 8,8 και ο όγκος προσαρμόζεται στα 100ml με H₂O.

Το διάλυμα αυτό τοποθετείται έξω από τα πηκτώματα μέσα στο δοχείο ηλεκτροφόρησης.

5x Διάλυμα ηλεκτροφόρησης Tris/Tricine/SDS (για πηκτώματα Tris-Tricine) pH 8,3.

0,5M Tricine

0,5M Tris

0,5% (w/v) SDS

Σε 800ml H₂O διαλυτοποιούνται 60,55g Trizma base και 89,60g Tricine. Στη συνέχεια το pH προσαρμόζεται στο 8,3. Αφού ρυθμιστεί το pH, προστίθενται 25ml 20% (w/v) SDS.

Το διάλυμα αυτό τοποθετείται ανάμεσα στα πηκτώματα, από την πλευρά των κελιών.

1x Διάλυμα μεταφοράς για πρωτεΐνες (transfer buffer)

25mM Tris

192mM Glycine

10% (v/v) methanol

Σε 700ml H₂O προστίθενται 200ml από το 5x Running Buffer και 100ml μεθανόλης. Το διάλυμα ψύχεται στους 4°C για την καλύτερη και ταχύτερη μεταφορά των πρωτεϊνών. Το διάλυμα αυτό είναι κοινό για όλους του τύπους των πηκτωμάτων.

2x SDS Gel Loading Buffer (για πρωτεΐνες, αποδιατακτικό, αναγωγικό)

1% (w/v) SDS

10 mM EDTA

10 mM sodium phosphate buffer (pH 7)

1% (v/v) μερκαπτοαιθανόλη

15% (v/v) γλυκερόλη

0,01% (w/v) κυανούν της βρωμοφαινόλης

Για 10ml προστίθενται σε 7ml H₂O 0,5ml SDS 20%w/v, 0,2ml EDTA 0,5M, 0,1ml Sodium phosphate buffer 1M [1M sodium phosphate buffer: 42,3ml 1M NaH₂PO₄·H₂O (138g/l) και 57,7ml 1M Na₂HPO₄ (142g/l)], 0,1ml β-μερκαπτοαιθανόλη, 1,5ml γλυκερόλη και 0,25ml κυανούν της βρωμοφαινόλης (BMB) 0,4% w/v. Ο όγκος συμπληρώνεται μέχρι τα 10ml με H₂O.

5x Reducing Gel Loading buffer (για πρωτεΐνες, αποδιατακτικό, αναγωγικό)

60mM Tris-HCl pH 6,8

2% (w/v) SDS

25% (v/v) γλυκερόλη

0,1% (w/v) κυανούν της βρωμοφαινόλης (BMB)

5% (v/v) β-μερκαπτοαιθανόλη

Για 15ml: 0,9ml Tris-Cl pH 1M pH 6,8, 1,5ml SDS 20% (w/v), 3,75ml γλυκερόλης, 3,75ml 0,4% (w/v) BMB, 0,75ml β-μερκαπτοαιθανόλης σε 4,35ml H₂O.

2x Non-Reducing gel loading buffer (μη αναγωγικό, αποδιατακτικό διάλυμα για πρωτεΐνες)

100mM Tris-HCl pH 6,8

25% (w/v) γλυκερόλη

1% (w/v) SDS

0,4 ‰ (w/v) κυανού της βρωμοφαινόλης (BMB)

Για 10ml: Προστίθενται 1ml Tris-HCl pH 6,8 1M, 2,5ml γλυκερόλη, 0,5ml SDS 20% (w/v) και 100μl BMB 0,4% (w/v) σε 5,9ml H₂O.

Προσοχή, τα δείγματα αυτά δε βράζονται.

2x Tris-Tricine loading buffer (αναγωγικό, αποδιατακτικό διάλυμα για πρωτεΐνες)

100mM Tris-HCl pH 6.8

24% (v/v) γλυκερόλη

8% (w/v) SDS

0,02% (w/v) Coomassie Blue G-250

2M DTT (or 2% β-μερκαπτοαιθανόλη)

Για 10 ml, προστίθενται 1ml Tris-HCl pH 6,8 1M, 2,4ml γλυκερόλη, 4ml SDS 20% (w/v) και 500μl Coomassie Blue G-250 0,4% (w/v) και 0,2ml β-μερκαπτοαιθανόλη σε 1,9ml H₂O.

Διαλύματα για πηκτώματα πολυακρυλαμίδης Tris-Glycine

4x Stacking Buffer, pH 6,8	4x Separating Buffer, pH 8,8
0,5 M Tris-HCl 0,4% (w/v) SDS	1,5 M Tris-HCl 0,4% (w/v) SDS

Σύνθεση πηκτωμάτων πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE, Tris-Glycine)

	Αντιδραστήρια	10%	12%	16%
Πήκτωμα διαχωρισμού (Separating gel)	4x separating buffer	1ml	1ml	1ml
	40% Acrylamide	1ml	1,2	1,6
	10% (w/v) APS	40μl	40μl	40μl
	TEMED	2,8 μl	2,8 μl	2,8 μl
	H ₂ O	1,978ml	1,778ml	1,378ml
	Σύνολο	4ml	4ml	4ml

Πήκτωμα συσώρευσης (Stacking gel) 4ml	Αντιδραστήρια	4%
	4x stacking buffer	1ml
	40% Acrylamide	0,4ml
	10% (w/v) APS	40μl
	TEMED	4 μl
	H ₂ O	2,576ml

3M Tris-HCl/SDS, pH 8,45 (για πηκτώματα Tris-Tricine)

3M Tris-HCl pH 8,45

0,3% (w/v) SDS

Σε 50ml H₂O διαλύονται 36,342g Trizma base και το pH ρυθμίζεται στο 8,45 με πυκνό υδροχλωρικό οξύ. Στη συνέχεια προστίθεται 1,5ml SDS 20% (w/v) και ο όγκος ρυθμίζεται στα 100ml με H₂O.

Σύνθεση πηκτωμάτων πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE, Tris-Tricine)

	Αντιδραστήρια	12%
Πήκτωμα διαχωρισμού (Separating gel)	3M Tris-HCl pH 8,45	5ml
	40% Acrylamide	4,5ml
	Γλυκερόλη	1,5ml
	30% (w/v) APS	14μl
	TEMED	14μl
	H ₂ O	4ml
	Σύνολο	15ml

	Αντιδραστήρια	4%
Πήκτωμα συσσώρευσης (Stacking gel)	3M Tris-HCl pH 8,45	1,55ml
	40% Acrylamide	0,6ml
	30% (w/v) APS	14μl
	TEMED	14μl
	H ₂ O	4,1ml
	Σύνολο	6,278ml

Διαλύματα για ανάλυση με τη μέθοδο της νουκλεάσης S1

S1 διάλυμα υβριδοποίησης

40mM PIPES pH 6,4

400mM NaCl

1mM EDTA

80% (v/v) φορμαμίδιο (recrystallized)

Για 10ml, αναμειγνύονται 8ml φορμαμίδιο, 1ml PIPES 400mM pH 6,4, 0,8ml NaCl 5M και 0,2ml EDTA 0,5M. Το διάλυμα ανακινείται καλά και φυλάσσεται στους -20°C σε δείγματα του 0,5ml.

10x S1 διάλυμα πέψης

2,8mM NaCl

300mM οξικό νάτριο (NaAc) pH 4,4

45mM οξικός ψευδάργυρος Zn(Acetate)₂

Για 30ml, διαλύονται σε 15ml H₂O 4,91g NaCl, 0,74g NaAc και 0,3g Zn(Acetate)₂. Στη συνέχεια το pH ρυθμίζεται στο 4,4 και ο όγκος συμπληρώνεται μέχρι τα 30ml με H₂O. Το διάλυμα διαμοιράζεται σε δείγματα του 0,5ml και φυλάσσεται στους -20°C.

S1 διάλυμα φόρτωσης

7M Urea

5mM Tris borate pH 8,3

1mM EDTA

0,1% (w/v) Xylene cyanole

0,1% (w/v) κυανού της βρωμοφαινόλης

Για 10ml: Προστίθενται 4,2g Urea σε 1ml ddH₂O. Το μείγμα θερμαίνεται στους 65°C (υδατόλουτρο) για να διαλυθεί. Στη συνέχεια προστίθενται 1ml TBE 5x, 2,5ml 0,4% Xylene cyanole, 2,5ml 0,4% BMB και 20μl EDTA 0,5M. Ο όγκος προσαρμόζεται με ddH₂O στα 10ml. Το διάλυμα διαμοιράζεται σε δείγματα του 0,5ml και φυλάσσεται στους -20°C.

Πήκτωμα ακρυλαμιδίου (Urea 8M/6% (w/v) Acrylamide)

48g Ουρία

5,7g Ακρυλαμίδιο

0,3g Bis- Ακρυλαμίδιο

500μl 20% (w/v) APS

50μl TEMED

20ml TBE 5x

H₂O μέχρι τα 100ml

Σε 20ml TBE προστίθενται τα 48g ουρίας και το δείγμα θερμαίνεται υπό ανάδευση μέχρι να διαλυθεί η ουρία. Στη συνέχεια, προστίθενται τα 5,7g ακρυλαμιδίου και τα 0,3g Bis-ακρυλαμιδίου. Ο όγκος συμπληρώνεται μέχρι τα 100ml με H₂O. Ακολούθως το διάλυμα φιλτράρεται με χαρτί Whatman 3mm και αφήνεται να κρυώσει μέχρι θερμοκρασίας 50°C. Μόλις αυτό έρθει στην επιθυμητή θερμοκρασία, προστίθενται 500μl 20% (w/v) APS και 50μl TEMED και πολύ γρήγορα το πήκτωμα εγχέεται ανάμεσα στα 2 τζάμια, τοποθετούνται τα πηγαδάκια και αφήνεται να πολυμεριστεί για περίπου μισή ώρα. Στη συνέχεια, προτού να φορτωθούν τα δείγματα, το πήκτωμα ηλεκτροφορείται για μισή ώρα για να αποκτήσουν τα πολυμερή του πολυακρυλαμιδίου το σωστό προσανατολισμό.

M2 θρεπτικό μέσο (μέσο για καθαρισμό ωαρίων).

Sigma #M7167

Σε 100ml θρεπτικού προστίθενται:

100μl Penicillin G potassium 6%w/v (τελική []= 60mg/l)

100μl Streptomycin sulfate 5%w/v (τελική []= 50mg/l)

Στη συνέχεια φυλάσσεται σε δείγματα των 7ml στους 4°C.

M16 θρεπτικό μέσο (μέσο για τη φύλαξη των ωαρίων σε επωαστήρα)

Sigma #M7292

Σε 100ml of medium προστίθενται:

100μl Penicillin G potassium (τελική []= 60mg/l)

100μl Streptomycin sulfate (τελική []= 50mg/l)

Στη συνέχεια φυλάσσεται σε δείγματα των 3ml στους 4°C.

Penicillin G Potassium (Sigma #P4687)

Σε 10 ml mQH₂O διαλυτοποιούνται 0,6gr πενικιλίνης.

Το διάλυμα φιλτράρεται 0,22μm.

Φύλαξη στους 4°C.

Συγκεντρωμένο διάλυμα: 6%w/v 1000x

Λειτουργικό διάλυμα: 6μg/l (100units/ml)

Streptomycin sulfate salt (Sigma #S1277)

Σε 10 ml mQH₂O διαλυτοποιούνται 0,5gr στρεπτομυκίνης.

Το διάλυμα φιλτράρεται 0,22μm.

Φύλαξη στους 4°C.

Συγκεντρωμένο διάλυμα: 5%w/v 1000x

Λειτουργικό διάλυμα: 5μg/l (100units/ml)

PMS (Γοναδοτροπίνη από ορό εγκύου φοράδας) Sigma#G4527

Η PMS χρησιμοποιείται για να μιμηθεί την ωθηλακιοτρόπο ορμόνη (FSH).

Φτιάχνεται συγκεντρωμένο διάλυμα 500units/ml σε αλατούχο διάλυμα (NaCl 0.9%). Η συγκέντρωση του ενέσιμου διαλύματος είναι 50units/ml και για κάθε ζώο χρησιμοποιούνται 100μl (5units/ζώο).

hCG (ανθρώπινη χοριονική γοναδοτροπίνη) Sigma #C8554

Η hCG χρησιμοποιείται για να μιμηθεί την ωχρινοτρόπο ορμόνη (FSH).

Φτιάχνεται συγκεντρωμένο διάλυμα 500units/ml σε αλατούχο διάλυμα (NaCl 0.9%). Η συγκέντρωση του ενέσιμου διαλύματος είναι 50units/ml και για κάθε ζώο χρησιμοποιούνται 100μl (5units/ζώο).

1% Θειοφλαβίνη-S (w/v)

Σε 10ml δις αποσταγμένου H₂O διαλυτοποιείται 0,1g Thioflavin-S. Φιλτράρεται πριν από κάθε χρήση με φίλτρο 0,22μm.

Thioglycollate

4% (w/v) Thioglycollate

Σε 100ml H₂O διαλύονται 4g Thioglycollate. Το διάλυμα αποστειρώνεται με κλιβανισμό και φυλάσσεται στους 4°C. Το δείγμα ετοιμάζεται τουλάχιστον 1 εβδομάδα πριν από τη χρήση.

Τεχνητό εγκεφαλονωτιαίο υγρό (ENY, artificial CSF-Ringer's solution)

147mM NaCl

2,7mM KCl

1,2mM CaCl₂

0,85mM MgCl₂

pH 7,4

Για 500ml διαλύματος, διαλύονται σε 300ml H₂O 4,295g NaCl, 0,1g KCl, 0,06659g CaCl₂ και 0,094g MgCl₂·7H₂O. Στη συνέχεια το pH προσαρμόζεται στο 7,4 με αραιό NaOH (0,04N) το οποίο προστίθεται στάγδην-στάγδην. Το διάλυμα αποστειρώνεται με φιλτράρισμα 0,22μm και φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β

Lack of LDL Receptor Enhances Amyloid Deposition and Decreases Glial Response in an Alzheimer's Disease Mouse Model

Loukia Katsouri, Spiros Georgopoulos*

Department of Cell Biology, Biomedical Research Foundation of the Academy of Athens, Athens, Greece

Abstract

Background: Apolipoprotein E (ApoE), a cholesterol carrier associated with atherosclerosis, is a major risk factor for Alzheimer's disease (AD). The low-density lipoprotein receptor (LDLR) regulates ApoE levels in the periphery and in the central nervous system. LDLR has been identified on astrocytes and a number of studies show that it modulates amyloid deposition in AD transgenic mice. However these findings are controversial on whether LDLR deletion is beneficial or detrimental on the AD-like phenotype of the transgenic mice.

Methodology/Principal Findings: To investigate the role of LDLR in the development of the amyloid related phenotype we used an APP/PS1 transgenic mouse (5XFAD) that develops an AD-like pathology with amyloid plaques, astrocytosis and microgliosis. We found that 4 months old 5XFAD transgenic mice on the LDLR deficient background (*LDLR*^{-/-}) have increased amyloid plaque deposition. This increase is associated with a significant decrease in astrocytosis and microgliosis in the 5XFAD/*LDLR*^{-/-} mice. To further elucidate the role of LDLR in relation with ApoE we have generated 5XFAD transgenic mice on the ApoE deficient (*ApoE*^{-/-}) or the ApoE/LDLR double deficient background (*ApoE*^{-/-}/*LDLR*^{-/-}). We have found that ApoE deletion in the 4 months old 5XFAD/*ApoE*^{-/-} mice decreases amyloid plaque formation as expected, but has no effect on astrocytosis or microgliosis. By comparison 5XFAD/*ApoE*^{-/-}/*LDLR*^{-/-} double deficient mice of the same age have increased amyloid deposition with decreased astrocytosis and microgliosis.

Conclusions: Our analysis shows that LDL deficiency regulates astrocytosis and microgliosis in an AD mouse model. This effect is independent of ApoE, as both 5XFAD/*LDLR*^{-/-} and 5XFAD/*ApoE*^{-/-}/*LDLR*^{-/-} mice show reduction in inflammatory response and increase in amyloid deposition compared to control mice. These results demonstrate that LDLR regulates glial response in this mouse model independently of ApoE and modifies amyloid deposition.

Citation: Katsouri L, Georgopoulos S (2011) Lack of LDL Receptor Enhances Amyloid Deposition and Decreases Glial Response in an Alzheimer's Disease Mouse Model. PLoS ONE 6(7): e21880. doi:10.1371/journal.pone.0021880

Editor: Michelle L. Block, Virginia Commonwealth University, United States of America

Received: March 29, 2011; **Accepted:** June 11, 2011; **Published:** July 6, 2011

Copyright: © 2011 Katsouri, Georgopoulos. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by a Ministry of Development of Greece Grant and Pfizer Hellas to SG (PENED 03ED/464). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: sgeorgopoulos@rics.bwh.harvard.edu; sgeorgopoulos@bioacademy.gr

Introduction

Alzheimer's disease (AD), the major form of dementia, is an age-related neurodegenerative disease that impairs basic cognitive functions, primarily memory. AD is characterized by age-dependant deposition of amyloid plaques and neurofibrillary tangles [1]. Apolipoprotein (ApoE) is the major susceptibility gene for the common late-onset form of Alzheimer's disease and the presence of the $\epsilon 4$ allele increases the risk of developing AD [2]. Accumulating evidence suggests that the differential effects of ApoE isoforms on A β aggregation and clearance play a major role in AD pathogenesis [3]. ApoE, a cholesterol carrier, is primarily synthesized in the liver and the central nervous system (CNS) [4]. ApoE within the CNS is synthesized by astrocytes and microglia [4]. Studies using huAPP transgenic mice that develop an AD-like phenotype have shown that ApoE deletion exerts a beneficial effect on A β -fibrillogenesis and amyloid plaque formation in the mouse brain without altering A β -production. APP transgenic mice deficient for ApoE show a dramatic decrease in fibrillary amyloid

deposits [5,6,7,8,9]. ApoE binds to a number of membrane receptors, known as the low density lipoprotein receptor (LDLR) family. Many of these structurally related proteins, including the LDLR and the LDL receptor-related protein 1 (LRP1), have been shown to have diverse roles ranging from cholesterol homeostasis to nervous system development [10]. LDLR, the ancestor gene of the group, has been originally identified as a receptor for cholesterol-rich lipoproteins that regulates LDL-cholesterol metabolism [11]. LDLR deficiency in humans causes familial hypercholesterolemia (type IIA) [12] and inactivation of the LDLR gene in the mouse increases cholesterol levels and causes atherosclerosis [13].

Accumulating evidence suggests that cholesterol and cholesterol related proteins are involved in the pathogenesis of AD in humans and AD mouse models [14]. Although the LDLR has been shown to have a major role in cholesterol and ApoE homeostasis in the periphery [15,16] its role in the CNS remains unclear [17]. Some LDLR polymorphisms showed a sex-dependent increased risk for developing AD in humans [18,19]. In LDLR deficient mice, lack

of LDLR increases brain ApoE but has no effect on hippocampal or CSF cholesterol [20]. A number of studies using AD mice have provided evidence that the family of proteins involved in cholesterol metabolism as the ABCA1, the ApoA1, the SR-BI and the LDLR are involved in the pathogenesis of the AD-like phenotype in the mouse brain [21,22,23,24]. Previous studies using different AD mouse models that were LDLR deficient resulted in conflicting data on the effect of LDLR deficiency on the amyloid related phenotype of the mice [20,25]. Lack of LDLR had no effect on amyloid deposition in the brain in a study using a huAPP transgenic mouse [20] while an analogous study using another huAPP transgenic mouse showed a significant increase in amyloid deposition [25]. A recent study where LDLR was over-expressed in the brains of APP transgenic mice resulted in a significant decrease of amyloid plaque formation, thus establishing an important role for LDLR in the amyloid related pathology in the mouse brain [26].

The focus of the present study was to elucidate the role of LDLR deficiency in the amyloid-related phenotype in an AD mouse model, as results from previous studies were conflicting, and to examine to what extent the effect on amyloid deposition caused by LDLR is exclusively mediated by ApoE. We used a transgenic mouse (5XFAD) that expresses huAPP and huPS1 mutant transgenes and develops an amyloid related pathology. Amyloid deposits first appear in the subiculum and spread to the hippocampus and the cortex. We found that 4 months old 5XFAD/*ApoE*^{-/-} mice develop considerably less amyloid deposits, mainly located to the subiculum, compared to 5XFAD mice. We generated 5XFAD/*LDLR*^{-/-}, 5XFAD/*ApoE*^{-/-} and 5XFAD/*ApoE*^{-/-}/*LDLR*^{-/-} double knock-out mice to evaluate the effect of the LDLR deficiency in the amyloid plaque formation on the *ApoE*^{+/+} and the *ApoE*^{-/-} background. Thioflavine-S positive amyloid deposition was increased in the 5XFAD/*LDLR*^{-/-} mice compared to the 5XFAD control mice as well as in the 5XFAD/*ApoE*^{-/-}/*LDLR*^{-/-} compared to the 5XFAD/*ApoE*^{-/-} mice. A significant decrease both in the astrocytic and microglial response was observed together with the increase in amyloid deposition in both the 5XFAD/*LDLR*^{-/-} and 5XFAD/*ApoE*^{-/-}/*LDLR*^{-/-} mice. These results demonstrate that the LDLR deficiency reduces the glial response in the 5XFAD mice and this effect is independent of ApoE.

Results

LDLR deficiency increases amyloid plaque formation both in the 5XFAD/*LDLR*^{-/-} and the 5XFAD/*ApoE*^{-/-}/*LDLR*^{-/-} transgenic mice

To elucidate the effect of LDLR deficiency on the AD-like phenotype we used 4 months old female 5XFAD transgenic mice as male 5XFAD mice of the same age displayed a significant delay in the development of the amyloid pathology. A similar sex-specific effect on amyloid deposition has been reported on other AD mice [27]. Our analysis showed that 5XFAD/*LDLR*^{-/-} mice showed a significant increase in Thioflavine-S positive amyloid deposits compared to the 5XFAD mice both in the hippocampus (Fig. 1B upper photos) and the cortex (Fig. 1A upper photos) (n = 7). Deletion of ApoE greatly reduced Thioflavine-S positive amyloid plaque formation in 5XFAD/*ApoE*^{-/-} transgenic mice, with amyloid plaques restricted mainly at the subiculum (Fig. 1A and B lower photos). 5XFAD/*ApoE*^{-/-}/*LDLR*^{-/-} double knock-out mice displayed a significant increase in amyloid plaque deposition, compared to the 5XFAD/*ApoE*^{-/-} mice in the hippocampus (Fig. 1C) (n = 5–7). Quantification of the Thioflavine-S positive amyloid plaque load in the hippocampus and the cortex in these

mice confirmed a significant increase in the absence of LDLR both in the presence and in the absence of ApoE (Fig. 1D). These data confirm that the absence of LDLR in the 5XFAD mouse model results in the increase of the amyloid plaque formation independently of ApoE.

LDLR deficiency increases ApoE in the brains of the 5XFAD/*LDLR*^{-/-} mice and has no effect on APP processing

To confirm the effect of LDLR deficiency on ApoE levels in the brains of the 5XFAD/*LDLR*^{-/-} and 5XFAD control mice we extracted and immunoblotted the plaque-associated fraction from brain homogenates of the 5XFAD and 5XFAD/*LDLR*^{-/-} mice (Fig. 2A). We found a significant increase in the brain levels of ApoE in the 5XFAD/*LDLR*^{-/-} mice compared to the 5XFAD mice (Fig. 2B), as it has been previously reported [20,25].

To evaluate the effect of LDLR deletion on APP processing, we analyzed protein extracts from mouse brains. Western-blot analysis of total brain protein extracts for the full-length APP and its proteolytic fragments (α - and β -CTFs) did not detect any differences among the different genotypes (Fig. 2C). These data support that the LDLR deletion has no effect on the levels of APP or CTFs in the brains of the 5XFAD transgenic mice.

LDLR deficiency increases A β deposition in the hippocampus of the 5XFAD/*LDLR*^{-/-} and the 5XFAD/*ApoE*^{-/-}/*LDLR*^{-/-} mice

Consistent with the increase in the Thioflavine-S positive amyloid deposits, 5XFAD/*LDLR*^{-/-} and 5XFAD/*ApoE*^{-/-}/*LDLR*^{-/-} transgenic mice displayed increased A β deposition detected by 6E10 antibody. Mouse brains of 4 months old 5XFAD/*LDLR*^{-/-} mice had increased total A β immunoreactivity in the hippocampus and the cortex compared to 5XFAD control mice (Fig. 3A upper photos) (n = 7). This increase was statistically significant only in the hippocampus and not in the cortex (Fig. 3B). The pattern of A β -deposition in the 5XFAD and the 5XFAD/*LDLR*^{-/-} mice was similar with more intense deposition in the subiculum and in the molecular layer of the dentate gyrus of the hippocampus. A significant increase in A β immunoreactivity was also noticed in the hippocampus of the 5XFAD/*ApoE*^{-/-}/*LDLR*^{-/-} mice compared to the 5XFAD/*ApoE*^{-/-} mice (n = 5–7) (Fig. 3A lower photos and 3B left graph). Also the pattern of A β -deposition was similar with a characteristic lack of deposition in the molecular layer of the dentate gyrus of the hippocampus both in the 5XFAD/*ApoE*^{-/-} and the 5XFAD/*ApoE*^{-/-}/*LDLR*^{-/-} mice. Comparison of A β -deposition in the cortices of the 5XFAD/*ApoE*^{-/-} and the 5XFAD/*ApoE*^{-/-}/*LDLR*^{-/-} mice showed a non significant increase in the 5XFAD/*ApoE*^{-/-} brains (Fig. 3B right graph). This could be explained by the different pattern of A β deposits between the two genotypes in the cortex. 5XFAD/*ApoE*^{-/-} mice developed a more ‘diffuse’ pattern covering a larger area, compared to the 5XFAD/*ApoE*^{-/-}/*LDLR*^{-/-} mice that showed a more ‘compact’ pattern covering a smaller area (Fig. 3A lower photos).

Analysis of A β ₄₀ and A β ₄₂ levels by ELISA between 5XFAD and 5XFAD/*LDLR*^{-/-} mice showed an increase both in the guanidine and lysis fractions in the 5XFAD/*LDLR*^{-/-} brains, reflecting the increase in Thioflavine-S deposition observed in the 5XFAD/*LDLR*^{-/-} mice. The same analysis between the 5XFAD/*ApoE*^{-/-} and the 5XFAD/*ApoE*^{-/-}/*LDLR*^{-/-} mice showed an increase in both A β ₄₀ and A β ₄₂ levels in the guanidine extract.

This increase of A β ₄₀ and A β ₄₂ levels observed mainly in the guanidine fraction suggests that LDLR deficiency promotes fibrillar A β formation (Fig. 3C.)

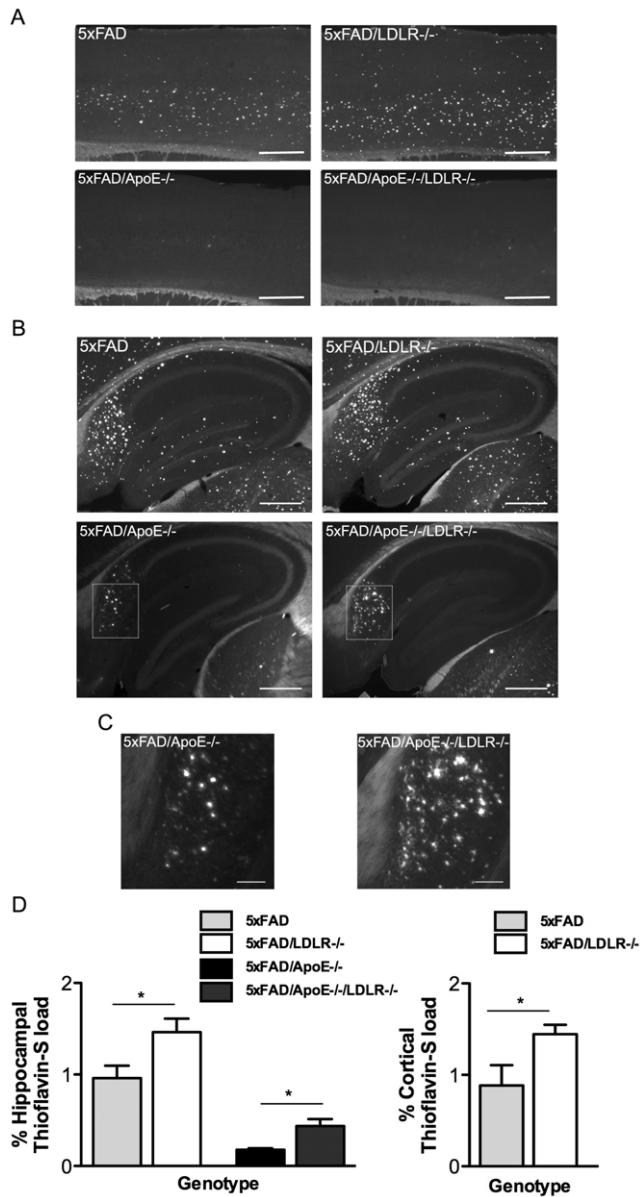


Figure 1. LDLR deficiency results in increased Thioflavine-S plaque load in the presence or in the absence of ApoE. A–B. Representative pictures of Thioflavine-S staining in cortices (A) and hippocampi (B) of the analyzed groups (n=5–7, 6–7 sections per animal, 240 mm apart). The absence of LDLR results in increased Thioflavine-S positive staining in the 5XFAD mice in the presence (A and B upper photos) or the absence of ApoE (A and B lower photos). Scale bar 0.5 mm. C. Magnification of the subiculum of the 5XFAD/ApoE^{-/-} and the 5XFAD/ApoE^{-/-}/LDLR^{-/-} mice, showing the difference in abundance of Thioflavine-S positive plaques. Scale bar 0.1 mm. D. Quantitation of Thioflavine-S positive staining in the hippocampi (left) and cortices (right) of female mice showing the increase in the amyloid plaques in the 5XFAD/LDLR^{-/-} and 5XFAD/ApoE^{-/-}/LDLR^{-/-} mice. One-way ANOVA showed a significant difference among groups ($P < 0.0001$) followed by Student's t-test. * $P < 0.05$. P-values among groups are analysed in Table 1. doi:10.1371/journal.pone.0021880.g001

5XFAD/LDLR^{-/-} and 5XFAD/ApoE^{-/-}/LDLR^{-/-} transgenic mice display decreased astrocytic and microglial response

5XFAD mice have been shown to have extended neuroinflammatory responses displaying a significant increase in astrocytic

and microglial response that is associated with age and amyloid deposition [28]. To evaluate the effect of LDLR deficiency on the glial response, astrocytic and microglial, we analysed female 4 month old 5XFAD and 5XFAD/LDLR^{-/-} mice as well as 5XFAD/ApoE^{-/-} and 5XFAD/ApoE^{-/-}/LDLR^{-/-} mice. Despite the increase in the amyloid deposition that was expected to further increase the glial response, in the 5XFAD/LDLR^{-/-} mice GFAP (astrocytic) and Iba-1 (microglial) staining was reduced compared to 5XFAD littermates of the same gender and age. A similar effect was exerted in the 5XFAD/ApoE^{-/-}/LDLR^{-/-} mice where astrocytic and microglial response was reduced compared to the 5XFAD/ApoE^{-/-} (Figs. 4A,B,C and 5A,B,C). This decrease of GFAP and Iba1 staining was localized in the subiculum of the hippocampus (Figs. 4A and 5A) as well as in the cortex where it was more profound (Figs. 4B and 5B). In the thalamus of the 5XFAD/LDLR^{-/-} mice we also noticed the formation of Iba-1 positive round cell formations surrounding Thioflavine-S positive amyloid deposits not observed in any other genotype (Fig. 5C).

These results indicate that the LDLR deficiency is affecting the neuroinflammatory response in the 5XFAD mouse model. Our results also suggest that this effect is not mediated by ApoE.

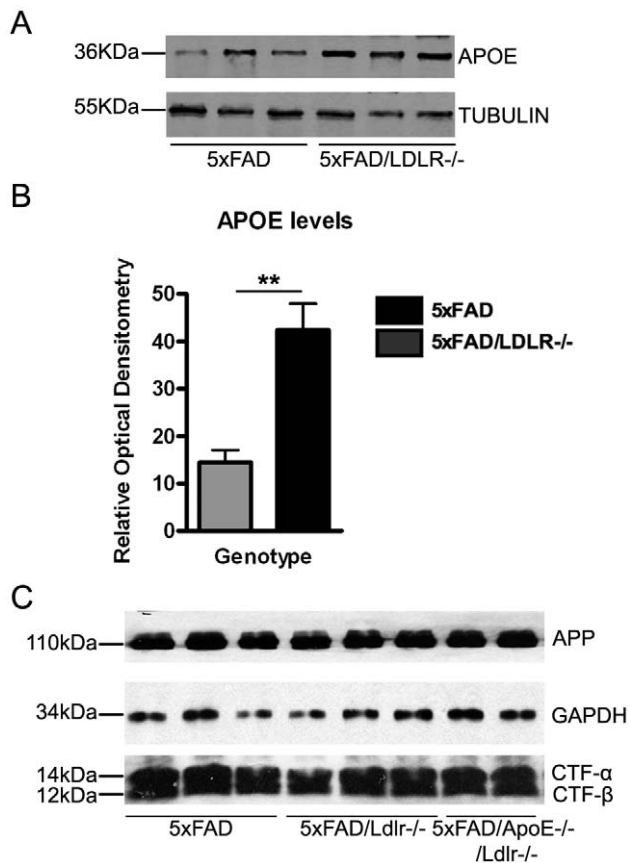
Discussion

ApoE is a major risk factor in the pathogenesis of AD in the human population. The $\epsilon 4$ allele of ApoE predisposes to AD while the $\epsilon 2$ allele is protective [29,30]. ApoE2 has been shown to have a very low binding capacity to the LDLR compared to ApoE3 or ApoE4 [4]. This difference in the binding ability to LDLR has led to the hypothesis that LDLR is a potential mediator of the differential effect of the ApoE alleles on A β clearance and aggregation. Previous studies where the LDLR gene was deleted or over-expressed in AD transgenic mice indeed confirmed the role of the LDLR in amyloid deposition [20,25,27]. In all these studies LDLR was shown to regulate ApoE levels in the brain suggesting that ApoE is possibly the key mediator of the effect on amyloid deposition. Nevertheless deletion of LDLR in huAPP transgenic mice into two separate studies resulted in opposing evidence on the effect of LDLR deletion in amyloid deposition, with one study having no effect and the other showing a significant increase [20,25]. To clarify the role of LDLR deficiency in amyloid deposition in a huAPP transgenic mouse model we generated and analyzed a novel huAPP/PS1 transgenic mouse deficient for LDLR. Also in the present study we examined whether LDLR effect on amyloid deposition is dependent on ApoE, or whether LDLR can exert any effect independent of ApoE on the pathogenesis of the amyloid related phenotype in this AD mouse model. ApoE has a major impact on the generation of amyloid deposits in the AD mouse brain and deletion of ApoE in most AD mouse models significantly inhibits amyloid plaque formation [6,7,8]. In this study we used an AD mouse model (5XFAD) that carries both huAPP and huPS1 mutant transgenes and starts to develop amyloid deposits at the early age of two months [28]. We backcrossed 5XFAD transgenic mice to the ApoE deficient background and we found a great reduction in amyloid load as expected. Although there was a significant reduction in amyloid deposition, 5XFAD/ApoE^{-/-} mice developed amyloid plaques in the subiculum at the early age of four months. Also as it has been reported with other APP/PS1 transgenic mice, we observed a sex-specific effect on amyloid deposition with 5XFAD female mice developing amyloid deposits earlier compared to male littermates [27,31,32]. As the prevalence of AD is higher in women it is noteworthy that a similar mechanism is likely to be present in the mice [33].

Table 1. Results of Student's t-test for Thioflavine-S positive amyloid deposits of the analyzed groups.

Group 1 (hippocampus)	Group 2 (hippocampus)	P value
5xFAD	5xFAD/ <i>LDLR</i> ^{-/-}	P = 0.03 (*)
5xFAD/ <i>ApoE</i> ^{-/-}	5xFAD/ <i>ApoE</i> ^{-/-} / <i>LDLR</i> ^{-/-}	P = 0.0274 (*)
5xFAD	5xFAD/ <i>ApoE</i> ^{-/-}	P = 0.013 (*)
5xFAD	5xFAD/ <i>ApoE</i> ^{-/-} / <i>LDLR</i> ^{-/-}	P = 0.0139 (*)
5xFAD/ <i>LDLR</i> ^{-/-}	5xFAD/ <i>ApoE</i> ^{-/-}	P = 0.0003 (***)
5xFAD/ <i>LDLR</i> ^{-/-}	5xFAD/ <i>ApoE</i> ^{-/-} / <i>LDLR</i> ^{-/-}	P = 0.0003 (***)
Group 1 (Cortex)	Group 2 (Cortex)	P value
5xFAD	5xFAD/ <i>LDLR</i> ^{-/-}	P = 0.0452 (*)

doi:10.1371/journal.pone.0021880.t001

**Figure 2. Lack of LDLR increases brain ApoE levels in the 5XFAD/*LDLR*^{-/-} mice and has no effect on the APP processing.**

A. Western blot for ApoE of protein extracts of 5XFAD and 5XFAD/*LDLR*^{-/-} mouse brains. Tubulin was used as a loading control. 30 μ g from the guanidine fraction of brain homogenates was loaded in each lane. In the absence of LDLR the levels of brain ApoE are increased. B. Densitometry of western blots shows a significant increase in the levels of ApoE in the guanidine fraction of total brain extracts. Statistical analysis was performed with the Student's *t*-test (** $P = 0.0041$). C. 10 μ g of protein from the lysis fraction of total brain homogenates were loaded in each lane and immunoblotted for full length APP and CTFs. GAPDH was used as a loading control. No difference was observed in the full length APP or the CTFs when normalised to the control indicating that LDLR deficiency has no effect on the steady-state levels of full-length APP or on α - and β -secretase activity (5-7 animals per genotype were analysed and the experiments were repeated 3 times). doi:10.1371/journal.pone.0021880.g002

To evaluate the effect of LDLR deletion on amyloid deposition we generated 5XFAD/*LDLR*^{-/-} mice and compared amyloid deposition to the 5XFAD mice. We found that LDLR deletion increases Thioflavine-S positive amyloid deposits both in the hippocampus and the cortex as it has been previously reported using a different AD mouse model. [25]. We also found that ApoE levels are increased in the 5XFAD/*LDLR*^{-/-} mice compared to 5XFAD mice suggesting that LDLR regulates ApoE levels in the brain.

Next, to examine whether the increase in amyloid deposition induced by the LDLR deficiency is mediated exclusively by the effect of LDLR on ApoE, we generated 5XFAD/*ApoE*^{-/-}/*LDLR*^{-/-} mice and compared amyloid deposition to the 5XFAD/*ApoE*^{-/-} mice. We found that deletion of LDLR in the 5XFAD/*ApoE*^{-/-}/*LDLR*^{-/-} mice increased amyloid deposition in the absence of ApoE. The pattern of formation of amyloid deposits both in the 5XFAD/*ApoE*^{-/-} and the 5XFAD/*ApoE*^{-/-}/*LDLR*^{-/-} mice was characteristic with absence of deposits in the molecular layer of the hillus of the hippocampus suggesting that lack of LDLR can enhance amyloid deposition but cannot modify the pattern of deposition that is dictated by ApoE. We also found that LDL deletion or double ApoE LDLR deletion has no impact on the APP processing and production of α and β -CTFs fragments in the mouse brain, suggesting that the effect on amyloid deposition resulted from increased A β aggregation and reduced clearance. Our results, using the 5XFAD mouse model, confirm that LDLR is involved in amyloid deposition as shown in previous studies. Deletion of LDLR confers a negative effect according to our data and other studies [20,25] while over-expression diminishes amyloid deposition [27]. Moreover our data demonstrate that LDLR deletion has an effect on amyloid deposition independent of ApoE as 5XFAD/*ApoE*^{-/-}/*LDLR*^{-/-} mice have increased amyloid deposition compared to the 5XFAD/*ApoE*^{-/-} mice. These results imply that LDLR might be involved in a mechanism affecting amyloid deposition where ApoE is not involved.

A major characteristic of AD pathology is the increased inflammatory response that is observed close and around the amyloid plaques. Many studies have suggested that the brain's immune system, microglia and astrocytes play a major role in AD pathogenesis [34,35]. As 5XFAD transgenic mice display early astrogliosis and microgliosis associated with amyloid deposits, we examined the effect of LDLR deficiency on astrogliosis and microgliosis in the mouse brain. We found that despite the increase of amyloid deposits in the 5XFAD/*LDLR*^{-/-} mice there was a profound decrease both in the astrocytic and microglial response compared to the 5XFAD mice. The same effect was observed in the 5XFAD/*ApoE*^{-/-}/*LDLR*^{-/-} mice compared to the

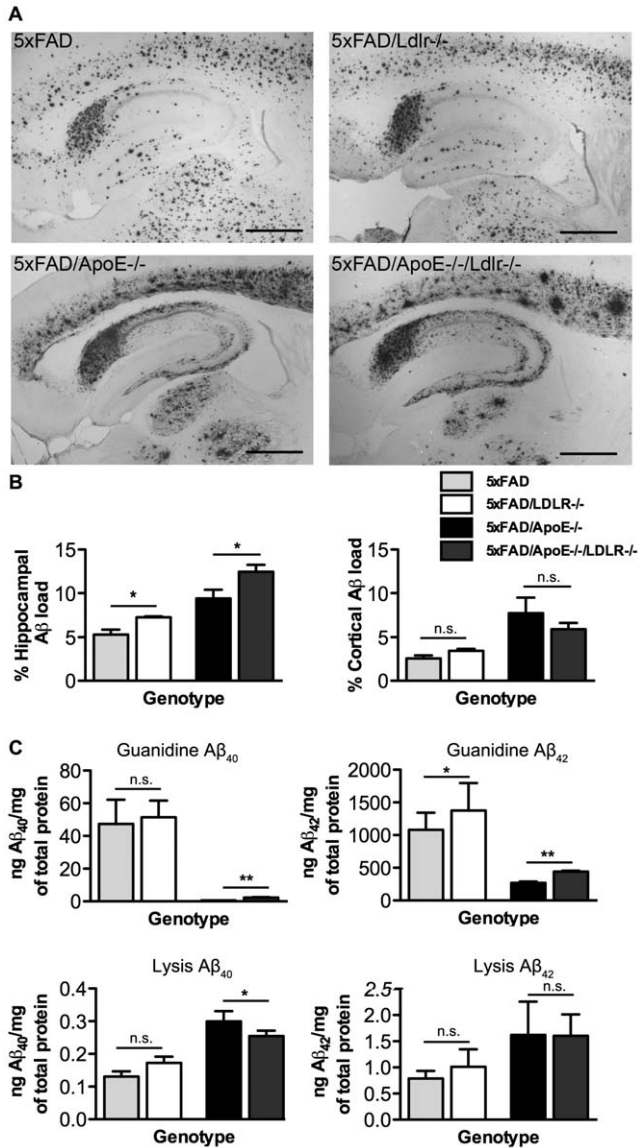


Figure 3. LDLR deletion increases A β deposition in the mouse hippocampus. A. Immunohistochemistry for total A β (6E10) in the brains of female mice. Representative pictures are shown for each genotype. The A β deposition is increased in the subiculum of the 5XFAD/LDLR $^{-/-}$ mice compared to the 5XFAD mice. The same effect is observed in the 5XFAD/ApoE $^{-/-}$ LDLR $^{-/-}$ mice where A β deposition is more intense in the subiculum. A β deposition in the 5XFAD/ApoE $^{-/-}$ LDLR $^{-/-}$ cortices appears more 'dense' and "compact" compared to the 5XFAD/ApoE $^{-/-}$ mice where A β deposition is more "diffuse". Scale bar 0.5 mm (n=5–7, 6–7 sections per animal, 240 μ m apart). B. Quantitation of A β immunoreactivity in the hippocampi (left) of the analysed groups shows a significant increase in the A β deposition in the 5XFAD/LDLR $^{-/-}$ and the 5XFAD/ApoE $^{-/-}$ LDLR $^{-/-}$ mice. In the cortices (right) there is no significant difference between 5XFAD and 5XFAD/LDLR $^{-/-}$ as well as between 5XFAD/ApoE $^{-/-}$ and 5XFAD/ApoE $^{-/-}$ LDLR $^{-/-}$. * $P < 0.05$. P-values among all groups are analysed in Table 2 and Table 3 for hippocampi and cortices respectively. C. Quantitation of A β_{42} and A β_{40} levels by ELISA in the 5XFAD and the 5XFAD/LDLR $^{-/-}$ mouse brain extracts showed an increase both in the guanine and lysis fraction in the 5XFAD/LDLR $^{-/-}$ mice. A similar increase was also observed in the guanine fraction of the 5XFAD/ApoE $^{-/-}$ LDLR $^{-/-}$ mice compared to the 5XFAD/ApoE $^{-/-}$ but not in the lysis fraction (n=5–7) * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$.

doi:10.1371/journal.pone.0021880.g003

Table 2. Results of Student's t-test for A β immunostaining in the hippocampi of the analyzed groups.

Group 1	Group 2	P value
5XFAD	5XFAD/LDLR $^{-/-}$	P = 0.0281 (*)
5XFAD/ApoE $^{-/-}$	5XFAD/ApoE $^{-/-}$ LDLR $^{-/-}$	P = 0.0493 (*)
5XFAD	5XFAD/ApoE $^{-/-}$	P = 0.0059 (**)
5XFAD	5XFAD/ApoE $^{-/-}$ LDLR $^{-/-}$	P = 0.0001 (***)
5XFAD/LDLR $^{-/-}$	5XFAD/ApoE $^{-/-}$	P = 0.0215 (*)
5XFAD/LDLR $^{-/-}$	5XFAD/ApoE $^{-/-}$ LDLR $^{-/-}$	P < 0.0001 (***)

doi:10.1371/journal.pone.0021880.t002

5XFAD/ApoE $^{-/-}$ mice. This was very obvious in the subiculum and in the cortex where amyloid plaques were formed. This was not expected as microglial and astrocytic response is proportional to the amyloid deposition and was expected to be more than less compared to the controls. These data clearly suggest for the possible involvement of LDLR in the glial response in the AD mouse brain. Also this effect is not related to ApoE as it is observed both in the 5XFAD/LDLR $^{-/-}$ and the 5XFAD/ApoE $^{-/-}$ LDLR $^{-/-}$ mice. An effect in the glial response related to LDLR has been also reported in another study where an LDLR transgene has been expressed in the brain of another AD mouse model [27]. In this study LDLR over-expression resulted in reduced amyloid deposition with decreased glial response. Glial response has been shown to be proportional to the amyloid deposition in most transgenic mice therefore a reduction in astrocytic and microglial response is an expected effect following reduced amyloid deposition.

Our study suggests that LDLR is not only able to regulate ApoE levels in the brain thus affecting amyloid deposition, but it can have an effect on amyloid deposition independent of ApoE by regulating glial response. Our data along with previous studies show that LDLR has an effect on amyloid deposition as other members of the LDLR family of receptors. LRP1 has also been shown to be involved in the clearance of amyloid [36,37,38]. It is likely that the LDLR acts jointly with the LRP1 and the deletion of LDLR is partially compensated by LRP1 in the clearance of A β .

In this study we also showed that LDLR is able to regulate the glial response, both astrocytic and microglial in the absence of ApoE. The increased formation of amyloid deposits in the 5XFAD/ApoE $^{-/-}$ LDLR $^{-/-}$ mice can be attributed to down-regulation of the glial inflammatory response. A defective cholesterol homeostasis can be a possible explanation for this effect. Abnormal cholesterol homeostasis caused by deletion of ApoE or other

Table 3. Results of Student's t-test for A β immunostaining in the cortices of the analyzed groups.

Group 1	Group 2	P value
5XFAD	5XFAD/LDLR $^{-/-}$	P = 0.0546 (ns)
5XFAD/ApoE $^{-/-}$	5XFAD/ApoE $^{-/-}$ LDLR $^{-/-}$	P = 0.3385 (ns)
5XFAD	5XFAD/ApoE $^{-/-}$	P = 0.007 (**)
5XFAD	5XFAD/ApoE $^{-/-}$ LDLR $^{-/-}$	P = 0.0297 (*)
5XFAD/LDLR $^{-/-}$	5XFAD/ApoE $^{-/-}$	P = 0.0179 (*)
5XFAD/LDLR $^{-/-}$	5XFAD/ApoE $^{-/-}$ LDLR $^{-/-}$	P = 0.006 (**)

doi:10.1371/journal.pone.0021880.t003

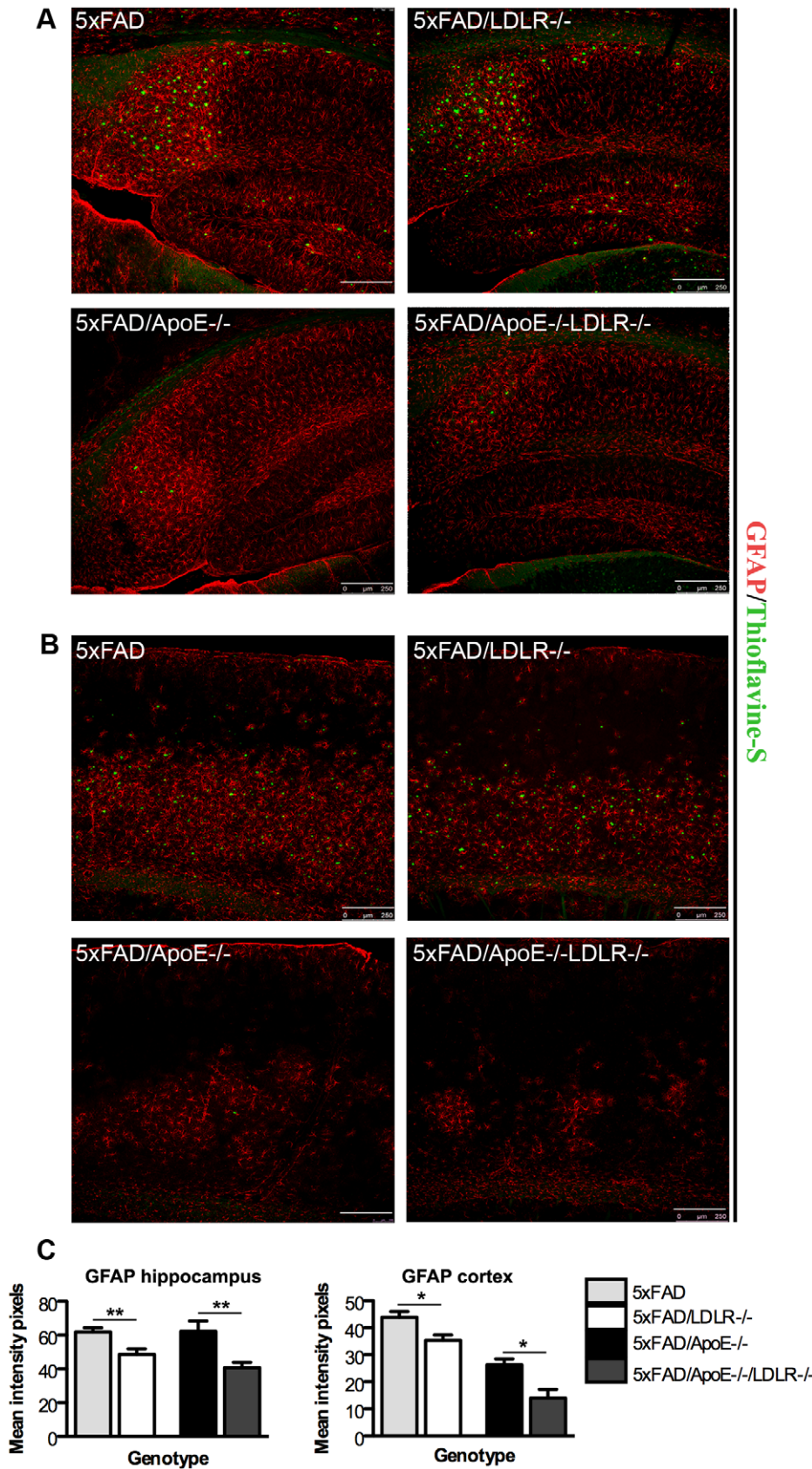


Figure 4. Astrocytosis is decreased in the brains of 5XFAD/LDLR-/- and 5XFAD/ApoE-/- LDLR-/- mice. Immunohistochemistry for GFAP (red) and Thioflavine-S (green) in the hippocampi (A) and the cortices (B) of mouse brains. Representative pictures are shown for each genotype. In both areas examined the absence of LDLR results in reduction of GFAP immunoreactivity. Astrocytosis in both the cortex and the hippocampus is

more intense in the 5XFAD and the 5XFAD/*ApoE*^{-/-} compared to the 5XFAD/*LDLR*^{-/-} and the 5XFAD/*ApoE*^{-/-}/*LDLR*^{-/-} sections respectively. Scale bar 250 μ m. The pictures were taken under the same conditions of intensity and the experiment was repeated 3 times. (n=5–7, 3–4 independent sections per animal were analyzed). C. Quantitation of GFAP positive staining in the hippocampi and cortices showing a decrease in the 5XFAD/*LDLR*^{-/-} and 5XFAD/*ApoE*^{-/-}/*LDLR*^{-/-} mice compared to the control mice. P-values in the hippocampi (left graph) ** P=0.0040 for 5XFAD vs. 5XFAD/*LDLR*^{-/-} and P=0.0031 for 5XFAD/*ApoE*^{-/-} vs. 5XFAD/*ApoE*^{-/-}/*LDLR*^{-/-}. In the cortices (right graph) * P=0.0399 for 5XFAD vs. 5XFAD/*LDLR*^{-/-} and P=0.0205 for 5XFAD/*ApoE*^{-/-} vs. 5XFAD/*ApoE*^{-/-}/*LDLR*^{-/-}.
doi:10.1371/journal.pone.0021880.g004

cholesterol receptors as the SR-BI has been shown to cause altered responses to different immune cell types like the macrophages [39], although LDLR has not been implicated in regulating immune responses in the brain or the periphery so far.

The present study further implicates LDLR in the pathogenesis of AD suggesting LDLR as a potential regulator of the glial response in the development of the AD-like phenotype in an AD mouse model. Moreover we show that this effect can be independent of ApoE suggesting a novel mechanism.

In conclusion, our results provide new evidence regarding the role of LDLR in the pathogenesis of Alzheimer's disease suggesting that LDLR could be a potential therapeutic target in AD.

Materials and Methods

Animals

LDLR^{-/-}, *ApoE*^{-/-} and 5XFAD transgenic mice were obtained from The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME. *ApoE*^{-/-} and 5XFAD mice were on the C57Bl6/J background. *LDLR*^{-/-} were on C57Bl6/J;129S2 mixed genetic background and have been backcrossed for at least six generations to C57Bl6/J background. All test and control mouse groups analyzed for A β related pathology were 4 months old. Only female mice were analyzed as female 5XFAD transgenic mice develop the amyloid related phenotype earlier compared to males of the same age. To generate 5XFAD/*LDLR*^{-/-} mice, 5XFAD mice were mated with *LDLR*^{-/-} mice and the resulting 5XFAD/*LDLR*^{+/-} mice were mated with the *LDLR*^{-/-} mice. 5XFAD/*LDLR*^{-/-} were identified by PCR. The same strategy was used to generate 5XFAD/*ApoE*^{-/-} mice. 5XFAD mice were mated with *ApoE*^{-/-} mice and the resulting 5XFAD/*ApoE*^{+/-} mice were mated with the *ApoE*^{-/-} mice. 5XFAD/*ApoE*^{-/-} mice were identified by PCR. To generate *ApoE*^{-/-}/*LDLR*^{-/-} mice, *ApoE*^{-/-} mice were mated to *LDLR*^{-/-} mice. The *ApoE*^{+/-}/*LDLR*^{+/-} that resulted from this cross were mated with each other and *ApoE*^{-/-}/*LDLR*^{-/-} mice were identified by PCR. To generate 5XFAD/*ApoE*^{-/-}/*LDLR*^{-/-} mice 5XFAD mice were mated with *ApoE*^{-/-}/*LDLR*^{-/-} mice and the resulting 5XFAD/*ApoE*^{+/-}/*LDLR*^{+/-} mice were mated with the *ApoE*^{-/-}/*LDLR*^{-/-} mice. 5XFAD/*ApoE*^{-/-}/*LDLR*^{-/-} mice were identified by PCR. All mice were maintained on a standard chow diet containing 5% fat. All animal procedures were approved by the Bioethical committee of the Biomedical Research Institute of the Academy of Athens and by the Prefecture of Athens, Greece. All animal experimentations were carried out in agreement with ethical recommendation of the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC). Standard PCR techniques were used to genotype the 5XFAD, ApoE and LDLR genotypes.

Tissue collection

Mice were anesthetized and transcardially perfused with PBS 0.1 M pH 7.4. Tissues were harvested immediately after perfusion. Left hemibrains were snap-frozen in liquid nitrogen for protein analysis. Right hemibrains were immersion-fixed in 4% PFA in PBS for 48 hours and cryoprotected in 20% sucrose in PBS for immunohistochemistry.

Protein extraction from brain tissue

Protein extraction from left hemibrains was performed in three consecutive steps in order to evaluate protein levels in PBS, Lysis buffer (containing 10% glycerol, 1% Triton X-100 and complete protease inhibitor (Roche Applied Science) in PBS) and Guanidine fractions (5 M Guanidine-HCl) respectively as described before [21]. Brain tissue from all animals was extracted in an identical manner, and all fractions were immediately frozen at -80°C until analysis. Protein concentrations were determined by BCA Protein Assay (Pierce).

Western blot

Left hemibrains tissues were homogenised as designated above and 30 μ g of total protein were separated in a 10% SDS-PAGE Tris-Glycine for ApoE and Tubulin. In brief, after electrophoresis, proteins were transferred to a PVDF membrane (Immobilon-P, Millipore), blocked for 1 hour at room temperature with 5% milk in TBS-Tween 0.05% (TBST) and incubated for 1 hour at room temperature with goat anti-ApoE (M20, 1:2000, Santa Cruz) or mouse anti-Tubulin (3D10, 1:500, Sigma) in blocking solution. After washes with TBST blots were incubated with appropriate secondary antibodies (Santa Cruz) for 1 hour. For APP western blot 10 μ g of total protein were separated in a 12% Tris-Tricine gel and transferred to nitrocellulose membrane (Protran, Whatman). Membranes were blocked for 30 minutes at 37°C in 5% FCS and incubated overnight at 4°C with rabbit polyclonal anti-human APP 1:2500 [R1(57), a kind gift by Dr. P. Mehta, Institute for basic research in developmental disabilities, Staten Island, NY] [40]. The following day the membrane was washed 3 times with TBST and incubated for 1 hour at room temperature with goat-anti-rabbit HRP-conjugated (Santa Cruz). Blots were developed using ECL (Amersham) according to the manufacturer's recommendations. Bands were quantitated by densitometry using NIH Image J software.

Immunohistochemistry

Brains were fixed in 4% PFA in PBS for 48 hrs and then were cryoprotected in 20% sucrose in PBS (0.1 M PBS, pH 7.4). Fixed hemibrains were cut in 40- μ m sagittal floating sections from the genu of the corpus callosum to the most caudal hippocampus using a vibratome (Leica VT1000S). For total A β immunostaining 6–7 sagittal sections 240 μ m apart from each other spanning all the hippocampal formation were chosen. Sections were washed with TBS-0.1% Triton X-100 3 times for 10 minutes each, incubated for 30 min with 0.3% H₂O₂ in TBS and washed with TBS 3 times. Antigen retrieval was performed with 98% formic acid for 5 min, followed by 3 washes with TBS. Sections were transferred into blocking solution containing 15% normal donkey serum (Vector Laboratories) in TBS-Triton X-100 0.1% for 1 hour and incubated overnight at 4°C in 5% normal donkey serum (Vector Laboratories) in TBS-Triton X-100 0.1% containing the monoclonal biotinylated 6E10 primary antibody (1:1000, Signet). Sections were then washed five times with TBS-Triton X-100 0.1%, and incubation in avidin-biotinylated horseradish peroxidase complex (ABC Elite, Vector Laboratories) followed for 90 min at room temperature. Peroxidase labelling was visualized

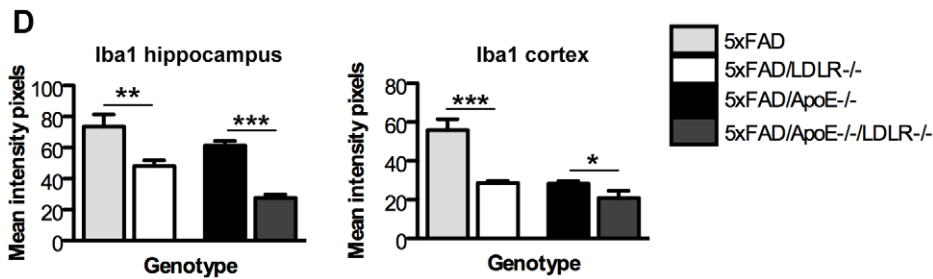
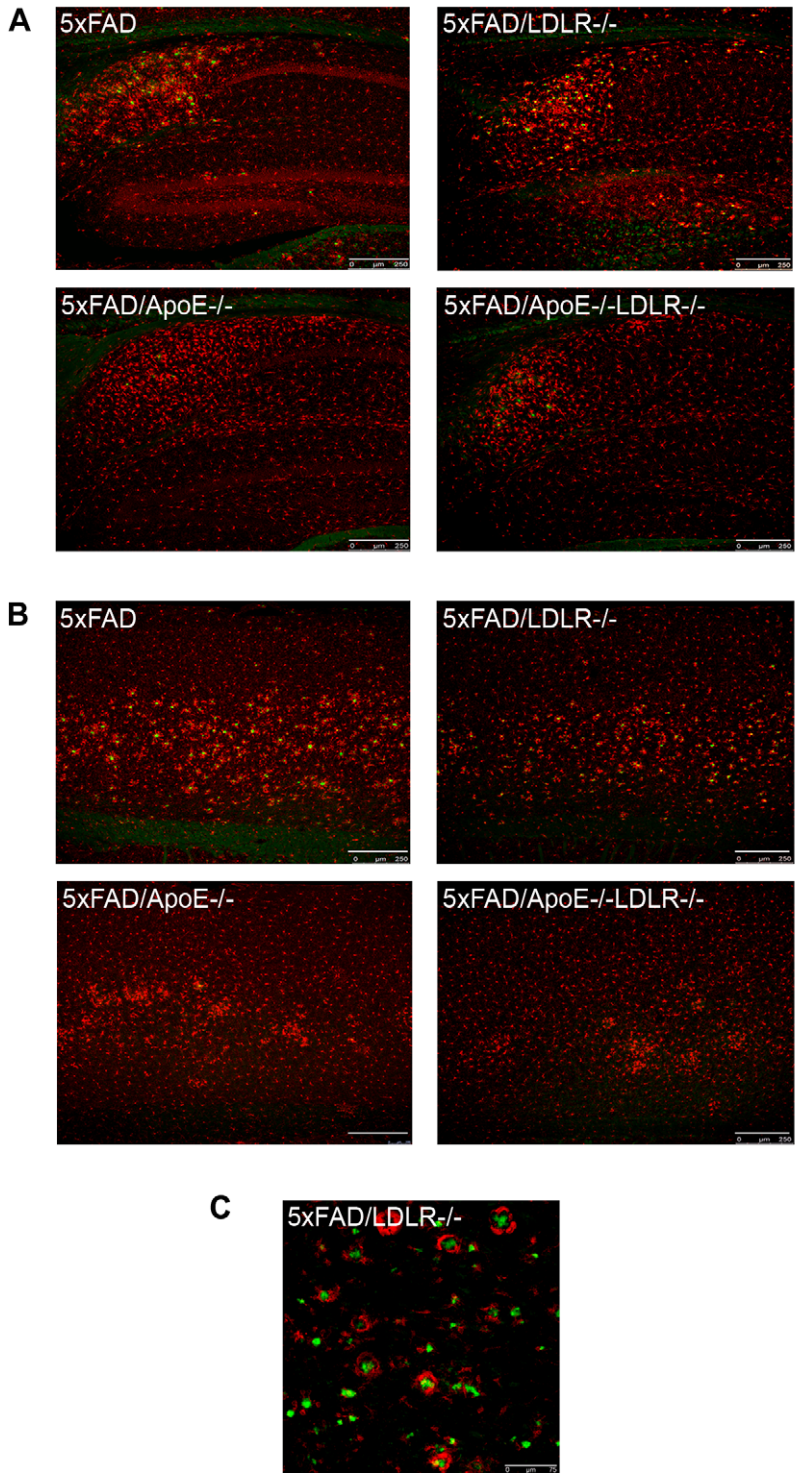


Figure 5. Microgliosis is decreased in the brains of 5XFAD/LDLR^{-/-} and 5XFAD/ApoE^{-/-}LDLR^{-/-} mice. A. Immunohistochemistry for Iba1 (red) and Thioflavine-S (green) in the hippocampus and cortex of mouse brains. Representative pictures are shown for each genotype. LDLR deficiency results in the reduction of microgliosis both in the hippocampi (A) and the cortices (B) in 5XFAD/LDLR^{-/-} and 5XFAD/ApoE^{-/-}LDLR^{-/-} mice. C. Iba1 positive round cell formations surrounding Thioflavine-S positive amyloid deposits in the thalamus of 5XFAD/LDLR^{-/-} mice. Scale bar 75 μ m. The pictures were taken under the same conditions of intensity and the experiment was repeated 3 times. (n=5-7, 3-4 independent sections per animal were analyzed). D. Quantitation of Iba1 positive staining in the hippocampi and cortices showing a decrease in the 5XFAD/LDLR^{-/-} and 5XFAD/ApoE^{-/-}LDLR^{-/-} mice compared to the control mice. P-values in the hippocampi (left graph) ** P=0.0043 for 5XFAD vs. 5XFAD/LDLR^{-/-} and ***P<0.0001 for 5XFAD/ApoE^{-/-} vs. 5XFAD/ApoE^{-/-}LDLR^{-/-}. In the cortices (right graph) *** P<0.0001 for 5XFAD vs. 5XFAD/LDLR^{-/-} and *P=0.0487 for 5XFAD/ApoE^{-/-} vs. 5XFAD/ApoE^{-/-}LDLR^{-/-}. doi:10.1371/journal.pone.0021880.g005

with DAB/Ni (Vector). After a 1-min incubation period, sections were washed, mounted on glass slides, dehydrated in increasing ethanol concentrations from 50 to 100% followed by xylene and coverslipped with DPX (BDH).

The specificity of immunoreactivity was confirmed both by omitting the primary antibody and by the lack of signal when applying the same protocol on brain sections of wild-type littermates.

Immunofluorescence

For the estimation of amyloid plaque load in transgenic mice, 6–7 sagittal sections 240 μ m apart from each other spanning all the hippocampal formation were chosen for Thioflavine-S staining. Sections were incubated for 8 minutes in aqueous solution of Thioflavine-S (1% w/v) and then differentiated 2 times with 80% Ethanol for 3 minutes each, followed by another 3-minutes wash with 95% Ethanol. Sections were rinsed three times with ddH₂O and coverslipped with Vectashield fluorescence mounting medium (Vector). Imaging for Thioflavine-S was performed on a Leica DMRA 2 microscope (magnification 2.5x for cortices and 5x for hippocampi) and image captivation was performed using Leica Application Suite, version 2.8.1 software. For the analysis of the inflammatory response in the brains of mice, the GFAP and Iba1 markers for astrocytes and microglia respectively were used. For GFAP and Thioflavine-S, free-floating sections were washed 3 times with 1 \times TBS pH 7.6, blocked with 1 \times TBS-Triton X-100 0.4%, 5% Normal Goat Serum (Vector) for 1 hour at room temperature and incubated overnight at 4°C with rabbit polyclonal anti-GFAP (1:1000, Sigma). The following day, sections were washed five times with 1 \times TBS and incubated in blocking solution with goat anti-rabbit Cy3-conjugated (1:300, Jackson ImmunoResearch) for 1 hour at room temperature. Sections were washed with 1 \times TBS and immersed in Thioflavine-S (1% w/v aqueous solution) for 5 minutes. Sections were differentiated twice with 70% Ethanol and rinsed 3 times with PBS (0,1 M pH 7.4). Sections were mounted on glass slides and coverslipped with Vectashield fluorescence mounting medium (Vector). For Iba1 and Thioflavine-S immunofluorescence sections were permeabilized for 30 minutes with PBS-Triton X-100 0.1% at room

temperature, blocked for 3 hours with 10% fetal calf serum (FCS), 1% BSA (fraction V, Sigma) in PBS-Triton X-100 0.1% and incubated overnight at 4°C with rabbit anti-Iba1 (1:300, Wako) in 1% FCS, 0.1% BSA, PBS-Triton X-100 0.01%. The following day, sections were washed 5 times with PBS and incubated with goat anti-rabbit Cy3-conjugated (1:300, Jackson ImmunoResearch) for 1 hour at room temperature. Sections were washed 5 times with 1 \times TBS and stained for Thioflavine-S as described above. Imaging was performed with a Leica TCS SP5 Confocal microscope and pictures were captured and analyzed with the Leica LAS AF Suite.

Quantitation and statistical analysis

Images were analysed with the NIH Image J software. For the A β or Thioflavine-S load the images were thresholded within a linear range and the load was defined as the per cent area covered by A β or Thioflavin-S positive plaques (% A β or Thioflavin-S load). For Iba1 and GFAP the mean intensity of the immunofluorescent signal within a linear range was analysed. All data are expressed as mean \pm SEM. Statistical significance of differences was evaluated either with Student's *t*-test or with one way ANOVA followed by the two-way Student's *t*-test. In the *t*-test analyses, Welch's correction for unequal variances was applied when variances were significantly different between groups. Probability values *P*<0.05 were considered significant. All statistical analyses were performed using GraphPad Prism (version 4.0; Graphpad software for Science Inc., San Diego).

Acknowledgments

We thank Dr. Kalliopi Thanopoulou (Biomedical Research Foundation of the Academy of Athens, Athens, Greece) for critically reading the manuscript.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: SG. Performed the experiments: LK. Analyzed the data: LK SG. Wrote the paper: SG.

References

- Selkoe DJ (1991) The molecular pathology of Alzheimer's disease. *Neuron* 6: 487–498.
- Coon KD, Myers AJ, Craig DW, Webster JA, Pearson JV, et al. (2007) A high-density whole-genome association study reveals that APOE is the major susceptibility gene for sporadic late-onset Alzheimer's disease. *J Clin Psychiatry* 68: 613–618.
- Kim J, Basak JM, Holtzman DM (2009) The role of apolipoprotein E in Alzheimer's disease. *Neuron* 63: 287–303.
- Mahley RW (1988) Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science* 240: 622–630.
- Holtzman DM, Bales KR, Wu S, Bhat P, Parsadanian M, et al. (1999) Expression of human apolipoprotein E reduces amyloid-beta deposition in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Clin Invest* 103: R15–R21.
- Buttini M, Yu GQ, Shockley K, Huang Y, Jones B, et al. (2002) Modulation of Alzheimer-like synaptic and cholinergic deficits in transgenic mice by human apolipoprotein E depends on isoform, aging, and overexpression of amyloid beta peptides but not on plaque formation. *J Neurosci* 22: 10539–10548.
- Bales KR, Verina T, Cummins DJ, Du Y, Dodel RC, et al. (1999) Apolipoprotein E is essential for amyloid deposition in the APP(V717F) transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 15233–15238.
- Bales KR, Verina T, Dodel RC, Du Y, Altstiel L, et al. (1997) Lack of apolipoprotein E dramatically reduces amyloid beta-peptide deposition. *Nat Genet* 17: 263–264.
- Holtzman DM, Fagan AM, Mackey B, Tenkova T, Sartorius L, et al. (2000) Apolipoprotein E facilitates neuritic and cerebrovascular plaque formation in an Alzheimer's disease model. *Ann Neurol* 47: 739–747.
- Herz J, Beffert U (2000) Apolipoprotein E receptors: linking brain development and Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci* 1: 51–58.
- Herz J (1993) The LDL-receptor-related protein - portrait of a multifunctional receptor. *Current Opinion in Lipidology* 4: 107–113.
- Hobbs HH, Russell DW, Brown MS, Goldstein JL (1990) The LDL receptor locus in familial hypercholesterolemia: mutational analysis of a membrane protein. *Annu Rev Genet* 24: 133–170.

13. Ishibashi S, Brown MS, Goldstein JL, Gerard RD, Hammer RE, et al. (1993) Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice and its reversal by adenovirus-mediated gene delivery. *J Clin Invest* 92: 883–893.
14. Leduc V, Jasmin-Belanger S, Poirier J (2010) APOE and cholesterol homeostasis in Alzheimer's disease. *Trends Mol Med* 16: 469–477.
15. Linton MF, Babaev VR, Gleaves LA, Fazio S (1999) A Direct Role for the Macrophage Low Density Lipoprotein Receptor in Atherosclerotic Lesion Formation. *Journal of Biological Chemistry* 274: 19204–19210.
16. Mahley RW, Ji ZS (1999) Remnant lipoprotein metabolism: key pathways involving cell-surface heparan sulfate proteoglycans and apolipoprotein E. *J Lipid Res* 40: 1–16.
17. Bu G (2009) Apolipoprotein E and its receptors in Alzheimer's disease: pathways, pathogenesis and therapy. *Rofo* 10: 333–344.
18. Lamsa R, Helisalmi S, Herukka SK, Tapiola T, Pirttila T, et al. (2008) Genetic study evaluating LDLR polymorphisms and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 29: 848–855.
19. Zou F, Gopalraj RK, Lok J, Zhu H, Ling IF, et al. (2008) Sex-dependent association of a common low-density lipoprotein receptor polymorphism with RNA splicing efficiency in the brain and Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet* 17: 929–935.
20. Fryer JD, Demattos RB, McCormick LM, O'Dell MA, Spinner ML, et al. (2005) The low density lipoprotein receptor regulates the level of central nervous system human and murine apolipoprotein E but does not modify amyloid plaque pathology in PDAPP mice. *J Biol Chem* 280: 25754–25759.
21. Thanopoulou K, Fragkouli A, Stylianopoulou F, Georgopoulos S (2010) Scavenger receptor class B type I (SR-BI) regulates perivascular macrophages and modifies amyloid pathology in an Alzheimer mouse model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 20816–20821.
22. Hirsch-Reinshagen V, Maia LF, Burgess BL, Blain JF, Naus KE, et al. (2005) The absence of ABCA1 decreases soluble ApoE levels but does not diminish amyloid deposition in two murine models of Alzheimer disease. *J Biol Chem* 280: 43243–43256.
23. Wahrle SE, Hong J, Parsadanian M, Hartman RE, Bales KR, et al. (2005) Deletion of Abca1 increases Abeta deposition in the PDAPP transgenic mouse model of Alzheimer disease. *J Biol Chem* 280: 43236–43242.
24. Fagan AM, Christopher E, Taylor JW, Parsadanian M, Spinner M, et al. (2004) ApoA1 deficiency results in marked reductions in plasma cholesterol but no alterations in amyloid-beta pathology in a mouse model of Alzheimer's disease-like cerebral amyloidosis. *Am J Pathol* 165: 1413–1422.
25. Cao D, Fukuchi K, Wan H, Kim H, Li L (2006) Lack of LDL receptor aggravates learning deficits and amyloid deposits in Alzheimer transgenic mice. *Neurobiol Aging* 27: 1632–1643.
26. Abazov VM, Abbott B, Abolins M, Acharya BS, Adams M, et al. (2009) Search for large extra spatial dimensions in the dielectron and diphoton channels in pp[over] collisions at sqrt[s] = 1.96 TeV. *Phys Rev Lett* 102: 051601.
27. Kim J, Castellano JM, Jiang H, Basak JM, Parsadanian M, et al. (2009) Overexpression of low-density lipoprotein receptor in the brain markedly inhibits amyloid deposition and increases extracellular A beta clearance. *Neuron* 64: 632–644.
28. Oakley H, Cole SL, Logan S, Maus E, Shao P, et al. (2006) Intraneuronal beta-amyloid aggregates, neurodegeneration, and neuron loss in transgenic mice with five familial Alzheimer's disease mutations: potential factors in amyloid plaque formation. *J Neurosci* 26: 10129–10140.
29. Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, et al. (1993) Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science* 261: 921–923.
30. Benjamin R, Leake A, McArthur FK, Ince PG, Candy JM, et al. (1994) Protective effect of apoE epsilon 2 in Alzheimer's disease. *Lancet* 344: 473.
31. Callahan MJ, Lipinski WJ, Bian F, Durham RA, Pack A, et al. (2001) Augmented senile plaque load in aged female beta-amyloid precursor protein-transgenic mice. *Am J Pathol* 158: 1173–1177.
32. Wang J, Tanila H, Puolivali J, Kadish I, van Groen T (2003) Gender differences in the amount and deposition of amyloidbeta in APPswe and PS1 double transgenic mice. *Neurobiol Dis* 14: 318–327.
33. Vina J, Lloret A (2011) Why women have more Alzheimer's disease than men: gender and mitochondrial toxicity of amyloid-beta peptide. *J Alzheimers Dis* 20 Suppl 2: S527–533.
34. Kashon ML, Ross GW, O'Callaghan JP, Miller DB, Petrovitch H, et al. (2004) Associations of cortical astrogliosis with cognitive performance and dementia status. *J Alzheimers Dis* 6: 595–604; discussion 673–581.
35. Nagele RG, Wegiel J, Venkataraman V, Imaki H, Wang KC (2004) Contribution of glial cells to the development of amyloid plaques in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 25: 663–674.
36. Zlokovic BV (2004) Clearing amyloid through the blood-brain barrier. *J Neurochem* 89: 807–811.
37. Bell RD, Sagare AP, Friedman AE, Bedi GS, Holtzman DM, et al. (2007) Transport pathways for clearance of human Alzheimer's amyloid beta-peptide and apolipoproteins E and J in the mouse central nervous system. *J Cereb Blood Flow Metab* 27: 909–918.
38. Shibata M, Yamada S, Kumar SR, Calero M, Bading J, et al. (2000) Clearance of Alzheimer's amyloid-ss(1-40) peptide from brain by LDL receptor-related protein-1 at the blood-brain barrier. *J Clin Invest* 106: 1489–1499.
39. Yancey PG, Jerome WG, Yu H, Griffin EE, Cox BE, et al. (2007) Severely altered cholesterol homeostasis in macrophages lacking apoE and SR-BI. *J Lipid Res* 48: 1140–1149.
40. Anderson JP, Refolo LM, Wallace W, Mehta P, Krishnamurthi M, et al. (1989) Differential brain expression of the Alzheimer's amyloid precursor protein. *Embo J* 8: 3627–3632.