



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ



**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ "ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ
ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΣΤΗΝ ΙΑΤΡΙΚΗ"**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΕΠΙΚΤΗΤΗΣ ΑΝΟΣΙΑΣ ΣΤΗΝ ΠΑΘΟΓΕΝΙΑ
ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ ALZHEIMER'S ΣΕ ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΑΚΑ ΠΟΝΤΙΚΙΑ**

Βασιλάτος-Λευτεράτος Σπυρίδων

**ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΣΤΡΑΒΟΠΟΔΗΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ, ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ
ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΤΟΥ ΕΘΝΙΚΟΥ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΑΘΗΝΩΝ**

**ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟΣ ΥΠΕΥΘΥΝΟΣ: ΓΕΩΡΓΟΠΟΥΛΟΣ ΣΠΥΡΟΣ, ΕΡΕΥΝΗΤΗΣ Β'
ΒΑΘΜΙΑΣ, ΤΑΡΥΜΑ ΙΑΤΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΡΕΥΝΩΝ ΑΚΑΔΗΜΙΑΣ ΑΘΗΝΩΝ**

ΑΘΗΝΑ 2018

Περιεχόμενα

ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....	6
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	7
ABSTRACT	8
ΜΕΡΟΣ ΠΡΩΤΟ	9
ΘΕΩΡΗΤΙΚΗ ΕΙΣΑΓΩΓΗ	9
1. Γενικά στοιχεία περί της νόσου Alzheimer	10
Α. Ιστορική αναδρομή	10
Β. Επιδημιολογία.....	12
Γ. Γενετική της νόσου Alzheimer	13
Δ. Παράγοντες κινδύνου και προστατευτικοί παράγοντες	15
Ε. Κλινική εικόνα	16
ΣΤ. Διάγνωση	16
Ζ. Θεραπεία	18
2. Νευροπαθολογικά χαρακτηριστικά της νόσου Alzheimer	19
Α. Νευριτικές πλάκες.....	19
Β. Νευροϊνιδιακά δεμάτια.....	22
Γ. Αμυλοειδική αγγειοπάθεια (Cerebral Amyloid Angiopathy - CAA).....	24
3. Παθογενετικοί μηχανισμοί της νόσου	25
Α. "ΒΑΡτιστές" εναντίον "ΤΑΥιστών"	25
Β. Η υπόθεση του καταρράκτη του αμυλοειδούς	26
4. Το β-αμυλοειδές πεπτίδιο.....	28
Α. Η οικογένεια της APP	29
Β. Φυσιολογικές λειτουργίες της APP	31
Γ. Τα μονοπάτια επεξεργασίας της APP	32
Δ. Εκκρίσεις.....	34
Ε. Πρεσενιλίνες.....	36
ΣΤ. Μεταλλάξεις της APP που προκαλούν FAD.....	37
Ζ. Μεταλλάξεις των πρεσενιλινών που προκαλούν FAD	38
Η. Καταβολισμός του β-αμυλοειδούς πεπτιδίου.....	38
5. Ο ρόλος του ανοσοποιητικού συστήματος στη νόσο Alzheimer	42
Α. Φλεγμονή και νόσος Alzheimer	42
Β. Κυτταρικοί πληθυσμοί του ανοσοποιητικού συστήματος του εγκεφάλου.....	43

Γ. Ο ρόλος του αιματοεγκεφαλικού φραγμού και των περιφερικών κυττάρων του ανοσοποιητικού στη νόσο Alzheimer	49
6. Το γονίδιο IKAROS	51
Α. Ρόλος και έκφραση	51
Β. Ισομορφές	53
7. Ο ποντικός <i>Mus musculus</i>	55
Α. Πλεονεκτήματα του ποντικού ως εργαστηριακό μοντέλο	56
Β. Κύκλος ζωής του ποντικού	57
Γ. Εμβρυική ανάπτυξη	57
8. Διαγονιδιακά ποντίκια	58
Α. Διαγονιδιακή τεχνολογία	58
Β. Διαγονιδιακά μοντέλα ποντικών	62
ΜΕΡΟΣ ΔΕΥΤΕΡΟ	70
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	70
1. Απομόνωση DNA	71
2. Φωτομέτρηση DNA	76
3. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	78
Α. Ολιγονουκλεοτίδια – αλληλουχίες έναρξης (primers)	81
Β. PCR για Ikaros ποντίκια	82
Γ. PCR για 5xFAD ποντίκια	84
4. Ηλεκτροφόρηση μορίων DNA σε πήκτωμα αγαρόζης.....	85
5. Απομόνωση εγκεφάλου και άλλων ιστών από ποντίκια	87
6. Λήψη τομών από εγκέφαλο ποντικών	89
7. Χρώση με Thioflavin S	90
8. Μικροσκοπική παρατήρηση και ανάλυση φωτογραφιών.....	92
ΜΕΡΟΣ ΤΡΙΤΟ.....	95
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	95
1. Μελέτη της επίδρασης της έλλειψης της επίκτητης ανοσίας στην εναπόθεση β-αμυλοειδούς στον εγκέφαλο των 5xFAD ποντικών.....	96
Α. Πειραματόζωα που χρησιμοποιήθηκαν	96
Β. Διασταυρώσεις πειραματόζωων.....	96
Γ. Απαραίτητες συνθήκες για την επιβίωση των ποντικών	97
Δ. Η αδρανοποίηση του ενός αλληλόμορφου του γονιδίου Ikaros στα διαγονιδιακά 5xFAD ποντίκια-μοντέλα της νόσου Alzheimer οδηγεί στη μείωση του αριθμού των αμυλοειδών πλακών στον εγκέφαλο των ποντικών.....	99

ΜΕΡΟΣ ΤΕΤΑΡΤΟ	103
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	103
Ο ρόλος του γονιδίου Ikaros στη νόσο Alzheimer	104
Βιβλιογραφία	110

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία με τίτλο **"Ο ρόλος της επίκτητης ανοσίας στην παθογένεια της νόσου Alzheimer's σε διαγονιδιακά ποντίκια"** εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Κυτταρικής Νευροβιολογίας του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών Ακαδημίας Αθηνών, στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού τίτλου σπουδών "Εφαρμογές της Βιολογίας στην Ιατρική" του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, στο χρονικό διάστημα από τον Ιούλιο του 2017 έως και τον Μάιο του 2018.

Καταρχάς θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον κ. Σπύρο Γεωργόπουλο, επιστημονικό μου υπεύθυνο, που μου έδωσε την ευκαιρία να γίνω μέλος του εργαστηρίου του και μου εμπιστεύθηκε μια τόσο ενδιαφέρουσα μελέτη. Τον ευχαριστώ για την καθοδήγησή και τη στήριξή του καθ' όλο το διάστημα της παραμονής μου στο εργαστήριό του, καθώς και για τις γνώσεις που μου προσέφερε.

Στη συνέχεια, θα ήθελα εξίσου θερμά να ευχαριστήσω και τον Επίκουρο Καθηγητή Δημήτριο Στραβοπόδη, επιβλέποντα καθηγητή μου, καθώς με καθοδήγησε όσον αφορά την επιλογή εργαστηρίου εκπόνησης της διπλωματικής μου και με συμβούλευσε σε γενικότερο βαθμό για οποιοδήποτε θέμα με προβλημάτιζε κατά τη διάρκεια των δίχρονων μεταπτυχιακών μου σπουδών.

Θα ήταν παράλειψή μου να μην ευχαριστήσω τα λοιπά μέλη του εργαστηρίου τόσο για τη βοήθεια που μου προσέφεραν σε εργαστηριακό επίπεδο όσο και για τη φιλία που αναπτύξαμε, καθώς επίσης και άλλα μέλη του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας, που αν και δεν ανήκαν στο ίδιο εργαστήριο με εμένα, συνέβαλαν καθοριστικά στην πραγματοποίηση των πειραμάτων μου.

Τέλος, θερμές ευχαριστίες θα ήθελα να δώσω στην οικογένεια και στους φίλους μου που ήταν μαζί μου σε όλες τις στιγμές, καλές και κακές, δίνοντας ιδιαίτερη έμφαση στη μητέρα μου, χωρίς τη στήριξη και τον αγώνα της οποίας δεν θα μπορούσα να ξεκινήσω, πόσο μάλλον να ολοκληρώσω τις σπουδές μου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η νόσος Alzheimer (Alzheimer's disease - AD) είναι μια νευροεκφυλιστική νόσος η οποία χαρακτηρίζεται από σταδιακή εξασθένηση της μνήμης και απώλεια των γνωστικών δεξιοτήτων. Παθολογικά, η νόσος χαρακτηρίζεται από το σχηματισμό πλακών β-αμυλοειδούς και από την παρουσία νευροϊνιδιακών δεματίων. Ενώ ο ρόλος του έμφυτου ανοσοποιητικού συστήματος στην παθογένεια της νόσου έχει μελετηθεί εκτενώς, λίγα είναι γνωστά για το ρόλο της ειδικής ανοσίας. Η πρωτεΐνη Ikaros είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας, ο οποίος είναι υπεύθυνος για την ωρίμανση και τη διαφοροποίηση των T- και B-λεμφοκυττάρων καθώς και των NK κυττάρων. Η αδρανοποίηση του γονιδίου αυτού σε διαγονιδιακά ποντίκια (Ik^{-/-}) έχει ως αποτέλεσμα την έλλειψη αυτών των κυτταρικών πληθυσμών και κατ' επέκταση της έλλειψη της επίκτητης ανοσίας. Προκειμένου να εξετασθεί η επίδραση της έλλειψης της επίκτητης ανοσίας στην παθολογία της νόσου Alzheimer, έγινε προσπάθεια δημιουργίας, κατόπιν διασταυρώσεων, 5xFAD Ik^{-/-} διαγονιδιακών ποντικών. Τα 5xFAD αποτελούν ένα μοντέλο ποντικών ταχείας εναπόθεσης αμυλοειδών πλακών στον εγκέφαλο και αποτελούν ένα καλό εργαλείο μελέτης της νόσου. Η ανάλυση των 5xFAD Ik^{+/-} ποντικών έδειξε μείωση στην εναπόθεση του β-αμυλοειδούς πεπτιδίου στον υπόκαμπο και στο φλοιό του εγκεφάλου σε σχέση με τα 5xFAD Ik^{+/+} ποντίκια.

ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disorder characterized by progressive memory impairment and loss of cognitive skills. Pathologically, the disease is characterized by the formation of beta-amyloid plaques and neurofibrillary tangles. While the role of the innate immune system in the pathogenesis of the disease has been extensively studied, little is known about the role of the adaptive immune system in AD pathogenesis. The Ikaros protein is a transcription factor that is responsible for the maturation and differentiation of T- and B-lymphocytes and of NK cells. The deletion of this gene in transgenic mice (Ik^{-/-}) results in a lack of the populations of these cells which leads to a lack of the adaptive immune system in general. To examine the role of the acquired immunity in AD, we attempted to generate , via the right matings, 5xFAD Ik^{-/-} transgenic mice. The 5xFAD line of mice are a good tool to study Alzheimer's disease because they rapidly accumulate beta-amyloid within their brains. Our analysis demonstrated reduction of the a-beta deposition in the hippocampus and cortex of the 5xFAD Ik^{+/-} mice brains, when compared to the 5xFAD Ik^{+/+} mice.

ΜΕΡΟΣ ΠΡΩΤΟ

ΘΕΩΡΗΤΙΚΗ ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.Γενικά στοιχεία περί της νόσου Alzheimer

A. Ιστορική αναδρομή

Η δραματική αύξηση στη διάρκεια ζωής κατά τον 20ο αιώνα, από τα 49 χρόνια στα 76 στις Η.Π.Α., έφερε ως αποτέλεσμα να φτάνει ο άνθρωπος σε ηλικία τέτοια που ξεκινούν οι νευροεκφυλιστικές νόσοι. Μεταξύ αυτών, η νόσος του Alzheimer's (Alzheimer's disease - AD), αναδύθηκε ως η πιο επικρατούσα νόσος νοητικής υποβάθμισης σε μεγαλύτερες ηλικίες στους ανθρώπους. Όταν ο Alois Alzheimer, ένας Βαυαρός ψυχίατρος, πρωτοπεριέγραψε τα κλινικο-παθολογικά χαρακτηριστικά του συνδρόμου που φέρει το όνομα του, σε μια συνάντηση στο Μόναχο το 1906, ούτε ο ίδιος ούτε το κοινό του αναγνώρισαν ότι η νόσος που περιέγραψε και αφορούσε μια γυναίκα στα 50 της, ήταν μη διακριτέα από την κοινή γεροντική άνοια (Selkoe, 2001).

Η αρχική ασθενής του Alzheimer, η Auguste D., έφερε πολλά από τα χαρακτηριστικά της νόσου τα οποία ακόμη παρατηρούνται στους περισσότερους ασθενείς σήμερα: προοδευτική απώλεια μνήμης, διαταραγμένες γνωστικές λειτουργίες, αλλαγμένη συμπεριφορά και παράνοια, ψευδαισθήσεις, απώλεια σωστής κοινωνικής συμπεριφοράς και προοδευτική ελάττωση επικοινωνιακών ικανοτήτων. Η γυναίκα αυτή νοσηλεύτηκε σε ψυχιατρική κλινική και κατέληξε πέντε χρόνια μετά την έναρξη της ασθένειας. Η νεκροψία αποκάλυψε την κλασική παθολογία της νόσου Alzheimer όπως την ξέρουμε σήμερα, τα νευροϊνιδιακά δεμάτια δηλαδή και τις αμυλοειδείς πλάκες στον φλοιό και τον ιππόκαμπο. Μετά από την αναφορά της περίπτωσης αυτής, ο όρος νόσος Alzheimer αποδόθηκε σε αυτόν τον τύπο της προ-γεροντικής άνοιας. Στα αρχικά και ενδιάμεσα στάδια αυτής της νόσου αργής προόδου, η ετοιμότητα του ασθενούς παραμένει και οι κινητικές λειτουργίες και τα αισθητήρια δεν επηρεάζονται. Παρ' όλα αυτά, καθώς η νόσος προοδεύει, λειτουργίες όπως ο διασκελισμός και ο συγχρονισμός των κινήσεων επηρεάζονται, με αποτέλεσμα την εμφάνιση ενός επιπλέον φαινοτύπου που ομοιάζει κινητικές παθήσεις, όπως είναι η νόσος του Parkinson (Selkoe, 2001).

Κατά τα πρώτα 60 χρόνια μετά από την περιγραφή της νόσου από τον Alois Alzheimer, πρακτικά δεν υπήρξε καμία πρόοδος σχετικά με την κατανόηση των αιτιών και των μηχανισμών που διέπουν την έναρξη και πορεία της νόσου. Στα μέσα της δεκαετίας του '60, η ηλεκτρονική μικροσκοπία επέτρεψε στους Michael Kidd και

Robert Terry να περιγράψουν τα βασικά στοιχεία της κυττοπαθολογίας της νόσου. Το 1968, οι Gary Blessed, Bernard Tomlinson και Martin Roth δημοσίευσαν μια σημαντική κλινικο-παθολογική μελέτη, η οποία επιβεβαίωσε αυτό που πολλοί νευροπαθολόγοι υποπτεύονταν από καιρό: ότι η νευροπαθολογία πολλών κοινών περιπτώσεων άνοιας γεροντικής ηλικίας δεν μπορεί να διαχωριστεί από τη νόσο Alzheimer. Η μελέτη αυτή έδειξε ότι η νόσος Alzheimer εμφανιζόταν σε μεγαλύτερες ηλικίες, με σχετικά σπάνια περιστατικά να εμφανίζονται πριν από τα 60 και ότι η επίπτωση της νόσου αυξανόταν σταθερά από την 7η έως την 9η δεκαετία ζωής (Selkoe, 2012).

Στα μέσα της δεκαετίας του '70 βγήκαν στο φως τα πρώτα στοιχεία που δείχνουν την προέλευση των ανοιακών συμπτωμάτων της νόσου. Τα στοιχεία αυτά βρέθηκαν μέσω της χρήσης του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου και αφορούσαν το γεγονός ότι οι νευρώνες που συνθέτουν και απελευθερώνουν ακετυλοχολίνη εκφυλίζονται. Αυτό παρατηρήθηκε ως μείωση στην ποσότητα και στη δραστηριότητα των συνθετικών και των αποικοδομητικών ενζύμων, της ακετυλοτρανσφεράσης της χολίνης και της χολινεστεράσης αντίστοιχα, στο μεταιχμιακό σύστημα και ως μείωση των χολινεργικών κυτταρικών σωμάτων στους υποφλοιικούς πυρήνες που προεκβάλλουν σε αυτές τις περιοχές. (Selkoe, 2001).

Το 1976, ο Robert Katzman έγραψε ένα σύντομο κείμενο ζητώντας την προσοχή του κόσμου και της επιστημονικής κοινότητας σχετικά με τη νόσο, την οποία και χαρακτήρισε ως μια επερχόμενη "επιδημία" για τις ανεπτυγμένες χώρες. Το 1979, ο Jerome Stone και άλλοι Αμερικανοί με συγγενείς που έπασχαν από τη νόσο, ίδρυσαν το Alzheimer Association στο Σικάγο. Αυτή η κίνηση προώθησε δραστικά την αναγνώριση της νόσου από το κοινό καθώς και τις προσωπικές αλλά και κοινωνικές τραγωδίες που αυτή εκπροσωπεί (Selkoe, 2012).

Ο George Glenner, το 1984, ήταν ο πρώτος που χαρακτήρισε την αμυλοειδή β-πρωτεΐνη σε εγκεφάλους ασθενών που είχαν πεθάνει έχοντας νόσο Alzheimer ή Down. Μέσα στα επόμενα 2 χρόνια, από πολλά εργαστήρια χαρακτηρίστηκε και η πρωτεΐνη tau ως το κύριο συστατικό των νευροϊνιδιακών δεματίων. Η κλωνοποίηση του πρόδρομου μορίου της β-αμυλοειδικής πρωτεΐνης (APP) το 1987 και η ανακάλυψη των μεταλλάξεων που προκαλούν τη νόσο το 1990 και 1991, έφεραν την

έρευνα της νόσου στα πεδία της μοριακής γενετικής και της χημείας πρωτεϊνών, ένα σημαντικό βήμα για τον χαρακτηρισμό της (Selkoe, 2012).

Η φαρμακολογική έρευνα επικεντρώθηκε στην ενίσχυση των επιπέδων της ακετυλοχολίνης, κυρίως παρεμποδίζοντας τη δράση των αποικοδομητικών ενζύμων. Η έρευνα αυτή οδήγησε στην έγκριση και κυκλοφορία δύο φαρμάκων ειδικών για την αντιμετώπιση της νόσου Alzheimer, της τετραϋδροαμινοακριδίνης (tetrahydroaminoacridine) και της donepezil. Αργότερα έγινε γνωστό ότι το AD δεν αποτελεί νόσημα εκφυλισμού συγκεκριμένου τύπου νευρώνων, αλλά είναι πιο ετερογενές, σε αντίθεση με τη νόσο Parkinson που επηρεάζεται μόνο μια κατηγορία νευρώνων. Αυτό εξηγεί την έλλειψη σημαντικού κλινικού οφέλους στους περισσότερους ασθενείς που ακολουθούσαν θεραπεία με χολινεργικά φάρμακα (Selkoe, 2001).

Σήμερα, με τις εξελίξεις της ανοσοϊστοχημείας και της μοριακής γενετικής, το ενδιαφέρον της ερευνητικής κοινότητας έχει επικεντρωθεί στα μονομερή και στα ολιγομερή που συνθέτουν τις νευριτικές πλάκες και τα νευροϊνιδιακά δεμάτια, καθώς και στις υπομονάδες σημαντικών πρωτεϊνών που παίζουν καθοριστικό ρόλο στους βασικούς μηχανισμούς της νόσου Alzheimer (Selkoe, 2001).

B. Επιδημιολογία

Η νόσος Alzheimer είναι η πιο κοινή μορφή άνοιας στους ηλικιωμένους, καθώς έχει υπολογιστεί ότι αποτελεί τουλάχιστον το 77% των περιπτώσεων (Reitz, 2011). Η συχνότητα εμφάνισης της νόσου είναι πολύ υψηλή, καθώς προσβάλλει περίπου το 7% των ατόμων ηλικίας άνω των 65 και μέχρι το 50% ατόμων άνω των 80 (Kandel, 2006). Ο ρυθμός εξέλιξης της νόσου ποικίλλει και ο ασθενής μπορεί να καταλήξει 3 έως και 20 χρόνια μετά από την εμφάνιση των πρώτων συμπτωμάτων (Reitz, 2011). Έως και το 2011, ο παγκόσμιος επιπολασμός της νόσου Alzheimer είχε εκτιμηθεί ότι βρίσκεται στα 30 εκατομμύρια, με πιθανότητα να τετραπλασιαστεί αυτό το νούμερο μέσα στα επόμενα 40 χρόνια (Holtzman, 2011), καθώς κάθε χρόνο αναφέρονται περίπου 5 εκατομμύρια νέα περιστατικά (Bekris, 2010). Στις Η.Π.Α. μόνο υπάρχουν πάνω από 5 εκατομμύρια ασθενείς με τη νόσο, με τουλάχιστον 10 εκατομμύρια άτομα να ασχολούνται με τη φροντίδα των ασθενών αυτών. Για τον λόγο αυτό

αποτελεί την 3η πιο δαπανηρή ασθένεια, καθώς κοστίζει στην κυβέρνηση των Η.Π.Α. 200 δις δολάρια ετησίως (Holtzman, 2011).

Μεταξύ τοπικών πληθυσμών ατόμων ηλικίας άνω των 60, αυτοί με καταγωγή από τη Βόρεια Αμερική και τη Δυτική Ευρώπη παρουσιάζουν τον υψηλότερο επιπολασμό γεροντικής άνοιας (6,4% και 5,4% των πληθυσμών αντιστοίχως) και έπονται αυτοί από τη Λατινική Αμερική (4,9%) και την Κίνα και τις ακτές του Δυτικού Ειρηνικού γενικότερα (4.0%). Ο επιπολασμός της άνοιας και της νόσου Alzheimer συγκεκριμένα στα άτομα ηλικίας <75 φαίνεται να είναι παρόμοιος μεταξύ μελετών σε διαφορετικούς πληθυσμούς. Σε μεγαλύτερες ηλικιακές ομάδες ωστόσο, υπάρχουν διαφορές μεταξύ πληθυσμών διαφορετικών γεωγραφικών περιοχών. Αυτό μπορεί να οφείλεται στη διαφορετική γεωγραφική κατανομή προστατευτικών προς τη νόσο παραγόντων ή παραγόντων κινδύνου (Reitz, 2011).

Η σοβαρότητα της νόσου μπορεί να φανεί λοιπόν τόσο σε οικογενειακό όσο και σε κοινωνικό επίπεδο. Πέρα από τις οικονομικές δυσκολίες που περνούν τα άτομα των οικογενειών στις οποίες ανήκουν ασθενείς με Alzheimer, επιβαρύνονται και ψυχολογικά, καθώς βλέπουν τους αγαπημένους τους να γίνονται άνθρωποι διαφορετικοί από αυτό που ήταν αρχικά. Επιπλέον, σε κοινωνικό επίπεδο, άτομα με τη νόσο που δεν μπορούν να εργαστούν, αποτελούν οικονομικό "βάρος" για την κοινωνία, λόγω των εξόδων υγείας που απαιτούνται για τη συμπτωματική αντιμετώπιση της νόσου. Για τους λόγους αυτούς φαίνεται ότι είναι αναγκαία η πρόοδος της επιστημονικής γνώσης πάνω στη νόσο αυτή προκειμένου να βρεθεί μια κατάλληλη θεραπευτική αντιμετώπιση.

Γ. Γενετική της νόσου Alzheimer

Ανάλογα με την ηλικία έναρξης, η νόσος του Alzheimer διακρίνεται στη μορφή πρώιμης έναρξης (early-onset AD - EOAD) και στη μορφή όψιμης έναρξης (late-onset AD - LOAD). Η μορφή της όψιμης έναρξης αποτελεί και το 95% των περιπτώσεων και συνήθως εμφανίζεται μετά την ηλικία των 65. Το 1-5% των περιστατικών ανήκει στην κατηγορία της πρώιμης έναρξης και εμφανίζεται στο τέλος της δεκαετίας των 40 με αρχές της δεκαετίας των 50. Η μορφή αυτή πλήττει συνήθως οικογένειες και για το λόγο αυτό καλείται και οικογενής μορφή της νόσου. Η άλλη μορφή έχει σποραδική εμφάνιση, γι' αυτό και καλείται εναλλακτικά σποραδική

μορφή της νόσου. Παρά τις διαφορές στην ηλικία εμφάνισης και στους παράγοντες που την προκαλούν, οι δυο μορφές αυτές είναι κλινικά μη διακριτές. Μεταξύ των δύο, η οικογενής μορφή θεωρείται πιο σοβαρή, καθώς έχει συσχετισθεί με ταχύτερη πρόοδο των συμπτωμάτων και κατ' επέκταση χειρότερη ποιότητα και μικρότερη διάρκεια ζωής (Reitz, 2011).

Τα γονίδια τα οποία έχουν ενοχοποιηθεί για την οικογενή μορφή της νόσου είναι 3: το γονίδιο της APP (από την οποία παράγεται το Αβ που συσσωρεύεται και δημιουργεί τις αμυλοειδείς πλάκες) και τα γονίδια των πρεσενιλινών 1 και 2 (PSEN1 και PSEN2 αντίστοιχα). Οι πρεσενιλίνες είναι πρωτεΐνες οι οποίες αποτελούν μέρος του συμπλέγματος της γ-εκκριτάσης και σχετίζονται με την πρωτεολυτική πέψη της APP και την παραγωγή Αβ και θα αναλυθούν αργότερα, όπως και η ίδια η APP. Στα γονίδια αυτά έχουν εντοπισθεί μεταλλάξεις οι οποίες τα συνδέουν με τη νόσο Alzheimer. Οι μεταλλάξεις αυτές μπορούν να χρησιμοποιηθούν και ως διαγνωστικοί βιομάρτυρες της νόσου, καθώς παρουσιάζουν υψηλή διεισδυτικότητα (>85%) και κυρίως επικρατή αυτοσωμική κληρονομικότητα (Reitz, 2011).

Μεταλλάξεις στην APP (Amyloid precursor protein - πρόδρομη πρωτεΐνη του β-αμυλοειδούς) ευθύνονται για το μόλις 0,1% των περιστατικών Alzheimer. Οι μεταλλάξεις του γονιδίου αυτού έχουν κυρίως επικρατή χαρακτήρα και σχετίζονται με την επεξεργασία της APP από πρωτεάσες. Όσον αφορά τις πρεσενιλίνες, έχουν βρεθεί 182 διαφορετικές μεταλλάξεις στην πρεσενιλίνη 1 και 14 μεταλλάξεις στην πρεσενιλίνη 2 που τις συνδέουν με τη νόσο. Οι περισσότερες μεταλλάξεις είναι απλές νουκλεοτιδικές αντικαταστάσεις, έχουν περιγραφεί όμως και μικρές προσθήκες ή απαλοιφές νουκλεοτιδίων (Reitz, 2011).

Τα γονίδια τα οποία σχετίζονται με τον σποραδικό τύπο της νόσου αυξάνουν την πιθανότητα εμφάνισής της, χωρίς όμως να αποτελούν και επαρκή συνθήκη, και δεν κληρονομούνται με μενδελικές αναλογίες. Συγγενείς πρώτου βαθμού με ασθενείς Alzheimer που φέρουν την όψιμη μορφή της νόσου, έχουν διπλάσια πιθανότητα να την εμφανίσουν κατά τη διάρκεια της ζωής τους σε σχέση με τον γενικό πληθυσμό. Η απολιποπρωτεΐνη E (Apolipoprotein E - ApoE) είναι το κύριο γονίδιο που έχει συσχετισθεί με την εμφάνιση της όψιμης μορφής της νόσου και σχετίζεται με την εκκαθάριση του β-αμυλοειδούς πεπτιδίου. Το αλληλόμορφο 4 συγκεκριμένα (ApoE e4) είναι που αυξάνει την πιθανότητα εμφάνισης της νόσου. Η παρουσία ενός

αλληλόμορφου δι-τριπλασιάζει την πιθανότητα εμφάνισης, ενώ παρουσία και των δύο αλληλόμορφων πενταπλασιάζεται (ή έως και 15απλασιάζεται, ανάλογα με την πηγή [Blennow]) η πιθανότητα εμφάνισης της νόσου. Για κάθε ApoE e4 αλληλόμορφο, θεωρείται ότι μειώνεται κατά 6-7 χρόνια η ηλικία πιθανής έναρξης των συμπτωμάτων. Για τον λόγο αυτό, το γονίδιο ApoE θεωρείται ότι συμβάλλει σε ένα ποσοστό 20-30% στην πιθανότητα εμφάνισης Alzheimer. Έχουν προταθεί και άλλα γονίδια η παρουσία των οποίων αποτελεί παράγοντα κινδύνου, όπως τα SORL1, CLU, PICALM και CRI, καθώς και άλλα (Reitz, 2011).

Δ. Παράγοντες κινδύνου και προστατευτικοί παράγοντες

Διάφοροι παράγοντες κινδύνου και προστατευτικοί παράγοντες έχουν συνδεθεί με την άνοια και με τη νόσο Alzheimer. Οι παράγοντες κινδύνου μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την εκτίμηση της πιθανότητας εμφάνισης της νόσου, χωρίς όμως να προσφέρουν αρκετή ευαισθησία και ειδικότητα ώστε να μπορούν να χρησιμοποιηθούν και ως διαγνωστικοί μάρτυρες. Ανάμεσα στους πιο κοινούς παράγοντες κινδύνου που έχουν ταυτοποιηθεί, είναι οι παράγοντες εκείνοι που σχετίζονται με καρδιαγγειακές νόσους και με καρδιακές ισχαιμίες. Θεωρείται ότι παράγοντες που μπορεί να οδηγήσουν προς τις προαναφερθείσες καταστάσεις, μπορεί να οδηγήσουν και προς άνοια ή AD. Η υψηλή αρτηριακή πίεση, ο διαβήτης τύπου 2, το πολύ μεγάλο ή πολύ μικρό σωματικό βάρος, η παρουσία μεταβολικού συνδρόμου και το κάπνισμα μπορούν επίσης να θεωρηθούν ως παράγοντες κινδύνου, πολλά στοιχεία και έρευνες όμως είναι αντικρουόμενα για τη συνεισφορά του καθενός. Τέλος έχει φανεί ότι η κατάθλιψη, το ψυχολογικό στρες και οι τραυματισμοί του εγκεφάλου μπορούν επίσης να συνεισφέρουν στην εμφάνιση της γεροντικής άνοιας ή της νόσου Alzheimer (Reitz, 2011).

Σε αντιδιαστολή με όσα αναφέρθηκαν παραπάνω, οι καλές καθημερινές συνήθειες μπορεί να μειώσουν την πιθανότητα εμφάνισης της νόσου. Μια καλή διαίτα, πλούσια σε ψάρια, φρούτα και λαχανικά καθώς επίσης και σε αντιοξειδωτικά (βιταμίνες C και E) μπορεί όχι μόνο να βελτιώσει τη γενικότερη ποιότητα ζωής, αλλά και να μειώσει την πιθανότητα εμφάνισης της γεροντικής άνοιας και να βελτιώσει τις γνωστικές λειτουργίες του ατόμου. Η φυσική δραστηριότητα φαίνεται επίσης να συμβάλλει προς αυτήν την κατεύθυνση. Τέλος είναι πολύ σημαντική η νοητική δραστηριότητα του ατόμου, καθώς η διέγερση του εγκεφάλου μέσω διαφόρων δραστηριοτήτων

μπορεί να συμβάλλει και αυτή σε σημαντικό βαθμό στην πνευματική διαύγεια (Reitz, 2011). Εν κατακλείδι, επιβεβαιώνεται και στην περίπτωση αυτή το αρχαίο ρητό "νους υγιής εν σώματι υγιεί".

Ε. Κλινική εικόνα

Τόσο η οικογενής όσο και η σποραδική μορφή της νόσου Alzheimer παρουσιάζουν μια κλινική εικόνα που ομοιάζει την κοινή άνοια, ξεκινώντας με μια σταδιακή έκπτωση της μνήμης η οποία συνεχώς και επιδεινώνεται. Αρχικά επηρεάζεται η ικανότητα του ατόμου να θυμάται γεγονότα και πληροφορίες του πρόσφατου παρελθόντος, χωρίς να επηρεάζεται η μνήμη παλαιότερων γεγονότων. Καθώς προχωρά η ασθένεια επηρεάζονται και άλλοι τομείς πέραν της μνήμης, όπως είναι η λογική σκέψη, η ικανότητα λήψης αποφάσεων, καθώς και ο λόγος, ο οποίος γίνεται πτωχός και χωρίς νοηματική συνοχή. Την επιδείνωση της κατάστασης του ασθενούς συνήθως συνοδεύουν οι γοργές αλλαγές στη διάθεση, καθώς και οι αυταπάτες και ψευδαισθήσεις, παρότι αυτά δεν αποτελούν κύρια σημεία της νόσου. Παρουσιάζονται επιπλέον διάφορες ψυχικές διαταραχές, όπως η κατάθλιψη και οι παρανοϊκές ιδέες. Νευρολογικά συμπτώματα που μπορεί να παρουσιάζονται αργότερα στην πορεία της νόσου είναι οι κρίσεις, η υπέρταση, η ακράτεια και ο αυτισμός. Στα τελικά στάδια της νόσου παρατηρείται και παρκινσονισμός. Ο θάνατος συνήθως επέρχεται λόγω γενικότερης αδυναμίας του οργανισμού, του υποσιτισμού καθώς και πνευμονιών (Bekris, 2010). Η τυπική διάρκεια των συμπτωμάτων είναι 8-10 χρόνια, που μπορεί όμως να κυμανθεί και από 1 έως 25 (Bird, 2008).

ΣΤ. Διάγνωση

Επί του παρόντος, η διάγνωση της νόσου Alzheimer βασίζεται στο κλινικό ιστορικό, στη νευρολογική εξέταση και στα νευροφυσιολογικά τεστ. Για τη διάγνωση της νόσου χρησιμοποιείται το *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders* (Fourth Edition [DSM-IV]) της Αμερικανικής Ψυχιατρικής Εταιρίας, ένα σύνολο κριτηρίων που απαιτεί την απώλεια τουλάχιστον 2 από τα ακόλουθα χαρακτηριστικά: μνήμη, λόγος, υπολογιστική ικανότητα, προσανατολισμός και ικανότητα κρίσης, για να χαρακτηριστεί ένα άτομο ως ασθενής της νόσου Alzheimer. Ένα άλλο σύνολο κριτηρίων που επίσης χρησιμοποιείται είναι αυτά του *National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke-Alzheimer's Disease and*

Related Disorders Association (NINCDS-ADRDA) Work Group, που απαιτεί την παρουσία άνοιας διαγνωσμένης με τη χρήση κλινικής εξέτασης, προβλήματα σε τουλάχιστον δύο γνωστικές δεξιότητες, απουσία άλλων συστημικών ασθενειών, την έναρξη της ασθένειας σε ηλικία μεταξύ 40-90 ετών και προοδευτική επιδείνωση της μνήμης για να διαγνωστεί ένα άτομο ως "πιθανός" AD ασθενής. Για να πραγματοποιηθεί διάγνωση θα πρέπει πρώτα να αποκλεισθούν άλλες νευρολογικής φύσης διαταραχές, όπως είναι η μετωποκροταφική άνοια, η νόσος Parkinson, η νόσος Creutzfeldt-Jakob και άλλες. Η διάκριση συνήθως πραγματοποιείται με κλινική εξέταση και με τη λήψη του κλινικού ιστορικού (Bekris, 2010). Η τελική διάγνωση πραγματοποιείται με μεταθανάτια βιοψία για τον εντοπισμό των πλακών αμυλοειδούς στον εγκέφαλο του ασθενούς.

Η κλινική διάγνωση του AD (πριν από την επιβεβαίωση μέσω αυτοψίας), είναι σωστή περίπου στο 80-90% των περιπτώσεων. Αυτή περιλαμβάνει εκτός από τη χρήση κλινικών συμπτωμάτων (αργή επιδείνωση της μνήμης), και τη χρήση απεικονιστικών τεχνικών (εκτεταμένη ατροφία του εγκεφαλικού φλοιού) (Bird, 2008).

Η χρήση των κατάλληλων βιοδεικτών μπορεί επίσης να βοηθήσει στη διάγνωση της νόσου. Οι βιοδείκτες αυτοί θα μπορούν να προέρχονται είτε από το αίμα είτε ακόμη και από το εγκεφαλονωτιαίο υγρό και να απεικονίζουν άμεσα την κατάσταση η οποία επικρατεί στο ΚΝΣ και κατ' επέκταση στον εγκέφαλο (Reitz, 2011). Η ελεύθερη μεταφορά πρωτεϊνών μεταξύ του εγκεφάλου και του εγκεφαλονωτιαίου υγρού μπορεί να αντικατοπτρίσει την κατάσταση που επικρατεί στον εγκέφαλο. Τα επίπεδα Αβ1-42, συνολική tau (t-tau) και φωσφορυλιωμένη tau (p-tau) στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό έχουν αποδειχθεί χρήσιμοι βιομάρτυρες για τη διάγνωση της νόσου ενώ αυτή βρίσκεται ακόμη σε πρώιμο στάδιο. Δείγματα ατόμων που διαγιγνώσκονται με τη νόσο φέρουν χαμηλότερα επίπεδα Αβ1-42 και υψηλότερα επίπεδα t-tau και p-tau σε σχέση με τα φυσιολογικά άτομα. Επιπλέον, τα επίπεδα t-tau αυξάνονται με την πρόοδο της νόσου (Reitz, 2011).

Λόγω των ιδιαίτερων ιδιοτήτων του αιματοεγκεφαλικού φραγμού (Blood-Brain Barrier - BBB) ως βιομάρτυρες του πλάσματος μπορούν να χρησιμοποιηθούν μόνο μικρές ή λιπόφιλες πρωτεΐνες που μεταφέρονται μέσω συγκεκριμένων μεταφορέων που μπορούν να περάσουν αυτόν τον φραγμό (Reitz, 2011).

Z. Θεραπεία

Ριζική θεραπεία της νόσου δεν υπάρχει. Αυτό που γίνεται σήμερα είναι συμπτωματική αντιμετώπιση των διάφορων σημείων της νόσου με σκοπό τη βελτίωση της ποιότητας ζωής του ασθενούς. Παρότι η βιοχημική βάση του AD δεν είναι πλήρως κατανοητή, είναι ευρέως γνωστό ότι επηρεάζεται το χολινεργικό σύστημα του εγκεφάλου. Για τον λόγο αυτό χρησιμοποιούνται διάφορα φάρμακα τα οποία ενισχύουν το σύστημα αυτό αναστέλλοντας την ακετυλοχολινεστεράση, το ένζυμο που διασπά την ακετυλοχολίνη. Τέτοια φάρμακα προσφέρουν ένα μέτριο αλλά χρήσιμο όφελος στις γνωστικές ικανότητες και συμπεριφορικές ιδιότητες των ασθενών. Το πρώτο φάρμακο αυτής της κατηγορίας που χρησιμοποιήθηκε ήταν το tacrine, που όμως είναι και ηπατοτοξικό. Σήμερα χρησιμοποιούνται νεότερα, μη ηπατοτοξικά φάρμακα: donepezil, rivastigmine, galantamine. Επίσης, ένας ανταγωνιστής του υποδοχέα του NMDA, η μεμαντίνη, φαίνεται να έχει αποτελέσματα στην θεραπεία ασθενών με μέτριο έως και σοβαρό AD. Επιπρόσθετα γίνεται χρήση και αντικαταθλιπτικής θεραπείας (Bird, 2008).

Υπό διερεύνηση βρίσκονται και θεραπείες που χρησιμοποιούν αντιφλεγμονώδεις παράγοντες (NSAIDs), οιστρογόνα, νευρητικούς αυξητικούς παράγοντες, BACE αναστολείς και αντιοξειδωτικά (Bird, 2008).

Άλλος τρόπος αντιμετώπισης της νόσου είναι η αναστολή της παραγωγής του Αβ. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί με τη χρήση μικρών μορίων τα οποία θα μπορούν να περάσουν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό και να αναστείλουν τη δράση της β- ή της γ-εκκριτάσης, μειώνοντας έτσι την παραγωγή του Αβ42. Αυτή η προσέγγιση θα μπορούσε να είναι επιτυχής στα αρχικά στάδια της νόσου που δεν έχει πραγματοποιηθεί ακόμη εκτεταμένη εναπόθεση πλακών. Στην περίπτωση της αναστολής των γ-εκκριτασών θα μπορούσε να μειωθεί η παραγωγή του Αβ σε ένα ποσοστό 30-40%, ώστε να μην αλληλεπιδρά ποσοτικά και με το Notch μονοπάτι, στο οποίο φαίνεται να έχει φυσιολογικό ρόλο η γ-εκκριτάση. Εναλλακτικά θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν και μικρά μόρια τα οποία προσδένουν τα Αβ μονομερή και αποτρέπουν τη συσσώρευσή τους στα τοξικά ολιγομερή. Πλεονέκτημα μιας τέτοιας μεθόδου είναι η απευθείας στόχευση των μορίων που είναι υπεύθυνα για την ασθένεια, χωρίς να υπάρχει αλληλεπίδραση με πρωτεΐνες οι οποίες παίζουν ρόλο και σε φυσιολογικές λειτουργίες του οργανισμού (εκκριτάσες στο μονοπάτι Notch) (Selkoe, 2001).

Μια άλλη προσέγγιση θα μπορούσε να είναι η χρήση αντι-φλεγμονωδών φαρμάκων, τα οποία θα μπορούσαν να επέμβουν στις αποκρίσεις της μικρογλοίας και των αστροκυττάρων στον εγκέφαλο. Επιδημιολογικής φύσης μελέτες έχουν συσχετίσει τη λήψη μη-στεροειδών αντιφλεγμονωδών φαρμάκων για άλλους λόγους, με τη μείωση της πιθανότητας εμφάνισης AD (Selkoe, 2001).

Τέλος, θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν μια πλειάδα αντιοξειδωτικών, μορίων που απομακρύνουν τις ελεύθερες ρίζες, παρεμποδιστών καναλιών ασβεστίου και ρυθμιστών διάφορων σηματοδοτικών μονοπατιών που θα προστατεύουν τους νευρώνες από την εξω- και ενδοκυτταρική συσσώρευση του Αβ. Θα μπορούσε να γίνει χρήση και παραγόντων αναγέννησης των νευρώνων, όπως είναι οι νευροτροφίνες και μικρά μόρια που μιμούνται τη δράση τους, που μπορούν να προστατεύσουν τις συνάψεις καθώς και τα κυτταρικά σώματα που υφίστανται τραυματισμούς (Selkoe, 2001).

Πρόσφατα έχει γίνει λόγος και για ανοσοποίηση του οργανισμού έναντι του Αβ πεπτιδίου, με στόχο την παραγωγή αντισωμάτων, μέρος των οποίων θα μπορεί να περνάει τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό και να καθαρίζει τον εγκέφαλο από εναποθέσεις αμυλοειδούς. Η προσέγγιση αυτή βρίσκεται ακόμη σε πολύ αρχικά στάδια (Selkoe, 2001), φαίνεται όμως ότι τα άτομα που την ακολούθησαν, στις μεταθανάτιες βιοψίες, είχαν πολύ λιγότερη εναπόθεση Αβ σε σχέση με το συνηθισμένο (Murphy, 2010).

2. Νευροπαθολογικά χαρακτηριστικά της νόσου Alzheimer

Σε μικροσκοπικό επίπεδο, τα κύρια χαρακτηριστικά της νόσου Alzheimer είναι οι γεροντικές ή νευριτικές πλάκες και τα νευροϊνιδιακά δεμάτια στον κροταφικό λοβό και στις φλοιικές περιοχές του εγκεφάλου, μαζί με την παρουσία νευροφλεγμονής και τον εκφυλισμό των νευρώνων και των συνάψεών τους. Παρακάτω αναλύονται τα νευροπαθολογικά αυτά χαρακτηριστικά.

A. Νευριτικές πλάκες

Οι νευριτικές πλάκες είναι ένα από τα διαγνωστικά στοιχεία που εντοπίζονται στους εγκεφάλους ασθενών με νόσο Alzheimer. Αποτελούν συσσωρεύσεις εξωκυττάρου

αμυλοειδούς, συγκεκριμένα της αμυλοειδούς β-πρωτεΐνης (Αβ). Αυτές εντοπίζονται σε διάφορες περιοχές του εγκεφάλου καθώς και στο ενδοθήλιο των αιμοφόρων αγγείων του εγκεφάλου (Selkoe, 2001). Αρχικά είχε θεωρηθεί ότι το Αβ αποτελεί μια μη φυσιολογική πρωτεΐνη. Αργότερα όμως φάνηκε ότι το Αβ αποτελεί φυσικό παραπροϊόν του μεταβολισμού της πρωτεΐνης APP από την β- και γ-εκκριτάση. Τα μονομερή Αβ που παράγονται μέσω της πρωτεολυτικής πέψης της APP από τις εκκριτάσες είναι διαλυτά. Αυτά υφίστανται μια διαμόρφωση και αποκτούν β-πτυχωτή δομή και έτσι μπορούν να αρχίσουν να συσσωρεύονται προς διαλυτά ολιγομερή και στη συνέχεια προς μεγαλύτερα αδιάλυτα ινίδια και πλάκες (Blennow, 2006).

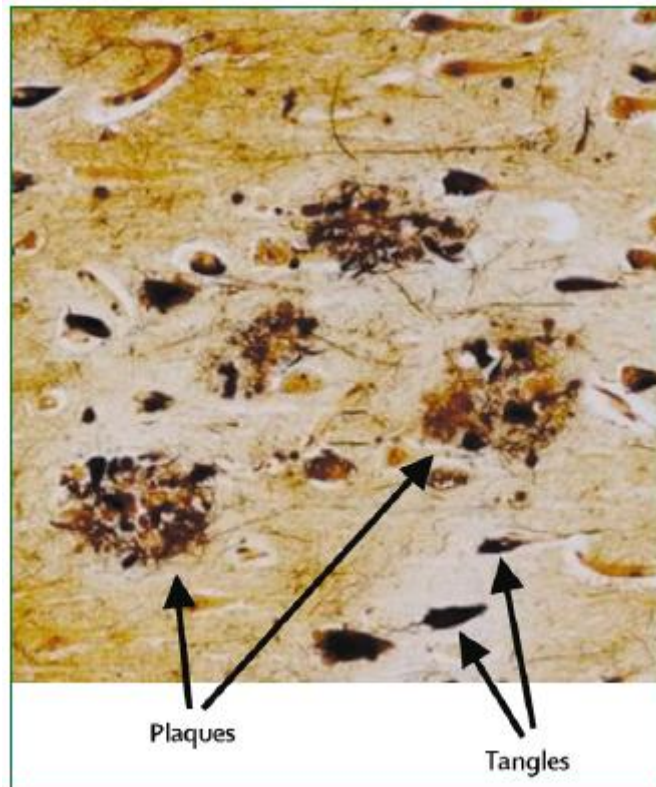
Οι δυστροφικοί νευρώνες προκύπτουν τόσο μέσα στις αμυλοειδείς εναποθέσεις, όσο και γύρω από αυτές. Οι νευρώνες αυτοί έχουν ιδιαίτερη μορφολογία (δισταλμένοι και ελικοειδείς) και φέρουν και άλλες ανωμαλίες, όπως διογκωμένα λυσοσώματα, πλειάδα μιτοχονδρίων κ.α. (Selkoe, 2001), καθώς επίσης είναι και ανοσο-θετικοί για APP (Serrano-Pozo, 2011). Αυτές οι πλάκες επίσης περικυκλώνονται από αστροκύτταρα και μικρογλοία. Η μικρογλοία είναι συνήθως ανάμεσα και πλευρικά στις νευριτικές πλάκες, ενώ τα αστροκύτταρα σχηματίζουν έναν δακτύλιο γύρω από τις πλάκες. Είναι άγνωστο πόσος χρόνος χρειάζεται για τη δημιουργία μιας τέτοιας πλάκας, πιθανότατα όμως γίνεται με την πάροδο μεγάλων χρονικών διαστημάτων, σε μήνες ή και σε χρόνια (Selkoe, 2001).

Το μεγαλύτερο μέρος του ινδιακού Αβ που εντοπίζεται στις πλάκες είναι το Αβ42, αυτό δηλαδή που τελειώνει στο αμινοξύ 42. Αυτή η μορφή είναι πιο επιμήκης και υδρόφοβη και κατ' επέκταση πιο πιθανή να δημιουργήσει συσσωματώματα σε σχέση με το Αβ40. Το Αβ40 συνήθως παράγεται σε μεγαλύτερη αφθονία από τα κύτταρα σε σχέση με το Αβ42. Τα Αβ40 και 42 συνήθως συνεντοπίζονται μέσα στις πλάκες (Selkoe, 2001).

Οι νευριτικές πλάκες, ανάλογα με τα μορφολογικά τους χαρακτηριστικά, μπορούν να διακριθούν σε δύο κατηγορίες: τις διάχυτες και τις ώριμες πλάκες. Ως "διάχυτες" πλάκες ή προ-αμυλοειδικές εναποθέσεις χαρακτηρίζονται οι άμορφες πλάκες οι οποίες θεωρείται ότι αποτελούν πρόδρομες μορφές των νευριτικών πλακών. Τα πεπτιδία Αβ42 είναι αυτά που δημιουργούν τις διάχυτες πλάκες, με μηδενική ή με ελάχιστη συμμετοχή Αβ40 πεπτιδίων, σε αντίθεση με το ανάμεικτο πρότυπο που δίνουν οι "ώριμες" πλάκες (Selkoe, 2001). Οι ώριμες πλάκες ή πλάκες πυκνού

πυρήνα (dense-core plaques) βάφουν με ειδικές χρωστικές οι οποίες αναγνωρίζουν τις β-πτυχωτές δομές, όπως είναι η χρωστική κόκκινο του Κονγκό (Congo Red) και η Thioflavin-S. Οι διάχυτες πλάκες είναι αρνητικές για αυτές τις χρώσεις. Διάχυτες πλάκες μπορούν να εντοπισθούν και στους εγκεφάλους ηλικιωμένων ανθρώπων οι οποίοι όμως δεν έχουν γνωστικά προβλήματα ή άνοια, σε αντίθεση με τις ώριμες πλάκες οι οποίες εντοπίζονται σε άτομα με AD (Serrano-Pozo, 2011).

Υπό φυσιολογικές συνθήκες, το Αβ που βρίσκεται στον εγκέφαλο αποικοδομείται από τις πεπτιδάσες ινσουλινο-διασπαστικό ένζυμο (insulin-degrading enzyme - IDE), νεπριλυσίνη (neprilysin - NEP) ή ενδοθηλινο-μετατρεπτικό ένζυμο (endothelin-converting enzyme). Η νεπριλυσίνη είναι μια μεταλλοπρωτεάση προσδεδεμένη στην εξωκυττάρια πλευρά της κυτταρικής μεμβράνης και είναι υπεύθυνη για την εξωκυττάρια πέψη πλειάδας πεπτιδίων. Η IDE, επίσης μεταλλοπρωτεάση, έχει ενδοκυττάρια και εξωκυττάρια δράση (Murphy, 2010). Επίσης, το Αβ καθαρίζεται από τον εγκέφαλο με μια διαδικασία η οποία ρυθμίζεται ανάλογα με την εισροή και την εκροή δια μέσου του αιματοεγκεφαλικού φραγμού. Η εκροή εξαρτάται από την πρωτεΐνη LRP (low-density lipoprotein receptor-related protein - LRP) και η εισροή από τον υποδοχέα RAGE (receptor for advanced glycation end products - RAGE) (Blennow, 2006). Αν επηρεαστεί με κάποιον τρόπο η ικανότητα εξόδου του Αβ από τον εγκέφαλο μέσω του αιματοεγκεφαλικού φραγμού, τότε αυτό συσσωρεύεται στον εγκέφαλο.



Εικόνα 1: Νευριτικές πλάκες και νευροϊνιδιακά δεμάτια στο φλοιό εγκεφάλου ασθενούς με AD (Blennow, 2006).

Η κύρια υπόθεση που προσπαθεί να εξηγήσει την αιτία της εμφάνισης της νόσου είναι η υπόθεση του καταρράκτη του αμυλοειδούς. Σύμφωνα με αυτήν, η έλλειψη ισορροπίας μεταξύ της παραγωγής και της εκκαθάρισης του Αβ από τον εγκέφαλο είναι το εναρκτήριο γεγονός που οδηγεί τελικά στην υποβάθμιση των νευρώνων και στην άνοια. Η υπόθεση αυτή υποστηρίζεται από το γεγονός ότι οι κύριες μεταλλάξεις που οδηγούν στην οικογενή μορφή της νόσου εντοπίζονται στα γονίδια των πρεσινιλινών και της APP, τα 3 γονίδια δηλαδή που χρειάζονται ουσιαστικά για την παραγωγή του Αβ. Όλες οι μεταλλάξεις στα γονίδια αυτά αυξάνουν την παραγωγή του Αβ₄₂. Επιπρόσθετη απόδειξη αποτελεί και το γεγονός ότι άτομα που πάσχουν από σύνδρομο Down και έχουν ένα επιπλέον APP γονίδιο, παρουσιάζουν εναποθέσεις Αβ και πλάκες αμυλοειδούς νωρίς στη ζωή τους (Blennow, 2006).

B. Νευροϊνιδιακά δεμάτια

Πολλοί νευρώνες στις περιοχές του εγκεφάλου που πλήττονται από τη νόσο Alzheimer, περιέχουν μεγάλα, μη-μεμβρανικά σωμάτια τα οποία καταλαμβάνουν μεγάλο μέρος του κυτταροπλάσματος. Τα σωμάτια αυτά αποτελούνται από την

πρωτεΐνη tau, μια πρωτεΐνη σχετιζόμενη με τους μικροσωληνίσκους, που φυσιολογικά είναι διαλυτή (Selkoe, 2001), η οποία διπλώνεται λανθασμένα και υπερφωσφοριλώνεται (Serrano-Pozo, 2011). Τα σωματίδια αυτά καλούνται νευροϊνιδιακά δεμάτια (neurofibrillary tangles - NFTs). Η υπερφωσφορυλίωση της πρωτεΐνης tau έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή δυσδιάλυτων μορφών, οι οποίες σχηματίζουν τελικά τα δεμάτια μήκους περίπου 10nm (Selkoe, 2001).

Τα νευροϊνιδιακά δεμάτια είναι αργυρόφιλα και μπορούν να φανούν με τη χρήση τεχνικών εμποτισμού με ασήμι, όπως για παράδειγμα με τη τεχνική Gallyas. Εναλλακτικά μπορούν να χρησιμοποιηθούν φθορίζουσες βαφές οι οποίες αναγνωρίζουν β-πτυχωτές δομές και προσδέονται σε συσσωματώματα πρωτεϊνών, όπως είναι η Thioflavin-S, ή και μέσω ανοσοϊστοχημικής χρώσης με αντισώματα έναντι της πρωτεΐνης tau (Serrano-Pozo, 2011). Στα νευροϊνιδιακά δεμάτια διακρίνονται 3 μορφολογικά στάδια:

1) pre-NFTs ή διάχυτα NFTs, που χαρακτηρίζονται από μια διάχυτη και πολλές φορές στικτή χρώση πρωτεΐνης tau στο κυτταρόπλασμα κατά τα άλλα φυσιολογικών νευρώνων (Serrano-Pozo, 2011).

2) Ωριμα ή ινιδιακά ενδονευρωνικά NFTs (iNFTs), που αποτελούνται από κυτταροπλασματικά νηματοειδή συσσωματώματα tau πρωτεΐνης τα οποία μετατοπίζουν τον πυρήνα του κυττάρου προς την περιφέρεια και πολλές φορές επεκτείνονται και μέχρι τους δενδρίτες δίνοντάς τους μια διαταραγμένη εμφάνιση (Serrano-Pozo, 2011).

3) Εξωνευρωνικά NFTs (eNFTs), τα οποία προκύπτουν από τον θάνατο των νευρώνων που τα έφεραν προηγουμένως και μπορούν να διακριθούν από την προηγούμενη κατηγορία χάρη στην έλλειψη πυρήνα και κυτταροπλάσματος που μπορεί να βαφεί με χρωστικές (Serrano-Pozo, 2011).

Η στερεοδιατακτική πρόοδος της εξάπλωσης των νευροϊνιδιακών δεματίων είναι προβλέψιμη. Πρωτοπαρατηρούνται στους νευρώνες του ενδορινικού φλοιού, που λαμβάνουν πληροφορίες από τον ισοφλοιό και προβάλλουν στον ιπόκαμπο, και αργότερα επεκτείνονται προς τον νεοφλοιό (Serrano-Pozo, 2011).

Μελέτες δείχνουν ότι πιθανώς η κακή ρύθμιση της κυκλινοεξαρτώμενης κινάσης 5 (cdk5), ως αποτέλεσμα πρωτεολυτικής πέψης της ρυθμιστικής περιοχής p35 προς

παραγωγή ενός θραύσματος (p25) με συνεχή ιδιότητα κινάσης, μπορεί να παίζει σημαντικό ρόλο στην υπερφωσφορυλίωση της tau και στον σχηματισμό των νευροϊνιδιακών νηματίων (Selkoe, 2001).

Τα δύο κύρια χαρακτηριστικά του AD, οι νευριτικές πλάκες δηλαδή και τα νευροϊνιδιακά δεμάτια, μπορούν να δημιουργηθούν ανεξάρτητα το ένα από το άλλο. Δεμάτια αποτελούμενα από tau πρωτεΐνη τα οποία είναι βιοχημικώς παρόμοια ή και δυσδιάκριτα από αυτά που παρατηρούνται στο AD, έχουν περιγραφεί σε αρκετές νευροεκφυλιστικές νόσους, σε σχεδόν καμία από τις οποίες δεν παρατηρούνται εναποθέσεις Αβ αμυλοειδούς ή νευριτικές πλάκες. Αντίστοιχα, εναποθέσεις Αβ αμυλοειδούς εντοπίζονται στους εγκεφάλους φυσιολογικών ηλικιωμένων, χωρίς όμως να υπάρχουν νευροϊνιδιακά δεμάτια. Υπάρχουν επίσης περιπτώσεις AD που χαρακτηρίζονται ως "πτωχές" δεματίων, παρά την έντονη παρουσία πλακών (Selkoe, 2001).

Γ. Αμυλοειδική αγγειοπάθεια (Cerebral Amyloid Angiopathy - CAA)

Το Αβ απομονώθηκε αρχικά από εξωεγκεφαλικά μηνιγγικά αρτηρίδια και φλεβίδια πλούσια σε αμυλοειδές που βρίσκονται συχνά σε ασθενείς με νόσο Alzheimer ή με σύνδρομο Down. Παρομοίως, μικρά αρτηρίδια, φλεβίδια και τριχοειδή εντός του εγκεφαλικού φλοιού, πολλές φορές φέρουν αμυλοειδείς εναποθέσεις. Αυτή η πάθηση των μικρών αγγείων χαρακτηρίζεται από αμυλοειδή ινίδια τα οποία εντοπίζονται στη βασική μεμβράνη των αγγείων και μερικές φορές εκτείνονται προς το περιβάλλον νευροπίλημα. Οι αμυλοειδείς αυτές εναποθέσεις αποτελούνται κατά βάση από το Αβ40, αντίθετα με τις αμυλοειδείς πλάκες, κύριο συστατικό των οποίων είναι το Αβ42. Είναι αξιοπερίεργο το γεγονός ότι το αμυλοειδές των μηνιγγικών αρτηριδίων που εισχωρούν και διασχίζουν τον φλοιό ξαφνικά παύει να υπάρχει, καθώς τα αγγεία εισχωρούν στην υποφλοιική λευκή ουσία. Σπάνια μπορούν να εντοπισθούν Αβ εναποθέσεις στα αγγεία της λευκής ουσίας. Η έκταση της αμυλοειδούς αγγειοπάθειας διαφέρει μεταξύ εγκεφάλων ασθενών με AD οι οποίοι κατά τα άλλα έχουν παρόμοιες εναποθέσεις αμυλοειδούς στο εγκεφαλικό παρέγχυμα. Αγγεία που φέρουν Αβ αμυλοειδές μπορούν να εντοπισθούν σε εγκεφάλους ασθενών που δεν φέρουν πλάκες και δεν έχουν AD (Selkoe, 2001). Η ίδια μεθοδολογία που χρησιμοποιείται για τον εντοπισμό και τη μελέτη των αμυλοειδών πλακών στον εγκέφαλο, μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για τη μελέτη της εναπόθεσης Αβ στα αγγεία. Η μεθοδολογία

αυτή περιλαμβάνει τις χρωστικές Thioflavin-S και Congo red καθώς και ανοσοϊστοχημική χρώση με anti-Aβ αντισώματα (Serrano-Pozo, 2011). Εφαρμόζεται ένα σύστημα βαθμίδων (grading system) για να χαρακτηρίσει τη σοβαρότητα της αγγειοπάθειας εντός ενός αγγείου:

- Grade 1: δακτύλιος προσφιλής στη χρωστική Congo red στην περιφέρεια ενός κατά τα άλλα φυσιολογικού αγγείου,
- Grade 2: πλήρης αντικατάσταση του ενδοθηλίου του αγγείου από υλικό προσφιλές στη χρωστική Congo red,
- Grade 3: διακοπή >50% της κυκλοφορίας του αγγείου δίνοντας μια όψη "διπλού βαρελιού",
- Grade 4: νέκρωση του αγγειακού τοιχώματος (Serrano-Pozo, 2011).

3. Παθογενετικοί μηχανισμοί της νόσου

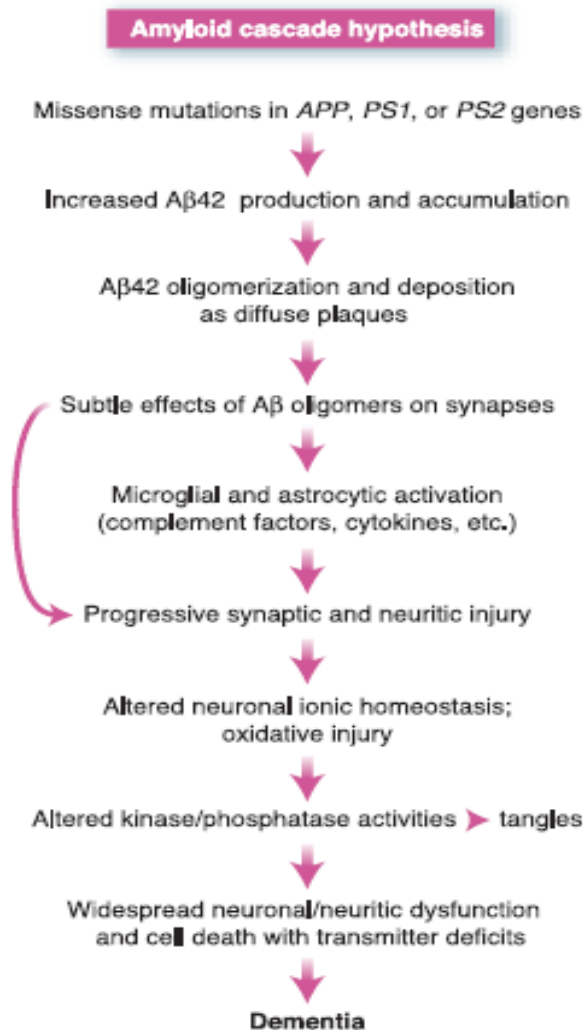
A. "ΒΑΡτιστές" εναντίον "ΤΑΥιστών"

Λόγω της παρουσίας των δύο κύριων παθολογοανατομικών χαρακτηριστικών της νόσου, των νευροϊνδιακών δεματίων πρωτεΐνης tau και των αμυλοειδών εναποθέσεων Αβ δηλαδή, δημιουργήθηκε στο παρελθόν διαμάχη εντός της επιστημονικής κοινότητας σχετικά με το ποιο είναι το χαρακτηριστικό αυτό το οποίο ευθύνεται για την έναρξη και την πρόοδο της νόσου και πώς αυτά αλληλεπιδρούν. Η διαμάχη αυτή ήταν μεταξύ αυτών που ενοχοποιούσαν την υπερφωσφορυλίωση και συσσώρευση της πρωτεΐνης tau ως το εναρκτήριο γεγονός της νόσου, των ΤΑΥιστών, και αυτών που ενοχοποιούσαν την εναπόθεση αμυλοειδών πεπτιδίων Αβ, των ΒΑΡτιστών (ΒΑΡ - Beta Amyloid Protein). Ωστόσο, τα τελευταία χρόνια έχουν περιοριστεί οι εντάσεις γύρω από αυτό το θέμα, καθώς οι κληρονομούμενες μεταλλάξεις στα γονίδια της APP ή της tau, τα ζωικά μοντέλα της νόσου και η προσεκτική ανάλυση του φαινοτύπου Alzheimer στο σύνδρομο Down, έχουν συνδυαστεί ώστε να διευκρινιστεί η σειρά με την οποία οι δύο αλλοιώσεις εμφανίζονται στην ασθένεια. Αρκετές ενδείξεις υποστηρίζουν ότι η συσσώρευση του β αμυλοειδούς προηγείται και οδηγεί στην ενδοκυττάρια εναπόθεση της πρωτεΐνης tau. Στις περιπτώσεις ατόμων με σύνδρομο Down άλλωστε, που παρουσιάζουν τρισωμία 21 και κατ' επέκταση φέρουν ένα επιπλέον APP γονίδιο, μπορεί να

διακριθεί ο φαινότυπος του Alzheimer με την εναπόθεση του Αβ να αποτελεί εναρκτήριο γεγονός (Hardy, 1992). Αυτό βέβαια σε καμία περίπτωση δεν υποβιβάζει την παθογενετική σημασία της tau και την εξασθένιση που αυτή προκαλεί στον κυτταροσκελετό των νευρώνων στη νόσο Alzheimer (Selkoe, 2012).

B. Η υπόθεση του καταρράκτη του αμυλοειδούς

Η κεντρική υπόθεση για την παθογένεια της νόσου Alzheimer είναι η υπόθεση του καταρράκτη του αμυλοειδούς (Amyloid Cascade Hypothesis). Σύμφωνα με την υπόθεση αυτή, η ανισορροπία μεταξύ της παραγωγής και της εκκαθάρισης του Αβ στον εγκέφαλο αποτελεί το εναρκτήριο γεγονός που οδηγεί στη συσσώρευσή του, στην εναπόθεση αμυλοειδών πλακών και τελικά στον νευρωνικό εκφυλισμό και στην άνοια. Πιο συγκεκριμένα, στην οικογενή μορφή της νόσου, οι μεταλλάξεις στα γονίδια APP, PS1 και PS2 προκαλούν χρόνια αύξηση της παραγωγής του Αβ42 έναντι του Αβ40 (Hardy & Selkoe, 2002). Όπως έχει αναφερθεί προηγουμένως, το Αβ42 έχει ισχυρότερη ικανότητα συσσώρευσης λόγω των βιοχημικών του ιδιοτήτων και κατ' επέκταση αυξημένη εναπόθεση υπό τη μορφή πλακών αμυλοειδούς. Στη σποραδική μορφή της νόσου, η γήρανση σε συνδυασμό με περιβαλλοντικούς και γενετικούς παράγοντες κινδύνου, όπως το αλληλόμορφο ε4 της ApoE, οδηγούν σε αποτυχία απομάκρυνσης του Αβ42, με αποτέλεσμα τη βαθμιαία συσσώρευσή του στον εγκέφαλο. Και στις δύο παραπάνω περιπτώσεις, η συσσώρευση του Αβ42 οδηγεί στον ολιγομερισμό του, γεγονός που προκαλεί βλάβες στις συνάψεις (Hardy & Selkoe, 2002). Τα ολιγομερή αυτά, βαθμιαία, σχηματίζουν τις διάχυτες πλάκες, οδηγώντας έτσι στη φλεγμονώδη αντίδραση και ενεργοποίηση των αστροκυττάρων και των μικρογλοιακών κυττάρων (Hardy & Selkoe, 2002). Τελικά η ιοντική ομοιόσταση των νευρώνων διαταράσσεται, προκαλείται οξειδωτικό στρες και επηρεάζεται η ενεργότητα των κινασών οδηγώντας σε υπερφωσφορυλίωση της πρωτεΐνης tau και στο σχηματισμό των νευροϊνιδιακών δεματίων. Τα γεγονότα αυτά καταλήγουν σε δυσλειτουργία των νευρώνων και τελικά σε νευρωνικό θάνατο στις περιοχές του ιππόκαμπου και του φλοιού, επιφέροντας και τις αντίστοιχες γνωστικές και συμπεριφορικές αλλοιώσεις στον ασθενή (Hardy & Selkoe, 2002).



Εικόνα 2: Η σειρά των παθογενετικών γεγονότων στην υπόθεση του καταρράκτη αμυλοειδούς. Στην περίπτωση της οικογενής μορφής της νόσου, η παρουσία των μεταλλαγμένων αλληλόμορφων των APP, PS1 και PS2 έχει ως αποτέλεσμα την αυξημένη παραγωγή και συσσώρευση Αβ42. Το Αβ42 ολιγομερίζεται και εναποτίθεται υπό τη μορφή διάχυτων πλακών. Τα ολιγομερή από μόνα τους μπορούν να προκαλέσουν βλάβες στις συνάψεις και να οδηγήσουν στην ενεργοποίηση των αστροκυττάρων και της μικρογλοίας. Το οξειδωτικό στρες που δημιουργείται στους νευρώνες και η διατάραξη της ιοντικής ομοιοστασίας έχουν ως αποτέλεσμα την αλλαγή στη λειτουργικότητα κινασών και φωσφατασών, γεγονότα που οδηγούν στη δημιουργία των νευροϊνδιακών δεματίων εντός των νευρώνων. Όλα τα παραπάνω οδηγούν σε νευρωνική δυσλειτουργία, κυτταρικό θάνατο και εν τέλει ανοιακά συμπτώματα (Hardy & Selkoe, 2002).

Η υπόθεση του καταρράκτη αμυλοειδούς υποστηρίζεται ισχυρά από 4 πρόσφατες παρατηρήσεις. Η πρώτη είναι ότι μεταλλάξεις στο γονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη tau, προκαλούν προσθολοβιακή άνοια με παρκινσονισμό. Αυτή η νευροεκφυλιστική νόσος χαρακτηρίζεται από έντονη παρουσία νευροϊνδιακών δεματίων στον εγκέφαλο, χωρίς όμως να παρατηρείται εναπόθεση αμυλοειδούς. Από αυτή την παρατήρηση φαίνεται ότι ακόμη και η έντονη συσσώρευση νευροϊνδιακών δεματίων δεν είναι αρκετή για την έναρξη της εναπόθεσης αμυλοειδών πλακών και

άρα δεν μπορεί να αποτελεί το εναρκτήριο γεγονός της νόσου Alzheimer. Αντίστοιχα, σε εγκεφάλους ασθενών με AD, τα νευροϊνιδιακά δεμάτια που προκύπτουν από τη συσσώρευση πρωτεΐνης tau αγρίου τύπου, πρέπει να ακολουθούν την εναπόθεση Αβ. Δεύτερη παρατήρηση που στηρίζει την υπόθεση είναι ότι μοντέλα ποντικών που υπερεκφράζουν τόσο τη μεταλλαγμένη ανθρώπινη APP (hAPP) όσο και τη μεταλλαγμένη ανθρώπινη tau, παρουσιάζουν δημιουργία περισσότερων δεματίων θετικών για tau, σε σύγκριση με μοντέλα ποντικών που υπερεκφράζουν μόνο την tau και όχι την APP. Αυτό δείχνει τον πιθανό ρόλο του Αβ στη δημιουργία των νευροϊνιδιακών δεματίων. Τρίτη παρατήρηση είναι ότι η διασταύρωση APP διαγονιδιακών ποντικών με ποντίκια ελλιπή ως προς την απολιποπρωτεΐνη E (apoE), δίνει απογόνους με μειωμένη εναπόθεση Αβ στο φλοιό. Η παρατήρηση αυτή παρέχει ισχυρά στοιχεία για τον ρόλο της apoE στο μεταβολισμό του Αβ. Τέταρτο και τελευταίο είναι το γεγονός ότι υπάρχουν ολοένα και περισσότερα στοιχεία που δείχνουν ότι η γενετική ποικιλότητα στον καταβολισμό του Αβ και στην εκκαθάρισή του μπορεί να παίζει ρόλο στην πιθανότητα εμφάνισης του όψιμου τύπου της νόσου Alzheimer. Όλα αυτά τα στοιχεία μαζί υποστηρίζουν την υπόθεση ότι η συσσώρευση Αβ αποτελεί το εναρκτήριο γεγονός της νόσου και ότι όλα τα άλλα χαρακτηριστικά της, συμπεριλαμβανομένης της δημιουργίας των νευροϊνιδιακών δεματίων, αποτελούν αποτέλεσμα της ανισορροπίας μεταξύ της παραγωγής και της εκκαθάρισης του Αβ (Hardy & Selkoe, 2002).

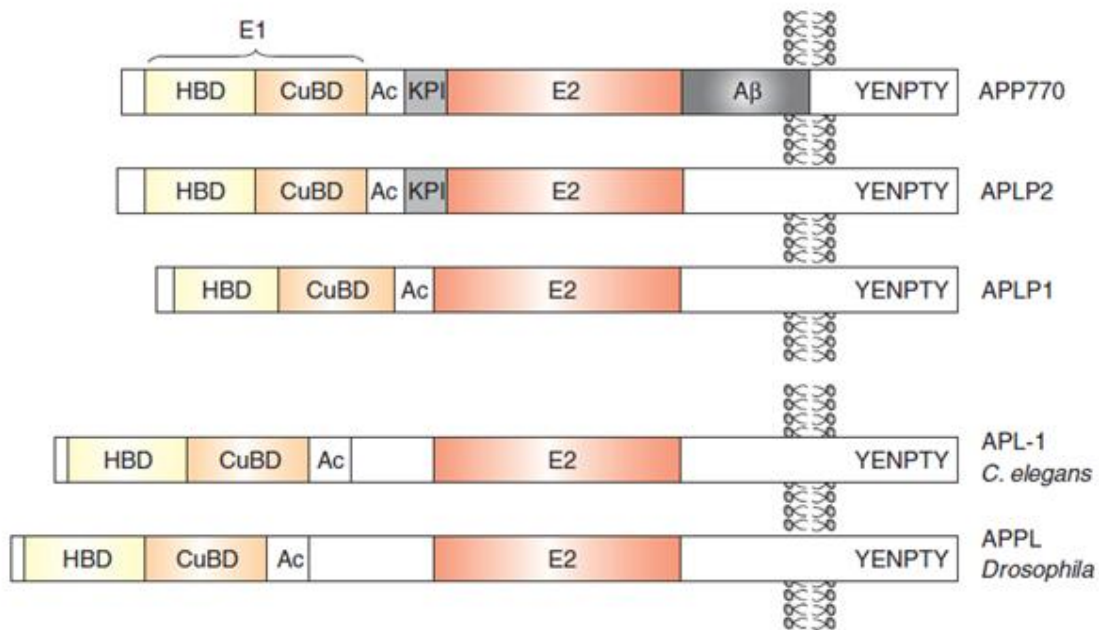
4. Το β-αμυλοειδές πεπτίδιο

Έγινε ήδη σύντομη αναφορά στην υπόθεση του καταρράκτη του αμυλοειδούς και φαίνεται από την υπόθεση αυτή ότι πιθανότατα ο κύριος ένοχος της παθολογίας της νόσου Alzheimer είναι το πεπτίδιο Αβ. Όπως προαναφέρθηκε, το πεπτίδιο Αβ προέρχεται από την πρόδρομη αμυλοειδική πρωτεΐνη APP, ύστερα από πρωτεολυτική πέψη από τη β- και τη γ-εκκριτάση (Jarrett, 1993). Το όνομα "εκκριτάσες" αναφέρεται στην έκκριση του πρωτεολυτικά κομμένου υποστρώματος (Haass, 2012). Από την πρωτεολυτική επεξεργασία της APP προκύπτει το Αβ40, που είναι και το πιο άφθονο, και σε μικρότερο ποσοστό (~10%) το Αβ42. Το διαλυτό Αβ42 υπόκειται σε μια αλλαγή της στερεοδιαμόρφωσής του προς β-πτυχωτή επιφάνεια, με αποτέλεσμα να γίνεται αρχικά επιρρεπές στη συσσωμάτωση προς διαλυτά ολιγομερή, στη

συνέχεια σε μεγαλύτερα αδιάλυτα ινίδια και τελικά σε πλάκες αμυλοειδούς. Στη διαδικασία αυτή το ινιδιογενές Αβ42 προκαλεί τη λανθασμένη αναδίπλωση και των άλλων ειδών Αβ (Jarrett, 1993). Αρχικά εθεωρείτο ότι μόνο το Αβ των πλακών ήταν νευροτοξικό. Παρ' όλα αυτά σήμερα πιστεύεται ότι τα διαλυτά ολιγομερή είναι αυτά που ευθύνονται για την εμφάνιση της νόσου επηρεάζοντας τη λειτουργία των συνάψεων (Walsh & Selkoe, 2004).

A. Η οικογένεια της APP

Η APP αποτελεί μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη τύπου I με μια μοναδική διαμεμβρανική επικράτεια, μια μεγάλη αμινοτελική εξωκυττάρια επικράτεια και μια μικρή κυτταροπλασματική καρβοξυτελική ουρά. Η APP αποτελεί μέλος μιας οικογένειας εξελικτικά συντηρημένων πρωτεϊνών. Στην οικογένεια αυτή ανήκουν η APL-1 του *Caenorhabditis elegans*, η APPL της *Drosophila* και οι appa και appb του *Zebrafish*. Στα θηλαστικά, εκτός από την APP υπάρχουν και οι APLP1 και APLP2. Τα μέλη της οικογένειας APP μοιράζονται συντηρημένες περιοχές στις μη-μεμβρανικές επικράτειές τους, συγκεκριμένα τις περιοχές E1 και E2 εξωκυττάρια καθώς και την κυτταροπλασματική ουρά. Η κυτταροπλασματική ουρά είναι η περιοχή με τη μεγαλύτερη ομοιότητα μεταξύ των μελών της οικογένειας. Είναι ενδιαφέρον το γεγονός ότι η εξωκυττάρια περιοχή των πρωτεϊνών που βρίσκεται εγγύς της κυτταροπλασματικής μεμβράνης αποκλίνει πολύ μεταξύ των διαφορετικών μελών της οικογένειας, με αποτέλεσμα η Αβ αλληλουχία της APP να είναι μοναδική. Η εξωκυττάρια περιοχή E1 μπορεί να διαχωρισθεί στην HBD/GFLD (Heparin-binding/growth factor like domains) περιοχή και στις μεταλλο-δεσμευτικές περιοχές CuBD και ZnBD για τον χαλκό και τον ψευδάργυρο αντίστοιχα. Την E1 περιοχή ακολουθεί μια όξινη περιοχή και μια περιοχή αναστολής πρωτεασών τύπου Kunitz (KPI). Η περιοχή αυτή παίζει ρόλο στη διαδικασία του εναλλακτικού ματίσματος τόσο για την APP όσο και για την APLP2. Η περιοχή E2 περιλαμβάνει μια δεύτερη επικράτεια δέσμευσης ηπαρίνης και ένα RERMS μοτίβο (Muller, 2012).



Εικόνα 3: Σχηματική απεικόνιση των επικρατειών των πρωτεϊνών της οικογένειας APP. Διακρίνεται η Αβ αλληλουχία της APP πρωτεΐνης η οποία και είναι μοναδική μεταξύ των μελών της οικογένειας (Muller, 2012).

Η ανθρώπινη APP που μας ενδιαφέρει κυρίως λόγω του ρόλου που αυτή παίζει στην παθοφυσιολογία της νόσου Alzheimer, αποτελεί ένα ετερογενές σύνολο πρωτεϊνών που κυμαίνονται σε μοριακό βάρος από 110 έως 140 kDa. Αυτή η ετερογένεια οφείλεται τόσο στο εναλλακτικό μάτισμα, δίνοντας 3 κύριες ισομορφές 695, 751 και 770 αμινοξικών καταλοίπων, όσο και σε μια πλειάδα μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων, συμπεριλαμβανομένων N- και O-γλυκοζυλιώσεων, σιλυλιώσεων και CS GAG τροποποιήσεων της εξοκυττάριας περιοχής, καθώς επίσης και φωσφορυλιώσεων σε πολλαπλά σημεία της ενδοκυττάριας καρβοξυτελικής ουράς (Selkoe, 2001).

Η APP αποτελεί ένα διαμεμβρανικό πολυπεπίδιο το οποίο μεταφέρεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο μέσω ενός πεπτιδίου και μετα-μεταφραστικά τροποποιείται. Σύντομα μετά τη βιοσύνθεσή της, η APP αποκτά N- και O- συνδεδεμένα σάκχαρα και έχει μια σχετικά σύντομη περίοδο ημιζωής (περίπου 45-60 λεπτά) (Selkoe, 2001).

B. Φυσιολογικές λειτουργίες της APP

Η φυσιολογική λειτουργία της APP δεν είναι απόλυτα ξεκάθαρη, αν και πιστεύεται ότι είναι υπεύθυνη για ποικίλες λειτουργίες των κυττάρων. Οι πρωτεΐνες της οικογένειας, όταν βρίσκονται στην πλήρη μορφή τους (ολοπρωτεΐνες), ομοιάζουν κυτταρικούς υποδοχείς επιφανείας και έχει δείχτει ότι μπορούν να προσδεθούν σε συστατικά της εξωκυττάριας μήτρας (ηπαρίνη, κολλαγόνο τύπου I και λαμινίνη) καθώς επίσης και να αλληλεπιδράσουν με πρωτεΐνες επιφανείας, όπως είναι η Alcadin, F-spondin, LRP1, sorL1/LR11, Nogo-66 υποδοχέας, Notch2 και νετρίνη. Παρότι πολλές από αυτές τις αλληλεπιδράσεις παίζουν ρόλο στη ρύθμιση της APP, ο φυσιολογικός τους ρόλος δεν είναι καλά κατανοητός. Επιπλέον, τα μέλη της οικογένειας APP φαίνεται να παίζουν ρόλο και στην αλληλεπίδραση μεταξύ κυττάρων. Αντίστοιχα με τις εξωκυττάριας συνδέσεις των πρωτεϊνών της οικογένειας, έχουν προσδιοριστεί και αλληλεπιδράσεις τους μέσω των ενδοκυτταρικών τους ουρών. Πιο γνωστό είναι το YENPTY μοτίβο, το οποίο είναι συντηρημένο από την APL-1 του *C. elegans* έως και την ανθρώπινη APP και προσφέρει τη δυνατότητα ενδοκύττωσης μέσω κυστιδίων καλυμμένων με κλαθρίνη, ρυθμίζει την παραγωγή του Αβ και προσδέεται σε διάφορες κινάσες καθώς και σε πρωτεΐνες-προσδέτες, συμπεριλαμβανομένων των mDab1, JIP, Shc, Grb2, Numb και την Fe65 οικογένεια πρωτεϊνών. Τέτοιες αλληλεπιδράσεις φαίνεται να παίζουν ρόλο σε σηματοδοτικά μονοπάτια των κυττάρων (Muller, 2012).

Η APP και η APLP2 παρουσιάζουν ένα ιδιοστατικό πρότυπο έκφρασης σε όλους τους ιστούς, με μεγαλύτερη όμως έκφραση στους νευρώνες. Αντίθετα, η APLP1 εντοπίζεται κατά κύριο λόγο στο νευρικό σύστημα. Όσον αφορά την τοποθέτησή τους μέσα στα κύτταρα, η APP και οι APLPs βρίσκονται τόσο στα σώματα όσο και στους δενδρίτες των νευρικών κυττάρων καθώς επίσης και στους άξονες. Τα επίπεδα της έκφρασής τους αυξάνονται κατά τη διάρκεια ωρίμανσης των νευρώνων και κατά τη διαφοροποίησή τους και μεταφέρονται γρήγορα μέσω κυστιδίων (Muller, 2012).

Τα τελευταία στοιχεία υποστηρίζουν ότι η APP έχει μια τροφική λειτουργία στους νευρώνες και στις συνάψεις. Απαλοιφή ή μείωση της έκφρασης του γονιδίου της APP έχει συσχετισθεί με μειωμένη ζωτικότητα των νευρώνων σε *in vitro* πειράματα και με μειωμένη συναπτική δραστηριότητα *in vivo*. Είναι πιθανό ότι για τη δράση της APP ως τροφικό μόριο να είναι αναγκαίο το πλήρες μήκος της πρωτεΐνης, καθώς επίσης

μπορεί να παίζουν ρόλο και οι προσκολλητικές της ικανότητες με άλλα μόρια. Συγκεκριμένα, η πρόσδεση της APP με εξωκυττάριας πεπτιδογλυκάνες φαίνεται να παίζει ρόλο στην ανάπτυξη των νευρώνων (Muller, 2012).

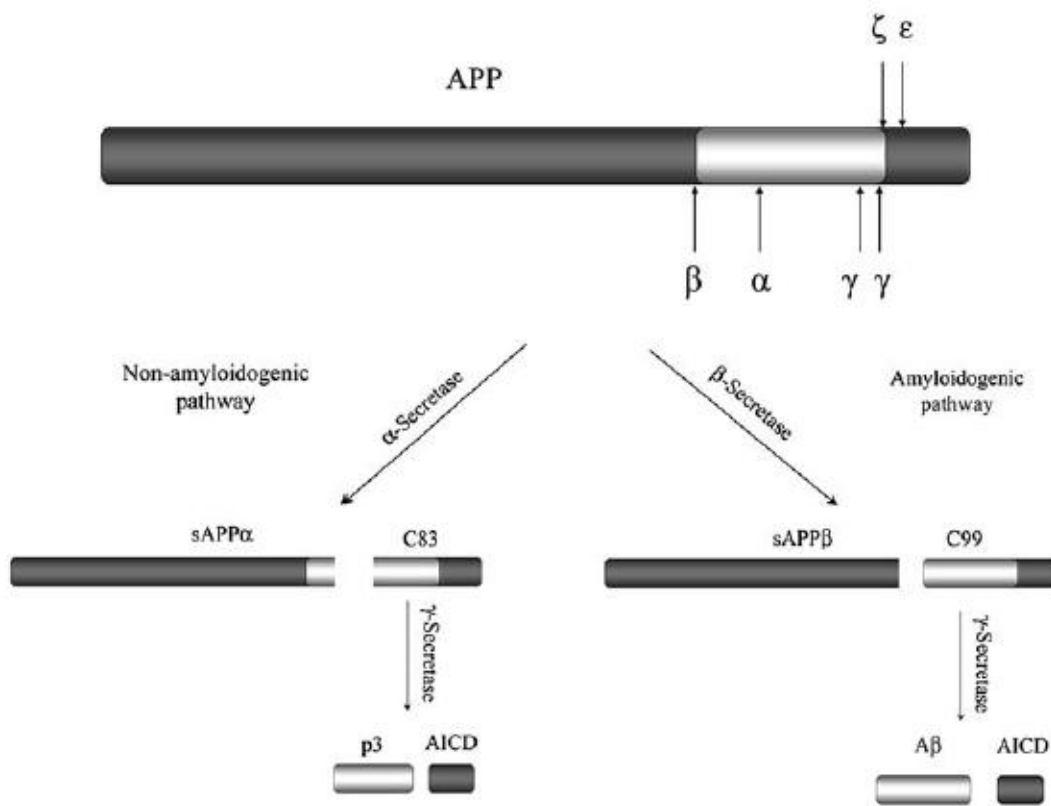
Γ. Τα μονοπάτια επεξεργασίας της APP

Οι ενζυματικές διαδικασίες οι οποίες είναι υπεύθυνες για το μεταβολισμό της APP προς Αβ είναι πλέον καλά κατανοητές. Η πρωτεολυτική επεξεργασία της APP μπορεί να διαχωριστεί σε 2 διαφορετικά μονοπάτια: το **αμυλοειδογενές** και το **μη-αμυλοειδογενές** μονοπάτι. Το πρώτο οδηγεί στον παραγωγή του Αβ. Το αμυλοειδογενές μονοπάτι ξεκινά με την πέψη της APP από τη β-εκκριτάση, προς παραγωγή του μεγάλου εξωκυττάριας πεπτιδίου sAPPβ. Το μεμβρανικό τμήμα 99 αμινοξέων που απομένει, το C99, γνωστό και ως CTFβ, πέπτεται επιπλέον από τη γ-εκκριτάση στο ενδο-μεμβρανικό τμήμα της πρωτεΐνης, παράγοντας Αβ και την ενδοκυττάρια περιοχή AICD. Η γ-εκκριτάση μπορεί να πέψει μεταξύ των αμινοξέων Val637 και Ile638 προς παραγωγή Αβ40 και μεταξύ των αμινοξέων Val637 και Ala639 προς παραγωγή Αβ42 (Jacobsen 2009, Lee 2010).

Κατά το μη-αμυλοειδογενές μονοπάτι, δεν πραγματοποιείται παραγωγή του Αβ καθώς η α-εκκριτάση κόβει την APP εντός της Αβ αλληλουχίας. Πέψη της APP με την α-εκκριτάση έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση του εξωκυττάριας θραύσματος sAPPα, αφήνοντας δεσμευμένη στην κυτταρική μεμβράνη μια πρωτεΐνη μήκους 83 αμινοξέων, τη C83, γνωστή και ως CTFα. Η C83 στη συνέχεια πέπτεται από τη γ-εκκριτάση προς p3 και AICD (Jacobsen, 2009). Ανάλογα με το σημείο πέψης της γ-εκκριτάσης, το μήκος των p3 πεπτιδίων που θα παραχθούν θα είναι διαφορετικό (Αβ17-40 και Αβ17-42) (De Strooper, 2010).

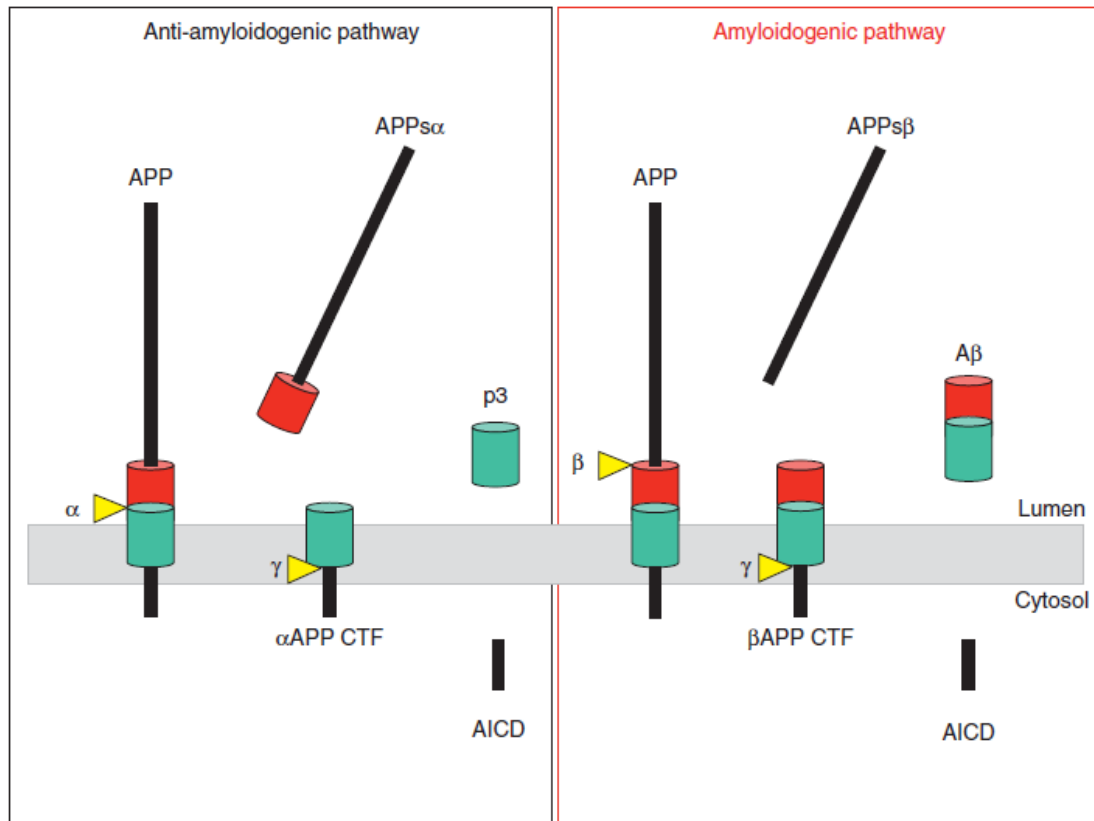
Θεωρείται ότι η πέψη από τη β-εκκριτάση, είναι το βήμα της διαδικασίας που καθορίζει και τον ρυθμό της παραγωγής του Αβ κατά το αμυλοειδογενές μονοπάτι. Κάθε στιγμή, η β-εκκριτάση πρωτεολύει περίπου το 10% της συνολικής APP του κυττάρου. Το υπόλοιπο 90% πέπτεται σε συνεχή ρυθμό από την α-εκκριτάση, παράγοντας sAPPα και το μεμβρανικό κομμάτι CTFα μήκους 83 αμινοξέων. Αυτό το κομμάτι κόβεται στη συνέχεια από τη γ-εκκριτάση προς παραγωγή του μη-παθογενούς p3 θραύσματος αντί για το Αβ. Η πέψη είτε του CTFα είτε του CTFβ από τη γ-εκκριτάση, εκτός από τα p3 και Αβ θραύσματα αντίστοιχα, παράγει και ένα

κυττοσολικό κομμάτι, το AICD, γνωστό και ως CTF γ . Αυτό το κομμάτι μπορεί να παίζει κάποιο ρόλο στη μεταγωγή σήματος στο κύτταρο (Murphy 2010).



Εικόνα 4: Μονοπάτια πρωτεολυτικής πέψης της APP. Φαίνεται η παραγωγή των sAPP α , p3 και AICD θραυσμάτων κατά το μη-αμυλοειδογενές μονοπάτι ύστερα από πρωτεολυτική πέψη από τις α - και γ -εκκρινάσες, και η παραγωγή των sAPP β , A β και AICD θραυσμάτων κατά το αμυλοειδογενές μονοπάτι ύστερα από πρωτεολυτική πέψη από τις β - και γ -εκκρινάσες (Jacobsen, 2009).

Θεωρείται ότι το αμυλοειδογενές και το μη-αμυλοειδογενές μονοπάτι ανταγωνίζονται το ένα το άλλο, τουλάχιστον σε κάποιους υποκυτταρικούς τόπους, καθώς ενίσχυση της δράσης της α -εκκρινάσης σε ζώα-μοντέλα της νόσου Alzheimer ή σε κυτταρικές σειρές μπορεί να μειώσει σημαντικά την παραγωγή του A β και ακόμη και τον σχηματισμό αμυλοειδών πλακών (Haass, 2012).



Εικόνα 5: Το αμυλοειδογενές και το μη-αμυλοειδογενές μονοπάτι. Φαίνονται τα σημεία δράσης των α-, β- και γ-εκκριστών καθώς και τα προϊόντα της κάθε πέψης (Haass, 2012).

Δ. Εκκριτάσες

α-εκκριτάση

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η APP κόβεται κατά κύριο λόγο (ποσοστό ~90%) από την α-εκκριτάση εντός του νευρικού συστήματος (De Strooper, 2010). Υπάρχουν πολλές υποψήφιες πρωτεΐνες όσον αφορά το ποια είναι αυτή που διαθέτει την ενεργότητα α-εκκριτάσης, και όλες είναι μέλη της οικογένειας μεταλλοπρωτεασών ADAM. Οι 2 κύριες υποψήφιες ήταν οι ADAM10 και ADAM17, γνωστή και ως TACE (Jacobsen, 2009). Νεότερες μελέτες απέδειξαν ότι η α-εκκριτάση είναι η μεταλλοπρωτεάση ADAM10, με τις ADAM9 και 17 να έχουν επίσης δράση α-εκκριτάσης (Kuhn, 2010).

β-εκκριτάση

Η β-εκκριτάση είναι μια μεμβρανο-δεσμευόμενη ασπαρτική πρωτεάση που αποτελείται από ένα αμινοτελικό άκρο με καταλυτική δράση που φέρει δύο σημαντικά κατάλοιπα ασπαρτικού, μια διαμεμβρανική περιοχή 17 αμινοξέων και μια μικρή καρβοξυτελική κυττοσολική ουρά (Hebert, 2006). Υπάρχουν δύο κύριες μορφές του ενζύμου, τα BACE1 και BACE2 (BACE - β-site APP cleaving enzyme),

τα οποία είναι κατά >65% ομόλογα. Η κύρια μορφή του ενζύμου που είναι υπεύθυνη για την παραγωγή του Αβ, το BACE1, έχει υψηλή έκφραση στον εγκέφαλο και στο πάγκρεας, εντοπίζεται όμως και σε χαμηλότερα επίπεδα σε άλλα όργανα. Αντίθετα, το BACE2 έχει χαμηλή έκφραση στον εγκέφαλο, είναι παρόν όμως σε υψηλότερα επίπεδα στους περισσότερους περιφερικούς ιστούς (Haass, 2012). Η ενεργότητα και η ποσότητα της β-εκκριτάσης φαίνεται να είναι αρκετά αυξημένες στην περίπτωση του AD σποραδικού τύπου. Επίσης η ενεργότητα της β-εκκριτάσης έχει δειχθεί να αυξάνεται με την αύξηση της ηλικίας στα τρωκτικά και στα μη-ανθρώπινα πρωτεύοντα, χωρίς όμως να είναι απαραίτητη η εμφάνιση της νόσου Alzheimer (Murphy 2010). Το BACE1 φαίνεται να είναι το μοναδικό ένζυμο με λειτουργία β-εκκριτάσης στο νευρικό σύστημα καθώς πειραματικό knock-out του BACE1 μπλοκάρει πλήρως η παραγωγή Αβ. Για τον λόγο αυτό, το BACE1, αποτελεί σημαντικό θεραπευτικό στόχο για την αντιμετώπιση της νόσου Alzheimer και βρίσκεται ήδη σε κλινικές μελέτες (Haass, 2012).

γ-εκκριτάση

Η γ-εκκριτάση αποτελεί ένζυμο με χαμηλή ειδικότητα αλληλουχίας που φέρει πολλές πρωτεϊνικές υπομονάδες, όπως είναι οι πρωτεΐνες APH1 (anterior pharynx defective), PEN2 (PS enhancer), νικαστρίνη (NCT) και οι πρεσινιλίνες 1 και 2 (PS1, PS2), όλες απαραίτητες για τη σωστή λειτουργία του συμπλόκου. Το ενζυμικό αυτό σύμπλοκο πιθανότατα περιέχει ένα μόνο αντίγραφο από την κάθε πρωτεϊνική υπομονάδα και είναι υπεύθυνο για την ενζυμική πέψη πολλών μεμβρανικών πρωτεϊνών, συμπεριλαμβανομένης της APP. Παρότι δεν έχουν πλήρως διευκρινιστεί οι λειτουργίες της κάθε υπομονάδας, θεωρείται ότι οι πρεσινιλίνες φέρουν την ενεργό περιοχή ασπαρτικής πρωτεάσης για την πέψη της APP (Murphy 2010). Η NCT περιοχή ίσως χρειάζεται ως υποδοχέας του υποστρώματος, ενώ η PEN2 ίσως ρυθμίζει την ενδοπρωτεόλυση των πρεσινιλινών προς την ενεργή, ετεροδιμερή κατάστασή τους και τις σταθεροποιεί εντός του συμπλέγματος της γ-εκκριτάσης. Τέλος, η APH1 ίσως να δρα ως "σκαλωσιά" για την αρχική πρόσδεση της NCT στο υπόστρωμα και πιθανόν να παίζει ρόλο και στη δημιουργία του συμπλόκου της γ-εκκριτάσης (Haass, 2012). Στην περίπτωση της νόσου Alzheimer, δεν φαίνεται να αυξάνεται η δραστηριότητα της γ-εκκριτάσης. Αντίθετα, υπάρχουν μεταλλάξεις που αλλάζουν τη δραστηριότητα του ενζύμου με αποτέλεσμα την παραγωγή ειδών Αβ μεγαλύτερου

μήκους (παραγωγή Αβ42 αντί για Αβ40). Οι μεταλλάξεις αυτές έχουν εντοπισθεί στις πρεσενιλίνες και είναι υπεύθυνες για την πρόωμη μορφή της νόσου (Murphy 2010).

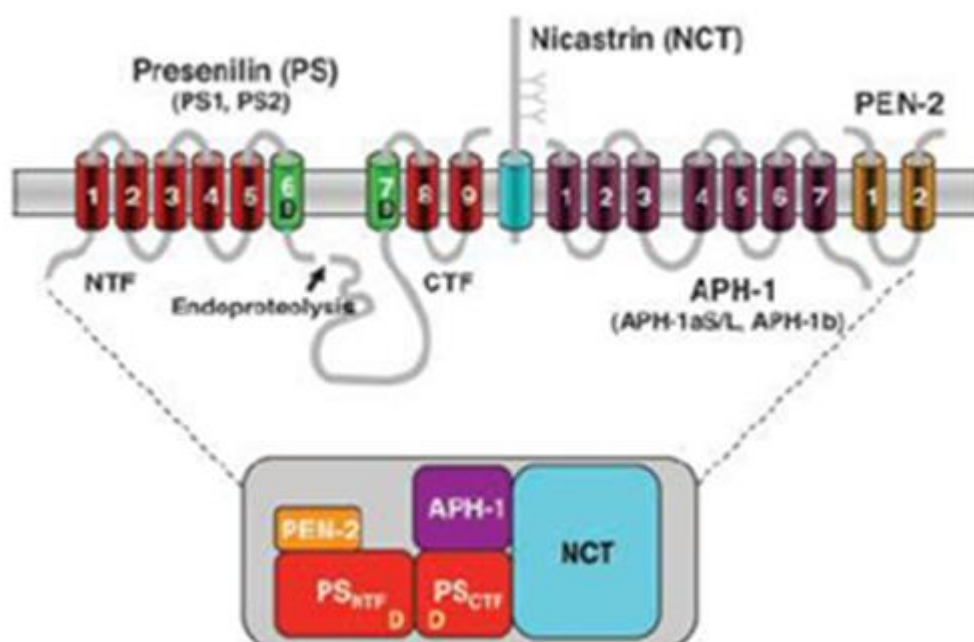
Η επεξεργασία της APP από τη γ-εκκριτάση δεν περιορίζεται σε ένα και μοναδικό σημείο. Πραγματοποιούνται πέψεις στα λεγόμενα ε- ζ- και γ-σημεία τα οποία διαχωρίζονται μεταξύ τους από περίπου 3 αμινοξέα το καθένα. Το τελικό γ-κόψιμο επίσης δεν είναι ακριβές και σε φυσιολογικές συνθήκες μπορεί να συμβεί σε οποιοδήποτε σημείο μεταξύ των αμινοξέων 37 και 42 της Αβ περιοχής. Πρώτα πραγματοποιείται το ε-κόψιμο μετά από τα αμινοξέα 49 ή 48. Αυτό ακολουθείται από το ζ-κόψιμο στα αμινοξέα 45 ή 46 και τέλος πραγματοποιείται το τελικό γ-κόψιμο κυρίως στα αμινοξέα 40 ή 42 και σπανιότερα στα 37, 38, 39 και 43. Έχουν παρατηρηθεί δύο σειρές γεγονότων που οδηγούν στην παραγωγή Αβ: η σειρά που οδηγεί στην παραγωγή Αβ42 η οποία ξεκινά με πέψη στη θέση 48 και ακολουθείται από πέψεις στις θέσεις 45 και 42, και η σειρά που οδηγεί στην παραγωγή Αβ40, η οποία ξεκινά με πέψη στη θέση 49 και ακολουθείται από πέψεις στις θέσεις 46 και 40 (Haass, 2012).

Ε. Πρεσενιλίνες

Οι πρεσενιλίνες 1 και 2 (PS1, PS2), όπως ήδη αναφέρθηκε, αποτελούν πρωτεΐνες του συμπλόκου της γ-εκκριτάσης. Εντοπίζονται στα χρωμοσώματα 14 και 1 αντίστοιχα. Η αλληλουχία της PS1 αποτελείται από 467 αμινοξικά κατάλοιπα και φέρει 9 διαμεμβρανικές επικράτειες. Το γονίδιο της PS1 εκφράζεται στους περισσότερους ιστούς των θηλαστικών, με κύρια σημεία έκφρασης όμως τον εγκέφαλο και τους νευρώνες. Η PS1 κόβεται με αυτοπρωτεόλυση στη μεγάλη κυτταροπλασματική θηλιά και στα αμινοτελικά και καρβοξυτελικά τμήματα. Είναι μια ασπαρτυλοπρωτεάση που θεωρείται ότι αποτελεί το ενεργό κέντρο του ενζύμου της γ-εκκριτάσης (Podlinsky 1997, Ratovitski 1997). Δύο ιδιαίτερα συντηρημένα κατάλοιπα ασπαρτικού, το Asp257 και το Asp385, στις διαμεμβρανικές επικράτειες TMD6 και TMD7, συνιστούν τον πυρήνα του καταλυτικού κέντρου (Wolfe, 1999).

Η PS2 είναι πιθανό να αποτελεί την καταλυτική υπομονάδα του συμπλόκου της γ-εκκριτάσης και έχει ενεργότητα ενδοπρωτεάσης που καταλύει το ενδομεμβρανικό κόψιμο μεμβρανικών πρωτεϊνών όπως είναι η APP και υποδοχείς του μονοπατιού Notch. Η PS2 ανήκει στην A22A οικογένεια πεπτιδασών και φέρει ένα PAL μοτίβο το οποίο είναι απαραίτητο για τη διαμόρφωση της ενεργούς περιοχής της πρωτεΐνης.

Φέρει τρεις διαφορετικές ισομορφές μήκους 448, 414 και 447 αμινοξικά κατάλοιπα [UniProtKB - P49810 (PSN2_HUMAN)].



Εικόνα 6: Σχηματική αναπαράσταση της γ -εκκριτάσης. Το σύμπλοκο της γ -εκκριτάσης αποτελείται από την καταλυτική υπομονάδα presenilin (PS) και τρεις ακόμα μεμβρανικές πρωτεΐνες, τη nicastrin (NCT), την APH-1 και την PEN-2. Οι διαμεμβρανικές επικράτειες 6 και 7 της PS, που περιέχουν τα κατάλοιπα ασπαρτικού του ενεργού κέντρου (D) επισημαίνονται με πράσινο. Στο κάτω πλαίσιο αναπαρίσταται η διάταξη των υπομονάδων του συμπλόκου όπως φαίνεται πάνω στη μεμβράνη (Lichtenthaler, 2011).

ΣΤ. Μεταλλάξεις της APP που προκαλούν FAD

Έχουν βρεθεί τουλάχιστον 50 μεταλλάξεις (Alzforum) που έχουν συσχετισθεί με την εμφάνιση νόσου Alzheimer πρώιμου τύπου εντός και γύρω από την Αβ περιοχή της APP πρωτεΐνης. Οι μεταλλάξεις αυτές επιταχύνουν την πρόοδο της νόσου μέσω διάφορων μηχανισμών.

Η Σουηδική μετάλλαξη εντοπίζεται στην αμινοτελική περιοχή της Αβ επικράτειας και έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της συνολικής παραγωγής Αβ (Αβ40 και Αβ42), καθώς παρέχει στη β-εκκριτάση καλύτερο υπόστρωμα ώστε αυτή να δράσει (Haass, 2012). Ουσιαστικά η Σουηδική μετάλλαξη αποτελεί μια διπλή σημειακή μεταλλαγή αντικατάστασης νουκλεοτιδίων στο εξόνιο 16 του γονιδίου που οδηγεί σε αλλαγή δύο αμινοξικών καταλοίπων, καθώς έχουμε αντικατάσταση μιας λυσίνης και μιας μεθειονίνης προς ασπαραγίνη και λευκίνη αντίστοιχα (Alzforum).

Μεταλλάξεις που εντοπίζονται πέρα από το καρβοξυτελικό άκρο της Αβ, όπως είναι η Αυστριακή, η Ιρανική, η Γαλλική, η Γερμανική, του Λονδίνου και της Φλόριντας, προκαλούν την παραγωγή ειδών Αβ μεγαλύτερων σε μήκος (Αβ42), ειδών δηλαδή που έχουν μεγαλύτερη τάση να συσσωρεύονται και που έχουν την ισχυρότερη κυτταροτοξική δράση (Haass, 2012). Όλες οι μεταλλάξεις αυτές εντοπίζονται στο εξόνιο 17 του γονιδίου της APP και πρόκειται για αντινοσηματικές μεταλλάξεις αντικατάστασης ενός νουκλεοτιδίου που οδηγούν στην αλλαγή της έκφρασης ενός αμινοξέος. Η Αυστριακή μετάλλαξη αποτελεί μια σημειακή αντινοσηματική μετάλλαξη αντικατάστασης μιας κυτοσίνης προς θυμίνη. Η Ιρανή και η μετάλλαξη της Φλόριντα είναι αντικαταστάσεις μιας αδενίνης προς γουανίνη. Η γαλλική και η μετάλλαξη του Λονδίνου είναι αντικαταστάσεις μιας γουανίνης προς αδενίνη. Τέλος, η Γερμανική, πρόκειται για μια μετάλλαξη απλής αντικατάστασης μιας θυμίνης προς κυτοσίνη (Alzforum).

Μεταλλάξεις στη μεσαία περιοχή της APP, όπως είναι η Αρκτική και η Ολλανδική, επηρεάζουν την αλληλουχία της Αβ με αποτέλεσμα την αύξηση της ικανότητάς της να δημιουργεί συσσωματώματα (Haass, 2012). Και αυτές οι μεταλλάξεις πρόκειται για αντινοσηματικές μεταλλάξεις σημειακής αντικατάστασης ενός νουκλεοτιδίου (Alzforum).

Z. Μεταλλάξεις των πρεσενιλινών που προκαλούν FAD

Περισσότερες από 100 παρερμηνεύσιμες μεταλλαγές των πρεσενιλινών συσχετίζονται με την οικογενή μορφή της νόσου (EOAD) και προκαλούν αλλαγές στις θέσεις που κόβεται η APP, με αποτέλεσμα την παραγωγή β-αμυλοειδών πεπτιδίων με διαφορετικό μήκος (Murphy, 2010). Η πλειοψηφία αυτών των μεταλλαγών αφορά την PS1 (τουλάχιστον 200 διαφορετικές μεταλλάξεις) και σε μικρότερο βαθμό την PS2 (περί τις 40) (Yan, 2015).

H. Καταβολισμός του β-αμυλοειδούς πεπτιδίου

Γνωρίζοντας τις μεταλλάξεις που προκαλούν FAD και τους παράγοντες που ρυθμίζουν την παραγωγή του Αβ και τον σχηματισμό των πλακών, όλη η έρευνα έχει επικεντρωθεί στους μηχανισμούς γύρω από την παραγωγή του Αβ, στη λειτουργία δηλαδή των εκκριτασών. Η λογική αυτής της προσέγγισης είναι ότι μείωση της παραγωγής του Αβ θα ελαττώσει την εναπόθεση του β-αμυλοειδούς και τελικά θα καθυστερήσει ή και θα σταματήσει τελείως την έκπτωση του νευρικού συστήματος. Παρ' όλα αυτά, η ενίσχυση των μηχανισμών εκκαθάρισης του Αβ ίσως θα ήταν ένας

εξίσου αποτελεσματικός τρόπος μείωσης του φορτίου του β-αμυλοειδούς στον εγκέφαλο (Tanzi, 2004).

Το διαλυτό Αβ στο εγκεφαλικό παρέγχυμα έχει δύο πιθανούς προορισμούς: είτε θα συσσωρευτεί σε ινίδια και τελικά θα σχηματίσει τις εναποθέσεις β-αμυλοειδούς είτε θα απομακρυνθεί με κάποιο μηχανισμό. Στη δεύτερη περίπτωση, το Αβ μπορεί να ενδοκυτταρωθεί και να αποικοδομηθεί από την ενεργοποιημένη μικρογλοία, να αποικοδομηθεί από τις πεπτιδάσες NEP και IDE ή να εξέλθει από τον εγκέφαλο δια μέσου του αιματοεγκεφαλικού φραγμού μέσω της LRP.

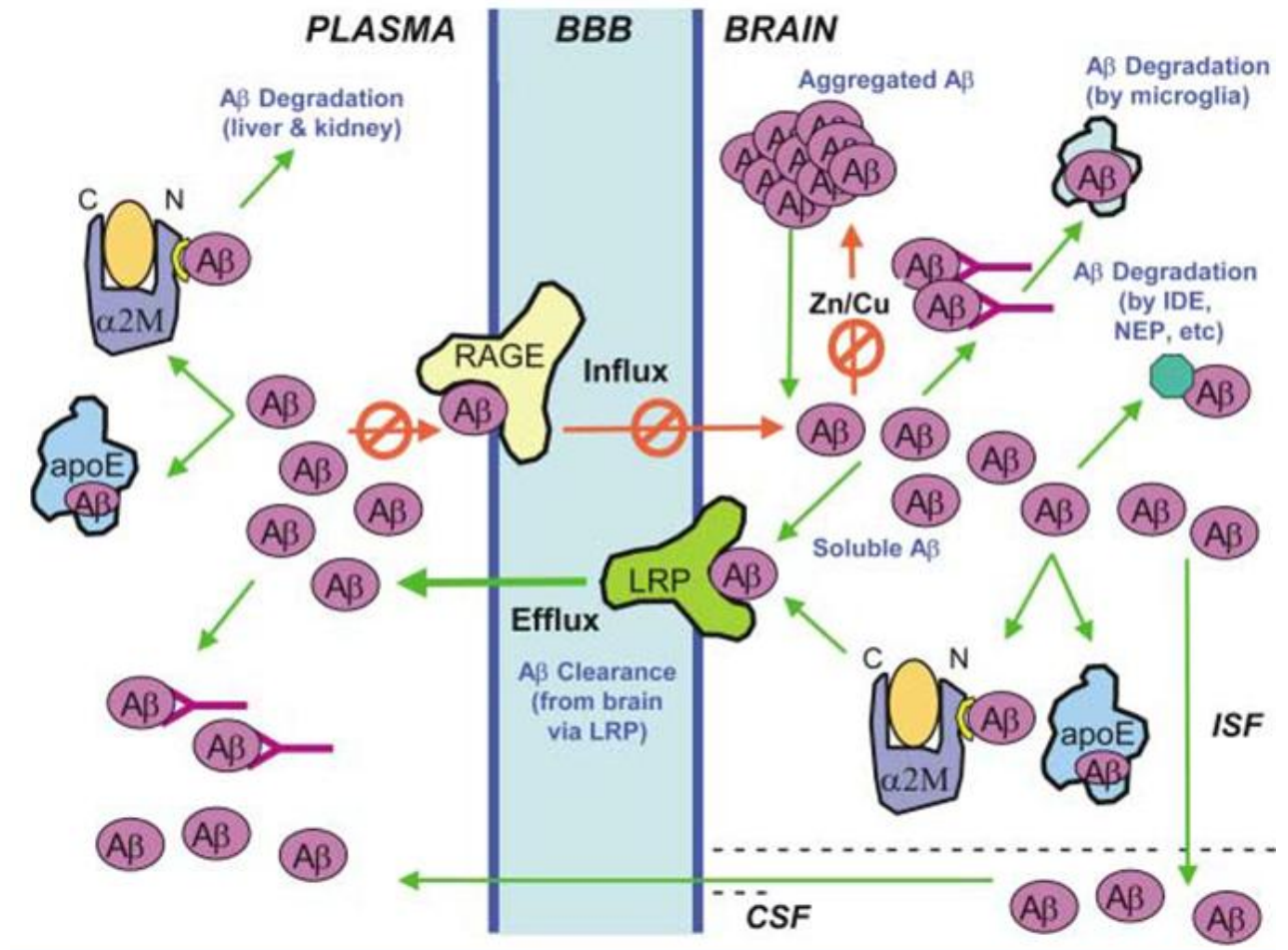
Θεωρείται ότι η LPR πρωτεΐνη (low-density lipoprotein receptor-related protein) και ο υποδοχέας RAGE (receptor for advanced glycation end products) είναι τα στοιχεία εκείνα που ρυθμίζουν τη ροή του Αβ δια μέσου του αιματοεγκεφαλικού φραγμού. Και οι δύο πρωτεΐνες αποτελούν υποδοχείς επιφανείας κυττάρων που ρυθμίζουν την εκκαθάριση ενός μεγάλου αριθμού πρωτεϊνών, συμπεριλαμβανομένου του Αβ. Ενώ η LPR φαίνεται να ρυθμίζει την εκροή του Αβ από τον εγκέφαλο προς την περιφέρεια, ο υποδοχέας RAGE ρυθμίζει την επανείσοδό του σε αυτόν. Η LPR είναι ένας υποδοχέας με πολλές λειτουργίες που αποτελείται από μια βαριά αλυσίδα που μπορεί να προσδέσει μια ποικιλία μορίων-προσδετών: apoE, α2-μακροσφαιρίνη και APP. Πειραματική χρήση ανταγωνιστών της LPR φαίνεται να μειώνει την εκροή του Αβ από τον εγκέφαλο έως και 90%. Η LPR λειτουργεί ως εξής: αρχικά το Αβ δημιουργεί σύμπλοκο με την ειδική πρωτεΐνη-μεταφορέα RAP (receptor-associated protein). Τον ρόλο της πρωτεΐνης-μεταφορέα RAP μπορούν να παίζουν η apoE και η α2-μακροσφαιρίνη. Το σύμπλοκο Αβ/RAP προσδέεται στην LPR στην εξωτερική πλευρά του ενδοθηλίου. Στη συνέχεια, η LPR που φέρει το Αβ ενδοκυτταρώνεται και εισάγεται στα όψιμα ενδοσώματα από όπου και μπορεί είτε να παραδοθεί στα λυσοσώματα, όπου και θα αποικοδομηθεί, είτε να μεταφερθεί κατά μήκος του αιματοεγκεφαλικού φραγμού και να απελευθερωθεί στην κυκλοφορία. Από εκεί μπορεί να καταλήξει σε περιφερικές θέσεις για αποικοδόμηση (ήπαρ, νεφρούς). Έχει δείξει ότι το Αβ μπορεί να προσδεθεί και απευθείας στην LPR χωρίς τη μεσολάβηση πρωτεΐνης-μεταφορέα (Tanzi, 2004).

Ο RAGE είναι ένας υποδοχέας της υπερ-οικογένειας των ανοσοσφαιρινών με ποικίλες λειτουργίες. Όπως και η LPR, προσδέει μια πλειάδα διαφορετικών μορίων, συμπεριλαμβανομένου του Αβ. Μελέτες έχουν δείξει ότι μείωση της έκφρασης του

RAGE μπορεί να μειώσει την εισροή Αβ από την περιφέρεια προς το κεντρικό νευρικό σύστημα. Επίσης έχειδειχθεί ότι η σύνδεση του Αβ στον RAGE μπορεί να ξεκινήσει κυτταρικές αποκρίσεις οι οποίες μπορούν να αποβούν παθογενείς, συμπεριλαμβανομένων της έκφρασης προ-φλεγμονωδών κυττοκινών και της μείωσης της αιματικής ροής στο φλοιό. Ρόλο παρόμοιο με αυτόν του RAGE έχει βρεθεί να παίζει και το σύμπλοκο gr330/μεγαλίνη, φέρνοντας το Αβ από την κυκλοφορία πίσω στον εγκέφαλο ύστερα από τη σύνδεσή του με την apoJ (Tanzi, 2004).

Οι δύο κύριες ενδοπεπτιδάσες που εμπλέκονται στην αποικοδόμηση του Αβ είναι δύο μεταλλο-ενδοπεπτιδάσες ψευδαργύρου: το ένζυμο αποικοδόμησης της ινσουλίνης (insulin degrading enzyme - IDE) και η νεπριλυσίνη (neprilysin - NEP). Το IDE είναι ένα ένζυμο μοριακού βάρους 110 kDa που έχει την ικανότητα να υδρολύει πολλά ρυθμιστικά πεπτίδια, συμπεριλαμβανομένων της ινσουλίνης, του γλυκογόνου, της β-ενδορφίνης και άλλων. Ανάμεσα σε αυτά ανήκουν και το Αβ καθώς επίσης και το παράγωγο της APP, AICD. Το IDE φαίνεται να είναι το ένα από τα κύρια ένζυμα αποικοδόμησης του Αβ, καθώς απαλοιφή του αντίστοιχου γονιδίου σε πειραματικά μοντέλα φαίνεται να προκαλεί αύξηση στην ποσότητα του ενδογενούς Αβ, ενώ μοντέλα ετερόζυγα για το γονίδιο (+/-) φέρουν ενδιάμεσα επίπεδα ενδογενούς Αβ σε σχέση με τα knockout (-/-) και του αγρίου τύπου (+/+). Ο ρόλος του IDE φαίνεται και από τη χρήση διαγονιδιακών μοντέλων ποντικών υπερέκφρασης της ανθρώπινης APP. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι το IDE φαίνεται να αποικοδομεί μόνο μονομερή Αβ (Tanzi, 2004).

Η άλλη σημαντική πεπτιδάση που είναι υπεύθυνη για τον μεταβολισμό του Αβ είναι η NEP. Η NEP είναι μια μεμβρανική πρωτεΐνη τύπου II η οποία, όπως και το IDE, υδρολύει κυκλοφορούντα βιολογικώς ενεργά πεπτίδια. Στα πεπτίδια αυτά ανήκουν η εγκεφαλίνη, η χολεκυστοκίνη, το νευροπεπτίδιο Y καθώς και το Αβ. Πειράματα απαλοιφής ή υπερέκφρασης του γονιδίου της NEP δείχνουν τη σημαντικότητά της στην εκκαθάριση του Αβ. Σε αντίθεση με το IDE, που κατά κύριο λόγο εντοπίζεται στο κυττοσόλιο, η NEP έχει κυρίως μεμβρανικό εντοπισμό, και κατ' επέκταση μπορεί να παίζει ρόλο στην αποικοδόμηση πεπτιδίων σε εξωκυττάρια σημεία αμυλοειδικής εναπόθεσης (διάχυτες πλάκες αμυλοειδούς) (Tanzi, 2004).



Εικόνα 7: Τα μονοπάτια που εμπλέκονται στην εκκαθάριση του Αβ. Το διαλυτό Αβ στο εγκεφαλικό παρέγχυμα μπορεί να καταλήξει σε μία από δύο διαφορετικές καταστάσεις. α) Μπορεί να συσσωματωθεί προς ινίδια τα οποία τελικά θα εναποτεθούν ως πλάκες β-αμυλοειδούς. Αυτό υποβοηθείται από αλληλεπιδράσεις του με ψευδάργυρο, χαλκό και άλλα βαρέα μέταλλα. Η παρεμπόδιση της αλληλεπίδρασης του Αβ με τα μέταλλα αυτά με τη χρήση φαρμάκων που συμπλοκοποιούνται με τα μέταλλα (πχ. clioquinol), έχει προταθεί ως μια θεραπευτική προσέγγιση για τον καθαρισμό του Αβ και την αντιμετώπιση της νόσου Alzheimer. Το διαλυτό Αβ μπορεί να απομακρυνθεί από τον εγκέφαλο μέσω δύο κύριων μηχανισμών: την ενζυματική αποικοδόμηση ή τη ρυθμιζόμενη από υποδοχείς εκκαθάριση. Στην περίπτωση της αποικοδόμησης, το Αβ μπορεί να ενδοκυτταρωθεί και να αποικοδομηθεί από τη μικρογλία του εγκεφάλου. Το εμβόλιο του αμυλοειδούς θεωρείται ότι μπορεί να ενισχύσει αυτή τη διαδικασία. β) Εναλλακτικά, το διαλυτό Αβ μπορεί να αποικοδομηθεί από ειδικές πεπτιδάσες, όπως είναι οι IDE και NEP που φαίνονται και στο σχήμα. Σε ένα εναλλακτικό μονοπάτι καθαρισμού του Αβ, αυτό μπορεί να απομακρυνθεί από τον εγκέφαλο προς την περιφέρεια διά μέσου του αιματοεγκεφαλικού φραγμού και να εισέλθει στην κυκλοφορία. Αυτό μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε με απευθείας πρόσδεσή του στον LRP είτε με πρόσδεση στους διαμεσολαβητές/πρωτεΐνες-συνοδούς apoE και α2M. Όταν το Αβ εισέλθει στην κυκλοφορία, μπορεί να ξαναπεράσει στον εγκέφαλο μέσω του υποδοχέα RAGE, ή να μεταφερθεί με τη βοήθεια της apoE σε περιφερικά σημεία αποικοδόμησης, όπως είναι το ήπαρ και οι νεφροί. Μια άλλη ιδέα που έχει προταθεί σχετικά με την ανοσοποίηση του οργανισμού έναντι του Αβ αφορά την πρόσδεση των αντι-Αβ αντισωμάτων στο Αβ της κυκλοφορίας και έτσι την παρεμπόδιση επανεισόδου αυτού στον εγκέφαλο. Στην παραπάνω εικόνα τα πράσινα βέλη υποδεικνύουν μονοπάτια τα οποία μπορούν φαρμακολογικά να ενισχυθούν και τα κόκκινα βέλη υποδεικνύουν μονοπάτια που μπορούν να μπλοκαριστούν ως θεραπευτική αντιμετώπιση της νόσου Alzheimer (Tanzi, 2004)

5. Ο ρόλος του ανοσοποιητικού συστήματος στη νόσο Alzheimer

A. Φλεγμονή και νόσος Alzheimer

Η παραγωγή και η εναπόθεση του β-αμυλοειδούς και των νευροϊνιδιακών δεματίων, καθώς και η αμυλοειδική αγγειοπάθεια, αποτελούν τα κυριότερα παθολογικά χαρακτηριστικά της νόσου Alzheimer. Πρόσφατες έρευνες όμως προτείνουν ότι η φλεγμονή αναπαριστά ένα πρόσθετο χαρακτηριστικό που μπορεί να συνεισφέρει στην εκκίνηση ή και στην εξέλιξη της νόσου (Heneka, 2007).

Παρότι ο παθογενετικός ρόλος του Αβ στη νόσο Alzheimer είναι ευρέως αποδεκτός, ο μηχανισμός δράσης αυτού είναι σε μεγάλο μέρος άγνωστος. Πολλές μελέτες προτείνουν ότι το Αβ συνεισφέρει στο πρώιμο δενδριτικό και συναπτικό τραύμα και κατ' επέκταση στη νευρωνική δυσλειτουργία. Επιπρόσθετα, η συσσώρευση του Αβ έχει δείχθει να ενεργοποιεί τη μικρογλοία και να εκκινεί την παραγωγή φλεγμονωδών μορίων όπως είναι το μονοξειδίο του αζώτου (NO), οι ενεργές ρίζες οξυγόνου (ROS), ο παράγοντας νέκρωσης όγκων α (TNF-α), ιντερλευκίνες (IL-1β, IL-6, IL-18) και προσταγλαδίνες (πχ προσταγλαδίνη E2). Οι ενδείξεις δείχνουν ότι το Αβ προωθεί όχι μόνο με άμεσο τρόπο τον νευρωνικό θάνατο αλλά και με έμμεσο, μέσω της ενεργοποίησης φλεγμονωδών συστημάτων, οδηγώντας έτσι στην πρόοδο της νόσου Alzheimer (Lee, 2010).

Η φλεγμονή αποτελεί μια πολύπλοκη κυτταρική και μοριακή απόκριση σε προσβολές (στρες, τραύμα, λοίμωξη) με σκοπό την αντιμετώπιση των προσβολών αυτών. Η φλεγμονή είναι μια απόκριση που στόχο έχει τόσο την αντιμετώπιση της αρχικής προσβολής όσο και τον καθαρισμό του νεκρωτικού ιστού και κυττάρων που προκύπτουν στην πορεία. Αν η υγιής κατάσταση του ιστού δεν επανέλθει σύντομα, τότε η φλεγμονή γίνεται μια χρόνια κατάσταση που διαβρώνει συνεχώς τους γειτονικούς ιστούς (Rubio-Perez, 2012). Η φλεγμονή έχει συσχετισθεί με την έναρξη διάφορων νευροεκφυλιστικών παθήσεων, συμπεριλαμβανομένης και της νόσου Alzheimer. Η φλεγμονώδης απόκριση στους νευρώνες (νευροφλεγμονή - neuroinflammation) περιλαμβάνει την ενεργοποίηση της μικρογλοίας, των αστροκυττάρων, των μακροφάγων και των λεμφοκυττάρων, καθώς και την απελευθέρωση φλεγμονωδών μορίων, όπως είναι οι κυττοκίνες, χημειοκίνες, νευροδιαβιβαστές και ROS. Η απελευθέρωση των μορίων αυτών έχει ως αποτέλεσμα τη στρατολόγηση λεμφοκυττάρων και μονοκυττάρων δια μέσου του

αιματοεγκεφαλικού φραγμού, καθώς και την ενεργοποίηση επιπλέον μικρογλοίας, γεγονός που οδηγεί στον πολλαπλασιασμό της και κατ' επέκταση στην παραγωγή και απελευθέρωση ακόμη περισσότερων φλεγμονωδών παραγόντων (Lee, 2010), τροφοδοτώντας έτσι έναν φαύλο κύκλο. Καθώς τα κύρια χαρακτηριστικά μιας φλεγμονώδους αντίδρασης (αύξηση θερμοκρασίας σώματος, ιδρώτας και πόνος) δεν είναι παρόντα στο εγκέφαλο κατά τη πρόοδο της νόσου Alzheimer, αναφερόμαστε σε μια κατάσταση χρόνιας και όχι οξείας φλεγμονής (Rubio-Perez, 2012).

Η υπόθεση σχετικά με τον ρόλο της φλεγμονής στη νόσο Alzheimer μας λέει ότι η χρόνια φλεγμονή είναι ουσιαστικά η αντίδραση του οργανισμού για τον καθαρισμό των Αβ πλακών καθώς και των συσσωματωμάτων της υπερφωσφορυλιωμένης tau πρωτεΐνης. Οι πλάκες αποτελούνται από δυστροφικούς νευρώνες, ενεργοποιημένη μικρογλοία και αστροκύτταρα. Τα συσσωματωμένα ινίδια Αβ και τα φλεγμονώδη μόρια που εκκρίνονται από τη μικρογλοία και τα αστροκύτταρα, από κοινού συνεισφέρουν στη ζημιά που υφίστανται οι νευρώνες (Rubio-Perez, 2012).

B. Κυτταρικοί πληθυσμοί του ανοσοποιητικού συστήματος του εγκεφάλου

B.1 Μικρογλοιακά κύτταρα

Η μικρογλοία είναι ένας κυτταρικός τύπος που υποστηρίζει και προστατεύει τις νευρωνικές λειτουργίες και απαρτίζει περίπου το 10% του κυτταρικού πληθυσμού του εγκεφάλου (Rubio-Perez, 2012). Αποτελεί την πρώτη και κύρια γραμμή άμυνας του κεντρικού νευρικού συστήματος και κατά τη διάρκεια παθολογικών καταστάσεων, όπως είναι νευροεκφυλιστικές νόσοι, εγκεφαλικά, τραύματα και εισβολές όγκων, ενεργοποιείται, μεταναστεύει και περικυκλώνει τραυματισμένα ή νεκρά κύτταρα προκειμένου να καθαρίσει τον ιστό από αυτά (Rubio-Perez, 2012).

Κατά την εμβρυική ανάπτυξη, τα προγονικά μικρογλοιακά κύτταρα, που προέρχονται από τα μεσεγχυματικά προγονικά κύτταρα της μυελοειδούς σειράς, μεταναστεύουν αρκετά νωρίς στο ΚΝΣ και πολλαπλασιάζονται, αποικίζοντας τον εγκέφαλο πριν από την ανάπτυξη και το κλείσιμο του αιματοεγκεφαλικού φραγμού (Cameron et al 2010, Wys-Corray et al 2012). Αυτός ο πληθυσμός κυττάρων θεωρείται διακριτός από τα εμβρυικά μακροφάγα που είναι επίσης μυελικής προέλευσης αλλά προέρχονται από μονοκύτταρα της εμβρυικής κυκλοφορίας. Αυτά τα εμβρυικά μακροφάγα εισέρχονται επίσης στον αναπτυσσόμενο εγκέφαλο και συνεισφέρουν στον μικρογλοιακό πληθυσμό, κυρίως σε μετέπειτα αναπτυξιακά στάδια (Cameron et al, 2010).

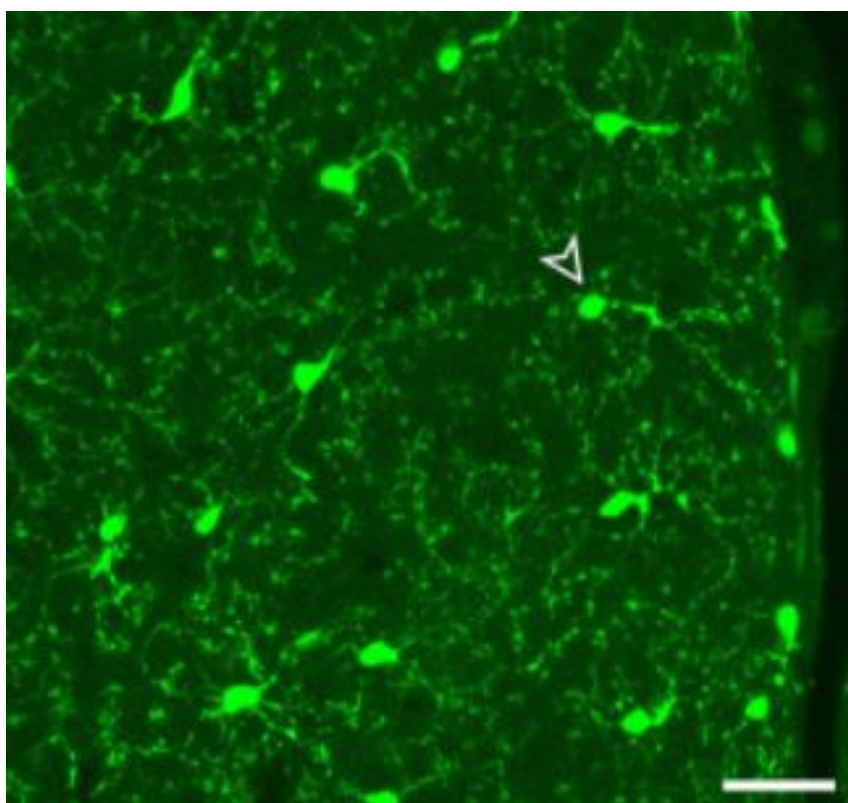
Συνήθως, στη φυσιολογική τους λειτουργία, τα μικρογλοιακά κύτταρα βρίσκονται σε μια κατάσταση ανάπαυσης και χαρακτηρίζονται από μικρό κυτταρικό σώμα και αποφύσεις που εκτείνονται προς όλες τις κατευθύνσεις. Ακόμη και μικρές αλλαγές στο κεντρικό νευρικό σύστημα μπορεί να προκαλέσουν την ενεργοποίηση της μικρογλοίας και κατ' επέκταση την αλλαγή της μορφολογίας της. Όταν ο εγκέφαλος μεταπίπτει από μια υγιή σε μια παθολογική κατάσταση, το κυτταρικό σώμα των μικρογλοιακών κυττάρων φουσκώνει, οι συνάψεις εξαφανίζονται και τα κύτταρα αποκτούν μια αμοιβαδοειδή μορφή (Li, 2014).

Η μικρογλοία δεν έχει μόνο νευροπροστατευτικό ρόλο, όπως λειτουργίες φαγοκυττάρωσης και περισυλλογής κυτταρικών αποβλήτων, αλλά και νευροτοξικά αποτελέσματα στον εγκέφαλο. Η ενεργοποιημένη μικρογλοία παράγει μια ποικιλία προ-φλεγμονωδών μορίων όπως κυττοκίνες και χημειοκίνες, ROS και πρωτεΐνες του συμπληρώματος. Η μικρογλοία παίζει σημαντικό ρόλο στην κυτταρική απόκριση έναντι παθολογικών καταστάσεων, όπως είναι η συσσώρευση του Αβ σε νευριτικές πλάκες. Το Αβ μπορεί να προσελκύσει και να ενεργοποιήσει τη μικρογλοία, οδηγώντας σε μια συσσώρευση της γύρω από τα σημεία εναπόθεσης Αβ στον εγκέφαλο. Η μικρογλοία επίσης εκφράζει υποδοχείς τύπου scavenger που ρυθμίζουν την προσκόλληση της μικρογλοίας σε επιφάνειες καλυμμένες με ινίδια Αβ. Αυτό το γεγονός οδηγεί στην ακινητοποίηση των κυττάρων και στην παραγωγή ROS. Αυτή η παραγωγή ROS μπορεί να οδηγήσει σε νευρωνική καταστροφή. Η μικρογλοία φαίνεται να ενεργοποιείται γενικά στην παρουσία παθογόνων, τραυματισμένων κυττάρων ή κυτταρικών θραυσμάτων. Η ενεργοποίηση της όμως από το Αβ δείχνει να προκαλεί μια αυξημένη έκφραση πρωτεϊνών επιφανείας του συμπλέγματος MHC II, μαζί με αυξημένη έκκριση των προ-φλεγμονωδών κυττοκινών IL-1β, IL-6 και TNF-α, των χημειοκινών IL-8 και άλλων. Τα μόρια αυτά ενισχύουν την ικανότητα των περιφερικών μονοκυττάρων να συρρέουν στον εγκέφαλο δια μέσου του αιματοεγκεφαλικού φραγμού.

Η μικρογλοία ενεργοποιείται επίσης μέσω του υποδοχέα RAGE (receptor for advanced glycation) και του M-CSF (macrophage colony-stimulating factor). Οι υποδοχείς αυτοί μπορούν να προσδένονται με το Αβ και να εκκινούν σηματοδοτικά μονοπάτια κυτταρικής ενεργοποίησης. Συγκεκριμένα, το M-CSF μπορεί να οδηγήσει στις χημειοτακτικές κινήσεις της μικρογλοίας, στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, στην αυξημένη έκφραση υποδοχέων τύπου scavenger και στην αυξημένη κυτταρική

επιβίωση. Παρότι σε γενικές γραμμές η μικρογλοία έχει νευροπροστατευτικό ρόλο, η συνεχής ενεργοποίησή της μπορεί να εκκινήσει νευροτοξικούς μηχανισμούς και να οδηγήσει σε φλεγμονή. Για τον λόγο αυτό, η συνεχής ενεργοποίηση της μικρογλοίας μπορεί να αποτελεί τη σκανδάλη για την πρόοδο της παθολογίας της νόσου Alzheimer (Lee, 2010).

Η μικρογλοία μπορεί επίσης να προκαλέσει άμεση καταστροφή στους νευρώνες απελευθερώνοντας προϊόντα υψηλής τοξικότητας όπως είναι ROS, μονοξειδίο του αζώτου, πρωτεολυτικά ένζυμα, παράγοντες του συμπληρώματος και άλλα. Όλα αυτά τα φλεγμονώδη μόρια με τη σειρά τους ενισχύουν την παραγωγή της APP, καθώς και την αμυλοειδική επεξεργασία της προς παραγωγή του Aβ42. Αυτές οι συνθήκες επίσης αποτρέπουν την παραγωγή του διαλυτού θραύσματος της APP που έχει νευροπροστατευτική δράση. Το Aβ που παράγεται με τη σειρά του ενισχύει την έκφραση των προ-φλεγμονωδών κυττοκινών από τα κύτταρα της γλοίας, σε έναν ατέρμονο κύκλο (Rubio-Perez, 2012).



Εικόνα 8: Κύτταρα μικρογλοίας στον εγκεφαλικό φλοιό. Η φωτογραφία έχει παρθεί με τη χρήση συνεστιακού μικροσκοπίου σάρωσης (Long-Jun Wu, photo posted in ResearchGate).

B2. Αστροκύτταρα

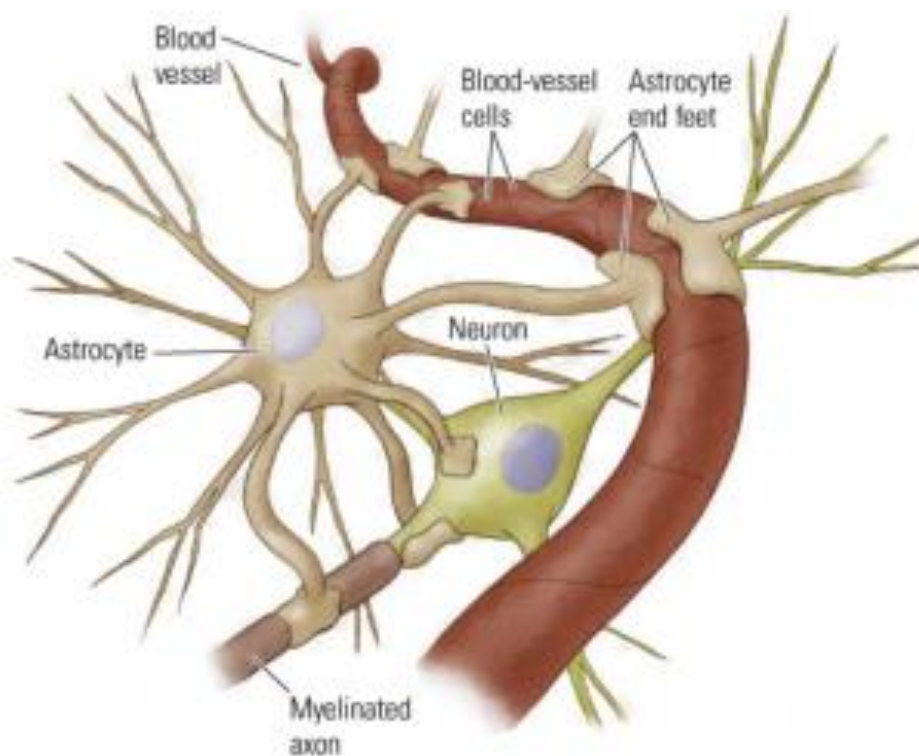
Τα αστροκύτταρα είναι χαρακτηριστικά κύτταρα γλοίας με σχήμα αστεριού. Βρίσκονται στον εγκέφαλο και στον νωτιαίο μυελό και αποτελούν τον μεγαλύτερο κυτταρικό πληθυσμό του εγκεφάλου. Τα αστροκύτταρα έχουν ποικίλες λειτουργίες συμπεριλαμβανομένης της βιοχημικής υποστήριξης των ενδοθηλιακών κυττάρων του αιματοεγκεφαλικού φραγμού, της διατήρησης της εξωκυττάριας ισορροπίας ιόντων καθώς και της ίασης του εγκεφάλου και του νωτιαίου μυελού ύστερα από κάποιο τραύμα. Μεταξύ άλλων, τα αστροκύτταρα ελέγχουν την τοπική συγκέντρωση των ιόντων και την ομοιοστασία του pH και μεταφέρουν γλυκόζη και παρέχουν μεταβολικά υποστρώματα στους νευρώνες. Επίσης απομακρύνουν μεταβολικά απόβλητα και νευροδιαβιβαστές (Li, 2011), φροντίζουν για την ανακατασκευή των συνάψεων και ρυθμίζουν τις καταστάσεις οξειδωτικού στρες (Lee 2010, Wys-Corray et al 2012).

Τα αστροκύτταρα ενεργοποιούνται για να διορθώσουν τραύματα ή φλεγμονώδεις βλάβες (Li et al, 2011). Συγκεντρώνονται γύρω από την περιοχή της βλάβης και επιδεικνύουν την ονομαζόμενη αστρογλοίωση (ή αστροκυττάρωση). Τα ενεργοποιημένα αστροκύτταρα γίνονται υπερτροφικά και υπερπλαστικά και εκδηλώνουν ανώμαλες λειτουργίες (Li et al, 2011). Η αστρογλοίωση είναι μια παθολογική εκδήλωση που εμφανίζεται νωρίς στη νόσο Alzheimer και παρατηρείται κυρίως γύρω από τις εναποθέσεις του Αβ στον εγκέφαλο (Weiner and Frenkel, 2006). Τα αστροκύτταρα στρατολογούνται στις πλάκες και συμμετέχουν στην εκκαθάριση του Αβ, με τρόπο εξαρτώμενο από την έκφραση της ApoE. Αστροκύτταρα ApoE -/- ποντικών δεν ενδοκυττάρωνουν Αβ με τον ίδιο βαθμό με τα αστροκύτταρα αγρίου τύπου (Dolev and Michaelson, 2004).

Παρομοίως με τη μικρογλοία, τα αστροκύτταρα επίσης παράγουν διάφορα προφλεγμονώδη μόρια όπως ιντερλευκίνες, προσταγλαδίνες, λευκοτριένια, θρομβοξάνες, παράγοντες του συμπληρώματος, πρωτεάσες και αναστολείς πρωτεασών. Η παρουσία των γεροντικών πλακών είναι ένας γνωστός τρόπος ενεργοποίησης των αστροκυττάρων, τα οποία φαίνεται να συσσωρεύονται γύρω από αυτές. Μελέτες δείχνουν ότι τα αστροκύτταρα μπορούν να προκαλέσουν τον καταβολισμό του Αβ καθώς και να το συσσωρεύσουν μέσα τους. Τα αστροκύτταρα που έχουν επιβαρυνθεί από το Αβ μπορούν να υποστούν λύση, γεγονός που οδηγεί στον σχηματισμό αμυλοειδών πλακών. Επιπλέον, οι χημειοκίνες, οι κυττοκίνες και οι

ελεύθερες ρίζες οξυγόνου που απελευθερώνονται από τα αστροκύτταρα, μπορεί να οδηγήσουν σε ζημιά των νευρικών κυττάρων. Οι χημειοκίνες που παράγονται από τα αστροκύτταρα προσελκύουν κύτταρα μικρογλοίας, τα οποία με τη σειρά τους παράγουν επιπλέον προ-φλεγμονώδη προϊόντα, αυξάνοντας έτσι ακόμη περισσότερο τη ζημιά στους νευρώνες και ενισχύοντας τους παθογενετικούς μηχανισμούς του Alzheimer (Lee, 2010)

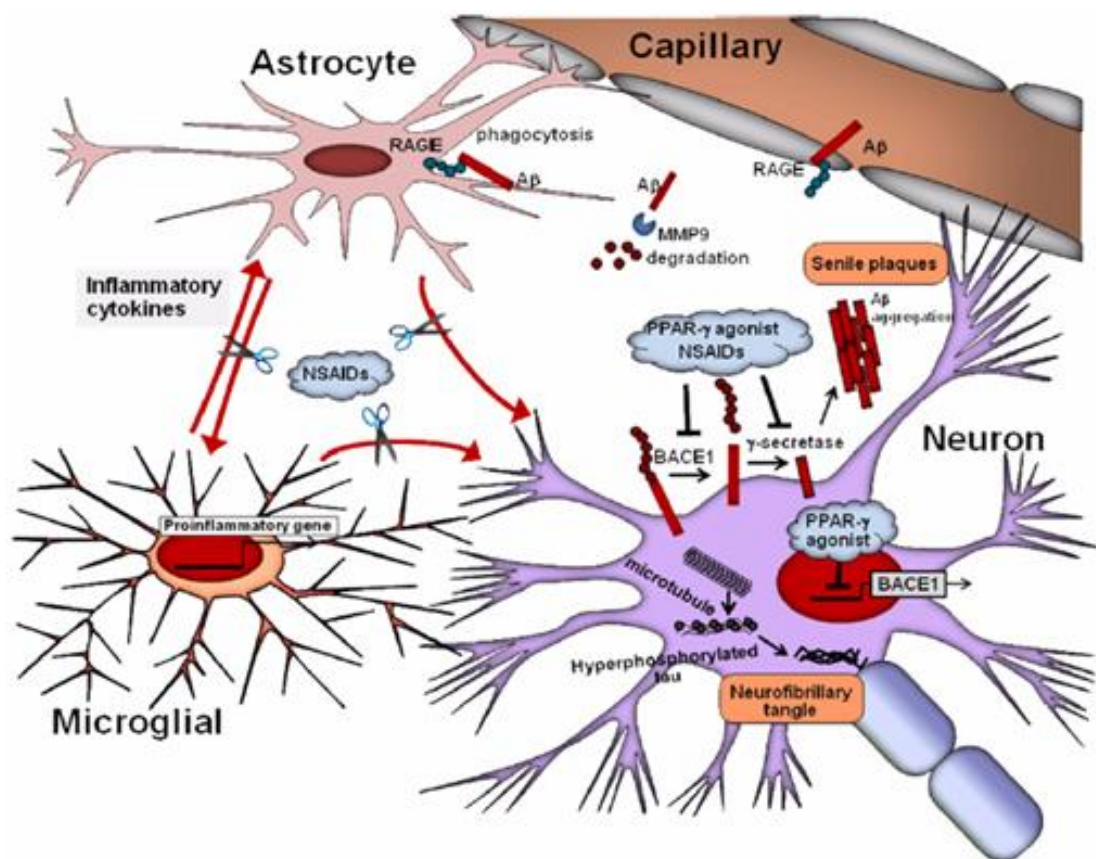
Τα αστροκύτταρα από μόνα τους μπορούν να παίζουν ρόλο στην εκκαθάριση και στον καταβολισμό του Αβ μέσω μιας διαδικασίας που βασίζεται στην απολιποπρωτεΐνη Ε, καθώς επίσης προσφέρουν και τροφική υποστήριξη στους νευρώνες δημιουργώντας έναν προστατευτικό φραγμό μεταξύ των εναποθέσεων Αβ και των νευρώνων (Lee, 2010). Σε αντίθεση με την ικανότητα των αστροκυττάρων να απομακρύνουν το Αβ, έχει προταθεί ότι μπορούν να δρουν και ως πηγή του β-αμυλοειδούς πεπτιδίου, επειδή υπερεκφράζουν την BACE1 ως απόκριση σε χρόνια στρες, δημιουργώντας έτσι έναν φαύλο κύκλο στην ανοσο-νευροπαθολογία της νόσου Alzheimer (Heneka, 2007).



Εικόνα 9: Σχηματική αναπαράσταση ενός αστροκυττάρου και της αλληλεπίδρασής του με ένα νευρικό κύτταρο και ένα αιμοφόρο αγγείο του εγκεφάλου (<http://jonlieffmd.com/blog/astrocytes-control-synapse-function>).

B3. Νευρικά κύτταρα

Παραδοσιακά εθεωρείτο ότι οι νευρώνες ήταν παθητικοί θεατές όσον αφορά τη νευροφλεγμονή και ότι δεν παίζουν με κάποιο τρόπο ρόλο στην πρόοδο της παθολογίας της νόσου Alzheimer. Παρ' όλα αυτά φαίνεται ότι και οι ίδιοι οι νευρώνες συνεισφέρουν στην παραγωγή των νευροφλεγμονωδών προϊόντων στη νόσο. Οι νευρώνες παράγουν διάφορες χημειοκίνες και κυττοκίνες όπως IL-1, IL-6 και TNF- α . Επιπλέον οι νευρώνες φαίνεται να αποτελούν μια πηγή πρωτεϊνών του συμπληρώματος, πεντραζινών, αμυλοειδούς P και άλλων. Προ-φλεγμονώδη μόρια που εκκρίνονται από τους νευρώνες φαίνεται να πυροδοτούν περαιτέρω τη φλεγμονή του νευρικού συστήματος και να οδηγούν σε επιπλέον ζημιά αυτού (Rubio-Perez, 2012).



Εικόνα 10: Σχηματική αναπαράσταση της επαγόμενης από τη φλεγμονή νευρωνικής απώλειας στη νόσο Alzheimer και πιθανά ευεργετικά αποτελέσματα των NSAIDs και των PPAR- γ αγωνιστών. Το A β , καθώς και οι χημειοκίνες που απελευθερώνονται από τα αστροκύτταρα, μπορούν να προσελκύσουν και να ενεργοποιήσουν τη μικρογλοία. Η ενεργοποιημένη μικρογλοία παράγει και εκκρίνει μια πλειάδα προ-φλεγμονωδών μορίων συμπεριλαμβανομένων κυτταροκινών και πρωτεϊνών της οξείας φάσης, συνεισφέροντας έτσι επιπλέον στον νευρωνικό τραυματισμό. Είναι πιθανό οι NSAIDs και οι PPAR- γ αγωνιστές να μπορούν να αποτρέψουν την απελευθέρωση φλεγμονωδών κυτταροκινών από τα αστροκύτταρα και τη μικρογλοία και να μειώσουν τη δραστηριότητα και τα πρωτεϊνικά επίπεδα των ενζύμων (BACE1, γ -εκκριτάση) που είναι απαραίτητα για την παραγωγή του A β 42 (Lee, 2010).

Γ. Ο ρόλος του αιματοεγκεφαλικού φραγμού και των περιφερικών κυττάρων του ανοσοποιητικού στη νόσο Alzheimer

Γ1. Διήθηση του εγκεφάλου από μονοκύτταρα της περιφέρειας

Είναι κοινώς αποδεκτό ότι η ενδογενής μικρογλοία του εγκεφάλου είναι αυτή που μεσολαβεί για την τοπική φλεγμονώδη απόκριση ύστερα από την έκθεσή της στο ινιδιογενές Αβ και στις αμυλοειδικές εναποθέσεις του στον εγκέφαλο ασθενών με AD. Ωστόσο, πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι ο εγκέφαλος διηθείται από μονοκύτταρα ή μακροφάγα της περιφέρειας (Rezai-Zadeh et al, 2009). Τα συμπεράσματα των μελετών αυτών τυγχάνουν αμφισβήτησης εξαιτίας διαφωνιών σχετικών με την ταυτοποίηση των περιφερικών μονοκυττάρων, καθώς δεν έχουν βρεθεί ακόμη αξιόπιστοι ειδικοί δείκτες για τη διάκριση των περιφερικών κυττάρων από την ενδογενή μικρογλοία του εγκεφάλου (Cameron and Landreth 2010, Malm et al 2010).

Υπό φυσιολογικές συνθήκες, η διήθηση του εγκεφάλου από περιφερικά κύτταρα του αίματος εμποδίζεται από τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό, ο οποίος προστατεύει ανοσολογικά και απομονώνει τον εγκέφαλο. Ο αιματοεγκεφαλικός φραγμός είναι μια μοναδική και σύνθετη δομή η οποία περιλαμβάνει εξειδικευμένα αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα που βρίσκονται σε στενή σύνδεση. Αυτή η δομή σχηματίζει έναν αποτελεσματικό φραγμό ο οποίος εμποδίζει την είσοδο στον εγκέφαλο μεγάλων πρωτεϊνών και λεμφοκυττάρων (Archambault, 2005). Η διήθηση περιφερικών μονοκυττάρων στον υγιή εγκέφαλο είναι σπάνια και τα επίπεδά τους είναι πολύ χαμηλά (Cameron and Landreth, 2010). Αρκετές ασθένειες του ΚΝΣ, μολύνσεις και εγκεφαλικά τραύματα προκαλούν διαταραχή της ακεραιότητας του αιματοεγκεφαλικού φραγμού και αύξηση της διαπερατότητάς του. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την εισροή κυττάρων της περιφέρειας στον εγκέφαλο, όπως μονοκυττάρων, μακροφάγων και T-λεμφοκυττάρων (Cameron and Landreth 2010, Malm et al 2010). Τα κύτταρα αυτά μεταναστεύουν στον εγκέφαλο χημειοτακτικά, με την επίδραση κυτταροκινών και χημειοκινών (Cameron and Landreth, 2010). Οι Simard et al (2006) αναφέρουν ότι οι εγκέφαλοι ποντικών-μοντέλων της νόσου διηθούνται από σημαντικό αριθμό μακροφάγων που προέρχονται από τον μυελό των οστών. Αυτά τα κύτταρα βρέθηκε ότι μπορούν να φαγοκυτταρώσουν αποτελεσματικά και να απομακρύνουν τις αμυλοειδείς πλάκες από τον εγκέφαλο. Τα δεδομένα των μελετών αυτών παρέχουν ενδείξεις ότι η συμπεριφορά των προερχόμενων από τον μυελό των οστών μονοκυττάρων είναι διαφορετική από αυτήν της ενδογενούς

μικρογλοίας, ενώ παράλληλα ανοίγονται προοπτικές για θεραπευτικές προσεγγίσεις της νόσου Alzheimer.

Εάν λοιπόν τα περιφερικά μονοκύτταρα είναι αποτελεσματικά στην εκκαθάριση του Αβ, γιατί δεν είναι ικανά να εμποδίσουν τη συσσώρευση αυτού στους εγκεφάλους ασθενών με AD; Οι Fiala et al συνέκριναν μονοκύτταρα του αίματος υγιών ατόμων με αυτά ασθενών με AD και βρήκαν ότι τα μονοκύτταρα των υγιών ατόμων διαφοροποιούνται σε μακροφάγα, φαγοκυτταρώνουν και αποικοδομούν το Αβ ή ακόμη και το εξάγουν από τον εγκέφαλο στην κυκλοφορία του αίματος. Από την άλλη, σημαντικός αριθμός μονοκυττάρων AD ασθενών είναι ανεπαρκή ως προς την ικανότητά τους να διαφοροποιούνται και έχουν χαμηλότερη έκφραση επιφανειακών πρωτεϊνών που εμπλέκονται στην φαγοκυττάρωση του Αβ καθώς επίσης αποπίπτουν στα αγγεία μέσω της ενεργοποίησης κασπασών (Zaghi et al, 2009). Υποθέτοντας λοιπόν ότι τα μονοκύτταρα του αίματος όντως διηθούν τον εγκέφαλο, τα παραπάνω υποστηρίζουν ότι η αιτία συσσώρευσης του Αβ στον εγκέφαλο των AD ασθενών είναι η δυσλειτουργία των κυττάρων αυτών (Malm et al 2,10).

Γ2. Ο ρόλος των T-λεμφοκυττάρων στη νόσο Alzheimer

Κάτω από συνθήκες φλεγμονής, ο αιματοεγκεφαλικός φραγμός υφίσταται σημαντικές δομικές αλλαγές με αποτέλεσμα να αυξάνεται η διαπερατότητά του (Archambault, 2005). Ως αποτέλεσμα αυτού, τα T-λεμφοκύτταρα έχουν τη δυνατότητα να εισέρχονται στον εγκέφαλο. Λόγω της αυξημένης καταστροφής του αιματοεγκεφαλικού φραγμού ή ως απόκριση στα φλεγμονώδη μόρια στον εγκέφαλο, τα T-κύτταρα εισέρχονται με μεγαλύτερη συχνότητα στον εγκέφαλο ενός ασθενή με νόσο Alzheimer σε σχέση με τον εγκέφαλο ενός υγιούς ατόμου. Σε διάφορες μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί, έχει παρατηρηθεί ότι ο αριθμός των T-λεμφοκυττάρων είναι μεγαλύτερος σε ασθενείς με Alzheimer σε σχέση με υγιείς ανθρώπους ή ακόμη και με άτομα που πάσχουν από άλλες νευροεκφυλιστικές νόσους (Town et al, 2005). Επίσης θεωρείται ότι τα επίπεδά τους στον εγκέφαλο ασθενών με νόσο Alzheimer είναι χαμηλά συγκριτικά με άλλες νευροεκφυλιστικές νόσους, όπως είναι η σκλήρυνση κατά πλάκας (Town et al, 2005).

Θεωρείται επίσης ότι τα T-λεμφοκύτταρα της περιφέρειας μπορούν να επιδράσουν στη νόσο χωρίς να εισέλθουν στον εγκέφαλο. Έχουν προταθεί δυο μηχανισμοί για αυτό: Το πρώτο σενάριο υποστηρίζει ότι τα T-κύτταρα δρουν μέσω των κυττοκινών

που παράγουν, οι οποίες εισέρχονται στον εγκέφαλο και ενεργοποιούν τη μικρογλοία και τα αστροκύτταρα. Το δεύτερο σενάριο προτείνει ότι τα ενεργοποιημένα T-λεμφοκύτταρα της περιφέρειας ενεργοποιούν τα κύτταρα της μυελοειδούς σειράς, όπως είναι τα μονοκύτταρα/μακροφάγα ή δενδριτικά, να εκκρίνουν προφλεγμονώδεις κυττοκίνες (Town et al, 2005).

Πρόσφατα αποδείχθηκε και η παρουσία Αβ ειδικών T-λεμφοκυττάρων. Παρότι η παραγωγή Αβ-αυτοαντισωμάτων και γενικότερα η παραγωγή αντισωμάτων είναι μια δραστηριότητα των B-λεμφοκυττάρων, η απόκριση υποστηρίζεται και από τα ενεργοποιημένα T-λεμφοκύτταρα (Fisher, 2010). Μελέτες έχουν δείξει ότι ο αριθμός των κυκλοφορούντων Αβ-αυτοαντισωμάτων ήταν τετραπλάσιος στους ασθενείς που έπασχαν από κάποια μορφή άνοιας σε σχέση με τους υγιείς ανθρώπους (Town, 2005). Από πειράματα που έχουν πραγματοποιηθεί σε ποντίκια υποστηρίζεται ότι τα αντισώματα αυτά μπορούν να εισέλθουν στο κεντρικό νευρικό σύστημα και να περιορίσουν την παθολογία σε πειραματικά μοντέλα ποντικών που εμφανίζουν τη νόσο Alzheimer (Bard, 2000).

6. Το γονίδιο IKAROS

A. Ρόλος και έκφραση

Το γονίδιο **Ikaros**, το οποίο κωδικοποιεί μια οικογένεια αιμοποιητικών πρωτεϊνών δακτύλου ψευδαργύρου, έχει περιγραφεί ως ο κύριος ρυθμιστής της διαφοροποίησης των λεμφοκυττάρων προς την B ή την T σειρά. Τα πρόδρομα T-λεμφοκύτταρα προέρχονται από τον μυελό των οστών των ενηλίκων και από το εμβρυικό ήπαρ και μεταναστεύουν στον θύμο αδένα όπου και ωριμάζουν ή υφίστανται απόπτωση. Η κατεύθυνση των κυττάρων προς B ή T λεμφοκύτταρα είναι από τα πρώτα στάδια ωρίμανσης των πρόδρομων κυττάρων που συμβαίνει έξω από τον θύμο αδένα. Θεωρείται ότι η πρωτεΐνη Ikaros είναι ένα από τα ρυθμιστικά στοιχεία εκείνα που παίζουν ρόλο στη δέσμευση των πρόδρομων κυττάρων στη B ή στην T σειρά (Georgopoulos, 1992). Αξίζει επίσης να σημειωθεί ότι το γονίδιο αυτό συμβάλλει, με άγνωστο ακόμη τρόπο, στην ωρίμανση και των φυσικών φονικών κυττάρων (NK cells).

Η πρωτεΐνη Ikaros αποτελείται από 431 αμινοξέα και από CX2CX12HX3H δακτύλους ψευδαργύρου, οργανωμένους σε δύο συμπλέγματα. Το πρώτο σύμπλεγμα εντοπίζεται 59 αμινοξέα καθοδικά της εναρκτήριου μεθειονίνης, ενώ το δεύτερο σύμπλεγμα βρίσκεται στην καρβοξυτελική περιοχή, 245 αμινοξέα καθοδικά του πρώτου (Georgopoulos, 1992).

Το γονίδιο Ikaros αποτελεί τον κύριο υποψήφιο ως τον σημαντικότερο ρυθμιστή της διαφοροποίησης των λεμφοκυττάρων. Αρχικά φάνηκε η ικανότητα της πρωτεΐνης να προσδένεται στον ενισχυτή του γονιδίου CD36 και να το ενεργοποιεί, ένα γονίδιο που αποτελεί πρώιμο μάρτυρα διαφοροποίησης των T-λεμφοκυττάρων (Georgopoulos, 1994). Κάτι αντίστοιχο συμβαίνει και στην περίπτωση των B-λεμφοκυττάρων, καθώς το γονίδιο αυτό φαίνεται να αποτελεί ρυθμιστή ποικίλων ενισχυτών που συμμετέχουν στην ωρίμανση των B-λεμφοκυττάρων (Georgopoulos, 2017).

Το πρώτο αιμοποιητικό κέντρο στα έμβρυα ποντικών είναι ο λεκιθικός σάκος, ο οποίος σχηματίζεται την 7η μέρα της γαστριδίωσης και σε αυτή τη φάση κατοικείται από πρώιμους ερυθροβλάστες. Στη φάση αυτή δεν εντοπίζεται mRNA του γονιδίου Ikaros. Το γονίδιο Ikaros εκφράζεται για πρώτη φορά στον λεκιθικό σάκο κατά την 8η μέρα της εμβρυικής ζωής. Στη συνέχεια εκφράζεται στο εμβρυικό ήπαρ κατά την ημέρα 9,5 με 10,5. Στα σημεία αυτά, το γονίδιο εκφράζεται σε πρόδρομα ερυθροειδή και μυελοειδή κύτταρα, πολύ πριν από την εμφάνιση των πρώτων εμβρυικών λεμφοκυττάρων. Οι μεγάλες ποσότητες Ikaros mRNA που εντοπίζονται στο πρώιμο εμβρυικό ήπαρ αρχίζουν και μειώνονται ύστερα από την ημέρα 14, παρόλο που το όργανο αυτό συνεχίζει να είναι το κέντρο ερυθροποίησης και παραγωγής B-λεμφοκυττάρων και παραμένει ενεργό ακόμη και μετά τη γέννηση. Η μείωση έκφρασης του γονιδίου Ikaros συσχετίζεται με την αλλαγή των αιμοποιητικών πρόδρομων κυττάρων σε αυτό το όργανο από πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα σε προγονικά ερυθροκύτταρα. (Georgopoulos 1992, 1997).

Παράλληλα αρχίζει η υψηλή έκφραση του γονιδίου στον αναπτυσσόμενο θύμο αδένα. Στην αρχή της ημέρας 12, όπου τα λεμφοποιητικά βλαστοκύτταρα αρχίζουν και αποικίζουν τον θύμο, αρχίζει και παρατηρείται Ikaros mRNA στο όργανο αυτό. Πιο συγκεκριμένα εντοπίζεται ένα σύνολο κυττάρων στο κέντρο του αδένα που εκφράζουν υψηλές ποσότητες Ikaros mRNA και περικυκλώνονται από περιφερικά κύτταρα που δεν εκφράζουν. Η έκφραση του γονιδίου είναι σημαντική στον θύμο

αδένα κατά την ημέρα 16 και από την ημέρα 19, το όργανο αυτό είναι το κύριο σημείο έκφρασης του Ikaros mRNA στο αναπτυσσόμενο έμβρυο (Georgopoulos, 1992).

Στα ενήλικα ποντίκια, το γονίδιο Ikaros εκφράζεται έντονα στα T κύτταρα και στα πρόδρομά τους. Στο ενήλικο ποντίκι, mRNA του γονιδίου Ikaros περιορίζεται στον θύμο αδένα και τον σπλήνα, με τριπλάσια έκφραση στον θύμο συγκριτικά με τον σπλήνα. Παρασκευάσματα θύμου αδένα στα οποία έχουν απομακρυνθεί τα T λεμφοκύτταρα εκφράζουν πολύ λιγότερο mRNA του γονιδίου Ikaros σε σχέση με τα φυσιολογικά θυμοκύτταρα. Αυτό δείχνει την ειδική έκφραση του γονιδίου στα θυμοκύτταρα και τον ρόλο του στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης των T κυττάρων και στην ωρίμανσή τους (Georgopoulos, 1992). Επιπλέον εκφράζεται έντονα στα B-λεμφοκύτταρα και στα φυσικά φονικά κύτταρα (Georgopoulos 1997, 1992).

Συνοψίζοντας, το γονίδιο Ikaros είναι απαραίτητο για την παραγωγή ώριμων και λειτουργικών T και B-λεμφοκυττάρων και NK κυττάρων, δεν παίζει ρόλο όμως στην παραγωγή των ολοδύναμων αιμοποιητικών βλαστικών κυττάρων, των ερυθροκυττάρων, μυελοκυττάρων, μονοκυττάρων, δενδριτικών κυττάρων, μεγακαρυοκυττάρων και αιμοπεταλίων (Georgopoulos, 1994).

B. Ισομορφές

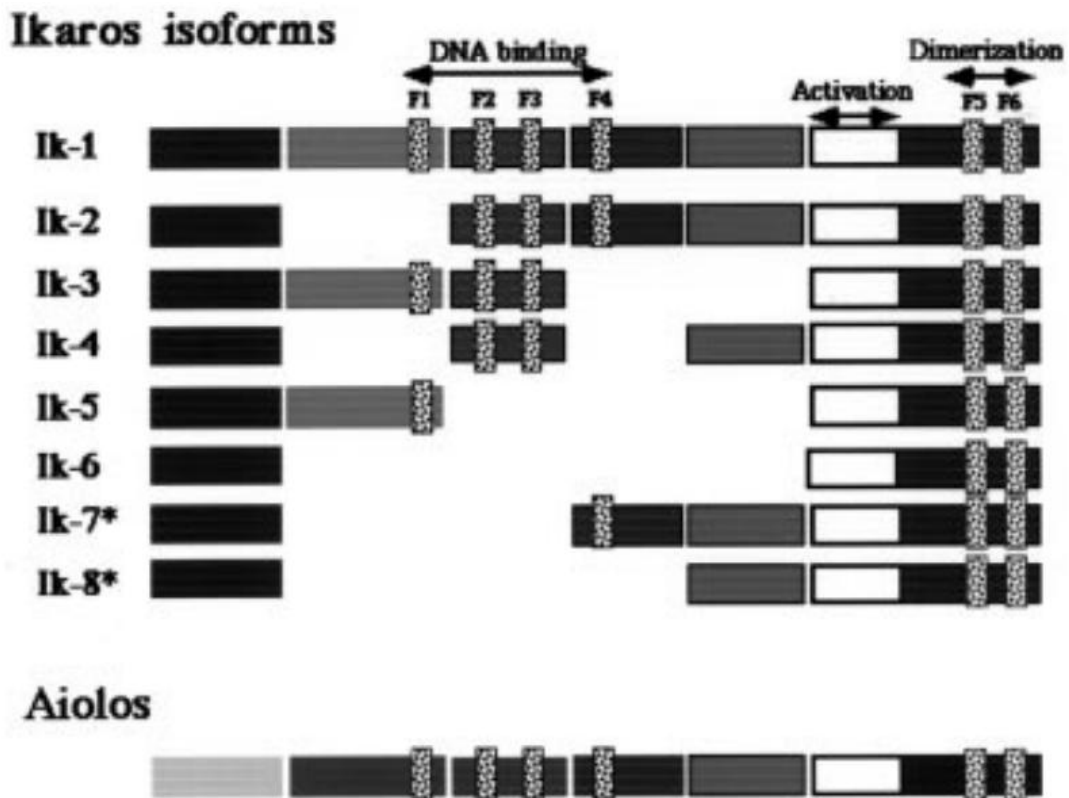
Το Ikaros (Ikzf1) αποτελεί το ιδρυτικό μέλος μιας οικογένειας πρωτεϊνών που περιλαμβάνει τα γονίδια Aiolos (Ikzf3), Helios (Ikzf2) και Dedalos (Ikzf4). Τα 4 αυτά γονίδια είναι υψηλά συντηρημένα και φέρουν μια αμινοτελική περιοχή με 4 δακτύλους ψευδαργύρου. Οι 2 μεσαίοι δάκτυλοι (F2 και F3) είναι αυτοί που αλληλεπιδρούν ειδικά με το DNA και δίνουν στις πρωτεΐνες το ρόλο τους ως μεταγραφικοί παράγοντες, ενώ οι εξωτερικοί δάκτυλοι σχετίζονται με την ενεργότητα της πρωτεΐνης. Οι δάκτυλοι ψευδαργύρου της καρβοξυτελικής περιοχής σχετίζονται με την ικανότητα των πρωτεϊνών να αλληλεπιδρούν μεταξύ τους ή με άλλες πρωτεΐνες (Georgopoulos, 2017).

Όλες οι ισομορφές της πρωτεΐνης Ikaros (που προέρχονται από τη διαδικασία του εναλλακτικού ματίσματος του pre-mRNA) φέρουν δύο κοινούς δακτύλους

ψευδαργύρου στην καρβοξυτελική περιοχή, ενώ διαφέρουν στον αριθμό των δακτύλων της αμινοτελικής περιοχής, όπου μπορεί να φέρουν από κανέναν έως και 4 δακτύλους. Τρεις αμινοτελικοί δάκτυλοι είναι απαραίτητοι για την ισχυρή δέσμευση στο DNA σε αλληλουχίες GGGA. Οι ισομορφές Ik-1, Ik-2 και Ik-3, με 4, 3 και 3 δακτύλους ψευδαργύρου αντίστοιχα, έχουν την ικανότητα ειδικής και ισχυρής πρόσδεσης στο DNA. Η ισομορφή Ik-4, με 2 δακτύλους, προσδένεται σε διαδοχικές θέσεις αναγνώρισης που μοιράζονται αυτήν την αλληλουχία. Οι ισομορφές με έναν (Ik-5, Ik-7) ή κανέναν δάκτυλο ψευδαργύρου (Ik-6, Ik-8) δεν μπορούν να αλληλεπιδράσουν ισχυρά με το DNA (Georgopoulos, 1997). Επιπρόσθετα, οι ισομορφές της πρωτεΐνης Ikaros, διαφέρουν στην ικανότητά τους να ενεργοποιούν τη μεταγραφή, καθώς κυμαίνονται από ισχυρούς ενεργοποιητές της μεταγραφής έως και καταστολείς (Georgopoulos, 1994).

Οι διάφορες ισομορφές μπορούν να ελέγχουν πολλαπλά επίπεδα γονιδιακής έκφρασης κατά τα στάδια οντογένεσης των λεμφοκυττάρων τόσο στην εμβρυική όσο και στην ενήλικη ζωή. Ρυθμιστικές περιοχές γονιδίων με υψηλή ικανότητα πρόσδεσης είναι αυτές των γονιδίων των υποδοχέων CD3 των T-λεμφοκυττάρων, RAG-1, TdT, υποδοχέας της ιντερλευκίνης 2, ελαφριές και βαριές αλυσίδες των ανοσοσφαιρινών κ.α. Τα γονίδια αυτά παίζουν σημαντικό ρόλο στην ωρίμανση και διαφοροποίηση των T και B-λεμφοκυττάρων (Georgopoulos, 1994).

Οι δακτύλοι της καρβοξυτελικής περιοχής χρησιμοποιούνται για την πρόσδεση των ισομορφών μεταξύ τους προς δημιουργία ομο- ή ετεροδιμερών. Αυτή η αλληλεπίδραση μεταξύ των πρωτεϊνών είναι απαραίτητη για τη δραστηριότητά τους. Σχηματισμός ομο- ή ετεροδιμερών μεταξύ των ισομορφών που έχουν αμινοτελικές περιοχές ικανές να προσδένονται στο DNA (Ik-1, Ik-2, Ik-3), αυξάνει δραματικά την ικανότητα πρόσδεσής τους στο DNA και την ενεργοποίηση της μεταγραφής. Αντίθετα, ετεροδιμερή μεταξύ ισομορφών που δεν προσδένονται ισχυρά στο DNA με τα ισομερή Ik-1, Ik-2 και Ik-3, καθώς και ετεροδιμερή ή ομοδιμερή μεταξύ των ισομορφών που δεν προσδένονται ισχυρά στο DNA, δεν μπορούν να ενεργοποιήσουν τη μεταγραφή. Έτσι, ισομορφές της πρωτεΐνης Ikaros που έχουν λιγότερους από τρεις δακτύλους ψευδαργύρου επιδρούν αρνητικά στη μεταγραφική ενεργοποίηση με υπερέχοντα τρόπο (Georgopoulos, 1997).



Εικόνα 11: Σχηματική αναπαράσταση των ισομορφών του Ikaros και οι ομοιότητές τους με την πρωτεΐνη Aiolos. Οι επικράτειες δακτύλων ψευδαργύρου που σχετίζονται με την πρόσδεση στο DNA και οι περιοχές διμερισμού παρουσιάζονται με βέλη. Η τοποθέτηση μιας καλά διατηρημένης περιοχής ενεργοποίησης μεταξύ των γονιδίων Ikaros και Aiolos παρουσιάζεται ως ένα άσπρο κουτί (Georgoroulos, 1997).

7. Ο ποντικός *Mus musculus*

Τα εργαστηριακά ποντίκια παίζουν έναν ολοένα και σημαντικότερο ρόλο στη βιοιατρική έρευνα. Χάρη στην μεταλλαξιγένεση, τη διαγονιδιακή τεχνολογία και τις τεχνολογίες στόχευσης γονιδίων, ο αριθμός των διαθέσιμων ποντικών-μοντέλων συνεχώς αυξάνεται (Breeding strategies manual, The Jackson Laboratory).

Βασίλειο	Ζώα (<i>Animalia</i>)
Φύλο	Χορδωτά (<i>Chordata</i>)
Κλάση	Θηλαστικά (<i>Mammalia</i>)
Τάξη	Τρωκτικά (<i>Rodentia</i>)
Οικογένεια	Μυίδια (<i>Muridae</i>)
Γένος	Μυς (<i>Mus</i>)
Είδος	<i>M. musculus</i>

A. Πλεονεκτήματα του ποντικού ως εργαστηριακό μοντέλο

Τα ποντίκια έχουν πολλές ομοιότητες με τον άνθρωπο όσον αφορά την εσωτερική τους ανατομία, τη φυσιολογία και το γενετικό τους υλικό. Η ομοιότητα του γενετικού υλικού των ποντικών με αυτό των ανθρώπων, κάνει τα ποντίκια πολύτιμα εργαλεία για τη μελέτη των ανθρώπινων ασθενειών. Σε σχέση με πειραματικά μοντέλα που βρίσκονται πιο κοντά στον άνθρωπο (χιμπατζής), η συντήρηση μιας αποικίας ποντικών είναι εύκολη και φθηνή διαδικασία. Επιπλέον τα ποντίκια μπορούν να πολλαπλασιάζονται γρήγορα (21 μέρες κύηση) και συχνά, καθώς μπορούν να ξαναζευγαρώσουν την αμέσως επόμενη ημέρα από τη γέννα. Επιπλέον, ο αναπαραγωγικός κύκλος ζωής, η περίοδος δηλαδή από τη γέννηση ενός ποντικιού έως τη στιγμή που θα αποκτήσει αυτό τους δικούς του απογόνους, είναι μικρή, συνήθως γύρω στις 10 εβδομάδες (Genome campus).

Ένα επιπλέον χαρακτηριστικό είναι η μικρή διάρκεια ζωής. Ένα έτος ζωής ποντικού αντιστοιχεί σε 30 ανθρώπινα έτη. Αυτή η αντιστοιχία επιτρέπει στους ερευνητές να μπορούν εύκολα να μελετήσουν τα φαινόμενα της γήρανσης ή ασθένειες που σχετίζονται με τη γήρανση. Τα ποντίκια είναι επίσης πολύ χρήσιμα εργαλεία για τη μελέτη πολύπλοκων γενετικών ασθενειών, όπως είναι η αθηροσκλήρωση και η υπέρταση, καθώς πολλά από τα γονίδια που είναι υπεύθυνα για την εμφάνιση αυτών των ασθενειών είναι κοινά μεταξύ ανθρώπου και ποντικού. Έρευνα στα ποντίκια μπορεί να αποκαλύψει τους γενετικούς παράγοντες κίνδυνου για την εμφάνιση ασθενειών στον ανθρώπινο πληθυσμό (Genome campus).

Επιπρόσθετα, είναι σχετικά εύκολος ο χειρισμός και η τροποποίηση του γονιδιώματος του ποντικού, για παράδειγμα η προσθήκη ή η αφαίρεση ενός γονιδίου, ώστε να κατανοήσουμε το ρόλο του στον οργανισμό. Τα ποντίκια είναι σαφώς ανώτερα πειραματικά μοντέλα από τη μύγα ή το σκουλήκι για τη μελέτη των περίπλοκων βιολογικών συστημάτων που εντοπίζονται στους ανθρώπους, όπως είναι το ανοσοποιητικό, το ενδοκρινολογικό, το νευρικό, το καρδιαγγειακό και το σκελετικό σύστημα. Όπως και οι άνθρωποι, έτσι και τα ποντίκια, ακόμη και υπό φυσιολογικές συνθήκες, μπορούν να αναπτύξουν ασθένειες που προσβάλλουν τα συστήματα αυτά, όπως είναι ο καρκίνος και ο διαβήτης (Genome campus).

Σε σύγκριση με άλλα πειραματικά μοντέλα, όπως είναι η *Drosophila* και ο *C. elegans*, ο ποντικός *Mus musculus* έχει έναν αργό κύκλο ζωής. Η κύηση στους ποντικούς διαρκεί 21 μέρες και ο νεογέννητος ποντικός χρειάζεται 5-6 εβδομάδες για να φτάσει στην εφηβεία. Άρα ο πραγματικός κύκλος ζωής του είναι 8-9 εβδομάδες, υπερπενταπλάσιος χρόνος από αυτόν της *Drosophila*. Ωστόσο, ως πειραματικό μοντέλο, ο ποντικός έχει το πλεονέκτημα της θέσης του στο γενεαλογικό δέντρο. Είναι θηλαστικό και φέρει σε πολλά επίπεδα ομοιότητες με τον άνθρωπο. Κατά συνέπεια, αποτελεί το συνδετικό κρίκο μεταξύ των βασικών αρχών που ανακαλύπτονται σε κατώτερα όντα, όπως στους σκώληκες και τις μύγες, και των εφαρμογών της βιολογικής γνώσης για την αντιμετώπιση των ανθρώπινων ασθενειών (Μοριακή Βιολογία του Γονιδίου, Watson).

Ο αριθμός των χρωμοσωμάτων στον ποντικό είναι παρόμοιος με αυτόν του ανθρώπου. Στον ποντικό υπάρχουν 19 αυτοσωμικά χρωμοσώματα (22 στον άνθρωπο) και τα δύο φυλετικά χρωμοσώματα X και Y. Μεγάλο μέρος του γονιδιώματος του ποντικού είναι ομόλογο με αυτό του ανθρώπου και φέρει περί τα 25000 γονίδια (Μοριακή Βιολογία του Γονιδίου, Watson).

B. Κύκλος ζωής του ποντικού

Σε γενικές γραμμές, τα εργαστηριακά ποντίκια φτάνουν σε αναπαραγωγική ωριμότητα στην ηλικία των 5-8 εβδομάδων. Τα περισσότερα στελέχη το κάνουν αυτό στις 6 εβδομάδες. Τα θηλυκά ποντίκια μπορούν να γονιμοποιηθούν ακόμη και όταν βρίσκονται στην ηλικία των 23 ημερών. Αφού ζευγαρώσει ένα θηλυκό ποντίκι, μπορεί να γεννήσει ένα litter που θα αποτελείται από 3 έως και 12 μικρά, περίπου 21 ημέρες μετά τη γονιμοποίηση του ωαρίου (Breeding strategies manual, The Jackson Laboratory).

Γ. Εμβρυική ανάπτυξη

Οι αρχικές κυτταροδιαίρεσεις του εμβρύου του ποντικού είναι πολύ αργές, με μέση συχνότητα διαίρεσης μόλις μία ανά 12-24 ώρες. Η πρώτη εμφανής διαφοροποίηση κυτταρικών τύπων είναι ορατή στο στάδιο των 16 κυττάρων, που λέγεται μορίδιο (morula). Τα κύτταρα των εξωτερικών περιοχών σχηματίζουν ιστούς που δεν συμμετέχουν στο σώμα του εμβρύου αλλά αναπτύσσονται σε πλακούντα. Τα κύτταρα των εσωτερικών περιοχών παράγουν την εσωτερική κυτταρική μάζα (inner cell mass, ICM). Στο στάδιο των 64 κυττάρων, υπάρχουν μόνο 13 κύτταρα ICM, αλλά τελικά αυτά σχηματίζουν όλους τους ιστούς του ενήλικα ποντικού. Τα ICM αποτελούν

κύρια πηγή των εμβρυικών βλαστικών κυττάρων, τα οποία μπορούν να καλλιεργηθούν *in vitro* και να επαχθούν προς σχηματισμό οποιουδήποτε κυτταρικού τύπου με προσθήκη κατάλληλων αυξητικών παραγόντων (Μοριακή Βιολογία του Γονιδίου, Watson).

Στο στάδιο των 64 κυττάρων (3-4 ημέρες μετά τη γονιμοποίηση), το έμβρυο βρίσκεται στο στάδιο της βλαστοκύστης (blastocyst). Σε αυτό το στάδιο είναι έτοιμο για εμφύτευση. Αλληλεπιδράσεις μεταξύ της βλαστοκύστης και του τοιχώματος της μήτρας οδηγούν στο σχηματισμό του πλακούντα. Μετά το σχηματισμό του πλακούντα, το έμβρυο εισέρχεται στη φάση της γαστριδίωσης (gastrulation), κατά την οποία τα ICM κύτταρα σχηματίζουν τα τρία βλαστικά στρώματα: ενδόδερμα, μεσόδερμα και εξώδερμα. Σε σύντομο χρονικό διάστημα από τότε εμφανίζονται εγκέφαλος, νωτιαίος μυελός και εσωτερικά όργανα, όπως καρδιά και ήπαρ (Μοριακή Βιολογία του Γονιδίου, Watson). Στις 21 περίπου μέρες μετά την γονιμοποίηση του ωαρίου, τα ποντίκια γεννιούνται.

8. Διαγονιδιακά ποντίκια

A. Διαγονιδιακή τεχνολογία

Ο όρος διαγονιδιακά (transgenic) χρησιμοποιείται για να περιγράψει όλους τους τύπους γενετικής τροποποίησης ενός οργανισμού. Η κλασική μέθοδος δημιουργίας διαγονιδιακών ποντικών περιλαμβάνει την ένεση DNA στον προπυρήνα του γονιμοποιημένου ωαρίου. Πιο πρόσφατα άρχισε να χρησιμοποιείται ευρέως η τεχνολογία στόχευσης γονιδίου (knock-in). Με τη συγκεκριμένη μέθοδο είναι δυνατόν να τροποποιηθεί η αλληλουχία ενός γονιδίου ενώ το περιβάλλον του παραμένει τελείως φυσιολογικό. Επιπλέον, έχουν αναπτυχθεί και άλλες μέθοδοι, οι οποίες βασίζονται στη χρήση ειδικών ενζύμων, των ιντεγκρασών, και καταλύουν την ένθεση DNA σε μια προκαθορισμένη θέση του γονιδιώματος (Slack J., Βασικές Αρχές Βιολογίας Ανάπτυξης). Ενώ η διαγονιδιακή τεχνολογία μπορεί να εφαρμοστεί εν δυνάμει σε όλα τα έμβια συστήματα, στη βιολογική έρευνα εφαρμόζεται σε ορισμένους οργανισμούς-μοντέλα που είναι εύκολοι στην εργαστηριακή χρήση και στην τροποποίηση. Οι οργανισμοί αυτοί είναι ο *Xenopus*, η *Drosophila*, ο *C. elegans*, το *zebrafish* και κυρίως το ποντίκι. Τα ποντίκια, εκτός από το ότι είναι μικρά ζώα,

εύκολα στον χειρισμό και την αναπαραγωγή και με σχετικά μικρό κόστος διατήρησης, ανήκουν στα ανώτερα θηλαστικά, και συνεπώς έχουν περισσότερες ομοιότητες με τον άνθρωπο, άρα είναι και καταλληλότερα ως μοντέλα μελέτης των ανθρώπινων ασθενειών.

A1. Εισαγωγή ξένου DNA στο έμβρυο ποντικού με μικροένεση

Έχουν αναπτυχθεί μέθοδοι μικροενέσεων για αποδοτική έκφραση ανασυνδυασμένου DNA σε διαγονιδιακά στελέχη ποντικών. Το DNA ενίεται στον προπυρήνα του ωοκυττάρου (ο ένας προπυρήνας προέρχεται από το σπερματοζώαριο και λέγεται αρσενικός και ο άλλος προέρχεται από το ωάριο και λέγεται θηλυκός), και τα έμβρυα τοποθετούνται στον ωαγωγό ενός "ψευδοεγκύου" θηλυκού ποντικού που έχει διεγερθεί ορμονικά, για να μπορέσουν να εμφυτευθούν και να αναπτυχθούν. Το ενιέμενο DNA ενσωματώνεται στο γονιδίωμα σε τυχαίες θέσεις. Το χμαιρικό γονίδιο εισάγεται στα περισσότερα ή και σε όλα τα κύτταρα της εσωτερικής κυτταρικής μάζας που σχηματίζουν τους σωματικούς ιστούς και τη γραμμή γαμετοκυττάρων του ενήλικα ποντικού. Περί το 50% των διαγονιδιακών ποντικών που γεννιούνται με αυτή τη μέθοδο μικροένεσης εμφανίζουν μετασχηματισμό των γαμετικών κυττάρων τους, δηλαδή οι απόγονοί τους θα περιέχουν το ξένο, ανασυνδυασμένο DNA (Μοριακή Βιολογία του Γονιδίου, Watson).

Με τη χρήση της μεθόδου δημιουργίας διαγονιδιακών ποντικών με ένεση DNA, ένα σημαντικό ποσοστό των ποντικών που γεννιούνται είναι διαγονιδιακοί και μερικοί από αυτούς φέρουν το διαγονίδιο και στην αναπαραγωγική τους σειρά. Αυτοί είναι που χρησιμοποιούνται για την εδραίωση του διαγονιδιακού στελέχους. Η εισαγωγή του διαγονιδίου γίνεται σε μια τυχαία θέση του γονιδιώματος, στην οποία συνεντοπίζονται πολλαπλά διαδοχικά αντίγραφα του. Τα επίπεδα γονιδιακής έκφρασης ποικίλλουν, αλλά σε γενικές γραμμές παρατηρούνται υψηλότερα επίπεδα έκφρασης όταν ενίεται γραμμικό DNA χωρίς πλασμιδιακές αλληλουχίες, οι οποίες φαίνεται να παρεμποδίζουν την έκφραση των διαγονιδίων.

Μετά τη γέννησή τους, τα υποψήφια διαγονιδιακά ζώα ελέγχονται για την ύπαρξη του διαγονιδίου. Αυτό γίνεται είτε με γονιδιωματικό στύπωμα Southern (Southern blot) είτε με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction - PCR). Το γονιδιωματικό DNA που ελέγχεται μέσω αυτών των μεθόδων, απομονώνεται από ένα ακραίο τμήμα της ουράς του ποντικού. Τα ζώα που αποδεικνύεται ότι είναι

διαγονιδιακά χρησιμοποιούνται για την εδραίωση του διαγονιδιακού στελέχους. Τα διαγονιδιακά στελέχη είναι συνήθως ετερόζυγα ως προς το διαγονίδιο. Αν χρειάζεται όμως, μέσω των κατάλληλων διασταυρώσεων, μπορεί το διαγονίδιο να βρεθεί σε ομοζυγωτία (Slack J., Βασικές Αρχές Βιολογίας Ανάπτυξης).

Παρότι στα διαγονιδιακά ζώα που δημιουργούνται με ένεση στον προ-πυρήνα το διαγονίδιο δεν εντοπίζεται στην φυσιολογική του θέση, το χωροχρονικό πρότυπο έκφρασής του είναι φυσιολογικό, με την προϋπόθεση βέβαια ότι στο διαγονίδιο περιλαμβάνονται οι κατάλληλες ρυθμιστικές αλληλουχίες. Για τον λόγο αυτό προτιμώνται αντί για τα πλασμίδια τα τεχνητά χρωμοσώματα των βακτηρίων BAC (Bacterial Artificial Chromosomes - BAC). Σε αυτά είναι δυνατή η κλωνοποίηση πολύ μεγαλύτερων τμημάτων που ενδέχεται να περιέχουν ρυθμιστικές αλληλουχίες (Slack J., Βασικές Αρχές Βιολογίας Ανάπτυξης).

Για να μελετηθεί η λειτουργία των ρυθμιστικών αυτών αλληλουχιών, χρησιμοποιούνται συνήθως γονίδια αναφοράς (reporter genes), τα προϊόντα των οποίων εντοπίζονται εύκολα. Τα γονίδια αναφοράς που χρησιμοποιούνται συχνότερα είναι τα lacZ και Luciferase. Η ενεργότητα β-γαλακτοζιδάσης, η οποία κωδικοποιείται από το γονίδιο lacZ, εντοπίζεται εύκολα, καθώς παρουσία του ενζύμου το υπόστρωμα X-Gal υδρολύεται προς έγχρωμο αδιάλυτο προϊόν. Η λουσιφεράση είναι ένα ένζυμο που μετατρέπει ένα συγκεκριμένο υπόστρωμα, τη λουσιφερίνη, σε οξυλουσιφερίνη, με ταυτόχρονη εκπομπή φωτός (Slack J., Βασικές Αρχές Βιολογίας Ανάπτυξης). Ένα άλλο παράδειγμα ενός ευρέως γνωστού γονιδίου αναφοράς είναι η πράσινη φθορίζουσα χρωστική (GFP - Green Florescence Protein).

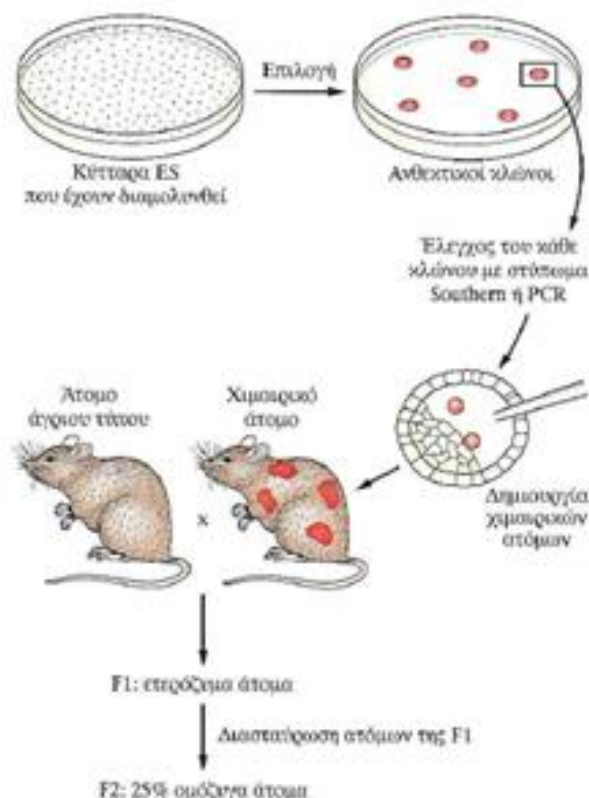
Η διαγονιδιακή τεχνολογία παρέχει επίσης τη δυνατότητα έκφρασης ενός γονιδίου υπό τον έλεγχο ρυθμιστικών στοιχείων ενός άλλου. Έτσι είναι δυνατόν να επιτευχθεί η έκτοπη έκφραση ενός γονιδίου ώστε να μελετηθούν οι επιπτώσεις της στην πορεία της ανάπτυξης και ζωής του οργανισμού (Slack J., Βασικές Αρχές Βιολογίας Ανάπτυξης).

A2. Στοχευμένη αδρανοποίηση γονιδίων

Η στοχευμένη αδρανοποίηση ενός γονιδίου πραγματοποιείται με την προσδοκία ότι ο φαινότυπος του εκμηδενιστικού μεταλλάγματος θα αποκαλύψει τη λειτουργία του. Για να επιτευχθεί η στοχευμένη αδρανοποίηση, απαιτείται η δημιουργία μιας κατασκευής στόχευσης που περιλαμβάνει μεγάλου μήκους τμήμα του γονιδιωματικού

DNA της υπό μελέτη περιοχής, στην οποία μια απαραίτητη για τη λειτουργία του γονιδίου περιοχή (πχ. ένα εξόνιο), αντικαθίσταται από ένα γονίδιο που παρέχει ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά, συνήθως το γονίδιο ανθεκτικότητας στη νεομυκίνη (neo). Η κατασκευή στόχευσης περιέχει επίσης ένα αντίγραφο ενός ιικού γονιδίου το οποίο κωδικοποιεί την κινάση της θυμιδίνης (TK). Αν η κατασκευή εισαχθεί σε μια τυχαία θέση, τότε στη θέση αυτή θα ενσωματωθούν τα γονίδια neo και TK. Αν όμως πραγματοποιηθεί σε ένα κύτταρο ομόλογος ανασυνδυασμός, τότε, καθώς στην κατασκευή στόχευσης το γονίδιο TK εντοπίζεται εκτός της περιοχής ομολογίας, η ένθεση θα περιλαμβάνει μόνο το γονίδιο neo. Η επιλογή των κυττάρων στα οποία έχει γίνει ομόλογος ανασυνδυασμός γίνεται σε θρεπτικό μέσο που περιέχει νεομυκίνη και γκανσικλοβίρη. Σε αυτές τις συνθήκες καλλιέργειας, κύτταρα στα οποία δεν έχει πραγματοποιηθεί ένθεση της κατασκευής στόχευσης είναι ευαίσθητα στη νεομυκίνη και πεθαίνουν. Επιπλέον, κύτταρα στα οποία έχει γίνει απλώς ένθεση της κατασκευής, χωρίς ομόλογο ανασυνδυασμό, φέρουν το γονίδιο TK και παρουσία γκανσικλοβίρης πεθαίνουν, επειδή η TK μετατρέπει το μόριο αυτό σε κυτταροτοξικό προϊόν. Η παραπάνω διαδικασία επιλογής είναι γνωστή ως θετική-αρνητική επιλογή. Ύστερα από τη διαδικασία επιλογής, τα κύτταρα αναπτύσσονται ως μεμονωμένοι κλώνοι και ελέγχονται με Southern blot ή PCR για να εξακριβωθεί εάν η κατασκευή στόχευσης έχει πράγματι εντεθεί στην προβλεπόμενη θέση. Οι κλώνοι που επιλέγονται ενίενται σε βλαστοκύστες και τα έμβρυα εμφυτεύονται σε θετές μητέρες που έχουν διεγερθεί ορμονικά. Το στέλεχος των εμβρύων-δεκτών επιλέγεται έτσι ώστε το χρώμα του τριχώματός του να διαφέρει από αυτό του στελέχους από το οποίο έχουν προέλθει τα εμβρυικά βλαστοκύτταρα. Έτσι, η παρουσία του χρώματος του στελέχους των εμβρυικών βλαστοκυττάρων στο τρίχωμα των ζώων που προκύπτουν, αποτελεί ένδειξη ότι τα άτομα αυτά είναι χμαιρικά. Για να διαπιστωθεί κατά πόσον η γαμετική σειρά αυτών των ποντικών είναι χμαιρική, πραγματοποιούνται κατάλληλες διασταυρώσεις και αναλύονται οι απόγονοί τους για την παρουσία του αδρανοποιημένου αλληλόμορφου. Αν μεταξύ των απογόνων υπάρχουν άτομα που φέρουν το αδρανοποιημένο αλληλόμορφο, αυτά διασταυρώνονται μεταξύ τους για να δώσουν ομόζυγους απογόνους (Slack J., Βασικές Αρχές Βιολογίας Ανάπτυξης).

Η ίδια μεθοδολογία χρησιμοποιείται και για τη στόχευση γονιδίου (knock-in). Αντί να αδρανοποιηθεί το ενδογενές γονίδιο, αντικαθίσταται από μια παραλλαγή του ή από ένα άλλο γονίδιο (Slack J., Βασικές Αρχές Βιολογίας Ανάπτυξης).



Εικόνα 12: Στοχευμένη αδρανοποίηση γονιδίων μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού σε εμβρυικά βλαστικά κύτταρα (Slack, Βασικές Αρχές Βιολογίας Ανάπτυξης, Τρίτη έκδοση).

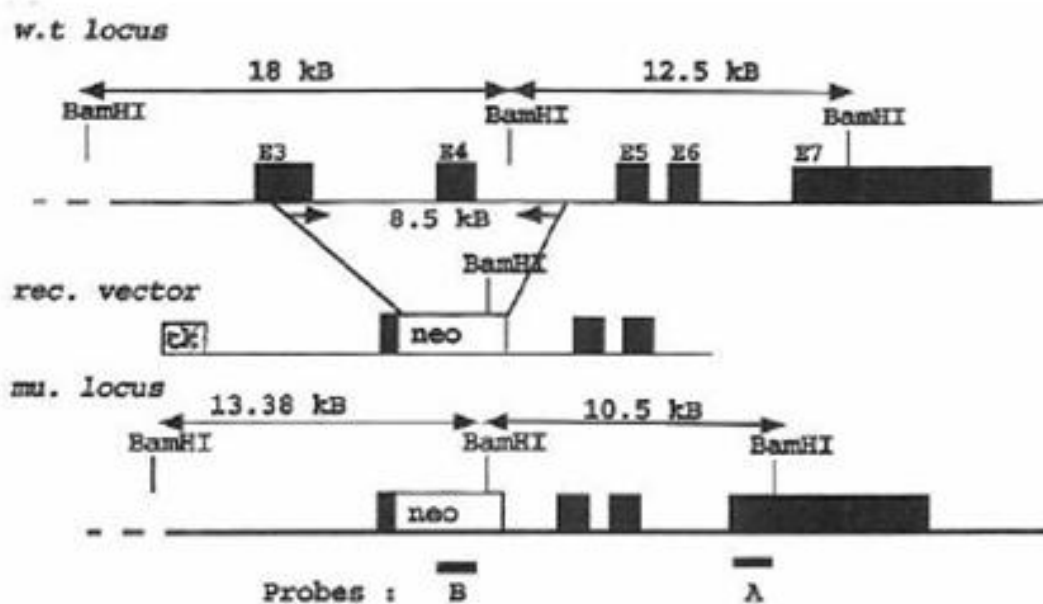
B. Διαγονιδιακά μοντέλα ποντικών

B1. Ikaros knock-out ποντίκια

Το γονίδιο Ikaros, όπως προαναφέρθηκε, συμμετέχει στη διαφοροποίηση, ανάπτυξη και εξειδίκευση των T- και B-λεμφοκυττάρων. Προκειμένου να διαπιστωθεί η ορθότητα αυτής της υπόθεσης, κατασκευάστηκε ένα διαγονιδιακό μοντέλο ποντικού στο οποίο έχει αδρανοποιηθεί το γονίδιο Ikaros. Η αδρανοποίηση του γονιδίου Ikaros προκύπτει με τη διαγραφή της αλληλουχίας που κωδικοποιεί την περιοχή υψηλής συγγένειας πρόσδεσης της πρωτεΐνης με το DNA, μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού στα εμβρυικά βλαστικά κύτταρα. Η μεταλλαγή αυτή στερεί από τις 4 ισομορφές της πρωτεΐνης Ikaros, την ικανότητα ειδικής πρόσδεσης στο DNA. Τα ποντίκια που είναι ομόζυγα για τη μετάλλαξη αυτή δεν διαθέτουν ούτε ώριμα T και B-λεμφοκύτταρα, ούτε τους αδιαφοροποίητους προγόνους τους. Τα NK κύτταρα, τα οποία προέρχονται

από κοινό πρόγονο με τα ώριμα T-λεμφοκύτταρα, είναι επίσης απόντα στα knockout ποντίκια για το γονίδιο Ikaros (Georgopoulos, 1994).

Η περιοχή του γονιδίου που διαγράφεται κατά τη φάση του ομόλογου ανασυνδυασμού έχει μήκος 8,5 kb και περιλαμβάνει τα εξόνια 3 και 4. Η περιοχή αυτή αντικαθίσταται με την neo κασέτα. Η μεταλλαγή αυτή διαγράφει τους δακτύλους ψευδαργύρου 1, 2 και 3 οι οποίοι δίνουν και στην πρωτεΐνη την υψηλή ικανότητα πρόσδεσής της με το DNA. Έτσι, με τη μεταλλαγή αυτή, χάνεται η ικανότητα των πρωτεϊνών να δεσμεύονται στο DNA και να δρουν ως μεταγραφικοί παράγοντες (Georgopoulos, 1994). Οι ανασυνδυασμένοι φορείς εισάγονται σε εμβρυικά βλαστικά κύτταρα και στη συνέχεια, τα βλαστοκύτταρα με τους επιθυμητούς ομόλογους ανασυνδυασμούς εισάγονται σε 3,5 ημερών βλαστοκύστες. Με τον τρόπο αυτό και μέσω κατάλληλων διασταυρώσεων προκύπτουν τα Ikaros knockout ποντίκια (Georgopoulos, 1994).



Εικόνα 13: Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας απαλοιφής του γονιδίου Ikaros με σκοπό τη δημιουργία των Ikaros knockout διαγονιδιακών ποντικών (Georgopoulos, 1994).

Ποντίκια με τη μετάλλαξη Ikaros γεννιούνται με τις αναμενόμενες μενδελικές αναλογίες. Αυτό δείχνει ότι η μετάλλαξη αυτή δεν επηρεάζει την ικανότητα επιβίωσής τους in utero. Τη στιγμή της γέννησης, ομόζυγα, ετερόζυγα και αγρίου τύπου ποντίκια δεν μπορούν να διακριθούν μεταξύ τους. Κατά την 1η εβδομάδα της

ζωή τους όμως, τα ομόζυγα ποντίκια μπορούν συνήθως να διακριθούν από το μικρότερο μέγεθός τους. Η ανικανότητα αυτή των ποντικιών να αναπτύσσονται σωστά γίνεται πιο έντονη κατά την 2η και 3η εβδομάδα της ζωής τους. Η πλειοψηφία των Ikaros knockout ποντικιών πεθαίνει μέσα στις πρώτες εβδομάδες της ζωής τους, με το 95% αυτών να πεθαίνει μέχρι την 4η εβδομάδα της ζωής τους. Μεγάλο ποσοστό αυτών των θανάτων προέρχεται από περιπτώσεις κανιβαλισμού από τις μητέρες τους. Βακτηριακές λοιμώξεις του ήπατος και των πνευμόνων είναι επίσης υπεύθυνες. Δεν παρατηρούνται διαφορές μεταξύ των ετερόζυγων ποντικιών και αυτών του αγρίου τύπου (Georgopoulos, 1994).

Στα ποντίκια knockout για το γονίδιο Ikaros, ο θύμος αδένας είναι υποανάπτυκτος. Ανοσοϊστοχημική χρώση με Thy-1 και CD3 αντισώματα δεν δίνει χρώση στα knockout ποντίκια σε αντίθεση με αυτά του αγρίου τύπου. Στα ποντίκια αυτά επίσης δεν παρατηρούνται λεμφαδένες στον γαστρεντερικό σωλήνα. Ο σπλήνας των Ikaros knockout ποντικιών είναι 1,5 με 3 φορές μεγαλύτερος από αυτόν του αγρίου τύπου και με λιγότερο οργανωμένη μορφολογία. Φυσικά φονικά κύτταρα δεν εντοπίζονται στον σπλήνα των Ikaros knockout ποντικιών με τη χρήση κυτταρομετρίας ροής, σε αντίθεση με το μικρό ποσοστό αυτών (2-5%) που εντοπίζονται σε ποντίκια αγρίου τύπου (Georgopoulos, 1994).

Στα Ikaros knockout ποντίκια λείπουν όλοι οι πρόγονοι των T-λεμφοκυττάρων και κατ' επέκταση τα NK κύτταρα, καθώς και τα pro-B, pre-B και ώριμα B-λεμφοκύτταρα. Αντίθετα, στα ποντίκια που έχουν κάποια έλλειψη στους μηχανισμούς ανασυνδυασμού που είναι απαραίτητοι για τη διαφοροποίηση των T και B-λεμφοκυττάρων (SCID, RAG-1, RAG-2) εντοπίζονται NK κύτταρα. Για τον λόγο αυτό, η υγεία των ποντικιών αυτών είναι και καλύτερη. Στα Ikaros ποντίκια η ανάπτυξη και διαφοροποίηση των λεμφοκυττάρων σταματά σε πρωιμότερο στάδιο, στο στάδιο των πολυδύναμων HSCs (Georgopoulos, 1994).

Στα Ikaros knockout ποντίκια, σε αντίθεση με την πλήρη απουσία των B-λεμφοκυττάρων από πολύ πρώιμο στάδιο ανάπτυξης, παρατηρείται ανάπτυξη κυτταρικών σειρών σχετικών με τα T-λεμφοκύτταρα. Λείπουν όλοι οι εμβρυϊκοί πρόγονοι των T-λεμφοκυττάρων καθώς και λεμφοκύτταρα από τον θύμο αδέν. Παρ' όλα αυτά, στις 3-5 ημέρες μετά τη γέννηση, εντοπίζονται μικροί αριθμοί ωριμαζόντων θυμοκυττάρων, που μέσα στις επόμενες εβδομάδες ζωής ωριμαζουν

πλήρως και δίνουν την αβ σειρά Τ-κυττάρων. Εντοπίζονται και μικροί αριθμοί γδ Τ κυττάρων στον θύμο. Γαστρο-εντερικά Τ λεμφοκύτταρα είναι απόντα, ενώ αντίθετα Τ κύτταρα του κοιλιακού επιθηλίου εντοπίζονται σε φυσιολογικές ποσότητες. Αυτές οι διακυμάνσεις στις ποσότητες και τους τύπους των Τ-λεμφοκυττάρων οφείλονται σε μια άλλη πρωτεΐνη, την Aiolos, η οποία αποτελεί ομόλογη της Ik-1 και εκφράζεται κατά το όψιμο στάδιο της ανάπτυξης του εμβρυικού θύμου. Η πρωτεΐνη αυτή έχει την ικανότητα να προσδένεται και να ενεργοποιεί τη μεταγραφή όπως και η Ikaros (Georgopoulos, 1997).

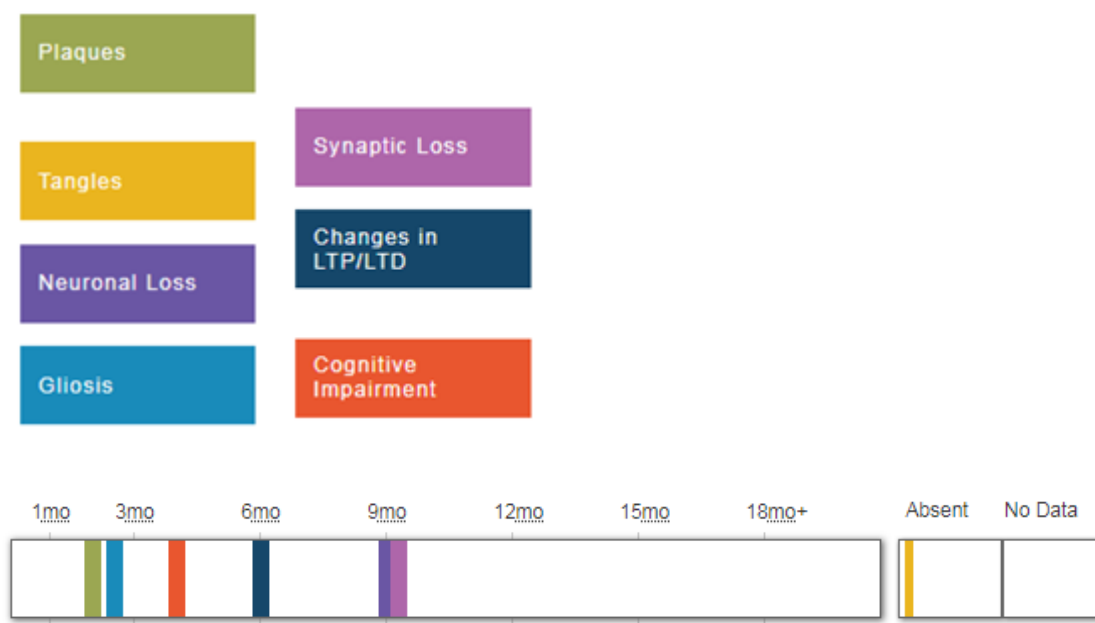
B2. 5x FAD ποντίκια

Τα μοντέλα διαγονιδιακών ποντικών που εναπόθεταν πλάκες αμυλοειδούς και ήταν διαθέσιμα στα εργαστήρια μέχρι και πριν την παραγωγή του 5xFAD μοντέλου, αργούσαν πολύ να εναποθέσουν πλάκες (6-12 μήνες). Για τον λόγο αυτό ξεκίνησε η παραγωγή του μοντέλου 5xFAD, το οποίο μπορεί να εναποθέσει πλάκες αμυλοειδούς σε πολύ συντομότερα χρονικά διαστήματα. Τα ποντίκια αυτά εκφράζουν την ανθρώπινη APP πρωτεΐνη με τις 3 FAD μεταλλάξεις (Σουηδική, Φλόριντας, Λονδίνου) στο ίδιο APP μόριο, καθώς και την ανθρώπινη PS1 η οποία επίσης φέρει 2 FAD μεταλλάξεις. Η παρουσία όλων αυτών των FAD μεταλλάξεων φαίνεται να δρα αθροιστικά. Οι FAD μεταλλάξεις της APP εντοπίζονται κοντά στις θέσεις που αναγνωρίζεται και κόβεται από τη β- και τη γ-εκκριτάση και προκαλούν αύξηση στη συνολική παραγωγή του β-αμυλοειδούς πεπτιδίου γενικότερα είτε του Αβ42 συγκεκριμένα. Η σουηδική μετάλλαξη (υποκατάσταση K670N/M671L) αυξάνει τη συνολική παραγωγή του Αβ, ενώ η μεταλλαγή της Φλόριντας (υποκατάσταση I716V) και του Λονδίνου (υποκατάσταση V717I) αυξάνουν συγκεκριμένα την παραγωγή του Αβ42 (Oakley et al, 2006). Οι FAD μεταλλάξεις των πρεσινιλινών PS1 και PS2, όπως οι υποκαταστάσεις M146L και L286V στην PS1 που εντοπίζονται στο διαγονιδιακό 5xFAD μοντέλο, αυξάνουν επίσης τα επίπεδα του Αβ42 (Oakley et al, 2006).

B2.1 Χαρακτηριστικά των 5XFAD διαγονιδιακών ποντικών

Τα 5xFAD διαγονιδιακά ποντίκια έχουν ορισμένα χαρακτηριστικά που τα κάνουν να ξεχωρίζουν από τα άλλα διαγονιδιακά μοντέλα μελέτης της νόσου Alzheimer. Καταρχάς, τα ποντίκια αυτά παρουσιάζουν εναπόθεση Αβ42 αμυλοειδούς εντός των

νευρώνων από την ηλικία του 1,5 μήνα. Η εναπόθεση των αμυλοειδών πλακών ξεκινά κατά το 2ο μήνα της ζωής τους και είναι ιδιαίτερα έντονη στους 4-5 μήνες ζωής ανάλογα με το φύλο (4 μήνες για τα θηλυκά, 5 για τα αρσενικά). Επιπλέον παρατηρείται γλοίωση στην ηλικία των 2 μηνών και φέρουν μειωμένους συναπτικούς μάρτυρες, αυξημένα επίπεδα p25, νευρωνική απώλεια και μειωμένη μνημονική ικανότητα στον λαβύρινθο τύπου Y (Oakley et al, 2006).



Εικόνα 14: Στο παραπάνω σχήμα φαίνονται οι χρονικές στιγμές που μπορούν να παρατηρηθούν τα ιδιαίτερα φαινοτυπικά γνωρίσματα των 5xFAD ποντικών. Συγκεκριμένα, μπορούμε να δούμε ότι η εναπόθεση των αμυλοειδών πλακών ξεκινά περίπου στην ηλικία των 2 μηνών και λίγο αργότερα ξεκινά η γλοίωση. Στην ηλικία των 4 μηνών περίπου ξεκινούν τα προβλήματα στη μνήμη και τη μάθηση των ποντικών ενώ μέχρι την ηλικία των 9 μηνών παρατηρείται ξεκάθαρη νευρωνική και συναπτική απώλεια. Νευροϊνδιακά δεμάτια είναι απόντα.

Η εναπόθεση των αμυλοειδών πλακών στον εγκέφαλο των 5XFAD ποντικών ακολουθεί ένα συγκεκριμένο πρότυπο. Στα νεαρά ποντίκια οι πλάκες αρχικά εμφανίζονται στις βαθύτερες στοιβάδες του φλοιού και του υποθαλάμου. Καθώς τα ποντίκια γηράσκουν, οι αμυλοειδείς εναποθέσεις εξαπλώνονται ώστε να γεμίσουν το μεγαλύτερο μέρος του φλοιού, τον υποθάλαμο και τον ιππόκαμπο. Πλάκες επίσης έχουν παρατηρηθεί στον θάλαμο, στο εγκεφαλικό στέλεχος και στον οσφρητικό λοβό σε πιο ηλικιωμένα ποντίκια, οι εναποθέσεις όμως σε αυτές τις περιοχές είναι λιγότερες. Σε σύγκριση με άλλα διαγονιδιακά μοντέλα εναπόθεσης πλακών, στα 5XFAD ποντίκια οι πλάκες είναι συνήθως μικρότερες (~20 μm), αλλά πολύ

περισσότερες. Το μικρότερο μέγεθος ίσως οφείλεται στη μεγαλύτερη πυκνότητα των πλακών (Oakley et al, 2006).

Η νευρο-φλεγμονή είναι ένα κύριο χαρακτηριστικό των AD εγκεφάλων και χαρακτηρίζεται από την παρουσία ενεργοποιημένων αστροκυττάρων και μικρογλοίας που περικυκλώνουν τις αμυλοειδείς πλάκες. Τα διαγονιδιακά μοντέλα ποντικών φέρουν αυξημένους μάρτυρες φλεγμονής και γλοίωσης. Ανοσοϊστοχημική χρώση για μάρτυρες ενεργοποίησης γλοίας, αποκαλύπτει ότι η γλοίωση είναι ανάλογη των επιπέδων Αβ42 και της αμυλοειδικής εναπόθεσης. Το ποσό των ενεργοποιημένων αστροκυττάρων και μικρογλοίας αυξάνεται με την ηλικία των ποντικών, όπως άλλωστε και τα ποσά του Αβ42 και των πλακών (Oakley et al, 2006).

Ένα κύριο χαρακτηριστικό AD εγκεφάλων είναι η παρουσία νευροϊνιδιακών δεματίων αποτελούμενων από υπερφωσφορυλιωμένη tau πρωτεΐνη. Χρώση τομών εγκεφάλου 5XFAD ποντικών με anti-Tau αντίσωμα δεν δείχνει παρουσία υπερφωσφορυλιωμένης tau στον εγκέφαλο των ποντικών αυτών (Oakley et al, 2006).

Παρατηρήθηκε ότι στο μοντέλο αυτό ποντικών οι νευρώνες οι οποίοι περιείχαν ενδο-νευρωνικά συσσωματώματα Αβ, είχαν μια διαταραγμένη μορφολογία καθώς επίσης βρίσκονταν και σε επαφή με τις εξωκυττάρια αμυλοειδείς εναποθέσεις. Οι παρατηρήσεις αυτές οδήγησαν στην υπόθεση ότι το ενδο-νευρωνικό Αβ μπορεί να σχετίζεται με τον νευροεκφυλισμό και τη νευρωνική απώλεια στον εγκέφαλο των 5XFAD ποντικών. Τα επίπεδα συναπτοφυσίνης στους εγκεφάλους των ποντικών αυτών είναι μειωμένα. Η μείωση αυτή ξεκινά στην ηλικία των 4 μηνών και μέχρι τους 9 μήνες τα επίπεδα της συναπτοφυσίνης βρίσκονται στο ~75% των μη-διαγονιδιακών ποντικών της ομάδας ελέγχου. Αυτό δείχνει σημαντικό εκφυλισμό των νευρικών συνάψεων των 5XFAD ποντικών. Οι νευρώνες που φαίνεται περισσότερο να επηρεάζονται είναι οι μεγάλοι πυραμυδοειδείς νευρώνες του φλοιού, της περιοχής δηλαδή με τη μεγαλύτερη εναπόθεση Αβ42 και πλακών (Oakley et al, 2006).

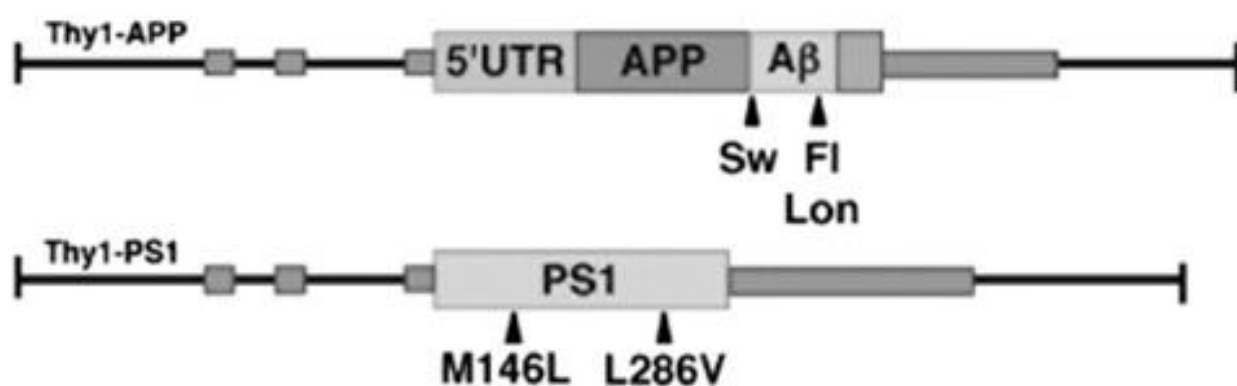
Τα υψηλά επίπεδα Αβ στους εγκεφάλους διαγονιδιακών ποντικών έχουν συνδεθεί με επιδείνωση της μνήμης τους. Ο έλεγχος της χωρικής μνήμης των ποντικών μπορεί να πραγματοποιηθεί με τη χρήση του λαβυρίνθου τύπου Υ. Ποντίκια ηλικίας 4-5 μηνών φαίνεται να έχουν μειωμένη μνημονική ικανότητα σε σχέση με τις μη-διαγονιδιακές ομάδες ελέγχου, ενώ ποντίκια ηλικίας 2 μηνών είναι φυσιολογικά. Μειωμένη

μνημονική ικανότητα φαίνεται και από άλλα συμπεριφορικά πειράματα, όπως είναι το *contextual fear conditioning* και ο λαβύρινθος νερού (Oakley et al, 2006).

B2.2 Παραγωγή των 5xFAD διαγονιδιακών ποντικών

Οι FAD μεταλλάξεις της APP K670N/M671L+I716V+V717I και της PS1 M146L+L286V εισήχθησαν στα cDNA των APP και PS1 αντίστοιχα και στη συνέχεια κλωνοποιήθηκαν μέσα στο εξόνιο 2 της Thy1 διαγονιδιακής κασέτας. Το APP διαγονίδιο περιλαμβάνει την 5' αμετάφραστη περιοχή, στην οποία περιέχεται ο ενισχυτής της ιντερλευκίνης β. Ύστερα από τον πολλαπλασιασμό των διαγονιδίων στους βέκτορες τους, τα διαγονίδια μικροενέθηκαν στον προ-πυρήνα ενός C57/B6XSJL κυττάρου υβριδικού εμβρύου (Oakley et al, 2006).

Οι διαγονιδιακές σειρές παρήχθησαν με προ-πυρηνική μικροένεση των APP και PS1 διαγονιδίων, καθένα με έναν νευρο-ειδικό Thy1 εκκνητή ώστε να προκληθεί υπερέκφρασή τους στον εγκέφαλο (Oakley et al, 2006). Τα διαγονιδιακά ποντίκια που προέκυψαν ταυτοποιήθηκαν με PCR και επιβεβαιώθηκαν με γονιδιωματικό στύπωμα κατά Southern (Oakley et al, 2006).



Εικόνα 15: Σχηματική απεικόνιση των FAD μεταλλαγών επί των διαγονιδίων Thy1-APP και Thy1-PS1. Τα βέλη προσδιορίζουν τις θέσεις που πραγματοποιούνται οι μεταλλαγές (Oakley et al, 2006).

B3. 5XFAD Ikaros knockout ποντίκια

Στην παρούσα μελέτη ήταν απαραίτητη η παραγωγή διπλά διαγονιδιακών στελεχών ποντικών που φέρουν ταυτόχρονα το διαγονίδιο 5XFAD, ώστε να παρουσιάζουν γρήγορη εναπόθεση του β-αμυλοειδούς πεπτιδίου μέχρι την ηλικία των 4 μηνών, και είναι knockout για το γονίδιο Ikaros. Αυτό μπορεί να πραγματοποιηθεί με τις κατάλληλες διασταυρώσεις. Το διαγονίδιο 5XFAD πρέπει πάντα να βρίσκεται σε

ετεροζυγωτία, οπότε οι γονείς που τοποθετούνται στη διασταύρωση είναι ο ένας ετερόζυγος για το διαγονίδιο και ο άλλος αγρίου τύπου. Όσον αφορά το γονίδιο Ikaros, ποντίκια που είναι knockout για το γονίδιο αυτό δεν μπορούν να αναπαραχθούν. Έτσι και οι δύο γονείς πρέπει να είναι ετερόζυγοι για το γονίδιο Ikaros, να φέρουν δηλαδή ένα λειτουργικό και ένα μη-λειτουργικό αλληλόμορφο. Από εκεί και πέρα, η παραγωγή του διπλά διαγονιδιακού στελέχους 5XFAD Ikaros knockout ακολουθεί τις κλασικές μενδελικές αναλογίες. Η πιθανότητα κληρονόμησης του 5XFAD διαγονιδίου είναι $1/2$ και η πιθανότητα κληρονόμησης και των δύο μη-ενεργών Ikaros αλληλομόρφων είναι $1/4$. Έτσι υπάρχει συνολικά μια πιθανότητα $1/8$ κάθε ποντίκι που γεννιέται από την αντίστοιχη διασταύρωση να είναι 5XFAD Ikaros knockout. Η περιγραφή των χαρακτηριστικών ενός τέτοιου μοντέλου ξεπερνά τα όρια της εισαγωγικής αναφοράς που γίνεται εδώ και εμπίπτει περισσότερο στα πλαίσια του κεφαλαίου "Συζήτηση", καθότι η μελέτη του συγκεκριμένου μοντέλου αποτελεί και τον στόχο της παρούσας διπλωματικής.

ΜΕΡΟΣ ΔΕΥΤΕΡΟ

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1.Απομόνωση DNA

Απομακρύνεται το ποντίκι από το κλουβί και μαρκάρεται το αυτί του με συγκεκριμένα πρότυπα κοψίματος ώστε να μπορεί να αναγνωρισθεί στη συνέχεια. Η αναγνώριση των διαφορετικών ποντικιών μεταξύ τους γίνεται με βάση 3 παράγοντες: φύλο (αρσενικό ή θηλυκό), χρώμα τριχώματος (καφέ ή μαύρο) και μαρκάρισμα στο αφτί. Στη συνέχεια κόβεται ένα κομμάτι από την άκρη της ουράς μήκους 0,5-1 cm και τοποθετείται σε eppendorf tube το οποίο περιέχει 500 μl TENS buffer. Για να αποφευχθεί η αιμορραγία του ποντικού, εάν αυτό είναι δυνατό, η ουρά καυτηριάζεται. Στη συνέχεια το ποντίκι επιστρέφεται στο κλουβί του.

Το TENS buffer είναι ένα ρυθμιστικό διάλυμα που αποτελείται από 50mM Tris pH 8.0, 100mM EDTA, 100mM NaCl και 1%SDS. Το Tris συμβάλλει στη ρύθμιση του pH στα απαραίτητα επίπεδα, το EDTA δεσμεύει τα ιόντα μετάλλων ώστε να αποφεύγεται ο σχηματισμός αλάτων με τις φωσφορικές ρίζες του DNA, το NaCl συμβάλλει στη σταθερότητα του μορίου του DNA και τέλος το SDS στη λύση της κυτταρικής και της πυρηνικής μεμβράνης ώστε να απελευθερωθεί το DNA.

Στη συνέχεια, στα σωληνάκια προστίθενται 4μl πρωτεΐνάσης K (10mg/ml), η οποία είναι ένα πρωτεολυτικό ένζυμο που προκαλεί την αποικοδόμηση των πρωτεϊνών. Τα σωληνάκια ύστερα επωάζονται στους 55°C. Την επόμενη μέρα, που ο ιστός έχει διαλυθεί, προστίθεται στο κάθε σωληνάκι 1μl RNase A (100mg/ml) και επωάζεται για μια ώρα σε υδατόλουτρο στους 37 °C. Με τη διαδικασία αυτή πραγματοποιείται η αποδιάταξη του RNA.

Μόλις ολοκληρωθεί η επώαση, σε κάθε σωληνάριο προστίθενται 500μl από ένα διάλυμα που περιέχει φαινόλη, χλωροφόρμιο και ισοαμυλική αλκοόλη σε αναλογίες 25:24:1. Το μείγμα αυτό απομονώνει τα λίπη και τα κυτταρικά θραύσματα στην οργανική φάση που θα προκύψει ύστερα από φυγοκέντρηση, ενώ το DNA θα απομονωθεί στην υδατική φάση.

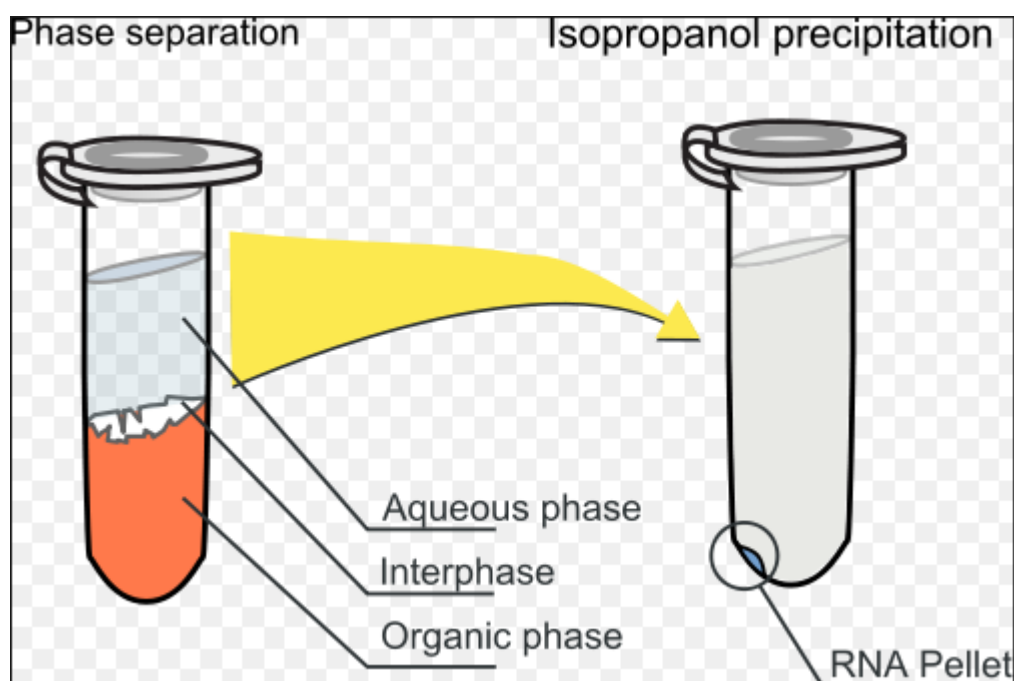
Το περιεχόμενο των σωληναρίων αναδεύεται με τη χρήση vortex για 5 λεπτά και στη συνέχεια φυγοκεντρείται στα 13.000 rpm για 15 λεπτά. Με τη διαδικασία αυτή πραγματοποιείται ο καθαρισμός του DNA. Στο τέλος της φυγοκέντρησης παρατηρούμε 3 φάσεις: την πάνω φάση που είναι η υδατική και περιέχεται το DNA,

την κάτω φάση, η οποία είναι η οργανική και περιέχει τα λίπη και τα κυτταρικά θραύσματα και τη μεσαία φάση στην οποία συναντώνται οι πρωτεΐνες. Η πάνω φάση μεταφέρεται σε καθαρά σωληνάκια, ενώ οι άλλες δύο απορρίπτονται. Η μεταφορά γίνεται με κομμένα tips, ώστε να προστατευθούν τα μόρια DNA από τη μηχανική καταπόνηση που θα είχαν εάν περνούσαν από τη λεπτή διατομή ενός άκοπου tip. Στα νέα σωληνάκια επαναλαμβάνεται η διαδικασία προσθήκης 500μl φαινόλης : χλωροφορμίου : ισοαμυλικής αλκοόλης και η φυγοκέντρωση και μεταφέρεται ξανά η υδατική φάση σε καθαρά σωληνάκια. Στα σωληνάκια αυτά στη συνέχεια προστίθενται 500μl χλωροφορμίου. Το χλωροφόρμιο συμβάλλει στην απομάκρυνση της φαινόλης. Το περιεχόμενο των σωληναρίων αναδεύεται με τη χρήση vortex για 5 λεπτά και στη συνέχεια φυγοκεντρείται στα 13.000 rpm για 15 λεπτά. Η υδατική φάση μεταφέρεται ξανά σε καθαρά σωληνάκια. Προκειμένου να μπορέσουμε να παραλάβουμε το διαλυμένο DNA προστίθενται 0,7 όγκοι ισοπροπανόλης. Ύστερα από ήπια ανάδευση με το χέρι, το DNA γίνεται αδιάλυτο και σχηματίζει ινίδια. Από το σημείο αυτό το μπορούμε να παραλάβουμε το DNA είτε με τη χρήση πιπέτας Pasteur είτε με επιπλέον φυγοκεντρήσεις.

Στην πρώτη περίπτωση χρησιμοποιείται πιπέτα Pasteur, της οποίας έχουμε κλείσει το άκρο με τη χρήση φλόγας. Γύρω από την πιπέτα τυλίγεται το DNA. Προκειμένου να καθαρίσουμε το DNA σε μεγαλύτερο βαθμό, εμβαπτίζουμε το άκρο της πιπέτας αρχικά σε 70% και στη συνέχεια σε 100% αιθανόλη. Αφήνουμε τις πιπέτες να στεγνώσουν για 5-10 λεπτά προκειμένου να απομακρυνθεί η αιθανόλη και στη συνέχεια, με τη χρήση ειδικού κοπτικού εργαλείου, η άκρη της πιπέτας που φέρει το DNA κόβεται και μεταφέρεται σε νέα αποστειρωμένα σωληνάκια τα οποία περιέχουν 50 μl TE. Το TE είναι διάλυμα που περιέχει 100mM Tris-HCl και 10mM EDTA pH 8 διαλυμένα σε απιονισμένο νερό. Τα σωληνάκια στη συνέχεια μεταφέρονται σε αναδευτήρα για 1 ώρα στους 37 °C σε 200 rpm ώστε να διαλυθεί το DNA. Τέλος, τα δείγματα αποθηκεύονται στους 4 °C.

Σε περίπτωση που δεν φανεί ο σχηματισμός ινιδίων DNA ύστερα από την προσθήκη της ισοπροπανόλης, μπορούμε να απομονώσουμε το DNA με τη χρήση διαδοχικών φυγοκεντρήσεων. Αρχικά τα δείγματα φυγοκεντρούνται σε 13.000 rpm για 10 λεπτά και το υπερκείμενο απορρίπτεται. Στο στάδιο αυτό πρέπει να βλέπουμε ίζημα στον πάτο του erpendorf. Στο ίζημα αυτό περιέχεται το DNA. Στη συνέχεια, για τον καθαρισμό του DNA προστίθενται 100μl 70% αιθανόλης. Τα δείγματα

φυγοκεντρούνται για 5 λεπτά και το υπερκείμενο απορρίπτεται. Έπειτα προστίθενται 100μl 100% αιθανόλης, τα δείγματα φυγοκεντρούνται για 5 λεπτά και το υπερκείμενο απορρίπτεται. Τα δείγματα αφήνονται να στεγνώσουν για περίπου 15 λεπτά και μετά προστίθενται 50μl TE. Τα σωληνάκια στη συνέχεια μεταφέρονται σε αναδευτήρα για 1 ώρα στους 37 °C σε 200 rpm ώστε να διαλυθεί το DNA. Τέλος, τα δείγματα αποθηκεύονται στους 4 °C.



Εικόνα 16: Σχηματική αναπαράσταση που δείχνει τις 3 φάσεις (υδατική, οργανική και ενδιάμεση) που προκύπτουν ύστερα από φυγοκέντρηση του δείγματος μετά την προσθήκη φαινόλης : χλωροφορμίου : ισοαμλικής αλκοόλης καθώς και το pellet (ίζημα) που σχηματίζεται στον πάτο του σωλήνα ύστερα από την προσθήκη της ισοπροπανόλης.

Πρωτόκολλο απομόνωσης γενομικού DNA από ουρές ποντικών:

1. Κόβεται 0,5-1cm ουράς ποντικού και τοποθετείται σε eppendorf που περιέχει 500 μl TENS buffer.
2. Προσθήκη 4μl πρωτεΐνάσης K.
3. Επώαση στους 55 °C κατά τη διάρκεια της νύχτας.
4. Προσθήκη 1μl RNase, επώαση στους 37 °C για 1 ώρα.
5. Προσθήκη 500μl φαινόλης : χλωροφορμίου : ισοαμλικής αλκοόλης (25:24:1).
6. 5 λεπτά vortex.

7. Φυγοκέντρωση στα 13000rpm για 15 λεπτά.
 8. Απομάκρυνση υπερκειμένου με κομμένα tips σε καθαρό σωληνάκι που περιέχει 500μl φαινόλης : χλωροφορμίου : ισοαμλικής αλκοόλης (25:24:1).
 9. 5 λεπτά vortex.
 10. Φυγοκέντρωση στα 13000rpm για 15 λεπτά.
 11. Απομάκρυνση υπερκειμένου με κομμένα tips σε καθαρό σωληνάκι που περιέχει 500μl χλωροφορμίου.
 12. 5 λεπτά vortex.
 13. Φυγοκέντρωση στα 13000rpm για 15 λεπτά.
 14. Απομάκρυνση υπερκειμένου με κομμένα tips σε καθαρό σωληνάκι. Μετράται ο όγκος του διαλύματος που περιέχει το DNA και προστίθενται 0,7 όγκοι ισοπροπανόλης.
- (Είναι σημαντικό να προσθέτουμε ισοπροπανόλη και να παρατηρούμε νέφος DNA σε κάθε δείγμα ξεχωριστά πριν προχωρήσουμε στο επόμενο.)
15. Ήπια ανάδευση μέχρι να παρατηρηθεί νέφος DNA.
-
- 16α. "Ψάρεμα" DNA με τη χρήση πιπέτας Pasteur.
 - 17α. Εμβάπτιση της πιπέτας σε 70% αιθανόλη.
 - 18α. Εμβάπτιση της πιπέτας σε 100% αιθανόλη.
 - 19α. Στέγνωμα στον αέρα για 5 λεπτά.
 - 20α. Κόψιμο άκρης πιπέτας σε αποστειρωμένο σωληνάκι που περιέχει 50μl TE.
 - 21α. Ανάδευση στους 37 °C σε 200rpm για 1 ώρα για να διαλυθεί το DNA.
 - 22α. Αποθήκευση στους 4 °C.
-

- 16β. Φυγοκέντρωση σε 13000rpm για 10 λεπτά.
- 17β. Απομάκρυνση υπερκειμένου.
- 18β. Προσθήκη 100μl 70% αιθανόλης.
- 19β. Φυγοκέντρωση σε 13000rpm για 5 λεπτά.
- 20β. Απομάκρυνση υπερκειμένου.
- 21β. Προσθήκη 100μl 100% αιθανόλης.
- 22β. Φυγοκέντρωση σε 13000rpm για 5 λεπτά.
- 23β. Απομάκρυνση υπερκειμένου.
- 24β. Στέγνωμα στον αέρα για 15 λεπτά.
- 25β. Ανάδευση στους 37 °C σε 200rpm για 1 ώρα για να διαλυθεί το DNA.
- 26β. Αποθήκευση στους 4 °C.

Σημαντικά διαλύματα:

TENS BUFFER

50mM Tris pH 8.0

100mM EDTA

100mM NaCl

1% SDS

Για ποσότητα 1 λίτρου προστίθενται:

- 50 ml 1M Tris pH 8.0
- 200 ml 0.5M EDTA
- 20 ml 5M NaCl
- 50 ml 20% SDS
- 680 ml ddH₂O

Το διάλυμα φιλτράρεται και αποθηκεύεται σε θερμοκρασία δωματίου.

Πρωτεΐνωση K (Sigma, P 4850 solution, P 6556 crystal)

Stock solution 10mg/ml

Διάλυση σε 50mM Tris pH 8

Αποθήκευση σε aliquots των 50μl στους -20 °C.

RNase A (Sigma, R 5503)

- Stock solution 10mg/ml
- Διάλυση σε 10mM sodium acetate (pH 5.2)
- Βράσιμο στους 100 °C για 15 λεπτά, αφήνεται να κρυώσει σε θερμοκρασία δωματίου και ύστερα προστίθεται 0,1 όγκος 1M Tris pH 7.4
- Αποθήκευση σε aliquots των 100μl στους -20 °C.

2. Φωτομέτρηση DNA

Προκειμένου να χρησιμοποιηθεί το DNA που απομονώθηκε από τις ουρές των ποντικών για τον εντοπισμό των υπό μελέτη γονιδίων με τη χρήση της μεθόδου PCR, απαραίτητο βήμα είναι η φωτομέτρησή του ώστε να υπολογισθεί η συγκέντρωση του κάθε δείγματος και να μπορεί να προστεθεί η κατάλληλη ποσότητα στην κάθε αντίδραση.

Η φωτομετρική ανάλυση των δειγμάτων βασίζεται στην αρχή ότι τα νουκλεϊκά οξέα απορροφούν το υπεριώδες φως με ένα συγκεκριμένο πρότυπο. Όταν ένα δείγμα DNA ή RNA εκτεθεί σε υπεριώδες φως σε ένα μήκος κύματος 690nm (εκεί συμβαίνει η μέγιστη απορρόφηση των μορίων αυτών), ένα μέρος του φωτός θα περάσει μέσα από το δείγμα και ένα μέρος αυτού θα απορροφηθεί από το δείγμα. Ένας ανιχνευτής φωτός μετράει την ένταση του φωτός που περνά μέσα από το δείγμα. Όσο περισσότερο φως απορροφάται από το δείγμα, τόσο μεγαλύτερη είναι και η συγκέντρωση DNA/RNA στο δείγμα αυτό.

Χρησιμοποιώντας τον νόμο των Lambert-Beer, μπορούμε να συσχετίσουμε το ποσό του φωτός που απορροφάται από το δείγμα με τη συγκέντρωση του δείγματος αυτού. Σε ένα μήκος κύματος 260nm, ο μέσος συντελεστής απόσβεσης (το πόσο εύκολα δηλαδή μπορεί να περάσει το φως μέσα από ένα υλικό) για το δίκλωνο μόριο DNA είναι $0.020 (\mu\text{g/ml})^{-1} \text{cm}^{-1}$, για το μονόκλωνο μόριο DNA είναι $0.027 (\mu\text{g/ml})^{-1} \text{cm}^{-1}$, και για το μονόκλωνο RNA είναι $0.025 (\mu\text{g/ml})^{-1} \text{cm}^{-1}$. Έτσι η απορρόφηση (Absorbance - A) $A=1$ αντιστοιχεί σε μια συγκέντρωση 50 mg/ml για το δίκλωνο DNA

(<https://www.webcitation.org/6ATzE7YQz?url=http://biotechnology.com/dna/analysis-dna-rna-wavelengths-230-260-280-nm>)

Όταν χρησιμοποιείται το φασματοφωτόμετρο, μας δίνει μια τιμή οπτικής απορρόφησης (Optical Density - OD). Αυτή υπολογίζεται με την παρακάτω εξίσωση:

- $OD = \text{Log}(\text{ένταση προσπίπτοντος φωτός}/\text{ένταση εκπεμπόμενου φωτός})$

Ένα δείγμα που δεν περιέχει καθόλου DNA ή RNA θα πρέπει να έχει $OD=0$.

Ο νόμος Lambert-Beer μας επιτρέπει να υπολογίσουμε τις συγκεντρώσεις άγνωστων δειγμάτων χρησιμοποιώντας την οπτική απορρόφηση. Ο τύπος που χρησιμοποιείται για το δίκλωνο DNA είναι ο εξής:

- $50 \times OD_{260} = \text{συγκέντρωση DNA (mg/mL)}$

Με το φωτόμετρο μπορεί να εξεταστεί και η καθαρότητα του δείγματος των νουκλεϊκών οξέων, μετρώντας την απορρόφηση που έχει το δείγμα σε άλλα μήκη κύματος που απορροφούν μέγιστα άλλα μόρια, όπως είναι οι πρωτεΐνες και οι πολυσακχαρίτες. Οι πρωτεΐνες παρουσιάζουν μέγιστη οπτική απορρόφηση στα 280 nm ενώ οι πολυσακχαρίτες στα 230 nm. Για να υπολογισθεί η καθαρότητα ενός δείγματος χρησιμοποιείται ο λόγος των τριών μηκών κύματος (230, 260 και 280 nm). Για παράδειγμα, ένα δείγμα που περιέχει μόνο RNA θεωρείται καθαρό αν ο λόγος $OD_{230}:OD_{260}:OD_{280}$ είναι 1:2:1. Αντίστοιχα, για ένα δείγμα DNA πρέπει να είναι 1:1,8:1.

(<https://www.webcitation.org/6ATzE7YQz?url=http://biotechnology.com/dna/analysis-dna-rna-wavelengths-230-260-280-nm>).

Η καθαρότητα και η συγκέντρωση ενός δείγματος μπορούν να επηρεαστούν περαιτέρω και από την παρουσία αντιδραστηρίων τα οποία χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διαδικασία απομόνωσης του νουκλεϊκού οξέος.

Από το δείγμα που έχει αποθηκευτεί στους 4 °C (αυτό θα αποτελεί πλέον το stock) διαλύονται 5μl σε 195μl απιονισμένου νερού. Όλα τα δείγματα ετοιμάζονται με τον ίδιο τρόπο σε μια τελική ποσότητα 200μl. Επιπλέον ετοιμάζεται ένα "τυφλό" δείγμα με το οποίο πραγματοποιείται ο μηδενισμός του φωτόμετρου. Το τυφλό δείγμα περιέχει 200μl απιονισμένου νερού, χωρίς να έχει DNA. Το τυφλό μεταφέρεται σε κυβέτα χαλαζία και χρησιμοποιείται για το μηδενισμό του φωτόμετρου. Στη συνέχεια υπολογίζεται η οπτική απορρόφηση του κάθε δείγματος (OD) στο φάσμα 260/280.

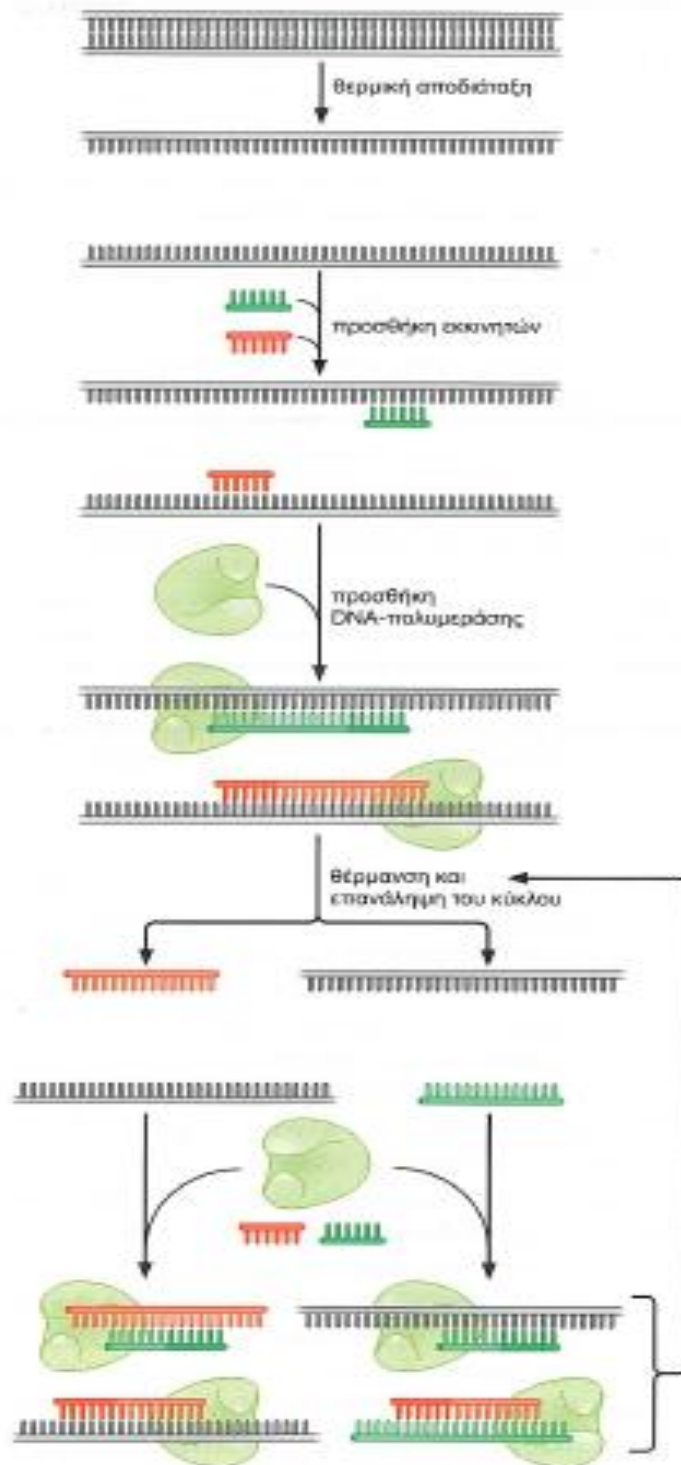
Αφού υπολογισθεί η συγκέντρωση του DNA του κάθε δείγματος, πραγματοποιούνται οι κατάλληλες αραιώσεις ώστε η τελική συγκέντρωση του DNA να είναι 100 ng/μl. Η αραιώση δεν πραγματοποιείται στο stock του δείγματος αλλά σε καθαρό σωληνάκι. Θεωρείται πως 100 ng είναι η κατάλληλη ποσότητα DNA ώστε η PCR αντίδραση να έχει τη μέγιστη δυνατή απόδοση. Οπότε με συγκέντρωση 100ng/μl, θα προστεθεί 1μl DNA στη αντίδραση.

3. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (polymerase chain reaction - PCR) αποτελεί μια δυναμική μέθοδο για την ενίσχυση συγκεκριμένων τμημάτων DNA. Η διαδικασία αυτή γίνεται εξ ολοκλήρου in vitro. Η PCR χρησιμοποιεί το ένζυμο DNA πολυμεράση που οδηγεί τη σύνθεση DNA από δεοξυριβονουκλεοτίδια στο 3' άκρο μιας εμπορικά σχεδιασμένης ακολουθίας νουκλεοτιδίων (εκκινητής - primer) , όταν αυτό είναι συνδεδεμένο σε ένα μεγαλύτερο εκμαγείο DNA. Εφόσον το συνθετικό ολιγονουκλεοτίδιο είναι συνδεδεμένο σε ένα μεγαλύτερου μήκους εκμαγείο που περιέχει μια περιοχή συμπληρωματική προς το ολιγονουκλεοτίδιο αυτό, η DNA πολυμεράση μπορεί να το χρησιμοποιήσει ως εκκινητή και να επιμηκύνει το 3' άκρο του παράγοντας μια εκτεταμένη περιοχή δίκλωνου DNA. Για να πραγματοποιηθεί η αντίδραση αυτή θα πρέπει να υπάρχουν δύο εκκινητές: ένας συμπληρωματικός προς το 3' άκρο και ένας συμπληρωματικός προς το 5' άκρο της αλληλουχίας που θέλουμε να ενισχύσουμε.

Για να ξεκινήσει η αντίδραση, το DNA πρέπει πρώτα να αποδιαταχθεί ώστε οι εκκινητές να μπορέσουν να συνδεθούν στις αλληλουχίες στόχους. Για να προκύψει μονόκλωνο DNA, αρκεί η θέρμανση του δίκλωνου DNA σε θερμοκρασία που πλησιάζει το σημείο βρασμού. Και οι δύο κλώνοι της διπλής έλικας μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη σύνθεση νέων μορίων. Στη συνέχεια προστίθενται στην αντίδραση η DNA πολυμεράση και δεοξυριβονουκλεοτίδια τα οποία θα χρησιμοποιήσει το ένζυμο για να επεκτείνει τους εκκινητές. Στο τέλος του πρώτου κύκλου της αντίδρασης παράγονται δύο δίκλωνο αντίτυπα της περιοχής του DNA που μας ενδιαφέρει.

Στη συνέχεια, το DNA υποβάλλεται σε δεύτερο κύκλο αποδιάταξης και σύνθεσης, χρησιμοποιώντας τους ίδιους εκκινητές. Αυτή η διαδικασία παράγει τέσσερα αντίγραφα του τμήματος που μας ενδιαφέρει. Επιπρόσθετοι, επαναλαμβανόμενοι κύκλοι αποδιάταξης και σύνθεσης DNA ενισχύουν τη περιοχή μεταξύ των δύο εκκινητών με μορφή γεωμετρικής προόδου (Watson, Μοριακή Βιολογία του Γονιδίου).



Εικόνα 17: Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR). Στο πρώτο βήμα της PCR, το εκμαγείο DNA αποδιατάσσεται θερμικά και ανασυνδέεται με συνθετικούς ολιγονουκλεοτιδικούς εκκινητές (κόκκινα και πράσινα ολιγονουκλεοτίδια στην εικόνα) που αντιστοιχούν στα όρια της προς ενίσχυση αλληλουχίας DNA. Στη συνέχεια, χρησιμοποιείται DNA πολυμεράση για να αντιγράψει το μονόκλωνο εκμαγείο επιμηκύνοντας την αλυσίδα από τους εκκινητές. Στο επόμενο βήμα, το DNA αποδιατάσσεται και πάλι, ανασυνδέεται με τους εκκινητές και χρησιμοποιείται ως εκμαγείο για νέο κύκλο σύνθεσης DNA. Στον 2ο αυτόν κύκλο, οι εκκινητές μπορούν να ξεκινήσουν σύνθεση τόσο από το νεοσυντηθέμενο DNA όσο και από το αρχικό DNA-εκμαγείο. Όταν η DNA πολυμεράση επεκτείνει τον πράσινου χρώματος εκκινητή που είχε συνδεθεί με το νεοσυντηθέν εκμαγείο (χρώματος πορτοκαλί) από τον προηγούμενο κύκλο σύνθεσης DNA (ή τον εκκινητή χρώματος πορτοκαλί από εκμαγείο πράσινου χρώματος), η πολυμεράση συνεχίζει να αντιγράφει μέχρι το άκρο του εκμαγείου και έπειτα αποδεσμεύεται. Με την ολοκλήρωση του 2ου βήματος έχει συντεθεί DNA που

περικλείει επακριβώς την προς ενίσχυση αλληλουχία. Στη συνέχεια, οι επόμενοι κύκλοι αποδιάταξης, εκκίνησης και σύνθεσης DNA παράγουν μόρια DNA που αντιστοιχούν στο διάστημα της αλληλουχίας που ορίζουν οι δύο εκκινητές. Η ποσότητα αυτού του DNA αυξάνεται με γεωμετρική πρόοδο σε κάθε διαδοχικό κύκλο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Watson, Μοριακή Βιολογία του Γονιδίου).

Στην πράξη, η τυπική απόδοση της τεχνικής ανέρχεται στο 10-30% της θεωρητικά μέγιστης. Παράγοντες που επηρεάζουν σημαντικά την απόδοση είναι το μήκος και η αλληλουχία του τμήματος που πρόκειται να διπλασιαστεί. Η DNA πολυμεράση συχνά δυσκολεύεται να αντιγράψει αλληλουχίες μεγάλου μήκους ή υψηλής περιεκτικότητας σε GC. Γενικά, πάντως, με την τεχνική της PCR παράγονται πάρα πολλά αντίγραφα (μετά από 32 κύκλους, 1.073.741.824 δίκλιωνα μόρια-στόχοι) και μπορεί κανείς να τα δει εύκολα μέσω ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης βαμμένο με βρωμιούχο αιθίδιο. Για τη βελτιστοποίηση της PCR είναι απαραίτητη η ρύθμιση πολλών παραμέτρων, όπως είναι η θερμοκρασία υβριδοποίησης των εκκινητών στην αλληλουχία-στόχο, οι συγκεντρώσεις των αλάτων και η χρονική διάρκεια κάθε επιμέρους βήματος. Επίσης, σημαντικό είναι ο σωστός σχεδιασμός των εκκινητών, των οποίων το ιδανικό μήκος κυμαίνεται από 18 έως 24 νουκλεοτίδια. Η DNA πολυμεράση που χρησιμοποιείται για την τεχνική της PCR είναι η θερμοανθεκτική Taq πολυμεράση. Η Taq πολυμεράση απομονώνεται από το βακτήριο *Thermus aquaticus*, το οποίο ζει στο νερό σε θερμοκρασία 75°C. Η βέλτιστη θερμοκρασία του ενζύμου είναι οι 72°C, ενώ είναι αρκετά σταθερό ακόμη και στους 94°C (Watson, 2007).

Με την PCR, λόγω της εκθετικής αύξησης, παράγεται επαρκής ποσότητα μορίων συγκεκριμένων γονιδίων από ένα δείγμα DNA, που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση μεταλλάξεων ή για τον προσδιορισμό της αλληλουχίας τους (Thompson & Thompson).

A. Ολιγονουκλεοτίδια – αλληλουχίες έναρξης (primers)

Τα χαρακτηριστικά τα οποία πρέπει να διαθέτει ένας εκκινητής είναι:

- 1) Η αναλογία G/C και A/T θα πρέπει να είναι περίπου 1:1.
- 2) Για να αποφευχθεί η σύνδεση των εκκινητών μεταξύ τους, πρέπει οι αλληλουχίες τους να μην είναι συμπληρωματικές κυρίως στο 3' άκρο τους.

- 3) Δεν θα πρέπει να υπάρχουν επαναλήψεις τριών ή περισσότερων C ή G στο 3' άκρο, κάτι που μπορεί να οδηγήσει σε λανθασμένη σύνδεση της αλληλουχίας έναρξης με περιοχές πλούσιες σε G και C βάσεις.
- 4) Να μην υπάρχουν εσωτερικές παλίνδρομες αλληλουχίες οι οποίες μπορεί να σχηματίσουν θηλιές.
- 5) Ο αριθμός των νουκλεοτιδίων ενός εκκινητή πρέπει να είναι τουλάχιστον 16, κατά προτίμηση 20 έως 24.
- 6) Οι τιμές των θερμοκρασιών τήξης T_m (melting temperature) πρέπει να είναι παρόμοιες, ενώ παρόμοιες πρέπει να είναι και οι συγκεντρώσεις τους.

B. PCR για Ikaros ποντίκια

Προκειμένου να γίνει η ταυτοποίηση των ποντικών Ikaros, πραγματοποιείται PCR με τη χρήση κατάλληλων εκκινητών και τη δράση του ενζύμου Q5 πολυμεράση. Η Q5 είναι μια πολυμεράση που θεωρείται ότι έχει μεγαλύτερη πιστότητα αντιγραφής (fidelity) σε σχέση με την Taq πολυμεράση.

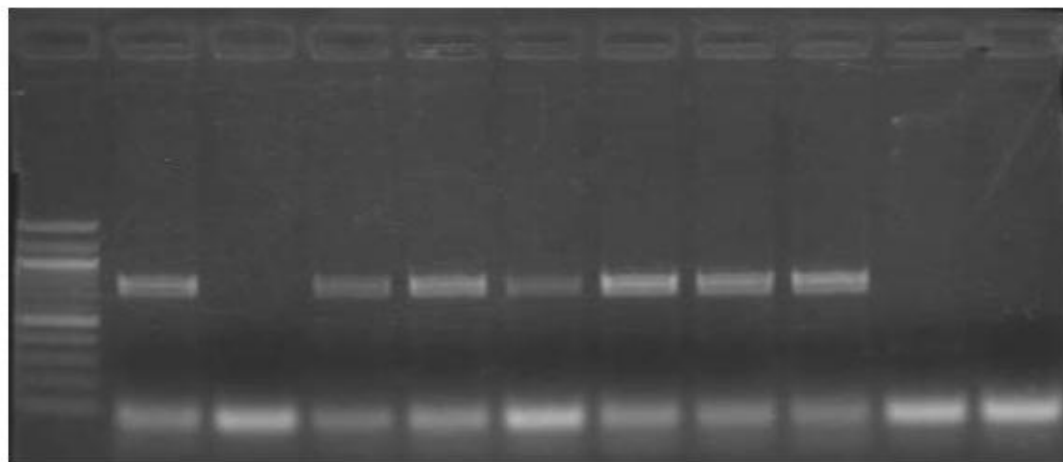
Για την ανίχνευση ποντικών που φέρουν τον άγριο τύπο του γονιδίου Ikaros (Ik w.t.) χρησιμοποιούνται οι εκκινητές Ikaros forward (IkF): 5'-GGG CCT TTG GGG ACA TCG AAG GTC-3', και ο Ikaros wild type (IkWT): 5'-CAT AGG GCA TGT CTG ACA GGC ACT-3' και ακολουθείται το παρακάτω πρωτόκολλο:

PCR για την ανίχνευση Ik w.t. διαγονιδιακών ποντικών με τη χρήση της Q5 πολυμεράσης:

Συστατικά:	Ποσότητα (μl)
DNA	1
Q5 Buffer	4
dNTPs (2,5mM)	1
Primer IkF	0,4
Primer IkWT	0,4
Q5 Polymerase	0,2
ddH ₂ O	13
Total	20

	Φάση	Θερμοκρασία	Χρόνος
Κύκλοι 35	Αρχική αποδιάταξη	98 °C	5:00 min
	Αποδιάταξη	98 °C	0:20 min
	Υβριδοποίηση εκκινητών	72 °C	0:20 min

	Επέκταση	72 °C	0:30 min
	Τελική επέκταση	72 °C	5:00 min



Ladder Sample 1 2 3 4 5 6 7 + control - control Blank

Εικόνα 18: Παράδειγμα μιας χαρακτηριστικής Iκ WT PCR ύστερα από ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πήκτωμα αгарόζης. Χαρακτηριστικό στοιχείο της συγκεκριμένης PCR είναι η διπλή μπάνα στα θετικά δείγματα.

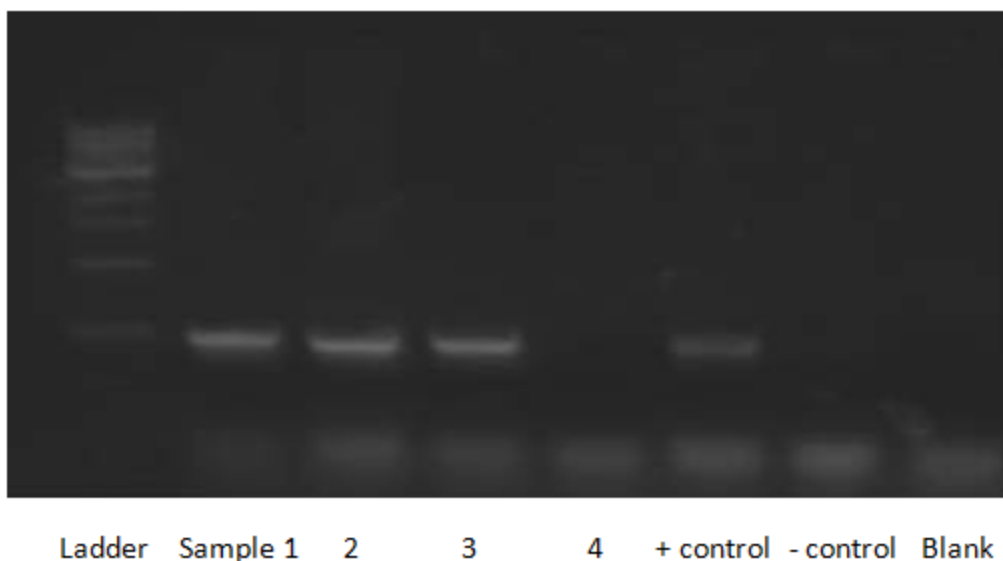
Για να ανιχνεύσουμε ποντίκια που φέρουν το ανασυνδυασμένο γονίδιο Ikaros (IkNeo) χρησιμοποιούνται οι εκκινητές Ikaros Forward (IkF): 5'-GGG CCT TTG GGG ACA TCG AAG GTC-3', όπως και προηγουμένως, και ο Ikaros Neo (IkNeo): 5'-CCA GCC TCT GAG CCC AGA AAG CGA-5' και ακολουθείται το παρακάτω πρωτόκολλο:

PCR για την ανίχνευση Ik neo διαγονιδιακών ποντικών με τη χρήση της Q5 πολυμεράσης:

Συστατικά	Ποσότητα (μl)
DNA	1
Q5 Buffer	4
dNTPs (2,5mM)	1
Primer IkF	0,4
Primer IkNeo	0,4
Q5 Polymerase	0,2
ddH2O	13
Total	20

	Φάση	Θερμοκρασία	Χρόνος
	Αρχική αποδιάταξη	98 °C	5:00 min
	Αποδιάταξη	98 °C	0:20 min

Κύκλοι 35	Υβριδοποίηση εκκινητών	72 °C	0:20 min
	Επέκταση	72 °C	0:30 min
	Τελική επέκταση	72 °C	5:00 min



Εικόνα 19: Παράδειγμα μιας χαρακτηριστικής Ik neo PCR ύστερα από ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πήκτωμα αγαρόζης

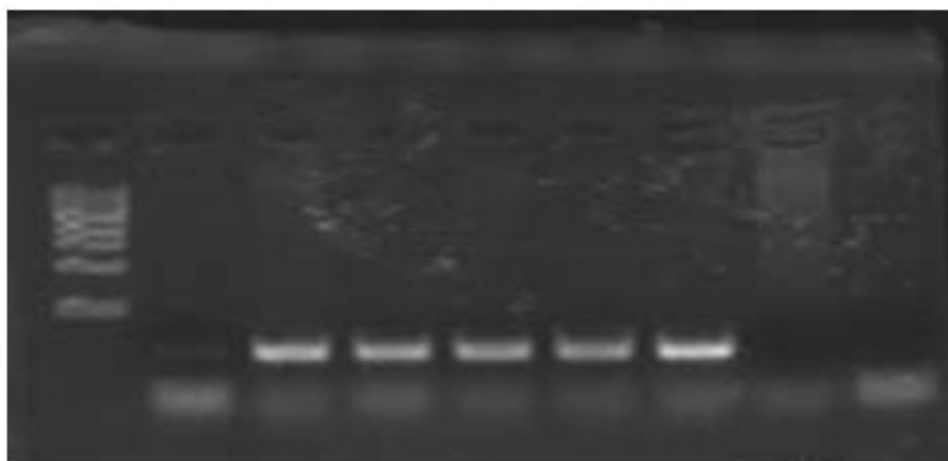
Χρησιμοποιείται το ίδιο πρόγραμμα στο μηχάνημα της PCR για τις Ik w.t. και Ik neo PCR.

Γ. PCR για 5xFAD ποντίκια

Για την ταυτοποίηση των 5xFAD διαγονιδιακών ποντικών πραγματοποιείται PCR με τη χρήση κατάλληλων εκκινητών και τη δράση της Taq One πολυμεράσης. Για να ανιχνεύσουμε τα ποντίκια που φέρουν το 5x διαγονίδιο χρησιμοποιούνται οι εκκινητές APP Forward (APPF): 5'-GAATTCCGACATGACTCAGG-3' και APP Reverse (APPR): 5'-GTTCTGCTGCATCTTGGACA-3' και ακολουθείται το παρακάτω πρωτόκολλο:

Συστατικά	Ποσότητα (μl)
DNA	1
Q5 Buffer	5
dNTPs (2,5mM)	1,8
Primer IkF	0,4
Primer IkNeo	0,4
Q5 Polymerase	0,125
ddH2O	16,275
Total	25

	Φάση	Θερμοκρασία	Χρόνος
Κύκλοι 35	Αρχική αποδιάταξη	94 °C	5:00 min
	Αποδιάταξη	94 °C	0:20 min
	Υβριδοποίηση εκκινητών	59 °C	0:20 min
	Επέκταση	68 °C	0:20 min
	Τελική επέκταση	68 °C	5:00 min



Ladder Sample 1 2 3 4 5 + control - control Blank

Εικόνα 20: Παράδειγμα μιας χαρακτηριστικής APP PCR ύστερα από ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πήκτωμα αγαρόζης

4. Ηλεκτροφόρηση μορίων DNA σε πήκτωμα αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση είναι τεχνική η οποία εξυπηρετεί στον διαχωρισμό, ταυτοποίηση αλλά και απομόνωση μορίων νουκλεϊκών οξέων. Καθώς το DNA και το RNA είναι αρνητικά φορτισμένα, κάτω από την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου "τρέχουν" σε πήκτωμα αγαρόζης με ταχύτητα η οποία είναι συνάρτηση του μήκους, του φορτίου και του σχήματός τους. Τα μικρά τμήματα, γενικά, κινούνται γρηγορότερα σε σύγκριση με τα μεγάλα.

Η αγαρόζη είναι ένα γραμμικό πολυμερές που συντίθεται από D- και L-γαλακτόζη μέσω α -(1→3) και β -(1→4) γλυκοζιτικών δεσμών. Η δημιουργία πηκτώματος αγαρόζης έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός τρισδιάστατου δικτύου καναλιών που ποικίλλουν σε διάμετρο από 50 έως 200nm. Οι παράγοντες που καθορίζουν τη μετανάστευση του DNA διαμέσου του πηκτώματος της αγαρόζης είναι: α) το

μοριακό βάρος του DNA, β) η συγκέντρωση της αγαρόζης, γ) η διαμόρφωση του DNA, δ) η παρουσία βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr) στο πήκτωμα και στο buffer της ηλεκτροφόρησης, ε) η εφαρμοζόμενη τάση, στ) ο τύπος της αγαρόζης και ζ) το buffer της ηλεκτροφόρησης. Έτσι, ο ρυθμός με τον οποίο κινείται το DNA στο πήκτωμα είναι αντιστρόφως ανάλογος του λογαρίθμου (\log_{10}) του μοριακού του βάρους. Η παρουσία EtBr ελαττώνει το αρνητικό φορτίο του DNA αυξάνοντας την ακαμψία αλλά και το μήκος του, ενώ όταν η εφαρμοζόμενη τάση είναι χαμηλή ο ρυθμός μετανάστευσης του DNA είναι ανάλογος με την τάση. Αντίθετα, όταν η τάση αυξηθεί κατά πολύ, τότε τα μόρια DNA με υψηλά μοριακά βάρη διαχωρίζονται με μη ομοιόμορφο τρόπο. Ο τύπος της αγαρόζης αφορά σε διαφορετικές θερμοκρασίες τήξης αυτής, ενώ σχετικά με το buffer αναφέρεται ότι η ηλεκτροχημική κινητικότητα του DNA επηρεάζεται από την ιοντική δύναμη του buffer ηλεκτροφόρησης. Έτσι, απουσία ιόντων, η ηλεκτρική αγωγιμότητα είναι ελάχιστη και το DNA μεταναστεύει πολύ αργά έως και καθόλου· πολύ υψηλή συγκέντρωση ιόντων οδηγεί στην παραγωγή μεγάλων ποσών θερμότητας με αποτέλεσμα, σε ακραίες περιπτώσεις, το πήκτωμα να λιώσει ή το DNA να αποδιαταχθεί (Κοτσιτίλη, 2012).

Πορεία

Προετοιμάζουμε με θέρμανση το πήκτωμα X% αγαρόζης (συνήθως 1-1,5%) σε 1x TBE προσθέτοντας 5 λ EtBr (σε τελική συγκέντρωση 1μg/ml) ανά 100 ml πηκτώματος. Το διάλυμα αδειάζεται σε κατάλληλο υποδοχέα και έπειτα τοποθετούνται τα χτενάκια. Αφού στερεοποιηθεί το πήκτωμα, προστίθεται buffer ηλεκτροφόρησης (TBE) στη συσκευή και εν συνεχεία αφαιρούνται τα χτενάκια. Με την αφαίρεσή τους σχηματίζονται τα "πηγαδάκια" εντός των οποίων θα μπορούν στη συνέχεια να τοποθετηθούν τα δείγματα. Όταν είναι πλέον έτοιμο το πήκτωμα, ξεκινά η τοποθέτηση των δειγμάτων. Αρχικά τοποθετείται ο ladder ο οποίος φέρει μόρια DNA γνωστού μοριακού βάρους και μήκους. Όταν πραγματοποιηθεί η ηλεκτροφόρηση, οι μπάστες που θα μας δώσει ο ladder θα μας βοηθήσουν να υπολογίσουμε το μήκος των μορίων DNA των δειγμάτων μας. Στη συνέχεια προστίθεται EtBr στα δείγματα και ύστερα από ήπια ανάδευση, ποσότητα κάθε δείγματος (15-25 μl) τοποθετείται στα πηγαδάκια. Τέλος, ρυθμίζονται οι παράμετροι της ηλεκτροφορητικής συσκευής (τάση ρεύματος, ένταση και χρόνος ηλεκτροφόρησης) και ξεκινά η διαδικασία. Αφού τα δείγματα "τρέξουν", το πήκτωμα

απομακρύνεται από την ηλεκτροφορητική συσκευή και τοποθετείται υπό υπεριώδες φως για να αποκαλυφθούν οι μπάντες του DNA. Λαμβάνεται φωτογραφία.



Εικόνα 21: Χαρακτηριστικό παράδειγμα πηκτώματος αγαρόζης όπως φαίνεται ύστερα από την έκθεσή του σε υπεριώδες φως. Φαίνονται οι μπάντες γνωστού μήκους του ladder καθώς και αυτές που σχηματίζουν τα θετικά δείγματα της PCR αντίδρασης.

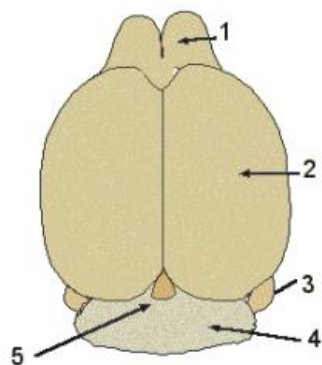
5. Απομόνωση εγκεφάλου και άλλων ιστών από ποντίκια

Η αναισθητοποίηση των πειραματόζωων πραγματοποιείται με τη χρήση ξηρού πάγου, η εξάχνωση του οποίου απελευθερώνει αέριο CO₂. Βάσει αυτής της ιδιότητας, τοποθετούνται μέσα σε κλειστό δοχείου μικρά θραύσματα ξηρού πάγου και το προς θανάτωση πειραματόζωο. Μεταξύ ξηρού πάγου και πειραματόζωου τοποθετείται κομμάτι χαρτί ώστε το πειραματόζωο να μην έρχεται σε απευθείας επαφή με τον πάγο. Όταν το ποντίκι είναι πλέον αναισθητό, απομακρύνεται από το δοχείο και ξεκινά η διαδικασία λήψης των ιστών του. Αρχικά, με τη βοήθεια ψαλιδιού και λαβίδας, ανοίγεται η θωρακική του κοιλότητα κόβοντας το διάφραγμα και τα πλευρά του μέχρι πάνω από το ύψος της καρδιάς. Έπειτα κόβεται ο δεξιός κόλπος της καρδιάς και με τη βοήθεια σύριγγας λαμβάνεται ποσότητα αίματος που απελευθερώνεται και μεταφέρεται σε σωληνάκι eppendorf. Η λήψη του αίματος πρέπει να γίνεται σταδιακά και προσεκτικά προκειμένου να μην αιμολυθεί. Από το αίμα απομονώνεται ο ορός (η πορεία απομόνωσης θα περιγραφεί αργότερα) όπου και αποθηκεύεται για μελλοντική χρήση.

Στη συνέχεια απομακρύνεται από το σώμα του ζώου το υπόλοιπο αίμα μέσω μιας διαδικασίας που λέγεται perfusion (αφαίμαξη). Κατά τη διαδικασία αυτή, με τη χρήση βελόνης τρυπάμε την αριστερή κοιλία της καρδιάς και εισάγουμε διάλυμα PBS 1X. Η σύσταση του διαλύματος αυτού είναι 13,7mM NaCl, 2,7mM KCl, 10mM

Na₂HPO₄ και KH₂PO₄ τα οποία είναι διαλυμένα σε ddH₂O. Η απομάκρυνση του αίματος γίνεται προκειμένου οι ιστοί να μπορούν να ληφθούν απαλλαγμένοι από αίμα και να είναι κατάλληλοι για μετέπειτα μελέτες. Με τη χορήγηση του PBS στην κυκλοφορία του ζώου (είναι σημαντικό η καρδιά του να χτυπάει ακόμα ώστε διαχυθεί σε όλο του το σώμα), παρατηρούμε αλλαγή του χρώματος του ήπατος. Αυτό, από βαθύ κόκκινο που είναι αρχικά, αποκτά σταδιακά ένα ωχροκίτρινο χρώμα. Όταν ασπρίσει αρκετά, θεωρούμε ότι έχει γίνει ολική απομάκρυνση του αίματος και σταματά η χορήγηση του PBS. Η χορήγηση γίνεται αργά ώστε να μη σπάσουν τα αγγεία του εγκεφάλου και πάθει ζημιά ο ιστός.

Μετά από το στάδιο του perfusion λαμβάνονται οι ιστοί. Κόβεται και αποθηκεύεται στους -80°C για μελλοντική χρήση ο άνω δεξιός λοβός του ήπατος καθώς και ένα μέρος της ουράς σε περίπτωση που θα χρειαστεί ξανά να πραγματοποιηθεί απομόνωση ολικού DNA. Για την απομόνωση του εγκεφάλου, αρχικά απομακρύνεται το δέρμα από το κεφάλι του ποντικού και έπειτα ανοίγεται το κρανίο του. Αφού αφαιρεθεί ο εγκέφαλος με πολλή προσοχή προκειμένου να μην τραυματιστεί, χωρίζεται στα δύο ημισφαίρια με τη χρήση ξυραφιού. Το δεξί ημισφαίριο χρησιμοποιείται συνήθως για ιστολογική ανάλυση, ενώ το αριστερό για απομόνωση πρωτεϊνών. Αυτός ο διαχωρισμός μπορεί να αλλάξει παρ' όλα αυτά σε περίπτωση που κατά την απομόνωση το δεξί ημισφαίριο τραυματιστεί. Στην ιστολογική ανάλυση θα χρησιμοποιηθεί το ημισφαίριο το οποίο βρίσκεται στην καλύτερα κατάσταση ύστερα από την απομόνωση. Προκειμένου να πραγματοποιηθεί η μονιμοποίηση του δεξιού ημισφαιρίου, τοποθετείται σε διάλυμα παραφολμαλδεΰδης 4% (PFA 4%) για 48 ώρες στους 4°C και έπειτα φυλάσσεται σε διάλυμα σουκρόζης 20% w/v σε PBS στους 4°C. Η παραφολμαλδεΰδη είναι ένα μονιμοποιητικό υλικό το οποίο συμβάλλει στη διατήρηση της δομής των κυττάρων του εγκεφάλου. Το αριστερό ημισφαίριο που θα χρησιμοποιηθεί για απομόνωση πρωτεϊνών τοποθετείται σε σωληνάκι erpendorf και φυλάσσεται στους -80 °C.



1. Οσφρητικοί Λοβοί
2. Εγκέφαλος
3. Ημισφαίρια
Παρεγκεφαλίδας
4. Παρεγκεφαλίδα
5. Επίφυση

Εικόνα 22: Απεικόνιση ενός εγκεφάλου ποντικού όπως φαίνεται από πάνω. Διακρίνονται οι οσφρητικοί λοβοί, τα εγκεφαλικά ημισφαίρια, η παρεγκεφαλίδα και η επίφυση (lab02_mouse-anatomy).

Πορεία απομόνωσης ορού αίματος:

1. Φυγοκέντρηση δείγματος στα 6.000 rpm για 10 λεπτά.
2. Μεταφορά υπερκείμενου υγρού σε νέο σωληνάκι.
3. Φυγοκέντρηση δείγματος στα 6.000 rpm για 10 λεπτά.
4. Μεταφορά υπερκείμενου υγρού σε νέο σωληνάκι.
5. Αποθήκευση στους -80 °C.

6. Λήψη τομών από εγκέφαλο ποντικών

Για να μπορεί να γίνει η μελέτη των κυττάρων και των πλακών του εγκεφάλου, είναι απαραίτητη η λήψη τομών. Για να γίνει αυτό χρησιμοποιείται μια μικροτόμος, η μικροτόμος δονούμενης λεπίδας (vibrotome). Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, για τη λήψη τομών χρησιμοποιείται το δεξί ημισφαίριο του εγκεφάλου. Οι τομές είναι οβελιαίες και έχουν πάχος 40μm. Αφού συναρμολογηθεί η μικροτόμος, το ημισφαίριο του εγκεφάλου κολλάται στην τράπεζα από την πλευρά που έχει κοπεί με το ξυραφάκι κατά την απομόνωσή του. Στη συνέχεια γεμίζουμε την τράπεζα με

ρυθμιστικό διάλυμα TBS pH 8. Η σύσταση του διαλύματος αυτού είναι 10mM Tris-HCl pH 8, 15mM NaCl σε ddH₂O. Αφού ρυθμίσουμε την ταχύτητα κίνησης της λεπίδας και τη συχνότητα δόνησής της και σχεδιάσουμε τη διαδρομή της πάνω στην τράπεζα, αρχίζει η λήψη των τομών. Αρχικά η συσκευή είναι ρυθμισμένη να λαμβάνει τομές πάχους 200μm μέχρι να αποκαλυφθεί ο ιππόκαμπος. Οι τομές αυτές δε συλλέγονται. Μόλις αποκαλυφθεί ο ιππόκαμπος, ρυθμίζεται η συσκευή ώστε να δίνει τομές πάχους 40μm. Η συλλογή των τομών γίνεται σε ειδικά πιάτα που φέρουν 24 πηγάδια (24-well plates). Σε κάθε πηγάδι έχει προηγουμένως τοποθετηθεί διάλυμα TBS pH 8 με 0,05% w/v sodium azide (νατραζίδιο). Ο ρόλος του νατραζιδίου είναι να προστατεύει τις τομές από κάποια πιθανή μεταγενέστερη μόλυνση από μύκητα. Αφού ολοκληρωθεί η διαδικασία, τα πιάτα ασφαλίζονται με parafilm και φυλάσσονται στους 4 °C.



Εικόνα 23: Μηχάνημα Vibrotome τύπου Leica VT1000 S (Google images). Το παρόν μηχάνημα χρησιμοποιήθηκε για τη λήψη τομών από τους εγκεφάλους των ποντικών.

7. Χρώση με Thioflavin S

Το Thioflavin S είναι ένα ομοιογενές μείγμα ενώσεων που προκύπτει από τη μεθυλίωση της διυδροθειοτολουιδίνης με σουλφονικό οξύ. Πρόκειται για μια

ιστοειδική χρωστική η οποία προσδένεται στα ινίδια αμυλοειδούς, αλλά όχι στα μονομερή, και προκαλεί την εκπομπή φθορισμού. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη χρώση του αμυλοειδούς των πλακών και των αγγείων. Η χρωστική αυτή παρασκευάζεται με την προσθήκη Thioflavin S 1% w/v σε δοκιμαστικό σωλήνα ο οποίος περιέχει ddH₂O. Αφού αναδευτεί καλά, φιλτράρεται προκειμένου να απομακρυνθούν τα ιζήματα που έχουν παραμείνει στον πάτο του δοκιμαστικού σωλήνα και μεταφέρεται σε καθαρό. Το σωληνάκι καλύπτεται με αλουμινόχαρτο προκειμένου να προστατευθεί η φωτοευαίσθητη χρωστική.

Για να πραγματοποιηθεί χρώση με Thioflavin S, αρχικά επιλέγονται οι κατάλληλες τομές. Συνήθως επιλέγονται 6 τομές πάχους 40μm με τέτοιο τρόπο ώστε να απέχουν μεταξύ τους 240μm. Οι τομές αυτές μεταφέρονται σε καθαρά πηγαδάκια. Σε κάθε πηγαδάκι έχει προστεθεί διάλυμα PBS 1x. Αρχικά οι τομές ξεπλένονται για 5 λεπτά πάνω σε αναδευτήρα με διάλυμα PBS 1x. Το στάδιο αυτό επαναλαμβάνεται δύο ακόμη φορές προκειμένου να απομακρυνθεί το sodium azide από τις τομές. Έπειτα προστίθεται η χρωστική και το πιάτο αναδύεται για 9 λεπτά. Έπειτα η χρωστική απομακρύνεται και γίνεται προσθήκη αιθανόλης 80% η οποία παραμένει στα πηγαδάκια για 3 λεπτά. Το βήμα αυτό επαναλαμβάνεται και 2η φορά. Ακολουθεί η προσθήκη αιθανόλης 95%, ξανά για 3 λεπτά. Τέλος ακολουθούν τρία διαδοχικά ξεπλύματα με ddH₂O για να απομακρυνθεί η περίσσεια αιθανόλης.

Αφού ολοκληρωθεί η χρώση, οι τομές μεταφέρονται σε αντικειμενοφόρους πλάκες. Πάνω από τις τομές προστίθεται υδατικό διάλυμα κάλυψης (mounting medium) και ακολουθεί η προσθήκη καλυπτρίδας. Μετά το στάδιο αυτό, τα πλακάκια είναι έτοιμα για παρατήρηση στο μικροσκόπιο φθορισμού

Πρωτόκολλο χρώσης τομών με Thioflavin S:

1. Φτιάχνουμε 5ml χρωστική, 1% σε ddH₂O, αναδύουμε σε vortex για να διαλυθεί, φιλτράρουμε.
2. Βάζουμε PBS 1x pH 7,4 στα well plates.
3. Κάνουμε 3 πλυσίματα (3x5 λεπτά) στα 30rpm βγάζοντας κάθε φορά το παλιό PBS και προσθέτοντας καινούριο.
4. Βάζουμε 500 μl χρωστικής για 9 λεπτά καθώς οι τομές αναδύονται στα 20rpm.

5. Πλένουμε 2 φορές με αιθανόλη 80% (2x3 λεπτά).
6. Πλένουμε 1 φορά με αιθανόλη 95% (1x3 λεπτά).
7. Ξεπλένουμε 3 φορές με αποσταγμένο νερό.
8. Βάζουμε τις τομές σε αντικειμενοφόρους, χρησιμοποιούμε mounting medium for fluorescence και κλείνουμε με καλυπτρίδα.
9. Παρατήρηση στο μικροσκόπιο φθορισμού.

8. Μικροσκοπική παρατήρηση και ανάλυση φωτογραφιών

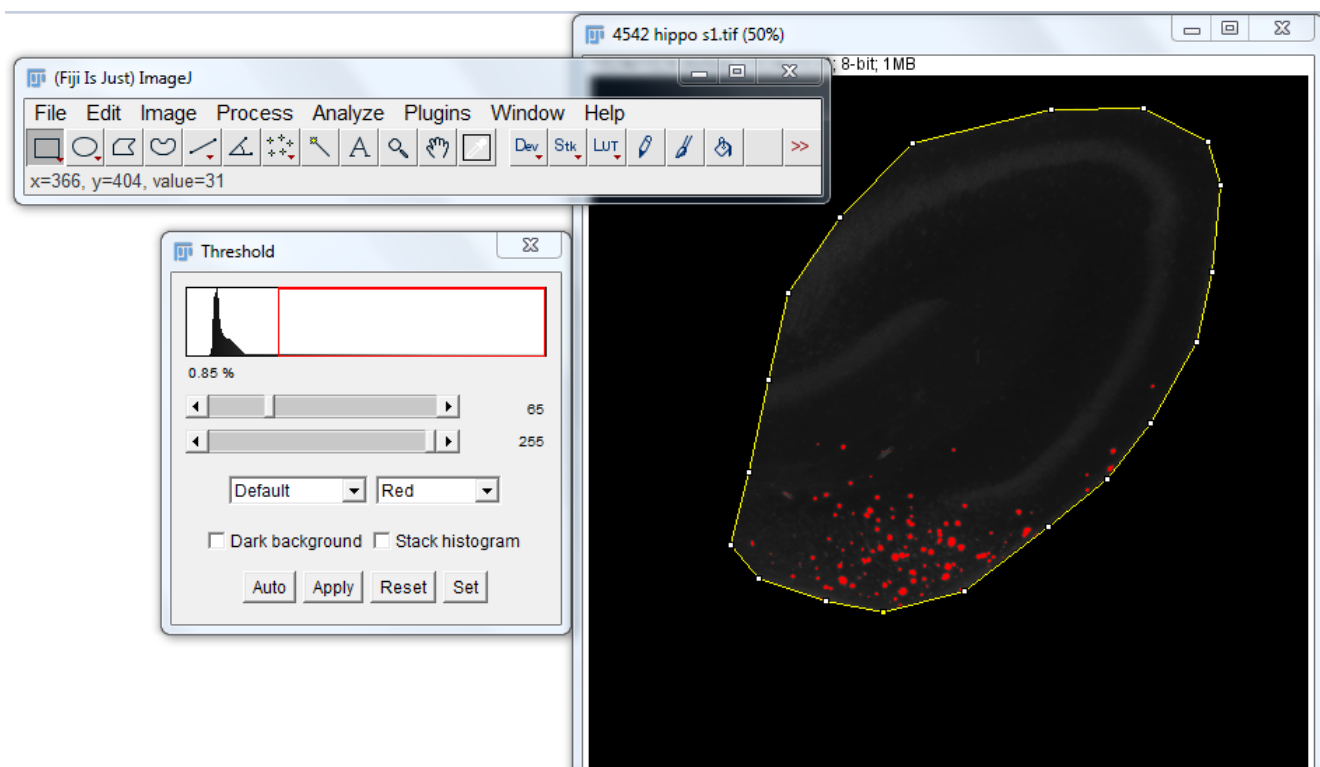
Η παρατήρηση των τομών και η λήψη φωτογραφιών πραγματοποιείται με τη βοήθεια ενός μικροσκοπίου φθορισμού. Ο ιππόκαμπος παρατηρείται χρησιμοποιώντας φακό που προσφέρει μεγέθυνση 5X, ενώ ο εγκεφαλικός φλοιός με 2,5X φακό. Αφού ληφθούν οι φωτογραφίες των εγκεφαλικών περιοχών που μας ενδιαφέρουν, πραγματοποιείται ανάλυσή τους με τη χρήση **ImageJ**. Με το πρόγραμμα αυτό μπορούμε να ποσοτικοποιήσουμε την επιφάνεια που καταλαμβάνουν στις τομές οι πλάκες του αμυλοειδούς σε σύγκριση με την ολική επιφάνεια του εκάστοτε παρασκευάσματος. Οι ποσοτικοποιήσεις αυτές μεταφράζονται σε γραφήματα με τη βοήθεια του προγράμματος **GraphPad Prism**. Με το πρόγραμμα αυτό γίνεται και η στατιστική ανάλυση που μας δείχνει εάν τα αποτελέσματά μας είναι στατιστικώς σημαντικά.

Στα πλακάκια που κατασκευάζονται έπειτα από τη χρώση με ThioS τοποθετούνται 5-6 τομές. Κάθε τομή αποτελεί μια οβελιαία τομή του εγκεφάλου του ποντικού που περιέχει τον εγκεφαλικό φλοιό και τον ιππόκαμπο, το ραβδωτό σώμα και μέρος της παρεγκεφαλίδας εάν αυτή δεν έχει αφαιρεθεί. Κατά τη μικροσκοπική παρατήρηση εστιάζουμε στον ιππόκαμπο με τον 5X φακό και στον φλοιό με τον 2,5X φακό και λαμβάνουμε τις φωτογραφίες. Ακόμη και στην 2,5X μεγέθυνση, δεν χωράει όλος ο φλοιός σε μια φωτογραφία. Έτσι λαμβάνουμε πολλαπλές φωτογραφίες (2-3), τις οποίες και θα ενώσουμε αργότερα χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα ImageJ. Προσέχουμε οι φωτογραφίες γειτονικών περιοχών του φλοιού που λαμβάνουμε να

έχουν κοινά μεταξύ τους σημεία, ώστε να μπορούν να αναγνωριστούν από το πρόγραμμα ως γειτονικές.

Αφού λάβουμε τις φωτογραφίες, ξεκινά η επεξεργασία τους με το πρόγραμμα ImageJ. Όσον αφορά τις φωτογραφίες του φλοιού, αρχικά με την επιλογή "Polygon selections" μπορούμε να επιλέξουμε και να απομονώσουμε την περιοχή που μας ενδιαφέρει, δηλαδή τον φλοιό. Αφού ρυθμίσουμε τη φωτεινότητα της φωτογραφίας και την αντίθεση ώστε να είναι όσο πιο ευκρινείς γίνεται οι πλάκες αμυλοειδούς (αυτό γίνεται με τις επιλογές Image»Adjust»Brightness/Contrast), πρέπει να ρυθμίσουμε την οδό έντασης φωτεινότητας στο σημείο εκείνο που το πρόγραμμα θα το θεωρεί ως σήμα. Να ορίσουμε δηλαδή το σημείο που το πρόγραμμα θα θεωρεί μια ένταση φωτός ως πλάκα αμυλοειδούς και όχι ως θόρυβο. Αυτό γίνεται με τις επιλογές Image»Adjust»Threshold. Στη συνέχεια επιλέγουμε "Analyze" και το πρόγραμμα αυτομάτως υπολογίζει την % κάλυψη των πλακών αμυλοειδούς στη φωτογραφία.

Στις φωτογραφίες του φλοιού πραγματοποιούμε ένα επιπλέον βήμα, δηλαδή ενώνουμε τις δύο ή τρεις φωτογραφίες που λάβαμε από την κάθε τομή. Για να το κάνουμε αυτό ανοίγουμε όλες τις φωτογραφίες μαζί στο πρόγραμμα και επιλέγουμε Plugins»Stitching»Pairwise stitching. Η υπόλοιπη διαδικασία που ακολουθούμε είναι η ίδια.



Εικόνα 24: Με την επιλογή Image»Adjust»Threshold μπορούμε να καθορίσουμε την ουδό έντασης φωτεινότητας στο σημείο εκείνο που το πρόγραμμα θα το θεωρεί ως σήμα. Στην παρούσα φωτογραφία βλέπουμε την τομή ενός ιπποκάμπου και με κόκκινο χρώμα φαίνονται οι πλάκες αμυλοειδούς.

Αφού πάρουμε τα αποτελέσματα, την % κάλυψη των πλακών σε κάθε τομή δηλαδή, χρησιμοποιούμε το πρόγραμμα GraphPad prism 6 για να κατασκευάσουμε τα διαγράμματα και να κάνουμε τον στατιστικό έλεγχο. Αρχικά βγάζουμε τον μέσο όρο κάλυψης πλακών από όλες τις φωτογραφίες που λάβαμε από το κάθε πειραματόζωο ξεχωριστά. Στη συνέχεια ομαδοποιούμε αυτούς τους μέσους όρους σε δύο ομάδες ανάλογα με τον γονότυπο των ποντικών (συνήθως ομάδα ελέγχου και πειραματική ομάδα), και τους εισάγουμε στο πρόγραμμα. Το πρόγραμμα αυτομάτως κατασκευάζει τις μπάρες. Όσον αφορά τον στατιστικό έλεγχο, με την επιλογή "Analyze" κατευθυνόμαστε στο t-test. Αν μας δώσει αυτό το τεστ $P\text{-value} < 0,05$, τότε μιλάμε για ένα στατιστικώς σημαντικό δείγμα.

ΜΕΡΟΣ ΤΡΙΤΟ

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1. Μελέτη της επίδρασης της έλλειψης της επίκτητης ανοσίας στην εναπόθεση β-αμυλοειδούς στον εγκέφαλο των 5xFAD ποντικών

A. Πειραματόζωα που χρησιμοποιήθηκαν

A1. Διαγονιδιακά 5xFAD ποντίκια-μοντέλα της νόσου Alzheimer

Διαγονιδιακά ποντίκια τα οποία εκφράζουν στον εγκέφαλο την ανθρώπινη APP η οποία φέρει τρεις FAD μεταλλαγές και την ανθρώπινη PS1 η οποία φέρει δύο. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αυξημένη παραγωγή και εναπόθεση του β-αμυλοειδούς πεπτιδίου στον ιππόκαμπο και τον φλοιό του εγκεφάλου των ποντικών.

A2. Ikaros -/- ποντίκια

Ποντίκια στα οποία έχει γίνει αδρανοποίηση του γονιδίου Ikaros το οποίο κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη η οποία είναι απαραίτητη για τη διαφοροποίηση και την ωρίμανση των T- και B-λεμφοκυττάρων και των φυσικών φονικών κυττάρων. Ως αποτέλεσμα αυτού, τα ποντίκια αυτά στερούνται επίκτητης ανοσίας και εμφανίζουν δυσκολίες επιβίωσης.

B. Διασταυρώσεις πειραματόζωων

Προκειμένου να μελετηθεί η επίδραση της έλλειψης της επίκτητης ανοσίας στην εναπόθεση του β-αμυλοειδούς πεπτιδίου στον εγκέφαλο των ποντικών, πραγματοποιήθηκαν διασταυρώσεις με σκοπό τη λήψη διαγονιδιακών ποντικιών-μοντέλων της νόσου Alzheimer τα οποία στερούνται επίκτητης ανοσίας, δηλαδή 5xFAD Ik^{+/-} διαγονιδιακά ποντίκια. Οι διασταυρώσεις που πραγματοποιήθηκαν ήταν οι εξής:

5xFAD Ik^{+/-} ♂ (x) Ik^{+/-} ♀ και 5xFAD Ik^{+/-} ♀ (x) Ik^{+/-} ♂

Από αυτές τις διασταυρώσεις προέκυψαν οι εξής απόγονοι:

- 5xFAD Ik^{+/+}
- 5xFAD Ik^{+/-}
- 5xFAD Ik^{-/-}
- Ik^{+/+}
- Ik^{+/-}
- Ik^{-/-}

Έπειτα από αυτές της διασταυρώσεις μπορούν να προκύψουν τα επιθυμητά 5xFAD Iκ-/- ποντίκια. Ο λόγος που διασταυρώθηκαν ποντίκια ετερόζυγα για το διαγονίδιο του Ikaros και όχι ποντίκια knockout είναι το γεγονός ότι τα Iκ-/- ποντίκια, πέραν από τη δυσκολία τους για επιβίωση, είναι ανίκανα να αναπαραχθούν λόγω της αδύναμης σωματικής τους κατάστασης. Με βάση τους νόμους της μενδελικής κληρονομικότητας, η πιθανότητα να γεννηθεί ποντίκι με γονότυπο 5xFAD Iκ-/- είναι 12,5%. Το ποσοστό αυτό μειώνεται στο 6,25% αν λάβουμε υπόψη το γεγονός ότι για τους πειραματισμούς χρησιμοποιούμε μόνο τα θηλυκά άτομα, και ακόμη περισσότερο καθώς η πλειοψηφία των ποντικιών αυτών πεθαίνει πρόωρα λόγω αδυναμίας επιβίωσης.

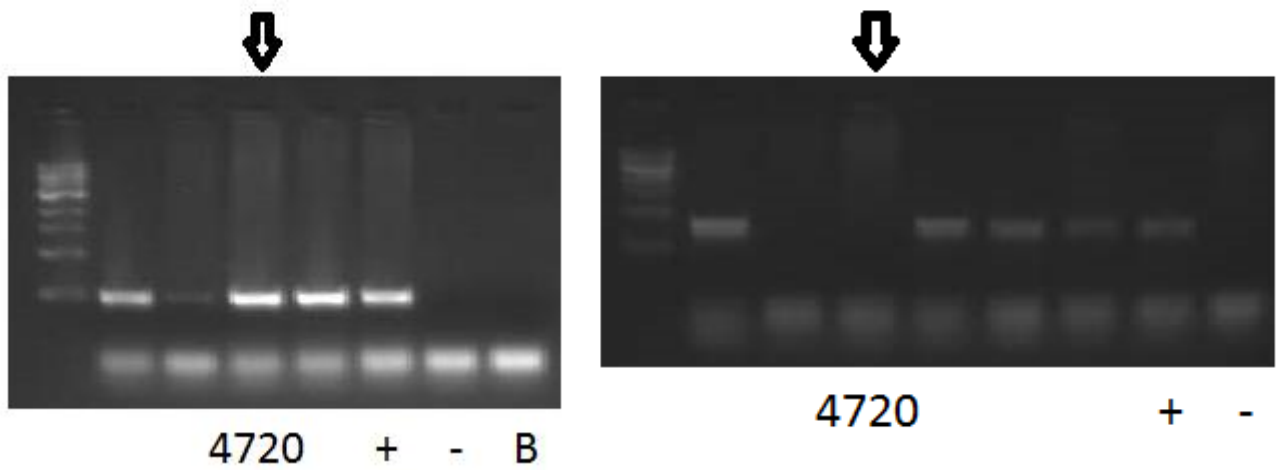
Όσον αφορά το τεχνικό μέρος των διασταυρώσεων, τα προς διασταύρωση ποντίκια μεταφέρονται σε ξεχωριστά κλουβιά και αφήνονται να γονιμοποιηθούν. Οι συνήθεις διασταυρώσεις αποτελούνται από ένα αρσενικό άτομο και δύο θηλυκά ίδιου γονοτύπου, σπανιότερα τρία. Σε ηλικία περίπου 1,5 μήνα τα ποντίκια θεωρούνται αναπαραγωγικά ώριμα. Η εγκυμοσύνη διαρκεί συνήθως 21 ημέρες. Η φροντίδα των νεογέννητων ποντικιών διαρκεί 2-3 εβδομάδες. Σε ορισμένες περιπτώσεις, το θηλυκό ποντίκι, στην πρώτη του γέννα δεν τρέφει τα μικρά με αποτέλεσμα αυτά να πεθαίνουν. Στις επόμενες γενιές η συμπεριφορά αυτή εξαλείφεται. Μετά το πέρας των τριών εβδομάδων τα μικρά μπορούν να απογαλακτιστούν και να απομακρυνθούν από τον κλωβό των γονέων. Επίσης θα πρέπει εντός του πρώτου μήνα της ζωής τους να διαχωριστούν τα αρσενικά από τα θηλυκά αδέρφια ώστε να μην αρχίσουν να διασταυρώνονται μεταξύ τους.

Γ. Απαραίτητες συνθήκες για την επιβίωση των ποντικών

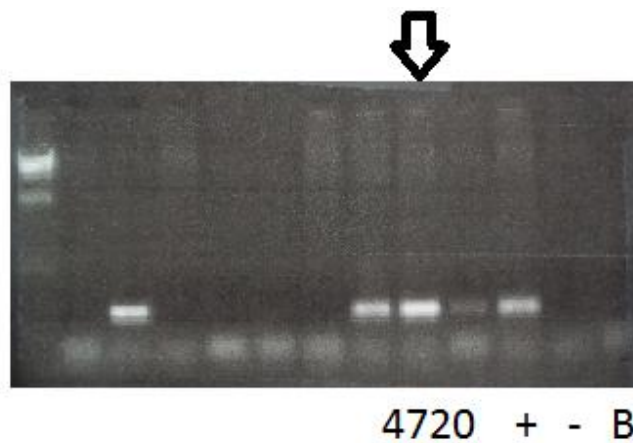
Όπως έχει ήδη αναφερθεί, τα ποντίκια που είναι knockout για το γονίδιο Ikaros δεν μπορούν να επιβιώσουν για μεγάλο χρονικό διάστημα λόγω της έλλειψης επίκτητης ανοσίας. Για τον λόγο αυτό είναι απαραίτητη προϋπόθεση η διατήρηση στειρών συνθηκών στον θάλαμο με τους κλωβούς των ποντικιών, η αποτελεσματική αποστείρωση των κλωβών και ο καθαρισμός όλων των εργαλείων που χρησιμοποιούνται καθώς και των χεριών του χειριστή με αιθανόλη. Παρ' όλα αυτά, ακόμη και αν τηρούνται όλα τα πρωτόκολλα υγιεινής του χώρου, τα Iκ-/- ποντίκια είναι και πάλι ανίκανα να επιβιώσουν για ικανά χρονικά διαστήματα. Για τον λόγο αυτό χορηγείται στα ποντίκια αυτά αντιβίωση Baytril 10% προκειμένου να αντιμετωπίζουν τις διάφορες πιθανές λοιμώξεις, μιας και το ανοσοποιητικό τους

σύστημα αδυνατεί να το κάνει αυτό από μόνο του. Η χορήγηση της αντιβίωσης πραγματοποιείται μια φορά την εβδομάδα με την προσθήκη 2 ml αντιβίωσης στα μπουκάλια με το νερό από τα οποία πίνουν. Απουσία αντιβίωσης τα ποντίκια αυτά φτάνουν το πολύ την ηλικία του ενός μήνα και μετά πεθαίνουν. Αυτό το γεγονός αποτελεί εμπόδιο στη μελέτη της εναπόθεσης του αμυλοειδούς η οποία ξεκινά μετά τον 1,5 μήνα και ολοκληρώνεται στους 4 μήνες ζωής στα θηλυκά άτομα. Σε αντίθεση με τα θηλυκά άτομα, η εναπόθεση του αμυλοειδούς στα αρσενικά άτομα είναι έντονη στους 5 μήνες της ζωής τους. Για τον λόγο αυτό είναι πιο δύσκολη η επιβίωσή τους έως αυτήν την ηλικία και κατ' επέκταση η μελέτη τους.

Δυστυχώς, στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής, δεν ήταν επιτυχής η παραγωγή του διαγονιδιακού 5xFAD Iκ^{-/-} μοντέλου ποντικού. Ενώ παρατηρήθηκε γέννηση τουλάχιστον δύο τέτοιων ατόμων κατά τη διάρκεια της παραμονής μου στο εργαστήριο (παράδειγμα στις παρακάτω εικόνες), κανένα ποντίκι δεν κατάφερε να επιβιώσει έως την ηλικία των 4 μηνών που είναι απαραίτητο για να πραγματοποιηθούν οι πειραματισμοί. Επιπλέον, παρατηρήθηκαν πολλές περιπτώσεις κανιβαλισμού από τις μητέρες ποντικιών που φαίνονταν να έχουν σωματικό μέγεθος μικρότερο από το φυσιολογικό. Είναι πιθανό αυτά τα ποντίκια να ήταν knockout για το γονίδιο Ikaros, που ποτέ δε μας δόθηκε η ευκαιρία όμως να επιβεβαιώσουμε τον γονότυπό τους με τη χρήση PCR. Έτσι, στα πλαίσια των αποτελεσμάτων, θα παρουσιαστούν μόνο οι πειραματισμοί που αφορούν τα 5xFAD Iκ^{+/-} και τα 5xFAD Iκ^{+/+} ποντίκια και όχι τα 5xFAD Iκ^{-/-}.



Εικόνα 25: Αριστερά: Ik Neo PCR για το ποντίκι 4720. Η PCR αυτή βγήκε θετική για το τροποποιημένο διαγονίδιο, που σημαίνει ότι το ποντίκι αυτό το έχει κληρονομήσει. Δεξιά: Ik WT PCR για το ποντίκι 4720. Η PCR βγήκε αρνητική για το γονίδιο αγρίου τύπου. Αυτό το αποτέλεσμα, σε συνδυασμό με το προηγούμενο, μας δείχνουν ότι πρόκειται για ένα ποντίκι με αδρανοποιημένα και τα δύο Ikaros αλληλόμορφα.



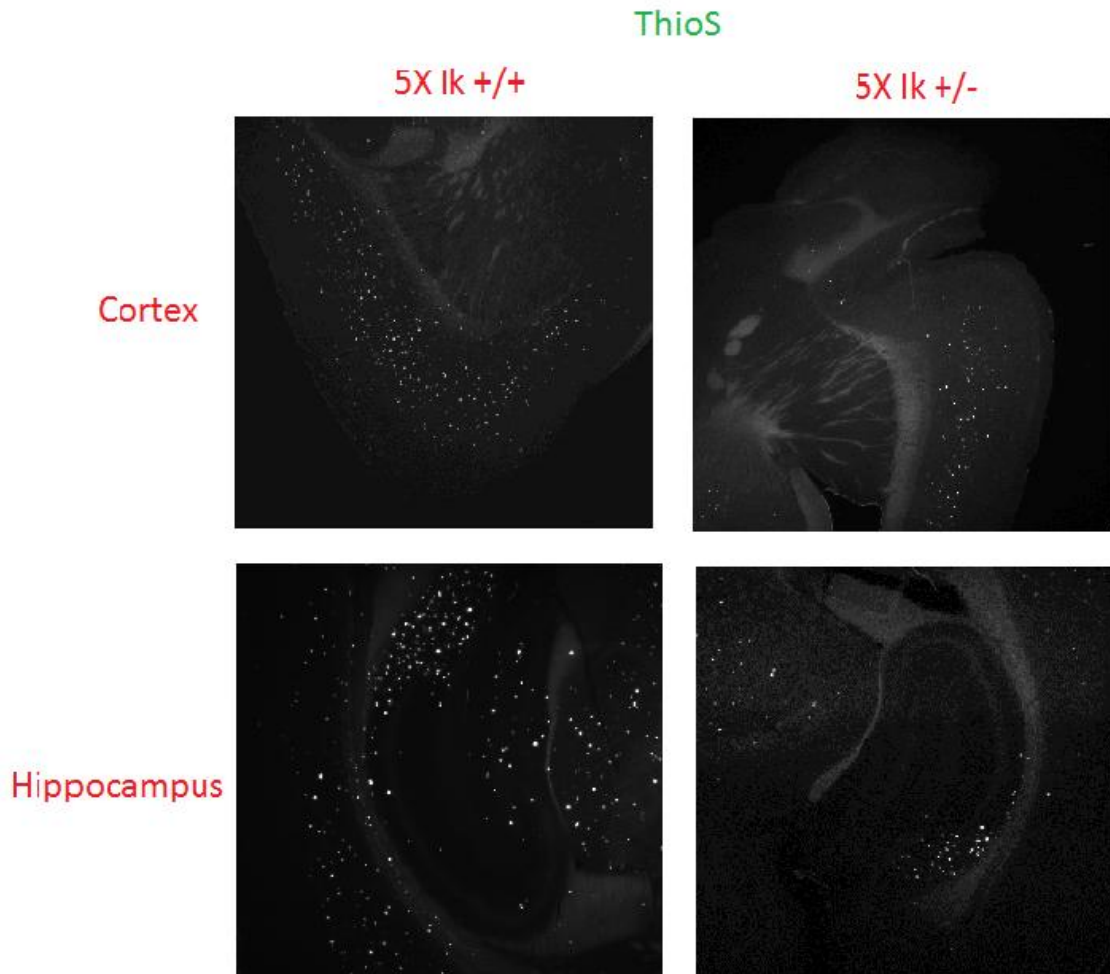
Εικόνα 26: APP PCR για το ποντίκι 4720. Η PCR αυτή βγήκε θετική, γεγονός που μας δείχνει ότι το ποντίκι φέρει το 5x διαγονίδιο.

Δ. Η αδρανοποίηση του ενός αλληλόμορφου του γονιδίου Ikaros στα διαγονιδιακά 5x*FAD* ποντίκια-μοντέλα της νόσου Alzheimer οδηγεί στη μείωση του αριθμού των αμυλοειδών πλακών στον εγκέφαλο των ποντικών

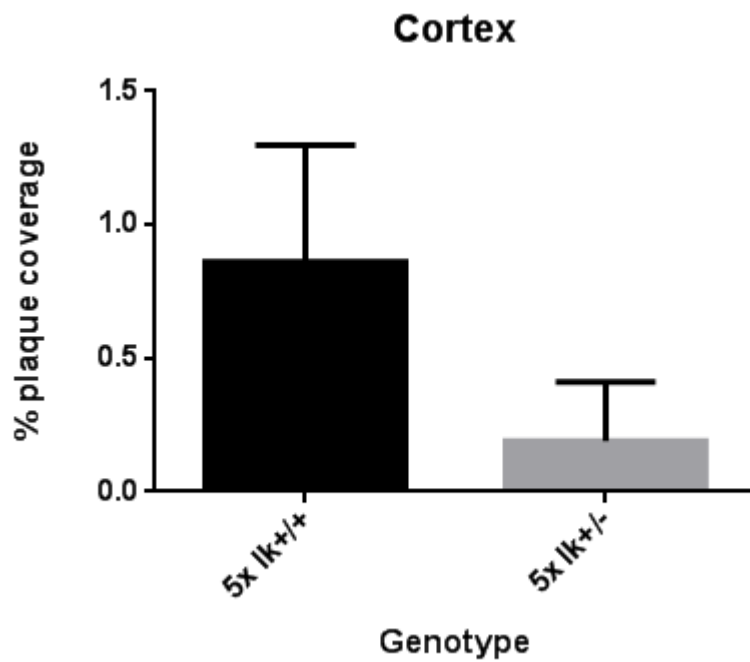
Τα ποντίκια που χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη της εναπόθεσης του β-αμυλοειδούς πεπτιδίου ήταν θηλυκά, ηλικίας 4 μηνών, τα οποία λάμβαναν αντιβίωση καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής τους. Προκειμένου να μελετηθούν οι πλάκες στον εγκέφαλο των ποντικών, πραγματοποιήθηκε λήψη αυτού ύστερα από θανάτωση του ζώου, λήψη τομών και χρώση με Thioflavin S, διαδικασίες οι οποίες αναλύονται στην ενότητα "Υλικά και Μέθοδοι". Όπως προαναφέρθηκε, το Thioflavin S είναι μια ιστοειδική χρωστική η οποία προσδένεται στα ινίδια αμυλοειδούς των πλακών καθώς και των αγγείων. Η παρατήρηση των πλακών πραγματοποιήθηκε σε συγκεκριμένα τμήματα του εγκεφάλου τα οποία εμφανίζουν τη μεγαλύτερη εναπόθεση β-

αμυλοειδούς, στον ιππόκαμπο δηλαδή και τον φλοιό. Ύστερα από χρώση των τομών και παρατήρησή τους στο μικροσκόπιο φθορισμού, παρατηρήθηκε ότι ο αριθμός των πλακών τόσο στον φλοιό όσο και στον ιππόκαμπο παρουσίαζε μια μείωση στα 5xFAD Iκ^{+/-} ποντίκια σε σχέση με τα 5xFAD Iκ^{+/+}.

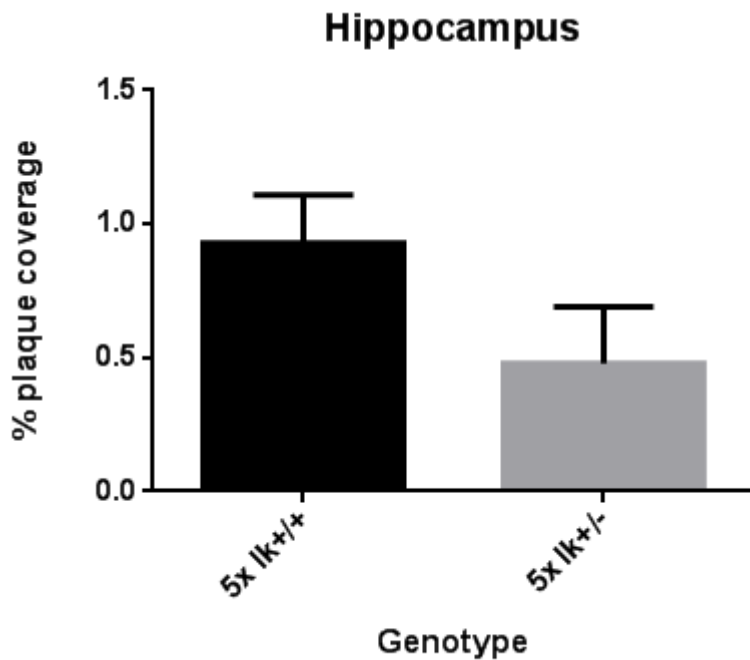
Προκειμένου να προσδιορίσουμε τον βαθμό μείωσης της εναπόθεσης του β-αμυλοειδούς πεπτιδίου στον εγκέφαλο πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση. Για τη στατιστική ανάλυση επιλέχθηκαν 6 τομές πάχους 40μm από τρία διαφορετικά πειραματόζωα, οι οποίες απέχουν μεταξύ τους 240μm και βάφτηκαν με Thioflavin S. Αυτές οι τομές θεωρείται ότι αντιπροσωπεύουν το σύνολο του εγκεφάλου. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια των προγραμμάτων Image J και Graph Prism. Με τη χρήση του Image J ποσοτικοποιήθηκε η εναπόθεση του β-αμυλοειδούς στον ιππόκαμπο και στον φλοιό του εγκεφάλου. Με την ποσοτικοποίηση λήφθηκαν τιμές που αντιστοιχούν στην επί τοις εκατό κάλυψη του ιππόκαμπου και του φλοιού από τις αμυλοειδείς πλάκες. Έπειτα, με τη χρήση του προγράμματος Graph Prism, προσδιορίστηκε ο μέσος όρος των τιμών και εντοπίστηκαν οι διαφορές μεταξύ των δύο ομάδων, των 5xFAD Iκ^{+/+} και 5xFAD Iκ^{+/-} δηλαδή. Παράλληλα παρασκευάστηκαν και τα αντιπροσωπευτικά γραφήματα..



Εικόνα 27: Χρώση τομών εγκεφάλου ποντικού με Thioflavin S. Στις φωτογραφίες αυτές παρατηρούνται οι αμυλοειδείς πλάκες στον φλοιό και στον ιππόκαμπο του εγκεφάλου ενός 5x Ik^{+/+} και ενός 5x Ik^{+/-} θηλυκού ποντικού ηλικίας 4 μηνών. Ανιχνεύεται μείωση του αριθμού των πλακών τόσο στον φλοιό όσο και στον ιππόκαμπο του εγκεφάλου των 5x Ik^{+/-} ποντικών σε σύγκριση με των 5x Ik^{+/+} (Μεγέθυνση 5X).



Εικόνα 28: Στατιστική ανάλυση των αμυλοειδών πλακών στον εγκεφαλικό φλοιό των 5xFAD Iκ+/+ και 5xFAD Iκ+/- ποντικών. Παρατηρείται μείωση της εναπόθεσης των πλακών αμυλοειδούς στα ετερόζυγα ποντίκια για το γονίδιο Iκaros σε σχέση με τα αγρίου τύπου.



Εικόνα 29: Στατιστική ανάλυση των αμυλοειδών πλακών στον ιππόκαμπο του εγκεφάλου των 5xFAD Iκ+/+ και 5xFAD Iκ+/- ποντικών. Παρατηρείται μείωση της εναπόθεσης των πλακών αμυλοειδούς στα ετερόζυγα ποντίκια για το γονίδιο Iκaros σε σχέση με τα αγρίου τύπου.

ΜΕΡΟΣ ΤΕΤΑΡΤΟ

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο ρόλος του γονιδίου Ikaros στη νόσο Alzheimer

Η νόσος του Alzheimer (Alzheimer's disease - AD) είναι μια νευροεκφυλιστική νόσος η οποία χαρακτηρίζεται από σταδιακή εξασθένηση της μνήμης, απώλεια των γνωστικών δεξιοτήτων και νευροεκφυλιστικές διαταραχές (Selkoe, 2011). Έχουν περιγραφεί δύο μορφές της νόσου ανάλογα με την ηλικία έναρξης αυτής: η οικογενής και η σποραδική μορφή (Bekris et al, 2010). Με την οικογενή μορφή της νόσου σχετίζονται μεταλλάξεις που έχουν εντοπιστεί στο γονίδιο που κωδικοποιεί την πρόδρομη πρωτεΐνη του β-αμυλοειδούς (Amyloid Precursor Protein - APP) και στα γονίδια των πρεσινιλινών 1 και 2 (Presenilin 1 και 2, ή αλλιώς PS1 και PS2) που αποτελούν μέρος του συμπλέγματος της γ-εκκριτάσης (Bekris et al, 2010). Με τη σποραδική μορφή της νόσου από την άλλη, έχουν βρεθεί να σχετίζονται μεταλλάξεις στο γονίδιο της Απολιποπρωτεΐνης E (Apolipoprotein E - ApoE) (Bekris et al, 2010). Τα βασικά παθολογικά χαρακτηριστικά της νόσου είναι ο σχηματισμός των β-αμυλοειδών πλακών, τα νευροϊνδιακά δεμάτια και η εγκεφαλική αμυλοειδική αγγειοπάθεια (Selkoe, 2011). Πρόσφατες έρευνες προτείνουν ότι και η φλεγμονή αποτελεί ένα πρόσθετο χαρακτηριστικό της νόσου καθώς μπορεί να συνεισφέρει στην εξέλιξή της (Heneka, 2007). Η φλεγμονώδης απόκριση έχει ως στόχο να εξαλείψει την αρχική αιτία τραυματισμού καθώς και των τραυματισμένων ιστών και κυττάρων. Εάν όμως η υγεία του ιστού δεν αποκατασταθεί, η φλεγμονή μετατρέπεται σε μια χρόνια κατάσταση η οποία συνεχώς διαβρώνει τους γύρω ιστούς. Κύριοι υπεύθυνοι για τη φλεγμονώδη αυτή απόκριση είναι η μικρογλοία και τα αστροκύτταρα (Rubio-Perez, 2012).

Ενώ ο ρόλος της φυσικής ανοσίας στην παθογένεια της νόσου Alzheimer έχει μελετηθεί εκτενώς, λίγα είναι γνωστά για τον ρόλο της επίκτητης ανοσίας. Η πρωτεΐνη Ikaros είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας ο οποίος είναι υπεύθυνος για την ωρίμανση και διαφοροποίηση των T- και B-λεμφοκυττάρων και των NK κυττάρων. Η πρωτεΐνη αυτή μπορεί να προσδένει και να ενεργοποιεί διάφορους ενισχυτές γονιδίων που σχετίζονται με τη διαφοροποίηση και ωρίμανση των παραπάνω κυτταρικών πληθυσμών (Georgopoulos et al, 1994, 2017, Kaufmann et al, 2003). Αδρανοποίηση του γονιδίου Ikaros σε διαγονιδιακά ποντίκια έχει ως αποτέλεσμα την έλλειψη αυτών των κυτταρικών πληθυσμών και κατ' επέκταση την έλλειψη της επίκτητης ανοσίας. Για τον λόγο αυτό, τα Iκ^{-/-} ποντίκια αντιμετωπίζουν

δυσκολίες επιβίωσης, καθώς δεν μπορούν να ανταπεξέλθουν στις διάφορες πιθανές μολύνσεις και έτσι δεν μπορούν από μόνα τους να επιβιώσουν για πάνω από 2-3 εβδομάδες. Μόνο με τη χορήγηση αντιβίωσης μπορεί να επεκταθεί σε κάποιο βαθμό η διάρκεια ζωής τους.

Σύμφωνα με μια πρόσφατη έρευνα που πραγματοποιήθηκε προκειμένου να μελετηθεί η έλλειψη της επίκτητης ανοσίας στον εγκέφαλο διαγονιδιακών ποντικών-μοντέλων της νόσου Alzheimer, ερευνητές διασταύρωσαν διαγονιδιακά ποντίκια-μοντέλα της νόσου (5xFAD) με ποντίκια που στερούνταν T και B-λεμφοκύτταρα και NK κύτταρα (Rag2^{-/-} Il2γ^{-/-}) λόγω της απαλοιφής δύο γονιδίων που παίζουν ρόλο στην ωρίμανσή τους (Marsh et al, 2016). Αποτέλεσμα των διασταυρώσεων αυτών ήταν η δημιουργία διαγονιδιακών ποντικών-μοντέλων της νόσου Alzheimer τα οποία στερούνται επίκτητου ανοσοποιητικού συστήματος. Ύστερα από την πραγματοποίηση διαφόρων πειραμάτων, οι ερευνητές κατάφεραν να δείξουν ότι τα ποντίκια τα οποία στερούνται επίκτητης ανοσίας εμφανίζουν υψηλότερα επίπεδα εναπόθεσης β-αμυλοειδούς στον εγκέφαλο, με αποτέλεσμα να έχουν πάνω από τον διπλάσιο αριθμό αμυλοειδικών πλακών (Marsh et al, 2016). Μετρώντας τα επίπεδα των ανοσοσφαιρινών στον εγκέφαλο και συγκεκριμένα των IgGs σε 5xFAD ποντίκια, παρατήρησαν ότι οι IgGs, με κάποιον άγνωστο μηχανισμό, διαπερνούν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό και εισέρχονται στον εγκέφαλο, συμβάλλοντας έτσι στην απομάκρυνση του β-αμυλοειδούς πεπτιδίου. Έτσι οδηγήθηκαν στο συμπέρασμα ότι τα RAG-5xFAD ποντίκια, λόγω της έλλειψης των λευκοκυττάρων, αδυνατούν να παράγουν ανοσοσφαιρίνες, γεγονός που αποτελεί τη βασική αιτία για την οποία τα ποντίκια αυτά εμφανίζουν διπλάσιο αριθμό πλακών αμυλοειδούς στον εγκέφαλό τους (Marsh et al, 2016).

Ανάλογη μελέτη πραγματοποιήθηκε και από την ερευνητική ομάδα των Spani et al (2015). Στη μελέτη αυτή, οι ερευνητές διερεύνησαν επίσης τον ρόλο του επίκτητου ανοσοποιητικού συστήματος στην προερχόμενη από τη συσσώρευση του β-αμυλοειδούς παθογένειας της νόσου Alzheimer. Αυτό το έκαναν με τη χρήση μοντέλου ποντικών της νόσου τα οποία δεν έφεραν T- και B-λεμφοκύτταρα. Το μοντέλο της νόσου Alzheimer που χρησιμοποιήθηκε ήταν τα PSAPP ποντίκια τα οποία τα οποία εκφράζουν μια χιμαιρική πρωτεΐνη του πρόδρομου αμυλοειδούς που φέρει ανθρώπινα και ποντικίσια τμήματα καθώς και τη μεταλλαγμένη ανθρώπινη πρεσενιλίνη 1 (PS1). Το ανοσοκατεσταλμένο μοντέλο ποντικού που

χρησιμοποιήθηκε ήταν αυτό που δε φέρει αντίγραφο του γονιδίου Rag2 (Rag2 ko) και κατ' επέκταση λειτουργικά B- και T-λεμφοκύτταρα (διαθέτουν όμως NK κύτταρα). Διασταύρωση αυτών των δύο μοντέλων ποντικών μεταξύ τους είχε ως αποτέλεσμα την παραγωγή ενός ποντικού-μοντέλου για τη νόσο Alzheimer που παράλληλα είναι Rag2 ko και έτσι δε φέρει επίκτητο ανοσοποιητικό σύστημα. Τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής ήταν τα αντίθετα από αυτά της προαναφερθείσας. Απουσία λειτουργικών T- και B-λεμφοκυττάρων είχε ως αποτέλεσμα τα μειωμένα επίπεδα Αβ στον εγκέφαλο μαζί με αυξημένη μικρογλοϊώση και εκκαθάριση των συσσωματωμάτων του Αβ. Παρόλα αυτά δεν επηρεάστηκαν τα επίπεδα του Αβ σε νεαρότερες ηλικίες ποντικών (3 μηνών), πριν από την έναρξη της εναπόθεσης των πλακών δηλαδή. Αυτό δείχνει ότι η απόκριση της μικρογλοϊας στο Αβ σχετίζεται άμεσα με την παρουσία των αμυλοειδών εναποθέσεων. Το αποτέλεσμα αυτό δείχνει την ύπαρξη ενός αδιευκρίνιστου ακόμη ρόλου της επίκτητης ανοσίας στη ρύθμιση και ίσως και μείωση της μικρογλοϊακής απόκρισης στα μη-σωστά διπλωμένα Αβ πεπτιδία στον εγκέφαλο. Από εξελικτική σκοπιά, ένα τέτοιο γεγονός θα μπορούσε να αποτελεί έναν προστατευτικό μηχανισμό του επίκτητου ανοσοποιητικού συστήματος ώστε να μπορεί να ρυθμίζει ή να μειώνει τις πιθανώς τοξικές νευροφλεγμονώδεις αποκρίσεις στην παρουσία του Αβ, ακόμη και εις βάρος αυξημένης αμυλοειδικής εναπόθεσης (Spani et al, 2015).

Στο εργαστήριό μας πραγματοποιείται μια αντίστοιχη μελέτη, μόνο που αυτή τη φορά η έλλειψη του επίκτητου ανοσοποιητικού συστήματος οφείλεται στην αδρανοποίηση του γονιδίου Ikaros. Έτσι, κατόπιν των κατάλληλων διασταυρώσεων, μπορούν να δημιουργηθούν 5xFAD Iκ^{-/-} διαγονιδιακά ποντίκια για να φανεί εάν η έλλειψη του γονιδίου Ikaros θα οδηγούσε στα ίδια αποτελέσματα.

Τα αποτελέσματα που λάβαμε κατά την ποσοτικοποίηση των αμυλοειδών πλακών στον εγκέφαλο, φαίνεται να συμφωνούν με αυτά της προαναφερθείσας μελέτης (Spani et al, 2015) και να διαφωνούν με αυτά των Marsh et al (2016). Παρατηρήθηκε μείωση του αριθμού των αμυλοειδών πλακών στα 5xFAD Iκ^{+/-} ποντίκια σε σύγκριση με τα 5xFAD Iκ^{+/+}. Τα 5xFAD Iκ^{+/-} ποντίκια χαρακτηρίζονται από μέτρια επίπεδα εναπόθεσης. Με βάση τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής οδηγηθήκαμε στο συμπέρασμα ότι η απώλεια του ενός αλληλόμορφου του γονιδίου Ikaros, οδηγεί σε σημαντική μείωση του αριθμού των αμυλοειδών πλακών. Μέσω παραγωγικής σκέψης θα μπορούσαμε να υποθέσουμε ότι απώλεια και των δύο αλληλόμορφων

οδηγεί σε ακόμη μικρότερη ή και σχεδόν μηδαμινή εναπόθεση του β-αμυλοειδούς στον εγκέφαλο.

Οι Spani et al στο πείραμά τους βεβαιώθηκαν ότι η μειωμένη εναπόθεση του Αβ στον εγκέφαλο δεν οφείλεται στη μειωμένη παραγωγή του Αβ ή της APP, ούτε στη μειωμένη λειτουργικότητα των πρεσενιλινών και των συμπλεγμάτων της β- και γ-εκκριτάσης, αλλά πιθανότατα στην αυξημένη εκκαθάριση του β-αμυλοειδούς από τον εγκέφαλο. Θα μπορούσαμε να υποθέσουμε ότι κάτι τέτοιο συμβαίνει και στη δική μας περίπτωση, αφού πρώτα πραγματοποιηθούν τα κατάλληλα πειράματα που θα δείξουν ότι δεν επηρεάζεται με κάποιον τρόπο η παραγωγή της APP ή η λειτουργία των εκκριτασών (Western blot για την APP ή τις υπομονάδες των εκκριτασών).

Είναι γνωστό ότι τόσο τα T-λεμφοκύτταρα όσο και τα B-λεμφοκύτταρα, με τα αντισώματα που παράγουν συμβάλλουν στην απομάκρυνση του Αβ από τον εγκέφαλο. Γιατί όμως στα PSAPP Rag ko ποντίκια που δεν φέρουν τους κυτταρικούς αυτούς πληθυσμούς, παρατηρείται επίσης μείωση; Θα μπορούσε να υποτεθεί ότι δεν είναι η έλλειψη αυτών των κυτταρικών πληθυσμών που δίνει τον ιδιαίτερο φαινότυπο των ποντικίων αυτών αλλά να σχετίζεται η άμεση δράση του γονιδίου Rag.

Ανάλογη υπόθεση θα μπορούσε να γίνει και για το γονίδιο Ikaros στη δική μας περίπτωση. Παρατηρώντας σημαντική μείωση των πλακών στα 5xFAD Iκ+/- ποντίκια σε σχέση με τα 5xFAD Iκ+/- και υποθέτοντας ότι στα 5xFAD Iκ-/- αυτή η μείωση θα είναι ακόμη μεγαλύτερη, δημιουργείται το ίδιο ερώτημα., Για να διερευνηθεί ο ρόλος του γονιδίου, θα μπορούσε να μελετηθεί το πρότυπο έκφρασής του. Είναι γνωστό ότι το γονίδιο Ikaros εκφράζεται στα φυσιολογικά ποντίκια στα B- και T-λεμφοκύτταρα και στα φυσικά φονικά κύτταρα (Georgopoulos 1992, 1997), δε μας είναι γνωστό όμως το πρότυπο έκφρασής του στον εγκέφαλο.

Επιπλέον, όσον αφορά το ρόλο του γονιδίου Ikaros εντός του εγκεφάλου και τη δράση που μπορεί αυτό να έχει άμεσα στη μικρογλοία, μας είναι άγνωστα. Δεν γνωρίζουμε το πρότυπο έκφρασης του γονιδίου στους διάφορους κυτταρικούς τύπους του εγκεφάλου. Το γονίδιο Ikaros πιθανότατα συμμετέχει σε σηματοδοτικά μονοπάτια και εκφράζεται σε διάφορους ιστούς και θα μπορούσε με άμεσο τρόπο να αλληλεπιδρά με την ενεργοποίηση της μικρογλοίας και του ανοσοποιητικού συστήματος του εγκεφάλου. Έτσι, η απαλοιφή του γονιδίου έχει ως αποτέλεσμα την

πρόκληση ποικίλων αλλαγών σε μοριακό, κυτταρικό και οργανισμικό επίπεδο, προκαλώντας τόσο λειτουργικές όσο και μορφολογικές διαφοροποιήσεις.

Μια σημαντική διαφορά μεταξύ του ανοσοκατεσταλμένου μοντέλου ποντικίου που χρησιμοποιήθηκε στη δική μας μελέτη, με αυτό που χρησιμοποιήθηκε στην προηγούμενη που αναφέρθηκε (Spani et al), είναι η παρουσία των NK κυττάρων. Στα ποντίκια που είναι knockout για το γονίδιο Ikaros δεν εντοπίζονται καθόλου NK κύτταρα. Αντίθετα, σε άλλα μοντέλα ποντικών που έχουν κάποια έλλειψη στους μηχανισμούς ανασυνδυασμού που είναι απαραίτητοι για τη διαφοροποίηση των T και B-λεμφοκυττάρων (SCID, RAG-1, RAG-2) εντοπίζονται NK κύτταρα. Αυτή η διαφορά όμως δεν μπορεί να εξηγήσει τα αντίθετα αποτελέσματα των Marsh et al και Spani et al.

Επιπλέον, στα Ikaros knockout ποντίκια, σε αντίθεση με την πλήρη απουσία των B-λεμφοκυττάρων από πολύ πρώιμο στάδιο ανάπτυξης, παρατηρείται ανάπτυξη κυτταρικών σειρών σχετικών με τα T-λεμφοκύτταρα. Στις 3-5 ημέρες μετά τη γέννηση, εντοπίζονται μικροί αριθμοί ωριμάζοντων θυμοκυττάρων, που μέσα στις επόμενες εβδομάδες ζωής ωριμάζουν πλήρως και δίνουν την αβ σειρά T-κυττάρων. Επιπλέον, τα T κύτταρα του κοιλιακού επιθηλίου εντοπίζονται σε φυσιολογικές ποσότητες (Georgopoulos 1992, 1997). Αυτές οι διακυμάνσεις στις ποσότητες και τους τύπους των T-λεμφοκυττάρων οφείλονται σε μια άλλη πρωτεΐνη, την Aiolos, η οποία αποτελεί ομόλογη της Ik-1 και εκφράζεται κατά το όψιμο στάδιο της ανάπτυξης του εμβρυϊκού θύμου. Η πρωτεΐνη αυτή έχει την ικανότητα να προσδένεται και να ενεργοποιεί τη μεταγραφή όπως και η Ikaros (Georgopoulos, 1997). Η παρουσία αυτής της πρωτεΐνης θα μπορούσε να δρα ως "αναπληρωτής" της πρωτεΐνης Ikaros και να προκαλεί την ωρίμανση και αργότερα την ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος με ένα διαφορετικό πρότυπο από αυτό που γνωρίζουμε. Για να μελετηθεί πιο αποτελεσματικά ο ρόλος της επίκτητης ανοσίας στη νόσο Alzheimer θα μπορούσε να παραχθεί ένα μοντέλο ποντικού που δε φέρει αντίγραφα ούτε του γονιδίου Ikaros, ούτε του Aiolos. Αυτό θα είχε σαν αποτέλεσμα την παραγωγή ενός μοντέλου που δε φέρει καμία από τις κυτταρικές σειρές των T-, B- και NK κυττάρων.

Κάτω από συνθήκες φλεγμονής, ο αιματοεγκεφαλικός φραγμός υφίσταται σημαντικές δομικές αλλαγές με αποτέλεσμα να αυξάνεται η διαπερατότητά του (Archambault,

2005). Ως αποτέλεσμα αυτού, τα T-λεμφοκύτταρα έχουν τη δυνατότητα να εισέρχονται στον εγκέφαλο. Λόγω της αυξημένης καταστροφής του αιματοεγκεφαλικού φραγμού ή ως απόκριση στα φλεγμονώδη μόρια στον εγκέφαλο, τα T-κύτταρα εισέρχονται με μεγαλύτερη συχνότητα στον εγκέφαλο ενός ασθενή με νόσο Alzheimer σε σχέση με τον εγκέφαλο ενός υγιούς ατόμου. Επίσης, πρόσφατα αποδείχθηκε και η παρουσία Αβ ειδικών T-λεμφοκυττάρων. Παρότι η παραγωγή Αβ-αυτοαντισωμάτων και γενικότερα η παραγωγή αντισωμάτων είναι μια δραστηριότητα των B-λεμφοκυττάρων, η απόκριση υποστηρίζεται και από τα ενεργοποιημένα T-λεμφοκύτταρα (Fisher, 2010). Μελέτες έχουν δείξει ότι ο αριθμός των κυκλοφορούντων Αβ-αυτοαντισωμάτων ήταν τετραπλάσιος στους ασθενείς που έπασχαν από κάποια μορφή άνοιας σε σχέση με τους υγιείς ανθρώπους (Town, 2005). Από πειράματα που έχουν πραγματοποιηθεί σε ποντίκια υποστηρίζεται ότι τα αντισώματα αυτά μπορούν να εισέλθουν στο κεντρικό νευρικό σύστημα και να περιορίσουν την παθολογία σε πειραματικά μοντέλα ποντικών που εμφανίζουν τη νόσο Alzheimer (Bard, 2000). Ήδη αναφέρθηκε ότι ακόμη και στα Ikaros -/- εντοπίζονται μικροί πληθυσμοί T-λεμφοκυττάρων λόγω της δράσης του γονιδίου Aiolos. Με βάση τα όσα προαναφέρθηκαν, τα κύτταρα αυτά θα μπορούσαν να διαπερνούν τον διαταραγμένο αιματοεγκεφαλικό φραγμό και να παίζουν ρόλο στην εκκαθάριση του β-αμυλοειδούς από τον εγκέφαλο.

Δεν μπορούμε να είμαστε σίγουροι για την αλληλεπίδραση μεταξύ των τριών παραγόντων επίκτητη ανοσία - γονίδιο Ikaros - πλάκες αμυλοειδούς, καθώς το πειραματικό μοντέλο που χρησιμοποιήθηκε ήταν ετερόζυγο για το γονίδιο Ikaros. Αυτό σημαίνει ότι τα ετερόζυγα ποντίκια φέρουν έως κάποιο βαθμό επίκτητη ανοσία. Είναι σημαντικό να μελετηθούν καλύτερα τόσο οι πληθυσμοί των κυττάρων της ανοσίας στα ετερόζυγα ποντίκια όσο και να παραχθούν 5xFAD Ikaros -/- ποντίκια για να μελετηθεί πιο αποτελεσματικά ο ρόλος της επίκτητης ανοσίας στη νόσο Alzheimer.

Βιβλιογραφία

- Alzforum <https://www.alzforum.org/mutations>
- Archambault, A.S., et al., Defining antigen-dependent stages of T-cell migration from the blood to the central nervous system parenchyma. *European journal of immunology*, 2005. 35(4): p. 1076-1085.
- Bard, F., et al., Peripherally administered antibodies against amyloid β -peptide enter the central nervous system and reduce pathology in a mouse model of Alzheimer disease. *Nature medicine*, 2000. 6(8): p. 916-919.
- Bekris L. et al. (2010). Genetics of Alzheimer Disease. *J Geriatr Psychiatry Neurol*. 23 (4), 213-227.
- Bird T. (2008). Genetic Aspects of Alzheimer Disease. *Genet Med*. 10 (4), 231-239.
- Blennow K. et al. (2006). Alzheimer's disease. *Lancet*. 368 (1), 387-403.
- Breeding strategies manual, The Jackson Laboratory
- Cameron, B. and G.E. Landerth, Inflammation, microglia, and Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis*, 2010. 37(3): p. 503-509.
- De Strooper B. (2010). The secretases: enzymes with therapeutic potential in Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol*. 6 (2), 99-107.
- Dolev, I. and D.M. Michaelson, A nontransgenic mouse model shows inducible amyloid-beta (A β) peptide deposition and elucidates the role of apolipoprotein E in the amyloid cascade. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004. 101(38): p. 13909-14.
- Fiala. M., et al., Cyclooxygenase-2-positive macrophages infiltrate the Alzheimer's disease brain and damage the blood-brain barrier. *Eur J Clin Invest*, 2002. 32(5): p. 360-371.
- Fisher, Y., et al., T cells specifically targeted to amyloid plaques enhance plaque clearance in a mouse model of Alzheimer's disease. *PLoS one*, 2010. 5(5): p. e10830.
- Georgopoulos Katia et al. (1992). Ikaros, an Early Lymphoid-Specific Transcription Factor and a Putative Mediator for T Cell Commitment. *SCIENCE*. 258 (1), 808-812.
- Georgopoulos Katia et al. (1994). The Ikaros Gene Is Required for the Development of All Lymphoid Lineages. *Cell*. 79 (1), 143-156.
- Georgopoulos Katia et al. (1997). The Role of the Ikaros Gene in Lymphocyte Development and Homeostasis. *Immunology*. 15 (1), 155-176.
- Georgopoulos Katia. (2017). The making of a lymphocyte: the choice among disparate cell fates and the IKAROS enigma. *GENES & DEVELOPMENT*. 31 (1), 439-450.
- Haass C. et al. (2012). Trafficking and Proteolytic Processing of APP. *Cold Spring Harb Perspect Med*;2:a006270
- Hardy J. and Higgins G.. (1992). Alzheimer's Disease: The Amyloid Cascade Hypothesis. *SCIENCE*. 10 (1), 184-185.
- Hardy & Selkoe. (2002). The Amyloid Hypothesis of Alzheimer's Disease: Progress and Problems on the Road to Therapeutics. *SCIENCE*. 297 (1), 353-356.

- Hébert, S.S., et al., Regulated intramembrane proteolysis of amyloid precursor protein and regulation of expression of putative target genes. *EMBO reports*, 2006. 7(7): p. 739- 745.
- Heneka, M.T. and M.K. O'Banion, Inflammatory processes in Alzheimer's disease. *Journal of neuroimmunology*, 2007. 184(1): p. 69-91.
- Holtzman et al. (2011). Mapping the Road Forward in Alzheimer's Disease. *Science Translational Medicine*. 114 (3), 114ps48.
- Jacobsen K. (2009). Amyloid precursor protein and its homologues: a family of proteolysis-dependent receptors. *Cell. Mol. Life Sci.*. 66 (1), 2299-2318.
- Jarrett J. (1993). The Carboxy Terminus of the Amyloid Protein Is Critical for the Seeding of Amyloid Formation: Implications for the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. *Biochemistry*. 32 (18), 4693-4697.
- Kandel, Βασικές Αρχές Νευροεπιστημών, Τέταρτη Αγγλική έκδοση, 2006
- Kaufmann, C., et al., A complex network of regulatory elements in Ikaros and their activity during hemo-lymphopoiesis. *The EMBO Journal*, 2003. 22(9): p. 2211-2223.
- Κοτσιλίτη Ελένη (2012). Μελέτη της έκφρασης και ρύθμισης του θερμοεπαγόμενου γονιδίου hsp27, στη μεσογειακή μύγα *Ceratitis capitata*. Διατριβή Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης, τμήμα βιολογίας, πανεπιστήμιο Πατρών.
- Kuhn, P.H., et al., ADAM10 is the physiologically relevant, constitutive α -secretase of the amyloid precursor protein in primary neurons. *The EMBO journal*, 2010. 29(17): p. 3020-3032.
- Lee Y. et al. (2010). Inflammation and Alzheimer's Disease. *Arch Pharm Res*. 33 (10), 1539-1556.
- Li, C., et al., Astrocytes: implications for neuroinflammatory pathogenesis of Alzheimer's disease. *Current Alzheimer Research*, 2011. 8(1): p. 67-80.
- Li, Y., et al., Microglia in Alzheimer's disease. *BioMed research international*, 2014.
- Lichtenthaler S. et al. (2011). Regulated Intramembrane Proteolysis - Lessons from Amyloid Precursor Protein Processing. *JOURNAL OF NEUROCHEMISTRY*. 117 (1), 779-796.
- Malm, T., et al., The role and therapeutic potential of monocytic cells in Alzheimer's disease. *Glia*, 2010. 58(8): p. 889-900.
- Marsh, S.E., et al., The adaptive immune system restrains Alzheimer's disease pathogenesis by modulating microglial function. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2016. 113(9): p. E1316-E1325.
- Muller U. & Zheng H. (2012). Physiological Functions of APP Family Proteins. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 4 (1), 4:a006288.
- Murphy M. et al. (2010). Alzheimer's Disease and the β -Amyloid Peptide. *J Alzheimers Dis*. 19 (1), 311. doi:10.3233/JAD-2010-1221.
- Oakley H. et al. (2006). Intraneuronal β -Amyloid Aggregates, Neurodegeneration, and Neuron Loss in Transgenic Mice with Five Familial Alzheimer's Disease Mutations: Potential Factors in Amyloid Plaque Formation. *The Journal of Neuroscience*. 26 (40), 10129 -10140.
- Ohno M. et al. (2007). BACE1 gene deletion prevents neuron loss and memory deficits in 5XFAD APP/PS1 transgenic mic. *Neurobiol Dis.*. 26 (1), 134-145.

- Podlinsky M et al. (1997). Presenilin Proteins Undergo Heterogeneous Endoproteolysis between Thr291 and Ala299 and Occur as Stable N- and C-Terminal Fragments in Normal and Alzheimer Brain Tissue. *Neurobiology of Disease*. 3 (1), 325–337.
- Ratovitski T. et al. (1997). Endoproteolytic Processing and Stabilization of Wild-type and Mutant Presenilin. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*. 272 (39), 24536–24541.
- Reitz C. et al. (2011). Epidemiology of Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol*. 7 (3), 137-152.
- Rezai-Zadeh, K., D. Gate and T. Town, CNS infiltration of peripheral immune cells: D-Day for neurodegenerative disease? *J Neuroimmune Pharmacol*, 2009. 4(4): p. 462-475.
- Rubio-Perez JM. et al. (2012). A Review: Inflammatory Process in Alzheimer's Disease, Role of Cytokines. *The ScientificWorld Journal*. 2012 (1), 756357.
- Selkoe D. (2001). Alzheimer's Disease: Genes, Proteins, and Therapy. *PHYSIOLOGICAL REVIEWS*. 81 (2), 741-766.
- Selkoe D. et al. (2012). Deciphering Alzheimer Disease. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2 (1), a011460.
- Seranno-Pozo A. et al. (2011). Neuropathological Alterations in Alzheimer Disease. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 1:a006189
- Simard, A.R., et al., Bone marrow-derived microglia play a critical role in restricting senile plaque formation in Alzheimer's disease. *Neuron*. 2006. 49(4): p. 489-502.
- Spani C. et al . (2015). Reduced β -amyloid pathology in an APP transgenic mouse model of Alzheimer's disease lacking functional B and T cells. *Acta Neuropathologica Communications*. 71 (3), DOI 10.1186/s40478-015-0251-x.258
- Tanzi R.E. et al. (2004). Clearance of Alzheimer's Minireview A Peptide: The Many Roads to Perdition. *Neuron*. 43 (1), 605–608.
- Thompson & Thompson, Ιατρική Γενετική, 2η Ελληνική έκδοση, p. 74-75
- Town, T., et al., T-cells in Alzheimer's disease. *Neuromolecular medicine*, 2005. 7(3): p.255-264.
- UniProtKB - P49810 (PSN2_HUMAN)
- Walsh & Selkoe. (2004). Deciphering the Molecular Basis of Memory Failure in Alzheimer's Disease. *Neuron*. 44 (1), 181–193.
- Watson, ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ, 1η Ελληνική έκδοση, 2008, p1017-1019
- Weiner, H.L. and D. Frenkel, Immunology and immunotherapy of Alzheimer's disease. *Nat Rev Immunol*, 2006. 6(5): p. 404-416.
- Wolfe M. et al. (1999). Two transmembrane aspartates in presenilin-1 required for presenilin endoproteolysis and g-secretase activity. *Nature*. 398 (1), 513-517.
- Yan-Cai et all. (2015). Mutations in Presenilin 2 and its implications in Alzheimer's disease and other dementia-associated disorders. *Dovepress*. 10 (1), 1163-1172.
- Zaghi, J., et al., Alzheimer disease macrophages shuttle amyloid-beta from neurons to vessels, contributing to amyloid angiopathy. *Acta Neuropathol*, 2009. 117(2): p. 111-124.

- <https://www.webcitation.org/6ATzE7YQz?url=http://biotechnology.com/dna/analysis-dna-rna-wavelengths-230-260-280-nm>
- <http://jonlieffmd.com/blog/astrocytes-control-synapse-function>
- https://en.wikipedia.org/wiki/House_mouse
- <https://www.yourgenome.org/facts/why-use-the-mouse-in-research>
- https://introduction-zoology.weebly.com/uploads/2/2/1/5/22154302/lab02._mouse_anatomy.pdf