



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ

Εθνικόν και Καποδιστριακόν
Πανεπιστήμιον Αθηνών

— ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837 —

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΣΤΗΝ ΙΑΤΡΙΚΗ»

Εργαστήριο Κυτταρικής Νευροβιολογίας,
Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών, Ακαδημία Αθηνών
Επιστημονικός Υπεύθυνος: Σπύρος Γεωργόπουλος

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**«Ανάλυση του αμυλοειδούς φαινοτύπου διαγονιδιακών
ποντικών της νόσου Alzheimer's με γενετικά
τροποποιημένο ανοσοποιητικό σύστημα»**

Μπουλέκου Σωτηρία, 41711

Βιολόγος

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Ισιδώρα Παπασιδέρι, Καθηγήτρια Βιολογίας, Τομέας Βιολογίας Κυττάρου & Ανάπτυξης
Δημήτρης Στραβοπόδης, Αναπληρωτής Καθηγητής Βιολογίας, Τομέας Βιολογίας
Κυττάρου & Ανάπτυξης (**Επιβλέπων**)

Σπύρος Γεωργόπουλος, Ερευνητής Β' ΠΒΕΑΑ, Εργαστήριο Κυτταρικής Νευροβιολογίας
(**Επιστημονικός Υπεύθυνος**)

ΑΘΗΝΑ 2019

Περίληψη

Η νόσος του Alzheimer είναι μια νευροεκφυλιστική νόσος που επηρεάζει μεγάλο αριθμό ασθενών παγκοσμίως και διακρίνεται σε δυο διαφορετικούς υπότυπους, την Οικογενή και τη Σποραδική μορφή. Βασικό σύμπτωμα της νόσου αποτελεί η σταδιακή εξασθένηση της μνήμης και των γνωστικών δεξιοτήτων, δυσχεραίνοντας έτσι τη διαβίωση των ασθενών και των οικείων τους. Όσον αφορά τα νευροπαθολογικά χαρακτηριστικά της νόσου παρατηρείται σχηματισμός και εναπόθεση β-αμυλοειδών πλακών και νευροϊνδιακών δεματίων στους εγκεφάλους.

Η συνεχής έρευνα γύρω από τη νόσο του Alzheimer παράγει διαρκώς νέα δεδομένα που υποστηρίζουν το γεγονός πως η φλεγμονή και οι διαμεσολαβητές της έχουν ενεργό ρόλο στην παθογένεση της νόσου. Ως αποτέλεσμα η έρευνα έχει στραφεί και στο ρόλο του TNF-α, μιας πλειοτροπικής προ-φλεγμονώδους κυτταροκίνης, που δρα μέσω της πρόσδεσης της στους δυο υποδοχείς της, τον TNFR1 και τον TNFR2, με έκφραση στον εγκέφαλο κυρίως στη μικρογλοία και στα αστροκύτταρα. Ωστόσο, τα μέχρι τώρα γνωστά δεδομένα σχετικά με το ρόλο του TNF-α είναι αρκετά διφορούμενα καθώς μερικά υποστηρίζουν την ευεργετική και προστατευτική του δράση, ενώ αλλά υποστηρίζουν την νευροτοξική του δράση.

Στην παρούσα μελέτη εξετάσαμε την επίδραση της υπερέκφρασης του TNF-α στον αμυλοειδή φαινότυπο, σε διαγονιδιακά ποντίκια-μοντέλα της νόσου του Alzheimer. Έτσι, χρησιμοποιήθηκε το 5XFAD μοντέλο της νόσου του Alzheimer, που φέρει 5 γνωστές μεταλλάξεις της οικογενούς μορφής της νόσου, σε διασταύρωση με τα TNF^{ΔARE/+} ποντίκια τα οποία μετά από απαλοιφή των ARE περιοχών υπερεκφράζουν τον TNF-α.

Η μελέτη πραγματοποιήθηκε σε θηλυκά ποντίκια ηλικίας 4μηνών, καθώς τότε έχει δημιουργηθεί ικανοποιητικός αριθμός αμυλοειδών πλακών. Βασικό εύρημα της παρούσας μελέτης ήταν η σημαντική μείωση των αμυλοειδών πλακών τόσο στον φλοιό όσο και στον υπόκαμπο στα 5XFADTNF^{ΔARE/+} ποντίκια, ενώ τα επίπεδα των ενζύμων αποικοδόμησης (BACE1, ADAM10) της APP πρωτεΐνης δεν επηρεάστηκαν, όπως επίσης δεν επηρεάστηκε και η TACE, το ένζυμο που μετατρέπει τον μεμβρανοσυνδεδεμένο TNF-α σε διαλυτό TNF-α. Παράλληλα παρατηρήθηκε αύξηση των επιπέδων του Iba1, δείκτη των μικρογλοιακών κυττάρων, ενώ τα επίπεδα του GFAP, δείκτη των αστροκυττάρων, παρέμειναν σταθερά. Τέλος, παρατηρήθηκε αύξηση του TNF-α στον ορό, ενώ τα επίπεδα του σε πρωτεϊνικό εκχύλισμα εγκεφάλου, παρέμειναν σταθερά.

Συνεπώς, καταλήξαμε στο συμπέρασμα πως η υπερέκφραση του (mu)TNF-α οδηγεί σε αύξηση του TNF-α στην περιφέρεια, και η αυτή η αύξηση φαίνεται πως επιδρά στον

αμυλοειδή φαινότυπο του εγκεφάλου, με μείωση των αμυλοειδών πλακών, με παράλληλη ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος του εγκεφάλου, και κυρίως των μικρογλοιακών κυττάρων, χωρίς ωστόσο να επηρεάζονται τα ένζυμα αποικοδόμησης της APP.

Abstract

Alzheimer's disease is a neurodegenerative disease that affects a significant number of patients worldwide and can be categorized in two different subtypes: Familial and Sporadic Alzheimer's Disease. One of the major symptoms of the disease is the gradual memory and cognitive skills impairment resulting in difficult circumstances for patients and their families. Regarding the neuropathological features of the disease, the formation and deposition of beta-amyloid plaques and neuro-fibrous bundles on the brain are observed.

Ongoing research on Alzheimer's disease is constantly producing new data highlighting that inflammation and its mediators play an active role in the pathogenesis of the disease. As a result, research has also shifted to investigate the role of TNF- α , a pleiotropic pro-inflammatory cytokine; TNF- α acts through its two receptors, TNFRI and TNFRII, and its expression in the brain, is mainly observed in the microglia and astrocytes. However, the known data, so far, on the role of TNF- α are quite ambiguous, since there are data supporting its beneficial and protective effect, while others demonstrate its neurotoxic effect.

In the present study, we examined the effect of overexpression of TNF- α on the amyloid phenotype in transgenic mouse-models of Alzheimer's disease. Thus, the 5XFAD model of Alzheimer's disease, carrying 5 known familial variants of the disease, was mated with TNF $^{\Delta ARE/+}$ mice that overexpress TNF- α , after deletion of ARE regions.

The study was performed on 4-month-old female mice, since a sufficient number of amyloid plaques is being observed at this time point. The main finding of the present study was the significant reduction of amyloid plaques in both cortex and hippocampus in 5XFADTNF $^{\Delta ARE/+}$ mice, whereas levels of degradation enzymes (BACE1, ADAM10) of APP protein were not affected; moreover TACE, the enzyme that converts membrane-bound TNF- α into soluble TNF- α , was not affected either.

At the same time, an increase in the levels of Iba1, an indicator of microglial cells, was observed, while levels of GFAP, an indicator of astrocytes, were not affected. Finally, elevated levels of TNF- α in the serum was observed, while its levels in brain protein extract remained stable.

Therefore, we concluded that overexpression of (mu)TNF- α leads to an increase on TNF- α levels in the periphery, and this increase appears to affect the amyloid phenotype of the brain by decreasing amyloid plaques, while activating the immune system of the brain, and especially the microglial cells, without affecting APP's degradation enzymes.

Πρόλογος

Με την ολοκλήρωση της εκπόνησης της διπλωματικής εργασίας, δράττομαι της ευκαιρίας να ευχαριστήσω θερμά όλους όσους συνέβαλαν με άμεσο ή έμμεσο τρόπο για την πραγματοποίησή της.

Αρχικά, θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου απέναντι στον κύριο Γεωργόπουλο Σπύρο για την ευκαιρία που μου έδωσε να ενταχθώ στο εργαστήριο του και να εκπονήσω την παρούσα διπλωματική εργασία. Η καθοδήγηση του και οι συμβουλές του αποτέλεσαν πηγή γνώσης για εμένα τόσο σε θεωρητικό όσο και σε πρακτικό επίπεδο.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κύριο Στραβοπόδη Δημήτρη, Αναπληρωτή Καθηγητή του τμήματος Βιολογίας, για τις γνώσεις, τις συμβουλές και την δυνατότητα αυτή που μου έδωσε ως επιβλέπωντας της διπλωματικής μου. Ευχαριστώ, επίσης, την κυρία Ισιδώρα Παπασιδέρη, Καθηγήτρια του τμήματος Βιολογίας, που δέχτηκε να συμμετάσχει στην τριμελή επιτροπή και να με καθοδηγήσει.

Στη συνέχεια θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου, τη Νικολέτα Καλοβυρνά, την Ολυμπία Αποκότου, την Ανθή Χατζημπίνου, την Βασιλική Θεοδώρου και την Ελευθερία Γιαγνίση, για την βοήθεια τους, τη συνεργασία τους, την υπομονή τους, την υποστήριξη τους, την παρέα τους και τη φιλία τους.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια και τους φίλους μου για την ηθική και υλική υποστήριξη, με στόχο την διεκπεραίωση των μεταπτυχιακών σπουδών μου.

Περιεχόμενα

Περίληψη	1- 2
Abstract	3
Πρόλογος	4
Περιεχόμενα	5- 6
Εισαγωγή	7- 28
1. Η νόσος του Alzheimer (Alzheimer's Disease, AD)	7- 10
1.1 Ιστορική Αναδρομή	7- 8
1.2 Γενετική της νόσου	8- 9
1.3 Συμπτώματα	9
1.4 Διάγνωση	9- 10
1.5 Θεραπεία	10
2. Νευροπαθολογικά Χαρακτηριστικά της Νόσου του Alzheimer	11- 12
2.1 Νευριτικές Πλάκες	11
2.2 Νευροϊνιδιακά Δεμάτια	11- 12
2.3 Εγκεφαλική Αμυλοειδική Αγγειοπάθεια	12
3. Το β-Αμυλοειδές Πεπτίδιο	12- 17
3.1 Πρόδρομη πρωτεΐνη του β-αμυλοειδούς: Δομή, Οικογένεια, Έκφραση	13
3.2 Φυσιολογικές Λειτουργίες της APP	13- 14
3.3 Αμυλοειδογενές και Μη Αμυλοειδογενές Μονοπάτι	14- 15
3.4 APP εκκρίτασες	15- 17
3.5 Καταβολισμός του β-Αμυλοειδούς Πεπτιδίου	17
4. Φλεγμονώδης Απόκριση κατά την AD	17- 23
4.1 Φλεγμονή και Νόσος Alzheimer	17- 18
4.2 Μικρογλοία	18
4.3 Παράγοντας Νέκρωσης Όγκων -α (TNF-α)	18- 20
4.4 Ο TNF-α στον Εγκέφαλο και στη Νόσο του Alzheimer	20- 23
5. Διαγονιδιακά Ποντίκια	23- 28
5.1 Διαγονιδιακή Τεχνολογία	23
5.2 Ποντίκια 5XFAD	23- 24
5.3 Ρυθμιστικές Αλληλουχίες ARE	24- 25
5.4 TNF ^{ΔARE} Ποντίκια	25- 28
Σκοπός	29

Υλικά και Μέθοδοι	30- 47
1. Ποντίκια	30
2. Απομόνωση DNA	30- 31
3. Ταυτοποίηση Γονότυπου	32- 34
4. Συλλογή ιστών	35
5. Επεξεργασία Ιστών - Απομόνωση Πρωτεϊνών:	35
6. Ανοσοαποτύπωμα κατά Western:	36- 42
7. ELISA	42- 43
8. Ανοσοϊστοχημεία - Χρώση με Thioflavin S	44- 47
Αποτελέσματα	48- 60
1. Η εναπόθεση αμυλοειδούς και πλακών είναι μειωμένη στους εγκεφάλους των 5XFAD/TNF ^{ΔARE/+} ποντικών	48- 51
2. Η μετατροπή του ενδογενούς γονιδίου του TNF-α δεν αλλάζει τα ένζυμα αποικοδόμησης της APP στα 5XFAD/TNF ^{ΔARE/+} ποντίκια	51- 54
3. Τα 5XFAD/TNF ^{ΔARE/+} έχουν αυξημένα επίπεδα TNF-α μόνο στην περιφέρεια και όχι στον εγκέφαλο.	54- 56
4. Τα 5XFAD/TNF ^{ΔARE/+} ποντίκια έχουν ενεργοποιημένη μικρογλοία αλλά όχι ενεργοποιημένα αστροκύτταρα.	56- 60
Συζήτηση	61- 63
Βιβλιογραφία	64- 71

Εισαγωγή

1. Η νόσος του Alzheimer (Alzheimer's Disease, AD)

1.1 Ιστορική αναδρομή

Κατά τη διάρκεια του 20^{ου} αιώνα παρατηρείται δραματική αύξηση του προσδόκιμου ζωής του ανθρώπου, γεγονός που οδήγησε στην αύξηση εμφάνισης των πιο κοινών νευροεκφυλιστικών νόσων, μία εκ των οποίων είναι και η νόσος του Alzheimer, η οποία έχει χαρακτηριστεί και ως η πιο κοινή, μη αναστρέψιμη, προοδευτική αιτία άνοιας [1,2].

Η νόσος περιεγράφηκε πρώτη φορά το 1907 από τον Alois Alzheimer, Βαυαρό ψυχίατρο, σε μια μεσήλικα γυναίκα, γύρω στα 50, η οποία είχε εκδηλώσει συμπτώματα όπως η απώλεια μνήμης και η προοδευτική απώλεια των γνωστικών της ικανοτήτων [1,3].

Ωστόσο, η πραγματική πρόοδος ως προς την κατανόηση των συμπτωμάτων πραγματοποιήθηκε τη δεκαετία του '60, όταν η τεχνολογική πρόοδος και συγκεκριμένα η ηλεκτρονική μικροσκοπία επέτρεψε την περιγραφή των γεροντικών πλακών και των νευροϊνιδιακών δεματίων, από τους Michael Kidd και Robert Terry [1]. Αργότερα, την ίδια δεκαετία οι Gary Blessed, Bernard Tomlinson και Martin Roth απέδειξαν με το επιστημονικό τους έργο ότι η νόσος, όπως αυτή είχε περιγραφεί από τον Alzheimer, ως προ-γεροντική άνοια, δεν διακρινόταν από την κοινή γεροντική άνοια [1].

Μερικά χρόνια αργότερα παρατηρήθηκε πως οι νευρώνες που συνθέτουν και απελευθερώνουν την ακετυλοχολίνη υφίστανται νευροεκφυλισμό. Η παρατήρηση έγινε λόγω της μείωσης της ποσότητας και της δραστηριότητας των συνθετικών και αποικοδομητικών ενζύμων στον φλοιό, δηλαδή της ακετυλοτρανσφεράσης της χολίνης και της ακετυλοχολινεστεράσης αντίστοιχα [1]. Αυτό το εύρημα οδήγησε την φαρμακολογική έρευνα να επικεντρωθεί στην ενίσχυση των επιπέδων ακετυλοχολίνης στην συναπτική σχισμή, αναστέλλοντας κυρίως τη δράση του αποικοδομητικού ενζύμου [1]. Έτσι τελικά παράχθηκαν και εγκρίθηκαν δυο εξειδικευμένα φάρμακα για την αντιμετώπιση της νόσου: η τετραϋδροαμινοακρινιδίνη και η donepezίλη [1].

Στα τέλη του 1970 με αρχές του 1980 οι επιστήμονες οδηγήθηκαν στο συμπέρασμα πως η νόσος του Alzheimer δεν περιλαμβάνει τον εκφυλισμό μιας μόνο κατηγορίας νευρώνων, αλλά περισσότερων συστημάτων, αντίθετα με τη νόσο του Parkinson, εξηγώντας έτσι την έλλειψη κλινικού οφέλους από την χορήγηση των χολινεργικών φαρμάκων, σε διάφορους ασθενείς [1].

Στα μέσα της δεκαετίας του 1980 ο George Glenner απομόνωσε και χαρακτήρισε μερικώς την β-αμυλοειδική πρωτεΐνη από εγκεφάλους ασθενών με τη νόσο Alzheimer ή με Σύνδρομο Down [4,5], ενώ αρκετά εργαστήρια ταυτοποίησαν την πρωτεΐνη tau, που σχετίζεται με τους μικροσωληνίσκους, ως βασικό συστατικό των νευροϊνιδιακών δεματίων [6]. Τέλος, στη δεκαετία του 1990 πραγματοποιήθηκαν οι πρώτες ανακαλύψεις των μεταλλαγών που προκαλούν τη νόσο [6].

1.2 Γενετική της νόσου

Η νόσος του Alzheimer διακρίνεται σε δυο υποτύπους, ανάλογα με την ηλικία έναρξης της νόσου. Έτσι, υπάρχει η οικογενής ή πρόωμης έναρξης νόσος του Alzheimer (Early Onset Alzheimer's Disease – EOAD) και η σποραδική ή όψιμης έναρξης νόσος του Alzheimer (Late Onset Alzheimer's Disease – LOAD) [2,7]. Στην οικογενή μορφή της νόσου ανήκει το 1-5% των περιπτώσεων, με τους ασθενείς να είναι σε ηλικία 40-50 ετών, ενώ στην σποραδική μορφή ανήκει η πλειοψηφία (>95%) και η ηλικία των ασθενών είναι άνω των 65 ετών [7]. Η κλινική εικόνα των δύο μορφών της νόσου δεν διαφέρει, με την οικογενή μορφή ωστόσο, να είναι γενικά πιο σοβαρή και να συνδέεται με ταχύτερο ρυθμό εξέλιξης της νόσου [7].

Πιο αναλυτικά, η οικογενής μορφή κληρονομείται με αυτοσωμικό επικρατή τρόπο [2, 8], ενώ μπορεί να παρατηρηθεί και σε οικογένειες με περιστατικά σποραδικής μορφής της νόσου [2]. Στις περισσότερες περιπτώσεις, η εμφάνιση της νόσου συνδέεται με τη συμμετοχή διαφόρων γονιδίων καθώς και γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων, ενώ υπάρχουν και μερικές εξαιρέσεις, όπου η νόσος οφείλεται στη δράση ενός μόνο γονιδίου [2]. Τα βασικά γονίδια που έχουν συσχετιστεί με τη νόσο είναι τρία. Το πρώτο είναι αυτό που κωδικοποιεί την πρόδρομη πρωτεΐνη του β-αμυλοειδούς πεπτιδίου (Amyloid Precursor Protein, APP), το οποίο εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 21 [8], και μεταλλαγές σε αυτό οδηγούν στην παραγωγή του β-αμυλοειδούς πεπτιδίου, το οποίο είναι υπεύθυνο για την εμφάνιση της νόσου. Οι μεταλλαγές αυτές εντοπίζονται σε διάφορες θέσεις πάνω στο γονίδιο, και πιο συγκεκριμένα πριν από το σημείο αναγνώρισης από την β-εκκριτάση, μετά το σημείο αναγνώρισης από την α-εκκριτάση και τέλος στο σημείο που δρα η γ-εκκριτάση, δηλαδή κοντά στο καρβοξυτελικό άκρο [1].

Τα δύο άλλα γονίδια που δρουν στην εξέλιξη της νόσου είναι αυτά των πρεσενιλινών, (Presenilin 1/PS1 και Presenilin 2/PS2), τα οποία είναι μέρος του συμπλέγματος της γ-εκκριτάσης και ο ρόλος τους είναι η διάσπαση της APP και η παραγωγή του β-αμυλοειδούς

πεπτιδίου (Aβ) [9,10]. Τα δυο αυτά γονίδια εμφανίζουν υψηλό βαθμό ομολογίας (67%), με το PS1 να εδράζεται στο χρωμόσωμα 14, ενώ το PS2 στο χρωμόσωμα 1[8].

Όσον αφορά την σποραδική μορφή της νόσου έχει βρεθεί πως συσχετίζεται με μεταλλαγές στο γονίδιο της Απολιποπρωτεΐνης E (Apolipoprotein E, ApoE). Το γονίδιο της ApoE εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 19 και εμπλέκεται στον σχηματισμό και την απομάκρυνση του β-αμυλοειδούς πεπτιδίου. Το αλληλόμορφο e4 του γονιδίου (ApoE 4) αποτελεί βασικό παράγοντα κινδύνου εμφάνισης της νόσου, καθώς με την κληρονόμηση ενός ή και των δυο αλληλομόρφων e4 αυξάνεται η πιθανότητα εμφάνισης της σποραδικής μορφής της νόσου. Πιο συγκεκριμένα με ένα αλληλόμορφο η πιθανότητα εμφάνισης της νόσου διπλασιάζεται έως και πενταπλασιάζεται σε ηλικία 60-70χρόνων, ενώ η κληρονόμηση και των δυο αυξάνει ακόμα περισσότερο τον κίνδυνο. Ωστόσο, αξίζει να αναφερθεί πως υπάρχουν περιπτώσεις ατόμων ηλικίας 90 χρόνων, ομόζυγων ως προς το e4, που δεν έχουν παρουσιάσει τη νόσο, και αντίστοιχα άτομα χωρίς κανένα αλληλόμορφο e4 που νόσησαν [2]. Επιπλέον πρόσφατα δεδομένα συσχέτισαν παραλλαγές σε 9 επιπλέον γονίδια που επηρεάζουν τον κίνδυνο για εμφάνιση της νόσου στον Ευρωπαϊκό πληθυσμό, και τα οποία σχετίζονται με βιολογικά μονοπάτια, όπως ο μεταβολισμός λιπιδίων, η φυσική ανοσία και η ενδοκυτταρική κυκλοφορία [2, 11].

1.3 Συμπτώματα

Όσον αφορά τη συμπτωματολογία της νόσου, και στους δυο τύπους, παρατηρείται μια μορφή άνοιας η οποία ξεκινά από μια σταδιακή εξασθένηση της μνήμης και μπορεί να φτάσει και ως την πλήρη ανικανότητα των ασθενών. Στα πρωταρχικά στάδια της νόσου δεν παρατηρούνται αλλοιώσεις στις διάφορες κινητικές και αισθητικές λειτουργίες των ασθενών. Ωστόσο σε μεταγενέστερα στάδια παρατηρούνται συμπτώματα όπως αδυναμία συγκράτησης νεοαποκτηθέντων γνώσεων, αδυναμία σε διάφορες γνωστικές λειτουργίες (πχ ομιλία) καθώς και αδυναμία στην επικοινωνία [1, 2]. Παράλληλα, πιθανή είναι και η αλλαγή διάθεσης ή και η εμφάνιση παραισθήσεων και αυταπατών. Τέλος, ο συνδυασμός αυτών των συμπτωμάτων μπορεί να οδηγήσει στην κακή διατροφή (αφαγία), εξάντληση ή άλλη πάθηση, και τελικά στον θάνατο του ασθενή [2].

1.4 Διάγνωση

Για την διάγνωση της νόσου Alzheimer είναι απαραίτητα τόσο κλινικά όσο και νευροπαθολογικά ευρήματα [2]. Το κλινικό σκέλος της διάγνωσης περιλαμβάνει τη μελέτη του ιστορικού του ασθενή, μέσω πληροφοριών από το οικογενειακό του περιβάλλον, καθώς

και νευρολογικές εξετάσεις, για την εύρεση νευροπαθολογικών χαρακτηριστικών της νόσου, όπως οι νευριτικές πλάκες, τα νευροϊνιδιακά δεμάτια και η αμυλοειδική αγγειοπάθεια [2, 4]. Για την έγκυρη διάγνωση της νόσου έχουν οριστεί κάποια κριτήρια από διάφορους οργανισμούς όπως η Αμερικάνικη Ψυχιατρική Εταιρία, με το «Diagnostic and Statistical manual of Mental Disorder (DSM-IV)» σύμφωνα με το οποίο για τη διάγνωση της άνοιας, απαιτείται η απώλεια δυο εκ των παρακάτω: μνήμη, ομιλία, υπολογισμός, προσανατολισμός και κρίση [4]. Κάποια άλλα κριτήρια που χρησιμοποιούνται είναι το NINCDS-ADRDA: National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke-Alzheimer's Disease and Related Disorders Association και το MMSE: Mini mental State Examination, που στοχεύει στην αξιολόγηση των γνωστικών ικανοτήτων του ασθενούς [2]. Ιδιαίτερα σημαντική είναι η διάκριση της νόσου από άλλες νευροεκφυλιστικές νόσους.

1.5 Θεραπεία

Ακόμα και σήμερα δεν υπάρχει κανένα αποτελεσματικό φάρμακο για την θεραπεία της νόσου, ωστόσο έχουν γίνει αρκετές προσπάθειες, και έχουν χρησιμοποιηθεί αρκετές αγωγές τόσο για την θεραπεία όσο για τον περιορισμό της εξέλιξης της νόσου. Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, δυο φάρμακα που έχουν χρησιμοποιηθεί είναι η τετραϋδροαμινοακριδίνη και η δονεπεξίλη, με σκοπό την αύξηση των επιπέδων της ακετυλοχολίνης [1]. Μια άλλη επιλογή είναι η χρήση της μεμαντίνης, που δρα ανταγωνιστικά για τους NMDA υποδοχείς, που συμμετέχουν στην πλαστικότητα των νευρώνων [12].

Άλλες θεραπευτικές προσεγγίσεις που έχουν χρησιμοποιηθεί κατά της νόσου είναι είτε μικρές χημικές ενώσεις, είτε συγκεκριμένα μόρια. Στην πρώτη περίπτωση ο στόχος είναι οι ενώσεις αυτές να διαπεράσουν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό και να καταστείλουν τον μηχανισμό παραγωγής του β-αμυλοειδούς πεπτιδίου, μέσω του περιορισμού της β και της γ εκκρίτασης. Αντίστοιχα, στη δεύτερη περίπτωση στόχος είναι η παρεμπόδιση σχηματισμού των τοξικών ολιγομερών του αμυλοειδούς, μέσω της πρόσδεσης των μορίων στα μονομερή του β-αμυλοειδούς [1]. Επιπλέον, έχουν χρησιμοποιηθεί και αντιφλεγμονώδη φάρμακα, αντιοξειδωτικά μόρια, παρεμποδιστές καναλιών ασβεστίου ή χειριστών σηματοδοτικών μονοπατιών, προστατεύοντας τους νευρώνες από τις βλάβες που προκαλούν τα συσσωματώματα του β-αμυλοειδούς ένδο- και έξω-κυτταρικά. Τέλος αντισώματα κατά του β-αμυλοειδούς πεπτιδίου, χρησιμοποιώντας συνθετικό ανθρώπινο β-αμυλοειδές πεπτίδιο ίσως αποτελέσει τρόπο περιορισμού του β-αμυλοειδούς στον ανθρώπινο εγκέφαλο, ωστόσο η αποτελεσματικότητά του είναι αβέβαιη, και πιθανώς να είναι απαραίτητος ο συνδυασμός περισσότερων της μιας θεραπευτικής προσέγγισης [1].

2. Νευροπαθολογικά Χαρακτηριστικά της Νόσου του Alzheimer

2.1 Νευριτικές Πλάκες

Ένα από τα παθολογικά χαρακτηριστικά της νόσου είναι οι νευριτικές πλάκες, μικροσκοπικές εξωκυτταρικές εναποθέσεις β-αμυλοειδούς πεπτιδίου, συνήθως με νηματοειδή μορφή. Αποτελούνται κυρίως από β-αμυλοειδές πεπτίδιο μήκους είτε 40 αμινοξέων (Αβ40), είτε 42 αμινοξέων (Αβ42) [1, 9]. Το Αβ40 και το Αβ42 αποτελούν προϊόντα πρωτεολυτικής διάσπασης της APP, της πρόδρομης πρωτεΐνης του αμυλοειδούς πεπτιδίου. Στον άνθρωπο, πιο συχνά απαντάται το Αβ40, ωστόσο, στις νευριτικές πλάκες το Αβ42 είναι πιο άφθονο και συσχετίζεται πιο άμεσα με τη νόσο [2], καθώς έχει δυο περισσότερα αμινοξέα, αλλά και επειδή έχει μεγαλύτερο βαθμό υδροφοβικότητας και έτσι έχει την τάση να σχηματίζει ινίδια [1, 2]. Παρ' όλα αυτά, στις νευριτικές πλάκες τα δυο πεπτίδια συνεντοπίζονται. Ο αναγκαίος χρόνος για τον σχηματισμό και την ανάπτυξη των πλακών είναι άγνωστος, ωστόσο, είναι κοινώς αποδεκτό ότι απαιτείται μεγάλο χρονικό διάστημα από μήνες έως και χρόνια [1]. Οι πλάκες μπορούν να διακριθούν σε δυο τύπους χρησιμοποιώντας ειδικές χρωστικές, όπως το Congo Red και η Thioflavine-S, για τις β-πτυχωτές επιφάνειες που διαθέτουν. Ο πρώτος τύπος έχει θετικές χρώσεις και αφορά τις πλάκες πυκνού πυρήνα, που είναι συμπαγείς και σχετίζονται απώλεια συνάψεων και φλεγμονώδεις αποκρίσεις, ενώ ο δεύτερος τύπος αφορά τις διάχυτες πλάκες, δεν έχει τα παραπάνω χαρακτηριστικά και είναι αρνητικός για αυτές τις δύο χρώσεις [13].

2.2 Νευροϊνιδιακά Δεμάτια

Το επόμενο σημαντικό νευροπαθολογικό χαρακτηριστικό της νόσου είναι τα νευροϊνιδιακά δεμάτια [4, 9]. Αυτά είναι αδιάλυτες ινώδεις συναθροίσεις στο εσωτερικό των κυτταρικών σωμάτων και αποτελούνται από ζεύγη ελικοειδών ινιδίων και ευθεία ινίδια, με μήκος περίπου 10nm [1, 14]. Στον σχηματισμό των δεματιών σημαντικό ρόλο έχει η υπερφωσφορυλιωμένη ισομορφή της πρωτεΐνης tau [4, 9, 15], μια πρωτεΐνη που εκφράζεται εντός των νευρώνων και αλληλοεπιδρά με τους μικροσωληνίσκους, προωθώντας τη μεταξύ τους σύνδεση [15]. Διάφορες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις όπως η φωσφορυλίωση της tau, ρυθμίζουν τη συγγένεια της tau με τους μικροσωληνίσκους. Η υπερφωσφορυλίωση της οδηγεί στην παραγωγή δυσδιάλυτων ισομορφών της που τελικά συσσωματώνονται στο εσωτερικό των κυττάρων, δημιουργώντας τα νευροϊνιδιακά δεμάτια [15]. Η φωσφορυλίωση της tau φυσιολογικά γίνεται από μεγάλο πλήθος κινασών, ωστόσο ακόμα δεν είναι γνωστό ποια ή ποιες είναι υπεύθυνες για την υπερφωσφορυλίωση της tau [1]. Χρώσεις όπως η τεχνική

Gallyas ή ο ανοσοεντοπισμός με φθορίζουσες χρωστικές ή με αντι-tau αντισώματα, είναι τρόποι εντοπισμού των νευροϊνιδιακών δεματίων [15,16].

2.3 Εγκεφαλική Αμυλοειδική Αγγειοπάθεια

Ένα άλλο χαρακτηριστικό είναι η εναπόθεση αμυλοειδούς γύρω από τα αιμοφόρα αγγεία που μπορεί να οδηγήσει σε αλλαγές στην ακεραιότητα του αιματοεγκεφαλικού φραγμού, σε εξαγγείωση των πρωτεϊνών του πλάσματος, σε σχηματισμό οιδήματος ή σε έκκριση φλεγμονωδών μεσολαβητών [17]. Η εναπόθεση αυτή σταδιακά περιορίζει τη ροή του αίματος οδηγώντας σε τοπική στέρηση του οξυγόνου, προκαλώντας τελικά οξειδωτικό στρες και κυτταρική τοξικότητα [17]. Αντίθετα με τις νευριτικές πλάκες, εδώ κυρίαρχο πεπτίδιο είναι το Αβ40 [1, 17]. Ο βαθμός αμυλοειδικής αγγειοπάθειας ποικίλλει μεταξύ των ασθενών, που μπορεί να έχουν παρόμοια επίπεδα β-αμυλοειδούς στο εγκεφαλικό παρέγχυμα [1].

3. Το β-Αμυλοειδές Πεπτίδιο

3.1 Πρόδρομη πρωτεΐνη του β-αμυλοειδούς: Δομή, Οικογένεια, Έκφραση

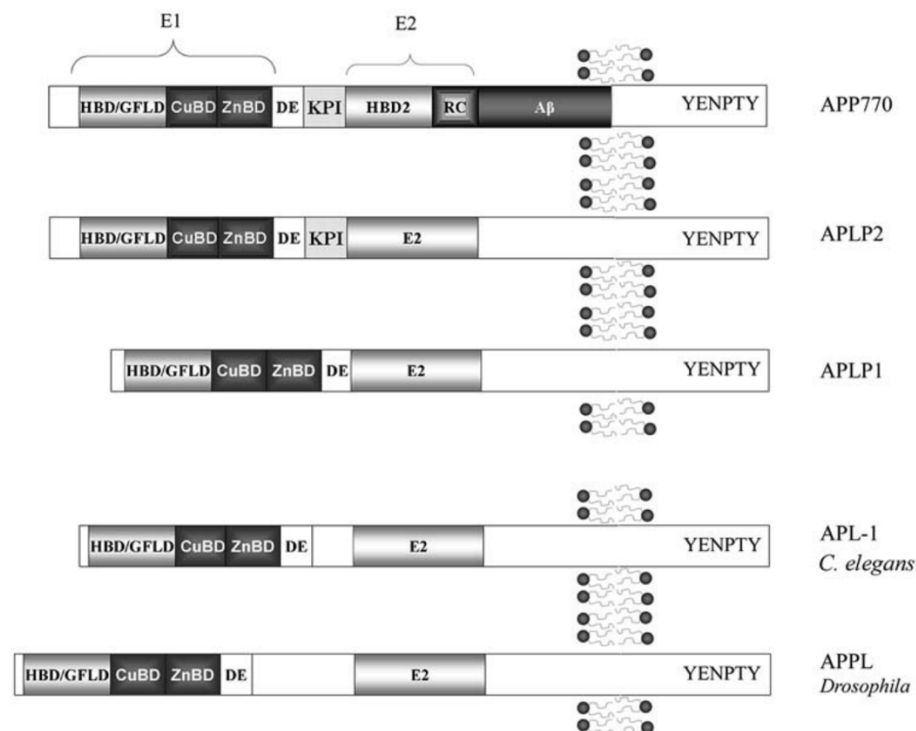
Η πρωτεολυτική διάσπαση του πρόδρομου β-αμυλοειδούς πεπτιδίου (Amyloid Precursor Protein, APP) οδηγεί στη δημιουργία του β-αμυλοειδούς πεπτιδίου [9]. Η APP είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη τύπου I και αποτελείται από ένα μεγάλο μήκους εξωκυτταρικό αμινοτελικό άκρο, μια μόνο διαμεμβρανική περιοχή και μια κοντή κυτταροπλασματική καρβοξυτελική ουρά [18]. Η APP είναι μέλος μιας εξελικτικά συντηρημένης οικογένειας πρωτεϊνών, που περιλαμβάνει πρωτεΐνες όπως η APL-1 του *Caenorhabditis elegans* [19], η APPL της *Drosophila melanogaster* [20] και οι APLP1 και APLP2 (APP-like-protein-1,2) των θηλαστικών [18].

Οι συντηρημένες περιοχές που είναι κοινές στις πρωτεΐνες αυτές εντοπίζονται τόσο στην εξωκυτταρική όσο και στην ενδοκυτταρική περιοχή [18]. Στο αμινοτελικό εξωκυτταρικό άκρο εντοπίζονται 2 αρκετά συντηρημένες περιοχές η E1 και η E2. Η πρώτη αποτελείται από μια αλληλουχία σύνδεσης της ηπαρίνης και μια αλληλουχία σύνδεσης κάποιου μετάλλου [18]. Στο ενδοκυτταρικό τμήμα υπάρχει ένα YENPTY μοτίβο, αρκετά συντηρημένο, που συμμετέχει στη διαδικασία ενδοκύτωσης μέσω κλαθρίνης, ελέγχει την παραγωγή β-αμυλοειδούς και προσδένεται σε διάφορες κινάσες. Αντίθετα, η αλληλουχία του β-αμυλοειδούς πεπτιδίου στο διαμεμβρανικό τμήμα είναι αρκετά αποκλίνουσα και εντοπίζεται μόνο στην APP [18].

Από την APP των θηλαστικών, μέσω του εναλλακτικού ματίσματος και των πολλών διαφορετικών μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων, μπορούν να προκύψουν μια πληθώρα πολυπεπτιδίων που διαφέρουν στον αριθμό των αμινοξικών τους καταλοίπων. Οι τρεις κύριες ισομορφές της, περιλαμβάνουν 695, 751 και 770 αμινοξικά κατάλοιπα, με την πρώτη να είναι αυτή που εκφράζεται κυρίως στους νευρώνες [1].

3.2 Φυσιολογικές Λειτουργίες της APP

Η APP θεωρείται ότι είναι υπεύθυνη για διάφορες λειτουργίες των κυττάρων, όπως η ανάπτυξη και η επιδιόρθωση των νευρώνων καθώς και ο σχηματισμός των συνάψεων, ωστόσο η βιολογική της λειτουργία δεν είναι απόλυτα ξεκάθαρη [21,22]. Αρχικά, υπήρχε υπόθεση ότι η APP είχε λειτουργία υποδοχέα, το οποίο επιβεβαιώθηκε με μελέτες που έδειξαν τη δράση της APP τόσο ως υποδοχέας όσο και ως προσδέτης [21]. Επιπλέον, διάφορες λειτουργίες της επιτελούνται και από τα εκκρινόμενα παράγωγα της APP (α -APPs). Αυτά μπορούν να δράσουν ως αυτοκρινείς και νευροπροστατευτικοί παράγοντες. Επίσης, οι ισομορφές με 751 ή 770 αμινοξικά κατάλοιπα, έχουν μια αλληλουχία 56 αμινοξέων στο εσωτερικό με δράση καταστολέα πρωτεασών σερίνης [21]. Τελικά, το συμπέρασμα από διάφορες μελέτες είναι πως η APP έχει συμμετοχή σε διάφορες φυσιολογικές λειτουργίες όπως η κυτταρική προσκόλληση, η συμμετοχή σε αλληλεπιδράσεις κυττάρων καθώς και η επιβίωση και η απόπτωση των νευρώνων [21].



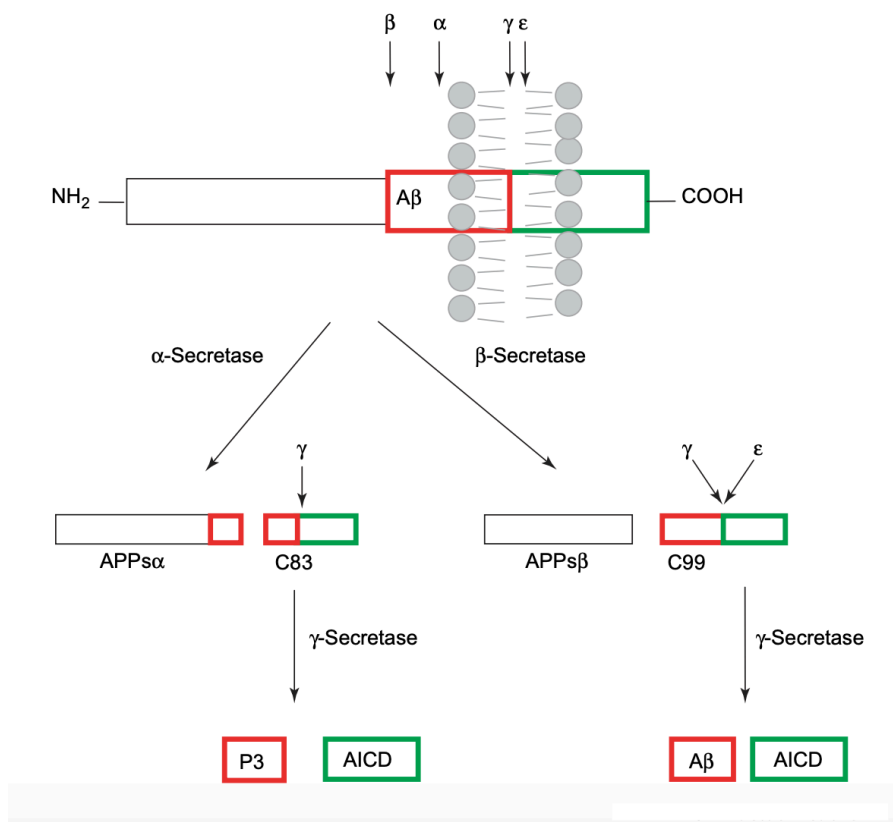
Εικόνα 1: Σχηματική απεικόνιση της δομής των APP πρωτεϊνών [21]

3.3 Αμυλοειδογενές και Μη Αμυλοειδογενές Μονοπάτι

Η πρωτεολυτική διάσπαση της πρόδρομης πρωτεΐνης του β-αμυλοειδούς πεπτιδίου είναι μια ενζυμική διαδικασία που πραγματοποιείται από τρεις πρωτεΐνες, τις α-, β-, γ- εκκριτάσες και μπορεί να διακριθεί σε δυο μονοπάτια: το Αμυλοειδογενές, από το οποίο προκύπτει το β-αμυλοειδές πεπτίδιο και το μη Αμυλοειδογενές, με αποτέλεσμα άλλα προϊόντα, διαφορετικά του β-αμυλοειδούς [1, 9, 21, 23, 24].

Στο αμυλοειδογενές μονοπάτι η πρωτεόλυση της APP γίνεται διαδοχικά από δυο μεμβρανικές ενδοπρωτεάσες, τη β- και τη γ- [1]. Στο πρώτο βήμα δρα η β-εκκριτάση, κόβοντας την APP κοντά στο αμινοτελικό άκρο, δημιουργώντας έτσι ένα μεγάλο αμινοτελικό θραύσμα της APP, το sAPPβ (soluble APPβ) [1, 23]. Παράλληλα, υπάρχει το CTFβ (β-C-terminal fragment), ένα καρβοξυτελικό άκρο 99 αμινοξικών καταλοίπων, που παραμένει συνδεδεμένο στη μεμβράνη. Σε επόμενο βήμα, το θραύσμα αυτό κόβεται από τη γ-εκκριτάση, εντός του διαμεμβρανικού τμήματος, παράγοντας έτσι το β-αμυλοειδές πεπτίδιο, που τελικά απελευθερώνεται στον εξωκυττάριο χώρο [1, 23]. Επιπλέον, απελευθερώνεται και ένα ενδοκυτταρικό θραύσμα της APP, η ACID (APP Intracellular Domain), με πιθανό ρόλο στη μεταγωγή σήματος. Η γ-εκκριτάση δεν διαθέτει μεγάλη ακρίβεια, συνεπώς παράγονται πεπτίδια Αβ με κυμαινόμενο μήκος από 37 ως 43 αμινοξέα. Βασικότερο προϊόν, σε ποσοστό 90%, είναι το Αβ40, ενώ το Αβ42 που εντοπίζεται κυρίως στις πλάκες αντιστοιχεί περίπου στο 10% [25].

Στο μη αμυλοειδογενές μονοπάτι η διάσπαση της APP γίνεται και πάλι από δυο ενδοπρωτεάσες, την α- και τη γ- εκκριτάση [9]. Η APP κόβεται από την α-εκκριτάση σε μεγαλύτερο ποσοστό (90%) από την β-εκκριτάση, παράγοντας έτσι ένα μεγάλο εξωκυτταρικό θραύσμα, το sAPPα (soluble APPα) και ένα καρβοξυτελικό θραύσμα 83 αμινοξέων, το CTFα (α-C-terminal fragment), που παραμένει στην μεμβράνη [9, 23]. Το CTFα κόβεται από την γ-εκκριτάση, παράγοντας ένα πεπτίδιο, το p3, αντί για το β-αμυλοειδές πεπτίδιο και απελευθερώνεται στο εξωκυτταρικό χώρο, αλλά δεν οδηγεί στην εμφάνιση της νόσου, ενώ ενδοκυτταρικά παράγεται και εδώ το θραύσμα ACID [9, 23].



Εικόνα 2: Μη αμυλοειδογενές και Αμυλοειδογενές Μονοπάτι [26].

3.4 APP Εκκριτάσες

Οι APP εκκριτάσες είναι τρεις (α-, β-, γ-) και η πρωτεολυτική τους δράση παίζει ρόλο κλειδί στην παθογένεια της νόσου Alzheimer [24]. Κάθε εκκριτάση έχει διαφορετικό σημείο δράσης, με την α- να κόβει εντός του β-αμυλοειδούς πεπτιδίου και τις β- και γ- να κόβουν εξωτερικά, στο αμινοτελικό και καρβοξυτελικό άκρο αντίστοιχα [9, 24].

Η α-εκκριτάση είναι αυτή που κόβει την APP κατά κύριο λόγο, σε ποσοστό περίπου 90%, κυρίως εντός του β-αμυλοειδούς πεπτιδίου, εμποδίζοντας έτσι το σχηματισμό του [9, 24]. Παλαιότερες μελέτες υποδείκνυαν πως πρωτεΐνες της οικογένειας των μεταλλοπρωτεασών ADAM, ίσως είναι οι α-εκκριτάσες. Πιο συγκεκριμένα ένα μετατρεπτικό ένζυμο του παράγοντα νέκρωσης όγκων α (Tumor Necrosis Factor-α /TNF-α converting enzyme) και η μεταλλοπρωτεΐνάση ψευδαργύρου ADAM-10 [27]. Νεότερες μελέτες επιβεβαίωσαν την δράση της ADAM-10 ως α-εκκριτάσης, αλλά και την αντίστοιχη δράση των ADAM-9 και ADAM-17 [27].

Η β-εκκριτάση ή αλλιώς BACE (β-site APP Cleaving Enzyme), μια ασπάρτυλο-πρωτεϊνάση, είναι υπεύθυνη για την παραγωγή του β-αμυλοειδούς [9]. Αναφορικά με τη δομή της, στο αμινοτελικό της άκρο φέρει δυο σημαντικά κατάλοιπα ασπαρτικού με καταλυτική δράση, η

διαμεμβρανική της περιοχή έχει 17 αμινοξικά κατάλοιπα και έχει μια μικρή καρβοξυτελική κυτοσολική ουρά. Εντοπίζονται δυο βασικές μορφές του ενζύμου, η BACE1 και η BACE2, με ομολογία >65% [9, 28]. Η έκφραση της BACE1 είναι υψηλότερη στον εγκέφαλο με αποτέλεσμα να θεωρείται ως νευρωνική β-εκκριτάση, που κόβει την APP σε σημείο που οδηγεί στην παραγωγή του β-αμυλοειδούς πεπτιδίου [9]. Έρευνες έχουν δείξει πως η παραγωγή του β-αμυλοειδούς πεπτιδίου είναι πολύ μειωμένη σε BACE-1 knock-out ποντίκια [9]. Αντίστοιχα, η BACE-2 εκφράζεται σε αισθητά χαμηλότερα επίπεδα στον εγκέφαλο, ενώ η παρουσία της είναι έντονη σε άλλους περιφερικούς ιστούς [9]. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός πως η ενεργότητα της BACE είναι ιδιαίτερα αυξημένη σε ασθενείς με τη σποραδική μορφή της νόσου [9].

Τέλος, η γ-εκκριτάση, μια ενδομεμβρανική ασπάρτυλο-πρωτεΐνάση, είναι ένα πρωτεϊνικό σύμπλεγμα απαρτιζόμενο από τέσσερις υπομονάδες σε ένα μόνο αντίγραφο η κάθε μια. Αυτές είναι η πρεσενιλίνη 1 (PS1) ή η πρεσενιλίνη 2 (PS2), η νικαστρίνη (nicastrin, NTC), η anterior pharynx defective (APH-1) και η presenilin enhancer 2 (PEN 2) [10, 29]. Το σύμπλοκο δρα κόβοντας πολλές πρωτεΐνες, καθώς και την APP [9]. Η πρεσενιλίνη είναι η καταλυτική υπομονάδα του συμπλόκου, καθώς μέσω μιας διαδικασίας πρωτεόλυσης κόβεται σε δυο τμήματα, ένα αμινοτελικό (N-terminal fragment, NTF) και ένα καρβοξυτελικό θραύσμα (C-terminal fragment, CTF), τα οποία παραμένουν συνδεδεμένα μεταξύ τους, δημιουργώντας έτσι το ετεροδιμερές, που αποτελεί την ενεργό μορφή της πρωτεΐνης [29]. Η οικογενής μορφή της νόσου Alzheimer σχετίζεται με περισσότερες από 100 παρερμηνεύσιμες μεταλλαγές στη πρεσενιλίνη, που προκαλούν αλλαγές στις θέσεις που κόβεται η APP και κατά συνέπεια προκύπτουν β-αμυλοειδή πεπτίδια, διαφορετικού μήκους [9, 29]. Η ενεργότητα της γ-εκκριτάσης δεν επηρεάζεται από την υπερέκφραση της πρεσενιλίνης και αντίστοιχα δεν επηρεάζεται η ποσότητα των παραγόμενων προϊόντων [10]. Η δράση της πρεσενιλίνης περιορίζεται από διάφορους περιοριστικούς παράγοντες, όπως η NTC, η οποία συμμετέχει στην αναγνώριση του υποστρώματος αλληλεπιδρώντας με τα εξωκυτταρικά αμινοτελικά του άκρα. [10, 29]. Παράλληλα έχει δειχθεί πως η ωρίμανση της NTC εξαρτάται από την πρεσενιλίνη, καθώς και πως η υπερέκφραση τους δεν αρκεί για την ενεργοποίηση της γ-εκκριτάσης, καθώς απαιτείται και η συμμετοχή άλλων περιοριστικών παραγόντων [10], όπως η APH-1 και η PEN-2. Ο ρόλος της πρώτης φαίνεται να είναι η σύνδεση των υπομονάδων μεταξύ τους, ενώ της δεύτερης η ενδοπρωτεόλυση της PS σε NTF και CTF, κατά τη ωρίμανση και ενεργοποίηση του συμπλέγματος [29]. Η λειτουργία της γ-εκκριτάσης απαιτεί την παρουσία των υπομονάδων αυτών στα κύτταρα των θηλαστικών [10].

3.5 Καταβολισμός του β-Αμυλοειδούς Πεπτιδίου

Μεγάλη σημασία έχει και ο καταβολισμός του β-αμυλοειδούς πεπτιδίου, διαδικασία στην οποία υπεύθυνα θεωρούνται δυο ένζυμα, η νεπριλυσίνη (neprilysin, NEP) και το ένζυμο αποικοδόμησης της ινσουλίνης (insulin degrading enzyme, IDE) [9]. Το πρώτο ένζυμο μια μεμβρανική μεταλλοπρωτεΐνάση τύπου II, θεωρείται ως το βασικό ένζυμο καταβολισμού του β-αμυλοειδούς στον εγκέφαλο [9, 30], ενώ το δεύτερο ένζυμο, μια μεταλλοπρωτεάση ψευδαργύρου, είναι ενεργή εντός και εκτός των κυττάρων [9, 31] και παρουσιάζει μεγαλύτερη συγγένεια με την ινσουλίνη, μεταβολίζοντας τη ωστόσο, με πιο αργό ρυθμό. Και τα δυο ένζυμα έχουν μειωμένο βαθμό έκφρασης και ενεργότητας σε ασθενείς με νόσο Alzheimer [9, 32]. Ένας άλλος πιθανός τρόπος απομάκρυνσης του β-αμυλοειδούς από τον εγκέφαλο είναι μέσω λυσοσωμικής δραστηριότητας από ένζυμα όπως η καθεψίνη B (cathepsin B) [33].

4. Φλεγμονώδης Απόκριση κατά την AD

4.1 Φλεγμονή και Νόσος Alzheimer

Εκτός από τα 3 βασικά νευροπαθολογικά χαρακτηριστικά της νόσου Alzheimer που αναλύθηκαν παραπάνω, πρόσφατα δεδομένα υποστηρίζουν πως η φλεγμονή είναι ένα πρόσθετο χαρακτηριστικό που συμμετέχει στην εξέλιξη της νόσου [34]. Η φλεγμονώδης απόκριση αποσκοπεί στην εξάλειψη των αιτίων τραυματισμού των κυττάρων αλλά και των τραυματισμένων ιστών [35]. Στην περίπτωση που δεν αποκατασταθεί ο τραυματισμένος ιστός η φλεγμονή οδηγείται σε μια χρόνια κατάσταση, καταστρέφοντας και τους γύρω ιστούς [35]. Σε νοσούντες από AD εγκεφάλους, η φλεγμονή εντοπίζεται σε παθολογικά ευάλωτες περιοχές, παράλληλα με αυξημένη έκφραση των πρωτεϊνών οξειάς φάσης και προφλεγμονωδών μεσολαβητών, όπως οι κυτταροκίνες, οι χημειοκίνες, τα μακροφάγα, τα μονοκύτταρα, οι προσταγλανδίνες, οι παράγοντες πήξης, οι αναστολείς πρωτεασών και το συμπλήρωμα [35]. Οι βασικοί κυτταρικοί πληθυσμοί που συμμετέχουν στην φλεγμονώδη απόκριση είναι η μικρογλοία, τα αστροκύτταρα και οι νευρώνες. Η ενεργοποίηση της μικρογλοίας κατά την φλεγμονή πραγματοποιείται από πληθώρα φλεγμονωδών μεσολαβητών [34], και εν συνεχεία η μικρογλοία «στρατολογεί» τα αστροκύτταρα, που ενισχύουν τη φλεγμονώδη απόκριση στις εξωκυτταρικές εναποθέσεις του β-αμυλοειδούς [35]. Ο συνδυασμός των παραπάνω παραγόντων μπορεί να οδηγήσει στη δυσλειτουργία των νευρικών κυττάρων και στον κυτταρικό θάνατο [34].

4.2 Μικρογλοία

Τα μικρογλοιακά κύτταρα, το 10% των συνολικών κυττάρων του νευρικού συστήματος, αποτελούν το έμφυτο ανοσοποιητικό σύστημα του εγκεφάλου, συνεπώς και την πρώτη γραμμή άμυνας σε πιθανή μόλυνση ή βλάβη του εγκεφάλου [34, 35]. Η προέλευση της μικρογλοίας είναι τα μεσεγχυματικά προδρομικά κύτταρα του μυελού των οστών [36], και συνήθως, κατά τη φυσιολογική τους λειτουργία βρίσκονται σε μια κατάσταση ανάπαυσης, όπου παρατηρείται μικρό κυτταρικό σώμα και αποφύσεις που εκτείνονται προς όλες τις κατευθύνσεις [36]. Με την ενεργοποίηση της μικρογλοίας παρατηρούνται αλλαγές στη μορφολογία της. Σε μια παθολογική κατάσταση του εγκεφάλου, το κυτταρικό σώμα των μικρογλοιακών κυττάρων διογκώνεται και οι συνάψεις εξαφανίζονται, με αποτέλεσμα τα κύτταρα να αποκτούν αμοιβαδοειδή μορφή [36]. Σε παθολογικές καταστάσεις όπως οι νευροεκφυλιστικές νόσοι, παρατηρείται ενεργοποίηση των κυττάρων αυτών, η μετανάστευση και η συγκέντρωση τους γύρω από τραυματισμένα ή νεκρά κύτταρα, με σκοπό τον καθαρισμό της περιοχής αυτής [34, 37]. Η δράση των μικρογλοιακών κυττάρων θα μπορούσε να παρομοιαστεί με τη δράση των μακροφάγων στο περιφερικό ανοσοποιητικό σύστημα [34, 37]. Επιπλέον έχει παρατηρηθεί έντονη συσχέτιση των μικρογλοιακών κυττάρων με την εναπόθεση β-αμυλοειδούς πεπτιδίου στον εγκέφαλο [36], καθώς αυτό ενεργοποιεί τη μικρογλοία η οποία στη συνέχεια παράγει ποικιλία φλεγμονωδών μεσολαβητών με νευροτοξική δράση και κατά συνέπεια αρνητική επίδραση στους νευρώνες [36]. Τέτοιοι παράγοντες είναι οι κυτταροκίνες (IL-1α, IL-6, TNF-α, INF-6), οι χημειοκίνες και πρωτεΐνες του συμπληρώματος [35]. Παράλληλα, η μικρογλοία μπορεί και απομακρύνει τις εναποθέσεις του β-αμυλοειδούς πεπτιδίου, «καθαρίζοντας» τις αμυλοειδείς πλάκες από τον εγκέφαλο [34, 36].

4.3 Παράγοντας Νέκρωσης Όγκων -α (TNF-α)

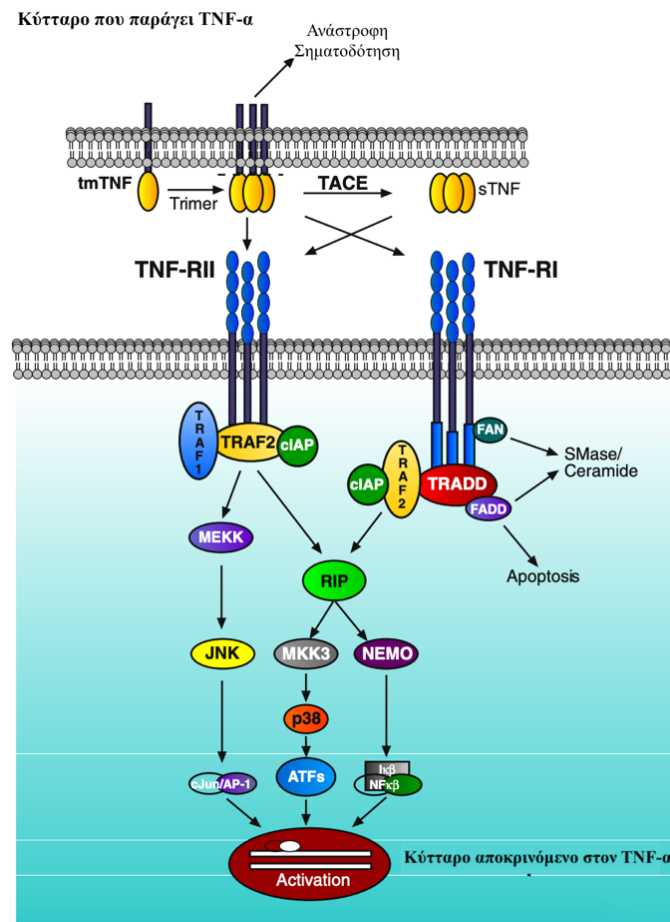
Ο παράγοντας νέκρωσης όγκων-α (tumor necrosis factor-α, TNF-α), μια ισχυρή προφλεμονώδης κυτταροκίνη, αποτελεί μέλος της TNF υπερικογένειας προσδετών [38], η οποία ανακαλύφθηκε αρχικά σε ποντίκια ως παράγοντας του ορού του αίματος, κατά την απόκριση στην ενδοτοξίνη, με δυνατότητα καταστροφής των καρκινικών κυττάρων [39]. Η αρχική του μορφή είναι μια μονομερής διαμεμβρανική πρωτεΐνη τύπου II (transmembrane TNF-α, tmTNF-α) με μοριακό βάρος 26kDa, και μετά από πρωτεόλυση παράγεται μια υπομονάδα με μοριακό βάρος 17kDa [38, 39]. Αρχικά, εισέρχεται στη μεμβράνη ως ομοτριμερές και έπειτα δέχεται τη δράση του μεταπρεπτικού ενζύμου του TNF-α (TNF-α

converting enzyme, TACE), και παράγεται η διαλυτή τριμερής μορφή του, με μοριακό βάρος 51 kDa (soluble TNF- α , solTNF- α) [38]. Τόσο ο διαμεμβρανικός όσο και ο διαλυτός TNF- α είναι βιολογικά ενεργοί, και η σύνθεση τους πραγματοποιείται στα μακροφάγα, τα T κύτταρα, τα σιτευτικά, τα κοκκιοκύτταρα, τα φυσικά φονικά, τα ενδοθηλιακά και τα λεία μυϊκά κύτταρα [40], ενώ στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα συντίθεται από τα μικρογλοιακά κύτταρα, τα αστροκύτταρα και κάποιους πληθυσμούς νευρώνων [38].

Η δράση του πραγματοποιείται με αυτοκρινή ή παρακρινή τρόπο και τόσο η διαλυτή μορφή, όσο και η διαμεμβρανική επιτυγχάνουν τις σηματοδοτικές τους λειτουργίες μέσω σύνδεσης με δυο, συγγενικές, διαμεμβρανικές γλυκοπρωτεΐνες-υποδοχείς, τον TNFR1 (p55, TNF receptor I), και τον TNFR2 (p75, TNF receptor II) [40,41]. Ο πρώτος υποδοχέας εκφράζεται στους περισσότερους τύπους κυττάρων, εκτός από τα ερυθροκύτταρα, και μπορεί να ενεργοποιηθεί και από τις δύο μορφές του TNF- α , και κυρίως από τη διαλυτή του μορφή. Η έκφραση του δεύτερου υποδοχέα επάγεται από τη φλεγμονή και είναι εντοπισμένη στα κύτταρα του ανοσοποιητικού (συνεπώς και της μικρογλοίας) καθώς και στα ενδοθηλιακά κύτταρα [38, 40]. Η ενεργοποίηση του TNFR2 πραγματοποιείται κυρίως από τη διαμεμβρανική μορφή του TNF- α [38], ωστόσο και η διαλυτή μορφή μπορεί να συνδεθεί σε αυτόν, αλλά η αποσύνδεση της είναι εύκολη, υποστηρίζοντας την υπόθεση μεταφοράς προσδέτη «ligand-passing hypothesis», όπου θεωρείται ότι η διαλυτή μορφή αποσυνδέεται ταχύτατα από τον TNFR2 και μεταφέρεται στον TNFR1, προκαλώντας γρήγορη μεταβίβαση σήματος μέσω του TNFR1 [40].

Η σηματοδότηση μέσω του TNF- α προκαλεί διάφορες κυτταρικές αποκρίσεις, στις οποίες παίζουν ρόλο διάφοροι παράγοντες, όπως η μεταβολική κατάσταση και διάφορες πρωτεΐνες-προσαρμοστές σε κάθε κύτταρο. Οι εκάστοτε ιδιαίτερες συνθήκες που επικρατούν επηρεάζουν την ενεργοποίηση διαφορετικών ενδοκυτταρικών σηματοδοτικών μονοπατιών, όπως αυτά των μονοπατιών των NF- κ B, JNK, p38 και των κεραμιδίων/σφιγγομυελινάσης, επηρεάζοντας έτσι και το είδος της απόκρισης που θα ακολουθήσει, όπως είναι η φλεγμονή, ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η επιβίωση, η απόπτωση και η νέκρωση [38, 42]. Ο TNFR1 συνδέεται κυρίως με τις κυτταροτοξικές αποκρίσεις, ενώ ο TNFR2 με τις κυτταροπροστατευτικές [40]. Επιπλέον, ο διαμεμβρανικός TNF έχει τη δυνατότητα σηματοδότησης ακόμα και στο κύτταρο έκφρασης του, εάν συνδεθεί με τους υποδοχείς του, διαδικασία γνωστή ως ανάστροφη σηματοδότηση. Με τον τρόπο αυτό μπορούν να ενεργοποιηθούν τα μονοπάτια των p38 και MAP (mitogen-activated protein) κινασών [38,40]. Επίσης, η δράση της TACE οδηγεί στην απελευθέρωση της ενδοκυτταρικής επικράτειας του TNF- α στο κυτταρόπλασμα, μέσω ρυθμιζόμενης ενδομεμβρανικής

πρωτεόλυσης. Το τμήμα αυτό μπορεί να μεταφερθεί στον πυρήνα, προκαλώντας αύξηση στην παραγωγή προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών [38].



Εικόνα 3: Κυτταρική σηματοδότηση των δυο μορφών TNF-α – τροποποίηση από Montgomery et al., 2012 [40].

Τέλος, μέσω της ανάστροφης σηματοδότησης είναι δυνατή η επικοινωνία διπλής κατεύθυνσης μεταξύ των κυττάρων [40].

4.4 Ο TNF-α στον Εγκέφαλο και στη Νόσο του Alzheimer

Η δράση του TNF-α στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα παρατηρείται μέσα από διάφορες λειτουργίες, όπως η απόπτωση των νευρωνών όταν αυτοί δε λαμβάνουν αρκετούς νευροτροφικούς παράγοντες κατά την ανάπτυξη, η ενεργοποίηση της μικρογλοίας και των αστροκυττάρων μετά από κάποια βλάβη ή τραυματισμό, η ρύθμιση της διαπερατότητας του αιματοεγκεφαλικού φραγμού, η συναπτική πλαστικότητα, καθώς και διάφορες θετικές και αρνητικές δράσεις στη διαδικασία της νευρογένεσης στην ενήλικη ζωή [38, 40].

Η συμμετοχή του TNF-α και της σηματοδότησης μέσω αυτού, στη νόσο του Alzheimer παρατηρήθηκε μέσω των αυξημένων επιπέδων του TNF-α στις αμυλοειδείς πλάκες στον

εγκέφαλο ασθενών με τη νόσο, αλλά και στο Εγκεφαλονωτιαίο Υγρό και τον ορό, όπου και παρατηρείται συσχέτιση των επιπέδων του TNF-α με τη σοβαρότητα της νόσου [40, 41].

Αργότερα, ο TNF-α εντοπίστηκε και σε αμυλοειδείς πλάκες σε διάφορα διαγονιδιακά ποντίκια-μοντέλα της νόσου [38, 42]. Απόρροια αυτών των παρατηρήσεων ήταν η πραγματοποίηση μελετών με σκοπό τη συσχέτιση, μέσω του γονιδιώματος, της αυξημένης παραγωγής TNF-α και τον υψηλότερο κίνδυνο εμφάνισης της νόσου, όπου και βρέθηκαν τρεις πολυμορφισμοί, οι δυο σε υποκινητή και ο τρίτος σε μικροδορυφορική περιοχή ανοδικά του γονιδίου [43].

Ωστόσο, υπάρχουν δεδομένα που υποστηρίζουν ότι ο TNF-α έχει προστατευτικό ρόλο για τους νευρώνες απέναντι στον κυτταρικό θάνατο που προκαλεί το Αβ [41]. Η συμμετοχή του TNF-α στη ρύθμιση της συσσώρευσης ασβεστίου, την ενεργοποίηση του NF-κΒ και των αντιοξειδωτικών μονοπατιών, είναι οι λειτουργίες του στις οποίες στηρίζεται η προστατευτική του δράση [41]. Αν τελικά ο TNF-α θα έχει νευροτοξική ή νευροτροφική δράση εξαρτάται από τον βαθμό ενεργοποίησης της μικρογλοίας σε συγκεκριμένες περιοχές του εγκεφάλου, τη χρονική στιγμή καθώς και τις συνθήκες ενεργοποίησης της σηματοδότησης μέσω TNF-α [41].

Επιπλέον, διάφορα πειραματικά δεδομένα επιβεβαιώνουν τη σχέση μεταξύ Αβ και της σηματοδότησης μέσω TNF-α, καθώς η σηματοδότηση μέσω του TNFR1 μπορεί και ρυθμίζει τα επίπεδα της BACE1, μέσω του μονοπατιού του NF-κΒ, άρα και την παραγωγή του Αβ. Επίσης στα APP23 διαγονιδιακά ποντίκια-μοντέλα της νόσου, με την απαλοιφή του γονιδίου για τον TNFR1, έχουν παρατηρηθεί μειωμένες συγκεντρώσεις αμυλοειδών πεπτιδίων και πλακών, εξαιτίας της μείωσης της BACE1. Παράλληλα, τα ποντίκια αυτά παρουσιάζουν βελτιωμένη μνήμη και μάθηση, γεγονός που υποδεικνύει την στόχευση του υποδοχέα ως μια πιθανή θεραπευτική προσέγγιση [44, 45]. Επιπλέον, ο TNF-α ρυθμίζει τον μεταβολισμό της APP από τη γ-εκκρίταση, μέσω ενός JNK-εξαρτώμενου μονοπατιού MAP-κινασών [46], με αποτέλεσμα την φωσφορυλίωση της πρεσενιλίνης και της νικαστρίνης [47].

Αντιθέτως, στα APP23 διαγονιδιακά ποντίκια, απαλοιφή του γονιδίου για τον TNFR2 οδηγεί σε επιδεινωμένη παθολογία της νόσου, καθώς η ρύθμιση της BACE1 γίνεται μέσω της μετατόπισης του NF-κΒ από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα, ο οποίος και προσδένεται σε περιοχή του υποκινητή του γονιδίου της BACE1 [48].

Επιπροσθέτως, σε τριπλά διαγονιδιακά ποντίκια 3xTg-AD (APP/PS1/tau) η έλλειψη έκφρασης των γονιδίων και των δυο υποδοχέων έχει ως αποτέλεσμα την ενίσχυση της αμυλοειδικής και tau παθολογίας των πειραματόζωων, οδηγώντας στο συμπέρασμα πως η

μακροπρόθεσμη και πλήρης αναστολής της σηματοδότης μέσω του TNF- α μπορεί τελικά να μην είναι η επιθυμητή θεραπευτική προσέγγιση της νόσου του Alzheimer [49].

Οι *in vivo* δοκιμές και επεξεργασία των επιπέδων TNF- α έχουν προσφέρει στην καλύτερη κατανόηση της συμμετοχής του στη παθογένεση της νόσου Alzheimer, καθώς και την πιθανή του θεραπευτική σημασία μέσω αντί-TNF- α προσεγγίσεις [40].

Για παράδειγμα η χρήση εκλεκτικού κυρίαρχου-αρνητικού (dominant-negative) αναστολέα της διαλυτής μορφής του TNF- α , που συνδέεται στον TNFR1, με ταυτόχρονη επαγόμενη από LPS, φλεγμονή οδηγεί σε μείωση συσσώρευσης του A β και παραγωγής του C-τελικού τμήματος της APP στις περιοχές του ιππόκαμπου, του φλοιού και της αμυγδαλής στα 3xTg-AD ποντίκια [50].

Αντίστοιχα, στα APP/PS1 διαγονιδιακά ποντίκια η ενδοεγκεφαλοκοιλιακή (intracerebroventricular, ICV) χορήγηση μονοκλωνικού anti-TNF- α αντισώματος infliximab οδήγησε σε μείωση των εναποθέσεων αμυλοειδούς και της υπερφωσφορυλίωσης της tau, αλλά και συσσώρευση κυττάρων CD11c⁺, κοντά στις αμυλοειδείς πλάκες, υποδεικνύοντας έτσι, τη συμμετοχή τους στην εκκαθάριση του A β [51]. Επιπροσθέτως, σε ποντίκια στα οποία εγχύθηκε ενδοεγκεφαλοκοιλιακά το πεπτίδιο A β ₄₀ και αναστάλθηκε φαρμακολογικά ο TNF- α ή ήταν TNFR1 knock out, παρατηρήθηκε βελτίωση σε προβλήματα μνήμης και μάθησης, που υπήρχαν εξαιτίας της συνεργιστικής δράσης του A β και του TNF- α [52].

Σε δυο μελέτες σχετικά με την επίδραση της υπερέκφρασης του TNF- α , με τη χρήση ανασυνδυασμένων αδenoϊών σε διαγονιδιακά ποντίκια της νόσου Alzheimer, προέκυψαν αντικρουόμενα αποτελέσματα που, ίσως εξαιτίας διαφορών στον τόπο και τον χρόνο έκφρασης. Η παροδική έκφραση του TNF- α στον ιππόκαμπο οδηγεί σε απόκριση της γλοίας και μειώνει την εναπόθεση του β -αμυλοειδούς στα TgCRND8 ποντίκια [53], αντίθετα η χρόνια νευροειδική έκφραση του στο 3xTg-AD μοντέλο, οδήγησε σε επιδείνωση της παθολογίας A β και tau, αν και υπήρχε αυξημένη ενεργοποίηση της μικρογλοίας [54].

Ένα άλλο διαγονιδιακό ποντίκι που έχει χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη της συσχέτισης του TNF- α με τη νόσο του Alzheimer είναι το Tg197, που εκφράζει ένα διαγονίδιο του ανθρώπινου TNF- α (huTNF- α). Η τροποποίηση που έχει πραγματοποιηθεί σε αυτό το ποντίκι είναι η αντικατάσταση της 3' αμετάφραστης περιοχής του γονιδίου του ενδογενούς huTNF- α από την 3' αμετάφραστη περιοχή του γονιδίου της ανθρώπινης β -σφαιρίνης. Αυτή η τροποποίηση έχει ως αποτέλεσμα την απορρύθμιση της έκφρασης του huTNF- α και κατά συνέπεια αυξημένο TNF- α στην περιφέρεια αλλά και στον εγκέφαλο, εμφανίζοντας συμπτώματα αντίστοιχα με αυτά της ρευματοειδούς αρθρίτιδας στον άνθρωπο [55]. Σε μελέτη όπου διασταυρώθηκαν τα Tg197 με τα 5XFAD ποντίκια, παρατηρήθηκε σημαντική

μείωση αμυλοειδών πλακών στον εγκέφαλο, εκτεταμένη ενεργοποίηση της μικρογλοίας και διαταραχή της νευρωνικής ακεραιότητας [56].

Με όσα δεδομένα υπάρχουν ως σήμερα είναι ιδιαίτερα εμφανής η σημαντική συσχέτιση και εμπλοκή του TNF- α στη νόσο του Alzheimer και κρίνεται απαραίτητο να πραγματοποιηθούν περαιτέρω μελέτες για τη διερεύνηση της σχέσης του με την παθογένεση της νόσου.

5. Διαγονιδιακα Ποντίκια

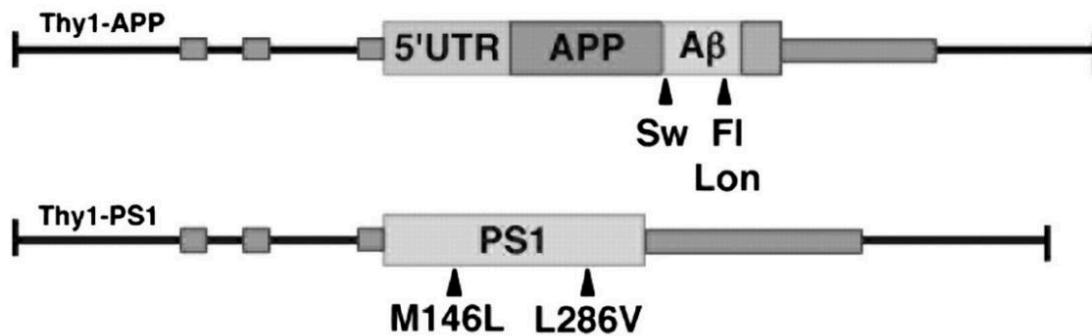
5.1 Διαγονιδιακή Τεχνολογία

Με τον όρο «διαγονιδιακή τεχνολογία» περιγράφονται όλοι οι τρόποι γενετικής τροποποίησης ενός οργανισμού [57]. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν δυο διαφορετικά διαγονιδιακά μοντέλα ποντικών. Στο μοντέλο 5XFAD η τροποποίηση έγινε με εισαγωγή γενετικού υλικού, ενώ στο μοντέλο TNF^{DARE}, η τροποποίηση έγινε μέσω απαλοιφής αλληλουχίας.

5.2 Ποντίκια 5XFAD

Είναι κοινώς αποδεκτό πως μεταλλάξεις στα γονίδια της APP και των πρεσενιλινών PS1, PS2 αυξάνουν την παραγωγή του β -αμυλοειδούς πεπτιδίου, και συγκεκριμένα το $A\beta_{42}$. Αυτές εντοπίζονται κυρίως κοντά σε θέσεις που αναγνωρίζονται και κόβονται από τη β - και τη γ -εκκριτάση. Οι μεταλλάξεις αυτές είναι η βασική αιτία ανάπτυξης της οικογενής μορφής της νόσου Alzheimer (familial Alzheimer's disease, FAD) [58]. Τα 5XFAD διαγονιδιακά-μοντέλα της νόσου του Alzheimer συνεκφράζουν πέντε (5X) γνωστές μεταλλάξεις για την οικογενή μορφή της νόσου, και έχουν ως αποτέλεσμα την αυξημένη παραγωγή του $A\beta$. Οι μεταλλάξεις αυτές είναι οι υποκαταστάσεις K670N/M671L (Σουηδική μετάλλαξη), I716V (μεταλλαγή της Φλόριντας) και V717I (μεταλλαγή του Λονδίνου) στο διαγονίδιο της ανθρώπινης APP, και οι υποκαταστάσεις M146L και L286V στο διαγονίδιο της ανθρώπινης PS1, υπό τον έλεγχο του ειδικού για τους νευρώνες υποκινητή Thy1 (Thymocyte differentiation antigen 1) [58]. Το μοντέλο αυτό αποτελεί ένα καλά χαρακτηρισμένο μοντέλο της νόσου. Στα περισσότερα AD διαγονιδιακά μοντέλα ποντικών χρειάζονται περίπου 6-12 μήνες για την εμφάνιση αμυλοειδών πλακών στον εγκέφαλο τους, ωστόσο, στο 5XFAD μοντέλο, παρατηρείται εναπόθεση πλακών νωρίτερα. Οι Σουηδικές μεταλλάξεις αυξάνουν την παραγωγή του συνολικού $A\beta$, ενώ οι υπόλοιπες αυξάνουν ειδικά την έκφραση του $A\beta_{42}$ [58, 59]. Για τη κατασκευή του διαγονιδίου, αρχικά έγινε εισαγωγή των μεταλλαγών στα

cDNAs της APP και της PS1 με κατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση και στη συνέχεια υποκλωνοποιήθηκαν εντός του εξωνίου 2 της διαγονιδιακής κασέτας Thy1 του ποντικού και αλληλουχήθηκαν με συγκεκριμένες διαδικασίες [58]. Ακολούθησε καθαρισμός των διαγονιδίων από την αλληλουχία του φορέα, τα διαγονίδια προστέθηκαν σε ίσες αναλογίες και ενέθηκαν σε προπυρήνες, μονοκύτταρων υβριδικών εμβρύων C57/B6XSJL [58, 59]. Στη συνέχεια, τα ποντίκια που προέκυψαν ταυτοποιήθηκαν με Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR) και επιβεβαιώθηκαν με γονιδιωματικό στύπωμα κατά Southern [58]. Στο συγκεκριμένο μοντέλο, εξαιτίας των υψηλών επιπέδων Αβ42, οι αμυλοειδείς πλάκες εμφανίζονται αρκετά νωρίς, ακόμα και σε ηλικία δυο μηνών. Άλλα νευροπαθολογικά χαρακτηριστικά που εμφανίζουν αυτά τα ποντίκια είναι η ενδονευρωνική συσσώρευση του Αβ, η γλοίωση, καθώς και ο νευροεκφυλισμός, που προκύπτει ως αποτέλεσμα των προηγούμενων παθολογικών χαρακτηριστικών [58].



Εικόνα 4: Σχηματική απεικόνιση των FAD μεταλλαγών στα διαγονίδια Thy1-APP και Thy1-PS1. Τα βέλη προσδιορίζουν τις θέσεις που πραγματοποιούνται οι μεταλλαγές [58].

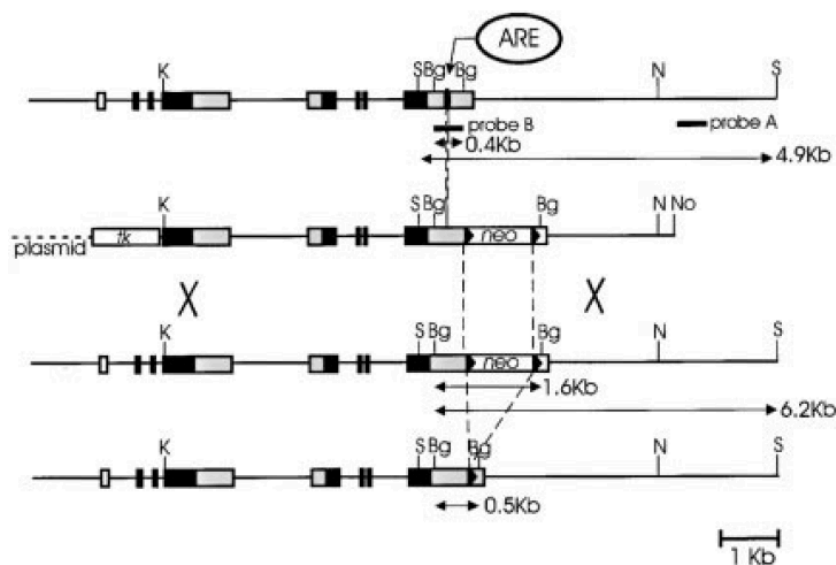
5.3 Ρυθμιστικές Αλληλουχίες ARE

Οι μηχανισμοί ρύθμισης της σταθερότητας και της μετάφρασης του mRNA ελέγχονται από συγκεκριμένα στοιχεία στην αλληλουχία του mRNA. Μια μεγάλη κατηγορία αυτών των ρυθμιστικών αλληλουχιών αποτελείται από πολυμερή αδεΐνης-ουρακίλης με μια χαρακτηριστική AUUUA πεντανουκλεοτιδική αλληλουχία για αυτό και αποκαλούνται και ως “στοιχεία πλούσια σε AU” (AU-rich Elements - ARE). Αυτές οι περιοχές έχουν χαρτογραφηθεί στην 3’ -αμετάφραστη περιοχή (3’ untranslated region- 3’UTR) στα μεταγγραφα που κωδικοποιούν για κυτταροκίνες, ογκοπρωτεΐνες, αυξητικούς και μεταγραφικούς παράγοντες [60]. Για πολλά mRNAs η λειτουργία των ARE έχει συσχετιστεί με τη ρύθμιση της σταθερότητας του mRNA [61, 62]. Επιπλέον, είναι κοινώς αποδεκτή η μεταφραστική ρύθμιση από τα ARE, για έναν αριθμό mRNAs [63].

Λαμβάνοντας υπόψιν την πλειοτροπική δράση του TNF- α , δεν προκαλεί εντύπωση το γεγονός πως η βιοσύνθεση του υπόκειται σε έλεγχο από πολλαπλούς και περίπλοκους μηχανισμούς. Η μεταγραφή του ελέγχεται από διάφορους παράγοντες όπως ο NF- κ B και ο NF-AT [63, 65]. Παράλληλα, επαρκή δεδομένα υποδεικνύουν επιπλέον μεταφραστικό έλεγχο από στοιχεία στο 3'UTR του mRNA του TNF- α . Με πειράματα με μεταφορά πλασμιδιακού φορέα σε κυτταρική καλλιέργεια, συσχετίστηκε η 3'UTR περιοχή του mRNA του TNF- α με την μεταφραστική καταστολή που παρατηρείται στα TNF- α μετάγραφα σε μη ενεργοποιημένη κατάσταση [66]. Μεταβολές στην παραγωγή του TNF έχουν συσχετισθεί με πολλές φλεγμονώδεις και αυτοάνοσες παθολογικές καταστάσεις [67, 68]. Πιο συγκεκριμένα, ο κυρίαρχος ρόλος του TNF- α στην παθογένεση της ρευματοειδούς αρθρίτιδας και στην ιδιοπαθή φλεγμονώδη νόσο του εντέρου, έχει αποδειχτεί σε κλινικές μελέτες από την επιτυχημένη χρήση του anti-TNF αντισώματος [69, 70]. Υπάρχουν στοιχεία που υποδεικνύουν έναν πιθανό ρόλο της 3'UTR περιοχής του TNF στην αρθρίτιδα που προκύπτουν από μελέτες που χρησιμοποιούν ποντίκια με ανθρώπινο TNF γονίδιο με αλλοιωμένο το 3'UTR [55]. Επιπλέον, σε μοντέλα ποντικών με αυτοανοσία, όπως το NZB/W, παρατηρούνται μειωμένα επίπεδα TNF που φαίνονται να είναι παθογόνα και σχετίζονται με μεταλλάξεις στις TNF ARE περιοχές [71]. Είναι λοιπόν κατανοητό πως οι παρεμβολές στη λειτουργία των ARE μπορούν να είναι αιτιοπαθολογικές *in vivo*. Για αυτό λοιπόν το λόγο κατασκευάστηκαν αρχικά τα TNF ^{Δ ARE} ποντίκια, με σκοπό τη μελέτη της ρύθμισης της βιοσύνθεσης του TNF.

5.4 TNF ^{Δ ARE} Ποντίκια

Για την παραγωγή των TNF ^{Δ ARE} ποντικών πραγματοποιήθηκε απαλοιφή 69bp που περιλάμβανε την αλληλουχία ARE σε εμβρυονικά βλαστοκύτταρα μαζί με προσθήκη δείκτη αντίστασης στην νεομυκίνη (neo), ενδιάμεσα σε loxP αλληλουχίες. Παροδική έκφραση της Cre recombinase σε γονιμοποιημένα ωοκύτταρα αυτών των ποντικών οδήγησε σε εκτομή του neo γονιδίου και στην κατασκευή των TNF ^{Δ ARE} διαγονιδιακών ποντικών [72].



Εικόνα 5: Κατασκευή των TNF^{ΔARE} ποντικών [72].

Πιο συγκεκριμένα, όσον αφορά την κατασκευή των διαγονιδιακών ποντικών, ο γενετικός τόπος TNF περιλαμβάνει τα γονίδια TNF, LT α και LT β γονιδίου, απομονώθηκε από 129/SVE γονιδιωματική βιβλιοθήκη ποντικού σε λFixtmII φορέα (Stratagene). Ένα τμήμα μεγέθους 0,7 kb που περιέχει το περισσότερο από το 3' UTR του TNF γονιδίου εισήχθη μετά από πέψη με RcoRI σε pBluescript φορέα και χρησιμοποιήθηκε ως εκμαγείο για την Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR), για κατευθυνόμενη απαλοιφή 69 bp που περιείχε 6 επαναλαμβανόμενες επαναλήψεις του μοτίβου (T)TAAAT(AT).

Για την απαλοιφή χρησιμοποιήθηκε ο παρακάτω μεταλλαξογόνος εκκινητής: 5'GAGCCAGCCCCCTCGGAAGGCCGGGGTG-3'. Το τελικό προϊόν PCR πέπτηκε με το BgIII για την απομάκρυνση του 3'-UTR/ΔARE τμήματος, μεγέθους 0,4 kb, το οποίο εισήχθη πίσω στην TNF 3'UTR κασέτα. Για το φορέα στόχευσης TNF^{ΔARE}, ένα θραύσμα XhoI-SalI μήκους 1,2 kb από το πλασμίδιο pL2-neo που περιέχει την κασέτα αντίστασης PMC neopoly (A), στη νεομυκίνη, που πλαισιώνεται από ακολουθίες loxP, εισήχθη στην θέση BstEII που βρίσκεται στην 3'-UTR γονιδιωματική αλληλουχία καταρροικά της μετάλλαξης ΔARE. [71]. Οι 5' και 3' περιοχές, ομόλογες των 4,2 kb (θραύσμα του TNF/LT α από τα KpnI-EcoRI) και 1,4 kb (θραύσμα NdeI 3'TNF από EcoRI) εισήχθησαν σε οποιαδήποτε θέση της τροποποιημένης TNF 3' UTR κασέτας. Το τελικό TNF^{ΔARE}neo στοχευόμενο τμήμα, ανακτήθηκε ως θραύσμα KpnI-NotI μεγέθους 6,5 kb και κλωνοποιήθηκε σε ένα πλασμίδιο pNT που φέρει κασέτα έκφρασης κινάσης θυμιδίνης ιού απλού έρπητα. Διαδικασίες στόχευσης σε εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα CCE (129 / SvE γένος ποντικού) και μετέπειτα πραγματοποιήθηκαν ενέσεις σε βλαστοκύστες C57BL/6 ποντικών. Οι στοχευόμενοι κλώνοι

ταυτοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας ανάλυση στυπώματος Southern με εξωτερικό ανιχνευτή το AccI 0,69 kb. Παροδική Cre έκφραση στα ωκύτταρα μέσω μικροέγχυσης του πλασμιδίου pMC-Cre-polyA κατέληξε σε εκτομή του γονιδίου neo από τη γαμετική σειρά, όπως εκτιμήθηκε με γονοτυπικό προσδιορισμό μέσω βιοψιών ουράς στους ποντικούς που προέκυψαν, με τη χρήση ενός ανιχνευτή BglIII μεγέθους 0,4 kb [72].

Τα ομόζυγα $TNF^{\Delta ARE/\Delta ARE}$ ποντίκια εμφανίζουν σε μικρή ηλικία σοβαρές παθολογικές εκδηλώσεις, καθώς και μικρή διάρκεια ζωής. Για αυτό το λόγο μελετήθηκαν σε ετερόζυγη κατάστασή $TNF^{\Delta ARE/-}$ ώστε να διερευνηθεί ο ρυθμιστικός ρόλος των ARE. Έτσι λοιπόν οι ερευνητές που δημιούργησαν αυτά τα διαγονιδιακά ποντίκια πραγματοποίησαν διάφορες πειραματικές διαδικασίες με σκοπό να κατανοήσουν την επίδραση των ρυθμιστικών αυτών στοιχείων στο mRNA του TNF- α . Από αυτή τη μελέτη προέκυψαν διάφορα δεδομένα και αποτελέσματα σχετικά με το ρόλο των ARE στην βιοσύνθεση του TNF και κατά συνέπεια και στα διαγονιδιακά ποντίκια.

Αρχικά, παρατηρήθηκε μια ολική, συνεχής και επαγωγίμη αύξηση παραγωγής TNF- α σε αυτά τα ποντίκια, υποδεικνύοντας τον κατασταλτικό ρόλο των ARE στην παραγωγή του TNF- α . Επίσης, αυτά τα ποντίκια παρουσίασαν αυξημένη ευαισθησία και θνησιμότητα στο LPS, άρα στην απουσία των ARE, η επακόλουθη οξεία ή χρόνια υπερπαραγωγή του TNF in vivo ευαισθητοποιεί τα ποντίκια στις θανατηφόρες επιδράσεις του LPS. Αντίστοιχα αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και στην παραγωγή του TNF- α από τα μακροφάγα, μια από τις βασικότερες πηγές TNF- α [72].

Επιπλέον, δεδομένα έδειξαν πως απουσία διέγερσης, τα ARE δρουν ως καθοριστές της αστάθειας του TNF- α mRNA, ενώ μετά από διέγερση με LPS, μεσολαβούν για την μετα-μεταγραφική αύξηση της συσσώρευσης του TNF mRNA [72]. Άλλα αποτελέσματα υποδεικνύουν πως εκτός από τα μακροφάγα, κι άλλα κύτταρα προερχόμενα από το αιμοποιητικό επηρεάζονται εξίσου από την απουσία των ARE.

Επιπροσθέτως, τα ARE φαίνεται πως αποτελούν στόχο για τη ρύθμιση της βιοσύνθεσης του TNF- α από τα p38/SAPK και JNK/SAPK σηματοδοτικά μονοπάτια. Ωστόσο, δεν φαίνεται η απουσία των ARE να επηρεάζει το ρυθμό μετάφρασης του μεταλλαγμένου mRNA μετά την διέγερση με LPS, συνεπώς τα ARE του TNF mRNA ρυθμίζουν την ενεργοποίηση της μετάφρασης αλλά όχι την μεταφραστική αποτελεσματικότητα.

Παράλληλα, παρατηρήθηκε διαφορετικός ρόλος του TNFR II στη ρύθμιση της Χρόνιας Φλεγμονώδους Αρθρίτιδας και στην παθολογία παρόμοια με αυτήν της ασθένειας Crohn στα $TNF^{\Delta ARE}$ ποντίκια. Μελετώντας $TNF^{\Delta ARE/+}$ / $TNFRII^{-/-}$ ποντίκια κατέληξαν στο συμπέρασμα ενός ολικού κατασταλτικού ρόλου του υποδοχέα στην ανάπτυξη αρθρίτιδας σε αυτό το

μοντέλο. Στη συνέχεια οδηγήθηκαν στον συμπέρασμα του κυρίαρχου ρόλου του TNFRI στη μεσολάβηση των παθολογικών καταστάσεων στα $TNF^{\Delta ARE}$ [72].

Ένα ακόμα χαρακτηριστικό των ARE, είναι η εμπλοκή τους σε μηχανισμούς αρνητικής ανατροφοδότησης, καθώς κατά την απουσία τους παρατηρείται καθυστέρηση στην διαδικασία αποικοδόμησης του mRNA [72].

Συμπερασματικά, λοιπόν, είναι ξεκάθαρη η σημασία των ρυθμιστικών ιδιοτήτων των ARE σε διάφορα σημεία ελέγχου της βιοσύνθεσης του TNF- α , γεγονός που καθιστά αυτό το μοντέλο ποντικού ενδιαφέρουσα επιλογή για τη μελέτη της δράσης του TNF- α στη νόσο του Alzheimer.

Σκοπός της Εργασίας

Τα τελευταία χρόνια από τη μελέτη της νόσου Alzheimer έχει συγκεντρωθεί μεγάλος αριθμός δεδομένων, σχετικά με τους μηχανισμούς παθογένεσής της. Ωστόσο, εξακολουθεί και παραμένει μια από τις πολυπλοκότερες ασθένειες με διαρκώς αυξανόμενο αριθμό νοσούντων, χωρίς ικανοποιητικές θεραπευτικές επιλογές. Η έρευνα που αφορά τη νόσο τα τελευταία χρόνια έχει στραφεί γύρω από τον ρόλο της φλεγμονής στην παθογένεσής της, καθώς πολλά πειραματικά και κλινικά δεδομένα υποδεικνύουν την σύνδεση τους. Η θεωρία πως ο εγκέφαλος ήταν «ανοσολογικά προστατευμένο» όργανο, έχει απορριφθεί καθώς πλέον είναι γνωστό πως διαθέτει ενδογενές ανοσοποιητικό σύστημα αποτελούμενο από μικρογλοία, αστροκύτταρα και λεμφικό σύστημα (73). Η ενεργοποίηση του από το Αβ και κατά συνέπεια η παραγωγή μεσολαβητών φλεγμονής (όπως ο TNF-α) ή η συστηματική φλεγμονή μπορεί να επηρεάσει την παθογένεση ή την εξέλιξη της νόσου του Alzheimer.

Παράλληλα ο ρόλος του TNF-α στην εξέλιξη της νόσου δεν είναι απόλυτα κατανοητός καθώς υπάρχουν δεδομένα που υποστηρίζουν πως υπερβολική ποσότητα TNF-α οδηγεί σε κυτταρικό θάνατο ανθρώπινων νευρώνων του φλοιού σε καλλιέργεια, ενώ σε νευρώνες υπόκαμπου αρουραίου έχει τροφική δράση (74) και προστατεύει από τοξικότητα του Αβ σε καλλιέργειες νευρώνων (75).

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η περαιτέρω διερεύνηση της επίδρασης TNF-α στον αμυλοειδή φαινότυπο σε μοντέλο ποντικού της νόσου του Alzheimer, μετά από τροποποίηση της έκφρασης του.

Υλικά και Μέθοδοι

1. Ποντίκια:

Για την πραγματοποίηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας όπως αναφέρθηκε καινωρίτερα χρησιμοποιήθηκαν 5XFAD ποντίκια [29] τα οποία προήλθαν από τα «The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA) με γενετικό υπόβαθρο C57Bl6/J. Τα TNF^{ΔARE/+} ποντίκια ήταν μια ευγενική χορηγία του Δρ. Γ. Κόλλια (Ερευνητικό Κέντρο Βιοϊατρικών Επιστημών “Αλέξανδρος Φλέμινγκ”, Ελλάδα) και είχαν γενετικό υπόβαθρο C57Bl6/J. Τόσο τα 5XFAD, όσο και τα TNF^{ΔARE/+} ποντίκια χρησιμοποιήθηκαν σε ετεροζυγωτία. Έτσι, ετεροζυγώτες 5XFAD διασταυρώθηκαν με TNF^{ΔARE/+}, ώστε να προκύψουν διπλά διαγονιδιακά ποντίκια 5XFAD/TNF^{ΔARE/+}, καθώς και 5XFAD, TNF^{ΔARE/+} και μη-διαγονιδιακά ποντίκια. Στην παρούσα ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν μόνο θηλυκά ποντίκια, καθώς τα θηλυκά 5XFAD εμφανίζουν τον αμυλοειδή φαινότυπο 2 μήνες νωρίτερα από τα 5XFAD αρσενικά [76,77]. Η στέγαση των ζώων γίνεται σε συνθήκες περιβάλλοντος που είναι σύμφωνες με τις προδιαγραφές που προβλέπονται από την Ευρωπαϊκή και Εθνική νομοθεσία καθώς και τις κατευθυντήριες γραμμές διεθνών οργανισμών όπως η Ευρωπαϊκή Ομοσπονδία των Εταιρειών που ασχολούνται με τα Ζώα Εργαστηρίου (Federation of European Laboratory Animal Science Associations - FELASA) και το Διεθνές Συμβούλιο για την Επιστήμη των Ζώων Εργαστηρίου (International Council of Laboratory Animal Science - ICLAS). Η διατροφή τους περιλάμβανε την βασική τροφή η οποία αποτελείται από 5% λίπος. Όλες οι πειραματικές διαδικασίες που εφαρμόστηκαν στα ποντίκια ήταν εγκεκριμένες από την Επιτροπή Βιοηθικής του ΠΒΕΑΑ και ήταν σε συμφωνία με τις συστάσεις του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και Συμβουλίου (86/609/EEC).

2. Απομόνωση DNA

Σε ηλικία 20 ημερών πραγματοποιείται απομόνωση γενωμικού υλικού από την ουρά των ποντικών σύμφωνα με το παρακάτω πρωτόκολλο:

Μέρα 1^η:

- Λήψη ουρών μήκους 0,5-1cm από ποντίκια ηλικίας 20 ημερών και τοποθέτηση τους σε Eppendorf σωληνάκια.
- Προσθήκη 500 μL διαλύματος TENS BUFFER. Το ρυθμιστικό αυτό διάλυμα αποτελείται από 50mM Tris pH 8.0, 100mM EDTA, 100mM NaCl και 1% SDS. Το Tris pH 8.0 συμβάλλει στην ρύθμιση του pH, το EDTA δεσμεύει τα ιόντα μετάλλων

και έτσι αποφεύγεται ο σχηματισμός αλάτων με τις φωσφορικές ρίζες του DNA, το NaCl συμβάλλει στην σταθερότητα του μορίου και τέλος το SDS συμβάλλει στην λύση της κυτταρικής και της πυρηνικής μεμβράνης προκειμένου να απελευθερωθεί το DNA.

- Προσθήκη 4μL πρωτεϊνάσης K (Proteinase K, 10mg/mL), η οποία είναι ένα πρωτεολυτικό ένζυμο που προκαλεί την αποικοδόμηση των πρωτεϊνών, ώστε αυτές να απομακρυνθούν ευκολότερα.
- Επώαση overnight στους 55°C.

Μέρα 2^η:

- Προσθήκη 1μL ριβονουκλεάσης A (RNase A, 100mg/mL).
- Επώαση για 1 ώρα σε υδατόλουτρο στους 37°C. Με τον τρόπο αυτό πραγματοποιείται η αποδιάταξη του RNA.
- Προσθήκη σε κάθε σωλήνα 500μL από ένα διάλυμα που περιέχει φαινόλη: χλωροφόρμιο: ισοαμυλική αλκοόλη σε αναλογία 25:24:1. Ανάδευση με vortex για 5 λεπτά.
- Φυγοκέντρηση (Biofuge fresco microcentrifuge, Fixed-angle rotor 7500 3325, Heraeus, Hanau, Germany) στις 13.000 rpm για 15 λεπτά σε θερμοκρασία ~20°C, διαδικασία που οδηγεί στον καθαρισμό του DNA. Με το πέρας της φυγοκέντρησης σε κάθε σωληνάκι συναντάμε 3 φάσεις: την πάνω φάση, η οποία είναι η υδατική φάση στην οποία περιέχεται το DNA, την κάτω φάση η οποία είναι η οργανική φάση και την μεσόφαση στην οποία απαντώνται οι πρωτεΐνες.
- Μεταφορά της πάνω φάσης σε νέα σωληνάκια τα οποία περιέχουν 500μL από το διάλυμα φαινόλη: χλωροφόρμιο: ισοαμυλική αλκοόλη και επανάληψη της ίδιας διαδικασίας με σκοπό τον αποτελεσματικότερο καθαρισμό του DNA.
- Μεταφορά της πάνω φάσης σε νέα σωληνάκια που περιέχουν 500μL χλωροφόρμιο, το οποίο συμβάλλει στην απομάκρυνση της φαινόλης.
- Ανάδευση με την χρήση του Vortex και φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm για 15 λεπτά σε θερμοκρασία ~20°C.
- Μεταφορά της πάνω φάσης, η οποία περιέχει το καθαρό DNA σε νέα σωληνάκια. Προκειμένου να μπορέσουμε να παραλάβουμε το διαλυμένο DNA προσθέτουμε ισοπροπανόλη σε όγκο 0,7 φορές τον όγκο του κάθε σωληνακίου με το διαλυμένο DNA. Με προσθήκη ισοπροπανόλης και ήπια ανάδευση το DNA γίνεται αδιάλυτο και σχηματίζει ινίδια τα οποία παραλαμβάνουμε με την χρήση πιπέτας Pasteur της οποίας έχουμε κλείσει το άκρο της, γύρω από το οποίο τυλίγουμε το DNA.

- Καθαρισμός του DNA με τη χρήση 70% και 100% αιθανόλης.

3. Ταυτοποίηση Γονοτύπου

Στη συνέχεια, το DNA που απομονώθηκε χρησιμοποιείται για την πραγματοποίηση Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (PCR) για την γονοτύπηση των ποντικών. Για κάθε πειραματόζωο έγιναν δυο διαφορετικές PCR, μια για το 5XFAD διαγονίδιο και μία για το TNF^{ΔARE/+}.

Τα πρωτόκολλα που ακολουθήθηκαν στην κάθε περίπτωση ήταν τα εξής:

Αντίδραση PCR για το διαγονίδιο 5XFAD με το ένζυμο One Taq DNA πολυμεράση:

DNA (50-200ng)	1 μL
5x One Taq Standard Reaction Buffer	5 μL
dNTPs 2,5mM (NEB)	1 μL
Primer APP F (50pmoles/μL)	0,4 μL
Primer APP R (50pmoles/μL)	0,4 μL
One Taq DNA polymerase	0,125μL
ddH ₂ O	17,075 μL
Σύνολο	25 μL

Πίνακας 1: Συστατικά αντίδρασης 5X PCR

Οι χρόνοι και οι θερμοκρασίες που χρησιμοποιήθηκαν στον θερμοκυκλοποιητή ήταν οι εξής:

94 °C 5 min

94 °C 20 sec

59 °C 20 sec

68 °C 20 sec

35 κύκλοι πολλαπλασιασμού

68 °C 5 min

16 °C for ever

Η ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε σε πήκτωμα αγαρόζης πυκνότητας 1,5%.

Η αλληλουχία των primers ήταν η εξής:

APP forward: 5'-GAA TTC CGA CAT GAC TCA GG-3'

APP reverse: 5'-GTT CTG CTG CAT CTT GGA CA-3'

Οι χρόνοι και οι θερμοκρασίες που χρησιμοποιήθηκαν στον θερμοκυκλοποιητή ήταν οι εξής:

98 °C 3 min

98 °C 20 sec

70 °C 30 sec

72 °C 20 sec

} 30 κύκλοι πολλαπλασιασμού

72 °C 3 min

16 °C for ever

Η αλληλουχία των primer ήταν η εξής:

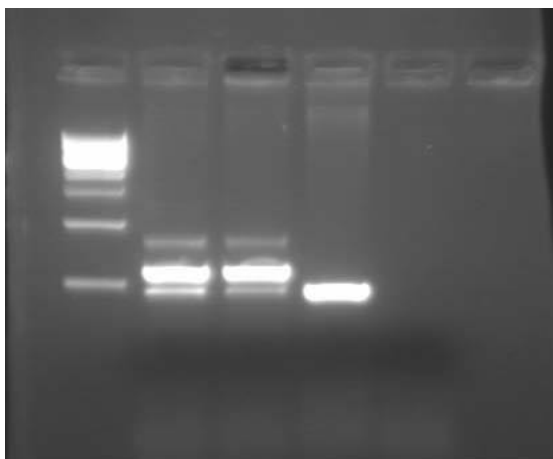
ΔARE S 483: 5'- GAGCCAGCCCCCTCGGAAGGCCGGGGTG -3'

ΔARE A 484: 5'- AATTAGGGTTAGGCTCCTGTTTCC -3'

Οι θερμοκρασίες T_m υπολογίστηκαν με βάση το NEB T_m Calculator (<https://tmcalculator.neb.com/#!/main>)

Μια χαρακτηριστική εικόνα της ΔARE PCR είναι η παρακάτω:

L + + - bl



Εικόνα 7: ΔARE PCR

Όπου:

L= Ladder

+ = θετικός μάρτυρας

- = αρνητικός μάρτυρας

bl = blank

4. Συλλογή Ιστών

Για την συλλογή των ιστών, τα ποντίκια αρχικά αναισθητοποιήθηκαν με τη εισπνοή διοξειδίου του άνθρακα, έπειτα έγινε λήψη αίματος από τον δεξιό κόλπο και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε η διαδικασία έκχυσης παγωμένου PBS 1X (perfusion), στην κυκλοφορία μέσω της καρδιάς και συγκεκριμένα της αριστερής κοιλίας, έτσι ώστε να απομακρυνθεί όλο το αίμα από την κυκλοφορία και τα όργανα. Με την ολοκλήρωση της διαδικασίας αφαιρείται προσεχτικά ο εγκέφαλος και χωρίζεται στα δυο ημισφαίρια με τη χρήση ξυραφιού. Το αριστερό ψύχεται άμεσα και φυλάσσεται στους -80°C , για μελλοντική χρήση σε βιοχημικές αναλύσεις. Το δεξί ημισφαίριο μονιμοποιείται σε διάλειμμα PFA 4%, για 48 ώρες, και στη συνέχεια μεταφέρεται σε διάλυμα σουκρόζης 20%. Το δεξί ημισφαίριο προορίζεται για ιστολογικές αναλύσεις.

Το αίμα που λήφθηκε αρχικά έχει τοποθετηθεί σε σωληνάκι με 5μL EDTA, και στη συνέχεια φυγοκεντρείται σε 6000 rpm για 10 λεπτά, ώστε να λάβουμε τον ορό, ο οποίος και φυλάσσεται επίσης στους -80°C για μελλοντικές βιοχημικές αναλύσεις.

5. Επεξεργασία Ιστών - Απομόνωση Πρωτεϊνών

Η απομόνωση των πρωτεϊνών από το αριστερό ημισφαίριο πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το παρακάτω πρωτόκολλο 3 βημάτων:

-Ομογενοποίηση των ιστών σε παγωμένο PBS (1X) που περιείχε Αναστολείς Πρωτεασών σε αναλογία 7:1 (Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail Tablets, Roche Diagnostics, Mannheim, German), με τη χρήση Ομογενοποιητή Ιστών (Wheaton, Millville, NJ, USA).

Για την πραγματοποίηση της ομογενοποίησης, αρχικά τα δείγματα ζυγίζονται και στη συνέχεια τους προστίθεται το παραπάνω διάλυμα, σε όγκο 8 φορές το βάρος του εγκεφάλου. Το ομογενοποίημα φυγοκεντρείται στις 12500 rpm για 45 λεπτά στους 4°C . Το υπερκείμενο, που αποτελεί το διαλυτό (PBS) κλάσμα, αφαιρείται και φυλάσσεται στους -80°C για μελλοντική χρήση.

- Επαναδιαλυτοποίηση του ιζήματος με τη χρήση παγωμένου Lysis διαλύματος (10% γλυκερόλη, 1% Triton X-100, Αναστολείς Πρωτεασών σε PBS) και φυγοκέντρωση στις 9000 rpm για 10 λεπτά στους 4°C . Το υπερκείμενο, που περιέχει τις μεμβρανοσυνδεδεμένες πρωτεΐνες (lysis κλάσμα) αφαιρείται και φυλάσσεται -80°C για μελλοντική χρήση.

- Το ίζημα, που περιέχει τις ινώδεις πρωτεΐνες, φυλάσσεται επίσης στους -80°C .

6. Ανοσοαποτύπωμα κατά Western

Για την μελέτη της επίδρασης του γονότυπου 5XFAD/TNF^{ΔARE/+} σε σημαντικές πρωτεΐνες και ένζυμα που σχετίζονται τόσο με τη νόσο του Alzheimer, όσο και με το ανοσοποιητικό σύστημα του πειραματόζωου πραγματοποιήθηκε η τεχνική του ανοσοτυπώματος κατά Western, κατά την οποία ένα πρωτεϊνικό μίγμα ηλεκτροφορεύεται σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης εμπλουτισμένο με SDS, που δρα αποδιατακτικά. Ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών γίνεται με βάση το μοριακό τους βάρος, καθώς οι πρωτεΐνες με μεγαλύτερο μοριακό βάρος μετακινούνται με μικρότερη ταχύτητα στο πήκτωμα. Στη συνέχεια γίνεται μεταφορά σε μια μεμβράνη (νιτροκυτταρίνης ή PVDF). Στο επόμενο βήμα γίνεται ο εντοπισμός των πρωτεϊνών ενδιαφέροντος με τη χρήση πολυκλωνικών ή μονοκλωνικών αντισωμάτων τα οποία είναι συζευγμένα με ένζυμο (ή ραδιοσημασμένα). Το σύμπλοκο Ag-Ab που δημιουργείται περιλαμβάνει την πρωτεΐνη ενδιαφέροντος καθώς η πρόσδεση του αντισώματος είναι ειδική. Αυτό το σύμπλοκο μπορεί να γίνει ορατό με τη χρήση δευτερογενούς αντισώματος το οποίο είναι συζευγμένο με ένζυμο και παρουσία χρωμογόνου υποστρώματος παράγει έγχρωμο αδιάλυτο προϊόν στην περιοχή που εντοπίζεται η υπό μελέτη πρωτεΐνη (ή με έκθεση της μεμβράνης σε film ακτινοβολίας X, μέσω μιας διαδικασίας που ονομάζεται αυτοραδιογραφία) [78].

Τα πήκτωμα πολυακρυλαμίδης που χρησιμοποιήθηκαν ήταν όλα πάχους 1,5 mm και η πυκνότητας του κυμαινόταν από 8% ως 14%, ανάλογα με το μοριακό βάρος της εκάστοτε πρωτεΐνης ενδιαφέροντος. Επίσης, τα περισσότερα ήταν πήκτωμα Tris-Glycine, ωστόσο χρησιμοποιήθηκαν και πήκτωμα Tris-Tricine (12%) για συγκεκριμένες περιπτώσεις, όπως για τα APP/CTFs και τον Iba1. Όσον αφορά στη δομή των πηκτωμάτων, αποτελούνταν από δύο διακριτά τμήματα-πηκτώματα, το πήκτωμα διαχωρισμού (separating gel) και το πήκτωμα «πακεταρίσματος» (stacking gel).

Τα συστατικά του separating gel του Tris-Glycine είναι τα εξής:

	8%	10%	12%	14%
ddH2O	4,314 mL	3,914 mL	3,514 mL	3,114 mL
4x separating buffer	2 mL	2 mL	2 mL	2 mL
Ακρυλαμίδη 40%	1,6 mL	2 mL	2,4 mL	2,8 mL
APS 10%	80 μL	80 μL	80 μL	80 μL
TEMED	5,6 μL	5,6 μL	5,6 μL	5,6 μL

Πίνακας 3: Συστατικά Tris-Glycine πηκτώματος διαχωρισμού, ανάλογα με τη συγκέντρωσή του

Τα συστατικά του separating gel για το Tris-Tricine είναι τα εξής:

	12%
ddH₂O	2,4 mL
3M Tris-HCl pH 8,45	3 mL
Ακρυλαμίδη 40%	2,7 mL
Γλυκερόλη	0,9 ml
APS 30%	8,4 μL
TEMED	8,4 μL

Πίνακας 4: Συστατικά Tris- Tricine πηκτώματος διαχωρισμού

Το 4x separating buffer αποτελείται από 1,5M Tris-HCl, 0,4% SDS και το pH του ρυθμίζεται στα 8.8 με την προσθήκη πυκνού HCl. Βασική λειτουργία του διαλύματος αυτού είναι η διατήρηση του pH, καθώς και η αποδιάταξη πρωτεϊνών μέσω του SDS. Η ακρυλαμίδη, το APS και το TEMED έχουν ως στόχο τον πολυμερισμό του πηκτώματος. Η ποσότητα της ακρυλαμίδης 40% που θα προστεθεί στο μίγμα κυμαίνεται ανάλογα με την επιθυμητή συγκέντρωση. Ο πολυμερισμός του μίγματος ξεκινάει άμεσα, οπότε η μεταφορά του στη συσκευή κατασκευής του πηκτώματος πρέπει να γίνει γρήγορα μετά την προσθήκη των πηκτικών παραγόντων. Το πήκτωμα χρειάζεται περίπου 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου για να πολυμεριστεί.

Αντίστοιχα, η σύσταση του stacking gel για τα Tris-Glycine είναι η εξής:

ddH₂O	2,556 mL
4x stacking buffer	1 mL
Ακρυλαμίδη 40%	400 μL
APS 10%	40 μL
TEMED	4 μL

Πίνακας 5: Συστατικά πηκτώματος πακεταρίσματος για τα Tris-Glycine πηκτώματα

Ενώ η σύσταση stacking gel για τα Tris-Tricine είναι η εξής:

ddH₂O	2,446 mL
3M Tris-HCl pH 8,45	0,930 mL
Ακρυλαμίδη 40%	0,374 μL
APS 30%	8,4 μL
TEMED	8,4 μL

Πίνακας 6: Συστατικά πηκτώματος πακεταρίσματος για τα Tris-Tricine πηκτώματα

Το 4x stacking buffer αποτελείται από 0,5M Tris-HCl, 0,4% SDS και το pH του προσαρμόζεται στα 6,8 με την προσθήκη πυκνού HCl. Όπως αντίστοιχα και στο separating gel, το stacking buffer ρυθμίζει το pH, το SDS δρα αποδιατακτικά ενώ τα υπόλοιπα συστατικά του μίγματος συμμετέχουν στον πολυμερισμό.

Με την προσθήκη του μίγματος στην συσκευή κατασκευής του πηκτώματος, τοποθετούνται και τα ειδικά χτενάκια που θα δημιουργήσουν τις θέσεις φόρτωσης των δειγμάτων. Ο χρόνος που απαιτείται για την πήξη του μίγματος είναι πάλι περίπου 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

Η ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνικών δειγμάτων πραγματοποιείται σε αποδιατακτικές συνθήκες. Αυτές εξασφαλίζονται με αποδιατακτικούς παράγοντες στο πήκτωμα, στο ρυθμιστικό διάλυμα της ηλεκτροφόρησης αλλά και μέσα στα δείγματα που θα φορτωθούν στο πήκτωμα. Ο αποδιατακτικός παράγοντας που επιλέχθηκε ήταν το SDS, ένα ανιοντικό απορρυπαντικό με την ικανότητα της αποδιάταξης των πρωτεϊνών και της καταστροφής των μη-ομοιοπολικών δεσμών. Επίσης, σε μερικές περιπτώσεις επιθυμητή είναι και η ύπαρξη αναγωγικών συνθηκών, οι οποίες επιτυγχάνονται με τη χρήση μερκαπτοαιθανόλης, ενός αναγωγικού παράγοντα που καταστρέφει δισουλφιδικούς δεσμούς. Συνεπώς, η σύσταση του τελικού δείγματος εξαρτάται από τις επιθυμητές συνθήκες και διαμορφώνεται ως εξής:

- Μη αναγωγικές συνθήκες: δείγμα - διάλυμα 2x SDS loading buffer σε αναλογία 1:1.
- Αναγωγικές συνθήκες: μερκαπτοαιθανόλη - 2x SDS loading buffer σε αναλογία 50:950, και αραίωση του δείγματος σε αυτό σε αναλογία 1:1. Σε αυτή την περίπτωση απαιτείται και βρασμός του δείγματος για 10 λεπτά.

Η σύσταση του SDS loading buffer είναι: 1% SDS, 10mM EDTA, 10mM sodium phosphate buffer pH 7.0, 15% γλυκερόλη και 0,01% κυανό της βρωμοφαινόλης, διαλυμένα σε νερό.

Όσον αφορά την διαδικασία της ηλεκτροφόρησης, χρησιμοποιείται ειδικό ρυθμιστικό διάλυμα, το “running buffer 1x”, στην περίπτωση των Tris-Glycine πηκτωμάτων, ενώ στα Tris-Tricine πηκτώματα είναι απαραίτητα δυο διαφορετικά διαλύματα, το διάλυμα ανόδου και το διάλυμα καθόδου.

Το running buffer 1x φτιάχνεται από αραίωση πυκνότερου διαλύματος running buffer, και προσθήκη SDS 10% σε τελική συγκέντρωση 1%. Το διάλυμα ανόδου συγκέντρωσης 5X χρειάζεται 121,14g Tris base σε 800 mL, 37% HCl, ώστε να ρυθμιστεί το pH στο 8.8, και

έπειτα συμπληρώνουμε ως το 1L. Το διάλυμα καθόδου συγκέντρωσης 5X αντίστοιχα χρειάζεται 60,57g Tris base, Tricine 89,85g σε 800 mL, και έπειτα συμπληρώνουμε στο 1 L νερό. Κατά την αραιώση του σε 1X προσθέτουμε 0,1% SDS.

Η διάρκεια της ηλεκτροφόρησης διαφέρει ανάλογα με την σύσταση του πηκτώματος καθώς και το μοριακό βάρος της πρωτεΐνης. Κοινό στοιχείο, ωστόσο, αποτελεί ένα αρχικό στάδιο ηλεκτροφόρησης 30 περίπου λεπτών στα 50V, έως ότου τα δείγματα να «διανύσουν» το stacking gel, και να περάσουν στο separating gel. Έπειτα η ένταση του ρεύματος μεταβάλλεται στα 120V και η ηλεκτροφόρηση ολοκληρώνεται μόλις τα δείγματα φτάσουν στο κάτω μέρος του πηκτώματος.

Το επόμενο στάδιο είναι η μεταφορά των δειγμάτων στη μεμβράνη (νιτροκυτταρίνη ή PVDF). Και στις δυο περιπτώσεις απαραίτητη είναι η χρήση ενός ρυθμιστικού διαλύματος, “transfer buffer”, το οποίο παρασκευάζεται από 200 mL Running Buffer 5X και 100 mL μεθανόλης (10%v/v) και συμπληρώνουμε ως το 1L νερό. Το transfer buffer είναι κοινό και για τα δυο είδη gel. Η μεταφορά διαρκεί περίπου 60 λεπτά με σταθερή την ένταση του ρεύματος στα 400 mA.

Εφόσον ολοκληρωθεί η μεταφορά των πρωτεϊνών στη μεμβράνη, και πριν την επώαση με το πρωτογενές αντίσωμα, απαραίτητη είναι η διαδικασία κάλυψης των μη ειδικών θέσεων στη μεμβράνη, δηλαδή η διαδικασία του “blocking”. Αυτό γίνεται με ειδικό διάλυμα το οποίο είναι συνήθως TBS-Tween 0,05% και 3% ή 5% αποβουτυρωμένο γάλα σε σκόνη, για 1 ή 2 ώρες, ανάλογα την πρωτεΐνη ενδιαφέροντος.

Αφού ολοκληρωθεί το blocking προστίθεται το πρωτογενές αντίσωμα, το οποίο συνδέεται ειδικά με την πρωτεΐνη ενδιαφέροντος. Η συγκέντρωση του αντισώματος, διαφέρει από πρωτεΐνη σε πρωτεΐνη, ενώ η επώαση είναι σχεδόν για όλα κοινή, δηλαδή περίπου 16 ώρες (overnight) στους 4°C. Την επόμενη μέρα λοιπόν η μεμβράνη ξεπλένεται με TBS-Tween (3 πεντάλεπτες πλύσεις συνήθως) ώστε να απομακρυνθεί η περίσσεια του αντισώματος, και στη συνέχεια προστίθεται το δευτερογενές αντίσωμα, το οποίο αναγνωρίζει την σταθερή περιοχή (Fc) του πρωτογενούς και είναι συζευγμένο με ένζυμο το οποίο παρουσία κατάλληλου υποστρώματος θα δώσει σήμα και θα οδηγήσει τελικά στον εντοπισμό της πρωτεΐνης ενδιαφέροντος.

Το ένζυμο που είναι συζευγμένο με το δευτερογενές αντίσωμα είναι συνήθως η υπεροξειδάση του ραπανακίου (HRP). Για την εμφάνιση του σήματος χρησιμοποιείται το σύστημα ECL, το οποίο βασίζεται στην αρχή της χημειοφωταύγειας.

Τα ECL αποτελούνται από δυο διαλύματα, το ECL A και το ECL B. Η σύσταση τους είναι η εξής:

	ECL A	ECL B
ddH ₂ O	9 mL	9 mL
Tris- HCL (pH 8.5)	1 mL	1 mL
Coumaric acid	45 μL	-
Luminol	100 μL	-
H ₂ O ₂ (30%)	-	6 μL

Πίνακας 7: Σύσταση διαλυμάτων ECL

Στους παρακάτω πίνακες παρουσιάζονται συγκεντρωμένα τα στοιχεία των πρωτεϊνών που εντοπίστηκαν μέσω ανοσοτυπώματος Western για την παρούσα διπλωματική εργασία, καθώς και τα στοιχεία των αντισωμάτων και των συνθηκών της πειραματικής διαδικασίας. Αυτά τα στοιχεία αφορούν τα μοριακά βάρη των πρωτεϊνών, το δείγμα (Lysis ή PBS) στο οποίο έγινε το πείραμα, το είδος του πηκτώματος, το είδος της μεμβράνης, τη διάρκεια μεταφοράς των πρωτεϊνών στη μεμβράνη, τα διαλύματα κάλυψης μη ειδικών θέσεων (blocking solutions) και τη συγκέντρωσή τους, τη διάρκεια της διαδικασίας κάλυψης μη ειδικών θέσεων, το είδος του πρωτογενούς αντισώματος που χρησιμοποιήθηκε, τη συγκέντρωσή του, το διάλυμα αραίωσης του, τον χρόνο επώασης, την εταιρία από την οποία το προμηθευτήκαμε, και οι αντίστοιχες πληροφορίες για τα δευτερογενή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν.

Protein						Transfer
	MW (kDa)	Sample	Den/Red*	Membr	Gel	Time
ADAM10	84	Lysis	√	NC	Tris-Glycine 10%	1h
APP fl	100	Lysis	√	PVDF	Tris-Tricine 12%	45min
BACE1	70	Lysis	√	NC	Tris-Glycine 10%	1h
GFAP	50	Lysis	√	NC	Tris-Glycine 10%	1h
Iba1	17	PBS	√	NC	Tris-Tricine 12%	45min
TACE	80-120	Lysis	√	NC	Tris-Glycine 8%	1,5h
Tubulin	55	Lysis/PBS	√	NC/PVDF	Glycine/Tricine	1h

Πίνακας 8: Στοιχεία πρωτεϊνών, αντισωμάτων και πειραματικών συνθηκών για το Western Blot

Blocking solution			
	Blocking	TBS-T	Time
ADAM10	5% Milk	0.05%	1h
APP fl	5% Milk	0.1%	2h
BACEI	3% Milk	0.05%	1h
GFAP	5% Milk	0.05%	1h
Iba1	3% Milk	0.05%	30min
TACE	5% FBS/NGS	0,05%	1h
Tubulin	5% Milk	0.1%	1h

Πίνακας 9: Στοιχεία πρωτεϊνών, αντισωμάτων και πειραματικών συνθηκών για το Western Blot

Primary Ab					
	Ab	Solution	Company	Store	Time
ADAM10	Rabbit anti-ADAM10 1:500	Blocking Solution	Chemicon		o/n 4°C
APP fl	Rabbit anti-APP C-terminal 1:1500	Blocking Solution	SIGMA	20°C	o/n 4°C
BACEI	Mouse anti-BACE1 1:300	Blocking Solution	Merck Millipore	4°C	o/n 4°C
GFAP	Mouse anti-GFAP 1:1500	Blocking Solution	SIGMA	20°C	o/n 4°C
Iba1	Rabbit anti-Iba1 1:500	Blocking Solution	Wako	20°C	o/n 4°C
TACE	Goat anti-TACE 1:100	Blocking Solution	Santa Cruz	4°C	1h RT
Tubulin	Mouse anti-Tubulin 1:1000	Blocking Solution	SIGMA	20°C	1h RT

Πίνακας 10: Στοιχεία πρωτεϊνών, αντισωμάτων και πειραματικών συνθηκών για το Western Blot

Secondary Ab					
	Ab	Solution	Company	Store	Time
ADAM10	Goat anti-rabbit 1:3000	Blocking Solution	Santa Cruz	4°C	1h
APP fl	Goat anti-rabbit 1:5000	Blocking Solution	Santa Cruz	4°C	1h
BACE1	Goat anti-mouse 1:3000	Blocking Solution	Santa Cruz	4°C	1h
GFAP	Goat anti-mouse 1:3000	Blocking Solution	Santa Cruz	4°C	1h
Iba1	Goat anti-rabbit 1:3000	Blocking Solution	Santa Cruz	4°C	1h
TACE	Rabbit anti-goat 1:5000	Blocking Solution	Santa Cruz	4°C	1h
Tubulin	Goat anti-mouse 1:5000	Blocking Solution	Santa Cruz	4°C	1h

Πίνακας 11: Στοιχεία πρωτεϊνών, αντισωμάτων και πειραματικών συνθηκών για το Western Blot

7. ELISA

Για την παρούσα διπλωματική εργασία μετρήθηκαν με τη μέθοδο της Ενζυμικής Ανοσοπροσοφητικής Δοκιμασίας (ELISA) οι εξής κυτταροκίνες: TNF- α , διαλυτός και μεμβρανό-συνδεόμενος, τόσο στον ορό όσο και σε πρωτεϊνικό εκχύλισμα εγκεφάλου, καθώς και IL-1 β και IL-10 σε πρωτεϊνικό εκχύλισμα εγκεφάλου.

Για την μέτρηση των κυτταροκινών χρησιμοποιήθηκαν τα αντιδραστήρια που περιλαμβάνονταν στα έτοιμα σετ (kit) Mouse TNF- α / IL-1 β / IL-10, ELISA MAX™ Standard της εταιρίας BioLegend.

Το πρωτόκολλο ήταν το εξής:

Μέρα 1^η:

- Διαλυτοποίηση του Αντισώματος Σύλληψης σε Ρυθμιστικό Διάλυμα Κάλυψης. Προσθήκη 100 μ L από το διάλυμα του Αντισώματος Σύλληψης, σε όλες τις θέσεις της μικροπλάκας τιτλοδότησης 96 θέσεων που παρέχεται μαζί με το σετ. Σφράγισμα της μικροπλάκας και επώαση για όλο το βράδυ σε θερμοκρασία 2- 8°C.

Μέρα 2^η:

- Έκπλυση της μικροπλάκας 4 φορές. Σε κάθε θέση έγινε προσθήκη τουλάχιστον 300 μ L από το διάλυμα πλυσίματος ανά έκπλυση. Επικάλυψη των θέσεων με 200 μ L διαλύματος αναφοράς A, σφράγισμα μικροπλάκας και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για μία ώρα, με ανακίνηση.

- Έκπλυση της μικροπλάκας 4 φορές. Προσθήκη 100 μ L από τα πρότυπα διαλύματα και 100 μ L από τα δείγματα προς εξέταση. Όλα τα δείγματα εξετάστηκαν δύο φορές. Η μέγιστη

συγκέντρωση στα πρότυπα διαλύματα για τις IL-1β και IL-10 ήταν 2000 pg/mL, ενώ η ελάχιστη ήταν 31.3 pg/mL, και αντίστοιχα για τον TNF-α ήταν 500 pg/mL και 7,8 pg/mL. Οι αραιώσεις τόσο των δειγμάτων, όσο και των πρότυπων διαλυμάτων έγιναν στο διάλυμα αναφοράς.

- Σφράγισμα της μικροπλάκας και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 2 ώρες με ανακίνηση.

- Έκπλυση της μικροπλάκας 4 φορές. Προσθήκη 100 μL από το διαλυμένο Αντίσωμα Αναγνώρισης σε κάθε θέση, σφράγισμα της μικροπλάκας και επώαση για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου με ανακίνηση.

- Έκπλυση της μικροπλάκας 4 φορές. Προσθήκη 100 μL από την αραιωμένη Υπεροξειδάση συνδεδεμένη με το Σύμπλοκο Αβιδίνης - Βιοτίνης σε κάθε θέση, σφράγισμα της μικροπλάκας και επώαση για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου με ανακίνηση.

- Έκπλυση της μικροπλάκας 5 φορές, με αναμονή 30''-1' ανά πλύση. Προσθήκη 100 μL από πρόσφατα παρασκευασμένο ρυθμιστικό διάλυμα υποστρώματος TMB σε κάθε θέση, σφράγισμα της μικροπλάκας και επώαση για 20 λεπτά σε σκοτάδι.

- Προσθήκη 100 μL διαλύματος Παύσης (H₂SO₄ 2N) σε κάθε θέση. Μέτρηση απορρόφησης στα 450 nm και στα 570 nm μέσα σε 15 λεπτά. Η απορρόφηση στα 570 nm μπορεί να αφαιρεθεί από αυτήν στα 450 nm.

Για την ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων από τα ανοσοαποτυπώματα κατά Western καθώς και των ELISA χρησιμοποιήθηκε το BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Το kit αυτό περιλαμβάνει το «διάλυμα Α» και το «διάλυμα Β». Η μέτρηση πραγματοποιείται σε μικροπλάκα με 96 πηγαδάκια.

Σε αναλογία 50 μέρη Α, 1 μέρος Β, κατασκευάζεται το «διάλυμα εργασίας». Η απαιτούμενη ποσότητα είναι 200μL ανά πηγαδάκι που θα χρησιμοποιηθεί. Στο εργαστήριο προετοιμάστηκαν γνωστές συγκεντρώσεις BSA (Bovine Serum Albumin), ώστε να κατασκευαστεί πρότυπη καμπύλη. Σε κάθε πηγαδάκι προστέθηκαν 20μl δείγματος (ή πρότυπης) και όλα προστέθηκαν από δυο φορές. Στη συνέχεια έγινε επώαση στους 37°C για 30min και τελικά το πιάτο φωτομετρήθηκε στα 575 nm.

Με βάση την πρότυπη καμπύλη υπολογίστηκε το σύνολο της πρωτεΐνης στα δείγματα που εξετάστηκαν.

8. Ανοσοϊστοχημεία - Χρώση με Thioflavin S

Για την πραγματοποίηση των ανοσοϊστοχημειών και της χρώσης με Thioflavin S (ThioS) βασικό βήμα αποτελεί η λήψη των σωστών τομών από τους εγκεφάλους των πειραματόζωων. Όπως αναφέρθηκε και πιο πάνω το ένα ημισφαίριο μονιμοποιείται και φυλάσσεται στους 4°C. Αυτό το ημισφαίριο θα «κοπεί» σε τομές πάχους 40μm με τη χρήση μικροτόμου με δονούμενη λεπίδα (Vibratome- Leica VT1000S, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). Η διαδικασία κοπής του εγκεφάλου είναι απλή αν γίνει σωστά το στήσιμο της συσκευής. Αρχικά κόβονται τοξοειδείς τομές πάχους 200μm (που δεν τις συλλέγουμε) και όταν αποκαλυφθεί ο υπόκαμπος αλλάζει το μέγεθος της τομής σε 40μm. Κατά τη διάρκεια της διαδικασίας ο εγκέφαλος είναι εμποτισμένος σε TBS pH 8, ενώ οι τομές μεταφέρονται σε 24-well plate, στο οποίο έχει προστεθεί σε κάθε πηγαδάκι TBS pH 8 0,05% w/v Sodium Azide, το οποίο προστατεύει τις τομές από κάποια μόλυνση. Τα plate στη συνέχεια φυλάσσονται στους 4°C μέχρι να χρησιμοποιηθούν οι τομές για κάποια ανοσοϊστοχημεία ή για χρώση με ThioS.

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε χρώση ThioS, ανοσοϊστοχημεία, για το Αβ, καθώς και διπλή ανοσοϊστοχημεία/ χρώση: Iba1/ThioS και GFAP/Thios.

Το ThioS είναι ένα ομοιογενές μείγμα ενώσεων που προκύπτει από τη μεθυλίωση της διυδροθειοτολουιδίνης με σουλφονικό οξύ και είναι μια ιστοειδική χρωστική που προσδένεται στα ινίδια αμυλοειδούς, αλλά όχι στα μονομερή και προκαλεί εκπομπή φθορισμού. Η παρασκευή της χρωστικής γίνεται με την προσθήκη Thioflavin (Sigma Aldrich) 1% w/v σε ddH₂O. Στη συνέχεια αναδεύεται καλά και φιλτράρεται ώστε να απομακρυνθούν τα ιζήματα. Ο δοκιμαστικός σωλήνας που περιέχει μείγμα καλύπτεται με αλουμινόχαρτο καθώς είναι φωτοευαίσθητο. Όσον αφορά τη χρήση του, αρχικά επιλέγονται 6-8 τομές πάχους 40 μm που απέχουν μεταξύ τους 240 μm. Στη συνέχεια οι τομές αυτές μεταφέρονται σε νέα πηγαδάκια που περιέχουν PBS 1X. Η διαδικασία που ακολουθείται είναι η εξής:

- 3 x 5min πλύσεις με PBS 1X, με ανάδευση, προκειμένου να απομακρυνθεί όλο το Sodium Azide.
- Προσθήκη χρωστικής στα πηγαδάκια και ανάδευση για 9min. Η ποσότητα της χρωστικής εξαρτάται από τον αριθμό των τομών ανά πηγαδάκι, αλλά σίγουρα είναι τουλάχιστον 250 μL.
- Απομάκρυνση χρωστικής και προσθήκη 80% v/v αιθανόλης για 3min x 2

- Προσθήκη 95% v/v αιθανόλης για 3min.
- 3x3 min πλύσεις με νερό

Αξίζει να σημειωθεί ότι από το στάδιο της προσθήκης της χρωστικής και έπειτα το plate πρέπει να καλύπτεται με αλουμινόχαρτο, ώστε να μην εξασθενίσει ο φθορισμός της χρωστικής.

Με την ολοκλήρωση της διαδικασίας οι τομές μεταφέρονται σε αντικειμενοφόρους πλάκες, προστίθεται σε αυτές υδατικό διάλυμα κάλυψης για φθορισμό (Mounting Medium for Fluorescent - Vectashield, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) και τέλος καλύπτονται με καλυπτρίδα. Το επόμενο βήμα είναι η φωτογράφιση των τομών με το Leica TCS SP5 confocal microscope και η ποσοτικοποίηση του ThioS.

Όσον αφορά την ανοσοϊστοχημεία πρόκειται για μια διαδικασία κατά την οποία ειδικά αντισώματα προσδένονται σε ειδικές δομές (πχ πρωτεΐνες) στις τομές των εγκεφάλων και μας επιτρέπουν να τους μελετήσουμε.

Για τις ανοσοϊστοχημείες τα πρωτόκολλα που ακολουθήθηκαν ήταν τα εξής:

- **Αβ ανοσοϊστοχημεία:**

- Τομές πάχους 40μm επώαστηκαν σε TBS/Triton X-100 0,3% για 10 min X 3 φορές, ώστε να γίνουν διαπερατές
- Επώαση σε 0,6% H₂O₂ σε TBS για 30 min
- 3 x 5 min πλύσεις με TBS
- 98% Formic Acid (AppliChem) για 5min, για την αποκάλυψη του αντιγόνου
- 3 x 5min πλύσεις με TBS
- Blocking σε 15% NGS (normal goat serum) (Vector Laboratories) σε TBS/ Triton X-100 0,1% για 1h
- Επώαση για τουλάχιστον 15 ώρες στους 4°C με το μονοκλωνικό-βιοτινυλιωμένο αντι-6E10 αντίσωμα (σε συγκέντρωση 1:500, Covance, Princeton, NJ, USA) σε 5% NGS, σε TBS/ Triton X-100 0,1%
- 4 x 15 min πλύσεις με TBS
- 1 x 15 min πλύση με PBS
- Επώαση με σύμπλοκο αβιδίνης-βιοτίνης-υπεροξειδάσης (Vectastain Standard ABC kit, Vector Laboratories) για 120 min σε θερμοκρασία δωματίου.
- Οπτικοποίηση του συμπλόκου με τη χρήση DAB/Ni (Vector Laboratories)

- Μετά από 1-2 min επώαση, πλύση με ddH₂O και στρώση σε αντικειμενοφόρους πλάκες (Thermo Fisher Scientific)
- Αφυδάτωση σε αιθανόλες με σταδιακή αύξηση της συγκέντρωσης τους από 50% σε 100% και στη συνέχεια σε ξυλήνη (Sigma Aldrich)
- Κάλυψη με DPX mounting medium (AppliChem)
- Χρήση του DM LS2 Leica μικροσκοπίου, και λήψη φωτογραφίας με το πρόγραμμα Leica Application Suite (version V4.6)

• **Iba1 Ανοσοϊστοχημεία**

Ημέρα 1^η

- Επιλογή τομών πάχους 40μm
- 3 x 5 min πλύσεις σε PBS 1X
- Επώαση σε PBS/Triton X-100 0,3% για 30-60 min σε θερμοκρασία δωματίου
- Blocking: 3h με 10% FCS (or FBS), 1%BSA, 0.3%Tx/PBS σε θερμοκρασία δωματίου
- Επώαση με πρωτογενές αντίσωμα Rb pAb anti-Iba1 σε συγκέντρωση 1:500 από 1mg/mL (019-19741 Wako) σε 1% FCS (or FBS), 1% BSA, 0.3%Tx/PBS για τουλάχιστον 15 ώρες, στους 4°C.

Ημέρα 2^η

- 5 x 10min πλύσεις με PBS
- Επώαση με δευτερογενές αντίσωμα Gt-a-Rb 1:500 Cy3-συζευγμένο με φθορίζουσα ένωση (Jackson Immunoresearch) σε 1%F CS (or FBS), 1% BSA, 0.3%Tx/PBS για 1h 30 min σε θερμοκρασία δωματίου
- 3 x 15 min πλύσεις με PBS

Τα επόμενα βήματα αφορούν τη χρώση με ThioS

- ThioS 1% για 5 min
- Ξέπλυμα 2 φορές με 70% EtOH
- 1 x 3 min με 70% EtOh
- Ξέπλυμα 3 φορές με PBS 1X

Με την ολοκλήρωση της διαδικασίας οι τομές μεταφέρονται σε αντικειμενοφόρους πλάκες, προστίθεται σε αυτές υδατικό διάλυμα κάλυψης για φθορισμό.

- **GFAP Ανοσοϊστοχημεία**

Ημέρα 1^η

- Επιλογή τομών πάχους 40μm
- 3 x 15 min πλύσεις σε TBS 1X
- Blocking σε TBS/Triton X-100 0,4%, 5% NHS (Normal Horse Serum) για 60 min, με ανάδευση, σε θερμοκρασία δωματίου
- Επώαση με anti-GFAP 1:500 mouse mab G-A-5 (Sigma G-3893, stock 8,7mg/ml) σε TBS/Triton X-100 0,4%, 5% NHS για τουλάχιστον 15 ώρες, στους 4°C με ανάδευση

Ημέρα 2^η

- Ξέπλυμα με TBS 1X
- 1 x 10 min πλύση με TBS
- 2 x 15 min πλύσεις με TBS
- 1 x 10 min πλύση με TBS
- Επώαση με δευτερογενές αντίσωμα Gt-anti-mouse IgG-FITC (Sigma F-2012) 1:500 ή anti-mouse Alexa-546 IgG 1:500 (Invitrogen-red) σε TBS/Triton X-100 0,4%, 5% NHS για 1h σε θερμοκρασία δωματίου, με ανάδευση
- Ξέπλυμα με TBS 1X
- 1 x 10 min πλύση με TBS
- 2 x 15 min πλύσεις με TBS
- 1 x 10 min πλύση με TBS

Τα επόμενα βήματα αφορούν τη χρώση με ThioS

- ThioS 1% για 5 min
- Ξέπλυμα 2 φορές με 70% EtOH
- 1 x 3 min με 70% EtOH
- Ξέπλυμα 3 φορές με PBS 1X

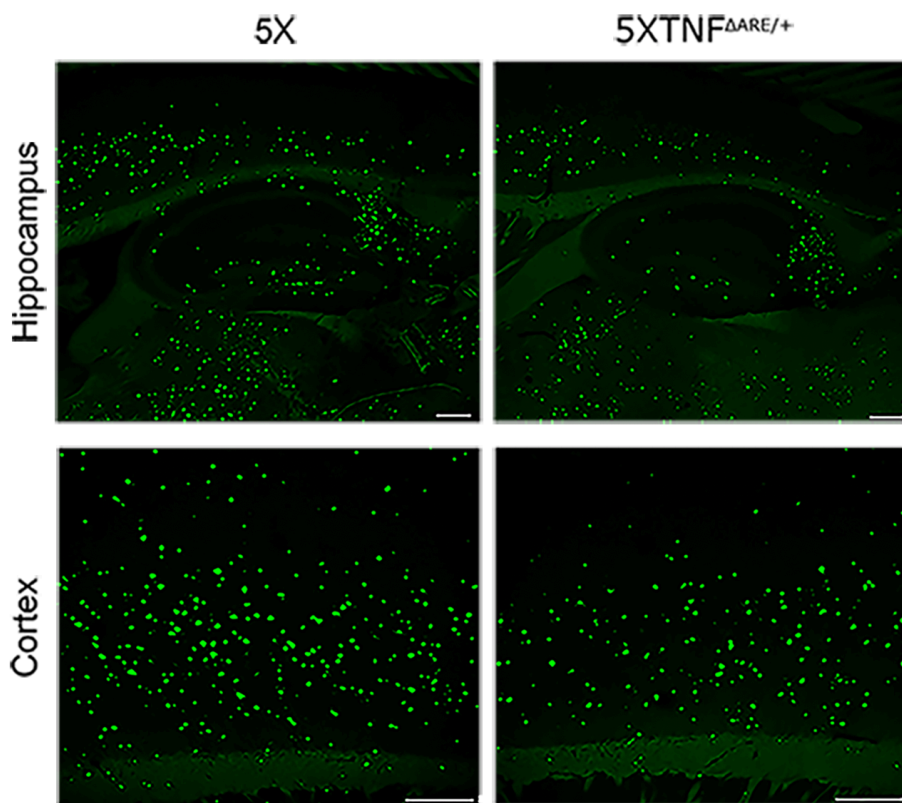
Με την ολοκλήρωση της διαδικασίας οι τομές μεταφέρονται σε αντικειμενοφόρους πλάκες, προστίθεται σε αυτές υδατικό διάλυμα κάλυψης για φθορισμό.

Αποτελέσματα

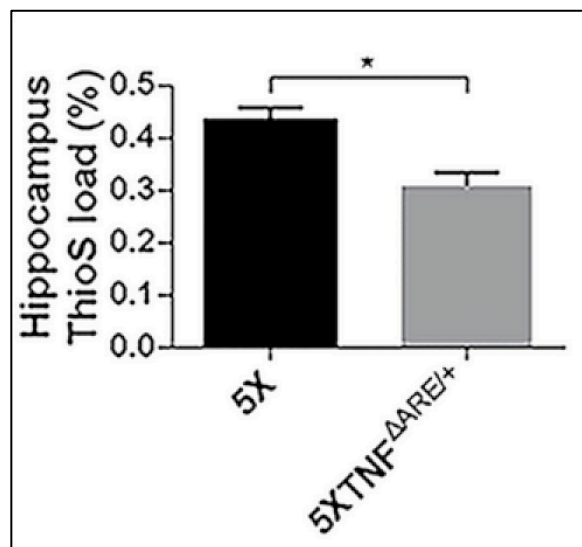
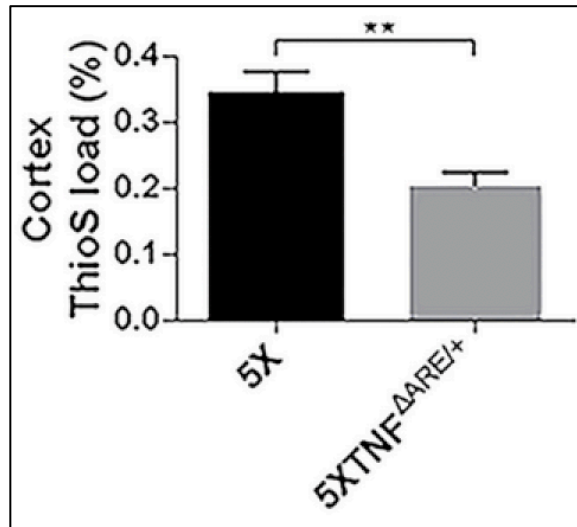
1. Η εναπόθεση αμυλοειδούς και πλακών είναι μειωμένη στους εγκεφάλους των 5XFAD/TNF^{ΔARE/+} ποντικών.

Για την αξιολόγηση της επίδρασης στον αμυλοειδή φαινότυπο των AD ποντικών, που είχε η απορρύθμιση του ανοσοποιητικού, από τη γενετική τροποποίηση του ενδογενούς μ TNF- α γονιδίου, χρησιμοποιήθηκαν 5XFAD διαγονιδιακά ποντίκια και μ TNF- α μεταλλαγμένα ποντίκια με απαλοιφή της ARE περιοχής (TNF^{ΔARE/+}).

Η ανάλυση των φωτογραφιών μετά από χρώση με ThioS έδειξε μια σημαντική μείωση στις αμυλοειδείς πλάκες στον ιππόκαμπο και στον φλοιό στα ποντίκια ηλικίας 4 μηνών 5XFAD/TNF^{ΔARE/+} σε σχέση με τα 5XFAD. Η ποσοτικοποίηση των θετικών από ThioS περιοχών στον ιππόκαμπο έδειξε μια στατιστικά σημαντική μείωση στα 5XFAD/TNF^{ΔARE/+} σε σχέση με τα 5XFAD. Παρομοίως, και στον φλοιό παρατηρήθηκε μείωση στις αμυλοειδείς πλάκες καθώς και σχετικά αραιή κατανομή τους, και η ποσοτικοποίηση έδειξε επίσης στατιστικά σημαντική μείωση.

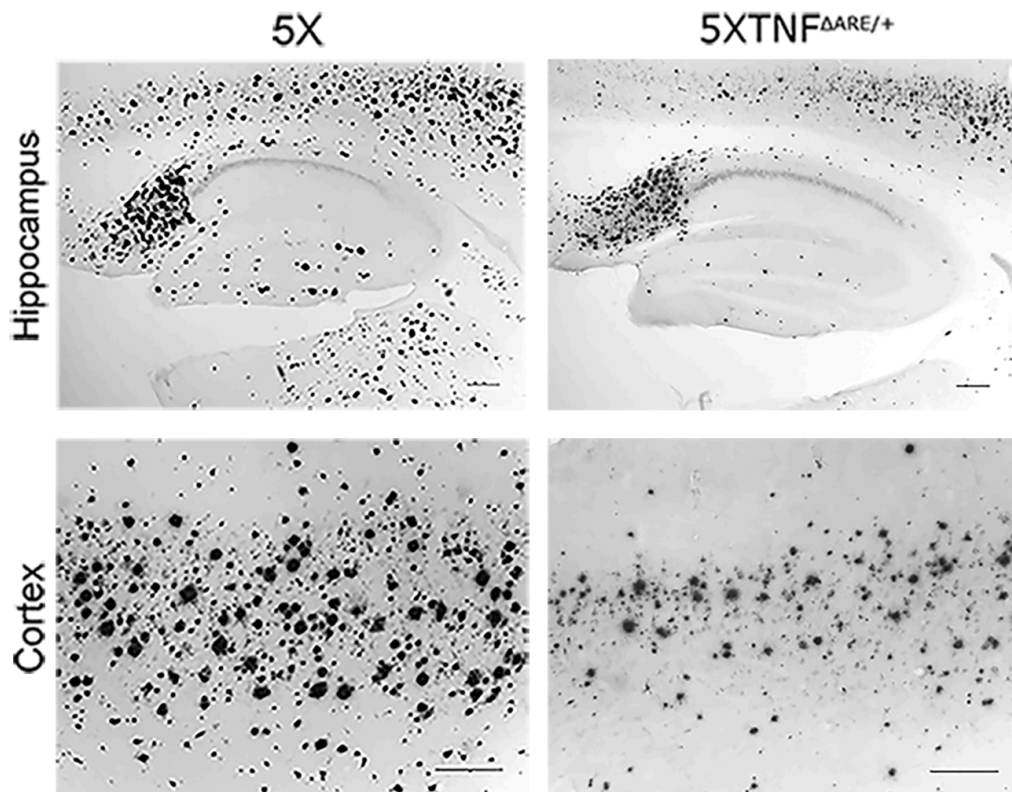


Εικόνα 8: Χρώση ThioS σε τομές 40 μ m από 5X και 5XTNF^{ΔARE/+} εγκεφάλους σε ιππόκαμπο και φλοιό.
Scalebar: 250 μ m



Εικόνα 9: Ποσοτικοποίηση με το λογισμικό ImageJ, πραγματοποίηση two-tailed unpaired t-test. n=3-5 ποντίκια ανά γκρουπ. ** p= 0.0077 και * p= 0.0162

Για περαιτέρω παρατήρηση των διαφορών στην εναπόθεση αμυλοειδών ινιδίων πραγματοποιήθηκε ανοσοϊστοχημεία με το 6E10 αντίσωμα που ανιχνεύει τόσο ινώδες όσο και μη ινώδες Αβ.

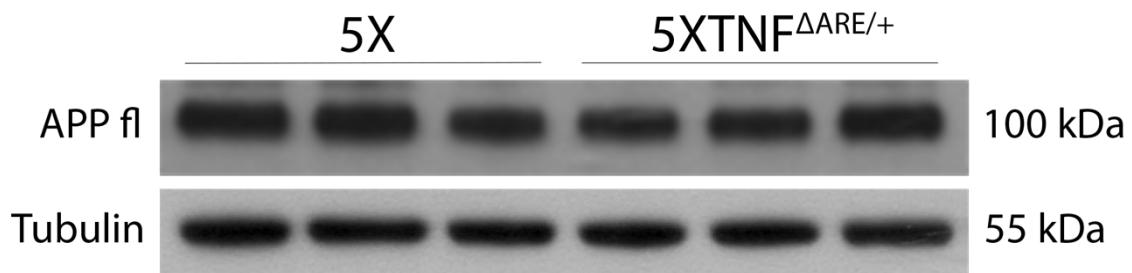


Εικόνα 10: Ανοσοϊστοχημεία για συνολικό Αβ σε τομές πάχους 40μm, σε φλοιό και ιππόκαμπο.
Scalebar: 250μm

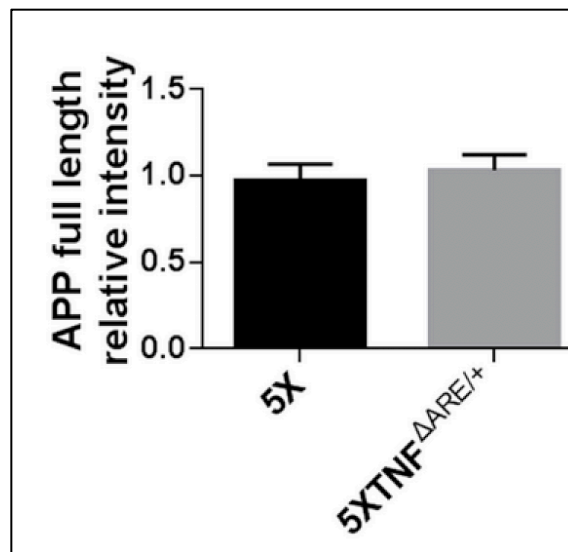
Η εικόνα με της 6E10 ανοσοϊστοχημείας είχε παρόμοιο μοτίβο με αυτή της ThioS χρώσης, με την αραιή κατανομή των πλακών στον φλοιό και τις συσσωρεύσεις τους κυρίως στο subiculum του ιππόκαμπου.

Αυτά τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι η γενετική μετατροπή του ενδογενούς TNF-α στα 5XFAD/TNF^{ΔARE/+} ποντίκια οδήγησε σε μείωση των πλακών και του Αβ πεπτιδίου. Η παρατηρούμενη μείωση μπορεί να εξηγείται από μείωση της APP πρωτεΐνης και από μειωμένη παραγωγή Αβ και μειωμένο σχηματισμό πλακών.

Για να διερευνήσουμε αυτή την υπόθεση εξετάσαμε τα επίπεδα της APP πρωτεΐνης (full length) σε ολικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα εγκεφάλου από 5XFAD/TNF^{ΔARE/+} και 5XFAD με Western blot ανάλυση. Η ανάλυση αυτή δεν έδειξε στατιστικά σημαντική διαφορά στα δύο γκρουπ, υποδεικνύοντας πως η μείωση στις αμυλοειδείς πλάκες στα 5XFAD/TNF^{ΔARE/+} δεν οφείλεται σε μειωμένη παραγωγή APP πρωτεΐνης.



Εικόνα 11: APP Western blot ανάλυση. n= 3 ποντίκια ανά γκρουπ



Εικόνα 12: Ποσοτικοποίηση της Western με το λογισμικό ImageJ. Χρήση του two-tailed unpaired t-test για την στατιστική ανάλυση. n= 3 ποντίκια ανά γκρουπ

2. Η μετατροπή του ενδογενούς γονιδίου του TNF- α δεν αλλάζει τα ένζυμα αποικοδόμησης της APP στα 5XFAD/TNF^{ΔARE/+} ποντίκια.

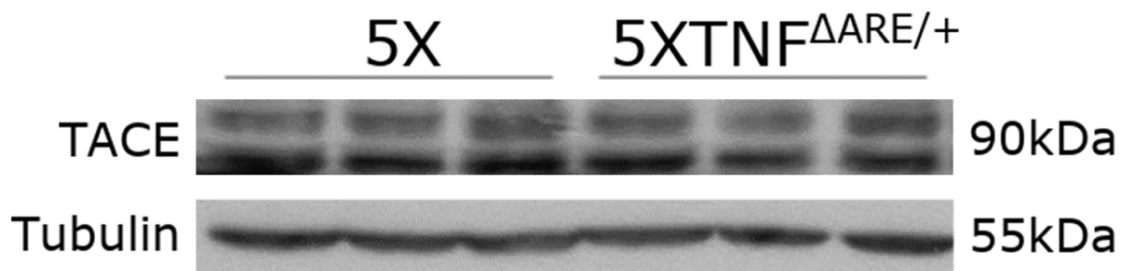
Ένας πιθανός μηχανισμός στον οποίο μπορεί να οφείλεται η μειωμένη εναπόθεση αμυλοειδούς στους εγκεφάλους των 5XFAD/TNF^{ΔARE/+} ποντικών μπορεί να είναι η αλλαγή στην επεξεργασία της APP πρωτεΐνης.

Για να εξετάσουμε αν λοιπόν, η μείωση στα 5XFAD/TNF^{ΔARE/+} ποντίκια οφείλεται σε αλλαγή στον μεταβολισμό της APP, ποσοτικοποιήσαμε τα επίπεδα των ενζύμων αποικοδόμησης της APP, που συμμετέχουν στην παραγωγή του Αβ. Έτσι, εξετάσαμε τα επίπεδα κάποιων ενζύμων-κλειδιά στην επεξεργασία της APP και στην παραγωγή του Αβ, όπως η BACE1, Η TACE και η ADAM10.

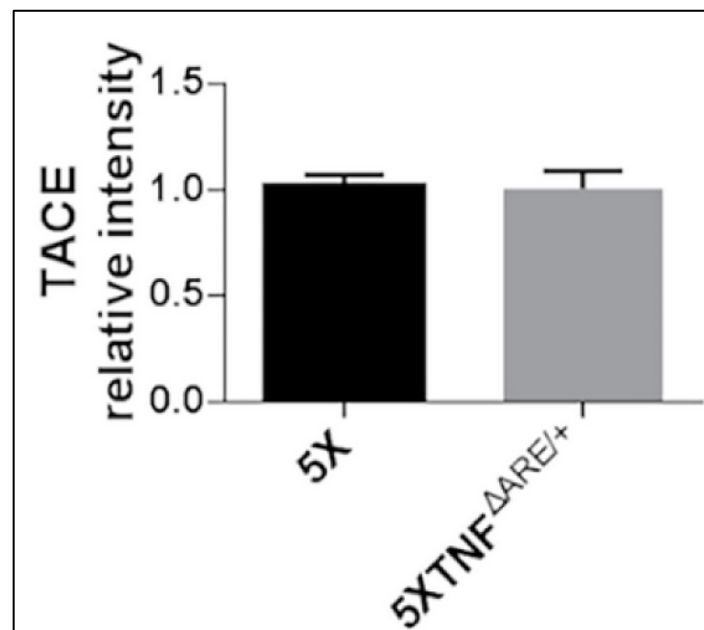
Τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα των εγκεφάλων των 5XFAD/TNF^{ΔARE/+} και των 5XFAD ποντικών αναλύθηκαν με Western blot χρησιμοποιώντας ειδικά αντισώματα με σκοπό την ανίχνευση των παραπάνω ενζύμων.

Εφόσον, ο TNF-α είναι το βασικό υπόστρωμα της TACE εξετάσαμε αν το μtTNF-α γονίδιο μπορεί να επηρεάσει τα πρωτεϊνικά επίπεδα της TACE στα 5XFAD/TNF^{ΔARE/+} ποντίκια.

Η ανάλυση που πραγματοποιήθηκε, έδειξε πως τα επίπεδα της πρωτεΐνης TACE παρέμειναν τα ίδια μεταξύ των δύο ομάδων.

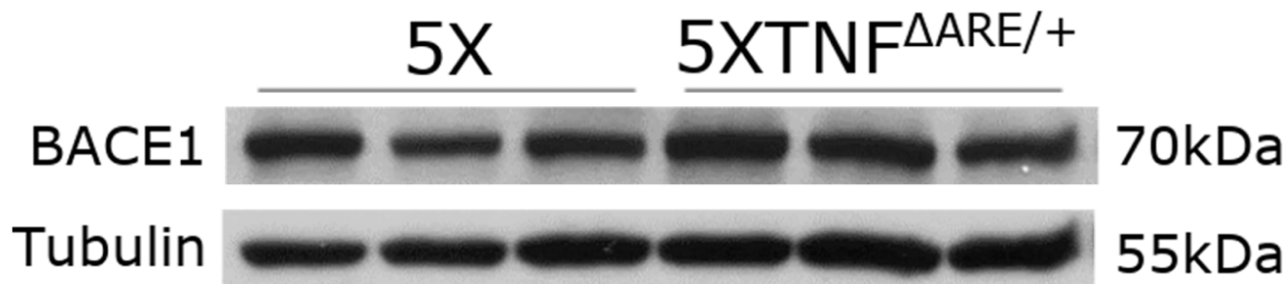


Εικόνα 13: TACE Western blot ανάλυση. n= 3 ποντίκια ανά γκρουπ

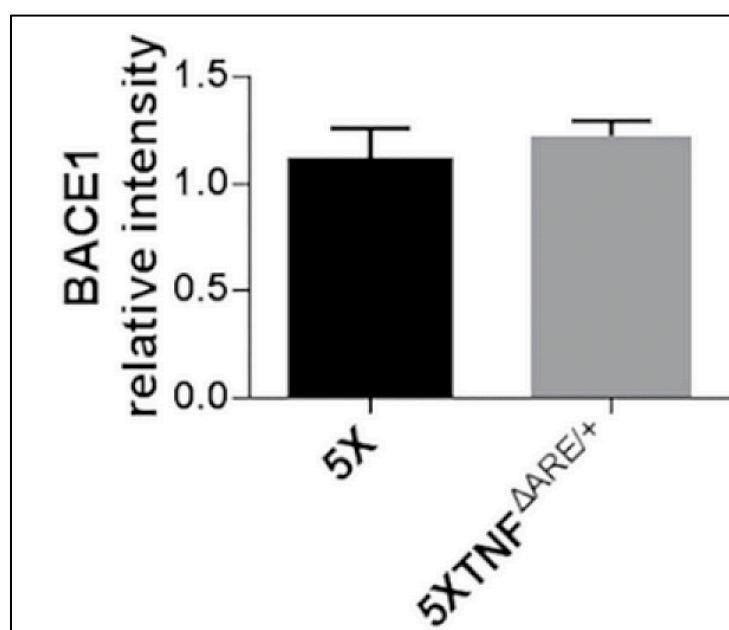


Εικόνα 14: Ποσοτικοποίηση της Western με το λογισμικό ImageJ. Χρήση του two-tailed unpaired t-test για την στατιστική ανάλυση. n= 3 ποντίκια ανά γκρουπ

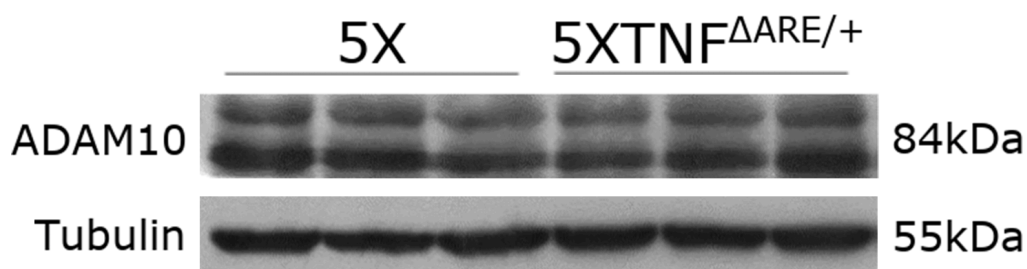
Παρομοίως, και στα επίπεδα των ADAM-10 και BACE-1, της α και β εκκρίτασης αντίστοιχα, που συμμετέχουν στην αποικοδόμηση της APP και παραγωγή του Αβ, δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές αλλαγές στα πρωτεϊνικά επίπεδα μεταξύ των δυο ομάδων ποντικών.



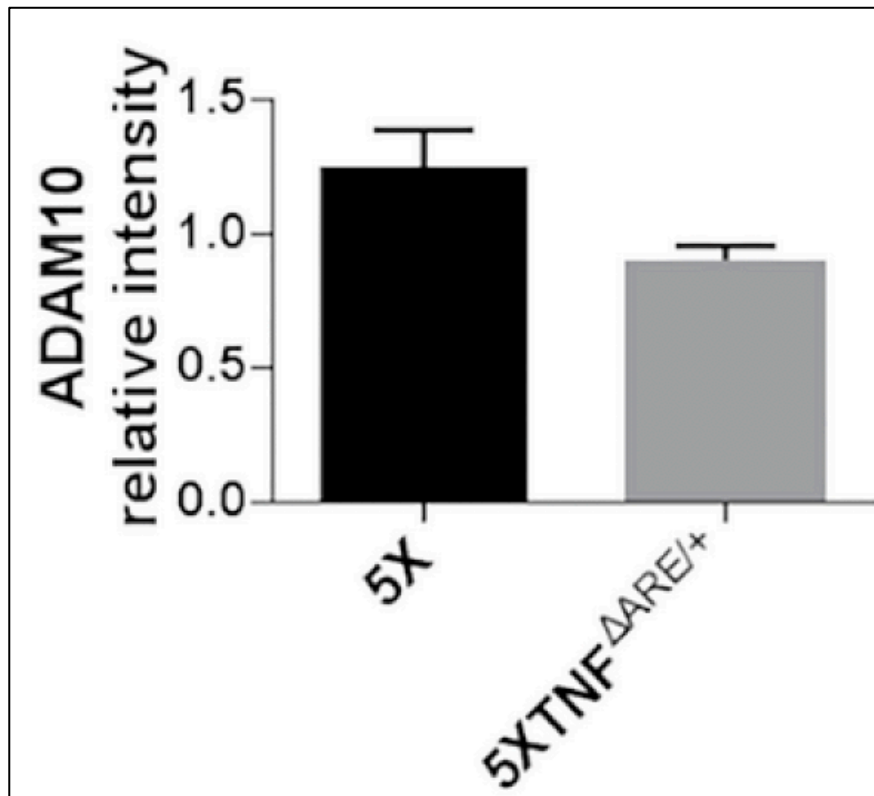
Εικόνα 15: BACE1 Western blot ανάλυση. n= 3 ποντίκια ανά γκρουπ



Εικόνα 16: Ποσοτικοποίηση της Western με το λογισμικό ImageJ. Χρήση του two-tailed unpaired t-test για την στατιστική ανάλυση. n= 3 ποντίκια ανά γκρουπ



Εικόνα 17: ADAM10 Western blot ανάλυση. n= 3 ποντίκια ανά γκρουπ



Εικόνα 18: Ποσοτικοποίηση της Western με το λογισμικό ImageJ. Χρήση του two-tailed unpaired t-test για την στατιστική ανάλυση. n= 3 ποντίκια ανά γκρουπ

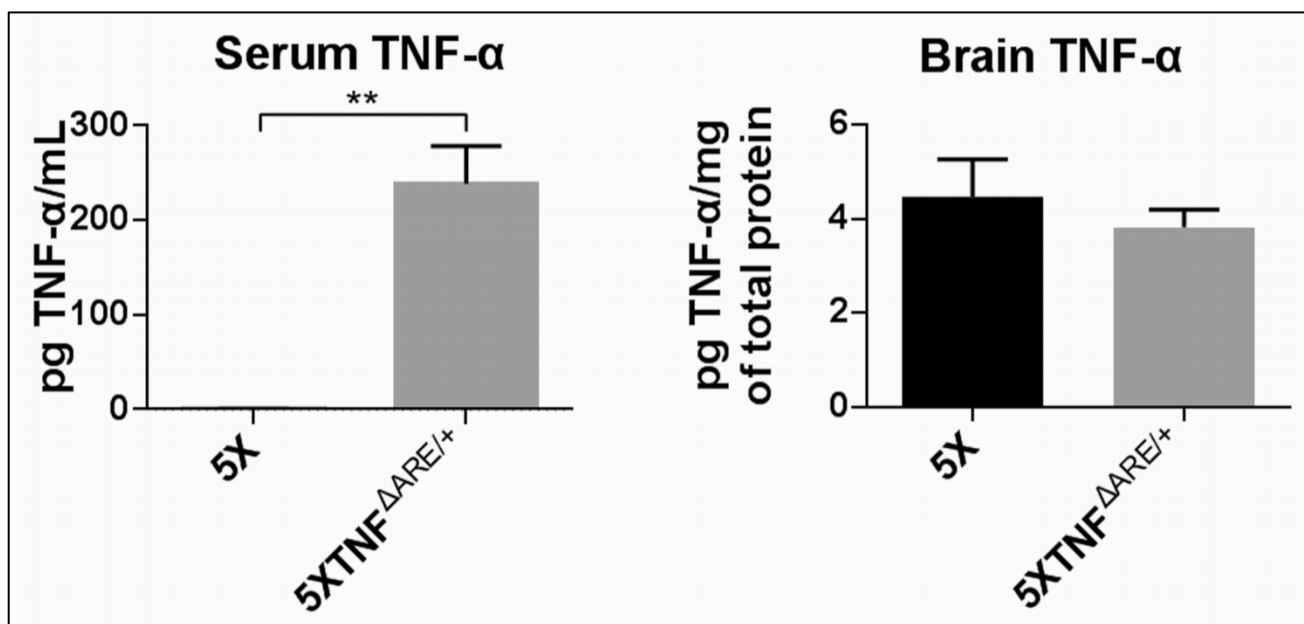
Τα δεδομένα αυτά υποστηρίζουν πως το μεταλλαγμένο TNF- α γονίδιο στα 5XFAD/TNF Δ ARE/+ ποντίκια δεν επηρεάζει τα ένζυμα που μεσολαβούν στην αποικοδόμηση της APP και στην παραγωγή του Α β , υποδεικνύοντας πως υπάρχει άλλος τρόπος με τον οποίο ο TNF- α αλλοιώνει την εναπόθεση αμυλοειδούς.

3. Τα 5XFAD/TNF Δ ARE/+ έχουν αυξημένα επίπεδα TNF- α μόνο στην περιφέρεια και όχι στον εγκέφαλο.

Η τροποποίηση του ενδογενούς μ TNF- α γονιδίου στα TNF Δ ARE/+ ποντίκια έχει δειχθεί πως αυξάνει τα επίπεδα του TNF- α στην περιφέρεια [72]. Με σκοπό να εξετάσουμε την επίδραση της τροποποίησης του ενδογενούς γονιδίου και την αύξηση των επιπέδων του μ TNF- α στα 5XFAD/TNF Δ ARE/+ ποντίκια, μετρήσαμε τα επίπεδα του μ TNF- α στο ορό και στον εγκέφαλο των ποντικών με τη χρήση ειδικής anti- μ TNF- α ELISA.

Η ανάλυση μας ανέδειξε στατιστικά σημαντική αύξηση των επιπέδων του μ TNF- α στον ορό των 5XFAD/TNF Δ ARE/+ ποντικών (>200 pg/mL), ενώ ο μ TNF- α δεν ήταν ανιχνεύσιμος στον ορό των 5XFAD ποντικών. Ο μ TNF- α ήταν ανιχνεύσιμος αλλά σε χαμηλά επίπεδα

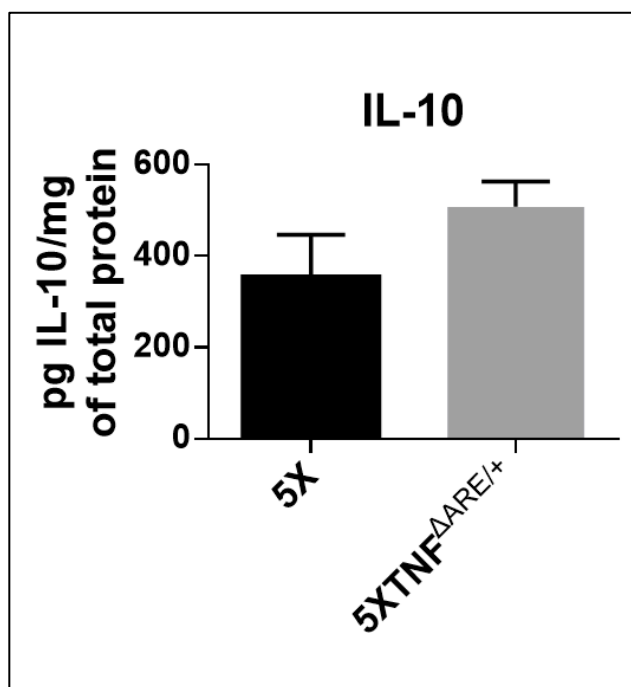
στα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα εγκεφάλων των 5XFAD/TNF^{ΔARE/+} και των 5XFAD (control) ποντικών αλλά δεν έδειξε καμία στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δυο ομάδων.



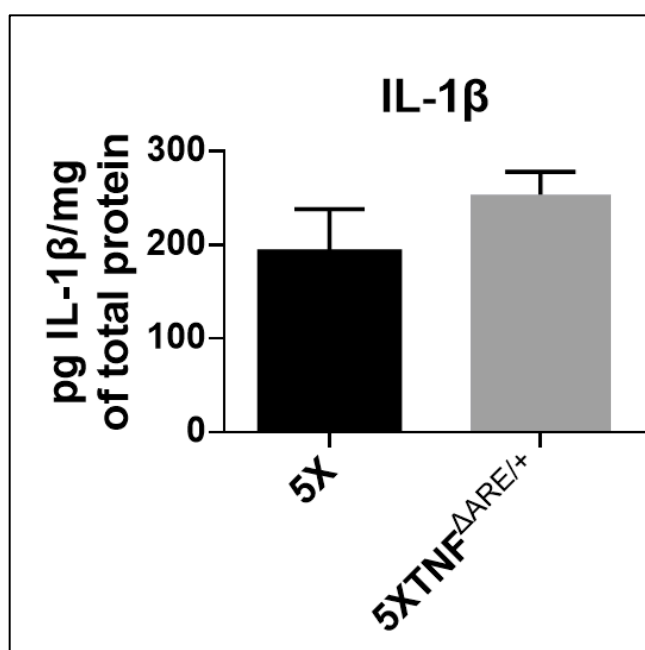
Εικόνα 19: ELISA για τον TNF-α. Χρήση two-tailed unpaired t-test για την στατιστική ανάλυση. n= 3-5 ποντίκια ανά γκρουπ. ** p= 0.040

Αυτά τα αποτελέσματα υποδεικνύουν πως η τροποποίηση του ενδογενούς μ TNF- α γονιδίου έχει μεγάλη επίδραση στα επίπεδα του TNF- α στην περιφέρεια, σε σχέση με τον εγκεφαλο, όπου η έκφραση του TNF- α είναι ελάχιστη και δε φαίνεται να διαφέρει μεταξύ των δυο γκρουπ.

Αντίστοιχα, δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δυο γκρουπ στις κυτταροκίνες IL-10 και IL-1 β , ωστόσο παρατηρείται μια τάση αύξησης στα 5XFAD/TNF^{ΔARE/+} ποντίκια.



Εικόνα 20: ELISA για την IL-10. Χρήση two-tailed unpaired t-test για την στατιστική ανάλυση. n= 3-5 ποντίκια ανά γκρουπ



Εικόνα 21: ELISA για την IL-1 β Χρήση two-tailed unpaired t-test για την στατιστική ανάλυση. n= 3-5 ποντίκια ανά γκρουπ

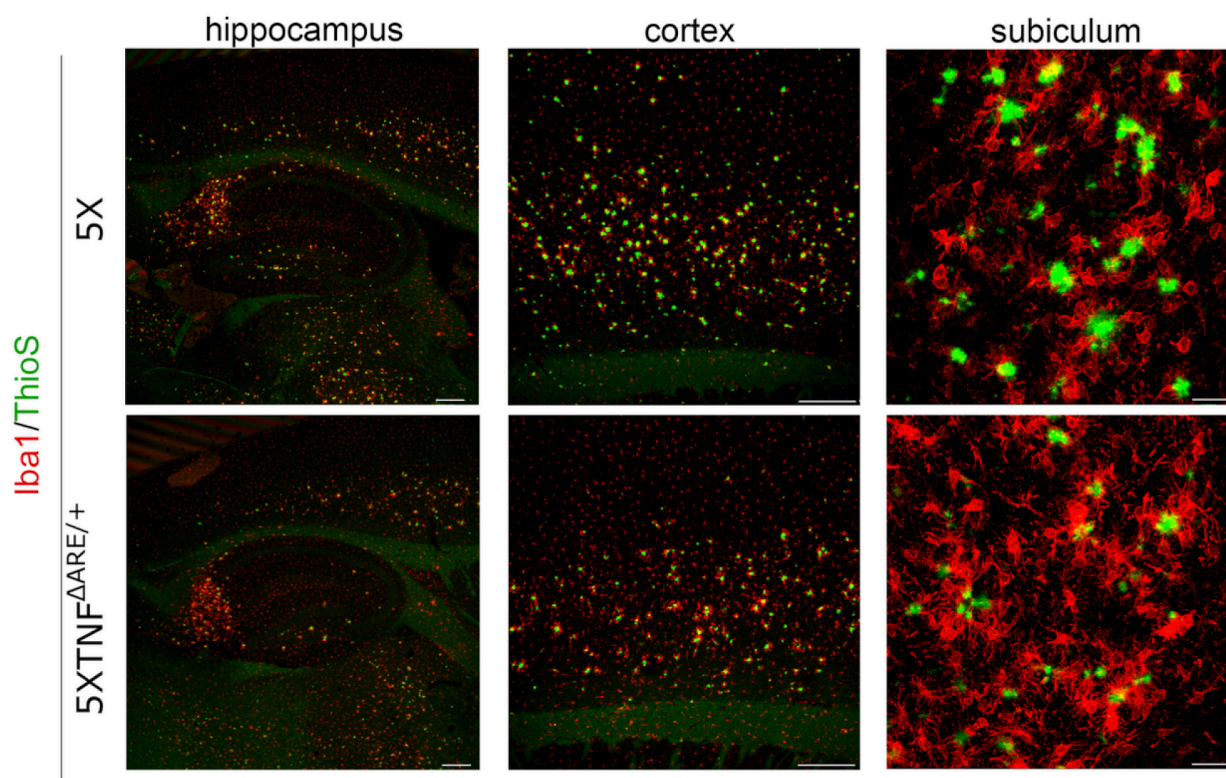
4. Τα 5XFAD/TNF Δ ARE/+ ποντίκια έχουν ενεργοποιημένη μικρογλοία αλλά όχι ενεργοποιημένα αστροκύτταρα.

Με σκοπό να αξιολογήσουμε την επίδραση της τροποποίησης της 3'UTR περιοχής του μ TNF- α ενδογενούς γονιδίου και των αυξημένων επιπέδων του TNF- α στην περιφέρεια,

στην ενεργοποίηση των νευρογλοιακών κυττάρων, εξετάσαμε τους εγκεφάλους των 5XFAD/TNF^{ΔARE/+} και 5XFAD για τον μικρογλοιακό δείκτη Iba1 και τον δείκτη αστροκυττάρων GFAP.

Πραγματοποιήθηκε διπλή ανοσοϊστοχημεία/χρώση Iba1 και ThioS όπου παρατηρήθηκε αύξηση της ενεργούς μικρογλοίας στους 5XFAD/TNF^{ΔARE/+} εγκεφάλους σε σχέση με τα 5XFAD ποντίκια, ίδιας ηλικίας, τόσο στον φλοιό, όσο και στον ιππόκαμπο.

Παρατηρήθηκε αύξηση του αριθμού των ενεργοποιημένων μικρογλοιακών κυττάρων που «περικυκλώνουν» τις αμυλοειδείς πλάκες, καθώς και αύξηση της διήθησης των αμυλοειδών εναποθέσεων στην περιοχή του Subiculum του ιππόκαμπου των 5XFAD/TNF^{ΔARE/+} εγκεφάλων, σε σύγκριση με τα 5XFAD.

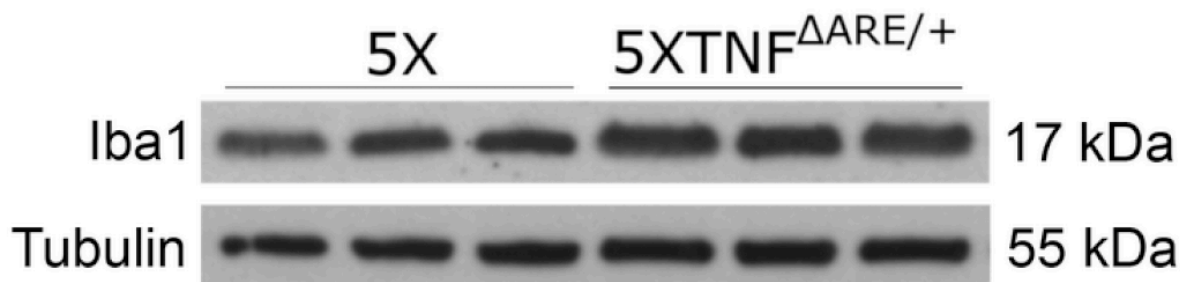


Εικόνα 22: Διπλή ανοσοϊστοχημεία/χρωση για Iba1 και ThioS σε τομές εγκεφάλου, πάχους 40μm, σε φλοιό και ιππόκαμπο.

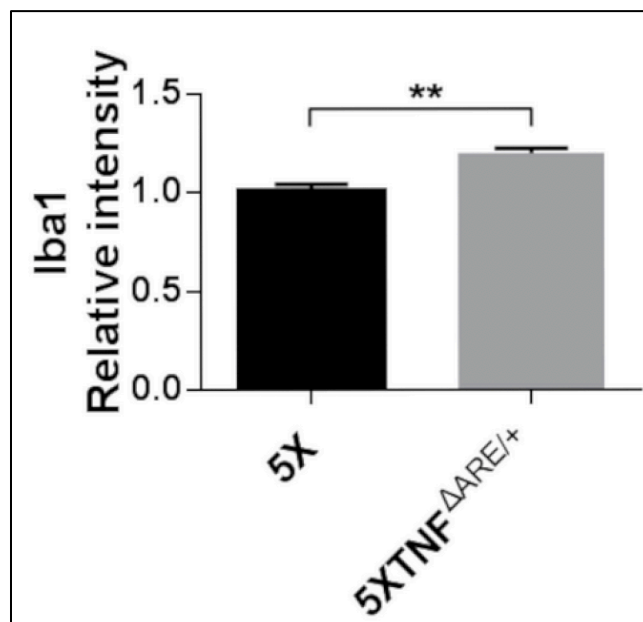
Scalebar: 250μm (ιππόκαμπος/φλοιός), 25μm (subiculum)

Για την περαιτέρω διερεύνηση των παραπάνω ευρημάτων πραγματοποιήσαμε Western blot ανάλυση μεταξύ των 5XFAD/TNF^{ΔARE/+} και των 5XFAD. Η ανάλυση των πρωτεϊνικών επιπέδων του Iba1 παρουσίασε στατιστικά σημαντική αύξηση των επιπέδων του, στα

5XFAD/TNF^{ΔARE/+} ποντίκια, σε σχέση με τα 5XFAD, σε συμφωνία με την αυξημένη ενεργοποίηση που παρατηρήθηκε μετά από την ανοσοϊστοχημεία.

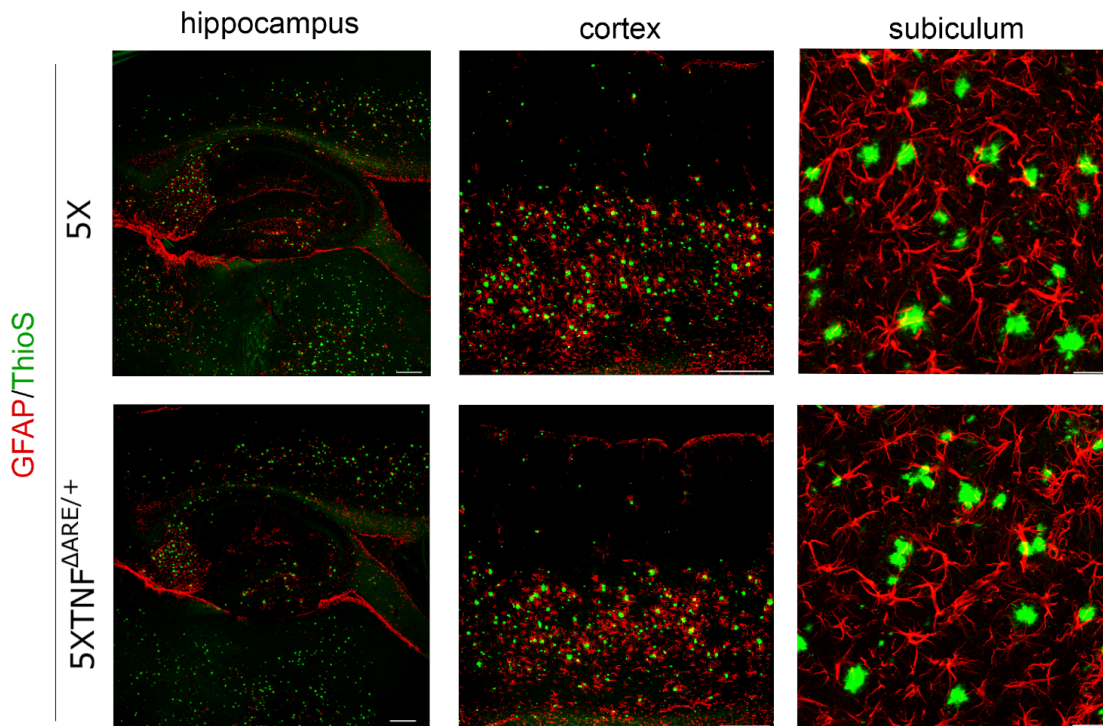


Εικόνα 23: Iba1 Western blot ανάλυση. n= 3 ποντίκια ανά γκρουπ



Εικόνα 24: Ποσοτικοποίηση της Western με το λογισμικό ImageJ. Χρήση του two-tailed unpaired t-test για την στατιστική ανάλυση. n= 3 ποντίκια ανά γκρουπ. ** p= 0.0078

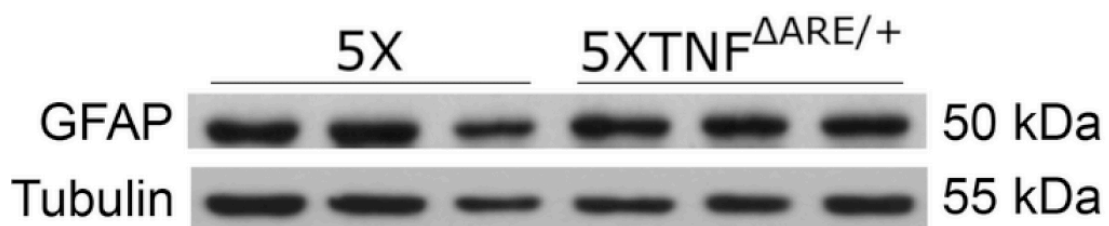
Στη συνέχεια εξετάσαμε την ενεργοποίηση των αστροκυττάρων στους εγκεφάλους των 5XFAD/TNF^{ΔARE/+} και των 5XFAD μετά από διπλή ανοσοϊστοχημεία/χρώση GFAP και ThioS, όπου δε παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές αλλαγές στην ενεργοποίηση των αστροκυττάρων γύρω από τις αμυλοειδείς πλάκες στα 5XFAD/TNF^{ΔARE/+} σε σχέση με τα 5XFAD.



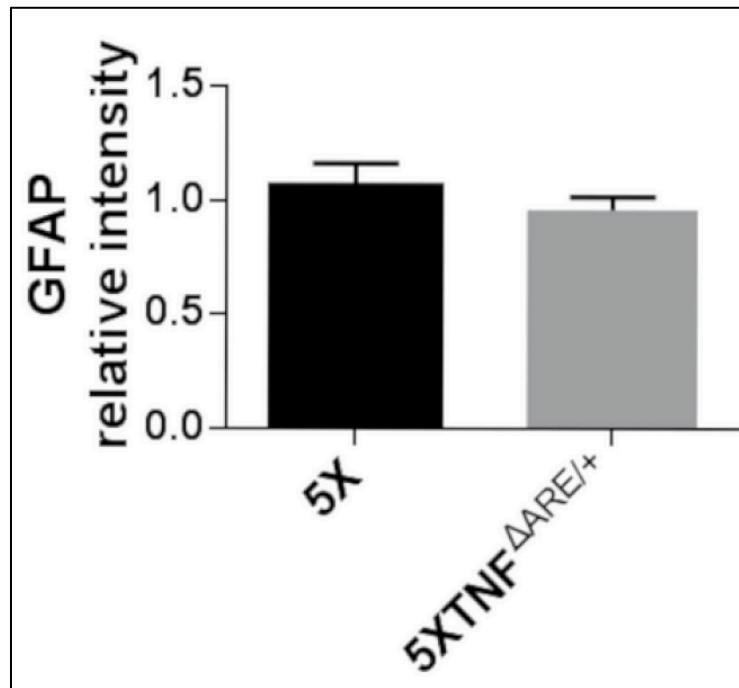
Εικόνα 25: Διπλή ανοσοϊστοχημεία/χρώση για GFAP και ThioS σε τομές εγκεφάλου, πάχους 40μm, σε φλοιό και υπόκαμπο.

Scalebar: 250μm (υπόκαμπος/φλοιός), 25μm (subiculum)

Για την επαλήθευση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήσαμε και Western blot, όπου παρόμοια με την ανοσοϊστοχημεία, δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στα επίπεδα του GFAP στα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα, μεταξύ των δυο γκρουπ



Εικόνα 26: GFAP Western blot ανάλυση. n= 3 ποντίκια ανά γκρουπ



Εικόνα 27: Ποσοτικοποίηση της Western με το λογισμικό ImageJ. Χρήση του two-tailed unpaired t-test για την στατιστική ανάλυση. n= 3 ποντίκια ανά γκρουπ.

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα υποδεικνύουν πως η τροποποίηση του μ TNF- α γονιδίου στα 5XFAD/TNF Δ ARE/+ και η αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων του περιφερικού TNF- α επάγουν μια ισχυρή μικρογλοιακή ενεργοποίηση, η οποία φαίνεται να είναι ειδική για την μικρογλοία, καθώς δεν παρατηρήθηκε αντίστοιχη ενεργοποίηση στα αστροκύτταρα.

Συζήτηση

Είναι πλέον κοινώς αποδεκτό πως η νόσος του Alzheimer και οι φλεγμονώδεις διαδικασίες που παρατηρούνται σε αυτή, διαμεσολαβούνται, σε μεγάλο βαθμό, από την κύρια προ-φλεγμονώδη κυτταροκίνη, τον TNF- α . Αν και η επιστημονική έρευνα έχει συλλέξει πολλά δεδομένα γύρω από τη σχέση του TNF- α και τη νόσο του Alzheimer, εξαιτίας της πλειοτροπικής δράσης και της πολυπλοκότητας του, δεν είναι ακόμα πλήρως κατανοητός και ξεκάθαρος ο ρόλος του και η συμβολή του στη παθογένεση της νόσου. Αυτό οφείλεται στο γεγονός πως πολλοί και διαφορετικοί παράγοντες επηρεάζουν τον τρόπο δράσης του και συγκεκριμένα, αν οι δράσεις του θα είναι ωφέλιμες ή βλαβερές για τους νευρώνες και την επιβίωση τους. Αυτό καθορίζεται από τη διάρκεια και τα επίπεδα έκφρασης του TNF- α , τους υποδοχείς του καθώς και το περιβάλλον και την υπάρχουσα φλεγμονή [40].

Η συσχέτιση του TNF- α με την νόσο του Alzheimer καθιστούν απαραίτητη την κατανόηση της σύνδεσης αυτής, καθώς σε πολλές μελέτες με διάφορα ζωικά μοντέλα της νόσου έχει δειχθεί πως η αναστολή της δράσης του έχει ευεργετικό ρόλο, καθιστώντας τον πιθανό θεραπευτικό στόχο. Ωστόσο, σε μελέτες με πειραματόζωα με απενεργοποιημένους τους δύο υποδοχείς του TNF- α (TNFR1 και TNFR2) ή μόνο του TNFR2 έχει παρατηρηθεί ενίσχυση των νευροπαθολογικών χαρακτηριστικών που σχετίζονται με το Alzheimer's στα ποντίκια μοντέλα της νόσου [48, 49].

Λαμβάνοντας υπόψιν τα παραπάνω δεδομένα επιλέχθηκε να μελετηθεί η επίδραση της υπερέκφρασης του TNF- α μετά από απαλοιφή των ρυθμιστικών στοιχείων ARE σε ποντίκι μοντέλο της νόσου του Alzheimer. Έτσι, επιλέχθηκε το 5XFAD μοντέλο της νόσου, ιδανική επιλογή, καθώς φέρει 5 διαφορετικές μεταλλαγές που προκαλούν την οικογενή μορφή της νόσου (Familial Alzheimer's Disease), οδηγώντας στην υπερπαραγωγή του A β ₄₂ και στην εμφάνιση κλασικών χαρακτηριστικών της νόσου σε νεαρή ηλικία (4μήνες). Τα ποντίκια αυτά διασταυρώθηκαν με τα TNF ^{Δ ARE/+} ποντίκια τα οποία υπερεκφράζουν τον TNF- α , ώστε να προκύψουν τα 5XTNF ^{Δ ARE/+} ποντίκια. Αυτά συγκρίθηκαν με 5XTNF^{+/+}, ώστε να εξεταστεί η επίδραση της υπερέκφρασης του TNF στο ζωικό μοντέλο της νόσου του Alzheimer.

Πρωταρχικό εύρημα αποτέλεσε η μείωση της εναπόθεσης των αμυλοειδών πλακών στον εγκέφαλο και κυρίως στον φλοιό των ποντικών, μετά από χρώση με ThioS, αλλά και ανοσοϊστοχημεία με το αντίσωμα 6E10, υποδεικνύοντας ίσως μια ευεργετική επίδραση της υπερέκφρασης του TNF- α . Η παρατήρηση αυτή μπορεί να εξηγείται από μείωση της APP πρωτεΐνης, από μειωμένη παραγωγή A β ή/και σχηματισμό πλακών. Συνεπώς, στη συνέχεια ελέγχθηκαν τα επίπεδα της APP πρωτεΐνης σε ολικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα εγκεφάλου, όπου

και δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Αντίστοιχα, δεν προέκυψαν στατιστικά σημαντικές αλλαγές ούτε στα επίπεδα των ενζύμων BACE1 και ADAM10, δηλαδή στα ένζυμα πέψης της APP. Έγινε λοιπόν κατανοητό πως η αλλαγή στον αριθμό των πλακών που παρατηρήθηκε δεν οφείλεται σε αλλαγή στα επίπεδα της APP ή του Αβ. Παράλληλα ελέγχθηκαν τα επίπεδα της TACE και ούτε σε αυτό το ένζυμο παρατηρήθηκαν διαφορές, συνεπώς τα επίπεδα του mRNA του TNF-α δεν επηρεάζουν τα επίπεδα του ενζύμου πέψης του.

Χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της ELISA προέκυψε το εύρημα, πως η συγκέντρωση του TNF-α στον εγκέφαλο δεν ήταν αυξημένη σε σχέση με τα ποντίκια που έχουν φυσιολογικά επίπεδα έκφρασης TNF-α, ενώ ήταν αυξημένη στην περιφέρεια. Αυτό το αποτέλεσμα οδηγεί στο συμπέρασμα πως η υπερέκφραση του mRNA του μ TNF-α, δεν συνεπάγεται και αύξηση της σύνθεσης της πρωτεΐνης στον εγκέφαλο. Παράλληλα οι IL-1β και η IL-10 παρουσίασαν μια αύξηση, που δεν ήταν ωστόσο στατιστικά σημαντική. Η τάση αυτή αύξησης, είναι ωστόσο, λογική καθώς η υπερέκφραση του TNF-α οδηγεί σε αυξημένη φλεγμονή, ενεργοποιώντας αντίστοιχα την προφλεγμονώδη κυτταροκίνη IL-1β, ενώ ταυτόχρονα ενεργοποιείται και η αντιφλεγμονώδης κυτταροκίνη IL-10, με σκοπό τη μείωση της παρατηρούμενης φλεγμονής.

Ακολούθως, ελέγχθηκε πως επηρεάζονται τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος του εγκεφάλου, και συγκεκριμένα τα αστροκύτταρα και τα μικρογλοιακά κύτταρα. Στα αστροκύτταρα, μετά από ανοσοϊστοχημεία και Western blot για το GFAP, δείκτη των αστροκυττάρων, δεν παρατηρήθηκε κάποια αλλαγή μεταξύ των δυο γκρουπ. Αντίθετα, στην ανοσοϊστοχημεία για το Iba1, δείκτη της μικρογλοίας, παρατηρήθηκε αύξηση των ενεργοποιημένων μικρογλοιακών κυττάρων και συσσώρευση τους γύρω από τις αμυλοειδείς πλάκες, ενώ η Western για το Iba1 έδειξε αντίστοιχη αύξηση των επιπέδων της μικρογλοίας. Συνεπώς, τα αποτελέσματα υποδεικνύουν πως η αύξηση του TNF-α της περιφέρειας επιδρά με σημαντικό τρόπο στο ανοσοποιητικό σύστημα του εγκεφάλου και κατά συνέπεια στον αμυλοειδή φαινότυπο, προκαλώντας μείωση των αμυλοειδών πλακών.

Τα συμπεράσματα αυτά συνάδουν με προηγούμενη μελέτη του εργαστήριου, όπου τα διαγονιδιακά ποντίκια 5XFAD/Tg197, που εκφράζουν τον ανθρώπινο TNF-α (huTNF-α) στην περιφέρεια και στον εγκέφαλο εμφανίζουν μειωμένη εναπόθεση αμυλοειδών πλακών και έντονη μικρογλοιακή ενεργοποίηση [56]. Σε αυτή τη μελέτη χορηγήθηκε στα ποντίκια αντί-huTNF-α αντίσωμα, το οποίο αναστέλλει μόνο τον TNF-α της περιφέρειας, και παρατηρήθηκε αύξηση της εναπόθεσης Αβ και μείωση της ενεργοποίησης της μικρογλοίας,

οδηγώντας στο συμπέρασμα πως ο huTNF-α της περιφέρειας ελέγχει τον φαινότυπο του εγκεφάλου [56].

Καταλήγουμε λοιπόν στο συμπέρασμα πως η υπερέκφραση του TNF-α στην περιφέρεια οδηγεί σε βελτίωση του αμυλοειδούς φαινοτύπου στο πειραματικό μας μοντέλο, επιδρώντας κυρίως στο ανοσοποιητικό σύστημα του εγκεφάλου και όχι στην παραγωγή ή αποικοδόμηση της APP.

Βιβλιογραφία

1. Selkoe DJ. Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev.* 2001 Apr;81(2):741-66.
2. Bekris LM, Yu CE, Bird TD, Tsuang DW. Genetics of Alzheimer disease. *J Geriatr Psychiatry Neurol.* 2010 Dec;23(4):213-27.
3. Eric R. Kandel JHS, Thomas M. Jessell. Βασικές Αρχές Νευροεπιστημών. Τέταρτη Αγγλική Έκδοση ed. Τετραπόλεως 14, Αθήνα: Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης; 2006.
4. Glenner GG, Wong CW. Alzheimer's disease and Down's syndrome: sharing of a unique cerebrovascular amyloid fibril protein. *Biochem Biophys Res Commun.* 1984 Aug 16;122(3):1131-5.
5. Glenner GG, Wong CW. Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commun.* 1984 May 16;120(3):885-90.
6. Selkoe D, Mandelkow E, Holtzman D. Deciphering Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2012 Jan;2(1):a011460.
7. Reitz C, Brayne C, Mayeux R. Epidemiology of Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol.* 2011 Mar;7(3):137-52.
8. Tomita, T., et al., The presenilin 2 mutation (N141I) linked to familial Alzheimer disease (Volga German families) increases the secretion of amyloid β protein ending at the 42nd (or 43rd) residue. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1997. 94(5): p. 2025-2030.
9. Murpy, M. and H. LeVine III, Alzheimer's disease and the β -amyloid peptide. *J Alzheimers Dis*, 2010. 19(1): p. 311-323.
10. Kimberly, W.T., et al., γ -Secretase is a membrane protein complex comprised of presenilin, nicastrin, Aph-1, and Pen-2. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2003. 100(11): p. 6382-6387.
11. Holtzman DM, Goate A, Kelly J, Sperling R. Mapping the road forward in Alzheimer's disease. *Sci Transl Med.* 2011 Dec 21;3(114):114ps48.
12. Scheuner, D., et al., Secreted amyloid β -protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease. *Nature medicine*, 1996. 2(8): p. 864-870.
13. Serrano-Pozo A, Frosch MP, Masliah E, Hyman BT. Neuropathological alterations in Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2011 Sep;1(1):a006189.

14. Masters, C.L., et al., Neuronal origin of a cerebral amyloid: neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease contain the same protein as the amyloid of plaque cores and blood vessels. *The EMBO journal*, 1985. 4(11): p. 2757.
15. Iba, M., et al., Synthetic tau fibrils mediate transmission of neurofibrillary tangles in a transgenic mouse model of Alzheimer's-like tauopathy. *Journal of Neuroscience*, 2013. 33(3): p. 1024-1037.
16. Braak H, Braak E. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol.* 1991;82(4):239-59.
17. van Bogaert, L. Cerebral amyloid angiopathy and Alzheimer's disease. in *Ciba Foundation Symposium-Alzheimer's Disease and Related Conditions*. 1970. Wiley Online Library.
18. Müller, U.C. and H. Zheng, Physiological functions of APP family proteins. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 2012. 2(2): p. a006288.
19. Daigle, I. and C.a.-. Li, *apl-1*, a *Caenorhabditis elegans* gene encoding a protein related to the human beta-amyloid protein precursor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1993. 90(24): p. 12045-12049.
20. Rosen, D.R., et al., A *Drosophila* gene encoding a protein resembling the human beta-amyloid protein precursor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1989. 86(7): p. 2478-2482.
21. Jacobsen, K.T. and K. Iverfeldt, Amyloid precursor protein and its homologues: a family of proteolysis-dependent receptors. *Cellular and molecular life sciences*, 2009. 66(14): p. 2299-2318.
22. Li, C., et al., Astrocytes: implications for neuroinflammatory pathogenesis of Alzheimer's disease. *Current Alzheimer Research*, 2011. 8(1): p. 67-80.
23. De Strooper, B., R. Vassar, and T. Golde, The secretases: enzymes with therapeutic potential in Alzheimer disease. *Nature Reviews Neurology*, 2010. 6(2): p. 99-107.
24. 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.
25. Lichtenthaler, S.F., C. Haass, and H. Steiner, Regulated intramembrane proteolysis—lessons from amyloid precursor protein processing. *Journal of neurochemistry*, 2011. 117(5): p. 779-796.
26. LaFerla, F.M. and S. Oddo, Alzheimer's disease: A β , tau and synaptic dysfunction. *Trends in molecular medicine*, 2005. 11(4): p. 170-176.

27. 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.
28. Bettegazzi, B., et al., β -Secretase activity in rat astrocytes: translational block of BACE1 and modulation of BACE2 expression. *European Journal of Neuroscience*, 2011. 33(2): p. 236-243.
29. Sato, T., et al., Active γ -secretase complexes contain only one of each component. *Journal of Biological Chemistry*, 2007. 282(47): p. 33985-33993.
30. Marr, R.A., et al., Neprilysin gene transfer reduces human amyloid pathology in transgenic mice. *Journal of Neuroscience*, 2003. 23(6): p. 1992-1996.
31. Zhao, L., et al., Insulin-degrading enzyme as a downstream target of insulin receptor signaling cascade: implications for Alzheimer's disease intervention. *Journal of Neuroscience*, 2004. 24(49): p. 11120-11126.
32. Miners, J.S., et al., Decreased expression and activity of neprilysin in Alzheimer disease are associated with cerebral amyloid angiopathy. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 2006. 65(10): p. 1012-1021.
33. Sun, B., et al., Cystatin C-cathepsin B axis regulates amyloid beta levels and associated neuronal deficits in an animal model of Alzheimer's disease. *Neuron*, 2008. 60(2): p. 247-257
34. Heneka, M.T. and M.K. O'Banion, Inflammatory processes in Alzheimer's disease. *Journal of neuroimmunology*, 2007. 184(1): p. 69-91.
35. Rubio-Perez, J.M. and J.M. Morillas-Ruiz, A review: inflammatory process in Alzheimer's disease, role of cytokines. *The Scientific World Journal*, 2012. 2012.
36. Li, Y., et al., Microglia in Alzheimer's disease. *BioMed research international*, 2014. 2014.
37. Brown, G.C. and J.J. Neher, Microglial phagocytosis of live neurons. *Nature Reviews Neuroscience*, 2014. 15(4): p. 209-216.
38. McCoy MK, Tansey MG. TNF signaling inhibition in the CNS: implications for normal brain function and neurodegenerative disease. *J Neuroinflammation*. 2008;5:45.
39. Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1975 Sep;72(9):3666-70.
40. Montgomery SL, Bowers WJ. Tumor necrosis factor-alpha and the roles it plays in homeostatic and degenerative processes within the central nervous system. *J Neuroimmune Pharmacol*. 2012 Mar;7(1):42-59.

41. Sriram K, O'Callaghan JP. Divergent roles for tumor necrosis factor-alpha in the brain. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2007 Jun;2(2):140-53.
42. McAlpine FE, Tansey MG. Neuroinflammation and tumor necrosis factor signaling in the pathophysiology of Alzheimer's disease. *J Inflamm Res.* 2008;1:29-39.
43. Collins JS, Perry RT, Watson B, Jr., Harrell LE, Acton RT, Blacker D, et al. Association of a haplotype for tumor necrosis factor in siblings with late-onset Alzheimer disease: the NIMH Alzheimer Disease Genetics Initiative. *Am J Med Genet.* 2000 Dec 4;96(6):823-30.
44. Li R, Yang L, Lindholm K, Konishi Y, Yue X, Hampel H, et al. Tumor necrosis factor death receptor signaling cascade is required for amyloid-beta protein-induced neuron death. *J Neurosci.* 2004 Feb 18;24(7):1760-71.
45. He P, Zhong Z, Lindholm K, Berning L, Lee W, Lemere C, et al. Deletion of tumor necrosis factor death receptor inhibits amyloid beta generation and prevents learning and memory deficits in Alzheimer's mice. *J Cell Biol.* 2007 Aug 27;178(5):829-41.
46. Liao YF, Wang BJ, Cheng HT, Kuo LH, Wolfe MS. Tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1beta, and interferon-gamma stimulate gamma-secretase-mediated cleavage of amyloid precursor protein through a JNK-dependent MAPK pathway. *J Biol Chem.* 2004 Nov 19;279(47):49523-32.
47. Kuo LH, Hu MK, Hsu WM, Tung YT, Wang BJ, Tsai WW, et al. Tumor necrosis factor-alpha-elicited stimulation of gamma-secretase is mediated by c-Jun N-terminal kinase-dependent phosphorylation of presenilin and nicastrin. *Mol Biol Cell.* 2008 Oct;19(10):4201-12.
48. Jiang H, He P, Xie J, Staufenbiel M, Li R, Shen Y. Genetic deletion of TNFR2 gene enhances the Alzheimer-like pathology in an APP transgenic mouse model via reduction of phosphorylated I κ B α . *Hum Mol Genet.* 2014 Sep 15;23(18):4906-18.
49. Montgomery SL, Mastrangelo MA, Habib D, Narrow WC, Knowlden SA, Wright TW, et al. Ablation of TNF-R1/R2 expression in Alzheimer's disease mice leads to an unexpected enhancement of pathology: implications for chronic pan-TNF-alpha suppressive therapeutic strategies in the brain. *Am J Pathol.* 2011 Oct;179(4):2053-70.
50. McAlpine FE, Lee JK, Harms AS, Ruhn KA, Blurton-Jones M, Hong J, et al. Inhibition of soluble TNF signaling in a mouse model of Alzheimer's disease prevents pre-plaque amyloid-associated neuropathology. *Neurobiol Dis.* 2009 Apr;34(1):163-77.
51. Shi JQ, Shen W, Chen J, Wang BR, Zhong LL, Zhu YW, et al. Anti-TNF-alpha reduces amyloid plaques and tau phosphorylation and induces CD11c-positive dendritic-like cell in the APP/PS1 transgenic mouse brains. *Brain Res.* 2011 Jan 12;1368:239-47.

52. Medeiros R, Prediger RD, Passos GF, Pandolfo P, Duarte FS, Franco JL, et al. Connecting TNF-alpha signaling pathways to iNOS expression in a mouse model of Alzheimer's disease: relevance for the behavioral and synaptic deficits induced by amyloid beta protein. *J Neurosci*. 2007 May 16;27(20):5394-404.
53. Chakrabarty P, Herring A, Ceballos-Diaz C, Das P, Golde TE. Hippocampal expression of murine TNFalpha results in attenuation of amyloid deposition in vivo. *Mol Neurodegener*. 2011;6:16.
54. Janelins MC, Mastrangelo MA, Park KM, Sudol KL, Narrow WC, Oddo S, et al. Chronic neuron-specific tumor necrosis factor-alpha expression enhances the local inflammatory environment ultimately leading to neuronal death in 3xTg-AD mice. *Am J Pathol*. 2008 Dec;173(6):1768-82.
55. Keffer, J., Probert, L., Cazlaris, H., Georgopoulos, S., Kaslaris, E., Kioussis, D., and Kollias, G. Transgenic mice expressing human tumour necrosis factor: a predictive genetic model of arthritis. *EMBO J*. 1991. 10, 4025–4031.
56. Evi Paouri, Ourania Tzara, Georgia-Ioanna Kartalou, Sofia Zenelak, Spiros Georgopoulos. Peripheral Tumor Necrosis Factor-Alpha (TNF- α) Modulates Amyloid Pathology by Regulating Blood-Derived Immune Cells and Glial Response in the Brain of AD/TNF Transgenic Mice. *The Journal of Neuroscience*, May 17, 2017. 37(20):5155–517.
57. Watson, B., Bell, Gann, Levine, Losick, Μοριακή Βιολογία Του Γονιδίου, 1η Ελληνική Έκδοση. 2008. p. 1109-1110.
58. Oakley, H., et al., Intraneuronal β -amyloid aggregates, neurodegeneration, and neuron loss in transgenic mice with five familial Alzheimer's disease mutations: potential factors in amyloid plaque formation. *Journal of Neuroscience*, 2006. 26(40): p. 10129-10140.
59. Ohno, M., et al., BACE1 gene deletion prevents neuron loss and memory deficits in 5XFAD APP/PS1 transgenic mice. *Neurobiology of disease*, 2007. 26(1): p. 134-145.
60. Caput, D., Beutler, B., Hartog, K., Thayer, R., Brown-Shimer, S., and Cerami, A. Identification of a common nucleotide sequence in the 3'-untranslated region of mRNA molecules specifying inflammatory mediators. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 1986. USA 83, 1670–1674.
61. Chen, C.Y., and Shyu, A.B. AU-rich elements: characterization and importance in mRNA degradation. *Trends Biochem. Sci*. 1995. 20, 465–470.
62. Chen, C.Y., Del Gatto-Konczak, F., Wu, Z., and Karin, M. Stabilization of interleukin-2 mRNA by the c-Jun NH2-terminal kinase pathway. *Science* 280, 1998. 1945–1949.

63. Kruys, V., Thompson, P., and Beutler, B. Extinction of the tumor necrosis factor locus, and of genes encoding the lipopolysaccharide signaling pathway. *J. Exp. Med.* 1993. 177, 1383–1390.
64. Collart, M.A., Baeuerle, P., and Vassalli, P. Regulation of tumor necrosis factor alpha transcription in macrophages: involvement of four kappa B-like motifs and of constitutive and inducible forms of NF-kappa B. *Mol. Cell. Biol.* 1990 10, 1498–1506.
65. Goldfeld, A.E., Strominger, J.L., and Doyle, C. Human tumor necrosis factor alpha gene regulation in phorbol ester stimulated T and B cell lines. *J. Exp. Med.* 1991. P.174, 73–81.
66. Han, J., Brown, T., and Beutler, B. Endotoxin-responsive sequences control cachectin/tumor necrosis factor biosynthesis at translational level. *J. Exp. Med.* 1990. 171, 465–475.
67. Vassalli, P. The pathophysiology of tumor necrosis factors. *Annu. Rev. Immunol.* 1992. 10, 411–452.
68. van Deventer, S.J. Tumour necrosis factor and Crohn's disease. *Gut* 1997. 40, 443–448.
69. Elliott, M.J., Maini, R.N., Feldmann, M., Long-Fox, A., Charles, P., Bijl, H., and Woody, J.N. Repeated therapy with monoclonal antibody to tumour necrosis factor alpha (cA2) in patients with rheumatoid arthritis. *Lancet* 1994. 344, 1125–1127.
70. Targan, S.R., Hanauer, S.B., van Deventer, S.J., Mayer, L., Present, D.H., Braakman, T., DeWoody, K.L., Schaible, T.F., and Rutgeerts, P.J. A short-term study of chimeric monoclonal antibody cA2 to tumor necrosis factor alpha for Crohn's disease. Crohn's disease cA2 study group. *N. Engl. J. Med.* 1997. 337, 1029–1035.
71. Jacob, C.O., Lee, S.K., and Strassmann, G. Mutational analysis of TNF-alpha gene reveals a regulatory role for the 3'- untranslated region in the genetic predisposition to lupus-like autoimmune disease. *J. Immunol.* 1996. 156, 3043–3050.
72. Dimitris Kontoyiannis, Manolis Pasparakis, Theresa T. Pizarro,† Fabio Cominelli, George Kollias. Impaired On/Off Regulation of TNF Biosynthesis in Mice Lacking TNF AU-Rich Elements: Implications for Joint and Gut-Associated Immunopathologies. *Immunity*, 1999. Vol. 10, 387–398,
73. Weiming Xia HX. *Amyloid Precursor Protein: A Practical Approach*. Florida: CRC PRESS; 2005.
74. Furukawa K, Mattson MP. The transcription factor NF-kappaB mediates increases in calcium currents and decreases in NMDA- and AMPA/kainate-induced currents induced by tumor necrosis factor-alpha in hippocampal neurons. *J Neurochem.* 1998 May;70(5):1876-86.

75. Barger SW, Horster D, Furukawa K, Goodman Y, Kriegstein J, Mattson MP. Tumor necrosis factors alpha and beta protect neurons against amyloid beta-peptide toxicity: evidence for involvement of a kappa B-binding factor and attenuation of peroxide and Ca²⁺ accumulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 Sep 26;92(20):9328-32.
76. Oakley, H., et al., Intraneuronal β -amyloid aggregates, neurodegeneration, and neuron loss in transgenic mice with five familial Alzheimer's disease mutations: potential factors in amyloid plaque formation. *Journal of Neuroscience*, 2006. 26(40): p. 10129-10140.
77. Sesele K, Thanopoulou K, Paouri E, Tsefou E, Klinakis A, Georgopoulos S. Conditional inactivation of nicastrin restricts amyloid deposition in an Alzheimer's disease mouse model. *Aging Cell*. 2013 Dec;12(6):1032-40.
78. Thomaw J. Kindt, R.A.G., Barbara A. Osborne, Kuby *Ανοσολογία*, 2η Ελληνική Έκδοση. 2013. p. 187-192.