



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑΤΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ- ΧΗΜΕΙΑΣ- ΝΟΣΗΛΕΥΤΙΚΗΣ

ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ
«ΚΛΙΝΙΚΗ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ-ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ»

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

ΘΕΜΑ:

**«Ανίχνευση απλοτύπου H1 στο *MAPT* γονίδιο και επαλήθευση
μεθόδου μέτρησης βιοδεικτών σε βιολογικά υγρά ασθενών με άνοιες»**

ΜΥΛΩΝΑ ΑΡΙΣΤΕΑ

ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΑΘΗΝΑ

2024



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑΤΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ- ΧΗΜΕΙΑΣ- ΝΟΣΗΛΕΥΤΙΚΗΣ

ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

«ΚΛΙΝΙΚΗ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ-ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ»

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

ΘΕΜΑ:

**«Ανίχνευση απλοτύπου H1 στο *MAPT* γονίδιο και επαλήθευση
μεθόδου μέτρησης βιοδεικτών σε βιολογικά υγρά ασθενών με άνοιες»**

ΜΥΛΩΝΑ ΑΡΙΣΤΕΑ

ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΑΘΗΝΑ

2024

**ΘΕΜΑ: «Ανίχνευση απλοτύπου H1 στο *MART* γονίδιο και
επαλήθευση μεθόδου μέτρησης βιοδεικτών σε βιολογικά υγρά
ασθενών με άνοιες»**

ΜΥΛΩΝΑ ΑΡΙΣΤΕΑ

A.M.: 7113062100015

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:

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

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

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

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

Παπαγεωργίου Σωκράτης, Καθηγητής Νευρολογίας– Νευροψυχολογίας,
Ιατρική Σχολή, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

ΠΡΟΛΟΓΟΣ-ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

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

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

Ευχαριστώ επίσης τη Διευθύντρια κα. Μουτσάτσου - Λαδικού Παρασκευή και τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου Κλινικής Βιοχημείας του ΑΤΤΙΚΟΝ Π.Γ.Ν για τη φιλοξενία στο εργαστήριο και τη συνεχή βοήθεια τους, όποτε τη χρειαζόμουν.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή κ. Σωκράτη Παπαγεωργίου (Νευρολογικές Κλινικές ΕΚΠΑ) για τη σημαντική βοήθειά του στη συλλογή των δειγμάτων και στην εκπαίδευσή μου στο αντικείμενο των ανοιγών καθώς και τους συνεργάτες του Ιωάννη Παπατριανταφύλλου και Βίκυ Παπαστεφανοπούλου.

Ευχαριστώ ιδιαίτερα τη δρ. Άννα Παπαδοπούλου, ΕΔΙΠ του εργαστηρίου Κλινικής Βιοχημείας του ΑΤΤΙΚΟΝ Π.Γ.Ν, και την τεχνολόγο Ελένη Καλαμπόκα για την εκπαίδευση και παροχή βοήθειας στο Γενετικό Αναλυτή SeqStudio (Applied Biosystems), καθώς και τις Μεταπτυχιακές φοιτήτριες Ναταλία Πετρή, Αντιγόνη Πουλοπούλου και Χρύσα Τσίγγκα για την υποστήριξη και τη συνεργασία στο τμήμα Νευροβιοχημείας - Μοριακής Διαγνωστικής του ΑΤΤΙΚΟΝ Π.Γ.Ν.

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

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<u>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</u>	1
<u>ABSTRACT</u>	4
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ	7
A. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	10
1. ΝΕΥΡΟΕΚΦΥΛΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΝΕΥΡΟΕΚΦΥΛΙΣΤΙΚΕΣ ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ.....	10
1.1. Εισαγωγή στις νευροεκφυλιστικές ασθένειες – άνοιες.....	10
1.2. Νόσος Alzheimer's(AD).....	12
1.3. Μετωποκροταφική άνοια(FTD).....	15
1.3.1. Κλινική εικόνα της FTD.....	16
1.3.2. Πρωτεϊνοπάθειες της FTD.....	18
FTLD-TAU.....	18
FTLD-TDP.....	23
FTLD-FUS.....	25
FTLD-UPS.....	26
1.3.3. Γενετική βάση της FTD.....	27
<i>MAPT</i> γονίδιο.....	28
<i>PGRN</i> γονίδιο.....	32
<i>C9orf72</i> γονίδιο.....	33
<i>TARDBP</i> γονίδιο.....	34
1.4. ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΙ ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ ΣΤΙΣ ΑΝΟΙΕΣ.....	35
1.4.1. Βιοδείκτες στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό (ENY).....	35
2. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΥΠΟΒΑΘΡΟ ΜΕΘΟΔΩΝ.....	39
2.1. Συμβατική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	39
2.2. DNA ηλεκτροφόρηση σε γέλη αγαρόζης.....	40
2.3. Αντίδραση θερμικών κύκλων (cycle sequencing).....	41
2.4. Ανάλυση της αλληλουχίας DNA (DNA Sequencing).....	42
2.5. MLPA μεθοδολογία.....	43
2.6. Ανοσοενζυμική μέθοδος στο πλάσμα (ELISA).....	45

2.7.	<i>APOE</i> γονοτύπηση με real time qPCR – Melting Curve Analysis	48
2.7.1.	LightCycler 480II (RT-PCR).....	48
2.7.2.	Melting Curve Analysis.....	49
2.8.	Electrochemiluminescence Immunoassay (ECLIA).....	50
2.8.1.	Προσδιορισμός του β-αμυλοειδούς πεπτιδίου (αβ42).....	51
2.8.2.	Προσδιορισμός της total tau.....	52
2.8.3.	Προσδιορισμός της p-tau181.....	53
	ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	55
	B. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	56
3.	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	56
3.1.	Ασθενείς FTD.....	56
3.2.	Ασθενείς με άνοιες για μέτρηση βιοδεικτών.....	58
3.3.	Απομόνωση γενωμικού DNA.....	59
3.4.	Ποσοτικός προσδιορισμός του DNA.....	62
3.5.	Οργανολογία.....	64
3.6.	Επιλογή εκκινητών του γονιδίου <i>MAPT</i> για τη συμβατική PCR.....	65
3.7.	DNA ηλεκτροφόρηση σε γέλη αгарόζης.....	67
3.8.	Καθαρισμός PCR προϊόντων.....	68
3.9.	Αντίδραση θερμικών κύκλων.....	71
3.10.	Καθαρισμός cycle sequencing προϊόντων.....	72
3.11.	Ανάλυση της αλληλουχίας DNA.....	73
3.12.	MLPA (Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification)	78
3.13.	<i>APOE</i> γονοτύπηση.....	83
3.14.	Ανοσοενζυμική μέθοδος για τον προσδιορισμό αβ42, ολικής tau και p-tau181 στο ENY (ELISA).....	88
3.15.	Μέθοδος ECLIA για την μέτρηση των αβ42, total tau και p-tau181, αναλυτής Elecsys, Roche.....	92
3.15.1.	Προσδιορισμός του αβ42.....	92
3.15.2.	Προσδιορισμός της total tau.....	92

3.15.3.	Προσδιορισμός της p-tau181.....	93
3.16.	Βιοπληροφορική ανάλυση αποτελεσμάτων με ειδικά λογισμικά.....	94
4.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	99
4.1.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ <i>MAPT</i> ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΣΕ FTD ΑΣΘΕΝΕΙΣ – ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ Η1 ΑΠΛΟΤΥΠΟΥ.....	99
4.1.1.	Αποτελέσματα συμβατικής PCR και ηλεκτροφόρησης σε γέλη αγαρόζης 1% w/v.....	99
4.1.2.	Αποτελέσματα αλληλούχισης DNA στο γονίδιο <i>MAPT</i>	101
4.1.2.1.	Εξώνιο 3.....	102
4.1.2.2.	Εξώνιο 4.....	103
4.1.2.3.	Εξώνιο 9.....	104
4.1.2.4.	Εξώνιο 10.....	105
4.1.2.5.	Εξώνιο 12.....	107
4.1.3.	Αποτελέσματα MLPA στο <i>MAPT</i> γονίδιο.....	108
4.1.4.	Σύνοψη αποτελεσμάτων - Ανίχνευση Η1 απλοτύπου.....	111
4.2.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΕΠΑΛΗΘΕΥΣΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΜΕΤΡΗΣΗΣ ΒΙΟΔΕΙΚΤΩΝ.....	112
4.2.1.	Υπολογισμός επαναληψιμότητας.....	115
4.2.2.	Υπολογισμός αναπαραγωγιμότητας, μεροληψίας, ολικού σφάλματος.....	116
4.2.3.	Έλεγχος ορθότητας μέσω υπολογισμού ανάκτησης.....	117
4.2.4.	Έλεγχος ορθότητας μέσω εξωτερικού ελέγχου ποιότητας (EQA).....	117
4.2.5.	Στατιστική ανάλυση παραμέτρων αβ42, total tau και p-tau181 για FUJIREBIO και ROCHE – Σύγκριση μεθόδων.....	120
5.	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	128
5.1.	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ <i>MAPT</i> ΑΝΑΛΥΣΗΣ FTD ΕΛΛΗΝΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ ΚΑΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ Η1 ΑΠΛΟΤΥΠΟΥ.....	128

5.2.	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΕΠΑΛΗΘΕΥΣΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΜΕΤΡΗΣΗΣ	
	ΒΙΟΔΕΙΚΤΩΝ ΣΕ ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΥΓΡΑ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΑΝΟΙΕΣ..	133
	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	141

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ανίχνευση απλοτύπου H1 στο *MAPT* γονίδιο σε βιολογικά υγρά ασθενών με άνοιες

Εισαγωγή – Σκοπός: Η μετωποκροταφική άνοια (Frontotemporal Dementia, FTD) μπορεί να είναι είτε οικογενής (30-50%) είτε σποραδική και είναι το ίδιο συχνή με την νόσο Alzheimer's σε άτομα ηλικίας <65 ετών. Μεταξύ των πολλών γονιδίων που ενέχονται στη νόσο είναι και το γονίδιο *MAPT* (microtubule – associated protein tau) το οποίο μεταγράφεται σε 3R/4R ισομορφές, αναλόγως εάν περιέχει τρεις ή τέσσερις επαναλήψεις των περιοχών δέσμησης των μικροσωληνίσκων. Μεταλλάξεις στο γονίδιο *MAPT* ή διατάραξη της φυσιολογικής αναλογίας 1:1 των 3R/4R ισομορφών -και κατά συνέπεια της ισορροπίας των μικροσωληνίσκων των νευρικών κυττάρων- οδηγούν σε FTD. Σκοπός της εργασίας ήταν η ανάπτυξη μεθοδολογίας ανίχνευσης *MAPT* DNA παραλλαγών σε Έλληνες FTD ασθενείς με τις μεθοδολογίες DNA Sequencing και MLPA, η σύγκριση των αποτελεσμάτων με NGS συνεργαζόμενου εργαστηρίου και η αξιολόγηση των ευρημάτων σε FTD ασθενείς.

Υλικά και μέθοδοι: Αρχικά απομονώθηκε DNA με High Pure Template Kit (Roche) από περιφερικό αίμα 20 FTD Ελλήνων ασθενών, μετά από έγγραφη ενημερωμένη συγκατάθεσή τους. Πραγματοποιήθηκε σχεδιασμός ειδικών εκκινητών για την DNA ενίσχυση και αλληλούχιση 11 εξωνίων. Μετά την PCR ενίσχυση, ακολούθησε Cycle Sequencing (Big Dye Terminator v3.1) και ηλεκτροφόρηση των τελικών προϊόντων στον SeqStudio γενετικό αναλυτή (Thermo ABI). Επίσης, η MLPA μέθοδος πραγματοποιήθηκε για την ανίχνευση τυχόν μεγάλων DNA αναδιατάξεων (MRC Holland). Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν με τα προγράμματα Chromas, NovoSNP και Coffalyzer.

Αποτελέσματα: Στη σύγκριση αποτελεσμάτων μεταξύ των δύο εργαστηρίων παρατηρήθηκε σχεδόν πλήρης ταύτιση. Στα 10 από τα 20 δείγματα, ανιχνεύθηκαν οι ίδιες 5 καλοήθειες παραλλαγές. Οι 2 από αυτές είναι ιντρονικές (rs75242405-rs1800547) και οι 3 είναι συνώνυμες εξωνικές (rs1052551-rs1052553-rs17652121). Οι τέσσερις από τους πέντε πολυμορφισμούς αποτελούν μέρος του απλοτύπου H1.

Συμπεράσματα: Η επαλήθευση της αναπτυχθείσας μεθόδου για την ανίχνευση των *MAPT* παραλλαγών κρίνεται ικανοποιητική. Στο 50% των FTD ασθενών ανιχνεύθηκε ο *MAPT* H1

απλότυπος ο οποίος συνδέεται με αυξημένη έκφραση της 4R ισομορφής η οποία δεσμεύεται πιο ισχυρά στους μικροσωληνίσκους. Η ανάλυση περισσότερων δειγμάτων FTD Ελλήνων ασθενών θα βοηθούσε ώστε να αποκαλυφθεί επακριβώς ο ρόλος του απλοτύπου H1 στην ανάπτυξη υποτύπων της νόσου (π.χ. άτυπες παρκινσονικές μορφές).

Επαλήθευση μεθόδου μέτρησης βιοδεικτών σε βιολογικά υγρά ασθενών με άνοιες

Εισαγωγή: Οι πρωτεΐνες του Εγκεφαλονωτιαίου Υγρού (ENY), β-αμυλοειδές (αβ42), ολική tau και φωσφορυλιωμένη tau (p-tau181), αποτελούν σήμερα αξιόπιστους βιοδείκτες για την ανίχνευση αμυλοειδικών πλακών, νευροεκφυλισμού και συσσωματωμάτων tau πρωτεΐνης που οδηγούν σε νευροϊνιδιακά δεμάτια σύμφωνα με την ταξινόμηση AT(N) 2018 των νευροεκφυλιστικών ανοιών. Η αυτοματοποίηση τέτοιων ανοσοχημικών μετρήσεων θα οδηγήσει σε αύξηση της ακρίβειας των μεθόδων και της ευρύτερης χρήσης τους σε παγκόσμιο επίπεδο.

Υλικά και μέθοδοι: Συλλέχθηκαν 27 δείγματα ENY από ασθενείς που ανήκουν στο φάσμα του νευροεκφυλισμού (Νόσος Alzheimer, Μετωποκροταφική άνοια κτλ.) και αναλύθηκαν στη συνέχεια για τους ανωτέρω βιοδείκτες τόσο με τη μέθοδο αναφοράς ELISA (Innotest Fujirebio), όσο και με τα νέα CE-IVD αντιδραστήρια της Roche για τον αυτόματο αναλυτή Elecsys. Ένα δείγμα εξωτερικού ελέγχου ποιότητας, συμπεριλήφθηκε επίσης.

Αποτελέσματα: Οι νέες μέθοδοι της Roche, είναι εύκολες στην εφαρμογή τους, ταχείες (τα αποτελέσματα δίνονται μέσα σε 18 λεπτά σε σύγκριση με τις 20 ώρες της χειροκίνητης ELISA) και παρουσιάζουν εξαιρετικά αποτελέσματα πιστότητας (εξαιρετικά χαμηλός συντελεστής μεταβλητότητας τόσο στα χαμηλά όσο και στα υψηλά δείγματα ελέγχου CV% <5% σε σύγκριση με το 8-12% της ELISA). Στατιστικές αναλύσεις συσχέτισης (correlation), παλινδρόμησης (regression) και συμφωνίας (concordance) πραγματοποιήθηκαν για κάθε μία από τις παραμέτρους, από όπου προέκυψαν οι ακόλουθες εξισώσεις: α) $\alpha\beta 42_{Roche} = 1,18 \times \alpha\beta 42_{Fujirebio} - 94$ ($r=0,91$, συμφωνία 70%), β) $\text{ολική tau}_{Roche} = 0,65 \times \text{ολική tau}_{Fujirebio} + 7$ ($\rho=0,87$, συμφωνία 96%) και γ) $p\text{-tau}181_{Roche} = 0,56 \times p\text{-tau}181_{Fujirebio} - 9$ ($\rho=0,93$, συμφωνία 81%). Για να είναι δίκαιη η σύγκριση μεθόδων, ο διαχωρισμός του φυσιολογικού από το μη-φυσιολογικό αποτέλεσμα (normal/abnormal), πραγματοποιείται με τη βοήθεια των cut-offs ορίων της βιβλιογραφίας για τη Fujirebio (550, 375, 52 pg/ml για αβ42, ολική tau και p-tau181 αντίστοιχα, αν και ο

κατασκευαστής προτείνει και διαχωρισμό με βάση την ηλικία) και για τη Roche 800, 300, 27 pg/ml αντίστοιχα (προτεινόμενα από τη Roche εκτός του cut-off του αβ42, το οποίο αυθαίρετα μετατράπηκε από 1000 σε 800 pg/ml ώστε να βελτιωθεί η συμφωνία των δύο μεθόδων).

Συμπεράσματα: Οι δύο μέθοδοι παρέχουν στατιστικά σχετιζόμενα αποτελέσματα για τις παραμέτρους ολική tau και p-tau181· το cut-off που παρέχει η Roche για την ολική tau είναι κατάλληλο για τον διαχωρισμό των περιπτώσεων, ενώ το όριο της p-tau181 χρειάζεται μικρή βελτίωση για να αυξηθεί η συμφωνία των μεθόδων. Οι τιμές του αβ42, φαίνεται να συγκλίνουν στην αποδεκτή συσχέτιση και ισοδυναμία, παρόλα αυτά, η τιμή των ορίων και για τις δύο μεθόδους χρειάζεται επανεξέταση καθώς πρέπει να ληφθεί υπόψιν το νέο πιστοποιημένο υλικό αναφοράς. Παρόλα αυτά η τελική και ορθή ταξινόμηση των περιπτώσεων άνοιας με βάση τους βιοδείκτες ENY θα πρέπει να γίνεται σε συνδυασμό με την κλινική εικόνα του ασθενούς και την παρακολούθησή τους. Επιβάλλεται η συνεχής προσπάθεια προς βελτίωση της μέτρησης αυτών των παραμέτρων, με σκοπό την τυποποίηση και εναρμόνιση των μεθόδων σε παγκόσμια κλίμακα.

ABSTRACT

Detection of H1 haplotype in *MAPT* gene in biological fluids of dementia patients

Introduction: Frontotemporal Dementia (FTD) may be either familial (30-50%) or sporadic and is as common as Alzheimer's in people <65 years old. Among the many genes involved in the disease, is the *MAPT* gene (microtubule-associated protein tau) which is transcribed into 3R/4R protein isoforms, depending on whether they contain 3 or 4 repeats of microtubule binding domains. *MAPT* gene mutations or disturbance of the normal 1:1 ratio of 3R/4R isoforms -and consequently the microtubule balance of nerve cells- leads to FTD. The purpose of this study is the development of methodology for detection *MAPT* DNA mutations in Greek FTD patients with DNA Sequencing and MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification), comparison of the results with NGS method of another collaborating laboratory abroad and evaluation of findings in FTD patients.

Patients and methods: In 20 well-ascertained FTD patients, EDTA blood was collected after obtaining their informed signed consent. DNA isolation was performed with the High Pure PCR Template Kit (Roche). Specific primers were designed for DNA amplification and sequencing of the amplicons of 11 *MAPT* exons. Then cycle sequencing (Big Dye Terminator v3.1) and electrophoresis of the purified products in the SeqStudio genetic analyzer (Thermo ABI) was executed. Also, MLPA methodology was performed in all samples to detect large rearrangements of the *MAPT* gene (MRC Holland). Results were analyzed with bioinformatics software Chromas, NovoSNP and Coffalyzer.

Results: Agreement between the two laboratories was largely found. The same 5 benign polymorphisms were detected in 10/20 samples. Two of them are intronic (rs75242405, rs1800547) and three of them are synonymous exonic (rs1052551, rs1052553, rs17652121). Four of these five polymorphisms belong to the H1 haplotype.

Conclusions: The verification of the developed method for detection of *MAPT* alterations is considered satisfactory. In 50% of the FTD patients, the *MAPT* H1 haplotype was detected. It has been correlated with increased expression of 4R isoforms that bind more tightly to microtubules. The analysis of more Greek FTD patients, would assist investigating the role of

the H1 haplotype in the development of subtypes of the disease (e.g. presentation with atypical Parkinsonian syndromes).

Method Verification for the measurement of biomarkers in biological fluids of dementia patients

Objectives. CSF proteins amyloid beta (ab42), total tau and p-tau181 are now considered reliable biomarkers of amyloid plaque formation, neurodegeneration and tau aggregation resulting in neurofibrillar tangles according to the recent AT(N) 2018 classification of neurodegenerative dementias. The automation of these immunochemical measurements will increase both accuracy and widespread application.

Materials and Methods. 27 CSF samples from patients from the neurodegenerative spectrum (Alzheimer's disease, Frontotemporal Dementia etc.) were analyzed for the aforementioned CSF biomarkers with the gold-standard Innotech ELISA methods from Fujirebio and in parallel, with the new CE-IVD Roche reagents that employ the Elecsys automated platform. An external quality assessment sample was also included.

Results. The new Roche reagents are easy to implement, rapid (results within 18 min compared to 20 hours for the ELISA manual procedures) and showed excellent precision results (CV% of internal low- and high-quality controls <5% compared to 8-12% for ELISA). Regression, correlation, and concordance statistical analysis showed the following results: a) $ab42_{Roche} = 1.18 \times ab42_{Fujirebio} - 94$ ($r=0.91$, concordance 70%), b) $total\ tau_{Roche} = 0.65 \times total\ tau_{Fujirebio} + 7$ ($\rho=0.87$, concordance 96%) c) $p\text{-}tau181_{Roche} = 0.56 \times p\text{-}tau181_{Fujirebio} - 9$ ($\rho=0.93$, concordance 81%). For a fair method comparison to be performed, normal/abnormal result concordance was evaluated according to literature universal cut-offs for Fujirebio (550, 375, 52 pg/ml for ab42, total tau, p-tau181 although the manufacturer provides age-specific cut-offs) and for Roche 800, 300, 27 pg/ml correspondingly (as suggested by Roche except for the ab42, that was changed arbitrarily from 1000 to 800 pg/ml to improve concordance).

Conclusions. Our results showed high correlation for the total tau and p-tau181 methods; the Roche total tau cut-off seems appropriate for correct classification of the cases and the Roche p-tau181 cut-off needs slight adjustment for the concordance to improve. Ab42 values seem to converge with acceptable correlation and equivalence but the cut-off value of the two methods need to be re-examined considering the new certified ab42 reference material. Final and correct adjudication of the dementia cases according to CSF biomarkers should include clinical

examination and patient monitoring. Efforts for standardization and harmonization of methods for these CSF parameters should continue worldwide.

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

AD	Alzheimer's Disease
ALS	Amyotrophic Lateral Sclerosis
APOE	Apolipoprotein E gene
ApoE2/3/4	Apolipoprotein E2/3/4
APP	Amyloid Precursor Protein
Aβ 1-38 / 1-40 / 1-42	Amyloid peptide β 1-38 / 1-40 / 1-42
bvFTD	Behavioral variant of Frontotemporal Dementia
C9orf72	Chromosome 9 open reading frame 72
Cas 3	Caspase 3
CBD	Corticobasal Degeneration
CBS	Corticobasal Syndrome
CNS	Central Nervous System
CSF	Cerebrospinal Fluid
CTFs	Carboxy-Terminal Fragments
ddNTPs	Dideoxynucleotide Triphosphates
dNTPs	DeoxyNucleotide Triphosphates
ECLIA	Electrochemiluminescence Immunoassay
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EOAD	Early Onset Alzheimer's Disease
EWS	Ewing's Sarcoma protein
FDA	Food & Drug Administration (US)
FET	FUS/EWS/TLS protein family
FTD	Frontotemporal Dementia
FTD-C9orf72	Frontotemporal Dementia caused by <i>C9orf72</i> expansion
FTD-GRN	Frontotemporal Dementia caused by <i>GRN</i> mutations
FTD-MAPT	Frontotemporal Dementia caused by <i>MAPT</i> mutations
FTDP-17	Frontotemporal Dementia and Parkinsonism linked to chromosome 17
FTLD	Frontotemporal Lobar Degeneration
FTLD-FUS	Frontotemporal Degeneration of FUS (+) pathology
FTLD-TAU	Frontotemporal Degeneration of TAU (+) pathology
FTLD-TDP	Frontotemporal Degeneration of TDP-43 (+) pathology
FTLD-U	Frontotemporal Degeneration of ubiquitin (+) pathology
FTLD-UPS (Aftld-U)	Frontotemporal Degeneration of ubiquitin/proteasome system (+) pathology (Atypical FTLD)
FUS	Fused in Sarcoma protein – gene
fvFTD	Frontal variant of Frontotemporal Dementia
GEMs	Granulin/Epithelin Modules
GEP	Granulin/Epithelin Precursor
GSK3-β	Glycogen Synthase Kinase-3 β
GWAS	Genome Wide Association Study

IBMPFD	Inclusion Body Myopathy with early-onset Paget disease and Frontotemporal dementia
IFCC	International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine
LOAD	Late Onset Alzheimer's Disease
LPA	Logopenic Progressive Aphasia
lvPPA	Logopenic variant of Primary Progressive Aphasia
MAO-A / B	Monoamino Oxidase A / B
MAPT	Microtubule-Associated Protein TAU gene
MCI	Mild Cognitive Impairment
MLPA	Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification
MND	Motor Neuron Disease
MRI	Magnetic Resonance Imaging
MT	Microtubule
MTB	Microtubule Binding
MTBDs/MBDs	Microtubule Binding Domains
MTBR	Microtubule Binding Region
mTORC1	mammalian Target of Rapamycin Complex 1
NCI	Neuronal Cytoplasmic Inclusions
NFTs	Neurofibrillary Tangles
nfvPPA	Nonfluent variant of Primary Progressive Aphasia
NGS	Next Generation Sequencing
NII	Neuronal Intranuclear Inclusions
Nrf2	Nuclear factor erythroid 2 (NFE2)-related factor 2
NTFs	Amino (NH ₂) -Terminal fragments
PCR	Polymerase Chain Reaction
PD	Parkinson's Disease
PET	Positron Emission Tomography
PGRN/GRN	Progranulin/Granulin gene-protein
PHFs	Paired Helical Filaments
PiD	Pick's Disease
PNFA	Progressive Nonfluent Aphasia
PNS	Peripheral Nervous System
PP1	Protein Phosphatase 1
PR3	Proteinase 3
PSEN 1 / 2	Presenilin 1 / 2 gene
PSF	Protein-associated Splicing Factor
PSP	Progressive Supranuclear Palsy
PTAU	Phosphorylated TAU
qPCR	Quantitative PCR
RRM1 / 2	RNA Recognition Motif domain 1 / 2
RT-PCR	Reverse Transcription PCR
Ru(bpy) ₃ ²⁺	τρις(διπυριδύλ)-ρουθηνίου

SD	Semantic Dementia
SOP	Standard Operating Procedures
SORT1	Sortilin
svPPA	Semantic variant of Primary Progressive Aphasia
TAF15	TATA-binding protein-associated Factor 2N
TARDBP	Transactive Response DNA Binding Protein 43 gene
TDP-43	Transactive response-DNA binding protein-43
TGF- β	Transforming Growth Factor β
T _m	Melting Temperature
TNFR 1 / 2	Tumor Necrosis Factor Receptor 1 / 2
TNF- α	Tumor Necrosis Factor α
TPA	Tripropylamine
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethane
TRN1	Transportin 1
T-TAU	Total TAU
U (Ub)	Ubiquitin
UPS	Ubiquitin-Proteasome System
VCP	Valosin Containing Protein gene
VUS	Variant of Unknown Significance
WES	Whole Exome Sequencing
WGS	Whole Genome Sequencing
WM	White Matter
WT	Wild Type

A. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΝΕΥΡΟΕΚΦΥΛΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΝΕΥΡΟΕΚΦΥΛΙΣΤΙΚΕΣ ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ

1.1 Εισαγωγή στις νευροεκφυλιστικές ασθένειες - άνοιες

Ο Νευροεκφυλισμός, αποτελεί μία περίπλοκη ευρεία έννοια που χρησιμοποιείται για να περιγράψει κάθε παθολογική κατάσταση του νευρικού συστήματος, στην οποία παρουσιάζεται προοδευτική απώλεια δομής ή λειτουργίας των νευρικών κυττάρων.

Οι νευροεκφυλιστικές ασθένειες αποτελούν μια μεγάλη ομάδα νευρολογικών διαταραχών με ετερογενείς κλινικές και παθολογικές εκφράσεις, που επηρεάζουν συγκεκριμένες περιοχές του κεντρικού νευρικού συστήματος, οδηγώντας σε βαθμιαίες γνωστικές ή κινητικές δυσλειτουργίες, ανάλογα με τον τύπο των νευρικών κυττάρων που υποβάλλονται σε εκλεκτικό εκφυλισμό, κυτταρικό θάνατο ή/και νέκρωση στην εκάστοτε παθολογία. Οι νευρώνες κατά κανόνα δεν αναπαράγονται και δεν ανανεώνονται, επομένως εάν υποστούν βλάβη ή εάν νεκρωθούν δεν μπορούν να αντικατασταθούν από τον οργανισμό κάτι που ενισχύει την επικινδυνότητα των συγκεκριμένων παθολογιών. Οι νευροεκφυλιστικές ασθένειες περιλαμβάνουν πολύπλοκες πολυπαραγοντικές παθολογίες, όπως η νόσος Alzheimer (AD), η νόσος Parkinson (PD), η μετωποκροταφική άνοια (FTD), η αμυοτροφική πλευρική σκλήρυνση (ALS) και διαταραχές, όπως οι νόσοι prion, για τις οποίες κληρονομικές, σποραδικές και μεταδιδόμενες μορφές είναι γνωστές.

Οι νευροεκφυλιστικές παθολογίες είναι διαταραχές που συνδέονται στενά με την ηλικία, καθιστώντας τις έτσι ένα αυξανόμενο πρόβλημα υγειονομικού και κοινωνικο-οικονομικού χαρακτήρα στις βιομηχανικές χώρες όπου η συχνότητά τους έχει αυξηθεί τις τελευταίες δεκαετίες, σε συνδυασμό με μια αύξηση στο προσδόκιμο ζωής των ατόμων [1].

Παράγοντες κινδύνου πέραν της αυξανόμενης ηλικίας και συγκεκριμένων γενετικών παθολογικών μεταλλάξεων ή πολυμορφισμών, αποτελούν το φύλο, η χαμηλού επιπέδου εκπαίδευση, το κάπνισμα, η υπέρταση, ο διαβήτης, η κατάθλιψη, οι λοιμώξεις και οι φλεγμονές, τα εγκεφαλικά επεισόδια, οι όγκοι και οι εγκεφαλικές κακώσεις, οι ανεπάρκειες βιταμινών, το οξειδωτικό στρες και η έκθεση σε χημικά. Η ενδοκρινική, ανοσολογική και μεταβολική

κατάσταση του ατόμου πρέπει να συνυπολογίζονται με τους περιβαλλοντικούς παράγοντες στην προσπάθεια εύρεσης των αιτιών αυτών των ασθενειών [2].

Ο ακριβής χαρακτηρισμός μιας νευροεκφυλιστικής ασθένειας συνήθως είναι ανέφικτος, καθώς υπάρχουν αλληλοεπικαλυπτόμενα συμπτώματα, οδηγώντας το 80% των τελικών διαγνώσεων να καταγράφονται ύστερα από την απεβίωση του πάσχοντος[3]. Παράλληλα, το ζήτημα περιπλέκεται περαιτέρω από το γεγονός ότι, σε ασθένειες στις οποίες επηρεάζονται πολλές περιοχές του εγκεφάλου, διαφορετικοί συνδυασμοί βλαβών μπορούν να προκαλέσουν διαφορετικές κλινικές εικόνες, ειδικά κατά την έναρξη της νευροεκφυλιστικής διαδικασίας. Τις τελευταίες δεκαετίες, σημαντικές πρόοδοι στις τεχνολογίες μελέτης των νευρολογικών διαταραχών όπως η ανοσοϊστοχημεία, έχουν αντικαταστήσει ή συμπληρώσει πολλές από τις ιστολογικές προσεγγίσεις της νεκροψίας, οι οποίες αποτελούν τη μέθοδο αναφοράς. Η πρόοδος αυτή σε συνδυασμό με τον επακριβή καθορισμό των νευρολογικών συμπτωμάτων μέσω νευροψυχολογικών τεστ, σε κάθε πάσχοντα σε πρώιμο στάδιο στοχεύει σε πιο ακριβή προσδιορισμό και κατάταξη της εκάστοτε νευροεκφυλιστικής ασθένειας.

Ο όρος «άνοια» δεν αντιπροσωπεύει μια συγκεκριμένη ασθένεια αλλά είναι ένας γενικός όρος που χρησιμοποιείται για την περιγραφή ενός μεγάλου εύρους συμπτωμάτων που σχετίζονται με την έκπτωση της νοητικής ικανότητας, η οποία είναι τόσο εκτεταμένη ώστε να επηρεάζονται σημαντικές λειτουργίες και δραστηριότητες του ατόμου όπως η επικοινωνία, ο συλλογισμός, τα συναισθήματα και η συμπεριφορά καθιστώντας το ανίκανο να ανταπεξέλθει στην καθημερινή διαβίωση. Η άνοια λανθασμένα αναφέρεται πολλές φορές ως γήρας ή ως ασθένεια του γήρατος, κάτι που αντικατοπτρίζει την παλαιότερη και ανακριβή αντίληψη πως η σοβαρή διανοητική έκπτωση είναι φυσιολογικό επακόλουθο της αυξανόμενης ηλικίας. Σήμερα έχουν γνωστοποιηθεί συγκεκριμένες παθοφυσιολογικές ανωμαλίες που σχετίζονται με την άνοια γεγονός που καθιστά την ταύτισή της με το γήρας παρωχημένη.

Στο ευρύ φάσμα των ανοιών ανήκουν μεταξύ άλλων: η νόσος του Alzheimer (AD), η μετωποκροταφική άνοια (FTD), η αγγειακή άνοια και η άνοια με σωμάτια Lewy.

1.2 Νόσος Alzheimer's (AD)

Η επικράτηση της άνοιας φτάνει τα 24 εκατομμύρια ανθρώπους παγκοσμίως και έχει προβλεφθεί να τετραπλασιαστεί μέχρι το έτος 2050 [4], με τη νόσο Alzheimer's (AD) να είναι η πιο κοινή μορφή της αντιπροσωπεύοντας το 60 έως 80% των ανοϊκών περιστατικών. Η νόσος Alzheimer είναι μια ετερογενής νευροεκφυλιστική διαταραχή, που χαρακτηρίζεται κλινικά από προοδευτικά και μη-αναστρέψιμα γνωστικά ελλείμματα και αλλαγές συμπεριφοράς που επηρεάζουν τη μνήμη, τη μαθησιακή ικανότητα, τις δραστηριότητες καθημερινής ζωής καθώς και την ποιότητα ζωής, ήδη σε πρώιμο στάδιο της νόσου. Ο επιπολασμός της είναι μόνο 1% σε άτομα άνω των 60 ετών αλλά αυξάνεται δραματικά έως 40% στους άνω των 85 ετών[5]. Ο αριθμός της νόσου προβλέπεται να φτάσει τα 106,8 εκατομμύρια παγκοσμίως μέχρι το έτος 2050· επομένως, η ασθένεια είναι μια αυξανόμενη ανησυχία για τη δημόσια υγεία, με μείζον κοινωνικοοικονομικό βάρος.

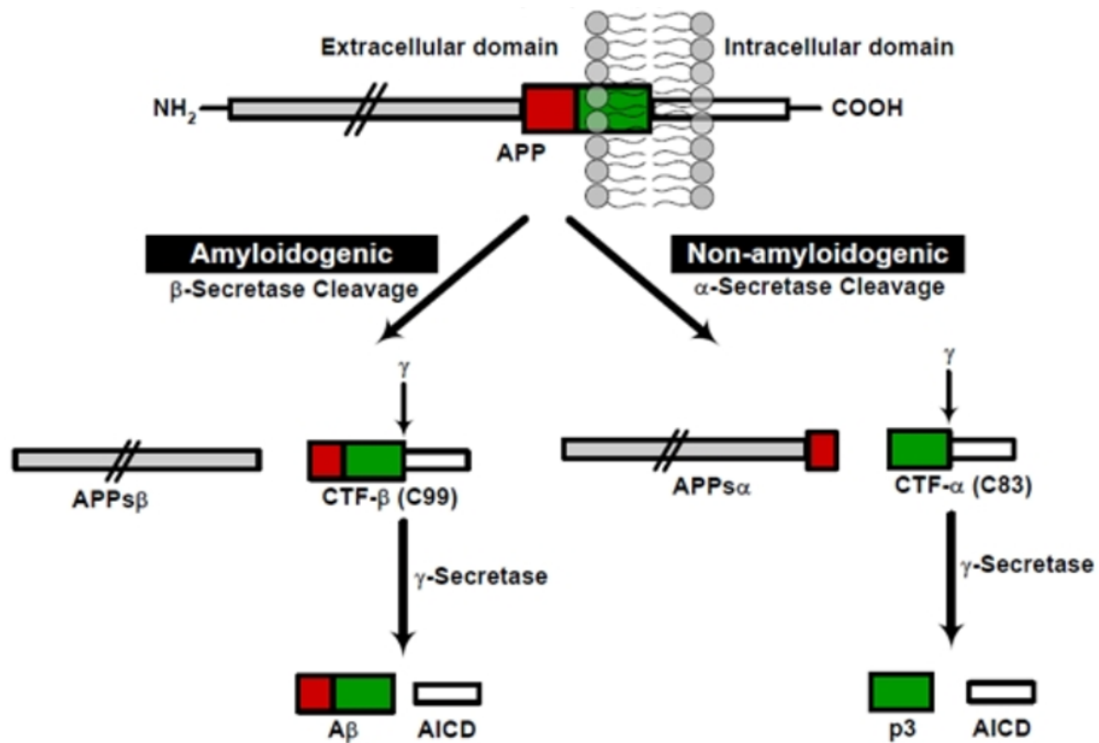
Με βάση την ηλικία έναρξης, η AD ταξινομείται στην νόσο πρώιμης έναρξης (Early Onset Alzheimer's Disease - EOAD, έναρξη <65 ετών) που αποτελεί το 1-5% του συνόλου των περιπτώσεων, και στην νόσο όψιμης έναρξης (Late Onset Alzheimer's Disease - LOAD, έναρξη ≥65 ετών) που αφορά στο περισσότερο από το 95% των πασχόντων. Χαρακτηριστικό της νόσου αυτής είναι η απώλεια μνήμης με ταυτόχρονη παρουσία ενός ή περισσότερων διανοητικών διαταραχών. Σε αυτές περιλαμβάνονται η αφασία (γλωσσική διαταραχή), η αγνωσία (αποτυχία αναγνώρισης ατόμων ή αντικειμένων, απουσία αισθητηριακής δυσλειτουργίας), η απραξία (αδυναμία εκτέλεσης κινήσεων, παρουσία άθικτου κινητικού συστήματος) και η διαταραχή της εκτελεστικής ικανότητας του ασθενούς (ανικανότητα μελλοντικών σχεδίων και εφαρμογής τους, δράσεων που υπάγονται σε μία ακολουθία, οργάνωσης και εκτέλεσης μαθηματικών πράξεων) [4]. Τελικά η νόσος μπορεί να οδηγήσει στο θάνατο του ασθενούς λόγω του υποσιτισμού, του εγκεφαλικού θανάτου και της εκτεταμένης απώλειας νευρικών κυττάρων που οδηγεί στην έκπτωση της λειτουργίας πολλών βασικών οργάνων.

Τα νευροπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά της AD περιλαμβάνουν τις διάχυτες νευριτικές πλάκες β-αμυλοειδούς (αβ42) πεπτιδίου, που συχνά περιβάλλονται από δυστροφικούς νευρίτες, και τα ενδοκυτταρικά νευροϊνιδιακά συμπλέγματα (Neurofibrillary Tangles - NFTs) υπερφωσφορυλιωμένης πρωτεΐνης tau (p-tau) [6]. Επιπλέον, παρουσιάζεται μικρογλοΐωση και

εκτεταμένη απώλεια νευρώνων, λευκής ουσίας και συνάψεων[4]. Αν και οι πλάκες και τα συμπλέγματα αυτά αναπτύσσονται στους περισσότερους ανθρώπους κατά την γήρανση, σε AD άτομα τείνουν να αναπτυχθούν σε πολύ μεγαλύτερο βαθμό και σε προβλέψιμο μοτίβο, ξεκινώντας από περιοχές σημαντικές για τη μνήμη προτού εξαπλωθούν και σε άλλες περιοχές του εγκεφάλου.

Η παθογένεση της EOAD έχει συσχετισθεί με μεταλλάξεις σε 3 αυτοσωμικά επικρατή γονίδια: το γονίδιο της πρεσενιλίνης 1 (*PSEN1*), της πρεσενιλίνης 2 (*PSEN2*) και το γονίδιο που κωδικοποιεί για την πρόδρομη πρωτεΐνη του αμυλοειδούς (*APP*).

Η APP είναι μια διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη. Αποτελεί φυσιολογικό συστατικό των κυτταρικών μεμβρανών και είναι άφθονη στις προσυναπτικές απολήξεις. Οι πιο τεκμηριωμένοι ρόλοι της περιλαμβάνουν τη συμμετοχή στο συναπτικό σχηματισμό και επισκευή και στη νευρωνική διαφοροποίηση [7]. Μέσω του αμυλοειδογενούς μονοπατιού παράγεται το αβ πεπτίδιο από την APP μέσω διαδοχικής πρωτεολυτικής διάσπασης από ένζυμα στην επιφάνεια της μεμβράνης των κυττάρων, που ονομάζονται β και γ σεκρετάσες. Το μήκος του παραγόμενου αβ πεπτιδίου εξαρτάται από την αρχική διάσπαση του εξωκυττάριου τμήματος της APP και παράγει κυρίως τα πεπτίδια αβ42 και αβ40. Το αβ42 είναι ιδιαίτερα νευροτοξικό στην ελεύθερη μορφή του και φαίνεται να είναι αυτό που ολιγομερίζεται και εναποτίθεται αρχικά και ίσως να διαδραματίζει κάποιο ρόλο στην εκκίνηση των γεγονότων που οδηγούν στη συσσωμάτωση του αμυλοειδούς. Η πλειονότητα των μεταλλάξεων που συνδέονται με την πρόωρη εκδήλωση της νόσου σχετίζονται με την αυξημένη παραγωγή του αβ42 [8].



Εικόνα 1.2.1: Σχηματική αναπαράσταση της πρωτεόλυσης του APP. Έπειτα από διάσπαση του APP μέσω της β-σεκρετάσης προκύπτει το αβ πεπτίδιο (αμυλοειδογενές μονοπάτι), ενώ η διάσπαση μέσω της α-σεκρετάσης οδηγεί στη δημιουργία του θραύσματος p3 (μη-αμυλοειδογενές μονοπάτι) [9].

Το γονίδιο πρεσενιλίνη 1 κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη στο χρωμόσωμα 14, η οποία συμμετέχει στην ανάπτυξη του εγκεφάλου και του νωτιαίου μυελού. Η πρεσενιλίνη 1 αποτελεί μια από τις τέσσερις πρωτεΐνες που συνθέτουν το καταλυτικό κέντρο του συμπλόκου της γ-σεκρετάσης[10]. Η απώλεια λειτουργίας της πρεσινιλίνης 1 προκαλεί ατελή πρωτεόλυση του αβ πεπτιδίου και μπορεί να συμβάλλει σε αυξημένη ευπάθεια του εγκεφάλου. Το γονίδιο πρεσινιλίνη 2 βρίσκεται στο χρωμόσωμα 1 και αποτελεί και αυτό συστατικό του συμπλόκου της γ-σεκρετάσης. Κάποιες μεταλλάξεις στην πρεσινιλίνη 2 έχει αποδειχθεί ότι αυξάνουν την ενεργότητα της γ-σεκρετάσης, με αποτέλεσμα την αύξηση της παραγωγής του αβ πεπτιδίου και της συσσωμάτωσής του στους εγκεφάλους των ασθενών [11].

Ένα τέταρτο γονίδιο, στο οποίο πλέον δίνεται ιδιαίτερη σημασία είναι το γονίδιο της απολιποπρωτεΐνης E (APOE) που έχει τρεις ισομορφές στον παγκόσμιο πληθυσμό ε2, ε3 και ε4. Η APOE είναι μια γλυκοπρωτεΐνη που σχετίζεται με το μεταβολισμό της χοληστερόλης, ενώ στο κεντρικό νευρικό σύστημα παράγεται κυρίως από τα αστροκύτταρα για μεταφορά χοληστερόλης στους νευρώνες. Αυτό το χαρακτηριστικό την καθιστά τον βασικό μεταφορέα

χοληστερόλης στον εγκέφαλο. Η ισομορφή ε4 σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο για LOAD και νεαρότερη ηλικία έναρξης της άνοιας με έναν δοσοεξαρτώμενο τρόπο [12]. Αντίθετα, η ισομορφή ε2, έχει ένα ισχυρό αντίκτυπο στην εξάπλωση των NFTs στο φλοιό, οδηγώντας σε κλινικά ηπιότερη μορφή AD των προσβεβληθέντων και κατέχοντας μάλλον έναν προστατευτικό ρόλο [13]. Η απολιποπρωτεΐνη E ενισχύει την πρωτεολυτική διάσπαση του αβ πεπτιδίου, τόσο εντός όσο και μεταξύ των κυττάρων. Η ισομορφή ε4 δεν είναι τόσο αποτελεσματική στην προώθηση αυτών των αντιδράσεων, με αποτέλεσμα την αυξημένη ευπάθεια στην AD σε άτομα με αυτή τη γονιδιακή παραλλαγή.

Σύμφωνα με δημοσίευση του εργαστηρίου οι Papastefanopoulou et al. (2022), έδειξαν ότι σε μία ομάδα ασθενών της νότιας Ελλάδας, η συχνότητα του αλληλίου E4 της απολιποπρωτεΐνης E, συναντάται σε ποσοστό 20,57% στους AD ασθενείς σε σύγκριση με το 6,7% στους υγιείς [14].

1.3 Μετωποκροταφική άνοια (FTD)

Ο όρος μετωποκροταφική άνοια (Frontotemporal Dementia – FTD) αφορά σε μία ομάδα προοδευτικών νευροεκφυλιστικών νόσων, οι οποίες αν και χαρακτηρίζονται από μεγάλη ετερογένεια σε ότι αφορά τους αιτιολογικούς παράγοντες και τη νευροπαθολογία τους, μοιράζονται κάποια κοινά χαρακτηριστικά γνωρίσματα, όπως για παράδειγμα την ατροφία στο μετωπιαίο και κροταφικό λοβό. Βασικό χαρακτηριστικό αυτών των νοσημάτων είναι η σταδιακή έκπτωση στο λόγο αλλά και πληθώρα συμπεριφορικών διαταραχών.

Η μετωποκροταφική άνοια κατατάσσεται είτε ως δεύτερος [15-17] είτε ως τρίτος, μετά την άνοια με σωμάτια Lewy[18], συχνότερος τύπος νευροεκφυλιστικής άνοιας. Σε άτομα ηλικίας <65 ετών με πρώιμη έναρξη της άνοιας, ακολουθεί την AD, καλύπτοντας το 5-15% των ανοιών παγκοσμίως [19]. Ο επιπολασμός της FTD είναι πιθανόν υποτιμημένος λόγω της έλλειψης εμπειρίας των ιατρών πρωτοβάθμιας περίθαλψης και της έλλειψης επικυρωμένων βιοδεικτών για διαφορική διάγνωση [20]. Οι περισσότερες περιπτώσεις (30-50%) είναι η οικογενής μορφή της ασθένειας, με το 10-15% των ασθενών να έχουν κληρονομήσει τη νόσο με καθαρά αυτοσωμικό επικρατή τρόπο [21-23].

Πολλές φορές αναφέρεται και ο όρος εκφύλιση των μετωπιαίων ή/και των κροταφικών λοβών (frontotemporal lobar degeneration – FTLD). Ωστόσο, στις μέρες μας ο όρος αυτός προτείνεται να χρησιμοποιείται αποκλειστικά για την περιγραφή των παθολογοανατομικών βλαβών και να διακρίνεται από τον όρο FTD, ο οποίος αναφέρεται στο ευρύ φάσμα των κλινικών συμπτωμάτων που χαρακτηρίζουν τη συγκεκριμένη νόσο[21]. Παρόλους τους πιθανούς τους συνδυασμούς, όλα τελικά προκύπτουν από την προοδευτική εκφύλιση και απορρύθμιση του φλοιού των μετωποκροταφικών λοβών, συχνά σε συνδυασμό με την εκφύλιση υποφλοιικών περιοχών του εγκεφάλου [24].

1.3.1 Κλινική εικόνα της FTD

Η διάγνωση της μετωποκροταφικής άνοιας βασίζεται στην αναγνώριση των κλινικών συμπτωμάτων. Οι διαφορετικοί τύποι μετωποκροταφικής άνοιας που υφίστανται ως ξεχωριστές κλινικές οντότητες (σύνδρομα) προσδιορίζονται από τον συνδυασμό των συμπτωμάτων που εμφανίζονται σε κάθε ασθενή. Τα κύρια κλινικά σύνδρομα είναι: η συμπεριφορική παραλλαγή της FTD (behavioral variant - bvFTD ή frontal variant - fvFTD ή “Pick’s disease” - PiD) και οι τρεις γλωσσικές παραλλαγές, η μη-ρέουσα παραλλαγή της πρωτοπαθούς προοδευτικής αφασίας ή προοδευτική μη-ρέουσα αφασία (non fluent variant of Primary Progressive Aphasia – nvPPA ή Progressive Non fluent Aphasia PNFA), η σημασιολογική παραλλαγή της πρωτοπαθούς προοδευτικής αφασίας ή σημασιολογική άνοια (semantic variant of PPA, svPPA ή semantic dementia, SD) και η λογοπενική παραλλαγή της πρωτοπαθούς προοδευτικής αφασίας ή λογοπενική προοδευτική αφασία (logopenic variant of Primary Progressive Aphasia – lvPPA ή logopenic progressive aphasia - LPA) [19,21,25]. Επίσης αναφέρονται και άτυπες παρκινσονικές μορφές όπως η προοδευτική υπερπυρηνική παράλυση (PSP) και το φλοιοβασικό σύνδρομο (CBS), καθώς εμφανίζονται και σε αυτές συμπεριφορικά συμπτώματα ή/και γλωσσική διαταραχή παρόμοια με αυτά που παρατηρούνται στην FTD, οδηγώντας στην συμπερίληψη και των δυο στο κλινικό φάσμα της FTD[26,27]. Έχει αναγνωριστεί και μια σημαντική επικάλυψη μεταξύ της FTD και της νόσου του κινητικού νευρώνα (Motor Neuron Disease - MND), καθώς περίπου το 15% των ασθενών με bvFTD διαγιγνώσκονται επίσης με αμυοτροφική πλευρική σκλήρυνση (ALS), οδηγώντας στη δημιουργία ενός επιπλέον τύπου μετωποκροταφικής άνοιας (FTD-MND)[28],[29].

Το πιο συχνά απαντώμενο σύνδρομο της FTD είναι η bvFTD ή αλλιώς PiD (60% του συνόλου των περιστατικών). Τα βασικά συμπτώματα αυτών των ασθενών είναι οι δυσλειτουργίες στην κοινωνική συμπεριφορά, αλλαγές στην προσωπικότητα του ασθενούς και στην ενσυναίσθηση. Η αμέλεια της προσωπικής υγιεινής και η παρορμητικότητα δεν λείπουν ποτέ σε αυτό το σύνδρομο, ενώ στα αρχικά στάδια δεν παρουσιάζουν σύγχυση και διαταραχή της μνήμης [24,30,31].

Ένα σημαντικό ποσοστό των ασθενών ανήκουν στο PNFA σύνδρομο (~ 20%). Βασικό χαρακτηριστικό αυτού του συνδρόμου είναι η ανικανότητα ρέουσας έκφρασης, η οποία σταδιακά μετατρέπεται σε γλωσσική απραξία και σε τελικό στάδιο αφωνία [24]. Τέλος, υπάρχει η πιθανότητα εκδήλωσης συμπεριφορικών διαταραχών που είναι χαρακτηριστικές άλλων συνδρόμων, όπως αυτών της bvFTD.

Σε αντίθεση, βρίσκονται οι ασθενείς που κατατάσσονται στο SD σύνδρομο, όσον αφορά την ομιλία και το σωστό συντακτικό. Σε αυτή την περίπτωση λόγω του γεγονότος της αλλοίωσης της σημασιολογικής μνήμης, είναι ανύπαρκτη η κατανόηση των εννοιών και της σημασίας των λέξεων. Αυτό συνδυάζεται και με τη δυσκολία αναγνώρισης των προσώπων, ειδικότερα όταν επηρεάζεται ο δεξιός κροταφικός λοβός. Αντιπροσωπεύει ισάξιο ποσοστό με το PNFA, αλλά αποτελεί την λιγότερο κληρονομήσιμη μορφή [24,32].

Η LPA εμφανίζεται με δυσκολία γρήγορης ομιλίας και ανάκτησης λέξεων, καθώς υφίσταται διαταραχή της φωνολογικής μνήμης. Η επανάληψη των φράσεων είναι μειωμένη, αλλά διαφέρει από τις άλλες δύο γλωσσολογικές παραλλαγές, καθώς υπάρχει μια σχετική κατανόηση των λέξεων και της σημασίας τους [24,33].

Στο FTD-MND σύνδρομο εκδηλώνονται συμπτώματα τα οποία είναι συνδυασμός των συμπτωμάτων της FTD αλλά και της εκφύλισης των κινητικών νευρών της σπονδυλικής στήλης, του εγκεφαλικού στελέχους και του φλοιού. Έτσι, οι συγκεκριμένοι ασθενείς αφενός εκδηλώνουν τη γνωστική δυσλειτουργία της FTD και αφετέρου παρουσιάζουν αδυναμία κατάποσης, κίνησης των χειρών, απώλεια λειτουργίας κάποιων μυών και πνιγμό. Αρχικό σύμπτωμα της ασθένειας είναι οι έντονες παραισθήσεις. Αυτό προμηνύει κακή πρόγνωση καθώς η διάρκειά της ανέρχεται στα τρία χρόνια [24,34],[24,35].

Τέλος σημαντικό ρόλο διαδραματίζουν οι άτυπες παρκινσονικές μορφές της FTD, το φλοιοβασικό σύνδρομο (CBS) και η προοδευτική υπερπυρηνική παράλυση (PSP). Το φλοιοβασικό σύνδρομο χαρακτηρίζεται από συμπτώματα προσβολής συγκεκριμένων περιοχών του φλοιού του εγκεφάλου και εκδηλώνεται με επιδεινούμενες κινητικές μεταβολές που προσβάλλουν την μία περιοχή του σώματος περισσότερο από την άλλη και ομοιάζουν με εκείνες της νόσου του Parkinson[36]. Η προοδευτική υπερπυρηνική παράλυση είναι μια ασυνήθης πάθηση με χαρακτηριστικά συμπτώματα την έντονη αστάθεια, τη δυσκαμψία, την βραδύτητα των κινήσεων και τη γνωστική δυσχέρεια[37].

1.3.2 Πρωτεϊνοπάθειες της FTD

Η μοριακή παθολογία της μετωποκροταφικής άνοιας περιορίζεται ουσιαστικά στην τοξική συσσωμάτωση χαρακτηριστικών πρωτεϊνών σε συγκεκριμένες περιοχές του εγκεφάλου, γεγονός που την κατατάσσει στις νευροεκφυλιστικές ασθένειες που αναφέρονται ως πρωτεϊνοπάθειες [38]. Η μετωποκροταφική άνοια, παρουσιάζει μεγάλη ετερογένεια μέσα στους διάφορους τύπους της και ανάλογα με το είδος των πρωτεϊνών που έχουν συσσωρευτεί και το είδος των νευρικών αλλοιώσεων που έχουν δημιουργηθεί, αποτελεί το φάσμα της εκφύλισης των μετωποκροταφικών λοβών (FTLD). Η FTLD χωρίζεται σε δύο μεγάλες βασικές κατηγορίες την FTLD-TAU, με εναποθέσεις υπερφωσφορυλιωμένης πρωτεΐνης ταυ και την FTLD-U, με tau και α-συνουκλεΐνη αρνητικές, αλλά ουβικουιτίνη θετικές εναποθέσεις. Με τη βοήθεια της ανοσοϊστοχημείας βρέθηκε ότι υπήρχαν νευρωνικά έγκλειστα ως προς την ουβικουιτίνη [39,40]. Έπειτα αποκαλύφθηκε ότι η πρωτεΐνη αυτή που είχε ουβικουιτιλιωθεί είναι στις περισσότερες περιπτώσεις η TDP-43, προϊόν του γονιδίου *TARDBP*, (FTLD-TDP) [41], ενώ σε λιγότερες περιπτώσεις η πρωτεΐνη αυτή ήταν η FUS (FTLD-FUS).

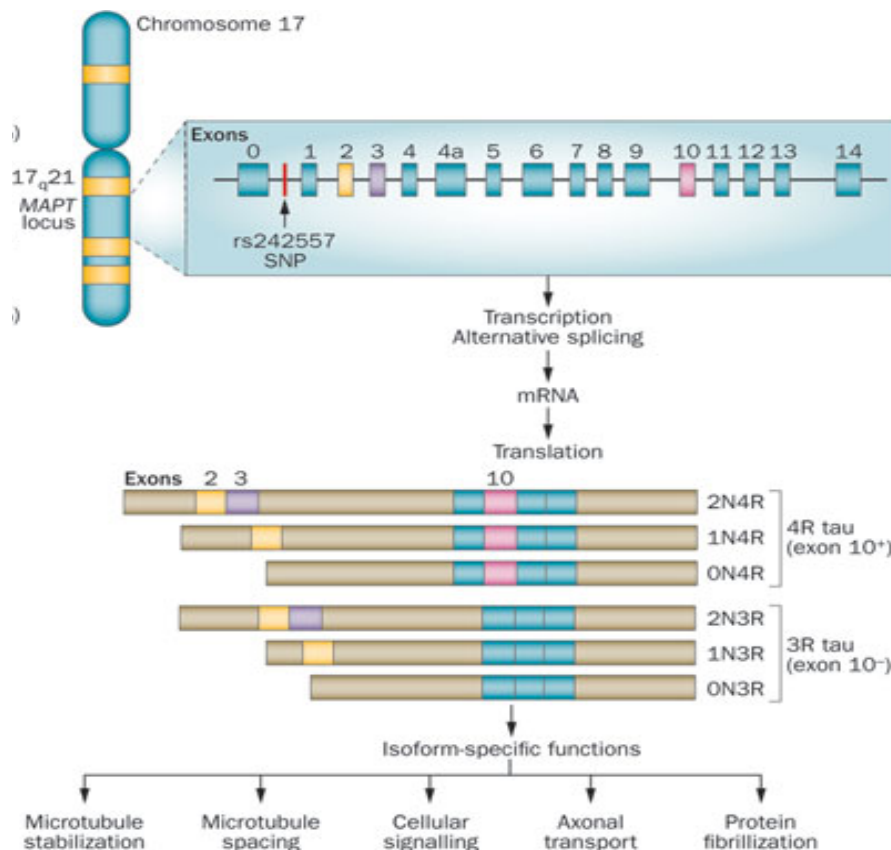
FTLD-TAU

Η FTLD-TAU παθολογία αντανακλά το 40-45% των περιπτώσεων της ασθένειας [42].

Οι ταυοπάθειες περιλαμβάνουν την νόσο του Pick (bvFTD), την φλοιοβασική εκφύλιση (CBD), την προοδευτική υπερπυρηνική παράλυση (PSP) και πιο γενικά την παθολογία που σχετίζεται με τις μεταλλάξεις του γονιδίου *MAPT* (Microtubule Associated Protein Tau) [43]. Η πρωτεΐνη tau που παράγεται από το γονίδιο αυτό ανήκει στην οικογένεια των πρωτεϊνών που σχετίζονται

με μικροσωληνίσκους (MAPs). Οι MAPs έχουν εξελιχθεί ώστε να εκπονούν διάφορες κυτταρικές λειτουργίες όπως για παράδειγμα την κίνηση των μικροσωληνίσκων.

Το μοναδικό γονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη tau ονομάζεται MAPT (microtubule-associated protein tau gene), χαρτογραφείται στο χρωμόσωμα 17q21 και αποτελείται από 16 εξώνια, τα 11 από τα οποία κωδικοποιούν την πρωτεΐνη (Εικόνα 1.3.2.1).

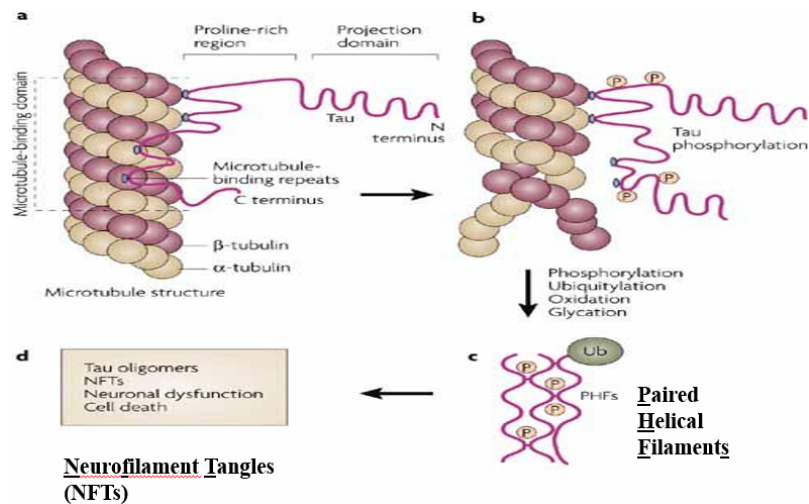


Εικόνα 1.3.2.1: Δομή γονιδίου MAPT και της αντίστοιχης πρωτεΐνης που παράγεται. Το MAPT γονίδιο περιέχει 16 εξώνια, τα 11 από τα οποία ματίζονται εναλλακτικά οδηγώντας στην έκφραση διαφόρων ισομορφών της πρωτεΐνης tau[44].

Η tau είναι μια ιδιόμορφη πρωτεΐνη, με δομή που μπορεί να υποδιαιρεθεί σε τέσσερις τομείς: N-τερματική περιοχή, περιοχή πλούσια σε προλίνη, περιοχή δέσμευσης μικροσωληνίσκων (MBD) και C-τερματική περιοχή. Η tau πρωτεΐνη εμφανίζεται με ισομορφές, που κυμαίνονται από 352 έως 441 αμινοξέα σε μήκος (~45-65 kDa) και διαφέρουν μεταξύ τους στην παρουσία ή απουσία τριών ενθεμάτων (που προκύπτουν από εναλλακτικό μάτισμα). Το αμινοτελικό άκρο της είτε δεν περιέχει κανένα ένθετο (ισομορφή 0N tau) είτε περιέχει: ένα ένθετο 29 αμινοξέων (ισομορφή 1N), ή αναδιπλασιασμένο 58 αμινοξέων (ισομορφή 2N). Το καρβοξυτελικό άκρο

της περιέχει τρεις ή τέσσερες ημι-ομόλογες επαναλήψεις 31 ή 32 αμινοξέων (3R ή 4R ισομορφές) και αντιστοιχούν σε περιοχές που δεσμεύουν μικροσωληνίσκους (Microtubule Binding Domains - MBDs). Ανάλογα με αυτές τις επαναλήψεις που φέρουν στην περιοχή δέσμευσης των μικροσωληνίσκων (εάν δηλαδή περιλαμβάνουν το εξώνιο 10 ή όχι) διαμορφώνεται αντίστοιχα η ισομορφή 3R ή 4R (Εικόνα 1.3.2.1). Ολόκληρη η οικογένεια των MAP2/tau πρωτεϊνών έχει περιοχές δέσμευσης στους μικροσωληνίσκους κοντά στο καρβοξυλικό τους άκρο. Οι 4R ισομορφές tau συνδέονται στους μικροσωληνίσκους με μεγαλύτερη συγγένεια από ό,τι οι 3R ισομορφές και μπορούν, επιπλέον, να εκτοπίζουν προηγουμένως δεσμευμένες 3R ισομορφές [45]. Στον ενήλικο εγκέφαλο, απαντώνται όλες οι πιθανές ισομορφές της πρωτεΐνης tau, με αυτήν που είναι λιγότερο αντιπροσωπευτική να είναι η 2N ισομορφή. Η αναλογία των 3R και 4R ισομορφών στον φυσιολογικό ενήλικο εγκέφαλο είναι ένα προς ένα (1:1).

Η πρωτεΐνη tau είναι εξαιρετικά υδρόφιλη και, ως εκ τούτου, διαλυτή και θερμοσταθερή. Με τη δέσμευση της στους μικροσωληνίσκους, οι οποίοι σχηματίζονται από τα ετεροδιμερή των πρωτοϊνιδίων α- και β-τουμπουλίνης, προάγει την συναρμολόγηση τους και τους προσδίδει δομική σταθερότητα. Αυτές αποτελούν τις δύο κύριες λειτουργίες της πρωτεΐνης tau [46]. Οι επαναλήψεις στις περιοχές δέσμευσης τουμπουλίνης είναι εκείνες που αναγνωρίζουν συγκεκριμένες θέσεις στους μικροσωληνίσκους και συμβάλλουν με αυτό τον τρόπο στη διαμόρφωσή τους (Εικόνα 1.3.2.2). Οι θετικά φορτισμένες πλούσιες σε προλίνη περιοχές συνδέονται στενά με την αρνητικά φορτισμένη επιφάνεια των πρωτοϊνιδίων και η αρνητικά φορτισμένη N τελική περιοχή προεξέχει από την επιφάνεια των μικροσωληνίσκων, λόγω ηλεκτροστατικής απώθησης και με αυτό τον τρόπο αλληλεπιδρά με άλλα στοιχεία του κυτταροσκελετού και την κυτταροπλασματική μεμβράνη [45,47].

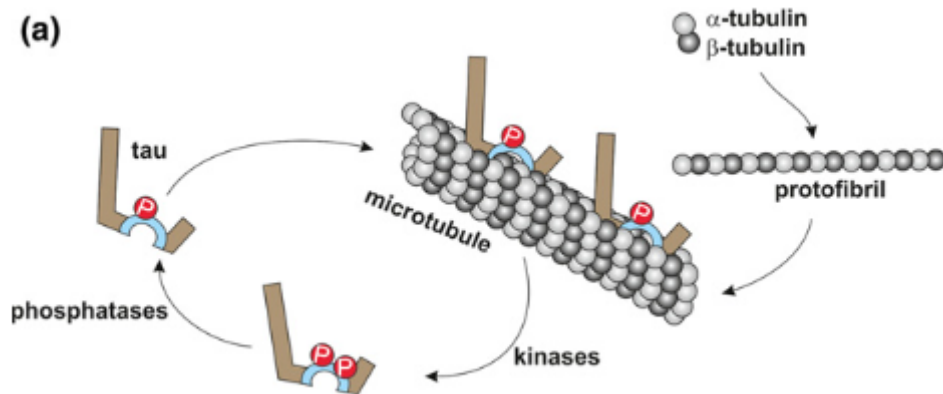


Εικόνα 1.3.2.2: α) Φυσιολογική αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης tau με τους μικροσωληνίσκους. Β) Υπερφωσφορυλίωση πρωτεΐνης και αποπολυμερισμός των μικροσωληνίσκων. Γ,δ) Δημιουργία ζευγαρωμένων ελικοειδών νημάτων και τελικά αδιάλυτων ινιδίων[48].

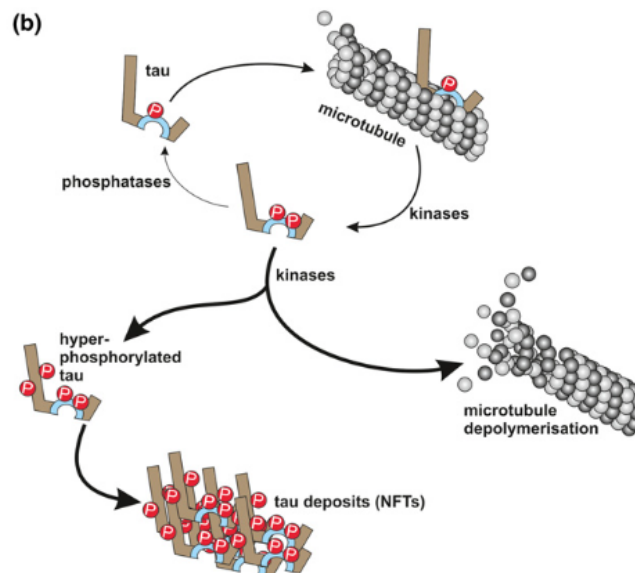
Στον εγκέφαλο φυσιολογικών ανθρώπων, η πρωτεΐνη tau φωσφορυλιώνεται. Η κατάσταση φωσφορυλίωσης της φυσιολογικής tau προκύπτει από τη ρυθμιζόμενη ισορροπία μεταξύ των δράσεων κινασών και φωσφατασών και οι λειτουργίες της ρυθμίζονται από το βαθμό φωσφορυλίωσής της (Εικόνα 1.3.2.3a). Η φυσιολογικά φωσφορυλιωμένη tau, προσδένεται στους μικροσωληνίσκους και τους προσδίδει σταθερότητα. Οι περισσότερες από τις θέσεις φυσιολογικής φωσφορυλίωσής της είναι παρούσες στις πλούσιες σε προλίνη περιοχές και στα καρβοξυτελικά άκρα.

Η ανώμαλη φωσφορυλίωση στις περιοχές δέσμευσης μικροσωληνίσκων επηρεάζει τη συναρμολόγηση τουμπουλίνης, με το να τροποποιεί την συγγένεια μεταξύ tau και μικροσωληνίσκων, παρεμποδίζοντας την δέσμευση της tau σε αυτούς και οδηγώντας τελικά στην αποδέσμευσή της. Αφενός προκύπτει αποπολυμερισμός των μικροσωληνίσκων και αφ' ετέρου σχηματισμός τοξικών συγκεντρώσεων της πρωτεΐνης tau στο κυτοσόλιο. Επίσης, η παθολογική tau αλληλοεπιδρά με την φυσιολογική, καθιστώντας τη δεύτερη μη-διαθέσιμη για την προώθηση της συγκρότησης της τουμπουλίνης στους μικροσωληνίσκους. Παρόλα αυτά, καθίσταται διαθέσιμη για υπερφωσφορυλίωση και τελικά ανώμαλες αναδιπλώσεις προς σχηματισμό αδιάλυτων νηματίων (neurofibrillary tangles - NFTs) (Εικόνα 1.3.2.3b). Ο σχηματισμός των NFTs πιστεύεται ότι είναι μια σταδιακή διαδικασία, ξεκινώντας με τον ολιγομερισμό της μη-δεσμευμένης υπερφωσφορυλιωμένης tau σε προπλέγματα, με αλλαγή στη β-φύλλου διαμόρφωση, δημιουργία νημάτων όπως τα ζευγαρωμένα ελικοειδή νήματα (Paired

Helical Filaments - PHFs) και, τέλος, οδηγώντας στη συναρμολόγηση σε NFTs (Εικόνα 1.3.2.2) [49]. Τα αδιάλυτα νημάτια μεταφέρονται σταδιακά από τον άξονα του νευρικού κυττάρου στους δενδρίτες. Το κύτταρο πεθαίνει, η πρωτεΐνη tau εκκρίνεται και μεταφέρεται στο διπλανό νευρικό κύτταρο.



Εικόνα 1.3.2.3a): Ισορροπία κινασών - φωσφατασών προς φυσιολογική φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης tau[45].



Εικόνα 1.3.2.3b): Δυναμική Tau - μικροσωληνίσκων υπό παθολογική κατάσταση [45].

Συμπερασματικά, η FTLD-TAU παθολογία θα μπορούσε να προκύψει, είτε λόγω διαταραχής της ισορροπίας 3R/4R ισομορφών, είτε λόγω ανισορροπίας δράσεων φωσφατασών και κινασών, είτε λόγω μεταλλάξεων ειδικά στις θέσεις φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης tau και συνεπώς αδυναμία πρόσδεσης στους μικροσωληνίσκους.

FTLD-TDP

Η FTLD-TDP παθολογία αντιπροσωπεύει το 50-55% του συνόλου των περιπτώσεων [16]. Σύμφωνα με την κατηγοριοποίηση από τους Mackenzie et al (2011), διακρίνουμε τέσσερις τύπους της συγκεκριμένης παθολογίας[50].

- Τύπος A: Χαρακτηριστικό αυτού του τύπου είναι η παρουσία πολλών μικρών δυστροφικών νευριτών και δισκοειδών ή οβάλ νευρωνικών κυτταροπλασματικών εγκλείστων (neuronal cytoplasmic inclusions – NCI). Σε μικρό μέρος των περιπτώσεων εντοπίζονται ενδοπυρηνικά νευρωνικά εγκλείστα (neuronal intranuclear inclusions – NII).
- Τύπος B: Αναγνωριστικό του τύπου αυτού είναι η παρουσία μερικών NCI, σε όλα τα στρώματα του φλοιού, αλλά ελάχιστων δυστροφικών νευριτών.
- Τύπος C: Σε αυτόν τον τύπο, επικρατούν οι μακριοί δυστροφικοί νευρίτες αλλά σπανίζουν τα NCI.
- Τύπος D: Αφορά στην παθολογία που σχετίζεται με την IBMPFD (Inclusion body myopathy associated with Paget disease of bone and frontotemporal dementia= μυοπάθεια σωματικών εγκλείστων που συνδέεται με την PBD και την FTD) και χαρακτηρίζεται από την παρουσία μεγάλου αριθμού μικρών δυστροφικών νευριτών και NII.

Η TDP-43 είναι μια πυρηνική πρωτεΐνη (46 kDa) 414 αμινοξέων, με δύο υπερσυντηρημένα μοτίβα αναγνώρισης RNA (RRM1, RRM2) τα οποία πλαισιώνονται από το αμινοτελικό και καρβοξυτελικό άκρο της (N-terminal και C-terminal, αντίστοιχα) και δεσμεύουν RNA και πολυάριθμες άλλες πρωτεΐνες, σχηματίζοντας πολλαπλά πρωτεϊνικά-RNA σύμπλοκα υψηλού μοριακού βάρους. Κωδικοποιείται από το γονίδιο *TARDBP* (TARDNA binding protein gene), που εντοπίζεται στη χρωμοσωμική θέση 1p36.22 και περιέχει 5 κωδικά και 2 μη-κωδικά εξώνια [51].

Η TDP-43 παίζει πλειοτροπικό και σημαντικό ρόλο στην επεξεργασία του RNA, συμπεριλαμβανομένης της ρύθμισης εναλλακτικού ματίσματος, της ωρίμανσης RNA, της σταθερότητας και διακίνησης του[52]. Η TDP-43 αποτελεί κατεξοχήν πυρηνική πρωτεΐνη, ωστόσο, υπό φυσιολογικές συνθήκες, μετακινείται ενεργά μεταξύ του πυρήνα και του κυτταροπλάσματος και ένα μικρό ποσοστό του συνολικού κυτταρικού TDP-43 (έως 30%) μπορεί να βρεθεί εκεί, όπου συνδέεται με το 3'-UTR των ώριμων mRNA στόχων της, ρυθμίζοντας έτσι τη σταθερότητα, τον εντοπισμό και τη μετάφρασή τους [53].

Σε παθολογικές καταστάσεις, όπως η FTLT, έχει βρεθεί ότι η TDP-43 υφίσταται ουβικιτιλίωση, υπερφωσφορυλίωση ενώ πολλές φορές πρωτεολύεται από άγνωστη μέχρι στιγμής πρωτεάση. Το αποτέλεσμα αυτής της δράσης είναι ο σχηματισμός καρβοξυτελικών και αμινοτελικών θραυσμάτων (carboxy-terminal tails, CTFs/amino-terminal tails, NTFs), με τα πρώτα να τροποποιούνται μέσω ουβικιτιλίωσης και φωσφορυλίωσης. Αυτά τα τροποποιημένα CTFs (~25 kDa) μετατοπίζονται στο κυτταρόπλασμα, όπου συγκεντρώνονται και σχηματίζουν χαρακτηριστικά συσσωματώματα. Στις μέρες μας υπάρχουν ειδικά αντισώματα έναντι των επιτόπων φωσφορυλίωσης, τα οποία χρησιμοποιούνται σε κλινικό επίπεδο ως σημαντικός δείκτης για την οπτικοποίηση αυτών των εγκλείστων, που αποτελούν τη διαγνωστική υπογραφή της FTLT-TDP[54].

Τα τελευταία χρόνια υπάρχουν αρκετά πειραματικά δεδομένα, τα οποία επιβεβαιώνουν αυτές τις τροποποιήσεις της παθολογικής TDP-43. Για παράδειγμα οι Zhang et al. (2009) πραγματοποίησαν πρωτεολυτική διάσπαση της TDP-43 με την κασπάση-3 (Caspase-3 –Cas3) και μετά από μελέτη των θραυσμάτων που προέκυψαν παρατήρησαν ότι τα θραύσματα αυτά παρουσιάζουν ομοιότητες με αυτά που απομονώνονται από νευριτικά και νευρογλοιακά κύτταρα FTLT-TDP ασθενών ως προς το πρότυπο θραυσματοποίησης, τις αλλαγές στη διαλυτότητα του μορίου TDP-43, τις βιοχημικές ιδιότητες αυτών των θραυσμάτων και την εντόπισή τους μέσα στο κύτταρο[55]. Οι Yang et al. μελέτησαν στην κυτταρική σειρά NSC-34 τις συνέπειες της θραυσματοποίησης της TDP-43 ως προς τη λειτουργία της και διαπίστωσαν ότι η κατακερματισμένη TDP-43 αναστέλλει την ανάπτυξη και διαφοροποίηση των νευρώνων καθώς τα CTFs ανεξάρτητα από τη συσσωμάτωσή τους εμποδίζουν τη νευρωνική ανάπτυξη, ενώ παράλληλα τα NTFs έχουν την ίδια επίδραση όταν αλληλοεπιδρούν με τη TDP-43[54].

FTLD-FUS

Η FTLD-FUS αποτελεί περίπου το 3% των συνολικών FTLD περιπτώσεων και αντιπροσωπεύει περίπου το 10% των TAU(-), TDP-43(-) FTLD πρωτεϊνοπαθειών [56]. Οι FUSπάθειες περιλαμβάνουν τις ειδικές παθολογίες της νόσου εγκλεισμού του ενδιάμεσου νήματος των νευρώνων (neuronal intermediate filament inclusion disease - NIFID), της νόσου του βασεόφιλου εγκλεισμού (basophilic inclusion body disease - BIBD) και της άτυπης FTLD με ανοσοαντιδραστικές αποκρίσεις μόνο με ουβικιτίνη [57]. Τα χαρακτηριστικά της FTLD-FUS είναι ουβικιτίνη θετικά, FUS θετικά, p62/TDP-43 αρνητικά νευρωνικά έγκλειστα με αξιοσημείωτη μορφολογία. Τα πιο χαρακτηριστικά γνωρίσματα της FTLD-FUS είναι μια πρόωμη έναρξη FTD με σοβαρές προοδευτικές ψυχοσυμπεριφορικές αλλαγές, αρνητικό οικογενειακό ιστορικό και εντυπωσιακή ατροφία του ραβδωτού σώματος και του κερκοφόρου πυρήνα κατά την νευροπαθολογική εξέταση[26,27,58].

Το γονίδιο FUS, που βρίσκεται στο χρωμόσωμα 16, αποτελείται από 15 εξώνια που κωδικοποιούν μια πρωτεΐνη 526 αμινοξέων της οικογένειας FET[59]. Η FUS είναι μια πρωτεΐνη που εκφράζεται παντού, που συνδέεται με το RNA και το DNA και εμπλέκεται σε διάφορες κυτταρικές διεργασίες, συμπεριλαμβανομένου του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, της επιδιόρθωσης DNA, της ρύθμισης της μεταγραφής, του ματίσματος RNA και της μεταφοράς του RNA μεταξύ των ενδοκυτταρικών διαμερισμάτων. Στους περισσότερους κυτταρικούς τύπους, η FUS υπάρχει τόσο στον πυρήνα όσο και στο κυτταρόπλασμα, ωστόσο στους νευρώνες υπάρχει αναλογικά περισσότερη στον πυρήνα και η έκφραση στη γλοία είναι αποκλειστικά πυρηνική[60-62].

Έχει βρεθεί ότι η FUS μαζί με άλλα μέλη της οικογένειας FET, όπως η TAF15 (σχετιζόμενη με τον παράγοντα TATA πρωτεΐνη δέσμευσης 15), η TRN1 και η πρωτεΐνη σαρκώματος Ewing (EWS) εντοπίζονται στα FUS-θετικά έγκλειστα[63]. Πιθανολογείται ότι οι πρωτεΐνες αυτές εμπλέκονται στον σχηματισμό εγκλείστων στην FTLD-FUS και έτσι δικαιολογείται και η συμμετοχή τους στην παθογενετικούς μηχανισμούς της FTLD-FUS. Εξάλλου οι πρωτεΐνες αυτές ανήκουν στο σύνολο τους στην οικογένεια FET, αλληλοεπιδρούν μεταξύ τους και σχηματίζουν πρωτεϊνικά σύμπλοκα τα οποία εμπλέκονται σε ποικίλες κυτταρικές λειτουργίες, όπως η μεταγραφή, η επεξεργασία και μεταφορά του RNA και η επιδιόρθωση DNA. Παρά το

γεγονός ότι οι αντίστοιχοι ρόλοι των FUS/TAF15/EWS στην FTLD-FUS, παραμένει να διευκρινιστούν, ο όρος FTLD-FET φαίνεται πια πως είναι περισσότερο κατάλληλος για αυτή την μοριακή FTLD υποομάδα[64-66].

FTLD-UPS

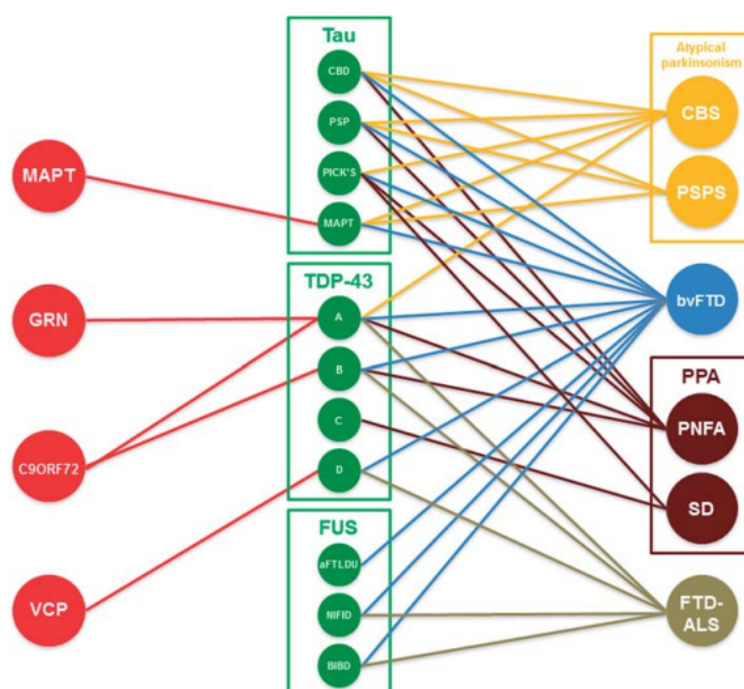
Οι FTLD-TDP και FTLD-FUS αντιπροσωπεύουν την πλειονότητα των περιπτώσεων FTLD-U. Ο χαρακτηρισμός επιπλέον περιπτώσεων ακόμα ερευνάται, καθώς έχουν περιγραφεί εγκλείσματα που είναι αρνητικά για TDP-43 και FUS, αλλά θετικά για συστατικά του συστήματος ουβικιτίνης - πρωτεασώματος (UPS). Ορισμένες περιπτώσεις FTLD-UPS παρουσιάζουν p62 παθολογία όχι μόνο σε νευρώνες αλλά και σε νευρογλοιακά κύτταρα[58,67-69]. Στις περιπτώσεις FTLD-p62, ύστερα από ανοσοχρώση, τα NCI στα κοκκιοκύτταρα της παρεγκεφαλίδας εμφανίζονται ως μικρά στρογγυλεμένα ή σχήματος κριθαριού σώματα, αν και περιστασιακά υπάρχουν ως μεγαλύτερα, περισσότερο στρογγυλεμένα και στερεά. Παρόμοια, πιο κοκκιώδη, NCI υπάρχουν στα bascet κύτταρα. Σε ορισμένες περιπτώσεις, και τα κύτταρα Purkinje και οι νευρώνες του dentate πυρήνα περιέχουν μικρές, οξύληκτες ή κοκκιώδεις p62-ανοσοαντιδραστικές δομές. Τέλος, στις περισσότερες περιπτώσεις, παρατηρούνται και αστροκύτταρα με p62 θετικά NII[68].

Η ουβικιτινο - δεσμευτική p62/SQSTM1/A170 (sequestosome 1) είναι μία ενδοκυτταρική πρωτεΐνη η οποία επάγεται σε περιπτώσεις κυτταρικού στρες. Η συγκεκριμένη πρωτεΐνη χαρακτηρίζεται από μία μεγάλη ποικιλία μοτίβων πρωτεΐνης - πρωτεΐνης αλληλεπίδρασης και σήμερα γνωρίζουμε ότι αποτελεί σημαντικό ρυθμιστικό παράγοντα σε πολλά σηματοδοτικά μονοπάτια, τα οποία εμπλέκονται στην κυτταρική επιβίωση και απόπτωση [π.χ. NF-κB σηματοδότηση, ενεργοποίηση του Nrf2 (nuclear factor erythroid 2 (NFE2) - related factor 2)]. Μία ακόμα σημαντική δράση της p62 είναι η διακίνηση και αποικοδόμηση πρωτεϊνών, μέσω του μηχανισμού της αυτοφαγίας και του συστήματος ουβικιτίνης - πρωτεασώματος. Συγκεκριμένα, η p62 αναγνωρίζει πολυουβικιτιλιωμένα πρωτεϊνικά υποστρώματα προωθώντας τα έτσι προς αποικοδόμηση. Τα επίπεδά της ρυθμίζονται από την αυτοφαγία, αλλά και η ίδια μπορεί να καταστείλει την αυτοφαγία μέσω ενεργοποίησης του συμπλόκου mTORC1 (mammalian target of rapamycin complex 1). Έχει βρεθεί ότι μία από τις πρωτεΐνες που αναγνωρίζονται από την p62 και δεσμεύονται με αυτήν είναι η TDP-43 και η αλληλεπίδραση

αυτή πιθανολογείται ότι υποδεικνύει μία ενδεχόμενη λειτουργική σύνδεση μεταξύ αυτών των πρωτεϊνών στις συγκεκριμένες πρωτεϊνοπάθειες[67,70,71].

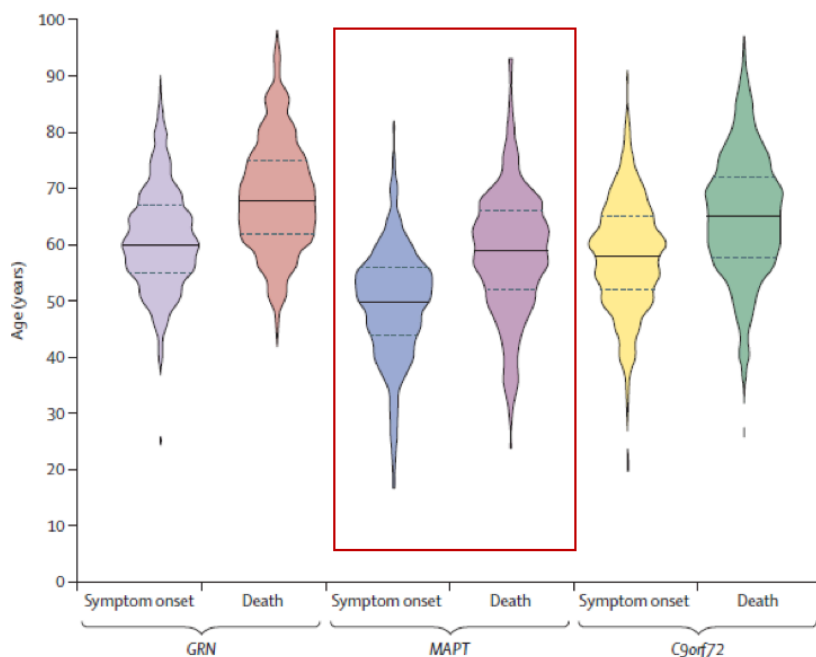
1.3.3. Γενετική βάση της FTD

Η FTLD περιλαμβάνει μια εξαιρετικά ετερογενή ομάδα διαταραχών τόσο από την άποψη της κλινικής εικόνας όσο και της νευροπαθολογίας (Εικόνα 1.3.3.1). Για αυτό το λόγο, η κλινική παρουσίαση ενός ασθενούς δεν προβλέπει εύκολα τον υποκείμενο τύπο της παθολογίας του. Ενώ αυτή η ετερογένεια είναι ένας σημαντικός παράγοντας που περιπλέκει τις γενετικές μελέτες της FTLD, σημαντικές επιτυχίες στην ταυτοποίηση γονιδίων έχουν γίνει μέσω της μελέτης μεμονωμένων οικογενειών FTLD και της χρήσης παθολογικά ομοιογενών υποπληθυσμών ασθενών [43].



Εικόνα 1.3.3.1: Σχηματική απεικόνιση της ετερογένειας της μετωποκροταφικής άνοιας. Συγκεκριμένα παρουσιάζονται οι πολύπλοκες συσχετίσεις μεταξύ των κλινικών συνδρόμων εντός του φάσματος της FTD (δεξιά), των ιστοπαθολογικών αιτιών (κέντρο) και των γενετικών αιτιών (αριστερά) [43].

Η μονογονιδιακή FTD συσχετίζεται κυρίως όπως ήδη αναφέρθηκε με τρία γονίδια: το *MAPT*, το *PGRN* και το *C9orf72*. Η ηλικία έναρξης, η ηλικία θανάτου και η διάρκεια της νόσου σε κάθε μια από τις περιπτώσεις απεικονίζονται στην εικόνα 1.3.3.2. Ιδιαίτερα στην περίπτωση του γονιδίου *MAPT*, φαίνεται ότι η FTD έχει την πρωιμότερη ηλικία έναρξης, αλλά ταυτόχρονα την πιο αργή εξέλιξη (περίπου 9,3 χρόνια), σε σχέση με τις άλλες δύο περιπτώσεις [72].

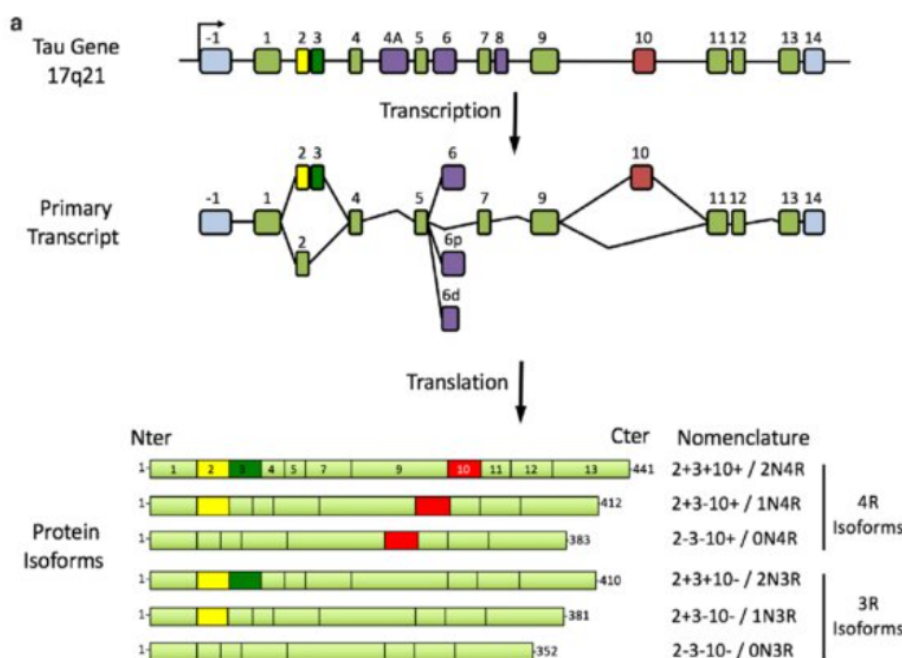


Εικόνα 1.3.3.2.: Σχηματική αναπαράσταση της έναρξης συμπτωμάτων και του θανάτου σε ασθενείς φορείς των μεταλλάξεων στα γονίδια *MAPT*, *PGRN* και *C9orf72* [72].

❖ *MAPT* Γονίδιο

Το ανθρώπινο *MAPT* γονίδιο χαρτογραφείται στη χρωμοσωμική θέση 17q21.31[73,74], περιλαμβάνει 16 εξώνια και μπορεί να έχει παραπάνω από έναν υποκινητές (ένας υποκινητής έχει χαρτογραφηθεί ανοδικά του εξωνίου 1) που να επηρεάζουν την ιστοειδικότητα και την απάντηση σε μεταγραφικούς και αναπτυξιακούς παράγοντες των τριών mRNAs του (2, 6 και 9 kb). Τα 2 kb μετάγραφα αφορούν την TAU του πυρήνα (πανταχού παρούσα), τα 6 kb κωδικοποιούν την νευραξονική TAU και τα 9 kb μετάγραφα περιορίζονται στον αμιβληστροειδή και το περιφερικό νευρικό σύστημα (Peripheral Nervous System - PNS). Τα 2 και 6 kb mRNAs προκύπτουν από τη χρησιμοποίηση δύο εναλλακτικών θέσεων πολυαδενυλίωσης (σε απόσταση ~4 kb μεταξύ τους) και οι δύο πολύ διαφορετικές 3'-UTRs

περιοχές που προκύπτουν υπαγορεύουν τον εντοπισμό ή/και την σταθερότητα αυτών των μεταγράφων. Η διαφορική συμπερίληψη δύο κασετών εξωνίων (2 και 3), πλησίον του αμινοτελικού άκρου της πρωτεΐνης, παράγει ένα σύνολο τριών πιθανών συνδυασμών (2-3-, 2 + 3- και 2 + 3 +) και ένα εύρος μοριακού βάρους μεταξύ 352 – 441 αμινοξέων. Η συμπερίληψη του εξωνίου 4A δημιουργεί το 9 kb TAU mRNA. Το εξώνιο 6 χρησιμοποιεί δύο επιπλέον 3' θέσεις ματίσματος, πέραν της κανονικής του, οδηγώντας σε αλλαγές πλαισίου ανάγνωσης που δημιουργούν ισομορφές TAU, από τις οποίες λείπει το καρβοξυτελικό άκρο. Κοντά στο καρβοξυτελικό άκρο, το εναλλακτικό μάτισμα εισάγει μία πρόσθετη αλληλουχία "επανάληψης" 31 αμινοξέων (κασέτα εξωνίου 10) εντός του MBD (οι άλλες επαναλήψεις MBD είναι στα εξώνια 9, 11 και 12)[75]. Το εξώνιο 4A εκφράζεται κυρίως στο PNS, ενώ τα επίπεδα των μεταγράφων του είναι χαμηλά στον εγκέφαλο, όπως και αυτά των εξωνίων 6 και 8. Τα εξώνια 0 (ενίοτε αναφέρεται ως -1) και 14, δεν εκφράζονται. Έντεκα εξώνια μεταγράφονται στο ΚΝΣ, για την παραγωγή των 6 διαφορετικών ισομορφών, μέσω του εναλλακτικού ματίσματος των εξωνίων 2,3 και 10. Συνεπώς αυτά είναι τα: 1, 2, 3, 4, 5, 7, 9, 10, 11, 12, 13 στη 2N4R ισομορφή (Εικόνα 1.3.3.3) [74,76-78]. Σύμφωνα με την αλληλουχία NG_007398.2 (*MAPT*) και συγκεκριμένα το μετάγραφο NM_001123066.4 (6644 bp) -που εμπεριέχει τα περισσότερα εξώνια- και μεταφράζει την πρωτεΐνη NP_001116538.2 (776 αμινοξέα), στην παρούσα διατριβή αναλύθηκαν με τη μέθοδο του Sequencing, τα ακόλουθα εξώνια: 2, 3, 4, 5, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14, τα οποία όμως ονοματίστηκαν σύμφωνα με απλή απαρίθμηση από τον αριθμό 1 μέχρι τον αριθμό 14 (εκτός τα εξώνια 4A και 8) και αντιστοιχούν στα εξώνια 1, 2, 3, 4, 5, 7, 9, 10, 11, 12, 13.



Εικόνα 1.3.3.3.: Σχηματική αναπαράσταση του γονιδίου *MAPT*, του πρωταρχικού μεταγράφοι και των 6 πρωτεϊνικών ισομορφών που εκφράζονται στον ανθρώπινο εγκέφαλο. Το γονίδιο *MAPT* αποτελείται από 16 εξώνια. Το 4A και το 8, δεν συμπεριλαμβάνονται στο πρωταρχικό μεταγράφο. Τα εξώνια -1 και 14, είναι παρόντα στο mRNA, αλλά δεν μεταφράζονται σε πρωτεΐνη [79].

Παρ' όλα αυτά έχουν ανακαλυφθεί επιπλέον TAU ισομορφές που περιέχουν το σύνολο ή τμήμα της αλληλουχίας που κωδικοποιείται από το εξώνιο 6 (το οποίο απουσιάζει από τα κανονικά ισόμορφα). Η ενσωμάτωση ολόκληρου του εξωνίου επεκτείνει την πλούσια σε προλίνη περιοχή της TAU και οδηγεί στην δημιουργία ισομορφών (6+) που μπορεί να κατέχουν ρυθμιστικό ρόλο στην νευρωνική επιμήκυνση[80].

Μεταλλάξεις στο γονίδιο *MAPT* καταγράφονται στο 50% των κληρονομικών FTD περιπτώσεων σε οικογένειες με ≥ 3 FTD νοσούντα άτομα, όπου η περίπτωση εύρεσης *MAPT* μετάλλαξης φτάνει μέχρι και το 80%[23], και οδηγούν σε FTLD-TAU παθολογία (Εικόνα 1.3.3.4). Οι εξωνικές μεταλλάξεις του *MAPT* επηρεάζουν σχεδόν αποκλειστικά τα εξώνια 9-13, με λίγες μεταλλάξεις εκτός της περιοχής αυτής, οι οποίες μειώνουν την ικανότητα της TAU να αλληλεπιδρά με τους μικροσωληνίσκους, προκαλώντας τελικά την αποσυναρμολόγηση αυτών. Η πλειονότητα των ιντρονικών μεταλλάξεων συγκεντρώνονται στο εσώνιο που ακολουθεί το εξώνιο 10, το οποίο κωδικοποιεί μέρος της περιοχής δέσμευσης μικροσωληνίσκων. Οι μεταλλάξεις σε αυτό το hotspot εναλλακτικού ματίσματος mRNA έχει αποδειχθεί ότι οδηγούν σε αύξηση της μετάφρασης 4R tau, τροποποιώντας τη φυσιολογική

Στην εικόνα 1.3.3.4. υποδεικνύονται και οι θέσεις που μπορεί να υπερφωσφορυλιωθούν (ειδικά στην πλούσια σε προλίνη περιοχή) και να οδηγήσουν σε AD ή να επηρεάσουν άλλες ταυπάθειες.



το λόγο 3R:4R (είτε αυξητικά $\uparrow$ είτε μειωτικά $\downarrow$) [83].

εμφάνισης της FTD, φαίνεται ότι ο H2 ίσως να δρα προστατευτικά ως προς την FTD[86].

❖ *PGRN* Γονίδιο

Το γονίδιο της προγρανουλίνης (*PGRN*), ενίοτε καλείται *GRN*, χαρτογραφείται στην χρωμοσωμική θέση 17q21.31 (1,7 Mb κεντρομερικά του γονιδίου *MAPT*) και περιλαμβάνει 13 εξώνια (1 και τμήματα των 2 και 13 εξωνίων μη-κωδικά). Εκφράζεται παντού, αλλά κυρίως στα επιθηλιακά, νευρικά, αιμοποιητικά κύτταρα και δρα με αυτοκρινή και παρακρινή τρόπο, συνδεόμενη σε κατάλληλους υποδοχείς. Στον άνθρωπο κωδικοποιεί για μία εκκρινόμενη πρόδρομη γλυκοπρωτεΐνη 593 αμινοξέων (88 kDa), την προγρανουλίνη (progranulin - *PGRN*) ή προεπιθιλίνη (proepithelin) ή πρόδρομη γρανουλίνη/επιθιλίνη (granulin/epithelin precursor -GEP).

Στο κεντρικό νευρικό σύστημα η ορμόνη αυτή εκφράζεται στην μικρογλοία -ιδιαίτερα αυξημένη έκφραση παρουσιάζεται στα Creutzfeldt-Jakob, AD και FTD- στον φλοιό και τον ιππόκαμπο στους πυραμιδικούς νευρώνες, στην παρεγκεφαλίδα, στα κύτταρα Purkinje και στους νωτιαίους κινητικούς νευρώνες[87,88]. Στα κύτταρα της γλοίας η έκφραση της *PGRN* είτε απουσιάζει είτε κυμαίνεται σε πολύ χαμηλά επίπεδα[89].

Η προγρανουλίνη ανήκει στην κατηγορία των γλυκοπρωτεϊνών και αποτελείται από 593 αμινοξέα (563 κωδικονίων) (88 kDa). Στο μόριο της *PGRN* περιλαμβάνεται μία αλληλουχία σηματοδότησης έκκρισης (secretory signal sequence), η διάσπαση της οποίας οδηγεί στον σχηματισμό της ώριμης προγρανουλίνης. Η τελευταία μπορεί να υποστεί περαιτέρω πρωτεολυτική πέψη στο λυσόσωμα με αποτέλεσμα την παραγωγή μίας μεγάλης ποικιλίας δραστικών πεπτιδίων με μοριακό βάρος 6 kDa (γρανουλίνες).

Από λειτουργικής άποψης, η *PGRN* και τα παραγόμενα πεπτίδια έχουν ένα ευρύ φάσμα δράσεων καθώς εμπλέκονται α) στην κυτταρική ανάπτυξη και πολλαπλασιασμό β) στην ομοιόσταση του επιθηλίου, γ) στη λειτουργία του αιμοποιητικού συστήματος, δ) στην ανοσολογική απόκριση, όπου ρυθμίζουν την ισορροπία στην παραγωγή αντιφλεγμονωδών και προφλεγμονωδών κυτοκινών και χημειοκινών [90] και ε) στην ογκογένεση [91]. Έχει επίσης αποδοθεί ένας νευροτροφικός ρόλος στην *PGRN*[92], καθώς φαίνεται όχι μόνο να προάγει την επιβίωση των νευρώνων αλλά και την αξονική έκφυση αλλά επίσης και να προστατεύει τους νευρώνες από το κυτταρικό στρες. Αντιστρόφως έχει παρατηρηθεί ότι η έλλειψη της *PGRN* συνδέεται με αυξημένο νευροεκφυλισμό και δραστηριότητα της μικρογλοίας ενώ παράλληλα

αυξάνει και την τοξικότητα του εξωκυτταρικού περιβάλλοντος [93]. Η συμμετοχή των *PGRN* μεταλλάξεων στην παθογένεση της FTD εντοπίζεται στην σύνδεσή τους με επεισόδια απορυθμισμένης ανοσολογικής απόκρισης, τα οποία μπορεί αθροιστικά να καταλήξουν σε νευροτοξικότητα και νευροεκφύλιση[94]. Υποστηρικτικά αυτής της άποψης είναι τα δεδομένα που δείχνουν ότι ο τραυματισμός, η κακοήθεια, η μόλυνση και η νευροεκφύλιση σχετίζονται με αυξημένη έκφραση της *PGRN* στον εγκέφαλο [95].

❖ *C9orf72* Γονίδιο

Η ισχυρή συσχέτιση μεταξύ FTD και ALS έχει γίνει ολοένα και πιο εμφανής λόγω ενός ταχέως διευρυνόμενου σώματος κλινικών, επιδημιολογικών, γενετικών και μοριακών στοιχείων[96] και, το 2006, ένας τύπος χαρτογραφήθηκε στο χρωμόσωμα 9p21 σε οικογένειες FTD-ALS[97]. Ο De Jesus - Hernandez και οι συνεργάτες του παρατήρησαν τη μη-μεντελική κληρονομικότητα μιας επανάληψης εξανουκλεοτιδίου GGGGCC, που εντοπίζεται σε μια μη - κωδικοποιητική περιοχή του γονιδίου *C9orf72*, η οποία επηρεάζεται στην FTD -ALS[98]. Οι επαναλήψεις αυτής της αλληλουχίας εμφανίζονται τόσο σε υγιή άτομα όσο και σε ασθενείς της FTD, ωστόσο παρατηρείται σημαντική διακύμανση στον αριθμό των επαναλαμβανόμενων μονάδων καθώς στα υγιή άτομα η επανάληψη κυμαίνεται μεταξύ 2-23 μονάδων, ενώ στους FTD/ALS ο αντίστοιχος αριθμός ανέρχεται στις 700-4400 μονάδες [99,100].

Μέχρι πρόσφατα, η *C9orf72* ήταν μια εντελώς αχαρακτήριστη πρωτεΐνη με άγνωστη λειτουργία εξαιρετικά διατηρημένη μεταξύ των ειδών. Το *C9orf72* υπόκειται σε εναλλακτικό μάτισμα, οπότε προκύπτουν τρία εναλλακτικά μετάγραφα, τα οποία κωδικοποιούν δύο πρωτεϊνικές ισομορφές. Ανάλογα με το εναλλακτικό μάτισμα προκύπτει είτε το μετάγραφο 1 στο οποίο η GGGGCC επανάληψη βρίσκεται στην περιοχή του υποκινητή είτε το μετάγραφο 2 όπου η συγκεκριμένη επανάληψη εντοπίζεται στο εσώνιο 1. Αναφορικά με την έκφρασή του *C9orf72*, έχει ανιχνευτεί σε πολλούς ιστούς, ενώ στον εγκέφαλο συγκεκριμένα τα 3 εναλλακτικά μετάγραφα εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα των νευρώνων[101].

Τα μέχρι τώρα δεδομένα υποστηρίζουν τη συμμετοχή της GGGGCC επανάληψης στην ανάπτυξη της ασθένειας μέσω τριών πιθανών μηχανισμών: α) Loss-of-function μηχανισμός, β) Gain-of-function μηχανισμός, ο οποίος βασίζεται στην παρεμπόδιση του φυσιολογικού ματίσματος του *C9orf72* (RNA τοξικότητα) και γ) RNA - μεσολαβούμενος μηχανισμός gain-

of-function, οπότε παράγονται μη-φυσιολογικές ποσότητες τοξικών μορίων RNA και διπεπτιδίων, τα οποία διαταράσσουν τις φυσιολογικές κυτταρικές οδούς [102-104].

❖ *TARDBP* Γονίδιο

Το *TARDBP* γονίδιο εντοπίζεται στη θέση 1p36.22, αποτελείται από 7 εξώνια (5 κωδικά και 2 μη κωδικά) και κωδικοποιεί την πρωτεΐνη TDP-43. Παρά την ανακάλυψη πολλών μεταλλάξεων του γονιδίου *TARDBP* στην οικογενή και σποραδική ALS, λίγες μελέτες έχουν δείξει κάποια συσχέτιση μεταξύ τέτοιων μεταλλάξεων και FTD νόσου[105]. Οι περισσότερες μεταλλάξεις του *TARDBP* γονιδίου οδηγούν στην συνύπαρξη της FTD με κινητικά νοσήματα (π.χ. MND/FTD, FTD/PSPκ.α.)[106].

Το 2009, έγινε η πρώτη αναφορά *TARDBP* μετάλλαξης που σχετιζόταν με καθαρή FTD, από τους Borroni et al., οι οποίοι παρουσίασαν έναν bvFTD ασθενή, φορέα της παθογόνου μετάλλαξης N267S[107]. Λίγα χρόνια αργότερα οι Moreno et al. (2015) παρουσίασαν έναν FTD ασθενή, ο οποίος ήταν φορέας της μετάλλαξης P112H μετάλλαξης και χαρακτηριζόταν από την παρουσία TDP-43(+) έγκλειστων, TAU(-) β-αμυλοειδών νευριτικών πλακών και άτυπη 4R-TAUπάθεια[106]. Επίσης, πολυμορφισμός στο *TARDBP* γονίδιο p.I383V (rs80356740) έχει αναφερθεί ως πιθανά παθογενετικός σε δημοσίευση του εργαστηρίου μας, σε μια ομάδα Ελλήνων FTD ασθενών [108].

Η πλειονότητα των μεταλλάξεων βρίσκονται στην πλούσια σε γλυκίνη περιοχή του καρβοξυτελικού άκρου[109]. Ορισμένες παρανοηματικές μεταλλάξεις του γονιδίου μπορούν να προκαλέσουν τοξικό gain-of-function, μέσω ενδοκυτταρικής συσσώρευσης και συσσωμάτωσης των TDP-43 θραυσμάτων, αλλά και loss-of-function, μέσω έκτροπης φωσφορυλίωσης και κυτταρικής κατανομής της TDP-43[105]. Παρά το γεγονός ότι σπανίως η FTD προκαλείται από *TARDBP* μεταλλάξεις, θεωρείται μεγάλης σημασίας ο έλεγχος ύπαρξης μεταλλάξεων αυτού του γονιδίου σε ασθενείς με ή χωρίς συμπτώματα MND, ειδικά όταν πιο συχνά γενετικά αίτια (*PGRN*, *C9orf72*, *MAPT*) έχουν αποκλειστεί και το οικογενειακό ιστορικό είναι πολύπλοκο και περιλαμβάνει παρκινσονισμό, MND και FTD[106,107].

1.4. Βιοχημικοί βιοδείκτες στις άνοιες

1.4.1 Βιοδείκτες στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό (ENY)

Αρχικά η διάγνωση των νευροεκφυλιστικών ανοιών βασιζόταν στο ιατρικό ιστορικό, την κλινική εξέταση και την εφαρμογή νευροψυχολογικών δοκιμασιών. Ωστόσο, η κατανόηση της μοριακής και γενετικής βάσης αυτής της νευροεκφυλιστικής νόσου ανέδειξε την ανάγκη αξιοποίησης μορίων-βιοδεικτών για την συσχέτιση των παθοφυσιολογικών αλλαγών με την κλινική εικόνα των ασθενών. Για αυτό το λόγο, αναθεωρήθηκαν τα διαγνωστικά κριτήρια της AD και αναγνωρίστηκαν τρεις φάσεις εξέλιξης της νόσου: α) Προκλινική φάση, β) Προ-ανοιακή φάση και γ) Συμπτωματική φάση. Μάλιστα στα αναθεωρημένα κριτήρια ενσωματώθηκαν βιοδείκτες οι οποίοι παρουσιάζουν συσχέτιση με κάθε φάση της ασθένειας. Τα κριτήρια κατηγοριοποιούνται ως εξής: α) βιοδείκτες στο ENY και β) τοπογραφικοί βιοδείκτες (απεικονιστικές εξετάσεις MRI και PET scan).

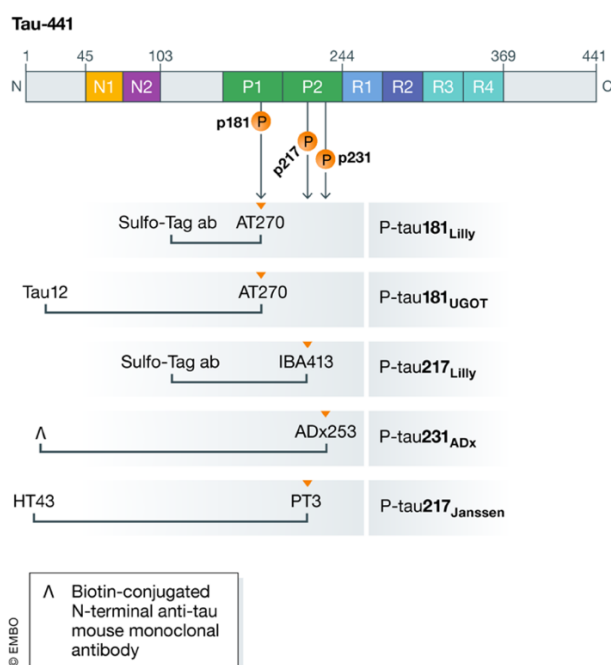
Εξαιτίας της άμεσης επαφής του με το κεντρικό νευρικό σύστημα, το εγκεφαλονωτιαίο υγρό έχει αποδειχθεί ιδανική πηγή πληροφοριών όχι μόνο για την ανίχνευση αλλά και τη μέτρηση βιοχημικών ανωμαλιών μέσα στον εγκέφαλο [110]. Οι κυριότεροι βιοδείκτες στο ENY, είναι το β-αμυλοειδές πεπτίδιο, αβ42, μόνο του αλλά και σε λόγο με το αβ40 (αβ42/αβ40) [111], η ολική πρωτεΐνη tau και η φωσφορυλιωμένη πρωτεΐνη tau[112]. Οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενες ισομορφές της φωσφορυλιωμένης πρωτεΐνης tau είναι εκείνες όπου η φωσφορυλίωση εντοπίζεται στα κατάλοιπα θρεονίνης στις θέσεις 181 ή 231 [113]. Πολλές έρευνες αποδεικνύουν ότι το προφίλ βιοδεικτών της νόσου AD, αποτελείται από μειωμένες συγκεντρώσεις αβ42 στο ENY και ταυτόχρονα αυξημένες συγκεντρώσεις tau και φωσφορυλιωμένης tau πρωτεΐνης, συγκριτικά με τους υγιείς πληθυσμούς [114].

Οι αυξήσεις της tau και p-tau στο ENY πιστεύεται ότι αντιπροσωπεύουν νευρωνικό εκφυλισμό, ενώ μειώσεις στο Αβ αμυλοειδές (1-42), πιθανώς, αντικατοπτρίζουν την εναπόθεση πλακών. Οι συγκεκριμένοι βιοδείκτες έχουν μελετηθεί εντατικά στο ENY και τα αποτελέσματα δείχνουν ευαισθησία 81% για την tau και 86% για την Αβ42 και ειδικότητα 90%[114]. Η tau πρωτεΐνη φαίνεται αυξημένη σε αρκετές νευροεκφυλιστικές καταστάσεις και για αυτό θεωρείται περισσότερο ευαίσθητος και λιγότερο ειδικός βιοδείκτης για την AD νόσο [115]. Σε αντίθεση

η p-tau ενισχύει την ειδικότητα για τη νόσο του AD, μέσα σε μια μεγάλη ποικιλία νευροεκφυλιστικών συνδρόμων [116].

Ο βιοδείκτης αβ42 απεικονίζεται ως ιδιαίτερα ελκυστικός για την πρόιμη ανίχνευση της νόσου του AD καθώς οι αλλαγές στην tau και ptau φαίνεται να συμβαίνουν σε μεταγενέστερο χρονικό σημείο της διαδικασίας της νόσου πιο κοντά στην κλινικά ανιχνεύσιμη άνοια[117]. Η αναλογία p-tau181/αβ42 φαίνεται να έχει μεγαλύτερη διαγνωστική αξία, από ότι οι δύο αυτές παράμετροι χωριστά αλλά και από τον λόγο tau/αβ42 για τον διαχωρισμό των AD ασθενών από τους non-AD[118].

Η ταυτοποίηση της φωσφορυλιωμένης tau πρωτεΐνης ως βασικό συστατικό των νευροϊνδιακών δεματίων[119,120], οδήγησε στην ανακάλυψη μορφών της p-tau στο ENY[121] στοχοποιώντας συγκεκριμένα κατάλοιπα σερίνης και θρεονίνης (Εικόνα 1.4.1.1). Παρά το γεγονός ότι υπάρχουν αρκετές θέσεις φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης tau[122], η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη είναι η φωσφορυλίωση στη θρεονίνη 181. Χρησιμοποιώντας αυτό το εύρημα, η ptau181 είναι εκείνη που παρατηρείται αυξημένη στους ασθενείς με νόσο AD[123]. Στις μέρες μας, αξιολογούνται επίσης οι μετρήσεις της p-tau231 και της p-tau217 τόσο στο ENY[124] όσο και στο πλάσμα[125].



Εικόνα 1.4.1.1: Σχηματική αναπαράσταση των διαφορετικών μορφών της φωσφορυλιωμένης πρωτεΐνης tau[111].

Αναφορικά με τους βιοδείκτες της FTD στο ENY έχει βρεθεί αρχικά ότι τα αυξημένα επίπεδα της πρωτεΐνης tau και της φωσφορυλιωμένης μορφής της στο ENY είναι ενδεικτικά του νευρικού εκφυλισμού, ενώ παράλληλα η μειωμένη συγκέντρωση του Αβ αμυλοειδούς (1-42) αντικατοπτρίζει την δημιουργία και εναπόθεση των αμυλοειδών πλακών. Έτσι, αυτά τα δύο χαρακτηριστικά συνεκτιμώνται μέσω προσδιορισμού της αναλογίας TAU:Αβ αμυλοειδές (1-42) στο ENY και αποτελούν έναν ευαίσθητο δείκτη για τη διαφοροδιάγνωση της FTD και της AD. Συγκεκριμένα η FTD χαρακτηρίζεται από μικρή αναλογία TAU:Αβ αμυλοειδές (1-42) σε αντίθεση με την AD στην οποία οι τιμές της συγκεκριμένης αναλογίας είναι αυξημένες. Έχει βρεθεί ότι τα επίπεδα της ολικής TAU (T-TAU) στο ENY, έχουν 72% ευαισθησία και 69% ειδικότητα στην διαφοροδιάγνωση της AD με την FTD. Ωστόσο αξίζει να αναφερθεί ότι δεν υπάρχει απόλυτη συμφωνία μεταξύ των μελετών αναφορικά με τα επίπεδα της T-TAU στο ENY. Συγκεκριμένα η πλειονότητα των πειραματικών δεδομένων δείχνουν χαμηλότερα επίπεδα της T-TAU στους FTD ασθενείς σε σχέση με τους AD, ωστόσο υπάρχουν και μελέτες που υποστηρίζουν την εξίσου αυξημένη συγκέντρωση της T-TAU τόσο στους FTD όσο και στους AD ασθενείς και αυξημένη φωσφορυλιωμένη TAU (PTAU) μόνο στους τελευταίους[126-130].

Η πρώιμη διαγνωστική αξία των υπαρχόντων βιοδεικτών μπορεί να αυξηθεί ακόμα περισσότερο με την προσθήκη του αβ40, αφού ο σχηματισμός αμυλοειδικών πλακών φαίνεται να ξεκινά έως και είκοσι χρόνια πριν από την έναρξη των κλινικών συμπτωμάτων. Η χρήση του λόγου αβ42/αβ40 ανοίγει νέες δυνατότητες για τον ακριβή εντοπισμό ατόμων «ασυμπτωματικών σε κίνδυνο για AD» για κλινικές δοκιμές [118].

Ωστόσο, δεν είναι αρκετά εύκολο να διαχωριστούν οι νόσοι που εμπεριέχονται στο ευρύ φάσμα «άνοιες». Ο μόνος τύπος άνοιας που μπορεί ίσως καλύτερα να διαγνωστεί με ακρίβεια με τη χρήση των βιοδεικτών είναι η νόσος AD, η οποία όπως αναφέρθηκε χαρακτηρίζεται από αυξημένη ολική tau πρωτεΐνη και ακόμα περισσότερο φωσφορυλιωμένη tau. Για τον λόγο αυτό, η χρήση του λόγου p-tau/αβ42 είναι καίριας σημασίας για τον διαχωρισμό του AD ατόμου από το ανοϊκό άτομο. Υπάρχουν φυσικά ενδείξεις και για τους υπόλοιπους τύπους ανοιών. Ο υδροκέφαλος παρουσιάζει σημαντική μείωση τόσο της ολικής tau πρωτεΐνης όσο και της φωσφορυλιωμένης tau. Η άνοια με σωμάτια Lewy δεν έχει αυξημένη την φωσφορυλιωμένη tau πρωτεΐνη και χρειάζεται μία ακόμα εξέταση για τον εντοπισμό της, την α-συνουκλεΐνη, η οποία

παρατηρείται μειωμένη. Το σύνδρομο Creutzfeldt-Jacob, χαρακτηρίζεται από σημαντικά αυξημένη ολική tau πρωτεΐνη, όχι όμως και φωσφορυλιωμένη tau. Τέλος, στην αγγειακή άνοια υπάρχει μόνο μια μέτρια αύξηση της ολικής tau πρωτεΐνης.

Η θεραπεία για τέτοιου είδους ασθένειες δυστυχώς δεν υπάρχει. Η αξία όμως των βιοδεικτών με σκοπό τη διαφοροδιάγνωση των τύπων άνοιας αποδεικνύεται σημαντική. Στις μέρες μας, όταν ένα ανοϊκό άτομο, φτάνει στο σημείο της διάγνωσης είναι πολύ αργά. Με τη βοήθεια όμως των βιοδεικτών θα μπορέσει να βοηθηθεί στην έγκαιρη διάγνωση της νόσου. Είναι σημαντικός ο διαχωρισμός του AD από τους άλλους τύπους άνοιας, διότι η φαρμακευτική αγωγή που είναι διαθέσιμη αυτή τη στιγμή είναι διαφορετική για τον κάθε έναν από αυτούς. Για παράδειγμα, όσον αφορά την FTD πρέπει να αποφεύγονται οι αναστολείς τόσο της ακετύλο- όσο και της βούτυλο- χολινεστεράσης (Aricept / Exelon). Η διάρκεια της ζωής του ατόμου είναι δυνατόν να παραταθεί με μειωμένες επιπτώσεις για τον ίδιο και την οικογένεια του μετά από την έγκαιρη διάγνωση μιας τέτοιας ασθένειας. Επίσης, είναι εξίσου σημαντικό να βελτιωθούν και να τελειοποιηθούν οι μεθοδολογίες μέτρησης βιοδεικτών στο ENY, ούτως ώστε να μετατεθεί η μέτρησή τους στο πλάσμα. Έτσι, η διαδικασία θα είναι πιο εύκολη, λιγότερο χρονοβόρα και καθόλου επίπονη για τον ασθενή, συγκριτικά με την νωτιαία παρακέντηση που πραγματοποιείται σήμερα. Τέλος, στόχος ενός κλινικού εργαστηρίου είναι να ενσωματώνονται στη ρουτίνα του νεότερες, ιχνηλάσιμες με κατάλληλα πιστοποιημένα υλικά αναφοράς και πιο εύκολες, αυτοματοποιημένες μεθοδολογίες, με σκοπό να απομακρυνθεί κάποια στιγμή η ELISA, η οποία πραγματοποιείται χειροκίνητα και απαιτεί προσωπικό και δύο ημέρες για την ολοκλήρωσή της.

2. Θεωρητικό Υπόβαθρο Μεθόδων

2.1. Συμβατική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase chain reaction, PCR) είναι ίσως η ευρύτερα χρησιμοποιούμενη μέθοδος της μοριακής βιολογίας, με αναρίθμητες εφαρμογές τόσο σε ερευνητικό όσο και σε διαγνωστικό επίπεδο. Ανακαλύφθηκε το 1983 από τον βιοχημικό Kary Mullis, που εργαζόταν στην εταιρεία βιοτεχνολογίας Cetus της Καλιφόρνιας. Για την ανακάλυψη αυτή τιμήθηκε 10 χρόνια αργότερα με το βραβείο Νόμπελ Χημείας. Η PCR είναι μια ενζυμική μέθοδος ενίσχυσης συγκεκριμένων τμημάτων γενετικού υλικού *in vitro*. Κατά τη διάρκεια μιας τυπικής αντίδρασης PCR το επιθυμητό τμήμα γενετικού υλικού πολλαπλασιάζεται μέχρι και ένα τρισεκατομμύριο φορές, γεγονός που είναι απαραίτητο για μετέπειτα καθοδικούς χειρισμούς, όπως η ηλεκτροφόρηση, η ανάγνωση της αλληλουχίας βάσεων κ.ά.

Τα απαραίτητα συστατικά για την διαδικασία αυτή είναι:

- Δυο συνθετικοί νουκλεοτιδικοί εκκινητές (~20 νουκλεοτίδια ο καθένας), συμπληρωματικοί περιοχών σε αντίθετες πλευρές των δύο αλυσίδων έτσι ώστε να περικλείεται ανάμεσα τους το DNA-στόχος. Οι εκκινητές αυτοί μετά την υβριδοποίηση με το DNA στόχο έχουν τα 3' –OH άκρα αντικριστά μεταξύ τους.
- Μια αλληλουχία-στόχος, δείγματος DNA, που βρίσκεται μεταξύ του ζεύγους των εκκινητών και μπορεί να έχει μήκος 100-35000 bp.
- Θερμοανθεκτική DNA πολυμεράση, ώστε να αντέχει στις υψηλές θερμοκρασίες που απαιτούνται για να εντοπίσουν οι εκκινητές τις συμπληρωματικές αλληλουχίες νουκλεοτιδίων του DNA.
- Τέσσερα τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs).

Η DNA πολυμεράση χρησιμοποιεί μονόκλωνο μόριο DNA ως εκμαγείο για τη σύνθεση ενός νέου συμπληρωματικού κλώνου. Τα μονόκλωνα μόρια μπορούν να παραχθούν με απλό τρόπο από δίκλωνα μόρια του DNA, όταν θερμαίνονται σε υψηλές θερμοκρασίες, οπότε αποχωρίζονται. Η DNA πολυμεράση απαιτεί επίσης την παρουσία ενός μικρού τμήματος δίκλωνου DNA για την έναρξη της σύνθεσης. Επομένως το σημείο έναρξης της σύνθεσης του

DNA μπορεί να καθοριστεί με την χρήση ενός ολιγονουκλεοτιδίου εναρκτήριου μορίου (εκκινητή, primer), που συνδέεται με την μήτρα σε αυτό ακριβώς το σημείο. Έτσι με την κατάλληλη επιλογή εκκινητών μπορούμε να κατευθύνουμε τη DNA πολυμεράση να συνθέσει συγκεκριμένη περιοχή του DNA.

Μια τυπική PCR διαδικασία περιέχει έναν αριθμό επαναλαμβανόμενων κυκλικών διαδικασιών για τον πολλαπλασιασμό του DNA στόχου. Κάθε κύκλος περιέχει τρία βήματα:

- 1^ο βήμα: **Αποδιάταξη**. Το πρώτο στάδιο είναι η θερμική αποδιάταξη της δίκλωνης αλυσίδας στόχου, που επιτυγχάνεται αυξάνοντας τη θερμοκρασία στο σωληνάριο αντίδρασης στους 95 °C. Στο στάδιο αυτό στο σωληνάριο αντίδρασης περιέχονται: τα dNTPs, η θερμοανθεκτική πολυμεράση και το ζεύγος εκκινητών σε περίσσεια. Η θερμοκρασία διατηρείται εκεί για ένα μικρό χρονικό διάστημα.
- 2^ο βήμα: **Υβριδισμός**. Στο δεύτερο στάδιο, του υβριδισμού, η θερμοκρασία του μίγματος σταδιακά κατεβαίνει περίπου στους 45-65 °C (η θερμοκρασία αυτή ποικίλει ανάλογα με τις ακολουθίες). Κατά τη διάρκεια αυτού του σταδίου οι εκκινητές σχηματίζουν ζεύγη βάσεων με τις συμπληρωματικές περιοχές του DNA στόχου.
- 3^ο βήμα: **Επέκταση**. Στο τρίτο στάδιο, η θερμοκρασία αυξάνεται στους 72 °C, όπου είναι η βέλτιστη θερμοκρασία για την καταλυτική δράση της πολυμεράσης. Ο χρόνος επώασης ποικίλει ανάλογα με το μήκος του τμήματος στόχου. Η σύνθεση του DNA αρχίζει στο 3' –OH άκρο κάθε εκκινητή.

2.2. DNA Ηλεκτροφόρηση σε γέλη αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση σε αγαρόζη (agarose gel electrophoresis) είναι η πιο κοινή, απλή και γρήγορη τεχνική ανάλυσης νουκλεϊκών οξέων. Χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό, την ταυτοποίηση και την απομόνωση τμημάτων DNA που συντίθενται κατά την PCR. Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στο γεγονός ότι το DNA είναι αρνητικά φορτισμένο σε ουδέτερο pH λόγω των φωσφορικών ομάδων του και κατά συνέπεια θα μετακινηθεί προς την άνοδο (το θετικά φορτισμένο ηλεκτρόδιο) όταν εφαρμοσθεί ηλεκτρικό πεδίο. Ο διαχωρισμός των νουκλεϊκών οξέων επιτυγχάνεται ανάλογα με το μοριακό τους βάρος όταν αυτά ηλεκτροφορηθούν σε γέλη

πολυμερούς. Η ταχύτητα μετακίνησης των μορίων DNA είναι αντιστρόφως ανάλογη του δεκαδικού λογαρίθμου του αριθμού των βάσεων τους. Έτσι, τα μικρότερα μόρια DNA μετακινούνται στην πηκτή πιο γρήγορα από τα μεγαλύτερα. Επειδή η γέλη εμποδίζει την τυχαία διάχυση των μορίων, τα μόρια διαφορετικού μεγέθους διαχωρίζονται σε «ζώνες». Η συγκέντρωση της αγαρόζης που χρησιμοποιείται σε κάθε εφαρμογή εκφράζεται σε %w/v και εξαρτάται από την ικανότητα διάκρισης (resolution) που επιδιώκεται. Η γέλη αγαρόζης είναι διαπερατή για χρωστικές, όπως το βρωμιούχο αιθίδιο, το οποίο έχει τη δυνατότητα να παρεμβάλλεται στη διπλή έλικα και να σχηματίζει φθορίζον σύμπλοκο με το DNA, καθιστώντας ορατές τις ζώνες των διαχωρισμένων μορίων.

2.3. Αντίδραση θερμικών κύκλων (cycle sequencing)

Η αντίδραση των θερμικών κύκλων είναι παρόμοια με αυτή της PCR και εκτελέστηκε με εκτελείται με το Kit Big Dye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing της Applied Biosystem (Thermo Fisher Scientific). Τα περισσότερα συστατικά που χρησιμοποιούνται είναι τα ίδια με αυτά της PCR και ακολουθείται η ίδια διαδικασία με θερμικούς κύκλους. Μια διαφορά είναι ότι μόνο ένας εκκινητής χρησιμοποιείται σε κάθε αντίδραση cycle sequencing (είτε ο πρόσθιος είτε ο ανάστροφος), με αποτέλεσμα η ενίσχυση του προϊόντος να είναι γραμμική και όχι εκθετική. Μια άλλη διαφορά είναι ότι προστίθενται επιπλέον διδεοξυνουκλεοτίδια (ddNTPs) που διακόπτουν την επέκταση του DNA όταν ενσωματωθούν. Τα διδεοξυνουκλεοτίδια είναι νουκλεοτίδια που τους λείπει η 3'-υδροξυλομάδα στο σάκχαρο της δεοξυριβόζης τους. Αφού η δεοξυριβόζη έχει ήδη έλλειψη της 2'-OH, η διδεοξυριβόζη έχει έλλειψη των υδροξυλομάδων και στον 2' και στον 3' άνθρακα. Λόγω της έλλειψης αυτής αφού η DNA πολυμεράση προσθέσει ένα διδεοξυνουκλεοτίδιο στην νεοσυντιθέμενη αλυσίδα, δεν μπορούν να προσδεθούν από εκεί και πέρα άλλα νουκλεοτίδια, αφού δεν μπορεί να δημιουργηθεί φωσφοδιεστερικός δεσμός ο οποίος είναι απαραίτητος για την ένωση των δύο δεοξυριβονουκλεοτιδίων. Έτσι τερματίζεται η επέκταση της αλυσίδας. Επειδή η αντίδραση του cycle sequencing είναι μια διαδικασία γραμμικής ενίσχυσης είναι λιγότερο επιρρεπής στις επιμολύνσεις, αλλά παρόλα αυτά δεν παύει να χρειάζεται στείρες συνθήκες.

Όσο αφορά τον εκκινητή που επιλέχθηκε για την γραμμική ενίσχυση του κάθε εξωνίου, η επιλογή έγινε ώστε η απόσταση μεταξύ εκκινητή και αρχής του εξωνίου να είναι γύρω στα 100-120 bp, κάτι που θα διευκόλυνε την μετέπειτα διαδικασία αλληλούχησης.

2.4. Ανάλυση της αλληλουχίας DNA (DNA Sequencing)

Η ενζυμική μέθοδος αλληλούχησης κατά Sanger, βασίζεται κατά κύριο λόγο στην αντιγραφή του DNA και στην ικανότητα της DNA πολυμεράσης να χρησιμοποιεί εκτός των τριφωσφορικών δεοξυνουκλεοτιδίων, και τα 2',3' - τριφωσφορικά διδεοξυνουκλεοτίδια σαν υποστρώματα. Κατά την διαδικασία αντιγραφής του DNA το άτομο άνθρακα στο 5' άκρο του dNTP ενώνεται με το άτομο άνθρακα στο 3' άκρο στο τέλος της αλυσίδας. Οι ομάδες υδροξυλίου σε κάθε θέση σχηματίζουν εστερικούς δεσμούς με ένα κεντρικό άτομο φωσφόρου και η αλυσίδα επιμηκώνεται. Το κλειδί στην αλληλούχιση κατά Sanger είναι η ιδιαίτερη χημεία των διδεοξυνουκλεοτιδίων. Όπως γίνεται με ένα dNTP, έτσι και ένα ddNTP ενσωματώνεται στην αλυσίδα σχηματίζοντας έναν φωσφοδιεστερικό δεσμό στο 5' άκρο. Ωστόσο το ddNTP δεν έχει ομάδα υδροξυλίου (OH) στη θέση 3' που είναι απαραίτητη για τη δημιουργία δεσμού με ένα εισερχόμενο νουκλεοτίδιο. Έτσι η προσθήκη ενός ddNTP, όπως προαναφέρθηκε, σταματά την επιμήκυνση της αλυσίδας. Για την αντίδραση του προσδιορισμού της αλληλουχίας του DNA, το δείγμα του οποίου πρόκειται να προσδιοριστεί η αλληλουχία συνδυάζεται με τον επιλεγμένο εκκινητή, την DNA πολυμεράση και τα τριφωσφορικά νουκλεοτίδια DNA. Προστίθενται και τα τέσσερα επισημασμένα με φθορίζουσα ουσία διδεοξυνουκλεοτίδια που τερματίζουν την αλυσίδα, αλλά φυσικά σε μικρότερες ποσότητες. Καθένα από αυτά τα νουκλεοτίδια έχει μια μοναδική φθορίζουσα ετικέτα. Στη συνέχεια, ο ολιγονουκλεοτιδικός εκκινητής υβριδίζεται στον 3'-5' κλάδο του προς προσδιορισμό DNA και με τη βοήθεια της DNA πολυμεράσης επεκτείνεται σε κατεύθυνση 5'-3' συμπληρωματικά στον αντιγραφόμενο κλάδο με την ανάπτυξη φωσφοδιεστερικών δεσμών ανάμεσα στο 3' άκρο του εκκινητή και το 5' άκρο του προστιθέμενου νουκλεοτιδίου που δρα ως δομικός λίθος. Η DNA πολυμεράση θα συνεχίσει την προσθήκη νουκλεοτιδίων μέχρι να λάβει χώρα η προσθήκη ενός διδεόξυνουκλεοτιδίου αντί για ένα κανονικό. Σε αυτό το σημείο, ο κλώνος θα σταματήσει την επιμήκυνσή του καθώς δεν μπορούν να προστεθούν άλλα νουκλεοτίδια. Αυτή η διαδικασία επαναλαμβάνεται σε διάφορους κύκλους. Έτσι το σωληνάριο στο τέλος θα περιέχει εκατομμύρια ολιγονουκλεοτιδικά αντίγραφα της αλληλουχίας ενδιαφέροντος.

2.5. MLPA μεθοδολογία

Η MLPA (Multiplex Ligation – dependent Probe Amplification) είναι μια μέθοδος πολλαπλής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης, ημι-ποσοτική και μη-αυτοματοποιημένη, η οποία ανιχνεύει μη φυσιολογικούς αριθμούς αντιγράφων ταυτόχρονα, μέχρι και σε εξήντα αλληλουχίες DNA με μία μόνο πολλαπλή αντίδραση PCR και είναι ικανή να ξεχωρίζει αλληλουχίες που διαφέρουν κατά ένα μόνο νουκλεοτίδιο. Η τεχνική αυτή είναι εύκολη στη χρήση καθώς απαιτεί μόνο έναν θερμικό κυκλοποιητή και τριχοειδική ηλεκτροφόρηση. Τα αποτελέσματα είναι διαθέσιμα μέσα σε 24 ώρες και μπορούν να πραγματοποιηθούν ταυτόχρονα μέχρι και 96 δείγματα. Παρόλο που για τις περισσότερες κληρονομικές καταστάσεις, οι απαλοιφές γονιδίων ή ο διπλασιασμός είναι λιγότερο του 10 % όλων των παραλλαγών, υπάρχουν και γενετικές ανωμαλίες που το ποσοστό αυτό μπορεί να αγγίζει το 30 %.

Η MLPA αντίδραση δεν βασίζεται σε αλληλουχίες που ενισχύονται, αλλά σε MLPA ανιχνευτές που υβριδίζονται στην αλληλουχία στόχο (δύο ανιχνευτές ανά περιοχή). Οι ανιχνευτές αυτοί περιέχουν επίσης αλληλουχίες κοινών εκκινητών. Έτσι, σε αντίθεση με μία τυπική PCR χρησιμοποιείται μόνο ένα σετ κοινών εκκινητών. Το μέγεθος των προϊόντων που ενισχύονται είναι μεταξύ 130 και 480 νουκλεοτιδίων και πρέπει να διαφέρουν μεταξύ τους ώστε να μπορεί να λάβει χώρα αντίδραση θραυσμάτων με τριχοειδική ηλεκτροφόρηση. Ο ένας PCR εκκινητής είναι επισημασμένος με φθορισμό επιτρέποντας τα ενισχυμένα προϊόντα να γίνουν ορατά κατά το διαχωρισμό κλασμάτων στο όργανο όπου πραγματοποιείται η ηλεκτροφόρηση. Ο διαχωρισμός αυτός δίνεται από μια εικόνα που λαμβάνεται από τον γενετικό αναλυτή. Στην εικόνα αυτή εμφανίζονται κορυφές από το κάθε ενισχυμένο τμήμα.

Οι κορυφές του δείγματος που εμφανίζονται στο διάγραμμα συγκρίνονται με τις κορυφές τριών δειγμάτων, τα οποία έχουν οριστεί ως δείγματα αναφοράς. Το ύψος της κάθε κορυφής του κάθε ενισχυμένου ζεύγους ανιχνευτών, συγκρίνεται με την κορυφή του ενισχυτή των δειγμάτων αναφοράς, αντικατοπτρίζοντας με αυτό τον τρόπο τον αριθμό αντιγράφων της αντίστοιχης αλληλουχίας σε ένα δείγμα. Μια έλλειψη ενός ή περισσότερων αλληλουχιών-στόχων είναι ορατή ως μια σχετική μείωση στο ύψος της κορυφής, ενώ η αύξηση στο ύψος της κορυφής αντικατοπτρίζει και μια αύξηση στον αριθμό των αντιγράφων.

Η αντίδραση MLPA, μπορεί να χωριστεί σε πέντε βασικά στάδια:

- i. Αποδιάταξη DNA και υβριδισμός MLPA ανιχνευτών
- ii. Αντίδραση λιγάσης
- iii. Αντίδραση PCR με κοινούς εκκινητές (ο ένας εκ των οποίων φθορίζει)
- iv. Διαχωρισμός των ενισχυμένων προϊόντων με τριχοειδική ηλεκτροφόρηση
- v. Ανάλυση δεδομένων

Κατά τη διάρκεια του πρώτου σταδίου της αντίδρασης αναδιατάσσεται πλήρως το DNA και επωάζεται για 16-20 ώρες με το μίγμα των ζευγών των MLPA ανιχνευτών. Το κάθε ζεύγος ανιχνευτών για μια ορισμένη γενωμική περιοχή αποτελείται από δύο διαφορετικά ολιγονουκλεοτίδια που το καθένα περιέχει μια κοινή συμπληρωματική αλληλουχία ενός PCR εκκινητή (το ένα του προσθίου και το άλλο του αντίστροφου). Οι δύο ανιχνευτές υβριδίζονται στις αλληλουχίες στόχους και μόνο όταν υβριδιστούν στις αλληλουχίες στόχους μπορούν να ενωθούν κατά την διάρκεια του δεύτερου σταδίου λιγάσης και άρα να ενισχυθούν στη συνέχεια κατά τη διάρκεια της PCR αντίδρασης με τους κοινούς εκκινητές. Ο αριθμός προϊόντων των ανιχνευτών που έχουν ενωθεί είναι το μέτρο του αριθμού των αλληλουχιών στόχων που υπάρχουν στο δείγμα. Τα επισημασμένα με φθορισμό προϊόντα διαχωρίζονται με τριχοειδή ηλεκτροφόρηση με βάση το μέγεθος τους. Παράλληλα χρησιμοποιείται και δείκτης μοριακού βάρους επισημασμένος με διαφορετική φθορίζουσα ουσία. Οι ανιχνευτές που δεν έχουν ενωθεί δεν παράγουν σήμα, και έτσι η MLPA είναι εύκολο να διεξαχθεί.

Πλεονεκτήματα της MLPA αντίδρασης

- Οι μέθοδοι που αρχικά αναπτύχθηκαν για να ανιχνεύουν τις σημειακές παραλλαγές, όπως το sequencing, δεν μπορούν να ανιχνεύσουν αλλαγές στον αριθμό των αντιγράφων.
- Η ανάλυση Southern blot, θα ανιχνεύσει πολλές μεγάλες αναδιατάξεις αλλά όχι μικρές απαλοιφές και δεν είναι ιδανική για τεχνική ρουτίνας.
- Η MLPA δεν είναι μόνο πολλαπλή τεχνική αλλά μπορεί να ανιχνεύσει αλλαγές στον αριθμό μικρών αλληλουχιών στόχων (50-70 νουκλεοτίδια), τα οποία είναι πολύ μικρά για να ανιχνευτούν με τη FISH.
- Μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε απομονωμένο DNA.
- Έχει χαμηλό κόστος και δεν είναι πολύπλοκη.

2.6. Ανοσοενζυμική μέθοδος στο πλάσμα (ELISA)

Η ανοσοενζυμική μέθοδος ELISA είναι μια ανοσοχημική μέθοδος ανίχνευσης της παρουσίας ενός αντισώματος ή ενός αντιγόνου σε ένα δείγμα και ανήκει στις δοκιμασίες άμεσης δέσμευσης. Εν συντομία, η αρχή της μεθόδου αποτελείται από την προσκόλληση ενός αντισώματος πάνω σε μία σταθερή επιφάνεια, την προσθήκη του δείγματος μέσα στο οποίο περιέχεται το επιθυμητό αντιγόνο και έπειτα από επώαση, την πρόσδεση αντιγόνου-αντισώματος. Κατόπιν, προστίθεται διαφορετικό αντίσωμα, το οποίο είναι επισημασμένο, που ανιχνεύει άλλο αντιγονικό επίτοπο και ακολουθεί ποσοτικοποίηση. Τα συζευγμένα ένζυμα επιλέγονται με βάση την ικανότητά τους να καταλύουν τη μετατροπή ενός υποστρώματος σε έγχρωμο, φθορίζον ή χημειοφωταυγές προϊόν το οποίο στη συνέχεια προσδιορίζεται ποσοτικά. Η ένταση της εκπομπής είναι ανάλογη με την συγκέντρωση του βιομορίου που μελετάται. Μέχρι σήμερα, έχει αναπτυχθεί ένας αριθμός παραλλαγών της βασικής δοκιμασίας ELISA. Κάθε τύπος ELISA μπορεί να χρησιμοποιηθεί ποιοτικά για την ανίχνευση της παρουσίας αντισώματος ή αντιγόνου. Εναλλακτικά, μια τυπική καμπύλη που βασίζεται σε γνωστές συγκεντρώσεις αντισώματος ή αντιγόνου μπορεί να παρασκευαστεί και να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης ενός δείγματος.

A) Έμμεση ELISA

Το αντίσωμα μπορεί να ανιχνευθεί ή να προσδιοριστεί η συγκέντρωσή του με μια έμμεση ανάλυση ELISA. Ορός ή κάποιο άλλο δείγμα που περιέχει πρωτογενές αντίσωμα (Ab1) προστίθεται σε ένα επικαλυμμένο με αντιγόνο φρεάτιο μικροτιτλοδότησης και αφήνεται να αντιδράσει με το αντιγόνο που είναι συνδεδεμένο στο φρεάτιο. Μετά την έκπλυση οποιουδήποτε ελεύθερου Ab1, το αντίσωμα που είναι δεσμευμένο στο αντιγόνο ανιχνεύεται με την προσθήκη ενός συζευγμένου με ένζυμο δευτερογενούς αντισώματος (Ab2) που συνδέεται με το Ab1. Οποιοδήποτε ελεύθερο Ab2 ξεπλένεται και πάλι και προστίθεται ένα υπόστρωμα για το ένζυμο. Η ποσότητα του έγχρωμου, φθορίζοντος ή φωταυγούς προϊόντος αντίδρασης που σχηματίζεται μετριέται χρησιμοποιώντας μια εξειδικευμένη συσκευή ανάγνωσης πλακών και συγκρίνεται με την ποσότητα προϊόντος που παράγεται όταν εκτελείται το ίδιο σύνολο αντιδράσεων χρησιμοποιώντας μια τυπική καμπύλη γνωστών συγκεντρώσεων Ab1. (Μια άμεση ανάλυση ELISA θα ανίχνευε την ποσότητα του αντιγόνου στο πιάτο χρησιμοποιώντας

αντισώματα συζευγμένα με ένζυμο και χρησιμοποιείται σπάνια.) Αυτή η παραλλαγή της ELISA είναι η επιλεγμένη μέθοδος για την ανίχνευση της παρουσίας αντισωμάτων ορού έναντι διαφόρων μικροοργανισμών.

B) ELISA Sandwich

Το αντιγόνο μπορεί να ανιχνευθεί ή να μετρηθεί με τη μέθοδο ELISA sandwich. Σε αυτή την τεχνική, το αντίσωμα (και όχι το αντιγόνο) ακινητοποιείται σε ένα φρεάτιο μικροτιτλοδότησης. Ένα δείγμα που περιέχει άγνωστες ποσότητες αντιγόνου αφήνεται να αντιδράσει με το ακινητοποιημένο αντίσωμα. Αφού εκπλυθεί το φρεάτιο, προστίθεται ένα δεύτερο συνδεδεμένο με ένζυμο αντίσωμα για ένα διαφορετικό επίτοπο στο αντιγόνο και αφήνεται να αντιδράσει με το δεσμευμένο αντιγόνο. Αφού αφαιρεθεί οποιοδήποτε ελεύθερο δεύτερο αντίσωμα με έκπλυση, προστίθεται υπόστρωμα και μετράται το έγχρωμο προϊόν της αντίδρασης. Μια κοινή παραλλαγή σε αυτόν τον προσδιορισμό χρησιμοποιεί ένα δεύτερο αντίσωμα συνδεδεμένο με βιοτίνη και στη συνέχεια προσθέτει ενζυμική αβιδίνη σε ένα επιπλέον βήμα. Οι ELISA sandwich έχουν αποδειχθεί ιδιαίτερα χρήσιμες για τη μέτρηση των συγκεντρώσεων διαλυτών κυτοκινών σε υπερκείμενα υγρά καλλιέργειας ιστών, καθώς και σε υγρά ορού και σώματος. Να σημειωθεί ότι, για να λειτουργήσει αυτή η δοκιμασία, τα δύο αντισώματα που χρησιμοποιούνται για τις φάσεις ακινητοποίησης αντιγόνου (σύλληψη) και ανίχνευσης αντίστοιχα πρέπει να συνδέονται με διαφορετικούς καθοριστικούς παράγοντες (επιτόπους) στο αντιγόνο. Ως εκ τούτου, οι ELISA sandwich χρησιμοποιούν συνήθως ένα ζεύγος μονοκλωνικών αντισωμάτων ειδικά για διαφορετικές περιοχές του αντιγόνου.

C) Ανταγωνιστική ELISA

Η ανταγωνιστική ELISA παρέχει μια άλλη εξαιρετικά ευαίσθητη παραλλαγή για τη μέτρηση των ποσοτήτων αντιγόνου. Σε αυτή την τεχνική, το αντίσωμα επωάζεται πρώτα σε διάλυμα με ένα δείγμα που περιέχει αντιγόνο. Το μίγμα αντιγόνου-αντισώματος στη συνέχεια προστίθεται σε ένα επικαλυμμένο με αντιγόνο φρεάτιο μικροτιτλοδότησης. Όσο περισσότερο αντιγόνο υπάρχει στο αρχικό διάλυμα, τόσο λιγότερο ελεύθερο αντίσωμα θα είναι διαθέσιμο για σύνδεση στο επικαλυμμένο με αντιγόνο φρεάτιο. Μετά την έκπλυση του μη-δεσμευμένου αντισώματος, μπορεί να προστεθεί ένα συζευγμένο με ένζυμο ειδικό Ab2 για τον ισότυπο του Ab1 για να

προσδιορίζεται η ποσότητα του Ab1 που είναι δεσμευμένο στο φρεάτιο. Στην ανταγωνιστική δοκιμασία, όσο υψηλότερη είναι η συγκέντρωση του αντιγόνου στο αρχικό δείγμα, τόσο χαμηλότερο είναι το τελικό σήμα.

Τα τρία ένζυμα που χρησιμοποιούνται συνήθως σε προσδιορισμούς ELISA είναι η αλκαλική φωσφατάση, η β-γαλακτοσιδάση και η υπεροξειδάση αγριοραπανίδας (Horseradish Peroxidase - HRP), καθένα από τα οποία μπορεί να χρησιμοποιηθεί με χρωμογόνα υποστρώματα (υποστρώματα που είναι άχρωμα αλλά δημιουργούν ένα προϊόν που απορροφά το φως στο ορατό εύρος). Από αυτά τα τρία, η β-γαλακτοσιδάση είναι η λιγότερο συχνά χρησιμοποιούμενη. Το πιο κοινό υπόστρωμα για την αλκαλική φωσφατάση είναι το p-nitrophenyl phosphate (pNPP), το οποίο είναι εξαιρετικά διαλυτό και άχρωμο. Η αλκαλική φωσφατάση διασπά τη φωσφορική ομάδα από αυτό το υπόστρωμα για να δώσει p-νιτροφαινόλη, η οποία είναι κίτρινη και απορροφά το φως στα 460 nm. Τόσο το υπόστρωμα όσο και το προϊόν είναι μη-τοξικά και φθηνά και το υπόστρωμα μπορεί να αγοραστεί σε μορφή δισκίου. Ωστόσο, το υπόστρωμα θα μετατραπεί σε προϊόν εάν αφεθεί σε διάλυμα σε θερμοκρασία δωματίου, γεγονός που περιορίζει κάπως το εύρος της χρωμογόνου ανάλυσης ELISA. Μια παρόμοια σειρά συστημάτων υποστρώματος-προϊόντων έχει αναπτυχθεί για τις ELISA που βασίζονται σε HRP. Επειδή τα υποστρώματα φθορισμού και φωταύγειας ήταν διαθέσιμα πρώτα για το σύστημα HRP, υπάρχουν επί του παρόντος διαθέσιμα περισσότερα σετ αντιδραστηρίων και παραλλαγές HRP παρά αλκαλικής φωσφατάσης. Οι καρκινογόνες ιδιότητες ορισμένων υποστρωμάτων και προϊόντων HRP σημαίνουν ότι η αλκαλική φωσφατάση εξακολουθεί να χρησιμοποιείται συχνά σε εργαστήρια διδασκαλίας χαμηλότερου επιπέδου, όπου τα άπειρα χέρια καθιστούν υψίστης σημασίας τις ανησυχίες για την ασφάλεια[131].

Ο αρχικός σχεδιασμός των δευτερογενών αναλύσεων ELISA περιλάμβανε την προσθήκη ενός πρωτογενούς αντισώματος στο αντιγόνο, ακολουθούμενο από ένα δευτερεύον, συζευγμένο με ένζυμο αντίσωμα ειδικό για την περιοχή Fc του πρωτογενούς αντισώματος. Αυτό απαιτεί κάθε εργαστήριο να αγοράζει ένα ξεχωριστό σύνολο αντισωμάτων συζευγμένων με ένζυμο ειδικά για κάθε κατηγορία πρωτογενούς αντισώματος. Δεδομένου ότι ορισμένα σετ αντιδραστηρίων ELISA χρησιμοποιούν πρωτογενή αντισώματα από διαφορετικά είδη, οι ερευνητές συνειδητοποίησαν γρήγορα τα πλεονεκτήματα που θα προέκυπταν εάν το ένζυμο μπορούσε να

συνδεθεί στο κύριο αντίσωμα χρησιμοποιώντας μια πιο τυποποιημένη μέθοδο. Η βιοτίνη είναι μια υδατοδιαλυτή βιταμίνη του συμπλέγματος B, η οποία διαθέτει μια σημαντική ιδιότητα: συνδέεται με τη βακτηριακή πρωτεΐνη στρεπταβιδίνη με μια συγγένεια που είναι σχεδόν απaráμιλλη στη βιολογία. Πράγματι, το K_d της αλληλεπίδρασης βιοτίνης-στρεπταβιδίνης είναι της τάξης των $10^{-14}M$, καθιστώντας την μία από τις ισχυρότερες φυσικώς απαντώμενες, μη-ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις στη φύση.

Επιπλέον, αυτή η αλληλεπίδραση είναι σταθερή κάτω από μια μεγάλη ποικιλία συνθηκών, συμπεριλαμβανομένης της παρουσίας τόσο οργανικών όσο και μη-οργανικών διαλυτών, μετουσιωτικών και απορρυπαντικών, και σε ακραίες θερμοκρασίες. Η στρεπταβιδίνη είναι μια τετραμερής πρωτεΐνη ικανή να δεσμεύει τέσσερα μόρια βιοτίνης ανά μόριο στρεπταβιδίνης. Πολλά χημικά παράγωγα της βιοτίνης έχουν συντεθεί που επιτρέπουν την ομοιοπολική σύζευξη με αντισώματα, με ελάχιστη επίδραση στη δομή του αντισώματος ή της βιοτίνης. Έτσι, μπορεί κανείς να χρησιμοποιήσει μια ποικιλία πρωτογενών, συζευγμένων με βιοτίνη αντισωμάτων με μόνο ένα συζευγμένο με ένζυμο απόθεμα στρεπταβιδίνης. Τα βήματα που βασίζονται στη βιοτίνη - στρεπταβιδίνη είναι πλέον ο κανόνας σε πολλές ανοσοχημικές αναλύσεις.

2.7. APOE γονοτύπηση με real time qPCR - Melting Curve Analysis

2.7.1. LightCycler 480II (RT-PCR)

Η ποσοτική αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου αποτελεί μια ταχύτατη, αξιόπιστη και με υψηλή ευαισθησία μεθοδολογία, η οποία μας επιτρέπει τόσο την ανίχνευση μορίων στόχων, όσο και την ποσοτικοποίησή τους. Στη Real-Time PCR, η μέτρηση της ποσότητας του προϊόντος πραγματοποιείται καθ' όλη τη διάρκεια της αντίδρασης, μέσω της παρακολούθησης της αύξησης του φθορισμού κάποιας φθορίζουσας ουσίας. Η αύξηση του σήματος φθορισμού είναι ανάλογη του συντιθέμενου προϊόντος και σχετίζεται άμεσα με την ποσότητα του αρχικού υποστρώματος. Ο φθορισμός μετριέται σε κάθε κύκλο της PCR, με αποτέλεσμα να προκύπτει μια καμπύλη ενίσχυσης, κάτι που επιτρέπει στον ερευνητή να παρακολουθεί όλη τη διαδικασία της αντίδρασης σε πραγματικό χρόνο. Η καμπύλη ενίσχυσης διακρίνεται σε τρεις φάσεις: την εκθετική, τη γραμμική και τη φάση κορεσμού. Κατά την εκθετική φάση, σε κάθε κύκλο της αντίδρασης πραγματοποιείται ακριβής διπλασιασμός του προϊόντος, καθώς όλα τα απαραίτητα

για την PCR συστατικά (π.χ. dNTPs, εκκινητές, πολυμεράση) βρίσκονται σε περίσσεια. Στη συνέχεια ακολουθεί η γραμμική φάση κατά την οποία κάποια από τα αντιδραστήρια αρχίζουν να εξαντλούνται, ενώ παράλληλα συσσωρεύονται αναστολείς. Στη συγκεκριμένη φάση, η αντίδραση της ενίσχυσης επιβραδύνεται και τελικά σταματάει εντελώς, οπότε η καμπύλη φθορισμού φτάνει σε σημείο κορεσμού (plateau). Οι μετρήσεις για την ποσοτικοποίηση αφορούν την εκθετική φάση της αντίδρασης.

2.7.2. Melting Curve Analysis

Η ειδικότητα και η απόδοση της PCR σχετίζονται άμεσα με την ικανότητα του συστήματος του θερμικού κύκλου να φτάνει γρήγορα και με ακρίβεια και να διατηρεί τις θερμοκρασίες της αντίδρασης. Για να επιτευχθεί η ταχύτητα και η ακρίβεια της PCR αντίδρασης σε plate της μορφής 96 ή 384 φρεατίων, ενσωματώθηκε ένας νέος τύπος κυκλοποιητή θερμικού μπλοκ. Η θέρμανση και η ψύξη επιτυγχάνονται με την αξιοποίηση του θερμοηλεκτρικού φαινομένου Peltier. Με τις τεχνολογίες αυτές καταφέρνει τη βέλτιστη κατανομή θερμότητας σε όλη την πλάκα και ταυτόχρονα την ομοιογένεια μεταξύ φρεατίων και την μέγιστη αναπαραγωγικότητα της ανάλυσης. Έτσι ολοκληρώνεται η PCR αντίδραση σε 40 λεπτά, επιτρέποντας τη μέγιστη ομοιογένεια κατά τη θέρμανση και την ψύξη σε ένα ευρύ φάσμα θερμοκρασιών.

Η ομοιογένεια της θερμοκρασίας αποτελεί βασική προϋπόθεση για την αναπαραγωγικότητα της qPCR σε μια πλάκα πολλών φρεατίων. Η ανάλυση της θερμοκρασίας τήξης αποτελεί ισχυρό εργαλείο για αυτή την παρακολούθηση. Η διαδικασία έχει ως εξής: Ένα ολιγονουκλεοτίδιο δεσμευμένο σε έναν συμπληρωματικό ανιχνευτή SimpleProbe, προστίθεται σε φρεάτια σε πολλές διαφορετικές θέσεις στην πλάκα και παρακολουθείται ο φθορισμός ενώ η θερμοκρασία αυξάνεται αργά με σταθερό ρυθμό. Στην ειδική θερμοκρασία τήξης αυτού του «μείγματος», η μείωση του φθορισμού φτάνει στο μέγιστο. Οι αναπαραγώγιμες τιμές της θερμοκρασίας τήξης παρατηρούνται μόνο εάν κατά τη διάρκεια της διαδικασίας τήξης η θερμοκρασία φτάσει ταυτόχρονα στην ίδια τιμή παντού στην πλάκα. Η καμπύλη τήξης, η οποία σχεδιάζεται αυτόματα από το όργανο, προκύπτει από την αρνητική δεύτερη παράγωγο της συνάρτησης μεταβολής της έντασης φθορισμού ως προς τη θερμοκρασία.

Η οπτική μονάδα του LightCycler ανιχνεύει το φθορισμό ανά προγραμματισμένα χρονικά διαστήματα κατά τη διάρκεια της αντίδρασης PCR και κατά συνεχή τρόπο κατά την ανάλυση καμπυλών τήξης. Η απόδοση του οπτικού συστήματος πηγάζει από μια λάμπα Xenon υψηλής έντασης που εκπέμπει φως σε ένα ευρύ φάσμα. Ο συνδυασμός των ενσωματωμένων φίλτρων για διέγερση και εκπομπή επιτρέπει τη χρήση μιας ποικιλίας φθορίζουσών χρωστικών και μορφών ανίχνευσης. Τα φίλτρα προσφέρουν πέντε διαφορετικά μήκη κύματος για διέγερση (440, 465, 498, 533 και 618 nm) και έξι για ανίχνευση (488, 510, 580, 610, 640, και 660 nm).

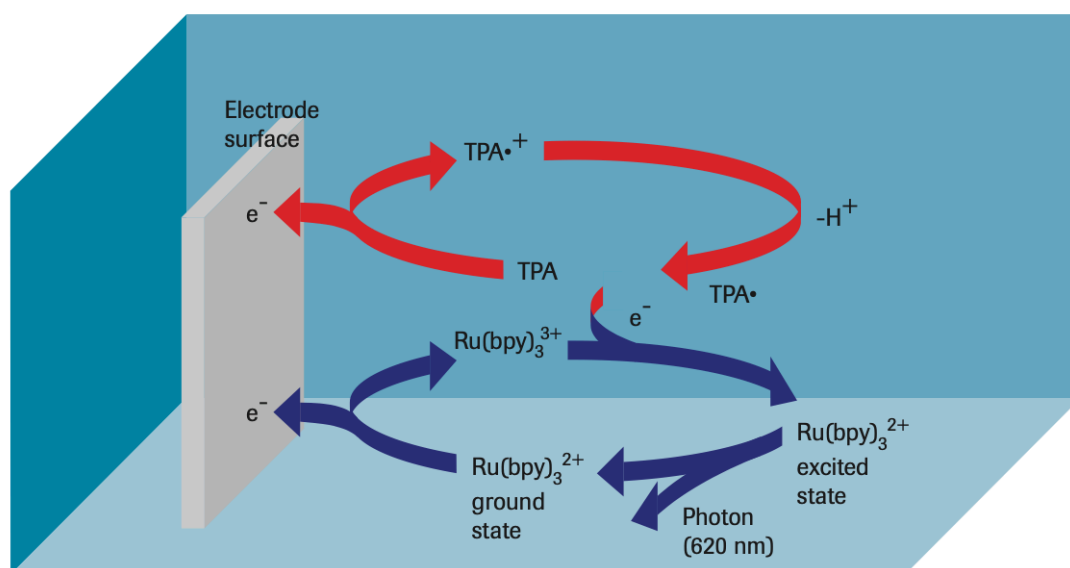
Κατά τη μέτρηση του σήματος φθορισμού, εκπέμπεται φως από την πηγή διέγερσης, διεγείροντας τα φθορισμοφόρα της αντίδρασης. Ο παραγόμενος φθορισμός κατευθύνεται εκ νέου προς την οπτική μονάδα όπου μια σειρά φίλτρων διαχωρίζει την φωτεινή ακτινοβολία σε διαφορετικά μήκη κύματος, που μετρούνται από τα ανωτέρω κανάλια. Για την παρακολούθηση της αντίδρασης ενώ αυτή εξελίσσεται, οι διάφορες πληροφορίες μεταφέρονται από και προς έναν ηλεκτρονικό υπολογιστή μέσω κατάλληλης σύνδεσης. Ο χρήστης εισάγει τα δεδομένα μέσω του πληκτρολογίου στο κατάλληλο πειραματικό πρωτόκολλο μέσα στον υπολογιστή και στη συνέχεια ο υπολογιστής μεταφέρει τις πληροφορίες στο όργανο. Επίσης, ο υπολογιστής καταγράφει τις θερμοκρασίες και τα σήματα φθορισμού κατά τη διάρκεια της αντίδρασης και επεξεργάζεται τέλος τα αποτελέσματα μέσω κατάλληλου λογισμικού.

2.8. Electrochemilumescence Immunoassay (ECLIA)

Η ηλεκτροχημειοφωταύγεια χρησιμοποιεί ως ιχνηθέτη το ρουθίνιο, το οποίο δεν ενεργοποιείται χημικά όπως τα άλλα μόρια (πχ εστέρες ακριδίνης) αλλά με την εφαρμογή διαφοράς δυναμικού. Αυτό έχει ως πλεονέκτημα τον καλύτερο έλεγχο της αντίδρασης. Η ECLIA θεωρείται σήμερα η πιο ευαίσθητη (μπορεί να μετρήσει πολύ μικρές συγκεντρώσεις) και προηγμένη αυτοματοποιημένη ανοσοχημική μέθοδος.

Τα άλατα του χηλικού συμπλόκου του ρουθινίου [τρις(διπυριδυλ)-ρουθινίου, $(\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+})$], έχουν τη δυνατότητα όταν ανάγονται να παράγουν φως. Η αντίδραση παραγωγής φωτός από το σύμπλοκο αυτό, προϋποθέτει και την ταυτόχρονη χρησιμοποίηση της τριπτοπυλαμίνης (TPA). Η όλη αντίδραση λαμβάνει χώρα στην επιφάνεια ενός ηλεκτροδίου. Εκεί η ρίζα TPA^+ και το $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$, αντιδρούν μεταξύ τους και το $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$ μετατρέπεται σε $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$. Αυτή

η μεταφορά ενέργειας δημιουργεί μια διεγερμένη κατάσταση, η οποία είναι ασταθής και επιστρέφει γρήγορα στην αρχική κατάσταση με την εκπομπή ενός φωτονίου στα 620 nm. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται συνεχώς. Η ρίζα TPA ανάγεται σε παραπροϊόντα, τα οποία δεν επηρεάζουν την αντίδραση της χημειοφωταύγειας, επειδή όμως εξαντλείται θα πρέπει να βρίσκεται σε περίσσεια. Στο τέλος της αντίδρασης το ρουθίνιο αναγεννάται και μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε πολλούς κύκλους παραγωγής φωτονίων. Καθώς εξαντλείται η ποσότητα της TPA, που βρίσκεται στο ηλεκτρικό πεδίο, η ισχύς του φωτός (σήμα) μειώνεται με αργό ρυθμό από το μέγιστο σημείο που έφτασε αρχικά. Το σύμπλοκο του ρουθινίου αναγεννάται συνεχώς και το σύμπλοκο αντιγόνου-αντισώματος παράγει στο τέλος πολλά φωτόνια.



The ECL reaction at the electrode surface

Εικόνα 2.8.1.: Αναπαράσταση της αρχής της μεθόδου της χημειοφωταύγειας (Roche).

2.8.1. Προσδιορισμός του β-αμυλοειδούς πεπτιδίου (αβ42)

Ενδεικνύομενη χρήση

Η ανάλυση Elecsys β-Amyloid (1-42) CSF II είναι μια invitro διαγνωστική ανοσολογική μέθοδος που προορίζεται για τον ποσοτικό προσδιορισμό της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης του β-αμυλοειδούς (1-42) σε ανθρώπινο εγκεφαλονωτιαίο υγρό (ENY).

Η ανάλυση Elecsys β-Amyloid (1-42) CSF II προορίζεται για χρήση σε ενήλικες ασθενείς με γνωσιακή διαταραχή, οι οποίοι διερευνώνται για τυχόν νόσο Alzheimer (AD) και άλλες αιτίες γνωσιακής διαταραχής.

Η ανάλυση Elecsys β -Amyloid (1-42) CSF II προορίζεται να χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με την ανάλυση Elecsys Phospho-Tau (181P) CSF ή Elecsys Total-Tau CSF για αποτέλεσμα με τη μορφή λόγου (ratio), σε ενήλικες ασθενείς με γνωσιακή διαταραχή που διερευνώνται για τυχόν AD και άλλες αιτίες γνωσιακής διαταραχής.

Ο ανοσοπροσδιορισμός ηλεκτροχημικής φωταύγειας "ECLIA" προορίζεται για χρήση σε αναλυτές ανοσοπροσδιορισμού Elecsys και Cobas.

Αρχή της μεθόδου

Αρχή διπλής ανοσοσήμανσης («σάντουιτς»). Συνολική διάρκεια της ανάλυσης: 18 λεπτά.

- 1η επώαση: 50 μ L δείγματος, ένα βιοτινυλιωμένο μονοκλωνικό ειδικό αντίσωμα έναντι του β -αμυλοειδούς (1-42) (21F12) και ένα μονοκλωνικό ειδικό αντίσωμα έναντι του β -αμυλοειδούς (1-42) (3D6) σημασμένο με σύμπλοκο ρουθηνίου αντιδρούν και σχηματίζουν σύμπλοκο «σάντουιτς».
- 2η επώαση: Μετά την προσθήκη μικροσφαιριδίων επικαλυμμένων με στρεπταβιδίνη, το σύμπλοκο δεσμεύεται στη στερεά φάση μέσω της αλληλεπίδρασης της βιοτίνης με τη στρεπταβιδίνη.
- Το μίγμα αντίδρασης αναρροφάται στην κυψελίδα μέτρησης, όπου τα μικροσφαιρίδια δεσμεύονται μαγνητικά στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου. Οι μη δεσμευμένες ουσίες απομακρύνονται κατόπιν με ProCell/ProCell M. Η εφαρμογή τάσης στο ηλεκτρόδιο προκαλεί κατόπιν την εκπομπή χημειοφωταύγειας, η οποία μετράται με φωτοπολλαπλασιαστή.
- Τα αποτελέσματα προσδιορίζονται από μια καμπύλη βαθμονόμησης, η οποία παράγεται ειδικά για κάθε αναλυτή, μέσω μιας διαδικασίας βαθμονόμησης 2 σημείων και μιας πρότυπης καμπύλης που λαμβάνεται μέσω του γραμμικού κώδικα αντιδραστήριου ή του e-γραμμικού κώδικα (e-barcode).

2.8.2. Προσδιορισμός της total tau

Ενδεικνυόμενη χρήση

Η ανάλυση Elecsys Total-Tau CSF είναι μια in vitro διαγνωστική ανοσολογική μέθοδος που προορίζεται για τον ποσοτικό προσδιορισμό της ολικής πρωτεΐνης tau σε ανθρώπινο ENY.

Η ανάλυση Elecsys Total-Tau CSF προορίζεται να χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με την ανάλυση Elecsys β -Amyloid (1-42) CSF II για αποτέλεσμα με τη μορφή λόγου, σε ενήλικες

ασθενείς με γνωσιακή διαταραχή που διερευνώνται για τυχόν AD και άλλες αιτίες γνωσιακής διαταραχής.

Αρχή της μεθόδου

Αρχή διπλής ανοσοσήμανσης («σάντουιτς»). Συνολική διάρκεια της ανάλυσης: 18 λεπτά.

- 1η επώαση: 50 μ L δείγματος, δύο βιοτινυλιωμένα μονοκλωνικά ειδικά αντισώματα έναντι της πρωτεΐνης tau (5.28.464 και 4.35.411) και ένα μονοκλωνικό ειδικό αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης tau (PC1C6) σημασμένο με σύμπλοκο ρουθηνίου αντιδρούν και σχηματίζουν σύμπλοκο «σάντουιτς».
- 2η επώαση: Μετά την προσθήκη μικροσφαιριδίων επικαλυμμένων με στρεπταβιδίνη, το σύμπλοκο δεσμεύεται στη στερεά φάση μέσω της αλληλεπίδρασης της βιοτίνης με τη στρεπταβιδίνη.
- Το μίγμα αντίδρασης αναρροφάται στην κυψελίδα μέτρησης, όπου τα μικροσφαιρίδια δεσμεύονται μαγνητικά στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου. Οι μη δεσμευμένες ουσίες απομακρύνονται κατόπιν με ProCell/ProCell M. Η εφαρμογή τάσης στο ηλεκτρόδιο προκαλεί κατόπιν την εκπομπή χημειοφωταύγειας, η οποία μετράται με φωτοπολλαπλασιαστή.
- Τα αποτελέσματα προσδιορίζονται από μια καμπύλη βαθμονόμησης, η οποία παράγεται ειδικά για κάθε αναλυτή, μέσω μιας διαδικασίας βαθμονόμησης 2 σημείων και μιας πρότυπης καμπύλης που λαμβάνεται μέσω του γραμμικού κώδικα αντιδραστηρίου ή του e-γραμμικού κώδικα (e-barcode).

2.8.3. Προσδιορισμός της p-tau181

Η ανάλυση Elecsys Phospho-Tau (181P) CSF είναι μια *in vitro* διαγνωστική ανοσολογική μέθοδος που προορίζεται για τον ποσοτικό προσδιορισμό της φωσφορυλιωμένης πρωτεΐνης Tau σε ανθρώπινο CSF.

Η ανάλυση Elecsys Phospho-Tau (181P) CSF προορίζεται να χρησιμοποιείται μόνη της ή σε συνδυασμό με την ανάλυση Elecsys β -Amyloid (1-42) CSF II για αποτέλεσμα με τη μορφή λόγου, σε ενήλικες ασθενείς με ήπια γνωσιακή διαταραχή, ως βοήθημα για τον εντοπισμό ατόμων που διατρέχουν χαμηλό έναντι υψηλού κίνδυνου γνωσιακής έκπτωσης.

Αρχή της μεθόδου

Αρχή διπλής ανοσοσήμανσης («σάντουιτς»). Συνολική διάρκεια της ανάλυσης: 18 λεπτά.

- 1η επώαση: 50 μ L δείγματος, ένα βιοτινυλιωμένο μονοκλωνικό ειδικό αντίσωμα για τη φωσφορυλίωση στη θρεονίνη 181 (11H5V1) και ένα μονοκλωνικό ειδικό αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης tau (PC1C6) σημασμένο με σύμπλοκο ρουθηνίου αντιδρούν και σχηματίζουν σύμπλοκο «σάντουιτς».
- 2η επώαση: Μετά την προσθήκη μικροσφαιριδίων επικαλυμμένων με στρεπταβιδίνη, το σύμπλοκο δεσμεύεται στη στερεά φάση μέσω της αλληλεπίδρασης της βιοτίνης με τη στρεπταβιδίνη.
- Το μίγμα αντίδρασης αναρροφάται στην κυψελίδα μέτρησης, όπου τα μικροσφαιρίδια δεσμεύονται μαγνητικά στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου. Οι μη δεσμευμένες ουσίες απομακρύνονται κατόπιν με ProCell/ProCell M. Η εφαρμογή τάσης στο ηλεκτρόδιο προκαλεί κατόπιν την εκπομπή χημειοφωταύγειας, η οποία μετράται με φωτοπολλαπλασιαστή.
- Τα αποτελέσματα προσδιορίζονται από μια καμπύλη βαθμονόμησης, η οποία παράγεται ειδικά για κάθε αναλυτή, μέσω μιας διαδικασίας βαθμονόμησης 2 σημείων και μιας πρότυπης καμπύλης που λαμβάνεται μέσω του γραμμικού κώδικα αντιδραστηρίου ή του e-γραμμικού κώδικα (e-barcode).

ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η εργασία αυτή διεξήχθη υπό την καθοδήγηση του καθηγητή Χ. Κρούπη στο εργαστήριο Κλινικής Βιοχημείας του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου «Αττικόν», στα πλαίσια μεταπτυχιακής ειδίκευσης του Π.Μ.Σ. «Κλινική Βιοχημεία και Μοριακή Διαγνωστική».

Σκοποί της παρούσας εργασίας ήταν:

α) η ανάπτυξη μεθοδολογίας για την πλήρη γενετική ανάλυση του γονιδίου *MAPT* τόσο με την τεχνική της αλληλούχισης του DNA όσο και με την τεχνική MLPA (για τυχόν ανίχνευση μεγάλων γενωμικών αναδιατάξεων)

β) η αξιολόγηση των αποτελεσμάτων της γενετικής ανάλυσης του *MAPT* γονιδίου σε περιφερικό αίμα Ελλήνων ασθενών με μετωποκροταφική άνοια κατάλληλα επιλεγμένους μετά από ενημέρωση και έγγραφη συναίνεση τους (π.χ. η ανίχνευση *MAPT* H1 απλοτύπου)

γ) η αναλυτική επαλήθευση νέας αυτοματοποιημένης μεθόδου, στον αναλυτή Elecsys της Roche για τη μέτρηση των βιοδεικτών στο ENY (αβ42, tau, p-tau181) μέσω σύγκρισης αποτελεσμάτων ανοϊκών ασθενών με την καθιερωμένη χειροκίνητη μέθοδο ELISA της Fujirebio και αξιολόγησης των αναλυτικών χαρακτηριστικών επίδοσης όπως η ορθότητα και η πιστότητα μιας μεθόδου.

B. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1. Ασθενείς FTD

Στη συγκεκριμένη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν 20 συνολικά δείγματα περιφερικού αίματος FTD ανοϊκών Ελλήνων ασθενών κατόπιν ενημέρωσης και έγγραφης συγκατάθεσής τους (14 γυναίκες και 6 άντρες, εύρος ηλικιών 49-76). Όλα είχαν ήδη γενετικό αποτέλεσμα από συνεργαζόμενο εργαστήριο του εξωτερικού με σκοπό την επαλήθευση των αποτελεσμάτων και τη συγκριτική αξιολόγησή τους. Τα εν λόγω δείγματα έχουν συλλεχθεί από την Α' Πανεπιστημιακή Νευρολογική Κλινική του Αιγινήτειου Νοσοκομείου (υπεύθυνος ιατρού: Καθηγητής Παπαγεωργίου Σωκράτης) και έχουν αναλυθεί με NGS για παθογνωμικές μεταλλάξεις σε 42 γονίδια, τα οποία είναι: *ALS2, ANG, ANXA11, APP, ATP13A2, CHCHD10, CHMP2B, DCTN1, DDHD1, ERBB4, ERLIN1, FIG4, FUS, PGRN, HEXA, HNRNPA2B1, ITM2B, KIF5A, LRRK2, MAPT, MATR3, NEFH, OPTN, PNF1, PRNP, PSEN1, PSEN2, SETX, SIGMAR1, SNCA, SOD1, SORL1, SPG11, SQSTM1, TARDBP, TBK1, TFG, TIA1, TREM2, UBQLN2, VAPB, VCP*, και για παθολογικές επεκτάσεις εξανουκλεοτιδικών αλληλουχιών με Fragment Analysis για το γονίδιο *C9ORF72*. Ως θετικός μάρτυρας για *MAPT* παθογενετική μετάλλαξη χρησιμοποιήθηκε δείγμα από προηγούμενη μελέτη που συμμετείχε το εργαστήριο [132] με κωδικό D69, στο οποίο είχε ανιχνευθεί σημειακή παραλλαγή c.2092G>A (p.Val698Ile), στο εξόνιο 13 του γονιδίου *MAPT*. Το δείγμα αυτό, αντιστοιχεί σε θήλυ, 56 ετών. Τα στοιχεία των νέων δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν αναφέρονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 3.1.1.).

<u>ΚΩΔΙΚΟΣ</u> <u>ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ</u>	<u>ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ</u> <u>(ΑΡΧΙΚΑ)</u>	<u>ΦΥΛΟ</u>	<u>ΗΛΙΚΙΑ</u>
A817	T.M.	ΑΡΡΕΝ	64
A818	M.K.	ΘΗΛΥ	65
A892	M.E.	ΘΗΛΥ	60
A903	Ψ.Γ.	ΑΡΡΕΝ	57
A910	Π.Ε.	ΘΗΛΥ	51
A929	M.Γ.	ΘΗΛΥ	52
A930	K.A.	ΘΗΛΥ	73
A937	Π.Β.	ΘΗΛΥ	49
A945	K.A.	ΘΗΛΥ	64
A948	M.E.	ΘΗΛΥ	54
A950	Σ.Α.	ΑΡΡΕΝ	
A959	T.I.	ΑΡΡΕΝ	76
A965	B.Δ.	ΑΡΡΕΝ	70
A966	T.M.	ΘΗΛΥ	69
A967	O.Δ.	ΘΗΛΥ	68
A968	M.K.	ΘΗΛΥ	73
A975	Δ.Ε.	ΘΗΛΥ	64
A976	Δ.N.	ΑΡΡΕΝ	49
A981	K.Δ.	ΘΗΛΥ	74
A987	M.A.	ΘΗΛΥ	63

Πίνακας 3.1.1. : Συγκεντρωτικός πίνακας δειγμάτων της μελέτης.

Όλα τα δείγματα περιφερικού αίματος των ασθενών συλλέγησαν σε σωληνάρια τύπου vacutainer των 3 ml με EDTA και συντηρήθηκαν στους 4 °C έως 2 ημέρες. Πραγματοποιήθηκε διαχωρισμός του περιφερικού αίματος, ύστερα από φυγοκέντρηση για 15 λεπτά στις 3.500 rpm, σε λευκά αιμοσφαίρια (buffy coat) και πλάσμα, ενώ απορρίφθηκαν τα ερυθρά αιμοσφαίρια. Η απομόνωση γενωμικού DNA έγινε από τη στιβάδα των λευκών αιμοσφαιρίων στα ανωτέρω δείγματα (buffy coat) και τα δείγματα DNA αποθηκεύτηκαν στους -20 °C. Τα δείγματα πλάσματος αποθηκεύτηκαν στους -20 °C για 3 μήνες ή στους -40 °C για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα και αποτελούν παρακαταθήκη του εργαστηρίου Κλινικής Βιοχημείας του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου "Αττικών", όπου και διεξήχθη το πειραματικό μέρος της εργασίας.

3.2. Ασθενείς με άνοιες για μέτρηση βιοδεικτών

Τα εν λόγω δείγματα εγκεφαλονωτιαίου υγρού έχουν συλλεχθεί από την Β' Πανεπιστημιακή Νευρολογική Κλινική του ΕΚΠΑ στο Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Αττικών με υπεύθυνους είτε τον Καθηγητή κ. Παπαγεωργίου Σωκράτη είτε τον Καθηγητή κ. Παρασκευά Γεώργιο, με σκοπό τη μέτρηση των αβ42, total tau και p-tau181 με τη μέθοδο ρουτίνας της Fujirebio (ELISA Innostest). Με τις υπόλοιπες ποσότητες των δειγμάτων μετρήθηκαν παράλληλα για τη μελέτη αυτή και με τα νέα αντιδραστήρια της Roche για την πλατφόρμα Elecsys. Τα δείγματα αυτά κατεργάζονται όπως αναφέρεται στην ενότητα 3.13.

<u>ΚΩΔΙΚΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ</u>	<u>ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ</u>
Δείγμα 1	Β.Γ.
Δείγμα 2	Β.Β.
Δείγμα 3	Γ.Σ.
Δείγμα 4	Κ.Κ.
Δείγμα 5	Κ.Ε.
Δείγμα 6	Instand 1
Δείγμα 7	Instand 2
Δείγμα 8	Instand 3
Δείγμα 9	Τ.Λ.
Δείγμα 10	Γ.Χ.
Δείγμα 11	Μ.Γ.

Δείγμα 12	Σ.Γ.
Δείγμα 13	Η.Π.
Δείγμα 14	Instand 4
Δείγμα 15	B.X.
CSF 1933	Σ.Β.
CSF 1936	M.E.
CSF 1937	T.M.
CSF 1938	I.K.
CSF 1939	K.X.
CSF 1940	Σ.Δ.
CSF 1941	Λ.Ε.
CSF 1942	K.A.
CSF 1943	B.A.
CSF 1944	M.A.
CSF 1945	E.N.
CSF 1946	K.K.

Πίνακας 3.2.1.: Συγκεντρωτικός πίνακας ασθενών της μελέτης.

3.3. Απομόνωση γενωμικού DNA

Η απομόνωση γενωμικού DNA με τη χρήση προκατασκευασμένων αντιδραστηρίων (kit) απομόνωσης αποτελεί μια απλή και ταχεία διαδικασία που εμπίπτει στις μεθόδους απομόνωσης DNA στερεής φάσης. Η μέθοδος αυτή επιτρέπει την ταυτόχρονη επεξεργασία μεγάλου αριθμού δειγμάτων ολικού αίματος ή buffy (στιβάδα λευκοκυττάρων και αιμοπεταλίων που προκύπτει μετά από φυγοκέντρηση) ή ακόμα και από ποικιλία ιστών, με ταχύτητα και αξιοπιστία ανώτερη των μεθόδων υγρής φάσης. Η δυνατότητα χρήσης πιάτων 96 φρεατίων, αλλά και αυτοματοποιημένων πλατφορμών επιτρέπει την εφαρμογή της μεθόδου σε μεγάλους αριθμούς κλινικών δειγμάτων.

Η μέθοδος της απομόνωσης DNA με τη χρήση στηλών φυγοκέντρησης βασίζεται στην ειδική σύνθεση της ρητίνης της στήλης, που εμπεριέχει οξείδιο του πυριτίου (silica gel). Το οξείδιο του πυριτίου έχει τη δυνατότητα πρόσδεσης του DNA κατά αντιστρεπτό τρόπο ανάλογα με την

ιονική σύνθεση του περιβάλλοντος. Προηγείται η κυτταρική λύση και η αποικοδόμηση των πρωτεϊνών και στη συνέχεια ακολουθεί η κατακρήμνιση του DNA με την προσθήκης αλκοόλης. Το διάλυμα αυτό που προκύπτει, διηθείται μέσω της μεμβράνης της στήλης με τη βοήθεια της φυγοκέντρωσης, όπου το DNA κατακρατείται από το οξείδιο του πυριτίου, ενώ οι πρωτεΐνες και άλλες προσμίξεις διαπερνούν τη στήλη. Ελεύθερο νουκλεάσης το προσδεδεμένο DNA εκλύεται με χαμηλής ιονικής ισχύος διάλυμα. Με τον τρόπο αυτό, προκύπτει με ικανοποιητική απόδοση DNA προς χρήση στην PCR ή σε άλλες ενζυματικές αντιδράσεις. Χρησιμοποιήθηκαν στήλες από το σετ αντιδραστηρίων: *High Pure PCR Template Preparation Kit* (Roche, Ελβετία).

Αντιδραστήρια/Υλικά/Εξοπλισμός

- Στήλες High Pure (Roche, Ελβετία)
- Binding Buffer (Ρυθμιστικό διάλυμα δέσμευσης)
- Πρωτεΐνάση K ανασυσταμένη σε 4,5 ml διπλά απεσταγμένου νερού (Roche, Ελβετία)
- Ισοπροπανόλη
- Inhibitor Removal Buffer (Ρυθμιστικό διάλυμα απομάκρυνσης αναστολέων). Απαιτείται αραιώση με προσθήκη απόλυτης αιθανόλης
- Wash Buffer (Ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης). Απαιτείται αραιώση με προσθήκη απόλυτης αιθανόλης
- Elution Buffer (Ρυθμιστικό διάλυμα έκλουσης)
- Ρυθμιστικό διάλυμα PBS (Phosphate-Buffered Saline). Χρήση στις περιπτώσεις όπου το δείγμα είναι <200 μl
- Σωληνάρια φυγοκέντρωσης 1,5 ml
- Ακρορύγχη με φίλτρο
- Πιπέτες Gilson, USA (100-1000 μl, 20-200 μl)
- Φυγόκεντρος (Biofuge, Heraeus, Thermo Fisher, USA)
- Συσκευή ανάδευσης, vortex (Thermo Fisher, USA)

Πειραματική διαδικασία

- i. Τοποθέτηση 200 μl buffy ή whole blood σε σωληνάριο φυγοκέντρωσης Eppendorf 1,5 ml.
- ii. Προσθήκη 200 μl Binding Buffer.
- iii. Προσθήκη 40 μl πρωτεΐνάσης K και έντονη ανάδευση για 10 sec.
- iv. Επώαση στους 70 °C για 10 min.

- v. Προσθήκη 100 µl ισοπροπανόλης και έντονη ανάδευση για 15 sec.
- vi. Τοποθέτηση στήλης High Pure σε σωληνάριο των 2 ml (παρέχεται στο kit).
- vii. Προσεκτική μεταφορά όλης της ποσότητας του προηγούμενου μείγματος στη στήλη και φυγοκέντρηση για 1 min στα 8000 xg.
- viii. Τοποθέτηση της στήλης σε καθαρό σωληνάριο και απόρριψη του σωληναρίου που περιέχει το υγρό.
- ix. Προσθήκη 500 µl Inhibitor Removal Buffer στη στήλη και φυγοκέντρηση για 1 min στα 8000 xg.
- x. Τοποθέτηση της στήλης σε καθαρό σωληνάριο και απόρριψη του σωληναρίου που περιέχει το υγρό.
- xi. Προσθήκη 500 µl Wash Buffer στη στήλη και φυγοκέντρηση για 1 min στα 8000 xg.
- xii. Τοποθέτηση της στήλης σε καθαρό σωληνάριο και απόρριψη του σωληναρίου που περιέχει το υγρό.
- xiii. Προσθήκη 500 µl Wash Buffer στη στήλη και φυγοκέντρηση για 1 min στα 8000 xg.
- xiv. Απόρριψη του υγρού που περιέχει το σωληνάριο και επανατοποθέτηση στη στήλη.
- xv. Χωρίς προσθήκη περαιτέρω διαλύματος πραγματοποιείται φυγοκέντρηση σε μέγιστη ταχύτητα για 10 sec.
- xvi. Απόρριψη του σωληναρίου με το υγρό και τοποθέτηση της στήλης σε σωληνάριο Eppendorf 1,5 ml.
- xvii. Προσθήκη 100 µl προθερμασμένο Elution Buffer στους 70 °C, διατήρηση σε θερμοκρασία δωματίου για 1 min και έπειτα φυγοκέντρηση για 1 min στα 8000 xg.
- xviii. Αποθήκευση του καθαρού δείγματος DNA στους -20 °C.

3.4. Ποσοτικός προσδιορισμός του DNA

Ο ποσοτικός προσδιορισμός του DNA έγινε με το όργανο Qubit 1.0 (Invitrogen, Thermo Fisher, USA) (Εικόνα 3.4.1).



Εικόνα 3.4.1: Το φθορισμόμετρο Qubit.

Η ποσοτικοποίηση του DNA επιτυγχάνεται με τη χρήση φθορίζουσας ουσίας μετά την πρόσδεση σε δίκλωνο DNA. Η χρωστική αυτή εκπέμπει ακτινοβολία μετά από διέγερση σε κατάλληλο μήκος κύματος η οποία όμως διαφέρει κατά αρκετές τάξεις μεγέθους ανάλογα με το εάν η χρωστική είναι ελεύθερη ή προσδεμένη σε μόριο δίκλωνου DNA. Το σετ αντιδραστηρίων περιέχει πρότυπα δείγματα, τα οποία επιτρέπουν τον αυτοματοποιημένο σχεδιασμό της καμπύλης βαθμονόμησης με βάση την οποία γίνεται η ποσοτικοποίηση των δειγμάτων άγνωστης συγκέντρωσης. Το εύρος της συγκεκριμένης δοκιμασίας κυμαίνεται μεταξύ 2-1000 ng. Συγκρίνοντας την ποσοτικοποίηση με το Qubit και τη μέτρηση της απορρόφησης της UV ακτινοβολίας (Nanodrop), συμπεραίνεται ότι το Nanodrop υπερέχει στην μη απαίτηση κυψελίδων και πρότυπων δειγμάτων καθώς και ότι μπορεί να μετράει υψηλές συγκεντρώσεις χωρίς να χρειάζεται αραιώση. Όσον αφορά το Qubit, πλεονέκτημα αποτελεί η εκλεκτικότητα των μετρήσεων που επιτρέπει τη σαφή διάκριση μεταξύ του DNA και του RNA κατά τη συνύπαρξή τους σε ένα δείγμα, όπως επίσης και η ακρίβεια στην ποσοτικοποίηση δειγμάτων σε χαμηλές συγκεντρώσεις ακόμα και σε επίπεδα των 10 pg/μl.

Αντιδραστήρια/Υλικά/Εξοπλισμός

- Qubit™ dsDNA BR reagent (Component A)
- Qubit™ dsDNA BR reagent (Component B)
- Qubit™ dsDNA BR standard #1 (Component C)
- Qubit™ dsDNA BR standard #2 (Component D)
- Σωληνάρια erppendorf
- Πιπέτες (Gilson, USA)
- Συσκευή ανάδευσης (Thermo Fisher, USA)
- Φθορισμόμετρο Qubit 1.0 (Invitrogen, Thermo Fisher, USA)

Πειραματική διαδικασία

- i. Προετοιμασία διαλύματος εργασίας σε ένα σωληνάριο Erppendorf με την προσθήκη 200 μl Buffer (Component A) και 1 μl χρωστικής (Component B) για κάθε δείγμα. Έντονη ανάδευση.
- ii. Τοποθέτηση 190 μl διαλύματος εργασίας σε δύο σωληνάρια για τα πρότυπα δείγματα.
- iii. Προσθήκη 10 μl κάθε πρότυπου δείγματος στο αντίστοιχο σωληνάριο. Έντονη ανάδευση.
- iv. Τοποθέτηση 180-199 μl διαλύματος εργασίας σε διαφορετικά σωληνάρια για τα άγνωστα δείγματα.
- v. Προσθήκη 1-20 μl άγνωστου δείγματος σε κάθε σωληνάριο, με τέτοιο τρόπο ώστε ο τελικός όγκος να είναι 200 μl. Έντονη ανάδευση.
- vi. Επώαση σωληναρίων σε θερμοκρασία δωματίου για 2 λεπτά.
- vii. Μέτρηση του φθορισμού των προτύπων και εν συνεχεία των άγνωστων δειγμάτων.

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης του DNA γίνεται με βάση την καμπύλη αλγορίθμου χρησιμοποιώντας πρότυπα διαλύματα συγκέντρωσης 0 ng/ml και 100 ng/ml. Τέλος το Qubit® φθορισμόμετρο δίνει τις τιμές των συγκεντρώσεων είτε σε μg/ml είτε σε ng/ml. Για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης χρησιμοποιείται η σχέση:

$$C = QF \text{ value} \times (200) / n$$

Όπου: QF value = η τιμή που δίνεται στον αναλυτή και

n= ο αριθμός των μl του δείγματος που χρησιμοποιήθηκαν

3.5. Οργανολογία

Για την εκτέλεση της αντίδρασης χρησιμοποιήθηκε ο θερμικός κυκλοποιητής: Eppendorf 5331 Gradient Master Cycler (Εικόνα 3.5.1), ο οποίος ανταποκρίνεται στις καθημερινές απαιτήσεις του εργαστηρίου με την ταχύτητα και την ευελιξία που παρέχει. Το όργανο αυτό διαθέτει υποδοχείς είτε για σωληνάρια PCR των 0,2 mL (χωρητικότητα 96 θέσεων) είτε των 0,5 mL (χωρητικότητα 77 θέσεων) είτε για μια πλάκα μικροτιτλοδότησης. Ο συγκεκριμένος θερμικός κυκλοποιητής προγραμματίζει μέσω ψηφιακού πληκτρολογίου και έκθεσης εικόνας σε LCD οθόνη. Επίσης μπορεί χάρη στα θερμικά στοιχεία peltier που διαθέτει να υποβάλλει τα δείγματα σε ταχύτατες ανυψώσεις θερμοκρασίας ($3\text{ }^{\circ}\text{C/sec}$) ή και μειώσεις ($2\text{ }^{\circ}\text{C/sec}$) και σε κύκλους αλλαγής θερμοκρασίας μεταξύ $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ και $99\text{ }^{\circ}\text{C}$ με ακρίβεια $\pm 0,2\text{ }^{\circ}\text{C}$. Ο μέγιστος αριθμός κύκλων που μπορεί να προγραμματίσει είναι 99 κύκλοι. Ο συγκεκριμένος θερμικός κυκλοποιητής έχει δυνατότητα αποθήκευσης 100 προγραμμάτων καθώς και 1 υποδοχή για κάρτα η οποία έχει τη δυνατότητα αποθήκευσης 10 προγραμμάτων. Ο Eppendorf 5331 Gradient απλοποιεί τη διαδικασία της PCR αυξάνοντας τις δυνατότητες και τη ταχύτητα της διαδικασίας, εκτελώντας test ταυτόχρονα σε διαφορετικές θερμοκρασίες. Η λειτουργία αυτή επιτρέπει τη βαθμιαία θερμοκρασιακή διαφορά έως $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ κατά μήκος της θερμικής πλάκας (μέση τιμή $\pm 10\text{ }^{\circ}\text{C}$). Έτσι πολλές αντιδράσεις σε διαφορετικές θερμοκρασίες μπορούν να ολοκληρωθούν την ίδια χρονική στιγμή.



Εικόνα 3.5.1: Σχηματική αναπαράσταση του θερμικού κυκλοποιητή Eppendorf 5331 Gradient Master Cycler.

3.6. Επιλογή εκκινητών του γονιδίου *MAPT* για τη συμβατική PCR

Για το γονίδιο *MAPT* οι εκκινητές για την PCR ελέγχθηκαν με το πρόγραμμα CLC Workbench έναντι της αλληλουχίας NG_007398. Η επιλογή των κατάλληλων εκκινητών από τη βιβλιογραφία[133], με εξαίρεση τους εκκινητές του εξωνίου 13 που σχεδιάστηκαν σε προηγούμενη διατριβή του εργαστηρίου [134], έγινε με τέτοιο σκοπό ώστε να παρέχουν ευρεία όρια για το μετέπειτα DNA Sequencing των δειγμάτων και να καλύπτουν έτσι, τουλάχιστον 20 βάσεις από τα γειτνιάζοντα εσώνια (Πίνακας 3.6.1). Οι εκκινητές παρασκευάστηκαν από την Biolegio (Netherlands). Ο κάθε εκκινητής είχε συγκέντρωση 100 pmol/μl και παρασκευάστηκαν δείγματα εργασίας των 10 pmol/μl.

Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι ακόλουθες:

<u>ΕΞΩΝΙΑ</u>	<u>ΕΚΚΙΝΗΤΗΣ</u>	<u>ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ</u>	<u>ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΟ ΜΕΓΕΘΟΣ</u>
2	Πρόσθιος	CAACACTCCTCAGAACTTATC	229bp
2	Ανάστροφος	CAGTGATCTGGGCCTGCTGTG	
3	Πρόσθιος	CACAGGGAGCGATTTTCAGC	338bp
3	Ανάστροφος	CCACGCTGTCCTGCAAAGC	
4	Πρόσθιος	GGGCTGCTTTCTGGCATATG	297bp
4	Ανάστροφος	CCTCACTTCTGTACAGGTC	
5	Πρόσθιος	GGATGTGACTTTCCTGAATG	277bp
5	Ανάστροφος	GAGCTCAGGTCCAAATGATC	
7	Πρόσθιος	CAGTGAAAATGGAGTGTGAC	136bp
7	Ανάστροφος	CAGCTGCAGAGCTCCGTGGC	
9	Πρόσθιος	CTAGGAGGCAAAGGGTCAC	304bp
9	Ανάστροφος	GAGAGCTTCAGCTTCCTCTAAG	
10	Πρόσθιος	CGAGTCCTGGCTTCACTCC	370bp
10	Ανάστροφος	CTTCCAGGCACAGCCCT	
11	Πρόσθιος	GGTGGCGTGTCACTCATCC	200bp
11	Ανάστροφος	TACGCACTCACACCACTTCC	
12	Πρόσθιος	CTTCTCATTGAGTTACACCC	256bp
12	Ανάστροφος	CTCACCAGGACTCCTCCAC	

13	Πρόσθιος	GGCACTTTGCCCTGTAGACTGC	294bp
13	Ανάστροφος	CTGGACCAGCCTTTGTCCACTC	
14	Πρόσθιος	CTTTCTCTGGCACTTCATCTC	299bp
14	Ανάστροφος	CCTCTCCACAATTATTGACCG	

Πίνακας 3.6.1. : Συγκεντρωτικός πίνακας αλληλουχιών εκκινητών για όλα τα εξόνια του γονιδίου *MAPT*.

Η επαλήθευση των εκκινητών και η εύρεση κατάλληλων πειραματικών συνθηκών για αξιόπιστη ποσοτική ενίσχυση με το σωστό μέγεθος PCR προϊόντος και χωρίς παραπροϊόντα έγινε, αρχικά, μέσω συμβατικής PCR και ηλεκτροφόρησης των PCR προϊόντων.

Τα συστατικά της αντίδρασης PCR για το γονίδιο *MAPT* (Πίνακας 3.6.2):

<u>ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ</u>	<u>ΑΡΧΙΚΗ</u> <u>ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ</u>	<u>ΠΡΟΣΤΙΘΕΜΕΝΟΣ</u> <u>ΟΓΚΟΣ ΣΤΑ 20 μl</u>	<u>ΑΝΑΓΩΓΗ</u> <u>ΣΤΑ 25 μl</u>
H ₂ O		8	10
Πρόσθιος εκκινητής	10 pmol/μl	0,4	0,5
Ανάστροφος εκκινητής	10 pmol/μl	0,4	0,5
Taq πολυμεράση BioMix Red (2X)	2X	10	12,5
DNA		1,2	1,5

Πίνακας 3.6.2.: Συστατικά της PCR αντίδρασης.

Πειραματικό πρωτόκολλο ενίσχυσης με συμβατική PCR για τα *MAPT* ζεύγη εκκινητών (Πίνακας 3.6.3):

<u>ΣΤΑΔΙΟ PCR</u>	<u>ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ</u>	<u>ΔΙΑΡΚΕΙΑ</u>	<u>ΕΠΑΝΑΛΗΨΕΙΣ</u>
Αρχικός διαχωρισμός των κλώνων του DNA	95 °C	6 min	
Διαχωρισμός των κλώνων του DNA	95 °C	30 sec	

Υβριδισμός των εκκινητών στο DNA	58 °C	30 sec	40 κύκλοι
Επέκταση των εκκινητών	72 °C	30 sec	
Τελικό στάδιο επέκτασης	72 °C	7 min	

Πίνακας 3.6.3.: Πρωτόκολλο ενίσχυσης συμβατικής PCR.

3.7. DNA ηλεκτροφόρηση σε γέλη αγαρόζης

Αντιδραστήρια/Υλικά/Εξοπλισμός

- Ρυθμιστικό διάλυμα 5X TBE (τρεις-βορικό-EDTA) [54 g Trizma Base (Sigma #201-064-4), 27,5 g βορικό οξύ (Sigma #036K0210) και 20 ml EDTA 0,5 M pH 8,0 σε 1 lt].
- Βρωμιούχο αιθίδιο (500 µg/ml) (Sigma, 012K8934)
- Αγαρόζη 100 g (Nippon Genetic A602, UK)
- Δείκτης μοριακών βαρών 50-766 bp PCR marker (NEB, ΗΠΑ, N3234G) με ζώνες στα 50, 150, 300, 500 και 766 bp
- Πιπέτες (Gilson, USA) των 20 µl και των 100 µl.
- Μικρού μεγέθους "κασέτα", χτένια 1 mm -1,5 mm (10 θέσεων)
- Ρύγχη των 10 µl χωρίς φίλτρο
- Ηλεκτροφορητική συσκευή Peqlab (Sci-Plas, Αγγλία)
- Τροφοδοτικό ηλεκτροφόρησης EPS5301 (Amersham, Αγγλία)
- Τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας (Vilbert Loumart, Γαλλία)
- DNA Gel Loading Dye (6x) (Thermo Fisher, USA)

Πειραματική διαδικασία

Για το διαχωρισμό των προϊόντων συμβατικής PCR, έγινε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 2% w/v. Η πηκτή παρασκευάζεται με 1g αγαρόζης σε 50 ml ρυθμιστικού διαλύματος TBE 0,5X (=>μικρού μεγέθους gel). Ακολουθεί ενυδάτωση της αγαρόζης, μέσω ανάδευσης για περίπου 10 min. Κατόπιν θερμάνσεως, μέχρι την πλήρη διάλυση της αγαρόζης, προστίθενται 50 μl βρωμιούχου αιθιδίου (500 μg/ml). Το υγρής μορφής gel τοποθετείται σε ειδική διαμόρφωση ("κασέτα"), παράλληλα με τις δομές ("χτένια") που θα δημιουργήσουν τις μελλοντικές θέσεις φόρτωσης των δειγμάτων ("πηγαδάκια"), και αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για 20 min. Κατάλληλος όγκος δείγματος μαζί με χρωστική (10 μl) τοποθετείται προσεκτικά στα πηγαδάκια του πηκτώματος αγαρόζης. Παράλληλα με τα δείγματα φορτώνεται πάντα και δείκτης μοριακών βαρών DNA (PCR marker), για τον προσδιορισμό του μεγέθους των PCR προϊόντων αλλά και για την εξακρίβωση επιτυχούς ηλεκτροφορητικής διαδικασίας. Η ηλεκτροφόρηση γίνεται παρουσία ρυθμιστικού διαλύματος TBE 0,5X (0,5X: διάλυμα αραιωμένο κατά 20 φορές) (2 M Tris, 1 M βορικό οξύ, 50 mM EDTA), υπό σταθερή τάση 120 V για 20-30 min. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης οι ζώνες του DNA γίνονται ορατές με την επίδραση UV ακτινοβολίας μήκους κύματος 312 nm, λόγω της εκπομπής ακτινοβολίας φθορισμού από την προσδεμένη στο DNA χρωστική.

3.8. Καθαρισμός PCR προϊόντων

Για τον καθαρισμό των PCR προϊόντων χρησιμοποιήθηκαν τρεις μέθοδοι. Το σετ αντιδραστηρίων «High Pure PCR Cleanup Micro kit» (Roche, Ελβετία), «DNA clean-up & gel-out kit» (Blirt, Πολωνία), και το «Nucleospin Gel and PCR Clean-up XS» (Macherey-Nagel, Γερμανία).

High Pure PCR Cleanup Micro kit (Roche)

- Μετά το πέρας της PCR, γίνεται προσαρμογή του τελικού όγκου του κάθε δείγματος στα 100 μl, προσθέτοντας δισαπεσταγμένο H₂O. Σε κάθε 25 μl PCR δείγματος, γίνεται προσθήκη 100 μl Binding Buffer και έντονη ανάδευση. Στη συνέχεια, φυγοκέντρωση για μερικά δευτερόλεπτα.

- Εισαγωγή στήλης στο αντίστοιχο σωληνάριο της. Χρησιμοποιώντας πιπέτα γίνεται μεταφορά όλου του δείγματος στη στήλη. Πραγματοποιείται φυγοκέντρηση για 30-60 sec σε μέγιστη ταχύτητα και θερμοκρασία δωματίου.
- Απόρριψη του υγρού από το σωληνάριο και επανατοποθέτηση στη στήλη.
- Προσθήκη 400 µl Wash Buffer και φυγοκέντρηση για 30-60 sec σε μέγιστη ταχύτητα.
- Απόρριψη του υγρού από το σωληνάριο και επανατοποθέτηση στη στήλη.
- Προσθήκη 300 µl Wash Buffer και φυγοκέντρηση για 30-60 sec σε μέγιστη ταχύτητα (Η μέγιστη καθαρότητα επιτυγχάνεται με την προσθήκη δεύτερης φοράς Wash Buffer).
- Απόρριψη του υγρού από το σωληνάριο και επανατοποθέτηση στη στήλη. Φυγοκέντρηση για 1 min σε μέγιστη ταχύτητα και έπειτα εισαγωγή της στήλης σε σωληνάριο Eppendorf 1,5 ml (Με αυτό το βήμα επιτυγχάνεται η επιβεβαίωση της πλήρους απομάκρυνσης του Wash Buffer).
- Προσθήκη 10-20 µl Elution Buffer στο κέντρο της στήλης και φυγοκέντρηση για 1 min σε μέγιστη ταχύτητα (Απαιτήση για αλκαλικό pH κατά την έκλυση).
- Το σωληνάριο Eppendorf τώρα περιέχει καθαρό PCR προϊόν. Φύλαξη στους 2-8 °C ή στους -20 °C για εν συνεχεία ανάλυση.

DNA clean-up & gel-out kit (Blirt)

- Προσθήκη CB Buffer, 5 φορές τον όγκο του δείγματος DNA (Αν DNA δείγμα = 13 µl, τότε CB Buffer = 65 µl). Το διάλυμα θα πρέπει να έχει κίτρινο χρώμα.
- Short spin~10 sec με σκοπό την απομάκρυνση του υγρού από το καπάκι και μεταφορά ολόκληρου του δείγματος σε στήλη. Τοποθέτηση της στήλης στο σωληνάριό της και έπειτα φυγοκέντρηση για 60 sec σε μέγιστη ταχύτητα.
- Απόρριψη του σωληναρίου και μεταφορά της στήλης σε νέο.
- Προσθήκη 600 µl Wash Buffer και φυγοκέντρηση για 30 sec σε μέγιστη ταχύτητα.
- Απόρριψη του υγρού από το σωληνάριο και επανατοποθέτηση στη στήλη.
- Προσθήκη 400 µl Wash Buffer και φυγοκέντρηση για 30 sec σε μέγιστη ταχύτητα.
- Απόρριψη του υγρού από το σωληνάριο και επανατοποθέτηση στη στήλη.
- Φυγοκέντρηση για 60-120 sec σε μέγιστη ταχύτητα (Το Wash Buffer περιέχει ακετόνη, η οποία ίσως «παρεμβαίνει» σε κάποιες ενζυμικές αντιδράσεις και μειώνει την αποτελεσματικότητα της έκλυσης. Καθίσταται σημαντική λοιπόν η απομάκρυνση πλήρως της ακετόνης από τη στήλη πριν την έκλυση).

- Απόρριψη του σωληναρίου και μεταφορά της στήλης σε 1,5 ml σωληνάριο Eppendorf.
- Προσθήκη 50-100 µl Elution Buffer, απευθείας στη στήλη.
- Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 120 sec και φυγοκέντρωση στη συνέχεια για 60 sec σε μέγιστη ταχύτητα.
- Απόρριψη της στήλης και αποθήκευση του καθαρού PCR προϊόντος στους -4 °C ή -20 °C για ανάλυση στη συνέχεια.

Nucleospin Gel and PCR Clean-up XS (Macherey-Nagel)

- Ανάμειξη ενός μέρους δείγματος με 2 μέρη του Buffer NTI (Διάλυμα πρόσδεσης). Για παράδειγμα, για 20 µl PCR προϊόντος, προσθήκη 40 µl NTI. Έντονη ανάδευση.
- Τοποθέτηση στήλης στο δοχείο συλλογής της. Προσοχή, η ποσότητα του δείγματος που θα φορτωθεί να μην ξεπερνάει τα 500 µl.
- Φυγοκέντρωση για 30 sec σε μέγιστη ταχύτητα.
- Απόρριψη του υγρού και επανατοποθέτηση της στήλης στο δοχείο συλλογής.
- Προσθήκη 500 µl Buffer NT3 στη στήλη.
- Φυγοκέντρωση για 30 sec σε μέγιστη ταχύτητα.
- Απόρριψη του υγρού και επανατοποθέτηση της στήλης στο δοχείο συλλογής.
- Προσθήκη 300 µl Buffer NT3 στη στήλη.
- Φυγοκέντρωση για 1 min σε μέγιστη ταχύτητα.
- Απόρριψη του υγρού και του δοχείου συλλογής.
- Τοποθέτηση της στήλης σε 1,5 ml σωληνάριο Eppendorf.
- Προσθήκη 6-12 µl Buffer NE (Elution Buffer) και επώαση για 1 min σε θερμοκρασία δωματίου.
- Φυγοκέντρωση για 1 min σε μέγιστη ταχύτητα και επανάληψη της διαδικασίας του elution για μια ακόμα φορά.

3.9. Αντίδραση θερμικών κύκλων

Στον πίνακα 3.9.1 καταγράφονται τα συστατικά της αντίδρασης cycle sequencing με τελικό όγκο τα 10 μ l.

<u>ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ</u>	<u>ΠΡΟΣΤΙΘΕΜΕΝΟΣ ΟΓΚΟΣ (μl)</u>
RRmix, ABI	0,5
5X sequencing buffer, ABI	2
Εκκινητής (10 pmol/ μ l)	0,25
H ₂ O	5,25
Κεκαθαρμένο PCR προϊόν	2

Πίνακας 3.9.1.: Πρωτόκολλο Cycle Sequencing για τις εξωνικές περιοχές του γονιδίου MPT

Σε περίπτωση που χρειάζεται να πραγματοποιηθεί έλεγχος ποιότητας (Quality Control) ακολουθείται η παραπάνω διαδικασία, με μόνη διαφορά ότι αντί για PCR προϊόν χρησιμοποιείται το πλασμίδιο PGEM 3Zf (+) (2 μ l) και για εκκινητή χρησιμοποιείται ο M13 (-21) εκκινητής (4 μ l). Τα δύο αυτά αντιδραστήρια περιέχονται στο kit της Applied Biosystems (Big Dye v3.1 Cycle Sequencing).

Θερμοκρασιακό πρόγραμμα Cycle Sequencing (Πίνακας 3.9.2):

<u>ΣΤΑΔΙΟ PCR</u>	<u>ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ</u>	<u>ΔΙΑΡΚΕΙΑ</u>	<u>ΕΠΑΝΑΛΗΨΕΙΣ</u>
Αρχικός διαχωρισμός των κλώνων DNA	96 °C	1 min	25 κύκλοι
Διαχωρισμός των κλώνων του DNA	96 °C	10 sec	
Υβριδισμός των εκκινητών στο DNA	50 °C	10 sec	
Επέκταση των εκκινητών	60 °C	4 min	

Πίνακας 3.9.2.: Θερμοκρασιακό πρόγραμμα Cycle Sequencing.

Εκκινητές που προτείνονται ως επιλογή στο cycle sequencing για τα MAPT εξώνια που πρόκειται να αλληλουχηθούν (Πίνακας 3.9.3).

<u>ΕΞΩΝΙΑ</u>	<u>ΕΚΚΙΝΗΤΗΣ</u>	<u>ΜΗΚΟΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ</u> <u>ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΗΣ ΣΤΟ</u> <u>SEQSTUDIO ΩΣ RUN MODULE</u>
2	Forward	Short
3	Forward	Short
4	Forward	Short
5	Forward	Short
7	Forward	Short
9	Forward	Short
10	Reverse	Short
11	Reverse	Short
12	Forward	Short
13	Forward	Short
14	Forward	Short

Πίνακας 3.9.3.: Προτεινόμενοι εκκινητές για την θερμική ενίσχυση των εξωνίων, καθώς και το μήκος της αλληλουχίας στο Sequencing.

3.10. Καθαρισμός cycle sequencing προϊόντων

Για τον καθαρισμό των προϊόντων μετά το cycle sequencing χρησιμοποιήθηκε το σετ αντιδραστηρίων Big Dye XTerminator (Applied Biosystems, USA). Ο καθαρισμός με τη μέθοδο αυτή αποσκοπεί στην απομάκρυνση των μη-συνδεδεμένων διδεόξυνουκλεοτιδίων και αποτελεί μια γρήγορη και απλή μέθοδο για τις αντιδράσεις DNA sequencing.

Αντιδραστήρια/Υλικά/Εξοπλισμός

- Διάλυμα SAM (Applied Biosystems, USA)
- Διάλυμα Big Dye XTerminator (Applied Biosystems, USA)
- Πιπέτες των 1000 µl (Gilson, USA)
- Ρύγχη των 1000 µl

- Σωληνάρια Eppendorf 1,5 ml
- Πλάκες μικροτιτλοδότησης
- Φυγόκεντρος (Hermle Labor technik, Gmb HZ 287 A)
- Συσκευή έντονης ανάδευσης (vortex) (Thermo Fisher, USA)
- Διαχωριστική μεμβράνη (A35641, ABI)

Πειραματική διαδικασία

- Υπολογισμός των όγκων των δυο διαλυμάτων SAM και Big Dye XTerminator, ανάλογα με τον όγκο της αντίδρασης, όπως στο παράδειγμα. Για κάθε 10 μl όγκου αντίδρασης $\Rightarrow$ 45 μl δ/τος SAM και 10 μl δ/τος Big Dye XTerminator.
- Ολόκληρος ο όγκος των καθαρών δειγμάτων προστίθεται απευθείας στα πηγαδάκια της πλάκας μικροτιτλοδότησης.
- Προετοιμασία του δ/τος SAM και Big Dye XTerminator σε σωληνάριο Eppendorf (ο όγκος τους προσδιορίζεται ανάλογα τον αριθμό των δειγμάτων σύμφωνα με το πρώτο παράδειγμα).
- Προσθήκη στο κάθε πηγαδάκι της κατάλληλης ποσότητας από το αναμειγμένο δ/μα έπειτα από συνεχή του ανάδευση με τη χρήση της πιπέτας.
- Σφράγισμα της πλάκας μικροτιτλοδότησης με μεμβράνη.
- Έντονη ανάδευση για 30 min.
- Φυγοκέντρωση για 2 min στα 1000xg.

3.11. Ανάλυση της αλληλουχίας DNA

Η ανάλυση της αλληλουχίας των δειγμάτων, εκτελέσθηκε στον γενετικό αναλυτή SeqStudio της Thermo Applied Biosystems. Ο γενετικός αναλυτής SeqStudio είναι ένα αυτοματοποιημένο όργανο για την ανάλυση κλασμάτων DNA τα οποία είναι επισημασμένα με φθορίζουσες ουσίες, χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της ηλεκτροφόρησης σε τριχοειδές.



Εικόνα 3.11.1: Γενετικός αναλυτής Thermo ABI SeqStudio.

Το όργανο αυτό χρησιμοποιεί ομάδες εικονικών φίλτρων για να ανιχνεύσει την ένταση του φθορισμού σε τέσσερις μη-επικαλυπτόμενες περιοχές πάνω στην CCD κάμερα που αντιστοιχούν στις τέσσερις χρωστικές που χρησιμοποιούνται: για το A→R66, για το C→R0X, για το G→R110 και για το T→TAMRA. Κάθε περιοχή αντιστοιχεί σε ένα φάσμα μηκών κύματος που περιέχει ή είναι κοντά στο μέγιστο της εκπομπής της χρωστικής του ABI prism. Αυτή η διαδικασία είναι αντίστοιχη με την χρήση ενός φυσικού φίλτρου που χωρίζει το φως σε διαφορετικά μήκη κύματος. Εν τούτοις, οι ομάδες των φίλτρων ονομάζονται «εικονικά φίλτρα» επειδή το όργανο δεν έχει φυσικά φίλτρα ως εξαρτήματα για να κάνει τον διαχωρισμό. Οι ακριβείς θέσεις των CCD περιοχών και οι κατάλληλοι συνδυασμοί των χρωστικών γι' αυτές τις θέσεις εξαρτώνται από τις ομάδες των εικονικών φίλτρων που χρησιμοποιούνται. Για παράδειγμα, με την ομάδα εικονικών φίλτρων E το όργανο καταγράφει την ένταση του φωτός σε τέσσερις περιοχές ή «παράθυρα» κεντραρισμένα στα 540 nm, στα 570 nm, στα 595 nm και στα 625 nm. Οι θέσεις των παραθύρων σε κάθε ομάδα εικονικού φίλτρου έχει βελτιστοποιηθεί ώστε να παρέχει το μέγιστο δυνατό διαχωρισμό μεταξύ των κέντρων ανίχνευσης για τις διαφορετικές χρωστικές ενώ διατηρεί καλή ένταση σήματος.

Το Data Collection Software κωδικοποιεί την ένταση και το χρώμα από τις τέσσερις περιοχές συγκέντρωσης του φωτός. Αυτές εμφανίζονται σαν μπλε, πράσινες, μαύρες και κόκκινες κορυφές στα ακατέργαστα δεδομένα. Το Sequencing Analysis Software χρησιμοποιεί τα ίδια

τέσσερα χρώματα για τα αναλυμένα δεδομένα από όλους τους συνδυασμούς των φίλτρων και των χρωστικών. Η έκθεση των χρωμάτων αναπαριστά τη σχετική, όχι την πραγματική, ανίχνευση των μηκών κύματος. Για σταθερότητα, το λογισμικό συμβολίζει πάντα στα αναλυόμενα δεδομένα το Α με πράσινο, το C με μπλε, το G με μαύρο και το T με κόκκινο στο ηλεκτροφορογράφημα. Στον πίνακα 3.11.2. και 3.11.3. φαίνονται οι χρωστικές που χρησιμοποιήθηκαν καθώς και τα μήκη κύματος στα οποία έχουν μέγιστη εκπομπή και απορρόφηση. Το αρχείο που λαμβάνεται μπορεί να συγκριθεί με τη φυσιολογική αλληλουχία του υπό μελέτη γονιδίου μέσω BLAST του PubMed ή με το πρόγραμμα Chromas ή με τα προγράμματα NovoSNP, Variant Reporter 3.0 και SnackVar.

ΟΜΑΔΑ ΕΙΚΟΝΙΚΟΥ ΦΙΛΤΡΟΥ	ΧΡΩΜΑ	ΕΥΡΟΣ ΜΗΚΟΥΣ ΚΥΜΑΤΟΣ ΤΟΥ ΕΙΚΟΝΙΚΟΥ ΦΙΛΤΡΟΥ
Α	Μπλε	530-541
	Πράσινο	554-564
	Μαύρο	581-591
	Κόκκινο	610-620
Ε	Μπλε	535-545
	Πράσινο	565-575
	Μαύρο	590-600
	Κόκκινο	620-630

Πίνακας 3.11.2.: Συσχετισμός χρώματος και εύρους μηκών κύματος των ομάδων εικονικών φίλτρων.

ΧΡΩΣΤΙΚΗ	ΜΕΓΙΣΤΗ ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗ (nm)	ΜΕΓΙΣΤΗ ΕΚΠΟΜΠΗ (nm)
A→R6G	530	590
C→ROX	575	602
G→R110	538	522
T→TAMRA	557	583

Πίνακας 3.11.3.: Μέγιστη απορρόφηση και εκπομπή των διαφόρων χρωστικών.

Ο αναλυτής διαθέτει μια αυτόνομη, αντικαταστάσιμη κασέτα με:

- Μία συστοιχία τεσσάρων τριχοειδών.
- Ένα πολυμερές ικανό να εκτελεί ανάλυση αλληλουχίας και θραυσμάτων.
- Ένα σύστημα παροχής πολυμερούς POP-1.
- Ένα ρυθμιστικό διάλυμα ανόδου.

Ο γενετικός αναλυτής SeqStudio αυτόματα:

- Εκτελεί οπτική ευθυγράμμιση κάθε φορά που τοποθετείται μια κασέτα.
- Εκτελεί αυτόματη φασματική βαθμονόμηση για κάθε ένα δείγμα για διόρθωση της φασματικής επικάλυψης.

Ο αναλυτής αυτός είναι συμβατός με τυπικές πλάκες μικροτιτλοδότησης οι οποίες διαθέτουν 96 πηγαδάκια στα οποία γίνεται η φόρτωση των δειγμάτων και είναι ένα αυτόνομο όργανο. Η ρύθμιση της πλάκας μπορεί να γίνει απευθείας στην οθόνη αφής, σε έναν υπολογιστή με SeqStudio Plate Manager, στο Thermo Fisher Cloud ή ακόμα σε USB. Μπορεί να παρακολουθηθεί μια αντίδραση απευθείας στην οθόνη αφής του οργάνου ή απομακρυσμένα στο Thermo Fisher Cloud.

Το seqstudio data collection software δημιουργεί ένα ηλεκτροφορογράφημα για κάθε χρωστική που βασίζεται στη μετανάστευση θραυσμάτων DNA κατά μήκος των τριχοειδών. Η μορφή των αρχείων καθορίζεται από τον τύπο του πειράματος που καθορίζεται κατά την τοποθέτηση της πλάκας.

- Τα πειράματα αλληλούχισης δημιουργούν ένα AB1 αρχείο.
- Τα πειράματα ανάλυσης θραυσμάτων δημιουργούν ένα FSA αρχείο.

Οι μορφές αρχείων AB1 και FSA μπορούν να αναλυθούν με λογισμικό δευτερεύουσας ανάλυσης. Το λογισμικό δευτερεύουσας ανάλυσης είναι διαθέσιμο για υπολογιστή και στο Thermo Fisher Cloud.

Η ποιότητα των αποτελεσμάτων είναι χρωματικά κωδικοποιημένη.

- Πράσινο: Η ποιότητα ήταν εξαιρετική.
- Κίτρινο: Τουλάχιστον μια ειδοποίηση προειδοποίησης για την ποιότητα.
- Κόκκινο: Τουλάχιστον μια ειδοποίηση για αποτυχία.

Δύο ορισμοί των οποίων οι τιμές είναι σημαντικό να παρατηρούνται είναι οι παρακάτω:

- **Median Pup:** Μέτρηση θορύβου - μέση τιμή εντός του σαφούς εύρους της αναλογίας του σήματος της κύριας ονομαζόμενης βάσης προς το σήμα της υψηλότερης δευτερεύουσας κορυφής.
- **CRL (contiguous read length):** Το μεγαλύτερο αδιάλειπτο τμήμα βάσεων με ποιότητα υψηλότερη από ένα καθορισμένο όριο. Κατά την αξιολόγηση της ποιότητας μιας βάσης, χρησιμοποιείται η ποιότητά της και η ποιότητα των παρακείμενων βάσεων εντός ενός καθορισμένου παραθύρου.

Αντιδραστήρια/Υλικά/Εξοπλισμός

- Πλάκες μικροτιτλοδότησης χωρητικότητας 96 δειγμάτων
- Πιπέτες των 20 µl (Gilson, USA)
- Γενετικός αναλυτής SeqStudio

Πειραματική διαδικασία

- Τοποθέτηση των καθαρών πλέον PCR δειγμάτων στις πλάκες μικροτιτλοδότησης και καλύπτονται με το ειδικό διαχωριστικό διάφραγμα
- Καταγραφή των θέσεων που χρησιμοποιούνται
- Φόρτωση των δειγμάτων στον γενετικό αναλυτή

Προετοιμασία του γενετικού αναλυτή πριν τη φόρτωση του «plate»

- I. Άνοιγμα του υπολογιστή, ο οποίος είναι συνδεδεμένος με τον γενετικό αναλυτή
- II. Προγραμματισμός των συνθηκών για την ανάλυση των δειγμάτων ακολουθώντας τα παρακάτω βήματα : Plate Manager → New → Name: Sequence/Anna analysis sets → Name in “sample name” → Select big dye 1.1 (E) or 3.1 (Z) → Run module

e.g. Short (>350) or Medium (>500) or Long (>800 bp) BDX Seq → Next → Select Folder → copy psm file to a USB.

- III. Άνοιγμα της πόρτας του αναλυτή : SeqStudio→ Αφαιρείται η κασέτα→ Γίνεται έλεγχος του ρυθμιστικού διαλύματος καθόδου→ Τοποθέτηση στον δειγματολήπτη την πλάκα μικροτιτλοδότησης→ Κλείσιμο την πόρτα → Εισαγωγή του USB και επιλογή: Set up run → Select USB → Select plate-check plate (order) → Start run - OK → Continue run.
- IV. Μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας, επιλογή του συμβόλου πάνω δεξιά στον γενετικό αναλυτή. Έξοδος της πλάκας μικροτιτλοδότησης, κλείσιμο της πόρτας του αναλυτή και επιλογή : Settings → Run history → Select file → Export → Select USB→ Copy to a folder.

3.12. MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification)

Αντιδραστήρια/Υλικά/Εξοπλισμός

- TE_{0,1} (10 mM Tris-HCL pH 8,0 + 0,1 mM EDTA) με χαμηλή ιοντική ισχύ
- Hi-Di φορμαμίδιο (Applied Biosystems, USA)
- Gene Scan 500 LIZ (Applied Biosystems, USA)
- Μείγμα υβριδισμού με 1,5 mL 41 ζευγών ανιχνευτών SALSA MLPA Probemix P275-C4 (*GRN* και *MAPT*) #P275-025R, 1,5 µL διάλυμα MLPA
- Μείγμα λιγάσης - 65 από σετ αντιδραστηρίων SALSA MLPA EK1-FAM (3 µL διάλυμα λιγάσης A, 3 µL διάλυμα λιγάσης B, 25 µL απιονισμένο νερό, 1 µL SALSA λιγάση - 65 MRC Holland)
- Μείγμα πολυμεράσης από σετ αντιδραστηρίων SALSA MLPA EK1-FAM (7,5 µL απιονισμένο νερό, 2 µL μείγμα εκκινητών FAM, 0,5 µL πολυμεράση SALSA MRC Holland)
- Σωληνάρια τύπου Eppendorf 1,5 ml
- Σωληνάρια των 0,2 ml
- Πιπέτες (Gilson, USA) των 10 µL και των 200 µL και αντίστοιχα ρύγχη με φίλτρο
- Θερμικός κυκλοποιητής Eppendorf 5331 Gradient
- Συσκευή έντονης ανάδευσης (Fisher, USA)
- Γενετικός αναλυτής Thermo ABI SeqStudio

Πειραματική διαδικασία

a) Επεξεργασία δείγματος

Σε σωληνάρια των 200 μL προστίθεται δείγμα DNA και ποσότητα TE low ρυθμιστικού διαλύματος ώστε η συγκέντρωση του DNA ιδανικά να είναι περίπου 100 ng (εύρος 50-250 ng) σε τελικό όγκο 5 μL . Αυτό το στάδιο έχει σκοπό τη ρύθμιση του pH του DNA ώστε να βρίσκεται μεταξύ του 8,0-8,5 ώστε να αποφευχθεί η αποπυρίνωση κατά τη διάρκεια της αρχικής επώασης στους 98 °C.

b) Διαχωρισμός της διπλής έλικας του DNA (μέρα πρώτη)

- i. Προσθήκη 5 μL δείγματος DNA σε κάθε σωληνάριο των 0,2 ml.
- ii. Τοποθέτηση των σωληναρίων στο θερμικό κυκλοποιητή.
- iii. Αύξηση της θερμοκρασίας στους 98 °C για 6 λεπτά ώστε να πραγματοποιηθεί ο διαχωρισμός των κλώνων.
- iv. Μείωση της θερμοκρασίας τους 25 °C και διατήρηση των σωληναρίων στο θερμικό κυκλοποιητή.

c) Αντίδραση υβριδισμού (μέρα πρώτη)

- i. Προετοιμασία μείγματος υβριδισμού. Μείγμα για κάθε αντίδραση: 1,5 μL ρυθμιστικό διάλυμα MLPA + 1,5 μL μείγματος ενισχυτών. Καλή ανάμειξη με τη χρήση πιπέτας ή vortex.
- ii. Μετά τον διαχωρισμό του DNA ακολουθεί προσθήκη 3 μL μείγματος υβριδοποίησης σε κάθε αντίδραση.
- iii. Συνέχεια του προγράμματος του θερμικού κυκλοποιητή για την υβριδοποίηση των ενισχυτών (probes): στους 95 °C για 2 λεπτά και έπειτα μείωση της θερμοκρασίας στους 60 °C για 18 ώρες.

d) Αντίδραση δεσμάσης - λιγάσης (μέρα δεύτερη)

- i. Προετοιμασία μείγματος λιγάσης - 65. Μείγμα για κάθε αντίδραση: 25 μL απεσταγμένου νερού + 3 μL ρυθμιστικό διάλυμα λιγάσης A + 3 μL ρυθμιστικό

- διάλυμα λιγάσης B + 1 μL ένζυμο λιγάση - 65. Καλή ανάμειξη μείγματος με τη χρήση πιπέτας.
- ii. Παύση θερμικού κυκλοποιητή όταν η θερμοκρασία φτάσει στους 54 °C, spin down και προσθήκη 32 μL μείγματος λιγάσης - 65 σε κάθε MLPA αντίδραση.
 - iii. Συνέχεια επώασης θερμικού κυκλοποιητή στους 54 °C για 15 λεπτά, στους 98 °C για 5 λεπτά και όταν η θερμοκρασία κατέβει στους 20 °C ακολουθεί προσωρινή παύση της λειτουργίας του προγράμματος και διατήρηση στους 20 °C με σκοπό την προετοιμασία των δειγμάτων για την PCR αντίδραση.

e) Αντίδραση PCR (μέρα δεύτερη)

- i. Προετοιμασία μείγματος πολυμεράσης. Μείγμα για κάθε αντίδραση: 7,5 μL απιονισμένο νερό + 2 μL SALSA PCR μείγμα εκκινητών (ο ένας εκ των οποίων επισημασμένος με FAM) + 0,5 μL πολυμεράση SALSA. Καλή ανάμειξη με χρήση πιπέτας.
- ii. Προσθήκη 10 μL μείγματος πολυμεράσης σε κάθε MLPA αντίδραση (σε θερμοκρασία δωματίου). Καλή ανάμειξη με τη χρήση πιπέτας και απευθείας τοποθέτηση των σωληναρίων στο θερμικό κυκλοποιητή και συνέχεια του προγράμματος της PCR αντίδρασης· αποτελείται από 35 κύκλους (95 °C για 30 δευτερόλεπτα, 60 °C για 30 δευτερόλεπτα και 72 °C για 60 δευτερόλεπτα), συνέχεια του προγράμματος στου 72 °C για 20 λεπτά και ακολουθεί παύση προγράμματος όταν η θερμοκρασία μειωθεί στους 15 °C.
- iii. Μετά την PCR αντίδραση, προτείνεται η αποφυγή ανοίγματος των σωληναρίων στον χώρο που έλαβε χώρα το πρόγραμμα του θερμικού κυκλοποιητή με σκοπό την αποφυγή επιμόλυνσης των δειγμάτων.
- iv. Τα δείγματα της PCR αντίδρασης μπορούν να αποθηκευτούν μακριά από έκθεση σε φως στους 4 °C για μία εβδομάδα ή στους -25 °C με -15 °C για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα.

<u>ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ DNA</u>		
1.	98°C	6 λεπτά
2.	25°C	Παύση
<u>ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΥΒΡΙΔΙΣΜΟΥ</u>		
3.	95°C	2 λεπτά
4.	60°C	18 ώρες
<u>ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΕΝΣΩΜΑΤΩΣΗΣ</u>		
5.	54°C	Παύση, spin down
6.	54°C	15 λεπτά
7.	98°C	5 λεπτά
8.	20°C	παύση
<u>ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ PCR</u>		
9. (35 κύκλοι)	95°C	30 δευτερόλεπτα
	60°C	30 δευτερόλεπτα
	72°C	60 δευτερόλεπτα
10.	72°C	20 λεπτά
11.	15°C	παύση

Πίνακας 3.12.1.: Πρόγραμμα θερμικού κυκλοποιητή για MLPA αντίδραση.

Μετά την ολοκλήρωση του προγράμματος στο θερμικό κυκλοποιητή (Πίνακας 3.12.1) ακολουθεί η προετοιμασία των δειγμάτων της αντίδρασης για την ανάλυσή τους από τον γενετικό αναλυτή ABI SeqStudio.

Η διαδικασία είναι η εξής:

- i. Προετοιμασία μείγματος με 11,9 μL Hi-Di φορμαμίδιο και 0,4 μL LIZ GS500 για κάθε δείγμα.
- ii. Προσθήκη 12,3 μL από το μείγμα σε σωληνάρια των 200 μL και προσθήκη 0,8 μL από τα PCR δείγματα.
- iii. Επώαση των παραπάνω δειγμάτων σε πρόγραμμα του θερμικού κυκλοποιητή για 3 λεπτά στους 86 °C και ψύξη αυτών για 2 λεπτά στους 4 °C.

Φόρτωση των δειγμάτων σε πλάκα μικροτιτλοδότησης και ηλεκτροφόρηση αυτών από τον γενετικό αναλυτή με πρόγραμμα Fragment Analysis (όχι long) φίλτρο G5 (DS-33) και size marker LIZ GS500 (-250), λήψη των αντίστοιχων fsa αρχείων και ανάλυση με το λογισμικό Coffalyzer.

Τα αποτελέσματα από την τεχνική MLPA αναλύονται με το πρόγραμμα Coffalyzer.Net. Οι βασικότερες ενδείξεις του προγράμματος φαίνονται στον πίνακα 3.12.2. Τουλάχιστον τρία δείγματα αναφοράς (από υγιή ή *MAPT* αρνητικά άτομα) πρέπει να περιλαμβάνονται σε κάθε MLPA πείραμα (ιδανικά τουλάχιστον 8 δείγματα στο σύνολο). Σε τυχόν εύρεση παθολογικού δείγματος απαιτείται η σύγκρισή του με φυσιολογικά δείγματα αναφοράς ή άλλα αρνητικά δείγματα. Το μίγμα ανιχνευτών του MLPA (probe mix) περιέχει θραύσματα ελέγχου ποιότητας (quality control fragments) τα οποία σηματοδοτούν εάν υπάρχει κάποιο σφάλμα σε κάθε δείγμα το οποίο επηρεάζει τα αποτελέσματα της MLPA αντίδρασης. Επίσης, το ειδικό αντιδραστήριο το οποίο χρησιμοποιήθηκε, περιέχει 5 ζεύγη ανιχνευτών για το γονίδιο *PGRN*, 14 ζεύγη ανιχνευτών για το γονίδιο *MAPT*, 14 ζεύγη ανιχνευτών που ελέγχουν άλλα σημεία αναφοράς της περιοχής 17q21 καθώς και άλλα 7 ζεύγη ανιχνευτών που ελέγχουν άλλα χρωμοσώματα ως σημεία αναφοράς.

<u>ΟΝΟΜΑ</u>	<u>ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ</u>
Benchmark fragment	Σύγκριση θραύσματος αναφοράς με τα υπόλοιπα θραύσματα ελέγχου.
Quantity fragments (Q-fragments)	Δίνουν υψηλό σήμα όταν η ποσότητα του DNA είναι πολύ χαμηλή ή σε τυχόν αποτυχία σύνδεσης του ζεύγους ανιχνευτών. Q-fragments>33% του θραύσματος αναφοράς (Benchmark fragment) προδίδει μη επαρκή ποσότητα DNA.
Denaturation fragments (D- fragments)	Δίνουν χαμηλό σήμα σε περίπτωση μη-ορθής αποδιάταξης του DNA. Σήμα <50% του θραύσματος αναφοράς → ανεπαρκής αποδιάταξη DNA.
X και Y fragments	Επιβεβαίωση φύλου ασθενούς (αντίστοιχα για X και Y χρωμόσωμα).

Πίνακας 3.12.2.: Πίνακας θραυσμάτων και κατάλληλη περιγραφή τους.

3.13. *APOE* γονοτύπηση

Για την *ApoE* γονοτύπηση του συνόλου των δειγμάτων, χρησιμοποιήθηκε το προτυποποιημένο LightMix® Kit *ApoE* C112R R158C (Roche), το οποίο περιλαμβάνει ένα λυοφιλιωμένο μείγμα από εκκινητές και ενισχυτές κατάλληλο για 96 αντιδράσεις από 20 μl η καθεμία. Οι αντιδράσεις PCR πραγματικού χρόνου και η ανάλυση καμπυλών τήξης πραγματοποιήθηκαν με τον θερμικό κυκλοποιητή LightCycler 480II της εταιρείας Roche.

Πειραματική διαδικασία για το LightCycler 480II

Σύμφωνα με το πρωτόκολλο του Light Mix Kit, ειδικοί εκκινητές ενισχύουν τμήμα 228 bp του *APOE* γονιδίου. Το αποκτηθέν προϊόν αναλύεται με ειδικό ανιχνευτή (Simple Probe probe 519) για τη μετάλλαξη C112R (έλεγχος E4), στο κανάλι 530 και με ανιχνευτές υβριδοποίησης (hybridization probes) επισημασμένους με LightCycler Red 640 για τη μετάλλαξη R158C (έλεγχος E2), στο κανάλι 640. Μετά την ανάλυση καμπύλης τήξεως, η ανίχνευση για το κωδικόνιο 112 παρουσιάζει στο κανάλι 530: $T_m = 55\text{ }^{\circ}\text{C}$ για τον πολυμορφισμό 112C (WT) και $T_m = 64\text{ }^{\circ}\text{C}$ για τον πολυμορφισμό 112R. Η ανίχνευση για το κωδικόνιο 158 παρουσιάζει στο κανάλι 640: $T_m = 63\text{ }^{\circ}\text{C}$ για τον πολυμορφισμό 158R και $T_m = 53\text{ }^{\circ}\text{C}$ για τον πολυμορφισμό 158C.

Για την επιτυχημένη ανάλυση όλων των πολυμορφισμών αυτών το αρχείο του color compensation είναι απαραίτητο.

Τα αποτελέσματα της αντίδρασης λαμβάνονται μέσα με 75 λεπτά (45 κύκλοι αντίδρασης και καμπύλη τήξης).

Υλικά/Εξοπλισμός

- Πιπέτες
- Ρύγχη Filter tips
- Eppendorf tubes
- LightCycler 480 Multiwell plate 96, white
- LightCycler 480 Sealing foil
- LightCycler 480 II, Roche
- LightMix Kit *ApoE* C112R R158C (TIB, MOLBIOL)
- Ψυχόμενη φυγόκεντρος Megafuge 1.0R (Heraeus)

Προετοιμασία LightCycler 480 II

1. Άνοιγμα του LightCycler και του H/Y στον οποίο είναι συνδεδεμένο.
2. Είσοδος στο πρόγραμμα του LightCycler.
3. Research Database→On.
4. New Experiment from Template →ApoE.
5. Detection Format: ApoE simple-dual.
6. Subset editon→ Πατάω το (+) → Επιλογή θέσεων που θα φορτωθούν τα δείγματα στο plate→Apply.
7. Sample editor → Select Workflow: Tm calling → Select Samples →Σήμανση των δειγμάτων και του blank.

Προετοιμασία stock αντιδραστηρίων (φυλάσσονται στους -20 °C)

- Roche Master Faststart 10 X (πολυμεράση): Μεταφέρουμε 60 μl από το 1b στο 1a.
- TIB Mix (primers, probes) 10 X: Στα αντιδραστήρια της TIB Mol Biol με το κόκκινο καπάκι προσθέτουμε 66 μl H₂O και στη συνέχεια vortex-spin down.

Το πειραματικό πρωτόκολλο του kit ακολουθεί παρακάτω στον πίνακα 3.13.1.

<u>ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ</u>	<u>ΑΡΧΙΚΗ</u> <u>ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ</u>	<u>ΠΡΟΣΤΙΘΕΜΕΝΟΣ</u> <u>ΟΓΚΟΣ (μl)</u>	<u>ΤΕΛΙΚΗ</u> <u>ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ</u>
H ₂ O	-	8,2	-
MgCl ₂	25 mM	1,6	2 mM
DMSO	-	1,2	-
Roche Master (LightCycler® FastStart DNA Master Hyb Probe)	10X	2,0	1X
Reagent Mix (περιέχει εκκινητές και ανιχνευτές)	10X	2,0	1X
DNA		5,0	

Πίνακας 3.13.1.: Πειραματικό πρωτόκολλο Real-Time PCR για το APOE γονίδιο.

Το πρωτόκολλο περιλαμβάνει τέσσερα στάδια, όπως φαίνεται παρακάτω (Πίνακας 3.13.2):

1. Denaturation: Αποδιάταξη δείγματος και δράση ενζύμου
2. Cycling: PCR ενίσχυση του DNA στόχου
3. Melting: Καμπύλη τήξης για ταυτοποίηση του PCR προϊόντος
4. Cooling: Μείωση θερμοκρασίας μηχανήματος

Program Step:	Denaturation	Cycling			Melting			Cooling
Parameter								
Analysis Mode	None	Quantification mode			Melting Curves mode			None
Cycles	1	45			1			1
Target [°C]	95	95	60	72	95	40	85	40
Hold [hh:mm:ss]	00:10:00	00:00:05	00:00:10	00:00:15	00:00:30	00:02:00	00:00:00	00:00:30
Ramp Rate [°C/s] 96	4.4	4.4	2.2	4.4	4.4	1.5	-	1.5
Ramp Rate [°C/s] 384	4.6	4.6	2.4	4.6	4.6	2.0	-	2.0
Acquisition Mode	None	None	Single	None	None	None	Continuous	None
Acquisitions [per °C]	-	-	-	-	-	-	1	-

Εικόνα 3.13.2.: Πρόγραμμα γονοτύπωσης ApoE στο LightCycler 480II.

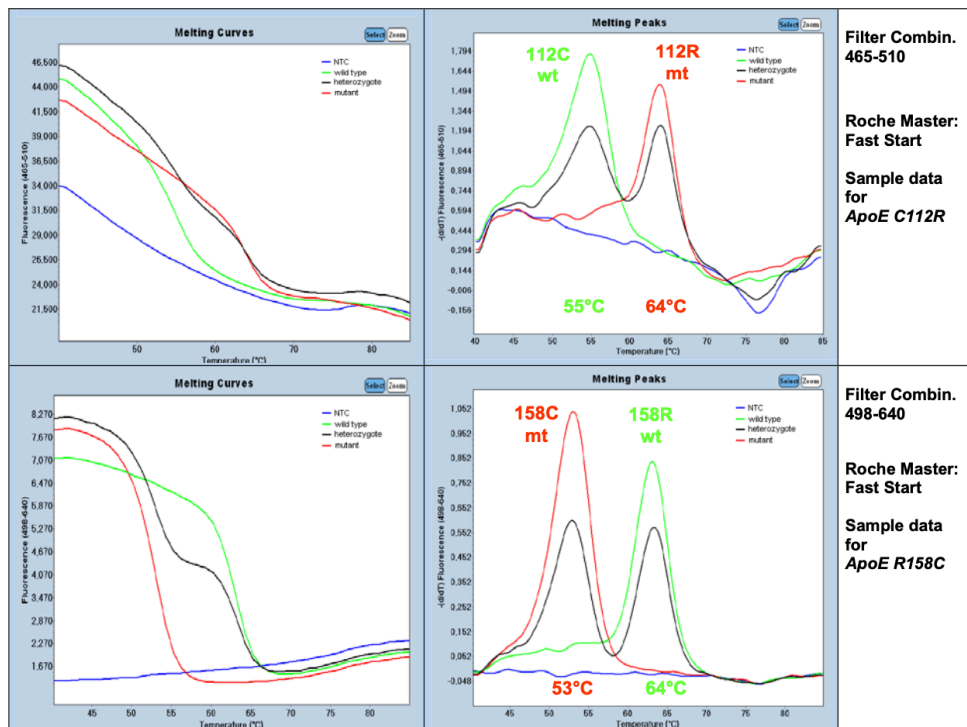
Προετοιμασία δειγμάτων

1. Ξεπάγωμα του stock των αντιδραστηρίων και τα προς εξέταση DNA. Τοποθέτηση τους στο ειδικό Cryobox μαζί με ένα σωληνάριο αποστειρωμένο νερό.
2. Κατασκευή του απαραίτητου mix με τα αντιδραστήρια του kit σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή: [ανά δείγμα: 8,2 µl H₂O, 1,6 µl 25 mM Mg²⁺, 2 µl TIB reagent mix (probes), 1,2 µl DMSO, 2 µl Roche Master mix (polymerase)] και το κατανέμουμε σε ίσους όγκους (15 µl) στις θέσεις στο plate.
3. Ως αρνητικό control (blank) δεν προστίθεται DNA στο πρώτο δείγμα. Ως θετικό control προστίθενται είτε τα πλασμίδια controls του kit είτε 3-4 προηγούμενα δείγματα με ποικίλους γονοτύπους π.χ. E2/E3, E3/E3, E3/E4. Στα υπόλοιπα δείγματα γίνεται προσθήκη 5 µl DNA των προς εξέταση ασθενών (μετά από vortex). Ο τελικός όγκος που περιέχουν οι θέσεις στο plate είναι 20 µl.
4. Κάλυψη του plate με μεμβράνη, spin down στην ψυχόμενη φυγόκεντρο, τοποθέτηση προσεκτικά και επιλογή Run. Στη συνέχεια αποθήκευση της διαδικασίας στον αντίστοιχο φάκελο με το όνομα ApoE και την ημερομηνία.

Ανάλυση αποτελεσμάτων

1. Επιλογή Color Compensation (CC) → In database → CC 510-640-690.
2. Analysis → Tm calling → Subset π.χ. "ApoE 04/10/2023" → OK.
3. Επιλογή των καναλιών: CC 465-510 και CC 498-640, αντίστοιχα για το πρώτο κανάλι επιλογή: Simple Probe Format και για το δεύτερο κανάλι επιλογή: Hybridization Probes
Σημείωση των θερμοκρασιών για τα δύο κανάλια σε controls και δείγματα.
4. Σημείωση του γονοτύπου που προκύπτει από την παραπάνω αντιστοίχιση.
5. Αποθήκευση αποτελεσμάτων στην εικόνα "δισκέτα" πάνω δεξιά → Report.
6. Στο General επιλογή: ApoE "date of experiment" + Experiment + Instrument + Tm calling + Results + Melting Curves + Melting Peaks.
7. PDF → Αποθήκευση ApoE reports.

Για την ανάλυση των αποτελεσμάτων, όσον αφορά την μετάλλαξη *ApoE C112R*, την ανιχνεύουμε με το κανάλι 465-510, ενώ τη μετάλλαξη *ApoE R158C*, με το κανάλι 498-640, χρησιμοποιώντας «Tm Calling» τρόπο ανάλυσης και στις δύο περιπτώσεις. Στο αρνητικό δείγμα ελέγχου δεν ανιχνεύεται καθόλου σήμα. Τα αποτελέσματα που προκύπτουν από αυτές τις αναλύσεις, φαίνονται στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 3.13.3).



Εικόνα 3.13.3.: Καμπύλες τήξεως για τα δύο κανάλια. Πάνω αριστερά: γράφημα φθορισμού έναντι θερμοκρασίας (καμπύλες τήξης) και πάνω δεξιά κορυφές τήξης στο κανάλι 530 και δείγμα APOE C112R (E3/E4). Κάτω αριστερά: καμπύλες τήξης και κάτω δεξιά: κορυφές τήξης στο κανάλι 640 και δείγμα APOE R158C (E2/E3).

Τέλος, ακολουθεί ερμηνεία των γραφημάτων σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα 3.13.4.:

Allele (amino acid)	112 C/C 158 R/R	112 C/C 158 C/C	112 C/C 158 C/R	112 C/R 158 C/R	112 C/R 158 R/R	112 R/R 158 R/R
ApoE Type	E3 / E3	E2 / E2	E2 / E3	E2 / E4	E3 / E4	E4 / E4
Tm of peaks 530	55°C	55°C	55°C	55°C / 64°C	55°C / 64°C	64°C
Tm of peaks 640	64°C	53°C	53°C / 64°C	53°C / 64°C	64°C	64°C

Πίνακας 3.13.4.: Αντιστοίχιση κορυφών τήξης με APOE γονότυπο.

3.14. Ανοσοενζυμική μέθοδος για τον προσδιορισμό αβ42, ολικής tau και p-tau181 στο ENY (ELISA)

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των πρωτεϊνών ολικής tau, p-tau181 και του β αμυλοειδούς 1-42 (αβ42) έγινε με τα κιτ αντιδραστηρίων INNOTEST της Fujirebio με CE-IVD εγκεκριμένες ELISA μεθοδολογίες.

Πειραματική διαδικασία

Προαναλυτικές συνθήκες

1. Εντός δύο (2) ωρών από την ώρα λήψης του δείγματος τα σωληνάρια φυγοκεντρούνται στις 3.400 rpm (2000 xg) για 15 λεπτά, στη φυγόκεντρο Heraeus Megafuge 1.0R .
2. Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε μικρό ειδικό σωληνάριο πολυπροπυλενίου μέχρι το > 80 % του όγκου τους.
3. Εάν η επεξεργασία του δείγματος δεν γίνει άμεσα, φυλάσσεται στους -20 °C (ή στους -40 °C μακροπρόθεσμα).

Προσδιορισμός των βιοχημικών δεικτών

1^η μέρα

Την πρώτη ημέρα ξεκινά το ELISA πρωτόκολλο των παραμέτρων **TAU** και **pTAU**.

1. Τα δείγματα αποψύχονται (-40 °C ή -20 °C ανάλογα με τον τρόπο διαχείρισης του δείγματος προαναλυτικά).
2. Φυγοκεντρούνται στις 3.500 rpm για 15 λεπτά.
3. Αποψύχονται τα calibrators και controls, ώστε να ξεπαγώσουν μέχρι να τελειώσει η φυγοκέντρωση (τα **TAU** σωληνάρια με κίτρινα καπάκια και τα **p-TAU** μωβ). **ΠΡΟΣΟΧΗ!!** Να αντιστοιχούν τα calibrators με το plate που χρησιμοποιείται κάθε φορά.
4. Σημειώνεται ο αριθμός csf στο δείγμα και ταξινομούνται με την σειρά που θα τοποθετηθούν στα plate.
5. Το plate που θα χρησιμοποιηθούν απομακρύνονται από το ψυγείο και επιλέγεται ο απαραίτητος αριθμός των strips που απαιτείται ανάλογα με τον αριθμό των δειγμάτων.
6. Παρασκευάζονται τα working solutions για conjugate 1 (100X) για το **TAU σε ροζ diluent** και **p-TAU σε μωβ diluent** (10 µL/mL ανά strip).

7. Στο πρώτο strip τοποθετούνται τα calibrators και controls από μια φορά το καθένα (τα οποία αναδεύονται ελαφρά πριν να τα φορτωθούν στο plate) και στη συνέχεια τα δείγματα εις διπλούν, με τη σειρά του αριθμού CSF. Ποσότητες: **p-TAU 75 µl** δείγμα και **TAU 25 µl** δείγμα.
8. Στην συνέχεια με το multipipette προστίθεται το conjugate 1 working solution αντίστοιχα για το **TAU (75 µl conjugate 1 working solution)** και το **p-TAU (25 µl conjugate 1 working solution).**
9. Τα wells καλύπτονται με διαφανές στεγανωτικό πλαστικό, ανακινούνται ελαφρά και επωάζονται για 14-18 ώρες σε σκοτεινό χώρο. Το **TAU** σε θερμοκρασία δωματίου ενώ το **p-TAU** στους 4 °C.
10. Τα δείγματα φυλάσσονται στο ψυγείο για την επόμενη ημέρα.

2^η ημέρα

Το wash buffer αραιώνεται (60 ml wash buffer solution και 1440 ml H₂O) σε φιάλη 2 L και επωάζεται στο υδατόλουτρο για μισή ώρα, στους 37 °C.

Aβ-42:

1. Αποψύχονται τα calibrators (με κόκκινα καπάκια) και controls του **Aβ-42**.
2. Φυγοκεντρώνονται τα δείγματα στις 3.500 rpm για 15 λεπτά.
3. Παρασκευάζεται με ανάλογο τρόπο το conjugate 1 working solution σε ροζ diluent για το **Aβ-42**.
4. Αφού ολοκληρωθεί η φυγοκέντρωση τα δείγματα ταξινομούνται πάλι με βάση τη σειρά του αριθμού csf, τοποθετείται ο αριθμός των strips που απαιτείται ανάλογα με τον αριθμό των δειγμάτων.
5. Αρχικά τοποθετούνται τα calibrators και controls (τα οποία αναδεύονται ελαφρά πριν να φορτωθούν στο plate), μια φορά το καθένα, και στη συνέχεια τα δείγματα, εις διπλούν (ανάλογα με τις οδηγίες κάθε φορά), **25 µl δείγμα**.
6. Στην συνέχεια με την βοήθεια του multipipette προστίθενται **75 µl conjugate 1 working solution**.
7. Τα strips καλύπτονται και μετά από μια ήπια ανάδευση και επωάζονται για 1 ώρα σε σκοτεινό μέρος σε θερμοκρασία δωματίου.

ΚΟΙΝΟ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ

1. Συνδέεται η φιάλη με το αραιωμένο διάλυμα εκπλύσεων στο μηχάνημα εκπλύσεων (BIO-TEKELx50 Auto strip Washer) και εκτελείται αρχικά prime ΟΔΗΓΙΕΣ ΧΡΗΣΗΣ ΜΗΧΑΝΗΜΑΤΟΣ: Power On->RUN->Prime->Enter->Start και στη συνέχεια, δοκιμή της λειτουργίας του ως εξής: 2 εκπλύσεις σε strips ενός παλιού plate ΟΔΗΓΙΕΣ ΧΡΗΣΗΣ ΜΗΧΑΝΗΜΑΤΟΣ: Main menu->Run->Wash->Select Wash Program (01) ->Enter->Number of strips (π.χ. 3) ->Start).
2. Στο ενδιάμεσο παρασκευάζονται το conjugate 2 working solutions (100X) με ανάλογο τρόπο σε **κοινό** πράσινο diluent, ξεχωριστά για τα **TAU**, **p-TAU**, **αβ-42**.
3. Και τα τρία plate εκπλένονται ταυτόχρονα, 5 εκπλύσεις/strip.
4. Προστίθενται **100 µl** conjugate 2 working solution, στα αντίστοιχα plate.
5. Επωάζονται για *30 min* για τα **TAU**, **αβ-42**, και *60 min* για το **p-TAU**. ΠΡΟΣΟΧΗ!! Όταν το επιτρέπει ο αριθμός των strips μετά την πρώτη έκπλυση, μπορούν να τοποθετηθούν στο ίδιο plate τα **TAU** και **αβ-42** ώστε στο επόμενο βήμα μετά την επώαση, η έκπλυση να είναι κοινή.
6. Παρασκευάζεται το substrate working solution (TMB 100X σε substrate buffer), το οποίο είναι κοινό και για τις τρεις ELISA.
7. Μετά το πέρας της μισής ώρας, γίνεται έκπλυση των wells **TAU** και **αβ-42** (5 εκπλύσεις/strip).
8. Προστίθενται **100 µl** substrate working solution στα **TAU** και **αβ-42** και επωάζονται στο σκοτάδι για 30 min.
9. Μόλις ολοκληρωθεί η επώαση του **p-TAU**, ακολουθούνται ομοίως τα βήματα 6 και 7 (έκπλυση και 100 µl substrate working solution) και επακόλουθα 30 min επώαση.
10. Γίνεται εκκίνηση του προγράμματος GEN5 vs.3.08 στον υπολογιστή που είναι συνδεδεμένος με το ELISA Reader (BIO-TEKELx800) που θα «διαβάσει» το plate: με την εντολή Protocols του Task Manager, επιλέγεται ένα από τα αντίστοιχα πρωτόκολλα (**TAU**, **p-TAU** και **αβ-42**) και open. Η διάταξη (plate layout) του plate τροποποιείται ανάλογα με τον αριθμό δειγμάτων και το είδος της ELISA. Στη συνέχεια με την εντολή Experiments του Task Manager, δίνεται εντολή Create using an existing protocol και επιλέγεται εκ νέου το πρόγραμμα. Από το μενού Plate επιλέγεται Samples, ενημερώνεται η λίστα των ασθενών με τους κωδικούς και τα ονόματα και γίνεται Export στο φάκελο Experiments και υποφάκελο Sample lists

ώστε να χρησιμοποιηθεί και στα υπόλοιπα πρωτόκολλα με την εντολή Import. Σημειώνονται οι λεπτομέρειες (LOT numbers και EXP date του Kit, του plate και των calibrators αντίστοιχα) στα comments της εντολής Information του μενού Plate. Ανοίγεται το power στο ELISA Reader και με το μενού System>Diagnostics>Run System Test ελέγχεται η καλή λειτουργία του (σημειώνεται το serial number του και οι χρήστες).

11. Μετά το πέρας της 30-λεπτης επώασης με το χρωμογόνο προστίθενται με την βοήθεια της οκτακάναλης πιπέτας σε όλα τα wells **50 µl** STOP διαλύματος για να τερματιστούν οι αντιδράσεις (0,9 NH₂SO₄, για το διάλυμα αυτό δεν απαιτείται αραιώση).
12. Παρατηρείται η αλλαγή του χρώματος από μπλε σε κίτρινο και αναδεύεται, εάν χρειαστεί.
13. Τα **TAU** και **Aβ-42** strips είναι έτοιμα προς μέτρηση των απορροφήσεων στο BIO-TEKELx800 και με την εντολή Read new (σήμα PLAY), επιλέγεται η περιοχή ανάγνωσης (Well selection) και OK. ΠΡΟΣΟΧΗ!! Να αντιστοιχεί το layout των δειγμάτων στο plate με αυτό που απεικονίζεται στο πρόγραμμα. Τα αποτελέσματα της πειραματικής διαδικασίας σώζονται στο φάκελο Experiments με το όνομα της παραμέτρου και ημερομηνία.
14. Ελέγχονται οι καμπύλες αναφοράς, οι συγκεντρώσεις των controls, οι απορροφήσεις του μεγαλύτερου και μικρότερου calibrator, τα CV% των δειγμάτων. Στη συνέχεια μέσω της εντολής select report και save ως pdf στο αρχείο Gen5 Reports εκτυπώνονται τα αποτελέσματα.
15. Επαναλαμβάνονται τα βήματα 11-14 ομοίως για το **p-TAU**.

3.15. Μέθοδος ECLIA για την μέτρηση των αβ42, total tau και p-tau181, αναλυτής Elecsys, Roche

3.15.1. Προσδιορισμός του αβ42

Αντιδραστήρια

Η συσκευασία έχει σημειωθεί ως Abeta 42.

M: Μικροσφαιρίδια επικαλυμμένα με στρεπταβιδίνη, 1 φιαλίδιο, 6,5 mL: Μικροσφαιρίδια επικαλυμμένα με στρεπταβιδίνη 0,72 mg/mL, συντηρητικό.

R1: Αντίσωμα έναντι του β-αμυλοειδούς (1-42) ~βιοτίνη, 1 φιαλίδιο, 6,5 mL: Βιοτινυλιωμένο μονοκλωνικό αντίσωμα 21F12 (ποντικού) έναντι του β-αμυλοειδούς (1-42) 2,0 mg/L, ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών > 100 mmol/L, pH 7,2, συντηρητικό.

R2: Αντίσωμα έναντι του β-αμυλοειδούς (1-42)~Ru(bpy)₃²⁺1 φιαλίδιο, 6,5 mL: Μονοκλωνικό αντίσωμα 3D6 (ποντικού) έναντι του β-αμυλοειδούς σημασμένο με σύμπλοκο ρουθενίου 1,75 mg/L, ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών > 100 mmol/L, pH 7,2, συντηρητικό.

3.15.2. Προσδιορισμός της total tau

Αντιδραστήρια

Η συσκευασία έχει σημειωθεί ως tTau.

M: Μικροσφαιρίδια επικαλυμμένα με στρεπταβιδίνη, 1 φιαλίδιο, 6,5 mL: Μικροσφαιρίδια επικαλυμμένα με στρεπταβιδίνη 0,72 mg/mL, συντηρητικό.

R1: Αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης tau~βιοτίνη, 1 φιαλίδιο, 6,5 mL: Βιοτινυλιωμένο μονοκλωνικό αντίσωμα (ποντικού) έναντι της πρωτεΐνης tau 1,25 mg/L, ρυθμιστικό διάλυμα Tris>14 mmol/L, pH 7,2, συντηρητικό.

R2: Αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης tau ~Ru(bpy)₃²⁺1 φιαλίδιο, 6,5 mL: Μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης tau σημασμένο με σύμπλοκο ρουθενίου 2,00 mg/L, ρυθμιστικό διάλυμα Tris>14 mmol/L, pH 7,2, συντηρητικό.

3.15.3. Προσδιορισμός της p-tau181

Αντιδραστήρια

Η συσκευασία έχει σημειωθεί ως pTau.

M: Μικροσφαιρίδια επικαλυμμένα με στρεπταβιδίνη, 1 φιαλίδιο, 6,5 mL: Μικροσφαιρίδια επικαλυμμένα με στρεπταβιδίνη 0,72 mg/mL, συντηρητικό.

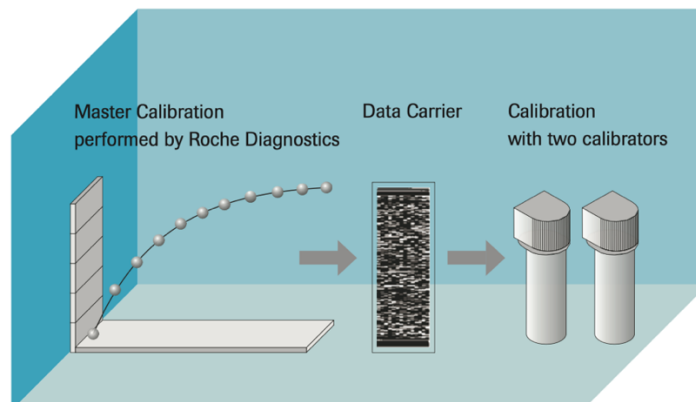
R1: Αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης ptau~βιοτίνη, 1 φιαλίδιο, 6,5 mL: Βιοτινυλιωμένο μονοκλωνικό αντίσωμα (κουνελιού/ποντικού) έναντι της πρωτεΐνης ptau 2,5 mg/L, ρυθμιστικό διάλυμα Tris>14 mmol/L, pH 7,2, συντηρητικό.

R2: Αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης ptau ~Ru(bpy)₃²⁺1 φιαλίδιο, 6,5mL: Μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης tau σημασμένο με σύμπλοκο ρουθηνίου 2,00 mg/L, ρυθμιστικό διάλυμα Tris>14 mmol/L, pH 7,2, συντηρητικό.

Η διαδικασία της εισόδου δειγμάτων προς μέτρηση των τριών αυτών παραμέτρων, ακολουθεί την ίδια αυτοματοποιημένη πορεία και για τις τρεις.

Το πρώτο βήμα, είναι η βαθμονόμηση για το αντιδραστήριο που υπάρχει στον αναλυτή.

Η προκαθορισμένη πρότυπη καμπύλη προσαρμόζεται στον αναλυτή με τη χρήση του αντίστοιχου calset. Η βαθμονόμηση πρέπει να εκτελείται μία φορά για κάθε παρτίδα αντιδραστηρίων καθώς και να ανανεώνεται όπως απαιτείται (π.χ όταν τα δείγματα ελέγχου παρατηρούνται εκτός ορίων). Η καμπύλη στον Elecsys, είναι δύο σημείων και πραγματοποιείται με τη βοήθεια ειδικών φιαλιδίων με barcode. Αυτό διαβάζει ο αναλυτής και ξέρει ακριβώς ποια καμπύλη θα κάνει και σε ποιο αντιδραστήριο αντιστοιχεί. Η κάθε παράμετρος έχει τα δικά της φιαλίδια για την καμπύλη (Εικόνα 3.15.1). Το αποτέλεσμα της καμπύλης γίνεται αυτόματα έγκυρο στον αναλυτή, ώστε να συνεχίσει η ρουτίνα.



Εικόνα 3.15.1.: Βαθμονόμηση αντιδραστηρίου στον αναλυτή Elecsys, Roche.

Μόλις ληφθεί το αποτέλεσμα της καμπύλης, ακολουθεί ο έλεγχος ποιότητας με τη βοήθεια των Preci Control, επιπέδων 1 και 2, αντίστοιχα τα δικά της για κάθε παράμετρο.

Οι αναλύσεις των δειγμάτων ελέγχου για τα διάφορα εύρη συγκέντρωσης, θα πρέπει να εκτελούνται ως μεμονωμένοι προσδιορισμοί τουλάχιστον 1 φορά κάθε 24 ώρες, όταν το αντιδραστήριο είναι σε χρήση. Απαραιτήτως, ο έλεγχος ποιότητας πραγματοποιείται κάθε φορά μετά από την βαθμονόμηση του αντιδραστήριου. Πρέπει να δοθεί προσοχή ώστε να διασφαλίζεται ότι η ακρίβεια και η επαναληψιμότητα, παραμένουν εντός των αποδεκτών ορίων για την κάθε εξέταση. Για τον λόγο αυτό, οι τιμές των δειγμάτων ελέγχου, περνάνε αυτόματα σε ένα διάγραμμα Levey-Jennings, ώστε να μπορεί ο ερευνητής κάθε φορά να κρίνει εάν τα δείγματα βρίσκονται εντός των καθορισμένων ορίων.

Όταν η βαθμονόμηση και ο εσωτερικός έλεγχος ποιότητας έχουν διευθετηθεί, ακολουθεί η προσθήκη του δείγματος στον αναλυτή με σκοπό τη μέτρηση της επιθυμητής ουσίας.

Είτε με barcode, είτε με χειροκίνητη προσθήκη του δείγματος, μέσω του ονόματος ή του κωδικού του εργαστηρίου, το δείγμα τοποθετείται στο αντίστοιχο rack και έπειτα μέσα στον αναλυτή. Το μόνο που χρειάζεται κανείς να κάνει, είναι η πίεση του πλήκτρου Start.

Το αποτέλεσμα, βρίσκεται στα χέρια του ερευνητή σε 18 λεπτά περίπου, όπου μπορεί να τυπωθεί, να περάσει αυτόματα σε ένα ενιαίο σύστημα παρακολούθησης των εξετάσεων ή να κρατηθεί σε κάποιο σκληρό δίσκο σε περίπτωση απώλειας των δεδομένων.

3.16. Βιοπληροφορική ανάλυση αποτελεσμάτων με ειδικά λογισμικά

Τα προγράμματα βιοπληροφορικής που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή την εργασία με σκοπό την ανάλυση των αποτελεσμάτων του sequencing είναι τα ακόλουθα:

Λογισμικό Chromas (Technelysium, Australia)

Το Chromas είναι ένα λογισμικό πρόγραμμα ανάλυσης αλληλούχισης DNA κατά Sanger. Το πρόγραμμα αυτό είναι απλό στη χρήση και δωρεάν. Είναι απαραίτητο να πραγματοποιηθεί εισαγωγή της αλληλουχίας αναφοράς του γονιδίου ενδιαφέροντος, ώστε να γίνει η σύγκριση

με την αλληλουχία του προς ανάλυση δείγματος. Το Chromas ανοίγει αρχεία χρωματογράφου ab1 από αλληλουχίες DNA Applied Biosystems. Το διάγραμμα παρουσιάζεται από μία σειρά κορυφών που βρίσκονται η μία δίπλα στην άλλη σχηματίζοντας την αλληλουχία του γονιδίου. Η κάθε κορυφή αντιστοιχεί σε συγκεκριμένο νουκλεοτίδιο, το οποίο απεικονίζεται με διαφορετικό χρώμα. Έτσι, η αδερίνη παρουσιάζεται με πράσινο χρώμα, η θυμίνη με κόκκινο, η κυτοσίνη με μπλε και η γουανίνη με μαύρο χρώμα.

Λογισμικό CLC Genomics Workbench

Το πρόγραμμα CLC Genomics Workbench είναι ένα χρήσιμο πρόγραμμα βιοπληροφορικής που έχει δημιουργηθεί από την εταιρεία Qiagen. Το κυριότερο χαρακτηριστικό του είναι ότι παρέχεται η δυνατότητα επεξεργασίας κάθε είδους αλληλουχιών (DNA, RNA, αμινοξέων), με ποικίλους τρόπους, ώστε να εξαχθούν όσες περισσότερες πληροφορίες δύναται για το γονίδιο. Με το πρόγραμμα αυτό μπορεί επίσης να επιτευχθεί αποτελεσματικός σχεδιασμός εκκινητών, μοριακή κλωνοποίηση, ανάλυση γονιδιακής έκφρασης, φυλογενετική ανάλυση και πρόβλεψη της δομής του RNA.

Στη συγκεκριμένη εργασία αποτέλεσε το κυρίαρχο πρόγραμμα αρχικά για την επιλογή των εκκινητών και στη συνέχεια για την ανάλυση των αποτελεσμάτων σε συνδυασμό με το Chromas, NovoSNP, Variant Reporter. Με τα παραπάνω προγράμματα εντοπίζονται τυχόν πολυμορφισμοί ή παραλλαγές στο γονίδιο *MAPT* των υπό εξέταση δειγμάτων, αφού πρώτα γίνει η σύγκριση με το γονίδιο αναφοράς. Το CLC Genomics Workbench εξυπηρετεί στο να εντοπιστεί η ακριβής θέση της παραλλαγής μέσα στο γονίδιο, η οποία μπορεί να βρίσκεται είτε σε περιοχή εσωνίου είτε σε περιοχή εξωνίου του γονιδίου. Επιπλέον, με το πρόγραμμα αυτό είναι δυνατή η εμφάνιση της αλληλουχίας των αμινοξέων κάτω από την αντίστοιχη του γονιδίου και έτσι ο εντοπισμός της θέσης της παραλλαγής πάνω στην τριπλέτα. Με τον τρόπο αυτό μπορεί να ελεγχθεί εάν η παραλλαγή ενδιαφέροντος επηρεάζει την πρωτεΐνη που παράγεται.

Λογισμικό πρόγραμμα NovoSNP

Το NovoSNP αποτελεί ένα πρόγραμμα που βοηθάει στον εντοπισμό πολυμορφισμών (σημειακών παραλλαγών ή πολυμορφισμών απαλοιφής και εισαγωγής). Απαραίτητη είναι η εισαγωγή μιας αλληλουχίας αναφοράς και το κυριότερο χαρακτηριστικό του είναι ότι συγκρίνει και δίνει αποτελέσματα ταυτόχρονα από αλληλουχίες οι οποίες προέρχονται από την ίδια γονιδιωματική περιοχή πολλών διαφορετικών δειγμάτων σε όλο το μήκος του γονιδίου. Δημιουργείται μια λίστα με πιθανούς πολυμορφισμούς και με δείκτη ποιότητας των αλληλουχιών αυτών. Τέλος, επιτρέπεται η ταξινόμηση και ο έλεγχος των πολυμορφισμών αυτών που εμφανίζονται οπτικά, καθώς και η παρακολούθηση επαληθεύσεων.

Λογισμικό Variant Reporter 3.0 (Thermo Fisher Scientific)

Το συγκεκριμένο λογισμικό πρόγραμμα εκτελεί συγκριτική αλληλούχιση, προσδιορισμό PCR αλληλουχίας και επαναπροσδιορισμό αλληλουχίας με τη χρήση αρχείων DNA αλληλούχισης. Το λογισμικό έχει σχεδιαστεί για ανάλυση με βάση μια αλληλουχία αναφοράς αλλά και για ανάλυση χωρίς αλληλουχία αναφοράς και οδηγεί σε ανίχνευση και ανάλυση παραλλαγών, ανακάλυψη και επικύρωση SNPs καθώς και επιβεβαίωση ακολουθίας. Οι ισχυροί αλγόριθμοι εντοπίζουν SNP, παραλλαγές, προσθήκες, απαλοιφές και ετερόζυγες προσθήκες/απαλοιφές σε δεδομένα που παράγονται με τη χρήση των γενετικών αναλυτών Applied Biosystems. Προκειμένου να πραγματοποιηθεί η βιοπληροφορική ανάλυση των δειγμάτων, ακολουθούνται τα εξής βήματα:

- i. New→ Import→ Επιλογή των αρχείων ενδιαφέροντος σε μορφή .abi→ Add selected traces→ OK.
- ii. Set Analysis Parameters→ Basecall Mixed Bases Threshold→ 50.0%.
- iii. Define reference→ Import→ Επιλογή του αρχείου της αλληλουχίας ενδιαφέροντος σε μορφή .gb→ Finish.
- iv. Amplicon primers/ known variants→ Add primers→ Εισαγωγή forward & reverse αλληλουχίας για κάθε εξόνιο→ Align→ OK.
- v. Define project details→ Name project→ Analyze.

Λογισμικό πρόγραμμα Mutalyzer 3

Το Mutalyzer είναι ένα πρόγραμμα ελεύθερης πρόσβασης στο διαδίκτυο, το οποίο έχει σχεδιαστεί με σκοπό τον έλεγχο της ακριβούς ονοματολογίας μιας παραλλαγής ταυτοποιημένη με γονίδιο με τη βοήθεια της αλληλούχισης. Το πρόγραμμα αυτό εκτός από την περιγραφή της παραλλαγής, δίνει επιπλέον πληροφορίες για τα διάφορα μετάγραφα του συγκεκριμένου γονιδίου και σε ποια ακριβώς θέση εντοπίζεται σε αυτά η παραλλαγή καθώς επίσης και για την ποιότητα της πρωτεΐνης και ποια είναι η αλλαγή σε αυτή, αν παρατηρείται. Το Mutalyzer χρησιμοποιεί την LOVD βάση δεδομένων, η οποία αποθηκεύει πληροφορίες για ποικίλες παραλλαγές ανθρώπινων γονιδίων και ελέγχει αυτές πριν από κάθε υποβολή νέων δεδομένων.

Πλατφόρμες αξιολόγησης DNA παραλλαγών Franklin και Varsome

Το προγράμματα αυτά παρέχουν ποικίλες πληροφορίες για διάφορες παραλλαγές ταυτοποιημένες σε ανθρώπινα γονίδια. Εκτός από τη θέση της παραλλαγής στο γονιδίωμα αναφοράς στα διαφορετικά μετάγραφα του γονιδίου και την συνέπεια που αυτή έχει στην αμινοξική αλληλουχία της πρωτεΐνης, δίνουν πληροφορίες για τις συχνότητες αυτής της παραλλαγής στον γενικό πληθυσμό καθώς επίσης και για βιβλιογραφικές αναφορές που υπάρχουν και αναφέρονται συγκεκριμένα σε αυτή. Τέλος, δίνουν έναν χαρακτηρισμό της παραλλαγής, ανάλογα με την επικινδυνότητά της, κλιμακούμενο από καλοήγη μέχρι παθογόνο. Εάν η παραλλαγή αφορά SNP, τότε υπάρχει διασύνδεση με την db SNP database.

Λογισμικό στατιστικής ανάλυσης SPSS (IBM SPSS Statistics)

Το λογισμικό IBM SPSS Statistics παρέχει ένα ισχυρό σύνολο στατιστικών εργαλείων που επιτρέπουν την στο έπακρο αξιοποίηση των πληροφοριών που παρέχουν τα πειραματικά δεδομένα. Το IBM SPSS Statistics v29 διαθέτει ισχυρή και εξελιγμένη λειτουργικότητα και διαδικασίες που αφορούν ολόκληρο τον κύκλο ζωής των αναλυτικών στοιχείων:

- Απευθύνεται σε όλες τις πτυχές της αναλυτικής διαδικασίας από προετοιμασία και διαχείριση δεδομένων έως ανάλυση και αναφορά
- Παρέχει αυτοματοποιημένες μεθόδους για τον εντοπισμό ανωμαλιών και στατιστικούς μετασχηματισμούς για την αντιμετώπιση ακραίων τιμών
- Παρέχει πίνακες και απεικονίσεις για αποτελεσματική επικοινωνία των αποτελεσμάτων

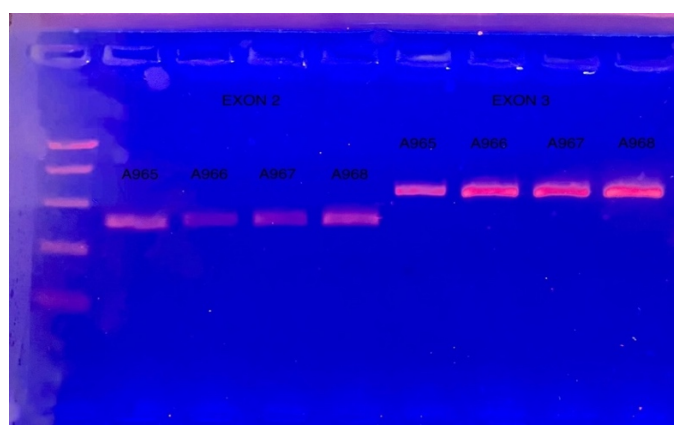
- Ταξινομεί τις περιπτώσεις σε ομάδες και προβλέπει τιμές των μεταβλητών στόχου με βάση τις τιμές των προγνωστικών μεταβλητών
- Επιτρέπει την ακριβή μοντελοποίηση γραμμικών και μη-γραμμικών σχέσεων.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

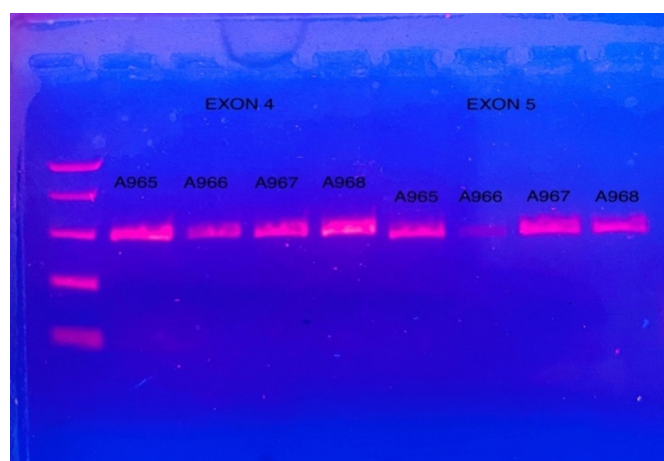
4.1. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ γενετικής ανάλυσης *MAPT* γονιδίου σε FTD ασθενείς – Ανίχνευση H1 απλοτύπου

4.1.1. Αποτελέσματα συμβατικής PCR και ηλεκτροφόρησης σε γέλη αγαρόζης 1%w/v

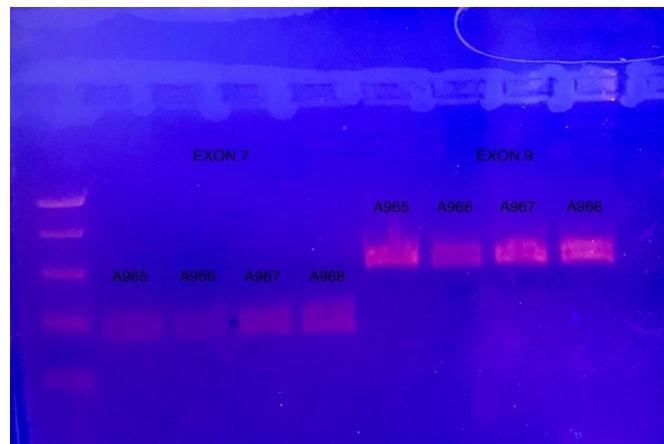
Έπειτα από την απομόνωση του γενωμικού DNA ακολούθησε ενίσχυση των εξωνίων του *MAPT* με συμβατική PCR. Για το διαχωρισμό των προϊόντων της συμβατικής PCR και για τον έλεγχο επιτυχούς επιλογής εκκινητών ακολούθησε ηλεκτροφόρηση σε γέλη αγαρόζης 1%w/v. Σε όλες τις αντιδράσεις ελήφθη καθαρό PCR προϊόν με το επιθυμητό μήκος bp. Από την ολοκλήρωση της ηλεκτροφόρησης προκύπτουν οι παρακάτω εικόνες, για τα εκάστοτε εξώνια, όπως αναφέρεται.



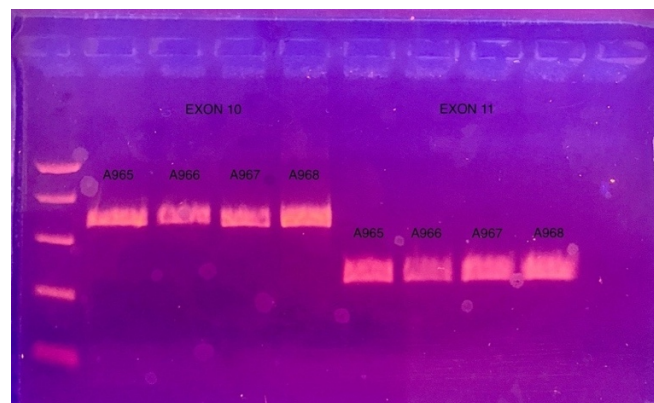
Εικόνα 4.1.1.1: Ενδεικτική εικόνα ηλεκτροφόρησης για τα MAPT εξώνια 2,3. Παρατηρούνται οι ζώνες στα 229 και 338 bp αντίστοιχα.



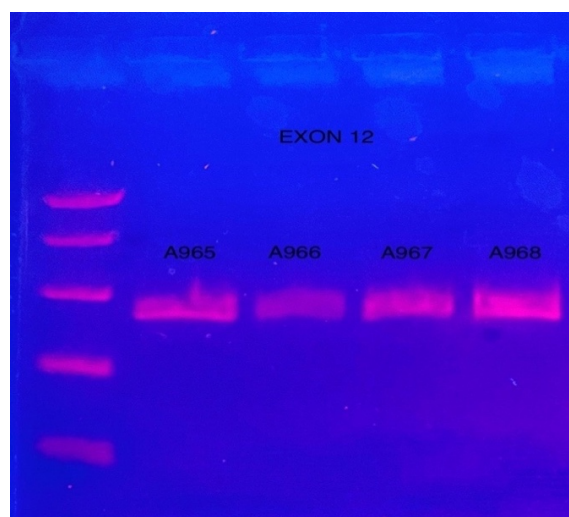
Εικόνα 4.1.1.2.: Ενδεικτική εικόνα ηλεκτροφόρησης για τα MAPT εξώνια 4,5. Παρατηρούνται οι ζώνες στα 297 και 277 bp αντίστοιχα.



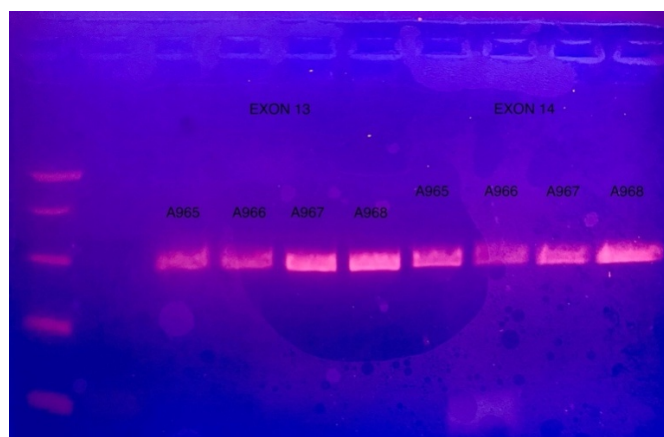
Εικόνα 4.1.1.3.: Ενδεικτική εικόνα ηλεκτροφόρησης για τα MAPT εξώνια 7,9. Παρατηρούνται οι ζώνες στα 136 και 304 bp αντίστοιχα.



Εικόνα 4.1.1.4.: Ενδεικτική εικόνα ηλεκτροφόρησης για τα MAPT εξώνια 10,11. Παρατηρούνται οι ζώνες στα 370 και 200 bp αντίστοιχα.



Εικόνα 4.1.1.5.: Ενδεικτική εικόνα ηλεκτροφόρησης για τα MAPT εξώνιο 12. Παρατηρούνται οι ζώνες στα 256 bp.



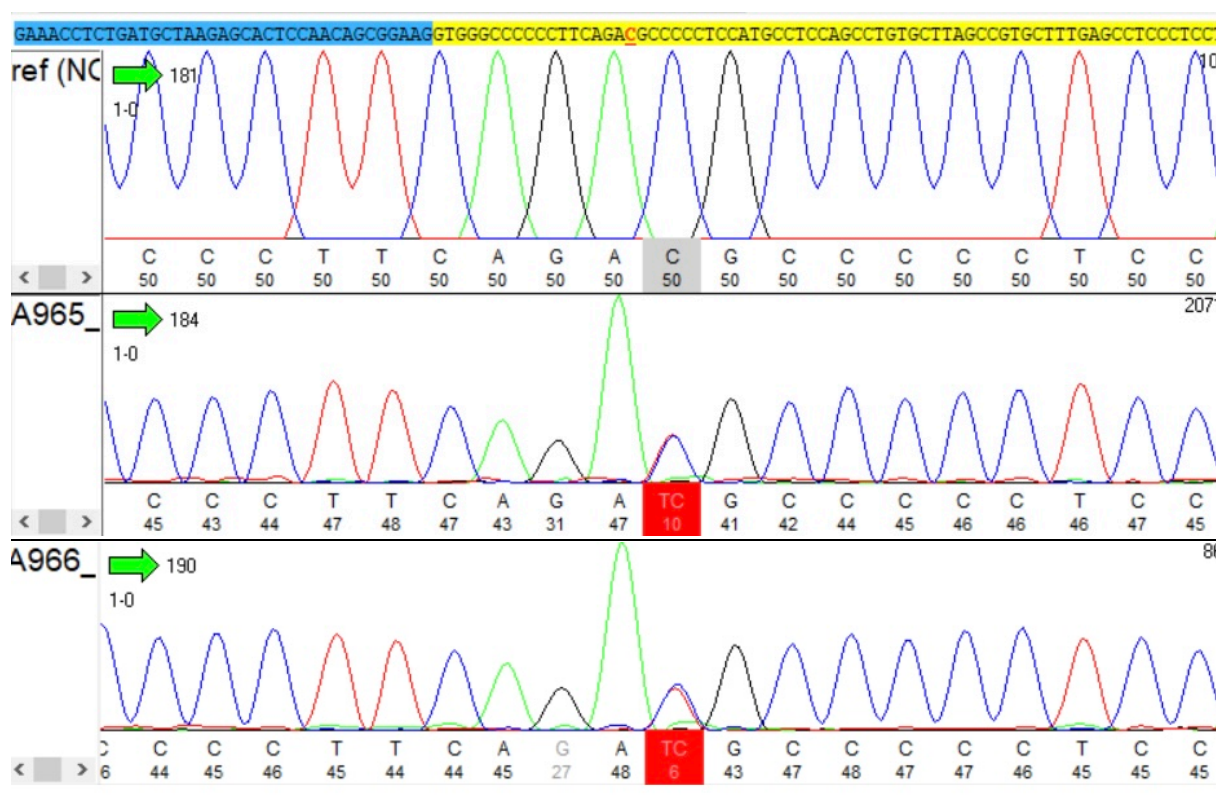
Εικόνα 4.1.1.6.: Ενδεικτική εικόνα ηλεκτροφόρησης για τα *MAPT* εξόνια 13,14. Παρατηρούνται οι ζώνες στα 294 και 299 βραντίστοιχα.

4.1.2. Αποτελέσματα αλληλούχισης DNA στο γονίδιο *MAPT*

Επαλήθευση γενετικού αναλυτή

Κατά το χρονικό διάστημα χρήσης του γενετικού αναλυτή SeqStudio, για την παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε ο απαραίτητος έλεγχος της μεθόδου με το πλασμίδιο pGEM (συνθετική αλληλουχία 1000 bp, AY390769.1). Η ανάγνωση της αλληλουχίας πραγματοποιήθηκε μέσω του προγράμματος Blast και έγινε ανάγνωση του 98,71% των βάσεων του πλασμιδίου. Η ηλεκτροφόρηση που επιλέχθηκε στο γενετικό αναλυτή ως run module ήταν Medium run. Αυτό δικαιολογεί το γεγονός ότι δεν καλύφθηκε ολόκληρη η αλληλουχία του πλασμιδίου και από τα 1000 bp διαβάστηκαν μόνο τα 833 bp, με πλήρη όμως ακρίβεια. Επίσης ανιχνεύθηκε με επιτυχία ο θετικός μάρτυρας (κωδικός D69), στο οποίο είχε ανιχνευθεί σημειακή παραλλαγή c.2092G>A (p.Val698Ile), στο εξόνιο 13 του γονιδίου *MAPT*. Συνεπώς η μέθοδος αλληλούχισης εκτελέστηκε με επιτυχία και για τα δείγματα της μελέτης.

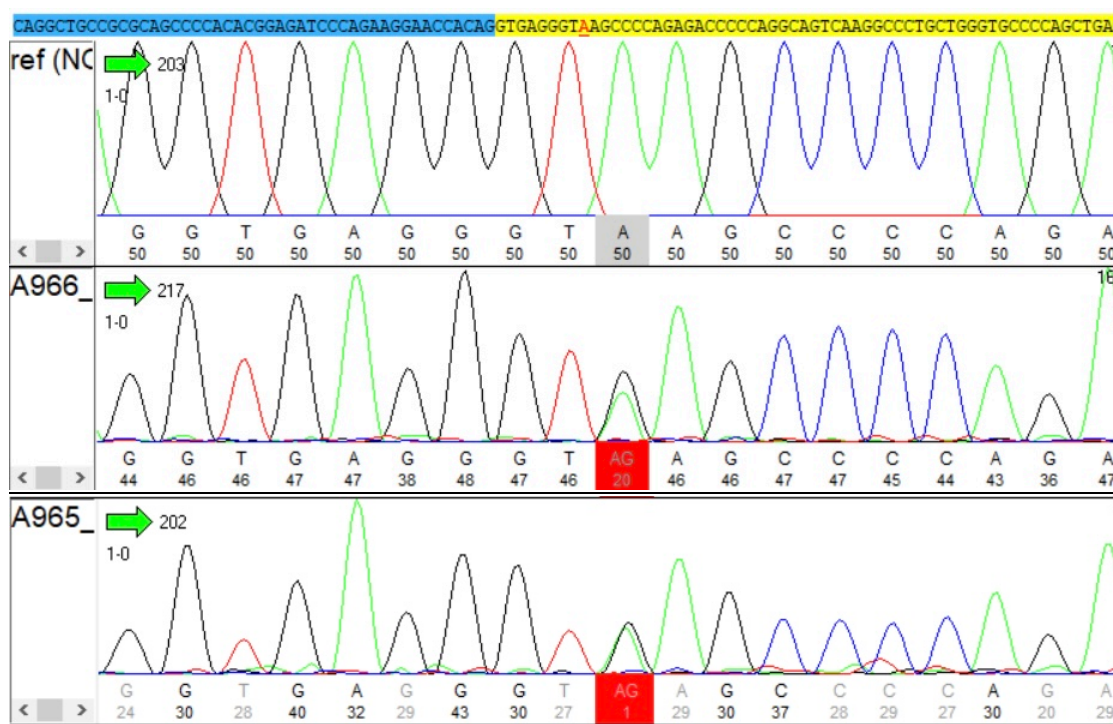
4.1.2.1. Εξώνιο 3



Εικόνα 4.1.2.1.1.: Ηλεκτροφορογράφημα DNA Sequencing για τα δείγματα A965 και A966 στο εξώνιο 3 του MAPT γονιδίου (με πρόσθιο εκκινητή).

Τόσο στο δείγμα A965, όσο και στο A966, εντοπίστηκε σημειακή παραλλαγή με τη βοήθεια του προγράμματος NovoSNP, εντός του ιντρονίου 3 (hg38, θέση 17:45971963, NG_007398.2(MAPT):g.82501C>T, NM_001123066.4:c.220+18C>T). Ο συγκεκριμένος πολυμορφισμός με rs75242405, δεν εντοπίζεται σε περιοχή ματίσματος και έτσι δεν επηρεάζει άμεσα το μηχανισμό αυτό. Έως σήμερα δεν έχει υπάρξει κάποια βιβλιογραφική αναφορά στο συγκεκριμένο πολυμορφισμό. Σύμφωνα με τις διαδικτυακές βάσεις αξιολόγησης και ερμηνείας σημειακών μεταλλαγών Varsome και Franklin, η συγκεκριμένη παραλλαγή χαρακτηρίζεται ως καλοήθης (Benign) και η συχνότητα εμφάνισης της στον παγκόσμιο πληθυσμό αγγίζει το 14,60 %.

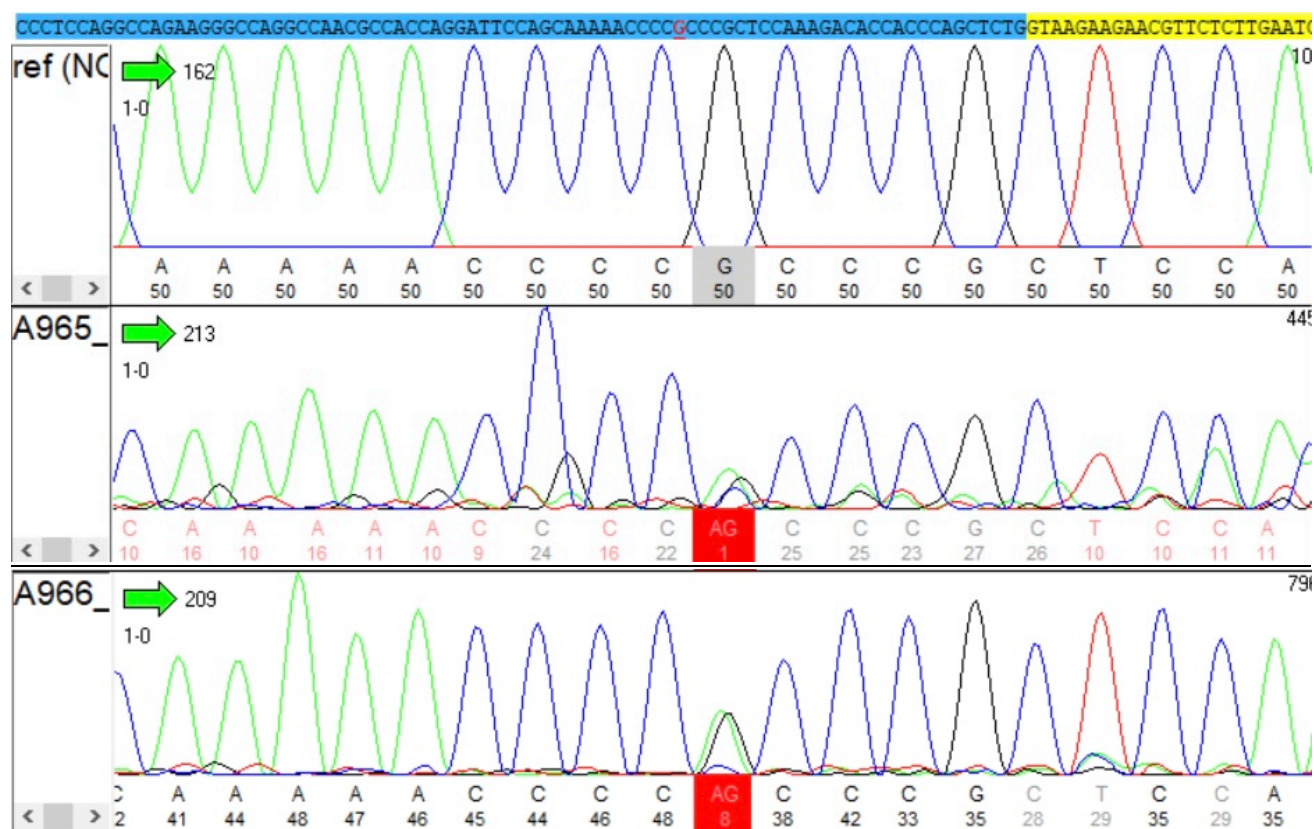
4.1.2.2. Εξώνιο 4



Εικόνα 4.1.2.2.1.: Ηλεκτροφορογράφημα DNA Sequencing για τα δείγματα A965 και A966 στο εξώνιο 4 του *MAPT* γονιδίου (με πρόσθιο εκκινητή).

Τόσο στο δείγμα A965, όσο και στο A966, εντοπίστηκε σημειακή παραλλαγή με τη βοήθεια του προγράμματος NovoSNP, εντός του ιντρονίου 4 (hg38, θέση 17:45974480, NG_007398.2(MAPT):g.85018A>G, NM_001123066.4:c.307+9A>G). Ο συγκεκριμένος πολυμορφισμός με rs1800547, δεν εντοπίζεται σε περιοχή ματίσματος, και άρα δεν επιδρά άμεσα με αυτό τον μηχανισμό. Σύμφωνα με τις διαδικτυακές βάσεις αξιολόγησης και ερμηνείας σημειακών μεταλλαγών Varsome και Franklin, η συγκεκριμένη παραλλαγή χαρακτηρίζεται ως καλοήθης (Benign) και η συχνότητα εμφάνισης της στον παγκόσμιο πληθυσμό αγγίζει το 14,50 %. Έως σήμερα έχουν υπάρξει 6 βιβλιογραφικές αναφορές στο συγκεκριμένο πολυμορφισμό[135-140].

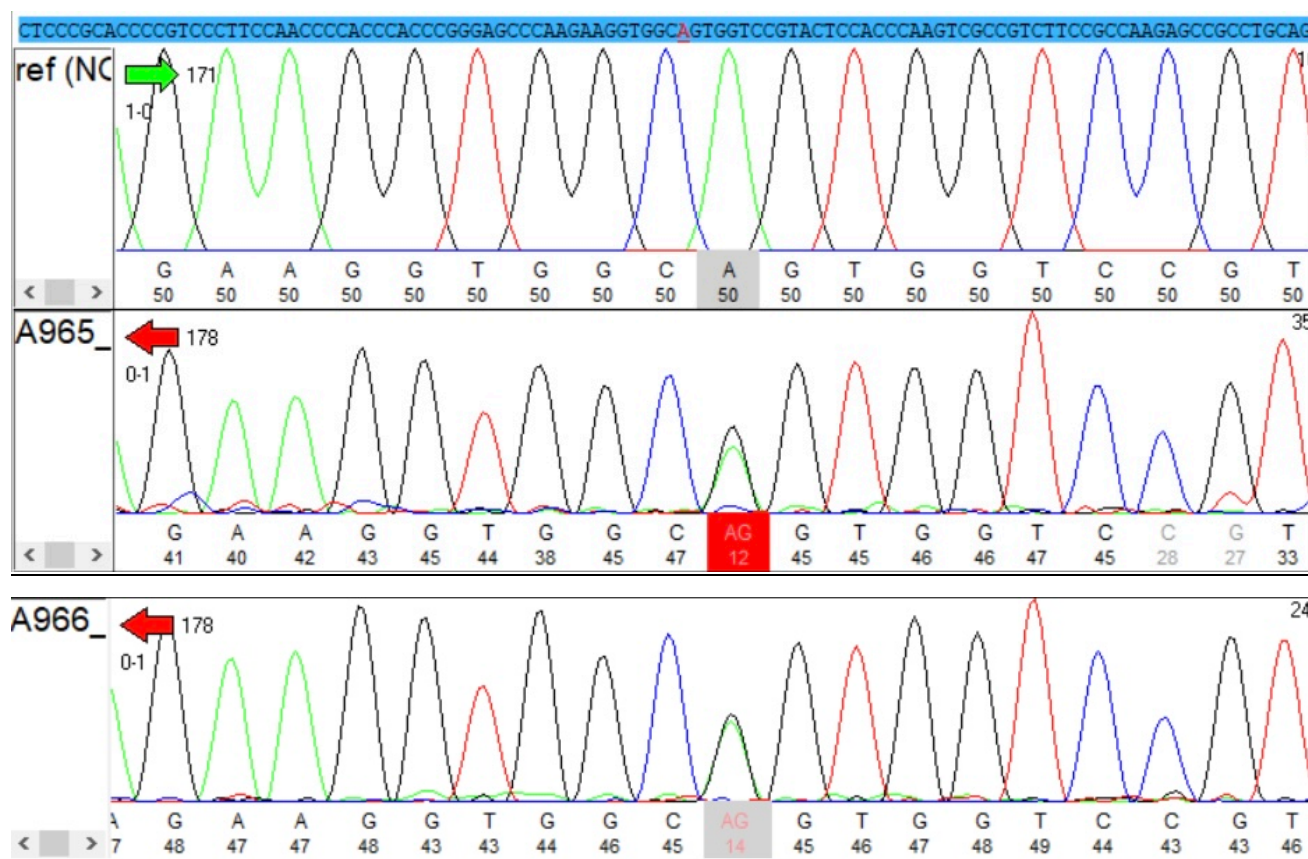
4.1.2.3. Εξώνιο 9



Εικόνα 4.1.2.3.1.: Ηλεκτροφορογράφημα DNA Sequencing για τα δείγματα A965 και A966 στο εξώνιο 9 του MAPT γονιδίου (με πρόσθιο εκκινητή).

Τόσο στο δείγμα A965, όσο και στο A966, εντοπίστηκε σημειακή παραλλαγή G>A (κωδικόνιο CC**G**>CC**A**) με τη βοήθεια του προγράμματος NovoSNP, εντός κωδικοποιητικής περιοχής του εξωνίου 9 (hg38, θέση 17:45991558, NG_007398.2(MAPT):g.102096G>A, NM_001123066.4:c.1479G>A) και δεν προκαλεί αλλαγή αμινοξέος, χαρακτηρίζεται ως silentmutation με συνέπεια p.Pro493(=) (rs1052551). Έως σήμερα δεν έχει υπάρξει κάποια βιβλιογραφική αναφορά στη συγκεκριμένη παραλλαγή. Σύμφωνα με τις διαδικτυακές βάσεις αξιολόγησης και ερμηνείας σημειακών μεταλλαγών Varsome και Franklin, η συγκεκριμένη παραλλαγή χαρακτηρίζεται ως καλοήθης (Benign) και η συχνότητα εμφάνισης της στον παγκόσμιο πληθυσμό αγγίζει το 14,23 %.

4.1.2.4. Εξώνιο 10

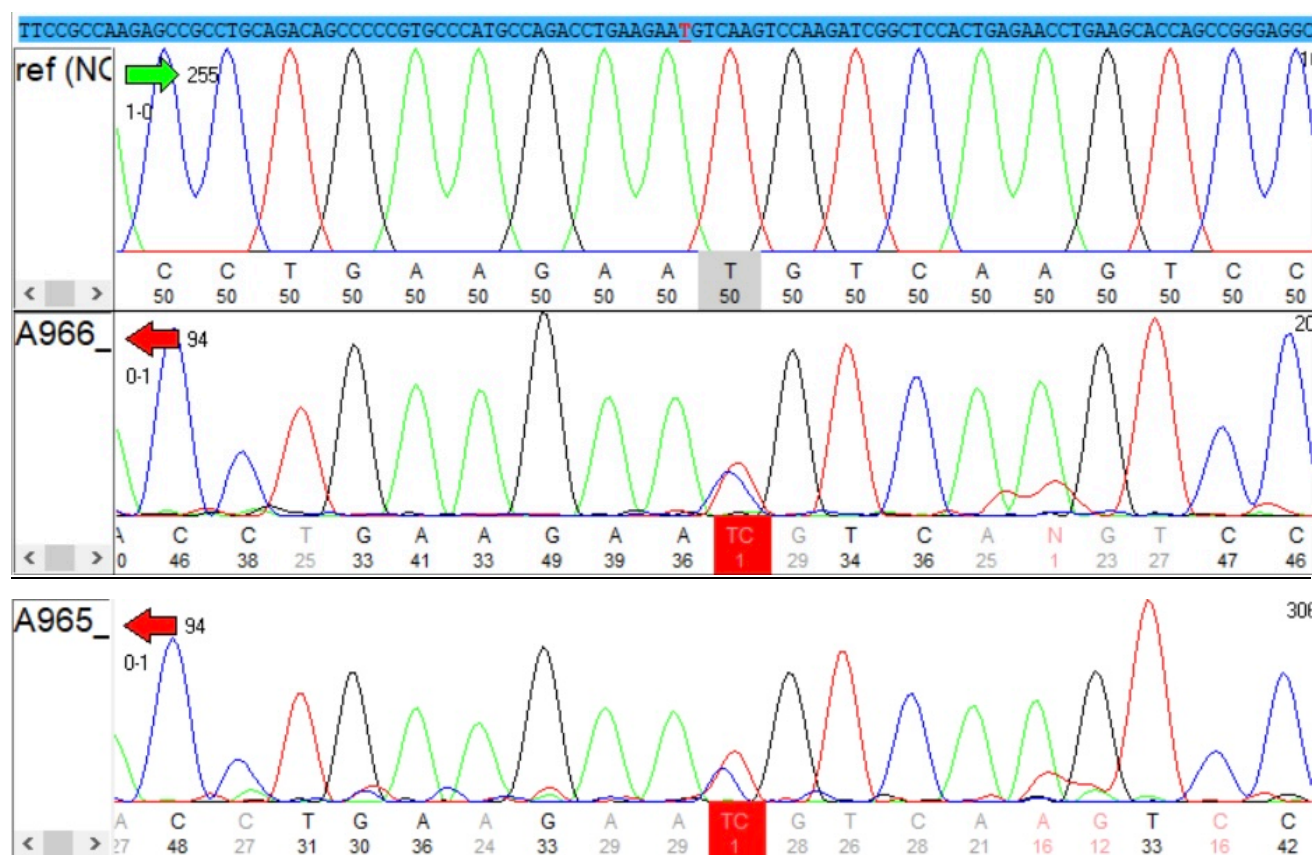


Εικόνα 4.1.2.4.1.: Ηλεκτροφορογράφημα DNA Sequencing για τα δείγματα A965 και A966 στο εξώνιο 10 του MAPT γονιδίου (με ανάστροφο εκκινητή).

Τόσο στο δείγμα A965, όσο και στο A966, εντοπίστηκε σημειακή παραλλαγή A>G (κωδικόνιο GCA>GCG), με τη βοήθεια του προγράμματος NovoSNP, εντός κωδικοποιητικής περιοχής του εξωνίου 10 (hg38, θέση 17:45996523, NG_007398.2(MAPT):g.107061A>G, NM_001123066.4:c.1686A>G) και δεν προκαλεί αλλαγή αμινοξέος, χαρακτηρίζεται ως silent mutation με συνέπεια p.Ala562(=) (rs1052553). Σύμφωνα με τις διαδικτυακές βάσεις αξιολόγησης και ερμηνείας σημειακών μεταλλαγών Varsome και Franklin, η συγκεκριμένη παραλλαγή χαρακτηρίζεται ως καλοήθης (Benign) και η συχνότητα εμφάνισης της στον παγκόσμιο πληθυσμό αγγίζει το 14,68 %.

Έως σήμερα έχουν υπάρξει αρκετές βιβλιογραφικές αναφορές στο συγκεκριμένο πολυμορφισμό[141-152]. Ο κατάλογος GWAS της βάσης δεδομένων Varsome αναφέρει χαρακτηριστικά ότι ο συγκεκριμένος πολυμορφισμός, ο οποίος αποτελεί μέρος του απλοτύπου

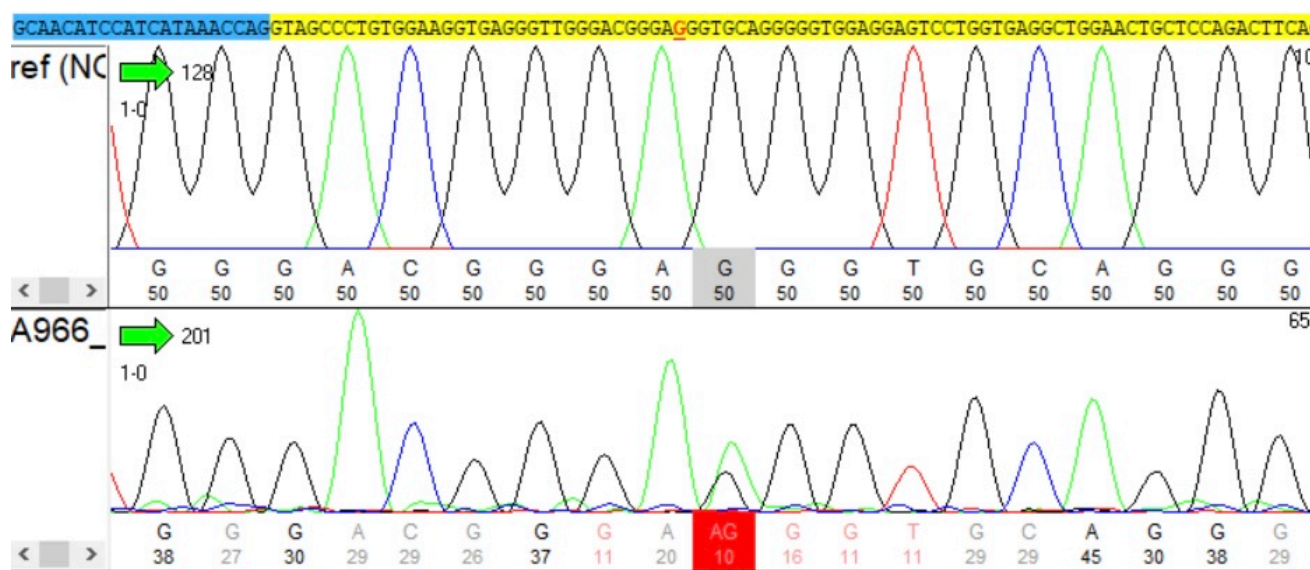
H1, έχει συσχετιστεί με σακχαρώδη διαβήτη τύπου I, κάτι που παρουσιάζεται και σε μία από τις παραπάνω βιβλιογραφικές αναφορές.



Εικόνα 4.1.2.4.2.: Ηλεκτροφορογράφημα DNA Sequencing για τα δείγματα A965 και A966 στο εξώνιο 10 του *MAPT* γονιδίου (με ανάστροφοεκκινητή).

Παραμένοντας στο εξώνιο 10, φαίνεται ότι και στα δύο δείγματα υπάρχει ακόμα ένας κοινός πολυμορφισμός. Εντοπίστηκε σημειακή παραλλαγή, T>C (κωδικόνιο AAT>AAC), εντός κωδικοποιητικής περιοχής (hg38, θέση 17:45996607, NG_007398.2(MAPT):g.107145T>C, NM_001123066.4:c.1770T>C) η οποία όμως δεν προκαλεί αλλαγή αμινοξέος, χαρακτηρίζεται ως σιωπηλή μετάλλαξη με αποτέλεσμα p.Asn590(=) (rs17652121). Σύμφωνα με τις διαδικτυακές βάσεις αξιολόγησης και ερμηνείας σημειακών μεταλλαγών Varsome και Franklin, η συγκεκριμένη παραλλαγή χαρακτηρίζεται ως καλοήθης (Benign) και η συχνότητα εμφάνισης της στον παγκόσμιο πληθυσμό αγγίζει το 14,54%. Έως σήμερα δεν έχει υπάρξει κάποια βιβλιογραφική αναφορά στη συγκεκριμένη παραλλαγή.

4.1.2.5. Εξώνιο 12



Εικόνα 4.1.2.5.1.: Ηλεκτροφορογράφημα DNA Sequencing για το δείγμα A966 στο εξώνιο 12 του MAPT γονιδίου (με πρόσθιο εκκινητή).

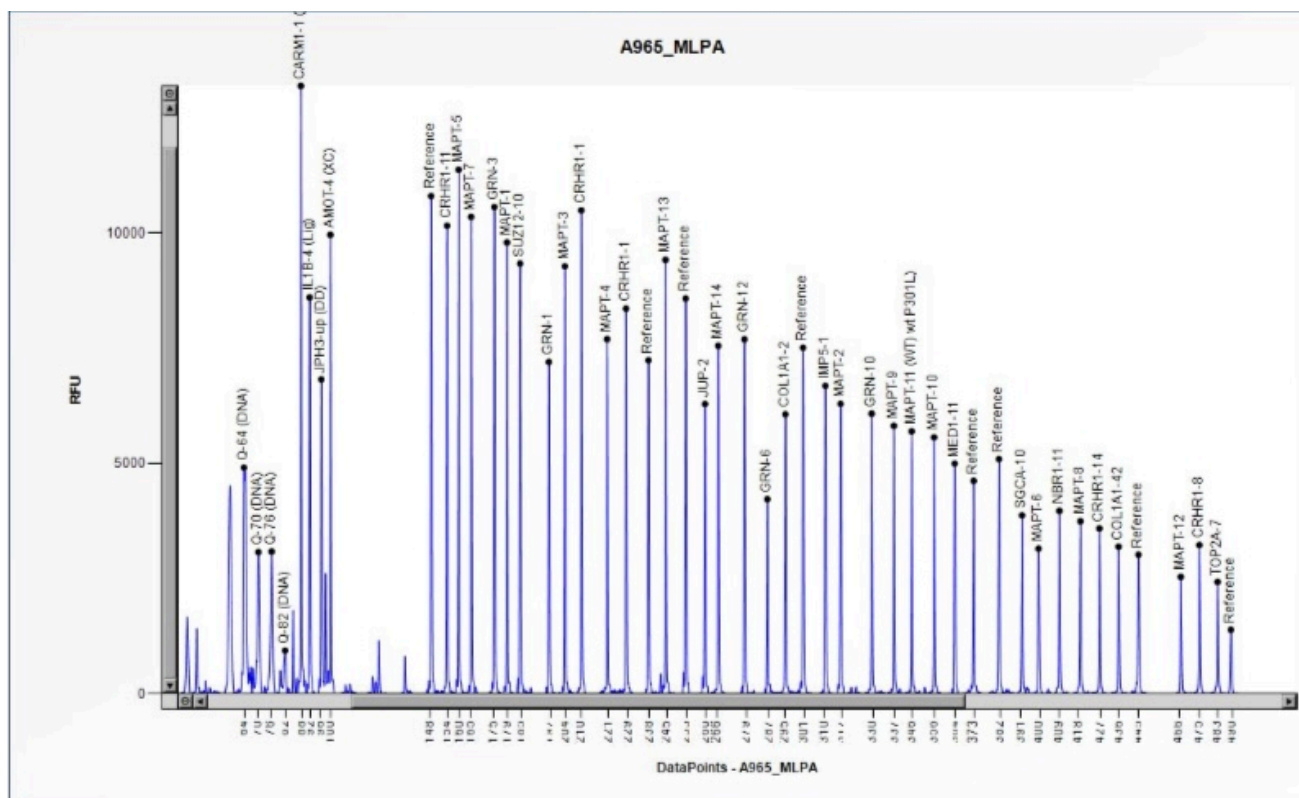
Στο δείγμα A966, εντοπίστηκε σημειακή παραλλαγή με τη βοήθεια του προγράμματος NovoSNP, εντός του ιντρονίου 13 (hg38, θέση 17:46014358, NG_007398.2(MAPT):g.124896G>A, NM_001123066.4:c.2002+34G>A). Ο συγκεκριμένος πολυμορφισμός με rs75534191, δεν εντοπίζεται σε περιοχή ματίσματος και έτσι δεν επηρεάζει άμεσα το μηχανισμό αυτό. Έως σήμερα δεν έχει υπάρξει κάποια βιβλιογραφική αναφορά στο συγκεκριμένο πολυμορφισμό. Σύμφωνα με τις διαδικτυακές βάσεις αξιολόγησης και ερμηνείας σημειακών μεταλλαγών Varsome και Franklin, η συγκεκριμένη παραλλαγή χαρακτηρίζεται ως καλοήθους (Benign) και η συχνότητα εμφάνισης της στον παγκόσμιο πληθυσμό αγγίζει το 14,33 %.

	<u>ΚΩΔΙΚΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΜΕ DNA Sequencing <i>MAPT</i> ΕΥΡΗΜΑΤΑ</u>				
	<u>A965</u>	<u>A966</u>	<u>A987</u>	<u>A950</u>	<u>ΚΩΔΙΚΟΣ rs</u>
<u>ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ ΣΥΜΦΩΝΑ ΜΕ</u>	c.220+18C>T	c.220+18C>T	c.220+18C>T	c.220+18C>T	rs75242405
<u>ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΝΑΦΟΡΑΣ</u>	c.307+9A>G	c.307+9A>G	c.307+9A>G	c.307+9A>G	rs1800547
<u>NM_001123066.4</u>	c.1479G>A	c.1479G>A	c.1479G>A	c.1479G>A	rs1052551
	c.1686A>G	c.1686A>G	c.1686A>G	c.1686A>G	rs1052553
	c.1770T>C	c.1770T>C	c.1770T>C	c.1770T>C	rs17652121
		c.2002+34G>A			rs75534191

Πίνακας 4.1.2.5.2.: Συνοπτικός πίνακας ευρημάτων. Με κόκκινη επισήμανση, οι μεταλλάξεις που αποτελούν μέρος του απλοτύπου H1.

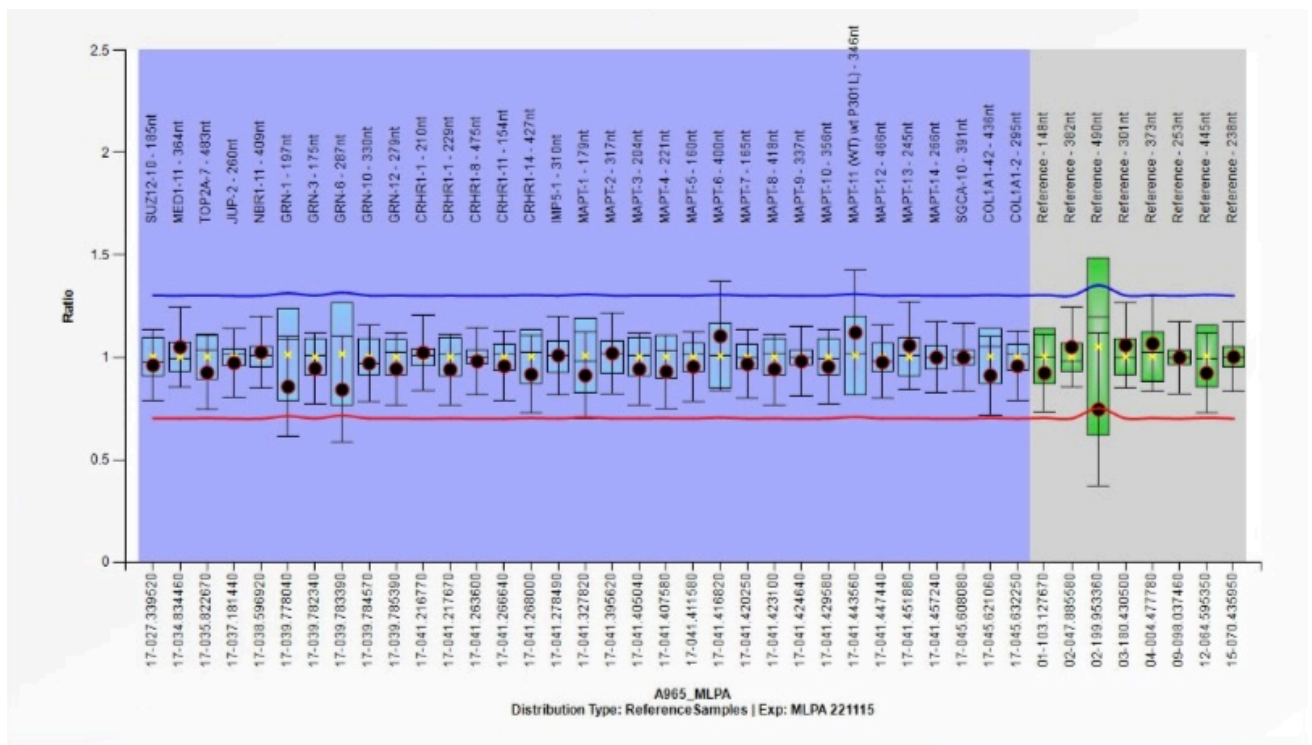
4.1.3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ MLPA ΣΤΟ *MAPT* ΓΟΝΙΔΙΟ

Αρχικά, χρησιμοποιήθηκαν ελαφρώς διαφορετικές συνθήκες σε κάποια από τα στάδια της MLPA αντίδρασης. Σε πρώτη φάση, τα δείγματα υποβάλλονταν σε διαχωρισμό του DNA για 5 λεπτά ενώ η αντίδρασης υβριδισμού διαρκούσε 1 λεπτό στους 95 °C και έπειτα διατηρούνταν 20 ώρες στους 60 °C. Τα αποτελέσματα όμως δεν ήταν ιδανικά ως προς την ισχύ του σήματος και τη στοχευμένη πρόσδεση των ζευγών ανιχνευτών, επομένως αποφασίστηκε η αύξηση της παρουσίας των δειγμάτων στη φάση διαχωρισμού και υβριδισμού κατά 1 λεπτό, καθώς και η μείωση των ωρών επώασης στις 18 ώρες για αποφυγή παραγωγής παραπροϊόντων. Τέλος, για βελτίωση της ισχύος του σήματος η ποσότητα του επισημασμένου με φοροισμό LIZ δείκτη μοριακών βαρών GS500 (-250 fragment) αυξήθηκε κατά 0,1 μl. Οι αλλαγές αυτές έφεραν ένα βέλτιστο αποτέλεσμα, χωρίς παραπροϊόντα οδηγώντας στην δημιουργία ενιαίου θερμοκρασιακού πρωτοκόλλου για όλα τα δείγματα. Όλα τα δείγματα στα οποία έλαβε χώρα η συγκεκριμένη ανάλυση είχαν αρνητικό αποτέλεσμα ως προς μεγάλη προσθήκη ή απαλοιφή στο *MAPT* γονίδιο. Ενδεικτικά παρατίθεται το ηλεκτροφόρημα του δείγματος A965.



Εικόνα 4.1.3.1.: Ενδεικτική εικόνα ηλεκτροφόρησης, όπου παρουσιάζονται τα διάφορα θραύσματα του δείγματος A965.

Τα 4 Q-Fragments, στο παραπάνω ηλεκτροφόρημα (Εικόνα 4.1.3.1), δεν βρίσκονται όλα κάτω από το 33% του θραύσματος αναφοράς, συνεπώς το δείγμα A965, δεν περιέχει πλήρως ικανοποιητική ποσότητα DNA. Τα δύο D-fragments έχουν υψηλότερο μήκος του 50% του θραύσματος αναφοράς, συνεπώς η αποδιάταξη της διπλής έλικας DNA εκτελέσθη με επιτυχία. Τέλος, αναφορικά με τα υπόλοιπα θραύσματα ελέγχου ποιότητας στο ηλεκτροφόρημα καταγράφεται ότι βρέθηκε X χρωμόσωμα, οπότε προκύπτει ότι το δείγμα ανήκει σε θηλυκό άτομο.



Εικόνα 4.1.3.2.: Ενδεικτική εικόνα αναλογίας των ανιχνευτών για το δείγμα A965.

Στην παραπάνω εικόνα (Εικόνα 4.1.3.2) φαίνεται η αναλογία των ανιχνευτών για το δείγμα A965. Οι ανιχνευτές για όλα τα εξώνια του γονιδίου *MAPT*, και των γονιδίων αναφοράς βρίσκονται εντός των φυσιολογικών ορίων (ζώνη μεταξύ μπλε/ κόκκινης γραμμής με λόγο 0,7 – 1,3). Το πρόγραμμα Coffalyser.Net χρησιμοποιεί στατιστικά στοιχεία για να προσδιορίσει εάν ένα αποτέλεσμα είναι αξιόπιστο ή όχι. Για να γίνει αυτό, υπολογίζει ένα διάστημα εμπιστοσύνης 95% στα δείγματα αναφοράς για κάθε ανιχνευτή. Αυτό αντιπροσωπεύει το εύρος στο οποίο αναμένεται να βρίσκεται η αναλογία του ανιχνευτή σε 95 από τα 100 δείγματα αναφοράς. Το διάστημα εμπιστοσύνης 95% ενός ανιχνευτή επί των δειγμάτων αναφοράς, απεικονίζεται ως έγχρωμη ράβδος στο διάγραμμα αναλογιών. Επιπλέον, υπολογίζει μια εκτίμηση διαστήματος εμπιστοσύνης 95% για κάθε ανιχνευτή σε ένα δείγμα. Αυτό αντιπροσωπεύει το εύρος στο οποίο αναμένεται να βρίσκεται η αναλογία του ανιχνευτή σε 95 από τα 100 πειράματα σε αυτό το δείγμα. Το διάστημα εμπιστοσύνης 95% ενός ανιχνευτή σε ένα δείγμα απεικονίζεται ως ράβδοι σφάλματος στο διάγραμμα αναλογιών που περιβάλλουν τον υπολογισμένο λόγο ανιχνευτή, ο οποίος αναπαρίσταται ως κουκκίδα. Όταν αυτά τα δύο διαστήματα εμπιστοσύνης 95 % δεν αλληλεπικαλύπτονται, μπορεί να συναχθεί με υψηλό βαθμό βεβαιότητας ότι το αποτέλεσμα σε ένα δείγμα είναι σημαντικά διαφορετικό από τα δείγματα αναφοράς. Συνεπώς συμπεραίνεται ότι δεν παρατηρείται κάποια απαλοιφή ή

προσθήκη στα εξεταζόμενα εξώνια του γονιδίου *MAPT* στο δείγμα A965 και άρα το δείγμα είναι αρνητικό.

4.1.4. ΣΥΝΟΨΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ – ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ Η1 ΑΠΛΟΤΥΠΟΥ

Συνοπτικά παρατίθενται ατομικά [φύλο - M/F (Male/Female), ηλικία] και κλινικά δεδομένα (Νόσος, *APOE* γονοτύπηση), τα αποτελέσματα της γενετικής ανάλυσης του γονιδίου *MAPT* και τυχόν άλλα γενετικά αποτελέσματα όπως προέκυψαν από το εργαστήριό μας (*PGRN* γονίδιο) ή από το συνεργαζόμενο εργαστήριο (*SQSTM1*, *PRNP*), στον πίνακα 4.1.4.1.

<u>ΚΩΔΙΚΟΣ</u> <u>ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ</u>	<u>ΟΝΟΜ/ΝΥΜΟ</u> <u>(ΑΡΧΙΚΑ)</u>	<u>ΦΥΛΟ</u>	<u>ΗΛΙΚΙΑ</u>	<u>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ</u>	<u>ΠΑΘΟΓΕΝΕΤΙΚΗ</u> <u>ΜΕΤΑΛΛΑΞΗ</u>	<u>MAPT Η1</u> <u>ΑΠΛΟΤΥΠΟΣ</u>	<u>ΚΛΙΝΙΚΗ</u> <u>ΕΙΚΟΝΑ</u>
A817	T.M.	M	64	E4/E3		OXI	FTD
A818	M.K.	F	65	E3/E3		OXI	bvFTD
A892	M.E.	F	60	E3/E3	PGRN c.264+1G>A	NAI	bvFTD
A903	Ψ.Γ.	M	57	E3/E3		NAI	FTD/AD?
A910	Π.Ε.	F	51	E3/E3		NAI	Λογοπενική PPA
A929	M.Γ.	F	52	E3/E3	PGRN c.264 del p. ala89profs*167	OXI	PNFA-FTD
A930	K.A.	F	73	E3/E3	SQSTM1 c.823_824del (p. Ser275Phefs*17)	NAI	Right Temporal Variant FTD
A937	Π.Β.	F	49	E2/E3	PRNP c.623G>A (p. Arg208His)	NAI	bvFTD
A945	K.A.	F	64	E3/E3		NAI	Right Temporal Variant FTD
A948	M.E.	F	54	E3/E3		OXI	
A950	Σ.Α.	M		E4/E3		NAI	
A959	T.I.	M	76	E3/E3		OXI	
A965	B.Δ.	M	70	E3/E3		NAI	
A966	T.M.	F	69	E3/E3		NAI	Πιθανή PSP
A967	Ο.Δ.	F	68	E3/E3		OXI	
A968	M.K.	F	73	E3/E3		OXI	Πιθανή CBS
A975	Δ.Ε.	F	64	E4/E3		OXI	FTD
A976	Δ.Ν.	M	49	E3/E3		OXI	bvFTD
A981	K.Δ.	F	74	E3/E3	PGRN c.264 del p. ala89profs*167	OXI	Πιθανή CBS/FTD
A987	M.A.	F	63	E3/E3		NAI	FTD/AD?

Πίνακας 4.1.4.1.: Συνοπτικός πίνακας δειγμάτων της μελέτης. Παράθεση συνολικών αποτελεσμάτων.

Με βάση τα αποτελέσματα του παραπάνω πίνακα, προκύπτει ότι ο H1 απλότυπος ανιχνεύθηκε σε 10/20 δείγματα, δηλαδή στο 50% των FTD δειγμάτων Ελλήνων ασθενών. Λόγω του μικρού αριθμού των δειγμάτων όμως δεν μπορεί να εξαχθεί ασφαλές στατιστικό αποτέλεσμα όσον αφορά τη συσχέτιση του απλοτύπου το φύλο, την ηλικία, το *APOE* αποτέλεσμα και την κλινική εικόνα.

4.2. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΕΠΑΛΗΘΕΥΣΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΜΕΤΡΗΣΗΣ ΒΙΟΔΕΙΚΤΩΝ

Συνοπτικά παρατίθενται στους παρακάτω πίνακες 4.2.1. – 4.2.3, τα αποτελέσματα της μέτρησης των βιοδεικτών καθώς και η αξιολόγησή τους με βάση το σημείο cut-off.

<u>ΚΩΔΙΚΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ</u>	<u>AB42_{FUJI}</u> <u>(pg/mL)</u>	<u>ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ</u> <u>ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΟ</u> <u>cut-off</u>	<u>AB42_{ROCHE}</u> <u>(pg/mL)</u>	<u>ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ</u> <u>ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΟ</u> <u>cut-off</u>
<u>Δείγμα 1</u>	1301	0	1300	0
<u>Δείγμα 2</u>	607	0	574	1
<u>Δείγμα 3</u>	729	0	821	0
<u>Δείγμα 4</u>	535	1	350	1
<u>Δείγμα 5</u>	394	1	405	1
<u>Δείγμα 6</u>	823	0	905	0
<u>Δείγμα 7</u>	467	1	849	0
<u>Δείγμα 8</u>	812	0	904	0
<u>Δείγμα 9</u>	380	1	441	1
<u>Δείγμα 10</u>	255	1	309	1
<u>Δείγμα 11</u>	243	1	267	1
<u>Δείγμα 12</u>	321	1	301	1
<u>Δείγμα 13</u>	368	1	345	1
<u>Δείγμα 14</u>	713	0	715	1
<u>Δείγμα 15</u>	515	1	480	1
<u>CSF 1933</u>	873	0	1001	0
<u>CSF 1936</u>	277	1	316	1
<u>CSF 1937</u>	863	0	972	0
<u>CSF 1938</u>	708	0	743	1
<u>CSF 1939</u>	373	1	245	1

<u>CSF 1940</u>	1122	0	1411	0
<u>CSF 1941</u>	1169	0	1539	0
<u>CSF 1942</u>	600	0	444	1
<u>CSF 1943</u>	330	1	207	1
<u>CSF 1944</u>	791	0	551	1
<u>CSF 1945</u>	650	0	398	1
<u>CSF 1946</u>	716	0	558	1

Πίνακας 4.2.1.: Συνοπτικός πίνακας σύγκρισης αβ42_{Fuji} και αβ42_{Roche} (n=27). Με τον συμβολισμό 1, αναφέρεται το *abnormal*, δηλαδή τιμές <550 για τη *Furirebio*, και <800 για τη *Roche*.

<u>ΚΩΔΙΚΟΣ</u> <u>ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ</u>	<u>TOTAL TAU_{FUJI}</u> <u>(pg/mL)</u>	<u>ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΜΕ</u> <u>ΒΑΣΗ ΤΟ</u> <u>cut-off</u>	<u>TOTAL TAU_{ROCHE}</u> <u>(pg/mL)</u>	<u>ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΜΕ</u> <u>ΒΑΣΗ ΤΟ</u> <u>cut-off</u>
<u>Δείγμα 1</u>	234	0	170	0
<u>Δείγμα 2</u>	520	1	334	1
<u>Δείγμα 3</u>	170	0	153	0
<u>Δείγμα 4</u>	1967	1	1227	1
<u>Δείγμα 5</u>	284	0	234	0
<u>Δείγμα 6</u>	627	1	168	0
<u>Δείγμα 7</u>	190	0	147	0
<u>Δείγμα 8</u>	657	1	434	1
<u>Δείγμα 9</u>	1621	1	1231	1
<u>Δείγμα 10</u>	136	0	126	0
<u>Δείγμα 11</u>	198	0	173	0
<u>Δείγμα 12</u>	949	1	625	1
<u>Δείγμα 13</u>	144	0	141	0
<u>Δείγμα 14</u>	327	0	152	0
<u>Δείγμα 15</u>	144	0	128	0
<u>CSF 1933</u>	158	0	104	0
<u>CSF 1936</u>	210	0	122	0
<u>CSF 1937</u>	241	0	144	0
<u>CSF 1938</u>	286	0	155	0
<u>CSF 1939</u>	155	0	101	0

<u>CSF 1940</u>	773	1	441	1
<u>CSF 1941</u>	343	0	210	0
<u>CSF 1942</u>	252	0	196	0
<u>CSF 1943</u>	390	1	330	1
<u>CSF 1944</u>	302	0	177	0
<u>CSF 1945</u>	166	0	126	0
<u>CSF 1946</u>	248	0	218	0

Πίνακας 4.2.2.: Συνοπτικός πίνακας σύγκρισης total tau_{Fuji} και total tau_{Roche} (n=27). Με τον συμβολισμό 1, αναφέρεται το abnormal, δηλαδή τιμές >375 για τη Furirebio, και >300 για τη Roche.

<u>ΚΩΔΙΚΟΣ</u> <u>ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ</u>	<u>P-TAU181_{FUJI}</u> <u>(pg/mL)</u>	<u>ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΜΕ</u> <u>ΒΑΣΗ ΤΟ</u> <u>cut-off</u>	<u>P-TAU181_{ROCHE}</u> <u>(pg/mL)</u>	<u>ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΜΕ</u> <u>ΒΑΣΗ ΤΟ</u> <u>cut-off</u>
<u>Δείγμα 1</u>	68	1	13	0
<u>Δείγμα 2</u>	84	1	33	1
<u>Δείγμα 3</u>	40	0	16	0
<u>Δείγμα 4</u>	62	1	26	0
<u>Δείγμα 5</u>	216	1	111	1
<u>Δείγμα 6</u>	56	1	20	0
<u>Δείγμα 7</u>	48	0	17	0
<u>Δείγμα 8</u>	43	0	13	0
<u>Δείγμα 9</u>	34	0	13	0
<u>Δείγμα 10</u>	188	1	114	1
<u>Δείγμα 11</u>	27	0	10	0
<u>Δείγμα 12</u>	27	0	11	0
<u>Δείγμα 13</u>	145	1	64	1
<u>Δείγμα 14</u>	31	0	11	0
<u>Δείγμα 15</u>	45	0	13	0
<u>CSF 1933</u>	39	0	11	0
<u>CSF 1936</u>	21	0	8	0
<u>CSF 1937</u>	38	0	10	0
<u>CSF 1938</u>	22	0	8	0

<u>CSF 1939</u>	26	0	10	0
<u>CSF 1940</u>	40	0	15	0
<u>CSF 1941</u>	42	0	16	0
<u>CSF 1942</u>	60	1	18	0
<u>CSF 1943</u>	35	0	12	0
<u>CSF 1944</u>	103	1	39	1
<u>CSF 1945</u>	68	1	19	0
<u>CSF 1946</u>	47	0	16	0

Πίνακας 4.2.3.: Συνοπτικός πίνακας σύγκρισης $p\text{-tau181}_{\text{Fujii}}$ και $p\text{-tau181}_{\text{Roche}}$ ($n=27$). Με τον συμβολισμό 1, αναφέρεται το *abnormal*, δηλαδή τιμές >52 για τη *Furirebio*, και >27 για τη *Roche*.

4.2.1. Υπολογισμός επαναληψιμότητας

Για τα πειράματα επαναληψιμότητας ελήφθησαν τρεις τιμές από ένα δείγμα ασθενούς. Οι τιμές ελήφθησαν εντός μιας ώρας, ενώ μεσολαβούσαν μετρήσεις δειγμάτων ρουτίνας στον αναλυτή (Πίνακας 4.2.1.1).

<u>ΕΛΕΓΧΟΣ ΕΠΑΝΑΛΗΨΙΜΟΤΗΤΑΣ</u>	<u>AB42</u>	<u>TOTAL TAU</u>	<u>P-TAU181</u>
<u>1^η Μέτρηση</u>	488	235	16,8
<u>2^η Μέτρηση</u>	494	236	16,8
<u>3^η Μέτρηση</u>	507	238	16,8
<u>Μέσος όρος</u>	496	236	16,8
<u>Τυπική απόκλιση (SD)</u>	9,71	1,53	0,03
<u>Συντελεστής διακύμανσης (CV%)</u>	1,96	0,65	0,18

Πίνακας 4.2.1.1. : Παρουσίαση δεδομένων και επεξεργασίας των τιμών επαναληψιμότητας για τις τρεις παραμέτρους *ab42*, *total tau*, *p-tau181*.

Η τυπική απόκλιση και ο συντελεστής διακύμανσης υπολογίστηκαν από τους κάτωθι τύπους:

$$SD = \sqrt{\sum \frac{(x_i - x_{mean})^2}{N-1}} \text{ και } CV = \frac{SD}{x_{mean}} \times 100, \text{ αντίστοιχα.}$$

Τα αποτελέσματα επαναληψιμότητας κρίνονται ικανοποιητικά και για τις τρεις παραμέτρους.

4.2.2. Υπολογισμός αναπαραγωγιμότητας, μεροληψίας, ολικού σφάλματος

Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν υπό τις ίδιες συνθήκες, με ίδιο αριθμό παρτίδας lot αντιδραστηρίου και δειγμάτων ελέγχου και για τις τρεις παραμέτρους. Η αναπαραγωγιμότητα ελέγχθηκε με βάση τις τιμές των δειγμάτων ελέγχου, για τις πέντε φορές διενέργειας του πειράματος. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.2.2.1.

Το ολικό σφάλμα υπολογίστηκε με βάση τον μαθηματικό τύπο:

$$\text{ΟΛΙΚΟ ΣΦΑΛΜΑ} = |\text{Bias\%}| + 1,65 \cdot \text{CV\%}, \text{ με 95\% C.I.}$$

	AB42		TOTAL TAU		P-TAU181	
	LEVEL1	LEVEL2	LEVEL1	LEVEL2	LEVEL1	LEVEL2
1 ^η Μέτρηση	561	1017	166	459	14,3	49,6
2 ^η Μέτρηση	519	978	176	442	14,4	50,1
3 ^η Μέτρηση	573	1032	180	454	14,4	40,5
4 ^η Μέτρηση	564	1041	177		14,5	41,1
5 ^η Μέτρηση					14,1	38,1
Μέσος όρος	554	1017	175	452	14,3	43,9
Τυπική απόκλιση (SD)	24,1	28,1	6,0	8,8	0,13	4,98
Συντελεστής διακύμανσης (CV%)	4,4%	2,8%	3,4%	1,9%	0,88%	11,35%
Αναμενόμενη Τιμή	531	961	183	450	14,1	48,3
Απόλυτη Μεροληψία	23	56	-8	2	0,2	-4,4
Σχετική Μεροληψία	0,043	0,058	-0,044	0,004	0,014	-0,091
Μεροληψία %	4,3	5,8	-4,4	0,4	1,4	-9,1
Ολικό Σφάλμα	11,6	10,4	10	3,5	2,9	27,8

Πίνακας 4.2.2.1.: Παρουσίαση δεδομένων και επεξεργασίας των τιμών της αναπαραγωγιμότητας, μεροληψίας και ολικού σφάλματος.

Έπειτα από τη διενέργεια των παραπάνω μετρήσεων, παρατηρείται ότι τα αποτελέσματα είναι αναπαραγωγίμα καθώς όλοι οι συντελεστές διακύμανσης είναι <15%. Δεδομένο αποτελεί ότι δεν υπάρχουν παγκόσμιες προδιαγραφές της βιολογικής μεταβλητότητας και μεγίστου ολικού επιτρεπτού σφάλματος, όσον αφορά τις ανοσοχημικές μεθόδους συντελεστής διακύμανσης 10-15% κρίνεται ικανοποιητικός. Το ολικό σφάλμα για όλες τις παραμέτρους φαίνεται να είναι αρκετά μικρό με εξαίρεση το υψηλό επίπεδο ελέγχου της p-tau181.

4.2.3. Έλεγχος ορθότητας μέσω υπολογισμού ανάκτησης

Για τον έλεγχο της ορθότητας μέσω ανάκτησης δείγματος, πραγματοποιήθηκε ανάμειξη (1:1) μεταξύ του δείγματος στο οποίο πραγματοποιήθηκε ο έλεγχος της επαναληψιμότητας παραπάνω και του πυκνού βαθμονομητή για την κάθε παράμετρο (Πίνακας 4.2.3.1).

Η ανάκτηση υπολογίστηκε σύμφωνα με τον εξής τύπο:

$$\text{Recovery (R)\%} = \frac{c_1 - c_{exp}}{c_{exp}} \times 100.$$

<u>ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΝΑΚΤΗΣΗΣ</u>	<u>AB42</u>	<u>TOTAL TAU</u>	<u>P-TAU181</u>
<u>Μέσος όρος</u>	496	236	16,8
<u>Τιμή του βαθμονομητή</u>	499	396	70,8
<u>Αναμενόμενη τιμή</u> <u>(AVERAGE+CAL2 NOM.)/2</u>	497,5	316	43,8
<u>Παρατηρούμενη τιμή</u>	510	298	34
<u>Ανάκτηση %</u>	2,51	-5,70	-22,37
<u>Τελική τιμή</u>	102,51	94,30	77,63

Πίνακας 4.2.3.1. : Παρουσίαση δεδομένων και επεξεργασίας των τιμών της ανάκτησης για τις τρεις παραμέτρους ab42, total tau, p-tau181.

Η ανάκτηση παρατηρείται αρκετά καλή στα ab42 και total tau (85% - 115%), αλλά όχι τόσο καλή στην p-tau181 παράμετρο.

4.2.4. Έλεγχος ορθότητας μέσω Εξωτερικού Ελέγχου Ποιότητας (EQA)

Έναν άλλο τρόπο ελέγχου της ορθότητας αποτελεί η συμμετοχή σε προγράμματα εξωτερικού ελέγχου ποιότητας. Στην παρούσα διατριβή πραγματοποιήθηκε συμμετοχή εξωτερικού ελέγχου ποιότητας στον οργανισμό INSTAND. Το δείγμα που εστάλη από τον οργανισμό INSTAND προς μέτρηση, περιείχε υψηλές ποσότητες ολικής tau πρωτεΐνης, αλλά φυσιολογικές ποσότητες φωσφορυλιωμένης tau και β-αμυλοειδούς πεπτιδίου (Εικόνα 4.2.4.1).

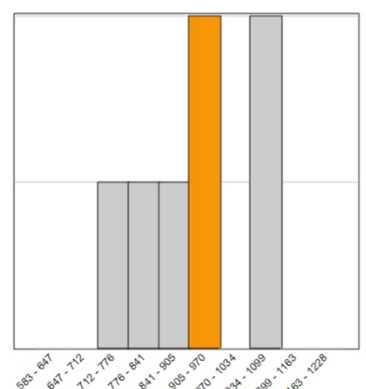
Analyte		Sam- ple	Unit	Your value	Target value	TV- Type	Lower limit	Upper limit	Deviation	Z-Score	Meets criteria	
Amyloid β Peptid 42 (A β 42)	(1)	66	pg/ml	905	862	ET	647	1078	5.0%	0,333	+	
Total Tau Protein (Tau)	(1)	66	pg/ml	434	765	ET	574	956	-43.3%	-1,37		
PhosphoTau Protein (pTau)	(1)	66	pg/ml	13.0	30.6	ET	23.0	38.3	-57.5%	-0,842		

Εικόνα 4.2.4.1.: Ενδεικτικά αποτελέσματα διεργαστηριακού ελέγχου για τις τρεις παραμέτρους. Με κόκκινο επισημαίνονται οι τιμές του εργαστηρίου για τη νέα μέθοδο Roche στην πλατφόρμα Elecsys, ενώ με μπλε οι τιμές στόχος, με βάση τη στατιστική ανάλυση.

Amyloid β Peptid 42 (A β 42) (pg/ml, N = 80)									
Collective	Sam- ple	Target value	Target range	Participants collective			Rate (%)		
				AVG	CV	Num.	Sam.	total	
EUROIMMUN	66	862	647 - 1078	938	12.7	27	88.9	88.9	
FUJIREBO Lumipuls	66	862	647 - 1078	746	5.11	27	100	100	
FUJIREBO	66	862	647 - 1078	923	11.1	19	89.5	89.5	
other providers (1)	66	862	647 - 1078	912	14.1	7			

(1) In individual cases is a statistically valid valuation with consensus value not given, because size of the collective < 8 values.

Rate of success: 93,8%

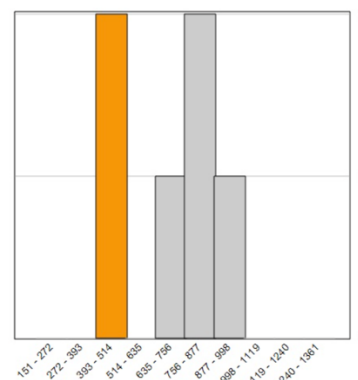


Εικόνα 4.2.4.2.: Αποτελέσματα διεργαστηριακού ελέγχου για την παράμετρο ab42. Αριστερά με πορτοκαλί ένδειξη, βρίσκεται η νέα μέθοδος της Roche, ενώ δεξιά παρατίθεται ραβδόγραμμα για σχηματική αναπαράσταση των τιμών μας σε σχέση με τις υπόλοιπες μεθόδους.

Total Tau Protein (Tau) (pg/ml, N = 80)									
Collective	Sam- ple	Target value	Target range	Participants collective			Rate (%)		
				AVG	CV	Num.	Sam.	total	
EUROIMMUN	66	765	574 - 956	766	10.5	27	92.6	92.6	
FUJIREBO	66	765	574 - 956	766	7.36	47	95.7	95.7	
other providers (1)	66	765	574 - 956	694	34.9	6			

(1) In individual cases is a statistically valid valuation with consensus value not given, because size of the collective < 8 values.

Rate of success: 92,5%

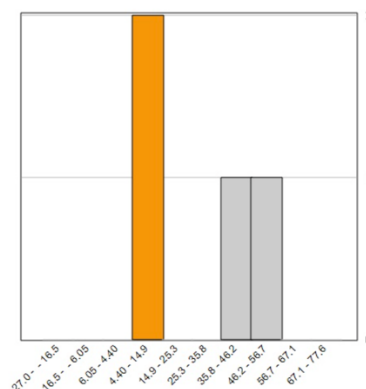


Εικόνα 4.2.4.3.: Αποτελέσματα διεργαστηριακού ελέγχου για την παράμετρο total tau. Αριστερά με πορτοκαλί ένδειξη, βρίσκεται η νέα μέθοδος της Roche, ενώ δεξιά παρατίθεται ραβδόγραμμα για σχηματική αναπαράσταση των τιμών μας σε σχέση με τις υπόλοιπες μεθόδους.

PhosphoTau Protein (pTau) (pg/ml, N = 76)									
Collective	Sam- ple	Target value	Target range		Participants collective			Rate (%)	
					AVG	CV	Num.	Sam.	total
EUROIMMUN	66	30.6	23.0	- 38.3	30.0	13.3	27	92.6	92.6
FUJIREBO	66	30.6	23.0	- 38.3	31.0	12.5	45	97.8	97.8
other providers	(1)	66	30.6	23.0 - 38.3	28.4	73.6	4		

(1) In individual cases is a statistically valid valuation with consensus value not given, because size of the collective < 8 values.

Rate of success: 92,1%



Εικόνα 4.2.4.4. : Αποτελέσματα διεργαστηριακού ελέγχου για την παράμετρο p-tau181. Αριστερά με πορτοκαλί ένδειξη, βρίσκεται η νέα μέθοδος της Roche, ενώ δεξιά παρατίθεται ραβδόγραμμα για σχηματική αναπαράσταση των τιμών μας σε σχέση με τις υπόλοιπες μεθόδους.

Η συμμετοχή του εργαστηρίου με τη νέα μέθοδο της Roche κρίνεται ικανοποιητική. Το δείγμα χαρακτηρίστηκε ως «πιθανόν Alzheimer» με βάση τη μέθοδο αυτή και με βάση την πλειοψηφία των αποτελεσμάτων κρίθηκε ορθός.

Η πλειονότητα των εργαστηρίων που συμμετείχαν στον διεργαστηριακό έλεγχο χρησιμοποίησαν για την ανάλυση των βιοδεικτών τις μεθόδους Fujirebio και Euroimmun. Η μέθοδος της Roche ανήκει στην κατηγορία που κατά την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων από τους διοργανωτές του EQA ονομάστηκε «Other Providers». Συγκεκριμένα, οι συμμετοχές στην κατηγορία αυτή ήταν λιγότερες από 10 για δύο από τις παραμέτρους και για μία από αυτές (p-tau181) λιγότερες από πέντε. Συνεπώς, τα στατιστικά αποτελέσματα του διεργαστηριακού ελέγχου καθορίστηκαν από τις μεθόδους Fujirebio και Euroimmun, για τις τιμές στόχος, και εύλογα διαφέρουν από εκείνες της Roche, με αποτέλεσμα το εργαστήριο να φαίνεται εκτός ορίων για τις παραμέτρους total tau και p-tau181 (Εικόνες 4.2.4.2.-4.2.4.2.).

4.2.5. Στατιστική ανάλυση παραμέτρων ab42, total tau και p-tau181 για FUJIREBIO και ROCHE – Σύγκριση μεθόδων

Για τη μελέτη των τριών βιοδεικτών (ab42, total tau, p-tau181) στις άνοιες με τις δύο μεθόδους καθώς και τη σύγκριση μεταξύ τους, πραγματοποιήθηκε μια σειρά στατιστικών αναλύσεων με το στατιστικό πρόγραμμα SPSS. Προηγήθηκε ο έλεγχος κανονικότητας και των 6 ποσοτικών μεταβλητών.

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		ab42Fuji	ab42Roche	tauFuji	tauRoche	ptauFuji	ptauRoche
N		27	27	27	27	27	27
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	627.22	642.63	433.04	287.67	61.30	24.70
	Std. Deviation	285.983	368.512	446.351	297.456	48.750	27.873
Most Extreme Differences	Absolute	.126	.166	.284	.312	.260	.345
	Positive	.126	.166	.284	.312	.260	.345
	Negative	-.090	-.119	-.253	-.265	-.204	-.274
Test Statistic		.126	.166	.284	.312	.260	.345
Asymp. Sig. (2-tailed) ^c		.200 ^d	.053	<.001	<.001	<.001	<.001
Monte Carlo Sig. (2-tailed) ^e	Sig.		.325	.052	<.001	<.001	<.001
	99% Confidence Interval	Lower Bound	.313	.047	.000	.000	.000
		Upper Bound	.337	.058	.000	.000	.000

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

c. Lilliefors Significance Correction.

d. This is a lower bound of the true significance.

e. Lilliefors' method based on 10000 Monte Carlo samples with starting seed 2000000.

Πίνακας 4.2.5.1.: Ανάλυση κανονικότητας για τις παραμέτρους ab42Fuji, ab42Roche, tauFuji, tauRoche, ptauFuji και ptauRoche κατά Kolmogorov-Smirnov.

Με βάση τον παραπάνω πίνακα ελέγχου κανονικότητας 4.2.5.1., συμπεραίνουμε ότι η κατανομή είναι κανονική ($p > 0,05$) μόνο για ab42Fuji και ab42Roche. Όλες οι άλλες παράμετροι δεν ακολουθούν κανονική κατανομή.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε περιγραφική στατιστική ανάλυση των ανωτέρω παραμέτρων όπως παρουσιάζεται στον πίνακα 4.2.5.2. (εύρος, μέσος όρος, διάμεσος, τυπική απόκλιση, ελάχιστο, μέγιστο) .

		Statistics					
		ab42Fuji	ab42Roche	tauFuji	tauRoche	ptauFuji	ptauRoche
N	Valid	27	27	27	27	27	27
	Missing	0	0	0	0	0	0
Mean		627.22	642.63	433.04	287.67	61.30	24.70
Median		607.00	551.00	252.00	170.00	43.00	15.00
Std. Deviation		285.983	368.512	446.351	297.456	48.750	27.873
Range		1058	1332	1831	1130	195	106
Minimum		243	207	136	101	21	8
Maximum		1301	1539	1967	1231	216	114
Percentiles	25	373.00	345.00	170.00	141.00	34.00	11.00
	50	607.00	551.00	252.00	170.00	43.00	15.00
	75	812.00	904.00	520.00	330.00	68.00	20.00

Πίνακας 4.2.5.2. : Περιγραφική στατιστική ανάλυση για τις παραμέτρους ab42Fuji, ab42Roche, tauFuji, tauRoche, ptauFuji και ptauRoche.

Όταν ο αριθμός των δειγμάτων είναι ικανοποιητικός ($n > 30$) και η κατανομή είναι κανονική, τότε το εύρος των τιμών για μια παράμετρο υπολογίζεται μέσω παραμετρικής δοκιμασίας (μέσος όρος $\pm 2SD$), με επίπεδο εμπιστοσύνης 95% CI. Όταν όμως ο αριθμός των δειγμάτων δεν είναι αρκετός ώστε να μπορέσει η αξιολόγηση να πραγματοποιηθεί με παραμετρικό τρόπο, το εύρος των τιμών προσδιορίζεται καλύτερα μη-παραμετρικά μέσω του εύρους μεταξύ 25^{ου} εκατοστημορίου και 75^{ου} εκατοστημορίου. Συνεπώς, το εύρος τιμών για το ab42 είναι 345-904, για την ολική tau πρωτεΐνη 141-330 και για την φωσφορυλιωμένη tau 11-20 pg/ml.

Για να αποδειχθεί η στατιστικά σημαντική διαφορά των ομάδων ή όχι, ακολούθησε η εκτέλεση στατιστικής δοκιμασίας t-test όταν οι υπό εξέταση ομάδες εμφανίζουν κανονική κατανομή ή Mann-Whitney για σύγκριση διαμέσων σε περίπτωση μη-κανονικότητας. Καθώς τα δείγματα συσχετίζονται μεταξύ τους ανά ζεύγη τότε αντίστοιχα χρησιμοποιούνται το Paired t-test και το Wilcoxon Signed Rank Test. Στην προκειμένη περίπτωση, για σύγκριση τιμών πιο αξιόπιστο

είναι το T-test μόνο για τις παραμέτρους ab42Fuji και ab42Roche (Πίνακας 4.2.5.3.), ενώ για τις υπόλοιπες παραμέτρους το Wilcoxon (Πίνακας 4.2.5.4.).

Paired Samples Test

		Mean	Paired Differences				t	df	Significance	
			Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				One- Sided p	Two- Sided p
					Lower	Upper				
Pair 1	ab42Fuji - ab42Roche	-15.407	159.485	30.693	-78.498	47.683	-.502	26	.310	.620
Pair 2	tauFuji - tauRoche	145.370	171.237	32.955	77.631	213.109	4.411	26	<.001	<.001
Pair 3	ptauFuji - ptauRoche	36.593	22.544	4.339	27.674	45.511	8.434	26	<.001	<.001

Πίνακας 4.2.5.3. : Στατιστική παραμετρική δοκιμασία *t-test* σε ζεύγη, για τον έλεγχο ύπαρξης στατιστικά σημαντικής διαφοράς των μέσων όρων όλων των παραμέτρων μεταξύ των παραμέτρων. Λόγω της κανονικότητας, αξιόπιστο είναι το τεστ για *ab42Fuji-ab42Roche*.

tauFuji, tauRoche		ptauFuji, ptauRoche	
Related-Samples Wilcoxon Signed Rank Test Summary		Related-Samples Wilcoxon Signed Rank Test Summary	
Total N	27	Total N	27
Test Statistic	.000	Test Statistic	.000
Standard Error	41.622	Standard Error	41.617
Standardized Test Statistic	-4.541	Standardized Test Statistic	-4.541
Asymptotic Sig.(2-sided test)	<.001	Asymptotic Sig.(2-sided test)	<.001

Πίνακας 4.2.5.4.: Στατιστική μη-παραμετρική δοκιμασία *Wilcoxon* σε ζεύγη για τον έλεγχο ύπαρξης στατιστικά σημαντικής διαφοράς των διαμέσων μεταξύ των παραμέτρων *tauFuji-tauRoche* και *ptauFuji-ptauRoche*.

Μεταξύ και των δύο αυτών στατιστικών δοκιμασιών προκύπτει ότι η παράμετρος αβ42, δεν εμφανίζει στατιστικά σημαντικές διαφορές είτε πραγματοποιείται με τη μέθοδο της Fujirebio, είτε με τη μέθοδο της Roche ($p=0,620$), με βάση το t-test σε ζεύγη. Για την περίπτωση όμως της ολικής tau και p-tau181, εμφανίζεται στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο μεθόδων ($p<0,001$), με βάση το Wilcoxon Signed Rank test.

Στη συνέχεια έγινε συσχέτιση όλων των παραμέτρων μεταξύ τους. Όταν η κατανομή είναι κανονική οι παράμετροι συσχετίζονται πιο αξιόπιστα με τον συντελεστή συσχέτισης r του Pearson. Στην παρούσα εργασία κανονική κατανομή ακολουθούν μόνο οι παράμετροι αβ42Fuji και αβ42Roche Πίνακας 4.2.5.5. ($r=0,91$, $p<0,001$).

Για τις παραμέτρους tauFuji, tauRoche, ptauFuji και ptauRoche, η συσχέτιση πραγματοποιείται με μη-παραμετρική συσχέτιση κατά Spearman (συντελεστής rho). Στατιστικά σημαντική συσχέτιση στα επίπεδα $<0,01$. Για την ολική tau ο συντελεστής είναι $\rho=0,87$ και $p<0,001$, ενώ για την p-tau181 ο συντελεστής είναι $\rho=0,93$ και $p<0,001$ (Πίνακας 4.2.5.6.).

Correlations

		ab42Fuji	ab42Roche	tauFuji	tauRoche	ptauFuji	ptauRoche
ab42Fuji	Pearson Correlation	1	.912**	-.056	-.144	-.205	-.310
	Sig. (2-tailed)		<.001	.781	.474	.306	.115
	N	27	27	27	27	27	27
ab42Roche	Pearson Correlation	.912**	1	-.072	-.152	-.219	-.271
	Sig. (2-tailed)	<.001		.723	.450	.274	.172
	N	27	27	27	27	27	27
tauFuji	Pearson Correlation	-.056	-.072	1	.973**	-.154	-.125
	Sig. (2-tailed)	.781	.723		<.001	.443	.535
	N	27	27	27	27	27	27
tauRoche	Pearson Correlation	-.144	-.152	.973**	1	-.121	-.090
	Sig. (2-tailed)	.474	.450	<.001		.547	.655
	N	27	27	27	27	27	27
ptauFuji	Pearson Correlation	-.205	-.219	-.154	-.121	1	.973**

	Sig. (2-tailed)	.306	.274	.443	.547		<.001
	N	27	27	27	27	27	27
ptauRoche	Pearson Correlation	-.310	-.271	-.125	-.090	.973**	1
	Sig. (2-tailed)	.115	.172	.535	.655	<.001	
	N	27	27	27	27	27	27

** . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

Πίνακας 4.2.5.5.: Παραμετρική συσχέτιση κατά Pearson.

			Correlations					
			ab42Fuji	ab42Roche	tauFuji	tauRoche	ptauFuji	ptauRoche
Spearman's rho	ab42Fuji	Correlation Coefficient	1.000	.911**	.217	.083	.138	.026
		Sig. (2-tailed)	.	<.001	.277	.682	.493	.899
		N	27	27	27	27	27	27
	ab42Roche	Correlation Coefficient	.911**	1.000	.173	.055	.093	.003
		Sig. (2-tailed)	<.001	.	.389	.785	.643	.988
		N	27	27	27	27	27	27
	tauFuji	Correlation Coefficient	.217	.173	1.000	.869**	-.133	-.001
		Sig. (2-tailed)	.277	.389	.	<.001	.508	.996
		N	27	27	27	27	27	27
	tauRoche	Correlation Coefficient	.083	.055	.869**	1.000	.079	.190
		Sig. (2-tailed)	.682	.785	<.001	.	.695	.343
		N	27	27	27	27	27	27
	ptauFuji	Correlation Coefficient	.138	.093	-.133	.079	1.000	.928**
		Sig. (2-tailed)	.493	.643	.508	.695	.	<.001
		N	27	27	27	27	27	27
	ptauRoche	Correlation Coefficient	.026	.003	-.001	.190	.928**	1.000
		Sig. (2-tailed)	.899	.988	.996	.343	<.001	.
		N	27	27	27	27	27	27

** . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

Πίνακας 4.2.5.6.: Μη-Παραμετρική συσχέτιση κατά Spearman.

Σε όσες ποσοτικές μεταβλητές υπήρχε άριστη συσχέτιση ($>0,8$) ακολούθησε γραμμική παλινδρόμηση μεταξύ δύο μεταβλητών με στατιστική ανάλυση linear regression. Στην παρούσα διατριβή οι μεταβλητές συσχετίστηκαν ανά δύο (ab42Fuji-ab42Roche, tauFuji-tauRoche, ptauFuji-ptauRoche). Εξαρτημένη μεταβλητή ορίστηκε σε κάθε περίπτωση η παράμετρος της Roche, ενώ ανεξάρτητη η Fujirebio καθώς είναι μέθοδος αναφοράς.

		Coefficients ^a					
		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients			95.0% Confidence Interval for B
Model		B	Std. Error	Beta	t	Sig.	Lower Bound Upper Bound
1	(Constant)	-94.181	72.782		-1.294	.207	-244.078 55.715
	ab42Fuji	1.175	.106	.912	11.091	<.001	.957 1.393

a. Dependent Variable: ab42Roche

Πίνακας 4.2.5.7.: Γραμμική παλινδρόμηση μεταξύ ab42Fuji και ab42Roche.

Ο μαθηματικός τύπος που συσχετίζει τις δύο αυτές παραμέτρους όπου η ανεξάρτητη μεταβλητή είναι η ab42Fuji και η εξαρτημένη μεταβλητή είναι η ab42Roche, είναι ο εξής:

$$\mathbf{ab42Roche = 1,175ab42Fuji - 94,181, \text{ με στρογγυλοποίηση } ab42Roche = 1,18ab42Fuji - 94.}$$

Δεδομένου ότι η διατομή (intercept) περικλείει το μηδέν και η κλίση (slope) τον αριθμό ένα, οι δύο μέθοδοι είναι ισοδύναμες (Πίνακας 4.2.5.7.).

		Coefficients ^a					
		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients			95.0% Confidence Interval for B
Model		B	Std. Error	Beta	t	Sig.	Lower Bound Upper Bound
1	(Constant)	6.856	18.925		.362	.720	-32.120 45.833
	tauFuji	.648	.031	.973	21.105	<.001	.585 .712

a. Dependent Variable: tauRoche

Πίνακας 4.2.5.8.: Γραμμική παλινδρόμηση μεταξύ tauFuji και tauRoche.

Ο μαθηματικός τύπος που συσχετίζει τις δύο αυτές παραμέτρους όπου η ανεξάρτητη μεταβλητή είναι η tauFuji και η εξαρτημένη μεταβλητή είναι η tauRoche, είναι ο εξής:

$$\tau_{\text{Roche}} = 0,648\tau_{\text{Fuji}} + 6,856, \text{ με στρογγυλοποίηση } \tau_{\text{Roche}} = 0,65\tau_{\text{Fuji}} + 7.$$

Στην περίπτωση αυτή μπορούμε να συμπεράνουμε ότι η διατομή περικλείει το μηδέν, αλλά η κλίση δεν περικλείει το ένα. Ενώ οι δύο μέθοδοι συσχετίζονται λόγω του Spearman, δεν είναι ισοδύναμες (Πίνακας 4.2.5.8.).

		Coefficients ^a						
		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.	95.0% Confidence Interval for B	
Model		B	Std. Error	Beta			Lower Bound	Upper Bound
1	(Constant)	-9.409	2.039		-4.615	<.001	-13.608	-5.210
	ptauFuji	.557	.026	.973	21.223	<.001	.503	.611

a. Dependent Variable: ptauRoche

Πίνακας 4.2.5.9.: Γραμμική παλινδρόμηση μεταξύ ptauFuji και ptauRoche.

Ο μαθηματικός τύπος που συσχετίζει τις δύο αυτές παραμέτρους όπου η ανεξάρτητη μεταβλητή είναι η p-tau181Fuji και η εξαρτημένη μεταβλητή είναι η p-tau181Roche, είναι ο εξής:

$$p\text{-tau181}_{\text{Roche}} = 0,557p\text{-tau181}_{\text{Fuji}} - 9,409, \text{ με στρογγυλοποίηση } p\text{-tau181}_{\text{Roche}} = 0,56p\text{-tau181}_{\text{Fuji}} - 9.$$

Στην περίπτωση αυτή μπορούμε να συμπεράνουμε ότι ούτε η διατομή περικλείει το μηδέν, ούτε η κλίση περικλείει το ένα. Συμπερασματικά, αυτές οι δύο μέθοδοι συσχετίζονται λόγω του Spearman, αλλά δεν είναι ισοδύναμες (Πίνακας 4.2.5.9.).

Όσον αφορά τα ποιοτικά αποτελέσματα συμφωνίας (concordance) των μεθόδων Roche και Fujirebio, βασιζόμενοι στους πίνακες 4.2.1-4.2.3 με τα προαναφερόμενα cut-offs, προκύπτουν τα ακόλουθα:

	<u>AB42_{Roche} - AB42_{FUJI}</u>	<u>TAU_{Roche} - TAU_{FUJI}</u>	<u>P-TAU181_{Roche} - P-TAU181_{FUJI}</u>
<u>ΣΥΜΦΩΝΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ</u>	19/27	26/27	22/27
<u>ΣΥΜΦΩΝΙΑ % (CONCORDANCE)</u>	70%	96%	81%

Πίνακας 4.2.5.10.: Σύνοψη αποτελεσμάτων συμφωνίας μεταξύ όλων των παραμέτρων και στις 2 μεθόδους.

Γενικότερα οι δύο μέθοδοι εμφανίζουν συμφωνία. Η παράμετρος ολική tau πρωτεΐνη παρουσιάζει τη μεγαλύτερη συμφωνία μεταξύ των αποτελεσμάτων ενώ το β-αμυλοειδές πεπτίδιο, τη μικρότερη.

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ

5.1. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΜΑΡΤ ΑΝΑΛΥΣΗΣ FTD ΕΛΛΗΝΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ ΚΑΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ Η1 ΑΠΛΟΤΥΠΟΥ

Στον ευρύ όρο άνοιες περιλαμβάνονται πολύπλοκες πολυπαραγοντικές παθολογίες, όπως είναι η νόσος Alzheimer's (AD), η νόσος Parkinson's (PD), η νόσος Huntington's, η νόσος Creutzfeldt-Jakob, ο φυσιολογικής πίεσης υδροκέφαλος και η μικτή άνοια. Η μετωποκροταφική άνοια (FTD) κατατάσσεται είτε ως δεύτερος είτε ως τρίτος, μετά την άνοια με σωμάτια Lewy, συχνότερος τύπος νευροεκφυλιστικής άνοιας. Σε άτομα ηλικίας <65 ετών ακολουθεί την νόσο του Alzheimer. Συνολικά η νόσος αυτή καλύπτει το 5-15 % παγκοσμίως. Η διάρκεια της ασθένειας καταλαμβάνει 6-8 χρόνια και εμφανίζεται με την ίδια συχνότητα σε άνδρες και γυναίκες. Στο 30-50% των περιπτώσεων είναι οικογενής, με το 10-15 % των ασθενών να έχουν κληρονομήσει τη νόσο με αυτοσωμικό επικρατή τρόπο. Τόσο το σύνολο όσο και η ένταση των συμπτωμάτων διαφέρουν από ασθενή σε ασθενή και καθορίζουν τον ξεχωριστό υπότυπο της νόσου FTD. Τα κύρια κλινικά σύνδρομα της FTD είναι η συμπεριφορική παραλλαγή (bvFTD) και οι τρεις γλωσσικές παραλλαγές της PPA (PNFA, SD και LPA), ενώ υπάρχουν και σύνδρομα όπως εκείνα που συνδέονται με τη νόσο του κινητικού νευρώνα (FTD-MND) ή με παρκινσονισμό (FTDP-17, PSP και CBS). Σε παγκόσμιο επίπεδο, ο επιπολασμός της νόσου αυξάνεται, καθώς πραγματοποιείται έγκαιρη διαφορική διάγνωση από την AD. Τα τρία πιο συχνά παρατηρούμενα μεταλλαγμένα στην FTD, είναι τα *MAPT*, *PGRN* και *C9orf72*. Όμως έχουν καταγραφεί και μεταλλάξεις σε *TARDBP*, *CHMP2B*, *FUS*, *VCP*, κ.α.

Στη συγκεκριμένη μελέτη, σκοποί ήταν η ανάπτυξη μεθοδολογίας για την πλήρη γενετική ανάλυση του γονιδίου *MAPT* τόσο με την τεχνική της αλληλούχισης του DNA όσο και με την τεχνική MLPA (για τυχόν ανίχνευση μεγάλων γενωμικών αναδιατάξεων) και στη συνέχεια τόσο η αξιολόγηση των αποτελεσμάτων αυτών σε Έλληνες ασθενείς (μετά από ενημέρωση και έγγραφη συγκατάθεση) με μετωποκροταφική άνοια, όσο και η ανίχνευση του απλοτύπου H1 σε μερικούς από αυτούς.

Η μελέτη περιέλαβε μια ομάδα ασθενών, που δέχτηκαν να συμπεριληφθούν στη γενετική μελέτη και των οποίων τα πλήρη κλινικά στοιχεία έχουν ληφθεί από την Α' Πανεπιστημιακή Νευρολογική Κλινική του Αιγινήτειου Νοσοκομείου (υπεύθυνος Ιατρού Αιγινήτειου:

Καθηγητής κ. Σωκράτης Παπαγεωργίου). Τα συγκεκριμένα δείγματα είχαν ήδη γενετικό αποτέλεσμα από συνεργαζόμενο εργαστήριο του εξωτερικού κι έτσι ήταν δυνατό να αξιολογηθούν και να συγκριθούν τα αποτελέσματα. Τα δείγματα αυτά υποβλήθηκαν σε DNA Sequencing και MLPA.

Έπειτα από απομόνωση γενωμικού DNA από όλα τα δείγματα, ενισχύθηκαν και οι 11 εξωνικές περιοχές κατά μήκος του γονιδίου *MAPT* με τη χρήση εκκινητών από προηγούμενη διπλωματική εργασία του εργαστηρίου και από υπάρχουσα βιβλιογραφία. Οι πρόσθιοι και οι ανάστροφοι εκκινητές ελέγχθησαν αρχικά με συμβατική PCR και ηλεκτροφόρηση σε γέλη αгарόζης 1% w/v. Στη συνέχεια ακολούθησε καθαρισμός των PCR προϊόντων, με το προτυποποιημένο σετ αντιδραστηρίων «High Pure PCR Cleanup Micro kit» (Roche, Ελβετία), είτε με το «DNA clean-up & gel-out kit» (Blirt) είτε με το «Nucleospin Gel and PCR Clean-up XS» (Macherey-Nagel, Γερμανία), προκειμένου προσμίξεις όπως περίσσεια εκκινητών, άλατα, ένζυμα, χρωστικές, να απομακρυνθούν κι έτσι τα προϊόντα να είναι έτοιμα για περαιτέρω χρήση. Ακολούθησε γραμμική ενίσχυση των αμπλικονίων μέσω της διαδικασίας του cycle sequencing. Όσον αφορά τον εκκινητή που επιλέχθηκε για τη γραμμική ενίσχυση του κάθε εξωνίου, η επιλογή έγινε ώστε η απόσταση μεταξύ εκκινητή και αρχής εξωνίου να είναι γύρω στα 100-120 bp, κάτι που θα διευκόλυνε τη μετέπειτα διαδικασία αλληλούχισης. Για τον καθαρισμό των cycle sequencing προϊόντων, από τα μη ενσωματωμένα ddNTP's, χρησιμοποιήθηκε το προτυποποιημένο σετ αντιδραστηρίων Big Dye XTerminator (Applied Biosystems, USA) και τα πλέον καθαρά δείγματα υπέστησαν τριχοειδή ηλεκτροφόρηση στον γενετικό αναλυτή SeqStudio της Thermo Applied Biosystems.

Για την ανίχνευση και οπτικοποίηση των DNA παραλλαγών χρησιμοποιήθηκαν τα προγράμματα Chromas και novoSNP έπειτα από στοίχιση με τις NCBI αλληλουχίες του *MAPT* (NG_007398.2 και NM_001123066.4).

Παρατηρώντας τον πίνακα στο κεφάλαιο 4.14, προκύπτει ότι στα πέντε από τα είκοσι δείγματα (25 %), έχει βρεθεί αιτιογόνος μετάλλαξη για την μετωποκροταφική άνοια (FTD). Τα δέκα από τα είκοσι συνολικά δείγματα (50 %) όμως εμφανίζουν τον επονομαζόμενο απλότυπο H1 (το ποσοστό στα δείγματα χωρίς αιτιογόνο μετάλλαξη είναι παρόμοιο, 47 %). Το ποσοστό αυτό εμφανίζεται ιδιαίτερα υψηλό ωστόσο ένας περιορισμός της μελέτης μας είναι ότι δεν υπάρχει

γνώση για τη συχνότητα του ποσοστού του απλοτύπου αυτού στον υγιή πληθυσμό. Θα μπορούσε το ποσοστό αυτό να διατηρείται στα ίδια επίπεδα και στους υγιείς.

Σε κανένα δείγμα δεν ανιχνεύθηκε ομοζυγωτία E4/E4 που είναι ισχυρότατος παράγων ανάπτυξης Alzheimer's. Όσα από αυτά διαθέτουν ένα τουλάχιστον αλληλόμορφο E4 (15 %), έχουν από μόνα τους αυξημένη πιθανότητα εμφάνισης άνοιας. Σε ένα μόνο δείγμα παρατηρείται απλότυπος H1 και ένα αλληλόμορφο E4.

Συγκρίνοντας τις παραλλαγές που προέκυψαν από τις αλληλουχίσεις που πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο, με εκείνες από τα αποτελέσματα του συνεργαζόμενου εργαστηρίου, προκύπτει ότι υπάρχει μια σχεδόν πλήρης ταύτιση. Όπως και στις αναλύσεις του συνεργαζόμενου εργαστηρίου του εξωτερικού, παθογενετική μετάλλαξη δεν ανιχνεύθηκε. Ανιχνεύθηκαν 5 καλοήθεις παραλλαγές, οι ίδιες σε 10 δείγματα, οι 4 αποτελούν μέρος του απλοτύπου H1 ενώ υπήρξαν και μικρές διαφορές που περιγράφονται στη συνέχεια. Την παραλλαγή του δείγματος A966 (rs75534191) που ανιχνεύθηκε στη μελέτη αυτή, δεν την ταυτοποιεί δικαιολογημένα το εργαστήριο του εξωτερικού καθώς το εύρος ανίχνευσης τους είναι: όριο εξωνίου ± 20 bp (η παραλλαγή αυτή εντοπίζεται στις 34 βάσεις μετά το δωδέκατο εξώνιο). Στη συνέχεια, από τη δική μας αλληλούχιση δεν ανιχνεύεται η καλοήθης παραλλαγή του δείγματος A968, η οποία καταλήγει σε συνώνυμο κωδικόνιο. Η παραλλαγή αυτή χαρτογραφείται ως εξής: *MAPT* NM_005910.5:c.810G>A, σιωπηλή μετάλλαξη p.Pro270(=) (rs11568305) και η συχνότητα εμφάνισής της στον παγκόσμιο πληθυσμό αγγίζει το 3,6%.

Η περιοχή στην οποία βρίσκεται το γονίδιο *MAPT* περιέχει δύο διευρυμένους απλοτύπους, τον H1 και τον H2, οι οποίοι οριοθετούνται μέσω μιας προσθήκης/διαγραφής 238bp εντός του ιντρονίου 9 (del-In9) [84,85]. Ο H1 είναι ο επικρατέστερος τύπος και σχετίζεται ισχυρά με τις σποραδικές μορφές tau-παθειών, όπως PSP και CBD [84,85]. Η συσχέτισή του με την ευρύτερη FTD παρόλα αυτά παρουσιάζει διφορούμενες απόψεις. Μερικοί υποστηρίζουν ότι δεν παρατηρείται καμία συσχέτιση [153,154], και άλλοι ότι υπάρχει ένας μικρός κίνδυνος παρουσία [155,156] ή μη του αλληλομόρφου E4 της απολιποπρωτεΐνης (APOE) [157]. Παρότι λοιπόν η παρουσία *MAPT* παραλλαγών σε FTD ασθενείς δεν είναι επιχείρημα για γενετική συσχέτιση του απλοτύπου με τη νόσο, το γεγονός ότι περίπου οι μισοί από τους FTD ασθενείς έχουν εναποθέσεις tau στους εγκεφάλους τους, είναι υπέρ της μελέτης αυτής της συσχέτισης [153,158,159]. Επιπρόσθετα, ο H2 απλότυπος, φαίνεται να μειώνει την ηλικία της έναρξης

FTD[160]. Αυτή η έλλειψη ομοφωνίας γενικότερα οφείλεται στο γεγονός ότι ο H1απλότυπος παρουσιάζει μεγαλύτερη ποικιλία και τυπική ανισορροπία σύνδεσης (LD), όχι όμως με τον H2, ο οποίος από μόνος του είναι απλός και μη-ανασυνδυαστικός απλότυπος[85]. Η ποικιλία αυτή όπως αναφέρθηκε προηγουμένως ορίζεται από την del-In9 και πέντε σημειακούς πολυμορφισμούς [85]. Ο H1 απλότυπος παρουσιάζει περίπου 20 κοινούς υπό-απλοτύπους, ανάμεσά τους και ο H1c. Ο πιο συχνός υπό-απλότυπος είναι ο H1b, ο οποίος συσχετίζεται με το προστατευτικό (G) αλληλόμορφο του rs242557 και συναντάται συχνότερα σε ασθενείς με PSP. Ο H1c υπο-απλότυπος ορίζεται από τους εξής πολυμορφισμούς: rs1467967, rs242557, rs3785883, rs2471738, rs75721 και del-ins9. Η H1c παραλλαγή αυτού του απλοτύπου H1, έχει συσχετιστεί με υψηλότερα επίπεδα της πρωτεΐνης tau τόσο στο πλάσμα, όσο και στο ENY, ορίζεται κυρίαρχα από τον πολυμορφισμό rs242557 και φαίνεται να είναι η κυρίαρχη αιτία της συσχέτισης του H1 απλοτύπου με την CBD και PSP[85,161] και πρόσφατα συνδέθηκε με την νόσο του Alzheimer[162]. Ωστόσο ακόμα η ταυτοποίηση της σύνδεσης του υποτύπου H1c με την νόσο του Alzheimer είναι διφορούμενη και πιθανόν να εξαρτάται από τους διαφορετικούς πληθυσμούς. Κατά αυτόν τον τρόπο, ένας μεγάλος αριθμός δεδομένων υποστηρίζει μια σημαντική συσχέτιση του απλοτύπου H1 με την νόσο του Parkinson, άλλοι όμως δίνουν διφορούμενα αποτελέσματα [163-167]. Ο H1 απλότυπος εξετάστηκε και σε διαφορετικές εθνικότητες, όμως η LD περιοχή φάνηκε να παρουσιάζει το ίδιο μοτίβο σε πολλούς διαφορετικούς πληθυσμούς επιβεβαιώνοντας το γεγονός ότι ο απλότυπος αυτός είναι αρχέγονος σχηματισμός [168].

Στον ενήλικο ανθρώπινο εγκέφαλο, υπάρχουν 6 κύριες ισομορφές της πρωτεΐνης tau, που προκύπτουν από ένα μόνο γονίδιο (*MAPT*) με εναλλακτικό μάτισμα του mRNA του. Το εναλλακτικό μάτισμα του εξωνίου 10, έχει σαν αποτέλεσμα 2 σημαντικές τάξεις των tau ισομορφών αναλόγως εάν περιέχει 3 (3R) ή 4 (4R) επαναλήψεις των περιοχών που κωδικοποιούν την περιοχή δέσμευσης των μικροσωληνίσκων[169,170]. Η 4R ισομορφή συνδέεται στους μικροσωληνίσκους τρεις φορές πιο ισχυρά από την 3R ισομορφή[171]. Η διατήρηση λοιπόν της ισορροπίας μεταξύ των δύο αυτών ισομορφών είναι κρίσιμη για την πρόοδο του νευροεκφυλισμού. Η φυσιολογική αναλογία των δύο αυτών ισομορφών είναι ίση με το 1. Η PSP και CBD χαρακτηρίζονται από συσσώρευση της 4R tau ισομορφής στους νευρώνες και στη γλοία[172]. Πιθανολογείται ότι η περίσσεια της 4R ισομορφής οδηγεί σε σχηματισμό ειδικής διαμόρφωσης τετραμερών ευθύγραμμων tau ινιδίων -ιδιαίτερα στην ωχρά σφαίρα του εγκεφάλου- που οδηγούν ταχέως σε νευροεκφύλιση με παρκινσονισμό[173,174].

Όσον αφορά τη νόσο του Alzheimer, η αναλογία 3R/4R είναι φυσιολογική στον εγκέφαλο [175].

Ο H1 απλότυπος εκφράζει 43 % περισσότερες 4R ισομορφές της tau, σε σχέση με τον H2 [148,162,176]. Η συμπερίληψη του εξωνίου 3 σε *MAPT* μετάγραφα μπορεί επίσης να συνεισφέρει στην προστασία H2 φορέων από τον νευροεκφυλισμό (2N ισομορφή). Ο H2 απλότυπος παρουσιάζει δύο φορές μεγαλύτερα μετάγραφα συμπεριλαμβάνοντας και το εξώνιο 3 που προκύπτει από το εναλλακτικό μάτισμα [177]

Τα 10 από τα 20 δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη, φαίνεται ότι παρουσιάζουν παραλλαγές οι οποίες είναι μέρος του απλοτύπου H1. Στην μελέτη του Hayesmoore, χρησιμοποιήθηκαν δύο παραλλαγές οι οποίες αναφέρονται και στην παρούσα μελέτη, οι: rs1052551 και rs1052553, οι οποίες βρίσκονται σε πλήρη ανισορροπία σύνδεσης ($r^2 = 1$) με τους *MAPT* H1/H2 απλότυπους και περιλαμβάνονται και στις 6 διαφορετικές ισομορφές του γονιδίου *MAPT* στον ανθρώπινο εγκέφαλο [178]. Ο Myers και οι συνεργάτες του χρησιμοποιώντας μέθοδο βασισμένη σε PCR για την παραλλαγή rs17652121 υπολόγισαν μια αύξηση της τάξης του 11-13 % στην συνολική έκφραση του γονιδίου και μια 25 % αύξηση σε 4R ισομορφές του *MAPT* σε H1c ετεροζυγώτες, συμπεριλαμβανομένων Alzheimer περιπτώσεων [162]. Ο Caffrey χρησιμοποίησε τις παραλλαγές rs1052553 και rs17652121 για προσδιορισμό της έκφρασης του απλοτύπου όσον αφορά το εξώνιο 10 (4R) [148]. Η παραλλαγή rs1800547, αναφέρεται στη μελέτη των Lai et al., οι οποίοι προσπάθησαν να προσδιορίσουν τις ακριβείς λειτουργίες κάποιων παραλλαγών, στην συμπερίληψη του εξωνίου 3 και κατέληξαν ότι οι πολυμορφισμοί αυτοί σχετίζονται με διαφορές στην έκφραση γονιδίων και στο εναλλακτικό μάτισμα. Οι πολυμορφισμοί αυτοί ως SNPs αλληλουχίες στους απλότυπους H1 και H2 προβλέπεται και ότι συνδέονται με διαφορετικούς παράγοντες ματίσματος [137]. Στην μελέτη των Trabzuni et al., η επιλογή των ατόμων με την H1/H1 κατάσταση βασίστηκε στους πολυμορφισμούς με rs1800547 και rs1052553.

Μελλοντικό στόχο αποτελεί η κλινική αξιολόγηση του ευρήματος του H1 απλοτύπου στο 50% των FTD Ελλήνων ασθενών καθώς και η μελέτη περισσότερων δειγμάτων για να αποκαλυφθεί επακριβώς η σημασία και ο ρόλος του απλοτύπου H1 στην ανάπτυξη FTD ή στην ανάπτυξη υποτύπων της νόσου (π.χ. PSP και CBD) ή άλλων κλινικών εκφάνσεων της νόσου (ψυχιατρικά προβλήματα κτλ.). Τέλος, θα πρέπει να διερευνηθεί η ερώτηση: οδηγεί ο απλότυπος από μόνος

του σε υπότυπο της νόσου ή μήπως αυτές οι «αθώες» παραλλαγές σηματοδοτούν κάποια άλλη παραλλαγή (tag-SNP), που ευθύνεται για τη νόσο;

5.2. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΕΠΑΛΗΘΕΥΣΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΜΕΤΡΗΣΗΣ ΒΙΟΔΕΙΚΤΩΝ ΣΕ ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΥΓΡΑ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΑΝΟΙΕΣ

Η διάγνωση των νευροεκφυλιστικών ανοιών έως πρόσφατα βασιζόταν στο ιατρικό ιστορικό, την κλινική εξέταση και τις νευροψυχολογικές δοκιμασίες. Στη συνέχεια, δημιουργήθηκε η ανάγκη για την καθιέρωση βιοδεικτών με σκοπό την συσχέτιση των παθοφυσιολογικών αλλαγών με την κλινική εικόνα των ασθενών. Οι βιοδείκτες αυτοί εντοπίζονται στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό, το οποίο αποτελεί το μέσο πληροφόρησης για τις δυσλειτουργίες του εγκεφάλου.

Οι κυριότεροι καθιερωμένοι βιοδείκτες στο ENY είναι το αβ42, η ολική πρωτεΐνη tau και η φωσφορυλιωμένη μορφή της, και κυρίως η p-tau181. Οι βιοδείκτες αυτοί χρησιμοποιούνται ευρέως στην επιβεβαίωση και διαφοροδιάγνωση της AD από άλλες άνοιες (FTD, LBD κ.λπ). Αυξημένα επίπεδα της ολικής πρωτεΐνης tau και p-tau181 αλλά και μειωμένα επίπεδα του αβ42, αντικατοπτρίζουν την δημιουργία και εναπόθεση αμυλοειδικών πλακών στη νόσο Alzheimer. Ιδιαίτερα μειωμένα επίπεδα ολικής tau πρωτεΐνης αλλά και φωσφορυλιωμένης tau χαρακτηρίζουν τον υδροκέφαλο, καθώς επίσης υπερβολικά αυξημένη ολική tau πρωτεΐνη αλλά όχι αντίστοιχη αύξηση της p-tau181, είναι η ένδειξη της νόσου Creutzfeldt-Jacob. Όσον αφορά την άνοια με σωμάτια Lewy, δεν παρατηρείται αύξηση της p-tau, αλλά χρειάζεται μια επιπλέον εξέταση, η α-συνουκλεΐνη, η οποία είναι μειωμένη. Η ορθή ταξινόμηση της νόσου, είναι ιδιαίτερα χρήσιμη στη σωστή επιλογή θεραπείας. Η θεραπεία αυτή δεν απευθύνεται στην ίαση της ασθένειας αλλά στην επιλογή ορθής θεραπείας (π.χ. αποφυγή αναστολέων χολινεστεράσης -δονεπεξίλη (Aricept) / ριβαστιγμίνη (Exelon)- στους FTD ασθενείς) με αποτέλεσμα την ανακούφιση της συμπτωματολογίας, η οποία σταδιακά θα οδηγήσει στην βραδύτερη εξέλιξη της νόσου. Στο μέλλον, η ανάλυση των βιοδεικτών στο ENY σε συνδυασμό με γενετικές αναλύσεις (π.χ. APOE γονοτύπηση) θα χρησιμοποιείται για επιλογή κατάλληλων ατόμων με ήπια γνωσιακή εξασθένηση προς αποφυγή της άνοιας στη συνέχεια. Μια ακόμα δυνατότητα για τον προσδιορισμό ατόμων με άνοια, αποτελούν οι απεικονιστικές μέθοδοι, όπως είναι το PET του β-αμυλοειδούς και πιο πρόσφατα το PET της ολικής tau πρωτεΐνης. Αυτού του είδους οι

μέθοδοι όμως έχουν πολύ υψηλό κόστος και πραγματοποιούνται αποκλειστικά σε εξειδικευμένα κέντρα (όχι ακόμα στην Ελλάδα). Για αυτό μέχρι σήμερα, η μέθοδος της ανάλυσης βιοδεικτών στο ENY αποτελεί την καλύτερη μέθοδο για τη διαφοροδιάγνωση ατόμων με άνοια, και στόχο αποτελεί η μετατόπιση της ανάλυσης αυτής στο πλάσμα, όπου θα υπάρχει η δυνατότητα ανώδυνης λήψης βιολογικού υγρού, πιο γρήγορα και με λιγότερο κόστος, από ότι με το ENY.

Στην παρούσα μελέτη, σκοπό αποτέλεσε η αναλυτική επαλήθευση νέας αυτοματοποιημένης μεθόδου, στον αναλυτή Elecsys της Roche για τη μέτρηση των βιοδεικτών στο ENY (αβ42, ολική tau, p-tau181) μέσω σύγκρισης αποτελεσμάτων ανοϊκών ασθενών με την καθιερωμένη χειροκίνητη μέθοδο ELISA της Fujirebio και αξιολόγησης των αναλυτικών χαρακτηριστικών επίδοσης όπως η ορθότητα και η πιστότητα μιας μεθόδου.

Η μελέτη αυτή περιέλαβε μια ομάδα ασθενών, που παραπέμφθηκαν για ανάλυση βιοδεικτών στο ENY και των οποίων τα πλήρη κλινικά στοιχεία έχουν συλλεχθεί από την Β' Πανεπιστημιακή Νευρολογική Κλινική του ΕΚΠΑ στο Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Αττικών με υπεύθυνους είτε τον Καθηγητή κ. Παπαγεωργίου Σωκράτη είτε τον Καθηγητή κ. Παρασκευά Γεώργιο. Τα δείγματα αυτά, υποβλήθηκαν παράλληλα σε μέτρηση βιοδεικτών, στον αυτόματο αναλυτή Elecsys της Roche και στη μέθοδο ρουτίνας του εργαστηρίου ELISA της Fujirebio.

Ακολουθήθηκαν οι ορθές προαναλυτικές διαδικασίες και έπειτα από παραλαβή του ENY από τις νευρολογικές κλινικές το δείγμα φυγοκεντρούταν άμεσα, γινόταν μεταφορά του υπερκειμένου σε ειδικό σωληνάριο πολυπροπυλενίου και έπειτα φυλασσόταν στην κατάψυξη στους -20 °C ή στους -40 °C, μέχρι την ημέρα της επεξεργασίας του, όπου τότε το δείγμα αναλύοταν με τις δύο μεθόδους προς μέτρηση των παραπάνω βιοδεικτών. Το σωληνάριο πολυπροπυλενίου είναι ειδικό ώστε να αποφευχθεί η κατακράτηση του «κολλώδους» αμυλοειδούς πεπτιδίου που παρατηρείται σε άλλου τύπου σωληνάρια (π.χ. υάλινα πολυπροπυλενίου), υπεύθυνα για ψευδώς μειωμένα θετικά αποτελέσματα για AD.

Οι νέες μέθοδοι αξιολογήθηκαν με βάση την ακρίβεια (accuracy) με τις δύο συνιστώσες, την πιστότητα (precision) και την ορθότητα (trueness), σύμφωνα με το ISO15189 πρότυπο για τα

κλινικά εργαστήρια. Για τον έλεγχο της πιστότητας υπολογίστηκε η επαναληψιμότητα και η αναπαραγωγιμότητα, ενώ για την ορθότητα (trueness) η ανάκτηση, ο εξωτερικός έλεγχος ποιότητας και η μεροληψία (bias). Τέλος, με σύγκριση μεθόδων μεταξύ Roche / Fujirebio και αξιολόγηση των εξισώσεων που τις συνδέουν, εφόσον οι τιμές συσχετίζονται.

Η επαναληψιμότητα σε δείγμα ασθενούς και για τις τρεις παραμέτρους αβ42, ολική tau και p-tau181 κρίνεται άριστη, καθώς το %CV έλαβε τιμές 1,96 %, 0,65 % και 0,18 % αντίστοιχα.

Η αναπαραγωγιμότητα ελέγχθηκε με τα συνθετικά δείγματα ελέγχου (controls) δύο επιπέδων: low και high, στις ίδιες εργαστηριακές συνθήκες και χρονικό διάστημα. Από αυτά λαμβάνουμε αποτελέσματα για το αβ42, 4,4 % (L) και 2,8 % (H), για την ολική tau, 3,4 % (L) και 1,9 % (H), και τέλος για την p-tau181, 0,88 % (L) και 11,35 % (H). Σε όλες τις περιπτώσεις τα αποτελέσματα κρίθηκαν αναπαραγώγιμα (% CV<10-15 % κρίνεται ικανοποιητικό για ανοσοχημική μέθοδο).

Επιπλέον, τα πειράματα ανάκτησης αποτελούν έναν τρόπο ελέγχου της ορθότητας της μεθόδου, καθώς προτείνεται η ανάμειξη ενός «πραγματικού» δείγματος με ένα «συνθετικό». Έτσι αξιολογείται και το υπόστρωμα των δειγμάτων ελέγχου, δηλαδή η μήτρα (matrix). Εάν είναι εναλλάξιμα (commutable), συμπεριφέρονται με τον ίδιο τρόπο. Για τον υπολογισμό της ανάκτησης, πραγματοποιήθηκε ανάμειξη 1:1 του δείγματος ασθενούς που είχε χρησιμοποιηθεί για τη μέτρηση της επαναληψιμότητας και του υψηλού calibrator για κάθε μία από τις παραμέτρους. Συγκεκριμένα, για το αβ42, το ποσοστό της ανάκτησης ήταν 102,51 %, για την ολική tau ήταν 94,30 % και για την p-tau181 77,63 %. Είναι εμφανές ότι η ανάκτηση είναι άριστη για τα αβ42, πολύ καλή για την ολική tau και οριακή για την p-tau181 παράμετρο (άριστη: 95-105 %, πολύ καλή: 90-110 % και οριακή: 80-120 %).

Η μεροληψία (bias), είναι δείκτης του συστηματικού σφάλματος μιας σειράς μετρήσεων, καθώς μας αποκαλύπτει τη διαφορά των μετρήσεών μας από την αληθή τιμή. Στην συγκεκριμένα εργασία, η μεροληψία παίρνει τιμές 4,3 % (L) και 5,8 % (H) για το αβ42, -4,4 % (L) και 0,4 % (H) για την ολική tau πρωτεΐνη και 1,4 % (L) και -9,1 % (H) για την p-tau181. Όπως φαίνεται από τις προηγούμενες μετρήσεις, η μεροληψία παρουσιάζεται αρκετά ικανοποιητική (<10 %).

Αναφορικά με τη στατιστική ανάλυση των τριών παραμέτρων στις δύο διαφορετικές μεθοδολογίες, αρχικά αξιολογήθηκε η κατανομή τους και η συσχέτισή τους ανά δύο. Όσον αφορά τη συσχέτιση των παραμέτρων, οι $\alpha\beta 42_{\text{Roche}}$ και $\alpha\beta 42_{\text{Fuji}}$, οι οποίες ακολουθούν κανονική κατανομή παρουσιάζουν συντελεστή συσχέτισης $r=0,912$. Οι $\text{tau}_{\text{Fuji}} - \text{tau}_{\text{Roche}}$ και οι $p\text{-tau}_{181\text{Fuji}} - p\text{-tau}_{181\text{Roche}}$, δεν παρουσιάζουν κανονική κατανομή και συσχετίζονται με τον συντελεστή rho κατά Spearman με τιμές $\rho=0,869$ και $\rho=0,928$ αντίστοιχα.

Από τη γραμμική παλινδρόμηση των σχετιζόμενων παραμέτρων προκύπτουν οι ακόλουθες εξισώσεις: $\alpha\beta 42_{\text{Roche}} = 1,18\alpha\beta 42_{\text{Fuji}} - 94$, $\text{tau}_{\text{Roche}} = 0,65\text{tau}_{\text{Fuji}} + 7$ και $p\text{-tau}_{181\text{Roche}} = 0,56p\text{-tau}_{181\text{Fuji}} - 9$. Όσον αφορά το $\alpha\beta 42$, οι δύο μέθοδοι κρίνονται σχετιζόμενες και ισοδύναμες, καθώς η κλίση δεν διαφέρει στατιστικά από το 1 και η διατομή από το 0 (σύμφωνα με το 95 % διάστημα εμπιστοσύνης) ενώ για τις δύο άλλες παραμέτρους (ολική tau, $p\text{-tau}_{181}$) οι δύο μέθοδοι σχετίζονται αλλά δεν ισοδυναμούν καθώς οι Roche μέθοδοι δίνουν χαμηλότερες τιμές στο $\approx 65\%$ και 55% των τιμών Fujirebio για την ολική tau και $p\text{-tau}$ αντίστοιχα. Αυτό διακρίνεται και από τις τιμές cut-off των δύο μεθόδων. Όσον αφορά την ολική tau πρωτεΐνη για τις δύο μεθόδους οι τιμές αυτές είναι κοντινές (Fujirebio 375 pg/mL και για τη Roche 300 pg/mL). Όμως, τόσο για την $p\text{-tau}_{181}$, οι τιμές στην Roche είναι σχεδόν οι μισές από εκείνες της Fujirebio (Fujirebio: 52 pg/mL, Roche: 27 pg/mL), όσο για το β-αμυλοειδές πεπτίδιο που οι τιμές της Roche είναι σχεδόν διπλάσιες από εκείνες της Fujirebio (Fujirebio: 550 pg/mL, Roche: 1000 pg/mL). Για αυτό η συμφωνία (concordance) και στο εργαστήριό μας για τις δύο αυτές μεθόδους παρατηρείται άριστη (96%) για την ολική tau πρωτεΐνη, μέτρια για την $p\text{-tau}_{181}$ (81%) και χαμηλότερη για το β-αμυλοειδές πεπτίδιο (70%). Με σκοπό τη βελτίωση της συμφωνίας στις δύο μεθόδους, θα πρέπει οι τιμές cut-off της νέας μεθόδου Roche ή της Fujirebio να εναρμονιστούν με το πρότυπο υλικό της IFCC που αυτή τη στιγμή υπάρχει μόνο για το β-αμυλοειδές. Τη στιγμή όπου η Roche παρουσιάζει ως τιμή cut-off του $\alpha\beta 42$ το 800 pg/ml, η συμφωνία των δύο μεθόδων εμφανίζεται να είναι 70 %. Εάν η τιμή του cut-off προσαρμοζόταν για να ομοιάζει με εκείνη της Fujirebio (550 pg/ml) η συμφωνία θα αυξανόταν στο 80 %, κάτι που θα βοηθούσε περισσότερο στη σύγκριση των δύο αυτών μεθόδων.

Ένας αξιόπιστος τρόπος ελέγχου της ορθότητας της μεθόδου, είναι ο εξωτερικός έλεγχος ποιότητας. Ο διεργαστηριακός εξωτερικός έλεγχος ποιότητας INSTAND και για τους τρεις βιοδείκτες ήταν σχετικά ικανοποιητικός. Συγκεκριμένα, κοιτάζοντας τα raw δεδομένα,

παρατηρείται ότι ο μεγαλύτερος αριθμός εργαστηρίων χρησιμοποιούν τις μεθόδους των Fujirebio και της Euroimmun, με πολύ μικρότερο αριθμό εργαστηρίων να συμμετέχουν σε διεργαστηριακό έλεγχο με άλλη μέθοδο (π.χ. Roche). Επομένως η σύγκριση EQA, δεν θεωρείται απόλυτα αξιόπιστη, καθώς όλα τα δείγματα βρίσκονται κάτω από μια ομπρέλα όμοιων τιμών αναφοράς, ανεξάρτητα με το ποια μέθοδο χρησιμοποιούν. Μελλοντικά, θα μπορούσαν να λαμβάνουν μέρος στον εξωτερικό έλεγχο ποιότητας όλο και περισσότερα εργαστήρια που αναλύουν βιοδείκτες με τη μέθοδο της Roche, για να υπάρχει καλύτερη σύγκριση κάτω από ίδιες συνθήκες. Για το αμυλοειδές η συμμετοχή κρίθηκε πολύ επιτυχημένη παρόλο που η εταιρεία δεν έχει τις ίδιες τιμές αναφοράς, καθώς όπως αποδείχθηκε οι δύο μέθοδοι δίνουν ισοδύναμα αποτελέσματα. Όσον αφορά την ολική tau πρωτεΐνη και την p-tau181, τα αποτελέσματα του διεργαστηριακού ελέγχου φαίνεται να βρίσκονται εκτός ορίων διότι οι συμμετοχές εργαστηρίων με τη συγκεκριμένη μέθοδο ήταν μικρότερες από 10 και συγκεκριμένα για την p-tau < 5. Και λόγω του μικρού αριθμού δειγμάτων, δεν υπάρχει ενιαία ομάδα ομοειδούς μεθόδου. Όσα δείγματα και αν συμπεριλαμβάνονταν στο διεργαστηριακό έλεγχο ποιότητας, αφού δεν υπάρχει κοινή πορεία από όλες τις εν χρήση μεθόδους, τα αποτελέσματα θα ήταν εκτός ορίων. Συνοψίζοντας, η βελτιστοποίηση των τιμών αναφοράς της Roche, άμεσα για το αμυλοειδές β πεπτίδιο καθώς και η συνεχώς αυξανόμενη συμμετοχή εργαστηρίων στον διεργαστηριακό έλεγχο ποιότητας με τη μέθοδο της Roche, θα οδηγήσει σε πιο αξιόπιστη η αξιολόγηση της επίδοσης των νέων μεθόδων και του εργαστηρίου.

Η αυτοματοποίηση έχει διεισδύσει στην καθημερινότητα σε όλους τους τομείς και βοηθάει στην βελτίωση της ποιότητας των εργαστηριακών αναλύσεων, βελτιώνοντας την πιστότητα, τον χρόνο turnaround time και στο τέλος, το κόστος όλων των σχετικών αναλύσεων.

Οι δύο μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν από το εργαστήριο παρουσιάζουν τόσο πλεονεκτήματα, όσο και μειονεκτήματα.

Όσον αφορά τη μέθοδο της Roche, η αυτοματοποίηση και η ταχύτητα αποτελούν τα μεγαλύτερα προσόντα της. Τα εργαστήρια σήμερα διαθέτουν κυρίως αυτοματοποιημένους αναλυτές, με σκοπό την άμεση και ταχεία εκτέλεση των αναλύσεών τους και η ένταξη χειροκίνητων μεθόδων όπως η ELISA, όσο ακριβής και αν είναι, είναι δύσκολη στη ρουτίνα του εργαστηρίου. Στην ELISA το αποτέλεσμα λαμβάνεται έπειτα από 2 ημέρες συνολικά ενώ στον αυτοματοποιημένο αναλυτή σε 20 λεπτά περίπου. Στον αναλυτή, χρησιμοποιώντας το ίδιο

σωληνάριο μπορούν να πραγματοποιηθούν και οι τρεις αναλύσεις ταυτόχρονα, με το ίδιο ακριβές και σωστά συντηρημένο probe ($50 \times 3 = 150$ μl δείγμα). Στην ELISA, χρειάζονται τρία διαφορετικά plate ένα για την κάθε παράμετρο (125 μl δείγματος συνολικά και για τα τρία). Τα δείγματα όμως τοποθετούνται εις διπλούν στα φρεάτια με σκοπό τον υπολογισμό του συντελεστή διακύμανσης και την επιβεβαίωση του αποτελέσματος. Στο σημείο αυτό υπάρχει και ο ανθρώπινος παράγοντας. Δεν δουλεύει χρησιμοποιώντας ένα ακριβές probe, το οποίο είναι ρυθμισμένο να πάρει μια συγκεκριμένη ποσότητα δείγματος και πιστοποιημένα παίρνει πάντα την ίδια. Το ανθρώπινο χέρι, το οποίο μπορεί να χρησιμοποιεί μια διακριβωμένη πιπέτα ακριβείας, ωστόσο σίγουρα θα έχει κάποιο ποσοστό μεταβλητότητας και λάθους. Επίσης, η θερμοκρασία είναι ένας παράγοντας που συνεχώς μεταβάλλεται. Στον αυτόματο αναλυτή, διατηρούνται σταθερές οι συνθήκες κατά τη διάρκεια της ανάλυσης (~20 λεπτά), ενώ στην ELISA είναι πιο δύσκολο να διατηρηθεί π.χ. η θερμοκρασία του χώρου σταθερή και για τις 16-20 ώρες της επώασης.

Από την άλλη πλευρά, με σκοπό την επαλήθευση της αναπαραγωγιμότητας της μεθόδου στον αυτόματο αναλυτή καθώς και τον έλεγχο της αβεβαιότητας, απαιτείται μεγάλο χρονικό διάστημα, μεγαλύτερο από αυτό των 6 μηνών. Σε αυτό το διάστημα, θα πρέπει να έχει αναλυθεί ένας εξαιρετικά μεγάλος αριθμός δειγμάτων, κάτω από διαφορετικές συνθήκες του μηχανήματος π.χ. διαφορετικές παρτίδες αντιδραστηρίων και διαφορετικοί χειριστές.

Με σκοπό να καθιερωθεί η νέα μέθοδος στην ανάλυση των αποτελεσμάτων, να ελαχιστοποιηθούν τα σφάλματα και να αυξηθεί η ακρίβειά της για τις παραμέτρους αυτές κρίνεται απαραίτητο, να εναρμονιστούν οι τιμές αναφοράς της με εκείνες των πρότυπων μεθόδων αναφοράς ή ακόμα και να τροποποιηθούν ήδη υπάρχουσες μέθοδοι. Συγκεκριμένα, δεν δύναται η Roche να έχει το διπλάσιο εύρος τιμών αναφοράς για τη μέτρηση π.χ. του β-αμυλοειδούς πεπτιδίου σε σχέση με τη Fujirebio, ενώ οι μέθοδοι κρίθηκαν στατιστικά ισοδύναμες. Αποτέλεσμα είναι η ασυμφωνία των δύο μεθόδων σε μεγάλο βαθμό.

Ο έλεγχος του αναλυτή για τις προς μέτρηση παραμέτρους με τη χρήση πιστοποιημένων υλικών αναφοράς αποτελεί βασική προϋπόθεση για την αξιοπιστία της μέτρησης. Μέχρι σήμερα, τέτοιο πιστοποιημένο υλικό αναφοράς υπάρχει μόνο για το β-αμυλοειδές πεπτίδιο (NIST 2389a), ενώ για την ολική tau πρωτεΐνη και την φωσφορυλιωμένη tau υπάρχουν επιτροπές της IFCC που προσπαθούν για την επίτευξη αυτού του στόχου. Συνεπώς, καλό θα

ήταν μελλοντικά να υπάρξουν πιστοποιημένα υλικά αναφοράς για έλεγχο όλων των παραμέτρων στις αυτοματοποιημένες πλατφόρμες και να εναρμονιστούν όλοι οι κατασκευαστές με αυτά, σύμφωνα με τον IVD κανονισμό (2017/746 EU).

Ένας από τους σημαντικότερους παράγοντες που καθορίζουν την ακριβή ανάλυση είναι η πιστή εφαρμογή των προαναλυτικών διαδικασιών και των SOPs. Η σωστή συντήρηση του εκάστοτε μηχανήματος, η τήρηση σταθερών περιβαλλοντικών συνθηκών και κανόνων υγιεινής, ο συχνός και επιτυχημένος εσωτερικός έλεγχος ποιότητας και η βαθμονόμηση πριν την χρήση και όποτε απαιτείται είναι μερικά από τα καθιερωμένα καθήκοντα προτού τοποθετηθεί ένα δείγμα για μέτρηση σε έναν αναλυτή. Το δείγμα θα πρέπει να έχει συλλεχθεί και μεταφερθεί με συγκεκριμένο τρόπο στον χώρο ανάλυσης, οι χρόνοι αναμονής του να είναι συγκεκριμένοι και οι συνθήκες διατήρησής του καθορισμένες.

Επιπλέον, την ορθότητα μιας μεθόδου την επικυρώνει και η συμμετοχή της σε διεργαστηριακό έλεγχο ποιότητας EQA, όπως είναι το Instand. Με αυτό τον τρόπο το εργαστήριο θα ενημερωθεί για συστηματικά σφάλματα που προκύπτουν από τη μέθοδο αυτή και θα συγκριθεί με άλλα εργαστήρια. Στόχος είναι η συνεχής παρακολούθηση της εξέλιξης του εργαστηρίου, η συνεχής βελτίωση της ακρίβειας της μεθόδου και η μείωση της αβεβαιότητας της μέτρησης.

Και στις δύο περιπτώσεις (αυτοματοποίηση της Roche και χειροκίνητη της Fujirebio), απαραίτητη κρίνεται η συμβολή της κλινικής επαλήθευσης των αποτελεσμάτων. Η τιμή που θα πάρει ο βιοδείκτης που αναλύθηκε στο εργαστήριο θα πρέπει να συγκριθεί και να ταυτοποιηθεί με την κλινική εικόνα που έχει ο αντίστοιχος ιατρός από τον εκάστοτε ασθενή. Το αποτέλεσμα είναι ένας συνδυασμός της ανοσοχημικής ανάλυσης του εργαστηρίου και της κλινικής επαλήθευσης από τον ιατρό. Η ανάλυση περισσότερων δειγμάτων σε βάθος χρόνου και η κλινική τους αξιολόγηση, εφόσον οι μέθοδοι αποδειχθούν διαγνωστικά ευαίσθητες και ειδικές, θα βοηθήσει στην περαιτέρω εξάπλωσή τους λόγω της αυτόματης και γρήγορης λήψης αποτελέσματος και της ευκολότερης χρήσης τους σε αναλυτές που ήδη υπάρχουν στα κλινικά εργαστήρια.

Οι πρόσφατες αξιοσημείωτες εξελίξεις στην κατανόηση της παθοφυσιολογίας, της γενετικής και της νευροπαθολογίας των ανοιτών οδηγούν σταδιακά στην ανάπτυξη θεραπειών που μπορούν να τροποποιήσουν τη νόσο. Στην πραγματικότητα, η στόχευση πιθανών επικείμενων

μηχανισμών είναι υποχρεωτική για να δικαιολογηθεί η ελπίδα για τροποποιητικές επιδράσεις της νόσου.

Μελλοντικό στόχο αποτελεί, η προσπάθεια ενσωμάτωσης της ανάλυσης βιοδεικτών στο πλάσμα και όχι πια στο ΕΝΥ, καθώς αποτελεί μια επεμβατική μέθοδο και είναι χρονοβόρα και επίπονη για τους ασθενείς με κάποιες πιθανές παρενέργειες (πονοκέφαλος, αιμορραγία κ.λπ). Τα συμπεράσματα από τις αυτοματοποιημένες αναλύσεις των βιοδεικτών στο ΕΝΥ θα αποτελέσουν φάρο στο μέλλον και για τις αντίστοιχες αναλύσεις στο πλάσμα όπου αναμένεται να τύχουν ευρείας εφαρμογής σε μεγάλο αριθμό ενδιαφερόμενων για έγκαιρη διάγνωση και πρόληψη με τα νέα (θεραπευτικά πλέον) σχήματα.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] Coppede F, Mancuso M, Siciliano G, Migliore L, Murri L. Genes and the environment in neurodegeneration. *Biosci Rep* 2006;26: 341-67.
- [2] Brown RC, Lockwood AH, Sonawane BR. Neurodegenerative diseases: an overview of environmental risk factors. *Environ Health Perspect* 2005;113: 1250-6.
- [3] Mok W, Chow TW, Zheng L, Mack WJ, Miller C. Clinicopathological concordance of dementia diagnoses by community versus tertiary care clinicians. *Am J Alzheimers Dis Other Dement* 2004;19: 161-5.
- [4] Reitz C, Mayeux R. Alzheimer disease: epidemiology, diagnostic criteria, risk factors and biomarkers. *Biochem Pharmacol* 2014;88: 640-51.
- [5] van der Beek EM, Kamphuis PJ. The potential role of nutritional components in the management of Alzheimer's Disease. *Eur J Pharmacol* 2008;585: 197-207.
- [6] Serrano-Pozo A, Frosch MP, Masliah E, Hyman BT. Neuropathological alterations in Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2011;1: a006189.
- [7] Priller C, Bauer T, Mitteregger G, et al. Synapse formation and function is modulated by the amyloid precursor protein. *J Neurosci* 2006;26: 7212-21.
- [8] Demuro A, Parker I, Stutzmann GE. Calcium signaling and amyloid toxicity in Alzheimer disease. *J Biol Chem* 2010;285: 12463-8.
- [9] Kumar-Singh S. Progranulin and TDP-43: mechanistic links and future directions. *J Mol Neurosci* 2011;45: 561-73.
- [10] Selkoe DJ. Cell biology of the amyloid beta-protein precursor and the mechanism of Alzheimer's disease. *Annu Rev Cell Biol* 1994;10: 373-403.
- [11] Cai Y, An SS, Kim S. Mutations in presenilin 2 and its implications in Alzheimer's disease and other dementia-associated disorders. *Clin Interv Aging* 2015;10: 1163-72.
- [12] Williamson J, Goldman J, Marder KS. Genetic aspects of Alzheimer disease. *Neurologist* 2009;15: 80-6.
- [13] Serrano-Pozo A, Qian J, Monsell SE, Betensky RA, Hyman BT. APOEepsilon2 is associated with milder clinical and pathological Alzheimer disease. *Ann Neurol* 2015;77: 917-29.
- [14] Papastefanopoulou V, Stanitsa E, Koros C, et al. APOE Allele Frequency in Southern Greece: Exploring the Role of Geographical Gradient in the Greek Population. *Geriatrics (Basel)* 2022;8.
- [15] Le B, I, van der Zee J, Hannequin D, et al. Progranulin null mutations in both sporadic and familial frontotemporal dementia. *Hum Mutat* 2007;28: 846-55.
- [16] Rademakers R, Neumann M, Mackenzie IR. Advances in understanding the molecular basis of frontotemporal dementia. *Nat Rev Neurol* 2012;8: 423-34.
- [17] Kleinberger G, Capell A, Brouwers N, et al. Reduced secretion and altered proteolytic processing caused by missense mutations in progranulin. *Neurobiol Aging* 2016;39: 220-6.
- [18] Mohandas E, Rajmohan V. Frontotemporal dementia: An updated overview. *Indian J Psychiatry* 2009;51 Suppl 1: S65-S69.
- [19] Benussi A, Padovani A, Borroni B. Phenotypic Heterogeneity of Monogenic Frontotemporal Dementia. *Front Aging Neurosci* 2015;7: 171.

- [20] Lee SE, Tartaglia MC, Yener G, et al. Neurodegenerative disease phenotypes in carriers of MAPT p.A152T, a risk factor for frontotemporal dementia spectrum disorders and Alzheimer disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 2013;27: 302-9.
- [21] Takada LT. The Genetics of Monogenic Frontotemporal Dementia. *Dementia & Neuropsychologia* 2015;9: 219-29.
- [22] Rohrer JD, Guerreiro R, Vandrovcova J, et al. The heritability and genetics of frontotemporal lobar degeneration. *Neurology* 2009;73: 1451-6.
- [23] Goldman JS, Farmer JM, Van Deerlin VM, et al. Frontotemporal dementia: genetics and genetic counseling dilemmas. *Neurologist* 2004;10: 227-34.
- [24] Goedert M, Ghetti B, Spillantini MG. Frontotemporal dementia: implications for understanding Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2012;2: a006254.
- [25] Kertesz A, McMonagle P, Blair M, Davidson W, Munoz DG. The evolution and pathology of frontotemporal dementia. *Brain* 2005;128: 1996-2005.
- [26] Josephs KA. Frontotemporal dementia and related disorders: deciphering the enigma. *Ann Neurol* 2008;64: 4-14.
- [27] Josephs KA, Lin WL, Ahmed Z, et al. Frontotemporal lobar degeneration with ubiquitin-positive, but TDP-43-negative inclusions. *Acta Neuropathol* 2008;116: 159-67.
- [28] Lomen-Hoerth C, Anderson T, Miller B. The overlap of amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia. *Neurology* 2002;59: 1077-9.
- [29] Ghetti B, Oblak AL, Boeve BF, et al. Invited review: Frontotemporal dementia caused by microtubule-associated protein tau gene (MAPT) mutations: a chameleon for neuropathology and neuroimaging. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2015;41: 24-46.
- [30] Piguet O, Hornberger M, Mioshi E, Hodges JR. Behavioural-variant frontotemporal dementia: diagnosis, clinical staging, and management. *Lancet Neurol* 2011;10: 162-72.
- [31] Pressman PS, Miller BL. Diagnosis and management of behavioral variant frontotemporal dementia. *Biol Psychiatry* 2014;75: 574-81.
- [32] Fletcher PD, Warren JD. Semantic dementia: a specific network-opathy. *J Mol Neurosci* 2011;45: 629-36.
- [33] Gorno-Tempini ML, Brambati SM, Ginex V, et al. The logopenic/phonological variant of primary progressive aphasia. *Neurology* 2008;71: 1227-34.
- [34] Hodges JR, Davies R, Xuereb J, Kril J, Halliday G. Survival in frontotemporal dementia. *Neurology* 2003;61: 349-54.
- [35] Boeve BF, Hutton M. Refining frontotemporal dementia with parkinsonism linked to chromosome 17: introducing FTDP-17 (MAPT) and FTDP-17 (PGRN). *Arch Neurol* 2008;65: 460-4.
- [36] Gibb WR, Luthert PJ, Marsden CD. Corticobasal degeneration. *Brain* 1989;112 (Pt 5): 1171-92.
- [37] Agarwal S, Gilbert R. Progressive Supranuclear Palsy. 2024.
- [38] Kovacs GG. Molecular Pathological Classification of Neurodegenerative Diseases: Turning towards Precision Medicine. *Int J Mol Sci* 2016;17.

- [39] Josephs KA, Holton JL, Rossor MN, et al. Frontotemporal lobar degeneration and ubiquitin immunohistochemistry. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2004;30: 369-73.
- [40] Mackenzie IR, Neumann M, Bigio EH, et al. Nomenclature for neuropathologic subtypes of frontotemporal lobar degeneration: consensus recommendations. *Acta Neuropathol* 2009;117: 15-8.
- [41] Neumann M. Molecular neuropathology of TDP-43 proteinopathies. *Int J Mol Sci* 2009;10: 232-46.
- [42] Ferrari R, Hernandez DG, Nalls MA, et al. Frontotemporal dementia and its subtypes: a genome-wide association study. *Lancet Neurol* 2014;13: 686-99.
- [43] Rohrer JD, Rosen HJ. Neuroimaging in frontotemporal dementia. *Int Rev Psychiatry* 2013;25: 221-9.
- [44] Wang JZ, Gao X, Wang ZH. The physiology and pathology of microtubule-associated protein tau. *Essays Biochem* 2014;56: 111-23.
- [45] Bodea LG, Eckert A, Ittner LM, Piguet O, Gotz J. Tau physiology and pathomechanisms in frontotemporal lobar degeneration. *J Neurochem* 2016;138 Suppl 1: 71-94.
- [46] Iqbal K, Liu F, Gong CX, Alonso AC, Grundke-Iqbal I. Mechanisms of tau-induced neurodegeneration. *Acta Neuropathol* 2009;118: 53-69.
- [47] Gendron TF, Petrucelli L. The role of tau in neurodegeneration. *Mol Neurodegener* 2009;4: 13.
- [48] Mazanetz MP, Fischer PM. Untangling tau hyperphosphorylation in drug design for neurodegenerative diseases. *Nat Rev Drug Discov* 2007;6: 464-79.
- [49] Ballatore C, Lee VM, Trojanowski JQ. Tau-mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease and related disorders. *Nat Rev Neurosci* 2007;8: 663-72.
- [50] Mackenzie IR, Neumann M, Baborie A, et al. A harmonized classification system for FTLD-TDP pathology. *Acta Neuropathol* 2011;122: 111-3.
- [51] Kuo PH, Doudeva LG, Wang YT, Shen CK, Yuan HS. Structural insights into TDP-43 in nucleic-acid binding and domain interactions. *Nucleic Acids Res* 2009;37: 1799-808.
- [52] Afroz T, Perez-Berlanga M, Polymenidou M. Structural Transition, Function and Dysfunction of TDP-43 in Neurodegenerative Diseases. *Chimia (Aarau)* 2019;73: 380-90.
- [53] Polymenidou M, Lagier-Tourenne C, Hutt KR, et al. Misregulated RNA processing in amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Res* 2012;1462: 3-15.
- [54] Yang C, Tan W, Whittle C, et al. The C-terminal TDP-43 fragments have a high aggregation propensity and harm neurons by a dominant-negative mechanism. *PLoS One* 2010;5: e15878.
- [55] Zhang YJ, Xu YF, Cook C, et al. Aberrant cleavage of TDP-43 enhances aggregation and cellular toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106: 7607-12.
- [56] Mackenzie IR, Rademakers R, Neumann M. TDP-43 and FUS in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia. *Lancet Neurol* 2010;9: 995-1007.
- [57] Urwin H, Josephs KA, Rohrer JD, et al. FUS pathology defines the majority of tau- and TDP-43-negative frontotemporal lobar degeneration. *Acta Neuropathol* 2010;120: 33-41.
- [58] Mackenzie IR, Foti D, Woulfe J, Hurwitz TA. Atypical frontotemporal lobar degeneration with ubiquitin-positive, TDP-43-negative neuronal inclusions. *Brain* 2008;131: 1282-93.

- [59] Aman P, Panagopoulos I, Lassen C, et al. Expression patterns of the human sarcoma-associated genes FUS and EWS and the genomic structure of FUS. *Genomics* 1996;37: 1-8.
- [60] Andersson MK, Stahlberg A, Arvidsson Y, et al. The multifunctional FUS, EWS and TAF15 proto-oncoproteins show cell type-specific expression patterns and involvement in cell spreading and stress response. *BMC Cell Biol* 2008;9: 37.
- [61] Bertrand P, Akhmedov AT, Delacote F, Durrbach A, Lopez BS. Human POMp75 is identified as the proto-oncoprotein TLS/FUS: both POMp75 and POMp100 DNA homologous pairing activities are associated to cell proliferation. *Oncogene* 1999;18: 4515-21.
- [62] Yang L, Embree LJ, Tsai S, Hickstein DD. Oncoprotein TLS interacts with serine-arginine proteins involved in RNA splicing. *J Biol Chem* 1998;273: 27761-4.
- [63] Neumann M, Bentmann E, Dormann D, et al. FET proteins TAF15 and EWS are selective markers that distinguish FTLD with FUS pathology from amyotrophic lateral sclerosis with FUS mutations. *Brain* 2011;134: 2595-609.
- [64] Davidson YS, Robinson AC, Hu Q, et al. Nuclear carrier and RNA-binding proteins in frontotemporal lobar degeneration associated with fused in sarcoma (FUS) pathological changes. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2013;39: 157-65.
- [65] Bentmann E, Neumann M, Tahirovic S, et al. Requirements for stress granule recruitment of fused in sarcoma (FUS) and TAR DNA-binding protein of 43 kDa (TDP-43). *J Biol Chem* 2012;287: 23079-94.
- [66] Mackenzie IR, Neumann M. Molecular neuropathology of frontotemporal dementia: insights into disease mechanisms from postmortem studies. *J Neurochem* 2016;138 Suppl 1: 54-70.
- [67] Le B, I, Camuzat A, Guerreiro R, et al. SQSTM1 mutations in French patients with frontotemporal dementia or frontotemporal dementia with amyotrophic lateral sclerosis. *JAMA Neurol* 2013;70: 1403-10.
- [68] Mann DM, Rollinson S, Robinson A, et al. Dipeptide repeat proteins are present in the p62 positive inclusions in patients with frontotemporal lobar degeneration and motor neurone disease associated with expansions in C9ORF72. *Acta Neuropathol Commun* 2013;1: 68.
- [69] Mahoney CJ, Beck J, Rohrer JD, et al. Frontotemporal dementia with the C9ORF72 hexanucleotide repeat expansion: clinical, neuroanatomical and neuropathological features. *Brain* 2012;135: 736-50.
- [70] Komatsu M, Kageyama S, Ichimura Y. p62/SQSTM1/A170: physiology and pathology. *Pharmacol Res* 2012;66: 457-62.
- [71] Jackson KL, Lin WL, Miriyala S, et al. p62 Pathology Model in the Rat Substantia Nigra with Filamentous Inclusions and Progressive Neurodegeneration. *PLoS One* 2017;12: e0169291.
- [72] Moore KM, Nicholas J, Grossman M, et al. Age at symptom onset and death and disease duration in genetic frontotemporal dementia: an international retrospective cohort study. *Lancet Neurol* 2020;19: 145-56.
- [73] Cruts M, Theuns J, Van BC. Locus-specific mutation databases for neurodegenerative brain diseases. *Hum Mutat* 2012;33: 1340-4.
- [74] Andreadis A. Tau splicing and the intricacies of dementia. *J Cell Physiol* 2012;227: 1220-5.
- [75] Andreadis A. Tau gene alternative splicing: expression patterns, regulation and modulation of function in normal brain and neurodegenerative diseases. *Biochim Biophys Acta* 2005;1739: 91-103.
- [76] Ingram EM, Spillantini MG. Tau gene mutations: dissecting the pathogenesis of FTDP-17. *Trends Mol Med* 2002;8: 555-62.

- [77] Goedert M. Tau protein and neurodegeneration. *Semin Cell Dev Biol* 2004;15: 45-9.
- [78] Liu F, Gong CX. Tau exon 10 alternative splicing and tauopathies. *Mol Neurodegener* 2008;3: 8.
- [79] Colin M, Dujardin S, Schraen-Maschke S, et al. From the prion-like propagation hypothesis to therapeutic strategies of anti-tau immunotherapy. *Acta Neuropathol* 2020;139: 3-25.
- [80] Lapointe NE, Horowitz PM, Guillozet-Bongaarts AL, et al. Tau 6D and 6P isoforms inhibit polymerization of full-length tau in vitro. *Biochemistry* 2009;48: 12290-7.
- [81] Hutton M, Lendon CL, Rizzu P, et al. Association of missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17. *Nature* 1998;393: 702-5.
- [82] Spillantini MG, Goedert M. Tau protein pathology in neurodegenerative diseases. *Trends Neurosci* 1998;21: 428-33.
- [83] Iqbal K, Liu F, Gong CX. Tau and neurodegenerative disease: the story so far. *Nat Rev Neurol* 2016;12: 15-27.
- [84] Baker M, Litvan I, Houlden H, et al. Association of an extended haplotype in the tau gene with progressive supranuclear palsy. *Hum Mol Genet* 1999;8: 711-5.
- [85] Pittman AM, Myers AJ, Abou-Sleiman P, et al. Linkage disequilibrium fine mapping and haplotype association analysis of the tau gene in progressive supranuclear palsy and corticobasal degeneration. *J Med Genet* 2005;42: 837-46.
- [86] Llado A, Sanchez-Valle R, Rey MJ, et al. Clinicopathological and genetic correlates of frontotemporal lobar degeneration and corticobasal degeneration. *J Neurol* 2008;255: 488-94.
- [87] Petoukhov E, Fernando S, Mills F, et al. Activity-dependent secretion of progranulin from synapses. *J Cell Sci* 2013;126: 5412-21.
- [88] Chen-Plotkin AS, Xiao J, Geser F, et al. Brain progranulin expression in GRN-associated frontotemporal lobar degeneration. *Acta Neuropathol* 2010;119: 111-22.
- [89] Ahmed Z, Sheng H, Xu YF, et al. Accelerated lipofuscinosis and ubiquitination in granulin knockout mice suggest a role for progranulin in successful aging. *Am J Pathol* 2010;177: 311-24.
- [90] Yin F, Banerjee R, Thomas B, et al. Exaggerated inflammation, impaired host defense, and neuropathology in progranulin-deficient mice. *J Exp Med* 2010;207: 117-28.
- [91] Shankaran SS, Capell A, Hruscha AT, et al. Missense mutations in the progranulin gene linked to frontotemporal lobar degeneration with ubiquitin-immunoreactive inclusions reduce progranulin production and secretion. *J Biol Chem* 2008;283: 1744-53.
- [92] Daniel R, He Z, Carmichael KP, Halper J, Bateman A. Cellular localization of gene expression for progranulin. *J Histochem Cytochem* 2000;48: 999-1009.
- [93] Van DP, Van HA, Lambrechts D, et al. Progranulin functions as a neurotrophic factor to regulate neurite outgrowth and enhance neuronal survival. *J Cell Biol* 2008;181: 37-41.
- [94] Ward ME, Miller BL. Potential Mechanisms of Progranulin-deficient FTL. *J Mol Neurosci* 2011;45: 574-82.
- [95] Liao LM, Lallone RL, Seitz RS, et al. Identification of a human glioma-associated growth factor gene, granulin, using differential immuno-absorption. *Cancer Res* 2000;60: 1353-60.

- [96] Gros-Louis F, Gaspar C, Rouleau GA. Genetics of familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Biochim Biophys Acta* 2006;1762: 956-72.
- [97] Vance C, Al-Chalabi A, Ruddy D, et al. Familial amyotrophic lateral sclerosis with frontotemporal dementia is linked to a locus on chromosome 9p13.2-21.3. *Brain* 2006;129: 868-76.
- [98] DeJesus-Hernandez M, Mackenzie IR, Boeve BF, et al. Expanded GGGGCC hexanucleotide repeat in noncoding region of C9ORF72 causes chromosome 9p-linked FTD and ALS. *Neuron* 2011;72: 245-56.
- [99] Fratta P, Mizielinska S, Nicoll AJ, et al. C9orf72 hexanucleotide repeat associated with amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia forms RNA G-quadruplexes. *Sci Rep* 2012;2: 1016.
- [100] Goldman JS. New Approaches to Genetic Counseling and Testing for Alzheimer β TMs Disease and Frontotemporal Degeneration. *Curr Neurol Neurosci Rep* 2012;12: 502-10.
- [101] Fratta P, Poulter M, Lashley T, et al. Homozygosity for the C9orf72 GGGGCC repeat expansion in frontotemporal dementia. *Acta Neuropathol* 2013;126: 401-9.
- [102] Webster CP, Smith EF, Bauer CS, et al. The C9orf72 protein interacts with Rab1a and the ULK1 complex to regulate initiation of autophagy. *EMBO J* 2016;35: 1656-76.
- [103] Webster CP, Smith EF, Grierson AJ, De Vos KJ. C9orf72 plays a central role in Rab GTPase-dependent regulation of autophagy. *Small GTPases* 2016; 1-10.
- [104] Davidson YS, Barker H, Robinson AC, et al. Brain distribution of dipeptide repeat proteins in frontotemporal lobar degeneration and motor neurone disease associated with expansions in C9ORF72. *Acta Neuropathol Commun* 2014;2: 70.
- [105] Gendron TF, Josephs KA, Petrucelli L. Review: transactive response DNA-binding protein 43 (TDP-43): mechanisms of neurodegeneration. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2010;36: 97-112.
- [106] Moreno F, Rabinovici GD, Karydas A, et al. A novel mutation P112H in the TARDBP gene associated with frontotemporal lobar degeneration without motor neuron disease and abundant neuritic amyloid plaques. *Acta Neuropathol Commun* 2015;3.
- [107] Borroni B, Bonvicini C, Alberici A, et al. Mutation within TARDBP leads to frontotemporal dementia without motor neuron disease. *Hum Mutat* 2009;30: E974-E983.
- [108] Charoniti E, Papastefanopoulou V, Florou-Hatziyiannidou C, et al. TARDBP p.I383V, a recurrent alteration in Greek FTD patients. *J Neurol Sci* 2021;428: 117566.
- [109] Wobst HJ, Wesolowski SS, Chadchankar J, et al. Cytoplasmic Relocalization of TAR DNA-Binding Protein 43 Is Not Sufficient to Reproduce Cellular Pathologies Associated with ALS In vitro. *Front Mol Neurosci* 2017;10: 46.
- [110] Hampel H, Lista S, Khachaturian ZS. Development of biomarkers to chart all Alzheimer's disease stages: the royal road to cutting the therapeutic Gordian Knot. *Alzheimers Dement* 2012;8: 312-36.
- [111] Leuzy A, Mattsson-Carlsson N, Palmqvist S, et al. Blood-based biomarkers for Alzheimer's disease. *EMBO Mol Med* 2022;14: e14408.
- [112] Mattsson N, Zetterberg H, Blennow K. Lessons from Multicenter Studies on CSF Biomarkers for Alzheimer's Disease. *Int J Alzheimers Dis* 2010;2010.
- [113] Blennow K, Hampel H, Weiner M, Zetterberg H. Cerebrospinal fluid and plasma biomarkers in Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol* 2010;6: 131-44.

- [114] Blennow K, Hampel H. CSF markers for incipient Alzheimer's disease. *Lancet Neurol* 2003;2: 605-13.
- [115] Mattsson N, Blennow K, Zetterberg H. CSF biomarkers: pinpointing Alzheimer pathogenesis. *Ann N Y Acad Sci* 2009;1180: 28-35.
- [116] Hampel H, Blennow K, Shaw LM, et al. Total and phosphorylated tau protein as biological markers of Alzheimer's disease. *Exp Gerontol* 2010;45: 30-40.
- [117] Buchhave P, Minthon L, Zetterberg H, et al. Cerebrospinal fluid levels of beta-amyloid 1-42, but not of tau, are fully changed already 5 to 10 years before the onset of Alzheimer dementia. *Arch Gen Psychiatry* 2012;69: 98-106.
- [118] Bjerke M, Engelborghs S. Cerebrospinal Fluid Biomarkers for Early and Differential Alzheimer's Disease Diagnosis. *J Alzheimers Dis* 2018;62: 1199-209.
- [119] Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Tung YC, et al. Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986;83: 4913-7.
- [120] Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Quinlan M, et al. Microtubule-associated protein tau. A component of Alzheimer paired helical filaments. *J Biol Chem* 1986;261: 6084-9.
- [121] Iqbal K, Grundke-Iqbal I. Elevated levels of tau and ubiquitin in brain and cerebrospinal fluid in Alzheimer's disease. *Int Psychogeriatr* 1997;9 Suppl 1: 289-96.
- [122] Portelius E, Hansson SF, Tran AJ, et al. Characterization of tau in cerebrospinal fluid using mass spectrometry. *J Proteome Res* 2008;7: 2114-20.
- [123] Blennow K, Dubois B, Fagan AM, et al. Clinical utility of cerebrospinal fluid biomarkers in the diagnosis of early Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 2015;11: 58-69.
- [124] Suarez-Calvet M, Karikari TK, Ashton NJ, et al. Novel tau biomarkers phosphorylated at T181, T217 or T231 rise in the initial stages of the preclinical Alzheimer's continuum when only subtle changes in Aβ pathology are detected. *EMBO Mol Med* 2020;12: e12921.
- [125] Ashton NJ, Pascoal TA, Karikari TK, et al. Plasma p-tau231: a new biomarker for incipient Alzheimer's disease pathology. *Acta Neuropathol* 2021;141: 709-24.
- [126] Gabelle A, Roche S, Geny C, et al. Decreased sAβPPβ, Aβ38, and Aβ40 cerebrospinal fluid levels in frontotemporal dementia. *J Alzheimers Dis* 2011;26: 553-63.
- [127] Scherling CS, Hall T, Berisha F, et al. Cerebrospinal fluid neurofilament concentration reflects disease severity in frontotemporal degeneration. *Ann Neurol* 2014;75: 116-26.
- [128] Bian H, Van Swieten JC, Leight S, et al. CSF biomarkers in frontotemporal lobar degeneration with known pathology. *Neurology* 2008;70: 1827-35.
- [129] Irwin DJ, Trojanowski JQ, Grossman M. Cerebrospinal fluid biomarkers for differentiation of frontotemporal lobar degeneration from Alzheimer's disease. *Front Aging Neurosci* 2013;5: 6.
- [130] Grossman M. Biomarkers in the primary progressive aphasia. *Aphasiology* 2014;28: 922-40.
- [131] Owen JA, Punt J, Stranford SA. *Kuby Immunology*. 7th ed.: Macmillan Higher Education, 2013.
- [132] Ramos EM, Koros C, Dokuru DR, et al. Frontotemporal dementia spectrum: first genetic screen in a Greek cohort. *Neurobiol Aging* 2019;75: 224.e1-224.e8.

- [133] Rizzu P, Van Swieten JC, Joosse M, et al. High prevalence of mutations in the microtubule-associated protein tau in a population study of frontotemporal dementia in the Netherlands. *Am J Hum Genet* 1999;64: 414-21.
- [134] Florou-Hatziyiannidou C, Koros C, Papastefanopoulou V, et al. Development of HRMA method for detection of GRN/MAPT mutations in Frontotemporal Dementia. *Clin Chem Lab Med* 2017;55: S954.
- [135] Tobin JE, Latourelle JC, Lew MF, et al. Haplotypes and gene expression implicate the MAPT region for Parkinson disease: the GenePD Study. *Neurology* 2008;71: 28-34.
- [136] Mata IF, Yearout D, Alvarez V, et al. Replication of MAPT and SNCA, but not PARK16-18, as susceptibility genes for Parkinson's disease. *Mov Disord* 2011;26: 819-23.
- [137] Lai MC, Bechy AL, Denk F, et al. Haplotype-specific MAPT exon 3 expression regulated by common intronic polymorphisms associated with Parkinsonian disorders. *Mol Neurodegener* 2017;12: 79.
- [138] Trotta L, Guella I, Solda G, et al. SNCA and MAPT genes: Independent and joint effects in Parkinson disease in the Italian population. *Parkinsonism Relat Disord* 2012;18: 257-62.
- [139] Compta Y, Ezquerro M, Munoz E, et al. High cerebrospinal tau levels are associated with the rs242557 tau gene variant and low cerebrospinal beta-amyloid in Parkinson disease. *Neurosci Lett* 2011;487: 169-73.
- [140] Sanchez-Juan P, Moreno S, de R, I, et al. The MAPT H1 Haplotype Is a Risk Factor for Alzheimer's Disease in APOE epsilon4 Non-carriers. *Front Aging Neurosci* 2019;11: 327.
- [141] Clark LN, Liu X, Parmalee NL, Hernandez N, Louis ED. The microtubule associated protein tau H1 haplotype and risk of essential tremor. *Eur J Neurol* 2014;21: 1044-8.
- [142] Jimenez-Jimenez FJ, Garcia-Martin E, Alonso-Navarro H, et al. A family study of DRD3 rs6280, SLC1A2 rs3794087 and MAPT rs1052553 variants in essential tremor. *Neurol Res* 2016;38: 880-7.
- [143] Wider C, Vilarino-Guell C, Heckman MG, et al. SNCA, MAPT, and GSK3B in Parkinson disease: a gene-gene interaction study. *Eur J Neurol* 2011;18: 876-81.
- [144] Garcia-Martin E, Martinez C, Alonso-Navarro H, et al. H1-MAPT and the risk for familial essential tremor. *PLoS One* 2012;7: e41581.
- [145] Wider C, Vilarino-Guell C, Jasinska-Myga B, et al. Association of the MAPT locus with Parkinson's disease. *Eur J Neurol* 2010;17: 483-6.
- [146] Trabzuni D, Wray S, Vandrovcova J, et al. MAPT expression and splicing is differentially regulated by brain region: relation to genotype and implication for tauopathies. *Hum Mol Genet* 2012;21: 4094-103.
- [147] Canu E, Boccardi M, Ghidoni R, et al. H1 haplotype of the MAPT gene is associated with lower regional gray matter volume in healthy carriers. *Eur J Hum Genet* 2009;17: 287-94.
- [148] Caffrey TM, Joachim C, Paracchini S, Esiri MM, Wade-Martins R. Haplotype-specific expression of exon 10 at the human MAPT locus. *Hum Mol Genet* 2006;15: 3529-37.
- [149] Sakae N, Santos OA, Pedraza O, et al. Clinical and pathologic features of cognitive-predominant corticobasal degeneration. *Neurology* 2020;95: e35-e45.
- [150] Marciniak E, Leboucher A, Caron E, et al. Tau deletion promotes brain insulin resistance. *J Exp Med* 2017;214: 2257-69.
- [151] Zou F, Chai HS, Younkin CS, et al. Brain expression genome-wide association study (eGWAS) identifies human disease-associated variants. *PLoS Genet* 2012;8: e1002707.

- [152] Ferrari R, Grassi M, Salvi E, et al. A genome-wide screening and SNPs-to-genes approach to identify novel genetic risk factors associated with frontotemporal dementia. *Neurobiol Aging* 2015;36: 2904-26.
- [153] Bernardi L, Maletta RG, Tomaino C, et al. The effects of APOE and tau gene variability on risk of frontotemporal dementia. *Neurobiol Aging* 2006;27: 702-9.
- [154] Sobrido MJ, Miller BL, Havlioglu N, et al. Novel tau polymorphisms, tau haplotypes, and splicing in familial and sporadic frontotemporal dementia. *Arch Neurol* 2003;60: 698-702.
- [155] Verpillat P, Camuzat A, Hannequin D, et al. Apolipoprotein E gene in frontotemporal dementia: an association study and meta-analysis. *Eur J Hum Genet* 2002;10: 399-405.
- [156] Verpillat P, Camuzat A, Hannequin D, et al. Association between the extended tau haplotype and frontotemporal dementia. *Arch Neurol* 2002;59: 935-9.
- [157] Hughes A, Mann D, Pickering-Brown S. Tau haplotype frequency in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Exp Neurol* 2003;181: 12-6.
- [158] Pittman AM, Myers AJ, Duckworth J, et al. The structure of the tau haplotype in controls and in progressive supranuclear palsy. *Hum Mol Genet* 2004;13: 1267-74.
- [159] Laws SM, Perneczky R, Drzezga A, et al. Association of the tau haplotype H2 with age at onset and functional alterations of glucose utilization in frontotemporal dementia. *Am J Psychiatry* 2007;164: 1577-84.
- [160] Borroni B, Yancopoulou D, Tsutsui M, et al. Association between tau H2 haplotype and age at onset in frontotemporal dementia. *Arch Neurol* 2005;62: 1419-22.
- [161] Pastor P, Ezquerra M, Perez JC, et al. Novel haplotypes in 17q21 are associated with progressive supranuclear palsy. *Ann Neurol* 2004;56: 249-58.
- [162] Myers AJ, Pittman AM, Zhao AS, et al. The MAPT H1c risk haplotype is associated with increased expression of tau and especially of 4 repeat containing transcripts. *Neurobiol Dis* 2007;25: 561-70.
- [163] Healy DG, Abou-Sleiman PM, Lees AJ, et al. Tau gene and Parkinson's disease: a case-control study and meta-analysis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2004;75: 962-5.
- [164] Zhang J, Song Y, Chen H, Fan D. The tau gene haplotype h1 confers a susceptibility to Parkinson's disease. *Eur Neurol* 2005;53: 15-21.
- [165] Fidani L, Kalinderi K, Bostantjopoulou S, et al. Association of the Tau haplotype with Parkinson's disease in the Greek population. *Mov Disord* 2006;21: 1036-9.
- [166] Fung HC, Xiomerisiou G, Gibbs JR, et al. Association of tau haplotype-tagging polymorphisms with Parkinson's disease in diverse ethnic Parkinson's disease cohorts. *Neurodegener Dis* 2006;3: 327-33.
- [167] Zabetian CP, Hutter CM, Factor SA, et al. Association analysis of MAPT H1 haplotype and subhaplotypes in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 2007;62: 137-44.
- [168] Fung HC, Evans J, Evans W, et al. The architecture of the tau haplotype block in different ethnicities. *Neurosci Lett* 2005;377: 81-4.
- [169] Andreadis A, Brown WM, Kosik KS. Structure and novel exons of the human tau gene. *Biochemistry* 1992;31: 10626-33.
- [170] Goedert M, Spillantini MG, Jakes R, Rutherford D, Crowther RA. Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *Neuron* 1989;3: 519-26.

- [171] Goedert M, Jakes R. Expression of separate isoforms of human tau protein: correlation with the tau pattern in brain and effects on tubulin polymerization. *EMBO J* 1990;9: 4225-30.
- [172] Takanashi M, Mori H, Arima K, Mizuno Y, Hattori N. Expression patterns of tau mRNA isoforms correlate with susceptible lesions in progressive supranuclear palsy and corticobasal degeneration. *Brain Res Mol Brain Res* 2002;104: 210-9.
- [173] Zhang W, Tarutani A, Newell KL, et al. Novel tau filament fold in corticobasal degeneration. *Nature* 2020;580: 283-7.
- [174] Majounie E, Cross W, Newsway V, et al. Variation in tau isoform expression in different brain regions and disease states. *Neurobiol Aging* 2013;34: 1922.
- [175] Galpern WR, Lang AE. Interface between tauopathies and synucleinopathies: a tale of two proteins. *Ann Neurol* 2006;59: 449-58.
- [176] Llado A, Ezquerra M, Gaig C, et al. Brain tau expression and correlation with the H1/H1 tau genotype in frontotemporal lobar degeneration patients. *J Neural Transm (Vienna)* 2007;114: 1585-8.
- [177] Caffrey TM, Joachim C, Wade-Martins R. Haplotype-specific expression of the N-terminal exons 2 and 3 at the human MAPT locus. *Neurobiol Aging* 2008;29: 1923-9.
- [178] Hayesmoore JB, Bray NJ, Cross WC, et al. The effect of age and the H1c MAPT haplotype on MAPT expression in human brain. *Neurobiol Aging* 2009;30: 1652-6.