



ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

<u>«Μηχανισμοί Νεφρικής Βλάβης στην Οικογενή</u>

<u>Αμυλοειδική Πολυνευροπάθεια»</u>

<u>Ιωάννης Πετράκης</u>

<u>Εργαστήριο Ερευνητικής Νεφρολογίας – Ιατρική</u>

Σχολή – Πανεπιστήμιο Κρήτης.

Νεφρολογική Κλινική-Πανεπιστημιακό Γενικό

<u>Νοσοκομείο Ηρακλείου.</u>

<u>Επιβλέποντες Καθηγητές:</u>

<u>Γεώργιος Αμοιρίδης: Αναπληρωτής Καθηγητής Νευρολογίας</u> <u>Ανδρέας Πλαϊτάκης: Καθηγητής Νευρολογίας</u> Ευγένιος Δαφνής: Επίκουρος Καθηγητής Νεφρολογίας

<u>Ηράκλειο , 2014.</u>

Πρόλογος

Για την ενασχόληση μου με την βασική έρευνα από τα φοιτητικά μου χρόνια, θα ήθελα να εκφράσω τις βαθύτατες ευχαριστίες μου στον καθηγητή κο Βασίλη Ζαννή, ομότιμο καθηγητή στα Πανεπιστήμια της Κρήτης και Βοστώνης, ΗΠΑ. Για την ένθερμη υποστήριξη τους, παροχή τεχνογνωσίας, κατευθυντήριων συμβουλών και σημαντικότερα για την παροχή του ίδιου του υλικού της διδακτορικής μου διατριβής, νιώθω βαθύτατη ευγνωμοσύνη για τους καθηγητές Ken-Ichi Yamamura (CARD, Kumamoto University, Japan) και Maria Joao Saraiva (IBMC, University of Porto, Portugal). Χωρίς την αμέριστη υποστήριξη και παροχή τεκμηριωμένων επιστημονικών θέσεων, του επίκουρου καθηγητή Νέφροπαθολογο-ανατομίας κου Κωνσταντίνου Γιαννακάκη (Πανεπιστήμιο της Ρώμης, Ιταλία) η ολοκλήρωση της παρούσας διατριβής θα ήταν εξαιρετικά επίπονη και χρονοβόρα.

Η αμέριστη βοήθεια σε τεχνογνωσία, εξοπλισμό και ερευνητικές μεθόδους τις οποίες μου παρείχε ο καθηγητής κος Γεώργιος Χαλεπάκης (Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης), έκαναν δυνατή την ολοκλήρωση της διδακτορικής μου διατριβής. Τον ευχαριστώ βαθύτατα για αυτό. Θα ήθελα να εκφράσω τις βαθύτατες ευχαριστίες μου στους καθηγητές κο Γεώργιο Αμοιρίδη, και κο Πλαϊτάκη, οι οποίοι δέχτηκαν να είναι στην τριμελή επιτροπή της διδακτορικής μου διατριβής, οι οποίοι με την στήριξη τους και τις συμβουλές τους έδωσαν καίριες λύσεις σε πολλαπλά προβλήματα.

Ιδιαίτερη μνεία οφείλω να απονείμω στον κο Ευγένιο Δαφνή, Διεθυντή της Νεφρολογικής Κλινικής, του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Κρήτης και του Εργαστηρίου Ερευνητικής Νεφρολογίας. Χωρίς την υποστήριξη του οποίου με υλικούς αλλά και με πνευματικούς πόρους δεν θα πραγματοποιούνταν η παρούσα διδακτορική διατριβή. Το ελεύθερο πνεύμα του, το ήθος του, η βαθειά γνώση της Νεφρολογίας, και η συστασιακή ευφυΐα του καθοδήγησαν την ερευνητική μου προσπάθεια σε ένα τομέα εξ αρχής άγνωστο για όλους μας.

Ευχαριστίες θα ήθελα να δώσω σε όλο το προσωπικό της Νεφρολογικής Κλινικής, ιδιαίτερα στους Διευθυντές ΕΣΥ, κα Ελευθερία Βαρδάκη, κο Κώνσταντίνο Περράκη, και κο Σπυρίδωνα Στρατήγη για την αμέριστη βοήθεια και συμβουλές που μου παρείχαν κατά την ολοκλήρωση της διατριβής μου. Ιδιαίτερα θα ήθελα να σημειώσω την μνημειώδη προσφορά που μου παρείχε ο Δρ. Κωνσταντίνος Στυλιανού (Επιμελητής Α, Νεφρολογική Κλινική, Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Κρήτης), για την ολοκλήρωση της παρούσας διδακτορικής διατριβής.

Ευχαριστίες αξίζουν σε όλα τα μέλη του εργαστηρίου Νεφρολογίας τα οποία συνεργαστήκαμε μαζί για την εκπόνηση της διδακτορικής διατριβής και ειδικότερα τους ιατρούς κα Βασιλική Μαυροειδή, και Σταύρο Στρατάκη, Θεοδώρα Κατσαρού, Ειρήνη Λιουδάκη και τον βιολόγο Γεώργιο Ευθυμίου ο οποίος ως προπτυχιακός φοιτητής διαδραμάτισε καίριο ρόλο στην εκτέλεση των μελετών άνοσο-ηλεκτρονικής μικροσκοπίας. Χωρίς την βοήθεια τους η πραγματοποίηση της παρούσας διδακτορικής διατριβής θα ήταν δυσκολότερη.

Θα ήθελα ξεχωριστά να ευχαριστήσω καθένα από τα μέλη του εργαστηρίου Μοριακής και Κυτταρικής Βιολογίας και του τμήματος Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας του τμήματος Βιολογίας Πανεπιστημίου Κρήτης για την αμέριστη συμπαράσταση τους κατά την εκπόνηση της παρούσας διδακτορική διατριβής και παροχή πολύτιμων συμβουλών.

Θα ήταν παράλειψη μου να μην ευχαριστήσω το προσωπικό του ζωοκομείου, του ινστιτούτου μοριακής βιολογίας, στο ΙΤΕ και ιδιαίτερα τον κτηνίατρο κο Κωνσταντίνο Κουρουνιώτη, που χωρίς την συνεισφορά του η εκπόνηση της

διδακτορικής μου διατριβής θα ήταν αδύνατη. «Μηχανισμοί Νεφρικής Βλάβης στην Οικογενή Αμυλοειδική Πολυνευροπάθεια»

Σύνοψη Διδακτορικής Διατριβής κου Ιωάννη Πετράκη.

Εισαγωγή :

Η Οικογενής Αμυλοειδική Πολυνευροπάθεια (ΟΑΠ) περιγράφηκε πριν από περίπου 60 έτη. Σήμερα αποτελεί μια από τις πιο συχνές μορφές κληρονομικής αμυλοείδωσης παγκοσμίως. Κληρονομείται με τον αυτοσωμικό επικρατή τρόπο. Η κλινική εικόνα παρουσιάζει ποικιλομορφία με κυριάρχο την προσβολή των λεπτών νευρικών ινών. Μέχρι στιγμής όλοι οι ασθενείς που υποφέρουν από ΟΑΠ είναι φορείς σημειακών μεταλλάξεων του γονιδίου της τρανσθυρετίνης και παρουσιάζουν αμυλοειδές με μόρια τρανσθυρετίνης σε διάφορους ιστούς. Νεφρική εναπόθεση αμυλοειδούς και νεφρική βλάβη έχει περιγραφεί σε ασθενείς με ΟΑΠ. Όσον αφορά την παθογένεση της ΟΑΠ οι ολιγομερείς μη ινιδικές μορφές τρανσθυρετίνης επάγουν απόπτωση, αυξημένη προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών και οξειδωτικής συμφόρησης στους ίστους.

Στόχος: Η παρούσα μελέτη είχε ως στόχο να διερευνήσει τους μηχανισμούς νεφρικής βλάβης σε ζωϊκά μοντέλα ΟΑΠ. Ειδικότερα εξέτασε την ημερήσια απέκκριση λευκωματίνης ούρων σε διαγονιδιακά μοντέλα ΟΑΠ.Επιπρόσθετα εξέτασε μηγανισμούς με τον τρόπο με τον οποίο τα διάφορα συστατικά του σπειραματικού ιθμού διήθησης (νεφρίνη, ποδοσίνη), ο πληθυσμός των ποδοκυττάρων, τα επίπεδα mRNA του WT-1, το πάχος της ΣBM και των δευτερογενών ποδικών εκβλαστήσεων των ποδοκυττάρων μεταβάλλονται αναλόγως της παρουσίας ή μερικής έλλειψης του Hsf-1. Επίσης εξέτασε υπό την επίδραση διαφορετικών περιβαλλοντικών συνθηκών σπειραματικών εναποθέσεων ανθρώπινης την παρουσία μεταλλαγμένης τρανσθυρετίνης, την έκφραση του γονιδίου της μεταλλαγμένης ανθρώπινης τρανσθυρετίνης, την εντόπιση της ανθρώπιου μεταλλαγμένης τρανσθυρετίνης εντός των ποδοκυττάρων καθώς και την ενεργοποίηση της ενδοκυτταρικής ποδοκυτταρικής κασπάσης 3. Επιπρόσθετα διερεύνησε την παρουσία ή την απουσία εναποθέσεων ανθρώπινης μεταλλαγμένης τρανσθυρετίνης ανάλογα με το φύλο των διαγονιδιακών ζώων, την επίδραση της ραπαμυκίνης στην σπειραματική εναπόθεση ανθρώπινης μεταλλαγμένης τρανσθυρετίνης, τα επίπεδα έκφρασης των μορίων bax/bcl-2 εντός του σπειράματος σε σχέση με το φύλο των ζώων.

Υλικά και μέθοδοι: Χρησιμοποιήθηκαν για την διενέργεια των πειραμάτων, διαγονιδιακά ζώα για το ανθρώπινο μεταλλαγμένο γονίδιο της τρασνθυρετίνης [C57Bl/6-Tg(6.0 TTRMet30)15Imeg –hTTRV30M] προεργόμενα από την μετεμφύτευση ψυγμένων σε βαθιά κατάψυξη εμβρύων (CARD, Kumamoto, Japan) σε ωαγωγούς θετών μητέρων. Νεαρά ζώα (10-16 μηνών) και Γηραιά ζώα (16-21 μηνών) με ή χωρίς το hTTRVal30Met τοποθετήθηκαν σε μεταβολικά κλουβιά (Tecniplast) για συλλογή ούρων 24ώρου. Η ημερήσια απέκκριση λευκωματίνης κανονικοποιήθηκε σύμφωνα με το σωματικό βάρος των ζώων. Η ημερήσια απέκκριση λευκωματίνης στα ούρα προσδιορίσηκε με μέθοδο ELISA (Bethyl Laboratories). Τα δεδομένα απέκκρισης *λ*ευκωματίνης ημερήσιας μετασχηματίστηκαν λογαριθμικά. Χρησιμοποιήθηκε δοκιμασία X² κατά την στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων. Η δοκιμασία Pearson's R γρησιμοποιήθηκε για την εκτίμηση του βαθμού συσγέτισης. Η στατιστική σημαντικότητα ορίστηκε στο ≤ 0.05 . Το λογισμικό SPSS 19 χρησιμοποιήθηκε για την στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων. Παράλληλα χορηγήθηκε σε ομάδα ζώων ηλικίας 8 μηνών ενδοπεριτοναϊκά ραπαμυκίνη (DMSO&Rapamycin) ή (DMSO) κάθε δεύτερη μέρα σε δόση 0.4 mg/Kg σωματικού βάρους για 2 μήνες. Παράλληλα γινόταν συλλογές ούρων 24ώρου για τον καθορισμό της ημερήσιας απέκκρισης λευκωματίνης. Τα νεφρά ψύχθηκαν ταχέως σε υγρό άζωτο (-196° C). Κρυοτομές πάχους 5 μm μονιμοποιήθηκαν με διάλυμα παραφορμαλδεΰδης 4% και επωάστηκαν με αντισώματα έναντι της ανθρώπινης τρανσθυρετίνης (rabbit anti-human TTR antibody-DAKO), έναντι της ποντικίσιας πρωτεΐνης bax (bax rabbit anti mouse antibody-Abcam) έναντι της ποντικίσιας πρωτεΐνης bcl-2 (bcl-2 rabbit antimouse antibody-Abcam). Ο νεφρικός ιστός περεταίρω υποβλήθηκε σε ιστοχημικές χρώσεις μεθεναμικού αργύρου, ερυθρού του Κονγκό, Τριχρωμικής Masson, καθώς και PAS. Συνεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού χρησιμοποιήθηκε για την επισκόπιση των τομών του ανοσοφθορισμού (Leica SP). Η ανάλυση των εικόνων φθορισμού έγινε με την λογισμικού χρήση του Leica Confocal Software. Τα στοιχεία ελέγχθηκαν για την κανονικότητα της κατανομής τους. Σε περίπτωση μη κανονικής κατανομής έγινε λογαριθμικός μετασχηματισμός των στοιχείων. Η στατιστική σημαντικότητα (οριζόμενη στο ≤ 0.05) εξετάστηκε με τις δοκιμασίες X^2 , και Τ για ανεξάρτητα δείγματα. Η συσγέτιση ελέγχθηκε με την χρήση της δοκιμασίας Pearson's R. Για την στατιστική ανάλυση χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό SPSS19. Επιπρόσθετα διερευνήθηκε ο βαθμός και το κατά πόσο η εναπόθεση ανθρώπινης μεταλλαγμένης τρανσθυρετίνης (TTRV30M) επηρεάζεται από διαφορετικές περιβαλλοντικές συνθήκες (συνθήκες υψηλού φραγμού-SPF και συνθήκες χαμηλού φραγμού-non-SPF). Συγκεκριμένα σπειράματα από διαγονιδιακά για το ανθρώπινο μεταλλαγμένο γονίδιο της τρασνθυρετίνης (hTTRV30M) εξετάστηκαν μέσω της χρήσης άμεσης και έμμεσης συνεστιακής μικροσκοπίας φθορισμού για την παρουσία εναποθέσεων ανθρώπινης μεταλλαγμένης τρανσθυρετίνης, ποντικίσιου αμυλοειδούς P (murine serum amyloid P), ποντικίσιας ενεργοποιημένης κασπάσης 3 και νεφρίνης. Η συσχέτιση του βαθμού συνεντόπισης και το ποσοστό συνεντόπισης εκτιμήθηκε χρησιμοποιόντας το λογισμικό Image J. Η εντόπιση των εναποθέσεων ανθρώπινης μεταλλαγμένης τρανσθυρετίνης εντός των ποδοκυττάρων έγινε με την χρήση άνοσοηλεκτρονικής μικροσκοπίας διέλευσης. Η νεφρική έκφραση της ανθρώπινης μεταλλαγμένης τρανσθυρετίνης (hTTRV30M) και της νεφρίνης (NPHS-1) έγιναν με την χρήση αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (RT-PCR). Παράλληλα μελετήθηκαν με την χρήση άνοσο-ιστοχημείας, στυπώματος κατά Western (Western Blot) και RT-PCR τα γονίδια της νεφρίνης, της ποδοσίνης και του WT1 σε νεφρικό ιστό hTTRV30M ποντικών ημίζυγων ή ομόζυγων για τον παράγοντα Hsf-1. Ηλεκτρονική μικροσκοπία διέλευσης χρησιμοποιήθηκε για την εκτίμηση του πάχους των δευτερογενών ποδοκυτταρικών ποδικών εκβλαστήσεων και της σπειραματικής βασικής μεμβράνης σε νεφρικό ιστό ποντικών ημίζυγων για τον Hsf-1 είτε με είτε χωρίς σπειραματική εναπόθεση ανθρώπινης μεταλλαγμένης τρανσθυρετίνης (hTTRV30M) ή εναπόθεσης αμυλοειδούς.

έκταση μεσαγγείου όταν συγκρίθηκαν με αρσενικά διαγονιδιακά ποντίκια τα οποία ελάμβαναν DMSO (X^2 =26.56; p<0.001). Τα σπειράματα από τα θηλυκά διαγονιδιακά ποντίκια που λάμβαναν ραπαμυκίνη είγαν μεγαλύτερη έκταση μεσαγγείου όταν συγκρίθηκαν με διαγονιδιακά ποντίκια τα οποία λάμβαναν DMSO($X^2 = 16.6$; p=0.001). Τα αρσενικά διαγονιδιακά ποντίκια τα οποία ελάμβαναν ραπαμυκίνη είχαν το 17.6% των σπειραμάτων με ένταση φθορισμού μεγαλύτερη της διάμεσης τιμή. Ενώ τα θηλυκά διαγονιδιακά ποντίκια τα οποία λάμβαναν ραπαμυκίνη είχαν 89.8% των σπειραμάτων με ένταση φθορισμού μεγαλύτερη της διάμεσης τιμής ($X^2 = 72.4$; p<0.001). Δεν υπήρχε διαφορά στην ένταση φθορισμού όσον αφορά τα θηλυκά και αρσενικά διαγονιδιακά ποντίκια τα οποία λάμβαναν DMSO ($X^2 = 2.12$; p=0.18) και οι τιμές των εντάσεων φθορισμού ήταν μεταξύ αύτων των θηλυκών διαγονιδιακών ποντικών και των αρσενικών διαγονιδιακών ποντικών που ελάμβαναν ραπαμυκίνη. Τα αρσενικά ποντίκια τα οποία ελάμβαναν ραπαμυκίνη είγαν 28.6% των σπειραμάτων με λόγο bax/bcl-2 μεγαλύτερο της διάμεσης τιμής (1.52) ενώ τα θηλυκά διαγονιδιακά ποντίκια τα οποία λάμβαναν ραπαμυκίνη είχαν 88.9% των σπειραμάτων με λόγο bax/bcl-2 μεγαλύτερο της διάμεσης τιμής ($X^2 = 27.71$; p<0.001). Οι αντίστοιχες τιμές για τα αρσενικά ποντίκια τα οποία λάμβαναν DMSO ήταν 10% ενώ για τα θηλυκά ποντίκια τα οποία λάμβαναν DMSO ήταν 71.4% ($X^2 = 24.45$; p<0.001). Τα διαγονιδιακά ζώα τα οποία στεγαζόταν σε συνθήκες χαμηλού φραγμού (non-SPF) έδειξαν αυξημένη εναπόθεση ανθρώπινης μεταλλαγμένης τρανσθυρετίνης hTTRV30M στα σπειράματά τους σε σχέση με τα διαγονιδιακά ζώα τα οποία στεγαζόταν σε συνθήκες υψηλού φραγμού (SPF). Επιπρόσθετα αυξημένη ποδοκυτταρική εναπόθεση hTTRV30M παρατηρήθηκε στα non-SPF διαγονιδιακά ποντίκια. Η σπειραματική ενεργοποίηση της κασπάσης-3 ήταν αυξημένη στα non-SPF ποντίκια. Η ποδοκυτταρική ενεργοποίηση της κασπάσης -3 ήταν αυξημένη στα διαγονιδιακά ζώα ανεξαρτήτως συνθηκών σε σύγκριση με τα μη διαγονιδιακά ζώα στις αντίστοιχες συνθήκες. Επιπρόσθετα τα σπειράματα των Hsf-1 ημίζυγων διαγονιδιακών ποντικών για την ανθρώπινη μεταλλαγμένη τρανσθυρετίνη είχαν μικρότερα περιεχόμενο νεφρίνης και ποδοσίνης άλλα μεγαλύτερο αριθμό ποδοκυττάρων όταν συγκρίνονταν με τα αντίστοιχα ομόζυγα για τον Hsf-1 διαγονιδιακά ζώα. Η εναπόθεση τρανσθυρετίνης ήταν αυξημένη στα σπειράματα των ζώων τα οποία ήταν ημίζυγα στον Hsf-1.Τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων νεφρίνης, ποδοσίνης και WT-1 δεν επηρρεάστηκαν από την ημιζυγία ή ομοζυγωτία του Hsf-1. Η αυξημένη εναπόθεση τρανσθυρετίνης στα Hsf-1 ημίζυγα ζώα σχετίστηκε με αυξημένο πάχος ποδικών εκβλαστήσεων και σπειραματικής βασικής μεμβράνης.

Συμπεράσματα

μεταλλαγμένου γονιδίου τρανσθυρετίνης Η παρουσία του ανθρώπινου (hTTRVal30Met) επιρρεάζει την ημερήσια απέκκριση αλβουμίνης στο παρόν διαγονιδιακό μοντέλο. Οι φορείς του γονιδίου παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικά υψηλότερη ημερήσια απέκκριση λευκωματίνης καθώς αυξάνεται η ηλικία τους όταν συγκρίνονται με τους αντίστοιχους μάρτυρες. Τα αρσενικά διαγονιδιακά ποντίκια τα οποία λάμβαναν ραπαμυκίνη είχαν μικρότερη έκταση μεσαγγείου όταν συγκρίνονταν με τα θηλυκά ποντίκια τα οποία λάμβαναν ραπαμυκίνη. Επιπρόσθετα περισσότερα σπειράματα από αρσενικά διαγονιδιακά ποντίκια τα οποία λάμβαναν ραπαμυκίνη είχαν αυξημένη εναπόθεση hTTRVal30Met σε σύγκριση με τα θηλυκά διαγονιδιακά ποντίκια. Ο λόγος bax/bcl-2 παρατηρούταν πιο συχνά αυξημένος σε σπειράματα από θηλυκά διαγονιδιακά ποντίκια απ' ότι σε σπειράματα αρσενικών διαγονιδιακών ποντικών. Έτσι η ραπαμυκίνη πιθανόν να επάγει διαφορετικές επιδράσεις είτε καταστροφικές είτε ευεργετικές αναλόγως του φύλου. Αυτή η αλληλεπίδραση δεν συνοδεύεται από αύξημένη απέκκριση λευκωματίνης. διαφορετικές Οı περιβαλλοντικές συνθήκες (συνθήκες υψηλού φραγμού -SPF/συνθήκες χαμηλού φραγμού –non-SPF) επιρρεάζουν την σπειραματική εναπόθεση, και την ενδοποδοκυτταρική εντόπιση της ανθρώπινης μεταλλαγμένης τρανσθυρετίνης (hTTRVal30Met). Σε αυτές τις συνθήκες (non-SPF) παρατηρείται αυξημένη ενεργοποίηση της κασπάσης-3. Παράλληλα κάτω από την επίδραση της ημιζυγίας στον Hsf-1, η εναπόθεση hTTRV30M έχει καταστροφικά αποτελέσματα στο πάχος της σπειραματικής βασικής μεμβράνης, στο πάχος των ποδοκυτταρικών ποδικών εκβλαστήσεων και στην σύσταση του λεπτού διαφράγματος χωρίς να επηρεάζει την έκφραση των γονιδίων της νεφρίνης και της ποδοσίνης.

Έτσι η νεφρική βλάβη που επάγεται από την εναπόθεση πρό-αμυλοειδικών εναποθέσεων hTTRV30M εξαρτάται από περιβαλλοντικούς καθώς και γονιδιακούς παράγοντες.

Mechanisms of renal insult in Familial Amyloid Polyneuropathy.

Thesis Summary.

Introduction: Familial Amyloid Polyneuropathy (FAP) has been first described 60 years ago. Nowadays consists one of the commonest forms of hereditary amyloidosis. It is inherited through the autosomal dominant way of transmittance. Clinical features vary, but the dominant one is polyneuropathy due to small nerve fibers insult. Till present all FAP patients carry spot mutations of transthyretin gene and present amyloid deposition in various tissues. Renal amyloid deposition and renal injury has been a not so common feature in FAP patients. As far as FAP pathogenesis is concerned oligomeric non-fibrilar transthyretin species induce apoptosis, increase pro-inflammatory cytokines and induce oxidative stress within target tissues.

Scope: The present study had the intention to examine mechanisms of renal insult in FAP animal models. It specifically examined urinary albumin excretion (UAE) in FAP animal models. Furthermore it examined the way with which various components of the slit diaphragm (nephrin and podocin), podocyte number, mRNA levels of WT1, glomerular basement membrane (GBM) thickness, foot process width (FPW), change due to partial shortage of Hsf-1. In addition it examined, the effect of different environmental conditions in TTRV30M glomerular deposition, TTRV30M renal gene expression, TTRV30M podocytic localization, as well as caspase 3 activation. Furthermore sex impact under the administration of rapamycin in tissue TTRV30M deposition was examined. Glomerular levels of bax/bcl-2 were examined in relation to transgenic mice gender.

Materials and Methods: Transgenic animals (C57Bl/6-Tg(6.0 TTRMet30)15Imeg – hTTRV30M, CARD, Kumamoto Japan) were used for experimentation. Oviduct transfer of cryopreserved embryos was performed. Young animals (10-16 months old), and Old animals (16-21) with or without TTRVal30Met gene were used for 24 hrs urinary collection. UAE was normalized over body weight (BW) of laboratory animals. UAE was examined with the use of ELISA (Bethyl laboratories). Logarithmic transformation of data was performed and test Chi square was used for statistical analysis. Statistical analysis was performed with SPSS 19 (IBM) software. Pearson's R was used for correlation analysis. Statistical significance was set at .05. In addition in an animal group 8 months old rapamycin (0.4 mg/kg BW) was

administered i.p for 2 months. In this group urinary collections were performed. The kidneys were acutely frozen in liquid nitrogen. Five µm thick cryosections were fixed with paraformaldehyde solution 4% and were incubated with rabbit anti-human transthyretin antibody (DAKO), bax anti mouse antibody (Abcam), bcl-2 anti mouse antibody (Abcam). Renal tissue was further stained for PAS, Silver Stain, Masson, Congo Red (CR) and H&E. Confocal microscopy was utilized for analyzing immunofluorescence sections (Leica, SP). Leica confocal software was used for image analysis. Data were examined for normality. In case of non normality logarithmic transformation was performed. Statistical significance was set at .05 and was examined with the use of test Chi square, and independent samples T test. SPSS 19 software was used for statistical analysis. In addition it was examined whether TTRV30M deposition is affected by different environmental conditions (SPF vs non-SPF housing conditions). Glomeruli from transgenic animals were examined under direct and indirect confocal microscopy fluorescence analysis for the presence of TTRV30M deposition, serum amyloid P (SAP), activation of caspase 3 and nephrin. Co-localization rate and amount of co-localization was estimated with the use of Image J software (NIH). TTRV30M localization was achieved with the use of immunoelectron microscopy. Levels of TTRV30M, and nephrin gene expression were estimated with the use reverse transcription real time pcr (RT-PCR). In parallel renal tissue genes nephrin, podocin, WT-1 from Hsf1 hemizygous TTRV30M mice were studied with the use of Western Blot (WB), RT-PCR, electron microscopy (GBM thickness, FPW), and immunofluorescence.

Results: 78.6% of Young TTRV30M animals had UAE above median, while 21.4% of non transgenic animals had UAE above median (X^2 =0.583, p=0.445). 100% of old TTRV30M animals had UAE above median, while 0% of non transgenic animals, had UAE above median (X^2 =8.6, p=0.003,R=0.496, p=0.002). As far as the rapamycin treated mice are concerned mean UAE = 778.9 +/- 6.0, while control mice had ean UAE =815.3 +/- 3.3 p=0.97. In all studied transgenic mice renal tissue was CR negative. Glomeruli from male transgenic rapamycin treated mice had less mesangial expansion when compared to DMSO treated control mice (X^2 =26.56; p<0.001). Glomeruli from female transgenic rapamycin treated mice had more mesangial expansion when compared to DMSO treated control mice (X^2 =16.6; p=0.001). Male transgenic rapamycin treated mice had 17.6% of glomeruli with fluorescence intensity above median, while female transgenic rapamycin treated mice had 89,8% of

glomeruli with fluorescence intensity above median($X^2 = 72.4$; p<0.001). No difference was observed for fluorescence intensity of male and female control mice (DMSO treated $X^2 = 2.12$; p=0.18), while fluorescence intensity was intermediate male and female mice treated with rapamycin. Male transgenic rapamycin treated mice had 28.6% of glomeruli with a bax/bcl2 ratio above median, while female transgenic rapamycin treated mice had 88.9% of glomeruli with a bax/bcl2 ratio above median($X^2 = 27.71$; p<0.001). Non SPF housed TTRV30M mice had increased transthyretin glomerular deposition when compared to SPF housed animals. In addition increased glomerular caspase3 activation was observed in non SPF transgenic mice in relation to SPF transgenic animals. Podocytic caspase3 activation was elevated irrespectively to housing conditions. Hsf1 hemizygous mice had lower nephrin and podocin content but higher podocyte number than Hsf1 homozygous mice. Transthyretin deposition was increased in glomeruli of Hsf1 hemizygous mice while no influence was observed in WT1, nephrin and podocin expression levels. Increased GBM thickness and FPW was observed in Hsf1 hemizygous mice.

Conclusions: Human TTRV30M transgene presence increases UAE, and this is accompanied by glomerular transthyretin deposition. Male transgenic rapamycin treated mice had less mesangial expansion to femal transgenic rapamycin treated mice. In addition more glomeruli of male transgenic rapamycin treated mice had increased TTRV30M deposition when compared to female counterparts. Increased bax/bcl2 ratio was observed in the glomeruli of female transgenic rapamycin treated mice in relation to male counterparts. Therefore rapamycin induces differential effects under the influence of sex either detrimental or beneficial. This interaction is not accompanied by UAE increase. Different environmental conditions (SPF, non SPF) affect glomerular transthyretin deposition, intrapodocytic transthyretin localization. Under these influences TTRV30M deposition causes an increase in caspase 3 activation. Under the effect of Hsf1 hemizygosity, TTRV30M deposition has catastrophic effects in GBM thickness, PFP width and slit diaphragm constitution without affecting podocin and nephrin gene expression. Therefore mechanisms of renal insult in FAP could be strongly be affected by the combination of environmental and genetic factors.

<u>Περιεχόμενα:</u>

<u>Α. Γενικό Μέρος</u>

1. Ανατομική Οργάνωση Νεφρικού Παρεγχύματος

2. Ανατομική Οργάνωση του Νεφρικού Σωματίου

<u>i) Σπειραματική Βασική Μεμβράνη.</u>

<u>ii) Κυτταρικοί Τύποι του Νεφρικού Σωματίου.</u>

3. Τρανσθυρετίνη.

<u>i) Γονιδιακή έκφραση.</u>

<u>ii) Δομή πρωτεϊνικού μορίου.</u>

<u>iii) Λειτουργία της πρωτεΐνης.</u>

<u>4. Αμυλοείδωση</u>

<u>i) Ορισμός.</u>

ii) Τύποι συστηματικών αμυλοειδώσεων

5. Οικογενής Αμυλοειδική Πολυνευροπάθεια σχετιζόμενη με την

<u>τρανσθυρετίνη.</u>

<u>i) Επιδημιολογικά στοιχεία.</u>

<u>ii) Κλινική Εικόνα.</u>

<u>iii) Παθοφυσιολογία.</u>

iv) Διάγνωση και Θεραπεία.

6. Οικογενής Αμυλοειδική Πολυνευροπάθεια σχετιζόμενη με την τρανσθυρετίνη και Νεφρική Προσβολή

<u>i) Παρούσα Γνώση</u>

<u>ii) Παθολογο-ανατομικη είκονα.</u>

7. Ζωϊκά Μοντέλα Οικογενούς Αμυλοειδικής Πολυνευροπάθειας.

8. Θέματα ειδικού επιστημονικού ενδιαφέροντος για την παρούσα

<u>διδακτορική διατριβή.</u>

i) Εξωτερικά επαγώμενη απόπτωση.

ii) Ο ρόλος των πρωτεΐνών Bax και Bcl-2 στην απόπτωση.

iii) Η απάντηση στην διαταραχή της πρωτεϊνικής ομοιόστασης (heat-

shock response) και ο ρόλος του Heat Shock Factor 1 (Hsf-1).

iv) Νεφρίνη και Ποδοσίνη.

<u>v) Μεταγραφικός παράγοντας WT-1.</u>

vi) Το μονοπάτι Akt/mTOR.

<u>Β. Ειδικό Μέρος</u>

<u>1. Πειραματόζωα, Υλικά και Μέθοδοι.</u>

<u>i) Διαγονιδιακά μοντέλα ποντικών τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για την εκπόνηση της</u>
παρούσας διδακτορικής διατριβής.

ii) Διαδικασία μεταφοράς γονιμοποιημένων ωαρίων C57Bl/6-6.0Kb hTTRMet30-15Imeg σε ωοθήκες θετών μητέρων (C57Bl/6).

iii) Διαδικασία γονοτυπικής ταυτοποίησης C57Bl/6 ποντικών.

α) Απομόνωση γενετικού υλικού από ουρές ποντικών.

β) PCR για τον πολλαπλασιασμό του αλληλίου 6.0Kb hTTRMet30.

γ) Επέκταση της αποικίας 6.0Kb hTTRMet30 και δημιουργία ομόζυγων

στελεχών ποντικών με το αλλήλιο 6.0Kb hTTRMet30.

δ) Συνθήκες φύλαξης στελεχών 6.0Kb hTTRMet30.

<u>iv) Μέτρηση αρτηριακή πίεσης στελέχους ποντικών 6.0Kb hTTRMet30.</u>

<u>ν) Συλλογές ούρων 24ώρου, μέτρηση ημερίσιας απέκκρισης αλβουμίνης στα</u> ούρα και μέτρηση επιπέδων της πρωτεΐνης TTRVal30Met στο αίμα.

<u>vi) Διαδικασία θυσίας ζώου.</u>

<u>vii) Διενέργεια ιστογημικών γρώσεων H&E, PAS, van Gieson, Αργύρου σε τομές</u> <u>παραφίνης ζώων TTR KO, M30, Hsf1 KO, Hsf1 M30.</u>

<u>α) Διαδικασία χρώσης H&E</u>

<u>β) Διαδικασία χρώσης περιοδικού οξέος (PAS):</u>

γ) Διαδικασία χρώσης νιτρικού αργύρου.

δ) Διαδικασία χρώσης Van Gieson.

<u>viii) Διενέργεια ιστοχημικής χρώσης Congo Red παραφίνης ζώων TTR KO,</u> M30, Hsf1 KO, Hsf1 M30, και hTTRMet30.

<u>ix) Διενέργεια ανοσο-ιστογημικών γρώσεων στο νεφρικό παρέγγυμα των υπό</u> εξέταση ζώων.

α) Διενέργεια τομών σε ταχέως ψυχθέν νεφρικό παρέγχυμα, κάλυψη ιστολογικών πλακιδίων με διάλυμα gelatin, παρασκευή διαλύματος παραφορμαλδεΰδης 4%.

β) Διενέργεια ανοσοφθορισμού σε νεφρικό παρέγχυμα hTTRMet30 ποντικών. γ) Διενέργεια ανοσοφθορισμού/ανοσοϊστοχημείας σε νεφρικό παρέγχυμα hTTRMet30 ποντικών TTR KO, M30, Hsf1 KO, Hsf1 M30. <u>x) Διενέργεια ηλεκτρονικής μικροσκοπίας διέλευσης (TEM) σε νεφρικό</u> παρέγχυμα διαγονιδιακών ζώων.

<u>xi) Διενέργεια άνοσο-ηλεκτρονικής μικροσκοπίας διέλευσης (TEM) σε νεφρικό</u> παρέγχυμα διαγονιδιακών ζώων.

<u>xii).Διενέργεια WB ολικής πρωτεΐνης από το νεφρικό παρέγχυμα διαγονιδιακών</u> ζώων.

<u>α)</u> Δημιουργία γέλης πολυακρυλαμίδης 7,5% (10 ml) - γέλη διαχωρισμού πρωτεϊνών ανάλογα με το μοριακό τους βάρος (Resolving gel).

<u>β)</u> Δημιουργία γέλης πολυακρυλαμίδης 5% (6 ml) - γέλη ισοστάθμισης πρωτεϊνών (Stacking gel).

γ) Παρασκευή διαλύματος ηλεκτροφόρησης (1 lt).

<u>δ) Παρασκευή διαλύματος μεταφοράς (1 lt).</u>

<u>ε) Προσθήκη δειγμάτων πρωτεΐνης στην γέλη ακρυλαμίδης και ηλεκτροφόρηση.</u>

ζ) Υγρή μεταφορά δειγμάτων πρωτεΐνης σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης.

<u>η) Διενέργεια WB σε μεμβράνες νιτροκυτταρίνης για τις πρωτεΐνες νεφρίνης, ποδοσίνης και ακτίνης.</u>

<u>xiii)Διενέργεια RT-PCR στο νεφρικό παρέγχυμα διαγονιδιακών ζώων όσον</u> αφορά το επίπεδο έκφρασης του γονιδίου της νεφρίνης, της ποδοσίνης, του WT-1, της τρανσθυρετίνης (TTRVal30Met) και της GAPDH.

α) Απομόνωση mRNA και παραγωγή cDNA από ολικό νεφρικό παρέγχυμα.

β) Διενέργεια RT-real time PCR.

<u>xiv) Στατιστικές μέθοδοι επεξεργασίας αποτελεσμάτων, και επεξεργασία</u> <u>εικόνας.</u>

2. Αποτελέσματα και συζήτηση.

<u>i) Ημερήσια απέκκριση Αλβουμίνης και μέτρηση αρτηριακής πίεσης από</u>
<u>διαγονιδιακά ποντίκια φέροντα το αλλήλιο hTTRV30M</u>.

ii) Επίπεδα τρανσθυρετίνης στον ορό διαγονιδιακών ποντικιών με το αλλήλιο hTTRV30M.

iii) Έκταση μεσαγγείου στα στελέχη διαγονιδιακών ποντικών υπό μελέτη. iv) Εναποθέσεις τρανσθυρετίνης και παρουσία αμυλοειδούς στα στελέχη διαγονιδιακών ποντικών.

<u>ν) Διαφορετικές περιβαλλοντικές συνθήκες αυξάνουν την παρουσία</u> εναποθέσεων TTRV30M στα ποδοκύτταρα στελεχών TTRV30M C57Bl/6. <u>vi) Η επίδραση του μεταγραφικού παράγοντα Hsfl υπό την επίδραση</u> εναπόθεσης του ανθρώπινου αλληλίου TTRV30M. Μελέτες σε στελέγη ποντικών Hsfl M30 και M30. <u>vii) Η γορήγηση του μακρολυδίου της ραπαμυκίνης σε ποντίκια</u> <u>στελέγους 6,0Kb-hTTRV30M: Διαφορετική επίδραση σε σγέση με το</u> <u>φύλο.</u>

3. Επίκριση και Συμπεράσματα.

<u>Γ. Βιβλιογραφία</u>

Α.Γενικό Μέρος

1. Ανατομική Οργάνωση Νεφρικού Παρεγχύματος^{1,2}.

Ο νεφρός λειτουργεί ως ένα σύστημα αλληλεπίδρασης του οργανισμού με το εξωτερικό περιβάλλον. Ειδικότερα η ανατομική/δομική οργάνωση του νεφρικού παρεγχύματος εξυπηρετεί στην τροποποίηση της σύστασης και ποσότητας του ενδοαγγειακού διαμερίσματος μέσω των εκκριτικών και ενδοκρινικών διεργασιών του. Βασική ανατομική/λειτουργική μονάδα του νεφρικού παρεγχύματος αποτελεί το νεφρώνιο. Ο ανθρώπινος νεφρός αποτελείται από περίπου 1 x 10⁶ νεφρώνια, σε αντιπαραβολή με τον ποντικίσιο ο οποίος αποτελείται από 30.000-50.000 νεφρώνια. Το τμημένο κατά μέσο στεφανιαίο επίπεδο νεφρό αποτελείται από ένα ανοιχτού χρώματος τμήμα (νεφρικός φλοιός) και ένα κλειστού χρώματος τμήμα (νεφρικός μυελός). Ο νεφρικός φλοιός χωρίζεται περεταίρω στον φλοιϊκό λαβύρινθο και στις μυελικές ακτίνες. Ο νεφρικός μυελός χωρίζεται περεταίρω σε ένα εξώτερο (έξω λωρίδα), δύο ενδότερα τμήματα (έσω λωρίδα, έσω μυελός). Μακροσκοπικά στον μυελό σχηματίζονται περιγράμματα κωνικού σχήματος (μυελικές πυραμίδες). Η επαφή της νεφρικής πυέλου με το νεφρικό παρέγχυμα στο επίπεδο του νεφρικού μυελού δημιουργεί τους νεφρικούς κάλυκες. Ο πιο απλός τύπος νεφρού είναι αυτός που αποτελείται από μια πυραμίδα, και μία νεφρική θηλή. Αυτός ο τύπος νεφρού συναντάται στα τρωκτικά. Όσο αυξάνει η μάζα και το μέγεθος του οργανισμού δεν αυξάνει ανάλογα ο όγκος του νεφρού. Αντίθετα πολλαπλασιάζονται ο αριθμός των νεφρικών πυραμίδων και των νεφρικών θηλών.

Αδρά το κάθε νεφρώνιο αποτελείται από ένα νεφρικό σωμάτιο το οποίο μέσω ενός περίπλοκου και διακλαδιζόμενου σωληναρίου παροχετεύει το διήθημα σε ένα

αθροιστικό πόρο. Τα νεφρώνια μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε τρεις τύπους ανάλογα με την θέση των νεφρικών σωματίων στον νεφρικό φλοιό: επιπολλής, μέσοφλοιϊκά, και παραμυελικά.Το σωληνώδες τμήμα του νεφρωνίου αποτελείται από ένα εγγύς τμήμα και ένα άπω τμήμα τα οποία συνδέονται μεταξύ τους με την αγκύλη του Henle. Ανάλογα με το μήκος της αγκύλης του Henle τα νεφρώνια μπορούν να κατηγοριοποιηθούν ως αυτά με μεγάλο μήκος και ως αυτά με μικρό μήκος αγκυλών. Τα νεφρώνια με μεγάλο μήκος αγκυλών του Henle φτάνουν σε βάθος όλα τα επίπεδα του νεφρικού μυελού. Οι διάφοροι τύποι νεφρικών σωματίων μπορούν να συνέχονται είτε με μικρού είτε με μεγάλου μήκους αγκύλες του Henle. Οι αθροιστικοί πόροι δημιουργούνται στον νεφρικό φλοιό από την συνένωση αρκετών νεφρωνίων δια των αθροιστικών σωληναρίων.

Ο χώρος μεταξύ της νεφρικής κάψας, της βασικής μεμβράνης των σωληναρίων, και των νεφρικών αγγείων ορίζεται ως διαμέσος ιστός του νεφρού. Τα κύρια κυτταρικά συστατικά του διαμερίσματος είναι ινοβλάστες, τα δενδριτικά κύτταρα και τα λεμφοκύτταρα. Ο χώρος μεταξύ των κυττάρων πληρώνεται από εξωκυττάριο ουσία. Ο περισωληναρικός διάμεσος ιστός εμπλέκεται σε όλες τις νεφρικές λειτουργίες. Ένα μεγάλο μέρος των απορροφούμενων και εκκρινόμενων ουσιών από τα νεφρικά σωληνάρια προς τα αγγεία και αντίστροφα διέρχεται διαμέσω του περισωληναριακού διάμεσου ιστού. Οι περισωληναριακοί ινοβλάστες δημιουργούν ένα δίκτυο/σκελετό απαραίτητο για τη διατήρηση της τρισδιάστατης δομής του νεφρικού παρεγχύματος ερχόμενοι σε άμεση επαφή με όλες τις νεφρικές δομές (βασική μεμβράνη σωληναριακών και ενδοθηλιακών κυττάρων, μεταναστεύοντα κυτταρικά στοιχεία). Τα δενδριτικά κύτταρα αποτελούν τον κύριο πληθυσμό αντιγονο-παρουσιαστικών κυττάρων στο υγιές νεφρικό παρέγχυμα παρουσιάζοντας ανοσο-ρυθμιστικό ρόλο. Η εξωκυττάριος ουσία αποτελείται από ένα δίκτυο ινών, πρωτεογλυκανών,

γλυκοπρωτεϊνών, και διαμέσου υγρού. Οι κύριοι τύποι ινών είναι τα μικροϊνίδια (κολλαγόνο τύπου 1) και οι δικτυωτές ίνες. Οι δικτυωτές ίνες δημιουργούν ένα δίκτυο ινών το οποίο δίκην θήκης περιβάλλει τα νεφρικά σωληνάρια. Οι γλυκοπρωτεΐνες καθώς και οι πρωτεογλυκάνες (με την μεγαλύτερη συγκέντρωση αυτών να παρατηρείται στον νεφρικό μυελό) διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην μετανάστευση κυττάρων, καθώς βρίσκονται στην βασική μεμβράνη των σωληνάριων και έρχονται σε επαφή με τις δικτυωτές ίνες του νεφρικού ιστού.

Η σύσταση της εξωκυτταρίου ουσίας του νεφρικού παρεγχύματος διαφοροποιείται ανάλογα με την τοπογραφική της εντόπιση (νεφρικός φλοιός, νεφρικός μυελός, συνδετικός ιστός ο οποίος συνοδεύει αγγειακούς και λεμφαγγειακούς σχηματισμούς). Η περισωληναριακή διάμεσος ουσία του νεφρικού φλοιού αποτελεί το 4% του ολικού νεφρικού όγκου (όπως προκύπτει από μελέτες σε νεφρικό ιστό επιμύων). Στο νεφρικό περισωληναριακό ιστό ιστοχημικά μπορούν να διακριθούν οι ινοβλάστες από τα δενδριτικά κύτταρα. Μεταξύ άλλων τα δενδριτικά κύτταρα εκφράζουν τα CD11a, μόρια του μείζονος συστήματος ιστοσυμβατότητας τύπου ΙΙ (MHC II), στην κυτταρική τους μεμβράνη, οι ινοβλάστες εκφράζουν αποκλειστικά το ένζυμο 5' νουκλεοτιδάση (5-NT). Η παρουσία της 5-NT σχετίζεται με την παρουσία m-RNA της ερυθροποιητίνης (EPO). Η ενεργότητα της 5-ΝΤ είναι μέγιστη στην περιοχή του εν βάθει φλοιϊκού λαβυρίνθου σε υγιείς νεφρούς. Σε παθολογικές καταστάσεις (αναιμία, υποξία) η έκφραση του mRNA της EPO παρατηρείται στους περισωληναριακούς ινοβλάστες του εν βάθει φλοιϊκού λαβυρίνθου αλλά και στους περισωληναριακούς ινοβλάστες κάτωθεν της νεφρικής κάψας. Υπό την επίδραση προφλεγμονωδών/ φλεγμονωδών κυτταροκινών οι ινοβλάστες ευρισκόμενοι στον νεφρικό φλοιό παρουσιάζουν φαινοτυπική τροποποίηση. Μετατρέπονται σε μυοϊνοβλάστες εκφράζοντας βιμεντίνη, α – SMA, και οι απολήξεις τους έρχονται σε

επαφή με τις συνδέσεις διάκενου (gap junctions). Οι μυοϊνοβλάστες ευρυσκόμενοι στον νεφρικό ιστό παράγουν διαφοροποιημένης σύστασης εξωκυττάριο ουσία και εμφανίζουν σταδιακά μειούμενη έκφραση του γονιδίου της EPO.

Ο νεφρικός μυελός έχει τρεις ζώνες διαμέσου ουσίας. Στην έξω λωρίδα του έξω μυελού ο διάμεσος ιστός του νεφρικού μυελού αποτελεί 4% του όγκου του μυελού. Το ίδιο ισχυεί για την έσω λωρίδα του έξω μυελού. Στο διάμεσο ιστό των αγγειακών δεσμίδων της έσω λωρίδας ο διάμεσος ιστός του νεφρικού παρεγχύματος αποτελεί το 10% του όγκου αυτού του διαμερίσματος. Στην έσω λωρίδα αυξάνεται στο 40%. Οι ινοβλάστες του νεφρικού μυελού δεν παράγουν ερυθροποιητίνη, αλλά περιέχουν στο κυτταροπλασμά τους λιπίδια, βρίσκονται τοποθετημένοι εγκάρσια σε σχέση με τις αγγειακές δομές και παρουσιάζουν αυξημένη έκφραση COX-2. Η παρουσία δενδριτικών κυττάρων είναι αυξημένη στα αθροιστικά σωληνάρια και στα παχειά ανιόντα σκέλη των αγκύλων του Henle. Όσον αφορά την έσω μυελό τα δενδριτικά κύτταρα προοδευτικά μειώνονται σε αριθμό. Στον υγιή νεφρό στα έσω τμήματα της έσω λωρίδας δεν ανιχνεύονται κύτταρα προερχόμενα από τον μυελό των οστών.

2. Ανατομική Οργάνωση του Νεφρικού Σωματίου

Το νεφρικό σωμάτιο αποτελείται από ένα θύσανο εξειδικευμένων τριχοειδών τα οποία εισδύουν στην κάψα του Bowman. Στο αγγειώδες σπείραμα τα τριχοειδή συγκρατούνται από το μεσάγγειο Το τοίχωμα των σπειραματικών τριχοειδών αποτελείται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα, τα οποία καλύπτονται από τη βασική μεμβράνη (GBM) πανω στην οποία επικάθονται εξειδικευμένα επιθηλιακά κύτταρα, τα ποδοκύτταρα Αυτά αποτελούν το σπλαγχνικό επιθήλιο της κάψας του Bowman το οποίο στον αγγειακό πόλο του αγγειώδους σπειράματος μεταπίπτει στο τοιχωματικό επιθήλιο της κάψας του Bowman. Ο όρος κάψα του Bowman αφορά αυτό ακριβώς το τοιχωματικό επιθήλιο με την βασική του μεμβράνη (τα οποία

σχηματίζουν το εξωτερικό τοίχωμα του νεφρικού σωματίου). Στον ουρικό πόλο η κάψα του Bowman μεταπίπτει στο εγγύς εσπειραμένο σωληνάριο, και ο χώρος του Bowman μεταπίπτει στον αυλό του εγγύς σωληναρίου.

Η προβολή του τοιχωματικού επιθηλίου της κάψας του Bowman στο σπλαγχνικό επιθήλιο του σπειράματος δημιουργεί μια οπή σχήματος oval στο σπείραμα η οποία αποκαλείται η πύλη του σπειράματος. Η σπειραματική βασική μεμβράνη (ΣΒΜ) η οποία μεταπίπτει σε τοιχωματική βασική μεμβράνη οριοθετεί την σπειραματική πύλη. Δια μέσου της πύλης τα σπειραματικά αρτηριόλια και το μεσάγγειο εισέρχονται στην ΣΒΜ η οποία σχηματίζει ένα σύμπλοκα αναδιπλωμένο σάκο. Εντός του σάκου αυτού τα νεφρικά αρτηριόλια ακολουθούν μια θυσανώδη πορεία οριζόμενη από τις κεντρικά τοποθετημενές περιοχές μεσαγγείου. Με αυτό τον τρόπο καλύπτεται το εσωτερικό της ΣΒΜ. Από τα έξω η ΣΒΜ καλύπτεται από το σπλαγχνικό επιθήλιο.

Τα σπειραματικά τριχοειδή προέρχονται από κλάδους του προσαγωγού αρτηριολίου. Κάθε ένας από αυτούς τους κλάδους διασυνδέεται με ένα δίκτυο αναστομόσεων με κατεύθυνση από τον αγγειακό προς τον ουρικό πόλο του σπειράματος. Με αυτόν τον τρόπο το σπείραμα υποδιαιρείται σε αγκύλες καθεμία από τις οποίες έχει ένα προσαγωγό και ένα απαγωγό τριχοειδές τμήμα. Οι τριχοειδικές αγκύλες δεν είναι απομονωμένες η μια από την άλλη. Μεταξύ των αγκυλών υπάρχουν αναστομώσεις. Τα απαγωγά τμήματα όλων των αγκυλών συγκλίνουν και σχηματίζουν το απαγωγό αρτηρίδιο. Το απαγωγό αρτηρίδιο (σε αντίθεση με το προσαγωγό αρτηρίδιο) σχηματίζεται εντός του σπειράματος. Κατά συνέπεια ένα τμήμα του απαγωγού αρτηριδίου είναι ενδοσπειραματικό. Το ενδοσπειραματικό τμήμα του απαγωγού αρτηριδίου έρχεται σε στενή επαφή με τον πρωτεύων αναστομωτικό κλάδο του προσαγωγού αρτηριδίου. Εξερχόμενο από το σπείραμα το απαγωγό αρτηρίδιο έρχεται σε στενή επαφή με το εξωσπειραματικό μεσάγγειο έτσι ώστε τα μεσαγγειακά

κύτταρα τοτ τοιχώματος του, σταδιακά μεταπίπτουν σε ενδοθηλιακά κύτταρα κατά την πορεία του στο εξωσπειραματικό μεσάγγειο.

Το εσωτερικό τοίχωμα των σπειραματικών τριχοειδών αποτελέιται από ενδοθηλιακά κύτταρα. Μικρή έκταση της επιφάνειας των ενδοθηλιακών κυττάρων έρχεται σε άμεση επαφή με το μεσάγγειο χωρίς τη παρέμβαση μεταξύ τους της βασικής μεμβράνης και αυτή αποτελεί τη παραμεσάγγειο περιοχή. Το μεγαλύτερο μέρος της στοιβάδας των ενδοθηλιακών κυττάρων των σπειραματικών τριχοειδών καλύπτεται από την ΣΒΜ επί της οποίας εδράζονται τα σπλαγχνικά επιθηλιακά κύτταρα (ποδοκύτταρα). Αυτό το τμήμα του τοιχώματος των τριχοειδών αποτελεί την επιφάνεια διήθησης.Το σπειραματικό μεσάγγειο αποτελεί τον κεντρικό άξονα του σπειραματικού θυσάνου, τα τριχοειδή του οποίου συνέχονται με αυτό μέσω των παραμεσαγγεικών περιοχών τους.

i) Σπειραματική Βασική Μεμβράνη (ΣΒΜ).

Η ΣΒΜ αποτελεί τον σκελετό του νεφρικού σπειράματος. Τοπογραφικά η ΣΒΜ αποτελείται από ένα περιτριχοειδικό και από ένα περιμεσαγγειακό τμήμα. Στο όριο μεταξύ των δύο τμημάτων η ΣΒΜ μεταβάλλεται από ένα κοίλο περιτριχοειδικό τμήμα σε ένα κυρτό περιμεσαγγειακό τμήμα. Τα σημεία καμπής αποτελούν τις μεσαγγειακές γωνίες. Η ΣΒΜ αναπτυξιακά προκύπτει από την σύντηξη των βασικών μεμβρανών των ποδοκυττάρων και των ενδοθηλιακών κυττάρων. Στην ενήλικο ζωή μετά την σύντηξη η παραγωγή της ΣΒΜ γίνεται σε μεγαλύτερο βαθμό από τα ποδοκύτταρα. Η ΣΒΜ υπόκειται σε μια διαδικασία συνεχούς αναδόμησης χωρίς να είναι γνωστοί οι ακριβείς μηχανισμοί. Το πάχος της ΣΒΜ ποικίλει ανάλογα με το υπό μελέτη είδος. Στον άνθρωπο το φυσιολογικό πάχος της ΣΒΜ κειμένεται μεταξύ 240 και 370 nm. Στον αρουραίο και σε άλλα πειραματόζωα το παχός της ΣΒΜ περιλαμβάνει μια

πυκνή στοιβάδα (lamina densa) η οποία περιβάλλεται από δύο στοιβάδές αραιής σύστασης (lamina rara interna; lamina rara externa). Τα κύρια συστατικά της ΣΒΜ αποτελούν το κολλαγόνο τύπου IV, λαμινίνη 521, περλεκάνη, agrin, γλυκοπρωτεΐνες (entactin/nidogen) και ινωδογονονεκτίνη. Έχουν επίσης παρατηρηθεί μόρια κολλαγόνου τύπου V και VI. Η βασική δομή της ΣΒΜ χαρακτηρίζεται από ένα τρισδιάστατο δίκτυο κολλαγόνου τύπου IV. Οι γλυκοπρωτεΐνες της ΣΒΜ είναι εντακτίνη, η λαμινίνη 521 και η ινωδογονονεκτίνη. Η λαμινίνη 521 αποτελεί το κύριο συστατικό και σχηματίζει ένα δεύτερο επιπροβαλλόμενο τρισδιάστατο δίκτυο στο κολλαγόνου τύπου IV. Τα δύο δίκτυα αυτά συνδέονται μέσω της εντακτίνης. Παράλληλα η εντακτίνη συνδέει την ΣΒΜ με υποδοχείς επιφανείας τύπου δυστρογλυκάνης και ιντεγκρίνης των ποδοκυττάρων και των ενδοθηλιακών κυττάρων. Αυτό το δίκτυο κολλαγόνου τύπου IV και λαμινίνης προσδίδει αντοχή στην ΣΒΜ και αποτελεί το σκελετό για την συγκρότηση και άλλων συστατικών της ΣΒΜ.

Οι πρωτεογλυκάνες της ΣΒΜ αποτελούνται από πρωτεΐνες οι οποίες είναι συνδεδεμένες ομοιοπολικά με γλυκοζαμινογλυκάνες και είναι συγκεντρωμένες στις στιβάδες αραιής σύστασης της ΣΒΜ. Το ηλεκτρο-αρνητικό φορτίο της ΣΒΜ οφείλεται στις πρωτεογλυκάνες της ΣΒΜ. Οι κύριες πρωτεογλυκάνες της ΣΒΜ είναι τύπου θειϊκής ηπαράνης (heparan sulfate proteoglycans) : Πιο άφθονη είναι η αγκρίνη (agrin) και υπάρχει και σημαντική παρουσία περλεκάνης. Τα μόρια των πρωτεογλυκανών συγκεντρωμένα δημιουργούν ένα δίκτυο εντός του οποίου παγιδεύονται μόρια νερού. Εντός της ΣΒΜ το δίκτυο των πρωτεογλυκανών πιθανόν να έχει δράση φραγής στην δημιουργία δεσμών υδρογόνου και κατά συνέπεια στην προσκόληση ανιονικών πρωτεϊνών του πλάσματος εξασφαλίζοντας με αυτόν τον τρόπο την ομαλή ροή ύδατος δια μέσου της ΣΒΜ.

<u>ii) Κυτταρικοί Τύποι του Νεφρικού Σωματίου (Εικόνα 1).</u>

Εντός του νεφρικού σωματίου βρίσκονται τρεις κυτταρικοί τύποι: Τα μεσαγγειακά κύτταρα, τα ενδοθηλιακά κύτταρα και τα ποδοκύτταρα. Τα μεσαγγειακά κύτταρα και η μεσάγγειος ουσία συνιστούν το σπειραματικό μεσάγγειο. Τα μεσαγγειακά κύτταρα έχουν ακανόνιστο σχήμα και διαθέτουν κυτταρικές απολήξεις οι οποίες έρχονται σε άμεση επαφή με την ΣΒΜ. Οι συνδέσεις μεταξύ των μεσαγγειακών κυττάρων και της ΣΒΜ είναι πυκνότερες (περιτριχοειδικό τμήμα ΣΒΜ) κατά μήκος των σπειραματικών τριχοειδών. Σε αυτές τις περιοχές οι απολήξεις των μεσαγγειακών κυττάρων εκτείνονται κάτωθεν του ενδοθηλίου, προς τις μεσαγγειακές γωνίες της ΣΒΜ όπου αγκυροβολούν. Γενικά οι απολήξεις των μεσαγγειακών κυττάρων συνδέουν αντιδιαμετρικά εδραζόμενες μεσαγγειακές γωνίες της ΣΒΜ καθώς και αντιδιαμετρικά εδραζόμενα τμήματα της ΣΒΜ. Τα μεσαγγειακά κύτταρα επικοινωνούν με την ΣΒΜ μέσω ιντεγκρίνης α₃β₁ και λουθέριου γλυκοπρωτεΐνης, μόρια συνδεόμενα με το δίκτυο της λαμινίνης. Η μεσάγγειος ουσία πληρώνει τον χώρο μεταξύ των μεσαγγειακών κυττάρων και της ΣΒΜ. Η μεσάγγειος ουσία αποτελείται από διάφορους τύπους κολλαγόνων (ΙΙΙ, ΙV, V και VI), πρωτεογλυκάνες τύπου θειϊκής ηπαράνης, ινοδονεκτίνη, λαμινίνη, εντακτίνη, και ινιδίνη-1(fibrillin-1) και άλλες πρωτεΐνες ελαστικών ινών. Μεταξύ αυτών των συστατικών η ινοδογονονεκτίνη είναι το πιο άφθονο συστατικό και συνδέεται με το δίκτυο μικροϊνιδίων της μεσαγγείου ουσίας. Το δίκτυο μικροϊνιδίων της μεσαγγείου ουσίας σχηματίζει μια τρισδιάστατη δομή η οποία συνδέει τα μεσαγγειακά κύτταρα με την ΣΒΜ. Η ιντεγκρίνη α₈ λειτουργεί ως υποδοχέας της εξωκυτταρίου ουσίας με τα μεσαγγειακά κύτταρα.

Τα σπειραματικά ενδοθηλιακά κύτταρα είναι μεγάλα επίπεδα κύτταρα τα οποία αποτελούνται από ένα κυτταρικό σώμα και λεπτυσμένα περιφερικά τμήματα τα οποία

έχουν μεγάλο αριθμό θυρίδων. Στον αρουραίο το 60% της επιφάνειας του ενδοθηλίου καταλαμβάνεται από τις θυρίδες. Το κυτταρόπλασμα των ενδοθηλιακών κυττάρων χαρακτηρίζεται από έλλειψη μικρο-πινο-κυτταρικών κυστιδίων συνηγορώντας στο γεγονός ότι η παρουσία των θυρίδων κάνει τις διάφορες διακυτταρικές διεργασίες περιττές. Η αυλική επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων είναι αρνητικά φορτισμένη. Αυτό συμβαίνει λόγω της παρουσίας πολυανιονικών γλυκοπρωτεϊνών, περιλαμβανομένης και της ποδοκαλυξίνης, μιας σιαλοπρωτεΐνης ευρισκόμενη και στην επιφάνεια των ποδοκυττάρων.

Τα σπειραματικά ενδοθηλιακά κύτταρα συνθέτουν και εκκρίνουν ενδοθηλίνη (endothelin), ενδοθηλιακό πάραγοντα χαλάρωσης (Endothelium Derived Relaxing Factor – EDRF), και αυξητικό παράγοντα των αιμοπεταλίων τύπου β (Platelet Derived Growth Factor –β – PDGF-β). Τα ενδοθηλιακά κύτταρα του σπειράματος έχουν υποδοχείς για τον αγγειακό ενδοθηλιακό αυξητικό παράγοντα- α (Vascular Endothelial Growth Factor – a – VEGFa) και για την αγγειοποιητίνη (angiopoetin), ουσίες παραγόμενες από τα ποδοκύτταρα. Η συνεχής ενεργοποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων από τον VEGFa διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην διατήρηση των σπειραματικών τριχοειδών.

Τα ώριμα ποδοκύτταρα αποτελούν κύτταρα υψηλής διαφοροποίησης. Το ογκώδες κυτταρικό σώμα των ποδοκυττάρων βρίσκεται εντός του ουρικού πόλου. Από το κυτταρικό σώμα εξέρχονται εκβλαστήσεις κατευθυνόμενες προς τη βασική μεμβράνη (πρωτογενείς ποδικές εκβλαστήσεις), οι οποίες διακλαδίζονται περεταίρω σε δευτερογενείς ποδικές εκβλαστήσεις οι οποίες προσφύονται στην ΣΒΜ. Οι δευτερογενείς ποδικές εκβλαστήσεις γειτονικών ποδοκυττάρων περιβάλλουν τα σπειραματικά τριχοειδή σε παράλληλη μεταξύ τους διάταξη και δημιουργούν μεταξύ τους σχισμές. Οι σχισμες αυτές διασυνδέονται μεταξύ τους με το λεπτό διάφραγμα.

Τα ποδοκύτταρα είναι πολωμένα κύτταρα διαθέτωντα μια βασικοπλαγία και μία αυλική επιφάνεια. Την βασικοπλαγία επιφάνεια των ποδοκυττάρων αποτελούν οι δευτερογενείς ποδικές απολήξεις οι οποίες εισέρχονται εντός της ΣΒΜ σε βάθος 40-60 nm. Το όριο μεταξύ της βασικοπλαγίας και αυλικής επιφάνειας των ποδοκυττάρων αποτελεί το λεπτό διάφραγμα. Τα ποδοκύτταρα συνθέτουν όλα τα συστατικά της ΣΒΜ.

Το σύνθετο σχήμα των ποδοκυττάρων οφείλετα στη παρουσία ενός καλώς ανεπτυγμένου κυτταροσκελετού. Στο κυτταροσκελετό του κυτταρικού σώματος και των πρωτογενών ποδικών εκβλαστήσεις κυριαρχούν οι μικροσωληνίσκοι και τα ενδιάμεσα ινίδια (βιμεντίνη,δεσμίνη) ενώ στις δευτερογενείς ποδικές εκβλαστήσεις κυριαρχούν τα μικροϊνίδια. Στο κυτταρικό σώμα των ποδοκυττάρων τα μικροϊνίδια σχηματίζουν ένα λεπτό στρώμα κάτωθεν της κυτταρικής μεμβράνης των ποδοκυττάρων.

Στις πρωτογενείς ποδικές εκβλαστήσεις οι δέσμες μικροσωληνίσκων σχετίζονται με πρωτεΐνες όπως οι MAP3, MAP4 (microtubule associated proteins 3 / 4) και η πρωτεΐνη tau. Επιπρόσθεται όπως και στους δενδρίτες των νευρικών κυττάρων οι μικροσωληνίσκοι των δευτερογενών ποδικών εκβλαστήσεων οργανώνονται μη ενιαία με μικροσωληνίσκους + ή – άκρου και σχετίζονται με την πρωτεΐνη CHO1/MKLP1. Επιπρόσθετα οι πρωτογενείς ποδικές εκβλαστήσεις περιέχουν την πρωτεΐνη ενδιαμέσων ινιδίων βιμεντίνη. Οι δευτερογενείς ποδικές εκβλαστήσεις είναι εφοδιασμένες με μια συσκευή σύσπασης. Επιμήκεις ζώνες μικροϊνιδίων διατρέχουν τον επιμήκη άζονα των δευτερογενών ποδικών εκβλαστήσεων. Οι ζώνες αυτές κάμπτονται κατά την μετάπτωση των δευτερογενών σε πρωτογενείς ποδικές εκβλαστήσεις και συνδέονται με τους μκροσωληνίσκους μέσω της πρωτεΐνης tau. Οι δέσμες μικροϊνιδίων περιέχουν ακτίνη (actin), μυοσίνη ΙΙ (myosin II), α- ακτινίνη (a-

actinin), και συναπτοποδίνη (synaptopodin). Η συναπτοποδίνη είναι μια σχετιζόμενη με την ακτίνη πρωτεΐνη, η οποία αλληλεπιδρά με την α-ακτινίνη και σχηματίζει παράλληλες δέσμες μικροϊνιδίων. Περιφερικά οι δέσμες ακτίνης αγκυροβολούν στην κυτταροπλασματική μεμβράνη της βασικοπλαγίας επιφάνειας των ποδοκυττάρων. Η αγκυροβόληση των δευτερογενών ποδικών εκβλαστήσεων στην ΣΒΜ επιτυγχάνεται με διαφορετικούς τύπους διαμεμβρανικών υποδοχέων. Υποδοχείς ιντεγκρίνης α₃β₁ προσδένονται εντός της ΣΒΜ σε μόρια κολλαγόνου ΙV, ινοδογονονεκτίνης, και λαμινίνης-11. Πρωτεϊνικά συμπλέγματα δυστρογλυκάνης συνδέουν ενδοκυττάρια μόρια ουτροφίνης με μόρια λαμινίνης-11, αγκρίνης, και περλεκάνης στην ΣΒΜ. Οι υποδογείς ιντεγκρίνης και δυστρογλυκάνης συνδέονται μέσω παξιλίνης, α-ακτινίνης, και άλλων διασυνδετικών πρωτεϊνών με τον κυτταροσκελετό της βινκουλίνης ακτίνης των ποδοκυττάρων. Με αυτόν τον τρόπο επιτυγγάνεται η διαβίβαση σημάτων και μηχανικών ερεθισμάτων και από τα δύο πλάγια της ΣΒΜ. Στην διαβίβαη σημάτων από την ΣΒΜ στο εσωτερικό του ποδοκυττάρου φαίνεται να έχει σημαίνοντα ρόλο, η σχετιζόμενη με τις ιντεγκρίνες κινάση (integrin linked kinase -ILK-1).

Πλειάδα υποδοχέων και ενδοκυττάριων μονοπατιών σηματοδότησης λαμβάνει χώρα εσωτερικό των ποδοκυττάρων. Σηματοδότηση διαμεσολαβούμενη από το cGMP (παράγοντες έκλυσης αποτελούν το κολπικό νατριουρητικό πεπτίδιο [ANP], το εγκεφαλικό νατριουρητικό πεπτίδιο [BNP], και η κυκλική νουκλεοτιδική φωσφοδιεστεράση [CNP]), διαμεσολαβούμενη από το cAMP (παράγοντες έκλυσης αποτελούν η προσταγλαδίνη E_2 , η ντοπαμίνη, η ισοπροτερενόλη, η παραθορμόνη [PTH] και το σχετιζόμενο με την παραθορμόνη πεπτίδιο [PTHrP]) και διαμεσολαβούμενη από Ca^{+2} (παράγοντες έκλυσης αποτελούν μια πληθώρα παραγόντων όπως η αγγειοτενσίνη ΙΙ, η ακετυλοχολίνη, PGF₂, η αργινινο-

βαζοπρεσίνη, η ενδοθηλίνη, και η ισταμίνη). Ο κύριος στόχος αυτής της σηματοδότησης είναι ο κυτταροσκελετός του ποδοκυττάρου. Οι σχισμές διήθησης αποτελούν τον χώρο διέλευσης του υπερδιηθήματος των ούρων διαμέσου των σπλαγχνικών επιθηλιακών κυττάρων. Έχουν πλάτος 30-40 nm και συνδέονται μεταξύ τους με το λεπτό διάφραγμα. Βάσει της πρωτεϊνικής σύστασης του το λεπτό διάφραγμα μπορεί να θεωρηθεί ως τροποποιημένος διακυτταρικός σύνδεσμος προσκόλλησης (adherens junction). Οι πρωτεΐνες που συμμετέχουν στο λεπτό διάφραγμα αποτελούν την Neph1, την p-cadherin, και την FAT. Άλλες πρωτεΐνες όπως η ZO-1, η ποδοσίνη, η CD2AP και η κατενίνες διαμεσολαβούν την σύνδεση του λεπτού διαφράγματος με τον κυτταροσκελετό της ακτίνης. Η νεφρίνη αποτελεί μέλος της υπερ-οικογένειας των ανοσοσφαιρινών (IgCAM), μεταλλάξεις του γονιδίου το οποίο κωδικοποιεί την νεφρίνη (NPHS1) προκαλλούν νεφρωσικό σύνδρομο Φιλλανδικού τύπου. Εκτός από τον δομικό ρόλο που έχει η νεφρίνη στην δομή του λεπτού διαφράγματος μπορεί να προκαλέσει σηματοδότηση διαμεσολαβούμενη από την κινάση MAP. Η Neph1 θεωρείται συνδέτης της νεφρίνης. Η ποδοσίνη ανήκει στην υπεροικογένεια των στοματινών και μεταλλάξεις του γονιδίου αυτής της πρωτεΐνης (NPHS2) προκαλούν το ανθεκτικό στα στεροειδή νεφρωσικό σύνδρομο. Η ποδοσίνη αλληλεπιδρά με την νεφρίνη και την CD2AP. Η πρωτεΐνη FAT αποτελεί μέλος της υπεροικογένειας των καντχερινών. Θεωρείται ότι αποτελεί το κύριο συστατικό του λεπτού διαφράγματος. Διαγονιδιακοί μύες με απενεργοποιημένο το γονίδιο της FAT αναπτύσουν λεπτό διάφραγμα. Η p-cadherin διασυνδέει, μέσω του ενδοκυτταρίου r τμηματός της, την διασύνδεση μεταξύ β- και γ- κατενίνης δημιουργόντας ένα σύμπλοκο το οποίο διασυνδέει την α-κατενίνη και την α-ακτινίνη με τον κυτταροσκελετό της ακτίνης.

Η αυλική επιφάνεια των ποδοκυττάρων καλύπτεται από έναν επιφανειακό μανδύα ο οποίος έχει μεγάλη περιεκτικότητα σιαλο-γλυκο-πρωτεϊνών (ποδοκαλυξίνη, ποδοενδίνη, και άλλες) και έτσι η επιφάνεια των ποδοκυττάρων είναι αρνητικά φορτισμένη. Η ποδοκαλυξίνη συνδέεται με τον κυτταροσκελετό της ακτίνης μέσω των πρωτεϊνών NHERF-2 και εζρίνης (ezrin). Το αρνητικό φορτίο των ποδοκυττάρων θεωρείται υπεύθυνο για το πρότυπο διάταξης των δευτερογενών ποδικών εκβλαστήσεων.



Εικόνα 1: Απεικόνιση νεφρικού σωματίου, και κυτταρικών τύπων.

3. Τρανσθυρετίνη

Η βιολογική λειτουργία της τρανσθυρετίνης έγγειται στο να μεταφέρει τις θυρεοειδικές ορμόνες και το σύμπλοκο προσδέουσας την ρετινόλη πρωτεΐνη(RBP)/βιταμίνης Α στους ιστούς.

<u>i) Γονιδιακή Έκφραση</u>

Το ανθρώπινο γονίδιο της τρανσθυρετίνης εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 18. Μελέτες με την χρήση in situ υβριδισμού εντοπίζουν το γονίδιο της τρανσθυρετίνης στην μονήρη θέση 18q11.2-q12.1³. Το ανθρώπινο γονίδιο της τρανσθυρετίνης περιλαμβάνει 4 εξώνια (μήκους 91 bp, 135 bp, 136 bp και 253 bp αντίστοιγα) και έχει μήκος 7 Kb. Επίσης περιλαμβάνει 3 εσώνια μήκους 934, 2090, και 3308 bp αντίστοιχα. Κατά μήκος του γονιδίου της τρανσθυρετίνης έχουν αναγνωριστεί 2 ανοικτά πλαίσια ανάγνωσης (open reading frames-ORF1/ORF2) ευρισκόμενα στο πρώτο και τρίτο εσλωνιο . Από το ORF1 δύναται να παραχθούν 2 πολυπεπτίδια μήκους 60 και 37 αμινοξέων αντίστοιχα. Από το ORF2 δύναται να παραχθούν 1 πολυπεπτίδιο μήκους 49 (ή εναλλακτικά 69) αμινοξέων. Όσον αφορά το ORF1 και ORF2 αυτά δεν αποδεικνύεται πειραματικά να παράγονται πρωτεΐνες οι οποίες να ρυθμίζουν την έκφραση του γονιδίου της τρανσθυρετίνης ή να ενέχονται σε τροποποίηση του mRNA της τρανσθυρετίνης⁴. Έχει διατυπωθεί η υπόθεση ότι αυτές οι περιοχές του γονιδίου της τρανσθυρετίνης αντιπροσωπεύουν μη εκφραζόμενες πλέον περιοχές ή ότι κάποια χρονική στιγμή της εξελικτικής πορείας είχαν ρόλο σε μετα-τη μετάφραση τροποποιήσεις του mRNA της τρανσθυρετίνης.

Η έκφραση του γονίδιου της τρανσθυρετίνης ρυθμίζεται τουλάχιστον από ένα εκκινητή και ένα άπω ενισχυτή. Για την ενεργοποίηση της έκφρασης του γονιδίου απαιτείται η συνεργική ενεργοποίηση από μεταφραστικούς παράγοντες του εκκινητή και του ενισχυτή. Αυτή η συνεργική ενεργοποίηση ομοιάζει να είναι ειδική για κάθε κυτταρικό τύπο. Αυτές οι περιοχές ρυθμίζουν την έκφραση του γονιδίου της τρανσθυρετίνης μέσω της πρόσδεσης των ηπατικών πυρηνικών παραγόντων HNF-4, HNF-3 (Foxa1, Foxa2 και Foxa3), HNF-1, και της προσδεόμενης στον ενισχυτή CCAAT πρωτεΐνης (C/EBP). Ένας συνδοιασμός παραγόντων οι οποίοι προσδέονται στις ρυθμιστικές περιοχές έκφρασης του γονιδίου της τρανσθυρετίνης μέσω της προσδείον του γονιδίου της τρανσθυρετίνης απαιτείται για

την ενεργοποίηση και τη διατήρησης της έκφρασης του γονιδίου στο ήπαρ. Οι πρωτεΐνες HNF-3 ρυθμίζουν καθοριστικά την έκφραση του γονιδίου της τρανσθυρετίνης σε κυτταρικές σειρές HepG2. Οι πρωτεΐνες αυτές ανήκουν σε μια οικογένεια μεταφραστικών παραγόντων με ομολογία δίκην έλικας/κεφαλής πηρουνιού (helix/forkhead) προσδέουσα στο DNA περιοχής. Η ενεργοποίηση της Foxa-1 επάγει την μεταγραφή της Foxa-2 η οποία συνοδεύεται από αύξηση της έκφρασης της τρανσθυρετίνης. Ο εκκινητής της τρανσθυρετίνης διαθέτει πολλαπλές θέσεις πρόσδεσης για τον παράγοντα Foxa-2 στα τετράποδα (άνθρωπος, αρουραίος, όρνιθα, βάτραχος). Στο ψάρι, ο εκκινητής της τρανσθυρετίνης δεν διαθέτει θέσεις πρόσδεσης για τον παράγοντα Foxa-2⁵.

Κατά την διάρκεια της απάντησης του ήπατος σε καταστάσεις οξείας φάσης η έκφραση του γονιδίου της τρανσθυρετίνης μειώνεται στο μισό. Οι πρωτεΐνες οξείας φάσης (II-6, II-1 και TNF-a), προσδένονται σε υποδοχείς των ηπατοκυττάρων και επάγουν ή καταστέλουν την παραγωγή μεταγραφικών παραγόντων όπως οι Foxa-2 και η C/EBP, παράγοντες οι οποίοι προκαλούν την μείωση της έκφρασης του γονίδιου της τρανσθυρετίνης. Επιπρόσθετο έλεγχο στην έκφραση του γονιδίου της τρασνθυρετίνης ασκούν οι θυρεοειδικές ορμόνες. Στα θηλαστικά οι στεροειδείς ορμόνες (ανδρογόνα, οιστρογόνα) προκαλούν αύξηση της γονιδιακής έκφρασης της τρανσθυρετίνης στο ήπαρ και στο χοριοειδές πλέγμα με άγνωστους μηχανισμούς. Στον αρουραίο η τρανσθυρετίνη εκφράζεται κυρίως στο ήπαρ, σημαντικές ποσότητες mRNA εντοπίζονται σε συγκεκριμένες περιοχές του εγκεφαλικού ιστού. Μικρότερο ποσοστό έκφρασης της τρανσθυρετίνης εντοπίζονται στην καρδιά, στον σκελετικό

μύ, στον στόμαχο και στον σπλήνα⁶.

<u>iii) Δομή^{7,8}</u>

Η πολυπεπτιδική αλυσίδα της τρανσθυρετίνης αποτελείται από 127 αμινοξέα. Η κυριαρχή δομή της δευτεροταγούς δομής της τρανσθυρετίνης είναι η δομή του βπτυχωτού φύλου. Πάνω από το 45% των αμινοξέων οργανώνονται σε 8 έλικες με δομή β-πτυχωτου φύλου (έλικες Α-Η). Οι έλικες Α, Β, C, Ε, F, G, και Η αποτελούνται από 6 – 9 αμινοξέα. Η έλικα D αποτελείται από 3 αμινοξέα. Οι έλικες διατάσσονται σε 2 πτυχωτά φύλα σε απόσταση 10 Å, το ένα αποτελούμενο από τις έλικες DAGH και το άλλο από τις έλικες CBEF. Αυτά τα β-πτυχωτά φύλα αποτελούν το μεγαλύτερο μέρος της επιφάνειας της τρανσθυρετίνης. Οι αλληλεπιδράσεις δεσμών υδρογόνου μεταξύ των ελικών είναι αντιπαράλληλες εκτός από αυτές των ελικών Α και G. Το αδρό σγήμα του μονομερούς μπορεί να γαρακτηριστεί ως αυτό ενός περικεκομένου κώνου μήκους 45 Å, του οποίου η διάμετρος μειώνεται από τα 30 Å στα 20 Å. Οι β-έλικες διατρέχουν παράλληλα τον επιμήκη άξονα του κώνου. Οι δομές β-πτυχωτού φύλου προσδίδουν ένα βαθμό ελίκωσης ο οποίος μειώνει τις μη ομοιοπολικές συνδέσεις μεταξύ γειτονικών ατόμων άνθρακα και πλευρικές αλυσίδες αμινοξέων. Η τριτογενής δομή της τρανσθυρετίνης καθορίζεται σε μεγάλο βαθμό από την αλληλεπίδραση των β-πτυχωτών φύλων των ελικών DAGH και CBEF. Το εσωτερικό κάθε υπομονάδας περιέχει πλευρικές αλυσίδες υδρόφοβων αμινοξέων. Τα αμινοξέα των δύο υπομονάδων δεν διαπλέκονται μεταξύ τους. Με αυτόν τον τρόπο ο πυρήνας της κάθε υπομονάδας αποτελείται από δύο επίπεδα. Στο τέλος της κάθες υπομονάδας περιέχεται μια έλικα. Σε αυτό το σημείο οι δομές β-πτυχωτού φύλου δημιουργούν μια συμπαγή δομή. Αντιδιαμετρικά της δομής αυτής η μεγαλύτερη απόσταση των β-πτυχωτών φύλων δημιουργεί μια περισσότερο χαλαρή δομή.

Οι αλληλεπιδράσεις μετάξυ τεσσάρων πανομοιότυπων υπομονάδων (I-IV) συμβαίνουν σε δύο μη αλληλεπικαλυπτόμενα επίπεδα και στα αντίστοιχα συμμετρικά τους. Αυτά τα επίπεδα είναι : α) Μεταξύ των μονομερών Ι και ΙΙ και το αντίστοιχα

συμμετρικό του μεταξύ των μονομερών ΙΙΙ και ΙV, β) 2 επίπεδα τα οποία περιλαμβάνουν και τα τέσσερα μονομερή, αλλά χαρακτηρίζονται από αλληλεπίδρασεις μεταξύ του μονομερούς Ι και ΙV στο ένα επίπεδο και από αλληλεπιδράσεις μεταξύ του μονομερούς ΙΙ και ΙΙΙ στο συμμετρικά αντίστοιχο του επίπεδο. Έτσι δημιουργούνται επίπεδα αλληλεπιδράσεων μεταξύ μονομερούςμονομερούς όσο και αλληλεπιδράσεων μεταξύ διμερούς-διμερούς.

Το επίπεδο αλληλεπίδρασης μεταξύ μονομερούς-μονομερούς χαρακτηρίζεται περισσότερο από αλληλεπιδράσεις μεταξύ υδρόφιλων αμινοξέων. Οι κύριες αλληλεπιδράσεις αφορούν τον σχηματισμό δεσμών υδρογόνου μεταξύ των αλυσίδων F και H των δύο β-πτυχωτών φύλων σε κάθε μονομερές καθώς και δεσμών υδρογόνου οι οποίοι αναπτύσσονται μεταξύ των πλευρικών αλυσίδων των αμινοξέων. Το επίπεδο αλληλεπίδρασης μεταξύ των δύο διμερών λαμβάνει χώρα λόγω ανάπτυξης δεσμών υδρογόνου μεταξύ των αμινοξέων στις έλικες (έλικα GH και έλικα AB) στα άκρα δύο πτυχωτών φύλων. Από αυτές η έλικα AB προβάλει ώστε να απομακρύνει τις δομές των β-πτυγωτών φύλων να έρθουν σε επαφή. Οι έλικες AB των μονομερών Ι και IV, Ι και ΙΙ, και Ι και ΙΙΙ έρχονται σε επαφή σε συμμετρικά οριζόμενα συμμετρικά ζεύγη, και ευρίσκονται στα ακραία τμήματα των αντίθετων β-πτυχωτών φύλων. Κάθε έλικα μεταξύ των τμημάτων Α και Β αλληλεπιδρά με το αντίθετα ευρισκόμενο διμερές βάσει της αλληλεπίδρασης των μονομερών. Με αυτόν τον τρόπο η έλικα AB του μονομερούς Ι έρχεται σε επαφή με τα μονομερή ΙΙΙ και IV. Η έλικα AB με την οποία είναι σε επαφή έρχεται σε επαφή με τα μονομερή Ι και ΙΙ. Σε αυτό το επίπεδο όλα τα μονομερή έρχονται σε επαφή.



Εικόνα 2: Το μόριο της τρανσθυρετίνης.

<u>iii) Λειτουργία της πρωτεΐνης.</u>

Οι περισσότερο γνωστές λειτουργίες της τρανσθυρετίνης είναι η μεταφορά της θυροξίνης (T₄) και της βιταμίνης Α μέσω της πρόσδεσης της συνδέουσας την ρετινόλη πρωτεΐνη (RBP)⁹.Προκειμένου να δείχνεται ο διττός ρόλος της πρωτεΐνης ως μεταφορέα της θυροξίνης και της βιταμίνης Α (ρετινόλης) η πρωτεΐνη ονομάστηκε τρανσθυρετίνη. Διάφορες μεταλλάξεις της τρανσθυρετίνης σχετίζονται με την οικογενή αμυλοειδική πολυνευροπάθεια (FAP) μια νόσο κληρονομούμενη με τον αυτοσωμικό επικρατή χαρακτήρα, η οποία χαρακτηρίζεται από εξωκυττάριο εναπόθεση τρανσθυρετίνης¹⁰. Η τρανσθυρετίνη εμφανίζεται να διαδραματίζει επιπρόσθετες λειτουργίες στο νευρικό σύστημα και έχει συσχετιστεί με έναν αριθμό νοσημάτων όπως η νόσος Alzheimer, η νόσος Parkinson, η σχιζοφρένεια και η κατάθλιψη. To 99% των κυκλοφορούντων θυρεοειδικών ορμονών συνδέεται με πρωτεΐνες του πλάσματος (T₄-συνδέουσα σφαιρίνη, τρανσθυρετίνη, και την λευκωματίνη). Στους ανθρώπους το 70% της T₄ του πλάσματος είναι συνδεδεμένη με την T₄-συνδέουσα σφαιρίνη ενώ η τρανσθυρετίνη μεταφέρει περίπου το 15% της ολικής ποσότητας T₄. Στα τρωκτικά το ποσοστό T₄ συνδεδεμένης με την τρανσθυρετίνη είναι υψηλότερο (50% της ολικής T₄). Το μη συνδεδεμένο με πρωτεΐνες κλάσμα της T₄ στο πλάσμα αποτελεί < 0,1% της ολικής ποσότητας της ορμόνης. Στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό (ENY) η τρασνθυρετίνη αποτελεί τον κύριο μεταφορέα T₄ τόσο στον άνθρωπο όσο και στα τρωκτικά. Στο ENY το 80% T₄ μεταφέρεται από την τρανσθυρετίνη. Όσον αφορά την απόδοση T₄ στους ιστούς αυτή φαίνεται να εξυπηρετείται τόσο από τις πρωτεΐνες μεταφορείς όσο και ελεύθερα μετά την αποσύνδεση της από τα συμπλέγματα της με τις πρωτεΐνες μεταφορείς¹¹.

Παρόλο του ότι η τρανσθυρετίνη φέρεται να έχει έλασσων ρόλο στην μέσω του αίματος μεταφορά των θυρεοειδικών ορμονών, λειτουργεί ως μέσο της μεταφοράς βιταμίνης Α στους ιστούς με την διαμεσολάβιση της μεταφοράς της συνδέουσας την ρετινόλη πρωτεΐνης (RBP)¹². Όσον αφορά την απόδοση της ρετινόλης στα κύτταρα, η τρέχουσα άποψη είναι ότι η τρασνθυρετίνη αποτελεί απλά φορέα του συμπλέγματος RBP-ρετινόλης. Πράγματι η πρόσδεση της RBP διαμεσολαβείται από ένα μεμβρανικό υποδοχέα (STRA6) ο οποίος μεταφέρει την ρετινόλη από το εξωκυττάριο στο ενδοκυττάριο περιβάλλον, χωρίς την διαμεσολάβηση της τρανσθυρετίνης.

Η τρανσθυρετίνη προσδένει την συνδέουσα την ρετινόλη πρωτεΐνη (retinol binding protein – RBP). Στο κυκλοφορούν σύμπλεγμα της RBP και τρανσθυρετίνης ένα μόριο τρανσθυρετίνης είναι συνδεδεμένο με ένα μόριο συνδέουσας την ρετινόλη πρωτεΐνη. Η RBP έχει μοριακό βάρος 21 KD. Έχει προταθεί ότι αυτή η σύνδεση αποτρέπει την RBP από το να διηθείται στο αγγείωδες σπείραμα και την απώλεια της από τα ούρα.

Επίσης έχει προταθεί ότι η βιταμίνη Α αποκλειστικά μεταφέρεται στους ιστούς μέσω της συνδέουσας πρωτεΐνης της. Σε ποντίκια στα οποία έχει απενεργοποιηθεί το γονίδιο της τρανσθυρετίνης τα επίπεδα στο πλάσμα της προσδέουσας την ρετινόλη πρωτεΐνη και της ρετινόλης μειώνονται στο 5% και 6% σε σχέση με αυτά του πλάσματος των αγρίου τύπου ποντικιών. Παρόλα αυτά, τα ποντίκια αυτά είναι υγιή, σε σύγκριση με ποντίκια τα οποία πάσχουν από έλλειψη βιταμίνης Α και έχουν παρόμοια επίπεδα βιταμίνης Α. στο πλάσμα. Στα ποντίκια με απενεργοποιημένο το γονίδιο της τρανσθυρετίνης τα ιστικά επίπεδα βιταμίνης Α βρίσκονται σε φυσιολογικό επίπεδο, και επιπλέον ελάχιστη ποσότητα RBP βρίσκεται στα ούρα αυτών των ποντικών. Τα δεδομένα αυτά υποστηρίζουν ότι είτε η γνώση όσον αφορά την κατανομή της βιταμίνης Α στους ιστούς είναι ελλειπής είτε ότι υπάρχουν άλλοι άγνωστοι μηχανισμοί οι οποίοι αντιρροπούν την έλλειψη τρανσθυρετίνης. Επιπλέον η κατανομή της βιταμίνης Α στους ιστούς εξελικτικά έκανε τη παρουσία πρωιμότερα της εμφάνισης της τρανσθυρετίνης και της RBP και επέτρεψε να αναπτυχθούν και άλλοι μηχανισμοί κατανομής της βιταμίνης Α στους ιστούς.

Σε ανάλυση μικροσυστοιχιών (microarray analysis), επιβεβαιωμένη με real-time PCR έχει δειχθεί ότι η τρανσθυρετίνη είναι μειωμένη 2 φορές στον ιππόκαμπο αρουραίων με επηρρεασμένη μνήμη σε σχέση με ζώα ελέγχου ίδιας ηλικίας τα οποία δεν παρουσιάζουν απώλεια μνήμης. Ως επιβεβαίωση αυτών των παρατηρήσεων ποντίκια στα οποία έχει σιγασθεί το γονίδιο της τρανσθυρετίνης (TTR-KO), σε ηλικίας. Τα ελλείματα στην μνήμη των ποντικών φαίνεται να αναστρεφόταν μερικώς με την χορήγηση ρετινοϊκού οξέος (βιταμίνη A). Επιπρόσθετα TTR-KO ποντίκια σε ηλικία 5 μηνών παρουσιάζουν βλάβες στην χωρική μνήμη σε σχέση με σχέση με την ομάδα ελέγχου¹³.

Αυτά τα ευρήματα συνηγορούν ότι η απουσία τρανσθυρετίνης επιταχύνει την γνωσιακή έκπτωση η οποία ακολουθεί, φυσιολογικά, την διαδικασία της γήρανσης. Εκτός από την σύνδεση της με τις θυρεοειδικές ορμόνες και την RBP, η τρανσθυρετίνη συνδέεται με λιποπρωτεΐνες χαμηλής και υψηλής πυκνότητος, μέσω της απολιποπρωτεΐνης Α-Ι (ApoA-I). Στην περεταίρω ανάλυση της συσχέτισης ΑροΑ-Ι και τρανσθυρετίνης, η τρανσθυρετίνη εμφανίζεται να έχει λειτουργία πρωτεάσης, ικανή να πρωτεολύει το καρβόξυ-τελικό άκρο της ApoA-I^{14,15}. Η πρωτεόλυση της ApoA-I από την τρανσθυρετίνη έχει επίδραση στην βιολογία των λιποπρωτεϊνών και στην ανάπτυξη αθηροσκλήρωσης, μειώνοντας την κάθαρση της γοληστερόλης (cholesterol efflux) και αυξάνοντας την αμυλοειδογενή επίδραση της AdoA-I¹⁶. Το γεγονός ότι η τρανσθυρετίνη έχει πρωτεολυτική δράση θέτει το ενδεχόμενο η δράση της να μην περιορίζεται σε ένα υπόστρωμα. Όντως η τρανσθυρετίνη φέρεται να πρωτεολύει το νευροπεπτίδιο Υ (NPY), και το πεπτίδιο αμυλοειδούς β. Αυτή η πρωτεολυτική δραστηριότητα της τρανσθυρετίνης φαίνεται να είναι σγετική με τις ιδιότητες της: Στο μεταβολισμό των νεύροπεπτιδίων και στην ενίσχυση της αναγέννησης των νεύρων¹⁷.

Όσον αφορά τον μεταβολισμό των νευροπεπτιδίων η απουσία τρανσθυρετίνης σε TTR-KO ποντίκια προκαλεί αυξημένη έκφραση του γονιδίου της πεπτιδυλ-γλικίνηςα- αμυδικής μόνο-οξυδάσης (PAM) και της λιποπρωτεϊνικής λιπάσης. Το ένζυμο PAM ως τώρα αποτελεί το μόνο γνωστό ένζυμο το οποίο προσθέτει αμίδια σε νευροπεπτίδια και διαδραματίζει κεντρικό ρόλο στην ωρίμανση των νευροπεπτιδίων. Η αύξηση της γονιδιακής έκφρασης του PAM έχει επιβεβαιωθεί στα γάγγλια των νωτιαίων νεύρων, στο ισχιακό νεύρο, στον ιππόκαμπο, στον εγκεφαλικό φλοιό και στον νωτιαίο μυελό TTR-KO ποντικών. Με αποτελέσμα τόσο στο περιφερικό και στο κεντρικό νευρικό σύστημα όσο και στο ENY, TTR-KO ποντικών να

παρατηρείται αυξημένη ποσότητα NPY. Αυτό το εύρημα σχετίζεται με τη παρατηήρηση ότι τα TTR-KO ποντίκια υποφέρουν σε μικρότερο βαθμό από κατάθλιψη σε σχέση με τις φυσιολογικές ομάδες ελέγχου. Εκτός αυτής της παρατήρησης, το NPY φαίνεται και ως νευροδιαβιβαστής να έχει και αντικαταθλιπτική δράση.

Τα TTR-KO ποντίκια είναι περισσότερο δραστήρια από ότι τα ποντίκια ελέγχου και αυτού του είδους η παρατήριση έχει οδηγήσει στο συμπέρασμα ότι τα TTR-KO ποντίκια είναι λιγότερο ευάλωτα στην ανάπτυξη καταθλιπτικών συμπεριφορών. Ο συγκεκριμένος φαινότυπος αποδίδεται σε αυξημένα επίπεδα νορεπινεφρίνης στο μεταιχμιακό σύστημα στον πρόσθιο εγκέφαλο.

Η απουσία τρανσθυρετίνης σχετίζεται επίσης με μειωμένο αριθμό εμμύελων και αμύελων ινών. Διαγονιδιακά ζώα τα οποία εκφράζουν τρανσθυρετίνη στους νευρώνες τους, σε υπόβαθρο απαλοιφής του γονιδίου της τρανσθυρετίνης δεν παρουσιάζουν ανάλογη παθολογο-ανατομική εικόνα. Απουσία τρανσθυρετίνης (In vitro) παρατηρείται ελαττωμένη ανάπτυξη νευριτών. Επιπλέον σε νευρώνες από τα γάγγλια των νωτιαίων νεύρων, η ενδοκυττάρωση της τρανσθυρετίνης είναι εξαρτώμενη από κλαθρίνη και διαμεσολαβούμενη από την μεγκαλίνη (megalin). Η ενδοκυτταρωμένη τρανσθυρετίνη είναι απαραίτητη για την αναγέννηση των νευρώνων¹⁸.

Η τρανσθυρετίνη ενέχεται στην παθογένεση του συνδρόμου Guillain-Barre (GBS). Το ENY ασθενών με GBS έχει 5 φορές μικρότερη ποσότητα τρανσθυρετίνης όταν γίνεται σύγκριση με υγιείς μάρτυρες. Αυτό υποδηλώνει ότι οι χαμηλές συγκεντρώσεις τρανσθυρετίνης μπορεί να είναι αρνητικός δείκτης για το GBS⁹.

Η τρανσθυρετίνη δρά προστατευτικά όσον αφορά την νόσο Alzheimer (AD). Η δράση της φαίνεται να διαμεσολαβείται μέσω της πρωτεόλυσης των Αβ πεπτιδίων
καθώς και ως ρυθμιστής της παρουσίας των πεπτιδίων Αβ στον εξωκυττάριο χώρο. Ηλικιωμένα APP23 διαγονιδιακά ποντίκια φέροντα το ανθρώπινο γονίδιο της τρανσθυρετίνης παρουσίαζαν παθολογο-ανατομική εικόνα με λιγότερες βλάβες καθώς και μικρότερη ποσότητα Αβ πρωτεΐνης σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Όταν APP23 διαγονιδιακά ποντίκια διασταυρώθηκαν με TTR-KO ποντίκια ώστε να απαλειφθεί το μεταλλαγμένο γονίδιο της τρανσθυρετίνης, τότε η ποσότητα της Αβ πρωτεΐνης αυξήθηκε σε σχέση με την ομάδα ελέγχου, και παρουσιάστηκαν πρώϊμα βλάβες δηλωτικές της AD στον εγκέφαλο των διαγονιδιακών ζώων. Παράλληλα νεαρά ζώα στα οποία έλειπε το γονίδιο της τρανσθυρετίνης παρουσίαζαν χωρικό έλλειμα, ακόμα με την έλλειψη αλληλεπίδρασης με Αβ πρωτεΐνη¹⁹.

Η νόσος του Πάρκινσον (PD) χαρακτηρίζεται από απώλεια ντοπαμινεργικών νευρώνων στην μέλαινα ουσία, με την ακόλουθο μείωση των επιπέδων ντοπαμίνης στο ραβδωτό σώμα και την εκδήλωση μυϊκού τρόμου, βραδικινησίας, μυϊκής δυσκαμψίας, και αστάθειας. Σε ασθενείς με PD, οι οποίοι υπεβλήθησαν σε αύτομεταμόσχευση του μυελού των επινεφριδίων παρατηρήθηκε αύξηση 1.9 φορές της ποσότητας της τρανσθυρετίνης στο ENY. Αυτές οι μεταβολές αποδόθηκαν στην ενεργοποίηση των χοριοειδών πλεγμάτων και ενέπλεξαν την παρουσία τρανσθυρετίνης στο ENY στην βελτίωση που παρατηρήθηκε σε μερικούς από τους ασθενείς που υπεβλήθησαν στην επέμβαση²⁰.

Από τα παραπάνω προκύπτει ότι η τρανσθυρετίνη έχει πολλαπλούς αναδυόμενους ρόλους στην φυσιολογία του ανθρώπινου οργανισμού και του νευρικού συστήματος, πολλοί από τους οποίους μέχρι πρόσφατα ήταν άγνωστοι και για τους οποίους οι ακριβείς μηχανισμοί δράσης είναι άγνωστοι.

4. Αμυλοείδωση

<u>i) Ορισμός</u>

Ο όρος αμυλοείδωση αναφέρεται σε μία ετερογενή ομάδα παθήσεων οι οποίες σχετίζονται με έκτοπη εξωκυττάρια εναπόθεση πρόδρομων πρωτεϊνών οι οποίες σχηματίζουν μια χαρακτηριστική ινιδική δομή. Η εναπόθεση αμυλοειδούς πιστεύεται ότι αναπτύσσεται με την αύξηση της ηλικίας, εφόσον οι ασθενείς φέρουν τις υπεύθυνες πρωτεΐνες για μακρό χρονικό διάστημα. Μικρές ποσότητες αμυλοειδούς έχουν ασθενές αποτέλεσμα σε οποιαδήποτε οργανική λειτουργία, ενώ υπέρμετρη εναπόθεση αμυλοειδούς στα διάφορα συστήματα είναι δυνητικά θανατηφόρα²¹.

Ο κλασσικός ιστορικός ορισμός του αμυλοειδούς είναι η εξωκυττάρια εναπόθεση πρωτεΐνης στην οποία προσδένεται το ερυθρό του Κογκό (CR) και παράγει πράσινοκίτρινη διπλοδιαθλαστικότητα όταν εκτείθεται στο πολωμένο φως^{22,23}. Η διάθλαση ακτίνων X ευθυγραμμισμένων ινιδίων αμυλοειδούς αποδίδει χαρακτηριστικό πρότυπο με διάθλαση μεσημβρινού στα 4,7 Ε και διάθλαση ισημερινού περίπου στα 8-11 Ε λόγω της δομής β-πτυχωτού φύλλου (cross b sheet structural motif) που κατέχουν τα ινίδια²⁴. Στην δομή β-πτυχωτού φύλλου, σε κάθε β πτυχωτή επιφάνεια οι μεμονωμένες έλικες β-αλυσίδων βρίσκονται κάθετα στον άξονα των ινιδίων (διάστημα 4,7 Ε), ενώ οι β-πτυχωτές επιφάνειες είναι παράλληλες με τον άξονα των ινιδίων. Υπό το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο τα ινίδια αμυλοειδούς παρουσιάζονται μακρά, μη διακλαδιζόμενα με διάμετρο 6-12 nm, υποδεικνύοντας ότι αποτελούνται από μια διάταξη χιλιάδων αντιγράφων πεπτιδίων/πρωτεΐνης.

Η ονοματολογία του αμυλοειδούς βασίζεται στην χημική ταυτότητα της πρωτεΐνης η οποία σχηματίζει τα ινίδια αμυλοειδούς καθώς και από την κλινική ταξινόμηση του τύπου της αμυλοείδωσης. Μια πρωτεΐνη η οποία μπορεί να σχηματίσει αμυλοειδικά ινίδια ορίζεται ως τέτοια όταν βρίσκεται εντός εναποθέσεων του ανθρωπίνου σώματος, όταν εμφανίζει συγγένεια για την χρώση CR και με την επισκόπιση υπό

πολωμένο φως παρουσιάζει πράσινη διπλοδιαθλαστικότητα. Όπου αυτό είναι δυνατό η χημική ταυτότητα της πρωτεΐνης θα πρέπει να αποδεικνύεται με αλληλούχιση της αμινοξικής της αλληλουχίας²⁵. Υπάρχει η σύσταση οι περιγραφικοί όροι (γεροντική αμυλοείδωση, καρδιακή αμυλοείδωση) να αποφεύγονται καθώς υπάρχει πλέον αιτιολογική-χημική ταξινόμιση με βάση την ουσία η οποία προκαλεί αμυλοείδωση²⁵. Ανάλογα με το εάν ένας τύπος αμυλοειδούς σχετίζεται με εντοπισμένη ή συστηματική συμμετοχή, τότε η αμυλοείδωση χαρακτηρίζεται εντοπισμένη ή/και συστηματική²⁵.

<u>ii) Τύποι συστηματικών αμυλοειδώσεων.</u>

Η ετήσια επίπτωση των συστηματικών αμυλοειδώσεων είναι 9 ασθενείς ανά εκατομμύριο πληθυσμού ανά έτος και τις κατατάσσει στα σπάνια νοσήματα²⁶. Όμως η επίπτωση αυτή συγκρίνεται με αυτή της χρόνιας μυελογενούς λευχαιμίας και της νόσου του Hodgkin, νοσήματα τα οποία είναι γνωστά στην παθολογική κοινότητα²⁷. Οι πιο συχνές μορφές αμυλοειδώσεων είναι πλέον θεραπεύσιμες, η επιβίωση των ασθενών μπορεί να βελτιωθεί σημαντικά, η ποιότητα ζωής τους μπορεί να αποκατασταθεί σε μεγάλο βαθμό, αρκεί η διάγνωση και η θεραπεία να λάβουν χώρα σε πρώϊμα στάδια της νόσου²⁸. Γι αυτούς τους λόγους, η ιατρική κοινότητα και ειδικότερα η παθολογική ιατρική κοινότητα (στην οποία παραπέμπονται ασθενείς με πολύ-οργανική δυσλειτουργία για διερεύνηση) οφείλει να έχει γνώση αυτών των νοσημάτων,για να αναγνωρίζει τις πρώϊμες εκδηλώσεις αυτών έγκαιρα, όταν ακόμη η βλάβη των οργάνων στόχων μπορεί να βελτιωθεί η αβλιωθεί ή να σταθεροποιηθεί με την θεραπεία.

Οι μορφές συστηματικών αμυλοειδώσεων οι οποίες είναι γνωστές μέχρι σήμερα και έχουν ταξινομηθεί ανάλογα με τις διαφορετικές πρόδρομες πρωτεΐνες είναι 15²⁵. Οι πιο συχνές από αυτές είναι 5 και συνιστούν το 99% των ασθενών²⁸. Οι παθογενετικοί

μηχανισμοί (σε μοριακό επίπεδο), μέσω των οποίων διαλυτές πρωτεΐνες γίνονται επιρρεπείς στο να υποστούν μια μη αντιστρεπτή μετάβαση της ενδογενούς διαμόρφωσης τους σε υψηλής τάξης συσσωματώματα, χαρακτηριστικά του αμυλοειδούς, είναι ετερογενείς. Αυτοί περιλαμβάνουν αυξημένη σύνθεση (αντιδραστική αμυλοείδωση λόγω χρόνιας φλεγμονής), μεταλλάξεις οι οποίες αυξάνουν την τάση δημιουργείας αμυλοειδούς στην περίπτωση των κληρονομικών μορφών αμυλοείδωσης, και η διαδικασία της γήρανσης στην περίπτωση της γεροντικής συστηματικής αμυλοείδωσης.

Η αμυλοείδωση η οποία προκαλείται από τις ελαφρές αλυσίδες των ανοσοσφαιρινών (AL-αμυλοείδωση) αποτελεί την πιο συχνή μορφή συστηματικής αμυλοείδωσης στον Δυτικό κόσμο. Στην ΑL-αμυλοείδωση η παθογενετική πρωτεΐνη είναι μονοκλωνική ελαφρά άλυσος η οποία παράγεται, συνήθως από ένα μικρό κλώνο πλασματοκυττάρων του μυελού των οστών²⁹. Τόσο η συγκέντρωση των ελαφρών αλύσων όσο και μεταλλάξεις του μορίου της ελαφράς αλύσου συμμετέχουν στην παθογένεση της AL-αμυλοείδωσης. Η καρδιακή βλάβη στην AL-αμυλοείδωση προκαλείται από το άμεση τοξική δράση των κυκλοφορούντων ελαφρών αλυσίδων. Πειραματικά δεδομένα έχουν δείξει ότι η έγχυση ελαφρών αλυσίδων από ασθενείς με AL-αμυλοείδωση και καρδιακή προσβολή, αυξάνει την τέλο-διαστολική πίεση απομονωμένων καρδιών ποντικών³⁰. Σε ασθενείς στους οποίους με την γορήγηση της θεραπείας επιτυγχάνεται μείωση του φορτίου των κυκλοφορούντων ελαφρών αλύσων, η καρδιακή δυσλειτουργία αναστρέφεται παρότι οι εναποθέσεις αμυλοειδούς παραμένουν αμετάβλητες³¹. Συγκεκριμένα δομικά χαρακτηριστικά των βλατπικών ελαφρών αλύσων έχουν ρόλο στον τροπισμό σε συγκεκριμένα οργανικά συστήματα. Τα γονίδια ελαφρών αλυσίδων (Vλ genes) IGL V2-14, IGVL6-57 και IGLV3-1 συνεισφέρουν περίπου στο 60% των αμυλοειδικών λ αλυσίδων^{32,33}. Οι αμυλοειδικές

λ άλυσοι της οικογένειας λVΙ σχετίζονται σε μεγάλο βαθμό με αμυλοείδωση η οποία προσβάλει τους νεφρούς³⁴, ενώ το γονίδιο IGLV1-44 σχετίζεται κατά προτίμηση με καρδιακή προσβολή³⁵.

Μεταλλαγμένες μορφές της απολιποπρωτεΐνης Α-Ι (ApoA-I) μπορεί να προκαλλέσουν αμυλοείδωση (AApoAI), η οποία πιο συχνά εκδηλώνεται με ασυμπτωματική ενδοηπατική χολόσταση, νεφρική βλάβη, και προσβολή των όρχεων με συνοδό υπογοναδισμό³⁶. Συγκεκριμένες μεταλλάξεις μπορεί να οδηγήσουν σε προοδευτική καρδιο-μυοπάθεια, και σε καρδιακή ανεπάρκεια³⁷. Η αναδόμηση μέσω πρωτεόλυσης διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην αμυλοειδογενή τάση των διάφορων μεταλλαγμένων μορφών ApoA-I³⁸.

Επίσης μεταλλαγμένες μορφές της απολιποπρωτεΐνης Α-ΙΙ (ApoA-II) μπορεί να προκαλέσουν αμυλοείδωση (AApoAII) η οποία εκδηλώνεται με αργά εξελισσόμενη νεφρική βλάβη, με τελική κατάληξη την εξωνεφρική κάθαρση. Σε αυτή την μορφή αμυλοείδωσης το αμυλοειδές αποτελείται από ολόκληρο το μόριο ApoA-II και επιπλέον μια περιοχή 21 αμινοξέων (κωδικοποιούμενη από την 3' αμετάφραστη περιοχή του γονιδίου της ApoA-II)³⁹.

Η απολιποπρωτεΐνη Α-ΙV (ApoA-IV) εναποτείθεται στους ιστούς ασθενών με γεροντική συστηματική αμυλοείδωση (ATTR)⁴⁰. Ωστόσο στην αμυλοείδωση από ApoA-IV (AApoA-IV) η νεφρική προσβολή περιορίζεται στον νεφρικό μυελό. Ο νεφρικός φλοιός δεν παρουσιάζει εναπόθεση αμυλοειδούς. Αυτός ο περιορισμός της νεφρικής προσβολής στον νεφρικό μυελό, συμβαδίζει με την χαμηλού ρυθμού έκπτωση της νεφρικής λειτουργίας, την απουσία πρωτεϊνουρίας, και την μην εύρεση σημαντικών στοιχείων στο ίζημα ούρων⁴¹. Η αναδίπλωση της ApoA-IV στο αμινοτελικό της άκρο, και ο προσανατολισμός της σε λιπιδικές επιφάνειες φέρεται να συνεισφέρει στην εναπόθεση της πρωτεΐνης και την δημιουργία αμυλοειδούς⁴².

Στην αντιδραστική αμυλοείδωση (AA), τα ινίδια σχηματίζονται από πρωτεολυμένα τμήματα της πρωτεΐνης οξείας φάσης αμυλοειδές A του ορού (SAA)⁴³. Η αντιδραστική αμυλοείδωση προκαλείται κυρίως από καταστάσεις οι οποίες επάγουν χρόνια φλεγμονώδη αντίδραση. Η φλεγμονή πυροδοτεί την παραγωγή κυτταροκινών (II-1,II-6 και TNF-a) οι οποίες επάγουν την σύνθεση SAA από το ήπαρ. Για να δημιουργηθεί AA απαιτείται επίμονα αυξημένη συγκέντρωση SAA. Παρόλα αυτά όλοι οι ασθενείς με χρόνια φλεγμονή δεν αναπτύσσουν AA. Αυτό είναι ενδεικτικό ότι υπάρχουν τροποποιητικοί της νόσου παράγοντες. Ο καλύτερα χαρακτηρισμένος τροποιητικός παράγοντας για την AA αμυλοείδωση είναι ο γονότυπος SAA1. Στους Καυκάσιους ο γονότυπος SAA1.1 και SAA1.3 στους Ιάπωνες σχετίζονται με αυξημένη επίπτωση και πρωΐμη έναρξη AA αμυλοείδωσης σε ασθενείς με χρόνια φλεγμονή.

Η σχετιζόμενη με την εξω-νεφρική κάθαρση αμυλοείδωση (DRA) είναι ένα κλινικό σύνδρομο που χαρακτηρίζεται από πόνο, απώλεια λειτουργικότητας λόγω της εναπόθεσης αμυλοειδούς από $\beta(2)$ -μικροσφαιρίνη($\beta(2)$ m) στο μυοσκελετικό σύστημα. Αυτή η κατάσταση συναντάται στους ασθενείς με χρόνια νεφρική νόσο(XNN) που βρίσκονται υπό εξωνεφρική κάθαρση για μεγάλο χρονικό διάστημα. Ο καταβολισμός της $\beta(2)$ m λαμβάνει χώρα στα εγγύς σωληναρία του νεφρού. Επακόλουθο της XNN είναι η αύξηση της συγκέντρωσης της $\beta(2)$ m. στον ορό εως και 60 φορές, σε σχέση με υγιείς ενήλικες, Για να προκύψει εναπόθεση αμυλοειδούς από $\beta(2)$ m απαιτείται η επίδραση διαφορετικών παραγόντων όπως η ηλικία των ασθενών, η διάρκεια της XNN⁴⁴, ο τρόπος εξωνεφρικής κάθαρσης⁴⁵, οι μεταμέταφραστικές τροποποιήσεις της πρωτεΐνης $\beta(2)$ m^{46,47}, και η σύνδεση της $\beta(2)$ m με μόρια που αφθονούν στους οστεο-αρθρικούς ιστούς ή που αθξάνουν κατά την διάρκεια της εξωνεφρικής κάθαρσης⁴⁸. Στα μόρια περιλαμβάνονται ο χαλκός

 $(Cu^{2+})^{48}$, οι γλυκοζαμινογλυκάνες (glycosaminoglycans)⁴⁹, το λυσοφωσφατιδικό οξύ (lysophosphatidic acid)⁵⁰, τα μη εστεροποιημένα λ ιπαρά οξέα και κολλαγόνο⁵¹. Η αμυλοείδωση που σχετίζεται με την γκελζολίνη (gelsolin – Agel) επηρρεάζει τα κρανιακά και τα περιφερικά νεύρα, οδηγώντας σε προοδευτική πολυνευροπάθεια. Επιπρόσθετα, λόγω της εναποθέσεων γκελζολίνης στην βασική μεμβράνη του δέρματος, δημιουργείται πάχυνση της δερμίδας, απώλεια της ελαστικότητας του δέρματος, απώλεια των εξαρτημάτων του δέρματος, με συνοδό τριχόπτωση και ανιδρωσία. Στα τελικά στάδια της νόσου υπάρχει σπειραματική εναπόθεση κλασμάτων γκελζολίνης με συνοδό ανάπτυξη νεφρωσικού συνδρόμου και XNN σταδίου V^{52} . Όταν συγκρίνεται η αμυλοειδογόνος δράση ολόκληρης της πρωτεΐνης (C68) σε σχέση με τμήματα της πρωτεΐνης μεγέθους 8 και 5 KDa αποδεικνύεται ότι το τμήμα μεγέθους 8 KDa έχει μεγαλύτερη αμυλοειδογόνο δράση σε σχέση με το τμήμα 5 KDa. Μόνο το τμήμα μεγέθους 8 KDa είναι το κύριο συστατικό ινίδιων αμυλοειδούς στην Agel. Η γκελζολίνη δεν σχηματίζει αμυλοειδές, δίδοντας εξήγηση γιατί στα ινίδια αμυλοειδούς δεν ανευρύσκεται ολόκληρη η πρωτεΐνη⁵³. Ωστόσο έχει την τάση να σχηματίζει μικρά διαλυτά ολιγομερή, και υπάρχει το ενδεχόμενο αυτά τα μικρά ολιγομερή να προκαλούν πρωτεοτοξικότητα στο μονοπάτι έκκρισης της γκελζολίνης⁵³. Τμήματα γκελζολίνης μεγέθους 8 KDa έχουν την τάση να σχηματίζουν πυρήνες διασποράς αμυλοειδούς (seeding nuclei) συμπαρασύροντας στην αμυλοειδογένεση και τμήματα γκελζολίνης μεγέθους 5 KDa, και να επιταχύνουν την επέκταση της νόσου⁵³. Παράλληλα γλυκοζαμινογλυκάνες φαίνεται να δρουν ως επιταχυντές στην αμυλοειδογένεση από γκελζολίνη, ευοδόνωντας την επιμήκυνση των ινίδιων αμυλοειδούς μέσω της ενσωμάτωσης τμημάτων γκελζολίνης μεγέθους 8 KDa⁵⁴. Επίσης οξειδωμένα μικρά μόρια και λιπίδια, καθώς και η παρουσία

οξειδωτικού στρες έχει αποδειχθεί ότι ασκούν καταλυτική δράση στην εναπόθεση αμυλοειδούς από γκελζολίνη.

Διαφορετικές σημειακές μεταλλάξεις του γονιδίου της λυσοζύμης σχετίζονται με την εμφάνιση συστηματικής αμυλοείδωσης (ALys) στα νεφρά, στον σπλήνα, στους πνεύμονες, και το ήπαρ⁵⁵. Η ALys ενδεχόμενα προκύπτει λόγω ελαττωματικής πρωτεόλυσης καθώς στις εναποθέσεις αμυλοειδούς έχει δειχθεί να ευρίσκονται ολόκληρα μόρια λυσοζύμης⁵⁶.

Ο λευκοκυτταρικός χημειοτακτικός παράγοντας 2 (LECT 2) συνεισφέρει σε μια μορφή αμυλοείδωσης (ALECT 2) η οποία χαρακτηρίζεται από εκτεταμένες εναποθέσεις CR στα σπειράματα, στο νεφρικό διάμεσο ιστό, και στα νεφρικά αγγεία⁵⁷. Ειδικότερα χαρακτηρίζεται από εναπόθεση αμυλοειδούς στις τοξοειδείς και στις μεσολοβίδιες αρτηρίες, σε μεγαλύτερο βαθμό από ότι στον διάμεσο ιστό του νεφρικού μυελού. Υπερμικροσκοπιά τα ινίδια αμυλοειδούς εντοπίζονται στην σπειραματική μεσάγγειο ουσία καθώς και στον διάμεσο ιστό του νεφρικού φλοιού⁵⁸. Ενώ στην πλειοψηφία των συστηματικών αμυλοειδώσεων οι συμμετέχουσες πρωτεΐνες έχουν αυξημένη αμυλοειδογόνο τάση, στην ALECT 2 δεν ισχύει κάτι τέτοιο. Υπάρχει μεταξύ των ασθενών με ALECT 2 ένας πολυμορφισμός (SNP) στην θέση 172 (SNPrs31517) σε αυξημένη συχνότητα⁵⁹. Ωστόσο σαφής παθογενετικός μηγανισμός σε αυτή την μορφή αμυλοείδωσης δεν έχει περιγραφεί⁵⁸.

Μεταλλάξεις στην Αα αλυσίδα του ινωδογόνου (Αα – fibrinogen) προκαλλούν αμυλοείδωση (AFib). Η κλινική πορεία της νόσου χαρακτηρίζεται από XNN σταδίου V, καρδιακή προσβολή καθώς και ηπατική συμμετοχή. Στο νεφρικό παρέγχυμα υπάρχει εκτεταμένη διεύρυνση των σπειραμάτων, με καταστροφή της κανονικής αρχιτεκτονικής του σπειράματος, από την εναπόθεση αμυλοειδούς. Σε αντίθεση με τα αγγεία ο διάμεσος ιστός των νεφρών δεν περιέχει εναποθέσεις αμυλοειδούς.

Η κληρονομική εγκεφαλική αιμορραγία με αμυλοείδωση ισλανδικού τύπου Ι (HCHWA-I) οφείλεται σε μεταλλάξεις της κυστατίνης C (cystatin C). Σχετίζεται με εναπόθεση αμυλοειδούς στις βασικές μεμβράνες των αγγείων στις λεπτομήνιγγες, στον εγκεφαλικό φλοιό, στα βασικά γάγγλια, στο εγκεφαλικό στέλεχος, και στην παρεγκεφαλίδα. Αμυλοειδικές εναποθέσεις μπορούν να παρατηρηθούν στα όργανα του λεμφικού ιστού, στο δέρμα, στους σιελογόνους αδένες και στους όρχεις. Σε αυτές τις εναποθέσεις αμυλοειδούς, εντοπίζεται τμήμα του άμινο-τελικού τμήματος της πρωτεΐνης. Κλινικά η νόσος χαρακτηρίζεται από επεισόδια εγκεφαλικής αιμορραγίας με συνοδό εξελισσόμενη άνοια⁶⁰.

Στην οικογενή άνοια δανικού τύπου (familial Danish dementia-FDD), οι ασθενείς παρουσιάζουν νοητική έκπτωση με συνοδό παρουσία νευρο-ινιδικών συσσωματωμάτων (neurofibrillary tangles) στις περιοχές του μεταιχμιακού συστήματος. Παράλληλα υπάρχουν εναποθέσεις αμυλοειδούς της πρωτεΐνης Danpp, οι οποίες κατά τον σχηματισμό τους ολιγομερίζονται, αποκτούν εικόνα παρόμοια με εκείνη των διαύλων ιόντων των λιπιδικών μεμβρανών, και ασκούν με αυτόν τον τρόπο την βλαπτική τους δράση⁶¹.

5. Οικογενής Αμυλοειδική Πολυνευροπάθεια σγετιζόμενη με την τρανσθυρετίνη.

<u>i) Επιδημιολογικά Στοιχεία</u>

Η παρουσία ασθενών με οικογενή αμυλοειδική πολυνευροπάθεια (FAP) σχετιζόμενη με την τρανσθυρετίνη (TTR-FAP), έχει περιγραφεί σε περισσότερες από 30 χώρες. Η μετάλλαξη Val30Met της τρανσθυρετίνης έχει παρατηρηθεί σε περισσότερες από 15 χώρες. Εστίες μεγάλου αριθμού ασθενών παρατηρούνται μόνο στην περίπτωση της μεταλλαγμένης τρανσθυρετίνης Val30Met. Αυτές οι εστίες εντοπίζονται στην Πορτογαλία, στην Σουηδία, στην Ιαπωνία, στην Βραζιλία και στην Μαγιόρκα. Υπάρχει η πεποίθηση ότι έχουν αναπτυχθεί ξεχωριστά στην Πορτογαλία και στην

Σουηδία^{62,63}. Ενώ στις άλλες περιογές έγουν προκύψει από διασπορά από τις 2 πρώτες εστίες. Στο βόρειο τμήμα της Σουηδίας οι φορείς της μετάλλαξης TTR-Val30Met, αριθμούν τους 7500, σε σύνολο πληθυσμού 500000. Η εκδήλωση νόσου σε αυτήν την περιοχή είναι 2% (11% είναι προσβεβλημένοι στην ηλικία των 50 ετών)⁶⁴. Στην Πορτογαλία έχουν καταγραφεί περίπου 3000 περιπτώσεις ασθενών με TTR-FAP^{65,66}. Η εκδήλωση της νόσου στην Πορτογαλία είναι υψηλή(80% στην ηλικία των 50 ετών). Έχουν καταγραφεί περίπου 1000 οικογένειες στις οποίες ύπαρχει η μετάλλαξη TTR-Val30Met στην Πορτογαλλία. Η επίπτωση στην Πορτογαλία(στις περιοχές Povoa de Varzim και Vila do Conde) της μετάλλαξης Val30Met πιστεύεται ότι είναι είναι 1 στους 538 άτομα ανά έτος⁶⁷. Αντίθετα η επίπτωση της TTR σχετιζόμενης αμυλοείδωσης(ATTR) στις ΗΠΑ και στην Ευρώπη πιστεύεται ότι είναι 1 ανά 100.000 άτομα ανά έτος. Στην Ιαπωνία έχουν καταγραφεί περίπου 500 ασθενείς με TTR-FAP, σε 2 ενδημικές περιοχές: Στην πόλη Arao, στην περιφέρεια Kumamoto, και στο χωρίο Ogawa, στην περιφέρεια Nagano⁶⁶. Στις μη ενδημικές περιογές της Ιαπωνίας η επίπτωση της νόσου είναι 1 ασθενείς ανά 1.000.000 ανά έτος⁶⁸.

Η σχετιζόμενες με καρδιομυοπάθεια μεταλλάξεις της τρανσθυρετίνης Leu111Met και Val122IIe εντοπίζονται σε πληθυσμούς Δανικής και Άφρο-Αμερικάνικης καταγωγής. Η συχνότητα της μετάλλαξης Val122IIe στους ασθενείς με Αφρο-Αμερικανική καταγωγή είναι 3-3.9%, και αυτοί εμφανίζουν όψιμης έναρξης καρδιακή αμυλοείδωση⁶⁹. Η μέση ηλικία έναρξης συμπτωματικής νόσου στην TTR-FAP, σε ασθενείς από ενδημικές περιοχές της Ιαπωνίας και της Πορτογαλίας είναι τα 33 έτη⁷⁰. Αντίθετα η μέση ηλικία έναρξης στην Σουηδία είναι τα 56 έτη⁶⁴. Ακόμη και σε εστίες ασθενών οι οποίες θεωρούνται πρώϊμης ενάρξεως, υπάρχουν υπο-ομάδες ασθενών με

όψιμη έναρξη. Οι ασθενείς με καρδιομυποπάθεια, αναπτύσσουν συμπτωματολογία στην ηλικία των 60 ετών.

<u>ii) Κλινική Εικόνα.</u>

Η TTR-FAP είναι μια νόσος με παρουσία πολλαπλών συμπτωμάτων η οποία μπορεί να παρουσιαστεί με περιφερική νευροπάθεια (κινητική και αισθητική), αυτόνομη νευροπάθεια, διαταραχές από το γαστρεντερικό σύστημα, καρδιομυοπάθεια, νεφροπάθεια ή εναπόθεση στον οφθαλμό. Η κλινική εικόνα των ασθενών με Val30Met TTR-FAP διαφοροποιείται αισθητά μεταξύ ασθενών οι οποίοι προέρχονται από ενδημικές εστίες της νόσου και από μη ενδημικές εστίες της νόσου⁷¹. Στις πρώτες περιπτώσεις ασθενών η έναρξη της νόσου ξεκινάει πριν από την ηλικία των 40 ετών, με προοδευτική αισθητικο-κινητική και αυτόνομη νευροπάθεια, προκαλώντας καχεξία, και θάνατο 10-20 έτη από την έναρξη των συμπτωμάτων. Παρότι οι αισθητικο-κινητικές εκδηλώσεις είναι πρώϊμες εκδηλώσεις της νόσου, πρώϊμη αυτόνομη νευροπάθεια μπορεί να αποτελεί την πρώτη κλινική εξέλιξη της νόσου⁷². Σε ασθενείς από μη ενδημικές περιοχές, παρουσιάζεται όψιμη έναρξη (μετά τα 60 έτη), με ανδρική υπεροχή, και μία εμφανώς σποραδική εμφάνιση της νόσου. Σε αυτές τις περιπτώσεις ασθενών, η αισθητικο-κινητική νευροπάθεια άνω και κάτω άκρων μπορεί να παρουσιαστεί σε σύντομο χρονικό διάστημα ή και ταυτόχρονα, ενώ η αυτόνομη νευροπάθεια μπορεί να είναι σχετικά ήπια.

Η αμυλοείδωση σχετιζόμενη με την τρανσθυρετίνη (ATTR) επάγει περιφερική νευροπάθεια εξαρτώμενη από το μήκος του προσβαλλόμενου νεύρου. Προσβάλλονται αρχικά τα κάτω άκρα, με συνοδό συμπτωματολογία παραισθησίες και νευροπαθητικού τύπου άλγος. Σε αυτό το στάδιο της νόσου (καθώς η εναπόθεση αμυλοειδούς επηρρεάζει τις λεπτές νευρικές ίνες [εμμύελες και αμύελες]) υπάρχει προσβολή της αίσθησης του πόνου και της θερμοκρασίας. Αντίθετα συντηρείται η

αίσθηση της λεπτής αφής και της ιδιοδεκτικότητας. Τα τενόντια αντανακλαστικά και η μυϊκή ισχής παραμένουν ανέπαφα. Με την πάροδο μερικών μηνών η αισθητική απώλεια εκτείνεται προς τις εγγύς επιφάνειες των κάτω μελών. Εμφανίζονται κινητικά ελλείματα στα άπω μυϊκά διαμερίσματα των κάτω μελών, και επηρρεάζεται η αίσθηση της λεπτής αφής και της ιδιοδεκτικότητας (υποδεικνύοντας προσβολή μακρύτερων και εμμύελων νευρικών ινών). Καθώς η νόσος εξελίσσεται η βάδιση περιορίζεται, με συνοδό απώλεια της ισορροπίας. Εμφανίζεται νευροπαθητικός πόνος με αίσθηση καύσους, ο οποίος επιδεινώνεται κατά την διάρκεια της νύκτας και σχετίζεται με αλλοδυνία. Με την πάροδο των χρόνων η απώλεια της αισθητικότητας εκτείνεται στις επιφάνειες των μηρών, τον κορμό και τα άνω άκρα. Η βάδιση πλέον δεν μπορεί να τελεστεί χωρίς βοήθεια, με τελική κατάληξη την μόνιμη κατάκλιση. Η απώλεια αισθητικότητας, διάκρισης θερμού ψυχρού μπορεί να οδηγήσει σε ατροφικά έλκη, εγκαύματα όταν υπάρχει επαφή με θερμά αντικείμενα, και η απώλεια της ιδιοδεκτικότητας σε όστεο-αρθροπάθεια. Εξαιτίας της προσβολής του περιφερικούς νευρικού συστήματος από την εναπόθεση αμυλοειδούς, μπορεί να προκληθεί εστιακό έλλειμα σε κρανιακά νεύρα, άξονα νεύρου, ή και νευρικό πλέγμα. Το σύνδρομο καρπιαίου σωλήνα αποτελεί μια πρώϊμη αλλά μη ειδική εκδήλωση της νόσου.

Σε όλες τις περιπτώσεις ασθενών με ATTR, το αμυλοειδές μπορεί να διηθήσει οποιοδήποτε ή όλα τα συστατικά στοιχεία του καρδιαγγειακού συστήματος (σύστημα αγωγής, το κολπικό και το κοιλιακό μυοκάρδιο, τις καρδιακές βαλβίδες, τα στεφανιαία αγγεία, καθώς και τα μεγάλα αγγεία του αορτικού τόξου)^{73,74}. Συχνά επηρρεάζεται το ερεθισματαγωγό σύστημα με τελική κατάληξη το δεσμιδικό αποκλεισμό, και σε ορισμένες περιπτώσεις κολποκοιλιακού, και φλεβοκολπικού αποκλεισμού. Η διήθηση του μυοκαρδίου από αμυλοειδές αυξάνει το πάχος των αριστερών και δεξιών κοιλιακών τοιχωμάτων και το πάχος του μεσοκοιλιακού

διαφράγματος. Η καρδιακή αμυλοείδωση θεωρείται ως μυοκαρδιοπάθεια, που παρουσιάζει υπερτροφικό φαινότυπο και περιοριστική φυσιοπαθολογία. Το κλάσμα εξώθησης της αριστερής κοιλίας είναι ήπια ελαττωμένο ή φυσιολογικό. Παρόλα αυτά έχουν περιγραφεί δυσλειτουργίες στην λειτουργία του επιμήκη άξονα και στις δύο κοιλίες κατά την κατά τύπου Doppler υπερηχοτομογραφία. Οι αλλοιώσεις αυτές προηγούνται της βλάβης της περιφερικής κοιλιακής λειτουργίας (circumferential ventricular function)⁷⁵. Η συμμετοχή των καρδιακών βαλβίδων οδηγεί στην δημιουργία οζιδίων ή διάχυτης πάχυνσης των καρδιακών βαλβίδων, η οποία συνοδεύεται από βαλβιδική ανεπάρκεια. Το κλινικό φάσμα της αμυλοειδικής καρδιοπάθειας είναι ευρύ. Περιλαμβάνει τον ασυμπτωματικό μερικό κολποκοιλιακό αποκλεισμό και δεσμιδικό αποκλεισμό, μέχρι και την τελικού σταδίου καρδιακή ανεπάρκεια περιοριστικού τύπου. Αυτές οι παραλλαγές σχετίζονται με την συγκεκριμένη μετάλλαξη της τρανσθυρετίνης, την γεωγραφική περιοχή εμφάνισης, καθός και τα ενδημικά ή μη ενδημικά χαρακτηριστικά του ασθενούς.

Εναπόθεση αμυλοειδούς στις λεπτομήνιγγες μπορεί να συμβεί στην ATTR τόσο λόγο σημειακών μεταλλάξεων(σπάνια) όσο και στα τελικά στάδια της Val30Met TTR-FAP. Στις περισσότερες περιπτώσεις η πηγή εναπόθεσης τρανσθυρετίνης είναι το χοριοειδές πλέγμα και όχι το ήπαρ⁷⁶. Η εγκεφαλική αμυλοειδική αγγειοπάθεια και οφθαλμική αμυλοείδωση είναι οι πιο κοινές κλινικές εκδηλώσεις αυτής της μορφής ATTR. Η εγκεφαλική αμυλοειδική αγγειοπάθεια, χαρακτηρίζεται από εναπόθεση αμυλοειδούς στον μέσο και ορογόνιο χιτώνα μέσου και μικρού μεγέθους αρτηριών, αρτηριολίων, περιστασιακά φλεβών εγκεφαλικού του φλοιού και των λεπτομηνίγγων. Τυπικές εκδηλώσεις αποτελούν τα αγγειακά εγκεφαλικά επεισόδια (ισχαιμικά και αιμορραγικά), υδροκέφαλος, αταξία, σπαστική παράλυση, σπασμοί, και άνοια.

Η προσβολή του αυτόνομου νευρικού συστήματος από TTR-FAP προκαλεί ανυδρωσία, έκπτωση της γενετήσιας ορμής, διαταραχές της κινητικότητας του γαστρεντερικού συστήματος (πιο συχνά διάρροια, εναλλασόμενη με δυσκοιλιότητα, ναυτία και έμετους), ορθοστατική υπόταση, και νευρογενή κύστη. Παράλληλα μπορεί να παρατηρηθεί αναιμία λόγω μείωσης των επιπέδων της ερυθροποιητίνης⁷⁷. Συχνή είναι η προσβολή των οφθαλμών, με θόλωση του υαλοειδούς, ξηροφθαλμία, γλαύκωμα, και διαταραχές των κορικών αντανακλαστικών⁷⁸. Ως αποτέλεσμα της εναπόθεσης αμυλοειδούς σε πολλαπλά οργανικά συστήματα μπορεί να παρατηρηθεί συμπτωματολογία βράγχους φωνής (παρέσεις κρανιακών νεύρων), αίσθημα κρύου, δυσκορία, δυσαισθησίες, μυϊκή αδυναμία και ατροφία, διαχωριστική αναισθησία, απώλεια σωματικού βάρους, οίδημα, καχεξία, και αρρυθμιογένεση.

Παρακάτω αναφέρονται συγκεκριμένα συστήματα ταξινόμησης της κλινικής σταδιοποίησης της TTR-FAP, της προσβολής του περιφερικού νευρικού συστήματος (PND), της αισθητικής λειτουργίας, της δυσλειτουργίας του αυτόνομου νευρικού συστήματος, καθώς και της κινητικής δυσλειτουργίας:

Στάδιο Ο	Χωρίς συμπτώματα
Στάδιο Ι	Βάδιση χωρίς προσβολή, κυρίως ήπια αισθητική, κινητική, και αυτόνομη νευροπάθεια στα κάτω άκρα.
Στάδιο ΙΙ	Βάδιση με βοήθημα, μέτρια προσβολή (αισθητικο-κινητική-αυτόνομη) κάτω άκρων, άνω άκρων και κορμού
Στάδιο ΙΙΙ	Αδυναμία βάδισης (σε αμαξίδιο, κατακεκλημένος), σοβαρή προσβολή (αισθητικο-κινητική-αυτόνομη) σε όλα τα άκρα και τον κορμό.

Πίνακας 1: Κλινική Ταξινόμηση Σταδίων TTR-FAP⁷⁹

Πίνακας 2: Σταδιοποίηση προσβολής του περιφερικού νευρικού συστήματος⁷⁹

Στάδιο Ο	Χωρίς προσβολή
Στάδιο Ι	Αισθητικές διαταραχές, με διατήρηση βάδισης

Στάδιο ΙΙ	Διαταραχή βάδισης(δυνατότητα βάδισης χωρίς βακτηρία ή περιπατητήρα)
Στάδιο ΙΙΙΑ	Βάδιση με βακτηρία
Στάδιο IIIB	Βάδιση με περιπατητήρα
Στάδιο ΙV	Κίνηση με αναπηρικό αμαξίδιο ή μόνιμα κατακεκλημένος

Πίνακας 3: Σταδιοποίηση αισθητικής διαταραχής (Η περισσότερο εγγύς περιοχή σημειώνεται για κάθε προσβεβλημένη αίσθηση)⁷⁹

Κάτω άκρα	
Αίσθηση Ψύχους	1: Δάκτυλα 2: Πόδια 3: Μηρός
Αίσθηση Άλγους	1: Δάκτυλα 2: Πόδια 3: Μηρός
Αίσθηση Λεπτής Αφής	1: Δάκτυλα 2: Πόδια 3: Μηρός
Άνω άκρα	
Αίσθηση Ψύχους	1: Δάκτυλα 2: Αγκώνας 3: Ώμος
Αίσθηση Άλγους	1: Δάκτυλα 2: Αγκώνας 3: Ώμος
Αίσθηση Λεπτής Αφής	1: Δάκτυλα 2: Αγκώνας 3: Ώμος
Κεφαλή και Κορμός	
Αίσθηση Ψύχους	1: Επίπεδο ομφαλού 2: Επίπεδο Κλείδας 3: Τράχηλος και Πρόσωπο
Αίσθηση Άλγους	1: Επίπεδο ομφαλού 2: Επίπεδο Κλείδας 3: Τράχηλος και Πρόσωπο

Πίνακας 4: Δυσλειτουργία αυτόνομου νευρικού συστήματος⁷⁹

Διάρροια	2: Εναλλαγή διάρροιας/δυσκοιλιότητας
	4:Διάρροια 6: Σοβαρή διάρροια
Ορθοστατική Υπόταση	2: Πτώση συστολικής αρτηριακής
	πίεσης(ΣΑΠ) 0-20 mmHg 4: >20 mmHg
	6: > 20 mmHg και λιποθυμικά επεισόδια
Ούρηση	2: Ήπιες διαταραχές 4: Κατακράτηση
	ούρων περιστασιακά 6: Μόνιμη
	κατακράτηση ούρων ή ακράτεια

Πίνακας 5: Κινητική	λειτουργία – Σταδιοποίηση	μυϊκής αδυναμίας ⁷⁹
2 1		

Πρόσθιος Κνημιαίος	0: φυσιολογικός 2: παρουσία κίνησης
	ενάντια στην βαρύτητα και κάποια
	αντίσταση 3: παρουσία κίνησης ενάντια
	στην βαρύτητα 4: απουσία κίνησης
	ενάντια στην βαρύτητα 5: παρουσία

	συσπάσεων/δεσμιδώσεων 6: Πλήρης παράλυση
Τετρακέφαλος	0: φυσιολογικός 2: παρουσία κίνησης ενάντια στην βαρύτητα και κάποια αντίσταση 4: απουσία κίνησης ενάντια στην βαρύτητα 6: Πλήρης παράλυση
Κάμψη του καρπού	0: φυσιολογικός 2: παρουσία κίνησης ενάντια στην βαρύτητα και κάποια αντίσταση 3: παρουσία κίνησης ενάντια στην βαρύτητα 4: απουσία κίνησης ενάντια στην βαρύτητα 5: παρουσία συσπάσεων/δεσμιδώσεων 6: Πλήρης παράλυση
Δικέφαλος βραχιόνιος	0: φυσιολογικός 2: παρουσία κίνησης ενάντια στην βαρύτητα και κάποια αντίσταση 4: απουσία κίνησης ενάντια στην βαρύτητα 6: Πλήρης παράλυση

T /	~	Π 0 0 /	,	, 79.80
Πινακας	6:	Προσβολή	οργάνων	στογων

<u></u>	
Καρδιά	 4: Κολποκοιλιακός αποκλεισμός τύπου Ι 8: Κολποκοιλιακός αποκλεισμός τύπου ΙΙ ή σύνδρομο νοσούντος φλεβοκόμβου 12: Πλήρης κολποκοιλιακός αποκλεισμός
Νεφρά	4: Παρουσία πρωτεϊνουρίας 8: νεφρωσικό σύνδρομο 12: Εξωνεφρική κάθαρση

<u>iii) Παθοφυσιολογία</u>

Το γονίδιο το οποίο κωδικοποιεί την τρανσθυρετίνη βρίσκεται στο χρωμόσωμα 18 (18q12.1) και έχει μέγεθος 6956 βάσεις, 4 εξώνια και 5 εσώνια. Τις τελευταίες δεκαετίες πάνω από 100 σημειακές μεταλλάξεις τρανσθυρετίνης οι οποίες οδηγούν στην παραγωγή μεταλλαγμένων μορφών πρωτεΐνης. Αυτές οι μεταλλαγμένες πρωτεΐνες έχουν την τάση να προκαλούν αμυλοείδωση. Οι οικογενείς μορφές της σχετιζόμενης με την τρανσθυρετίνη αμυλοείδωση είναι κληρονομικές κληρονομούμενες με τον αυτοσωμικό επικρατή τρόπο μεταβίβασης⁸¹.

Παρόλο τα in vitro δεδομένα δεν μπορούν να αναπαραστήσουν την in vivo δυναμική της αμυλοειδογένεση⁸², καθώς υπάρχουν παράγοντες (πρωτεογλυκάνες, αμυλοειδές P του ορού – serum amyloid P) οι οποίοι επηρρεάζουν την in vivo δυναμική του

φαινομένου της αμυλοειδογένεσης⁸³. Η δομή β-πτυχωτού φύλλου διαθέτει αμυλοειδογόνο δυναμική. Ο σχηματισμός του αμυλοειδούς μπορεί να πυροδοτείται από την αποδιάταξη του τετραμερούς μορίου της τρανσθυρετίνης, σε ένα συμπαγές διαταραγμένης στερεοδομής μονομερές. Αυτό το σύνολο τετραμερών διακατέχει χαμηλή σταθερότητα σχηματισμού τετραμερών (low conformational stability), η οποία οδηγεί σε μη αμυλοειδικές συσσωρεύσεις TTR ή μερικώς αναδιπλωμένα είδη μονομερών (partially unfolded monomeric species). Αυτές του είδους οι στερεοδιαμορφώσεις αύτο-συσσωρεύονται σχηματίζοντας πρωτο-ινίδια και ώριμα ινίδια αμυλοειδούς⁸⁴⁻⁸⁸. Η ενδιάμεση μορφή αμυλοειδογόνου μονομερούς ενδιάμεσου τρανσθυρετίνης υπόκειται σε αύτο-συσσώρευση σχηματίζοντας μια πλειάδα τεταρτογενών δομών στην οποία μετέχουν τόσο μόρια φυσιολογικής όσο και μεταλλαγμένης τρανσθυρετίνης⁸⁹. Είναι πιθανό ότι η τρανσθυρετίνη αποδιατάσσεται και σχηματίζει αμυλοειδές όταν οι προσδέτες της απελευθερώνονται στα όργανα στόχους⁹⁰. In vitro τα μονομερή ίσως αποτελούν τους δομικούς λίθους των ινιδίων αμυλοειδούς, σχηματίζοντας πολλαπλά πρώτο-ινίδια, τα οποία περιέχουν περιστρεφόμενες δομές β πτυχωτού φύλλου⁸¹. In vivo έχει δειχθεί ότι η τρανσθυρετίνη μπορεί να εναποτείθεται σε μη αμυλοειδικές ή προ-αμυλοειδικές μορφές στα νεύρα πριν την παρουσία εκφύλισης νευρικών ινών⁹¹. Πρωτεολυμένα διμερή τρανσθυρετίνης(στο αμινοτελικό άκρο) μπορούν επίσης να σχηματίσουν εναποθέσεις αμυλοειδούς.

Υπάρχει συσχέτιση της αμυλοειδογένεσης και της θερμοδυναμικής αστάθειας της τρανσθυρετίνης. Κάτω από συνθήκες χαμηλού pH έχει δειχθεί ότι αμυλοειδογένεση από τρανσθυρετίνη επιταχύνεται⁹². Η φυσιολογική πρωτεΐνη τρανσθυρετίνη (WT-TTR) δημιουργεί βραδύτερα ινίδια από ότι μεταλλαγμένες μορφές τρανσθυρετίνης (variant TTR)⁸⁶. Η κινητική αποδιάταξης μονομερών TTR είναι ταχύτερη από ότι η

κινητική για την αποδιάταξη ολόκληρης της πρωτεΐνης (τετραμερής τρανσθυρετίνη). Τα πρώϊμα ινίδια αμυλοειδούς παρουσιάζουν μια διασυνδεμένη μορφή έλικας πτυχωτού φύλλου(cross sheet helix structure)⁹³. Η βασική υπομονάδα του αμυλοειδούς της τρανσθυρετίνης είναι ένα διμερές το οποίο περιέχει τουλάχιστον μία υπομονάδα μεταλλαγμένης πρωτεΐνης⁹⁴. Οι ενδιάμεσες προ-αμυλοειδικές μορφές έχουν δομή β πτυγωτού φύλλου. Η συσσώρευση τρανσθυρετίνης (TTR aggregation) μπορεί να ακολουθεί μια ανεξάρτητη πυρηνοποίησης διαδικασία (nucleation independent), στην οποία το μονομερές με την υψηλότερη ενεργιακή κατάσταση σχηματίζει πολυμερή συσσωματώματα χαμηλής ενέργειας. Ασταθείς μεταλλαγμένες μορφές της τρανσθυρετίνης στον ορό αποδομούνται στο ενδοπλασματικό δίκτυο (ER associated degradation-ERAD). Αυτό το σύστημα ελέγχου ποιότητας του ενδοπλασματικού δικτύου αποτρέπει την πρώϊμη έναρξη συστηματικής αμυλοείδωσης διατηρώντας την συγκέντρωση αυτών των ασταθών μορφών στον ορό σε χαμηλά επίπεδα. Ακολούθως αυτό το σύστημα ελέγχου διαδραματίζει ρόλο στην σοβαρότητα εκδήλωσης της νόσου⁹⁵.

Οι μεταλλάξεις της τρανσθυρετίνης οι οποίες σχετίζονται με νόσο (ATTR, TTR-FAP) μεταβάλλουν την σταθερότητα της πρωτεΐνης, οδηγώντας σε συσσώρευση προαμυλοειδικών μορφών και σχηματισμό ινιδίων αμυλοειδούς⁹⁶. Τα ινίδια αμυλοειδούς της τρανσθυρετίνης μπορεί να σχηματιστούν από τετραμερή τα οποία διασυνδέονται με δισουλφιδικές γέφυρες⁹⁷. Δομικές τροποποιήσεις της τρανσθυρετίνης (Glu54Gly, Glu54Lys) μπορούν να επαρκούν να μεταβάλλουν την σταθερότητα του τετραμερούς, και την πρόσδεση T₄. Η TTR-FAP με την μετάλλαξη TTRLeu55Pro είναι από τις πιο επιθετικές μορφές της νόσου. Το μονομερές σε αυτήν την περίπτωση υπόκειται σε ουσιαστικές δομικές αλλαγές σε σύγκριση με τις αλλαγές οι οποίες παρατηρούνται στα μονομερή των WT-TTR, και Val30MetTTR⁹⁸. Και σε

αυτή την περίπτωση της αμυλοειδόγονου τρανσθυρετίνης (TTRLeu55Pro) το μονομερές του μορίου της τρανσθυρετίνης αποτελεί τον δομικό λίθο του αμυλοειδούς⁹⁹. Ο τροπος αποδιάταξης των πρωτεϊνών TTRVal30Met, WT-TTR, TTRLeu55Pro(L55P) είναι τέτοιος ώστε όλες οι υπο εξέταση πρωτεΐνες να σχηματίζουν ινίδια σε φυσιολογικό pH⁸⁹. Πειραματικά η εναλλαγή υπομονάδων κατά τον σχηματισμό αμυλοειδούς από την L55P συμβαίνει μεταξύ διμερών της πρωτεΐνης ενώ κατά τον σχηματισμό αμυλοειδούς από WT-TTR μεταξυ διμερών και μονομερών της πρωτεΐνης¹⁰⁰. Η παρουσία in vitro της L55P αυξάνει τον ρυθμό αποδιάταξης της WT-TTR και τον σχηματισμό υβριδικών τετραμερών (L55P-WT-TTR). In vitro ou ιδιότητες σχηματισμού ινιδίων της WT-TTR σε οξινο pH και της L55P σε φυσιολογικό pH αποκαλύπτουν παρόμοια μορφολογικά χαρακτηριστικά, και διαστάσεις των ινιδίων¹⁰¹. Όταν συνεπωάζονται L55P και WT-TTR δημιουργούνται ινίδια των οποίων ο πυρήνας παρουσιάζει ατέλειες δόμησης ενδεικτικές της ύπαρξης μη ινιδικής πρωτεΐνης. Διάφορες μελέτες ασθενών έγουν εμπλέξει την συμβολή WT-TTR στην εναπόθεση αμυλοειδούς στις καρδιές ασθενών με FAP¹⁰². Επιπλέον μελέτες σταθερότητας WT-TTR έχουν δείξει ότι η αύξηση της θερμοκρασίας ή της υδροστατικής πίεσης μπορεί να προκαλέσουν τον σχηματισμό αμυλοειδογόνων μορφών της πρωτεΐνης.

Ιη νίνο η αμυλοειδογένεση από την TTR περιπλέκεται διότι οι περισσότεροι ασθενείς είναι ετεροζυγώτες για την μεταλλαγμένη πρωτεΐνη. Εκφράζονται στο ήπαρ τους τόσο WT-TTR όσο και μεταλλαγμένες πρωτεΐνες¹⁰³. Στους ετεροζυγώτες ασθενείς (TTRVal30Met), στο πλάσμα και στα ινίδια αμυλοειδούς, η αναλογία WT-TTR/TTRVal30Met είναι 2/1 και 1/2 αντίστοιχα¹⁰⁴. Σε περιπτώσεις ασθενών έχει περιγραφεί η φορεία τόσο της TTRVal30Met όσο και η φορεία TTRThr119Met¹⁰⁵. Οι ασθενείς αυτοί εμφανίζουν καθόλου ή ήπια σημειολογία TTR-FAP. In vitro η

συμμετοχή μορίων TTRThr119Met σε τετραμερή τα οποία έχουν αμυλοειδογόνο τάση προκαλεί σταθεροποίηση του τετραμερούς (μέσω δια-αλληλικής τρανς – καταστολής / inter allelic trans suppression), και ελαττώνοντας έτσι την δημιουργία αμυλοειδούς.

Τα μεταλλικά ιόντα συμπεριλαμβανομένου και του Zn⁺² ευοδώνουν την αμυλοειδογένεση στην FAP¹⁰⁶. Έχει δειχθεί ότι η αυξημένη γλυκοζυλίωση του ινωδογόνου, και η απώλεια της λειτουργικής λευκωματίνης πυροδοτεί αύξηση του σχηματισμού ινιδίων αμυλοειδούς στην FAP^{107,108}. Μεταλλάξεις του μορίου της τρανσθυρετίνης(πέραν της TTRVal30Met) οι οποίες δρουν αποσταθεροποιητικά είναι TTRTyr78Phe, Asp18Asn, Leu110Ara (αποσταθεροποίηση AB έλικας), : 01 Gly53Ser, Glu54Asp, Leu55Ser (δομικές αλλαγές στην έλικα CD, D β πτυχωτή επιφάνεια, και στην έλικα DE). Η θέση πρόσδεσης των θυρεοειδικών ορμονών επηρρεάζεται και από μεταλλάξεις οι οποίες προκαλούν αμυλοείδωση όπως οι TTRTyr116Ser, Phe87Met, Leu110Met¹⁰⁹. Αντίθετα υπάρχουν και μεταλλάξεις οι οποίες σταθεροποιούν το μόριο της τρανσθυρετίνης (TTRSer117Cvs, Glu92Cvs)⁸⁷. Ο μηχανισμός με τον οποίο η εναπόθεση τρανσθυρετίνης προκαλεί νευροτοξικότητα δεν είναι γνωστός. Αναγνωρίζεται ωστόσο ένας πληθυσμός ασταθών, ετερογενών, αμυλοειδικών ολιγομερών και πρώτοϊνιδίων τα οποία είναι υπεύθυνα για την επαγόμενη νευροτοξικότητα. Η παθογένεση της βλάβης των περιφερικών νεύρων στην FAP, αποδίδεται σε συμπίεση από το συσσωρευμένο αμυλοειδές, στην ισχαιμία, και στην επαγώμενη νευροτοξικότητα και απόπτωση από την εναπόθεση αμυλοειδούς¹¹⁰. Η βλάβη των περιφερικών νευρών (εξαρτώμενη από το μήκος των νεύρων) αποδίδεται στην πολυεστιακή εναπόθεση αμυλοειδούς στο ενδονεύριο. Σε ένα αριθμό μελετών η παθολογοανατομική εικόνα των κυτταρών Schwann δεν παρουσίαζε στοιχεία τμηματικής εκφύλισης, δυσαναλογίας νευρικού ιστού μυελίνης

καθώς και στοιχεία αναγέννησης¹¹¹. Σε διαφορετικές μελέτες ωστόσο έχουν περιγραφεί, αντίθετα άτυπα ευρήματα όπως απώλεια αξόνων (μακρών εμμύελων ινών), βλάβη της μυελίνης, και ανεξάρτητη συσχέτιση βλάβης μεταξύ απώλειας ινών και μήκους¹¹²⁻¹¹⁴. Οι βλάβες αυτές έχουν περεταίρω αποδοθεί στην προσβολή των νευρώνων των γαγγλίων των οπισθίων ριζών (DRG) ή στα κύτταρα Schwann¹¹⁵. Έχει αναφερθεί ότι η παρουσία TTR mRNA στα DRG, και στην ιππουρίδα και η απουσία TTR mRNA, στα ισχιακά νεύρα, στο οσφυϊκό πλέγμα, ή στα συμπαθητικά γάγγλια πιθανον να διαδραματίζει κάποιο ρόλο στην παρουσία νευροπάθειας¹¹⁶. Ωστόσο αυτά τα αποτελέσματα δεν επιβεβαιώθηκαν¹¹⁷.

Τοξικές μορφές μεταλλαγμένων μορφών της τρανσθυρετίνης έχουν αναγνωριστεί in vitro και in vivo σε διαγονιδιακά μοντέλα νόσου καθώς και σε ex vivo όργανα ασθενών^{91,118,119}. Παλαιότερα υπήρχε η πεποίθηση ότι το αμυλοειδές το οποίο σχηματίζεται από την τρανσθυρετίνη δημιουργούσε τις παρατηρούμενες βλάβες. Ωστόσο η τρέχουσα άποψη είναι ότι η επαγόμενη βλάβη είναι το αποτέλεσμα της παρουσίας στο ιστικό περιβάλλον ολιγομερών, προ-αμυλοειδικών μορφών και πρωτοϊνιδίων κατά την διάρκεια της διαδικασίας της αμυλοειδογένεσης^{91,120}. Αυτές οι ολιγομερείς- προ- αμυλοειδικές μορφές επάγουν το οξειδωτικό στρες, και την έκφραση μορίων σχετιζόμενων με την παρουσία φλεγμονής όπως ο TNF-a, η II-1βb, ο πυρηνικός μεταγραφικός παράγοντας κ B (NF κ B) και MCSF (macrophage-colony stimulating factor). Επίσης ταυτόγρονα με την παρουσία των προαμυλοειδικών μορφών έχει δειχθεί και η παρουσία κυτταρικών υποδοχέων για τα προϊόντα προηγμένης γλυκοζυλίωσης (RAGE) τα οποία οδηγούν τα υπό μελέτη κυτταρικά στοιχεία σε απόπτωση¹²¹. Ειδικότερα έχει δειχθεί ότι η ενεργοποίηση του υποδοχέα RAGE, οδηγεί σε στρες του ενδοπλασματικού δικτύου (endoplasmic reticulum stress), ενεργοποίηση των κινασών ERK1/2 και απόπτωση εξαρτώμενη από τις

κασπάσες¹²². Μετά την εναπόθεση αμυλοειδούς σε νευρικές ίνες ασθενών με FAP αυξάνει η έκφραση της II-10¹²³.

Ολιγομερή τρανσθυρετίνης μπορούν να συνδέονται με περιοχές της κυτταρικής μεμβράνης, οι οποίες είναι πλούσιες σε λιπίδια (lipid rich areas), και με αυτόν τον τρόπο να ασκούν την τοξική τους δράση (διαταραχή της συνέχειας της κυτταρικής μεβράνης και της κυτταρικής ακεραιότητας). Ολιγομερή τρανσθυρετίνης μπορούν να διαταράξουν την ενδοκυττάρια εισροή ασβεστίου αυξάνοντας της διαπερατότητα της κυτταρικής μεμβράνης σε ασβέστιο. Επιπλέον ολιγομερή τρανσθυρετίνης έχει δειχθεί ότι ενεργοποιούν τα κανάλια TRPM8 (transient receptor potential M8), με την συνοδό ενεργοποίηση (άνοιγμα), δυναμο-εξαρτώμενων διαύλων νατρίου και ασβεστίου σε κύτταρα DRG¹²⁴. Οι ινοβλάστες του εξωκυτταρίου χώρου μπορεί να κυτταροτοξικών προστατευτούν από την παρουσία ολιγομερών, μέσω ενδοκυττάρωσης τους^{125,126}. Προστατευτικό ρόλο στην εναπόθεση τρανσθυρετίνης και ολιγομερών μορφών του μορίου της φέρεται να έγουν οι heat shock proteins (HSP-HSP27,HSP70), o heat shock factor 1 (HSF1) και η α B crystallin (HSPB5)¹²⁷. Τα συστατικά του εξωκυτταρίου χώρου διαδραματίζουν ρόλο στην διαδικασία της αμυλοειδογένεσης⁵⁴. Οι εναποθέσεις αμυλοειδούς αποτελούνται από τις μεταλλαγμένες μορφές τρανσθυρετίνης, την WT-TTR (αγρίου τύπου τρανσθυρετίνη), SAP (serum amyloid P), apoE (apolipoprotein E), πρωτεογλυκάνες και μεταλλοπρωτεϊνάσες της εξωκυτταρίου (matrix metalloproteinase 9) ουσίας¹²⁸⁻¹³¹. Στην TTR-FAP υπάρχει υπερ-έκφραση των γονιδίων της biglycan, της NGAL (neutrophil gelatinase associated lipocalin) και της MMP-9 στο ενδονεύριο. Τα γονίδια της biglycan, η NGAL, και η MMP-9 αυξάνουν τη μετάφαρση τους μέσω της επίδρασης του NF-κB, η παρουσία του οποίου παρατηρείται αυξημένη στα νεύρα ασθενών με TTR-FAP¹³¹. Ενώ η MMP-9 in vitro πρωτεολύει τις εναποθέσεις αμυλοειδούς, in

vivo με την ενσωμάτωση στα ινίδια του αμυλοειδούς SAP αυτές γίνονται ανθεκτικές στην πρωτεόλυση. Όσον αφορά την καρδιακή αμυλοείδωση, η οποία επάγεται από την τρανσθυρετίνη, έχει δειχθεί ότι υπάρχει ενεργοποίηση της πρωτεόλυσης στην εξωκυττάριο ουσία. Έτσι το σύστημα των ΜΜΡ και των ιστικών αναστολέων τους (TIMPs-tissue inhibitors) πιθανόν να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεση της επαγόμενης από την εναπόθεση βλάβης. Προηγείται ο σχηματισμός ινιδίων στην βασική μεμβράνη, και ακολουθεί η εναπόθεση αμυλοειδούς. Λόγω της εναπόθεσης επάγεται η έκφραση συστατικών της βασικής μεμβράνης όπως κολαγόνο τύπου ΙV, laminin, και fibronectin¹³². Οι γλυκοζαμινογλυκάνες (GAGs) συμπεριλαμβανομένων των θεική ηπαράνη (heparan sulfate), θεική δερματάνη (dermatan sulfate), θεική κερατάνη (keratin sulfate), και θειϊκή χονδροϊτίνη (chondroitin sulfate) ευρίσκονται σε άφθονη ποσότητα στην εξωκυττάριο ουσία και βρίσκονται in vivo σε άμεση συσχέτιση με τα ινίδια του αμυλοειδούς της τρανσθυρετίνης. Η τρανσθυρετίνη μπορεί να προσδεθεί στην περλεκάνη (GAG), η οποία συνδέει πολλά συστατικά της εξωκυτταρίου ουσίας με συστατικά των κυτταρικών επιφανειών^{133,134}. Παράλληλα υπάρχουν αναφορές ότι οι GAGs μπορούν να επάγουν την αμυλοειδογένεση προσδένοντας προ-αμυλοειδικές μορφές μέσω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων, δημιουργώντας όμως λιγότερο τοξικές προ-αμυλοειδικές μορφές. Πιθανόν οι GAGs να διαδραματίζουν και προστατευτικό ρόλο στην δημιουργία αμυλοειδούς. Μόρια όπως η clusterin, τα οποία δρουν βοηθητικά στην διαδικασία της πρωτεόστασης του εξωκυτταρίου χώρου σταθεροποιώντας την στερεοδιάταξη των πρωτεϊνών, σχετίζονται με τα ινίδια αμυλοειδούς σε ασθενείς με TTR-FAP. Άρα η παρουσία των μορίων αυτών διαδραματίζει ρόλο στην παθογένεση της επαγόμενης από τρανσθυρετίνη αμυλοείδωσης.

<u>iv) Διάγνωση και Θεραπεία.</u>

Βιοψία.

Για να επιβεβαιωθεί η διάγνωση της αμυλοείδωσης πρέπει να αποδειχθεί μέσω βιοψίας ιστού η παρουσία αμυλοειδούς. Αυτό γίνεται με την χρώση ερυθρού του κογκό (Congo Red- CR)¹³⁵. Το αμυλοειδές παρουσιάζει χαρακτηριστική διπλοδιαθλαστικότητα πράσινου, υπό το πολωμένο φως. Κατάλληλοι ιστοί για βιοψία αποτελούν το υποδόριο λίπος από το κοιλιακό τοίχωμα, ο νεφρός, το δέρμα, ο γαστρικός ή ο πρωκτικός βλεννογόνος, το ισχιακό νεύρο, το λίπος το οποίο λαμβάνεται κατά την χειρουργική αποσυμπίεση του καρπιαίου σωλήνα, και ιστός από τους σιελογόννους αδένες¹³⁶. Η ευαισθησία ενδοσκοπικής βιοψίας από το γαστρεντερικό σύστημα είναι περίπου 85%, ενώ η βιοψία από το ισχιακό νεύρο είναι λιγότερο ευαίσθητη διότι η κατανομή του αμυλοειδούς είναι τυχαία και σποραδική. Η ανοσο-ιστοχημεία για τρανσθυρετίνη του αμυλοειδούς, μπορεί να καθορίσει την νόσο ως αμυλοείδωση σχετιζόμενη με την τρανσθυρετίνη αλλά δεν μπορεί να διαχωρίσει την WT-TTR από τις κληρονομικές μορφές της νόσου. Σε ασθενείς με τυπικά της νόσου συμπτώματα, η αρνητική βιοψία ιστού δεν μπορεί να αποκλείσει την νόσο.

Μεταλλαγμένη πρωτεΐνη

Η τρανσθυρετίνη κυκλοφορεί στον ορό ως διαλυτή πρωτεΐνη με συγκέντρωση 20-40 mg/dl. Μετά από ανοσοκαθήλωση με ειδικό αντί της τρανσθυρετίνης αντίσωμα, η μεταλλαγμένη τρανσθυρετίνη του ορού μπορεί να ανιχνευτεί με φασματοφωτομετρία μάζας. Το 90% των μεταλλαγμένων μορφών τρανσθυρετίνης μπορεί να παρουσιάσει την προβλεπόμενη μετατόπιση μάζας η οποία προκαλείται από την αντικατάσταση ενός αμινοξέος στην μεταλλαγμένη μορφή τρανσθυρετίνης¹³⁷. Ανάλογη διεργασία μπορεί να γίνει και σε δείγματα ιστού των ασθενών.

Γενετική επιβεβαίωση

Παρόλο που η φασματοφωτομετρία μάζας μπορεί να επιδείξει διαφορά μάζας μεταξύ WT-TTR και μεταλλαγμένης τρανσθυρετίνης ορού, δεν καθορίζει τον τόπο και το είδος του αμινοξέος στις διάφορες μεταλλάξεις της τρανσθυρετίνης. Η αλληλούχιση DNA απαιτείται για να καθορίσει τον τόπο και το είδος του αμινοξέος. Με τις τρέχουσες τεχνικές αλληλούχισης αναγνωρίζεται >99% των μεταλλάξεων που σχετίζονται με νόσο.

Θεραπεία

Οι παρούσες θεραπευτικές επιλογές για ασθενείς με ATTR, είναι περιορισμένες. Οι ασθενείς με ήπιο ή μέτριο στάδιο νόσου,επιβεβαιωμένη με βιοψία διάγνωση και με γενετικό έλεγχο η μεταμόσχευση ήπατος αποτελεί την τρέχουσα θεραπευτική επιλογή. Παρόλα αυτά προτεραιότητα αποτελεί άμεση ανακούφιση των συμπτωμάτων της νόσου. Επειδή το μεγαλύτερο ποσοστό της τρανσθυρετίνης παράγεται στο ήπαρ, η μεταμόσχευση ήπατος θα έπρεπε να σταματάει την παραγωγή της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης και την εξέλιξη της νόσου (εκτός του ΚΝΣ). Στις περισσότερες περιπτώσεις η μεταμόσχευση ήπατος δεν εμποδίζει την εμφάνιση μυοκαρδιοπάθειας στις περισσότερες περιπτώσεις ασθενών, και δεν ενδείκνυται για ασθενείς με σοβαρό στάδιο νόσου ή για ασθενείς με αμυλοείδωση των λεπτομηνίγγων.

Μεταμόσχευση ήπατος.

Η ορθοτοπική μεταμόσχευση ήπατος είναι η μοναδική τροποποιητική της νόσου θεραπεία. Η παρέμβαση αυτή αφαιρεί το 95% της παραγωγής της τρανσθυρετίνης και δύναται να ελαττώσει την εξέλιξη της νόσου. Η νευρική βλάβη σπανίως αναστρέφεται μετά από μεταμόσχευση ήπατος. Υπάρχει η πιθανότητα ελάττωσης της αυτόνομης συμπτωματολογίας. Η καλύτερη έκβαση με την μεταμόσχευση ήπατος επιτυγχάνεται όταν η διαδικασία εκτελείται σε νεαρούς ασθενείς με χαμηλό στάδιο

νόσου. Παρόλο που σε αρκετούς ασθενείς η πρόοδος της νόσου σταματάει, και η επιβίωση βελτιώνεται δεν βελτιώνεται η ποιότητα ζωής τους. Ιστοπαθολογικά με την μεταμόσχευση ήπατος επιτυγχάνεται ύφεση των εναποθέσεων αμυλοειδούς, η πενταετής επιβίωση είναι >77%, και η δεκαετής επιβίωση 74% για τους ασθενείς με TTRVal30Met^{137,138}. Για τους ασθενείς με μη TTRVal30Met η δεκαετής επιβίωση είναι 44%, δίνοντας έτσι χρησιμότητα στην στοχευμένη στην μετάλλαξη του εκάστοτε ασθενούς μεταμόσχευσης ήπατος. Ασθενείς με σημαντική εναπόθεση αμυλοειδούς στο ερεθισματαγωγό σύστημα της καρδιάς/ή και στην καρδιά, μετά την μεταμόσχευση ήπατος μπορεί να επιδεινώσουν την πρόοδο της νόσου λόγω εναπόθεσης WT-TTR¹³⁹. Λόγω του ότι υπάρχει έλλειψη οργάνων, ασθενείς με ηπατική ανεπάρκεια πεθαίνουν ενώ βρίσκονται σε λίστα αναμονής για μεταμόσχευση. Επειδή στην TTR-FAP η προσβολή του ήπατος είναι ελάχιστη και η νόσος για να εμφανιστεί έχει μακρύ χρόνο επώασης (20-40 έτη), ασθενείς οι οποίοι αναμένουν μεταμόσχευση ήπατος και υπάρχει κίνδυνος για την ζωή τους στον δοθέντα χρόνο αναμονής μπορεί να λάβουν ήπαρ από ασθενή με TTR-FAP (domino liver transplantation-DLT). And to 1995 έχουν εκτελεστεί >950 DLT παγκόσμια¹⁴⁰. Ωστόσο έχουν παρουσιαστεί εκ νέου περιπτώσεις TTR-FAP σε δέκτες οργάνων από ασθενείς με TTR-FAP¹⁴¹. Σε ορισμένες περιπτώσεις έχει χρειαστεί μεταμόσχευση ήπατος εκ νέου σε περίοδο 8-10 ετών.

Οι επιπλοκές από το καρδιαγγειακό σύστημα είναι αυξημένες σε ασθενείς οι οποίοι υπόκεινται σε ορθοτοπική μεταμόσχευση ήπατος για TTR-FAP και σε αυτές οφείλεται το 39% των θανάτων (το 50% συμβαίνει στους τρεις πρώτους μήνες μετά την μεταμόσχευση). Σε ασθενείς με καρδιακή ανεπάρκεια λόγω αμυλοειδικής καρδιομυοπάθειας χωρίς εκτεταμένη προσβολή του περιφερικού νευρικού συστήματος ενδείκνυται η συνδυασμένη μεταμόσχευση ήπατος – καρδιάς. Επίσης η

συνδυασμένη μεταμόσχευση ήπατος-καρδιάς ενδείκνυται σε ασθενείς με μεταλλάξεις διαφορετικές από την TTRVal30Met, οι οποίοι είναι υποψήφιοι για μεταμόσχευση ήπατος και έχουν υπερηχο-καρδιογραφικές αλλοιώσεις συμβατές με καρδιομυοπάθεια¹⁴².

Φαρμακευτική Αγωγή.

Η εύρεση των μηχανισμών οι οποίοι συνεισφέρουν στην αποδιάταξη της τρανσθυρετίνης και στον σχηματισμό αμυλοειδούς έχουν αναδείξει στην σταθεροποίηση του τετραμερούς μορίου της τρανσθυρετίνης ως το περιοριστικό βήμα στο οποίο δύναται να στοχεύουν νεότερες φαρμακευτικές θεραπείες για την TTR-FAP. Οι νεότερες φαρμακευτικές θεραπείες της TTR-FAP μπορεί να χορηγηθούν ενώ ο ασθενής αναμένει μεταμόσχευση ήπατος, ή να καθυστερήσουν την ανάγκη για μεταμόσχευση ήπατος.

Tafamidis (Pfizer, New York)

Η φαρμακευτική ουσία Tafamidis είναι μια τροποποιητική της νόσου ουσία η οποία σταθεροποιεί το τετραμερές της τρανσθυρετίνης, εμποδίζοντας την αποδιάταξη του σε μονομερή. Έτσι θεωρείται ότι αναστρέφεται η διαδικασία της παραγωγής αμυλοειδούς. Η αρχική μελέτη φάσης 2/3 έδειξε ότι το φάρμακο ήταν καλά ανεκτό, ωστόσο τα καταληκτικά σημεία της μελέτης (απάντηση στην θεραπεία στους 18 μήνες όπως αυτή καταγράφεται από τα εργαλεία NIS-LL και Norfolk Quality of Life-Diabetic Neuropathy Total Score) δεν επιτεύχθησαν. Παρόλα αυτά θεωρείται ότι ο tafamidis μπορεί να ελαττώσει την πρόοδο της νόσου σε ασθενείς με στάδιο Ι νόσου. Παρενέργειες του φαρμάκου αποτελούν γαστρεντερικές διαταραχές και αύξηση κολπικών λοιμώξεων. Το 2011, το tafamidis έχει καθοριστεί ως μοναδικό φάρμακο (orphan drug designation) για την TTR-FAP (Val30Met και non-Val30Met) στην

Ευρώπη και στις ΗΠΑ. Το φάρμακο δεν ενδείκνυται για ασθενείς σταδίου ΙΙ και ΙΙΙ ή σε αυτούς με αμυλοειδική μυοκαρδιοπάθεια¹⁴³.

Diflunisal

Το diflunisal είναι ένα εμπορικά διαθέσιμο μη στεροειδές αντιφλεγμονώδες το οποίο σταθεροποιεί τα τετραμερή τρανσθυρετίνης in vitro, εμποδίζοντας τον σχηματισμό αμυλοειδούς από τα μονομερή τρανσθυρετίνης. Σε μελέτη φάσης 1 αποδείχθηκε ότι χαμηλές δόσεις diflunisal, σταθεροποιούν τα τετραμερή της τρανσθυρετίνης στον ορό χωρίς την εμφάνιση τοξικότητας. Στην μελέτη φάσης 2/3 σε 130 ασθενείς με TTR-FAP σε διάρκεια 2 ετών μείωσε τον ρυθμό εξέλιξης της νόσου και διατήρησε την ποιότητα ζωής των ασθενών. Τα ευρήματα αυτά μπορεί να έχουν όφελος για την θεραπεία της οικογενούς αμυλοειδικής πολυνευροπάθειας. Μπορεί στον πληθυσμό μιας κλινικής μελέτης να μην παρουσιάζονται ανεπιθύμητες ενέργειες, αλλά πρέπει να γίνεται προσεκτική επιλογή ασθενών με βάση τον κίνδυνο για αιμορραγία πεπτικού, κατακράτησης ύδατος και οξείας νεφρικής βλάβης¹⁴⁴.

ALN-TTR01 και ALN-TTR02 (Alnylam Pharmaceuticals, MA, USA)

Οι φορείς ALN-TTR01 και ALN-TTR02 συστηματικά προκαλούν σίγαση του γονιδίου της τρανσθυρετίνης, και με αυτόν τον τρόπο εμποδίζουν την παραγωγή αμυλοειδούς. Ο φορέας ALN-TTR01 αποτελείται από πρώτης γενιάς λιπιδικά νανοσωματίδια στα οποία εμπεριέχεται RNAi και μεταφέρεται στους ιστούς στόχους. Μελέτες σε διαγονιδιακά μοντέλα TTR-FAP, έχουν δείξει αναστολή και υποχώρηση εναποθέσεων αμυλοειδούς σε περιφερικούς ιστούς. Μια δόση ALN-TTR01 σε ασθενείς με TTRVal30Met επιτυγχάνει ταχύτατη δοσο-εξαρτώμενη μείωση και παρατεταμένα χαμηλά επίπεδα TTR στον ορό των ασθενών. Ο φορέας ALN-TTR02 έχει 10 φορές περισσότερη ισχύ από τον φορέα ALN-TTR01. Σε εξέλιξη βρίσκονται μελέτες φάσης 2¹⁴⁵.

ISIS-TTRRx (Isis Pharmaceuticals Inc CA, USA)

Η θεραπεία με ISIS-TTRRx αποτελεί θεραπεία η οποία καταστέλει την έκφραση του TTR mRNA. Μελέτη φάσης 1 έχει δείξει μια δοσο-εξαρτώμενη ελάττωση των κυκλοφορούντων επιπέδων τρανσθυρετίνης χωρίς σημαντικές παρενέργειες. Σε εξέλιξη βρίσκεται μελέτη φάσης 2/3 η οποία εξετάζει το αποτέλεσμα στην πρόοδο της νόσου και στην ποιότητα ζωής των ασθενών με ATTR Val30Met¹⁴⁶.

Δοξυκυκλινη/ ταυροουρσο δεοξυ χολικό οξύ (Doxy – TUDCA)

Η συνδυασμένη χρήση δοξυκυκλίνης, ενός αντιβιοτικού το οποίο διακόπτει το μονοπάτι παραγωγής αμυλοειδούς από τρανσθυρετίνη, και TUDCA μπορεί να ελαττώσει την εναπόθεση προ-αμυλοειδικών μορφών τρανσθυρετίνης, με συνδυαστικό τρόπο σε ζωικά μοντέλα TTR-FAP¹⁴⁷. Σε μελέτη φάσης 2 η συνδοιαστική αυτή θεραπεία φέρεται να σταματάει την πρόοδο της νόσου.

6. Οικογενής Αμυλοειδική Πολυνευροπάθεια σχετιζόμενη με την τρανσθυρετίνη και νεφρική Προσβολή.

<u>i) Παρούσα Γνώση.</u>

Η νεφρική προσβολή στην ΑΤΤR στις περισσότερες σειρές ασθενών είναι υπαρκτή, αλλά συμβαίνει σε ένα 10-30% ασθενών¹⁴⁸. Η μέχρι τώρα βιβλιογραφική εμπειρία βασίζεται σε μικρές σειρές ασθενών, ετερογενώς περιγεγραμμένες όσον αφορά την παθολογο-ανατομική εικόνα και την κλινική εικόνα των ασθενών. Σε σειρά ασθενών με TTR-FAP από την Πορτογαλία, έχει παρατηρηθεί ότι προοπτικά αναπτύσσουν μικρολευκωματινούριας στην ηλικία των 30-50 ετών. Η μικροαλευκωματινουρία προηγείται της νεφρικής βλάβης. Συγκεκριμένα η παρουσία μικρολευκωματινουρίας αυξάνει τον κίνδυνο ανάπτυξης νευρικής προσβολής κατά 4.8 φορές σε τρία έτη από την εμφάνιση της. Όταν οι ασθενείς ανέπτυξαν νευροπάθεια, στο 50% των ασθενών, η νεφρική προσβολή από το στάδιο της μικροαλευκωματινουρίας εξελίχθηκε με έκπτωση της νεφρικής λειτουργίας. Πιο ευπαθείς σε αυτό το φαινόμενο ήταν οι γυναίκες ασθενείς. Χρόνια νεφρική νόσος σταδίου V αναπτύχθηκε στο 19% των ασθενών με TTRVal30Met και μικρολευκωματινούρια, και στο 1/3 αυτών με έκπτωση της νεφρικής λειτουργίας. Κλινικά η παρουσία μικροαλευκωματινουρίας παριστά πρώϊμο στάδιο προσβολής του νεφρικού παρεγχύματος στην ATTR. Η παρουσία μικροαλευκωματινουρίας σε ασθενείς με ATTR ορίζει ένα πληθυσμό ασθενών με ATTR με μεγαλύτερο κίνδυνο για την ανάπτυξη χρονίας νεφρικής νόσου¹⁴⁹. Υπάρχουν συγκεκριμένες μεταλλάξεις της τρανσθυρετίνης οι οποίες σχετίζονται με νεφρική προσβολή (Πίνακας 7).

Πίνακας 7: Μεταλλάξεις TTR με νεφρική προσβολή. ΠΝ: Περιφερικά Νεύρα, ΑΝ: Αυτόνομο Νευρικό σύστημα, Οφθ: Οφθαλμική προσβολή, Καρδ: Καρδιακή προσβολή, ΣΚΣ: Σύνδρομο Καρπιαίου Σωλήνα, Δρμ: Δέρμα, Πρ: Πρωτεϊνουρία, Αμυλ: Αμυλοειδικές εναποθέσεις, XNN: Χρόνια Νεφρική Νόσος,.

Μεταλλαγμένη	Σημειακή	Φαινότυπος	Τύπος Νεφρικής	Τόπος
TTR	Μεταλλαζη		Βλαβης	
Val30Met	148G>A	ΠN, AN,	Πρ, Αμυλ, ΧΝΝ	Πορτογαλία,
		Οφθ, Νεφρός		Ιαπωνία, ΗΠΑ,
				Σουηδία,
				Κύπρος,
				Ελλάδα ¹⁵⁰
Val30Ala	149T>C	Καρδ, ΠΝ,	Αμυλ	НПА,
		ΑΝ, Νεφρός		Γερμανία,
				Κίνα ¹⁵¹
Phe33Cys	158T>G	ΣΚΣ, Καρδ,	Αμυλ	$H\Pi A^{152}$
		Οφθ, Νεφρός		
Phe33Ile	157T>A	ΠN, AN,	Αμυλ	Πολωνί α^{153}
		Οφθ, Νεφρ		
Gly47Glu	200G>A	Καρδ, ΠΝ,	ΧΝΝ, Αμυλ	Τουρκία,
		ΑΝ, Νεφρ		НПА,
				Γερμανία ¹⁵⁴
	214T>C	ΠN, AN,	ΧΝΝ, Αμυλ	Αγγλία,
Ser52Pro		Καρδ, Νεφρ		Πορτογαλία ¹⁵⁵
Gly53Glu	218G>A	Καρδ, Νεφρ	XNN	Σουηδί α^{156}
Ile73Val	277A>G	ΠN, AN,	XNN	Μπαγκλαντες
		Νεφρ		
Ser77Tyr	290C>A	Καρδ, Νεφρ,	XNN	НПА,
		ΠΝ		Γαλλία ¹⁵⁷
Tyr78Phe	293A>T	ΠΝ, ΣΚΣ,	XNN	Γαλλία,
		Δρμ, Νεφρ,		Ιταλία ¹⁵⁸
		Καρδ		

His88Arg	323A>G	ΠΝ, Καρδ,	XNN	Σουηδία
		Νεφρ		
Glu92Lys	334G>A	Καρδ, Νεφρ	Αμυλ	Ιαπωνία
Val94Ala	341T>C	Καρδ, Νεφρ,	Αμυλ	Γερμανία,
		ΠN, AN		НПА
Ser112Ile	395G>T	ΠΝ, Καρδ,	XNN	Ιταλία ¹⁴⁸
		Νεφρ		
Asn124Ser	371A>G	Καρδ, Νεφρ	Πρ, Αμυλ	Ιταλία

Ο νεφρικός θάνατος (εξωνεφρική κάθαρση) σε ασθενείς με TTR-FAP συμβαίνει κατά μέσο όρο 10 έτη (εύρος 3-18 έτη) μετά την έναρξη των συμπτωμάτων της νόσου. Η μέση ηλικία έναρξης εξωνεφρικής κάθαρσης των ασθενών ήταν 52 έτη (εύρος 36-84 έτη). Έχει παρατηρηθεί ότι σε ασθενείς με TTR-FAP και διαταραχή νεφρικής λειτουργίας υπάρχει οικογενειακό ιστορικό νεφρικής νόσου¹⁵⁹.

Η νεφρική λειτουργία των ασθενών με TTR-FAP οι οποίοι υπόκεινται σε μεταμόσχευση ήπατος εμφανίζουν μικρότερη έκπτωση του ρυθμού σπειραματικής διήθησης από ότι μάρτυρες οι οποίοι υπόκεινται σε μεταμόσχευση ήπατος για διαφορετικούς λόγους, υποδεικνύοντας ότι η μεταμόσχευση ήπατος μπορεί να έχει προστατευτικό ρόλο στην νεφρική προσβολή που οφείλεται στην TTR-FAP. Μετά την μεταμόσχευση ήπατος το 50% των ασθενών παρουσιάζει πρωτεϊνουρία (0,1 – 3,8 gr/ημέρα). Ο βαθμός της πρωτεϊνουρίας σε ασθενείς με TTR-FAP και μεταμόσχευση ήπατος δεν σχετίζεται με τον ρυθμό έκπτωσης της νεφρικής λειτουργίας, και την διάρκεια των νευρολογικών συμπτωμάτων. Λόγω της υποθρεψίας των ασθενών με TTR-FAP η κρεατινίνη δεν αποτελεί αξιόπιστο δείκτη παρακολούθησης της νεφρικής λειτουργίας¹⁵⁹. Επιπλέον η 24ωρη απέκκριση ούρων για την εκτίμηση της πρωτεϊνουρίας των ασθενών με TTR-FAP (ειδικότερα σε ασθενείς με XNN στ III-IV), λόγω της παρουσίας νευρογενούς κύστης δεν παριστά αξιόπιστο διαγνωστικό μέσο (υποεκτίμηση του αποβαλλόμενου όγκου). Ωστόσο η παρακολούθηση της νεφρικής λειτουργίας με την χρήση της εξίσωσης Crockfort-Gold έχει σταθμιστεί και αποτελεί αξιόπιστο δείκτη του επιπέδου της νεφρικής λειτουργίας σε σειρές ασθενών TTR-FAP από την Πορτογαλία.

<u>ii) Παθολογο-ανατομική εικόνα</u>

Υπάρχει περιορισμένος αριθμός βιβλιογραφικών αναφορών όσον αφορά την νέφροπαθολογο-ανατομική εικόνα της TTR-FAP. Η αναφορά των παθολογο-ανατομικών ευρημάτων και της κλινικής συσχέτισης τους, αποδίδει την έκταση της νεφρικής προσβολής στον άνθρωπο. Στην TTR-FAP αναδεικνύεται σπειραματική εναπόθεση αμυλοειδούς. Σε κάποιους ασθενείς υπάρχει προσβολή ενός ποσοστού σπειραμάτων, ενώ σε κάποιους άλλους υπάρχει προσβολή όλων των υπό εξέταση σπειραμάτων. Η σπειραματική σκλήρυνση – ίνωση ίνωση σπειραμάτων αποτελεί σπάνιο φαινόμενο στην TTR-FAP (εξαιρείται η παρουσία XNN σταδίου V). Στα προσβεβλημένα σπειράματα υπάρχει μεσαγγειακή εναπόθεση αμυλοειδούς. Παράλληλα ανευρίσκεται συμμετοχή των αρτηριολίων (παρασπειραματική συσκευή). Ο φλοιϊκός διάμεσος ιστός, και τα εγγύς εσπειραμένα σωληνάρια δεν παρουσίαζαν εναπόθεση αμυλοειδούς. Ωστόσο στα εγγύς εσπειραμένα σωληνάρια φέρεται να υπάρχει ενδοκυττάρια τρανσθυρετίνη. Η ενδοκυττάρωση της τρανσθυρετίνης εξυπηρετείται από την μεγκαλίνη¹⁶⁰. Σε λίγες περιπτώσεις ασθενών υπήρχε εναπόθεση αμυλοειδούς στην έξω πλευρά της σωληναριακής βασικής μεμβράνης των εγγύς σωληναρίων. Μεγάλες ποσότητες αμυλοειδούς υπήρχαν εναποτεθειμένες στον διάμεσο ιστό της μυελικής μοίρας. Σωληναριακές εναποθέσεις παρατηρήθηκαν στις αγκύλες του Henle, και στο άπω εσπειραμένο σωληνάριο. Ενώ τα φλοιϊκά αρτηριόλια δεν παρουσίαζαν συμμετοχή, συχνά υπήρχε διήθηση των ευθέων αγγείων¹⁶¹.

Σε διαφορετική σειρά ασθενών με TTR-FAP και νεφρική εναπόθεση αμυλοειδούς, παρατηρείται διατήρηση του φλοιο-μυελικού διαχωρισμού στο 44% των ασθενών με XNN σταδίου IV. Σε ασθενείς με σημαντική έκπτωση της νεφρικής λειτουργίας

(XNN σταδίου IV) υπήρχε εκτεταμένη προσβολή του μεσαγγειακού αγγειακού πόλου, καθώς και εναπόθεση αμυλοειδούς στο μέσο χιτώνα των νεφρικών αγγείων. Αρκετά σπειράματα ήταν πλήρως διηθημένα από αμυλοειδές (αύξηση της διαμέτρου των σπειραμάτων, και αντικατάσταση των σπειραματικών δομών από αμυλοειδές) ή είχαν αντικατασταθεί από ινώδη ιστό. Υπήρχε διάμεση ίνωση, με συνοδό ατροφία των σωληναρίων, και κάποιος βαθμός διήθησης από λευκοκύτταρα σε πέρισπειραματικές περιοχές. Εκτεταμένη εναπόθεση αμυλοειδούς υπήρχε στον νεφρικό μυελό. Ο διάμεσος ιστός στον φλοιό καθώς και τα εγγύς εσπειραμένα σωληνάρια δεν παρουσίαζαν στοιχεία προσβολής¹⁵⁹.

Χαρακτηριστικό της παθολογο-ανατομικής εικόνας της νόσου είναι η παρουσία αμυλοειδικών εναποθέσεων πέρι- αγγειακά (σε μικρές αρτηρίες και αρτηριόλια). Τα νεφρά παρουσιάζονται ατροφικά με συνοδό σπειραματική ίνωση και πολλαλπλές ηωσινοφιλικές εναποθέσεις υαλίνης.

Όταν υπάρχει εκτεταμένη εναπόθεση αμυλοειδούς το μεσάγγειο και ο αγγειακός πόλος του σπειράματος είναι περισσότερο προσβεβλημένοι. Στις μέχρι τώρα αναφορές η προσβολή των νεφρικών σπειραμάτων από αμυλοειδές αντανακλά τον βαθμό αγγειακής εναπόθεσης αμυλοειδούς. Ακόμα και σε ασθενείς TTR-FAP χωρίς την παρουσία λευκωματινουρίας υπάρχει εναπόθεση αμυλοειδούς στο νεφρικό παρέγχυμα. Η παρουσία λευκωματινουρίας σχετίζεται με μεγαλύτερης έκτασης και βαρύτητας εναπόθεση. Επιπλέον η έκπτωση της νεφρικής λειτουργίας σχετίζεται με τον βαθμό σπειραματικής εναπόθεσης, και με τον βαθμό εναπόθεσης στο νεφρικά αγγεία. Δεν υπάρχει συσχέτιση μεταξύ έκτασης νεφρικής δυσλειτουργίας και βαρύτητας εναπόθεσης στον νεφρικό μυελό¹⁵⁹. Η εναπόθεση αμυλοειδούς στον νεφρό δεν συμβαδίζει με τον βαθμό απώλειας εμμύελων ινών στο γαστροκνήμιο νεύρο. Η

σοβαρότητα της νευροπάθειας δεν σχετίζεται με την σοβαρότητα της νευροπάθειας¹⁶².

7. Ζωϊκά Μοντέλα Οικογενούς Αμυλοειδικής Πολυνευροπάθειας.

Εκτός από τους ανθρώπους αναπτύσσουν αμυλοείδωση και διάφορα είδη ζώων. Τα διάφορα ζωϊκά μοντέλα αμυλοείδωσης χρησιμεύουν στην κατανόηση των παθογενετικών μηχανισμών της νόσου και στην εφαρμογή νεώτερων θεραπειών για την vóσo. Αυτό ισχύει και για την TTR-FAP. Είναι αναγκαίο να γίνει αναφορά στα διάφορα μοντέλα νόσου όσον αφορά τα χαρακτηριστικά τους, το είδος της μετάλλαξης/γενετικής τροποποίησης που προκαλεί την νόσο, την χρήση τους στην θεμελίωση παθοφυσιολογικών μηχανισμών της νόσου, και καινούργιων θεραπειών. Παρακάτω γίνεται αναφορά στα μέχρι τώρα μοντέλα νόσου για την σχετιζόμενη με την τρανσθυρετίνη αμυλοείδωση.

i) Chlorocebus pygerythrus

Το πρωτεύον Chlorocebus pygerythus αναπτύσσει de novo αμυλοείδωση¹⁶³. Σε μελέτη 17 πρωτευόντων Chlorocebus pygerythus και σε αντίστοιχους μάρτυρες, το 65% των υποκειμένων παρουσίασε καρδιακή δυσλειτουργία (αρρυθμία, αυξημένο καρδιοθωρακικό δείκτη, αυξημένη συγκέντρωση κολπικού νατριουρητικού πεπτιδίου, και ελαττωμένο κλάσμα εξώθησης), σε ηλικία >12 ετών (χρόνια ζωής 11-13). Εναποθέσεις τρανσθυρετίνης εντοπίστηκαν στο γαστρεντερικό σύστημα, στο υποδόριο λίπος, στον πνεύμονα, στην γλώσσα, και στο τοίχωμα αγγείων. Δεν υπήρχε παρουσία αμυλοειδούς στα νεφρικά σπειράματα. Η εναποθέσεις τρανσθυρετίνης ήταν θετικές για αμυλοειδός με την χρώση Congo Red. Ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης σε όργανα στόχους(καρδιακό μυς, υποδόρια λίπος) ανέδειξε ανοργάνωτα διατεταγμένα ινίδια αμυλοειδούς. Όλα τα υπό εξέταση πρωτεύοντα Chlorocebus pygerythus είχαν το αλλήλιο TTR Val122Ile, το οποίο σχετίζεται με αμυλοείδωση

στον άνθρωπο. Τα πρωτεύοντα τα οποία χρησιμοποιήθηκαν ως ομάδα ελέγχου δεν έφεραν αυτό το αλλήλιο. Η ομολογία της ανθρώπινης τρανσθυρετίνης με την τρανσθυρετίνη των πρωτευόντων Chlorocebus pygerythus είναι 90%. Η συγκέντρωση τρανσθυρετίνης ορού στα πρωτεύοντα Chlorocebus pygerythus ήταν 50% ελαττωμένη σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου, ενώ διατηρούσαν το ίδιο επίπεδο γονιδιακής έκφρασης με την ομάδα ελέγχου. Παρόμοιο εύρημα παρατηρείται σε ασθενείς με καρδιακή αμυλοείδωση από TTR Val122Ile¹⁶⁴.

Για την διερεύνηση της επίδρασης της μετάλλαξης TTR Val122Ile στην σταθερότητα του μορίου τρανσθυρετίνης δημιουργήθηκε ανασυνδοιασμένη μορφή τρανσθυρετίνης. Η ανασυνδυασμένο τρανσθυρετίνη επέδειξε μεγαλύτερη τάση να αποδιατάσσεται σε μονομερή κατά την προσθήκη ουρίας στο διάλυμα (αποδιατακτικές συνθήκες), και κατά την εφαρμογή στο μόριο της TTR Val122Ile μελετών σύνδεσης με θειοφλαβίνη T (Thioflavin – T) σχηματίστηκαν περισσότερα ινίδια αμυλοειδούς in vitro σε σχέση με την τρανσθυρετίνη ελέγχου.

Συμπερασματικά, λόγω του γεγονότος ότι όλα τα πρωτεύοντα Chlorocebus pygerythus ήταν φορείς του αλληλίου TTR Val122Ile (το οποίο προκαλεί ATTR, στους ανθρώπους), ενώ η ομάδα ελέγχου (της οποίας το μόριο τρανσθυρετίνης παρουσιάζει, πλην της μετάλλαξης TTR Val122Ile απόλυτη ταύτιση με το μόριο των πρωτευόντων Chlorocebus pygerythus) δεν είχε εναποθέσεις αμυλοειδούς, η μετάλλαξη TTR Val122Ile διαδραματίζει κριτικό ρόλο στην εμφάνιση αμυλοείδωσης στο υπό μελέτη ζωϊκό μοντέλο ATTR.

ii) Διαγονιδιακός Dark Agouti (DA) Αρουραίος για το αλλήλιο TTRV30M

Για την δημιουργία του μοντέλου αυτού εισήχθη σε γονιμοποιημένα ωάρια αρουραίων η αλληλουχία της ανθρώπινης μεταλλαγμένης πρωτεΐνης TTRV30M συζευγμένη με τα κατάλληλα στοιχεία έκφρασης της (mouse albumin enhancer/

promoter sequence). Τα ωάρια εμφυτεύθηκαν σε θετές μητέρες (στις οποίες είχε γίνει η κατάλληλη ορμονική προετοιμασία), και η ανίχνευση του γονιδίου έγινε με την χρήση PCR και ολιγονουκλεοτίδιων τα οποία πολλαπλασίαζαν μόνο το ανθρώπινο γονίδιο της τρανσθυρετίνης.

Με την χρήση μελετών RT-PCR το TTR Val30Met mRNA είχε ισχυρή έκφραση στο ήπαρ, και στον εγκέφαλο των διαγονιδιακών αρουραίων. Υπήρχε ασθενώς θετική έκφραση στον πνεύμονα, στον οφθαλμό και στο νεφρό. Στην καρδιά, στους όρχεις, και στον μυ το TTR Val30Met mRNA δεν ήταν ανιχνεύσιμο. Με την χρήση WB (Western Blot) η παρουσία TTR Val30Met ήταν υπαρκτή στον ορό, το ENY, το ήπαρ, τον εγκέφαλο και τον οφθαλμό των διαγονιδιακών ζώων. Τα επίπεδα ορού της πρωτεΐνης TTR Val30Met ήταν αυξημένα στους αρσενικούς διαγονιδιακούς DA αρουραίους. Μετά την διενέργεια ορχεκτομής, τα επίπεδα ορού TTR Val30Met μεταξύ αρσενικών και θυληκών διαγονιδιακών DA αρουραίων δεν παρουσίασαν διαφορά. Πιθανώς η έκφραση της τρανσθυρετίνης να αυξάνεται/ εξαρτάται από την πρόσδεση στεροειδών ορμονών στους εκκινητές/ενισχυτές του γονιδίου της τρανσθυρετίνης.

Σε θηλυκούς διαγονιδιακούς DA αρουραίους ηλικίας 6-24 μηνών και σε αρσενικούς διαγονιδιακούς DA αρουραίους ηλικίας 6 μηνών δεν παρουσιάστηκαν αμυλοειδικές εναποθέσεις (Congo red χρώση αρνητική). Σε αντίθεση σε αρσενικούς διαγονιδιακούς DA αρουραίους ηλικίας 10-24 μηνών, ανευρεύθησαν προαμυλοειδικές εναποθέσεις υποβλεννογόνια στο παχύ έντερο. Στην καρδιά, στο ήπαρ, στο νεφρό, στο στόμαχο, στο λεπτό έντερο, στο δέρμα, στον εγκέφαλο, και στα περιφερικά νεύρα δεν ανιχνεύτηκαν εναποθέσεις ΤΤR Val30Met. Δεν υπήρχε εναπόθεση ενδογενούς τρανσθυρετίνης στους υπό εξέταση ιστούς. Μετά από
μεταμόσχευση ήπατος μη διαγονιδιακών αρουραίων στους διαγονιδιακούς αρουραίους τα επίπεδα TTR Val30Met ορού ήταν μη ανιχνεύσιμα.

iii) Η Drosophila Melanogaster ως μοντέλο νόσου για την ATTR (TTR Val30Met)

Η εισαγωγή της αλληλουχίας της TTR Val30Met στην Drosophila Melanogaster έχει ως αποτέλεσμα μείωση του χρόνου ζωής του εντόμου σε σχέση με την ομάδα ελέγχου, όπως και ελαττωμένη ικανότητα ανάβασης των διαγονιδιακών εντόμων, γεγονός το οποίο υποδεικνύει προσβολή του νευρικού συστήματος από την εναπόθεση TTR Val30Met. Στον εγκέφαλο των διαγονιδιακών για την TTR Val30Met γηρασμένων εντόμων παρατηρήθηκαν εναποθέσεις αμυλοειδούς TTR Val30Met (Congo-Red θετικές)¹⁶⁵.

iv) Χρήση ποντικών 129Sv χωρίς το ενδογενές γονίδιο της τρανσθυρετίνης (TTR-KO) για την δημιουργία όργανο εξαρτώμενης έκφρασης τρανσθυρετίνης με την χρήση ιϊκών φορέων.

Με την χρήση σχετιζόμενων με αδενοϊους ιϊκούς φορείς (AAV) στους οποίους έχει ενσωματωθεί το cDNA διαφόρων αλληλίων τρανσθυρετίνης (αγρίου τύπου-WT, αλλήλιο Val30Met, αλλήλιο Leu12Phe), και οργανο-ειδικών εκκινήτων / αλληλουχιών ενσωμάτωσης, έχει επιτευχθεί η δημιουργία διαγονιδιακών μοντέλων για την διερεύνηση των μηχανισμών ATTR. Τα πλεονεκτήματα ενός τέτοιου είδους μοντέλου νόσου αποτελούν το ότι η γενετική έκφραση μπορεί να εκφραστεί σε οποιοδήποτε χρονικό σημείο κατά την διάρκεια της ζωής του ζώου και επιτυγχάνεται υψηλού επιπέδου έκφραση του γονιδίου.

Η χρήση αυτού του συστήματος μεταφοράς έγινε με στόχο να εμφυτευθεί η TTR Leu12Phe στο ήπαρ των ζώων, ώστε να ερευνηθεί η εμπλοκή του ελέγχου του ενδοπλασματικού δικτύου και της απάντησης του πρωτεο-σώματος στο ήπαρ σε αυτή την μορφή ATTR. Με αυτή την μέθοδο μεταφοράς το ήπαρ αποτελούσε όργανο

έκφρασης της ανθρώπινης TTR Leu12Phe, και ανευρέθησαν σε αυτό σημαντικός αριθμός αντιγράφων ιϊκών φορέων με το ανθρώπινο αλλήλιο. Παράλληλα ανευρέθηκε ποσότητα αλληλίων στο στόμαχο και στο κεντρικό νευρικό σύστημα. Όσον αφορά τα επίπεδα ορού των αλληλίων τρανσθυρετίνης, αυτά ήταν 5 φορές ελαττωμένα σε σχέση με τα αντίστοιχα στελέχη διαγονιδιακών ποντικών, και 10 φορές πιο ελαττωμένα όσον αφορα το TTR Leu12Phe αλλήλιο, παρά την παρουσία ίδιου αριθμού αντιγράφων στο ήπαρ για κάθε αλλήλιο. Παράλληλα στον ορό των ζώων τα οποία είχαν το TTR Leu12Phe αλλήλιο υπήρχε η παρουσία Νγλυκοζυλίωσης σε αυξημένο ποσοστό στο μόριο TTR Leu12Phe.

Σε μελέτες ανοσοφθορισμού στο ήπαρ των ποντικών στους οποίους είχε γίνει μεταφορά του αλληλίου TTR Leu12Phe διαπιστώθηκαν ενδοκυττάρια συσσωματώματα μορίων TTR Leu12Phe τα οποία εντοπιζόνταν στα λυσοσώματα (συνεντόπιση με τον δείκτη Lamp-2). Συμπερασματικά αυτή η μορφή ATTR σχετίζεται με αυξημένη Ν-γλυκοζυλίωση του μορίου και καταστροφή μεταλλαγμένου TTR Leu12Phe μορίου στα λυσοσώματα, με αποτέλεσμα την περιορισμένη έκκριση του από το ηπατοκύτταρο¹⁶⁶.

<u>v) Ανθρωποποιημένα ποντίκια C57Bl/6 για το αλλήλιο TTR Val30Met.</u>

Για την δημιουργία ανθρωποποιημένων ποντικών (στέλεχος ICR) για το αλλήλιο TTR Val30Met έγινε με την χρήση τόπων loxP, και εισαγωγή (knocked in) του cDNA του αλληλίου TTR Val30Met μέσω ανασυνδυασμού διαμεσολαβούμενο από Cre (Cre mediated recombination). Συγκεκριμένα έγινε σίγαση του ενδογενούς γονιδίου της τρανσθυρετίνης και εισαγωγή είτε του φυσιολογικού γονιδίου τρανσθυρετίνης (Val30/Val30), είτε του μεταλλαγμένου γονιδίου της τρανσθυρετίνης (Met30/Val30, Met30/Met30). Ως ομάδες ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν ποντίκια στα οποία είτε είχε διατηρηθεί το ένα αλλήλιο της ενδογενούς τρανσθυρετίνης (+/-), είτε

είχαν απαληφθεί και τα δύο αλλήλια της ενδογενούς τρανσθυρετίνης (-/-). Το επίπεδο έκφρασης των ανθρώπινων αλληλίων τρανσθυρετίνης ήταν ίδιο με το επίπεδο έκφρασης του ενδογενούς γονιδίου τρανσθυρετίνης. Η έκφραση των ανθρώπινων αλληλίων τρανσθυρετίνης (καθώς και των ενδογενών αλληλίων τρανσθυρετίνης) εντοπιζόταν στο ήπαρ, στον οφθαλμό και στο ΚΝΣ (χοριοειδές πλέγμα). Η έκκριση της παραγόμενης ανθρώπινης πρωτεΐνης γινόταν χωρίς διαταραχή της εκκριτικής συσκευής (secretory apparatus/ενδοπλασματικό δίκτυο, σύμπλεγμα Golgi). Κατά την ιστολογική εξέταση των διαγονιδιακών ποντικιών για τα αλλήλια TTR Val30Met δεν ανευρέθησαν εναποθέσεις αμυλοειδούς. Τα επίπεδα ορού των προϊόντων των ανθρώπινων αλληλίων τηςτρανσθυρετίνης (ενώ δεν υπήρχαν διαφορές στο επίπεδο ηπατικής έκφρασης μεταξύ ποντικίσιας και ανθρώπινης τρανσθυρετίνης) ήταν ελαττωμένα σε σχέση με τα επίπεδα της ενδογενούς τρανσθυρετίνης. Σε μελέτες ελέγχου αποδιάταξης ομοτετραμερών τρανσθυρετίνης ορού, η TTR Val30Met ήταν περισσότερο ασταθής από την TTR Val30Val. Ωστόσο στα διαγονιδιακά ζώα τα οποία ήταν ομόζυγα για την ανθρώπινη TTR Val30Met, τα ομοδιμερή TTR Val30Met ήταν περισσότερο σταθερά, από ότι τα ομοδιμερή TTR Val30Val. Ίσως για αυτό στους ομοζυγώτες ασθενείς με ATTR Val30Met η συμπτωματολογία και η βαρύτητα της νόσου είναι ηπιότερη. Με την χρήση αυτού του συστήματος έκφρασης διαφόρων αλληλίων τρανσθυρετίνης μπορεί να γίνει μελέτη γενετικής έκφρασης διαφόρων μεταλλαγμένων μορφών τρανσθυρετίνης.

<u>vi.) Διαγονιδιακό μοντέλο μελέτης επίδρασης του Heat shock factor-1 (Hsf-1) στην</u> εναπόθεση TTR Val30Met.

Η ενεργοποίηση του NF-κB έχει παρατηρηθεί σε ιστούς ασθενών με TTR-FAP (νεύρα, σιελογόννοι αδένες)¹⁶⁷. Υπάρχει συμμετοχή του υποδοχέα προϊόντων

προκεχωρημένης γλυκοζυλίωσης (Receptor for Advanced Glycation End products-RAGE)¹²¹, με τη συνοδό πυροδότηση του ενδοκυτταρίου στρες, και προφλεγμονωδών κυτταροκινών όπως ο TNF-a, η II-1β και την ενεργοποίηση της κασπάσης 3. Η απάντηση στο εξωκυττάριο στρες είναι μέρος της πρωτεϊνικής ομοιόστασης. Η διαταραχή της απάντησης αυτής μέσω απενεργοποίησης του Hsf-1 διαδραματίζει σημαίνοντα ρόλο στην ATTR.

Για την δημιουργία αυτού του μοντέλου νόσου χρησιμοποιήθηκαν ημίζυγα για τον Hsf-1 ποντίκια (Hsf1tm1Ijb-Balb/c x 129SvEv) τα οποία διασταυρώθηκαν για > 9γενεές με το υπόβαθρο TTR Val30Met – murine TTR KO-129SV. Με αυτόν τον τρόπο δημιουργήθηκαν ποντίκια διαγονιδιακά για το αλλήλιο TTR Val30Met, και ημίζυγα για τον Hsf-1 (Hsf-1/TTR Val30Met/murine TTR KO - 129SV-Hsf-1/M30). Τα Hsf-1/M30 ποντίκια παρουσίασαν πρώϊμα εναπόθεση τρανσθυρετίνης (αμυλοειδές, προ-αμυλοειδικές εναποθέσεις) στο γαστρεντερικό σύστημα (στόμαχος, παχύ έντερο, λεπτό έντερο), στο περιφερικό νευρικό σύστημα (ισχυακό νεύρο), και στα DRG κατά την διάρκεια ζωής τους (1-24 μήνες) και σε μεγαλύτερη έκταση σε σύγκριση με τους μάρτυρες (ποντίκια μόνο με το ανθρώπινο αλλήλιο TTR Val30Met). Η εναπόθεση τρανσθυρετίνης στα Hsf-1/M30 ποντίκια προκάλεσε αύξηση των φλεγμονωδών κυτταροκινών (TNF-a, II-1β), αύξηση της έκφρασης του υποδογέα RAGE, και μετατόπιση του NF-κB στον πυρήνα των νεύρικών κυττάρων (DRG). Επιπλέον η εναπόθεση τρανσθυρετίνης προκαλεί επαγωγή της πρωτεΐνης Hsp 70, η οποία ρυθμίζεται από τον Hsf-1. Με το διαγονιδιακό μοντέλο αυτό, δίδεται έμφαση στον ρόλο της πρωτεόστασης, και του Hsf-1 στην παθογένεση της TTR-FAP, καθώς και στο γεγονός ότι μπορούν να σχεδιαστούν στοχευμένες θεραπείες για την επαγωγή της πρωτεϊνικής ομοιόστασης, και μείωσης του εξωκυτταρίου στρες στην TTR-FAP¹⁶⁸.

<u>vii) Διαγονιδιακά ποντίκια για το αλλήλιο TTR Val30Met με επαγωγή της έκφρασης</u> του αλληλίου με τον εκκινητή μεταλλοθειονίνης -1(mouse MT-1 promoter/ MT-1/ <u>MT1-V30M</u>)

Αποτελεί το πρώτο διαγονιδιακό μοντέλο για την TTR-FAP. Σε έμβρυα σταδίου ενός κυττάρου από στέλεχος ποντικών C57bl/6 x C3H έγινε μικροέγχυση του αλληλίου TTR Val30Met συνδεδεμένο με τον εκκινητή MT-1 (0,6 – 7,9 αντίγραφα γενετικού υλικού ανα διπλοειδές γένωμα-copies per diploid genome/c.p.d). Ακολούθως έγινε εμφύτευση των εμβρύων σε ωαγωγούς ποντικών στελεγούς ICR. Τα γεννηθέντα διαγονιδιακά ζώα παρουσίαζαν στον ορό τους TTR Val30Met γεγονός που υποδεικνύει ότι το διαγονίδιο εκφράζεται και η πρωτεϊνη του εκκρίνεται στην κυκλοφορία. Ωστόσο τα επίπεδα TTRVal30Met ήταν χαμηλότερα από τα παρατηρούμενα στους ασθενείς με TTR-FAP¹⁶⁹. Από τις διάφορες σειρές ζώων οι οποίες προέκυψαν, μια από αυτές παρουσίασε αμυλοειδικές εναποθέσεις TTR Val30Met, στο γαστρεντερικό σύστημα (6 μήνες ζωής), στη καρδιά, στα νεφρά και στον θυρεοειδή (12 μήνες ζωής). Με την ενδοπεριτοναϊκή έγχυση λιποπολυσακχαρίτη τοιχώματος E.coli σε διάφορες ηλικιακές ομάδες έγινε επαγωγή οξείας φλεγμονής. Τα ζώα παρουσιάσαν εναποθέσεις αμυλοειδούς Α (ΑΑ) στο γαστρεντερικό σύστημα, στην καρδιά, στο ήπαρ και στα νεφρά. Η οξεία φλεγμονή δεν αύξησε την εναπόθεση τρανσθυρετίνης¹⁷⁰.

Η ίδια γενετική κατασκευή (MT-1/human TTR Val30Met) εισήχθη με την διαδικασία της μικροέγχυσης, σε μεγαλύτερο αριθμό αντιγράφων (200 c.p.d) σε γονιμοποιημένα ωάρια C57Bl/6 ποντικών. Ακολούθησε εμβρυομεταφορά σε ωαγωγούς θετών ICR μητέρων. Τα γεννηθέντα ποντίκια παρουσίασαν εναποθέσεις αμυλοειδούς στον σπλήνα, στον νεφρό (ηλικία 6 μηνών), στον θυρεοειδή (ηλικία 12 μηνών), στο στόμαχο και στο λεπτό έντερο (ηλικία 6 μηνών). Στο νεφρό οι εναποθέσεις

αμυλοειδούς περιοριζόταν αποκλειστικά στα σπειράματα στα αρχικά στάδια και αργότερα επεκτεινόταν στο διάμεσο ιστό. Στην ηλικία των 6 μηνών, εμφανιζόταν ασθενείς εναποθέσεις αμυλοειδούς στο μεσάγγειο, στο 10% των υπό εξέταση σπειραμάτων. Στην ηλικία των 18 μηνών, τα περισσότερα των σπειραμάτων, είγαν αυξημένη εναπόθεση αμυλοειδούς. Μετά την ηλικία των 21 μηνών, σχεδόν το 100% των σπειραμάτων είγαν εναπόθεση αμυλοειδούς. Υπερμικροσκοπικά τα ινίδια αμυλοειδούς εντοπιζόταν στην μεσάγγειο ουσία και υπενδοθηλιακά. Με την αύξηση της ηλικίας τα ινίδια αμυλοειδούς αυξανόταν σε ποσότητα και εντοπιζόταν στο έσω πέταλο της σπειραματικής βασικής μεμβράνης. Σε προχωρημένη ηλικία, μαζικές συναθροίσεις ινιδίων αμυλοειδούς εντοπιζόταν σε όλη την έκταση της μεσαγγείου ουσίας. Τα μεσαγγειακά κύτταρα ήταν διογκωμένα και τα ποδοκύτταρα παρουσίαζαν τήξη των ποδικών τους εκβλαστήσεων. Στο διάμεσο ιστό των διαγονιδιακών ποντικών ηλικίας 21 μηνών, το αμυλοειδές εντοπιζόταν μόνο στο φλοιό και όχι στον μυελό και παρατηρήθηκε υπερμικροσκοπική εντόπιση στην βασική μεμβράνη των εγγύς εσπειραμένων σωληναρίων. Με την χρήση αυτού του διαγονιδιακού συστήματος έγινε αναφορά για πρώτη φορά, όσον αφορά την TTR-FAP, για το πώς μια σημειακή μετάλλαξη μπορεί να προκαλέσει παθολογο-ανατομικές αλλοιώσεις σε όργανα στόχους 171 .

<u>viii) Διαγονιδιακά C57Bl/6 ποντίκια για το αλλήλιο TTR Val30Met, φέροντα</u> ανθρώπινες ρυθμιστικές περιοχές του γονιδίου μήκους 0,6 Kb (0,6 Kb-hTTRV30M).

Η δημιουργία αυτού του συστήματος ελέγχου έγινε για να καθοριστεί το κατά πόσο η ρύθμιση της έκφρασης του ανθρώπινου αλληλίου TTR Val30Met επηρρεάζει τον βαθμό και την θέση της εναπόθεσης του αμυλοειδούς. Για την κατασκευή αυτού του μοντέλου συνενώθηκαν περιοχές 0,6 Kb ανάντη του 5΄ άκρου του ανθρώπινου γονιδίου της τρανσθυρετίνης και το αλλήλιο TTRVal30Met. Με την διαδικασία της

μικροέγχυσης τα μόρια του DNA εισήχθησαν σε γονιμοποιημένα ωάρια C57Bl/6 ποντικών και εμφυτεύθηκαν σε ωαγωγούς ποντικών ICR. Η έκφραση του αλληλίου TTRVal30Met παρατηρήθηκε στο ήπαρ, και όχι στο χοριοειδές πλέγμα. Ωστόσο ανοσοϊστοχημικά ανηχνεύθηκαν μόρια TTRVal30Met στο χοριοειδές πλέγμα, υποδηλώνοντας ότι υπάρχει ίστο-εξαρτώμενη έκφραση στο εσωτερικό της γενετικής κατασκευής. Δεν υπήρχε διαφορά, κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη, της έκφρασης του αλληλίου TTRVal30Met και του ενδογενούς γονιδίου. Επομένως το μέγεθος της εισαχθείσας ρυθμιστικής ανθρώπινης αλληλουχίας δεν επηρρέασε την έκφραση του γονιδίου¹⁷².

<u>ix) Διαγονιδιακά C57Bl/6 ποντίκια για το αλλήλιο TTR Val30Met, φέροντα</u> ανθρώπινες ρυθμιστικές περιοχές του γονιδίου μήκους 6 Kb (6 Kb-hTTRV30M).

Για τον περεταίρω έλεγχο της ρύθμισης της έκφρασης του αλληλίου TTR Val30Met, έγινε σύζευξη 6 Kb ανάντη του 5' άκρου του γονιδίου της τρανσθυρετίνης με το αλλήλιο TTR Val30Met, μικροέγχυση σε γονιμοποιημένα ωάρια C57Bl/6 ποντικών, και εμφύτευση των ωαρίων αυτών στους ωαγωγούς θετών μητέρων. Σε αυτό το διαγονιδιακό σύστημα τα επίπεδα ορού τρανσθυρετίνης ήταν > 10 mg/dl (μέσος όρος 25 mg/dl). Η έκφραση του γονιδίου της τρανσθυρετίνης ήταν στο ήπαρ, στο νεφρό, στο KNΣ (χοριοειδές πλέγμα) και στον εμβρυϊκό σάκο. Σε ακριβώς αυτούς τους ιστούς εκφράζεται και το ενδογενές γονίδιο της τρανσθυρετίνης. Το επίπεδο ιστικής έκφρασης του αλληλίου TTR Val30Met ήταν του ίδιου επιπέδου με εκείνο του ενδογενούς γονιδίου της τρανσθυρετίνης. Επιπλέον mRNA TTR Val30Met ανιχνεύθηκε σε χαμηλά επίπεδα στο ήπαρ (13 ημερών έμβρυο), και παρουσίασε σταδιακή αύξηση κατά την διάρκεια της κύησης. Μετά την γέννηση το επίπεδο mRNA έφτασε στα επίπεδα του ενηλίκου στις 4 εβδομάδες ζωής. Αντίθετα το γέννηση και έκτοτε παρέμεινε σε αυτά. Αυτό το γεγονός υποδεικνύει διαφορετικούς ρυθμιστικούς μηχανισμούς της έκφρασης του ανθρώπινου και ποντικίσιου γονιδίου της τρανσθυρετίνης¹⁷³.

Για την επίδραση της γονιδιακής ρύθμισης του αλληλίου TTR Val30Met στην εναπόθεση αμυλοειδούς έγινε σύγκριση των διαγονιδιακών στελεχών 6 Kb-hTTRV30M και 0,6 Kb-hTTRV30M. Στο στέλεχος 6 Kb-hTTRV30M εναπόθεση αμυλοειδούς στο νεφρό παρατηρήθηκε στην ηλικία των 9 μηνών. Στο στέλεχος 0,6 Kb-hTTRV30M εναπόθεση αμυλοειδούς στο νεφρό παρατηρήθηκε στην ηλικία των 15 μηνών. Η εναπόθεση αμυλοειδούς στο νεφρικό παρέγχυμα του στελέχους 6 Kb-hTTRV30M ήταν περισσότερο εκτεταμένη από ότι στο στέλεχος 0,6 Kb-hTTRV30M. Στην ηλικία των 24 μηνών, 100% των ποντικών του στελέχους 6 Kb-hTTRV30M είχαν σπειραματική εναπόθεση αμυλοειδούς ήταν σπάνια. Στο στέλεχος 0,6 Kb-hTTRV30M η εναπόθεση αμυλοειδούς αρχικά περιοριζόταν στα σπειράματα (9 μήνες), και με την πάροδο της ηλικίας (18-24 μήνες) επεκτεινόταν στον διάμεσο ιστό (φλοιός)¹⁷⁴.

<u>x.)</u> Διαγονιδιακά ποντίκια χωρίς το ενδογενές γονίδιο της τρανσθυρετίνης (TTR-KO). Το ενδογενές γονίδιο της τρανσθυρετίνης απενεργοποιήθηκε με στοχευμένη εισαγωγή κλώνου νεομυκίνης στο 2[°] εξώνιο του γονιδίου της τρανσθυρετίνης, εισαγωγή της γενετική κατασκευής, σε εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα και εμφύτευση των βλαστικών κυττάρων σε βλαστοκύστεις στελέχους MF1 ποντικών. Τα TTR-KO ποντίκια δεν παρουσίαζαν αυξήμενη περιγεννητική θνητότητα και είχαν φυσιολογική ενδομήτριο ανάπτυξη. Ωστόσο τα επίπεδα T₄ ορού ήταν 3 φορές χαμηλότερα σχέση με την ομάδα ελέγχου, καθώς και τα επίπεδα T₃ ήταν 65% χαμηλότερα σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (πρόσδεση T₃ στην αλβουμίνη), χωρίς μεταβολή στα επίπεδα

θυρεοειδοτρόπου ορμόνης. Ο θυρεοειδής των TTR-KO ποντικών δεν ανέδειξε μορφολογικές αλλοιώσεις κατά την ιστολογική εξέταση. Παράλληλα στα TTR-KO ποντίκια τα επίπεδα ρετινόλης πλάσματος ήταν < 6%, και τα επίπεδα RBP ήταν 3% της φυσιολογικής τιμής αντίστοιχα. Ωστόσο τα TTR-KO ποντίκια δεν παρουσίαζαν σημεία υποβιταμίνωσης Α, υποδηλώνοντας διαφορετικές οδούς διάθεσης της βιταμίνης Α στους ιστούς στόχους. Τα TTR-KO ποντίκια έχουν χρησιμοποιηθεί για να μελετηθεί η επίδραση αλληλίων της τρανσθυρετίνης¹⁷⁵.

<u>xi) Ομόζυγα (TTR-KO-V30M+/+) και ετερόζυγα (TTR-KO-V30M+/-) στελέχη</u> ποντικών φέροντα το αλλήλιο TTR Val30Met σε υπόβαθρο άνευ του ενδογενούς γονιδίου της τρανσθυρετίνης.

Το στέλεχος αυτό διαγονιδιακών ποντικών παρήχθη με την διασταύρωση TTR-KO και 6 Kb-hTTRV30M ποντικών. Τα επίπεδα τρανσθυρετίνης ορού μεταξύ TTR-KO-V30M+/- και TTR-KO-V30M+/+ δεν διέφεραν. Κατά την ιστολογική εξέταση των ποντικών των στελεχών TTR-KO-V30M+/+ και TTR-KO-V30M+/- δεν υπήρχε διαφορά στην έναρξη και στην έκταση της εναπόθεσης αμυλοειδούς. Οι εναποθέσεις αμυλοειδούς στο νεφρό άρχισαν να παρουσιάζονται στην ηλικία των 18 μηνών. Οι εναποθέσεις αμυλοειδούς στον νεφρό των διαγονιδιακών ποντικών (TTR-KO-V30M+/-, TTR-KO-V30M+/+) περιοριζόταν στα σπειράματα, με πλήρη κατάληψη του αγγειώδους σπειράματος. Με βάση τα επίπεδα τρανσθυρετίνης ορού των (TTR-KO-V30M+/-, στελεγών αυτών TTR-KO-V30M+/+), επίπεδα τα τρανσθυρετίνης ορού του στελέχους ΜΤΙ-V30Μ, και τα αντίστοιχα ιστικά πρότυπα εναπόθεσης αμυλοειδούς, εξάγεται το συμπέρασμα ότι τα επίπεδα ορού τρανσθυρετίνης πάνω από ένα συγκεκριμένο όριο δεν επιδεινώνουν την εναπόθεση

αμυλοειδούς, και κάτω από ένα συγκεκριμένο όριο δεν μπορεί να δημιουργηθεί εναπόθεση αμυλοειδούς¹⁷⁶.

<u>xii) Διαγονιδιακά ποντίκια για το αλληλίο TTR Leu55Pro και για πολλαπλά</u> αντίγραφα του φυσιολογικού αλληλίου τρανσθυρετίνης.

Έγινε εισαγωγή ανθρώπινου γονιδιώματος μήκους 19,2 Kb ανάντη του ανθρώπινου αλληλίου TTR Leu55Pro, και το ανθρώπινο αλλήλιο TTR Leu55Pro (2 c.p.d) σε γονιμοποιημένα ωάρια στελέχους C57Bl/6 x DBA/2, τα οποία εμφυτεύθηκαν σε θετές μητέρες. Τα προκύπτοντα ποντίκια παρουσίασαν μειωμένη γονιμότητα. Τα επίπεδα ορού του αλληλίου TTR Leu55Pro ήταν 1-3 mg/dl. Σε περίοδο παρακαλούθησης 2,5 ετών κανένα ζώο δεν παρουσίασε εναποθέσεις αμυλοειδούς. Το αλλήλιο TTR Leu55Pro στον άνθρωπο προκαλεί κλινικά επιθετική TTR-FAP. Ίσως ο παρατηρούμενος φαινότυπος να οφείλεται σε διαφορετική ρύθμιση της έκφρασης μεταξύ των ειδών, ή και σε σταθεροποίηση του αλληλίου TTR Leu55Pro από το ενδογενές μόριο τρανσθυρετίνης του ποντικού¹⁷⁷.

Έγινε επίσης εισαγωγή ανθρώπινου γονιδιώματος μήκους 19,2 Kb ανάντη του φυσιολογικού γονιδίου της τρανσθυρετίνης (wt-TTR) και του φυσιολογικού γονιδίου της τρανσθυρετίνης (wt-TTR) και του φυσιολογικού γονιδίου της τρανσθυρετίνης (90 c.p.d) σε γονιμοποιημένα ωάρια στελέχους C57Bl/6 x DBA/2, τα οποία εμφυτεύθηκαν σε θετές μητέρες. Τα γεννηθέντα ποντίκια εξέφραζαν το wt-TTR στο ήπαρ, στο νεφρό , στην γλώσσα, στους σκελετικούς μύες, στην καρδιά, και στον στόμαχο. Η συγκέντρωση τρανσθυρετίνης ορού ήταν 100-300 mg/dl. Τα διαγονιδιακά ζώα παρουσίαζαν εναποθέσεις wt-TTR σε ηλικίες 12 – 17 μήνες παρατηρήθηκαν προ-αμυλοειδικές εναποθέσεις wt-TTR στα νεφρά , στην καρδιά, και στο έντερο. Σε ηλικία > 12 μηνών. Στις ηλικίες 12 – 17 μήνες παρατηρήθηκαν προ-αμυλοειδικές εναποθέσεις και προ-αμυλοειδικές εναποθέσεις βρέθηκαν σε μεγαλύτερο ποσοστό ζώων (84%). Στα νεφρά, οι εναποθέσεις αμυλοειδούς ήταν έντονες στα σπειράματα,

και εστίες εναποθέσεων παρατηρήθηκαν στον διάμεσο ιστό, και στο περινεφρικό λίπος. Τα περισσότερα υπό εξέταση σπειράματα ήταν προσβεβλημένα, είτε στο μεσάγγειο, είτε στην περιοχή των αγγειακών αγκύλων όπου μαζικές εναποθέσεις προκαλούσαν απόφραξη. Μελέτες ανοσο-ηλεκτρονικής μικροσκοπίας ανέδειξαν εναποθέσεις αμυλοειδούς ύπο-ενδοθηλιακά¹⁷⁸.

8. Θέματα ειδικού επιστημονικού ενδιαφέροντος για την παρούσα διδακτορική διατριβή.

i.) Εξωτερικά επαγώμενη απόπτωση.

Στους ιστούς ασθενών με TTR-FAP, σε διαγονιδιακά μοντέλα TTR-FAP, και σε κυτταρικές σειρές έχει αναφερθεί αυξημένη παρουσία TNF-a, II-1B (προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες), και ενεργοποίηση της κασπάσης 3 (activated caspase 3 – acasp3)¹⁷⁹. Η εξωτερικά επαγώμενη απόπτωση (extrinsic apoptosis), υποδηλώνει περιπτώσεις κυτταρικού θανάτου επαγόμενες από εξωκυττάρια ερεθίσματα, τα οποία διαβιβάζονται από ειδικούς διαμεμβρανικούς υποδοχείς. Η εξωτερικά επαγώμενη απόπτωση μπορεί να πυροδοτηθεί από την πρόσδεση συνδετών (lethal ligands) όπως οι FAS/ CD95 (FASL/CD95L), TNF, το μέλος 10 της υπεροικογένειας TNF (TNFSF10-TNF related apoptosis inducing ligand/TRAIL), σε διάφορους υποδοχείς κυτταρικού θανάτου (FAS/CD95, TNFR1, TRAILR 1-2)^{180,181}. Εναλλακτικά ένα σήμα της εξωτερικά επαγώμενης απόπτωσης μπορεί να διαμεσολαβηθεί μέσω υποδογέων εξάρτησης (dependence receptors) συμπεριλαμβανωμένων και των υποδοχέων νετρίνης (netrin receptors), οι οποίοι ενεργοποιούνται όταν η συγκέντρωση των συνδετών τους φτάσει κάτωθεν ενός συγκεκριμένου επιπέδου¹⁸².

Ένα σηματοδοτικό μονοπάτι το οποίο οδηγεί σε εξωτερικά επαγώμενη απόπτωση, εκλύεται μέσω της ενεργοποίησης των υποδοχέων FASR. Χωρίς την παρουσία FASL, οι υπομονάδες του FASR, σχηματίζουν αυθόρμητα τριμερή στο κυτταρόπλασμα (λόγω της παρουσίας στο μόριο τους της δομής preligand assembly domain-PLAD). Η σύνδεση του FASL στον FASR, σταθεροποιεί τα τριμερή αυτά, για τον σχηματισμό ενός δυναμικού πολυπρωτεϊνικού σχηματισμού, στο κυτταροπλασματικό τμήμα του υποδοχέα. Αυτό επιτυγχάνεται με την διαμεσολάβηση μιας νουκλεοτιδικής αλληλουχίας 80 αμινοξέων (death domain- DD)¹⁸³. Στην DD του FAS περιλαμβάνουν την αλληλεπιδρούσα με πρωτεΐνες κινάση 1 (RIPK1/RIP1), σχετιζόμενη πρωτεΐνη της DD του FAS (FADD), πολλαπλές ισομορφές του c-FLIP, πρωτεΐνες κυτταρικοί ανασταλτές της απόπτωσης (cellular inhibitor of apoptosis/cIAPs), η λιγκάση ουβικουϊτίνης E3 (αναστέλλουν την απόπτωση με την παρεμπόδιση της ενεργοποίησης των κασπασών 10 και 8)¹⁸⁴. Αυτό το πολυπρωτεϊνικό σύμπλεγμα (death inducing signaling complex) αποτελεί πλατφόρμα ρύθμισης της ενεργοποίησης της κασπάσης 8¹⁸⁵.

Υπάρχουν κατηγορίες υποδοχέων κυτταρικού θανάτου με συγκεκριμένες σηματοδοτικές ιδιότητες. Οι πρωτεΐνες τύπου TNFR1 χρειάζονται την DD του TNFR για να συστρατεύσουν την FADD και την κασπάση 8. Αντίθετα τα μόρια FASR και TRAILR1/2 δεν απαιτούν την DD¹⁸⁰. Η κινάση RIP1, αλληλεπιδρά με cIAPs, επιτρέποντας την συστράτευση της TGF-b- ενεργοποιούμενης κινάσης-1 (TAK1), TAK1-προσδεόμενης πρωτεΐνης 2 (TAB2) και TAB3. Τα μόρια αυτά (TAK1, TAB2, TAB3) ενεργοποιούν το πολυσήμαντο μονοπάτι σηματοδότησης για τον NF-κB¹⁸⁰. Επομένως η ενεργοποίηση των υποδοχέων κυτταρικού θανάτου δεν εμπεριέχει πάντοτε την διαβίβαση ενός σήματος κυτταρικού θανάτου. Για παράδειγμα ο TNFR1 μπορεί να επάγει τόσο τη σηματοδότηση κυτταρικού πολλαπλασιασμού όσο και τη

σηματοδότηση του κυτταρικού θανάτου. Σε ορισμένους κυτταρικούς κυτταρικούς τύπους, όπως τα λεμφοκύτταρα (κύτταρα τύπου Ι), η ενεργή κασπάση 8 καταλύει άμεσα την πρωτεολυτική ωρίμανση της κασπάσης 3, επάγωντας την εκτελεστική φάση της απόπτωσης, χωρίς την συμμετοχή των μιτοχονδρίων. Σε άλλους κυτταρικούς τύπους όπως τα β κύτταρα του παγκρέατος, και τα ηπατοκύτταρα (κύτταρα τύπου II), η κασπάση 8 πρωτεολύει την BH3- αλληλεπιδρούσα δομή του αγωνιστή κυτταρικού θανάτου (BID), οδηγώντας στην δημιουργία του διατιτραίνοντος μιτοχονδριακού κλάσματος (truncated BID). Επομένως ενώ τα κύτταρα τύπου Ι υπόκεινται σε εξωκυττάριο αποπτωτικό θάνατο χωρίς την συμμετοχή των μιτοχονδρίων, τα κύτταρα τύπου ΙΙ υποκύπτουν από την ενεργοποίηση των υποδοχέων κυτταρικού θανάτου ενώ παράλληλα παρουσιάζουν σημεία διάτρησης της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης (MOMP), απώλεια διαμεμβρανικού δυναμικού του μιτοχονδρίου (Dcm), και απελεύθερωση τοξικών πρωτεϊνών του μιτοχονδριακού διαμεμβρανικού χώρου¹⁸⁶. Μεταξύ αυτών των πρωτεϊνών η παρουσία του κυτοχρώματος c (CYTC) στο κυτταρόπλασμα οδηγεί στον σχηματισμό του αποπτοσώματος (apoptosome). Η συμμετοχή της κασπάσης 10, στην εξωκυττάρια επαγομένη απόπτωση είναι ασαφής, και διαφαίνεται ότι η κασπάση 10 δεν μπορεί λειτουργικά να αντικαταστήσει την κασπάση 8. Ωστόσο έχει προταθεί ότι η κασπάση 10 απαιτείται για την πυροδοτούμενη σηματοδότηση του κυτταρικού θανάτου από υποδοχείς κυτταρικού θανάτου, παρουσία ανασταλτών των κασπασών¹⁸⁷.

Οι υποδοχείς εξάρτησης συνδέονται με ταχεία ενεργοποίηση της κασπάσης 3 (εκτελεστικό σκέλος της σηματοδότησης των κασπασών). Απουσία των συνδετών τους, μερικοί υποδοχείς εξάρτησης (Patched, DCC), αλληλεπιδρούν με το κυτταροπλασματικό τμήμα της πρωτεΐνης DRAL, και ενεργοποιούν την πλατφόρμα

ενεργοποίησης της κασπάσης 9. Ο υποδοχέας εξάρτησης UNC5B, μετά την αφαίρεση της netrin-1, συστρατεύει ένα σηματοδοτικό σύμπλοκο το οποίο περιλαμβάνει την πρωτεϊνική φωσφατάση 2A (PP2A) και την θάνατο-εξαρτώμενη πρωτεϊνική κινάση 1 (DAPK1)¹⁸⁸. Μέσω αυτών των πολυπρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων, η PP2A απόφωσφορυλιώνει την DAPK1 ενεργοποιώντας περεταίρω την αποπτωτική διαδικασία¹⁸⁹.

Επομένως ο εξωτερικά επαγώμενος κυτταρικός θάνατος, αποτελεί μια διαδικασία εξαρτώμενη από τις κασπάσες και για αυτόν τον λόγο μπορεί να ανασταλλεί από αναστολείς των κασπασών (π.χ. Z-VAD-fmk) ή από ιογενώς παραγόμενους ιϊκών αναστολέων των κασπασών (π.χ. CrmA). Ο εξωτερικά επαγώμενος κυτταρικός θάνατος χαρακτηρίζεται από 3 κύρια σηματοδοτικά μονοπάτια: α) Από την σηματοδότηση μέσω υποδοχέων κυτταρικού θανάτου και ενεργοποίησης της κασπάσης 8 και της κασπάσης 3. β) Από την σηματοδότηση μέσω υποδοχέων και ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού της κασπάσης 8-tBID-MOMP-κασπάση 9- κασπάση 3. γ) Από ένδεια συνδετών και ενεργοποίησης των υποδοχέων κυτταρικής εξάρτησης και συνοδό ενεργοποίηση της κασπάσης 9 και της κασπάσης 3 (άμεση ή MOMP-εξαρτώμενη)¹⁸⁴.





ii.) Ο ρόλος των πρωτεΐνών Bax και Bcl-2 στην απόπτωση.

Η πρωτεΐνη Bcl-2 δεν προωθεί τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, αλλά απενεργοποιεί το μονοπάτι της απόπτωσης. Στα ευκαριωτικά κύτταρα αυτό επιτυγχάνεται με την έμμεση αναστολή ενεργοποίησης των κασπασών. Η πρωτεΐνη Bcl-2 αναστέλλει την απελευθέρωση των προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών από τα μιτοχόνδρια, οι οποίες είναι ικανές να προκαλέσουν κυτταρικό θάνατο, και να οδηγήσουν σε περεταίρω ενεργοποίηση των κασπασών. Η πρωτεΐνη Bax είναι πρωτεΐνη η οποία επάγει την απόπτωση. Η μετακίνηση της πρωτεΐνης Bax από το κυτταρόπλασμα στα μιτοχόνδρια, οδηγεί σε συσσωματώματα με την πρωτεΐνη Bak-1, τα οποία

σχηματίζουν διαύλους στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη, απελευθερώνοντας συστατικά των μιτοχονδρίων (cyt-c, Smac/Diablo) στο κυτταρόπλασμα, επάγοντας με αυτόν τον τρόπο απόπτωση. Η δημιουργία διαγονιδιακών μοντέλων ποντικών στα οποία έχουν απαλειφθεί μόνο ένα από τα γονίδια Bax ή Bak έχει ως αποτέλεσμα ήπιο φαινότυπο. Η απαλοιφή και των δύο γονιδίων έχει δραματικά αποτελέσματα , με αποτέλεσμα αυξημένη εμβρυϊκή θνητότητα, καθώς και ανωμαλίες της διάπλασης (μη διάνοιξη των μεσοδακτυλίων πτυχών, ατρησία κόλπου, συσσωματώματα νευρώνων και λευκοκυττάρων)¹⁹⁰.



Εικόνα 4: Εσωτερικά επαγομένη απόπτωση, ο ρόλος των μιτοχονδρίων¹⁸⁴.

iii.) Η απάντηση στην διαταραχή της πρωτεϊνικής ομοιόστασης (heat-shock response) και ο ρόλος του Heat Shock Factor 1 (Hsf-1).

Τα γονίδια τα οποία κωδικοποιούν της πρωτεΐνες διαμεσολαβητές της απάντησης στην διαταραχή της πρωτεϊνικής ομοιόστασης εκφράζονται κατά την διάρκεια της ανάπτυξης και της αύξησης του οργανισμού, για να ανταποκριθούν στα βλαβερά ερεθίσματα στους περισσότερους ιστούς¹⁹¹. Κατά την έκθεση κυττάρων και ζωϊκών οργανισμών, σε βλαβερά ερεθίσματα, υπάρχει ακαριαία ενεργοποίηση της απάντησης στην διαταραχή της πρωτεϊνικής ομοιόστασης, ανάλογη της έντασης, της διάρκειας και του είδους του βλαπτικού ερεθίσματος. Ενώ η πρωτογενής απόκριση περιλαμβάνει την μεταγραφή γονιδίων, η απάντηση στην διαταραχή της πρωτεϊνικής ομοιόστασης περιλαμβάνει τον μετά τη μεταγραφή έλεγχο της σταθερότητας του mRNA και μεταφραστικό έλεγχο των heat shock response (hs) mRNA^{192,193}. Η μεταγραφή των hs γονιδίων ρυθμίζεται από μια οικογένεια συντηρημένων μεταγραφικών παραγόντων (HSFs). Ο Hsf-1 είναι συντηρημένος στους ανθρώπους, στην Drosophila, C. elegans, και στους μύκητες. Αντίθετα οι HSF-2, -3, και -4 εκφράζονται στα σπονδυλωτά και παρουσιάζουν πολλαπλές λειτουργίες κατά την διάρκεια της εμβρυϊκής ανάπτυξης, του στρες, και όλης της ζωής¹⁹¹. Η ενεργοποίηση του Hsf-1 επάγεται από οξείες και χρόνιες καταστάσεις στρες, διαταραχές της φυσιολογικής ομοιόστασης, και νοσηρές καταστάσεις κατά την διάρκεια της ζωής του οργανισμού. Η ρύθμιση της ενεργοποίησης του Hsf-1 περιλαμβάνει πολλαπλά στάδια κατά την διάρκεια των οποίων αδρανή μονομερή μόρια Hsf-1, σχηματίζουν ομοτριμερείς δομές και μεταναστεύουν στον κυτταρικό πυρήνα. Στον πυρήνα συνδέονται με hs στοιχεία (heat shock elements - HSE) ανάντη των hs γονιδίων, προκαλώντας αύξηση των επιπέδων έκφρασης των hs γονιδίων. Αντίστροφα κατά την μείωση της απάντησης στο στρες, παρατηρείται μείωση της μεταγραφικής δραστηρίοτητας των hs γονιδίων, αποσύνδεση των ομοτριμερών δομών Hsf από τα HSE, αποφωσφορυλίωση του Hsf-1 και μετατροπή των Hsf-1 τριμερών σε μονομερή^{191,194}. Η διατήρηση των μονομερών του Hsf-1 περιλαμβάνει ασθενή αλλά σταθερή αλληλεπίδραση με μόρια συνοδούς (Hsp90, Hsp70, Hsp40- Heat Shock Proteins/Hsp)¹⁹⁵. Κατά την διαταραχή της πρωτεϊνικής ομοιόστασης τα μόρια συνοδοί συνδέονται με αποδιαταγμένες πρωτεΐνες οδηγώντας στην ενεργοποίηση του Hsf-1.

Η πρόσδεση του Hsf-1 στα HSE διαμεσολαβείται από την αμινο-τελική περιοχή του (περιοχή η οποία συνδέεται με το DNA/ DNA binding domain-DBD). Η DBD περιέχει ένα μοτίβο έλικας – στροφής – έλικας και ένδομοριακές αλληλεπιδράσεις της επαναλήψεων υδρόφοβης επτάδας (HR – A/B) σχηματίζουν μια ελικοειδή δομή (coiled coil)¹⁹⁶. Η αντιστρεπτή μετάβαση του Hsf-1 από μονομερή σε τριμερή μορφή περιλαμβάνει την αλληλεπίδραση της ελικοειδούς δομής με τις καρβόξυ τελικές επτάδες (HR-C). Στο καρβόξυ τελικό τμήμα του Hsf-1 εντοπίζονται περιοχές ενεργοποίησης των hs γονιδίων (transcription activation domains- AD1 και AD2). Υπό συνθήκες ηρεμίας αναστέλλονται από μία περιοχή του μορίου που βρίσκεται μεταξύ HR-A/B και HR-C. Η φωσφορυλίωση του Hsf-1 στις θέσεις \$303, \$307, S308 (κατάσταση ηρεμίας) έχει ως αποτέλεσμα την διατήρηση του μορίου σε ανενεργή μορφή. Αντίθετα η hs επαγόμενη φωσφορυλίωση του Hsf-1 στις θέσεις S230, S326, S249 σχετίζεται με ενεργοποίηση και έναρξη μεταγραφικής δραστηριότητας¹⁹¹. Επίσης το μόριο του Hsf-1 υπόκειται σε πολλαπλές μετά τη μετάφραση τροποποιήσεις. Με αυτόν τον τρόπο επιτυγγάνεται πολυεπίπεδη ρύθμιση, ακριβής και σε στενά πλαίσια, έλεγχος της hs απόκρισης.

Η εξάλειψη της hs απόκρισης ρυθμίζει την μεταφραστική δραστηριότητα του Hsf-1 όταν είναι συνδεδεμένος με το DNA και αποτελεί το βασικό σημείο, το οποίο

καθορίζει την διάρκεια και την ένταση της Hsf-1 επαγόμενης μεταγραφικής δραστηριότητας. Σε υψηλές συγκεντρώσεις οι πρωτεΐνες Hsp90 και Hsp70 αλληλεπιδρούν με το καρβοξυτελικό άκρο του Hsf-1 και αναστέλλουν την ενεργοποίηση του¹⁹⁵. Αυτό υποδηλώνει ότι τα μόρια συνοδοί βρίσκονται σε επαρκή ποσότητα, το επίπεδο απόκρισης στο στρες (εξωκυττάριο, ενδοκυττάριο) βρίσκεται σε ικανοποιητικά επίπεδα, καθώς και τα επίπεδα των αποδιαταγμένων πρωτεϊνών. Η απελευθέρωση των ομοτριμερών του Hsf-1 από τα HSE σχετίζεται με την ακετυλίωση του μορίου του Hsf-1 (στην θέση K80), στην περιοχή DBD του μορίου. Το ανασταλτικό αποτέλεσμα της ακετυλίωσης αυτής στην ενεργοποίηση του Hsf-1 ελέγχεται από το ένζυμο SIRT-1 (νικοτιναμιδο/αδένινο/δινουκλεοτίδιο[NAD]εξαρτώμενη αποακετυλάση, σιρτουΐνη). Τα ενδοκυττάρια επίπεδα ΝΑD, καθορίζονται από την ενεργειακή ομοιόσταση του κυττάρου, και επομένως η παροχή θρεπτικών συστατικών στο κύτταρο έχει καίριο ρόλο στην ρύθμιση της hs απόκρισης¹⁹⁷. Με την πρόσδεση του Hsf-1 στις περιοχές DBD, δημιουργείται ένα σύμπλεγμα το οποίο μεταξύ άλλων περιλαμβάνει μια RNA πολυμεράση, και έγει ως αποτέλεσμα την μεταγραφή hs σχετιζόμενων γονιδίων¹⁹⁸. Συμπερασματικά το κύτταρο και κατά επέκταση ο οργανισμός βρίσκονται σε χρόνια πρωτεοτοξική συμφόρηση η οποία επάγεται από διάφορες νοσηρές καταστάσεις, με συνέπεια την διαταραγή της διαμόρφωσης των πρωτεϊνών και την συσσώρευση πρωτεϊνών. Η hs απάντηση λειτουργεί για την αποφυγή τέτοιων καταστρεπτικών καταστάσεων.



Εικόνα 5: Ενεργοποίηση του Hsf-1 και των μορίων συνοδών της απόκρισης στο στρες $^{199}.$

iv.) Νεφρίνη και Ποδοσίνη.

Στο συγγενές νεφρωσικό σύνδρομο φιλανδικού τύπου (Finnish type nephrotic syndrome-CNF), υπάρχει έλλειψη του λεπτού διαφράγματος, και πρωτεϊνουρία νεφρωσικού επιπέδου²⁰⁰. Το γονίδιο της νεφρίνης είναι μεταλλαγμένο στο CNF. Η νεφρίνη είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη (185-200 KDa) με ένα βραχύ διαμεμβρανικό τμήμα, ένα εξωκυττάριο τμήμα με 8 άπω αμινοξικές αλληλουχίες δίκην IgG (IgG like motifs), και μία εγγύς αμινοξική αλληλουχία δίκην ινωδογονονεκτίνης III (fibronectin III like motif). Το μήκος της εξωκυτταρίου περιοχής της νεφρίνης είναι 35 nm. Κάθε αμινοξική αλληλουχία δίκην IgG περιέχει δύο αμινοξέα κυστεΐνης τα οποία σχηματίζουν δισουλφιδικούς δεσμούς κατά μήκος των επαναλαμβανόμενων περιοχών IgG. Αποτέλεσμα είναι αυτές οι δομές να έχουν ελλειπτικό ή σφαιρικό σχήμα²⁰¹. Η θέση της νεφρίνης στο λεπτό διάφραγμα, υποδεικνύει ότι αναπτύσσονται ομόφιλες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μορίων της νεφρίνης σχηματίζοντας ένα δίκτυο πόρων. Μελέτες ηλεκτρονικής τομογραφίας

υψηλής ευκρίνειας του λεπτού διαφράγματος, έδειξαν ότι αποτελείται από εσπειραμένες αλύσους, οι οποίες διασχίζουν το μέσο του μήκους κάθε σχισμής, σχηματίζοντας μια δομή δίκην «φερμουάρ», με πόρους διαμέτρου μικρότερης αυτής της λευκωματίνης. Με τη διάταξη αυτή τα μόρια νεφρίνης σχηματίζουν μια δομή δίκην «φερμουάρ», στο λεπτό διάφραγμα, καθώς γειτονικά μόρια νεφρίνης αλληλεπιδρούν μέσω των επαναλαμβανόμενων περιοχών IgG²⁰².

Το εξωκυττάριο τμήμα της ανθρώπινης νεφρίνης περιέχει θέσεις Ν-γλυκοζυλίωσης. Η γλυκοζυλίωση της νεφρίνης στις θέσεις αυτές είναι απαραίτητη για την σωστή αναδίπλωση του μορίου και την πρόσδεση της στην βασική μεμβράνη²⁰³. Υπάρχουν πρωτεΐνες της οικόγενειας Neph (Neph1, Neph2, Neph3) οι οποίες έχουν δομική ομολογία με την νεφρίνη. Η πρωτεΐνες Neph1 και Neph2 ευρίσκονται στο λεπτό διάφραγμα²⁰⁴. In vitro η Neph1 αλληλεπιδρά με το εξωκυττάριο τμήμα της νεφρίνης²⁰⁵. Η χορήγηση αντισώματος έναντι της Neph1 οδηγεί σε πρωτεϊνουρία, υποδεικνύοντας ότι η πρωτεΐνη Neph1 διαδραματίζει κάποιο ρόλο στον σχηματισμό του λεπτού διαφράγματος²⁰⁶. Η απαλοιφή του γονιδίου της Neph1 σε μοντέλα ποντικών προκαλεί πρωτεϊνουρία και τήξη των ποδικών εκβλαστήσεων (foot process effacement) των ποδοκυττάρων²⁰⁷. Το μέγεθος της πρωτεϊνουρίας είναι ηπιότερο σε σχέση με εκείνο το οποίο προκαλείται με την απαλοιφή του γονιδίου της νεφρίνης, υποδηλώνοντας ότο ο ρόλος της νεφρίνης είναι πιο σημαντικός στον σχηματισμό του λεπτού διαφράγματος. Επιπρόσθετα η πρωτεΐνη FAT1 εντοπίζεται στο λεπτό διάφραγμα²⁰⁸. Η απαλοιφή του γονιδίου της FAT1 οδηγεί και αυτή σε πρωτεϊνουρία υποδεικνύοντας το σημαντικό ρόλο της FAT1 στην δημιουργία του λεπτού διαφράγματος²⁰⁹. Επιπλέον συστατικό του λεπτού διαφράγματος αποτελεί η πρωτεΐνη p-cadherin, χωρίς όμως να διαδραματίζει σημαίνοντα ρόλο για τον σχηματισμό του ηθμού διήθησης²¹⁰.

Η ενδοκυττάρια δομή της νεφρίνης εμπεριέχει 154 αμινοξέα. Στην ενδοκυττάρια αμινοξική αλληλουχία της νεφρίνης περιλαμβάνονται τυροσίνες οι οποίες είναι εξελικτικά συντηρημένα αμινοξέα. Τρία από αυτά τα αμινοξέα τυροσίνης βρίσκονται μέσα μοτίβα τα οποία αποτελούν θέσεις πέδισης για SH2 δομές κινασών και συνδετικές πρωτεΐνες²¹¹. Η φωσφορυλίωση της νεφρίνης σε αυτά τα αμινοξέα τυροσίνης ρυθμίζει την μορφολογία των ποδοκυττάρων μέσω πρόσδεσης των πρωτεϊνών Nck στις SH2 περιοχές της νεφρίνης²¹². Οι πρωτεΐνες Nck (Nck1 και Nck2) σχετίζονται με την ρύθμιση της δυναμικής του κυτταροσκελετού της ακτίνης. Σε μοντέλα ποντικών στα οποία είχε απαλειφθεί το γονίδιο Nck1, η απενεργοποίηση του γονιδίου Nck2 στα ποδοκύτταρα αποτρέπει το σχηματισμό των ποδικών εκβλαστήσεων και σε νεφρωσικού επιπέδου πρωτεϊνουρία. Σε καταστάσεις επομένως οξείας βλάβης των ποδοκυττάρων, με την αύξηση της φωσφορυλίωσης της νεφρίνης, η συστράτευση μορίων Nck στο κυτταροπλασματικό τμήμα της νεφρίνης ρυθμίζει την ανακατασκευή του κυτταροσκελετού της ακτίνης. Η σχετιζόμενη με το CD2 πρωτεΐνη (CD2AP), είναι μια ενδοκυττάρια πρωτεΐνη, της οποίας το καρβόξυ τελικό της άκρο συνδέεται με το ενδοκυττάριο τμήμα της νεφρίνης²¹³. Η CD2AP συνδέει την νεφρίνη με τον κυτταροσκελετό της ακτίνης²¹⁴. Παράλληλα η CD2AP συνδέει την νεφρίνη με την ΑΚΤ, επάγοντας αντι-αποπτωτική σηματοδότηση εντός του εσωτερικού του ποδοκυττάρου²¹⁵. Η απαλοιφή του γονιδίου της CD2AP σε διαγονιδιακά μοντέλα ποντικών οδηγεί σε καταστροφικά για τα ποδοκύτταρα αποτελέσματα²¹⁶. Επομένως η νεφρίνη αποτελεί απαραίτητο συστατικό του λεπτού διαφράγματος, και η σηματοδότηση της νεφρίνης στο κυτταροπλασματικό της τμήμα διαμεσολαβείται από πολλαπλές πρωτεΐνες.

Μεταλλάξεις στο γονίδιο της ποδοσίνης προκαλούν το ανθεκτικό στα στεροειδή νεφρωσικό σύνδρομο²¹⁷. Η ποδοσίνη (42 KDa) εντοπίζεται στο λεπτό διάφραγμα,

ενδοκυττάρια, έχει σχήμα δίκην «φουρκέτας», και αλληλεπιδρά με την νεφρίνη με το καρβόξυ-τελικό της άκρο²¹⁸. Η αλληλεπίδραση νεφρίνης και ποδοσίνης ευοδώνει την σηματοδότηση της νεφρίνης στο ενδοκυττάριο τμήμα της ²¹⁹. Η ποδοσίνη φέρεται να διαδραματίζει σημαίνοντα ρόλο στην ενδοκυττάρια μεταφορά της νεφρίνης από το ενδοπλασματικό δίκτυο στο λεπτό διάφραγμα, καθώς μεταλλάξεις της ποδοσίνης στο καρβόξυ-τελικό της άκρο προκαλούν κατακράτηση της νεφρίνης στο ενδοπλασματικό δίκτυο²²⁰. Η απαλοιφή του γονιδίου της ποδοσίνης σε μοντέλα ποντικών προκαλεί πρωτεϊνουρία νεφρωσικού επιπέδου και σε τήξη των ποδικών εκβλαστήσεων των ποδοκυττάρων²²¹.

Το ενδοκυττάριο τμήμα της νεφρίνης βρίσκεται σε επαφή με πρωτεΐνες όπως η IQGAP1 (IQ motif GTPase Activating Protein), MAGI2 (Membrane Associated Guanylate kinase Inverted 2), CASK (Calcium/calmodulin Associated serine protein Kinase), a-ακτινίνη, aII spectrin, βII spectrin υποδεικνύοντας ότι το λεπτό διάφραγμα συμμετέχει στη διακυττάρια σύνδεση, συνδέοντας τον κυτταροσκελετό γειτονικών ποδοκυττάρων²¹⁵.

Στην ΙgΑ νεφροπάθεια ο πολυμορφισμός G349A του γονιδίου της νεφρίνης σχετίζεται με νεφρωσικού επιπέδου πρωτεϊνουρία και έκπτωση της νεφρικής λειτουργίας²²². Σε πολλές επίκτητες νοσολογικές οντότητες οι παρατηρούμενες αλλαγές στην έκφραση της νεφρίνης (πρωτεΐνη, mRNA) είναι δευτεροπαθείς, και οφείλονται στην διαταραχή της αρχιτεκτονικής και λειτουργίας του ποδοκυττάρου, χωρίς αυτές να διαδραματίζουν κάποιο ρόλο στην ανάπτυξη της πρωτεϊνουρίας²¹⁵. Καθότι πολλές σπειραματοπάθειες έχουν ανοσολογικό μηχανισμό, και κατά την έγχυση αντισωμάτων έναντι της νεφρίνης αναπτύσσεται πρωτεϊνουρία, υπάρχει πιθανότητα ανάπτυξης αύτο-αντισωμάτων έναντι της νεφρίνης σε κάποιες σπειραματοπάθειες²¹⁵.



Εικόνα 6: Το λεπτό διάφραγμα και η θέση της νεφρίνης και της ποδοσίνης¹.

<u>v.) Μεταγραφικός παράγοντας WT-1.</u>

Ο μεταγραφικός παράγοντας WT-1 διαθέτει διάφορες ισομορφές. Το εξωνίο 5 του γονιδίου του WT-1 προσθέτει 17 αμινοξέα μεταξύ της δομής ενεργοποίησης (trans activation domain) και της δομής δακτυλίου ψευδαργύρου (zinc finger domain)²²³. Μια θέση εναλλακτικού ματίσματος (alternative splicing) στο εξώνιο 9 εισάγει 3 επιπλέον αμινοξέα: λυσίνη, θρεονίνη, και σερίνη (KTS), μεταξύ της τρίτης και τέταρτης δομής δακτυλίου ψευδαργύρου²²⁴. Οι ισομορφές του WT-1, οι οποίες περιέχουν το εξώνιο 5 εκφράζονται μόνο στα θηλαστικά, ενώ οι ισομορφές οι οποίες διαθέτουν το μάτισμα KTS εκφράζονται σε όλα τα σπονδυλωτά²²⁵. Ο λόγος ισομορφών WT-1 με εξώνιο 5 (+) και χωρίς το εξώνιο 5 (-) ρυθμίζεται με ίστο-εξαρτώμενο τρόπο στο ουροποιογεννητικό σύστημα (νεφρά, μήτρα, ωοθήκες, και όρχεις), και στο αιμοποιητικό σύστημα (σπλήν, εμβρυϊκό ήπαρ, και μυελός των οστών). Ο λόγος +/- εξώνιο 5 των ισομορφών του WT-1 διαφοροποιείται στο νεφρό κατά την διάρκεια της ανάπτυξης του οργανισμού. Αντίθετα ο λόγος +/- KTS ισομορφών του WT-1 είναι συντηρημένος στους διάφορους ιστούς (1,1 – 1,5 στους ανθρώπους). Η πιο κοινή ισομορφή του WT-1 είναι η (+ εξώνιο 5 + KTS), και η

λιγότερο κοινή ισομορφή είναι η (- εξώνιο 5 – KTS). Το μοριακό βάρους των παραγόμενων πρωτεϊνών είναι μεταξύ 52-54 KDa ανάλογα με το αν περιέχουν τα 17 αμινοξέα τα οποία κωδικοποιούνται από το εξώνιο 5²²³. Το γεγονός ότι το γονίδιο του WT-1 έχει πολλαπλά σημεία έναρξης της μεταγραφής, υποδηλώνει τη πολυπλοκότητα στην έκφραση καθώς και πολλαπλές χρήσεις του WT-1.

Μεταλλάξεις του WT-1 έχουν αποτέλεσμα διάφορα γενετικά σύνδρομα όπως το Denys Drash (DDS), το Frasier (FS) και το σύνδρομο WAGR (Wilms tumor, Aniridia, Genitourinary abnormalities, mental Retardation). Οι ασθενείς με FS χαρακτηρίζονται από εναλλαγή ανδρικού – γυναικείου φύλου (εξωτερικά γεννητικά όργανα γυναικός, γονάδες μειωμένου μεγέθους και καρυότυπο ΧΥ), εστιακή τμηματική σπειραματοσκλήρυνση (FSGS) και υψηλό κίνδυνο γοναδοβλαστώματος²²⁶. Ετερόζυγη σημειακή μετάλλαξη σε θέση εναλλακτικού ματίσματος του εσωνίου 9, έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια την απώλεια (+ KTS) εξωνίου από το ένα αλλήλιο²²⁷. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την μείωση των ισομορφών WT-1 με (+ KTS). Η σημασία του αναλογίας των ισομορφών του WT-1 αναδεικνύεται από την δημιουργία μοντέλων ποντικών στα οποία έχει απαλειφθεί το ένα αλλήλιο του (+ KTS) του WT-1. Τα ποντίκια αυτά εμφανίζουν FSGS. Ποντίκια στα οποία έχουν απαλειφθεί και τα δύο αλλήλια (+ KTS) του WT-1 εμφανίζουν πλήρη αναστροφή φύλου²²⁸. Το σύνδρομο DDS προκαλείται από ετερόζυγες σημειακές μεταλλάξεις στην κωδικοποιούσα περιοχή της δομής του δακτυλίου ψευδαργύρου του γονιδίου του WT-1. Το αποτέλεσμα είναι η αδυναμία προσδέσης του WT-1 στο DNA και η έναρξη των δράσεων του. Ο φαινότυπος του συνδρόμου αυτού χαρακτηρίζεται από πρωτεϊνουρία νεφρωσικού επιπέδου πριν την ηλικία των 3 ετών, δυσπλασίες του γεννητικού συστήματος (άρρεν ψευδο-ερμαφροδιτισμός, δυσγενεσία των γεννητικών οργάνων), και όγκους Wilms²²⁹.

Η ιστοχημική ανάλυση του WT-1 και των δεικτών κυτταρικού πολλαπλασιασμού σε φυσιολογικά σπειράματα και σε σπειράματα με ασθενείς με DDS, δείγνει μείωση της έκφρασης του WT-1 στο DDS και ότι η πολλαπλασιαστική ικανότητα των ποδοκυττάρων αντίστροφα ανάλογη των επίπεδα του WT-1 (καταστολή της έκφρασης αυξητικών παραγόντων)²³⁰. Αντίθετα μεταλλάξεις του WT-1 μπορεί να προκαλέσουν υπερπλασία των ποδοκυττάρων. Παράλληλα στα ποδοκύτταρα ασθενών με DDS υπάρχει υπερέκφραση του αυξητικού παράγοντα των αιμοπεταλίων τύπου α (PDGF-a) και του μεταμορφωτικού αυξητικού παράγοντα τύπου β1 (TGFβ1)²³⁰. Η ασθενής έκφραση του WT-1 στα ποδοκύτταρα ασθενών με DDS, έχει ως αποτέλεσμα την συνεγή έκφραση Pax-2 σε σκληρυσμένα σπειράματα ασθενών DDS²³¹. Παράλληλα έχει αποδειχθεί ότι ο WT-1 καταστέλλει την έκφραση του Pax-2²³². Επομένως οι μορφολογικές διαταραχές οι οποίες παρατηρούνται στα ποδοκύτταρα, ο ανώμαλος πολλαπλασιασμός και η αποδιαφοροποίηση των ποδοκυττάρων μπορούν να αποδοθούν στην μη αναστολή του Pax-2 από τις μη λειτουργικές μορφές του WT-1. Σε διαγονιδιακά ποντίκια με μετάλλαξη στην δομή δακτυλίου του ψευδαργύρου του WT-1, δεν μπορεί να καθοριστεί αν η έκφραση του Pax-2 προηγείται της σπειραματοσκλήρυνσης ή όχι. Ωστόσο η μειωμένη έκφραση της συναπτοποδίνης, της νεφρίνης και της α-ακτινίνης 4 η οποία παρατηρείται στα σκληρυσμένα σπειράματα σε αυτό το διαγονιδιακό μοντέλο νόσου, αποδίδεται στην αποδιαφοροποίηση των ποδοκυττάρων λόγω της μετάλλαξη του WT-1²³³. Σε ένα άλλο διαγονιδιακό μοντέλο για το DDS όπου έχει αντικατασταθεί μια αργινίνη με μια τρυπτοφάνη (R394W - R394W/DDS), παρατηρείται πρωτεϊνουρία, σκλήρυνση του μεσαγγείου, πάχυνση της σπειραματικής βασικής μεμβράνης, και τήξη των ποδικών εκβλαστήσεων των ποδοκυττάρων. Επίσης στα σκληρυσμένα σπειράματα των ποντικών του μοντέλου αυτού παρατηρείται αύξηση του IGF-1, και του TGF-β1.

Αυξανόμενης της ηλικίας των πειραματοζώων παρατηρείται μείωση της έκφρασης των γονιδίων της συναπτοποδίνης (synaptopodin) και της CD2AP, χωρίς να μπορεί να τεκμηριωθέι άμεση συσχέτιση της με την μετάλλαξη του WT-1²³⁴.

Τα αθανατοποιημένα ποδοκύτταρα προκύπτουν από την απομόνωση τους από το διαγονιδιακό μοντέλο ποντικού, το οποίο εκφράζει το αντιγόνο SV-40 (tsA58Tag)²³⁵. Τα αθανατοποιημένα ποδοκύτταρα τα οποία αναπτύσσονται σε θερμοκρασία 33° C εμφανίζουν χαρακτηριστικά αποδιαφοροποίησης. Τα αθανατοποιημένα ποδοκύτταρα τα οποία αναπτύσσονται σε θερμοκρασία 37° C εμφανίζουν χαρακτηριστικά ώριμωνδιαφοροποιημένων ποδοκυττάρων (έκφραση νεφρίνης, p-cadherin, συναπτοποδίνης)²³⁶. Αθανατοποιημένα ποδοκύτταρα DDS παρουσιάζουν μορφολογία ινοβλάστη, εκφράζουν Pax 2 και ακτίνη (smooth muscle actin). Επιπλέον παρουσιάζουν διαταραχή στην έκφρασης των πρωτεϊνών, οι οποίες σχετίζονται με την δομή του κυτταροσκελετού (κοφιλίνη, καλπονίνη, elfin, hsp27, και βινκουλίνη)²³⁷. Αυτά τα δεδομένα υποδηλώνουν ότι ο WT-1 εκτός από ρυθμιστής του ποδοκυτταρικού πολλαπλασιασμού είναι και ρυθμιστής της δομής του κυτταροσκελετού.

vi.) Το μονοπάτι Akt/mTOR²³⁸.

Ο ρόλος του πρωτεϊνικού μορίου mTOR περιλαμβάνει την επιτήρηση του κυτταρικού περιβάλλοντος για την επάρκεια των συνθηκών και των συστατικών τα οποία είναι για τον πολλαπλασιασμό και την αύξηση. Παράγοντες οι οποίοι πυροδοτούν την κυτταρική αύξηση και τον πολλαπλασιασμό είναι οι αυξητικοί παράγοντες, τα θρεπτικά συστατικά, οι κυτταρικές αποθήκες ενέργειας, και η επάρκεια σε οξυγόνο. Αντίστροφα η έλλειψη οξυγόνου και ενέργειας καθώς και η βλάβη στο DNA αναστέλλουν την δράση της mTOR. Η κινάση mTOR είναι μια πρωτεΐνη (289 KDa) η οποία ανήκει στην οικογένεια των PI3K (phospatidylinositol 3-kinase) κινασών.

Στο καρβόξυτελικό άκρο της mTOR βρίσκεται η καταλυτική δομή PI3K, η οποία περιβάλλεται τόσο προς το καρβοξυτελικό της άκρο όσο και προς το άμινοτελικό της άκρο από τις δομές FRAP, ATM, TRAP και FATC. Η δομή FAT διαμεσολαβεί αλληλεπιδράσεις μεταξύ της mTOR και άλλων πρωτεϊνών. Η δομή FATC λειτουργεί ως αισθητήρας του δυναμικού αναγωγής στο κυτταρόπλασμα και πιθανώς επηρεάζει τον ρυθμό αποδόμησης της mTOR. Το αμινοτελικό άκρο της mTOR περιέχει δομές όπως αυτή του παράγοντα επιμήκυνσης 3, την ρυθμιστική Α υπομονάδα της φωσφατάσης 2A, και της TOR (HEAT). Οι δομές ΗΕΑΤ διαμεσολαβούν τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ της mTOR και των άλλων πρωτεϊνών και και την έκφραση της στην κυτταροπλασματική μεμβράνη. Επίσης μέσω των δομών ΗΕΑΤ γίνεται ο σχηματισμός των συμπλόκων mTORc1 και mTORc2 τα οποία είναι απαραίτητα για την λειτουργία της κινάσης mTOR. Η ραπαμυκίνη προσδέεται στην δομή FKBP12 του μορίου mTOR. Τα συμπλέγματα mTORc1 και mTORc2 είναι πολυπρωτεϊνικά συμπλέγματα. Στο σύμπλεγμα mTORc1 υπάρχουν αποκλειστικά η ρυθμιστική πρωτεΐνη η οποία σχετίζεται με την mTOR (regulatory – associated protein of mTOR/ Raptor) και το υπόστρωμα της κινάσης Akt (PRAS40). Η ενεργοποίηση του συμπλέγματος mTORc1 ξεκινά με την φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης Raptor, την αλληλεπίδραση της mTORc1 με τα διάφορα μόρια ρυθμιστές της και ακολουθεί (μέσω της Raptor) η δημιουργία του πρωτεϊνικού συμπλέγματος mTORc1. Η ραπαμυκίνη προσδεόμενη με την δομή FKBP12 διαταρράσει την συσχέτιση mTOR και Raptor εμποδίζοντας την φωσφορυλίωση των μορίων στόχων της mTORc1. Όταν η δομή PRAS40 είναι υπό-φωσφορυλιωμένη εμποδίζει της δράση της mTORc1. Η φωσφορυλίωση της PRAS40 από την Akt αίρει την αλληλεπίδραση της με το σύμπλοκο mTORc1. Στο σύμπλεγμα mTORc2 υπάρχουν αποκλειστικά η μη ευαίσθητη στην ραπαμυκίνη συνοδός πρωτεΐνη της mTOR (rapamycin insensitive

companion of mTOR/Rictor), την αλληλεπιδρούσα πρωτεΐνη της ευαίσθητης κινάσης των θηλαστικών 1 (mammalian stress activated protein kinase interacting protein 1/mSIN1), καθώς και μια συνοδευτική της πρωτεΐνης Rictor πρωτεΐνη (Protor). Η πρωτεΐνη Rictor είναι αναγκαία για την δημιουργία του συμπλόκου mTORc2. Η πρωτεΐνη mSIN1 είναι απαραίτητη για την έκφραση της mTORc2 στην κυτταροπλασματική μεμβράνη και την φωσφορυλίωση της Akt από το σύμπλοκο mTORc2. Στα συμπλέγματα mTORc1 και mTORc2 εντοπίζονται από κοινού 2 πρωτεΐνες. Η πρωτεΐνη mLST8 (mammalian lethal with SEC13 protein 8), η οποία έχει ρόλο σταθεροποιητή της mTOR με την Raptor στο σύμπλεγμα mTORc1 και της Rictor στο σύμπλεγμα mTORc2. Η πρωτεΐνη DEPTOR (tandem Dishevelled EGL-10 and pleckstrin/DEP) η οποία είναι αρνητικός ρυθμιστής της δραστηριότητας των συμπλεγμάτων mTORc1 και mTORc2. Η φωσφορυλίωση της mTOR στην θέση Ser2448 παρατηρείται κυρίως όταν η mTOR είναι μέρος του συμπλέγματος mTORc1, ενώ η φωσφορυλίωση της mTOR στην θέση Ser2481 παραατηρείται όταν αυτή είναι μέρος του συμπλέγματος mTORc2. Η ραπαμυκίνη έχει διαφορετική δράση στα συμπλέγματα mTORc1 και mTORc2. Η ραπαμυκίνη αναστέλει την δράση του συμπλέγματος mTORc1. Ωστόσο η επίδραση της ραπαμυκίνης στο σύμπλεγμα mTORc2 δεν είναι άμεση και φέρεται να εμπλέκεται στην συστράτευση των μορίων του συμπλόκου mTORc2.

Το σύμπλεγμα mTORc1 ενεργοποιεί την κυτταρική αύξηση και τον πολλαπλασιασμό μέσω της ευόδωσης της φάσης G0/G1 του κυτταρικού κύκλου. Μόρια στόχοι του συμπλέγματος είναι οι S6K1 και S6K1 (ribosomal S6 kinases) και οι 4E-BPs (4E binding proteins). Οι 4E-BPs (4E-BP1, 4E-BP2, 4E-BP3) ρυθμίζουν την δραστηριότητα του eIF-4E (eukaryotic translation initiation factor). Όταν

φωσφορυλιωθούν οι S6K1, S6K2 και οι 4E-BPs αυξάνουν την πρωτεϊνοσύνθεση μέσω αύξησης της μετάφρασης του mRNA.

Η αυτοφαγία (autophagy) είναι η διαδικασία η οποία απομακρύνει τα γηρασμένα μακρομόρια και οργανίδια από το κυτταρόπλασμα. Σε περιόδους ενεργειακής ένδειας μέσω της αυτοφαγίας παρέχονται τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά στο κύτταρο. Η αυτοφαγία διαμεσολαβείται μέσω των αυτοφαγοσωμάτων (κυστίδια με λιπιδική μεμβράνη) τα οποία περικλείουν τα κυτταρικά συστατικά τα οποία πρόκειται να αποδομηθούν, και τήκονται με τα λυσοσώματα για την καταστροφή των μακρομορίων αυτών. Η ένδεια ενέργειας και η υποξία επάγουν την αυτοφαγία αναστέλλοντας το σύμπλεγμα mTORc1. Το σύμπλεγμα mTORc1 φωσφορυλιώνει και απενεργοποιεί τις κινάσες/ενεργοποιητές της αυτοφαγίας ULK1/2 (Unc-51-like kinase-1 and -2).

Η απενεργοποίηση του συμπλέγματος mTORc1 από την ραπαμυκίνη οδηγεί σε μείωση του διαμεμβρανικού δυναμικού των μιτοχονδρίων, και την σύνθεση ATP. Όσον αφορά την σύνθεση ATP το σύμπλεγμα mTORc1 μπορεί να κατευθύνει την σύνθεση του ATP από τα μιτοχόνδρια ή από άλλες διαδικασίες.

Για την ενεργοποίηση ή απανεργοποίηση του συμπλέγματος mTORc1 απαρτιώνονται οι πληροφορίες για την διαθεσιμότητα των αυξητικών παραγόντων όπως οι IGF-1 (insulin-like growth factor-1), EGF (epidermal growth factor), η επάρκεια σε θρεπτικά συστατικά (γλυκόζη, λιπίδια, αμινοξέα), η επάρκεια σε ενέργεια, και η παρουσία και η έκταση κυτταρικής βλάβης. Άμεσος ρυθμιστής του συμπλέγματος mTORc1 για την απαρτίωση των παραπάνω πληροφοριών αποτελεί η πρωτεΐνη Rheb (κυτταροπλασματική πρωτεΐνη GTPase). Όταν η πρωτεΐνη Rheb είναι ενεργοποιημένη ενεργοποιεί το σύμπλεγμα mTORc1. Η TSC (Tuberous Sclerosis) οφελείται σε δύο πρωτεΐνες, την πρωτεΐνη hamartin (TSC1) και την πρωτεΐνη tuberin

(TSC2). Η πρωτεΐνη TSC απενεργοποιεί την πρωτεΐνη Rheb. Εκτός από τα αμινοξέα και το φωσφατιδικό οξύ τα οποία ενεργοποιούν απευθείας το σύμπλεγμα mTORc1, όλες οι υπόλοιπες πληροφορίες ενεργοποίησης ή απενεργοποίησης του συμπλέγματος mTORc1 διέρχονται μέσω της πρωτεΐνης TSC. Αυξητικοί παράγοντες (π.χ. ινσουλίνη, IGF-1) ενεργοποιούν το σύμπλεγμα mTORc1 μέσω της κινάσης Akt. Η ενεργοποίηση της κινάσης PI3K, οδηγεί στην φωσφορυλίωση της μεμβρανοσύνδετης διφωσφορικής φωσφατιδυλο-ινοσιτόλης [PtdIns(3,4,5)P3]. Η PtdIns(3,4,5)P3 ενεργοποιεί την κινάση PDK1 (3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1) η οποία με την σειρά της ενεργοποιεί την Akt στην θέση 308 (Akt308). Η Akt308 ενεργοποιεί το σύμπλεγμα mTORc1 απενεργοποιώντας την πρωτεΐνη TSC ή απενεργοποιώντας την πρωτεΐνη PRAS40. Αυξητικοί παράγοντες όπως ο EGF ενεργοποιούν το σύμπλεγμα mTORc1 χωρίς την διαμεσολάβηση της Akt, αλλά μέσω της κινάσης ERK1/2. Αυτό το γεγονός υποδηλώνει ότι το σύμπλεγμα mTORc1 μπορεί και χωρίς την διαμεσολάβηση της Akt.

Τα αμινοξέα είναι απαραίτητα για την ενεργοποίηση του συμπλέγματος mTORc1. Η έλλειψη αμινοξέων κάνει αδύνατη την ενεργοποίηση του συμπλέγματος mTORc1 από άλλα ερεθίσματα. Η περίσσεια αμινοξέων (λευκίνη και αργινίνη) στα λυσοσσώματα πυροδοτεί τον σχηματισμό ενός πολύ-πρωτεϊνικού συμπλέγματος με κύριο συστατικό την πρωτεΐνη Rag (Ragulator). Το σύμπλεγμα Ragulator συστρατεύει τις απαραίτητες πρωτεΐνες για την δημιουργία του συμπλέγματος mTORc1 στην κυτταροπλασματική μεμβράνη και το ενεργοποιεί.

Η ικανότητα των κυττάρων να ελέγχουν τα αποθέματα ενέργειας διαμεσολαβείται από την AMPK (AMP activated protein kinase). Η παρουσία ATP αναστέλλει την AMPK ενώ η παρουσία ADP, και AMP ενεργοποιεί την AMPK. Όταν η AMPK είναι ενεργοποιημένη απενεργοποιεί το σύμπλεγμα mTORc1 φωσφορυλιώνοντας την

πρωτεΐνη TSC1 και παρεμποδίζοντας το πολυπρωτεϊνικό σύμπλεγμα Raptor να σχηματίσει το σύμπλεγμα mTORc1. Η AMPK ενεργοποιεί την ULK1/2 επάγοντας την αυτοφαγία.

Το σύμπλεγμα mTORc2 έχει ως στόγους τα μόρια PKC (protein kinase C), Akt, S6K1, S6K2 και SGK1 (serum and glucocorticoid induced protein kinase 1). Ou παραπάνω κινάσες διαμεσολαβούν διαφορετικές κυτταρικές λειτουργίες όπως ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η κυτταρική αύξηση, η πολικότητα του κυττάρου, την αναδιάταξη του κυτταροσκελετού, και η διαμεσολαβούμενη από την αλδοστερόνη επαναρρόφηση νατρίου από το άπω σωληνάριο. Το σύμπλεγμα mTORc2 ενεργοποιεί την Akt φωσφορυλιώνοντας την στη θέση 473 (Akt473). Η Akt473 ενεργοποιεί τους μεταγραφικούς παράγοντες τύπου forkhead (FOXOs). Για την απενεργοποίηση προαποπτωτικών μορίων (BAD, Bax) η Akt φωσφορυλιώνεται στην θέση 308 από την PDK1. Όσον αφορά την διαμόρφωση του κυτταροσκελετού, το σύμπλεγμα mTORc2 ενεργοποιεί την PKCa. Η PKCa ενεργοποιεί τις πρωτεΐνες Rho και Rac1, οι οποίες αποτελούν ρυθμιστικές πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού. Η SGK1 ρυθμίζει την επαναρρόφηση νατρίου, μέσω της ρύθμισης του καναλιού ENaC (epithelial sodium channel). Η ενεργοποίηση της SGK1 διαμεσολαβείται από το σύμπλοκο mTORc2. Αυτή η δράση του συμπλέγματος mTORc2 θέτει την υποψία εμπλοκής του mTORc2 στην επαναρρόφηση του Να από το αθροιστικό σωληνάριο και την ρύθμιση της αρτηριακής πίεσης.



Εικόνα 7: Αδρή περιγραφή του μονοπατιού Akt/mTOR²³⁸.

Β. Ειδικό Μέρος

1. Πειραματόζωα, Υλικά και Μέθοδοι.

i) Διαγονιδιακά μοντέλα ποντικών τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για την εκπόνηση της παρούσας διδακτορικής διατριβής.

Όλοι οι χειρισμοί στα ζώα έγιναν σύμφωνα με την τρέχουσα νομοθεσία της Ευρωπαϊκής Ένωση και είχαν εγκριθεί από την Υγειονομική Υπηρεσία της Περιφέρειας Κρήτης, και την επιτροπή ζωοκομείου του Πανεπιστημίου Κρήτης.Για την διενέργεια της παρούσας διδακτορικής διατριβής χρησιμοποιήθηκαν:

α) 200 ποντίκια στελέχους C57Bl/6 -6.0Kb hTTRMet30-15Imeg, ηλικίας 2-24 μηνών τα οποία προέκυψαν από εμβρυομεταφορά γονιμοποιημένων ωαρίων C57Bl/6 -6.0Kb hTTRMet30-15Imeg σε ωαγωγούς θετών μητερών (C57Bl/6)¹⁷³. Ταυτισμένα ποντίκια C57Bl/6 για την ηλικία και το φύλο χρησιμοποιήθηκαν ως ομάδα ελεγχου. Η προμήθεια των γονιμοποιημένων ωαρίων έγινε από το CARD (Center for Analysis, Resource and Development, Kumamoto, University, Japan) σε συνεργασία με τον καθηγητή Ken Ichi Yamamura.

β) Νεφρικό παρέγχυμα από αρσενικά ποντίκια (6) στελέχους 129/Sv ηλικίας 10-12 μηνών και ηλικίας (6) >18 μήνων ως ομάδα ελέγχου. Ν

γ) Νεφρικό παρέγχυμα από αρσενικά ποντίκια στελέχους 129/Sv στα οποία είχε απενεργοποιηθεί το ενδογενές γονίδιο της τρανσθυρετίνης (TTR-KO) ηλικίας 10-12 μηνών (6) και ηλικίας (6) > 18 μηνών ως ομάδα ελέγχου.

δ) Νεφρικό παρέγχυμα από αρσενικά ποντίκια στελέχους 129/Sv στα οποία είχε απενεργοποιηθεί το ενδογενές γονίδιο της τρανσθυρετίνης (TTR-KO) και είχε εισαχθεί το αλλήλιο TTRVal30Met (M30) ηλικίας 10-12 μηνών (6) και ηλικίας (6) > 18 μηνών.

ε) Νεφρικό παρέγχυμα από αρσενικά ποντίκια στελέχους 129/Sv στα οποία είχε απενεργοποιηθεί το ενδογενές γονίδιο της τρανσθυρετίνης (TTR-KO) και ήταν ημίζυγα για το αλλήλιο του Hsf-1 (Hsf1 tm1Ijb/Hsf-1 KO) ηλικίας 10-12 μηνών (6) και ηλικίας (6) > 18 μηνών ως ομάδα ελέγχου.

ζ) Νεφρικό παρέγχυμα από αρσενικά ποντίκια στελέχους 129/Sv στα οποία είχε απενεργοποιηθεί το ενδογενές γονίδιο της τρανσθυρετίνης (TTR-KO), ήταν ημίζυγα για το αλλήλιο του Hsf-1 (Hsf1 tm1Ijb/Hsf-1-KO) και είχε εισαχθεί το ανθρώπινο

μεταλλαγμένο αλλήλιο της τρανσθυρετίνης (hTTRVal30Met/Hsf-1 M30) ηλικίας 10-12 μηνών (6) και ηλικίας (6) > 18 μηνών ως ομάδα μελέτης¹⁶⁸. Οι ιστοί των διαγονιδιακών ζώων ήταν προσφορά της καθηγήτριας Maria Joao Saraiva (Πανεπιστήμιο Πόρτο, Πορτογαλλία).

<u>ii) Διαδικασία μεταφοράς γονιμοποιημένων ωαρίων C57Bl/6-6.0Kb hTTRMet30-</u> 15Imeg σε ωοθήκες θετών μητερών (C57Bl/6).

Η εμβρυομεταφορά έλαβε χώρα στο ζωοκομείο του Ιδρύματος Τεχνολογίας και Έρευνας (ΙΤΕ, Ηράκλειο, Κρήτης) με την συνεργασία του κου Κωνσταντίνου Κουρουνιώτη (Κτηνίατρος, Υπεύθυνος ζωοκομείου ΙΤΕ). Όπως προαναφέρθηκε τα έμβρυα μεταφέρθηκαν από το CARD (Center for Analysis, Resource and Development, Kumamoto, University, Japan) σε συσκευή υγρού αζώτου (- 196° C). Έγινε χρήση 160 εμβρύων ποντικών C57Bl/6-6.0Kb hTTRMet30-15Imeg και 160 εμβρύων στελέχους ICR ποντικών. Για την απόψυξη των εμβρύων χρειάστηκε να παρασκευαστούν τα παρακάτω διαλύματα : PB1-0,25 M sucrose και mWM – 0,25 M sucrose. Η σύσταση του διαλύματος PB1-0,25 M sucrose απεικονίζεται στον πίνακα 8.

Αντιδαστήριο	mg/100ml	Πάροχος	Αριθμός Καταλόγου
NaCl	800.0	Sigma	S-5886
KCl	20.0	Sigma	P-5405
CaCl ₂	12.0	Sigma	C 5670
KH ₂ PO ₄	20.0	Sigma	P5655
MgCl ₂ 6H ₂ O	10.0	Sigma	M 2393
Na ₂ HPO ₄	115.0	Sigma	S 5136
Na-Pyruvate	3.6	Sigma	P-4562
Glucose	100.0	Sigma	G-6152
Penicillin	7.5	Sigma	P-4687
Streptomycin	5.0	Sigma	S-1277

Πίνακας 8:	Σύσταση	διαλύματος	PB1-0,25 M
-1		•	,

BSA	300.0	Sigma	A-4378
-----	-------	-------	--------

 	8	

Η σύσταση	του διαλύματ	ος mWM – 0,2	5 M sucrose	απεικονίζεται	στον πίνακα 9.
	. .	5		5	

Αντιδαστήριο	mg/100ml	Πάροχος	Αριθμός Καταλόγου
NaCl	640.0	Sigma	S-5886
KCl	35.6	Sigma	P-5405
KH ₂ PO ₄	16.2	Sigma	P5655
MgSO ₄ 7H ₂ O	29.4	Sigma	M-7774
NaHCO ₃	190.0	Sigma	S-5761
Glucose	100.0	Sigma	G-6152
Na-Pyruvate	2.5	Sigma	P-4562
Ca-lactate pentahydrate	46.0	Sigma	C8356
Streptomycin	5.0	Sigma	S-1277
Penicillin	7.5	Sigma	P-4687
0.5% phenol red	0.2ml	Sigma	P-0290
20mM 2-ME	10.0µl	Sigma	M7522
100mM EDTA	50.0µl	Sigma	E-6635
BSA	300.0	Sigma	A-4378

Πίνακας 9: Σύσταση διαλύματος mWM – 0,25 M

Για την σύσταση διαλύματος σουκρόζης 0,25 M, ανά 20 ml διαλύματος PB1 προστέθηκαν 1711,5 (Sigma-Aldrich). mg sucrose Mε ανάλογο τρόπο παρασκευάστηκε και το διάλυμα mWM sucrose 0,25 M. Μετά την παρασκευή τους τα διαλύματα διηθήκαν από φίλτρο το οποίο είχε διάμετρο πόρων 0,45 μm (Millipore). Η διαδικασία της απόψυξης και της εμβρυομεταφοράς έγινε σε στείρες συνθήκες. Κατά την διαδικασία της απόψυξης ακολουθήθηκαν τα παρακάτω βήματα: 1. Έγινε αφαίρεση του κάθε κρυο-σωλήνα από το υγρό άζωτο, διάνοιξη, απομάκρυνση του υγρού αζώτου από τον κρυο-σωλήνα, και επίθεση του σε στείρα 30 επιφάνεια θερμοκρασία δωματίου σε για secs. 2. Προστέθηκαν 0,9 ml PB1-0,25 M sucrose στον κάθε κρυοσωλήνα, και μεταφορά των περιεχόμενων του κρυοσωλήνα σε στείρο δισκίο petri. Δώθηκε ιδιαίτερη
προσοχή στο να μην δημιουργηθούν φυσαλίδες κατά την αναρρόφηση του περιεχομένου.

3. Επαναλανβάνεται η προσθήκη 0.4-0.5ml διαλύματος PB1-0,25 M sucrose στον κάθε κρυοσωλήνα, και μεταφορά των περιεχόμενων του κρυοσωλήνα στο ίδιο δισκίο petri (Σε αυτό το στάδιο της διαδικασίας γίνεται περεταίρω αραίωση του κρυοπροστατευτικού μέσου και διασφαλίζεται η μεταφορά όλων των περιεχομένων εμβρύων). Δόθηκε ιδιαίτερη προσοχή στο να μην δημιουργηθούν φυσαλίδες κατά αναρρόφηση του περιεχομένου.

4. Η αναρρόφηση των εμβρύων από το διάλυμα PB1-0,25 M sucrose έλαβε χώρα υπό επισκόπηση σε στερεοσκόπιο και ακολούθησε μεταφορά τους σε διάλυμα mWM sucrose 0,25 M.



Εικόνα 8: Σχηματοποιημένη η διαδικασία μεταφοράς γονιμοποιημένων ωαρίων.

Κατά την διαδικασία απόψυξης των εμβρύων απομονώθηκαν 25 έμβρυα ποντικών C57Bl/6-6.0Kb hTTRMet30-15Imeg και 20 έμβρυα ποντικών ICR. Έγινε παράλληλη έγχυση εμβρύων ποντικών ICR για να μειωθεί το ποσοστό απόρριψης των εμβρύων των ποντικών C57Bl/6-6.0Kb hTTRMet30-15Imeg. Ακολούθησε αναισθησία της θετής μητέρας υπό στείρες συνθήκες με διάλυμα κεταμίνης/Ξυλαζίνης, προετοιμασία/αποστείρωση χειρουργικού πεδίου, τοποθέτηση της θετής μητέρας (C57Bl/6) σε πρηνή θέση, τομή κάτωθεν του πλευρικού τόξου, χειρουργική παρασκευή ωαγωγών και έγχυση σε αυτούς τα έμβρυα (Εικόνα 8). Ακολούθησε σύγκλιση του χειρουργικού τραύματος. Η μετεγχειρητική πορεία ήταν ομαλή. Μετά από 22 μέρες τοκετού η θετή μητέρα γέννησε 15 ποντίκια. Τα 4 ποντίκια (3 θηλυκά και 1 αρσενικό) είχαν μαύρο τρίχωμα και τα 11 λευκό τρίχωμα.

iii. Διαδικασία γονοτυπικής ταυτοποίησης C57Bl/6 ποντικών.

α) Απομόνωση γενετικού υλικού από ουρές ποντικών.

Για την διαδικασία γονοτυπικής ταυτοποίησης C57Bl/6 ποντικών ακολουθήθηκε το παρακάτω πρωτόκολλο απομόνωσης γενετικού υλικού (παροχή και ανάπτυξη σε συνεργασία με τον καθηγητή Ken-Ichi Yamamura):

- 1. Δύο mm ουράς ποντικού τοποθετήθηκαν σε σωληνάριο 1,5 ml (Eppendorf)
- Προστέθηκαν 600 μl διαλύματος 50mM NaOH (Sigma, Aldrich) στον σωλήνα και ακολούθησε επώαση σους 95° C για 10 mins.
- 3. Ο σωλήνας αφέθηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 3 mins για να ξεπαγώσει.
- 4. Έγινε έντονη ανάδευση του σωλήνα για 40 secs.
- Έγινε προσθήκη διαλύματος 50 μl of 1 M Tris HCl (pH = 8) (Sigma Aldrich) και έντονη ανάδευση για 10 secs.
- 6. Έγινε φυγοκέντρηση στα 14000 g για 10 min στους 4° C.

 Για την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) χρησιμοποιήθηκαν 2 μl υπερκείμενου διαλύματος.

β) PCR για τον πολλαπλασιασμό του αλληλίου 6.0Kb hTTRMet30.

Με την χρήση του λογισμικού Primer Blast (NCBI, NIH), έγινε σχεδιασμός ζεύγων εκκινητών (primers) ειδικών για αλληλουχία του ανθρώπινου γονιδίου της τρανσθυρετίνης (6.0Kb hTTRMet30) και όχι για το ενδογενές γονίδιο της τρανσθυρετίνης. Οι αλληλουχίες των primers (IMBB, FORTH) είναι :

- TTR1: Forward Primer 1: 5'-TCT CAC GTG TCT TCT CTA CA-3'
- TTR1: Reverse Primer 1: 5'-AGC CTC TCT CTA CCA AGT GA-3'
- TTR: Forward Primer 2: 5'-CGG GCT CTG GTG GAA ATG GA-3'
- TTR: Reverse Primer 2: 5'-TTG TCT CTG CCT GGA CTT CT-3'

Η πολλαπλασιαζόμενες αλληλουχίες του 6.0Kb hTTRMet30 έχουν μήκος 231 και 273 bp αντίστοιχα :

Πολλαπλασιαζόμενη αλληλουχία με σετ Primer 1:

TCTCACGTGTCTTCTCTACACCCAGGGCACCGGTGAATCCAAGTGTCCTCTGA TGGTCAAAGTTCTAGATGCTGTCCGAGGCAGTCCTGCCATCAATGTGGCCGTG CATGTGTTCAGAAAGGCTGCTGATGACACCTGGGAGCCATTTGCCTCTGGGT AAGTTGCCAAAGAACCCTCCCACAGGACTTGGTTTTATCTTCCCGTTTGCCCCC

TCACTTGGTAGAGAGAGGCT 231 bp

Πολλαπλασιαζόμενη αλληλουχία με σετ Primer 2:

CGGGCTCTGGTGGAAATGGATCTGTCTGTCTTCTCATAG<mark>GTGGTATTCACA</mark>

GCCAACGACTCCGGCCCCGCCGCTACACCATTGCCGCCCTGCTGAGCCCCT

ACTCCTATTCCACCACGGCTGTCGTCACCAATCCCAAGGAATGAGGGACTTCT

CCTCCAGTGGACCTGAAGGACGAGGGATGGGATTTCATGTAACCAAGAGTAT

TCCATTTTTACTAAAGCAGTGTTTTCACCTCATATGCTATGTT<mark>AGAAGTCCAG</mark>

GCAGAGACAA 273 bp

Template

Autoclave, ddH20

Για τον πολλαπλασιασμό του γενετικού υλικού χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω

υλικά στις αναφερόμενες αναλογίες (Πίνακας 10) :

Πίνακας 10: Συστατικά	αντίδρασης και αναλα	ογίες διαλυμάτων για	τον
πολλαπλασιασμό του αλληλί	ου 6.0Kb hTTRMet30		
Συστατικά Αντίδρασης	Final Concentration	Volume(µl)	
10 x PCR Buffer			
(Invitrogen)	1 x	5	
10 mM dNTP mixture			
(Invitrogen)	0,2 mM	1	
50 mM MgCl2 (Invitrogen)	1,5 mM	1,5	
Primer TTR - F2			
(FORTH)	0,2 μM	1	
Primer TTR - R2			
(FORTH)	0,2 μM	1	
Platinum Taq-DNA			
polymerase (Invitrogen)	1.0 unit	0,2	

Για τον πολλαπλασιασμό του γενετικού υλικού χρησιμοποιήθηκε θερμικός κυκλοποιητής Bio-rad PTC-200 DNA Engine Cycler. Το πρόγραμμα πολλαπλασιασμού ήταν :

1. 94° C for 5 min \rightarrow 2. 94° C for 30 sec \rightarrow 3. 62° C for 30 sec \rightarrow 4. 72° C for 30

sec \rightarrow 5. GOTO step 2 for 33 times \rightarrow 6. 12 ° C \rightarrow END

Από την διαδικασία γενοτυπικής ταυτοποίησης εξάγεται το συμπέρασμα ότι 3 από τα 4 ποντίκια C57Bl/6 έφεραν το αλλήλιο 6.0Kb hTTRMet30 (1 αρσενικό και 2 θηλυκά). Ως θετικό δείγμα ελέγχου χρησιμοποιήθηκε ανθρώπινο DNA. Ως αρνητικό δείγμα ελέγχου χρησιμοποιήθηκε Autoclave, ddH20.

γ) Επέκταση της αποικίας 6.0Kb hTTRMet30 και δημιουργία ομόζυγων στελεχών ποντικών με το αλλήλιο 6.0Kb hTTRMet30.

2 35,3 Για την επέκταση της αποικίας 6.0Kb hTTRMet30 έγιναν διασταυρώσεις και ακολούθως γονοτυπικές ταυτοποιήσεις ποντικών C57Bl/6 με ποντικούς 6.0Kb hTTRMet30-C57Bl/6. Παράλληλα δημιουργήθηκαν ομόζυγοι για το αλλήλιο 6.0Kb hTTRMet30 ποντικοί με την διενέργεια διασταυρώσεων ετερόζυγων 6.0Kb hTTRMet30 ποντικών με ετερόζυγους 6.0Kb hTTRMet30 ποντικούς C57Bl/6. Οι απογονοί τους ζευγαρώθηκαν με C57Bl/6 ούτως ώστε να δώσουν γέννες > 5 ποντίκια C57Bl/6 τα οποία να είναι όλα θετικά για το αλλήλιο 6.0Kb hTTRMet30.



Εικόνα 9: Ε σετ primer 1, F σετ primer 2, (1,2,3,4) κωδική ονομασία ποντικών C57Bl/6, P Θετικό δείγμα ελέγχου, N Αρνητικό δείγμα ελέγχου, Ladder (Invitrogen).

δ) Συνθήκες φύλαξης στελεχών 6.0Kb hTTRMet30.

Για την διενέργεια της παρούσας διδακτορικής διατριβής τα στελέχη ποντικών C57Bl/6 στεγάζονταν σε υψηλού φραγμού εγκατάστασεις (FORTH, IMBB-

Συνθήκες Υψηλού Φραγμού/ΣΥΦ). Για την είσοδο στις εγκαταστάσεις αυτές το προσωπικό φοράει στείρα ρούχα και κάνει μπάνιο πριν την είσοδο. Τα κλουβιά, το νερό, και η στρωμνή των ζώων είναι στείρα. Τα ζώα λαμβάνουν τροφή η οποία έχει πρώτα ακτινοβοληθεί με γ ακτινοβολία. Στον χώρο επικρατούν συνθήκες αερισμού θετικής πίεσης, και ο αέρας εισέρχεται μέσω φίλτρων ΗΕΡΑ. Ακολουθείται κύκλος 12ώρων μέρας/νύχτας.

Παράλληλα υπήρχε στέγαση ζώων σε μονάδα καραντίνας (FORTH, IMBB) όπου για την είσοδο στην μονάδα το προσωπικό φορούσε στείρα στολή, η στρωμνή, η τροφή και το νερό των ζώων ήταν στείρα. Για τον έλεγχο της επίδρασης των περιβαλλοντικών συνθηκών στην εναπόθεση έγινε χρήση ειδικά διαμορφομένου χώρου (τμήμα Ιατρική Παν/μιο Κρήτης-Συνθήκες Χαμηλού Φραγμού/ΣΧΦ) όπου τα ζώα ελάμβαναν μη αποστειρωμένο νερό, και τροφή. Η στρωμνή ήταν αποστειρωμένη. Το προσωπικό φορούσε μη αποστειρωμένο ρουχισμό κατά την είσοδο στον χώρο αυτό. Ακολουθούνταν κύκλος 12ώρων μέρας/νύχτας. Σε ΣΥΦ και ΣΧΦ χωρίστηκαν ίδια γέννας 24 ποντίκια 6.0Kb hTTRMet30 C57Bl/6 (12 αρσενικά, 12 θηλυκά ισομερώς κατά φύλο) και παρέμειναν στις συνθήκες αυτές μέχρι την ηλικία των 17 μηνών.

iv) Μέτρηση αρτηριακή πίεσης στελέχους ποντικών 6.0Kb hTTRMet30.

Για την μέτρηση αρτηριακής πίεσης (ΑΠ) στελέχους ποντικών 6.0Kb hTTRMet30 έγινε χρήση του μηχανήματος μέτρησης ΑΠ με το σύστημα 229 NIBP IITC (IITC, CA, USA) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

<u>ν) Συλλογές ούρων 24ώρου, μέτρηση ημερίσιας απέκκρισης αλβουμίνης στα</u> ούρα και μέτρηση επιπέδων της πρωτεΐνης TTRVal30Met στο αίμα.

Για την διενέργεια συλλογών ούρων 24ώρου χρησιμοποιήθηκαν μεταβολικά κλουβιά (Techniplast, Italy). Η μέτρηση της 24ωρης απέκκρισης λευκωματίνης ούρων έγινε

με την χρήση ELISA (Bethyl Laboratories, TX, USA) σύμφωνα με τις οδηγίες μέτρησης του κατασκευαστή. Επιπλέον η ποσοτικοποίηση της ημερήσιας απέκκρισης λευκωματίνης έγινε με την ηλεκτροφόρηση ούρων σε γέλη ακρυλαμίδης 7,5%, με θετικό μάρτυρα βόειο αλβουμίνη. Για την απεικόνιση της πρωτεΐνης έγινε χρώση της γέλης ακρυλαμίδης με χρώση Coomasie Blue (Sigma, Aldrich). Η παρασκευή της γέλης ακρυλαμίδης έγινε με την διαδικασία που περιγράφεται στο τμήμα 1 xii. Η αξιολόγηση των επιπέδων έκφρασης έγινε με το σύστημα Image J (NIH). Τα επίπεδα ανθρώπινης τρανσθυρετίνης στο αίμα μετρήθηκαν με την χρήση ELISA (Abnova, Taiwan) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

<u>vi) Διαδικασία θυσίας ζώου.</u>

Ακολουθεί η διαδικασία απομόνωσης του νεφρού των ζώων, και η περεταίρω επεξεργασία του για την μελέτη του με τεχνικές μοριακής βιολογίας, ιστοχημείας, ανοσοιστοχημείας, ηλεκτρονικής και άνοσο-ηλεκτρονικής μικροσκοπίας. Τα ζώα αναισθητοποιήθηκαν με ισοφλουράνιο, και θανατώνονταν με απεγκεφαλισμό. Έπειτα διενεργήθηκε μέση τομή, αφαίμαξη της αριστεράς κοιλίας, παρασκευή και εκτομή των νεφρών άμφω. Ο κάθε νεφρός τεμνόταν και τα προκύπτοντα ιστοτεμάχια επεξεργάζονταν με τους ακόλουθους τρόπους. Σε όλη την διάρκεια της διαδικασίας ο νεφρός διατηρείτο σε διάλυμα φωσφορικών (PBS) σε θερμοκρασία 4° C.

Για την μονιμοποίηση του ιστικού δείγματος του νεφρού στο οποίο θα γινόταν αναλυση με φωτονικό μικροσκόπιο χρησιμοποιήθηκε ουδέτερη φορμόλη 10 ml (NBF 10%, Sigma Aldrich) μέχρι την περαιτέρω επεξεργασία του δείγματος. Για την μονιμοποίηση του ιστικού δείγματος του νεφρού στο οποίο θα γινόταν αναλυση με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο χρησιμοποιήθηκε διάλυμα Gluteraldeyde 2.5 % σε 0.1 M Cacodylate Buffer pH = 7.2 (Sigma, Aldrich).

Για την μονιμοποίηση του ιστικού δείγματος του νεφρού στο οποίο θα γινόταν αναλυση μέσω άνοσο-ηλεκτρονικής μικροσκοπίας έγινε χρήση διαλύματος παραφορμαλδεΰδης 4% (PFA 4%) –PBS για 2 ώρες στους 4° C μέχρι την περαιτέρω επεξεργασία του δείγματος. Για την επεξεργασία του τεμαχίων νεφρικού παρεγχύματος (συνολική μάζα 100 mg) τα οποία προοριζόταν για μελέτες με ανοσοστύπωμα κατά Western (WB), ο νεφρός ομογενοποιούνταν με την χρήση ομογενοποιητών τύπου Tenbroek (Fisher), σε διάλυμα λύσης στους 4° C. Το διάλυμα λύσης είχε την παρακάτω σύσταση 20 mM MOPS pH=7, 2mM EGTA, 5mM EDTA, 30mM Sodium Fluoride, 60mM β-glycerophosphate, 20mM Sodium Pyrophosphate, 1mM Sodium Orthovanadate, 1mM DTT (Sigma) και μίγμα αναστολέων πρωτεασών (complete mini, Roche). Το μίγμα αναστολέων πρωτεασών προσθετόταν στο διάλυμα πριν την έναρξη της θυσίας. Μετά την ομογενοποίηση του νεφρικού ιστού το ομογενοποιημένο διάλυμα παρέμενε σε θερμοκρασία 2° C για 60 mins. Ακολουθούσε φυγοκέντρηση στις 14.000 στροφές για 15 min και φύλαξη του δείγματος στους -80°

Για την μελέτη του νεφρικού παρεγχύματος με την χρήση τεχνικής PCR πραγματικού χρόνου (Real time – reverse transcription PCR), 100 mg νεφρικού ιστού εμβυθιζόταν σε 1 ml αντιδραστηρίου TRIZOL (Invitrogen) σε θερμοκρασία 4° C, ομογενοποιούνταν και αποθηκευόταν στους – 80° C μέχρι την περαιτέρω επεξεργασία του.

Για την μελέτη νεφρικού παρεγχύματος με την χρήση ανοσο-ιστοχημικών τεχνικών, τεμάχια νεφρού ψυχόταν ταχέως σε υγρό άζωτο (-196° C) και αποθηκευόταν στους -80° C για την περαιτέρω μελέτη τους.

<u>vii) Διενέργεια ιστογημικών γρώσεων H&E, PAS, van Gieson, Αργύρου σε τομές</u> παραφίνης ζώων TTR KO, M30, Hsf1 KO, Hsf1 M30^{239,240}.

Η εφαρμογή των ιστοχημικών τεχνικών που θα περιγραφούν παρακάτω έγινε σε τομές παραφίνης νεφρικού παρεγχύματος πάχους 3 μm. Η παρασκευή των ιστών έγινε στο IBMC (Porto, Portugal καθηγήτρια Maria Joao Saraiva). Όλα τα υλικά για την διενέργεια των ιστοχημικών χρώσεων προμηθεύθηκαν από την Sigma Inc.

Για την αποπαραφίνωση του νεφρικού παρεγχύματος ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία :

- 1. Επώαση τομών παραφίνης σε Xylene για 10 min
- 2. Επώαση τομών παραφίνης σε νέο διάλυμα Xylene για 10 min.
- 3. Επώαση τομών παραφίνης σε διάλυμα 100% Ethanol για 2 min.
- 4. Επώαση τομών παραφίνης σε νέο διάλυμα 100 % Ethanol για 2 min
- 5. Επώαση τομών παραφίνης σε διάλυμα 90% Ethanol για 1 min.
- 6. Επώαση τομών παραφίνης σε διάλυμα 80% Ethanol για 1 min.
- 7. Επώαση τομών παραφίνης σε διάλυμα 70% Ethanol για 1 min
- 8. Επώαση τομών παραφίνης σε διάλυμα 50% Ethanol για 1 min
- 9. Επώαση τομών παραφίνης σε διάλυμα 30% Ethanol για 1 min
- 10. Επώαση τομών παραφίνης σε ddH_2O για 5 min.

α) Διαδικασία χρώσης Η&Ε

Παρασκευή διαλύματος Mayer's Haemalumin (Haematoxylin) : (Προσθήκη υλικών

με την σειρά την οποία αναγράφονται.)

 $\Sigma \epsilon$ 750 ml ddH₂O:

- 1. 50 gr Aluminum Ammonium Sulphate
- 2. 1 gr Haematoxylin
- 3. 0,1 gr Sodium Iodate
- 4. 1 gr Citric Acid Monohydrate
- 5. 50 gr Chloral Hydrate (Υπό απορροφητήρα)

6. Προσαρμογή όγκου με ddH_2O ώστε ο τελικός όγκος να είναι 1 lt.

Παρασκευή διαλύματος 2% Eosin Y:

- Σε 225 ml 100% Ethanol προσθήκη 25 ml ddH₂O. (Τελικός όγκος διαλύματος 250 ml)
- 2. Προσθήκη 5 gr Eosin Y υπό ανάδευση μέχρι να διαλυθεί η ποσότητα Eosin Y.

Τα διάφορα μίγματα Eosin Y έχουν μεταβλητή ποσότητα Eosin Y, επομένως απαιτείται δοκιμή της ποσότητας Eosin Y η οποία θα προστεθεί στο διάλυμα και του χρόνου επώασης ώστε να επιτευχθεί το επιθυμητό αποτέλεσμα.

α)Διενέργεια χρώσης Η&Ε:

- Επώαση αποπαραφινωμένων ιστικών τομών σε διάλυμα Mayer's Haemalumin για 10 min.
- Επώαση αποπαραφινωμένων ιστικών τομών σε τρεχούμενο νερό βρύσης (TapH₂O) για 2 min
- Επώαση αποπαραφινωμένων ιστικών τομών σε διάλυμα 2% Eosin Y για 10 min.
- Γρήγορο πλύσιμο (1 sec)σε διάλυμα 90% Ethanol (στράγγισμα διαλύματος σε απορροφητικό χαρτί για την αφαίρεση της περίσσειας του διαλύματος 90% Ethanol)
- Γρήγορο πλύσιμο (1 sec) σε διάλυμα 100% Ethanol (στράγγισμα διαλύματος σε απορροφητικό χαρτί για την αφαίρεση της περίσσειας του διαλύματος 100% Ethanol)
- Γρήγορο πλύσιμο (1 sec) σε διάλυμα 100% Ethanol (στράγγισμα διαλύματος σε απορροφητικό χαρτί για την αφαίρεση της περίσσειας του διαλύματος 100% Ethanol)
- 7. Επώαση των αποπαραφινωμένων ιστικών τομών σε Xylene για 2 min.

- Επώαση των αποπαραφινωμένων ιστικών τομών σε νέο διάλυμα Xylene για 3 min.
- 9. Εμπέδιση των τομών σε ρητίνη και κάλυψη του πλακιδίου με καλυπτρίδα.

<u>β) Διαδικασία χρώσης περιοδικού οξέος (PAS):</u>

Διάλυμα PAS (1% w/v)

Προσθήκη 2.0 gr PAS(HIO₄.2H₂O) σε 200 ml ddH₂O και ανάδευση εως ότου το PAS διαλυθεί πλήρως. Η διάρκεια του διαλύματος είναι μερικές εβδομάδες. Αν αποκτίσει καφέχρωη απόχρωση πρέπει να απορριφθεί.

Αντιδραστήριο Schiff's. (Χρήση υπό απορροφητήρα)

- 1. Βρασμός 400 ml ddH₂O.
- 2. Προσθήκη 1,5 gr basic fuchsine υπό ανάδευση
- 3. Το διάλυμα αφήνεται μέχρι να αποκτήσει θερμοκρασία δωματίου.
- 4. Δίηθηση διαλύματος σε διηθητικό χαρτί.
- 5. Προσθήκη 1 ml of thionyl chloride (υπό απορροφητήρα) υπό ανάδευση.
- 6. Σφράγισμα δοχείου και παραμονή διαλύματος στο δοχείο για 12 ώρες.
- 7. Προσθήκη 2 gr ενεργού άνθρακα.
- 8. Ανάμειξη του διαλύματος.
- Διήθηση διαλύματος σε διηθητικό χαρτί για να αφαιρεθεί ο ενεργός άνθρακας.
- 10. Αποθήκευση διαλύματος σε καλά κλεισμένο δοχείο στους 4° C.

Το αντιδραστήριο Schiff έχει διάρκεια ζωής 6 μήνες. Αν αποκτίσει ροζ χρώμα πρέπει να απορριθφεί. Οι διάφορες παρτίδες basic fuchsine έχουν διαφορετική συγκέντρωση pararosaniline, οπότε χρειάζεται στάθμιση των χρόνων επώασης και της ποσότητας basic fuchsine η οποία πρέπει να προστεθεί να επιτευχθεί το επιθυμητό αποτέλεσμα.

Διενέργεια χρώσης PAS:

- 1. Το αντιδραστήριο Schiff πρέπει να έχει θερμοκρασία δωματίου.
- Προσθήκη των αποπαραφινωμένων ιστικών τομών σε διάλυμα 1% w/v PAS για 15 mins.
- Ξέπλυμα των αποπαραφινωμένων ιστικών τομών σε τρεχούμενο TapH₂O για
 3 mins.
- Προσθήκη των αποπαραφινωμένων ιστικών τομών σε αντιδραστήριο Schiff's για 40 mins.
- Ξέπλυμα των αποπαραφινωμένων ιστικών τομών σε μη τρεχούμενο TapH₂O για 2 mins.
- Προσθήκη των αποπαραφινωμένων ιστικών τομών σε διάλυμα Mayer's haematoxylin για 10 mins.
- Ξέπλυμα των αποπαραφινωμένων ιστικών τομών σε τρεχούμενο TapH₂O για 2 mins.
- Αφυδάτωση των ιστικών τομών σε διαλύματα αιθανόλης αυξανόμενης συγκέντρωσης. Εμπέδιση σε ρητίνη και κάλυψη ιστικών τομών με καλυπτρίδα.

Οι βλέννοπολυσακχαρίτες οι οποίοι περιέχουν εξόζες και σιαλικό οξύ έχουν ροζ- και ανοιχτή μωβ απόχρωση. Οι βασικές μεμβράνες διακρίνονται ξεχωριστά και έρχονται σε αντίθεση με το υπόστρωμα.

γ) Διαδικασία χρώσης νιτρικού αργύρου.

Χρησιμοποιείται διάλυμα PAS όπως αυτό έχει περιγραφεί στο β) μέρος αυτής της ενότητας.

Δημιουργία υδατικού διαλύματος νιτρικού αργύρου 5% (Διάλυμα Α):

Προσθήκη 2,5 gr Silver Nitrate σε 50 ml ddH₂O. Ανάδευση του διαλύματος μέχρι να διαλυθεί η ποσότητα Silver Nitrate. Σχηματίζεται νεφελώδες διάλυμα. Το διάλυμα πρέπει να αποθηκεύεται στο σκοτάδι σε θερμοκρασία 4° C.

Δημιουργία υδατικού διαλύματος 3% Methenamine (Hexamethylenetetramine) (Διάλυμα B).

Προσθήκη 15 gr Hexamethylenetetramine σε 500 ml ddH₂O (Υπό απορροφητήρα). Αποθήκευση σε θερμοκρασία δωματίου.

Δημιουργία υδατικού διαλύματος 5% Sodium Tetraborate (Διάλυμα Γ).

Προσθήκη διαλύματος 12,5 gr Sodium Tetraborate σε 250 ml ddH₂O (Ανάδευση για 2 ώρες). Ακόμη όταν υπάρχουν κρύσταλλοι το διάλυμα μπορεί να χρησιμοποιηθεί. Η διαλυτότητα του Sodium Tetraborate στο νερό είναι 3,1gr / 100 ml H₂O σε $\Theta = 25^{\circ}$ C.

Δημιουργία αποθεματικού διαλύματος Silver Methenamine (Διάλυμα Δ). Ανάμειξη σε αναλογία όγκων 1/20 διαλύματος Α (10 ml) προς διάλυμα Β (200 ml). Προκαλείται νεφελώδης αντίδραση. Φύλαξη του διαλύματος προστατευμένο από το φως σε θερμοκρασία 4° C.

Δημιουργία διαλύματος εργασίας Silver Methenamine.

Προσθήκε 125 ml Διαλύματος Δ σε 125 ml ddH₂O. Έπειτα προσθήκη 10 ml Διαλύματος Γ. Αυτό το διάλυμα μπορεί να χρησιμοποιηθεί μόνο μια φορά.

Διαδικασία χρώσης Silver Methenamine.

- 1. Αποπαραφίνωση τομών
- Προσθήκη αποπαραφινωμένων ιστικών τομών σε διάλυμα 1% Periodic acid για 25 min.
- 3. Σύντομο ξέπλυμα με ddH₂O σε θερμοκρασία δωματίου.
- 4. Σύντομο ξέπλυμα με ddH₂O σε ddH₂O Θ = 60° C.
- 5. Προσθήκη αποπαραφινωμένων ισικών τομών σε διάλυμα εργασίας Silver Methenamine $\Theta = 60^{\circ}$ C, για χρόνο > 30 min.
- 6. Σύντομο ξέπλυμα με ddH₂O Θ = 60° C.
- 7. Σύντομο ξέπλυμα με ddH_2O σε θερμοκρασία δωματίου.
- 8. Επώαση ιστικών τομών σε διάλυμα 0,1% Gold Chloride για 6 secs.
- 9. Σύντομο ξέπλυμα με ddH₂O Θ = 60° C.
- 10. Διαδικασία χρώσης Η&Ε.

Το περιοδικό οξύ οξειδώνει επιλεκτικά περιοδικά ιόντα των υδροξυλομάδων (γλυκόλες) που είναι συνδεδεμένες με άτομα άνθρακα, μέσω τήξης του συμμετέχοντος ατόμου άνθρακα, και σχηματίζει αλδεΰδη. Οι γλυκόλες είναι παρούσες στα ουδέτερα ζάχαρα (γλυκόζη, γαλακτόζη, μαννόζη), και στις λειτουργίκες ομάδες οι οποίες περιέχουν άζωτο. Τα συμπλέγματα αργύρου και η μεθεναμίνη, οξειδώνουν άμεσα τις παραγόμενες αλδεΰδες και ο άργυρος ανάγεται σε μεταλλικό ιόν το οποίο καθιζάνει (μαύρο χρώμα). Έτσι οι βασικές μεμβράνες αποχτούν μαύρη απόχρωση, όπως και η μεσάγγειος ουσία του αγγειώδους σπειράματος. Για την επιτυχία της χρώσης αργύρου, χρειάζεται τακτικός έλεγχος κατά την διάρκεια της χρώσης, ώστε να ελέγχεται η ανάπτυξη της χρώσης.

δ) Διαδικασία χρώσης Van Gieson.

Δημιουργία διαλύματος Weigert's Iron – Haematoxylin.

Διάλυμα A: Προσθήκη Haematoxylin 5 gr σε διάλυμα Ethanol 95% 500 ml.

Διάλυμα B: Προσθήκη 5,8 gr Iron(III) chloride hexahydrate και 5 ml πυκνού διαλύματος υδροχλωρικού οξέος σε ddH₂O 495 ml

Διάλυμα Van Gieson's: Προσθήκη 0,5 gr Acid fuchsine σε 500 ml κορεσμένου διαλύματος πικρικού οξέος.

Διάλυμα εργασίας Weigert's Iron – Haematoxylin:

Ανάμειξη ίσων όγκων διαλυμάτων A & B στο δοχείο χρώσης για ταχεία ανάπτυξη της χρώσης. Το διάλυμα εργασίας μπορεί να χρησιμοποιηθεί για 2 εβδομάδες μετά την πρώτη χρήση.

Διαδικασία χρώσης Van Gieson

- Επώαση αποπαραφινωμέων ιστικών τεμαχίων σε διάλυμα εργασίας Weigert's Iron – Haematoxylin για 10 mins.
- 2. Ξέπλυμα ιστικών τεμαχίων σε τρεχούμενο TapH₂O για 1 min.
- Επώαση αποπαραφινωμέων ιστικών τεμαχίων σε διάλυμα Van Gieson's για 10 mins.
- Διαφοροποίηση της χρώσης σε τρεις αλλαγές διαλύματος 100% (1-2 sec / αλλαγή).
- Αφυδάτωση ιστικών τομών σε διαλύματα αιθανόλης αυξανόμενης συγκέντρωσης. Εμπέδιση σε μέσο ρητίνης και κάλυψη ιστικών τομών με καλυπτρίδα.

Πυρήνες: Μαύροι/ καφέ απόχρωση

Κολλαγόνο: Κόκκινο

Το νεφρικό παρέγχυμα από τα διαγονιδιακά ζώα hTTRMet30 παρασκευάστηκε (έγκλιση σε παραφίνη, διενέργεια ιστολογικών χρώσεων) για ιστοχημική ανάλυση

στο νέφροπαθολογο-ανατομικό εργαστήριο του Πανεπιστήμιου της Ρώμης (επίκουρους καθηγητής Κων/νος Γιαννακάκης).

<u>viii) Διενέργεια ιστοχημικής χρώσης Congo Red παραφίνης ζώων TTR KO,</u> M30, Hsf1 KO, Hsf1 M30, και hTTRMet30.

Η διενέργεια των ιστοχημικής χρώσης Congo Red έγινε στο IBMC (Porto, Portugal, καθηγήτρια Maria Joao Saraiva), και στο νέφροπαθολογο-ανατομικό εργαστήριο του Πανεπιστήμιου της Ρώμης (επίκουρους καθηγητής Κων/νος Γιαννακάκης).

ix) Διενέργεια ανοσο-ιστογημικών γρώσεων στο νεφρικό παρέγχυμα των υπό εξέταση ζώων.

α) Διενέργεια τομών σε ταχέως ψυχθέν νεφρικό παρέγχυμα, κάλυψη ιστολογικών πλακιδίων με διάλυμα gelatin, παρασκευή διαλύματος παραφορμαλδεΰδης 4%.

Για την καλύτερη προσκόληση των ιστικών τεμαχίων στο πλακίδιο έγινε κάλυψη των πλακιδίων με διάλυμα gelatin σύμφωνα με την παρακάτων διαδικασία:

- 1. Προσθήκη 1,5 gr gelatin(MERCK) σε 300 ml ddH₂O
- Ανάδευση του διαλύματος σε θερμοκρασία 40° C εως ώτου διαλυθεί η ποσότητα gelatin.
- 3. Διακοπή ανάδευσης έως ότου Θ = 15-30° C
- 4. Προσθήκη 150 mg KCr(SO₄)₂12H₂O (Sigma) στο διάλυμα gelatin. Το υλικό είναι φωτοευαίσθητο οπότε χρειάζεται προστασία από το φως. Ανάδευση διαλύματος (Θ= 37° C) μέχρι την πλήρη διάλυση της ποσότητας KCr(SO₄)₂12H₂O (15 min)
- 5. Προσθήκη του διαλύματος σε δοχείο εμβάπτισης πλακιδίων.
- 6. Προσθήκη των πλακιδίων στο διάλυμα για 10 min

Εξαγωγή πλακιδίων από το διάλυμα. Επώαση πλακιδίων σε θερμοκρασία 37°
 C για 16 ώρες.

Με το πέρας της παραπάνω διαδικασίας τα πλακίδια ήταν έτοιμα για χρήση.

Παρασκευή διαλύματος μονιμοποίησης παραφορμαλδεΰδης 4% (PFA 4%).

- 1. Διάλυση 4g Paraformaldehyde(Sigma) σ ε 50 ml ddH₂O
- 2. Προσθήκη 1 ml διαλύματος NaOH 1M
- 3. Ανάδευση του διαλύματος ($\theta = 65^{\circ}$ C) μέχρι την διάλυση της ποσότητας PFA (υπό απορροφητήρα).
- Προσθήκη στο διάλυμα 10 ml διαλύματος 10x PBS και διακοπή ανάδευσης μέχρι η θερμοκρασία του διαλύματος να γίνει ίση με την θερμοκρασία δωματίου.
- 5. Ρύθμιση pH=7,4 με την χρήση διαλύματος 1M HCl
- 6. Τιτλοποίηση τελικού όγκου διαλύματος στα 100 ml με την προσθήκη ddH_2O
- Μοίρασμα του διαλύματος σε σωληνάρια 2 ml και αποθήκευση στους -20° C.
 Το διάλυμα έχει διάρκεια ζωής αρκετούς μήνες. Το διάλυμα σε κάθε σωληνάριο χρησιμοποιήθηκε άπαξ.

Παρασκευή τομών σε ταχέως ψυχθέν νεφρικό παρέγχυμα.

Για την Παρασκευή τομών σε ταχέως ψυχθέν νεφρικό παρέγχυμα χρησιμοποιήθηκε κρυοτόμος Leica. Η θερμοκρασία κοπής ήταν -25° C. Το πάχος κάθε τομής ήταν 3 μm. Για την διενέργεια τομών κάθε ιστικό τεμάχιο νεφρού εμβυθιζόταν σε OCT (Sakura, Inc). Όταν είχε διενεργηθεί η τομή του νεφρικού τεμαχίου γινόταν επίθεση του τεμαχίου σε πλακίδιο καλυμένο με gelatin. Τα πλακίδια αυτά παρέμεναν στην θερμοκρασία των -25° C καθόλη την διάρκεια της διαδικασίας κοπής. Με το πέρας της διαδικασίας κοπής διενεργούταν άμεσα ανοσοφθορισμός επί των τομών νεφρικού παρεγχύματος.

<u>β) Ανοσοφθορισμός στο νεφρικό παρέγχυμα των hTTRMet30 ποντικών.</u>

Για την διενέργεια ανοσοφθορισμού σε νεφρικό παρέγχυμα hTTRMet30 ποντικών έγινε χρήση τεμαχίων νεφρού το οποία είχαν ψυχθεί ταχέως σε υγρό άζωτο (-196° C) και είχαν αποθηκευθεί στους -80° C μέχρι την περαιτέρω μελέτη τους. Καθόλη την διάρκεια της διενέργειας ανοσοφθορισμού ο ιστός και τα υπό χρήση αντισώματα ήταν προφυλαγμένα από το φως.

- 1. Μονιμοποίηση των τομών στα πλακίδια με διάλυμα 4% PFA, PBS-1x, pH=7,1 για 10 min, Θ = 15-30° C
- 2. Ξέπλυμα των τομών με την χρήση διαλύματος PBS 1x-Tween 0,05% (PBS-T 1x) $\Delta t = 5 \text{ min}, \Theta = 15-30^{\circ} \text{ x } 3$
- 3. Προσθήκη διαλύματος Triton-X 0,1% PBS-1x $\Delta t=10 \min \Theta = 15-30^{\circ}$ C.
- 4. Ξέπλυμα των τομών με την χρήση διαλύματος PBS-T 1x $\Delta t = 5 \min$, $\Theta = 15-30^{\circ}$ x 3
- 5. Επώαση των τομών με το κατάλληλο διάλυμα blocking -PBS-T 1x, $\Delta t = 60$ min, $\Theta = 15-30^{\circ}$ C
- 6. Επώαση των τομών με το κατάλληλο διάλυμα blocking -PBS-T 1x + 1ογενές αντίσωμα Δt = 18 hrs θ= 4° C.
- 7. Ξέπλυμα των τομών με την χρήση διαλύματος PBS-T 1
x $\Delta t=5~min~\Theta=15\text{-}30^\circ\text{, x}$ 3
- 8. Επώαση των τομών με το κατάλληλο διάλυμα blocking -PBS-T 1x + 20γενές αντίσωμα, Δt = 30 min.Θ=15-30° C
- 9. Ξέπλυμα των τομών με την χρήση διαλύματος PBS-T 1x $\Delta t = 5 \min \Theta = 15-30^{\circ}$, x 3

Όταν απαιτείται η απεικόνιση των πυρήνων με μπλε χρώμα απόχρωση ,τότε η διαδικασία συνεχίζεται ως εξής:

- 10. Επώαση των τομών με χρώση DAPI (1:1000) $\Delta t = 5 \min \Theta = 15-30^{\circ}$.
- 11. Ξέπλυμα τομών με την χρήση διαλύματος PBS-T 1x $\Delta t = 5 \min \Theta = 15-30^\circ$, x 3
- Οι τομές πάνω στα πλακίδια καλύπτονται με το μέσο Mowiol (80 μl / πλακίδιο)
 και εναποτείθεται σε αυτά καλυπτρίδα.
- Τα πλακίδια φυλασσόταν σε θερμοκρασία των 4° C, προστατευμένα από το φως μέχρι να επισκοπηθούν.

Όταν απαιτείτο η απεικόνιση των πυρήνων με κόκκινο χρώμα απόχρωση τότε η διαδικασία συνεχίζεται ως εξής:

- 10. Επώαση των τομών με διάλυμα RNAse $\Delta t=30 \min \Theta = 37^{\circ} C.(1:500)$
- 11. Προσθήκη διαλύματος Propidium Iodide $\Delta t=5 \min \Theta = 15-30^{\circ} \text{ C.}(1:1000)$
- 12. Ξέπλυμα των τομών με την χρήση διαλύματος PBS-T 1x $\Delta t = 5 \min \Theta = 15-30^{\circ}$, x 3
- 13. Ξέπλυμα των τομών με την χρήση διαλύματος PBS-T 1
x $\Delta t=5~min~\Theta=15-30^{o},$ x 3
- 14. Οι τομές πάνω στα πλακίδια καλύπτονται με το μέσο Mowiol (80 μl / πλακίδιο) και εναποτείθεται σε αυτά καλυπτρίδα.
- 15. Τα πλακίδια φυλασσόταν στην θερμοκρασία των 4° C, προστατευμένα από το φως μέχρι να επισκοπηθούν με συμβατικό μικροσκόπιο φθορισμού (Nikon Eclipse E800 [Nikon, Japan] το οποίο ήταν εξοπλισμένο με ψηφιακή κάμερα (Progres CF [Jenoptik, Germany]) και με συνεστιακό μικροσκόπιο (Leica SP [Leica, Germany] ή Zeiss Biorad [Carl Zeiss, USA]).

Σήμανση πρωτογενών αντισωμάτων bax, bcl-2, hTTR, SAP με φθορίζοντα Fab τμήματα και διενέργεια ανοσοφθορισμού στους ιστούς των hTTRV30M ποντικών.

Όταν υπάρχουν ≥ 2 πρωτογενή αντισώματα τα οποία έχουν παραχθεί στο ίδιο είδος ζώου η διενέργεια έμμεσου ανοσοφθορισμού είναι αδύνατη. Η σήμανση των πρωτογενών αντισωμάτων με Fab κλάσματα σημασμένα με φθορίζουσες χρωστικές μη αλληλοεπικαλυπτόμενων φασμάτων εκπομπής, παρακάμπτει αυτή την τεχνική δυσκολία²⁴¹. Για την σήμανση πρωτογενών αντισωμάτων bax, bcl-2, hTTR, SAP με φθορίζοντα Fab τμήμα χρησιμοποιήθηκε το παρακάτω πρωτόκολλο.΄

- Επώαση πρωτογενούς αντισώματος bax (Rabbit anti mouse [Abcam, plc, UK]) με Fab Dylight 488 (Jackson ImmunoResearch, UK), σε αραίωση 1:2 για 20 mins σε θερμοκρασία δωματίου. Επώαση πρωτογενούς αντισώματος bcl-2 (Rabbit anti mouse [Abcam, plc, UK]) με Fab Dylight 555 (Jackson ImmunoResearch, UK), σε αραίωση 1:2, για 20 mins σε θερμοκρασία δωματίου. Επώαση πρωτογενούς αντισώματος hTTR(Rabbit anti human [Dako,Denmark]) με Fab Dylight 488 (Jackson ImmunoResearch, UK), σε αραίωση 1:2 για 20 mins σε θερμοκρασία δωματίου. Επώαση πρωτογενούς αντισώματος SAA (Rabbit anti mouse [Abcam, plc, UK]) με Fab Dylight 555(Jackson ImmunoResearch, UK), σε αραίωση 1:2 για 20 mins σε θερμοκρασία δωματίου. Η αντίδραση έλαβε χώρα σε μικρό όγκο διαλύματος (10μl διαλύματος PBS-Tween-20 0,05% pH=7,4 / 1 μg πρωτογενούς αντισώματος). Για όλη την διαδικασία χρησιμοποιήθηκε διάλυμα PBS-Tween-20 0,05% pH=7,4. Το διάλυμα το οποίο προέκυπτε ήταν το διάλυμα γρώσης.
- Επώαση διαλύματος χρώσης με 10% ορό Rabbit PBS-Tween-20 0,05%
 pH=7,4 για 10 mins σε θερμοκρασία δωματίου.

- 3. Φυγοκέντρηση διαλύματος στα13.000 x g για 10 min.
- Επώαση μονιμοποιημένων τομών νεφρικού παρεγχύματος με το διάλυμα χρώσης.

Εκτέλεση ανοσοφθορισμού με το διάλυμα χρώσης.

- 1. Μονιμοποίηση των τομών στα πλακίδια με διάλυμα 4% PFA, PBS-1x, pH=7,1 για 10 min, Θ = 15-30° C
- Ξέπλυμα των τομών με την χρήση διαλύματος PBS 1x-Tween 0,05%(PBS-T
 1x) Δt = 5 min, Θ = 15-30° x 3
- 3. Προσθήκη διαλύματος Triton-X 0,1% PBS-1x $\Delta t=10 \min \Theta = 15-30^{\circ} \text{ C}$.
- 4. Ξέπλυμα των τομών με την χρήση διαλύματος PBS-T 1x $\Delta t = 5 \min$, $\Theta = 15-30^{\circ}$ x 3
- 5. Επώαση των τομών με το κατάλληλο διάλυμα blocking -PBS-T 1x, $\Delta t = 60$ min, $\Theta = 15-30^{\circ}$ C
- 6. Επώαση των τομών με το κατάλληλο διάλυμα blocking -PBS-T 1x + Διάλυμα χρώσης Δt = 18 hrs θ= 4° C.
- 7. Ξέπλυμα των τομών με την χρήση διαλύματος PBS-T 1
x $\Delta t = 5~min~\Theta = 15-30^{\rm o}, x~3$
- 8. Τα πλακίδια φυλασσόταν σε θερμοκρασία των 4° C, προστατευμένα από το φως μέχρι να επισκοπηθούν με συμβατικό μικροσκόπιο φθορισμού (Nikon Eclipse E800 [Nikon, Japan] το οποίο ήταν εξοπλισμένο με ψηφιακή κάμερα (Progres CF [Jenoptik, Germany]) και με συνεστιακό μικροσκόπιο (Leica SP [Leica, Germany] ή Zeiss Biorad [Carl Zeiss, USA]).

<u>γ)</u> Ανοσοφθορισμός/ανοσοϊστοχημεία στο νεφρικό παρέγχυμα των hTTRMet30
 <u>ποντικών TTR KO, M30, Hsf1 KO, Hsf1 M30.</u>

Επειδή οι ιστοί των ζώων αυτών ήταν εγκλεισμένοι σε παραφίνη ήταν απαραίτητο να προηγηθεί αποκάλυψη (unmasking) των αντιγονικών επιτόπων. Είναι γνωστό ότι όταν ένας ιστός εκτείθεται στην διαδικασία της εμπέδισης σε παραφίνη οι αντιγονικοί επίτοποι τους οποίους περιλαμβάνει (λόγω των αλληλεπιδράσεων οι οποίες αναπτύσσονται μεταξύ μορίων παραφίνης και ιστικών μορίων, επίδραση της μονιμοποίησης πάνω σε ιστικά μόρια) ενώ διατηρούν την άνοσο-δραστικότητα τους δεν είναι ικανοί να αντιδράσουν με τα πρωτεγενή αντισώματα ανίχνευσης και παραυσιάζονται ως ανοσο-δραστικά αδρανείς²⁴⁰. Με την διαδικασία του unmasking γίνεται έκθεση των αντιγονικών επιτόπων, με την επίδραση στον ιστό θερμικής ενέργειας, όξινων ή βασικών διαλυμάτων, ενζυμικής πέψης του ιστού, καθώς και διαλυμάτων απορρυπαντικών (Tween-20, Triton X -100). Κάθε αντιγονικός επίτοπος αποκαλύπτεται υπό διαφορετικές συνθήκες pH, θερμοκρασίας, συγκέντρωσης απορρυπαντικού, συγκέντρωσης πρωτογενούς και δευτερογενούς αντισώματος. Επίσης οφείλει να τονιστεί το γεγονός ότι οι συνθήκες αποκάλυψης του αντιγονικού επιτόπου είναι μοναδικές και για κάθε ειδικό για τον αντιγονικό επίτοπο αντίσωμα. Ακολουθεί η περιγραφή της διαδικασίας αποκάλυψης των αντιγονικών επιτόπων νεφρίνης, ποδοσίνης και WT-1 σε νεφρικό ιστό εγκλεισμένο σε παραφίνη από διαγονιδιακά ποντίκια TTR KO, M30, Hsf1 KO, Hsf1 M30. Αξίζει να σημειωθεί ότι η διαδικασία αποπαραφίνωσης των ιστών έγινε όπως περιγράφεται στο τμήμα 1 viii

Αποκάλυψη της νεφρίνης.

του ειδικού μέρους.

Αποπαραφινωμένες τομές του νεφρικού παρεγχύματος των διαγονιδιακών ποντικών επωάστηκαν για 40 mins σε συμβατικό φούρνο μικροκυμάτων (MWO) με διάλυμα 10 mM Tris – NaOH, 1 mM EDTA, Triton X-100 0,1% v/v pH = 9 Buffer.

<u>Αποκάλυψη ποδοσίνης.</u>

Αποπαραφινωμένες τομές του νεφρικού παρεγχύματος των διαγονιδιακών ποντικών επωάστηκαν για 30 mins σε MWO με διάλυμα 10 mM Tris – HCl , 1 mM EDTA, Triton X-100 0,1% v/v pH = 2.

Αποκάλυψη WT-1.

Αποπαραφινωμένες τομές του νεφρικού παρεγχύματος των διαγονιδιακών ποντικών επωάστηκαν για 50 mins σε MWO με διάλυμα 10 mM Tris – HCL 1 mM EDTA Triton X-100 0,3% v/v pH = 10.

Ανοσοφθορισμός σε αποπαραφινωμένες τομές του νεφρικού παρεγχύματος των διαγονιδιακών ποντικών οι οποίες επωάστηκαν με πρωτογενή αντισώματα έναντι της νεφρίνης και της ποδοσίνης.

- Ξέπλυμα των τομών 3 φορές / 5 min κάθε φορά σε διάλυμα PBS 1x -Tween(0,05%) pH = 7
- 2. Επώαση των τομών με διάλυμα Triton X 100 0,1% v/v PBS 1x για 10 mins
- 3. Ξέπλυμα των τομών 3 φορές / 5 min κάθε φορά σε διάλυμα PBS 1x -Tween(0,05%) pH = 7
- 4. Επώαση των τομών με διάλυμα ορού Guinea Pig 5% (Jackson ImmunoResearch, UK) PBS Tween για 60 mins (εφόσον επρόκειτο να επωαστούν με πρωτογενές αντίσωμα έναντι της νεφρίνης) ή Επώαση τομών με διάλυμα ορού Rabbit 5% (Jackson ImmunoResearch, UK) PBS Tween για 60 mins (εφόσον επρόκειτο να επωαστούν με πρωτογενές αντίσωμα έναντι της ποδοσίνης).
- 5. Επώαση των τομών με διάλυμα του πρωτογενούς αντισώματος για 12 hrs

- a. Anti-Nephrin (ενδοκυττάριο τμήμα της νεφρίνης/ guinea pig anti mouse/Progen GmbH, Germany) σε αραίωση 1: 100 (σε διάλυμα PBS-Tween ορού Guinea Pig 1%).
- b. Anti-Podocin (rabbit anti mouse / Abcam UK) σε αραίωση 1:100 (σε διάλυμα PBS-Tween ορού Rabbit 1%).
- 6. Ξέπλυμα των τομών 3 φορές / 5 min κάθε φορά σε διάλυμα PBS 1x -Tween(0,05%) pH = 7
- Επώαση των τομών με διάλυμα δευτερογενούς αντισώματος για 30 mins (Alexa Fluor 488 (Invitrogen, CA, USA) - anti guinea pig ή anti rabbit αντίστοιχα (σε διάλυμα PBS-Tween ορού Guinea Pig 1% ή σε διάλυμα PBS-Tween ορού Rabbit 1% αντίστοιχα) σε αραίωση 1:500.
- 8. Ξέπλυμα των τομών 3 φορές / 5 min κάθε φορά σε διάλυμα PBS 1x -Tween(0,05%) pH = 7
- Οι τομές στα πλακίδια καλύπτονται με το μέσο Mowiol (Sigma Aldrich-80 μl / πλακίδιο) και τοποθετείται επ αυτών καλυπτρίδα.

Τα πλακίδια φυλασσόταν στην θερμοκρασία των 4° C, προστατευμένα από το φως μέχρι να επισκοπηθούν με συμβατικό μικροσκόπιο φθορισμού (Nikon Eclipse E800 [Nikon, Japan] το οποίο ήταν εξοπλισμένο με ψηφιακή κάμερα (Progres CF [Jenoptik, Germany]).

<u>Ανοσο-ιστοχημεία σε αποπαραφινωμένες τομές του νεφρικού παρεγχύματος των</u> διαγονιδιακών ποντικών οι οποίες επωάστηκαν με πρωτογενές αντίσωμα έναντι του WT-1.

1. Ξέπλυμα των τομών 3 φορές / 5 min κάθε φορά σε διάλυμα PBS 1x -Tween(0,05%) pH = 7

- 2. Επώαση των τομών με διάλυμα Triton X 100 0,1% v/v PBS 1x για 10 mins
- 3. Ξέπλυμα των τομών 3 φορές / 5 min κάθε φορά σε διάλυμα PBS 1x -Tween(0,05%) pH = 7
- Επώαση των τομών με διάλυμα ορού Goat 5% (Jackson ImmunoResearch, UK) - PBS – Tween για 60 mins
- 5. Επώαση των τομών με διάλυμα πρωτογενούς αντισώματος για 12 hrs
 - a. Anti-WT1 (rabbit anti mouse/Abcam UK) σε αραίωση 1: 200 (σε διάλυμα PBS-Tween ορού Goat 1%).
- 6. Ξέπλυμα των τομών 3 φορές / 5 min κάθε φορά σε διάλυμα PBS 1x -Tween(0,05%) pH = 7
- Επώαση ττων τομών με διάλυμα δευτερογενούς αντισώματος (Goat anti-Rabbit-HRP/Millipore 1:800 σε διάλυμα ορού Goat 5% - PBS – Tween) για 45 mins.
- 8. Ξέπλυμα των τομών 3 φορές / 5 min κάθε φορά σε διάλυμα PBS 1x -Tween(0,05%) pH = 7
- Επεξεργασία των τομών με NovaRed kit (VectorLab, USA) ώστε να γίνει η αντίδραση περοξιδάσης και να αποκτήσουν οι πυρήνες των ποδοκυττάρων βαθιά κόκκινη απόχρωση.
- 10. Εκτέλεση χρώσης αιματοξυλίνης για 5 λεπτά (χρώση των πυρήνων).

Σταδιακή αφυδάτωση των τομών και εμπέδιση σε ρητίνη. Φύλαξη μακριά από το ηλιακό φως μέχρι την επισκόπηση των τομών. Η επισκόπηση των τομών έγινε με συμβατικό οπτικό μικροσκόπιο (Nikon Eclipse E800 [Nikon, Japan] το οποίο ήταν εξοπλισμένο με ψηφιακή κάμερα (Progres CF [Jenoptik, Germany]).

Πίνακας 11: Αντισώματα τα οποία χρησιμοποιήθηκαν κατά την μελέτη με τεχνικές άνοσοϊστοχημείας/ανοσοφθορισμού του νεφρικού παρεγχύματος διαγονιδιακών ζώων.

Πρωτογενές	Έιδος	Μόριο	Αραίωση	Πάροχος
Αντίσωμα	Παραγωγής	Στόχος	(PBS-	
			Tween20	
			0.05%)	
Anti-hTTR	Rabbit	Human TTR	1:100	DAKO, Denmark
Anti-NPHS1	Guinea Pig	NPHS1	1:200	Progen, GmbH,
		intracellular		Germany
		domain.		
Anti-a-casp3	Rabbit	Active	1:100	Abcam, PLC, UK
		caspase-3		
Anti-NPHS2	Rabbit	Podocin	1:100	Abcam, PLC, UK
Anti-Bax	Rabbit	Bax	1:100	Abcam, PLC, UK
Anti-Bcl2	Rabbit	Bcl2	1:100	Abcam, PLC, UK
Anti-WT1	Rabbit	WT1	1:200	Abcam, PLC, UK
Anti-SAA	Goat	SAA	1:100	Santa-Cruz, USA
Anti-SAP	Rabbit	SAP	1:200	Abcam, PLC, UK
Δευτερογενές	Είδος	Μόριο	Αραίωση	Πάροχος.
Αντίσωμα	Παραγωγής	Στόχος	(σε PBS-	
			Tween20	
			0.05%)	
Anti-guinea	Goat	Anti-NPHS1	1:700	Jackson
pig IgG				ImmunoResearch,
(H+L)-				UK
Dylight 649				
Fab fragment	Donkey	Anti-hTTR	1:700	Jackson
goat anti-	-	Anti-a-casp3		ImmunoResearch,
rabbit IgG		-		UK
(H+L)-				
Dylight 488				
Anti-Rabbit	Goat	Podocin	1:1000,	Molecular
IgG (H+L)-			1:700	Probes,
Alexa				Invitrogen
Fluor488				
Anti-Goat	Donkey	Anti-SAA	1:700	Jackson
IgG (H+L) –		Anti-SAP		ImmunoResearch,
Dylight 549				UK
Anti-Rabbit	Goat	Anti-hTTR,	1:800	Millipore
IgG (H+L)-		Anti-WT-1		-
HRP				

Αξίζει να σημειωθεί ότι για τις μελέτες του ανοσοφθορισμού διπλής σήμανσης οι παραπάνω διαδικασίες προσαρμόστηκαν ώστε στο βήμα πρόσθεσης του πρωτογενούς αντισώματος γινόταν η προσθήκη και 2^{ου} πρωτογενούς αντισώματος. Αντίστοιχα στο

βήμα πρόσθεσης του δευτερογενούς αντισώματος γινόταν η προσθήκη και δεύτερου δευτερογενούς αντισώματος.

Όλες οι μελέτες ανοσοφθορισμού συνοδευόταν από τον έλεγχο παρουσίας εναποθέσεων IgG, στα σπειράματα. Στα παρόντα διαγονιδιακά μοντέλα δεν παρατηρήθηκε τέτοιο φαινόμενο. Δείγματα αρνητικού ελέγχου ελεγχόνταν με την απαλοιφή του πρωτογενούς αντισώματος. Η ειδικότητα των αντισωμάτων έγινε με την χρήση WB.

<u>x) Ηλεκτρονική μικροσκοπία διέλευσης (TEM) σε νεφρικό παρέγχυμα</u> διαγονιδιακών ζώων.

Μονιμοποιημένα δείγματα του νεφρικού παρεγχύματος των διαγονιδιακών ζώων, τα οποία προοριζόταν για μελέτες ηλεκτρονικής μικροσκοπίας διέλευσης επεξεργάστηκαν με τον παρακάτω τρόπο:

- Τα δείγματα μονιμοποιήθηκαν εκ νέου με διάλυμα 1% osmium tetroxide για 1 hr
- 2. Αφυδατώθηκαν με επώαση τους σε κλιμακούμενη συγκέντρωση αιθανόλης.
- 3. Επωάστηκαν σε 100% διάλυμα ακετόνης.
- 4. Εγκλίστηκαν σε ρητίνη Epon 812.
- 5. Τομές πάχους 40-50 nm επωάστηκαν με χρώση uranyl-acetate και lead-citrate.
- Οι τομές εξετάστηκαν σε ηλεκτρονικά μικροσκόπια διέλευσης
 (JEM2100/JEM 100 CX-II; JEOL Inc., Tokyo Japan).
- Ψηφιακές μικροφωτογραφίες ελήφθησαν με την χρήση ψηφιακής κάμερας
 ES1000W Erlangshen CCD Camera και αναλύθηκαν με την χρήση του λογισμικού DigitalMicrograph software (Gatan GmbH, Munchen, Germany).

Για την μέτρηση του πάχους της βασικής μεμβράνης και των ποδοκυτταρικών ποδικών εκβλαστήσεων (FPW), η μέτρηση έγινε σε όλο το μήκος όλων των υπό

μελέτη ανοιχτών σπειραματικών αγκυλών (LL, loop length). Το FPW υπολογίστηκε με την χρήση του τύπου FPW= ($\pi/4$ X LL) / FPN. Όπου FPN είναι ο αριθμός των ποδικών εκβλαστήσεων. Ο παράγοντας $\pi/4$ διορθώνει την τυχαία διακύμανση της γωνίας κοπής σχετικά με τον επιμήκη άξονα των ποδοκυττάρων. Για το πάχος της GBM χρησιμοποιήθηκε ο τύπος $8/3\pi$ x 10^6 /M x l_h όπου l_h είναι ο αρμονικός μέσος του πάχους της βασικής μεμβράνης^{242,243}.

<u>xi) Ανοσο-ηλεκτρονική μικροσκοπία διέλευσης (TEM) σε νεφρικό παρέγχυμα</u> διαγονιδιακών ζώων.

Μονιμοποιημένα δείγματα νεφρικού παρεγχύματος διαγονιδιακών ζώων, τα οποία προοριζόταν για μελέτες άνοσο-ηλεκτρονικής μικροσκοπίας διέλευσης επεξεργάστηκαν με τον παρακάτω τρόπο:

- 1. Δύο ξεπλύματα με διάλυμα PBS, 20-30min/ξέπλυμα, Θ=4°
- Τα επόμενα βήματα πραγματοποιήθηκαν στο σύστημα EM-AFS1 (Leica, Germany)
- 3. Αφυδάτωση με διάλυμα 30% EtOH, για 30min, Θ=0°
- 4. Αφυδάτωση με διάλυμα 50% EtOH, για 30min, Θ =-10°
- 5. Αφυδάτωση με διάλυμα 70% EtOH, για 30min, Θ =-25°
- 6. Αφυδάτωση με διάλυμα 100% EtOH, για 30min, Θ =-40°
- 7. Αφυδάτωση με διάλυμα 100% EtOH, για 30min, Θ =-50°
- Διήθηση με διάλυμα ρητίνης Formvar (Tousimis, MD, USA) 1/4 + 3/4 100%
 διάλυμα EtOH, για 60min, Θ=-50°
- Διήθηση με διάλυμα ρητίνης Formvar 1/2 resin + 1/2 διάλυμα EtOH, για
 60min, Θ=-50°
- 10. Διήθηση με διάλυμα ρητίνης Formvar 3/4 resin + 1/4 διάλυμα EtOH, για
 60min, Θ=-50°

- 11. Διήθηση με διάλυμα ρητίνης Formvar 100%, για 60min, Θ =-50°
- 12. Διήθηση με διάλυμα ρητίνης Formvar 100%, για 18 hrs, Θ =-50°
- 13. Διήθηση με διάλυμα ρητίνης Formvar 100%, για 60min, Θ =-50°
- 14. Δημιουργία block ρητίνης.
- 15. Πολυμερισμός ύπο UV για 48h, Θ =-50°
- Τομές πάχους 40-50 nm επωάστηκαν με διάλυμα 5% ορού Goat PBS pH=7,4
 για 30min, σε θερμοκρασία δωματίου.
- 17. Οι τομές επωάστηκαν με διάλυμα πρωτογενούς αντισώματος έναντι της ανθρώπιου τρανσθυρετίνης σε αραίωση 1:100 (rabbit anti human, DAKO) για
 18 hrs σε θερμοκρασία 4° C.
- Τέσσερα ξεπλύματα με διάλυμα PBS, 20min/ξέπλυμα, σε θερμοκρασία δωματίου, με ανάδευση
- 19. Οι τομές επωάστηκαν με διάλυμα δευτερογενούς αντισώματος σημασμένο με σωματίδια χρυσού διαμέτρου 10nm (Goat anti Rabbit, Aurion) σε αραίωση
 1:100 για 60min, σε θερμοκρασία δωματίου, με ανάδευση
- Τέσσερα ξεπλύματα με διάλυμα PBS, 20min/ξέπλυμα, σε θερμοκρασία δωματίου, με ανάδευση
- 21. Δύο ξεπλύματα με διάλυμα PBS, 20min/ξέπλυμα, σε θερμοκρασία δωματίου, με ανάδευση
- Χρώση με uranyl acetate 7% σε Ultra pure H₂O,για 5min, σε θερμοκρασία δωματίου.
- 23. Οι τομές εξετάστηκαν σε ηλεκτρονικά μικροσκόπια διέλευσης(JEM2100/JEM 100 CX-II; JEOL Inc., Tokyo Japan).

24. Ψηφιακές μικροφωτογραφίες ελήφθησαν με την χρήση ψηφιακής κάμερας ES1000W Erlangshen CCD Camera και αναλύθηκαν με την χρήση του λογισμικού DigitalMicrograph software (Gatan GmbH, Munchen, Germany).

Χρησιμοποιήθηκε ως δείγμα αρνητικού ελέγχου η απαλοιφή από την διαδικασία του πρωτογενούς αντισώματος σε διαγονιδιακά για την TTRV30M ποντίκια. Ως δείγμα θετικού ελέγχου χρησιμοποιήθηκε η προσθήκη του πρωτογενούς αντισώματος σε μη διαγονιδιακά ποντίκια ελέγχου.

<u>xii).Προσδιορισμός της WB ολικής πρωτεΐνης στο νεφρικό ιστό διαγονιδιακών</u> <u>ζώων.</u>

Για το προσδιορισμό της WB χρησιμοποιήθηκαν 100 μg ολικής πρωτεΐνης από το διάλυμα λύσης το οποίο περιγράφηκε στο τμήμα 2 vi. Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης πρωτεΐνης του διαλύματος λύσης, το οποίο προέκυπτε από την επεξεργασία κάθε δείγματος νεφρού έγινε με την μέθοδο Bradford²⁴⁴. 100 μg ολικής πρωτεΐνης αποδιατάσσοταν με διάλυμα SDS και β-μερκαπτοαιθανόλης/loading buffer (Sigma) αναλογία όγκων 3:1., ακολουθούσε επώαση του δείγματος της ολικής πρωτεΐνης στους 100° C για 5 λεπτά. Ακολούθως εφαρμοζόταν ηλεκτροφόρηση πρωτεΐνων κατά Western.

α) Παρασκευή γέλης πολυακρυλαμίδης 7,5% (10 ml) - γέλη διαχωρισμού πρωτεϊνών ανάλογα με το μοριακό τους βάρος (Resolving gel).

Προσθήκη υλικών (Sigma) με την σειρά αναγραφής. Ανάδευση διαλύματος μετά από κάθε βήμα.

- 1. 2,5 ml 30 % (29 : 1) acrylamide (7,5 %)
- 2. 2,5 ml 1,5 M Tris Cl pH = 8,8 (0,375 M)
- 3. 4,8 ml dd H₂O
- 4. 100 µl 10 % SDS (0,1 %)

- 5. 100 µl 10 % APS (0,1 %)
- 6. 10 μl TEMED (0,01 %)

Με το πέρας της παρασκευής του διαλύματος, ακολουθεί έγχυση του διαλύματος σε μήτρα της συσκευής ηλεκτροφόρησης (Biorad).

<u>β) Παρασκευή γέλης πολυακρυλαμίδης 5% (6 ml) - γέλη ισοστάθμισης πρωτεϊνών</u> (Stacking gel).

Προσθήκη υλικών με την σειρά αναγραφής. Ανάδευση διαλύματος μετά από κάθε βήμα.

- 1. 1 ml 30 % Acrylamide (5 %)
- 2. 0,76 ml 1 M Tris HCl pH = 6,8 (0,126 M)
- 3. 60 µl 10 % SDS (0,1 %)
- 4. $4,2 \text{ ml } ddH_2O$
- 5. 60 μl 10 % APS (0, 1 %)
- 6. 6 μl TEMED (0,01 %)

Με το πέρας της παρασκευής του διαλύματος, ακολουθεί έγχυση του διαλύματος σε μήτρα της συσκευής ηλεκτροφόρησης επί της γέλης Resolving. Τοποθέτηση συσκευής δίκην «χτένας» ώστε να δημιουργηθούν θέσεις έγχυσης του διαλύματος ολικής πρωτεΐνης.

γ) Παρασκευή διαλύματος ηλεκτροφόρησης (1 lt).

Προσθήκη υλικών (Sigma) σε ddH2O υπό ανάδευση με την παρακάτω σειρά.

18,8 gr Glycine (250 mM)

3 gr Tris – Base (25 mM)

10 ml SDS (0,1 %)

δ) Παρασκευή διαλύματος μεταφοράς (1 lt).

Προσθήκη υλικών (Sigma) σε ddH_2O υπό ανάδευση με την παρακάτω σειρά.

192 mM Glycine

25 mM Tris Base

20 % Methanol

ε) Προσθήκη δειγμάτων πρωτεΐνης στην γέλη ακρυλαμίδης και ηλεκτροφόρηση.

Γίνεται εμβύθιση της γέλης ακρυλαμίδης στο διάλυμα ηλεκτροφόρησης. Ακολουθεί έγχυση στις κατάλληλες θέσεις της γέλης ακρυλαμίδης των δειγμάτων πρωτεΐνης καθώς και πρωτεΐνικού δείκτη (10 - 260 KDa- Thermo Scientific). Ακολουθεί ηλεκτροφόρηση σε τάση 100V σε θερμοκρασία 4° C για 1 ώρα.

<u>() Υγρή μεταφορά δειγμάτων πρωτεΐνης σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης.</u>

Γίνεται μεταφορά πρωτεϊνών από την γέλη ακρυλαμίδης 7,5% σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (Whatman, Kent USA) για 1 ώρα σε θερμοκρασία 4° C σε τάση 120V. Τόσο η μεταφορά όσο και η ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών έγιναν με συσκευή ηλεκτροφόρησης και μεταφοράς Biorad – Mini Protean. Κατόπιν της μεταφοράς των πρωτεϊνών στην μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, γίνεται φύλαξη της μεμβράνης στους 4° C μέχρι περαιτέρω επεξεργασία.

<u>η) WB σε μεμβράνες νιτροκυτταρίνης για τις πρωτεΐνες νεφρίνης, ποδοσίνης και</u> ακτίνης.

Ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία όσον αφορά την ανίχνευση μορίων νεφρίνης.

- Επώαση της μεμβράνης νιτροκυτταρίνης με διάλυμα blocking (TBS-Tween20 0,05% – 5 % LFM) για 60 min υπό ανάδευση.
- Δημιουργία διαλύματος του πρωτογενούς αντισώματος τηςνεφρίνης (5
 % Low Fat Milk/LFM TBS –T 10 ml. Προσθήκη σε 1 ml του προηγούμενου διαλύματος πρωτογενές αντίσωμα νεφρίνης [guinea pig anti mouse, Progen] ,σε αραίωση 1: 500.

- Επώαση της μεμβράνης της νιτροκυτταρίνης με διάλυμα πρωτογενούς αντισώματος νεφρίνης για 18 hrs στους 4° C υπό ανάδευση.
- 4. 3 ξεπλύματα της μεμβράνης της νιτροκυτταρίνης σε διάλυμα TBS Τ
 0,05% για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Επώαση των μεμβρανών νιτροκυτταρίνης σε διάλυμα LFM 5 % & TBS-T 1 x & 1:5000 HRP anti-guinea pig για 60 min σε θερμοκρασία δωματίου.
- 3 ξεπλύματα της μεμβράνης νιτροκυτταρίνης σε διάλυμα TBS Τ
 0,05% για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

Ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία όσον αφορά την ανίχνευση των μορίων ποδοσίνης.

- Επώαση της μεμβράνης νιτροκυτταρίνης με διάλυμα blocking (TBS-Tween20 0,05% – 5 % LFM) για 60 min υπό ανάδευση.
- Δημιουργία του διαλύματος του πρωτογενούς αντισώματος της ποδοσίνης (5 % Low Fat Milk/LFM – TBS – T 10 ml. Προσθήκη σε 1 ml του προηγούμενου διαλύματος πρωτογενές αντίσωμα ποδοσίνης [rabbit anti mouse, Abcam], σε αραίωση 1: 500.
- Επώαση της μεμβράνης νιτροκυτταρίνης με διάλυμα πρωτογενούς αντισώματος νεφρίνης για 18 hrs στους 4° C υπό ανάδευση.
- 3 ξεπλύματα της μεμβράνης νιτροκυτταρίνης σε διάλυμα TBS Τ 0,05% για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Επώαση των μεμβρανών νιτροκυτταρίνης σε διάλυμα LFM 5 % & TBS-T 1 x & 1:3000 HRP Goat anti-rabbit (Jackson ImmunoResearch) για 60 min σε θερμοκρασία δωματίου.

3 ξεπλύματα της μεμβράνης νιτροκυτταρίνης σε διάλυμα TBS – Τ
 0,05% για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

Ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία όσον αφορά την ανίχνευση μορίων ακτίνης.

- Επώαση της μεμβράνης νιτροκυτταρίνης με διάλυμα blocking (TBS-Tween20 0,05% – 5 % LFM) για 60 min υπό ανάδευση.
- Δημιουργία του διαλύματος πρωτογενούς αντισώματος ακτίνης (5 % Low Fat Milk/LFM – TBS –Τ 10 ml. Προσθήκη σε 1 ml του προηγούμενου διαλύματος πρωτογενές αντίσωμα ακτίνης [rabbit anti mouse, Abcam] ,σε αραίωση 1: 500.
- Επώαση της μεμβράνης νιτροκυτταρίνης με διάλυμα πρωτογενούς αντισώματος νεφρίνης για 18 hrs στους 4° C υπό ανάδευση.
- 3 ξεπλύματα της μεμβράνης νιτροκυτταρίνης σε διάλυμα TBS Τ 0,05% για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Επώαση των μεμβρανών νιτροκυτταρίνης σε διάλυμα LFM 5 % & TBS-T 1 x & 1:5000 HRP Goat anti-rabbit (Jackson ImmunoResearch) για 60 min σε θερμοκρασία δωματίου.
- 3 ξεπλύματα της μεμβράνης νιτροκυτταρίνης σε διάλυμα TBS Τ
 0,05% για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

Με το πέρας της διαδικασίας σήμανσης, η ανίχνευση των υπό μελέτη πρωτεϊνών έγινε με το σύστημα ανίχνευσης χημειοφωταύγειας Lumisensor (Genescript, USA), και ακτινογραφικά φιλμ Fuji (Kisker, Germany). Η ανάλυση των εικόνων έγινε με την χρήση του λογισμικού Image J (Bethesda, NIH).

<u>xiii) RT-PCR στο νεφρικό παρέγχυμα των διαγονιδιακών ζώων όσον αφορά το</u> επίπεδο έκφρασης του γονιδίου της νεφρίνης, της ποδοσίνης, του WT-1, της τρανσθυρετίνης (TTRVal30Met) και της GAPDH. Επειδή τα γονίδια ενδιαφέροντος εκφράζονται μόνο στα ποδοκύτταρα (εξαιρουμένου του αλληλίου της τρανσθυρετίνης), δεν χρειάστηκε να γίνει απομόνωση σπειραμάτων. Με το λογισμικό Primer Blast (NCBI, NIH) έγινε σχεδιασμός και κατασκευή primers (FORTH, IMBB) ειδικών για το cDNA των γονιδίων ενδιαφέροντος. Οι αλληλουχίες των εκκινητών απεικονίζονται στον παρακάτω πίνακα :

Γονίδιο Ενδιαφέροντος	Αλληλουχία Primer		
	Forward		
	Reverse		
Νεφρίνη (NPHS1)	TGGCTTAAGGATTCGCGCCC		
	TTGTCCGGCGGGCCTATGAT		
Ποδοσίνη (NPHS2)	GCCAAAGGTCCTGGCCTGTTC		
	GCGGTAGTAGCAGACAGCGTCT		
hTTRVal30Met	GCATGCAGAGGTGGTATTCACAGC		
	TCCCATCCCTCGTCCTTCAGGT		
WT1	TGTCGCTACGGACCCTTCGG		
	CCGTGCTGTATCCTTGGTTGCG		
GAPDH	GAGACGGCCGCATCTTCTTGT		
	GGCCAAATCCGTTCACACCGA		

Πίνακας 12: Αλληλουχίες εκκινητών γονιδίων ενδιαφέροντος.

α) Απομόνωση mRNA και παραγωγή cDNA από ολικό νεφρικό παρέγχυμα.

Η απομόνωση mRNA έγινε από νεφρικό ιστό (100 mg) ο οποίος είχε αποθηκευθεί σε TRIZOL (Invitrogen) κατά την διάρκεια της διαδικασίας θυσίας ζώου σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η παραγωγή cDNA από ολικό νεφρικό παρέγχυμα έγινε με το σύστημα Superscript II (Invitrogen) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

β) Διενέργεια RT-real time PCR.

Η διενέργεια RT-real time PCR έγινε στο σύστημα ABI-PRISM 7000 (Applied Biosystems, USA). Όλα τα δείγματα για μια αντίδραση RT-real time PCR εξετάστηκαν εις διπλούν. Κάθε πείραμα εκτελέσθηκε εις διπλούν. Το επίπεδο έκφρασης του γονιδίου της GAPDH χρησιμοποιήθηκε για την κανονικοποίηση των επιπέδων έκφρασης των υπολοίπων υπό μελέτη γονιδίων. Ο υπολογισμός των επιπέδων έκφρασης έγινε με την χρήση efficiency models²⁴⁵. Στον παρακάτω πίνακα απεικονίζονται οι αναλογίες των συστατικών οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν για την διενέργεια της αντίδρασης.

Πίνακας 13: Συστατικά μίγματος αντίδρασης RT Συστατικά Αντίδρασης ΚΑΡΑ SYBP FAST αPCP Master Mix (2x) ABI) – Real time PCR. Όγκος 1 Αντίδρασης(μΙ)	
prism (KAPA Biosystems, USA)		10
WT1 F (10 µM) -> 300 nM (FORTH, IMBB)		0.6
WT1 R (10 µM) -> 300 nM (FORTH, IMBB)		0,6
WFI		6,8
Sample		2
KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix (2x) ABI		
prism (KAPA Biosystems, USA)		10
TTRV30M F (10 μM) -> 300 nM (FORTH, IMBB)		0,6
TTRV30M R (10 μM) -> 300 nM (FORTH, IMBB)		0,6
WFI		6,8
Sample		2
KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix (2x) ABI		
prism		10
Nephrin F (10 μM) -> 300 nM		0,6
Nephrin R (10 μM) -> 300 nM		0,6
WFI		6,8
Sample		2
KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix (2x) ABI		
prism		10
Podocin F (10 µM) -> 300 nM		0,6
Podocin R (10 μM) -> 300 nM		0,6
WFI		6,8
Sample		2
KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix (2x) ABI		10
prism		
---------------------------	-----	
GAPDH F (10 μM) -> 300 nM	0,6	
GAPDH R (10 μM) -> 300 nM	0,6	
WFI	6,8	
Sample	2	

<u>xiv) Στατιστικές μέθοδοι επεξεργασίας αποτελεσμάτων, και επεξεργασία</u>

<u>εικόνας.</u>

Για την στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα SPSS 19 (IBM, USA). Τα δεδομένα εξετάστηκαν για την κανονικότητα τους. Σε περίπτωση μη κανονικής κατανομής των δεδομένων εφαρμόστηκε λογαριθμικός μετασχηματισμός τους. Για πολλαπλές συγκρίσεις δεδομένων χρησιμοποιήθηκε η δοκιμασία One way ANOVA με διόρθωση Bonferroni. Η δοκιμασία t-test χρησιμοποιήθηκε για ανεξάρτητα δείγματα. Εάν μετά τον λογαριθμικό μετασχηματισμό τους τα δεδομένα δεν είχαν κανονική κατανομή χρησιμοποιήθηκαν οι δοκιμασίες Kruskal-Wallis για ανεξάρτητα δείγματα, και Mann-Whitney U για ζεύγη ανεξάρτητων δειγμάτων. Η δοκιμασία X² χρησιμοποιήθηκε για την εκτίμηση της επίδρασης της εναπόθεσης TTRV30M στα επίπεδα πρωτεΐνης νεφρίνης και ποδοσίνης. Επιπλέον η δοκιμασία X² χρησιμοποιήθηκε για την εκτίμηση της πυκνότητας σύνδεσης TTRV30M μορίων στα διαφορετικά συστατικά κάθε σπειραματικής αγκύλης. Για την ανάλυση συσχέτισης χρησιμοποιήθηκε η δοκιμασία Pearson's R.

Όσον αφορά την ανάλυση εικόνας για τις μελέτες ανοσοφθορισμού χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω λογισμικά επεξεργασίας έντασης σήματος LCS Lite (Leica Microsystems), Image J (NIH), Cell Profiler (Broad Institute). Για την ανάλυση συσχέτισης στις μελέτες ανοσοφθορισμού διπλής σήμανσης χρησιμοποιήθηκαν οι σταθερές Mandel (M1 και M2)²⁴⁶. Η εκτίμηση της έκτασης της μεσαγγείου ουσίας έγινε με την χρήση του λογισμικού ImageScope (Aperio, USA).

145

Το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας τέθηκε στο 0.05. Όλα τα δείγματα επισκοπήθηκαν από ανεξάρτητους παρατηρητές οι οποίοι δεν είχαν γνώση των ομάδων μελέτης.

<u>Αποτελέσματα και συζήτηση.</u>

<u>i) Ημερήσια απέκκριση λευκωματίνης και μέτρηση της αρτηριακής πίεσης στα</u> διαγονιδιακά ποντίκια φέροντα το αλλήλιο hTTRV30M.

Τα ποντίκια στελέχους C57Bl/6 τα οποία φέρουν το αλλήλιο TTRV30M έχουν μεγαλύτερη απέκκριση λευκωματίνης/24ώρες σε σχέση με τα ποντίκια ελέγχου. Επιπλέον τα ποντίκια στελέχους C57Bl/6 τα οποία φέρουν το αλλήλιο TTRV30M φέρονται να αυξάνουν το επίπεδο απέκκρισης λευκωματίνης/24ώρες καθώς αυξάνεται η ηλικίαςτους. Η διάρκεια ζωής των ποντικιών στελέχους C57Bl/6 είναι περίπου 24 μήνες. Η νεφρική προσβολή στην FAP στους ανθρώπους αρχίζει περίπου στην ηλικία των 40 ετών και κορυφώνεται στα 50 έτη. Η λευκωματινουρία είναι δείκτης νεφρικής προσβολής στην FAP¹⁴⁹.

Τα ποντίκια τα οποία φέρουν το αλλήλιο TTRV30M εμφανίζουν αύξηση της πρωτεϊνουρίας όταν βρίσκονται στο δεύτερο μισό της ενήλικου ζωής τους, γεγονός το οποίο συμβαδίζει με τις τρέχουσες παρατηρήσεις στους ασθενείς με FAP. Στην Εικόνα 1 γίνεται απεικόνιση αυτής της ομάδας παρατηρήσεων.

Participation of the second se	Log UAE 24hrs / BW >=0.72 - <=2.33 >=-1,43 - <,072	Εικόνα 2.1: Log UAE 24 hrs/ BW: Λογαριθμικός μετασχηματισμός ημερήσιας απέκκρισης αλβουμίνης κανονικοποιημένη ανα γραμμάριο σωματικού βάρους. Age (months): Ηλικία σε μήνες Percentage: % ποσοστό ποντικών μεταξύ των διαφόρων ομάδων. Χρησιμοποίηθηκαν περίπου 100 TTRV30M C57Bl/6 ποντίκια και οι αντίστοιχοι μάρτυρες. Val30Met TTR gene Carrier Status: Παρουσία του αλληλίου TTRV30M ή όχι.
Val30Met TTR gen Carrier Status	io Ie	Status: Παρουσία του αλληλίου TTRV30M ή όχι. Pearson's X^2 test=4,422 p=0,035.

Η μέση αρτηριακή πίεση των διαγονιδιακών ποντικών 6.0 Kb –TTRV30M κυμαίνονταν μεταξύ 90-110 mmHg, χωρίς να παρουσιάσει διαφορές από την ομάδα ελέγχου ταυτισμένη σε φύλο και ηλικία.

ii) Επίπεδα τρανσθυρετίνης στον ορό των διαγονιδιακών ποντικιών με το αλλήλιο hTTRV30M.

Τα ποντίκια τα οποία έφεραν το αλλήλιο TTRV30M είχαν επίπεδα τρανσθυρετίνης ορού 160 μg/μl (C.I. 95% 10,31-184,41 μg/μl). Στο συγκεκριμένο σύστημα έκφρασης τα επίπεδα τρανσθυρετίνης ορού παραμένουν σταθερά καθόλη την διάρκεια ζωής του διαγονιδιακού ζώου¹⁷³(Προσωπική επικοινωνία με καθηγητή Ken Ichi Yamamura). Όταν έγινε σύγκριση μεταξύ διαγονιδιακών ποντικών οι οποίοι στεγαζόταν σε συνθήκες υψηλού φραγμού (TTRV30M-SPF) και διαγονιδιακών ποντικών οι οποίοι στεγαζόταν σε συνθήκες χαμηλού φραγμού (TTRV30M-non/SPF) τα επίπεδα τρανσθυρετίνης ορού στα TTRV30M-non/SPF ζώα ήταν υψηλότερα αν και στατιστικά μη σημαντικά (TTRV30M-non/SPF 49,17 μg/μl [C.I. 95% 10,31-108,66μg/μl] TTRV30M-SPF 110,68 μg/μl [C.I. 95% 36,95-184,41μg/μl], p=0,109). Το γεγονός αυτό ίσως απεικονίζει τάση χαμηλότερης έκφρασης του γονιδίου σε συνθήκες SPF, το οποίο οφείλει να αποδωθεί σε περιβαλλοντική επίδραση στην έκφραση του ανθρώπινου γονιδίου της τρανσθυρετίνης εφόσον τα ζώα ήταν προϊόντατης ίδιας γέννας. Είναι γεγονός ότι χαμηλού επιπέδου έκφραση του γονιδίου τρανσθυρετίνης οδηγεί σε ελαττωμένη εναπόθεση τρανσθυρετίνης¹³⁸, και διαγονιδιακά ποντίκια τα οποία στεγάζονται σε SPF συνθήκες παρουσιάζουν μειωμένη εναπόθεση τρανσθυρετίνης στους ιστούς στόχους και δεν αναπτύσσουν αμυλοείδωση²⁴⁷.

iii) Έκταση μεσαγγείου στα στελέχη των υπό μελέτη. διαγονιδιακών ποντικών

Τα διαγονιδιακά ποντίκια τα οποία έφεραν το αλλήλιο TTRV30M (M30, TTRV30M [SPF,non/SPF] Hsf1-M30) (Ενδεικτικά Εικόνα 2.2A) είχαν μεγαλύτερη έκταση μεσαγγείου ουσίας (38%, p<0,001) όταν συγκρινόταν με τα αντίστοιχα μη διαγονιδιακά ποντίκια ελέγχου. Η έκταση της μεσαγγείου ουσίας ήταν ελαττωμένη όταν τα TTRV30M τοποθετούνταν σε συνθήκες υψηλού φραγμού (TTRV30M-SPF, Εικόνα 2.2C). Ωστόσο σε σύγκριση με μη διαγονιδιακά ποντίκια ελέγχου σε SPF και non/SPF συνθήκες παρέμενε αυξημένη (14%, p<0,001). Από αυτή την παρατήρηση εξάγεται το συμπέρασμα ότι οι συνθήκες στέγασης (οι οποίες κατ επέκταση απεικονίζουν την αλληλεπίδραση του οργανισμού με το περιβάλλον) επηρρεάζουν την έκταση της μεσαγγείου ουσίας στα TTRV30M ποντίκια. Αξίζει να σημειωθεί ότι τα TTRV30M-non/SPF ποντίκια εμφάνιζαν αύξηση του μεσαγγείου στην ηλικία των 6 μηνών και την διατηρούσαν καθόλη την διάρκεια της ζωής τους.



Είκονα 2.2? Εκταση μεσαγγείου ΤΤΚ V 30M SPF, non-SPF ποντικία Mean PAS staining intensity (95% C.I.): Μέση ένταση έκτασης μεσαγγείου ουσίας. SPF-NT: Μη διαγονιδιακά ποντίκια ελέγχου σε SPF συνθήκες nonSPF-NT: Μη διαγονιδιακά ποντίκια ελέγχου σε non SPF συνθήκες. p<0,001

Από την εξέταση των σπειραμάτων των διαγονιδιακών ζώων στελεχών TTR KO, M30, Hsf1 KO, Hsf1 M30 εξάγεται το συμπέρασμα ότι το φυσιολογικό αλλήλιο της τρανσθυρετίνης TTRV30M δρά προστατευτικά όσον αφορά την παρουσία μεσαγγειακής υπερπλασίας με την πάροδο της ηλικίας (Εικόνα 2.3). Ο όρος μεσαγγειακή υπερπλασία διαφέρει από τον όρο αύξηση της μεσαγγείου ουσίας . Η αύξηση της μεσαγγείου ουσίας αναφέρεται στην αύξηση του εμβαδού του μεσαγγείου , ενώ η μεσαγγείακή υπερπλασία αναφέρεται στην αύξηση του αριθμού των μεσαγγειακών κυττάρων (>2 ή κατά άλλους >3 μεσαγγειακά κύτταρα / σπειραματική αγκύλη).



40x 40x Mesangial Hyperplasia estimated by renal pathologist in Hsf - M mice.



Εικόνα 2.3: Μεσαγγειακή Υπερπλασία σε ποντίκια Hsf1-M30 **Mesangial Hyperplasia Estimated by renal pathology in Hsf-M/Hsf-HM mice:** Συνολική εκτίμηση της μεσαγγειακής υπερπλασίας ανά ζώο (**Number of animals**) από τον επίκουρο καθηγητή Νεφροπαθολογοανατομίας Κώνσταντίνο Γιαννακάκη σε ποντίκια Hsf1-KO, και Hsf1-M30 σε ηλικίες <12 και ≥12 μηνών για κάθε ομάδα αντίστοιχα. **Pasm**: Χρώση αργύρου

Τα μεσαγγειακά κύτταρα αν και δεν ανήκουν στο σύστημα των μακροφάγων μονοπυρήνων παρουσιάζουν φαγοκυτταρικές ιδιότητες. Κάτω από την επίδραση της εναπόθεσης AL εμφανίζουν διάφορες λειτουργικές και φαινοτυπικές διαταραχές²⁴⁸. Επίσης σε πλήθος νοσολογικών οντοτήτων που προσβάλλουν το νεφρικό παρέγχυμα η μεσαγγειακή υπερπλασία αποτελεί χαρακτηριστικό γνώρισμα²⁴⁹. Ωστόστο αυτό το οποίο προκαλεί εντύπωση είναι ότι η προσθήκη του ανθρώπινου αλληλίου TTRV30M σε στέλεχος Hsf1-KO (δημιουργία στελέχους Hsf1-M30) λειτουργεί ανασταλτικά στην εμφάνιση μεσαγγειακής υπερπλασίας. Γεγονός για το οποίο θα γίνει προσπάθεια επεξήγησης παρακάτω.

iv) Εναποθέσεις τρανσθυρετίνης και παρουσία αμυλοειδούς στα στελέχη διαγονιδιακών ποντικών.

Στα στελέχη Hsf1-M30, M30, TTRV30M-SPF, TTRV30M-non/SPF άμορφες εναποθέσεις ανθρώπινης τρανσθυρετίνης εμφανίζονται στην ηλικία των 2-6 μηνών και εξής (Εικόνες 2.4, 2.5). Στο στέλεχος Hsf1-M30 οι αμυλοειδικές εναποθέσεις εμφανίζονται μετά την ηλικία των 18 μηνών(Εικόνα 2.6). Στα υπόλοιπα στελέχη δεν παρατηρήθηκαν εναποθέσεις αμυλοειδούς με την χρώση Congo Red. Είναι γνωστό ότι οι περιβαλλοντικές συνθήκες επηρρεάζουν την εναπόθεση τρανσθυρετίνης τόσο στα ζώα, όσο και στους ανθρώπους. Επιπλέον έχει δειχθεί ότι η απενεργοποίηση της απόκρισης στο στρες αποδιάταξης των πρωτεϊνών διαδραματίζει καίριο ρόλο στον σχηματισμό αμυλοειδούς από τρανσθυρετίνη. Ωστόσο θεωρείται πλέον εδραιωμένη γνώση, ότι η κυτταρική βλάβη λανβάνει χώρα όταν στον ιστό υπάρχουν οι προ-αμυλοειδικές μορφές μιας αμυλοειδογόνου πρωτεΐνης (εν προκειμένω της τρανσθυρετίνης). Το αμυλοειδές per se εμφανίζεται όταν πλέον η ιστική βλάβη είναι μη αναστρέψιμη. Εκτός των άλλων το αμυλοειδές αποτελεί θερμοδυναμικά σταθερό σχηματισμό, σε τέτοιο βαθμό ώστε να χρησιμοποιείται ως μήτρα καλλιέργειας κυττάρων²⁵⁰.



Εικόνα 2.4: Παρουσία εναποθέσεων τρανσθυρετίνης σε σπείραμα από στέλεχος M30.

Οι εναποθέσεις ανθρώπινης τρανσθυρετίνης (καφέ χρώμα) παρουσιάζουν κατανομή κατά μήκος των ΣΒΜ, στο μεσάγγειο, στα αγγεία, και στις σωληναριακές βασικές μεμβράνες. Στο ένθετο Α υπάρχει έντονη παρουσία τρανσθυρετίνης σε ποδοκύτταρα (άσπρα βέλη).

Ανοσοϊστοχημεία, μεγέθυνση 40x



Εικόνα 2.5: Παρουσία εναποθέσεων τρανσθυρετίνης σε σπειράματα από στελέχη TTRV30M-SPF, TTRV30M-non/SPF ηλικίας 15-17 μηνών. Οι εναποθέσεις ανθρώπινης τρανσθυρετίνης (πράσσινο χρώμα) παρουσιάζουν κατανομή κατά μήκος των ΣBM, και στο μεσάγγειο. Υπάρχει αυξημένη συσχέτιση [TTRV30M-SAP co-localization (Mean 95% C.I.)]ανθρώπινης τρανσθυρετίνης με ποντικίσιο SAP (κόκκινο χρώμα). SAP fluorescence intensity (Mean 95% C.I.): Ένταση φθορισμού SAP. SPF-NT: Μη διαγονιδιακά ποντίκια ελέγχου σε SPF συνθήκες nonSPF-NT: Μη διαγονιδιακά ποντίκια ελέγχου σε non SPF συνθήκες. C, F, I, L: εικόνες συνεντόπισης p<0,001.

Το αμυλοειδές P του ορού (SAP) αποτελεί επί του παρόντος το δείκτη παρουσίας αμυλοειδούς στον άνθρωπο. Το μόριο SAP αποτελεί τον καθολικό προσδέτη των ινιδίων αμυλοειδούς ανεξάτηρτητα από το είδος της πρόδρομης αμυλοειδικής πρωτεΐνης¹²⁸. Επιπρόσθετα έχει δειχθεί ότι η πρόσδεση του SAP στον Fc υποδοχέα νεφρικών κυττάρων προκαλεί την έκκριση II-10 με αποτέλεσμα την φαγοκυττάρωση καταστροφικών για τα κύτταρα εξωκυτταρίων ουσιών²⁵¹. Εναλακτικά το SAP αποτελεί συστατικό της ΣΒΜ και επομένως δεν αποκλείεται ένα ποσοστό συνεντόπισης να αποτελεί τυχαία συνύπαρξη με τις εναποθέσεις τρανσθυρετίνης²⁵². Η παρατήρηση ότι η ένταση φθορισμού για το SAP είναι αυξημένη σε non-SPF συνθήκες καθώς και ότι ο βαθμός συνεντόπισης είναι μεγαλύτερος, συνηγορούν με την παρουσία εναπόθεσης. Επιπλέον η κατανομή του SAP δεν περιορίζεται κατά μήκος της ΣΒΜ, αλλά παρουσιάζει επιπλέον και μεσαγγειακό πρότυπο κατανομής. Τέλος το ότι η παρουσία εναποθέσεων τρανσθυρετίνης συνδέεται με την παρουσία SAP στο σπείραμα ενδυναμώνεται από το γεγονός ότι τα μη διαγονιδιακά ποντίκια δεν παρουσίαζαν ενδοσπειραματική εναπόθεση SAP. Άρα ο συνδυασμός εναπόθεσης τρανσθυρετίνης και περιβαλλοντικής επίδρασης καθοδηγεί την εναπόθεση SAP. Αν και τα υπό εξέταση διαγονιδιακά ζώα σε SPF και σε non/SPF συνθήκες δεν παρουσίαζαν εναποθέσεις αμυλοειδούς εν τούτοις παρουσίαζαν αυξημένο βαθμό συσχέτισης SAP και TTRV30M. Η παρατήρηση αυτή ίσως είναι ενδεικτική της να συνδέεται και με ικανότητας του SAP πρό-αμυλοειδικές εναποθέσεις τρανσθυρετίνης πέραν των αμυλοειδούς. ώριμων μορίων Σε διαφορετικά διαγονιδιακά μοντέλα έχει δειχθεί ότι το SAP δεν προσδένεται σε προαμυλοειδικές εναποθέσεις τρανσθυρετίνης^{147,170}.



Εικόνα 2.5: Χρώση Congo Red σε νεφρικό παρέγχυμα από στελέχη TTRV30M-SPF, TTRV30M-non/SPF ηλικίας 15-17 μηνών.

Δεν παρατηρείται εναπόθεση αμυλοειδόυς στα υπό εξέταση ζώα.CR: Θετική χρώση CR: σε ανθρώπινο νεφρικό παρέγχυμα, CR*: Χρωσή CR υπό πολωμένο φως σε ανθρώπινο νεφρικό παρέγχυμα. Θετικό δείγμα ελέγχου. A: SPF χρώση CR, a: SPF χρώση CR υπό πολωμένο φως, B: non/SPF χρώση CR, b: non/SPF χρώση CR υπό πολωμένο φως, C: TTRV30M-non/SPF χρώση CR c: TTRV30M-non/SPF χρώση CR υπό πολωμένο φως D: TTRV30M- SPF χρώση CR d: TTRV30M- SPF χρώση CR υπό πολωμένο φως. Μεγέθυνση 20 x



Εικόνα 2.6: Χρώση Congo Red σε νεφρικό παρέγχυμα από στελέχη Hsf1-M30 ηλικίας 15-17 μηνών. Ενδοσπειραματικες εναποθέσεις τρανσθυρετίνης (βαθύ κόκκινο χρώμα), και παρουσία αμυλοειδούς (Congo Red- πολωμένο φως). Ανοσοϊστοχημεία, δείκτης μήκους 15 μm.

<u>ν) Διαφορετικές περιβαλλοντικές συνθήκες αυξάνουν την παρουσία εναποθέσεων</u>

<u>ΤΤRV30Μ στα ποδοκύτταρα στελεχών TTRV30M C57Bl/6.</u>

Στο ένθετο της εικόνας 2.4 απεικονίζονται προ-αμυλοειδικές εναποθέσεις ανθρώπινης τρανσθυρετίνης εντός των ποδοκυττάρων σε μελέτες ανοσοϊστοχημείας. Αυτή η ομάδα παρατηρήσεων οδήγησε στην ανάπτυξη της ερευνητικής υπόθεσης ότι τα ποδοκύτταρα ενδοκυτταρώνουν τρανσθυρετίνη. Επιπλέον η ποσότητα η οποία ενδοκυτταρώνεται ελλατώνεται όταν τα διαγονιδιακά ζώα μειώνουν την αλληλεπίδραση τους με το εξωτερικό περιβάλλον.

Αρχικά ένα ερώτημα το οποίο τέθηκε ήταν κατά πόσο το αλλήλιο TTRV30M, κατά την διαδικασία της μικροέγχυσης ενσωματώθηκε σε περιοχές του γονιδιώματος (λόγω μη στοχευμένου ανασυνδοιασμού) οι οποίες κατευθύνουν την ανάπτυξη των ποδοκυττάρων και κατά επέκταση η παρουσία μορίων TTRV30M εντός των ποδοκυττάρων αποτελεί προϊόν έκφρασης μιας τέτοιας αλληλουχίας. Αν ισχύει κάτι τέτοιο τότε η έκφραση του αλληλίου TTRV30M θα έπρεπε σε SPF συνθήκες να είναι στατιστικώς σημαντικά μικρότερη από την έκφραση του αλληλίου σε συνθήκες non-SPF. Επειδή έχει δειχθεί ότι η αλληλουχία που χρησιμοποιήθηκε για την κατασκευή του συγκεκριμένου διαγονιδιακού συστήματος (0,6 Kb-hTTRV30M) περιέχει τα

ρυθμιστικά στοιχεία της ορθότοπης έκφρασης του αλληλίου TTRV30M, η απόκκριση στις συνθήκες στέγασης είναι ιστικά ενιαία¹⁷³. Κατά την διενέργεια RT-PCR σε ολικό νεφρικό παρέγχυμα διαγονιδιακών ζώων στεγαζόμενα σε συνθήκες SPF και non-SPF, δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στο επίπεδο έκφρασης της αλληλίου τρανσθυρετίνης (Εικόνα 2.7). Επείδη ως δείκτης συνεντοπισμού εντός των ποδοκυττάρων χρησιμοποιήθηκε το ενδοκυττάριο τμήμα της νεφρίνης, εξετάστηκαν τα επίπεδα έκφρασης της νεφρίνης στο νεφρικό παρέγχυμα. Η εξέταση των επιπέδων έκφρασης της νεφρίνης δείχνει σε ποιό βαθμό η ενδογενής έκφραση του γονιδίου επηρρεάζει τα επίπεδα πρωτεΐνης και επομένως και την ένταση φθορισμού. Δεν βρέθηκε να υπάρχει διαφορά στο επίπεδο έκφρασης της νεφρίνης ανάλογα με τις συνθήκες στέγασης των ζώων (Εικόνα 2.8).



Levels of TTRV30M gene expression within the Kidney of 6.0Kb-hTTRV30M C57Bl/6

Εικόνα 2.7: Επίπεδο γονιδιακής έκφρασης του αλληλίου TTRV30M στο νεφρό (Levels of TTRV30M gene expression within the Kidney of 6.0Kb-hTTRV30M C57Bl/6 transgenics).

Έγινε κανονικοποίηση ως προς τα επίπεδα νεφρικής έκφρασης του γονιδίου της GAPDH (Mean hTTRmRNA gene expression levels normalized over GAPDH). Non-SPF/SPF age adjusted pooled: Αναφέρεται συνολικά στο επίπεδο έκφρασης του αλληλίου TTRV30M το οποίο είναι ανύπαρκτο στους μάρτυρες. Error Bars 95% CI (95% διαστήματος εμπιστοσύνης). Παρατηρούμενη διαφορά στην έκφραση παρατηρείται μόνο μεταξύ διαγονιδιακών ζώων (SPF-TTRV30M είτε non/SPF-TTRV30M) και μη διαγονιδιακών ζώων. p<0,05. Δεν παρατηρείται διαφορά στην έκφραση του αλληλίου της τρανσθυρετίνης σε διαφορετικές συνθήκες στέγασης. p> 0,05.

Τα παραπάνω δεδομένα δεν υποστηρίζουν ότι επηρεάζεται η γονιδιακή έκφραση της τρανσθυρετίνης ή της νεφρίνης από τις συνθήκες στέγασης.

Στην συνέχεια εκτελέστηκαν πειράματα συνεντόπισης με την χρήση αντισώματος το οποίο ανιγνεύει το ενδοκυττάριο τμήμα της νεφρίνης, και με την χρήση αντισώματος το οποίο ανιχνεύει την ανθρώπινη τρανσθυρετίνη (στην συγκεκριμένη περίπτωση το αλλήλιο TTRV30M), με την χρήση συνεστιακής μικροσκοπίας.



Εικόνα 2.7: Επίπεδο γονιδιακής έκφρασης του γονιδίου της νεφρίνης στο νεφρό (Nephrin gene expression levels within the Kidney of 6.0Kb-hTTRV30M C57Bl/6 mice).

Έγινε κανονικοποίηση ως προς τα επίπεδα νεφρικής έκφρασης του γονιδίου της GAPDH (Mean nephrin gene expression levels normalized over GAPDH). Non-SPF/SPF age adjusted pooled: Αναφέρεται στο επίπεδο έκφρασης του γονιδίου της νεφρίνης στους μάρτυρες. Error Bars 95% CI (95% διαστήματος εμπιστοσύνης). Δεν παρατηρείται διαφορά στην έκφραση του γονιδίου της νεφρίνης μεταξύ των διαφορετικών ομάδων. p>0,05.

Στα πειράματα αυτά αναδείχθηκε η αυξημένη συσχέτιση μεταξύ τρανσθυρετίνης και νεφρίνης στα διαγονιδιακά ζώα τα οποία στεγαζόταν σε non-SPF συνθήκες (συνθήκες όπου η αλληλεπίδραση με το περιβάλλον ήταν μέγιστη). Άρα σε non-SPF συνθήκες παρατηρείται ενδοκυττάρωση της τρανσθυρετίνης από τα ποδοκύτταρα και αυτή είναι αυξημένη κατά 20% σε σχέση με τις SPF συνθήκες (Εικόνα 2.8).



Εικόνα 2.8: Βαθμός συνεντόπισης και έντασης φθορισμού νεφρίνης και τρανσθυρετίνης.

Tα σπειράματα διαγονιδιακών ζώων (non/SPF-TTRV30M) τα οποία στεγαζόταν σε non-SPF συνθήκες είχαν αυξημένη ένταση φθορισμού νεφρίνης (μπλέ χρώμα) σε σχέση με τα σπειράματα διαγονιδιακών ζώων τα οποία στεγαζόταν σε SPF (SPF-TTRV30M) συνθήκες. Τα ζώα τα οποία δεν παρουσίαζαν εναποθέσεις τρανσθυρετίνης (μη διαγονιδιακά ζώα-SPF NT/non-SPF NT) είχαν μεγαλύτερη ένταση φθορισμού νεφρίνης (NPHS1 fluorescence intensity). Οι εναποθέσεις τρανσθυρετίνης (πράσσινο χρώμα) ήταν αυξημένες στα ζώα τα οποία στεγαζόταν σε non-SPF συνθήκες (TTRV30M fluorescence intensity). Ο βαθμός συνεντόπιση της νεφρίνης με την τρανσθυρετίνη (NPHS1 TTRV30M Co-localization) ήταν αυξημένος σε non-SPF συνθήκες (M1, M2, Pearson's Coefficient). Για όλες τις συγκρίσεις p<0,001.

A, B, C : Non SPF TTRV30M, D, E, F: non-SPF NT, G, H, I: SPF TTRV30M, J, K, L: SPF NT,

C, F, I, L : Συνεντόπιση νεφρίνης τρανσθυρετίνης.

Για την επιβεβαίωση της ύπαρξης τρανσθυρετίνης εντός των ποδοκυττάρων διενεργήθηκαν μελέτες ανοσο-ηλεκτρονικής μικροσκοπίας για τον εντοπισμό της θέσης της. Η υπερμικροσκοπική εντόπιση των μορίων TTRV30M ήταν αυξημένη εντός του σώματος των ποδοκυττάρων (PB-500%), της ΣBM (GBM-153%), των ποδοκυτταρικών δευτερογενών ποδικών εκβλαστήσεων (PFP-215%), και στον ουρικό χώρο (US – 60%), στα ποδοκύτταρα των διαγονιδιακών ποντικών τα οποία στεγαζόταν σε συνθήκες αυξημένης περιβαλλοντικής επίδρασης (non-SPF-TTRV30M) σε σύγκριση με τα ποδοκύτταρα των SPF TTRV30M ποντικών (Eικόνες 2.9, 2.10, Πίνακας 14).



Εικόνα 2.9: Υπερμικροσκοπική εντόπιση της τρανσθυρετίνης στο μικροπεριβάλλον του ποδοκυττάρου.

Τα ποδοκύτταρα διαγονιδιακών ζώων (non/SPF-TTRV30M) τα οποία στεγαζόταν σε non-SPF συνθήκες είχαν αυξημένη συγκέντρωση σωματιδίων χρυσού σε σχέση με ποδοκύτταρα διαγονιδιακών ζώων τα οποία στεγαζόταν σε SPF (SPF-TTRV30M) συνθήκες άμεσο μικροπεριβάλλον τους. Τα ζώα τα οποία δεν παρουσίαζαν εναποθέσεις τρανσθυρετίνης (μη διαγονιδιακά ζώα-SPF NT/non-SPF NT) χρησιμοποιήθηκαν ως αρνητικά δείγματα ελέγχου. Οι εναποθέσεις τρανσθυρετίνης (πράσσινο χρώμα) ήταν αυξημένες στα ζώα τα οποία στεγαζόταν σε non-SPF συνθήκες (TTRV30M fluorescence intensity). Ο βαθμός συνεντόπιση της νεφρίνης με την τρανσθυρετίνη (NPHS1 TTRV30M Co-localization) ήταν αυξημένος σε non-SPF συνθήκες (M1, M2, Pearson's Coefficient). Για όλες τις συγκρίσεις p<0,001.

A-E : Non SPF TTRV30M (A-ένθετο: εντόπιση σωματιδίων χρυσού σε υλικό με ίδια ηλεκτρονική πυκνότητα με αυτή της ΣBM εντός του PB, **A-D**: Εντόπιση σωματιδίων χρυσού εντός της ΣBM, του PB, του USP, και των PFP. **E:** Αρνητικό δείγμα ελέγχου) **F, G: SPF TTRV30M (F:** Μικρότερος αριθμός σωματιδίων χρυσού εντός της ΣBM, του PB, του USP, και των PFP, **G:** Αρνητικό δείγμα ελέγχου) **H, I: non-SPF NT** (**H:** τα σωματίδια χρυσού τα οποία εντοπίζονται είναι ενδεικτικά της ειδικότητας της μεθόδου, **I:** Αρνητικό δείγμα ελέγχου)



Εικόνα 2.10: Αριθμός των σωματιδίων χρυσού ανά μm² ανά κυτταρικό διαμέρισμα (USP, PB, GBM, PFP) το οποίο εξετάστηκε (Gold particles sum per μm² per compartment examined). Neg Ctrl: Αρνητικό δείγμα ελέγχου Non-SPF-NT: Μη διαγονιδιακά ζώα.

Πίνακας 14: Αναλυτική Περιγραφή των σωματιδίων χρυσού ανά ομάδα μελέτης ανά ποδοκυτταρικό διαμέρισμα

Ποδοκυτταρικό Διαμέρισμα	pfp	gbm	pb	usp
Ομάδα Μελέτης				
SPF	589	170	35	113
SPF negative	167	12	25	15
control				
Non-SPF	1267	261	171	181
Non-SPF negative	175	30	20	34
control				
Non transgenic	175	34	8	23
Non transgenic	144	14	11	8
negative control				
Test X ²	2398,58	623,91	429,03	388,1
p value	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001

Δεν υπάρχουν επιστημονικά δεδομένα, τα οποία να υποστηρίζουν ότι η τρανσθυρετίνη αποτελεί δομικό συστατικό της ΣΒΜ. Μέχρι σήμερα η εναπόθεση τρανσθυρετίνης στην βασική μεμβράνη (εξωκυττάριος χώρος του ποδοκυτταρου), θεωρείται παθολογικό εύρημα. Επιπλέον δεν υπάρχουν δεδομένα τα οποία να υποστηρίζουν ότι η τρανσθυρετίνη διαδραματίζει λειτουργικό ρόλο στις ποδικές εκβλαστήσεις των ποδοκυττάρων. Μόλις πρόσφατα αναδειχθείκε ο ρόλος των ινοβλαστών (τόσο από ανθρώπινο δέρμα, όσο και από δέρμα TTRV30M διαγονιδιακών ποντικών) ως μηχανισμός κάθαρσης της εξωκυττάριας εναπόθεσης τρανσθυρετίνης¹²⁶. Τα ποδοκύτταρα συμμετέχουν στην παραγωγή και ανανέωση των συστατικών της βασικής μεμβράνης¹. Τα πρόσφατα δεδομένα υποστηρίζουν ισχυρά το ενδεχόμενο τα ποδοκύτταρα να συμμετέχουν στην κάθαρση των εναποθέσεων τρανσθυρετίνης της ΣΒΜ. Ακομή πιο σημαντικό είναι το γεγονός ότι δεδομένης της περιβαλλοντικής αλληλεπίδρασης μπορούν να μεταβάλλουν τον ρυθμό ανανέωσης – κάθαρσης της ΣΒΜ. Τα ρυθμιστικά στοιχεία τα οποία αφορούν την έκφραση του

ανθρώπινου αλληλίου TTRV30M στο παρόν διαγονιδιακό μοντέλο, επάγουν την έκφραση του στο νεφρικό παρέγχυμα των διαγονιδιακών ζώων¹⁷³. Το επίπεδο έκφρασης του όμως παραμένει σταθερό και δεν επηρρεάζεται από τον βαθμό αλληλεπίδρασης με το εξωτερικό περιβάλλον. Ωστόσο εντός του ποδοκυτταρικού σώματος παρατηρήθηκε αυξημένη συγκέντρωση σωματιδίων χρυσού. Με βάση τα παρόντα δεδομένα δεν μπορεί να αποκλειστεί και το γεγονός ποδοκυτταρικής έκφρασης του αλληλίου TTRV30M. Ωστόσο εφόσον τα επίπεδα έκφρασης της τρανσθυρετίνης παραμένουν σταθερά μεταξύ των συγκρινόμενων στελεχών, το επίπεδο ποδοκυτταρικής έκφρασης του αλληλίου της τρανσθυρετίνης (αν υπάρχει), δεν θα πρέπει να είναι σε αυξημένα επίπεδα. Συμπερασματικά, τείθεται ισχυρά η υποψία, ότι η παρουσία μορίων τρανσθυρετίνης εντός του ποδοκυτταρικού σώματος αποτελεί κυρίως αποτέλεσμα των επαγόμενων μηχανισμών κάθαρσης της ΣBM, από την εναπόθεση TTRV30M.

Η ενεργοποίση της κασπάσης 3 αποτελεί τελικό καταληκτικό σημείο των πολλαπλών σημάτων κυτταρικού θανάτου¹⁸⁴. Η παρουσία προ-αμυλοειδικών εναποθέσεων επάγει την αποπτωτική σηματοδότηση²⁵³. Εξετάστηκε ο βαθμός ενεργοποίησης της κασπάσης 3 (acasp3) των ποδοκυττάρων στα διαγονιδιακά ζώα με συνθήκες στέγασης SPF, και non-SPF. Στα non-SPF TTRV30M ποντίκια η acasp3 δεν ήταν αυξημένη σε σχέση με τα SPF TTRV30M ποντίκια. Επιπλέον τα μη διαγονιδιακά ποντίκια είχαν μικρότερο βαθμό ενεργοποίησης της κασπάσης 3 (30%) σε σχέση με τα διαγονιδιακά ποντίκια τα οποία παρουσίαζαν εναποθέσεις τρανσθυρετίνης (Εικόνα 2.11). Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι υπάρχει ποδοκυτταρική απόκριση στην παρουσία εναπόθεσης τρανσθυρετίνης του τύπου όλου-ουδέν. Η εναπόθεση τρανσθυρετίνης προκαλεί δυσπραγία στο ποδοκύτταρο, ανεξάρτητα από περιβαλλοντικές συνθήκες. Ωστόσο η έκταση της επίδρασης του περιβάλλοντος

161

καθορίζει τον βαθμό εναπόθεσης TTRV30M, και κατά συνέπεια τον βαθμό ενδοκυττάρωσης της τρανσθυρετίνης και ανανένωσης της ΣBM από το ποδοκύτταρο. Ωστόσο η σπειραματική ενεργοποίηση της κασπάσης 3 ήταν αυξημένη μόνο στα σπειράματα non-SPF TTRV30M ποντικών, υποδεικνύοντας ότι η έκταση της περιβαλλοντικής επίδρασης επηρρεάζει διαφορετικά τους άλλους κυτταρικούς τύπους του σπειράματος (μεσαγγειακά κύτταρα και ενδοθηλιακά κύτταρα).



Εικόνα 2.10: Βαθμός συνεντόπισης και έντασης φθορισμού acasp3 και τρανσθυρετίνης.

Τα σπειράματα διαγονιδιακών ζώων (non/SPF-TTRV30M) τα οποία στεγαζόταν σε non-SPF συνθήκες είχαν αυξημένη ένταση φθορισμού acasp3 (πράσσινο χρώμα) σε σχέση με τα σπειράματα διαγονιδιακών ζώων τα οποία στεγαζόταν σε SPF (SPF-TTRV30M) συνθήκες. Τα ζώα τα οποία δεν παρουσίαζαν εναποθέσεις τρανσθυρετίνης (μη διαγονιδιακά ζώα-SPF NT/non-SPF NT) είχαν μειωμένη ένταση φθορισμού acasp3 (Activated caspase 3 fluorescence intensity). Ο βαθμός συνεντόπιση της νεφρίνης με την acasp3 (NPHS1 activated caspase 3 Colocalization) ήταν αμετάβλητος σε SPF ή non-SPF συνθήκες στα διαγονιδιακά ποντίκια, αλλά ήταν αυξημένος σε σχέση με τις αντίστοιχες ομάδες ελέγχου SPF-NT και non-SPF NT αντίστοιχα (M1, M2, Pearson's Coefficient). p<0,001.

A, B, C : Non SPF TTRV30M, D, E, F: SPF TTRV30M, G, H, I: non-SPF NT, J, K, L: SPF NT,

C, **F**, **I**, **L**: Συνεντόπιση νεφρίνης acasp3. Έγινε κανονικοποίηση ως προς την επιφάνεια του σπειράματος. Μεγέθυνση 40x.

Αξίζει να σημειωθεί ότι το αντίσωμα το οποίο χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση των μορίων TTRV30M ανιχνεύει τόσο διαλυτή μορφή της πρωτεΐνης, όσο και την αδιάλυτη (εναποθέσεις). Επομένως τα μόρια TTRV30M τα οποία εντοπίζονταν στον ουρικό χώρο ίσως αντιπροσωπεύουν μόρια τα οποία διαφεύγουν στον ουρικό χώρο λόγω της επαγόμενης από την εναπόθεση σπειραματικής βλάβης. Επιπρόσθετα τα non-SPF- TTRV30M διαγονιδιακά ζώα παρουσιάζουν αυξημένη απέκκριση λευκωματίνης στα ούρα

Επίσης η τρανσθυρετίνη ενδοκυτταρώνεται μέσω μεγκαλίνης, και τα ποδοκύτταρα ποντικού διαθέτουν μεγκαλίνη^{160,254}. Υπάρχει το ενδέχομενο στα διαγονιδιακά ζώα η ενδοκυττάρωση της τρανσθυρετίνης να διαμεσολαβείται από τον υποδοχέα της μεγκαλίνης.

Το αμυλοειδές Α του ορού (SAA), αποτελεί πρωτεΐνη οξείας φάσης⁴³. Τα επίπεδα ορού τρανσθυρετίνης κατά την διάρκεια της οξείας φάσης ελαττώνονται. Στο παρόν διαγονιδιακό μοντέλο (6.0kb-TTRV30M) έχει αποδειχθεί ότι υπάρχει διαφορά στην μικροβιακή σύσταση του στομάχου (από βακτηρίδια εποικιστές) και η διαφορά στην μικροβιακή α σύσταση έχει συσχετιστεί με τον βαθμό εναπόθεσης. Παράλληλα τα βακτηρίδια εποικιστές (όπου και αν υπάρχουν στο σώμα/ή αλλιώς μικροβίωμα) έχουν την ικανότητα να επάγουν χαμηλού επιπέδου φλεγμονώδη αντίδραση η οποία σε νεφρικό επίπεδο μπορεί να ευθύνεται για την επαγωγη εστιακής σπειραματοσκλύρηνσης (FSGS)²⁵⁵. Τα σπειράματα διαγονιδιακών ποντικών non-SPF TTRV30M παρουσίαζαν μεγαλύτερη εναπόθεση SAA σε σχέση με τα σπειράματα των υπόλοιπων ζώων (SPF TTRV30M, SPF-NT, non-SPF-NT/ Εικόνα 2.11). Επιπλέον τα επίπεδα ορού SAA στα non-SPF TTRV30M ποντίκια ήταν αυξημένα σε σχέση με τα SPF TTRV30M, SPF-NT, non-SPF-NT ποντίκια. Αντίστροφη τάση

163

είχαν τα επίπεδα ορού TTRV30M μεταξύ non-SPF TTRV30M και SPF TTRV30M ποντικών (Εικόνα 2.11).



Εικόνα 2.11: Ενταση φθορισμού SAA και TTRV30M (Glomerular SAA), επίπεδα ορού TTRV30M (Serum TTRV30M concentration) και SAA (Serum SAA concentration).

Τα σπειράματα διαγονιδιακών ζώων (non/SPF-TTRV30M) τα οποία στεγαζόταν σε non-SPF συνθήκες είχαν αυξημένη ένταση φθορισμού SAA (κόκκινο χρώμα) σε σχέση με τα σπειράματα διαγονιδιακών ζώων τα οποία στεγαζόταν σε SPF (SPF-TTRV30M) συνθήκες. Τα ζώα τα οποία δεν παρουσίαζαν εναποθέσεις τρανσθυρετίνης (μη διαγονιδιακά ζώα-SPF NT/non-SPF NT) είχαν μειωμένη ένταση φθορισμού SAA. Merge (Εικόνες Συνεντόπισης TTRV30M και SAA). Τα επίπεδα ορού SAA στα non/SPF-TTRV30M ήταν υψηλότερα από τα επίπεδα ορού SAA στα spe-TTRV30M ποντίκια. p<0,05. Αντίστροφη τάση επικρατούσε για τα επίπεδα ορού TTRV30M χωρίς ωστόσο να είναι στατιστικά σημαντική p>0,05. TTR: πράσσινο χρώμα, TTRV30M

<u>vi) Η επίδραση του μεταγραφικού παράγοντα Hsf1 στην εναπόθεση του</u> ανθρώπινου αλληλίου TTRV30M. Μελέτες σε στελέχη ποντικών Hsf1 M30 και <u>M30.</u>

Έχει ήδη αναφερθεί ότι η κυτταρική δυσπραγία, η οποία προκαλείται από την εναπόθεση TTRV30M διαμεσολαβείται από τον μεταγραφικό παράγοντα Hsf1 και έχει σημαντικό ρόλο στην παθογένεση της FAP. Ήδη στο μέρος 2ν δείξαμε ότι η παρουσία εναποθέσεων τρανσθυρετίνης επάγει την ενεργοποίηση της κασπάσης 3 με τρόπο εξαρτώμενο από την περιβαλλοντική επίδραση όσον αφορά το σπείραμα, και ανεξάρτητο αυτής όσον αφορά τα ποδοκύτταρα. Τα ποδοκύτταρα (κύτταρα με χαμηλό πολλαπλασιαστικό δυναμικό), χρησιμοποιούν τον Hsf1 και την απάντηση στο εξωκυττάριο/ενδοκυττάριο πρωτεϊνικό στρες. Μέχρι τώρα δεν έχει δειχθεί ποια είναι η επίδραση της απενεργοποίησης του Hsf1 στα ποδοκύτταρα, όταν υπάρχουν εναπόθεσεις TTRV30M. Για αυτόν το λόγο χρησιμοποιήθηκαν πολλαπλά στελέχη ποντικών (Hsf1-KO, TTR KO, Hsf-1 M30, M30) ώστε πολυπαραγοντικά να μπορεί να εκτιμηθεί η πιθανή επίδραση του Hsf1. Για λόγους οικονομίας της συζήτησης, και στην εναπόθεση της τρανσθυρετίνης, το ενδιαφέρον εστίασης της μελέτης επικεντρώνεται στην σύγκριση των διαγονιδιακών ζώων Hsf1-M30 και M30 ηλικίας 10-12 μηνών (νεαρά) και >18 μηνών (γηραιά). Ειδικότερα η ανάλυση θα επεκταθεί σε ένα πληθυσμό ζώων Hsf1-M30 ηλικίας 18-24 μηνών, τα οποία για άγνωστο λόγο δεν παρουσίασαν ούτε εναπόθεση τρανσθυρετίνης, ούτε και εναπόθεση αμυλοειδούς. Με την χρήση ανοσοϊστοχημικής χρώσης έναντι του παράγοντος WT1 (ο οποίος είναι ειδικός για ποδοκύτταρα εντός του σπειράματος) έγινε καταμέτρηση του αριθμού των ποδοκυττάρων και εξετάστηκε εάν η έλλειψη Hsf1 έχει επίδραση σε αυτόν. Στα Hsf1-M30 ποντίκια με παρουσία εναποθέσεων TTRV30M, ο αριθμός των ποδοκυττάρων ήταν αυξημένος κατά 50% σε σύγκριση με τα M30 ποντίκια (Εικόνα 2.12). Σε ποντίκια Hsf1-M30 τα οποία για άγνωστο λόγο δεν παρουσίασαν εναπόθεση TTRV30M δεν υπήρχε διαφορά στον αριθμό των ποδοκυττάρων σε σύγκριση με τα ποντίκια Hsf1-M30 τα οποία παρουσίασαν εναπόθεση TTRV30M. Υπήρχε όμως διαφορά στον αριθμό των ποδοκυττάρων σε σύγκριση με τα M30 ποντίκια.



Εικόνα 2.12: Αριθμός ποδοκυττάρων σε ποντίκια στελεχών Hsf1-M30, και M30 (Mean WT1 positive cells/glomerular μm²) σε σχέση με την ηλικία (Age). Τα νεαρά (Young) Hsf1-M30 ποντίκια είχαν αυξημένο αριθμό ποδοκυττάρων σε σύγκριση με τα M30 ποντίκια (γηραιά, νεαρά) p<0,001. Στα γηραιά (Old) Hsf1-M30 ποντίκια δεν υπήρχε στατιστική σημαντικότητα, αν και παρουσιαζόταν μια τάση αύξησης του αριθμού των ποδοκυττάρων σε σχέση με τα M30 ποντίκια. Μπάρα: 9 μm **Βαθύ κόκκινο χρώμα:** Κύτταρα θετικά για τον μεταγραφικό παράγοντα WT1 (Ποδοκύτταρα).

Η διαφορά αυτή παρατηρήθηκε μόνο στα νεαρά Hsf1 M30 ποντίκια. Η στατιστική σημαντικότητα εξαφανίστηκε με την αύξηση της ηλικίας όσον αφορά τον αριθμό των ποδοκυττάρων. Η μόνη διαφορά την οποία είχαν τα M30 από τα Hsf1-M30 ζώα ήταν η έκταση της εναπόθεσης. Τα Hsf-1 M30 ποντίκια είχαν μεγαλύτερη έκταση

εναπόθεσης. Σε συνδυασμό με τη παρατήρηση ότι η εναποθέση της TTRV30M επάγει την ενεργοποίηση της κασπάσης 3, υπάρχει το ενδεχόμενο κάποια ποδοκύτταρα στην πορεία της ζωής των Hsf-1 M30 ζώων να αποπίπτουν. Εξάλλου η εναπόθεση TTRV30M στον άνθρωπο σχετίζεται με την εκδήλωση χρόνιας νεφρικής νόσου σταδίου V (εξωνεφρική κάθαρση), γεγονός το οποίο συνδέεται με την απώλεια ποδοκυττάρων από το νεφρικό παρέγχυμα.

Περαιτέρω μελετήθηκε η επίδραση της ημιζυγίας του Hsf1 στην έκφραση της νεφρίνης και της ποδοσίνης στα σπειράματα γηραιών και νεαρών ποντίκιων Hsf1-M30 και M30 αντίστοιχα. Τα Hsf-1 M30 ποντίκια παρουσίζαν χαμηλότερα επίπεδα νεφρίνης και ποδοσίνης από ότι τα ποντίκια M30. Συμπεριλαμβάνοντας στην ανάλυση και τα γηραιά Hsf1-M30 ποντίκια, τα οποία δεν είχαν εναποθέσεις τρανσθυρετίνης, παρατηρείται ότι η μεγαλύτερη μείωση της έκφρασης της νεφρίνης και ποδοσίνης στα Hsf1-M30 ποντίκια με εναποθέσεις TTRV30M. Άρα η παρουσία σπειραματικών εναποθέσεων τρανσθυρετίνης σε συνδοιασμό με την έλλειψη του Hsf1 προκαλλούν δυσπραγία στα ποδοκύτταρα με συνέπεια τα επίπεδα των πρωτεϊνών νεφρίνη και ποδοσίνη να είναι δευτερογενώς ελλατωμένα (Εικόνες 2.13, 2.14, 2.15).



Εικόνα 2.13: Σπειραματικό πρωτεϊνικό περιεχόμενο σε νεφρίνη σε ποντίκια στελεχών Hsf1-M30, και M30 (Mean Nephrin Fluorescence Intensity) σε σχέση με την ηλικία (Age).

Τα νεαρά (Young) και γηραιά (Old) M30 ποντίκια είχαν αυξημένη ποσότητα νεφρίνης σε σύγκριση με τα Hsf1-M30 ποντίκια (γηραιά, νεαρά), Στην πολυπαραγοντική ανάλυση *p<0,001 #p=0,006.

Μπάρα: 9 μm Πράσινο Χρώμα: Νεφρίνη.

Στην WB οι διπλές ζώνες τις οποίες ανιχνεύει το αντίσωμα έναντι της νεφρίνης, αντιπροσωπεύουν διαφορετικό επίπεδο N γλυκοζυλίωσης της νεφρίνης και μέσω της διαδικασίας αυτής παράγονται μόρια από 180 μέχρι 200 KD. Η πυκνομέτρηση αφορούσε όλες τις ζώνες της νεφρίνης.



στελεχών Hsf1-M30, και M30 (Mean Podocin Fluorescence Intensity) σε σχέση με την ηλικία (Age). Τα νεαρά (Young) και γηραιά (Old) M30 ποντίκια είχαν αυξημένη ποσότητα ποδοσίνης σε σύγκριση με τα Hsf1-M30 ποντίκια (γηραιά, νεαρά), Στην πολυπαραγοντική ανάλυση *p<0,001 #p=0,021.

Στήλη : 9 μm Πράσινο Χρώμα: Ποδοσίνη.

Για την ερμηνεία των παραπάνω αποτελεσμάτων διερευνήθηκε το επίπεδο γονιδιακής

έκφρασης των γονιδίων της νεφρίνης, της ποδοσίνης και WT-1. Δεν αναδείχθησαν

στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ Hsf1-M30, και M30 ποντικών (Πίνακας 15).



Εικόνα 2.15: Σπειραματικό πρωτεϊνικό περιεχόμενο σε ποδοσίνη (podocin) και νεφρίνη (nephrin) σε γηραιά ποντίκια στελέχους Hsf1-M30.

Τα ποντίκια με εναποθέσεις τρανσθυρετίνης έχουν χαμηλότερο πρωτεϊνικό περιεχόμενο νεφρίνης και ποδοσίνης.

Μπάρα: 9 μm Πράσινο Χρώμα: Νεφρίνη, Ποδοσίνη, Χρόνος Έκθεσης (Exposure Time msec).

TTR+CR+: Παρουσία σπειραματικών εναποθέσεων TTRV30M, και αμυλοειδούς, **TTR+CR-:** Παρουσία σπειραματικών εναποθέσεων TTRV30M μόνο, **TTR-CR-:** Απουσία σπειραματικών εναποθέσεων TTRV30M και αμυλοειδούς. Τεστ X^2 p<0,001.

Πίνακας 15: Επιπέδο γονιδιακής έκφρασης νεφρίνης, ποδοσίνης, και WT-1 κανονικοποιημένο ως προς το επίπεδο γονιδιακής έκφρασης. Κατά την πολυπαραγοντική ανάλυση όλα τα p>0,1.

Mean (95%	6 C.I.)	M30	Hsf1-M30
	Νεαρά	1.05 (0.71-1.38)	1.48 (0.59-2.38)
Νεφρίνη			
	Γηραιά	1.31 (0.66-1.95)	1.02 (0.72-1.31)
	Νεαρά	1.21 (0.65-1.78)	1.78 (0.72-2.85)
Ποδοσίνη			
	Γηραιά	1.34 (1.11-1.58)	1.7 (1.07-2.32)
	Νεαρά	2.19 (1.48-2.9)	3.16 (0.77-5.55)
WT1	-		
	Γηραιά	4.12 (-2.01-10.26)	2.59 (0.58-4.59)
			. ,

Η υπερμικροσκοπική ανάλυση της δομής των ποδοκυττάρων από γηραιά Hsf1-M30 με ή χωρίς την παρουσία αμυλοειδούς, και με ή χωρίς την παρουσία εναποθέσεων TTRV30M (TTR+CR+, TTR+CR-, TTR-CR-), ανέδειξε ότι η παρουσία εναποθέσεων TTRV30M οδηγεί σε στατιστικώς σημαντική αύξηση του πάχους της ΣBM, καθώς και σε εξάλειψη των PFP των ποδοκυττάρων (foot process effacement). Συγκεκριμένα το μεγαλύτερο ποσοστό βλάβης φέρεται να συμβαίνει σε ποντίκια τα οποία έχουν μόνο εναποθέσεις TTRV30M χωρίς την παρουσία αμυλοειδούς (Εικόνα 2.16).



Εικόνα 2.16: Πάχος ΣΒΜ (**GBM Thickness nm**) και πλάτος Ποδικών εκβλαστήσεων (**PFP width pm**) σε γηραιά ποντίκια στελέχους Hsf1-M30. Τα ποντίκια με εναποθέσεις τρανσθυρετίνης χωρίς την παρουσία αμυλοειδούς (**TTR+CR-**) έχουν αυξημένο πάχος ποδικών εκβλαστήσεων και παρουσιάζουν εξάλειψη των ποδικών εκβλαστήσεων (**βέλος**). Κατά την δοκιμασία Kruskal Whalis και Mann Whitney U test p<0,05. Αυξημένο πάχος ΣΒΜ παρουσίαζαν τα ζώα TTR+CR-, ή τα ζώα TTR+CR+ σε σχέση με τα ζώα TTR-CR-. Κατά την δοκιμασία Kruskal Whalis και Mann Whitney U test p<0,05. Μπάρα: 1 μm **TTR+CR+:** Παρουσία σπειραματικών εναποθέσεων TTRV30M, και αμυλοειδούς, **TTR+CR-:** Παρουσία σπειραματικών εναποθέσεων TTRV30M μόνο, **TTR-CR-:**

Απουσία σπειραματικών εναποθέσεων TTRV30M μονο, TTR-CR-: Απουσία σπειραματικών εναποθέσεων TTRV30M και αμυλοειδούς. Κατά την δοκιμασία Kruskal Whalis και Mann Whitney U test p<0,05. Λαμβάνοντας υπόψιν το σύνολο των παρατηρήσεων ίσως τα ποδοκύτταρα στα Hsf-1 Μ30 ποντίκια να αδυνατούν να ανταπεξέλθουν στο επαγόμενο από την εναπόθεση μορίων TTRV30M στρες. Δεδομένης της απουσίας διαφοράς στην γονιδιακή έκφραση των γονιδίων νεφρίνης και ποδοσίνης, τα παρατηρούμενα αποτελέσματα ίσως οφείλονται σε μέτα-τη μετάφραση τροποποιήσεις. Ανώμαλη Ν-γλυκοζυλίωση της νεφρίνης και της ποδοσίνης, και επαγώμενη καταστροφή της πρωτεΐνης στο ενδοπλασματικό δίκτυο των ποδοκυττάρων έχει παρατηρηθεί ως απόκριση τους στο στρες Με αυτό τον τρόπο η ημιζυγία στον Hsf1 έχει σα συνέπεια λιγότερο λειτουργικά ποδοκύτταρα όταν παρατηρούνται εναποθέσεις TTRV30M. Οι TTRV30M εναποθέσεις προκαλούν μεγαλύτερο βαθμό ποδοκυτταρικής δυσλειτουργίας από ότι η ίδια η παρουσία αμυλοειδούς, παρατήρηση η οποία συμφωνεί με το γεγονός ότι οι ινιδικές προ-αμυλοειδικές μορφές τρανσθυρετίνης προκαλούν μεγαλύτερο βαθμό βλάβης από τα ώριμα ινίδια αμυλοειδούς. Συμπερασματικά στο πλαίσιο της μειωμένης απάντησης στο εξωκυττάριο στρες τα επίπεδα νεφρίνης και ποδοσίνης ελαττώνονται.

<u>vii) Η χορήγηση του μακρολυδίου της ραπαμυκίνης σε ποντίκια στελέχους</u> 6,0Kb-hTTRV30M: Διαφορετική επίδραση σε σχέση με το φύλο.

Η χορήγηση του μακρολυδίου της ραπαμυκίνης σε 6,0Kb TTRV30M διαγονιδιακά ποντίκια έγινε με σκοπό τη μελέτη της επίδρασης στο νεφρικό παρέγχυμα των ανοσοκατασταλτικών φαρμάκων τα οποία λαμβάνουν ασθενείς με μεταμόσχευση ήπατος και FAP. Επιπλέον ο σχεδιασμός της μελέτης αυτής ήταν τέτοιος ώστε να περιλαμβάνει μόνο διαγονιδιακά ζώα, τα οποία ήταν απόγονοι της ίδιας γέννας (littermates). Δεν συμπεριλήφθησαν στην μελέτη αυτή μη διαγονιδιακά ποντίκια ελέγχου. Ως ομάδα ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν ποντίκια στελέχους 6,0Kb TTRV30M στα οποία γινόταν χορήγηση μόνο του διαλύτη της ραπαμυκίνης DMSO. Για τον

καθορισμό της δόσης ραπαμυκίνης και των επιπέδων ορού εως και 48 ώρες μετά την i.p. χορήγηση του φαρμάκου θυσιάστηκαν 6,0Kb TTRV30M διαγονιδιακά ποντίκια απόγονοι ίδιας γέννας σε τακτά χρονικά διαστήματα (2, 6, 24, 36, 48 hrs), και το αίμα αναλύθηκε για καθορισμό επιπέδων ραπαμυκίνης (Εικόνα 2.17).



Εικόνα 2.17: Επίπεδα ραπαμυκίνης στον ορό 6,0 Kb TTRV30M C57Bl/6. Εκτέλεστηκαν 2 δοσολογικά σχήματα 0,4 mg/Kg/BW, και 0,8 mg/Kg/BW κάθε 48 hrs. Επιλέχθηκε το δοσολογικό σχήμα 0,4 mg/Kg/BW/48 hrs.

Είναι ενδιαφέρον ότι κανένα από τα διαγονιδιακά ποντίκια δεν παρουσίασε λευκωματινουρία (Εικόνα 2.18), υποδεικνύοντας το γεγονός ότι η παρουσία νεφρικής βλάβης ίσως προηγείται της παρουσίας πρωτεϊνουρίας. Όντως μπορεί να υπάρξει νεφρική δυσλειτουργία με απουσία πρωτεϊνουρίας²⁵⁶.



Eικόνα 2.18: Ηλεκτροφόρηση ούρων (SDS-PAGE) για την ανίχνευση αλβουμινουρίας (Log UAE/24 hrs/gr BW) σε διαγονιδιακά ποντίκια (DMSO, Rapamycin). Mέση UAER στην ομάδα θεραπείας με Rapamycin = 778.9 +/- 6.0, Μέση UAER στην όμαδα θεραπείας με DMSO = 815.3 + -3.3;p=0.97

Κανένα από τα υπό εξέταση διαγονιδιακά ζώα (με ή χωρίς χορήγηση ραπαμυκίνης) δεν παρουσιάζει εναποθέσεις αμυλοειδούς. Ωστόσο τα σπειράματα των αρσενικών διαγονιδιακών ζώων τα οποία λάμβαναν ραπαμυκίνη παρουσίαζαν μικρότερη έκταση μεσαγγείου σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Η αντίστροφη σχέση εμφανιζόταν όταν η σύγκριση αφορούσε τα θηλυκά διαγονιδιακά ζώα τα οποία λάμβαναν ραπαμυκίνη. Περαιτέρω διερεύνηση της σχέσης αυτής ανέδειξε ότι τα αρσενικά διαγονιδιακά ποντίκια είχαν το 17,6% των σπειραμάτων τους με ένταση φθορισμού TTRV30M πάνω από την διάμεση τιμή, ενώ τα θηλυκά διαγονιδιακά διαγονιδιακά ποντίκια τα οποία λάμβαναν ραπαμυκίνη είχαν το 89,8% των σπειραμάτων με ένταση φθορισμού πάνω από την διάμεση τιμή.

Είναι γνωστό όσον αφορά την εμφάνιση συμπτωματολογίας οι άρρενες ασθενείς με FAP εμφανίζουν νωρίτερα συμπτωματολογία και σημειολογία σε σχέση με τις ασθενείς με FAP. Αυτό το φαινόμενο παρατηρείται και στην περίπτωση αδελφών διαφορετικού φύλου. Τα άρρενα άτομα εμφανίζουν νωρίτερα την νόσο από τα αδελφά θήλεα άτομα^{70,154}.

Τα θηλυκά διαγονιδιακά ποντίκια τα οποία ελάμβαναν ραπαμυκίνη παρουσίαζαν αυξημένο βαθμό σπειραματικής απόπτωσης, σε σχέση με τα αρσενικά διαγονιδιακά ποντίκια. Ωστόσο τα διαγονιδιακά ζωά τα οποία ελάμβαναν ραπαμυκίνη παρουσίαζαν αύξηση της σπειραματικής απόπτωσης σε σχέση με την ομάδα ελέγχου.



Εικόνα 2.19: Χρώση Congo Red σε διαγονιδιακά ποντίκια (**DMSO, Rapamycin**). Δεν παρατηρούνται εναποθέσεις αμυλοειδούς σε καμία ομάδα μελέτης.

Σε αυτή την ομάδα παρατηρήσεων όλες οι παρατηρούμενες αλλαγές στο νεφρικό παρέγχυμα δεν συνοδεύονται από τη παρουσία λευκωματινουρίας. Δεδομένου ότι η διάρκεια της θεραπείας με ραπαμυκίνη στα υπό εξέταση διαγονιδιακά ζώα είχε διάρκεια 2 μήνες (2/24 της ζωής του ζώου, η έναρξη της εναπόθεσης αμυλοειδούς στο συγκεκριμένο στέλεχος (6,0 Kb TTRV30M) παρατηρείται στους 6 μήνες ζωής του ζώου, και η έναρξη της θεραπείας με ραπαμυκίνη έγιννε στους 10 μήνες ζωής παρουσιάζεται ομοιότητα με την έναρξη της FAP στον άνθρωπο.



Εικόνα 2.20: Παρουσία εναποθέσεων τρανσθυρετίνης (πράσσινο) στις διάφορες υπό μελέτη. ομάδες

Τα αρσενικά διαγονιδιακά ζώα υπό ραπαμυκίνη (DMSO & Rapamycin Male) είχαν 17,6 % των σπειραμάτων με ένταση φθορισμού μεγαλύτερη από την διάμεσο τιμή (45,96 τυχαίες μονάδες), ενώ τα θηλυκά διαγονιδιακά ζώα υπό ραπαμυκίνη (DMSO & Rapamycin Female) είχαν το 89,8% των σπειραμάτων αντίστοιχα (Τεστ X^2 =72,74, p<0,001). Στα διαγονιδιακά ζώα τα οποία ελάμβαναν DMSO δεν παρατηρήθηκαν διαφορές μεταξύ θηλυκών και αρσενικών ποντικών και οι τιμές έντασης φθορισμού ήταν ενδιάμεσες των ζώων τα οποία λάμβαναν ραπαμυκίνη (Τεστ X^2 =2,12 p=0,18)

Η παρουσία ορατών εναποθέσεων στο στέλεχος 6,0 Kb – TTRV30M συμβαίνει στην ηλικία των 6 μηνών (αναλογεί ηλικιακά σε 20 ανθρώπινα έτη), η έναρξη της θεραπείας με ραπαμυκίνη αναλογεί ηλικιακά σε 33 ανθρώπινα έτη (εντός του ηλικιακού εύρους έναρξης συμπτωματολογίας της νόσου), και η διάρκεια θεραπείας με ραπαμυκίνη αντιστοιχεί σε 8 περίπου ανθρώπινα έτη. Σε αυτό το χρονικό όριο επάγονται αλλαγές στο νεφρικό παρέγχυμα οι οποίες εξαρτώνται από το φύλο, και υπάρχουν άγνωστοι μέχρι τώρα φύλο-εξαρτώμενοι τροποποιητικοί παράγοντες της νόσου.



Εικόνα 2.21: Ενδοσπειραματική παρουσία πρωτεϊνών bax (πράσσινο) και bcl-2 (κόκκινο) στις διάφορες ομάδες υπό μελέτη.

Τα αρσενικά διαγονιδιακά ζώα υπό ραπαμυκίνη (**DMSO & Rapamycin Male**) είχαν 28,6 % των σπειραμάτων με ένταση φθορισμού μεγαλύτερη από την διάμεσο τιμή (1,52 τυχαίες μονάδες), ενώ τα θηλυκά διαγονιδιακά ζώα υπό ραπαμυκίνη (**DMSO & Rapamycin Female**) είχαν το 88,9% των σπειραμάτων αντίστοιχα (Τεστ X^2 =27,71, p<0,001). Στα αρσενικά διαγονιδιακά ζώα τα οποία ελάμβαναν **DMSO** οι αντιστοιχες τιμές ήταν 10% και στα θηλυκά διαγονιδιακά ζώα τα οποία ελάμβαναν **DMSO** οι αντίστοιχες τιμές ήταν 71,4% (Τεστ X^2 =24,45 p<0,001) Αυτοί οι παράγοντες διαδραματίζουν ρόλο και στην έκφραση της νεφρικής βλάβης με διαφορετικούς όρους από πλευράς βαθμού εναπόθεσης και απόκρισης στην θεραπεία.

<u>3. Επίκριση και Συμπεράσματα.</u>

Στο έργο του, From Fish to Philosopher²⁵⁷, ο Homer Smith αναφέρει: «Διαθέτουμε το εσωτερικό περιβάλλον το οποίο διαθέτουμε επειδή έχουμε αυτό το είδος νεφρών, και οφείλουμε να αναγνωρίσουμε ότι συστασιακά τα νεφρά μας αποτελούν το θεμέλιο λίθο της φυσιολογικής μας ελευθερίας. Μόνο επειδή λειτουργούν με τον τρόπο τον οποίο λειτουργούν είναι για μας δυνατό να έχουμε οστά, μύες, αδένες και εγκεφάλους. Επιφανειακά κάποιος μπορεί να πεί ότι η λειτουργία των νεφρών είναι να δημιουργούν ούρα. Αλλά μια από μια πιο σκεπτόμενη θέση, κάποιος μπορεί να πει ότι τα νεφρά δημιουργούν την ουσία της ίδιας της φιλοσοφίας».

Η παρούσα διδακτορική διατριβή ενώ ξεκίνησε με στόχο να μελετήσει συγκεκριμένους μηχανισμούς νεφρικής βλάβης στο νεφρικό παρέγχυμα σκόνταψε στην ανακάλυψη της (ίσως για κάποιους εύρημα τρομακτικό) αλληλεπίδρασης του εξωτερικού περιβάλλοντος, με το εσωτερικό περιβάλλον και την ανάπτυξη νόσου. Και εξείδικευσε τον βαθμό αλληλεπίδρασης του νεφρικού παρεγχύματος με το περιβάλλον χρησιμοποιώντας το παράδειγμα της FAP, με την χρήση διαγονιδιακών μοντέλων της νόσου, στο επίπεδο του νεφρικού σπειράματος και του ποδοκυττάρου. Συγκεκριμένα η σπειραματική βλάβη η οποία προκαλείται από την εναπόθεση αμυλοειδούς εξαρτάται από τον βαθμό περιβαλλοντικής αλληλεπίδρασης στο σύνολο του. Δεν υπάρχει ένας συγκεκριμένος περιβαλλοντικός παράγοντας ο οποίος σταθεροποιεί ή επιταχύνει την ανάπτυξη της νόσου, αλλά ένα σύνολο παραγόντων το οποίο δημιουργεί ένα βέλος εξέλιξης προς τον ελάχιστο βαθμό εναπόθεσης και έκτασης βλάβης στην περίπτωση της ελάχιστης περιβαλλοντικής αλληλεπίδρασης, ή

178

στον μεγαλύτερο βαθμό εναπόθεσης και έκτασης βλάβης στην περίπτωση της μέγιστης περιβαλλοντικής αλληλεπίδρασης.

Ένα άλλο πρωτοπόρο εύρημα στην παρούσα διδακτορική διατριβή είναι το σύνολο των στοιχείων που συνηγορούν ισχυρά στο ότι τα ποδοκύτταρα σε ένα συγκεκριμένο βιολογικό σύστημα μπορούν και ενδοκυτταρώνουν με διαφορετικό ρυθμό μια εξωκυττάρια εναποτειθέμενη πρωτεΐνη. Αυτό το εύρημα θέτει την βάση για την διεύρυνση και ανακάλυψη άγνωστων μέχρι τώρα λειτουργιών τόσο όσον αφορά τους ιστικούς μηχανισμούς κάθαρσης του αμυλοειδούς όσο και της λειτουργίας των ποδοκυττάρων.

Στο εσωτερικό περιβάλλον, και ειδικότερα στο μικροπεριβάλλον του σπειράματος, η έλλειψη απόκρισης στην εξωκυττάριο δυσπραγία η οποία προκαλείται από την εναπόθεση τρανσθυρετίνης, οδηγεί σε ποδοκυτταρική βλάβη όταν έχει απενεργοποιηθεί εν μέρει το υπεύθυνο οργανικό σύστημα απόκρισης. Η απενεργοποίηση του Hsf1 προκαλεί δομικές αλλαγές στα ποδοκύτταρα, και οδηγεί σε αύξηση στον αριθμό τους. Άν και μόλις πρόσφατα έχει αρχίσει να αναγνωρίζεται ότι το ποδοκύτταρο έχει πολλαπλασιαστικό δυναμικό, δεν είχε μελετηθεί επαρκώς η επίδραση σε ποδοκυτταρικούς δείκτες της απενεργοποίησης του Hsf1. Ιδιαίτερα η επίδραση αυτή ασκείται μετά την μετάφραση

Το δόγμα, ότι η νεφρική βλάβη πάντα εκδηλώνεται με λευκωματινουρία δεν ισχύει σε όλες τις περιπτώσεις. Για παράδειγμα η χορήγηση του μακρολυδίου της ραπαμυκίνης δεν συνοδεύεται από λευκωματινουρία, αλλά επάγει αποπτωτικά ερεθίσματα στο νεφρικό σπείραμα. Και μάλιστα τα ερεθίσματα αυτά είναι εξαρτώμενα από το φύλο. Τέλος αντί επιλόγου, το πνεύμα της παρούσας διδακτορικής διατριβής συμβαδίζει με τα λόγια του William James στο έργο του The Will to Believe²⁵⁸ « Το μεγάλο πεδίο των νέων ανακαλύψεων είναι το μη ταξινομημένο υπόλοιπο. Στον περίγυρο των

179

πιστοποιημένων και τακτικών επιστημονικών εννοιών αιωρείται ένα νεφέλωμα εξαιρετικών παρατηρήσεων, παραμελημένων συμβάντων, σπάνια απαντώμενων, το οποίο είναι βολικό να αγνοήσει κάποιος παρά να το παρατηρήσει. Η φιλοσοφική λίθος κάθε επιστήμης είναι ένα κλειστό και ολοκληρωμένο σύστημα αλήθειας. Μη ταξινομημένα φαινόμενα μέσα σε αυτό το σύστημα θεωρούνται παράλογα και πρέπει να είναι αναληθή. Κάποιος τα αγνοεί ή τα αρνείται με την χρήση των καλύτερων γνωστών επιστημονικών κανόνων. Κάποιος θα καινοτομήσει στην επιστήμη του, αν θα ανιχνεύει σταθερά παράταιρα φαινόμενα. Η ανανεωμένη επιστήμη που θα προκύψει, οι νέοι κανόνες της, έχουν περισσότερο το πνεύμα της εξαίρεσης παρά το πνεύμα εκείνου υποτίθενται ότι ήταν ο κανόνας.»

<u>Γ. Βιβλιογραφία</u>

- 1.Alpern RJ, Herbert SC, Seldin DW, Giebisch GH. Seldin and Giebisch's the
kidney physiology & pathophysiology. 4th ed. Amsterdam ; Boston: Elsevier
Academic Press,; 2008:
http://www.sciencedirect.com/science/book/9780120884889.
- Lifton RP. Genetic diseases of the kidney. 1st ed. Amsterdam ; Boston: Elsevier/Academic Press,; 2009: <u>http://www.sciencedirect.com/science/book/9780124498518</u> Access restricted to McGill users.
- 3. Sparkes RS, Sasaki H, Mohandas T, et al. Assignment of the prealbumin (PALB) gene (familial amyloidotic polyneuropathy) to human chromosome region 18q11.2-q12.1. *Human genetics*. Feb 1987;75(2):151-154.
- 4. Soares ML, Centola M, Chae J, Saraiva MJ, Kastner DL. Human transthyretin intronic open reading frames are not independently expressed in vivo or part of functional transcripts. *Biochimica et biophysica acta*. Apr 15 2003;1626(1-3):65-74.
- 5. Costa RH, Grayson DR. Site-directed mutagenesis of hepatocyte nuclear factor (HNF) binding sites in the mouse transthyretin (TTR) promoter reveal synergistic interactions with its enhancer region. *Nucleic acids research*. Aug 11 1991;19(15):4139-4145.
- 6. Soprano DR, Herbert J, Soprano KJ, Schon EA, Goodman DS. Demonstration of transthyretin mRNA in the brain and other extrahepatic tissues in the rat. *The Journal of biological chemistry*. Sep 25 1985;260(21):11793-11798.
- 7. Blake CC, Geisow MJ, Oatley SJ, Rerat B, Rerat C. Structure of prealbumin: secondary, tertiary and quaternary interactions determined by Fourier refinement at 1.8 A. *Journal of molecular biology*. May 25 1978;121(3):339-356.
- 8. Benson MD, Kincaid JC. The molecular biology and clinical features of amyloid neuropathy. *Muscle & nerve*. Oct 2007;36(4):411-423.
- 9. Fleming CE, Nunes AF, Sousa MM. Transthyretin: more than meets the eye. *Progress in neurobiology*. Nov 2009;89(3):266-276.
- 10. Saraiva MJ. Transthyretin mutations in hyperthyroxinemia and amyloid diseases. *Human mutation.* Jun 2001;17(6):493-503.
- 11. Palha JA, Fernandes R, de Escobar GM, Episkopou V, Gottesman M, Saraiva MJ. Transthyretin regulates thyroid hormone levels in the choroid plexus, but not in the brain parenchyma: study in a transthyretin-null mouse model. *Endocrinology*. Sep 2000;141(9):3267-3272.
- 12. Raz A, Goodman DS. The interaction of thyroxine with human plasma prealbumin and with the prealbumin-retinol-binding protein complex. *The Journal of biological chemistry*. Jun 25 1969;244(12):3230-3237.
- 13. Sousa JC, Marques F, Dias-Ferreira E, Cerqueira JJ, Sousa N, Palha JA. Transthyretin influences spatial reference memory. *Neurobiology of learning and memory*. Oct 2007;88(3):381-385.
- 14. Liz MA, Gomes CM, Saraiva MJ, Sousa MM. ApoA-I cleaved by transthyretin has reduced ability to promote cholesterol efflux and increased amyloidogenicity. *Journal of lipid research*. Nov 2007;48(11):2385-2395.
- 15. Liz MA, Faro CJ, Saraiva MJ, Sousa MM. Transthyretin, a new cryptic protease. *The Journal of biological chemistry*. May 14 2004;279(20):21431-21438.
- 16. Sousa MM, Berglund L, Saraiva MJ. Transthyretin in high density lipoproteins: association with apolipoprotein A-I. *Journal of lipid research*. Jan 2000;41(1):58-65.
- 17. Liz MA, Fleming CE, Nunes AF, et al. Substrate specificity of transthyretin: identification of natural substrates in the nervous system. *The Biochemical journal*. Apr 15 2009;419(2):467-474.
- 18. Fleming CE, Mar FM, Franquinho F, Saraiva MJ, Sousa MM. Transthyretin internalization by sensory neurons is megalin mediated and necessary for its neuritogenic activity. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. Mar 11 2009;29(10):3220-3232.
- 19. Choi SH, Leight SN, Lee VM, et al. Accelerated Abeta deposition in APPswe/PS1deltaE9 mice with hemizygous deletions of TTR (transthyretin). *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience.* Jun 27 2007;27(26):7006-7010.
- 20. Abram SR, Kruskal JB, Allen GS, Burns RS, Parker R, Tulipan N. Alterations in prealbumin concentration after adrenal autotransplantation for Parkinson's disease. *Experimental neurology*. May 1990;108(2):130-135.
- 21. Nishi S, Alchi B, Imai N, Gejyo F. New advances in renal amyloidosis. *Clinical and experimental nephrology*. Apr 2008;12(2):93-101.
- 22. Sipe JD, Cohen AS. Review: history of the amyloid fibril. *Journal of structural biology*. Jun 2000;130(2-3):88-98.
- 23. Westermark GT, Johnson KH, Westermark P. Staining methods for identification of amyloid in tissue. *Methods in enzymology*. 1999;309:3-25.
- 24. Sunde M, Blake C. The structure of amyloid fibrils by electron microscopy and X-ray diffraction. *Advances in protein chemistry*. 1997;50:123-159.
- 25. Sipe JD, Benson MD, Buxbaum JN, et al. Amyloid fibril protein nomenclature: 2012 recommendations from the Nomenclature Committee of the International Society of Amyloidosis. *Amyloid : the international journal*

of experimental and clinical investigation : the official journal of the International Society of Amyloidosis. Dec 2012;19(4):167-170.

- 26. Kyle RA, Linos A, Beard CM, et al. Incidence and natural history of primary systemic amyloidosis in Olmsted County, Minnesota, 1950 through 1989. *Blood.* Apr 1 1992;79(7):1817-1822.
- 27. Gertz MA, Lacy MQ, Dispenzieri A. Amyloidosis. *Hematology/oncology clinics of North America*. Dec 1999;13(6):1211-1233, ix.
- 28. Merlini G, Wechalekar AD, Palladini G. Systemic light chain amyloidosis: an update for treating physicians. *Blood.* Jun 27 2013;121(26):5124-5130.
- 29. Merlini G, Stone MJ. Dangerous small B-cell clones. *Blood*. Oct 15 2006;108(8):2520-2530.
- 30. Liao R, Jain M, Teller P, et al. Infusion of light chains from patients with cardiac amyloidosis causes diastolic dysfunction in isolated mouse hearts. *Circulation.* Oct 2 2001;104(14):1594-1597.
- 31. Palladini G, Lavatelli F, Russo P, et al. Circulating amyloidogenic free light chains and serum N-terminal natriuretic peptide type B decrease simultaneously in association with improvement of survival in AL. *Blood*. May 15 2006;107(10):3854-3858.
- 32. Abraham RS, Geyer SM, Price-Troska TL, et al. Immunoglobulin light chain variable (V) region genes influence clinical presentation and outcome in light chain-associated amyloidosis (AL). *Blood.* May 15 2003;101(10):3801-3808.
- 33. Comenzo RL, Zhang Y, Martinez C, Osman K, Herrera GA. The tropism of organ involvement in primary systemic amyloidosis: contributions of Ig V(L) germ line gene use and clonal plasma cell burden. *Blood.* Aug 1 2001;98(3):714-720.
- 34. Solomon A, Frangione B, Franklin EC. Bence Jones proteins and light chains of immunoglobulins. Preferential association of the V lambda VI subgroup of human light chains with amyloidosis AL (lambda). *The Journal of clinical investigation*. Aug 1982;70(2):453-460.
- 35. Perfetti V, Palladini G, Casarini S, et al. The repertoire of lambda light chains causing predominant amyloid heart involvement and identification of a preferentially involved germline gene, IGLV1-44. *Blood.* Jan 5 2012;119(1):144-150.
- 36. Obici L, Palladini G, Giorgetti S, et al. Liver biopsy discloses a new apolipoprotein A-I hereditary amyloidosis in several unrelated Italian families. *Gastroenterology*. May 2004;126(5):1416-1422.
- 37. Obici L, Bellotti V, Mangione P, et al. The new apolipoprotein A-I variant leu(174) --> Ser causes hereditary cardiac amyloidosis, and the amyloid fibrils are constituted by the 93-residue N-terminal polypeptide. *The American journal of pathology*. Sep 1999;155(3):695-702.
- 38. Obici L, Franceschini G, Calabresi L, et al. Structure, function and amyloidogenic propensity of apolipoprotein A-I. *Amyloid : the international journal of experimental and clinical investigation : the official journal of the International Society of Amyloidosis.* Dec 2006;13(4):191-205.
- 39. Benson MD, Liepnieks JJ, Yazaki M, et al. A new human hereditary amyloidosis: the result of a stop-codon mutation in the apolipoprotein AII gene. *Genomics*. Mar 15 2001;72(3):272-277.
- 40. Bergstrom J, Murphy C, Eulitz M, et al. Codeposition of apolipoprotein A-IV and transthyretin in senile systemic (ATTR) amyloidosis. *Biochemical and biophysical research communications*. Jul 27 2001;285(4):903-908.

- 41. Sethi S, Theis JD, Shiller SM, et al. Medullary amyloidosis associated with apolipoprotein A-IV deposition. *Kidney international*. Jan 2012;81(2):201-206.
- 42. Bergstrom J, Murphy CL, Weiss DT, et al. Two different types of amyloid deposits--apolipoprotein A-IV and transthyretin--in a patient with systemic amyloidosis. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. Aug 2004;84(8):981-988.
- 43. Obici L, Merlini G. AA amyloidosis: basic knowledge, unmet needs and future treatments. *Swiss medical weekly*. 2012;142:w13580.
- 44. Zingraff JJ, Noel LH, Bardin T, et al. Beta 2-microglobulin amyloidosis in chronic renal failure. *The New England journal of medicine*. Oct 11 1990;323(15):1070-1071.
- 45. Davison AM. beta 2-microglobulin and amyloidosis: who is at risk? Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association. 1995;10 Suppl 10:48-51.
- 46. Esposito G, Michelutti R, Verdone G, et al. Removal of the N-terminal hexapeptide from human beta2-microglobulin facilitates protein aggregation and fibril formation. *Protein science : a publication of the Protein Society*. May 2000;9(5):831-845.
- 47. Bellotti V, Gallieni M, Giorgetti S, Brancaccio D. Dynamic of beta(2)microglobulin fibril formation and reabsorption: the role of proteolysis. *Seminars in dialysis.* Mar-Apr 2001;14(2):117-122.
- 48. Eakin CM, Miranker AD. From chance to frequent encounters: origins of beta2-microglobulin fibrillogenesis. *Biochimica et biophysica acta*. Nov 10 2005;1753(1):92-99.
- 49. Athanasou NA, Puddle B, Sallie B. Highly sulphated glycosaminoglycans in articular cartilage and other tissues containing beta 2 microglobulin dialysis amyloid deposits. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association European Renal Association.* 1995;10(9):1672-1678.
- 50. Ookoshi T, Hasegawa K, Ohhashi Y, et al. Lysophospholipids induce the nucleation and extension of beta2-microglobulin-related amyloid fibrils at a neutral pH. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association European Renal Association.* Oct 2008;23(10):3247-3255.
- 51. Relini A, Canale C, De Stefano S, et al. Collagen plays an active role in the aggregation of beta2-microglobulin under physiopathological conditions of dialysis-related amyloidosis. *The Journal of biological chemistry*. Jun 16 2006;281(24):16521-16529.
- 52. Maury CP. Homozygous familial amyloidosis, Finnish type: demonstration of glomerular gelsolin-derived amyloid and non-amyloid tubular gelsolin. *Clinical nephrology*. Jul 1993;40(1):53-56.
- 53. Solomon JP, Bourgault S, Powers ET, Kelly JW. Heparin binds 8 kDa gelsolin cross-beta-sheet oligomers and accelerates amyloidogenesis by hastening fibril extension. *Biochemistry*. Apr 5 2011;50(13):2486-2498.
- 54. Suk JY, Zhang F, Balch WE, Linhardt RJ, Kelly JW. Heparin accelerates gelsolin amyloidogenesis. *Biochemistry*. Feb 21 2006;45(7):2234-2242.

- 55. Pepys MB, Hawkins PN, Booth DR, et al. Human lysozyme gene mutations cause hereditary systemic amyloidosis. *Nature*. Apr 8 1993;362(6420):553-557.
- 56. Booth DR, Sunde M, Bellotti V, et al. Instability, unfolding and aggregation of human lysozyme variants underlying amyloid fibrillogenesis. *Nature*. Feb 27 1997;385(6619):787-793.
- 57. Benson MD, James S, Scott K, Liepnieks JJ, Kluve-Beckerman B. Leukocyte chemotactic factor 2: A novel renal amyloid protein. *Kidney international*. Jul 2008;74(2):218-222.
- 58. Larsen CP, Kossmann RJ, Beggs ML, Solomon A, Walker PD. Clinical, morphologic, and genetic features of renal leukocyte chemotactic factor 2 amyloidosis. *Kidney international*. Feb 12 2014.
- 59. Murphy CL, Wang S, Kestler D, et al. Leukocyte chemotactic factor 2 (LECT2)-associated renal amyloidosis: a case series. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation*. Dec 2010;56(6):1100-1107.
- 60. Frangione B, Revesz T, Vidal R, et al. Familial cerebral amyloid angiopathy related to stroke and dementia. *Amyloid : the international journal of experimental and clinical investigation : the official journal of the International Society of Amyloidosis.* Jul 2001;8 Suppl 1:36-42.
- 61. Rostagno A, Ghiso J. Preamyloid lesions and cerebrovascular deposits in the mechanism of dementia: lessons from non-beta-amyloid cerebral amyloidosis. *Neuro-degenerative diseases*. 2008;5(3-4):173-175.
- 62. Ohmori H, Ando Y, Makita Y, et al. Common origin of the Val30Met mutation responsible for the amyloidogenic transthyretin type of familial amyloidotic polyneuropathy. *Journal of medical genetics*. Apr 2004;41(4):e51.
- 63. Zaros C, Genin E, Hellman U, et al. On the origin of the transthyretin Val30Met familial amyloid polyneuropathy. *Annals of human genetics*. Jul 2008;72(Pt 4):478-484.
- 64. Holmgren G, Costa PM, Andersson C, et al. Geographical distribution of TTR met30 carriers in northern Sweden: discrepancy between carrier frequency and prevalence rate. *Journal of medical genetics*. May 1994;31(5):351-354.
- 65. Coelho T, Sousa A, Lourenco E, Ramalheira J. A study of 159 Portuguese patients with familial amyloidotic polyneuropathy (FAP) whose parents were both unaffected. *Journal of medical genetics*. Apr 1994;31(4):293-299.
- 66. Ando Y, Nakamura M, Araki S. Transthyretin-related familial amyloidotic polyneuropathy. *Archives of neurology*. Jul 2005;62(7):1057-1062.
- 67. Conceicao I, De Carvalho M. Clinical variability in type I familial amyloid polyneuropathy (Val30Met): comparison between late- and early-onset cases in Portugal. *Muscle & nerve*. Jan 2007;35(1):116-118.
- 68. Kato-Motozaki Y, Ono K, Shima K, et al. Epidemiology of familial amyloid polyneuropathy in Japan: Identification of a novel endemic focus. *Journal of the neurological sciences*. Jul 15 2008;270(1-2):133-140.
- 69. Yamashita T, Hamidi Asl K, Yazaki M, Benson MD. A prospective evaluation of the transthyretin Ile122 allele frequency in an African-American population. *Amyloid : the international journal of experimental and clinical investigation : the official journal of the International Society of Amyloidosis.* Jun 2005;12(2):127-130.

- 70. Ikeda S, Nakazato M, Ando Y, Sobue G. Familial transthyretin-type amyloid polyneuropathy in Japan: clinical and genetic heterogeneity. *Neurology*. Apr 9 2002;58(7):1001-1007.
- 71. Ando Y, Araki S, Ando M. Transthyretin and familial amyloidotic polyneuropathy. *Internal medicine*. Dec 1993;32(12):920-922.
- 72. Ando Y, Suhr OB. Autonomic dysfunction in familial amyloidotic polyneuropathy (FAP). *Amyloid : the international journal of experimental and clinical investigation : the official journal of the International Society of Amyloidosis.* Dec 1998;5(4):288-300.
- 73. Rapezzi C, Quarta CC, Riva L, et al. Transthyretin-related amyloidoses and the heart: a clinical overview. *Nature reviews. Cardiology.* Jul 2010;7(7):398-408.
- 74. Rapezzi C, Perugini E, Salvi F, et al. Phenotypic and genotypic heterogeneity in transthyretin-related cardiac amyloidosis: towards tailoring of therapeutic strategies? *Amyloid : the international journal of experimental and clinical investigation : the official journal of the International Society of Amyloidosis*. Sep 2006;13(3):143-153.
- 75. Koyama J, Ray-Sequin PA, Davidoff R, Falk RH. Usefulness of pulsed tissue Doppler imaging for evaluating systolic and diastolic left ventricular function in patients with AL (primary) amyloidosis. *The American journal of cardiology*. May 1 2002;89(9):1067-1071.
- 76. Mitsuhashi S, Yazaki M, Tokuda T, et al. Biochemical characteristics of variant transthyretins causing hereditary leptomeningeal amyloidosis. *Amyloid* : the international journal of experimental and clinical investigation : the official journal of the International Society of Amyloidosis. Dec 2005;12(4):216-225.
- 77. Beirao I, Lobato L, Costa PM, et al. Kidney and anemia in familial amyloidosis type I. *Kidney international*. Nov 2004;66(5):2004-2009.
- 78. Ando E, Ando Y, Okamura R, Uchino M, Ando M, Negi A. Ocular manifestations of familial amyloidotic polyneuropathy type I: long-term follow up. *The British journal of ophthalmology*. Apr 1997;81(4):295-298.
- 79. Glenner GG, Costa PPe, Freitas AFod. *Amyloid and amyloidosis : proceedings of the Third International Symposium on Amyloidosis, Póvoa de Varzim, Portugal, 23-28 September 1979.* Amsterdam ; Princeton

New York: Excerpta Medica;

sole distributors for the U.S.A. and Canada, Elsevier/North-Holland; 1980.

- 80. Sales-Luis ML, Galvao M, Carvalho M, Sousa G, Alves MM, Serrao R. Treatment of familial amyloidotic polyneuropathy (Portuguese type) by plasma exchange. *Muscle & nerve*. Apr 1991;14(4):377-378.
- 81. Quintas A, Vaz DC, Cardoso I, Saraiva MJ, Brito RM. Tetramer dissociation and monomer partial unfolding precedes protofibril formation in amyloidogenic transthyretin variants. *The Journal of biological chemistry*. Jul 20 2001;276(29):27207-27213.
- 82. Snow CM, Senior A, Gerace L. Monoclonal antibodies identify a group of nuclear pore complex glycoproteins. *The Journal of cell biology*. May 1987;104(5):1143-1156.
- 83. Prelli F, Pras M, Frangione B. The primary structure of human tissue amyloid P component from a patient with primary idiopathic amyloidosis. *The Journal of biological chemistry*. Oct 25 1985;260(24):12895-12898.

- 84. Hammarstrom P, Wiseman RL, Powers ET, Kelly JW. Prevention of transthyretin amyloid disease by changing protein misfolding energetics. *Science*. Jan 31 2003;299(5607):713-716.
- 85. Lai Z, McCulloch J, Lashuel HA, Kelly JW. Guanidine hydrochloride-induced denaturation and refolding of transthyretin exhibits a marked hysteresis: equilibria with high kinetic barriers. *Biochemistry*. Aug 19 1997;36(33):10230-10239.
- 86. Jiang X, Smith CS, Petrassi HM, et al. An engineered transthyretin monomer that is nonamyloidogenic, unless it is partially denatured. *Biochemistry*. Sep 25 2001;40(38):11442-11452.
- 87. Redondo C, Damas AM, Saraiva MJ. Designing transthyretin mutants affecting tetrameric structure: implications in amyloidogenicity. *The Biochemical journal*. May 15 2000;348 Pt 1:167-172.
- 88. Schneider F, Hammarstrom P, Kelly JW. Transthyretin slowly exchanges subunits under physiological conditions: A convenient chromatographic method to study subunit exchange in oligomeric proteins. *Protein science : a publication of the Protein Society*. Aug 2001;10(8):1606-1613.
- 89. Lashuel HA, Lai Z, Kelly JW. Characterization of the transthyretin acid denaturation pathways by analytical ultracentrifugation: implications for wild-type, V30M, and L55P amyloid fibril formation. *Biochemistry*. Dec 22 1998;37(51):17851-17864.
- 90. White JT, Kelly JW. Support for the multigenic hypothesis of amyloidosis: the binding stoichiometry of retinol-binding protein, vitamin A, and thyroid hormone influences transthyretin amyloidogenicity in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Nov 6 2001;98(23):13019-13024.
- 91. Sousa MM, Cardoso I, Fernandes R, Guimaraes A, Saraiva MJ. Deposition of transthyretin in early stages of familial amyloidotic polyneuropathy: evidence for toxicity of nonfibrillar aggregates. *The American journal of pathology*. Dec 2001;159(6):1993-2000.
- 92. Colon W, Kelly JW. Partial denaturation of transthyretin is sufficient for amyloid fibril formation in vitro. *Biochemistry*. Sep 15 1992;31(36):8654-8660.
- 93. Blake C, Serpell L. Synchrotron X-ray studies suggest that the core of the transthyretin amyloid fibril is a continuous beta-sheet helix. *Structure*. Aug 15 1996;4(8):989-998.
- 94. Serag AA, Altenbach C, Gingery M, Hubbell WL, Yeates TO. Identification of a subunit interface in transthyretin amyloid fibrils: evidence for self-assembly from oligomeric building blocks. *Biochemistry*. Aug 7 2001;40(31):9089-9096.
- 95. Sekijima Y, Yoshida K, Tokuda T, Ikeda S. Familial Transthyretin Amyloidosis. In: Pagon RA, Adam MP, Bird TD, et al., eds. *GeneReviews(R)*. Seattle (WA)1993.
- 96. Kelly JW. The alternative conformations of amyloidogenic proteins and their multi-step assembly pathways. *Current opinion in structural biology*. Feb 1998;8(1):101-106.
- 97. Nakanishi T, Yoshioka M, Moriuchi K, Yamamoto D, Tsuji M, Takubo T. Ssulfonation of transthyretin is an important trigger step in the formation of transthyretin-related amyloid fibril. *Biochimica et biophysica acta*. Jul 2010;1804(7):1449-1456.

- 98. Yang M, Lei M, Huo S. Why is Leu55-->Pro55 transthyretin variant the most amyloidogenic: insights from molecular dynamics simulations of transthyretin monomers. *Protein science : a publication of the Protein Society*. Jun 2003;12(6):1222-1231.
- 99. Sebastiao MP, Saraiva MJ, Damas AM. The crystal structure of amyloidogenic Leu55 --> Pro transthyretin variant reveals a possible pathway for transthyretin polymerization into amyloid fibrils. *The Journal of biological chemistry*. Sep 18 1998;273(38):24715-24722.
- 100. Keetch CA, Bromley EH, McCammon MG, Wang N, Christodoulou J, Robinson CV. L55P transthyretin accelerates subunit exchange and leads to rapid formation of hybrid tetramers. *The Journal of biological chemistry*. Dec 16 2005;280(50):41667-41674.
- 101. Cardoso I, Goldsbury CS, Muller SA, et al. Transthyretin fibrillogenesis entails the assembly of monomers: a molecular model for in vitro assembled transthyretin amyloid-like fibrils. *Journal of molecular biology*. Apr 12 2002;317(5):683-695.
- 102. Yazaki M, Tokuda T, Nakamura A, et al. Cardiac amyloid in patients with familial amyloid polyneuropathy consists of abundant wild-type transthyretin. *Biochemical and biophysical research communications*. Aug 11 2000;274(3):702-706.
- 103. Saraiva MJ, Sherman W, Marboe C, et al. Cardiac amyloidosis: report of a patient heterozygous for the transthyretin isoleucine 122 variant. *Scandinavian journal of immunology*. Oct 1990;32(4):341-346.
- 104. Dwulet FE, Benson MD. Primary structure of an amyloid prealbumin and its plasma precursor in a heredofamilial polyneuropathy of Swedish origin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* Feb 1984;81(3):694-698.
- 105. Coelho T CM, Saraiva MJ, Alvas I, Almedia MR, Costa PP. Familial Amyloidotic Polyneuropathy and Other Transthyretin Related Disorders. 2nd International Symposium. Skelleftea, Sweden, June 1-3, 1992. Abstracts. *The Journal of rheumatology*. Jan 1993;20(1):173-198.
- 106. Palmieri Lde C, Lima LM, Freire JB, et al. Novel Zn2+-binding sites in human transthyretin: implications for amyloidogenesis and retinol-binding protein recognition. *The Journal of biological chemistry*. Oct 8 2010;285(41):31731-31741.
- 107. da Costa G, Gomes RA, Guerreiro A, et al. Beyond genetic factors in familial amyloidotic polyneuropathy: protein glycation and the loss of fibrinogen's chaperone activity. *PloS one*. 2011;6(10):e24850.
- 108. Kugimiya T, Jono H, Saito S, et al. Loss of functional albumin triggers acceleration of transthyretin amyloid fibril formation in familial amyloidotic polyneuropathy. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. Aug 2011;91(8):1219-1228.
- 109. Banerjee A, Bairagya HR, Mukhopadhyay BP, Nandi TK, Bera AK. Structural insight to mutated Y116S transthyretin by molecular dynamics simulation. *Indian journal of biochemistry & biophysics*. Aug 2010;47(4):197-202.
- 110. Said G. Familial amyloid polyneuropathy: mechanisms leading to nerve degeneration. *Amyloid : the international journal of experimental and clinical investigation : the official journal of the International Society of Amyloidosis.* Aug 2003;10 Suppl 1:7-12.

- 111. Toyooka K, Fujimura H, Ueno S, et al. Familial amyloid polyneuropathy associated with transthyretin Gly42 mutation: a quantitative light and electron microscopic study of the peripheral nervous system. *Acta neuropathologica*. 1995;90(5):516-525.
- 112. Misu K, Hattori N, Nagamatsu M, et al. Late-onset familial amyloid polyneuropathy type I (transthyretin Met30-associated familial amyloid polyneuropathy) unrelated to endemic focus in Japan. Clinicopathological and genetic features. *Brain : a journal of neurology*. Oct 1999;122 (Pt 10):1951-1962.
- 113. Sobue G, Nakao N, Murakami K, et al. Type I familial amyloid polyneuropathy. A pathological study of the peripheral nervous system. *Brain* : *a journal of neurology*. Aug 1990;113 (Pt 4):903-919.
- 114. Yamada M, Hatakeyama S, Tsukagoshi H. Peripheral and autonomic nerve lesions in systemic amyloidosis. Three pathological types of amyloid polyneuropathy. *Acta pathologica japonica*. Nov 1984;34(6):1251-1266.
- 115. Sousa MM, Saraiva MJ. Neurodegeneration in familial amyloid polyneuropathy: from pathology to molecular signaling. *Progress in neurobiology*. Dec 2003;71(5):385-400.
- 116. Murakami T, Ohsawa Y, Sunada Y. The transthyretin gene is expressed in human and rodent dorsal root ganglia. *Neuroscience letters*. May 16 2008;436(3):335-339.
- 117. Sousa MM, Saraiva MJ. Transthyretin is not expressed by dorsal root ganglia cells. *Experimental neurology*. Dec 2008;214(2):362-365.
- 118. Andersson K, Olofsson A, Nielsen EH, Svehag SE, Lundgren E. Only amyloidogenic intermediates of transthyretin induce apoptosis. *Biochemical and biophysical research communications*. Jun 7 2002;294(2):309-314.
- 119. Reixach N, Deechongkit S, Jiang X, Kelly JW, Buxbaum JN. Tissue damage in the amyloidoses: Transthyretin monomers and nonnative oligomers are the major cytotoxic species in tissue culture. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Mar 2 2004;101(9):2817-2822.
- 120. Bucciantini M, Giannoni E, Chiti F, et al. Inherent toxicity of aggregates implies a common mechanism for protein misfolding diseases. *Nature*. Apr 4 2002;416(6880):507-511.
- 121. Sousa MM, Du Yan S, Fernandes R, Guimaraes A, Stern D, Saraiva MJ. Familial amyloid polyneuropathy: receptor for advanced glycation end products-dependent triggering of neuronal inflammatory and apoptotic pathways. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience.* Oct 1 2001;21(19):7576-7586.
- 122. Huttunen HJ, Fages C, Rauvala H. Receptor for advanced glycation end products (RAGE)-mediated neurite outgrowth and activation of NF-kappaB require the cytoplasmic domain of the receptor but different downstream signaling pathways. *The Journal of biological chemistry*. Jul 9 1999;274(28):19919-19924.
- 123. Sousa MM, do Amaral JB, Guimaraes A, Saraiva MJ. Up-regulation of the extracellular matrix remodeling genes, biglycan, neutrophil gelatinase-associated lipocalin, and matrix metalloproteinase-9 in familial amyloid polyneuropathy. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. Jan 2005;19(1):124-126.

- 124. Gasperini RJ, Hou X, Parkington H, et al. TRPM8 and Nav1.8 sodium channels are required for transthyretin-induced calcium influx in growth cones of small-diameter TrkA-positive sensory neurons. *Molecular neurodegeneration*. 2011;6(1):19.
- 125. Nagasaka T, Togashi S, Watanabe H, et al. Clinical and histopathological features of progressive-type familial amyloidotic polyneuropathy with TTR Lys54. *Journal of the neurological sciences.* Jan 15 2009;276(1-2):88-94.
- 126. Misumi Y, Ando Y, Goncalves NP, Saraiva MJ. Fibroblasts endocytose and degrade transthyretin aggregates in transthyretin-related amyloidosis. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology.* Aug 2013;93(8):911-920.
- 127. Magalhaes J, Santos SD, Saraiva MJ. alphaB-crystallin (HspB5) in familial amyloidotic polyneuropathy. *International journal of experimental pathology*. Dec 2010;91(6):515-521.
- 128. Pepys MB, Rademacher TW, Amatayakul-Chantler S, et al. Human serum amyloid P component is an invariant constituent of amyloid deposits and has a uniquely homogeneous glycostructure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* Jun 7 1994;91(12):5602-5606.
- 129. Gallo G, Wisniewski T, Choi-Miura NH, Ghiso J, Frangione B. Potential role of apolipoprotein-E in fibrillogenesis. *The American journal of pathology*. Sep 1994;145(3):526-530.
- 130. Lyon AW, Narindrasorasak S, Young ID, et al. Co-deposition of basement membrane components during the induction of murine splenic AA amyloid. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology.* Jun 1991;64(6):785-790.
- 131. Sousa MM, Ferrao J, Fernandes R, et al. Deposition and passage of transthyretin through the blood-nerve barrier in recipients of familial amyloid polyneuropathy livers. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. Jul 2004;84(7):865-873.
- 132. Misumi Y, Ando Y, Ueda M, et al. Chain reaction of amyloid fibril formation with induction of basement membrane in familial amyloidotic polyneuropathy. *The Journal of pathology*. Dec 2009;219(4):481-490.
- 133. Iozzo RV, Cohen IR, Grassel S, Murdoch AD. The biology of perlecan: the multifaceted heparan sulphate proteoglycan of basement membranes and pericellular matrices. *The Biochemical journal*. Sep 15 1994;302 (Pt 3):625-639.
- 134. Smeland S, Kolset SO, Lyon M, Norum KR, Blomhoff R. Binding of perlecan to transthyretin in vitro. *The Biochemical journal*. Sep 15 1997;326 (Pt 3):829-836.
- 135. Vital C, Vital A, Bouillot-Eimer S, Brechenmacher C, Ferrer X, Lagueny A. Amyloid neuropathy: a retrospective study of 35 peripheral nerve biopsies. *Journal of the peripheral nervous system : JPNS.* Dec 2004;9(4):232-241.
- 136. Guy CD, Jones CK. Abdominal fat pad aspiration biopsy for tissue confirmation of systemic amyloidosis: specificity, positive predictive value, and diagnostic pitfalls. *Diagnostic cytopathology*. Mar 2001;24(3):181-185.
- 137. Tsuchiya A, Yazaki M, Kametani F, Takei Y, Ikeda S. Marked regression of abdominal fat amyloid in patients with familial amyloid polyneuropathy during long-term follow-up after liver transplantation. *Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver*

Diseases and the International Liver Transplantation Society. Apr 2008;14(4):563-570.

- 138. Herlenius G, Wilczek HE, Larsson M, Ericzon BG, Familial Amyloidotic Polyneuropathy World Transplant R. Ten years of international experience with liver transplantation for familial amyloidotic polyneuropathy: results from the Familial Amyloidotic Polyneuropathy World Transplant Registry. *Transplantation.* Jan 15 2004;77(1):64-71.
- 139. Ihse E, Suhr OB, Hellman U, Westermark P. Variation in amount of wild-type transthyretin in different fibril and tissue types in ATTR amyloidosis. *Journal of molecular medicine*. Feb 2011;89(2):171-180.
- 140. Wilczek HE, Larsson M, Ericzon BG, Fapwtr. Long-term data from the Familial Amyloidotic Polyneuropathy World Transplant Registry (FAPWTR). *Amyloid : the international journal of experimental and clinical investigation : the official journal of the International Society of Amyloidosis.* Jun 2011;18 Suppl 1:193-195.
- 141. Stangou AJ, Heaton ND, Hawkins PN. Transmission of systemic transthyretin amyloidosis by means of domino liver transplantation. *The New England journal of medicine*. Jun 2 2005;352(22):2356.
- 142. Arpesella G, Chiappini B, Marinelli G, et al. Combined heart and liver transplantation for familial amyloidotic polyneuropathy. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*. May 2003;125(5):1165-1166.
- 143. Merlini G, Plante-Bordeneuve V, Judge DP, et al. Effects of tafamidis on transthyretin stabilization and clinical outcomes in patients with non-Val30Met transthyretin amyloidosis. *Journal of cardiovascular translational research*. Dec 2013;6(6):1011-1020.
- 144. Berk JL, Suhr OB, Obici L, et al. Repurposing diflunisal for familial amyloid polyneuropathy: a randomized clinical trial. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. Dec 25 2013;310(24):2658-2667.
- 145. Coelho T, Adams D, Silva A, et al. Safety and efficacy of RNAi therapy for transthyretin amyloidosis. *The New England journal of medicine*. Aug 29 2013;369(9):819-829.
- 146. Ackermann EJ, Guo S, Booten S, et al. Clinical development of an antisense therapy for the treatment of transthyretin-associated polyneuropathy. *Amyloid* : the international journal of experimental and clinical investigation : the official journal of the International Society of Amyloidosis. Jun 2012;19 Suppl 1:43-44.
- 147. Cardoso I, Martins D, Ribeiro T, Merlini G, Saraiva MJ. Synergy of combined doxycycline/TUDCA treatment in lowering Transthyretin deposition and associated biomarkers: studies in FAP mouse models. *Journal of translational medicine*. 2010;8:74.
- 148. Lobato L, Rocha A. Transthyretin amyloidosis and the kidney. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN*. Aug 2012;7(8):1337-1346.
- 149. Lobato L, Beirao I, Silva M, et al. Familial ATTR amyloidosis: microalbuminuria as a predictor of symptomatic disease and clinical nephropathy. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association.* Mar 2003;18(3):532-538.
- 150. Saraiva MJ, Costa PP, Birken S, Goodman DS. Presence of an abnormal transthyretin (prealbumin) in Portuguese patients with familial amyloidotic

polyneuropathy. Transactions of the Association of American Physicians. 1983;96:261-270.

- 151. Liu JY, Guo YJ, Zhou CK, et al. Clinical and histopathological features of familial amyloidotic polyneuropathy with transthyretin Val30Ala in a Chinese family. *Journal of the neurological sciences*. May 15 2011;304(1-2):83-86.
- 152. Lim A, Prokaeva T, McComb ME, Connors LH, Skinner M, Costello CE. Identification of S-sulfonation and S-thiolation of a novel transthyretin Phe33Cys variant from a patient diagnosed with familial transthyretin amyloidosis. *Protein science : a publication of the Protein Society*. Aug 2003;12(8):1775-1785.
- 153. Gafni J, Fischel B, Reif R, Yaron M, Pras M. Amyloidotic polyneuropathy in a Jewish family. Evidence for the genetic heterogeneity of the lower limb familial amyloidotic neuropathies. *The Quarterly journal of medicine*. Apr 1985;55(216):33-44.
- 154. Pelo E, Da Prato L, Ciaccheri M, et al. Familial amyloid polyneuropathy with genetic anticipation associated to a gly47glu transthyretin variant in an Italian kindred. *Amyloid : the international journal of experimental and clinical investigation : the official journal of the International Society of Amyloidosis.* Mar 2002;9(1):35-41.
- 155. Skinner M, Grateau G, Kyle RA. *Amyloid and amyloidosis*. Boca Raton, Fla.: CRC Press; 2005.
- 156. Holmgren G, Hellman U, Anan I, et al. Cardiomyopathy in Swedish patients with the Gly53Glu and His88Arg transthyretin variants. *Amyloid : the international journal of experimental and clinical investigation : the official journal of the International Society of Amyloidosis*. Sep 2005;12(3):184-188.
- 157. Wallace MR, Dwulet FE, Williams EC, Conneally PM, Benson MD. Identification of a new hereditary amyloidosis prealbumin variant, Tyr-77, and detection of the gene by DNA analysis. *The Journal of clinical investigation*. Jan 1988;81(1):189-193.
- 158. Riboldi G, Del Bo R, Ranieri M, et al. Tyr78Phe Transthyretin Mutation with Predominant Motor Neuropathy as the Initial Presentation. *Case reports in neurology*. 2011;3(1):62-68.
- 159. Lobato L, Beirao I, Silva M, et al. End-stage renal disease and dialysis in hereditary amyloidosis TTR V30M: presentation, survival and prognostic factors. *Amyloid : the international journal of experimental and clinical investigation : the official journal of the International Society of Amyloidosis*. Mar 2004;11(1):27-37.
- 160. Sousa MM, Norden AG, Jacobsen C, et al. Evidence for the role of megalin in renal uptake of transthyretin. *The Journal of biological chemistry*. Dec 8 2000;275(49):38176-38181.
- 161. Oguchi K, Takei Y, Ikeda S. Value of renal biopsy in the prognosis of liver transplantation in familial amyloid polyneuropathy ATTR Val30Met patients. *Amyloid : the international journal of experimental and clinical investigation : the official journal of the International Society of Amyloidosis.* Jun 2006;13(2):99-107.
- 162. Takahashi K, Sakashita N, Ando Y, Suga M, Ando M. Late onset type I familial amyloidotic polyneuropathy: presentation of three autopsy cases in comparison with 19 autopsy cases of the ordinary type. *Pathology international*. Jun 1997;47(6):353-359.

- 163. Nakamura S, Okabayashi S, Ageyama N, et al. Transthyretin amyloidosis and two other aging-related amyloidoses in an aged vervet monkey. *Veterinary pathology*. Jan 2008;45(1):67-72.
- 164. Buxbaum J, Koziol J, Connors LH. Serum transthyretin levels in senile systemic amyloidosis: effects of age, gender and ethnicity. *Amyloid : the international journal of experimental and clinical investigation : the official journal of the International Society of Amyloidosis*. Dec 2008;15(4):255-261.
- 165. Berg I, Thor S, Hammarstrom P. Modeling familial amyloidotic polyneuropathy (Transthyretin V30M) in Drosophila melanogaster. *Neurodegenerative diseases*. 2009;6(3):127-138.
- 166. Batista AR, Sena-Esteves M, Saraiva MJ. Hepatic production of transthyretin L12P leads to intracellular lysosomal aggregates in a new somatic transgenic mouse model. *Biochimica et biophysica acta*. Aug 2013;1832(8):1183-1193.
- 167. Sousa MM, Yan SD, Stern D, Saraiva MJ. Interaction of the receptor for advanced glycation end products (RAGE) with transthyretin triggers nuclear transcription factor kB (NF-kB) activation. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. Jul 2000;80(7):1101-1110.
- 168. Santos SD, Fernandes R, Saraiva MJ. The heat shock response modulates transthyretin deposition in the peripheral and autonomic nervous systems. *Neurobiology of aging*. Feb 2010;31(2):280-289.
- 169. Sasaki H, Tone S, Nakazato M, et al. Generation of transgenic mice producing a human transthyretin variant: a possible mouse model for familial amyloidotic polyneuropathy. *Biochemical and biophysical research communications*. Sep 14 1986;139(2):794-799.
- 170. Murakami T, Yi S, Maeda S, et al. Effect of serum amyloid P component level on transthyretin-derived amyloid deposition in a transgenic mouse model of familial amyloidotic polyneuropathy. *The American journal of pathology*. Aug 1992;141(2):451-456.
- 171. Araki S, Yi S, Murakami T, et al. Systemic amyloidosis in transgenic mice carrying the human mutant transthyretin (Met 30) gene. Pathological and immunohistochemical similarity to human familial amyloidotic polyneuropathy, type I. *Molecular neurobiology*. Feb 1994;8(1):15-23.
- 172. Yamamura K, Tashiro F, Yi S, et al. Transgenic mouse model for human genetic diseases. *Molecular reproduction and development*. Oct 1993;36(2):248-250.
- 173. Nagata Y, Tashiro F, Yi S, et al. A 6-kb upstream region of the human transthyretin gene can direct developmental, tissue-specific, and quantitatively normal expression in transgenic mouse. *Journal of biochemistry*. Jan 1995;117(1):169-175.
- 174. Takaoka Y, Tashiro F, Yi S, et al. Comparison of amyloid deposition in two lines of transgenic mouse that model familial amyloidotic polyneuropathy, type I. *Transgenic research*. Jul 1997;6(4):261-269.
- 175. Episkopou V, Maeda S, Nishiguchi S, et al. Disruption of the transthyretin gene results in mice with depressed levels of plasma retinol and thyroid hormone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* Mar 15 1993;90(6):2375-2379.
- 176. Kohno K, Palha JA, Miyakawa K, et al. Analysis of amyloid deposition in a transgenic mouse model of homozygous familial amyloidotic polyneuropathy. *The American journal of pathology*. Apr 1997;150(4):1497-1508.

- 177. Tagoe CE, Reixach N, Friske L, et al. In vivo stabilization of mutant human transthyretin in transgenic mice. *Amyloid : the international journal of experimental and clinical investigation : the official journal of the International Society of Amyloidosis.* Sep 2007;14(3):227-236.
- 178. Teng MH, Yin JY, Vidal R, et al. Amyloid and nonfibrillar deposits in mice transgenic for wild-type human transthyretin: a possible model for senile systemic amyloidosis. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. Mar 2001;81(3):385-396.
- 179. Monteiro FA, Sousa MM, Cardoso I, do Amaral JB, Guimaraes A, Saraiva MJ. Activation of ERK1/2 MAP kinases in familial amyloidotic polyneuropathy. *Journal of neurochemistry*. Apr 2006;97(1):151-161.
- 180. Schutze S, Tchikov V, Schneider-Brachert W. Regulation of TNFR1 and CD95 signalling by receptor compartmentalization. *Nature reviews. Molecular cell biology.* Aug 2008;9(8):655-662.
- 181. Wajant H. The Fas signaling pathway: more than a paradigm. *Science*. May 31 2002;296(5573):1635-1636.
- 182. Mehlen P, Bredesen DE. Dependence receptors: from basic research to drug development. *Science signaling*. 2011;4(157):mr2.
- 183. Boldin MP, Mett IL, Varfolomeev EE, et al. Self-association of the "death domains" of the p55 tumor necrosis factor (TNF) receptor and Fas/APO1 prompts signaling for TNF and Fas/APO1 effects. *The Journal of biological chemistry*. Jan 6 1995;270(1):387-391.
- 184. Galluzzi L, Vitale I, Abrams JM, et al. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell death and differentiation*. Jan 2012;19(1):107-120.
- 185. Muzio M, Chinnaiyan AM, Kischkel FC, et al. FLICE, a novel FADDhomologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death--inducing signaling complex. *Cell.* Jun 14 1996;85(6):817-827.
- 186. Barnhart BC, Alappat EC, Peter ME. The CD95 type I/type II model. *Seminars in immunology.* Jun 2003;15(3):185-193.
- 187. Lafont E, Milhas D, Teissie J, et al. Caspase-10-dependent cell death in Fas/CD95 signalling is not abrogated by caspase inhibitor zVAD-fmk. *PloS one*. 2010;5(10):e13638.
- 188. Guenebeaud C, Goldschneider D, Castets M, et al. The dependence receptor UNC5H2/B triggers apoptosis via PP2A-mediated dephosphorylation of DAP kinase. *Molecular cell*. Dec 22 2010;40(6):863-876.
- 189. Bialik S, Kimchi A. The death-associated protein kinases: structure, function, and beyond. *Annual review of biochemistry*. 2006;75:189-210.
- 190. Gewirtz DA, Holt SE, Grant S. *Apoptosis, senescence, and cancer.* 2nd ed. Totowa, N.J. Oxford: Humana ; Blackwell distributor; 2007.
- 191. Akerfelt M, Morimoto RI, Sistonen L. Heat shock factors: integrators of cell stress, development and lifespan. *Nature reviews. Molecular cell biology.* Aug 2010;11(8):545-555.
- 192. Theodorakis NG, Morimoto RI. Posttranscriptional regulation of hsp70 expression in human cells: effects of heat shock, inhibition of protein synthesis, and adenovirus infection on translation and mRNA stability. *Molecular and cellular biology*. Dec 1987;7(12):4357-4368.
- 193. Banerji SS, Theodorakis NG, Morimoto RI. Heat shock-induced translational control of HSP70 and globin synthesis in chicken reticulocytes. *Molecular and cellular biology*. Nov 1984;4(11):2437-2448.

- 194. Morimoto RI. Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators. *Genes & development*. Dec 15 1998;12(24):3788-3796.
- 195. Abravaya K, Myers MP, Murphy SP, Morimoto RI. The human heat shock protein hsp70 interacts with HSF, the transcription factor that regulates heat shock gene expression. *Genes & development*. Jul 1992;6(7):1153-1164.
- 196. Sorger PK, Nelson HC. Trimerization of a yeast transcriptional activator via a coiled-coil motif. *Cell*. Dec 1 1989;59(5):807-813.
- 197. Westerheide SD, Anckar J, Stevens SM, Jr., Sistonen L, Morimoto RI. Stressinducible regulation of heat shock factor 1 by the deacetylase SIRT1. *Science*. Feb 20 2009;323(5917):1063-1066.
- 198. Boehm AK, Saunders A, Werner J, Lis JT. Transcription factor and polymerase recruitment, modification, and movement on dhsp70 in vivo in the minutes following heat shock. *Molecular and cellular biology*. Nov 2003;23(21):7628-7637.
- 199. Morimoto RI. The heat shock response: systems biology of proteotoxic stress in aging and disease. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*. 2011;76:91-99.
- 200. Kestila M, Lenkkeri U, Mannikko M, et al. Positionally cloned gene for a novel glomerular protein--nephrin--is mutated in congenital nephrotic syndrome. *Molecular cell*. Mar 1998;1(4):575-582.
- 201. Tryggvason K. Unraveling the mechanisms of glomerular ultrafiltration: nephrin, a key component of the slit diaphragm. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. Nov 1999;10(11):2440-2445.
- 202. Khoshnoodi J, Sigmundsson K, Ofverstedt LG, et al. Nephrin promotes cellcell adhesion through homophilic interactions. *The American journal of pathology*. Dec 2003;163(6):2337-2346.
- 203. Yan K, Khoshnoodi J, Ruotsalainen V, Tryggvason K. N-linked glycosylation is critical for the plasma membrane localization of nephrin. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. May 2002;13(5):1385-1389.
- 204. Barletta GM, Kovari IA, Verma RK, Kerjaschki D, Holzman LB. Nephrin and Neph1 co-localize at the podocyte foot process intercellular junction and form cis hetero-oligomers. *The Journal of biological chemistry*. May 23 2003;278(21):19266-19271.
- 205. Gerke P, Huber TB, Sellin L, Benzing T, Walz G. Homodimerization and heterodimerization of the glomerular podocyte proteins nephrin and NEPH1. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN.* Apr 2003;14(4):918-926.
- 206. Liu G, Kaw B, Kurfis J, Rahmanuddin S, Kanwar YS, Chugh SS. Neph1 and nephrin interaction in the slit diaphragm is an important determinant of glomerular permeability. *The Journal of clinical investigation*. Jul 2003;112(2):209-221.
- 207. Donoviel DB, Freed DD, Vogel H, et al. Proteinuria and perinatal lethality in mice lacking NEPH1, a novel protein with homology to NEPHRIN. *Molecular and cellular biology*. Jul 2001;21(14):4829-4836.
- 208. Inoue T, Yaoita E, Kurihara H, et al. FAT is a component of glomerular slit diaphragms. *Kidney international*. Mar 2001;59(3):1003-1012.
- 209. Ciani L, Patel A, Allen ND, ffrench-Constant C. Mice lacking the giant protocadherin mFAT1 exhibit renal slit junction abnormalities and a partially

penetrant cyclopia and anophthalmia phenotype. *Molecular and cellular biology*. May 2003;23(10):3575-3582.

- 210. Radice GL, Ferreira-Cornwell MC, Robinson SD, et al. Precocious mammary gland development in P-cadherin-deficient mice. *The Journal of cell biology*. Nov 17 1997;139(4):1025-1032.
- 211. Putaala H, Sainio K, Sariola H, Tryggvason K. Primary structure of mouse and rat nephrin cDNA and structure and expression of the mouse gene. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN.* Jun 2000;11(6):991-1001.
- 212. Jones N, Blasutig IM, Eremina V, et al. Nck adaptor proteins link nephrin to the actin cytoskeleton of kidney podocytes. *Nature*. Apr 6 2006;440(7085):818-823.
- 213. Shih NY, Li J, Cotran R, Mundel P, Miner JH, Shaw AS. CD2AP localizes to the slit diaphragm and binds to nephrin via a novel C-terminal domain. *The American journal of pathology*. Dec 2001;159(6):2303-2308.
- 214. Hutchings NJ, Clarkson N, Chalkley R, Barclay AN, Brown MH. Linking the T cell surface protein CD2 to the actin-capping protein CAPZ via CMS and CIN85. *The Journal of biological chemistry*. Jun 20 2003;278(25):22396-22403.
- 215. Patrakka J, Tryggvason K. Nephrin--a unique structural and signaling protein of the kidney filter. *Trends in molecular medicine*. Sep 2007;13(9):396-403.
- 216. Shih NY, Li J, Karpitskii V, et al. Congenital nephrotic syndrome in mice lacking CD2-associated protein. *Science*. Oct 8 1999;286(5438):312-315.
- 217. Boute N, Gribouval O, Roselli S, et al. NPHS2, encoding the glomerular protein podocin, is mutated in autosomal recessive steroid-resistant nephrotic syndrome. *Nature genetics*. Apr 2000;24(4):349-354.
- 218. Schwarz K, Simons M, Reiser J, et al. Podocin, a raft-associated component of the glomerular slit diaphragm, interacts with CD2AP and nephrin. *The Journal of clinical investigation*. Dec 2001;108(11):1621-1629.
- 219. Huber TB, Kottgen M, Schilling B, Walz G, Benzing T. Interaction with podocin facilitates nephrin signaling. *The Journal of biological chemistry*. Nov 9 2001;276(45):41543-41546.
- 220. Nishibori Y, Liu L, Hosoyamada M, et al. Disease-causing missense mutations in NPHS2 gene alter normal nephrin trafficking to the plasma membrane. *Kidney international*. Nov 2004;66(5):1755-1765.
- 221. Roselli S, Heidet L, Sich M, et al. Early glomerular filtration defect and severe renal disease in podocin-deficient mice. *Molecular and cellular biology*. Jan 2004;24(2):550-560.
- 222. Narita I, Goto S, Saito N, et al. Genetic polymorphism of NPHS1 modifies the clinical manifestations of Ig A nephropathy. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. Aug 2003;83(8):1193-1200.
- 223. Haber DA, Sohn RL, Buckler AJ, Pelletier J, Call KM, Housman DE. Alternative splicing and genomic structure of the Wilms tumor gene WT1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* Nov 1 1991;88(21):9618-9622.
- 224. Morris JF, Madden SL, Tournay OE, Cook DM, Sukhatme VP, Rauscher FJ, 3rd. Characterization of the zinc finger protein encoded by the WT1 Wilms' tumor locus. *Oncogene*. Dec 1991;6(12):2339-2348.
- 225. Kent J, Coriat AM, Sharpe PT, Hastie ND, van Heyningen V. The evolution of WT1 sequence and expression pattern in the vertebrates. *Oncogene*. Nov 2 1995;11(9):1781-1792.

- 226. Moorthy AV, Chesney RW, Lubinsky M. Chronic renal failure and XY gonadal dysgenesis: "Frasier" syndrome--a commentary on reported cases. *American journal of medical genetics. Supplement.* 1987;3:297-302.
- 227. Klamt B, Koziell A, Poulat F, et al. Frasier syndrome is caused by defective alternative splicing of WT1 leading to an altered ratio of WT1 +/-KTS splice isoforms. *Human molecular genetics*. Apr 1998;7(4):709-714.
- 228. Lahiri D, Dutton JR, Duarte A, Moorwood K, Graham CF, Ward A. Nephropathy and defective spermatogenesis in mice transgenic for a single isoform of the Wilms' tumour suppressor protein, WT1-KTS, together with one disrupted Wt1 allele. *Molecular reproduction and development*. Mar 2007;74(3):300-311.
- 229. Ismaili K, Verdure V, Vandenhoute K, Janssen F, Hall M. WT1 gene mutations in three girls with nephrotic syndrome. *European journal of pediatrics*. May 2008;167(5):579-581.
- 230. Patek CE, Fleming S, Miles CG, et al. Murine Denys-Drash syndrome: evidence of podocyte de-differentiation and systemic mediation of glomerulosclerosis. *Human molecular genetics*. Sep 15 2003;12(18):2379-2394.
- 231. Yang Y, Jeanpierre C, Dressler GR, Lacoste M, Niaudet P, Gubler MC. WT1 and PAX-2 podocyte expression in Denys-Drash syndrome and isolated diffuse mesangial sclerosis. *The American journal of pathology*. Jan 1999;154(1):181-192.
- 232. Ryan G, Steele-Perkins V, Morris JF, Rauscher FJ, 3rd, Dressler GR. Repression of Pax-2 by WT1 during normal kidney development. *Development*. Mar 1995;121(3):867-875.
- 233. Patek CE, Little MH, Fleming S, et al. A zinc finger truncation of murine WT1 results in the characteristic urogenital abnormalities of Denys-Drash syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Mar 16 1999;96(6):2931-2936.
- 234. Gao F, Maiti S, Sun G, et al. The Wt1+/R394W mouse displays glomerulosclerosis and early-onset renal failure characteristic of human Denys-Drash syndrome. *Molecular and cellular biology*. Nov 2004;24(22):9899-9910.
- 235. Mundel P, Reiser J, Zuniga Mejia Borja A, et al. Rearrangements of the cytoskeleton and cell contacts induce process formation during differentiation of conditionally immortalized mouse podocyte cell lines. *Experimental cell research*. Oct 10 1997;236(1):248-258.
- 236. Saleem MA, O'Hare MJ, Reiser J, et al. A conditionally immortalized human podocyte cell line demonstrating nephrin and podocin expression. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. Mar 2002;13(3):630-638.
- 237. Viney RL, Morrison AA, van den Heuvel LP, et al. A proteomic investigation of glomerular podocytes from a Denys-Drash syndrome patient with a mutation in the Wilms tumour suppressor gene WT1. *Proteomics*. Mar 2007;7(5):804-815.
- 238. Lieberthal W, Levine JS. Mammalian target of rapamycin and the kidney. I. The signaling pathway. *American journal of physiology. Renal physiology.* Jul 1 2012;303(1):F1-10.
- 239. Kiernan JA. *Histological and histochemical methods : theory and practice*. Oxford: Pergamon; 1981.

- 240. Bancroft JD, Gamble M. *Theory and practice of histological techniques*. 6th ed. Philadelphia, Pa.: Churchill Livingstone Elsevier; 2008.
- 241. Brown JK, Pemberton AD, Wright SH, Miller HR. Primary antibody-Fab fragment complexes: a flexible alternative to traditional direct and indirect immunolabeling techniques. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society.* Sep 2004;52(9):1219-1230.
- 242. Hirose K, Osterby R, Nozawa M, Gundersen HJ. Development of glomerular lesions in experimental long-term diabetes in the rat. *Kidney international*. May 1982;21(5):689-695.
- 243. Deegens JK, Dijkman HB, Borm GF, et al. Podocyte foot process effacement as a diagnostic tool in focal segmental glomerulosclerosis. *Kidney international*. Dec 2008;74(12):1568-1576.
- 244. Kruger NJ. The Bradford method for protein quantitation. *Methods in molecular biology*. 1994;32:9-15.
- 245. King NA, SpringerLink (Online service). RT-PCR Protocols Second Edition. Methods in Molecular Biology, Methods and Protocols,. Second Edition. ed. Totowa, NJ: Humana Press : Imprint: Humana Press,; 2010: <u>http://www.springerprotocols.com/doiresolver?genre=book&pid=10.1007/978</u> <u>-1-60761-629-0</u>.
- 246. Bolte S, Cordelieres FP. A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. *Journal of microscopy*. Dec 2006;224(Pt 3):213-232.
- 247. Inoue S, Ohta M, Li Z, et al. Specific pathogen free conditions prevent transthyretin amyloidosis in mouse models. *Transgenic research*. Oct 2008;17(5):817-826.
- 248. Keeling J, Teng J, Herrera GA. AL-amyloidosis and light-chain deposition disease light chains induce divergent phenotypic transformations of human mesangial cells. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. Oct 2004;84(10):1322-1338.
- 249. Heptinstall RH, Jennette JC. *Heptinstall's pathology of the kidney*. 5th ed ed. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1998.
- 250. Cinar G, Ceylan H, Urel M, et al. Amyloid inspired self-assembled peptide nanofibers. *Biomacromolecules*. Oct 8 2012;13(10):3377-3387.
- 251. Castano AP, Lin SL, Surowy T, et al. Serum amyloid P inhibits fibrosis through Fc gamma R-dependent monocyte-macrophage regulation in vivo. *Science translational medicine*. Nov 4 2009;1(5):5ra13.
- 252. Dyck RF, Lockwood CM, Kershaw M, et al. Amyloid P-component is a constituent of normal human glomerular basement membrane. *The Journal of experimental medicine*. Nov 1 1980;152(5):1162-1174.
- 253. Sousa MM, Fernandes R, Palha JA, Taboada A, Vieira P, Saraiva MJ. Evidence for early cytotoxic aggregates in transgenic mice for human transthyretin Leu55Pro. *The American journal of pathology*. Nov 2002;161(5):1935-1948.
- 254. Prabakaran T, Nielsen R, Larsen JV, et al. Receptor-mediated endocytosis of alpha-galactosidase A in human podocytes in Fabry disease. *PloS one*. 2011;6(9):e25065.
- 255. Wei C, El Hindi S, Li J, et al. Circulating urokinase receptor as a cause of focal segmental glomerulosclerosis. *Nature medicine*. Aug 2011;17(8):952-960.
- 256. Thomas MC, Macisaac RJ, Jerums G, et al. Nonalbuminuric renal impairment in type 2 diabetic patients and in the general population (national evaluation of

the frequency of renal impairment cO-existing with NIDDM [NEFRON] 11). *Diabetes care*. Aug 2009;32(8):1497-1502.

- 257. Smith HW. From fish to philosopher. 1st ed. Boston,: Little; 1953.
- 258. James W. *The will to believe, and other essays in popular philosophy.* New York etc.: Longmans, Green, and Co.; 1897.