

Σοφία Βρόντου

**ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟΥ ΤΙΤΛΟΥ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ
ΣΤΗ ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΓΕΝΕΤΙΚΗ**

ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ CMRP.

Υπεύθυνος Καθηγητής: Γ. Χαλεπάκης

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
Ηράκλειο, Σεπτέμβριος 1997**

*Αφιερωμένο στους
Παπούδες μου Κωσταντίνο Βρόντο
και Γεώργιο Γεωργαλή και στην
αδερφή μου Ελευθερία.*

Ολοκληρώνοντας την εργασία μου για τον μεταπτυχιακό τίτλο ειδίκευσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους εκείνους που με βοήθησαν και με ενθάρρυναν κατά τη διάρκεια του προηγούμενου χρόνου.

Ευχαριστώ ειλικρινά τον επιβλέποντα Καθηγητή Γεώργιο Χαλεπάκη για την βοήθεια του, την υπομονή του, τις χρήσιμες συμβουλές του, αλλά και για τον ενθουσιασμό με τον οποίο με ενέπνευσε όσον αφορά το θέμα της εργασίας αυτής.

Ιδιαίτερα ευχαριστώ τον Καθηγητή Νίκο Μοσχονά για την υλικοτεχνική υποδομή την οποία μας παρείχε αλλά και για τις συμβουλές και τις ενδιαφέρουσες προτάσεις του, και κυρίως για τις πολύτιμες διορθώσεις του στο κείμενο αυτής της εργασίας.

Ευχαριστώ τον Γεώργιο Γουλιέλμο για την καλή του διάθεση και την προθυμία του να βοηθήσει σε κάθε μου επιστημονικό ή τεχνικό πρόβλημα.

Ευχαριστώ τον Αλέξανδρο Αργυροκαστρίτη, τον πρώτο μου δάσκαλο στο χώρο της Μοριακής Βιολογίας, για τις πολύτιμες συμβουλές του αλλά και για τη συμπαράσταση και το ενδιαφέρον του.

Ευχαριστώ επίσης όλα τα παιδιά στο εργαστήριο του Νίκου Μοσχονά και ιδιαίτερα την Αγγέλα Πασπαράκη, την Μαρία Κοκκινάκη, την Ελεονώρα Καρτσάκη, την Λιλύ Σαραφίδου, την Αναστασία Ρούσσου, τον Ηλία Παυλόπουλο και τον Λάμπρο Μαυρόγιαννη για την κατανόηση και την ενθάρρυνση τους.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Τάσο Οικονόμου και την Λίλυ Καραμάνου για την προθυμία με την οποία δέχτηκαν να μας βοηθήσουν στον καθαρισμό των πρωτεϊνών που εκφράσαμε, αλλά και για τις πολύτιμες συμβουλές τους σε πολλά θέματα.

Ευχαριστώ θερμά τον Ερευνητή Δημήτρη Τζαμαρία και την Νίκη Γουναλάκη για το χώρο εργασίας που μας παρείχαν κατά τη διάρκεια της μετακόμισης του τμήματος Βιολογίας, αλλά και για τις χρήσιμες προτάσεις και συμβουλές τους.

Επίσης ευχαριστώ τον Ερευνητή Ηλία Κραμποβίτη για τη βοήθεια του στην παραγωγή των αντισωμάτων μας, την Ερευνήτρια Κλειώ Μαμμαλάκη για τα ποντίκια που μας διέθεσε για τα πειράματα μας και τον Καθηγητή Μανώλη Στρατάκη για την υλικοτεχνική υποδομή που με προθυμία μας παρείχε.

Τέλος ευχαριστώ το εργαστήριο του Μιχάλη Κοκκινίδη και ιδιαίτερα τον Αλέξανδρο Ροΐδη για την βοήθεια τους αλλά και τον Τάσο Γεωργακόπουλο για την προθυμία του να μας βοηθήσει σε διάφορα προβλήματα.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.1 Γενικές πληροφορίες για τη νόσο Alzheimer	1
1.1.1 Δημιουργία των πλακών αμυλοειδούς στην ασθένεια Alzheimer	2
1.1.2 Σύνδεση 4 γονιδίων με κληρονομικές περιπτώσεις της ασθένειας Alzheimer	8
1.1.3 Ρόλος των πλακών αμυλοειδούς στην παθογένεση της νόσου Alzheimer	12
1.1.4 Μηχανισμοί θανάτου των νευρικών κυττάρων στην ασθένεια Alzheimer	14
1.2 Υπάρχουσα γνώση για το γονίδιο <i>CMRP</i>	17
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	22
2.1 Ανίχνευση βιβλιοθήκης cDNA σε φορέα λExCell <i>EcoRI/CIP</i>	22
2.1.1 Τρυβλία	22
2.1.2 Άπλωμα των βακτηριακών κυττάρων NM522 μετά την μόλυνση τους από τους φάγους της βιβλιοθήκης	22
2.1.3 Μεταφορά των πλακών που σχηματίζονται στα τρυβλία σε μεμβάνες από νάυλον	23
2.1.4 Προϋβριδοποίηση /Υβριδοποίηση των μεμβρανών	24
2.1.5 Πλυσίματα των μεμβρανών	25
2.1.6 Έκθεση / Εμφάνιση	25
2.1.7 Συλλογή των πλακών	25
2.1.8 Απομόνωση φαγικού γενωμικού DNA από υγρή καλλιέργεια	26
2.2 Ανίχνευση βιβλιοθήκης γενωμικού DNA στον φαγικό φορέα λDash II Vector	27
2.3 Πορεία που ακολουθείται για την παραγωγή των αντισωμάτων	28

2.3.1 Υπερέκφραση των πρωτεϊνών σε κύτταρα E.coli BL21(DE3)	29
2.3.2 Ανίχνευση των πρωτεϊνών σε ολόκληρα κυτταρικά εκχυλίσματα (whole cell extracts)	30
2.3.3 Ανίχνευση των πρωτεϊνών στο διαλυτό ή στο αδιάλυτο μέρος των κυτταρικών εκχυλισμάτων	30
2.3.4 Απομόνωση των πρωτεϊνών από τα έγκλειστα σωματίδια (inclusion bodies)	30
2.3.5 Απομάκρυνση του απορρυπαντικού Sarkosyl από τα απομονωμένα έγκλειστα σωματίδια	33
2.3.6 Πρόγραμμα ανοσοποίησης	33
2.3.7 Πηκτώματα πολυακρυλαμίδης-SDS	34
2.3.8 Στύπωμα Western	35
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	37
3.1 Απομόνωση καινούργιων κλώνων cDNA για το <i>CMRP</i>	37
3.2 Παρασκευή πολυκλωνικών αντισωμάτων για την πρωτεΐνη <i>CMRP</i>	40
3.3 Χαρακτηρισμός και απομόνωση γενωμικών ενθεμάτων που περιέχουν το γονίδιο <i>CMRP</i>	45
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	47
4.1 Συλλογή επιπλέον κλώνων για το cDNA του <i>CMRP</i>	47
4.2 Παρασκευή ειδικών πολυκλωνικών αντισωμάτων για την πρωτεΐνη <i>CMRP</i>	47
4.3 Απομόνωση γενωμικών κλώνων για το γονίδιο <i>CMRP</i> μέσω των οποίων θα ανασταλλεί η λειτουργία του ενδογενούς γονιδίου	48
4.4 Πιθανοί συσχετισμοί του γονιδίου <i>CMRP</i> με την ασθένεια Alzheimer.	50
5. REFERENCES	57

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Γενικές πληροφορίες για τη νόσο Alzheimer

Η ασθένεια Alzheimer (AD) είναι μία νευροεκφυλιστική πάθηση και αποτελεί την κυριότερη αιτία που οδηγεί σε άνοια ηλικιωμένους ανθρώπους, καθιστώντας τους ανήμπορους και αβοήθητους όπως ένα νεογέννητο. Προσβάλλει περίπου το 7-10% των ατόμων ηλικίας μεγαλύτερης των 65 ετών και ίσως μέχρι και το 40% των ατόμων ηλικίας μεταξύ 80 και 90 ετών. Μόνο στις Ηνωμένες Πολιτείες, πάσχουν από την ασθένεια γύρω στα 4 εκατομμύρια άνθρωποι με κόστος για την περίθαλψη που φτάνει τα 100 δισεκατομμύρια δολάρια (Marx 1996a). Τόσο ο αριθμός των ασθενών, όσο και το κόστος υπολογίζεται ότι θα τριπλασιαστεί τα επόμενα 25 χρόνια, δεδομένου ότι ο μέσος όρος ζωής αυξάνεται, με αποτέλεσμα η ασθένεια Alzheimer να αποτελέσει ένα από τα πιο σημαντικά προβλήματα υγείας του επόμενου αιώνα.

Η ασθένεια, που περιγράφηκε για πρώτη φορά πριν 90 χρόνια από τον Alois Alzheimer, χαρακτηρίζεται από νευροπαθολογικές φλεγμονές σε περιοχές του εγκεφάλου που είναι σημαντικές για την διανοητική λειτουργία, με αποτέλεσμα να επέρχεται προοδευτική άνοια. Τα πρώτα συμπτώματα της ασθένειας περιλαμβάνουν μικρής έκτασης διαταραχές της μνήμης και της σκέψης, αδυναμία μάθησης, ελαττωμένη προσοχή, νευρικότητα και κυκλοθυμική συμπεριφορά. Καθώς η ασθένεια προχωρεί, ακολουθεί πλήρης απώλεια κάθε κριτικής ικανότητας και λογικής και ο ασθενής μένει κατάκοιτος. Το χρονικό διάστημα που μεσολαβεί από την εμφάνιση των πρώτων συμπτωμάτων της νόσου μέχρι τον θάνατο, κυμαίνεται ανάμεσα σε 3 και 15 χρόνια. Συγκεκριμένα η παθολογία της νόσου χαρακτηρίζεται από, συσσώρευση εξωκυτταρικών πλακών αμυλοειδούς, εκτεταμένη απώλεια κυτταρικών σωμάτων νευρώνων, ποικίλες μετατροπές στους νευρίτες του φλοιού (ακόμα και σ' αυτούς που δεν περικλείονται από τις πλάκες), αλλά και από φλεγμονές σε συγκεκριμένες περιοχές του εγκεφάλου. Οι παραπάνω παθολογικές και ιστολογικές αλλαγές παρατηρούνται κυρίως στον ιππόκαμπο, στο νεοφλοιό, αλλά και στον αμυγδαλοειδή πυρήνα, καθώς και σε μερικούς

υποφλοιώδεις πυρήνες που προβάλλουν στον ιππόκαμπο και στον νεοφλοιό (Roses, 1996; Selkoe, 1991).

1.1.1 Δημιουργία των πλακών αμυλοειδούς στην ασθένεια Alzheimer

Η πλάκα αμυλοειδούς είναι ένα διατεταγμένο συσσωμάτωμα ινώδους πρωτεΐνης, στην οποία το κύριο συστατικό είναι ένα υδρόφοβο πρωτεολυτικό προϊόν 39-43 αμινοξέων, το οποίο προέρχεται από την ανθρώπινη πρόδρομη πρωτεΐνη του αμυλοειδούς (β-APP: β-Amyloid-Precursor-Protein) και που είναι γνωστό ως πεπτίδιο β-αμυλοειδούς ή πεπτίδιο βA4 ή πεπτίδιο Αβ. Άλλες πρωτεΐνες που μπορεί να ανιχνεύονται στις πλάκες, είναι η ακετυλοχολινεστεράση (AChE), η οποία επιταχύνει το σχηματισμό του αμυλοειδούς (Inestrosa *et al.*, 1996), το συστατικό P του αμυλοειδούς (amyloid P component), η απολιποπρωτεΐνη J (ApoJ), η απολιποπρωτεΐνη E (ApoE), η α1-αντιχυμοθρυψίνη, πρωτεΐνες του συμπληρώματος, ανοσοσφαιρίνες, λυσοσωματικές πρωτεάσες, η πρωτεογλυκάνη της θεικής ηπαράνης (heparan sulfate proteoglycan), καθώς και το NAC (Non - Αβ - component; Iwai *et al.*, 1995) που είναι πρωτεολυτικό προϊόν της NACP (Non-Aβ-Component Precursor Protein), η οποία είναι μια συναπτική πρωτεΐνη που εντοπίζεται αποκλειστικά στον εγκέφαλο. Εκτός από τον πυκνό πυρήνα νηματίων αμυλοειδούς (που συντίθεται από νημάτια Αβ: β αμυλοειδές) μήκους 6-10 nm και τις παραπάνω πρωτεΐνες, οι πλάκες αυτές περιλαμβάνουν δυστροφικούς νευρίτες και νευράξονες και περιβάλλονται από επανεργοποιημένα αστροκύτταρα και ενεργοποιημένη μικρογλοία (μέσα και γύρω από τον κεντρικό πυρήνα). Αυτές οι πλάκες είναι οι λεγόμενες νευριτικές ή γεροντικές (neuritic ή senile plaques) και χαρακτηρίζουν σχεδόν όλους τους ασθενείς που πάσχουν από AD (Selkoe, 1994).

Τόσο στους ασθενείς με AD όσο και στους υγιείς ηλικιωμένους ανθρώπους, το πεπτίδιο Αβ συναθροίζεται πολύ πιο συχνά σε άμορφες αποθέσεις (μη νηματοειδείς σχηματισμοί των πεπτιδίων Αβ), οι οποίες δεν περιλαμβάνουν ούτε κατεστραμμένους νευρίτες, ούτε ενεργοποιημένη μικρογλοία ή αστροκύτταρα. Αυτές οι πλάκες είναι γνωστές σαν διαχεόμενες ή προαμυλοειδικές (diffuse ή preamyloid plaques), και σε αντίθεση με τις γεροντικές πλάκες περιέχουν τη μεγαλύτερη και περισσότερο αμυλοειδογενή μορφή του πεπτιδίου Αβ, την Αβ₄₂ (οι γεροντικές πλάκες περιέχουν και

το Aβ₄₂ αλλά και την πιο άφθονη μορφή Aβ₄₀). Πιστεύεται ότι οι διαχεόμενες πλάκες μπορούν κάτω από κατάλληλες συνθήκες (π.χ. παρουσία φλεγμονών) να «ωριμάσουν» και να «εξελιχθούν» σε γεροντικές πλάκες. Το γεγονός αυτό μάλλον επιτυγχάνεται μέσω της ενεργοποίησης των αστροκυττάρων και της μικρογλοίας και των κυτοκινών που παράγονται από αυτά. Η πορεία των γεγονότων που πιθανόν ακολουθείται για την δημιουργία των πλακών αμυλοειδούς εικονίζεται στο μοντέλο, που φαίνεται στο σχήμα 1.

Σχήμα 1: Μοντέλο ωρίμανσης των πλακών (Patterson, 1995).

α) Αρχικά η διαχεόμενη πλάκα περιέχει μια άμορφη μάζα πεπτιδίων Aβ και μη ενεργοποιημένα αστροκύτταρα και μικρογλοία. β) Καθώς αρχίζει η συμπίκνωση των πεπτιδίων Aβ παρατηρείται ενεργοποίηση των αστροκυττάρων και της μικρογλοίας με συνακόλουθη απελευθέρωση κυτοκινών και πρωτεϊνών οξείας φάσεως. Μέσω αυτών των φλεγμονωδών αλλαγών, πραγματοποιείται παραπέρα ενεργοποίηση των παραπάνω κυττάρων και αύξηση των ουσιών που απελευθερώνουν, γεγονός που οδηγεί τελικά σε αυξημένη παραγωγή και επεξεργασία της β-APP (μάλιστα η επεξεργασία της β-APP διαφοροποιείται κατά τέτοιο τρόπο ώστε να αυξάνει η παραγωγή των πεπτιδίων Aβ), και τελικά σε ωρίμανση των πλακών. Επίσης οι παραπάνω φλεγμονώδεις αλλαγές άμεσα ή έμμεσα (μέσω της νευροτοξικότητας των πεπτιδίων Aβ) μπορούν να προκαλέσουν αλλοιώσεις σε γειτονικούς νευρώνες και σημαντικές αλλαγές στο μεταβολισμό τους, οι οποίες μπορούν να οδηγήσουν και στη δημιουργία NFTs. γ) Δημιουργία πυκνού πυρήνα αμυλοειδούς, δυστροφικοί νευρίτες, ενεργοποιημένα αστροκύτταρα και μικρογλοία, δηλαδή δημιουργία γεροντικής πλάκας. δ) Η τελική και πιο ώριμη μορφή της πλάκας η οποία στερεείται την παρουσία άμορφων πεπτιδίων Aβ αλλά και κυτταρικών στοιχείων (Patterson, 1995; Harper *et al.*, 1997).

Αξίζει να σημειωθεί ότι εναποθέσεις πλακών αμυλοειδούς παρατηρούνται σε όλους σχεδόν τους ασθενείς με AD αλλά σε μεγάλες ποσοτικές αποκλίσεις και στα τοιχώματα των μηνίγγων και των εγκεφαλικών αιμοφόρων αγγείων.

Τέλος, ένα άλλο νευροπαθολογικό χαρακτηριστικό σε αρκετούς ασθενείς με AD, είναι τα νευροϊνιδικά συμπλέγματα (Neurofibrillary Tangles; NFTs). Αυτά είναι πυκνές δεσμίδες (μη συνδεδεμένες με τη μεμβράνη) μακρών και αδιακλάδωτων νηματίων, που συγκεντρώνονται στο περιπυρηνικό κυτταρόπλασμα αρκετών νευρώνων του φλοιού και του μεσολόβιου. Σ' αυτές τις νηματοειδείς δομές το κάθε νημάτιο είναι πάχους 10nm και τυλίγεται ελικοειδώς, το ένα γύρω από το άλλο, με αποτέλεσμα να δημιουργούνται ζευγαρωμένα ελικοειδή νημάτια (Paired Helical Filaments; PHFs). Η πιο σημαντική πρωτεϊνική υπομονάδα αυτών των νηματίων είναι μία υπερφωσφοριλιωμένη μορφή της πρωτεΐνης tau, η οποία είναι μία νευρωνική πρωτεΐνη που συνδέεται με τους μικροσωληνίσκους. Τα NFTs μπορεί να είναι τόσο πυκνά ώστε είναι δυνατόν να παραμορφώσουν το σώμα των νευρώνων και να μετατοπίσουν τον πυρήνα τους. Επίσης τα PHFs μπορούν να βρεθούν και εντός των νευριτών που εκφυλίζονται στη νόσο Alzheimer (Selkoe, 1994).

Κλινικά η διάγνωση της ασθένειας γίνεται με βάση το ιατρικό παρελθόν του ασθενούς, νευροφυσιολογικές εξετάσεις, αλλά και την παρατήρηση της εικόνας του εγκεφάλου (brain imaging). Βέβαια η οριστική διάγνωση της ασθένειας (αφού υπάρχουν και άλλες αιτίες που προκαλούν απώλεια της μνήμης και διανοητική δυσλειτουργία) μπορεί να γίνει με μικροσκοπική μελέτη εγκεφαλικού ιστού είτε με βιοψία, είτε πιο συχνά με αυτοψία (δηλαδή με μεταθανάτια μελέτη του εγκεφάλου), όπου πρέπει να παρατηρούνται τα παθολογικά χαρακτηριστικά που προαναφέραμε.

Το πρόδρομο μόριο του πεπτιδίου Αβ, που τελικά σχηματίζει τις πλάκες αμυλοειδούς, είναι όπως αναφέρθηκε η β-APP. Η πρωτεΐνη αυτή κωδικοποιείται από ένα γονίδιο το οποίο βρίσκεται στο χρωμόσωμα 21 και συγκεκριμένα από 18 εξόνια, εκ των οποίων το 16 και το 17 κωδικοποιούν εν μέρει το πεπτίδιο Αβ. Το γονίδιο της β-APP είναι ένα γονίδιο βασικής λειτουργίας, το οποίο εκφράζεται σε όλους τους ιστούς (ιδιαίτερα στον εγκέφαλο, καρδιά, σπλήνα, νεφρό και μύες). Η αμινοξική αλληλουχία της β-APP υποδηλώνει ότι είναι μία διαμεμβρανική πρωτεΐνη (integral membrane protein), δηλαδή αποτελείται από μία εξωκυτταρική περιοχή, μία διαμεμβρανική περιοχή

και μία κυτταροπλασματική ουρά. Επίσης η πρωτεΐνη υφίσταται τόσο N - όσο και O - γλυκοζυλίωση (είναι δηλαδή μια διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη) και περιλαμβάνει μία όξινη περιοχή. Από το αρχικό γονίδιο της β-APP μπορούν να προκύψουν διάφορα ισόμορφα, μέσω εναλλακτικής συναρμολόγησης του RNA, τα οποία έχουν μέγεθος που κυμαίνεται μεταξύ 563-770 αμινοξέων. Όλα τα ισόμορφα συνθέτονται ως διαμεμβρανικές πρωτεΐνες και επεξεργάζονται, κάθε φορά σε διαφορετικό βαθμό, μέσω πρωτεόλυσης, N- και O- γλυκοζυλίωσης, φωσφορυλίωσης ή θείωσης. Οι κυριότερες ισομορφές της β-APP που βρίσκονται στον εγκέφαλο και οι οποίες περιέχουν το πεπτίδιο Αβ (το οποίο βρίσκεται στο αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης) είναι οι β-APP₆₉₅, β-APP₇₅₁ και β-APP₇₇₀. Απ' αυτές η β-APP₆₉₅ εντοπίζεται κυρίως στους νευρώνες, ενώ οι άλλες δύο παράγονται παντού και περιλαμβάνουν το 7ο εξόνιο που κωδικοποιεί για μια περιοχή που παρουσιάζει υψηλή ομολογία με τον αναστολέα των πρωτεασών Kunitz. Άλλες λιγότερο συχνές ισομορφές της β-APP είναι οι 752, 733, 714, 696, 677 κ.λ.π. Αξίζει να σημειωθεί ότι η β-APP ανήκει σε μια πολυγονιδιακή οικογένεια που περιλαμβάνει πρωτεΐνες που μοιάζουν με την β-APP, αλλά μόνο η β-APP περιλαμβάνει την περιοχή του πεπτιδίου Αβ.

Στην άγνωστη μέχρι σήμερα πρωτεάση που εμπλέκεται στην πρωτεολυτική επεξεργασία της β-APP δόθηκε το όνομα εκκρετάση, χωρίς πάντως να είναι ακόμα γνωστό αν υπάρχουν περισσότερες από μια ανάλογες πρωτεΐνες. Η β-APP επεξεργάζεται μέσω δύο διαφορετικών πρωτεολυτικών μονοπατιών. Το κύριο μονοπάτι επεξεργασίας της β-APP είναι το συμβατικό εκκριτικό μονοπάτι (conventional ή constitutive secretory pathway), το οποίο κόβει την β-APP εντός της εξωκυττάριας περιοχής του Αβ, με αποτέλεσμα να προκύπτουν ένα μεγάλο εκκρινόμενο και διαλυτό πολυπεπτίδιο της β-APP (APPs), αλλά και ένα μεμβρανικό κομμάτι 10-12 kDa (P10), το οποίο δεν είναι αμυλοειδογενές και έτσι δεν οδηγεί στην παθολογία με τις πλάκες αμυλοειδούς που παρατηρούνται στην AD. Στη συνέχεια το μεμβρανικό κομμάτι μπορεί να κοπεί από μια πρωτεάση (την ίδια με πριν ή και διαφορετική) μέσα στη μεμβράνη και να δώσει ένα εκκρινόμενο διαλυτό κομμάτι 3kDa, το P3 και ένα μεμβρανικό 7kDa (P7; σχ. 2). Από την άλλη μεριά υπάρχει και το μονοπάτι κατά το οποίο προκύπτει το πεπτίδιο Αβ και που είναι γνωστό ως το δευτερεύον μονοπάτι ή μονοπάτι παραγωγής πεπτιδίου Αβ (Minor ή Αβ Generating pathway). Σ' αυτό το μονοπάτι η β-APP κόβεται τόσο

διαμεμβρανικά όσο και εξωκυτταρικά με αποτέλεσμα να προκύπτουν ένα εκκρινόμενο κομμάτι 39-43 αμινοξέων, το πεπτίδιο Αβ ή βΑ4 (το οποίο αποτελεί το κύριο συστατικό των πλακών αμυλοειδούς στην νόσο Alzheimer), αλλά και ένα άλλο μεγάλο εκκρινόμενο και διαλυτό πολυπεπτίδιο της β-APP (APPs), καθώς και ένα διαμεμβρανικό κομμάτι 7kDa (P7). Τα γεγονότα αυτά εικονίζονται παρακάτω (σχ. 2).

Σχήμα 2: Μονοπάτια πρωτεολυτικής επεξεργασίας της β-APP.

APPs (α), (β): Διαλυτά και εκκρινόμενα πολυπεπτίδια της β-APP.

P3, P7, P10, P11: Πρωτεολυτικά προϊόντα της β-APP, 3, 7,10 ,11 kDa αντίστοιχα.

α , β , γ: Είναι οι πιθανές εκκρετάσες που θεωρούνται ότι κόβουν την β-APP στα σημεία που φαίνονται στο σχήμα

Αξίζει να σημειωθεί ότι το μονοπάτι αυτό συμβαίνει και σε φυσιολογικά άτομα, σε μικρότερο βέβαια βαθμό σε σχέση με τα άτομα που πάσχουν από AD, δεδομένου ότι το πεπτίδιο Αβ, α) εκκρίνεται από κυτταροκαλλιέργειες φυσιολογικών νευρικών αλλά και μη νευρικών κυττάρων και β) βρίσκεται στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό και ασθενών με Alzheimer αλλά και υγιών ατόμων. Τα παραπάνω εξηγούν και την παρουσία διαχεόμενων πλακών στους εγκεφάλους ηλικιωμένων αλλά υγιών ατόμων.

Όσον αφορά το που ακριβώς στο κύτταρο πραγματοποιείται η πρωτεολυτική επεξεργασία της β-APP έχουν διατυπωθεί δύο σενάρια. Σύμφωνα με το πρώτο, μερικά από τα ολόκληρα μόρια της β-APP, τα οποία βρίσκονται στη μεμβράνη, μαζί με κάποια άλλα καρβοξυτελικά μεμβρανικά κομμάτια της β-APP, ξαναεσωτερικοποιούνται και οδηγούνται από την κυτταρική μεμβράνη στα λυσοσώματα όπου και υφίστανται την τελική τους πρωτεόλυση. (Η πρωτεΐνη β-APP έχει στην κυτταροπλασματική της περιοχή την συντηρημένη αλληλουχία NPXY, με την οποία μπορεί να επιτευχθεί η εσωτερικοποίηση της). Εκτός όμως από το παραπάνω μονοπάτι εσωτερικοποίησης (reinternalization pathway), η β-APP μπορεί να ακολουθήσει και το μονοπάτι που υποστηρίζει το δεύτερο σενάριο. Σύμφωνα μ' αυτό, είναι πιθανό η β-APP, αλλά και κομμάτια που περιέχουν το πεπτίδιο Αβ, να οδηγηθούν από το ενδοπλασματικό δίκτυο

και το σύμπλεγμα Golgi, όπου και πραγματοποιείται η συνθεσή τους, κατευθείαν στα ενδοσώματα και στα λυσοσώματα για περαιτέρω επεξεργασία. (Haass *et al.*, 1993; Hendriks *et al.*, 1996; De Strooper, *et al.*, 1993; Haass *et al.*, 1995; Zhong *et al.*, 1994).

Συνεπώς το μεγάλο ερώτημα που παραμένει αναπάντητο, αφορά το ποιές είναι αυτές οι πρωτεάσες, αλλά και το αν κόβουν την β-APP στην πλασματική, ή σε κάποια άλλη ενδοκυτταρική μεμβράνη. Η δε ταυτοποίηση αυτών των ενζύμων, αποτελεί έναν από τους κύριους στόχους της έρευνας στο πεδίο της ασθένειας Alzheimer, λόγω της συμμετοχής τους στην παραγωγή του πεπτιδίου Αβ και συνεπώς στη παθογένεση της ασθένειας.

Η φυσιολογική λειτουργία της β-APP δεν είναι ακόμα γνωστή, ενώ η διαφορετική κατανομή του mRNA των ισομορφών της β-APP στους ιστούς, υποδηλώνει και διαφορετικές λειτουργίες των ισομορφών αυτών (Sola *et al.*, 1993). Πάντως πιστεύεται ότι κάποιες ισομορφές της β-APP έχουν λειτουργίες που προάγουν την ανάπτυξη και μπορούν να ρυθμίσουν με θετικό τρόπο τις αποφύσεις νευριτών, μέσω αλληλεπιδράσεων με μόρια που είναι προσκολλημένα σε νευρικά κύτταρα, αλλά και με πρωτεΐνες της εξωκυττάριας ουσίας, όπως το κολλαγόνο, η λαμινίνη και οι πρωτεογλυκάνες. Επίσης η β-APP μπορεί να παίζει ένα προστατευτικό ρόλο στα νευρικά κύτταρα μέσω ρύθμισης των ενδοκυτταρικών επιπέδων Ca^{++} . Συγκεκριμένα έχει δειχθεί ότι η β-APP μπορεί να ενεργοποιήσει κανάλια K^{+} και έτσι να χαμηλώσει τα επίπεδα Ca^{++} στο κύτταρο, με αποτέλεσμα την καταστολή της νευρικής δραστηριότητας. Μ' αυτόν ίσως τον τρόπο επιτυγχάνεται και ο ρόλος της β-APP στη συναπτογένεση, στη συναπτική πλαστικότητα και στην επιβίωση του κυττάρου (Furukawa *et al.*, 1996; Ohta *et al.*, 1993). Επίσης πιστεύεται ότι η β-APP μπορεί να εμπλέκεται στην επούλωση των πληγών. Επιπλέον η ανάλυση του φαινοτύπου που παρουσιάζουν ποντίκια που τους λείπει το προϊόν του γονιδίου της β-APP (APP- deficient mice), αλλά και διαγονιδιακά ποντίκια τα οποία εκφράζουν εκτοπικά μια μεταλλαγμένη μορφή της πρωτεΐνης β-APP, επιβεβαίωσε ότι η β-APP μπορεί να παίζει ρόλο στη διαδικασία εκφυλισμού και αναγέννησης νευρών και μυών (Zheng *et al.*, 1995; Moechars 1996).

1.1.2 Σύνδεση 4 γονιδίων με κληρονομικές περιπτώσεις της ασθένειας

Alzheimer

Παρόλο που οι περισσότερες περιπτώσεις ασθενών με AD εμφανίζονται ως σποραδικές, αναγνωρίζεται ότι υπάρχουν και κληρονομικοί παράγοντες που παίζουν σημαντικό ρόλο στην παθογένεση αυτής της ασθένειας. Πληθυσμιακές μελέτες αποκάλυψαν ότι το 25-40% των περιπτώσεων έχουν τουλάχιστον άλλο ένα μέλος της οικογένειάς τους που πάσχει από την ασθένεια Alzheimer. Στις περισσότερες οικογένειες η ασθένεια κληρονομείται ακολουθώντας ένα επικρατή αυτοσωμικό τρόπο με διεισδυτικότητα η οποία εξαρτάται από την ηλικία. Μέχρι τώρα έχουν ανακαλυφθεί 4 γονίδια (σε διαφορετικά χρωμοσώματα) μεταλλάξεις των οποίων συνδέονται με το σύνολο των κλινικών συμπτωμάτων, τις ενδείξεις και τα νευροπαθολογικά κριτήρια βάσει των οποίων καθορίζεται η AD. Το πρώτο απ' αυτά τα γονίδια είναι το γονίδιο της β-APP, το οποίο συνδέεται με τη μορφή της ασθένειας AD1, η οποία εκδηλώνεται σχετικά νωρίς (early onset). Είναι σημαντικό να τονισθεί ότι ασθενείς με τρισωμία 21 (Down syndrome) αναπτύσσουν νευροπαθολογικές μεταβολές δυσδιάκριτες από εκείνες που εντοπίζονται στην AD, με τη διαφορά όμως ότι στην τρισωμία 21 αυτά τα συμπτώματα ξεκινούν από πολύ νεαρή ηλικία. Μπορούμε λοιπόν εύκολα να υποθέσουμε, δεδομένου ότι τα αποτελέσματα της τρισωμίας 21 οφείλονται στην παρουσία ενός παραπάνω χρωμοσώματος 21 και το γονίδιο της β-APP βρίσκεται στο χρωμόσωμα 21, ότι μία αύξηση στη γονιδιακή δόση της β-APP μπορεί να οδηγήσει στα χαρακτηριστικά της AD που υπάρχουν στο σύνδρομο Down. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι, όλες οι γνωστές σημειακές μεταλλαγές του γονιδίου β-APP που εντοπίστηκαν σε ασθενείς που πάσχουν από AD, συγκεντρώνονται είτε στις εξειδικευμένες θέσεις, είτε γύρω από τις εξειδικευμένες θέσεις που πρωτεολύεται η β-APP, από την ή τις εκκρετάσες (Haass *et al.*, 1994). Δηλαδή όλες επηρεάζουν την πρωτεόλυση της β-APP και οδηγούν σε αυξημένη έκκριση του πεπτιδίου Αβ, συμβάλλοντας μ' αυτόν το τρόπο στη δημιουργία πλακών αμυλοειδούς και κατά συνέπεια στην νόσο Alzheimer. Συγκεκριμένα, οι μεταλλαγές που έχουν βρεθεί ως τώρα στο γονίδιο της β-APP είναι οι ακόλουθες:

α) Η β-APP_{670/671} (Swedish mutation), η οποία οδηγεί σε αύξηση της παραγωγής του πεπτιδίου Αβ.

β) Η β-APP₇₁₇ (London mutation), η οποία οδηγεί σε αύξηση της αναλογίας του πεπτιδίου Αβ_{1-42, 43} προς το πεπτίδιο Αβ₁₋₄₀. Κάτι τέτοιο διευκολύνει την δημιουργία πλακών αμυλοειδούς αφού τα πεπτίδια Αβ_{1-42, 43} έχουν την τάση να συναθροίζονται πιο εύκολα και πιο γρήγορα, δεδομένου ότι τώρα το στάδιο της πυρήνωσης επιταχύνεται.

γ) Η β-APP₆₉₂ (Flemish mutation), η οποία οδηγεί σε μικρή αύξηση της παραγωγής του πεπτιδίου Αβ, σε σχέση με το P3 που μειώνεται.

δ) Η β-APP₆₉₃ (Dutch mutation), αυξάνει τόσο τον σχηματισμό των νημάτων Αβ όσο και την σταθερότητα των νημάτων αυτών.

ε) Η β-APP₆₄₂ (όπου η Val στη θέση 642 της β-APP₆₉₅ αντικαθίστανται από την Ile, Phe ή Gly). Και αυτή η μεταλλαγή αυξάνει την παραγωγή πλακών αμυλοειδούς, με το να αυξάνει το λόγο του πεπτιδίου Αβ_{1-42,43} / Αβ₁₋₄₀. Αξίζει να σημειωθεί ότι η έκφραση αυτών των συγκεκριμένων μεταλλαγμένων μορφών της β-APP σε νευρικά κύτταρα οδηγεί στον τεμαχισμό του νουκλεοσωμικού τους DNA. Επιπλέον η διαδικασία αυτή επιτυγχάνεται μέσω G πρωτεϊνών και απαιτεί την κυτταροπλασματική περιοχή της β-APP. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι ορισμένες τουλάχιστον μεταλλαγές της β-APP, σχετίζονται με την νόσο Alzheimer, όχι μόνο αυξάνοντας την παραγωγή των πλακών αμυλοειδούς, αλλά και προκαλώντας το θάνατο νευρικών κυττάρων μέσω της συνεχούς ενεργοποίησης ενός μονοπατιού μετάδοσης σήματος που ξεκινάει από την β-APP και οδηγεί σε απόπτωση (Hendriks *et al.*, 1996).

Το δεύτερο γονίδιο το οποίο σχετίζεται με την AD, είναι το γονίδιο που κωδικοποιεί για την αποπολιπρωτεΐνη E (ApoE). Η ApoE είναι μια ομοτετραμερής πρωτεΐνη με υψηλό ποσοστό α-ελίκων, η οποία εμπλέκεται στο μεταβολισμό της χοληστερόλης. Υπάρχουν τρία αλληλόμορφα της ApoE στον ανθρώπινο πληθυσμό, το E2, το E3 και το E4, εκ των οποίων το E3 είναι το πιο διαδεδομένο. Έχειδειχθεί ότι το αλληλόμορφο E4 του γονιδίου της ApoE (το οποίο βρίσκεται στο χρωμόσωμα 19) συνδέεται με τη μορφή της ασθένειας AD2, που εκδηλώνεται σε μεγάλη ηλικία (μεγαλύτερη των 60 ετών). Γενικότερα οι φαινότυποι της ApoE που περιέχουν την ισομορφή E4 (E4/4, E4/3) προδιαθέτουν για τη νόσο Alzheimer ενώ η ApoE3 και περισσότερο η ApoE2 έχουν προστατευτικό ρόλο. Επομένως, αντιλαμβανόμαστε ότι ο μεταβολισμός της ApoE σχετίζεται με την AD. Πιστεύεται ότι οι ειδικές, για κάθε ισομορφή της ApoE, αλληλεπιδράσεις με άλλα μόρια, ίσως καθορίζουν τον ρόλο της

κάθε ισομορφής στη νόσο Alzheimer. Τα μόρια αυτά μπορεί να είναι πρωτεΐνες ή πεπτίδια που υπάρχουν στα NFTs στις γεροντικές πλάκες αλλά και στις φλεγμονές του εγκεφάλου που παρατηρούνται κατά την εμφάνιση της ασθένειας. Επίσης οι διαφορετικές για κάθε ισομορφή μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις, ίσως να μπορούν να εξηγήσουν την διαφορετική επίδραση που έχει κάθε αλληλόμορφο της ApoE στην AD. Γενικά ο μηχανισμός δράσης της ApoE στην εκδήλωση της AD δεν είναι γνωστός, όμως ασθενείς με AD οι οποίοι φέρουν το αλληλόμορφο E4 παρουσιάζουν μία αυξημένη τάση απόθεσης πεπτιδίων Αβ (η οποία εξαρτάται από τη δόση του E4), και μάλιστα του Αβ₁₋₄₀. Πρόσφατα έχει βρεθεί ότι σε φυσιολογικό pH 7,4 και θερμοκρασία 37 °C η ApoE έχει τη δυνατότητα να σχηματίζει πρωτεϊνικά σύμπλοκα με το πεπτίδιο Αβ. Μάλιστα η ικανότητα σχηματισμού αυτών των συμπλεγμάτων ακολουθεί την σειρά ApoE2>ApoE3>ApoE4. Η παρατήρηση αυτή παρέχει ενδείξεις ότι η ισχυρή πρόσδεση της ApoE στο πεπτίδιο Αβ συσχετίζεται αντίστροφα με τον κίνδυνο ανάπτυξης της νόσου Alzheimer (Chan *et al.*, 1996; Strittmatter *et al.*, 1996; Selkoe, 1997).

Πρόσφατα ταυτοποιήθηκαν δύο γονίδια (μέλη της ίδιας γονιδιακής οικογένειας) που ονομάστηκαν *presenilin-1* (*PS-1*, στο χρωμόσωμα 14) και *presenilin-2* (*PS-2*, στο χρωμόσωμα 1) και τα οποία είναι υπεύθυνα για τη μορφή AD3 και AD4 της ασθένειας Alzheimer. Και οι δύο μορφές της ασθένειας κληρονομούνται με επικρατή αυτοσωμικό τρόπο, ενώ η μορφή AD3 εκδηλώνεται και σε μικρή ηλικία. Επίσης μεταλλαγές στο γονίδιο της *PS-1*, εξηγούν το 70-80% των κληρονομικών περιπτώσεων της Alzheimer που εκδηλώνονται νωρίς και οι οποίες αποτελούν το 10% όλων των περιπτώσεων της Alzheimer.

Η πρωτεϊνική αλληλουχία των πρεσενιλινών υποδηλώνει ότι περιέχουν 7 διαμεμβρανικές περιοχές, και μοιάζουν με υποδοχείς, κανάλια ή δομικές μεμβρανικές πρωτεΐνες. Και οι δύο πρωτεΐνες αποτελούνται από 450 περίπου αμινοξέα και παρουσιάζουν ομοιότητα που φθάνει το 67%. Η ομοιότητα φτάνει το 84% στις διαμεμβρανικές περιοχές των δύο προϊόντων, ενώ οι μη διαμεμβρανικές περιοχές είναι λιγότερο συντηρημένες. Γενικά οι μεταλλαγές στις πρεσενιλίνες που σχετίζονται με την AD εντοπίζονται, είτε στις θηλειές γύρω από τις διαμεμβρανικές περιοχές, είτε μέσα σ' αυτές και φαίνεται ότι επηρεάζουν τόσο την ένθεση, όσο και την αγκυροβόληση των πρωτεϊνών αυτών στις μεμβράνες (γεγονός πολύ σημαντικό, όπως φαίνεται, για τη

λειτουργία τους) (Sherrington *et al.*, 1995; Levy-Lahad *et al.*, 1996). Αξίζει να σημειωθεί ότι η PS-1 υφίστανται ενδοπρωτεολυτική επεξεργασία, οπότε προκύπτουν δύο προϊόντα μεγέθους 17 kDa και 27 kDa. Η σημασία αυτού του κοψίματος δεν είναι ακόμα γνωστή (Thinakaran *et al.*, 1996).

Ο ρόλος των πρεσενιλινών δεν είναι ακόμα γνωστός. Πάντως έχει βρεθεί ότι η PS-1 συμμετέχει στο μονοπάτι του Notch το οποίο ευθύνεται για τη μετάδοση σημάτων που καθορίζουν τις αποφάσεις που παίρνει ένα κύτταρο για τον τελικό καθορισμό της λειτουργίας του. Το πως συμμετέχει η PS-1 και ίσως και η PS-2 (αφού παρουσιάζει υψηλή ομολογία με την PS-1) στο μονοπάτι του Notch δεν είναι γνωστό, αλλά υπάρχουν δύο υποθέσεις σύμφωνα με τις οποίες: είτε έχουν ένα άμεσο ρόλο στη σηματοδότηση με το να αναμεταδίδουν τα σήματα του Notch στον πυρήνα, είτε μετέχουν έμμεσα, π.χ. «χτίζοντας» ή συντηρώντας το μονοπάτι.

Περαιτέρω μελέτες που έχουν γίνει με βάση τις 30 μεταλλαγές στα γονίδια των πρεσενιλινών που έχουν ανακαλυφθεί μέχρι σήμερα και που σχετίζονται με την AD έδειξαν ότι προκαλείται αύξηση στη παραγωγή του πεπτιδίου Αβ_{1-42,43} και επομένως αύξηση στη δημιουργία των πλακών αμυλοειδούς (Duff *et al.*, 1996). Αντιλαμβανόμαστε λοιπόν ότι οι μεταλλαγές στις πρεσενιλίνες αλλάζουν τον τρόπο με τον οποίο τα κύτταρα επεξεργάζονται την β-APP, είτε επειδή χάνεται η φυσιολογική τους λειτουργία, είτε επειδή ανακτάται μια καινούργια τοξική λειτουργία. Για παράδειγμα έχει δειχθεί πρόσφατα η εμπλοκή της PS-2 στην απόπτωση των νευρικών κυττάρων (μέσω της δράσης πρωτεϊνών G) σε κυτταροκαλλιέργειες. Μ' αυτόν τον τρόπο, και αν οι μεταλλαγές της PS-2 έχουν παρόμοια δράση στον εγκέφαλο, μπορούμε να πούμε ότι οι μεταλλαγές στο γονίδιο της PS-2 τουλάχιστον, οδηγούν στην AD επιταχύνοντας την διαδικασία των μηχανισμών απόπτωσης και κατά συνέπεια του νευροεκφυλισμού που χαρακτηρίζει τη νόσο. Εκτός όμως από αυτή την άμεση σχέση με την AD η αυξημένη τάση για απόπτωση που προκαλούν ορισμένες μεταλλαγές της PS-2, μπορεί (μέσω της ενεργοποίησης σιναλών απόπτωσης) να πυροδοτήσει μια αντίδραση stress, κατά την οποία θα διαταραχθεί ο τρόπος επεξεργασίας της β-APP, έτσι ώστε να αυξηθεί η παραγωγή πεπτιδίων Αβ και κατά συνέπεια η δημιουργία πλακών αμυλοειδούς που χαρακτηρίζουν την AD (Marx, 1996β).

Τέλος τα αποτελέσματα που προκύπτουν από ποντίκια στα οποία έχει αφαιρεθεί το γονίδιο της PS-1 (*PS-1* *-/-* mice), δείχνουν ότι η PS-1 απαιτείται για τον σωστό σχηματισμό του αξονικού σκελετού, για την φυσιολογική νευρογένεση αλλά και για την επιβίωση των κυττάρων (Shen *et al.*, 1997).

1.1.3 Ρόλος των πλακών αμυλοειδούς στην παθογένεση της νόσου

Alzheimer

Ένα αμφιλεγόμενο ερώτημα για την εμφάνιση και εξέλιξη της νόσου Alzheimer, το οποίο ακόμα παραμένει αναπάντητο, είναι το αν η εναπόθεση του αμυλοειδούς και η δημιουργία των πλακών αποτελεί την αιτία, ή είναι απλώς ένα παραπροϊόν των μεταβολών που συμβαίνουν στον εγκέφαλο και οι οποίες τελικά οδηγούν στο χάσιμο της μνήμης και στα υπόλοιπα συμπτώματα της ασθένειας.

Μέχρι τώρα είδαμε ότι και τα τέσσερα γνωστά γονίδια, τα οποία ευθύνονται για τις κληρονομικές περιπτώσεις της AD, αυξάνουν είτε την παραγωγή, είτε την εναπόθεση των πεπτιδίων Αβ στον εγκέφαλο. Δηλαδή τα προϊόντα των γονιδίων αυτών συνδέονται μεταξύ τους λειτουργικά, είτε με το να συμβάλλουν άμεσα στη δημιουργία των πλακών αμυλοειδούς, είτε έμμεσα, με το να εμπλέκονται στη βιοχημική επεξεργασία της β-APP. Επίσης από μελέτες που έχουν γίνει σε ασθενείς με τρισωμία 21, σε ασθενείς με AD, σε φυσιολογικούς ηλικιωμένους ανθρώπους, σε ανθρώπους που παρουσιάζουν άλλες ασθένειες που σχετίζονται με εναποθέσεις αμυλοειδούς, σε διαγονιδιακά ποντίκια, αλλά και σε κυτταροκαλλιέργειες νευρώνων, έχει προκύψει ότι: Η συνάθροιση των πεπτιδίων Αβ στον εγκεφαλικό φλοιό αποτελεί ένα πρώιμο και αναπόσπαστο γεγονός στην εξέλιξη της ασθένειας Alzheimer, το οποίο προηγείται των άλλων φλεγμονών του εγκεφάλου, αλλά και όλων των άλλων παθολογικών και κλινικών συμπτωμάτων της AD, κατά αρκετά χρόνια, ακόμα και δεκαετίες, δείχνοντας έτσι ότι μάλλον προηγείται της παθολογίας της AD, παρά ότι αποτελεί ένα αποτέλεσμα αυτής. Μερικές φορές μάλιστα οι εναποθέσεις του αμυλοειδούς δεν ακολουθούνται από την εκδήλωση της AD. Αντιλαμβανόμαστε λοιπόν ότι η συνάθροιση του αμυλοειδούς αποτελεί ένα αναγκαίο αλλά όχι και ένα επαρκές γεγονός για την εκδήλωση της ασθένειας Alzheimer. Αποτελεί με άλλα λόγια ένα πρώιμο παθογενετικό παράγοντα, τουλάχιστον σ' όλες τις

κληρονομικές μορφές της ασθένειας, ο οποίος όμως πρέπει να ακολουθηθεί από πολλές μοριακές και κυτταρικές αλλαγές πριν αρκετές φλεγμονές και αλλοιώσεις οδηγήσουν στα συμπτώματα της AD. Το κυριότερο επιχείρημα εναντίον ενός κεντρικού ρόλου στο αμυλοειδές για τη γέννηση της AD, αποτελεί το γεγονός ότι αποθέσεις πεπτιδίων Αβ βρίσκουμε και σε φυσιολογικούς ανθρώπους. Βέβαια αυτές οι αποθέσεις είναι κυρίως διαχεόμενες πλάκες και όχι νευριτικές πλάκες ή NFTs. Έτσι μπορούμε να πούμε ότι οι διαχεόμενες πλάκες αποτελούν αρχικές αλλοιώσεις, οι οποίες μπορεί, ανάλογα με την παρουσία των διαφόρων παραγόντων, αλλά και την μακροζωία του ατόμου, είτε να ωριμάσουν, είτε να μην ωριμάσουν σε αλλοιώσεις οι οποίες θα προκαλέσουν τα κατάλληλα συμπτώματα (Selkoe, 1997; Hsiao *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 1996).

Από τα παραπάνω προκύπτει το πόσο σημαντικό είναι να βρεθούν οι πρωτεάσες που επεξεργάζονται την β-APP, αφού βρίσκοντας στη συνέχεια ειδικούς αναστολείς γι' αυτές τις πρωτεάσες, θα μπορούσαμε να επιτύχουμε μία αποτελεσματική θεραπεία των ασθενών με AD, δεδομένου ότι θα αναστέλλαμε την παραγωγή των πεπτιδίων Αβ, δηλαδή ένα αναγκαίο και πρώιμο βήμα της ασθένειας.

Τέλος αξίζει να σημειωθεί ότι τόσο η ApoE όσο και οι πρεσενιλίνες μπορούν να συνδεθούν λειτουργικά με την β-APP και με τα παράγωγά της όχι μόνο γενετικά αλλά και βιοχημικά. Η ApoE έχειδειχθεί με ανοσοχημικό τρόπο ότι μπορεί να αποτελεί ένα ελάχιστο συστατικό της αμυλοειδικής πλάκας. Επίσης μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί *in vitro* έχουν δείξει ότι η ApoE δένεται σε πεπτίδια Αβ και επιπρόσθετα ρυθμίζει και το σχηματισμό των νηματίων Αβ (Chan *et al.*, 1996). Από την άλλη μεριά έχειδειχθεί πρόσφατα ότι, αν οι κυτταρικές σειρές οι οποίες εκφράζουν είτε την β-APP, είτε τις πρεσενιλίνες, ανακατευτούν και ελεγχθεί η τάση τους να συναθροίζονται, τα κύτταρα που περιέχουν τις πρεσενιλίνες μπορούν να δεθούν με τα κύτταρα που περιέχουν την APP (Dewji *et al.*, 1996).

1.1.4 Μηχανισμοί θανάτου των νευρικών κυττάρων στην ασθένεια

Alzheimer

Ένα άλλο σημαντικό ερώτημα στο πεδίο έρευνας της AD αποτελεί το πως πεθαίνουν τα νευρικά κύτταρα στις συγκεκριμένες περιοχές του εγκεφάλου των ασθενών

που πάσχουν από τη νόσο Alzheimer. Γενικά υπάρχουν δύο μονοπάτια τα οποία μπορούν να οδηγήσουν στο θάνατο ένα κύτταρο. Το ένα είναι η νέκρωση (Necrosis), το οποίο οδηγεί σε λύση του κυττάρου και ακολουθείται από μία φλεγμονώδη αντίδραση. Από την άλλη μεριά υπάρχει η απόπτωση, η οποία εξελίσσεται σύμφωνα μ' ένα προγραμματισμένο και ελεγχόμενο τρόπο, συνιστώντας το τελικό αποτέλεσμα μιας αλληλουχίας γονιδιακών αλληλεπιδράσεων. Επιπλέον έχει βρεθεί ότι η απόπτωση παίζει ρόλο στη γήρανση αλλά και σε διάφορες νευροεκφυλιστικές ασθένειες. Υπάρχουν μάλιστα τρεις περιπτώσεις μελετών οι οποίες έχουν πραγματοποιηθεί σε πειράματα *in vitro* και οι οποίες υποστηρίζουν την ύπαρξη σχέσης ανάμεσα στην απόπτωση και στην AD.

Η πρώτη μελέτη έδειξε την παρουσία τόσο μορφολογικών όσο και βιοχημικών χαρακτηριστικών της απόπτωσης σε νευρικά κύτταρα στα οποία έχει χορηγηθεί β-αμυλοειδές. Επίσης έχει ήδη αναφερθεί η σχέση τόσο της β-APP (και μάλιστα της μεταλλαγής β-APP₆₄₂) όσο και της PS-2 με την διαδικασία της απόπτωσης. Συγκεκριμένα είδαμε ότι νευρικά κύτταρα τα οποία έχουν διαμολυνθεί με μεταλλαγμένα cDNAs που κωδικοποιούν για την β-APP₆₉₅ (συγκεκριμένα με τα μεταλλάγματα V₆₄₂→I, V₆₄₂→F, V₆₄₂→G), η οποία εντοπίζεται κυρίως στον εγκέφαλο, παρουσιάζουν τετραπλάσιο κατακερματισμό του DNA τους σε σχέση μ' αυτά που έχουν μολυνθεί με αγρίου τύπου β-APP. Δεδομένου ότι οι μεταλλαγές αυτές παρατηρούνται σε κληρονομικές περιπτώσεις AD, και ότι ο κατακερματισμός του DNA αποτελεί κύριο χαρακτηριστικό της απόπτωσης, η σχέση μεταξύ απόπτωσης και AD είναι προφανής (Yamatsuji *et al.*, 1996). Από την άλλη μεριά τόσο υπερέκφραση του γονιδίου της PS-2, όσο και διαμόλυνση μεταλλαγμάτων της PS-2 (που παρατηρούνται σε οικογενείς μορφές AD) σε νευρικά κύτταρα στα οποία έχει προκληθεί απόπτωση μέσω του β-αμυλοειδούς, προκαλεί αυξημένη τάση για απόπτωση. Ταυτόχρονα η χορήγηση αντικωδικού PS-2 προσφέρει προστασία ενάντια στην απόπτωση στα παραπάνω κύτταρα. Τονίζουμε ότι, στην πρώτη περίπτωση, με τα μεταλλάγματα του β-APP, όσο και στην τελευταία έχει δειχθεί ότι η απόπτωση προκαλείται από την διαταραχή ενός ενδοκυτταρικού μονοπατιού στο οποίο εμπλέκονται πρωτεΐνες G (Wolozin *et al.*, 1996; Vito, *et al.*, 1996, Neve, 1996). Εκτός από τα παραπάνω ευρήματα τα οποία έχουν προκύψει από *in vitro* μελέτες, έχει δειχθεί η παρουσία των μορφολογικών χαρακτηριστικών των

αποπτωτικών κυτταρικών πυρήνων σε εγκεφάλους ασθενών που έπασχαν από τη νόσο Alzheimer, χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της τελικής δεοξυνουκλεοτιδικής τρανσφεράσης (terminal deoxynucleotide transferase -TDT- technique) (Su *et al.*, 1994; Smale *et al.*, 1995; Choi *et al.*, 1996).

Αξίζει να σημειωθεί επίσης η ικανότητα της β-APP να προσδένει Cu(II) και Zn(II). Η πρόσδεση αυτών των ιόντων μπορεί να επηρεάσει τόσο την σταθερότητα και τη διαμόρφωση αλλά και τις πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις της β-APP. Όσον αφορά το βιολογικό ρόλο αυτής της ικανότητας έχουν διατυπωθεί δύο θεωρίες. Η πρώτη υποστηρίζει ότι η β-APP μπορεί μ' αυτόν τον τρόπο να παίζει το ρόλο διακυτταρικού μεταφορέα ιόντων Cu και Zn από τους άξονες στους δενδρίτες στα νευρικά κύτταρα, δεδομένου ότι η β-APP μεταφέρεται από την επιφάνεια των αξόνων στις μεμβράνες των δενδριτών. Επιπλέον ο χαλκός πιστεύεται ότι δρα ενισχυτικά στη συνάθροιση των πεπτιδίων Αβ για το σχηματισμό πλακών αμυλοειδούς. Μάλιστα έχει βρεθεί ότι η συγκέντρωσή του στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό ασθενών με AD είναι 2.2 φορές μεγαλύτερη από τη συγκέντρωσή του σε υγιείς ανθρώπους. Καταλαβαίνουμε λοιπόν ότι η σύνδεση του β-APP με την AD, μπορεί να γίνει και μέσω της ιδιότητας της β-APP να προσδένει ιόντα Cu και ίσως και Zn.

Σύμφωνα με τη δεύτερη θεωρία, η σύνδεση του Cu(II) στην β-APP έχει σαν αποτέλεσμα την αναγωγή του από Cu(II)→Cu(I), και την ελευθέρωση, κατά την οξείδωση του μονοσθενούς Cu, ηλεκτρονίων τα οποία μπορούν να αυξήσουν την παραγωγή ριζών υδροξυλίου καθώς και ενεργοποιημένων μονάδων οξυγόνου (HO·, O₂⁻). Αυτές μπορούν να προσβάλλουν διάφορα άλλα κυτταρικά συστατικά και να δράσουν τοξικά. Έτσι κάτω από κατάλληλες συνθήκες, οι οποίες μπορεί να προκληθούν από τις μεταλλαγές στο γονίδιο της β-APP που συναντάμε στην AD, (π.χ. από κάποια ανωμαλία στην κυστιδιακή μετακίνηση του συμπλόκου APP-Cu, η οποία μπορεί να οδηγήσει στη συσσώρευση του συμπλόκου στα κύτταρα), είναι δυνατόν να ελευθερωθούν τοπικά πολλές ελεύθερες ρίζες, οι οποίες να οδηγήσουν στο φαινόμενο του νευροεκφυλισμού που παρατηρείται στην Alzheimer (Multhaup *et al.*, 1996).

Ένα επιπλέον χαρακτηριστικό της παθολογίας της AD είναι τα αποθέματα πλακών αμυλοειδούς στα τοιχώματα των αιμοφόρων αγγείων των μηνίγγων και γενικά του εγκεφάλου. Όταν η συχνότητα των πλακών σ' αυτές τις περιοχές είναι πολύ υψηλή

τότε είναι δυνατόν να προκληθούν εγκεφαλικές αιμορραγίες. Οι περισσότερες περιπτώσεις αγγειοπάθειας στην AD είναι σποραδικές. Υπάρχει όμως και μια περίπτωση η οποία κληρονομείται με επικρατή και αυτοσωμικό τρόπο και παρατηρείται σ' ένα μικρό αριθμό οικογενειών στην Ολλανδία. Αυτή η περίπτωση ονομάζεται εγκεφαλική αιμορραγία με εναπόθεση αμυλοειδούς του Ολλανδικού τύπου (Hereditary Cerebral Haemorrhage With Amyloidosis of the Dutch type; HCHWA-D) και χαρακτηρίζεται από συνεχόμενες αιμορραγίες στα αιμοφόρα αγγεία του εγκεφάλου και των μηνίγγων εξαιτίας της αυξημένης εναπόθεσης αμυλοειδούς. Συνήθως τα άτομα που εκδηλώνουν αυτή την ασθένεια είναι ηλικίας 45-60 ετών και το 50% των ασθενών πεθαίνουν κατά τη διάρκεια της πρώτης αιμορραγίας ενώ αυτά που επιβιώνουν αναπτύσσουν προοδευτικά άνοια (Hendriks *et al.*, 1996). Τίθεται λοιπόν το ερώτημα του κατά πόσο το β αμυλοειδές συμβάλλει στην πρόκληση αιμοραγιών. Μηχανιστικά έχειδειχθεί ότι το β-αμυλοειδές αλληλεπιδρά με τα ενδοθηλιακά κύτταρα στα αιμοφόρα αγγεία και παράγει περίσσεια ριζών υπεροξειδίου, οι οποίες προσβάλλουν και αλλάζουν την ενδοθηλιακή δομή και λειτουργία. Βέβαια αυτή η βλάβη στα ενδοθήλια μπορεί να προληφθεί από τη δισμουτάση του υπεροξειδίου, το οποίο είναι ένα ένζυμο που “καθαρίζει” το κύτταρο από τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου. Από τα παραπάνω προκύπτει ένας φυσιολογικός αγγειοενεργός ρόλος για το β-αμυλοειδές αλλά και ένας μηχανισμός δράσης, μέσω ελευθέρων ηλεκτρονίων, με τον οποίο εξηγούνται οι αγγειακές ανωμαλίες αλλά και ο νευροεκφυλισμός που θα μπορούσε να προκαλεί το β-αμυλοειδές. Ταυτόχρονα βρίσκεται και ο σύνδεσμος του β-αμυλοειδούς με την παραγωγή ελευθέρων ριζών, η ύπαρξη του οποίου αναζητούνταν, δεδομένου ότι εναποθέσεις β-αμυλοειδούς σχετίζονται τόσο με την AD όσο και με την γήρανση και από την άλλη είναι γνωστή η θεωρία της δράσης των ελευθέρων ριζών στη γήρανση (Thomas *et al.*, 1996; Rose, 1996). Σχετικά με αυτό πρέπει να αναφερθεί ότι τελευταία κερδίζει όλο και μεγαλύτερη αποδοχή η άποψη ότι, βλάβες στην παραγωγή ενέργειας από τα μιτοχόνδρια έχουν σαν αποτέλεσμα την αύξηση των επιπέδων των ελευθέρων ριζών (μ' άλλα λόγια «ελαττωματική» οξειδωτική φωσφορύλιωση), συμβάλλοντας έτσι στην εμφάνιση και εξέλιξη της AD. (Beal, 1996)

Ανακεφαλαιώνοντας, θα μπορούσαμε να αναφέρουμε ότι ο αυξημένος ρυθμός κυτταρικού θανάτου των νευρώνων που παρατηρείται στην AD μπορεί να προκύψει από τη συνδυασμένη δράση της ενεργοποίησης της απόπτωσης, της τοξικότητας του β-

αμυλοειδούς, αλλά και της παραγωγής ελευθέρων ριζών (λόγω γήρανσης, μέσω του β-αμυλοειδούς, μέσω της αναγωγής του δισθενούς Cu σε μονοσθενή από την β-APP και μάλιστα όταν ο μονοσθενής Cu οξειδωθεί σε δισθενή, μέσω διαταραχών στην οξειδωτική φωσφορλίωση, από τα μικρογλοιακά κύτταρα, και ίσως και με πολλούς άλλους τρόπους). Ταυτόχρονα έχει δειχθεί ότι οι παραπάνω μηχανισμοί επηρεάζουν ο ένας τον άλλο. Για παράδειγμα εκτός από το β-αμυλοειδές που οδηγεί στην παραγωγή ελευθέρων ριζών, η ενεργοποίηση της απόπτωσης μπορεί να δημιουργήσει κατάσταση stress για το κύτταρο η οποία είναι δυνατό να αυξήσει τόσο την έκφραση του β-APP, όσο και την έκκριση του πεπτιδίου Αβ, αλλά μπορεί και να καταστήσει τα νευρικά κύτταρα πιο ευαίσθητα στις δράσεις των άλλων μηχανισμών.

1.2 Υπάρχουσα γνώση για το γονίδιο *CMRP*

Μονολότι μέχρι σήμερα έχουν ανακαλυφθεί τέσσερα γονίδια που εμπλέκονται σε κληρονομικές περιπτώσεις της νόσου Alzheimer, οι μηχανισμοί που οδηγούν στην παθογένεση είναι ακόμα τελείως άγνωστοι. Κατά συνέπεια, ανακαλύπτοντας περισσότερα μόρια από το μοριακό μονοπάτι (ή τα μονοπάτια) που οδηγούν σ' αυτή την ασθένεια, θα βοηθήσει στην κατανόηση της γένεσης, της εξέλιξης, αλλά και στην αντιμετώπιση της. Επιπλέον και τα τέσσερα αυτά γονίδια εκφράζονται στα θηλαστικά, σε όλους τους ιστούς, ενώ ο ιστολογικός φαινότυπος της νόσου Alzheimer περιορίζεται σε συγκεκριμένες μόνο περιοχές του εγκεφάλου. Ως εκ τούτου, είναι θεμιτόν να τεθεί η υπόθεση ότι άγνωστα μέχρι σήμερα γονιδιακά προϊόντα, τα οποία παρουσιάζουν πιο εξειδικευμένο πρότυπο έκφρασης, που να ταυτίζεται με τις περιοχές των ιστών που εμφανίζονται οι βλάβες σε ασθενείς με τη νόσο Alzheimer, παίζουν ρόλο κλειδί στην παθογένεση της ασθένειας.

Πρόσφατα κλωνοποιήθηκε από τον Γεώργιο Χαλεπάκη ένας καινούργιος κλώνος cDNA στον ποντικό που αντιστοιχεί σ' ένα νέο γονίδιο που κωδικοποιεί για μια πρωτεΐνη η οποία χαρακτηρίζεται από ένα μεγάλο αριθμό επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών κυστεΐνης και το οποίο ονομάστηκε *CMRP* (Cysteine Motif Rich Protein). Το γονίδιο αυτό θα μπορούσε να παίζει ρόλο κλειδί στη παθογένεση της νόσου Alzheimer, αφού είναι το μοναδικό μέχρι σήμερα γνωστό γονίδιο το οποίο εκφράζεται

σχεδόν αποκλειστικά και μόνο στις περιοχές που παρουσιάζουν βλάβες σε ασθενείς με τη νόσο, και από την άλλη μεριά τα διάφορα μοτίβα αλληλουχιών που παρουσιάζει η πρωτεΐνη *CMRP*, μπορούν να συσχετιστούν λειτουργικά με διάφορους μοριακούς μηχανισμούς ικανούς να οδηγήσουν στη νόσο Alzheimer.

Η μελέτη της έκφρασης του *CMRP* κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης αλλά και κατά την ενηλικίωση του ποντικού, έγινε με πειράματα *in situ* υβριδοποίησης του mRNA σε ιστολογικές τομές εμβρύων ποντικού και εγκεφάλων ενηλίκων, από τον Γεώργιο Χαλεπάκη. Σύμφωνα με τα πειράματα αυτά, την ημέρα 12.5 κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης (E.12.5) το *CMRP* εκφράζεται σε επιθηλιακές δομές στον πνεύμονα και στα νεφρά, καθώς επίσης και στο χοριοειδές πλέγμα σε όλες τις κοιλίες του εγκεφάλου. Την ημέρα 15.5 (E.15.5) έκφραση παρατηρήθηκε στο χοριοειδές πλέγμα, τον ιππόκαμπο και το νεοφλοιό. Επίσης στο ίδιο στάδιο το *CMRP* εντοπίστηκε στα άκρα, στις περιοχές μεταξύ των δακτύλων, οι οποίες σχετίζονται άμεσα με κυτταρικό θάνατο που οδηγεί στο διαχωρισμό των δακτύλων (εικ. 1D), υποδεικνύοντας ότι η πρωτεΐνη αυτή μπορεί να εμπλέκεται σε αποπτωτικούς μηχανισμούς. Μια πιο αναλυτική εξέταση της έκφρασης του *CMRP* κατά την ημέρα της γέννησης, οδήγησε στον εντοπισμό του mRNA στη στιβάδα των κυττάρων Purkinjje στην παρεγκεφαλίδα (εικ. 1C), στο χοριοειδές πλέγμα (Chpl στην εικ. 1C), στον ιππόκαμπο και στο νεοφλοιό. Ιστολογικές τομές του εγκεφάλου 6 εβδομάδες μετά την γέννηση έδειξαν ότι το *CMRP* δεν εκφράζεται πλέον στην παρεγκεφαλίδα (ή μπορεί να εκφράζεται πολύ ισχνά), ενώ εξακολουθεί να εντοπίζεται στον ιππόκαμπο (HI: στην εικ. 1A), στο νεοφλοιό (C: εικ. 1A), στο χοριοειδές πλέγμα (Chpl: εικ. 1B) και στον ενδορινικό φλοιό (OLC: εικ. 1B). Πολύ έντονη έκφραση εντοπίστηκε επίσης στο υπόθεμα του ιπποκάμπου (S: εικ. 1A) και στο βασικό αμυγδαλοειδή πυρήνα (AA: εικ. 1B).

Από την άλλη μεριά έγινε μια προσπάθεια ολοκλήρωσης του cDNA του *CMRP* με τη διαλογή κατάλληλων κλώνων από μια βιβλιοθήκη cDNA (Oliver *et al.*, 1995), η οποία έχει προκύψει από εγκεφαλο εμβρύου ποντικού ημέρας 14.5 (την E 14.5, παρατηρείται έντονη έκφραση του *CMRP*).

Εικόνα 1: Εντοπισμός της έκφρασης του *CMRP* σε ιστολογικές τομές εμβρύων ποντικού και εγκεφάλων ενηλίκων ποντικών.

Οι κλώνοι που έχουν επιλεγεί μέχρι τώρα, η σχετική τους θέση στο cDNA του *CMRP* και οι επικάλυψεις που παρουσιάζουν μεταξύ τους εικονίζονται στην εικόνα 2.

Εικόνα 2: Οι κλώνοι cDNA για το *CMRP* που έχουν απομονωθεί.

Τα παραπάνω κουτιά παριστάνουν τους απομονωμένους κλώνους cDNA. W87, W41, W42, W43, W70, είναι τα ονόματα των κλώνων cDNA. Οι αριθμοί που αναγράφονται κάτω από τα αντίστοιχα κουτιά, αναφέρονται στη σχετική θέση του εκάστοτε κλώνου cDNA στο συνολικό cDNA του *CMRP*. Διαφαίνεται ότι οι κλώνοι αυτοί αλληλοεπικαλύπτονται.

Το γονίδιο αυτό αποκαλύπτεται για πρώτη φορά και συγκρίσεις που έγιναν σε πρωτεϊνικό επίπεδο με άλλες γνωστές πρωτεΐνες αποκάλυψαν στην πρωτεΐνη *CMRP* τις ακόλουθες περιοχές (ξεκινώντας από την αμινοτελική περιοχή):

- 1) Μία περιοχή πλούσια σε κυστεΐνη, η οποία περιλαμβάνει 6 επαναλαμβανόμενες πεπτιδικές αλληλουχίες, και που είναι ομόλογη της καρβοξυτελικής περιοχής του παράγοντα von Willebrand (περιοχή A στην εικ. 3). Ο παράγοντας von Willebrand είναι μια γλυκοπρωτεΐνη της οποίας η λειτουργία συνδέεται με την αιμόπτυξη και μεταλλαγές του αντίστοιχου γονιδίου προκαλούν μία ασθένεια που συνοδεύεται από έντονη αιμορραγία.
- 2) Μία άλλη περιοχή πλούσια σε κυστεΐνες με 13 τώρα επαναλαμβανόμενες πεπτιδικές

αλληλουχίες, η οποία έχει χαρακτηριστικά υποδοχέα και συναντάται σε πρωτεάσες που

ανήκουν στην οικογένεια των φουρινών (furin) (περιοχή B στην εικ. 3).

3) Μία περιοχή (περιοχή C στην εικ. 3) που παρουσιάζει ομολογία με την πρωτεογλυκάνη θεική χονδροϊτίνη NG2 (Chondroitin Sulfate Proteoglycan NG2).

Εικόνα 3 : Ομολογία της πρωτεΐνης CMRP με γνωστές πρωτεΐνες.

Μια πιο αναλυτική συγκριτική μελέτη που έγινε για την αποκάλυψη περαιτέρω αμινοξικών αλληλουχιών με εξειδικευμένες λειτουργίες έδωσε τα παρακάτω αποτελέσματα:

1. Μια αλληλουχία σινιάλο στα πρώτα 20 αμινοτελικά αμινοξέα τα οποία μπορούν να σχηματίζουν μία υδρόφοβη α-έλικα, όπως προκύπτει από προγράμματα ανάλυσης πρωτεϊνικών δομών (πρόγραμμα predict).
2. 4 θέσεις N-γλυκοζυλίωσης. Αυτό είναι συμβατό με την αλληλουχία σινιάλο που έχει εντοπιστεί στο αμινοτελικό άκρο, αφού αυτό το σινιάλο θα μπορούσε να οδηγήσει την πρωτεΐνη για ολοκλήρωση της σύνθεσης της στο αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο και στη συνέχεια στο σύμπλεγμα Golgi (εικ. 3).
3. 9 καλά συντηρημένες αλληλουχίες που θα μπορούσαν να προσδέσουν μια ομάδα αίμης, όπως αυτή που υπάρχει στο κυτόχρωμα c (εικ. 3).

Κύριος στόχος της εργασίας αυτής αποτελεί ο περαιτέρω χαρακτηρισμός του γονιδίου *CMRP* με απώτερο στόχο την εύρεση της σχέσης του με τη νόσο Alzheimer, ενώ οι επιμέρους στόχοι που θέτονται είναι:

- 1) Η επιλογή επιπλέον κλώνων cDNA για την ολοκλήρωση του cDNA του *CMRP*.
- 2) Η παρασκευή ειδικών πολυκλώνικων αντισωμάτων για την πρωτεΐνη που κωδικοποιεί το cDNA του *CMRP* έτσι ώστε να εντοπιστεί η πρωτεΐνη τόσο σε ενδοκυτταρικό επίπεδο όσο και σε ιστολογικό.
- 3) Απομόνωση γενωμικών ενθεμάτων του *CMRP* για την καταστολή της λειτουργίας του *CMRP* στον ποντικό με τη μέθοδο του ομόλογου ανασυνδυασμού.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Στα υλικά και μέθοδοι έχουν χρησιμοποιηθεί οι παρακάτω συντημήσεις:

APS: Amonium Per Sulfate

DTT: Dithiothreitol

EDTA: Disodium Ethylenediaminetetraacetate. H₂O

SDS: Sodium Dodecyl Sulfate

SSC: Sodium Chloride, Sodium Citrate

TCA: Trichloroacetic Acid

TEMED: N, N, N', N'-Tetramethylethylen-diamine

2.1 Ανίχνευση βιβλιοθήκης cDNA σε φορέα λExCell *EcoRI/CIP*

2.1.1 Τρυβλία

Για το άπλωμα της βιβλιοθήκης απαιτούνται τρυβλία διαστάσεων 24x24cm.

Σ' αυτά ρίχνουμε 300ml θρεπτικού μέσου **NZY**.

NZY 1lt: 5g NaCl
2g MgSO₄.7H₂O
2g Yeast Extract
10g NZ Amine (casein hydrolysate)
4,5ml 1N NaOH Ph 7.5)
15g agar (ή 7g αγαρόζη αν θέλουμε να φτιάξουμε Top agarose).

Τα τρυβλία αφήνονται 2 μέρες σε θερμοκρασία δωματίου να στεγνώσουν καλά.

2.1.2 Άπλωμα των βακτηριακών κυττάρων NM522 μετά την μόλυνση τους από τους φάγους της βιβλιοθήκης

Επωάζουμε μία ολονύκτια καλλιέργεια κυττάρων NM522 σε θρεπτικό μέσο **LB**.

LB 1lt: 8g NaCl
10g Bacto-Tryptone
5g Yeast Extract
7,5ml 1N NaOH

Το **LB** περιέχει 0,2% Maltose και 10mM MgSO₄ στους 37 °C. Το πρωί τα κύτταρα φυγοκεντρώνονται στους 4 °C σε 1000 στροφές για 10 λεπτά και το ίζημα των κυττάρων διαλυτοποιείται σε όγκο ίσο με το μισό του όγκου της ολονύκτιας καλλιέργειας, διαλύματος MgSO₄ συγκέντρωσης 10mM. Στη συνέχεια επωάζονται 3ml βακτηριακών κυττάρων με 13,3μl (από αραιώση 1:100), της συγκεκριμένης φαγικής βιβλιοθήκης στους 37 °C για 20 λεπτά. Τιτλοδότηση της βιβλιοθήκης είχε δείξει ότι τα 13,3μl, από αραιώση 1:100, περιέχουν περίπου 200,000 φάγους. Έπειτα το μίγμα των βακτηρίων με τους φάγους ανακατεύεται με 30ml Top agarose και χύνεται σε τρυβλίο 24x24cm με στερεοποιημένο NZY-agar και προθερμασμένο στους 37 °C. Στην περίπτωση μας απλώσαμε 4 τρυβλία δηλαδή περίπου 800,000 φάγους. Αφού πήξει το Top agarose, τα τρυβλία τοποθετούνται στους 37 °C για 8-10 ώρες.

2.1.3 Μεταφορά των πλακών που σχηματίζονται στα τρυβλία σε μεμβάνες από νάυλον

- Κρυώνουμε τα παραπάνω τρυβλία στους 4 °C, ώστε να σκληρύνει το Top agarose και να μην υπάρχει κίνδυνος να κολλήσει στις μεμβράνες.
- Στη συνέχεια ονομάζουμε τόσο τα τρυβλία, όσο και τις μεμβράνες, τις οποίες και τοποθετούμε με προσοχή (δηλαδή χωρίς την παγίδευση φυσαλίδων αέρα) πάνω στα τρυβλία.
- Αφήνουμε τις μεμβράνες στα τρυβλία γύρω στο 1 λεπτό και με μία βελόνη τρυπούμε τις μεμβράνες και το NZY-agar στο ίδιο σημείο για να τα μαρκάρουμε.
- Στη συνέχεια αφαιρούμε τις μεμβράνες προσεκτικά και γρήγορα.
- Ακολούθως αποδιατάσσουμε το γενετικό υλικό που έχει κρατηθεί στις μεμβράνες σε 0,5N NaOH, 1,5M NaCl για 2 λεπτά.
- Ακολουθεί ουδετεροποίηση σε 0,5M Tris-Cl pH 7,4; 1,5M NaCl για 5 λεπτά.
- Οι μεμβράνες ξεπλένονται σε 2xSSC για 1 λεπτό.
- Αφού στεγνώσουν καλά μονιμοποιούμε το DNA με υπεριώδη διασύνδεση (U.V.-crosslinking) και στη συνέχεια θέρμανση στους 80 °C για 2 ώρες.

2.1.4 Προϋβριδοποίηση /Υβριδοποίηση των μεμβρανών

Όλα τα διαλύματα που χρησιμοποιούνται έχουν προθερμανθεί στους 65 °C.

- Αρχικά οι μεμβράνες βρέχονται με αποϊονισμένο νερό και τοποθετούνται στις μπουκάλες υβριδοποίησης.
- Ακολούθως ξεπλένονται σε 40-50ml 0.3xSSC / 0.1%SDS στους 65 °C, για 15-30 λεπτά.
- Στη συνέχεια οι μεμβράνες προϋβριδοποιούνται στους 65 °C για τουλάχιστον 30 λεπτά σε 25ml του παρακάτω διαλύματος:

3x SSC
0,1% SDS
10x Denhard's (100x Denhard's περιέχει 2% Ficoll, 2% Bovine Serum Albumine Fraction V, 2 % Polyvinyl pyrrollidone).
75µg/ml salmon sperm DNA

(Το διάλυμα αυτό έχει ήδη προθερμανθεί στους 65 °C.)

- Το διάλυμα προϋβριδοποίησης αφαιρείται και οι μεμβράνες υβριδοποιούνται σε 25ml του προηγούμενου διαλύματος, το οποίο όμως τώρα περιέχει και τον ραδιενεργό ανιχνευτή. Η υβριδοποίηση διαρκεί όλο το βράδυ.
Τονίζουμε ότι η σήμανση του ραδιενεργού ανιχνευτή πραγματοποιείται με τη μέθοδο των **τυχαίων εκκινήτων (Random priming; Maniatis *et al.*, 1989)**

Σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή :

- Αποδιατάσσουμε 10 ng DNA σε όγκο 7,5µl υδατικού διαλύματος, με βρασμό για 2-5 λεπτά.
- Στη συνέχεια το διάλυμα τοποθετείται κατευθείαν στον πάγο προκειμένου το DNA να διατηρηθεί αποδιαταγμένο.
- Προστίθενται 12,4µl από το παρακάτω μίγμα:

11,4µl 2x **LS** και 1µl BSA 10 mg/ml
2x **LS**: 1M HEPES pH 6,6 / **DTM** / **OL** σε αναλογία 25 / 25 / 7
DTM: 0,1mM dGTP, dTTP σε **TM** (250mM Tris-HCl pH 8,0; 25mM MgCl₂, 50mM
2-Μερκαπτοαιθανόλη)
OL: 1mM Tris pH 7,5
1mM EDTA pH 7,0
90 units/ml ολιγονουκλεοτίδια (τυχαίοι εκκινήτες)

- Φυγοκεντρούμε (spin).
- Προσθέτουμε 5 units Klenow πολυμεράση.
- Προσθέτουμε 2μl ραδιενεργού α-dATP και 2μl α-dCTP.
- Ανακατεύουμε με προσοχή και επωάζουμε το μίγμα στους 37 °C για 2-3 ώρες.
- Μετά την επώαση προσθέτουμε 80μl TE και το διάλυμα περνάει από στήλη G-50, έτσι ώστε να κρατηθούν τα ελεύθερα ραδιενεργά νουκλεοτίδια.

2.1.5 Πλυσίματα των μεμβρανών

Τα πλυσίματα των μεμβρανών πραγματοποιούνται στους 65 °C χρησιμοποιώντας τα παρακάτω διαλύματα προθερμασμένα στην παραπάνω θερμοκρασία:

- 3x SSC/0.1%SDS
2x για 10 λεπτά.
- 0,3x SSC/0.1% SDS
3x για 15 λεπτά
- 0,1x SSC/0.1% SDS
2x για 10 λεπτά

2.1.6 Εκθέση /Εμφάνιση

- Η έκθεση διαρκεί 1-2 ημέρες (ανάλογα με την ειδική ενεργότητα του ανιχνευτή).

2.1.7 Συλλογή των πλακών

- Οριοθετούμε τη μεμβράνη πάνω στο φιλμ και το φιλμ πάνω στο πιάτο, έτσι ώστε με τη βοήθεια του, να συλλεχθεί το τμήμα του πιάτου που αντιστοιχεί στο σήμα που βλέπουμε στο φιλμ. Το τμήμα του πιάτου που συλλέγεται, έχει διάμετρο που είναι λίγο μικρότερη από την διάμετρο της κορυφής ενός μπλέ tip. Το κομμάτι αυτό τοποθετείται σε διάλυμα SM που περιέχει CHCl₃ σε 500μl SM προσθέτοντας 30μl CHCl₃ και αφήνεται να εκχυλιστεί όλη νύχτα.

Η διαδικασία της ανίχνευσης επαναλαμβάνεται σε μικρά τρυβλία χρησιμοποιώντας

350μl βακτηριακών κυττάρων NM522, 3ml Top agarose και φάγους από το παραπάνω εκχύλισμα, σε διάφορες αραιώσεις με στόχο να απομονώσουμε μοναδιαίες πλάκες που να περιέχουν μόνο το ζητούμενο κλώνο cDNA.

2.1.8 Απομόνωση φαγικού γενωμικού DNA από υγρή καλλιέργεια

- Από μία πλάκα φάγων την οποία έχουμε καθαρίσει και η οποία περιέχει μόνο το ζητούμενο ένθεμα, απλώνουμε μία ολονύκτια καλλιέργεια. Από αυτήν συλλέγουμε 50 περίπου πλάκες και τις αφήνουμε να εκλουστούν ολονύκτια σε 300μl SM και 20μl CHCl₃.
- Βάζουμε μία ολονύκτια καλλιέργεια βακτηριακών κυττάρων LE392 ή NM522 σε θρεπτικό μέσο NZY το οποίο περιέχει 0,2% μαλτόζη, στους 37 °C.
- Την επόμενη μέρα αναμιγνύουμε 100μl 5mM CaCl₂ και 5mM MgCl₂, με 100μl της ολονύκτιας καλλιέργειας των βακτηριακών κυττάρων και 100μl του παραπάνω φαγικού διαλύματος και τα επωάζουμε στους 37 °C για 15 λεπτά (έτσι ώστε να προσδεθούν οι φάγοι στα βακτήρια).
- Παίρνουμε 100μl από το προηγούμενο μίγμα και εμβολιάζουμε 17ml NZY, τα οποία περιέχονται σε μία φιάσκα των 100ml. Το μίγμα επωάζεται στους 37 °C για 7 ώρες περίπου, οπότε και λαμβάνει χώρα η λύση των κυττάρων.
- Αφήνουμε την καλλιέργεια να έρθει σε θερμοκρασία δωματίου και προσθέτουμε 8,5μl RNase 10μg/μl και 8,5μl DNase 10μg/μl. Η καλλιέργεια επωάζεται στους 37 °C για 30 λεπτά (αργή ανακίνηση).
- Φυγοκεντρούμε την καλλιέργεια στις 9000 στροφές για 30 λεπτά.
- Παίρνουμε 16ml από το υπερκείμενο και προσθέτουμε σ' αυτό 3,2ml 5M NaCl και επαναφυγοκεντρούμε. Στη συνέχεια προσθέτουμε 6,4ml διαλύματος που περιέχει 40%PEG (6000)
- Αφήνουμε το μίγμα αυτό στον πάγο για 1-2 ώρες το πολύ.
- Φυγοκεντρούμε στις 9000 στροφές για 30 λεπτά.
- Αφαιρούμε το υπερκείμενο και επαναδιαλύουμε το ίζημα σε 700μl του παρακάτω διαλύματος:

10ml διαλύματος

1000μl 1M Tris pH 7,5

100μl 0,5M EDTA

500μl 10% SDS

400μl 5M NaCl

400μl 10 μg/μl proteinase K (προστίθεται μετά την επαναδιάλυση)

7600μl H₂O

- Μεταφέρουμε το επαναδιαλυόμενο ίζημα σε eppendorf tube και επωάζουμε στους 50 °C για 45 λεπτά.
- Στη συνέχεια πραγματοποιούνται 2 εκχυλίσεις με φαινόλη και μία με CHCl₃ / ισοαμυλική αλκοόλη.
- Στο υπερκείμενο προστίθενται ίσος όγκος διαλύματος ισοπροπανόλης / NH₄OAc (σε αναλογία 416ml ισοπροπανόλη /83ml NH₄OAc) και το μίγμα τοποθετείται στον πάγο για 5 λεπτά..
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση και ξέπλυμα με 70% αιθανόλη.
- Επαναδιαλύουμε το ίζημα σε 500μl TE+RNase (100μg/ml) και το επωάζουμε στους 37 °C για 30 λεπτά.
- Ακολουθεί μία εκχύλιση με διάλυμα φαινόλης / CHCl₃ / ισοαμυλική αλκοόλης και μία μόνο με CHCl₃ και κατακρήμνιση με αιθανόλη και NH₄OAc.
- Τέλος το ίζημα διαλυτοποιείται σε 50μl TE.
Ακολουθεί κλωνοποίηση του φαγικού ενθέματος σε πλασμιδιακό φορέα Bluescript II KS+ και ανάγνωση της αλληλουχίας του, χρησιμοποιώντας το Kit της Sequenase Version 2.0.

2.2 Ανίχνευση βιβλιοθήκης γενωμικού DNA στον φαγικό φορέα

λDash II Vector

- Η διαδικασία είναι η ίδια που ακολουθείται και στην ανίχνευση βιβλιοθήκης cDNA, με τη διαφορά ότι ο συγκεκριμένος φαγικός φορέας μολύνει τα βακτηριακά κύτταρα LE392 (τα οποία μεγαλώνουν κατά τη διάρκεια της νύχτας, στο ίδιο θρεπτικό μέσο που επωάζονται και τα NM522). Στη συγκεκριμένη περίπτωση

απλώνουμε 7μl από την παραπάνω βιβλιοθήκη σε κάθε πιάτο, και συνολικά χρησιμοποιούμε 4 τρυβλία. Η τιτλοδότηση της συγκεκριμένης βιβλιοθήκης έδειξε ότι σε κάθε 1μl περιέχονται περίπου 28,000 φάγοι, δηλαδή συνολικά απλώνουμε περίπου 800,000 φάγους.

2.3 Πορεία που ακολουθείται για την παραγωγή των αντισωμάτων

Γενικά

Ο φορέας στον οποίο κλωνοποιούνται τα κομμάτια cDNA του *CMRP* που θέλουμε να εκφράσουμε σε κύτταρα *E.coli* είναι ο pJC20 (εικ.4). Ο φορέας pJC20 χρησιμοποιεί για την μεταγραφή των κλωνοποιημένων ενθεμάτων την πολυμεράση T7, αφού περιέχει τον υποκινητή της. Τα πλεονεκτήματα της χρήσης της RNA πολυμεράσης του βακτηριοφάγου T7 για τη μεταγραφή των συγκεκριμένων περιοχών είναι τα παρακάτω:

1. Η πολυμεράση του βακτηριοφάγου T7 είναι ιδιαίτερα επιλεκτική όσον αφορά τον υποκινητή στον οποίο θα προσδεθεί, και προσδέεται μόνο στον υποκινητή T7.
2. Η πολυμεράση αυτή είναι ιδιαίτερα γρήγορη και ενεργή συγκρινόμενη με την RNA πολυμεράση της *E.coli*.
3. Σιινιάλα τερματισμού αποδοτικά γι' αυτήν την πολυμεράση συναντώνται πολύ σπάνια, με αποτέλεσμα η πολυμεράση αυτή να αποδίδει σχεδόν αποκλειστικά ολοκληρωμένα μετάγραφα.

Τονίζουμε ότι η παραγωγή της πολυμεράσης T7 δεν είναι συστατική, αλλά επάγεται με τη χορήγηση IPTG (Isopropyl-6-D-thiogalactopyranoside). Αυτό γίνεται για να μην δημιουργούνται προβλήματα βιωσιμότητας στα κύτταρα, λόγω της συστατικής παραγωγής της πολυμεράσης T7.

Συγκεκριμένα, τα πλασμίδια pJC20 στα οποία έχουν κλωνοποιηθεί τα κομμάτια του *CMRP* που θέλουμε να εκφράσουμε, εισάγονται στα βακτηριακά κύτταρα BL21(DE3). Αυτά είναι κύτταρα *E.coli* τα οποία έχουν γίνει λυσιγόνα στο βακτηριοφάγο DE3. Αυτός είναι ένα παράγωγο του βακτηριοφάγου λ, ο οποίος περιλαμβάνει την περιοχή ανοσίας του φάγου 21, καθώς και ένα κομμάτι DNA το οποίο περιέχει το γονίδιο *lacI*, τον υποκινητή *lacUV5*, την αρχή του γονιδίου *lacZ* και το γονίδιο που παράγει την πολυμεράση T7. Αυτό το κομμάτι του DNA εισέρχεται στο γονίδιο *int* του φάγου (το οποίο απαιτείται για την ενσωμάτωση του φάγου στο κύτταρο του ξενιστή) και το καταστρέφει με αποτέλεσμα ο φάγος DE3 να απαιτεί τόσο για την ενσωμάτωσή του, όσο και για την αποκοπή του από το γένωμα του ξενιστή ένα φάγο βοηθό (helper phage). Μόλις δημιουργηθούν κύτταρα λυσιγόνα στον φάγο DE3 μπορεί να πραγματοποιηθεί η μεταγραφή και στη συνέχεια η έκφραση της πολυμεράσης T7, με τη χορήγηση IPTG στα κύτταρα (μιας και το IPTG επάγει τον υποκινητή *lacUV5* της πολυμεράσης T7).

Εικόνα 4: Χάρτης του πλασμιδιακού φορέα pJC20.

2.3.1 Υπερέκφραση των πρωτεϊνών σε κύτταρα *E.coli* BL21(DE3)

- Μετασχηματισμός της κατάλληλης πλασμιδιακής κατασκευής σε κύτταρα *E.coli* BL21(DE3).
- Ολονύκτια καλλιέργεια μιας ή και περισσέρων αποικιών, σε LB + Αμπικιλίνη, στους 37 °C.
- Νέα καλλιέργεια, χρησιμοποιώντας το 1/100 της ολονύκτιας.
- Περιμένουμε μέχρι η O.D. των κυττάρων στα 600nm να γίνει ίση με 0,8-1,0.
- Επάγουμε με IPTG τελικής συγκέντρωσης 0,5Mm για 2 ώρες στους 37 °C .
- Φυγοκεντρούμε και το ίζημα των κυττάρων φυλλάσσεται στους -20 °C.

2.3.2 Ανίχνευση των πρωτεϊνών σε ολόκληρα κυτταρικά εκχυλίσματα (whole cell extracts)

Το προηγούμενο ίζημα των κυττάρων διαλυτοποιείται σε **SDS loading buffer**, θερμαίνεται στους 95 °C για 5 λεπτά και φυγοκεντρείται. Στη συνέχεια μέρος αυτού φορτώνεται σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης-SDS.

SDS loading buffer

100ml

50ml Γλυκερόλη

10g SDS 10%

30ml 1M Tris pH 6.8

1ml Β-Μερκαπτοαιθανόλη

0,005% Βρωμοφαινόλη

2.3.3 Ανίχνευση των πρωτεϊνών στο διαλυτό ή στο αδιάλυτο μέρος των κυτταρικών εκχυλισμάτων

- Το ίζημα των κυττάρων (από το 2.3.1) διαλύεται σε TE pH 8,0.
- Προσθέτουμε λυσοζύμη ώστε η τελική της συγκέντρωση να είναι 0,5mg/ml.
- Επώαση για 30-60 λεπτά στον πάγο (περιοδική ανακίνηση).
- Πάγωμα -ξεπάγωμα (υγρό άζωτο-37 °C) 4 φορές.
- Φυγοκέντρωση στους 4 °C.
- Χωρίζουμε το υπερκείμενο, που αποτελεί το διαλυτό μέρος του εκχυλίσματος, από το ίζημα που αποτελεί το αδιάλυτο.
- Προσθέτουμε τόσο στο υπερκείμενο όσο και στο ίζημα SDS loading buffer και τα αναλύουμε σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης-SDS.

2.3.4 Απομόνωση των πρωτεϊνών από τα έγκλειστα σωματίδια (inclusion bodies)

ΥΛΙΚΑ

1. Λυσοζύμη 10 mg/ml
2. 1M MgCl₂

3. 1mg/ml DNase I
4. Citrate buffer: 500mM κιτρικό οξύ pH 6,0 χρησιμοποιώντας στερεό Na₂HPO₄
5. 10% Sarkosyl
6. 1M Tris-Cl pH 8,0
7. 1M DTT
8. 10M Urea
9. Γυάλινος ομογενοποιητής (Dounce homogenizer)
10. 23 C
11. SS34 rotor και τα αντίστοιχα σωληνάρια

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Στη περίπτωση που έχουμε ίζημα κυττάρων που προέρχεται από καλλιέργεια 400ml, ακολουθούμε την παρακάτω διαδικασία:

- Διαλυτοποιούμε το ίζημα σε 5-20ml (ανάλογα με το μεγεθός του) του παρακάτω ισοτονικού διαλύματος:
 - 50mM Tris pH 8,0
 - 20% Γλυκόζη
 (έτσι μπορεί να διατηρηθεί στους -20 C).
- Προσθέτουμε 450μl λυσοζύμης συγκέντρωσης 10mg /ml.
- Επωάζουμε στους 23 C για 5 λεπτά.
- Προσθέτουμε 26 μl 1M MgCl₂ και 26μl 1mg /ml DNase I.
- Επωάζουμε για 5 λεπτά στους 23 C.
- Προσθέτουμε 17ml Citrate buffer και 100μl PMSF 0,1M.
- Ομογενοποίηση των κυττάρων (20-60 χτυπήματα).
- Επώαση στους 23 C για 30 λεπτά.
- Φυγοκέντρωση στους 23 C στις 10,000 στροφές για 15 λεπτά, σε SS34 rotor.
- Σώζουμε το υπερκείμενο σαν υπερκείμενο 1. στους 4 C αν χρησιμοποιηθεί άμεσα και στους -20 C αν θέλουμε να το αποθηκεύσουμε.
- Επαναδιαλύουμε το ίζημα με τον ομογενοποιητή σε 17ml Citrate buffer (από εδώ και πέρα η χρήση του PMSF είναι προαιρετική) και επαναφυγοκεντρούμε όπως πριν (χωρίς να επωάσουμε). Το νέο υπερκείμενο φυλάσσεται σαν υπερκείμενο 2.

- Επανάληψη του προηγούμενου σταδίου και φύλαγμα του καινούργου υπερκείμενου σαν υπερκείμενο 3.
- Επαναδιαλύουμε το ίζημα με τον ομογενοποιητή σε 10ml 100mM Citrate buffer το οποίο περιέχει 1,5% Sarkosyl.
- Επιδιώκουμε στους 23 °C για 30 λεπτά.
- Φυγοκεντρούμε στους 23 °C στις 16,000 στροφές για 15 λεπτά, σ' ένα SS34 rotor και σώζουμε το υπερκείμενο σαν υπερκείμενο 4.
- Επαναδιαλύουμε το ίζημα (με τον ομογενοποιητή) σε 10ml 100mM Citrate +1,5% Sarkosyl buffer, φυγοκεντρούμε στους 23 °C στις 16,000 στροφές για 15 λεπτά, σε SS34 rotor χωρίς επώαση και σώζουμε το υπερκείμενο σαν υπερκείμενο 5.
- Επαναλαμβάνουμε το προηγούμενο βήμα 4 φορές και σώζουμε τα αντίστοιχα υπερκείμενα σαν υπερκείμενα 6., 7., 8., 9. .
- Επαναδιαλύουμε το ίζημα (με τον ομογενοποιητή) σε 5ml 50mM Tris-Cl pH 8,0 + 2mM DTT.
- Φυγοκεντρούμε όπως και προηγουμένως και σώζουμε το υπερκείμενο σαν υπερκείμενο10.
- Διαλυτοποιούμε το ίζημα σε 500-2000μl, 6M Urea + 50mM Tris-Cl pH 8,0 + 2 mM DTT.
- Τρέχουμε, σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης-SDS, δείγματα από τα παραπάνω υπερκείμενα και το τελευταίο διαλυτοποιημένο ίζημα, προκειμένου να διαπιστωθεί αν τα έγκλειστα σωματίδια έχουν σπάσει νωρίτερα από το τελευταίο στάδιο, με αποτέλεσμα μέρος των πρωτεϊνών μας να περιέχεται και σε κάποια από τα υπερκείμενα.
- Τέλος ποσοτικοποιούμε αν θέλουμε, το τελικό διάλυμα με τη μέθοδο Bradford .

2.3.5 Απομάκρυνση του απορρυπαντικού Sarkosyl από τα απομονωμένα έγκλειστα σωματίδια

ΥΛΙΚΑ

1. 25% TCA
2. Ακετόνη

3. Urea buffer: 6M Urea, 50mM Tris-Cl pH 8,0

4. SDS loading buffer.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

- Στο διάλυμα των απομονωμένων έγκλειστων σωματίων προσθέτουμε ίσο όγκο παγωμένου διαλύματος 25% TCA.
- Ανακινούμε και επωάζουμε στον πάγο για 15 λεπτά.
- Φυγοκεντρούμε στους 4 °C στις 14,000 στροφές για 8-10 λεπτά.
- Αφαιρούμε το υπερκείμενο και επαναδιαλύουμε το ίζημα σε 1ml παγωμένης ακετόνης.
- Επαναφυγοκεντρούμε στις ίδιες συνθήκες.
- Επαναλαμβάνουμε τα δύο προηγούμενα βήματα.
- Στεγνώνουμε το ίζημα στους 37 °C για 5 λεπτά.
- Επαναδιαλύουμε το ίζημα στο κατάλληλο όγκο του Urea buffer+SDS loading buffer.

Στην συνέχεια τρέχουμε το παραπάνω διάλυμα σε δύο διαδοχικά πηκτώματα πολυακρυλαμίδης-SDS (α : 12,5%, β : 17%) και η ζώνη που απομονώνεται (απαλλαγμένη πια από το θόρυβο των άσχετων πρωτεϊνών), δίνεται για ανοσοποίηση.

2.3.6 Πρόγραμμα ανοσοποίησης

- Η ζώνη που απομονώθηκε από το πήκτωμα πολυακρυλαμίδης-SDS τεμαχίζεται σε μικρότερα κομμάτια τα οποία θα χρησιμοποιηθούν για τις ανοσοποιήσεις των κουνελιών.
- Συγκεκριμένα :
- Κατά την πρώτη ανοσοποίηση ενέονται υποδόρια, τουλάχιστον 50μg της κατάλληλης πρωτεΐνης μαζί με το πλήρες ανοσοενισχυτικό Freund's.
- Μετά από δύο εβδομάδες ξαναενέουμε ανάλογη ποσότητα πρωτεΐνης μαζί με το ατελές τώρα ανοσοενισχυτικό Freund's .
- Ανάλογη υπενθύμιση γίνεται μετά από δύο εβδομάδες.
- Μετά από μία εβδομάδα παίρνουμε δείγμα αίματος το οποίο και επεξεργαζόμαστε.
- Στη συνέχεια ακολουθούν τρεις κύκλοι της παρακάτω πορείας:
Την επόμενη εβδομάδα γίνεται όπως και προηγουμένως, μια υπενθύμιση στο

κουνέλι, ενώ την μεθεπόμενη ξαναπαίρνουμε δείγμα.

Τα δείγματα αίματος επεξεργάζονται με τον ακόλουθο τρόπο:

Αφού πάρουμε αίμα από το κουνέλι το αφήνουμε 2-3 ώρες στους 37 °C να πήξει. Στη συνέχεια το αφήνουμε όλη τη νύχτα στους 4 °C να συσταλλεί και το επόμενο πρωί φυγοκεντρούμε το δείγμα στους 4 °C στις 10.000 στροφές, για 10 λεπτά. Ο ορός αφαιρείται προσεκτικά σαν υπερκείμενο ενώ τόσο το πήγμα όσο και τα υπόλοιπα αδιάλυτα συστατικά καθιζάνουν. Τονίζουμε ότι ο ορός φυλλάσσεται σε, aliquots, στους -20 °C (συνήθως παρουσία Sodium azide)

2.3.7 Πηκτώματα πολυακρυλαμίδης-SDS

Η συνταγή για τα πηκτώματα αυτά αναγράφεται στους παρακάτω πίνακες:

RUNNING GEL

% Ακρυλαμίδη	<u>5</u>	<u>7</u>	<u>7.5</u>	<u>10</u>	<u>12.5</u>	<u>15</u>	<u>17.5</u>	<u>20</u>	<u>25</u>
Tris 3M pH 8,9	1,25 ml	1,25 ml	1,25 ml	1,25 ml	1,25 ml	1,25 ml	1,25 ml	1,25 ml	1,25 ml
30% Ακρυλαμίδη +0.8% Δις ακρυλαμίδη	1,68 ml	2,35 ml	2,5 ml	3,35 ml	4,18 ml	5 ml	5,85 ml	6,5 ml	8,33 ml
H ₂ O	7 ml	6,33 ml	6,18 ml	5,33 ml	4,5 ml	3,68 ml	2,83 ml	2,18 ml	0,35 ml
TEMED	<u>20μl</u>								
20% SDS	<u>50μl</u>								
10% APS	<u>50μl</u>								

STACKING GEL

Tris 1M pH 6,8 0,5 ml
30% Ακρυλαμίδη +0.8% Δις Ακρυλαμίδη 1,25ml
H₂O 7,5ml
TEMED 10μl
20% SDS 38μl
10% APS 75μl

Το βάψιμο των αναλυτικών πηκτωμάτων γίνεται σε Coomassie Brilliant Blue:

1lt: 1 gr Coomassie Blue R250

400ml μεθανόλη

100ml οξικό οξύ

ενώ ο απομάκρυνση της περίσσειας χρωστικής γίνεται με:

1lt: 400ml μεθανόλη

100ml οξικό οξύ

Στα παρασκευαστικά πηκτώματα το βάψιμο γίνεται με νερό και βρωμοφαινόλη. Επίσης αυτά τα πηκτώματα, τα οποία είναι πάχους 3mm, τρέχουν στα 15-20 mA όλη τη νύχτα, ενώ τα αναλυτικά, στο Stacking τρέχουν στα 14 mA και στο Running στα 20 mA, για το κατάλληλο χρονικό διάστημα.

2.3.8 Στύπωμα Western

- Το πήκτωμα το οποίο έχει τρέξει και το οποίο θέλουμε να στυπώσουμε, τοποθετείται στην κασέτα της συσκευής (για το στύπωμα Western), πάνω από ένα σφουγγάρι και ένα χαρτί Whatmann, τα οποία έχουν διαβραχεί στο παρακάτω διάλυμα:

20mM Tris-Cl pH 8,3

150mM Γλυκίνη

20% Μεθανόλη

- Στη συνέχεια, και αφού το πήκτωμα κοπεί σε κάποιο άκρο του ώστε να γνωρίζουμε τον

προσανατολισμό του, τοποθετούμε επάνω του μία μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, η οποία έχει διαβραχεί προηγουμένως τόσο σε H₂O όσο και στο παραπάνω διάλυμα και πάνω απ'αυτά τοποθετούμε ένα Whatmann και ένα άλλο σφουγγάρι, τα οποία έχουν

διαβραχεί και αυτά στο προηγούμενο διάλυμα.

(Στην παραπάνω διαδικασία προσέχουμε να μην εγκλωβιστεί πουθενά φυσαλίδα αέρα.)

- Κλείνουμε την κασσέτα και την τοποθετούμε στη συσκευή, η οποία είναι γεμάτη με το παραπάνω διάλυμα. Προσέχουμε η κασσέτα να είναι έτσι τοποθετημένη, ώστε οι πρωτεΐνες να κινούνται από τη μεμβράνη προς την νιτροκυτταρίνη.
- Η διαδικασία της μεταφοράς ολοκληρώνεται, είτε στα 90 mA για 4 ώρες, είτε στα 20 mA για 15 ώρες.
- Στη συνέχεια η νιτροκυτταρίνη, αφού κοπεί στην κατάλληλη θέση (ώστε να ξέρουμε τον προσανατολισμό της), ξεπλένεται σε PBS για 10-15 λεπτά.
- Ακολουθεί ανάδευση της νιτροκυτταρίνης σε διάλυμα 2% BSA σε PBS, για 4 ώρες τουλάχιστον. (Η επώαση σ' αυτό το διάλυμα βοηθάει στο να μην έχουμε αργότερα μη ειδική πρόσδεση του αντισώματος.)
- Ακολουθούν 3 πεντάλεπτα πλυσίματα της νιτροκυτταρίνης σε PBS που περιέχει 0,05% Tween-20 έτσι ώστε να απαλλαγούμε από την περίσσεια BSA.
- Στη συνέχεια επωάζουμε τη νιτροκυτταρίνη με το πρωτογενές αντίσωμα του όρου μας το οποίο αραιώνεται συνήθως 100-10,000 φορές σε PBS που περιέχει 1% BSA και 0,05% Tween. (Η νιτροκυτταρίνη αναδεύεται για 2 ώρες τουλάχιστον.)
- Μετά από το παραπάνω χρονικό διάστημα ακολουθούν 5 πεντάλεπτα πλυσίματα της νιτροκυτταρίνης με PBS που περιέχει 0,05% Tween, έτσι ώστε να απαλλαγούμε από την περίσσεια του πρωτογενούς αντιγόνου).
- Στη συνέχεια επωάζουμε τη νιτροκυτταρίνη με το δευτερογενές αντίσωμα. Αυτό αραιώνεται συνήθως 200-5000 φορές σε PBS που περιέχει 1% BSA+ 0,05% Tween. (Η νιτροκυτταρίνη αναδεύεται για 2 ώρες τουλάχιστον.)
- Ξεπλένουμε τη μεμβράνη 5 φορές, με ανάδευση για 5 λεπτά, σε PBS που περιέχει 0,05% Tween (έτσι ώστε να απομακρυνθεί το επιπλέον δευτερογενές αντίσωμα).
- Ακολουθεί αντίχρωση του δευτερογενούς αντισώματος, είτε χρησιμοποιώντας το αντιδραστήριο ECL (Amersham), είτε χρησιμοποιώντας το Vector® Vip Substrate Kit For Peroxidase.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Απομόνωση καινούργιων κλώνων cDNA για το *CMRP*

Για την απομόνωση καινούργιων cDNA για το γονίδιο *CMRP* έγινε χρήση μιας βιβλιοθήκης cDNA (Oliver *et al.*, 1995), η οποία έχει προκύψει από εγκέφαλο εμβρύου ποντικού ημέρας 14.5 (την E 14.5, παρατηρείται έντονη έκφραση του *CMRP*). Τα cDNAs της βιβλιοθήκης προκύπτουν μέσω της δράσης του ενζύμου της αντίστροφης μεταγραφάσης, η οποία χρησιμοποιεί σαν καλούπι RNA που έχει απομονωθεί από τον παραπάνω ιστό, με τη βοήθεια τυχαίων εκκινητών (random primers). Τα κομμάτια cDNA που προκύπτουν μ' αυτόν τον τρόπο υφίστανται κατεργασία με Klenow πολυμεράση, ώστε να παρουσιάζουν λεία άκρα και στη συνέχεια συνδέονται σε κάθε άκρο τους με τμήματα DNA που ονομάζονται αλληλουχίες σύνδεσης (linkers). Οι αλληλουχίες αυτές στη συγκεκριμένη περίπτωση περιλαμβάνουν τις περιοριστικές θέσεις για τα ένζυμα *EcoRI* και *NotI*. Ακολούθως οι κατασκευές αυτές εισάγονται στο φαγικό φορέα λExCell *EcoRI/CIP* στη θέση *EcoRI* μετά από ανάλογη ενζυματική πέψη. Ο φορέας αυτός έχει μέγεθος 45.5 Kb, προέρχεται από ένα φορέα λ charon και μπορεί να μολύνει κύτταρα *E.coli* της κατηγορίας NM522 ή NP66. Στη συνέχεια χρησιμοποιώντας κατάλληλους ανιχνευτές επιλέγονται φαγικοί κλώνοι, από την παραπάνω βιβλιοθήκη cDNA, οι οποίοι περιέχουν ενθέματα cDNA του *CMRP*. Τα ενθέματα αυτά απομονώνονται από τους κλώνους με κατεργασία με *EcoRI* και ακολούθως κλωνοποιούνται σε πλασμιδιακό φορέα Bluescript (pBS) II KS +, και προσδιορίζεται η νουκλεοτιδική αλληλουχία των άκρων τους. Μ' αυτόν τον τρόπο επιτρέπεται η επιλογή κλώνων που εκτείνονται, (είτε προς τη μία, είτε προς την άλλη κατεύθυνση), από το ήδη γνωστό μέρος του cDNA του *CMRP*. Έτσι διαβάζεται ολόκληρη η αλληλουχία των κατάλληλων κλώνων με δύο τρόπους. Σύμφωνα με τον πρώτο τρόπο κάθε κλώνος κόβεται σε μικρότερα κομμάτια, τα οποία κλωνοποιούνται πάλι στον pBS, διαβάζεται η αλληλουχία τους και τοποθετούνται στη σειρά. Ενώ με τον δεύτερο τρόπο η ολοκλήρωση της ανάγνωσης της αλληλουχίας του κλώνου γίνεται με τη συνεχόμενη δημιουργία καινούργιων εκκινητών. Η ανάγνωση της αλληλουχίας κάθε κλώνου και με

τους δύο τρόπους μπορεί να βοηθήσει στην αποφυγή λαθών στην ανάγνωση της αλληλουχίας.

Οι καινούργιοι κλώνοι cDNA για το *CMRP* που απομονώθηκαν είναι οι W104, W105 και W106 και έχουν επιλεγθεί χρησιμοποιώντας σαν ανιχνευτή το κομμάτι του cDNA του *CMRP* από τη θέση των 4500 bp μέχρι τη θέση των 5100 bp (εικ. 5). Το κομμάτι αυτό προκύπτει από τον κλώνο W43 μετά από πέψη του με ClaI/StuI (εικ. 5). Τονίζουμε ότι το κομμάτι αυτό είναι κοινό στους κλώνους W43 και W70, έτσι ώστε να θεωρείται ότι δεν είναι χιμαιρικό. Γίνεται προσπάθεια ολοκλήρωσης της ανάγνωσης της αλληλουχίας των κλώνων W104 και W106, καθώς και συλλογής καινούργιων κλώνων, χρησιμοποιώντας σαν ανιχνευτές κομμάτια cDNA που βρίσκονται στο τέλος των κλώνων W104 και W106. Συγκεκριμένα χρησιμοποιώντας τις τελευταίες 700 βάσεις του W106, επιλέξαμε 4 επιπλέον κλώνους, οι οποίοι πρόκειται να αναλυθούν.

Η νουκλεοτιδική και αμινοξική αλληλουχία του *CMRP* δεν έχει ακόμα αποκαλυφθεί τελείως και η υπάρχουσα νουκλεοτιδική αλληλουχία (5450 bp) περιέχει ένα ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης 1524 αμινοξέων, το οποίο περιλαμβάνει το αμινοτελικό άκρο συμπεριλαμβανομένου του κωδικονίου έναρξης της μεθειονίνης, χωρίς όμως την ύπαρξη μέχρι τώρα κάποιου κωδικονίου λήξης (εικ. 6). Αυτό αναμένουμε να υπάρχει στους καινούργιους κλώνους cDNA που απομονώθηκαν.

Αξίζει να σημειωθεί ότι το υπάρχον cDNA του *CMRP* παρουσιάζει υψηλή ομολογία (87%) μ' ένα μόνο ανθρώπινο EST (expressed sequence tag) 530 bp, και μάλιστα με τις πρώτες 320 βάσεις του. Το συγκεκριμένο EST είναι γνωστό ως HS806211 ή H59806 και η ομολογία του με το cDNA του *CMRP* εντοπίζεται στη θέση 4520-4840 (εικ. 5). Αυτή η περιοχή του cDNA του *CMRP* αντιπροσωπεύεται από πολλούς κλώνους cDNA με αποτέλεσμα η νουκλεοτιδική της αλληλουχία να μην είναι χιμαιρική. Έτσι αντιλαμβανόμαστε ότι ο χιμαιρισμός πρέπει να εντοπίζεται στο EST και έχει σαν αποτέλεσμα το EST μετά τις πρώτες 320 βάσεις του να μην παρουσιάζει ομολογία με το *CMRP*.

Εικόνα 5: Το σύνολο των απομονωμένων κλώνων cDNA για το *CMRP*.

Τα ονόματα των κλώνων cDNA που έχουν απομονωθεί αναγράφονται μέσα στα κουτιά. Με pExCell ή BS-KSII σημειώνουμε τα ονόματα των φορέων στους οποίους είναι κλωνοποιημένα τα ενθέματα του cDNA του *CMRP*. T3, T7, rev, upi, είναι τα ονόματα των εκκινητών που χρησιμοποιούνται στους παραπάνω φορείς. Τονίζουμε ότι το κάθε κουτάκι περιβάλλεται από συγκεκριμένες θέσεις περιοριστικών ενζύμων ανάλογα με τον φορέα κλωνοποίησης. Κάτω από τα κουτιά αναγράφονται αριθμοί που αντιστοιχούν στη θέση έναρξης και λήξης του αντίστοιχου κλώνου σε σχέση με το συνολικό cDNA του *CMRP* που απεικονίζεται στο κάτω μέρος της εικόνας. Το σκιασμένο μέρος των κλώνων W106, W104, αντιπροσωπεύει την άγνωστη μέχρι τώρα νουκλεοτιδική τους αλληλουχία, η εύρεση της οποίας θα αποκαλύψει το αν αυτοί οι κλώνοι επικαλύπτονται ή όχι. Το αριστερό μέρος των κλώνων αντιστοιχεί με το 5' άκρο και το δεξιό με το 3' άκρο σύμφωνα με την κατεύθυνση μετάφρασης. Εκτός από τα σκιασμένα άκρα των κλώνων W106 και W104, όλοι οι άλλοι κλώνοι αλληλοεπικαλύπτονται. Το κωδικόνιο έναρξης της μετάφρασης (μεθειονίνη) εντοπίζεται στη θέση 874 του συνολικού cDNA. Κάτω από το συνολικό cDNA του *CMRP* παρουσιάζεται η θέση του EST και πάνω από τον κλώνο W43 το κομμάτι του cDNA που χρησιμοποιήθηκε για την ανεύρεση των κλώνων W104, W105 και W106 στα πλαίσια αυτής της εργασίας. Οι κλώνοι W87, W41, W42, W43 και W70 έχουν απομονωθεί από τον Γεώργιο Χαλεπάκη.

Εικόνα 6: Αμινοξική αλληλουχία του *CMRP*.

Z: Κωδικόνια λήξης, NCT, NGS, NIT: Θέσεις N-γλυκοζυλίωσης, M: Κωδικόνιο έναρξης στη θέση 292. Η υπογραμμισμένη αμινοξική αλληλουχία είναι η αλληλουχία η οποία έχει προκύψει στα πλαίσια της παρούσας εργασίας. Τα υπογραμμισμένα πενταπεπίδια υποδηλώνουν τις πιθανές θέσεις πρόσδεσης αίμης. Οι αλληλουχίες έχουν τοποθετηθεί με τέτοιο τρόπο, ώστε να διακρίνονται τα 6 επαναλαμβανόμενα μοτίβα κυστεϊνών στο επάνω μέρος και τα άλλα 13 επαναλαμβανόμενα μοτίβα στο μέσο περίπου της κωδικής περιοχής. Οι κυστεΐνες των μοτίβων εμφανίζονται με μεγαλύτερα γράμματα για τον ευκολότερο εντοπισμό τους.

3.2 Παρασκευή ειδικών πολυκλωνικών αντισωμάτων για την πρωτεΐνη *CMRP*

Εκτός από την προσπάθεια ολοκλήρωσης του cDNA του γονιδίου, το οποίο θα αποτελέσει απαραίτητο εργαλείο για βιοχημικές μελέτες, έγινε και προσπάθεια παρασκευής ειδικών πολυκλωνικών αντισωμάτων για την πρωτεΐνη *CMRP*.

Τα αντισώματα αυτά θα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον χαρακτηρισμό της φυσικής πρωτεΐνης, τον εντοπισμό της σε κυτταρικό επίπεδο και για τον χαρακτηρισμό των κυτταρικών τύπων που την εκφράζουν. Επίσης θα μπορέσουν να χρησιμοποιηθούν

για την ανεύρεση άλλων πρωτεϊνών με τις οποίες αλληλεπιδρά η πρωτεΐνη CMRP (με τη μέθοδο της ανοσοκατακρήμνησης), αλλά και για το χαρακτηρισμό των μεταβολών που μπορεί να παρουσιάζει το πρότυπο έκφρασης της CMRP σε ασθενείς με τη νόσο Alzheimer.

Για το σκοπό αυτό κλωνοποιήθηκαν στον πλασμιδιακό φορέα pJC20 (εικ.4) δύο περιοχές του cDNA του *CMRP*. Οι περιοχές αυτές κωδικοποιούν για 206 και 314 περίπου αμινοξέα αντίστοιχα και εντοπίζονται στο cDNA του *CMRP*, η πρώτη στη θέση 4500-5120 bp και η δεύτερη στη θέση 4500-5450 bp (εικ. 5). Δηλαδή όσον αφορά την αμινοξική αλληλουχία της πρωτεΐνης CMRP τα ενθέματα αυτά του cDNA του *CMRP* εντοπίζονται, το πρώτο στη περιοχή από το αμινοξύ 1502-1816 και το δεύτερο σ' αυτήν από το αμινοξύ 1502-1708 (εικ. 6). Συγκεκριμένα το πρώτο έχει προκύψει με πέψη του κλώνου W43 με *StuI* / *ClaI*, και το δεύτερο με πέψη του ίδιου κλώνου με *StuI*. Στη συνέχεια τα ενθέματα αυτά κλωνοποιούνται στον φορέα pJC20 μετά από πέψη του με *XhoI* και κατεργασία με *Klenow* πολυμεράση. Οι παραπάνω πρωτεϊνικές περιοχές εντοπίζονται στο καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης CMRP στην περιοχή μετά τα μοτίβα των κυστεϊνών. Αυτές οι περιοχές επιλέγονται έτσι ώστε να μην περιέχουν κυστεΐνες, γιατί η παρουσία τους ίσως: α) οδηγεί σε πρωτεϊνικά προϊόντα τα οποία να είναι δυσδιάλυτα (εξαιτίας της δημιουργίας γεφυρών δισουλφιδικού δεσμού μεταξύ των κυστεϊνών, οι οποίες μπορούν να συνδέσουν μ' αυτόν τον τρόπο διάφορες πολυπεπτιδικές αλυσίδες), β) οδηγεί στην παραγωγή αντισωμάτων ενάντια όχι στις πρωτεΐνες που κωδικοποιούν οι περιοχές αυτές, αλλά ενάντια σε σύμπλοκα των πρωτεϊνών αυτών με διάφορες άλλες πρωτεΐνες (πάλι εξαιτίας των δισουλφικών δεσμών που δημιουργούνται).

Μετά από εισαγωγή των παραπάνω πλασμιδιακών κατασκευών στα κύτταρα *E.coli* BL21(DE3), παρατηρείται υπερέκφραση των ζητούμενων πρωτεϊνών όπως προκύπτει από ανάλυση των συνολικών βακτηριακών πρωτεϊνών σε πηκτώματα πολυακρυλαμίδης-SDS. Η επιβεβαίωση ότι οι πρωτεΐνες που υπερεκφράζονται είναι οι ζητούμενες, προέρχεται τόσο από το μέγεθος τους, όσο και από το γεγονός ότι τα προϊόντα αυτά απουσιάζουν από το εκχύλισμα των ίδιων κυττάρων BL21(DE3) όταν σ' αυτά εισαχθεί φορέας pJC20. Τα παραπάνω φαίνονται στο ακόλουθα πηκτώματα πολυακρυλαμίδης-SDS (εικόνα 7, 8).

Εικόνα 7: Αναλυτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης-SDS.

1: Εκχύλισμα βακτηριακών κυττάρων BL21(DE3) στα οποία έχει εισαχθεί φορέας pJC20 και στα οποία έχει χορηγηθεί IPTG. **2:** Εκχύλισμα βακτηριακών κυττάρων BL21(DE3) στα οποία έχει εισαχθεί φορέας pJC20. **3:** Διαλυτό μέρος του εκχυλίσματος που περιγράφεται στο 5. **4:** Αδιάλυτο μέρος του προηγούμενου εκχυλίσματος. **5:** Εκχύλισμα βακτηριακών κυττάρων BL21(DE3) στα οποία έχει εισαχθεί το κομμάτι του cDNA του *CMRP* που κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη μεγέθους 206 αμινοξέων και στα οποία έχει χορηγηθεί IPTG. **6:** Εκχύλισμα βακτηριακών κυττάρων BL21(DE3) στα οποία έχει εισαχθεί το κομμάτι του cDNA του *CMRP* που κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη μεγέθους 206 αμινοξέων. **7:** Διαλυτό μέρος του εκχυλίσματος που περιγράφεται στο 9. **8:** Αδιάλυτο μέρος του προηγούμενου εκχυλίσματος. **9:** Εκχύλισμα βακτηριακών κυττάρων BL21(DE3) στα οποία έχει εισαχθεί το κομμάτι του cDNA του *CMRP* που κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη μεγέθους 314 αμινοξέων και στα οποία έχει χορηγηθεί IPTG. **10:** Εκχύλισμα βακτηριακών κυττάρων BL21(DE3) στα οποία έχει εισαχθεί το κομμάτι του cDNA του *CMRP* που κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη μεγέθους 314 αμινοξέων.

Εικόνα 8: Επιβεβαίωση της υπερέκφρασης των ζητούμενων πρωτεϊνών, σε κύτταρα BL21(DE3), με τη χρήση πρωτεϊνικού μάρτυρα.

1: Εκχύλισμα βακτηριακών κυττάρων BL21(DE3) στα οποία έχει εισαχθεί το κομμάτι του cDNA του *CMRP* που κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη μεγέθους 314 αμινοξέων. **2:** Εκχύλισμα βακτηριακών κυττάρων BL21(DE3) στα οποία έχει εισαχθεί το κομμάτι του cDNA του *CMRP* που κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη μεγέθους 314 αμινοξέων και στα οποία έχει χορηγηθεί IPTG. **3:** Αδιάλυτο μέρος του προηγούμενου εκχυλίσματος. **4:** Διαλυτό μέρος του προηγούμενου εκχυλίσματος. **5:** Πρωτεϊνικός μάρτυρας. **6:** Εκχύλισμα βακτηριακών κυττάρων BL21(DE3) στα οποία έχει εισαχθεί το κομμάτι του cDNA του *CMRP* που κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη μεγέθους 206 αμινοξέων. **7:** Εκχύλισμα βακτηριακών κυττάρων BL21(DE3) στα οποία έχει εισαχθεί το κομμάτι του cDNA του *CMRP* που κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη μεγέθους 206 αμινοξέων και στα οποία έχει χορηγηθεί IPTG. **8:** Αδιάλυτο μέρος του προηγούμενου εκχυλίσματος.

Στη συνέχεια οι πρωτεΐνες που εκφράζονται μ' αυτό τον τρόπο, απομονώνονται και καθαρίζονται από τα βακτήρια και τις υπόλοιπες ενδογενείς πρωτεΐνες τους, με μια διαδικασία η οποία περιλαμβάνει: α) απομόνωση των έγκλειστων σωματίων των

κυττάρων (υλικά και μέθοδοι) και β) διαχωρισμό των ζητούμενων πρωτεϊνών από τα υπόλοιπα προϊόντα των έγκλειστων σωματίων, με το πέρασμά τους από δύο διαδοχικά πηκτώματα πολυακρυλαμίδης-SDS (υλικά και μέθοδοι). Έτσι τα πρωτεϊνικά προϊόντα που χρησιμοποιούνται για την ανοσοποίηση των κουνελιών και την παραγωγή αντισωμάτων, είναι απαλλαγμένα από τον “θόρυβο” άλλων άσχετων πρωτεϊνών. Αυτό φαίνεται στην εικόνα 9, όπου έχουν αναλυθεί σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης-SDS δείγματα από τα πρωτεϊνικά προϊόντα που χορηγούνται μαζί με άλλα ανοσοενισχυτικά στα κουνέλια.

Συνολικά ανοσοποιούνται 4 κουνέλια, 2 για κάθε πρωτεϊνικό κομμάτι και αριθμούνται 18, 19 αυτά που ανοσοποιούνται με την μεγαλύτερη πρωτεΐνη και 20, 21 αυτά που ανοσοποιούνται με την μικρότερη.

Εικόνα 9: Καθαρότητα των πρωτεϊνικών δειγμάτων που χορηγούνται στα κουνέλια για ανοσοποίηση.

1: Πρωτεϊνικός μάρτυρας, 2: Δείγμα από την πρωτεΐνη των 314 αμινοξέων που χορηγείται στα κουνέλια που αριθμούνται 18,19, 3: Δείγμα από την πρωτεΐνη των 206 αμινοξέων που χορηγείται στα κουνέλια που αριθμούνται 20 και 21, 4: Δείγμα από βακτηριακό εκχυλίσμα κυττάρων BL21(DE3) στα οποία έχει εισαχθεί ο φορέας pJC20.

Τόσο η εξειδίκευση, όσο και η ευαισθησία των αντισωμάτων που προέκυψαν, φαίνονται στις εικόνες 10 και 11.

Στην εικόνα 10 περιλαμβάνονται στυπώματα-Western στα οποία έχουν χρησιμοποιηθεί βακτηριακά εκχυλίσματα κυττάρων BL21(DE3), τα οποία περιέχουν σκέτο τον φορέα pJC20, αλλά και εκχυλίσματα κυττάρων στα οποία έχουν εκφραστεί τα πρωτεϊνικά προϊόντα των ενθεμάτων cDNA του *CMRP*, αραιωμένα 100 φορές σε σχέση με τα εκχυλίσματα που περιέχουν σκέτο τον φορέα (ώστε τα υπερεκφραζόμενα πρωτεϊνικά προϊόντα να παρουσιάζουν τέτοια συγκέντρωση, που να μην οδηγεί σε μη ειδική

αναγνώριση από τους αντιορούς). Τα στυπώματα αυτά έχουν επωασθεί με αντιορό και από τα 4 κουνέλια (αραιωμένο 1000 φορές), αλλά και με αντιορό που έχουμε πάρει από κουνέλι πριν την ανοσοποίηση (αραιωμένο και αυτό 1000 φορές). Για την ανίχνευση του δευτερογενούς αντισώματος, το οποίο είναι συνδεδεμένο με περοξιδάση (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.) και το οποίο είναι αραιωμένο 2000 φορές, χρησιμοποιήθηκε το Vector® Vip Substrate Kit For peroxidase.

Εικόνα 10: Προσδιορισμός της εξειδίκευσης των αντισωμάτων χρησιμοποιώντας το Vector® Vip Substrate Kit For peroxidase.

1: Βακτηριακό εκχύλισμα κυττάρων BL21(DE3) τα οποία περιέχουν σκέτο τον φορέα pJC20, **2:** Βακτηριακό εκχύλισμα κυττάρων BL21(DE3) στα οποία εκφράζεται το πρωτεϊνικό προϊόν των 314 αμινοξέων (αραιωμένο 100 φορές), **3:** Βακτηριακό εκχύλισμα κυττάρων BL21(DE3) στα οποία εκφράζεται το πρωτεϊνικό προϊόν των 206 αμινοξέων (αραιωμένο 100 φορές).

A: Επώαση με τον αντιορό από κουνέλι πριν την ανοσοποίηση, **B:** Επώαση με τον αντιορό από το κουνέλι 18, **Γ:** Επώαση με τον αντιορό από το κουνέλι 19, **Δ:** Επώαση με τον αντιορό από το κουνέλι 20, **Ε:** Επώαση με τον αντιορό από το κουνέλι 21.

Παρατηρούμε ότι ο αντιορός πριν την ανοσοποίηση δεν αναγνωρίζει τα συγκεκριμένα πρωτεϊνικά πεπτίδια, ενώ ο αντιορός μετά την ανοσοποίηση τα αναγνωρίζει. Από την άλλη μεριά, ο θόρυβος που παρατηρείται στον ορό των κουνελιών 18, 20 και 21, παρουσιάζεται και στον αντιορό πριν την ανοσοποίηση. Φαίνεται λοιπόν ότι τα αντισώματα μας παρουσιάζουν ικανοποιητική εξειδίκευση.

Η δεύτερη εικόνα (εικόνα 11) περιλαμβάνει ένα στύπωμα-Western, στο οποίο έχουμε χρησιμοποιήσει διάφορες αραιώσεις των βακτηριακών εκχυλισμάτων που περιέχουν τα συγκεκριμένα πρωτεϊνικά προϊόντα, σε σχέση με το βακτηριακό εκχύλισμα που περιέχει το φορέα pJC20. Το στύπωμα αυτό έχει επωασθεί με τον αντιορό από το

κουνέλι 19 αραιωμένο 300 φορές, ενώ η ανίχνευση του δευτερογενούς αντισώματος, το οποίο αραιώθηκε 2000 φορές έγινε με το ECL Kit της Amersham.

Εικόνα 11: Προσδιορισμός της ευαισθησίας των αντισωμάτων χρησιμοποιώντας το ECL Kit της Amersham.

1: Βακτηριακό εκχύλισμα κυττάρων BL21(DE3) τα οποία περιέχουν τον φορέα pJC20, **2:** Βακτηριακό εκχύλισμα κυττάρων BL21(DE3) στα οποία εκφράζεται το πρωτεϊνικό προϊόν των 206 αμινοξέων (αραιωμένο 100 φορές), **3:** Βακτηριακό εκχύλισμα κυττάρων BL21(DE3) στα οποία εκφράζεται το πρωτεϊνικό προϊόν των 314 αμινοξέων (αραιωμένο 100 φορές), **4:** Βακτηριακό εκχύλισμα κυττάρων BL21(DE3) στα οποία εκφράζεται το πρωτεϊνικό προϊόν των 314 αμινοξέων (αραιωμένο 1000 φορές), **5:** Βακτηριακό εκχύλισμα κυττάρων BL21(DE3) στα οποία εκφράζεται το πρωτεϊνικό προϊόν των 314 αμινοξέων (αραιωμένο 5000 φορές), **6:** Βακτηριακό εκχύλισμα κυττάρων BL21(DE3) στα οποία εκφράζεται το πρωτεϊνικό προϊόν των 314 αμινοξέων (αραιωμένο 10.000 φορές).

Παρατηρούμε ότι τα αντισώματα μας αναγνωρίζουν, με ικανοποιητική εξειδίκευση, ακόμα και πολύ μικρές ποσότητες των συγκεκριμένων πρωτεϊνικών πεπτιδίων, γεγονός που υποδηλώνει την ικανοποιητική τους ευαισθησία. Επίσης τονίζουμε ότι τα διάφορα προϊόντα που βλέπουμε στη σειρά 3 αποτελούν πρωτεολυτικά προϊόντα της πρωτεΐνης των 314 αμινοξέων. Μάλιστα η συγκεκριμένη αραιώση του αντιορού (1:300) από το κουνέλι 19, αναγνωρίζει μέχρι και 10ng πρωτεΐνης (όπως φαίνεται στη σειρά 6 στην εικόνα 11, όπου το ποσό της πρωτεΐνης έχει υπολογιστεί). Στόχος μας είναι να προσδιορίσουμε την μικρότερη δυνατή ποσότητα των συγκεκριμένων πρωτεϊνών που αναγνωρίζουν τα αντισωματά μας όταν αραιωθούν κατάλληλα, έτσι ώστε να είναι δυνατή η ανίχνευση της φυσικής πρωτεΐνης ακόμα και αν

αυτή εντοπίζεται σε πολύ μικρές ποσότητες (στην περίπτωση βέβαια που την αναγνωρίζουν ειδικά).

3.3 Χαρακτηρισμός και απομόνωση γενωμικών ενθεμάτων που περιέχουν το γονίδιο *CMRP*

Ένας από τους απώτερους στόχους μας ήταν να απομονώσουμε γενωμικά ενθέματα που να περιέχουν κατάλληλες περιοχές του γονιδίου *CMRP* από γενωμική βιβλιοθήκη (σε φαγικό φορέα) ποντικού στελέχους Sv129, ώστε να χρησιμοποιηθούν σε κατασκευές με τις οποίες θα επιτύχουμε αναστολή της λειτουργίας του γονιδίου *CMRP* στον ποντικό με τη μέθοδο του ομόλογου ανασυνδυασμού. Οι γενωμικοί αυτοί κλώνοι θα πρέπει κατά προτίμηση να περιέχουν την περιοχή του cDNA του *CMRP* γύρω από το κωδικόνιο έναρξης της μετάφρασης ώστε να χρησιμοποιηθούν για την καταστροφή του γονιδιακού προϊόντος ήδη από το αμινοτελικό του άκρο.

Κατά πρώτο ελέγχθηκαν τρεις γενωμικοί κλώνοι οι οποίοι έχουν απομονωθεί από τον Γ.Χαλελάκη χρησιμοποιώντας σαν ανιχνευτή ένα κομμάτι από το cDNA του *CMRP*, το οποίο βρίσκεται πριν το κομμάτι που κωδικοποιεί για την *CMRP* πρωτεΐνη. Οι γενωμικοί κλώνοι που απομονώθηκαν, είναι κλωνοποιημένοι στο pBS (KS) +, στη θέση NotI και οι δύο από αυτούς είναι ίδιοι και παρουσιάζουν επικάλυψη με την αρχή του cDNA του *CMRP*. Αυτοί οι κλώνοι υβριδοποιήθηκαν με δύο ανιχνευτές που καταλαμβάνουν τις παρακάτω περιοχές στο cDNA του *CMRP*: α) την περιοχή από την θέση 2060 μέχρι την θέση 2710 που αντιστοιχεί στο cDNA του *CMRP* που κωδικοποιεί για τα μοτίβα των κυστεϊνών και β) την περιοχή από τη θέση 1028 μέχρι τη θέση 1750 που αντιστοιχεί στην αρχή της πρωτεΐνης που κωδικοποιείται από το *CMRP* (εικ. 5). Το αποτέλεσμα που προέκυψε ήταν ότι κανένας από τους παραπάνω γενωμικούς κλώνους δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη δημιουργία κατάλληλων κατασκευών (αφού δεν υβριδοποιήθηκε με τους παραπάνω ανιχνευτές), που μέσω της μεθόδου του ομόλογου ανασυνδυασμού θα προκαλέσουν πλήρη καταστολή της λειτουργίας του ενδογενούς γονιδίου *CMRP*, αφού δεν εντοπίζονται ούτε στην περιοχή του cDNA που κωδικοποιεί

το αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης, αλλά ούτε και στην περιοχή των μοτίβων των κυστεϊνών.

Προκειμένου λοιπόν να βρεθούν οι κατάλληλοι γενωμικοί κλώνοι διερευνήσαμε μια άλλη γενωμική βιβλιοθήκη, στην οποία ως ενθέματα χρησιμοποιούνται κομμάτια γενωμικού DNA που έχει απομονωθεί από αρχέγονα εμβρυϊκά κύτταρα DE3 ποντικού, του στελέχους Sv129. Οι γενωμικοί κλώνοι είναι κλωνοποιημένοι στον φαγικό φορέα λDASH II της Stratagene (Kaestner *et al.*, 1993), ο οποίος μολύνει κύτταρα E.coli του τύπου LE392. Σαν ανιχνευτές της παραπάνω γενωμικής βιβλιοθήκης χρησιμοποιήθηκαν:

- i) Ο δεύτερος ανιχνευτής που χρησιμοποιήθηκε και προηγουμένως, και
- ii) Ένας καινούργιος ανιχνευτής, ο οποίος καταλαμβάνει την περιοχή, από τη θέση 787 μέχρι τη θέση 2190, πάνω στο cDNA του *CMRP* (σημειώνουμε ότι το κωδικόνιο έναρξης της *CMRP* πρωτεΐνης εντοπίζεται στη θέση 874 του cDNA του *CMRP*; εικ.5).

Δυστυχώς, χρησιμοποιώντας τους παραπάνω ανιχνευτές, δεν κατορθώσαμε να απομονώσουμε κανένα γενωμικό κλώνο, γι' αυτό και απαιτείται να ξαναπροσπαθήσουμε χρησιμοποιώντας είτε καινούργιους ανιχνευτές, είτε διαφορετική γενωμική βιβλιοθήκη.

4. Σ Υ Ζ Η Τ Η Σ Η

4.1 Συλλογή επιπλέον κλώνων για το cDNA του *CMRP*

Οι κλώνοι cDNA που απομονώθηκαν συνέβαλαν με την μέχρι τώρα γνωστή αλληλουχία τους, στην ταυτοποίηση της αμινοξικής αλληλουχίας που έχει υπογραμμιστεί στην εικόνα 6. Με την ανάγνωση ολόκληρης της αλληλουχίας τους πιστεύεται ότι το cDNA του *CMRP* θα μεγαλώσει τουλάχιστον κατά 1000 ακόμα βάσεις και ίσως βρεθεί και το κωδικόνιο λήξης της πρωτεΐνης που κωδικοποιεί.

Η ολοκλήρωση του cDNA του *CMRP* θα αποτελέσει απαραίτητο εργαλείο για τον μοριακό χαρακτηρισμό του γονιδίου. Πρώτα απ' όλα θα ολοκληρωθεί η αμινοξική

αλληλουχία της πρωτεΐνης που κωδικοποιεί. Επίσης θα μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν εργαλείο για βιοχημικές μελέτες για τον έλεγχο πιθανών λειτουργιών του. Συγκεκριμένα κλωνοποιώντας το cDNA του *CMRP* σε ευκαρυωτικούς φορείς κλωνοποίησης οι οποίοι φέρουν επαγωγίμους υποκινητές, θα εισαχθεί σε κατάλληλες κυτταρικές σειρές και θα εκφρασθεί κατόπιν επαγωγής του υποκινητή του. Έτσι για παράδειγμα θα εξεταστεί η πρωτεολυτική του δραστηριότητα, ο ρόλος του στην απόπτωση αλλά και η ικανότητα του να προσδένει ιόντα μετάλλων.

4.2 Παρασκευή ειδικών πολυκλωνικών αντισωμάτων για την πρωτεΐνη *CMRP*

Τα αντισώματα που παρασκευάσαμε παρουσιάζουν μεγάλη εξειδίκευση και μπορούν να ανιχνεύσουν μέχρι και 5-10ng των πρωτεϊνικών πεπτιδίων των 206 και 314 αμινοξέων που εκφράσαμε. Τα αντισώματα αυτά θα χρησιμοποιηθούν για την ταυτοποίηση της φυσικής πρωτεΐνης που θεωρούμε ότι κωδικοποιεί το cDNA του *CMRP*.

Στην περίπτωση που τα αντισώματα αυτά αναγνωρίζουν την φυσική πρωτεΐνη (αν για παράδειγμα οι περιοχές στις οποίες εκφράζεται η πρωτεΐνη *CMRP* ταυτίζονται με τις περιοχές όπου ανιχνεύεται το mRNA του *CMRP*) θα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον κυτταρικό εντοπισμό της *CMRP* με χρήση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου, για το χαρακτηρισμό των κυτταρικών τύπων που την εκφράζουν με χρήση αντισωμάτων μαρτύρων για πρωτεΐνες ειδικές για διάφορους κυτταρικούς τύπους, για την ανεύρεση άλλων πρωτεϊνών με τις οποίες αλληλεπιδρά η πρωτεΐνη *CMRP* με τη μέθοδο της ανοσοκατακρήμνησης, αλλά και για το χαρακτηρισμό των μεταβολών που μπορεί να παρουσιάζει το πρότυπο έκφρασης της *CMRP* σε ασθενείς με τη νόσο Alzheimer.

4.3 Απομόνωση γενωμικών κλώνων για το γονίδιο *CMRP* μέσω των οποίων θα ανασταλλεί η λειτουργία του ενδογενούς γονιδίου

Οι γενωμικοί κλώνοι που απομονώθηκαν επειδή δεν υβριδοποιούνται με τους ανιχνευτές που χρησιμοποιήθηκαν, δεν περιλαμβάνουν την περιοχή του cDNA του *CMRP* που κωδικοποιεί για το αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης, ούτε την περιοχή που κωδικοποιεί για τις κυστεΐνες, με αποτέλεσμα να μην μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε κατασκευές που με τη μέθοδο του ομόλογου ανασυνδυασμού θα οδηγήσουν σε πλήρη αναστολή της λειτουργίας του ενδογενούς γονιδίου.

Συγκεκριμένα η διαδικασία που θα ακολουθούσαν αν είχαμε απομονώσει το κατάλληλο γενωμικό ένθεμα θα περιελάμβανε την εισαγωγή του γονιδίου της νεομυκίνης (neomycin resistance gene: Neo-gene) σε ένα από τα εξόνια που κωδικοποιούν την αμινοτελική περιοχή της πρωτεΐνης *CMRP*. Στη συνέχεια η κατασκευή αυτή θα εισαχθεί στα εμβρυϊκά πολυδύναμα προγονικά κύτταρα (embryonic stem cells: ES-cells) RI. Τονίζουμε ότι το πρωτεϊνικό προϊόν του γονιδίου της νεομυκίνης προσφέρει ανθεκτικότητα στα κύτταρα κατά την παρουσία του αντίστοιχου αντιβιοτικού G418 και η έκφρασή του ελέγχεται από έναν υποκινητή που είναι ενεργός στα εμβρυϊκά προγονικά κύτταρα. Κατά συνέπεια, τα κύτταρα που θα είναι ανθεκτικά στο αντιβιοτικό G418 θα περιέχουν την κατασκευή του DNA που βάλαμε. Με PCR ή Southern-blot θα ταυτιστούν στη συνέχεια τα κύτταρα στα οποία το ενδογενές γονίδιο *CMRP* έχει αντικατασταθεί από τη μεταλλαγμένη κατασκευή DNA και θα συσσωματωθούν με έμβρυα αγρίου τύπου ποντικού πρόωρου σταδίου μοριδίου (8-16 κυττάρων). Τα συσσωματώματα αυτά θα εισαχθούν στις σάλπιγγες ενός ψευδοεγκύου ποντικού για την παραγωγή χιμαιρικών ζώων, τα οποία θα δώσουν απόγονους κατάλληλους για μελέτη. Αξίζει να σημειωθεί ότι στην περίπτωση που η απουσία λειτουργικής πρωτεΐνης *CMRP* προκαλέσει πρόωρη θνησιμότητα σε εμβρυϊκά στάδια του ποντικού, θα προσπαθήσουμε να παράγουμε χιμαιρικά ποντίκια στα οποία θα επάγεται η καταστολή της λειτουργικής πρωτεΐνης *CMRP* με τη βοήθεια του συστήματος της Cre-recombinase, σε διάφορους ιστούς, αλλά και σε διάφορα αναπτυξιακά στάδια, ή και σε ενήλικα ποντίκια.

Τα ποντίκια στα οποία έχει κατασταλεί η λειτουργία του *CMRP* θα χρησιμεύσουν για τις παρακάτω μελέτες:

- α) Για την εύρεση της βιολογικής λειτουργίας του *CMRP*, που περιλαμβάνει την περιγραφή του μορφολογικού και ιστολογικού φαινοτύπου απουσία λειτουργικής πρωτεΐνης.

β) Για το αν και με ποιό τρόπο το *CMRP* εμπλέκεται σε μηχανισμούς προγραμματισμένου

κυτταρικού θανάτου.

γ) Για την *in vivo* συσχέτιση της λειτουργίας του *CMRP* με την παθογένεση της νόσου Alzheimer, και πιο ειδικά για το αν και πώς το *CMRP* εμπλέκεται στη δημιουργία των πλακών αμυλοειδούς. Όπως έχει ήδη αναφερθεί το βασικό συστατικό των πλακών αμυλοειδούς είναι το πεπτίδιο βΑ4 το οποίο είναι το προϊόν της πρωτεολυτικής επεξεργασίας του β-APP στον άνθρωπο. Στον ποντικό όμως, η αμινοξική αλληλουχία της

ομόλογης πρωτεΐνης του β-APP παρουσιάζει ορισμένες διαφορές γύρω από την περιοχή

που αποκόπτεται πρωτεολυτικά και έτσι εμποδίζεται η πρωτεόλυση και κατά συνέπεια

η

απελευθέρωση του πεπτιδίου βΑ4 και η δημιουργία πλακών αμυλοειδούς (De Strooper *et*

al. 1995). Από την άλλη μεριά σε διαγονιδιακά ποντίκια, στα οποία έχει εισαχθεί το ανθρώπινο γονίδιο της β-APP επέρχεται πρωτεολυτική επεξεργασία και εμφανίζονται πλάκες αμυλοειδούς. Αυτό αποδεικνύει ότι στον ποντικό υπάρχουν όλοι οι μηχανισμοί

για

τη δημιουργία πλακών αμυλοειδούς με τη διαφορά όμως ότι η πρωτεΐνη β-APP του ποντικού δεν πρωτεολύεται έτσι ώστε να παραχθεί το βΑ4 πεπτίδιο και έτσι αυτός προστατεύεται από την αποθήκευση πλακών αμυλοειδούς. Από τα παραπάνω γίνεται αντιληπτό, ότι διασταυρώνοντας τα ποντίκια στα οποία έχει καταστραφεί η λειτουργία

του

CMRP με τα διαγονιδιακά ποντίκια που φέρουν το ανθρώπινο γονίδιο της β-APP θα μπορούσαμε να ελέγξουμε αν η απουσία λειτουργικής πρωτεΐνης *CMRP* επηρεάζει τη δημιουργία πλακών αμυλοειδούς.

4.4 Πιθανοί συσχετισμοί του γονιδίου *CMRP* με την ασθένεια Alzheimer

Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα προκύπτουν διάφοροι συσχετισμοί μεταξύ πιθανών λειτουργιών του *CMRP* και μηχανισμών που οδηγούν στην παθογένεση της νόσου Alzheimer.

Πρώτα απ' όλα η έκφραση του γονιδίου *CMRP* ταυτίζεται πολύ καλά με τις περιοχές του εγκεφάλου ασθενών με AD που παρουσιάζουν μεγάλη συσσώρευση πλακών αμυλοειδούς, (το *CMRP* εκφράζεται στον εγκέφαλο, σχεδόν μόνο στις περιοχές που παρουσιάζουν βλάβες σε ασθενείς με AD) γεγονός που υποδηλώνει ότι μπορεί να σχετίζεται με την νόσο. Ταυτόχρονα εκφράζεται επίσης πολύ ισχυρά στο χοριοειδές πλέγμα, για το οποίο συζητείται ότι μάλλον περιέχει ενεργότητα εκκρετάσης, εφόσον το εγκεφαλονωτιαίο υγρό του ανθρώπου περιέχει μεγάλη ποσότητα του πεπτιδίου βΑ4. Και αυτή η πληροφορία αποτελεί μια ένδειξη της σχέσης του γονιδίου *CMRP* με τη νόσο Alzheimer, αφού είναι πιθανή η συμμετοχή του στη δημιουργία των πλακών αμυλοειδούς.

Από την άλλη μεριά η ύπαρξη της περιοχής B στην πρωτεΐνη *CMRP*, η οποία είναι χαρακτηριστική των πρωτεασών της οικογένειας των φουρινών, μαρτυρεί ότι η πρωτεΐνη *CMRP* ενδέχεται να σχετίζεται λειτουργικά με πρωτεάσες της οικογένειας των φουρινών.

Οι φουρίνες αποτελούν τα μέλη μιας οικογένειας πρωτεασών σερίνης, των σουμπτιλισινών (*Subtilisin*), στα θηλαστικά. (Οι σουμπτιλισίνες κόβουν τα υποστρώματα τους στο καρβοξυτελικό άκρο βασικών αμινοξέων.) Συγκεκριμένα είναι διαμεμβρανικές πρωτεάσες, εξαρτώμενες από την παρουσία ασβεστίου, οι οποίες βρίσκονται σ' όλους τους ιστούς, και οι οποίες κόβουν μια σειρά από πρόδρομες πρωτεΐνες, στις θέσεις RxK/RR (που αποτελούνται από βασικά αμινοξέα), κατά την πάροδο αυτών από το συστατικό εκκριτικό μονοπάτι (*Constitutive Secretory Pathway*). Επίσης παίζουν ρόλο στην παθογονικότητα μερικών βακτηρίων και ιών.

Οι φουρίνες συντίθενται σαν πρόδρομα ένζυμα στο αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο, και στη συνέχεια συγκεντρώνονται στο σύμπλεγμα Golgi, στην επιφάνεια του κυττάρου και στα πρώιμα ενδοσώματα. Χαρακτηριστικές πρωτεϊνικές περιοχές των φουρινών ξεκινώντας από το αμινοτελικό τους άκρο είναι: α) Μια περιοχή «*prepro*» (η οποία περιέχει μια αλληλουχία σινιάλο που αποκόπτεται). β) Μια καταλυτική περιοχή παρόμοια της σαμπτιλισίνης, η οποία ακολουθείται από μια δυνητική (αυτο-)

πρωτεολυτική θέση κοπής (K-R-R-T-K-R-). γ) Μια «ενδιάμεση» περιοχή. δ) Μια περιοχή πλούσια σε κυστεΐνες της οποίας ο ρόλος δεν έχει ακόμα ξεκαθαριστεί πλήρως, αλλά πιστεύεται ότι απαιτείται για την αλληλεπίδραση των φουρινών με άλλες πρωτεΐνες (ίσως μέσω δισουλφιδικών δεσμών) και κατά συνέπεια για τη δράση των φουρινών ως πρωτεάσες, αφού για να κόψει μια πρωτεΐνη κάθε πρωτεάση πρέπει πρώτα να έρθει σε επαφή με αυτή. Αυτή είναι και η περιοχή των φουρινών με την οποία παρουσιάζει ομολογία το *CMRP*. ε) Μια δυνητική διαμεμβρανική περιοχή. και στ) μια κυτταροπλασματική περιοχή.(Seidah *et al.*, 1990; Vey *et al.*, 1994; Roebroek *et al.*, 1994; Basbaum *et al.*, 1996; Chiron *et al.*, 1994; Roebroek *et al.*, 1992; Hatsuzawa *et al.*, 1992; Wasley *et al.*, 1993; Garred *et al.*, 1995; Tsuneoka *et al.*, 1993; Takahashi *et al.*, 1993.)

Αξίζει να σημειωθεί ότι πρωτεάσες της οικογένειας των φουρινών έχουν χαρακτηριστεί ως πιθανοί υποψήφιοι για την πρωτεολυτική επεξεργασία της β-APP, αφού όπως αναφέρθηκε εντοπίζονται και στην κυτταρική μεμβράνη όπου πιστεύεται ότι πρέπει να συμβαίνει η πρωτεολυτική επεξεργασία της β-APP. Μάλιστα, όπως προκύπτει από την βιβλιογραφία, έχουν πραγματοποιηθεί διάφορα πειράματα που ελέγχουν την πρωτεόλυση της β-APP από φουρίνες, τα οποία όμως δεν είχαν καμμία επιτυχία (De Strooper *et al.*, 1994). Παρ' όλα αυτά η υπόθεση ότι κάποιο άλλο μέλος της οικογένειας των φουρινών εμπλέκεται σ' αυτήν την κατεργασία παραμένει ανοιχτή. Μπορούμε λοιπόν να υποθέσουμε ότι το *CMRP* παίζει αυτό το ρόλο, αφού παρουσιάζει ομολογία με τις φουρίνες και ταυτόχρονα εκφράζεται και στις περιοχές του εγκεφάλου που παρουσιάζουν μεγάλη συσσώρευση πλακών αμυλοειδούς. Επιπλέον η έκφρασή του στο χοριοειδές πλέγμα υποδηλώνει ότι μπορεί να είναι εκκρετάση. Έτσι ένας από τους κύριους στόχους μας θα αποτελέσει ο έλεγχος των πρωτεολυτικών ιδιοτήτων του *CMRP* και ιδιαίτερα η ικανότητα του να πρωτεολύει την β-APP .

Για το σκοπό αυτό θα κλωνοποιηθεί πρώτα το cDNA του *CMRP* σε ευκαρυωτικούς φορείς κλωνοποίησης οι οποίοι φέρουν κάποιο επαγωγίμο υποκινητή και στη συνέχεια αυτές οι κατασκευές θα χρησιμοποιηθούν για τη δημιουργία μόνιμων κυτταρικών σειρών που θα παρουσιάζουν ελάχιστη δραστικότητα ενδογενούς εκκρετάσης, αλλά ταυτόχρονα θα εκφράζουν το γονίδιο της β-APP. Τα πρωτεολυτικά παράγωγα της β-APP θα εντοπισθούν με τη βοήθεια ειδικών αντισωμάτων. Εάν τα

παραπάνω πειράματα δείχνουν ότι το *CMRP* δεν εμπλέκεται στην πρωτεολυτική επεξεργασία της β -APP, τότε το γονίδιο *CMRP* θα εισαχθεί σε κυτταρικές σειρές, οι οποίες εμφανίζουν έντονη ενδογενή δραστικότητα εκκρετάσης και παράγουν και β -APP, ώστε να μελετηθεί μ' αυτόν τον τρόπο εάν η πρωτεΐνη *CMRP* δρα κατασταλτικά στην πρωτεολυτική επεξεργασία της β -APP.

Σημαντικό επίσης είναι να τονισθεί ότι πειραματικές αποδείξεις μαρτυρούν όλο και πιο πειστικά ότι ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος παίζει σημαντικό ρόλο στο θάνατο των νευρικών κυττάρων όπως αυτό συμβαίνει σε ασθενείς που πάσχουν από τη νόσο Alzheimer. Από την άλλη μεριά η έκφραση του *CMRP* στις περιοχές μεταξύ των δακτύλων στα άκρα κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ανάπτυξης, που χαρακτηρίζονται από ενεργό προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο, επιτρέπει την υπόθεση ότι το *CMRP* εμπλέκεται σε μηχανισμούς κυτταρικού θανάτου και σε άλλες περιοχές, εκτός αυτές των άκρων, όπως σ' αυτές που ταυτίζονται με την νόσο Alzheimer στον εγκέφαλο. Έτσι η πιθανή εμπλοκή του *CMRP* στην απόπτωση των νευρικών κυττάρων, αποτελεί έναν άλλο τρόπο με τον οποίο το *CMRP* μπορεί να συσχετίζεται με την νόσο Alzheimer. Για το σκοπό αυτό, το cDNA του *CMRP* θα κλωνοποιηθεί σε ένα ευκαρυωτικό φορέα ο οποίος θα φέρει έναν επαγωγίμο υποκινητή, θα εισαχθεί σε κατάλληλες κυτταρικές σειρές και θα εκφρασθεί κατόπιν επαγωγής του υποκινητή του. Η έκφραση του γονιδίου *CMRP* θα επιτρέψει τη μελέτη του αποτελέσματος που επιφέρει τόσο στη θραύση του πυρηνικού DNA, η οποία αποτελεί ένδειξη προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου, όσο και στην κυτταρική αύξηση και επιβίωση σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα. Ταυτόχρονα ο ρόλος του *CMRP* στην απόπτωση μπορεί να διελευκανθεί και με μελέτες σε ιστολογικές τομές ποντικών αγρίου τύπου και ποντικών στους οποίους έχει ανασταλεί η λειτουργία του *CMRP*, τόσο σε εμβρυϊκό επίπεδο όσο και σε επίπεδο ενήλικου ατόμου, με τη μέθοδο TUNEL (Terminal transferase-mediated-dUTP-biotin Nick End Labelling).

Μια άλλη πιθανή λειτουργία της *CMRP*, η οποία μπορεί να συσχετιστεί με τη παθογένεση της νόσου Alzheimer είναι και η παρακάτω. Έχει δειχθεί πειραματικά ότι η β -APP προσδένεται σε πρωτεογλυκάνες του εξωκυτταρικού χώρου και ότι μπορεί ακόμα να προσδέσει ιόντα μετάλλων όπως του χαλκού (Cu^{2+}) και του ψευδαργύρου (Zn^{2+}). Μάλιστα η πρόσδεση του δισθενούς χαλκού (Cu^{2+}) ακολουθείται από άμεση αναγωγή του σε μονοσθενή (Cu^+). Αυτός ο μηχανισμός μεταφοράς ελευθέρων ηλεκτρονίων

υποτίθεται ότι ενισχύει την παραγωγή ελευθέρων ριζών (όπως HO[·], O₂⁻) που είναι αρκετά τοξικές και οδηγούν στη γένεση νευροεκφυλιστικών ασθενειών όπως είναι η AD. Από την άλλη μεριά η πρωτεΐνη CMRP παρουσιάζει ομολογία με πρωτεογλυκάνες στο καρβοξυτελικό της άκρο, ενώ θα μπορούσε να προσδένει και μόρια αίμης. Έτσι μπορούμε να υποθέσουμε ότι η CMRP πρωτεΐνη θα μπορούσε να αλληλεπιδρά με την β-APP και στη συνέχεια μέσω των ομάδων αίμης (που θα μπορούσε να προσδένει και των ιόντων σιδήρου που κουβαλούν αυτές) να συμμετέχει στην μεταφορά των e⁻ που μεταφέρονται από την β-APP στο χαλκό. Δηλαδή ο φυσιολογικός ρόλος της πρωτεΐνης CMRP θα μπορούσε να είναι, είτε η πρόληψη της αναγωγής του δισθενούς χαλκού, με το να παραλαμβάνει ο σίδηρος της αίμης που προσδένει η CMRP τα ηλεκτρόνια που προορίζονται για το Cu, είτε η προστασία ενάντια στην παραγωγή ελευθέρων ριζών και ενεργών μονάδων οξυγόνου, που θα προέκυπταν μετά e⁻ που απελευθερώνονται κατά την οξείδωση του μονοσθενούς χαλκού σε δισθενή. Δηλαδή ο σίδηρος της αίμης που προσδένει η CMRP, θα μπορούσε να παραλαμβάνει τα ηλεκτρόνια αυτά και να τα οδηγεί σ' ένα σύστημα αδρανοποίησης τους (π.χ. αντίστοιχο της δισμουτάσης στα μιτοχόνδρια). Στην περίπτωση που χάνονταν αυτός ο κρίκος στο παραπάνω σύστημα μεταφοράς e⁻ τα e⁻ θα κατέληγαν σε διάφορα συστατικά του κυττάρου δρώντας τοξικά και τελικά θα οδηγούσαν και στο θάνατο του. Ίσως αυτός να είναι και ο τρόπος που το CMRP σχετίζεται με την νόσο Alzheimer. Μένει να το διαπιστώσουμε. Συγκεκριμένα η αλληλεπίδραση της β-APP με την CMRP μπορεί να επιβεβαιωθεί είτε με το διυβριδικό σύστημα στο ζαχαρομύκητα, είτε με τη μέθοδο της ανοσοκατακρήμνισης, όπου θα χρησιμοποιηθούν αντισώματα ειδικά για την CMRP αλλά και ραδιοσημασμένη APP. Από την άλλη μεριά η σύνδεση μετάλλων στην CMRP μπορεί να μελετηθεί με την ατομική σπεκτροσκοπία, αλλά και με βιοχημικά πειράματα σύμφωνα με τα οποία η CMRP θα επωασθεί με ραδιενεργά μέταλλα και η συνδεδεμένη ραδιενέργεια θα μετρηθεί. Αξίζει να σημειωθεί ότι αν πράγματι επιβεβαιωθεί ο παραπάνω ρόλος του CMRP τότε θα έχει ανακαλυφθεί ένα σύστημα μεταφοράς e⁻ που εντοπίζεται στην κυτταρική μεμβράνη.

Τέλος το CMRP μπορεί να συσχετιστεί με την Alzheimer και ως εξής: Η κληρονομική περίπτωση HCHWA-D της νόσου Alzheimer, η οποία εμφανίζεται σε ένα μικρό αριθμό οικογενειών στην Ολλανδία, χαρακτηρίζεται από αιμορραγίες των

εγκεφαλικών αιμοφόρων αγγείων λόγω εκτεταμένης συσσώρευσης πλακών αμυλοειδούς. 50% των ασθενών πεθαίνουν με την πρώτη αιμορραγία, ενώ αυτοί που επιβιώνουν παρουσιάζουν συμπτώματα της νόσου Alzheimer σε πολύ προχωρημένο στάδιο. Μάλιστα έχει δειχθεί μηχανιστικά ότι το β-αμυλοειδές αλληλεπιδρά με τα ενδοθηλιακά κύτταρα των αιμοφόρων αγγείων παράγοντας ελεύθερες ρίζες, οι οποίες αλλάζουν τη δομή και την λειτουργία του ενδοθηλίου και τελικά οδηγούν και στην αιμορραγία. Εκτός όμως από τους μοριακούς μηχανισμούς που προκαλούν την αιμορραγία, τίθεται το ερώτημα του αν στην παραπάνω περίπτωση διαταράσσεται και το αιμοστατικό σύστημα του ανθρώπου. Από την άλλη μεριά η περιοχή A της *CMRP* παρουσιάζει εντυπωσιακή ομολογία με την καρβοξυτελική περιοχή του παράγοντα von Willebrand. Ο παράγοντας von-Willebrand γενικά αποτελεί μια πολυμερή γλυκοπρωτεΐνη η οποία βρίσκεται στο αίμα (και στο πλάσμα και στα αιμοπετάλια), αλλά και στα ενδοθηλιακά κύτταρα και στο υποενδοθηλιακό τοίχωμα των αιμοφόρων αγγείων, και συμβάλλει στην αιμόπηξη. Επιπλέον, μεταλλαγές στον παράγοντα von-Willebrand προκαλούν την ασθένεια Willebrand που αποτελεί την πιο κοινή κληρονομική περίπτωση δημιουργίας αιμορραγιών στον άνθρωπο. Έτσι βασιζόμενοι στην παραπάνω αναφερθείσα ομολογία μεταξύ *CMRP* και του παράγοντα von-Willebrand θα μπορούσαμε να υποθέσουμε ότι η *CMRP* πιθανόν να εμπλέκεται και σε αιμοπηκτικούς μηχανισμούς. Αν πράγματι συνέβαινε κάτι τέτοιο, τότε θα υπήρχε εξαιρετικό ενδιαφέρον να διερευνηθεί η παρακάτω πειραματική υπόθεση: Δυσλειτουργία του *CMRP* θα συνέβαλλε στην νόσο Alzheimer, και ιδιαίτερα στις περιπτώσεις αυτής που σχετίζονται με αιμορραγίες, α) με το να συμβάλλει στη δημιουργία και εναπόθεση πλακών αμυλοειδούς στα τοιχώματα των αιμοφόρων αγγείων του εγκεφάλου και κατά συνέπεια στην καταστροφή του ενδοθηλίου με αποτέλεσμα την αιμορραγία και β) με το να σταματά ο φυσιολογικός του ρόλος στην αιμόπηξη.

Από τα παραπάνω προκύπτει ότι η σημασία του συγκεκριμένου ερευνητικού προγράμματος είναι να προσθέσουμε ένα ακόμα μοριακό γενετικό κρίκο (το γονίδιο *CMRP*) στους παθογενετικούς μηχανισμούς που οδηγούν σε νευροεκφυλιστικές ασθένειες και πιο συγκεκριμένα στη νόσο Alzheimer, που είναι η πλέον διαδεδομένη ασθένεια που προσβάλλει τον μηχανισμό νόησης του ανθρώπου. Η κατανόηση των μοριακών μηχανισμών της ασθένειας θα βοηθήσει στην φαρμακευτική αντιμετώπιση

της. Μάλιστα το γεγονός ότι δεν έχουν ακόμα εντοπισθεί πρωτεάσες που να συμβάλλουν στην πρωτεολυτική επεξεργασία της β -APP, κάνει την πιθανή πρωτεολυτική δράση της CMRP ιδιαίτερα ενδιαφέρουσα, αφού η επιβεβαίωση αυτής της δράσης θα βοηθούσε στην εύρεση ή στον σχεδιασμό ειδικών αναστολλέων που θα εμπόδιζαν την πρωτεολυτική της δραστηριότητα και κατά συνέπεια την παραγωγή του πεπτιδίου β -A4 και έτσι τη δημιουργία πλακών αμυλοειδούς (Dobel, 1997; Esler *et al.*, 1996).

Ταυτόχρονα επιτυχής συσχέτιση της λειτουργίας του CMRP με την παθογένεση της νόσου Alzheimer, θα μας οδηγήσει στο να ελέγξουμε το γονίδιο CMRP από ασθενείς με τη νόσο για πιθανές μεταλλάξεις που θα καταστέλλουν ή και θα αλλάζουν την λειτουργία της CMRP. Θετικά αποτελέσματα θα χρησιμοποιηθούν σαν εργαλεία για την διάγνωση της ασθένειας σε κληρονομικές περιπτώσεις AD. Τέλος απώτερος σκοπός μας είναι να δημιουργήσουμε ένα ποντίκι-μοντέλο για να εξετάσουμε και να ελέγξουμε την εξέλιξη της νόσου Alzheimer, καθώς επίσης και τους αποπτωτικούς μηχανισμούς κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ανάπτυξης και του γήρατος.

5. REFERENCES

- Basbaum, C.B., Werb, Z. (1996). Focalized proteolysis: spatial and temporal regulation of extracellular matrix degradation at the cell surface. *Curr Opin Cell Biol* 8(5), 731-738.
- Beal, M.F. (1996). Mitochondria, free radicals, and neurodegeneration. *Curr Opin Neurobiol* 6(5), 661-666.
- Chan, W., Fornwald, J., Brawner, M., Wetzel, R. (1996). Native complex formation between apolipoprotein E isoforms and the Alzheimer's disease peptide A beta. *Biochemistry* 35(22), 7123-7130.
- Chiron, M.F., Fryling, C.M., FitzGerald, D.J. (1994). Cleavage of pseudomonas exotoxin and diphtheria toxin by a furin-like enzyme prepared from beef liver. *J Biol Chem* 269(27), 18167-18176.
- Choi, D.W., Gage, F.H. (1996). Disease, transplantation and regeneration. *Curr Opin Neurobiol* 6(5), 635-637.
- Citron, M., Diehl, T.S., Capell, A., Haass, C., Teplow, D.B., Selkoe, D.J. (1996). Inhibition of amyloid beta-protein production in neural cells by the serine protease inhibitor AEBSF. *Neuron* 17(1), 171-179.
- De Strooper, B., Creemers, J., Moechars, D., Huylebroeck, D., Van De Ven, W., Van Leuven, F., Van den Berghe, H. (1994). Amyloid precursor protein is not processed by furin, PACE 4, PC1/3, PC2, PC4 and PC5/6 of the furin family of proprotein processing enzymes. *Biochimica et Biophysica Acta* 1246, 185-188.
- De Strooper, B., Umans, L., Van Leuven, F., Van Den Berghe, H. (1993). Study of the synthesis and secretion of normal and artificial mutants of murine amyloid precursor protein (APP): cleavage of APP occurs in a late compartment of the default secretion pathway. *J Cell Biol* 121(2), 295-304.
- De Strooper, B., Simons, M., Multhaup, G., Van Leuven, F., Beyreuther, K., Dotti, C.G. (1995). Production of intracellular amyloid-containing fragments in hippocampal neurons expressing human amyloid precursor protein and protection against amyloidogenesis by subtle amino acid substitutions in the rodent sequence. *EMBO J* 14(20), 4932-4938.
- Dewji, N.N., Singer, S.J. (1996). Specific transcellular binding between membrane proteins crucial to Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(22), 12575-12580.
- Dobeli, H. (1997). Rapid drug screening for Alzheimer's. *Nat Biotechnol* 15(3), 223-224.
- Duff, K., Eckman, C., Zehr, C., Yu, X., Prada, C.M., Perez-tur, J., Hutton, M., Buee, L., Harigaya, Y., Yager, D., Morgan, D., Gordon, M.N., Holcomb, L., Refolo, L., Zenk, B., Hardy, J., Younkin, S. (1996). Increased amyloid-beta₄₂(43) in brains of mice expressing mutant presenilin 1. *Nature* 383(6602), 710-713.

- Esler, W.P., Stimson, E.R., Ghilardi, J.R., Felix, A.M., Lu, Y.A., Vinters, H.V., Mantyh, P.W., Maggio, J.E. (1997). A beta deposition inhibitor screen using synthetic amyloid. *Nat Biotechnol* 15(3), 258-263.
- Furukawa, K., Barger, S.W., Blalock, E.M., Mattson, M.P. (1996). Activation of K⁺ channels and suppression of neuronal activity by secreted beta-amyloid-precursor protein. *Nature* 379(6560), 74-78.
- Garred, O., van Deurs, B., Sandvig, K. (1995). Furin-induced cleavage and activation of Shiga toxin. *J Biol Chem* 270(18), 10817-10821.
- Haass, C., and Selkoe, D.J. (1993). Cellular processing of b-amyloid precursor protein and the genesis of amyloid-b peptide. *Cell* 75, 1039-1042.
- Haass, C., Hung, A.Y., Selkoe, D.J., Teplow, D.B. (1994). Mutations associated with a locus for familial Alzheimer's disease result in alternative processing of amyloid beta-protein precursor. *J Biol Chem* 269(26), 17741-17748.
- Haass, C., Koo, E.H., Capell, A., Teplow, D.B., Selkoe, D.J. (1995). Polarized sorting of beta-amyloid precursor protein and its proteolytic products in MDCK cells is regulated by two independent signals. *J Cell Biol* 128(4), 537-547.
- Harper, J.D., Lansbury, P.T. Jr. (1997). Models of amyloid seeding in Alzheimer's disease and scrapie: mechanistic truths and physiological consequences of the time-dependent solubility of amyloid proteins. *Annu Rev Biochem* 66, 385-407.
- Hatsuzawa, K., Nagahama, M., Takahashi, S., Takada, K., Murakami, K., Nakayama, K. (1992). Purification and characterization of furin, a Kex2-like processing endoprotease, produced in Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* 267(23), 16094-16099.
- Hendriks L., and Van Broeckhoven, C. (1996). The bA4 amyloid precursor protein gene and Alzheimer's disease. *Eur. J. Biochem.* 237, 6-15.
- Hooper, N.M. (1995). Specificity of the Alzheimer's amyloid precursor protein alpha-secretase. *Trends Biochem Sci* 20(1), 15-16.
- Hsiao, K., Chapman, P., Nilsen, S., Eckman, C., Harigaya, Y., Younkin, S., Yang, F., and Cole, G. (1996). Correlative memory deficits, Ab elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. *Science* 274, 99-102.
- Inestrosa, N.C., Alvarez, A., Perez, C.A., Moreno, R.D., Vicente, M., Linker, C., Casanueva, O.I., Soto, C., and Garrido, J. (1996). Acetylcholinesterase accelerates assembly of amyloid-b-peptides into Alzheimer's fibrils: possible role of the peripheral site of the enzyme. *Cell* 16, 881-891.
- Iwai, A., Masliah, E., Yoshimoto, M., Ge, N., Flanagan, L., de Silva, H.A., Kittel, A., Saitoh, T. (1995). The precursor protein of non-A beta component of Alzheimer's disease amyloid is a presynaptic protein of the central nervous system. *Neuron* 14(2), 467-475.

- Kaestner, K., et al. (1993). Six members of the mouse forkhead gene family are developmentally regulated. *PNAS*, Vol. 90, 7628-7631.
- Lee, M.K., Borchelt, D.R., Wong, P.C., Sisodia, S.S., Price, D.L. (1996). Transgenic models of neurodegenerative diseases. *Curr Opin Neurobiol* 6(5), 651-660.
- Levy-Lahad, E., Wasco, W., Poorkaj, P., Romano, D.M., Oshima, J., Pettingell, W.H., Yu, C.E., Jondro, P.D., Schmidt, S.D., Wang, K., et al. (1995). Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus *Science* 269(5226), 973-977.
- Marx, J. (1996 α). Searching for drugs that combat Alzheimer's. *Science* 273(5271), 50-53.
- Marx, J. (1996 β). Dissecting how presenilins function--and malfunction. *Science* 274(5294), 1838-1840.
- Moechars, D., Lorent, K., De Strooper, B., Dewachter, I., and Van Leuven, F. (1996). Expression in brain of amyloid precursor protein mutated in the a-secretase site causes disturbed behavior, neuronal degeneration and premature death in transgenic mice. *EMBO J.* 15, 1265-1274.
- Multhaup, G., Schlicksupp, A., Hesse, L., Beher, D., Ruppert, T., Masters, C.L., and Beyreuther, K. (1996). The amyloid precursor protein of Alzheimer's disease in the reduction of Copper(II) to Copper(I). *Science* 271, 1406-1409.
- Neve, R.L. (1996). Mixed signals in Alzheimer's disease. *Trends Neurosci* 19(9), 371-372.
- Ohta, M., Kitamoto, T., Iwaki, T., Ohgami, T., Fukui, M., Tateishi, J. (1993). Immunohistochemical distribution of amyloid precursor protein during normal rat development. *Brain Res Dev Brain Res* 75(2), 151-161.
- Oliver, G., et al. (1995). Homeobox genes and connective tissue patterning. *Development* Mar;121(3):693-705.
- Patterson, P.H. (1995). Cytokines in Alzheimer's disease and multiple sclerosis. *Curr Opin Neurobiol* 5(5), 642-646.
- Roebroek, A.J., Creemers, J.W., Pauli, I.G., Kurzik-Dumke, U., Rentrop, M., Gateff, E.A., Leunissen, J.A., Van de Ven, W.J. (1992). Cloning and functional expression of Dfurin2, a subtilisin-like proprotein processing enzyme of *Drosophila melanogaster* with multiple repeats of a cysteine motif. *J Biol Chem* 267(24), 17208-17215.
- Roebroek, A.J., Creemers, J.W., Ayoubi, T.A., Van de Ven, W.J. (1994). Furin-mediated proprotein processing activity: involvement of negatively charged amino acid residues in the substrate binding region. *Biochimie* 76(3-4), 210-216.
- Rose, M.R., Archer, M.A. (1996). Genetic analysis of mechanisms of aging. *Curr Opin Genet Dev* 6(3), 366-370.

- Roses, A.D. (1996). The Alzheimer diseases. *Curr Opin Neurobiol* 6(5), 644-650.
- Saido, T.C., Iwatsubo, T., Mann, D.M., Shimada, H., Ihara, Y., Kawashima, S. (1995). Dominant and differential deposition of distinct beta-amyloid peptide species, A beta N3(pE), in senile plaques. *Neuron* 14(2), 457-466.
- Seidah, N.G., Gaspar, L., Mion, P., Marcinkiewicz, M., Mbikay, M., Chretien, M. (1990). cDNA sequence of two distinct pituitary proteins homologous to Kex2 and furin gene products: tissue-specific mRNAs encoding candidates for pro-hormone processing proteinases. *DNA Cell Biol* 9(10), 789.
- Selkoe D.J. (1991). Amyloid protein and Alzheimer's disease. *Scientific American*, November 1991, 40-47.
- Selkoe D.J. (1994). Cell biology of the amyloid b-protein precursor and the mechanism of Alzheimer's disease. *Annu. Rev. Cell Biol.* 10, 373-403.
- Selkoe, D.J. (1997). Alzheimer's disease: genotypes, phenotypes, and treatments. *Science* 275(5300), 630-631.
- Shen, J., Bronson, R.T., Chen, D.F., Xia, W., Selkoe, D.J., Tonegawa, S. (1997). Skeletal and CNS defects in Presenilin-1-deficient mice. *Cell* 89(4), 629-639.
- Sherrington, R., Rogaev, E.I., Liang, Y., Rogaeva, E.A., Levesque, G., Ikeda, M., Chi, H., Lin, C., Li, G., Holman, K., et al. (1995). Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease *Nature* 375 (6534), 754-760.
- Smale, G., Nichols, N.R., Brady, D.R., Finch, C.E., Horton, W.E. Jr. (1995). Evidence for apoptotic cell death in Alzheimer's disease. *Exp Neurol* 133(2), 225-230.
- Sola, C., Mengod, G., Probst, A., Palacios, J.M. (1993). Differential regional and cellular distribution of beta-amyloid precursor protein messenger RNAs containing and lacking the Kunitz protease inhibitor domain in the brain of human, rat and mouse. *Neuroscience* 53(1), 267-295.
- Strittmatter, W.J., and Roses, A.D. (1996). Apolipoprotein E and Alzheimer's disease. *Annu. Rev. Neurosci.* 19, 53-77.
- Su, J.H., Anderson, A.J., Cummings, B.J., and Cotman, C.W. (1994). Immunohistochemical evidence for apoptosis in Alzheimer's disease. *NeuroReport* 5, 2529-2533.
- Takahashi, S., Kasai, K., Hatsuzawa, K., Kitamura, N., Misumi, Y., Ikehara, Y., Murakami, K., Nakayama, K. (1993). A mutation of furin causes the lack of precursor-processing activity in human colon carcinoma LoVo cells. *Biochem Biophys Res Commun* 195(2), 1019-1026.
- Thinakaran, G., Borchelt, D.R., Lee, M.K., Slunt, H.H., Spitzer, L., Kim, G., Ratovitsky, T., Davenport, F., Nordstedt, C., Seeger, M., Hardy, J., Levey, A.I., Gandy, S.E., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., Price,

- D.L., Sisodia, S.S. (1996). Endoproteolysis of presenilin 1 and accumulation of processed derivatives in vivo. *Neuron* 17(1), 181-190.
- Thomas, T., Thomas, G., McLendon, C., Sutton, T., and Mullan, M. (1996). b-Amyloid-mediated vasoactivity and vascular endothelial damage. *Nature* 380, 168-171.
- Tsuneoka, M., Nakayama, K., Hatsuzawa, K., Komada, M., Kitamura, N., Mekada, E. (1993). Evidence for involvement of furin in cleavage and activation of diphtheria toxin. *J Biol Chem* 268(35), 26461-26465.
- Vey, M., Schafer, W., Berghofer, S., Klenk, H.D., Garten, W. (1994). Maturation of the trans-Golgi network protease furin: compartmentalization of propeptide removal, substrate cleavage, and COOH-terminal truncation. *J Cell Biol* 127(6), 1829-1842.
- Vito, P., Lacana, E., D'Adamio, L. (1996). Interfering with apoptosis: Ca(2+)-binding protein ALG-2 and Alzheimer's disease gene ALG-3. *Science* 271(5248), 521-525.
- Wasley, L.C., Rehemtulla, A., Bristol, J.A., Kaufman, R.J. (1993). PACE/furin can process the vitamin K-dependent pro-factor IX precursor within the secretory pathway. *J Biol Chem* 268(12), 8458-8465.
- Wolozin, B., Iwasaki, K., Vito, P., Ganjei, J.K., Lacana, E., Sunderland, T., Zhao, B., Kusiak, J.W., Wasco, W., D'Adamio, L. (1996). Participation of presenilin 2 in apoptosis: enhanced basal activity conferred by an Alzheimer mutation. *Science* 274(5293), 1710-1713.
- Yamatsuji, T., Matsui, T., Okamoto, T., Komatsuzaki, K., Takeda, S., Fukumoto, H., Iwatsubo, T., Suzuki, N., Asami-Odaka, A., Ireland, S., Kinane, T.B., Giambarella, U., and Nishimoto, I. (1996). G protein-mediated neuronal DNA fragmentation induced by familial Alzheimer's disease-associated mutants of APP. *Science* 272, 1349-1352.
- Zheng, H., Jiang, M., Trumbauer, M.E., Sirinathsinghji, D.J.S., Hopkins, R., Smith, D.W., Heavens, R.P., Dawson, G.R., Boyce, S., Conner, M.W., Stevens, K.A., Slunt, H.H., Sisodia, S.S., Chen, H.Y., and Van der Ploeg, L.H.T. (1995). b-Amyloid precursor protein-deficient mice show reactive gliosis and decreased locomotor activity. *Cell* 81, 525-531.
- Zhong, Z., Higaki, J., Murakami, K., Wang, Y., Catalano, R., Quon, D., Cordell, B. (1994). Secretion of beta-amyloid precursor protein involves multiple cleavage sites. *J Biol Chem* 269(1), 627-632.