

**ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ  
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ**

**ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟΥ ΤΙΤΛΟΥ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ**

**ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΑΚΟΥ ΠΟΝΤΙΚΟΥ ΜΕ ΣΚΟΠΟ ΝΑ  
ΑΠΟΤΕΛΕΣΕΙ ΜΟΝΤΕΛΟ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΣΘΕΝΕΙΑ ALZHEIMER**

***ΣΟΥΤΟΓΛΟΥ ΕΥΑΝΘΙΑ***

**ΥΠΕΥΘΥΝΟΣ ΕΡΕΥΝΗΤΗΣ: ΤΑΛΙΑΝΙΔΗΣ ΙΩΑΝΝΗΣ  
ΥΠΕΥΘΥΝΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΠΑΠΑΜΑΤΘΑΙΑΚΗΣ ΙΩΣΗΦ**

**ΗΡΑΚΛΕΙΟ ΚΡΗΤΗΣ  
ΣΕΠΤΕΜΒΡΙΟΣ 1998**

*Στον αδερφό μου*

## Αρχής γενομένης...

**Γιάννη**, σε ευχαριστώ πολύ για την εμπιστοσύνη που μου έδειξες και που μου ανέθεσες την εργασία αυτή. Σε ευχαριστώ επίσης, για την αγάπη για την επιστήμη που μου μεταδίδεις, τις συνεχείς συμβουλές, τεχνικές και επιστημονικές, καθώς και για την ενεργή συμμετοχή σου στη δημιουργία του διαγωνιστικού ποντικού.

**Νίτσα**, σε ευχαριστώ όχι μόνο για τις τεχνικές συμβουλές και την εκμάθηση βασικών τεχνικών στα πρώτα βήματα μου στο εργαστήριο, αλλά και γιατί ξέρω πως στον απέναντι μου πάγκο υπάρχει μια φίλη, που με κάνει με τον δικό της τρόπο πάντα να αισθάνομαι μοναδική.

**Άσραφ**, ή αλλιώς **Άσραφάκη**, η «ατυχία» με έριξε να δουλεύω δίπλα σου και πρέπει να ομολογήσω πως είναι μία πραγματική εμπειρία!!! Σε ευχαριστώ λοιπόν, που μου έδωσες τη βοήθειά σου όποτε τη χρειαζόμουν, καθώς και για τα αστεία σου και τα καθημερινά πειράγματα, που έκαναν τις ώρες να κυλούν ευχάριστα.

**Παντελή**, με σένα το λάθος έγινε από την αρχή!!! Διαλέξαμε το ίδιο εργαστήριο!!! Σε ευχαριστώ πάντως που με γέμιζες με αισιοδοξία ακόμα και μετά από ένα αποτυχημένο πείραμα. Απορώ ακόμα που την έβρισκες!!!

**Ελένη**, σε ευχαριστώ που ποτέ δεν αρνήθηκες τη βοήθεια σου όποτε σου τη ζήτησα και για τα μαρκαδοράκια σου και τις χρωματιστές ταινίες, που κατά καιρούς οικειοποιήθηκα.

**Κλειώ**, σε ευχαριστώ για το προσωπικό ενδιαφέρον που έδειξες σε όλη τη διάρκεια της εργασίας αυτής, τις επιστημονικές και τεχνικές συμβουλές πάνω σε θέματα που πρώτη φορά γινόταν στο εργαστήριο, και την σημαντική σου βοήθεια κατά τη διάρκεια των ενέσεων.

Θα ήταν μεγάλη παράληψη, αν δεν εξέφραζα τις θερμές μου ευχαριστίες στον κύριο **Κωστή Κουρουνιώτη**, ο οποίος έκανε τις ενέσεις και φρόντιζε για τις διασταυρώσεις των ποντικών καθώς και την **Ντεπούλα** που μου έδειξε το dot blot.

Ευχαριστώ επίσης τον **κ.Παπαματθαϊάκη** που ανέλαβε και περάτωσε την διόρθωση της παρούσας εργασίας.

Ευχαριστώ, **όλα τα παιδιά** για το όμορφο κλίμα που δημιουργούσαν τόσο μέσα στο εργαστήριο όσο και σε όλο το group των θηλαστικών, αλλά ιδιαίτερα την φίλη μου Ειρήνη ή αλλιώς «Τσίου», τόσο γιατί είχε γίνει ο προσωπικός μου ταξιτζής

όλο αυτόν τον καιρό, αλλά και γιατί ο αυθορμητισμός της και η αγάπη για τους φίλους της μου θυμίζει εμένα.....

Πέρα από φίλους και γνωστούς, οι αφανείς «ήρωες» αυτής της ιστορίας, είναι **οι γονείς μου** και ο **αδερφός μου**, τους οποίους ευχαριστώ τόσο για την οικονομική όσο για την ηθική συμπαράσταση και ψυχολογική τους στήριξη.

Τέλος, είναι δύσκολο να αποδώσει κανείς ένα ευχαριστώ, σε ένα άτομο που χρωστάει χίλια !!! Χίλια λοιπόν ευχαριστώ, σε σένα **Κωστή**, που ξενύχτησες, λυπήθηκες και χάρηκες μαζί μου και μου έδειξες τι πραγματικά σημαίνει “αγαπώ αυτό που κάνω”.

**Εύη**

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η ασθένεια Alzheimer, είναι μία νευροεκφυλιστική ασθένεια, με κύρια νευροπαθολογικά χαρακτηριστικά, την εκτεταμένη συσσώρευση εξωκυτταρικών πλακών αμυλοειδούς (γεροντικές πλάκες), απώλεια νευρικών κυττάρων, και εγκεφαλικές φλεγμονές στο νεοφλοιό, στον ιππόκαμπο και στον αμυγδαλοειδή πυρήνα. Τέσσερα γονίδια έχουν συνδεθεί με κληρονομικές περιπτώσεις της ασθένειας. Το πρώτο, είναι το γονίδιο της πρόδρομης πρωτεΐνης του αμυλοειδούς (APP), από την οποία προέρχεται το πεπτίδιο Αβ, που είναι το κυριότερο συστατικό των πλακών αμυλοειδούς. Άλλα δύο γονίδια, η PS1(presenilin1) και PS2 (presenilin2), τα οποία είναι ομόλογα μεταξύ τους, φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο στην ασθένεια, αυξάνοντας την ποσότητα του εκκρινόμενου Αβ πεπτιδίου. Το τελευταίο γονίδιο, είναι το γονίδιο της APOE, πρωτεΐνης που συμμετέχει στο μεταβολισμό της χοληστερόλης και εντοπίζεται στις γεροντικές πλάκες. Ο κύριος σκοπός της παρούσας εργασίας, είναι η δημιουργία ενός διαγονιδιακού ποντικού, που να έχει στο γένωμά του αλλά και να εκφράζει την ανθρώπινη πρωτεΐνη APP, ώστε να αποτελέσει μοντέλο για την ασθένεια Alzheimer, δηλαδή να εμφανίζει, τόσο τα παθολογικά χαρακτηριστικά, όσο και την συμπεριφορά ασθενών με Alzheimer (απώλεια μνήμης, αδυναμία μάθησης). Για τη δημιουργία αυτού, χρησιμοποιήθηκε μία κατασκευή που περιέχει μία μεταλλαγμένη μορφή της APP (V717F, K670N, M671L) κάτω από τον έλεγχο του ανθρώπινου PDGF υποκινητή. Βρέθηκαν τρεις ποντικοί ιδρυτές, (founders) που έχουν στο γένωμά τους διαφορετικό αριθμό αντιγράφων του ενθέματος και εκτράφηκαν με σκοπό να δημιουργηθούν διαγονιδιακές σειρές. Ανάλυση των δύο από τις τρεις σειρές έδειξε υψηλή έκφραση του γονιδίου της ανθρώπινης APP σε επίπεδο mRNA.

## SUMMARY

The Alzheimer disease is a neurodegenerative disease, the main neuropathological characteristics of which are the extended accumulation of extracellular amyloid plaques (senile plaques), the loss of nerve cells and cerebral inflammations in the neocortex, the hippocampus and the amygdaloid nucleus. Four genes have been genetically linked with the familial cases of the disease. The first is the gene for Amyloid Precursor Protein (APP) from which the Aβ peptide is derived, which is the main component of amyloid plaques. Two other genes, PS1 and PS2, which are homologous to each other, seem to play an important role in the pathogenesis, increasing the quantity of the secreted Aβ peptide. The last gene, is the gene coding for APOE, a protein that participates in cholesterol metabolism and is localized in senile plaques. The main aim of the present study is the development of a transgenic mouse containing in its genome and expressing the human APP protein, to use as a model for the Alzheimer disease, to both, that is, exhibit the pathological characteristics and the behavior of Alzheimer patients (memory loss, learning impairment). A construct containing a mutated form of APP (V717F, K670N, M671L) under the control of human PDGF promoter was used to generate transgenic animals. Three founders bearing different copy number of the transgene were selected and bred to obtain transgenic lines. Preliminary analysis of two of these lines, showed high level expression of APP mRNA.

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 1. ΠΑΘΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ ALZHEIMER.

Η ασθένεια Alzheimer(AD), είναι μία νευροεκφυλιστική ασθένεια, που έχει σαν αποτέλεσμα την καταστροφή όλων των γνωστικών εγκεφαλικών λειτουργιών και τη δημιουργία μη αναστρέψιμης άνοιας. Προσβάλλει περίπου το 7-10% των ατόμων ηλικίας μεγαλύτερης των 65 ετών και ίσως μέχρι το 40% των ατόμων ηλικίας μεταξύ 80-90 ετών. Υπολογίζεται ότι το 75% των περιπτώσεων άνοιας οφείλεται στη νόσο Alzheimer. Λόγω του μεγάλου ποσοστού των ασθενών σε όλο τον κόσμο, το κόστος για την περίθαλψη είναι πολύ υψηλό. Τόσο ο αριθμός των ασθενών, όσο και το κόστος, υπολογίζεται ότι θα αυξηθεί τα επόμενα 25 χρόνια, δεδομένου ότι ο χρόνος ζωής αυξάνεται, με αποτέλεσμα η ασθένεια πιθανότατα να αποτελέσει ένα από τα σημαντικότερα προβλήματα υγείας του επόμενου αιώνα..

Η ασθένεια περιγράφηκε για πρώτη φορά από τον Alois Alzheimer πριν από 90 χρόνια .Τα πρώτα συμπτώματα της ασθένειας περιλαμβάνουν μικρής έκτασης διαταραχές της μνήμης και της σκέψης, αδυναμία μάθησης, ελαττωμένη προσοχή, νευρική και κυκλοθυμική συμπεριφορά. Καθώς η ασθένεια προχωρεί, ακολουθεί πλήρης απώλεια κάθε κριτικής ικανότητας και λογικής.

Η παθολογία της νόσου Alzheimer χαρακτηρίζεται από εκτεταμένη απώλεια νευρικών κυττάρων και εγκεφαλικές φλεγμονές στο νεοφλοιό, στον ιππόκαμπο και στον αμυγδαλοειδή πυρήνα, οι οποίες συνοδεύονται από εκτεταμένη συσσώρευση εξωκυτταρικών πλακών αμυλοειδούς (γεροντικές πλάκες). Τα κύρια συστατικά των πλακών είναι μία μορφή αμυλοειδούς και μία μη κανονική συσσώρευση νευρώνων και γλοιών. Αμυλοειδές είναι ένας γενικός όρος μιας ποικιλίας πρωτεϊνών ή πεπτιδίων που συγκεντρώνονται σαν εξωκυτταρικά ινίδια 7-10nm και έχουν κοινά δομικά χαρακτηριστικά, όπως η β-πτυχωτή δομή τους και η ικανότητα να βάφονται με Congo red και thioflavine. Οι πλάκες αμυλοειδούς είναι μη κανονικές, σχεδόν σφαιρικές και το μεγεθός τους ποικίλει από 10μm μέχρι πολύ μεγάλες δηλαδή μερικές εκατοντάδες μικρόμετρα. Στην περίπτωση της νόσου Alzheimer, το κύριο συστατικό των πλακών αμυλοειδούς είναι το υδρόφοβο πεπτίδιο 39-43 αμινοξέων, το πρωτεολυτικό προϊόν που προέρχεται από την ανθρώπινη πρόδρομη πρωτεΐνη του αμυλοειδούς (β-APP:β-Amyloid precursor protein).Το πεπτίδιο αυτό είναι γνωστό ως πεπτίδιο β-αμυλοειδούς ή πεπτίδιο Αβ.

Άλλες πρωτεΐνες που μπορεί να συμβάλλουν στη συσσώρευση πλακών και ανιχνεύονται σε αυτές είναι η ακετυλοχολινεστεράση (AChE), το συστατικό P του αμυλοειδούς (amyloid P component), η α1-αντιχυμοθρυψίνη, ανοσοσφαιρίνες, πρωτεάσες, η απολιποπρωτεΐνηJ(ApoJ) και απολιποπρωτεΐνη E (APOE), η οποία προσδένεται στο πεπτίδιο καθιστώντας το έτσι λιγότερο διαλυτό και κατά συνέπεια επικρατέστερο για εναπόθεση. Εκτός από τον πυκνό πυρήνα νηματιδίων αμυλοειδούς και τις παραπάνω πρωτεΐνες, οι πλάκες περιλαμβάνουν δυστροφικούς νευρίτες και νευράξονες και περιβάλλονται από επανεργοποιημένα αστροκύτταρα και ενεργοποιημένη μικρογλοία.

Μία μεγάλη ποικιλία νευροδιαβιβαστών και ενζύμων των νευροδιαβιβαστών έχουν βρεθεί στους νευρίτες των πλακών όπως η ακετυλοχολινεστεράση, η ακετυλοτρανσφεράση της χολίνης, η υδροξυλάση της τυροσίνης, η σωματοστατίνη κ.τ.λ.(Candel,1996). Αυτές οι πλάκες είναι οι λεγόμενες νευριτικές ή γεροντικές πλάκες (neuritic or senile plaques) και χαρακτηρίζουν όλους σχεδόν τους ασθενείς που πάσχουν από Alzheimer (Selkoe,1994).

Τόσο στους ασθενείς με Alzheimer, όσο και στους υγιείς ηλικιωμένους ανθρώπους, το πεπτίδιο Αβ συναθροίζεται σε άμορφες αποθέσεις (μη νηματοειδείς σχηματισμοί των πεπτιδίων Αβ), οι οποίες δεν περιλαμβάνουν ούτε κατεστραμμένους νευρίτες, ούτε ενεργοποιημένη μικρογλοία ή αστροκύτταρα και περιέχουν τη μικρότερη μορφή του Αβ πεπτιδίου την Αβ<sub>40</sub> σε μικρότερο όμως ποσοστό. Οι πλάκες αυτές είναι γνωστές ως διαχεόμενες ή προαμυλοειδικές πλάκες. Στην περίπτωση λοιπόν των ασθενών με AD, οι πλάκες αυτές εξελίσσονται σταδιακά σε γεροντικές πλάκες, που είναι πιο συμπαγείς και περιέχουν σε μεγάλο ποσοστό την Αβ<sub>40</sub> μορφή του Αβ πεπτιδίου. Το γεγονός αυτό επιτυγχάνεται παρουσία φλεγμονών και μέσω ενεργοποίησης των αστροκυττάρων και της μικρογλοίας (Patterson,1995,Harper,1997).

Ένα άλλο νευροπαθολογικό χαρακτηριστικό σε ασθενείς με Alzheimer, είναι τα νευροϊνδιακά συμπλέγματα (Neurofibrillary Tangles: NFTs). Αυτά είναι πυκνές δεσμίδες αδιακλάδωτων νηματίων, πάχους 10nm, τα οποία τυλίγονται ελικοειδώς το ένα γύρω από το άλλο, με αποτέλεσμα να δημιουργούνται ζευγαρωμένα ελικοειδή νημάτια (Paired Helical Filament:,PHFs). Η πιο σημαντική πρωτεϊνική υπομονάδα αυτών των νηματίων, είναι μια υπερφωσφορυλιωμένη μορφή της πρωτεΐνης tau, η οποία είναι μια 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 (Selkoe,1994). Ο εγκέφαλος ασθενή με Alzheimer, χαρακτηρίζεται επίσης από απώλεια νευρικών κυττάρων, από απώλεια συνάψεων και προσυναπτικών πρωτεϊνών στον νεοφλοιό και τον ιππόκαμπο, καθώς και από αλλαγές στη μορφολογία του, όπως μείωση του βάρους του εγκεφάλου και ατροφία του φλοιού (Candel,1996). Η οριστική διάγνωση της ασθένειας γίνεται με μικροσκοπική μελέτη του εγκεφαλικού ιστού με βιοψία, ή με αυτοψία μετά θάνατο.

Το πρόδρομο μόριο του πεπτιδίου Αβ είναι όπως αναφέρθηκε η β-APP. Η πρωτεΐνη αυτή κωδικοποιείται από ένα γονίδιο το οποίο βρίσκεται στο χρωμόσωμα 21 και αποτελείται από 18 εξόνια εκ των οποίων το 16 και το 17 κωδικοποιούν το πεπτίδιο Αβ. Η αμινοξική αλληλουχία της β-APP υποδηλώνει ότι είναι μία διαμεμβρανική πρωτεΐνη δηλαδή αποτελείται από μία εξωκυτταρική περιοχή, μία διαμεμβρανική περιοχή και μία κυτταροπλασματική ουρά. Το μόριο ξεκινά με μία ακολουθία σινιάλο για τη μεταφορά του μέσω της μεμβράνης του ενδοπλασματικού δικτύου. Η ακολουθία σινιάλο ακολουθείται από μία περιοχή πλούσια σε κυστεΐνες. Επομένως η δομή της πρωτεΐνης στο αμινοτελικό άκρο σταθεροποιείται από δισουλφιδικές γέφυρες. Η αμινοτελική περιοχή του μορίου έχει δύο θέσεις N-γλυκοζυλίωσης. Ακολουθεί μία περιοχή πλούσια σε θρεονίνες, γλουταμινικό και ασπαρτικό οξύ η οποία περιέχει μία μόνο λυσίνη και δύο αργινίνες. Για το λόγο αυτό η περιοχή αυτή έχει την ικανότητα να συνδέεται με θετικά φορτία και πολικότητες και να συμμετέχει στην ηλεκτρική δραστηριότητα των νευρικών κυττάρων (Kang,1987).

Από το αρχικό γονίδιο της β-APP μπορούν να προκύψουν διάφορα ισόμορφα μέσω εναλλακτικού ματίσματος του RNA τα οποία έχουν μέγεθος που κυμαίνεται μεταξύ 563-770 αμινοξέων. Οι κυριότερες ισομορφές που εντοπίζονται στον εγκέφαλο είναι η APP<sub>695</sub> η APP<sub>751</sub> και η APP<sub>770</sub>. Οι δύο τελευταίες περιλαμβάνουν το 7ο εξόνιο που κωδικοποιεί για μια περιοχή που παρουσιάζει μεγάλη ομολογία με τον αναστολέα πρωτεασών Kunitz (Hsiao,1996) .Το γονίδιο της APP εκφράζεται σε όλους τους ιστούς, ιδιαίτερα στον εγκέφαλο,στην καρδιά,τον σπλήνα,το νεφρό και τους μύες.

Η APP πρωτεΐνη υφίσταται πρωτεόλυση με τρεις διαφορετικούς τρόπους. Ο πιο συχνός είναι αυτός κατά τον οποίο η APP κόβεται στην εξωκυττάρια περιοχή, με αποτέλεσμα, να προκύπτουν ένα μεγάλο εκκρινόμενο και ένα διαλυτό πεπτίδιο της APP και ένα μεμβρανικό κομμάτι 10-12kDa (P10), το οποίο δεν είναι



αμυλοειδογενές. Στη συνέχεια το μεμβρανικό κομμάτι μπορεί να κοπεί από μία πρωτεάση μέσα στη μεμβράνη και να δώσει ένα εκκρινόμενο διαλυτό κομμάτι 3 kDa(P3) και ένα μεμβρανικό 7 kDa (P7). Από την άλλη υπάρχει και το μονοπάτι, κατά το οποίο προκύπτει το πεπτίδιο Αβ στο οποίο η APP κόβεται τόσο διαμεμβρανικά όσο και εξωκυτταρικά με αποτέλεσμα να προκύπτουν το Αβ πεπτίδιο 39-43 αμινοξέων (αναλόγως που θα κόψει η πρωτεάση) και άλλα δύο πρωτεολυτικά προϊόντα εκατέρωθεν του Αβ πεπτιδίου. Οι παραπάνω διαδικασίες απεικονίζονται στο σχήμα 1. Οι άγνωστες μέχρι σήμερα πρωτεάσες αυτές ονομάζονται εκκριτάσες και πιστεύεται πως πρόκειται για τρία διαφορετικά μόρια.

Αξίζει να σημειωθεί ότι η πρωτεολυτική διαδικασία παραγωγής του Αβ πεπτιδίου πραγματοποιείται και σε φυσιολογικά άτομα σε μικρότερο όμως βαθμό σε σχέση με τα άτομα που πάσχουν από Alzheimer, δεδομένου ότι το πεπτίδιο Αβ εκκρίνεται από κυτταροκαλιέργειες φυσιολογικών νευρικών και μη νευρικών κυττάρων και 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.

Η φυσιολογική λειτουργία της APP δεν είναι ακόμα γνωστή, ενώ η διαφορετική κατανομή του mRNA των ισομορφών της APP στους ιστούς υποδηλώνει διαφορετικές λειτουργίες των ισομορφών αυτών. Πάντως πιστεύεται ότι κάποιες από αυτές προάγουν την ανάπτυξη των νευριτών, μέσω αλληλεπιδράσεων με μόρια που είναι προσκολλημένα στα νευρικά κύτταρα, αλλά και με πρωτεΐνες της εξωκυττάριας ουσίας όπως το κολλαγόνο, η λαμινίνη και οι πρωτεογλυκάνες (Furukawa, 1996).

## 2.ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΣΥΝΔΕΣΗ ΤΕΣΣΑΡΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΜΕ ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΚΕΣ (FAMILIAL) ΠΕΡΙΠΤΩΣΕΙΣ ΤΗΣ ΑΣΘΕΝΕΙΑΣ ALZHEIMER.

Παρόλο που οι περισσότερες περιπτώσεις ασθενών με Alzheimer εμφανίζονται σποραδικές και φαίνεται πως περιβαλλοντικοί (εγκεφαλικό τραύμα, έκθεση σε βαριά μέταλλα, κάπνισμα), κοινωνικοί (π.χ.κατάθλιψη) και βιολογικοί (π.χ.ηλικία) παίζουν σημαντικό ρόλο, αναγνωρίζεται ότι υπάρχουν και κληρονομικοί παράγοντες που συμμετέχουν στην παθογένεση αυτής της ασθένειας. Πληθυσμιακές μελέτες αποκάλυψαν ότι το 25-40% των περιπτώσεων έχουν τουλάχιστον άλλο ένα μέλος της οικογένειας τους που πάσχει από Alzheimer.

Στις περισσότερες οικογένειες η ασθένεια κληρονομείται ακολουθώντας έναν επικρατή αυτοσωμικό τρόπο, με διεισδυτικότητα η οποία εξαρτάται από την ηλικία. Μέχρι τώρα έχουν ανακαλυφθεί τέσσερα 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 Alzheimer.

Το πρώτο από αυτά τα γονίδια, είναι το γονίδιο της APP το οποίο συνδέεται με τη μορφή της ασθένειας που εκδηλώνεται σχετικά νωρίς (early onset). Το γονίδιο αυτό, βρίσκεται στο χρωμόσωμα 21 και έτσι φαίνεται λογικό πως ασθενείς με σύνδρομο Down εμφανίζουν την ίδια παθολογία με αυτή των ασθενών με Alzheimer(αμυλοειδείς πλάκες).

Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός, ότι όλες οι γνωστές σημειακές μεταλλάξεις του γονιδίου APP που εντοπίστηκαν σε ασθενείς με Alzheimer, συγκεντρώνονται είτε σε εξειδικευμένες θέσεις, είτε γύρω από τις εξειδικευμένες θέσεις που πρωτεολύεται η APP από τις εκκριτάσες. Δηλαδή όλες επηρεάζουν την πρωτεόλυση της APP και οδηγούν σε αυξημένη έκκριση του πεπτιδίου Αβ, συμβάλλοντας στη δημιουργία πλακών αμυλοειδούς.

Συγκεκριμένα, οι μεταλλαγές που έχουν βρεθεί ως τώρα στο γονίδιο της APP είναι οι ακόλουθες: α)η APP<sub>670/671</sub> (Swedish mutation) η οποία είναι διπλή μετάλλαξη και η λυσίνη στη θέση 670 έχει μετατραπεί σε ασπαραγίνη, ενώ η μεθειονίνη στη θέση 671 έχει μετατραπεί σε λευκίνη .Οδηγεί σε αύξηση της παραγωγής του πεπτιδίου Αβ, β)η APP<sub>717</sub> (London mutation) όπου η βαλίνη έχει μετατραπεί σε ισολευκίνη ή μεθειονίνη η οποία οδηγεί σε αύξηση της αναλογίας του

Aβ<sub>1-42,43</sub> προς το Aβ<sub>1-40</sub>, γ) η APP<sub>692</sub> (Flemish mutation) η οποία οδηγεί σε αύξηση της παραγωγής του Aβ πεπτιδίου σε σχέση με το P3 πεπτίδιο, δ) η APP<sub>642</sub> όπου η βαλίνη στη θέση 642 έχει αντικατασταθεί από ισολευκίνη, φαινυλαλανίνη ή γλυκίνη. Και αυτή αυξάνει την δημιουργία πλακών αμυλοειδούς, με το να αυξάνει το λόγο Aβ<sub>1-42,43</sub>/Aβ<sub>1-40</sub>.

Η πρόσφατη ταυτοποίηση δύο ακόμα γονιδίων που φαίνεται να εμπλέκονται στην ασθένεια, της presenilin1 (χρωμόσωμα 14) και της presenilin2 (χρωμόσωμα 1), έχει δώσει νέες ευκαιρίες για την κατανόηση της μοριακής βάσης της αιτιολογίας και της παθολογίας της νόσου. Μέχρι σήμερα, έχουν περιγραφεί 45 διαφορετικές μεταλλάξεις στο γονίδιο της presenilin1 (PS1) και δύο στο ομόλογό του presenilin2 (PS2). Οι μεταλλάξεις στο πρώτο, εξηγούν το 70-80% των κληρονομικών περιπτώσεων της νόσου 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 πρωτεΐνες. Η PS1 έχει μέγεθος 43-45kDa ενώ η PS2 53-55 kDa. Παρουσιάζουν ομοιότητα 67% η οποία φτάνει το 84% στις διαμεμβρανικές περιοχές ενώ οι μη διαμεμβρανικές είναι μη συντηρημένες.

Υφίσταται ενδοπρωτεολυτική επεξεργασία, οπότε προκύπτουν δύο προϊόντα μεγέθους 17 kDa και 27 kDa. Τα προϊόντα αυτά φαίνεται πως ολιγομερίζονται *in vivo* και *in vitro*, ενώ τα καρβοξυτελικά ενδοπρωτεολυτικά προϊόντα έχει δείχθει πως φωσφορυλιώνονται από την πρωτεϊνική κινάση C. Εκτός όμως από το κανονικό μονοπάτι πρωτεόλυσης των πρεσενιλινών, υπάρχει και το εναλλακτικό που φαίνεται να πραγματοποιείται κατά τη διάρκεια της απόπτωσης. Η πρωτεόλυση γίνεται από μία πρωτεάση (caspase) που ενεργοποιείται στα τελευταία στάδια της απόπτωσης και συμβαίνει κοντά στο σημείο της κανονικής πρωτεόλυσης, δίνοντας ένα λίγο μεγαλύτερο αμινοτελικό κομμάτι και ένα μικρότερο καρβοξυτελικό (Tae-Wan Kim, 1997).

Ο ρόλος των πρεσενιλινών δεν είναι ακόμα πλήρως γνωστός. Έχει βρεθεί ότι η πρωτεΐνη SEL-12 στον *C. elegans*, που είναι ομόλογη της PS1 λειτουργεί ως συνυποδοχέας του Notch υποδοχέα. Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι και η PS1 και η PS2 σώζουν τον sel-12 μεταλλαγμένο φαινότυπο. Αυτό αποδεικνύει πως οι πρεσενιλίνες ίσως παίζουν ρόλο στη σηματοδότηση μέσω Notch κατά τη διάρκεια της εμβρυικής ανάπτυξης και της κυτταρικής διαφοροποίησης. Αυτό αποδεικνύεται από

το γεγονός ότι τα ποντίκια στα οποία έχει αφαιρεθεί το γονίδιο της PS1 (PS1<sup>-/-</sup>) πεθαίνουν αμέσως μετά τη γέννηση, λόγω προβλημάτων στον αξονικό σκελετό και στην τμηματοποίηση των σομιτών καθώς και λόγω εγκεφαλικής αιμοραγίας. Παρόμοια προβλήματα στη μορφοποίηση των σομιτών φαίνεται να υπάρχουν και στο Notch<sup>-/-</sup> ποντίκι. Επίσης, το Notch και οι πρεσενιλίνες έχουν το ίδιο πρότυπο έκφρασης κατά τη διάρκεια ανάπτυξης του εμβρύου του ποντικού.

Οι μελέτες που έχουν γίνει με βάση τις μεταλλάξεις στα γονίδια των πρεσενιλινών, έδειξαν ότι προκαλείται αύξηση της ποσότητας του πεπτιδίου Αβ<sub>1-42,43</sub> που παράγεται και επομένως αύξηση στη δημιουργία πλακών αμυλοειδούς (Duff, 1996). Φαίνεται λοιπόν, πως οι μεταλλάξεις αυτές προσδίδουν στις πρεσενιλίνες μία λειτουργία (gain of function) που ίσως να επηρεάζει τον τρόπο με τον οποίο τα κύτταρα επεξεργάζονται την APP, ενεργοποιώντας το μονοπάτι πρωτεόλυσης της που οδηγεί στη αμυλοειδογένεση.

Μία άμεση αλληλεπίδραση της APP με τις PS1 και PS2 έχειδειχθεί με ανοσοκατακρήμνυση (Xia W, 1997). Η δημιουργία αυτού του συμπλόκου φαίνεται να γίνεται αρχικά στο ενδοπλασματικό δίκτυο, και δεδομένου ότι έχειδειχθεί ότι το Αβ<sub>42</sub> παράγεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο ενώ το Αβ<sub>40</sub> από ξεχωριστά εκκριτικά μονοπάτια, μπορεί να πει κανείς ότι η αλληλεπίδραση μεταξύ των μορίων αυτών επηρεάζει άμεσα την παραγωγή του Αβ πεπτιδίου, τουλάχιστον στο κυτταρικό αυτό διαμέρισμα.

Το τελευταίο γονίδιο το οποίο σχετίζεται με την ασθένεια, είναι το γονίδιο που κωδικοποιεί για την απολιποπρωτεΐνη Ε (ApoE). Η ApoE είναι μία ομοτετραμερής πρωτεΐνη, με υψηλό ποσοστό α ελίκων, η οποία εμπλέκεται στο μεταβολισμό της χοληστερόλης. Παράγεται και εκκρίνεται στο συκώτι αλλά και στο κεντρικό νευρικό σύστημα από τα αστροκύτταρα. Ο εγκέφαλος έχει την μεγαλύτερη ποσότητα ApoE mRNA μετά από το συκώτι. Η σύνθεσή της αυξάνεται μετά από τραυματισμό και φαίνεται να εμπλέκεται στην αύξηση και επιδιόρθωση κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης ή μετά από τραυματισμό στο κεντρικό νευρικό σύστημα. Τα επίπεδα της ApoE είναι αυξημένα σε πολλές νευροεκφυλιστικές ασθένειες καθώς και στην Alzheimer (Strittmatter, 1993).

Υπάρχουν τρία αλληλόμορφα της ApoE στον ανθρώπινο πληθυσμό, το E<sub>2</sub> το E<sub>3</sub> και το E<sub>4</sub> εκ των οποίων το E<sub>3</sub> είναι το πιο διαδεδομένο. Το γονίδιο που βρίσκεται στο χρωμόσωμα 19, συνδέεται με τη μορφή της ασθένειας που εκδηλώνεται σε μεγάλη ηλικία. (Late onset). Γενικότερα, οι φαινότυποι της ApoE που περιέχουν την

ισομορφή E<sub>4</sub> (E<sub>4/4</sub>,E<sub>4/3</sub>) προδιαθέτουν για τη νόσο Alzheimer, ενώ η ApoE<sub>3</sub> και περισσότερο η ApoE<sub>2</sub> παίζουν προστατευτικό ρόλο.

Υπάρχουν αρκετές ενδείξεις που συνδέουν την ApoE με την ασθένεια. Αρχικά βρέθηκε ότι προσδένεται στο Αβ πεπτιδίο στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό αλλά και στις γεροντικές πλάκεςκαθιστώντας τις πιο συμπαγείς. Επιπλέον, είναι βασικό συστατικό των νευροινδιακών συμπλεγμάτων που περιγράφηκαν πιο πάνω. *In vitro* έχει βρεθεί ότι σε φυσιολογικό pH=7.4 και θερμοκρασία 37°C η ApoE έχει δυνατότητα να σχηματίζει πρωτεϊνικά σύμπλοκα με το πεπτιδίο Αβ και ότι η ικανότητα σχηματισμού αυτών των συμπλεγμάτων ακολουθεί τη σειρά ApoE<sub>2</sub>>ApoE<sub>3</sub>>ApoE<sub>4</sub>. Η παρατήρηση αυτή περιέχει ενδείξεις ότι η ισχυρή πρόσδεση της ApoE στο πεπτιδίο Αβ συσχετίζεται αντίστροφα με τον κίνδυνο ανάπτυξης της νόσου (Selkoe, 1997).

Οι ενδείξεις αυτές ίσως να μεταφράζονται in vivo πως η ApoE<sub>4</sub> συνδέεται χαλαρά στο Αβ πετιδο, συμμετέχοντας στην εναπόθεσή του, ενώ η ApoE<sub>2</sub> συνδέεται ισχυρά, εμποδίζοντάς το να εναποτεθεί και να σχηματίσει πλάκες. Έχει επίσης προταθεί πως τα E<sub>2</sub> και E<sub>3</sub> αλληλόμορφα μπορεί να εμποδίζουν την συσσώρευση της πρωτεΐνης tau στα ελικοειδή νημάτια (PHFs). Συμπερασματικά, ο μηχανισμός της δράσης της ApoE στην εκδήλωση της ασθένειας δεν είναι γνωστός, όμως ασθενείς με Alzheimer οι οποίοι φέρουν το αλληλόμορφο E<sub>4</sub> παρουσιάζουν μία αυξημένη τάση απόθεσης πεπτιδίων Αβ κυρίως του Αβ<sub>1-40</sub> (η οποία εξαρτάται από τη δόση του E<sub>4</sub>) (Lambert,1997).

Το πόσο σημαντικό ρόλο παίζει η απολιποπρωτεΐνη στην ασθένεια φαίνεται από τελευταία δεδομένα που δείχνουν ότι κατά τη διασταύρωση διαγονιδιακού ποντικού που έχει το γονίδιο της ανθρώπινης APP και αποτελεί μοντέλο για την ασθένεια με ποντικό στον οποίο έχει γίνει απαλοιφή του γονιδίου ApoE (ApoE<sup>-/-</sup>) παρατηρείται σημαντική μείωση πλακών αμυλοειδούς στο ετερόζυγο ζώο (ApoE<sup>+/-</sup> X APP<sup>+/+</sup>) η οποία γίνεται δραματική, όταν η διαστάυρωση γίνεται με το ομόζυγο ζώο.( ApoE<sup>-/-</sup> X APP<sup>+/+</sup>)(Bales,1997).

### **3. ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΑΚΟΙ ΠΟΝΤΙΚΟΙ-MONTEΛΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΣΘΕΝΕΙΑ ALZHEIMER ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΣΗ ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΕΝΗΣ ΜΟΡΦΗΣ ΤΗΣ hAPP.**

Γνωρίζοντας αρκετά στοιχεία για τα γονίδια που εμπλέκονται στην ασθένεια, οι επιστήμονες άρχισαν να αναζητούν τρόπους θεραπείας της. Για να εφαρμοστεί μία θεραπεία, είτε είναι φαρμακευτική, είτε γονιδιακή, η δημιουργία και η διαθεσιμότητα ενός ζώου-μοντέλου για την ασθένεια είναι απαραίτητη. Δεδομένου όμως πως πρόκειται για μία πολυπαραγοντική ασθένεια, η δημιουργία ενός τέτοιου μοντέλου που να εμφανίζει και την παθολογία και την συμπεριφορά αποδείχθηκε δύσκολη υπόθεση.

Έγιναν προσπάθειες από πολλές ερευνητικές ομάδες υπερεκφράζοντας μεταλλαγμένες μορφές της hAPP, αλλά ορισμένα μόνο από τα ζώα που δημιουργήθηκαν είχαν κάποια από τα χαρακτηριστικά της νόσου. Πολύ σημαντική για την υψηλή έκφραση του διαγονιδίου στον εγκέφαλο του ποντικού, όπως φαίνεται από τις εργασίες αυτές, είναι η επιλογή ενός κατάλληλου υποκινητή .

Στον παρακάτω πίνακα συνοψίζονται όλα τα στοιχεία που αφορούν τα διαγονιδιακά ζώα-μοντέλα για την νόσο.

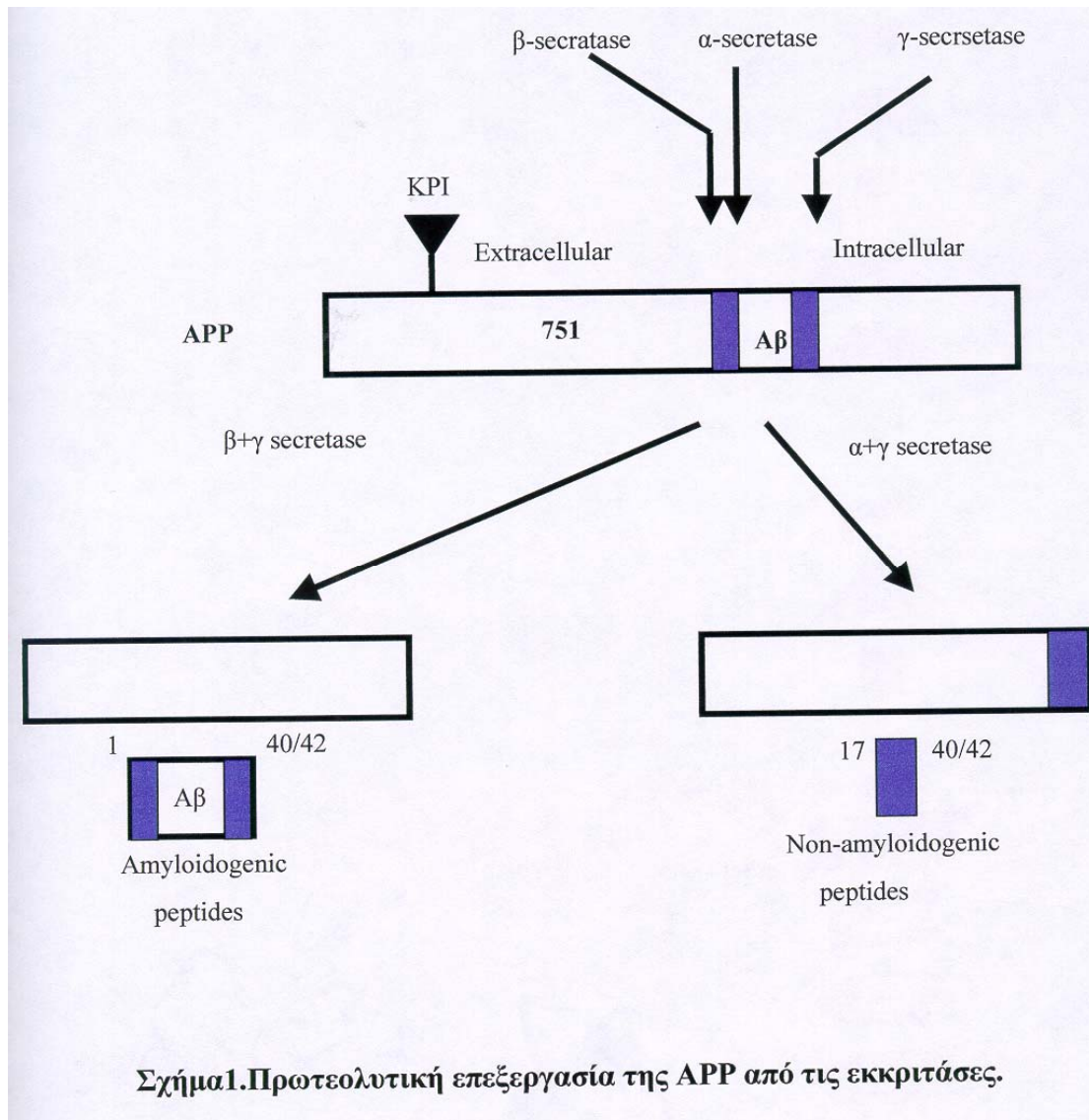
## ΚΥΡΙΟΙ ΣΚΟΠΟΙ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

**Ο κύριος σκοπός αυτής της εργασίας, είναι η δημιουργία ενός διαγονιδιακού ποντικού που να υπερεκφράζει μία μεταλλαγμένη μορφή της ανθρώπινης APP(V717F, K670N, M671L) στον εγκέφαλό του. Το ποντίκι αυτό αναμένεται να αποτελέσει ένα μοντέλο για την ασθένεια Alzheimer και κατόπιν να χρησιμοποιηθεί σε μελέτη του πιθανού ρόλου άλλων πρωτεϊνών, όπως των αλληλομόρφων της APOE και του υποδοχέα της, μετά από διασταυρώσεις με ήδη διαθέσιμα για τις αντίστοιχες πρωτεΐνες διαγονιδιακά ποντίκια.**

Η χρησιμότητα της δημιουργίας ενός νέου ποντικού που να υπερεκφράζει την ανθρώπινη APP εξηγείται από το γεγονός πως τα ήδη υπάρχοντα μοντέλα δεν είναι διαθέσιμα λόγω των περιορισμών της πατέντας. Για να ξεπεραστεί λοιπόν κάθε πιθανό μελλοντικό πρόβλημα, χρησιμοποιήσαμε διαφορετική κατασκευή η οποία περιέχει και διαφορετικές μεταλλαγές της APP.

<i>Κατασκευή</i>	<i>Στέλεχος</i>	<i>Έκφραση</i>	<i>Πλάκες</i>	<i>Θάνατος νευρώνων</i>	<i>Συμπεριφορά</i>
<i>APP γενωμικό κομμάτι</i>	C57Bl/6X129	1X	OXI	OXI	Κανονική
<i>APP770 (V717F)</i>	C57Bl/6	4X	NAI	OXI	Νοητικά προβλήματα
<i>APP751 (V717F)</i>	C57Bl/6	7X	NAI	Δεν έχει	Δεν έχει δειχθεί
<i>(V717F+K67 0N+M671L)</i>	C57Bl/6	2X	OXI	δειχθεί	
<i>APPC100</i>	C57Bl/6XSJ L	1X	OXI	NAI	Σποραδική απώλεια μνήμης
<i>mAPP695 hAβ (K670N+M6 71L)</i>	C3HX C57Bl/6	2-3X	NAI	Δεν έχει δειχθεί	Δεν έχει δειχθεί
<i>hAPP695 (K670N+M6 71L)</i>	C57Bl/6XSJ L	4-6X	NAI	OXI	Προβλήματα μάθησης,μερική απώλεια μνήμης
<i>APP751</i>	JU	1.5-2X	NAI	Μερική	Προβλήματα μάθησης,μερική απώλεια μνήμης

**Πίνακας1.** Διαγονιδιακά ζώα-μοντέλα για την ασθένεια Alzheimer





## ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 1.ΜΕΘΟΔΟΙ

#### **1.1ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΝΟΥΚΛΕΙΚΩΝ ΟΞΕΩΝ**

##### 1.1.1 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα (small scale) DNA preparation

Για την παρασκευή σε μικρή κλίμακα υπερελικομένου πλασμιδιακού DNA χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της αλκαλικής λύσης, ακολουθούμενης από τρεις εκχυλίσεις με μίγμα Ph/CHCL<sub>3</sub>/iaa, σε αναλογία 25/24/1 και από μία με μίγμα CHCL<sub>3</sub>/iaa σε αναλογία 24/1, καθώς και από κατακρήμνιση με 2,5 όγκους απόλυτης αιθανόλης παρουσία 1/10 του όγκου διαλύματος 3M οξικού νατρίου pH=5,29 (Sambrook et al).

##### 1.1.2 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μεγάλη κλίμακα(large scale DNA preparation

Για τα πειράματα δημιουργίας διαγονιδιακού ποντικού, χρησιμοποιήθηκε η αλκαλική μέθοδος της κυτταρικής λύσης με συνδιασμό διαδοχικών υπερφυγοκεντρήσεων κλίσης χλωριούχου καισίου (CsCl gradient) παρουσία βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr),όπως περιγράφεται από τους Sambrook et al.

Εναλλακτικά έγινε χρήση της κολώνας QIAGEN tip 500 σύμφωνα με τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρείας (QIAGEN GmbH).

##### 1.1.3 Απομόνωση και καθαρισμός τμημάτων DNA από πήκτωμα αγαρόζης

Βασικό κριτήριο για την επιλογή της μεθόδου απομόνωσης και καθαρισμού τμημάτων DNA από πήκτωμα αγαρόζης, ήταν η διαθέσιμη ποσότητα και το μορικό μέγεθος του προς καθαρισμό τμήματος.. Έτσι σε περιπτώσεις που η ποσότητα ξεπερνούσε τα 20-30 μγκαι το μέγεθος του τμήματος ξεπερνούσε τις 500bp επιλεγόταν η μέθοδος της ηλεκτροέκλουσης σε μεμβράνες διαπίδυσης ή σε ειδική συσκευή (elutrap της S&S)με τη χρήση κατάλληλων μεμβρανών.

Σε άλλες περιπτώσεις και ειδικά σε αυτές που απομονώθηκαν μικρά τμήματα DNA χρησιμοποιήθηκαν ενεργοποιημένες DEAE μεμβράνες. Ο τρόπος ενεργοποίησης και χρήσης τους περιγράφεται από τους Sambrook et al. Τέλος,χρησιμοποιήθηκε το QIAquick gel extraction kit, σύμφωνα με τις οδηγίες των κατασκευαστών(QIAGEN).

#### 1.1.4 Απομόνωση γενωμικού DNA από βιοψία ουράς ποντικού

Προκειμένου να απομονωθεί DNA από ουρά ποντικού κόβονται 5mm από αυτή και τοποθετούνται σε ειδικό μίγμα (50mM TrisPH8.0 , 100mMEDTA, 100mMNaCl, 1%SDS) το οποίο περιέχει 25μl Proteinase K (10mg/ml) και διατηρούνται για 12 ώρες στους 55°C, με σκοπό να καταστραφούν οι πρωτεΐνες της ουράς. Ακολουθεί κατεργασία με 10μl RNAase(10mg/ml) και τρεις διαδοχικές εκχυλίσεις με ίσο όγκο μείγματος φαινόλης/χλωροφορμίου(αναλογία 1/1) και μία τελική εκχύλιση με ίσο όγκο χλωροφορμίου. Ακολουθεί κατακρήμνιση με ισοπροπανόλη (0% όγκοι), ξέπλυμα με 70% αιθανόλη και συλλογή του με πιπέτα pasteur. Αφού αφεθεί να στεγνώσει,ακολουθεί ο έλεγχος της ποιότητας του DNA με ηλεκτροφόρηση σε πύκτομα αγαρόζης.

Αν η ποιότητα είναι καλή, μπορεί να γίνει πέψη με περιοριστικά ένζυμα. Η συγκέντρωση του DNA στο υδατικό διάλυμα, βρίσκεται με μέτρηση της οπτικής του πυκνότητας στο υπεριώδες φως (260nm μήκος

κύματος). Μετά την πέψη ηλεκτροφορείται μία μικρή ποσότητα DNA, για να πιστοποιηθεί ότι έγινε η πέψη και τελικά ακολουθεί ηλεκτροφόρηση όλης της ποσότητας (10 mg DNA σε κάθε πηγάδι του πηκτώματος) σε πήκτωμα αγαρόζης 1 % υπό κλίση 2V/cm για 10 ώρες περίπου.

### 1.1.5 Απομόνωση RNA από ιστούς ποντικού.

Αρχικά ο ιστός τοποθετείται σε διάλυμα D, το οποίο αποτελείται από τα εξής:

- 250 g ισοθεικυανικό γουανίδιο
- 293 ml νερό
- 17.6 ml κιτρικό νατρίο 0.75N pH 7
- 26.4 ml σαρκασύλιο 10%

Το μίγμα θερμαίνεται στους 65°C. Πριν τη χρήση πρέπει να προσθέεται β-μερκαπτοαιθανόλη σε αναλογία 0.3ml σε 50ml διαλύματος D. Ακολουθεί η ομογενοποίηση του ιστού και η λύση των κυττάρων. Αυτό γίνεται είτε με σύριγγα του 1ml στην περίπτωση που έχουν απομονωθεί κύτταρα, είτε με το ειδικό μηχάνημα polytron. Αφού λυθούν τα κύτταρα, γίνεται εκχύλιση με όξινη φαινόλη η οποία προκαλεί απομακρυνση του DNA από την υδατινή φάση. Η εκχύλιση γίνεται με ίσο όγκο όξινης φαινόλης με τον όγκο του διαλύματος D, 0.1 όγκο διαλύματος οξικού νατρίου pH4 και 0.2 όγκους διαλύματος χλωροφορμίου-ισοαμυλικής αλκοόλης 24/1. Στην υδατική φάση προστίθεται ίσος όγκος διαλύματος ισοπροπανόλης, η οποία προκαλεί κατακρίμνηση του RNA.. Το ίζημα RNA ξεπλένεται με αιθανόλη 70% και στη συνέχεια απαναλαμβάνεται μία κατακρήμνυση με αιθανόλη και το RNA διατηρείται στις -80°C ώσπου να χρησιμοποιηθεί.

## **1.2 ΑΝΑΛΥΣΗ ΝΟΥΚΛΕΙΚΩΝ ΟΞΕΩΝ**

### 1.2.1 Ραδιοσήμανση γραμμικών μορίων DNA (labelling)

Χρησιμοποιήθηκαν δύο μέθοδοι: Α) η μέθοδος των τυχαίων εκκινήτων.

Η βάση της μεθόδου στηρίζεται στην παροδική αποδιάταξη του δίκλωνου τμήματος DNA που πρόκειται να σημανθεί και στην επακόλουθη βαθμιαία αναδιάταξη της κάθε αλυσίδας με μία σειρά τυχαίων εξαμερών εκκινήτων. Δηλαδή γίνεται ανάμειξη του DNA (100ng) με 11.5μl LS και 1μl BSA (10mg/ml) και το μίγμα βράζεται για 3 λεπτά ώστε να γίνει η αποδιάταξη του DNA. Στη συνέχεια το μήκος των τοπικά σχηματιζόμενων δίκλωνων περιοχών αυξάνεται με τη δράση της πολυμεριστικής ιδιότητας του Klenow (5u/μl) ενζυμικού κλάσματος παρουσία α[ P]-dATP (5μl) και α[ P]-dATP (5μl) ραδιοσημασμένων νουκλεοτιδίων. Επώζουμε στους 37°C για τρεις ώρες. Ακολουθώς κάνουμε εκχύλιση με μίγμα Ph/CHCl<sub>3</sub>/iaa και περνάμε την υδατική φάση από 2 G-50 κολώνες για να απομακρυνθούν τα μη ενσωματωμένα νουκλεοτίδια. Τέλος μετράμε τα cpm του ανιχνευτή.

Β) η μέθοδος μετάφρασης εγκοπής.

Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στην επιδιόρθωση και στον πολυμερισμό των τυχαίων εγκοπών που δημιουργούνται στο δίκλωνο κομμάτι DNA που πρόκειται να σημανθεί. Η ραδιοσήμανση γίνεται σε 100ng DNA στο οποίο προσθέτονται 2μl μη ραδιοσημασμένα νουκλεοτίδια dTTP και 2μl dGTP συγκέντρωσης 1mM, 2μl ραδιοσημασμένα νουκλεοτίδια α-[ P]dATP και 2μl α-[ P]dCTP συγκέντρωσης 1mM, 2μl ρυθμιστικού διαλύματος μετάφρασης εγκοπής (100mM Tris-HCl pH 7.5, 50mM MgCl<sub>2</sub>, 7.5mM διθειοτριτόλη), 1.5μl DNA πολυμεράσης (Ecoli) και 1μl Dnase I η οποία έχει αραιωθεί 17000 φορές σε νερό από αρχική συγκέντρωση 10mg/ml. Ο τελικός όγκος του διαλύματος είναι 20μl και η επώαση της αντίδρασης γίνεται στους 16°C για μία ώρα. Ακολουθεί μοριακή διήθηση του διαλύματος σε κλώνα χρωματογραφίας G-50 ώστε να κατακρατηθούν τα μη ενσωματωμένα ραδιενεργά νουκλεοτίδια.

### 1.2.2 Ανάλυση γενωμικού DNA κατά Southern (Southern blot)

Το απομονωμένο από την ουρά ποντικού γενωμικό DNA (10μg) υφίσταται πέψη διάρκειας 16 ωρών με το κατάλληλο περιοριστικό

ένζυμο. Στη συνέχεια ηλεκτροφορούμε το κομένο DNA σε πήκτωμα αγαρόζης (0.8%). Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης το πήκτωμα αναδεύεται για 45 λεπτά σε διάλυμα που περιέχει NaOH 0.5N και 1.5M NaCl αλκαλικού χαρακτήρα ικανό να αποδιατάξει το DNA καθιστώντας ικανή τη μεταφορά και την παραμονή του σε φίλτρο νιτροκυτταρίνης. Μετά την αποδιάταξη ακολουθεί ανάδευση του πηκτώματος σε ουδέτερο διάλυμα (0.5M Tris-HCl pH 7.4 1.5M NaCl) για 45 λεπτά. Στη συνέχεια το πήκτωμα τοποθετείται πάνω σε γέφυρα από διηθητικό χαρτί Watman 3MM του οποίου τα δύο άκρα είναι βυθισμένα σε διάλυμα 20XSSC (3M NaCl, 0.3M κιτρικό νάτριο).

Επάνω στο πήκτωμα τοποθετείται η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και τρία φύλλα από διηθητικό χαρτί Watman 3MM τα οποία μαζί με την μεμβράνη είχαν εμβαπτιστεί σε διάλυμα 2XSSC. Πάνω από αυτά τοποθετούνται χαρτοπετσέτες και ένα βάρος 1 κιλό περίπου. Μετά από 8 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου ολοκληρώνεται η μεταφορά του DNA στη μεμβράνη η οποία ξεπλένεται σε διάλυμα 6XSSC και ψήνεται στους 80°C για 2 ώρες προκειμένου να μονιμοποιηθούν τα νουκλεϊκά οξέα πάνω σε αυτή.

### 1.2.3 Ακινιτοποίηση νουκλεϊκών οξέων σε σημείο (DOT BLOT)

Κατά τη μέθοδο αυτή 5μg DNA (τα οποία βρίσκονται σε 180λ δισαπεσταγμένο νερό) αποδιατάσσονται με την προσθήκη 20μl NaOH (4M) και επώαση για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια ποστίθενται 200μl οξικού αμωνίου (NH<sub>4</sub>Ac 2M) και το μίγμα τοποθετείται στον πάγο. Η ακινιτοποίηση του DNA γίνεται πάνω σε νιτροκυτταρίνη η οποία βρέχεται πρώτα σε διάλυμα 1M NH<sub>4</sub>Ac. Στο ίδιο διάλυμα βρέχουμε και δύο χαρτιά Watman 3MM ίδιου μεγέθους με τη νιτροκυτταρίνη τα οποία τοποθετούνται κάτω από αυτή στην συσκευή dot blot. Το DNA δεσμεύεται στη νιτροκυτταρίνη με τη βοήθεια

κενού. Τέλος η μεμβράνη ψήνεται στους 80°C για 2 ώρες για να μονιμοποιηθούν τα νουκλεϊκά οξέα πάνω σε αυτή.

#### 1.2.4 Ανάλυση ολικού RNA κατά Northern(Northern blot).

Η ηλεκτροφόρηση του RNA λόγω των δευτεροταγών δομών τογίνεται σε πήκτωμα αγαρόζης, με αποδιατακτικές συνθήκες. Για το σκοπό αυτό κατασκευάζεται πήκτωμα με την εξής σύνθεση:

- 120ml dH<sub>2</sub>O
- 1.8g αγαρόζη
- 22.5ml φορμαλδεΰδη
- 7.5ml MOPS20X(0.4M MOPS 0.06MgaOAc 0.02M EDTA)

Το διάλυμα φόρτωσης των RNAs αποτελείται από 5ml 20XMOPS, 29ml γλυκερόλης 87% και 0.005g Bromophenol blue σε τελικό όγκο Το διάλυμα φόρτωσης 50ml. Για κάθε δείγμα RNA αναμιγνύονται 6μl διαλύματος φόρτωσης, 10.5μl φορμαλδεΰδη 30μl φορμαμίδιο και 3 μl MOPS 20X. Το μείγμα πριν την ηλεκτροφόρηση θερμαίνεται στους 65°C για να αποδιαταχθεί το RNA. Μετά την ηλεκτροφόρηση ακολουθεί κατεργασία του πηκτώματος σε διάλυμα 50mM NaOH-0.1NaCl σε διάλυμα 0.1M tris-HCl pH7.6 και σε διάλυμα 2XSSC. Κάθε κατεργασία έχει διάρκεια 20 λεπτά. Η μεταφορά του RNA στη μεμβράνη γίνεται με τον ίδιο τρόπο που γίνεται η μεταφορά του DNA κατά Southern. Αφού η μεταφορά ολοκληρωθεί η μεμβράνη εκτίθεται σε υπεριώδη ακτινοβολία 254nm για δύο λεπτά και ψήσιμο στους 80°C προκειμένου να μονιμοποιηθεί το RNA.

Η προϋβριδοποίηση της μεμβράνης γίνεται στους 42°C γιατί το διάλυμα υβριδοποίησης έχει αποδιατακτικές ιδιότητες (50% φορμαμίδιο 5X SSC 10X Denharts 20mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH6.8 0.4% SDS και 10% θειική δεξτράνη). Κατά την προϋβριδοποίηση προστίθενται επίσης 120μg/ml αποδιαταγμένου σπέρματος σολομού που έχουν ως σκοπό την αποτροπή μη ειδικών υβριδοποιήσεων του ανιχνευτή. Οι υπόλοιπες διαδικασίες υβριδοποίησης, ξεπλύματος της μεμβράνης και έκθεσης σε φιλμ αυτοραδιογραφίας είναι ίδιες με την περίπτωση του Southern blot.

### 1.2.5 Υβριδοποίηση νουκλεϊκών οξέων με ραδιοσημασμένο ανιχνευτή.

Η μεμβράνη μετά το ψήσιμο εμβαπτίζεται σε διάλυμα 2XSSC και στη συνέχεια υβριδοποιείται στους 65 C με 10ml διαλύματος υβριδοποίησης και 500μg αποδιαταγμένου με βρασμό(10 λεπτά) DNA από σπέρμα σολομού. Το διάλυμα υβριδοποίησης αποτελείται από τα εξής:

- 3X SSC
- 0.1% SDS
- 10% θειική δεξτράνη
- 0.2% Φικόλη
- 0.2% πολυβίνυλο πυρολιδόνη
- 0.2% αλβουμίνη βοείου ορού

Μετά από 2 ώρες προστίθεται ο ραδιοσημασμένος ανιχνευτής ο οποίος προηγουμένος αποδιατάσσεται με βρασμό για 7 λεπτά. Η διάρκεια της υβριδοποίησης είναι 12-15 ώρες περίπου. Αφού ολοκληρωθεί η υβριδοποίηση, απομακρύνεται το διάλυμα υβριδοποίησης και η μεμβράνη ξεπλένεται από την μη ειδικά υβριδοποιημένη ραδιενέργεια. Οι πλύσεις γίνονται και πάλι στους 65°C με την χρήση τριών διαλυμάτων ελαττούμενης αλατότητας. Αρχικά γίνονται δύο πλύσεις με διάλυμα 3XSSC-0.1%SDS, διάρκειας 15 λεπτών ,ακολουθώς δύο πλύσεις με διάλυμα 0.3XSSC-0.1%SDS, διάρκειας 15 λεπτών και τελικά δύο πλύσεις με διάλυμα 0.1XSSC-0.1%SDS, διάρκειας 15 λεπτών. Η μεμβράνη εκτίθεται σε φίλμ αυτοραδιογραφίας στους -80°C.

## 1.3 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΕΣ ΥΠΟΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗΣ ΜΟΡΙΩΝ DNA

### 1.3.1 Παρασκευή κυττάρων ικανών να μετασχηματίζονται –Επιδεκτικά κύτταρα(competent cells)

Αποστειρωμένο θρεπτικό διάλυμα SOB(2% tryptone 0.5% yeast extract 0.4mM NaCl 0.1mM KCl) εμπλουτισμένο με MgCl<sub>2</sub> και MgSO<sub>4</sub> συγκεντρώσεως 1M το κάθε ένα μολύνεται με 1-2 αποικίες από φρέσκο πιάτο στο οποίο καλλιεργήθηκε το βακτηριακό στέλεχος που θέλουμε να μετατρέψουμε σε επιδεκτικό. Η επώαση γίνεται στους 25°C υπό έντονη ανάδευση μέχρι η απορρόφηση των κυττάρων (OD) να φτάσει 0.35-0.4(περίπου 20-25 ώρες). Στη συνέχεια φυγοκεντρούμε τα κύτταρα για 10 λεπτά στους 4°C και στις 4000 στροφές. Επαναδιαλύουμε το ίζημα σε 40ml διαλύματος μετασχηματισμού(transformation buffer 10mM Pipes 15mM CaCl<sub>2</sub> 250mM KCl pH6.7 55mM MnCl<sub>2</sub>). Ακολούθως επωάζουμε για 10 λεπτά στον πάγο και επαναλαμβάνουμε την πιο πάνω φυγοκέντρηση. Επαναδιαλύουμε το ίζημα των κυττάρων σε 10ml διαλύματος μετασχηματισμού προσθέτοντας συγχρόνως DMSO μέχρι τελική συγκέντρωση 7%. Μοιράζουμε τα κύτταρα σε μικρές ποσότητες (aliquotes) και τα διατηρούμε στους -80°C μέχρι να τα χρησιμοποιήσουμε.

### 1.3.2 Αντίδραση συρραφής(ligation) πλασμιαδικού φορέα με το υπό εξέταση DNA.

Η αντίδραση συρραφής πραγματοποιείται αναμιγνύοντας κατάλληλες ποσότητες DNA από το φορέα και το υπό εξέταση DNA ώστε η αναλογία μορίων φορέα /DNA να είναι 1/5. Στην αντίδραση προστίθεται 10X διαλύματος συρραφής(ligation buffer) ώστε η τελική



συγκέντρωση να είναι 1X και 4u/μl T4 λιγάση (ligase). Το μίγμα επωάζεται στους 16°C για 16 ώρες περίπου.

### 1.3.3 Μετασηματισμός βακτηριακών πλασμιδιακές στελεχών από κατασκευές.

Σε 200μl επιδεικτικών κυττάρων προσθέτουμε ένα μέρος από την αντίδραση συρραφής(5-10μl) και αφήνουμε το μίγμα στον πάγο για 30 λεπτά. Ακολουθεί θερμικό σοκ για 45 δευτερόλεπτα στους 42°C και τοποθετούμε το μίγμα σε πάγο για 2 λεπτά. Στη συνέχεια προσθέτουμε 800μl θρεπτικού μέσου SOC και επωάζουμε μία ώρα στους 37°C υπό ανάδευση. Στη συνέχεια επιστρώνουμε το δείγμα μας υπό στείρες συνθήκες σε πιάτο με θρεπτικό μέσο LB(Sambrook et al )το οποίο έχει κατάλληλη ποσότητα του αντιβιοτικού με το οποίο κάνουμε την επιλογή(π.χ.αμπικιλίνη) Τα πιάτα τοποθετούνται στους 37°C για 16 ώρες προκειμένου να αναπτυχθούν οι αποικίες των βακτηρίων.

### 1.3.4 Προσδιορισμός της πρωτοταγούς αλληλουχίας νουκλεοτιδίων

Ο προσδιορισμός της αλληλουχίας των νουκλεοτιδίων γίνεται σε περίπου 5μg DNA τα οποία πρέπει να είναι αποδιαταγμένα προκειμένου να υβριδοποιηθεί ο εκκινητής με την συμπληρωματική του περιοχή στο πλασμίδιο. Η απόδιάταξη γίνεται με 5μl διαλύματος NaOH 1.2M και βρασμό για 5 λεπτά στους 85°C. Στο διάλυμα προσθέτονται 75μl αιθανόλης 100% και 3μl διαλύματος οξικού αμμωνίου συγκέντρωσης 2M pH4.0. Ακολουθεί κατακρήμνιση και πλύση με 75% αιθανόλη. Αφού αποξηρανθεί το ίζημα του πλασμιδίου προστίθονται σε αυτό 1μl εκκινητή (10ng/μl), 2μl 5X ρυθμιστικού διαλύματος(200mM Tris-HCl pH7.5, 100mM MgCl<sub>2</sub> 250 mM NaCl ) και 7μl διαλύματος TE. Γίνεται

επώαση για 15 λεπτά στους 37 C και στη συνέχεια για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

Εντωμεταξύ σε πιάτο με ειδικά πηγαδάκια μοιράζονται ανά πηγάδι 2.5μl από κάθε ddNTP τα οποία προκαλούν σταμάτημα της αντιγραφής. Τα ddNTPs βρίσκονται σε διάλυμα που περιέχουν 80μM από κάθε dNTP, 8μM από το αντίστοιχο dNTP και 50mM NaCl.

Στη συνέχεια το DNA αναμυγνύεται με το ακόλουθο διάλυμα:

- 2μl labeling mix αραιωμένο σε νερό 8 φορές (7.5μM dGTP 7.5μM dCTP 7.5μM dTTP)
- 6.5u ένζυμο sequenase αραιωμένο σε TE 8 φορές
- 1μ διθειοτριτόλη 0.1M
- 0.5μl <sup>35</sup>S-ATP

Από το διάλυμα που προκύπτει μοιράζονται 4μl σε κάθε πηγάδι. Γίνεται επώαση στους 37°C για 10 λεπτά και τέλος σε κάθε πηγάδι προστίθονται 4μl διαλύματος διακοπής της αντίδρασης (95% φορμαμίδιο 20mM EDTA 0.05% Bromophenol blue 0.05 Xylene Cyanol FF). Οι αντιδράσεις ηλεκτροφορούνται σε πήκτωμα ακρυλαμίδης 5% αφού πρώτα αποδιαταχθούν με θέρμανση για 7 λεπτά στους 100°C. Το πήκτωμα στη συνέχεια στεγνώνεται και εκτίθεται σε φίλμ αυτοραδιογραφίας.

### 1.3.5 Αλυσιδωτή αντίδραση πλυμεράσης (PCR)

Η μέθοδος χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία προκειμένου να γίνει αναδιάταξη δύο ολιγονουκλεοτιδίων (συμπληρωματικών κατά ένα μέρος) και να παραχθεί μεγάλη ποσότητα από το δίκλωνο αυτό τμήμα DNA ώστε στη συνέχεια να υποκλωνοποιηθεί. Τα μονόκλιωνα νουκλεοτίδια (500ng το καθένα) αναμείχθηκαν με 0.5μl dNTP συγκέντρωσης 10mM, 1X ρυθμιστικού διαλύματος και 5u Pfu πολυμεράσης. Οι συνθήκες που έγινε η αντίδραση είναι οι εξής:

Time delay	94°C	3min
Cycling	94°C	1min

	40°C	1min
	72°C	0.5min
Time delay	72°C	1min
Soak	4°C	

## 1.4 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ ΑΠΟ ΕΓΚΕΦΑΛΟ ΠΟΝΤΙΚΟΥ

Ο ιστός από εγκέφαλο ποντικού στελέχους C<sub>57</sub>Bl τοποθετείται σε διάλυμα που περιέχει 1% NP40, 150mM NaCl, 100mM Tris pH7.5, 10mM EDTA, 1mM PMSF, 10μg/ml aprotinin και ομογενοποιείται με μηχανικό τρόπο. Ο ομογενοποιημένος ιστός φυλάσσεται στους -80°C. Στη συνέχεια ακολουθούν τρία διαδοχικά παγώματα και ξεπαγώματα (freeze-thaw) του ιστού για να σπάσουν οι μεμβράνες των κυττάρων και να πάρουμε ολικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα. Φυγοκεντρούμε στους 4°C για 5 min 14.000rpm. Παίρνουμε το υπερκείμενο και μετράμε την ποσότητα της πρωτεΐνης στο εκχύλισμα με την μέθοδο Bradford.

Τα ολικά εκχυλίσματα ηλεκτροφορούνται σε 6% πήκτωμα ακρυλαμίδης. Ακολουθεί η μεταφορά τους σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης με την ειδική συσκευή mini-transblot της Biorad παρουσία διαλύματος για 1 ώρα στα 350mA. Μετά από δύο σύντομα ξεπλύματα με διάλυμα TBST (1M Tris pH=8, 5M NaCl, Tween20 0.1%) η μεμβράνη επώαζεται σε διάλυμα 5% milk σε TBST για μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση. Αφού πραγματοποιηθούν 4 ξεπλύματα 15 λεπτ'ων με TBST, η μεμβράνη υβριδοποιείται με αντίσωμα ειδικό για APP (monoclonal anti-APP) αραιωμένο 1:20 και με ένα άλλο αντίσωμα ειδικό για το Αβ πεπτιδίο (Rabbit anti-Aβ) αραιωμένο 1:200 σε διάλυμα 1% milk σε TBST για μία ώρα.

Η μεμβράνη στη συνέχεια ξεπλένεται με TBST 4 φορές από 15 λεπτά. Για τον εντοπισμό του anti-APP αντισώματος η μεμβράνη υβριδοποιείται με antimouse HRP αντίσωμα αραιωμένο 1:40.000 ενώ για το anti-Aβ η υβριδοποίηση γίνεται με το anti-rabbit αντίσωμα αραιωμένο 1:40.000 σε 1% milk σε TBST. Ακολουθούν 4 ξεπλύματα 15 λεπτών το καθένα με TBST. Τα ανοσοσύμπλοκα ανιχνεύονται μετά από επώαση της μεμβράνης για 1 λεπτό με ποσότητα μίγματος των αντιδραστηρίων

ECL σε αναλογία 1:1 ικανή να την καλύψει. Πραγματοποιούνται πολλαπλές εκθέσεις λίγων δευτερολέπτων ως λίγων λεπτών για την επίτευξη καλύτερης εικόνας.

#### 1.4 Απομόνωση και καθαρισμός DNA από ειδικό φίλτρο (Elutip)

Ξεπλένεται το φίλτρο με 1-2ml διαλύματος ΙΙ(1.0M NaCL, 20mM Tris HCLpH7.3-7.5, 1.0mM EDTA). Στη συνέχεια ακολουθεί ξέπλυμα του φίλτρου με διάλυμα Ι(0.2M NaCL, 20mM Tris HCLpH7.3-7.5, 1.0mM EDTA). Το DNA διαλύεται σε διάλυμα Ι και περνάει από το φίλτρο. Ακολουθεί ξέπλυμα του φίλτρου με διάλυμα Ι και το DNA εκλύεται από την κολώνα με 400μl διαλύματος ΙΙ υψηλής αλατότητας. Όλα τα παραπάνω ξεπλύματα και η έκλυση γίνεται πολύ αργά.

## 2. ΥΛΙΚΑ

Τα χημικά και τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν έχουν παρασκευαστεί από τις εταιρείες: AMERSAM, SIGMA, MERCK, PROMEGA, NEW ENGLAND BIOLABS, STRATAGENE, QIAGEN, CLONTECH. Τα ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν των εταιρειών: NEW ENGLAND BIOLABS, MINOTECH. Τα συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια παρασκευάστηκαν στο εργαστήριο μικροχημείας του Ι.Μ.Β.Β. Τα βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν ήταν E.coli(DH5a).

## Α Π Ο Τ Ε Λ Ε Σ Μ Α Τ Α – Σ Υ Ζ Η Τ Η Σ Η

### Η κατασκευή που χρησιμοποιήθηκε στις ενέσεις

Για τη δημιουργία ενός διαγονιδιακού ποντικού, το πρώτο βήμα είναι ο σχεδιασμός μιας κατασκευής που να περιέχει τα απαραίτητα στοιχεία για την ενσωμάτωσή του στο γένωμα του ποντικού, την σταθεροποίηση του μηνύματος που θα μεταγραφεί και επομένως την έκφραση λειτουργικής πρωτεΐνης από το γονίδιο που εισάγεται στο ζώο. Για το σκοπό αυτό η κατασκευή που χρησιμοποιήθηκε στις ενέσεις στην εργασία αυτή έχει τα εξής στοιχεία:

α)τον PDGF (platelet-derived growth factor) υποκινητή που όπως έχει αποδειχθεί από άλλες εργασίες προσφέρει αυξημένη έκφραση των γονιδίων που υποκινεί, κυρίως στο κεντρικό νευρικό σύστημα (Sasahara, 1991). Έτσι λοιπόν χρησιμοποιήθηκε ο συγκεκριμένος υποκινητής, για να επιτευχθεί αυξημένη έκφραση της ανθρώπινης APP στον εγκέφαλο του ποντικού.

β)Ένα χμαιρικό ιντρόνιο, που αποτελείται από την 5΄περιοχή του πρώτου ιντρονίου του ανθρώπινου γονιδίου της β-σφαιρίνης και την 3΄περιοχή από το ιντρόνιο του γονιδίου μιας ανοσοσφαιρίνης. Κατά την ένωση αυτών των δύο περιοχών, έχουν γίνει κάποιες αλλαγές, όπως προσθήκη κάποιων συντηρημένων ακολουθιών ειδικών για μάτισμα (splicing). Το ιντρόνιο αυτό δηλαδή, βοηθάει στην καλύτερη έκφραση του γονιδίου της APP.

γ)Το cDNA της 751 ισομορφής της APP με δύο ειδών μεταλλάξεις. Την διπλή μετάλλαξη Swedish (η λυσίνη στην 670 θέση έχει μετατραπεί σε ασπαραγίνη και η μεθειονίνη στην 671 θέση έχει μετατραπεί σε λευκίνη) και τη μετάλλαξη London (η βαλίνη στην 717 θέση έχει μετατραπεί σε φαινυλαλανίνη). Λόγω αυτών των μεταλλάξεων αναμένεται αυξημένη παραγωγή του Αβ, ένα από τα στοιχεία που χαρακτηρίζει την ασθένεια Alzheimer.

δ)Ένα σήμα πολυαδενυλίωσης, που προέρχεται από τον ιό SV40 για τη σταθεροποίηση του μεταγράφου του γονιδίου (pCI-neo Mammalian Expression Vector). Όλα τα παραπάνω στοιχεία κλωνοποιήθηκαν στον φορέα pBR322(σχήμα3).

Για να προκύψει αυτή η τελική κατασκευή έγιναν πρώτα δύο ενδιάμεσες κατασκευές. Η μία περιλάμβανε τον υποκινητή και το ιντρόνιο και η άλλη το cDNA του γονιδίου της APP. Η κατασκευή τους έγινε ως εξής:

το HindIII τμήμα του φορέα pCIneo (Promega), το οποίο περιλαμβάνει το ιντρόνιο που περιγράφηκε πιο πάνω, κλωνοποιήθηκε στην HindIII θέση του φορέα pSPcat3, που περιέχει ήδη τον PDGF υποκινητή (σχήμα 1).

Η δεύτερη ενδιάμεση κατασκευή έγινε με κλωνοποίηση ενός δίκλωνου ολιγονουκλεοτιδίου 50 βάσεων σε KpnI –XbaI θέσεις στον φορέα pBR322 751 β APP, ώστε να τοποθετηθεί στο 5' άκρο του γονιδίου της APP και να συμπληρώσει το αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης που έλειπε από την προϋπάρχουσα κατασκευή(σχήμα 2).

Η τελική κατασκευή προέκυψε με κλωνοποίηση του XbaI τμήματος του pSPPDGfcat3 φορέα που περιλαμβάνει τον υποκινητή με το ιντρόνιο, στην XbaI θέση της pBR322 751βAPP κατασκευής.

Το τμήμα του DNA που ενέθηκε στα ωάρια των ποντικών, κόπηκε με το ένζυμο περιορισμού Not I ώστε να απομακρυνθούν οι πλασμιδιακές αλληλουχίες και απομονώθηκε από πήκτωμα αγαρόζης με την μέθοδο της ηλεκτροέκλουσης (Υλικά και μέθοδοι). Για να είναι όμως αρκετά καθαρό ώστε να χρησιμοποιηθεί στη δημιουργία διαγονιδιακού ζώου περάστηκε από ειδικό φίλτρο (Elutipr ,Υλικά και μέθοδοι) και αραιώθηκε 15 φορές σε τελικό όγκο 500μl.

### **Διαδικασία δημιουργίας διαγονιδιακών ποντικών**

Λίγες μέρες πριν τη πραγματοποίηση των ενέσεων σε γονιμοποιημένα ωάρια ποντικών, στα ποντίκια-δότες (θηλυκά) χορηγήθηκαν ορμόνες (γοναδοτροπίνη) ώστε να έχουμε υπερπαραγωγή ωαρίων. Στην συνέχεια τα ποντίκια αυτά τοποθετήθηκαν σε ξεχωριστά κλουβιά με έναν αρσενικό ποντικό, για να πραγματοποιηθεί σύζευξη και επομένως γονιμοποίηση των ωαρίων. Από τα θηλυκά ποντίκια στα οποία χορηγήθηκαν ορμόνες συνήθως 5-8 στα 10 έρχονται σε επαφή με τα αρσενικά, γεγονός που εξαρτάται και από το στέλεχος του ποντικού, και από αυτά 15-30 γονιμοποιημένα ωάρια μπορούν να χρησιμοποιηθούν στις ενέσεις. Τα ποντίκια αυτά θυσιάστηκαν, και από τους ωαγωγούς και με ειδικές βελόνες αφαιρέθηκαν τα ωάρια και τοποθετήθηκαν σε θρεπτικό υλικό όπου ξεπλύθηκαν και στη συνέχεια μεταφέρθηκαν σε άλλο θρεπτικό υλικό στους 37° C, που περιέχει CO<sub>2</sub>, από όπου χρησιμοποιήθηκαν για τις ενέσεις. Τα ωάρια πάρθηκαν από θηλυκά ποντίκια στελέχους C57Bl, τα οποία είχαν συζευχθεί με αρσενικά ποντίκια στελέχους CBA.

Ακολούθησαν ενέσεις περίπου 70-80 γονιμοποιημένων ωαρίων. Με ειδικές πιπέτες τα ωάρια τα οποία είχαν ενεθεί μεταφέρθηκαν στις ωοθήκες άλλων θηλυκών ποντικών, στελέχους C57Bl, (μετά από εγχείρηση) τα οποία ήταν ψευδοέγκυα. Σε κάθε μητέρα μεταφέρονται περίπου 20 ωάρια σε κάθε ωοθήκη.

Η παραπάνω διαδικασία έγινε τρεις φορές και τα ποντίκια που γεννήθηκαν συνολικά ήταν 25.

### **Ανάλυση των ποντικών –εύρεση founders**

Για να εξακριβωθεί το ποια από τα ζώα που γεννήθηκαν ήταν διαγονιδιακά δηλαδή είχαν στο γένωμά τους το γονίδιο της ανθρώπινης APP, απομονώθηκε DNA από τις ουρές και των 25 ποντικών και αναλύθηκε με δύο τρόπους την ανάλυση dot blot και την κατά Southern ανάλυση.

### **Εύρεση αριθμού αντιγράφων του ενθέματος με dot blot.**

Τα DNA των παραπάνω ποντικών ακινητοποιήθηκαν σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και υβριδοποιήθηκαν με ραδιοσημασμένο ανιχνευτή (probe), που περιλαμβάνει ένα τμήμα του PDGF υποκινητή του γονιδίου της APP μεγέθους ενός Kb. Το αποτέλεσμα της αυτοραδιογραφίας ήταν τρία σήματα διαφορετικής έντασης που αντιστοιχούν στα DNA των QT2<sub>1</sub>, QT2<sub>7</sub>, QT2<sub>15</sub> και αντιπροσωπεύουν τα αντίγραφα του DNA του γονιδίου της APP που εντέθηκαν στα γενώματα των παραπάνω ποντικών. Εικόνα 1.

Μετρώντας τις εντάσεις των σημάτων σε ειδικό μηχάνημα που μετρά ραδιοσημασμένο φώσφορο (phosphorimager) και συγκρίνοντας τις με την ένταση του σήματος που δίνει το γενωμικό DNA ανθρώπου, που έχει χρησιμοποιηθεί σαν control, και το οποίο όπως είναι γνωστό έχει δύο αντίγραφα του γονιδίου της APP, βρέθηκε ότι ο founder QT2<sub>1</sub> έχει 20-35 αντίγραφα του ενθέματος, ο QT2<sub>15</sub> 1-2 αντίγραφα και ο QT2<sub>7</sub> 4-6. Ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία και όταν από κάθε ιδρυτή (founder) προήλθε μία σειρά ποντικών οπότε έγινε έλεγχος με αυτόν τον τρόπο ποιοι από του απογόνους της κάθε επαναδιαστάυρωσης έχουν το διαγονίδιο (transgene) και ποιοι όχι.

Παρατηρείται βέβαια ο ίδιος αριθμός αντιγράφων (copies) ανάμεσα στους ιδρυτές της κάθε σειράς και στους απογόνους τους. Παρατηρούμε επίσης, πως ενώ ο

QT2<sub>1</sub> founder έχει στο γένωμά του πολλά αντίγραφα του transgene, το τελευταίο δεν μεταφέρεται εύκολα στους απογόνους του, δεδομένου πως μόνο δύο απόγονοι, οι QT4<sub>12</sub> και QT5<sub>10</sub> (εικόνα 2 τα E2 και E3) έχουν το γονίδιο της ανθρώπινης APP από τρεις διαφορετικές επαναδιασταυρώσεις του ίδιου founder (QT2<sub>1</sub>).

### **Ανάλυση κατά Southern**

Το γενωμικό DNA που απομονώθηκε από τις ουρές μετά από πέψη με το περιοριστικό ένζυμο EcoR I και αφού ακινητοποιήθηκε σε μεμβράνη (υλικά και μέθοδοι) υβριδοποιήθηκε με δύο ραδιοσημασμένους ανιχνευτές, ένα EcoR I-Not I κομμάτι που περιλαμβάνει το μεγαλύτερο μέρος του PDGF υποκινητή και το EcoR I-Not I τμήμα που περιλαμβάνει το καρβοξυτελικό κομμάτι του γονιδίου της APP και την SV40 polyA ουρά.

Η μέθοδος αυτή έδειξε, όπως και η προηγούμενη, πως τα ποντίκια QT2<sub>7</sub> (εικόνα 4, σειρά 1), QT2<sub>1</sub> (εικόνα 4, σειρά 7), QT2<sub>15</sub> (εικόνα 5), έχουν το διαγονίδιο (transgene), μπορούν να αποτελέσουν δηλαδή ιδρυτές (founders) μιας σειράς ποντικών που θα φέρουν και αυτοί το διαγονίδιο στον ίδιο αριθμό αντιγράφων. Από την ανάλυση είναι φανερό, πως ο αριθμός των αντιγράφων του διαγονιδίου είναι διαφορετικός στους τρεις αυτούς founders δεδομένου ότι οι ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν είναι αυστηρά οι ίδιες (10μg) και η σύγκρισή γίνεται και πάλι με το DNA του ανθρώπου όπου είναι γνωστό ότι έχει δύο αντίγραφα του APP γονιδίου. Με την ανάλυση κατά Southern όμως και χρησιμοποιώντας τον κατάλληλο ανιχνευτή, μπορούμε να βρούμε σε ποιο σημείο του γενώματος εντέθηκε το διαγονίδιο (APP) και τη διαφορά των ενθέσεων μεταξύ των διαφορετικών founders.

Οι ζώνες που εμφανίζονται λοιπόν στην υβριδοποίηση του γενωμικού DNA του QT2<sub>15</sub> (εικόνα 5), ποντικού με τον ανιχνευτή που περιλαμβάνει τον PDGF υποκινητή είναι μεγέθους 2.0 Kb περίπου και 2.3 Kb ενώ εμφανίζεται και μία ζώνη μεγέθους 3.6Kb. Η πρώτη εξηγείται από την ένθεση των αντιγράφων του διαγονιδίου με φορά “κεφαλή με κεφαλή” (head to head) ενώ η δεύτερη αντιπροσωπεύει αντίγραφα του διαγονιδίου που έχουν εντεθεί με φορά “κεφαλή με ουρά” (head to tail). Η τελευταία πρέπει να οφείλεται σε ελλιπή πέψη του DNA από το περιοριστικό ένζυμο. Σε επανάληψη της μεθόδου, στην περίπτωση των γενωμικών DNA των QT2<sub>1</sub> (εικόνα 4 σειρά 7) και QT2<sub>7</sub> (εικόνα 4 σειρά 1), τα οποία είναι επίσης κομμένα με το ένζυμο EcoRI και χρησιμοποιώντας ως ανιχνευτή το τμήμα που περιλαμβάνει



το καρβοξυτελικό κομμάτι του γονιδίου της APP και το SV40 σήμα πολυαδενυλίωσης, εμφανίζονται ζώνες μεγέθους 2.3Kb και στους δύο founders. Εικόνα 3 και 4.

Στις εικόνες αυτές παρατηρούμε πως στον QT2<sub>7</sub> founder κοντά στη ζώνη των 2.3Kb, υπάρχουν και κάποιες άλλες ζώνες στα 3.6 και 3.0Kb. Όπως φαίνεται και από το dot blot ο QT<sub>27</sub> founder έχει 4-6 αντίγραφα του APP γονιδίου, ενώ η εμφάνιση της ζώνης 2.3 Kb μπορεί να εξηγηθεί από την ένθεση των αντιγράφων του γονιδίου της APP «ουρά με κεφαλή» (tail to head) ώστε όταν κόβεται με το περιοριστικό ένζυμο EcoRI να εμφανίζεται η παραπάνω ζώνη.

Οι άλλες ζώνες είναι τμήματα που περιλαμβάνουν την περιοχή που υβριδοποιεί ο ανιχνευτής (SV40 polyA), μαζί με κάποιες αλληλουχίες του γενωμικού DNA, που προέκυψαν από την πέψη του με το περιοριστικό ένζυμο και εξαρτώνται από την περιοχή στην οποία έγινε η ένθεση του διαγονιδίου στο γένωμα του ποντικού (flanking sequences), ή οφείλονται σε ελλιπή πέψη του γενωμικού DNA από το ένζυμο περιορισμού.

Στην περίπτωση του QT2<sub>1</sub>(εικ.4 σειρά7), όπου τα αντίγραφα είναι 20-35 φαίνεται πως τα περισσότερα εντέθηκαν στο γένωμα με την ίδια φορά όπως και στην προηγούμενη περίπτωση (tail to head) αφού η ζώνη στα 2.3Kb είναι η πιο έντονη αλλά εμφανίζονται και ζώνες στα 1.5Kb ,καθώς και στα 3,6 Kb που είναι και αυτές flanking sequences.

Στις εικόνες 4 &5 έχει επαναληφθεί η μέθοδος και στους απόγονους των ιδρυτών, ώστε να εξακριβωθεί αν μεταξύ τους υπάρχουν διαφορές στο σημείο όπου έγινε η ένθεση των διαφόρων αντιγράφων του γονιδίου της APP, ώστε να διασταυρωθούν μεταξύ τους μόνο τα όμοια ως προς το σημείο ένθεσης ποντίκια. Οι απόγονοι λοιπόν του QT2<sub>7</sub> founder που είναι οι QT3<sub>1, 5, 8, 9</sub> και QT7<sub>5</sub>(εικ.4 σειρές 2-6), φαίνεται να έχουν όλοι το ίδιο πρότυπο(pattern) καθώς και οι απόγονοι του founder QT2<sub>15</sub> που είναι οι QT6<sub>6, 9, 13, 19, 21, 22</sub> και οι QT9<sub>1,2,4,6,7,9,11</sub> (εικόνα 4 σειρές 9, 10 και εικ.5 σειρές 1-11). Για τους απογόνους της επαναδιασταύρωσης του QT2<sub>1</sub> founder δεν μπορούμε να βγάλουμε κανένα συμπέρασμα γιατί όπως φαίνεται στο σχήμα έχει αναλυθεί μόνο ένας ο QT5<sub>10</sub>. (Εικόνα 4 σειρά 8).

Από τις σειρές QT2<sub>7</sub>(copy number 4-6) και QT2<sub>15</sub> (copy number 1-2) υπάρχουν και θηλυκά και αρσενικά ποντίκια οπότε μπρούν με διασταυρώσεις ποντικών της ίδιας σειράς να προκύψουν ομόζυγα ζώα. Από την QT2<sub>1</sub> σειρά όμως

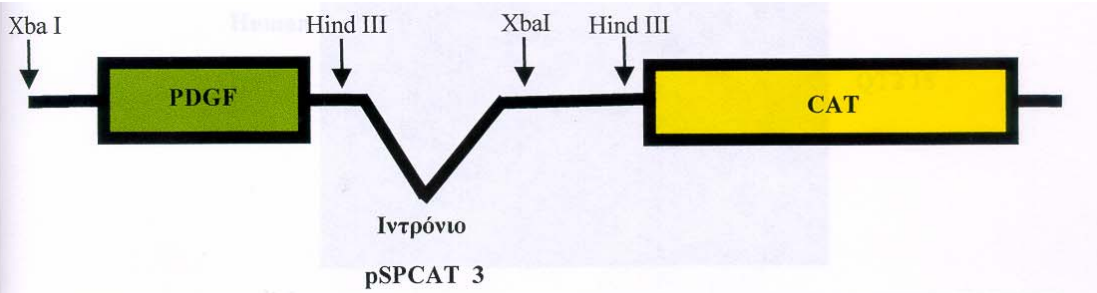
που υπάρχουν μόνο αρσενικοί απόγονοι(QT4<sub>12</sub>, QT5<sub>10</sub>) πρέπει να γίνουν νέες επαναδιασταυρώσεις του QT2<sub>1</sub> ώστε να προκύψουν και θηλυκά ποντίκια.

### **Έλεγχος της έκφρασης των διαγονιδιακών ποντικών**

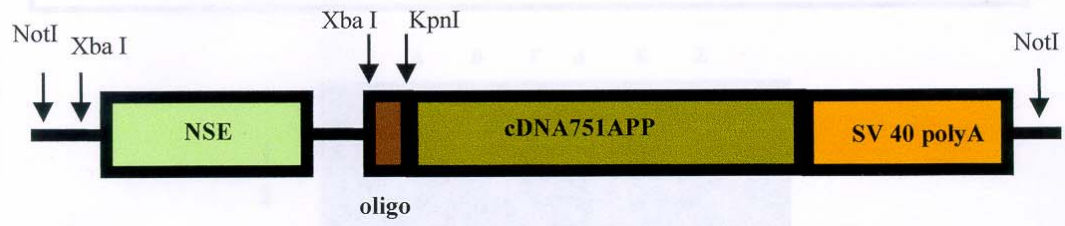
Όπως είναι γνωστό, για να εκφράζει ένα γονίδιο το οποίο ενίεται σε έναν ποντικό, δεν αρκεί να εντεθεί μέσα στο γένωμά του σε πολλά αντίγραφα. Η έκφραση του γονιδίου, εξαρτάται από το σημείο ένθεσης στο γένωμα.(ετεροχρωματινικές, ευχρωματινικές περιοχές). Για το λόγο αυτό θεωρήθηκε απαραίτητο να ελεγχθεί η έκφραση του APP γονιδίου με ανάλυση κατά Northern.

Απομονώθηκε RNA από τον εγκέφαλο του QT3<sub>8</sub> (απόγονος του QT2<sub>7</sub> με 4-6 αντίγραφα του ενθέματος) διαγονιδιακού ποντικού σε ηλικία 4 μηνών, και του QT6<sub>6</sub> (απόγονος του QT2<sub>15</sub> με 1-2 αντίγραφα του ενθέματος) στην ίδια ηλικία, ακινητοποιήθηκε σε μεμβράνη νυτροκυτταρίνης και στη συνέχεια υβριδοποιήθηκε με ραδιοσημασμένο ανιχνευτή (probe) ο οποίος περιλαμβάνει όλο σχεδόν το cDNA της APP<sub>751</sub> (EcoRI-KpnI τμήμα). Σε αυτοραδιογραφία βλέπουμε μία ζώνη μεγέθους 3.5Kb σε κάθε έναν από του δύο διαγονιδιακούς ποντικούς. Το ενδογενές μετάγραφο δεν εντοπίζεται από τον συγκεκριμένο ανιχνευτή, χωρίς να αποκλείεται η πιθανότητα το γεγονός αυτό να οφείλεται στις συγκεκριμένες συνθήκες υβριδοποίησης. Επίσης, οι εντάσεις των σημάτων αντιστοιχούν στο συμπέρασμα που βγαίνει από την dot blot ανάλυση πως η QT3 σειρά ποντικών έχει πιο πολλά αντίγραφα ενθέματος (APP) από την QT6 σειρά. Εικόνα 6.

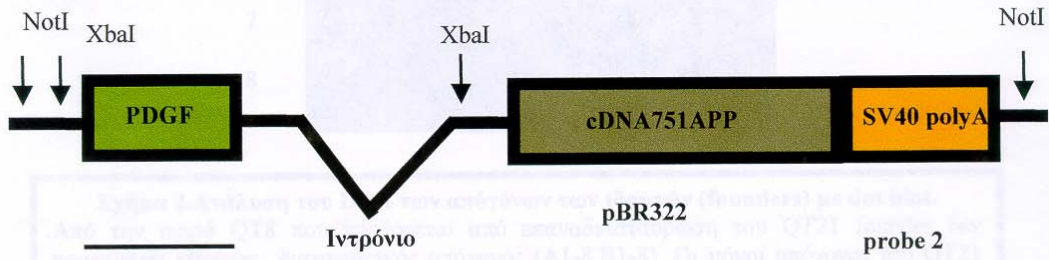
Έλεγχος της έκφρασης της QT2<sub>1</sub> σειράς δεν είναι ακόμα δυνατός, αφού υπάρχουν μόνο δύο απόγονοι (QT4<sub>12</sub> QT5<sub>10</sub>) και φυσικά δεν μπορούν να θυσιαστούν.



Σχήμα 1. Α' ενδιάμεση κατασκευή.



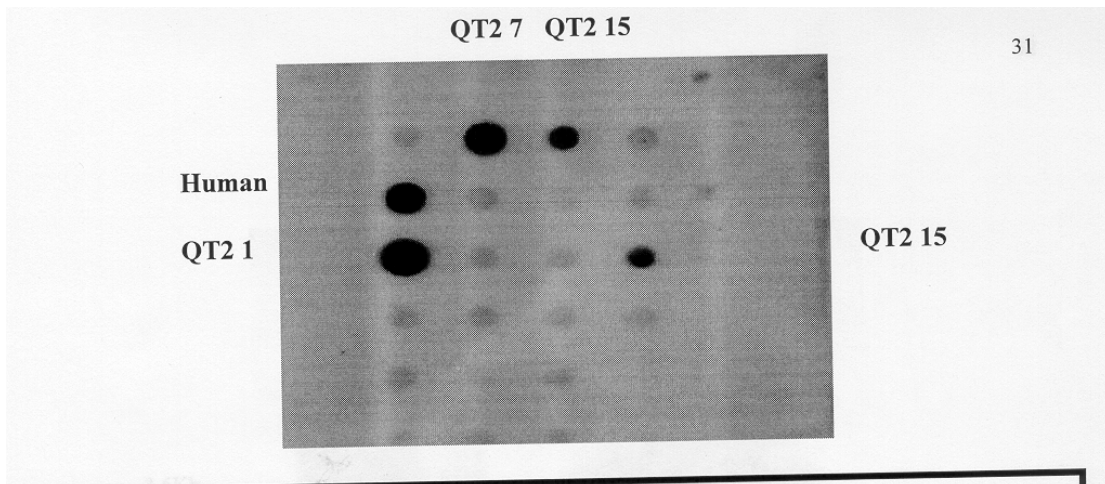
Σχήμα 2. Β' ενδιάμεση κατασκευή.



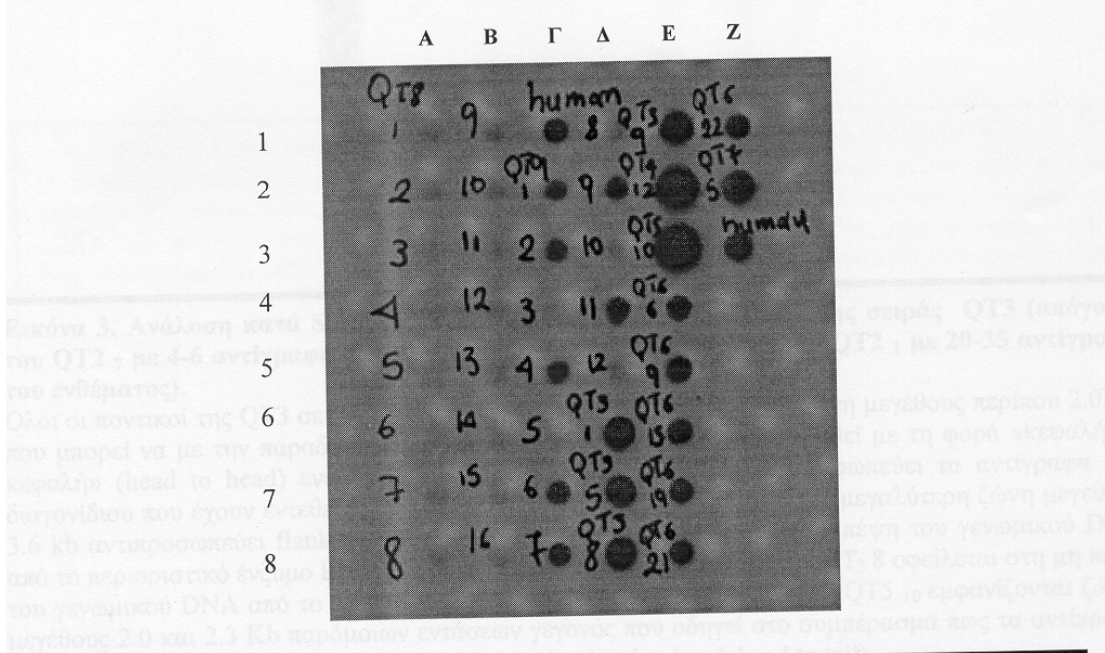
Σχήμα 3. Τελική κατασκευή.



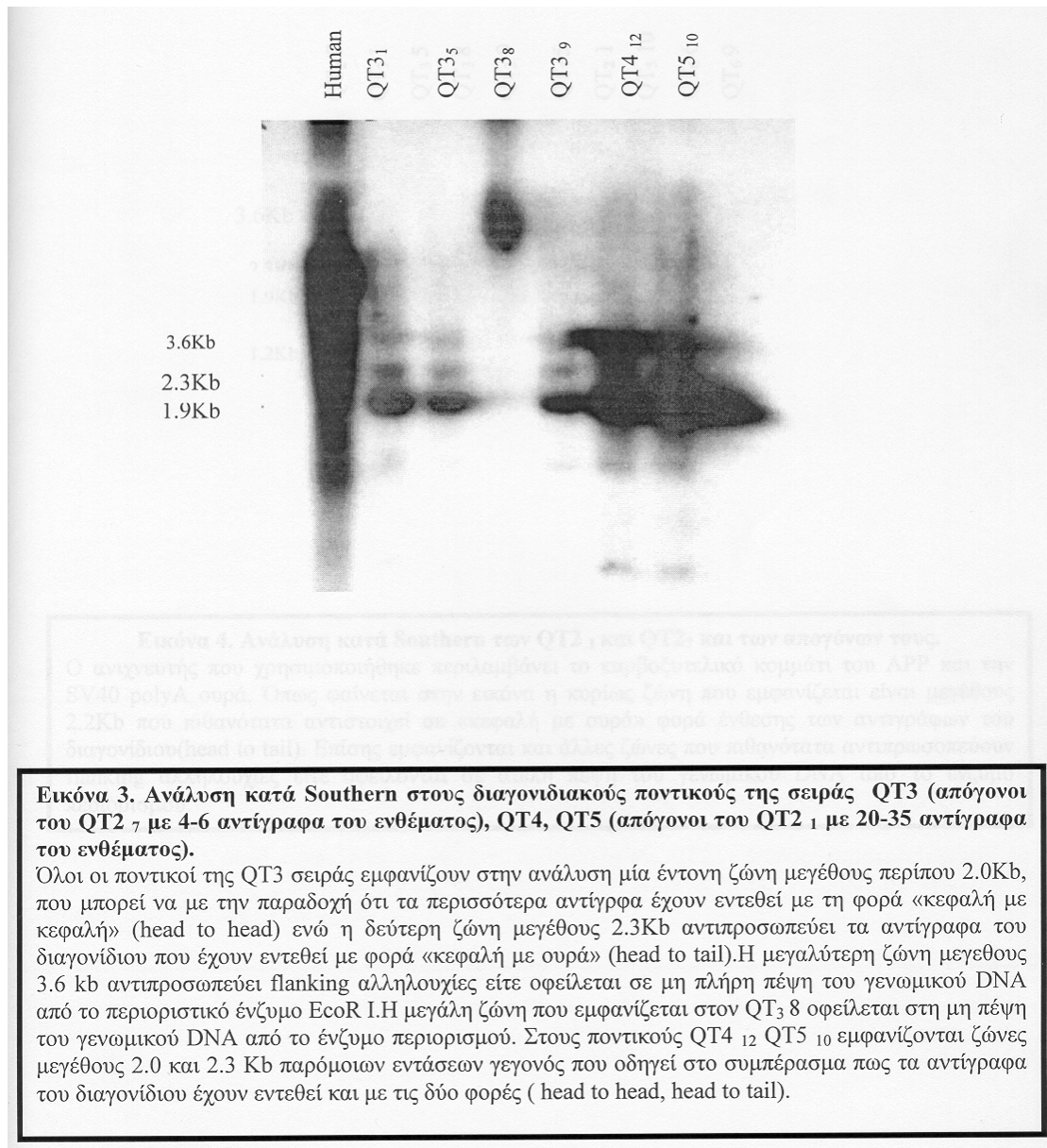


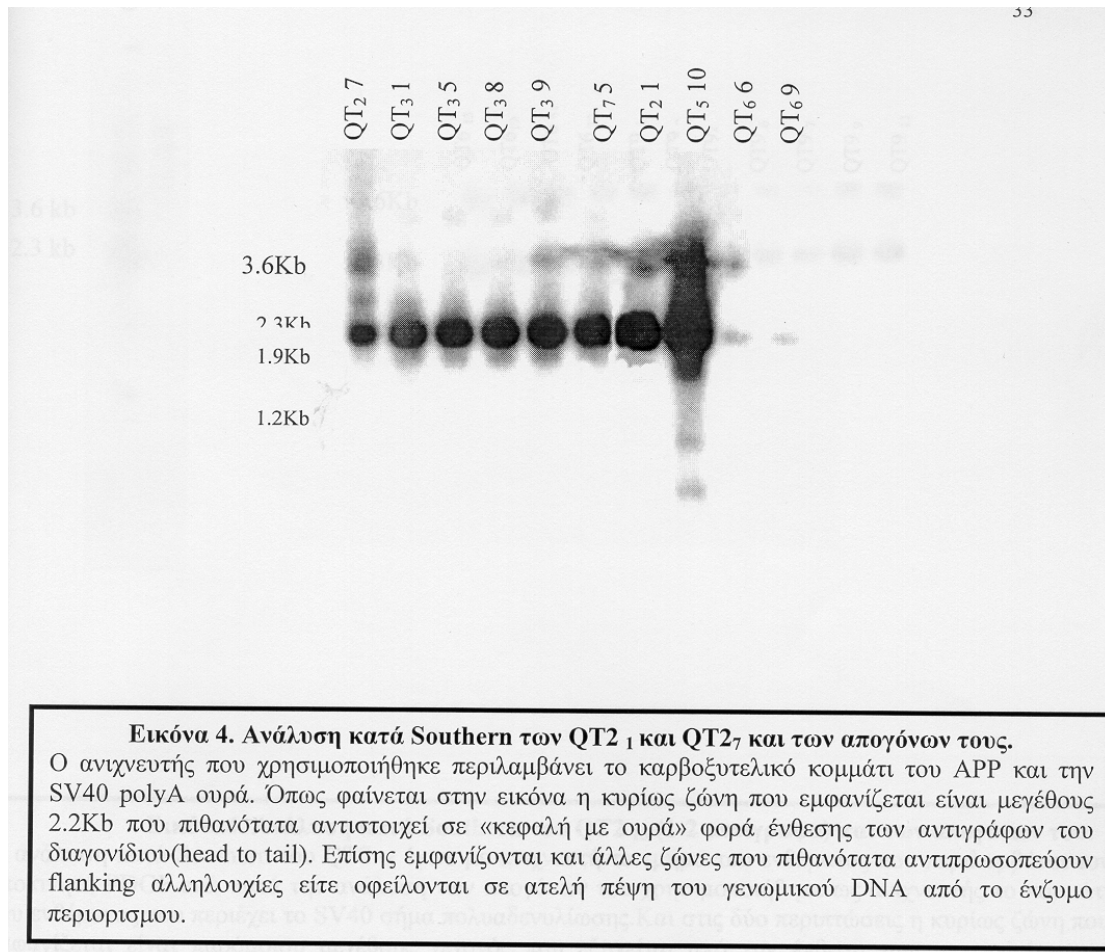


**Εικόνα1. Εύρεση των founders με dot blot.**  
 Από 25 ποντικούς που γεννήθηκαν από 3 διαφορετικές “μητέρες” στα ωάρια των οποίων ενέθηκε το γονίδιο της ανθρώπινης APP υπάρχουν μόνο τρεις ποντικοί που φέρουν το ένθεμα σε διαφορετικά αντίγραφα.

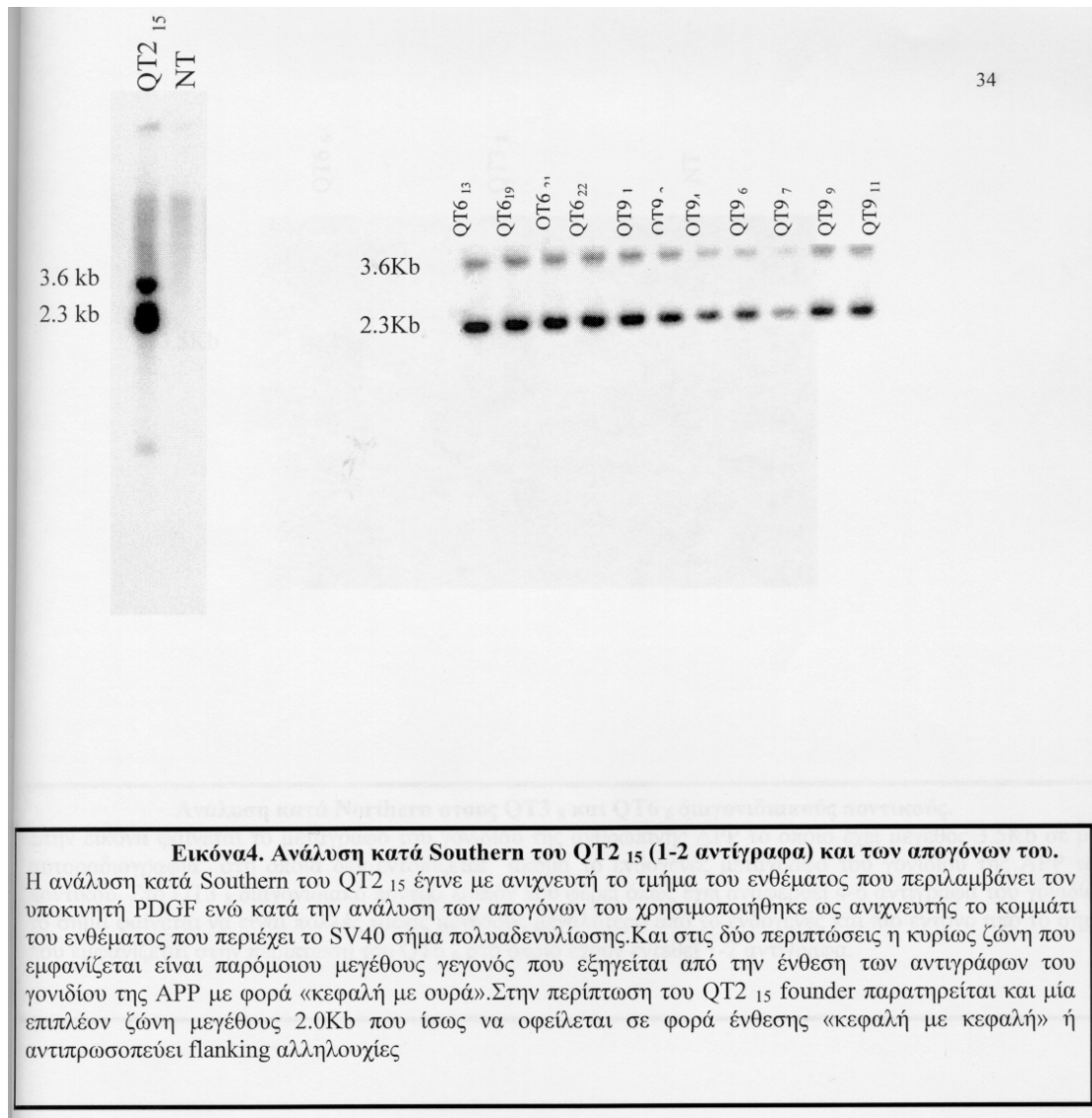


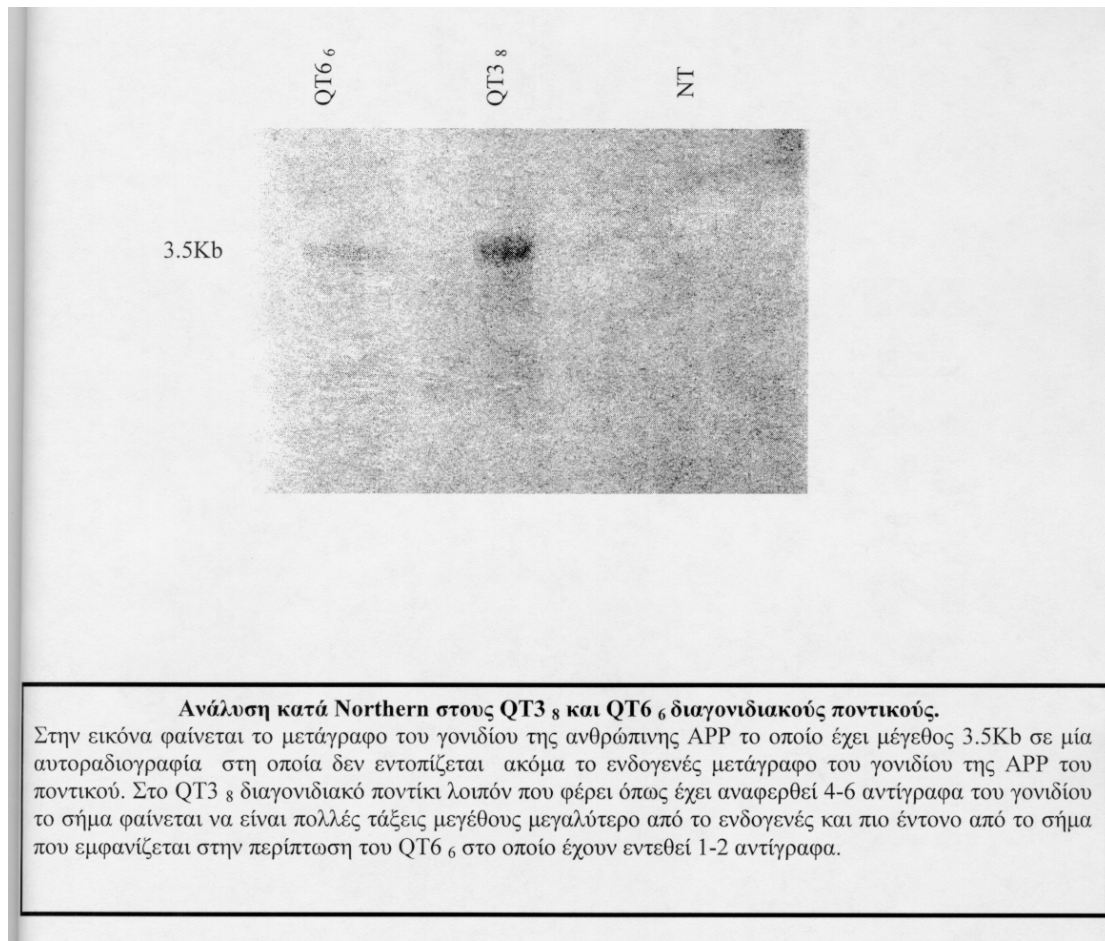
**Σχήμα 2. Ανάλυση του DNA των απογόνων των ιδρυτών (founders) με dot blot.**  
 Από την σειρά QT8 που προέρχεται από επαναδιασταύρωση του QT21 founder δεν προκύπτει κανένας διαγονιδιακός απόγονος (A1-8, B1-8). Οι μόνοι απόγονοι του QT21 founder που έχουν το γονίδιο της APP είναι ο QT4<sub>12</sub> και ο QT5<sub>10</sub> (E2 και E3). Σε σύγκριση με το γενωμικό DNA του ανθρώπου που έχει δύο αντίγραφα του γονιδίου της APP οι παραπάνω ποντικοί φέρουν 20-35 αντίγραφα του ενθέματος. Από τους απογόνους της επαναδιασταύρωσης του QT27 founder (QT9 και QT6 σειρά Γ2-8, Δ1-5, Ε4-8, Ζ1-2) προκύπτουν συνολικά 13 διαγονιδιακοί ποντικοί που φαίνεται να έχουν στο γένωμά τους 1-2 αντίγραφα του transgene (hAPP). Από τους απογόνους της επαναδιασταύρωσης του QT2 15 (QT3, QT7 σειρές Δ6-8, Ε1) προκύπτουν 5 διαγονιδιακοί ποντικοί που φέρουν 4-8 αντίγραφα του ενθέματος.











## ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΑ ΣΧΕΔΙΑ

**Ο βασικός σκοπός της εργασίας είναι η δημιουργία ενός ποντικού μοντέλου για την ασθένεια Alzheimer διαφορετικού από τα μέχρι τώρα δημοσιευμένα.** Για να αποτελέσει όμως ένα διαγονιδιακό ποντίκι μοντέλο για μία ασθένεια δεν αρκεί μόνο να εκφράζει την πρωτεΐνη που κωδικοποιεί το διαγονίδιο (transgene), που στην συγκεκριμένη περίπτωση είναι η ανθρώπινη APP. Πρέπει να εμφανίζει συγχρόνως την παθολογία της νόσου καθώς και τη συμπεριφορά .

Έτσι, ένα από τα επόμενα βήματα που πρέπει να ακολουθηθούν είναι οι ιστολογικές, **νευροπαθολογικές και ανοσοϊστοχημικές μελέτες**, ώστε να ελεγχθεί αν σχηματίζονται πλάκες αμυλοειδούς, ποιες άλλες πρωτεΐνες εντοπίζονται σε αυτές και αν υπάρχει απώλεια ή καταστροφή νευρώνων και νευρικών συνάψεων. Η διαδικασία αυτή που απαιτεί γνώσεις νευροανατομίας και παθολογίας, καθώς και τεχνική γνώση για εγκεφαλικές τομές, θα γίνει σε εργαστήριο με μεγάλη εμπειρία σε τέτοιου είδους θέματα.

Απαραίτητες είναι βέβαια οι **μελέτες συμπεριφοράς των ζώων αυτών**, που θα πραγματοποιηθούν από εξειδικευμένο εργαστήριο και στο οποίο τα ζώα θα υποβληθούν σε τεστ μνήμης και ικανότητας μάθησης σε διάφορες ηλικίες, ώστε να αποδειχθεί αν τα ποντίκια αυτά που εκφράζουν την μεταλλαγμένη μορφή της ανθρώπινης APP έχουν διαταραχές μνήμης, η δυσκολίες στη μάθηση, που ταιριάζουν πολύ στα χαρακτηριστικά των ασθενών με Alzheimer. Έχοντας εξασφαλίσει όλα τα παραπάνω αποτελέσματα, μπορούμε να πούμε πια με σιγουριά πως το διαγονιδιακό ποντίκι που έχουμε είναι μοντέλο για την ασθένεια.

Όπως έχει περιγραφεί από την βιβλιογραφία, αλλά και αναφέρεται στην εισαγωγή της εργασίας, η απολιποπρωτεΐνη E φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στην ασθένεια. Πολύ ενδιαφέρον επίσης παρουσιάζει το δεδομένο πως τα διαφορετικά αλληλόμορφα της ApoE, επηρεάζουν με διαφορετικό τρόπο τον φαινότυπο της ασθένειας. Έτσι όπως ξανά ειπώθηκε στην εισαγωγή, η ApoE<sub>4</sub> φαίνεται να συμβάλει στον σχηματισμό πλακών ενώ η ApoE<sub>2</sub> και η ApoE<sub>3</sub> παίζουν προστατευτικό ρόλο.

Ένα λοιπόν από τα αρχικά σχέδια του εργαστηρίου μας, **ήταν η διασταύρωση του APP-διαγονιδιακού ποντικού με ποντίκι στο οποίο έχει γίνει**

**απαλοιφή του ApoE γονιδίου (ApoE<sup>-/-</sup>)**, για να βρεθεί ποιος είναι ο γενικός ρόλος της ApoE στην ασθένεια. Εντωμεταξύ, η δουλειά αυτή, υλοποιήθηκε από άλλο εργαστήριο (Bales, 1997). Το αποτέλεσμα ήταν η αισθητή μείωση των πλακών αμυλοειδούς στους απογόνους της παραπάνω διασταύρωσης η οποία γίνεται δραματική όταν τα ζώα γίνονται ομόζυγα (ApoE<sup>-/+APP<sup>+/+</sup></sup>). Η ApoE λοιπόν όπως αποδεικνύεται, εμπλέκεται στην ασθένεια, έτσι ώστε αξίζει κανείς, να βρει με ποιο τρόπο.

Έτσι το επόμενο βήμα είναι η **διασταύρωση του APP διαγονιδιακού ποντικού, με ποντικούς διαγονιδιακούς ως προς το κάθε ένα αλληλόμορφο της ApoE ξεχωριστά**. Μετά τις διασταυρώσεις αυτές και την δημιουργία ομόζυγων ζώων και ως προς τα δύο γονίδια, (APP και ApoE<sup>2ή3ή4</sup>) πρέπει να ακολουθήσουν ιστολογικές και νευροανατομικές μελέτες και μελέτες συμπεριφοράς και να συγκριθούν με παρόμοιες μελέτες που έγιναν στο APP-ποντικό και να αποφασιστεί ο ρόλος του κάθε αλληλόμορφου στην Alzheimer.

Τελευταία από τη βιβλιογραφία έγινε γνωστό, πως ApoE<sup>4</sup> διαγονιδιακά ποντίκια σε ApoE<sup>-/-</sup> γενετικό υπόβαθρο συγκρινόμενα με αντίστοιχα διαγονιδιακά του ApoE<sup>3</sup> αλληλόμορφου του ίδιου υπόβαθρου, ή και με άγριου τύπου ποντίκια, εμφάνισαν προβλήματα μάθησης και διαταραχές μνήμης που αυξάνονταν με την ηλικία. Τα νοητικά αυτά προβλήματα ήταν επίσης πιο έντονα στα θηλυκά ζώα. Η εργασία αυτή έδειξε καθαρά πως τα *in vitro* πειράματα και οι πληθυσμιακές μελέτες που έχουν γίνει μέχρι τώρα και που αφορούν την ApoE δεν απέχουν πολύ από τι πραγματικά συμβαίνει *in vivo* ενώ οι παραπάνω διασταυρώσεις πιθανότατα θα ξεκαθαρίσουν την εικόνα και ίσως να γίνουν η απαρχή της δημιουργίας κάποιων αποτελεσματικών φαρμάκων που θα αναστέλλουν ή θα καθυστερούν τη δημιουργία πλακών αμυλοειδούς στους εγκεφάλους ασθενών με Alzheimer.

Πολύ πρόσφατα, βρέθηκε πως μία άλλη πρωτεΐνη παίζει προστατευτικό ρόλο στην ασθένεια. Αυτή η πρωτεΐνη είναι η α<sub>2</sub>μακροσφαιρίνη (α<sub>2</sub>macroglobulin, a<sub>2</sub>M), η οποία δρα ως γενικά ως «καθαριστής» των νευρώνων αφού ενώνεται με διάφορες πρωτεΐνες που είναι τοξικές για τους νευρώνες και τις απομακρύνει από τον χώρο μεταξύ τους. Ειδικότερα στην Alzheimer, συνδέεται στο Αβ πεπτίδιο και με αυτό τον τρόπο διαλύει τις πλάκες ή δεν επιτρέπει, εξ αρχής, τη δημιουργία τους. Σε μεταλλάξεις αυτής, έχουμε κανονική εναπόθεση πλακών και θάνατο νευρώνων. Η α<sub>2</sub>M ενώνεται λοιπόν με το Αβ πεπτίδιο και το μεταφέρει μέσα στα κύτταρα για αποικοδόμηση. Για να το κάνει αυτό χρησιμοποιεί τον ίδιο υποδοχέα που

χρησιμοποιεί η AροE για να μπει μέσα στα κύτταρα. Αυξημένες ποσότητες AροE ανταγωνίζονται την είσοδο της α2M μαζί με το Αβ πεπτιδίο στο κύτταρο και οδηγού ν σε εναπόθεση πλακών αμυλοειδούς.

Μέχρι τώρα γνωρίζουμε δύο παράγοντες επικινδυνότητας (risk factors) της ασθένειας που ενώνονται στον AροE υποδοχέα, που είναι μία επιφανειακή πρωτεΐνη γνωστή ως LRP (low-density lipoprotein receptor-related protein) και πιθανότατα υπάρχουν και άλλοι. Το γεγονός αυτό συνδέει άμεσα την LRP με την ασθένεια.

Ένα από τα προσεχή σχέδια λοιπόν του εργαστηρίου μας, είναι η **διασταύρωση ενός ποντικού στον οποίο έγινε απαλοιφή του γονιδίου της LRP με το APP διαγονιδιακό ποντίκι**, ώστε να διαλευκανθεί ο ρόλος του εν λόγω υποδοχέα στην ασθένεια. Δηλαδή μετά τις διασταυρώσεις αυτές και τη δημιουργία ομόζυγων ποντικών, θα γίνουν και πάλι νευροανατομικές και ανοσοϊστοχημικές μελέτες καθώς και τεστ μνήμης-μάθησης για να εξακριβωθεί αν ο φαινότυπος γίνεται πιο δραματικός ή αν παρατηρείται το αντίθετο αποτέλεσμα.

Μία σχετικά πρόσφατη δημοσίευση έκανε γνωστά αρκετά πρωτότυπα δεδομένα για την ασθένεια Alzheimer. Σε ασθενείς λοιπόν με Alzheimer, βρήκαν πως στην περιοχή του εγκεφάλου μέσα στις γεροντικές πλάκες, εντοπίζεται μία μορφή της πρωτεΐνης APP που της λείπει το καρβοξυτελικό άκρο, η οποία προήλθε από μία έλλειψη δύο νουκλεοτιδίων στο επίπεδο της μετα-μεταγραφικής τροποποίησης του RNA (RNA editing, που οδήγησε σε αλλαγή του αναγνωστικού πλαισίου και τη δημιουργία ενός κωδικού λήξης (stop codon), λίγα αμινοξέα μετά την αλλαγή.

Κατά τη διαδικασία αυτή όμως, κάποια μόρια ξεφεύγουν από την πρωτεολυτική επεξεργασία της APP που οδηγεί στην έκκριση του Αβ πεπτιδίου. Φαίνεται λοιπόν πως το ίδιο το κύτταρο βρίσκει από μόνο του τρόπους να ξεφεύγει από τον πιθανό εκφυλισμό του. Από την άλλη όμως, έχει παρατηρηθεί, πως τέτοιου είδους μεταλλάξεις συμβαίνουν συχνά και ότι το κύτταρο και κυρίως το νευρικό συσσωρεύει μη λειτουργικές πρωτεΐνες κατά τη διάρκεια της γήρανσης .

Αν λοιπόν ο παραπάνω μηχανισμός είναι ένας μηχανισμός διάσωσης του κυττάρου ή ένα αποτέλεσμα γήρανσης αυτού, θα ήταν πολύ ενδιαφέρον **να μελετηθεί αν παρατηρείται και στον διαγονιδιακό ποντικό-μοντέλο για την ασθένεια Alzheimer**. Η μελέτη αυτή είναι ένα από τα μελλοντικά σχέδια του εργαστηρίου μας και η οποία για να πραγματοποιηθεί απαιτεί τη βοήθεια άλλων εργαστηρίων με γνώσεις νευροανατομίας και ανοσοϊστοχημείας ώστε να απομονωθεί η περιοχή στην οποία εντοπίζεται η ακρωτηριασμένη (truncated) αυτή μορφή της πρωτεΐνης APP από

όπου θα απομονωθεί RNA από το οποίο θα γίνει βιβλιοθήκη έκφρασης πρωτεϊνών. Για να απομονώσουμε τον βακτηριακό κλώνο που εκφράζει την εν λόγω πρωτεΐνη θα χρησιμοποιήσουμε αντίσωμα που αναγνωρίζει την περιοχή της πρωτεΐνης που δεν υπάρχει στην κανονική μορφή της APP.

Πραγματοποιώντας όλα τα παραπάνω σχέδια, ελπίζουμε ότι θα προσφέρουμε και εμείς ένα σημαντικό κομμάτι στη γνώση, αλλά και θα συμβάλλουμε στη εύρεση νέων φαρμάκων και ίσως μακροπρόθεσμα στη γονιδιακή θεραπεία της ασθένειας.

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Allen D Roses. **The Alzheimer diseases.** Current opinion in Neurobiology 1996,6:644-650.
2. Jie Kang et al. **The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor.** Nature,1987,325:733-736.
- 3 James Goldman, Lucien Cote. **Aging of the brain: Dementia of the Alzheimer's type.** Candel,1996.
4. K.Johnson-Wood et al. **Amyloid precursor protein processing and A $\beta$ <sub>42</sub> deposition in a transgenic mouse model of Alzheimer disease.** PNAS,1997,94:1550-1555.
5. Dora Games et al. **Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F  $\beta$ -amyloid precursor protein.** Nature,1995,373:523-527
6. Karen Hsiao et al. **Correlative memory deficits, A $\beta$  elevation, and amyloid plaques in transgenic mice.** Science,1996,274:99-102.
7. Nobuhiro Suzuki et al. **An increased percentage of long amyloid  $\beta$  protein secreted by familial amyloid  $\beta$  protein precursor ( $\beta$  APP<sub>717</sub>) mutants.** Science,1994,27:336-339.
8. Christine Sturchler-Pierrat et al. **Two amyloid precursor protein transgenic mouse models with Alzheimer disease-like pathology.** PNAS,1997,94:13287-13292.
9. Kelly R. Bales et al. **Lack of apolipoprotein E dramatically reduces amyloid  $\beta$ -peptide deposition.** Nature Genetics,1997,17:263-264.
10. Dieder Moechars et al. **Expression in brain of APP mutated in the  $\alpha$ -secretase site causes disturbed behavior, neuronal degeneration and premature death in transgenic mice.** EMBO, 1996,15:1265-1274.
11. Warren J.Strittmatter et al. **Apolipoprotein E: High-avidity binding to  $\beta$ -amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease.** PNAS,1993,90:1977-1981.
12. Jun Zhao et al. **B-secretase processing of the  $\beta$ -amyloid precursor protein in transgenic mice is efficient in neurons but inefficient in astrocytes.** The Journal of Biological Chemistry,1996,271;31407-31411.
13. Andrew G. Reaume et al. **Enhanced amyloidogenic processing of the  $\beta$ -amyloid precursor protein in gene-targeted mice bearing the Swedish familial**

**Alzheimer's disease mutations and a "Humanized" A $\beta$  sequence.** . The Journal of Biological Chemistry,1996,271:23380-23388.

14. Peter Seubert et al. **Isolation and quantification of soluble Alzheimer's  $\beta$ -peptide from biological fluids.** Nature,1992,359:325-327.

15. Margaret A. Pericak-Vance and Jonathan L. Haines. **Genetic susceptibility to Alzheimer disease.** Trends in Genetics ,1995,11:504-508.

16. Tae-Wan Kim and Rudolph E Tanzi. **Presenilins and Alzheimer's disease.** Current opinion in Neurobiology,1997,7:683-688.

17. Karen Duff et al. **Increased amyloid- $\beta$ 42(43) in expressing mutant presenilin1.** Nature,1996,383:710-713.

18. Bart De Strooper et al. **Deficiency of presenilin-1 inhibits the normal cleavage of amyloid precursor protein.** Nature,1998,391:387-390.

19. George A. Carlson et al. **Genetic modification of the phenotypes produced by amyloid precursor protein overexpression in transgenic mice.** Human Molecular Genetics,1997,6:1951-1959.

20. Masakiyo Sassa et al. **PDGF B-Chain in neurons of the Central Nervous System, posterior Pituitary, and in a transgenic model.** Cell,1991,64:217-227.

21. J. Nalbantoglu et al. **Impaired learning and LTP in mice expressing the carboxyterminus of the Alzheimer amyloid precursor protein.** Nature,1997,387:500-505.

22. Michael K Lee et al. **Transgenic models of neurodegenerative diseases.** Current opinion in Neurobiology,1996,6:651-660.

23. Jinhe Li et al. **Alzheimer presenilins in the nuclear membrane, interphase kinetochores, and centrosomes suggest a role in chromosome segregation.** Cell 1997,90:917-927.

24. Selkoe DJ et al. **Alzheimer's disease. In the beginning...** Nature,1991,354:432-433.

25. Vassilis I. Zannis, Dimitris Kardassis, and Eleni Economou Zanni. **Genetic mutations affecting Human Lipo-proteins their Receptors, and their enzymes.** Advances in Human Genetics,1993,21:173-178.

26. Tomita S, Kirino Y, Suzuki T. **A basic amino acid in the cytoplasmic domain of Alzheimer's beta-amyloid precursor protein (APP) is essential for cleavage of APP at the alpha-site.** Journal of Biological Chemistry,1998,273:19304-19310.



27. Salehi A, Dubelaar EJG, Mulder M, Swaab DF. **Aggravated decrease in the activity of nucleus basalis neurons in Alzheimer's disease is apolipoprotein E-type dependent.** PNAS, 1998, 95:11445-11449.
28. Fred W. et al. **Frameshift mutants of  $\beta$  amyloid precursor protein and ubiquitin -B in Alzheimer's and Down patients.** Science, 1998, 279:242-247.
29. Blacker D. et al. **Alpha-2 macroglobulin is genetically associated with Alzheimer disease.** Nature Genetics, 1998, 19:357-360.



