



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**



**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ ΣΤΙΣ
ΝΕΥΡΟΕΠΙΣΤΗΜΕΣ**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ
Μεταπτυχιακή φοιτήτρια: Πάνου Θεοδώρα

ΤΙΤΛΟΣ

**‘Γενετική ανάλυση του πολυμορφισμού M129V του
γονιδίου *PRNP* σε γηγενείς Κρήτες ασθενείς με νόσο του
Parkinson’**

Υπεύθυνος καθηγητής: ΠΛΑΪΤΑΚΗΣ ΑΝΔΡΕΑΣ
Καθηγ. Νευρολογίας

ΟΚΤΩΒΡΙΟΣ 2006

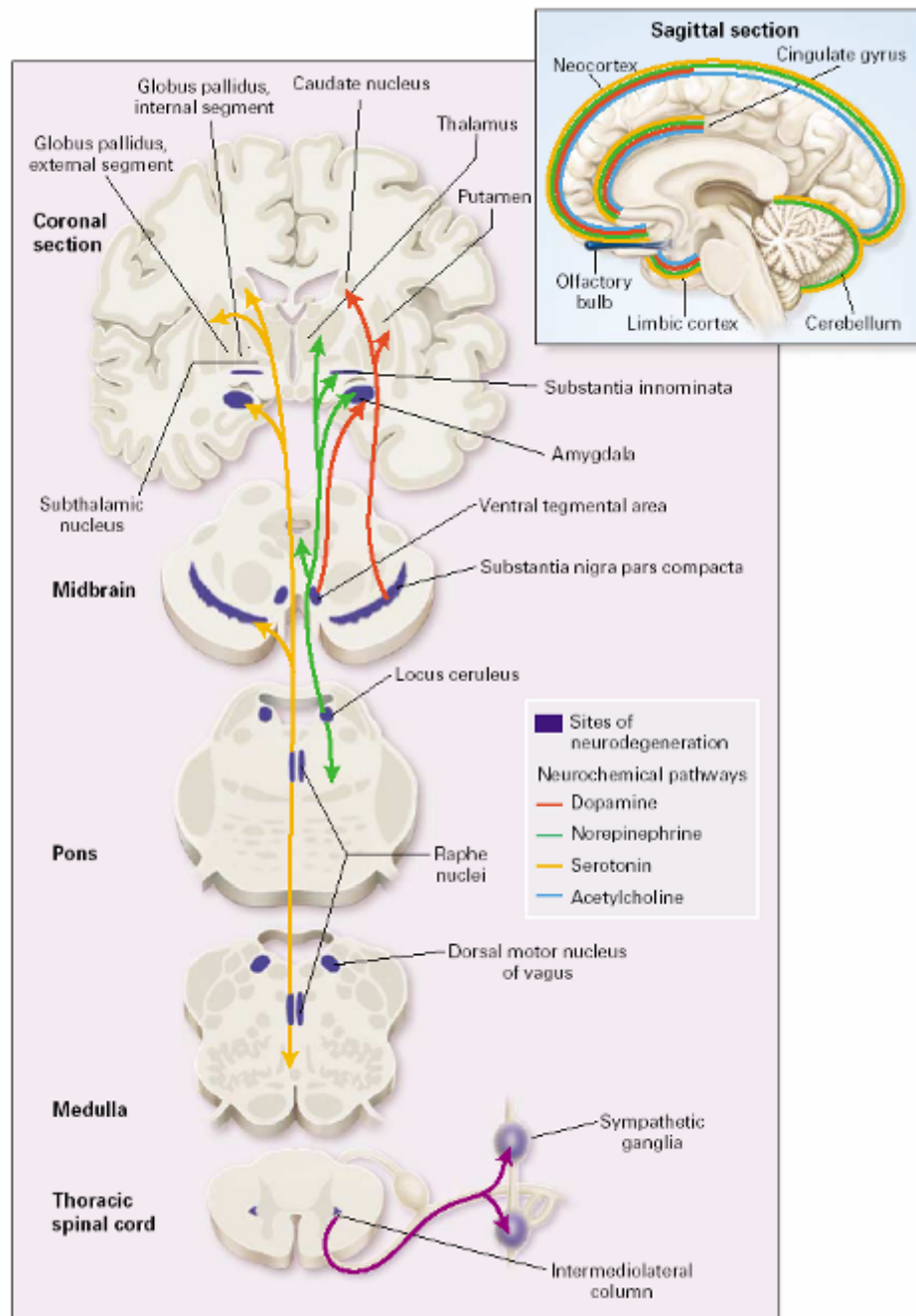
ΕΙΣΑΓΩΓΗ

ΝΟΣΟΣ ΤΟΥ ΠΑΡΚΙΝΣΟΝ

ΠΑΘΟΛΟΓΟΑΝΑΤΟΜΙΚΑ ΕΥΡΗΜΑΤΑ

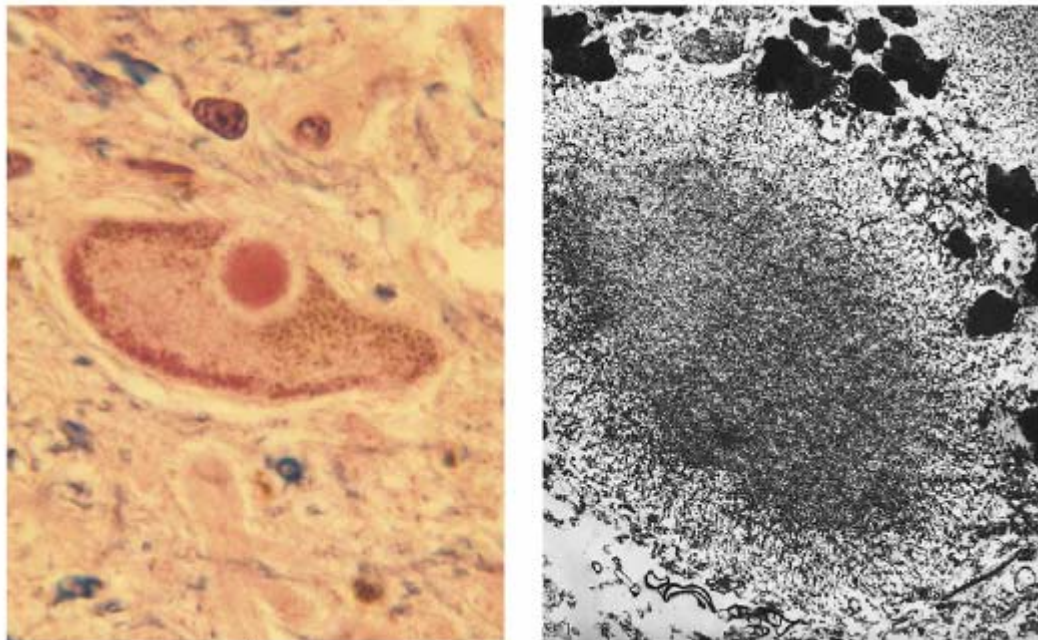
Η νόσος του Parkinson χαρακτηρίζεται από την προοδευτική εκλεκτική εκφύλιση ετερογενών ομάδων νευρώνων, όπως οι ντοπαμινεργικοί νευρώνες της συμπαγούς μοίρας της μέλαινας ουσίας, κατεχολαμινεργικοί και σεροτονινεργικοί πυρήνες του στελέχους, ο χολινεργικός βασικός πυρήνας του Meynert, υποθαλάμιοι νευρώνες και μικροί νευρώνες στο φλοιό, ιδίως στην υπερμεσολόβια έλικα και τον ενδορινικό φλοιό, καθώς επίσης ο οσφρητικός βολβός, τα συμπαθητικά γάγγλια και οι παρασυμπαθητικοί νευρώνες του γαστρεντερικού σωλήνα (Tolosa et al., 2006). Η απώλεια των νευρώνων φαίνεται να ξεκινάει από το κοιλιοπλάγιο τρίτο της συμπαγούς μοίρας της μέλαινας ουσίας και υπολογίζεται στο 60-70% κατά την έναρξη των συμπτωμάτων, ενώ ακολουθεί το έσω κοιλιακό και τέλος το ραχιαίο τρίτο της. Το παραπάνω μοντέλο αποτελεί μοντέλο κυτταρικού θανάτου ειδικό για τη νόσο του Parkinson, το οποίο συνεπάγεται μεγαλύτερη μείωση της ντοπαμίνης αρχικά στο ραχιαίο και διάμεσο τμήμα του κελύφους, γεγονός που θεωρείται ότι ευθύνεται για την ακινησία και τη δυσκαμψία του πρώιμου σταδίου.

Η απώλεια των νευρώνων στο έσω τμήμα της μέλαινας ουσίας και, κατά συνέπεια, των προβολών τους στον κερκοφόρο πυρήνα, η εκφύλιση υποφλοιωδών δομών, όπως ο βασικός πυρήνας του Meynert αλλά και του ενδορινικού φλοιού, θεωρείται ότι ευθύνονται για τη νοητική έκπτωση που παρατηρείται στη νόσο του Parkinson. Η εκφύλιση των νευρώνων στον οσφρητικό βολβό ευθύνεται για την ανοσμία, η εκφύλιση των συμπαθητικών και παρασυμπαθητικών γαγγλίων για τη δυσαισθησία και, τέλος, η απώλεια των σεροτονινεργικών και νοραδρενεργικών νευρώνων του στελέχους, καθώς και του αμυγδαλοειδούς πυρήνα ευθύνεται για τις διαταραχές συμπεριφοράς και την κατάθλιψη που παρατηρείται στους ασθενείς (Wolters et al., 2006).



Εικόνα 1. Οι περιοχές νευροεκφύλισης και τα νευροχημικά μονοπάτια που εμπλέκονται στη νόσο του Parkinson. Οι περιοχές που χαρακτηρίζονται από παθολογικές αλλαγές απεικονίζονται σε σκούρο μπλε. Τα νευροχημικά μονοπάτια που επηρεάζονται από τη νόσο αυτή σημειώνονται με τα έγχρωμα βέλη. Οι προορισμοί των οδών αυτών σημειώνονται στις στεφανιαίες τομές με τις αιχμές των βελών και στην οβελιαία τομή του εγκεφάλου με έγχρωμα περιγράμματα.: το κόκκινο δείχνει ντοπαμίνη, το πράσινο νορεπινεφρίνη, το πορτοκαλί σεροτονίνη και το τυρκουάζ ακετυλοχολίνη.

Το τυπικό παθολογοανατομικό εύρημα της νόσου είναι το σωματίο Lewy, ένα κυτταροπλασματικό έγκλειστο που παρατηρείται σταθερά στους υπό εκφύλιση νευρώνες. Τα σωματία Lewy στο στέλεχος και στο βασικό πρόσθιο εγκέφαλο είναι συνήθως πάνω από 15 μm και έχουν ένα σφαιρικό πυρήνα υαλίνης που περιβάλλεται από μια διαυγή άλω, παίρνοντας μια μορφή δίκην στόχου. Το σωματίο Lewy είναι ένα παθολογοανατομικό εύρημα με μεγάλη ευαισθησία για τη νόσο αλλά χωρίς μεγάλη ειδικότητα, καθώς μπορεί να παρατηρηθεί και σε άλλες ασθένειες (Burn, 2006). Ο μηχανισμός με τον οποίον σχηματίζονται τα σωματία αυτά και η σπουδαιότητά τους στη νευροεκφυλιστική διαδικασία αναπτύσσονται σχολαστικότερα παρακάτω.



Εικόνα 2. Ένα τυπικό σωματίο Lewy. Η εικόνα Α δείχνει το σωματίο μέσα στο κυτταρόπλασμα ενός ντοπαμινεργικού νευρώνα της μέλαινας ουσίας (αιματοξυλίνη-εοσίνη και Luxol fast blue, x100). Εξέταση με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (εικόνα Β) δείχνει συσσώρευση ινιδίων και κοκκιώδους υλικού με πυκνό πυρήνα και ακτινωτά χαλαρά περιφερικά ινίδια(x21.560)

ΠΑΘΟΓΕΝΕΤΙΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ

Η αιτιοπαθογένεια της πρωτοπαθούς μορφής της νόσου, δηλαδή η αιτία που προκαλεί την εκλεκτική καταστροφή των κυττάρων του ΚΝΣ, δεν έχει ακόμα πλήρως διαλευκανθεί. Επί του παρόντος υπάρχουν κυρίως τέσσερις υποθέσεις. Η πρώτη αφορά **εξωγενείς τοξίνες**, η δεύτερη ενδογενείς παράγοντες (το λεγόμενο **Oxidative stress**), η τρίτη **διαταραχές του μεταβολισμού της κυτταρικής ενέργειας** και η τέταρτη **γενετικούς παράγοντες**. Πολύ πρόσφατα, με τις νέες ανακαλύψεις της γενετικής, έχει αναπτυχθεί μια ενοποιημένη θεωρία για την αιτιοπαθογένεια της νόσου, που εμπερικλείει όλες τις επιμέρους θεωρίες.

Νόσος του Parkinson και περιβαλλοντικοί παράγοντες

Η πρώτη περιγραφή της νόσου έλαβε χώρα στις αρχές του 19^{ου} αιώνα, χρονική περίοδο που συμπίπτει με τη βιομηχανική επανάσταση και οδήγησε στην υπόθεση ότι πρόκειται για νόσο που προκαλείται από τοξικές ουσίες του περιβάλλοντος. Διάφορες παρατηρήσεις συνηγορούν υπέρ αυτής της θεωρίας: 1) το γεγονός ότι η νόσος έχει μεγαλύτερη συχνότητα σε αγροτικές περιοχές από ότι σε αστικές, 2) η διαφορετική επίπτωση της σε άτομα της ίδιας εθνικής προέλευσης που ζουν σε διαφορετικές χώρες, 3) η ανακάλυψη ότι το MPTP, ένα παράγωγο της μεπεριδίνης το οποίο ελάμβαναν νεαροί ηρωινομανείς, προκαλεί παρκινσονισμό και 4) πολλές επιδημιολογικές μελέτες που έχουν συσχετίσει διάφορους περιβαλλοντικούς παράγοντες με το κίνδυνο εκδήλωσης της νόσου του Parkinson. Μέχρι σήμερα όμως, κανένας περιβαλλοντικός παράγοντας δεν έχει αποδειχθεί ότι προκαλεί την ιδιοπαθή μορφή της νόσου του Parkinson.

Μιτοχονδριακή δυσλειτουργία στη νόσο του Parkinson

Η αναπνευστική αλυσος των μιτοχονδρίων οδηγεί στην παραγωγή ενέργειας (ATP) μέσω οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Στη διαδικασία αυτή συμμετέχουν 5 ενζυμικά συμπλέγματα που φέρουν τα ονόματα I, II, III, IV και V τα οποία εντοπίζονται κατά μήκος της εσωτερικής μεμβράνης των μιτοχονδρίων. Οι πρωτεϊνικές υπομονάδες των συμπλεγμάτων αυτών κωδικοποιούνται τόσο από το πυρηνικό όσο και από το μιτοχονδριακό DNA.

Το MPTP, ένας περιβαλλοντικός παράγοντας που αποδείχθηκε ότι μπορεί από

μόνος του να προκαλέσει τη νόσο, επιδρά στη λειτουργία του συμπλέγματος I (Complex I) (Bove et al., 2005). Αφού διαπεράσει τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό, μεταβολίζεται από την μονοαμινοξειδάση B στα αστροκύτταρα στον ενεργό μεταβολίτη MPP+. Ο μεταβολίτης αυτός προσλαμβάνεται εκλεκτικά από τους ντοπαμινεργικούς νευρώνες, λόγω της υψηλής συγγένειας που έχει με τον μεταφορέα της ντοπαμίνης, συσσωρεύεται στα μιτοχόνδρια και **αναστέλλει τη λειτουργία του συμπλέγματος I της αναπνευστικής αλυσού.**

Μελέτες αναφέρουν ελάττωση του συμπλέγματος I στη μέλαινα ουσία παρκινσονικών ασθενών, αλλά όχι σε άλλες περιοχές του Κ.Ν.Σ. Άλλοι έδειξαν ότι η διαταραχή του συμπλέγματος I είναι γενικευμένη στους ασθενείς με νόσο του Parkinson και παρουσιάζεται και σε ιστούς έξω από το νευρικό σύστημα, όπως στα αιμοπετάλια, τους μύες και τα λεμφοκύτταρα. Στην ιδιοπαθή νόσο του Parkinson παρατηρείται μείωση κατά 30-40% της δραστηριότητας του συμπλέγματος I της αναπνευστικής αλυσού στη μέλαινα ουσία (Scharira et al. 2006). Η φύση της ανεπάρκειας του συμπλέγματος I, δηλαδή το εάν πρόκειται για γενετικής ή επίκτητης αιτιολογίας δυσλειτουργία, παραμένει ασαφής.

Συνοψίζοντας, λοιπόν, υπάρχουν ενδείξεις για γενικευμένη διαταραχή του συμπλέγματος I στους παρκινσονικούς ασθενείς. Υπάρχουν όμως πολλά ερωτηματικά όπως: 1) γιατί η ελάττωση του συμπλέγματος I παρατηρείται μόνο στη μέλαινα ουσία και όχι και σε άλλες περιοχές του Κ.Ν.Σ., αν και υποτίθεται ότι υπάρχει γενικευμένη διαταραχή; 2) γιατί η ελάττωση του συμπλέγματος I δεν είναι ειδική για τη νόσο του Parkinson, καθώς παρουσιάζεται και σε άλλα νευροεκφυλιστικά νοσήματα, όπως στη νόσο του Huntington και αλλού; 3) γιατί δεν υπάρχουν μεταλλάξεις στο μιτοχονδριακό DNA που κωδικοποιούν τη συγκεκριμένη υπομονάδα; Δεν μπορεί να αποκλειστεί η πιθανότητα, η μείωση του συμπλέγματος I να αποτελεί επιφανόμενο, καθώς τα κύτταρα της μέλαινας ουσίας παρουσιάζουν έντονο μεταβολισμό και μπορεί να περιέχουν το σύμπλεγμα I σε μεγαλύτερη ποσότητα.

Η διαταραχή του συμπλέγματος I (εάν υπάρχει) σε συνδυασμό με διάφορους ενδογενείς παράγοντες των ντοπαμινεργικών νευρώνων της μέλαινας ουσίας, πιθανόν να καθιστά τους νευρώνες αυτούς ιδιαίτερα ευαίσθητους στη δράση πολλών περιβαλλοντικών τοξινών που προκαλούν αναστολή του συμπλέγματος I των μιτοχονδρίων. Τέλος, η δυσλειτουργία αυτή του συμπλέγματος I πιθανόν να κάνει τους νευρώνες ακόμα περισσότερο ευάλωτους στο οξειδωτικό stress και τη διεγερτικονευροτοξικότητα, που αναπτύσσονται αναλυτικά παρακάτω.

Οξειδωτικό Stress

Εκτός από τον σημαντικό ρόλο που παίζουν τα μιτοχόνδρια στην παραγωγή ATP, αποτελούν και την κύρια πηγή παραγωγής ελευθέρων ριζών οξυγόνου. Κατά την οξειδωτική φωσφορυλίωση το μοριακό οξυγόνο ανάγεται σε νερό. Ένα μικρό ποσοστό του μοριακού οξυγόνου ανάγεται, μη ενζυματικά, από ελεύθερα ηλεκτρόνια που διαρρέουν από την αναπνευστική αλυσίδα, σε υπεροξειδίο του οξυγόνου, υπεροξειδίο του υδρογόνου και άλλες ελεύθερες ρίζες οξυγόνου (Reactive Oxygen Species/ ROS). Τα μόρια αυτά αντιδρούν με τις πρωτεΐνες, τα λιπίδια και το DNA και προκαλούν οξειδωτική βλάβη. Διάφοροι μηχανισμοί προστατεύουν το κύτταρο από τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου όπως η γλουταθειόνη (GSH). Η ανεπάρκεια του συμπλέγματος I οδηγεί σε αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών οξυγόνου, οι οποίες με τη σειρά τους μπορεί να υπερβαίνουν τις δυνατότητες εξουδετέρωσης των προστατευτικών αυτών μηχανισμών. Αντίθετα, ανεπάρκεια των μηχανισμών αυτών της εξουδετέρωσης, π.χ. της γλουταθειόνης μπορεί να προκαλέσει οξειδωτική βλάβη στο σύμπλεγμα I της αναπνευστικής αλυσίδας και να οδηγήσει σε αναστολή της λειτουργίας του (Gandhi et al., 2005).

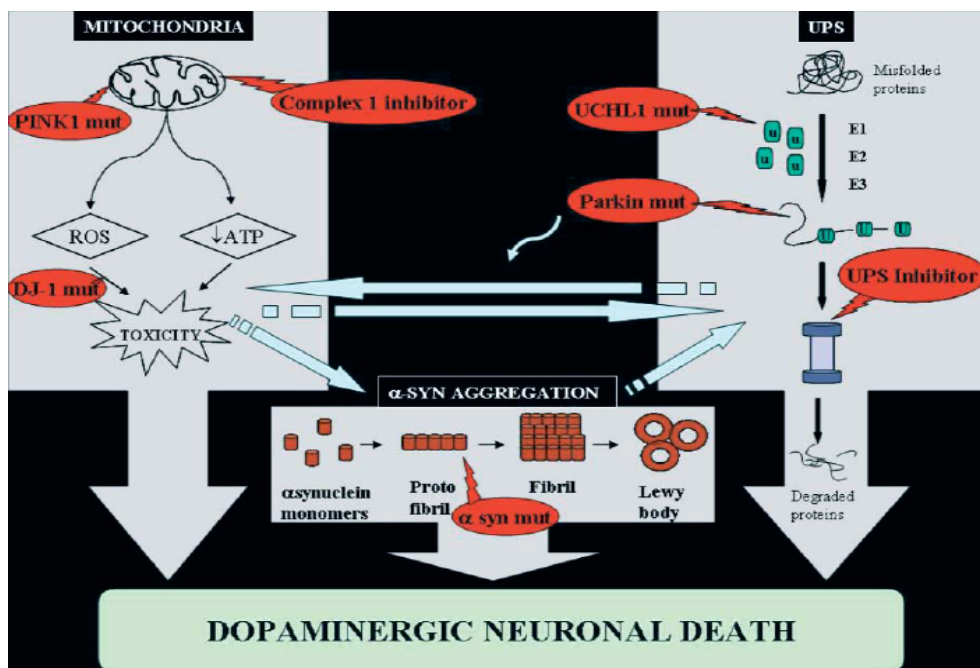
Εκτός από τα μιτοχόνδρια, ROS παράγονται και ως παραπροϊόντα του μεταβολισμού και της αυτο-οξειδωσίας της ντοπαμίνης. Τόσο ο ενζυματικός όσο και ο χημικός μεταβολισμός της ντοπαμίνης έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία υπεροξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂) και κατά συνέπεια στη γένεση μιας ισχυρά κυτταροτοξικής ελεύθερης ρίζας υδροξυλίου.

Ως εκ τούτου, οξειδωτικό stress και επακόλουθος κυτταρικός θάνατος μπορεί να προκληθεί στη μέλαινα ουσία υπό συγκεκριμένες συνθήκες στις οποίες υπάρχει 1) αυξημένος μεταβολισμός της ντοπαμίνης 2) ανεπάρκεια της γλουταθειόνης.

Διεγερτική νευροδιαβίβαση και τοξικότητα

Η διεγερτική νευροδιαβίβαση έχει κατά καιρούς ενοχοποιηθεί για τη νευροεκφύλιση στη νόσο του Parkinson, την οποία φαίνεται να προκαλεί μέσω δύο υποθετικών μηχανισμών. Ο πρώτος αφορά τη θεωρία της «**ισχυρής διεγερτικής νευροδιαβίβασης**» συνέπεια αυξημένης σύνθεσης γλουταμικού. Οι ντοπαμινεργικοί νευρώνες φέρουν πληθώρα υποδοχέων του γλουταμικού και δέχονται πυκνή γλουταματεργική νεύρωση τόσο από το φλοιό, όσο και από τον υποθαλάμιο πυρήνα. Η

δεύτερη αφορά τη θεωρία της «ασθενούς διεγερτικής νευροδιαβίβασης». Η διεγερτική νευροδιαβίβαση ως γνωστόν χρησιμοποιεί τεράστια ποσά κυτταρικής ενέργειας. Η έλλειψη ATP οδηγεί σε μείωση της λειτουργίας της K^+/Na^+ ΑΤΡάσης με αποτέλεσμα τη μερική μόνο εκπόλωση της νευρωνικής κυτταρικής μεμβράνης και την επακόλουθη μείωση της αναστολής του NMDA υποδοχέα του γλουταμικού που εξαρτάται από τη διαφορά δυναμικού και το Mg. Υπό αυτές τις συνθήκες, ακόμα και φυσιολογικά επίπεδα του διεγερτικού νευροδιαβιβαστή γλουταμικού μπορεί να προκαλέσουν ενεργοποίηση των NMDA υποδοχέων και ενδοκυττάρια εισροή μεγάλων ποσοτήτων ιόντων ασβεστίου. Η ενδοκυττάρια είσοδος του ασβεστίου μπορεί να επιμηκυνθεί σε διάρκεια ή και να αυξηθεί σε ποσότητα λόγω της μειωμένης ικανότητας των μιτοχονδρίων να ρυθμίσουν το ενδοκυττάριο ασβέστιο, αλλά και λόγω της μειωμένης λειτουργίας της ΑΤΡάσης ασβεστίου. Επιπρόσθετα, η υπερφόρτιση των μιτοχονδρίων με ασβέστιο μπορεί να οδηγήσει στην εκπόλωση των μιτοχονδρίων και την περαιτέρω παραγωγή ελευθέρων ριζών οξυγόνου. Η διεγερτικοτοξική βλάβη θεωρείται ότι πραγματοποιείται μέσω του μονοξειδίου του αζώτου (NO). Μία αύξηση στο ενδοκυττάριο ασβέστιο έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της NOS και κατά συνέπεια την αύξηση της παραγωγής NO. Το NO στη συνέχεια αντιδρά με ρίζες υπεροξειδίου και συνθέτει ρίζες OH και peroxynitrite (Jain et al., 2005).



Γενετικοί παράγοντες

Οι περισσότερες περιπτώσεις της νόσου του Parkinson (>80%) είναι σποραδικές, ενώ η κληρονομική μορφή της νόσου είναι σχετικά σπάνια. Οι συχνότερα χρησιμοποιούμενες είναι οι μελέτες διδύμων, οι επιδημιολογικές μελέτες ασθενών-μαρτύρων για τον υπολογισμό του κινδύνου εμφάνισης της νόσου σε συγγενείς ασθενών σε σχέση με συγγενείς μαρτύρων και μελέτες οικογενειών που μελετούν τον τρόπο κληρονομικής μεταβίβασης της νόσου.

Μορφές της νόσου του Parkinson που κληρονομούνται σύμφωνα με τους Μενδελικούς κανόνες

Μέχρι σήμερα 6 **μονογονιδιακές** μορφές της νόσου του Parkinson έχουν βρεθεί και άλλοι 6 γενετικοί τόποι έχουν συνδεθεί με τη νόσο σε διάφορες οικογένειες, οι υπεύθυνες γενετικές βλάβες όμως παραμένουν ακόμα άγνωστες.

1. α-συνουκλεΐνη-PARK1.

Το γονίδιο της α-συνουκλεΐνης είναι το πρώτο γονίδιο του οποίου μεταλλάξεις αποδείχθηκε ότι ευθύνονται για την πρόκληση της νόσου του Parkinson. Η ανακάλυψη αυτή αποτελεί την πρώτη ισχυρή ένδειξη εμπλοκής γενετικών παραγόντων στην αιτιοπαθογένεια της νόσου (Recchia A et al., 2004).

Η α-συνουκλεΐνη είναι μια πρωτεΐνη με 140 αμινοξέα που εκφράζεται κυρίως στους νευρώνες. Η φυσιολογική της λειτουργία παραμένει ουσιαστικά άγνωστη. Φαίνεται όμως ότι παίζει ρόλο στην πλαστικότητα των συνάψεων και στην αποθήκευση της ντοπαμίνης στα συναπτικά κυστίδια. Η εμπλοκή της στην αιτιοπαθογένεια της νόσου του Parkinson, ενισχύθηκε από το γεγονός ότι η α-συνουκλεΐνη βρέθηκε να αποτελεί το κύριο συστατικό των σωματίων Lewy, που χαρακτηρίζουν παθολογοανατομικά τη νόσο. Οι μεταλλαγμένες ισομορφές της πρωτεΐνης μεταβολίζονται βραδύτερα από ότι οι φυσιολογικές, με αποτέλεσμα να συσσωρεύονται σε παθολογικές δομές προσδίδοντάς της τοξικές ιδιότητες.

2. Παρκίνη-PARK2.

Το υπεύθυνο γονίδιο για τον νεανικό παρκινσονισμό εντοπίζεται σε μια περιοχή στο μακρύ σκέλος του χρωμοσώματος 6, την 6q25.2-27 και κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη 465 αμινοξέων που μοιάζει με την ubiquitine και ονομάστηκε παρκίνη και το

μεταλλαγμένο γονίδιο parkin gene. Σε ασθενείς με νεανικό παρκινσονισμό από μη συγγενικές οικογένειες διαπιστώθηκε μετάλλαξη (deletion) στο εξόνιο 4 του γονιδίου αυτού (Dawson, 2006).

Η παρκίνη είναι μια πρωτεΐνη με δράση λιγκάσης, της ubiquitine (E3 ubiquitine ligase), και συμμετέχει στο πρωτεασωματικό σύστημα αποδόμησης πρωτεϊνών μέσω της ουμπικουϊτίνης (Shimura et al., 2000).

3. L1-Υδρολάση της Ubiquitin-PARK5.

Σε δύο πάσχοντα μέλη μιας Γερμανικής οικογένειας με κληρονομική μορφή της νόσου του Parkinson και αυτόσωμη επικρατή κληρονομικότητα ταυτοποιήθηκε μια σημειακή μετάλλαξη στο γονίδιο της Ubiquitine Hydrolase L1 (UCH-L1)(Morris, 2005). Η μεταλλαγμένη μορφή της πρωτεΐνης παρουσίαζε μειωμένη δραστηριότητα, η οποία πιθανόν να συνεπάγεται διαταραχή της αποδόμησης των πρωτεϊνών μέσω του προαναφερθέντος συστήματος ουμπικουϊτίνης-πρωτεασώματος.

4. Γονίδιο DJ-1-PARK7.

Πολύ πρόσφατα σε δύο αιμομικτικές οικογένειες με αυτόσωμη υπολειπόμενη κληρονομικότητα και πρόωμη έναρξη της νόσου βρέθηκαν 2 μεταλλάξεις στο γονίδιο DJ-1 (Bonifati et al 2003). Από ερευνητικές μελέτες, οι μεταλλάξεις του γονιδίου DJ-1 αφορούν κυρίως ασθενείς με νόσο πρόωμης έναρξης, παρατηρούνται σε ποσοστό περίπου 1%, ενώ δεν φαίνεται προς το παρόν να συσχετίζονται με την νόσο όψιμης έναρξης.

Η πρωτεΐνη DJ-1 εμπλέκεται στον έλεγχο της ρύθμισης των γονιδίων και εντοπίζεται τόσο στον πυρήνα όσο και στο κυτταρόπλασμα σε διάφορους τύπους κυττάρων. Φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στη λειτουργία ιστών όπως οι όρχεις και ο εγκέφαλος. Πολύ πρόσφατα, η πρωτεΐνη DJ-1 εντοπίστηκε σε έγκλειστα που περιέχουν πρωτεΐνη TAU και χαρακτηρίζουν πληθώρα νευροεκφυλιστικών διαταραχών που καλούνται Tauopathies (Rizzu et al 2004). Η σημειακή μετάλλαξη (L166P) κάνει την πρωτεΐνη DJ-1 εξαιρετικά ασταθή και προάγει την αποδόμηση της μέσω τους συστήματος ουμπικουϊτίνης-πρωτεασώματος (Riess et al., 2006). Έτσι μειώνονται σημαντικά τα επίπεδα της φυσιολογικής πρωτεΐνης με λειτουργικά αποτελέσματα όμοια με εκείνα της απαλοιφής.

5. Γονίδιο *PINK-1*.

Πρόκειται για μία κινάση, η οποία φωσφορυλιώνει πρωτεΐνες της κατηγορίας σερίνης-θρεονίνης σε μια περιοχή που την κατευθύνει στα μιτοχόνδρια. Πρόσφατα ανευρέθησαν δύο σημειακές μεταλλάξεις σε Ισπανικές και Ιταλικές οικογένειες στο γονίδιο που κωδικοποιεί την *PINK-1*.

Λόγω της παρουσίας των μεταλλάξεων και στους δύο γονείς των ασθενών (αυτοσωμική υπολειπόμενη μορφή κληρονομικότητας) και της θέσης των μεταλλάξεων στην περιοχή της κινάσης, θεωρείται ότι η νόσος του Parkinson σε αυτές τις οικογένειες οφείλεται σε απώλεια λειτουργίας της *PINK-1* (Gandhi et al., 2006).

6. *LRRK 2-PARK8*

Το πιο πρόσφατο και πιθανόν πιο σημαντικό γονίδιο για την εμφάνιση της PD ταυτοποιήθηκε στον γενετικό τόπο *PARK8* που βρίσκεται στο χρωμόσωμα 12q12 σε μια Ιαπωνική οικογένεια, καθώς και σε αρκετές Ευρωπαϊκές.

Η *Lrrk 2* είναι μια μεγάλη πολύ-λειτουργική πρωτεΐνη και φαίνεται να εκφράζεται σε αρκετές εγκεφαλικές περιοχές. Είναι μέλος της οικογένειας *ROCO* (Riess et al., 2006).

Κλινικά, τα άτομα με μεταλλάξεις στο ***LRRK2*** γονίδιο έχουν συμπτώματα παρόμοια με την τυπική όψιμη έναρξης PD, χωρίς ωστόσο να παρατηρούνται γνωστικά ελλείμματα ακόμη και μετά από μεγάλη διάρκεια της ασθένειας. Η ανακάλυψη της συμμετοχής των τεσσάρων αυτών πρωτεϊνών: α-συνουκλεΐνης, παρκίνης, *UCH-L1* και *DJ-1* στην αιτιοπαθογένεια της οικογενούς μορφής της νόσου του Parkinson εμπλέκει ισχυρά την οδό ουμπικουιτίνης-πρωτεασώματος που χρησιμοποιείται από το κύτταρο για την αποδόμηση ορισμένων πρωτεϊνών. Θεωρείται ότι η ελαττωματική αποδόμηση των πρωτεϊνών αυτών (όπως της α-συνουκλεΐνης) έχει ως αποτέλεσμα την εκλεκτική καταστροφή των νευρικών κυττάρων που χαρακτηρίζει τη νόσο. Η όλη ενοποιημένη θεωρία της εμπλοκής του πρωτεασώματος στην αιτιοπαθογένεια της νόσου αναπτύσσεται διεξοδικότερα παρακάτω.

Gene	Inheritance	Locus	Clinical features	Histopathology
<i>α-synuclein</i>	AD	PARK1/4 (4q21)	Ala53Thr: early onset, rapid progression Ala30Pro: typical parkinsonian phenotype Glu46Lys: cognitive decline, hallucinations Duplication: typical parkinsonian phenotype Tripllication: early onset, rapid progression, dementia, early death	SN degeneration, Lewy body pathology in substantia nigra, cortex and hippocampus
<i>Parkin</i>	AR	PARK2 (6q25-27)	Early disease onset, resembles idiopathic PD phenotype, slow disease progression, good response to levodopa, early dyskinesias, diurnal fluctuation and sleep relief	SN degeneration in the absence of Lewy bodies. Lewy body pathology reported in compound heterozygous carriers
Unknown	AD	PARK3 (2p13)	Typical parkinsonian phenotype	Nigral Degeneration with Lewy bodies
<i>UCH-L1</i>	AD	PARK5 (4p14)	Typical parkinsonian phenotype	N/A
<i>PINK1</i>	AR	PARK6 (1p35-36)	Early disease onset, levodopa responsive, slow progression, dyskinesias	N/A
<i>DJ-1</i>	AR	PARK7 (1p36)	Early disease onset, levodopa responsive. Dystonia and psychiatric features reported	N/A
<i>LRRK2</i>	AD	PARK8 (12q12)	Predominantly levodopa responsive parkinsonism for all mutations. Supranuclear gaze palsy, dystonia, dementia and motor neuron disease is described in some individuals	All had SN degeneration. Variable additional pathology: novel ubiquitin positive inclusions and MND (Tyr1699Cys), tau pathology (Arg1441Cys), Lewy bodies (Gly2019Ser, Arg1441Cys), no additional pathology (Arg1441Cys)
Unknown	N/A	PARK10 (1p32)	Typical parkinsonian phenotype	N/A
Unknown	N/A	PARK11 (2q36-37)	Typical parkinsonian phenotype	N/A

AD, autosomal dominant; AR, autosomal recessive; SN, substantia nigra; N/A, not available; MND, motor neuron disease (amyotrophic lateral sclerosis).

Το σύστημα ουμπικουϊτικής πρωτεασώματος και η εμπλοκή του στην αιτιοπαθογένεια της νόσου

Το σύστημα ουμπικουϊτικής-πρωτεασώματος αποτελεί το βασικό μηχανισμό της μη λυσοσωματικής αποδόμησης και κάθαρσης των παθολογικών, μεταλλαγμένων, εκτοπισθέντων, κατεστραμμένων ή βεβλαμμένων πρωτεϊνών των ευκαρυωτικών κυττάρων (Wang et al., 2006). Ελέγχει επίσης μέσω ταχείας αποδόμησης, το 30% των νεοσυντιθέμενων πρωτεϊνών, οι περισσότερες από τις οποίες είναι πρωτεΐνες βραχείας διάρκειας που υπεισέρχονται στη μεταγραφή του DNA και της νευροδιαβίβασης. Αυτή η διαδικασία είναι σημαντική για ένα μεγάλο αριθμό κυτταρικών γεγονότων όπως ο κυτταρικός κύκλος, η ανοσολογική απάντηση, ο μεταβολισμός και η μετάδοση σήματος. Προκειμένου οι πρωτεΐνες αυτές να αποδομηθούν μέσω του μηχανισμού αυτού θα πρέπει κατ' αρχήν να συνδεθούν με μια αλυσίδα μορίων ουμπικουϊτικής. Η προσθήκη πολλαπλών μορίων ουμπικουϊτικής στις πρωτεΐνες-υποστρώματα είναι το σήμα που θα αναγνωρίσει το πρωτεάσωμα.. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται με τη βοήθεια ενός συστήματος τριών ενζύμων (E1, E2, E3) (McNaught et al., 2006).

Ανεπάρκεια του συστήματος ουμπικουϊτικής-πρωτεασώματος να αποδομήσει πλήρως τις ανεπιθύμητες πρωτεΐνες έχει σαν συνέπεια τη συσσώρευση τους και το

σχηματισμό αδιάλυτων εγκλείστων που τελικά θα οδηγήσουν στη διαταραχή της κυτταρικής ομοιόστασης και τη διάσπαση της κυτταρικής ακεραιότητας.

Συνουκλεΐνη και Πρωτεάσωμα

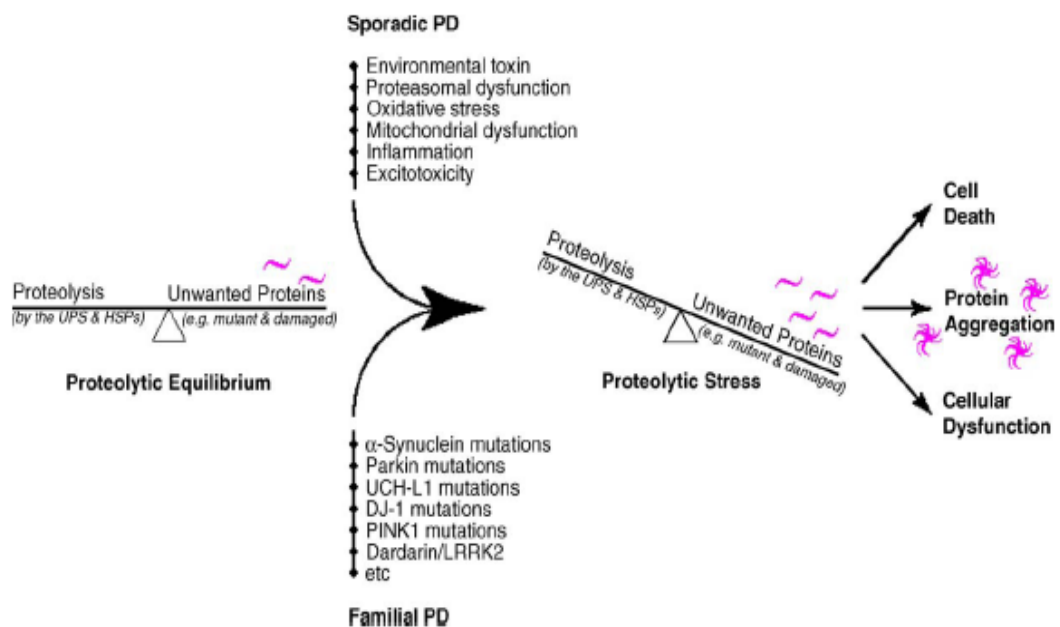
Η φυσιολογική συνουκλεΐνη αποδομείται από το πρωτεάσωμα αλλά η μεταλλαγμένη συνουκλεΐνη είναι ανθεκτική στην πρωτεόλυση (Giorgi et al., 2006). Σε καλλιέργειες PC12 κυττάρων η έκφραση μεταλλαγμένης συνουκλεΐνης αναστέλλει τη λειτουργία του πρωτεασώματος και οδηγεί στη συσσώρευση ατελώς αποδομημένων ουμπικουΐτινωμένων πρωτεϊνών, στο σχηματισμό κυτταρικών εγκλείστων και στον κυτταρικό θάνατο (Beyer et al., 2006).

Συμπερασματικά, η αποτυχία του συστήματος ουμπικουΐτίνης-πρωτεασώματος να αποδομήσει τη μεταλλαγμένη α-συνουκλεΐνη μπορεί να εξηγεί τη συσσώρευση της α-συνουκλεΐνης καθώς και άλλων πρωτεϊνών στα σωματία Lewy με τελικό αποτέλεσμα τη διαταραχή της κυτταρικής λειτουργίας και τη νευροεκφύλιση.

Ο ρόλος των σωματίων Lewy

Τα σωματία Lewy βρίσκονται στη μέλαινα ουσία αλλά και σε άλλες περιοχές στους εγκεφάλους ασθενών με νόσο του Parkinson. Παρατηρούνται όμως και στο φλοιό ασθενών που πάσχουν από άνοια σωματίων Lewy (LBD), νόσο Alzheimer (AD) και ILBD. Πρόσφατες μελέτες υποστηρίζουν το ότι τα σωματία Lewy σχετίζονται με τα «**συσσωρεύματα**» (aggresomes) (McNaught et al 2006). Τα συσσωρεύματα είναι κυτταροπλασματικά έγκλειστα που σχηματίζονται στο κεντρόσωμα και αποτελούν ένα κυτταροπροστατευτικό μηχανισμό συσσώρευσης δυνητικά τοξικών πρωτεϊνών και ευόδωσης της αποδόμησης τους μέσω του πρωτεασώματος (Gandhi et al., 2005). Αυτή η διεργασία λαμβάνει χώρα υπό φυσιολογικές και μη συνθήκες. Η παρουσία παρόμοιων πρωτεϊνών στα συσσωματώματα αυτά και στα σωματία Lewy ενισχύει τη θεωρία σύμφωνα με την οποία τα σωματία Lewy αποτελούν έναν κυτταροπροστατευτικό μηχανισμό που σκοπό έχει τον έλεγχο των επιπέδων των ανεπιθύμητων πρωτεϊνών στο κύτταρο (Jose et al., 2000). Η δυσλειτουργία του πρωτεασώματος που παρατηρείται στη σποραδική νόσο του Parkinson ή και η αυξημένη παραγωγή παθολογικών πρωτεϊνών στις οικογενείς μορφές της νόσου έχουν σαν τελικό αποτέλεσμα την συσσώρευση ανεπιθύμητων πρωτεϊνών, τη δημιουργία αδιάλυτων εγκλείστων και τη μετατροπή των συσσωματωμάτων (aggressomes) σε σωματία Lewy.

Συμπερασματικά, λοιπόν, η αδυναμία του πρωτεασώματος να αποδομήσει επαρκώς τις ανεπιθύμητες πρωτεΐνες αποτελεί κοινό χαρακτηριστικό τόσο της οικογενούς όσο και της σποραδικής μορφής της νόσου. Σε αυτό μπορεί να συμβάλλουν: 1) η παραγωγή παθολογικών πρωτεϊνών ανθεκτικών στην πρωτεασωμική πρωτεόλυση (π.χ. μεταλλαγμένη α-συνουκλείνη), 2) η διαταραχή της προσθήκης μορίων ουμπικουϊτίνης στις πρωτεΐνες (μεταλλάξεις της παρκίνης), 3) η μειωμένη αφαίρεση των μορίων ουμπικουϊτίνης από τις πρωτεΐνες και η ανεπαρκής ανακύκλωση των ελεύθερων μορίων της (μεταλλάξεις στη UCHL-1), 4) οι διαταραχές στο ίδιο το πρωτεάσωμα (ενεργειακή ένδεια του κυττάρου, μιτοχονδριακή δυσλειτουργία, οξειδωτική βλάβη, περιβαλλοντικοί παράγοντες, ηλικία) (BenMoyal-Segal et al. 2006).



Εικόνα 9. Περιβαλλοντικοί, γενετικοί και ενδογενείς παράγοντες προκαλούν το θάνατο των ντοπαμινεργικών νευρώνων μέσω διαταραχής της πρωτεασωμικής λειτουργίας τους (BenMoyal-Segal et al. 2006).

PRION DISEASES

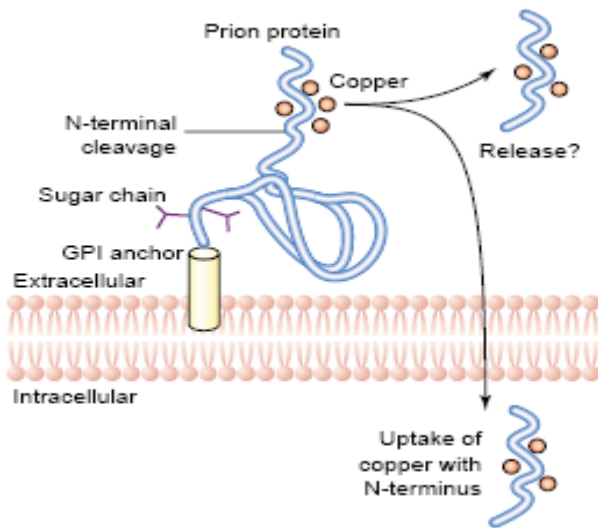
PrP ΠΡΩΤΕΪΝΗ

Η πρωτεΐνη Prion (PrP) συνδέεται με ποικίλες μορφές μεταδοτικής σπογγώδους εγκεφαλοπάθειας (Transmissible Spongiform Encephalopathy - TSEs) στον άνθρωπο, οι οποίες και αποτελούν ομάδα σπανίων μεταδοτικών νοσημάτων του ΚΝΣ με χαρακτηριστικές παθολογοανατομικές αλλοιώσεις, όπως σχηματισμό κενотоπίων, γλοιώση, έκπτωση νευρικών κυττάρων και σπογγώδη εκφύλιση του εγκεφάλου. Δεν παρουσιάζουν φλεγμονώδη αντίδραση και ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος με σχηματισμό αντισωμάτων. Οι ανθρώπινου τύπου TSEs χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες, την κληρονομική, την σποραδική και την επίκτητη (μολυσματικού τύπου) και ταξινομούνται στην Creutzfeldt-Jakob disease (CJD), Gerstmann-Sträussler-Scheinker disease (GSS), Kuru και την πρόσφατα μελετημένη variant CJD (v CJD).

Δομή PrP πρωτεΐνης

Ο γονιδιακός τόπος της πρωτεΐνης PrP βρίσκεται στο βραχύ βραχίονα του χρωμοσώματος 20 στο ανθρώπινο γονιδίωμα. Έως σήμερα, 2 γονίδια έχουν χαρτογραφηθεί σε αυτή την περιοχή, το *PRNP* γονίδιο και το Doppel (*PRND*). Το *PRNP* είναι ένα μοναδιαίο γονίδιο, το οποίο εκτείνεται σε μια περιοχή γύρω στα 20kb, αποτελείται από 2 εξόνια και κωδικεύει μια πρωτεΐνη (PrP^c) αποτελούμενη από 209 αμινοξέα. Στο καρβοξυτελικό της άκρο, η PrP^c έχει μια GPI (glycosylphosphatidylinositol) περιοχή που της επιτρέπει την πρόσδεση στην κυτταρική μεμβράνη. Η ευρύτερη καρβοξυτελική περιοχή σχηματίζει ένα πιο στέρεο, σφαιρικό τμήμα, το οποίο περιέχει τρεις α-έλικες και ένα μικρότερο αντιπαράλληλο β-πτυχωτό (*b-sheet*) δύο αλυσίδων. Αυτή η περιοχή σταθεροποιείται από ένα δισουλφιδικό δεσμό και περιέχει δύο σημεία N-linked γλυκοζυλίωσης (Teun van Rheede et al., 2002). Η αμινοτελική περιοχή της PrP^c περιέχει 5 επαναλαμβανόμενα οκταπεπτίδια, που εκτείνονται στην περιοχή 51-91, με δύο ενδεχόμενα γλυκοζυλιωμένα τμήματα στις περιοχές 181 και 197. Η περιοχή αυτή με τα επαναλαμβανόμενα οκταμερή βρέθηκε ότι προσδένει ειδικά μέχρι και 5 άτομα χαλκού (Cu) (Laffont-Proust et al., 2005). Με κατάτμηση της πρωτεΐνης στην αμινοτελική περιοχή απελευθερώνεται μαζί και χαλκός

είτε στο εσωτερικό του κυττάρου είτε στη σύναψη ανάλογα με τη θέση της πρωτεΐνης (Brown et al., 2001).



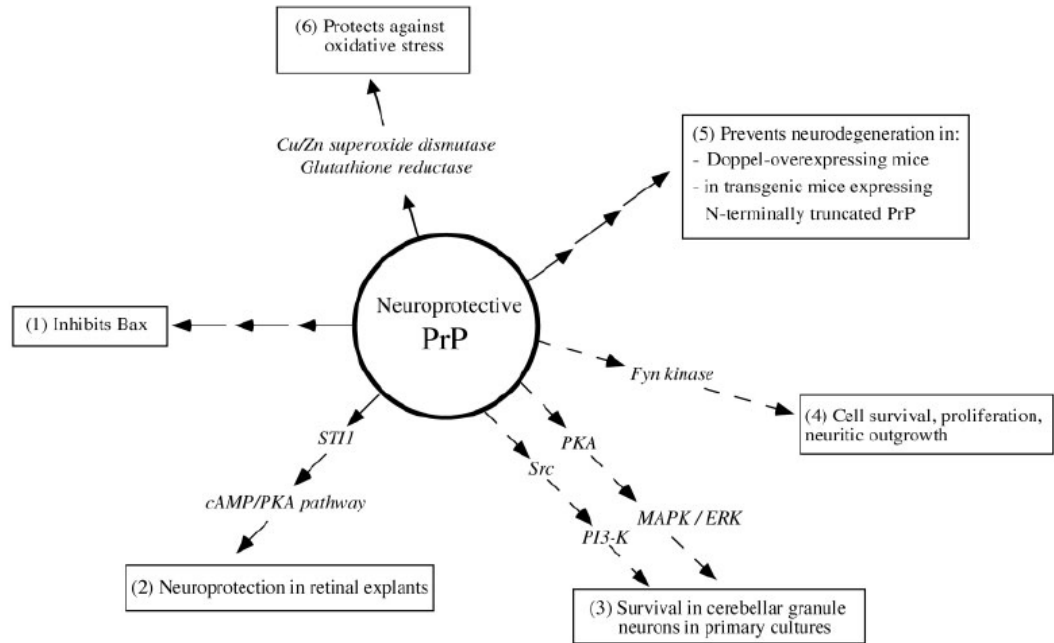
Στερεοταξική αλλαγή της δευτεροταγούς δομής του μορίου έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή της παθολογικής μορφής της πρωτεΐνης, την PrP^{Sc}, μια ισομορφή ανθεκτική στις πρωτεάσες (Pan et al., 1993). Αυτή η μετάβαση (transition) συμβαίνει στο στάδιο της μετάφρασης και περιλαμβάνει μια αύξηση του β -πτυχωτού πεδίου από 3% έως 40% περίπου, καθώς και μια μείωση της δομής της α -έλικας από 40% σε 30%. Μελέτες υποστηρίζουν ότι η PrP^{Sc} μπορεί να προκαλέσει μία α -έλικα να μετατραπεί σε β -πτυχωτό πεδίο (Caughey et al., 2003). Το ισομερές αυτό προέρχεται από το φυσιολογικό πρόδρομο ισομερές με μία επιπλέον μετα-μεταφραστική ωρίμανση που αλλάζει τη δευτεροταγή της δομή.



Λειτουργία της PrP^c πρωτεΐνης

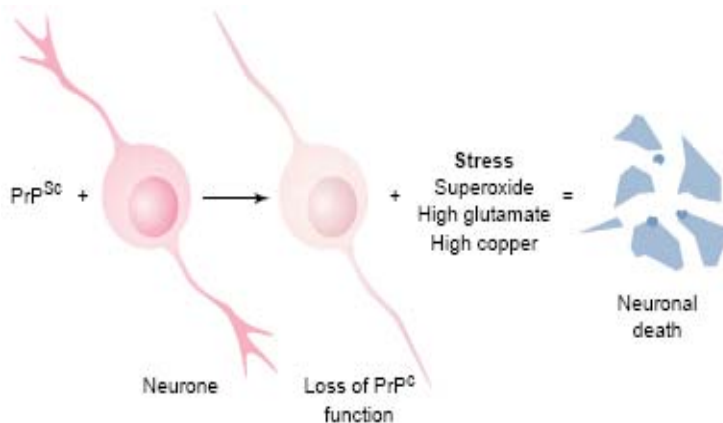
Η ακριβής λειτουργία της φυσιολογικής κυτταρικής πρωτεΐνης (PrP^c) παραμένει άγνωστη. Η PrP^c εκφράζεται στην επιφάνεια πολλών κυττάρων και ανιχνεύεται στην κυτταρική μεμβράνη νευρικών και μυϊκών κυττάρων αλλά και λευκών αιμοσφαιρίων. Για το λόγο αυτό, δεν μπορεί να αποδοθεί μόνο νευρωνική λειτουργία στην πρωτεΐνη αυτή. Ωστόσο, το γεγονός ότι η PrP^c εκφράζεται στους νευρώνες σε υψηλότερα επίπεδα απ' ό,τι σε άλλους κυτταρικούς τύπους αποτελεί ένδειξη ότι η πρωτεΐνη αυτή έχει κάποιο πιο συγκεκριμένο ρόλο στο νευρικό σύστημα (Herms et al., 1999).

Σε κυτταρικό επίπεδο, τα μεταλλαγμένα ως προς την PrP^c κύτταρα είναι λιγότερο βιώσιμα από ό,τι τα αγρίου τύπου, καθώς και περισσότερο ευαίσθητα σε οξειδωτική βλάβη και τοξικότητα προκαλούμενη από στοιχεία, όπως ο χαλκός. Μελέτες δείχνουν αύξηση της έκφρασης της πρωτεΐνης σε περιπτώσεις stress που προκαλείται από οξειδωτική βλάβη (Guentchev et al., 2000). Η PrP^c φαίνεται κατά την ενεργοποίησή της να αποτρέπει τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο και την απόπτωση που διαμεσολαβείται από Bax (Bounhar et al., 2001). Παρατηρούνται, επίσης, δομικές αλλαγές στο σχηματισμό των συνάψεων σε ποντίκια μεταλλαγμένα ως προς την PrP^c. Είναι γνωστό ότι με κατάτμηση της πρωτεΐνης στην αμινοτελική περιοχή απελευθερώνεται μαζί και χαλκός είτε στο εσωτερικό του κυττάρου είτε στη σύναψη ανάλογα με τη θέση της πρωτεΐνης. Ωστόσο, ο ακριβής ρόλος του χαλκού στη σύναψη παραμένει ασαφής. Φαίνεται ότι ανισορροπία των επιπέδων χαλκού στη σύναψη έχει ως αποτέλεσμα τη διατάραξη της λειτουργίας των υποδοχέων, όπως την αναστολή της λειτουργικότητας των GABAεργικών υποδοχέων και μείωση της LTP (Rachidi et al., 2003). Μελέτες σε ζώα μεταλλαγμένα ως προς την PrP^c (PrP^c KO) έδειξαν ότι απουσία της PrP^c, οι συνάψεις είναι πιο ευαίσθητες στις επιβλαβείς επιδράσεις του χαλκού στη νευροδιαβίβαση. Τα παραπάνω δεδομένα αποτελούν ένδειξη για πιθανή προστατευτική λειτουργία της PrP^c τόσο σε επίπεδο κυτταρικό όσο και σε συστηματικό επίπεδο.



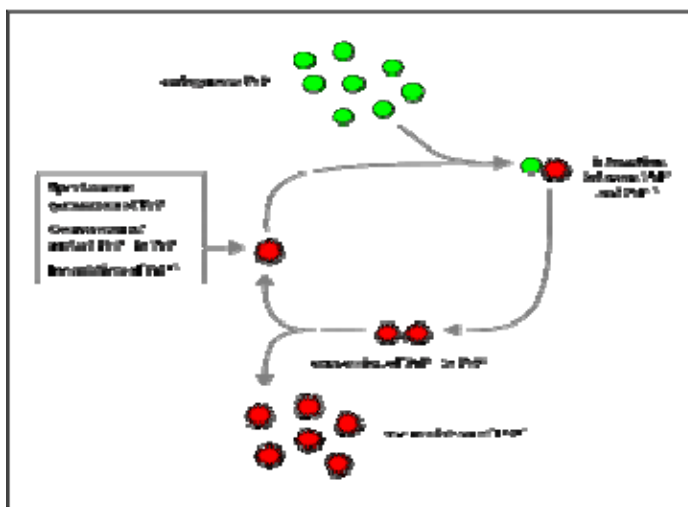
Η Θεωρία των Prions

Στερεοταξική αλλαγή της δευτεροταγούς δομής του μορίου της PrP πρωτεΐνης έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή της παθολογικής μορφής της, PrP^{Sc}, μια ισομορφή ανθεκτική στις πρωτεάσες και υπεύθυνη για την εμφάνιση σπογγώδων εγκεφαλοπάθειων. Η μετατροπή της PrP^c σε PrP^{Sc} πραγματοποιείται διαμεμβρανικά.. Η ακριβής δράση της PrP^{Sc} κατά την είσοδο της εντός του νευρικού κυττάρου δεν έχει πλήρως εξακριβωθεί. Εικάζεται μια αλυσιδωτή αντίδραση που τελικά επιφέρει μετατροπή της φυσιολογικής PrP^c στην παθολογική μορφή της (PrP^{Sc}) και αυξημένη συγκέντρωσή της στο κυτταρόπλασμα των γλοιακών και στους δενδρίτες των νευρικών κυττάρων (Kaneko et al., 1995).



Μικροσκοπικά η συσσώρευση της PrP^{Sc} προκαλεί το σχηματισμό πλακών αμυλοειδούς που εναποτίθενται εξωτερικά των κυττάρων και οδηγεί σε κυτταρική νέκρωση και μακροσκοπικά σε σπογγώδη εκφύλιση του εγκεφαλικού παρεγχύματος (Teun van Rheede et al. 2003).

Οι ασθένειες Prion διακρίνονται σε κληρονομικού, σποραδικού και μολυσματικού τύπου. Οι κληρονομικοί τύποι συνδέονται με μεταλλάξεις στο γονίδιο της Prion, οι οποίες αυξάνουν την μετάβαση από PrP^c σε PrP^{Sc}. Στις σποραδικές περιπτώσεις, η αλλαγή αυτή μπορεί να προκληθεί από αυθόρμητη λάθος αναδίπλωση της PrP^c.



Η νόσος Creutzfeldt-Jakob (CJD)

Αποτελεί μια ταχέως εξελισσόμενη θανατηφόρο εκφυλιστική νόσο του ΚΝΣ, που χαρακτηρίζεται κλινικά κυρίως από άνοια και ιστολογικά από σπογγώδη εκφύλιση του εγκεφαλικού ιστού.

Η συνηθέστερη μορφή (85-90%) της νόσου είναι η σποραδική (sCJD). Τα πρώτα συμπτώματα της νόσου παρατηρούνται σε ενήλικες 50-70 ετών. Συγχυτικά επεισόδια, διαταραχές μνήμης και συμπεριφοράς παρατηρούνται αρχικά στο 1/3 των ασθενών. Αταξία, εστιακή σημειολογία και διαταραχές όρασης αποτελούν τα πρώτα ευρήματα στο υπόλοιπο των ασθενών. Η κλινική εικόνα επιβαρύνεται ταχέως, ενώ στην πορεία η πλειοψηφία των ασθενών παρουσιάζουν μυοκλονίες. Στο τελικό στάδιο οι ασθενείς παρουσιάζουν εικόνα ακινητικής βωβότης (akinetetic mutism) και οι περισσότεροι (80%) καταλήγουν εντός έτους (Maltete et al., 2006). Η πλειοψηφία των ασθενών (94%)

παρουσιάζει στην πορεία χαρακτηριστικά ηλεκτρο-εγκεφαλογραφικά ευρήματα. Ο απεικονιστικός έλεγχος με μαγνητική τομογραφία αποτυπώνει στις T2 ακολουθίες τυπικές αλλοιώσεις των βασικών γαγγλίων με αυξημένο σήμα στο 79% των ασθενών. Σε ανάλογα ποσοστά ασθενών (80-90%) ανιχνεύονται αυξημένα επίπεδα πρωτεΐνης 14-3-3, S-100 και NSE στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό (ENY). Η βιοψία εγκεφάλου αναδεικνύει έκπτωση νευρικών κυττάρων, γλοιώση και σπογγώδη ατροφία του εγκεφαλικού παρεγχύματος. Σε ποσοστό μόλις 10% των ασθενών παρατηρούνται αμυλοϊδικές πλάκες, σε αντίθεση με τη νόσο Kuru και την nvCJD, όπου στη συντριπτική τους πλειοψηφία οι ασθενείς παρουσιάζουν τέτοιου είδους πλάκες (Hill et al., 2003).

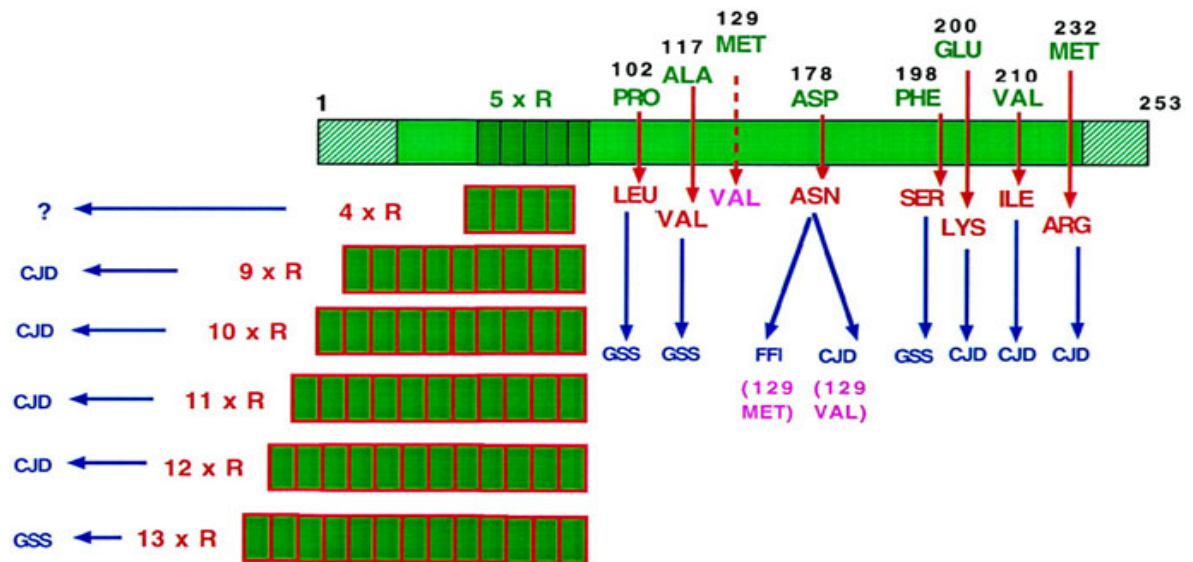
Η οικογενής μορφή της νόσου των Creutzfeldt-Jakob, η οποία αποτελεί το 10-15% του συνόλου των περιστατικών με CJD, οφείλεται σε μετάλλαξη στο γονίδιο της *PRNP* στο χρωμόσωμα 20. Η μορφή αυτή της νόσου και σε σύγκριση με τη σποραδική μορφή χαρακτηρίζεται από εμφάνιση σε νεότερη ηλικία, βραδύτερη εξέλιξη, φυσιολογικό ηλεκτροεγκεφαλογράφημα και απουσία της πρωτεΐνης 14-3-3 στο ENY (Gambetti et al., 2003).

Η Νέα Παραλλαγή της νόσου Creutzfeldt-Jakob (New-Variant Creutzfeldt-Jakob Disease-nvCJD) διαφέρει από τη σποραδική μορφή της νόσου ως προς τη μέση ηλικία προσβολής των ασθενών, τη μέση διάρκεια επιβίωσης και την αρχική εμφάνιση ψυχιατρικών και όχι ανοϊκών συμπτωμάτων. Οι ασθενείς με nvCJD παρουσιάζουν τα πρώτα συμπτώματα κατά μέσο όρο σε ηλικία 29 ετών, ενώ επιβιώνουν κατά μέσο όρο 14 μήνες. Οι αντίστοιχες μέσες τιμές για τους ασθενείς με τη σποραδική μορφή της CJD είναι το 60ο έτος της ηλικίας και μόλις 5 μήνες επιβίωσης. Χαρακτηριστικό επίσης είναι το γεγονός ότι το HEF των ασθενών με nvCJD δεν παρουσιάζει τα χαρακτηριστικά τριφασικά κύματα, τα οποία παρατηρούνται στη συντριπτική πλειοψηφία των ασθενών με τη σποραδική μορφή της νόσου. Αντιθέτως, ενώ η ιστολογική εξέταση των ασθενών με nvCJD παρουσιάζει στο σύνολο τους διάχυτο σχηματισμό αμυλοϊδικών πλακών, αντίστοιχα περιορισμένης έκτασης ευρήματα περιγράφονται μόλις στο 10% των ασθενών με τη σποραδική μορφή (Cali et al. 2006).

M129V πολυμορφισμός του *PRNP* γονιδίου και CJD

Ένας μεγάλος αριθμός μεταλλάξεων και πολυμορφισμών έχει αναφερθεί για το *PRNP* γονίδιο. Οι μεταλλάξεις συμπεριλαμβάνουν 24 σημειακές αλλαγές (missense

mutations), 27 μεταλλάξεις της οκταπεπτιδικής αλληλουχίας με ενθέσεις των 1, 2 και 4-9 επαναλήψεων (Makrinou et al., 2002).. Μέχρι σήμερα έχουν χαρακτηριστεί τρεις missense πολυμορφισμοί στα κωδικόνια 129 (M/V), 171 (N/S) και 219 (E/K), έλλειψη μιας οκταπεπτιδικής επαναλαμβανόμενης αλληλουχίας αποτελούμενη από 24bp και 12 σιωπηλοί πολυμορφισμοί (Kovacs et al., 2002).



Το *PRNP* γονίδιο έχει εμπλακεί στην παθογένεια της CJD. Ο πολυμορφισμός στο κωδικόνιο 129 του *PRNP* που κωδικεύει είτε τη μεθειονίνη (ATG ή Met) είτε τη βαλίνη (GTG ή Val) επηρεάζει την κλινικοπαθολογική εικόνα της σποραδικής CJD, καθώς και τον κλινικό φαινότυπο της οικογενούς CJD (McCormack et al., 2002).

Ομοζυγωτία της Met, η οποία παρατηρείται στο 80% περίπου των σποραδικών CJD περιπτώσεων, συνδέεται με τον κλασσικό φαινότυπο της CJD, ραγδαία προοδευτική άνοια, πρόωπη μυοκλονία και τυπικά ηλεκτρο-εγκεφαλογραφικά ευρήματα. Επίσης, στο 40% περίπου των περιπτώσεων εμφανίζει οπτική ανεπάρκεια. Αντίθετα, **ομοζυγωτία της Val** συνδέεται με αταξία κατά την έναρξη της νόσου, εμφάνιση στοιχείων γνωστικής ανεπάρκειας (mild cognitive impairment), μη τυπικά ηλεκτρο-εγκεφαλογραφικά ευρήματα και απουσία μυοκλονιών. Νευροπαθολογικά παρατηρείται εμπλοκή υποφλοιικών περιοχών, συμπεριλαμβανομένου και του πυρήνα του εγκεφαλικού στελέχους (Parchi et al., 1999). **Ετεροζυγωτία (Met/Val)**, η οποία φαίνεται να είναι λιγότερο συχνή στην CJD (9% των περιπτώσεων), χαρακτηρίζεται από μεγαλύτερο μέσο όρο διάρκειας των συμπτωμάτων και με μια αργή πορεία της νόσου συγκριτικά με τις περιπτώσεις ομοζυγωτίας, αταξία, υψηλή συχνότητα γνωστικής

ανεπάρκειας κατά την έναρξη και ιστοπαθολογικά κυρίως από την ύπαρξη αμυλοειδικών πλακών τύπου Kuru (Kovacs et al., 2000).

Ομοζυγωτία στο κωδικόνιο 129 του συγκεκριμένου πολυμορφισμού αποτελεί παράγοντα κινδύνου για την ανάπτυξη CJD. Μελέτες έχουν δείξει ότι ο γονότυπος της βαλίνης (Val) αυξάνει την παραγωγή της PrP^c και ο Met/Val διευκολύνει τη συσσώρευση της παθολογικής PrP^{sc} σε αμυλοειδικές πλάκες (Hauw et al., 2000).

M129V πολυμορφισμός και άνοια

Τις τελευταίες δεκαετίες παρατηρείται αυξημένο ενδιαφέρον για το ρόλο του M129V πολυμορφισμού του *PRNP* γονιδίου σε σχέση με τη γήρανση καθώς και με άλλες συνδεδεμένες με την ηλικία νευροεκφυλιστικές ασθένειες, συμπεριλαμβανομένου και της νόσου Alzheimer (AD).

Η AD, η πιο συχνή αιτία άνοιας και λειτουργικής ανικανότητας στην όψιμη ηλικία, δεν έχει ακόμη ολοκληρωτικά χαρακτηριστεί σε σχέση με τα νευροπαθολογοανατομικά ευρήματα, παρόλο που έχουν εμπλακεί διαδικασίες όπως η φλεγμονή (neuroinflammation) και η αυτοτοξικότητα (autotoxicity). Αρκετοί γενετικοί παράγοντες υπεύθυνοι για την αιτιολογία ή την αύξηση της ευαισθησίας εμφάνισης της ασθένειας έχουν διερευνηθεί. Τρία γονίδια έχουν συνδεθεί με την σχετικά σπάνια πρόιμη έναρξη των αυτοσωμικών επικρατούντων περιπτώσεων της AD: το γονίδιο της APP (amyloid precursor protein gene), το γονίδιο της πρεσυνιλίνης 1 (PS 1) και το γονίδιο της πρεσυνιλίνης 2 (PS 2). Αντίθετα, στην πιο συχνή σποραδική όψιμης έναρξης AD, ο κύριος γενετικός παράγοντας είναι το αλληλόμορφο ε4 της απολιποπρωτεΐνης E (APOE), η παρουσία του οποίου αυξάνει σημαντικά την πιθανότητα ανάπτυξης της ασθένειας (Del Bo et al., 2006).

Τόσο η AD όσο και η CJD χαρακτηρίζονται από συσσώρευση στον εγκέφαλο παθολογικών πρωτεϊνών οι οποίες οδηγούν στην νευροεκφύλιση. Στην AD παρατηρείται συσσώρευση του β-αμυλοειδικού πεπτιδίου σε εξωκυττάριους σχηματισμούς και σχηματισμό εκφυλιστικών πλακών, ενώ στην CJD μία ισομορφή ανθεκτική στις πρωτεάσες (PrP^{sc}) της φυσιολογικής κυτταρικής πρωτεΐνης (PrP^c) συσσωρεύεται στους νευρώνες σχηματίζοντας εξωκυτταρικά αμυλοειδικά συσσωματώματα. Συνεντοπισμός των νευροπαθολογικών αυτών δομών και των δύο πρωτεϊνών έχει αναφερθεί σε ασθενείς με CJD, θέτοντας τον προβληματισμό για μια

πιθανή παθογενετική συνύπαρξη (overlap) ανάμεσα στην AD και στην CJD (Del Bo, 2006).

Ομοζυγωτία στο κωδικόνιο 129 του *PRNP* γονιδίου αποτελεί παράγοντα κινδύνου για την εμφάνιση της CJD, τροποποιώντας, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, τόσο τα κλινικά όσο και τα παθολογικά χαρακτηριστικά της ασθένειας (Parchi et al., 2000, Alperovitch et al., 1999). Έχει προταθεί ότι ο γονότυπος της βαλίνης αυξάνει την παραγωγή της PrP^{Sc} πρωτεΐνης (Baskakov et al., 2005) και ότι η ετεροζυγωτία (Met/Val) διευκολύνει την συσσώρευσή της σε αμυλοειδικές πλάκες (Hauw et al., 2000). Ορισμένες βλάβες που σχετίζονται με τη συσσώρευση του Αβ αμυλοειδούς κατά την εγκεφαλική γήρανση και την AD έχουν επίσης, αμυλοειδικά χαρακτηριστικά. Τα β-πτυχωτά πεδία ανευρίσκονται σε εστιακές εναποθέσεις του Αβ πεπτιδίου, όπως παρόμοια παρατηρούνται στην PrP^{Sc} πρωτεΐνη στην CJD. Ο ακριβής μηχανισμός αυτής της τροποποίησης διαφορετικών πρωτεϊνών παραμένει άγνωστος. Επιπλέον, υποστηρίζεται ότι παρουσία βλαβών τύπου Alzheimer στην CJD αποτελεί μια αλλαγή άμεσα συσχετιζόμενη με την ηλικία. Ωστόσο, καθώς εναποθέσεις της PrP^{Sc} συχνά συσσωρεύονται στην περιφέρεια των εστιακών Αβ εναποθέσεων, έχει υποθεθεί ότι η παρουσία του Αβ αμυλοειδούς μπορεί να επηρεάζει τη μορφογένεση της PrP^{Sc} (Hainfellner, 1998).

Ωστόσο, οι μελέτες σχετικά με το ρόλο του M129V πολυμορφισμού και τη συσχέτισή του με την εμφάνιση άνοιας, και συγκεκριμένα της AD, παρουσιάζονται αντικρουόμενες. Συγκεκριμένα, σε μια σειρά μελετών με ασθενείς σε όψιμη ηλικία, το αλληλόμορφο της βαλίνης στο κωδικόνιο 129 του *PRNP* συνδέθηκε με την παρουσία και την πυκνότητα Αβ αμυλοειδικών βλαβών, ενώ αντίθετα, δεν παρατηρήθηκε καμία σύνδεση με τους tau νευρώνες (Berr et al., 2003). Επίσης, τρεις αναφορές για την σποραδική AD απέτυχαν να αποκαλύψουν οποιαδήποτε σύνδεση ανάμεσα στην ομοζυγωτία για αλληλόμορφα της μεθιονίνης ή βαλίνης και AD (Combarros et al., 2000, Casadei et al., 2001, Li et al., 2005). Ωστόσο, στη μελέτη των Casadei et al. (2001) υποστηρίζεται ότι η ύπαρξη ενός τουλάχιστον αλληλομόρφου βαλίνης σε ασθενείς με AD μπορεί να αποτελέσει παράγοντα πρόωμης έναρξης της ασθένειας και νοητικής έκπτωσης συγκριτικά με ομοζυγωτία στη μεθιονίνη. Το αποτέλεσμα αυτό συμφωνεί με προηγούμενη μελέτη σε 1163 άτομα ηλικίας 59-71 ετών (Berr et al., 1998), όπου αναφέρεται σύνδεση μεταξύ ομοζυγωτίας της βαλίνης και πρόωμης εμφάνισης νοητικής έκπτωσης, χωρίς ωστόσο ο συγκεκριμένος γονότυπος (Val/Val) να συνδέεται με την εμφάνιση AD. Επιπλέον, σε πρόσφατη μελέτη ασθενών και

φυσιολογικών μαρτύρων (Del Bo et al., 2006) δεν παρατηρήθηκε σημαντική σύνδεση μεταξύ του πολυμορφισμού M129V και της AD, ωστόσο υποστηρίζεται η επίδραση του αλληλόμορφου της βάλινης ως παράγοντας κινδύνου για πρόωμη γνωστική ανεπάρκεια των ασθενών με AD (Dermaut et al., 2003).

Από την άλλη, γονοτυπική ανάλυση του συγκεκριμένου πολυμορφισμού σε πληθυσμό γερμανικής καταγωγής έδειξε ότι ομοζυγωτία της μεθιονίνης (Met/Met) αποτελεί παράγοντα κινδύνου εμφάνισης της AD, με μείωση της ηλικίας έναρξης της νόσου, ανεξάρτητα από τον APOE γονότυπο (Riemenscheider, 2004). Επίσης, σε Πολωνούς ασθενείς με AD το ποσοστό των M/M και V/V γονοτύπων ήταν υψηλότερο από ότι στους υγιείς μάρτυρες, ωστόσο η ετεροζυγωτία υπερεκφραζόταν στην ομάδα ελέγχου (Golanska et al., 2004). Οι παραπάνω μελέτες προτείνουν μια σημαντική επίδραση του εθνολογικού υπόβαθρου στον συγκεκριμένο πολυμορφισμό και, συνεπώς, στην γενετική ευαισθησία της AD. Σημαντικές διαφοροποιήσεις, επίσης, παρατηρούνται στην κατανομή του *PRNP* πολυμορφισμού ανάμεσα σε Ασιατικές και Δυτικοευρωπαϊκές εθνικές ομάδες (Nurmi et al, 2003). Σε τέσσερις μελέτες (meta-analysis), οι οποίες πραγματοποιήθηκαν ώστε να ξεπεραστούν περιορισμοί που προέρχονται από το μέγεθος και το διαφορετικό εθνικό υπόβαθρο των πληθυσμών με AD, παρατηρήθηκε ότι τόσο στον Καυκάσιο πληθυσμό όσο και σε Ιάπωνες ασθενείς με AD ομοζυγωτία στη μεθιονίνη αποτελεί παράγοντα κινδύνου ανάπτυξης AD, ανεξάρτητα από την ηλικία έναρξης και το εθνολογικό υπόβαθρο (Del Bo et al., 2006).

Συμπερασματικά, όλα τα παραπάνω δεδομένα παρέχουν απόδειξη για κοινούς γενετικούς παράγοντες κινδύνου στη γήρανση και σε νευροεκφυλιστικές διαταραχές που συνοδεύονται από άνοια.

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Παρόλο που η PD και η CJD αποτελούν δύο διαφορετικές κλινικές οντότητες με διαφορετικό γενετικό υπόβαθρο, ωστόσο και οι δύο χαρακτηρίζονται τόσο από κοινά νευροπαθολογικά ευρήματα, όπως απώλεια νευρώνων και ινώδη συσσώρευση παθολογικής πρωτεΐνης όσο και από κλινικά χαρακτηριστικά, όπως ο παρκινσονισμός. Επιπλέον, παρατηρούνται ιστοπαθολογικές ομοιότητες, όπως για παράδειγμα συσσώρευση και εναπόθεση της α -συνουκλεΐνης, καθώς και άλλων πρωτεϊνών στα σωματίδια Lewy, με τελικό αποτέλεσμα τη διαταραχή της κυτταρικής λειτουργίας και τη νευροεκφύλιση (Haïk et al., 2002).

Οι παραπάνω αναφερθείσες κλινικοπαθολογικές ομοιότητες ανάμεσα στην PD και CJD θα μπορούσαν να επιδείξουν έναν κοινό παράγοντα γενετικής προδιάθεσης μεταξύ των δύο ασθενειών. Για το λόγο αυτό σκοπός της παρούσας έρευνας ήταν η μελέτη της κατανομής του M129V πολυμορφισμού του *PRNP* γονιδίου σε Παρκινσονικούς ασθενείς και σε αντίστοιχη με την ομάδα των ασθενών ως προς το φύλο και την ηλικία ομάδα ελέγχου, προκειμένου να ταυτοποιηθεί η πιθανή επίδραση του πολυμορφισμού στην προδιάθεση για εμφάνιση PD και στην φαινοτυπική έκφραση της ασθένειας.

Τις τελευταίες δεκαετίες παρατηρείται αυξημένο ενδιαφέρον για το ρόλο του M129V πολυμορφισμού του *PRNP* γονιδίου σε σχέση με τη γήρανση καθώς και με άλλες συνδεδεμένες με την ηλικία νευροεκφυλιστικές ασθένειες, συμπεριλαμβανομένου και της AD (Rujescu et al., 2003). Τόσο η άνοια, και συγκεκριμένα η AD, όσο και η CJD χαρακτηρίζονται από συσσώρευση στον εγκέφαλο παθολογικών πρωτεϊνών οι οποίες οδηγούν στην νευροεκφύλιση (Conway et al., 2003). Ειδικότερα, στην AD παρατηρείται συσσώρευση του β -αμυλοειδικού πεπτιδίου σε εξωκυττάριους σχηματισμούς και σχηματισμό εκφυλιστικών πλακών, ενώ στην PD παρατηρείται συσσώρευση και εναπόθεση της α -συνουκλεΐνης στους νευρώνες σχηματίζοντας εξωκυτταρικά αμυλοειδικά συσσωματώματα (Padovani et al., 2006). Συγκεκριμένα, στην παρούσα μελέτη οι PD ασθενείς εξετάστηκαν κλινικά για έλεγχο άνοιας ως συνοδό κλινικό χαρακτηριστικό, ώστε να συσχετιστεί η κατανομή και επίδραση του M129V πολυμορφισμού στους ανοιακούς PD ασθενείς.

Πρόσφατη μελέτη από το εργαστήριο μας (Plaitakis et al, 2002) παρουσίασε ένα σημαντικό υψηλό ποσοστό ομοζυγωτίας στη μεθιονίνη (Met) στον Κρητικό πληθυσμό (57%) συγκριτικά με άλλες μελέτες (41.5%) των οποίων τα ποσοστά συμφωνούν με την

κατανομή του *PRNP* πολυμορφισμού στο Δυτικοευρωπαϊκό πληθυσμό. Στην παρούσα μελέτη, λοιπόν, προσπαθήσαμε να πιστοποιήσουμε τα αποτελέσματα των παραπάνω μελετών σε ένα μεγαλύτερο δείγμα φυσιολογικών ατόμων που άνηκαν στον Κρητικό γηγενή πληθυσμό (N: 783 άτομα), προκειμένου να αποφευχθεί η περίπτωση στατιστικού λάθους λόγω μικρού αριθμού του δείγματος.

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

Συμμετέχοντες

Ομάδα ασθενών

Η Κρήτη αποτελεί ένα νησί με περίπου 0.6 εκατομμύρια κατοίκους, οι οποίοι έχουν το ίδιο γενετικό και πολιτισμικό υπόβαθρο και βιώνουν όμοιες περιβαλλοντικές συνθήκες. Ο πληθυσμός της, λοιπόν, θεωρείται κατάλληλος για τη μελέτη εκφυλιστικών διαταραχών, καθώς η διάρκεια ζωής του γηγενή πληθυσμού είναι όμοια (ή ακόμη και υψηλότερη) με άλλες Δυτικές χώρες.

Το Νευρολογικό τμήμα του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου της Κρήτης έχει εγκαθιδρύσει από το 1987 καταγραφή των ασθενών με Parkinson. Το δείγμα της παρούσας μελέτης αποτελείται από 274 ασθενείς με Parkinson (άνδρες: 58.76%, γυναίκες: 41.24%), διαγνωσμένοι με βάση τα δημοσιευμένα κλινικά κριτήρια με τυπική, κυρίως σποραδικού τύπου, όψιμης έναρξης PD και μέσο όρο ηλικίας κατά την εξέταση 71.658 ± 9.028 (εύρος: 39-94 χρόνια, σύνολο ασθενών: 263 άτομα, λόγω απουσίας δεδομένων όσον αφορά την ηλικία για 10 ασθενείς). Ασθενείς με εξωπυραμιδικές διαταραχές διαφορετικού τύπου από την PD αποκλείστηκαν από τη μελέτη. Στις περιπτώσεις ύπαρξης της ασθένειας σε περισσότερα από ένα μέλη της οικογένειας, περιλήφθηκε μόνο ένας ασθενής, καθώς μέλη της ίδιας οικογένειας μπορεί να έχουν κοινούς γενετικούς πολυμορφισμούς. Για την εκτίμηση της παρουσίας άνοιας στους ασθενείς χρησιμοποιήθηκε το όριο των 24 βαθμών στην κλίμακα Mini Mental Scale Evaluation. Η συμμετοχή των ασθενών στη μελέτη πραγματοποιήθηκε μετά από έγγραφη συγκατάθεση.

Ομάδες ελέγχου

Τα άτομα για τις ομάδες επιλέχθηκαν από τον τοπικό πληθυσμό με τυχαίο τρόπο και κύριο γνώρισμα τη γηγενή καταγωγή τόσο από την πατρική όσο και από τη μητρική πλευρά για τις τρεις τελευταίες τουλάχιστον γενεές. Διαμορφώθηκαν δύο μερικώς επικαλυπτόμενες ομάδες ελέγχου. Η πρώτη αποτελείται από 378 υγιή άτομα (άντρες: 53.17%, γυναίκες: 46.83%), με μέσο όρο ηλικίας κατά την εξέταση 71.659 ± 7.489 (εύρος: 60-99 χρόνια). Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά σχετικά με την ηλικία και το φύλο ανάμεσα στην ομάδα των ασθενών και την πρώτη ομάδα ελέγχου.

Η δεύτερη ομάδα ελέγχου αποτελείται από ένα σύνολο 783 υγιών ατόμων (στα οποία περιλαμβάνεται και η πρώτη ομάδα ελέγχου), η οποία έχει χωριστεί σε ηλικιακές ομάδες κατανεμημένες ανά δεκαετία από τα 20 έως τα 80 χρόνια (50 άτομα ανά ηλικιακή ομάδα). Η επιλογή της δεύτερης αυτής μεγαλύτερης ομάδας ελέγχου έγινε με σκοπό να μελετηθεί η επίδραση της ηλικίας στην κατανομή του M129V γονότυπου στον πληθυσμό της Κρήτης.

Διαδικασία

Μελέτη του γονότυπου στην ομάδα έλεγχου και στους ασθενείς με PD

Το γενομικό DNA απομονώθηκε από 20ml περιφερικού αίματος, χρησιμοποιώντας στανταρισμένο πρωτόκολλο το FlexiGene DNA kit (Qiagen).

Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης αποτελεί μια *in vitro* κλωνοποίηση, κατά την οποία μια ορισμένη αλληλουχία νουκλεοτιδίων μπορεί να αντιγραφεί σε μεγάλες ποσότητες γρήγορα και εκλεκτικά από οποιοδήποτε δείγμα DNA που την περιέχει. Η τεχνική βασίζεται στη χρησιμοποίηση της DNA πολυμεράσης για τον πολλαπλασιασμό ενός εκμαγείου DNA σε επανειλημμένους κύκλους αντιγραφής. Το ένζυμο καθοδηγείται στην αλληλουχία που επιδιώκεται να αντιγραφεί από βραχεία oligονουκλεοτίδια που δρουν ως εκκινητές (primers), τα οποία υβριδίζονται με την αρχή και το τέλος του εκμαγείου της επιθυμητής αλληλουχίας του DNA. Οι εκκινητές σχεδιάζονται έτσι ώστε να υποβοηθήσουν την εκκίνηση της αντιγραφής του DNA σε κάθε κλώνο του αρχικού δικλώνου DNA.

PCR αντιδραστήρια και συνθήκες πολλαπλασιασμού (cycling conditions)

Περίπου 100-150 ng του συνολικού DNA πολλαπλασιάστηκε σε ένα μείγμα συνολικής αντίδρασης 25 μl, το οποίο περιλάμβανε τα ακόλουθα συστατικά: α) 0.2 mM dNTP (2mM), β) 1.5 mM MgCl₂ (50mM), γ) 1.25 units Taq DNA polymerase (5U/ul) και δ) 5 pmoles/ul για κάθε εκκινητή (forward and reverse primer).

Η αλληλουχία των oligονουκλεοτιδικών εκκινητών που χρησιμοποιήθηκε είναι η ακόλουθη: 5'-TCAAGGAGGTGGCACCCACA-3' (forward) και 5'-GATATTGACGCAGTCGTGCACAAA-3' (reverse). Οι εκκινητές επεκτείνονται σε

για περιοχή 277 bp του PRNP γονιδίου.

Το πρωτόκολλο της PCR που πραγματοποιήθηκε περιλάμβανε τα ακόλουθα βήματα:

Step	Temperature	Time	Cycles
1	94° C	5 min	1
2	94° C	1 min	34
	58° C	1 min & 30 sec	
	72° C	1 min	
3	72° C	10 min	1

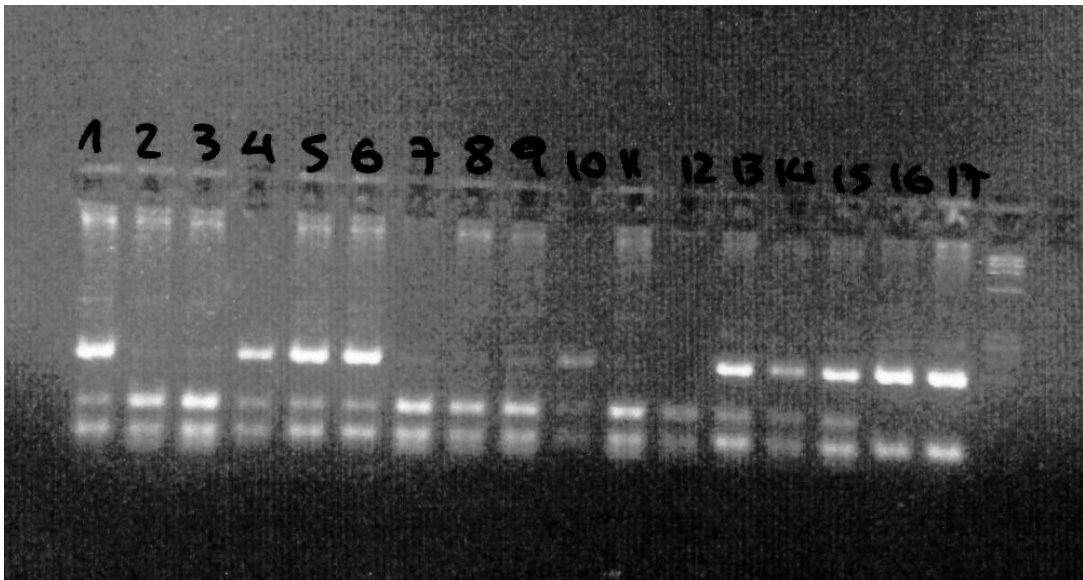
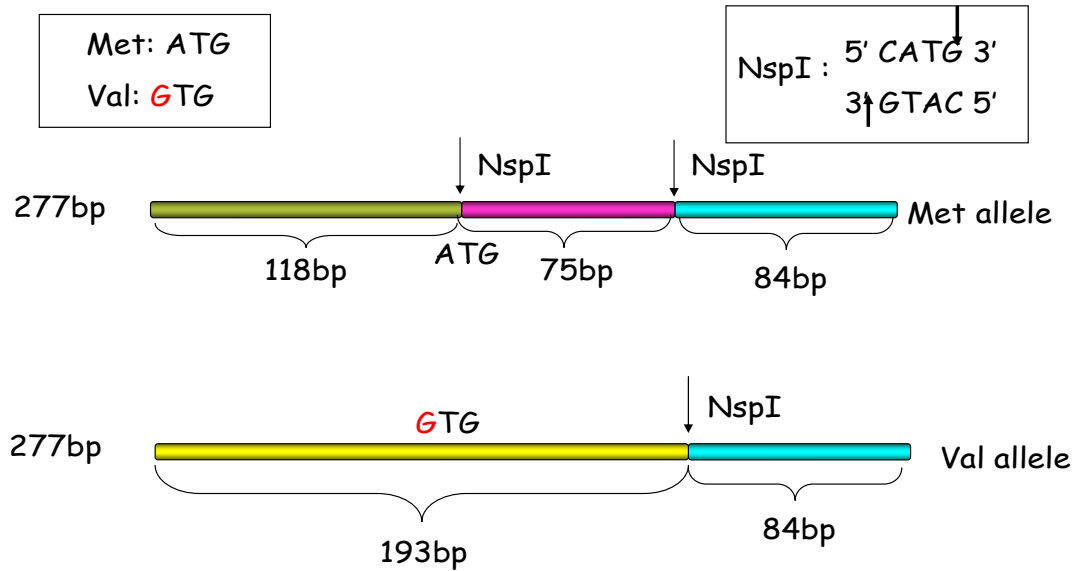
Agarose Gel Electrophoresis and Size standards

Ακολούθως της αντίδρασης PCR, όλα τα προϊόντα φορτώθηκαν σε gel αгарόζης (1,5% για την αντίδραση της PCR και 3% για την RFLP αντίδραση), ώστε να ελεγχθεί η αποτελεσματικότητα του πολλαπλασιασμού. Για έλεγχο των προϊόντων της PCR, 5 μl από PCR προϊόντα αναμειγνύθηκαν με 5 μl agarose gel χρωστικής. Για τον έλεγχο των RFLP προϊόντων, 15 μl από RFLP προϊόντα αναμειγνύθηκαν με 7μl agarose gel χρωστικής.

Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) assay

Οι γονότυποι του πολυμορφισμού M129V προσδιορίστηκαν με τη χρήση περιοριστικής ενδονουκλεάσης Nsp I (5U/ul), με επώαση στους 37 °C. Η σημειακή αλλαγή στη θέση 129 από Αδενίνη σε Γουανίνη (A129G) προκαλεί την εξαφάνιση της συγκεκριμένης θέσης περιορισμού όσον αφορά στο ένζυμο Nsp I. Η πέψη προκάλεσε την παραγωγή τμημάτων DNA διαφορετικού μήκους: ομοζυγώτες ως προς τη μεθιονίνη (118bp, 84bp και 75bp), ετεροζυγώτες (193bp, 118bp, 84bp και 75bp) και ομοζυγώτες ως προς τη βαλίνη (193bp και 84bp).

Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) assay



Στατιστική ανάλυση

Η κατανομή του γονότυπου και των αλληλομόρφων (Met/Met, Met/Val, Val/Val) των ασθενών με Parkinson συγκρίθηκε με αυτή της πρώτης ομάδας ελέγχου (N=378) με το στατιστικό κριτήριο X^2 , χρησιμοποιώντας το στατιστικό πακέτο Κοινωνικών Επιστημών (SPSS v. 13) και το Epi Info 2002. Το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας προσδιορίστηκε στο 5% ($p < .05$ two tailed-test).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Κατανομή γονότυπου για τον M129V πολυμορφισμό στην ομάδα ελέγχου και στους ασθενείς με PD

Όπως φαίνεται στον Πίνακα 1, η κατανομή των γονότυπων του M129V πολυμορφισμού στους ασθενείς με PD ήταν 48.9% Met/Met, 45.4% Met/Val και 5.7% Val/Val και Met/Met 47.9%, Met/Val 44.2% και Val/Val 7.9% στην πρώτη ομάδα ελέγχου ($p=0.54$).

Πίνακας 1. Κατανομή γονότυπων για τον M129V πολυμορφισμό στους ασθενείς με PD και στις δύο ομάδες ελέγχου

	MM	MV	VV	N	p
PD ασθενείς	129 (48.9%)	120 (45.4%)	15 (5.7%)	264	
Δείγμα ελέγχου	181 (47.9%)	167 (44.2%)	30 (7.9%)	378	0.54
Συνολικό δείγμα ομάδας ελέγχου	379 (48.4%)	344 (43.9%)	60 (7.7%)	783	0.55

Κατανομή αλληλόμορφων για τον M129V πολυμορφισμό στην ομάδα ελέγχου και στους ασθενείς με PD

Διαχωρίζοντας τα δείγματα ανάλογα με το φύλο, δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στη συχνότητα των Met και Val αλληλόμορφων ανάμεσα στην ομάδα ελέγχου (N: 378) και την ομάδα των ασθενών. Η συχνότητα των αλληλόμορφων δεν απέκλινε από το δείκτη ισορροπίας Hardy-Weinberg ($p=0.57$, $\chi^2: 0.32$, OR: 0.92; 95% C.I.: 0.72-1.19).

Πίνακας 2. Κατανομή αλληλόμορφων για τον M129V πολυμορφισμό στους ασθενείς με PD και στις δύο ομάδες ελέγχου

	M	V	Odds ratio	C.I.	X ² , p
PD ασθενείς (N: 264)	71.6%	28.4%	0.92	0.72-1.19	X ² =0.32, p=0.57
Δείγμα ελέγχου (N: 378)	69.9%	30.1%			
Συνολικό δείγμα ελέγχου (N: 783)	70.4%	29.6%	1.06	0.85-1.33	X ² =0.23, p=0.63

Κατανομή γονότυπων για τον M129V πολυμορφισμό με βάση τα κλινικά συμπτώματα της PD και την άνοια στους PD ασθενείς

Στη συνέχεια συγκρίθηκαν οι κατανομές του πολυμορφισμού M129V σε διαφορετικές υποομάδες ασθενών ανάλογα με το προεξάρχον κλινικό σύμπτωμα που παρουσίαζαν. Τα ποσοστά πολυμορφισμών ανάμεσα στους ασθενείς με Tremorogenic/mixed PD (n: 152) ήταν Met/Met 50%, Met/Val 43.4% και Val/Val 6.6% ενώ τα αντίστοιχα ποσοστά ανάμεσα στους ασθενείς με akinetic/rigid PD (n: 36) ήταν Met/Met 41.7%, Met/Val 58.3% και Val/Val 0% (p=0.12).

Στην ομάδα των ασθενών με PD και συνοδό κλινικό σύμπτωμα την άνοια (N: 29) βρέθηκαν τα παρακάτω ποσοστά γονότυπων: Met/Met 34.5%, Met/Val 65.5% και Val/Val 0%. Διαπιστώθηκε μία μη στατιστικά σημαντική τάση (p= 0.06) διαφοράς ανάμεσα στους ασθενείς με PD που εμφανίζουν άνοια και σε αυτούς που δεν εμφανίζουν. Το εύρημα αυτό θα μπορούσε ίσως να θεωρηθεί ως ένδειξη το μεγαλύτερο ποσοστό των ασθενών με PD και άνοια εμφανίζουν ετεροζυγωτία (M/V65.5%), η οποία όμως χρήζει περαιτέρω ελέγχου σε μεγαλύτερο δείγμα.

Πίνακας 3. Κατανομή γονότυπων για τον M129V πολυμορφισμό με βάση τα κλινικά συμπτώματα της νόσου PD

	MM	MV	VV	N	p
Σύνολο ασθενών	129 (48.9%)	120 (45.4%)	15 (5.7%)	264	
Τρόμος	76 (50%)	66 (43.4%)	10 (6.6%)	152	0.12
Ακαμψία/ ακινησία	15 (41.7%)	21 (58.3%)	0 (0%)	36	
Ασθενείς χωρίς άνοια*	116 (49.5%)	103 (43.9%)	16 (6.6%)	235	0.06
Ασθενείς με άνοια	10 (34.5%)	19 (65.5%)	0 (0%)	29	

MMSE >24

Κατανομή γονοτύπου για τον M129V πολυμορφισμό με βάση την ηλικία και το φύλο στην συνολική ομάδα ελέγχου

Η δεύτερη, ευρύτερη, ομάδα (N: 783) κατανεμήθηκε σε ηλικιακές ομάδες (50-170 άτομα η καθεμία) χωρισμένες ανά δεκαετία, όμοια κατανεμημένες ως προς το φύλο, με σκοπό την σύγκριση της κατανομής των γονότυπων με βάση την ηλικία (βλ. Πίνακα 4), χωρίς να παρατηρηθεί στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ηλικιακών ομάδων. Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν, όταν το δείγμα χωρίστηκε σε δύο ηλικιακές ομάδες αποτελούμενες από άτομα άνω ή κάτω των 60 ετών. Δεν βρέθηκαν επίσης στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ ηλικιακών ομάδων όταν οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν σε άνδρες και γυναίκες χωριστά (βλ. Πίνακες 5-6).

Πίνακας 4. Κατανομή γονότυπων για τον M129V στον κρητικό πληθυσμό με βάση την ηλικία

Ηλικία	MM	MV	VV	N	p
20 - 29	51 (49%)	42 (40.4%)	11 (10.6%)	104	0.226
30 - 39	35 (45.4%)	36 (46.75%)	6 (7.8%)	77	
40 - 49	45 (50.6%)	38 (42.7%)	6 (6.7%)	89	
50 - 59	41 (49.4%)	38 (45.8%)	4 (4.8%)	83	
60 - 69	77 (45.1%)	83 (48.5%)	11 (6.4%)	171	
70 - 79	79 (51.3%)	59 (38.3%)	16 (10.4%)	154	
80 - 109	25 (46.2%)	25 (46.2%)	4 (7.4%)	54	
Σύνολο	353 (48.2%)	321 (43.9%)	58 (7.9%)	732	
Αγνώστου ηλικίας	26	23	2	51	
Σύνολο	379	344	60	783	

Πίνακας 5. Κατανομή γονότυπων για τον M129V στους άνδρες της ομάδας ελέγχου με βάση την ηλικία

Ηλικία	MM	MV	VV	N	p
20 - 29	21 (56.8%)	14 (37.8%)	2 (5.4%)	37	0.647
30 - 39	12 (48%)	12 (48%)	1 (4%)	25	
40 - 49	17 (53.125%)	14 (43.75%)	1 (3.125%)	32	
50 - 59	18 (40.9%)	23 (52.3%)	3 (6.8%)	44	

60 – 69	34 (44.7%)	37 (48.7%)	5 (6.6%)	76
70 – 79	51 (54.2%)	32 (34.1%)	11 (11.7%)	34
80 – 89	9 (37.5%)	12 (50%)	3 (12.5%)	24
90 – 109	4 (57.1%)	3 (42.9%)	-	7
Σύνολο	166 (48.9%)	147 (43.4%)	26 (7.7%)	339
Αγνώσ του ηλικίας	11	8	1	20
Σύνολο	177	155	27	359

Πίνακας 6. Κατανομή γονότυπων για τον M129V στις γυναίκες της ομάδας ελέγχου με βάση την ηλικία

Ηλικία	MM	MV	VV	Total	p
20 – 29	30 (44.8%)	28 (41.8%)	9 (13.4%)	67	0.221
30 – 39	23 (44.2%)	24 (46.2%)	5 (9.6%)	52	
40 – 49	28 (49.1%)	24 (42.1%)	5 (8.8%)	57	
50 – 59	23 (58.9%)	15 (38.5%)	1 (2.6%)	39	
60 – 69	43 (45.3%)	46 (48.4%)	6 (6.3%)	95	
70 – 79	28 (46.7%)	27 (45%)	5 (8.3%)	60	
80 – 89	11 (55%)	9 (45%)	-	20	
90 – 109	1 (33.3%)	1 (33.3%)	1 (33.3%)	3	

Σύνολο	187 (47.6%)	174 (44.3%)	32 (8.1%)	393
Αγνώστου ηλικίας	15	15	1	31
Σύνολο	202	189	33	424

Πίνακας 7. Κατανομή γονότυπων για τον M129V στον κρητικό πληθυσμό με βάση δύο ηλικιακές ομάδες

Ηλικία	MM	MV	VV	Total	p
20 – 59	172 (48.6%)	154 (43.5%)	28 (7.9%)	354	0.98
60 – 109	181 (47.9%)	167 (44.2%)	30 (7.9%)	378	
Σύνολο	353 (48.2%)	321 (43.9%)	58 (7.9%)	732	
Αγνώστου ηλικίας	26	23	2	51	
Σύνολο	379	344	60	783	

Σύγκριση συχνότητας γονότυπων για τον πολυμορφισμό M129V ανάμεσα σε διάφορους δυτικοευρωπαϊκούς πληθυσμούς

Τα ποσοστά των γονότυπων (M/M, M/V, V/V) που βρέθηκαν για τον γηγενή κρητικό πληθυσμό συγκρίθηκαν με αντίστοιχα ποσοστά από μελέτες που διενεργήθηκαν σε φυσιολογικούς πληθυσμούς διαφόρων δυτικοευρωπαϊκών χωρών. Για τη σύγκριση επιλέχθηκαν μελέτες όπου ο αριθμός του δείγματος των φυσιολογικών ατόμων ξεπερνούσε τα 400 άτομα, ώστε να μειωθεί η πιθανότητα στατιστικού λάθους λόγω μικρού δείγματος.

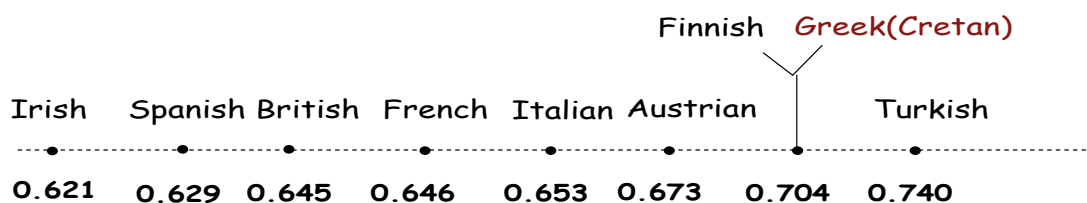
Συγκεκριμένα, συγκρίθηκαν τα ποσοστά των γονότυπων ανάμεσα στο δείγμα του κρητικού πληθυσμού (783 άτομα) με τα ποσοστά από τα δείγματα της Φιλανδίας (1957 άτομα), της Ισπανίας (546 άτομα) και της Μεγάλης Βρετανίας (406 άτομα). Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στο δείγμα της Κρήτης και τα δείγματα της Φιλανδίας και της Ισπανίας ($p=0.437$, $p=0.295$, αντίστοιχα), γεγονός που επιβεβαιώνει τη σημαντικότητα του μεγάλου δείγματος ελέγχου σε μελέτες κατανομής.

Επιπλέον, η στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0.04$) που παρατηρείται ανάμεσα στο δείγμα της Κρήτης (N: 783) και το δείγμα της Μεγάλης Βρετανίας (N: 406) πιθανώς οφείλεται στο σχετικά μικρό δείγμα της Μ. Βρετανίας.

Πίνακας 8. Κατανομή γονότυπων για τον M129V σε 4 πληθυσμούς

	n	MM	MV	VV	p
Κρήτη	783	48.4%	43.9%	7.7%	
Φιλανδία	1957	49%	42%	9%	$X^2=0.6$ (OR:0.93, CI:0.78-1.11), p = 0.437
Ισπανία	546	42%	44%	14%	$X^2=1.09$ (OR:1.14, CI:0.9-1.45), p = 0.295
Μεγάλη Βρετανία	406	40%	48%	11%	$X^2=4.26$ (OR:1.32, CI:1.01-1.71), p = 0.04

Κατανομή της συχνότητας του Met αλληλομόρφου στο κωδικόνιο 129 ανάμεσα σε διαφορετικούς Ευρωπαϊκούς Πληθυσμούς



Concept of east-west gradient of M129V polymorphism

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η παρούσα μελέτη διερευνά το ρόλο του M129V πολυμορφισμού του *PRNP* γονιδίου στη νόσο του Parkinson. Το γεγονός ότι ο παρκινσονικά συμπτώματα παρατηρούνται επίσης στη νόσο CJD, σε συνδυασμό με την συνύπαρξη ιστοπαθολογικών σημείων ανάμεσα στην Parkinson και στη CJD, θέτει τον προβληματισμό για κοινούς παθογενετικούς μηχανισμούς των δύο αυτών ασθενειών. Το ερώτημα, λοιπόν, που τίθεται είναι κατά πόσο ένας συγκεκριμένος γονότυπος (Met/Met, Met/Val, Val/Val) στο κωδικόνιο 129 του *PRNP* γονιδίου μπορεί να δράσει ως παράγοντας κινδύνου για την εμφάνιση της νόσου Parkinson .

Τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι δεν υπάρχει άμεση σύνδεση μεταξύ της παρουσίας μεθιονίνης ή βαλίνης στη θέση 129 του *PRNP* γονιδίου και εμφάνισης της νόσου μετά από ανάλυση της κατανομής των αντίστοιχων γονότυπων σε ασθενείς με PD και σε υγιείς μάρτυρες από τον Κρητικό πληθυσμό. Το παραπάνω αποτέλεσμα βρίσκεται σε συμφωνία με τη μελέτη των Gossrau et al. (2006), σύμφωνα με την οποία δεν παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα σε PD ασθενείς και σε υγιή πληθυσμό Γερμανικής καταγωγής αναφορικά με την κατανομή των γονότυπων του M129V πολυμορφισμού και τη σύνδεσή τους με την εμφάνιση PD. Παρόμοια, στη μελέτη των Scholz et al (2006) δεν βρέθηκε στατιστική σύνδεση στην κατανομή του γονότυπου και των αλληλόμορφων για τον M129V ανάμεσα σε φυσιολογικούς Φιλανδικής, Ελληνικής και Βρετανικής καταγωγής και σε PD ασθενείς. Ωστόσο, εξαιτίας του μικρού αριθμού των μαρτύρων και στους τρεις πληθυσμούς δεν μπορεί να αποκλειστεί η περίπτωση αυτός ο πολυμορφισμός να αποτελεί σπάνιο καθοριστικό παράγοντα που εμπλέκεται στην παθοφυσιολογία της Parkinson.

Επιπρόσθετα, ελέγξαμε την υπόθεση σύνδεσης μεταξύ κλινικών συμπτωμάτων της PD (**τρόμου και ακαμψίας/ακινησίας**) και γονότυπων του M129V πολυμορφισμού, χωρίς όμως να βρεθούν ενδείξεις στο δείγμα μας. Το αποτέλεσμα αυτό έρχεται σε αντίθεση με τη μελέτη των Gossrau et al. σύμφωνα με την οποία οι tremorogenic/mixed PD ασθενείς είχαν χαμηλότερο ποσοστό ομοζυγωτίας στη μεθιονίνη συγκριτικά με τους akinetic/rigid PD ασθενείς ($p < 0.05$), δείχνοντας μια πιθανή επίδραση του γονότυπου του M129V πολυμορφισμού στα πρωτεύοντα συμπτώματα της PD.

Τις τελευταίες δεκαετίες παρατηρείται αυξημένο ενδιαφέρον για το ρόλο του M129V πολυμορφισμού του *PRNP* γονιδίου σε σχέση με τη γήρανση καθώς και με άλλες συνδεόμενες με την ηλικία νευροεκφυλιστικές ασθένειες, συμπεριλαμβανομένης

και της AD. Τόσο η άνοια, και συγκεκριμένα η AD, όσο και η CJD χαρακτηρίζονται από συσσώρευση στον εγκέφαλο παθολογικών πρωτεϊνών οι οποίες οδηγούν στην νευροεκφύλιση. Ειδικότερα, στην παρούσα μελέτη στην ομάδα των ασθενών με PD και συνοδό κλινικό σύμπτωμα την άνοια (N: 29) βρέθηκαν τα παρακάτω ποσοστά γονότυπων: Met/Met 34.5%, **Met/Val 65.5%** και Val/Val 0%. Η διαφορά ανάμεσα στους ασθενείς με PD που εμφανίζουν άνοια και σε αυτούς που δεν εμφανίζουν ήταν οριακή στατιστικά (**p = 0.06**), εύρημα συμβατό με την υπόθεση ότι ασθενείς με PD και άνοια εμφανίζουν **ετεροζυγωτία** που όμως απαιτεί περαιτέρω έλεγχο, καθώς ο αριθμός των ασθενών με άνοια ήταν πολύ μικρός (N: 29).

Ωστόσο, οι μελέτες σχετικά με το ρόλο του M129V πολυμορφισμού και τη συσχέτισή του με την εμφάνιση άνοιας, και συγκεκριμένα της AD, παρουσιάζονται αντικρουόμενες. Συγκεκριμένα, σε μια σειρά μελετών με ασθενείς σε όψιμη ηλικία, το αλληλόμορφο της βαλίνης στο κωδικόνιο 129 του *PRNP* συνδέθηκε με την παρουσία και την πυκνότητα Αβ αμυλοειδικών βλαβών, ενώ αντίθετα, δεν παρατηρήθηκε καμία σύνδεση με τους tau νευρώνες (Beir, 2003). Επίσης, δύο αναφορές για την σποραδική AD απέτυχαν να αποκαλύψουν οποιαδήποτε σύνδεση ανάμεσα στην ομοζυγωτία για αλληλόμορφα της μεθιονίνης ή βαλίνης και AD (Combarros, 2000, Casadei, 2001). Ωστόσο, στη μελέτη των Casadei et al. (2001) υποστηρίζεται ότι η ύπαρξη ενός τουλάχιστον αλληλόμορφου βαλίνης σε ασθενείς με AD μπορεί να αποτελέσει παράγοντα πρόωμης έναρξης της ασθένειας και νοητικής έκπτωσης συγκριτικά με ομοζυγωτία στη μεθιονίνη. Το αποτέλεσμα αυτό συμφωνεί με προηγούμενη μελέτη σε 1163 άτομα ηλικίας 59-71 ετών (Beir 1998), όπου αναφέρεται σύνδεση μεταξύ ομοζυγωτίας της βαλίνης και πρόωμης εμφάνισης νοητικής έκπτωσης, χωρίς ωστόσο ο συγκεκριμένος γονότυπος (Val/Val) να συνδέεται με την εμφάνιση AD.

Πρόσφατη μελέτη από το εργαστήριο μας (Plaitakis et al, 2002) παρουσίασε ένα σημαντικό υψηλό ποσοστό ομοζυγωτίας στη μεθιονίνη (Met) στον Κρητικό πληθυσμό (57%) συγκριτικά με άλλες μελέτες (41.5%) των οποίων τα ποσοστά συμφωνούν με την κατανομή του *PRNP* πολυμορφισμού στο Δυτικοευρωπαϊκό πληθυσμό. Στην παρούσα μελέτη, προσπαθήσαμε αυξάνοντας σημαντικά το δείγμα των φυσιολογικών ατόμων (N: 783 άτομα) να μειώσουμε όσον το δυνατόν περισσότερο την περίπτωση στατιστικού λάθους. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι ο αριθμός των φυσιολογικών μαρτύρων που επιλέχθηκε αντιστοιχεί και ανταποκρίνεται στον συνολικό πληθυσμό της Κρήτης (600.000 κάτοικοι). Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης εμφανίζουν χαμηλότερο ποσοστό ομοζυγωτίας στη μεθιονίνη (M/M: 48.4%) για τον Κρητικό πληθυσμό

συγκριτικά με τα παλαιότερα δημοσιευμένα αποτελέσματα της ίδιας ομάδας (M/M: 57%), αποτελέσματα που συμφωνούν με αντίστοιχη μελέτη σε ελληνικό πληθυσμό (Saetta et al., 2006). Πιθανή εξήγηση για την διαφοροποίηση του ποσοστού των γονότυπων για τον M129V πολυμορφισμό ανάμεσα στις δύο αυτές μελέτες αποτελεί η σημαντική επίδραση του αριθμού του δείγματος ελέγχου στη στατιστική ανάλυση για την κατανομή των γονότυπων του πολυμορφισμού στον Κρητικό γηγενή πληθυσμό. Το γεγονός ότι το παραπάνω αποτέλεσμα συμφωνεί με αντίστοιχη μελέτη ως προς την κατανομή του M129V πολυμορφισμού σε φυσιολογικό πληθυσμό της Φιλανδίας (N: 1957 άτομα), όπου δεν παρατηρείται στατιστική διαφορά στη συχνότητα του γονότυπου του M129V πολυμορφισμού αναφορικά με το φύλο και τις ηλικιακές ομάδες (Nurmi et al, 2003), υποστηρίζει την αξιοπιστία των μελετών με μεγάλο πληθυσμιακό δείγμα.

Για την επιβεβαίωση του παραπάνω συμπεράσματος, συγκρίθηκαν τα ποσοστά των γονότυπων ανάμεσα στο δείγμα του κρητικού πληθυσμού (783 άτομα) με τα ποσοστά από δείγματα της Φιλανδίας (1957 άτομα), της Ισπανίας (546 άτομα) και της Μεγάλης Βρετανίας (406 άτομα). Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στο δείγμα της Κρήτης και τα δείγματα της Φιλανδίας και της Ισπανίας, γεγονός που επιβεβαιώνει τη σπουδαιότητα μεγάλων δειγμάτων ελέγχου σε μελέτες κατανομής. Η στατιστικά σημαντική διαφορά που παρατηρήθηκε, όμως, ανάμεσα στο δείγμα της Κρήτης και το δείγμα της Μεγάλης Βρετανίας (N: 406) είναι πιθανώς αποτέλεσμα στατιστικού σφάλματος λόγω του σχετικά μικρού δείγματος της Μ. Βρετανίας.

Τέλος, στατιστική ανάλυση με σκοπό την σύγκριση της κατανομής των γονότυπων με βάση την ηλικία και το φύλο του φυσιολογικού πληθυσμού δεν έδειξε στατιστικά διαφορές. Το αποτέλεσμα αυτό συμφωνεί με αντίστοιχες μελέτες οι οποίες ερευνούν τη συσχέτιση του πολυμορφισμού με το φύλο και την ηλικία (Georgsson et al 2006, Nurmi et al 2003). Ωστόσο, μελέτη των Mitrova et al. (2005) έδειξε διαφοροποίηση αναφορικά με το φύλο, με υψηλό ποσοστό ομοζυγωτίας της μεθιονίνης στους άνδρες συγκριτικά με τις γυναίκες, στις οποίες αντίθετα η ετεροζυγωτία ήταν υψηλή. Επίσης, η κατανομή της βαλίνης ήταν σημαντικά χαμηλότερη στους άνδρες συγκριτικά με τις γυναίκες. Ανάλυση με βάση την ηλικία και συσχέτιση με βάση τον M129V πολυμορφισμό στη συγκεκριμένη μελέτη συμφωνεί με τα δικά μας αποτελέσματα.

Τα αποτελέσματά μας συγκρινόμενα με αντίστοιχες Ευρωπαϊκές μελέτες υπογραμμίζουν την ανάγκη μιας συντονισμένης Ευρωπαϊκής μελέτης για την

επαναξιολόγηση της κατανομής του M129V πολυμορφισμού σε κατάλληλο δείγμα ελέγχου με βάση την ηλικία, το φύλο και τη γεωγραφική κατανομή

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Alperovitch A., Zerr I., Pocchiari M., et al. Codon 129 prion protein genotype and sporadic Creutzfeldt-Jakob disease, *Lancet* 1999; 353:1673–1674.
2. Baskakov I., Disterer P., Breydo L., Shaw M. et al. The presence of valine at residue 129 in human prion protein accelerates amyloid formation *FEBS Letters* 2005; 579: 2589–2596
3. BenMoyal-Segal L. and Soreq H. Gene–environment interactions in sporadic Parkinson’s disease, *Journal of Neurochemistry* 2006; 97: 1740–1755
4. Berr C., Helbecque N., Sazdovitch V. et al. •Polymorphism of the codon 129 of the prion protein (PrP) gene and neuropathology of cerebral ageing *Acta Neuropathol* 2003; 106: 71–74
5. Berr C., Richard F., Dufouil C. et al. Polymorphism of the prion protein is associated with cognitive impairment in the elderly: The EVA study *American Academy of Neurology* 1998; 51 (3): 734-737
6. Beyer K. a-Synuclein structure, posttranslational modification and alternative splicing as aggregation enhancers, *Acta Neuropathol* 2006 112:237–251
7. Bonifati V, Rizzu P, Squitieri F. et al. DJ-1 (PARK7), a novel gene for autosomal recessive, early onset parkinsonism. *Neurol Sci.* 2003; 24(3):159-60.
8. Bove J, Prou D, Perier C. Toxin-induced models of Parkinson's disease. *NeuroRx.* 2005; 2(3):484-94
9. Bounhar Y., Zhang Y., Goodyer C.G. et al. Prion protein protects human neurons against Bax-mediated apoptosis, *J Biol. Chem* 2001; 276: 39145-39149
10. Brown D.R. Prion and prejudice: normal protein and the synapse, *Trends in Neurosciences* 2001; 24(2)
11. Burn DJ. Parkinson's disease dementia: what's in a Lewy body? *J Neural Transm Suppl.* 2006; 70:361-5.
12. Caughey B. Prion protein conversions: insight into mechanisms, TSE transmission barriers and strains, *British Medical Bulletin* 2003; 66: 109–120
13. Cali I., Castellani R., Yuan J. Classification of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease revisited. *Brain.* 2006;129(Pt 9):2266-77
14. Casadei V.M., Ferri C., Calabrese E. et al. Prion protein gene polymorphism and Alzheimer’s disease: one modulatory trait of cognitive decline? *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2001; 71:279–280

15. Combarros O., Sánchez-Guerra M., Llorca J. et al. Polymorphism at codon 129 of the prion protein gene is not associated with sporadic AD, *Neurology* 2000; 55(4): 593-595
16. Conway K.A., Baxter E.W., Felsenstein K.M et al, Emerging b-Amyloid Therapies for the Treatment of Alzheimer's Disease *Current Pharmaceutical Design*, 2003; 9: 427-447
17. Dawson TM. Parkin and defective ubiquitination in Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl.* 2006;70:209-13.
18. Del Bo R., Scarlato M., Ghezzi S. et al. Is M129V of PRNP gene associated with Alzheimer's disease? A case-control study and a meta-analysis *Neurobiology of Aging* 2006; 27: 770.e1–770.e5
19. Dermaut B., Croes E.A., Rademakers R. et al. PRNP Val129 homozygosity increases risk for early-onset Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 2003; 53:409–412.
20. Gandhi S., Muqit M.M., Stanyer I. et al. PINK1 protein in normal human brain and Parkinson's disease. *Brain.* 2006;129(Pt 7):1720-31
21. Gandhi S. and Wood N.W. Molecular pathogenesis of Parkinson's disease *Human Molecular Genetics* 2005; 14: (18) 2749–2755
22. Gambetti P, Kong Q, Zou W. Sporadic and familial CJD: classification and characterisation. *Br Med Bull.* 2003;66:213-39.
23. Georgsson G, Tryggvason T, Jonasdottir AD. Polymorphism of PRNP codons in the normal Icelandic population. *Acta Neurol Scand.* 2006;113(6):419-25.
24. Giorgi F.S., Bandettini di Poggio A., Battaglia G. A short overview on the role of alpha-synuclein and proteasome in experimental models of Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl.* 2006; 70:105-9
25. Golanska E, Hulas-Bigoszewska K, Rutkiewicz E. Polymorphisms within the prion (PrP) and prion-like protein (Doppel) genes in AD. *Neurology* 2004; 62(2):313-5
26. Gossrau G., Herting B., Mockel S. et al. Analysis of the polymorphic prion protein gene codon 129 in idiopathic Parkinson's disease, *Journal of Neural Transmission* 2006; 113:331-337
27. Guentchev M. Evidence for oxidative stress in experimental prion disease, *Neurobiol. Dis.* 2000; 7: 270-273
28. Hainfellner JA, Wanschitz J, Jellinger K. Coexistence of Alzheimer-type neuropathology in Creutzfeldt-Jakob disease. *Acta Neuropathol (Berl).* 1998;96(2):116-22
29. Hauw J., Sazdovitch V., Laplace J. et al. Neuropathologic variants in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease and codon 129 of PrP gene, *Neurology* 2000; 54 (8): 1641-1646
30. Haïk S., Privat N., Adjou K. T, Sazdovitch V. Alpha-synuclein-immunoreactive deposits in human and animal prion diseases, *Acta Neuropathol* 2002; 103: 516–520
31. Herms J, Tings T, Gall S et al. Evidence of Presynaptic Location and Function of the Prion Protein, *The Journal of Neuroscience* 1999; 19(20): 8866–8875
32. Hill A.F., Joiner S., Wadsworth J.D. et al. Molecular classification of sporadic Creutzfeldt-Jakob

- disease, *Brain* 2003; 126: 1333-1346
33. Jain S., Nicholas W. Wood N.W. and Daniel G. Healy D.G. Molecular genetic pathways in Parkinson's disease: a review *Clinical Science* 2005; 109: 355–364
 34. Jose M. Souza J.M., Benoit I. Giasson B.I., Virginia M.-Y. Lee V.M. Chaperone-like activity of synucleins, *FEBS Letter* 2000; 474: 116-119
 35. Kaneko K., Peretz D., Pan K.M. et al. Prion protein (PrP) synthetic peptides induce cellular PrP to acquire properties of the scrapie isoform *Proc, Natl. Acad. Sci.* 1995; 92: 11160-11164
 36. Kovacs G. G., Head M. W., Bunn T., Laszlo L. et al. Clinicopathological phenotype of codon 129 valine homozygote sporadic Creutzfeldt-Jakob disease, *Neuropathology and Applied Neurobiology* 2000; 26: 463-472
 37. Kovacs G., Trabattoni G., Hainfellner J.A. et al. Mutations of the Prion Protein gene, *J Neurol* 2002; 249: 1567-1582
 38. Laffont-Proust I., Faucheux B.A., Hassig R. et al. The N-terminal cleavage of cellular prion protein in the human brain, *FEBS Letters* 2005; 579: 6333–6337
 39. Li X., Rowland L., Mitsumoto H. et al. Prion Protein codon 129 genotype prevalence is altered in Primary Progressive Aphasia, *Ann Neurol* 2005;58:858-864
 40. Makrinou E., Collinge J., Antoniou M. et al. Genomic characterization of the human prion protein (PrP) gene locus, *Mammalian Genome* 2002; 13: 696–703
 41. Maltete D., Lucie Guyant-Marechal L., Mihout B. Movement disorders and Creutzfeldt-Jakob disease: A review, *Parkinsonism and Related Disorders* 2006; 12: 65–71
 42. McCormack J.E., Baybutt H.N., Dawn Everington D. et al. PRNP contains both intronic and upstream regulatory regions that may influence susceptibility to Creutzfeldt–Jakob Disease, *Gene* 2002; 288: 139–146
 43. McNaught K.P, Olanow C. W. Protein aggregation in the pathogenesis of familial and sporadic Parkinson's disease, *Neurobiology of Aging* 2006; 27: 530–545
 44. McNaught KS, Jackson T, JnoBaptiste R. et al. Proteasomal dysfunction in sporadic Parkinson's disease. *Neurology.* 2006;66(10 Suppl 4):S37-49
 45. Mitrova E., Mayer V., Jovankovicova V. et al. Creutzfeldt-Jakob disease risk and PRNP codon 129 polymorphism: necessity to revalue current data. *European Journal of Neurology* 2005; 12: 998-1001
 46. Morris H.R. Genetics of Parkinson's disease, *Annals of Medicine* 2005; 37: 86–96
 47. Nurmi M.H., Bishop M., Strain L. et al. The normal population distribution of *PRNP* codon 129 polymorphism, *Acta Neurol Scand* 2003; 108: 374-378
 48. Padovani A., Costanzi C., Gilberti N. et al. Parkinson's disease and dementia. *Neurol Sci.* 2006 Mar;27 Suppl 1:S40-3
 49. Pan K.M, Baldwin M, Nguyen J et al. Conversion of α -helices into β -sheets features in the formation of the scrapie prion proteins, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1993; 90: 10962-10966

50. Parchi P., Giese A., Capellari S. et al. Classification of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease based on molecular and phenotypic analysis of 300 subjects, *Ann Neurol* 1999; 46: 224-233
51. Plaitakis A., Viskadouraki A.K., Tzagournissakis M. et al. Increased incidence of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease on the Island of Crete associated with a high rate of PRNP 129 Methionine homozygosity in the local population *Ann Neurol* 2001; 50: 227-233
52. Rujescu D., Hartmann A.M., Gonnemann C. et al. M129V variation in the prion protein may influence cognitive performance, *Molecular Psychiatry* 2003; 8: 937–941
53. Riemenschneider M., Klopp ., Xiang W. et al. Prion protein codon 129 polymorphism and risk of Alzheimer disease, *Neurology* 2004; 63: 364-366
54. Rachidi W., Vilette D., Guiraud P., Arlotto M., Jacqueline Riondel J. et al., Expression of Prion Protein Increases Cellular Copper Binding and Antioxidant Enzyme Activities but Not Copper Delivery, *The journal of Biological chemistry* 2003; 278 (11): 9064–9072
55. Recchia A., Debetto P., Negro A et al. α -Synuclein and Parkinson's disease, *The FASEB Journal* 2004; 18
56. Riess O., Kruger R., Hochstrasser H. Genetic causes of Parkinson's disease: extending the pathway. *J Neural Transm Suppl.* 2006;70:181-9
57. Rizzo P., Hinkle D.A., Zhukareva V. et al. DJ-1 colocalizes with tau inclusions: a link between parkinsonism and dementia, *Ann Neurol.* 2004; 55(1):113-8.
58. Saetta A., Michalopoulos N., Malamis G. et al. Analysis of PRNP gene codon 129 polymorphism in the Greek population, *Genetic Epidemiology* 2006; 21: 211-215
59. Scholz S.W., Xiromerisiou G., Fung H.C. et al. The human prion disease M129V polymorphism is not associated with idiopathic Parkinson's disease in three distinct populations, *Neuroscience Letters* 2006; 395: 227-229
60. Schapira AH. Etiology of Parkinson's disease. *Neurology.* 2006;66(10 Suppl 4): S10-23
61. Shimura H., Hattori N., Kubo S. et al. Familial Parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase. *Nat Genet.* 2000; 25(3):302-5
62. Teun van Rheede T., Smolenaars M.M., Madsen O. et al. Molecular evolution of the mammalian prion protein, *Mol. Biol. Evol.* 2003; 20 (1): 111-121
63. Tolosa E., Wenning G., Poewe W. The diagnosis of Parkinson's disease, *Lancet Neurol* 2006; 5: 75–86
64. Wang J., Maldonado M.A. The ubiquitin-proteasome system and its role in inflammatory and autoimmune diseases. *Cell Mol Immunol.* 2006;3(4):255-61.
65. Wolters E.Ch., Braak H. Parkinson's disease: premotor clinico-pathological correlations. *J Neural Transm Suppl.* 2006;70:309-19