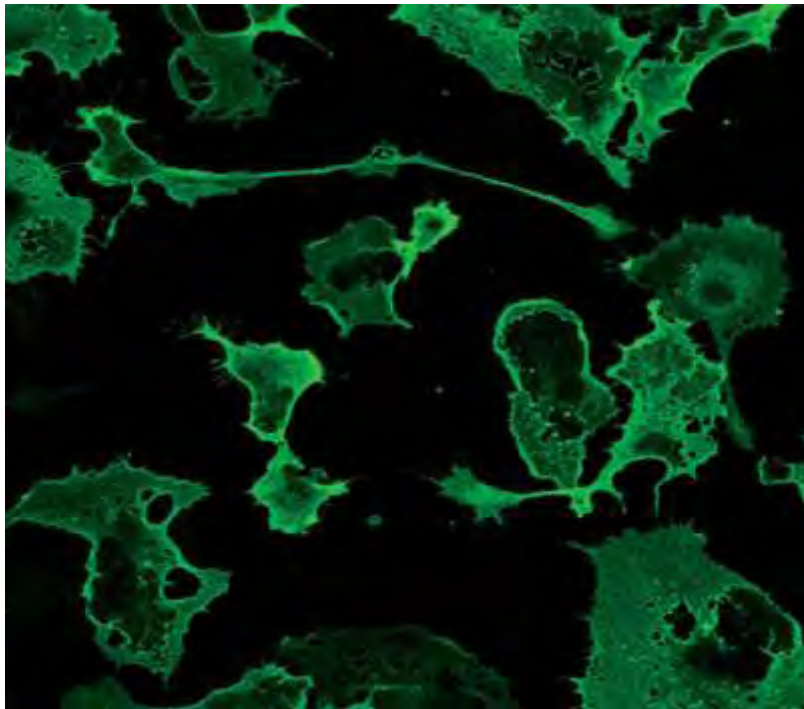


**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ  
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ  
“ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ  
ΙΑΤΡΙΚΗΣ”**

***ΝΟΣΟΣ NASU-HAKOLA : ΠΡΩΤΗ ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΣΤΗΝ  
ΕΛΛΑΔΑ ΚΑΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΝΕΑΣ ΜΕΤΑΜΛΑΞΗΣ***



**ΚΟΥΝΤΡΑ ΠΕΡΣΙΑ-ΜΑΡΙΑ**

**ΥΠΕΥΘΥΝΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΧΑΤΖΗΓΕΩΡΓΙΟΥ Γ.  
ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΝΕΥΡΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΛΑΡΙΣΑ 2012**

## Ευχαριστίες

Μετά την ολοκλήρωση της διπλωματικής μου εργασίας θα ήθελα να ευχαριστήσω ορισμένους ανθρώπους που συνέβαλαν ουσιαστικά σε αυτή την προσπάθεια.

Κατ' αρχάς ευχαριστώ θερμά τον καθηγητή κ. Χατζηγεωργίου Γεώργιο, ο οποίος με δέχτηκε στο εργαστήριο Νευρογενετικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας και μου παρείχε όλα τα τεχνικά μέσα, προκειμένου να υλοποιηθεί η παρούσα εργασία. Τον ευχαριστώ, επίσης, για την υπομονετική και διδακτική του καθοδήγηση, καθώς και για τη στήριξη που μου προσέφερε καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της παρούσας μελέτης.

Παράλληλα, θα ήθελα να απευθύνω ένα μεγάλο ευχαριστώ στην Dr Δαρδιώτη Μαρία (μοριακή βιοχημικό) και Dr.Δαρδιώτη Ευθύμιο (λέκτορα Νευρολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας) για την αδιάκοπη στήριξη και την ανεκτίμητη βοήθειά τους κατά την εκπαίδευση στις μοριακές τεχνικές και όχι μόνο. Πιστεύω ότι η αμέριστη συμπαράστασή τους και οι εποικοδομητικές τους παρατηρήσεις συνέβαλαν αποφασιστικά στη διεκπεραίωση της παρούσας εργασίας.

Λάρισα, Φεβρουάριος 2012

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ.....σελ.

<b>Ευχαριστίες</b>	<b>2</b>
<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b>	<b>4</b>
<b>ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b>	<b>5</b>
<b>ΝΟΣΟΣ NASU-HAKOLA</b>	
• Ιστορία-Επιδημιολογία.....	6
• Αιτιοπαθογένεια.....	6
• Κλινική εικόνα - Πορεία.....	7
• Απεικονιστικός έλεγχος.....	8
• Παθολογική ανατομική.....	9
<b>ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΗΣ PLOSL</b>	<b>10</b>
• TYROBP : Το πρώτο γονίδιο.....	11
• TREM2 : Το δεύτερο γονίδιο.....	11
• Η πρωτεΐνη DAP12.....	14
• Η πρωτεΐνη TREM2.....	15
• Έκφραση και λειτουργία του συμπλέγματος DAP12/TREM2.....	16
• Λειτουργία της TREM2 στα δενδριτικά κύτταρα.....	17
• Λειτουργία του συμπλέγματος DAP12/TREM2 στους οστεοκλάστες.....	19
<b>ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΠΕΡΙΣΤΑΤΙΚΟΥ</b> .....	<b>20</b>
<b>ΓΕΝΕΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ</b> .....	<b>21</b>
• Απομόνωση DNA.....	21
• Προσδιορισμός ποιότητας και συγκέντρωσης του DNA.....	24
• Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης ( PCR – Polymerase Chain Reaction ).....	25
• Πέψη με την περιοριστική ενδονουκλεάση SfaNI.....	29
• Ηλεκτροφόρηση.....	30
<b>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b> .....	<b>32</b>
<b>ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ</b> .....	<b>35</b>
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b> .....	<b>36</b>

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η νόσος Nasu-Hakola (NHD) περιγράφηκε ταυτόχρονα από τους Nasu και Hakola ξεχωριστά, την ίδια περίπου περίοδο, τη δεκαετία του '70. Πρόκειται για ένα νόσημα, που κληρονομείται με τον αυτοσωματικό υπολειπόμενο χαρακτήρα και χαρακτηρίζεται από την εγκατάσταση προιούσας άνοιας και την εμφάνιση επαναλαμβανόμενων παθολογικών καταγμάτων, κατά τη διάρκεια της εφηβείας. Έχει αποδειχθεί ότι η νόσος οφείλεται σε μεταλλάξεις των γονιδίων TREM2 και DAP12 (TYROBP). Πρόκειται για γονίδια, που κωδικοποιούν τις δύο μονάδες ενός διαμεμβρανικού υποδοχέα μετάδοσης σήματος σε κύτταρα της φυσικής ανοσίας (NK-cells), με απώτερο σκοπό την ενεργοποίηση της μικρογλοίας και την διαφοροποίηση – λειτουργία των οστεοκλαστών και των δενδριτικών κυττάρων. Έως σήμερα έχουν περιγραφεί 8 μεταλλάξεις στο γονίδιο TREM2 και 6 μεταλλάξεις στο γονίδιο DAP12, που προκαλούν NHD.

Στην παρούσα εργασία περιγράφεται το πρώτο περιστατικό στην Ελλάδα, που διαπιστώθηκε να εμφανίζει τη νόσο, καθώς και πρωτοεμφανιζόμενη μετάλλαξη στο γονίδιο TREM2 (TYROBP).

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### ΝΟΣΟΣ NASU-HAKOLA

Η κάθε μορφής άνοιας, με προεξάρχουσα την νόσο Alzheimer, αποτελεί συχνή νευρολογική οντότητα στον ηλικιωμένο πληθυσμό, αποτελώντας πλέον τόσο ιατρική, όσο και κοινωνικοοικονομική πρόκληση για τις διάφορες βαθμίδες υγείας. Κατανοώντας τους μηχανισμούς εμφάνισης των διαφόρων νοσημάτων, μπορούν να αναπτυχθούν θεραπείες, που θα τα προβλέπουν και θα τα αντιμετωπίζουν. Η μελέτη των μονογονιδιακών νοσημάτων μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μοντέλο κατανόησης του παθογενετικού μηχανισμού κοινών διαταραχών.

Η άνοια, που ως όρος γενικά χαρακτηρίζει την έκπτωση των ανώτερων φλοιικών λειτουργιών, ορίζεται ως : ανάπτυξη νοητικής ανεπάρκειας, διαταραχή της μνήμης κι εν συνεχεία εγκατάσταση αφασίας, απραξίας, αγνωσίας ή και διαταραχή των εκτελεστικών διαταραχών. Η νοητική έκπτωση θα πρέπει να είναι αρκετά σοβαρή, ώστε να προκαλέσει διαταραχή της επαγγελματικής ή και κοινωνικής ζωής και θα πρέπει να αποκλίνει από το σύνηθες προηγούμενο υψηλότερο επίπεδο λειτουργικότητας του ασθενούς. Η άνοια είναι ένας πολύπλοκος κλινικός φαινότυπος, με πολλαπλή αιτιολογία και σημαντικότερες κοινωνικές επεκτάσεις, ίδια όταν εμφανίζεται πρώιμα, δηλαδή σε ηλικίες μικρότερες των 50 ετών. Πλειάδα νοσημάτων, που εκδηλώνονται σε εφήβους και ενήλικες, εμφανίζει σε κάποιο στάδιο εξέλιξης του άνοια, όπως : 1) πρωτοπαθή νευροεκφυλιστικά νοσήματα (νόσος Alzheimer, μετωποκροταφική άνοια, άνοια με σωματία Lewy, νόσος Parkinson, νόσος Huntington, σύνδρομο Down), 2) αγγειακής αιτιολογίας προσβολή του κεντρικού νευρικού συστήματος (οικογενής αμυλοειδωσική αγγειοπάθεια, σύνδρομο Cadasil – αυτοσωματική επικρατητική αγγειοπάθεια εγκεφάλου με υποφλοιώδη έμφρακτα και λευκοεγκεφαλοπάθεια), 3) διαταραχές του ανοσοποιητικού συστήματος (όπως η άνοια, που εμφανίζεται σε ανοσοκατασταλμένους από τον ιό HIV ασθενείς, νοσήματα που προκαλούνται από prions, η προϊούσα πολυεστιακή λευκοεγκεφαλοπάθεια, που εμφανίζεται σε ανοσοκατασταλμένους ασθενείς, στους οποίους ενεργοποιείται ο ιός JC και προκαλεί εγκεφαλοπάθεια, που στο μεγαλύτερο ποσοστό οδηγεί στο θάνατο), 4) τοξικές και μεταβολικές διαταραχές ( όπως ο αλκοολισμός, ο

υποθυρεοειδισμός, η ανεπάρκεια της βιταμίνης B12, η άνοια που παρουσιάζουν κάποιοι ασθενείς νεφροπαθείς, που αιμοκαθαίρονται, κυρίως παλαιότερα, όπου τα φίλτρα που χρησιμοποιούνταν στις μονάδες τεχνητού νεφρού περιείχαν αλουμίνιο), 5) αμομυελινωτικά νοσήματα (όπως η πολλαπλή σκλήρυνση, όπου 5-10% των ασθενών εκδηλώνουν άνοια, ίδια όταν εμφανίζονται βλάβες στην παρεγκεφαλίδα ). Τέλος, δομικές διαταραχές του εγκεφαλικού παρεγχύματος, όπως χωροκατακτητικές εξεργασίες ή τραυματισμοί του ( πχ άνοια των πυγμάχων ), μπορούν δυνητικά να προκαλέσουν σε κάποιο βαθμό άνοια.

Στον αρκετά μεγάλο κατάλογο των νοσημάτων, που προαναφέρθηκαν και μπορούν να παρουσιάσουν άνοια, υπάγονται και άλλα σπανιότερα και, ως ένα βαθμό, γενετικά καθορισμένα, όπως είναι κάποιες μορφές νόσου κινητικού νευρώνα καθώς και η πολυκυστική λιπομεμβρανώδης οστεοδυσπλασία με σκληρυντική λευκοεγκεφαλοπάθεια ( PLOSL : Polycystic lipomembranous osteodysplasia with sclerosing leucoencephalopathy ) ή νόσος Nasu-Hakola, για την οποία γίνεται εκτενής αναφορά στην παρούσα εργασία.

Η νόσος Nasu-Hakola κληρονομείται με τον αυτοσωματικό υπολειπόμενο χαρακτήρα<sup>5</sup> και προκαλεί πρόωμη έναρξη προιούσας άνοιας και παθολογικά κατάγματα των οστών<sup>6,1,2</sup>. Η μοριακή βάση της PLOSL είναι γνωστή, από τη στιγμή που ανακαλύφθηκαν μεταλλάξεις στα γονίδια DAP12 και TREM2<sup>3,4</sup>. Το σηματοδοτικό μονοπάτι, στο οποίο συμμετέχουν οι πρωτεΐνες, που κωδικοποιούνται από τα ανωτέρω γονίδια, εντοπίζεται στα κύτταρα της μυελοειδούς σειράς<sup>7</sup>. Η μικρογλοία και οι οστεοκλάστες είναι τα μυελοειδή κύτταρα του εγκεφάλου και των οστών αντίστοιχα κι έτσι εμπλέκονται στην παθογένεση της PLOSL. Ο ακριβής μηχανισμός, όμως, με τον οποίο διαταραχές στη λειτουργικότητα του υποδοχέα, ως αποτέλεσμα μεταλλάξεων στα γονίδια DAP12 και TREM2 οδηγούν στη νόσο, δεν έχει πλήρως εξακριβωθεί.

## Ιστορία – Επιδημιολογία

Το 1961 ο Terayama σε συνέδριο Ορθοπαιδικής στην Ιαπωνία ονόμασε τις χαρακτηριστικές οστικές βλάβες της νόσου ως multiple membranocystoses<sup>8</sup>. Αργότερα, ο Nasu τη χαρακτήρισε ως membrano-cystic lipodistrophy και την παρουσίασε στο συνέδριο Παθολογίας στο Τόκυο το 1970, ενώ επί 2 έτη στη συνέχεια, αναφερόταν στα συνέδρια ως membranous lipodystrophy<sup>9</sup>.

Η νόσος περιγράφηκε ακόμη και σε Σκανδιναβικές χώρες και συγκεκριμένα σε Σουηδία και Φινλανδία, όπου ο Jarvi και συν. της προσέδωσαν την ονομασία cystic capillary-necrotic osteodysplasia<sup>10</sup>. Το 1970 ο Hakola και συν. τη χαρακτήρισαν ως osteodysplasia polycystica hereditaria combined with sclerosing leucoencephalopathy. Το 1973 ο Yakumaru επεσήμανε ομοιότητες σε παθολογοανατομικό επίπεδο ανάμεσα στους Σουηδούς και Φινλανδούς πάσχοντες<sup>11</sup>. Στην Ιαπωνία η νόσος ονομάστηκε Nasu disease και το 1981 ο Hanawa και συν. πρότεινε ότι από τη στιγμή που τα περιστατικά των Φινλανδών και η Nasu disease ήταν πανομοιότυπα, η νόσος έπρεπε να ονομάζεται Nasu-Hakola ( NHD )<sup>12</sup>. Στη Φινλανδία, από το 1980 ονομαζόταν «polycystic lipomembranous osteodysplasia with sclerosing leucoencephalopathy»(PLOSL)<sup>13</sup>. Έκτοτε έχουν περιγραφεί περίπου 200 περιστατικά παγκοσμίως, τα περισσότερα στην Ιαπωνία και τη Φινλανδία, αλλά επίσης και στη Σουηδία, ΗΠΑ, Νορβηγία, Ιταλία, Νότιο Αφρική, Αυστρία, Τουρκία, Βέλγιο, Γαλλία, Βραζιλία, Γερμανία, Ισπανία, Βολιβία και πλέον 1 περιστατικό και στην Ελλάδα, με ανίχνευση νέας μετάλλαξης, όπως θα περιγραφεί παρακάτω. Η επίπτωση της νόσου στη Φινλανδία είναι 2/1000000<sup>14</sup>.

## Αιτιοπαθογένεια

Έχουν προταθεί δύο υποθέσεις όσον αφορά στον παθογενετικό μηχανισμό της PLOSL: η πρώτη υποστηρίζει ότι η νόσος οφείλεται σε διαταραχή του μεταβολισμού των λιπιδίων, που οδηγεί σε καταστοφή της μυελίνης<sup>15</sup>. Η δεύτερη υπόθεση θεωρεί ότι η πρωταρχική βλάβη, που οδηγεί σε διαταραχή του

αιματοεγκεφαλικού φραγμού και χρόνιο εγκεφαλικό οίδημα, είναι αγγειακής αρχής<sup>16</sup>. Πράγματι, στην PLOSL ανευρίσκονται δομικές βλάβες των αγγείων του εγκεφάλου, αλλά δεν είναι ακριβώς γνωστό το αν αυτές είναι η αιτία ή το αποτέλεσμα της νόσου. Καμία από τις δύο αυτές υποθέσεις δεν έχουν αποδειχθεί, οπότε αναζητούμε την αιτιοπαθογένεια της νόσου σε γενετικούς παράγοντες, όπως θα δούμε λίγο παρακάτω.

## **Κλινική εικόνα**

Η πρόιμη ανάπτυξη των ασθενών με PLOSL είναι φυσιολογική. Η συμπτωματολογία άρχεται συνήθως με άλγος και κατάγματα στους καρπούς και τα σφυρά, μετά από ελάσσονες κακώσεις στην πρόιμη ενήλικη ζωή. Η νευρολογική εικόνα εμφανίζεται ως διαταραχή της προσωπικότητας και της συμπεριφοράς στην τρίτη δεκαετία της ζωής. Συγκεκριμένα, οι ασθενείς εμφανίζουν σύνδρομο μετωπιαίου λοβού (απώλεια κρίσης, έλλειψη πρωτοβουλίας, ευφορικό συναίσθημα, άρση των αναστολών, διαταραχή συγκέντρωσης και προσοχής, απώλεια της libido, απάθεια, μη εναισθησία της κατάστασής τους)<sup>17</sup>. Αναπτύσσεται εν συνεχεία προιούσα άνοια, με διαταραχές της μνήμης, απραξία, αγνωσία, αποπροσανατολισμός σε χώρο-χρόνο, και στους περισσότερους ασθενείς παρουσιάζονται σημεία και συμπτώματα προσβολής του ανώτερου κινητικού νευρώνα, δηλαδή πυραμιδική σημειολογία (αμφοτερόπλευρο σημείο Babinski, σπαστικότητα) με αποτέλεσμα σπαστική βάδιση, παραπληγία, ορθοκυστικές διαταραχές<sup>18</sup>. Επίσης, οι περισσότεροι εμφανίζουν επιληπτικές κρίσεις, μερικές εκ των οποίων καταλήγουν σε επιληπτική κατάσταση (status epilepticus)<sup>19</sup>. Η νόσος οδηγεί σε τελικού σταδίου άνοια και φυτική κατάσταση, ενώ ο θάνατος επέρχεται πριν την ηλικία των 50 ετών<sup>20</sup>.

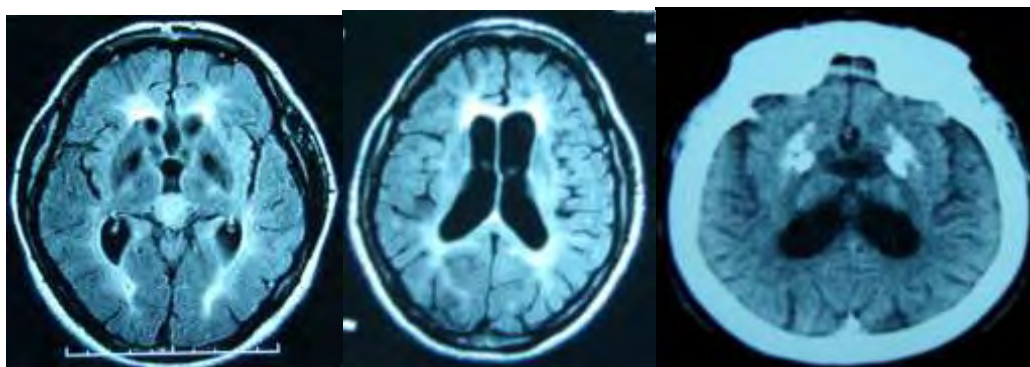
Ο Hakola διέκρινε την κλινική εικόνα σε 4 στάδια : το πρώτο είναι το λανθάνον στάδιο, που χαρακτηρίζεται από φυσιολογική πρόιμη ανάπτυξη. Το δεύτερο, το οστικό, που ξεκινά την τρίτη δεκαετία της ζωής, με άλγος και παθολογικά κατάγματα, ίδια των καρπών και των σφυρών και παρουσία κυστικών αλλοιώσεων, κυρίως στα επιφυσιακά άκρα των μακρών οστών. Το πρώιμο νευρολογικό στάδιο, το τρίτο στη σειρά, εμφανίζεται περίπου στην ηλικία των 40 ετών, με προιούσα διαταραχή της μνήμης, ευφορικό συναίσθημα, άρση των αναστολών και απαρχή έκπτωσης των υπολοίπων ανώτερων φλοιικών λειτουργιών. Καθώς η νόσος



εξελίσσεται, μεταβαίνει στο τέταρτο και τελευταίο στάδιο, το όψιμο νευρολογικό. Οι ασθενείς εμφανίζουν βαριά άνοια, είναι κατακεκλιμένοι, ανίκανοι να βαδίσουν λόγω του οστικού άλγους και της σοβαρής κινητικής διαταραχής (συνεπεία της προσβολής του ανώτερου κινητικού νευρώνα) με αποτέλεσμα να οδηγούνται στο θάνατο, λόγω λοιμώξεων του αναπνευστικού (από εισρόφηση) ή σπανιότερα του ουροποιητικού συστήματος, λίγα χρόνια αργότερα, πριν την ηλικία των 50 ετών <sup>21</sup>.

### **Απεικονιστικός έλεγχος**

Ο ακτινολογικός έλεγχος επιβεβαιώνει τις οστικές βλάβες με την ανάδειξη κυστικών αλλοιώσεων στα μακρά οστά, ίδια στα επιφυσιακά τμήματα αυτών. Στον εγκέφαλο, η διενέργεια αξονικής ή μαγνητικής τομογραφίας αναδεικνύει διάταση του κοιλιακού συστήματος και ατροφία των εγκεφαλικών ημισφαιρίων, κυρίως μετωποκροταφικά, καθώς και αμφοτερόπλευρη και συμμετρική επασβέστωση των βασικών γαγγλίων <sup>22</sup>. Το ηλεκτροεγκεφαλογράφημα (ΗΕΓ) παρουσιάζει μια διάχυτη βραδεία δραστηριότητα (κυρίως θ ρυθμό), με καταγραφή διάσπαρτων αιχμηρών κυμάτων. Η αξονική τομογραφία εκπομπής μονήρων φωτονίων (SPECT : Single-photon emission computed tomography) εμφανίζει ελάττωση της αιματικής ροής στους μετωπιαίους και κροταφικούς λοβούς, τα βασικά γάγγλια και το θάλαμο <sup>23</sup>, ενώ η τομογραφία εκπομπής ποζιτρονίων (PET : Positron-emission tomography) φανερώνει μειωμένο ρυθμό μεταβολισμού της γλυκόζης στις προαναφερθείσες περιοχές <sup>24</sup>.



***Εικόνα 1 :** Απεικονιστικός έλεγχος του εγκεφάλου όπου καταδεικνύεται εγκεφαλική ατροφία, λευκοεγκεφαλοπάθεια και αποτιτανώσεις των βασικών γαγγλίων*

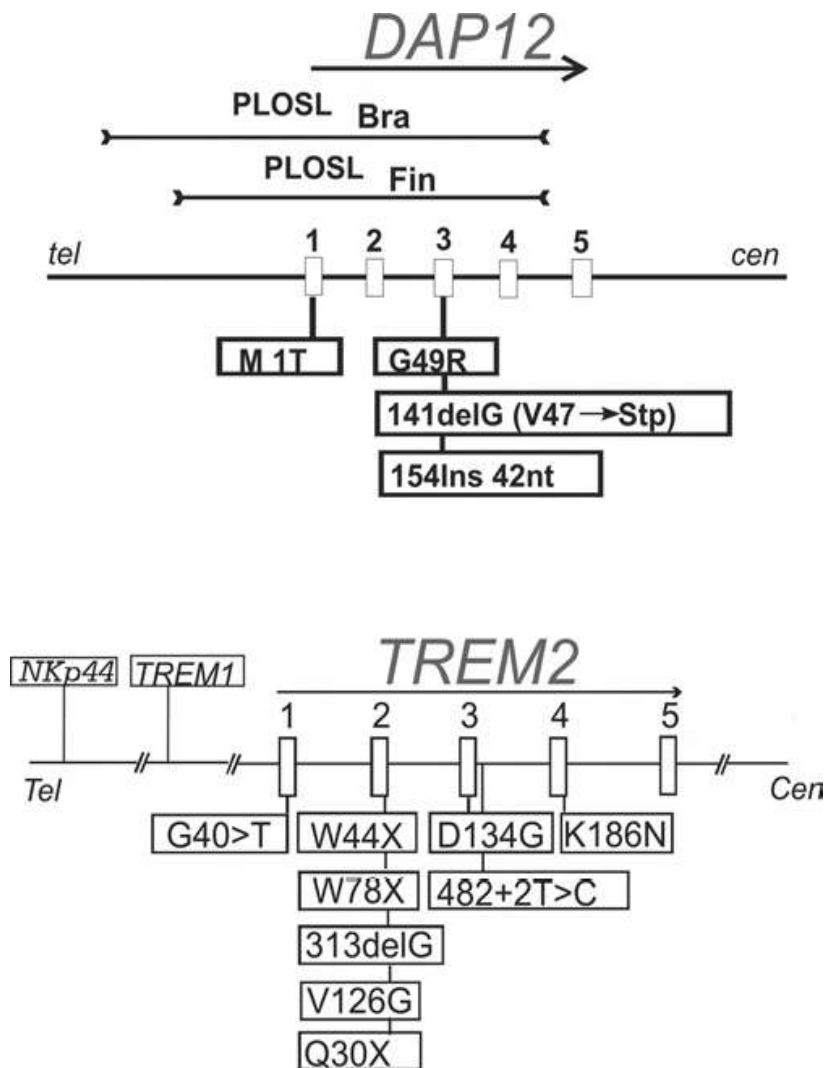


*Εικόνα 2 : Ακτινολογικός έλεγχος άκρας χείρας με παρουσία κύστεων στα επιφυσιακά τμήματα των μακρών οστών*

### **Παθολογική ανατομική**

Οι ασθενείς με PLOSL αναπτύσσουν οστεοπόρωση (απώλεια οστικής μάζας). Ο ακτινολογικός έλεγχος καταδεικνύει, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, κυστικές αλλοιώσεις στα μακρά οστά, οι οποίες πληρούνται με άμορφα λιπώδη υλικά, λιπιδικές μεμβράνες και λιποκύτταρα <sup>25</sup>. Στο κεντρικό νευρικό σύστημα η ιστολογική μελέτη καταδεικνύει σημαντική εκφύλιση των αξόνων και της μυελίνης, ενεργοποίηση της μικρογλοίας και των αστροκυττάρων και διαταραχές των αγγείων, που συνίστανται σε λεπτύνση του τοιχώματός τους και περιορισμό της διαπερατότητάς τους. Δεν έχουν παρατηρηθεί παθολογικά έγκλειστα στους νευρώνες-γλοία, μετά την χρώση τους για ανεύρεση φωσφορυλιωμένης tau-πρωτεΐνης, ασνουκλείνης, ουμπικουιτίνης ή σωματίων Lewy <sup>26</sup>.

## Γενετική της PLOSL



**Εικόνα 1 :** Τα γονίδια *TYROBP* (ή *DAP12*) και *TREM 2* και οι μεταλλάξεις τους

## **TYROBP : Το πρώτο γονίδιο της PLOSL**

Ο πρώτος γενετικός τόπος της νόσου ανευρέθηκε στο χρωμόσωμα 19q13.1 σε Φινλανδούς ασθενείς, με τη βοήθεια μελετών ευρείας γονιδιωματικής συσχέτισης (GWA - Genome Wide Approach), την ανισορροπία σύνδεσης (linkage disequilibrium) και την ανάλυση των απλοτύπων<sup>26,27</sup>. Οι GWA είναι ουσιαστικά μελέτες γενετικής συσχέτισης, που ελέγχουν το κατά πόσο ένα αλληλίο (SNP- single nucleotide polymorphism) εμφανίζεται με μεγαλύτερη συχνότητα σε πάσχοντες, σε σχέση με τους μη πάσχοντες (συνήθως αφορούν στο γενικό πληθυσμό και όχι σε οικογένειες). Η ανισορροπία σύνδεσης (linkage disequilibrium) είναι ένας όρος που περιγράφει την κατάσταση, σύμφωνα με την οποία στο ίδιο χρωμόσωμα, σ' έναν γενετικό τόπο, ένα συγκεκριμένο αλληλόμορφο κληρονομείται μαζί με κάποιο άλλο συγκεκριμένο αλληλόμορφο ενός δεύτερου γενετικού τόπου, συχνότερα από ότι θα συνέβαινε τυχαία ή αλλιώς η εμφάνιση κάποιων συνδυασμών αλληλομόρφων ή γενετικών δεικτών σε έναν πληθυσμό, συχνότερα ή σπανιότερα απ' ότι θα περίμενε κανείς, με βάση έναν τυχαίο σχηματισμό απλοτύπων από αλληλόμορφα, βάσει των συχνοτήτων τους<sup>62,63</sup>.

Στη συνέχεια έγινε sequencing της περιοχής 19q13.1 και ανακαλύφθηκε το γονίδιο TYROBP (ή DAP12 ή KARAP)<sup>28,29</sup>. Όλοι οι Φινλανδοί ασθενείς βρέθηκαν ομόζυγοι σε μετάλλαξη διαγραφής 5265bp στα εξόνια 1-4 του γονιδίου TYROBP. Μεταλλάξεις στο ίδιο γονίδιο ανευρέθησαν και σε ασθενεία άλλων χωρών (Πίνακας 1)

## **TREM2 : Το δεύτερο γονίδιο της PLOSL**

Μελέτες γενετικής συσχέτισης και συγκεκριμένα μελέτες υποψηφίων γονιδίων χρησιμοποιήθηκαν σε πάσχοντες, στους οποίους δεν βρέθηκαν μεταλλάξεις στο γονίδιο TYROBP και οι οποίες οδήγησαν στην εντόπιση μεταλλάξεων στο γονίδιο TREM2, που εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 6p21.2<sup>30,61</sup>. Οι ερευνητές προέβησαν ακολούθως σε αποκωδικοποίηση της παραπάνω περιοχής, όπου διαπιστώθηκε ότι υπάρχουν άλλα δύο υποψήφια γονίδια, τα TREM1 και NKP44, αλλά μόνο το TREM2 είναι τελικά, μέσω sequencing του γενομικού DNA των ασθενών, υπεύθυνο για την εμφάνιση της νόσου<sup>31,32</sup>. Έως τώρα έχουν περιγραφεί 11

μεταλλάξεις του γονιδίου αυτού (Πίνακας 1). Οι περισσότερες είναι σημειακές (point mutations), προκαλώντας αντικατάσταση ενός αμινοξέως με κάποιο άλλο, με αποτέλεσμα την παραγωγή μιας μη λειτουργικής πρωτεΐνης. Έχουν επίσης περιγραφεί και κάποιες άλλες μεταλλάξεις, που προκαλούν την εμφάνιση κωδικονίων λήξης του σχηματισμού της αντίστοιχης πρωτεΐνης (stop codons)<sup>33,59,60</sup>.

Τόσο το TYROBP όσο και το TPBM2 μελετήθηκαν και σε άλλα νευροεκφυλιστικά νοσήματα, στα οποία εμφανίζεται σχετικά πρώιμα άνοια, όπως σε κάποια περιστατικά νόσου Alzheimer και σε κάποια με μετωποκροταφική άνοια, αλλά έως τώρα δεν βρέθηκαν κάποιοι μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί (SNP's), που να ευθύνονται για την εμφάνισή τους<sup>34,35</sup>.

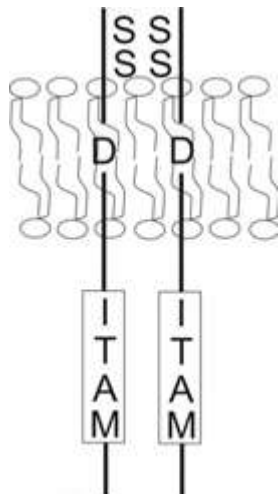
<i>Μετάλλαξη</i>	<i>Χώρα</i>	<i>Αναφορά</i>
<b><u>TYROBP</u></b>		
Del 5.3 kb (PLOSFin)	Finlad, Sweden, Norway	(Paloneva et al. 2000; Tranebjaerg et al. 2000)
Del 8 kb	Brazil	(Paloneva et al. 2002)
2T>C / Met1Thr	Japan	(Kondo et al. 2002)
141delG / FS and termination at aa 52	Japan	(Paloneva et al 2000; Kondo et al. 2002)
145G>C / Gly49Arg	Portugal	(Baeta et al. 2002)
154-155ins42nt	United Kingdom (Scotland), Germany	Klunemann et al 2005)
262G>T / Glu87Stp	Japan	(Kuroda et al. 2007)
<b><u>TREM2</u></b>		
40G>T / Glu14Stp	Germany	(Paloneva et al. 2003)
97C>T / Gln33Stp	Belgium, Italy	(Soragna et al. 2003; Klunemann et al. 2005)
132G>A / Trp44Stp	Bolivia	(Paloneva et al. 2002)
233G>A / Trp78Stp	Sweden	(Paloneva et al. 2002)
267delG / FS	France (Turkey)	(Klunemann et al. 2005)
313delG / FS	Germany	(Klunemann et al. 2005)
377T>G / Val126Gly	Canada, UK (Sri Lanka)	(Klunemann et al. 2005)
401A>G / Asp134Gly	USA (Slovakia)	(Paloneva et al. 2002)
482+2T>C / SP	Italy	(Paloneva et al. 2002)
558G>T / Lys186Asn	Norway	(Paloneva et al. 2002)

**(TP, truncated protein; FS, frameshift; SP, splicing mutation.)**

*Πίνακας 1 : Μεταλλάξεις των γονιδίων TYROBP και TREM2*

## Η πρωτεΐνη DAP12

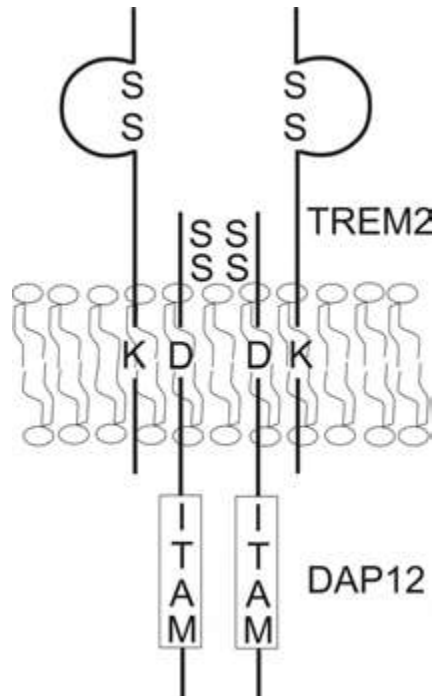
Το γονίδιο TYROBP (ή DAP12) κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη 12kDa, που είναι ουσιαστικά μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη τύπου I, αποτελούμενη από 113 αμινοξέα<sup>36,37</sup>. Η διμερής αυτή πρωτεΐνη αποτελείται από ένα κορυφαίο (εξωκυττάριο) τμήμα 27 αμινοξέων, ακολουθεί το υπόλοιπο εξωκυττάριο από με 14 αμινοξέα, το διαμεμβρανικό από 24 αμινοξέα και το ενδοκυττάριο από 48 αμινοξέα. Πρόκειται για πρωτεΐνη υποδοχής σήματος<sup>38</sup>. Το ενδοκυττάριο τμήμα της DAP12 περιλαμβάνει μια ενεργοποιημένη ακολουθία αμινοξέων, που περιέχει τυροσίνη, το άκρο της οποίας είναι θέση φωσφορυλίωσης της πρωτεϊνικής κινάσης C (PKC) και της κινάσης II (ITAM)<sup>39,57,58</sup>. Στο ενδοκυττάριο τμήμα της η πρωτεΐνη φέρει μια περιοχή ασπαρτικού οξέος (D), υπεύθυνο για τη σύνδεσή της με το μόριο υποδοχής (Εικόνα 3)



**Εικόνα 3 :** Σχηματική αναπαράσταση του πρωτεϊνικού διμερούς DAP12. Το αρνητικά φορτισμένο ασπαρτικό (D) είναι αναγκαίο για τη σύνδεση της πρωτεΐνης με το μόριο υποδοχής, ενώ το ενδοκυττάριο τμήμα ITAM για τη μετάδοση του σήματος

## Η πρωτεΐνη TREM2

Η πρωτεΐνη TREM2 (Triggering receptor expressed on myeloid cells-2) κωδικοποιείται από το ομώνυμο γονίδιο και είναι ένας διαμεμβρανικός υποδοχέας της υπεροικογένειας των ανοσοσφαιρινών <sup>40</sup>. Η οικογένεια των TREM πρωτεϊνών συμμετέχει σε διάφορες κυτταρικές λειτουργίες των μυελοειδών κυττάρων. Μέλη αυτής της οικογένειας συνδέονται με την πρωτεΐνη DAP12 για την ενδοκυττάρια μετάδοση σημάτων <sup>41</sup>. Η TREM2 είναι μια γλυκοπρωτεΐνη 40 kDa, περιλαμβάνει ένα εξωκυττάριο μεταβλητό τμήμα (V-type) , μια φορτισμένη περιοχή λυσίνης (K) στο διαμεμβρανικό της τμήμα και μια μικρή κυτταροπλασματική ουρά, που δεν περιέχει λειτουργικά τμήματα. Η φορτισμένη λυσίνη (K) στο διαμεμβρανικό τμήμα είναι απαραίτητη για τη σύνδεση της TREM2 με την DAP12 <sup>42,43</sup>.



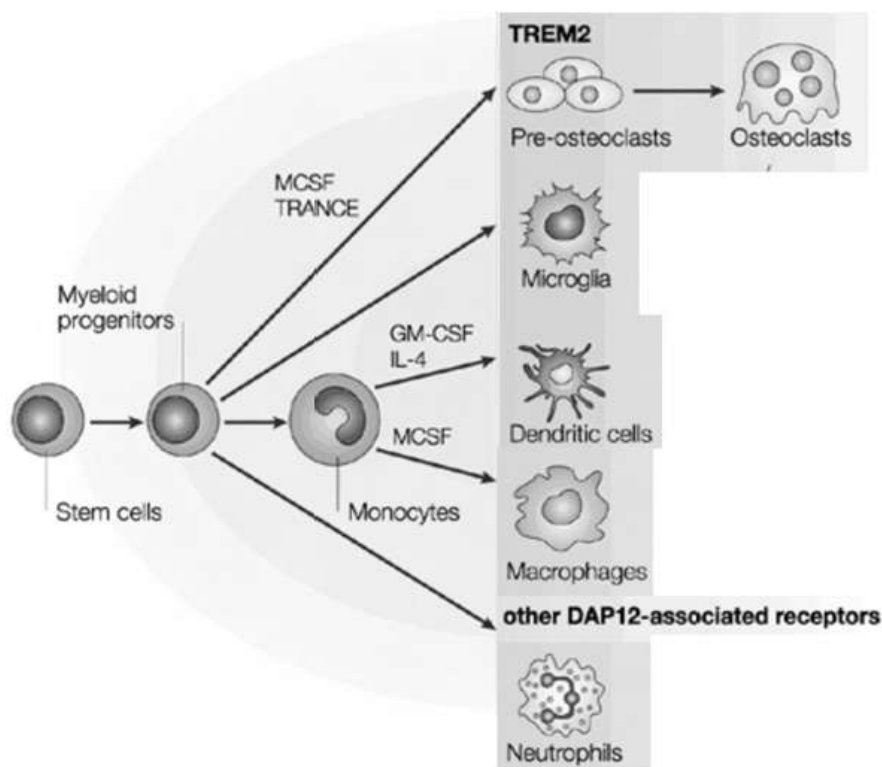
**Εικόνα 4 :** Το σύμπλεγμα των πρωτεϊνών TREM2 και DAP12



## Έκφραση και λειτουργία του συμπλέγματος DAP12/TREM2

Η πρωτεΐνη DAP12 εκφράζεται στα λευκά αιμοσφαίρια του περιφερικού αίματος, το σπλήνα, τα NK-cells και ακόμη στο cDNA των μονοπύρηνων του περιφερικού αίματος, των δενδριτικών κυττάρων (DC's), των μονοκυττάρων και των NK-cells<sup>44</sup>. Η πρωτεΐνη TREM2 εκφράζεται στα δενδριτικά κύτταρα. Έτσι, ενώ η DAP12 εκφράζεται σε αρκετά κύτταρα της αιμοποιητικής σειράς, η έκφραση της TREM2 φαίνεται πως εμφανίζεται μόνο στα μυελοειδή<sup>45,46</sup>.

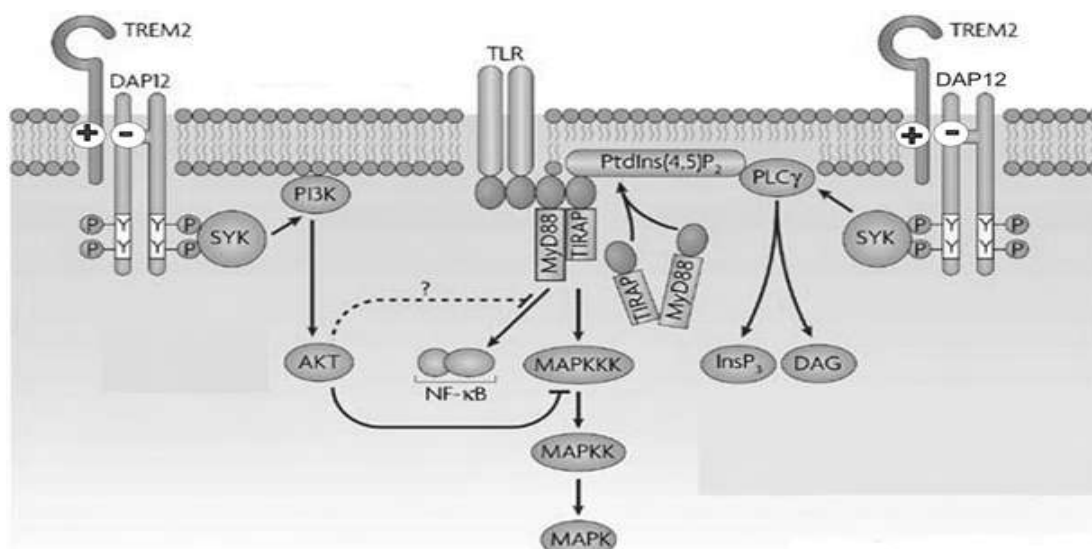
Τα μυελοειδή κύτταρα προέρχονται από τα πρόδρομα αιμοποιητικά κύτταρα του μυελού των οστών. Αυτά, αρχικά διαφοροποιούνται σε προγονικά μυελοειδή, που δίνουν στη συνέχεια γένεση στα μονοκύτταρα, τους πρόδρομους οστεοκλάστες και τη μικρογλοία. Τα μονοκύτταρα διαφοροποιούνται περαιτέρω στα μακροφάγα και τα δενδριτικά κύτταρα. Οι προ-οστεοκλάστες συγχωνεύονται και δίνουν τους ώριμους οστεοκλάστες<sup>47</sup>.



**Εικόνα 5 :** Τα μυελοειδή κύτταρα που εκφράζουν τις πρωτεΐνες DAP12 και TREM2

## Λειτουργία της TREM2 στα δενδριτικά κύτταρα

Οι πρωτεΐνες DAP12 και TREM2 εκφράζονται και οι δύο όπως αναφέρθηκε στα δενδριτικά κύτταρα. Η έκφραση της TREM2 πραγματοποιείται στα δενδριτικά κύτταρα (DCs) όταν η ωρίμανση αυτών προάγεται από λιποπολυσακχαρίτες (LPS), τον παράγοντα νέκρωσης όγκων – α (TNF-α), τα CD40, την ιντερλευκίνη (IL)- 1β ή τις ανοσοσφαιρίνες συνολικά (IgG's)<sup>48</sup>. Η σύνδεση της TREM2 μ' ένα μονοκλωνικό αντίσωμα (mAb) έχει ως αποτέλεσμα τη γρήγορη αύξηση των επιπέδων ασβεστίου ενδοκυτταρίως. Επίσης, μέσω της TREM2 επέρχεται η φωσφορυλίωση της τυροσίνης με τις κινάσες ERK1/2 και παράταση της επιβίωσης των DC's. Αυτό το αποτέλεσμα μπλοκάρεται από αναστολείς της ERK, πράγμα που σημαίνει ότι η TREM2 προάγει την επιβίωση των DC's μέσω ενεργοποίησης του μονοπατιού ERK<sup>49,50</sup>. Η TREM2 προκαλεί επίσης την αύξηση της έκφρασης του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (MHC class II), των CD40 και CD86, τα οποία όλα εμπλέκονται στην ενεργοποίηση των T- λεμφοκυττάρων. Η ενεργοποίηση της TREM2 εξαρτάται πλήρως από την πρωτεϊνική κινάση της τυροσίνης (PTK), μερικώς από την ERK και είναι ανεξάρτητη από τον NF-κΒ και την p38/SAPK (stress activated protein kinase)<sup>51,52</sup>. Έτσι, η TREM2 φαίνεται ότι είναι ένας ενεργός υποδοχέας για τα DC's και άρα σημαντική για τη φυσιολογική τους ομοίωσταση.



Εικόνα 6 : Λειτουργία του συμπλέγματος DAP12/TREM2

## Λειτουργία του συμπλέγματος DAP12/TERM2 στους οστεοκλάστες

Οι οστεοκλάστες είναι πολυπύρρηνα γιγαντιαία κύτταρα, που ενέχονται στην ομοίωση και την αποδόμηση του οστού. Ανεπάρκεια της λειτουργίας του συμπλέγματος DAP12/TERM2 οδηγεί σε ελάττωση της αποδόμησης του οστού και εξασθενημένη επαναδιοργάνωση της ακτίνης<sup>53,54</sup>. In vitro έχει δειχθεί ότι το σύμπλεγμα αυτών των πρωτεϊνών ρυθμίζει τόσο την επαναρρόφηση, όσο και την μετακίνηση των οστεοκλαστών κι έτσι συμβάλλει εξαιρετικά στη διαφοροποίησή τους<sup>55,56</sup>. Κάτι τέτοιο όμως δεν έχει αποδειχθεί in vivo, εντούτοις όμως είναι προφανείς οι οστικές διαταραχές στην PLOSL, ασχέτως αν ο μηχανισμός πρόκλησής των απαιτεί ακόμη περαιτέρω έρευνα, προκειμένου να αποσαφηνιστεί.

## ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### Παρουσίαση περιστατικού

Πρόκειται για ασθενή 33 ετών, θήλυ, ελληνικής καταγωγής με αρνητικό οικογενειακό ιστορικό άνοιας, που προσεκομίσθη στη Νευρολογική κλινική του ΠΓΝΛ λόγω προιούσας έκπτωσης των ανώτερων φλοιικών λειτουργιών κι εγκατάσταση άνοιας. Στο παρελθόν είχε υποστεί τρεις φορές κατάγματα στα άκρα, μετά από κακώσεις ήσσονος έντασης (σε ηλικία 28, 30 και 33 ετών).

Από την ηλικία των 30 ετών η ασθενής παρουσίασε προοδευτικά διαταραχές από την ψυχική σφαίρα (διαταραχές θυμικού, με εναλλαγές ευφορίας-κατάθλιψης), βουλιμία, αύξηση του ρυθμού ομιλίας, έλλειψη πρωτοβουλίας, δυσκολία στην επιτέλεση ακόμη και των απλών καθημερινών δραστηριοτήτων, τάσεις φυγής, εύκολη απόσπαση προσοχής, δυσχέρεια στη συγκέντρωση, στερεοτυπίες, διαταραχές της πρόσφατης μνήμης, αστάθεια στη βάδιση και δυσχέρεια στην έναρξη της ούρησης.

Η αντικειμενική εξέταση κατέδειξε τετραπυραμιδική συνδρομή, με συμμετρικά ζωηρά τενόντια αντανακλαστικά, αμφοτερόπλευρο σημείο Babinski και έκλυση αρχέγονων αντανακλαστικών. Από τη νευροψυχολογική εκτίμηση προέκυψε Mini-mental score 14/30 κι επιπλέον η ασθενής παρουσίαζε μείωση των γνωστικών της λειτουργιών συνολικά, με προεξάρχουσες την άρση των αναστολών, τη διάσπαση της προσοχής, τη μείωση των εκτελεστικών της δεξιοτήτων, την εξασθένιση της μνήμης, τη μείωση των λεκτικών δεξιοτήτων, της αυθόρμητης κατονομασίας και της κατανόησης

Ο απεικονιστικός της έλεγχος κατέδειξε στον μεν εγκέφαλο διάταση του κοιλιακού συστήματος, εγκεφαλική ατροφία (ίδια μετωπιαία άμφω) και επασβεστώσεις στα βασικά γάγγλια, στα δε οστά κυστικές αλλοιώσεις στα επιφυσιακά άκρα των μακρών οστών των άκρων.

Ως εκ τούτου ετέθη κλινικά η διάγνωση της νόσου Nasu-Hakola (ή PLOSL) και ακολούθησε γενετικός έλεγχος στα γονίδια TREM2 και DAP12 (TYROBP).

## Γενετικός έλεγχος

1. Γενομικό DNA απομονώθηκε από περιφερικό αίμα της ασθενούς, των γονέων και του αδελφού της καθώς και από φαινοτυπικά φυσιολογικούς 200 μάρτυρες ελληνικής καταγωγής, χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της εξαλάτωσης. Ενζυμική ενίσχυση του DNA πραγματοποιήθηκε με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR : Polymerase Chain Reaction). Συγκεκριμένα ελέγχθησαν οι κωδικοποιούμενες αλληλουχίες των γονιδίων TREM2 (εξόνια 1-5) και DAP12 (TYROBP) (εξόνια 1-5 ). Τα εξόνια ενισχύθηκαν με τη χρήση κατάλληλων εκκινητών και πραγματοποιήθηκε ανίχνευση της πρόσθιας και αντίστροφης αλληλουχίας τους, με υψηλής ευκρίνειας τριχοειδή ηλεκτροφόρηση σε γενετικό αναλυτή Applied Biosystems prism 3100. Έγινε ανάλυση της ανιχνευθείσας ακολουθίας τους και σύγκριση με φυσιολογική ακολουθία, που ελήφθη από την παγκόσμια βάση δεδομένων GenBank database.

## ΤΕΧΝΙΚΕΣ

### Απομόνωση DNA

Βασικό και πρωταρχικό βήμα για τη μελέτη του DNA αποτελεί αναμφισβήτητα η σωστή και αποτελεσματική απομόνωσή του από τα κύτταρα του οργανισμού. Ζητείται πάντα μια μέθοδος απομόνωσης DNA που να είναι αποδοτική ποσοτικά και να δίνει DNA σε καλή κατάσταση. Αυτό συμβαίνει όταν το DNA είναι ελεύθερο προσμίξεων και δεν είναι διασπασμένο σε πολύ μικρά κομμάτια που δεν μπορούν να ενισχυθούν και να αναλυθούν.

Υπάρχουν πολλές μέθοδοι απομόνωσης γενομικού DNA. Η επιλογή της κατάλληλης τεχνικής εξαρτάται από πολλές παραμέτρους, όπως το είδος και η ποσότητα των διαθέσιμων κυττάρων, το είδος και η ποιότητα του DNA που θέλουμε να απομονώσουμε αλλά και η μοριακή κατάσταση στην οποία θα πρέπει να βρίσκεται

το DNA. Στο συγκεκριμένο πειραματικό στάδιο εφαρμόστηκε η μέθοδος της εξαλάτωσης. Η απομόνωση γενωμικού DNA γίνεται από εμπύρηννα κύτταρα περιφερικού αίματος (πυρήνες λευκοκυττάρων). Για τη διαδικασία αυτή λαμβάνονται 10ml αίματος που τοποθετούνται σε σωληνάριο, παρουσία αντιπηκτικού Na<sub>2</sub>EDTA. Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται για την απομόνωση του γενωμικού DNA φαίνονται στον παρακάτω πίνακα:

-Διάλυμα διάσπασης των πυρήνων
Lysis I: NH <sub>4</sub> Cl (155mM), KHCO <sub>3</sub> (10mM), EDTA (1mM), pH=7,4
Lysis II: Tris (10mM), NaCl (400mM), di-Na EDTA (2mM), pH= 8,2
-Διάλυμα πρωτεΐνάσης K (10mg/ml)
-Διάλυμα 10% w.v SDS (sodium dodecyl sulfate: δωδεκακυλοθειϊκό νάτριο)
-Κορεσμένο διάλυμα NaCl (6M)
-Απόλυτη αιθανόλη
-CH <sub>3</sub> COONa (3M)
-Πηκτή αγαρόζης 1%

Τα στάδια που ακολουθούνται για την απομόνωση του DNA με τη μέθοδο της εξαλάτωσης παρουσιάζονται παρακάτω:

#### 1η μέρα

1. Τοποθετούμε το αίμα σε σωληνάριο πολυπροπυλενίου των 15ml και αραιώνουμε ως 12 περίπου ml με ddH<sub>2</sub>O (δισ απεσταγμένο νερό). Ακολουθεί καλή ανάδευση (με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται λύση των ερυθρών αιμοσφαιρίων).
2. Φυγοκεντρούμε για 15min στις 3000rpm, στους 4°C (απομόνωση των εμπύρηνων κυττάρων).

3. Μετά την ολοκλήρωση της φυγοκέντρωσης, το υπερκείμενο απορρίπτεται και η διαδικασία συνεχίζεται με το ίζημα. Τα κύτταρα αραιώνονται σε ddH<sub>2</sub>O έως 12ml περίπου και ανακινούμε σε vortex.
4. Φυγοκεντρούμε για 15min στις 3000rpm, στους 4°C.
5. Αφαιρούμε το υπερκείμενο και συνεχίζουμε με το ίζημα. Προσθέτουμε το διάλυμα lysis I μέχρι τα 12ml.
6. Φυγοκεντρούμε για 15min στις 3000rpm, στους 4°C.
7. Επαναλαμβάνουμε τα στάδια 5 και 6 με lysis I.
8. Αφαιρούμε το υπερκείμενο και συνεχίζουμε με το ίζημα. Προσθέτουμε το διάλυμα lysis II μέχρι τα 6ml (τα λυτικά διαλύματα lysis I και lysis II διευκολύνουν τη διάσπαση των πυρηνικών μεμβρανών για την απελευθέρωση του DNA. Επίσης, όπως φαίνεται στον παραπάνω πίνακα, περιέχουν EDTA που δεσμεύει τα δισθενή κατιόντα (Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>) που θεωρούνται απαραίτητα για τη δράση των νουκλεασών. Έτσι, τα ένζυμα αυτά απενεργοποιούνται, γεγονός που εξυπηρετεί στην αποφυγή της διάσπασης του DNA). Ανακινούμε ισχυρά και επωάζουμε για 15-30min, σε θερμοκρασία δωματίου.
9. Προσθέτουμε 750μl SDS (10% w/v) και 100μl πρωτεΐνάσης K (10mg/ml) (το SDS είναι ένα ανιονικό αποδιατακτικό που δεσμεύει τα λιπίδια και καταστρέφει τη δομή της μεμβράνης του πυρήνα, ενώ συμμετέχει στην αποδιάταξη της χρωματίνης και των πρωτεϊνών. Επίσης, με την πρωτεΐνάση K επιτυγχάνεται η διάσπαση και η πέψη των πρωτεϊνών, με τις οποίες είναι συνδεδεμένο το DNA).
10. Επώαση στους 37°C καθ' όλη τη διάρκεια της νύχτας (overnight)

## 2<sup>η</sup> μέρα

1. Προσθέτουμε 2ml 6M κεκορεσμένου NaCl. Αναδεύουμε ισχυρά για 15sec (με τη διαδικασία αυτή λαμβάνει χώρα η κατακρήμνιση των αποδιαταγμένων πρωτεϊνών).
2. Φυγοκεντρούμε για 15min στις 3500rpm, στους 4°C.
3. Στο υπερκείμενο υπάρχει το DNA. Μεταγγίζουμε το υπερκείμενο σε καθαρό σωληνάκι και απορρίπτουμε το ίζημα. Αναδεύουμε ισχυρά.
4. Φυγοκεντρούμε για 15min στις 3500rpm, στους 4°C.
5. Μεταγγίζουμε το υπερκείμενο σε καθαρό σωληνάκι των 50ml και απορρίπτουμε το ίζημα.

6. Ακολουθεί καταβύθιση του νουκλεϊκού οξέος, που βρίσκεται στο υπερκείμενο διάλυμα, με 2 όγκους απόλυτης αιθανόλης (2πλάσιο όγκο σε σχέση με το αρχικό διάλυμα) και  $\text{CH}_3\text{COONa}$  σε ποσότητα ίση με το 1/10 του όγκου του αρχικού διαλύματος. *Σημείωση: Σε περίπτωση που η αρχική ποσότητα του δείγματος του αίματος είναι αρκετή, δεν χρειάζεται να προσθέσουμε  $\text{CH}_3\text{COONa}$ .*
7. Επώαση στους  $-20^\circ\text{C}$  καθ' όλη τη διάρκεια της νύχτας (overnight).

### 3<sup>η</sup> μέρα

1. Φυγοκεντρούμε για 50min στις 3500rpm, στους  $4^\circ\text{C}$ .
2. Απορρίπτουμε το υπερκείμενο. Το DNA που συλλέγεται «ξεπλένεται» με διάλυμα αιθανόλης 70% και εισάγεται σε σωληνάκι τύπου eppendorf (το συγκεκριμένο βήμα καθαρισμού χρειάζεται για την απομάκρυνση του άλατος που έχει παραμείνει στο διάλυμα).
3. Φυγοκεντρούμε για 30min στις 12000rpm, στους  $4^\circ\text{C}$ .
4. Επαναλαμβάνουμε το στάδιο 2 άλλες δύο φορές, με τη διαφορά ότι η διάρκεια της φυγοκέντρωσης είναι 20min.
5. Αφαιρούμε όλο το υπερκείμενο (αιθανόλη) προσεκτικά (αφήνουμε μόνο το ίζημα-DNA) και καλύπτουμε το σωληνάριο με παραφίλμ, το οποίο τρυπάμε με μικροσκοπική καρφίτσα (με τον τρόπο αυτό διευκολύνεται η εξάτμιση της αιθανόλης που έχει παραμείνει στο σωληνάριο).
6. Επώαση σε θερμοκρασία ψυγείου.
7. Το DNA φυλάσσεται στους  $4^\circ\text{C}$  (για συχνή χρήση) ή στους  $-20^\circ\text{C}$  (για μεγάλο χρονικό διάστημα).

## **Προσδιορισμός ποιότητας και συγκέντρωσης του DNA**

### A. Έλεγχος σε πηκτική αγαρόζης

Με μικρή ποσότητα DNA πραγματοποιείται ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αγαρόζης (1%) παρουσία βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr) και το DNA γίνεται ορατό με υπεριώδη ακτινοβολία σε συσκευή UV.



## B. Μέτρηση συγκέντρωσης

Μετά το πέρας της διαδικασίας απομόνωσης του DNA ακολουθεί ο προσδιορισμός της συγκέντρωσής του. Το DNA ανιχνεύεται και προσδιορίζεται ποσοτικά με πολλούς τρόπους. Η απλούστερη μέθοδος περιλαμβάνει τον υπολογισμό της συγκέντρωσής του με φωτομέτρηση σε φασματοφωτόμετρο. Η τεχνική αυτή βασίζεται στην ιδιότητα του DNA να απορροφά εκλεκτικά ακτινοβολία μήκους κύματος 260nm.

Συγκεκριμένα, μετράται η οπτική πυκνότητα (OD) υδατικού διαλύματος DNA (αραιωμένο διάλυμα DNA 1:100) σε μήκος κύματος 260nm και 280nm σε κυψελίδα χαλαζία με διαδρομή φωτός 1cm. Η απορρόφηση στα 260nm αντιστοιχεί στο νουκλεϊκό οξύ που περιέχεται στο διάλυμα, ενώ η απορρόφηση στα 280nm αντιστοιχεί στις πρωτεΐνες και άλλες προσμίξεις που έχουν παραμείνει στο διάλυμα.

Η καθαρότητα του DNA εκτιμάται με βάση το λόγο  $OD_{260}/OD_{280}$ . Τιμές του λόγου μεταξύ 1,7 και 1,9 υποδηλώνουν παρουσία επαρκώς καθαρού DNA, τιμές μικρότερες του 1,7 φανερώνουν ότι το διάλυμα του DNA περιέχει πρωτεΐνες, ενώ τιμές μεγαλύτερες του 1,9 υποδηλώνουν πρόσμιξη με RNA.

Έχει αποδειχθεί ότι σε μήκος κύματος 260nm τιμή OD ίση με 1 αντιστοιχεί σε συγκέντρωση 50μg/ml δίκλωνου DNA. Βάσει αυτού του δεδομένου μπορεί να υπολογιστεί η συγκέντρωση του DNA μετά τη φωτομέτρηση ως εξής:

$$\text{Συγκέντρωση DNA (mg/ml)} = \text{αραίωση} \times 50 \times \text{τιμή } OD_{260}$$

Η μέθοδος αυτή είναι αρκετά ευαίσθητη και μπορεί να ανιχνεύσει ποσότητες DNA μέχρι και 0,2μg DNA/ml διαλύματος.

## **Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR- Polymerase Chain Reaction)**

Η τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης επιτρέπει τον ενζυμικό πολλαπλασιασμό *in vitro* επιλεγμένων αλληλουχιών DNA (DNA-στόχου) από ελάχιστες αρχικές ποσότητες δείγματος. Η τεχνική της PCR εκμεταλλεύεται δύο χαρακτηριστικά της αντιγραφής του DNA: Το πρώτο είναι ότι η DNA πολυμεράση

χρησιμοποιεί μονοκλωνικό DNA ως εκμαγείο για τη σύνθεση ενός νέου συμπληρωματικού κλώνου. Για το λόγο αυτό η αποδιάταξη του DNA είναι απαραίτητη για τη δράση της Taq DNA πολυμεράσης. Το δεύτερο είναι ότι για να μπορέσει η DNA πολυμεράση να αρχίσει τη σύνθεση χρειάζεται ένα μικρό τμήμα δίκλωνου DNA. Αυτό σημαίνει ότι αν μετά το διαχωρισμό των δύο αλυσίδων ενός μορίου DNA χρησιμοποιηθεί ένας εκκινητής που υβριδίζεται σε ένα σημείο της μιας αλυσίδας, τότε θα αρχίσει η σύνθεση της συμπληρωματικής αλυσίδας από το σημείο που υβριδίστηκε ο εκκινητής (primer). Επομένως, είναι δυνατόν να επιτευχθεί η ενίσχυση οποιουδήποτε τμήματος δίκλωνου DNA επιλέγοντας δύο εκκινητές που υβριδίζονται εκατέρωθεν της αλληλουχίας-στόχου. Ο κάθε εκκινητής είναι συμπληρωματικός προς κάθε μία από τις δύο αλυσίδες DNA και οι δύο μαζί καθορίζουν τα άκρα του επιθυμητού προϊόντος.

Η τεχνική της PCR αποτελείται από επαναλαμβανόμενους κύκλους. Κάθε κύκλος της PCR περιλαμβάνει τρία στάδια και η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται εξ' ολοκλήρου in vitro σε ένα σωληνάκι τύπου erpendorf με τη χρήση θερμικού κυκλοποιητή.

1<sup>ο</sup> στάδιο: θερμική αποδιάταξη του DNA-εκμαγείου, όπου το δίκλωνο DNA μετατρέπεται σε μονόκλωνο (denaturation).

2<sup>ο</sup> στάδιο: σύνδεση εκκινητών, όπου οι δύο εκκινητές υβριδίζονται με τις δύο συμπληρωματικές αλληλουχίες του DNA-στόχου (primer annealing).

3<sup>ο</sup> στάδιο: σύνθεση DNA, όπου παρουσία Taq DNA πολυμεράσης και dNTPs, οι συμπληρωματικές βάσεις προστίθενται στα 3' άκρα των εκκινητών με βάση την αλυσίδα DNA-εκμαγείο και οι νέες πολυνουκλεοτιδικές αλυσίδες επεκτείνονται (extension). Η σύνθεση DNA γίνεται πάντοτε προς την κατεύθυνση 5'→3'.

Για τη λειτουργία της μεθόδου είναι απαραίτητη η χρήση:

- Ειδικής DNA πολυμεράσης (Taq DNA πολυμεράσης)
- Ενός ζεύγους συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων, τα οποία ονομάζονται μόρια-εκκινητές (primers)
- Κατάλληλου διαλύματος ελεύθερων 5 τριφωσφορικών δεοξυριβοζονουκλεοτιδίων (dNTPs)
- Κατάλληλης συγκέντρωσης διαλύματος MgCl<sub>2</sub>
- Ειδικού ρυθμιστικού διαλύματος για την Taq DNA πολυμεράση

- Μικρής ποσότητας DNA που παίζει το ρόλο του εκμαγείου - μήτρας

Πιο συγκεκριμένα, όσον αφορά:

Το μόριο του DNA- στόχου υποστηρίζεται ότι για την PCR χρειάζεται τουλάχιστον ένα αντίγραφο του γονιδίου-στόχου για να εξασφαλιστεί η αντιγραφή του. Ο μεγαλύτερος αριθμός των αντιγραφών του DNA-στόχου ενισχύει την πιθανότητα ενός επιτυχούς πολλαπλασιασμού του DNA. Κάθε βλάβη, όπως η ύπαρξη διασπασμένου DNA, εμποδίζει την αντίδραση της PCR. Επιπλέον η νουκλεοτιδική αλληλουχία-στόχος μπορεί να είναι άγνωστη, αρκεί να είναι γνωστές οι αλληλουχίες των δύο άκρων της, ώστε να σχεδιαστούν οι απαραίτητοι για τη μέθοδο εκκινητές.

Επίσης οι εκκινητές δεν θα πρέπει να συνδέονται με ανεπιθύμητες αλληλουχίες DNA για να επιτευχθεί εξειδικευμένη ενίσχυση του DNA-στόχου. Συνήθως, το μήκος των εκκινητών υπολογίζεται από 15 μέχρι 30 νουκλεοτίδια χωρίς συμπληρωματική αλληλοεπικάλυψη στα 3' άκρα τους. Το ζεύγος των εκκινητών που απαιτείται για την ενίσχυση του στόχου θα πρέπει να διαθέτει παρόμοια θερμοκρασία τήξεως ( $T_m$ , melting temperature), ή πιο εξειδικευμένα, θερμοκρασία επαναδιάταξης ( $T_a$ , annealing temperature). Επίσης, πρέπει να έχουν παρόμοια περιεκτικότητα σε G+C, η οποία να κυμαίνεται σε ποσοστό 40% με 60%.

Η Taq DNA-πολυμεράση που απομονώνεται από το θερμόφιλο βακτήριο *Thermus aquaticus* αντέχει επαναλαμβανόμενη έκθεση σε υψηλές θερμοκρασίες που απαιτούνται για την αποδιάταξη του DNA. Επίσης, είναι ενεργή σε θερμοκρασίες όπου επιτελείται υβριδισμός των εκκινητών επί των συμπληρωματικών επιθυμητών αλληλουχιών. Η βέλτιστη θερμοκρασία δράσης του ενζύμου (temperature optimum) κυμαίνεται γύρω στους 72°C.

Επιπλέον, ελεύθερα 5' τριφωσφορικά δεοξυριβοζονουκλεοτίδια (dNTPs) απαιτούνται για τη σύνθεση του DNA. Τα τέσσερα dNTPs (dATP, dTTP, dCTP και dGTR) ενδείκνυται να χρησιμοποιούνται σε ισοδύναμες συγκεντρώσεις και ανάλογες με την αντίστοιχη της πολυμεράσης, έτσι ώστε να εμποδίζεται η λανθασμένη πρόσδεση νουκλεοτιδίων κατά τη διάρκεια της επιμήκυνσης.

Απαραίτητα για την PCR θεωρούνται και τα δισθενή κατιόντα μαγνησίου ( $Mg^{2+}$ ). Η συγκέντρωση των ιόντων  $Mg^{2+}$  επιδρά στον υβριδισμό-πρόσδεση των εκκινητών, στη θερμοκρασία τήξεως του DNA και στη δραστηριότητα του ενζύμου.

Εκτός από τα αντιδραστήρια, τα οποία άμεσα περιλαμβάνονται στην αντίδραση, η PCR απαιτεί και ένα κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα (buffer). Το ρυθμιστικό διάλυμα περιέχει Tris-HC και άλατα και καθορίζει το pH της αντίδρασης μεταξύ 8,3 και 8,9.

Η τεχνική της PCR περιλαμβάνει μια επαναλαμβανόμενη εναλλαγή ανάμεσα σε μια υψηλή θερμοκρασία για το διαχωρισμό των αλυσίδων του DNA, μια σχετικά χαμηλή θερμοκρασία για τον υβριδισμό των εκκινητών με συμπληρωματικές περιοχές του DNA-στόχου και μια ενδιάμεση θερμοκρασία για την επέκταση των εκκινητών.

Αναμφισβήτητα, οι θερμοκρασίες για την PCR είναι κρίσιμες, οπότε σημαντικό ρόλο διαδραματίζουν οι θερμοκυκλοποιητές (thermal cycler), οι οποίοι επιτυγχάνουν ακριβή ρύθμιση της θερμοκρασίας. Έχουν την ιδιότητα να επιτρέπουν την αυτοματοποιημένη εναλλαγή της θερμοκρασίας, σύμφωνα με θερμοκρασιακό προγραμματισμό.

Η επιλογή κατάλληλης συγκέντρωσης των αντιδραστηρίων που απαιτούνται, κατάλληλης θερμοκρασίας και χρόνου σε κάθε στάδιο της αντίδρασης σχετίζονται με την ειδικότητα της αντίδρασης. Θα πρέπει να τονιστεί ότι απόκλιση από τις ιδανικές συγκεντρώσεις και συνθήκες έχει σαν αποτέλεσμα την παραγωγή μεγάλης ποσότητας μη-ειδικών προϊόντων.

Οι συνθήκες της PCR περιγράφονται στον ακόλουθο πίνακα:

<u>PCR συνθήκες:</u>	
95°C για 5min	
95°C για 1min	¶
63°C για 1min	¶¶ 30 φορές
72°C για 2min	¶¶
72°C για 10min	
4°C για ∞	

Επίσης, παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων σε τελικό όγκο 25μl:

DNA (200ng/μl)	2,50μl	0,2μgr
10x PCR buffer	2,50μl	
dNTPs (40mM)	0,50μl	0,8mM
Primer F (10μM)	0,50μl	0,1μM
Primer R (10μM)	0,50μl	0,1μM
MgCl <sub>2</sub> (50mM)	0,75μl	2mM
TaqDNA Polymerase (5u/μl)	0,50μl	
ddH <sub>2</sub> O	17,25μl	-
Τελικός όγκος (V <sub>TEΛ.</sub> )	25,00μl	

### Πέψη με την περιοριστική ενδονουκλεάση SfaNI

Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες είναι ένζυμα που αναγνωρίζουν ειδικές δίκλωνες αλληλουχίες DNA και κόβουν το μόριο μέσα ή κοντά στην αλληλουχία αναγνώρισης. Οι αλληλουχίες αναγνώρισης έχουν μήκος συνήθως 4-8 νουκλεοτίδια και συχνά είναι παλίνδρομα, δηλαδή «διαβάζονται» με τον ίδιο τρόπο και από τις δύο κατευθύνσεις του DNA (5'-3' και 3'-5'). Επειδή το ένζυμο τέμνει εξειδικευμένα το δίκλωνο DNA όταν συναντά την αλληλουχία αναγνώρισης, έστω και μία αλλαγή βάσης σε κάποια πιθανή θέση διάσπασης αίρει την αναγνώριση και την κοπή αυτής της θέσης από το ένζυμο. Έτσι, η πέψη αυτού του είδους επιτρέπει την εξέταση της συγκεκριμένης αλληλουχίας.

Τα ρυθμιστικά διαλύματα μέσα στα οποία γίνεται η αντίδραση της επώασης περιέχουν συνήθως Mg<sup>2+</sup> που λειτουργεί ως συμπαράγοντας του ενζύμου καθώς και ένα μονοσθενές κατιόν (Na<sup>+</sup>). Τα συστατικά των διαλυμάτων επώασης πρέπει να είναι καθαρά και απαλλαγμένα από νουκλεάσες. Το DNA που χρησιμοποιείται πρέπει να είναι απαλλαγμένο από προσμίξεις όπως EDTA, SDS, φαινόλη, βρωμιούχο

αιθίδιο, που μπορεί να παρεμποδίσουν τη δραστηριότητα του ενζύμου. Τα ένζυμα φυλάσσονται στους  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο SfaNI, το οποίο απομονώνεται από το μικρόβιο *Streptococcus faecalis* και αναγνωρίζει την αλληλουχία 5'- GATGC - 3'. Η διαδικασία περιελάμβανε την ανάμιξη του προϊόντος της PCR με το ένζυμο και το ρυθμιστικό του διάλυμα (10 x NE3) και επώαση στους  $37^{\circ}\text{C}$  overnight. Οι συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων σε τελικό όγκο 25μl φαίνονται στον ακόλουθο πίνακα:

PCR product	20,0μl
SfaNI	1,0μl
10 x NE3	2,5μl
ddH <sub>2</sub> O	1,5μl
Τελικός όγκος ( $V_{\text{TEΛ}}$ )	25,0μl

## Ηλεκτροφόρηση

Η ηλεκτροφόρηση ορίζεται ως η μετακίνηση ενός φορτισμένου μορίου υπό την επίδραση του ηλεκτρικού πεδίου. Είναι η τεχνική που χρησιμοποιήθηκε για το διαχωρισμό του DNA με βάση το φορτίο και το μοριακό του βάρος. Στο συγκεκριμένο πειραματικό στάδιο πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης που αποτελεί καθιερωμένη μέθοδο για τον προσδιορισμό του μήκους και της καθαρότητας του DNA. Η μέθοδος είναι απλή, γρήγορη και ικανή να διαχωρίσει τμήματα DNA, τα οποία δεν μπορούν να διαχωριστούν ικανοποιητικά με άλλες τεχνικές.

Η αгарόζη που απομονώνεται από φύκη είναι ένας γραμμικός πολυσακχαρίτης. Ο πολυσακχαρίτης συνίσταται από D-γαλακτόζη και 3,6-άνυδρο-L-γαλακτόζη που συνδέονται με γλυκοζιτικό δεσμό. Επίσης, ο σχηματισμός των πόρων είναι μια φυσική διαδικασία που προκύπτει από την αναδιάταξη των μορίων που την αποτελούν. Συνεπώς, η χαρακτηριστική ανομοιομορφία στο μέγεθος των πόρων οδηγεί σε μικρή διαχωριστική ικανότητα. Ωστόσο, όσο αυξάνεται η περιεκτικότητα της πηκτής σε αгарόζη, τόσο αυξάνεται και η ικανότητά της να διαχωρίζει μικρού μεγέθους μόρια. Οι πηκτές αгарόζης ηλεκτροφορούνται συνήθως οριζόντια σε ηλεκτρικό πεδίο σταθερής ισχύος και κατεύθυνσης.

Η πηκτή αγαρόζης παρασκευάζεται λιώνοντας την αγαρόζη στο κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα μέχρις ότου αυτό γίνει εντελώς διαυγές. Το ρυθμιστικό διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε είναι το Tris-Βορικό-EDTA (1 x TBE:10mM Tris, 0.5M EDTA) και pH περίπου 8 και διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου. Είναι ευρέως αποδεκτό ότι το TBE επιτυγχάνει καλό διαχωρισμό και έχει υψηλή ρυθμιστική ικανότητα.

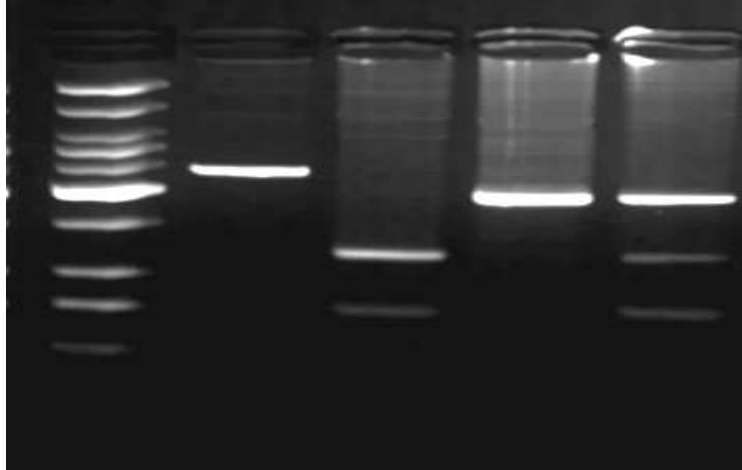
Στη συνέχεια, το διάλυμα τοποθετείται σε κατάλληλη συσκευή-εκμαγείο όπου και πήζει. Οι συσκευές που χρησιμοποιούνται είναι οριζόντιες και παρέχουν αρκετά πλεονεκτήματα, όπως: α) δυνατότητα χρησιμοποίησης χαμηλών συγκεντρώσεων αγαρόζης, β) εύκολη παρασκευή πηκτής με διαστάσεις που κάθε φορά απαιτούνται γ) εύκολη και γρήγορη κατασκευή και χρησιμοποίηση των πηκτών.

Ακολούθως απαραίτητη θεωρείται η ανάμιξη του δείγματος DNA με μια χρωστική (βρωμοφαινόλη: 100mM EDTA, 20% w/v Ficoll, Bromophenol blue). Με τον τρόπο αυτό το δείγμα γίνεται ορατό και διευκολύνεται η εισαγωγή του στην κατάλληλη περιοχή («πηγαδάκι») της πηκτής αγαρόζης. Στη συνέχεια, όταν εφαρμοστεί το ηλεκτρικό πεδίο κατά μήκος της πηκτής, το DNA κατευθύνεται προς την άνοδο. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι το DNA καθίσταται αρνητικά φορτισμένο σε ουδέτερο pH, λόγω της παρουσίας των φωσφορικών ομάδων.

Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης οι ζώνες του DNA σε πηκτή αγαρόζης δεν είναι δυνατόν να γίνουν ορατές εκτός αν το DNA βαφεί με κάποιο τρόπο. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιείται διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου. Η ουσία αυτή παρεμβάλλεται ανάμεσα στις βάσεις του DNA. Με την τοποθέτηση της πηκτής σε συσκευή UV, οι ζώνες του DNA είναι ορατές, γεγονός που οφείλεται στο φθορισμό της χρωστικής κάτω από την υπεριώδη ακτινοβολία. Ακολουθεί η φωτογράφιση του DNA.

Στη μελέτη μας πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση τόσο για τον έλεγχο ύπαρξης DNA μετά τη διαδικασία απομόνωσης, όπως προαναφέρθηκε, όσο και για την ανίχνευση του προϊόντος της PCR. Συγκεκριμένα, τα προϊόντα της PCR ελέγχθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 3% παρουσία βρωμιούχου αιθιδίου και έγιναν ορατά με υπεριώδη ακτινοβολία. Ο έλεγχος του μεγέθους του προϊόντος της PCR που ενισχύθηκε έγινε εφικτός μετά από σύγκριση με το μέγεθος των ζωνών γνωστού DNA (100bp DNA ladder).

Στην παρακάτω εικόνα παρουσιάζονται χαρακτηριστικά ο γονότυπος της ασθενούς, που είναι ομόζυγη στην ευρεθείσα ματάλλαξη και του πατέρα της, που είναι ετεροζυγώτης, συγκριτικά με φυσιολογικό μάρτυρα.

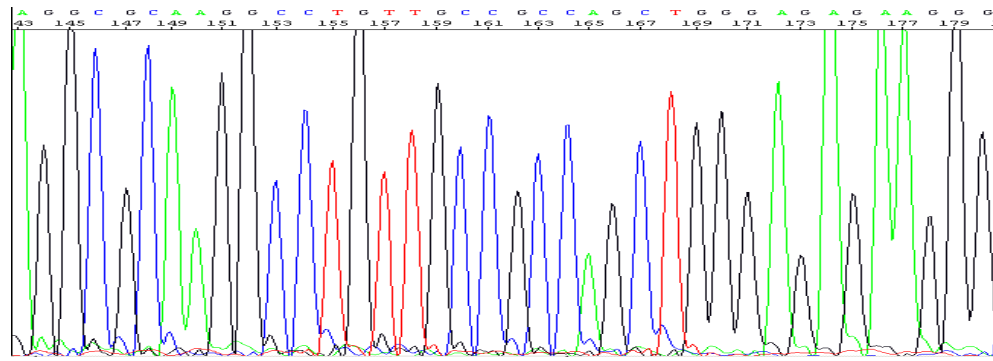


*Εικόνα 7 : Διαχωρισμός των προϊόντων PCR με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 3% 1.100bp DNA ladder , 2.Undigested PCR product , 3.Φυσιολογικός μάρτυρας , 4.Ασθενής , 5. Πατέρας της ασθενούς*

### **Αποτελέσματα**

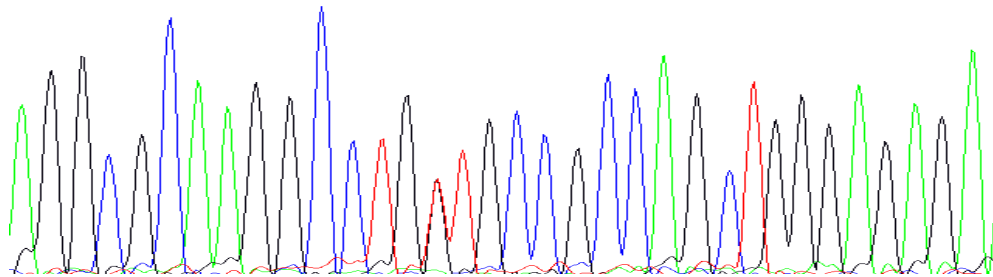
Στο εξόνιο 2 του γονιδίου TREM2 και στο κωδικόνιο 50 ανιχνεύθηκε η μετάλλαξη W50C ( Trp>Cys , TGG>TGT ). Η ασθενής ήταν ομοζυγώτης στη μετάλλαξη, ενώ οι γονείς της και ο αδερφός της ετεροζυγώτες ( Εικόνα 8α , 8β ). Η μετάλλαξη επιβεβαιώθηκε επίσης με την τεχνική PCR/RFLP, ενώ δεν ανιχνεύθηκε η παρουσία της σε 200 φυσιολογικούς μάρτυρες ελληνικής καταγωγής.





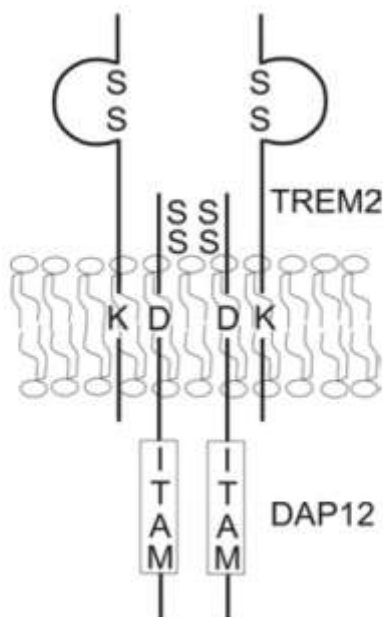
**Εικόνα 8 α :** TGG>TGT μετάλλαξη – ασθενής ομοζυγώτης

A G G C G C A A G G C C T G T T G C C G C C A G C T G G G A G A G A A G G C  
143 145 147 149 151 153 155 157 159 161 163 165 167 169 171 173 175 177 179



**Εικόνα 8 β :** TGG>TGT μετάλλαξη – ετεροζυγώτης πατέρας της ασθενούς

Η ανιχνευθείσα μετάλλαξη εντοπίζεται στο εξωκυττάριο τμήμα της πρωτεΐνης, ακριβώς δίπλα σε άλλο μόριο Cys , που ευθύνεται για την ανάπτυξη δισουλφιδικού δεσμού ( θέση 51 με θέση 60 ) ( Εικόνα 9 )



**Εικόνα 9 :** Σχηματική απεικόνιση της θέσης της νέας μετάλλαξης στο εξωκυττάριο τμήμα της πρωτεΐνης *TREM2*

Το κωδικόνιο 50 της πρωτεΐνης *TREM2*, στο οποίο ανιχνεύθηκε η νέα μετάλλαξη, είναι εξελικτικά διατηρητέο στα διάφορα είδη ( Εικόνα 10 ).Πρόκειται για μία λειτουργική μετάλλαξη, δεδομένου ότι, πέραν της κλινικής εικόνας, που είναι αποδεδειγμένα παθολογική, και η βιοπληροφορική ανάλυση έδειξε ότι η συγκεκριμένη ματάλλαξη είναι καταστρεπτική για τη λειτουργία της πρωτεΐνης και συνεπώς του συμπλέγματος *TREM2/DAP12*.

	50
Homo sapiens:	FQGVAGQSLQVSCPYPDSMKHWGRRKAWCRQLGEGKGPCQRVVSTHNLWLLSFLRRWN
Bos taurus:	FQGMGRSLRVSCPYNLSLKHGRRKAWCRQLGEEGLCQQVSTHPSWLLSFLKRRN
Xenopus tropicalis:	LSGQLGDTLTILCPYKQRADRWRKKLWCKED-SANHCQPVVTTARRFWL-QLSKRSN
Mus musculus:	LQGMAGQSLRVSCYDALKHWGRRKAWCRQLGEEGPCQRVVSTHGVWLLAFLKRRN
Rattus norvegicus:	LQGVAGQSLRVSCYDALRHWGRRKAWCRQLAEEGPCQRVVSTHGVWLLAFLRKQN

*Εικόνα 10 : Το κωδικόνιο 50 στο οποίο ανιχνεύθηκε η μετάλλαξη είναι εξελικτικά διατηρητέο στα διάφορα είδη*

## **ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ**

Η παρούσα εργασία ασχολήθηκε με την πρώτη περιγραφή της νόσου Nasu-Hakola στον ελληνικό πληθυσμό και με την ανίχνευση μιας νέας λειτουργικής μετάλλαξης ( W50C ) στο γονίδιο TREM2. Αυτή η νέα μετάλλαξη, όπως και οι ήδη περιγραφείσες ανά τον κόσμο μεταλλάξεις, καταδεικνύουν τον σημαντικό ρόλο του συμπλέγματος DAP12/TREM2 στο αντίστοιχο μονοπάτι κυτταρικής σηματοδότησης, εφόσον η διαταραχή, που επέρχεται στη λειτουργία του, επιφέρει σοβαρές εκδηλώσεις, τόσο από τα οστά , όσο , κυρίως, από το κεντρικό νευρικό σύστημα, με τις συνέπειες που περιγράφησαν αναλυτικά παραπάνω. Παρ'όλο που η νόσος Nasu-Hakola είναι σπάνια, η γενετική της βάση είναι ήδη ευμεγέθης και μας καλεί να προβληματιστούμε και να προσπαθήσουμε να εντρυφήσουμε στη μοριακή βάση και άλλων νευροεκφυλιστικών, και όχι μόνο, νοσημάτων, γεγονός που θα οδηγούσε στην κατανόηση της παθογένειάς τους και, γιατί όχι, στην ανακάλυψη νέων στοχευμένων θεραπειών.

## **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

1. .Nasu T, Tsukahara Y, Terayama K, Mamiya N. An autopsy case of membranous lipodystrophy with myeloosteopathy of long bones and leucodystrophy of the brain ( in Japanese ). Tokyobyourisyuudan/kaikirikou 1970;10-13
2. Hakola HPA, Jarvi OH, Sourander P.Osteodysplasia polycystica hereditaria combined with sclerosing leucoencephalopathy.Acta Neurol Scand Suppl 1970;43:79-80
3. Paloneva J, Ketsila M, Wu J et al. Loss of function mutation in TYROBP (DAP12) result in a presenile dementia with bone cysts. Nat Genet 2000;25:357-361
4. Paloneva J, Manninen T, Christman G et al. Mutations in two genes encoding different subunits of a receptor signalling complex result in an identical disease phenotype. Am J Hum Genet 2002;71:656-662

5. Hakola HPA. Neuropsychiatric and genetic aspects of a new hereditary disease characterized by progressive dementia and lipomembranous polycystic osteodysplasia. *Acta Neuropsych Scand Suppl* 1972;232:1-173
6. Verloes A et al. Nasu-Hakola syndrome: polycystic lipomembranous osteodysplasia with sclerosing leukoencephalopathy and presenile dementia. *J. Med. Genet* 1997;34:753-757
7. Lanier LL, Corliss BC, Wu J, Leong C, Phillips JH. Immunoreceptor DAP12 bearing a tyrosine-based activation motif is involved in activating NK cells. *Nature* 1998;391:703-707
8. Terayama K. Two cases of disease presented specific features with bone cyst-like lesions ( in Japanese ). *Nipponseikeigekagakkazasshi* 1961;35:626
9. Nasu T. Pathology of membranous lipodystrophy ( in Japanese ). *Nikonbyourigakkaishi* 1978;67:57-98
10. Javri OH, Hakola HPA, Lauttamus LL. Cystic capillary-necrotic osteodysplasia: a systemic bone disease probably caused by arteriolar and capillary necrosis. Relation to brain affections. State University of Milan; 1968 Seventh International Congress of International Academy of Pathology, Abstracts
11. Yakumaru K, Matsuyama H, Kageyama K, Nasu T. An autopsy case of membranous lipodystrophy. The 19<sup>th</sup> Autumn Meeting of the Japanese Pathologic Society, Tokyo 1973
12. Hanawa S, Matsushita M, Takahashi K. A case of Nasu-Hakola's disease ( in Japanese with English abstract ). *Psychiatr Neurol Jpn* 1981;83:29-45
13. Javri OH, Hakola HPA, Sourander P, Kormanen M, Nevalainen T, Kalimo H. Polycystic lipomembranous osteodysplasia with sclerosing leukoencephalopathy (PLOS). In : Erikson AW, ed. Population Structure and genetics disorders ( Proceedings of 7<sup>th</sup> Sigrid Foundation Symposium, Aland Island, Finland, August 1978 (London : Academic Press, 1980; 656-664
14. Hakola HPA. Polycystic lipomembranous osteodysplasia with sclerosing leukoencephalopathy ( membranous lipodystrophy ): a neuropsychiatric follow-up study. In : Henrikson M, Huttunen M, Kuoppasalmi K, Lindfors O, Lonnqvist J, eds. *Monographs of Psychiatria Fennica. Monograph 17.* Helsinki : Foundation for Psychiatric Research in Finland, 1990, 1-111

15. Paloneva J, Kestilä M, Wu J, Salminen A, Bohling T, Ruotsalainen V, Hakola P, Bakker AB, Phillips JH, Pekkarinen P, Lanier LL, Timonen T, Peltonen L (2000) Loss-of-function mutations in TYROBP (DAP12) result in a presenile dementia with bone cysts. *Nat Genet* 25:357-361
16. Wood C (1978) Membranous lipodystrophy of bone. *Arch Pathol Lab Med* 102:22-27
17. Adolfsson R, Forsell A, Johansson G. Hereditary polycystic osteodysplasia with progressive dementia in Sweden. *Lancet* 1978; 1:1209-1210
18. Verloes A, Maqut P, Sadzot B, Vivario M, Thiry A, Franck G. Nasu-Hakola syndrome. *J Med Genet* 1997;34:753-757
19. Paloneva J, Autti T, Raininko R et al. CNS manifestations of Nasu-Hakola disease :a frontal dementia with bone cysts. *Neurology* 2001;56:1552-1558
20. Tranebjaerg L, Schrader H, Paloneva J (2000) [Polycystic lipomembranous osteodysplasia]. *Tidsskr Nor Laegeforen* 120:3196
21. Hakola HPA. Neuropsychiatric and genetic aspects of a new hereditary disease characterized by progressive dementia and lipomembranous polycystic osteodysplasia. *Acta Neuropsych Scand Suppl* 1972;232:1-173
22. Turnbull IR, McDunn JE, Takai T, Townsend RR, Cobb JP, Colonna M (2005) DAP12 (KARAP) amplifies inflammation and increases mortality from endotoxemia and septic peritonitis. *J Exp Med* 202:363-369
23. Tomasello E, Desmoulins PO, Chemin K, Guia S, Cremer H, Ortaldo J, Love P, Kaiserlian D, Vivier E (2000) Combined natural killer cell and dendritic cell functional deficiency in KARAP/DAP12 loss-of-function mutant mice. *Immunity* 13:355-364
24. Tomasello E, Olcese L, Vely F, Geourgeon C, Blery M, Moqrich A, Gautheret D, Djabali M, Mattei MG, Vivier E (1998) Gene structure, expression pattern, and biological activity of mouse killer cell activating receptor-associated protein (KARAP)/DAP-12. *J Biol Chem* 273:34115-34119
25. Soragna D, Tupler R, Ratti MT, Montalbetti L, Papi L, Sestini R (2003) An Italian family affected by Nasu-Hakola disease with a novel genetic mutation in the TREM2 gene. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 74:825-826
26. Takahashi K, Rochford CD, Neumann H (2005) Clearance of apoptotic neurons without inflammation by microglial triggering receptor expressed on myeloid cells-2. *J Exp Med* 201:647-657

27. Takaki R, Watson SR, Lanier LL (2006) DAP12: an adapter protein with dual functionality. *Immunol Rev* 214:118-129
28. Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO (1995) Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 270:467-470
29. Schmid CD, Sautkulis LN, Danielson PE, Cooper J, Hasel KW, Hilbush BS, Sutcliffe JG, Carson MJ (2002) Heterogeneous expression of the triggering receptor expressed on myeloid cells-2 on adult murine microglia. *J Neurochem* 83:1309-1320
30. Mocsai A, Abram CL, Jakus Z, Hu Y, Lanier LL, Lowell CA (2006) Integrin signaling in neutrophils and macrophages uses adaptors containing immunoreceptor tyrosine-based activation motifs. *Nat Immunol* 7:1326-1333
31. McVicar DW, Taylor LS, Gosselin P, Willette-Brown J, Mikhael AI, Geahlen RL, Nakamura MC, Linnemeyer P, Seaman WE, Anderson SK, Ortaldo JR, Mason LH (1998) DAP12-mediated signal transduction in natural killer cells. A dominant role for the Syk protein-tyrosine kinase. *J Biol Chem* 273:32934-32942
32. Lanier LL, Corliss BC, Wu J, Leong C, Phillips JH (1998) Immunoreceptor DAP12 bearing a tyrosine-based activation motif is involved in activating NK cells. *Nature* 391:703-707
33. Lee SC, Liu W, Dickson DW, Brosnan CF, Berman JW (1993) Cytokine production by human fetal microglia and astrocytes. Differential induction by lipopolysaccharide and IL-1 beta. *J Immunol* 150:2659-2667
34. Kuroda R, Satoh J, Yamamura T, Anezaki T, Terada T, Yamazaki K, Obi T, Mizoguchi K (2007) A novel compound heterozygous mutation in the DAP12 gene in a patient with Nasu-Hakola disease. *J Neurol Sci* 252:88-91
35. Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, Devon K, et al. (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409:860-921
36. Humphrey MB, Daws MR, Spusta SC, Niemi EC, Torchia JA, Lanier LL, Seaman WE, Nakamura MC (2006) TREM2, a DAP12-associated receptor, regulates osteoclast differentiation and function. *J Bone Miner Res* 21:237-245
37. Humphrey MB, Ogasawara K, Yao W, Spusta SC, Daws MR, Lane NE, Lanier LL, Nakamura MC (2004) The signaling adapter protein DAP12

- regulates multinucleation during osteoclast development. *J Bone Miner Res* 19:224-234
38. Wilms H, Sievers J, Dengler R, Bufler J, Deuschl G, Lucius R (2003) Intrathecal synthesis of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in amyotrophic lateral sclerosis: further evidence for microglial activation in neurodegeneration. *J Neuroimmunol* 144:139-142
  39. Vivier E, Nunes JA, Vely F (2004) Natural killer cell signaling pathways. *Science* 306:1517-1519
  - Vicente-Manzanares M, Sanchez-Madrid F (2004) Role of the cytoskeleton during leukocyte responses. *Nat Rev Immunol* 4:110-122
  40. Nataf S, Anginot A, Vuailat C, Malaval L, Fodil N, Chereul E, Langlois JB, Dumontel C, Cavillon G, Confavreux C, Mazzorana M, Vico L, Belin MF, Vivier E, Tomasello E, Jurdic P (2005) Brain and bone damage in KARAP/DAP12 loss-of-function mice correlate with alterations in microglia and osteoclast lineages. *Am J Pathol* 166:275-286
  41. Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F (2005) Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science* 308:1314-1318
  42. Hamerman JA, Jarjoura JR, Humphrey MB, Nakamura MC, Seaman WE, Lanier LL (2006) Cutting edge: inhibition of TLR and FcR responses in macrophages by triggering receptor expressed on myeloid cells (TREM)-2 and DAP12. *J Immunol* 177:2051-2055
  43. Hamerman JA, Tchao NK, Lowell CA, Lanier LL (2005) Enhanced Toll-like receptor responses in the absence of signaling adaptor DAP12. *Nat Immunol* 6:579-586
  44. Daws MR, Lanier LL, Seaman WE, Ryan JC (2001) Cloning and characterization of a novel mouse myeloid DAP12-associated receptor family. *Eur J Immunol* 31:783-791
  45. Daws MR, Sullam PM, Niemi EC, Chen TT, Tchao NK, Seaman WE (2003) Pattern recognition by TREM-2: binding of anionic ligands. *J Immunol* 171:594-599
  46. Cella M, Buonsanti C, Strader C, Kondo T, Salmaggi A, Colonna M (2003) Impaired differentiation of osteoclasts in TREM-2-deficient individuals. *J Exp Med* 198:645-651



47. Cella M, Sallusto F, Lanzavecchia A (1997) Origin, maturation and antigen presenting function of dendritic cells. *Curr Opin Immunol* 9:10-16
48. Brumbaugh KM, Binstadt BA, Billadeau DD, Schoon RA, Dick CJ, Ten RM, Leibson PJ (1997) Functional role for Syk tyrosine kinase in natural killer cell-mediated natural cytotoxicity. *J Exp Med* 186:1965-1974
49. Bouchon A, Dietrich J, Colonna M (2000) Cutting edge: inflammatory responses can be triggered by TREM-1, a novel receptor expressed on neutrophils and monocytes. *J Immunol* 164:4991-4995
50. Bouchon A, Facchetti F, Weigand MA, Colonna M (2001a) TREM-1 amplifies inflammation and is a crucial mediator of septic shock. *Nature* 410:1103-1107
51. Bakker AB, Hoek RM, Cerwenka A, Blom B, Lucian L, McNeil T, Murray R, Phillips LH, Sedgwick JD, Lanier LL (2000) DAP12-deficient mice fail to develop autoimmunity due to impaired antigen priming. *Immunity* 13:345-353
52. Lanier LL, Corliss B, Wu J, Phillips JH (1998b) Association of DAP12 with activating CD94/NKG2C NK cell receptors. *Immunity* 8:693-701
53. McVicar DW, Taylor LS, Gosselin P, Willette-Brown J, Mikhael AI, Geahlen RL, Nakamura MC, Linnemeyer P, Seaman WE, Anderson SK, Ortaldo JR, Mason LH (1998) DAP12-mediated signal transduction in natural killer cells: a dominant role for the Syk protein-tyrosine kinase. *J Biol Chem* 273: 32934-32942
54. Bakker ABH, Baker E, Sutherland GR, Phillips JH, Lanier LL (1999) Myeloid DAP12-associating lectin (MDL)-1 is a cell surface receptor involved in the activation of myeloid cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:9792-9796
55. Bird TD, Koerker RM, Leaird BJ, Vlcek BW, Thorning DR (1983) Lipomembranous polycystic osteodysplasia (brain, bone, and fat disease): a genetic cause of presenile dementia. *Neurology* 33:81-86
56. Bouchon A, Hernandez-Munain C, Cella M, Colonna M (2001b) A dap12-mediated pathway regulates expression of cc chemokine receptor 7 and maturation of human dendritic cells. *J Exp Med* 194:1111-1122
57. Kuroda R, Satoh J, Yamamura T, Anezaki T, Terada T, Yamazaki K, Obi T, Mizoguchi K. 2007. A novel compound heterozygous mutation in the DAP12 gene in a patient with Nasu-Hakola disease. *J Neurol Sci* 252:88-91

58. Neumann H, Takahashi K. 2007. Essential role of the microglial triggering receptor expressed on myeloid cells-2 (TREM2) for central nervous tissue immune homeostasis. *J Neuroimmunol.* 184:92-99
59. Haugarvoll K, Wszolek ZK, Hutton M. 2007. The genetics of frontotemporal dementia. *Neurol Clin* 25:697-715.
60. Kiialainen A, Veckman V, Saharinen J, Paloneva J, Gentile M, Hakola P, Hemelsoet D, Ridha B, Kopra O, Julkunen I, Peltonen L. 2007. Transcript profiles of dendritic cells of PLOSL patients link demyelinating CNS disorders with abnormalities in pathways of actin bundling and immune response. *J Mol Med* 85:971-983.
61. M. Cella, C. Buonsanti, C. Strader, T. Kondo, A. Salmaggi, M. Colonna, Impaired differentiation of osteoclasts in TREM2 deficient individuals, *J.Exp. Med.* 198 (2003) 645-651.
62. M. Colonna, TREMs in the immune system and beyond, *Nat. Rev. Immunol.* 3 (2003) 445-453.
63. M.R. Daws, L.L. Lanier, W.E. Seaman, J.C. Ryan, Cloning and characterization of a novel mouse myeloid DAP-12-associated receptor family, *Eur. J. Immunol.* 31 (2001) 783-791.
64. I. Guidi, D. Galimberti, E. Venturelli, C. Lovati, R. Del Bo, C. Fenoglio, A. Gatti, R. Dominici, S. Galbiati, R. Virgilio, S. Pomati, G.P. Comi, C. Mariani, G. Forloni, N. Bresolin, E. Scarpini, Influence of the Glu298Asp polymorphism of NOS3 on age at onset and homocysteine levels in AD patients, *Neurobiol. Aging* 26 (2005) 789-794.
65. H.P. Hakola, M. Puranen, Neuropsychiatric and brain CT findings in polycystic lipomembranous osteodysplasia with sclerosing leukoencephalopathy, *Acta Neurol. Scand.* 88 (1993) 370-375.