



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ»

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

<< ΠΡΩΤΕΙΝΕΣ PRION: ΝΕΑ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΑ ΚΑΙ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΑ
ΔΕΔΟΜΕΝΑ >>

ΜΑΡΚΟΥ ΚΑΤΕΡΙΝΑ

ΝΕΥΡΟΛΟΓΟΣ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΔΗΜΑΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ, ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΤΣΕΖΟΥ ΑΣΠΑΣΙΑ, ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΤΡΑΧΑΝΑ ΒΑΡΒΑΡΑ, ΕΠΙΚΟΥΡΗ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΛΑΡΙΣΑ, 2018



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ»

PRION PROTEINS: NEW DIAGNOSTIC AND THERAPAUTICAL
EVIDENCE

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι prion νόσοι είναι μία ομάδα νευροεκφυλιστικών καταστάσεων που αφορούν στους ανθρώπους και στα ζώα. Εμφανίζονται με τη μορφή προϊούσας άνοιας και αταξίας. Είναι νόσοι που προσβάλλουν το κεντρικό και περιφερικό νευρικό σύστημα οδηγώντας σε δυσλειτουργία μνήμης, προσωπικότητας, συμπεριφοράς και κινητικότητας. Η βάση της παθογένειας είναι η μετατροπή της φυσιολογικής prion για τον οργανισμό πρωτεΐνης σε παθολογική ισομορφή που λέγεται PrP^{Sc}. Η παρούσα διπλωματική εργασία αφορά στη βιολογία της νόσου και στα καινούρια διαγνωστικά και πιθανά θεραπευτικά δεδομένα με βάση τη ταχέως εξελισσόμενη επιστήμη της γενετικής. Η προοπτική αφορά στην αποσιώπηση του υπεύθυνου γονιδίου, ιδιαίτερα στις κληρονομικές μορφές της νόσου.

ABSTRACT

Prion diseases are a rare group of fatal neurodegenerative disorders in humans and animals that manifest primarily as progressive dementia and ataxia. Prions affect the Central neural system (CNS) and the Peripheral neural system (PNS) and cause impaired brain function (memory, personality and behavior changes and at late stages movement disorders. The histopathological background is the transformation from normal prion protein into the pathological isoform PrP^{Sc}. The present Master thesis deals with the biology of the disease, new diagnostic and possible therapeutic data based on the rapidly evolving science of genetics. The prospect relates to the silencing of the responsible gene, particularly to the hereditary forms.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη.....	3
Abstract.....	4
Εισαγωγή.....	8
1: Παθήσεις Prion (PrD).....	8
1.1 Κατηγορίες PrD.....	11
1.2 Νευροπαθολογικά ευρήματα (σε postmortem βιοψικά υλικά εγκεφάλων).....	11
1.3 Συσχέτιση γονότυπου-φαινότυπου των PrD.....	15
2: CJD mimics and chameleons.....	16
2.1 Prion mimics και γενετική.....	20
2.2 Υποξεία συνδυασμένη σκλήρυνση.....	21
2.3 Νεοπλασματικές και παρανεοπλασματικές καταστάσεις.....	22
3: Prion πρωτεΐνη: δομή, μετατροπή και μηχανισμοί της μετάδοσης.....	23
3.1 Πεπτιδικά μοντέλα: κατανόηση της δομής της prion πρωτεΐνης και της μετάδοσής της.....	26
3.2 Εξωσώματα: Η συμμετοχή των εξωσωμάτων στις prion παθήσεις.....	27
4: Prion στελέχη, φραγμοί μεταξύ των ειδών (species barriers).....	32
4.1 Μετάδοση των prion πρωτεϊνών.....	34
4.2 Μετάδοση των prions πρωτεϊνών μέσω του εντερικού επιθηλίου.....	37
4.3 Από τα λεμφικά όργανα στον εγκέφαλο.....	39

5: Κυτταρική βιολογία ,γενετική και λειτουργικότητα της φυσιολογικής prion πρωτεΐνης.....	40
5.1 Ο ρόλος της prion πρωτεΐνης C στον μεταβολισμό του χαλκού.....	41
5.2 PrP knockout animals and doppel	41
6: Νευροεκφύλιση στα prion νοσήματα.....	43
6.1 Χαρακτηριστικά της εκφύλισης του εγκεφαλικού παρεγχύματος	43
6.2 Μηχανισμός της νευρωνικής απόπτωσης.....	44
6.3 Ο ρόλος του πρωτεασώματος στην παθογένεια της νόσου CJD.....	47
7: Η διάγνωση και τα σύγχρονα τεστ.....	48
7.1 Νέες προοπτικές μετά από διάγνωση της prion πρωτεΐνης σε άτομα πριν από το θάνατο (premortem early diagnosis).....	50
7.2 Ειδικά τροποποιημένα αντισώματα.....	52
8: Θεραπευτικές προοπτικές.....	54
8.1 Φαρμακευτικές ουσίες οι οποίες καταστέλλουν τη δράση της PrPSc και τροποποιούν την έκφραση της νόσου.....	56
9: Άλλα νοσήματα τα οποία έχουν σχέση με την διαταραχή της δομής της πρωτεΐνης (protein misfolding diseases).....	60
9.1 Κινητική και αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πρωτεϊνών με λάθος αναδίπλωση και της άθροισης αυτών.....	63
9.2 Είναι τα prions κοινό φαινόμενο στη βιολογία ;.....	64
9.3 Είναι τελικά τα prions μέρος μιας φυσιολογικής βιολογικής διεργασίας και ένα κοινό φαινόμενο στη βιολογία και ποια η σημασία αυτών;.....	65
10: Τα πειραματικά μοντέλα και τα θεραπευτικά πρωτόκολλα.....	68

10.1 Τα ζωικά μοντέλα των prion παθήσεων: από τους πιθήκους στα έντομα.....	68
10.2 Εναλλακτικά ζωικά μοντέλα.....	72
10.3 Τα μοντέλα και τα συστήματα σε ειδικά βιολογικά υλικά.....	73
10.4 Γενετική ευαισθησία: μοντέλα του prnp γονιδίου, πολυμορφισμοί και μεταλλάξεις.....	74
11: Γονιδιακή Αποσιώπηση.....	75
11.1 SiRNA (Short interference RNA) ή RNAi (RNA interference): Μικρά μόρια RNA μπορούν να αποσιωπήσουν την γονιδιακή έκφραση.....	76
11.2 Γονιδιακή θεραπεία.....	78
11.3 Θεραπευτικές παρεμβάσεις για τις prion παθήσεις.....	78
Συμπέρασμα.....	82
Βιβλιογραφία.....	88

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Στη παρούσα διπλωματική εργασία γίνεται προσπάθεια κατανόησης της φύσης των prion παθήσεων, της μελέτης της μολυσματικότητας της prion πρωτεΐνης και της συμμετοχής αυτής σε παθήσεις του νευρικού συστήματος. Λόγω της λοιμογονικότητας των συγκεκριμένων πρωτεϊνών και την ταχύτητα εξέλιξης σε θάνατο των προσβεβλημένων ατόμων, παρατηρείται άνοση τα τελευταία χρόνια τόσο σε ερευνητικό όσο και σε επίπεδο διεθνούς βιβλιογραφίας. Σκοπός είναι η διαλεύκανση της φύσης των θανατηφόρων αυτών παθήσεων όσο και η ανάδειξη πιθανών θεραπευτικών προσεγγίσεων με βάση τη ταχέως εξελισσόμενη επιστήμη της Γενετικής και της Ανοσολογίας.

1. Παθήσεις Prion (PrD)

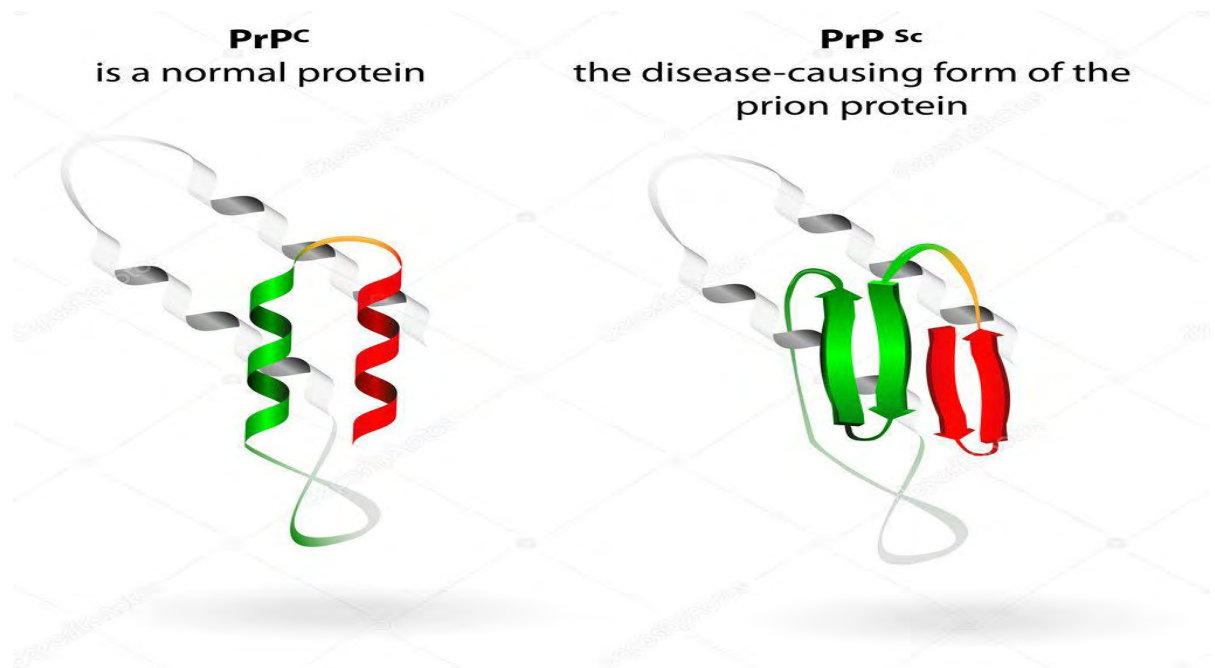
Οι Prion παθήσεις αφορούν σε νόσους που προσβάλλουν το νευρικό σύστημα (κεντρικό και περιφερικό). Είναι σπάνιες νόσοι (η συχνότητα τους είναι 1 ανα εκατομμύριο πληθυσμού), χαρακτηρίζονται σαν θανατηφόρες νευροεκφυλιστικές και μέχρι τώρα άγνωστης αιτιολογίας -μεταδοτικές- νόσοι με πιθανό γενετικό υπόβαθρο.

Ωστόσο αιτιολογικά με το πέρασμα των ετών και μέσα από μακροχρόνια παρατήρηση και μελέτη, ο Prusiner εισήγαγε τη θεωρία της "πρωτεϊνικής νόσου", την ύπαρξη παθολογικής πρωτεΐνης η οποία αποκτά λοιμογόνο ικανότητα.

Με την εισαγωγή της βιολογίας και της ανοσογενετικής, θεωρείται πλέον η νόσος prion περίπλοκη και ιδιαίτερη, σε έδαφος προσβολής του νευρικού συστήματος από έναν λοιμώδη παράγοντα και σε έδαφος πάντα, μίας κληρονομικής "ευπάθειας".

Αιτιολογικά διακρίνονται σε ποσοστό 80-90% σε σποραδικής εμφάνισης και επίκτητης μορφής, ενώ στο 10-15% αφορούν στην κληρονομική-οικογενή μορφή, δηλαδή στη μετάλλαξη του γονιδίου PRNP (prion protein) που μετατρέπει τη φυσιολογική για το κύτταρο prion πρωτεΐνη PrP^C στην παθολογική πλέον PrP^{Sc}. Οι δράσεις της φυσιολογικής PrP στο κύτταρο είναι με τα μέχρι τώρα δεδομένα -προστατευτική- και συμμετέχει σε σημαντικές κυτταρικές διεργασίες όπως στη μεταφορά του χαλκού στα κύτταρα, στη νευροπροστασία (προφύλαξη νευρώνων από τραυματισμό), και στη διακυτταρική επικοινωνία.

MedlinePlus Encyclopedia: Creutzfeldt-Jakob disease



Εικόνα 1. Δομή φυσιολογικής prion πρωτεΐνης και δομή παθολογικής prion πρωτεΐνης

Η μεταλλαγμένη πλέον πρωτεΐνη PrP^{Sc}, δημιουργεί συσσωματώματα και συναθροίσεις εντός του νευρικού ιστού, τα οποία δρουν νευροτοξικά, με καταστροφή νευρώνων, κυτταρική απόπτωση και δημιουργία μικροσκοπικών κενотоπίων (vacuole) στον εγκέφαλο (εικόνα μικροσκοπικά κυτταρικής ερήμωσης-γλοίωσης-και της σπογγώδους μετατροπής του εγκεφαλικού παρεγχύματος).

1.1 Κατηγορίες των PrD

- Η σποραδική Creutzfeldt-Jakob (SCJD).
- Η σποραδική θανατηφόρος οικογενής αυπνία (SFI) και η μεταβαλλόμενη - ευαίσθητη στη πρωτεάση prionopathy.
- Η Gerstmann-Straussler-Sheinker (GSS).
- Η Kuru-scrapie

Mead Simon, 2005-2006

Οι σποραδικές αυτές μορφές αφορούν στο 85%, χαρακτηρίζονται από ταχέως εξελισσόμενη νευρολογική βλάβη και η διάρκεια τους είναι λιγότερη από 12 μήνες.

(Collins et al,2004). Οι ασθενείς με σποραδική μορφή της νόσου δεν έχουν οικογενειακό ιστορικό και δεν έχουν γνωστή μετάλλαξη του PRNP γονιδίου (μετατροπή της PrP^c σε PrP^{Sc} πρωτεΐνη).

Οι επίκτητες μορφές προκύπτουν από την έκθεση των ατόμων που προσεβλήθησαν στο λοιμογόνο παράγοντα (άρα στην PrP^{Sc}). Οι λοιμώξεις αυτές που απέκτησαν επιδημική μορφή το 1986 εμφανίζονται λόγω κατανάλωσης μολυσμένων προϊόντων μέσω της βρώσης. Γνωστές είναι ως "νόσοι των τρελών αγελάδων" (mad cow disease) - σπογγώδης εγκεφαλοπάθεια ή νόσος (στον πληθυσμό των νήσων Fore στους Papua της νέας Γουινέας) μετά από κανιβαλιστικές τελετουργικές πρακτικές βρώσης εγκεφάλου των συγγενικών τους προσώπων.

Genetic Testing Registry: Genetic prion diseases

Άλλη μορφή είναι η επίκτητη ιατρογενής- κατόπιν έκθεσης των προσβεβλημένων ατόμων σε βιολογικά, μολυσματικά υλικά, δοτών όπως από χορήγηση ανθρωπείας γ-σφαιρίνης, αυξητικής ορμόνης, μεταμόσχευσης κερατοειδούς ή λήψης άλλων οργάνων (1%-2%) των συνολικών περιπτώσεων.

Το πρώτο περιστατικό που μελετήθηκε και ανακοινώθηκε ήταν το 1920 από το Γερμανό νευρολόγο Hans Gerhard-Grutzfeldt παρατηρώντας την νόσο σε ένα θήλυ άτομο με γρήγορη εξέλιξης, διαταραχών μνήμης (άνοιας), τρόμο κεφαλής, άκρων, δυσκαταποσία, σπαστικότητα, αταξίας βάδισης και μυοκλονιών (Richardson and Masters, 1995; Creutzfeldt, 1920), ενώ παρόμοια περιστατικά ανακοινώθηκαν από τον Alfons Maria Jakob.

Άλλη ονοματολογία των παθήσεων είναι:

- Inherited human transmissible spongiform encephalopathies
- Prion-associated disorders
- Prion-induced disorders
- Prion protein
- Transmissible dementias
- Transmissible spongiform encephalopathies (TSE)

Health Topic: Creutzfeldt - Jakob disease

Παθήσεις που θα πρέπει να διαφοροδιαγιγνώσκονται από τις Prion, είναι η Alzheimer και η Parkinson σαν νευροεκφυλιστικές tau-πάθειες. Τελευταία ανακοινώθηκε μία μορφή Huntington-like-φαινοτυπική νόσος, γνωστή ως Huntington disease-like-1 (HDL-1) σε μία οικογένεια με γενετικής βάσης P.D. (Mastrianni, 2010)

Οι κλινικές μορφές της νόσου αφορούν σε άνοια, ψυχιατρικές εκδηλώσεις με τη μορφή οπτικών και ακουστικών ψευδαισθήσεων, παραισθήσεων, απρακτικά φαινόμενα, αβουλία, κατάθλιψη, mutismus. Επιπλέον αφορά σε αταξία βάδισης, παρεγκεφαλιδικού τύπου διαταραχές οφθαλμοκίνησης, δυσαρθρία, μυοκλονίες άνω και κάτω άκρων, σπαστικότητα-εξωπυραμιδικού τύπου βλάβες. Τέλος, χορειακές κινήσεις, stroke-like (προσομοιάζονται με ισχαιμικό εγκεφαλικό επεισόδιο), επιληπτικές κρίσεις (epileptic seizures) με τη μορφή εστιακών κρίσεων (τονικών και κλονικών) ατονικών και μυοκλονιών, διαταραχές αυτόνομου νευρικού συστήματος (από το καρδιαγγειακό σύστημα, θερμορύθμισης-λήψης τροφής), διαταραχές ύπνου/κιρκάδιων ρυθμών (υπέρπνοια/αυπνία). (Mastrianni, 2010).

1.2 Νευροπαθολογικά ευρήματα (σε postmortem βιοψικά υλικά εγκεφάλων) :

- Σπογγώδης εκφύλιση εγκεφαλικού παρεγχύματος
- Αστροκυτταρική γλοίωση (φλοιού όσο και των εν τω βάθει πυρήνων-δομών εγκεφάλου:βασικά γάγγλια-θάλαμος).
- Αμυλοειδικές πλάκες στις οποίες συνδέονται τα αντισώματα (Ab) έναντι της αντι-prion proteins (PrP) και εικόνα μακροσκοπικά και μικροσκοπικά ατροφίας και κυτταρικής ερήμωσης-σχεδόν σε πρώιμα στάδια σε δομές όπως οι πυρήνες της ελαίας (παρεγκεφαλίδας) και της περιοχής του θαλάμου.

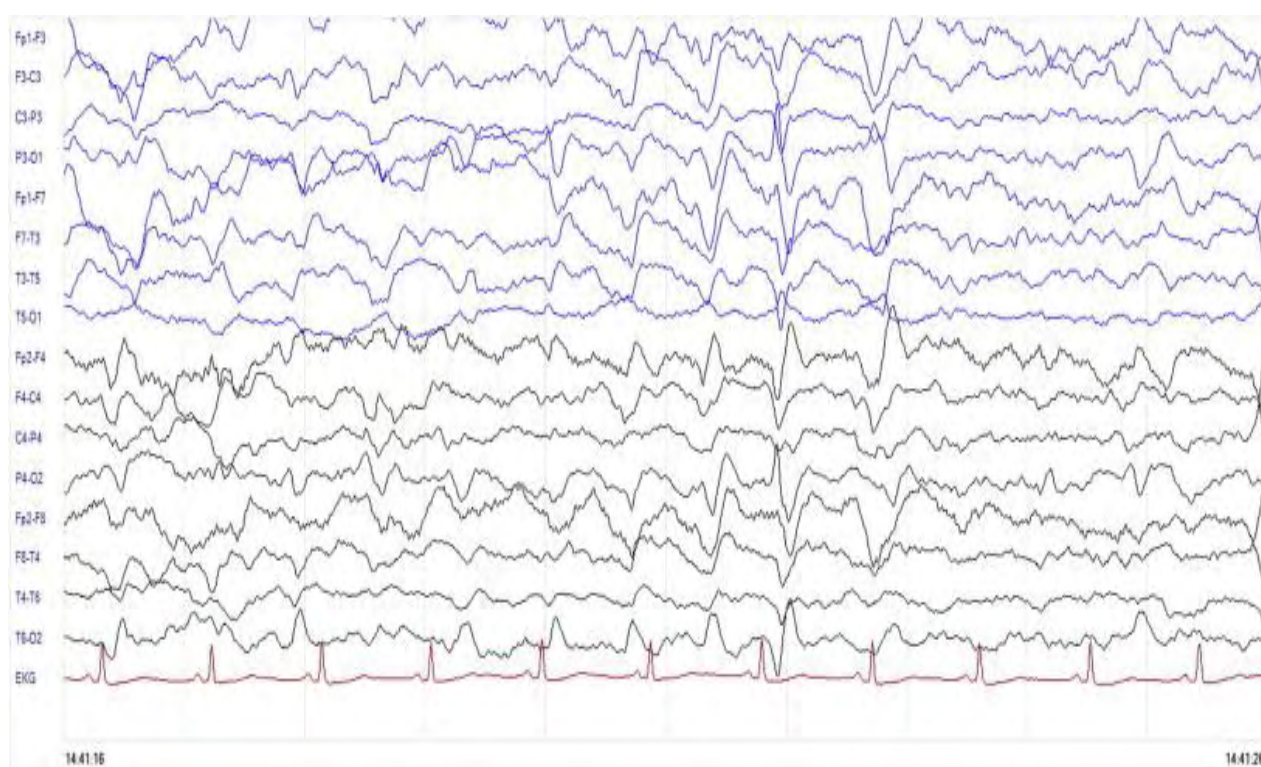
Οι διαγνωστικές εξετάσεις περιλαμβάνουν το ηλεκτροεγκεφαλογράφημα (electroencephalogram EEG), απεικονιστικές εξετάσεις με μαγνητική τομογραφία εγκεφάλου (MRI), PET (positron emission tomography) και έλεγχος εγκεφαλονωτιαίου υγρού (CSF) για την ανίχνευση της παθολογικής 14-3-3 πρωτεΐνης.

Οι εξετάσεις αυτές πραγματοποιούνται αρχικά για τις μη-γενετικής βάσης prion-πάθειες και γίνονται σε νοσοκομειακές μονάδες.

Ηλεκτροεγκεφαλογραφικά ευρήματα:

Παροξυσμικά αιχμηρά στοιχεία (επιληπτικής αιτιολογίας)- συμπλέγματα αιχμής-κύματος, με περιοδικότητα, (PSWCs-periodic spike wave complexes), τα οποία εμφανίζονται με την εξέλιξη της νόσου. Επίσης χαρακτηριστικά είναι τα τριφασικά κύματα (triphasic waves) με τις εκφορτίσεις αυτών σε συχνότητα 0.5-2.0 seconds.

Οι ΗΕΓ αλλοιώσεις εμφανίζονται παθογνωμικά στις PrD . Αξίζει να σημειωθεί ότι αρχικά τόσο τα τριφασικά κύματα αφορούν στο ένα εγκεφαλικό ημισφαίριο, αλλά με την εξέλιξη της νόσου εμφανίζονται διάχυτα και συνεχή, στα εγκεφαλικά ημισφαίρια, αμφοτερόπλευρα. Προς το τέλος της νόσου, η περιοδική αυτή δραστηριότητα εξαφανίζεται στα διαγράμματα (λόγω της εγκεφαλικής ατροφίας), δίνουν δε τη θέση τους σε γενικευμένες και συνεχείς βραδυρρυθμίες δέλτα συχνότητας. Παρακάτω απεικονίζεται τμήμα ηλεκτροεγκεφαλογραφήματος ασθενή με νόσο CJD.



Εικόνα 2. Παθολογικό ηλεκτροεγκεφαλογράφημα λόγω της εμφάνισης βραδυρρυθμιών θ (4-7Hz) και δ (0.5-4Hz) συχνότητας, σε γενικευμένη κατανομή (μετωπιαία και κροταφοβρεγματικά. Εικόνα τριφασικών δυναμικών με περιοδική εμφάνιση.

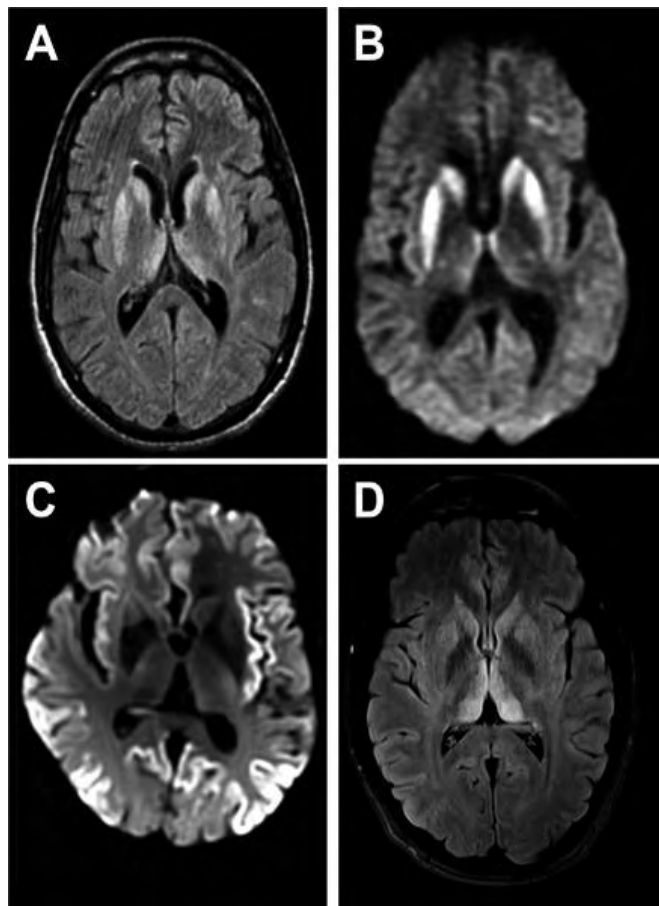


Εικόνα 3. Παθολογικό ηλεκτροεγκεφαλογράφημα με την εμφάνιση αιχμηρών στοιχείων-τριφασικών δυναμικών στις μετωποποκροταφοβρεγματικές περιοχές αμφοτερόπλευρα. Χαρακτηριστική η περιοδικότητα των παροξυσμικών στοιχείων.

Απεικόνιση με MRI

Αρχικά ήπια έως μέτρια ατροφία εγκεφαλικού παρεγχύματος. Περιοχές που προσβάλλονται συχνότερα είναι οι μετωπιαίοι και κροταφικοί λοβοί αργότερα δε οι εν τω βάθει δομές (βασικά γάγγλια/στέλεχος). Χαρακτηριστική εικόνα: Ribbon Sign στις T2-weighted εικόνες: αυξημένο σήμα στα βασικά γάγγλια (εικόνα Ribbon Sign): Εύρημα ιδιαίτερα στη σποραδική μορφή της νόσου, με μεγάλη ευαισθησία και ειδικότητα ενώ αφορά στην ωχρά σφαίρα και στο κέλυφος.

Καινούρια δεδομένα δείχνουν ότι οι αλλοιώσεις αυτές μπορεί να ανευρίσκονται και στις genetic prion diseases. (Genetics in Medicine, 2010)



Εικόνα 4. (A) Αυξημένο σήμα (hyperintensity) στη περιοχή των βασικών γαγγλιών (κερκοφόρος πυρήνας, ωχρά σφαίρα) σε άμφωτα εγκεφαλικά ημισφαίρια με εικόνα ατροφίας στους κροταφικούς λοβούς αμφοτερόπλευρα. (B) Ήπια διάταση κοιλιακού συστήματος μετωπιαίων και ινιακών κερμάτων, γενικευμένη ατροφία και αυξημένο σήμα στα βασικά γάγγλια. (C) Εικόνα Ribbon Sign φλοιικά στον κροταφικό και ινιακό λοβό (Diffusion weighted brain MRI). (D) Εικόνα αυξημένου σήματος

στους

θαλάμους

αμφοτερόπλευρα.

PET (αξονική τομογραφία μονήρους φωτονιακής δεσμίδας) περιορισμένης χρησιμότητας.

Εικόνα υπομεταβολισμού στα βασικά γάγγλια (θάλαμος) => εύρημα συχνότερο στην οικογενή θανατηφόρο αυπνία (FFI).

Εγκεφαλονωτιαίο υγρό

Αύξηση της πρωτεΐνης στο ENY στο 10%, πιο ειδικά της 14-3-3, της ειδικής νευρωνικής ενολάσης και της tau (μη φωσφοριλιωμένης πρωτεΐνης). Οι πρωτεΐνες αυτές αυξάνονται σε καταστάσεις απόπτωσης και κυτταρικού θανάτου των νευρώνων, και χρησιμοποιούνται σαν βιοδείκτες ειδικά σε μη γενετικές μορφές της νόσου. Άλλες καταστάσεις στις οποίες αυξάνεται είναι η ερπητική εγκεφαλίτιδα, πολλαπλή σκλήρυνση, θυρεοειδίτιδα Hashimoto, Alzheimer και AEE. (Mastrianni, 2010)

Όσον αφορά στην σύγχρονη διαγνωστική με βάση τη γενετική, γίνεται έλεγχος μέσω molecular genetic testing για το PRNP γονίδιο (οι μεταλλάξεις στο γονίδιο αυτό είναι

πάντοτε παρούσες στα συμπτωματικά άτομα). Μοναδική για τις νόσους αυτές είναι τα prions-ισομορφή της φυσιολογική PrP^C με μη καλή αναδίπλωση (misfolded), η οποία μεταδίδεται από κύτταρο σε κύτταρο και από ξενιστή σε ξενιστή, έτσι ώστε πάντα η παθολογική ισομορφή να προσβάλλει (μολύνει) τα γενετικά κύτταρα.

1.3 Συσχέτιση γονότυπου-φαινότυπου των PrD

Creutzfeldt-Jakob disease φαινότυπος.

Αρκετές PRNP εστιακές μεταλλάξεις έχουν βρεθεί σε σχέση με τη CJD (Asp 178 Asn με φυσιολογικές παραλλαγές Val 129, στις Val180Ile, Glu196Lys, Glu200Lys, Val203Ile, Arg208His, στις Val210Ile, Glu211Gln, Met232Arg, Thr183Ala).

GSS phenotype

Μεταλλάξεις στα Pro 102Leu, Pro 105Leu, Ala 117Val, Gly 131Val, Tyr 145Stop, Gln 160Stop, Phe 198Ser, Asp 202Asn, Gln 212Pro and Gln 217Arg.

FI (Fatal Insomnia)

Ο απλότυπος (Asp178Asn + normal variant M129) (Kovacs et al, 2002, Mastrianni et al, 1998)

Παραλλαγές στον φαινότυπο

His18 Arg

Αναφορά: μίας οικογένειας με συμπτώματα μετωποκροταφικής άνοιας (frontotemporal dementia) με τη συγκεκριμένη μετάλλαξη καθώς και μίας με άνοια, αταξία, μυοκλονίες και επιληπτικές κρίσεις. (Hall et al, 2005, Colucci et al, 2006)

Εισαγωγή οκταπεπτιδικών επαναλήψεων

Η προσθήκη αυτή γίνεται σε ιδιαίτερα ασταθείς περιοχές του PRNP, οι οποίες είναι πλούσιες σε προλίνη, γλυκίνη και γλουταμίνη. Η επανάληψη χαρακτηρίζεται σαν επαναλήψεις οκταπεπτιδίων. Μία στις 9 επαναλήψεις προσθετικών οκταπεπτιδίων (OPRI) έχουν περιγραφεί στις παθήσεις αυτές.

Φυσιολογικές-παραλλαγές στη νόσο.

Κωδικόνιο 129

Η πιο κοινή παραλλαγή είναι στο κωδικόνιο 129 του PRNP γονιδίου (385 A>G) το οποίο κωδικοποιεί τόσο τη μεθειονίνη (Met; 129M) ή τη βαλίνη (Val; 129V). Στη σπογγώδη εγκεφαλοπάθεια BSE, τα προσβεβλημένα άτομα είναι 129M ομοζυγώτες. 50% του καυκάσιου πληθυσμού είναι ομόζυγοι για την παραλλαγή για τη μεθειονίνη Met(40%) ή βαλίνης (10%). (Palmer et al, 1991)

Κωδικόνιο 219

Glu219Lys variant έχει αναφερθεί στο 6% του Ιαπωνικού πληθυσμού. (Shibuya et al, 1998)

Κωδικόνιο 127

Παρατήρηση ενός νέου πολυμορφισμού για τη Gly127Val σε πληθυσμό της Νέας Γουινέας. (Mead et al, 2009)

2. CJD mimics and chameleons

Οι ταχέως εξελισσόμενες άνοιες οι οποίες μιμούνται την CJD είναι σπάνιες καταστάσεις, οι οποίες πρέπει να είναι οικίες για τους θεράποντες ιατρούς (παθολόγους και νευρολόγους). Πρώτον για την ταχύτητα της διάγνωσης και δεύτερον για την θεραπευτική παρέμβαση. Οι ασθενείς θα πρέπει να μεταφέρονται αρκετά γρήγορα σε οργανωμένα διαγνωστικά κέντρα όπως είναι τα νοσοκομεία (γενικά νοσοκομεία ή νοσοκομεία αναφοράς με ειδικές οργανωμένες νευρολογικές κλινικές ή ακόμα και κλινικές της διάγνωσης της νόσου της CJD) . Η νόσος έχει χαρακτηριστική κλινική εικόνα και σπάνια διαφεύγει από την διαγνωστική ικανότητα

των νευρολόγων. Δεδομένου όμως ότι υπάρχουν τόσες άτυπες μορφές και η νόσος χαρακτηρίζεται από μεγάλη ετερογένεια, θα πρέπει να διαφοροδιαγιγνώσκεται από άλλες κοινές νευροεγκεφαλολογικές παθήσεις. Μιμητές, σαν κλινική εκδήλωση είναι η επιληπτική δραστηριότητα (γενικευμένοι τονικοί-κλονικοί σπασμοί), υπονατριαιμία και άλλες μεταβολικές παθήσεις. Επιπρόσθετα, εμπύρετες καταστάσεις (π.χ. λοίμωξη του κεντρικού νευρικού συστήματος), διαταραχές με άτυπες καθώς και τυπικές χειλοπροσωπικές κινήσεις (πιθανή αυτοάνοση εγκεφαλίτιδα). Στις καταστάσεις αυτές η νευρολογική εξέταση είναι ως επί το πλείστον φυσιολογική. Η απεικόνιση του κεντρικού νευρικού συστήματος με μαγνητική τομογραφία (MRI) καταδεικνύει

αυξημένης έντασης σήμα σε περιοχές του ραβδωτού σώματος, του θαλάμου καθώς και του φλοιού. Οι βιοχημικές εξετάσεις με τη μορφή της μελέτης και της εξέτασης του εγκεφαλονωτιαίου υγρού ENY δείχνουν πλειοκύττωση στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό.

(Mead, 2017)

Η ταχέως εξελισσόμενη άνοια είναι μία κλινική κατάσταση, η οποία αφορά στην έναρξη των συμπτωμάτων τους τελευταίους 6 μήνες έως και 1 χρόνο. Τα αρχικά συμπτώματα δεν είναι ειδικά και μπορούν να είναι κοινά και στον φυσιολογικό πληθυσμό. Οι ασθενείς εμφανίζουν διαταραχή από τις ανώτερες φλοιικές λειτουργίες όπως π.χ. τη συγκέντρωση, τη μνήμη, το προσανατολισμό στο χώρο, καθώς επίσης και στο χρόνο. Διαταραχές από την διάθεση καθώς και από την συμπεριφορά. Σε αρκετούς ασθενείς εμφανίζεται εικόνα παραληρήματος (delirium). Είναι δε οξείας και υποξείας έναρξης. Στη διερεύνηση θα πρέπει να γίνεται έλεγχος και αποκλεισμός παθολογικών καταστάσεων όπως τοξικών (toxic), μεταβολικών καταστάσεων, υπέρ και υπογλυκαιμία, υπέρ και υπονατριαιμία, καταστάσεις οι οποίες είναι θεραπεύσιμες και συνεπώς η αντιμετώπιση και έτσι η υποστροφή των συμπτωμάτων του ασθενούς. Πολύ σημαντική θεωρείται η λήψη ενός σωστού ιατρικού ιστορικού. (Geschwind et al, 2008)

Καταστάσεις οι οποίες έχουν παρόμοια εικόνα και θα πρέπει να αποκλειστούν είναι πολλαπλά έμφρακτα του εγκεφάλου (multiple strokes), ιογενής εγκεφαλίτιδα και όγκοι του κεντρικού νευρικού συστήματος όπως π.χ. μηνιγγιώματα, γλοιοβλαστώματα. Η διαφορική διάγνωση είναι η λιμβική εγκεφαλίτιδα, οι λοιμώδεις εγκεφαλίτιδες, ιογενής – μυκόπλασμα - παράσιτα, άνοια (η οποία είναι καλά ανταποκρινόμενη στα κορτικοστεροειδή). Επιπλέον παρανεοπλασματικές καταστάσεις, εγκεφαλοπάθεια Wernicke, νευροσαρκοείδωση, επιληπτικές καταστάσεις (non-convulsive status epilepticus) υποξική εγκεφαλοπάθεια, υποθυρεοειδισμός, τοξικές και μεταβολικές καταστάσεις, ψυχογενείς καταστάσεις (functional disorders). Διαφορική διάγνωση αποτελούν επίσης οι φλοιοβασικές άνοιες, διαταραχές του ύπνου και θαλαμικές βλάβες. Αυτές συνδυάζονται με διαταραχές του ύπνου, περιφερικούς πόνους και διαταραχές της αισθητικότητας Η αταξική μορφή της νόσου όπως π.χ. αταξικό βάδισμα, αστασία, αβασία και μυόκλονος. Άλλες διαταραχές είναι οι αμιγείς βλάβες από την ανώτερη φλοιική λειτουργία, όπως διαταραχές της μνήμης, του λόγου, απρακτικά φαινόμενα, δυσφασία συμπτώματα του κροταφικού λοβού ή ακόμα και του βρεγματικού λοβού. Τέλος φλοιική απραξία, κινητικό mutismus και η κλασική μορφή

της νόσου είναι γενικευμένες βλάβες από την μνήμη. Ο ασθενής καθίσταται παρεγκεφαλιδικός με κυρίαρχα συμπτώματα την αταξία και την δυσαρθρία με έντονο μυόκλωνο και έντονα κινητικά συμπτώματα. (Caine et al, 2015)

Οι διαταραχές αφορούν κυρίως την μνήμη, τη συμπεριφορά, διαταραχές των αριθμητικών πράξεων της άρθρωσης και αφασικές διαταραχές. Οι καταστάσεις αυτές συνδυάζονται επίσης με παρεγκεφαλιδική αταξία, μυόκλωνο, πυραμιδικές και εξωπυραμιδικές βλάβες. Άλλα συμπτώματα είναι οπτικές και ακουστικές ψευδαισθήσεις. (Caine et al, 2015). Στο 15% των ασθενών υπάρχουν και άτυπες εκδηλώσεις που προκαλούν δυσκολία στη διαφορική διάγνωση και στη διάγνωση, όπως άνοια που αφορά στη νόσο του Alzheimer, των μετωποκροταφικών ανοιών και άνοια με τα Lewy bodies. Η νόσος η οποία αφορά στο 10% έχει συμπτώματα όπως αταξία και διαταραχές στη βάδιση και στην ορθοστάτιση. Συχνά συγχέεται με διαταραχές της παρεγκεφαλίδας, του εγκεφαλικού στελέχους και των συνδέσεων αυτών, καθώς και αγγειακές, νεοπλασματικές, παρανεοπλασματικές και φλεγμονώδεις καταστάσεις. Τα συμπτώματα της νόσου εφόσον είναι οπτικές διαταραχές (Heidenhein variant), αφορούν στο 5% και είναι με τη μορφή της ημιανοψίας, σκοτώματος ψευδαισθήσεων οπτικών, παλλινοψίας και διαταραχές των χρωμάτων. Άλλοι ασθενείς έχουν σαν πρώτα συμπτώματα οφθαλμοπληγία, διαταραχές της οφθαλμοκίνησης. Κατά βάση ιδιαίτερα ανησυχητικά είναι τα ψυχιατρικά συμπτώματα που εμφανίζονται στο 5% των ασθενών. Άλλα συμπτώματα είναι κατάθλιψη, διαταραχές της προσωπικότητας των ασθενών, παρανοϊκές καταστάσεις, οπτικές ψευδαισθήσεις, έντονη επιθετικότητα, τα οποία εμφανίζονται στην αρχική εμφάνιση της νόσου. Αργότερα αφορούν τόσο στις σποραδικές μορφές της νόσου όσο και στις οικογενής, (συχνότερα δε στις σποραδικές μορφές). Αρκετά συχνά εφόσον υπάρχουν τα ψυχιατρικά νοσήματα οι ασθενείς θεραπεύονται και παρακολουθούνται από ψυχιάτρους γιατρούς με διάγνωση ψύχωσης και κατάθλιψης. Άλλοι μιμητές είναι εγκεφαλικά επεισόδια (2%), φλοιοβασικές άνοιες (2%), θαλαμικές παθήσεις (2%), καταστάσεις οι οποίες περιλαμβάνουν διαταραχές του ύπνου, επώδυνων καταστάσεων, διαταραχές του αυτόνομου νευρικού συστήματος: αίσθημα προκάρδιων παλμών, διαταραχές της θερμορύθμισης, αυξημένη αρτηριακή πίεση καθώς και ορθοστατική υπόταση. Ειδικά όσο αφορά τις διαταραχές του ύπνου και διαταραχές από το αυτόνομο νευρικό σύστημα, στοιχειοθετούν την οικογενή θανατηφόρο αυπνία. Είναι πολύ συχνή στις κληρονομικές μορφές των prion diseases που αφορούν στην μετάλλαξη του

γονιδίου D178N. Έχει σχέση με το αλληλίο της μεθειονίνης στο πολυμορφικό κωδικόνιο 129. Καταστάσεις ύποπτες για λοιμώξεις του κεντρικού νευρικού συστήματος όπως είναι οι ιογενείς εγκεφαλίτιδες θα πρέπει επειγόντως να μεταφέρονται στο νοσοκομείο και να αντιμετωπίζονται με ενδοφλέβια χορήγηση της συγκλοβίρης. Καταστάσεις οι οποίες συνδυάζονται με απώλεια βάρους, κατανάλωση αλκοόλ, και αλκοολικής αιτιολογίας καχεξία, διαταραχές από τη λήψη της τροφής, διαταραχές από την συμπεριφορά, (οπότε μπαίνει και η υπόνοια της νόσου του Wernicke) θα πρέπει να θεραπεύονται ή να αντιμετωπίζονται με ενδοφλέβια χορήγηση βιταμινών. Σημαντική είναι η εξέταση αίματος ολικού και βιοχημικές εξετάσεις όπως είναι ήπατος, ουρίας και κρεατινίνης, ειδική εξέταση βιταμινών όπως βιταμίνης B12, ορολογικές εξετάσεις για αποκλεισμό της νευροσύφιλης, αντισωμάτων που αντιστοιχούν σε παρανεοπλασματικές καταστάσεις καθώς και αντισώματα που θέτουν τη διάγνωση της λιμβικής εγκεφαλίτιδας. Το πρωτόκολλο για τη διάγνωση της άνοιας αφορά απεικόνιση με μαγνητική τομογραφία του εγκεφάλου (MR scan), η οποία περιλαμβάνει λήψεις με διάχυση (FLAIR: fluid-attenuated inversion recovery). Επιπλέον εξετάσεις με ηλεκτροεγκεφαλογράφημα (EEG) και εξέταση του εγκεφαλονωτιαίου υγρού (CSF examination). Ειδικές εξετάσεις για τη νόσο είναι η 14-3-3 πρωτεΐνη, η S100b, α βeta, tau πρωτεΐνη, η real-time quaking-induced conversion assay (RT-QUIC) και η νευρωνική-ειδική ενολάση. (Cooper et al, 2005, Thompson et al, 2014)

Πάνω από το 80% των ασθενών με τη νόσο του CJD έχουν διαταραχές της πρωτεΐνης 14-3-3 με αυξημένο τίτλο που θέτει τη διάγνωση. Η πρωτεΐνη αυτή αυξάνεται στο συγκεκριμένο test το οποίο αφορά στον ενοφθαλμισμό της πρωτεΐνης 14-3-3 αλλά και της ανασυνδυσμένης prion πρωτεΐνης, η οποία τελικώς ανιχνεύεται με την αύξηση της φθοριωμένης θειοβλαβίνης T (hence real time). Βοηθητικές εξετάσεις για τη διάγνωση της νόσου είναι η λήψη βιοψίας από τις αμυγδαλές καθώς και διάφορα άλλα αιματολογικά test (the Direct Detection Assay). Σημαντική εξέταση επίσης είναι το brushing, η λήψη υλικού από το οσφρητικό σύστημα, εξετάσεις των ούρων καθώς επίσης και αίματος. Όσον αφορά σε βιοψία του εγκεφάλου είναι σημαντική, και θα πρέπει να γίνεται κάτω από ειδικές καταστάσεις, σε εξειδικευμένα κέντρα από νευροχειρουργούς σε άσηπτες καταστάσεις και μέσω ειδικών πρωτοκόλλων. (Peden et al, 2012, Zanussso, 2014)

2.1 Prion mimics και γενετική

Αυτοάνοση εγκεφαλίτιδα με αντισώματα έναντι των Voltage-gated potassium channel (Casp-1), αυτοάνοση εγκεφαλίτιδα με αντισώματα έναντι του N-methyl-D-aspartate acid(NMDAR), B-cell (B-CLL/SLL) λέμφωμα και τέλος C9orf72 μετάλλαξη με έντονη γενικευμένη φλοιική εγκεφαλική ατροφία.

Οι αγγειακές παθήσεις και ειδικά αυτές που αφορούν στα βασικά γάγγλια όπως είναι στο ραβδωτό σώμα καθώς και στο θάλαμο είναι δυνατόν να προκαλέσουν διαγνωστική σύγχυση και προσομοιάζουν με τη νόσο του CJD. Συμπτώματα όπως είναι ο μυόκλονος, η αταξία και κινητικά συμπτώματα που ανευρίσκονται πολύ συχνά στις νευροεκφυλιστικές καταστάσεις είναι δυνατόν να επιδεινώνονται με την φαρμακευτική αγωγή όπως είναι π.χ. τα τρικυκλικά αντικαταθλιπτικά. Όλες οι νευροεκφυλιστικές καταστάσεις κληρονομούνται μέσω της μενδέλιας γενετικής π.χ. όπως είναι το C9orf72 που φαίνεται να σχετίζεται με την ταχείας εξέλιξη CJD. Η ανάγκη εξετάσεων μέσω γενετικού panel είναι σημαντική. Παρότι πολλές καταστάσεις υπάγονται στις παρανεοπλασματικές παθήσεις, η εξέταση μέσω της φθοριοδεοξυγλυκόζης δηλαδή μέσω του PET είναι σημαντική, για την ανεύρεση υποκείμενου όγκου δεδομένου ότι συχνά σχετίζονται τόσο με καλοήθειες (τεράτωμα ωοθηκών) όσο και κακοήθειες όγκους. (Beck et al, 2014)

Όσον αφορά σε εγκεφαλίτιδες υπάρχουν συγκεκριμένα αντισώματα, τα οποία κατευθύνονται εναντίον της επιφάνειας και των υποδοχέων των νευρώνων, καθώς και των διαύλων των ιόντων στην επιφάνεια των κυττάρων αυτών. Πολλές αυτοάνοσες εγκεφαλίτιδες-παρανεοπλασματικής αιτιολογίας έχουν πολύ καλή πρόγνωση και θεραπεία μετά την κατάλληλη χρήση των ανοσοκατασταλτικών και ανοσοτροποποιητικών φαρμάκων.

Στις λιμβικές εγκεφαλίτιδες οι οποίες αφορούν σε νέους ανθρώπους αλλά και μεσήλικες συσχετίζεται πολύ συχνά με τεράτωμα των ωοθηκών στις γυναίκες καθώς και με το μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα και τα σεμινώματα των όρχεων.

Στις επιληπτικές κρίσεις-καταστάσεις χρήζει συγκεκριμένης αντιεπιληπτικής αγωγής. Όσον αφορά στη μαγνητική τομογραφία του εγκεφάλου έχουμε αυξημένο σήμα στο ραβδωτό σώμα στο θάλαμο καθώς και στο φλοιό του εγκεφάλου.

Όσον αφορά στους λοβούς του εγκεφάλου, προσβεβλημένοι φαίνονται να είναι ο κροταφικός λοβός και ο υπόκαμπος, λιγότερο δε το εγκεφαλικό στέλεχος, η παρεγκεφαλίδα και η λευκή ουσία. Άλλη αυτοάνοση εγκεφαλίτιδα έχει σχέση με τα voltage-gated potassium channel (VGKC) complex, ενώ πιο αυξημένα φαίνονται να είναι και τα LGI1 αντισώματα. (Graus et al, 2016)

Δυνητικές διαταραχές όπως είναι οι μυοκλονίες που είναι βραχείας διάρκειας και συχνές επιληπτικές κινήσεις προσβάλλουν τόσο μονόπλευρα όσο και αμφοτερόπλευρα τα άνω και τα κάτω άκρα. Χαρακτηριστική όμως είναι η faciobrachial dystonic position. (Mead, 2017)

Άλλες μορφές αυτοάνοσης εγκεφαλίτιδας είναι εκείνες που αφορούν στην αποκαρβοξυλάση του γλουταμινικού οξέος (glutamic acid decarboxylase). Τα αντισώματα εναντίον των υποδοχέων AMPA συνδυάζονται με όγκους. Πολύ σημαντική στη διαφορική διάγνωση είναι η Hashimoto εγκεφαλίτιδα που είναι μία δυνητικά ιάσιμη νόσος πολύ καλά ανταποκρινόμενη στα στεροειδή. Για τη διάγνωση θα πρέπει να γίνεται ο έλεγχος των θυρεοειδικών ορμονών καθώς και anti-TPO (αντιθυρεοειδικής αντι-βodies). Άλλη σημαντική κατάσταση είναι η progressive multifocal encephalopathy, μία ευκαιριακή λοίμωξη του εγκεφάλου που συνδυάζεται με πολύωμα JC Virus αποκλειστικά εμφανιζόμενη σε ανοσοκατεσταλμένα άτομα. Άλλες λοιμώξεις είναι το AIDS (HIV λοίμωξη), λέμφωμα Hodgking ή ακόμη και ιστορικό χρόνιας λεμφοκυτταρικής λευχαιμίας. Η κατάσταση αυτή πολύ συχνά έχει συγκεκριμένα κλινικά συμπτώματα όμως συγγέεται με τη νόσο του CJD. Συχνά εμφανίζεται με γενικευμένες επιληπτικές κρίσεις, σχεδόν στο 50% των περιπτώσεων. Όσον αφορά στη νόσο PML(Progressive Multifocal Leukoencephalopathy) χαρακτηριστική είναι η απεικόνιση, όπου υπάρχει γενικευμένη απομυελίνωση τόσο στη λευκή όσο και στη φαία ουσία των βρεγματικών και των ινιακών λοβών, ενώ η προσβολή φαίνεται να είναι ιδιαίτερα έντονη και στο corpus callosum δηλαδή στο μεσολόβιο όσο και στο θάλαμο και στα βασικά γάγγλια. Η διάγνωση της νόσου γίνεται μέσω της λήψης και της εξέτασης του εγκεφαλονωτιαίου υγρού όπου στέλνεται PCR για το JC Virus. (Gastaldi, 2016)

2.2 Υποξεία Συνδυασμένη Σκλήρυνση

Είναι σπάνια επιπλοκή των παιδικών λοιμώξεων ειδικά της ιλαράς. Έχει συμπτώματα τα οποία προσομοιάζουν με τη νόσο CJD. Ειδικά με τη διαταραχή του ύπνου, σύγχυση

λήθαργο. Πρόδρομα συμπτώματα είναι διαταραχές από την συμπεριφορά, ενώ κινητικά συμπτώματα (μυόκλονος) αφορούν σε κινητικές επιληπτικές καταστάσεις, διαταραχές από την μνήμη και τον λόγο ενώ αργότερα υπάρχουν συμπτώματα όπως π.χ. σπαστικότητα, πάρεση, παραπάρεση, πληγίες και διαταραχές συνείδησης.

Η υπόνοια της νόσου θα πρέπει να μπαίνει τόσο σε παιδιά όσο και σε νέους ενήλικες που έχουν ειδικά ιστορικό με λοίμωξη από τον ιό της ιλαράς. Χαρακτηριστικά είναι τα ηλεκτροεγκεφαλογραφικά ευρήματα, δηλαδή με αμφοτερόπλευρα σύγχρονα και περιοδικά συμπλέγματα αιχμής και κύματος τα οποία διαρκούν για λίγα δευτερόλεπτα. Παθολογική είναι και η εξέταση του εγκεφαλονωτιαίου υγρού ειδικά για τα αντισώματα τα οποία αφορούν στην ιλαρά. Άλλες ιογενείς εγκεφαλίτιδες θα πρέπει να μπαίνουν στην υπόνοιά μας εφόσον εμφανίζονται με ταχέως εξελισσόμενη εικόνα . Εμφανίζονται αρκετά συχνά σαν εμπύρετο με αυξημένους φλεγμονώδεις παράγοντες τόσο στο αίμα όσο και στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό . Κλινικά δε επανεμφανίζονται με κλινική εικόνα λοίμωξης του κεντρικού νευρικού συστήματος με επιληπτικές κρίσεις, με μηνιγγισμό, και συχνά οι ασθενείς πέφτουν σε κώμα. Η υποψία εμφάνισης των νόσων αυτών συχνά συγχέεται με τη νόσο του CJD. (Mead, 2017)

2.3 Νεοπλασματικές και παρανεοπλασματικές καταστάσεις.

Τυπικά η CJD θα πρέπει να διαφοροδιαγιγνώσκεται από το πρωτοπαθές λέμφωμα του κεντρικού νευρικού συστήματος, από την γενικευμένη καρκινομάτωση καθώς και από το ενδοαγγειακό λέμφωμα. Κατάσταση καλά ανταποκρινόμενη με τη χορήγηση κορτικοστεροειδών. Πολύ σημαντική για τη διάγνωση της νόσου είναι η βιοψία του εγκεφαλικού ιστού. Ορολογικά αυξημένα βρίσκονται οι βιοδείκτες που αφορούν στους όγκους καθώς και το ολικό scanning το οποίο δείχνει το κατά πόσο υπάρχουν καρκινωμάτωσης εστίες η όχι. Το ενδοαγγειακό (β-cell) λέμφωμα είναι σπάνια κατάσταση η οποία διαγιγνώσκεται δύσκολα. Κλινικά αυτή η κατάσταση χαρακτηρίζεται από διαταραχή στη νοητική σφαίρα όπως άνοια, από επιληπτικές κρίσεις, διαταραχές από τον ανώτερο κινητικό νευρώνα αλλά και από το περιφερικό νευρικό σύστημα όπως π.χ. μία περιφερική νευροπάθεια. Σημαντική είναι η συμβολή της απεικόνισης του εγκεφάλου με μαγνητικό τομογράφο. (Mead, 2017)

Οι αγγειακές νόσοι, αγγειακά εγκεφαλικά επεισόδια με τη μορφή της προσβολής και της απόφραξης μεγάλων αγγειακών στελεχών (ισχαιμικό της μέσης εγκεφαλικής αρτηρίας) της πρόσθιας εγκεφαλικής αρτηρίας ή ακόμη και του σπονδυλοβασικού

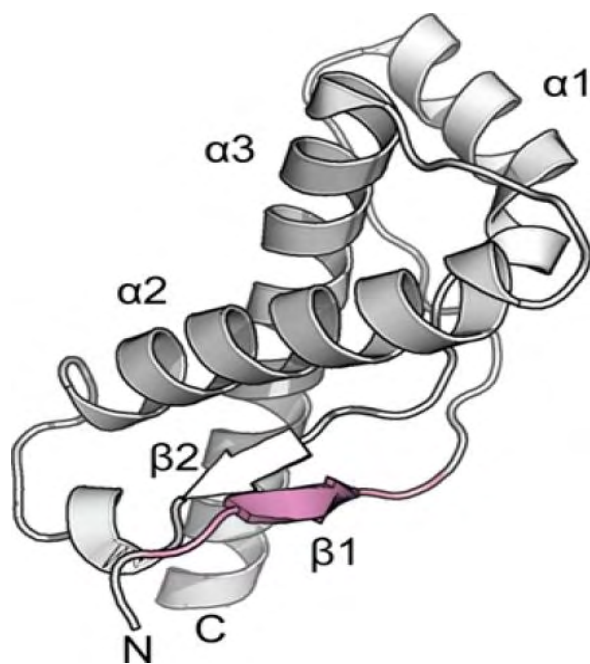
συστήματος. Αρτιοφλεβώδεις διαταραχές, σύνδρομο της οπίσθιας αναστρέψιμης εγκεφαλοπάθειας και το σύνδρομο της πρωτοπαθής αγγειίτιδας του κεντρικού νευρικού συστήματος μπορούν να μιμηθούν το CJD. Σημαντική είναι η διάγνωση ή να διαχωρίζεται μεταξύ των άλλων κληρονομικών μορφών π.χ. της παρεγκεφαλιδικής αταξίας η οποία αφορά στη κλινική εικόνα που έχει σχέση με τη διαταραχή της αισθητικότητας των κάτω άκρων της απουσίας των επιγονατίων αντανακλαστικών και του θετικού πελματιαίου αντανακλαστικού. (Mead, 2017)

3. Prion πρωτεΐνη: δομή, μετατροπή και μηχανισμοί της μετάδοσης.

Η PrP πρωτεΐνη είναι το προϊόν ενός απλού γονιδίου, το οποίο καλείται PRNP, και κατευθύνει την σύνθεση πρωτεΐνης 253 αμινοξέων (252 σε μερικά είδη), η οποία περιέχει ένα σηματοδοτικό πεπτίδιο , 5 επαναλήψεις οκταπεπτιδίων κοντά στο αμινοτελικό άκρο, 2 γλυκοζυλιωμένες άκρες και μία δυσουλφιδική γέφυρα.(Cohen, 1999). Μία άκρη της γλυκοσυλφωσφατιδυλινοσιτόλης (GPI:glycosylphosphatidylinositol) έρχεται σε επαφή με την πρωτεΐνη και μάλιστα με την εξωτερική επιφάνεια αυτής. Η PrP^{Sc} πρωτεΐνη παράγεται από την μετατόπιση της αλληλουχίας του αμινοτελικού άκρου στο ενδοπλασματικό δίκτυο (endoplasmic reticulum, ER), και στο σύστημα Golgi. (Harris, 2003).

Η PrP εκφράζεται σε 3γλυκο-μορφές (μονο-,δι-,και μη γλυκοζυλιωμένες μορφές), καταστάσεις διαφορετικές από είδος σε είδος στο ζωικό βασίλειο. Οι πρωτογενείς μορφές και δομές των δύο prion πρωτεϊνών (PrP^C και PrP^{Sc}) φαίνεται να έχουν διαφορές τόσο σε βιοχημικό επίπεδο όπως και σαν δομές όπως π.χ. η αντοχή και η ανθεκτικότητα στις πρωτεάσες, στη διαλυτότητα, στην αντοχή και στην συγκέντρωσή τους. (Cohen and Prusiner et al, 1988)

Οι διαφορές μεταξύ αυτών μπορεί να είναι σε επίπεδο αλλαγής της δομής της πρωτεΐνης από δευτεροταγή σε τεταρτοταγή. Άρα, η PrP^C πρωτεΐνη αποτελείται από δύο δομικά τμήματα, όπου το ένα αποτελείται από ένα αμινοτελικό άκρο (N-) με 128τμήματα. Αποτελείται από επαναλήψεις οκταπεπτιδίων και αναλαμβάνει ρόλο μίας πρωτεΐνης, με ιδιαίτερες βιολογικές ιδιότητες και δράσεις ενώ το δεύτερο τμήμα αυτής είναι το καρβοξυλικό άκρο το οποίο συνδέεται με 3 α-έλικες και δύο μικρά β-strand περιοχές.



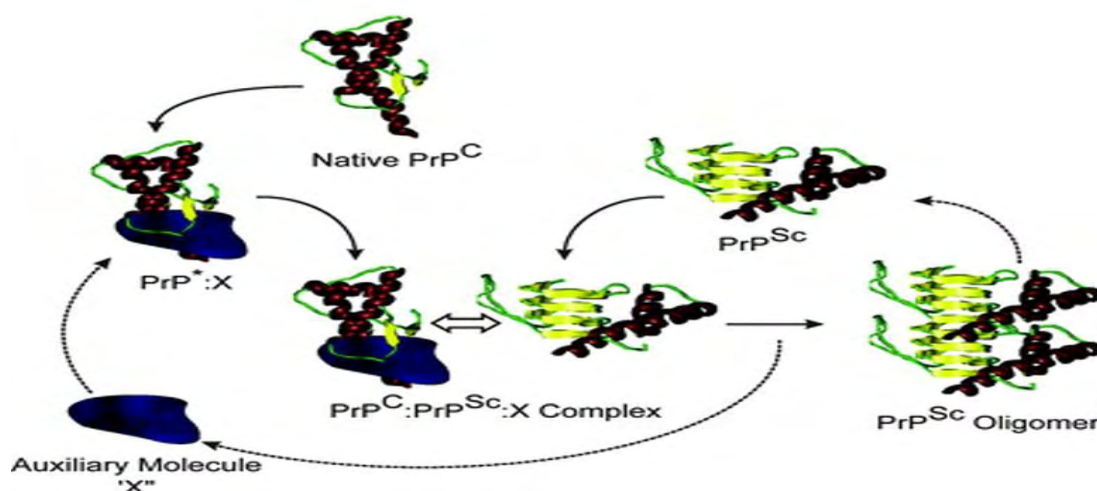
Εικόνα 5. Δομή της PrP^C πρωτεΐνης με α-β έλικες με το καρβοξυλικό (-C) και το αμινοτελικό της άκρο (-N).

Η χαρακτηριστική αυτή δομή της PrP^C πρωτεΐνης κατακερματίζεται με τη δράση του NMR: Nuclear magnetic resonance (πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός) σε είδη όπως είναι τα θηλαστικά, ο άνθρωπος, τα ποντίκια, τα χάμστερς, τα βοοειδή και τα ερίφια. Από άποψη εργαστηρίου πρόσφατα φάνηκε ότι η κρυσταλλική δομή της διμερούς μορφής της ανασυνδυασμένης ανθρώπινης PrP^C εμφανίζει διαθλαστικότητα μέσω των ακτίνων X. (Knaus et al, 2001)

Το πρόσφατο μοντέλο της PrP^{S^C} δομής φαίνεται να έχει μία υδρόφοβη περιοχή, η οποία βρίσκεται στο N άκρο και στη μέση μιας σφαιρικής περιοχής η οποία οργανώνεται σε δύο αντιπαράλληλα β-ελάσματα. (Huang et al, 1996)

Σε πρόσφατα πειράματα έχει φανεί ότι η ενδογενής πρωτεΐνη PrP^C συμμετέχει στην εμφάνιση λοίμωξης ,ενώ έχει χρησιμοποιηθεί πειραματικά σε διάφορα διαγονιδιακά ποντίκια ή ακόμα και σε knocked out για την μελέτη των γονιδίων που παράγουν την PrP πρωτεΐνη. Τα πειραματόζωα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν ανθεκτικά στην prion με αποτέλεσμα να μην συμμετέχουν στην μετάδοση της νόσου.

Σε *in vitro* μελέτες των πρωτεϊνών PrP^{Sc} απαραίτητο είναι να υπάρχει μείγμα μεταξύ της πρωτεΐνης PrP^C και της PrP^{Sc} για να αυξηθεί η μολυσματικότητά της. Σε μοριακές και γενετικές μελέτες συμμετέχει ο μηχανισμός των chaperones δηλαδή πρωτεΐνες X (PrP*) που προωθούν τη μετατροπή της PrP^C -> στην PrP^{Sc}.



Εικόνα 6. Η μετατροπή της αρχικής prion πρωτεΐνης μέσω του μηχανισμού των τσαπερονών (δηλαδή πρωτεΐνες X) στην παθολογική PrP^{Sc}.

Τα μοντέλα τα οποία προτείνονται για την μετατροπή αυτών των δύο ισομορφών είναι το template-assisted conversion model. Προτάθηκε από τους Cohen και Prusiner το 1998. Αφορούν στη φυσική αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο ισομορφών τα οποία δημιουργούν τις αλλαγές στη δομή των δύο αυτών πρωτεϊνών και έτσι λοιπόν παράγεται το παθολογικό τμήμα της PrP^{Sc}. (Cohen and Prusiner, 1998) Επιπλέον το nucleation/polymerization model. Στο μοντέλο αυτό φαίνεται ότι η PrP^{Sc} έχει θερμοδυναμική σταθερότητα σε σχέση με την προηγούμενη και διαφορετική τελικά φαρμακοκινητική. (Caughey, 2001, Lansbury, 2003)

Αυθαίρετα τα ετεροδιμερή τα PrP^{Sc} μετατρέπονται στα PrP^{Sc} ομοδιμερή τα οποία εμπεριέχουν τόσο την παλιά όσο και την καινούρια PrP^{Sc} πρωτεΐνη. Η δομική μετατροπή του πλούσιου σε β-έλασμα υλικού είναι υπεύθυνο για την σύνδεση της PrP* στο PrP^{Sc} πολυμερές. Το μακροσκελές PrP^{Sc} πολυμερές σπάει σε μικρότερα μολυσματικά τμήματα.

Σημαντική για τη μετατροπή αυτών των δύο πρωτεϊνών είναι η συμμετοχή της πρωτεΐνης X. Μεταφέρονται σε διάφορα διαγονιδιακά ποντίκια και σε χιμαιρικές μορφές μεταξύ ποντικών και μεταξύ ανθρώπων και ποντικών. Η μεταφορά της ανθρωπείας prion στα ποντίκια γίνεται μέσω prp-null γονιδιακών ποντικών.

(Telling et al, 1995)

3.1 Πεπτιδικά μοντέλα: κατανόηση της δομής της prion πρωτεΐνης και της μετάδοσής της.

Σε χιμαιρικά διαγονιδιακά ποντίκια η PrP^C και η PrP^{Sc} αλληλοεπιδρούν μεταξύ τους με ένα κεντρικό μόριο το οποίο συνήθως σταματά στα κωδόνια 96 και 169. (Scott et al 2000, Telling et al, 1996)

Έτσι λοιπόν μελέτες οι οποίες χρησιμοποιούν συνθετική prion πρωτεΐνη ή συνθετικά πεπτίδια prion πρωτεΐνης δείχνουν ότι τα πεπτίδια αυτά περιστρέφονται στις περιοχές 109-141 ή στο δεσμό 141 της PrP^C και στη συνέχεια ολοκληρώνουν την αλληλεπίδραση με το PrP^{Sc}.

Πεπτίδια τα οποία συνδέονται με την αλληλουχία 109-141 της PrP πρωτεΐνης αναστέλλουν την αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο PrP ισομορφών με αποτέλεσμα να προφυλάσσουν το κύτταρο γενικά από τη μετατροπή της PrP^C στη παθολογική PrP^{res} μορφή. (Chabry et al, 1998)

Επομένως το τμήμα της PrP πρωτεΐνης 109-141 το οποίο τελικά συνδέεται με τη δομή β-Sheet είναι ανθεκτικό στην αποδόμηση από την πρωτεϊνάση K (PK). Το ίδιο πεπτίδιο όταν έρχεται σε επαφή με μία τυχαία άλλη δομή γρήγορα αποδομείται από τη συγκεκριμένη πρωτεάση αυτή. Η μορφή της PrP με τις αλληλουχίες 109-141 δημιουργεί τυπικό αμυλοειδές. Τα oligομερή με β-Sheet δομές από τις πρωτεΐνες 109-141 αλληλουχίες προάγουν τη διαδικασία του κυτταρικού θανάτου στο ανθρώπινο νευροβλάστωμα και τα κύτταρα που απαρτίζουν αυτό. (Zhang et al, 1995) Η αλληλουχία 106-126 είναι μερικώς ανθεκτική στην πρωτεϊνάση K. Δρα κυτταροτοξικά τόσο *in vitro* όσο και στο εγκεφαλικό παρέγχυμα, προγραμματίζοντας το κυτταρικό θάνατο (μοντέλα νευρώνων αμφιβληστροειδούς). (Selvaggini et al, 1993, Forloni et al, 1993) Επίσης, οι αλληλουχίες 134-217 είναι υψηλά τοξικές για τις κυτταρικές μεμβράνες. Η πρωτεΐνη PrP 106 θεωρείται κατάλληλος παράγοντας για τη μελέτη της

τοξικής μετατροπής της πρωτεΐνης από την μορφή της PrP^C στην PrP^{Sc} και της παθογονικότητας τους. (Bonetto et al, 2002)

3.2 Εξωσώματα: Η συμμετοχή των εξωσωμάτων στις prion παθήσεις

Τα εξωσώματα περιεγράφηκαν για πρώτη φορά από τον Pan και Johnstone το 1983, ενώ σήμερα η έρευνα πάνω στο πεδίο αυτό συνεχώς κερδίζει έδαφος. Τα εξωσώματα είναι μικροκυστίδια (micro-vesicles), διαμέτρου 40-100nm, τα οποία βρίσκονται στην μεμβράνη των κυττάρων. Βρίσκονται σε πάρα πολλά βιολογικά υγρά (αίμα , ούρα, σίελο, μητρικό γάλα). Παράγονται και υπάρχουν σε πολλά είδη κυττάρων ενώ μεταφέρονται μέσω διάχυσης στον εξωκυττάριο χώρο. Τα λιπίδια και οι πρωτεΐνες είναι τα κύρια συστατικά των εξωσωμικών μεμβρανών , τα οποία περιέχουν επίσης συνδέσμους (σχεδίες) λιπιδίων (lipid-rafts). Ποικιλία νουκλεϊκών οξέων έχουν πρόσφατα περιγραφεί, καθώς και mRNAs, microRNAs και άλλα μη κωδικοποιά RNA (non-coding RNAs). Αυτά τα εξωσωμικά RNAs προσλαμβάνονται από τα γειτονικά ή ακόμα και από απομακρυσμένα κύτταρα μέσω της κυκλοφορίας (διακυτταρική επικοινωνία και ρύθμιση). Με τον τρόπο αυτό τα κύτταρα ανταλλάσσουν πληροφορίες. Τα εξωσωμικά miRNAs συμμετέχουν στην μετάδοση νόσων (μετάδοση ερπητοϊών, ρετροϊών κ.α.), στην αγγειογένεση καθώς και στις καρκινικές μεταστάσεις. (Simons, 2009 and Mathivanan et al., 2010)

Τα τελευταία χρόνια σημαντική θέση στην έρευνα, όσον αφορά στην παθολογία πάρα πολλών νοσημάτων (καρκίνος, νευροεκφυλιστικές αλλοιώσεις, λοιμώξεις), έχουν τα εξωσώματα. Συμμετέχουν στην διακυτταρική μεταφορά και εξάπλωση της φυσιολογικής και της παθολογικής prion-πρωτεΐνης. Σε άλλες περιπτώσεις τα εξωσώματα δρουν νευροπροστατευτικά. Στη βιβλιογραφία υπάρχουν αρκετές μελέτες που περιγράφουν τους ιδιαίτερους και πολλαπλούς μηχανισμούς μεταφοράς και εξάπλωσης της μολυσματικής prion πρωτεΐνης από κύτταρο σε κύτταρο. Οι τύποι διακυτταρικής μεταφοράς είναι από κύτταρο σε κύτταρο επαφή γειτονικών και απομακρυσμένων κυττάρων (cell to cell) [Kanu et al., 2002], η μεταφορά μέσω νανοσωληνίσκων (nano-tubes) [Gousset et al 2009] και μέσω εξωσωμάτων [Fevrier et al 2004]. Οι μελέτες αυτές βασίζονται σε παρατηρήσεις σε καλλιέργειες κυττάρων. (Cheng et al., 2015)

Σημαντικό είναι να τονισθεί, ο ρόλος της μετατροπής της φυσιολογικής prion στη μολυσματική μορφή καθώς και η συμμετοχή των εξωσωμάτων στην μετάδοσή τους. Η

φυσιολογική της μορφή είναι η PrP^C, η οποία συμμετέχει στις διαδικασίες ομοιοστάσης του κυττάρου [διαφοροποίηση νευρικών κυττάρων, προσκόλληση κυττάρων (Cell adhesion), στο σηματοδοτικό μηχανισμό (signal transduction), στη φυσιολογική λειτουργικότητα συνάψεων, μεταφορά μετάλλων-ιόντων και ιχνοστοιχείων, μεταφορά και ομοιοστάση χαλκού – ασβεστίου και τέλος στη λειτουργία νευρώνων ιπποκάμπου]. (Whittington et al, 2000, Collinge et al 1994 and Curtis et al 2003)

Με βάση τις πληροφορίες για την διακυτταρική επαφή και "γλώσσα" τα εξωσώματα τα οποία συμμετέχουν στην έκκριση της φυσιολογικής παραγόμενης PrP^C πρωτεΐνης, συμμετέχουν συνεχώς στην παραγωγή και εναπόθεση στους ιστούς του ΚΝΣ και του ΠΝΣ, αυτής της σημαντικής για τη ζωτικότητα των κυττάρων πρωτεΐνης. Επίσης, η PrP^C δρα σαν υποδοχέας για τα ολιγομερή του β-αμυλοειδούς (Αβ) (Jarosz-Griffiths et al, 2016). Τα εξωσώματα τα οποία ενσωματώνονται με την PrP^C, δρουν κατασταλτικά στο μηχανισμό της μακράς διάρκειας δυναμικών της επιφάνειας των νευρικών κυττάρων του ιπποκάμπου (LTP:Long-term potentiation), διαδικασία σημαντική για τη λειτουργία της μνήμης αλλά και της επιληπτογένεσης. (An et al, 2013)

Άλλες εργασίες υποστηρίζουν την επιτάχυνση της δημιουργίας ινιδίων του αβ ολιγομερούς και τη μείωση της νευροτοξικότητας της παθολογικής PrP^{Sc} πρωτεΐνης, μέσω αύξησης της παραγωγής και εναπόθεσης της φυσιολογικής PrP^C μορφής. (Falker et al, 2016)

Παθοφυσιολογικά, η μετατροπή, η εναπόθεση στους ιστούς και η αύξηση του μεγέθους και της συγκέντρωσης της ισομορφής PrP^{Sc} είναι η βάση της εμφάνισης των τοξικών αποτελεσμάτων δηλαδή της νευροεκφύλισης στους νευρικούς ιστούς. Βέβαια, οι τοξικές δράσεις της παθολογικής prion αφορούν στον "αριθμό" ή το σύνολο αυτής και στη βαρύτητα της νόσου. (Hill et al, 2000, Medori et al, 1992).

Στη νευροτοξικότητα δεν συμμετέχουν μόνο τα ολιγομερή-υπότυποι της PrP, PrP^C (L:Lethal:θανατηφόρος) αλλά και συμπαραγοντες(co-factors), που τελικώς οδηγούν στο δραματικό-ιστολογικό και κλινικό αποτέλεσμα. (Hill et al, 2000)

Για την καλύτερη κατανόηση του ρόλου των εξωσωμάτων στην μεταφορά και στην εξάπλωση των prions, έχει γίνει πληθώρα ερευνών, στις οποίες ιδιαίτερη σημασία δίνεται στα ενδοσώματα, στην έκκριση και στην επαναπρόσληψη των εξωσωμάτων που περιέχουν prion πρωτεΐνη. Σημαντικός στον μηχανισμό αυτό είναι ο παράγοντας

ESCRT(Endosomal Sorting Complex Required for Transport), ο οποίος είναι μη εξαρτώμενος από την ουμπικιτίνη. Όσο για την εξάπλωση των prions συμμετέχουν τα σεραμίδια, καθώς και η σφιγγομυελινάση (nsMase). (Guo et al., 2015, Vilette et al., 2015)

Προς το παρόν δεν είναι γνωστό αν η GPI(glycophosphatidyl-inositol) συνδεδεμένη PrP μπορεί να μεταφερθεί μέσω του παραπάνω μηχανισμού. Παρόλα αυτά αποσιώπηση του ESCRT μηχανισμού, καθώς και των παραγόντων HRS-ESCRT-O και Tsg101-ESCRT-1 υπομονάδας, συμμετέχουν στην ελάττωση της μεταφοράς και της εξάπλωσης των prions πρωτεϊνών. Χρησιμοποιώντας RNAi για την αποσιώπηση(silencing) του παράγοντα ESCRT και της σφιγγομυελινάσης, φαίνεται ότι η εναπόθεση της PrP και της σχετιζόμενης σφιγγομυελινάσης-ανεξάρτητης ισομορφής, συμμετέχουν στην βιογένεση των εξωσωμάτων και στο διαφορετικό τρόπο εξάπλωσής της σε μολυσμένα και μη κύτταρα. (Vilette et al, 2015)

Με βάση τους παραπάνω μηχανισμούς, γίνεται προσπάθεια κατανόησης των μηχανισμών διασποράς των prions από το λεμφοδικτυωτό σύστημα στον εγκέφαλο καθώς και του μηχανισμού συμμετοχής των εξωσωμάτων στη μεταφορά της μεταλλαγμένης PrP^{Sc} πρωτεΐνης, η οποία καταστρέφει και περνάει τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό.

Η αλληλεπίδραση εξωσωμάτων και γειτονικών κυττάρων γίνεται μέσω των διαμεμβρανικών πρωτεϊνών τους και των υποδοχέων στα σηματοδοτικά κύτταρα στόχους (Munich et al., 2012). Επιπλέον, μέσω της διάχυσης (δια των κυτταρικών μεμβρανών των γειτονικών κυττάρων που υποδέχονται το περιεχόμενο των εξωσωμάτων) καθώς και με την εγκύστωση-εγκόλπωση. Μερικά εγκυστωμένα εξωσώματα -μέσω συγχώνευσης- μετατρέπονται σε ενδοσώματα. Επιπλέον στη συνέχεια μέσω μεταφοράς δια των κυτταρικών μεμβρανών τα εξωσώματα έρχονται σε επαφή με τον περιβάλλοντα χώρο. Ενδοσώματα τα οποία διαχέονται με τη μορφή των εξωσωμάτων ωριμάζουν και μετατρέπονται σε λυσοσώματα, τα οποία υφίστανται περαιτέρω αποδόμηση και καταστροφή. (Mulcahy et al., 2014, Tian et al., 2013)

Τα microRNAs, τα οποία είναι μικρά μη κωδικά μόρια RNA μήκους 17-24 νουκλεοτιδίων,, τα οποία ελέγχουν τη γονιδιακή έκφραση σε μεταμεταγραφικό επίπεδο , μέσω της σύνδεσής τους με την 3' - μη μεταφρασμένη περιοχή (UTR) ή με το ανοιχτό αναγνωστικό πλαίσιο (ORF) του mRNA στόχου. (Bartel et al., 2004). Ο σχηματισμός

και η έκκριση των εξωσωμάτων απαιτεί την παρουσία ATP, ενζύμων, των mRNA και microRNA. Τα εξωσώματα σε ηλεκτρονικό μικροσκοπικό και transmission microscopy, έχουν κυπελλοειδή διαμόρφωση. Αναγνωρίζονται μέσω της παρουσίας πρωτεϊνών κοινών όπως η tetraspanin proteins (CD63, CD9, CD81).(Simons et al ., 2009, Mathivanan et al, 2010). Τα μικροκυστίδια σχηματίζονται μέσω εγκόλπωσης στα ενδοσώματα (ενδοσωμικές μεμβράνες) => MVB(multi vesicles bodies). Τα συγκεκριμένα MVB διαχέονται μέσω της κυτταρικής μεμβράνης και εκχέουν τα ενδοσωληναριακά ενδοσωμικά κυστίδια (Gruenberg et al., 2006).

Τα εξωσώματα εκκρίνονται από διάφορα κύτταρα όπως κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος , κύτταρα του αιμοποιητικού, ενδοθηλιακά, αιμοπετάλια και των λειών μυϊκών ινών. Πιστεύεται ότι μέσω εξωσωμάτων μεταφέρονται λιπίδια , πρωτεΐνες , νουκλεϊκά οξέα. Παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανοσολογική απόκριση, εξέλιξη και αύξηση των όγκων και στις νευροεκφυλιστικές νόσους (άνοιες και prion λοιμώξεις). Τα μικρομόρια τα οποία περιέχονται στα μικροκυστίδια, αναλύονται στο Exo-Carta Database (Simpson et al ., 2012).

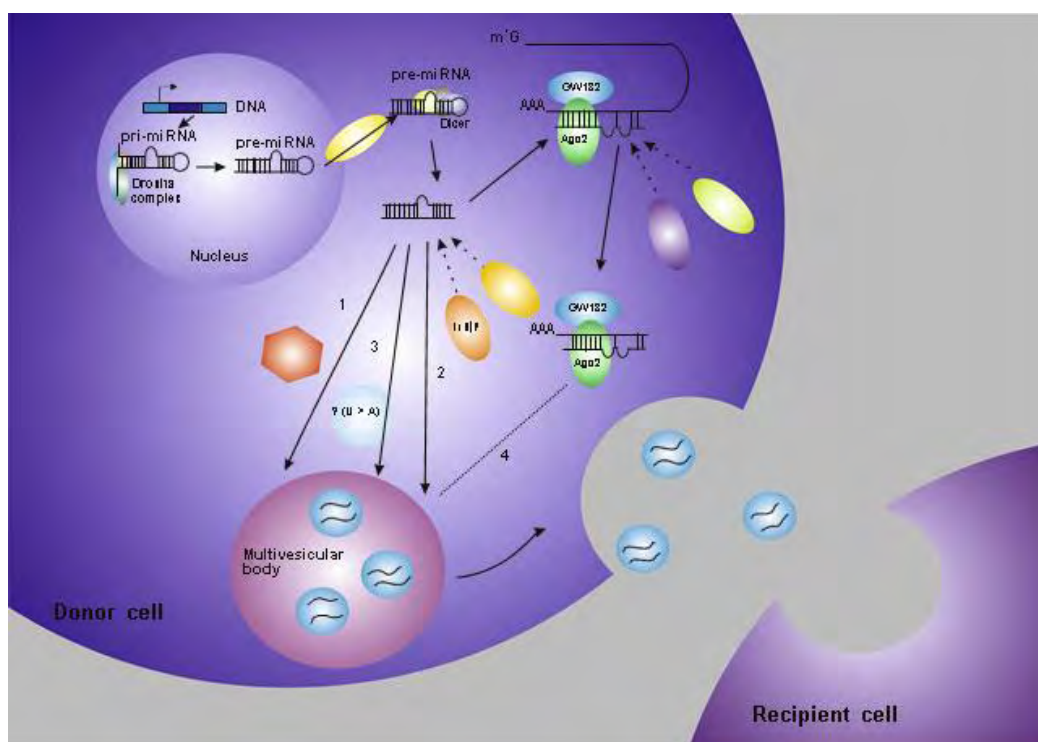
Η δράση των microRNA εντός των εξωσωμάτων εξαρτάται από το ένζυμο σφιγγομυελινάση 2 (nSMase-2)-εξαρτώμενη, η οποία οδηγεί σε αύξηση της έκκρισης των micro-RNAs ή το αντίθετο.(Kosaka et al ., 2013). Επίσης εξαρτάται από την οδό της ριβονουκλεοπρωτεΐνης (ετερογενής πυρηνική hnRNPs), μέλος της οικογένειας (hnRNPA1). Αναγνωρίζει δε, το GGAG μοτίβο της 3' – τμήματος του RNA αλληλουχίας, η οποία παράγει ειδικά RNAs που αποθηκεύονται τελικώς στα εξωσώματα. Επιπλέον από το 3' – τελικό τμήμα της αλληλουχίας του miRNA pathway (κυρίως παρουσιάζονται στα β-λεμφοκύτταρα) και τέλος το micro-RNA επαγόμενο σύμπλεγμα αποσιώπησης miRISC (Villarroya-Beltri et al., 2013).

Τα microRNAs είναι δυνατόν να συσσωρευτούν και να αποθηκευτούν μέσα στα εξωσώματα ή στα μικροκυστίδια, ενώ τα εξωκυτταρικά microRNAs είναι δυνατόν να εμφανιστούν συσσωρευμένα και αποθηκευμένα στις λιποπρωτεΐνες highdensity (highDL). Επίσης μία άλλη ουσία είναι η AGO2 πρωτεΐνη η οποία υπάρχει εξωτερικά των κυστιδίων αυτών. Όλοι αυτοί οι τρόποι αποθήκευσης του microRNA στην ουσία προστατεύουν το microRNA από την αποδόμηση και την καταστροφή αυτού. Τα microRNAs τα οποία συσχετίζονται με τη μεταφορά των μέσων εξωσωμάτων είναι τα

let-7 miRNA, όπως στα κύτταρα του γαστρικού καρκίνου, του καρκίνου του πνεύμονα και του ορθοκυστικού (AZ-P7a, SBC-3, SW480 αντίστοιχα). (Ohshima et al, 2010)

Έχει δειχθεί ότι η έκφραση του μικροσωμικού miRNA τροποποιείται ανάλογα με τις διάφορες παθολογικές καταστάσεις π.χ. τα επίπεδα miRNA ήταν χαμηλότερα σε ασθενείς με γλοιοβλάστωμα (Skog Cell adhesion) (Wurdinger et al., 2008 and Taylor et al., 2008).

Τα microRNAs έχουν συγκεκριμένες λειτουργίες και ρυθμίζουν την έκφραση των γονιδίων-στόχων τους. Για παράδειγμα, το exosomal miR-105 το οποίο εκφράζεται στον καρκίνο του μαστού και στις κυτταρικές σειρές MCF-10A, ελαττώνει την έκφραση του γονιδίου ZO-1. Επιπλέον το exosomal miR-92a, μειώνει την έκφραση της ιντεργκίνης α5 στο ενδοθήλιο των φλεβών HUVEC (human umbilical vein endothelial cells) και επηρεάζει την κυτταρική μετανάστευση και τη δημιουργία του αυλού των αγγείων.(Zhou et al, 2014 , Umezu et al., 2013).



Εικόνα 7. Τα microRNA αντιγράφονται σε primary miRNAs και επεξεργάζονται από το σύμπλεγμα Drosha (Protein Coding Drosha Ribonuclease III: διπλής έλικας RNA ειδική ριβονουκλεάση 3, η οποία συμμετέχει στη σύνθεση των microRNAs και pre-miRNAs). Τα παραπάνω μεταφέρονται στο κυτταρόπλασμα μέσω του συμπλέγματος Dicer για να μετατραπούν στα micro-RNAs. Τα ώριμα micro-RNAs μετατρέπονται σε

εξωσώματα μέσω τεσσάρων οδών. (1) nSMase-dependent pathway (σφυγγομυελινάση-2). (2) miRNA και hnRNPs-dependent pathway μέσω της sumoylation της eIF4E η οποία ενεργοποιεί τη μετάφραση του mRNA. Η παραπάνω οδός αφορά στην οικογένεια των πρωτεϊνών που αναγνωρίζει το GGAG στην 3' περιοχή της microRNA αλληλουχίας, το οποίο οδηγεί στη είσοδο εντός εξωσωμάτων. (3) 3' mRNA αλληλουχία ανεξάρτητη οδός; τα miRNAs τα οποία εισάγονται μέσα στα εξωσώματα έχουν μία σειρά από poly (U) > poly (A) στο 3' άκρο. (4) miRISC-related pathway τα οποία γειτνιάζουν με τα άκρα των εξωσωμάτων τα οποία προέρχονται από τις πολυκυψελίδες-κυστίδια και των συστατικών τους, όπως η AGO2 πρωτεΐνη και το miRNA στοχευμένο mRNA, τα οποία μετατρέπουν το microRNA σε εξωσώματα.

4. Prion στελέχη, φραγμοί μεταξύ των ειδών (species barriers).

Οι διάφορες μορφές ή τα μεμονωμένα μόρια prions ονομάζονται- strains. Τα strains λοιπόν ορίζονται ως υπότυποι ενός λοιμώδους παράγοντα, ικανού να μολύνει και να δημιουργεί ειδική φαινοτυπική εικόνα στα άτομα που μεταδίδεται. Αυτό αφορά τόσο στη σποραδική μορφή της νόσου καθώς και στα πειραματόζωα.

Τα strains μπορούν να χαρακτηριστούν από διάφορες ιδιότητες όπως είναι η περίοδος της επώασης, με βάση τις εστίες στον εγκέφαλο καθώς και η κλινική εμφάνιση των νόσων αλλά και των βιοχημικών μορφών της PrP. Η περίοδος επώασης των prions κυμαίνεται από μήνες έως και χρόνια ακόμη και δεκαετίες. Τα περιστατικά δε είναι συνήθως το πρώτο καιρό ασυμπτωματικά. Η περίοδος της επώασης εξαρτάται από το γενετικό προφίλ και τη γενετική βάση του ατόμου ξενιστή. Στα πειραματόζωα (ποντίκια) έχουν αναγνωριστεί δύο αλληλίες της PrP πρωτεΐνης και του ανάλογου γονιδίου (έχουν χαρακτηριστεί σαν a και b). Κωδικοποιούν την ανάλογη πρωτεΐνη η οποία διαφέρει μεταξύ αυτών σε δύο αμινοξέα στο κωδόνιο 108 (λευκίνη ή φαινυλαλαίνη) καθώς και στο κωδόνιο 189 (θρεονίνη ή βαλίνη (Westaway et al., 1987).

Από άποψη επιστημονικού ενδιαφέροντος φαίνεται ότι τόσο η περίοδος της επώασης όσο και η κλινική εκδήλωση εξαρτώνται από διάφορα γονίδια και πρωτεΐνες όπως το γονίδιο το οποίο χαρακτηρίζεται σαν Sinc (για τη scrapie) καθώς και τα δύο Sinc αλληλίες με s7 και p7 τα οποία έχουν σχέση με το αλληλίο a και β του γονιδίου PrP.

Παθολογοανατομικά, οι ιστικές βλάβες αφορούν στη δημιουργία των κενотоπίων και της εμφάνισης ατροφικών περιοχών στο εγκεφαλικό παρέγχυμα. Αυτή η εμφάνιση των κενотоπίων αφορά τόσο στη φαιά όσο και στη λευκή ουσία του εγκεφαλικού παρεγχύματος (Fraser et al, 1993, Dickinson et al., 1968).

Άλλα TSE (transmissible spongiform encephalopathies) strains μπορούν να παράξουν αμυλοειδικές πλάκες ενώ άλλα καθόλου. Αυτό εξαρτάται από τις διαφορετικές ικανότητες της αντιγραφής του PrP^{Sc} αλλά και της συσσώρευσης μεταξύ των TSE strains. Στους ανθρώπους βρέθηκαν 7 διαφορετικά strains στη σποραδική μορφή της νόσου CJD. Όταν ο πολυμορφισμός είναι στο κωδόνιο 129 έχουμε ειδικές ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις. (Parchi et al., 1999)

Στο ανθρώπινο PrP υπάρχει πολυμορφισμός στη θέση 129 όπου η βαλίνη και η μεθειονίνη συμμετέχουν στη σύνθεση των prions strains και την εκδήλωση της νόσου.

Ο φραγμός μεταξύ των ειδών (Species barrier)

Υπάρχουν δύο λόγοι για την εμφάνιση αυτού του φαινομένου, της μετάδοσης των prion πρωτεϊνών μεταξύ των διαφόρων ειδών. Αυτό είναι η διαφορά μεταξύ της ανάπτυξης και της επέκτασης της φυσιολογικής κυτταρικής πρωτεΐνης PrP^C, (με βάση το ένα είδος το οποίο ακολουθείται από μία δευτερογενή βλάβη) και της μετατροπής στη παθολογική πλέον PrP^{Sc} πρωτεΐνη. Στην αρχική μορφή το PrP^{Sc} μπορεί όταν είναι σε μικρή ποσότητα να διαφύγει της εναπόθεσης στον ιστό μέχρι δημιουργίας ικανής συγκέντρωσης που δρα πλέον καταστροφικά.

Στη παρούσα φάση δεν είναι πλήρως ικανοποιητική η απάντηση για το φραγμό μεταξύ των ειδών. Ο επόμενος στόχος είναι να δημιουργηθούν πειράματα με διαγονιδιακά ποντίκια και μάλιστα γενετικά τροποποιημένα ώστε να παράξουν την παθολογική πρωτεΐνη.

Το άλλο εναλλακτικό σχέδιο είναι πλέον σε *in vitro* πειράματα να μπορεί να μεταφερθεί η ανθρώπινη PrP^C πρωτεΐνη στα πειραματόζωα. (Raymond et al, 1997).

Τα prion strains αλληλοεπιδρούν στην μετατροπή της PrP σε PrP^S μέσω της αλλαγής της τεταρτοταγής δομής της PrP^{Sc}. Επιπλέον χρησιμοποιώντας τη πρωτεΐνη X, δηλαδή έναν συμπαράγοντα ο οποίος εμπλέκεται στην μετατροπή της PrP^C στο PrP^{Sc} την παθολογική μορφή.

Η πρωτεΐνη X είναι ικανή κατά κάποιο τρόπο να λύσει το πάζλ μεταξύ της μεταφοράς της ανθρώπινης μορφής των prions σε διάφορα διαγονιδιακά ποντίκια (Telling et al, 1994-1995).

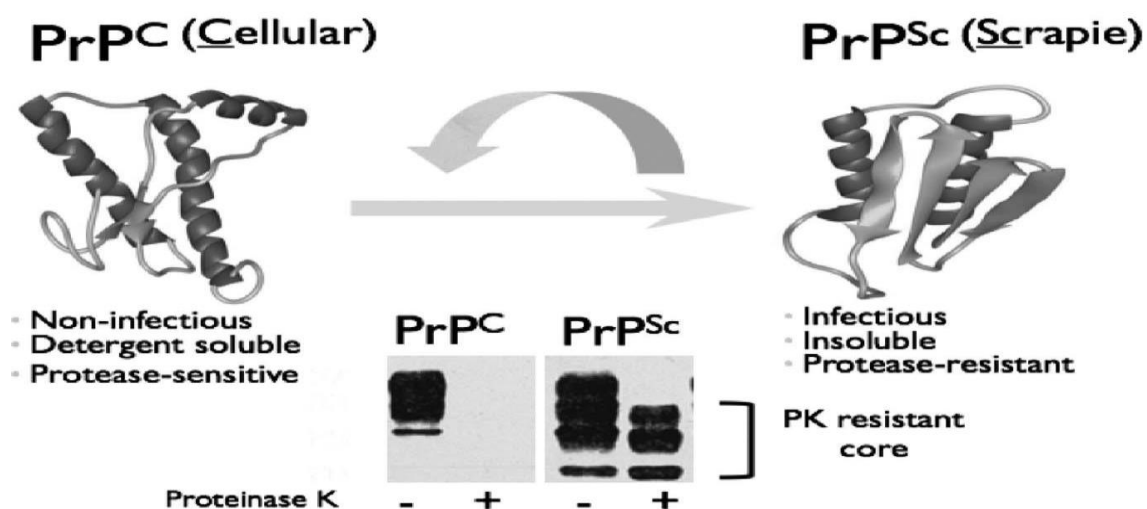
Πειραματικά φαίνεται ότι τα ποντίκια τα οποία εκφράζουν τόσο την PrP των ποντικών όσο και την ανθρώπινη PrP, είναι ανθεκτικά στα ανθρώπινα prions. Γενικά υπερέχει ότι τελικά η PrP^C πρωτεΐνη των ποντικών μάλλον παρεμποδίζει την μεταφορά και την μετάδοση των ανθρώπινων prion πρωτεϊνών. Επίσης τα ποντίκια τα οποία εκφράζουν τόσο την PrP των ποντικών όσο και του χμαιρικού γονιδίου είναι πιο ευαίσθητα στα ανθρώπινα prions (Telling et al, 1994). Τελικά η PrP^C των ποντικών έχει την ελάχιστη δράση στην μετατροπή ή στη δημιουργία της χμαιρικής MHu2M prion πρωτεΐνης Sc.

4.1 Μετάδοση των prion πρωτεϊνών

Για πρώτη φορά περιεγράφηκε το 1937 όταν κατά τυχαίο τρόπο παρατηρήθηκε ότι σε έναν πληθυσμό αμνοεριφίων στην Σκωτία μετά από τον εμβολισμό ενός κοινού ιού (από εκχύλισμα εγκεφαλικού ιστού σε ζώα με scrapie), φάνηκε ότι τα ζώα εμφάνισαν τη CJD. Ο ιστός αυτός προερχόταν από ζώα τα οποία έπασχαν από τη νόσο του scrapie.

Η scrapie νόσος μεταδιδόταν πειραματικά από ζώο σε ζώο και μάλιστα από αμνοερίφιο σε αμνοερίφιο, ενώ αργότερα και σε ποντικούς (Cullie et al, 1939, Chandler et al, 1961)

Normal and Pathogenic Prion Protein



Εικόνα 8. Μετατροπή της prion πρωτεΐνης C σε prion Sc η οποία μετατρέπεται σε λοιμώδης αδιάλυτη, ανθεκτική στη πρωτεάση μορφή. Η πρωτεϊνάση K με τη συμμετοχή του ασβεστίου συμβάλλει στην πέψη των πρωτεϊνών.

Στους ανθρώπους ο λοιμώδης παράγοντας της νόσου άρχισε να περιγράφεται στον γηγενή πληθυσμό, ο οποίος έπασχε από τη νόσο Kuru και στα τροπικά νησιά όπως είναι η νήσος Βόρνεο και Γουινέα όπου πρακτικά γινόταν κανιβαλλιστικές τελετές. Οι παρατηρήσεις αυτές έγιναν στη Νέα Γουινέα το 1966, έτσι λοιπόν έγινε υπόθεση της μεταδοτικής φύσης της νόσου αυτής. Αργότερα έγινε σε εργαστήρια και πειραματική πλέον μετάδοση στα διάφορα ζώα. Εκτενής περιγραφή της νόσου έγινε από τον Creutzfeldt-Jakob. Ταυτόχρονα παρατηρήθηκε οικογενής μορφή της νόσου που πήρε το όνομα του Gerstmann Straussler Scheinker syndrome με ισχυρό κληρονομικό υπόβαθρο (Gajdusek et al, 1966 ,Masters et al, 1981).

Αρχικά η υπόθεση ήταν, ότι επρόκειτο για έναν βραδέως δρώντα ιό (slow virus) λόγω της ασυνήθιστης μεγάλης περιόδου επώασης, μεταξύ της έκθεσης των ατόμων και της εμφάνισης των κλινικών συμπτωμάτων (Cho, 1976). Εκτενείς μελέτες αργότερα κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι ο παράγοντας αυτός είναι διαφορετικής φύσης. Οι επιστήμονες περιέγραψαν ότι το ελάχιστο μοριακό βάρος των παραγόντων για να χαρακτηριστεί λοιμώδης ήταν μικρό (περίπου $2 \cdot 10^5$) και έτσι παρέμεινε η υπόθεση ότι είναι ιός ή πιο μικροσκοπικός παράγοντας ο οποίος έχει λοιμώδεις ικανότητες. Την ίδια χρονική περίοδο φάνηκε ότι ο παράγοντας αυτός ήταν ανθεκτικός σε διάφορες μεθόδους κάθαρσης ή θεραπείες οι οποίες καταστρέφουν τα νουκλειικά οξέα όπως π.χ. η υπεριώδης ακτινοβολία (UV), η ιονίζουσα ακτινοβολία. Το 1980 πλέον εισήχθη ο όρος prion το οποίο είναι ένας καινοτόμος όρος που περιγράφει τη λοιμογόνο ικανότητα μίας πρωτεΐνης η οποία μεταδίδει νοσήματα είτε από άτομο σε άτομο του ίδιου είδους ή σε διαφορετικά είδη (Gabizon et al, 1988).

Η παθολογική αυτή πρωτεΐνη είναι ανθεκτική στη δράση των πρωτεασών, ενώ από την άλλη πλευρά η λοιμογόνος δράση μπορεί να καταστρέφεται ή να μειώνεται μέσω διαφόρων άλλων παραγόντων που μετατρέπουν ή καταστρέφουν την πρωτεϊνική δομή όπως π.χ. anti-prp αντισώματα. (Gabizon et al, 1988)

Με την πάροδο των ετών και μέσω της μεγάλης ανάπτυξης της γενετικής και της βιολογίας έγινε η προσπάθεια της ερμηνείας της λοιμογόνου φύσης της πρωτεΐνης μέσω κληρονομικότητας και γονιδίων οπότε περιεγράφηκε πλέον η πρωτεΐνη prion (PrP) αλλά και τα γονίδια τα οποία κωδικοποιούν τη πρωτεΐνη. Η prion πρωτεΐνη βρίσκεται σε φυσιολογικούς ιστούς. Το PrP mRNA όπως φαίνεται υπάρχει σε εγκεφαλικό ιστό μη προσβεβλημένων ατόμων. Εκφράζεται σε πληθυσμό πολλών

κυττάρων. Η prion πρωτεΐνη PrP υπάρχει σε δύο εναλλακτικές μορφές: της φυσιολογικής κυτταρική πρωτεΐνης (χαρακτηριζόμενη σαν PrP^C) και της παθολογικής ισομορφής (χαρακτηριζόμενη σαν PrP^{Sc}). Μεταξύ των δύο αυτών ισομορφών (Stahl et al, 1993) υπάρχει αλλαγή της α-έλικας της φυσιολογικής πρωτεΐνης σε μία μορφή η οποία περιέχει αθροίσεις από β-Sheet (β ελάσματα) στον εγκεφαλικό ιστό. (Pan et al, 1993)

Σε πειραματικό επίπεδο έχει περιγραφεί ότι υπάρχει ανθεκτικότητα στη μετάδοση της νόσου, από το πρόβατο στο ποντίκι δεδομένου ότι χρήζει ειδικής έκφρασης ειδικών γονιδίων.

Επιπλέον ενδιαφέρον εύρημα είναι η προσβολή και η λοίμωξη κυττάρων του νευροβλαστώματος. Εμφανίζουν χρόνια φλεγμονώδη στοιχεία όταν αυτά μολύνονται ή προσβάλλονται από ομογενοποιημένο ιστό που περιέχει την PrP^{Sc} (Race et al, 1987, Rubenstein et al, 1984).

Σημαντική είναι η εργασία και η παρατήρηση του Caughey και των συνεργατών του (Kocisko et al, 1994) όπου χρησιμοποιώντας μία αμιγή μορφή του PrP^{Sc} με ανάμεικτα στοιχεία με την PrP^{res} (prion πρωτεΐνη πλούσια σε β-ελάσματα ανθεκτική στη πρωτεάση: protease resistant, σε πειραματικό επίπεδο φαίνεται να μην είναι μολυσματική) είναι δυνατόν να ευνοείται η αντιγραφή της παθολογικής πρωτεΐνης και έτσι λοιπόν να αυξάνεται η εναπόθεση των παθολογικών μορφών στον εγκεφαλικό ιστό.

Η PrP^{res} είναι ικανή να μετατρέπει τη φυσιολογική πρωτεΐνη PrP σε περισσότερη PrP^{res} με αποτέλεσμα η παθολογική αυτή συσσώρευση στον εγκεφαλικό ιστό να δρα πλέον τοξικά. Σε *in vitro* καλλιέργειες η μετατροπή μεγάλης ποσότητας PrP^C σε PrP^{Sc} βασίζεται σε σύστημα το οποίο ονομάζεται PMCA (protein misfolding cyclic amplification). Με βάση την prion υπόθεση, ο αναδιπλασιασμός της prion πρωτεΐνης είναι ένα κυκλικό φαινόμενο το οποίο παράγει συνεχώς καινούρια μόρια PrP^{res} τα οποία συντελούν στην εναπόθεση της μη καλής αναδιπλούμενης πρωτεΐνης (misfolded protein) (Saborio et al, 2001).

Εάν στα *in vitro* πειράματα για την ανάπτυξη και την καλλιέργεια των prion πρωτεϊνών ο λοιμογόνος παράγοντας είναι η παθολογική PrP^{Sc} πρωτεΐνη, θεωρείται ότι η αντιγραφή προάγεται από την αλληλεπίδραση της PrP^{Sc} με τον παράγοντα PrP^C. (Prusiner, 1998)

Ο Prusiner και οι συνεργάτες του σε βιβλιογραφικές αναφορές του Legname et al, 2004 περιέγραψαν ότι η ανασυνδυασμένη μορφή της PrP σε πειράματα σε ποντίκια (στα τμήματα 89 έως και 230) δημιουργεί τη μορφή ιών αμυλοειδούς, τα οποία είναι το κύριο αίτιο της μεταδοτικής σπογγώδους εγκεφαλοπάθειας με την δομή της PrP^{res} πρωτεΐνης. Μετά την εξωγενή χορήγηση μέσω ένεσης της παθολογικής πρωτεΐνης, ο χρόνος επώασης είναι αρκετά έτη μέχρι και την εμφάνιση της νόσου.

Έτσι η ενίσχυση μέσω του μηχανισμού PMCA αυξάνει 300 φορές την ιδιότητα της πρωτεΐνης PrP^{res} μετά από έναν κύκλο 100 επαναλήψεων των 100 PMCA αυξάνοντας την μολυσματικότητα (Bieschke et al., 2004).

4.2 Μετάδοση των prions μέσω του εντερικού επιθηλίου.

Οι περιοχές του γαστρεντερικού συστήματος οι οποίες εμπλέκονται είναι ο ειλεός. Η μετάδοση γίνεται μέσω κατανάλωσης μολυσματικών προϊόντων (Wells et al., 1994) καθώς οι Peyer's πλάκες συμμετέχουν στην αντιγονοπαρουσίαση.

Από ότι φαίνεται υπάρχουν αποδείξεις ότι οι πλάκες του Peyer είναι η είσοδος των prion πρωτεϊνών που καταναλώνονται ως επί τον πλείστον δια του στόματος. Έτσι λοιπόν ενοχοποιείται η κατανάλωση ή μετάδοση των prion πρωτεϊνών από τη στοματική κοιλότητα μέσω της κυκλοφορίας αφού περάσουν πρώτα το εντερικό επιθήλιο και μετά στο εγκεφαλικό παρέγχυμα. (Press et al, 2004)

Σε *in vitro* μελέτες έχει φανεί ότι χρησιμοποιώντας κυτταρικά μοντέλα ιδιαίτερα της γαστρεντερικής οδού, οι μεμβράνες των επιθηλιακών κυττάρων (M cells) συμμετέχουν στην επέκταση και τη μετάδοση των prion πρωτεϊνών μεταξύ των διακυτταρικών επαφών. (Heppner et al, 2001)

Το εντερικό επιθήλιο είναι εκείνο το οποίο ενοχοποιείται για την παθολογία λόγω της μεγάλης διαπερατότητας σε διάφορα εντερικά παθογόνα μικρόβια.

Οι κυτταρικοί τύποι που εμπλέκονται είναι τα Caco-2 κύτταρα, τα β-λεμφοκύτταρα και τα M-κύτταρα τα οποία φαίνονται να μεταφέρουν τον λοιμογόνο αυτό παράγοντα μεταξύ των διαφόρων τμημάτων των κυττάρων (Heppner et al., 2001).

Βέβαια φαίνεται ότι είναι πολύ πιο δύσκολα να μεταφέρονται τα prion στις Caco-2 καλλιέργειες χωρίς τα M-κύτταρα. Είναι σημαντική δηλαδή η συμμετοχή των M-κυττάρων (Aguzzi et al, 2003). Υπάρχει γρήγορη διακυτταρική μεταφορά μέσω των

ενδοεπιθηλιακών αυτών δομών καθώς επίσης εμπλέκονται και τα μακροφάγα, τα δενδριτικά κύτταρα καθώς και τα λεμφοκύτταρα. Τα διάφορα λεμφικά όργανα, δηλαδή τα όργανα τα οποία συμμετέχουν στο λεμφικό σύστημα είναι εδώ και καιρό γνωστό ότι εμπλέκονται στην μετάδοση των prion πρωτεϊνών και φυσικά στην εκδήλωση της νόσου (Aguzzi et al, 2003).

Τα όργανα τα οποία ενοχοποιούνται είναι ο σπλήνας καθώς και οι λεμφαδένες στους οποίους βρέθηκε ότι υπάρχει μεγάλη συμμετοχή στην μετατροπή των φυσιολογικών PrP πρωτεϊνών στην παθολογική PrP^{Sc} πρωτεΐνη και μάλιστα συμμετέχουν στην αντιγραφή πλέον της παθολογικής PrP^{Sc} η οποία εναποτίθεται από εκεί και πέρα στους διάφορους ιστούς. Φαίνεται ότι δεν εναποτίθεται μόνο στο εγκεφαλικό παρέγχυμα αλλά και περιφερικά δηλαδή σε όργανα όπως είναι π.χ. οι αμυγδαλές (tonsils) αλλά και σε άλλα όργανα.

Ένα δεύτερο όργανο εντός του γαστρεντερικού συστήματος στο οποίο μπορεί να εναποτεθεί και ενοχοποιείται για τη μετάδοση της νόσου είναι η σκωληκοειδής απόφυση (appendix) προσβεβλημένων ατόμων από διάφορες μορφές της νόσου CJD.

(Wadsworth et al., 2001).

Σημαντική είναι η συμμετοχή του λεμφικού συστήματος και της ανοσιακής απόκρισης του οργανισμού στη μετατροπή της ώριμης prion πρωτεΐνης σε παθολογική. Χαρακτηριστικά υπάρχει ευαισθησία σε συγκεκριμένα άτομα και ειδικό ανοσολογικό προφίλ δεδομένου ότι η χορήγηση των κορτικοστεροειδών ελαττώνει την ευαισθησία και την ευαλωτότητα των ατόμων στην εμφάνιση της νόσου scrapie (Outram et al., 1974). Η σπληνεκτομή καθυστερεί την εμφάνιση της νόσου όπως φάνηκε σε πειράματα με ποντικούς.

Επίσης υπάρχουν εργασίες κατά τις οποίες πειραματόζωα τα οποία είναι ανοσοκατεσταλμένα ή με βαριές ανοσοανεπάρκειες (severe immunodeficiencies) έχουν δείξει ότι τα άτομα είναι ανθεκτικά στην εμφάνιση της scrapie νόσου ακόμα και μετά από ενδοπεριτοναϊκή, υποδόρια ένεση ή ενοφθαλμισμό της νόσου. (Klein et al, 1997, Kimberlin Walker et al, 1979)

Μεγάλη σημασία έχει η ανοσοαντίδραση των κυττάρων του εγκεφαλικού παρεγχύματος όπως είναι π.χ. των δενδριτικών κυττάρων (follicular dendritic cells-

FDC). Τα κύτταρα αυτά συμμετέχουν στην αντιγραφή των prion πρωτεϊνών και από εκεί στην επέκτασή τους εντός του νευρικού συστήματος (Carnaud et al, 2002).

Ανοσοκατεσταλμένα ποντίκια όπως εκείνα με καταστολή της δραστηριότητας των β κυττάρων τελικά, δεν εμφανίζουν την νόσο, όπως επίσης δεν εμφανίζουν και την ανάλογη νευρολογική εικόνα. Η ανοσοανεπάρκεια των T-κυττάρων (T-cell deficiency) φαίνεται τελικά ότι δεν επηρεάζει την prion λοίμωξη και την prion. Το λεμφικό σύστημα είναι ένα σημαντικό σύστημα για την μεταφορά και την μετάδοση της νόσου (trafficking prions). Τα δενδριτικά κύτταρα του εγκεφάλου είναι καλός υποψήφιος για την αντιγραφή των prion πρωτεϊνών. Είναι όμως προϋπόθεση η μεγάλη συγκέντρωσή τους στην εναπόθεσή τους στους ιστούς.

Εργαστηριακά φαίνεται ότι η γονιδιακή απαλοιφή σε ποντίκια έδειξε τη συμμετοχή ειδικού σηματοδοτικού μονοπατιού και τη συμμετοχή του tumor necrosis factor (TNF) καθώς και των λεμφοτοξινών (lymphotoxins) που χρειάζονται για την ανάπτυξη των δενδριτικών αυτών κυττάρων. Μελέτες έχουν δείξει ότι η μη ωρίμανση των δενδριτικών αυτών κυττάρων (μέσω χρησιμοποίησης λεμφοτοξίνης) τελικώς καθυστερεί και καταστέλλει την εμφάνιση της νόσου μετά από ενδοπεριτονιακό ενοφθαλμισμό των παθολογικών prion πρωτεϊνών. (Montrasio et al, 2000)

4.3 Από τα λεμφικά όργανα στον εγκέφαλο

Όπως προαναφέρθηκε το λεμφικό σύστημα συμμετέχει στην μετάδοση της νόσου όμως ασαφής παραμένει ο μηχανισμός. Η υπόθεση είναι ότι τα prions εγκαταλείπουν τελικά τα λεμφικά όργανα και προσεγγίζουν το νευρικό σύστημα μέσω των διαφόρων νευρικών ιών ή ακόμη και μέσω του αγγειακού δικτύου. Εκτός από τον εγκέφαλο φαίνεται ότι μετά την κατάποση και μετά την επέκταση των prion πρωτεϊνών, οι prion πρωτεΐνες βρίσκονται στο πνευμονικό παρέγχυμα. Τα αγγεία είναι εκείνα τα οποία μεταδίδουν τον λοιμογόνο αυτό παράγοντα ή ακόμα και αυτά είναι προσβεβλημένα πολύ πιο πριν από την εμφάνιση των κλινικών συμπτωμάτων (Brown et al., 2001).

Σημαντική είναι και η συμμετοχή του αυτόνομου νευρικού συστήματος όσον αφορά στην μετάδοση της νόσου. Φαίνεται ότι η εννεύρωση των λεμφικών οργάνων γίνεται μέσω της συμπαθητικής οδού. Συνεπώς όταν γίνεται μια εκτομή της συμπαθητικής οδού (sympathectomy) υπάρχει μία σαφής καθυστέρηση της εμφάνισης της νόσου. (Glatzel et al, 2001)

Τελικά η εξάπλωση της παθολογικής πρωτεΐνης είναι μέσω επαφής ενός κυττάρου με το γειτονικό του, δηλαδή μέσω της επαφής των μεμβρανών τους, ειδικά με τη μεταφορά της PrP^C η οποία συνδέεται με το τέρμα της αλληλουχίας της παθολογικής PrP^{Sc} πρωτεΐνης.

5. Κυτταρική βιολογία, γενετική και λειτουργικότητα της φυσιολογικής πρωτεΐνης prion.

Η βιοσύνθεση της PrP^C πρωτεΐνης είναι ίδια με την σύνθεση των άλλων μεμβρανικών πρωτεϊνών, γίνεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο (ER) και στο σύστημα Golgi (Golgi apparatus (Harris, 2003)). Όπως έχει αναφερθεί ήδη οι πιο πολλές από τις ώριμες μορφές της PrP^C πρωτεΐνης έχουν στην μεμβράνη τους δομές όπως είναι τα lipid rafts τα οποία μεταφράζονται σε "σχεδίες" που περιέχουν λιπίδια, είναι δε, πλούσιες δομές σε σφιγγολιπίδια και χοληστερόλη (Taraboulos et al, 1992). Οι λιπιδικές σχεδίες (lipid rafts) αποτελούν σημαντικές δομές της κυτταρικής μεμβράνης, ανθεκτικές στην αποδόμηση. Περιέχουν σημαντικούς κυτταρικούς υποδοχείς όπως είναι η τυροσινική κινάση και η γλυκοσύλ φωσφατιδύλ ινοσιτόλη.

Όσον αφορά στην φαρμακοκινητική της πρωτεΐνης αυτής, η πρωτεΐνη prion, στον βιολογικό της κύκλο έχει χρόνο γύρω στα 60 λεπτά από τον ενοφθαλμισμό, από τον έναν κύκλο στον άλλο. Κατά τη μετατροπή αυτής 1 με 5% των μορίων αυτών, είναι δυνατόν να καταστρέφεται μέσω διαφόρων πρωτεολυτικών μηχανισμών.

Η prion πρωτεΐνη δρα επιπλέον σαν πρωτεΐνη οξέως φάσεως [stress-inducible πρωτεΐνη1 (STI1)]. Χρησιμοποιώντας εκχυλίσματα από τον αμφιβληστροειδή χιτώνα φαίνεται ότι η αλληλεπίδραση μεταξύ της PrP^C και της STI1 προστατεύει τα νευρικά κύτταρα από την εξαρτώμενη από ανισομυκίνη (anisomycin)-κυτταρική απόπτωση. (Zanata et al, 2002)

Η αλληλεπίδραση μεταξύ της PrP^C πρωτεΐνης με τα πεπτίδια προάγουν την ενεργοποίηση της κυκλικής αδενοσίνης και της μονοφωσφορικής κυκλικής αδενοσίνης (cAMP) εξαρτώμενης πρωτεϊνικής κινάσης A (PKA). Επιπλέον συμμετέχουν στα ERK (εξοκυττάρια σηματοδοτικά μονοπάτια της ρυθμιστικής κινάσης) και στις βιοχημικές οδούς ρυθμίζοντας την ισορροπία των προαποπτωτικών και

αντιαποπτωτικών μηχανισμών (μηχανισμός κυτταρικού θανάτου). (Chiarini et al, 2002)

5.1 Ο ρόλος της prion πρωτεΐνης C στον μεταβολισμό του χαλκού.

Σημαντική είναι η λειτουργία της prion πρωτεΐνης τόσο στη δέσμευση όσο και στο μεταβολισμό του χαλκού (Brown 2001). Η συσχέτιση μεταξύ της διαταραχής του μεταβολισμού του χαλκού και της σπογγώδους εγκεφαλοπάθειας έχει αναφερθεί σε διάφορες εργασίες οι οποίες δείχνουν ότι η χρήση χηλικού παράγοντα χαλκού όπως είναι η κουπριζόνη δρα προστατευτικά (Pattison and Jebbett, 1973)

Σε εγκεφάλους με προσβολή από scrapie λοίμωξη σε ποντίκια, φαίνεται ότι με την έναρξη της εμφάνισης των κλινικών συμπτωμάτων υπάρχει αλλαγή του επιπέδου του χαλκού στους ιστούς. Η αλληλεπίδραση μεταξύ της PrP^C πρωτεΐνης και της PrP^{Sc} ή της PrP 106-126 πεπτιδικής αλληλουχίας, αναστέλλει τη δράση της δισμουτάσης του υπεροξειδίου (superoxide dismutase) δρώντας καταστροφικά (Brown., 2001).

Η ενδοκύττωση και η δέσμευση του χαλκού αυξάνει την ικανότητα της PrP^C να συνδέεται με διάφορους ενδοκυτταρικούς υποδοχείς με αποτέλεσμα να συμμετέχει σε ένα μηχανισμό ανακύκλωσης και σύνδεσης των ιόντων του χαλκού μέσα τον εξωκυτταρικό χώρο. Τελικά η σύνδεση με τον χαλκό δημιουργεί αλλαγές τόσο στην δευτεροταγή όσο και στη τεταρτοταγή δομή της prion πρωτεΐνης, με αποτέλεσμα έτσι να δημιουργείται μία μορφή ανθεκτική στη δράση της πρωτεάσης (Qin et al., 2000).

Η σύνδεση του χαλκού αυξάνει την σταθερότητα των β-ελασμάτων καθώς θερμοδυναμικά συντελεί στη μετατροπή της α-helical μορφής σε β-ελάσματα.

5.2 PrP Knockout animals and doppel

Στις μελέτες τα δύο πρώτα null mice (πειραματόζωα) χαρακτηρίζοντας τα ως PRNP^{0/0} Zurich I και PRNP^{-/-} Edinburgh ήταν τα πειραματόζωα τα οποία δεν παρουσίαζαν νευρολογικά ελλείματα.(Bueler et al, 1992, Manson et al, 1994). Πειραματικά φάνηκε ότι τα πειραματόζωα παρουσίασαν προβλήματα όπως διαταραχές του κερκάρδιου ρυθμού και διαταραχές του ύπνου. Αντιθέτως, 3 knockout ποντίκια τα οποία χαρακτηρίζονται σαν PRNP^{-/-} Nagasaki, Rmc0, PRNP^{0/0} Zurich II, εμφάνισαν μακροσκοπικά και μικροσκοπικά εκφύλιση των κυττάρων της παρεγκεφαλίδας (των Purkinje κυττάρων). Αποτέλεσμα η απομυελίνωση των περιφερικών νεύρων με εικόνα αταξίας (Moore et al., 1999).

Μετά από αναλύσεις και σε εργασίες του Westaway και των συνεργατών του βρέθηκε γονίδιο που κωδικοποιούσε την παθολογική πρωτεΐνη(179-residue protein) η οποία ονομαζόταν doppel (Dpl) (Moore et al, 1999).

Η Dpl έχει συγκεκριμένες δομικές ομοιότητες με το C τελικό άκρο της PrP^C πρωτεΐνης. Στα PrP^C-null πειραματόζωα τα οποία εμφάνιζαν αταξία στην κλινική τους εικόνα φάνηκε ότι: διάφορες περιοχές της Prnd πρωτεΐνης βρισκόταν κάτω από τον έλεγχο της PrP πρωτεΐνης, δημιουργώντας αυξημένα επίπεδα της Dpl. Η εμφάνιση της αταξίας μετά από την καταστροφή των κυττάρων Purkinje της παρεγκεφαλίδας είχε σχέση με τα αυξημένα επίπεδα της Dpl στο κεντρικό νευρικό σύστημα (Behrens and Aguzzi, 2002).

Σε εργασίες με διάφορα διαγονιδιακά ποντίκια αρχικά για την μελέτη και την έρευνα φάνηκε ότι η PrP^{Sc} πρωτεΐνη μπορεί να ανταγωνιστεί την Dpl πρωτεΐνη και τη δραστηριότητα της ακόμα και με την απουσία της PrP^C πρωτεΐνης. Από την άλλη πλευρά η απουσία της PrP^C είναι απαραίτητη έτσι ώστε η Dpl να προάγει τον κυτταρικό θάνατο. (Behrens and Aguzzi , 2002).

Η PrP^C έχει μεγαλύτερη ικανότητα να δρα ως αγωνιστής, ενώ η Dpl συμπεριφέρεται σαν ανταγωνιστής λόγω της ικανότητάς της για σύνδεση με τα μόρια.

Μόνο με την απουσία της PrP^C η Dpl είναι ικανή να συνδέεται με τμήματα τα οποία προάγουν την νευροτοξικότητα μέσω ενεργοποίησης της κυτταρικής βλάβης. Μία δεύτερη πιθανότητα είναι ότι η PrP^C φυσιολογικά έχει έναν νευροπροστατευτικό μηχανισμό ή δράση, ενώ η Dpl εκφραζόμενη δημιουργεί στον εγκέφαλο μία προαποπτωτική διεργασία.

Τρίτο μοντέλο υποθέτει ότι η έκφραση της Dpl στον εγκέφαλο συντελεί στην αμυλοειδογένεση μέσω σχηματισμού των ολιγομερών του αβ αμυλοειδούς. Θα πρέπει βέβαια να τονιστεί και το τελικό αποτελέσματα του κυτταρικού θανάτου μέσω των διεργασιών και των βιοχημικών οδών του οξειδωτικού στρες. Σε knockout ποντίκια φαίνεται ότι το οξειδωτικό στρες δημιουργεί διάφορες βιοχημικές αλλαγές όπως παραδείγματος χάρι την αύξηση των επιπέδων του πυρηνικού παράγοντα NF-kB και Mn της δισμουτάσης, η οποία ελαττώνει τα επίπεδα του p53. Συμμετέχει επίσης, στην διαταραχή των επιπέδων της μελατονίνης ενώ αυξάνεται η έκφραση των γονιδίων Bax και Bcl-2 και phospho-ERKs, τα οποία έχουν σχέση και αυτά με την απόπτωση. (Brown et al, 2002).

Τελικά το σενάριο το οποίο επικρατεί είναι ότι στη σπογγώδη εγκεφαλοπάθεια διαταράσσεται η ισορροπία μεταξύ της τοξικής δράσης της PrP^{Sc}, η οποία δημιουργεί την καταστολή των νευροτροφικών παραγόντων αλλά και της σύνθεσης των νευροτροφικών παραγόντων της PrP^C.

6 Νευροεκφύλιση στα prion νοσήματα.

6.1 Χαρακτηριστικά της εκφύλισης του εγκεφαλικού παρεγχύματος.

Τα τυπικά νευροπαθολογικά ευρήματα στην σπογγώδη εγκεφαλοπάθεια είναι η εμφάνιση των κενотоπίων τόσο στη λευκή όσο και στη φαιά ουσία με χαρακτηριστική απώλεια των νευρώνων, άτυπες φλεγμονώδεις αλλοιώσεις των προσβεβλημένων περιοχών, δυσλειτουργία των συνάψεων και τελικά άλλοτε άλλου βαθμού ατροφία του εγκεφαλικού παρεγχύματος. (MacDonald et al, 1996, Wells, 1993).

Οι αλλοιώσεις είναι εστιακές αθροίσεις μικρών στρογγυλών κενотоπίων με εικόνα σπογγώδους μορφής. Φλεγμονώδεις αλλοιώσεις με τη μορφή της κλασικής φλεγμονής είναι πάρα πολύ σπάνιες στη νόσο του CJD. Συνήθως εμφανίζεται αυξημένη δραστηριότητα των αστροκυττάρων και της εναπόθεση της μικρογλοίας με αποτέλεσμα να έχουμε τη δημιουργία ινιδίων και ινδιακών πλακών χωρίς όμως να εμφανίζεται λεμφοκυτταρική διήθηση. (Betmouni et al., 1996).

Η δυσλειτουργία των συνάψεων η οποία τελικά συσχετίζεται με τη μη φυσιολογική εναπόθεση της πρωτεΐνης PrP έχει σαν αποτέλεσμα τον κυτταρικό θάνατο. Η φυσιολογική κυτταρική πρωτεΐνη (PrP^C) φαίνεται ότι αλληλεπιδρά με προσυναπτικές πρωτεΐνες όπως είναι η συναπτοφυσίνη. Η παθολογική PrP^{Sc} πρωτεΐνη αθροίζεται στα λεγόμενα lipid rafts δηλαδή στις σχεδίες των λιπιδίων, ενώ έρχεται σε επαφή με την καβεολίνη και με τις άλλες συναπτοφυσίνες που είναι μέρος των μεμβρανών των κυττάρων. (Russelakis-Carneiro et al., 2004).

Στη μαζική απόπτωση των κυττάρων της παρεγκεφαλίδας και ειδικά των κοκκιωδών κυττάρων αυτής περιλαμβάνεται τμήμα του DNA, ενδοπυρηνικά καθώς και ενεργοποίηση του μηχανισμού ή των βιολογικών μονοπατιών της κασπάσης 3 Chiesa et al., 2000).

Παρόμοια στα διαγονιδιακά ποντίκια υπάρχει μία υπερέκφραση της μεταλλαγμένης PrP πρωτεΐνης και έτσι έχουμε τα αποτελέσματα αυτά μακροσκοπικά και κλινικά πλέον (Westaway et al., 1994) .

Τελικά φαίνεται ότι η τοξική δράση της εναπόθεσης σε μεγάλη ποσότητα της παθολογικής πρωτεΐνης PrP^{Sc} αφορά σε εγκεφαλικό ιστό(νευρώνες, νευρογλοία και κυτταροσκελετό).

Ο Solforosi και οι συνεργάτες του έχουν δείξει ότι για να δράσει η PrP^C χρειάζεται μία διασταυρούμενη αντίδραση μεταξύ της PrP^C και ενός μονοκλωνικού αντισώματος (Solforosi et al., 2004). Τα ολιγομερή της παθολογικής PrP^{Sc} μπορεί να είναι ο ενεργοποιητής της PrP^C - μεσολαβούμενης οδού του συγκεκριμένου βιοχημικού μονοπατιού.

6.2 Μηχανισμός της νευρωνικής απόπτωσης.

Η απόπτωση είναι ένας προγραμματισμένος μηχανισμός που οδηγεί στον κυτταρικό θάνατο και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο τόσο στην ανάπτυξη των κυττάρων και του οργανισμού γενικότερα καθώς και στην ομοιόσταση. (Jakobson et al, 1997)

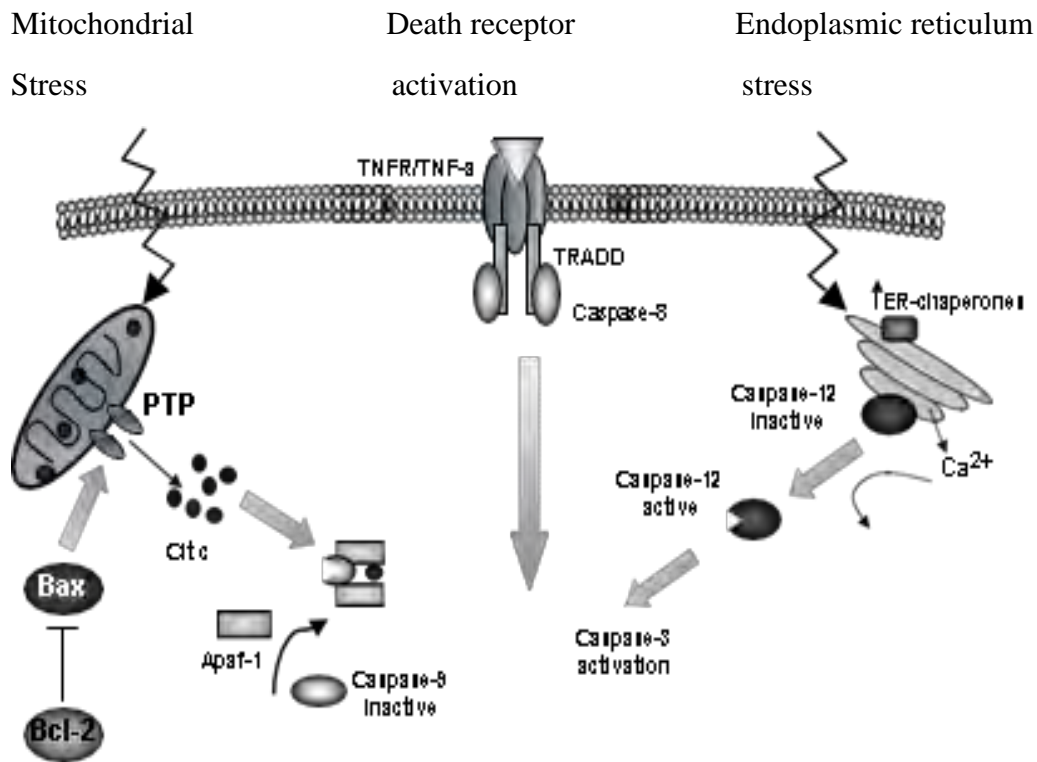
Κεντρικό ρόλο στο μηχανισμό της απόπτωσης παίζουν μόρια τα οποία ανήκουν σε μία μεγάλη οικογένεια που ονομάζονται πρωτεάσες της κυστεΐνης γνωστές ως κασπάσες.

(Hengartner, 2000) Οι κασπάσες χωρίζονται σε δύο κατηγορίες. Έχουμε τους initiators στα μόρια δηλαδή έναρξης της διαδικασίας (όπως η καπάση-8 και κασπάση-9). Άλλα μόρια που συμμετέχουν είναι η κασπάση-3 καθώς και οι φλεγμονώδεις κασπάσες (όπως η κασπάση-1). Ενεργοποίηση της απόπτωσης η οποία είναι ανεξάρτητη των κασπασών μπορεί να ενεργοποιεί και να είναι εναρκτήριο της διέγερσης του κυτταρικού θανάτου.

Στα πλαίσια της παραπάνω διαδικασίας σημαντικό ρόλο παίζει και το μιτοχονδριακό στρες. (Budihardjo et al, 1999). Ουσίες που ενεργοποιούν το στρες του ενδοπλασματικού δικτύου (endoplasmic reticulum ER), μέσω της επίδρασης και της διαταραχής της ομοιόστασης του ασβεστίου ή ακόμη και μέσω της εναπόθεσης των παθολογικών misfolded πρωτεϊνών ενεργοποιούν συγκεκριμένες κασπάσες. Τα τελευταία χρόνια γίνονται εκτενείς μελέτες όσον αφορά στο στρες του ενδοπλασματικού δικτύου που έχει σχέση με την απόπτωση και το οποίο διαφοροποιεί το στρες το οποίο δημιουργεί τις νευροεκφυλιστικές παθήσεις.

Στα μιτοχόνδρια ενεργοποιείται η κασπάση-8 έτσι λοιπόν δημιουργείται στρες σε αυτά και στα οργανίδια του μέσω της διάσπασης και της καταστροφής του DNA. Μικροσκοπικά υπάρχει διάνοιξη των πόρων της μιτοχονδριακής μεμβράνης (PTP:permeability transition pore) η οποία οδηγεί σε έκφραση ή σε δυσλειτουργία του κυτοχρώματος C στη συγκεκριμένη περιοχή και μάλιστα στο μιτοχονδριακό κυττοσόλιο. Το κυτόχρωμα C δημιουργεί ένα σύμπλοκο με την πρωτεΐνη apaf-1 και την προκασπάση-9 η οποία οδηγεί σε μία πρωτεολυτική διαδικασία και ενεργοποίηση του ενζύμου. Έτσι λοιπόν στην ενεργοποίηση της βιοχημικής αυτής οδού του ενδοπλασματικού δικτύου φαίνεται ότι η βλάβη καθώς και η συσσώρευση της μη φυσιολογικής αναδιπλούμενης πρωτεΐνης επάγει την έκκριση του ασβεστίου από το δίκτυο αυτό.

Η αρχική αντίδραση στο ενδοπλασματικό δίκτυο εκφράζεται με την υπερλειτουργία και την υπερέκφραση των R ενδοπλασματικών (ER) τσαπερονών (chaperones) (όπως το Grp58, Grp78/Bip, Grp94, heat-shock proteins). Επιπλέον πρέπει να αναφερθεί ότι όταν η καταστροφή αυτή παραμένει τότε εμφανίζεται και η δράση των κασπασών-12 οι οποίες πλέον ενεργοποιούνται για την περαιτέρω βλάβη. Οι ενεργοποιημένες μορφές των κασπασών 8,9 ή 12 δημιουργούν την έκφραση ή την εκτέλεση της καταστροφικής δράσης της κασπάσης 3.



Εικόνα 9. Μηχανισμός νευρωνικής απόπτωσης.

Μελέτες έχουν γίνει σε κύτταρα νευροβλαστώματος που έχουν μολυνθεί από prions.

Αυτό αντανακλάται φυσικά με την έκκριση του ασβεστίου από το ενδοπλασματικό δίκτυο το οποίο έχει δράση επάνω στην unfolded πρωτεΐνη (unfolded protein response, UPR). Αυτή δε εξαρτάται και συνδέεται με την αύξηση της δράσης των τσαπερονών στο ενδοπλασματικό δίκτυο καθώς και των γλυκοζοεξαρτώμενων τσαπερονών. Οι τσαπερόνες αυτές λέγονται Grps (glucose-regulated chaperone protein) (Hetz, 2003)

Από ότι είναι γνωστό η πρώτη αντίδραση στο στρες στο ενδοπλασματικό δίκτυο είναι διάφορες αντιαποπτωτικές πρωτεΐνες μέσω της αντιαποπτωτικής οδού. Φαίνεται ότι δημιουργεί up-regulation δηλαδή αύξηση των διαφόρων τσαπερονών που όμως έχουν προστατευτική δράση. Όταν αυτές οι διεργασίες της απόπτωσης είναι σταθερές τότε διάφορες προαποπτωτικές διεργασίες λαμβάνουν χώρα με αποτέλεσμα να έχουμε έναν κυτταρικό θάνατο ο οποίος μεσολαβείται ή ολοκληρώνεται στη συνέχεια με την δραστηριοποίηση της ανθεκτικής ενδοπλασματικής κασπάσης 12 (ή κασπάσης 4 στους ανθρώπους).

Πειραματικά μετά από θεραπεία στα κύτταρα που έχουνε μολυνθεί με το PrP^{Sc} η κασπάση 12 φαίνεται να δραστηριοποιεί το στρες του ενδοπλασματικού δικτύου, το οποίο τελικώς οδηγεί στην ενεργοποίηση της κασπάσης 3 σαν κεντρικός ή σαν κεντρικής σημασίας αποπτωτικός μηχανισμός. Αύξηση των τσαπερονών του ενδοπλασματικού δικτύου όπως η Grp58 συσχετιζόταν με την άθροιση και την συσσώρευση της παθολογικής PrP^{Sc}. (Hetz et al, 2005).

Σαν πληροφορία επίσης ενδιαφέρον είναι ότι αρκετές ενδοπλασματικές τσαπερόνες όπως η Bip/Grp78, καλνεξίνη, καθώς και η δυσουλφιδική πρωτεϊνική ισομεράση, φαίνεται να έχουν αλληλεπίδραση με τη παθολογική πρωτεΐνη.

Όπως προαναφέρθηκε σε μολυσμένα κύτταρα από scrapie νόσο η πρωτεΐνη PrP είναι δυνατόν να φανεί ακόμη και στο κυττοσόλιο δηλαδή στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων και μάλιστα χρησιμοποιώντας Golgi markers. (Taraboulos et al., 1990).

6.3 Ο ρόλος του πρωτεασώματος στην παθογένεια της νόσου του CJD.

Το 10% περίπου των μορίων της πρωτεΐνης PrP χαρακτηρίζεται σαν misfolded και δρουν στο ενδοπλασματικό δίκτυο, προκαλώντας το ενδοπλασματικό στρες μέσω ενεργοποίησης του termed ERAD. Κατά τη διάρκεια της διεργασίας αυτής η PrP έχει απογλυκοζυλιωθεί ενώ είναι συνδεδεμένη με ένα μόριο ουμπικιτίνης η οποία στη συνέχεια δρα θετικά για την πρωτεοσωμική βλάβη και καταστροφή. Οι ενδοπλασματικές τσαπερόνες όπως η Grp78/Bip είναι σημαντικές για τη βλάβη των πρωτεασωμάτων. Οι βλάβες στα πρωτεασώματα και η παθολογική συσσώρευση της PrP πρωτεΐνης μέσα στο κυτταρόπλασμα συνεχίζεται στη διεργασία με αποτέλεσμα να έχουν μία δράση κυτταροτοξική δημιουργώντας φλεγμονή και αύξηση των επιπέδων του PrP mRNA.

Η δράση τους φαίνεται να είναι μη ειδική επάνω στην αναστολή των εκκινητών των ιών που προάγει την υπερέκφραση της prion πρωτεΐνης. (Driscaldi et al., 2003).

Σε διαγονιδιακά ποντίκια η έκφραση της κυτταροπλασματικής PrP πρωτεΐνης προκαλεί τη μίμηση των PrP πρωτεϊνών, εξαπλώνεται μέσω του μηχανισμού ERAD (ER-associated degradation pathway) και προκαλεί αταξία, παρεγκεφαλιδική εκφύλιση και γλοΐωση.

Επίσης αυτή η ενδοκυτταρική άθροιση των παθολογικών πρωτεϊνών στο ενδοπλασματικό δίκτυο έχει σαν αποτέλεσμα να υπερεκφράζει την παθολογική

μεταλλαγμένη PrP πρωτεΐνη (E200K y D178N). Αυτές οι μορφές έχουν σχέση με την οικογενή μορφή της CJD, ενώ η πρωτεΐνη prion Q217R, έχει φανεί ότι έχει σχέση με την άθροιση στο ενδοπλασματικό δίκτυο. (Negro et al, 2001, Singh et al, 1997)

7. Η διάγνωση και τα σύγχρονα τεστ.

Τα τελευταία χρόνια υπάρχει αυξημένη επίπτωση της νόσου. Η γρήγορη διάγνωση της, θα πρέπει να γίνεται με βάση τα πρόσφατα δεδομένα, αρκετά ακριβής αλλά και γρήγορη για την καλύτερη πρόληψη.

Τεστ τα οποία έχουν αρκετά υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα (είναι μη επεμβατικά) και οδηγούν σε γρήγορη διάγνωση. Σημαντικοί είναι οι βιοδείκτες και διάφορα αιματολογικά τεστ. Αν και τελικά η διάγνωση της σπογγώδους εγκεφαλοπάθειας στα περιστατικά αυτά τα οποία ήταν ύποπτα για τη νόσο έγιναν Postmortem.

Στην περίοδο της έξαρσης της νόσου CJD ήταν πολύ έντονο το ερώτημα το κατά πόσο εκτός από την κατανάλωση μετά βρώσεως μολυσμένων κρεάτων υπήρχε και μετάδοση της νόσου μέσω της ιατρογενούς οδού π.χ. μετά από τη χρησιμοποίηση μολυσμένων ιστών μέσω διαφόρων χειρουργικών παρεμβάσεων όπως π.χ. της μεταμόσχευσης του κερατοειδούς ή ακόμα και της μεταμόσχευσης μηνίγγων προσβεβλημένων ατόμων. (Brown et al., 2000).

Οι ιατρογενείς αιτίες για τη μετάδοση της νόσου είναι επίσης η χρησιμοποίηση της ανθρώπινης αυξητικής ορμόνης που προερχότανε από ανθρώπια υπόφυση αλλά και της χρησιμοποίησης μολυσμένων προϊόντων αίματος που χρησιμοποιήθηκαν για μεταγγίσεις σε ασθενείς.

Τα διαγνωστικά μέσα τα οποία χρησιμοποιούνται τελευταία είναι μέσω της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR).

Η PrP^{Sc} μορφή δεν είναι το μόνο παθολογικό προϊόν της λοίμωξης με prion πρωτεΐνη σε άτομα με σπογγώδη εγκεφαλοπάθεια, παρ'όλα αυτά όμως είναι μέχρι τώρα ο μοναδικός βιοδείκτης ο οποίος μπορεί να μετρηθεί τουλάχιστον εργαστηριακά. (Prusiner, 1998)

Εκτός από τις εξετάσεις οι οποίες είναι προσβάσιμες στα νοσοκομεία, όπως είναι η μαγνητική τομογραφία του εγκεφάλου (νευροαπεικόνιση) καθώς και το

ηλεκτροεγκεφαλογράφημα με τα ανάλογα παθολογικά ευρήματα, σημαντικό είναι σε άτομα στα οποία υπάρχει υπόνοια της οικογενούς μορφής της CJD να υπάρχει ένας γενετικός έλεγχος της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης και του γονιδίου.

Εκτός από τα νευροψυχολογικά τεστ τα οποία γίνονται αρχικά από τους κλινικούς γιατρούς για την επιβεβαίωση υποξείας ή οξείας μορφής διαταραχής της νοητικής σφαίρας με τη μορφή άνοιας καθώς και κατάθλιψης-απάθειας, σημαντικό είναι ο ιστολογικός έλεγχος των αμυγδαλών καθώς και της σκωληκοειδούς απόφυσης. Ωστόσο στη σημερινή εποχή δεν υπάρχει ειδική νομοθετική ρύθμιση για τη διενέργεια των βιοψιών αυτών.

Εκτός από τις ιστολογικές και γενετικές αναλύσεις σημαντική είναι η εξέταση των διαφόρων βιοχημικών δεικτών όπως της πρωτεΐνης S-100, της νευρωνικής ειδικής ενολάσης, των ειδικών νευρωνικών ισοενζύμων, της ομπικιτίνης καθώς και ο δείκτης 14-3-3 ο οποίος έχει σχέση με τον νευρωνικό θάνατο. Τελευταία χρησιμοποιείται επίσης και ο παράγοντας erythroid differentiation-related factor.

Ωστόσο τελευταία στην κλινική πρακτική χρησιμοποιείται σαν διαγνωστικό μέσο ο παράγοντας, δηλαδή η πρωτεΐνη 14-3-3 μετά από λήψη εγκεφαλονωτιαίου υγρού (CSF).

Άλλα τεστ τα οποία έχουν εισαχθεί στην πρακτική της διάγνωσης είναι η ανεύρεση και η έρευνα των παθολογικών PrP^{Sc} ισομορφών είτε μέσω του Western blot ή της ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay).

Prionics check, Western blot test: Τα τεστ αυτά βασίζονται στη Western blot διεργασία η οποία είναι σχεδιασμένη για να ανιχνεύει θραύσματα ή τμήματα της PrP^{Sc} πρωτεΐνης η οποία είναι ανθεκτική στη πρωτεάση (ειδικά χαρακτηριζόμενη σαν πρωτεΐνη prp27-30) (Oesch et al., 2000). Η ελάχιστη διάρκεια η οποία χρειάζεται για να ολοκληρωθεί το τεστ αυτό είναι περίπου 6 με 8 ώρες και ο σχεδιασμός αφορά σε 100 τεστ με διπλασιασμούς η ένα άτομο την ημέρα. Τα αποτελέσματα διακρίνονται για την 100% ευαισθησία καθώς και την ειδικότητα.

Το επόμενο τεστ λέγεται **ENFER**: Το τεστ αυτό είναι τύπου ELISA, βασίζεται στον χημειοφθορισμό και ολοκληρώνεται σε διάρκεια περίπου 4 ωρών. Με βάση την ευρωπαϊκή κοινότητα το τεστ ENFER μπορεί να διαγνώσει με μεγάλη ακρίβεια τόσο θετικά όσο και αρνητικά δείγματα και χαρακτηρίζεται από 100% ευαισθησία καθώς

και ειδικότητα (Schimmel et al, 1999a). Στα πλεονεκτήματα του τεστ είναι η ταχύτητα της διάγνωσης της νόσου και στα αρνητικά ψευδώς θετικά αποτελέσματα.

Το επόμενο τεστ λέγεται **CEA/bioRat test**: Χρησιμοποιούνται δύο διαφορετικά μονοκλωνικά αντισώματα. Το τεστ αυτό λέγεται και sandwich immunoassay και χρησιμοποιεί τουλάχιστον prion πρωτεΐνη μεγέθους 27-30. Το τεστ αυτό χαρακτηρίζεται με 100% ευαισθησία και ειδικότητα. Μειονέκτημα της μεθόδου είναι ότι μπορεί να ανιχνεύσει PrP^{Sc}, τη παθολογική δηλαδή πρωτεΐνη στον εγκέφαλο σε προσυμπτωματικά ζώα. (Grassi et al, 2001, Moynagh Shimmel, 1999a)

Το τέταρτο τεστ λέγεται **prionics check, LIA test**: Η μέθοδος αυτή είναι τύπου ELISA, η οποία χρησιμοποιεί δύο διαφορετικά μονοκλωνικά αντισώματα για να ανιχνεύσει τις ανθεκτικές στην πρωτεϊνική κινάση, prion πρωτεΐνες (Biffiger et al., 2002). Ο χρόνος που χρειάζεται για να γίνει η δοκιμασία αυτή είναι λιγότερο από 4 ώρες, η ευαισθησία της μεθόδου είναι 97,9% και η ειδικότητα είναι γύρω στο 100%. Όμως υπάρχει το μειονέκτημα των ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων.

Το άλλο τεστ είναι το **conformational dependent immunassay (CDI) test**: Αυτή η εξέταση έχει βάση την ανοσοιστοχημεία, χρησιμοποιεί τον φθορισμό και τα υψηλής ευαισθησίας ανασυνδυασμένα τμήματα των αντισωμάτων και ανιχνεύει θραύσματα και υποτμήματα της παθολογικής PrP πρωτεΐνης (Safar et al, 1998). Η εξέταση αυτή είναι δυνατόν να διενεργηθεί περίπου σε 8 ώρες, η ειδικότητα και η ευαισθησία αφορούν περίπου στο 100% και είναι ειδική στο να αναγνωρίζει διάφορους επιτόπους, ειδικά προσαρμοσμένα και ανασυνδυασμένα αντισώματα. Υλικό για βιοψία λαμβάνεται από το λεμφικό ιστό, από τους σκελετικούς μύες, από το σπλήνα και από το επιθήλιο του οσφρητικού βολβού.

Στο παρελθόν έχουν γραφτεί διάφορες εργασίες μέσω των οποίων γινόταν ανίχνευση της πρωτεΐνης PrP^{res}-like μορφής η οποία ήταν ανθεκτική στην πρωτεάση σε υλικό όπως ήταν π.χ. τα ούρα των ανθρώπων και ζώων (Shaked et al., 2001)

7.1 Νέες προοπτικές μετά από διάγνωση της prion πρωτεΐνης σε άτομα πριν από τον θάνατο (premortem early diagnosis)

Η multispectral ultraviolet fluoroscopy (πολυφασματική υπεριώδη φθοριοσκοπία): Η μέθοδος αυτή να μπορεί να διαχωρίσει την πρωτεΐνη PrP^c και της

PrP^{Sc} χρησιμοποιώντας διαφορετικά strains και βασίζεται στην φθορισκοπική μέθοδο με βάση τα διάφορα μήκη των υπεριδιών ακτινοβολιών (Rubenstein et al, 1998).

Το θετικό της μεθόδου είναι ότι ουσιαστικά δεν εξαρτάται από την ανίχνευση των ειδικών αντισωμάτων ή δεν εξαρτάται από την μορφή της PrP^{Sc} η οποία φαίνεται να κατακερματίζεται από τις διάφορες πρωτεάσες. Παρ'όλα αυτά φαίνεται ότι η μέθοδος αυτή είναι χαμηλότερης διαγνωστικής αξίας από την ELISA ή το Western blot.

Confocal dual-color fluorescence-correlation spectroscopy: Η μέθοδος αυτή (FCS) ανιχνεύει απλά μόρια μέσω του φθορισμού συνήθως σε υγρή μορφή όταν αυτά διαπερνούν μία δεσμίδα laser και τελικώς προσμετράται με έναν μετρητή των απλών φωτονίων (Bieschke et al., 2000).

Βέβαια το μειονέκτημα είναι ότι στην εξέταση αυτή γίνεται ένα μείγμα μεταξύ anti-PrP αντισωμάτων τα οποία τελικά ανήκουν σε δύο διαφορετικούς κυτταρικούς πληθυσμούς. Η τεχνική αυτή έχει μεγαλύτερη ευαισθησία από Western blot και την ELISA assays αλλά ο τρόπος αυτός δεν προτιμάται για πρακτικούς λόγους λόγω του αυξημένου κόστους και λόγω μη γρήγορης πρόσβασης της.

FTIR spectra analyzed by neural network: Η εξέταση αυτή έχει ευαισθησία στο 97% και ειδικότητα στο 100%. Συνήθως μελετά φυσιολογικό αίμα το οποίο συγκρίνεται με το παθολογικό και βγαίνουν τα ανάλογα αποτελέσματα. Η μελέτη αυτή βασίζεται στον μηχανισμό Fourier-transformed infrared spectroscopy η οποία βασίζεται σε ένα δείγμα το οποίο περιέχει παθολογική πρωτεΐνη PrP^{Sc} σε ένα όμως τεχνητά κατασκευασμένο νευρωνικό δίκτυο.

Στη συνέχεια και μέσω ειδικών τεχνικών και προγραμμάτων υπολογιστών φαίνεται ότι το σύστημα του λογισμικού μπορεί και ξεχωρίζει τον παθολογικό από τον φυσιολογικό ιστό ή το παθολογικό από το φυσιολογικό δείγμα, δηλαδή το κατά πόσο υπάρχει μία μεταλλαγμένη μορφή της prion πρωτεΐνης με τη μορφή της PrP^{Sc}. (Lasch et al, 2003)

Fluorescence detection after capillary electrophoresis: Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην φθορισκοπική ανίχνευση των παθολογικών αντιγόνων και αντισωμάτων τα οποία εναποτίθενται στα τριχοειδή αγγεία. (Jackman and Schmerr, 2003)

Σε αυτή τη μέθοδο ένα φθορισμένο συνθετικό πεπτίδιο το οποίο περιέχει μία βραχεία αλληλουχία της prion πρωτεΐνης ενοφθαλμίζεται μαζί με την παρουσία ή την

συνύπαρξη anti-PrP αντισωμάτων σε συγκεκριμένο ιστό. Αυτή η εξέταση είναι δυνατόν να παράγει τη σύνδεση στο 50% του πεπτιδίου.

Αυτό υπάρχει σε ανάμειξη με τμήμα το οποίο θεραπεύεται με πρωτεϊνική κινάση και αν η παθολογική πρωτεΐνη PrP^{Sc} είναι παρούσα τότε αυτή είναι δυνατόν να πάρει το μέρος ή να απομακρύνει το πεπτίδιο από το αντίσωμα αλλάζοντας έτσι τη μορφή του πεπτιδίου. Η μέθοδος μπορεί να ανιχνεύσει την PrP^{Sc} πρωτεΐνη στο αίμα ιδιαίτερα προσβεβλημένων ζώων αλλά και ανθρώπων από το scrapie (Schmerr et al., 1999).

Το μειονέκτημα της μεθόδου είναι ότι μετρά απευθείας την συγκέντρωση της PrP^{Sc} ή την ύπαρξη αυτής στον εγκεφαλικό ιστό και εξαρτάται από τις συγκρίσεις μεταξύ των διαφόρων σηματοδοτικών μηνυμάτων των διαφόρων δειγμάτων. Η μέθοδος δεν είναι δυνατόν να αναπαραχθεί στα διάφορα εργαστήρια.

7.2 Ειδικά τροποποιημένα αντισώματα

Η παραγωγή τροποποιημένων αντισωμάτων για την PrP^{Sc} θα μπορούσε να είναι βοηθητική για την διάγνωση των prion νόσων και ειδικά να ανιχνεύει και να μετρά ποσοτικά την PrP^{Sc} σε σωματικά υγρά έτσι ώστε να κατασκευαστούν ειδικοί βιοδείκτες για τη διάγνωση της νόσου.

Δεδομένου ότι υπάρχουν μεγάλες δομικές διαφορές μεταξύ των δύο πρωτεϊνών δηλαδή της PrP^C και της PrP^{Sc} η αρχική σκέψη ήταν να δημιουργηθούν ειδικά τροποποιημένα αντισώματα τα οποία είχαν μεγαλύτερη διαγνωστική ικανότητα.

Αρχικά το 1997 ένα από τα επιτυχή αποτελέσματα αναφέρθηκαν από τον Korth et al., 1997 και Korth et al., 1999 όταν ένα ειδικό αντίσωμα το οποίο ονομάστηκε 15B3 είχε χαρακτηριστικούς υπότοπους ή επίτοπους και ειδικές ανοσοιστοχημικές περιοχές τόσο της βόειας όσο και της ανθρώπινης PrP^{Sc} όχι όμως της PrP^C. Αποτέλεσμα ήταν ότι τόσο η PrP^C όσο και η PrP^{Sc} μοιράζονταν κοινούς επίτοπους αλλά απέτυχε δεδομένου ότι η ικανότητα και η διαγνωστική της δοκιμασία ήταν πολύ χαμηλή.

Μία άλλη εργασία η οποία έγινε ήταν μέσω της μελέτης ειδικών PrP^{Sc} ειδικών αντισωμάτων τα οποία βασιζόταν στη φιλοσοφία μοντέλου ή μοτίβου επανάληψης της τυροσίνης-τυροσίνης-αργινίνης σαν βιολογική βλάβη στα άτομα τα οποία έπασχαν από τη νόσο. Έτσι λοιπόν στα ζώα αυτά γινόταν μία ανοσολογική μετατροπή μέσω εμβολιασμού με ένα συνθετικό παράγωγο δηλαδή ενός πεπτιδίου το οποίο περιείχε την συγκεκριμένη αυτή αλληλουχία που προαναφέρθηκε.

Αντισώματα που τεχνικώς παρασκευάστηκαν αναγνώριζαν την PrP^{Sc} αλλά όχι όμως και την PrP^C με αποτέλεσμα έτσι χρησιμοποιώντας την κυτταρομετρία ροής να υπάρχει μία αυξημένη διαγνωστική ικανότητα της συγκεκριμένης εξέτασης.

Υπάρχει επιπλέον αναφορά για ειδικό PrP^{Sc} μονοκλωνικό αντίσωμα, με το όνομα V5B2, το οποίο είναι εναντίον του C-terminal της prion πρωτεΐνης (Curin et al., 2004).

Πιο πρόσφατα υπάρχουν ειδικές αναφορές ότι για την διάγνωση χρησιμοποιείται ένα ειδικό anti-DNA αντίσωμα το οποίο ονομάζεται OCD4 και το οποίο αναγνωρίζει ειδικές τροποποιημένες prion πρωτεΐνες.

Μελέτες των Ζου και συνεργατών το 2004 έδειξαν ότι το OCD4 φαίνεται να αντιδρά με το DNA με βάση την ανοσολογία ή ένα άλλο μόριο να προσομοιάζει με το DNA δημιουργώντας ένα ειδικό σύμπλοκο με την prion πρωτεΐνη και τελικά να θέτει τη διάγνωση της νόσου. Άλλα μόρια τα οποία χρησιμοποιούνται είναι το νατριούχο phosphotungstic acid το οποίο μπορεί να αναγνωρίζει την πρωτεΐνη PrP^{Sc} από διάφορες πηγές (Safar et al., 1998) χρησιμοποιώντας διάφορες μεθόδους με βάση τον χημειοφθορισμό. Η μέθοδος αυτή είναι ιδιαίτερα σημαντική για τη διάγνωση των παθολογικών πρωτεϊνών στις διάφορες μορφές της νόσου CJD και αφορά σε ιστούς όπως είναι ο νωτιαίος μυελός, ο θύμος αδένας, οι λεμφαδένες, οι αμυγδαλές, ο σπλήνας και οι διάφοροι αδένες όπως είναι τα επινεφρίδια, το ορθό, ο αμφιβληστροειδής καθώς και το οπτικό νεύρο (Wadsworth et al., 2001).

Επίσης τεχνητά κατασκευασμένα μόρια τα οποία παράγονται σε in vitro μελέτες και αφορούν στην 2'-φθόριο-modified RNA χρησιμοποιούνται για την διάγνωση χρησιμοποιώντας το μόριο aptamer SAF-93. Συνεπώς, έχουμε διαγνωστική αξία δέκα φορές παραπάνω για τη prion πρωτεΐνη Sc περισσότερο από ότι όμως για την ανασυνδυασμένη μορφή της PrP^C (Proske et al., 2002).

Τέλος έχει γίνει διαγνωστική προσπάθεια μέσω της χρησιμοποίησης ειδικών κυττάρων ποντικών που αφορούν στο νευροβλάστωμα χαρακτηριζόμενα από N2a κύτταρα και τα οποία αφορούν σε προσβεβλημένα ποντίκια από τα prions. Σε αυτές τις σειρές των πειραμάτων φαίνεται ότι η ευαισθησία της εξέτασης αυτής είναι αρκετά μεγάλη σχεδόν δέκα φορές πιο γρήγορη σε σχέση με τις προηγούμενες αναφερθείσες και φαίνεται μάλιστα ότι είναι και λιγότερο ακριβή.

8. Θεραπευτικές προοπτικές

Όπως προαναφέρθηκε η νόσος CJD είναι 100% προς το παρόν θανατηφόρος. Έχουν γίνει πολλές προσπάθειες, χωρίς όμως τα αναμενόμενα αποτελέσματα. Στο συγκεκριμένο κεφάλαιο θα αναφερθούν διάφορες πειραματικές-φαρμακευτικές προσπάθειες τα τελευταία χρόνια. Πολύ μεγάλη σημασία δίνεται στη μοριακή και γενετική βάση της νόσου και των κληρονομικών μορφών, έτσι ώστε να υπάρξει στο μέλλον μία θεραπεία με την τροποποίηση των συγκεκριμένων ένοχων στόχων-γονιδίων.

Καταστολή της έκφρασης της prion πρωτεΐνης.

Επιστημονικά έχει γίνει η πρόταση ότι καταστέλλοντας την έκφραση της prion πρωτεΐνης C, ενδεχομένως να κατασταλεί η έναρξη αλλά και η εκδήλωση της νόσου.

Οι προσπάθειες-στόχοι είναι η καταστολή της έκφρασης του γονιδίου και της παραγωγής της παθολογικής πρωτεΐνης μέσω των antisense ολιγονουκλεοτιδίων και μέσω μεθόδων έκφρασης του RNAi. Γίνεται μέσω γενετικής μηχανικής και της δράσης των ανάλογων ριβοσωμάτων και ενζύμων αυτών. (Bueler et al, 1993)

Αναστολή της Pr-πρωτεΐνη X και της αλληλεπίδραση της.

Βιοχημικά πειράματα με διαγονιδιακά πειραματόζωα έδειξαν, για να γίνει μετατροπή της φυσιολογικής prion στην παθολογική πρωτεΐνη χρειάζεται ένας κυτταρικός συμπαράγοντας, γνωστός ως πρωτεΐνη X. Η πρωτεΐνη X καταλύει την μετατροπή και την εναπόθεση της παθολογικής πρωτεΐνης στο εγκεφαλικό παρέγχυμα.

Με βάση τις εργασίες των Kaneko et al., 1997 εργαστηριακά έγιναν σχεδιασμοί για αναστολή της έκφρασης της πρωτεΐνης X (Perrier et al., 2000), δηλαδή αναστολή της σύνδεσης του συμπαράγοντα X.

Ενώ σαν ιδέα είναι αρκετά ελπιδοφόρα, παρ'όλα αυτά είναι δύσκολο να παραχθεί πρακτικά η σύνδεση μεταξύ του ενεργού μορίου και της πρωτεΐνης PrP^{Sc} δεδομένου ότι ακριβώς η φύση του δεν έχει διαλευκανθεί ακόμα.

Αναστολή της αλληλεπίδρασης μεταξύ της PrP^C και του PrP^{Sc}.

Η αναστολή της αλληλεπίδρασης και της σύνδεσης μεταξύ αυτών των δύο παραγόντων έχει σαν σκοπό να μην παράγονται καινούρια μόρια από την PrP^C στην PrP^{Sc} και έτσι να κατασταλεί η εναπόθεση της πλέον, αφού θα έχει προηγηθεί η αντιγραφή της σαν

προμόριο. Εργαστηριακά η εσωτερική αλληλουχία 106-141 της prion πρωτεΐνης έχει συνδεθεί με την αλληλεπίδραση μεταξύ της PrP^C και της PrP^{Sc} με αποτέλεσμα η τροποποίηση στη συγκεκριμένη αλληλουχία ενδεχομένως να οδηγήσει σε κάποια σύγχρονη θεραπεία (Chabry et al, 1998).

Πρόληψη της μετατροπής της prion πρωτεΐνης C.

Η προφύλαξη αφορά στη μετατροπή της μορφής από α -> β με αποτέλεσμα έτσι να αλλάζει γενικότερα η πιθανότητα της μετατροπής της PrP^C σε PrP^{Sc}. Σταθεροποιώντας την δομή της πρωτεΐνης C έχει φανεί ότι σε κύτταρα νευροβλαστώματος που έχουν προσβληθεί από prion πρωτεΐνη, όταν θεραπεύονται με χημικά τροποποιημένες πιατσαπερόνες, τροποποιείται το μόριο όπου και στερείται της ικανότητας να μετατρέπεται στην παθολογική PrP πρωτεΐνη. (Tatzelt et al., 1996). Αυτό είναι δυνατόν να γίνει μέσω βιοχημικής μηχανικής ή γενετικής μηχανικής η οποία να τροποποιεί την αλληλουχία των παθολογικών αυτών πρωτεϊνών και γονιδίων.

Αντιστρέφοντας την δημιουργία της PrP^{Sc} .

Η αρχική ιδέα της θεραπευτικής αυτής προοπτικής βασίστηκε στο γεγονός ότι αν σταθεροποιηθεί η β δομή (η οποία είναι και η παθολογική της μορφή) υπάρχει πιθανότητα της καταστολής στην περαιτέρω μετατροπή. Άρα λοιπόν η ιδέα είναι ότι θα πρέπει να ανασταλεί η μετατροπή της PrP^C σε PrP^{Sc} για να μην δρα πλέον τοξικά. (Tatzelt et al, 1996)

Ενισχύοντας την διαγραφή αλλά και την κάθαρση της παθολογικής PrP^{Sc} πρωτεΐνης.

Η πρακτική βασίζεται στο γεγονός ότι υπάρχει ανισορροπία μεταξύ της μετατροπής και της κάθαρσης της παθολογικής πρωτεΐνης και τελικά της απομάκρυνσής της με αποτέλεσμα, η μη φυσιολογικά αναδιπλούμενη πρωτεΐνη να έχει την ικανότητα (μέσω βλάβης της πρωτεοσωμικής καταστροφής) να αυξάνεται η συγκέντρωσή της.

Ελπιδοφόρα θεραπεία είναι η ανοσοποίηση, να βρεθούν δηλαδή ανοσοποιητικά ή ανοσολογικά δραστικά μόρια τα οποία πλέον να απομακρύνουν την εναπόθεση των αμυλοειδικών πλακών (πειράματα τα οποία έχουν γίνει τόσο σε νόσους Alzheimer σαν νευροεκφυλιστική νόσο όσο και στην prion πρωτεΐνη) (Schenk et al., 1999).

Η φιλοσοφία της θεραπείας αυτής είναι ότι υπάρχει μία τόσο ενεργής όσο και παθητική ανοσοποίηση σε διάφορα διαγονιδιακά πειραματόζωα με anti-PrP αντισώματα τα οποία θα οδηγούν πλέον σε καταστολή ή αναστολή της αντιγραφής της prion πρωτεΐνης τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*. (Enari et al, 2001 and Sigurdsson et al., 2002).

Τροποποιώντας την τοξικότητα της PrP^{Sc}.

Πειράματα των ερευνητικών ομάδων με βάση βιβλιογραφικά τον Hetz et al., 2003 έδειξαν ότι ενεργοποιώντας την τσαπερόνη του ενδοπλασματικού δικτύου με το όνομα Grp58 οδηγεί στην προστασία από τον κυτταρικό θάνατο και μάλιστα καταστέλλει τη δράση της PrP^C.

Σαν ενδιαφέρουσα τοποθέτηση βιοχημικά και βιολογικά φάνηκε ότι η κασπάση 12 είναι μία από τα λίγα μέλη της οικογένειας των κασπασών που δεν εμπλέκεται στην φυσιολογική κυτταρική λειτουργία και ομοιόσταση και έχει σχέση με τις παθολογικές καταστάσεις (Mehmet, 2000). Έτσι λοιπόν η κασπάση 12-null στα πειραματόζωα ενοχοποιείται λιγότερο για την νευροεκφύλιση σε αυτές τις διαδικασίες όταν εμπλέκονται οι misfolded πρωτεΐνες (Nakagawa et al., 2000).

8.1 Φαρμακευτικές ουσίες οι οποίες καταστέλλουν τη δράση της PrP^{Sc} και τροποποιούν την έκφραση της νόσου.

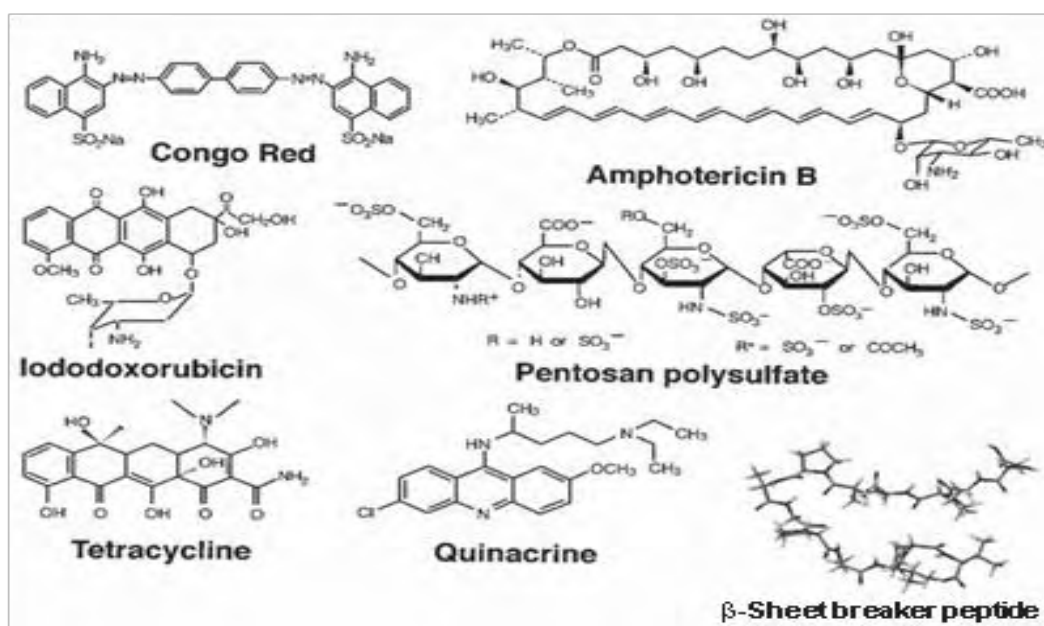
Οι ουσίες που θα αναφερθούν στη συνέχεια καταστέλλουν την αντιγραφή της prion πρωτεΐνης τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*. Σε μία μικρή λίστα παρουσιάζουμε τις χημικές ουσίες οι οποίες είναι το ερυθρό του Congo (Congo red), η αφοτερικίνη β, η ιωδοδοξορουβικίνη, η πεντοζανπολυσουλφατάση, η τετρακυκλίνη, η κουνιακρίνη και τέλος ουσίες που καταστέλλουν τη δημιουργία των β ελασμάτων.

Αναλύοντας το ερυθρό του Congo, τις ανθρακυκλίνες και την τετρακυκλίνη συμπεραίνουμε ότι πολλά φάρμακα επεμβαίνουν στην αλληλεπίδραση αυτών με την PrP^{Sc} πρωτεΐνη και σταθεροποιούν τόσο τα β-ελάσματα όσο και την παθολογική δομή. (Weissmann and Aguzzi, 2005). Το ερυθρό του Congo είναι ίσως ένα από τα πρωτότυπα φάρμακα το οποίο επιδρά στα β-ελάσματα [δηλαδή στις β δομές καθώς και στο αμυλοειδές δρώντας σαν αναστολέας της εναπόθεσης του αμυλοειδούς και της δημιουργίας των αμυλοειδικών πλακών].

Στη σπογγώδη εγκεφαλοπάθεια το ερυθρό του Congo καταστέλλει την άθροιση της PrP^C πρωτεΐνης σε χρόνια μολυσμένα κύτταρα.

Υπάρχουν κάποιες ενστάσεις, ότι με τη χορήγηση του ερυθρού του Congo υπάρχει καθυστέρηση στην έναρξη της νόσου με βάση κάποια πειραματικά δεδομένα. Το ερυθρό του Congo είναι αρκετά τοξικό και χαρακτηρίζεται από χαμηλή βιοδιαθεσιμότητα και ικανότητα να περνά τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό (blood-brain barrier). Επομένως, λόγω της τοξικότητας δεν εφαρμόζεται πρακτικά. Όσον αφορά στην ιωδοδοξορουβικίνη η οποία είναι ανθρακυκλίνη αυξάνει την βιωσιμότητα των κυττάρων στα τα hamsters (Tagliavini et al., 1997). Ο παράγοντας δρα ανασταλτικά στην εναπόθεση των αμυλοειδικών ινών-πλακών.

Όσον αφορά στην χορήγηση της τετρακυκλίνης (στη κατηγορία των αντιβιοτικών), η δράση της είναι ιδιαίτερη και αφορά στην αναστολή της άθροισης της PrP^{Sc} πρωτεΐνης στο κεντρικό νευρικό σύστημα (Forloni et al., 2002). Η τετρακυκλίνη σε σχέση με τους υπόλοιπους παράγοντες που αναφέρθηκαν είναι πιο ασφαλή για τους ασθενείς με πιο γνωστές φαρμακολογικές ιδιότητες.



Εικόνα 10. Δομή των χημικών μορίων που χορηγήθηκαν για θεραπεία στα prion νοσήματα.

Polyanions

Τα Polyanions είναι ειδικά μόρια και καταστέλλουν την είσοδο διαφόρων ιών εντός των κυττάρων με έναν μη ειδικό μηχανισμό. Συσχετίζονται με την αλληλεπίδραση των ιών και των κυτταροπλασματικών μεμβρανών. (Dormont, 2003)

Άλλοι παράγοντες με βάση την οικογένεια των polyanions όπως είναι η dextran sulfate, pentosan sulfate, suramine and HPA23, καθυστερούν την έκφραση και την εξέλιξη της scrapie νόσου σε διάφορα πειραματικά μοντέλα. Σε πειράματα, έγχυση των ουσιών αυτών ενδοκοιλιακά στον εγκέφαλο των πειραματόζωων αυξάνει την βιωσιμότητά τους. (Doh-Ura et al., 2004).

Αντιβιοτικά παράγωγα πολυενίου (Polyene antibiotics)

Τα αντιβιοτικά αυτά είναι η αμφοτερικίνη Β, ένας αντιμυκητιασικός παράγοντας που αντιδρά με την εργοστερόλη, συστατικό των μεμβρανών των μυκήτων και με την χοληστερόλη που βρίσκεται στις κυτταρικές μεμβράνες σαν λιπίδιο στα θηλαστικά (Hartsel and Bolard, 1996). Η αμφοτερικίνη Β έχει θετική επίδραση στην καταστολή της εναπόθεσης της prion πρωτεΐνης, της καθυστέρησης της έναρξης της νόσου αλλά και της έκφρασής της. Έτσι λοιπόν η αμφοτερικίνη Β και ένας λιγότερο τοξικός παράγοντας που προέρχεται από αυτή όπως είναι MS 8209 έχουν ικανότητες και ιδιότητες που καταστέλλουν τη νόσο.

Το τελευταίο μόριο είναι η φιλιπίνη με ανάλογες δραστηριότητες.

Χλωροπρομαζίνη και κινακρίνη (Chlorpromazine and quinacrine).

Στρατηγική η οποία χρησιμοποιήθηκε εδώ και χρόνια από τον Prusiner. Φαρμακολογικές ουσίες που διαπερνούν εύκολα τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό με αποτέλεσμα να δρουν στα χρονίως προσβεβλημένα κύτταρα. Η δράση της χλωροπρομαζίνης και της κινακρίνης είναι αρκετά υψηλή σε πειράματα που έχουν γίνει *in vitro*. (Korth et al., 2001).

Πεπτίδια καταστροφείς των β-ελασμάτων (B-Sheet-breaker peptides).

Τελευταία τεχνικής θεραπεία η οποία αφορά στην ικανότητα των πεπτιδίων να καταστρέφουν την β δομή. Αποτέλεσμα, η καθυστέρηση στην δημιουργία της πρωτεΐνης PrP^{Sc} η οποία είναι ανθεκτική στην πρωτεάση. Στην προκειμένη περίπτωση τα συγκεκριμένα πειράματα παρουσιάζουν θετικά αποτελέσματα στα χρονίως μολυσμένα κύτταρα του νευροβλαστώματος.

Η αρχική ιδέα για τη θεραπεία ήταν ότι μικρά συνθετικά πεπτίδια τα οποία περιείχαν αυτοαναγνωριστικό μηχανισμό της prion πρωτεΐνης, βιοχημικά ή με μηχανικό τρόπο αποσταθεροποιούσαν την κυτταρική μεμβράνη καθώς και τις παθολογικές πρωτεΐνες

με αποτέλεσμα τη μη συσσώρευση στο παρέγχυμα ή στους άλλους ιστούς. Έτσι, υπήρξε καθυστέρηση τόσο της έκφρασης της νόσου όσο και της πορείας αυτής (Soto et al, 2000).

Ανοσοποίηση και ανοσοτροποποιητικές πρακτικές

Πολλά υποσχόμενη θεραπεία, αν και μέχρι τώρα υπήρχαν κάποιες αμφισβητήσεις. Παρ'όλα αυτά σε όλες σχεδόν τις μορφές των prion πρωτεϊνών ο εμβολιασμός στις συγκεκριμένες παθήσεις δοκιμάστηκε σε μεγάλο πληθυσμό. Σκέψη στην οποία υπήρχε αρκετός ενθουσιασμός τόσο στα prion νοσήματα όσο και σε άλλες νευροεκφυλιστικές καταστάσεις όπως είναι η Alzheimer νόσος (Schenk et al, 1999).

Αντισώματα τα οποία κατευθυνόταν εναντίον των επιτόπων της prion πρωτεΐνης θεωρήθηκαν ικανά να θεραπεύσουν χρονίως προσβεβλημένα ή μολυσμένα κύτταρα (Enari et al, 2001; Peretz et al, 2001). Στην περίπτωση αυτή σε διαγονιδιακά ποντίκια *in vivo* με ανοσοποίηση μέσω αντισωμάτων PrP τα οποία περιείχαν μικρή μ-chain αλυσίδα, ήταν λιγότερο ευαίσθητα στην λοίμωξη, τουλάχιστον στο περιφερικό σύστημα από τους παράγοντες που εκδήλωναν ή ήταν υπεύθυνοι για τη νόσο.

Άρα τα αντισώματα anti-PrP ήταν ικανά να καταστείλουν ξανά την prion πρωτεΐνη η οποία ήταν ανθεκτική πρωτεάση σε διάφορους κυτταρικούς πληθυσμούς με το μηχανισμό του εμβολιασμού με ανασυνδυασμένη prion πρωτεΐνη τόσο πριν όσο και κατά τη διάρκεια μιας ήδη υπάρχουσας φλεγμονής στα κύτταρα που μελετώνται. Έτσι λοιπόν στον εμβολιασμό με την ανασυνδυασμένη prion πρωτεΐνη στα πειραματόζωα τουλάχιστον, υπήρχε καθυστέρηση τόσο της διεργασίας όσο και της εκδήλωσης της νόσου. Ο εμβολιασμός ήταν ενεργητικός και παθητικός. Ο παθητικός εμβολιασμός γινόταν με αντισώματα εναντίον της πρωτεΐνης P (epitopes 91-110 and 149-159) τα οποία σε πρακτικό επίπεδο σηματοδοτούσαν και την βιωσιμότητα των πειραματόζωων. Γενικότερα, ο παθητικός εμβολιασμός παρείχε μεγαλύτερη προστασία από τις νόσους που εμπλέκεται η prion πρωτεΐνη. (Polymenidou et al, 2004; Sigurdsson et al, 2002).

Τα πειράματα τα οποία πραγματοποιούνταν σε ζώα όταν προσπάθησαν να γίνουν πράξεις στη νόσο Alzheimer, δυστυχώς τα άτομα τα οποία συμμετείχαν εμφάνιζαν έντονα φλεγμονώδη φαινόμενα (σαν παρενέργειες), ειδικά στην μελέτη φάσης 2 με αποτέλεσμα τη διακοπή των θεραπευτικών πρωτοκόλλων για λόγους ασφαλείας.

Με βάση το άρθρο των Solforosi et al, (Solforosi et al.,2004), απευθείας ενδοεγκεφαλική έγχυση αντισωμάτων εναντίον του PrP και μάλιστα ενδοκοιλιακά, μπορεί να προκαλέσει εκφύλιση αρκετά έντονη στους νευρώνες του ιπποκάμπου και των άλλων νευρώνων της παρεγκεφαλίδα.

9. Άλλα νοσήματα τα οποία έχουν σχέση με την διαταραχή της δομής της πρωτεΐνης (protein misfolding diseases).

Γνωστές είναι διάφορες νευρολογικές και εκφυλιστικές παθήσεις όπως η νόσος του Alzheimer με τα ανάλογα κλινικά ‘φαινόμενα, η αιμολυτική αναιμία, η νόσος Huntington, η κυστική ίνωση, η amyotrophic lateral sclerosis δηλαδή η νόσος του κινητικού νευρώνα, ο διαβήτης τύπου II η δευτεροπαθής αμυλοείδωση, η Parkinson’s disease (PD) και διάφορες άλλες παθολογικές καταστάσεις. Υπόλοιπα νοσήματα είναι οι διαταραχές της τρανσθυρετίνης και της απολιποπρωτεΐνης A-I. Η τρανσθυρετίνη έχει σχέση με την οικογενή αμυλοειδική πολυνευροπάθεια τύπου I, τη διαταραχή των απολιποπρωτεϊνών A-I, A-II, A-IV, με την οικογενή αμυλοειδική πολυνευροπάθεια τύπου II,III κτλ. Η λακτοφερίνη, με την αμυλοείδωση του κερατοειδούς, διαταραχή των λυσοενζύμων με την αμυλοείδωση των λυσοσωμάτων. Άλλα ενδεικτικά είναι οι διαταραχές των βαρέων και των ελαφρών αλύσων της ανοσοσφαιρίνης η οποία αντανακλά στο νόσημα που ονομάζεται πρώιμη συστηματική αμυλοείδωση, η β2 μικρογλοβουλίνη, η οποία συνδυάζεται με την αμυλοείδωση συσχετιζόμενη με την αιμοδιάλυση. Υπάρχουν διαταραχές των υποδοχέων των ανδρογόνων συσχετιζόμενες με την νωτιαία αλλά και την προμηκική νωτιαία ατροφία και την λακτοφερίνη η οποία έχει σχέση με την αορτική αμυλοείδωση. Τέλος η αταξίνη στην νωτιοπαρεγκεφαλιδική αταξία και η ατροφίνη I με την οδοντοερυθροαχρολουζία ατροφία.

Τα πιο χαρακτηριστικά νοσήματα είναι η αμυλοείδωση, οι διαταραχές του αμυλοειδούς β που αντανακλά στη νόσο του Alzheimer με την μορφή της Dutch κληρονομικής αμυλοείδωσης, η tau-πάθεια που έχει σχέση με τη νόσο του Alzheimer, η prion πρωτεΐνη με τη σπογγώδη εγκεφαλοπάθεια και η α-συνουκλείνη με την Parkinson καθώς και με τη νόσο των διάχυτων σωματίων του Lewy. Τέλος χαρακτηριστική είναι η νόσος Huntington και η πλάγια μυατροφική σκλήρυνση λόγω διαταραχής της υπεροξειδικής δυσμουτάσης.

Στα νοσήματα αυτά το σημαντικό είναι η αλλαγή της δομής της πρωτεΐνης από την δευτεροταγή στην τεταρτοταγή δομή (Carrell and Cooptu, 1998; Soto, 2001).

Τα νοσήματα αυτά οφείλονται σε κακής αναδίπλωσης πρωτεΐνη η οποία είναι πλούσια στα β-ελάσματα με την δημιουργία της και την εναπόθεσή της στους ιστούς. Τα β-ελάσματα αποτελούνται από πεπτίδια τα οποία βρίσκονται με τη μορφή ευθειών πλούσια σε υδρογόνο. Το υδρογόνο συνδέεται στις αμινοτελικές (-NH₂) και καρβοξυτελικές (-COOH) ομάδες και δημιουργούν σύμπλοκα. Το υδρογόνο συνδέεται με τις δομές αυτές αλληλοεπιδρώντας τόσο με διαμοριακές όσο και ενδομοριακές δομές με αποτέλεσμα την συσσώρευση και την άθροιση της παθολογικής πρωτεΐνης.

Το τελικό προϊόν των παθολογικών πρωτεϊνών είναι η δημιουργία του αμυλοειδούς, το οποίο είναι εξωκυτταρική πρωτεΐνη. Αποτελεί κύρια αιτία των νευροινδιακών πλακών στην νόσο του Alzheimer και στις άλλες εκφυλιστικές καταστάσεις.

Από παθολογοανατομικής ή από ιστολογικής πλευράς είναι δομή η οποία είναι ευθεία, συνδέεται με το ερυθρό του Congo και με την θειοφλαβίνη S, είναι ανθεκτική στην αποδόμηση μέσω πρωτεόλυσης και έχει εμφάνιση πολλαπλών ινιδίων καλά ορατών από το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (είναι μία ευθεία 10 nm φαρδύ ινίδιο) (Glennner, 1980; Sipe and Cohen, 2000). Οι μεταλλάξεις των γονιδίων αυτών καθώς και της εναπόθεσης των ινιδίων στους διάφορους ιστούς έχουν γενετικό υπόβαθρο.

Οι οικογενείς μορφές των νοσημάτων έχουν την ιδιομορφία τα συμπτώματα να εμφανίζονται σε μικρή ηλικία στους ασθενείς. Επιπλέον οι μεταλλάξεις αποσταθεροποιούν την δομή της πρωτεΐνης. Οι παθολογικές μορφές εναποτίθενται στο εγκεφαλικό παρέγχυμα με αποτέλεσμα να έχουμε άνοια και άλλες καταστάσεις [εναπόθεση στο οπτικό νεύρο οδηγεί σε οπτική ατροφία, εναπόθεση στο εγκεφαλικό παρέγχυμα δευτεροπαθώς δημιουργεί εικόνα αστρογλοίωσης και εμφάνιση μικροσκοπικών (ουλών)]. Το κλινικό αποτέλεσμα είναι η άνοια. Η α-συνουκλείνη καθορίζει σε μεγάλο βαθμό την εναπόθεση των σωματίων του Lewy μέσα στους νευρώνες του νέου φλοιού του ιπποκάμπου, της μέλαινας ουσίας, ενώ δευτεροπαθώς οδηγεί σε απώλεια της σύνθεσης ή της ντοπαμίνης η οποία αποδομείται στο τέρμα των νευρώνων στα βασικά γάγγλια (ελάττωση αυτής οδηγεί σε διαταραχή του εξωπυραμιδικού συστήματος με κινητικές διαταραχές). (Masliah et al, 2000). Εναπόθεση στο εγκεφαλικό παρέγχυμα δημιουργεί σωματίια τα οποία περιέχουν υαλίνη ή έγκλειστα υαλίνης, οδηγούν σε εκφυλισμό των νευρικών κυττάρων όπως π.χ. του

νεοφλοιού καθώς και των νευραξόνων με αποτέλεσμα τη βλάβη περιφερικά στους μύες στην απονεύρωση των μυών και μυϊκή ατροφία. Στην μικροσκοπική εξέταση του παρασκευάσματος υπάρχει καταστροφή των αστροκυττάρων. Στο κεντρικό και περιφερικό νευρικό σύστημα αυτό μεταφράζεται με απομυελίνωση των μακρών και μεγάλων εμμύλων ινών με αποτέλεσμα καταστροφή της μυϊκής μάζας λόγω ατελούς εννεύρωσης. Στα διαγονιδιακά ποντίκια στα οποία υπάρχει επανάληψη της τριπλέτας ,κυτοσίνης, αδενίνης και γουανίνης στο 115-156, υπάρχει επιμήκυνση των τρινουκλεοτιδικών αυτών αλυσίδων με αποτέλεσμα την έκφραση της νόσου του Huntington (Scherzinger et al, 1997).

Οι παθολογικές πρωτεΐνες διακρίνονται από μειωμένη διαλυτότητα και λόγω της εμφάνισης μη κρυσταλλικής δομής, η άθροισή τους είναι δύσκολη γενικότερα να μελετηθεί. Παρ'όλα αυτά χρησιμοποιώντας νέες μεθόδους και X-ray δηλαδή ακτίνες X fiber diffraction και solid-state NMR μπορούν να απεικονιστούν οι β δομές. Εξάιρεση αποτελεί η tau πρωτεΐνη που εναποτίθεται και αυξάνεται σε συγκέντρωση. Για τη διεργασία αυτή είναι απαραίτητη η παρουσία της α-ελικάσης (α-helices). Συνήθως χρησιμοποιείται κυκλικός δίχρωματισμός ή δίχρωμα κυκλικά μόρια και σπεκτροσκοπία ή φασματοσκοπία του Fourier (Serpell et al., 2000 and Sadqi et al., 2002).

Οι μηχανισμοί οι οποίοι οδηγούν στην κακής αναδίπλωσης πρωτεΐνη και στην συσσώρευση αυτών, είναι πρωτεΐνες στις οποίες η κακή αναδίπλωση και η συσσώρευση μιας ατελούς πολυπεπτιδικής αλυσίδας είναι αποτέλεσμα αλληλεπίδρασης μεταξύ υδρόφοβων ομάδων. Οι πρωτότυπες πρωτεΐνες όπως π.χ. αυτές που εμπλέκονται στην νόσο του Alzheimer όπως είναι το αμυλοειδές β (Aβ) και στη νόσο του Parkinson, η α-συνουκλείνη και η prion πρωτεΐνη που οδηγεί στην σπογγώδη εγκεφαλοπάθεια υπάγονται στις κατηγορίες αυτές (Soto et al., 1994).

Επιπλέον μηχανισμό αποτελεί η πρωτεΐνη στην οποία υπάρχει πλημμελής αναδίπλωση και άθροιση αυτών όπου συνήθως οδηγούν σε δευτεροπαθείς αλλοιώσεις. Οι νόσοι που εμπλέκονται: διαταραχή της τρανσθυρετίνης, υπεροξειδική δυσμουτάση (SOD1) που έχει σχέση με την νωτιαία μυϊκή ατροφία με τη νόσο του ALS και νόσοι των ελαφρών αλύσων των ανοσοσφαιρινών που έχουν σχέση με την πρόωμη αμυλοείδωση.

Η εναπόθεση της πολυγλουταμινικής αλυσίδας [της επανάληψης των τριπλετών κυτοσίνης αδενίνης γουανίνης (CAG)] οδηγεί στη νόσο Huntington. (Zoghbi and Orr,

2000). Εκτός από τη νόσο αυτή έχουμε και τις νωτιοπαρεγκεφαλιδικές εκφυλίσεις. Η συσσώρευση της χαντικτίνης και της αταξίνης σε *in vitro* καταστάσεις εξαρτώνται από το μήκος των πολυγλουταμινικών επαναλήψεων (Scherzinger et al, 1997). Τόσο το γλουταμινικό όσο και η ασπαραγίνη έχουν ομάδα αμιδίου η οποία είναι στην άκρη της αλυσίδας και συνδέεται με την ομάδα του υδρογόνου.

Το τέρμα της σύνδεσης λέγεται <<polar zipper>> (Perutz et al., 1994). Υπάρχει διπλή σύνδεση μεταξύ του υδρογόνου, της καρβοξυλικής ομάδας και της αμινικής ομάδας. Έτσι λοιπόν τα πεπτίδια αυτά συνδέονται μεταξύ τους και γίνεται η πολυγλουταμινική επέκταση. Το τελικό προϊόν είναι η λάθος αναδιπλούμενη πρωτεΐνη.

9.1 Κινητική και αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πρωτεϊνών με λάθος αναδίπλωση και της άθροισης αυτών.

Η δημιουργία της παθολογικής πρωτεΐνης και των ολιγομερών σχετίζεται με τη δημιουργία ενός πυρήνα από τα ολιγομερή (στα οποία τελικώς εναποτίθενται επιπλέον μόρια). Όταν έχουμε μεγάλο αριθμό πολυμερών τα οποία εναποτίθενται στα ενδοκυττάρια και στα εξωκυττάρια τμήματα οδηγούν στη δημιουργία της παθολογίας. (Harper and Lansbury, 1997).

Δύο ενδιάμεσα βιοχημικά μονοπάτια μετατρέπουν τα πρώτα μονομερή των πρωτεϊνών σε παθολογική πρωτεΐνη (η οποία εναποτίθεται με τη μορφή των ινιδίων *in vitro*). Ο πρώτος ενδιάμεσος παράγοντας είναι διαλυτός, χαμηλού μοριακού βάρους ολιγομερές ενώ οι δομές αυτές έχουν βρεθεί εργαστηριακά σε διάφορα βιολογικά υγρά όπως είναι π.χ. το εγκεφαλονωτιαίο υγρό το οποίο αντανακλά τη βιοχημεία του εγκεφάλου. (Levine III, 1995; Kuo et al., 1996). Οι διάμεσες δομές είναι unstable (ασταθείς). Όταν υπάρχει ο πυρήνας των ολιγομερών και αύξηση του αριθμού τους εναποτίθενται στον εγκέφαλο προκαλώντας τη περαιτέρω βλάβη (Caughey and Lansbury, 2003).

Τα πρωτοινίδια είναι πολυμερή με πλάτος 3-6 nm τα οποία εμφανίζονται χωρίς βραχίονα και έχουν μήκος 10 nm (Harper et al., 1999). Βρίσκονται σε ισορροπία με τα ολιγομερή των πρωτεϊνών και είναι πρόιμη μορφή των ινιδίων του αμυλοειδούς. Επιπλέον είναι πλούσια στα β-ελάσματα και συνδέονται με διάφορους παράγοντες, ειδικοί για το αμυλοειδές όπως π.χ. το ερυθρό του Congo και η θειοφλαβίνη T (Walsh et al., 1999).

Η αλληλεπίδραση των παθολογικών αυτών πρωτεϊνών.

Όλες αυτές οι πρωτεΐνες αλληλοεπιδρούν μεταξύ τους και επηρεάζει η μία την δημιουργία της άλλης. Το αμυλοειδές αθροίζεται ενδοκυτταρίως με αποτέλεσμα τις δημιουργίες των νευροινδιακών πλακών οι οποίες αποτελούνται από στοιχεία που έχουν υπερφοσφορρωλειωθεί και χαρακτηρίζονται σαν πρωτεΐνη tau.

Στα διαγονιδιακά ποντίκια έγινε η μελέτη της ανθρώπινης APP (amyloid polypeptide) και της tau πρωτεΐνης (Oddo et al., 2003).

9.2 Είναι τα prions κοινό φαινόμενο στη βιολογία ;

Η prion πρωτεΐνη μελετήθηκε πρώτη φορά στους ζυμομύκητες. (Lindquist, 1997 and Wickner et al.1999). Υπάρχουν μοριακοί μηχανισμοί όπου τα prions αντιγράφονται και μέσω της μεταγραφής πολλαπλασιάζονται.

Τα prions στους ζυμομύκητες.

Το 1994 ο Reed Wickner μελέτησε τις prion πρωτεΐνες οι οποίες προερχόταν από τους ζυμομύκητες και παρατήρησε ότι η μετάδοσή τους ήταν ασυνήθης και μεταφερόταν με το μη κλασικό μενδελικό πρότυπο. Ενώ η μετάδοση των prions αφορούσε σε δύο γενετικά στοιχεία τα οποία χαρακτηρίστηκαν σαν (URE3) και (PSI+). Βιοχημικά η Sup35p παίζει καθοριστικό ρόλο στο μεταγραφικό τέρμα, ενώ η Ure2p στη ρύθμιση του μεταβολισμού του αζώτου. (*H URE3 και η PSI+ είναι πρόδρομες μορφές των Ure2p και Sup35p) (Lindquist, 1997; Masison, 2000).

Ο φαινότυπος των prion πρωτεϊνών στη μαγιά προκαλείται από την εναπόθεση των παθολογικών misfolded πρωτεϊνών με αποτέλεσμα να οδηγείται στην κυτταρική απόπτωση. Για παράδειγμα η πρωτεΐνη Sup35p συμμετέχει στην μετάφραση με αποτέλεσμα η συσσώρευσή της σε διάφορους ιστούς να καταστρέψει την φυσιολογική λειτουργικότητα τους και τελικώς να μετατραπεί σε prion πρωτεΐνη.

Τα prions που βρίσκονται στους ζυμομύκητες μπορούν να χαρακτηριστούν σαν πρωτεΐνες με λοιμογόνο ικανότητα και κληρονομούνται με μη μενδελικό τρόπο (μετάδοση βιολογικών πληροφοριών σε απουσία νουκλεϊκών οξέων). Στην μαγιά τα prions δεν μεταφέρονται από κύτταρο σε κύτταρο και δεν είναι θανατηφόρα για γειτονικά τους κύτταρα. Κληρονομούνται συνήθως στα κύτταρα τα οποία έχουν σχέση με θυγατρικά προϊόντα. Αντιθέτως στα θηλαστικά τα prions μεταδίδονται μετά τη μετατροπή τους στη παθολογική μορφή. Οπότε η μεταβίβαση γίνεται τελικά επιγενετικά και δευτεροπαθώς. Η δομή των πρωτεϊνών αυτών που μετατρέπονται

δευτερογενώς είναι μοναδική με την έννοια ότι τα νουκλειικά οξέα δρουν σαν μεταδοτικοί παράγοντες.

Οι δομικές αλλοιώσεις δίνουν την μοναδικότητα στις prion πρωτεΐνες. (Uptain and Lindquist, 2002; Wickner et al, 2004). Υπερπαραγωγή μιας φυσιολογικής πρωτεΐνης αυξάνει σποραδικά την εμφάνιση των prion μορφών. Ο prion φαινότυπος είναι δυνατόν να μετατραπεί μέσω της αποδόμησης των πρωτεϊνών, όμως επανεμφανίζεται αυθόρμητα μετά από την μετατροπή τους στη παθολογική μορφή. Η prion πρωτεΐνη είναι δύο μορφών. Πρώτον μία διαλυτή η οποία είναι φυσιολογική και ευαίσθητη στη πρωτεάση και δεύτερον μία μη διαλυτή μορφή. Η αδιάλυτη συσσωρεύεται σε συσσωματώματα και εναποτίθεται στους ιστούς. Στην αναπαραγωγή της prion σε in vitro καταστάσεις όταν χρησιμοποιούνται πολύ υψηλής κάθαρσης πρωτεΐνες, μέσω εναπόθεσης στα κύτταρα αλλάζουν τον φαινότυπο των πρωτεϊνών. Η διαδικασία της αντιγραφής συνήθως γίνεται με έναν τρόπο που προσομοιάζει με αλληλουχία μετά από αρκετές μετατροπές μιμούμενες πλέον τις παθολογικές πρωτεΐνες οι οποίες καθώς πολλαπλασιάζονται εναποτίθενται πλέον στους ιστούς.

Η δομή prion που χαρακτηρίστηκε σαν Sup35p είναι μεταδοτική και θεωρείται ότι είναι αποτέλεσμα επιγενετικής μετάλλαξης. Μέσω μίας διαδικασίας διάχυσης στα κύτταρα των θηλαστικών εκδηλώνει την τοξικότητα της στους φυσιολογικούς ιστούς.

9.3 Είναι τελικά τα prions μέρος μιας φυσιολογικής βιολογικής διεργασίας και ένα κοινό φαινόμενο στη βιολογία και ποια η σημασία αυτών ;

Το sup35p παίζει σημαντικό ρόλο στον τερματισμό της μεταγραφής ενώ το Ure2p παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση του μεταβολισμού του αζώτου. Το sup35p είναι μέρος του τερματισμού της μετάφρασης το οποίο τελικά δημιουργεί τις απαραίτητες συνθήκες για την εναπόθεση τόσο των prion strains και των παραγώγων τα οποία ομοιάζουν με το β-αμυλοειδές.

Οι φυσιολογικές κυτταρικές διεργασίες αφορούν στη συμμετοχή της συναπτικής διαβίβασης μέσω μηνυμάτων της διακυτταρικής επικοινωνίας και της πλαστικότητας. Συμμετέχουν στην διεργασία της μνήμης και στην σταθεροποίηση των σταδίων του ύπνου. Καταστέλλουν την κυτταρική διεγερσιμότητα μέσω της αλληλεπίδρασης της PrP^C με την Dipeptidyl peptidase-like 6 (DPP6) της υποομάδας των voltage-gated potassium channel 4.2 (Kv4.2), καθώς και της καταστολής του sAHP (slow after hyperpolarization) το οποίο ανευρίσκεται στην PrPC-deficient mice. Άλλη

φυσιολογική διεργασία είναι η ομοιόσταση του ασβεστίου (Mercer et al., 2013 and King et al., 2015). Τα φυσιολογικά prions δρουν προστατευτικά στην εμφάνιση επιληπτικών κρίσεων που έχουν σχέση με την διαταραχή του μεταβολισμού του καινικού οξέος, ενώ δρουν κατασταλτικά στα ιόντα ή στους διαύλους του ασβεστίου (voltage-gated calcium channel:VGCC). Αυξάνει την συγκέντρωση του κυκλοφορούντος ασβεστίου με βάση το φαινότυπο της prNp^{-/-} model system.(Striebel et al., 2013). Επιπλέον φαίνεται ότι τα prions έχουν σχέση με τη λειτουργία του γλουταμινικού οξέος. Σε κυτταρικό επίπεδο προκαλούν υπερδιεγερσιμότητα των νευρώνων με τη μορφή εκφορτίσεων μέσω αλλαγής δυναμικού ενεργείας και ηρεμίας της επιφάνειας της κυτταρικής μεμβράνης. Έτσι λοιπόν το NMDA(N-methyl-D-aspartate) συγκαταλέγεται στους διεγερτικούς νευρομεταβιβαστές. Σαν διπλή δράση έχει την ιδιότητα νευροτρόφου παράγοντα στην ιστική-νευρωνική πλαστικότητα. Από την άλλη στην αύξηση της συγκέντρωσης των παθολογικών prion δρουν τοξικά όπως προαναφέρθηκε μέσω εναπόθεσης διαφόρων ολιγομερών αμυλοειδούς. Σε μείωση της νευροπροστατευτικής δράσης (στις παθολογικές μορφές των prion πρωτεϊνών) σε διάφορα πειράματα όπως π.χ. σε περιοχές του εγκεφάλου οι οποίες έχουν υποστεί οξεία ισχαιμία, ελαττώνεται η δραστηριότητα της υπεροξειδικής δισμουτάσης. Η παθολογική μορφή έχει σαν αποτέλεσμα την διαταραχή του μεταβολισμού του χαλκού, του ψευδαργύρου, του σιδήρου καθώς και των γαλακτικών. Τέλος μεταφράζεται σε καταστολή της εναπόθεσης και της παραγωγής των ιόντων του ψευδαργύρου. Αντιθέτως αυξάνεται η δράση του γαλακτικού οξέος σε διάφορους κυτταρικούς πληθυσμούς όπως π.χ. στα αστροκύτταρα. Μειώνει το μεταβολισμό ή παρεμβαίνει στον μεταβολισμό του σιδήρου καθώς και του χαλκού και τέλος σε σχέση με το κεντρικό και περιφερικό νευρικό σύστημα έχουμε την εικόνα της απομυελινωτικής νευροπάθειας.

Στη παρουσία συγκεκριμένων γονιδίων και αντισωμάτων είναι απαραίτητη πάντοτε η φυσιολογική μορφή για την μετατροπή τελικώς μέσω διαφόρων παθολογικών καταστάσεων στην παθολογική μορφή (PrP^{Sc}). Υπερπαραγωγή της φυσιολογικής πρωτεΐνης αυξάνει με άγνωστο μηχανισμό την ευαισθησία με αποτέλεσμα να εμφανιστούν παθολογικές μορφές των prion πρωτεϊνών, με τρόπο μάλλον αυθόρμητο και τυχαίο. Ο φαινότυπος των prion είναι δυνατόν να αλλάξει και έτσι να έχουμε καταστροφή των φυσιολογικών πρωτεϊνών. Σε διάφορες μορφές των πρωτεϊνών και σε *in vitro* μελέτες φαίνεται ότι prion πρωτεΐνες μετατρέπονται σε παθολογικές μέσω της

δράσης πλέον διαφόρων εξωγενών παραγόντων. Η αντιγραφή της παθολογικής πρωτεΐνης είναι το έναυσμα της παθολογικής διεργασίας. Το sup35p παίζει σημαντικό ρόλο στο τερματισμό της μετάφρασης. Έχει παρατηρηθεί ότι σε nonprion κατάσταση (PSI-), η διαλυτή Sup35 συνδέεται με την Sup45 με αποτέλεσμα να δημιουργεί σύμπλοκο το οποίο συνδέεται με αλληλουχία του Mpa. Το σύμπλοκο αυτό κωδικοποιεί την τερματική περιοχή της μετάφρασης και τελικώς η διεργασία αυτή να λαμβάνει τέλος.

Σε κατάσταση prion (termed PSI+) το Sup35 έχει σχέση με την λάθος αναδιπλούμενη πρωτεΐνη. Αυτό το σύμπλοκο δεν είναι ικανό να προκαλέσει τερματισμό της μετάφρασης με αποτέλεσμα να έχουμε την παράταση της δημιουργίας των παθολογικών πρωτεϊνών και της συσσώρευσής τους.

Το Ure2p έχει σχέση με τη ρύθμιση του μεταβολισμού του αζώτου και σε non prion κατάσταση (ure-o), η διαλυτή Ure2p αλληλοεπιδρά με το Gln3, με αποτέλεσμα να προστατεύει την μεταφορά μέσα στο κύτταρο και εντός του πυρήνα και να επιδρά στην μεταγραφή DAL5 γονιδίου. Στην prion όμως κατάσταση (Ure3, Ure2p) το αμυλοειδές μετατρέπεται σε ίνες ή σε πλάκες τα οποία αλληλοεπιδρούν με το Gln3, το οποίο ωθεί στην μεταγραφή του DAL5 γονιδίου.

Πόσο κοινό είναι το prion φαινόμενο στη φύση ?

Οι prion πρωτεΐνες όπως αναφέρθηκε, λαμβάνουν μέρος σε φυσιολογικές κυτταρικές διεργασίες. Σε ενδιαφέρουσες μελέτες του Kandel και των συνεργατών του βρέθηκαν τμήματα τα οποία έμοιαζαν με τις prion πρωτεΐνες (prion-like properties) σε νευρωνικές δομές του CPEB family (cytoplasmic polyadenylation element binding protein). Η οικογένεια CPEB συμμετείχε στη μετάφραση του mRNA (Si et al., 2003).

ΟΙ ίδιοι συγγραφείς υπέθεσαν ότι το CPEB μιας prion-like δομής συμμετείχε τελικά στις διάφορες συνάψεις και αλλαγές, σε σχέση με τις διεργασίες ή τη λειτουργία της μνήμης. Άλλες περιοχές που είναι πλούσιες σε ασπαραγίνη και γλουταμινικό στους ζυμομύκητες συμμετείχαν στα διάφορα τμήματα των συγκεκριμένων πρωτεϊνών.

Ο Dopson και οι συνεργάτες του υπέθεσαν ότι διάφορες πρωτεΐνες οι οποίες είναι δυνατόν να δημιουργήσουν β-ελάσματα και οι οποίες προκαλούν διάφορες διαμοριακές αλληλεπιδράσεις τελικώς δημιουργούν σύμπλοκα (Stefani and Dobson, 2003).

10. Τα πειραματικά μοντέλα και τα θεραπευτικά πρωτόκολλα.

10.1 Τα ζωικά μοντέλα των prion παθήσεων: από τους πιθήκους στα έντομα.

Μετάδοση της ανθρώπινης prion νόσου στα πρωτεύοντα θηλαστικά .

Η λογική και η φιλοσοφία των πειραμάτων αυτών έγινε δεδομένου ότι ο ενοφθαλμισμός των παραγώγων ή ακόμη και των εκχυλισμάτων-ιστών του εγκεφάλου από τον άνθρωπο στα διάφορα άλλα ζώα αλλά όμως και το αντίθετο, είναι δυνατόν να προκαλέσουν νόσο η οποία μοιάζει με τη σπογγώδη εγκεφαλοπάθεια. Η prion πρωτεΐνη τελικά είναι μία ζωνόσος, μεταδίδεται από άνθρωπο σε άνθρωπο, από βοοειδή σε άνθρωπο αλλά και σε άλλα πρωτεύοντα έχοντας κάποιους φραγμούς μεταξύ των διαφόρων ειδών. Η μετάδοση της νόσου στα διάφορα πειραματόζωα γίνεται μέσω της βρώσης μολυσματικών υλικών όπως φάνηκε αργότερα με την επιδημία που είχε ξεσπάσει με την σπογγώδη εγκεφαλοπάθεια των βοοειδών . Ο πίθηκος *Cynomolgus macaque monkey* είναι από τις πιο δημοφιλείς επιλογές για τη μετάδοση στα εργαστήρια της prion νόσου.

Επίσης σημαντικά μοντέλα είναι τα τρωκτικά (χάμστερς, mice) τα οποία είναι τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα πειραματόζωα στη δεκαετία του 1970. Στη συνέχεια αφού εισήχθη πλέον και η γενετική στην αποσαφήνιση της νόσου και γύρω στο μέσον της δεκαετίας του 90' μελετήθηκαν διάφορα διαγονιδιακά πειραματόζωα με γενετικές τροποποιήσεις όπως π.χ. με την χρησιμοποίηση των gene knock-out μοντέλων, που διαλεύκανε την φύση της έκφρασης και της δημιουργίας της νόσου μέσω της παθολογικής prion πρωτεΐνης και φυσικά του prnp γονιδίου. Άλλα τρωκτικά τα οποία χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα Wild-type Syrian golden hamsters τα οποία μελετήθηκαν το 1970 (Jendroska, 1991 and Kimberlin, 1989).

Τις τελευταίες δεκαετίες έγιναν πειράματα στους αρουραίους (bank vole) όπου βρέθηκε ότι η prion πρωτεΐνη και το κωδικόνιο 109 της prion πρωτεΐνης (μεθειονίνη ή ισολευκίνη) είχαν αντικατασταθεί, με αποτέλεσμα έτσι στους αρουραίους να εκδηλώνεται πλέον η νόσος (CJD) (Watts, 2014). Όταν υπήρχε η μετάδοση των prions που προκαλούσαν τη σποραδική νόσο του CJD υπήρχε ομόζυγη μορφή μεταξύ της μεθειονίνης-μεθειονίνης 1, μεθειονίνης-βαλίνης 1, μεθειονίνης-μεθειονίνης 2, μεθειονίνης-βαλίνης 2 και βαλίνης-βαλίνης 2 (Parchi et al., 1999).

Ta inbred strains of wild-type mice.

Τα πιο κοινά πειραματόζωα που μελετήθηκαν σε εργαστηριακό επίπεδο ήταν το C57B1/6L, C57B1/6N, C57BL/10, FVB, 129/Ola. Και άλλες λιγότερο χρησιμοποιούμενες σειρές όπως είναι οι RIII, VM, NZW και CD1.

Τελικά δημιουργήθηκαν σε πειραματικό επίπεδο πλέον τα humanised transgenic mice δηλαδή τα εξανθρωποποιημένα ποντίκια με αποτέλεσμα να υπάρχει μεγαλύτερη δυνατότητα για την χαρτογράφηση των διαγονιδίων αλλά και των περιοχών των prion πρωτεϊνών που τελικά ήταν εκείνα τα οποία μεταδιδόταν και σε άλλα είδη και φυσικά ξέφευγαν από τον λεγόμενο φραγμό μεταξύ των ειδών (Striebel, 2011).

PrP knock-out mice (PrP-null mouse, prnp0/0):

Υπήρχαν 7 διαφορετικά prnp0/0 models. Έτσι φάνηκε ότι στα μοντέλα αυτά και επί απουσίας διαφόρων περιοχών του prnp τελικώς δεν εκφραζόταν το τελικό προϊόν το οποίο ήταν η φυσιολογική πρωτεΐνη PrP^C. Τα μοντέλα τα οποία είχαν ανακοινωθεί ήταν με το όνομα της Ζυρίχης. Τα μοντέλα τα οποία ονομαζόταν Nagasaki (Ngsh prnp0/0) εμφάνιζαν κλινικά τόσο αταξία μέσω της προϊούσας διαταραχής και απώλειας των παρεγκεφαλιδικών κυττάρων του Purkinje.

Η διαταραχή προκλήθηκε από την απαλοιφή του υποδοχέα του intron2, του γονιδίου της prnp πρωτεΐνης με αποτέλεσμα να έχουμε την υπερπαραγωγή του μεταγραφέντος γονιδίου και της πρωτεΐνης που ονομαζόταν Doppel ή Dpl (Manson, 1994).

Υπάρχουν ευρήματα τα οποία βασίστηκαν στη μελέτη των εμβρυικών βλαστοκυττάρων τα οποία συμμετείχαν στη μετάδοση της prion πρωτεΐνης αλλά και της μελέτης του prnp0/0 ποντικών. Χρησιμοποιώντας γονιδιακή καταγραφή gene editing του C57BL/6J γονιμοποιημένα ωάρια καθώς και μία νέα prnp0/0 πρωτεΐνη και ποντίκια τα οποία ονομαζόταν φυσικά PrnpZH3/ZH3 ήταν εκείνα τα οποία προκαλούσαν καταστροφή μέσω απομυελίνωσης των περιφερικών νεύρων (Nuvolone, 2016).

Διαγονιδιακή έκφραση ανθρώπινης PRNP σε στελέχη ποντικών τύπου prnp0/0: ένα άλμα προς την κατανόηση της prion νόσου. (Human PRNP transgenesis on the background of prnp0/0 mice: a leap to understand human prion disease).

Υπάρχουν τουλάχιστον 45 στελέχη από εξανθρωποποιημένα ποντίκια τα οποία τελικά χαρακτηρίζονται από έναν συνδυασμό μεταξύ διαγονιδιακών μεταλλάξεων και γονιδιακών στόχων σε φορείς της μετάλλαξης της *Prnp0/0*. Μεταφέρουν μόνο τις παθολογικές μεταλλάξεις στο κωδικόνιο 129 (και πιο πρόσφατα φαίνεται τόσο στο κωδόνιο 219 αλλά και στο 127) όπου γουανίνη G>V (βαλίνη), υπάρχει δηλαδή η αντικατάσταση αυτή στο *Prnp* γονίδιο. (Asante et al., 2015)

Υπάρχουν επίσης μελέτες οι οποίες χρησιμοποιούν σαν βάση σειρές όπως είναι η 129V (βαλίνη) (Tg152) ή 129M line (Tg35) τα οποία είναι πειραματικά τουλάχιστον στην βάση FVB/N, C57BL 129Sv με αποτέλεσμα να υπάρχουν παθολογικές διεργασίες στη συγκεκριμένη πρωτεΐνη. (Asante et al., 2002)

Διάφορες συγκρίσεις μεταξύ των διαφόρων αυτών σειρών των διαγονιδιακών ποντικών φαινόταν είχαν διαφορετική έκφραση της *Prion* πρωτεΐνης. Για παράδειγμα το Tg650 mice (HuM129), 6 φορές εμφάνιζε μεγαλύτερη έκφραση της *Prp* όταν αυτή ενοφθαλμιζόταν με *Prions* πρωτεΐνη και δημιουργούσε τα νευρολογικά συμπτώματα σε ένα ποσοστό σχεδόν 100%. (Beringue, 2008).

Χιμαιρικά πρότυπα ανθρώπινης νόσου σε ποντίκια τύπου *Prnp0/0*. (Chimeric human/mouse models on the background of *Prnp0/0* mouse).

Σε 20 διαφορετικά μοντέλα χιμαιρικών ποντικών τα οποία χαρακτηριζόταν σαν MHu2M (25% ήταν τα τρωκτικά-ποντικοί, 50% ήταν ανθρώπειο γενετικό υλικό και 25% ήταν αλληλουχία βάσεων ξανά των ποντικών). Αυτές οι σειρές διέφεραν μεταξύ των γονιδίων ή της αλληλουχίας των ανθρώπων και των ποντικών περίπου σε ένα αμινοξύ με αποτέλεσμα να υπάρχει διαφορετική έκφραση μεταξύ του ενοφθαλμισμού και της περιόδου επώασης και της εκδήλωσης της νόσου. (Giles, 2012).

Conditional knock-out knock-in models: the Cre-lox P system.

Το σύστημα Cre/lox P ανασυνδυασμένο σύστημα ήταν εκείνο το οποίο κατά περίπτωση προκαλούσε τόσο καταστολή αλλά και επαγωγή της έκφρασης των γονιδίων με αποτέλεσμα να αλλάζει η έκφραση των κλινικά εμφανιζόμενων συμπτωμάτων σε έδαφος διαφορετικής εκδήλωσης των νευροπαθολογικών αλλοιώσεων.

Το Cre-lox P system ήταν τελικά ένα σύστημα το οποίο δημιουργούσε μία χιμαιρική κατάσταση δηλαδή ήταν γενετικό υλικό το οποίο δημιουργούσε εξανθρωποποιημένη

prion στα ποντίκια. Υπήρχε η δυνατότητα της μελέτης των διαλυτών διμερών PrP δηλαδή των διμερών της PrP^C-PrP^{Sc}. (Kitamoto, 1996 and Meier, 2003).

Μεταλλάξεις του PrP: απαλοιφές και σημειακές μεταλλάξεις.

Η μελέτη μετά τη δημιουργία τόσο της φυσιολογικής όσο και της παθολογικής μορφής των prion πρωτεϊνών: έκφραση της πλήρους δομής, της μερικώς διαγεγραμμένης ή της prion στην οποία έχει γίνει απαλοιφή ή της ιστοειδικής prp πρωτεΐνης. Η φιλοσοφία είναι η επανεισαγωγή της πλήρους μεγέθους και μήκους prion πρωτεΐνης μέσα σε prnp0/0 ποντίκια. Έχει αποδείξει ότι οδηγεί στην παραγωγή αλλά και στην αύξηση της εναπόθεσης της prion πρωτεΐνης στους ιστούς.

Τα ποντίκια στα οποία έχει γίνει εισαγωγή της πλήρους μορφής PrP σχεδιάστηκαν και χαρακτηρίστηκαν σαν Tga20. Ο ενοφθαλμισμός των Tga20 ποντικών με RML prion πρωτεϊνών είχε σαν αποτέλεσμα να προκαλέσει εμφάνιση της νόσου σε βραχύ χρονικό διάστημα, στη διάρκεια περίπου των 60 ημερών. Άρα ο ενοφθαλμισμός αυτός δημιούργησε καταστάσεις έτσι ώστε να έχουμε αφενός μεν τη γρήγορη εμφάνιση της νόσου και αφετέρου στα wild type ποντίκια να εκφράζεται πολύ πιο ήπια η νόσος. Στα wild type ποντίκια η έκφραση ήταν μέσα σε δύο σειρές των prnp. Σε αντίθεση τα ετερόζυγα ποντίκια τα οποία εξέφραζαν μόνο ένα αλληλίο της prnp (Prnp+/0) είχαν αυξημένη διάρκεια ενοφθαλμισμού. (Fischer, 1996).

Μεταλλαγμένη μορφή της PrP: απαλοιφές καθώς και σημειακές μεταλλάξεις.

Σε σχέση με την επανέκφραση της πλήρους μορφής της prion, ο Fischer et al 1996, δημιούργησε διάφορες μεταλλαγμένες μορφές της prnp πρωτεΐνης και έδωσε σημασία ιδιαίτερα στα τερματικά των αμινοξέων με αποτέλεσμα να μελετά στη συνέχεια τις διάφορες σειρές των απαλοιφών των αμινοξέων. Οι μελέτες αυτές γινόταν με βάση την ανάγνωση των διαφόρων πλαισίων. Πλαίσια στα οποία έχουν γίνει απαλοιφές των διαφόρων αμινοομάδων (Δ32-93, Δ32-106, Δ32-121, Δ32-134). Με βάση τις απαλοιφές αυτές υπήρχαν διάφορα αποτελέσματα όπως π.χ. ένας φαινότυπος της νόσου ιδιαίτερα ,με μία προϊούσα παρεγκεφαλιδική αταξία σε έδαφος παρεγκεφαλιδικής εκφύλισης ιδιαίτερα των σειρών Δ32-121, Δ32-134. (Hill, 1997).

Έμφαση δόθηκε στο γεγονός ότι κατά την δημιουργία των prion πρωτεϊνών με βάση τα διάφορα ετεροδιμερή και την Doppel πρωτεΐνη, η οποία αλληλοεπιδρούσε με την

PrP, είχε σαν αποτέλεσμα την ύπαρξη μιας μεταλλαγμένης πρωτεΐνης. Ο στόχος είναι στις μεταλλαγμένες μορφές της prnp πρωτεΐνες καθώς και τις μελέτες του ανοιχτού αναγνωστικού πλαισίου να δημιουργηθεί μία prion πρωτεΐνη η οποία να αφορά βέβαια στους ανθρώπους. Σε πλαίσιο 144 βάσεων και της εισόδου αυτών μέσα στο ανοιχτό αναγνωστικό πλαίσιο της prnp πρωτεΐνης καθώς και του γονιδίου 6-οκταπεπτιδικών επαναλήψεων των OPRI, έχουν σχέση με την οικογενή μορφή της νόσου CJD. Οι μορφές των prion πρωτεϊνών καθώς και των υπότυπων αυτών όπως η P102L έχουν σχέση με το σύνδρομο του Gerstmann Scheinker Straussler. (Owen, 1989).

Διαγονιδιακά ποντίκια και η έκφραση της prion πρωτεΐνης και της αλληλουχίας αυτής σε μη ανθρώπινα είδη.

Τα διαγονιδιακά ποντίκια τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για το πειραματικό αυτό μοντέλο περιείχαν τα Syrian golden hamsters και έγιναν για πρώτη φορά το 1989.

Στη συγκεκριμένη περίπτωση στο πειραματικό μοντέλο δημιουργήθηκε η prion σπογγώδης εγκεφαλοπάθεια και μάλιστα από ότι φαίνεται στα συγκεκριμένα είδη η εναπόθεση των prion γινόταν όχι μόνο στους νευρώνες αλλά και στα άλλα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος και στην μικρογλοία. (Scott et al., 1989).

Νηματοειδή και έντομα

Τα έντομα τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για να μελετηθούν αυτά τα νευροεκφυλιστικά νοσήματα ήταν τα νηματοειδή όπως το *C. elegans* καθώς και οι μύγες όπως υδροσόφιλα, *melanogaster*.

10.2 Εναλλακτικά ζωικά μοντέλα

***Ex vivo* μοντέλα.**

Τα είδη που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα ποντίκια και η μελέτη αφορούσε στη δημιουργία της prion πρωτεΐνης C, της παθολογικής πρωτεΐνης Sc και της αλληλεπίδρασης μεταξύ αυτών των δύο. Στη συνέχεια μελετήθηκε η νευροτοξικότητα αυτών και οι θεραπευτικές προοπτικές.

***In vitro* μελέτες σε κυτταρικές σειρές.**

Χαρακτηριστική είναι η μελέτη σε κύτταρα νευροβλαστώματος σε ποντικούς και σε κυτταρικές σειρές που χαρακτηρίζονται σαν N2a στα οποία έγινε επιμόλυνση και μάλιστα ενοφθαλμισμός με prion πρωτεΐνες όπως π.χ. η σειρά RML-Chandler (1987).

Με τη πάροδο των ετών δημιουργήθηκαν άλλες 15 κυτταρικές σειρές οι οποίες αφορούσαν τόσο νευρωνικά κύτταρα όσο και μη νευρωνικά κύτταρα. Χαρακτηριζότανε σαν sub-clones, όμως στη προκειμένη περίπτωση δεν οδηγήθηκαν σε κοινά αποτελέσματα μεταξύ των *in vitro* και των *in vivo* μελετών. (Race, 1987).

Μη κυτταρικές σειρές, και αμιγείς μορφές ανασυνδυασμένης prion πρωτεΐνης, συνθετικές μορφές prion πρωτεϊνών.

Μετά από τη δημιουργία διαφόρων κυτταρικών σειρών τα οποία ήταν ανθεκτικά στη πρωτεάση όπως και η prion πρωτεΐνη, το 1994 δημιουργήθηκαν αμιγής μορφές ανασυνδυασμένης prion πρωτεΐνης στα θηλαστικά. (Legname, 2004).

Στο υλικό το οποίο έγινε η μελέτη ήταν φυσικά η *Escherichia Coli*. Το recombinant DNA πολλαπλασιαζόταν με αποτέλεσμα να προκαλεί την επιμόλυνση του ιστού στο οποίο εναποτίθετο. Η ανθρωπεία ανασυνδυασμένη prion πρωτεΐνη είναι γενικότερα πλήρους μεγέθους και μάλιστα έχει τις επαναλήψεις 23-231. Οι μορφές αυτές είναι μη γλυκοζυλιωμένες και χωρίς GPI anchor. Αυτές οι μορφές της ανασυνδυασμένης prion πρωτεΐνης ήταν βλαπτικές για το εγκεφαλικό παρέγχυμα. Άλλα πειραματικά μοντέλα είναι μέσω ανάλυσης σε διάφορα computers και βιοπληροφορική (Kuffer et al., 2016).

10.3 Τα μοντέλα και τα συστήματα σε ειδικά βιολογικά υλικά.

Τα τελευταία χρόνια έχει ανιχνευθεί και μία άλλη μορφή της prion πρωτεΐνης η οποία λέγεται protease sensitive δηλαδή πρωτεασοευαίσθητη prionopathy (VPSPr) (Diack et al., 2014).

Αυτή η μορφή τώρα της prion πρωτεΐνης είναι διαφορετική λόγω της χαμηλής λοιμογονικότητας και έχει διαφορετικό τρόπο μετάδοσης σε σχέση με την σποραδική μορφή της CJD και των υποτύπων αυτών.

Πειραματικά μοντέλα για την κατανόηση της μετάδοσης των prion μεταξύ των ειδών.

Χαρακτηριστικό είναι το μοντέλο των τρωκτικών στα οποία υπάρχει μία έκφραση μεταξύ χημικών ποντικών και ανθρώπων prions, δηλαδή μεταξύ των ποντικών και των ανθρώπων.

Πειράματα έχουν γίνει σε επιμολυσμένα από scrapie prion πρωτεΐνες σε κύτταρα νευροβλαστώματος στα οποία υπάρχει εναπόθεση παθολογικής prion πρωτεΐνης.

Το πλέον χαρακτηριστικό στη διαφορά της λοιμογονικότητας των prions μεταξύ των ειδών είναι ότι ακόμα και η απαλοιφή ενός απλού αμινοξέος στην σειρά της πρωτεΐνης δημιουργεί μία κριτική περιοχή η οποία είναι και το αίτιο της αλλαγής, της μετάδοσης των prion μεταξύ των ειδών. Αυτό βέβαια φαίνεται και σε άλλα πειράματα όπως π.χ. όταν έχουμε την αμιγή ανασυνδυασμένη μορφή των prions όπως π.χ. το PrP23-144 στους ανθρώπους, στα ποντίκια καθώς και στα Syrian hamsters φαίνεται ότι η περιοχή 138 και 139 είναι ανεξάρτητη στα διάφορα είδη. (Vanik, 2004).

10.4 Γενετική ευαισθησία: μοντέλα του prnp γονιδίου, πολυμορφισμοί και μεταλλάξεις.

Το ανθρώπινο prnp γονίδιο κωδικοποιεί την μεθειονίνη (M) ή την βαλίνη (V) στη θέση 129 η οποία έχει ισχυρή δράση στην ευαισθησία των ανθρώπων στην εμφάνιση των prion νοσημάτων. Στις σποραδικές μορφές της CJD εμφανίζονται η μορφή μεθειονίνη-μεθειονίνη σε ομόζυγη μορφή και έτσι λοιπόν αυτή είναι πιο συσχετιζόμενη με την επίκτητη μορφή της CJD. Όταν υπάρχει ομόζυγη μορφή για την μεθειονίνη στο κωδικόνιο 129 στην prnp πρωτεΐνη φαίνεται ότι εκδηλώνεται πιο γρήγορα η νόσος. Σε ένα πολυμορφισμό στο κωδικόνιο 127 (G127V) του prnp φάνηκε ότι υπάρχει ανθεκτικότητα στην εκδήλωση της επιδημικής μορφής της Kuru νόσου. Έτσι λοιπόν οι πολυμορφισμοί στο κωδικόνιο 127 και στο κωδικόνιο 129 της prion πρωτεΐνης φαίνεται στον πληθυσμό να έχει κάποια γενετική βάση. Στον Ασιατικό πληθυσμό φαίνεται ότι υπάρχει η συχνότητα του αλληλίου στο 6% το οποίο χαρακτηρίζεται σαν E219K έχει φανεί ότι δρα προστατευτικά έναντι στην σποραδική μορφή της CJD. (Mead et al., 2009).

Πάνω από 40 διαφορετικές μεταλλάξεις έχουν περιγραφεί στις διάφορες επαναλήψεις των οκταπεπτιδίων στο N-τερματικό μέρος της prion πρωτεΐνης. Η prion πρωτεΐνη missense και μεταλλάξεις οι οποίες προκαλούν μία παραλλαγή της αλλαγής των αμινοξέων εκδηλώνουν βαριά μορφή της νόσου. Οι πιο συχνές μεταλλάξεις των

επαναλήψεων των οκταπεπτιδίων και της εισόδου αυτών είναι σημειακές μεταλλάξεις P102L, D178N, E200K, V210I, το οποίο δημιουργεί τελικώς στο 15% λοιμώξεις prion.

Ακόμη στις περιοχές 127 και 219 του prnp γονιδίου εμφανίζει ευαισθησία ιδιαίτερα στην επίκτητη, σποραδική μορφή της νόσου και στην κληρονομική μορφή αυτής. Η έκφραση έχει σχέση με διάφορους συνδυασμούς των 129 μεθειονίνη και 129 βαλίνη ενώ τελικά φαίνεται ότι στα διάφορα πειραματικά μοντέλα η prnp 129 μεθειονίνη-βαλίνη είναι πιο ευαίσθητη και πιο συχνή στην εκδήλωση της CJD και των υπότυπων αυτών. Σε σχέση πάντοτε βέβαια με την σπογγώδη εγκεφαλοπάθεια των βοοειδών μπορεί να παρουσιάζεται με νευροπαθολογικά ευρήματα διαφορετικά σε σχέση με αυτής των variants CJD. Στα διάφορα πειραματικά μοντέλα στα ποντίκια φαίνεται ότι υπάρχει προστατευτική δράση του αλληλίου βαλίνη 129 και το οποίο υπάρχει μόνο σε συνδυασμό με M129 αλληλίο του prnp. Ο πολυμορφισμός στον Ασιατικό πληθυσμό του E219K δημιουργεί μία τέλεια αντίσταση στις συγκεκριμένες παθήσεις. (Asante, 2015 and Hizume, 2009)

11. Γονιδιακή αποσιώπηση

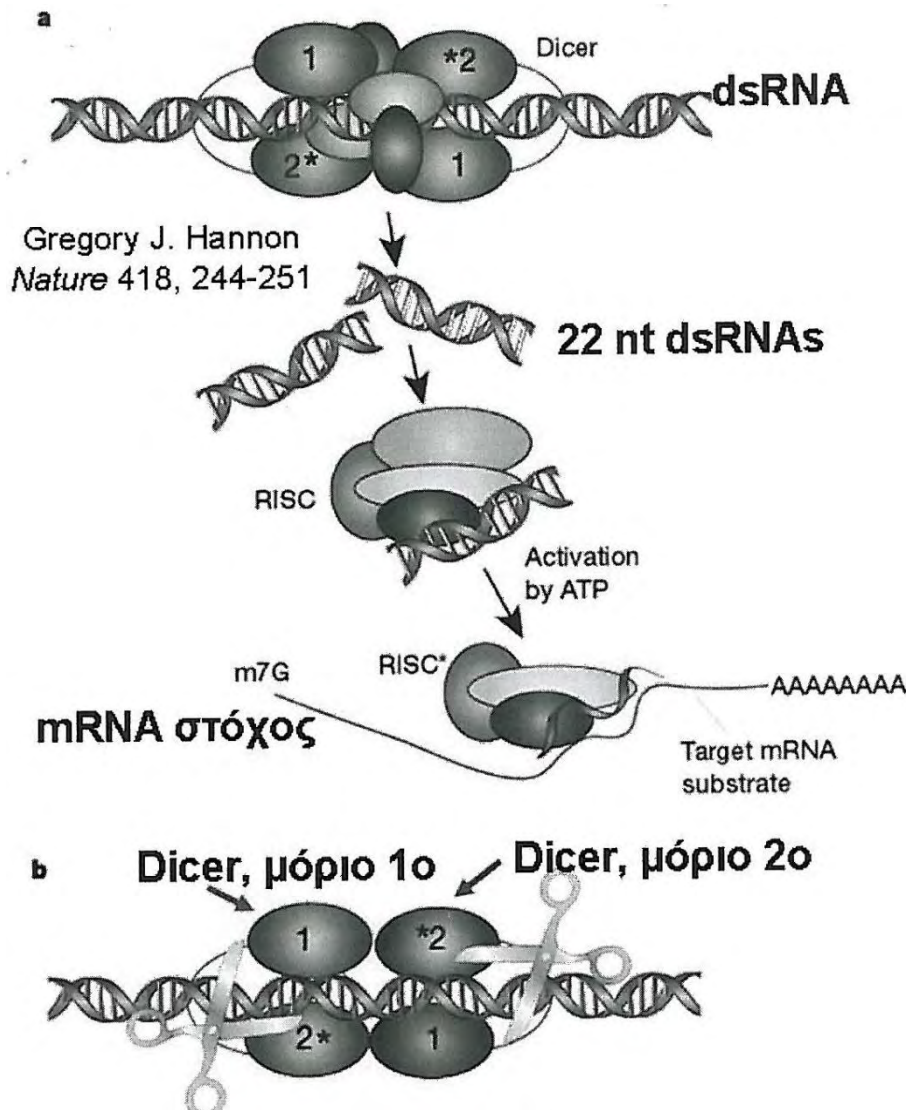
Γονιδιακή αποσιώπηση είναι ένας γενικός όρος που περιγράφει επιγενετικές διαδικασίες της γονιδιακής ρύθμισης. Ο όρος γονιδιακή αποσιώπηση χρησιμοποιείται γενικά για να περιγράψει το <<σβήσιμο>> ενός γονιδίου από ένα μηχανισμό διαφορετικό από τη γενετική τροποποίηση. Δηλαδή, ένα γονίδιο το οποίο θα εκφραζόταν (ενεργοποιημένο) υπό κανονικές συνθήκες είναι απενεργοποιημένο από τις μηχανές στο κύτταρο. Τα γονίδια ρυθμίζονται σε μεταγραφικό και μετα-μεταγραφικό επίπεδο. Η μεταγραφική σίγηση γονιδίων είναι το αποτέλεσμα των τροποποιήσεων των ιστονών, δημιουργώντας ένα περιβάλλον ετεροχρωματίνης γύρω από ένα γονίδιο που το καθιστά απρόσιτο σε μεταγραφική μηχανή (RNA πολυμεράση, μεταγραφικούς παράγοντες, κλπ). Η μεταγραφική σίγηση γονιδίων είναι το αποτέλεσμα του mRNA ενός συγκεκριμένου γονιδίου το οποίο καταστρέφεται ή μπλοκάρεται. Η καταστροφή του mRNA εμποδίζει τη μετάφραση να διαμορφώσει ένα ενεργό προϊόν του γονιδίου (στις περισσότερες περιπτώσεις, μια πρωτεΐνη). Ένας κοινός μηχανισμός της μεταγραφικής σίγησης των γονιδίων είναι το RNAi. Τόσο η μεταγραφική όσο και η μετα-μεταγραφική σίγηση γονιδίων χρησιμοποιούνται για τη ρύθμιση των ενδογενών γονιδίων. Μηχανισμοί γονιδιακής σίγησης, επίσης

προστατεύουν το γονιδίωμα του οργανισμού του από μεταθετά στοιχεία (τρανσποζόνια) και ιούς. Έτσι, η γονιδιακή αποσιώπηση (Gene silencing) μπορεί να είναι μέρος ενός αρχαίου ανοσοποιητικού συστήματος προστασίας από τέτοιου είδους μολυσματική DNA στοιχεία.

Κατά τα τελευταία χρόνια, μόρια RNA των ~20-30 νουκλεοτιδίων έχουν αναδειχθεί ως κρίσιμης σημασίας στοιχεία στην έκφραση και τη λειτουργία των ευκαρυωτικών γονιδιωμάτων. Δύο κύριες κατηγορίες αυτών των μικρών RNAs-σύντομης παρέμβασης RNAs (Short interfering: siRNAs) και microRNAs (miRNAs)- ενεργούν τόσο σε σωματικά όσο και γαμετικά κύτταρα ενός ευρέως φάσματος ευκαρυωτικών ειδών για τη ρύθμιση των ενδογενών γονιδίων και για την υπεράσπιση του γονιδιώματος από νουκλεϊκά οξέα που εισβάλλουν.

11.1 SiRNA (Short interference RNA) ή RNAi (RNA interference): Μικρά μόρια RNA μπορούν να αποσιωπήσουν την γονιδιακή έκφραση (Tropp., 2008)

Το 1998, οι Andrew, Craig και οι συνεργάτες τους ανακάλυψαν έναν πολύ σημαντικό μηχανισμό ο οποίος επιτρέπει τα ευκαρυωτικά να αποσιωπήσουν ειδικά μόρια mRNAs. Όταν ξεκίνησαν τις μελέτες τους ήταν γνωστό ότι μετά από χορήγηση νοηματικού ή αντινοηματικού RNA μέσα σε σκώληκες του τύπου *C. Elegance*, μπλοκάρεται η έκφραση ειδικού γονιδίου και επίσης ότι η αναστολή εξακολουθεί να υφίσταται και στην επόμενη γενεά.



Εικόνα 11. (a) Το RNAi ξεκινά με το ένζυμο Dicer (2 μόρια Dicer με 5 δομές το καθένα) που ανήκει στην οικογένεια των RNase-III. Το ένζυμο κόβει σαν διμερές διότι η μία από τις 2 ενεργές θέσεις που περιέχει είναι ανενεργή (αυτή με αστερίσκο). Τα siRNAs των 22 nt ενσωματώνονται στο σύμπλεγμα. Το σύμπλεγμα RISC ξετυλίγει τα κομμένα μικρά dsRNAs. (b) Αναπαράσταση σύνδεσης των 2 μορίων Dicer με το άκοπο dsRNA και το κόψιμό του.

Το φαινόμενο που ονομάζεται μεταβατικό RNAi (transitive RNAi phenomenon) μας δίνει χρήσιμα συμπεράσματα για τον μηχανισμό αύξησης στο *C. Elegance*. Ο όρος μεταβατικό RNAi αναφέρεται στην ιδιότητα του σήματος αποσιώπησης να δρα κατά μήκος ενός συγκεκριμένου γονιδίου. Αυτό το φαινόμενο έχει αποδειχθεί με τη σύντηξη γονιδίου πράσινης φθορίζουσας πρωτεΐνης (GFP) με ένα κομμάτι του γονιδίου του

μυονηματίου (myofilament: UNC-22) στα σκουλήκια τα οποία διαθέτουν και ένα ακέραιο UNC-22 γονίδιο .

11.2 Γονιδιακή θεραπεία

Είναι η σκόπιμη τροποποίηση της γονιδιακής έκφρασης σε συγκεκριμένα κύτταρα για τη θεραπεία παθολογικών καταστάσεων. Η γονιδιακή θεραπεία περιλαμβάνει την εισαγωγή εξωγενών νουκλεϊκών οξέων (DNA, mRNA, siRNA, microRNAs) μέσα στα κύτταρα για να διορθώσει τη κυτταρική δυσλειτουργία ή για να προσδώσει νέες λειτουργίες στα κύτταρα ώστε να θεραπεύσει ή να καθυστερήσει την εξέλιξη της νόσου (Παπαθανασίου Ιωάννα, Βιολόγος PhD)

Τύποι γονιδιακής θεραπείας

- 1) Ex vivo Γονιδιακή θεραπεία
- 2) In vivo Γονιδιακή θεραπεία
- 3) Anti-sense Θεραπεία (siRNAs, microRNAs)
- 4) Γονιδιακή θεραπεία- Βλαστικά κύτταρα

Παπαθανασίου Ιωάννα, Βιολόγος PhD

11.3 Θεραπευτικές παρεμβάσεις για τις prion παθήσεις

Οι prion παθήσεις δυνητικά είναι ένας παράγοντας κινδύνου για τη γενική υγεία του πληθυσμού.

Μέχρι τώρα δεν υπήρχε ακριβής θεραπεία. Τελευταία έγιναν προσπάθειες μέσω της χρησιμοποίησης του RNAi (RNA interference) της prion πρωτεΐνης C, δηλαδή της PrP^c η οποία θα μπορούσε να είναι θεραπευτική, με βάση τη λογική να κατασταλεί η έκφραση του γονιδίου prnp και η παραγωγή της πρωτεΐνης PrP^c και της μετατροπής στην παθολογική της μορφή.(Daude et al., 2003, Tilly et al., 2003).

Το RNAi είναι ένας κυτταρικός μηχανισμός κατά τον οποίο μεταγραφικές διεργασίες ενός γονιδίου μπορεί να είναι η έναρξη γονιδιακής αποσιώπησης (Gene silencing). Το RNAi σαν μηχανισμός συμμετέχει στην άμυνα των κυττάρων εναντίον διαφόρων εισβολέων, τα οποία αφορούν σε ξένους παράγοντες όπως είναι ιούς, παράσιτα ή μη φυσιολογικά παράγωγα ενδογενών παραγόντων όπως π.χ. μη φυσιολογικών mRNA.

Schmidt, 2005. Ο συγκεκριμένος κυτταρικός μηχανισμός ρυθμίζει την μόλυνση των κυττάρων από διάφορους οργανισμούς. Εκτός της μόλυνσης των κυττάρων και των οργανισμών από τέτοιους λοιμογόνους παράγοντες όπως είναι τα παράσιτα ακόμα και μολυσματικές πρωτεΐνες, σημαντικό ρόλο έχει και η λοίμωξη τους από τις prion πρωτεΐνες.

Σε διάφορα πειραματικά πρότυπα φάνηκε ότι η εξωγενής δημιουργία μικρού περιβαλλόμενου RNA με δομή φουρκέτας (short interfering (si) RNA) σε ένα κύτταρο, οδηγεί σε καταστροφή ειδικών mRNA σε ομόλογη μορφή σε μία αλληλουχία των siRNAs. Συγκρίνοντας το siRNA, short hairpin (sh)RNA δημιουργεί προσοδοφόρο έδαφος για τη θεραπεία χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της γονιδιακής αποσιώπησης (Gene silencing). Σε πολλές μελέτες φάνηκε ότι χρησιμοποιώντας τη μέθοδο του RNAi είναι δυνατόν να θεραπεύσουμε διάφορες νόσους. (Camprochiaro, 2006 and Davindson and Boudreau, 2007).

Η λογική είναι: χρησιμοποιώντας το short interfering (si)RNA και small hairpin (sh)RNA έχει σαν στόχο την prion πρωτεΐνη και το γονίδιο της prion πρωτεΐνης (prnp), με αποτέλεσμα η αποσιώπηση του γονιδίου να οδηγεί στην ελάττωση της παραγωγής της PrP^C, της μετατροπής της στο PrP^{Sc}. Έχουν γίνει πειράματα σε κύτταρα νευροβλαστώματος τα οποία έχουν προσβληθεί από prion πρωτεΐνη.

Χρησιμοποιώντας τη θεραπεία με το RNAi, ιδιαίτερα σε μορφές παθήσεων όπως ήταν η prion πρωτεΐνη στα βοοειδή και στα τρωκτικά, έδειξε πειραματικά ικανή καταστολή της παραγωγής της PrP^C πρωτεΐνης. Αποτέλεσμα η ελάττωση της παραγωγής PrP^{Sc} με μειωμένη λοιμογονικότητα. Πρόσφατα χρησιμοποιήθηκαν για τη μέθοδο του RNAi lentivirus σαν μεταφορείς του RNAi και φάνηκε να έχει θετικά αποτελέσματα ειδικά σε ποντικούς που είχαν προσβληθεί από τα prions. (Pfeifer et al, 2006 and White et al, 2008). Η χρονικά παρατεταμένη έναρξη της νόσου σε όλα τα ζώα στα οποία χορηγήθηκε RNAi εναντίον της PrP^C πρωτεΐνης, αρχικά ήταν ελπιδοφόρα προοπτική. Τελικώς όλα τα ζώα που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα κατέληξαν. (Pfeifer et al., 2006, White et al., 2008).

Επιγραμματικά τα υλικά και οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν είναι το siRNA και shRNA.

Καλλιέργειες κυττάρων, επιμόλυνση και θεραπεία με διάφορους παράγοντες.

Απομόνωση του RNA RT-PCR.

Οι παραπάνω θεραπείες είχαν σαν αποτέλεσμα την παροδική καταστολή της μόλυνσης των κυττάρων του νευροβλαστώματος με το pShRNA-PrPT. Έγινε μία προσπάθεια απομόνωσης του RNA των επιμολυσμένων κυττάρων χρησιμοποιώντας Trizol (Invitrogen) σε διάλυμα. Γενικότερα έχει φανεί ότι το RT-PCR έχει καταστείλει ή έχει μειώσει τα επίπεδα του mRNA του prnp στα κύτταρα τα οποία ήταν μολυσμένα με την pShRNA-PrPT. Όμως δεν επηρέασε καθόλου τα κύτταρα που ήταν επιμολυσμένα με την pShRNA-prps

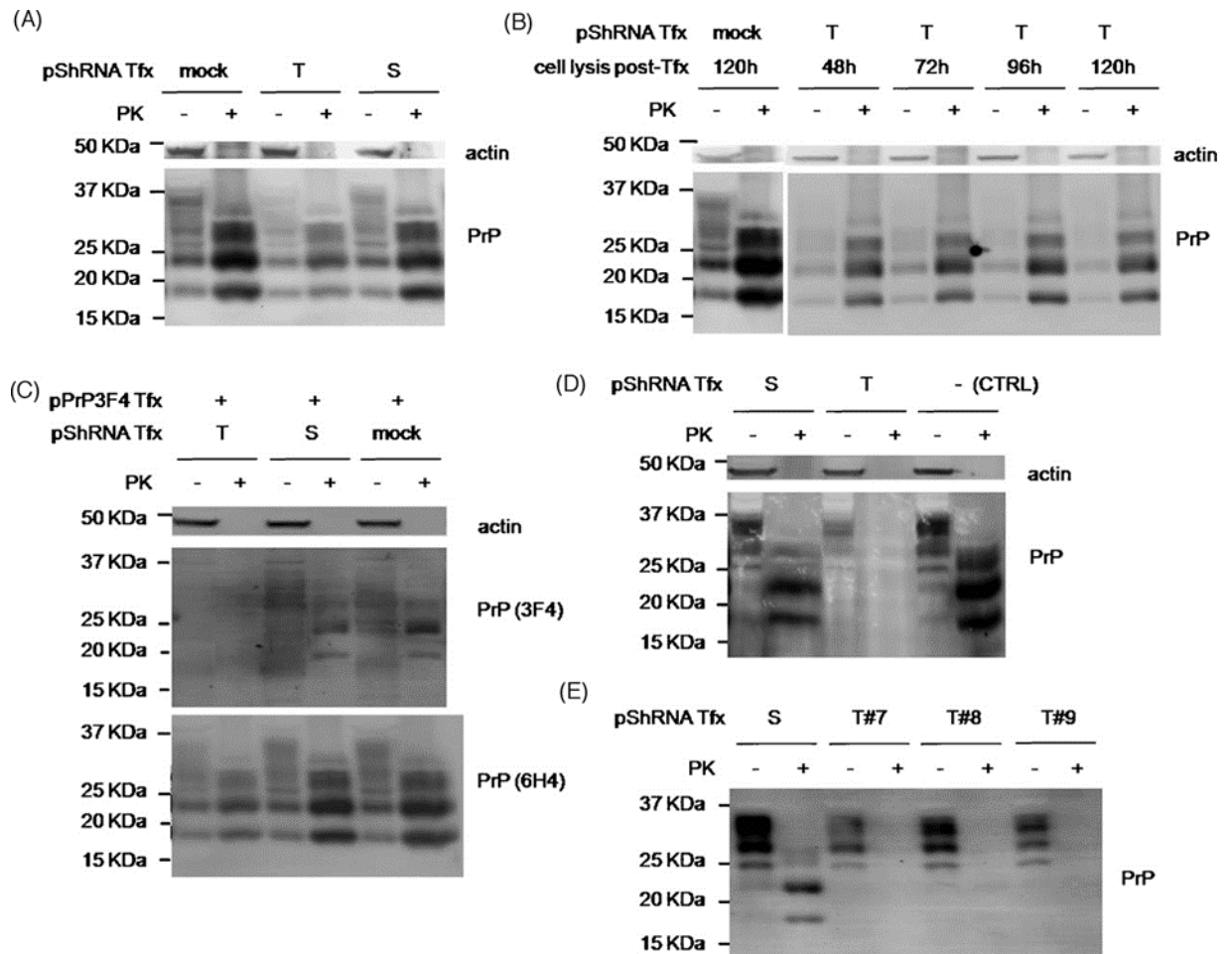
Στην ανάλυση του qRT-PCR στο 81-89% το prnp-mRNA ήταν ελαττωμένο στα κύτταρα του νευροβλαστώματος, και συγκεκριμένα του N2a κυττάρων τα οποία ήταν μολυσμένα. Αυτά τα δεδομένα αποδεικνύουν ότι η έκφραση του shRNA όταν είναι σε αποσιώπηση, καταστέλλει την παραγωγή των παθολογικών πρωτεϊνών και της μετάδοσης της νόσου.

Στην ανάλυση με Western blot φαίνεται η μείωση της παραγωγής του PrP^C, στα N2a κύτταρα του νευροβλαστώματος, εξαρτώμενο από την έκφραση του pShRN-PrPT. Τα επίπεδα του PrP^C ήταν μειωμένα μέσω της μεταφοράς της λοίμωξης με την αυξημένη ποσότητα του pShRNA-PrPT όπου η εισαγωγή του pshRNA-PrP^C δεν παρεμβαίνει στην έκφραση της PrP^C.

RNAi mediated καταστολή της μετατροπής της PrP^{Sc} πρωτεΐνης σε κύτταρα τα οποία έχουν επιμολυνθεί με prion πρωτεΐνη. Η επιμόλυνση αυτή φαινόταν με τη μέθοδο αυτή να μειώνει τα επίπεδα της PrP^{Sc} στα κύτταρα αυτά. Η μείωση αφορούσε στο 50% και άνω. Έτσι η μείωση της έκφρασης του prnp Mrna καθώς και της PrP^C γινόταν μέσω της έκφρασης του shRNA, ενώ τα N2a κύτταρα του νευροβλαστώματος είχαν επιμολυνθεί με δύο πλασμίδια φορείς (constructs). Τα επιμολυσμένα αυτά κύτταρα μελετήθηκαν περίπου 48 ώρες μετά τη λοίμωξη.

Ενώ κυτταρικοί πληθυσμοί που ήταν προς σύγκριση είχαν επιμολυνθεί με την PrP^C. Οι πληθυσμοί σύγκρισης δεν είχαν επιμολυνθεί με πλασμίδια. Τα κύτταρα ScN2a ήταν επιμολυσμένα με το pShRNA-PrPT. Είχαν σαν στόχο την PrP^C και την pShRNAPrPS και περιείχαν αλληλουχία γονιδίων η οποία χαρακτηριζόταν σαν scruble sequence. Στόχος ήταν να βρεθεί ένας τρόπος χρησιμοποιώντας τα RNAi, έτσι ώστε να σταματήσουμε την έναρξη της νόσου αλλά και την εξέλιξη της, χρησιμοποιώντας τα

ειδικά shRNA και διάφορους μεταφορείς όπως π.χ. ιούς κτλ. Viral vectors. (White et al., 2008)



Εικόνα 12. Η προς τα κάτω ρύθμιση του PrP^C και PrP^{Sc} σε ScN2a κύτταρα τα οποία είναι επιμολυσμένα με shRNAs prnp. Τα ScN2a κύτταρα έχουν μολυνθεί ξανά με pShRNA-PtPT (T) στοχευμένο prnp και pShRNA-PrPS(S) το οποίο περιέχει μεικτές αλληλουχίες. Η επιμόλυνση (Tfx) έλαβε χώρα με pShRNA πλασμίδιο DNAs. (A) Μέτρηση του ενδογενούς PrP^C και PrP^{Sc} από παροδικά μολυσμένα ScN2a κύτταρα. Τα επιμολυσμένα στοιχεία αναλύθηκαν 48 ώρες μετά την μόλυνση. (B) Αλλαγές των επιπέδων της PrP^C και της PrP^{Sc} μετά από 48-120 ώρες. (C) Μέτρηση της εκ νέου PrP^{Sc}. Εδώ τα κύτταρα είχαν μία επιμόλυνση με ένα συμπαράγοντα των pPrP3F4. Τα επιμολυσμένα στοιχεία αναλύθηκαν 48 ώρες μετά την μόλυνση. Στα στοιχεία αυτά έγινε πέψη με και χωρίς πρωτεϊνάση K και διαχωρίστηκαν σε δύο διαφορετικά anti-PrP αντισώματα, 6^H4 και 3F4. (D) Μέτρηση της ενδογενούς PrP^C και PrP^{Sc} σε μόνιμα μολυσμένα ScN2a κύτταρα. Τα σταθερά μολυσμένα κύτταρα δημιουργήθηκαν μετά από επιλογή της υδρομικίνης μέχρι την τελική απομάκρυνση των επιμολυσμένων

στοιχείων mock transfected κυττάρων. CTRL: ScN2a κύτταρα τα οποία είναι τα δείγματα των κυττάρων πριν από την επιμόλυνση με PrP^{Sc}. (E) Τα επίπεδα της PrP^C και PrP^{Sc} σε κλώνους (T#7, 8, 9) της σταθερής επιμόλυνσης με pShRNA-PrPT. Ο ανάμεικτος πληθυσμός των μολυσμένων κυττάρων με pShRNA-PrPS (S) παρέμεινε υπό έλεγχο.

Η σημαντική βλάβη του εγκεφαλικού ιστού και η βλάβη που δημιουργήθηκε πριν από την εκδήλωση των κλινικών σημείων της νόσου CJD, που προκαλεί στο εγκεφαλικό παρέγχυμα είναι συνήθως μη αναστρέψιμη. Ο αρχικός σκοπός ήταν η μείωση της έναρξης της εναπόθεσης της παθολογικής αυτής πρωτεΐνης, έτσι ώστε να μην υπάρχει δημιουργία ινιδιακών πλακών.

Τελικά η προσπάθεια μέσω RNAi δεν είναι ειδικός θεραπευτικός παράγοντας για την καταπολέμηση της νόσου. Δεδομένου ότι η μετατροπή της PrP^{Sc} και εναπόθεσή της στα εγκεφαλικά κύτταρα, ακόμη και τα κύτταρα τα οποία έχουν θεραπευτεί μέσω της μεθόδου RNAi, θα μπορούσε εφόσον υπάρξουν οι κατάλληλες τροποποιήσεις και οι κατάλληλες μελέτες στο μέλλον να χρησιμοποιηθεί εκ νέου σαν θεραπευτική παρέμβαση. Φαίνεται ότι η παραγωγή της PrP^{Sc} πρωτεΐνης είναι μία διαρκής κατάσταση ακόμα και σε θεραπευμένα κύτταρα του νευροβλαστώματος, με την προοπτική για την θεραπεία να γίνεται η εισαγωγή του RNAi αρκετά νωρίς ώστε να μην υπάρχουν τοξικές εκδηλώσεις της παθολογικής prion πρωτεΐνης. Η αποσιώπηση του υπεύθυνου γονιδίου για την εκδήλωση της νόσου είναι μία από τις μελλοντικές προκλήσεις για την θεραπευτική της νόσου της οικογενούς μορφής, ενώ προσπάθεια θα πρέπει να γίνει και για τις επίκτητες μορφές της νόσου.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ

Συζήτηση νεότερων θεραπευτικών δεδομένων και συγκριτικά αποτελέσματα

Οι prion παθήσεις είναι σπάνιες νόσοι με συχνότητα 1.5-2 περιστατικά στο 1 εκατομμύριο πληθυσμό το χρόνο. Η νόσος επιφέρει το θάνατο, παρά τις όποιες θεραπευτικές προσπάθειες. Είναι από τις πιο δραματικές νευρολογικές ασθένειες, όπως και η πλάγια μυατροφική σκλήρυνση, με ραγδαία εμφάνιση συμπτωμάτων όπως άνοια, επιληπτικές κρίσεις και τελικά αποφλοίωση του εγκεφάλου. Η αιτιολογία της νόσου είναι μεταλλάξεις της φυσιολογικής prion πρωτεΐνης σε παθολογική μορφή, η οποία

χαρακτηρίζεται σαν λάθος αναδιπλούμενη πρωτεΐνη prion. Το εναρκτήριο γεγονός για την μετατροπή μιας φυσιολογικής πρωτεΐνης prion η οποία έχει προστατευτικές δράσεις για το νευρικό κύτταρο , είναι η άθροιση της παθολογικής prion πρωτεΐνης (είναι ανθεκτική στη πρωτεϊνάση K στο νευρικό ιστό).

Θεραπευτικά έχουν δοκιμαστεί παράγοντες που μπορούν να τροποποιήσουν και να σταματήσουν την εξέλιξη της άθροισης της παθολογικής prion πρωτεΐνης, όπως οι παράγοντες polyanionic. Παράγοντες οι οποίοι ελαττώνουν ή διακόπτουν τη μετατροπή της PrP^C στην PrP^{Sc} τόσο *in vitro* όσο και σε άλλα πειράματα, θεραπευτικά χαρακτηρίζονται από τοξικότητα και από χαμηλή δραστηριότητα. Οι παράγοντες των πολυαμινών έχουν δραστηριότητα έναντι των prion πρωτεϊνών που μολύνουν τα κύτταρα του νευροβλαστώματος. Οι παράγοντες αυτοί δρουν καλύτερα σε πρωτονομιμένο περιβάλλον και μάλιστα σε όξινη μορφή ή όξινο pH. Οι παραπάνω παράγοντες δεν ήταν δραστικοί.

Παράγοντες οι οποίοι δρουν καλύτερα σε όξινο pH φαίνεται ότι αναστέλλουν την μετατροπή και την εναπόθεση των παθολογικών prion πρωτεϊνών στα ενδοσώματα και στα λυσοσώματα. Μόρια τα οποία αφορούν σε συνθετικά μόρια των δενδρομερών που έχουν σχέση με τις πολυαμίνες, και ειδικά τα δενδρομερή, φέρουν στο μόριό τους φώσφορο και είναι δραστικοί anti-prion παράγοντες τόσο *in vitro* όσο και σε άλλες μελέτες.

Το Pentosan, ειδικά η πολυσουλφατιδική μορφή, έδειξε στα πειραματόζωα όπως τα ποντίκια ότι αύξησε το χρόνο επιβίωσής τους μετά τη χορήγηση του παράγοντα αυτού και μάλιστα μέσω αναστολής της μετατροπής της prion πρωτεΐνης στην PrP^{Sc}. Στη συνέχεια ο αντικός παράγοντας που μελετήθηκε σε πειραματόζωα και ανθρώπους ήταν η αμανταδίνη, δραστικός παράγοντας της κοινής γρίπης, ωστόσο δεν έδειξε τα επιθυμητά αποτελέσματα.

Άλλοι αντικοί παράγοντες που χρησιμοποιήθηκαν είναι γνωστά φάρμακα για τους ερπητοϊούς, όπως είναι το acyclovir, το zovirax ακόμα και το gancyclovir. Λόγω της τοξικότητας τους και της χαμηλής δραστηριότητας έναντι των prion πρωτεϊνών δεν είχαν τα επιθυμητά αποτελέσματα.

Η φλουπιρίνη είναι αμινοπυριδίνη, χρησιμοποιήθηκε σαν αναλγητικός παράγοντας, τόσο σε πειραματόζωα όσο και σε ανθρώπους σε διπλές τυφλές μελέτες χωρίς όμως τα επιθυμητά αποτελέσματα.

Η κιννακρίνη (1930) χρησιμοποιήθηκε έναντι της ελονοσίας, παράγοντας πολλά υποσχόμενος για τη νόσο CJD. Παρ'όλα αυτά οι κλινικές παρατηρήσεις όσο και οι σειρές των περιστατικών δεν έδειξαν ιδιαίτερα ενθαρρυντικά αποτελέσματα. Η χαμηλή διαπερατότητα του φαρμάκου μέσω του αιματοεγκεφαλικού φραγμού ήταν η αιτία της χαμηλής δραστηριότητας. Τα επίπεδα της συγκέντρωσης του φαρμάκου ήταν χαμηλά στο ENY. Ασθενείς οι οποίοι ήταν στην αρχή της νόσου, δηλαδή τα κλινικά συμπτώματα ήταν ήπια και στους οποίους χορηγήθηκε η κιννακρίνη, είχαν καλύτερη πορεία όσον αφορά στις πιο βαριές μορφές της νόσου.

Επιπλέον παράγοντας ήταν η δοξικυκλίνη, ένα αντιβιοτικό το οποίο δόθηκε για να σταματήσει η μετατροπή της prion πρωτεΐνης. Άλλοι παράγοντες όπως, Β, IND24, anle138b ήταν επίσης στους αντιprion παράγοντες που δεν έδειξαν τα επιθυμητά αποτελέσματα. Τελευταία χρησιμοποιήθηκαν παράγοντες οι οποίοι διασπούν την δομή των β-ελασμάτων με αποτέλεσμα την μη παραγωγή των παθολογικών ινιδίων και την ελαττωμένη εναπόθεσή τους, με τη μορφή των βραχέων ολιγομερών στο νευρικό ιστό. Αυτό ακολουθεί την μη παραγωγή της παθολογικής PrP^{Sc} πρωτεΐνης, της διάσπασης των παθολογικών αυτών β-ελασμάτων, της αύξησης της υπερσταθεροποίησης των ελασμάτων αυτών ή της δομής αυτής. Αυτό θεραπευτικά έγινε μέσω συγκεκριμένων φαρμακευτικών ουσιών τα οποία λέγονται πολυθειοφένια (luminescent conjugated polythiophenes-LCPs) τα οποία υπερσταθεροποιούν τη δομή των β ελασμάτων και τελικώς δε μετατρέπονται στα ινίδια του αμυλοειδούς ούτε στην παθολογική prion πρωτεΐνη. Οι δομές LCP μειώνουν την μολυσματικότητα των prion πρωτεϊνών και τελικά την μη εναπόθεση και τη συσσώρευση στο νευρικό σύστημα, στα πειραματόζωα όπως πχ στα ποντίκια. Όταν τα ινίδια του αμυλοειδούς συνδέονται με το LCP δεν εναποτίθενται στο νευρικό ιστό. Οι δομές αυτές πέπτονται μέσω της πρωτεϊνάσης K και χάνουν τη σταθερότητά τους. Απώτερο αποτέλεσμα είναι η απώλεια της μολυσματικότητας της prion πρωτεΐνης. Άλλη πειραματική προσπάθεια ήταν μέσω του στόχου των κυτταρικών οδών μετατροπής από φυσιολογική στην παθολογική μορφή. Το σύστημα αυτό αφορά στην ουμπικιτίνη-πρωτεάσωμα σύστημα (UPS), μηχανισμός ο οποίος ελέγχει το σχηματισμό της κυτταρικής λανθασμένης πρωτεΐνης. Εργαστηριακά όταν υπάρχουν αυξημένα ποσά πρωτεϊνών στους εγκεφάλους μολυσμένων από prion πρωτεΐνη, οι πρωτεΐνες οι οποίες συνδέονται με την ουμπικιτίνη είναι περισσότερο δυσλειτουργικές. Το παραπάνω σύμπλεγμα είναι νευροτοξικό. Η PrP^{Sc} μπορεί να συνδεθεί με το εξωτερικό φύλλο του 20S (πρωτεοσωμική υπομονάδα),

δομή η οποία καταστρέφει την λειτουργία των κυττάρων. Αυτή η υπόθεση μπορεί να εξηγήσει τη δυσλειτουργία του πρωτεοσώματος στις διάφορες prion παθήσεις. Σκοτεινή παραμένει ακόμα η διαδικασία μεταφοράς της prion πρωτεΐνης από το ενδοπλασματικό δίκτυο (ER) και τον εξωκυττάριο χώρο στο κυττοσόλιο, διαδικασία στην οποία συμμετέχει το πρωτεάσωμα. Έτσι αναστέλλοντας την ουμπικιτίνωση ή το σύμπλεγμα ubiquitin carboxy-terminal υδρολάση 14 (USP14) μέσω μιας αποουμπικιτινάσης (η οποία δρα επάνω στο 19S πρωτεάσωμα) ή στην υπομονάδα αυτού δρα στην εναπόθεση και την άθροιση των prion πρωτεϊνών. Έτσι μικρά μόρια τα οποία στοχεύουν την USP14 δρουν μέσω της κυτταρικής βλάβης και της καταστροφής της παθολογικής prion πρωτεΐνης, η οποία συνδέεται με τις νευροεκφυλιστικές παθήσεις.

Θεραπευτικούς παράγοντες αποτελούν οι TDP43,tau και η αταξίνη, οι οποίοι είναι μικρά μόρια τα οποία κατευθύνονται εναντίον της ενδογενούς E3 ουμπικιτίνης, λιγάσης και των τμημάτων τους. Οι παράγοντες αυτοί λέγονται PROTACs (proteolysis-targeting chimeric molecules), τα οποία αφορούν σε πεπτίδια που αναγνωρίζουν ειδικά τη λιγάση της ουμπικιτίνης. Είναι δομές οι οποίες μοιάζουν χημικά ή έχουν σχέση με μικρά μόρια τα οποία αναγνωρίζουν διάφορες πρωτεΐνες στόχους. Η θεραπεία αυτή, ερευνητικά τουλάχιστον, χρησιμοποιήθηκε αρχικά για τη θεραπεία εναντίον του καρκίνου. Αργότερα μέσω της ίδιας φιλοσοφίας χρησιμοποιήθηκε και σαν στόχος έναντι των παθήσεων που αφορούσαν τις νευροεκφυλιστικές παθήσεις.

Καινούριες στρατηγικές αφορούν τον συνδυασμό φαρμάκων με τις πρωτεΐνες chaperones, μικρά μόρια τα οποία κατευθύνονται εναντίον των misfolded πρωτεϊνών μέσω της εκφύλισης και της καταστροφής του πρωτεοσώματος. Άλλες παθήσεις που σχετίζονται με τον μηχανισμό των τσαπερονών είναι: η πλάγια μυατροφική σκλήρυνση και η νωτιαία μυϊκή ατροφία. Αυξημένα επίπεδα των ER τσαπερονών GRP94, GRP78, GRP54, μέσω της διαταραχής της ομοιόστασης του ασβεστίου στα κύτταρα παρεμβαίνουν στη σωστή λειτουργικότητα του ενδοπλασματικού δικτύου ER, τα οποία μέσω της δράσης των τσαπερονών καταστέλλουν την μετατροπή των παθολογικών prion πρωτεϊνών. Υπάρχει συγκεκριμένα ένα σύμπλοκο μεταξύ UPS και ER stress το οποίο τελικά οδηγεί στην αναστολή της πρωτεοσωμικής δράσης στο UPR.

Άλλοι θεραπευτικοί παράγοντες δρουν μέσω λυσομάτων. Αποτέλεσμα έχουν την καταστροφή των παθολογικών prion πρωτεϊνών μέσω της αυτοφαγίας. Η μετατροπή

των prion τροποποιείται μέσω της καταστολής της διαδικασίας της ενδοκύττωσης καθώς και της ανακύκλωσης αυτών μέσω των μικροκυστιδίων. Παράγοντες όπως είναι το λίθιο και η ραπαμυσίνη δρουν μέσω του μηχανισμού αυτού.

Η Trehalose ουσία η οποία παράγεται από μύκητες και φυτά και καταστρέφει τις prion πρωτεΐνες.

Η Imatinib, είναι φαρμακευτικός παράγοντας, ο οποίος μέσω του μηχανισμού της αυτοφαγίας καταστρέφει τις παθολογικές πρωτεΐνες. Η θεραπεία μέσω των Chaperones γίνεται μέσω αλληλεπίδρασης με άλλες πρωτεΐνες που οδηγεί στη σταθεροποίησή τους. Βιοχημικά αφορά σε ειδικό σύστημα ελέγχου της σταθερότητας των πρωτεϊνών και της προστασίας έναντι των μη καλής αναδίπλωσης πρωτεϊνών και της τοξικής τους δράσης.

Οι μεθαλαμίνες και η γλυκερόλη είναι δραστικές στην αναστολή της μετατροπής της prion πρωτεΐνης σε PrP^{Sc}. Οι ανθρακυκλίνες-πορφυρίνες παρεμβαίνουν στην αντιγραφή των παθολογικών πρωτεϊνών. Στους ζυμομύκητες, η heat shock protein 104 (Hsp104) disaggregase είναι διαλυτός κυττοσολικός παράγοντας ο οποίος συναθροίζει την sup35. Οι ερευνητές κατέληξαν ότι η τριάδα της Hsp110-70-40 στα θηλαστικά δρουν κατασταλτικά στην άθροιση των prion πρωτεϊνών. Η αύξηση της Hsp70 από μόνη της δρα νευροπροστατευτικά σε διάφορα μοντέλα. Έτσι εργαστηριακά και κλινικά φάνηκε σε πειραματόζωα ότι δόθηκαν οι παράγοντες αυτοί σαν anti-prion παράγοντες.

Πολλά υποσχόμενες θεραπείες είναι οι ανοσοθεραπείες εναντίον των prion πρωτεϊνών. Η ανοσοθεραπεία γίνεται μέσω βραχέων τμημάτων των prion πρωτεϊνών, τα οποία ενεργοποιούν το μείζον σύστημα της ιστοσυμβατότητας της τάξεως II. Η θεραπεία αυτή λέγεται anti-PrP^C ανοσοθεραπεία, με αντισώματα εναντίον της πρωτεΐνης K ανθεκτικής prion Sc πρωτεΐνης. Στην ενεργητική ανοσοθεραπεία στα ποντίκια, με ανασυνδυασμένη prion πρωτεΐνη, έδειξε καθυστέρηση στην εξέλιξη της νόσου. Η ανοσοποίηση έγινε με τη χορήγηση ενδοπεριτοναϊκά, της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης. Άλλες σειρές αφορούν στη χορήγηση των prion πρωτεϊνών σε συνδυασμό με DNA. Άλλη πρακτική αφορούσε στη χορήγηση διαφόρων νευροπροστατευτικών παραγόντων και στην ανοσοτροποποίηση. Η πειραματική αυτή θεραπεία αφορά στα prions τα οποία συνδέονται με επαναλαμβανόμενες νησίδες, CpG και των ολιγομερών όπως ολιγοδεοξυνουκλεοτίδια (CpG-ODNs), τα οποία ενεργοποιούν το ανοσιακό σύστημα. Θεραπεία με τη συγκεκριμένη μορφή έδειξε ότι εκτός από την καθυστέρηση

προκαλεί και ανοσοκαταστολή του λεμφικού συστήματος, ηπατοτοξικότητα και αιμορραγική διάθεση. Η παθητική ανοσοθεραπεία εναντίον των prion πρωτεϊνών αφορά στην χορήγηση παραγόντων που καταστέλλουν την μετατροπή σε παθολογική PrP^{Sc} πρωτεΐνη. Οι θεραπευτικές αυτές αφορούν σε χορήγηση μονοκλωνικών αντισωμάτων (monoclonic anti-prp antibodies) 6H4,SAF32, SAF61. Αφορούν σε σύνδεση με τα PrP ειδικά αντιγόνα και μέσω του FAB συστήματος. Τα αντισώματα αυτά λέγονται D13,D18,R1 και R2, χρησιμοποιούνται σε χρόνιες μορφές της νόσου prion και ειδικά σε κύτταρα του νευροβλαστώματος τα οποία έχουν μολυνθεί με την prion, δηλαδή τα N2A. Όταν το D13 δόθηκε με τη μορφή δισθενών αντισωμάτων της κατηγορίας IgG, η νευρωνική απόπτωση παρατάθηκε. Τα τοξικά αποτελέσματα του D13 έχουν καταγραφεί σε διάφορες εργασίες. Η ασφάλεια της χορήγησης των αντισωμάτων anti-PrP τα οποία χαρακτηρίζονται σαν ICSM18 και ICSM35 έδειξαν αποτελέσματα αντικρουόμενα. Τοξικότητα αναφέρεται στη χορήγηση αντισώματος στη δόση 2μg. Αναφορά δοσοεξαρτώμενης τοξικότητας πάνω από τα 2μg. Εύλογη ανησυχία και διστακτικότητα για την ασφάλεια της χορήγησης των αντισωμάτων αυτών. Αναφορικά το POM1 (εναντίον του επίτιπου ICSM18) παρουσίασε σοβαρή τοξικότητα και δεν χρησιμοποιήθηκε πλέον στη θεραπευτική πρακτική.

Ενθαρρυντικά αποτελέσματα υπήρχαν μετά την χρησιμοποίηση των νευροπροστατευτικών παραγόντων έναντι των prion πρωτεϊνών που είχαν σχέση με τα μονοκλωνικά αντισώματα στοχεύοντας τους επιτόπους των οκταπεπτιδικών επαναλήψεων (OR) των prion πρωτεϊνών. Η μετατροπή σε prion Sc αναστάλθηκε μετά τη χρησιμοποίηση αυτών στα κύτταρα του νευροβλαστώματος. Ειδικά με χορήγηση των D-OR αντισωμάτων καθώς και των mab110 και SAF34. Πρόσφατα χορηγήθηκε το POM2. Δραστικό μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι των οκταπεπτιδικών επαναλήψεων. Το αντίσωμα έναντι των prion C ή των οκταπεπτιδικών επαναλήψεων το οποίο χαρακτηρίζεται σαν 4H11 δεν έδειξε την ανάλογη αποτελεσματικότητα.

Τελευταία προσπάθεια έγινε μέσω της στόχευσης της αντιγραφής των prion πρωτεϊνών. Ο επόμενος θεραπευτικός στόχος ήταν μέσω της καταστολής στην ωρίμανση των β λεμφοκυττάρων. Ο φαρμακευτικός παράγοντας ο οποίος χρησιμοποιήθηκε ήταν το Rituximab, anti-CD20 παράγοντας ο οποίος έδρασε προφυλακτικά έναντι στην prion λοίμωξη. Η prion πρωτεΐνη αθροίζεται δευτεροπαθώς στα διάφορα λεμφικά όργανα μετά την είσοδο και την εισβολή στο νευρικό σύστημα. Αν και τελικώς χαρακτηρίζονται τα prion ότι είναι παθολογικές πρωτεΐνες οι οποίες

προτιμούν το νευρικό σύστημα, δευτεροπαθώς όμως αντιγράφονται και στο περιφερικό σύστημα και στους λεμφαδένες.

Η ραπαμυκίνη (rapamycin) συνδέεται με τη διαδικασία της αυτοφαγίας στα πλαίσια του κυτταρικού θανάτου και είναι αναστολέας της mTOR (σηματοδοτικό μονοπάτι το οποίο σχετίζεται με την ενδοκυττάρια και εξωκυττάρια ομοιόσταση και τον κυτταρικό μεταβολισμό). Ο μηχανισμός του mTOR ενεργοποιείται μέσω διαφόρων παθολογικών διεργασιών όπως είναι καρκινικές μεταλλάξεις και λοιμώξεις. Η κινάση mTOR είναι μια κινάση σερίνης/θρεονίνης με MB με 289 kDa,.

Σκοπός της εργασίας είναι η προοπτική ανάδειξης θεραπείας για τα prions μέσω του gene-silencing (γονιδιακής αποσιώπησης), ιδιαίτερα του υπεύθυνου γονιδίου για τις κληρονομικές μορφές της νόσου. Καταστολή του prnp γονιδίου που θα συντελέσει στη μη παραγωγή της παθολογικής prion πρωτεΐνης. Ιδανικό θα ήταν η αναστολή της μετατροπής της PrP^c στην PrP^{Sc} (μολυσματικής πρωτεΐνης), μέσω διακοπής των κατάλληλων βιοχημικών μονοπατιών pathways. Επιπλέον η διακοπή της μετάδοσης των prion υλικών μέσω της διακυτταρικής επικοινωνίας και μέσω των εξωσωμάτων. Δεδομένου ότι οι προηγούμενες προσπάθειες χορήγησης κλασικών φαρμακευτικών παραγόντων έχουν μέχρι τώρα αποτύχει. Τα τελευταία χρόνια στη φαρέτρα των θεραπειών είναι οι ανοσοθεραπείες με τα μονοκλωνικά αντισώματα.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

MedlinePlus Encyclopedia: Creutzfeldt-Jakob disease

Genetic Testing Registry: Genetic prion disease

Health Topic: Creutzfeldt - Jakob disease

Genetics in Medicine, vol 12, number 4, April 2010

Mead, S. (2006). "Prion disease genetics." *Eur J Hum Genet* 14(3): 273-281.

Mastrianni, J. A. (2010). "The genetics of prion diseases." *Genet Med* 12(4): 187-195.

Moore, R. C., et al. (2001). "Huntington disease phenocopy is a familial prion disease." *Am J Hum Genet* 69(6): 1385-1388.

- Meissner, B., et al. (2004). "Sporadic Creutzfeldt-Jakob disease: magnetic resonance imaging and clinical findings." *Neurology* 63(3): 450-456.
- Demaerel, P., et al. (1999). "Diffusion-weighted MRI in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease." *Neurology* 52(1): 205-208.
- Shiga, Y., et al. (2004). "Diffusion-weighted MRI abnormalities as an early diagnostic marker for Creutzfeldt-Jakob disease." *Neurology* 63(3): 443-449.
- Sanchez-Juan, P., et al. (2006). "CSF tests in the differential diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease." *Neurology* 67(4): 637-643.
- Zerr, I., et al. (1998). "Detection of 14-3-3 protein in the cerebrospinal fluid supports the diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease." *Ann Neurol* 43(1): 32-40.
- Satoh, J., et al. (1999). "The 14-3-3 protein detectable in the cerebrospinal fluid of patients with prion-unrelated neurological diseases is expressed constitutively in neurons and glial cells in culture." *Eur Neurol* 41(4): 216-225.
- Huang, N., et al. (2003). "14-3-3 protein in the CSF of patients with rapidly progressive dementia." *Neurology* 61(3): 354-357.
- Mastrianni, J. A., et al. (1999). "Prion protein conformation in a patient with sporadic fatal insomnia." *N Engl J Med* 340(21): 1630-1638.
- Kovacs, G. G., et al. (2002). "Mutations of the prion protein gene phenotypic spectrum." *J Neurol* 249(11): 1567-1582.
- Mastrianni, J. A. (1998). "The prion diseases: Creutzfeldt-Jakob, Gerstmann-Straussler-Scheinker, and related disorders." *J Geriatr Psychiatry Neurol* 11(2): 78-97.
- Hall, D. A., et al. (2005). "PRNP H187R mutation associated with neuropsychiatric disorders in childhood and dementia." *Neurology* 64(7): 1304-1306.
- Colucci, M., et al. (2006). "Gerstmann-Straussler-Scheinker: a new phenotype with 'curly' PrP deposits." *J Neuropathol Exp Neurol* 65(7): 642-651.
- Laplanche, J. L., et al. (1999). "Prominent psychiatric features and early onset in an inherited prion disease with a new insertional mutation in the prion protein gene." *Brain* 122 (Pt 12): 2375-2386.

- Palmer, M. S., et al. (1991). "Homozygous prion protein genotype predisposes to sporadic Creutzfeldt-Jakob disease." *Nature* 352(6333): 340-342.
- Alperovitch, A., et al. (1999). "Codon 129 prion protein genotype and sporadic Creutzfeldt-Jakob disease." *Lancet* 353(9165): 1673-1674.
- Shibuya, S., et al. (1998). "Codon 219 Lys allele of PRNP is not found in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease." *Ann Neurol* 43(6): 826-828.
- Mead, S., et al. (2009). "A novel protective prion protein variant that colocalizes with kuru exposure." *N Engl J Med* 361(21): 2056-2065.
- Richardson, E. P., Jr. and C. L. Masters (1995). "The nosology of Creutzfeldt-Jakob disease and conditions related to the accumulation of PrPCJD in the nervous system." *Brain Pathol* 5(1): 33-41.
- Pan, B. T. and R. M. Johnstone (1983). "Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: selective externalization of the receptor." *Cell* 33(3): 967-978.
- Simons, M. and G. Raposo (2009). "Exosomes--vesicular carriers for intercellular communication." *Curr Opin Cell Biol* 21(4): 575-581.
- Mathivanan, S., et al. (2010). "Exosomes: extracellular organelles important in intercellular communication." *J Proteomics* 73(10): 1907-1920.
- Gross, J. C., et al. (2012). "Active Wnt proteins are secreted on exosomes." *Nat Cell Biol* 14(10): 1036-1045.
- Sato-Kuwabara, Y., et al. (2015). "The fusion of two worlds: non-coding RNAs and extracellular vesicles--diagnostic and therapeutic implications (Review)." *Int J Oncol* 46(1): 17-27.
- Kanu, N., et al. (2002). "Transfer of scrapie prion infectivity by cell contact in culture." *Curr Biol* 12(7): 523-530.
- Gousset, K., et al. (2009). "Prions hijack tunnelling nanotubes for intercellular spread." *Nat Cell Biol* 11(3): 328-336.
- Fevrier, B., et al. (2004). "Cells release prions in association with exosomes." *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(26): 9683-9688.

- Vella, L. J., et al. (2007). "Packaging of prions into exosomes is associated with a novel pathway of PrP processing." *J Pathol* 211(5): 582-590.
- Whittal, R. M., et al. (2000). "Copper binding to octarepeat peptides of the prion protein monitored by mass spectrometry." *Protein Sci* 9(2): 332-343.
- Collinge, J., et al. (1994). "Prion protein is necessary for normal synaptic function." *Nature* 370(6487): 295-297.
- Maglio, L. E., et al. (2006). "Role of cellular prion protein on LTP expression in aged mice." *Brain Res* 1097(1): 11-18.
- Whittington, M. A., et al. (1995). "Rescue of neurophysiological phenotype seen in PrP null mice by transgene encoding human prion protein." *Nat Genet* 9(2): 197-201.
- Vassallo, N. and J. Herms (2003). "Cellular prion protein function in copper homeostasis and redox signalling at the synapse." *J Neurochem* 86(3): 538-544.
- Aguzzi, A. and A. K. K. Lakkaraju (2016). "Cell Biology of Prions and Prionoids: A Status Report." *Trends Cell Biol* 26(1): 40-51.
- Brown, D. R., et al. (1997). "Prion protein-deficient cells show altered response to oxidative stress due to decreased SOD-1 activity." *Exp Neurol* 146(1): 104-112.
- Brown, D. R., et al. (1997). "The cellular prion protein binds copper in vivo." *Nature* 390(6661): 684-687.
- Varela-Nallar, L., et al. (2006). "Role of copper in prion diseases: deleterious or beneficial?" *Curr Pharm Des* 12(20): 2587-2595.
- Curtis, J., et al. (2003). "Age-dependent loss of PTP and LTP in the hippocampus of PrP-null mice." *Neurobiol Dis* 13(1): 55-62.
- Jarosz-Griffiths, H. H., et al. (2016). "Amyloid-beta Receptors: The Good, the Bad, and the Prion Protein." *J Biol Chem* 291(7): 3174-3183.
- An, K., et al. (2013). "Exosomes neutralize synaptic-plasticity-disrupting activity of Abeta assemblies in vivo." *Mol Brain* 6: 47.

- Lauren, J., et al. (2009). "Cellular prion protein mediates impairment of synaptic plasticity by amyloid-beta oligomers." *Nature* 457(7233): 1128-1132.
- Walsh, D. M., et al. (2002). "Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo." *Nature* 416(6880): 535-539.
- Falker, C., et al. (2016). "Exosomal cellular prion protein drives fibrillization of amyloid beta and counteracts amyloid beta-mediated neurotoxicity." *J Neurochem* 137(1): 88-100.
- Hill, A. F., et al. (2000). "Species-barrier-independent prion replication in apparently resistant species." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(18): 10248-10253.
- Medori, R., et al. (1992). "Fatal familial insomnia: a second kindred with mutation of prion protein gene at codon 178." *Neurology* 42(3 Pt 1): 669-670.
- Guo, B. B., et al. (2015). "The neutral sphingomyelinase pathway regulates packaging of the prion protein into exosomes." *J Biol Chem* 290(6): 3455-3467.
- Vilette, D., et al. (2015). "Efficient inhibition of infectious prions multiplication and release by targeting the exosomal pathway." *Cell Mol Life Sci* 72(22): 4409-4427.
- Munich, S., et al. (2012). "Dendritic cell exosomes directly kill tumor cells and activate natural killer cells via TNF superfamily ligands." *Oncoimmunology* 1(7): 1074-1083.
- Mulcahy, L. A., et al. (2014). "Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake." *J Extracell Vesicles* 3.
- Tian, T., et al. (2013). "Dynamics of exosome internalization and trafficking." *J Cell Physiol* 228(7): 1487-1495.
- Bartel, D. P. (2004). "MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function." *Cell* 116(2): 281-297.
- Kosaka, N., et al. (2013). "Neutral sphingomyelinase 2 (nSMase2)-dependent exosomal transfer of angiogenic microRNAs regulate cancer cell metastasis." *J Biol Chem* 288(15): 10849-10859.

- Kosaka, N., et al. (2010). "Secretory mechanisms and intercellular transfer of microRNAs in living cells." *J Biol Chem* 285(23): 17442-17452.
- Pan, B. T. and R. Johnstone (1984). "Selective externalization of the transferrin receptor by sheep reticulocytes in vitro. Response to ligands and inhibitors of endocytosis." *J Biol Chem* 259(15): 9776-9782.
- Gruenberg, J. and F. G. van der Goot (2006). "Mechanisms of pathogen entry through the endosomal compartments." *Nat Rev Mol Cell Biol* 7(7): 495-504.
- Simpson, R. J., et al. (2012). "ExoCarta as a resource for exosomal research." *J Extracell Vesicles* 1.
- Villarroya-Beltri, C., et al. (2013). "Sumoylated hnRNPA2B1 controls the sorting of miRNAs into exosomes through binding to specific motifs." *Nat Commun* 4: 2980.
- Koppers-Lalic, D., et al. (2014). "Nontemplated nucleotide additions distinguish the small RNA composition in cells from exosomes." *Cell Rep* 8(6): 1649-1658.
- Skog, J., et al. (2008). "Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers." *Nat Cell Biol* 10(12): 1470-1476.
- Taylor, D. D. and C. Gerceel-Taylor (2008). "MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer." *Gynecol Oncol* 110(1): 13-21.
- Zhou, W., et al. (2014). "Cancer-secreted miR-105 destroys vascular endothelial barriers to promote metastasis." *Cancer Cell* 25(4): 501-515.
- van Balkom, B. W., et al. (2013). "Endothelial cells require miR-214 to secrete exosomes that suppress senescence and induce angiogenesis in human and mouse endothelial cells." *Blood* 121(19): 3997-4006, S3991-3915.
- Umezu, T., et al. (2013). "Leukemia cell to endothelial cell communication via exosomal miRNAs." *Oncogene* 32(22): 2747-2755.
- Murray, K. (2011). "Creutzfeldt-Jacob disease mimics, or how to sort out the subacute encephalopathy patient." *Pract Neurol* 11(1): 19-28.
- Caine, D., et al. (2015). "The cognitive profile of prion disease: a prospective clinical and imaging study." *Ann Clin Transl Neurol* 2(5): 548-558.

- Cooper, S. A., et al. (2005). "Isolated visual symptoms at onset in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease: the clinical phenotype of the "Heidenhain variant"." *Br J Ophthalmol* 89(10): 1341-1342.
- Thompson, A., et al. (2014). "Behavioral and psychiatric symptoms in prion disease." *Am J Psychiatry* 171(3): 265-274.
- Zerr, I., et al. (1997). "The 14-3-3 brain protein and transmissible spongiform encephalopathy." *N Engl J Med* 336(12): 874; author reply 874-875.
- Zanusso, G., et al. (2014). "A test for Creutzfeldt-Jakob disease using nasal brushings." *N Engl J Med* 371(19): 1842-1843.
- Luk, C., et al. (2016). "Diagnosing Sporadic Creutzfeldt-Jakob Disease by the Detection of Abnormal Prion Protein in Patient Urine." *JAMA Neurol* 73(12): 1454-1460.
- Beck, J., et al. (2014). "Validation of next-generation sequencing technologies in genetic diagnosis of dementia." *Neurobiol Aging* 35(1): 261-265.
- Bieschke, J., et al. (2004). "Autocatalytic self-propagation of misfolded prion protein." *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(33): 12207-12211.
- Caughey, B. (2003). "Prion protein conversions: insight into mechanisms, TSE transmission barriers and strains." *Br Med Bull* 66: 109-120.
- Chandler, R. L. (1961). "Encephalopathy in mice produced by inoculation with scrapie brain material." *Lancet* 1(7191): 1378-1379.
- Cho, H. J. (1976). "Is the scrapie agent a virus?" *Nature* 262(5567): 411-412.
- Gabizon, R., et al. (1988). "Immunoaffinity purification and neutralization of scrapie prion infectivity." *Proc Natl Acad Sci U S A* 85(18): 6617-6621.
- Kocisko, D. A., et al. (1994). "Cell-free formation of protease-resistant prion protein." *Nature* 370(6489): 471-474.
- Legname, G., et al. (2004). "Synthetic mammalian prions." *Science* 305(5684): 673-676.
- Race, R. E., et al. (1987). "Characterization of scrapie infection in mouse neuroblastoma cells." *J Gen Virol* 68 (Pt 5): 1391-1399.

- Rubenstein, R., et al. (1984). "In vitro replication of scrapie agent in a neuronal model: infection of PC12 cells." *J Gen Virol* 65 (Pt 12): 2191-2198.
- Saborio, G. P., et al. (2001). "Sensitive detection of pathological prion protein by cyclic amplification of protein misfolding." *Nature* 411(6839): 810-813.
- Stahl, N., et al. (1993). "Structural studies of the scrapie prion protein using mass spectrometry and amino acid sequencing." *Biochemistry* 32(8): 1991-2002.
- Caughey, B. (2001). "Interactions between prion protein isoforms: the kiss of death?" *Trends Biochem Sci* 26(4): 235-242.
- Caughey, B. and P. T. Lansbury (2003). "Protofibrils, pores, fibrils, and neurodegeneration: separating the responsible protein aggregates from the innocent bystanders." *Annu Rev Neurosci* 26: 267-298.
- Chabry, J., et al. (1998). "Specific inhibition of in vitro formation of protease-resistant prion protein by synthetic peptides." *J Biol Chem* 273(21): 13203-13207.
- Cohen, F. E. (1999). "Protein misfolding and prion diseases." *J Mol Biol* 293(2): 313-320.
- Cohen, F. E. and S. B. Prusiner (1998). "Pathologic conformations of prion proteins." *Annu Rev Biochem* 67: 793-819.
- Harris, D. A. (2003). "Trafficking, turnover and membrane topology of PrP." *Br Med Bull* 66: 71-85.
- Huang, Z., et al. (1996). "Scrapie prions: a three-dimensional model of an infectious fragment." *Fold Des* 1(1): 13-19.
- Knaus, K. J., et al. (2001). "Crystal structure of the human prion protein reveals a mechanism for oligomerization." *Nat Struct Biol* 8(9): 770-774.
- Scott, M. R., et al. (2000). "Transgenic models of prion disease." *Arch Virol Suppl*(16): 113-124.
- Telling, G. C., et al. (1996). "Interactions between wild-type and mutant prion proteins modulate neurodegeneration in transgenic mice." *Genes Dev* 10(14): 1736-1750.

- Zhang, H., et al. (1995). "Conformational transitions in peptides containing two putative alpha-helices of the prion protein." *J Mol Biol* 250(4): 514-526.
- Behrens, A. and A. Aguzzi (2002). "Small is not beautiful: antagonizing functions for the prion protein PrP(C) and its homologue Dpl." *Trends Neurosci* 25(3): 150-154.
- Brown, D. R. (2001). "Copper and prion disease." *Brain Res Bull* 55(2): 165-173.
- Brown, D. R., et al. (2002). "Lack of prion protein expression results in a neuronal phenotype sensitive to stress." *J Neurosci Res* 67(2): 211-224.
- Bueler, H., et al. (1992). "Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein." *Nature* 356(6370): 577-582.
- Manson, J. C., et al. (1994). "PrP gene dosage determines the timing but not the final intensity or distribution of lesions in scrapie pathology." *Neurodegeneration* 3(4): 331-340.
- Moore, R. C., et al. (1999). "Ataxia in prion protein (PrP)-deficient mice is associated with upregulation of the novel PrP-like protein doppel." *J Mol Biol* 292(4): 797-817.
- Pattison, I. H. and J. N. Jebbett (1973). "Clinical and histological recovery from the scrapie-like spongiform encephalopathy produced in mice by feeding them with cuprizone." *J Pathol* 109(3): 245-250.
- Qin, K., et al. (2000). "Copper(II)-induced conformational changes and protease resistance in recombinant and cellular PrP. Effect of protein age and deamidation." *J Biol Chem* 275(25): 19121-19131.
- Taraboulos, A., et al. (1992). "Synthesis and trafficking of prion proteins in cultured cells." *Mol Biol Cell* 3(8): 851-863.
- Bruce, M. E. and H. Fraser (1991). "Scrapie strain variation and its implications." *Curr Top Microbiol Immunol* 172: 125-138.
- Bruce, M. E., et al. (1991). "The disease characteristics of different strains of scrapie in Sinc congenic mouse lines: implications for the nature of the agent and host control of pathogenesis." *J Gen Virol* 72 (Pt 3): 595-603.
- Dickinson, A. G., et al. (1968). "Identification of a gene which controls the incubation period of some strains of scrapie agent in mice." *J Comp Pathol* 78(3): 293-299.

- Fraser, H. (1993). "Diversity in the neuropathology of scrapie-like diseases in animals." *Br Med Bull* 49(4): 792-809.
- Parchi, P., et al. (1999). "Classification of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease based on molecular and phenotypic analysis of 300 subjects." *Ann Neurol* 46(2): 224-233.
- Raymond, G. J., et al. (1997). "Molecular assessment of the potential transmissibilities of BSE and scrapie to humans." *Nature* 388(6639): 285-288.
- Telling, G. C., et al. (1994). "Transmission of Creutzfeldt-Jakob disease from humans to transgenic mice expressing chimeric human-mouse prion protein." *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(21): 9936-9940.
- Telling, G. C., et al. (1995). "Prion propagation in mice expressing human and chimeric PrP transgenes implicates the interaction of cellular PrP with another protein." *Cell* 83(1): 79-90.
- Westaway, D., et al. (1987). "Distinct prion proteins in short and long scrapie incubation period mice." *Cell* 51(4): 651-662.
- Aguzzi, A. (2003). "Prions and the immune system: a journey through gut, spleen, and nerves." *Adv Immunol* 81: 123-171.
- Aguzzi, A., et al. (2003). "Immune system and peripheral nerves in propagation of prions to CNS." *Br Med Bull* 66: 141-159.
- Banks, W. A., et al. (2004). "Passage of murine scrapie prion protein across the mouse vascular blood-brain barrier." *Biochem Biophys Res Commun* 318(1): 125-130.
- Brown, P., et al. (2001). "Blood infectivity and the prospects for a diagnostic screening test in Creutzfeldt-Jakob disease." *J Lab Clin Med* 137(1): 5-13.
- Cashman, N. R., et al. (1990). "Cellular isoform of the scrapie agent protein participates in lymphocyte activation." *Cell* 61(1): 185-192.
- Heppner, F. L., et al. (2001). "Transepithelial prion transport by M cells." *Nat Med* 7(9): 976-977.

- Kimberlin, R. H. and C. A. Walker (1979). "Pathogenesis of mouse scrapie: dynamics of agent replication in spleen, spinal cord and brain after infection by different routes." *J Comp Pathol* 89(4): 551-562.
- Klein, M. A., et al. (1997). "A crucial role for B cells in neuroinvasive scrapie." *Nature* 390(6661): 687-690.
- Outram, G. W., et al. (1974). "Reduced susceptibility to scrapie in mice after steroid administration." *Nature* 249(460): 855-856.
- Wadsworth, J. D., et al. (2001). "Tissue distribution of protease resistant prion protein in variant Creutzfeldt-Jakob disease using a highly sensitive immunoblotting assay." *Lancet* 358(9277): 171-180.
- Wells, G. A., et al. (1994). "Infectivity in the ileum of cattle challenged orally with bovine spongiform encephalopathy." *Vet Rec* 135(2): 40-41.
- Betmouni, S., et al. (1996). "Evidence for an early inflammatory response in the central nervous system of mice with scrapie." *Neuroscience* 74(1): 1-5.
- Budihardjo, I., et al. (1999). "Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis." *Annu Rev Cell Dev Biol* 15: 269-290.
- Chiesa, R., et al. (2000). "Accumulation of protease-resistant prion protein (PrP) and apoptosis of cerebellar granule cells in transgenic mice expressing a PrP insertional mutation." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(10): 5574-5579.
- Driscaldi, B., et al. (2003). "Mutant PrP is delayed in its exit from the endoplasmic reticulum, but neither wild-type nor mutant PrP undergoes retrotranslocation prior to proteasomal degradation." *J Biol Chem* 278(24): 21732-21743.
- Dorandeu, A., et al. (1998). "Neuronal apoptosis in fatal familial insomnia." *Brain Pathol* 8(3): 531-537.
- Hengartner, M. O. (2000). "The biochemistry of apoptosis." *Nature* 407(6805): 770-776.
- Hetz, C., et al. (2003). "Caspase-12 and endoplasmic reticulum stress mediate neurotoxicity of pathological prion protein." *EMBO J* 22(20): 5435-5445.

- Hetz, C., et al. (2005). "The disulfide isomerase Grp58 is a protective factor against prion neurotoxicity." *J Neurosci* 25(11): 2793-2802.
- MacDonald, S. T., et al. (1996). "Prion protein genotype and pathological phenotype studies in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease." *Neuropathol Appl Neurobiol* 22(4): 285-292.
- Prusiner, S. B. (1996). "Human prion diseases and neurodegeneration." *Curr Top Microbiol Immunol* 207: 1-17.
- Russelakis-Carneiro, M., et al. (2004). "Prion replication alters the distribution of synaptophysin and caveolin 1 in neuronal lipid rafts." *Am J Pathol* 165(5): 1839-1848.
- Solfrosi, L., et al. (2004). "Cross-linking cellular prion protein triggers neuronal apoptosis in vivo." *Science* 303(5663): 1514-1516.
- Taraboulos, A., et al. (1990). "Scrapie prion proteins accumulate in the cytoplasm of persistently infected cultured cells." *J Cell Biol* 110(6): 2117-2132.
- Wells, G. A. (1993). "Pathology of nonhuman spongiform encephalopathies: variations and their implications for pathogenesis." *Dev Biol Stand* 80: 61-69.
- Westaway, D., et al. (1994). "Degeneration of skeletal muscle, peripheral nerves, and the central nervous system in transgenic mice overexpressing wild-type prion proteins." *Cell* 76(1): 117-129.
- Bieschke, J., et al. (2000). "Ultrasensitive detection of pathological prion protein aggregates by dual-color scanning for intensely fluorescent targets." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(10): 5468-5473.
- Biffiger, K., et al. (2002). "Validation of a luminescence immunoassay for the detection of PrP(Sc) in brain homogenate." *J Virol Methods* 101(1-2): 79-84.
- Brown, P. (2000). "The risk of blood-borne Creutzfeldt--Jakob disease." *Dev Biol (Basel)* 102: 53-59.
- Jackman, R. and M. J. Schmerr (2003). "Analysis of the performance of antibody capture methods using fluorescent peptides with capillary zone electrophoresis with laser-induced fluorescence." *Electrophoresis* 24(5): 892-896.

- Korth, C., et al. (1997). "Prion (PrP^{Sc})-specific epitope defined by a monoclonal antibody." *Nature* 390(6655): 74-77.
- Korth, C., et al. (1999). "Monoclonal antibodies specific for the native, disease-associated isoform of the prion protein." *Methods Enzymol* 309: 106-122.
- Oesch, B., et al. (2000). "Application of Prionics Western blotting procedure to screen for BSE in cattle regularly slaughtered at Swiss abattoirs." *Arch Virol Suppl*(16): 189-195.
- Proske, D., et al. (2002). "Prion-protein-specific aptamer reduces PrP^{Sc} formation." *Chembiochem* 3(8): 717-725.
- Prusiner, S. B. (1998). "Prions." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(23): 13363-13383.
- Rubenstein, R., et al. (1998). "Detection and discrimination of PrP^{Sc} by multi-spectral ultraviolet fluorescence." *Biochem Biophys Res Commun* 246(1): 100-106.
- Safar, J., et al. (1998). "Eight prion strains have PrP(Sc) molecules with different conformations." *Nat Med* 4(10): 1157-1165.
- Safar, J. G., et al. (2002). "Measuring prions causing bovine spongiform encephalopathy or chronic wasting disease by immunoassays and transgenic mice." *Nat Biotechnol* 20(11): 1147-1150.
- Schmerr, M. J., et al. (1999). "Use of capillary electrophoresis and fluorescent labeled peptides to detect the abnormal prion protein in the blood of animals that are infected with a transmissible spongiform encephalopathy." *J Chromatogr A* 853(1-2): 207-214.
- Shaked, G. M., et al. (2001). "A protease-resistant prion protein isoform is present in urine of animals and humans affected with prion diseases." *J Biol Chem* 276(34): 31479-31482.
- Wadsworth, J. D., et al. (2001). "Tissue distribution of protease resistant prion protein in variant Creutzfeldt-Jakob disease using a highly sensitive immunoblotting assay." *Lancet* 358(9277): 171-180.
- Zou, W. Q., et al. (2004). "Antibody to DNA detects scrapie but not normal prion protein." *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(5): 1380-1385.

- Doh-ura, K., et al. (2004). "Treatment of transmissible spongiform encephalopathy by intraventricular drug infusion in animal models." *J Virol* 78(10): 4999-5006.
- Dormont, D. (2003). "Approaches to prophylaxis and therapy." *Br Med Bull* 66: 281-292.
- Enari, M., et al. (2001). "Scrapie prion protein accumulation by scrapie-infected neuroblastoma cells abrogated by exposure to a prion protein antibody." *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(16): 9295-9299.
- Forloni, G., et al. (2002). "Tetracyclines affect prion infectivity." *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(16): 10849-10854.
- Hartsel, S. and J. Bolard (1996). "Amphotericin B: new life for an old drug." *Trends Pharmacol Sci* 17(12): 445-449.
- Kaneko, K., et al. (1997). "Evidence for protein X binding to a discontinuous epitope on the cellular prion protein during scrapie prion propagation." *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(19): 10069-10074.
- Korth, C., et al. (2001). "Acridine and phenothiazine derivatives as pharmacotherapeutics for prion disease." *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(17): 9836-9841.
- Mehmet, H. (2000). "Caspases find a new place to hide." *Nature* 403(6765): 29-30.
- Nakagawa, T., et al. (2000). "Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta." *Nature* 403(6765): 98-103.
- Peretz, D., et al. (2001). "Antibodies inhibit prion propagation and clear cell cultures of prion infectivity." *Nature* 412(6848): 739-743.
- Perrier, V., et al. (2000). "Mimicking dominant negative inhibition of prion replication through structure-based drug design." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(11): 6073-6078.
- Polymenidou, M., et al. (2004). "Humoral immune response to native eukaryotic prion protein correlates with anti-prion protection." *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 Suppl 2: 14670-14676.

- Schenk, D., et al. (1999). "Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse." *Nature* 400(6740): 173-177.
- Sigurdsson, E. M., et al. (2002). "Immunization delays the onset of prion disease in mice." *Am J Pathol* 161(1): 13-17.
- Soto, C., et al. (2000). "Reversion of prion protein conformational changes by synthetic beta-sheet breaker peptides." *Lancet* 355(9199): 192-197.
- Tagliavini, F., et al. (1997). "Effectiveness of anthracycline against experimental prion disease in Syrian hamsters." *Science* 276(5315): 1119-1122.
- Tatzelt, J., et al. (1996). "Chemical chaperones interfere with the formation of scrapie prion protein." *EMBO J* 15(23): 6363-6373.
- Weissmann, C. and A. Aguzzi (2005). "Approaches to therapy of prion diseases." *Annu Rev Med* 56: 321-344.
- Carrell, R. W. and B. Gooptu (1998). "Conformational changes and disease--serpins, prions and Alzheimer's." *Curr Opin Struct Biol* 8(6): 799-809.
- Fink, A. L. (1999). "Chaperone-mediated protein folding." *Physiol Rev* 79(2): 425-449.
- Glenner, G. G. (1980). "Amyloid deposits and amyloidosis. The beta-fibrilloses (first of two parts)." *N Engl J Med* 302(23): 1283-1292.
- Harper, J. D., et al. (1999). "Assembly of A beta amyloid protofibrils: an in vitro model for a possible early event in Alzheimer's disease." *Biochemistry* 38(28): 8972-8980.
- Kuo, Y. M., et al. (1996). "Water-soluble Abeta (N-40, N-42) oligomers in normal and Alzheimer disease brains." *J Biol Chem* 271(8): 4077-4081.
- Levine, H., 3rd (1995). "Soluble multimeric Alzheimer beta(1-40) pre-amyloid complexes in dilute solution." *Neurobiol Aging* 16(5): 755-764.
- Masliah, E., et al. (2000). "Dopaminergic loss and inclusion body formation in alpha-synuclein mice: implications for neurodegenerative disorders." *Science* 287(5456): 1265-1269.

- Oddo, S., et al. (2003). "Amyloid deposition precedes tangle formation in a triple transgenic model of Alzheimer's disease." *Neurobiol Aging* 24(8): 1063-1070.
- Perutz, M. F., et al. (1994). "Glutamine repeats as polar zippers: their possible role in inherited neurodegenerative diseases." *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(12): 5355-5358.
- Sadqi, M., et al. (2002). "Alpha-helix structure in Alzheimer's disease aggregates of tau-protein." *Biochemistry* 41(22): 7150-7155.
- Scherzinger, E., et al. (1997). "Huntingtin-encoded polyglutamine expansions form amyloid-like protein aggregates in vitro and in vivo." *Cell* 90(3): 549-558.
- Serpell, L. C., et al. (2000). "Fiber diffraction of synthetic alpha-synuclein filaments shows amyloid-like cross-beta conformation." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(9): 4897-4902.
- Serpell, L. C., et al. (2000). "Molecular structure of a fibrillar Alzheimer's A beta fragment." *Biochemistry* 39(43): 13269-13275.
- Sipe, J. D. (1992). "Amyloidosis." *Annu Rev Biochem* 61: 947-975.
- Soto, C. (2001). "Protein misfolding and disease; protein refolding and therapy." *FEBS Lett* 498(2-3): 204-207.
- Soto, C., et al. (1994). "Structural determinants of the Alzheimer's amyloid beta-peptide." *J Neurochem* 63(4): 1191-1198.
- Thomas, P. J., et al. (1995). "Defective protein folding as a basis of human disease." *Trends Biochem Sci* 20(11): 456-459.
- Walsh, D. M., et al. (1999). "Amyloid beta-protein fibrillogenesis. Structure and biological activity of protofibrillar intermediates." *J Biol Chem* 274(36): 25945-25952.
- Zoghbi, H. Y. and H. T. Orr (2000). "Glutamine repeats and neurodegeneration." *Annu Rev Neurosci* 23: 217-247.
- Lindquist, S. (1997). "Mad cows meet psi-chotic yeast: the expansion of the prion hypothesis." *Cell* 89(4): 495-498.
- Masison, D. C., et al. (2000). "[URE3] and [PSI] are prions of yeast and evidence for new fungal prions." *Curr Issues Mol Biol* 2(2): 51-59.

- Stefani, M. and C. M. Dobson (2003). "Protein aggregation and aggregate toxicity: new insights into protein folding, misfolding diseases and biological evolution." *J Mol Med (Berl)* 81(11): 678-699.
- Uptain, S. M. and S. Lindquist (2002). "Prions as protein-based genetic elements." *Annu Rev Microbiol* 56: 703-741.
- Wickner, R. B., et al. (1999). "Prions of yeast and fungi. Proteins as genetic material." *J Biol Chem* 274(2): 555-558.
- Wickner, R. B., et al. (2004). "Prion genetics: new rules for a new kind of gene." *Annu Rev Genet* 38: 681-707.
- Striebel, J. F., et al. (2013). "Lack of influence of prion protein gene expression on kainate-induced seizures in mice: studies using congenic, coisogenic and transgenic strains." *Neuroscience* 238: 11-18.
- Mercer, R. C., et al. (2013). "The prion protein modulates A-type K⁺ currents mediated by Kv4.2 complexes through dipeptidyl aminopeptidase-like protein 6." *J Biol Chem* 288(52): 37241-37255.
- King, B., et al. (2015). "IKCa channels are a critical determinant of the slow AHP in CA1 pyramidal neurons." *Cell Rep* 11(2): 175-182.
- Tatsuki, F., et al. (2016). "Involvement of Ca²⁺-Dependent Hyperpolarization in Sleep Duration in Mammals." *Neuron* 90(1): 70-85.
- Jendroska, K., et al. (1991). "Proteinase-resistant prion protein accumulation in Syrian hamster brain correlates with regional pathology and scrapie infectivity." *Neurology* 41(9): 1482-1490.
- Kimberlin, R. H. and C. A. Walker (1986). "Pathogenesis of scrapie (strain 263K) in hamsters infected intracerebrally, intraperitoneally or intraocularly." *J Gen Virol* 67 (Pt 2): 255-263.
- Kimberlin, R. H. and C. A. Walker (1989). "The role of the spleen in the neuroinvasion of scrapie in mice." *Virus Res* 12(3): 201-211.
- Watts, J. C., et al. (2014). "Evidence that bank vole PrP is a universal acceptor for prions." *PLoS Pathog* 10(4): e1003990.

- Striebel, J. F., et al. (2011). "Strain specific resistance to murine scrapie associated with a naturally occurring human prion protein polymorphism at residue 171." *PLoS Pathog* 7(9): e1002275.
- Bueler, H., et al. (1993). "Mice devoid of PrP are resistant to scrapie." *Cell* 73(7): 1339-1347.
- Sailer, A., et al. (1994). "No propagation of prions in mice devoid of PrP." *Cell* 77(7): 967-968.
- Manson, J. C., et al. (1994). "129/Ola mice carrying a null mutation in PrP that abolishes mRNA production are developmentally normal." *Mol Neurobiol* 8(2-3): 121-127.
- Sakaguchi, S., et al. (1996). "Loss of cerebellar Purkinje cells in aged mice homozygous for a disrupted PrP gene." *Nature* 380(6574): 528-531.
- Nuvolone, M., et al. (2016). "Strictly co-isogenic C57BL/6J-Prnp^{-/-} mice: A rigorous resource for prion science." *J Exp Med* 213(3): 313-327.
- Asante, E. A., et al. (2002). "BSE prions propagate as either variant CJD-like or sporadic CJD-like prion strains in transgenic mice expressing human prion protein." *EMBO J* 21(23): 6358-6366.
- Asante, E. A., et al. (2015). "A naturally occurring variant of the human prion protein completely prevents prion disease." *Nature* 522(7557): 478-481.
- Beringue, V., et al. (2008). "Prominent and persistent extraneural infection in human PrP transgenic mice infected with variant CJD." *PLoS One* 3(1): e1419.
- Fischer, M., et al. (1996). "Prion protein (PrP) with amino-proximal deletions restoring susceptibility of PrP knockout mice to scrapie." *EMBO J* 15(6): 1255-1264.
- Giles, K., et al. (2012). "Identification of I137M and other mutations that modulate incubation periods for two human prion strains." *J Virol* 86(11): 6033-6041.
- Hill, A. F., et al. (1997). "Diagnosis of new variant Creutzfeldt-Jakob disease by tonsil biopsy." *Lancet* 349(9045): 99-100.
- Hsiao, K., et al. (1989). "Linkage of a prion protein missense variant to Gerstmann-Straussler syndrome." *Nature* 338(6213): 342-345.

- Kitamoto, T., et al. (1996). "Humanized prion protein knock-in by Cre-induced site-specific recombination in the mouse." *Biochem Biophys Res Commun* 222(3): 742-747.
- Meier, P., et al. (2003). "Soluble dimeric prion protein binds PrP(Sc) in vivo and antagonizes prion disease." *Cell* 113(1): 49-60.
- Owen, F., et al. (1989). "Insertion in prion protein gene in familial Creutzfeldt-Jakob disease." *Lancet* 1(8628): 51-52.
- Shmerling, D., et al. (1998). "Expression of amino-terminally truncated PrP in the mouse leading to ataxia and specific cerebellar lesions." *Cell* 93(2): 203-214.
- Scott, M., et al. (1989). "Transgenic mice expressing hamster prion protein produce species-specific scrapie infectivity and amyloid plaques." *Cell* 59(5): 847-857.
- Sorce, S., et al. (2014). "The role of the NADPH oxidase NOX2 in prion pathogenesis." *PLoS Pathog* 10(12): e1004531.
- Zhu, C., et al. (2016). "A neuroprotective role for microglia in prion diseases." *J Exp Med* 213(6): 1047-1059.
- Mahal, S. P., et al. (2007). "Prion strain discrimination in cell culture: the cell panel assay." *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(52): 20908-20913.
- van der Merwe, J., et al. (2015). "The standard scrapie cell assay: development, utility and prospects." *Viruses* 7(1): 180-198.
- Kuffer, A., et al. (2016). "The prion protein is an agonistic ligand of the G protein-coupled receptor Adgrg6." *Nature* 536(7617): 464-468.
- Diack, A. B., et al. (2014). "Variably protease-sensitive prionopathy, a unique prion variant with inefficient transmission properties." *Emerg Infect Dis* 20(12): 1969-1979.
- Notari, S., et al. (2014). "Transmission characteristics of variably protease-sensitive prionopathy." *Emerg Infect Dis* 20(12): 2006-2014.
- Vanik, D. L., et al. (2004). "Molecular basis of barriers for interspecies transmissibility of mammalian prions." *Mol Cell* 14(1): 139-145.
- Mead, S., et al. (2003). "Balancing selection at the prion protein gene consistent with prehistoric kurulike epidemics." *Science* 300(5619): 640-643.

- Monari, L., et al. (1994). "Fatal familial insomnia and familial Creutzfeldt-Jakob disease: different prion proteins determined by a DNA polymorphism." *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(7): 2839-2842.
- Hizume, M., et al. (2009). "Human prion protein (PrP) 219K is converted to PrP^{Sc} but shows heterozygous inhibition in variant Creutzfeldt-Jakob disease infection." *J Biol Chem* 284(6): 3603-3609.
- Beck, J. A., et al. (2010). "PRNP allelic series from 19 years of prion protein gene sequencing at the MRC Prion Unit." *Hum Mutat* 31(7): E1551-1563.
- Daude, N., et al. (2003). "Specific inhibition of pathological prion protein accumulation by small interfering RNAs." *J Cell Sci* 116(Pt 13): 2775-2779.
- Tilly, G., et al. (2003). "Efficient and specific down-regulation of prion protein expression by RNAi." *Biochem Biophys Res Commun* 305(3): 548-551.
- Schmidt, F. R. (2005). "About the nature of RNA interference." *Appl Microbiol Biotechnol* 67(4): 429-435.
- Campochiaro, P. A. (2006). "Potential applications for RNAi to probe pathogenesis and develop new treatments for ocular disorders." *Gene Ther* 13(6): 559-562.
- Davidson, B. L. and R. L. Boudreau (2007). "RNA interference: a tool for querying nervous system function and an emerging therapy." *Neuron* 53(6): 781-788.
- Pfeifer, A., et al. (2006). "Lentivector-mediated RNAi efficiently suppresses prion protein and prolongs survival of scrapie-infected mice." *J Clin Invest* 116(12): 3204-3210.
- White, M. D., et al. (2008). "Single treatment with RNAi against prion protein rescues early neuronal dysfunction and prolongs survival in mice with prion disease." *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(29): 10238-10243.
- Sutou, S., et al. (2007). "Knockdown of the bovine prion gene PRNP by RNA interference (RNAi) technology." *BMC Biotechnol* 7: 44.
- Kim, Y., et al. (2009). "Changes in gene expression of kringle domain-containing proteins in murine brains and neuroblastoma cells infected by prions." *Mol Cell Biochem* 328(1-2): 177-182.

Αγγελίδης Χαράλαμπος, Αν.Καθηγητής Βιολογίας, 2010

Burton E. Tropp (2008) *Molecular Biology, genes to proteins*, Section 5, chapter 17, page 810, third edition

Aguzzi, A., et al. (2007). "Insights into prion strains and neurotoxicity." *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(7): 552-561.

Snow, A. D., et al. (1989). "Sulfated glycosaminoglycans in amyloid plaques of prion diseases." *Acta Neuropathol* 77(4): 337-342.

Gabizon, R., et al. (1993). "Heparin-like molecules bind differentially to prion-proteins and change their intracellular metabolic fate." *J Cell Physiol* 157(2): 319-325.

Ingrosso, L., et al. (1995). "Congo red prolongs the incubation period in scrapie-infected hamsters." *J Virol* 69(1): 506-508.

Klajnert, B., et al. (2007). "Influence of phosphorus dendrimers on the aggregation of the prion peptide PrP 185-208." *Biochem Biophys Res Commun* 364(1): 20-25.

Terzano, M. G., et al. (1983). "The effect of amantadine on arousal and EEG patterns in Creutzfeldt-Jakob disease." *Arch Neurol* 40(9): 555-559.

Otto, M., et al. (2004). "Efficacy of flupirtine on cognitive function in patients with CJD: A double-blind study." *Neurology* 62(5): 714-718.

Geschwind, M. D., et al. (2013). "Quinacrine treatment trial for sporadic Creutzfeldt-Jakob disease." *Neurology* 81(23): 2015-2023.

Assar, H., et al. (2015). "A case of variably protease-sensitive prionopathy treated with doxycyclin." *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 86(7): 816-818.

Herrmann, U. S., et al. (2015). "Prion infections and anti-PrP antibodies trigger converging neurotoxic pathways." *PLoS Pathog* 11(2): e1004662.

Sonati, T., et al. (2013). "The toxicity of antiprion antibodies is mediated by the flexible tail of the prion protein." *Nature* 501(7465): 102-106.

Nilsson, K. P., et al. (2005). "Conjugated polyelectrolytes: conformation-sensitive optical probes for detection of amyloid fibril formation." *Biochemistry* 44(10): 3718-3724.

- Margalith, I., et al. (2012). "Polythiophenes inhibit prion propagation by stabilizing prion protein (PrP) aggregates." *J Biol Chem* 287(23): 18872-18887.
- Kenward, N., et al. (1994). "Expression of polyubiquitin and heat-shock protein 70 genes increases in the later stages of disease progression in scrapie-infected mouse brain." *J Neurochem* 62(5): 1870-1877.
- Deriziotis, P., et al. (2011). "Misfolded PrP impairs the UPS by interaction with the 20S proteasome and inhibition of substrate entry." *EMBO J* 30(15): 3065-3077.
- Ma, J. and S. Lindquist (2002). "Conversion of PrP to a self-perpetuating PrP^{Sc}-like conformation in the cytosol." *Science* 298(5599): 1785-1788.
- Deshaies, R. J. (2015). "Protein degradation: Prime time for PROTACs." *Nat Chem Biol* 11(9): 634-635.
- Dantuma, N. P. and L. C. Bott (2014). "The ubiquitin-proteasome system in neurodegenerative diseases: precipitating factor, yet part of the solution." *Front Mol Neurosci* 7: 70.
- Kalmar, B., et al. (2012). "Treatment with a coinducer of the heat shock response delays muscle denervation in the SOD1-G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis." *Amyotroph Lateral Scler* 13(4): 378-392.
- Dufey, E., et al. (2014). "Cellular mechanisms of endoplasmic reticulum stress signaling in health and disease. 1. An overview." *Am J Physiol Cell Physiol* 307(7): C582-594.
- Shorter, J. and S. Lindquist (2004). "Hsp104 catalyzes formation and elimination of self-replicating Sup35 prion conformers." *Science* 304(5678): 1793-1797.
- Sethi, S., et al. (2002). "Postexposure prophylaxis against prion disease with a stimulator of innate immunity." *Lancet* 360(9328): 229-230.
- Aguzzi, A., et al. (2013). "The immunobiology of prion diseases." *Nat Rev Immunol* 13(12): 888-902.
- Rouvinski, A., et al. (2014). "Live imaging of prions reveals nascent PrP^{Sc} in cell-surface, raft-associated amyloid strings and webs." *J Cell Biol* 204(3): 423-441.

Dearmond, S. J. and K. Bajsarowicz (2010). "PrPSc accumulation in neuronal plasma membranes links Notch-1 activation to dendritic degeneration in prion diseases." *Mol Neurodegener* 5: 6.

Geschwind MD, Shu H, Haman A, et al. Rapidly progressive dementia. *Ann Neurol* 2008;64:97-108.

Peden AH, McCuire LI, Appleford NE, et al. Sensitive and specific detection of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease brain prion protein using real-time quaking-induced conversion. *J Gen Virol* 2012;93 (Pt 2):438-49.

Ohshima K, Inoue K, Fujiwara A, Hatakeyama K, Kanto K, Watanabe Y, et al. Let-7 micro-RNA family is selectively secreted into the extracellular environment via exosomes in a metastatic gastric cancer cell line. *PLoS One* 2010;5:e13247.