

Apolipoprotein E Polymorphism in Multiple Sclerosis

Thesis Submitted for Partial Fulfillment of M.D. Degree
in Neurology

Presented by

Heba Mahmoud Esmail Khafaga
M.B.B.Ch., M.SC.

Under Supervision of

Prof. Mohamad Osama Abdulghani

*Professor of Neurology
Faculty of Medicine
Ain Shams Univeristy*

Prof. Fatthy Mohamed Abdel-Tawab

*Professor of Genetics and Molecular Biology
Faculty of Agriculture
Ain Shams Univeristy*

Prof. Samia Ashour Mohamed

*Professor of Neurology
Faculty of Medicine
Ain Shams Univeristy*

Prof. Ayman Mohamad Nassef

*Professor of Neurology
Faculty of Medicine
Ain Shams Univeristy*

Dr. Ahmed Abdel-Monem Gaber

*Assistant Professor of Neurology
Faculty of Medicine
Ain Shams Univeristy*

Faculty of Medicine
Ain Shams Univeristy
2010

التعدد الشكلي للأبوليبيروتين إى فى مرض التصلب المتناثر للجهاز العصبى

رسالة مقدمة

توطئة للحصول على درجة الدكتوراة فى الأمراض العصبية

مقدمة من

طبيبة / هبة محمود إسماعيل خفاجة

ماجستير الأمراض العصبية و النفسية

تحت إشراف

الأستاذ الدكتور / محمد أسامة عبد الغنى الأستاذ الدكتور / فتحى محمد عبد التواب

أستاذ الوراثة والبيولوجيا الجزيئية
كلية الزراعة
جامعة عين شمس

أستاذ الأمراض العصبية
كلية الطب
جامعة عين شمس

الأستاذ الدكتور / سامية عاشور محمد

أستاذ الأمراض العصبية
كلية الطب
جامعة عين شمس

الأستاذ الدكتور / أيمن محمد ناصف الدكتور / أحمد عبد المنعم جابر

أستاذ مساعد الأمراض العصبية
كلية الطب
جامعة عين شمس

أستاذ الأمراض العصبية
كلية الطب
جامعة عين شمس

كلية الطب
جامعة عين شمس

٢٠١٠

Protocol

Multiple sclerosis (MS) is the most frequent neurological autoimmune disorder and the leading cause of serious neurological disability in early adulthood (**Poser, 1994**).

The phenotype is highly variable with symptoms including gait disorder, visual loss, spasticity and fatigue (**McAlpine et al., 1972**). In Canada, the prevalence of MS is $\sim 1/1000$ or 0.1% among Caucasians of central and northern European origin (**Sweeney et al., 1986; Hader et al., 1988**). There is also a well recognized preponderance of females which approaches a female to male ratio of 2:1. The average age for MS onset is between 28-30 with females having their first symptom a year or two earlier than males (**Weinshenker et al., 1989**). This has been attributed to environmental and genetic factors (**Sawcer et al., 1997**). However, genetic factors may not only influence a person's susceptibility for multiple sclerosis but can also be expected to modulate the course of the disease (**Lublin and Reingold, 1996**).

The clinical course of multiple sclerosis is variable. Available data on the natural history of the disease suggest that approximately 50% of patients will have progressive MS within 10 years of their initial attacks and require some form of walking aid within 15 years after the onset of the disease. By contrast, 20% to 40% of patients experience a benign course of MS with minor disability after 10 years of diagnosis (**Weinshenker, 1995**).

This diversity may be, in part, due to different pathogenic mechanisms involved in the evolution of this disease. More recently, however, interest has also focused on genetic factors that may influence the prognosis of MS (**Weinshenker and Kantarci, 2000**). Apolipoprotein E (APOE) polymorphism has been a candidate for such investigations.

Apolipoprotein E, a 35-kDa plasma protein synthesized mainly in the liver, is involved in cholesterol transport and metabolism (**Mahley, 1988**). APOE is also expressed in other tissues, notably the brain, the second most prolific tissue in terms of APOE production (**Elshourbagy et al., 1985**). Human APOE has three major isoforms, E2, E3, and E4, and these are produced by three independent alleles at a single genetic

locus which is located on chromosome 19 (**Zannis and Breslow, 1981**). Thus, three homozygous (E2/E2, E3/E3, and E4/E4) and three heterozygous (E2/E3, E3/E4, and E2/E4) phenotypes are represented.

In various cell lines APOE3 has been shown to increase the growth and branching of neurites, whereas APOE4 was found to have the opposite effect (**Nathan et al., 1994**). At least equally important in the context of multiple sclerosis, there have been several reports indicating that APOE is involved in lipid redistribution after demyelination. Therefore, an isoform specific differential effect of APOE may not only affect the preservation of axons but also the process of remyelination (**Boyles et al., 1989**).

Apolipoprotein E also exerts anti-inflammatory and neuroprotective effects in the CNS. Recent clinical and genetic studies display an association between APOE genotype and the progression and severity of multiple sclerosis, raising the possibility that modulation of APOE may be a novel treatment for multiple sclerosis (**Li et al., 2006**).

The E4 allele is associated with an increased risk and earlier age of onset of both familial and sporadic Alzheimer's disease (**Saunders et al., 1993**). In motor neuron disease the E4 allele is more common in the more severe bulbar onset compared with limb onset type (**al-Chalabi et al., 1996**). Patients with APOE4 alleles who have haemorrhagic strokes have a poorer prognosis (**Alberts et al., 1995**) and after head injury, E4 patients seem to be associated with poorer recovery than non-E4 patients (**Roses and Saunders, 1995**).

Because MS is characterized by repeated damage to the central nervous system followed by attempts to repair, it is speculated that the APOE genotype could also affect the prognosis of the disease. Initially, support for these speculations came from the results of relatively small cross-sectional studies on MS that usually involved fewer than 100 patients and found a severe outcome in those with E4 allele (**Sylantiev et al., 1998; Dousset et al., 1998; Evangelou et al., 1999**). Two subsequent investigations on larger number of patients yielded conflicting results. One study found no relationship between any of the APOE alleles or genotypes with disease progression (**Weatherby et al., 2000a**), whereas in another study, a significantly faster progression of MS was observed in patients homozygous for the APOE4 allele (**Hugh et al., 2000**).

Aim of the work:

To study the association of apolipoprotein E polymorphism with multiple sclerosis.

To study the role of apolipoprotein E polymorphism in clinical types and severity of multiple sclerosis.

Subjects and methods:

Subjects:

Two groups will be included: -

(a) Patients group (b) Control group.

a) Patients Group:

We will collect 60 patients diagnosed as having multiple sclerosis, for at least 2 years from the onset, according to revised McDonald criteria admitted to Ain Shams University Hospital or Ain Shams University Specialized Hospital.

The revised McDonald criteria for diagnosis of MS:

- For 2 or more attacks with objective clinical evidence of two or more lesions, no additional data are needed for MS diagnosis.
- For 2 or more attacks with objective clinical evidence of one lesion, additional criteria of dissemination in space may include either MRI or 2 or more MRI-detected lesions consistent with MS plus positive CSF findings or waiting for another clinical attack affecting a different clinical site.
- For 1 attack with objective clinical evidence of 2 or more lesions, additional data needed are dissemination in time demonstrated by MRI or second clinical attack.
- For 1 monosymptomatic attack with objective evidence of 1 lesion, additional data required are (1) dissemination in space with positive MRI result or 2 or more MRI-detected lesions consistent with MS plus positive CSF findings; and (2) dissemination in time demonstrated by MRI or second clinical attack.
- For insidious neurologic progression suggestive of MS, additional data needed for diagnosis are 1 year of disease progression and 2 of the following: (1) positive brain MRI findings (9 T2 lesions or ≥ 4

T2 lesions with positive visual evoked potentials), (2) positive spinal cord MRI findings (≥ 2 focal T2 lesions), and (3) positive CSF findings (**Polman et al., 2005**).

b) Control Group:

30 subjects will be included with no personal nor family history of multiple sclerosis, who matched patients group as regards age and sex. This group will undergo the same clinical evaluation, genetic testing and genotyping as the patients group.

Methods:

An informed written consent will be taken from subjects of both patients and control groups.

All patients were subjected to the following:-

1- Clinical evaluation including history taking and complete physical, medical and neurological examination, especially:

- Age of the onset of disease
- Duration of illness
- The number of relapses

2- Family pedigree study to detect patients with family history of multiple sclerosis.

3- Assessment of the severity of the multiple sclerosis using the Expanded Disability Status Scale (EDSS) (Kurtzke, 1983).

4- Laboratory investigations including:

- a) Routine laboratory investigations: complete blood count (CBC), liver and kidney functions tests and serum electrolytes.
- b) Genetic profile: polymerase chain reaction (PCR) will be performed to detect the presence of genetic polymorphism and genotyping of the APOE gene. This will be performed in the Department of Genetics, Faculty of Agriculture, Ain Shams University.

5- Magnetic resonance imaging of the brain +/- spinal cord for: numbers of lesions, site of lesions (brain or spinal or both), evidence of activity.

6- Statistical analysis.

References:

- al-Chalabi A, Enayat ZE, Bakker MC, Sham PC, Ball DM, Shaw CE, Lloyd CM, Powell JF, Leigh PN. Association of apolipoprotein E epsilon 4 allele with bulbar-onset motor neuron disease. *Lancet* 1996; 347:159-160.
- Alberts MJ, Graffagnino C, McClenny C, DeLong D, Strittmatter WJ, Saunders AM, Roses AD. ApoE genotype and survival from intracerebral haemorrhage. *Lancet* 1995; 346:575.
- Boyles JK, Zoellner CD, Anderson LJ, Kosik LM, Pitas RE, Weisgraber KH, Hui DY, Mahley RW, Gebicke-Haerter PJ, Ignatius MJ, and Shooter EM. A role for apolipoprotein E, apolipoprotein A-I, and low density lipoprotein receptors in cholesterol transport during regeneration and remyelination of the rat sciatic nerve. *J Clin Invest* 1989; 83:1015-1031.
- Dousset V, Gayou A, Brochet B, Iron A. ApoE polymorphism in multiple sclerosis. *Mult Scler* 1998; 4: 357.
- Elshourbagy NA, Liao WS, Mahley RW, Taylor JM. Apolipoprotein E mRNA is abundant in the brain and adrenals, as well as in the liver, and is present in other peripheral tissues of rats and marmosets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985; 82:203-207.
- Evangelou N, Jackson M, Beeson D, Palace J. Association of the APOE 4 allele with disease activity in multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1999; 67:203-205.
- Hader WJ, Elliott M, Ebers GC. Epidemiology of multiple sclerosis in London Ontario, Canada. *Neurology* 1988; 38, 617-621.
- Hugh P, Oturai A, Schreiber K, Blinkenberg M, Jørgensen OS, Ryder L, Paulson OB, Sørensen PS, Knudsen GM. Apolipoprotein E (APOE) and multiple sclerosis: impact of the epsilon-4 allele on susceptibility, clinical type and progression rate. *Multiple Sclerosis*, August 1, 2000; 6(4): 226 - 230.
- Kurtzke JF. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology* 1983; 33:1444-1452.
- Li F-Q, Sempowski GD, McKenna SE, Laskowitz DT, Colton CA, Vitek MP. Apolipoprotein E-derived peptides ameliorate clinical disability and inflammatory infiltrates into the spinal cord in a murine model of multiple sclerosis. *Journal of Pharmacology And Experimental Therapeutics Fast Forward*. September 1, 2006; 318(3): 956 - 965.

- Lublin FD, Reingold SC. Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. *Neurology* 1996; 46:907-911.
- Mahley RW. Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science* 1988; 240:622-630.
- McAlpine D, Lumsden CE, Acheson ED, eds. *Multiple Sclerosis: A Reappraisal*. 1972. Churchill Livingstone, Edinburgh.
- Nathan BP, Bellosta S, Sanan DA, Weisgraber KH, Mahley RW, Pitas RE. Differential effects of apolipoprotein E3 and E4 on neuronal growth in vitro. *Science* 1994; 264:850-852.
- Polman CH, Reingold SC, Edan G, Filippi M, Hartung H-P, Kappos L, Lublin FD, Metz LM, McFarland HF, O'Connor PW, Sandberg-Wollheim M, Thompson AJ, Weinshenker BG, Wolinsky JS. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 revisions to the "McDonald criteria." *Ann Neurol* 2005; 56:840-864.
- Poser C. The epidemiology of multiple sclerosis. A general overview. *Ann Neurol* 1994; 36(suppl 2):S180-S193.
- Roses AD, Saunders A. Head injury, amyloid beta and Alzheimer's disease. *Nat Med* 1995; 1:603-604.
- Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel D, George-Hyslop PH, Pericak-Vance MA, Joo SH, Rosi BL, Gusella JF, Crapper-MacLachlan DR, Alberts MJ, et al. Association of apolipoprotein E allele epsilon 4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease. *Neurology* 1993; 43:1467-1472.
- Sawcer S, Goodfellow PN, Compston A. The genetic analysis of multiple sclerosis. *Trends Genet* 1997; 13:234-239
- Sweeney, V.P., Sadovnick, A.D. and Brandeys, V. Prevalence of multiple sclerosis in British Columbia. *Can. J. Neurol. Sci.* 1986; 13, 47-51.
- Sylantiev C, Chapman J, Chilkevich O. The ApoE 4 allele and progression of disability in multiple sclerosis. *Neurology* 1998; 50(Suppl): A 150.
- Weatherby SJ, Mann CL, Davies MB, Carthy D, Fryer AA, Boggild MD, Young C, Strange RC, Ollier W, Hawkins CP. Polymorphisms of apolipoprotein E: outcome and susceptibility in multiple sclerosis. *Mult Scler* 2000; 6: 32-36.
- Weinshenker BG. The natural history of multiple sclerosis. *Neurol Clin* 1995; 13:119-46.
- Weinshenker B, Bass B, Rice GP, Ebers GC. The natural history of multiple sclerosis I. Clinical course and disability. *Brain*. 1989; 112, 133-146.

- Weinshenker BG, Kantarci OH: Seeking genes for MS: big risks for big gains. *Neurology* 2000; 54:542-4.
- Zannis VI, Breslow JL. Human very low density lipoprotein apolipoprotein E isoprotein polymorphism is explained by genetic variation and posttranslational modification. *Biochemistry* 1981; 20:1033-1041.

مقدمة

يعد التصلب المتناثر فى الجهاز العصبى من أكثر الأمراض ذاتية المناعة إنتشارا و المؤدى إلى العجز العصبى فى البالغين.

تختلف أعراض المرض من إضطراب فى المشى، فقد فى البصر، إنقباض و تعب. و فى كندا ينتشر التصلب المتناثر بمعدل ٠.١% فى القوقازيين فى وسط و شمال اوروبا. و ينتشر المرض فى الإناث أكثر من الذكور بمعدل ١:٢. تبدأ أعراض المرض بين ٢٨-٣٠ سنة و تبدأ الأعراض فى الإناث قبل الذكور بسنة أو اثنتين.

و يرجع المرض لعوامل بيئية و وراثية. مع ذلك، لا تؤثر العوامل الوراثية فى الإستعداد للمرض فقط و لكن فى تعديل مجراة أيضا.

يتغير المجرى الإكلينيكى للتصلب المتناثر. و من التاريخ المرضى، حوالى ٥٠% من المرضى سيصابون بالتصلب المتناثر المتزايد فى خلال ١٠ سنوات من بداية المرض و سيحتاجون عون فى المشى فى خلال ١٥ سنة. على العكس، ٢٠ الى ٤٠% سيكون المرض حميد مع عجز بسيط بعد ١٠ سنوات من تشخيص المرض.

و يرجع هذا الاختلاف، لإختلاف التقنية المعللة لتطور المرض. مؤخرا، أصبح التكهن بالمرض بالعوامل الوراثية و منها التعدد الشكلى للأبوليوبروتين إى.

الأبوليوبروتين إى، و هو بروتين بلازما يصنع فى الكبد و يعمل على نقل الكوليسترول و استقلابه، و يتواجد أيضا فى المخ. و يكون من ثلاث أنواع إى٤، ٣، ٢، و ينتجوا عن طريق ثلاث أليلات مستقلة متواجدة فى موضع جينى واحد فى كروموسوم رقم ١٩. لذلك يوجد ثلاث أشكال لمتماثل الزيجية و ثلاث أشكال لمتغير الزيجية.

و قد ظهر أن الأبوليوبروتين إى٣ يعمل على زيادة نمو المحاور العصبية و لكن الأبوليوبروتين إى٤ يعمل عكس ذلك. كما وجدت عدة تقارير فى التصلب المتناثر تظهر أن الأبوليوبروتين إى يشترك فى إعادة توزيع الدهون بعد نزع النخاعية. لذلك فالأنواع المختلفة من الأبوليوبروتين إى لا تؤثر فقط فى حفظ المحاور العصبية، و لكن فى عملية إعادة النخاعية أيضا. و وجد أيضا أنه يعمل كمضاد للالتهاب و الحماية العصبية فى الجهاز العصبى.

قد أظهرت مؤخرا الدراسات الإكلينيكية و الجينية ارتباط الأنماط الجينية للأبوليوبروتين إى بمآل و بزيادة حدة التصلب المتناثر. و ذلك أدى إلى إرتفاع احتمالية تعديل الأبوليوبروتين إى ليصبح علاج جديد للتصلب المتناثر.

يرتبط الأليل إى٤ بإرتفاع نسبة حدوث مرض الزهايمر. و يكثر إى٤ مع حدة المرض فى داء العصبنات المحركة، و مع النزيف المخى حيث يكون التكهن بالمرض سيىء. لذلك يكون مرضى إى٤ استعدادهم للشفاء أسوأ من غيرهم.

حيث أن التصلب المتناثر يتصف بتكرار تلف الجهاز العصبي مع محاولة إصلاحه، فانه من الممكن التكهن بان النمط الجيني للأبوليوبروتين إى يؤثر على التكهن بتقدم المرض . و فى البداية، أثبتت بعض الدراسات الصغيرة ذلك مع إى ٤. و لكن اثنين من الدراسات التى تمت على عدد أكبر من المرضى أظهرت نتائج متضاربة، فالأولى أثبتت انه لا يوجد علاقة بين الأبوليوبروتين إى و تدهور المرض، اما الثانية أثبتت تدهور أسرع فى المرض مع الأبوليوبروتين إى ٤.

الهدف من البحث:

- دراسة ارتباط تعدد الصور المظهرية الوراثية للأبوليوبروتين إى بمرض التصلب المتناثر للجهاز العصبي.
- دراسة دور تعدد الصور المظهرية الوراثية للأبوليوبروتين إى بالأنواع الإكلينيكية و حدة التصلب المتناثر.

المجموعة التى تحت البحث والوسائل المستخدمة:

لتحقيق أهداف هذا البحث سوف يتم إجراء هذه الدراسة علي مجموعتين:

المجموعة الأولى:

تشتمل على ٦٠ من المرضى المصابون بالتصلب المتناثر على الأقل لمدة سنتين من بداية المرض. و سيتم التشخيص بمعيار ماك دونالد المراجع. و سيتم تجميعهم من مستشفى عين شمس الجامعى أو التخصصى.

معيار ماك دونالد المراجع يشتمل على:

- نوبتان أو أكثر مع بيئة إكلينيكية موضوعية لأفتين أو أكثر.
- نوبتان أو أكثر مع بيئة إكلينيكية موضوعية لأفة واحدة، بالإضافة إلى التناثر فى المكان بالرنين المغناطيسى، أو أفتين أو أكثر فى الرنين المغناطيسى تشمل التصلب المتناثر + كشف إجابى للوسائل المخى الشوكى ، أو الإنتظار لحدوث نوبة إكلينيكية في مكان آخر.
- نوبة واحدة مع بيئة إكلينيكية موضوعية لأفتين أو أكثر، بالإضافة إلى التناثر فى الزمان بالرنين المغناطيسى أو نوبة إكلينيكية ثانية.
- نوبة واحدة مع بيئة إكلينيكية موضوعية لأفة واحدة، بالإضافة إلى (١) التناثر فى المكان بالرنين المغناطيسى، أو أفتين أو أكثر فى الرنين المغناطيسى تشمل التصلب المتناثر + كشف إجابى للوسائل المخى الشوكى و (٢) التناثر فى الزمان بالرنين المغناطيسى أو نوبة إكلينيكية ثانية.
- اما فى حالات التصلب المتناثر ذات التقدم المخادع فيضاف معلومات للتشخيص و هى: سنة من التقدم فى المرض بالإضافة إلى إثنين من الآتى: (١) رنين مغناطيسى إيجابى للمخ ، (٢) رنين مغناطيسى إيجابى للنخاع الشوكى، (٣) كشف إجابى للوسائل المخى الشوكى.

المجموعة الثانية:

وتشمل ثلاثين شخصا غير مصابين بالتصلب المتناثر مماثلين فى العمر والجنس للمجموعة الأولى كمجموعة ضابطة يخلو تاريخهم الشخصى و العائلى من المرض. ويخضع هؤلاء الأشخاص إلي كشف إكلينيكي كامل بالإضافة إلى نفس الفحوصات الجينية الوراثية التى سوف يتم عملها لأفراد المجموعة الأولى.

الوسائل المستخدمة:

فى البداية سوف يتم أخذ موافقة مكتوبة من جميع المشاركين فى هذا البحث أو أحد أفراد عائلتهم ثم يخضع أفراد المجموعة الأولى إلى:

١ - كشف إكلينيكي كامل، ومعرفة التاريخ المرضى و بالاختص:

- السن الذى بدأ عندة المرض.
- فترة المرض.
- عدد النكسات.

٢ - معرفة سلسلة النسب لمعرفة التاريخ العائلى للمرض.

٣ - قياس حدة المرض بمقياس حالة العجز الموسع EDSS.

٤ - الفحوصات المعملية وتشمل:

- الفحوصات المعملية الروتينية : صورة دم و وظائف الكلى والكبد.
- تفاعل السلسلة المتعددة لتحديد تعدد الصور المظهرية الوراثية للأبوليوبورتين إي. و سوف تتم فى قسم الجينات فى كلية الزراعة، جامعة عين شمس.

٥ - رنين مغناطيسى على المخ +/- النخاع الشوكى لمعرفة: عدد الآفات، مكان الآفات (فى المخ أو النخاع الشوكى أو الإثنين)، نشاط الآفات.

٦ - إحصاء لتحليل البيانات.

Contents

	Page
Contents.....	I
Acknowledgments	III
List of Abbreviations	V
List of Figures	IX
List of Tables	XII
Genetic Glossary	XVI
Introduction and Aim of the Work	1
Review of Literature	5
Chapter 1: Molecular Biology of Apolipoprotein E.	
1.1 Early Delineation	5
1.2 Molecular Basis of Polymorphism	6
1.3 Function of Apolipoprotein E	11
1.4 Role of Apolipoprotein in Alzheimer Disease.....	14
1.5 Role of Apolipoprotein in Multiple Sclerosis.....	17
1.6 Role in Other Neurologic Disorders	22
1.7 Molecular Genetics	28
1.8 Mapping	29
1.9 Population Genetics	31
1.10 Mortality Differences by APOE Genotype	33
Chapter 2: Epidemiology, Clinical Picture and Course of Multiple Sclerosis.	
2.1 Epidemiology	35
2.2 Clinical Picture.....	36
2.3 Clinical Course	41
2.4 Diagnostic Criteria.....	44
Chapter 3: Pathogenesis and Pathology of Multiple Sclerosis	
3.1 Adaptive and Innate Immune Responses	48
3.2 Autoimmunity	49

3.3 T cells and Pathogenesis of Multiple Sclerosis.....	51
3.4 Pathogenesis of Multiple Sclerosis.....	55
3.5 Neurodegeneration in Multiple Sclerosis	62
3.6 Remyelination in Multiple Sclerosis	64
3.7 Pathology of Multiple Sclerosis	66
Chapter 4: Causes of Multiple Sclerosis	
4.1 Environmental Susceptibility in MS	75
4.2 Genetics of Multiple Sclerosis.....	77
4.2.1 Genetic Epidemiology of Multiple Sclerosis	80
4.2.2 Genes of Multiple Sclerosis	81
4.3 Vitamin D and Sunlight in MS	112
4.4 Smoking and Multiple Sclerosis	114
4.5 Infections and Multiple Sclerosis	115
Subjects and Methods.....	121
Results.....	130
Discussion.....	173
Recommendations.....	182
Conclusion.....	183
Summary.....	184
References.....	190
Appendix.....	277
Arabic Summary	

Acknowledgments

I would like to express my profound gratitude to Professor Mohamed Osama Abdulghani, Professor of Neurology, Ain Shams University, for suggesting this topic, and for his help, guidance, kind support, and continuous feedback without whom this work would not have been completed.

I would like to express my deepest thanks and appreciations to Professor Fatthy Mohamed Abdel-Tawab, Professor of Genetics and Molecular Biology, Faculty of Agriculture Ain Shams University, for his valuable encouragement, advices and help throughout this work.

I would like to express my profound gratitude to Professor Samia Ashour Mohamed, Professor of Neurology, Ain Shams University, for her help, guidance, kind support, and continuous feedback.
