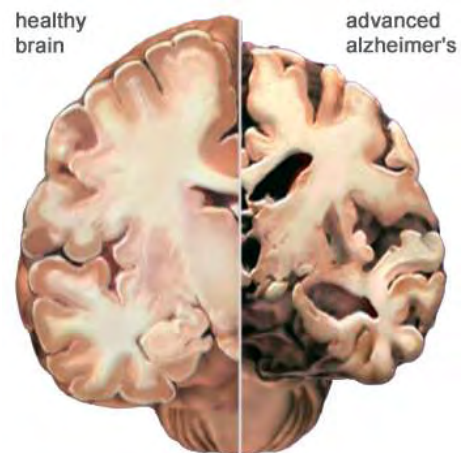
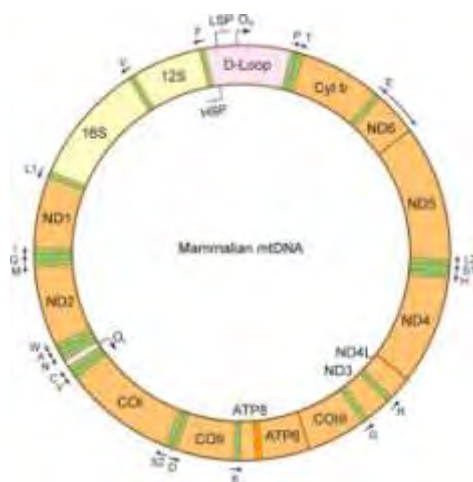


**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**  
**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**  
**ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΚΟΛΛΙΑ ΒΑΣΙΛΙΚΗ

**ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ ΣΕ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΑ tRNA  
ΓΟΝΙΔΙΑ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ALZHEIMER**



**ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ: ΖΙΦΑ ΑΙΜΙΛΙΑ**

ΛΑΡΙΣΑ 2013

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Γενετικής, Συγκριτικής & Εξελεκτικής Βιολογίας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κατά το ακαδημαϊκό έτος 2012-2013 υπό την επίβλεψη και την καθοδήγηση της κ. Ζίφα Αιμιλίας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της τριμελούς επιτροπής και ιδιαίτερα την κ. Ζίφα για την ανάθεση του θέματος και την επιστημονική της καθοδήγηση καθ' όλη τη διάρκεια της εργασίας. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον διδάκτορα κ. Σταμάτη Κωνσταντίνο καθώς και τους υποψήφιους διδάκτορες Γιαννούλη Θεμιστοκλή και Σαρρή Κωνσταντίνα για τη βοήθεια που μου παρέιχαν κατά τη διεξαγωγή του πειραματικού μέρους.

Η τριμελής εξεταστική επιτροπή αποτελείται από τους:

Ζίφα Αιμιλία, Επίκουρος Καθηγήτρια Βιολογίας/Νευροβιολογίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

Μαμούρης Ζήσης, Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

Χατζηγεωργίου Γεώργιος, Αναπληρωτής Καθηγητής Νευρολογίας, Τμήμα Ιατρικής

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΠΕΡΙΛΗΨΗ/ ABSTRACT.....	5
2. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	6
2.1 ΤΑ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑ.....	6
2.1.1 Η δομή του μιτοχονδρίου.....	6
2.1.2 Λειτουργίες του μιτοχονδρίου.....	8
2.2 ΤΟ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑ.....	11
2.3 ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΕΣ ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ.....	13
2.3.1 Μεταλλάξεις σε μιτοχονδριακά tRNA γονίδια.....	15
2.4 Η ΝΟΣΟΣ ΤΟΥ ALZHEIMER.....	16
2.4.1 Η παθογένεια της νόσου.....	17
2.4.2 Οικογενής- Σποραδικός τύπος.....	19
2.4.3 Συσχέτιση μιτοχονδρίων με τη νόσου του Alzheimer.....	20
2.4.4 Μιτοχονδριακές μεταλλάξεις και νόσος Alzheimer.....	22
2.5 ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	23
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	24
3.1 ΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΥΛΙΚΟ.....	24
3.2 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR).....	24
3.2.1 Αρχή της μεθόδου.....	24
3.2.2 Τα στάδια της αντίδρασης.....	26
3.2.3 Πολλαπλασιασμός των tRNA γονιδίων του mtDNA.....	28
3.2.4 Ποιοτικός έλεγχος των PCR προϊόντων σμε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης.....	30
3.3 ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥ ΜΟΝΟΚΛΩΝΗΣ ΑΛΥΣΙΔΑΣ (SSCP, Single- Strand Conformation Polymorphism).....	32
3.3.1 Αρχή της μεθόδου.....	32
3.3.2 Παρασκευή πηκτώματος πολυακρυλαμίδης.....	33
3.3.3 Χρώση πηκτώματος πολυακρυλαμίδης με διάλυμα νιτρικού αργύρου (Silver staining).....	35
3.4 ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ.....	36
3.5 ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗ.....	37
3.5.1 Μέθοδος τερματισμού νουκλεοτιδικής αλυσίδας με δι- δεοξυνουκλεοτίδια (Μέθοδος Sanger).....	37
3.5.2 Αυτόματη αλληλούχιση.....	38
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	39
4.1 ΓΟΝΙΔΙΟ tRNA <sup>Gly</sup> ΚΑΙ ΠΑΡΑΚΕΙΜΕΝΕΣ ΠΕΡΙΟΧΕΣ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ALZHEIMER.....	39
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	43
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	46

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα μιτοχόνδρια είναι υπεύθυνα για την παραγωγή ενέργειας στο κύτταρο. Λόγω μειωμένης επιδιορθωτικής ικανότητας και αυξημένης παραγωγής ελευθέρων ριζών συσσωρεύουν στο DNA τους πληθώρα μεταλλάξεων, πολλές από τις οποίες οδηγούν σε μειωμένη παραγωγή ενέργειας. Τα κύτταρα που πλήττονται περισσότερο λόγω των αυξημένων απαιτήσεων τους σε ενέργεια είναι τα μυϊκά και τα νευρικά. Τελευταία παρατηρείται συσχέτιση των μιτοχονδριακών μεταλλάξεων με νευροεκφυλιστικές ασθένειες (Parkinson, Alzheimer). Συγκεκριμένα, στους ασθενείς με Alzheimer έχουν παρατηρηθεί τόσο λειτουργικές όσο και δομικές διαφορές στα μιτοχόνδριά τους. Στην παρούσα εργασία αναλύθηκε 1 γονίδιο tRNA σε 50 ασθενείς Alzheimer. Ταυτοποιήθηκαν 2 μεταλλάξεις στους 14 από τους 50 ασθενείς. Αναλυτικότερα, στο tRNA<sup>Gly</sup> ταυτοποιήθηκε η μετάλλαξη T10034C στο 2% των ασθενών (1/50), ενώ κανένα από τα 200 φυσιολογικά άτομα που εξετάστηκαν δεν έφερε τη μετάλλαξη αυτή. Η δεύτερη μετάλλαξη ανιχνεύτηκε για πρώτη φορά στη βιβλιογραφία, είναι η C10181G στην ND3 υπομονάδα του συμπλόκου I της αναπνευστικής αλυσίδας και εμφανίζεται σε ποσοστό 26% των ασθενών 13/50, με το αντίστοιχο ποσοστό στους φυσιολογικούς να είναι 1,96% (4/204). Αν και παρατηρήθηκε αυξημένη συχνότητα των μεταλλάξεων στους ασθενείς με Alzheimer, σε σχέση με τους φυσιολογικούς, η ολοκλήρωση της μελέτης και στα υπόλοιπα tRNA γονίδια καθώς και ο φυσιολογικός ρόλος των μεταλλάξεων που βρίσκονται σε σημαντικά αυξημένη συχνότητα στους ασθενείς, θα δώσει μια πιο ολοκληρωμένη και ακριβή εικόνα για το ρόλο που διαδραματίζει το mtDNA στην κληρονομικότητα του Alzheimer.

## ABSTRACT

Mitochondria are responsible for energy production in cells. Because of their reduced DNA repair capacity and increased production of free radicals, they accumulate many mutations, some of which lead to reduced energy production. The neural cells are the first to be affected due to their increased needs in energy. Association between mitochondrial mutations and neurodegenerative diseases (Parkinson's, Alzheimer) has been observed. In Alzheimer patients have been noticed both functional and structural differences in their mitochondria. In this study, 1 tRNA gene were examined in 50 Alzheimer patients. Two mutations were identified in 14 out of 50 patients. Specifically, the mutation T10034C was identified at tRNA<sup>Gly</sup> in 2% of the patients (1/50), while it has not been identified in control group (0/200). The second mutation C10181G was identified for the first time at the ND3 subunit of complex I of electron transport chain in 26% of the patients and in 1.96% of control group. Even though higher frequency of these mutation was observed in Alzheimer patients rather than in control group, the completion of the study in the rest of tRNA genes, as well as the role of these mutations will provide more information for mtDNA's role in Alzheimer's inheritance.

## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 2. ΤΑ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑ

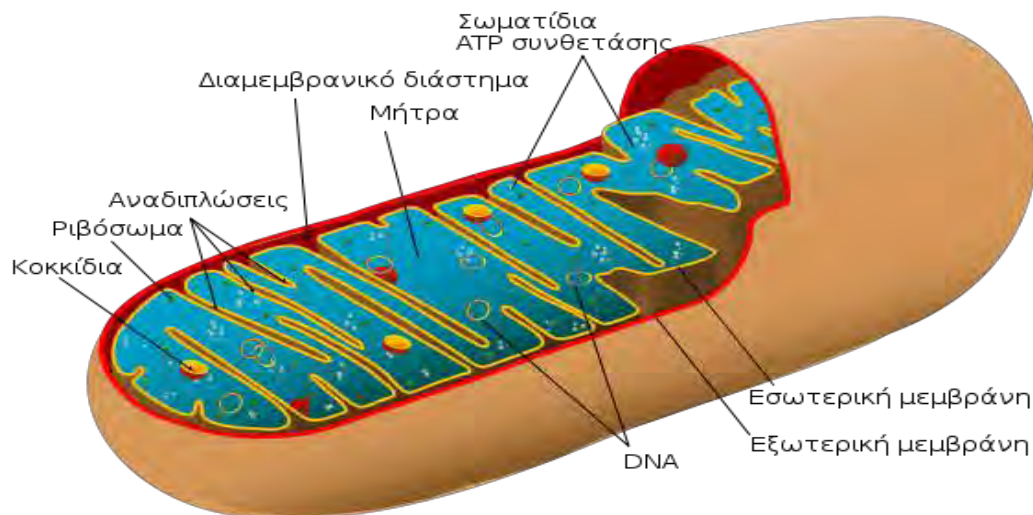
Το μιτοχόνδριο αποτελεί ένα κυτταρικό οργανίδιο, το οποίο περιβάλλεται από μία διπλή μεμβράνη και απαντάται μόνο σε ευκαρυωτικά κύτταρα, με εξαίρεση την *Giardia intestinalis*. Μιτοχόνδρια παρατηρήθηκαν για πρώτη φορά το 1840, ταυτοποιήθηκαν όμως ως ανεξάρτητα οργανίδια το 1894. Κάποια από τα σημαντικότερα βήματα στην ανακάλυψη και περαιτέρω μελέτη των μιτοχονδρίων παρατίθενται παρακάτω.

Συγκεκριμένα το 1886 πραγματοποιήθηκε η ανακάλυψη τους από τον R. Altman, ενώ το 1898 εισήχθη για πρώτη φορά ο όρος μιτοχόνδριο (μίτος + χόνδρος). Ακολούθως το 1952 παρατηρήθηκε η δομή των μιτοχονδρίων μέσω της χρήσης ηλεκτρονικού μικροσκοπίου. Τέλος το 1971 διατυπώθηκε η θεωρία της ενδοσυμβίωσης που εξηγούσε την προέλευση τους και δέκα χρόνια αργότερα, το 1981 ολοκληρώθηκε η αλληλούχιση του μιτοχονδριακού γονιδιώματος. Το μέγεθος τους κυμαίνεται από 0,3-10 μm, ενώ καταλαμβάνουν περίπου το 18-20% του συνολικού κυτταροπλασματικού όγκου ενός ευκαρυωτικού κυττάρου. Ένα τυπικό μιτοχόνδριο έχει σωληνοειδές σχήμα, υπάρχουν όμως και σφαιρικά, ελικοειδή, δακτυλοειδή, αστεροειδή. Ο αριθμός τους ποικίλλει τόσο ανάμεσα στους διάφορους κυτταρικούς τύπους, όσο και στους διάφορους οργανισμούς. Αυτό εξαρτάται κυρίως από την εκάστοτε κυτταρική δραστηριότητα και γενικότερα από τις ανάγκες του κάθε κυττάρου.

Συχνά τους αποδίδεται ο όρος «εργοστάσια παραγωγής ενέργειας», καθώς διαθέτουν ένζυμα που συμμετέχουν ενεργά στον αερόβιο μεταβολισμό με αποτέλεσμα να παράγουν τη μεγαλύτερη ποσότητα τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP) παρέχοντας έτσι μεγάλα αποθέματα ενέργειας (Campbell et al., 2006).

#### 2.1.1 Δομή του μιτοχονδρίου

Τα μιτοχόνδρια έχουν επίμηκες, σφαιρικό ή και ωσειδές σχήμα. Το 1952 ανακαλύφθηκε η δομή τους με τη χρήση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου. Κάθε τυπικό μιτοχόνδριο περιβάλλεται από δύο μεμβράνες, μία εξωτερική και μία εσωτερική. Οι δύο αυτές μεμβράνες ορίζουν δύο ενδομιτοχονδριακούς χώρους, το *διαμεμβρανικό χώρο* ο οποίος είναι ένας λεπτός χώρος ανάμεσα στις δύο μεμβράνες και το *χώρο της μητρικής ουσίας* (matrix) (Εικόνα 1)



*Εικόνα 1: Σχηματική απεικόνιση της δομής του μιτοχονδρίου*

Η **εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη** είναι σχετικά διαπερατή και περιέχει ένζυμα που μετατρέπουν ορισμένα λιπίδια σε ενώσεις ικανές να μεταβολισθούν μέσα στο μιτοχόνδριο. Επίσης περιέχει ειδικές πρωτεΐνες μεταφοράς όπως οι **πορίνες**, οι οποίες επιτρέπουν ελεύθερη μεταφορά στα μόρια με μοριακό βάρος μέχρι 10 kD από το κυτταρόπλασμα στο διαμεμβρανικό χώρο. Η **εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη** είναι αδιαπέραστη στα μικρά ιόντα, φαινόμενο που οφείλεται στη μεγάλη περιεκτικότητά της σε **καρδιολιπίνη**. Αυτή η ιδιότητα της εσωτερικής μεμβράνης είναι ουσιώδης για τη μιτοχονδριακή λειτουργία καθώς επιτρέπει τη δημιουργία ηλεκτροχημικής διαβάθμισης κατά τη διάρκεια της παραγωγής των υψηλής ενέργειας κυτταρικών μεταβολιτών.

Η εσωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου εμφανίζει πολλαπλές πτυχώσεις γνωστές ως **ακρολοφίες**. Οι πτυχώσεις αυτές είναι συνήθως κάθετες προς τον επιμήκη άξονα του μιτοχονδρίου και σχηματίζουν ατελή διαφράγματα τα οποία δεν διακόπτουν τη συνέχεια της μήτρας. Τείνουν να αυξάνουν την επιφάνειά της και σε αυτές εντοπίζονται τα ένζυμα της αναπνευστικής αλυσίδας και η συνθετάση του ATP, που είναι υπεύθυνα για την παραγωγή ενέργειας.

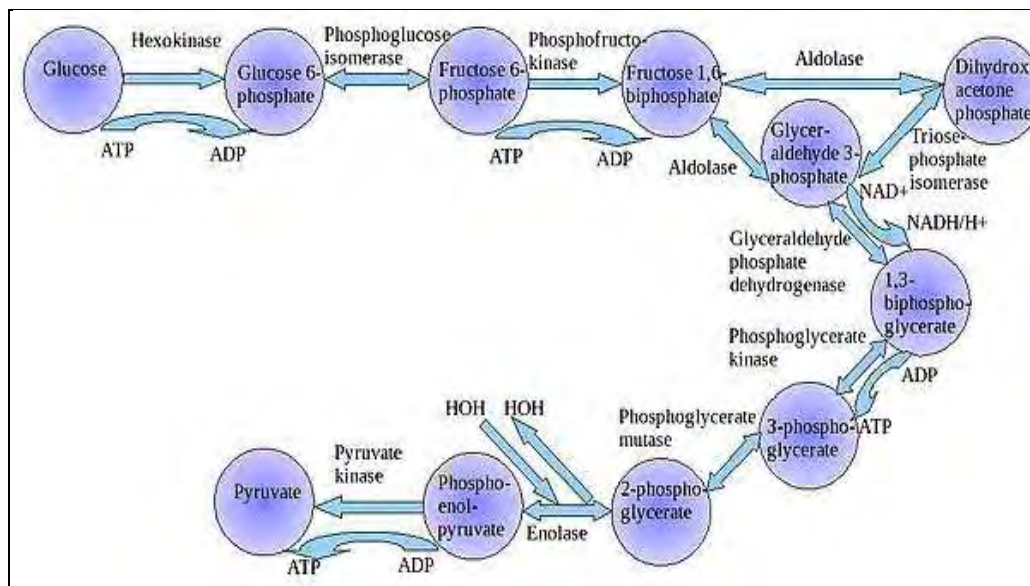
Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, αυτά τα δύο συστήματα μεμβρανών δημιουργούν δύο διαμερίσματα στο μιτοχόνδριο. Συγκεκριμένα, ο διαμεμβρανικός χώρος, δηλαδή ο χώρος ανάμεσα στην εσωτερική και εξωτερική μεμβράνη περιέχει μεταβολίτες οι οποίοι διαχέονται διαμέσου της εξωτερικής μεμβράνης, ATP που παράγεται στο μιτοχόνδριο και τέλος ιόντα που αντλούνται από το χώρο της μιτοχονδριακής μήτρας, κατά τη διάρκεια της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Το δεύτερο διαμέρισμα, η μήτρα, περιέχει ένζυμα υπεύθυνα για την οξείδωση των λιπαρών οξέων καθώς επίσης για τον κύκλο του πυροσταφυλικού και κιτρικού οξέος (TCA). Επίσης περιέχει μιτοχονδριακό DNA καθώς και ειδικά ένζυμα υπεύθυνα για τη μεταγραφή του.

## 2.1.2 Λειτουργίες μιτοχονδρίου

Ο κύριος ρόλος των μιτοχονδρίων μπορεί αναμφισβήτητα να θεωρηθεί η παραγωγή ενέργειας. Στα οργανίδια αυτά λαμβάνουν χώρα τα τελευταία στάδια του μεταβολισμού των βιολογικών μακρομορίων που προσλαμβάνουν οι οργανισμοί με τις τροφές, (σάκχαρα και λίπη). Αποτέλεσμα αυτής της διαδικασίας είναι η παραγωγή ATP, απαραίτητου ενεργειακού νομίσματος για την επιβίωση των αερόβιων ευκαρυωτικών κυττάρων.

Η παραγωγή ενέργειας ακολουθεί μία πολύπλοκη διαδρομή, η οποία περιλαμβάνει τα στάδια της γλυκόλυσης, του κύκλου του κιτρικού οξέος και τέλος της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Συγκεκριμένα, τα μόρια των τροφών αρχικά διασπώνται σε απλούστερα μόρια, στα μονομερή τους. Οι πολυσακχαρίτες διασπώνται σε σάκχαρα (γλυκόζη), τα λίπη σε λιπαρά οξέα και οι πρωτεΐνες σε αμινοξέα. Μετά την εισαγωγή τους στα κύτταρα, τα λιπαρά οξέα εισάγονται κατευθείαν στα μιτοχόνδρια, ενώ τα σάκχαρα ακολουθούν ένα διαφορετικό μονοπάτι.

Πιο αναλυτικά, τα σάκχαρα εισάγονται στο βιοχημικό μονοπάτι της γλυκόλυσης από το οποίο θα παραχθεί ένα μόριο πυροσταφυλικού οξέος (Εικόνα 2).

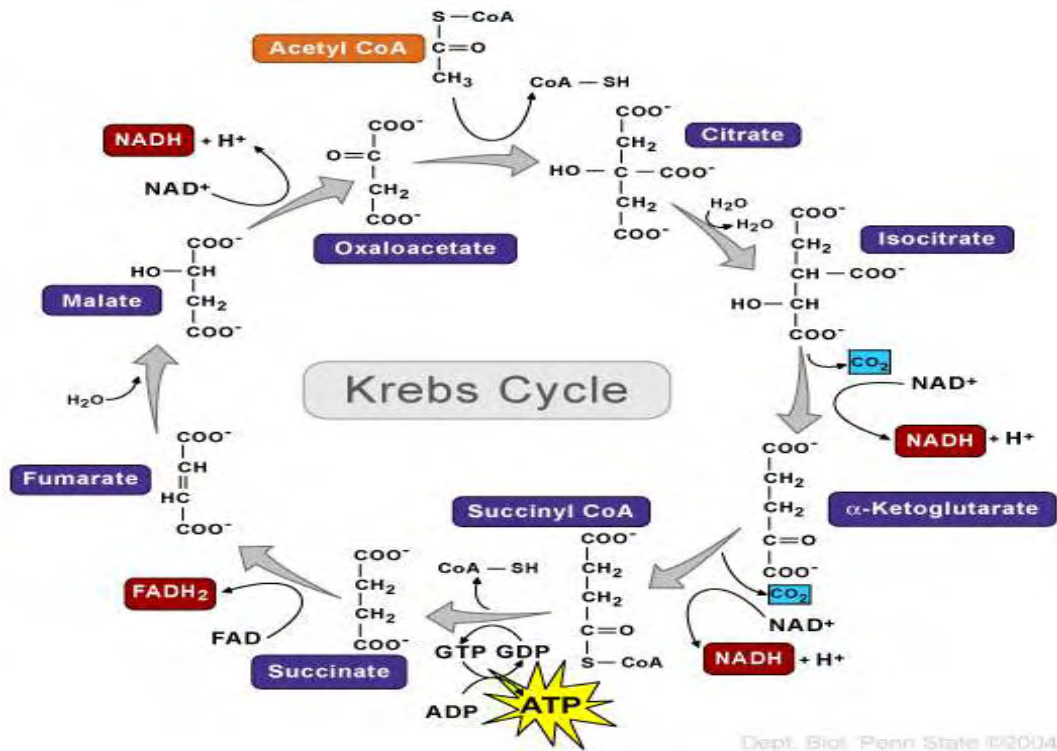


**Εικόνα 2:** Σχηματική απεικόνιση του βιοχημικού κύκλου της γλυκόλυσης

Το μόριο αυτό (πυροσταφυλικό) στη συνέχεια εισάγεται στα μιτοχόνδρια, όπου και θα μετατραπεί στο κύριο μεταβολικό ενδιάμεσο το ακέτυλοσυνένζυμο- A (ακέτυλοCo-A). Το ακέτυλοCo-A θα πυροδοτήσει την έναρξη του κύκλου του κιτρικού οξέος (λαμβάνει χώρα στην μιτοχονδριακή μήτρα), με αποτέλεσμα την οξείδωση των ακετυλομάδων του (Εικόνα 3). Από τις αντιδράσεις του κύκλου του

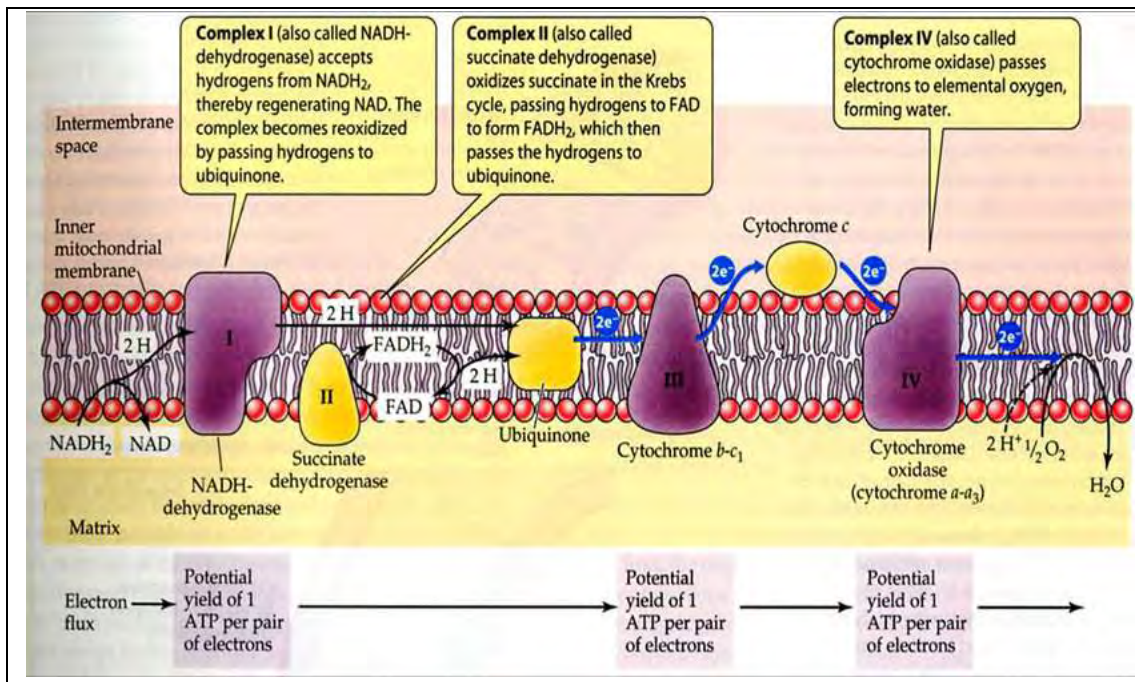


κιτρικού οξέος παράγεται  $\text{CO}_2$  το οποίο αποβάλλεται από το κύτταρο, καθώς και  $e^-$  υψηλής ενέργειας τα οποία μεταφέρονται από ενεργοποιημένους συμπαράγοντες  $\text{NADH}$  και  $\text{FADH}_2$ .



Εικόνα 3: Σχηματική απεικόνιση του κύκλου του κιτρικού οξέος

Στη συνέχεια τα  $e^-$  αυτά μεταφέρονται στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη και έτσι εισέρχονται στην αναπνευστική αλυσίδα (Εικόνα 4). Εκεί βρίσκονται τρία διαμεμβρανικά σύμπλοκα ενζύμων, το **σύμπλοκο αφυδρογονάσης του  $\text{NADH}$** , το **σύμπλοκο των κυτοχρωμάτων  $b-c_1$**  και το **σύμπλοκο της οξειδάσης του κυτοχρώματος**. Τα ηλεκτρόνια μετακινούνται διαδοχικά από το ένα σύμπλοκο στο επόμενο καθοδηγούμενα από τις διαδοχικά χαμηλότερες ενέργειές τους. Η διαφορά ενέργειας αξιοποιείται μέσω της άντλησης πρωτονίων, δηλαδή κατιόντων υδρογόνου από το στρώμα προς το διαμεμβρανικό χώρο. Τελικός σταθμός των ηλεκτρονίων κατά μήκος της αλυσίδας είναι το  $\text{O}_2$ , το οποίο προέρχεται από την αναπνοή. Τα ηλεκτρόνια ανάγουν το οξυγόνο και παράγεται νερό με τη βοήθεια του συμπλόκου της οξειδάσης του κυτοχρώματος. Έτσι τα ηλεκτρόνια βρίσκονται τώρα στην χαμηλότερη ενεργειακή στάθμη.



**Εικόνα 4:** Σχηματική απεικόνιση της αναπνευστικής αλυσίδας

Η όλη διαδικασία απελευθερώνει την ενέργεια που απαιτείται για την άντληση των πρωτονίων. Επομένως η συγκέντρωση πρωτονίων εκτός του μιτοχονδρίου είναι περίπου δέκα φορές μεγαλύτερη εκτός του στρώματος γι' αυτό εξάλλου και η διαδικασία της άντλησης απαιτεί ενέργεια και δεν είναι αυθόρμητη. Μόλις λοιπόν δοθεί ευκαιρία, τα πρωτόνια τείνουν να εισέλθουν στο στρώμα. Εδώ αναλαμβάνει δράση η συνθετάση του ATP. Αφού η συγκέντρωση πρωτονίων εκτός του στρώματος είναι πολύ μεγαλύτερη της εσωτερικής, εκείνα χρησιμοποιούν τη συνθετάση του ATP για να επανέλθουν. Ταυτόχρονα όμως οδηγούν σε μία αλλαγή της διαμόρφωσης των υπομονάδων της πρωτεΐνης, η οποία δίνει την ενέργεια που απαιτείται για να πραγματοποιηθεί η προσθήκη μιας φωσφορικής ομάδας στο ADP και να παραχθεί ATP. Η διαδικασία αυτή ονομάζεται χημειόσμωση (Mitchell et al., 1967).

Εκτός όμως από το ενεργειακό υπόβαθρο, τα μιτοχόνδρια συμμετέχουν και σε μία πληθώρα άλλων διεργασιών. Συγκεκριμένα συμμετέχουν στη δημιουργία των ενεργών ριζών οξυγόνου (ROS), στη ρύθμιση της ομοιόστασης του ενδοκυτταρικού  $\text{Ca}^{2+}$ , στον κυτταρικό θάνατο και τέλος σε διάφορες κυτταρο-ειδικές λειτουργίες.

Οι ROS αποτελούν παραπροϊόντα της μεταφοράς ηλεκτρονίων. Είναι δυνατόν κάποια ποσότητα μοριακού οξυγόνου καθώς μεταβαίνει από τα διάφορα στάδια της αναπνευστικής αλυσίδας να υποστεί αναγωγή με αποτέλεσμα να σχηματιστούν οι ενεργές ρίζες οξυγόνου. Λόγω των πιθανών βλαβών που μπορούν να προκαλέσουν, τα μιτοχόνδρια διαθέτουν αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς που προσπαθούν να εξουδετερώσουν τις ρίζες. Διαταραχές είτε στο σχηματισμό των ριζών, είτε στην αποτελεσματικότητα των αντιοξειδωτικών μηχανισμών οδηγούν σταδιακά σε πρόκληση οξειδωτικού stress και σε γενικότερη κυτταρική βλάβη. (Allen et al., 1996).

Σε ό,τι αφορά το ενδοκυτταρικό  $Ca^{2+}$ , τα μιτοχόνδρια έχουν διττό ρόλο. Αφ' ενός παρέχουν την ενέργεια που είναι απαραίτητη για την ενεργοποίηση και τη σωστή λειτουργία των ΑΤΡασών-  $Ca^{2+}$  και αφ' ετέρου λειτουργούν ως αποθήκες  $Ca^{2+}$ .

Ο κυτταρικός θάνατος είναι ένα ακόμα μονοπάτι, στο οποίο συμμετέχουν τα μιτοχόνδρια. Η ικανότητά τους να εμπλέκονται σε διεργασίες μεταγωγής σήματος τα καθιστά ικανά να ενεργοποιούν τόσο τη νέκρωση όσο και την απόπτωση. Συγκεκριμένα, το μονοπάτι της νέκρωσης μπορεί να ενεργοποιηθεί λόγω κάποιας ανωμαλίας στηλειτουργία των μιτοχονδρίων. Η δυσλειτουργία αυτή οδηγεί σε μειωμένα επίπεδα ΑΤΡ, τα οποία με τη σειρά τους θα κατευθύνουν το κύτταρο στη νέκρωση. Στην περίπτωση της απόπτωσης, τα μιτοχόνδρια έχουν επικουρικό ρόλο, καθώς οι προ-αποπτωτικές πρωτεΐνες που απελευθερώνουν, θα δώσουν το κύριο έναυσμα για την ενεργοποίηση του καταρράκτη των κασπασών.

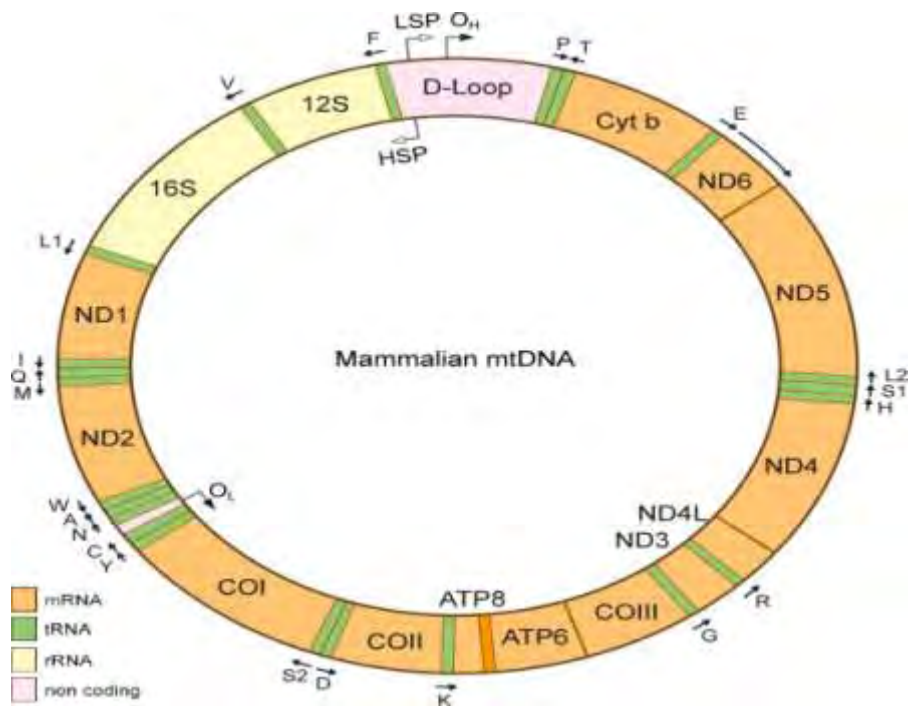
Τα μιτοχόνδρια εμπλέκονται στην κατασκευή, διάσπαση και ανακύκλωση των προϊόντων που απαιτούνται για τη σωστή λειτουργία των κυττάρων. Τα μιτοχόνδρια επίσης εμπλέκονται στην παραγωγή κάποιων ορμονών όπως τα οιστρογόνα και η τεστοστερόνη. Είναι αναγκαία για μεταβολισμό της χοληστερόλης, το μεταβολισμό των νευροδιαβιβαστών, και την αποτοξίνωση της αμμωνίας στον κύκλο ουρίας ([www.ivy-rose.co.uk](http://www.ivy-rose.co.uk)). Έτσι, αν τα μιτοχόνδρια δεν λειτουργούν σωστά, θα επηρεαστούν άμεσα όχι μόνο η παραγωγή ενέργειας, αλλά και η παραγωγή κυτταροειδικών προϊόντων που είναι απαραίτητα για τη φυσιολογική λειτουργία των κυττάρων.

## 2.2 ΤΟ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑ

Στους περισσότερους πολυκύτταρους οργανισμούς, το mtDNA είναι οργανωμένο ως ένα κυκλικό, δίκλωνο μόριο DNA που απαντάται στη μήτρα των μιτοχονδρίων. Ωστόσο, το mtDNA συναντάται ως ένα γραμμικά οργανωμένο DNA σε πολλούς μονοκύτταρους (π.χ. βλεφαριδοφόρο *Tetrahymena* ή το πράσινο φύκος *Chlamydomonas reinhardtii*) και σε σπάνιες περιπτώσεις και σε πολυκύτταρους οργανισμούς (π.χ. σε ορισμένα είδη Cnidaria). Οι λειτουργίες της αντιγραφής, της μεταγραφής και της μετάφρασης του mtDNA πραγματοποιούνται ανεξάρτητα από αυτές του πυρηνικού DNA. Το μιτοχονδριακό DNA αν και περιέχει πολύ σημαντικές πληροφορίες που σχετίζονται με τη δομή και τη λειτουργία των οργανιδίων, εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από το πυρηνικό γονιδίωμα και αυτός είναι και ο λόγος που τα μιτοχόνδρια χαρακτηρίζονται ως ημιαυτόνομα οργανίδια.

Το ανθρώπινο μιτοχονδριακό γονιδίωμα είναι δίκλωνο κυκλικό μόριο, του οποίου η μία αλυσίδα είναι πλούσια σε γουανίνη (βαριά), ενώ η άλλη σε κυτοσίνη (ελαφριά) (Εικόνα 5). Αποτελείται από 16.569 ζεύγη βάσεων DNA. Συνολικά περιέχει 37 γονίδια εκ των οποίων τα 28 κωδικοποιούνται από τη βαριά αλυσίδα, ενώ τα υπόλοιπα 9 από την ελαφριά. Αυτά τα 37 γονίδια κωδικοποιούν για 13 πρωτεΐνες-υπομονάδες της αναπνευστικής αλυσίδας, 22 tRNAs, και 2 rRNAs. Πιο αναλυτικά, κωδικοποιούνται 7 υπομονάδες του συμπλόκου I (ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L,

ND5, ND6), 1 υπομονάδα του συμπλόκου III (Cyt b), 3 υπομονάδες του συμπλόκου IV (COI, COII, COIII) και τέλος 2 υπομονάδες του συμπλόκου V (ATPase6, ATPase8).



**Εικόνα 5:** Σχηματική απεικόνιση του ανθρώπινου μιτοχονδριακού γονιδιώματος

Το μικρό μιτοχονδριακό γονιδίωμα δεν είναι σε θέση να παράγει ανεξάρτητα όλες τις πρωτεΐνες που απαιτούνται για τη λειτουργικότητά του. Έτσι, τα μιτοχόνδρια εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από το γονιδίωμα του πυρήνα. Ένα μιτοχόνδριο περιέχει δεκάδες αντίγραφα του μιτοχονδριακού γονιδιώματός του. Επιπλέον, κάθε κύτταρο περιέχει πολλά μιτοχόνδρια. Ως εκ τούτου, ένα κύτταρο μπορεί να περιέχει αρκετές χιλιάδες αντίγραφα του μιτοχονδριακού γονιδιώματός του, αλλά μόνο ένα αντίγραφο του πυρηνικού. Το mtDNA περιέχει λίγες μη κωδικοποιούμενες αλληλουχίες του DNA (3% του μιτοχονδριακού γονιδιώματος αποτελεί το μη κωδικοποιούμενο DNA).

Τέλος, κληρονομείται αποκλειστικά και μόνο από τη μητέρα, με αποτέλεσμα όλα τα γονίδια να είναι μητρικής προέλευσης. Ο λόγος είναι ότι το mtDNA του σπερματοζωαρίου βρίσκεται στην ουρά και έτσι δεν καταφέρνει να εισχωρήσει στο ωάριο. Παρ' όλα αυτά όμως, σε κάποιες περιπτώσεις, έχει αναφερθεί φαινόμενο πατρικής προέλευσης του μιτοχονδριακού γονιδιώματος, καθώς μία μικρή ποσότητα κυτταροπλάσματος μπορεί να διαφύγει από το τμήμα της ουράς και να εισχωρήσει στο ωάριο (Johns et al., 2003).

### 2.3 ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΕΣ ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ

Ένα από τα πιο σημαντικά χαρακτηριστικά που παρουσιάζει το μιτοχονδριακό γονιδίωμα, είναι ο ιδιαίτερα υψηλός βαθμός μεταλλαξιγένεσης, έως και 10 φορές υψηλότερος από τον αντίστοιχο του πυρηνικού DNA. Οι μεταλλάξεις είναι συνήθως απόρροια των βλαβών που προκαλούν οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου (ROS). Πηγή μεταλλάξεων, θα μπορούσε να θεωρηθεί και η ίδια η δομή του μιτοχονδριακού γονιδιώματος, καθώς η απουσία ιντρονίων, εξασφαλίζει ότι οποιαδήποτε μετάλλαξη και αν λάβει χώρα, θα αφορά αποκλειστικά και μόνο κωδικοποιητικές αλληλουχίες DNA.

Όλα αυτά, σε συνδυασμό με τους περιορισμένους προστατευτικούς μηχανισμούς που διαθέτουν τα μιτοχόνδρια, αυξάνουν ακόμα περισσότερο το ρυθμό μεταλλαξιγένεσης. Οι μεταλλάξεις αυτές μπορεί να είναι μικρές, σημειακές ή παρανοηματικές. Αφορούν κυρίως γονίδια που κωδικοποιούν τις υπομονάδες της αναπνευστικής αλυσίδας, ή γονίδια που συμμετέχουν στη διαδικασία της πρωτεϊνοσύνθεσης (Scharira et al., 2006). Αυτές οι μιτοχονδριακές μεταλλάξεις οδηγούν σταδιακά σε διάφορες διαταραχές και δυσλειτουργίες του μιτοχονδριακού συστήματος με αποτέλεσμα την ανάπτυξη και εμφάνιση των μιτοχονδριακών νοσημάτων - όπως αυτά ονομάζονται.

Πιο αναλυτικά λοιπόν, ο όρος 'μιτοχονδριακά νοσήματα' αναφέρεται σε μια μεγάλη και ετερογενή ομάδα γενετικών νοσημάτων, τα οποία σχετίζονται άμεσα με ανωμαλίες της μιτοχονδριακής αναπνευστικής αλυσίδας. Η μεγάλη ετερογένεια τους οφείλεται κατά κύριο λόγο στη βιοχημική πολυπλοκότητα του μηχανισμού της μιτοχονδριακής αναπνοής. Οι μεταλλάξεις αυτές μπορεί να επηρεάσουν είτε όλα τα αντίγραφα του mtDNA (ομοπλασμία), είτε μερικά από αυτά (ετεροπλασμία). Γενικά, όργανα και ιστοί με την υψηλότερη ενεργειακή απαίτηση, όπως ο νευρικός, ο μυϊκός και ο καρδιακός, είναι πιο πιθανό να επηρεαστούν και γι'αυτό τα νοσήματα αυτά αναφέρονται κι ως "μιτοχονδριακές εγκεφαλομυοπάθειες". Επίσης, η ηλικία εμφάνισης των συμπτωμάτων και ο φαινότυπος του κάθε νοσήματος ποικίλουν από περίπτωση σε περίπτωση.

Έτσι λοιπόν, ακόμα κι αν η μιτοχονδριακή ασθένεια ποικίλλει πολύ στο φαινότυπο από περίπτωση σε περίπτωση, διάφορες σημαντικές κατηγορίες της ασθένειας έχουν καθοριστεί, με βάση τα πιο κοινά συμπτώματα και τις ιδιαίτερες μεταλλάξεις που τείνουν να τους προκαλέσουν. Παρακάτω συνοψίζονται κάποια από τα κύρια μιτοχονδριακά νοσήματα με τα αντίστοιχα χαρακτηριστικά τους.

**1. Χρόνια προοδευτική εξωτερική οφθαλμοπληγία (CPEO)** – παράλυση των μυών που κινούν τους οφθαλμούς, πτώση. Έλλειψη του mtDNA. Το 60% περίπου των ασθενών φέρουν τη μετάλλαξη A3243G στο tRNA της λευκίνης (tRNA<sup>Leu(UUR)</sup>).

**2. Σύνδρομο Kearns-Sayre (KSS)** – σποραδική με έναρξη πριν από την ηλικία των 20. Προοδευτική εξωτερική οφθαλμοπληγία, ανώμαλη χρώση της ίριδας, καρδιακή δυσλειτουργία, εγκεφαλική αταξία. Διαβήτης. Νεφρική ανεπάρκεια. Η τυπική μετάλλαξη είναι η A3243G στο tRNA της λευκίνης (tRNA<sup>Leu(UUR)</sup>).

**3. Μυοκλωνική επιληψία (MERRF)** - επιληψία, αταξία εμφανιζόμενη σε παιδικά ηλικία ή εφηβεία. Μπορεί να εμφανισθούν απώλεια ακοής, άνοια, ατροφία οπτικού νεύρου. Στο 85% των περιπτώσεων μετάλλαξη αντικατάστασης βάσης στο tRNA-λυσίνη που οδηγεί σε βλάβες στα σύμπλοκα I και IV. Συνήθως ετεροπλασμία.

**4. Μιτοχονδριακή εγκεφαλοπάθεια, οξέωση λακτικού και καρδιακά επεισόδια (MELAS).** Δυσλειτουργία του εγκεφάλου (συνήθως επιληψία, παράλυση και άνοια) σε συνδυασμό με μιτοχονδριακή μυοπάθεια και οξέωση του αίματος. Σταδιακή εμφάνιση της ασθένειας, με τα πρώτα συμπτώματα να εμφανίζονται μεταξύ 5 και 15 ετών. Το 80% των ασθενών έχουν ετεροπλασμία. Αντικατάσταση στο tRNA – λευκίνη, που οδηγεί σε έλλειψη των απαραίτητων πρωτεϊνών που κωδικοποιούνται από τα μιτοχόνδρια και διεξάγουν την οξειδωτική φωσφορύλιση.

**5. Leber's κληρονομική οπτική νευροπάθεια (LHON)** Ξαφνική απώλεια της όρασης γύρω στην ηλικία των 20 ετών. Το 90% των περιπτώσεων φέρει μεταλλάξεις που εντοπίζονται στις ND1 ND4 και ND6 περιοχές. Συγκεκριμένα στην ND1 ταυτοποιείται η μετάλλαξη G3460A, στην ND4 η G11778A και στην ND6 η T14484C.

**6. Νευρογενής μυϊκή αδυναμία, αταξία, αμφιβληστροειδοπάθεια (NARP).** Απώλεια μυϊκής δύναμης και συντονισμού κινήσεων που συνοδεύεται από εκφύλιση εγκεφαλικών περιοχών και του αμφιβληστροειδούς. Η μετάλλαξη απαντάται στην υπομονάδα του συμπλόκου V ATPase 6 σε ποσοστό μεγαλύτερο του 50 % και είναι η T8993G.

**7. Σύνδρομο Leigh's.** Προοδευτική απώλεια της κίνησης και της ομιλίας και εκφύλιση βασικών γαγγλίων-δυνητικά θνησιγόνος στην παιδική ηλικία. Η τυπική μετάλλαξη εντοπίζεται στην υπομονάδα του συμπλόκου V ATPase 6 και είναι η T8993G. Έχουν περιγραφεί και μεταλλάξεις πυρηνικού DNA.

**8. Σύνδρομο Pearson's.** Δυσλειτουργία του μυελού των οστών από την παιδική ηλικία και έκπτωση παγκρεατικής λειτουργίας. Έλλειψη/διπλασιασμός mtDNA.

### 2.3.1 Μεταλλάξεις σε μιτοχονδριακά tRNA γονίδια

Τα γονίδια που κωδικοποιούν τα tRNAs αποτελούν μόνο το 10% περίπου του συνολικού μιτοχονδριακού γονιδιώματος. Παρ' όλα αυτά όμως, έχει αναφερθεί πως περισσότερες από τις μισές παθογόνες μεταλλάξεις που ευθύνονται για μία πληθώρα μιτοχονδριακών νοσημάτων, απαντώνται σε μιτοχονδριακά tRNA γονίδια. Τις μεταλλάξεις αυτές, μπορούμε να τις κατατάξουμε σε δύο βασικές κατηγορίες, ανάλογα με το αποτέλεσμα το οποίο παράγουν.

Συγκεκριμένα, μεταλλάξεις οι οποίες δεν προκαλούν κάποια αλλαγή στη δομή και κατ' επέκταση στη λειτουργία των tRNAs, καλούνται **πολυμορφισμοί**. Αντίθετα, μεταλλάξεις οι οποίες συντελούν στην εμφάνιση διαφόρων κλινικών συμπτωμάτων, καλούνται **παθογόνες μεταλλάξεις**. Σύμφωνα με τα δεδομένα του πίνακα 1 παρατηρούμε πως μέχρι σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί συνολικά 139 παθογόνες μεταλλάξεις και 243 πολυμορφισμοί. Θα πρέπει να σημειωθεί πως μόνο στο tRNA

tRNA	Αριθμός παθογόνων μεταλλάξεων	Αριθμός πολυμορφισμών
tRNA <sup>Leu(UUR)</sup>	28	7
tRNA <sup>Lys</sup>	14	9
tRNA <sup>Ile</sup>	14	7
tRNA <sup>Leu(CUN)</sup>	10	11
tRNA <sup>Thr</sup>	8	29
tRNA <sup>Ser(UCN)</sup>	7	10
tRNA <sup>Phe</sup>	7	10
tRNA <sup>Val</sup>	6	10
tRNA <sup>Trp</sup>	6	13
tRNA <sup>Gly</sup>	5	12
tRNA <sup>Tyr</sup>	4	7
tRNA <sup>Pro</sup>	4	9
tRNA <sup>Asn</sup>	4	7
tRNA <sup>Gln</sup>	3	15
tRNA <sup>His</sup>	3	11
tRNA <sup>Met</sup>	3	6
tRNA <sup>Ala</sup>	3	11
tRNA <sup>Ser(AGY)</sup>	3	13
tRNA <sup>Glu</sup>	3	9
tRNA <sup>Cys</sup>	2	16
tRNA <sup>Asp</sup>	2	11
tRNA <sup>Arg</sup>	0	9
Σύνολο	139	243

της αργινίνης δεν έχει εντοπιστεί μέχρι στιγμής κάποια παθογόνα μετάλλαξη. Αντίθετα πολυμορφισμοί έχουν ταυτοποιηθεί σε όλα τα μιτοχονδριακά tRNA γονίδια.

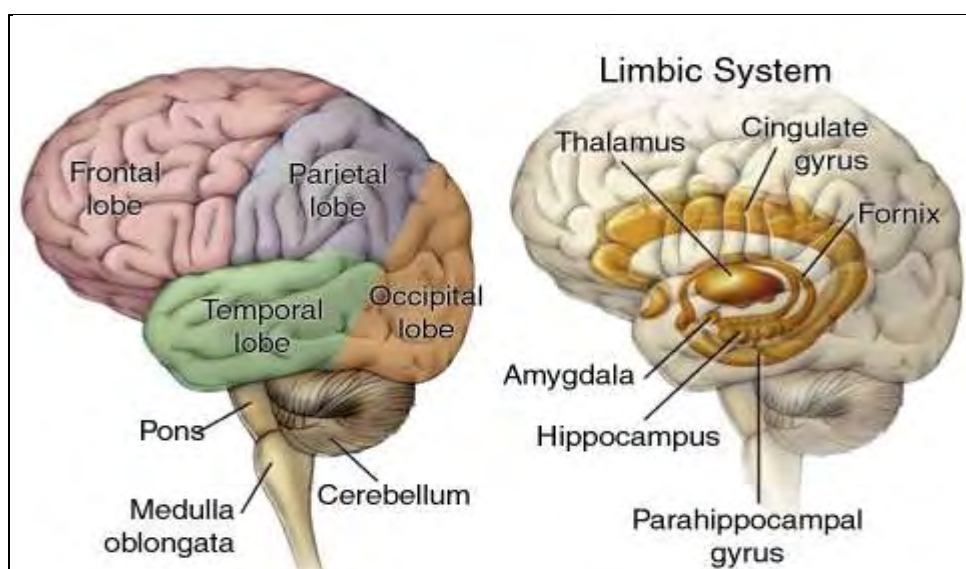
Οι μεταλλάξεις αυτές, είτε ανήκουν στην κατηγορία των παθογόνων, είτε των πολυμορφισμών, φαίνεται πως στην πλειονότητά τους αφορούν μεταπτώσεις και λιγότερο μετατροφές. Επίσης, εντοπίζονται τόσο στους βραχίονες, όσο και στις θηλιές.

Στην πρώτη περίπτωση, επηρεάζεται το φυσιολογικό ζευγάρωμα των αζωτούχων βάσεων, όπως ορίζεται από τους κανόνες Watson-Crick, ενώ στη δεύτερη, οι μεταλλάξεις συνήθως εκλείπουν γιατί τα νουκλεοτιδικά κατάλοιπα είναι εξαιρετικά συντηρημένα και οποιαδήποτε αλλαγή θα είχε άμεση επίδραση στην πρωτεϊνοσύνθεση.

Βέβαια το πότε μία μετάλλαξη θεωρείται παθογόνα δεν είναι τόσο εύκολο να καθοριστεί. Συνήθως, οι παθογόνες μεταλλάξεις που εμφανίζουν σοβαρό κλινικό φαινότυπο αφορούν πολύ συντηρημένες θέσεις, ενώ οι πολυμορφικές κυρίως μη συντηρημένες περιοχές. Παρ' όλα αυτά δεν υπάρχει σαφής διάκριση για την παθογένεια των μιτοχονδριακών tRNA μεταλλάξεων.

## 2.4 Η ΝΟΣΟΣ ΤΟΥ ALZHEIMER

Η νόσος του Alzheimer είναι μία νευροεκφυλιστική και προοδευτική ασθένεια του εγκεφάλου. Το 1906 περιγράφηκε αρχικά από το Γερμανό ψυχίατρο και νευροπαθολόγο Alois Alzheimer απ' όπου πήρε και το όνομα της. Στην πλειονότητα των περιπτώσεων εμφανίζεται σε ηλικία μεγαλύτερη των 65 ετών, αν και κάποιες φορές, η ασθένεια μπορεί να κάνει την εμφάνισή της και πολύ νωρίτερα, ίσως και πριν τα 50 χρόνια. Οι περιοχές του εγκεφάλου που πλήττονται περισσότερο είναι ο φλοιός, ο ιππόκαμπος, η αμυγδαλή, ο μετωπικός, κροταφικός, πλευρικός και ινιακός λοβός (Εικόνα 6)



*Εικόνα 6: Απεικόνιση των περιοχών του εγκεφάλου*

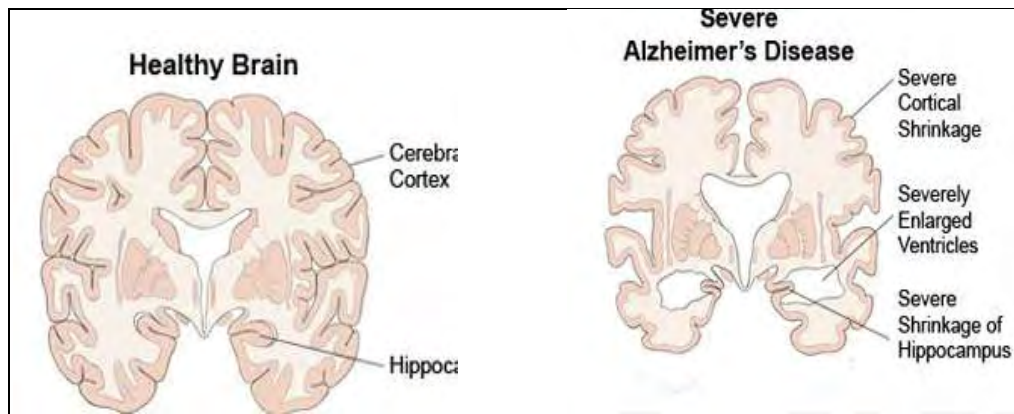
Η νόσος χαρακτηρίζεται από μία συνεχόμενη κατάπτωση των διανοητικών ικανοτήτων που επηρεάζει πολλαπλά γνωστικά πεδία, και δημιουργεί πρόβλημα στην καθημερινή, επαγγελματική και κοινωνική ζωή του ατόμου. Αποτελεί τη συχνότερη αιτία άνοιας και είναι υπεύθυνη για περισσότερες από τις μισές περιπτώσεις άνοιας.

Στα συμπτώματα της ασθένειας συγκαταλέγονται κατά κύριο λόγο η απώλεια μνήμης (το κυριότερο γνώρισμα της νόσου), η δυσκολία στην αφηρημένη σκέψη (πχ στους υπολογισμούς με τους αριθμούς) καθώς επίσης και η δυσκολία στον λόγο, υπό την έννοια της εύρεσης της σωστής λέξης. Ο ασθενής παρουσιάζει επίσης έλλειψη προσανατολισμού, δυσκολία στην κρίση και τη λήψη αποφάσεων. Έτσι ο ασθενής δεν μπορεί να λύσει απλά προβλήματα της καθημερινότητας.

Διαταραχές εμφανίζονται όμως και στο επίπεδο της συμπεριφοράς. Συγκεκριμένα αναπτύσσονται ψυχικές διαταραχές όπως κατάθλιψη, άγχος και επιθετικότητα. Οι περιοχές του εγκεφάλου που πλήττονται περισσότερο είναι ο φλοιός, ο ιππόκαμπος, η αμυγδαλή. Στη νόσο του Alzheimer, υπάρχει μια συνολική συρρίκνωση του ιστού του εγκεφάλου. Οι αύλακες στον εγκέφαλο παρουσιάζονται αισθητά διευρυμένες ενώ ταυτόχρονα παρατηρείται συρρίκνωση των ελίκων, που αποτελούν τις καλά ανεπτυγμένες πτυχώσεις του εξωτερικού στρώματος του



εγκεφάλου. Επιπλέον, οι κοιλίες εντός του εγκεφάλου που περιέχουν το εγκεφαλονωτιαίο υγρό, είναι και αυτές ιδιαίτερα διευρυμένες (Εικόνα 7)

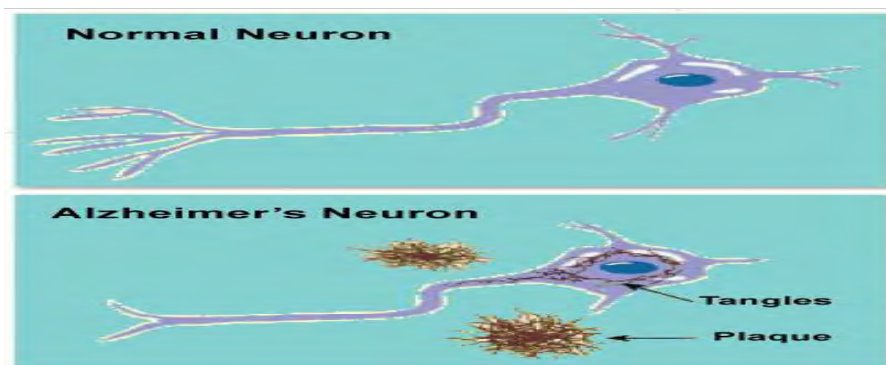


**Εικόνα 7:** Σχηματική αναπαράσταση του εγκεφάλου ενός φυσιολογικού ατόμου και του εγκεφάλου ενός ασθενούς που παρουσιάζει τις χαρακτηριστικές συρρικνώσεις και διευρύνσεις.

Στα αρχικά στάδια της νόσου του Αλτσχάιμερ, η βραχυπρόθεσμη μνήμη αρχίζει να εξασθενεί, όταν τα κύτταρα στον ιππόκαμπο, (μέρος του μεταιχμιακού συστήματος), εκφυλίζονται. Καθώς η νόσος εξελίσσεται, περισσότερα νευρικά κύτταρα πεθαίνουν, οδηγώντας τελικά σε αλλαγές στη συμπεριφορά.

#### 2.4.1 Η παθογένεια της νόσου

Σε ότι αφορά την παθογένεια της νόσου, τα βασικά γνωρίσματα που μπορούν να παρατηρηθούν στο εγκεφαλο του ασθενούς (σε μικροσκοπικό επίπεδο), είναι οι **νευριτικές- αμυλοειδείς πλάκες** και τα **νευροϊνιδιακοί σωροί**. (Εικόνα 8).

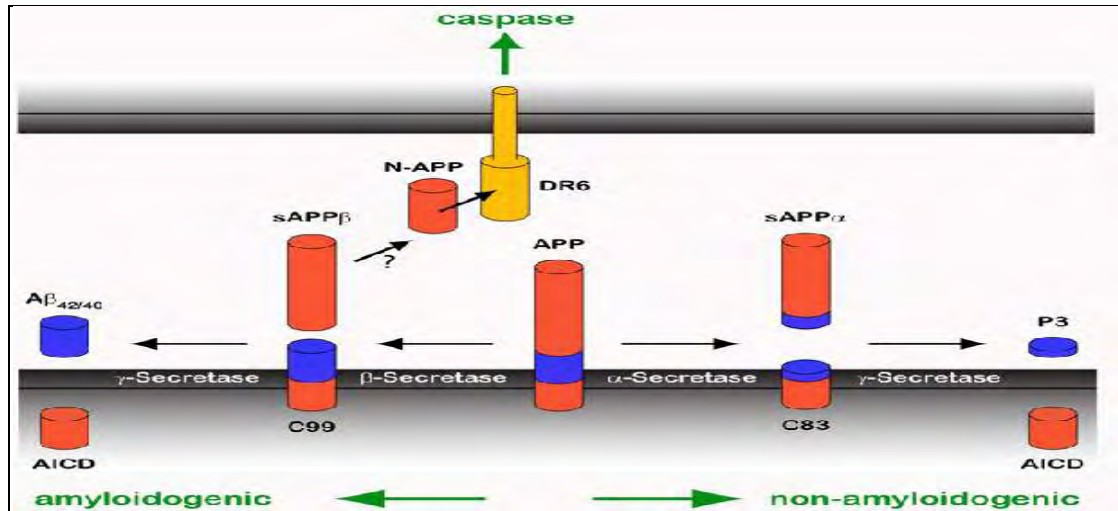


**Εικόνα 8:** Σχηματική απεικόνιση των αμυλοειδών πλακών και των νευροϊνιδιακών σωρών σε έναν παθολογικό νευρώνα. Αντίστοιχα ευρήματα δεν εντοπίζονται στο φυσιολογικό.

Πιο αναλυτικά:

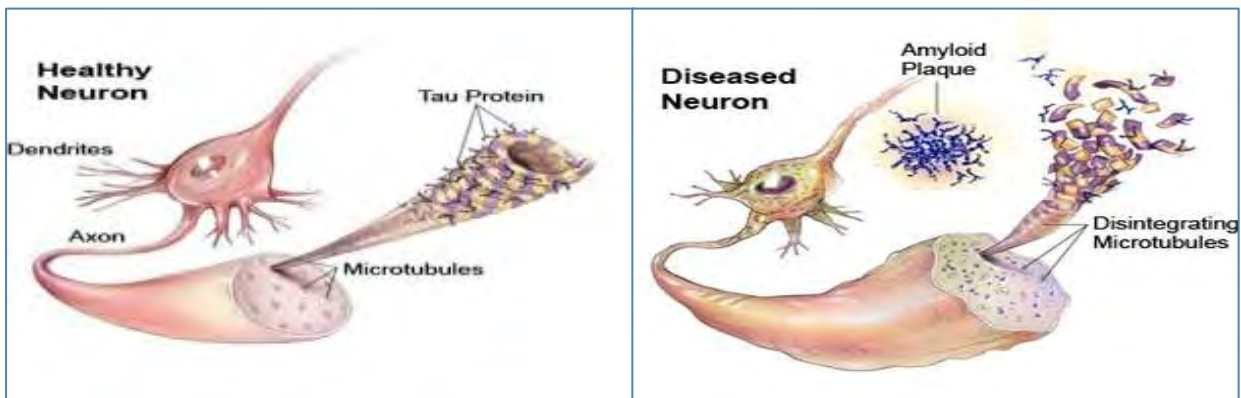
Οι αμυλοειδείς πλάκες αποτελούν μικροσκοπικούς αδιάλυτους σχηματισμούς από μίγμα συστατικών της εξωκυττάριας ουσίας και συσσωρευμένο Αβ πεπτιδίδο σε

πολυμερισμένη μορφή. Το Αβ πεπτίδιο προκύπτει, από την πρωτεόλυση της πρόδρομης πρωτεΐνης του αμυλοειδούς (APP) κατά τη συνδυασμένη δράση β και γ σεκρετασών. Εναλλακτικά, επιδρά η α-σεκρετάση στο APP μόριο. Στην περίπτωση αυτή το αποτέλεσμα είναι η θραύση του μορίου εντός της αλληλουχίας Αβ και η απελευθέρωση του αμινοτελικού άκρου της APP (sAPPα), το οποίο έχει νευροπροστατευτική δράση. (Εικόνα 9).



**Εικόνα 9:** Σχηματική απεικόνιση της δημιουργίας των αμυλοειδών πλακών.

Οι νευροϊνδιακοί σωροί αποτελούν συγκέντρωση νευροϊνδιακών αλλοιώσεων μέσα στο κύτταρο που οφείλονται στη συσσώρευση της υπερφωσφορυλιωμένης πρωτεΐνης tau. Η πρωτεΐνη αυτή φυσιολογικά προάγει τον πολυμερισμό της σωληνίνας και τη συγκρότηση των μικροσωληνίσκων. Η ανώμαλη φωσφορυλίωσή της (υπερφωσφορυλίωση) προκαλεί αυτές τις δομές. (Εικόνα 10).



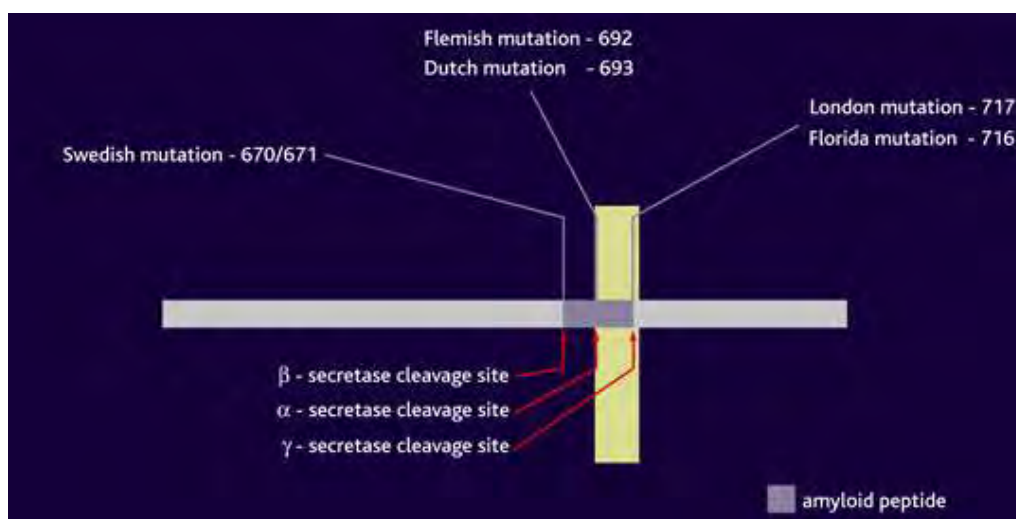
**Εικόνα 10:** Σχηματική απεικόνιση ενός φυσιολογικού νευρώνα (αριστερά) και ενός παθολογικού (δεξιά). Παρατηρούνται τόσο οι αμυλοειδείς πλάκες, όσο και ο σχηματισμός των σωρών λόγω της μη φυσιολογικής λειτουργίας της πρωτεΐνη tau.

## 2.4.2 Οικογενής – Σποραδικό τύπος

Η νόσος του Alzheimer μπορεί να διαχωριστεί σε δύο επιμέρους κατηγορίες, ανάλογα με τον τρόπο κληρονόμησής της, καθώς επίσης και με την ηλικία εμφάνισης των συμπτωμάτων. Συγκεκριμένα, υπάρχει η **οικογενής** και η **σποραδική νόσος**.

Στην πρώτη περίπτωση, περίπου το 1%-5% των περιπτώσεων της νόσου κληρονομείται με αυτοσωμικό επικρατή τρόπο και παρουσιάζεται πιθανότητα 50%-100% να νοσήσουν οι απόγονοι. Η ηλικία εμφάνισης της νόσου φαίνεται να είναι τα 45-65 χρόνια (*πρώιμη έναρξη*). Η οικογενής μορφή της νόσου θεωρείται ιδιαίτερα σπάνια και οφείλεται σε γενετικές μεταλλάξεις σε 3 γονίδια, στο γονίδιο που κωδικοποιεί την ίδια την *APP*, στην *πρεσενιλίνη 1 (PS1)* και στην *πρεσενιλίνη 2 (PS2)*. Όλες οι μεταλλάξεις προκαλούν αύξηση του Αβ42 ή του λόγου Αβ42/Αβ40.

Πιο αναλυτικά, το γονίδιο της *APP* εδράζεται στο χρωμόσωμα 21. Συνολικά έχουν ταυτοποιηθεί 27 μεταλλάξεις αποτελώντας περίπου το 10% των περιπτώσεων της οικογενούς μορφής. Οι θέσεις των μεταλλάξεων είναι συγκεκριμένες και εντοπίζονται γύρω από τις περιοχές που κόβονται από τις σεκρετάσες. Οι μεταλλάξεις αυτές αυξάνουν την παραγωγή του πεπτιδίου Αβ (*Εικόνα 11*).



*Εικόνα 11: Απεικόνιση των θέσεων όπου εντοπίζονται οι μεταλλάξεις στο γονίδιο της APP*

Για το γονίδιο της πρεσενιλίνης 1 γνωρίζουμε ότι εδράζεται στο χρωμόσωμα 14. Έχουν βρεθεί 166 μεταλλάξεις που αποτελούν την πλειοψηφία των περιπτώσεων της αυτοσωμικά επικρατούς μορφής της νόσου (περίπου 80%). Φαίνεται να αποτελεί την πιο επιθετική μορφή.

Επιπλέον, σε ό,τι αφορά το γονίδιο της πρεσενιλίνης 2, εδράζεται στο χρωμόσωμα 1 και έχουν βρεθεί 10 μεταλλάξεις (είναι η πιο σπάνια μορφή της οικογενούς ΝΑ). Έχει βρεθεί επίσης ότι 4 στις 10 μεταλλάξεις συμβαίνουν στο διαμεμβρανικό τμήμα 2.

Όπως και στην περίπτωση του γονιδίου της APP έτσι και εδώ, οι μεταλλάξεις στα γονίδια PS1 και PS2 έχουν ως αποτέλεσμα την αυξημένη παραγωγή του Αβ πεπτιδίου. Ενεργοποιείται έτσι ένας καταρράκτης αντιδράσεων που θα μπορούσε να παρουσιαστεί συνοπτικά από τα ακόλουθα βήματα:

1. Μεταλλάξεις στα γονίδια APP, PS1 και PS2
2. Διαταραχή της πρωτεόλυσης του APP-Αυξημένη παραγωγή Αβ42
3. Σταδιακή συσσώρευση του Αβ42 ως αδιάλυτες πλάκες
4. Δημιουργία αντιφλεγμονώδους αντίδρασης (μικρογλοία, αστροκύτταρα)
5. Σταδιακός τραυματισμός των νευρώνων
6. Διαταραχή της μεταβολικής και ιονικής ομοιόστασης- οξειδωτικό stress
7. Διαταραχή της δράσης των κινασών/ φωσφατασών υπερφωσφορυλίωση της tau
8. Διάχυτη δυσλειτουργία νευρώνων και θάνατος κυττάρων του ιπποκάμπου και του φλοιού
9. Άνοια τύπου Alzheimer

Ο σποραδικός τύπος αποτελεί περίπου το 95% των περιπτώσεων της νόσου και προσβάλλει κυρίως άτομα ηλικίας μεγαλύτερης από τα 65 χρόνια. Τα αίτια θεωρούνται σύνθετα καθώς υπάρχει αλληλεπίδραση γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων. Στους περιβαλλοντικούς παράγοντες συγκαταλέγονται το αλκοόλ, το κάπνισμα, ο διαβήτης και η υπερλιπιδαιμία.

Στους γενετικούς όμως παράγοντες, ο κύριος εκπρόσωπος είναι η απολιποπρωτεΐνη E (APOE). Το 1993, οι Saunders A. M. et al., δημοσίευσαν συσχέτιση του γονιδίου της απολιποπρωτεΐνης E με τη σποραδική ΝΑ. Το γονίδιο εδράζεται στο χρωμόσωμα 19. Έχει βρεθεί ότι εμπλέκεται στη ρύθμιση του μεταβολισμού της χοληστερόλης και των τριγλυκεριδίων. Σε σχέση με τη νόσο του Alzheimer, η APOE αυξάνει τη συσσώρευση του Αβ42 πεπτιδίου. Υπάρχουν τρία κύρια αλληλόμορφα του γονιδίου, το ε2, ε3 και ε4. Κάθε άτομο φέρει ένα συνδυασμό 2 εκ των 3 αλληλομόρφων. Το ε4 είναι ισχυρός παράγοντας κινδύνου, το ε3 ουδέτερο και το ε2 δρα μάλλον προστατευτικά.

Τα αλληλόμορφα αυτά επηρεάζουν τόσο την ηλικία εμφάνισης όσο και την πορεία της νόσου. Για παράδειγμα, άτομα που φέρουν το ε4 σε ομόζυγη κατάσταση, εκδηλώνουν τα πρώιμα συμπτώματα της νόσου σε ηλικία περίπου 60 ετών και τα μικροσκοπικά ευρήματα δείχνουν μεγαλύτερες και πιο πυκνές πλάκες απ' ότι παρατηρείται σε άτομα ομόζυγα για το ε3.

#### **2.4.3 Συσχέτιση μιτοχονδρίων με τη νόσο του Alzheimer**

Συγκεντρώνοντας όλα τα παραπάνω στοιχεία, μπορούμε αναμφισβήτητα να καταλήξουμε στο συμπέρασμα πως το Alzheimer είναι μία καθαρά πολυπαραγοντική νόσος. Έτσι λοιπόν, η εμπλοκή των μιτοχονδρίων στην ανάπτυξη της ασθένειας δεν αποτελεί ένα αδύνατο σενάριο. Συγκεκριμένα, η συμμετοχή τους στην παθογένεση προτάθηκε αρχικά τη δεκαετία του 80', όταν σε ασθενείς με Alzheimer, παρατηρήθηκε μειωμένος μεταβολισμός γλυκόζης, υποδεικνύοντας τη μη

φυσιολογική λειτουργία τους (Horwitz et al., 1987)/( Hoyer et al., 1988). Στη συνέχεια, ακολούθησε μία πιο λεπτομερής μελέτη της λειτουργίας των μιτοχονδρίων ασθενών με Alzheimer, η οποία έφερε στο προσκήνιο τη συσχέτιση των μιτοχονδρίων με τη νόσο. Συγκεκριμένα παρατηρήθηκαν:

- Μειωμένος μεταβολισμός γλυκόζης (Horwitz et al., 1987)/( Hoyer et al., 1988)
- Μειωμένη ενεργότητα κυτοχρωμικής οξειδάσης (Parker et al., 1989)/( Kish et al., 1992)/( Mutisya et al., 1994)
- Αυξημένη ενεργοποίηση αποπτωτικών πρωτεϊνών (Su et al., 1997)/( Su et al., 2002)
- Αυξημένη ενεργοποίηση αποπτωτικών πρωτεϊνών (Su et al., 1997)/( Su et al., 2002)
- Μειωμένος αριθμός μιτοχονδρίων (Hirai et al., 2001)/( Castellanni et al., 2002)
- Αλλαγή της μορφολογίας των μιτοχονδρίων (Hirai et al., 2001)/( Castellanni et al., 2002)
- Μειωμένη ενεργότητα ενζύμων του κύκλου του Krebs (Blass and Brown et al., 2000)/( Gibson et al., 2008)
- Συγκέντρωση των μιτοχονδρίων γύρω από τον πυρήνα (Wang et al., 2008)
- Αυξημένη παραγωγή ROS (Moreira et al., 2008)

Θα μπορούσε κανείς να αναφέρει ότι η αυξημένη παραγωγή ελεύθερων ριζών οξυγόνου είναι το άμεσο αποτέλεσμα όλων των παραπάνω και ουσιαστικά αποτελεί το ενδιάμεσο βήμα για την ανάπτυξη της νόσου. Πιο αναλυτικά, η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία είναι μια σημαντική αιτία για την εμφάνιση του οξειδωτικού stress στον εγκέφαλο. Ο εγκέφαλος είναι ιδιαίτερα επιρρεπής στο οξειδωτικό stress και σε συνδυασμό με την έλλειψη αντιοξειδωτικών μηχανισμών, μπορούν να προκληθούν σημαντικές βλάβες που μπορεί να οδηγήσει ακόμα και στην εμφάνιση του Alzheimer. Οι βλάβες αυτές, αφορούν λιπίδια, πρωτεΐνες και νουκλεϊκά οξέα και οδηγούν σταδιακά σε αποσταθεροποίηση της δομής της μεμβράνης, σε αλλαγή της διαπερατότητας της μεμβράνης των μιτοχονδρίων και γενικότερα σε μεταλλάξεις στο DNA.

#### 2.4.4 Μιτοχονδριακές μεταλλάξεις και η νόσος Alzheimer

Η αλλαγή της δομής και της λειτουργίας των μιτοχονδρίων σε ασθενείς με Alzheimer έθεσε τα θεμέλια για περαιτέρω μελέτη. Σκοπός ήταν να διερευνηθεί η συμμετοχή των μιτοχονδριακών μεταλλάξεων στην πρόκληση μιτοχονδριακής δυσλειτουργίας. Η βιβλιογραφία αναφέρει μεταλλάξεις σε όλο το εύρος του μιτοχονδριακού DNA με τους ασθενείς να τις φέρουν σε εμφανώς μεγαλύτερα επίπεδα απ' ό,τι τα άτομα ελέγχου. Ιδιαίτερο ρόλο φαίνεται να έχουν οι μεταλλάξεις στα μιτοχονδριακά tRNA γονίδια, χωρίς βέβαια να υπάρχει απόλυτα ξεκάθαρη εικόνα. Η πιο συχνή μετάλλαξη που παρατηρείται είναι αυτή στο tRNA<sup>Gln</sup> αν και κάποιοι επιστήμονες δεν συμφωνούν με την άποψη που υποστηρίζει την σύνδεση μεταξύ της συγκεκριμένης μετάλλαξης και της ασθένειας (Wragg et al., 1995).

Παρ' όλα αυτά όμως η συμμετοχή των μιτοχονδρίων στη νόσο του Alzheimer είναι ευρέως αποδεκτή και ο κύριος λόγος είναι οι ανωμαλίες που παρουσιάζονται στη δομή και τη λειτουργία τους καθώς και οι μεταλλάξεις που έχουν ταυτοποιηθεί στο DNA τους. Το βασικό όμως που πρέπει να απαντηθεί προκειμένου να δώσει μία πιο ξεκάθαρη εικόνα είναι το κατά πόσο ***οι μιτοχονδριακές μεταλλάξεις αποτελούν την αιτία ή το αποτέλεσμα της νόσου;***

## 2.5 ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Σκοπός της συγκεκριμένης εργασίας είναι η ανίχνευση μεταλλάξεων σε μιτοχονδριακά tRNA γονίδια σε 50 ασθενείς με Alzheimer. Συγκεκριμένα, το γονίδιο που μελετήθηκε ήταν αυτό του tRNA<sup>Gly</sup> (γλυκίνη). Απώτερος στόχος είναι να ανιχνευθούν μεταλλάξεις στα μιτοχονδριακά tRNA γονίδια ασθενών με Alzheimer και να συγκριθεί το ποσοστό τους με το αντίστοιχο ποσοστό στον φυσιολογικό πληθυσμό.

### 3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

#### 3.1 ΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΥΛΙΚΟ

Στην παρούσα πειραματική μελέτη χρησιμοποιήθηκε ως βιολογικό υλικό, ολικό αίμα από ένα σύνολο 50 ασθενών με Alzheimer από την ευρύτερη περιοχή της Θεσσαλίας. Τα άτομα επιλέχθηκαν τυχαία και δεν υπάρχει συγγένεια μεταξύ τους. Πρωταρχικό βήμα ήταν η απομόνωση του DNA από τα δείγματα αυτά. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο του κυρίου Χατζηγεωργίου.

#### 3.2 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ

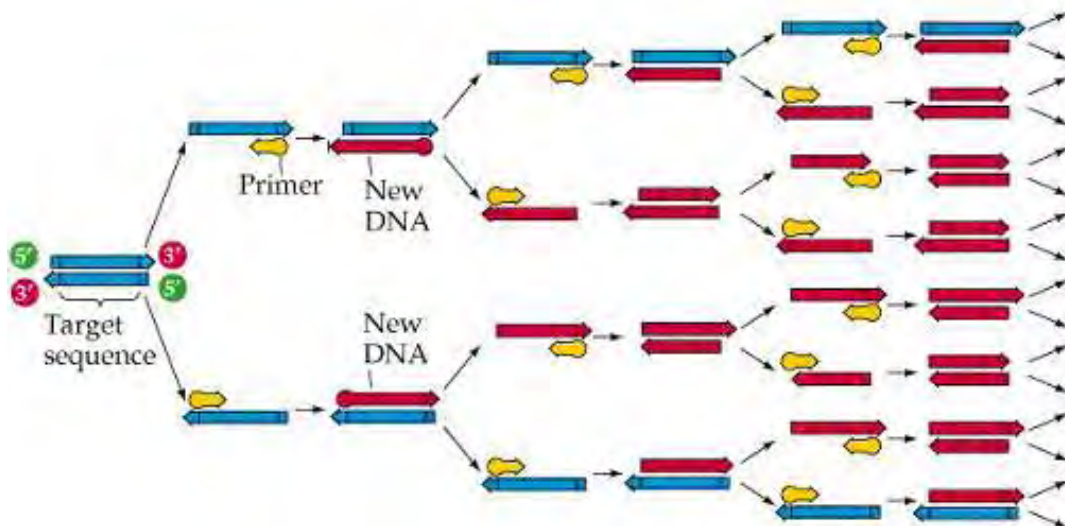
Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR= *polymerase chain reaction*) είναι μία μέθοδος βιοχημείας και μοριακής βιολογίας για την απομόνωση και τον πολλαπλασιασμό μίας αλληλουχίας DNA, μέσω της ενζυμικής αναπαραγωγής του DNA χωρίς τη χρήση ζωντανών μικροοργανισμών όπως το βακτήριο *E. coli* ή οι ζύμες.

Η PCR είναι μία *in vitro* μέθοδος και μπορεί να πραγματοποιηθεί χωρίς περιορισμούς στη μορφή του χρησιμοποιούμενου DNA. Η ευαισθησία και ταχύτητα της μεθόδου αυτής έχει επιφέρει επανάσταση στη Μοριακή Γενετική δίνοντας καινούργιες προοπτικές για τη μελέτη και ανάλυση γονιδίων. Μπορεί ακόμα να διαφοροποιηθεί εκτενώς για την πραγματοποίηση ποικίλων μεθόδων γενετικής επέμβασης. Με τη χρήση της συγκεκριμένα τμήματα DNA μπορούν να κλωνοποιηθούν σε έναν δοκιμαστικό σωλήνα, απουσία ζωντανών κυττάρων. Η μέθοδος αναπτύχθηκε το 1985 από τους Mullis και Silverstein και άρχισε να χρησιμοποιείται ευρέως το 198. Μάλιστα στον Οκτώβριο του 1993 ο K. Mullis τιμήθηκε με το Νόμπελ Χημείας για αυτή την καθοριστική του συμβολή στην ανακάλυψη και ανάπτυξη της PCR.

##### 3.2.1 Αρχή της μεθόδου

Η PCR βασίζεται στη δράση της DNA πολυμεράσης. Το ένζυμο αυτό χρησιμοποιεί μονόκλωνο DNA για τη σύνθεση ενός συμπληρωματικού κλώνου με κατεύθυνση 5'→3'. Τα μονόκλιωνα τμήματα, που προκύπτουν μετά από θέρμανση του αρχικού δίκλωνου σε υψηλές θερμοκρασίες, χρησιμοποιούνται ως μήτρα για τη σύνθεση των νέων μορίων. Για να μπορέσει να δράσει η πολυμεράση πρέπει να υπάρχει ένα μικρό τμήμα δίκλωνου DNA. Για το λόγο αυτό στην αντίδραση προστίθενται δύο εκκινητές – ολιγονουκλεοτίδια (primers). Η αλληλουχία του κάθε εκκινητή είναι συμπληρωματική προς τη μία από τις δύο αλυσίδες του δίκλωνου DNA- εκμαγείου. Οι κύκλοι της αντίδρασης επαναλαμβάνονται και έτσι μετά από n κύκλους, η αντίδραση μπορεί να δώσει έως και 2n δίκλιωνα μόρια (Εικόνα 12).





*Εικόνα 12: Σχηματική απεικόνιση της μεθόδου της PCR*

Για την εκτέλεση μίας αντίδρασης PCR χρειάζονται:

- Μια θερμοσταθερή DNA πολυμεράση . Το ένζυμο αυτό καταλύει την σύνθεση του DNA . Σήμερα υπάρχουν εμπορικά διαθέσιμες μια ποικιλία θερμοσταθερών DNA πολυμερασών από διάφορους θερμοφίλους οργανισμούς
- Ένα ζευγάρι εκκινητών. Οι εκκινητές είναι συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια τα οποία χρησιμοποιούνται από την πολυμεράση ως εναρκτήρια τμήματα για τη σύνθεση του DNA. Σχεδιάζονται κατά τέτοιο τρόπο ώστε να υβριδοποιούνται (προσδένονται) στα άκρα της αλληλουχίας - στόχου με το ελεύθερο 3' υδροξύλιό τους προσανατολισμένο προς το εσωτερικό του τμήματος DNA που πρόκειται να πολλαπλασιαστεί κατά την αντίδραση PCR
- Ο σωστός σχεδιασμός των εκκινητών αποτελεί μια κρίσιμη παράμετρο για την επιτυχία της αντίδρασης (Mitsunashi M.). Οι δύο εκκινητές πρέπει να έχουν παραπλήσια θερμοκρασία τήξης ( $T_m$ ) ώστε να υβριδοποιούνται στα άκρα της αλληλουχίας - στόχου στην ίδια θερμοκρασία. Θα πρέπει επίσης η αλληλουχία τους να έχει ορισμένα χαρακτηριστικά τα οποία θα αναφέρουμε και θα συζητήσουμε κατά τη διάρκεια της άσκησης , στα πλαίσια της οποίας θα γίνει επίσης επίδειξη ενός προγράμματος σχεδιασμού εκκινητών
- Τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs). Τυπικά χρησιμοποιείται κάθε dNTP σε συγκέντρωση 200 - 250  $\mu\text{M}$  . Η ποσότητα αυτή είναι υπεραρκετή καθώς αν αξιοποιηθεί όλη, θα συντεθούν 6-6,5  $\mu\text{g}$  DNA. Ειδικά λοιπόν όταν το προϊόν της αντίδρασης είναι σχετικά μικρό (της τάξης των μερικών εκατοντάδων ζευγών βάσεων) είναι δυνατό να χρησιμοποιηθεί χαμηλότερη συγκέντρωση dNTPs (100  $\mu\text{M}$  ή και μικρότερη)

- Δισθενή κατιόντα . Όλες οι θερμοσταθερές DNA πολυμεράσες που χρησιμοποιούνται στην PCR χρειάζονται δισθενή κατιόντα προκειμένου να λειτουργήσουν , συνήθως  $Mg^{2+}$ . Η συγκέντρωση των ιόντων  $Mg^{2+}$  συνήθως κυμαίνεται μεταξύ 1 - 5 mM ανάλογα με την αντίδραση. Έχει διαπιστωθεί πως σε διαφορετικές συγκεντρώσεις  $Mg^{2+}$  μεταβάλλεται η κινητική της πρόσδεσης των εκκινητών, στη συμπληρωματική προς αυτούς αλληλουχία την οποία αναγνωρίζουν. Σχετικά υψηλή συγκέντρωση  $Mg^{2+}$  σε ορισμένες περιπτώσεις έχει αναφερθεί πως μειώνει την ειδικότητα της πρόσδεσης (Riedel K.H., et al.), ενώ σε άλλες περιπτώσεις έχει αναφερθεί πως την αυξάνει (Harris S . & Jones D. B.). Στην πράξη η ιδανική συγκέντρωση  $Mg^{2+}$  για κάθε δεδομένη αντίδραση PCR προσδιορίζεται εμπειρικά.
- Ρυθμιστικό διάλυμα. Συνήθως ως ρυθμιστικό διάλυμα χρησιμοποιείται Tris-HCl τυπικά σε συγκέντρωση ~10 mM, προκειμένου το pH να διατηρείται μεταξύ 8,3 και 8,5 σε θερμοκρασία δωματίου . Στην θερμοκρασία των 72°C στην οποία επιτελείται ο πολυμερισμός, το pH πέφτει κατά μια περίπου μονάδα φθάνοντας στο ~7,2 που είναι η κατάλληλη τιμή για τη δράση των περισσότερων θερμοσταθερών DNA πολυμερασών
- Το DNA - μήτρα . Πρόκειται για το DNA που περιλαμβάνει την αλληλουχία - στόχο. Θεωρητικά, αλλά και πρακτικά κάτω από ιδανικές συνθήκες (Li H. et al.), η PCR μπορεί να δώσει ικανοποιητική ποσότητα προϊόντος ξεκινώντας ακόμα και από ένα μόριο DNA - μήτρας . Συνήθως όμως χρησιμοποιούνται ως μήτρα μερικές χιλιάδες αντίγραφα της αλληλουχίας - στόχου. Στην πράξη αυτό σημαίνει πως όταν ως μήτρα χρησιμοποιείται γονιδιωματικό DNA θηλαστικών, στην αντίδραση περιλαμβάνονται ~200 ng DNA. Όταν ως μήτρα χρησιμοποιείται γονιδιωματικό DNA από ζυμομύκητα, από βακτήρια ή καθαρό πλασμιδιακό DNA, στην αντίδραση περιλαμβάνονται ~10 ng DNA , ~1 ng DNA και ~1 pg DNA αντίστοιχα .

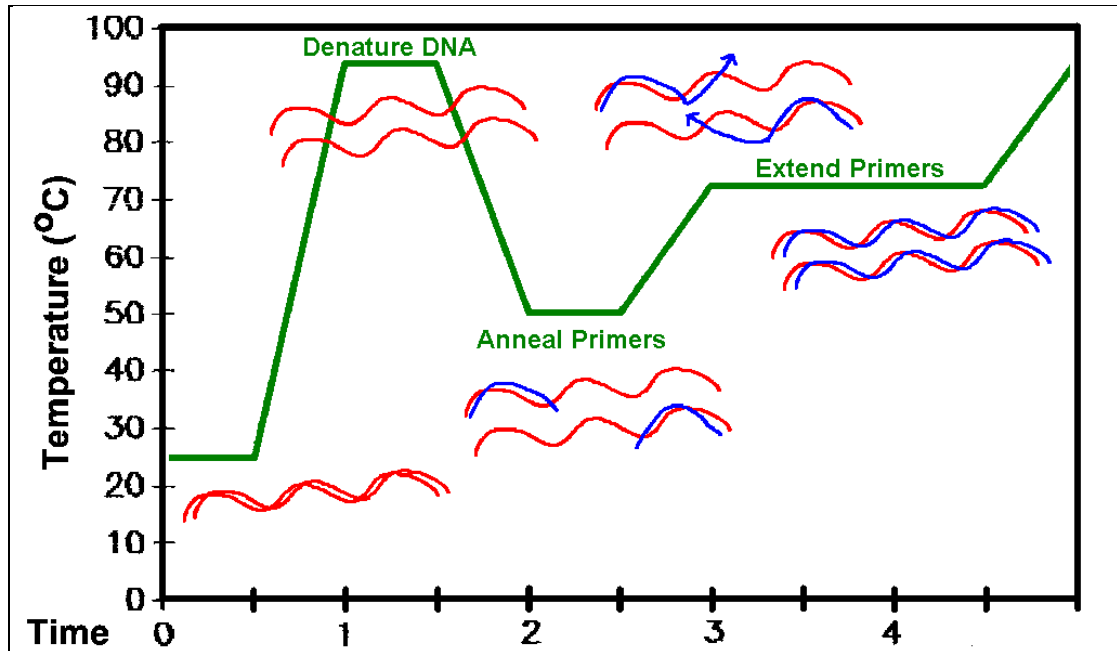
### 3.2.2 Τα στάδια της αντίδρασης

Ένας πλήρης κύκλος μιας PCR αντίδρασης περιλαμβάνει τρία στάδια (Εικόνα 13):

- Αποδιάταξη του DNA (denaturation)
- Υβριδοποίηση των εκκινητών στο DNA εκμαγείο (annealing)
- Επιμήκυνση των εκκινητών (extension)

Κατά την διάρκεια του **πρώτου σταδίου** το τμήμα DNA που μας ενδιαφέρει υποβάλλεται σε θερμοκρασία 94°C προκειμένου να επιτευχθεί ο διαχωρισμός των αλυσίδων του δίκλωνου αυτού DNA (αποδιάταξη/denaturation). Στο **δεύτερο στάδιο** η θερμοκρασία μειώνεται στους 50-60°C και έτσι επιτυγχάνεται η ένωση των εκκινητών με τις συμπληρωματικές αλληλουχίες του DNA σε κάθε αλυσίδα (υβριδοποίηση εκκινητών/primer annealing). Τέλος στο **τρίτο στάδιο** η θερμοκρασία αυξάνεται στους 72°C και με την βοήθεια της DNA πολυμεράσης, που προσθέτει τα

νουκλεοτίδια (dNTP's) στο 3' άκρο των εκκινητών, επιτυγχάνεται η σύνθεση των νέων συμπληρωματικών αλυσίδων DNA. Η σύνθεση των αντιγράφων γίνεται από την DNA πολυμεράση πάντα με κατεύθυνση 5' προς 3'.



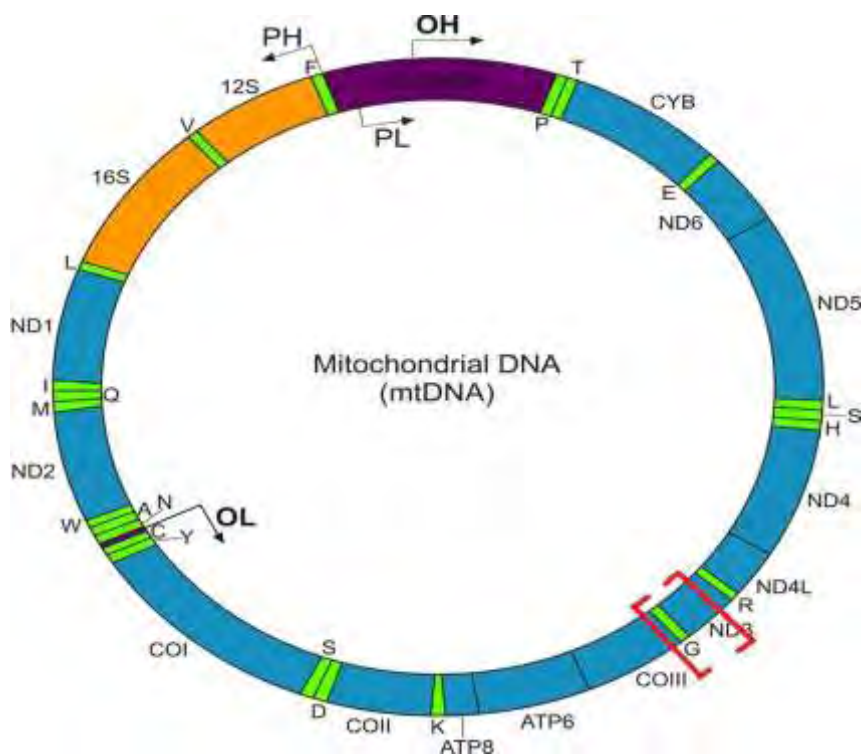
*Εικόνα 13: Διαγραμματική απεικόνιση των 3 σταδίων ενός κύκλου PCR. Στο πρώτο στάδιο (θερμοκρασία 94°C) πραγματοποιείται η αποδιάταξη των δύο αλυσίδων του δίκλωνου DNA. Στο δεύτερο στάδιο (θερμοκρασία 50-60 °C) λαμβάνει χώρα η υβριδοποίηση των εκκινητών και στο τρίτο στάδιο (θερμοκρασία 72°C) ξεκινά ο πολυμερισμός των αλυσίδων από την DNA πολυμεράση.*

### 3.2.3 Πολλαπλασιασμός του tRNA γονιδίου του mtDNA

Για τον πολλαπλασιασμό του tRNA<sup>Gly</sup> χρησιμοποιήθηκε ένα συγκεκριμένο ζεύγος εκκινητών μήκους 224bp που ενίσχυσε το επιθυμητό τμήμα.

Γονίδιο tRNA	FW Primer	T m	RV Primer	Tm
Gly	5'- CCATCTATTGATGAGGGTCT-3'	5 6	5'- GGATATAGGGTCCAAGCCGCA-3'	63

Στην παρακάτω εικόνα απεικονίζεται το τμήμα που ενισχύθηκε:



**Εικόνα 14:** Με κόκκινο πλαίσιο απεικονίζεται το τμήμα του γονιδιώματος που ενισχύθηκε με την τεχνική της PCR. Όπως παρατηρούμε εκτός από το γονίδιο του , η αλληλουχία αυτή περιέχει και τμήμα από τις περιοχές ND3 και COIII.

Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε erpendorfs των 500μl και ο τελικός όγκος της αντίδρασης είναι 50 μl. Για μια αντίδραση χρησιμοποιούνται τα παρακάτω:

	<b>ΑΡΧΙΚΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ</b>	<b>ΤΕΛΙΚΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ</b>
<b>DNA</b>	100 ng/μl	4 ng/μl
<b>Buffer solution</b>	10 X	1X
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	50 Mm	2 Mm
<b>Primers (FW/RV)</b>	50 pmol/μl	1 pmol/μl
<b>dNTPs</b>	10 mM	0,2 mM
<b>Taq πολυμεράση</b>	5 u/μl	1 u/μl

Για το συγκεκριμένο πείραμα, οι ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν για κάθε αντιδραστήριο ήταν οι ακόλουθες:

<b>ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟ</b>	<b>ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ</b>
DNA	2 μl
Buffer solution	5 μl
MgCl <sub>2</sub>	1 μl
Primers (FW/RV)	1+1 μl
dNTPs	1 μl
Taq πολυμεράση	0,2 μl
ddH <sub>2</sub> O	39 μl

Για κάθε σύνολο αντιδράσεων χρησιμοποιείται και ένας αρνητικός μάρτυρας για να εξακριβωθεί εάν υπάρχει επιμόλυνση. Ο μάρτυρας περιέχει όλα τα παραπάνω συστατικά εκτός από το DNA.

Οι αντιδράσεις λαμβάνουν χώρα σε θερμικό κυκλοποιητή ο οποίος προγραμματίζεται ως εξής:

<b>ΣΤΑΔΙΟ</b>	<b>ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ</b>	<b>ΔΙΑΡΚΕΙΑ</b>
Αρχική αποδιάταξη	95°C	4min
Αποδιάταξη	95 °C	40sec
Υβριδοποίηση	52 °C	45sec
Επέκταση	72 °C	50sec
Τελική επέκταση	72°C	10min

Το στάδιο αποδιάταξη-υβριδοποίηση-επέκταση επαναλαμβάνεται για 35 κύκλους. Το επόμενο βήμα είναι ο ποιοτικός προσδιορισμός των PCR προϊόντων.

### 3.2.4 Ποιοτικός έλεγχος των PCR προϊόντων με ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αγαρόζη

Για να διαπιστωθεί η επιτυχία της ενίσχυσης του επιθυμητού τμήματος, γίνεται ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης. Η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης, είναι μία μέθοδος που χρησιμοποιείται στη βιοχημεία, τη μοριακή βιολογία και την κλινική χημεία, για να διαχωρίσει ένα μικτό πληθυσμό DNA ή πρωτεϊνών σε μία μήτρα αγαρόζης. Οι πρωτεΐνες μπορούν να διαχωριστούν με βάση το φορτίο ή το μέγεθός τους, ενώ τα θραύσματα DNA και RNA με βάση το μήκος. Ο διαχωρισμός των βιομορίων βασίζεται στην εφαρμογή ενός ηλεκτρικού πεδίου. Μόλις ολοκληρωθεί η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης, το πήκτωμα παρατηρείται κάτω από την επίδραση UV φωτός, με σκοπό να αποκαλυφθούν τα διαχωρισμένα τμήματα.

Συστατικά

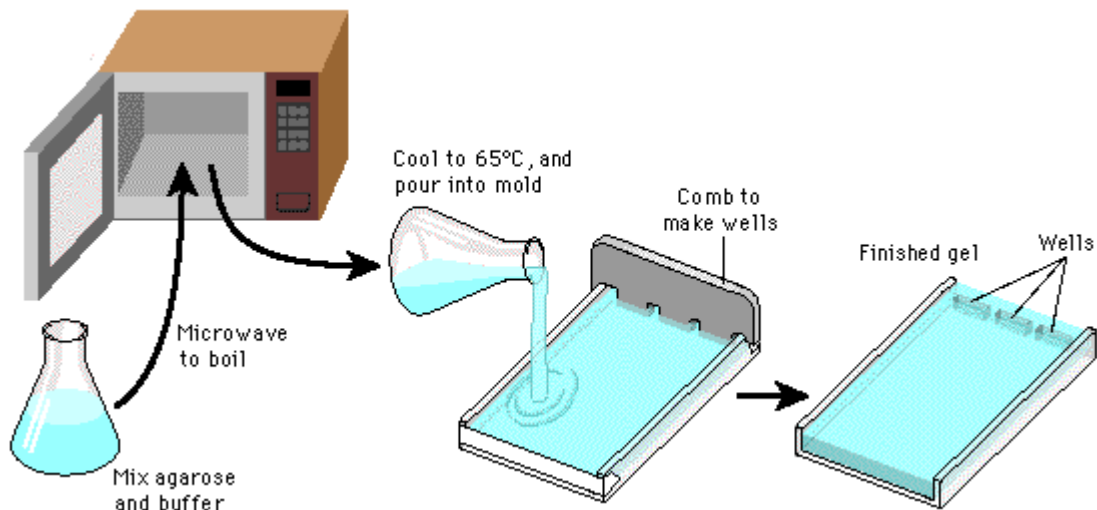
Στη συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία, πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αγαρόζη 2%. Για την παρασκευή του πηκτώματος χρησιμοποιούνται:

- 40ml TAE (Tris, Acetic, EDTA) 1X
- 0,6gr αγαρόζη
- 4μl βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr)

Να σημειωθεί ότι το TAE 1X παρασκευάζεται από την ανάμειξη 20ml stock διαλύματος TAE 50X και 980ml ddH<sub>2</sub>O. Το TAE είναι ένα ρυθμιστικό διάλυμα που αποτελείται από Tris, οξικό οξύ και EDTA. Η αγαρόζη αποτελεί τον βασικό παράγοντα πήξης του πηκτώματος και βρίσκεται υπό τη μορφή σκόνης. Τέλος το βρωμιούχο αιθίδιο είναι μία φθορίζουσα χρωστική που παρεμβάλλεται ανάμεσα στις βάσεις του DNA και φθορίζει κάτω από την επίδραση υπεριώδους φωτός αποκαλύπτοντας τις ζώνες του DNA.

Η διαδικασία λαμβάνει χώρα ως εξής:

1. Κατασκευή της μήτρας όπου θα στερεοποιηθεί το πήκτωμα. Συγκεκριμένα τα «χτενάκια» τοποθετούνται στη βάση για να δημιουργηθούν τα «πηγαδάκια» δηλαδή οι θέσεις φόρτωσης των δειγμάτων.
2. Ζύγιση 0,6 gr αγαρόζης.
3. Μεταφορά της αγαρόζης σε κωνική φιάλη που περιέχει 40ml TAE.
4. Θέρμανση του διαλύματος σε φούρνο μικροκυμάτων για περίπου 1-2min έως ότου διαλυτοποιηθεί πλήρως η αγαρόζη και το διάλυμα γίνει διαυγές.
5. Η κωνική τοποθετείται κάτω από κρύο νερό με ταυτόχρονη ανάδευση έως ότου το διάλυμα έρδει σε θερμοκρασία δωματίου.
6. Μεταφορά 4μl βρωμιούχου αιθιδίου στην κωνική και ήπια ανάδευση.
7. Μεταφορά τελικού διαλύματος στη μήτρα απομακρύνοντας τυχόν φυσαλίδες που μπορεί να δημιουργηθούν.
8. Αναμονή για 15-20min έως ότου πήξει το διάλυμα.

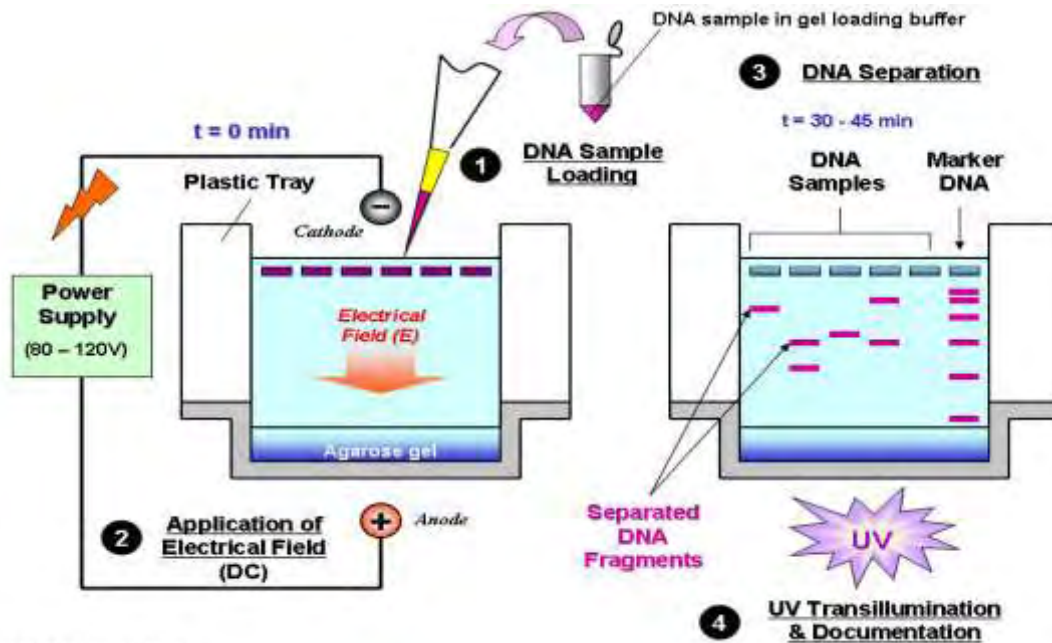


**Εικόνα 15:** Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας της ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αγαρόζης.

Μόλις το διάλυμα πήξει, ακολουθεί προετοιμασία των δειγμάτων για τη φόρτωση τους στα πηγαδάκια. Συγκεκριμένα 5μl δείγματος από το PCR προϊόν αναμειγνύονται με 3μl loading buffer. Το buffer αυτό αποτελείται από τη χρωστική μπλε της βρωμοφαινόλης, από γλυκερόλη, TBE (Tris/ Borate/EDTA) και ddH<sub>2</sub>O. Η γλυκερόλη προσδίδει βάρος στο δείγμα και έτσι γίνεται πιο εύκολη η εισαγωγή στα πηγαδάκια.

Μόλις τοποθετηθούν όλα τα δείγματα (συμπεριλαμβανομένου και του αρνητικού μάρτυρα), η συσκευή ηλεκτροφόρησης ρυθμίζεται στα 100 mA και τα δείγματα ηλεκτροφορούνται έως ότου η χρωστική διανύσει τα 2/3 της διαδρομής του μήκους του πηκτώματος. Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης, το πήκτωμα παρατηρείται κάτω από την επίδραση υπεριώδους UV ακτινοβολίας με σκοπό την αποκάλυψη των ζωνών. Στη διαδικασία αυτή συμβάλει το βρωμιούχο αιθίδιο.

Σε ένα πήκτωμα όπου η PCR και η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκαν με επιτυχία θα αποκαλυφθούν για κάθε δείγμα δύο ζώνες. Η πάνω ζώνη θα είναι πιο έντονη και θα αντιπροσωπεύει το DNA, ενώ η κάτω ζώνη θα είναι πιο αχνή και θα αντιπροσωπεύει τους εκκινητές. Αν η πάνω ζώνη δεν εμφανιστεί, σημαίνει πως το αντίστοιχο δείγμα δεν έχει δουλέψει. Φυσιολογικά ο αρνητικός μάρτυρας δεν πρέπει να εμφανίζει την πάνω ζώνη καθώς δεν περιέχει DNA. Σε περίπτωση που εντοπιστεί μία τέτοια ζώνη σημαίνει ότι υπάρχει επιμόλυνση στα δείγματα και η διαδικασία πρέπει να γίνει ξανά από την αρχή.



Graphic©ESchmid/2001

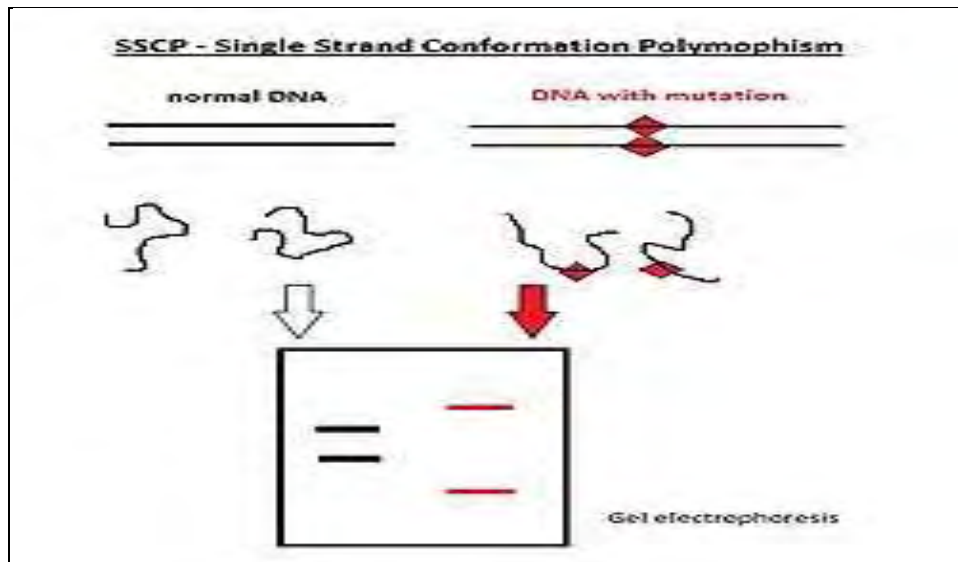
**Εικόνα 16:** Σχηματική απεικόνιση των μετέπειτα βημάτων της ηλεκτροφόρησης. Παρουσιάζεται η φόρτωση των δειγμάτων (1), η εφαρμογή του ηλεκτρικού πεδίου (2), ο διαχωρισμός των τμημάτων (3) και τέλος η εφαρμογή της υπεριώδους ακτινοβολίας για την αποκάλυψη των ζωνών (4).

### 3.3 ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥ ΜΟΝΟΚΛΩΝΗΣ ΑΛΥΣΙΔΑΣ (SSCP, Single- Strand Conformation Polymorphism)

#### 3.3.1 Αρχή μεθόδου

Η μέθοδος ανάλυσης πολυμορφισμού μονόκλωνης διαμόρφωσης (SSCP) είναι μια απλή και ευαίσθητη τεχνική που χρησιμοποιείται ευρέως για την ανίχνευση πιθανών μεταλλάξεων και τον προσδιορισμό του γονοτύπου. Η αρχή της ανάλυσης SSCP βασίζεται στο γεγονός ότι οι μονόκλωνο DNA έχει μια καθορισμένη διαμόρφωση. Διαφορετική διαμόρφωση που οφείλεται ακόμα και σε μια μόνο αλλαγή βάσης στην ακολουθία μπορεί να προκαλέσει διαφορετικά πρότυπα κινητικότητας του μονόκλωνου DNA κάτω από τις κατάλληλες συνθήκες ηλεκτροφόρησης. Συνεπώς οι μονόκλωνες αλυσίδες αγρίου τύπου και μεταλλαγμένα δείγματα DNA εμφανίζουν διαφορετικά πρότυπα ζώνης σε πηκτώματα πολυακρίλαμιδίου. Η SSCP χρησιμοποιείται ευρέως από το 1989.





**Εικόνα 17:** Σχηματική απεικόνιση της μεθόδου SSCP. Τα δείγματα DNA θα πρέπει να υποστούν αποδιάταξη πριν τη φόρτωση τους στο πήκτωμα. Μία σημειακή μετάλλαξη είναι ικανή να προσδώσει στη μονόκλωνη αλυσίδα τέτοια διαμόρφωση, ώστε μετά την ηλεκτροφόρηση το πρότυπο της αντίστοιχης ζώνης να διαφέρει από αυτό του φυσιολογικού.

### 3.3.2 Παρασκευή πηκτώματος πολυακρυλαμίδης

Η συγκέντρωση του πηκτώματος συνήθως κυμαίνεται από 8-12%, ανάλογα με το μήκος του μορίου που έχει ενισχυθεί. Συγκεκριμένα, όσο πιο μικρό είναι το μήκος του μορίου, τόσο πιο πυκνό πρέπει να είναι το πήκτωμα. Σε αυτή την πειραματική διαδικασία παρασκευάστηκε πήκτωμα συγκέντρωσης 10%.

Συστατικά για την παρασκευή 2 gel 10%:

<b>ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ</b>	<b>ΠΟΣΟΤΗΤΕΣ</b>
Ακρυλαμίδιο	12,375 gr
Bis-acrylamide	0,333gr
TBE 10X	10ml
Γλυκερόλη 50%	12,5ml
APS 20%	650μl
TEMED	125μl

- Ακρυλαμίδιο/ Bis-acrylamide: πολυμερίζονται και παράγουν το πήκτωμα
- TBE10X: ρυθμιστικό διάλυμα που καθορίζει το pH
- TEMED (N,N' τετραμέθυλοαιθυλενοδιαμίνη): φωτοχημικός καταλύτης της αντίδρασης πολυμερισμού
- APS (υπερθειικό αμμώνιο): παράγει ελεύθερες ρίζες  $\text{SO}_8^{2-} \rightarrow 2 \text{SO}_4^-$  και ξεκινά την αντίδραση πολυμερισμού

Η διαδικασία έχει ως εξής:

1. Κατασκευή της συσκευής κάθετης ηλεκτροφόρης (για κάθε gel χρειάζονται 2 τζάμια)
2. Ζύγιση 12,375gr ακρυλαμιδίου και 0,333gr Bis-acrylamide και μεταφορά τους σε πίκερ (πλαστικό δοχείο)
3. Μεταφορά 10ml TBE και 12,5 ml γλυκερόλη 50% στο πίκερ
4. Πλήρωση με απεσταγμένο H<sub>2</sub>O μέχρι τα 125 ml
5. Ανάδυση μέχρι να γίνει διαυγές
6. Φιλτράρισμα του διαλύματος με τη χρήση χωνιού και διηθητικού χαρτιού
7. Πλήρωση με H<sub>2</sub>O μέχρι τα 130 ml
8. Μεταφορά του διαλύματος σε κωνική φιάλη
9. Μεταφορά 650 μl APS 20% και 125 μl TEMED στη φιάλη
10. Γρήγορη ανάδευση
11. Μεταφορά του διαλύματος στη συσκευή ηλεκτροφόρησης (στο εσωτερικό των δύο τζαμιών)
12. Τα «χτενάκια» τοποθετούνται ανάμεσα στα δύο τζάμια
13. Αναμονή περίπου 30 min έως ότου πήξει το διάλυμα
14. μετά το πέρας των 30 min τα «χτενάκια» αφαιρούνται και αποκαλύπτονται οι θέσεις εισαγωγής των δειγμάτων (πηγαδάκια)
15. Καθαρισμός του gel με ειδική βελόνα

Μετά την παρασκευή των 2 gel, ακολουθεί η προετοιμασία για την αποδιάταξη των PCR προϊόντων

Η διαδικασία έχει ως εξής:

1. Μεταφορά 10μl αποδιατακτικού διαλύματος (Denaturation buffer) eppendorf του 0,5ml
2. Μεταφορά 5 μl PCR προϊόντος για τα δείγματα που έδωσαν έντονη ζώνη και 10μl για τα δείγματα που έδωσαν αχνή ζώνη
3. Εισαγωγή των δειγμάτων στον θερμοκυκλοποιητή για αποδιάταξη
4. Ο κυκλοποιητής προγραμματίζεται ως εξής:

<b>ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ</b>	<b>ΔΙΑΡΚΕΙΑ</b>
92°C	2min
95 °C	2min
97 °C	7min

Το Denaturation buffer αποτελείται από φορμαμίδιο, EDTA, NaOH, μπλε της βρωμοφαινόλης και κυανούν του ξυλενίου.

Λίγο πριν την ολοκλήρωση της αποδιάταξης (1 min & 30 sec) τα δείγματα αφαιρούνται από τη συσκευή και τοποθετούνται στον πάγο. Το τελευταίο βήμα είναι η φόρτωση των δειγμάτων στα πηγαδάκια. Η συσκευή πληρώνεται με TBE 0,5X και

ρυθμίζεται στα 220V. Τέλος μεταφέρεται στο ψυγείο, όπου και παραμένει για 19 περίπου ώρες.

### **3.3.3 Χρώση πηκτώματος πολυακρυλαμίδης με διάλυμα νιτρικού αργύρου (Silver Staining)**

Μετά το πέρας των 19 ωρών τα gel απομακρύνονται από τη συσκευή και τοποθετούνται σε ειδικά δοχεία. Η διαδικασία της χρώσης περιλαμβάνει 3 διαλύματα. Συγκεκριμένα για τη χρώση 2 gel χρειάζονται:

#### **Διάλυμα 1<sup>ο</sup>:**

- 780ml ddH<sub>2</sub>O
- 20ml αιθανόλη 100%
- 1ml οξικό οξύ

#### ***Διαδικασία:***

- ❖ 400ml από το τελικό διάλυμα μεταφέρονται σε κάθε gel και αναδεύονται για 3min
- ❖ Αποχύνουμε το περιεχόμενο και ξεπλένουμε με ddH<sub>2</sub>O 1 φορά

#### **Διάλυμα 2<sup>ο</sup>:**

- 400ml AgNO<sub>3</sub>

#### ***Διαδικασία:***

- ❖ 200ml από το διάλυμα μεταφέρονται σε κάθε gel και αναδεύονται για 10min
- ❖ Αποχύνουμε το περιεχόμενο και ξεπλένουμε με ddH<sub>2</sub>O 2 φορές

#### **Διάλυμα 3<sup>ο</sup>:**

- 6gr NaOH
- 0,02gr NaBH<sub>4</sub>
- 2ml φορμαλδεΰδη
- H<sub>2</sub>O ως τα 400ml

#### ***Διαδικασία:***

- ❖ 200ml από το διάλυμα μεταφέρονται σε κάθε gel και αναδεύονται έως ότου εμφανιστούν οι ζώνες (περίπου 20min)
- ❖ Αποχύνουμε το περιεχόμενο και ξεπλένουμε με ddH<sub>2</sub>O 1φορά

### 3.4 ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ PCR ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ ΓΙΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗ

Τα δείγματα τα οποία εμφάνισαν ένα διαφορετικό πρότυπο θα σταλούν για αλληλούχιση για να αποκαλυφθεί η ακριβής νουκλεοτιδική αλληλουχία. Όμως πριν από τη διαδικασία της αλληλούχισης, τα προς αποστολή δείγματα πρέπει να καθαριστούν. Η διαδικασία καθαρισμού γίνεται με Invitrogen και έχει ως εξής:

1. Σε eppendorf των 2ml τοποθετούμε τη στήλη καθαρισμού
2. Προσθήκη 100μl NT1 διαλύματος στο PCR προϊόν
3. Ήπια ανάδευση με την πιπέτα
4. Μεταφορά 150μl διαλύματος (NT1 + PCR) στη στήλη
5. Φυγοκέντρηση για 1min στις 11.000rpm
6. Απόχυση του περιεχομένου του eppendorf
7. Προσθήκη 700μl Wash Buffer (αιθανόλη) στη στήλη
8. Φυγοκέντρηση για 1min στις 11.000rpm
9. Απόχυση του περιεχομένου του eppendorf
10. Φυγοκέντρηση για 1min στις 11.000rpm
11. Μεταφορά της στήλης σε νέο eppendorf των 1,5ml
12. Προσθήκη 30μl NE (elution) διαλύματος στη στήλη
13. Αναμονή 3min
14. Φυγοκέντρηση για 2min στις 11.000rpm
15. Απόρριψη της στήλης
16. Ανάκτηση του καθαρισμένου προϊόντος

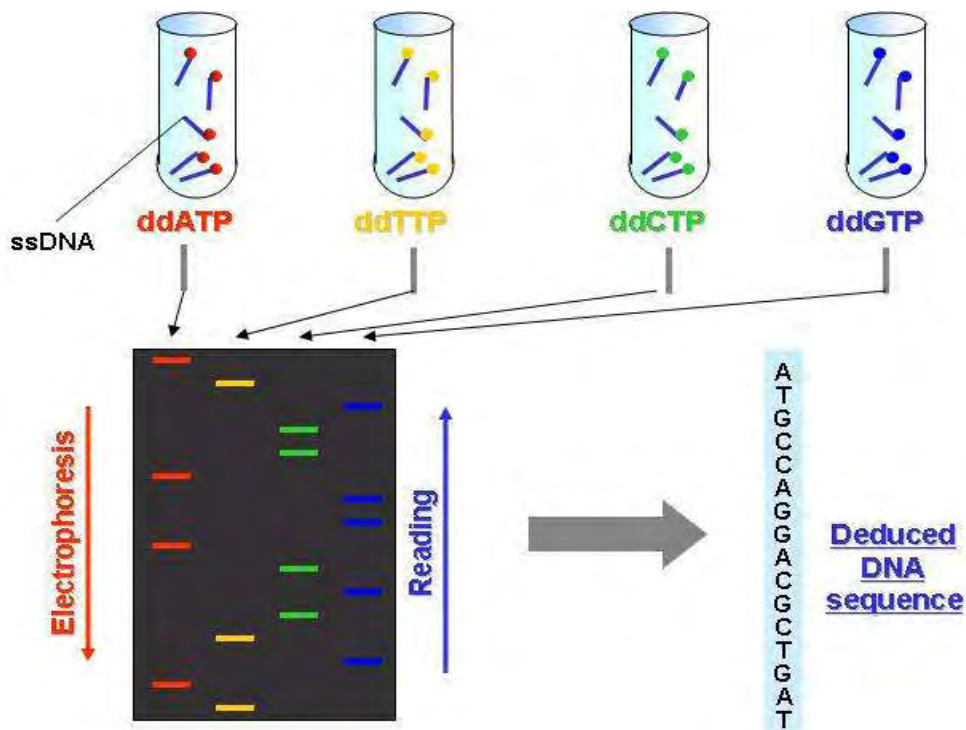
Στη συνέχεια ακολουθεί ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης (2μl καθαρισμένου DNA + 3μl χρωστικής) για να ταυτοποιηθεί η ποσότητα του καθαρού DNA. Όσα δείγματα εμφανίσουν αχνή ζώνη επιβάλλονται σε μία ακόμη διαδικασία. Συγκεκριμένα, στα αντίστοιχα eppendorf προστίθενται 300μl παγωμένης αιθανόλης (EtOH) 100% και 10μl οξικού νατρίου (CH<sub>3</sub>COONa). Ακολουθεί ήπια ανάδευση και τα δείγματα επωάζονται overnight στους -20°C. Την επόμενη ημέρα ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 13.000rpm για 20min στους 4 °C και το υπερκείμενο απορρίπτεται. Το εναπομείναν ίζημα πρέπει να υποστεί ξήρανση για μία ώρα στους 37 °C.

Για την αλληλούχιση, εκτός από τα δείγματα, πρέπει να σταλούν και οι αντίστοιχοι εκκινητές.

### 3.5 ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗ

#### 3.5.1 Μέθοδος τερματισμού νουκλεοτιδικής αλυσίδας με δι- δεοξυνουκλεοτίδια (Μέθοδος Sanger)

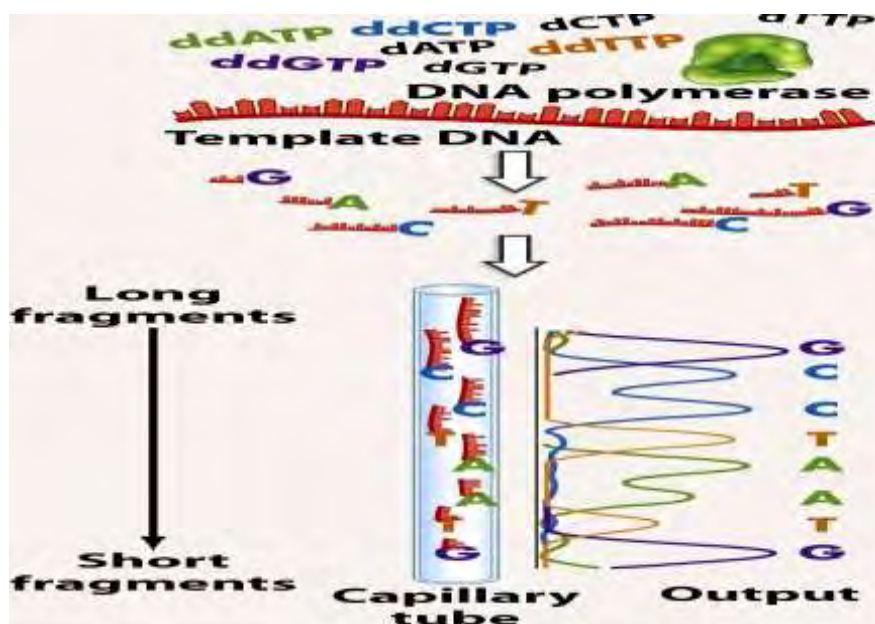
Η ενζυμική μέθοδος (Sanger) απαιτεί μονόκλωνο DNA, που χρησιμοποιείται σαν μήτρα για την σύνθεση ραδιοσημασμένης συμπληρωματικής αλυσίδας in vitro. Η αντίδραση αυτή επιτυγχάνεται με την DNA πολυμεράση της E.coli στην παρουσία των τεσσάρων δεοξυνουκλεοτιδίων (dATP, dTTP, dGTP, dCTP, ένα από τα οποία είναι ραδιοσημασμένο) και ενός συνθετικού ολιγονουκλεοτιδίου που είναι συμπληρωματικό στο DNA μήτρα και χρησιμεύει ως εκκινητής. Τέσσερις κατά τ' άλλα όμοιες αντιδράσεις σύνθεσης αναμειγνύονται με προσθήκη στην κάθε μία μικρής ποσότητας ενός διαφορετικού 2',3'- διδεοξυνουκλεοτιδίου (ddATP, ddGTP κλπ.). Η ενσωμάτωση ενός ddNMP στο 3' άκρο μίας αντιγραφόμενης αλυσίδας σταματάει την περαιτέρω σύνθεση, γιατί δεν υπάρχει πια 3' -OH για προέκταση της αλυσίδας. Ο λόγος της π.χ. ddATP προς την dATP είναι ρυθμισμένος έτσι ώστε να μην γίνεται περάτωση της σύνθεσης σε κάθε σημείο που συναντάται A. Έτσι κάθε αντίδραση καταλήγει να περιέχει μίγμα περατωμένων αλυσίδων, όλες σε διαφορετική περίσταση που συναντάται A, G, C ή T, ανάλογα με το ddNTP που συμπεριλήφθηκε. Μετά από ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης και αυτοραδιογραφία μπορούμε να διαβάσουμε την αλληλουχία του DNA.



Εικόνα 18: Σχηματική απεικόνιση της αλληλούχισης κατά Sanger.

### 3.5.2 Αυτόματη αλληλούχιση

Για την αλληλούχιση ενός τμήματος DNA πραγματοποιείται μία σύνθετη αντίδραση τερματισμού. Η αντίδραση γίνεται παρουσία των τεσσάρων κανονικών τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTP), σε σχετικά μεγάλη συγκέντρωση, και τεσσάρων διδεοξυριβονουκλεοτιδίων (ddNTP), σε μικρότερη συγκέντρωση, τα οποία είναι σημασμένα, το καθένα με διαφορετική φθορίζουσα χρωστική. Έτσι, σχηματίζεται μίγμα προϊόντων τερματισμού που μπορεί να έχουν οποιαδήποτε από τις τέσσερις βάσεις στο 3' άκρο τους. Τα προϊόντα αυτά προκύπτουν από την ενσωμάτωση ενός διδεοξυριβονουκλεοτιδίου σε μία τυχαία θέση κατά τη σύνθεση. Ωστόσο, επειδή οι τέσσερις φθορίζουσες χρωστικές που χρησιμοποιούνται εκπέμπουν φωτεινή ακτινοβολία δε διαφορετικό μήκος κύματος, δηλαδή εκπέμπουν διαφορετικό χρώμα, η ταυτότητα της βάσης στην οποία τερματίζεται η σύνθεση αντιστοιχεί στο χρώμα του ddNTP που έχει ενσωματωθεί στο 3' άκρο.



Εικόνα 19: Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας της αυτόματης αλληλούχισης.

Τα προϊόντα της αντίδρασης, φορτώνονται και αναλύονται στην ίδια διαδρομή του πηκτώματος ή σε ένα τριχοειδές σωληνάκι μίας συσκευής αυτόματης αλληλούχισης. Τα τμήματα διαχωρίζονται ανάλογα με το μέγεθός τους και σχηματίζουν μία κλίμακα αυξανόμενου μήκους καθώς προχωράμε από κάτω προς τα πάνω. Καθώς η κλίμακα των σημασμένων προϊόντων τερματισμού ηλεκτροφορείται στη συσκευή αυτόματης αλληλούχισης, κάθε τμήμα «φωτίζεται» από το λέιζερ του ανιχνευτή. Πρόκειται για μία ακτίνα φωτός με μήκος κύματος που διεγείρει και τις τέσσερις φθορίζουσες χρωστικές. Οι διεγερμένες χρωστικές επανέρχονται στο ενεργειακό επίπεδο ηρεμίας εκπέμποντας φως συγκεκριμένου μήκους κύματος, χαρακτηριστικού για κάθε διαφορετική χρωστική. Ο αισθητήρας του ανιχνευτή καταγράφει την ένταση και το μήκος κύματος του φωτός και στέλνει ένα σήμα στον υπολογιστή που είναι συνδεδεμένος με τη συσκευή αλληλούχισης.

#### 4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

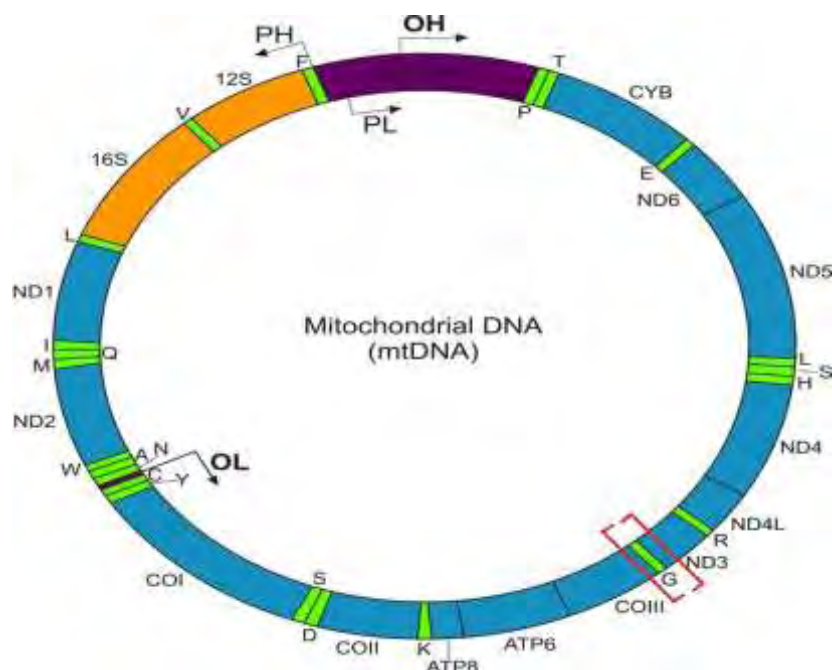
Στους 50 ασθενείς με Alzheimer που εξετάστηκαν, ταυτοποιήθηκαν συνολικά 2 μεταλλάξεις. Η πρώτη από αυτές, T10034C εντοπίστηκε στο tRNA<sup>Gly</sup>, ενώ η δεύτερη C10181G στην ND3 υπομονάδα του συμπλόκου I της αναπνευστικής αλυσίδας.

##### 4.1 ΓΟΝΙΔΙΟ tRNA<sup>Gly</sup> ΚΑΙ ΠΑΡΑΚΕΙΜΕΝΕΣ ΠΕΡΙΟΧΕΣ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ALZHEIMER

Για το τμήμα των 224bp (FW:9970-9989/ RV:10193-10173) που κωδικοποιεί για το tRNA<sup>Gly</sup> καθώς επίσης και για τα τμήματα των παρακείμενων περιοχών COIII και ND3 εντοπίστηκαν 2 μεταλλάξεις. Η πρώτη από αυτές, T10034C εντοπίστηκε στο tRNA<sup>Gly</sup>, ενώ η δεύτερη C10181G, στην ND3 υπομονάδα του συμπλόκου I της αναπνευστικής αλυσίδας.

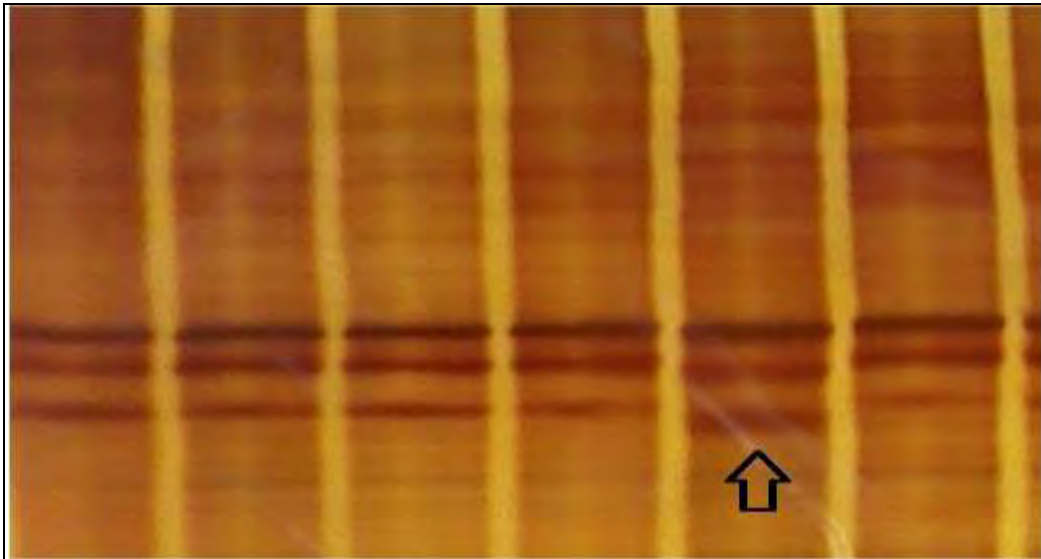
Στον παρακάτω πίνακα συνοψίζονται οι μεταλλάξεις οι οποίες ταυτοποιήθηκαν, οι γενετικοί τόποι στους οποίους εντοπίστηκαν και τέλος η συχνότητα εμφάνισής τους.

<i><b>ΜΕΤΑΛΛΑΞΗ</b></i>	<i><b>ΓΕΝΕΤΙΚΟΣ ΤΟΠΟΣ</b></i>	<i><b>ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ</b></i>
T10034C	tRNA <sup>Gly</sup>	1/50 (2%)
C10181G	ND3	13/50 (26%)



***Εικόνα 20:** Με κόκκινο πλαίσιο δηλώνεται η ευρύτερη περιοχή στην οποία παρατηρήθηκαν οι 2 μεταλλάξεις.*

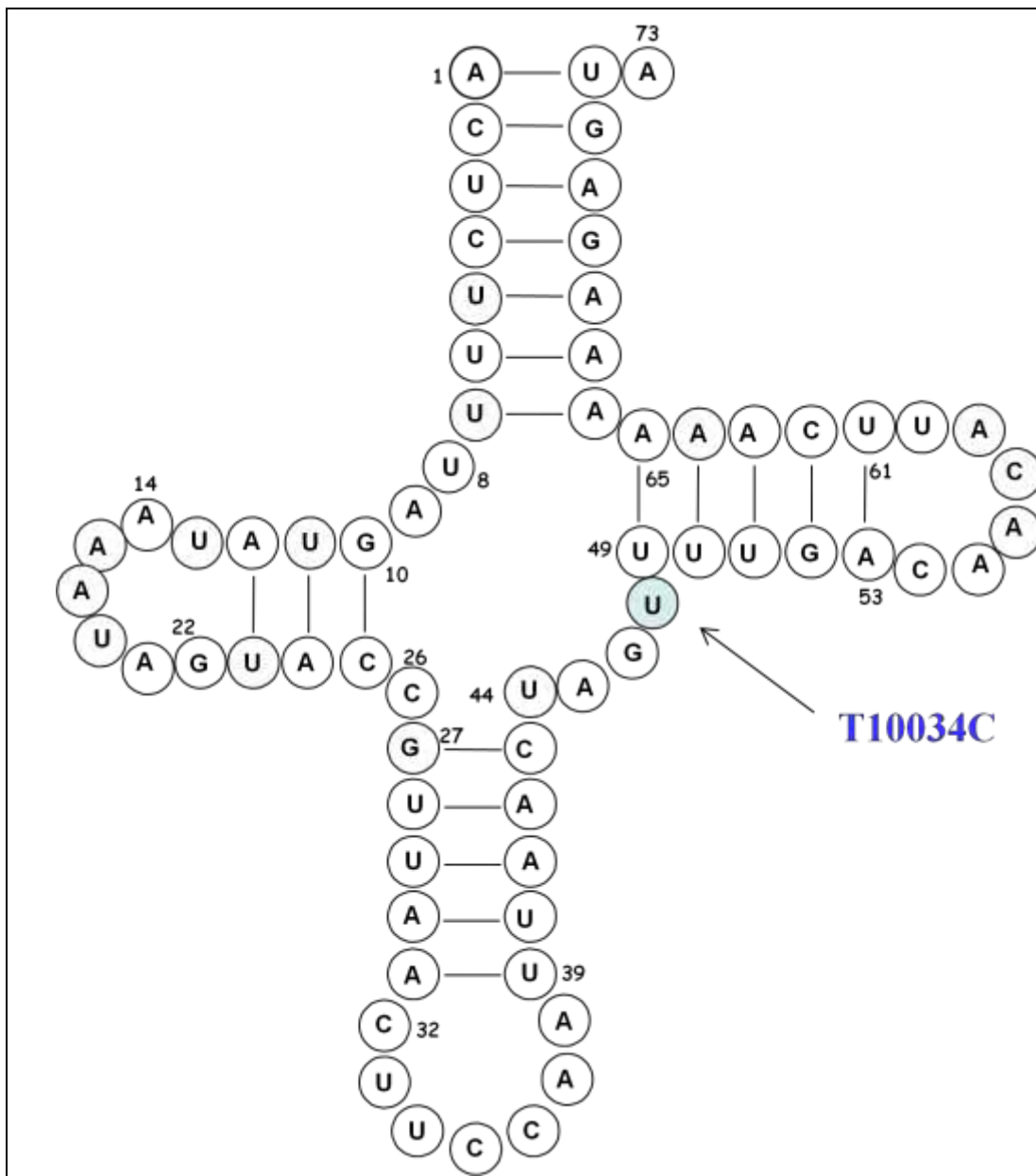
Στο πήκτωμα πολυακρυλαμίδης συγκέντρωσης 10% (220V,19h, 4°C) της παρακάτω εικόνας απεικονίζεται ενδεικτικά με μαύρο βέλος το πρότυπο της μετάλλαξης tRNA<sup>Gly</sup> T10034C.



**Εικόνα 21:** Απεικόνιση του πηκτώματος πολυακρυλαμίδης. Με μαύρο βέλος απεικονίζεται ενδεικτικά το πρότυπο της μετάλλαξης tRNA<sup>Gly</sup> T10034C.

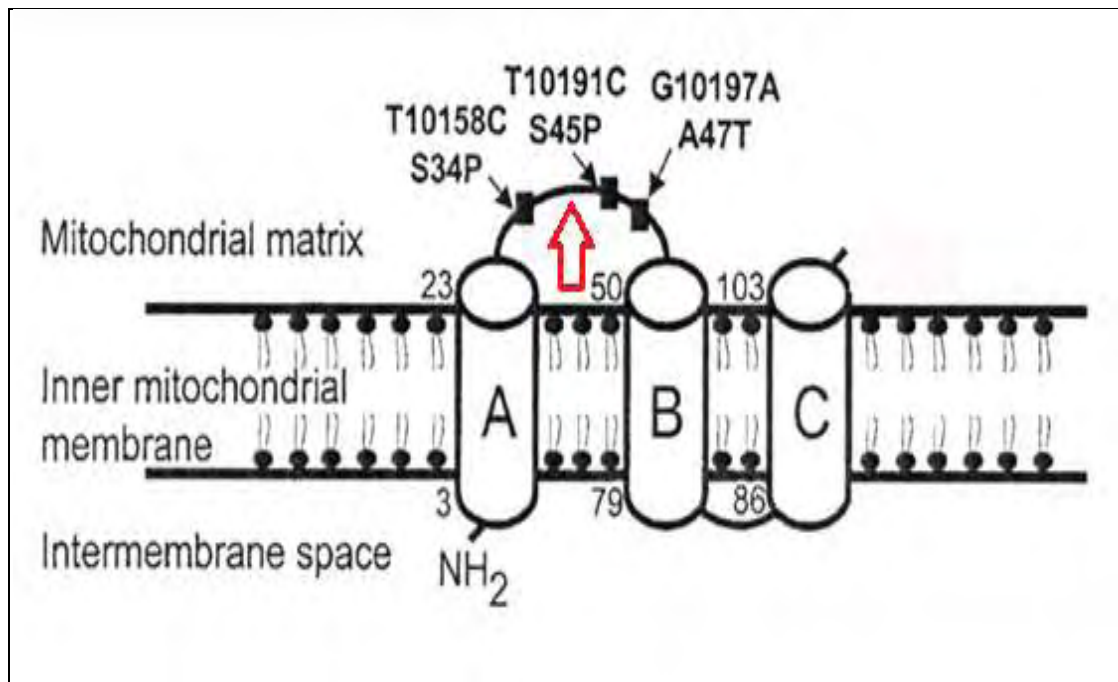


Στην παρακάτω εικόνα απεικονίζεται το tRNA<sup>Gly</sup> και με γαλάζιο πλαίσιο επισημαίνεται η θέση στην οποία εντοπίστηκε η μετάλλαξη T10034C.



**Εικόνα 22:** Σχηματική απεικόνιση του tRNA<sup>Gly</sup>. Με μπλε χρώμα σημειώνεται η θέση στην οποία εντοπίστηκε η μετάλλαξη T10034C.

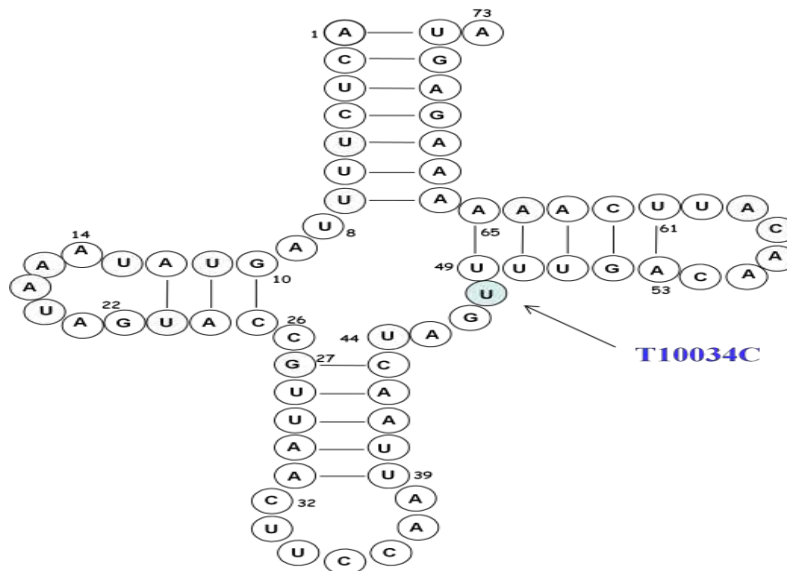
Στην εικόνα αυτή παρουσιάζεται η ευρύτερη περιοχή ND3 και με κόκκινο βέλος απεικονίζεται η θέση στην οποία ταυτοποιήθηκε η μετάλλαξη C10181G.



**Εικόνα 23:** Σχηματική απεικόνιση της ND3 υπομονάδας. Με κόκκινο βέλος απεικονίζεται η θέση στην οποία εντοπίστηκε η μετάλλαξη C10181G.

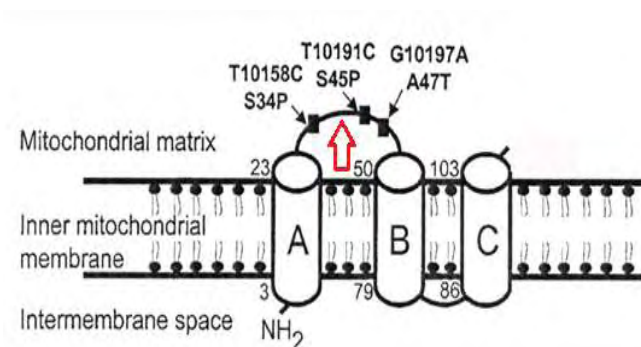
## 5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε ένα μιτοχονδριακό tRNA γονίδιο, αυτό της γλυκίνης (tRNA<sup>Gly</sup>) σε 50 ασθενείς με Alzheimer. Συνολικά ταυτοποιήθηκαν 2 μεταλλάξεις σε 14 από τους 50. Η πρώτη, T10034C εντοπίστηκε στην περιοχή του tRNA της γλυκίνης και συγκεκριμένα στον επιπλέον (μεταβλητό) βραχίονα ανάμεσα στη θηλιά του αντικωδικονίου και τη θηλιά ΤψC (Εικόνα 24).



Εικόνα 24:

Επειδή όμως οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν δεν ενισχύουν μόνο τα tRNA αλλά και τμήματα των παρακείμενων γονιδίων, η δεύτερη μετάλλαξη ταυτοποιήθηκε στην ND3 υπομονάδα του συμπλόκου I της αναπνευστικής αλυσίδας. Συγκεκριμένα, στην περιοχή αυτή ταυτοποιήθηκε η μετάλλαξη C10181G. (Εικόνα 25)



Η μετάλλαξη **T10034C** εντοπίστηκε σε 1 από τους 50 ασθενείς που εξετάστηκαν (2%). Σε μία προηγούμενη μελέτη που πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο μας σε 50 ασθενείς με Alzheimer, η μετάλλαξη αυτή είχε ανιχνευτεί ξανά σε ποσοστό 2% δηλαδή μόνο 1 στους 50 ταυτοποιήθηκε με τη μετάλλαξη αυτήν. Το αντίστοιχο ποσοστό εμφάνισης της μετάλλαξης στα άτομα ελέγχου είναι 0%. Συγκεκριμένα, κανένα από τα 204 φυσιολογικά άτομα που εξετάστηκαν δεν έφερε την μετάλλαξη αυτή.

Σε μία διαφορετική μελέτη, εξετάστηκαν 69 ασθενείς που έπασχαν από Alzheimer και 83 άτομα ελέγχου. Και σε αυτή την περίπτωση οι ασθενείς εμφάνισαν τη μετάλλαξη T10034C σε μεγαλύτερα ποσοστά απ' ότι οι φυσιολογικοί. Συγκεκριμένη η μετάλλαξη απαντά σε ποσοστό 15,9% στους ασθενείς, ενώ στα άτομα ελέγχου σε ποσοστό 10,8% (Chagnon et al., 1999).

Σύμφωνα όμως με τη βιβλιογραφία η μετάλλαξη αυτή έχει ταυτοποιηθεί και σε περιπτώσεις που σχετίζονται και με άλλες ασθένειες. Πιο αναλυτικά, σε μία μελέτη που πραγματοποιήθηκε από τους Eloisa et al., 1998 παρουσιάστηκε ότι από τους 85 ασθενείς με διατακτική μυοκαρδιοπάθεια- DCM (Dilated cardiomyopathy) μόνο 1 εμφάνισε τη συγκεκριμένη μετάλλαξη (1,2%), ενώ από τα 111 φυσιολογικά άτομα που εξετάστηκαν, κανένα δεν την εμφάνισε (0%).

Ένα ακόμη παράδειγμα ταυτοποίησης της μετάλλαξης T10034C αφορά μία μελέτη, σύμφωνα με την οποία εξετάστηκαν τόσο ασθενείς που έπασχαν από διάφορες μιτοχονδριακές εγκεφαλομυοπάθειες όσο και άτομα ελέγχου. Συγκεκριμένα, εξετάστηκαν 27 ασθενείς και 2 από αυτούς έφεραν τη μετάλλαξη αυτή (7,4%). Το αντίστοιχο ποσοστό για τα φυσιολογικά άτομα ήταν 1% (Sternberg et al., 1998).

Τέλος, σε μία διαφορετική μελέτη, εξετάστηκαν θύματα που διαγνώστηκαν με το σύνδρομο αιφνίδιου βρεφικού θανάτου- SIDS (Sudden infant death syndrome). Στην περίπτωση αυτή, η μετάλλαξη ταυτοποιήθηκε σε 8 από τα 257 άτομα (3,1%) ενώ στα 102 φυσιολογικά (εν ζωή) βρέφη που επίσης εξετάστηκαν, η μετάλλαξη εμφανίστηκε σε ποσοστό 0,98% (δηλαδή 1/102 βρέφη). (Opdal et al., 2004)

Η δεύτερη μετάλλαξη που ανιχνεύτηκε ήταν η **C10181G** και ταυτοποιήθηκε στην ND3 υπομονάδα του συμπλόκου I της αναπνευστικής αλυσίδας. Πιο αναλυτικά, η συγκεκριμένη μετάλλαξη ανιχνεύτηκε σε 13 από τους 50 ασθενείς που εξετάστηκαν (26%). Το αντίστοιχο ποσοστό για τα άτομα ελέγχου είναι (1,96%). Δηλαδή από τα 204 φυσιολογικά άτομα που εξετάστηκαν, τα 4 έφεραν τη μετάλλαξη αυτή.

Η συγκεκριμένη μετάλλαξη δεν είναι μέχρι στιγμής καταχωρημένη στη βάση δεδομένων (mitomap) και δεν υπάρχει κάποια αναφορά στη βιβλιογραφία. Στην ίδια θέση της (10181) ND3 υπομονάδας έχει ταυτοποιηθεί και άλλη μία μετάλλαξη, η οποία όμως αφορά νουκλεοτιδική αλλαγή από κυτοσίνη σε θυμίνη (**C10181T**) και όχι από κυτοσίνη σε γουανίνη όπως συμβαίνει στην περίπτωση αυτή.

Για να μπορέσουμε επομένως να αποφανθούμε κατά πόσο η συγκεκριμένη μετάλλαξη αποτελεί ένα πολυμορφισμό ή μία παθολόγο μετάλλαξη και ταυτόχρονα κατά πόσο αποτελεί αιτία για την εμφάνιση της νόσου, θα πρέπει να

πραγματοποιηθούν περαιτέρω μελέτες τόσο στους ασθενείς, όσο και στα άτομα ελέγχου. Μέσω της σύγκρισης των συχνοτήτων εμφάνισης της συγκεκριμένης μεταλλάξης στις δύο ομάδες (ασθενείς και άτομα ελέγχου) θα μπορέσουμε να καταλήξουμε στα επιθυμητά συμπεράσματα.

Θα πρέπει να σημειωθεί ότι τα 50 άτομα με Alzheimer που εξετάστηκαν στο εργαστήριο για τη συγκεκριμένη μετάλλαξη, έχουν εξεταστεί και για άλλες μεταλλάξεις σε άλλα tRNA γονίδια. Στις περισσότερες περιπτώσεις διαπιστώνεται ότι φέρουν περισσότερες από μία μεταλλάξεις, οι οποίες όλες μαζί συνεργιστικά, μπορεί να συμβάλλουν στην εκδήλωση του κλινικού φαινοτύπου του Alzheimer. Συγκεκριμένα στον ασθενή που εξετάστηκε για τη μετάλλαξη στο tRNA Gly, ταυτοποιήθηκαν και άλλες τρεις μεταλλάξεις. Η πρώτη εντοπίστηκε στο tRNA Thr και είναι η A15924G, ενώ η δεύτερη, A10398G εντοπίστηκε στην ND3 υπομονάδα του συμπλόκου I της αναπνευστικής αλυσίδας. Τέλος, η τρίτη μετάλλαξη ταυτοποιήθηκε στην D-loop και είναι η ins568-572. Από αυτές τις τρεις μεταλλάξεις, μόνο η A10398G της ND3 υπομονάδας έχει βρεθεί στα άτομα ελέγχου.

Με βάση λοιπόν όλα τα παραπάνω στοιχεία, μπορούμε να καταλήξουμε πως για να μπορέσουν να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα για το ρόλο των σημειακών μεταλλάξεων στα μιτοχονδριακά tRNA γονίδια και γενικότερα για το ρόλο του mtDNA στην εμφάνιση της νόσου Alzheimer, πρέπει να ολοκληρωθεί η έρευνα και στα υπόλοιπα tRNA γονίδια τόσο στους ασθενείς, όσο και στα άτομα ελέγχου.

Επίσης, οι μεταλλάξεις του mtDNA μπορεί να έχουν ευεργετική, βλαβερή αλλά και ουδέτερη επίδραση στη λειτουργία του μιτοχονδρίου. Ένα άλλο χαρακτηριστικό τους είναι ότι αν και κάποιες μεταλλάξεις μπορεί να μην αποτελούν συνθήκη αναγκαία και ικανή για την εμφάνιση της νόσου, η συνεργιστική τους δράση με άλλες μεταλλάξεις μπορεί να δώσει τελικά έναν παθογόνο χαρακτήρα.

Επομένως, είναι απαραίτητο να προσδιοριστεί η ακριβής επίδραση των μεταλλάξεων και των αντίστοιχων συνδυασμών τους στη λειτουργία των μιτοχονδρίων. Μέσα από αυτές τις πληροφορίες, θα μπορέσει να προσδιοριστεί η ακριβής επίδραση αυτών των μεταλλάξεων και στην εξέλιξη των συμπτωμάτων του Alzheimer.

## 6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Allen JF., Raven JA., Free- radical-induced mutation vs regulation: costs and benefits of genes in organelles, *J Mol Evol* 1996; 42:427-434
2. Anderson S., Bankier AT., Barrell BG., de Bruijn MH., Coulson AR., Sequence and organization of the human mitochondrial genome, *Nature* 1981;29
3. An electron microscope study of the mitochondrial structure George E. Palade From the Laboratories of The Rockefeller Institute for Medical Research, New York 21, N. Y
4. Battersby BJ, Richter U., Why translation counts for mitochondria - retrograde signalling links mitochondrial protein synthesis to mitochondrial biogenesis and cell proliferation, *J Cell Sci.* 2013 Sep 6
5. Bereiter-Hahn J., Voth M., Dynamics of mitochondria in living cells: Shape changes, dislocations, fusion and fission of mitochondria, *Microscopy Research and Technique* 2005; 27:198-219
6. Blanchard B.J., A mitochondrial DNA deletion in normally aging and in Alzheimer brain tissue, *Neuroreport* 1993; 4:796-803
7. Blass JP., Gibson GE., The role of the oxidate abnormalities in the pathophysiology of Alzheimer's disease, *Rev Neurol* 1991; 147:511-525
8. Blass JP., Brown AM., Lower activity of Krebs cycle enzymes than of electron transport in human brain: disease implications. *Neurobiol Aging* 2000; 21:81-83
9. Castellani R, Hirai K, Aliev G, Drew KL, Nunomura A, Takeda A, Cash AD, Obrenovich ME, Perry G, Smith MA. Institute of Pathology, Case Western Reserve University, Cleveland, *J Neurosci Res.* 2002 Nov 1;70(3):357-60
10. Chagnon P, Gee M, Filion M, Robitaille Y, Belouchi M, Gauvreau D. Phylogenetic analysis of the mitochondrial genome indicates significant differences between patients with Alzheimer disease and controls in a French-Canadian founder population. *Am J Med Genet.* 1999 Jul 2;85(1):20-30.
11. Chan C. David, Mitochondria: Dynamic Organelles in Disease, Aging, and Development, 1241-1252, 30 June 2006
12. Chang SW, Zhang D, Chung HD, Zassenhaus HP, Department of Molecular Microbiology and Immunology, Department of Pathology, St. Louis University Health Sciences Center, The frequency of point mutations in mitochondrial DNA is elevated in the Alzheimer's brain, *Biochem Biophys Res Commun.* 2000 Jun 24;273(1):203-8
13. Chial, H. & Craig, J. (2008) mtDNA and mitochondrial diseases. *Nature Education* 1(1)
14. Czarnecka AM., Krawczyk T., Zdrozny M, Lubiński J, Arnold RS, Kukwa W, Scińska A, Golik P, Bartnik E, Petros JA. Institute of Genetics and Biotechnology, Faculty of Biology, University of Warsaw, Mitochondrial

- NADH-dehydrogenase subunit 3 (ND3) polymorphism (A10398G) and sporadic breast cancer in Poland, *Breast Cancer Res Treat.* 2010 Jun;121(2):511-8
15. Da Pozzo, P., Cardaioli, E., Radi, E., Federico, A. (2004) Sequence analysis of the complete mitochondrial genome in patients with mitochondrial encephalomyopathies lacking the common pathogenic DNA mutations *Biochemical and Biophysical Research Communications* . 324 (1): 360-36
  16. Eloisa Arbustini, Marta Diegoli, Roberta Fasani, Maurizia Grasso, Patrizia Morbini, Nadia Banchieri, Ornella Bellini, Barbara Dal Bello, Andrea Pilotto, Giulia Magrini, Carlo Campana, Paolo Fortina, Antonello Gavazzi, Jagat Narula, and Mario Viganò, Mitochondrial DNA Mutations and Mitochondrial Abnormalities in Dilated Cardiomyopathy, *Am J Pathol.* 1998 November; 153(5): 1501–1510.
  17. Emily Zifa, Stamatina Giannouli, Paschalis Theotokis, Costas Stamatis, Zissis Mamuris, Constantinos Stathopoulos, Mitochondrial tRNA Mutations: Clinical and Functional Perturbations, *RNA Biologi* 2007; 29:489-496
  18. Findeis MA., The role of amyloid beta peptide 42 in Alzheimer's disease, *Pharmacol Ther.*, 2007 Nov;116(2):266-86. Epub 2007 Jul 17
  19. Finnila, S., Lehtonen, M. S., Majamaa, K. (2001) Phylogenetic network for European mtDNA *American Journal of Human Genetics* . 68 (6): 1475-1484
  20. Ghiselli F, Milani L, Guerra D, Chang PL, Breton S, Nuzhdin SV, Passamonti M., Structure, transcription, and variability of metazoan mitochondrial genome: perspectives from an unusual mitochondrial inheritance system, *Genome Biol Evol.* 2013 Jan;5(8):1535-54. doi: 10.1093/gbe/evt112.
  21. Giordano, C., Sebastiani, M., Plazzi, G., Travaglini, C., Sale, P., Pinti, M., Tancredi, A., Liguori, R., Montagna, P., Bellan, M., Valentino, M. L., Cossarizza, A., Hirano, M., d'Amati, G., Carelli, V. (2006) Mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy: evidence of mitochondrial DNA depletion in the small intestine *Gastroenterology* . 130 (3): 893-901
  22. Hanna, M. G., Nelson, I. P., Morgan-Hughes, J. A., Wood, N. W. (1998) MELAS: a new disease associated mitochondrial DNA mutation and evidence for further genetic heterogeneity *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry* . 65 (4): 512-517
  23. Hansson Petersen CA, Alikhani N, Behbahani H, Wiehager B, Pavlov PF, Alafuzoff I, Leinonen V, Ito A, Winblad B, Glaser E, Ankarcrona M., The amyloid beta-peptide is imported into mitochondria via the TOM import machinery and localized to mitochondrial cristae, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 Sep 2;105(35):13145-50. doi: 10.1073/pnas.0806192105. Epub 2008 Aug 29
  24. Hofmann, S., Jaksch, M., Bezold, R., Mertens, S., Aholt, S., Paprotta, A., Gerbitz, K.D. (1997) Population genetics and disease susceptibility: characterization of central European haplogroups by mtDNA gene mutations, correlation with D loop variants and association with disease *Human Molecular Genetics* . 6 (11): 1835-1846

25. Howell, N., Bogolin, C., Jamieson, R., Marenda, D.R., Mackey, D.A. (1998) mtDNA mutations that cause optic neuropathy: how do we know? *American Journal of Human Genetics* . 62 (1): 196-202
26. J Nosek, H Fukuhara, NADH dehydrogenase subunit genes in the mitochondrial DNA of yeasts, *J. Bacteriol.* 1994, 176(18):5622 Johns DR, Paternal transmission of mitochondrial DNA is (fortunately) rare, *Ann Neurol.* 2003 Oct;54(4):422-4.
27. Kish SJ, Bergeron C, Rajput A, Dozic S, Mastrogiacono F, Chang LJ, Wilson JM, DiStefano LM, Nobrega JN., Human Neurochemical Pathology Laboratory, Clarke Institute of Psychiatry, Brain cytochrome oxidase in Alzheimer's disease, *J Neurochem.*, 1992 Aug;59(2):776-9
28. Kong, Q. P., Bandelt, H. J., Sun, C., Yao, Y. G., Salas, A., Achilli, A., Wang, C. Y., Zhong, L., Zhu, C. L., Wu, S. F., Torroni, A., Zhang, Y. P. (2006) Updating the East Asian mtDNA phylogeny: a prerequisite for the identification of pathogenic mutations *Human Molecular Genetics* . 15 (13): 2076-2086
29. Lehtonen, M. S., Moilanen, J. S., Majamaa, K. (2003) Increased variation in mtDNA in patients with familial sensorineural hearing impairment *Human Genetics* . 113 (3): 220-227
30. Luberichs, J., Leo-Kottler, B., Besch, D., Fauser, S. (2002) A mutational hot spot in the mitochondrial ND6 gene in patients with Leber's hereditary optic neuropathy *Graefes Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology* . 240 (2): 96-100
31. Mancuso, M., Nardini, M., Micheli, D., Rocchi, A., Nesti, C., Giglioli, N. J., Petrozzi, L., Rossi, C., Ceravolo, R., Bacci, A., Choub, A., Ricci, G., Tognoni, G., Manca, M. L., Siciliano, G., Murri, L. (2007) Lack of association between mtDNA haplogroups and Alzheimer's disease in Tuscany *Neurological Sciences* . 28 (3): 142-147
32. Marzuki, S., Noer, A. S., Letrit, P., Thyagarajan, D., Kapsa, R., Utthanaphol, P., Byrne, E. (1991) Normal variants of human mitochondrial DNA and translation products: the building of a reference data base *Human Genetics* . 88 (2): 139-145
33. Moreira PI, Nunomura A, Nakamura M, Takeda A, Shenk JC, Aliev G, Smith MA, Perry G., Nucleic acid oxidation in Alzheimer disease, *Free Radic Biol Med.* 2008 Apr 15;44(8):1493-505. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2008.01.002. Epub 2008 Jan 18
34. Noer, A.S., Sudoya, H., Lertrit, P., Thyagarajan, D., Utthanaphol, P., Kapsa, R., Byrne, E., Marzuki, S. (1991) A tRNALys mutation in the mtDNA is the causal genetic lesion underlying myoclonic epilepsy and ragged-red fiber (MERRF) syndrome *American Journal of Human Genetics* . 49 (4): 715-722
35. Opdal, S. H., Rognum, T. O. (2004) The sudden infant death syndrome gene: does it exist? *Pediatrics* . 114 (4): e506-512



36. Petruzzella V, Chen X, Schon EA., Is a point mutation in the mitochondrial ND2 gene associated with Alzheimer's disease, *Biochem Biophys Res Commun.* 1992 Jul 15;186(1):491-7
37. Piechota, J., Tonska, K., Nowak, M., Kabzinska, D., Lorenc, A., Bartnik, E. (2004) Comparison between the Polish population and European populations on the basis of mitochondrial morphs and haplogroups *Acta Biochimica Polonica* . 51 (4): 883-895
38. R E Giles, H Blanc, H M Cann, and D C Wallace, Maternal inheritance of human mitochondrial DNA, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1980 November; 77(11): 6715–6719
39. Reddy PH, Beal MF, Neurogenetics Laboratory, Neurological Sciences Institute, Oregon Health and Science University, Are mitochondria critical in the pathogenesis of Alzheimer's disease? *Brain Res Brain Res Rev.* 2005 Nov;49(3):618-32. Epub 2005 Apr 19
40. Saxena, R., de Bakker, P. I., Singer, K., Mootha, V., Burt, N., Hirschhorn, J. N., Gaudet, D., Isomaa, B., Daly, M. J., Groop, L., Ardlie, K. G., Altshuler, D. (2006) Comprehensive association testing of common mitochondrial DNA variation in metabolic disease *American Journal of Human Genetics* . 79 (1): 54-61 .
41. Selkoe Denis J., Alzheimer's Disease: Genes, Proteins, and Therapy, *Physiological Reviews* 2001; 81: 741-767
42. Simon, D.K., Mayeux, R., Marder, K., Kowall, N.W., Beal, M.F., Johns, D.R. (1999) Mitochondrial DNA mutations in complex I and tRNA genes in Parkinson's disease *Neurology* . 54 (3): 703-70
43. Siri H. Opdal, Åshild Vege, Thore Egeland, Musse A. Musse, Torleiv O. Rognum, Possible role of mtDNA mutations in sudden infant death, *Pediatric Neurology* Volume 27, Issue 1 , Pages 23-29, July 2002
44. Sternberg D, Danan C, Lombès A, Laforêt P, Girodon E, Goossens M, Amselem S, Exhaustive scanning approach to screen all the mitochondrial tRNA genes for mutations and its application to the investigation of 35 independent patients with mitochondrial disorders, *Hum Mol Genet.* 1998 Jan;7(1):33-42
45. Tang, S., Batra, A., Zhang, Y., Ebenroth, E. S., Huang, T. (2010) Left ventricular noncompaction is associated with mutations in the mitochondrial genome *Mitochondrion* . 10 (4): 350-357 .
46. Vilmi, T., Moilanen, J. S., Finnila, S., Majamaa, K. (2005) Sequence variation in the tRNA genes of human mitochondrial DNA *Journal of Molecular Evolution* . 60 (5): 587-597
47. van der Walt JM, Dementieva YA, Martin ER, Scott WK, Nicodemus KK, Kroner CC, Welsh-Bohmer KA, Saunders AM, Roses AD, Small GW, Schmechel DE, Murali Doraiswamy P, Gilbert JR, Haines JL, Vance JM, Pericak-Vance MA., Analysis of european mitochondrial haplogroups with alzheimer disease risk, *Neurosci Lett.*, 2004 Jul 15;365(1):28-32.

48. Younkin SG., The role of A beta 42 in Alzheimer's disease, *J Physiol Paris*. 1998 Jun-Aug;92(3-4):289-92.
49. Wallace DC., Mitochondrial DNA mutations in disease and aging, *Environ Mol Mutagen*. 2010 Jun;51(5):440-50. doi: 10.1002/em.20586.
50. Zsurka G, Kálmán J, Császár A, Raskó I, Janka Z, Venetianer P., No mitochondrial haplotype was found to increase risk for Alzheimer's disease, *Biol Psychiatry*. 1998 Sep 1;44(5):371-3.
51. <http://emed.med.uoa.gr>
52. <http://www.obeline.gr>
53. <http://www.epilepsy.com>
54. <http://www.ivy-rose.com>
55. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9896/>
56. <http://www.brightfocus.org>
57. <http://www.beautyview.gr>
58. <http://www.alzheimer-hellas.gr>
59. <http://estia.hua.gr><http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16028682>
60. <http://ghr.nlm.nih.gov/gene/MT-ND3>
61. <http://www.alzheimer-hellas.gr>