



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΜΕ ΘΕΜΑ:

Ανίχνευση μιτοχονδριακών μεταλλάξεων στο γονίδιο tRNA^{Phe} σε ασθενείς με νόσο Alzheimer και σε «φυσιολογικά» άτομα.

Νάλκος Διονύσης



Επιβλέπουσα Καθηγήτρια: Ζίφα Αιμιλία

ΛΑΡΙΣΑ 2011

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα Πτυχιακή Εργασία πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας. Σε αυτό το σημείο θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες σε όσους συνέβαλαν στην ολοκλήρωσή της.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω μέλη της τριμελούς επιτροπής και ιδιαίτερα την κα. Αιμιλία Ζίφα για την ανάθεση αυτού του ιδιαίτερα ενδιαφέροντος θέματος, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε καθώς και για την επιστημονική της καθοδήγηση καθ' όλη τη διάρκεια της προσπάθειάς μου.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στον υποψήφιο διδάκτορα κ. Κώστα Σταμάτη για την πολύτιμη βοήθεια του κατά την εκτέλεση του πειραματικού μέρους, αλλά και για την υπομονή και την προθυμία του. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τη Λέκτορα του Τμήματος κα. Θεολογία Σαραφίδου και τον υποψήφιο διδάκτορα, Θέμη Γιαννούλη.

Θα ήθελα επίσης να εκφράσω τις ευχαριστίες μου σε όλους τους μεταπτυχιακούς και προπτυχιακούς φοιτητές του Εργαστηρίου Γενετικής και ιδιαίτερα στην Μαρία-Ειρήνη Τερζενίδου για την άψογη συνεργασία μας και το ευχάριστο κλίμα που επικρατούσε στο εργαστήριο.

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.....	4
2. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	5
2.1 Νευροπαθολογία.....	5
2.2 Ανωμαλίες στο Σύστημα των Νευροδιαβιβαστών.....	6
2.3 Γενετική.....	7
2.4 Παθογένεση.....	7
2.5 Αμυλοειδές β.....	7
2.6 Πρωτεΐνη TAU.....	7
2.7 Θεωρίες για την παθογένεση της AD.....	8
2.8 Συσχέτιση της νόσου Alzheimer με την μιτοχονδριακή δυσλειτουργία tRNA	9
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	15
3.1 Υλικά.....	16
3.2 Μέθοδοι.....	17
3.3 Απομόνωση DNA.....	17
3.4 Παρασκευή των Αντιδραστηρίων.....	18
3.5 Ρόλος των Αντιδραστηρίων.....	19
3.6 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR).....	19
3.6.1 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης.....	22
3.6.2 Παραγωγή 1% πηκτώματος αγαρόζης και ηλεκτροφόρηση.....	22
3.7 Ανάλυση Πολυμορφισμού Διαμόρφωσης Μονοκλωνικού DNA (SSCP).....	23
3.7.1 Παρασκευή πηκτώματος πολυακρυλαμίδης	25
3.7.2 Καθαρισμός PCR προϊόντος.....	27
3.8 Ανάλυση πρωτοδιάταξης DNA αλληλουχίας	28
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	31
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	37
5.1 Απλοομάδες.....	39
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	40

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι μεταλλάξεις στο μιτοχονδριακό DNA και η δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων είναι υπεύθυνες για μια ετερογενή ομάδα ασθενειών, γνωστές ως μιτοχονδριακά νοσήματα. Κοινό τους χαρακτηριστικό είναι η βλάβη της αναπνευστικής αλυσίδας με αποτέλεσμα την ελαττωμένη παραγωγή ενέργειας. Στη νόσο του Alzheimer παρατηρείται μιτοχονδριακή δυσλειτουργία και μορφολογικές ανωμαλίες των μιτοχονδρίων οι οποίες υποδεικνύουν την εμπλοκή των μιτοχονδρίων στην ασθένεια. Στην παρούσα μελέτη ελέγχθηκαν 100 <<φυσιολογικά>> άτομα, και 50 ασθενείς με Alzheimer για την παρουσία μεταλλάξεων στο γονίδιο tRNA^{Phe}. Στους 50 ασθενείς με Alzheimer εντοπίστηκαν συνολικά 6 πολυμορφισμοί. Και οι 5 από αυτούς εντοπίζονται στην D-loop του μιτοχονδριακού DNA, η οποία εντοπίζεται πριν από το γονίδιο tRNA^{Phe}. Στα <<φυσιολογικά>> άτομα εντοπίσαμε μια γνωστή μετάλλαξη, η οποία αφορά την αντικατάσταση μιας θυμίνης (T) από μια κυστεΐνη (C) μέσα στο γονίδιο tRNA^{Phe}, καθώς και μια προσθήκη τριών νουκλεοτιδίων C στην περιοχή που προηγείται του γονιδίου. Για να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα πρέπει να ολοκληρωθεί η έρευνα σε όλα τα tRNA γονίδια στους ασθενείς και να γίνει σύγκριση με μεγάλη ομάδα του <<φυσιολογικού>> πληθυσμού.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Μια από τις πιο επίφοβες συνέπειες της γήρανσης στον άνθρωπο, είναι η εξασθένηση της μνήμης και η άνοια που εμφανίζεται με αυξημένη συχνότητα στους ηλικιωμένους. Έχει εκτιμηθεί ότι το 10% του πληθυσμού ηλικίας μεγαλύτερης των 65 χρονών, υποφέρει από ήπια έως μέτρια άνοια, και το 4-5% υποφέρει από σοβαρή άνοια. Τα μεγάλα ποσοστά άνοιας που συνδέονται με την ηλικία, έχουν αυξήσει τις έρευνες που σχετίζονται με τα αίτιά της, και πιθανή πρόληψη ή θεραπεία με φαρμακευτικούς παράγοντες. Η έναρξη της γεροντικής άνοιας χαρακτηρίζεται από αυξανόμενη βλάβη της μνήμης. Αναπόφευκτα, οι ασθενείς χάνουν τις γνωστικές τους ικανότητες, δηλ. την ικανότητα να γράφουν, να διαβάζουν, να κάνουν μαθηματικούς υπολογισμούς, και να χρησιμοποιούν την γλώσσα κατάλληλα. Δεν μπορούν να τραφούν ή να ντυθούν μόνοι τους, δεν αναγνωρίζουν τις οικογένειες τους, και τελικά δεν ξέρουν ούτε τα ονόματα τους. Για κάποια χρόνια, αυτά τα συμπτώματα θεωρούνταν φυσιολογικές συνέπειες της γήρανσης. Ιατρικές μελέτες έδειξαν ότι ορισμένες περιπτώσεις της άνοιας προκαλούνται από εγκεφαλικά επεισόδια, ιογενείς και βακτηριακές λοιμώξεις, από τον αλκοολισμό, και από αρτηριοσκλήρυνση με συνέπεια την μειωμένη παροχή αίματος στον εγκέφαλο, η οποία οδηγεί στον κυτταρικό θάνατο. Ωστόσο, το πιο συχνή μορφή άνοιας είναι η νόσος Alzheimer (AD).

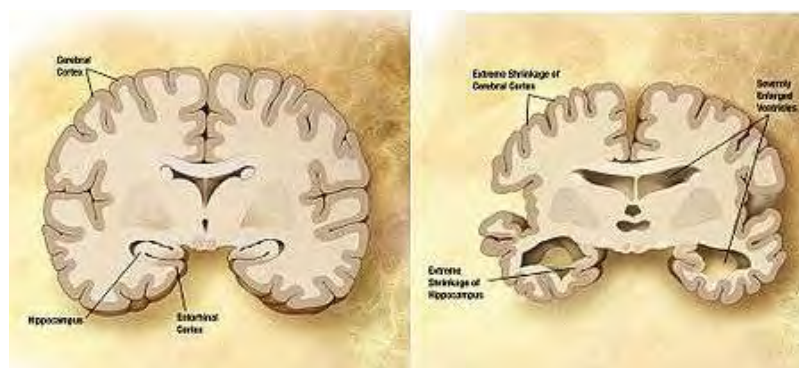
Η νόσος Alzheimer πήρε το όνομα της από έναν Γερμανό νευρολόγο, τον Alois Alzheimer. Το 1907, ο Alzheimer δημοσίευσε μια μελέτη η οποία περιέγραφε μια σειρά από μη αναγνωρισμένα ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά στον εγκέφαλο μιας 51χρονης γυναίκας, η οποία είχε άνοια όταν πέθανε. Η άνοια η οποία συσχετίζεται με την AD συνήθως εμφανίζεται σε ηλικιωμένους περίπου 65 χρονών. Περιστασιακά, η AD είναι κληρονομήσιμη μέσα στις οικογένειες, και αποκαλείται οικογενής AD. Πρέπει να ξεχωρίζεται η οικογενής από τη μη οικογενή AD, επειδή η οικογενής AD μπορεί να ανιχνευθεί σε αρκετές αναγνωρισμένες γενετικές μεταλλάξεις, λαμβάνοντας υπόψη ότι η γενετική παραλλαγή αντιπροσωπεύει τις διαφορές στην ευαισθησία της σποραδικής AD. Ακόμα και η σποραδική AD συνδέεται με μειωμένη διάρκεια ζωής, καθιστώντας την AD μια από τις κύριες αιτίες θανάτου μεταξύ των ηλικιωμένων.

Νευροπαθολογία

Όπως περιγράφηκε αρχικά στην AD, τα κλασικά νευροϊστοπαθολογικά σημάδια της AD είναι η παρουσία ανώμαλων δομών, οι οποίες είναι οι γεροντικές - αμυλοειδείς πλάκες και οι νευροϊνιδιακοί σωροί (NFTs). Ο Alzheimer το 1907 έγραψε ότι οι NFTs φαίνονταν να αντιπροσωπεύουν μια ανωμαλία στην ινώδη δομή των νευρώνων. Μελέτες με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο έδειξαν ότι αυτά τα στοιχεία αποτελούνται κυρίως από ζευγάρια ινών, τυλιγμένα το ένα γύρω από το άλλο σε ελικοειδή διάταξη.

Οι γεροντικές πλάκες αποτελούν το πιο χαρακτηριστικό εύρημα στους εγκεφάλους ασθενών με νόσο του Alzheimer. Έχουν βρεθεί διάφοροι τύποι γεροντικών πλακών, όπως οι νευρωτικές πλάκες που έχουν δυστροφικούς και εκφυλισμένους νευρίτες, και οι διάχυτες πλάκες που περιέχουν πρωτεϊνικές ίνες β-αμυλοειδούς, αλλά όχι νευρίτες. Οι γεροντικές πλάκες χαρακτηρίζονται από συσσώρευση του Αβ πεπτιδίου που παράγεται από το μεταβολισμό της προδρομίου πρωτεΐνης του αμυλοειδούς (amyloid precursor protein, APP) (Glennner et.al 1994). Ιστολογικές μελέτες περιέγραψαν την παρουσία δύο διαφορετικών μορφολογικών συσσωρεύσεων του Αβ πεπτιδίου (Schmidt ML και συν., 1995). Πρώιμες βλάβες, αναφερόμενες σαν διάχυτες, χαρακτηρίζονται από συσσώρευση του Αβ πεπτιδίου αλλά όχι από δυστροφικούς νευρίτες. Σε μεταγενέστερα στάδια, οι αμυλοειδείς πλάκες περιέχουν κύτταρα και κυτταρικά συστατικά (όπως δυστροφικούς νευρίτες, μικρογλοία, νευρώνες με ή χωρίς νευροϊνδιακές απολήξεις και πρωτεΐνες όπως συστατικά συμπληρώματος, ApoE και α-1-χυμοθρυψίνη) (Pericak-Vance et al.1991).

Υπάρχουν στοιχεία ότι η ιστοπαθολογία της AD ξεκινάει από τον έσω κροταφικό λοβό και εξαπλώνεται σε άλλες περιοχές μέσω των συνδέσεων του φλοιού. Μια συνέπεια αυτής της υπόθεσης είναι ότι η αποσύνδεση μεταξύ του ιππόκαμπου και του νεοφλοιού, παίζει σημαντικό ρόλο στην κλινική συμπτωματολογία της AD. Ο θάνατος των νευρώνων στον φλοιό συσχετίζεται με την αντιδραστική γλοίωση, όπως φαίνεται στην αυξημένη ανοσοαντιδραστικότητα στην αστροκυτταρική πρωτεΐνη GFAP. Επίσης, ζημιά στις απαγωγές ίνες του φλοιού όπως και στους εσωτερικούς φλοιικούς νευρώνες έχουν επιβλαβή δράση στις συναπτικές αλληλεπιδράσεις μέσα στον φλοιό. Η απώλεια της συναπτικής σύνδεσης μπορεί να είναι ένας σημαντικός παράγοντας για την άνοια και πιθανώς να συμβάλλει στην ατροφία του εγκεφάλου.



Εικόνα 1: Φυσιολογικός εγκέφαλος στα αριστερά και με Alzheimer στα δεξιά
Πηγή: http://el.wikipedia.org/wiki/Νόσος_Αλτσχάιμερ

Ανωμαλίες στα συστήματα των νευροδιαβιβαστών

Οι ανωμαλίες που συσχετίζονται με τους νευροδιαβιβαστές δεν είχαν ανακαλυφθεί μέχρι την ανακάλυψη των βιοχημικών και ιστοχημικών τεχνικών, που έδωσαν την δυνατότητα για μελέτη των νευροδιαβιβαστών και των συνθετικών και καταβολικών ενζύμων τους, στον εγκεφαλικό ιστό. Έτσι, έχει βρεθεί μείωση στους χολινεργικούς νευρώνες του πρόσθιου εγκεφάλου, αλλά και σε χολινεργικούς δείκτες, όπως της ακετυλοχολίνης. Η χολινεργική υπόθεση, υποστηρίζει ότι πολλά από τα γνωστικά,

λειτουργικά και συμπεριφορικά συμπτώματα της AD προέρχονται από τη μειωμένη δραστηριότητα των συστημάτων της ακετυλοχολίνης του εγκεφάλου, αποτέλεσμα της απώλειας χολινεργικών νευρώνων του βασικού πυρήνα του Meynert και άλλων πυρήνων που προβάλλουν στον υπόκαμπο και στην έσω κροταφική περιοχή. Υπάρχουν ενδείξεις ότι και άλλα συστήματα νευροδιαβιβαστών εμπλέκονται στην AD, όπως για παράδειγμα το σύστημα της νοραδρεναλίνης το οποίο ευθύνεται για νευρωνικές δυσλειτουργίες στον φλοιό και στον υποθάλαμο.

Γενετική

Στις πρώτες έρευνες που έγιναν για τους γενετικούς μηχανισμούς της AD, βρέθηκε ότι πρόκειται για μια γενετικά ετερογενή διαταραχή και ότι ασθενείς που έπασχαν από μια μορφή νοητικής υστέρησης, το σύνδρομο Down, παρουσίαζαν ίδια εγκεφαλική παθολογία με τους ασθενείς με AD. Με γονιδιακή χαρτογράφηση εντοπίστηκε το γονίδιο *APP* το οποίο βρίσκεται στο χρωμόσωμα 21 (όπου και τα άτομα με σύνδρομο Down έχουν τρισωμία), και μεταλλάξεις σε ορισμένες θέσεις του γονιδίου είναι υπεύθυνες για την εμφάνιση AD. Η *APP* εμφανίζεται σε πολλές διαφορετικές ισομορφές, οι οποίες προκύπτουν από το εναλλακτικό μάτισμα ενός και μόνο γονιδίου. Αν και πολλές λειτουργίες αποδίδονται στην *APP*, κανένα στοιχείο δε δείχνει ότι μια θεμελιώδης κυτταρική λειτουργία της χάνεται στους ασθενείς με AD. Αντίθετα, οι μεταλλάξεις της *APP* φαίνεται ότι ενεργούν μέσα από ένα τοξικό μηχανισμό αυξημένης λειτουργίας,

Παθογένεση

Πολλοί ερευνητές πιστεύουν ότι ανωμαλίες του β-αμυλοειδούς και της πρωτεΐνης TAU παίζουν σημαντικό ρόλο στην παθογένεση της AD.

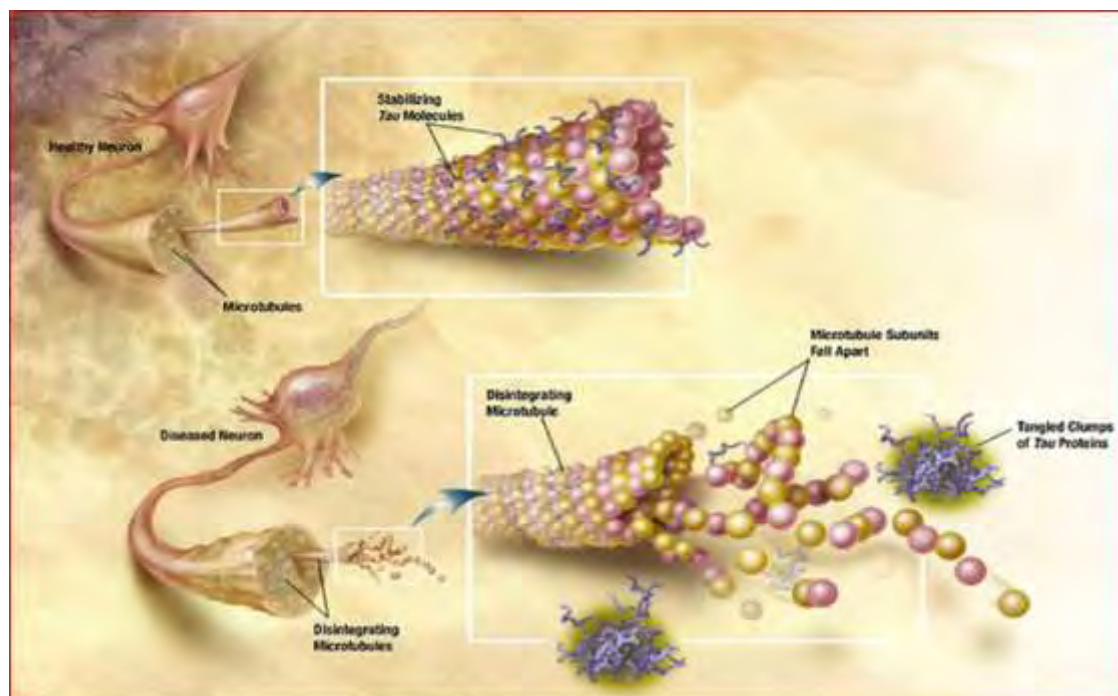
Αμυλοειδές β

Το β αμυλοειδές (Aβ) είναι ένα πεπτιδίο που κυκλοφορεί στο πλάσμα και στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό σε υγιείς ανθρώπους και άλλα θηλαστικά. Το Aβ προέρχεται από ενδοπρωτεολυτική πέψη της *APP*, η οποία έχει ένα μεγάλο εξωκυττάριο τμήμα, μία μικρή διαμεμβρανική περιοχή καθώς και ένα μικρό κυτταροπλασματικό τμήμα. Η πλειοψηφία των εκκρινόμενων πεπτιδίων του Aβ είναι βραχεία διαλυτά Aβ40. Ωστόσο, περίπου το 10% είναι οι πιο αδιάλυτες Aβ42 μορφές, που εύκολα συναθροίζονται με τη μορφή εξωκυττάρων ινιδίων. Μελέτες υποστηρίζουν την υπόθεση ότι το Aβ42 είναι τοξικό και συμβάλλει άμεσα στο νευροεκφυλιστικό φαινότυπο της AD. Έρευνες έχουν δείξει ότι το Aβ ενεργοποιεί τον κυτταρικό κύκλο στους νευρώνες, απρογραμμάτιστα, ενεργοποιώντας τη μετάβαση από τη G1 φάση στη S. Αυτό που παρατηρείται επιπλέον στους νευρώνες που εκτίθενται σε Aβ, είναι ότι εισέρχονται στη φάση S πριν τον αποπτωτικό τους θάνατο. Εν ολίγοις, η έκθεση μεταμιτωτικών νευρώνων σε επίπεδα Aβ τέτοια που υπάρχουν στον εγκέφαλο με AD μπορεί να επάγει σηματοδοτικό μονοπάτι που οδηγεί στην έναρξη αποτυχημένου νευρωνικού κυτταρικού κύκλου.

Πρωτεΐνη TAU

Ο φυσιολογικός ρόλος της TAU είναι να σταθεροποιεί τα νευρωνικά μικροσωληνάρια και να προωθεί τη νευρωνική ανάπτυξη. Η υπερ-φωσφορυλίωση ή η

ανώμαλη φωσφορυλίωση της εγγενούς TAU πρωτεΐνης, οδηγεί σε αλλαγή της διαμόρφωσης του μορίου της, με αποτέλεσμα την εμφάνιση τοξικότητας στο κύτταρο. Η συνάθροιση της TAU πρωτεΐνης οδηγεί στο σχηματισμό νευροϊνιδικών σχηματισμών, που συνιστούν ομόλογα μεταξύ πολλών διαταραχών, γνωστές ως TAU-πάθειες. Η υπερ-φωσφορυλιωμένη TAU πρωτεΐνη οφείλεται στη δράση μιας κινάσης και στη διαταραχή της ισορροπίας φωσφορικών στο κύτταρο, ενώ η μειωμένη αποδόμηση της υπερ-φωσφορυλιωμένης TAU μέσω των πρωτεολυτικών συμπλόκων, οδηγεί στην αύξηση της ποσότητάς της στο κύτταρο. Οι νευροϊνιδικοί σωροί στην AD αποτελούνται και από τις έξι ισομορφές της υπερ-φωσφορυλιωμένης TAU πρωτεΐνης.

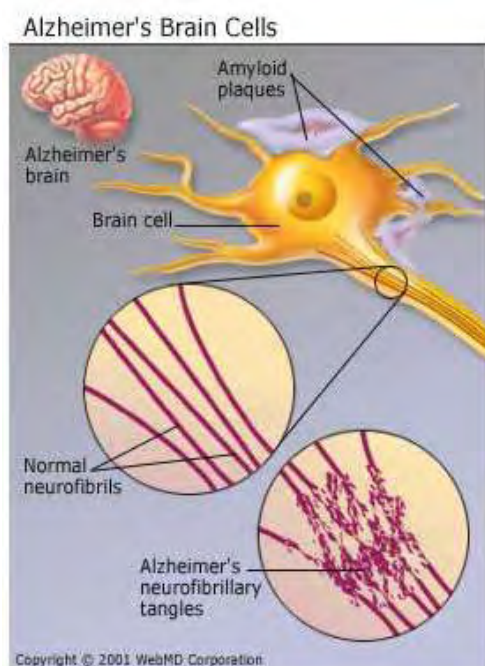


Εικόνα 2: Ένας υγιής νευρώνας πάνω, και ένας ελαττωματικός νευρώνας με αποσυντιθέμενα μικροσωληνάρια κάτω.
Πηγή : http://www.lifesciencesfoundation.org/events-Alzheimers_gene.html

Θεωρίες για την παθογένεση της AD

Υπάρχουν αρκετές διαφωνίες σχετικά με τους μηχανισμούς που ευθύνονται για την νευροπαθολογία της AD και την σειρά των γεγονότων που οδηγούν στην νόσο. Η πιο ισχυρή υπόθεση είναι αυτή του «καταρράκτη του αμυλοειδούς», σύμφωνα με την οποία, η σύνθεση του APP δεν γίνεται φυσιολογικά λόγω της επίδρασης διαφόρων γενετικών ή περιβαλλοντικών παραγόντων. Το αμυλοειδές έχει τοξική επίδραση στους νευρώνες, οδηγώντας σε ενδο-νευρωνικές αλλαγές συμπεριλαμβανομένου του σχηματισμού NFTs. Η συσσωρευμένη ιστολογική ζημιά προκαλεί τον θάνατο των νευρώνων, έλλειμμα νευροδιαβιβαστών και άνοια. Ωστόσο, ακόμα και αυτή η θεωρία έχει αμφισβητηθεί σε αρκετά σημεία, επειδή οι ασθενείς με AD δεν έχουν δείξει ένα κοινό πρότυπο ως προς τις αλλοιώσεις στις πλάκες στους εγκεφάλους τους, και υπάρχουν πολλοί παράγοντες που επηρεάζουν την νόσο. Για παράδειγμα, υπάρχουν ισχυρές αποδείξεις ότι χρόνια φλεγμονώδης διαδικασία είναι παρούσα στην AD. Μια πρόσφατη υπόθεση της AD αφορά τις ελεύθερες ρίζες και το οξειδωτικό stress. Έχει

βρεθεί ότι το μονοξείδιο του αζώτου (NO) είναι μια πιθανή πηγή ελευθέρων ριζών, οι οποίες οδηγούν στον νευρωνικό θάνατο. Αυτές είναι κάποιες από τις πιθανές αιτίες της AD.



Εικόνα 3: Αμυλοειδείς πλάκες και NFTs σε AD εγκέφαλο

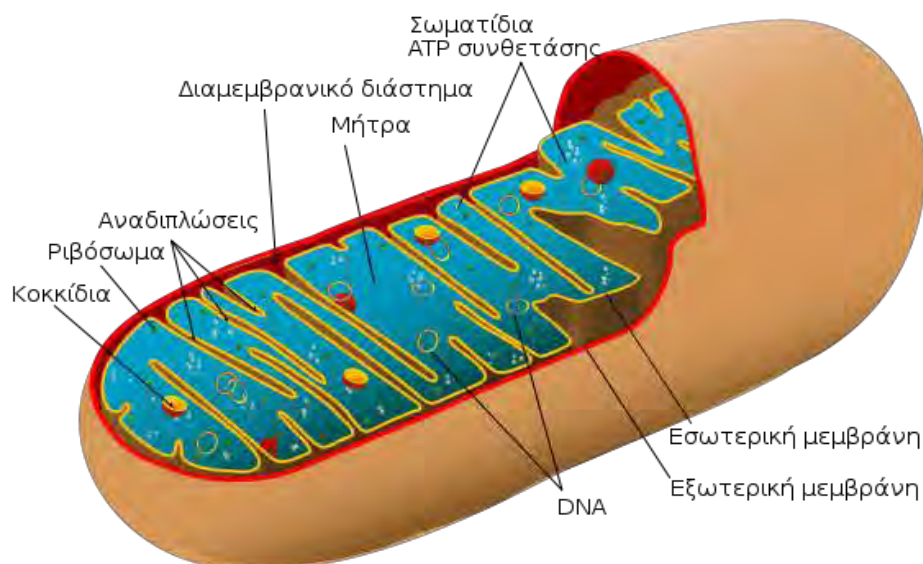
Πηγή: <http://www.webmd.com/alzheimers/guide/understanding-alzheimers-disease-basics>

Εμείς θα ασχοληθούμε με τον ρόλο των μιτοχονδρίων στην AD. Στα κύτταρα των θηλαστικών, τα μιτοχόνδρια παρέχουν ενέργεια μέσω του αερόβιου μεταβολισμού. Παίζουν επίσης σημαντικό ρόλο στην απόπτωση, την παραγωγή και την αποτοξίνωση των ελευθέρων ριζών και χρησιμεύουν ως κυτταρικός ρυθμιστής του ασβεστίου. Οι νευροεκφυλιστικές διαταραχές στις οποίες συμμετέχουν τα μιτοχόνδρια συνδέονται με ανωμαλίες στην οξειδωτική φωσφορυλίωση και μπορούν να διαιεθούν σε αυτές που προκαλούνται είτε λόγω μεταλλάξεων του μιτοχονδριακού DNA, όπως η AD, είτε λόγω μεταλλάξεων του πυρηνικού DNA. Η συμμετοχή μη νευρωνικών ιστών, όπως τα αιμοπετάλια και οι ινοβλάστες δείχνει ότι η οξειδωτική βλάβη δεν είναι απλώς μια τοπική συνέπεια της νόσου, αλλά μπορεί να είναι γενετικά καθορισμένη.

Συσχέτιση της νόσου Alzheimer με τη μιτοχονδριακή δυσλειτουργία

Το μιτοχόνδριο είναι κυτταρικό οργανίδιο, το οποίο περιβάλλεται από διπλή μεμβράνη. Μιτοχόνδρια απαντούν μόνο στα ευκαρυωτικά κύτταρα και τα ένζυμά τους διενεργούν τα στάδια του αερόβιου μεταβολισμού τα οποία αποδίδουν ενέργεια. Τα μιτοχόνδρια βρίσκονται σε διάφορα μεγέθη και σχήματα. Περιβάλλονται από δύο μεμβράνες, την εξωτερική και την εσωτερική. Η εξωτερική τους μεμβράνη είναι λεία, έχει κυλινδρικό σχήμα και δεν φέρει οξυσώματα. Αντίθετα η εσωτερική μεμβράνη είναι αναδιπλωμένη, σχηματίζει πολυάριθμες δισκοειδείς ή δακτυλιοειδείς πτυχώσεις

και φέρει οξυσώματα που αποτελούνται από πολυενζυμικά συστήματα τα οποία και ευθύνονται για τη φωσφορυλίωση και την αναπνευστική αλυσίδα. Ο ενδιάμεσος χώρος μεταξύ των δύο μεμβρανών ονομάζεται διαμεμβρανικό διάστημα ή μεσομεμβρανικός χώρος του μιτοχονδρίου. Ο χώρος αυτός πληρούται υπό υγρού που χρησιμεύει στη λειτουργική επικοινωνία των δύο μεμβρανών.



Εικόνα 4: Η δομή του μιτοχονδρίου

Πηγή: <http://el.wikipedia.org/wiki/Μιτοχόνδριο>

Βλάβες στην μιτοχονδριακή οξειδωτική φωσφορυλίωση έχουν συσχετισθεί αρκετές φορές με την AD, και οι μεταλλάξεις στο mtDNA έχουν αναφερθεί σε ορισμένες περιπτώσεις AD. Υποστηρίζεται ότι αυτά τα ελαττώματα επηρεάζουν αρνητικά την μεταφορά ηλεκτρονίων και την παραγωγή ενέργειας, αποδίδοντας χαμηλά επίπεδα ATP, που δεν επαρκούν για την φυσιολογική λειτουργία των κυττάρων. Η πρόοδος των μιτοχονδριακών ασθενειών που ευθύνεται για την φαινοτυπική τους έκφραση, μπορεί να περιλαμβάνει δύο κύριους παράγοντες: Μια μετάλλαξη η οποία οδηγεί στην παθολογική κατάσταση, και έναν παράγοντα που συσχετίζεται με την ηλικία και προκαλεί ελάττωση της μιτοχονδριακής λειτουργίας. Η καθυστερημένη έναρξη και πρόοδος των μιτοχονδριακών νόσων δείχνει ότι η μιτοχονδριακή λειτουργία μειώνεται ανάλογα με την ηλικία.

Η υπόθεση των μιτοχονδρίων θα μπορούσε να εξηγήσει πολλά από τα βιοχημικά, γενετικά, και παθολογικά χαρακτηριστικά της AD. Μεταλλάξεις στο μιτοχονδριακό DNA, μπορούν να προκαλέσουν αποτυχία στην παραγωγή ενέργειας, αυξημένο οξειδωτικό stress, και συσσωρευμένο αμυλοειδές β, το οποίο με την σειρά του προκαλεί περαιτέρω καταστροφή του mtDNA και οξειδωτικό stress. Αν και υπάρχουν στοιχεία για την μιτοχονδριακή δυσλειτουργία στην AD, καμία μετάλλαξη στο

mtDNA δεν έχει συνδεθεί άμεσα με την AD. Πράγματι, αποτελέσματα από έρευνες πάνω στον ρόλο των πολυμορφισμών των mtDNA ή στις απλοομάδες στην AD, είναι αμφιλεγόμενα.

Μεταλλάξεις στο mtDNA ηλικιωμένων ανθρώπων έχουν εξεταστεί ιδιαίτερα, με τα αποτελέσματα να δείχνουν ότι η μείωση της μακροζωίας επηρεάζεται κυρίως από την μητρική σειρά. Πιθανώς, μακρόβια άτομα έχουν κληρονομήσει από τις μητέρες τους τύπους mtDNA οι οποίοι προστατεύουν τις μιτοχονδριακές λειτουργίες από την καταστροφή που προκαλείται από την παραγωγή ελεύθερων ριζών οξυγόνου, και με αυτόν τον τρόπο δίνεται ένα μικρό αλλά συνεχές πλεονέκτημα στις γυναίκες για αύξηση της πιθανότητας επιτυχούς γήρανσης και μακροζωίας.

Σε εγκεφάλους ασθενών με AD, τα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων με αθηροσκληρωτικές βλάβες και γειτονικά περιαγγειακά κύτταρα έχουν αναφερθεί να περιέχουν συστάδες φυσιολογικών και κατεστραμμένων μιτοχονδριακών γονιδιωμάτων. Η χρόνια υποαιμάτωση μπορεί να είναι ένα στοιχείο που περιλαμβάνεται στην παθογένεση της AD, προκαλώντας οξειδωτικό stress και μιτοχονδριακή δυσλειτουργία. Η γήρανση και η αγγειοεγκεφαλική συννοσηρότητα ίσως μειώνει την εγκεφαλική αιμάτωση, προκαλώντας τον εκφυλισμό των τριχοειδών του εγκεφάλου και ανεπαρκή μεταφορά υποστρωμάτων ενέργειας στον νευρικό ιστό. Η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία, το οξειδωτικό stress, η μειωμένη παραγωγή ATP και η αυξημένη είσοδος ασβεστίου, οι ανωμαλίες στην πρωτεϊνσύνθεση και η αποτυχία στην μεταφορά νευροδιαβιβαστών συμβάλλουν στην ανάπτυξη του εκφυλισμού των νευρώνων και στην εμφάνιση AD. Σε μικροαγγεία εγκεφάλων ασθενών με AD, βρέθηκαν ελλείψεις στο mtDNA, και ανοσοκυτταροχημική ανάλυση έδειξε ότι ανωμαλίες των μιτοχονδρίων στους νευρώνες συσχετιζόνταν με αυξημένους δείκτες στην υπεροξείδωση των λιπιδίων. Μια υποθετική σειρά των γεγονότων στην εξέλιξη της AD αφορά την εξέλιξη της οξειδωτικής καταστροφής προς σχηματισμό προ-νευροϊνιδιακών πλακών προκαλώντας μη αναστρέψιμη καταστροφή των νευρώνων.

Για την διαπίστωση της συνεισφοράς του πολυμορφισμού του mtDNA ή των σπάνιων παραλλαγών, ή και των δύο, στην παθολογία της AD έγιναν μελέτες οι οποίες έδειξαν ότι οι κοινοί κληρονομήσιμοι πολυμορφισμοί του mtDNA, δεν μπορούσαν να είναι ο σημαντικός παράγοντας της AD, αλλά κάποιες σπάνιες παραλλαγές στην κωδικοποίηση των πρωτεϊνών μπορούσαν να έχουν προστατευτικά αποτελέσματα για πληθυσμούς υψηλού κινδύνου με το APOE4 αλληλόμορφο. Επίσης, μεταλλάξεις στην περιοχή ελέγχου του mtDNA, βρέθηκαν να είναι πιο συχνές σε ασθενείς με AD. Ωστόσο, καμία μετάλλαξη στο mtDNA δεν έχει βρεθεί μέχρι στιγμής να είναι άμεσα υπεύθυνη για την AD. Όμως, υπάρχουν μεταλλάξεις οι οποίες εμφανίζουν μεγάλη συχνότητα σε ασθενείς με AD. Για παράδειγμα, μια συχνή μετάλλαξη είναι η 4336G η οποία υπερεκπροσωπείται από ηλικιωμένα άτομα και συνδέεται με αυξανόμενο κίνδυνο για AD όψιμης έναρξης (Shoffner, J. M., Brown, M. D., Torroni, A., Lott, M. T., Cabell, M. F., Mirra, S. S., Beal, M. F., Yang, C.-C., Gearing, M., Salvo, R., Watts, R. L., Juncos, J. L., Hansen, L. A., Crain, B. J., Fayad, M., Reckord, C. L. &

Wallace, D. C. (1993) *Genomics* 17, 171-184). Επίσης, έχει βρεθεί ότι οι AD εγκέφαλοι, αλλά όχι οι «φυσιολογικοί», παρουσιάζουν την κοινή μετάλλαξη T414G. Αυτή η μετάλλαξη μεταβάλλει την θέση σύνδεσης του μιτοχονδριακού μεταγραφικού παράγοντα Tfam, που συνδέεται με τον προαγωγέα που μεταγράφει το ND6 γονίδιο. Κλωνοποίηση και αλληλούχιση των περιοχών ελέγχου από ασθενείς με AD και «φυσιολογικούς», έδειξε ότι οι AD εγκέφαλοι παρουσιάζουν περισσότερες μεταλλάξεις στο mtDNA απ' ό,τι οι «φυσιολογικοί», και κάποιες μεταλλάξεις μπορούν να συσσωρευτούν σε υψηλά επίπεδα ετεροπλασμίας στους AD εγκέφαλους. Επιπλέον, σε αντίθεση με τις λιγότερο συχνές μεταλλάξεις στους «φυσιολογικούς» εγκέφαλους, οι AD μεταλλάξεις τροποποίησαν το κέντρο ελέγχου της μεταγραφής του mtDNA, και τις ρυθμιστικές περιοχές της αντιγραφής του. Τα αυξημένα επίπεδα μετάλλαξης του mtDNA στην AD, συνδέθηκαν με 50% μείωση της έκφρασης του μεταγράφου ND6. Ίσως, τα μειωμένα επίπεδα ND6 να είναι προϊόντα μιας επιγενετικής απάντησης στην μιτοχονδριακή ανωμαλία. Πρόσφατα, βρέθηκε ότι ένα μέλος της οικογένειας των αυξητικών παραγόντων των μυϊκών κυττάρων (MEF2), ο MEF2D, εισέρχεται μέσα στο μιτοχόνδριο και συνδέεται με το mtDNA μέσω του ND6. Ο MEF2D απαιτείται για την λειτουργία του ND6, και απώλεια του οδηγεί σε χαμηλά επίπεδα ND6, καθώς και σε χαμηλή παραγωγή ATP και αυξημένη παραγωγή H₂O₂. Ο MEF2D εντοπίζεται στους νευρώνες και απαιτείται για την φυσιολογική ανάπτυξη των νευρώνων, και την πλαστικότητα των συνάψεων. Πιθανόν, η έκφραση του MEF2D να παίζει σημαντικό ρόλο στην AD.

Υπάρχουν και άλλα στοιχεία που δείχνουν ότι ο υψηλός ρυθμός μετάλλαξης σωματικού mtDNA είναι χαρακτηριστικό των ασθενών με AD. Έγιναν πειράματα όπου μετρήθηκαν τα επίπεδα των μεταλλάξεων στο mtDNA σε λεμφοβλαστικές κυτταρικές σειρές, και βρέθηκε ότι στις κυτταρικές σειρές που λήφθηκαν από ασθενείς με AD τα επίπεδα των μεταλλάξεων ήταν πού υψηλότερα σε σχέση με αυτά που βρέθηκαν στις «φυσιολογικές» κυτταρικές σειρές (P. Mecocci, MD, PhD, M. C. Polidori, MD, T. Ingegneri, MD, A. Cherubini, MD, F. Chionne, MSc, R. Cecchetti, BSc and U. Senin, MD et al.199).

Οπότε, είτε τα μεταλλαγμένα mtDNAs εκφράζονται κατά προτίμηση στις λεμφοβλαστικές κυτταρικές σειρές, είτε ο υψηλός ρυθμός μεταλλάξεων διατηρείται σε αυτές τις κυτταρικές σειρές και συνεχώς προστίθενται νέες mtDNA μεταλλάξεις καθώς χάνονται οι παλαιότερες.

Οι παραπάνω mtDNA μεταλλάξεις συνδέονται με τον τροποποιημένο μεταβολισμό του Αβ. Οι σωματικές mtDNA μεταλλάξεις εμφανίζονται νωρίς στην ανάπτυξη, πολύ πιο πριν από την συσσώρευση του Αβ στον εγκέφαλο, οπότε η συσσώρευση αυτή δεν μπορεί να είναι υπεύθυνη για τα επίπεδα των μεταλλάξεων του mtDNA. Οπότε, πιθανώς τα αυξημένα επίπεδα των mtDNA μεταλλάξεων ευθύνονται για την αυξημένη συσσώρευση του Αβ.

Η συσχέτιση μεταξύ της συναπτικής δυσλειτουργίας και των μιτοχονδριακών ανωμαλιών κατά την πρόοδο της AD, δεν έχει μελετηθεί. Ωστόσο, έχει αναφερθεί ότι στην οικογενή AD το Αβ 42 επάγει την υπεροξειδωση των μεμβρανικών λιπιδίων στις συνάψεις και στους δένδριτες, έχοντας ως αποτέλεσμα την βλάβη των ΑΤΡασών των μεμβρανών, αλλά και στους μεταφορείς γλυκόζης και γλουταμικού. Αυτή η υπεροξειδωση διαταράσσει την ομοιόσταση της ενέργειας, επάγοντας τον εκφυλισμό

των συνάψεων. Στην AD, οι κύριες αιτίες του νευροεκφυλισμού δεν είναι σαφώς καθορισμένες, αλλά πιθανώς εμπεριέχουν αυξημένα επίπεδα οξειδωτικού stress και μειωμένου ενεργειακού μεταβολισμού. Τέτοιες μεταβολές έχουν δείχθει να εμποδίζουν την ομοιόσταση του νευρικού σβεςτίου και να συμμετέχουν στον νευροεκφυλισμό. Αυτά φαίνονται να είναι μερικά από τα κύρια γεγονότα στην AD. Πρωτεομική ανάλυση των μιτοχονδρίων AD εγκεφάλων, έχει δείξει επαγωγή κάποιων πρωτεϊνών που συσχετίζονται με τον μιτοχονδριακό ενεργειακό μεταβολισμό, όπως οι ANT, VDAC, και η κινάση της κρεατίνης (Sarah J. Schonberger, Paul F. Edgar, Robert Kydd, Richard L. M. Faull, Garth J. S. Cooper et al 2001). Αυτό ίσως αντανakλά μια αντισταθμιστική αύξηση της παραγωγής μιτοχονδριακής ενέργειας ως απάντηση στην χρόνια μιτοχονδριακή δυσλειτουργία. Έχει παρατηρηθεί μια παρόμοια επαγωγή της ισομορφής 1 της νουκλεοτιδικής μεταφοράσης της αδενίνης (Ant1), ως απάντηση στον τραυματισμό του εγκεφάλου. Οι Ant πρωτεΐνες εξάγουν το μιτοχονδριακό ATP στο κυττόςλιο προς ανταλλαγή κυττόςολικού ADP, και ρυθμίζουν το mtPTP (πόρος μετάβασης μιτοχονδριακής διαπερατότητας), καθώς και την έναρξη της απόπτωσης (Darren A. Talbot). Στον πληγωμένο εγκέφαλο, η έκφραση της Ant1 επάγεται στα αστροκύτταρα από αυξημένο TGFβ, δρώντας μέσω του SMAD μονοπατιού. Πιθανώς, η αυξημένη Ant1 αυξάνει την εξαγωγή του ATP για να διευκολύνει την επιδιόρθωση της κυτταρικής ζημιάς, καθώς και την πρόσληψη γλουταμικού. Εάν τα κύτταρα είναι αρκετά κατεστραμμένα, ώστε το αυξημένο ATP δεν λύνει το κυτταρικό πρόβλημα, η Ant συνεχίζει να παράγεται μέχρι να φτάσει η έκφραση της ένα μέγιστο όριο, το οποίο ενεργοποιεί το mtPTP και καταστρέφει το κύτταρο μέσω της απόπτωσης. Σε μικρές ηλικίες στον άνθρωπο, όπου τα κύτταρα είναι άφθονα αυτή η στρατηγική θα απάλλασσε τους ιστούς από ελαττωματικά κύτταρα τα οποία θα μπορούσαν να επηρεάσουν την νευρολογική λειτουργία. Ωστόσο, σε μεγαλύτερες ηλικίες, όπου ο αριθμός των κυττάρων περιορίζεται, η συνεχής απώλεια κυττάρων θα επηρέαζε σημαντικά την σωστή λειτουργία του εγκεφάλου.

Σε μια έρευνα που έγινε σε ποντίκια, με στοχευμένη αποσιώπηση μιτοχονδριακών γονιδίων που εκφράζονται στον πυρήνα, εντοπίστηκε εκφυλισμός των αξόνων των φλοιονωτιαίων και των ισχνών δεμάτων (Douglas C. Wallace). Τα ποντίκια με τα αποσιωπημένα γονίδια. εμφάνισαν εκφυλισμό στους νωτιαίους και στους περιφερικούς άξονες. Μιτοχονδριακές μορφολογικές ανωμαλίες εμφανίστηκαν στην συναπτική σχισμή και σε περιφερικές περιοχές των αξόνων αρκετά πριν την εμφάνιση του εκφυλισμού. Έτσι διαπιστώθηκε ότι η αποτυχία της μιτοχονδριακής λειτουργίας μπορεί να επηρεάσει την αξονική μεταφορά και να προκαλέσει εκφυλισμό των αξόνων. Πλέον, γνωρίζουμε καλά πως η απώλεια των συνάψεων και των συναπτικών πρωτεϊνών είναι άμεσα υπεύθυνη για την εξασθένηση των γνωστικών λειτουργιών σε ασθενείς με AD, και η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία στους ασθενείς με AD είναι καλά τεκμηριωμένη. Είναι γνωστό ότι παράγωγα των μεταλλαγμένων APP, όπως τα ενδονευρωνικά διαλυτά μονομερή και ολιγομερή Αβ, προκαλούν αλλαγές στην μακροπρόθεσμη αύξηση της τοξικότητας, η οποία είναι υπεύθυνη για την εξασθένηση των γνωστικών λειτουργιών. Είναι πιθανό, τα ελαττωματικά μιτοχόνδρια στους AD νευρώνες να μην κινούνται αποτελεσματικά και να μην παρέχουν το απαραίτητο κυτταρικό ATP στις νευρικές απολήξεις, και να μην προωθείται η φυσιολογική νευρική επικοινωνία. Τα χαμηλά επίπεδα κυτταρικού

ΑΤΡ στις νευρικές απολήξεις, πιθανόν να οδηγούν στην απώλεια των συνάψεων και των συναπτικών λειτουργιών.

Πολλές μιτοχονδριακές ασθένειες, όπως οι μιονευρογενικές εγκεφαλοπάθειες και οι μιτοχονδριακές εγκεφαλομυοπάθειες έχουν συνδεθεί με αυξημένο αριθμό μεταλλάξεων στο tRNA. Το tRNA παίζει ρόλο κλειδί κατά την μετάφραση και είναι σημαντικό να παρατηρήσουμε μεταλλάξεις οι οποίες θα οδηγήσουν σε σημαντικά λάθη κατά την σύνθεση των πρωτεϊνών και πιθανώς σε κάποια δυσλειτουργία.

tRNA

Από το mtDNA κωδικοποιούνται 37 γονίδια, τα 24 από τα οποία κωδικοποιούν τη μεταφραστική μηχανή του (22tRNAs, 2 rRNAs). Παθογόνες σημειακές μεταλλάξεις στα μιτοχονδριακά γονίδια των tRNAs είναι υπεύθυνες για την πλειοψηφία των μιτοχονδριακών ασθενειών παρόλο που αντιπροσωπεύουν μόνο το 5-10% του συνολικού mtDNA. Η σχέση γονότυπου-φαινότυπου των ασθενειών που προκαλούνται από μεταλλάξεις των γονιδίων των tRNAs είναι εξαιρετικά πολύπλοκη. Η γενετική ετερογένεια μεταξύ κυττάρων και ιστών φαίνεται να κατέχει μεγάλη σημασία στην παθογένεια της νόσου. Αν και το mtDNA είναι μητρικής κληρονομιάς, η διαβίβαση των μιτοχονδριακών παθήσεων και η σοβαρότητά τους είναι δύσκολο να προβλεφθούν.

Μεταλλάξεις στα γονίδια tRNA έχουν συσχετιστεί με πάρα πολλά κλινικά χαρακτηριστικά, πολλά από τα οποία συναντώνται και σε άλλες μορφές μιτοχονδριακών παθήσεων. Γενικά, υπάρχει μικρή συσχέτιση μεταξύ των κλινικών χαρακτηριστικών και του γονότυπου του tRNA. Μεταλλάξεις σε διαφορετικά σημεία στο ίδιο γονίδιο tRNA μπορούν να προκαλέσουν αρκετά διαφορετικά κληρονομικά σύνδρομα, όμως και η ίδια σημειακή μετάλλαξη μπορεί να οδηγήσει σε πολλούς διαφορετικούς κλινικούς φαινότυπους. Πιθανές παθογόνες μεταλλάξεις έχουν εντοπιστεί και στα 22 mt-tRNAs. Υπάρχει τεράστια ποικιλία στους προκύπτοντες φαινότυπους, αν και ο τρόπος με τον οποίο ο γονότυπος σχετίζεται με το φαινότυπο είναι ακόμα άγνωστος. Πολλές από τις διαφορές αυτές αποδίδονται στην ετεροπλάσμία αλλά οι βασικοί μοριακοί μηχανισμοί μέσω των οποίων οι μεταλλάξεις προκαλούν ασθένειες είναι επίσης άγνωστοι. Έχουν εντοπιστεί πολλές διαφορετικές πιθανές επιπτώσεις των μεταλλάξεων, μεταξύ των οποίων η παρεμπόδιση της ωρίμανσης του 3'-άκρου, της αμινοακυλίωσης, της πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων καθώς και προβλήματα με την αναγνώριση του κωδικονίου. Το μόνο κοινό χαρακτηριστικό είναι η απώλεια της σταθερότητας του mt-tRNA. Η διαβίβαση των ασθενειών που οφείλονται σε τέτοιου είδους μεταλλάξεις είναι επίσης άγνωστη, με παράγοντες όπως ο τύπος της μετάλλαξης και η θέση της εντός του tRNA να είναι δυνητικά σημαντική.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Υλικά

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Αγαρόζη

Αιθανόλη

Ακρυλαμίδη και bis-Ακρυλαμίδη

Αλατούχο κιτρικό νάτριο (SSC 1x)

Βορο-υδρίδιο του νατρίου

Βρωμιούχο αιθίδιο

Γλυκερόλη 50x

Διάλυμα έκλουσης (Elution buffer)

Διάλυμα πλύσης (Wash buffer)

Διάλυμα πρόσδεσης (Binding buffer)

Διάλυμα MgCl

Εκκινητές

Ισοπροπανόλη

Μπλε βρωμοφαινόλης

Νιτρικός Αργυρος

Οξικό Νάτριο

Οξικό οξύ, CH₃COOH

Πρωτεΐνάση K 10U/ml

Υπερθειικό αμμώνιο 20%

Φαινόλη

Φορμαλδεΐδη

Φορμαμίδιο

Χλωροφόρμιο

DNTPs

Taq DNA πολυμεράση

TEMED

Tris-Borate-EDTA 0.5x/10x

10x ρυθμιστικό διάλυμα υψηλής απόδοσης για PCR με Mg⁺⁺

ΣΥΣΚΕΥΕΣ

Αναδευτήρας

Απαγωγός

Διαφανοσκόπιο UV

Διηθητικό Χαρτί

Καλούπι για παρασκευή gel

Κλίβανος

Κωνική Φιάλη

Ογκομετρικός κύλινδρος

Πιπέτες και tips

Ποτήρι ζέσεως

Συσκευή ηλεκτροφόρησης

Φυγόκεντρος

Φωτόμετρο

Eppendorfs

Parafilm

PureLink Spin Column

Vortex

Μέθοδοι

Για την παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν δείγματα ολικού αίματος από 50 άτομα ασθενείς με τη νόσο Alzheimer και από 105 υγιή άτομα τα οποία αποτέλεσαν την ομάδα ελέγχου

Απομόνωση του DNA

1. Αρχικά αφήνουμε τα δείγματα να ξεπαγώσουν σε θερμοκρασία δωματίου. Ανακινούμε ελαφρά κάθε δείγμα ώστε να μην πηξει το αίμα.
2. Όταν ξεπαγώσουν, μεταφέρουμε 0,5 ml αίματος σε σωλήνα eppendorf (2ml) και προσθέτουμε 1ml SSC 1x. Ακολουθεί ανάδευση στη συσκευή vortex και φυγοκέντρηση στις 13000 rpm στους 4° C για 3 min.
3. Απομακρύνουμε το υπερκείμενο και προσθέτουμε εκ νέου 1ml SSC1x. Ακολουθεί ανάδευση στη συσκευή vortex και φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 4 min.
4. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και προσθέτουμε 0,5 ml CH₃COONa 0,2M, 50 μl SDS 5% και 5 μl πρωτεΐνάση K. Αναδεύουμε τους σωλήνες στο vortex και ακολουθεί επώαση για 1h στους 55° C
5. Έπειτα, προσθέτουμε 0,5 ml φαινόλη και 0,5 ml χλωροφόρμιο, αναδεύουμε στο vortex και φυγοκεντρούμε 10 λεπτά στους 4° C στις 13000 rpm. Δημιουργούνται 3 στρώσεις, μια ανώτερη υδατική φάση, μια κατώτερη οργανική φάση και μία ενδιάμεση στοιβάδα μεταξύ των δύο προηγούμενων φάσεων. Έτσι, διαχωρίζουμε τη διαλυτή φάση που περιέχει το DNA από την οργανική

6.Μεταφέρουμε το υπερκείμενο σε νέο erpendorf και προσθέτουμε 1ml χλωροφόρμιο, αναδεύουμε στο vortex και φυγοκεντρούμε για 10 λεπτά στους 4° C στις 13000 rpm.

7.Μεταφέρουμε το υπερκείμενο σε νέα erpendorf και προσθέτουμε 1ml ισοπροπανόλης. Ακολουθεί ανάδευση των δειγμάτων και παραμονή στους -20° C για 15 λεπτά ή όλη την νύχτα. Ακολουθεί φυγοκέντρωση για 20 λεπτά στις 13000 rpm, στους 4° C.

8.Αφαιρούμε το υπερκείμενο και προσθέτουμε 1ml διαλύματος παγωμένης αιθανόλης 70%. Φυγοκεντρούμε για 10 λεπτά στους 4° C στις 13000 rpm.

9.Αφαιρούμε το υπερκείμενο και τοποθετούμε τα δείγματα στον κλίβανο για ξήρανση για 1 ώρα στους 55° C. Εξατμίζεται η αιθανόλη, και το DNA μένει στα erpendorfs λόγω της προηγούμενης φυγοκέντρωσης.

10. Στεγνώνει το DNA, και προσθέτουμε 100 µl ddH₂O για επαναδιάλυση του DNA.

11.Αφήνουμε τα δείγματα σε θερμοκρασία δωματίου για να επαναδιαλυθούν overnight. Μπορούν να αποθηκευτούν στους -20° C για μελλοντική χρήση.

12. Για να βεβαιωθούμε ότι έχει πραγματοποιηθεί επιτυχώς η απομόνωση του DNA πραγματοποιούμε ποιοτική και ποσοτική ανίχνευση. Ηλεκτροφορούμε 2µl από το επαναδιαλυμένο δείγμα μας σε πηκτή αγαρόζης πυκνότητας 1% w/v, και φωτομετρούμε 1µl δείγματος διαλυμένο σε 49 µl ddH₂O.

Το DNA που λήφθηκε μετά τη μέτρηση έχει μέση συγκέντρωση 50 ng/µl.

Παρασκευή των αντιδραστηρίων

Τα stock διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση του DNA είναι τα εξής:

20x SSC(3M NaCl, 0,3 M sodium citrate, pH 7.0) : Προσθήκη 175,4 g NaCl και 88,2 gr Sodium citrate dehydrate σε 500 ml ddH₂O. Ρύθμιση του pH του διαλύματος στο 7.0 με σταγόνες HCl. Τελικός όγκος διαλύματος 1 lt. Ακολουθεί αποστείρωση. Το διάλυμα SSC 1x που χρησιμοποιήθηκε στην απομόνωση του DNA προέκυψε από την αραιώση του παραπάνω διαλύματος.

3M Sodium Acetate (NaOAc): Διαλύονται 40,81 gr sodium citrate σε 80 ml ddH₂O. Ρυθμίζουμε το pH του διαλύματος στο 5.2 με σταγόνες CH₃COOH. Συμπληρώνουμε με ddH₂O ως τα 100ml. Ακολουθεί αποστείρωση. Για την απομόνωση του DNA χρησιμοποιήθηκε Sodium Acetate 0,2 M το οποίο προέκυψε από την αραιώση του πυκνού διαλύματος.

10% SDS: Αναμειγνύονται 10 gr Electrophoresis grade SDS σε 90 ml ddH₂O.Ανάδευση στους 68° C για επιτάχυνση της διάλυσης. Ρυθμίζουμε το pH του διαλύματος στο 7,2 προσθέτοντας σταγόνες HCl. Προσθήκη ddH₂O ώστε να έχουμε τελικό όγκο 100 ml.Με αραιώση, προέκυψε το 5% SDS που χρησιμοποιήθηκε

Ρόλος των αντιδραστηρίων

EDTA 0,5M : Αντιπηκτικός παράγοντας που αποτρέπει την πήξη του αίματος και την συγκόλληση των ερυθροκυττάρων. Για αυτό το λόγο το αίμα των ασθενών με Alzheimer μετά τη λήψη του διατηρήθηκε σε σωληνάκια falcon των 15 ml που περιέχουν 0,5 ml EDTA 0,5 M.

SSC: Ήπιο διάλυμα με λυτικό ρόλο. Καταστρέφει τις κυτταρικές μεμβράνες ώστε να μπορέσουν τα επόμενα διαλύματα να επιδράσουν στις πυρηνικές μεμβράνες.

NaOAc: Χρησιμοποιείται για την κατακρήμνιση του DNA.

SDS: Ιονικό απορρυπαντικό που διασπά την πυρηνική μεμβράνη και γαλακτωματοποιεί τα λιπίδια και τις πρωτεΐνες του κυττάρου. Παρεμβαίνει στις πολικές αλληλεπιδράσεις που συγκρατούν την δομή της κυτταρικής μεμβράνης. Το αποτέλεσμα είναι να σχηματίζονται πολύπλοκες δομές των λιπιδίων και των πρωτεϊνών οι οποίες κατακρημνίζονται, προστατεύοντας έτσι το DNA από τις νουκλεάσες.

Πρωτεϊνωση K 20ng/μl : Προκαλεί πέψη των πρωτεϊνών, όπως οι νουκλεάσες που αποικοδομούν το DNA. Το ένζυμο παραμένει ενεργό κατά την παρουσία διάφορων χημικών ουσιών που αποδιατάζουν πρωτεΐνες όπως το SDS

Φαινόλη: Αποδιατάσσει τις πρωτεΐνες και διαχωρίζει τα λιπίδια, τις πρωτεΐνες και τα νουκλεϊκά οξέα κατά την εκχύλιση του DNA. Το διάλυμα φαινόλης που χρησιμοποιείται είναι εξισορροπημένο σε pH>7 ώστε το DNA να κατανέμεται στην υπερκείμενη υδατική φάση. Η προσθήκη του χλωροφόρμιου στη συνέχεια έχει ως στόχο τον καλύτερο διαχωρισμό των φάσεων λόγω μεγάλης πυκνότητας. Προκαλεί επίσης τη μετουσίωση των πρωτεϊνών και την απομάκρυνση της διαλυμένης φαινόλης από την υδατική φάση. Η ισοαμυλική αλκοόλη μειώνει τον αφρό και σταθεροποιεί την ενδιάμεση φάση μεταξύ της υδατικής και της οργανικής, όπου συλλέγονται οι πρωτεΐνες.

Ισοπροπανόλη-Παγωμένη Αιθανόλη 70%: Το DNA κατακρημνίζεται με ισοπροπανόλη και στη συνέχεια ακολουθεί πλύση με αιθανόλη 70%. Το DNA, λόγω της ιονικής του φύσης, παραμένει αδιάλυτο στους συγκεκριμένους οργανικούς διαλύτες.

Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)

Η μέθοδος βασίζεται στην επαναλαμβανόμενη αντιγραφή ενός τμήματος DNA με τη βοήθεια μιας ειδικής θερμοανθεκτικής πολυμεράσης και δύο ολιγονουκλεοτιδικών εκκινητών σχεδιασμένων σε γνωστές αλληλουχίες. Έτσι, ένα δείγμα DNA αναμειγνύεται με τα τέσσερα δεοξυριβονουκλεοτίδια, τα δύο εναρκτήρια ολιγονουκλεοτίδια (εκκινητές) και την ειδική DNA πολυμεράση. Το δείγμα θερμαίνεται στους 94-95°C για να αποδιαταχθεί το DNA και ακολούθως ψύχεται στους 50-65°C για να υβριδοποιηθούν οι εκκινητές με τις αποδιαταγμένες αλυσίδες του DNA. Ακολουθεί πολυμερισμός στους 72°C και τα παραπάνω βήματα

επαναλαμβάνονται πολλές φορές έως ότου συντεθεί αρκετή ποσότητα του επιθυμητού προϊόντος.

Μία αντίδραση PCR πρέπει να περιέχει τα εξής συστατικά:

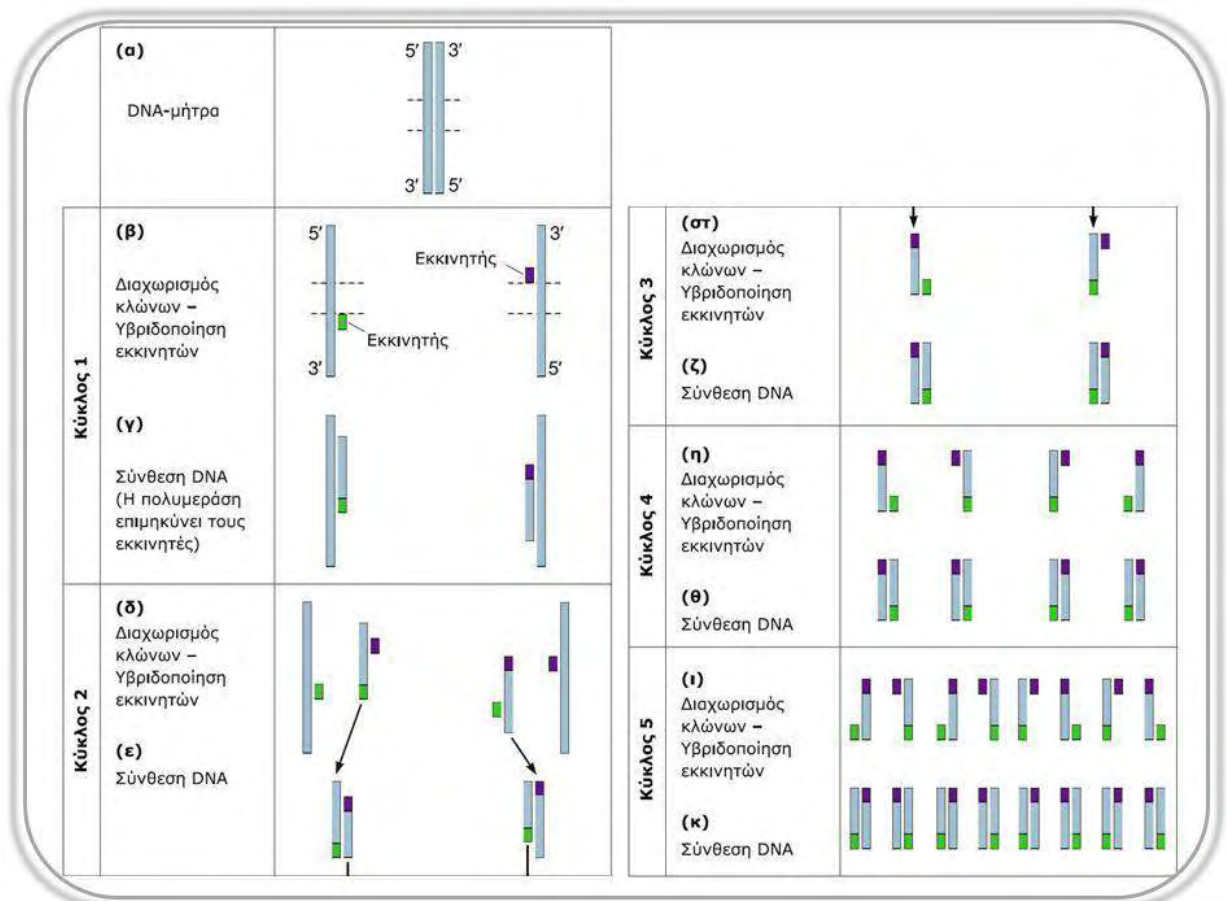
1. Μια ειδική DNA πολυμεράση, την Taq DNA πολυμεράση, η οποία έχει απομονωθεί από το θερμοανθεκτικό βακτήριο *Thermus aquaticus* (Saiki et al., 1988) και επιτρέπει τη χρησιμοποίηση υψηλών θερμοκρασιών στα βήματα υβριδισμού και επιμήκυνσης. Παρουσιάζει βέλτιστη θερμοκρασία πολυμερισμού 75-80°C και ταχύτητα σύνθεσης 150 νουκλεοτίδια / μόριο ενζύμου το δευτερόλεπτο. Η Taq πολυμεράση δεν περιέχει 3' ^ 5' δράση εξωνουκλεάσης και έτσι στο τελικό προϊόν παραμένουν νουκλεοτίδια που έχουν εισαχθεί λανθασμένα. Επίσης, υψηλή συγκέντρωση ιόντων Mg⁺⁺ (>10 mM), νουκλεοτιδίων (>4-6 mM) ή/και μονοσθενών ιόντων Na⁺, K⁺ (>50 mM) αποτελούν ανασταλτικούς παράγοντες για τη δράση της.
2. Ένα ζεύγος συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων, τα οποία αποκαλούνται εκκινητές και καθορίζουν τα όρια του τμήματος DNA που θα ενισχυθεί. Η συγκέντρωση των εκκινητών καθορίζεται συνήθως μεταξύ 0.4-0.6 μ M ενώ μεγαλύτερες συγκεντρώσεις μπορούν να προκαλέσουν λανθασμένη έναρξη, ενίσχυση μη ειδικών προϊόντων και δημιουργία διμερών (primer-dimer) που χρησιμοποιούνται επίσης ως DNA στόχος, ελαττώνοντας έτσι τη σύνθεση ειδικών προϊόντων. Τα ολιγονουκλεοτίδια πρέπει να είναι αντιπαράλληλου προσανατολισμού και καθένα συμπληρωματικό προς τη μία αλυσίδα του υπό μελέτη DNA. Όσον αφορά στο σχεδιασμό των εκκινητών πρέπει το μήκος τους να κυμαίνεται μεταξύ 18-24 νουκλεοτιδίων, η κατανομή των νουκλεοτιδίων να είναι τυχαία και η περιεκτικότητα σε G/C να είναι μεταξύ 40-60%. Επίσης πρέπει να αποφεύγονται περιοχές με πολυπυρίνες ή πολυπυριμιδίνες καθώς και επαναλήψεις νουκλεοτιδίων, να μην εμφανίζουν συμπληρωματικότητα στο 3' ή 5' άκρο τους, ώστε να αποφεύγεται η χρησιμοποίησή τους ως υπόστρωμα και συνεπώς η παραγωγή μη ειδικών προϊόντων (primer- dimer), να μην περιέχουν εσωτερικές παλίνδρομες αλληλουχίες, να μην υπάρχουν επαναλήψεις 3 ή περισσότερων C ή G στο 3' άκρο, διότι μπορεί να χρησιμεύουν για λανθασμένη έναρξη σε περιοχές DNA που είναι πλούσιες σε G+C.
Οι εκκινητές που χρησιμοποίησα ήταν για το γονίδιο της φαινυλαλανίνης (Phe,P) :

FwPhe: 5'-CAACCAAACCCCAAAGACA-3'
RevPhe: 5'-GGATGCTTGCATGTGTAATC-3'

3. Κατάλληλο διάλυμα ελεύθερων 5' τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs: dATP, dTTP, dCTP, dGTP) σε συγκέντρωση 0.2 mM το καθένα, ώστε να περιοριστεί η πιθανότητα εισαγωγής λανθασμένου νουκλεοτιδίου. Η εισαγωγή λανθασμένων νουκλεοτιδίων είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του κάθε νουκλεοτιδίου στην αντίδραση. Έλλειψη ισορροπίας στο μείγμα των dNTPs μειώνει επίσης την πιστότητα της Taq πολυμεράσης
4. Κατάλληλη συγκέντρωση διαλύματος MgCl₂. Η παρουσία ιόντων Mg⁺⁺ είναι απαραίτητη για τη δράση της πολυμεράσης. Τα ιόντα Mg⁺⁺ σχηματίζουν διαλυτά σύμπλοκα με τα dNTPs ώστε να δημιουργήσουν το πραγματικό υπόστρωμα που αναγνωρίζει η πολυμεράση. Η συγκέντρωση των ελευθέρων

ιόντων Mg^{++} εξαρτάται από τις συγκεντρώσεις των ενώσεων που δεσμεύουν το ιόν μεταξύ των οποίων είναι τα dNTPs, το EDTA και φωσφορικά ιόντα.

5. Ειδικό ρυθμιστικό διάλυμα (buffer) της Taq πολυμεράσης, ώστε να διατηρούνται σταθερά το pH και η ιονική ισχύς του περιβάλλοντος της αντίδρασης, τα οποία παρέχονται από την παρουσία Tris-HCl και NaCl ή KCl, αντίστοιχα.
6. Τον στόχο (μήτρα) DNA, η ποσότητα του οποίου εξαρτάται από τον αριθμό των αντιγράφων του. Στις βέλτιστες συνθήκες, η τεχνική PCR μπορεί θεωρητικά να ενισχύσει την αλληλουχία στόχο από ένα μόνο αντίγραφο DNA. Παρόλα αυτά σε μία τυπική αντίδραση η ποσότητα DNA που χρησιμοποιείται εξαρτάται από το μέγεθος του γονιδιώματος του υπό μελέτη οργανισμού και αντιστοιχεί σε αρκετές χιλιάδες αντίγραφα στόχου. Επίσης, το DNA πρέπει να μην είναι κατεστραμμένο στην περιοχή του στόχου, ώστε να υπάρχει η δυνατότητα να ενισχυθεί αυτή η περιοχή και να είναι υψηλής καθαρότητας χωρίς φαινόλες, πολυσακχαρίτες, απορρυπαντικά, EDTA ή άλλα χημικά που μπορεί να έχουν ανασταλτική δράση.



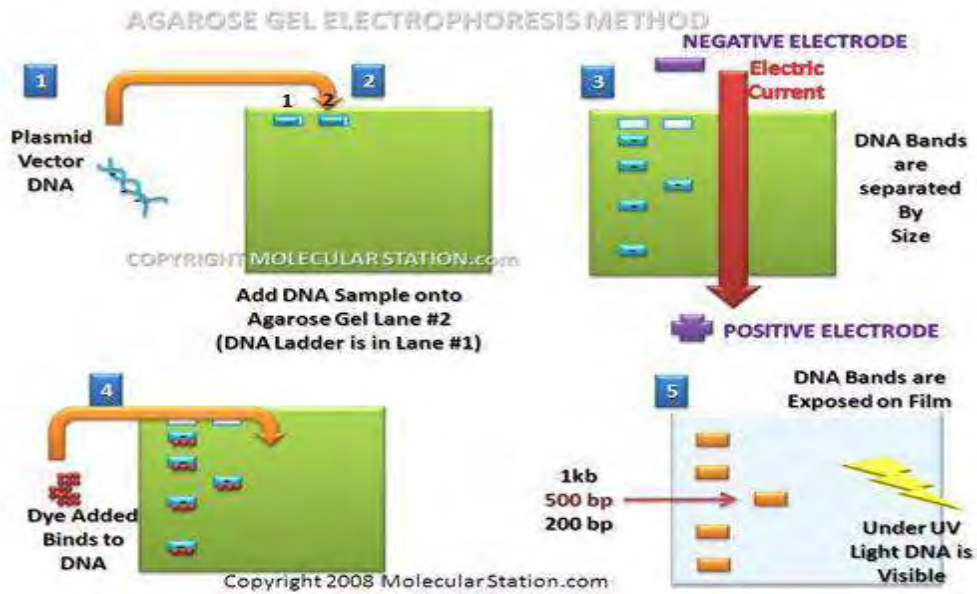
Εικόνα 5: Η εκθετική αύξηση των αντιγράφων DNA κατά την PCR Πηγή: Εργαστηριακός Οδηγός Γενετικής, Θεολογία Σαραφίδου, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ DNA ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ

Η ηλεκτροφόρηση του DNA σε πήκτωμα αγαρόζης χρησιμοποιείται κυρίως για το διαχωρισμό μορίων δίκλωνου DNA σε ουδέτερο pH (π.χ. ύστερα από κατάτμηση με ενδονουκλεάσες περιορισμού για τη χαρτογράφηση κλωνοποιημένων τμημάτων ή τη μεταφορά κατά Southern και την υβριδοποίηση καθώς και για την ανάλυση PCR προϊόντων όπως στη μοριακή διάγνωση ασθενειών). Υπό αυτές τις συνθήκες (ουδέτερο pH) το DNA φέρει αρνητικό φορτίο λόγω των φωσφορικών του ομάδων. Επομένως, αν τοποθετηθούν τμήματα DNA στην κάθοδο (-) θα κινηθούν προς την άνοδο (+).

Παρασκευή 1% πηκτώματος αγαρόζης και ηλεκτροφόρηση

1. Σε κωνική φιάλη προσθέτουμε τις επιθυμητές ποσότητες σκόνης αγαρόζης και ρυθμιστικού διαλύματος. Για τη δημιουργία 100 ml πηκτώματος, αναμιγνύουμε 10 ml stock διαλύματος 5X TBE σε 90 ml απιονισμένο νερό και προσθέτουμε 1 g αγαρόζης.
 2. Θερμαίνουμε ανακινώντας μέχρις ότου διαλυθεί η αγαρόζη (χρειάζεται να βράσει). Στη συνέχεια αφήνουμε να κατεβεί η θερμοκρασία περίπου στους 50°C (κωνική ανεκτή στην παρειά) ώστε το ζεστό διάλυμα να μην επηρεάσει την πλαστική βάση.
 3. Προσθέτουμε βρωμιούχο αιθίδιο (από διάλυμα 10 mg/ml που φυλάσσεται σε σκούρο μπουκάλι στο ψυγείο) έτσι ώστε να έχουμε τελική συγκέντρωση περίπου 0.5 mg/ml. Το βρωμιούχο αιθίδιο είναι ισχυρό μεταλλαξιγόνο και δεν πρέπει να έρθει σε επαφή με το δέρμα σας.
 4. Αποχύνουμε προσεκτικά το ζεστό διάλυμα της αγαρόζης στη βάση (μήτρα πολυμερισμού) όπου θα στερεοποιηθεί το πήκτωμα. Προηγούμενα έχουμε τοποθετήσει με κάθετη διεύθυνση “χτενάκια” ώστε να προκύψουν οι ειδικές θέσεις “πηγαδάκια” φόρτωσης των δειγμάτων.
 5. Όταν στερεοποιηθεί το διάλυμα τα “χτενάκια” απομακρύνονται και η βάση τοποθετείται στην ηλεκτροφορητική συσκευή, η οποία είναι πληρωμένη με διάλυμα ηλεκτροφόρησης (αντίστοιχο με αυτό που έχει κατασκευαστεί το πήκτωμα) τόσο ώστε να επικαλύπτει το πήκτωμα.
- Στα προς ηλεκτροφόρηση δείγματα προσθέτουμε χρωστική που περιέχει 5-10% γλυκερόλη και 0.025% μπλε της βρωμοφαινόλης και/ή κυανούν της ξυλόλης. Η ποσότητα που μπορούμε να φορτώσουμε εξαρτάται από το μέγεθος των δοντιών της χτένας, στην περίπτωσή μας γύρω στα 15 μl. Πρέπει να φροντίσουμε η συγκέντρωση του DNA να είναι μικρή ώστε ο διαχωρισμός να είναι καλός.
6. Για τον προσδιορισμό του μεγέθους των ζωνών του DNA στο πήκτωμα παράλληλα με τα προς εξέταση δείγματα ηλεκτροφορείται το κατάλληλο πρότυπο μεγεθών DNA
 7. Κατά την ηλεκτροφόρηση μπορούμε να παρακολουθούμε τον διαχωρισμό των ζωνών του DNA με λάμπα υπεριώδους φωτός. Χρησιμοποιώντας υπεριώδες φως μπορούμε να φωτογραφίσουμε το πήκτωμα μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης.



Εικόνα 6: Η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης

Πηγή: <http://withfriendship.com/user/cyborg/agarose-gel-electrophoresis.php>

Ανάλυση Πολυμορφισμών Διαμόρφωσης Μονόκλωνου DNA (SSCP)

Μία μέθοδος για την σάρωση τμημάτων DNA, με μεγάλη διακριτική ικανότητα και ταυτόχρονα ιδιαίτερα απλή, γρήγορη και οικονομική είναι η ανάλυση πολυμορφισμών διαμόρφωσης μονόκλωνου DNA (Single Strand Conformational Polymorphism, SSCP). Η μέθοδος στηρίζεται στην διαφορετική δομή και συνεπώς διαφορετική κινητικότητα σε πήκτωμα, που λαμβάνουν μονόκλινα μόρια DNA που διαφέρουν μεταξύ τους έστω και κατά μόνο μία βάση. Έτσι, τμήματα DNA του ίδιου γονιδίου που έχουν παραχθεί με PCR, με υπόστρωμα γενωμικό DNA από διαφορετικά άτομα και που φέρουν μεταλλαγές σε διαφορετικές θέσεις, θα έχουν και διαφορετική κινητικότητα κατά την ηλεκτροφόρηση και άρα θα είναι δυνατή η διάκρισή τους. Στην SSCP, η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε πήκτωμα ακρυλαμίδης, ένα μονομερές το οποίο πολυμερίζεται σε μακριές αλυσίδες παρουσία ελεύθερων ριζών οι οποίες με τη σειρά τους διασυνδέονται παρουσία του N,N – μεθυλεν-δισ-ακρυλαμίδη, ενός μορίου διασυνδέτη και έτσι σχηματίζεται μία πορώδης πηκτή. Τα δείγματα-προϊόντα PCR πριν την ηλεκτροφόρησή τους υφίστανται αποδιάταξη με θέρμανση ώστε να σχηματιστούν οι μονόκλωνες αλυσίδες ενώ στη συνέχεια η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται απουσία αποδιατακτικού μέσου ώστε

να επιτρέπονται μερικώς οι ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις. Έτσι, η κινητικότητα του μορίου δεν εξαρτάται μόνο από το μέγεθός του αλλά και από την τριτοταγή δομή του που με τη σειρά της καθορίζεται από την αλληλουχία του κλώνου. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης πραγματοποιείται χρώση του πηκτώματος με διάλυμα νιτρικού αργύρου που έχει μεγάλη διακριτική ικανότητα ανιχνεύοντας ποσότητες της τάξεως των λίγων νανογραμμαρίων.

Καθώς η διαμόρφωση ενός μονόκλωνου τμήματος DNA εξαρτάται από διάφορες παραμέτρους του πηκτώματος και της ηλεκτροφόρησης, αυτές πρέπει να λαμβάνονται υπ' όψιν κατά την εφαρμογή της SSCP. Έτσι, η θερμοκρασία κατά την οποία πραγματοποιείται η ηλεκτροφόρηση είναι κρίσιμη καθώς υψηλές θερμοκρασίες λόγω αποδιατακτικών επιδράσεων, μπορούν να μειώσουν το επίπεδο της τριτοταγούς δομής με αποτέλεσμα τη μείωση της διακριτικής ικανότητας. Επίσης, επίδραση στη διακριτική ικανότητα έχει το μέγεθος των πόρων του πηκτώματος που επιλέγεται κυρίως βάση του μεγέθους του DNA και καθορίζεται τόσο από την συγκέντρωσή του πηκτώματος όσο και από την αναλογία της N,N – μεθυλεν-δισ-ακρυλαμίδης. Όσον αφορά το μέγεθος του DNA υπό ανάλυση, αυτό επηρεάζει αντιστρόφως ανάλογα την διακριτική ικανότητα, παρατηρώντας δηλαδή σταδιακή μείωσή της όσο αυξάνει το μήκος του προϊόντος. Γενικά, είναι προτιμότερο να χρησιμοποιούνται τμήματα λίγων εκατοντάδων ζευγών βάσεων, συνθήκη που ρυθμίζεται εύκολα με βάση τον σχεδιασμό των εκκινητών κατά την PCR.

Το αρνητικό της μεθόδου είναι ότι κατά την ηλεκτροφόρηση κάποια μόρια επανασηματίζουν δίκλωνη αλυσίδα με αποτέλεσμα να εμφανίζονται επιπλέον ζώνες ενώ συνήθως αναλύονται ταυτόχρονα πολλαπλά δείγματα που είναι πιθανόν να φέρουν πολυμορφισμούς σε διαφορετικές θέσεις ή και σε περισσότερες του ενός, με συνέπεια τα τελικά πρότυπα των ζωνών και η σύγκρισή τους να είναι αρκετά πολύπλοκη. Παρόλα αυτά και εφόσον έχει πραγματοποιηθεί βελτιστοποίηση της PCR ώστε να μην προκύπτουν παραπροϊόντα τα οποία τελικά θα δώσουν επιπλέον ζώνες κατά τη χρώση και με προσεκτική ανάλυση των αποτελεσμάτων, η μέθοδος είναι ιδιαίτερα αποτελεσματική και με μεγάλη γενικά διακριτική ικανότητα. Επιπλέον, είναι δυνατή η ομαδοποίηση των δειγμάτων που εμφανίζουν ταυτόσημο πρότυπο έτσι ώστε να πραγματοποιηθεί αλληλούχηση σε ένα μόνο από αυτά, μειώνοντας έτσι σημαντικά το κόστος του πειράματος.

Παρασκευή πηκτώματος ακρυλαμίδης

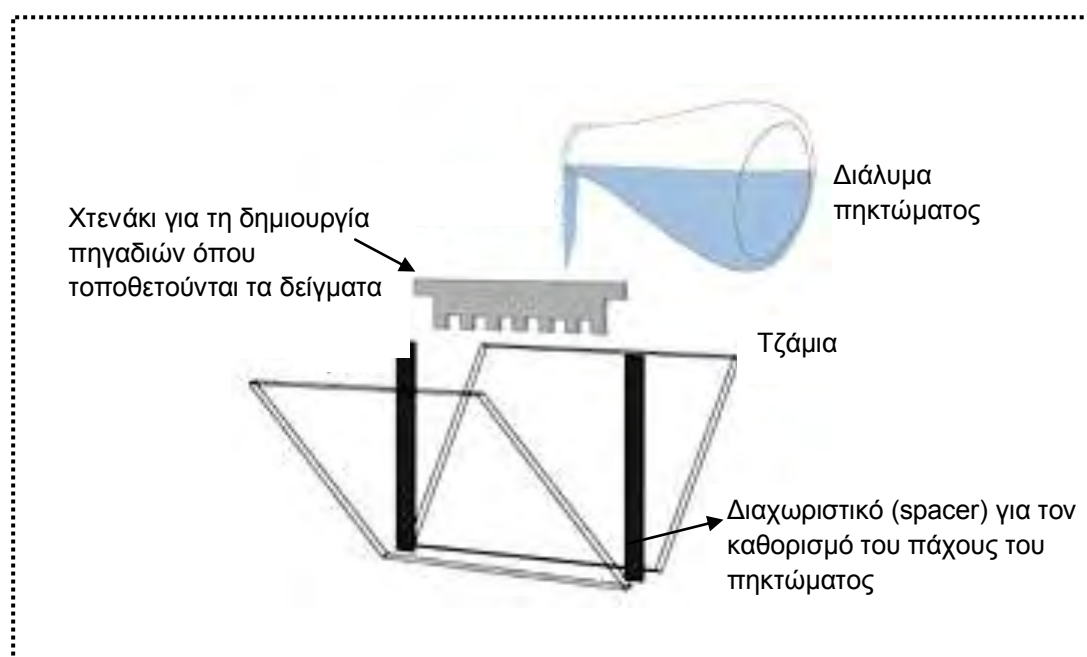
Σε ποτήρι ζέσεως παρασκευάζουμε το διάλυμα ακρυλαμίδης- N,N – μεθυλεν-δισ-ακρυλαμίδης τελικής συγκέντρωσης 38,5% (37,5gr ακρυλαμίδης και 1gr N,N – μεθυλεν-δισ-ακρυλαμίδης σε H₂O σε τελικό όγκο 100ml). Η διάλυση γίνεται στον μαγνητικό αναδευτήρα αφού έχουμε τοποθετήσει μέσα στο διάλυμα ένα μαγνητάκι.

Σε ποτήρι ζέσεως παρασκευάζουμε το διάλυμα του πηκτώματος, ο όγκος του οποίου εξαρτάται από την συσκευή που χρησιμοποιούμε. Οι τελικές συγκεντρώσεις των συστατικών του είναι: 10% διαλύματος ακρυλαμίδης (εξαρτάται από το μέγεθος των τμημάτων DNA που θα ηλεκτροφορηθούν), 0,5xTBE, 5% γλυκερόλη. Για τον πολυμερισμό του πηκτώματος προσθέτουμε TEMED (που καταλύει το σχηματισμό ελεύθερων ριζών από το APS) και APS (που ξεκινάει τον πολυμερισμό) σε τελική συγκέντρωση 0,1% και τα δύο.

0,5xTBE: Παρασκευάζεται με αραιώση πυκνότερου διαλύματος 10xTBE (0,9M Trizma base, 0,9M βορικό οξύ, 20mM EDTA pH 8.0)

APS: Παρασκευάζεται ως διάλυμα 20%

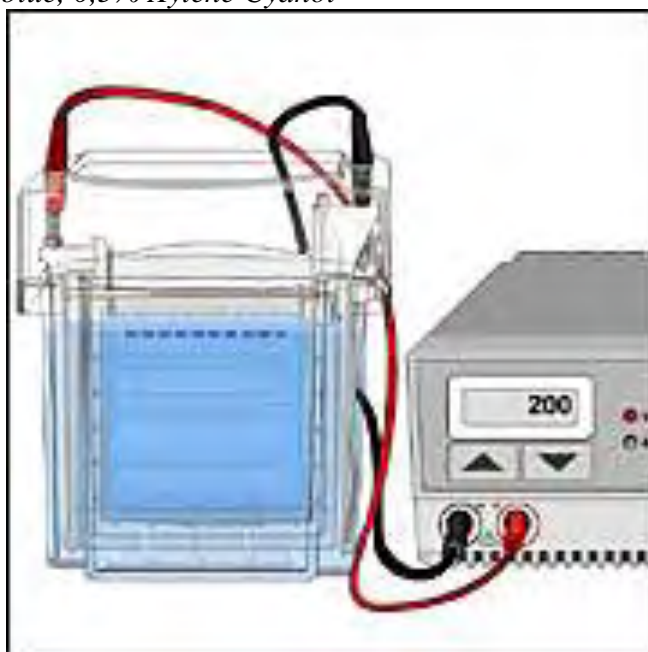
Συναρμολογούμε τη συσκευή (Εικ. 10) και ρίχνουμε σ' αυτήν το πήκτωμα όπου και στερεοποιείται.



Εικ. 7: Παρασκευή πηκτώματος Πηγή: Εργαστηριακός Οδηγός Γενετικής, Θεολογία Σαραφίδου, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

Τοποθετούμε το πήκτωμα στη συσκευή ηλεκτροφόρησης (Εικ. 11) και ετοιμάζουμε τα δείγματα ως εξής: Σε 5μl προϊόντος PCR (~10% του συνολικού) προσθέτουμε 10μl διαλύματος αποδιάταξης, αποδιάτασσουμε τα δείγματα με θέρμανση στους 96°C για 10min και τα τοποθετούμε σε πάγο ώστε να διατηρηθεί η μονόκλωνη κατάσταση. Τοποθετούμε τα δείγματα στα πηγάδια και πραγματοποιούμε την ηλεκτροφόρηση στα 220V στους 4°C ολονύκτια.

Διάλυμα αποδιάταξης: 95% φορμαμίδη, 10mM NaOH, 0,05% Bromophenol blue, 0,5% Xylene Cyanol



Εικ. 8: Συσκευή ηλεκτροφόρησης

Πηγή: <http://biomedicinabrasil.blogspot.com/2010/10/eletroforese.html>

Πραγματοποιείται χρώση με διάλυμα νιτρικού αργύρου (Silver Staining), επωάζοντας το πηκτώμα διαδοχικά στα Διαλύματα I, II και III υπό ανάδευση. Στο Διάλυμα I πραγματοποιείται η σταθεροποίηση του DNA στο πήκτωμα και η διαδικασία διαρκεί 3min με μία επανάληψη. Στο Διάλυμα II, πραγματοποιείται η σύνδεση του νιτρικού αργύρου με το DNA και η ανάδευση διαρκεί 15min ενώ στο Διάλυμα III γίνεται η αντίδραση της φορμαλδεΐδης παρουσία βάσης και η εμφάνιση των ζωνών. Η επώαση διαρκεί ~20min, ουσιαστικά μέχρι να εμφανιστούν οι ζώνες των δειγμάτων σε

ικανοποιητικό βαθμό. Μεταξύ των διαλυμάτων γίνεται ξέπλυμα της πηκτής με απεσταγμένο νερό.

Διάλυμα I: 8ml αιθανόλης και 0,5ml οξικό οξύ. Προσθήκη H₂O μέχρι 400 ml

Διάλυμα II: 200ml AgNO₃ 1gr/lt.

Διάλυμα III: 3gr NaOH, 0,01gr NaBH₄, 1ml HCHO. Προσθήκη H₂O μέχρι τα 200ml.

Καθαρισμός PCR προϊόντος

Τα δείγματα που επελέγησαν με βάση τις διαφορές στην κινητικότητα τους καθαρίστηκαν στην συνέχεια με PureLink PCR Purification Kit προκειμένου να απομακρυνθούν εκκινητές, dNTPs, ένζυμα και άλατα.

1. Αναμιγνύουμε 200μl Binding Buffer με το PCR προϊόν και το μεταφέρουμε σε μια στήλη PureLink Spin Column τοποθετημένη σε σωλήνα eppendorf του 1,5 ml
2. Φυγοκεντρούμε για 1 λεπτό στις 12000 rpm σε θερμοκρασία δωματίου. Το DNA έχει προσδεθεί στη στήλη.
3. Απομακρύνουμε το υγρό και προσθέτουμε στη στήλη 650 μl Wash Buffer για ξέπλυμα.
4. Φυγοκεντρούμε για 1 λεπτό στις 12000 rpm σε θερμοκρασία δωματίου. Απομακρύνουμε το υγρό και φυγοκεντρούμε ξανά για 2-3 λεπτά στη μέγιστη ταχύτητα σε θερμοκρασία δωματίου
5. Μεταφέρουμε τη στήλη σε καινούριο σωλήνα eppendorf του 1,5 ml
6. Προσθέτουμε 50μl Elution Buffer στο κέντρο της στήλης και επωάζουμε για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου.
7. Φυγοκεντρούμε για 2 λεπτά στη μέγιστη ταχύτητα σε θερμοκρασία δωματίου. Το καθαρισμένο DNA βρίσκεται τώρα στο σωλήνα eppendorf.

Για να βεβαιωθούμε ότι έχει πραγματοποιηθεί επιτυχώς ο καθαρισμός του DNA, πραγματοποιούμε ποιοτική και ποσοτική ανίχνευση. Ηλεκτροφορούμε 2 μl από το δείγμα σε πηκτή αгарόζης πυκνότητας 2% w/v και φωτομετρούμε 1μl δείγματος διαλυμένο σε 49μl ddH₂O. Εφόσον πάρουμε ικανοποιητικά αποτελέσματα από τις μετρήσεις, στέλνουμε τα δείγματα για αλληλούχιση.

ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΡΩΤΟΛΙΑΤΑΞΗΣ DNA ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ (SEQUENCING)

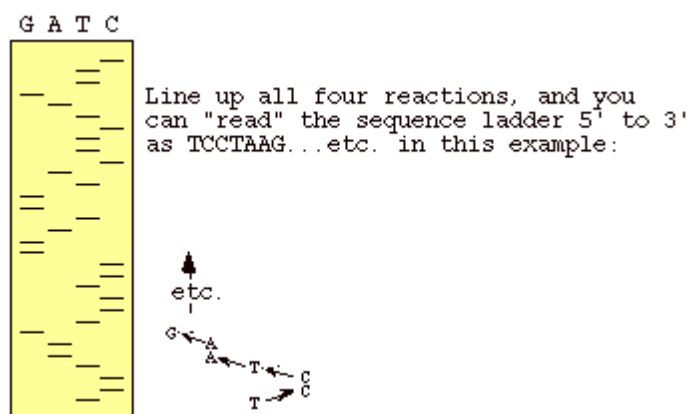
Προκειμένου να μάθουμε το είδος της πληροφορίας που είναι αποθηκευμένη σε ένα γονίδιο, θα πρέπει να γνωρίζουμε την αλληλουχία των νουκλεοτιδίων του μορίου. Υπάρχουν δύο τεχνικές με τις οποίες μπορούμε να μάθουμε τη δομή ενός μορίου DNA. Η πρώτη που αναπτύχθηκε από τους Maxam-Gilbert (βραβείο Nobel), είναι η λεγόμενη χημική μέθοδος. Η δεύτερη είναι η ενζυμική μέθοδος που αναπτύχθηκε από τον Sanger (επίσης βραβείο Nobel). Αρχικά, η πρώτη ήταν πιο διαδεδομένη γιατί χρησιμοποιούσε πιο απλά αντιδραστήρια, σήμερα όμως χρησιμοποιείται κυρίως η δεύτερη ή τροποποιήσεις της (δίνει καλύτερα αποτελέσματα και χρησιμοποιεί λιγότερο επικίνδυνα αντιδραστήρια).

Κατά τη χημική μέθοδο, η διαδικασία ξεκινά με μια ομάδα ίδιων δίκλωνων μορίων DNA επισημασμένων στο 5' άκρο, που έχουν παραχθεί με τη βοήθεια της πολυνουκλεοτιδικής κινάσης. Στο πρώτο στάδιο οι κλώνοι της διπλής έλικας διαχωρίζονται και εκτίθενται σε ήπια κατεργασία με μια χημική ένωση που καταστρέφει μία από τις τέσσερις βάσεις στο DNA, π.χ. την αδενίνη. Επειδή η κατεργασία είναι ήπια, συνήθως μόνο μια αδενίνη καταστρέφεται σε κάθε μόριο, τυχαία. Αυτό δίνει μια οικογένεια τμημάτων DNA διαφορετικού μήκους, που αντικατοπτρίζουν τις διαφορετικές περιοχές στις οποίες υπάρχει αδενίνη στο αρχικό μόριο DNA. Αυτά τα τμήματα διαχωρίζονται με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα και ανιχνεύονται με αυτοραδιογραφία. Μόνο τα τμήματα που διαθέτουν μια 5' τελική 32 P φωσφορική ομάδα θα εμφανιστούν στο πήκτωμα και τα μεγέθη τους αποκαλύπτουν τις αποστάσεις από το επισημασμένο άκρο στις οποίες προκύπτουν οι αδενίνες. Για να προσδιοριστεί ολόκληρη η αλληλουχία, παρόμοιες διαδικασίες ακολουθούνται παράλληλα σε τέσσερα ξεχωριστά δείγματα του ίδιου επισημασμένου DNA μορίου, χρησιμοποιώντας χημικά αντιδραστήρια που κόβουν το DNA σε θυμίνη στο πρώτο δείγμα, κυτοσίνη στο δεύτερο, γουανίνη στο τρίτο και αδενίνη στο τέταρτο δείγμα. Τα τμήματα αυτά διαχωρίζονται σε παράλληλες διαδρομές ενός πηκτώματος, δίνοντας ένα μοτίβο ραδιενεργών ζωνών DNA από το οποίο διαβάζεται η αλληλουχία του DNA.

Η μέθοδος Sanger, γνωστή και ως διδεόξυ-μέθοδος, βασίζεται στον βασηο-ειδικό τερματισμό μιας ενζυμικά καταλυόμενης αντίδρασης επέκτασης εκκινητή. Τέσσερις ξεχωριστές αντιδράσεις γίνονται ταυτόχρονα, που όλες περιέχουν εκκινητή, DNA - μήτρα, ένζυμο πολυμερισμού και τα τέσσερα δεοξυ-νουκλεοτίδια (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), αλλά κάθε μία περιέχει και ένα τροποποιημένο νουκλεοτίδιο, το οποίο σταματά την επέκταση της συμπληρωματικής αλυσίδας. Το νουκλεοτίδιο αυτό είναι ένα διδεόξυ-νουκλεοτίδιο, το οποίο μπορεί και ενσωματώνεται στην νεοσυντιθέμενη αλυσίδα, όμως δεν μπορεί να σχηματίσει φωσφοδιεστερικό δεσμό με επόμενο νουκλεοτίδιο, γιατί λείπει το υδροξύλιο στην 3' θέση. Συνεπώς, σε κάθε αντίδραση παράγεται ένα μίγμα θραυσμάτων που όλα τερματίζουν στο ίδιο τροποποιημένο νουκλεοτίδιο. Όταν τα προϊόντα αυτών των αντιδράσεων ηλεκτροφορηθούν στη σειρά, η ακολουθία με την οποία τα νουκλεοτίδια προστίθενται στον εκκινητή μπορεί να βρεθεί από τα αυξανόμενου μεγέθους διαδοχικά θραύσματα που προκύπτουν στις τέσσερις σειρές του πηκτώματος ηλεκτροφόρησης (Εικόνα 12). Η θέση των θραυσμάτων αυτών αποκαλύπτεται με την σήμανσή τους (ραδιενεργή ή φθορίζουσα), πριν ή κατά την διάρκεια των αντιδράσεων επέκτασης.

Μεθοδολογία:

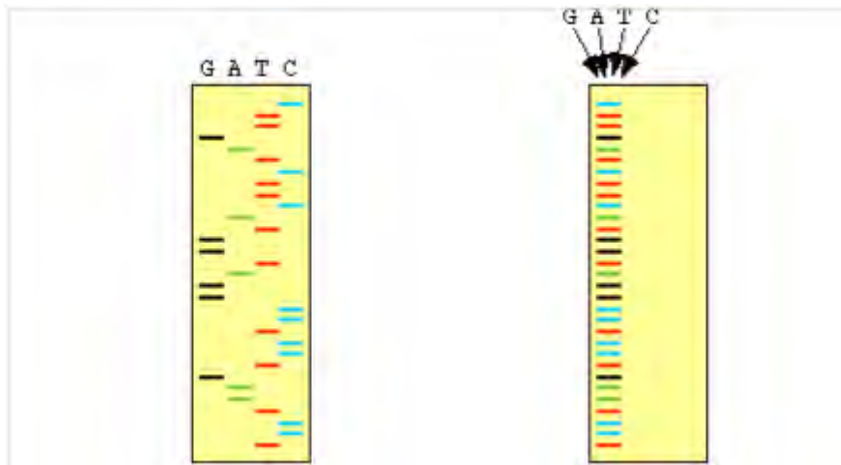
1. Το δείγμα DNA που θέλουμε να αναλύσουμε γίνεται μονόκλωνο και χωρίζεται σε τέσσερα δείγματα.
2. Σημαίνουμε με κάποιο τρόπο τον εκκινητή ή κάποιο νουκλεοτίδιο.
3. Σε κάθε δείγμα προστίθενται ο εκκινητής, τα τέσσερα δεοξυ-νουκλεοτίδια, DNA πολυμεράση και ένα από τα τέσσερα διδεοξυ-νουκλεοτίδια (αυτό σε περιορισμένη ποσότητα).
4. Ακολουθεί η επέκταση του DNA, η οποία τερματίζεται όταν ενσωματωθεί το διδεοξυ-νουκλεοτίδιο (δίνοντας έτσι τμήματα DNA διαφόρων μεγεθών, ανάλογα με το πότε ενσωματώθηκε το διδεοξυ-νουκλεοτίδιο).
5. Το DNA αποδιατάσσεται και ηλεκτροφορεύεται σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδιου, όπου τα κομμάτια διαχωρίζονται βάση μεγέθους
6. Η οπτικοποίηση γίνεται σε φιλμ αυτοραδιογραφίας, αν η σήμανση έγινε με ραδιενέργεια, ή σε υπεριώδες φως, αν η σήμανση έγινε με φθορισμό.



Εικόνα 9: Αυξανόμενου μεγέθους διαδοχικά θραύσματα που προκύπτουν στις τέσσερις σειρές του πηκτώματος ηλεκτροφόρησης.

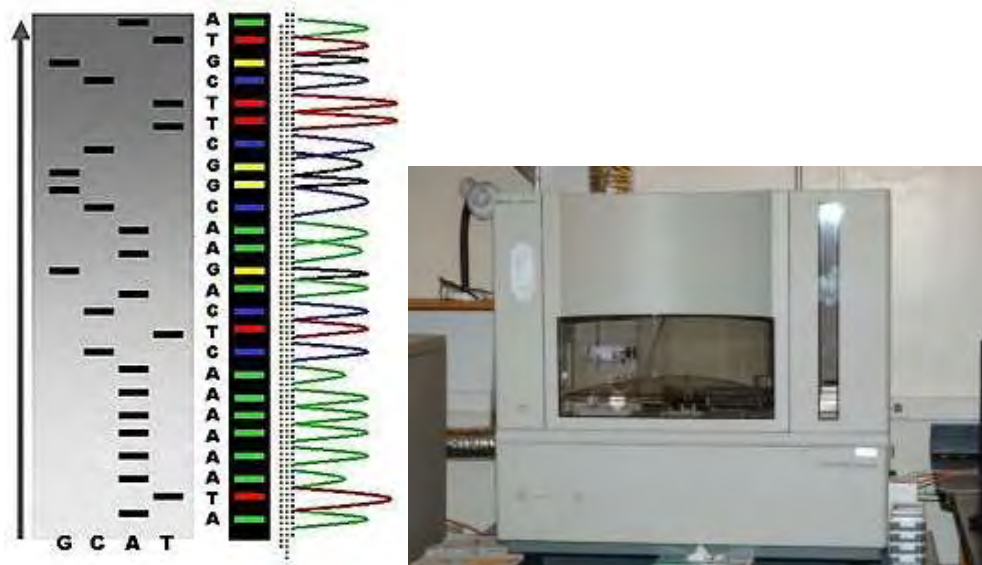
Πηγή: http://www.bio.davidson.edu/Courses/Molbio/MolStudents/spring2003/Obenrader/sanger_method_page.htm

Η ανάπτυξη των διαφόρων φθορίζουσών χρωστικών έχει επιτρέψει την εξέλιξη της μεθόδου. Σημαίνοντας τα νουκλεοτίδια τερματισμού, όχι με ραδιενέργεια, αλλά με χρωστικές που μπορούν να εκπέμπουν φθορισμό σε διαφορετικά μήκη κύματος, είναι δυνατό να ηλεκτροφορηθούν οι 4 αντιδράσεις στην ίδια διαδρομή. Έτσι η μέθοδος γίνεται πιο γρήγορη και εύκολη (Εικόνα 13). Οι σύγχρονες συσκευές αλληλούχισης μπορούν να αναλύσουν ως και 384 δείγματα σημασμένα με φθορισμό σε ένα 'τρέξιμο' και μπορούν να τρέξουν 24 φορές δείγματα σε μια ημέρα. Μπορούν να διαβάσουν ως και 1000 ζεύγη βάσεων μήκος αλληλουχίας



Εικόνα 10: Αριστερά: Τα προϊόντα εμφανίζονται σε 4 διαφορετικές διαδρομές
 Δεξιά: Τα προϊόντα εμφανίζονται στην ίδια διαδρομή

Πηγή: http://www.bio.davidson.edu/Courses/Molbio/MolStudents/spring2003/Obenrader/sanger_method_page.htm



Εικόνα 11 : Αριστερά: Αλληλουχία γονιδίου και χρωματογράφημα
 Δεξιά : Συσκευή αλληλούχισης DNA

Πηγές : http://en.wikipedia.org/wiki/DNA_sequencing

<http://scorpion.amnh.org/page19/page23/page23.html>

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Για την εξαγωγή των αποτελεσμάτων ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία:

1. Απομόνωση πυρηνικού και μιτοχονδριακού DNA από δείγματα ολικού αίματος ασθενών και υγιών ατόμων
2. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1% w/v για την ποιοτική ανίχνευση του απομονωμένου DNA
3. PCR με κατάλληλους εκκινητές για την ενίσχυση των μιτοχονδριακών γονιδίων που κωδικοποιούν τα tRNA της Phe.
4. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 2% w/v για την ποιοτική ανίχνευση του PCR προϊόντος.
5. Ανάλυση SSCP για την κατάταξη των δειγμάτων σε πρότυπα ανάλογα με την ηλεκτροφορητική τους κινητικότητα
6. Αλληλούχιση των δειγμάτων που παρουσίασαν διαφορετικό πρότυπο στην ανάλυση SSCP.

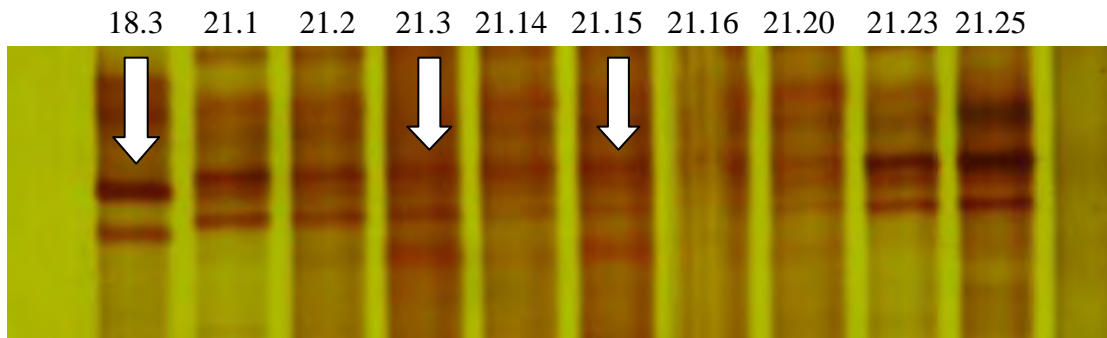
Για την εξαγωγή των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήσαμε δείγματα αίματος από 100 <<φυσιολογικά>> άτομα, και από 50 άτομα με Alzheimer. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν μετά από αυτή τη διαδικασία ήταν τα εξής:

	Control	Alzheimer
Νουκλεοτιδική Αλλαγή	D-loop ins574CCC + Phe T672C	G499A,
		C497T, T507C
		C498T del514,515 (CA)
		G499A ins516,517 (CA)
		del514,515 (CA)
Άτομα με μεταλλάξεις στο γονίδιο tRNA ^{Phe}	1/100	5/50

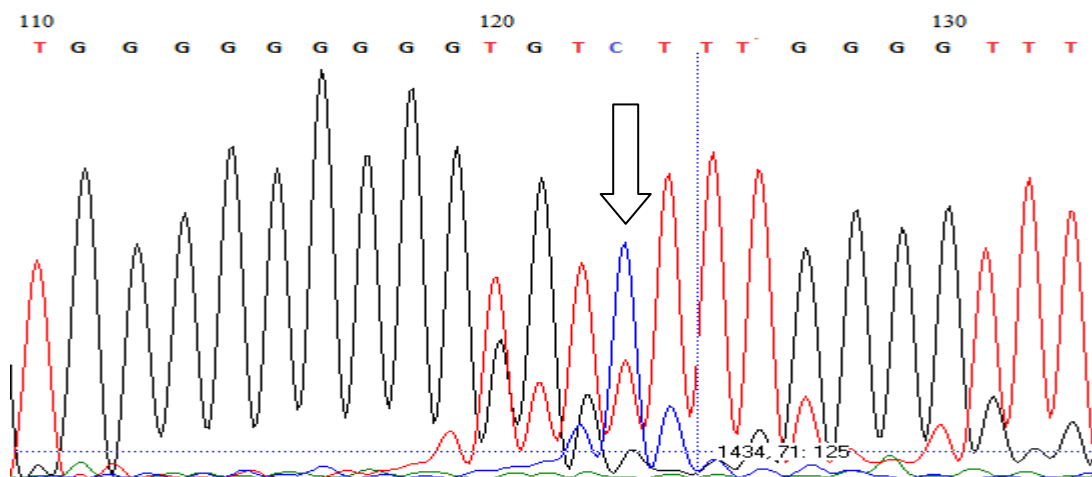
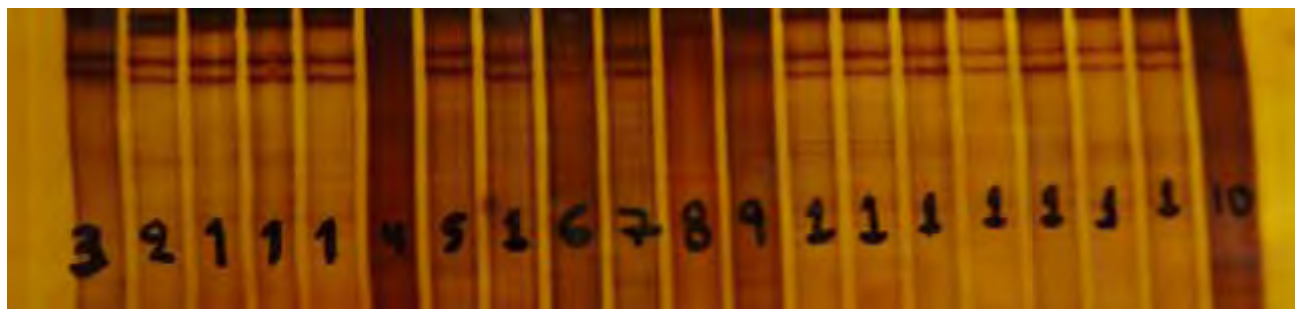
Παρατίθενται εικόνες από τα πηκτώματα πολυακρυλαμίδης της ανάλυσης SSCP και των χρωματογραφημάτων που προέκυψαν από την αλληλούχιση των προϊόντων της PCR.

Τα παρακάτω δείγματα προέρχονται από την ομάδα ελέγχου. Από την ανάλυση SSCP προκύπτουν τρία διαφορετικά πρότυπα για την Phe: το 18.3, το 21.3 και το 21.15. Μετά την αλληλούχιση και την εξέταση των χρωματογραφημάτων καταλήξαμε μόνο

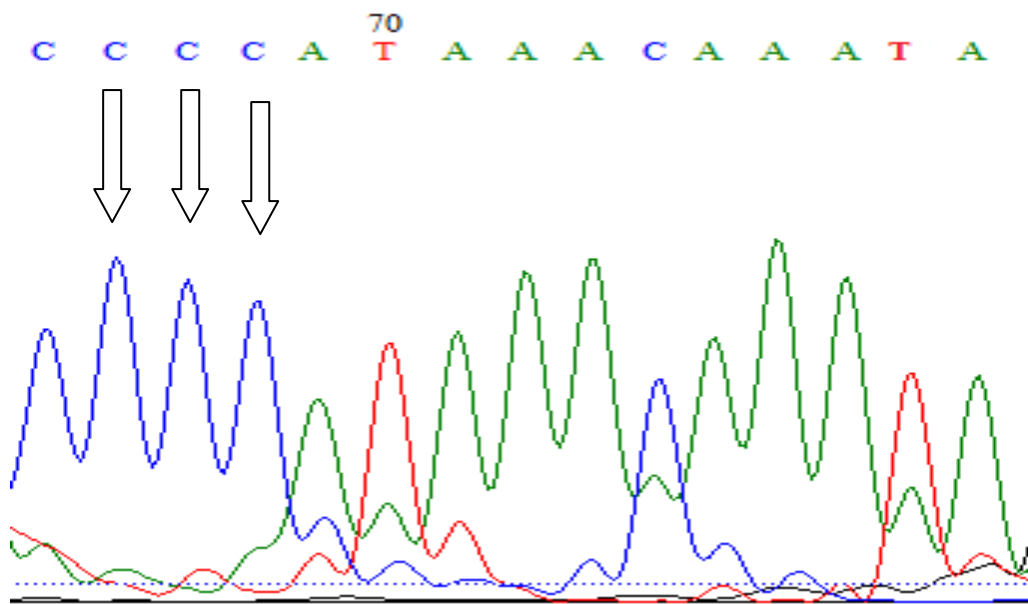
σε έναν πολυμορφισμό , τον T669C. Τα υπόλοιπα δείγματα έφεραν την πρότυπη αλληλουχία σύμφωνα με την GeneBank.



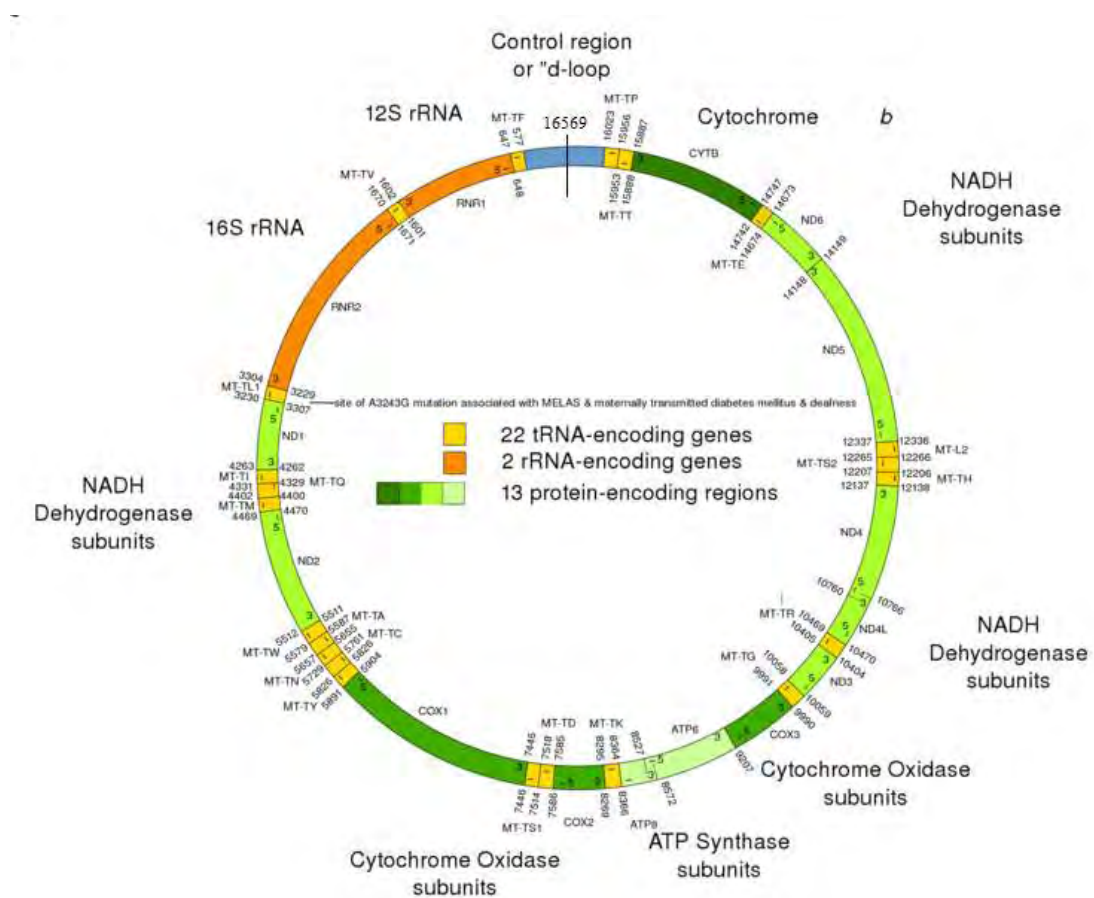
Τα επόμενα δείγματα προέρχονται από ασθενείς με Alzheimer. Οι αριθμοί που φαίνονται, δείχνουν τα δέκα διαφορετικά πρότυπα που βρέθηκαν. Από την εξέταση των χαρτογραφημάτων καταλήξαμε σε 6 πολυμορφισμούς, μια αφαίρεση 2 νουκλεοτιδίων (CA) στις θέσεις 514,515 όπου βρίσκεται η D-loop καθώς και μια προσθήκη νουκλεοτιδίων CA στις θέσεις 516,157, και 4 σημειακές μεταλλάξεις C498T , G499A,C497T,T507C



Αλληλουχία που φέρει τον πολυμορφισμό T>C στο γονίδιο tRNA^{Phe}

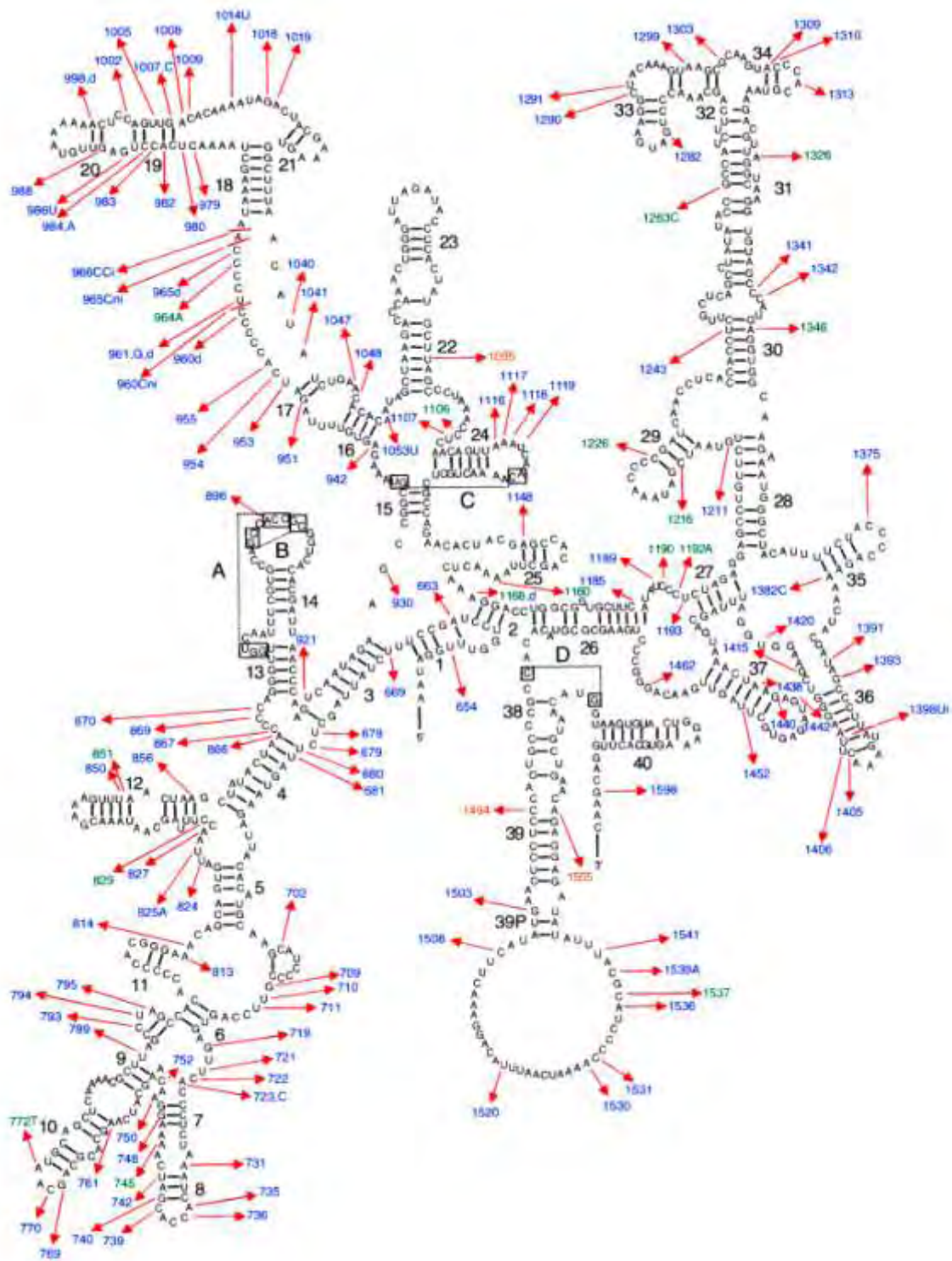


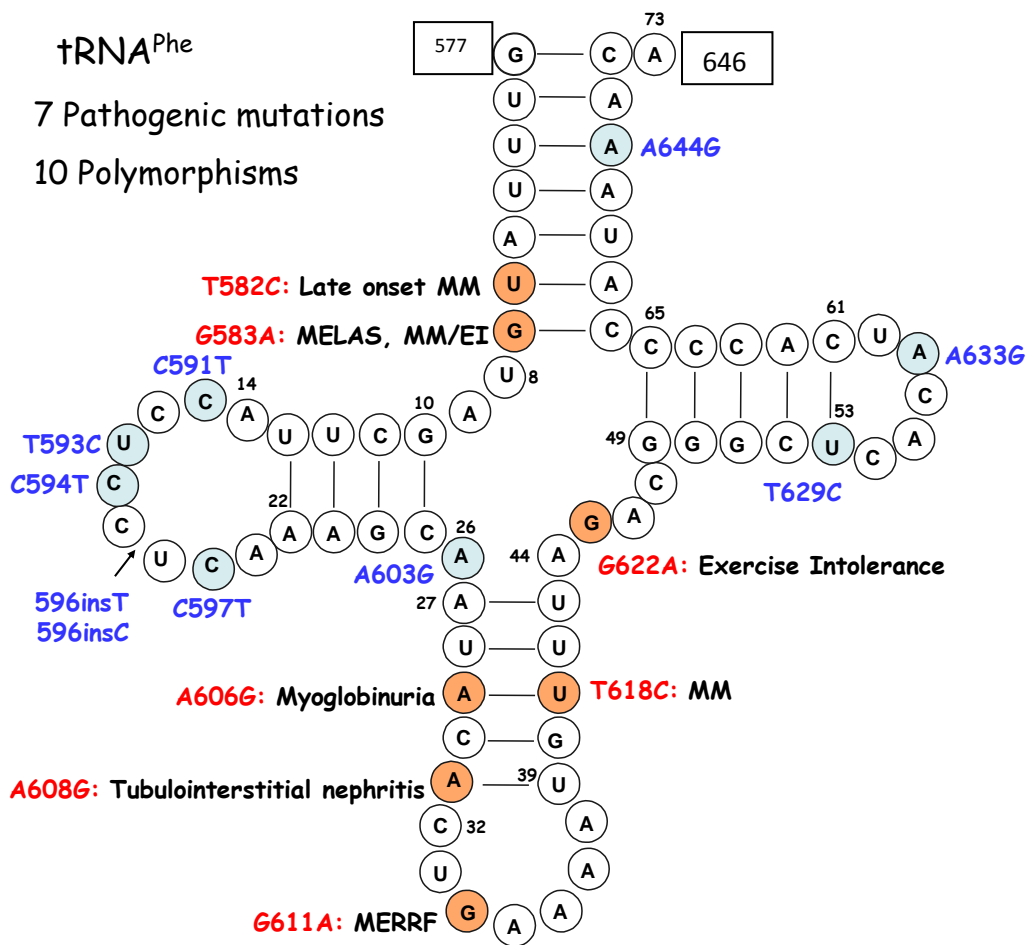
Αλληλουχία όπου έχει συμβεί εισαγωγή τριών νουκλεοτιδίων κυστεΐνης στην D-loop πριν το γονίδιο tRNA^{Phe}.



Εικόνα 12: Το μιτοχondριακό DNA.

Πηγή: http://www.ganfyd.org/index.php?title=Image:Human_Mitochondrial_DNA_en.svg





Εικόνα 13: Το γονίδιο του tRNA^{Phe} και οι μεταλλάξεις που έχουν βρεθεί συνολικά σε αυτό.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Συνοψίζοντας, οι περισσότερες μορφές της σποραδικής όψιμης έναρξης AD έχουν σύνθετη αιτιολογία που περιλαμβάνει περιβαλλοντικούς και γενετικούς παράγοντες οι οποίοι μεμονωμένα δεν είναι επαρκείς για την ανάπτυξη της νόσου. Στην πλειονότητα των ασθενών, οι τυχαίοι παράγοντες παραμένουν άγνωστοι. Η οξειδωτική βλάβη και η δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων έχουν εμπλακεί ευρέως στην παθογένεια της AD διότι, όπως φαίνεται και σε πειραματόζωα, εμφανίζεται νωρίς στον εγκέφαλο πριν από την εμφάνιση των γεροντικών πλακών. Υπάρχουν σοβαρές αποδείξεις των μορφολογικών, βιοχημικών και μοριακών ανωμαλιών στα μιτοχόνδρια σε διάφορους ιστούς των ασθενών με AD.

Τα μιτοχόνδρια είναι βασικοί ρυθμιστές της επιβίωσης και του θανάτου των κυττάρων και η δυσλειτουργία του μεταβολισμού της ενέργειας οδηγεί σε μειωμένη παράγωγή ATP, μειωμένη ρύθμιση του ασβεστίου και αυξημένη παραγωγή των δραστικών μορφών του οξυγόνου (ROS) (Moreira et al.2008).

Το mtDNA είναι ιδιαίτερα ευαίσθητο στην οξειδωτική βλάβη. Λόγω της εγγύτητας με την πηγή των ROS (αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων) και της απουσίας μηχανισμών επιδιόρθωσης παρουσιάζει υψηλό ρυθμό μετάλλαξης. Η συσσώρευση των mtDNA μεταλλάξεων επιδεινώνει τη φυσιολογική γήρανση, οδηγεί σε οξειδωτική βλάβη, προκαλεί ανεπάρκεια ενέργειας και αυξημένη παραγωγή ROS, δημιουργώντας ένα φαύλο κύκλο. Ο εγκέφαλος είναι ιδιαίτερα ευάλωτος στην οξειδωτική βλάβη λόγω της υψηλής περιεκτικότητας του σε ακόρεστα λιπαρά οξέα, την κατανάλωση οξυγόνου και τη σχετική έλλειψη αντιοξειδωτικών ενζύμων σε σύγκριση με άλλα όργανα. Η βλάβη που προκαλείται από τις ROS θεωρείται γενικά ως αιτιολογικός παράγοντας στη νευρωνική εκφύλιση και έχει αναφερθεί σε πολλές νευροεκφυλιστικές ασθένειες.

Εκτός από σωματικές μεταλλάξεις, το mtDNA χαρακτηρίζεται, επίσης, από γενετικούς πολυμορφισμούς. Είναι πιθανό, οι πολυμορφισμοί να μπορούν να προκαλέσουν μικρές διαφορές στις πρωτεΐνες της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης και υπερπαραγωγή ελεύθερων ριζών. Αυτό θα μπορούσε να προδιαθέτει ένα άτομο, ή ένα πληθυσμό που μοιράζεται τον ίδιο γονότυπο μιτοχονδριακού DNA, σε εμφάνιση του παθολογικού φαινότυπου. Οι κοινοί mtDNA πολυμορφισμοί ορίζουν μια ποικιλία μιτοχονδριακών γονοτύπων ειδικών για κάθε ήπειρο, που ονομάζονται απλοομάδες. Στην Ευρώπη έχουν προσδιοριστεί εννέα διαφορετικές μιτοχονδριακές απλοομάδες (H,I,J,K,T,U,V,W,X).

Ωστόσο, ο μηχανισμός με τον οποίο δρουν οι απλοομάδες είναι κάθε άλλο παρά σαφής. Οι μελέτες που έχουν γίνει πάνω στη συμμετοχή συγκεκριμένων γενετικών πολυμορφισμών σε νευροεκφυλιστικές ασθένειες αναφέρουν αντικρουόμενα δεδομένα. Υπάρχουν πολλά αποδεικτικά στοιχεία που δείχνουν ότι τα μιτοχόνδρια έχουν κεντρικό ρόλο στις νευροεκφυλιστικές ασθένειες που σχετίζονται με την ηλικία αλλά είναι ακόμη υπό συζήτηση αν το οξειδωτικό στρες και η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία εμπλέκονται στην έναρξη και την εξέλιξη αυτών των διαταραχών ή είναι απλώς συνέπεια της νευροεκφύλισης. Ένα από τα σημαντικότερα και

συνηθέστερα κριτήρια για τον καθορισμό του αν μια μετάλλαξη του DNA είναι αιτιώδης σε μια ασθένεια ή είναι πολυμορφισμός είναι ο έλεγχος της μετάλλαξης σε πληθυσμούς ελέγχου. Η παθολογική σημασία των μεταλλάξεων του DNA αποκλείεται όταν η μετάλλαξη εντοπίζεται στο γενικό πληθυσμό. Ωστόσο, mtDNA μελέτες έχουν δείξει ότι οι περισσότερες mtDNA παραλλαγές είναι ηπειρο-ειδικές και ότι ορισμένες παραλλαγές και απλοομάδες μπορούν να είναι εξαιρετικά κοινές σε ορισμένους πληθυσμούς και εντελώς απύσες σε άλλες εθνικές ομάδες. Κατά συνέπεια, η εφαρμογή του παρόντος κριτηρίου για τις mtDNA μελέτες ασθένειας απαιτεί οι πληθυσμοί ελέγχου να ταιριάζουν με ακρίβεια με το εθνικό υπόβαθρο των ασθενών.

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε το μιτοχονδριακό γονίδιο tRNA^{Phe} 100 <<φυσιολογικών>> ατόμων, και 50 ασθενών με Alzheimer. Η μόνη μετάλλαξη που βρέθηκε μέσα στο γονίδιο του tRNA^{Phe} ήταν σε φυσιολογικό άτομο και αφορά τη μετάλλαξη T669C. Επειδή όμως οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν δεν ενισχύουν μόνο τα tRNA γονίδια αλλά και τμήματα των παρακείμενων γονιδίων βρέθηκαν 6 μεταλλάξεις σε θέσεις, πριν το γονίδιο tRNA^{Phe}, οι οποίες ανήκουν στην D-loop του μιτοχονδριακού γονιδίου. Όσον αφορά τις μεταλλάξεις που εντοπίστηκαν στους ασθενείς με Alzheimer καμία από αυτές δεν φαίνεται να έχει αιτιολογική σχέση με την ασθένεια από μόνη της και καμία από αυτές δεν έχει αναφερθεί σε αυξημένο ποσοστό σε μελέτες για την νόσο του Alzheimer. Είναι πιο πιθανό κάποιες mtDNA μεταλλάξεις δρώντας συνεργιστικά (Brown et.al 1996) να είναι παθογόνες για ένα μικρό μέρος του πληθυσμού που εμφανίζει τη νόσο του Alzheimer και ένα μικρό ποσοστό που δεν την εμφανίζει να φέρει μετάλλαξη που έχει προστατευτικό ρόλο.

Τέλος, καθώς η έρευνα πάνω στις μεταλλάξεις στα μιτοχονδριακά γονίδια των tRNAs συνεχίζεται με περισσότερα δείγματα ασθενών με AD και υγιών ατόμων στο εργαστήριο Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, θα είμαστε σύντομα σε θέση να εξάγουμε ακόμα πιο αξιόπιστα και εμπειριστατωμένα αποτελέσματα επί του θέματος.

Απλοομάδες

Στη μελέτη της μοριακής εξέλιξης, μία απλοομάδα είναι μία ομάδα παρόμοιων απλότυπων που μοιράζονται έναν κοινό πρόγονο με μια μετάλλαξη ενός πολυμορφικού νουκλεοτιδίου (SNP). Επειδή μία απλοομάδα αποτελείται από παρόμοιους απλότυπους, αυτό καθιστά μια απλοομάδα προβλέψιμη από τους απλότυπους. Μια δοκιμή SNP επιβεβαιώνει μία απλοομάδα. Οι απλοομάδες όλο και περισσότερο συσχετίζονται με ένα ευρύ φάσμα κοινών ασθενειών. Υπάρχει αξιοσημείωτη επίδραση των κληρονομούμενων μιτοχονδριακών παραλλαγών στην εμφάνιση της σποραδικής μορφής της AD που είναι φυλο-ειδική και ανεξάρτητη από τον γονότυπο APOE. Έχει βρεθεί μια ιδιαίτερη φυλο-ειδική συσχέτιση της απλοομάδας U με προδιάθεση για AD. Πιο συγκεκριμένα οι άρρενες που φέρουν την απλοομάδα U έχουν μεγαλύτερο κίνδυνο να νοσήσουν από ότι οι γυναίκες-φορείς των πολυμορφισμών της απλοομάδας U. Το φυλο-ειδικό αποτέλεσμα είναι ιδιαίτερα ενδιαφέρον καθώς η προδιάθεση για AD φαίνεται να είναι υψηλότερη στις γυναίκες

από ότι στους άντρες. Ίσως, αυτό το αποτέλεσμα θα μπορούσε να αντικατοπτρίζει μια λειτουργική διαφορά των mt SNPs της απλοομάδας U που εξαρτάται από κάποιο φυλοειδικό παράγοντα. Τέλος, η απλοομάδα U παρατηρήθηκε λιγότερο συχνά σε άρρενες αιωνόβιους και υγιείς σε σύγκριση με τους ασθενείς. Πιθανώς, η κληρονόμηση της απλοομάδας U μπορεί να έχει αρνητικές επιπτώσεις για τη γήρανση στους Καυκάσιους άνδρες.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- (1) <http://www.wikipedia.org>
- (2) <http://www.google.com>
- (3) genetics home reference
- (4) <http://www.encephalos.gr/full/41-3-01g.htm>
- (5) <http://www.humpath.com/spip.php?article13107>
- (6) <http://www.helmedica.gr>

- (7) <http://www.psych.gr/documents/psychiatry/16.1-GR-114.pdf>

- (8) <http://maryjosephfoundation.blogspot.com/2010/01/progressive-memory-loss.html>

- (9) <http://www.mitosciences.com/alzheimers.html>

- (10) http://biotech.aua.gr/BSC_COURSES/evolution/Dialexeis_Exelixa_PPS/4_evolution_mol.pdf

- (11) <http://www.molecularneurodegeneration.com/content/5/1/8>

- (12) Aaij C., Borst P. (1972) The gel electrophoresis of DNA. *Biochim Biophys Acta* 269: 192-200

- (12) Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J. (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215: 403-410

- (13) Feinberg A.P., Vogelstein B. (1983) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem* 132: 6-13

- (14) Harris S., Jones D.B. (1997) Optimisation of the polymerase chain reaction. *Br J Biomed Sci* 54: 166-173

- (15) Kramer J.A. (2001) Omega TM: A PC-based sequence analysis tool. *Mol Biotech* 19: 97-106

- (16) Kumar S., Tamura K., Jakobsen I.B., Nei M. (2001) MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software. *Bioinformatics* 17: 1244-1245

- (17) Lichtenstein A.V., Moiseev V.L., Zaboikin M.M. (1990) A procedure for DNA and RNA transfer to membrane filters avoiding weight-induced flattening. *Anal Biochem* 191: 187-191

- (18) Mullis K.B., Faloona F., Scharf S., Saiki R., Horn G et al. (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* 51: 263-273.

- (19) Mullis K.B., Faloona F.A. (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed reaction. *Methods Enzymol* 155: 335-350

- (20) Olszewska E., Jones K. (1988) Vacuum blotting enhances nucleic acid transfer. *Trends Genet* 4: 92-94

(21)Saiki R.K., Gelfand D.H., Stoffel S., Scharf S.J. Higuchi R. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491

(22)Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. (1989) *Molecular cloning A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press

(23)Sharp P.A., Sugden B., Sambrook J. (1973) Detection of two restriction endonuclease activities in *Haemophilus parainfluenzae* using analytical agarose-ethidium bromide electrophoresis. *Biochemistry* 12: 3055-3063

(24)Southern E.M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 98: 503-517

2

(25) Are mitochondria critical in the pathogenesis of Alzheimer's disease? 005 Nov;49(3):618-32. Epub 2005 Apr 19. Reddy PH, Beal MF. *Source Neurogenetics Laboratory, Neurological Sciences Institute, Oregon Health and Science University, 505 NW 185th Avenue, Beaverton, OR 97006, USA*

(26) Mitochondria, mitochondrial DNA and Alzheimer's disease. What comes first? Mancuso M, Orsucci D, Siciliano G, Murri L. 2008 Oct;5(5):457-68.

(27) A mitochondrial DNA clone is associated with increased risk for Alzheimer disease

1. Whitehouse, P. J., Price, D. L., Struble, R. G., Clark, A. W., Coyle, J. T. & DeLong, M. R. (1982) *Science* 215, 1237-1239. 2. St George-Hyslop, P. H., Myers, R. H., Haines, J. L., Farrer, L. A., Tanzi, R. E., Abe, K., James, M. F., Conneally, P. M., Polinsky, R. J. & Gusella, J. F. (1989) *Neurobiol. Aging* 10, 417-425. 3. Breteler, M. M. B., Claus, J. J., van Duijn, C. M., Launer, L. J. & Hofman, A. (1992) *Epidemiol. Rev.* 14, 59-82. 4. Rao, V. S., van Duijn, C. M., Connor-Lacke, L., Cupples, A., Growdon, J. H. & Farrer, L.A. (1994) *Am. J. Hum. Genet.* 55, 991-1000. 5. Mullan, M., Houlden, H., Windelspecht, M., Fidani, L., Lombardi, C., Diaz, P., Rossor, M., Crook, R., Hardy, J., Duff, K. & Crawford, F. (1992) *Nat. Genet.* 2, 340-342. 6. Schellenberg, G. D., Bird, T. D., Wijsman, E. M., Orr, H. T., Anderson, L., Nemens, E., White, J. A., Bonnycastle, L., Weber, J. L., Alonso, M. E., Potter, H., Heston, L. L. & Martin, G. M. (1992) *Science* 258, 668-671.

7. St George-Hyslop, P. H., Haines, J. L., Rogaev, E., Mortilla, M., Vaala, G., et al. (1992) *Nat. Genet.* 2, 330-334. 8. van Broeckhoven, C., Backhoven, H., Cruts, M., Winter, G. D., Bruyland, M., Cras, P. & Martin, J.-J. (1992) *Nat. Genet.* 2, 335-339.
9. Goate, A., Chartier-Harlin, M.-C., Mullan, M., Brown, J., Crawford, F., et al. (1991) *Nature (London)* 349, 704-706.
10. Borgaonkar, D. S., Schmidt, L. C., Martin, S. E., Kanzer, M. D., Edelson, L., Growdon, J. & Farrer, J. (1993) *Lancet* 342, 625.
11. Corder, E. H., Saunders, A. M., Strittmatter, W. J., Schmechel, D. E., Gaskell, P. C., Small, G. W., Roses, A. D., Haines, J. L. & Pericak-Vance, M. A. (1993) *Science* 261, 921-923. 12. Saunders, A. M., Strittmatter, W. J., Schmechel, D., St George-Hyslop, P. H., Pericak-Vance, M. A., Joo, S. H., Rosi, B. L., Gusella, J. F., CrapperMacLachlan, D. R., Alberts, M. J., Hulette, C., Crain, B., Goldgaber, D. & Roses, A. D. (1993) *Neurology* 43, 1467-1472.
13. Strittmatter, W. J., Saunders, A. M., Schmechel, D., Pericak-Vance, M., Enghild, J., Salvesen, G. S. & Roses, A. D. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 1977-1981. 14. DiMauro, S. & Wallace, D. C. (1993) *Mitochondrial DNA in Human Pathology* (Raven, New York). 15. Shoffner, J. M., Brown, M. D., Torroni, A., Lott, M. T., Cabell, M. F., Mirra, S. S., Beal, M. F., Yang, C.-C., Gearing, M., Salvo, R., Watts, R. L., Juncos, J. L., Hansen, L. A., Crain, B. J., Fayad, M., Reckord, C. L. & Wallace, D. C. (1993) *Genomics* 17, 171-184. 16. Hutchin, T., Haworth, I., Higashi, K., Fischel-Ghodsian, N., Stoneking, M., Saha, N., Arnos, C. & Cortopassi, G. (1993) *Nucleic Acids Res.* 18, 4174-4179. 17. Fitch, W. M. & Margoliash, E. (1967) *Science* 155, 279-284.
18. Felsenstein, J. (1993) *Phylogeny Inference Package (PHYLIP)* (University of Washington, Seattle), Version 3.5. 19. Saitou, N. & Nei, M. (1987) *Mol. Biol. Evol.* 4, 406-425.
20. Sokal, R. R. & Rohlf, F. J. (1981) *Biometry: The Principles and Practice of Statistics in Biological Research* (Freeman, San Francisco).
21. Schlesselman, J. (1982) *Case Control Studies: Design, Conduct, Analysis*

(Oxford Univ. Press, Oxford). 22. DiRienzo, A. & Wilson, A. C. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 1597-1601. 23. Vigilant, L., Stoneking, M., Harpending, H., Hawkes, K. & Wilson, A. C. (1991) *Science* 253, 1503-1507.

24. Maddison, W. P. & Maddison, D. R. (1992) *M4CCLADE: Analysis of Phylogeny and Character Evolution* (Sinauer, Sunderland, MA), Version 3.02.

25. Pfeffer, R. I., Afifi, A. A. & Chance, J. M. (1987) *Am. J. Epidemiol.* 125, 420-433. 26. Beard, C. M., Kokmen, E., Offord, K. & Kurland, L. T. (1991) *Neurology* 41, 1911-1914. 27. Evans, D. A., Funkenstein, H. H., Albert, M. S., Scherr, P. A., Cook, N. R., Chown, M. J., Hebert, L. E., Hennekens, C. H. & Taylor, J. O. (1989) *J. Am. Med. Assoc.* 262, 2551-2556. 28. Bachman, D. L., Wolf, P. A., Linn, R., Knoefel, J. E., Cobb, J., Belanger, A., D'Agostino, R. B. & White, L. R. (1992) *Neurology* 42, 115-119.

29. Wallace, D. C., Singh, G., Lott, M. T., Hodge, J. A., Schurr, T. G., Lezza, A. M. S., Elias, L. J., II, & Nikoskelainen, E. K. (1988) *Science* 242, 1427-1430. 30. Howell, N., Bindoff, L. A., McCullough, D. A., Kubacka, I., Poulton, J., Mackey, D., Taylor, L. & Turnbull, D. M. (1991) *Am. J. Hum. Genet.* 49, 939-950. 31. Prezant, T. R., Agaipan, J. V., Bohlman, M. C., Bu, X., Oztas, S., Qu, W.-Q., Amos, K S., Cortopassi, G. A., Jaber, L., Rotter, J. I., Shohat, M. & Fischel-Ghodsian, N. (1993) *Nat. Genet.* 4, 289-294.

32. Hutchin, T. & Cortopassi, G. A. (1995) *Am. J. Med. Genet. (Neuropsychiatr. Genet.)*, in press. 33. Cortopassi, G. A. & Wang, E. (1995) *Biochim. Biophys. Acta* 1271, in press. 34. Takeshige, K. & Minikami, S. (1979) *Biochem. J.* 180, 129-135.

35. Takayanagi, R., Takeshige, K. & Minakami, S. (1980) *Biochem. J.* 192, 853-860. 36. Turrens, J. K. & Boveris, A. (1980) *Biochem. J.* 191, 421-427.

37. Hasegawa, E., Takeshige, K., Oishi, T., Murai, Y. & Minakami, S. (1990) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 170, 1049-1055. 38. Cleeter, M. W., Cooper, J. M. & Schapira, A. H. (1992) *J. Neurochem.* 58, 786-789.

39. Wolvetang, E. J., Johnson, K. L., Krauer,

(26) Does the mitochondrial genome play a role in the etiology of alzheimer's disease

- Anandatheerthavarada HK, Biswas G, Robin M-A, Avadhani NG (2003) Mitochondrial targeting and a novel transmembrane arrest of Alzheimer's amyloid precursor protein impairs mitochondrial function in neuronal cells. *J Cell Biol* 161:41–54
- Andrews RM, Kubacka I, Chinnery PF, Lightowlers RN, Turnbull DM, Howell N (1999) Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. *Nat Genet* 23:147
- Bandelt H-J, Forster P, Sykes BC, Richards MB (1995) Mitochondrial portraits of human populations using median networks. *Genetics* 141:743–753
- Beal MF (2005) Mitochondria take center stage in aging and neurodegeneration. *Ann Neurol* 58:495–505
- Bosetti F, Brizzi F, Barogi S, Mancuso M, Siciliano G, Tendi EA, Murri L, Rapoport SI, Solaini G (2002) Cytochrome c oxidase and mitochondrial F1F0-ATPase (ATPase) activities in platelets and brain from patients with Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 23:371–376
- Brown MD, Yang C-C, Trounce I, Torroni A, Lott MT, Wallace DC (1992) A mitochondrial DNA variant, identified in Leber hereditary optic neuropathy patients, which extends the amino acid sequence of cytochrome c oxidase subunit I. *Am J Hum Genet* 51:378–385
- Busciglio J, Pelsman A, Wong C, Pigino G, Yuan M, Mori H, Yankner BA (2002) Altered metabolism of the amyloid β precursor protein is associated with mitochondrial dysfunction in Down's syndrome. *Neuron* 33:677–688
- Cardoso SM, Proenca MT, Santos S, Santana I, Oliveira CR (2004) Cytochrome c oxidase is decreased in Alzheimer's disease platelets. *Neurobiol Aging* 25:105–110
- Casley CS, Land JM, Sharpe MA, Clark JB, Duchon MR, Canevari L (2002) β amyloid fragment 25–35 causes mitochondrial dysfunction in primary cortical neurons. *Neurobiol Dis* 10:258–267
- Castellani R, Hirai K, Aliev G, Drew KL, Nunomura A, Takeda A, Cash AD, Obrenovich ME, Perry G, Smith MA (2002) Role of mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease. *J Neurosci Res* 70:357–360
- Chagnon P, Betard C, Robitaille Y, Cholette A, Gauvreau D (1995) Distribution of cytochrome oxidase activity in various neurodegenerative diseases. *Mol Neurosci* 6:711–715
- Chagnon P, Gee M, Filion M, Robitaille Y, Belouchi M, Gauvreau D (1999) Phylogenetic analyses of the mitochondrial genome indicates significant differences between patients with Alzheimer disease and controls in a French–Canadian founder population. *Am J Med Genet* 85:20–30
- Chinnery PF, Johnson M, Taylor RW, Lightowlers RN, Turnbull DM (1997) A novel mitochondrial tRNA phenylalanine gene mutation presenting with acute rhabdomyolysis. *Ann Neurol* 41:408–410

Chinnery PF, Taylor GA, Howell N, Andrews RM, Morris CM, Taylor RW, McKeith IG, Perry RH, Edwardson JA, Turnbull DM (2000) Mitochondrial DNA haplogroups and susceptibility to AD and dementia with Lewy bodies. *Neurol* 55:302–304

Chinnery PF, Taylor GA, Howell N, Brown DT, Parsons TJ, Turnbull DM (2001) Point mutations of the mtDNA control region in normal and neurodegenerative human brains. *Am J Hum Genet* 68:529–532

Coskun PE, Beal MF, Wallace DC (2004) Alzheimer's brains harbor somatic mtDNA control-region mutations that suppress mitochondrial transcription and replication. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:10726–10731

Cottrell DA, Blakely EL, Johnson MA, Ince PG, Turnbull DM (2001) Mitochondrial enzyme-deficient hippocampal neurons and choroidal cells in AD. *Neurology* 57:260–264

Cottrell DA, Borthwick GM, Johnson MA, Ince PG, Turnbull DM (2002) The role of cytochrome c oxidase deficient hippocampal neurons in Alzheimer's disease. *J Neuropath Appl Neurobiol* 28:390–396

Crouch PJ, Blake R, Duce JA, Ciccotosto GD, Li Q-X, Barnham KJ, Curtain CC, Cherny RA, Cappai R, Dyrks T, Masters CL, Trounce IA (2005) Copper-dependent inhibition of human cytochrome c oxidase by a dimeric conformer of amyloid- β 1–42. *J Neurosci* 25:672–679

Danielson SR, Carelli V, Tan G, Martinuzzi A, Schapira AHV, Savontaus M-L, Cortopassi GA (2005) Isolation of transcriptomal changes attributable to LHON mutations and the cybridization process. *Brain* 128:1026–1037

DiMauro S, Schon E (2001) Mitochondrial DNA mutations in human disease, *Am J Med Genet* 106:18–26

Elson JL, Turnbull DM, Howell N (2004) Comparative genomics and the evolution of human mitochondrial DNA: assessing the effects of selection. *Am J Hum Genet* 74:229–238

Ghosh SS, Swerdlow RH, Miller SW, Sheeman B, Parker WD, Davis RE (1999) Use of cytoplasmic hybrid lines for elucidating the role of mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Ann NY Acad Sci* 893:176–191

Gonnet GH, Cohen MA, Benner SA (1992) Exhaustive matching of the entire protein sequence database. *Science* 256:1443–1445

Herrnstadt C, Howell N (2004) An evolutionary perspective on pathogenic mtDNA mutations: haplogroup associations of clinical disorders. *Mitochondrion* 4:791–798

Herrnstadt C, Elson JL, Fahy E, Preston G, Turnbull DM, Anderson C, Ghosh SS, Olefsky JM, Beal MF, Davis RE, Howell N (2002) Reduced-median-network analysis of complete mitochondrial DNA coding-region sequences for the major African, Asian, and European haplogroups. *Am J Hum Genet* 70:1152–1171

Herrnstadt C, Preston G, Howell N (2003) Errors, phantom and otherwise, in human mtDNA sequences. *Am J Hum Genet* 72:1585–1586

Hirai K, Aliev G, Nunomura A, Fujioka H, Russell RL, Atwood CS, Johnson AB, Kress Y, Vinters HV, Tabaton M, Shimohama S, Cash AD, Siedlak SL, Harris PLR, Jones PK, Petersen RB, Perry G, Smith MA (2001) Mitochondrial abnormalities in Alzheimer's disease. *J Neurosci* 21:3017–3023

Howell N, Oostra R-J, Bolhuis PA, Spruijt L, Clarke LA, Mackey DA, Preston G, Herrnstadt C (2003a) Sequence analysis of the mitochondrial genomes from Dutch pedigrees with Leber hereditary optic neuropathy. *Am J Hum Genet* 72:1460–1469

Howell N, Smejkal CB, Mackey DA, Chinnery PF, Turnbull DM, Herrnstadt C (2003b) The pedigree rate of sequence divergence in the human mitochondrial genome: there is a difference between phylogenetic and pedigree rates. *Am J Hum Genet* 72:659–670

Howell N, Elson JL, Chinnery PF, Turnbull DM (2005) mtDNA mutations and common neurodegenerative disorders. *Trends Genet* 21:583–584

Ioannidis JPA (2005) Why most published research findings are false. *PloS Med* 2:e124

Ito S, Ohta S, Nishimaki K, Kagawa Y, Soma R, Kuno S, Komatsuzaki Y, Mizusawa H, Hayashi J-I (1999) Functional integrity of mitochondrial genomes in human platelets and autopsied brain tissues from elderly patients with Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:2099–2103

Keers SM, Gibson AM, Turnbull DM, Chinnery PF (2004) No evidence of an association between the mtDNA 16184-93 polyC tract and late onset dementia. *J Med Genet* 41:957–958

Khan SM, Cassarino DS, Abramova NN, Keeney PM, Borland MK, Trimmer PA, Krebs CT, Bennett JC, Parks JK, Swerdlow RH, Parker WD, Bennett JP (2000) Alzheimer's disease cybrids replicate β -amyloid abnormalities through cell death pathways. *Ann Neurol* 48:148–155

Kish SJ, Bergeran C, Rajput A, Dozie S, Mastrogiacono F, Chang LJ, Wilson JM, DiStefano LM, Nobrega JN (1992) Brain cytochrome oxidase activity is reduced in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 59:776–779

Kish SJ, Mastrogiacono F, Guttman M, Furukawa Y, Taanman J-W, Dozie S, Pandolfo M, Lamarche J, DiStefano L, Chang L-J (1999) Decreased brain protein levels of cytochrome oxidase subunits in Alzheimer's disease and in hereditary spincerebellar ataxia disorders: a nonspecific change? *J Neurochem* 72:700–707

Kondrashov FA (2005) Prediction of pathogenic mutations in mitochondrially encoded human tRNAs. *Hum Mol Genet* 14:2415–2419

Lehtonen MS, Moilanen JS, Majamaa K (2003) Increased variation in mtDNA in patients with familial sensorineural hearing impairment. *Hum Genet* 113:220–227

Lin MT, Simon DK, Ahn CG, Kim LM, Beal MF (2002) High aggregate burden of somatic mtDNA point mutations in aging and Alzheimer's disease brain. *Hum Mol Genet* 11:133–145

Maurer I, Zierz S, Moller H-J (2000) A selective defect of cytochrome c oxidase is present in brain of Alzheimer's disease patients. *Neurobiol Aging* 21:455–462

Mayeux R (2003) Epidemiology of neurodegeneration. *Ann Rev Neurosci* 26:81–104

McFarland R, Elson JL, Taylow RW, Howell N, Turnbull DM (2004a) Assigning pathogenicity to mitochondrial tRNA mutations: when “definitely maybe” is not good enough. *Trends Genet* 20:591–596

McFarland R, Taylor RW, Chinnery PF, Howell N, Turnbull DM (2004b) A novel sporadic mutation in cytochrome c oxidase subunit II as a cause of rhabdomyolysis. *Neuromuscul Disord* 14:162–166

Moilanen JS, Majamaa K (2003) Phylogenetic network and physiochemical properties of nonsynonymous mutations in the protein-coding genes of human mitochondrial DNA. *Mol Biol Evol* 20:1195–1210

Mutisya EM, Bowling AC, Beal MF (1994) Cortical cytochrome oxidase activity is reduced in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 63:2179–2184

Niemi A-K, Hervonen A, Hurme M, Karhunen PJ, Jylhä M, Majamaa K (2003) Mitochondrial DNA polymorphisms associated with longevity in a Finnish population. *Hum Genet* 112:29–33

Ng PC, Henkoff JG, Henikoff S (2000) PHAT: a transmembrane-specific substitution matrix. *Bioinformatics* 16:760–766

Parker WD, Parks JK (2005) Mitochondrial ND5 mutations in idiopathic Parkinson's disease. *Biochem Biophys Res Commun* 326:667–669

Parker WD, Filley CM, Parks JK (1990) Cytochrome oxidase deficiency in Alzheimer's disease. *Neurol* 40:1302–1303

Parker WD, Parks JK, Filley CM, Kleinschmidt-Demasters BK (1994) Electron transport chain defects in Alzheimer's disease brain. *Neurol* 44:1090–1096

Persson B, Argos P (1994) Prediction of transmembrane segments in proteins utilizing multiple sequence alignments. *J Mol Biol* 237:182–192

Richards M, Macaulay V, Hickey E, Vega E, Sykes B, Guida V, Rengo C, Sellitto D, Cruciani F, Kivisild T, Villems R, Thomas M, Rychkov S, Rychkov O, Rychkov Y, Golge M, Dimitrov D, Hill E, Bradley D, Romano V, Cali F, Vona G, Demaine A, Papiha S, Triantaphydis C, Stefanescu G, Hatina J, Belledi M, Di renzo A, Novelletto A, Oppenheim A, Norby S, Al-Zaheri N,

- Santachiara-Benerecetti S, Scozzari R, Torroni A, Bandelt H-J (2000) Tracing European founder lineages in the Near Eastern mtDNA pool. *Am J Hum Genet* 67:1251–1277
- Rose G, Passarino G, Carrieri G, Altomare K, Greco V, Bertolini S, Bonafe M, Franceschi C, De Benedictis G (2001) Paradoxes in longevity: sequence analysis of mtDNA haplogroup J in centenarians. *Eur J Hum Genet* 9:701–707
- Roubertoux PL, Sluyter F, Carlier M, Marcet B, Maarouf-Veray F, Cherif C, Marcian C, Arrechi P, Godin F, Jamon M, Verrier B, Cohen-Salmon C (2003) Mitochondrial DNA modifies cognition in interaction with the nuclear genome and age in mice. *Nat Genet* 35:65–69
- Schon EA, Manfredi G (2003) Neuronal degeneration and mitochondrial dysfunction. *J Clin Invest* 111:303–31
- Schon EA, Shoubridge EA, Moraes CT (1998) Cybrids in Alzheimer's disease: a cellular model of the disease? *Neurology* 51:326–327
- Simonian NA, Hyman BT (1993) Functional alterations in Alzheimer's disease: diminution of cytochrome oxidase in the hippocampal formation. *J Neuropath Exp Neurol* 52:580–585
- Simonian NA, Hyman BT (1994) Functional alterations in Alzheimer's disease: selective loss of mitochondrial-encoded cytochrome oxidase mRNA in the hippocampal formation. *J Neuropath Exp Neurol* 53:508–512
- Smith MA, Drew KL, Nunomara A, Takeda A, Hirai K, Zhu X, Atwood CS, Raina AK, Rottkamp CA, Sayre LM, Friedland RP, Perry G (2002) Amyloid- β , tau alterations and mitochondrial dysfunction in Alzheimer disease: the chickens or the eggs? *Neurochem Int* 40:527–531
- Swerdlow RH, Parks JK, Cassarino DS, Maguire DJ, Maguire RS, Bennett JPJ, Davis RE, Parker WD (1997) Cybrids in Alzheimer's disease: a cellular model of the disease? *Neurology* 49:918–925
- Thomas PD, Kejariwal A (2004) Coding single-nucleotide polymorphisms associated with complex vs. Mendelian disease: evolutionary evidence for differences in molecular effects. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:15398–15403
- Trimmer PA, Swerdlow RH, Parks JK, Keeney P, Bennett JP, Miller SW, Davis RE, Parker WD (2000) Abnormal mitochondrial morphology in sporadic Parkinson's and Alzheimer's disease cybrid cell lines. *Exp Neurol* 162:37–50
- Trimmer PA, Keeney PM, Borland MK, Simon FA, Almeida J, Swerdlow R, Parks JP, Parker WD, Bennett JP (2004) Mitochondrial abnormalities in cybrid cell models of sporadic Alzheimer's disease worsen with passage in culture. *Neurobiol Dis* 15:29–39
- Valla J, Berndt JD, Gonzalez-Lima F (2001) Energy hypometabolism in posterior cingulate cortex of Alzheimer's patients: superficial laminar cytochrome oxidase associated with disease duration. *J Neurosci* 21:4923–4930

Vilmi T, Moilanen JS, Finnila S, Majamaa K (2005) Sequence variation in the tRNA genes of human mitochondrial DNA. *J Mol Evol* 60:587–597

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, Doraisamy PM, Gilbert JR, Haines JL, Vance JM, Pericak-Vance MA (2004) Analysis of European mitochondrial haplogroups with Alzheimer disease risk. *Neurosci Lett* 365:28–32

Zhu X, Raina AK, Perry G, Smith MA (2004) Alzheimer's disease: the two-hit hypothesis. *Lancet Neurol* 3:219–226