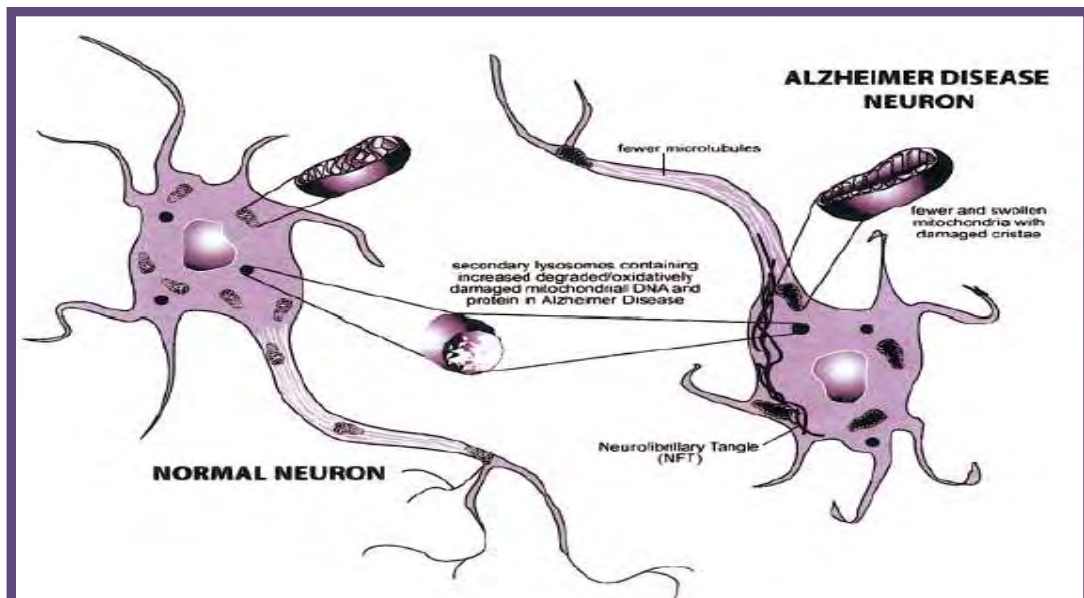


*ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ*

*«ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ - ΜΟΡΙΑΚΗ  
ΓΕΝΕΤΙΚΗ - ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ»*

**“ΚΛΗΡΟΝΟΜΙΚΟΤΗΤΑ & ALZHEIMER ”**

*ΤΣΙΓΓΕΝΕ ΑΝΘΗ*



Επιβλ. Καθηγήτρια : Ζίφα Αιμιλία

*Κληρονομικότητα & Alzheimer*

*Inheritance & Alzheimer Disease*

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

*Ζίφα Αιμιλία : Επίκουρος Καθηγήτρια Βιολογίας –  
Νευροβιολογίας - Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας,  
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.*

*Μαμούρης Ζήσης : Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών -  
Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.*

*Χατζηγεωργίου Γεώργιος : Αναπληρωτής Καθηγητής  
Νευρολογίας – Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.*

## *ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ*

Προτού ξεκινήσει η λεπτομερής παρουσίαση της μεταπτυχιακής μου διατριβής, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την επίκουρο καθηγήτρια Βιολογίας – Νευροβιολογίας, Αιμιλία Ζίφα για την ευκαιρία που μου έδωσε να πραγματοποιήσω την παρούσα εργασία στο εργαστήριο Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Θα ήθελα ακόμη να την ευχαριστήσω για τις γνώσεις μου μετέδωσε κατά τη διάρκεια διεξαγωγής της παρούσας εργασίας, τον χρόνο που διέθεσε και την πολύτιμη βοήθειά της.

Ακόμη θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερος τον μεταδιδακτορικό συνεργάτη κ. Κ. Σταμάτη καθώς και τον υποψήφιο διδάκτορα Θ. Γιαννούλη για την πολύτιμη βοήθειά και καθοδήγηση που μου προσέφεραν κατά τη διάρκεια της συνεργασίας μας. Καθώς επίσης και τους μεταπτυχιακούς φοιτητές του εργαστηρίου και τους λοιπούς συναδέλφους για το φιλικό περιβάλλον και τη δημιουργική συνεργασία που μου προσέφεραν κατά την εκπόνηση της ερευνητικής μου εργασίας.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω τους Ε. Τράντου και Κ. Θεοδωρίκα για την βοήθεια που μου προσέφεραν κατά την εκπόνηση της εν λόγω έρευνας, καθώς επίσης την οικογένεια μου και τα άτομα του στενού φιλικού περιβάλλοντός μου για την αμέριστη συμπαράσταση και υποστήριξη τους .

# **ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ**

<b>Περίληψη</b> .....	7
<b>Abstract</b> .....	8
<b>Κεφάλαιο 1 : Εισαγωγή</b>	
1.1 Μιτοχόνδρια .....	10
1.1.1 Δομή μιτοχονδρίων .....	11
1.1.2 Μιτοχονδριακές λειτουργίες .....	12
1.1.3 Μιτοχονδριακό γονιδίωμα .....	16
1.1.4 Μιτοχονδριακά tRNAs .....	17
1.1.5 Μιτοχονδριακές ασθένειες .....	20
1.1.5.1 Νευροεκφυλιστικές ασθένειες .....	22
1.2 Νόσος Alzheimer .....	23
1.2.1 Συμπτωματολογία - Διάγνωση – Θεραπεία .....	23
1.2.2 Παθοφυσιολογία της νόσου .....	24
1.2.3 Γενετικό υπόβαθρο της νόσου .....	28
1.3 Ο ρόλος των μιτοχονδρίων στη νόσο Alzheimer .....	30
1.4 Το γονίδιο tRNA <sup>Leu(UUR)</sup> .....	33
<b>Κεφάλαιο 2 : Υλικά &amp; Μέθοδοι</b>	
<b>Υλικά και μέθοδοι</b>	
2.1 Βιολογικό υλικό .....	37
2.2 Μεθοδολογία .....	37

2.2.1 Απομόνωση DNA .....	37
2.2.1.1 Ποιοτική ανάλυση προϊόντων .....	38
2.2.2 Polymerase chain reaction (PCR) .....	39
2.2.2.1 Ποιοτική ανάλυση προϊόντων PCR .....	41
2.2.3 Single strand confirmation polymorphism (SSCP) .....	42
2.2.4 Καθαρισμός προϊόντων PCR .....	46
2.2.5 Αλληλούχηση προϊόντων .....	47
2.2.6 Στατιστική ανάλυση .....	48
<b>Κεφάλαιο 3 : Αποτελέσματα .....</b>	<b>49</b>
<b>Κεφάλαιο 4 : Συζήτηση .....</b>	<b>58</b>
<b>Παραρτήματα .....</b>	<b>62</b>
<b>Βιβλιογραφία.....</b>	<b>66</b>

## **ΠΕΡΙΛΗΨΗ**

Η νόσος Alzheimer είναι μία πολυπαραγοντική νευροεκφυλιστική διαταραχή που πλήττει σήμερα μεγάλο ποσοστό των ατόμων μέσης ηλικίας. Χαρακτηρίζεται από την εμφάνιση νευροϊνιδικών σωρών και γεροντικών πλακών στον εγκέφαλο ασθενών ατόμων. Το γενετικό υπόβαθρο της νόσου επηρεάζεται σημαντικά από το μιτοχονδριακό γονιδίωμα. Στο μιτοχονδριακό DNA περιλαμβάνονται γονίδια που κωδικοποιούν ριβοσωμικά και μεταφορικά RNAs καθώς και πρωτεΐνες της αναπνευστικής αλυσίδας. Μεταλλάξεις στα tRNAs είναι εκείνες που μπορούν να επηρεάσουν ολόκληρη την πρωτεϊνοσύνθεση.

Στην παρούσα έρευνα έγινε μία προσπάθεια συσχέτισης του μιτοχονδριακού tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> με τη νόσο. Για το λόγο αυτό αναζητήθηκαν μεταλλάξεις στο γονίδιο που το κωδικοποιεί μέσα σε ένα εύρος 50 ατόμων με διαγνωσμένη νόσο Alzheimer και 20 υγιών ατόμων. Στο γονίδιο αυτό δεν εντοπίστηκε καμία μετάλλαξη τόσο στους ασθενείς όσο και στους υγιείς. Εντοπίστηκαν πέντε μεταλλάξεις σε περιοχές παρακείμενων γονιδίων. Οι T3398C, G3357A και A3360G εντοπίστηκαν στην περιοχή του γονιδίου ND1, ενώ οι A3213G και T3197C εντοπίστηκαν στο 16S rRNA. Όλες οι παραπάνω μεταλλάξεις βρέθηκαν μόνο σε ασθενή άτομα εκτός από την A3213G που βρέθηκε μόνο σε υγιή.

Τα αποτελέσματα της έρευνας συγκρίθηκαν και προστέθηκαν με τα αντίστοιχα προγενέστερης έρευνας που πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Γενετικής, Συγκριτικής & Εξελικτικής Βιολογίας. Η στατιστική ανάλυση των συνολικών δεδομένων αποκάλυψε ότι μόνο η T319C μπορεί να σχετίζεται με την εκδήλωση της νόσου καθώς η τιμή P δεν ξεπέρασε το όριο του 0,05, σε αντίθεση με τις υπόλοιπες μεταλλάξεις που έδωσαν τιμές πιθανότητας (P) μεγαλύτερες του 0,05 (στατιστικά μη σημαντικές) και αποτελούν πιθανώς τυχαίους πολυμορφισμούς του πληθυσμού.

## ***ABSTRACT***

Alzheimer disease is a multifunctional neurodegenerative disorder that currently affects a significant number of middle age people. Characterized by neurofibrillary tangles and senile plaques which appear in the brain of patients. Its genetic background appears to be affected by the mitochondrial genome. The mtDNA includes genes that encode ribosomal and transport RNAs and molecules of the respiratory chain. Mutations in the tRNAs can affect the entire protein synthesis.

In this dissertation, we investigated the association between the mitochondrial tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> and the AD. For this reason we searched for any mutations in that gene within a range of 50 patients with Alzheimer disease and 20 healthy persons. No mutation was detected in tRNA<sup>Leu(UUR)</sup>, neither in healthy persons nor in patients, which probably suggests that there was no correlation between them. Although, five mutations were detected in neighboring genes. The T3398C, G3357A and A3360G were detected in ND1 coding region, beside the T3197C and A3213G were detected in 16S rRNA. All mutations were identified only in patients with Alzheimer, except from the A3213G which was found in healthy people only.

The results of the research were compared and aggregated with those of previous research conducted in the laboratory of Genetics, Comparative & Evolutionary Biology. The statistical analysis of the overall data revealed that only the T319C may be associated with the illness as the P value did not exceed the limit of 0.05, in contrast with other mutations that gave values of probability (P) higher than 0.05 (statistically not significant) and are probably random population polymorphisms.



# ***ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1***

## ***ΕΙΣΑΓΩΓΗ***

## 1.1 ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑ

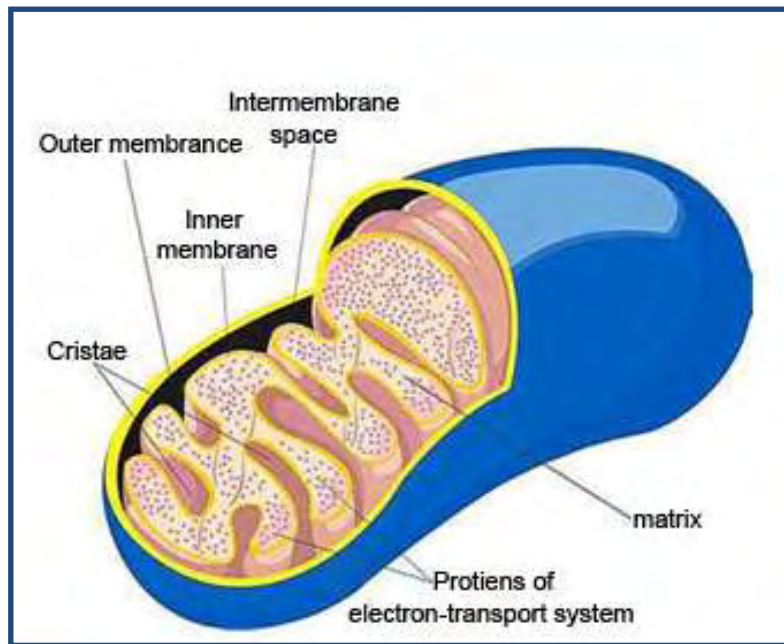
Τα μιτοχόνδρια είναι ημιαυτόνομα και αυτοαναπαραγόμενα κυτταρικά οργανίδια που εντοπίζονται στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Συμμετέχουν σε αρκετές κυτταρικές διεργασίες ενώ συχνά χαρακτηρίζονται «ενεργειακά κέντρα του κυττάρου» ή «εργοστάσια ενέργειας» γιατί με τα ένζυμα που διαθέτουν διεκπεραιώνουν όλα τα βήματα για τον αερόβιο μεταβολισμό των κυττάρων. Στα ευκαρυωτικά κύτταρα συναντούμε ένα ή περισσότερα μιτοχόνδρια τα οποία καταλαμβάνουν συνήθως το 20% του κυτταρικού όγκου. Ο αριθμός των μιτοχονδρίων ποικίλει ανάλογα με το είδος του οργανισμού αλλά και το είδος του κυττάρου. Χαρακτηριστικά, στα αυγά των αμφιβίων υπάρχουν πάνω από 10000 μιτοχόνδρια ανά κύτταρο, ενώ στα ηπατικά κύτταρα των θηλαστικών 1000-1500. Ωστόσο, ο αριθμός των μιτοχονδρίων εμφανίζεται αυξημένος σε κύτταρα με υψηλές ενεργειακές απαιτήσεις όπως τα μυϊκά και τα νευρικά κύτταρα (Berg J et al 2004, Alberts B et al 2006, Bonda D et al 2010).

Η σχετική αυτοδυναμία των μιτοχονδρίων οδηγεί τους επιστήμονες στην υπόθεση ότι προήλθαν από προκαρυωτικούς οργανισμούς, ενσωματώθηκαν στα αρχέγονα ευκαρυωτικά κύτταρα και εξελίχθηκαν συμβιώνοντας με αυτά. Πιο συγκεκριμένα πιστεύεται ότι προήλθαν από αερόβιους βακτηριακούς πληθυσμούς πριν από περίπου 1,5 δισεκατομμύρια χρόνια μέσα από μια διαδικασία ενδοσυμβίωσης τους με αρχέγονους ευκαρυώτες. Συμπτύχθηκαν και εξελίχθηκαν παράλληλα με αυτούς προσδίδοντας τους την ικανότητα του αερόβιου μεταβολισμού. Αρκετά από τα χαρακτηριστικά των μιτοχονδρίων ενισχύουν την υπόθεση αυτή, όπως είναι η διπλή μεμβράνη που διαθέτουν και το κυκλικό γονιδίωμα (Reddy P et al 2005, Mancuso M et al 2009b).

### **1.1.1 ΔΟΜΗ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΩΝ**

Η μορφή και το μέγεθος των μιτοχονδρίων θυμίζει τα βακτηριακά κύτταρα, αν και ποικίλουν ανάλογα με το είδος του κυττάρου. Ένα τυπικό μιτοχόνδριο έχει σωληνοειδές σχήμα με διάμετρο 0,2-1  $\mu\text{m}$  και είναι ορατό στο φωτονικό μικροσκόπιο.

Οι ερευνητές G. Palade και F. Sjostrand μέσα από μελέτες ηλεκτρονικής μικροσκοπίας αποκάλυψαν ότι τα μιτοχόνδρια διαθέτουν δύο συστήματα μεμβρανών: μία εξωτερική μεμβράνη και μία μεγάλων διαστάσεων πτυχωτή εσωτερική μεμβράνη. Η εξωτερική μεμβράνη είναι εκείνη που περιορίζει το οργανίδιο από το υπόλοιπο κυτταρόπλασμα. Είναι λεία και σχηματίζει ευρείς υδρόφιλους διαύλους διαμέσου της λιπιδικής διπλοστοιβάδας, διαθέτοντας πολλά μόρια πορινών και γι' αυτό λειτουργεί ως ηθμός διαπερατός από όλα τα μόρια με μοριακό βάρος μικρότερο των 50KDa. Αντίθετα, η εσωτερική μεμβράνη είναι αδιαπέραστη από όλα τα ιόντα και τα πολικά μόρια και διαθέτει αρκετούς μεταφορείς που προάγουν τη μετατόπιση μορίων διαμέσου αυτής (Berg J et al 2004). Ακόμη η εσωτερική μεμβράνη είναι πολλές φορές αναδιπλωμένη σχηματίζοντας μεγάλο αριθμό εγκολλώσεων που ονομάζονται «πτυχές». Οι «πτυχές» ποικίλουν σε αριθμό και μορφολογία στα διάφορα κύτταρα ωστόσο ο βασικός προορισμός τους είναι η αύξηση της επιφάνειας της εσωτερικής μεμβράνης σε σχέση με τον όγκο του μιτοχονδρίου. Οι δύο μεμβράνες διαχωρίζουν το μιτοχόνδριο σε δυο διακριτά διαμερίσματα: τον διαμεμβρανικό και τον εσωτερικό χώρο. Ο διαμεμβρανικός χώρος είναι ο χώρος που περικλείεται από τις δυο μεμβράνες, ενώ ο εσωτερικός είναι ο χώρος που περικλείεται από την εσωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου. Ο εσωτερικός χώρος καλείται μήτρα (matrix) και περιέχει τα ένζυμα του μιτοχονδρίου και το γονιδιώμά του [Εικόνα 1] (Μαρμάρας Β, Μαρμάρα - Λαμπροπούλου Μ 2005, Alberts Β et al 2006, Mancuso Μ et al 2008, 2009a).



**Εικόνα 1.** Η δομή του μιτοχονδρίου. Διακρίνονται η εξωτερική μεμβράνη (*outer membrane*), η εσωτερική (*inner membrane*) με τις χαρακτηριστικές πτυχώσεις (*cristae*), ο ενδομεμβρανικός χώρος (*intarmembrance space*) & η μήτρα (*matrix*).

### **1.1.2 ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ ΤΩΝ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΩΝ**

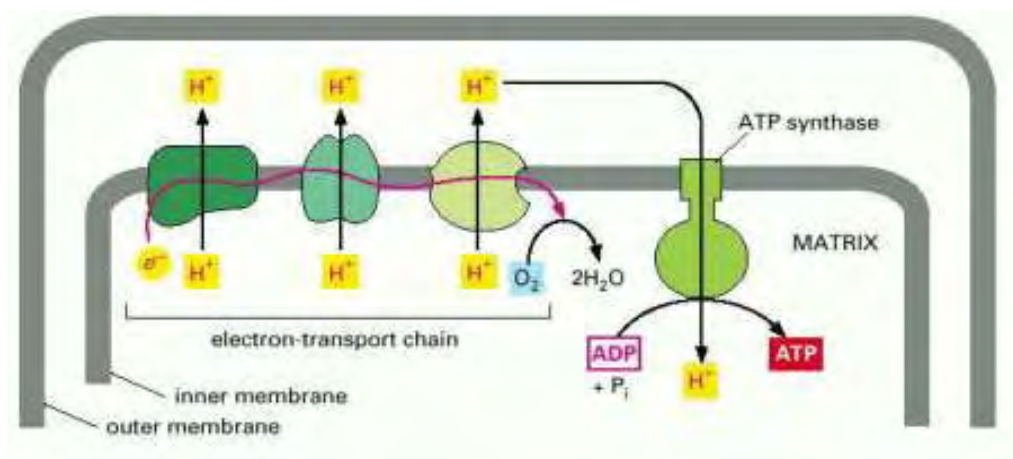
Τα μιτοχόνδρια είναι οργανίδια απαραίτητα για την επιβίωση των ευκαρυωτικών κυττάρων καθώς συμμετέχουν σε πλήθος διεργασιών. Κατέχουν βασικό ρόλο στον αερόβιο μεταβολισμό των ευκαρυώτων μέσα από τη διεξαγωγή της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Συμμετέχουν στην διαδικασία της απόπτωσης, μεσολαβούν στη βιοσύνθεση των αμινοξέων, την οξείδωση των λιπαρών οξέων, την παραγωγή ενεργών ριζών οξυγόνου (ROS) καθώς και στην παραγωγή πυριμιδίνων, ορισμένων ορμονών και άλλων μεταβολιτών.

#### **Οξειδωτική φωσφορυλίωση**

Τα μιτοχόνδρια, όπως ήδη αναφέρθηκε, χαρακτηρίζονται ως τα εργοστάσια παραγωγής ενέργειας του κυττάρου. Ο χαρακτηρισμός αυτός δόθηκε γιατί εδώ παράγεται το μεγαλύτερο μέρος της τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP). Το μόριο

αυτό αποτελεί το μοριακό νόμισμα του κυττάρου για την παραγωγή και τη μεταφορά ενέργειας.

Το μόριο της ATP παράγεται από τα μιτοχόνδρια μέσα από μια διαδικασία μεταφοράς ηλεκτρονίων από τα NADH και FADH<sub>2</sub> προς το O<sub>2</sub> μέσω μιας σειράς φορέων ηλεκτρονίων που περιγράφεται ως οξειδωτική φωσφορυλίωση. Πιο αναλυτικά, τα ηλεκτρόνια από διάφορα υποστρώματα μέσω του κύκλου του Krebs μεταφέρονται στα NADH και FADH<sub>2</sub>. Έπειτα από αυτά και μέσα από τα σύμπλοκα της αναπνευστικής αλυσίδας, τα ηλεκτρόνια μεταφέρονται από το NADH μέσω της οξειδοαναγωγής του ζεύγους NADH-Q (σύμπλοκο I) στην ουβικινόνη Q. Τα ηλεκτρόνια που προέρχονται από το FADH<sub>2</sub> μεταφέρονται και αυτά στην ουβικινόνη Q μέσω της αναγωγής του ζεύγους ηλεκτρικού - Q (σύμπλοκο II). Από την ουβικινόνη Q ρέουν μέσω της οξειδοαναγωγής του ζεύγους Q-κυτόχρωμα c (σύμπλοκο III) στο κυτόχρωμα c. Και στη συνέχεια αυτό το κυτόχρωμα c διαμέσου της οξειδάσης του κυτοχρώματος c (σύμπλοκο IV) καταλήγουν στην αναγωγή του O<sub>2</sub> [Εικόνα 2]. Τα σύμπλοκα της αναπνευστικής αλυσίδας βρίσκονται στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη και κατά τη μεταφορά ηλεκτρονίων αντλούν πρωτόνια από τη μιτοχονδριακή μήτρα (εκτός του συμπλόκου II). Έτσι δημιουργείται μια ηλεκτροχημική βαθμίδωση διαμέσου της εσωτερικής μεμβράνης που παρέχει την ενέργεια για την παραγωγή μορίων (Shonner J 1997, Graeber M, Muller U 1998, Berg J et al 2004, Monte S 2011).



**Εικόνα 2:** Αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων διαμέσου της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης και της συνθέσεως της ATP (Alberts B et al 2005).

Η σύνθεση του ATP αποτελεί το τελευταίο βήμα της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης και διεκπεραιώνεται από τη συνθετάση της ATP (σύμπλοκο V). Το ένζυμο αυτό αποτελείται από δύο τμήματα  $F_1$  και  $F_0$ . Το τμήμα  $F_0$  του ενζύμου είναι δεσμευμένο στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη και είναι υπεύθυνο για τη μεταφορά των πρωτονίων. Ενώ το τμήμα  $F_1$  προεξέχει σαν κεφαλή στη μιτοχονδριακή μήτρα και αποτελεί την καταλυτική περιοχή του ενζύμου. Η συνθετάση της ATP ουσιαστικά είναι ένας μοριακός κινητήρας που αποτελείται από δύο μονάδες: μια περιστρεφόμενη ( $F_1$ ) και μια σταθερή ( $F_0$ ). Χρησιμοποιεί το σύμπλοκο  $Mg^{+2}$ -ADP και ανόργανο φώσφορο και εκμεταλλεύεται την ηλεκτροχημική βαθμίδωση των πρωτονίων για να περιστραφεί και να φωσφοριώσει το ADP σε ATP, το οποίο και απελευθερώνεται από το ένζυμο (Berg J. et al 2004, Fukui H et al 2008, Monte S 2011).

Ακόμη, η ATP συνθετάση εκτός από τη σύνθεση του ATP, αξιοποιώντας τη βαθμίδωση των πρωτονίων μπορεί να ωθεί και τα πρωτόνια ενάντια στην ηλεκτροχημική βαθμίδωση με ηλεκτρόλυση ATP (Μαρμάρας Β, Μαρμάρα-Λαμπροπούλου Μ 2005).

### Απόπτωση

Κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης ενός οργανισμού ή σε περιπτώσεις σημαντικής κυτταρικής βλάβης σε επιμέρους κύτταρα παρατηρείται προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος ή απόπτωση. Τα μιτοχόνδρια δρουν ως κέντρα ελέγχου που ρυθμίζουν αυτή τη διεργασία. Αυτό συμβαίνει γιατί πολλά από τα απαραίτητα συστατικά της απόπτωσης όπως το κυτόχρωμα c βρίσκεται μέσα στα μιτοχόνδρια.

Το μιτοχονδριακό αποπτωτικό μονοπάτι ενεργοποιείται ως απόκριση σε ποικίλους τύπους ενδοκυτταρικού στρες, όπως για παράδειγμα οι βλάβες στο DNA και η σηματοδότηση μέσω υποδοχέων θανάτου (death receptors), και μπορεί να ακολουθήσει ποικίλες πορείες. Συνήθως ξεκινά με τη αλληλεπίδραση του παράγοντα FasL, μέλος της οικογένειας TNFR, με τον προσδέτη του Fas. Στο σύμπλοκο προστίθεται ο παράγοντας FADD και σε αυτόν μέσω των περιοχών DED (Death Effector Domain) δεσμεύεται η προκασπάση 8 και σχηματίζεται το σύμπλοκο DISC (Death Inducing Signaling Complex). Έπειτα η προκασπάση 8 μετατρέπεται σε

κασπάση 8 και μπορεί να ακολουθηθούν δύο πορείες με τελικό στόχο την ενεργοποίηση των κασπασών 3 και 9. Στην πρώτη πορεία η κασπάση 8 αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη BID, μέλος της οικογένειας των πρωτεϊνών Bcl. Κατά την αλληλεπίδραση το καρβοξυτελικό άκρο της BID αποκόπτεται και μεταφέρεται στα μιτοχόνδρια όπου ενεργοποιεί την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c, το οποίο στη συνέχεια μέσω του παράγοντα Apaf θα ενεργοποιήσει τις κασπάσες 9 και 3. Ενώ στη δεύτερη πορεία η κασπάση 8 ενεργοποιεί απευθείας την κασπάση 3.

Ωστόσο όταν η απόπτωση ωθείται από αυξητικούς παράγοντες τότε ακολουθούνται τα μονοπάτια της PI3K (κινάση της 3-φωσφατιδυλοϊνσιτολης) ή της PKC (πρωτεϊνική κινάση C), όπου και τα δύο καταλήγουν στην αναστολή της αντιαποπτωτικής πρωτεΐνης BLXL (B-cell lymphoma-extra large). Η BLXL ανήκει στην οικογένεια των πρωτεϊνών - ρυθμιστών της απόπτωσης Bcl2 (B-Cell Leukemia-2) και βρίσκεται στη μεμβράνη των μιτοχονδρίων και η αναστολή της πυροδοτεί την έκκριση μορίων MMP (μεταλλοπρωτεϊνάσες της μιτοχονδριακής μήτρας) που ενισχύουν ακόμη περισσότερο την απόπτωση (Berg J et al 2004, Kim R et al 2006).

### Οξειδωτικό στρες

Η ροή των ηλεκτρονίων μέσα από την αναπνευστική αλυσίδα κατά τη διαδικασία της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης οδηγεί στην παραγωγή διαφόρων παραπροϊόντων. Κατά την αναγωγή του οξυγόνου από την οξειδάση του κυτοχρώματος c αλλά και άλλες πρωτεΐνες σχηματίζονται μικρές ποσότητες ανιόντος υπεροξειδίου και υπεροξειδίου του υδρογόνου. Οι ενώσεις αυτές χαρακτηρίζονται ως δραστικές ενώσεις οξυγόνου ή ROS. Οι ROS είναι τοξικές τόσο για τα μιτοχόνδρια όσο και για τα κύτταρα, για το λόγο αυτό υπάρχουν προστατευτικά ένζυμα για την αποφυγή μιας επικείμενης οξειδωτικής βλάβης (Shonner J 1997, Berg J et al 2004)

Στα ένζυμα αυτά συγκαταλέγεται ή δισμουτάση του υπεροξειδίου που δεσμεύει τις ρίζες υπεροξειδίου και τις μετατρέπει σε υπεροξείδιο του οξυγόνου και η γλουταθειονική υπεροξειδάση που καταλύει τη μετατροπή του υπεροξειδίου του οξυγόνου σε νερό. Η αύξηση των επιπέδων των ROS στα μιτοχόνδρια επηρεάζει την αναπνευστική αλυσίδα παρεμβαίνοντας στην λειτουργία των συμπλοκών I και III

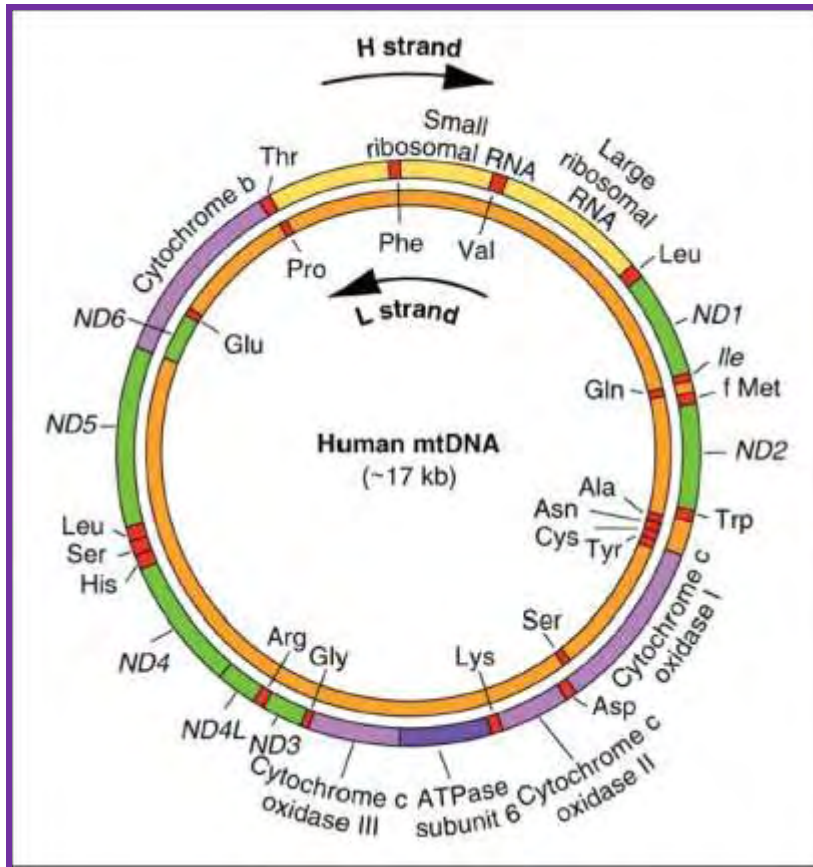
και την αναστέλλει χρησιμοποιώντας το μοριακό οξυγόνο για την παραγωγή σουπεροξειδίου. Παρατεταμένη παραγωγή των ROS μπορεί να προκαλέσει οξειδωτική καταστροφή στα μιτοχόνδρια, τα νουκλεϊκά οξέα, της κυτταρικές πρωτεΐνες και τα λιπίδια. Ενώ απότομη αύξηση των επιπέδων τους επιδρά ανασταλτικά στον κύκλο του Krebs και στα «κέντρα» της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης και καθιστά τα μιτοχόνδρια ανίκανα να παράγουν ενέργεια (Reddy P et al 2005, Petrozzi L et al 2007).

### **1.1.3 ΓΟΝΙΔΙΩΜΑ**

Το μιτοχονδριακό γονιδίωμα των θηλαστικών αποτελείται από 16,5 kb που σχηματίζουν ένα δίκλωνο κυκλικό μόριο DNA. Συνήθως κάθε μιτοχόνδριο διαθέτει 2-10 μόρια γενετικού υλικού. Σε αυτό περιλαμβάνονται συνολικά 37 γονίδια, τα οποία κωδικοποιούν ριβοσωμικά και μεταφορικά RNA καθώς και στοιχεία της αναπνευστικής αλυσίδας. Πιο συγκεκριμένα, το μιτοχονδριακό γονιδίωμα κωδικοποιεί τα ριβοσωμικά RNAs 12S και 16S και 22 γονίδια για τα tRNAs (Yang T et al 2008, Kokotas H et al 2009). Ενώ από τα υπόλοιπα 13 γονίδια που συμμετέχουν στην αναπνευστική αλυσίδα τα 7 (ND1, ND2, ND3, ND4, ND41, ND5, ND6) ανήκουν στο σύμπλοκο I (οξειδοαναγωγή του ζεύγους NADH-ουβικινόνη Q). Ένα από αυτά, το κυτόχρωμα b, ανήκει στο σύμπλοκο III (οξειδοαναγωγή του ζεύγους ουβικινόνη Q – κυτόχρωμα c). Τρία από αυτά (COXI, COXII, COXIII) ανήκουν στο σύμπλοκο IV (οξειδάση του κυτοχρώματος c) και δυο από αυτά οι ATPase C και ATPase 8 ανήκουν στο σύμπλοκο V (ATPσυνθάση) (Wallace D et al 1992, Bonilla E et al 1998, Orth M et al 2001).

Οι υπόλοιπες πρωτεΐνες που είναι απαραίτητες τόσο για την οξειδωτική φωσφορυλίωση αλλά και για τη λειτουργία του μιτοχονδρίου παράγονται από το πυρηνικό DNA και εισέρχονται στο μιτοχόνδριο (Reddy P et al 2005, Moura M et al 2010).





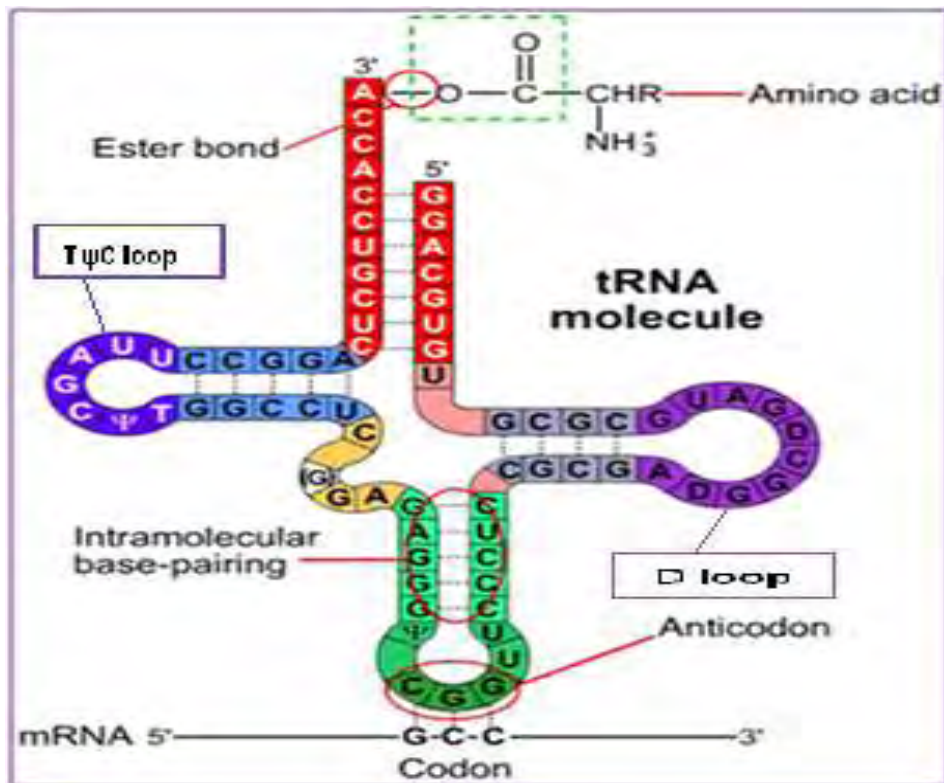
**Εικόνα 3.** Το ανθρώπινο μιτοχondριακό γονιδίωμα. Οι δύο κλώνοι (H & L strand) περιέχουν όλα τα γονίδια : τα ριβοσωμικά RNAs 12S και 16S, 22 γονίδια για τα tRNAs & 13 γονίδια που συμμετέχουν στην αναπνευστική αλυσίδα ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5, ND6, COXI, COXII, COXIII, cyt b, ATPase C & ATPase 8

### 1.1.4 ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΑ tRNAs

Η πιστότητα της πρωτεϊνοσύνθεσης είτε αυτή συμβαίνει στον πυρήνα είτε στα μιτοχόνδρια στηρίζεται στη σωστή αναγνώριση της τριπλέτας του κωδικονίου πάνω στην αλληλουχία του mRNA - αγγελιοφόρο RNA. Κάθε τριπλέτα του mRNA αναγνωρίζεται από το ένα μόριο μεταφορικού tRNA που φέρει την συμπληρωματική τριπλέτα και το αντίστοιχο αμινοξύ.

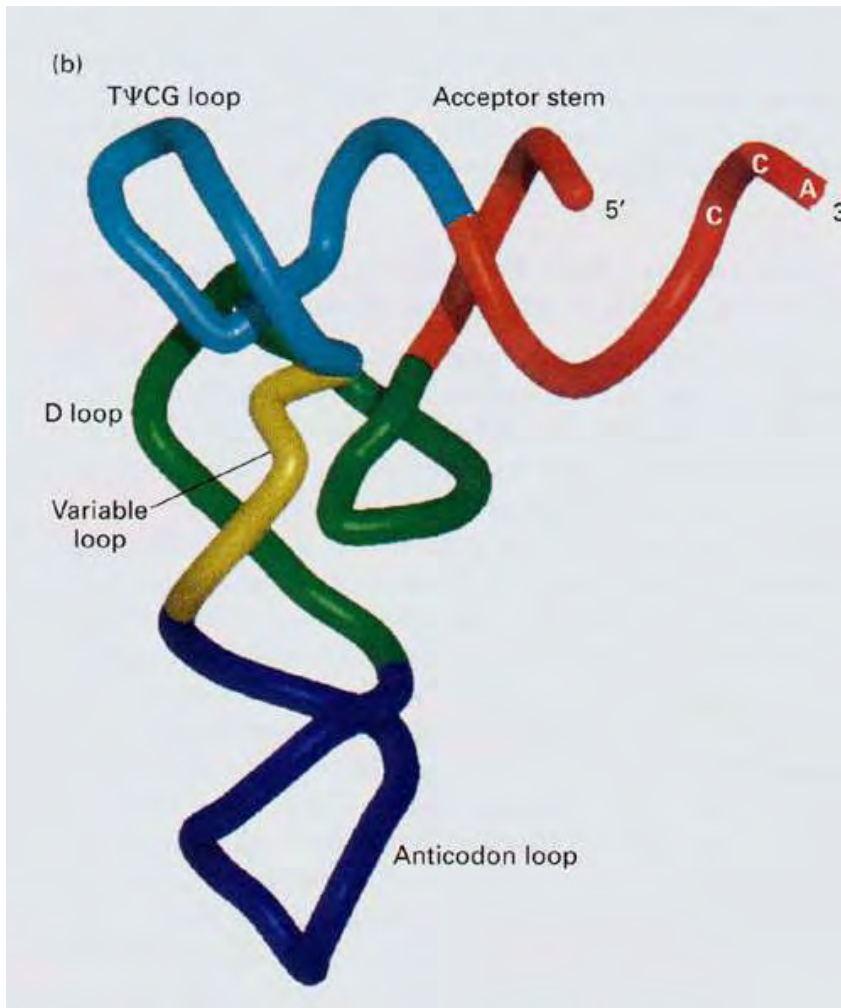
Η αλληλουχία του πρώτου tRNA ανακαλύφθηκε από τον Robert Holley το 1965 και ήταν το tRNA για το αμινοξύ αλανίνη στον ζυμομύκητα. Σταδιακά και με την ανάπτυξη της τεχνολογίας ανακαλύφθηκαν και χαρακτηρίστηκαν αρκετά ακόμη tRNAs. Όλα φαίνονται να εμφανίζουν ορισμένα κοινά χαρακτηριστικά. Είναι μικρά

μόρια μήκους 75-95 νουκλεοτιδίων που σχηματίζουν μια μονόκλωνη αλυσίδα στην πρωτοταγή δομή, ενώ έχουν χαρακτηριστική δευτεροταγή και τριτοταγή δομή (Berg J et al 2004, Lewin B 2004). Σε όλα τα tRNAs παρατηρούνται κάποιες ασυνήθιστες βάσεις οι οποίες έχουν προέλθει από μεταγραφικές τροποποιήσεις. Οι βάσεις αυτές παρεμποδίζουν τη δημιουργία δεσμών υδρογόνου στις περιοχές αυτές και χρησιμεύουν ως θέσεις αναγνώρισης για διάφορες πρωτεΐνες. Οι κυριότερες από αυτές είναι η ινοσίνη (I), η ψευδοουριδίνη ( $\psi$ ), η μεθυλοϊνοσίνη ( $M_1$ ), η διυδροουρακίλη (D) και η μεθολογουανίνη (Μαρμάρας Β, Μαρμάρα - Λαμπροπούλου Μ 2005). Όσον αφορά τη δευτεροταγή δομή του, το tRNA μπορεί να απεικονιστεί σε σχήμα τριφυλλιού [Εικόνα 3]. Στη δομή αυτή, ζεύγη συμπληρωματικών βάσεων σχηματίζουν δίκλινα στελέχη. Στα άκρα των στελεχών δημιουργούνται μονόκλωνοι βρόγχοι και οι δομές στελέχους-βρόγχου ονομάζονται βραχίονες. Σε κάθε tRNA συναντάμε 4 βραχίονες. Ο βραχίονας-δέκτης καταλήγει σε ένα βραχύ μονόκλωνο τμήμα όπου θα προσδεθεί το αμινοξύ. Ο βραχίονας ΤψC, ονομάζεται έτσι γιατί φέρει την τριπλέτα ΤψC (θυμίνη - ψευδοουριδίνη - κυτοσίνη). Ο βραχίονας αντικωδικονίου πάντα περιέχει την τριπλέτα του αντικωδικονίου. Και ο βραχίονας D ονομάζεται έτσι από τη βάση διυδροουρακίλη D που περιέχει. Όλα τα tRNAs διαθέτουν ακόμη τον επιπλέον βρόγχο ο οποίος έχει μήκος από 3-21 βάσεις και εντοπίζεται ανάμεσα στο βραχίονα ΤψC και το βραχίονα αντικωδικονίου [Εικόνα 4] (Lewin B 2004, Clark B 2005). Ακόμη, κάθε tRNA αναγνωρίζεται από την αντίστοιχη αμινο-άκυλο-tRNA συνθετάση που μεταφέρει το κατάλληλο αμινοξύ και το ενσωματώνει στο μόριο του tRNA. Το 5'-άκρο του μορίου είναι φωσφορυλιωμένο και το 5'-τελικό κατάλοιπο είναι φωσφορυλιωμένη γουανίνη (pG) συνήθως. Στο 3'-άκρο εντοπίζεται η τριπλέτα CCA, όπου και θα δεσμευτεί το κατάλληλο αμινοξύ μετά από σύνδεση στην βάση της αδενίνης (A). Στα ώριμα tRNA αυτή η περιοχή είναι μονόκλωνη. Διαθέτουν στο βραχίονα του αντικωδικονίου την αντικωδική περιοχή που ζευγαρώνει με την κωδική του mRNA. Ενώ αναγνωρίζονται και από τα ριβοσώματα. Τέλος στα tRNA παρατηρούμε κάποιες ασυνήθιστες βάσεις οι οποίες έχουν προέλθει από μεταγραφικές τροποποιήσεις (Berg J et al 2004, Lewin B 2004, Clark B 2005, Alberts B et al 2006).



**Εικόνα 4:** Η δευτεροταγής δομή των μορίων tRNA. Διακρίνονται οι βρόγχοι TψC & D, οι θέσεις δέσμευσης του κωδικονίου και η τριπλέτα του αντικωδικονίου στον αντίστοιχο βρόγχο και η θέση δέσμευσης του αμινοξέος (amino acid).

Η τρισδιάστατη δομή ενός μορίου tRNA προσδιορίστηκε έπειτα από κρυσταλλογραφικές μελέτες στο tRNA της φαινυλαλάνινης στο ζυμομύκητα το 1974. Η δομή αυτή αποδείχτηκε εντυπωσιακά όμοια με τις δομές άλλων tRNA που προσδιορίστηκαν αργότερα. Στο χώρο τα μόρια tRNA έχουν το σχήμα του γράμματος Γ [Εικόνα 5]. Στο ένα άκρο προεξέχει η μονόκλωνη αλληλουχία CCA όπου δεσμεύεται το αμινοξύ. Ενώ στο άλλο άκρο βρίσκεται ο βρόγχος του αντικωδικονίου (Berg J. et al 2004).



**Εικόνα 5:** Η τριτοταγής δομή των μορίων tRNA. Διακρίνονται ο βραχίονας δέκτης (acceptor stem - κόκκινο) όπου θα προσδεθεί το αμινοξύ, ο βρόγχος TψC (γαλάζιο), ο βρόγχος D (πράσινο), ο βρόγχος του αντικωδικονίου (μπλε) και ο επιπλέον βρόγχος (variable loop – κίτρινο).

### **1.1.5 ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΕΣ ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ**

Όπως αρμόζει σε ένα οργανίδιο που είναι απαραίτητο στην παραγωγή μεταβολικής ενέργειας, η δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων μπορεί να οδηγήσει σε παθολογικές καταστάσεις. Τα μιτοχονδριακά νοσήματα κατά κανόνα χαρακτηρίζονται από ποικιλομορφία και ιστοειδικότητα, που δεν σχετίζεται άμεσα ή μόνο από το γονότυπο αλλά αντανακλά την επίδραση μιας σειράς παραγόντων. Σε αυτούς συμπεριλαμβάνεται η μητρική κληρονομία των μιτοχονδρίων, το

φαινόμενο της ετεροπλάσμιας και η εξάρτηση των ιστών από την οξειδωτική φωσφορυλίωση ενώ δεν μπορούν να παραβλεφθούν οι μεταλλάξεις του μιτοχονδριακού.

Αναλυτικότερα, κατά τη δημιουργία του ζυγωτού τα μιτοχόνδρια που παρέχονται σε αυτό είναι κατά κύριο λόγο μητρικής φύσης, προερχόμενα από το ωάριο. Συνεπώς, μεταλλάξεις του μιτοχονδριακού γονιδιώματος θα κληροδοτηθούν στο έμβρυο μόνο αν προέρχονται από τα ωάρια. Το γεγονός της μητρικής κληρονομησης των μιτοχονδρίων οφείλεται στην κυτταροπλασματική τους θέση, καθώς τα μαστίγια των σπερματοζωαρίων, τα οποία φέρουν τη συντριπτική πλειοψηφία των μιτοχονδρίων τους, δεν εισέρχονται στο ωάριο κατά τη γονιμοποίηση, οπότε στο ζυγωτό προσφέρονται σχεδόν αποκλειστικά από τη μητέρα.

Στους πληθυσμούς των μιτοχονδρίων κάθε κυττάρου παρατηρείται συχνά το φαινόμενο της ετεροπλάσμιας, δηλαδή συνυπάρχουν διαφορετικοί τύποι μιτοχονδρίων. Συνήθως σε κάποιο από τα αντίγραφα του mtDNA υπάρχει μετάλλαξη η οποία διαιωνίζεται στα mtDNA που προκύπτουν από την αντιγραφή του. Ωστόσο τα υπόλοιπα μόρια mtDNA παραμένουν φυσιολογικά και έτσι δημιουργούνται διαφορετικοί πληθυσμοί μιτοχονδρίων στο ίδιο κύτταρο. Όταν όλα τα αντίγραφα του mtDNA είναι πανομοιότυπα το φαινόμενο χαρακτηρίζεται ως ομοπλάσμια. Η αναλογία των ποικίλων μιτοχονδριακών πληθυσμών προσδιορίζει σε μεγάλο βαθμό τον φαινότυπο του ατόμου.

Στην ποικιλομορφία των μιτοχονδριακών ασθενειών, όπως αναφέρθηκε, φαίνεται να πρωταγωνιστούν οι μεταλλάξεις του μιτοχονδριακού γονιδιώματος. Ωστόσο, ο βασικός παράγοντας της ιστοειδικότητας που παρουσιάζουν τα μιτοχονδριακά νοσήματα είναι η εξάρτηση των ιστών από την οξειδωτική φωσφορυλίωση. Καθώς κάποιοι ιστοί όπως η καρδιά, οι σκελετικοί μύες καθώς και το κεντρικό νευρικό σύστημα είναι πιο εξαρτημένοι από την οξειδωτική φωσφορυλίωση από άλλους καθώς η λειτουργία τους προϋποθέτει υψηλή κατανάλωση ATP.

Οι μιτοχονδριακές ασθένειες συχνά εμφανίζονται ως νευρολογικές διαταραχές ή εγκεφαλοπάθειες αλλά μπορούν να εμφανιστούν και ως διαβήτης, πολλαπλή ενδοκρिनοπάθεια ή μυοπάθειες). Ο φαινότυπος των μιτοχονδριακών νοσημάτων χαρακτηρίζεται από ποικιλομορφία και ιστοειδικότητα. Ενώ η εκδήλωση τους προϋποθέτει την ύπαρξη μεταλλάξεων που αυξάνουν την προδιάθεση για τη νόσο.

Πρόσθετη επιβάρυνση φαίνεται να είναι η οξειδωτική καταστροφή των μιτοχονδριακών γονιδιωμάτων (Yang J et al 2008).

### 1.1.5.1 Νευροεκφυλιστικές ασθένειες

Οι νευροεκφυλιστικές ασθένειες οφείλονται σε θάνατο των νευρώνων και σταδιακή απώλεια των συνάψεων στον εγκέφαλο και του νωτιαίου μυελού. Τα συμπτώματα που τις χαρακτηρίζουν περιλαμβάνουν την απώλεια μνήμης, συναισθηματικές αλλαγές, απώλεια ισορροπίας του σώματος και κινητικών λειτουργιών (Swerdlow R. 2009). Τα νοσήματα αυτά πιθανώς οφείλονται σε αλληλεπίδραση γενετικών μεταλλάξεων και περιβαλλοντικών παραγόντων. Έπειτα από χρόνια μελετών, πλήθος αποτελεσμάτων συγκλίνουν ότι καθοριστικό ρόλο στην εμφάνιση και την πρόοδο των ασθενειών αυτών κατέχουν τα μιτοχόνδρια και πιο συγκεκριμένα η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία και το οξειδωτικό στρες (Reddy P et al 2005, Moura M et al 2010). Αρκετές νευροεκφυλιστικές ασθένειες έχουν τη γενετική τους βάση στη δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων ή εκεί οφείλουν την εξέλιξη τους [Πίνακας 1].

**Πίνακας 1:** Κάποιες νευροεκφυλιστικές ασθένειες και η συσχέτισή τους με μεταλλάξεις που επηρεάζουν τη λειτουργία των μιτοχονδρίων (Reddy P et al).

<i>Νευροεκφυλιστικές ασθένειες</i>	<i>Μεταλλάξεις γονιδίων που επηρεάζουν τη λειτουργία των μιτοχονδρίων</i>
Leigh Syndrome	Μεταλλάξεις στα γονίδια CCIII, ND5, tRNAs
Parkinsonism	Μεταλλάξεις στο 12S rRNA
Wilson Disease	Μεταλλάξεις στον μεταφορέα Cu της ATPase 6
Sporadic Alzheimer disease	Μεταλλάξεις σε υπομονάδες της αναπνευστικής αλυσίδας στο mtDNA και σε ρυθμιστικές περιοχές

## 1.2 ΝΟΣΟΣ ALZHEIMER

Η νόσος Alzheimer είναι μία από τις πιο σύνθετες και πολύπλοκες νόσους που έχει αντιμετωπίσει η κλινική ιατρική και η πιο κοινή αιτία θνησιμότητας στους ηλικιωμένους. Εντούτοις, τα τελευταία χρόνια έχει σημειωθεί μεγάλη πρόοδος στην κατανόηση αυτής της ασθένειας. Πρόκειται για μια νευροεκφυλιστική διαταραχή που εμφανίζεται ως συνάρτηση της ηλικίας και αποτελεί την πιο κοινή αιτία άνοιας στους ηλικιωμένους. Προσβάλλει περίπου το 7-10% των ατόμων ηλικίας άνω των 65 ετών και περίπου το 40% των ατόμων άνω των 80 ετών. Σε έρευνες του 2008 μόνο στις Η.Π.Α. ο αριθμός των προσβεβλημένων ατόμων από τη νόσο ανέρχονταν στα 5 εκατομμύρια παρουσιάζοντας μια αύξηση 10% σε σχέση με αντίστοιχες έρευνες του 2000. Και πιστεύεται ότι εξαιτίας της αύξησης του μέσου όρου ζωής το 2050 ο αριθμός των νοσούντων θα έχει τριπλασιαστεί στις Η.Π.Α. (Kandel E et al 2006, Mosconi L et al 2010).

### 1.2.1 ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΟΛΟΓΙΑ - ΔΙΑΓΝΩΣΗ - ΘΕΡΑΠΕΙΑ

Η νόσος περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1907 από τον Alois Alzheimer, από τον οποίο πήρε και το όνομά της για να περιγράψει την πρώτη μορφή άνοιας. Στην πλειοψηφία των ασθενών τα κλινικά συμπτώματα εμφανίζονται κατά την έβδομη δεκαετία της ζωής, ενώ σε αρκετές περιπτώσεις η νόσος μπορεί να εκδηλωθεί κατά τη μέση ηλικία. Η νόσος εκδηλώνεται με προοδευτική απώλεια της μνήμης και διαφόρων γνωστικών λειτουργιών και συχνά συνοδεύεται από διαταραχές της οπτικοχωρικής αντίληψης, αγωνία, άγχος, κατάθλιψη και επιθετικότητα. Σταδιακά, παρατηρείται γενική απώλεια των νοητικών λειτουργιών, ενώ στα τελικά στάδια τα άτομα είναι άλαλα, παρουσιάζουν ακράτεια ούρων, είναι κατάκοιτοι και συχνά πεθαίνουν από άλλες ασθένειες (Castellani R. et al 2009, Santoro A et al 2010).

Η διάγνωση της νόσου Alzheimer είναι ιδιαίτερα δύσκολη καθώς τα συμπτώματα μπορούν να παραπλανήσουν και να παραπέμψουν τους ειδικούς σε οποιαδήποτε άλλη αιτία άνοιας. Η μόνη διαθέσιμη μέθοδος διάγνωσης της νόσου σε εν ζωή ασθενείς, είναι η βιοψία εγκεφάλου. Οι κλινικοί γιατροί για τη διάγνωση της νόσου

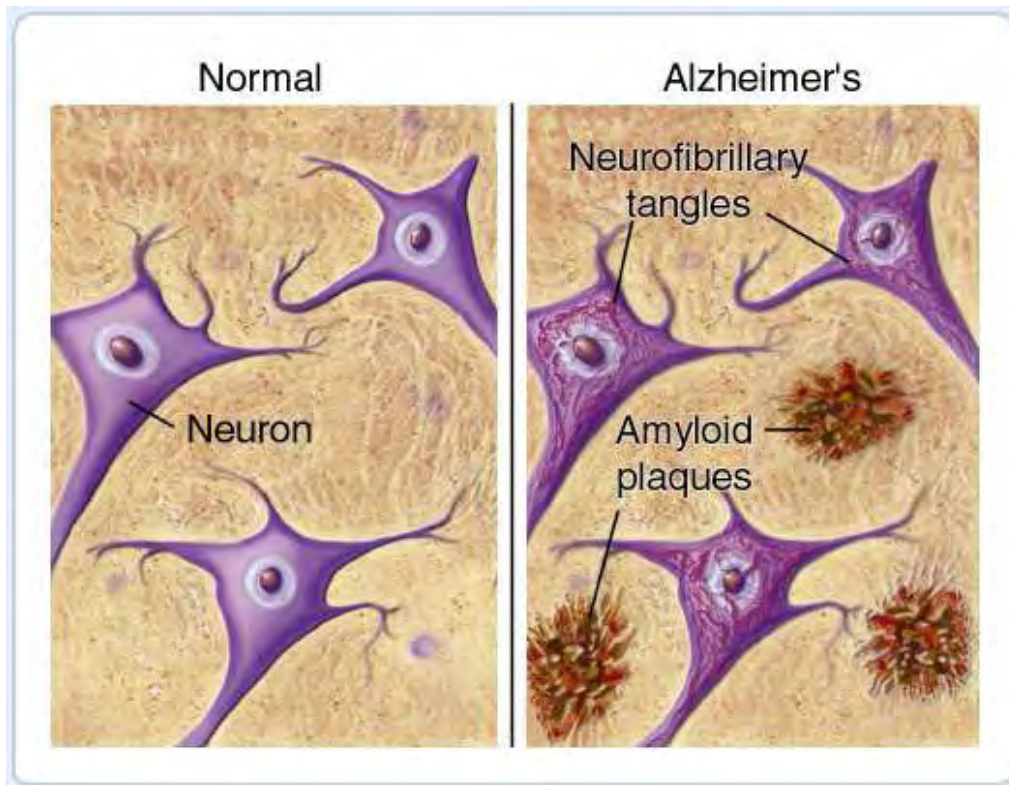
και τον αποκλεισμό άλλων αιτιών άνοιας στηρίζονται στις πληροφορίες που λαμβάνουν από τον ασθενή ή από άτομα του περιβάλλοντός τους, στη φυσική, νευρολογική και ψυχιατρική εξέταση του ασθενούς, στις εργαστηριακές αναλύσεις, τους νευροψυχολογικούς ελέγχους καθώς και σε διαγνωστικούς ελέγχους για την απεικόνιση του νευρικού συστήματος. Ιδιαίτερη προγνωστική αξία φαίνεται να έχουν οι μεταβολές στον ορό ή στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό συγκεκριμένων πρωτεϊνών, όπως η Ταυ και το πεπτίδιο του β αμυλοειδούς. Ακόμη για την ταυτοποίηση άλλων ασθενειών που μοιάζουν και ίσως ταυτίζονται με τη νόσο Alzheimer, συχνά εφαρμόζονται στους ασθενείς υπολογιστική τομογραφία (CT) και απεικόνιση του εγκεφάλου με μαγνητικό συντονισμό (MRI) για να αποκαλυφθούν πιθανές ανωμαλίες (Kandel E et al 2006, Mosconi L et al 2010).

Δυστυχώς για την καταπολέμηση της νόσου δεν υπάρχει αποτελεσματική θεραπεία. Η αντιμετώπισή της στηρίζεται στην ανακούφιση των ασθενών από συμπτώματα, όπως η κατάθλιψη, η ταραχή και οι διαταραχές ύπνου. Οι έρευνες για την εύρεση μιας αποτελεσματικής θεραπείας έχουν ως κύριο στόχο το χολινεργικό σύστημα του εγκεφάλου καθώς αυτό βλάπτεται σοβαρά από τη νόσο. Ενώ άλλες στρατηγικές εστίαζαν στην αναχαίτιση των συσσωρευμένων εναποθέσεων αμυλοειδούς χωρίς κάποια θετική εξέλιξη (Kandel E et al 2006).

## **1.2.2 ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ**

Όπως ήδη αναφέρθηκε, η νόσος Alzheimer αποτελεί ένα τυπικό παράδειγμα νευροεκφυλιστικής νόσου. Οι ιστοπαθολογικές ενδείξεις που την χαρακτηρίζουν είναι μια σειρά ανωμαλιών στον εγκέφαλο που επηρεάζουν επιλεκτικά τους νευρώνες συγκεκριμένων περιοχών, ιδιαίτερα του νεοφλοιού, του ιππόκαμπου, της ενδορρινικής περιοχής, του πρόσθιου θαλάμου και της αμυγδαλής. Από αυτές, οι γεροντικές ή νευριτικές πλάκες και οι νευροϊνιδικοί σωροί αποτελούν την ιστοπαθολογική σφραγίδα της νόσου [Εικόνα 6] (Hirai K et al 2001).



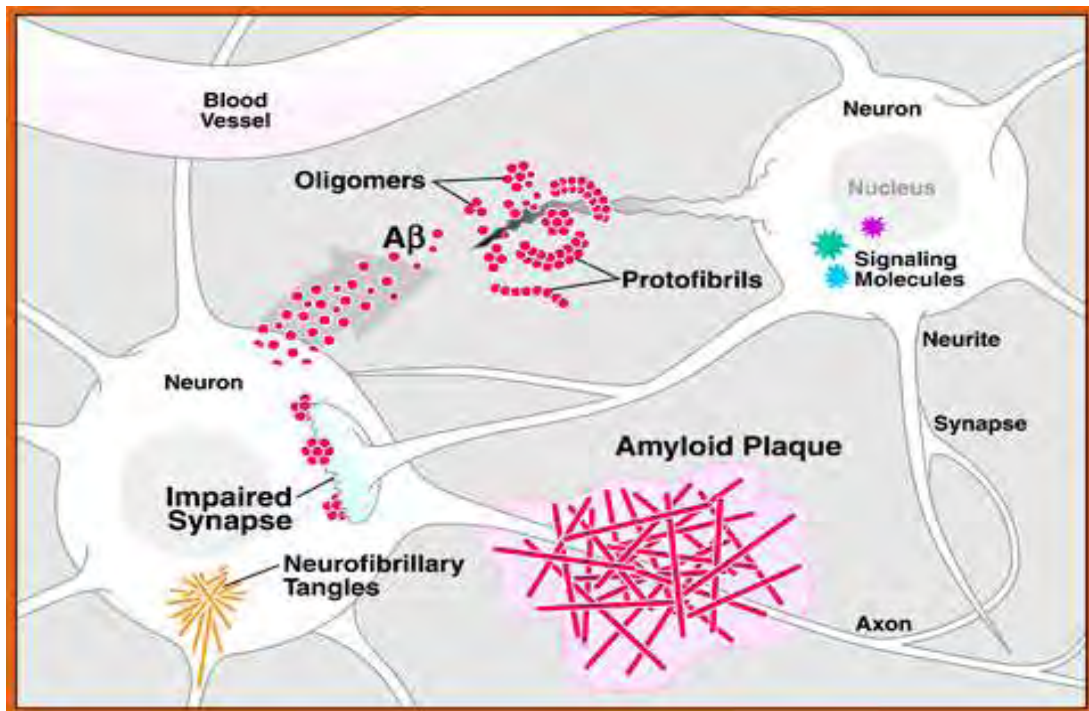


**Εικόνα 6:** Σύγκριση των φυσιολογικών νευρώνων με νευρώνες ατόμων που πάσχουν από Alzheimer. Στους νευρώνες των ασθενών ατόμων διακρίνονται οι πλάκες αμυλοειδούς και στο εσωτερικό των νευρώνων οι νευροϊνιδικοί σωροί.

Στις προσβεβλημένες εγκεφαλικές περιοχές η δυσλειτουργία και ο θάνατος των νευρώνων σχετίζονται με ανωμαλίες του κυτταροσκελετού και οδηγούν σε μείωση των επιπέδων των συναπτικών πρωτεϊνών στις εγκεφαλικές περιοχές. Οι ανωμαλίες του κυτταροσκελετού συχνά προέρχονται από αλλοιώσεις οφειλόμενες σε νευροϊνιδικούς σωρούς [Εικόνα 7]. Πρόκειται για ινώδεις αδιάλυτες συναθροίσεις ενδονευρωνικών εγκλείστων που προέρχονται από υπερβολικά ή ανώμαλα φωσφορυλιωμένη πρωτεΐνη Tau. Η Tau είναι μια πρωτεΐνη που συνδέεται στους μικροσωλινίσκους και κάτω από φυσιολογικές συνθήκες είναι διαλυτή. Ινώδεις κυτταροσκελετικές ανωμαλίες διαφορετικής προέλευσης παρατηρούνται στους νευράξονες και στις νευρικές απολήξεις. Οι αλλοιώσεις του κυτταροσκελετού διαταράζουν την μεταφορά των ώσεων διαμέσου των νευρώνων και κατά συνέπεια την επιβίωση αυτών (Swerdlow R 2007, Castellani R et al 2008, Bobba A et al 2010).

Στις εγκεφαλικές περιοχές ατόμων που βλάπτονται από τη νόσο Alzheimer παρατηρούνται και οι νευριτικές ή γεροντικές πλάκες. Ουσιαστικά είναι εξωκυττάρειες εναποθέσεις που προκύπτουν από τη συσσώρευση του αδιάλυτου ινιδικού β-αμυλοειδούς πεπτιδίου (Αβ). Περιγράφονται σαν βλάβες διαφόρου μεγέθους που αποτελούνται από έναν πυρήνα συμπαγούς ινιδικού Αβ πεπτιδίου που περιβάλλεται από χαλαρά οργανωμένα ινίδια β-αμυλοειδούς καθώς και από δυστροφικούς δενδρίτες και προεκβολές μικρογλοιακών κυττάρων και αστροκυττάρων. Οι ινιδικές δομές του Αβ ινιδικού αμυλοειδούς πεπτιδίου έχουν χαρακτηριστικές διαμορφώσεις β - πτυχωτών φύλλων και ανιχνεύονται χρωστικά με κυανό του Κονγκό ή θειοφλαβίνης και διακρίνονται από το διαλυτό Αβ πεπτίδιο που εμφανίζεται αρκετά χρόνια νωρίτερα από την εμφάνιση των νευριτικών πλακών [Εικόνα 7] (Yang J et al 2008, Mancuso M et al 2009b). Τα αμυλοειδή πεπτίδια ΑΒ προέρχονται από την πρωτεόλυση διάφορων ισόμορφων της APP πρωτεΐνης, που εδράζεται στο χρωμόσωμα 21. Η πρωτεΐνη αυτή είναι παρούσα σε όλα τα τμήματα των νευρώνων (δενδρίτες, νευράξονες, σώματα) εκφράζεται στα ενδοθηλιακά κύτταρα, τα κύτταρα των λείων μυϊκών ινών, τα αστροκύτταρα αλλά και όλα τα περιφερικά κύτταρα (Barrow C & Small D 2007).

Η APP μεσολαβεί σε διάφορες λειτουργίες του νευρικού συστήματος δρώντας σαν νευροτροφικός και νευροπροστατευτικός παράγοντας. Επηρεάζει ακόμη την κυτταρική προσκόλληση και τη νευρωνική μετανάστευση και την νευρική σηματοδότηση, ενώ συμμετέχει και στην ομοίωση του Cu. Είναι μια γλυκοπρωτεΐνη της μεμβράνης που αποτελείται από ένα διαμεμβρανικό τμήμα, μια μεγάλη αμινοτελική ουρά εξωκυτταρικά και ένα καρβοξυτελικό ενδοκυτταρικό τμήμα. Η πρωτεΐνη αυτή υφίσταται πρωτεόλυση από τρεις διαφορετικές σεκρετάσες α, β, γ προκειμένου να παραχθεί το αμυλοειδές Αβ πεπτίδιο. Όταν πέπτεται από την α σεκρετάση, δεν παράγεται το Αβ πεπτίδιο γιατί η πέψη γίνεται μέσα στην περιοχή του Αβ αμυλοειδούς. Όταν όμως πέπτεται από τις β και γ σεκρετάσες παράγονται διάφορες ισόμορφες των πεπτιδίων ΑΒ. Από αυτές τις ισόμορφες η Αβ1-42 είναι αυτή που συναντάμε στις εναποθέσεις αμυλοειδούς στους ασθενείς με Alzheimer και φαίνεται να έχει νευροτοξική δράση, χωρίς να είναι ακόμη πλήρως κατανοητός ο μηχανισμός δράσης της (Kandel E et al 2006, Barrow C & Small D 2007, Castellani R et al 2009).



**Εικόνα 7:** Απεικόνιση του εγκεφαλικού νευρωνικού περιβάλλοντος ασθενών με νόσο Alzheimer. Διακρίνονται οι νευροϊνιδικοί σωροί (neurofibrillary tangles) στο εσωτερικό των νευρώνων και οι νευριτικές πλάκες (amyloid plaque) που περιβάλλουν έναν νευρίτη. Τα Αβ πεπτίδια αμυλοειδούς εμφανίζονται αρχικά ως ολιγομερή (oligomers Αβ) και έπειτα καθώς σχηματίζουν β ινίδια (protofibrils). Ενώ είναι εμφανείς οι φυσιολογικές νευρικές συνάψεις, οι συνάψεις όπου έχουν δημιουργηθεί ολιγομερή Αβ πεπτιδίων (impaired synapse) αλλά και η αλληλεπίδραση των νευρώνων.

Ωστόσο μελέτες υποστηρίζουν ότι η γήρανση πιθανώς κάνει τον εγκέφαλο πιο ευάλωτο στην τοξικότητα των Αβ αμυλοειδών πεπτιδίων, ενώ τα αμυλοειδή στη συνέχεια επιδρούν στον εγκέφαλο, προωθώντας γήρανση αυτού και αυξάνοντας τη νευροτοξικότητα της με παράλληλη παραγωγή ελεύθερων ριζών (Barrow C & Small D 2007, Mosconi M et al 2010). Χωρίς όμως να υπάρχει κάποιο τεκμηριωμένο αποτέλεσμα ως σήμερα.

### **1.2.3 ΓΕΝΕΤΙΚΟ ΥΠΟΒΑΘΡΟ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ ALZHEIMER**

Η μελέτη της νόσου Alzheimer από τις αρχές του 20<sup>ου</sup> αιώνα που περιγράφηκε για πρώτη φορά, μέχρι και σήμερα έχει αποκαλύψει πλήθος μηχανισμών που εμπλέκονται στην εξέλιξη και πιθανώς στην εμφάνισή της. Ο πολυπαραγοντικός χαρακτήρας και η γενετική ετερογένεια είναι το συμπέρασμα όλων των μελετών που έχουν γίνει στο παρελθόν για τη νόσο Alzheimer.

Γενετικά η νόσος μπορεί να διαχωριστεί σε δυο τύπους, τον οικογενή και τον σποραδικό. Ο οικογενής τύπος της νόσου Alzheimer (familial Alzheimer disease-FAD) χαρακτηρίζεται από πρόωμη έναρξη των συμπτωμάτων πριν την ηλικία των 60-65 ετών και δεν αντιπροσωπεύει παρά μόνο το 2-3% των συνολικών περιπτώσεων της νόσου. Κληρονομείται με αυτοσωμικό επικρατή χαρακτήρα και οφείλεται σε μεταλλάξεις που διαιωνίζονται από γενιά σε γενιά. Η πλειοψηφία των ασθενών ωστόσο εμφανίζει την σποραδική μορφή, η οποία χαρακτηρίζεται από καθυστερημένη ηλικία εκδήλωσης κυρίως μετά την ηλικία των 60 ετών (Swerdlow R 2007, Yang J et al 2008). Σε αυτήν τη μορφή η αμυλοειδογένεση φαίνεται να μην προκαλείται από μεταλλάξεις αλλά να έχει πολυπαραγοντικό χαρακτήρα.

#### **Οικογενής μορφή Alzheimer**

Συνήθως η οικογενής μορφή της νόσου αρχικά χαρακτηρίζονται από συγγενείς διαταραχές που συνοδεύονται από νευρολογικές καταστάσεις, όπως αδυναμία ελέγχου των κινήσεων και αταξία ενώ με την πάροδο της ηλικίας εμφανίζονται και τα υπόλοιπα συμπτώματα της νόσου. Οι κυριότεροι γενετικοί παράγοντες της οικογενούς νόσου Alzheimer αφορούν μεταλλάξεις στα γονίδια της πρωτεΐνης APP, της πρεσελίνης 1 και 2 καθώς και της απολιποπρωτεΐνης E (Coon K et 2006, Mancuso M et al 2007).

Το γονίδιο της πρόδρομης αμυλοειδούς πρωτεΐνης APP φαίνεται να φέρει πλήθος μεταλλάξεων που σχετίζονται με την εμφάνιση της νόσου. Οι μεταλλαγές αυτές βρίσκονται πάνω ή κοντά στους τόπους πρωτεόλυσης από τις β και γ σεκρετάσες (Mosconi L et al 2010, Moura M et al 2010). Και είτε αυξάνουν την παραγωγή του Αβ-42 πεπτιδίου είτε ωθούν τα Αβ πεπτίδια να σχηματίζουν αμυλοειδή ινίδια με

αποτέλεσμα την πρόωρη δημιουργία νευριτικών πλακών (Swerdlow R 2009, Bobba A et al 2010, Monte S 2011).

Η πρεσελίνη 1 (PS-1) εντοπίστηκε στο χρωμόσωμα 14 και αποτελεί τον καταλυτικό πυρήνα της  $\gamma$ -σεκρετάσης. Ενώ διαθέτει και ανεξάρτητες λειτουργίες συμμετέχοντας στα σηματοδοτικά μονοπάτια Notch και Wnt. Η πλειοψηφία των μεταλλάξεων φαίνεται να οδηγεί σε αλλαγές στη διαμόρφωση του μορίου της PS-1 που φαίνεται να οδηγεί και σε αλλαγές στην αλληλεπίδραση της με την πρωτεΐνη APP και τελικά σε αυξημένη παραγωγή του A $\beta$ 1-42 αμυλοειδούς πεπτιδίου. Ωστόσο οι μεταλλάξεις στο γονίδιο της PS-1 που ξεπερνούν τις 40 είναι αυτές που εντοπίζονται πιο συχνά στην εκδήλωση της πρώιμης οικογενούς μορφής της νόσου Alzheimer σε ηλικία 25-65 ετών (Kandel E et al 2006, Monte S 2011).

Το γονίδιο της πρεσελίνης 2 εδράζεται στο χρωμόσωμα 1 και η παραγόμενη πρωτεΐνη PS-2 εκφράζεται σε πλήθος ιστών συμπεριλαμβανομένου και του εγκεφάλου. Εμφανίζει υψηλή ομολογία με την PS-1 και φαίνεται να έχει παρόμοια λειτουργία με αυτή. Οι μεταλλάξεις που έχουν ανιχνευτεί στο γονίδιο της PS-2 αγγίζουν περίπου τις 10 και φαίνεται να σχετίζονται με αύξηση των επιπέδων των A $\beta$ -42 αμυλοειδούς πεπτιδίων (Kandel E et al 2006, Swerdlow R 2009).

Η απολιποπρωτεΐνη E (ApoE) είναι μια γλυκοπρωτεΐνη που μεταφέρει χοληστερόλη και άλλα λιπίδια στο αίμα και έχει ενοχοποιηθεί ως παράγοντας κινδύνου για την πρώιμη έναρξη της νόσου. Εδράζεται στο χρωμόσωμα 19 και παράγεται κυρίως στο ήπαρ και στο κεντρικό νευρικό σύστημα εκκρίνεται από αστροκύτταρα. Η ApoE διαθέτει τρία διαφορετικά αλληλόμορφα, τα E2, E3 και E4, αλλά μόνο το E4 φαίνεται να εμφανίζει την υψηλότερη συσχέτιση με την εμφάνιση της νόσου. Η σχέση ανάμεσα στο αλληλόμορφο E4 της ApoE και στα αμυλοειδή συσσωματώματα φαίνεται να είναι αντίστροφη καθώς η απώλεια ή η μειωμένη λειτουργικότητα του ApoE-E4 οδηγεί σε αύξηση των ινωδών A $\beta$  πεπτιδίων (Christen Y 2000, Kandel E et al 2006, Mosconi L et al 2010). Έρευνες σε ασθενείς με πρώιμη εμφάνιση οικογενούς μορφής Alzheimer απέδειξαν ότι το 42% αυτών παρουσίαζαν έλλειψη των αλληλομόρφων ApoE-E4. Ενώ σε ομόζυγα άτομα για το ApoE-E4 η απώλεια του αυξάνει έως και 15 φορές τον κίνδυνο για πρόωρη έναρξη της νόσου, 10-20 χρόνια νωρίτερα (Monte S 2011).

### Σποραδική μορφή Alzheimer

Παρ' ότι η σποραδική μορφή δεν στηρίζεται στις γενετικές αλλαγές που καθορίζουν την οικογενή και εδώ υπάρχει έντονο γενετικό υπόβαθρο, καθώς στην πλειοψηφία των ασθενών υπάρχουν στο οικογενειακό τους ιστορικό, περιπτώσεις άνοιας. Ωστόσο το γενετικό υπόστρωμα αλλά και ο ηλικιο-εξαρτημένος χαρακτήρας της μορφής αυτής πιθανολογείται να είναι συνέπεια της συσσώρευσης γενετικών αλλαγών κατά τη διάρκεια της εξέλιξης μέσα στα γονίδια, που μπορούν να αποδειχτούν επιβλαβείς ή προστατευτικές κατά τη διάρκεια της εγκεφαλικής γήρανσης (Moura M et al 2010, Monte S 2011).

Η συμμετοχή των γενετικών παραγόντων στη σποραδική μορφή της νόσου φαίνεται να περιορίζεται στην αλληλεπίδραση πολυάριθμων μεταλλάξεων ή πολυμορφισμού γονιδίων τόσο μεταξύ τους όσο και με περιβαλλοντικούς παράγοντες (Moura M et al 2010).

Μελέτες ευρείας ανάλυσης του γονιδιώματος απέδειξαν ότι κύριος παράγοντας προδιάθεσης είναι οι μεταλλάξεις στο γονίδιο της απολιποπρωτεΐνης Ε (ApoE) καθώς ταυτοποιήθηκαν στο 50% των ασθενών με σποραδική μορφή της νόσου. Ωστόσο ο κίνδυνος εξαιτίας αυτών αυξάνεται μόνο κατά 0,10-0,15 φορές. Οι ίδιες μελέτες αποκάλυψαν και τον προδιαθετικό ρόλο αρκετών γονιδίων που εμπλέκονται στο μεταβολισμό των β-αμυλοειδών πεπτιδίων καθώς και γονιδίων που συμμετέχουν στη ρύθμιση της φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης Tau (Monte S 2011).

## **1.3 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΩΝ ΣΤΗΝ ΝΟΣΟ ALZHEIMER**

Η επιστημονική έρευνα για τη μελέτη της νόσου έχει ενταθεί τις τελευταίες δεκαετίες με σκοπό τον εντοπισμό παραγόντων αγνώστων έως σήμερα που εμπλέκονται στην εκδήλωση της αλλά και στη διερεύνηση των ήδη γνωστών προκειμένου να προσδιοριστεί ακριβώς ο ρόλος τους. Αρκετές υποθέσεις έχουν διατυπωθεί για την αιτιολογία της νόσου, χωρίς όμως να έχουν τεκμηριωθεί επιστημονικά. Οι σημαντικότερες εξ' αυτών σχετίζονται με την αμυλοειδωση και τη

μιτοχονδριακή δυσλειτουργία. Στην προσπάθεια των ερευνητών να ερμηνευτούν πλήρως οι κλινικές ενδείξεις και η παθοφυσιολογία των ασθενών διατυπώθηκε η υπόθεση του αμυλοειδούς καταρράκτη. Σύμφωνα με αυτή, οι μεταλλάξεις στα γονίδια της πρωτεΐνης APP, των πρεσελίνων 1 και 2 και της απολιποπρωτεΐνης E, είναι οι κυριότερες αιτίες για την αμυλοείδωση και τη δημιουργία γεροντικών πλακών και νευροϊνιδικών πλεγμάτων (Hirai K et al 2001, Swerdlow R 2007 & 2009,).

Ωστόσο η υπόθεση αυτή, δεν μπορεί να υποστηρίξει την σποραδική μορφή της νόσου, καθώς σπάνια οι ασθενείς εμφανίζουν μεταλλάξεις στα γονίδια που εμπλέκονται στο μεταβολισμό των αμυλοειδών. Σε έρευνες που πραγματοποιήθηκαν σε άτομα με σποραδική μορφή της νόσου, μέσα από βιοψίες εγκεφάλου εντοπίστηκε πλήθος ανωμαλιών στα μιτοχόνδρια αυτών. Οι ανωμαλίες αυτές περιλάμβαναν γενετικές αλλαγές στο μιτοχονδριακό DNA (με πιο συχνές τις A4336G, T414G & T477C), βιοχημικές μεταβολές με αύξηση των επιπέδων ROS και αλλαγές στα επίπεδα πρωτεϊνών που πλήττονταν από το οξειδωτικό στρες καθώς και αλλαγές στη μορφολογία των μιτοχονδρίων ως αποτέλεσμα όλων των παραπάνω. Η εύρεση μιτοχονδριακών δυσλειτουργιών σε άτομα με σποραδική μορφή Alzheimer οδήγησε τους επιστήμονες στην υπόθεση του μιτοχονδριακού καταρράκτη. Η συσσώρευση μεταλλάξεων στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα, το οποίο με την πρόοδο της ηλικίας γίνεται πιο ευάλωτο από το πυρηνικό, οδηγεί σε διαταραχές της έκφρασης των μιτοχονδριακών πρωτεϊνών και σταδιακά καταστροφή των νευρώνων και νευροεκφυλισμό.

Προκειμένου να τεκμηριωθεί η παραπάνω υπόθεση οι έρευνες συνεχίστηκαν σε ποικίλους ιστούς ασθενών με Alzheimer και αποκάλυψαν ότι τα μιτοχόνδρια διαφόρων περιοχών του εγκεφάλου παρουσιάζουν μειωμένη λειτουργικότητα. Ακόμη εντοπίστηκαν κάποια ένζυμα που φαίνεται να εμπλέκονται άμεσα, η δεϋδρογονάση του πυροσταφυλικού οξέος, η δεϋδρογονάση του α-κετογλουταρικού οξέος και η οξειδάση του κυτοχρώματος c. Τα ένζυμα αυτά σε δυσλειτουργικά μιτοχόνδρια παρουσιάζουν συνήθως μειωμένη ενεργότητα. Οι δύο δεϋδρογονάσες δημιουργούν ανωμαλίες στη διεξαγωγή του κύκλου του κιτρικού οξέος, όπου είναι και η κύρια λειτουργία τους ενώ η οξειδάση του κυτοχρώματος c επηρεάζει την αναπνευστική αλυσίδα και επιδρά στην παραγωγή ελευθέρων ριζών (Petrozzi L et al 2007, Christen Y 2010).

Από τα ένζυμα που αναφέρθηκαν παραπάνω ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η οξειδάση του κυτοχρώματος c. Η μειωμένη ενεργότητα της οδηγεί σε μειωμένη παραγωγή ενέργειας από την αναπνευστική αλυσίδα (χωρίς ωστόσο να επηρεάζεται η λειτουργικότητα της ATP συνθάσης) που συνεπάγεται ευρύτερη μιτοχονδριακή δυσλειτουργία και ωθείται η απόπτωση (Maruszak A, Zeknowski C 2006). Οι ανωμαλίες αυτές μπορεί να οφείλονται σε τοξικές περιβαλλοντικές επιδράσεις καθώς και σε μεταλλάξεις του πυρηνικού ή του μιτοχονδριακού DNA (nDNA/mtDNA) αυθόρμητες ή κληρονομούμενες. Η οξειδάση του κυτοχρώματος c αποτελείται από υπομονάδες που κωδικοποιούνται τόσο από το πυρηνικό όσο και από το μιτοχονδριακό DNA, συνεπώς η μειωμένη δραστηριότητά της θα μπορούσε να οφείλεται σε μεταλλάξεις στα γονίδια των υπομονάδων αυτών, σε αδυναμία αναγνώρισης των υπομονάδων για τη συναρμολόγηση του ενζύμου καθώς και σε σφάλματα στις πρωτεΐνες που αναλαμβάνουν τη μεταφορά των υπομονάδων διαμέσου των μιτοχονδριακών μεμβρανών (Cottrell D et al 2002, Mancuso M et al 2008 & 2009b). Μακροχρόνιες διαταραχές στη λειτουργία της οδηγούν σε συσσώρευση ελευθέρων ριζών με αποτέλεσμα το οξειδωτικό στρες των νευρώνων. Οι νευρώνες χάνουν την ικανότητα μεταφοράς ώσεων στις διάφορες περιοχές του εγκεφάλου και σε συνδυασμό με τα νευροϊνδικά πλέγματα και την αμυλοειδωση σταδιακά σε ασθενή άτομα περιοχές του εγκεφάλου υπολειτουργούν και τελικά νεκρώνονται (Castellani R et al 2002 & 2009, Lovell M, Markesbery N 2007, Moura M et al 2010).

Οι ερευνητές σε μια προσπάθεια αναζήτησης αποτελεσματικής θεραπείας της νόσου, προσπάθησαν να αποσαφηνίσουν τις αιτίες που οδηγούν στην δυσλειτουργία του ενζύμου, χρησιμοποιώντας την τεχνική των κυτταροπλασματικών υβριδίων “cybrids”. Η τεχνική αυτή περιγράφηκε και χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά το 1989. Κύτταρα τα οποία έπειτα από επεξεργασία έχουν χάσει το μιτοχονδριακό τους DNA (mtDNA) καλλιεργούνται με mtDNA από ασθενή άτομα με νόσο Alzheimer και από φυσιολογικά άτομα. Οι φαινοτυπικές αλλαγές στις κυτταρικές σειρές “cybrids” προέρχονται αποκλειστικά από το μιτοχονδριακό DNA και όχι από το πυρηνικό ή από εξωγενείς παράγοντες. Συνεπώς η λειτουργικότητα της οξειδάσης του κυτοχρώματος c μόνο από μιτοχονδριακό DNA (Reddy P et al 2005, Petrozzi L et al 2007, Mancuso M et al 2008). Ακόμη παρατηρήθηκε ότι κυτταρικές σειρές υβριδίων με mtDNA από άτομα με νόσο Alzheimer υπερπαραγάγουν Αβ αμυλοειδή



πεπτίδια, μιμούμενες τις αμυλοειδείς πλάκες που εμφανίζονται στον εγκέφαλο των ασθενών με Alzheimer. Η ανώμαλη έκφραση της οξειδάσης του κυτοχρώματος c στις υβριδικές αυτές κυτταρικές σειρές, οδηγεί σε παραγωγή ελευθέρων ριζών που μεταβάλλουν την οξειδωτική τους κατάσταση ωθούν την απόπτωση, απελευθερώνοντας μόρια του κυτοχρώματος c και ενεργοποιώντας το αποπτωτικό μονοπάτι των κασπασών (Christen Y 2000, Elson J et al 2006, Onyango I et al 2006). Η εσφαλμένη λειτουργία των μιτοχονδρίων σε συνδυασμό με το οξειδωτικό στρες δεν οδηγούν μόνο σε μειωμένη παραγωγή ATP, αλλά διαταράσσουν την εισροή και εκροή ιόντων καθώς και την πρωτεϊνοσύνθεση και αρχίζει σταδιακά ο νευροεκφυλισμός του εγκεφάλου με την εμφάνιση των βασικών χαρακτηριστικών της νόσου. Συνεπώς υποστηρίζεται η υπόθεση του μιτοχονδριακού καταρράκτη καθώς εκφράζουν τον μορφολογικό και βιοχημικό φαινότυπο που παρατηρείται στον εγκεφαλικό ιστό ασθενών που πάσχουν από τη σποραδική μορφή της νόσου Alzheimer (Mancuso M et al 2008).

## 1.4 ΤΟ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟ tRNA<sup>Leu(UUR)</sup>

Η κύρια λειτουργία των tRNAs είναι η μεταφορά του αντίστοιχου αμινοξέος στα ριβοσώματα κατά τη διαδικασία της πρωτεϊνοσύνθεσης. Τόσο το μιτοχονδριακό όσο και το πυρηνικό tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> αναλαμβάνει τη μεταφορά του αμινοξέος λευκίνη (UUR). Όπως όλα τα μεταφορικά tRNA που συναντώνται στους οργανισμούς εμφανίζει χαρακτηριστική δευτεροταγή [Εικόνα 8] και τριτοταγή δομή.

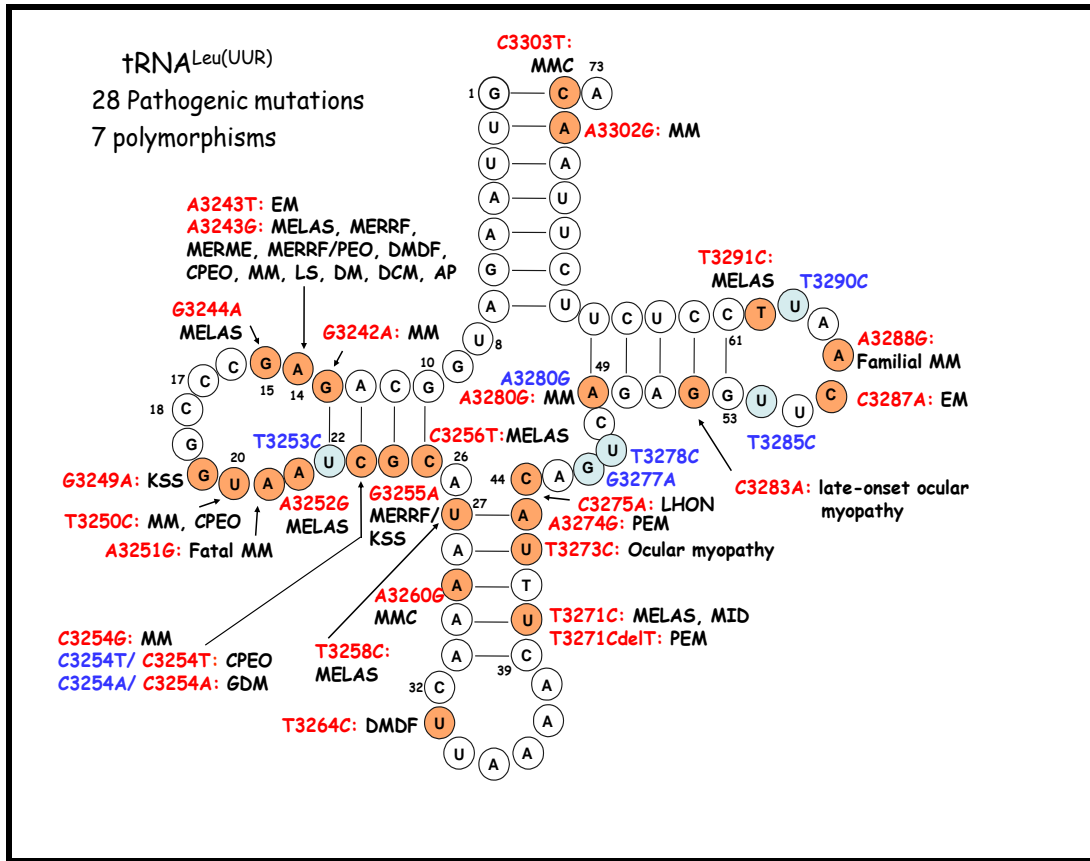
Το μιτοχονδριακό tRNA<sup>Leu</sup> συμμετέχει στην μετάφραση των πρωτεϊνών που κωδικοποιούνται από το μιτοχονδριακό γονιδίωμα. Πιθανές μεταλλάξεις στην αλληλουχία του ενδέχεται να μην επηρεάζουν τη στερεοδιάταξή του και να επιτρέπουν την ομαλή διεξαγωγή της πρωτεϊνοσύνθεσης, αλλά μπορεί να επιφέρουν αλλαγές στη θέση πρόσδεσης του αμινοξέος ή στη περιοχή του αντικωδικονίου παρεμποδίζοντας ή οδηγώντας σε λανθασμένη μετάφραση. Αποτέλεσμα τέτοιων σφαλμάτων είναι η παραγωγή πρωτεϊνών με ανώμαλη λειτουργία καθώς μπορεί να επηρεαστεί το ενεργό κέντρο, αν το αμινοξύ λευκίνη βρίσκεται εντός αυτού. Επειδή το μιτοχονδριακό γονιδίωμα όπως ήδη αναφέρθηκε είναι πιο ευάλωτο σε

μεταλλάξεις από το πυρηνικό, οι μεταλλάξεις στο γονίδιο που κωδικοποιεί το tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> είναι πιο συχνές στα μιτοχόνδρια (Bonilla E et al 1999).

Αρκετές έρευνες αποκάλυψαν ότι κάποιες από τις μεταλλάξεις στο tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> σχετίζονται με την εμφάνιση ασθενειών όπως το MELAS (μιτοχονδριακή μυοπάθεια συνοδευόμενη από εγκεφαλοπάθεια, γαλακτική οξέωση και εγκεφαλικά επεισόδια), το σύνδρομο Leigh (LS), διάφορες μορφές διαβήτη καθώς και τη νόσο Alzheimer (Kobayash Y et al 1991, Shiotani H et al 1998, Linong J et al 2001, Koga Y et al 2008). Μία συχνή μετάλλαξη που αναφέρεται σε πλήθος ερευνών και εμφανίζει άμεση συσχέτιση κυρίως με το σύνδρομο MELAS είναι στη θέση A3242G (Yorifuzi J et al 1996, Sternberg D et al 1998). Η μετάλλαξη αυτή όταν εντοπίζεται στην πλειοψηφία των tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> στα κύτταρα (>94%) επηρεάζει τη σύνθεση όλων των μιτοχονδριακών πρωτεϊνών και συνεπώς και των πρωτεϊνών της αναπνευστικής αλυσίδας. Ακόμη δημιουργεί αστάθεια στην περιοχή σύνδεσης με τη Leu<sup>(UUR)</sup> και εμποδίζει την αποτελεσματική πρόσδεσή στην αμινοάκυλο tRNA συνθετάση της Leu(UUR) (Park H et al 2008). Άλλες μεταλλάξεις του γονιδίου έχουν εντοπιστεί στις θέσεις T3271C, A3302G και A3288G (Dimauro S, Schon E. 2001, Kirino Y et al 2005).

Η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία εμφανίζει άμεση συσχέτιση και με τη νόσο Alzheimer, ωστόσο η σχέση των μεταλλαγών που εδράζονται στο γονίδιο του tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> δεν έχει ακόμη προσδιοριστεί πλήρως. Έχουν εντοπιστεί αρκετές μεταλλάξεις του γονιδίου, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, ωστόσο δεν έχει αποδειχτεί ότι οι συγκεκριμένες επηρεάζουν την εκδήλωση της νόσου.

Στην παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή έγινε μία προσπάθεια ανίχνευσης μεταλλάξεων του μιτοχονδριακού tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> και η συσχέτισή τους με τη νόσο Alzheimer. Για το σκοπό αυτό μελετήθηκαν 50 ασθενή άτομα με διαγνωσμένη νόσο Alzheimer και 20 υγιή άτομα. Από αυτά απομονώθηκε το γενετικό τους υλικό και ενισχύθηκε με τη μέθοδο PCR το γονίδιο του mt tRNA<sup>Leu(UUR)</sup>. Έπειτα από αποδιάταξη ηλεκτροφορήθηκε σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης ώστε να παρατηρηθεί η κίνηση των μονόκλωνων τμημάτων. Δείγματα που εμφάνιζαν διαφορετικό πρότυπο κίνησης αλληλουχγήθηκαν με σκοπό την εύρεση πιθανών μεταλλάξεων.



**Εικόνα 8:** Η αλληλουχία του ανθρώπινου μιτοχondριακού tRNA<sup>Leu(UUR)</sup>. Απεικονίζεται η δευτεροταγής δομή του μορίου και είναι ευδιάκριτες αρκετές παθογόνες μεταλλάξεις που εντοπίζονται σε αυτό καθώς και κάποιοι πολυμορφισμοί.

## ***ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2***

### ***ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ***

## 2.1 ΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΥΛΙΚΟ

Στην παρούσα ερευνητική εργασία χρησιμοποιήθηκε ολικό περιφερικό αίμα από 50 ασθενείς με διαγνωσμένη νόσο Alzheimer, καθώς και από 20 φυσιολογικά άτομα. Όλα τα δείγματα προήλθαν από το Γενικό Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας.

## 2.2 ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

### 2.2.1 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA

Τα δείγματα τόσο των ασθενών όσο και των φυσιολογικών ατόμων επεξεργάστηκαν ώστε από το περιφερικό ολικό αίμα να απομονωθεί το γενετικό τους υλικό. Η διαδικασία απομόνωσης που ακολουθήθηκε περιλαμβάνει τα παρακάτω βήματα:

1. Σε erpendorf 2ml τοποθετούμε 1ml διάλυμα 1x SSC (Saline sodium citrate) [Παράρτημα 1] και 0,5ml ολικό περιφερικό αίμα
2. Ακολουθεί ανάδευση σε vortex και φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 3 min σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και απομάκρυνση του υπερκείμενου
3. Στο ίζημα προσθέτουμε 1 ml 1x SSC και επαναδιαλύουμε
4. Αναδεύουμε σε vortex και φυγοκεντρούμε στις 13000 rpm για 2 min στους 4° C. Μετά το τέλος της φυγοκέντρησης απομακρύνουμε το υπερκείμενο και στο ίζημα περιέχονται μόνο κύτταρα αίματος
5. Επαναδιαλύουμε το ίζημα με προσθήκη 0,5ml NaOAc 0,2M, 50μl SDS 5% [Παράρτημα 1] και 10μl πρωτεΐνάση K (10u/ml) με σκοπό τη λύση των κυττάρων
6. Ακολουθεί επώαση για 1 ώρα στους 55° C με συνεχή ανάδευση
7. Έπειτα προσθέτουμε 0,5ml φαινόλης και 0,5 ml χλωροφόρμιο και φυγοκεντρούμε στις 13000rpm για 10 min στους 4° C, ώστε να απομακρυνθούν υδατάνθρακες, πρωτεΐνες και άλλα συστατικά των κυττάρων, εκτός από το DNA
8. Μετά το τέλος της φυγοκέντρησης το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο erpendorf και προστίθεται 1 ml χλωροφόρμιο

9. Ανακινούμε ήπια τα δείγματα και φυγοκεντρούμε στις 13000rpm για 10min στους 4°C
10. Μεταφέρουμε το υπερκείμενο σε νέο eppendorf και προσθέτουμε 1 ml ισοπροπανόλης, ώστε να δεσμεύσει το DNA. Επωάζουμε για 15 min στους -20°C
11. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 13000rpm για 20 min στους 4°C και απομάκρυνση υπερκειμένου
12. Στο ίζημα προσθέτουμε 1ml παγωμένης αιθανόλης 70%, ώστε να απομακρυνθούν τα υπολείμματα της ισοπροπανόλης. Φυγοκεντρούμε στις 13000rpm για 15min, στους 4°C και απομακρύνουμε το υπερκείμενο
13. Στη συνέχεια ακολουθεί επώαση - ξήρανση των δειγμάτων στους 55°C για μία ώρα
14. Τέλος προσθέτουμε 100ml ddH<sub>2</sub>O και επωάζουμε σε θερμοκρασία δωματίου για επαναδιάλυση του ιζήματος.

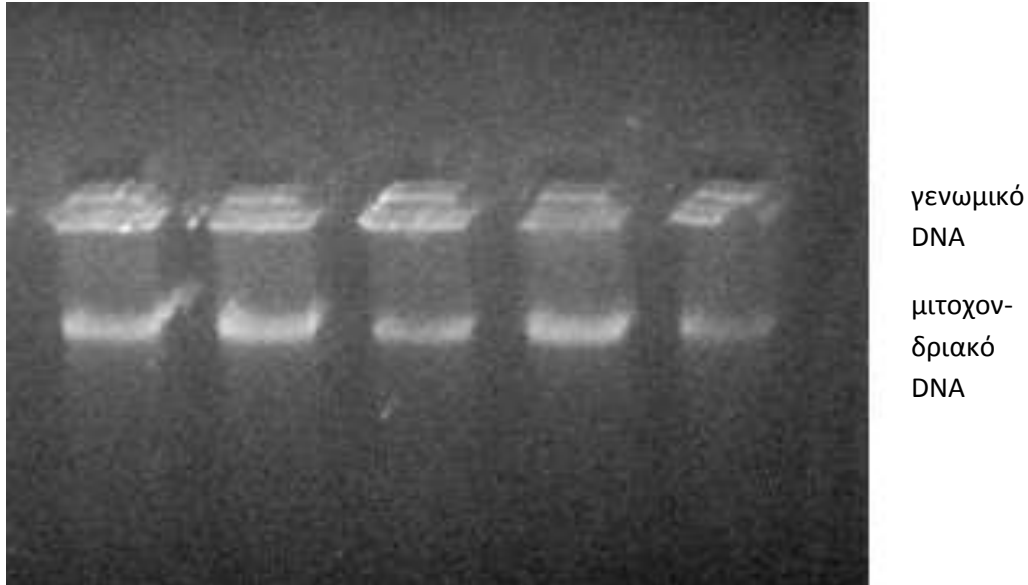
#### *2.2.1.1 ΠΟΙΟΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ*

Με την ολοκλήρωση της διαδικασίας απομόνωσης, ακολουθεί ποιοτικός προσδιορισμός των προϊόντων με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1%. Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή της πηκτής είναι τα παρακάτω:

- 40ml 1X TAE [Παράρτημα 1]
- 0,4gr αγαρόζη (0,01gr/ml)
- 4μl βρωμιούχο αιθίδιο (0,1μl/ml)

Αρχικά σε μία κωνική φιάλη τοποθετούνται 0,4gr αγαρόζης και 40ml 1x TAE (Tris acetic acid EDTA). Το μείγμα θερμαίνεται για 2-3 min (σε μικροκύματα) μέχρι να διαλυθεί η αγαρόζη πλήρως. Αφήνουμε να μειωθεί ελαφρώς η θερμοκρασία του και προσθέτουμε 4μl βρωμιούχο αιθίδιο (μία ουσία που δεσμεύεται στο DNA και φθορίζει κάτω από υπεριώδη ακτινοβολία). Το μείγμα μεταφέρεται σε κατάλληλο καλούπι με θέσεις υποδοχής - πηγαδάκια και αφήνεται να στερεοποιηθεί για 15-20 min. Έπειτα το gel αγαρόζης τοποθετείται στην κατάλληλη συσκευή ηλεκτροφόρησης και προστίθεται η απαραίτητη ποσότητα buffer, 1x TAE, μέχρι να καλυφθεί πλήρως η πηκτή. Τέλος, αναμιγνύουμε 2μl DNA και 3μl loading dye (διάλυμα για να αντιλαμβανόμαστε που βρίσκεται το δείγμα μέσα στο πήκτωμα) και

τοποθετούμε το μείγμα στις θέσεις υποδοχής της πηκτής. Ηλεκτροφορούμε τα δείγματα στα 100V για 15-20 min, μέχρι να διανύσουν τα 2/3 της διαδρομής, και παρατηρούμε το πήκτωμα σε συσκευή UV.



*Εικόνα 9* : Πήκτωμα αгарόζης 1%, χαρακτηριστικό για τα προϊόντα της απομόνωσης. Μέσα στα πηγαδάκια του πηκτώματος παραμένει το γενωμικό DNA εξαιτίας του μεγάλου μεγέθους του και τρέχει μόνο το μιτοχονδριακό DNA.

### **2.2.2 ΑΛΥΣΙΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ PCR**

Η μέθοδος της PCR χρησιμοποιείται ευρέως στην μοριακή βιολογία καθώς επιτρέπει την επιλεκτική ενίσχυση συγκεκριμένων αλληλουχιών του γονιδιώματος μέσα από ένα δείγμα που περιέχει πλήθος μορίων DNA. Η αλληλουχία που μας ενδιαφέρει πολλαπλασιάζεται με τη χρήση ειδικών εκκινητών και αξιοποιώντας τη δράση της DNA πολυμεράσης για την αντιγραφή του γενετικού υλικού. Η διαδικασία λαμβάνει χώρα σε ένα θερμικό κυκλοποιητή ο οποίος ρυθμίζει τη διαδοχική θέρμανση και ψύξη των δειγμάτων σε κάθε κύκλο.

Η αντίδραση της PCR στο θερμοκυκλοποιητή ξεκινά με την ενεργοποίηση της δραστηριότητας του ενζύμου που επιτυγχάνεται με άνοδο της θερμοκρασίας στους 94-96° C για μερικά λεπτά. Έπειτα ακολουθούν τα βήματα της αποδιάταξης (denaturation), της υβριδοποίησης (annealing) και της επιμήκυνσης (elongation), τα

οποία επαναλαμβάνονται για αρκετούς κύκλους, προκειμένου να ενισχυθεί αρκετές φορές η επιθυμητή αλληλουχία. Αρχικά για την αποδιάταξη η θερμοκρασία παραμένει υψηλή (94-96° C) για μερικά δευτερόλεπτα ώστε να διασπαστούν οι δεσμοί υδρογόνου που συνδέουν τις δύο αλυσίδες. Στη συνέχεια, κατά την υβριδοποίηση η θερμοκρασία μειώνεται στους 50-65° C για 20-40 δευτερόλεπτα ώστε να επιτρέψει στους εκκινητές να υβριδοποιηθούν πάνω στις μονόκλωνες αλυσίδες του DNA. Οι εκκινητές συνδέονται ισχυρά με το DNA στόχο μόνο στα σημεία που θα συναντήσουν υψηλή συμπληρωματικότητα. Η σύνδεση τότε συνοδεύεται από το σχηματισμό δεσμών υδρογόνου. Κατά την επιμήκυνση η DNA πολυμεράση προσδένεται στο σύμπλοκο εκκινητή- DNA και ξεκινά τη σύνθεση της νέας συμπληρωματικής νουκλεοτιδικής αλυσίδας, προσθέτοντας νουκλεοτίδια (dNTPs) με κατεύθυνση 5'-3'. Η θερμοκρασία στο στάδιο αυτό είναι ιδανική για την δράση του ενζύμου και κυμαίνεται στους 75-80°C για λιγότερο από ένα λεπτό. Μετά την ολοκλήρωση των κύκλων των παραπάνω βημάτων ακολουθεί ένα ακόμη βήμα, τελική επιμήκυνση, πριν το τέλος της αντίδρασης προκειμένου να εξασφαλισθεί ότι όλες οι μονόκλωνες αλυσίδες έχουν επιμηκυνθεί πλήρως. Για το λόγο αυτό η θερμοκρασία παραμένει στους 70-75°C για 10-15 min. Τέλος η θερμοκρασία στον θερμοκυκλοποιητή μειώνεται στους 4°C, όπου και το δείγμα μπορεί να παραμείνει για αρκετό χρονικό διάστημα.

Στα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή την εργασία, η μέθοδος της PCR εφαρμόστηκε για να ενισχύσει το γονίδιο του μιτοχondριακού tRNA<sup>Leu(UUR)</sup>. Για την αντίδραση σχεδιάστηκαν δύο εκκινητές (forward & reverse) ειδικοί για την ενίσχυση του γονιδίου αυτού. Η αλληλουχία τους είναι η ακόλουθη:

- Primer forward mt tRNA<sup>Leu(UUR)</sup>: GGACAAGAGAAATAGGCC
- Primer reverse mt tRNA<sup>Leu(UUR)</sup>: ACGCAAAGGCCCAACGTG

Πιο αναλυτικά για την συγκεκριμένη αντίδραση PCR χρησιμοποιήθηκαν για το κάθε δείγμα:

- 3-4μl DNA
- 1μl Primer forward & 1μl Primer reverse mt tRNA<sup>Leu(UUR)</sup>
- 1μl dNTPs (φωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια απαραίτητα για τη σύνθεση των νέων κλώνων)
- 1μl MgCl<sub>2</sub> 25mM (απαραίτητο για την ενζυμική δράση της πολυμεράσης)



- 5μl 10x Buffer solution (για τη δημιουργία βέλτιστου περιβάλλοντος για τη δράση της πολυμεράσης)
- 0,2 μl KAPA Taq Polymerase 500U
- 47-48 μl ddH<sub>2</sub>O (για τη συμπλήρωση τελικού όγκου 50ml)

Το μείγμα του DNA και των αντιδραστηρίων της PCR εισάγεται στον θερμικό κυκλοποιητή για να ενισχυθεί το γονίδιο mt tRNA<sup>Leu(UUR)</sup>.

Τα στάδια ενίσχυσης είναι τα ακόλουθα:

Στάδιο 1 <sup>ο</sup>	95° C for 4 min	Αρχική αποδιάταξη/ Initial denaturation
Στάδιο 2 <sup>ο</sup>	95° C for 30 sec	Αποδιάταξη/ Denaturation
Στάδιο 3 <sup>ο</sup>	50° C for 40 sec	Υβριδισμός/ Annealing
Στάδιο 4 <sup>ο</sup>	72° C for 40 sec	Επιμήκυνση/ Extension
Στάδιο 5 <sup>ο</sup>	72° C for 10 min	Τελική Επιμήκυνση/ Final extension

\*Τα στάδια 2-4 επαναλαμβάνονται για 35 κύκλους

Μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας η θερμοκρασία μειώνεται στους 4°.

### 2.2.2.1 ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ

Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης PCR, τα προϊόντα ηλεκτροφορούνται σε πηκτή αγαρόζη 1,5% για να εκτιμηθεί ποιοτικά η επιτυχία της PCR. Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την Παρασκευή του πηκτώματος είναι τα παρακάτω:

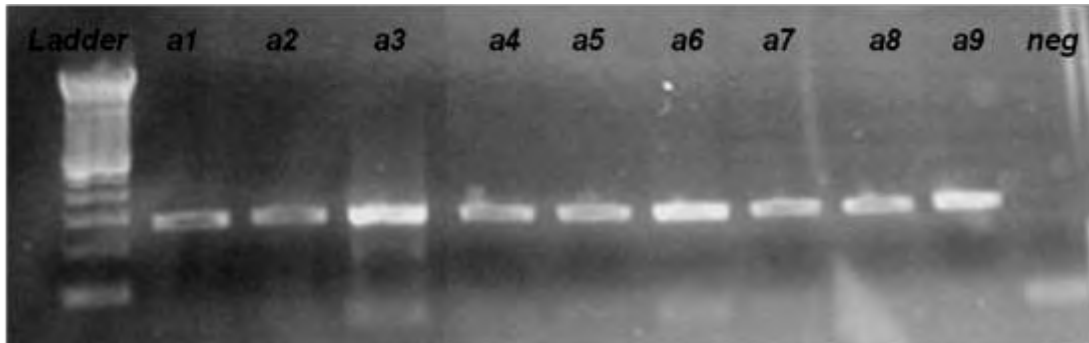
40ml 1x TAE

0,6gr αγαρόζη (0,015gr/ml)

4μl βρωμιούχο αιθίδιο (0,1μl/ml)

Η πηκτή παρασκευάζεται όπως περιγράφηκε παραπάνω (παρ. 2.2.1.1). Όταν η διαδικασία έχει ολοκληρωθεί και το πήκτωμα έχει στερεοποιηθεί τοποθετούμε στις θέσεις υποδοχείς μείγμα που περιλαμβάνει 5μl DNA και 3μl loading dye. Ηλεκτροφορούμε τα δείγματα στα 100V για 15-20 min, μέχρι να διανύσουν τα 2/3

της διαδρομής, και παρατηρούμε το πήκτωμα σε συσκευή UV. Η ηλεκτροφόρηση γίνεται παρουσία μάρτυρα με γνωστό μοριακό βάρος, ώστε να είμαστε σίγουροι ότι δεν ενισχύθηκαν μη ειδικά προϊόντα καθώς και παρουσία δείγματος αρνητικού ελέγχου για προσδιορισμό επιμόλυνσης ή μη των δειγμάτων με ξένο γενετικό υλικό.



**Εικόνα 10** :Ένα πήκτωμα αγαρόζης στο οποίο ηλεκτροφορήθηκαν προϊόντα μιας αντίδρασης PCR. Χρησιμοποιήθηκε μάρτυρας μοριακού βάρους (ladder) καθώς και δείγμα αρνητικού ελέγχου (neg). Οι μπάντες των προϊόντων είναι ευδιάκριτες.

Στην παρούσα εργασία όλα τα δείγματα τόσο ασθενών όσο και των φυσιολογικών ατόμων έδωσαν θετικές μπάντες κατά την ηλεκτροφόρηση.

### **2.2.3 SINGLE STRAND CONFORMATION POLYMORPHISM (S.S.C.P.)**

Η ανάλυση του πολυμορφισμού διαμόρφωσης μονόκλωνου DNA (SSCP) καθιερώθηκε το 1989 από την ερευνητική ομάδα του Orita και έκτοτε χρησιμοποιείται ευρέως στην ανίχνευση μεταλλαγών στην αλληλουχία γονιδιακών τόπων. Η μέθοδος SSCP είναι απλή, αποδοτική και αξιόπιστη στη χρήση της. Η αρχή αυτής στηρίζεται στη διαφορετική ταχύτητα μετακίνησης μονόκλωνων τμημάτων DNA εξαιτίας του μεγέθους και της αλληλουχίας τους. Πιο αναλυτικά κατά τη μέθοδο SSCP ενισχυμένα προϊόντα PCR αποδιατάσσονται και στη συνέχεια ψύχονται άμεσα. Τα μονόκλινα τμήματα ανάλογα με την αλληλουχία τους σχηματίζουν διαφορετική τρισδιάστατη διαμόρφωση και η κινητικότητά τους μέσα

στο πήκτωμα ηλεκτροφόρησης εξαρτάται από αυτή. Το μονόκλωνο DNA παρουσιάζει εκ φύσεως μεγαλύτερη αστάθεια συγκριτικά με το δίκλωνο, και η απώλεια του συμπληρωματικού κλώνου ωθεί τη δημιουργία αναδιπλώσεων και θηλειών προσδίδοντας χαρακτηριστική τριτοταγή δομή στο μόριο. Συνεπώς ακόμη και η διαφορά σε μία μόνο βάση είναι ικανή να οδηγήσει ένα μονόκλωνο τμήμα σε νέα τριτοταγή δομή με αποτέλεσμα τη διαφορετική ταχύτητα κίνησης και θέση κατά την ηλεκτροφόρηση.

Στην παρούσα έρευνα τα δείγματα έπειτα από ενίσχυση με τη μέθοδο της PCR υποβλήθηκαν σε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου, έπειτα υποβάλλονται σε χρώση με νιτρικό άργυρο και παρατηρείται η ηλεκτροφορητική δραστηριότητα των δειγμάτων. Αρχικά πριν την προετοιμασία των πηκτωμάτων ετοιμάζουμε το καλούπι στο οποίο θα τοποθετηθεί το διάλυμα του πηκτώματος ώστε να στερεοποιηθεί. Το καλούπι αυτό αποτελείται από δύο γυάλινες διάφανες πλάκες στο εσωτερικό των οποίων θα τοποθετηθεί το διάλυμα.

#### Παρασκευή πηκτής πολυακρυλαμιδής

Στην παρούσα εργασία η συγκέντρωση του πολυακρυλαμιδίου που επιλέχθηκε ήταν 10%. Για την παρασκευή 2 πηκτωμάτων αυτής της πυκνότητας και τελικού όγκου 130ml χρησιμοποιήθηκαν:

- 12,375 gr Ακρυλαμίδη 99%
- 0,33gr Bis-acrylamide
- 10ml 10x TBE [Παράρτημα 1]
- 12,5 ml Glycerol 50%
- 650 μl APS 20% [Παράρτημα 1]
- 125 ml TEMED
- ddH<sub>2</sub>O για τη συμπλήρωση του όγκου των 130 ml

Αρχικά σε ένα δοχείο χωρητικότητας 200 ml τοποθετούμε ένα μικρό μαγνήτη και προσθέτουμε τις απαιτούμενες ποσότητες ακρυλαμιδής, bis-acrylamide, 10x TBE (Tris- borate EDTA) και γλυκερόλη 50%. Το δοχείο τοποθετείται στον μαγνητικό

αναδευτήρα και αφήνεται μέχρι να γίνει το διάλυμα διαυγές. Έπειτα ακολουθεί διήθηση του διαλύματος σε ένα ογκομετρικό σωλήνα και συμπλήρωση του τελικού όγκου 130 ml με προσθήκη ddH<sub>2</sub>O. Κατ' όπιν το διάλυμα μεταφέρεται σε κωνική φιάλη και προστίθενται σε αυτό APS 20% (ammonium persulfate) και TEMED (N, N, N, N – tetramethylethylenediamine) για τον πολυμερισμό του. Έπειτα από σύντομη έντονη ανάδευση το διάλυμα μεταφέρεται στο καλούπι που έχουμε ετοιμάσει και αφού προστεθούν τα κατάλληλα χτενάκια για τον διαχωρισμό των πηγαδιών (2mm) αφήνεται να πήξει για 30-40 min.

#### Ηλεκτροφόρηση δειγμάτων

Τα προϊόντα PCR που έδωσαν θετικό αποτέλεσμα είναι και αυτά που θα ηλεκτροφορηθούν στην πηκτή πολυακρυλαμίδιου. Αρχικά θα παρασκευάσουμε το αποδιατακτικό διάλυμα που είναι απαραίτητο για την ηλεκτροφόρηση γιατί τα συστατικά του εξασφαλίζουν την διατήρηση της αποδιάταξης των δύο κλώνων του DNA. Για την παρασκευή 1lt αποδιατακτικού διαλύματος (denaturation buffer) χρησιμοποιούμε:

- 475 mL φορμαμίδιο 95%
- 5mmol EDTA 20mM (ethylenediaminetetraacetic acid)
- 0,5 gr κυανό του ξυλενίου 0,05%
- 0.2 g κυανό της βρωμοφαινόλης 0,05%
- 5 mmol Tris

Σε eppendorf των 1,5ml τοποθετώ 10μl αποδιατακτικό διάλυμα (denaturation buffer) και 5μl προϊόν PCR από το κάθε δείγμα. Το μείγμα τοποθετείται σε συσκευή θερμοκυκλοποιητή ώστε να πραγματοποιηθεί η πλήρης αποδιάταξη των δίκλωνων μορίων DNA. Το πρόγραμμα που επιλέγεται περιλαμβάνει τα παρακάτω βήματα:

2 min στους 95° C

2 min στους 97° C

7 min στους 99° C

Τα δείγματα απομακρύνονται από τον θερμοκυκλοποιητή περίπου 1,5 min πριν τη λήξη του προγράμματος και τοποθετούνται αμέσως σε πάγο για να διατηρηθεί η

αποδιάταξη. Έπειτα προετοιμάζουμε τη συσκευή ηλεκτροφόρησης. Τοποθετούμε στις κατάλληλες θέσεις τα καλούπια με τα πηκτώματα πολυακρυλαμιδίου και γεμίζουμε τη συσκευή με ρυθμιστικό διάλυμα 0,5x TBE. Φορτώνουμε τα δείγματα και κλείνουμε τη συσκευή. Τα δείγματα ηλεκτροφορούνται για 20 ώρες στους 4°C και εφαρμόζεται τάση 220 Volt.

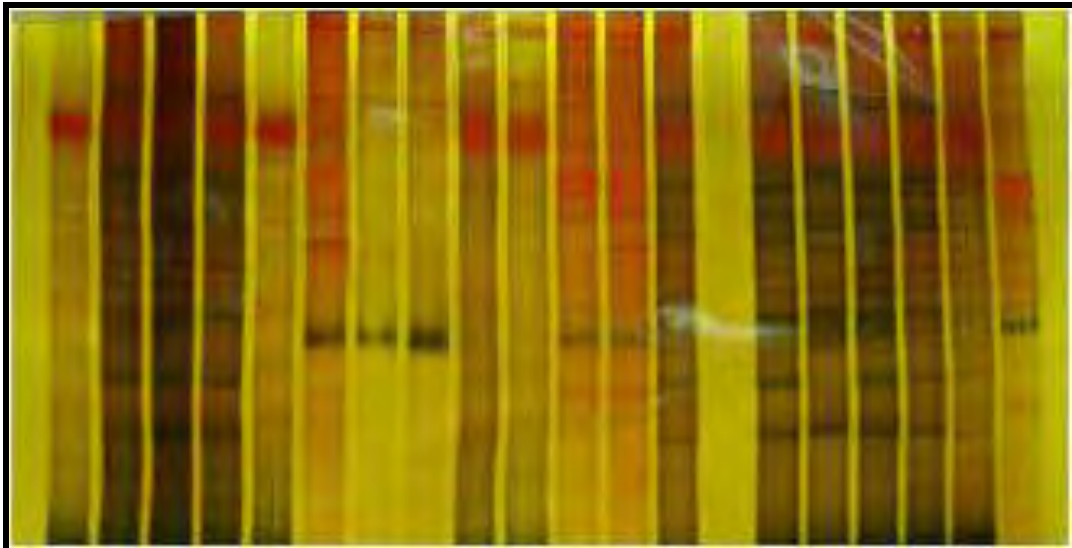
#### Χρώση με νιτρικό άργυρο/ Silver staining

Μετά τη λήξη της ηλεκτροφόρησης αφαιρούμε τα καλούπια από τα πηκτώματα και ακολουθεί η χρώση τους μέσα από εμποτισμό σε τρία διαλύματα. Για την παρασκευή των διαλυμάτων αυτών, για τα 2 πηκτώματα χρησιμοποιήθηκαν τα συστατικά που αναγράφονται στον πίνακα 2.

**Πίνακας 2:** Συστατικά διαλυμάτων για χρώση νιτρικού αργύρου

<i>Διάλυμα 1<sup>ο</sup></i>	<i>Διάλυμα 2<sup>ο</sup></i>	<i>Διάλυμα 3<sup>ο</sup></i>
<i>800 ml ddH<sub>2</sub>O</i>	<i>400ml AgNO<sub>3</sub> (1gr/lt)</i>	<i>6gr NaOH</i>
<i>20 ml Ethanol 100%</i>	-	<i>0,02gr NaBH<sub>4</sub></i>
<i>1ml CH<sub>3</sub>COOH 90%</i>	-	<i>2ml φορμαλδεΰδη HCHO</i>
-	-	<i>ddH<sub>2</sub>O έως 400ml τελικό όγκο</i>

Αρχικά το κάθε πήκτωμα εμποτίζεται σε 200 ml του 1<sup>ου</sup> διαλύματος για 3 min. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται ακόμη μία φορά και στη συνέχεια ακλουθούν δύο πλύσεις του 1min με ddH<sub>2</sub>O. Έπειτα εμποτίζεται σε 200ml του 2<sup>ου</sup> διαλύματος του AgNO<sub>3</sub> το κάθε ένα από αυτά και αφήνεται για 15min. Ακλουθούν δύο πλύσεις του 1min με ddH<sub>2</sub>O και στη συνέχεια σε κάθε ένα προστίθενται 200 ml του 3<sup>ου</sup> διαλύματος. Τα πηκτώματα αφήνονται στο τελευταίο διάλυμα για 15-20 min έως ότου εμφανιστούν οι μπάντες. Ακολουθεί μία ακόμη πλύση του 1min με ddH<sub>2</sub>O. Τα πηκτώματα στεγνώνονται ελαφρώς, συσκευάζονται σε ζελατίνη και είναι έτοιμα για παρατήρηση, αξιολόγηση και αποθήκευση.



*Εικόνα 11: Χαρακτηριστική εικόνα ενός πηκτώματος πολυακρυλαμιδίου, έπειτα από χρώση νιτρικού αργύρου.*

#### **2.2.4 ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ PCR**

Στην παρούσα έρευνα δείγματα που φαίνεται να παρουσιάζουν διαφορετικό πρότυπο κίνησης κατά την ηλεκτροφόρηση σε σύγκριση με τα φυσιολογικά επιλέχθηκαν να σταλούν για αλληλούχηση ώστε να εντοπιστούν πιθανές μεταλλάξεις.

Κατά την προετοιμασία των δειγμάτων για αλληλούχηση πρέπει να απομακρυνθούν από τα προϊόντα της αντίδρασης PCR όλα τα πρόσθετα αντιδραστήρια που δεν αξιοποιήθηκαν πλήρως ώστε να παραμείνει μόνο το ενισχυμένο DNA. Για το λόγο αυτό το προϊόν την αντίδρασης PCR υφίσταται καθαρισμό με χρήση ειδικών προϊόντων από την εταιρία Invitrogen, PureLink:PCR purification kit, που περιλαμβάνει όλα τα απαραίτητα διαλύματα. Τα βήματα που ακολουθούνται είναι τα εξής:

- Σε ένα όγκο PCR προϊόντος προστίθενται 4 όγκους Binding buffer με ισοπροπανόλη
- Το μείγμα αναμειγνύεται καλά και τοποθετείται σε κατάλληλη στήλη Spin Column Purelink που φέρει eppendorf/ collection tube για τη συλλογή των προϊόντων των φυγοκεντρήσεων που θα ακολουθήσουν
- Φυγοκεντρείται αρχικά στις 10000rpm για 1 min σε θερμοκρασία δωματίου και η στήλη μεταφέρεται σε νέο eppendorf/ collection tube

- Ακολουθεί προσθήκη 650  $\mu$ l Wash buffer with ethanol στη στήλη και φυγοκέντρωση στις 10000rpm για 1 min σε θερμοκρασία δωματίου
- Απομακρύνεται το διάλυμα από το collection tube και επαναφυγοκεντρείται η στήλη για 2-3 min σε θερμοκρασία δωματίου σε μέγιστη ταχύτητα (ή 12000-13000 rpm)
- Η στήλη μεταφέρεται σε καθαρό Purelink Elution tube 1,7 ml
- Προσθέτεται 50 $\mu$ l Elution buffer ή ddH<sub>2</sub>O και αφήνεται για επώαση για 1min σε θερμοκρασία δωματίου (incubate)
- Φυγοκεντρείται για 2min στη μέγιστη ταχύτητα σε θερμοκρασία δωματίου
- Αφαιρείται η στήλη και στο elution tube και υπάρχει καθαρό DNA
- Τέλος τα προϊόντα του καθαρισμού ηλεκτροφορούνται για ποιοτικό έλεγχο σε gel αγαρόζης 1,5%

Εφ' όσον ο ποιοτικός έλεγχος δείξει ότι υπάρχει αρκετή ποσότητα DNA για το κάθε δείγμα, αυτά είναι έτοιμα να αποσταλούν για αλληλούχηση. Μαζί με τα δείγματα θα σταλούν και δύο tubes, ένα για τον κάθε εκκινητή, με τους εκκινητές που χρησιμοποιήσαμε για την ενίσχυση του γονιδίου σε συγκέντρωση 5pmol/ $\mu$ l.

## **2.2. 5 ΑΛΛΗΛΟΥΧΗΣΗ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ**

Η εξέλιξη των επιστημών κατά τον 20<sup>ο</sup> αιώνα ώθησε τους ερευνητές στην εύρεση μεθόδων για την ολοκληρωμένη ανάλυση αλληλουχιών DNA. Στα τέλη της δεκαετίας του 1970 άρχισαν να εφαρμόζονται ολοκληρωμένες τεχνικές αλληλούχησης/ταυτοποίησης του DNA. Την ίδια εποχή αναπτύσσονται η χημική αλληλούχηση από τους Maxam M. - Gilbert W. και η ενζυμική μέθοδος με χρήση διδεοξυνουκλεοτιδίων από τον Sanger F. Οι τεχνικές αυτές γρήγορα εξελίχθηκαν και σήμερα έχουν αναπτυχθεί ειδικοί αυτόματοι αναλυτές που μειώνουν σημαντικά το χρόνο διεξαγωγής της αντίδρασης, αξιοποιούν τη χρήση φθορίζουσών ουσιών και μεταφέρουν τα δεδομένα σε ηλεκτρονικό υπολογιστή με τη μορφή χρωματογραφημάτων.

Τα δείγματα της παρούσας έρευνας αλληλουχήθηκαν στο τμήμα Ανοσολογίας-Ιστοσυμβατότητας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

### Αξιολόγηση αποτελεσμάτων

Τα αποτελέσματα της αλληλούχησης περιλάμβαναν δύο αλληλουχίες για το κάθε δείγμα όπως διαβάστηκε από τον κάθε εκκινητή συνοδευόμενες από το αντίστοιχο ηλεκτρογράφημα. Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με χρήση του προγράμματος bioedit. Πιο συγκεκριμένα ελέγχτηκε η ορθή ανάγνωση της κάθε αλληλουχίας, συγκρίθηκαν από το κάθε δείγμα οι αλληλουχίες που προέκυψαν από τον κάθε εκκινητή προκειμένου να βρεθεί η ολοκληρωμένη αλληλουχία κάθε δείγματος. Τέλος πραγματοποιήθηκε σύγκριση όλων των αλληλουχιών με την πρότυπη μιτοχονδριακή αλληλουχία προκειμένου να εντοπιστούν μεταλλάξεις.

### **2.2.6 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ**

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την παρούσα έρευνα, διασταυρώθηκαν με παλαιότερη έρευνα, που είχε πραγματοποιηθεί επίσης στο Εργαστήριο Γενετικής, Συγκριτικής & Εξελικτικής Βιολογίας. Τα αποτελέσματα και των δύο ερευνών αθροίστηκαν και έδωσαν τα συνολικά δεδομένα. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε στα συνολικά δεδομένα των δύο ερευνών. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με εφαρμογή του Fisher's exact test. Ο έλεγχος με αυτή τη μεθοδολογία προτιμήθηκε γιατί οι τιμές των συχνοτήτων ήταν πολύ μικρές.



## ***ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3***

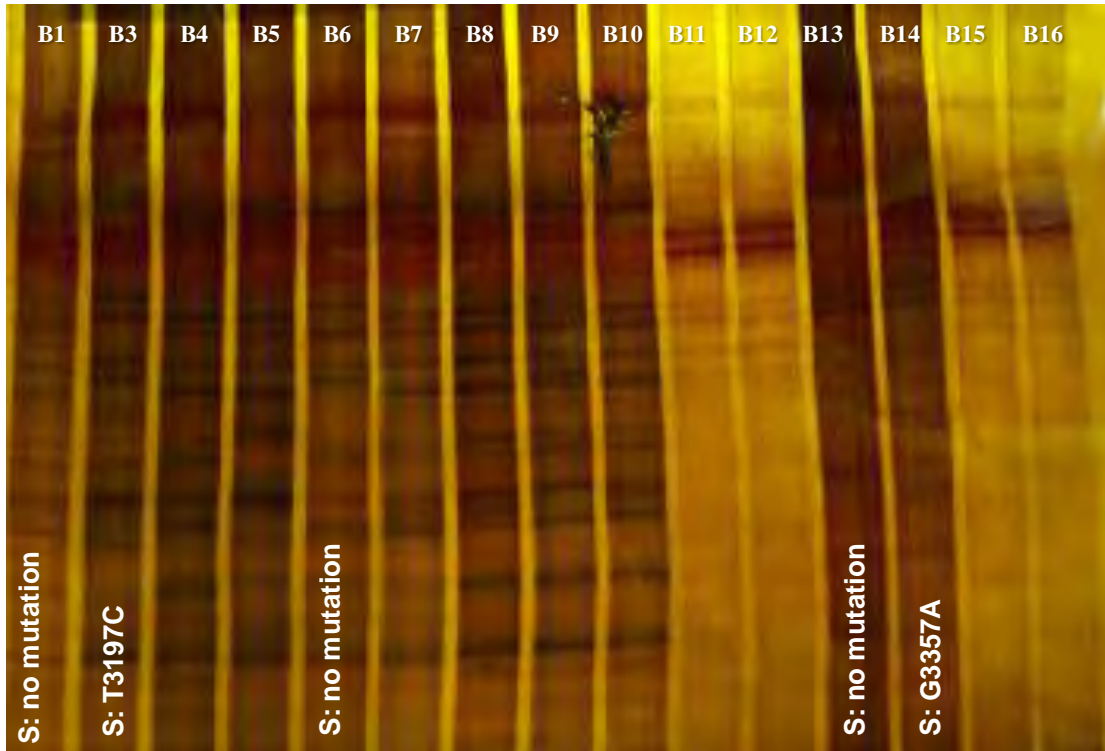
## ***ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ***

Στην παρούσα εργασία από τη μελέτη των 50 ασθενών ατόμων με νόσο Alzheimer εντοπίστηκαν συνολικά 5 μεταλλάξεις, ενώ από τη μελέτη των φυσιολογικών για τη νόσο ατόμων εντοπίστηκε μία μεταλλαγή. Ωστόσο καμία από τις παραπάνω μεταλλάξεις δεν εντοπίζεται μέσα στο γονίδιο για το tRNA<sup>Leu(UUR)</sup>. Από το σύνολο αυτών στην παρακείμενη περιοχή που κωδικοποιεί το 16S rRNA εντοπίστηκαν δύο μεταλλάξεις, οι T3197C και A3213G. Η πρώτη παρουσιάστηκε σε δείγματα προερχόμενα από άτομα ασθενή ενώ η δεύτερη εμφανίστηκε σε ένα μόνο δείγμα υγιούς ατόμου. Στην γειτονική περιοχή του γονιδίου ND1 εντοπίστηκαν τρεις μεταλλάξεις μόνο σε ασθενή άτομα, οι T3398C, G3357A και A3360G. Όλες οι μεταλλάξεις που ταυτοποιήθηκαν στην παρούσα έρευνα συνοψίζονται στον Πίνακα 3.

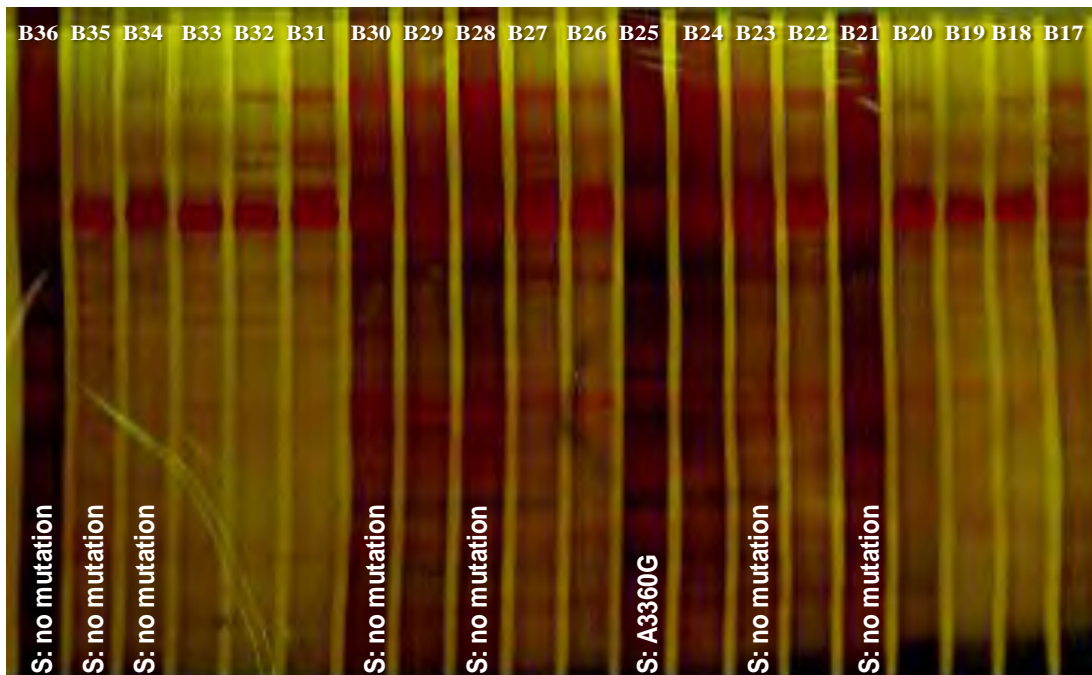
**Πίνακας 3:** Σύνοψη των μεταλλάξεων που βρέθηκαν και αξιολογήθηκαν στην παρούσα έρευνα. Παρουσιάζονται τα δείγματα ασθενών και υγιών ατόμων που φέρουν μεταλλάξεις θέση αυτών των μεταλλάξεων στο mtDNA και το αποτέλεσμα που επιφέρουν στο πρωτεϊνικό προϊόν.

Άτομα με νόσο Alzheimer	Τμήμα του 16S rRNA	Γονίδιο του tRNA <sup>Leu(UUR)</sup>	Τμήμα του ND1	Αποτέλεσμα μετάλλαξης
B2	-	-	T3398C	M - T
B3	T3197C	-	-	Μη κωδικοποιούσα
B14	-	-	G3357A	Συνώνυμη
B25	-	-	A3360G	Συνώνυμη
B43	T3197C	-	-	Μη κωδικοποιούσα
B44	T3197C	-	-	Μη κωδικοποιούσα
B49	T3197C	-	-	Μη κωδικοποιούσα
B50	T3197C	-	-	Μη κωδικοποιούσα
Υγιή Άτομα	Τμήμα του 16S rRNA	Γονίδιο του tRNA <sup>Leu(UUR)</sup>	Τμήμα του ND1	Αποτέλεσμα μετάλλαξης
C7	A3213G	-	-	H - R

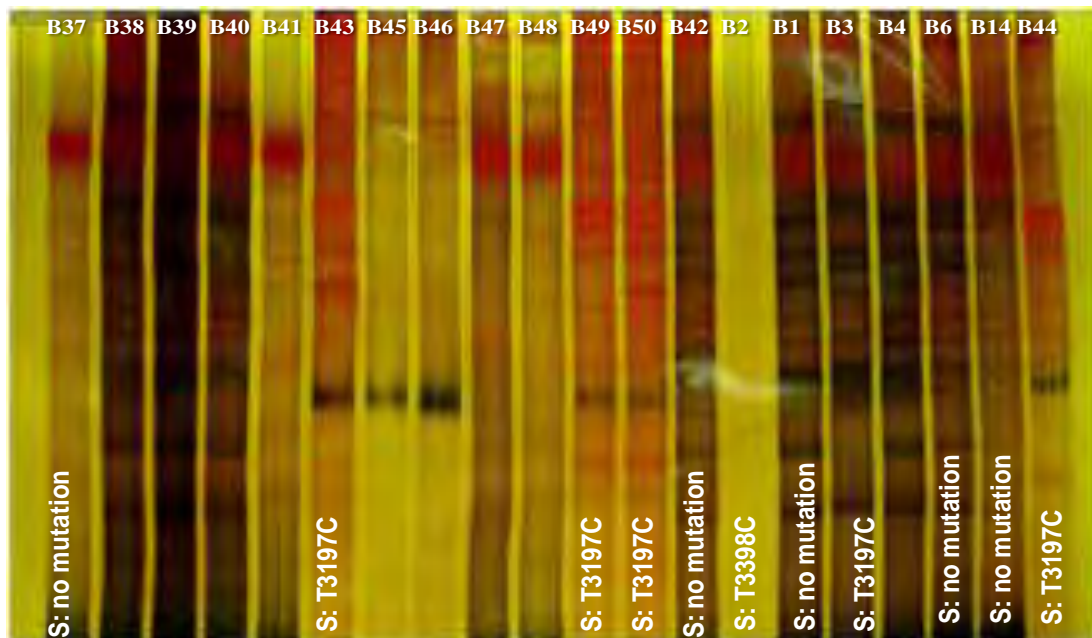
Όλες οι μεταλλάξεις εμφάνισαν διαφορετικό πρότυπο ηλεκτροφόρησης στο πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου. Παρακάτω παρουσιάζονται τα πήκτώματα έπειτα από χρώση νιτρικού αργύρου, όπου παρατηρούνται οι μεταβολές στην κίνηση των μονόκλωνων τμημάτων DNA [Εικόνες12-15]



**Εικόνα 12:** Πήκτωμα πολυακρυλαμιδης [1] για δείγματα των ασθενών ατόμων (B1, B3- B16). Επισημαίνονται τα δείγματα που στάλθηκαν για αλληλούχηση (S). Τα B1, B6 και B13 δεν έδειξαν κάποια μετάλλαξη κατά την αλληλούχηση (S: no mutation). Τα B3 και B14 φέρουν μεταλλάξεις.

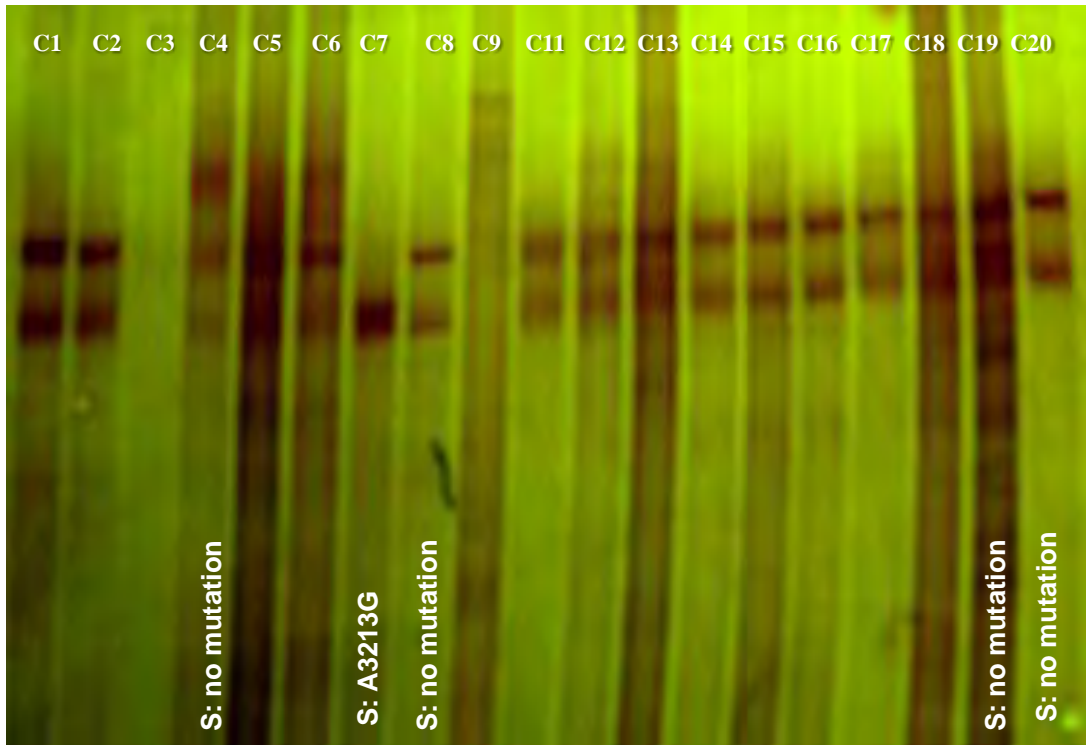


*Εικόνα 13: Πήκτωμα πολυακρυλαμίδης [2] για δείγματα των ασθενών ατόμων (B17- B36). Επισημαίνονται τα δείγματα που στάλθηκαν για αλληλούχηση (S). Τα B21, B23, B28, B30, B34, B35 και B36 δεν έδειξαν κάποια μετάλλαξη κατά την αλληλούχηση (S: no mutation). Το δείγμα B25 φέρει μετάλλαξη.*



*Εικόνα 14: Πήκτωμα πολυακρυλαμίδης [3] για δείγματα των ασθενών ατόμων (B37-B50 & B1-B4, B6, B14 επαναληπτικά). Επισημαίνονται τα δείγματα που στάλθηκαν για*

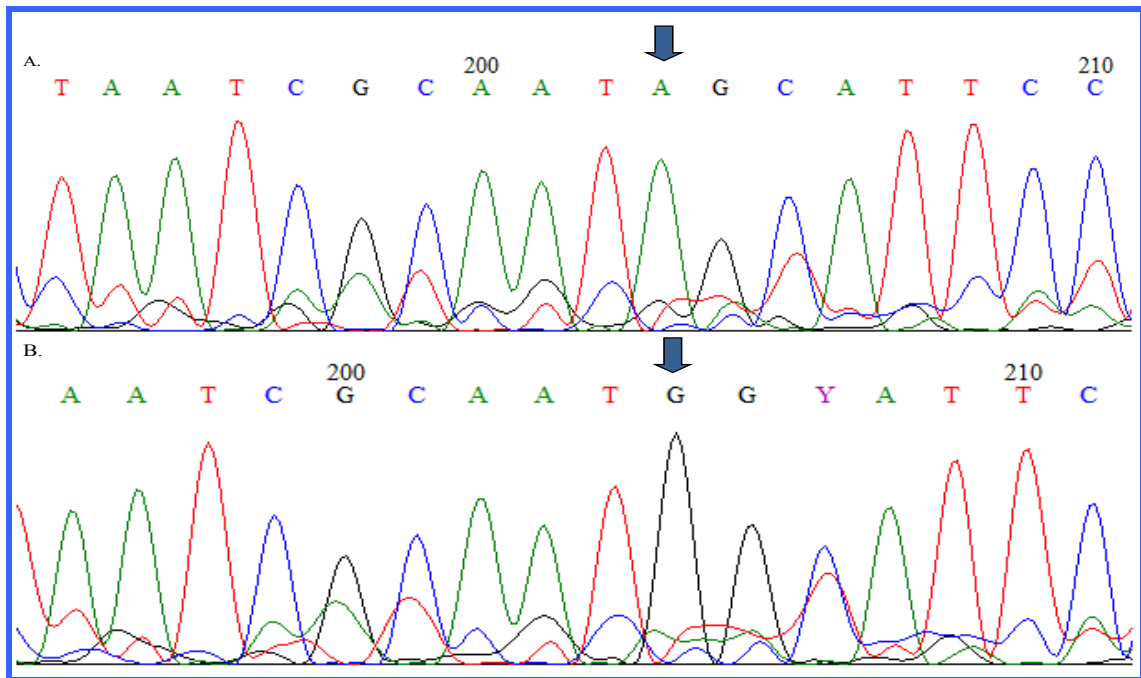
αλληλούχηση(S). Τα B1, B6, B14, B37 και B42 δεν έδειξαν κάποια μετάλλαξη κατά την αλληλούχηση (S: no mutation). Τα B2, B3, B43, B44, B49 και B50 φέρουν μεταλλάξεις.



**Εικόνα 15:** Πήκτωμα πολυακρυλαμίδης [4] για δείγματα των υγιών ατόμων (C1-C9,C11-C20). Επισημαίνονται τα δείγματα που στάλθηκαν για αλληλούχηση (S). Τα C4, C8,C19 και C20 δεν έδειξαν κάποια μετάλλαξη κατά την αλληλούχηση (S: no mutation). Το δείγμα C7 φέρει μετάλλαξη.

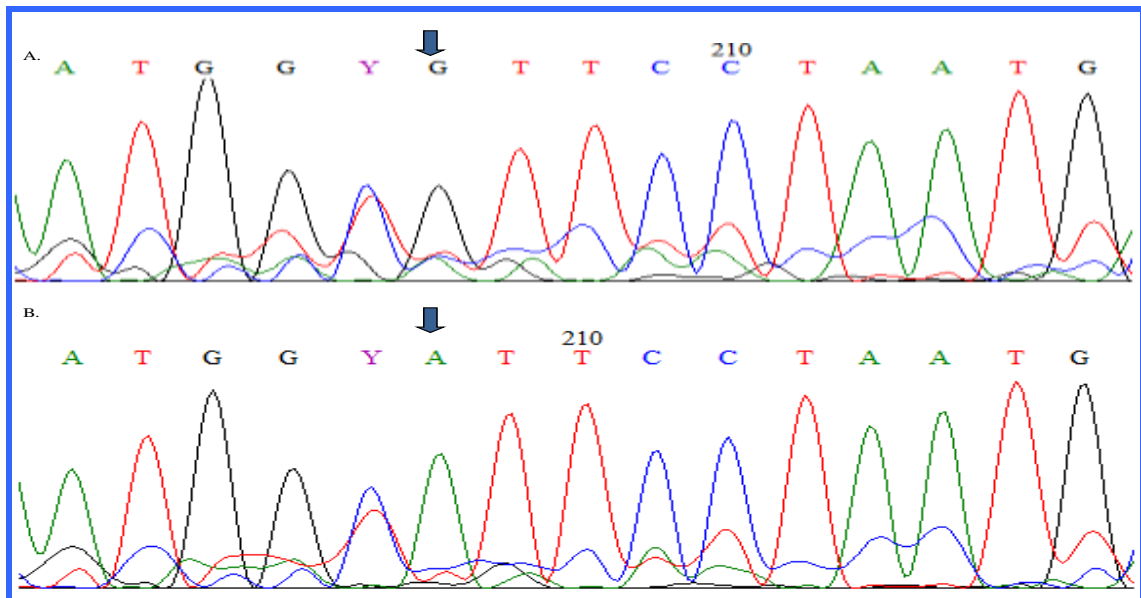
Τα δείγματα που παρουσίασαν διαφορετική κινητικότητα κατά την ηλεκτροφόρηση, όπως ήδη αναφέρθηκε, αλληλουχήθηκαν για να διαπιστωθεί αν φέρουν κάποια μεταλλαγή. Παρακάτω παρουσιάζονται τα χρωματογραφήματα της αλληλούχησης για όλες τις μεταλλάξεις που εντοπίστηκαν [Εικόνες 16-20].

### G3357A



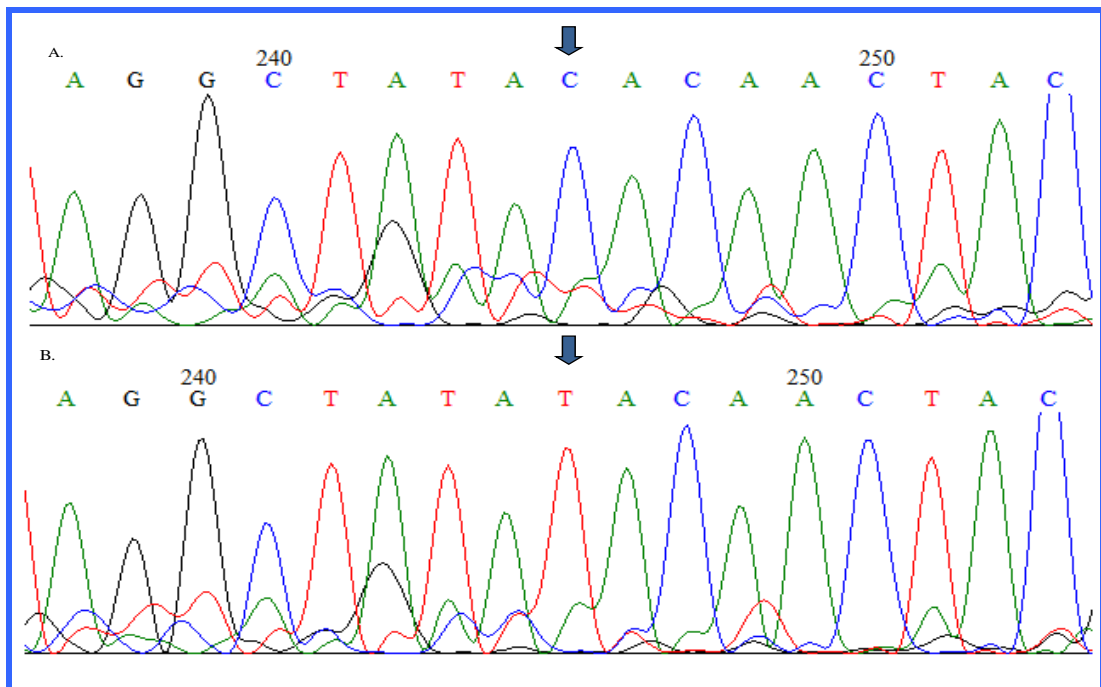
**Εικόνα 16:** Χρωματογράφημα αλληλούχησης για το γονίδιο *tRNA<sup>Leu(UUR)</sup>* σε ασθενή άτομο (A) και φυσιολογικό (B). Είναι εμφανής η μεταλλαγή G / A στη θέση 3357.

### A3360G



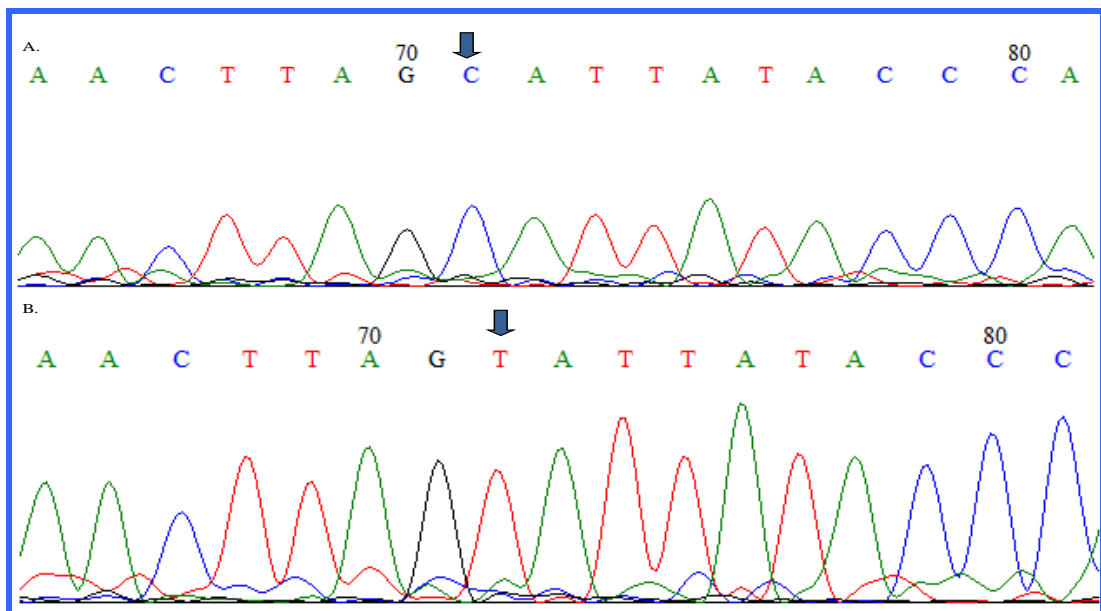
**Εικόνα 17:** Χρωματογράφημα αλληλούχησης για το γονίδιο *tRNA<sup>Leu(UUR)</sup>* σε ασθενή άτομο (A) και φυσιολογικό (B). Είναι εμφανής η μεταλλαγή A / G στη θέση 3360.

### T3398C



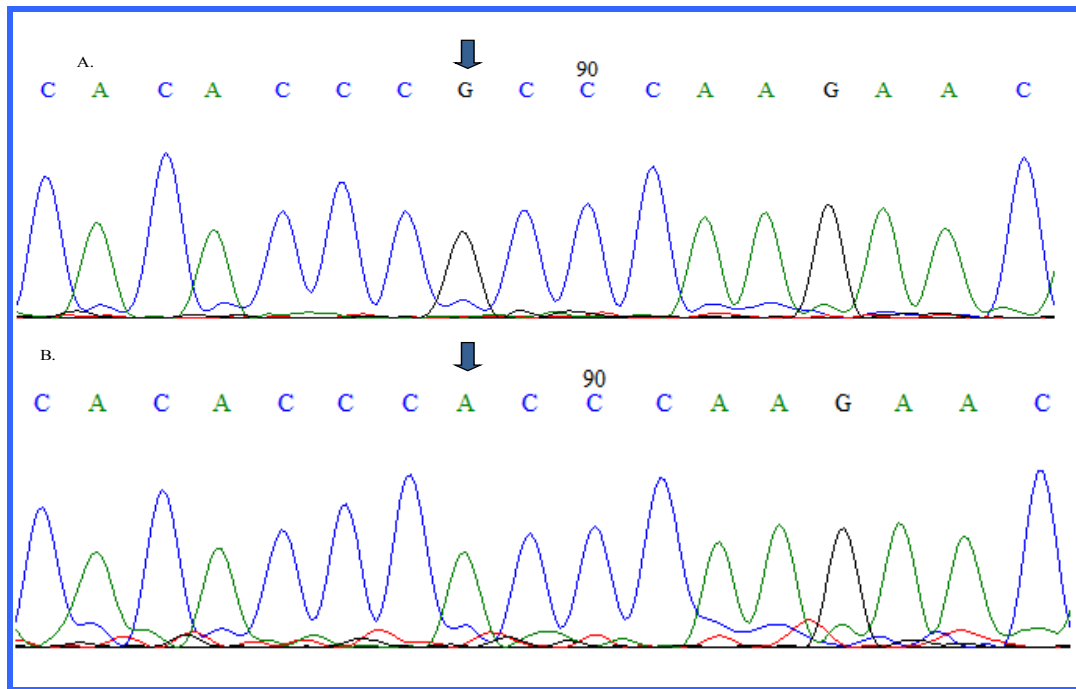
**Εικόνα 18:** Χρωματογράφημα αλληλούχησης για το γονίδιο *tRNA<sup>Leu(UUR)</sup>* σε ασθενή άτομο (A) και φυσιολογικό (B). Είναι εμφανής η μεταλλαγή T / C στη θέση 3398.

### T3197C



**Εικόνα 19:** Χρωματογράφημα αλληλούχησης για το γονίδιο *tRNA<sup>Leu(UUR)</sup>* σε ασθενή άτομο (A) και φυσιολογικό (B). Είναι εμφανής η μεταλλαγή T / C στη θέση 3197.

## A3213G



**Εικόνα 21:** Χρωματογράφημα αλληλούχησης για το γονίδιο  $tRNA^{Leu(UUR)}$  σε ασθενή άτομο (A) και φυσιολογικό (B). Είναι εμφανής η μεταλλαγή ] A / G στη θέση 3213.

Από τη στατιστική ανάλυση των συνολικών δεδομένων των δύο ερευνών, προέκυψε ότι οι περισσότερες από τις παραπάνω μεταλλάξεις δεν εμφανίζουν στατιστικά σημαντική πιθανότητα, ώστε να θεωρηθεί ότι σε άτομα με νόσο Alzheimer συναντώνται πιο συχνά. Μόνο η μετάλλαξη T3197C διαφοροποιήθηκε από τις υπόλοιπες. Τα αποτελέσματα της παρούσας έρευνα, τα συνολικά δεδομένα καθώς και τα δεδομένα της στατιστικής ανάλυσης συνοψίζονται στον Πινάκα 4.



**Πίνακας 4:** Σύνοψη των αποτελεσμάτων. Παρουσιάζονται τα ευρήματα της παρούσας έρευνας καθώς και τα συνολικά δεδομένα, όπως προέκυψαν από διασταύρωση με παλαιότερες έρευνες. Για κάθε μετάλλαξη καταγράφεται ο αριθμός τόσο των υγιών όσο και των ασθενών ατόμων που τη φέρουν και η συχνότητα εμφάνισής της σε κάθε περίπτωση και στις δύο έρευνες. Επίσης καταγράφονται και τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης που προέκυψαν για τα συνολικά δεδομένα.

Μεταλλάξεις	Δεδομένα Παρούσας Έρευνας				Συνολικά Δεδομένα Ερευνών (παρούσα & προγενέστερη)				Πιθανότητα* (P)
	Ασθενή άτομα		Υγιή άτομα		Ασθενή άτομα		Υγιή άτομα		
	Αριθμός Ατόμων	Συχνότητα	Αριθμός Ατόμων	Συχνότητα	Αριθμός Ατόμων	Συχνότητα	Αριθμός Ατόμων	Συχνότητα	
<b>T3398C</b>	1/50	2%	0/20	0%	1/100	1%	0/205	0%	0.328
<b>T3197C</b>	5/50	10%	0/20	0%	6/100	6%	1/205	0,488%	0,006
<b>G3357A</b>	1/50	2%	0/20	0%	1/100	1%	0/205	0%	0.328
<b>A3360G</b>	1/50	2%	0/20	0%	1/100	1%	0/205	0%	0.328
<b>A3213G</b>	0/50	0%	1/20	2%	0/100	0%	3/205	1,46%	0.553

# ***ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4***

## ***ΣΥΖΗΤΗΣΗ***

Σκοπός της παρούσας ερευνητικής εργασίας ήταν η ανίχνευση μεταλλάξεων στο μιτοχondριακό γονίδιο που κωδικοποιεί το tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> και η συσχέτισή τους με τη νόσο Alzheimer. Η προσπάθεια ανίχνευσης μεταλλάξεων που βρίσκονται σε αυτό το γονίδιο αποκάλυψε τέσσερις συνολικά μεταλλάξεις από τη μελέτη 50 ασθενών ατόμων και μία μετάλλαξη στα 20 υγιή άτομα. Καμία όμως από αυτές δεν βρέθηκε στο γονίδιο του mt tRNA<sup>Leu(UUR)</sup>, αντιθέτως όλες ήταν σε τμήματα των παρακείμενων περιοχών ND1 και 16S rRNA. Πιο συγκεκριμένα στο τμήμα του γονιδίου της ND1 υπομονάδας του συμπλόκου I της αναπνευστικής αλυσίδας εντοπίστηκαν τρεις σημειακές μεταλλάξεις, η T3398C, η G3357A και η A3360G όλες σε ασθενή άτομα. Ενώ στο τμήμα του γονιδίου 16S rRNA εντοπίστηκαν δύο μεταλλάξεις, η T3197C σε πάσχοντα άτομα και η A3213G σε υγιή άτομα.

Η μετάλλαξη T3398C στο τμήμα της ND1, είναι μία αντικατάσταση η οποία μετατρέπει τη μεθειονίνη (ATA) σε θρεονίνη (ACA). Η μετάλλαξη αυτή έχει εντοπιστεί ξανά στο παρελθόν. Σε έρευνα ατόμων που πάσχουν από μιτοχondριακές εγκεφαλοπάθειες εντοπίστηκε με συχνότητα 1/35 σε ασθενή άτομα που ήδη έφεραν και τη μετάλλαξη A3243G και φαίνεται να συνδέεται με την εμφάνιση τέτοιων διαταραχών (Sternberg D et al 2008). Ακόμη σε έρευνα για τη μελέτη της σχέσης του μιτοχondριακού γονιδιώματος με την καρδιομυοπάθεια LVNC (left ventricular non-compaction) βρέθηκε σε 3 από τα 20 ασθενή άτομα και πιθανώς συμμετέχει στην παθογένεια της νόσου (Tang S et al 2010). Ωστόσο δεν βρέθηκε κάποια αναφορά της σε μελέτες για τη νόσο Alzheimer. Στην παρούσα έρευνα η μετάλλαξη αυτή εντοπίστηκε σε 1 από τα 50 άτομα με Alzheimer, με συχνότητα 2%, ενώ δεν εντοπίστηκε καθόλου στα φυσιολογικά άτομα. Στα συνολικά δεδομένα του εργαστηρίου η συχνότητα της ήταν 1% στους ασθενείς και 0% στους υγιείς. Η πιθανότητα (P) της συγκεκριμένης μετάλλαξης, όπως προέκυψε από τη στατιστική ανάλυση, είναι 0,328 (P>0,05).

Η μετάλλαξη G3357A στο τμήμα της ND1, ανήκει στις συνώνυμες μεταλλάξεις, καθώς δεν αλλάζει το αμινοξύ της μεθειονίνης (ATG / ATA). Σε προγενέστερη έρευνα για τον καρκίνο του προστάτη, η μετάλλαξη αυτή βρέθηκε σε 1 από τα 16 ασθενή άτομα και φαίνεται να σχετίζεται με την εμφάνισή αυτής της μορφής καρκίνου, ενώ υποστηρίζεται ότι μαζί με τις υπόλοιπες μεταλλάξεις που εντοπίστηκαν (G3434A, A3505G, A12372G, A16183 κ.α.) μπορεί να έχουν προγνωστικό ρόλο στην ανίχνευσή του σε πρώιμα στάδια (Jeronimo C et al 2001).

Ακόμη εντοπίστηκε σε ασθενείς με διαβήτη μελιταίο με συχνότητα 1/240 ασθενείς (Ohkubo K et al 2001) καθώς και σε άτομα με καρδιομυοπάθεια συνοδευόμενη από μιτοχονδριακές ανωμαλίες, με συχνότητα 1/86 ασθενείς (Arbustin E et al 1998) χωρίς όμως να παρουσιάζει καμία συσχέτιση με τα παραπάνω νοσήματα. Η μετάλλαξη αυτή δεν έχει αναφερθεί στο παρελθόν σε έρευνες σχετικά με τη νόσο Alzheimer και από τα αποτελέσματα της παρούσας έρευνας δεν φαίνεται να υπάρχει κάποια συσχέτιση. Η παραπάνω μετάλλαξη, στην παρούσα έρευνα βρέθηκε μόνο σε ένα από τα 50 ασθενή άτομα, με συχνότητα 2%, ενώ στα υγιή άτομα είχε μηδενική συχνότητα. Στα συνολικά δεδομένα η συχνότητα βρέθηκε 1%, ενώ στα φυσιολογικά άτομα παρέμεινε 0%. Η τιμή της πιθανότητας και για αυτή τη μετάλλαξη βρέθηκε 0,32 ( $P>0,05$ ).

Η μετάλλαξη A3360G κατατάσσεται στις συνώνυμες μεταλλαγές καθώς η αντικατάσταση (GCA / GCG) δεν μεταβάλλει το αμινοξύ της αλανίνης. Ελάχιστες έρευνες κάνουν αναφορές για τη μετάλλαξη αυτή, χωρίς ωστόσο καμία να αναφέρεται στη νόσο Alzheimer. Στην παρούσα έρευνα η μετάλλαξη εμφάνισε ακριβώς τα ίδια αποτελέσματα με τις προηγούμενες δύο μεταλλάξεις, δηλαδή εντοπίστηκε σε 1/50 πάσχοντα άτομα με συχνότητα 2% και καθόλου στα υγιή. Από τα συνολικά δεδομένα η συχνότητά της βρέθηκε 1% για τους ασθενείς με Alzheimer και 0% για τους υγιείς, ενώ η πιθανότητα ( $P$ ) από τη στατιστική ανάλυση βρέθηκε 0,328 ( $P>0,05$ - στατιστικά μη σημαντική).

Η μετάλλαξη T3197C στο τμήμα του 16S rRNA είναι μία αντικατάσταση που οδηγεί σε μετατροπή της γλουταμίνης (CAA) σε κωδικόνιο λήξης και συνεπώς σε πρόωρο τερματισμό της πολυπεπτιδικής αλυσίδας. Η μετάλλαξη αυτή έχει εντοπιστεί σε πλήθος ερευνών που αφορούν το μιτοχονδριακό γονιδίωμα. Σε έρευνα για τη μελέτη της μιτοχονδριακής εγκεφαλοπάθειας εντοπίστηκε σε 5 από τα 35 ασθενή άτομα, ωστόσο δεν σχετίζεται με τη νόσο αλλά φαίνεται να αποτελεί κοινό πολυμορφισμό καθώς η συχνότητα υγιών και ασθενών ατόμων ήταν παρόμοια (Sternberg D et al 1998). Την άποψη του απλού πολυμορφισμού ενισχύει μία ακόμη έρευνα για τη μελέτη του σακχαρώδη διαβήτη. Σε αυτή την έρευνα η μετάλλαξη T3197C παρουσίασε συχνότητα 10,6% στους ασθενείς, μέσα σε ένα εύρος 122 νοσούντων ατόμων. Δεν εμφάνισε κάποια συσχέτιση με τη νόσο και χαρακτηρίστηκε τυχαίος πολυμορφισμός (Klemm T et al 2001). Ακόμη η μετάλλαξη αυτή έχει εντοπιστεί σε έρευνα για τη μελέτη της οπτικής νευροπάθειας Leber

(LHON), καθώς βρέθηκε σε 4 από τις 36 οικογένειες που έπασχαν από τη νόσο μαζί με αρκετές ακόμη σημειακές μεταλλάξεις, χωρίς να έχει διευκρινιστεί ο ρόλος της (Ruomilla A et al 2007). Ωστόσο φαίνεται να σχετίζεται με τον καρκίνο του μαστού. Σε έρευνα 156 γυναικών με οικογενή καρκίνο του μαστού, η μετάλλαξη T3197C παρουσίασε πιθανότητα P ίση με 0,0043 ( $P < 0,05$ ) και φαίνεται να αποτελεί παράγοντα μείωσης του κινδύνου εμφάνισης (Bai R et al 2007). Παρά τις αναφορές που υπάρχουν για τη συγκεκριμένη μετάλλαξη καμία δεν αναφέρεται στη σχέση της με τη νόσο Alzheimer. Στην παρούσα έρευνα η μετάλλαξη T3197C βρέθηκε σε 5 από τα 50 ασθενή άτομα, παρουσιάζοντας συχνότητα 10%, ενώ δεν βρέθηκε καθόλου στα υγιή άτομα. Από τα συνολικά δεδομένα του εργαστηρίου η συχνότητα της στα ασθενή άτομα είναι 6% ενώ στα υγιή 0,488%. Από τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων προέκυψε ότι η πιθανότητα P έχει τιμή 0,006 ( $P < 0,05$ ). Το στατιστικά σημαντικό αυτό αποτέλεσμα, οδηγεί στην υπόθεση ότι η T319C σχετίζεται με τη νόσο και αναμένεται να εντοπίζεται συχνότερα στα ασθενή άτομα. Η πιθανότητα σφάλματος της υπόθεσης αυτής είναι 0,6%.

Η μετάλλαξη A3213G στο τμήμα του 16S rRNA, είναι μία αντικατάσταση η οποία μετατρέπει την ιστιδίνη (CAC) σε αργινίνη (CGC). Η μετάλλαξη αυτή εντοπίζεται για πρώτη φορά καθώς δεν υπάρχουν καθόλου προγενέστερες αναφορές. Στην παρούσα έρευνα η μετάλλαξη αυτή εντοπίστηκε σε ένα από τα 20 υγιή άτομα που μελετήθηκαν, με συχνότητα 2%, ενώ δεν βρέθηκε σε κανέναν από τους ασθενείς. Από τα συνολικά δεδομένα η συχνότητά της στα άτομα με Alzheimer παρέμεινε 0% ενώ στα υγιή άτομα βρέθηκε 1,46%. Η στατιστική ανάλυση υποδηλώνει ότι δεν υπάρχει κάποια σχέση αυτής της μεταλλαγής με τη νόσο, καθώς η τιμή της πιθανότητα P είναι 0,553 ( $> 0,05$ ).

Η απουσία μεταλλάξεων στο μιτοχονδριακό tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> στην παρούσα έρευνα σε συνδυασμό με την έντονη σχέση αυτού με σοβαρά και θανατηφόρα νοσήματα όπως το σύνδρομο MELAS υποδηλώνει ότι ο γενετικός αυτός τύπος συνδέεται με ασθένειες που οδηγούν σε βαρύτερο φαινότυπο από τη νόσο Alzheimer. Επιπλέον δεν υπάρχουν αναφορές που να συνδέουν μεταλλάξεις αυτού του γονιδίου με τη νόσο Alzheimer και ενισχύεται η άποψη ότι δεν υπάρχει συσχέτιση αυτών. Ακόμη η αξιολόγηση των μεταλλάξεων που εντοπίστηκαν σε τμήματα γειτονικών περιοχών δεν έδειξαν στην πλειοψηφία τους κάποιο στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα, καθώς οι περισσότερες παρουσίασαν αρκετά χαμηλές συχνότητες και τιμές πιθανότητας P

μεγαλύτερες του 0,05. Εξαίρεση αποτελεί η μετάλλαξη T319C. Η πιθανότητα P που προέκυψε από τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων δεν ξεπέρασε το όριο του 0,05 δίνοντας ένα στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα και υποστηρίζοντας την υπόθεση συσχέτισης αυτής της μετάλλαξης με τη νόσο Alzheimer. Συνεπώς, από το σύνολο των μεταλλάξεων που εντοπίστηκαν στα τμήματα του ND1 και του 16S rRNA, οι T3398C, G3357A, A3213G και A3360G φαίνεται να αποτελούν τυχαίους πολυμορφισμούς του πληθυσμού, ενώ μόνο η T319C παρουσιάζει συσχέτιση με τη νόσο Alzheimer.

Τέλος για να εξαχθούν πιο ασφαλή συμπεράσματα για το ρόλο των σημειακών μεταλλάξεων που αναλύθηκαν παραπάνω και γενικά για το ρόλο του mtDNA στην εμφάνιση της νόσου Alzheimer, η έρευνα θα πρέπει να επεκταθεί σε μεγαλύτερο εύρος ασθενών ατόμων και να γίνει σύγκριση με μεγαλύτερη ομάδα του υγιών ατόμων. Ενώ θα πρέπει ακόμη να προσδιοριστεί η ακριβής επίδραση αυτών των μεταλλάξεων στη λειτουργία των μιτοχονδρίων και έπειτα στη νόσο Alzheimer.

# ***ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ***

## Παράρτημα 1: Διαλύματα

<b>ΔΙΑΛΥΜΑ</b>	<b>ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ</b>
SSC 20x	173 gr NaCl 3M 88,2 gr Na <sub>3</sub> Citrate.2H <sub>2</sub> O 0,3M HCl 1M to adjust pH=7 ddH <sub>2</sub> O to 1lt
SDS 10%	1lt ddH <sub>2</sub> O 100gr bottle broth
TAE 50 X	121gr Tris base 28.5 ml Acetic acid( CH <sub>3</sub> COOH) 0,5 ml EDTA 0,5M ddH <sub>2</sub> O to 500ml
TBE 20x	121 gr Tris base 61,7 gr Boric acid 80 ml EDTA 0,5M ddH <sub>2</sub> O to 1lt
APS 20%	385,4 gr Ammonium persulfate 20% 150 ml ddH <sub>2</sub> O
Loading Dye 6x	5 ml glycerol 1 ml bromophenole blue 0,5 ml TBE 20% 3,5 ml ddH <sub>2</sub> O



## Παράρτημα 2: Αντιδραστήρια

Αντιδραστήρια	Εταιρία	Κωδικός
Καπα TAg polymerase kit	Biosystem	CT1015003115
Πρωτεϊνάση K	Bioline	BIO-37037
Φαινόλη	Panreac	141323.1611
Χλωροφόρμιο	Panreac	593101
Ισοπροπανόλη	Scharlau	AL0323
Αγαρόζη	HT Biotechnology Ltd	SB11
Βρωμ. Αιθίδιο	Sigma	46067
Μάρτυρας/ Ladder 100bp	Bioline	BIO-33062
Ακρυλαμίδη	Sigma	#059K1523
Bis-acrylamide	Sigma	M-7256
NaOH	Panreac	131659.1211
NaBH <sub>4</sub>	Fluka	71320
Φορμαλδεΰδη	Sigma	F-1268
Γλυκερόλη	Panreac	131339.1211
Οξικό οξύ CH <sub>3</sub> COOH	Panreac	131008.12.12

<b>Αντιδραστήρια</b>	<b>Εταιρία</b>	<b>Κωδικός</b>
Primer Fw tRNA <sup>Leu(UUR)</sup> -MT3	Metabion International	10310133-0965A09 3/34
Primer Rv tRNA <sup>Leu(UUR)</sup> –MT4	Metabion International	10310133-0965B09 4/34
Ethanol 100%	MERCK	K42829928_146
Loading dye	Bioline	HLBB-106G
Νιτρικός άργυρος AgNO3	Panreac	131459.1608
Temed	Sigma	#MKBF1427V

### *Παράρτημα 3 : Μηχανήματα*

<b>Μηχάνηματα</b>	<b>Εταιρία</b>	<b>Κωδικός</b>
<i>Μικροφυγόκεντρος</i>	<i>eppendorf</i>	<i>Centrifuge 5415C</i>
<i>Φυγόκεντρος ψυχόμενη</i>	<i>eppendorf</i>	<i>Centrifuge5810R</i>
<i>Συσκευή PCR</i>	<i>eppendorf</i>	<i>Mastercycler personal</i>
<i>Θερμοκυκλοποιητής</i>	<i>Cyclogene</i>	<i>Techne Cyclogene</i>

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Alberts B, Bray D, Hopkin K, Johnson A, Lewis J, Raff M, Robberts K, Walter P. Essential cell biology. *Garland Science*. 2006; II: 562-578.
2. Arbustin E, Diegoli M, Fasani R, Grasso M, Morbini P, Banchieri N, Bellini O, Dal Bello B, Pilotto A, Margini G, Campana C, Fortina P, Gavazzi A, Narula J, Vigano M. Mitochondrial DNA mutations and mitochondrial abnormalities in dilated cardiomyopathy. *American Journal of Pathology*. 1998; Nov: 153(5): 1501-1510.
3. Bai R, Leal SM, Covarrubias Δ, A Liu, o Wong LJ. Mitochondrial genetic background modifies breast cancer risk. *Cancer Research*. 2007; 67(10): 4687-94.
4. Barrow C, Small D. Abeta peptide and Alzheimer's disease: celebrating a century research. *Springer - Verlag London Limited*. 2007; 1-4, 52-55, 62-65.
5. Berg J, Tymoczko J, Stryer L. Biochemistry, 5<sup>th</sup> Edition. *W. H. Freeman and Company*. 2005; 549-585, 914-918.
6. Bobba A et al. Alzheimer's proteins, oxidative stress and mitochondrial dysfunction interplay in a neuronal model of Alzheimer's disease. *International Journal of Alzheimer's disease*. 2010; 2010: 621870.
7. Bonda D, Petragallo VA, Marra E, Atlante A. Mitochondrial dynamics in Alzheimer's disease opportunities for future treatment strategies. *Drugs aging*. 2010; 27: 181-192.
8. Bonilla E, Tanji K, Hirano M, Vu TH, DiMauro S, Schon EA. Mitochondrial involvement in Alzheimer's disease. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1999; 171-182.
9. Castellani R, Hirai K, Aliev G, Drew KL, Nunomura A, Takeda A, Cash AD, Obrenovich ME, Perry G, Smith MA. Role of mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease. *Journal of neuroscience Research*. 2002; 70: 357-360.
10. Castellani R, Zhu X, Lee HG, Smith MA, Perry G. Molecular pathogenesis of Alzheimer's disease: reductionist versus expansionist approach. *International Journal of Molecular Science*. 2009; 10: 1386-1406.
11. Christen Y. Oxidative stress and Alzheimer's disease. *American Journal for Clinical Nutrition*. 2000; 71: 621-626.
12. Clark B. The crystal structure of tRNA. *Journal of Bioscience*. 2006; 31:453-457.
13. Coon K, Valla J, Szelinger S, Schneider LE, Niedzielko TL, Brown KM, Pearson JV, Halperin R, Dunckley T, Papassotiropoulos A, Caselli RJ, Reiman EM, Stephan DA. Quantification of heteroplasmy of mtDNA sequence variants identified in a population of AD patients and controls by array-base resequencing. *Mitochondrion*. 2006; 6: 194-210.

14. Cottrell DA, Borthwick GM, Johnson MA, Ince PG, Turnbull DM. The role of cytochrome c oxidase deficient hippocampal neurons in Alzheimer's disease. *Neuropathology and Applied Neurobiology*. 2002; 28: 390-396.
15. Dimauro S, Schon E. Mitochondrial DNA mutation in human disease. *American Journal of Medical Genetics*. 2001; 106: 18-26.
16. Elson J, Herrstadt C, Preston G, Thal L, Morris CM, Edwardson JA, Beal MF, Turnbull DM, Howell N. Does the mitochondrial genome play a role in the etiology of Alzheimer's disease? *Human Genetics*. 2006; 119: 241-254.
17. Fukui H, Moraes C. The mitochondrial impairment, oxidative stress and neurodegeneration connection: reality or just an attractive hypothesis? *Trends Neuroscience*. 2008;31(5):251-6.
18. Graeber M, Muller U. Recent developments in the molecular genetics of mitochondrial disorders. *Journal of Neurological Science*. 1998;153: 251-263.
19. 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 PL, Jones PK, Petersen RB, Perry G, Smith MA. Mitochondrial abnormalities in Alzheimer's disease. *Journal of neuroscience*. 2001; 21: 3017-3023.
20. Hirano M, Konishi K, Arata N, Iyori M, Saruta T, Kuramochi S, Akizuki M. Renal complications in a patient with A- to- G mutation of mitochondrial DNA at ht 3243 position of leucine tRNA. *Internal medicine*. 2002; 41: 113-118.
21. Hutchin T, Heath PR, Pearson RC, Sinclair AJ. Mitochondrial DNA mutations in Alzheimer's disease. *Biomedical & biophysical research communications*. 1997; 241, 221-225.
22. Jeronimo C, Nomoto S, Caballero OL, Usadel H, Henrique R, Varzim G, Oliveira J, Lopes C, Fliiss MS, Sidransky D. Mitochondrial mutations in early stage prostate cancer and bodily fluids. *Oncogene*. 2001; 20 (37): 5195-5198.
23. Kandel E, Shwardz J, Jessell T. Principles of neural science. *McGraw – Hill Companies*. 2006; 3:1537-1552.
24. Klemm T, Neumann S, Trulzsch B, Pitrosch F, Hanefeld M, Paschke R. Search of mitochondrial DNA mutation at position 3243 in German patients with a positive family history of maternal diabetes mellitus. *Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes*. 2001; 109(5): 283-287.
25. Kobayash Y, Momoi MY, Tominaga K, Shimoizumi H, Nihei K, Yanagisawa M, Kagawa Y, Ohta S. Respiration- deficient cells are caused by a single point mutation in the mitochondrial tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> gene in mitochondrial encephalopathy, lactic acidosis and stroke like episodes (MELAS). *American Journal of Human Genetics*. 1991; 49: 590-599.

26. Koga Y, Akita Y, Takane N, Sato Y, Kato H. Heterogeneous presentation in A3243G mutation in the mitochondrial tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> gene. *Archives of Diseases in Childhood*. 2000; 82: 407-411.
27. Kokotas H et al. Mitochondrion, that tiny demon. *Hellenic Otorhinolaryngology – Head & Neck Surgery*. 2009; 30: 26-31.
28. Kim R, Emi M, Tanabe K. Role of mitochondria as the gardens of cell death. *Cancer Chemotherapy & Pharmacology*. 2006 May; 57(5): 545-53.
29. Kirino Y, Suzuki T. Human mitochondrial disease associated with tRNA wobble modification deficiency. *RNA biology*. 2005; 2: 41-44.
30. Lewin B. Genes VIII. *Pearson Education*. 2004; 166-168.
31. Linong J, Hou X, Han X. Prevalence and clinical characteristics of mitochondrial tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> mt 3242 A-G and ND-1 gene mt 3316 G-A mutations in Chinese patients with type 2 diabetes. *Chinese medical Journal*. 2001; 114: 1205-1207.
32. Lovell M, Markesbery W. Oxidative DNA damage in mild cognitive impairment and late – stage Alzheimer’s disease. *Nucleic Acids Research*. 2007; 35: 7497-7504.
33. Mancuso M, Calsolaro V, Orsucci D, Siciliano G, Murri L. Is there a primary role of the mitochondrial genome in Alzheimer’s disease? *Journal of Bioenergy & Biomembrance*. 2009a; 41: 411-416 .
34. Mancuso M, Calsolaro V, Orsucci D, Siciliano G, Murri L. Mitochondria, cognitive impairment and Alzheimer’s disease. *International Journal of Alzheimer’s disease*. 2009b; (6)951548.
35. Markesbery W, Lovell M. DNA oxidation in Alzheimer's disease. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2006; Nov-Dec; 8: 11-12.
36. Μαρμάρας Β, Μαρμάρα- Λαμπροπούλου Μ. Βιολογία κυττάρου: Μοριακή προσέγγιση. *Εκδόσεις Typorama*. 2005; 195,254-259.
37. Maruszak A, Gaweda-Walerych K, Sołtyszewski I, Zekanowski C. Mitochondrial DNA in pathogenesis of Alzheimer’s and Parkinson’s diseases. *Acta Neurobiologiae Experimentalis*. 2006; 66: 153-176.
38. Monte S. Alzheimer’s disease pathogenesis – core concepts, shifting paradigms and therapeutic target. *In tech publisher*. 2011; 11,14& 15.
39. Mosconi L, Berti V, Swerdlow RH, Pupi A, Duara R, de Leon M. Maternal transmission of Alzheimer’s disease: prodromal metabolic phenotype and the search for genes. *Human Genomics*. 2010; 4: 170-193.
40. Moura MB, dos Santos LS, Van Houten B. Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases and cancer. *Environmental and molecular mutagenesis*. 2010; 51: 391-405.

41. Ohkubo K, Yamano A, Nagashima M, Mori Y, Anzai K, Akehi Y, Nomiyama R, Asano T, Urae A, Ono J. Mitochondrial gene mutations in the tRNA(Leu(UUR)) region and diabetes: prevalence and clinical phenotypes in Japan. *Clinical Chemistry*. 2001 Sep; 47(9): 1641-8.
42. Onyango I, Khan S, Miller B, Swerdlow R, Trimmer P, Bennett P. Mitochondrial genomic contribution to mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's disease*. 2006; 9: 183-193.
43. Orth M, Schapira AH. Mitochondria and degenerative disorders. *American Journal of Medical Genetics*. 2001; 106(1): 27-36.
44. Park H, Davidson E, King MP. Overexpressed mitochondrial leucyl – tRNA synthetase suppresses the A3243G mutation in the mitochondrial tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> gene. *RNA*. 2008; 14: 2407-2416.
45. Petrozzi L, Ricci G, Giglioli N, Siciliano G, Mancuso M. Mitochondria and neurodegeneration. *Bioscience Reports*. 2007; 27: 87-104.
46. Puomilla A, Hamalainen P, Kivioja S, Savontaus M, Koivumaki S, Huoponen K, Nikoskelainen E. Epidemiology and penetrance of Leber hereditary optic neuropathy in Finland. *European Journal of Human Genetics*. 2007; 15(10): 1079-1089.
47. Reddy P, Beal M. Are mitochondria critical in the pathogenesis of Alzheimer's disease?. *Brain research reviews*. 2005; 618-632.
48. Santoro A, Balbi V, Balducci E, Pirazzini C, Rosini F, Tavano F, Achilli A, Siviero P, Minicuci N, Bellavista E, Mishto M, Salvioli S, Marchegiani F, Cardelli M, Olivieri F, Nacmias B, Chiamenti AM, Benussi L, Ghidoni R, Rose G, Gabelli C, Binetti G, Sorbi S, Crepaldi G, Passarino G, Torroni A, Franceschi C. Evidence for sub-haplogroup h5 of mitochondrial DNA as a risk factor for late onset Alzheimer's disease. *PLoS One*. 2010; Aug 6; 5(8): e12037.
49. Shiotani H, Ueno H, Inoue S, Yokota Y, Yokoyama M. Diabetes mellitus and cardiomyopathy – association with mutation in the mitochondrial tRNA tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> gene. *Japanese Circulation Journal*. 1998; 62: 309- 310.
50. Shoffner J. Oxidative phosphorylation defects and Alzheimer's disease. *Neurogenetics*. 1997; 1: 13-19.
51. 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. *Human Molecular Genetics*. 1998; 7: 33-42.
52. Swerdlow R. Pathogenesis of Alzheimer's disease. *Clinical interventions in aging*. 2007; 2: 347-359.
53. Swerdlow R. The neurodegenerative mitochondriopathies. *Journal of Alzheimer's Disease*. 2009; 17: 737-751.

54. Tang S, Batra A, Zhang Y, Ebenroth ES, Huang T. Left ventricular non-compaction is associated with mutations in the mitochondrial genome. *Mitochondrion*. 2010;10 (4): 350-357.
55. Udar N, Atilano SR, Memarzadeh M, Boyer DS, Chwa M, Lu S, Maguen B, Langberg J, Coskun P, Wallace DC, Nesburn AB, Khatibi N, Hertzog D, Le K, Hwang D, Kenney MC. Mitochondrial DNA haplogroups associated with age-related macular degeneration. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. 2009; 50 (6): 2966-2974.
56. Wallace D, Lott MT, Shoffner JM, Brown MD. Diseases resulting from mitochondrial DNA point mutations. *Journal of Inherited Metabolic Disease*. 1992; 15: 472-479.
57. Yamagata K, Tomida C, Umeyama K, Urakami K, Ishizu T, Hirayama K, Gotoh M, Iitsuka T, Takemura K, Kikuchi H, Nakamura H, Kobayashi M, Koyama A. Prevalence of Japanese dialysis patient with an A to G mutation at nucleotide 3243 of the mitochondrial tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> gene. *Nephrology Dialysis Transplantation: European Dialysis & Transplant association*. 2000; 15: 385-388.
58. Yang J, Weissman L, Bohr VA, Mattson MP. Mitochondrial DNA damage and repair in neurodegenerative disorders. *DNA Repair*. 2008. 1; 7(7):1110-20.
59. Yorifuji T, Kawai M, Momoi T, Sasaki H, Furusho K, Muroi J, Shimizu K, Takahashi Y, Matsumura M, Nambu M, Okuno T. Nephropathy and growth hormone deficiency in a patient with mitochondrial tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> mutation. *Journal of Medical Genetics*. 1996; 33: 621-622.
60. Zekanowski C, Religa D, Graff C, Filipek S, Kuźnicki J. Genetic aspects of Alzheimer's disease. *Acta Neurobiologiae Experimentalis*. 2004; 64(1): 19-31.

