

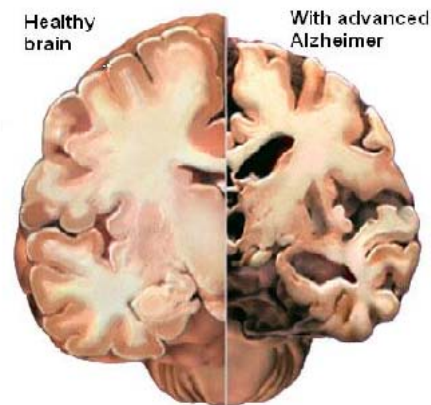
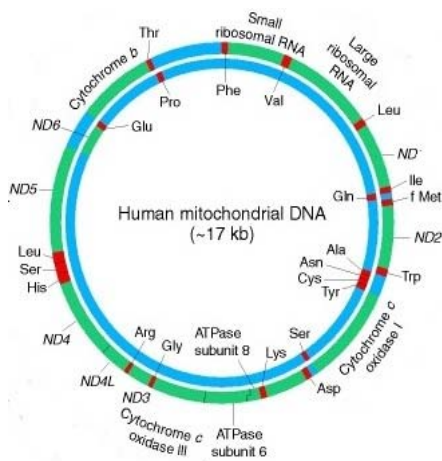


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



## ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

# ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ ΣΕ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΑ tRNA ΓΟΝΙΔΙΑ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ALZHEIMER



ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ: ΖΙΦΑ ΑΙΜΙΛΙΑ

ΣΑΧΙΝΗ ΝΙΚΟΛΕΤΑ-ΝΙΚΗ

ΛΑΡΙΣΑ 2010

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Γενετικής, Συγκριτικής & Εξελικτικής Βιολογίας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κατά το ακαδημαϊκό έτος 2009-2010, υπό την επίβλεψη και την καθοδήγηση της κ. Ζίφα Αιμιλίας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της τριμελούς επιτροπής και ιδιαίτερα την κα Ζίφα για την ανάθεση του θέματος και για την καθοδήγησή της καθ' όλη τη διάρκεια της διπλωματικής μου εργασίας.

Θα ήθελα ακόμη να ευχαριστήσω τον υποψήφιο διδάκτορα Κώστα Σταμάτη και τους μεταπτυχιακούς φοιτητές Κωνσταντίνο Παπαδημητρίου, Χριστίνα Βαϊτσοπούλου και Θέμη Γιαννούλη, για τη βοήθεια που μου παρείχαν κατά τη διάρκεια του πειραματικού μέρους.

Η τριμελής εξεταστική επιτροπή αποτελείται από τους:

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

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

Χατζηγεωργίου Γεώργιος, Αναπληρωτής Καθηγητής Νευρολογίας, Τμήμα Ιατρικής

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΠΕΡΙΛΗΨΗ / ABSTRACT.....	5
2. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	7
2.1 ΤΑ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑ .....	7
2.1.1 Δομή του μιτοχονδρίου.....	8
2.1.2 Λειτουργίες του μιτοχονδρίου.....	10
2.2 ΤΟ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟ DNA (mtDNA).....	13
2.2.1 Ανθρώπινο μιτοχονδριακό DNA.....	13
2.3 ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΕΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ ΚΑΙ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ.....	15
2.3.1 Παθογόνες και ουδέτερες μεταλλάξεις σε μιτοχονδριακά γονίδια tRNA .....	18
2.4 Η ΝΟΣΟΣ ΤΟΥ ALZHEIMER.....	19
2.4.1 Μοριακή βάση της νόσου του Alzheimer.....	20
2.4.2 Γενετική βάση της νόσου του Alzheimer.....	21
2.4.3 Τα μιτοχόνδρια και η συσχέτιση τους με το Alzheimer.....	22
2.4.4 Μιτοχονδριακές μεταλλάξεις και νόσος Alzheimer.....	24
2.5 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	26
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	27
3.1 ΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΥΛΙΚΟ.....	27
3.2 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR, Polymerase Chain Reaction) .....	27
3.2.1 Αρχή της μεθόδου.....	27
3.2.2 Πολλαπλασιασμός των tRNA γονιδίων του mtDNA.....	30
3.2.3 Ποιοτικός έλεγχος των PCR προϊόντων με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης .....	31
3.3 ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥ ΜΟΝΟΚΛΩΝΗΣ ΑΛΥΣΙΔΑΣ ( SSCP, Single-Strand Conformation Polymorphism).....	33
3.3.1 Αρχή της μεθόδου.....	33
3.3.2 Παρασκευή πηκτώματος πολυακρυλαμίδης.....	34
3.3.3 Χρώση πηκτώματος πολυακρυλαμίδης με διάλυμα νιτρικού αργύρου (silver staining).....	35
3.4 ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ PCR ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ.....	36
3.5 ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗ	
3.5.1 ΜΕΘΟΔΟΣ ΤΕΡΜΑΤΙΣΜΟΥ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΗΣ ΑΛΥΣΙΔΑΣ ΜΕ ΔΙ-ΔΕΟΞΥΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΑ (Μέθοδος Sanger).....	37
3.5.2 Αυτόματη αλληλούχιση .....	37
3.6 ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΣ ΜΗΚΟΥΣ ΤΜΗΜΑΤΩΝ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΥ (RFLP, Restriction Fragment Length polymorphism).....	39
3.6.1 Ενίσχυση του γονιδίου COI.....	40
3.6.2 Παρασκευή πηκτώματος πολυακρυλαμίδιου.....	41
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	43
4.1 ΓΟΝΙΔΙΟ tRNA <sup>Gly</sup> ΚΑΙ ΠΑΡΑΚΕΙΜΕΝΕΣ ΠΕΡΙΟΧΕΣ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ALZHEIMER.....	43
4.2 ΓΟΝΙΔΙΟ tRNA <sup>Arg</sup> ΚΑΙ ΠΑΡΑΚΕΙΜΕΝΕΣ ΠΕΡΙΟΧΕΣ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ALZHEIMER.....	47
4.3 ΓΟΝΙΔΙΟ tRNA <sup>Arg</sup> ΚΑΙ ΠΑΡΑΚΕΙΜΕΝΕΣ ΠΕΡΙΟΧΕΣ ΣΕ ΑΤΟΜΑ ΠΟΥ ΔΕΝ ΕΜΦΑΝΙΖΟΥΝ ΚΑΠΟΙΟ ΚΛΙΝΙΚΟ ΣΥΜΠΤΩΜΑ.....	49

4.4 ΓΟΝΙΔΙΟ tRNA <sup>Phe</sup> ΚΑΙ ΠΑΡΑΚΕΙΜΕΝΕΣ ΠΕΡΙΟΧΕΣ ΣΕ ΑΤΟΜΑ ΠΟΥ ΔΕΝ ΕΜΦΑΝΙΖΟΥΝ ΚΑΠΟΙΟ ΚΛΙΝΙΚΟ ΣΥΜΠΤΩΜΑ.....	52
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	54
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	58

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι μεταλλάξεις στο μιτοχονδριακό DNA (mtDNA) και η δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων είναι υπεύθυνες για μια ετερογενή ομάδα ασθενειών, γνωστές ως μιτοχονδριακά νοσήματα. Κοινό τους χαρακτηριστικό είναι η βλάβη της αναπνευστικής αλυσίδας με αποτέλεσμα την ελαττωμένη παραγωγή ενέργειας. Στη νόσο του Alzheimer παρατηρείται μιτοχονδριακή δυσλειτουργία και μορφολογικές ανωμαλίες των μιτοχονδρίων υποδεικνύοντας την εμπλοκή των μιτοχονδρίων στην ασθένεια. Στην παρούσα μελέτη ελέγχθηκαν 50 ασθενείς με Alzheimer για την παρουσία μεταλλάξεων σε 2 από τα 22 μιτοχονδριακά tRNA γονίδια (tRNA<sup>Gly</sup>, tRNA<sup>Arg</sup>) και 58 δείγματα ατόμων χωρίς την ασθένεια για τα γονίδια tRNA<sup>Phe</sup> και tRNA<sup>Arg</sup>. Στους 50 ασθενείς με Alzheimer εντοπίστηκαν συνολικά 4 μεταλλάξεις. Οι δύο από αυτές, T10007C και T10034C, εντοπίζονται στο tRNA<sup>Gly</sup>. Οι άλλες δύο, A10398G και C10128T, εντοπίζονται στη ND3 υπομονάδα του συμπλόκου I της αναπνευστικής αλυσίδας. Οι μεταλλάξεις οι οποίες ανιχνεύθηκαν βρέθηκαν σε μικρό ποσοστό στους ασθενείς 2% και δεν εντοπίστηκαν στην ομάδα αναφοράς, εκτός από την A10398G που εμφανίζεται με ποσοστό 20% στους ασθενείς σε σχέση με 13,7% στην ομάδα αναφοράς. Στα άτομα χωρίς κάποιο κλινικό σύμπτωμα βρέθηκαν γνωστοί πολυμορφισμοί G709A, T10321C και T10463C οι οποίοι δεν εντοπίστηκαν στους ασθενείς με Alzheimer. Για να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα πρέπει να ολοκληρωθεί η έρευνα σε όλα τα tRNA γονίδια στους ασθενείς και να γίνει σύγκριση με μεγάλη ομάδα του «φυσιολογικού» πληθυσμού.

## ABSTRACT

The mutations in mitochondrial DNA (mtDNA) and the dysfunction of mitochondria are responsible for an heterogeneous group of diseases, known as mitochondrial disorders. Mitochondrial dysfunction and mitochondrial morphological abnormalities have been reported to Alzheimer's disease indicating the involment of mitochondria in the disease. In this study, 50 samples of Alzheimer patients were examined for the presence of mutations in 2 of the 22 mitochondrial tRNA genes (tRNA<sup>Gly</sup>, tRNA<sup>Arg</sup>) and 58 samples of controls were examined for the presence of mutations in tRNA<sup>Phe</sup> and tRNA<sup>Arg</sup>. 4 mutations were found in patients. 2 of them, T10007C και T10034C, are located at the tRNA<sup>Gly</sup> and the two others, A10398G and C10128T, at the ND3 subunit of complex I of electron transport chain. The detected mutations were found in a low percentage in patients 2% but in the controls, with the exception of the A10398G which was found in the percentage of 20% in patients compared to the percentage of the 13,7% in controls. In the control group we found already known polymorphisms G709A, T10321C and T10463C that did not detected in the Alzheimer's patients. Finally to reach safe results the completion of the research concerning all the mitochondrial tRNA genes in patients as well as the comparison with a greater group of controls are essential.

## 2. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 2.1 ΤΑ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑ

Τα μιτοχόνδρια είναι μικρά, υποκυτταρικά οργανίδια που συναντώνται στους περισσότερους ευκαρυώτες με εξαίρεση κάποιους μονοκύτταρους οργανισμούς. Υπάρχουν σε όλα τα ευκαρυωτικά κύτταρα (φωτοσυνθετικά και μη) με εξαίρεση τα ώριμα ερυθρά αιμοσφαίρια.

Μια σύντομη αναδρομή στη μελέτη των μιτοχονδρίων περιλαμβάνει τα ακόλουθα:

**1886:** Ανακάλυψη μιτοχονδρίων από τον R. Altmann.

**1898:** Εισαγωγή του όρου «μιτοχόνδριο» (μίτος + χόνδρος).

**1904:** Περιγραφή μιτοχονδρίων σε φυτικά κύτταρα.

**1934:** Απομόνωση των οργανιδίων με υπερφυγοκέντρωση.

**1952:** Παρατήρηση της δομής των μιτοχονδρίων με τη χρήση του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου και συσχέτιση δομής με λειτουργία (*Εικόνα 1*).

**1961:** Χημειοσμωτική θεωρία από τον P. Mitchell.

**1971:** Διατύπωση της θεωρίας της ενδοσυμβίωσης.

**1981:** Αλληλούχιση του μιτοχονδριακού DNA.



*Εικόνα 1:* Δομή ενός μιτοχονδρίου όπως διακρίνεται με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο.

Τα μιτοχόνδρια αποτελούν συνήθως το 18-20% του συνολικού κυτταροπλασματικού όγκου ενός ευκαρυωτικού κυττάρου. Ο αριθμός των μιτοχονδρίων σε ένα κύτταρο ποικίλλει σε μεγάλο βαθμό στους διάφορους οργανισμούς και κυτταρικούς τύπους και ανάλογα με την κυτταρική δραστηριότητα, από ένα ως και αρκετές χιλιάδες. Το σχήμα τους είναι ωοειδές και οι διαστάσεις τους κυμαίνονται από 0,3-1μm σε διάμετρο και 1-10μm σε μήκος, έχουν δηλαδή τις διαστάσεις βακτηρίου.

Όπως έχει βρεθεί με ανοσοφθορισμό, η κατανομή των μιτοχονδρίων μέσα στα κύτταρα ακολουθεί σε πολλές περιπτώσεις την κατανομή των μικροσωληνίσκων, ενώ με παρατήρηση σε μικροσκόπια αντίθετης φάσης και μικροκινηματογράφηση έχει διαπιστωθεί διαρκής κίνηση και αλλαγή σχήματος (Bereiter-Hahn et al., 1998). Πιθανότητα αυτή η πλαστικότητα του σχήματός τους και η ικανότητά τους να αλλάζουν θέση οφείλεται στις αλληλεπιδράσεις με τον κυτταροσκελετό, με τον οποίο φαίνεται να βρίσκονται σε επαφή (Rappaport et al., 1998). Ακόμη έχουν την ικανότητα να συντήκονται και να πολλαπλασιάζονται με διαίρεση.

Κύρια λειτουργία των μιτοχονδρίων είναι η παραγωγή ενέργειας με τη μορφή τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP), απαραίτητη για την επιβίωση των κυττάρων, για αυτό και καλούνται «εργοστάσια παραγωγής ενέργειας». Εμπλέκονται ακόμη σε ένα εύρος διαδικασιών, όπως είναι η μεταγωγή σήματος, η κυτταρική διαφοροποίηση, ο κυτταρικός θάνατος, η ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και της κυτταρικής αύξησης, καθώς και η διατήρηση της ομοιόστασης του ενδοκυτταρικού ασβεστίου και η παραγωγή θερμότητας.

### **2.1.1 Δομή του μιτοχονδρίου**

Η δομή των μιτοχονδρίων ανακαλύφθηκε με τη χρήση του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου (*Εικόνα 1*). Τα μιτοχόνδρια έχουν δύο συστήματα μεμβρανών: μια εξωτερική μεμβράνη και μια μεγάλων διαστάσεων πτυχωτή εσωτερική μεμβράνη. Έτσι δημιουργούνται δύο διαμερίσματα στο μιτοχόνδριο: ο διαμεμβρανικός χώρος μεταξύ της εσωτερικής και της εξωτερικής μεμβράνης και η μήτρα η οποία περιβάλλεται από την εσωτερική μεμβράνη. Οι πτυχώσεις τις εσωτερικής μεμβράνης ονομάζονται ακρολοφίες (*Εικόνα 2*).

#### **ΕΞΩΤΕΡΙΚΗ ΜΕΜΒΡΑΝΗ (outer membrane):**

Περιβάλλει ολόκληρο το μιτοχόνδριο. Περιέχει πορίνες, που σχηματίζουν πόρους και για αυτό είναι διαπερατή από όλα τα μικρά μόρια και ιόντα (μόρια με MB μικρότερο από 10kD).

#### **ΔΙΑΜΕΜΒΡΑΝΙΚΟΣ ΧΩΡΟΣ (intermembrane space):**

Ο χώρος μεταξύ της εσωτερικής και εξωτερικής μεμβράνης, ο οποίος λόγω της διαπερατότητας της εξωτερικής μεμβράνης περιέχει ιόντα σε ισοδύναμες συγκεντρώσεις με το κυτταρόπλασμα.

#### **ΕΣΩΤΕΡΙΚΗ ΜΕΜΒΡΑΝΗ (inner membrane):**

Είναι αδιαπέραστη σε όλα τα μόρια και η μεταφορά μορίων και ιόντων μέσα και έξω από τη μήτρα γίνεται με τη βοήθεια ειδικών μεταφορέων. Στην εσωτερική μεμβράνη πραγματοποιείται η οξειδωτική φωσφορυλίωση για αυτό και περιέχει ένα πλήθος πρωτεϊνών που σχετίζονται με την κυτταρική αναπνοή. Εκτός από αυτές τις πρωτεΐνες στην εσωτερική μεμβράνη υπάρχουν και πρωτεΐνες που συμμετέχουν στη μεταφορά μορίων από και προς τη μήτρα και στη σύντηξη και τη διαίρεση των μιτοχονδρίων.

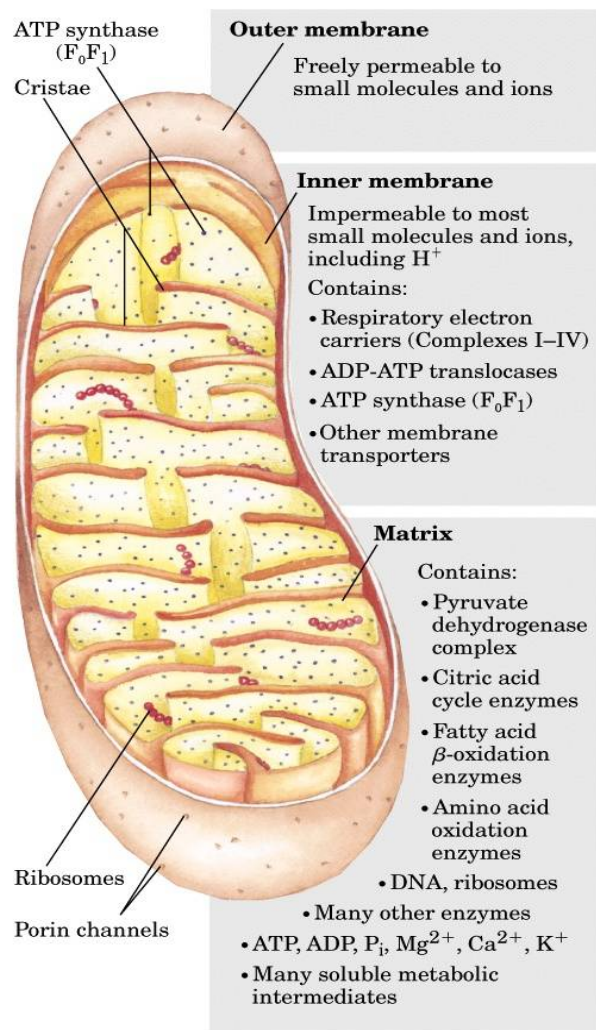
#### **ΑΚΡΟΛΟΦΙΕΣ (cristae):**

Είναι συνήθως κάθετες προς τον επιμήκη άξονα του μιτοχονδρίου και σχηματίζουν ατελή διαφράγματα, τα οποία δε διακόπτουν τη συνέχεια της μήτρας. Η κατανομή των πτυχώσεων φαίνεται να έχει σχέση με την έκταση της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης που επιτελείται, αφού ο αριθμός των πτυχώσεων αυξάνει καθώς αυξάνει ο ρυθμός της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης.



### ΜΗΤΡΑ (matrix):

Η πυκνότητα της ποικίλλει ανάλογα με τη λειτουργική κατάσταση του οργανιδίου. Η σταθερή της σύνθεση αποτελείται από τα ακόλουθα: τα μόρια του μιτοχονδριακού DNA, τα μιτοχονδριακά ριβοσώματα, ακανόνιστα, πυκνά συσσωματώματα, διαμέτρου 50nm, τα οποία δημιουργούνται από τη συσσώρευση των κατιόντων, όλα τα ένζυμα που παίρνουν μέρος στον κύκλο του κιτρικού οξέος και στη βιοσύνθεση των λιπαρών οξέων.



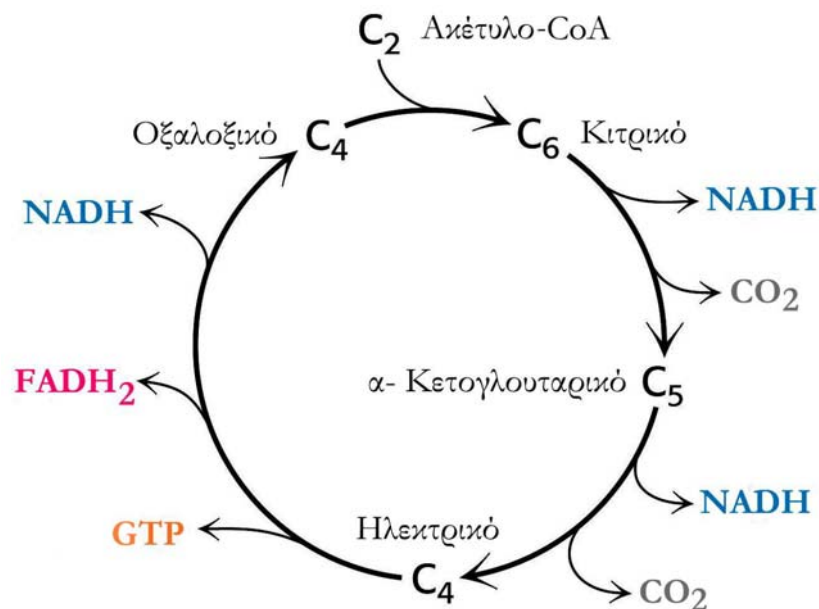
Εικόνα 2: Σχηματική απεικόνιση της δομής του μιτοχονδρίου.

## 2.1.2 Λειτουργίες του μιτοχονδρίου

### α. Παραγωγή ενέργειας

Στα μιτοχόνδρια ολοκληρώνεται ο μεταβολισμός των σακχάρων και παράγεται το ATP που χρειάζονται τα αερόβια κύτταρα, μέσω των αντιδράσεων του κύκλου του κιτρικού οξέος, ο οποίος λαμβάνει χώρα στη μιτοχονδριακή μήτρα, και της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, που πραγματοποιείται στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη. Για ένα μόριο γλυκόζης που οξειδώνεται παράγονται περίπου 36 μόρια ATP.

Τα μιτοχόνδρια έχουν τη δυνατότητα να χρησιμοποιούν ως καύσιμα τόσο το πυροσταφυλικό οξύ, το κύριο προϊόν της γλυκολυτικής οδού, όσο και τα λιπαρά οξέα. Και τα δύο είδη καυσίμων εισέρχονται της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης με ενεργή μεταφορά και κατόπιν μετατρέπονται στο καίριο μεταβολικό ενδιάμεσο μέσο, το ακέτυλο-CoA, με τη δράση ενζύμων που εντοπίζονται στη μιτοχονδριακή μήτρα. Στη συνέχεια, οι ακετυλομάδες του ακέτυλο-CoA οξειδώνονται στη μήτρα μέσω του κύκλου του κιτρικού οξέος (κύκλος του Krebs) (Εικόνα 3). Οι αντιδράσεις του κύκλου παράγουν CO<sub>2</sub> το οποίο αποβάλλεται από το κύτταρο, και e<sup>-</sup> υψηλής ενέργειας που μεταφέρονται από τα ενεργοποιημένα μόρια φορείς NADH και FADH<sub>2</sub>.

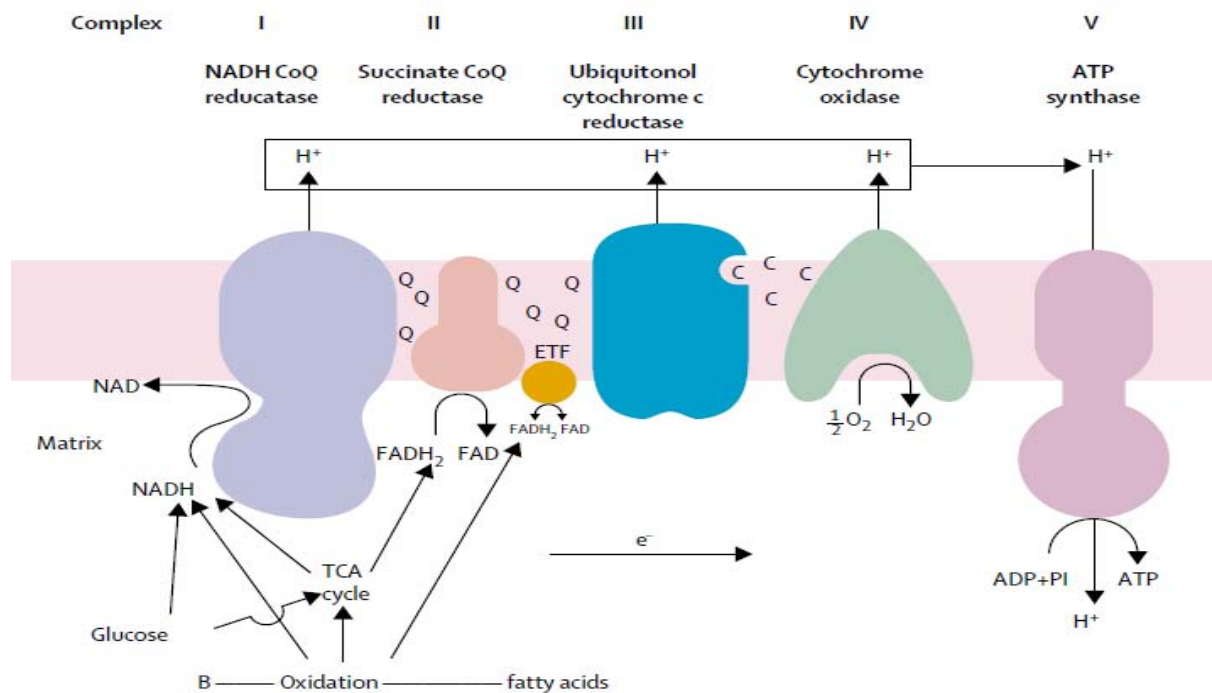


Εικόνα 3: Σχηματική απεικόνιση του κύκλου του κιτρικού οξέος.

Στη συνέχεια τα e<sup>-</sup> αυτά μεταφέρονται στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη, όπου εισέρχονται στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων, γνωστή επίσης και ως αναπνευστική αλυσίδα. Η αναπνευστική αλυσίδα αποτελείται από τέσσερα σύμπλοκα στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη τα οποία λειτουργούν σαν αντλία πρωτονίων (Εικόνα 4). Είναι οργανωμένη με τέτοιο τρόπο ώστε να αυξάνεται το αναγωγικό δυναμικό σε κάθε βήμα της μεταφοράς των ηλεκτρονίων από το NADH στο O<sub>2</sub>. Η μεταφορά ηλεκτρονίων συνδέεται με τη μετακίνηση πρωτονίων κατά μήκος της εσωτερικής μεμβράνης και αυτή η ηλεκτροχημική διαβάθμιση μετατρέπεται σε χημική ενέργεια για την παραγωγή ATP από την ATP συνθάση. Τα ηλεκτρόνια από το NADH μεταφέρονται στην προσθετική ομάδα FMN της οξειδοαναγωγάσης του ζεύγους NADH-συνενζύμου Q (σύμπλοκο I). Τα ηλεκτρόνια

εμφανίζονται στην  $\text{QH}_2$ , την ανηγμένη μορφή της ουβικινόνης (Q). Το ένζυμο ηλεκτρική αφυδρογονάση του κύκλου του κιτρικού οξέος είναι συνιστώσα του συμπλόκου της αναγωγής του ζεύγους ηλεκτρικού συνενζύμου Q (σύμπλοκο II), το οποίο προσφέρει ηλεκτρόνια από το  $\text{FADH}_2$  στην Q για το σχηματισμό  $\text{QH}_2$ . Αυτός ο φορέας μεταφέρει τα ηλεκτρόνια του στην οξειδοαναγωγή του ζεύγους Q-κυτοχρώματος c (σύμπλοκο III) το οποίο με τη σειρά του ανάγει το κυτόχρωμα c. Το κυτόχρωμα c μεταφέρει τα ηλεκτρόνια προς την οξειδάση του κυτοχρώματος c (σύμπλοκο IV). Ένα άτομο σιδήρου και ένα άτομο χαλκού στην οξειδάση αυτή μεταφέρουν τα ηλεκτρόνια προς το  $\text{O}_2$ , τον τελικό αποδέκτη, για το σχηματισμό  $\text{H}_2\text{O}$ .

Η ροή των ηλεκτρονίων μέσω των τριών ασύμμετρα προσανατολισμένων διαμεμβρανικών συμπλόκων (I, III, IV) έχει ως αποτέλεσμα την άντληση πρωτονίων έξω από τη μιτοχονδριακή μήτρα προς το διαμεμβρανικό χώρο και την παραγωγή ενός μεμβρανικού δυναμικού. Παράγεται μια πρωτονιοκίνητη δύναμη η οποία αποτελείται από μια βαθμίδωση του pH, με βασική την πλευρά της μήτρας, και ένα δυναμικό μεμβρανικό δυναμικό, με αρνητική την πλευρά της μήτρας. Η ροή των πρωτονίων μέσω της ATP συνθάσης οδηγεί στην παραγωγή ATP από ADP και  $\text{P}_i$ . Η διαδικασία αυτή παρατηρήθηκε από τον Mitchell και ονομάζεται χημειόσμωση (Mitchell et al., 1967).



**Εικόνα 4:** Σχηματική απεικόνιση της αναπνευστικής αλυσίδας. Αποτελείται από τέσσερα σύμπλοκα τα οποία λειτουργούν ως αντλία πρωτονίων. Η μεταφορά ηλεκτρονίων συνδέεται με τη μετακίνηση πρωτονίων κατά μήκος της εσωτερικής μεμβράνης και αυτή η ηλεκτροχημική διαβάθμιση μετατρέπεται σε χημική ενέργεια για την παραγωγή ATP από την ATP συνθάση.

### **β. Ρύθμιση της ομοιόστασης του ενδοκυτταρικού $\text{Ca}^{2+}$**

Τα μιτοχόνδρια συμμετέχουν στη διατήρηση της ομοιόστασης του ενδοκυτταρικού  $\text{Ca}^{2+}$ . Από τη μια πλευρά παρέχουν την απαραίτητη ενέργεια για τη λειτουργία των ΑΤΡασών- $\text{Ca}^{2+}$  στην κυτταρική μεμβράνη και στη μεμβράνη του ενδοπλασματικού δικτύου και από την άλλη λειτουργούν ως αποθήκη  $\text{Ca}^{2+}$ . Η πρόσληψη του  $\text{Ca}^{2+}$  από τα μιτοχόνδρια εξαρτάται από την παρουσία του δυναμικού μεμβράνης και πραγματοποιείται μέσω μεταφορέων, ενώ η έξοδος από τα μιτοχόνδρια γίνεται με ανταλλαγή  $\text{H}^+$  ή  $\text{Na}^+$ . Είναι πιθανόν τα μιτοχόνδρια να προσλαμβάνουν  $\text{Ca}^{2+}$  κατά τη διάρκεια περιοδικών ξαφνικών αυξήσεων της ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης  $\text{Ca}^{2+}$  ή όταν βρίσκονται σε στενή επαφή με το ενδοπλασματικό δίκτυο, την κύρια αποθήκη  $\text{Ca}^{2+}$  του κυττάρου. Η φυσιολογική παρουσία του  $\text{Ca}^{2+}$  στα μιτοχόνδρια εκτός από τη διατήρηση της ομοιόστασης του ενδοκυτταρικού σχετίζεται και με τη ρύθμιση κάποιων ενζύμων της κυτταρικής αναπνοής.

### **γ. Δημιουργία ενεργών ριζών οξυγόνου (ROS)**

Τα μιτοχόνδρια αποτελούν την κύρια πηγή δημιουργίας ενεργών ριζών οξυγόνου (ROS) μέσα στο κύτταρο, καθώς παράγονται σαν παραπροϊόντα της μεταφοράς ηλεκτρονίων. Δηλαδή μια μικρή ποσότητα μοριακού οξυγόνου μπορεί να υποστεί αναγωγή στα ενδιάμεσα βήματα της αναπνευστικής αλυσίδας και στη συνέχεια με τη δράση διαφόρων ενζύμων να σχηματιστούν ελεύθερες ρίζες. Για αυτό το λόγο τα μιτοχόνδρια έχουν αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς. Το  $\text{O}_2$  μετατρέπεται σε  $\text{H}_2\text{O}_2$  με τη βοήθεια του ενζύμου δισμουτάση του υπεροξειδίου (SOD). Παρ' όλα αυτά η αλληλεπίδραση του  $\text{H}_2\text{O}_2$  με Fe και Cu παράγει  $\text{OH}^\cdot$  που μπορεί να δημιουργήσει βλάβες στο mtDNA και λιπιδιακή υπεροξειδωση. Διαταραχές στη δημιουργία των ROS ή στους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς προκαλούν οξειδωτικό stress και κατ' επέκταση μιτοχονδριακή και κυτταρική βλάβη (π.χ. βλάβες στην αναπνευστική αλυσίδα, βλάβες στο DNA, λιπιδιακή οξείδωση) (Allen et al., 1996).

### **δ. Κυτταρικός θάνατος: νέκρωση και απόπτωση**

Τα μιτοχόνδρια μπορούν να σηματοδοτήσουν τον κυτταρικό θάνατο είτε μέσω της διαδικασίας της νέκρωσης είτε μέσω της απόπτωσης. Δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων προκαλεί έλλειψη ATP που μπορεί να οδηγήσει το κύτταρο στη νέκρωση. Στην άλλη περίπτωση κατά τη διαδικασία της απόπτωσης τα μιτοχόνδρια απελευθερώνουν προ-αποπτωτικές πρωτεΐνες όπως το κυτόχρωμα c και Bax οι οποίοι με τη σειρά τους θα ενεργοποιήσουν έναν καταρράκτη κασπασών, τον κύριο αποπτωτικό μοριακό μηχανισμό (Desagher and Martinou, 2000).

## 2.2 ΤΟ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟ DNA (mtDNA)

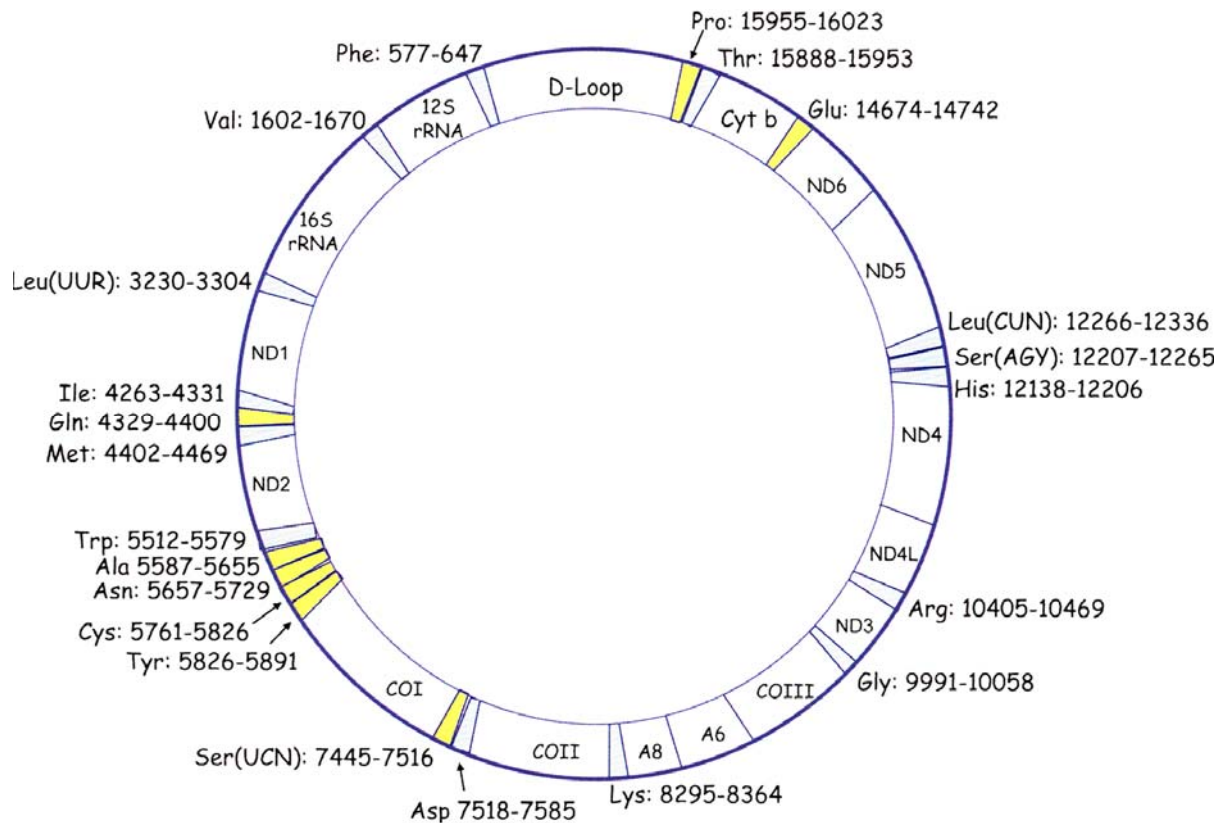
Το μιτοχονδριακό DNA είναι ένα δίκλωνο, υπερελικωμένο, κυκλικό (με κάποιες εξαιρέσεις των πρωτοζώων που είναι ραβδόμορφο) μόριο που εντοπίζεται στη μήτρα των μιτοχονδρίων. Υπάρχει σε πολλαπλά αντίγραφα από 2 έως 10 σε κάθε μιτοχόνδριο, με αποτέλεσμα να υπάρχουν 1000-100.000 αντίγραφα του μορίου σε κάθε κύτταρο. Η αντιγραφή, η μεταγραφή και η μετάφραση του μιτοχονδριακού DNA πραγματοποιούνται καθ' όλη τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου ανεξάρτητα από τις αντίστοιχες διαδικασίες του πυρηνικού DNA. Αν και τα μιτοχόνδρια περιέχουν το δικό τους DNA, το οποίο κωδικοποιεί μια ποικιλία πρωτεϊνών και μορίων RNA, δεν περιέχει όλες τις απαραίτητες πληροφορίες για τη σύνθεση όλων των λειτουργικών και δομικών αναγκών των οργανιδίων- γι' αυτό χαρακτηρίζονται ημιαυτόνομα οργανίδια- και γίνεται εισαγωγή μορίων από το κυτταρόπλασμα (ενζύμων, ρυθμιστικών και ριβοσωμικών πρωτεϊνών) που η σύνθεσή τους ελέγχεται από το πυρηνικό DNA. Οι διαδικασίες της αντιγραφής και της μεταγραφής στηρίζονται σε πυρηνικούς παράγοντες. Οι πυρηνικοί παράγοντες που προορίζονται για τα μιτοχόνδρια μεταφράζονται στα ριβοσώματα του κυτταροπλάσματος και τροποποιούνται μεταμεταφραστικά με μία αλληλουχία-οδηγό στο N-άκρο, ώστε να εισαχθούν στα μιτοχόνδρια με τη βοήθεια μεταφορέων (Taanman et al., 1999).

### 2.2.1 Ανθρώπινο μιτοχονδριακό DNA

Το ανθρώπινο μιτοχονδριακό DNA έχει μέγεθος 16,569 kb (Εικόνα 5), η πρωτοταγής δομή του δημοσιεύτηκε για πρώτη φορά το 1981 και αναφέρεται ως Cambridge reference sequence (Anderson et al., 1981). Ο ένας κλώνος είναι πλούσιος σε γουανίνη και αναφέρεται ως βαρύς κλώνος (heavy strand-H) και ο άλλος είναι πλούσιος σε κυτοσίνη και αναφέρεται ως ελαφρύς κλώνος (light strand-L). Οι δύο κλώνοι μπορούν να διαχωριστούν με διαβαθμίσεις πυκνότητας CsCl<sub>2</sub>.

Το μιτοχονδριακό DNA κωδικοποιεί συνολικά 37 γονίδια, από τα οποία 13 κωδικοποιούν υπομονάδες της αναπνευστικής αλυσίδας. Πιο συγκεκριμένα 7 υπομονάδες του συμπλόκου I (ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5, ND6), 1 υπομονάδα του συμπλόκου III, 3 υπομονάδες του συμπλόκου IV (COXI, COXII, COXII I) και 2 υπομονάδες του συμπλόκου V (ATPase6, ATPase8). Οι υπόλοιπες μιτοχονδριακές πρωτεΐνες, συμπεριλαμβανομένων και όλων των υπομονάδων του συμπλόκου II, κωδικοποιούνται από το πυρηνικό DNA. 2 από τα μιτοχονδριακά γονίδια κωδικοποιούν για rRNA (12S και 16S) και 22 για tRNA. Στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα έχει βρεθεί μια όχι τόσο συντηρημένη περιοχή πλούσια σε A-T, η οποία αποτελεί το σημείο έναρξης της αντιγραφής και ονομάζεται D βρόγχος (D-loop).

Χαρακτηριστικό του ανθρώπινου mtDNA (όπως και των περισσότερων θηλαστικών) είναι ότι παρουσιάζει συμπαγή οργάνωση (Attardi, 1985). Αποτελεί πρότυπο οικονομίας, γιατί απουσιάζουν ιντρόνια από τα γονιδιά του και σχεδόν όλη η πρωτοταγής νουκλεοτιδική αλληλουχία καθορίζει τη δομή πρωτεϊνών ή μορίων RNA, καθώς δεν υπάρχουν μεσοδιαστηματικές περιοχές. Το mtDNA κληρονομείται μητρικά και όλα τα μιτοχονδριακά γονίδια προέρχονται αποκλειστικά από τη μητέρα. Κατά τη διάρκεια της γονιμοποίησης το σπερματοζώαριο συνεισφέρει μόνο ένα αντίγραφο πυρηνικού DNA αλλά καθόλου μιτοχονδριακού (Hutchison et al., 1974). Το mtDNA του σπερματοζωαρίου βρίσκεται στην ουρά του και δεν εισχωρεί στο ωάριο. Σε κάποιες περιπτώσεις έχει αναφερθεί ότι το mtDNA μπορεί να κληρονομηθεί και πατρικά, καθώς μπορεί να διαφύγει μικρή ποσότητα κυτταροπλάσματος από την ουρά και να μπει στο ωάριο (Johns et al., 2003).



**Εικόνα 5:** Σχηματική απεικόνιση του ανθρώπινου μιτοχονδριακού γονιδιώματος. Με κίτρινο απεικονίζονται τα tRNAs που προκύπτουν από τη μεταγραφή του κλώνου L και με μπλε αυτά που προκύπτουν από τη μεταγραφή του κλώνου H.

Ο γενετικός κώδικας των μιτοχονδρίων των θηλαστικών έχει μερικά μοναδικά χαρακτηριστικά τόσο ως προς τον παγκόσμιο γενετικό κώδικα, όσο και ως προς τον κώδικα άλλου είδους (Jukes and Osawa, 1990) (Πίνακας 1). Τα κυριότερα από αυτά είναι:

- Τα κωδικόνια AUA, AUU και AUG χρησιμοποιούνται ως κωδικόνια έναρξης.
- Το κωδικόνιο UGA κωδικοποιεί για το αμινοξύ τρυπτοφάνη και δεν αποτελεί σήμα τερματισμού, όπως στον παγκόσμιο κώδικα.
- Τα κωδικόνια AGA και AGG δεν κωδικοποιούν για το αμινοξύ αργινίνη, αλλά αποτελούν κωδικόνια λήξης.

**Πίνακας 1:** Διαφορές στο γενετικό κώδικα των μιτοχονδρίων των θηλαστικών σε σχέση με τον παγκόσμιο γενετικό κώδικα

ΚΩΔΙΚΟΝΙΟ	ΓΕΝΕΤΙΚΟΣ ΚΩΔΙΚΑΣ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΥ mtDNA	ΠΑΓΚΟΣΜΙΟΣ ΓΕΝΕΤΙΚΟΣ ΚΩΔΙΚΑΣ
UGA	Trp	κωδικόνιο λήξης
AUA	Met, κωδικόνιο έναρξης	Ile
AGA	Κωδικόνιο λήξης	Arg
AGG	Κωδικόνιο λήξης	Arg
AUU	Ile, κωδικόνιο έναρξης	Ile
AUG	Met	Met, κωδικόνιο έναρξης

### 2.3 ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΕΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ ΚΑΙ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ

Το μιτοχονδριακό DNA εμφανίζει υψηλό ρυθμό μεταλλαξιγένεσης και μάλιστα 10 φορές υψηλότερο σε σχέση με το πυρηνικό DNA (Pesole et al., 1999). Το mtDNA είναι ιδιαίτερα ευάλωτο σε βλάβες από ελεύθερες ρίζες λόγω της γεινιάσής του με την εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη στην οποία εντοπίζεται η αναπνευστική αλυσίδα κατά τη φυσιολογική λειτουργία της οποίας παράγονται ελεύθερες ρίζες (ROS) (Allen et al., 1996). Η απουσία προστατευτικών ιστονών και οι περιορισμένοι μηχανισμοί επιδιόρθωσης αυξάνουν την πιθανότητα μετάλλαξης. Τέλος το γεγονός ότι το ανθρώπινο mtDNA είναι συμπαγές και δεν έχει ιντρόνια μπορεί να συμβάλλει στον υψηλό βαθμό μεταλλαξιγένεσης, καθώς δεν υπάρχουν περιθώρια για «άχρηστο» DNA στο οποίο να συσσωρεύονται μεταλλάξεις. Βεβαίως τα μιτοχόνδρια περιέχουν έναν αριθμό αντιοξειδωτικών ενζύμων π.χ. δισμουτάση του υπεροξειδίου (SOD), ώστε να προστατεύονται από τις ROS και επιδιορθωτικά ένζυμα για την επιδιόρθωση των βλαβών στο DNA (Yang et al., 2008).

Η πρώτη παθολόγος μετάλλαξη στο ανθρώπινο mtDNA περιγράφηκε το 1988 (Holt et al., 1988) και από τότε έχουν καταγραφεί άλλες 300 μιτοχονδριακές μεταλλάξεις (mitomap). Οι μιτοχονδριακές μεταλλάξεις χωρίζονται σε μεγάλης έκτασης ανακατατάξεις (ελλείψεις ή διπλασιασμοί) συνήθως σποραδικές και σε σημειακές μεταλλάξεις, οι οποίες αφορούν γονίδια που συμμετέχουν στην πρωτεϊνοσύνθεση των μιτοχονδρίων ή γονίδια που κωδικοποιούν υπομονάδες της αναπνευστικής αλυσίδας (Schapira et al., 2006). Σε βιοχημικό επίπεδο οι μιτοχονδριακές μεταλλάξεις μπορούν να επηρεάσουν την πρωτεϊνοσύνθεση και τη φυσιολογική λειτουργία της αναπνευστικής αλυσίδας.

Το mtDNA βρίσκεται σε πολλαπλά αντίγραφα σε κάθε μιτοχόνδριο και σε μερικές εκατοντάδες σε κάθε κύτταρο. Σε φυσιολογικές καταστάσεις όλα τα αντίγραφα του mtDNA σε ένα κύτταρο είναι όμοια και με αγρίου τύπου (wild type wt) αλληλουχίες. Μια μιτοχονδριακή μετάλλαξη μπορεί να επηρεάσει όλα τα αντίγραφα του mtDNA, ένα φαινόμενο που αναφέρεται ως ομοπλασμία. Παρ' όλα αυτά οι περισσότερες παθολόγες μεταλλάξεις επηρεάζουν μόνο κάποια mtDNA αντίγραφα, με αποτέλεσμα τη συνύπαρξη wt και μεταλλαγμένων mtDNA στο ίδιο μιτοχόνδριο, κύτταρο, όργανο, και κατ' επέκταση στο άτομο σε διαφορετικές αναλογίες (ετεροπλασμία).

Οι διαταραχές που προκαλούνται από δυσλειτουργίες της αναπνευστικής αλυσίδας ονομάζονται μιτοχονδριακά νοσήματα (Πίνακας 2). Τα μιτοχονδριακά νοσήματα έχουν ποικίλους φαινοτύπους και διαφορετικές ηλικίες έναρξης των συμπτωμάτων. Τα όργανα και οι ιστοί που πλήττονται περισσότερο είναι αυτά που εξαρτώνται άμεσα από την παραγωγή ενέργειας των μιτοχονδρίων, όπως ο νευρικός ιστός, ο καρδιακός και ο μυϊκός ιστός (Di Mauro and Schon., 2003).

Το επίπεδο της ετεροπλασμίας καθορίζει την εκδήλωση και τη σοβαρότητα ενός κλινικού φαινοτύπου που οφείλεται σε μιτοχονδριακή μετάλλαξη. Υπάρχει δηλαδή ένα όριο της ετεροπλασμίας που, αν ξεπεραστεί, παρατηρείται κάποιου είδους βιοχημική βλάβη. Όσο υψηλότερος είναι ο βαθμός παθολόγων μεταλλάξεων στο mtDNA, τόσο πιο πιθανό είναι ο ασθενής να εμφανίζει σοβαρότερα συμπτώματα.

*Πίνακας 2: Παρουσιάζονται κάποια από τα κύρια μιτοχονδριακά νοσήματα, οι κυριότερες μεταλλάξεις που τα προκαλούν και ο κλινικός τους φαινότυπος*

<b>ΑΣΘΕΝΕΙΑ</b>	<b>ΜΕΤΑΛΛΑΞΗ</b>	<b>ΚΛΙΝΙΚΟΣ ΦΑΙΝΟΤΥΠΟΣ</b>
<b>Μιτοχονδριακή εγκεφαλομυοπάθεια, γαλακτική οξέωση, εγκεφαλικά επεισόδια (MELAS)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Περίπου το 80% των ασθενών φέρει τη μετάλλαξη <b>A3243G</b> tRNA<sup>Leu(UUR)</sup></li> </ul>	Εγκεφαλικά επεισόδια πριν από την ηλικία των 40 ετών, εγκεφαλοπάθεια, μυοπάθεια, γαλακτική οξέωση, ερυθρές μυϊκές ίνες. Με μικρότερη συχνότητα εμφανίζονται σπασμοί, παράνοια, καρδιομυοπάθεια, κώφωση, διαβήτης.
<b>Μυοκλωνική επιληψία με ανώμαλες ερυθρές ίνες (MERRF)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Περίπου το 80% των ασθενών φέρει τη μετάλλαξη tRNA<sup>Lys</sup> <b>A8344G</b></li> </ul>	Μυοκλωνική επιληψία, σύγχυση, μυϊκή αδυναμία, ανώμαλες ερυθρές μυϊκές ίνες, κώφωση.
<b>Σύνδρομο του Leigh (LS)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Η τυπική μετάλλαξη εντοπίζεται στην υπομονάδα του συμπλόκου V ATPase 6 : <b>T8993G</b></li> </ul>	Αδυναμία στήριξης του κεφαλιού, απώλεια ελέγχου συγκεκριμένων μυών, καρδιακά προβλήματα, υποτονία, γαλακτική οξέωση.
<b>Κληρονομική οπτική νευροπάθεια του Leber (LHON)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Το 90% των περιπτώσεων φέρει μία από τις μεταλλάξεις: ND4: <b>G11778A</b> ND1: <b>G3460A</b> ND6: <b>T14484C</b></li> </ul>	Απώλεια όρασης, τύφλωση. Επιπρόσθετα μπορεί να δημιουργηθούν καρδιακές διαταραχές, αταξία, δυστονία.
<b>Σύνδρομο Kearns-Sayre (KSS)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Η τυπική μετάλλαξη είναι tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> <b>G3249A</b></li> </ul>	Οφθαλμοπάρεση, μελαγχρωματική ρετινοπάθεια πριν από την ηλικία των 20 ετών.



Θεωρητικά απαιτείται 70-90% μεταλλαγμένου mtDNA για την εμφάνιση ενός κλινικού φαινοτύπου, αλλά αυτό ποικίλλει ανάλογα με τη μετάλλαξη. Το όριο αυτό είναι διαφορετικό για κάθε κυτταρικό ιστό, κάτι που εξηγεί γιατί μερικοί ιστοί είναι πιο ευάλωτοι, ακόμη και με την ύπαρξη μικρού ποσοστού μεταλλαγμένου DNA, σε σχέση με κάποιους άλλους.

Κατά τη διάρκεια της κυτταρικής διαίρεσης το mtDNA κατανέμεται τυχαία στα θυγατρικά κύτταρα οδηγώντας σε αλλαγή της αναλογίας των μεταλλαγμένων μορίων στη διάρκεια της ζωής ενός ασθενούς. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται μιτωτικός διαχωρισμός. Λόγω των αποτελεσμάτων του μιτωτικού διαχωρισμού κάποιοι ασθενείς μεταπηδούν από έναν κλινικό φαινότυπο σε άλλο καθώς μεγαλώνουν.

Η σύνδεση γονοτύπου και φαινοτύπου για τα μιτοχονδριακά νοσήματα είναι πολύπλοκη. Οι φαινότυποι που οφείλονται σε παθογόνες μεταλλάξεις είναι πολυπληθείς. Η ίδια μετάλλαξη μπορεί να οδηγήσει σε διαφορετικούς φαινότυπους, ενώ ο ίδιος φαινότυπος μπορεί να προκαλείται από διαφορετικές μεταλλάξεις. Συνεπώς δεν υπάρχει σαφής συσχέτιση φαινοτύπου-γονοτύπου. Γενικά ένας κλινικός φαινότυπος είναι το αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης του επιπέδου της ετεροπλασμίας και της κατανομής των μεταλλαγμένων γονιδιωμάτων στο χώρο (οργανίδια, κύτταρα, ιστοί, όργανο) και στο χρόνο. Για αυτό το λόγο τα μιτοχονδριακά νοσήματα είναι πιθανόν να εκδηλωθούν σε οποιοδήποτε ιστό και σε οποιαδήποτε ηλικία. Εντούτοις, όπως ήδη αναφέρθηκε, οι μύες, η καρδιά και ο εγκέφαλος που εξαρτώνται άμεσα από την οξειδωτική φωσφορυλίωση είναι πιο ευάλωτοι από τους υπόλοιπους ιστούς, ακόμη και αν το ποσοστό μετάλλαξης είναι χαμηλό. Επιπλέον κι άλλοι παράγοντες συμβάλλουν στην εκδήλωση των φαινοτύπων που οφείλονται στην ίδια μετάλλαξη, όπως τα πυρηνικά γονίδια, η ηλικία, το φύλο και το περιβάλλον.

### 2.3.1 Παθογόνες και ουδέτερες μεταλλάξεις σε μιτοχονδριακά γονίδια tRNA

Περισσότερες από τις μισές παθογόνες μεταλλάξεις που ευθύνονται για μιτοχονδριακές ασθένειες εντοπίζονται σε μιτοχονδριακά tRNA γονίδια, γεγονός αξιοσημείωτο καθώς τα tRNA γονίδια αποτελούν μόνο το 10% του mtDNA. Ορισμένες μεταλλάξεις δεν προκαλούν αλλαγή στην τρισδιάστατη δομή του tRNA και συνεπώς στη λειτουργία του οπότε αναφέρονται ως πολυμορφισμοί και άλλες είναι παθογόνες προκαλώντας διάφορα κλινικά συμπτώματα. Ουδέτερες μεταλλάξεις, συνήθως σημειακές, εντοπίζονται σε όλα τα tRNA γονίδια και δεν επηρεάζουν τη δομική ακεραιότητα και το λειτουργικό ρόλο των μορίων. Παθογόνες μεταλλάξεις έχουν βρεθεί σε όλα τα tRNA γονίδια, εκτός από αυτό της αργινίνης. Μάλιστα το 50% των γνωστών παθογόνων μεταλλάξεων εντοπίζεται σε τρία γονίδια tRNA: tRNA<sup>Leu(UUR)</sup>, tRNA<sup>Lys</sup>, tRNA<sup>Ile</sup> (Zifa et al., 2007). Έως τώρα, 243 πολυμορφικές και 139 παθογόνες mt tRNA μεταλλάξεις έχουν περιγραφεί και έχουν γίνει η αφορμή μελέτης πολυάριθμων μεμονωμένων αναφορών (Πίνακας 3).

Οι περισσότερες μεταλλάξεις είναι μεταπτώσεις (πυριμιδίνη σε πυριμιδίνη, πουρίνη σε πουρίνη) παρά μεταστροφές και κατανέμονται ομοιόμορφα στο μόριο των tRNA, τόσο στους βραχίονες όσο και στις θηλιές. Αυτές που εντοπίζονται στους βραχίονες διαταράσσουν το φυσιολογικό ζευγάρωμα των βάσεων κατά Watson-Crick και συνήθως εμφανίζονται ως C-A ή G-U. Στην τριπλέτα του αντικωδικονίου εκλείπουν σχεδόν πλήρως οι μεταλλάξεις, γιατί τα νουκλεοτιδικά κατάλοιπα είναι εξαιρετικά συντηρημένα και οποιαδήποτε αλλαγή θα είχε άμεση επίδραση στην πρωτεϊνοσύνθεση.

Είναι δύσκολο να καθοριστεί πότε μία μετάλλαξη σε tRNA γονίδιο είναι παθογόνος. Συνήθως οι παθογόνες μεταλλάξεις με σοβαρή επίδραση στο φαινότυπο επηρεάζουν πολύ συντηρημένες θέσεις σε αντίθεση με τις ουδέτερες που εντοπίζονται με μεγαλύτερη συχνότητα σε μη συντηρημένες περιοχές. Ωστόσο δεν υπάρχει σαφής διάκριση για την παθογένεια των μιτοχονδριακών tRNA μεταλλάξεων.

**Πίνακας 3:** Παθογόνες και πολυμορφικές μεταλλάξεις στα ανθρώπινα γονίδια μιτοχονδριακών tRNA Πηγές: ([www.mitomap.org](http://www.mitomap.org) και [www.genpat.uu.se/mtDB](http://www.genpat.uu.se/mtDB))

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

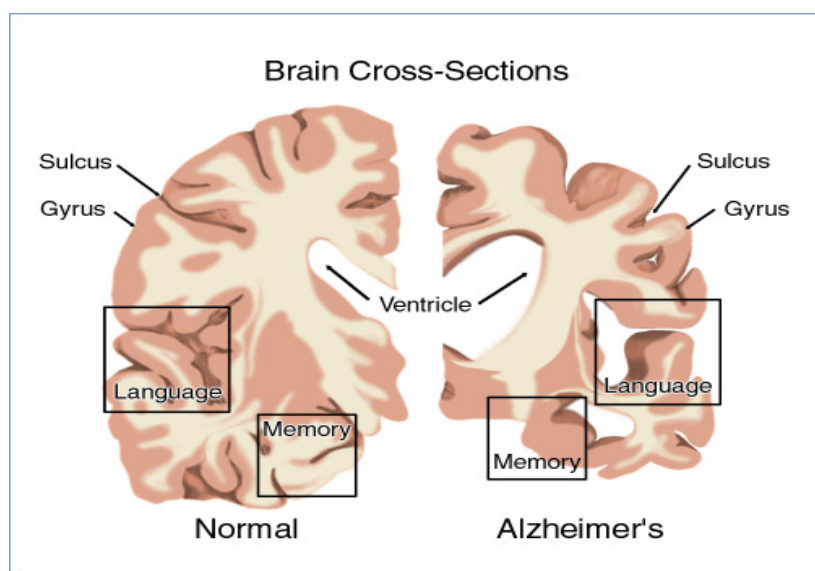
## 2.4 Η ΝΟΣΟΣ ΤΟΥ ALZHEIMER

Η νόσος του Alzheimer (Alzheimer Disease, AD) είναι μια νευροεκφυλιστική ασθένεια του εγκεφάλου. Περιγράφηκε για πρώτη φορά από τον Lois Alzheimer το 1907. Οι περιοχές του εγκεφάλου που πλήττονται είναι ο φλοιός, ο ιππόκαμπος, η αμυγδαλή, ο μετωπικός, κροταφικός, πλευρικός και ινιακός λοβός (Εικόνα 6). Τα συμπτώματα της νόσου διακρίνονται σε δύο κατηγορίες:

1. Γνωσιακές- νοητικές διαταραχές: σταδιακή απώλεια της μνήμης και ιδιαίτερα της πρόσφατης μνήμης, δυσκολία προσανατολισμού στο χώρο και στο χρόνο, δυσκολία στο λόγο, στη σκέψη, απραξία, αγνωσία.

2. Διαταραχές της συμπεριφοράς: εμφάνιση απάθειας, αδιαφορίας για το περιβάλλον, κοινωνική απόσυρση, κατάθλιψη, σεξουαλική ανικανότητα, επιθετικότητα.

Επιπλέον με την εξέλιξη της ασθένειας μπορεί να εμφανιστεί και απώλεια κινητικών λειτουργιών, όπως βάδιση και προσανατολισμός. Μια κλινική εικόνα που μοιάζει με εξωπυραμιδικές κινητικές διαταραχές, όπως η νόσος του Parkinson (Selkoe et al., 2001).

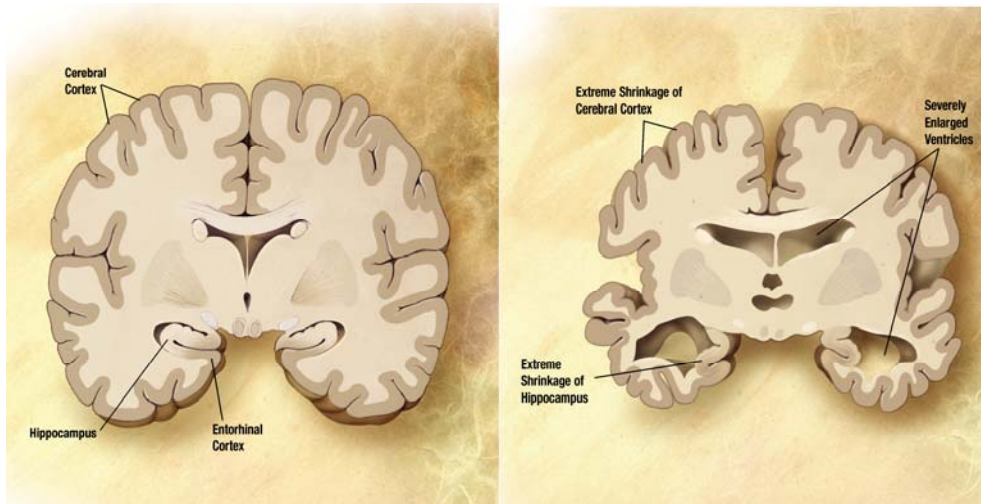


*Εικόνα 6: Περιοχές του εγκεφάλου που πλήττονται στη νόσο του Alzheimer. Επηρεάζονται περισσότερο το κέντρο της μνήμης, του λόγου και η αμυγδαλή.*

Το AD είναι η πιο συχνή αιτία άνοιας στα άτομα τρίτης ηλικίας. Η συχνότητά του μάλιστα αυξάνεται με την αύξηση του προσδόκιμου της ζωής. Δύο είναι οι τύποι της νόσου: η οικογενής AD, η οποία κληρονομείται με αυτοσωμικό επικρατή χαρακτήρα και η σποραδική AD όπου δεν είναι προφανής κάποια κληρονομικότητα. Οι περισσότερες περιπτώσεις της νόσου είναι σποραδικές. Πρόκειται για μια πολυπαραγοντική ασθένεια που επηρεάζεται από περιβαλλοντικούς και γενετικούς παράγοντες. Το οικογενές με το σποραδικό Alzheimer είναι φαινοτυπικά όμοια, αλλά διαφέρουν στην ηλικία έναρξης συμπτωμάτων. Η οικογενής μορφή είναι πρώιμης έναρξης, εκδηλώνεται πριν από την ηλικία των 60 ετών και εμφανίζεται σε ποσοστό μικρότερο από 10% του συνολικού αριθμού των περιπτώσεων. Η πλειονότητα των περιπτώσεων της νόσου ανήκει στη σποραδική μορφή με εμφάνιση συμπτωμάτων σε άτομα ηλικίας άνω των 60 ετών. Παρ' όλη τη διαφορά στην ηλικία έναρξης των συμπτωμάτων οι δύο μορφές φαίνονται να έχουν κοινή παθογένεια (Grazina et al., 2006).

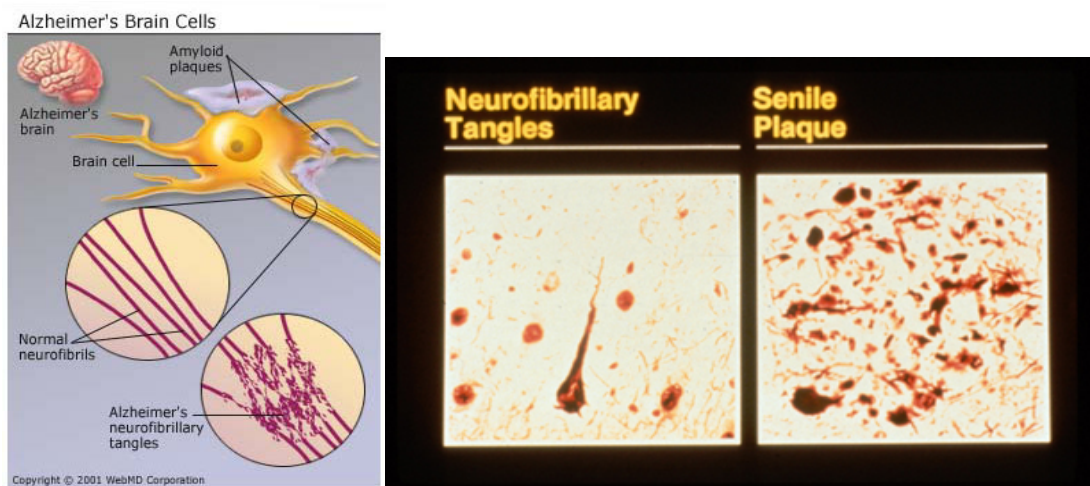
### 2.4.1. Μοριακή βάση της νόσου του Alzheimer

Η ασθένεια χαρακτηρίζεται από προοδευτική και μη αναστρέψιμη καταστροφή νευρώνων, κυρίως χολινεργικών, σε συγκεκριμένες περιοχές του εγκεφάλου. Μακροσκοπικά παρατηρείται ατροφία του φλοιού του εγκεφάλου και διεύρυνση των αυλάκων (Εικόνα 7).



*Εικόνα 7: Σχηματική αναπαράσταση του εγκεφάλου φυσιολογικού ατόμου και εγκεφάλου ασθενούς που παρουσιάζει τη χαρακτηριστική ατροφία. Παρατηρείται συρρίκνωση του φλοιού και του ιππόκαμπου και μεγέθυνση της αμυγδαλής.*

Μικροσκοπικά στον εγκέφαλο ενός ασθενούς παρατηρούνται δύο κυρίως νευροπαθολογικά ευρήματα: οι αμυλοειδείς πλάκες και οι νευροϊνιδιακοί σωροί (Εικόνα 8).



*Εικόνα 8: Αριστερά σχηματική αναπαράσταση των αμυλοειδών πλακών και των νευροϊνιδιακών σωρών. Δεξιά οι δομές των νευροϊνιδιακών σωρών και των αμυλοειδών πλακών σε νευρικά κύτταρα του εγκεφάλου.*

**1. Αμυλοειδείς πλάκες:** Πρόκειται για πυκνές και αδιάλυτες εναποθέσεις πρωτεϊνών και κυτταρικών συστατικών έξω και γύρω από τους νευρώνες του εγκεφάλου. Περιέχουν μεγάλα ποσά β-αμυλοειδούς μαζί με τμήματα νευρώνων και μη νευρικών κυττάρων, όπως μικρογλοία και αστροκύτταρα. Μορφολογικά οι νευρώνες αυτοί είναι διογκωμένοι και ελικοειδείς και χαρακτηρίζονται από δομικές ανωμαλίες, συμπεριλαμβανομένων μεγάλων λυσοσωμάτων, πολλών μιτοχονδρίων και ελικοειδών ινιδίων. Η ανάπτυξη των πλακών γίνεται σταδιακά από μήνες ως χρόνια. Το κύριο συστατικό των πλακών είναι ένα μικρό πεπτίδιο 42 αμινοξέων που ονομάζεται Αβ και προκύπτει με πρωτεόλυση της πρόδρομης πρωτεΐνης του αμυλοειδούς β (APP, Amyloid β Precursor Protein) (Glennner et al., 1984). Η APP έχει θέσεις πρωτεόλυσης και αποτελεί υπόστρωμα για σεκρετάσες (α-, β-, γ-) που η καθεμία κόβει σε διαφορετικό σημείο. Για την αποτελεσματική δράση της γ-σεκρετάσης απαιτείται η πρεσενιλίνη.

**2. Νευροϊνιδιακοί σωροί:** Αποτελούνται από ενδοκυττάρια συγκεντρώσεις ανώμαλων ινιδίων με κύριο συστατικό την πρωτεΐνη T (tau). Αυτή η πρωτεΐνη προάγει τον πολυμερισμό της σωληνίνας και τη συγκρότηση των μικροσωληνίσκων. Η ανώμαλη φωσφορυλίωσή της προκαλεί αυτές τις δομές (Grundke et al., 1986).

#### **2.4.2 Γενετική βάση της νόσου του Alzheimer**

Σε περιπτώσεις οικογενούς μορφής του Alzheimer εντοπίστηκαν τρία διαφορετικά γονίδια τα οποία ευθύνονται για το ήμισυ περίπου των περιπτώσεων πρώιμης έναρξης της νόσου. Μεταλλάξεις οποιουδήποτε από αυτά τα γονίδια αυξάνουν τη συσσώρευση του πεπτιδίου Αβ, που σχηματίζει τις αμυλοειδείς πλάκες. Δύο από αυτά τα γονίδια, τα *presenilin 1 (PS1)* και *presenilin 2 (PS2)* (St George-Hyslop et al., 1992; van Broeckhoven et al., 1992), κωδικοποιούν συστατικά ενός ενζύμου το οποίο ευθύνεται για το κόψιμο της πρόδρομης πρωτεΐνης του αμυλοειδούς β (APP). Τα άτομα που φέρουν μεταλλάξεις στα γονίδια *PS1* και *PS2* κόβουν την APP με ανώμαλο τρόπο, με αποτέλεσμα την αύξηση της συγκέντρωσης του πεπτιδίου Αβ. Επιπλέον σε ορισμένες σπάνιες περιπτώσεις έχουν εντοπιστεί μεταλλάξεις στο γονίδιο που κωδικοποιεί την ίδια την APP (St George-Hyslop et al., 1987), οι οποίες επίσης αυξάνουν την παραγωγή του πεπτιδίου Αβ.

Σε περιπτώσεις σποραδικής μορφής, όταν δηλαδή η ασθένεια εμφανίζεται σε άτομα ηλικίας άνω των 60ετών, δεν εντοπίζονται μεταλλάξεις στα γονίδια που κωδικοποιούν την APP ή την πρεσενιλίνη. Προκειμένου οι ερευνητές να εντοπίσουν τους γενετικούς παράγοντες που εμπλέκονται στις συνηθέστερες μορφές της νόσου, έχουν εξετάσει γονίδια τα οποία κωδικοποιούν πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με την APP και προκαλούν αύξηση της συσσώρευσης του πεπτιδίου Αβ. Χάρη σε πειράματα γενετικής σύνδεσης εντοπίστηκε μια περιοχή στο μεγάλο βραχίονα του χρωμοσώματος 19, η οποία περιλαμβάνει το γονίδιο που κωδικοποιεί την απολιποπρωτεΐνη Ε (APOE) (Pericak-Vance et al., 1991). Η γενετική ανάλυση που ακολούθησε έδειξε ότι η συμβολή του *APOE* στη νόσο του Alzheimer είναι όντως σημαντική. Η apoE4 είναι μια πρωτεΐνη 34kD, που παίζει ρόλο στο μεταβολισμό των λιπιδίων. Υπάρχουν τρία κύρια αλληλόμορφα του γονιδίου *APOE*: το ε2, το ε3 και το ε4. Διαπιστώθηκε ότι η παρουσία τουλάχιστον ενός αλληλομόρφου ε4 ήταν σχεδόν τρεις φορές συχνότερη στα άτομα που έπασχαν από τη νόσο του Alzheimer από ό,τι σε άτομα από ομάδα αναφοράς (Corder et al., 1993). Διαπιστώθηκε επίσης ότι οι γονότυποι του γονιδίου *APOE* επηρεάζουν την ηλικία κατά την οποία εμφανίζεται η νόσος. Τυπικά η ηλικία εμφάνισης είναι τα 80-85 χρόνια, αλλά τα άτομα που φέρουν το αλληλόμορφο ε4 του *APOE* σε ετερόζυγη κατάσταση και εκδηλώνουν τη νόσο εμφανίζουν τα πρώτα συμπτώματά της συνήθως σε ηλικία περίπου 75 ετών. Τα

άτομα που φέρουν το ε4 σε ομόζυγη κατάσταση και εκδηλώνουν τη νόσο εμφανίζουν τα πρώτα συμπτώματα ακόμα νωρίτερα, μεταξύ 65 και 70 ετών (Farrer et al., 1997). Αν και η συσχέτιση μεταξύ της νόσου του Alzheimer και της APOE έχει επιβεβαιωθεί από πολλές μελέτες, ο μηχανισμός που συνδέει το μόριο αυτό με την ασθένεια δεν είναι γνωστός. Ο γονότυπος του APOE θεωρείται ότι ευθύνεται για το 50% περίπου της προδιάθεσης για την όψιμη έναρξη της νόσου του Alzheimer, αλλά δεν αποτελεί ούτε αναγκαία ούτε ικανή συνθήκη για την εκδήλωσή της.

Εκτός από τα 3 κύρια γονίδια που αναφέρονται παραπάνω (PS1, PS2, APOE) αλλά 660 γονίδια ([www.alzgene.org](http://www.alzgene.org)) είναι υποψήφια για την εμπλοκή τους στη νόσο του Alzheimer. Τα περισσότερα από αυτά είναι πρωτεολυτικά ένζυμα, πρωτεΐνες πλάσματος, αυξητικοί παράγοντες και μεμβρανικοί υποδοχείς. Ανάλογα με τη λειτουργία τους και τη συμμετοχή τους στα μονοπάτια παθογένεσης του Alzheimer έχουν βρεθεί μεταλλάξεις σε γονίδια που σχετίζονται με: τη σύνθεση της APP στο ενδοπλασματικό δίκτυο, την πρωτεόλυση της APP, την ενδοκύττωση της APP, την αντιφλεγμονώδη αντίδραση λόγω της συνάθροισης του Αβ πεπτιδίου, το οξειδωτικό stress που επάγεται από τα Αβ πεπτίδια, το μεταβολισμό της χοληστερόλης στον εγκέφαλο, τη συναπτική δυσλειτουργία και τη διαταραχή της ομοιόστασης του  $Ca^{2+}$ .

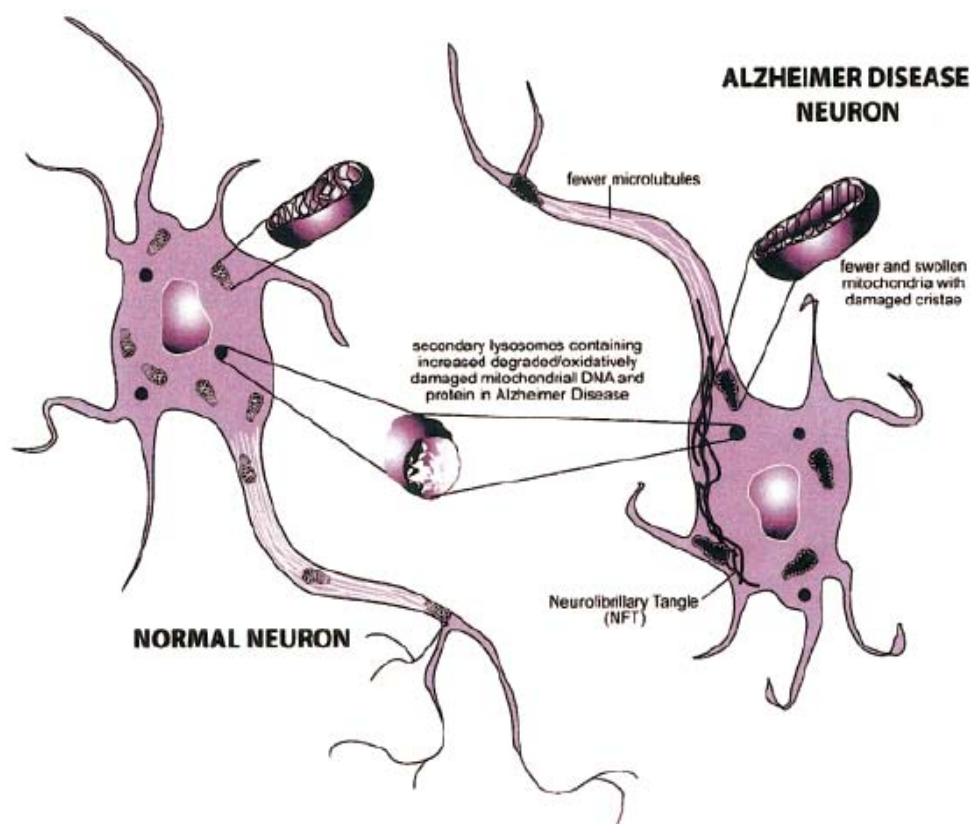
Από τα παραπάνω φαίνεται ότι η νόσος είναι πιθανό να προκαλείται από πολλαπλούς γενετικούς παράγοντες. Στην πλειονότητα των περιπτώσεων οι γενετικοί παράγοντες δρουν σαν αιτίες προδιάθεσης, χωρίς να είναι ικανοί να προκαλέσουν την ασθένεια αλλά ικανοί να αυξήσουν τον κίνδυνο εμφάνισής της. Οι γενετικοί παράγοντες μπορούν να ασκήσουν την παθογόνο δράση τους αλληλεπιδρώντας με περιβαλλοντικούς παράγοντες ή κάτω από φυσιολογικές ή παθολογικές συνθήκες. Μπορούν βέβαια να αλληλεπιδρούν και μεταξύ τους συμβάλλοντας έτσι στην εμφάνιση της νόσου.

#### **2.4.3 Τα μιτοχόνδρια και η συσχέτισή τους με τη νόσο του Alzheimer**

Όπως φαίνεται και από τα παραπάνω είναι πιθανόν να εμπλέκονται επιπλέον μηχανισμοί στην παθογένεση και στην εξέλιξη της νόσου του Alzheimer. Η εμπλοκή των μιτοχονδρίων στην παθογένεση της ασθένειας προτάθηκε αρχικά με βάση την παρατήρηση ότι ο μεταβολισμός της γλυκόζης είναι μειωμένος στη νόσο (Horwitz et al., 1987; Hoyer et al., 1988), υποδεικνύοντας τη μη φυσιολογική λειτουργία τους. Ακόμη κύριο χαρακτηριστικό των ασθενών είναι η ανεπάρκεια κυτοχρωμικής οξειδάσης c (COX) που αρχικά παρατηρήθηκε στα αιμοπετάλια ασθενών (Parker et al., 1989) και αργότερα και στον εγκέφαλο (Kish et al., 1992; Mutisya et al., 1994). Έχουν βρεθεί επιπλέον αλλαγές στην ενεργότητα κάποιων ενζύμων του κύκλου του Krebs με βασικότερες τη μείωση της ενεργότητας της πυροσταφυλικής δεϋδρογονάσης και της α-κετογλουταρικής δεϋδρογονάσης, ένζυμα κλειδιά του κύκλου (Blass and Brown, 2000; Gibson et al., 2008). In vitro πειράματα έχουν δείξει ότι το Αβ πεπτίδιο καταστέλλει την COX, την πυροσταφυλική δεϋδρογονάση και την α-κετογλουταρική δεϋδρογονάση προτείνοντας ότι το Αβ έχει άμεση επίδραση στην παραγωγή της ενέργειας στα μιτοχόνδρια (Perez-Gracia et al., 2008).

Ταυτόχρονα με τις βλάβες που εντοπίζονται στη λειτουργία των μιτοχονδρίων εμφανίζονται και ανωμαλίες στη μορφή τους. Στους νευρώνες των ασθενών τα μιτοχόνδρια είναι επιμηκυμένα και διογκωμένα με κατεστραμμένες ακρολοφίες (Εικόνα 9). Επιπλέον ο αριθμός τους είναι μειωμένος (Hirai et al., 2001; Castellanni et al., 2002). Οι μελέτες δείχνουν αλλαγές όχι μόνο στη μορφολογία των μιτοχονδρίων αλλά και στην κατανομή τους. Ειδικότερα τα μιτοχόνδρια φαίνεται να συγκεντρώνονται γύρω από τον πυρήνα των προσβεβλημένων κυττάρων (Wang et al., 2008). Τα παραπάνω ευρήματα έχουν εντοπιστεί τόσο σε νευρώνες, που είναι ο

πρώτος στόχος της ασθένειας, όσο και σε άλλα κύτταρα όπως οι ινοβλάστες. Τέλος από αυτοψίες εγκεφάλων έχει εντοπιστεί Αβ αμυλοειδές στις μιτοχονδριακές ακρολοφίες (Petersen et al., 2008).



**Εικόνα 9:** Στους νευρώνες των ασθενών με Alzheimer παρατηρούνται λιγότερα, διογκωμένα και με κατεστραμμένες ακρολοφίες μιτοχόνδρια.

Όλα τα στοιχεία δείχνουν ότι στους ασθενείς με Alzheimer τα μιτοχόνδρια δε λειτουργούν σωστά. Η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία είναι μια σημαντική αιτία για την εμφάνιση οξειδωτικού stress στον εγκέφαλο ασθενών. Ο εγκέφαλος είναι ευαίσθητος στο οξειδωτικό stress λόγω της υψηλής περιεκτικότητας του σε λιπίδια, των υψηλών απαιτήσεων του σε ενέργεια και των χαμηλών επιπέδων του σε αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς. Πράγματι αυξημένοι δείκτες οξειδωτικού stress, έχουν βρεθεί σε προσβεβλημένες περιοχές του εγκεφάλου, στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό, στο πλάσμα, στον ορό και στα ούρα ασθενών με Alzheimer υποδεικνύοντας την αυξημένη παραγωγή ελεύθερων ριζών από τα μιτοχόνδρια. Ανάμεσα σ' αυτούς τους δείκτες συγκαταλέγονται: η 8-υδροξυ-2' δεοξυγουανοσίνη (8-OHdG) που βρέθηκε αυξημένη στο mtDNA σε σχέση με το nDNA, τα αυξημένα προϊόντα λιπιδιακής υπεροξειδωσης (κυρίως αλδευδικά παράγωγα), τα αυξημένα επίπεδα Cu και Fe που συμβάλλουν στη δημιουργία ROS (Moreira et al., 2008). Με βάση τα παραπάνω προτείνεται ότι η υπερπαραγωγή των ROS από τα δυσλειτουργικά μιτοχόνδρια μπορεί να προκαλέσει οξειδωτική βλάβη σε μακρομόρια όπως τα λιπίδια, τις πρωτεΐνες και τα νουκλεϊκά οξέα, με αποτέλεσμα την αποσταθεροποίηση της δομής της κυτταρικής μεμβράνης, αλλαγή στη διαπερατότητα της μεμβράνης των μιτοχονδρίων, τη συγκέντρωση μη αναδιπλωμένων ή μη φυσιολογικά

αναδιπλωμένων πρωτεϊνών και μεταλλάξεις στο DNA. Σε εγκεφάλους ασθενών με Alzheimer έχουν παρατηρηθεί αυξημένα επίπεδα θρυμματισμένου DNA και αυξημένη ενεργοποίηση αποπτωτικών πρωτεϊνών όπως Bax και κασπάση-3 που δείχνουν την ενεργοποίηση μονοπατιών απόπτωσης (Su et al., 1997; Su et al., 2002). Τα μη φυσιολογικά μιτοχόνδρια λόγω της αλλαγής στη διαπερατότητα της μεμβράνης τους ενεργοποιούν μονοπάτια απόπτωσης απελευθερώνοντας κυτόχρωμα c και  $Ca^{2+}$  σε καταστάσεις που αυτό δεν είναι απαραίτητο.

#### 2.4.4 Μιτοχονδριακές μεταλλάξεις και νόσος του Alzheimer

Λόγω των μεταβολών που παρατηρούνται στη δομή και τη λειτουργία των μιτοχονδρίων σε ασθενείς με Alzheimer μελετήθηκε τυχόν συμμετοχή μεταλλάξεων στο mtDNA, οι οποίες θα μπορούσαν να ευθύνονται για τη μιτοχονδριακή δυσλειτουργία.

Στη βιβλιογραφία αναφέρονται μεταλλάξεις σε όλες τις περιοχές του μιτοχονδριακού DNA, οι οποίες εμφανίζονται με μεγαλύτερη συχνότητα στους ασθενείς με Alzheimer σε σχέση με τις ομάδες αναφοράς (Πίνακας 4), (Lin et al., 1992; Shoffner et al., 1993; Brown et al., 1996; Coskun et al., 2004; Grazina et al., 2005; Elson et al., 2006; Tanaka et al., 2010). Πιο ειδικά για τις μεταλλάξεις σε μιτοχονδριακά tRNA γονίδια και τη συμβολή τους στη νόσο του Alzheimer δεν υπάρχει ξεκάθαρη εικόνα. Η πιο εδραιωμένη και συχνή μετάλλαξη tRNA γονιδίων που φέρουν άτομα με τη νόσο εντοπίζεται στο tRNA<sup>Gln</sup> και είναι η μετάπτωση T4336C που παρατηρήθηκε για πρώτη φορά σε Καυκάσιους ασθενείς με Alzheimer με συχνότητα 5,2%, ενώ στην ομάδα ελέγχου με 0,7% (Shoffner et al., 1993). Η συσχέτιση αυτής της μετάλλαξης με τη νόσο έχει επιβεβαιωθεί και από άλλες ερευνητικές ομάδες (Hutchin and Contorpassi., 1995). Ωστόσο άλλες μελέτες υποστηρίζουν ότι δεν υπάρχει κάποια σύνδεση μεταξύ της συγκεκριμένης μετάλλαξης και της ασθένειας (Wragg et al., 1995).

Κάποιες έρευνες ταυτοποιούν την απλοομάδα J σαν παράγοντα κινδύνου για εμφάνιση της νόσου και την απλοομάδα T σαν προστατευτικό παράγοντα (Chagnon et al., 1999). Επιπλέον η απλοομάδα U έχει βρεθεί να υπερ-αντιπροσωπεύεται σε αρσενικά άτομα που εμφανίζουν τη νόσο, υπονοώντας έτσι κάποια προδιάθεση για τους άντρες που ανήκουν στην απλοομάδα αυτή, ενώ στις γυναίκες ίσως προσδίδει κάποιο προστατευτικό πλεονέκτημα καθώς υπο-αντιπροσωπεύεται (van der Walt et al., 2004). Εντούτοις υπάρχει και η άποψη ότι δεν υπάρχει σχέση μεταξύ των mtDNA απλοομάδων και της νόσου (Zsurka et al., 1998).

**Πίνακας 4:** Χρονολογική αναφορά μελετών στο mtDNA για την ανίχνευση μεταλλάξεων σε ασθενείς με Alzheimer.

ΜΕΛΕΤΕΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ ΣΤΟ mtDNA ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ALZHEIMER
<ul style="list-style-type: none"> <li>• 10/19 ασθενείς με Alzheimer έφεραν τη μετάλλαξη G5460A στο ND2 γονίδιο χωρίς αυτή να εντοπιστεί στα 11 controls (Lin et al., 1992).</li> <li>• Η μετάλλαξη G5460A δεν επιβεβαιώθηκε σε καμία από τις 15 περιπτώσεις ασθενών που εξετάστηκαν (Petruzella et al., 1992).</li> <li>• Παρατηρήθηκε έλλειψη 4977bp με συχνότητα 0,14% στους ασθενείς και 0,12% στα controls (Blanchard et al., 1993).</li> <li>• Εντοπίστηκε η μετάλλαξη A4336G στο tRNA<sup>Gln</sup> σε ποσοστό 5,2% των ασθενών και 0,7 στα controls. Βρέθηκαν ακόμη οι: 956-965 (προσθήκη C) στο 12S rRNA, G3196A στο 16S rRNA και A3397G στο ND1 (Shoffner et al., 1993).</li> </ul>



- Η έλλειψη 4977bp παρατηρήθηκε 15 φορές πιο συχνά σε εγκεφάλους από ασθενείς με Alzheimer (Corral-Debrinski et al., 1994).
- Επιβεβαίωση της μετάλλαξης A4336G σε 8,3% από 72 ασθενείς και σε 0,34% σε 296 controls (Hutcin and Cortopassi, 1995).
- Εξέταση 155 δειγμάτων αίματος ασθενών για την εύρεση της A4336G. Δεν επιβεβαιώθηκε σε κανένα (Wragg et al., 1995).
- Εξέταση 3 ασθενών με Alzheimer και Parkinson και ενός μόνο με Parkinson. 1 από τους 3 έφερε την A4336G, ενώ βρέθηκαν και σπάνιες μεταλλάξεις με αλλαγή αμινοξέος (Brown et al., 1996).
- Εξέταση 70 ασθενών για τις μεταλλάξεις A4336G, A3397G, T4216C και G13708A. Βρέθηκε μόνο η A4336G σε έναν ασθενή και όχι στα controls (Zsurka et al., 1998).
- Αλληλούχιση 69 δειγμάτων ασθενών και 83 controls για τα 3 CO γονίδια και τα 22 tRNA. Εντοπίστηκαν 95 πολυμορφισμοί: 52 σιωπηλοί, 15 στα tRNA και 9 στα rRNA και 19 που επέφεραν αλλαγή του αμινοξέος. Οι συχνότητες στους ασθενείς και στα controls ήταν παρόμοιες. Βρέθηκαν ακόμη 34 νέες μεταλλάξεις (Chagnon et al., 1999).
- Εξέταση 20 ασθενών για τη σημειακή μετάλλαξη C16390T στην D-loop περιοχή. Βρέθηκε ότι ήταν 3 φορές πιο συχνή στους εγκεφάλους ασθενών σε σχέση με τα controls (Chang et al., 2000).
- Αλληλούχιση της D-loop ανάμεσα στις θέσεις 333-785 σε ασθενείς. Βρέθηκε ένας καινούριος πολυμορφισμός, ο T466C (Chinnery et al., 2001).
- Ανίχνευση των μεταλλάξεων G8206T και A8224T στο COII (Qui et al., 2001).
- Έρευνα για τη συσχέτιση της ασθένειας με συγκεκριμένες απλοομάδες. Εξετάστηκαν 989 ασθενείς και 328 controls. Αρσενικά άτομα στην απλοομάδα U είχαν αυξημένο κίνδυνο για εμφάνιση Alzheimer σε αντίθεση με τα θηλυκά (van der Walt et al., 2004).
- Ανάλυση της D-loop περιοχής 23 ασθενών και 40 controls. Βρέθηκε σε 65% η μετάλλαξη T414G (Coskun et al., 2004).
- Ανίχνευση των μεταλλάξεων T3197C και T3199C στο 16S rRNA και της T3338C στο ND1 (Grazina et al., 2005).
- Ανίχνευση της προσθήκης 956-965 (poly-C) και της A856G στο 12S rRNA. Χαρακτηρισμός ως παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση της νόσου (Tanaka et al., 2010).

Η εμπλοκή των μιτοχονδρίων στη νόσο του Alzheimer είναι ευρέως αποδεκτή λόγω των ανωμαλιών που παρουσιάζονται στη λειτουργία τους και των μεταλλάξεων που έχουν εντοπιστεί στο DNA τους, όπως αναφέρθηκε παραπάνω. Αυτό που μένει να διασαφηνιστεί είναι αν η μιτοχονδριακή βλάβη είναι συνέπεια της ασθένειας ή αν οι μιτοχονδριακές ανωμαλίες παίζουν ρόλο στην παθογένεση και στην εξέλιξη της ασθένειας.

## 2.5 ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Με γνωστή τη μιτοχονδριακή δυσλειτουργία και τις μορφολογικές ανωμαλίες των μιτοχονδρίων που παρατηρούνται σε ασθενείς με Alzheimer αλλά και τον αριθμό των μεταλλάξεων στο mtDNA που αναφέρονται στη βιβλιογραφία, σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η ανίχνευση και ταυτοποίηση μεταλλάξεων σε μιτοχονδριακά tRNA γονίδια σε 50 ασθενείς με τη νόσο του Alzheimer και σε 58 άτομα χωρίς κάποιο κλινικό σύμπτωμα. Τα γονίδια που μελετήθηκαν είναι: tRNA<sup>Gly</sup>, tRNA<sup>Arg</sup> για τους ασθενείς με το Alzheimer και tRNA<sup>Phe</sup>, tRNA<sup>Arg</sup> για τα άτομα χωρίς κάποιο κλινικό σύμπτωμα.

### 3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

#### 3.1 ΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΥΛΙΚΟ

Για τη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν 50 δείγματα DNA ασθενών με Alzheimer και 58 δείγματα ολικού αίματος υγιών ατόμων που προμηθευτήκαμε από το Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας.

Η διαδικασία της μελέτης, με σκοπό την εύρεση μεταλλάξεων σε tRNA γονίδια του μιτοχονδριακού DNA, συνολικά ήταν η ακόλουθη: PCR, SSCP, καθαρισμός των PCR προϊόντων, αλληλούχιση, επεξεργασία αλληλούχισης.

#### 3.2 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR, Polymerase Chain Reaction)

Η τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) επινοήθηκε από τον Kary Mullis το 1983 και αποτελεί σημαντικό εργαλείο της Μοριακής Βιολογίας τόσο για ερευνητικές όσο και για διαγνωστικές εφαρμογές. Πρόκειται για μια ενζυμική μέθοδο που επιτρέπει τον *in vitro* ειδικό πολλαπλασιασμό μιας αλληλουχίας DNA από κάποιο βιολογικό δείγμα. Είναι μια ευαίσθητη τεχνική που μπορεί να παράγει εκατομμύρια φορές μια αλληλουχία από ένα μόνο μόριο DNA, χωρίς πρώτα να κλωνοποιηθεί. Υπάρχουν αρκετές παραλλαγές της μεθόδου π.χ. RT-PCR. Στη συγκεκριμένη μελέτη πραγματοποιήθηκε η απλή PCR.

##### 3.2.1 Αρχή της μεθόδου

Η PCR βασίζεται στη δράση του ενζύμου DNA πολυμεράση. Η DNA πολυμεράση χρησιμοποιεί μονόκλωνο DNA για τη σύνθεση ενός συμπληρωματικού κλώνου με κατεύθυνση 5'-3'. Για να προκύψει μονόκλωνο μόριο DNA αρκεί η θέρμανση του δίκλωνου σε υψηλές θερμοκρασίες οπότε και οι κλώνοι μετουσιώνονται και διαχωρίζονται. Και οι δύο κλώνοι της διπλής έλικας του DNA μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως μήτρα για τη σύνθεση νέων μορίων. Το ένζυμο απαιτεί ένα τμήμα δίκλωνου DNA ώστε να ξεκινήσει τη σύνθεση γι αυτό και στην αντίδραση προστίθενται δύο ειδικοί, συνθετικοί ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινητές. Καθένας από αυτούς είναι συμπληρωματικός με μια περιοχή του ενός από τους δύο κλώνους του DNA-στόχου, ώστε να υβριδοποιείται σε αυτή. Οι κύκλοι θέρμανσης, υβριδοποίησης των εκκινητών στη μήτρα και επέκτασής τους με αποτέλεσμα τη σύνθεση νέων μορίων DNA επαναλαμβάνονται, έτσι ώστε μετά από  $n$  κύκλους η αντίδραση να δίνει θεωρητικά έως  $2n$  δίκλιωνα μόρια DNA τα οποία φέρουν αντίγραφα της αλληλουχίας που βρίσκεται ανάμεσα στους εκκινητές.

##### Συστατικά της αντίδρασης

Τα συστατικά της αντίδρασης περιλαμβάνουν: το DNA από κάποιο βιολογικό δείγμα, την ειδική DNA πολυμεράση, ρυθμιστικό διάλυμα (buffer solution),  $MgCl_2$ , ένα ζεύγος κατάλληλων εκκινητών (primers), μίγμα από τα τέσσερα δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs) και  $ddH_2O$ .

- Το DNA χρησιμεύει ως εκμαγείο.
- Η DNA πολυμεράση η οποία χρησιμοποιείται, Taq πολυμεράση, είναι θερμοάντοχη, δηλαδή αντέχει σε επαναλαμβανόμενη θέρμανση στους 94-95°C, χωρίς να απαιτείται η προσθήκη νέου ενζύμου μετά από κάθε κύκλο πολυμερισμού. Οι πολυμεράσες αυτές απομονώνονται από θερμοφιλά βακτήρια όπως το είδος *Thermus Aquaticus* ή από Αρχαία που ζουν σε υψηλές θερμοκρασίες. Πρέπει να σημειωθεί ότι η Taq πολυμεράση δεν έχει 3'-5'

δράση εξωνουκλεάσης και για αυτό στο τελικό προϊόν παραμένουν νουκλεοτίδια που έχουν εισαχθεί λανθασμένα.

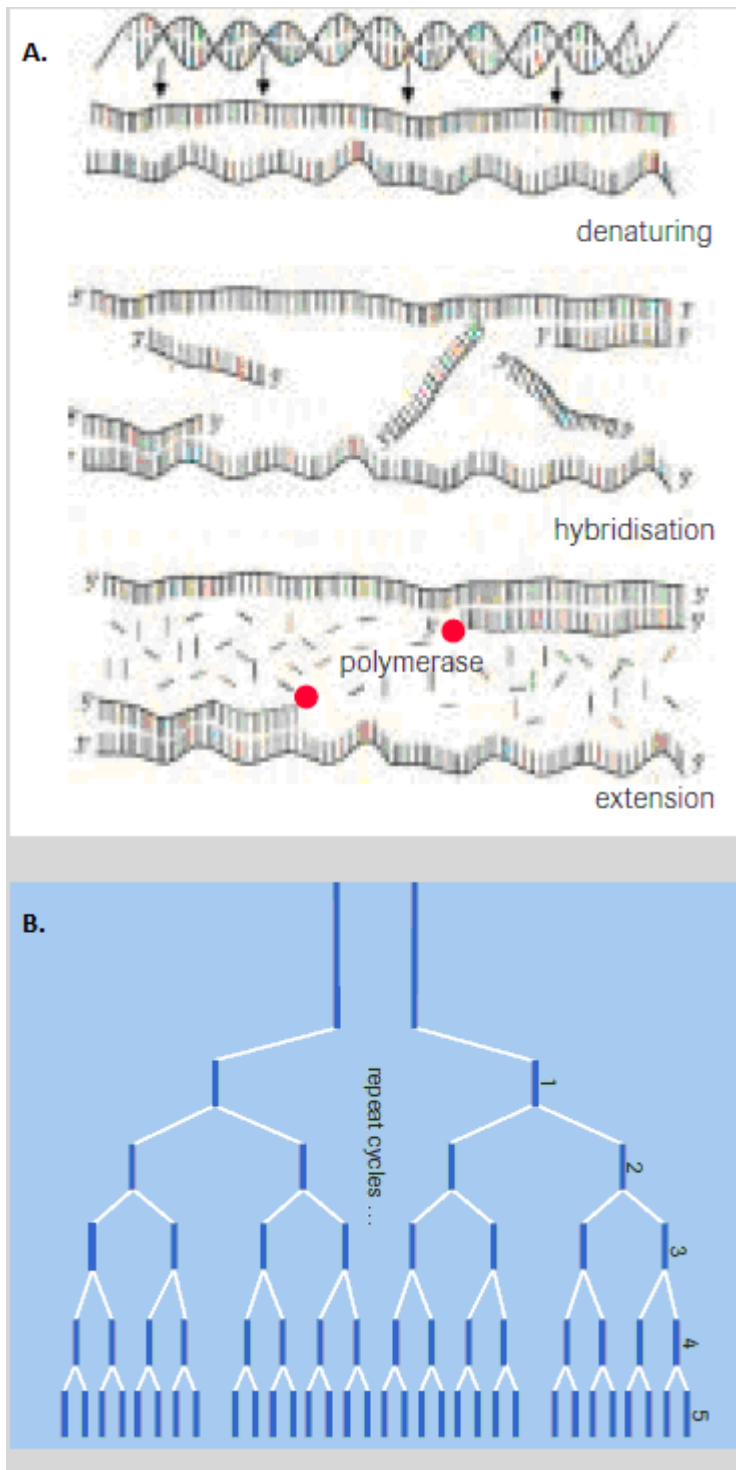
- Το ρυθμιστικό διάλυμα (buffer solution) δημιουργεί το κατάλληλο περιβάλλον π.χ. pH για τη βέλτιστη δραστηριότητα και σταθερότητα του ενζύμου.
- Το  $MgCl_2$  αποτελεί συμπράγοντα για την DNA πολυμεράση, οπότε είναι απαραίτητο για τη δράση της.
- Οι εκκινητές (primers) είναι συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια μήκους 17-28 νουκλεοτιδίων με δομή συμπληρωματική στην αρχή και στο τέλος της αλληλουχίας στόχου. Μεγαλύτερες συγκεντρώσεις μπορούν να προκαλέσουν λανθασμένη έναρξη και παραγωγή μη ειδικών προϊόντων. Στο σχεδιασμό των εκκινητών πρέπει να δίνεται σημασία στα ακόλουθα:
  - Τα 3' άκρα των δύο εκκινητών να μην είναι συμπληρωματικά, ώστε να αποφεύγεται η χρήση τους ως υπόστρωμα και συνεπώς ο σχηματισμός διμερών.
  - Το περιεχόμενο σε G-C να είναι 50-60%.
  - Οι θερμοκρασίες τήξεως των δύο εκκινητών να είναι παρόμοιες.

### Στάδια της αντίδρασης

Οι επαναλαμβανόμενοι κύκλοι αποδιάταξης, ένωσης και αντιγραφής από την πολυμεράση μπορούν να αυτοματοποιηθούν με τη χρήση μιας συσκευής, του θερμικού κυκλοποιητή, που προγραμματίζεται ώστε να μεταβαίνει κυκλικά στις επιθυμητές θερμοκρασίες για συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα.

Ένας κύκλος αποτελείται από τρία στάδια (Εικόνα 10):

1. Στάδιο αποδιάταξης DNA (denaturation): Η θερμοκρασία ανέρχεται στους  $95^{\circ}C$  για 30sec. Οι δύο κλώνοι του DNA μετουσιώνονται καθώς διασπώνται οι δεσμοί υδρογόνου και διαχωρίζονται σε μονόκλωνες αλυσίδες.
2. Στάδιο υβριδισμού (annealing): Σε αυτό το στάδιο η θερμοκρασία μειώνεται στους  $30-65^{\circ}C$  για 30sec επιτρέποντας την υβριδοποίηση των εκκινητών με το μονόκλωνο DNA. Η θερμοκρασία και ο χρόνος που χρειάζεται για την υβριδοποίηση των εκκινητών εξαρτάται από τη συγκέντρωσή τους στην αντίδραση, το μήκος και την αλληλουχία των βάσεων τους. Η θερμοκρασία του υβριδισμού ρυθμίζεται περίπου  $5^{\circ}C$  χαμηλότερα από το σημείο τήξης ( $T_m$ ).
3. Στάδιο επιμήκυνσης (extention): Η θερμοκρασία ανεβαίνει και πάλι στους  $65-75^{\circ}C$  για 2-5min ώστε η DNA πολυμεράση να ξεκινήσει τη σύνθεση των νέων κλώνων.



**Εικόνα 10:** *A. Κάθε κύκλος της PCR αποτελείται από τρία στάδια: αποδιάταξη, υβριδοποίηση, επέκταση. B. Μετά τον 1<sup>ο</sup> κύκλο παράγονται 2 μόρια DNA, με τον 2<sup>ο</sup> κύκλο παίρνουμε 4 μόρια DNA και μετά από θεωρητικά n κύκλους παράγονται έως 2n δίκλιωνα μόρια DNA.*

Πριν αρχίσουν οι επαναλαμβανόμενοι κύκλοι στον θερμικό κυκλοποιητή προηγείται το αρχικό στάδιο στο οποίο η θερμοκρασία ανεβαίνει στους 95 °C και διατηρείται για 4min. Μετά τον τελευταίο κύκλο PCR ακολουθεί το στάδιο της τελικής επιμήκυνσης κατά το οποίο η θερμοκρασία παραμένει στους 72 °C για 10min. Αυτό επιτρέπει σε ατελώς επιμηκυνόμενα προϊόντα στο μίγμα της αντίδρασης να επιμηκυνθούν πλήρως. Στο τελικό στάδιο η θερμοκρασία μειώνεται σταδιακά και παραμένει στους 4 °C.

### 3.2.2 Πολλαπλασιασμός των tRNA γονιδίων του mtDNA

Στόχος της εργασίας είναι η μελέτη τριών μιτοχονδριακών γονιδίων: tRNA<sup>Gly</sup>, tRNA<sup>Arg</sup>, tRNA<sup>Phe</sup> για την εύρεση μεταλλάξεων. Γι αυτό το λόγο για την ενίσχυση των τριών γονιδίων χρησιμοποιούνται ζεύγη εκκινητών με τα παρακάτω χαρακτηριστικά :

γονίδιο tRNA	FW Primer 5'-3' RV Primer 5'-3'	νουκλεοτιδική θέση	μήκος (bp)
Gly	CCATCTATTGATGAGGGTCT GGATATAGGGTCCAAGCCGCA	(FW 9970-9989) & (RV 10193-10173)	224
Arg	GCCCTACAAACAACCTAACCT AGTGAGATGGTAAATGCTAG	(FW 10290-10309) & (RV10516-10497)	227
Phe	CAACCAAACCCCAAAGACA GGATGCTTGCATGTGTAATC	(FW 549-567) & (RV 706-687)	158

#### ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ PCR

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

	ΑΡΧΙΚΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ	ΤΕΛΙΚΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ
DNA	100ng/μl	4ng/μl
Buffer solution	10X	1X
MgCl <sub>2</sub>	50mM	2mM
Primers (F+R)	50pmol/μl	1pmol/μl
dNTPs	10mM ( Το διάλυμα dNTPs παρασκευάζεται από dATP, dCTP, dGTP και dTTP με μίξη ίσων ποσοτήτων από ξεχωριστά διαλύματα stock των 0,2mM το καθένα.)	0,2mM (0,2mM x 4= 0,8mM)
Ταq πολυμεράση	5u/μl	1u/μl

Οι ποσότητες των αντιδραστηρίων για μια αντίδραση είναι οι ακόλουθες:

DNA	2 $\mu$ l
Buffer solution	5 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub>	1 $\mu$ l
Primers (F+R)	1+1 $\mu$ l
dNTPs	1 $\mu$ l
Taq πολυμεράση	0,2 $\mu$ l
ddH <sub>2</sub> O	39 $\mu$ l
Vτελ=50 $\mu$ l	

Σημειώνεται ότι για κάθε σύνολο αντιδράσεων χρησιμοποιείται και ένας αρνητικός μάρτυρας για να διαπιστωθεί αν υπάρχει επιμόλυνση. Φυσιολογικά στον αρνητικό μάρτυρα δεν θα πρέπει να υπάρχουν προϊόντα αφού δεν έχει προστεθεί DNA.

Οι αντιδράσεις πραγματοποιούνται σε θερμικό κυκλοποιητή ο οποίος ρυθμίζεται με το ακόλουθο πρόγραμμα:

ΣΤΑΔΙΟ	ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ	ΧΡΟΝΟΣ
Αρχική αποδιάταξη	95 °C	4min
35 x { Αποδιάταξη Υβριδοποίηση Επέκταση	95 °C	30sec
	50 °C	40sec
	72 °C	40sec
Τελική επέκταση	72 °C	10min

Μετά την τελική επέκταση η θερμοκρασία κατεβαίνει στους 4 °C και τα δείγματα μπορούν να βγουν από τη συσκευή. Η διάρκεια της κάθε αντίδρασης κυμαίνεται από 1h:30min με 2h. Αφού το ενισχυμένο δείγμα βγει από τη συσκευή χρησιμοποιείται άμεσα σε κάποια άλλη τεχνική ή διατηρείται στους -20 °C επ' αόριστον.

### 3.2.3 Ποιοτικός έλεγχος των PCR προϊόντων με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

Για να επιβεβαιωθεί ο πολλαπλασιασμός του DNA χρησιμοποιείται ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης, καθώς το DNA μετακινείται σε ηλεκτρικό πεδίο λόγω του αρνητικού φορτίου.

#### Συστατικά

Για την παρασκευή πηκτώματος αγαρόζης απαιτούνται: αγαρόζη, TAE 1X, βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr) και για το «φόρτωμα» στη μήτρα loading buffer.

- αγαρόζη: παράγοντας πήξης του πηκτώματος
- TAE (Tris, Acetic, EDTA) 1X: ρυθμιστικό διάλυμα. Το ρυθμιστικό διάλυμα TAE 1X παρασκευάζεται από stock διάλυμα 50X με ανάμιξη 20 ml 50X TAE και 980ml dd-H<sub>2</sub>O.
  - Τα 500 ml του 50x TAE περιέχουν :
  - Tris 121 gr
  - Οξικό οξύ 28,5ml
  - EDTA 0,5M 50ml
  - dd-H<sub>2</sub>O μέχρι τα 500ml

- Βρωμιούχο αιθίδιο: φθορίζουσα χρωστική που παρεμβάλλεται ανάμεσα στις βάσεις του DNA και φθορίζει σε υπεριώδες φως. Είναι μεταλλαξιγόνο.
- loading buffer (6X):  
Τα 10ml περιέχουν: 1ml χρωστική μπλε της βρωμοφαινόλης  
5ml γλυκερόλη  
0,5ml TBE 20X  
3,5ml ddH<sub>2</sub>O

Στο loading buffer χρησιμοποιούνται χρωστικές για τον έλεγχο της ηλεκτροφόρησης και για το σωστό φόρτωμα των δειγμάτων στα «πηγάδια». Η γλυκερόλη χρησιμοποιείται ως μεγαλομοριακή ουσία ώστε να αυξάνεται η ειδική πυκνότητα και το DNA να καθιζάνει στο «πηγάδι».

\*TBE (Tris/Borate/EDTA) : 1L TBE 5X περιέχει: 53g Tris, 27.5 βορικό οξύ, 20ml EDTA 0.5M

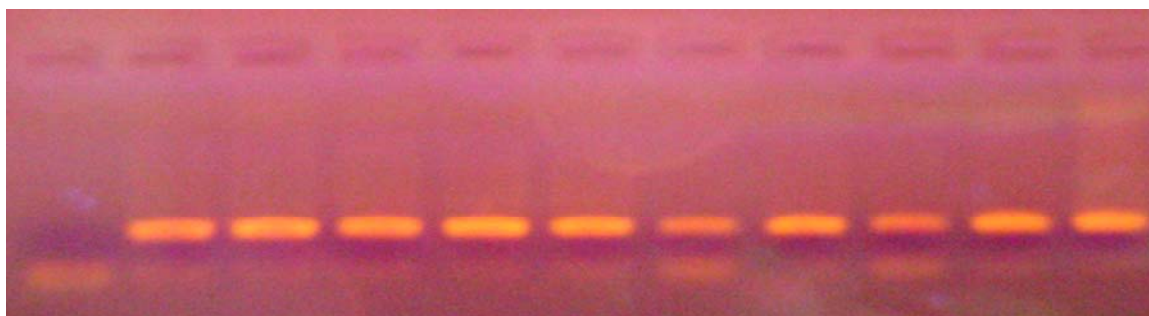
Για την παρασκευή πηκτώματος αγαρόζης 2%, 40ml χρησιμοποιούνται οι ακόλουθες ποσότητες:

Αγαρόζη	0,6gr
TAE 1X	40ml
EtBr	4μl

Η διαδικασία έχει ως εξής:

1. Ζύγιση 0,6gr αγαρόζης και ανάμειξη με 40ml TAE 1X σε κωνική φιάλη.
2. Θέρμανση του διαλύματος σε φούρνο μικροκυμάτων για 1-2min (για να πραγματοποιηθεί ο πολυμερισμός της αγαρόζης)
3. Προσθήκη 4μl EtBr αφού κρυώσει το διάλυμα.
4. Διάχυση του διαλύματος στη μήτρα όπου θα στερεοποιηθεί το πήκτωμα. Προηγουμένως έχουν τοποθετηθεί στη μήτρα τα «χτενάκια» για να δημιουργηθούν οι θέσεις φόρτωσης των δειγμάτων, όταν πήξει η αγαρόζη. Το διάλυμα αγαρόζης πήζει σε 10-15min και τότε μπορούν να αφαιρεθούν και τα «χτενάκια».
5. Τοποθέτηση της μήτρας με το πήκτωμα σε οριζόντια συσκευή ηλεκτροφόρησης που περιέχει ρυθμιστικό διάλυμα TAE 1X.
6. Φόρτωμα των δειγμάτων στα «πηγάδια»: αναμιγνύονται 3μl loading buffer και 5μl δείγματος.

Εφαρμόζεται τάση 180mA και τα δείγματα ηλεκτροφορούνται στο πήκτωμα μέχρι η χρωστική να διανύσει τα 2/3 της διαδρομής του μήκους του πηκτώματος. Με το τέλος της ηλεκτροφόρησης το πήκτωμα παρατηρείται σε ειδική συσκευή ακτινοβολίας UV για την εμφάνιση των ζωνών. Όσα δείγματα περιέχουν την επιθυμητή αλληλουχία ενισχυμένη εμφανίζουν μία ζώνη, ενώ αυτά που δεν έχουν δουλέψει δεν εμφανίζουν καμία ζώνη (Εικόνα 11). Τα δείγματα που περιέχουν PCR προϊόν αποθηκεύονται στους -20 °C για να χρησιμοποιηθούν σε επόμενες τεχνικές.



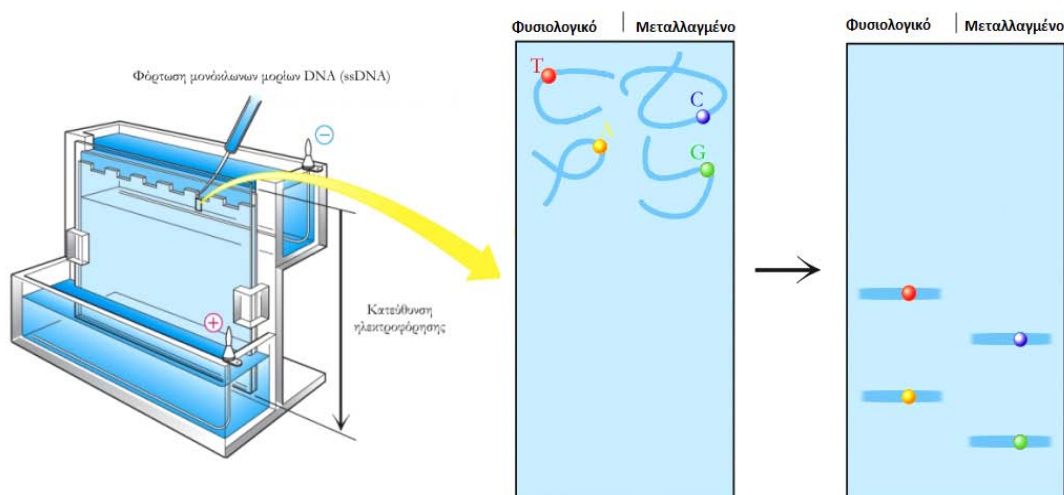
**Εικόνα 11:** Φωτογραφία από πήκτωμα αγαρόζης 2% (180mA), για τον έλεγχο PCR προϊόντων στη συσκευή ακτινοβολίας UV. Στην πρώτη διαδρομή είναι ο αρνητικός μάρτυρας και στις υπόλοιπες δείγματα στα οποία η PCR έχει δουλέψει.



## (SSCP, Single-Strand Conformation Polymorphism)

### 3.3.1 Αρχή της μεθόδου

Η μέθοδος ανάλυσης πολυμορφισμού μονόκλωνης αλυσίδας χρησιμοποιείται από το 1989 για τον εντοπισμό πολυμορφισμών και μεταλλάξεων. Πρόκειται για τον ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό μονόκλωνων νουκλεϊκών οξέων λόγω μικρών διαφορών στην αλληλουχία τους. Η κινητικότητα των δίκλωνων μορίων DNA σε πηκτώματα εξαρτάται από το μέγεθος και το μήκος του μορίου, αλλά είναι ανεξάρτητη από τη νουκλεοτιδική αλληλουχία. Αντίθετα η κινητικότητα μονόκλωνων μορίων DNA επηρεάζεται από μικρές αλλαγές στη νουκλεοτιδική αλληλουχία, όπως από μονονουκλεοτιδικούς πολυμορφισμούς (SNPs), λόγω της ασταθούς φύσης τους. Απουσία της συμπληρωματικής αλυσίδας, η μονόκλωνη αλυσίδα μπορεί να σχηματίσει ενδομοριακούς δεσμούς, οι οποίοι έχουν ως αποτέλεσμα τη δημιουργία αναδιπλώσεων και θηλιών, προσδίδοντας μια χαρακτηριστική τρισδιάστατη δομή με αποτέλεσμα να εμφανίζονται με διαφορετικά πρότυπα ζωνών σε πηκτώματα πολυακρυλαμιδίου (Εικόνα 12).



**Εικόνα 12:** Σχηματική αναπαράσταση της μεθόδου SSCP. Τα δείγματα DNA θα πρέπει να υποστούν αποδιάταξη πριν την φόρτωσή τους στο πήκτωμα. Μία σημειακή μετάλλαξη είναι ικανή να προσδώσει στη μονόκλωνη αλυσίδα τέτοια μοναδική διαμόρφωση, ώστε, μετά την ηλεκτροφόρηση, το πρότυπο της αντίστοιχης ζώνης να διαφέρει από αυτό του φυσιολογικού.

### 3.3.2 Παρασκευή πηκτώματος πολυακρυλαμίδης

Η συγκέντρωση του πηκτώματος κυμαίνεται από 8-12% και εξαρτάται από το μήκος του μορίου που έχει ενισχυθεί. Όσο πιο μικρό είναι τόσο πιο πυκνό πρέπει να είναι το πήκτωμα. Στη δικιά μας περίπτωση χρησιμοποιείται πήκτωμα 10%.

#### Συστατικά

Για 2 πηκτώματα 10% διαστάσεων 19cm x 17,5cm και πάχος 2mm με τελικό όγκο 125ml χρησιμοποιούνται:

		ΤΕΛΙΚΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ
Ακρυλαμίδιο	12,375gr	9,9% w/v
Δις- ακρυλαμίδιο	0,33gr	0,264% w/v
TBE 10X	10ml	0,8X
Γλυκερόλη 50%	12,5ml	5%
APS 20%	650μl	0,008%
TEMED	125μl	

- **Ακρυλαμίδιο και δις-ακρυλαμίδιο:** πολυμερίζονται και δίνουν το πήκτωμα.
- **TBE 10X:** ρυθμιστικό διάλυμα που καθορίζει το pH.
- **TEMED (N,N' τετραμεθυλοαιθυλενοδιαμίνη):** φωτοχημικός καταλύτης της αντίδρασης πολυμερισμού.
- **APS (υπερθειϊκό αμμώνιο):** ξεκινά την αντίδραση πολυμερισμού δημιουργώντας ελεύθερες ρίζες  $S_2O_8^{2-} \rightarrow 2 SO_4^{\bullet}$ .

Η αντίδραση ολοκληρώνεται σε 30min περίπου και το πήκτωμα έχει σχηματιστεί. Στη συνέχεια τοποθετείται σε συσκευή κάθετης ηλεκτροφόρησης.

#### Προετοιμασία και αποδιάταξη των PCR προϊόντων

Σε eppendorf του 0,5ml προστίθενται 5μl PCR προϊόντος και 10μl αποδιατακτικού διαλύματος (Denaturation Buffer).

Τα 3ml αποδιατακτικού διαλύματος περιέχουν:

95% φορμαμίδιο  
20mM EDTA

10mM NaOH

0,05% κυανούν ξυλενίου

0,05% μπλε της βρωμοφαινόλης

Ακολουθεί αποδιάταξη των δειγμάτων σε θερμικό κυκλοποιητή σύμφωνα με το ακόλουθο πρόγραμμα:

ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ	ΧΡΟΝΟΣ
92 °C	2min
95 °C	2min
97 °C	7min

Πριν ολοκληρωθεί το τελευταίο στάδιο τα δείγματα βγαίνουν και τοποθετούνται απευθείας στον πάγο για την αποφυγή της επαναδιάταξης των μονόκλωνων μορίων DNA. Στη συνέχεια τα δείγματα φορτώνονται στο πήκτωμα που βρίσκεται στη συσκευή αφού πρώτα προστεθεί σε αυτή ρυθμιστικό διάλυμα TBE 0,5X. Τα δείγματα ηλεκτροφορούνται για 22h σε τάση 220V και θερμοκρασία 4 °C.

### 3.3.3 Χρώση πηκτώματος πολυακρυλαμίδης με διάλυμα νιτρικού αργύρου (silver staining)

Για την εμφάνιση των ζωνών στο πήκτωμα γίνεται χρώση του πηκτώματος με νιτρικό άργυρο.

Για δύο πηκτώματα χρησιμοποιούνται:

Διάλυμα 1 : 800ml ddH<sub>2</sub>O + 20ml αιθανόλη 100% + 1ml CH<sub>3</sub>COOH

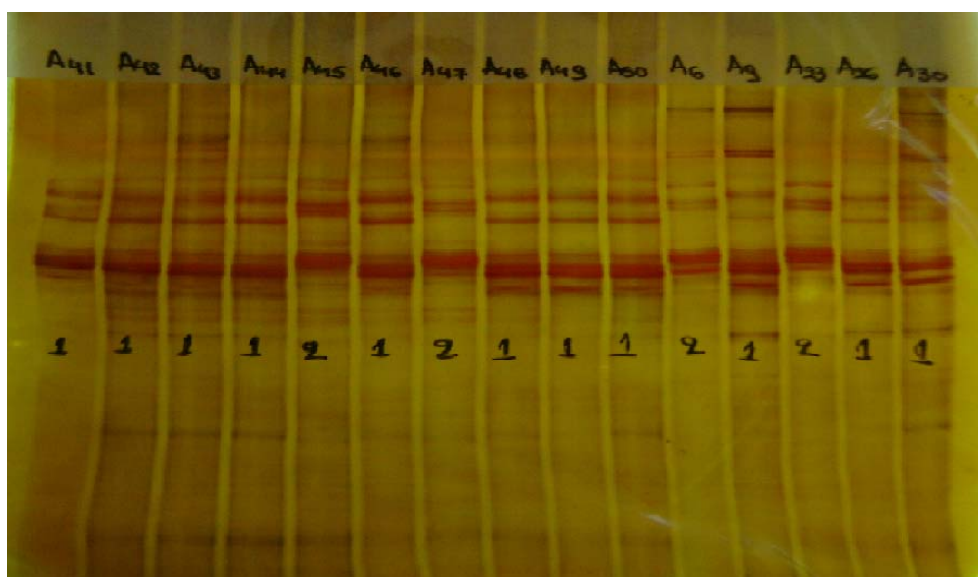
Διάλυμα 2 : 400ml AgNO<sub>3</sub> 1gr / l (1gr AgNO<sub>3</sub> σε 1 l ddH<sub>2</sub>O)

Διάλυμα 3 : 6gr NaOH + 0,02gr NaBH<sub>4</sub> + 2 ml HCHO και ddH<sub>2</sub>O έως 400ml

Η διαδικασία της χρώσης πραγματοποιείται υπό ανακίνηση και έχει ως εξής:

1. ανακίνηση του πηκτώματος με 200 ml του διαλύματος 1 για 3min
2. απομάκρυνση του διαλύματος
3. ανακίνηση του πηκτώματος με 200 ml του διαλύματος 1 για 3min
4. απομάκρυνση του διαλύματος και ξέπλυμα με ddH<sub>2</sub>O
5. ανακίνηση με το διάλυμα 2 για 20 min
6. απομάκρυνση του διαλύματος και ξέπλυμα με ddH<sub>2</sub>O δύο φορές
7. ανακίνηση με το διάλυμα 3 έως την εμφάνιση χρώματος και ζωνών
8. απομάκρυνση του διαλύματος και ξέπλυμα με ddH<sub>2</sub>O

Τα πηκτώματα παρατηρούνται για την εμφάνιση διαφορετικών προτύπων ηλεκτροφόρησης (Εικόνα 13). Τα δείγματα που εμφανίζουν διαφορετικά πρότυπα επιλέγονται για να σταλούν για αλληλούχιση, αφού πρώτα γίνει καθαρισμός.



**Εικόνα 13:** Πήκτωμα πολυακρυλαμίδης 10% (22h, 220V, 4°C) μετά από χρώση με νιτρικό άργυρο. Στο συγκεκριμένο πήκτωμα εμφανίζονται δύο διαφορετικά πρότυπα, το 1 και το 2.

### 3.4 ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ PCR ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ

Ο καθαρισμός των PCR προϊόντων που πρόκειται να σταλούν για αλληλούχιση γίνεται με Invitrogen™ Kit. Με τη διαδικασία αυτή απομακρύνονται εκκινητές, νουκλεοτίδια, πολυμεράση, άλατα που μπορεί να έχουν παραμείνει στο διάλυμα μαζί με τα PCR προϊόντα και ίσως να προκαλέσουν προβλήματα ανάγνωσης στη διαδικασία της αλληλούχισης.

1. Προσθέτουμε 200μl από το διάλυμα σύνδεσης (Binding buffer) με 50μl PCR προϊόντος, σε eppendorf των 750μl. Για να ανακτήσουμε ολόκληρη την ποσότητα του PCR προϊόντος ξεπλένουμε με 50 μl Binding buffer ακόμη το eppendorf του PCR προϊόντος και το προσθέτουμε στο eppendorf.
2. Τοποθετούμε τις στήλες PureLink™ Spin σε eppendorf των 2ml.
3. Μεταφέρουμε προσεκτικά το περιεχόμενο από το βήμα 1 στις στήλες PureLink™ Spin και φυγοκεντρούμε για 1 λεπτό στις 10000g. Σε αυτό το βήμα πραγματοποιείται η πρόσδεση των επιθυμητών αλληλουχιών πάνω στη στήλη.
4. Απομακρύνουμε το έκλουσμα και τοποθετούμε τη στήλη στον ίδιο σωλήνα συλλογής.
5. Προσθέτουμε 650μl από το διάλυμα πλύσης (washing buffer) και φυγοκεντρούμε για 1 λεπτό στις 10000g.
6. Απομακρύνουμε το έκλουσμα και τοποθετούμε τη στήλη στον ίδιο σωλήνα συλλογής. Φυγοκεντρούμε ξανά για 2-3 λεπτά. Είναι πολύ σημαντικό να μην μείνει καθόλου αιθανόλη από το διάλυμα πλύσης μέσα στη στήλη.
7. Τοποθετούμε τις στήλες PureLink™ Spin σε 1,7ml PureLink™ elution tube που δίνεται μαζί με το kit.
8. Προσθέτουμε προσεκτικά 50μl από το διάλυμα έκλυσης (elution buffer) και επωάζουμε τα δείγματα για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου.
9. Τέλος, φυγοκεντρούμε στις 13.000 στροφές για 2 λεπτά για ανάκτηση του καθαρισμένου DNA.

Στη συνέχεια, ακολουθεί υπολογισμός της ποσότητας του PCR προϊόντος ποσοτικά με φωτόμετρο (1μl και 49μl dd-H<sub>2</sub>O) ή ποιοτικά με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 2%.

#### Λυοφιλίωση

Τα δείγματα που πρόκειται να σταλούν για αλληλούχιση πρέπει να είναι σε στερεή μορφή (ίζημα) και για να επιτευχθεί αυτό ακολουθείται η εξής διαδικασία:

Για κάθε δείγμα των 50μl:

1. προσθήκη 300μl παγωμένης EtOH 100% και 10μl CH<sub>3</sub>COONa (3M)
2. ελαφριά ανάδευση (flip-flop)
3. επώαση των δειγμάτων overnight στους -20 °C
4. την επόμενη μέρα: φυγοκέντρωση σε 13.000rpm για 20min στους 4 °C
5. απομάκρυνση του υπερκειμένου
6. ξήρανση στους 37 °C περίπου για 1h

Μαζί με τα δείγματα που στέλλονται για αλληλούχιση αποστέλλονται και οι αντίστοιχοι εκκινητές για τη χρήση τους στη διαδικασία της αλληλούχισης. Οι εκκινητές αραιώνονται σε τελικό όγκο 20μl (4μl εκκινητή+ 16μl H<sub>2</sub>O).

## 3.5 ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗ

### 3.5.1 ΜΕΘΟΔΟΣ ΤΕΡΜΑΤΙΣΜΟΥ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΗΣ ΑΛΥΣΙΔΑΣ ΜΕ ΔΙ-ΔΕΟΞΥΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΑ (Μέθοδος Sanger)

#### Αρχή μεθόδου

Η ενζυμική μέθοδος κατά Sanger χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας μορίων DNA. Βασίζεται στην ενζυμική σύνθεση ενός σημασμένου μορίου DNA χρησιμοποιώντας ειδικά τροποποιημένα νουκλεοτίδια, τα διδεοξυνουκλεοτίδια (ddNTPs). Τα ddNTPs δεν έχουν στη θέση 3' την –OH ομάδα, που έχουν τα dNTPs, αλλά αντί αυτής έχουν –H. Αυτά τα μόρια ενσωματώνονται στην υπό σύνθεση αλυσίδα DNA από την DNA πολυμεράση μέσω των 5' φωσφορικών ομάδων, όπως και τα συνηθισμένα δεοξυνουκλεοτίδια. Όμως δεν έχουν την 3'-OH ομάδα που είναι απαραίτητη για το σχηματισμό του φωσφοδιεστερικού δεσμού με το επόμενο νουκλεοτίδιο στην αναπτυσσόμενη αλυσίδα και συνεπώς, η ανάπτυξη της αλυσίδας σταματάει σε εκείνο ακριβώς το σημείο όπου έχει ενσωματωθεί το συγκεκριμένο ddNTP.

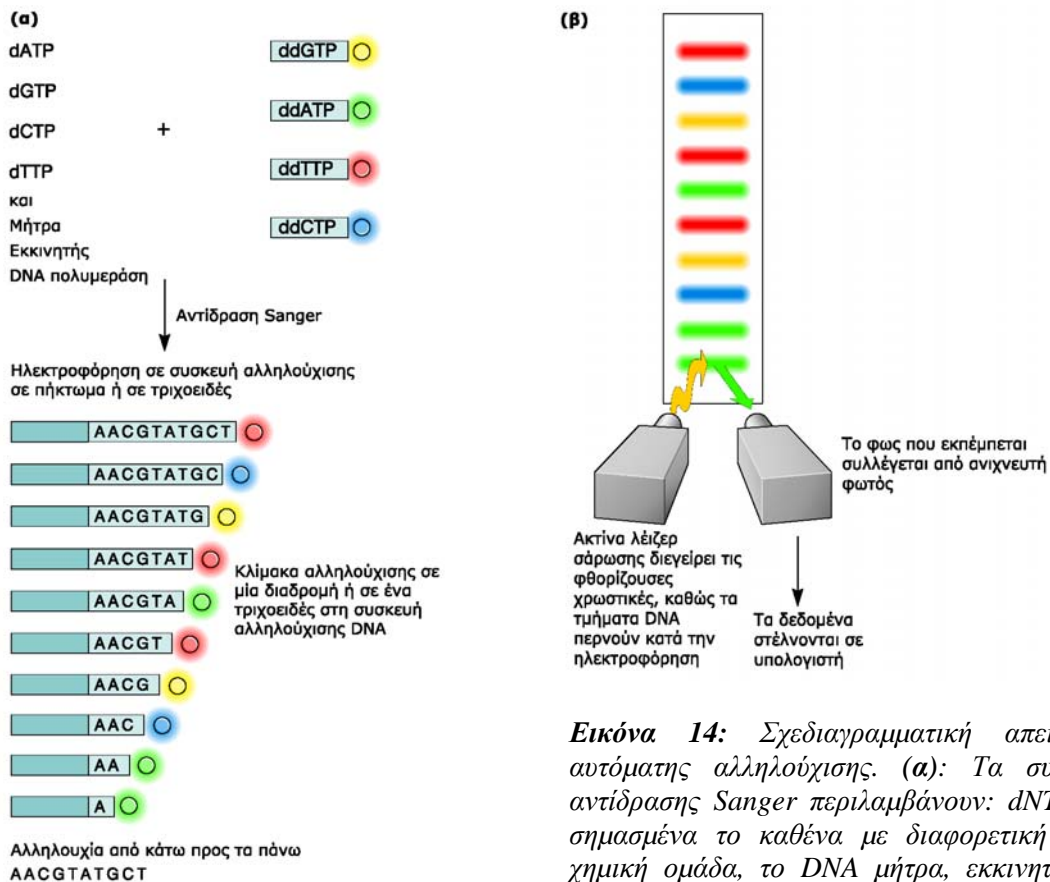
Συνοπτικά η διαδικασία έχει ως εξής:

- Αποδιάταξη του δίκλωνου DNA για να δημιουργηθεί μονόκλωνη μήτρα.
- Σήμανση του εκκινητή ή των νουκλεοτιδίων.
- Προσθήκη σε κάθε δείγμα εκκινητή, μίγμα από τα 4 δεοξυριβονουκλεοτίδια dNTPs, DNA πολυμεράση και ένα από τα τέσσερα διδεοξυνουκλεοτίδια (ddNTPs). Εκτελούνται τέσσερις διαφορετικές αντιδράσεις ταυτόχρονα.
- Αντιδράσεις επέκτασης και δημιουργία τμημάτων DNA διάφορων μεγεθών.
- Αποδιάταξη του DNA και ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου, όπου τα κομμάτια διαχωρίζονται βάση μεγέθους. Όταν τα προϊόντα των τεσσάρων αντιδράσεων ηλεκτροφορούνται στη σειρά, η ακολουθία με την οποία τα νουκλεοτίδια προστίθενται στον εκκινητή μπορεί να βρεθεί από τα αυξανόμενου μεγέθους διαδοχικά θραύσματα που προκύπτουν στις τέσσερις σειρές ηλεκτροφόρησης. Η θέση των θραυσμάτων εμφανίζεται με τη σήμανση ραδιενεργή ή φθορίζουσα.

### 3.5.2 Αυτόματη αλληλούχιση

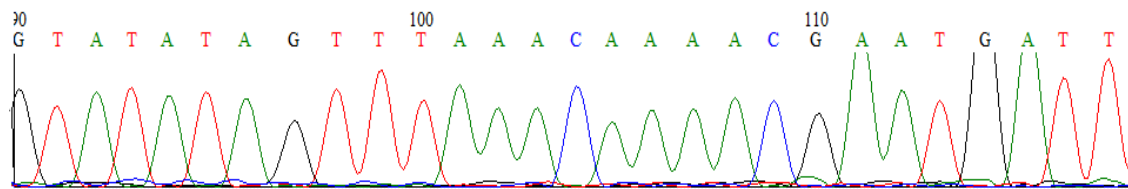
Για την αλληλούχιση ενός τμήματος DNA πραγματοποιείται μια σύνθετη αντίδραση τερματισμού. Η αντίδραση γίνεται παρουσία των τεσσάρων κανονικών dNTPs, σε σχετικά μεγάλη συγκέντρωση, και τεσσάρων ddNTPs, σε μικρότερη συγκέντρωση, τα οποία είναι σημασμένα το καθένα με διαφορετική φθορίζουσα χημική ομάδα. Η αλληλούχιση τεσσάρων χρωμάτων βασίζεται στην αρχή σήμανσης καθενός από τα τέσσερα ddNTPs με διαφορετική φθορίζουσα ομάδα. Οι φθορίζουσες χρωστικές συνδέονται στα ddNTPs με τρόπο που δεν εμποδίζει την DNA πολυμεράση να δράσει και να προσθέτει τη συμπληρωματική βάση τους στη DNA μήτρα. Κατά τις αντιδράσεις επέκτασης σχηματίζεται μίγμα προϊόντων τερματισμού που μπορεί να έχουν οποιαδήποτε από τις τέσσερις βάσεις στο 3' άκρο τους. Τα προϊόντα αυτά προκύπτουν από την ενσωμάτωση ενός ddNTP σε μια τυχαία θέση κατά τη σύνθεση. Επειδή οι τέσσερις φθορίζουσες χρωστικές που χρησιμοποιούνται εκπέμπουν φωτεινή ακτινοβολία σε διαφορετικό μήκος κύματος, λόγω των διαφορετικών χρωμάτων, η ταυτότητα της βάσης στην οποία τερματίζεται η σύνθεση αντιστοιχεί στο χρώμα του ddNTP που έχει ενσωματωθεί στο 3' άκρο. Τα προϊόντα

της αντίδρασης φορτώνονται και αναλύονται στην ίδια διαδρομή του πηκτώματος ή σε ένα τριχοειδές σωληνάκι μιας συσκευής αυτόματης αλληλούχισης. Καθώς η κλίμακα των σημασμένων προϊόντων τερματισμού ηλεκτροφορείται στη συσκευή αυτόματης αλληλούχισης, κάθε τμήμα «φωτίζεται» από το λέιζερ του ανιχνευτή. Πρόκειται για μια ακτίνα φωτός με μήκος κύματος που διεγείρει και τις τέσσερις φθορίζουσες χρωστικές. Οι διεγερμένες χρωστικές επανέρχονται στο ενεργειακό επίπεδο ηρεμίας εκπέμποντας φως συγκεκριμένου μήκους κύματος χαρακτηριστικό για κάθε χρωστική. Ο αισθητήρας του ανιχνευτή καταγράφει την ένταση και το μήκος κύματος του φωτός και στέλνει ένα σήμα στον υπολογιστή που είναι συνδεδεμένος με τη συσκευή αλληλούχισης (Εικόνα 14).



**Εικόνα 14:** Σχεδιαγραμματική απεικόνιση της αυτόματης αλληλούχισης. (α): Τα συστατικά της αντίδρασης Sanger περιλαμβάνουν: dNTPs, ddNTPs σημασμένα το καθένα με διαφορετική φθορίζουσα χημική ομάδα, το DNA μήτρα, εκκινητές και DNA πολυμεράση. Κατά τις αντιδράσεις επέκτασης σχηματίζεται μίγμα προϊόντων τερματισμού που μπορεί να έχουν οποιαδήποτε από τις τέσσερις βάσεις στο 3' άκρο τους. Τα προϊόντα αυτά έχουν διαφορετικό μέγεθος προκύπτουν από την ενσωμάτωση ενός ddNTP σε μια τυχαία θέση κατά τη σύνθεση. (β): Η κλίμακα των σημασμένων προϊόντων τερματισμού ηλεκτροφορείται στη συσκευή αυτόματης αλληλούχισης και «φωτίζεται» από το λέιζερ του ανιχνευτή το οποίο διεγείρει τις φθορίζουσες ουσίες και δίνουν σήμα.

Η κατανομή των σημάτων από την ακτινοβολία εκπομπής των τεσσάρων χρωστικών, κατά την ηλεκτροφόρηση ενός τμήματος, αναπαριστάται στο γράφημα εκπομπής. Στο γράφημα εκπομπής καθεμία από τις βάσεις παριστάνεται με διαφορετικό χρώμα. Στον οριζόντιο άξονα αντιπροσωπεύεται ο χρόνος από την έναρξη της ηλεκτροφόρησης, ενώ στον κατακόρυφο άξονα η ένταση των αντίστοιχων σημάτων. Κάποια τμήματα DNA δίνουν πολύ καθαρές, οξείες κορυφές, ενώ άλλες είναι πιο αμβλείες και επικαλύπτονται με γειτονικά σήματα ( *Εικόνα 15*).



*Εικόνα 15: Χρωματογράφημα για γονίδιο από δείγμα που στάλθηκε για αλληλούχηση.*

Για την επεξεργασία των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκαν τα προγράμματα: BIOEDIT 7.0 και CLUSTALX 1.8. Το πρώτο χρησιμεύει στην «ανάγνωση» της αλληλουχίας του κάθε γονιδίου που απεικονίζεται με τη μορφή χρωματογραφήματος. Με τον τρόπο αυτό συγκρίνοντας τη ζητούμενη αλληλουχία με μια πρότυπη, εντοπίζουμε τυχόν σημειακές μεταλλάξεις, την προσθήκη ή την έλλειψη βάσει των διαφορών στις κορυφές τους. Το δεύτερο χρησιμεύει για πολλαπλή ομοπαράθεση της ζητούμενης αλληλουχίας με μια πρότυπη, για την επιβεβαίωση της σωστής ανάγνωσης της αλληλουχίας με το BIOEDIT.

### **3.6 ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΣ ΜΗΚΟΥΣ ΤΜΗΜΑΤΩΝ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΥ (RFLP, Restriction Fragment Length Polymorphism )**

Πολλά βακτήρια παράγουν ένζυμα που ονομάζονται ενδονουκλεάσες περιορισμού. Τα ένζυμα αυτά προστατεύουν τα βακτήρια αποικοδομώντας ξένο προς αυτά DNA. Κάθε ένζυμο περιορισμού αναγνωρίζει μια συγκεκριμένη αλληλουχία μήκους τεσσάρων με οκτώ νουκλεοτιδίων. Αυτές οι αλληλουχίες, που υπάρχουν στο γενετικό υλικό του ίδιου του βακτηρίου, προστατεύονται χάρη στη μεθυλίωση μιας τριφωσφορικής αδενοσίνης ή τριφωσφορικής κυτοσίνης, ενώ αλληλουχίες ξενιστών που δεν είναι μεθυλιωμένες, αποκόπτονται από τις ενδονουκλεάσες περιορισμού. Μια συγκεκριμένη ενδονουκλεάση περιορισμού θα κόψει σε μια σειρά συγκεκριμένων τμημάτων οποιοδήποτε δίκλωνο μόριο DNA που έχει απομονωθεί από ένα κύτταρο. Τα τμήματα αυτά ονομάζονται τμήματα περιορισμού. Συγκρίνοντας το μέγεθος των τμημάτων περιορισμού που έχουν παραχθεί από μια συγκεκριμένη γενετική περιοχή μετά την επεξεργασία της με ένα συνδυασμό διαφορετικών ενζύμων περιορισμού, δημιουργείται ένας χάρτης περιορισμού.

### 3.6.1 Ενίσχυση του γονιδίου COI - Διαδικασία πέψης

Πριν από την πέψη προηγείται ενίσχυση της κατάλληλης αλληλουχίας (γονίδιο COI) με τους εξής εκκινητές: FW 5' CTCTGAGCCCTAGGATTCATC 3' και RV 5'GTGGTGTATGCATCGGGGTA 3'. Το πρόγραμμα που ακολουθείται για την PCR είναι:

x35  
κύκλους

95°C για 4min

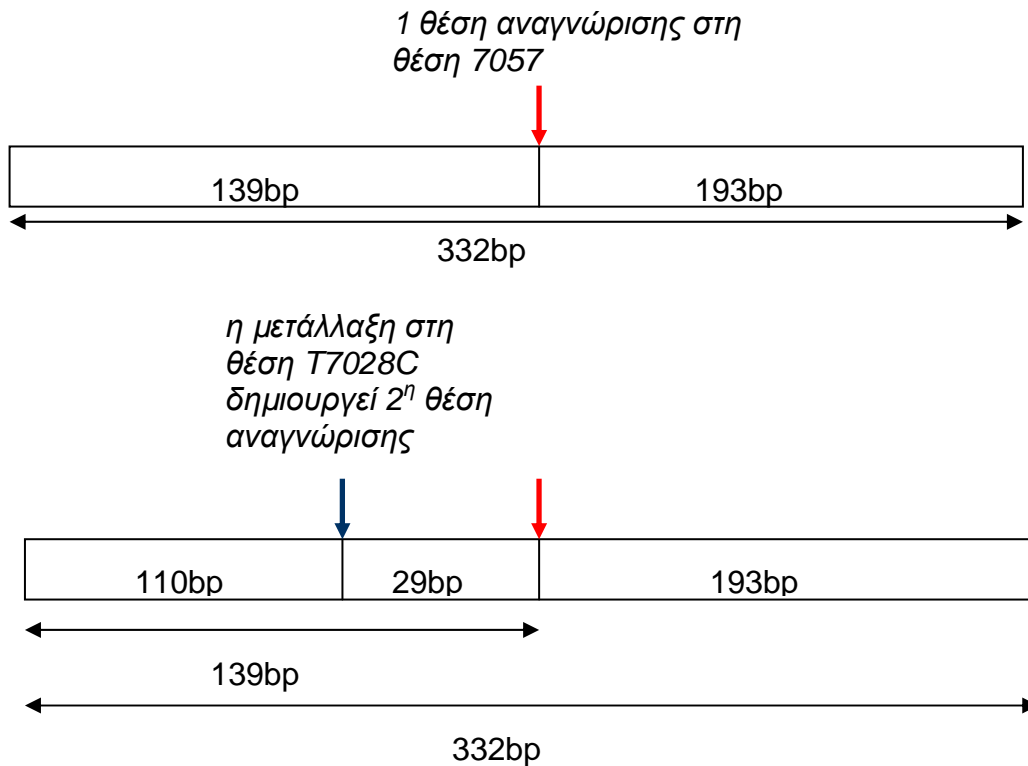
{ 95°C για 40sec  
59°C για 50sec  
72°C για 50sec

72°C για 10min

Η αλληλουχία που αναγνωρίζει το ένζυμο Alu I είναι 5'AGCT 3' και κόβει ανάμεσα από το GC. Το κομμάτι που ενισχύεται έχει μέγεθος 332bp (ανάμεσα στα μπλε γράμματα). Μέσα σε αυτό η αλληλουχία αναγνώρισης υπάρχει μια φορά στη θέση 7057 (κόκκινα γράμματα), οπότε αν γίνει πέψη με το Alu I προκύπτουν δύο ζώνες με μέγεθος 193bp και 139bp. Αν όμως γίνει μετάλλαξη στη θέση 7028 (γαλάζια επισήμανση) και από C γίνει T, τότε δημιουργείται και δεύτερη θέση αναγνώρισης μέσα στο κομμάτι με αποτέλεσμα μετά από πέψη με Alu I να υπάρχουν 3 ζώνες 193bp, 10bp και 29bp (*Εικόνα 16*).

```
6901aatgatctgc tgcagtgctc tgagccctag gattcatctt tcttttcacc gtaggtggcc
6961tgactggcat tgtattagca aactcatcac tagacatcgt actacacgac acgtactacg
7021ttgtagcaca cttccactat gtcctatcaa tagggctgt atttgccatc ataggaggct
7081tcattcactg atttccccta ttctcaggct acaccctaga ccaaacctac gccaaaatcc
7141atttcactat catattcatc ggcgtaaadc taactttctt cccacaacac tttctcggcc
7201tatccggaat gccccgacgt tactcggact accccgatgc atacaccaca tgaaacatcc
7261tatcatctgt aggctcattc atttctctaa cagcagtaat attaataatt ttcatgattt
```





**Εικόνα 16:** Σχηματική απεικόνιση των ζωνών του κομματιού 332bp του γονιδίου COI που εμφανίζονται μετά από πέψη με *Alu I* πάνω χωρίς και κάτω με τη μετάλλαξη στη θέση 7028.

Στην αντίδραση πέψης χρησιμοποιούνται 2μl από τα κατάλληλα PCR προϊόντα. Για τελικό όγκο 10μl το διάλυμα περιέχει:

- 2μl DNA
- 0,2μl ενζύμου *Alu I* (4U)
- 1μl NEB buffer (10x)
- 6,8μl dd-H<sub>2</sub>O

Τα δείγματα επωάζονται overnight στους 37°C.

### 3.6.2 Παρασκευή πηκτώματος πολυακρυλαμιδίου

Το πήκτωμα αυτή τη φορά έχει 8% περιεκτικότητα σε ακρυλαμίδιο καθώς επίσης και αποδιατακτικές ιδιότητες λόγω της παρουσίας ουρίας. Για 62,5ml (για 1 gel) οι ποσότητες των αντιδραστηρίων είναι:

- 8 gr Ουρίας
- 16,625 ml από μητρικό διάλυμα ακρυλαμιδίου 30% ( $V_{\text{τελ}}=100\text{ml}$ )
- 29 gr Ακρυλαμίδιο
- 1 gr Δις-ακρυλαμίδιο
- Συμπληρώνουμε με H<sub>2</sub>O έως τα 100ml
- 8,25 ml TBE 10x
- Διηθούμε και συμπληρώνουμε με H<sub>2</sub>O έως τα 62,5ml και προσθέτουμε:
- 83,75 μl TEMED

- 200  $\mu$ l APS 20%

Ο χρόνος που απαιτείται για να πήξει το πήκτωμα κυμαίνεται από μισή έως 1 ώρα.

Παράλληλα με τα δείγματα είναι απαραίτητη, η παρουσία ladder. Έτσι για την ηλεκτροφόρηση στο πήκτωμα ετοιμάζουμε:

- Ladder (100bp) 2 $\mu$ l + 4  $\mu$ l loading buffer (η σύστασή του είναι αυτή που αναφέρθηκε παραπάνω).
- DNA δείγμα (το οποίο επώαστηκε με το AluI overnight) 10 $\mu$ l + 4 $\mu$ l loading buffer

Οι συνθήκες ηλεκτροφόρησης είναι :

- 2,5 ώρες (έως η χρωστική να φτάσει στο κάτω μέρος του πηκτώματος)
- 220V

## 4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στους 50 ασθενείς με Alzheimer εντοπίστηκαν συνολικά 4 μεταλλάξεις. Οι δύο από αυτές, T10007C και T10034C, εντοπίζονται στο tRNA<sup>Gly</sup> και οι άλλες δύο, A10398G και C10128T, στη ND3 υπομονάδα του συμπλόκου I της αναπνευστικής αλυσίδας.

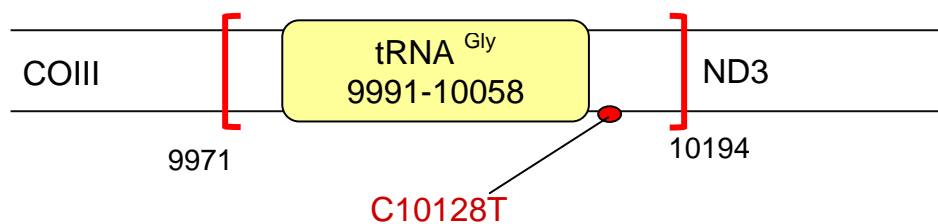
Στα 58 δείγματα από τα άτομα χωρίς κάποιο κλινικό σύμπτωμα για το γονίδιο tRNA<sup>Arg</sup> βρέθηκαν 3 μεταλλάξεις, A10398G, T10321C και T10463C. Από τα 58 «φυσιολογικά» δείγματα εξετάστηκαν 46 για μεταλλάξεις στο γονίδιο tRNA<sup>Phe</sup> βρέθηκε 1 μετάλλαξη η G709A.

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

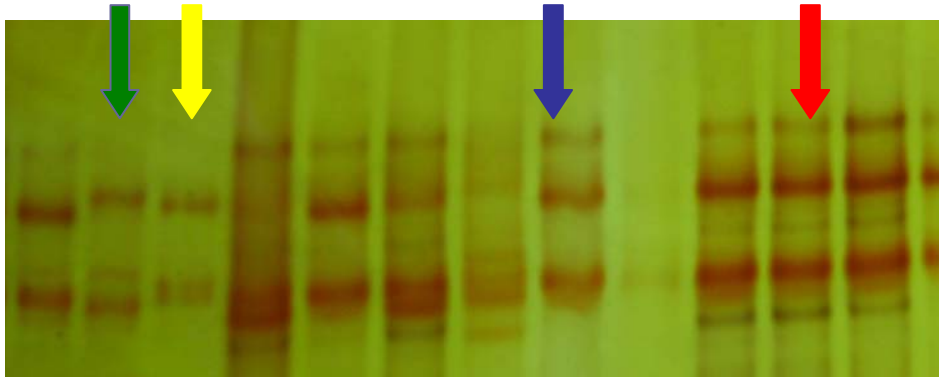
Για το τμήμα των 224bp που κωδικοποιεί το γονίδιο tRNA<sup>Gly</sup> καθώς και για τμήματα των παρακείμενων γονιδίων COIII και ND3 εντοπίστηκαν 3 μεταλλάξεις. Οι δύο από αυτές εντοπίζονται στο tRNA<sup>Gly</sup> και η άλλη στη ND3 υπομονάδα του συμπλόκου I της αναπνευστικής αλυσίδας (Πίνακας 5).

*Πίνακας 5: Μεταλλάξεις που βρέθηκαν στο γονίδιο tRNA<sup>Gly</sup> και στις παρακείμενες περιοχές.*

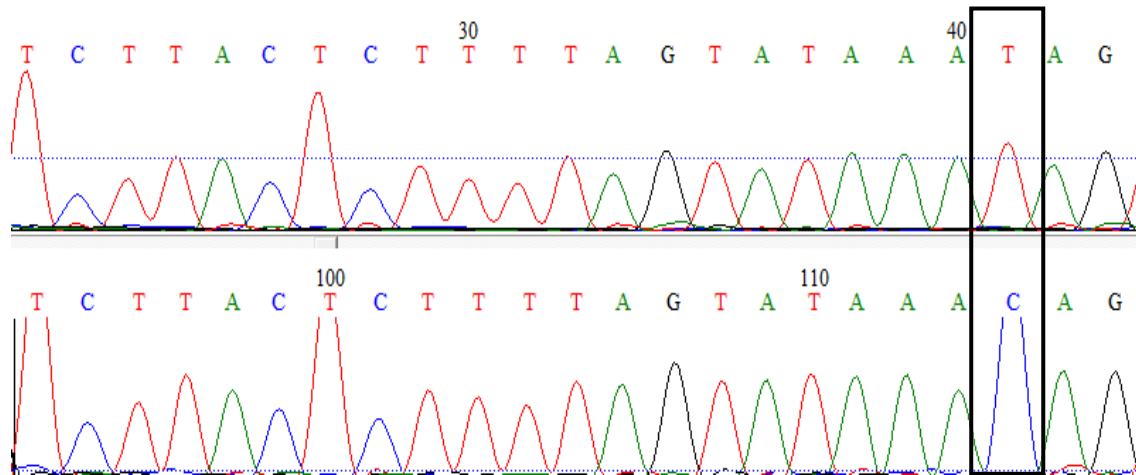
ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ	ΓΕΝΕΤΙΚΟΣ ΤΟΠΟΣ	ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ
T10007C	tRNA <sup>Gly</sup>	1/50 (2%)
T10034C	tRNA <sup>Gly</sup>	1/50 (2%)
C10128T	ND3	1 / 50 (2%)



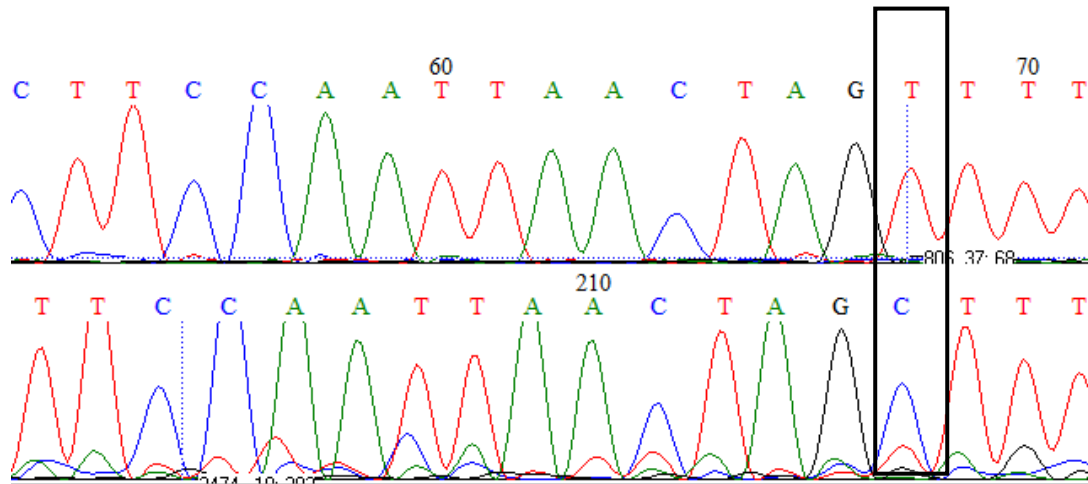
*Εικόνα 17: Οι μεταλλάξεις που βρέθηκαν στις παρακείμενες περιοχές (COIII, ND3) του γονιδίου tRNA<sup>Gly</sup>.*



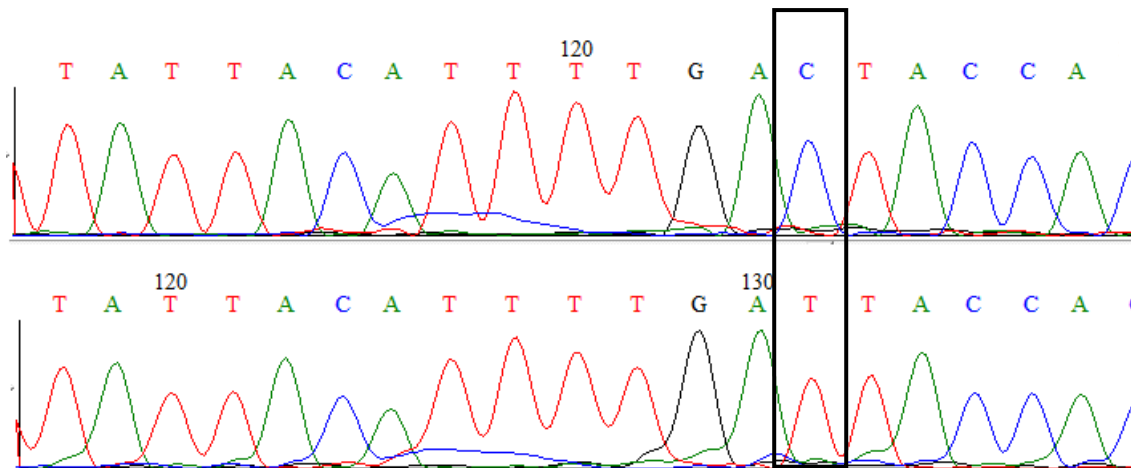
**Εικόνα 18:** Στο πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου 10% (22h,220V,4°C) απεικονίζονται με το πράσινο βέλος το πρότυπο της μετάλλαξης tRNA<sup>Gly</sup> T10007C, με το κίτρινο βέλος το πρότυπο του πολυμορφισμού tRNA<sup>Gly</sup> T10034C, με το μπλε βέλος το πρότυπο της μετάλλαξης C10128T (ND3) και με το κόκκινο βέλος το πρότυπο που δε φέρει καμία μετάλλαξη.



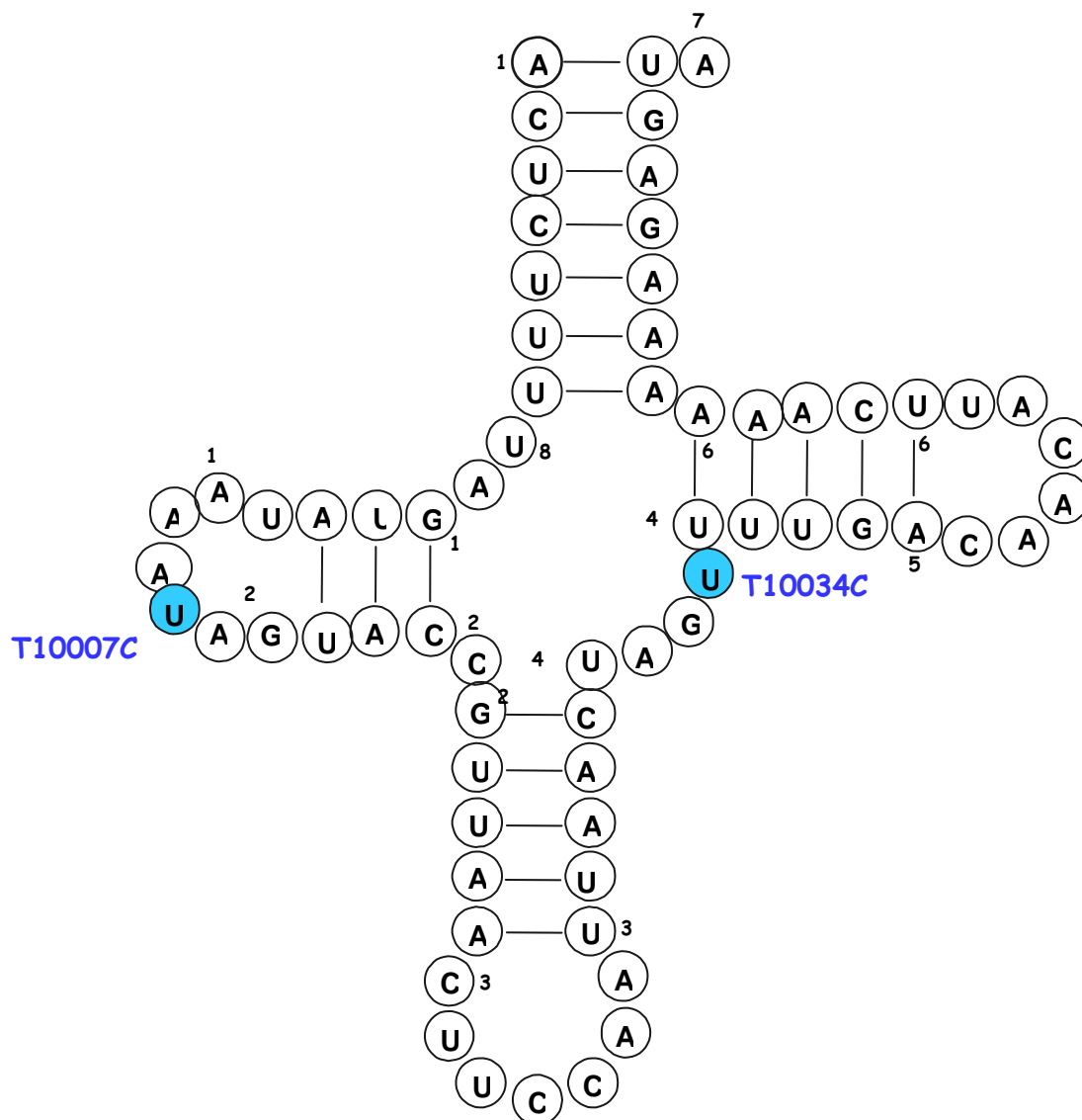
**Εικόνα 19:** Χρωματογράφημα sequencing τμήματος του γονιδίου tRNA<sup>Gly</sup> σε άτομο control (πάνω) και στο άτομο A12(κάτω). Είναι εμφανής η μετάπτωση T→C στη θέση 10007.



**Εικόνα 20:** Χρωματογράφημα sequencing τμήματος του γονιδίου  $tRNA^{Gly}$  σε άτομο control (πάνω) και στο άτομο A14(κάτω). Είναι εμφανής η μετάπτωση  $T \rightarrow C$  στη θέση 10034.



**Εικόνα 21:** Χρωματογράφημα sequencing τμήματος του γονιδίου ND3 σε άτομο control (πάνω) και στο άτομο A23(κάτω). Είναι εμφανής η μετάπτωση  $C \rightarrow T$  στη θέση 10128.



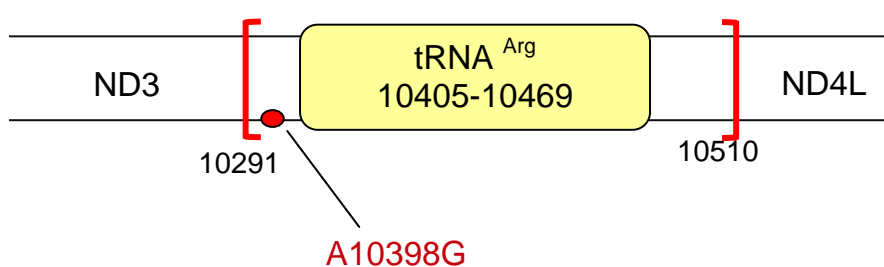
**Εικόνα 22:** Οι μεταλλάξεις που βρέθηκαν στο tRNA<sup>Gly</sup>. Οι γαλάζιες επισημάνσεις παραπέμπουν στη θέση που επηρεάζει η μετάλλαξη.

## 4.2 ΓΟΝΙΔΙΟ $tRNA^{Arg}$ ΚΑΙ ΠΑΡΑΚΕΙΜΕΝΕΣ ΠΕΡΙΟΧΕΣ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ALZHEIMER

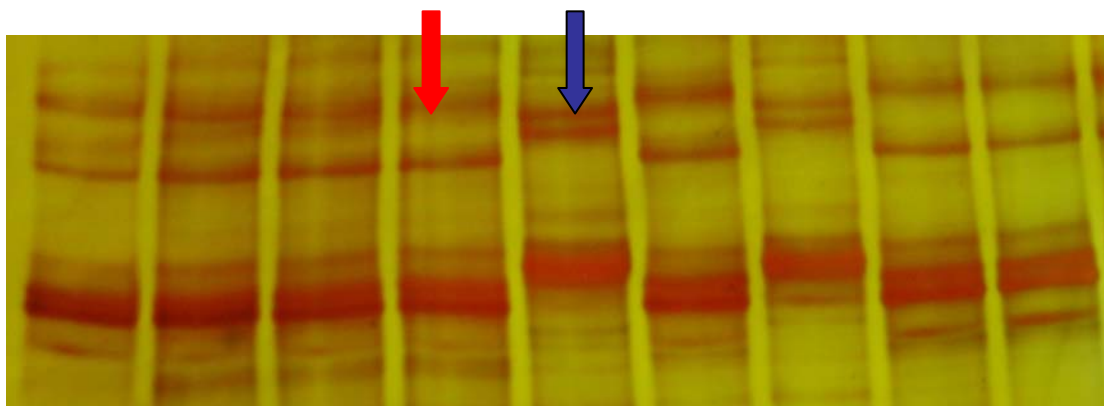
Για το τμήμα των 227bp που κωδικοποιεί το γονίδιο  $tRNA^{Arg}$  καθώς και για τμήματα των παρακείμενων γονιδίων ND3 και ND4L δε βρέθηκε κάποια μετάλλαξη στο  $tRNA^{Arg}$ . Ωστόσο βρέθηκε η μετάλλαξη A10398G στην ND3 υπομονάδα του συμπλόκου I της αναπνευστικής αλυσίδας (Πίνακας 6).

**Πίνακας 6:** Μεταλλάξεις που βρέθηκαν στο γονίδιο  $tRNA^{Arg}$  και στις παρακείμενες περιοχές.

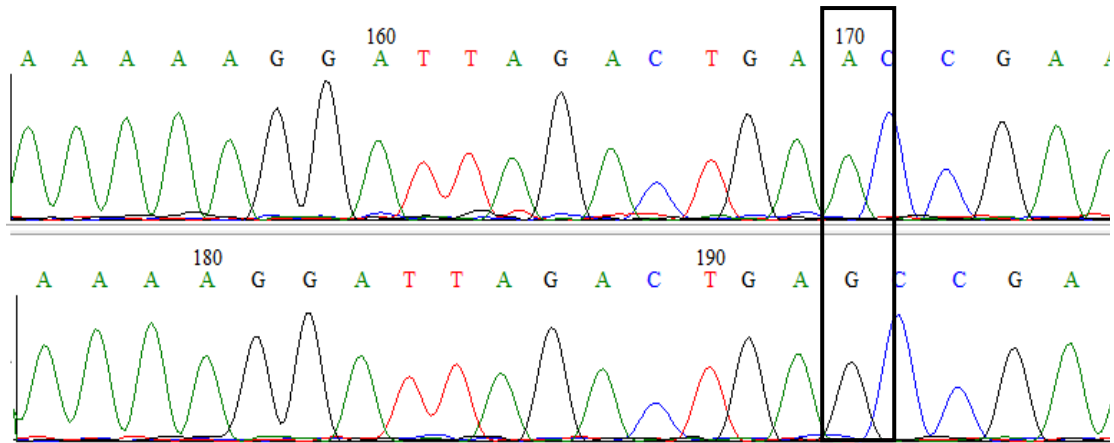
ΜΕΤΑΛΛΑΞΗ	ΓΕΝΕΤΙΚΟΣ ΤΟΠΟΣ	ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ
A10398G	ND3	10/50 (20%)



**Εικόνα 23:** Η μετάλλαξη που βρέθηκε σε παρακείμενη περιοχή (ND3) του  $tRNA^{Arg}$ .

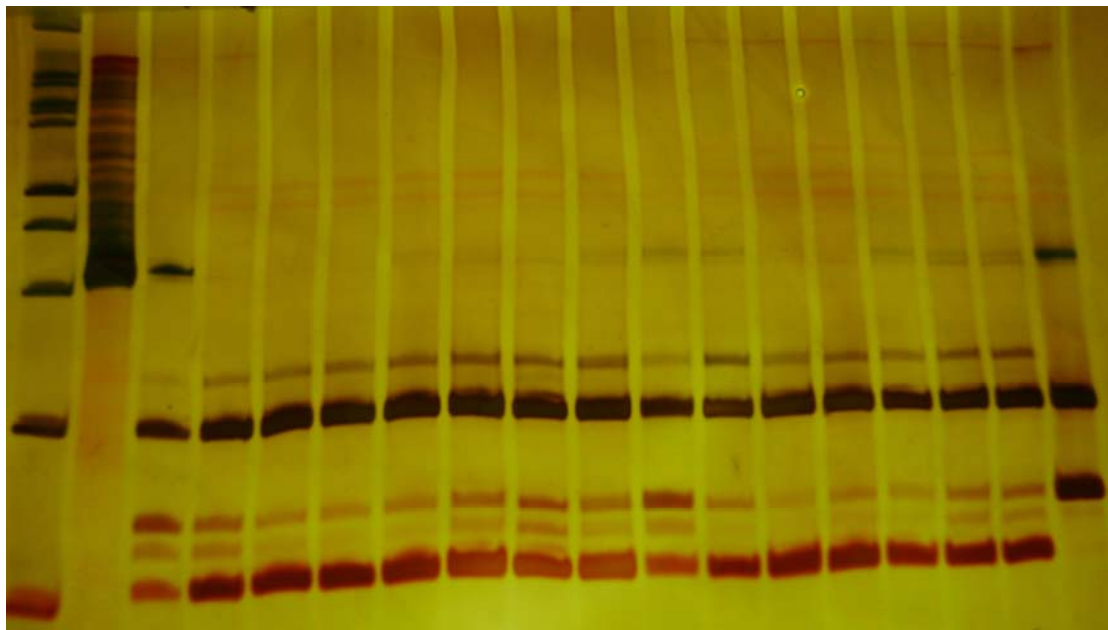


**Εικόνα 24:** Στο πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου 10% (22h, 220V, 4°C) απεικονίζονται με το μπλε βέλος το πρότυπο της μετάλλαξης A10398G (ND3) και με το κόκκινο βέλος το δεύτερο πρότυπο το οποίο δε φέρει καμία μετάλλαξη.



**Εικόνα 25:** Χρωματογράφημα sequencing τμήματος του γονιδίου ND3 σε άτομο control (πάνω) και στο άτομο Α6 (κάτω). Είναι εμφανής η μετάπτωση A→G στη θέση 10398.

Η μετάλλαξη A10398G όπως και η T7028C καθορίζουν απλοομάδες. Για την τελευταία πραγματοποιήθηκε RFLP σε 14 ασθενείς που έχουν την A10398G και άλλους πολυμορφισμούς απλοομάδων οι οποίοι έχουν ανιχνευθεί στο εργαστήριό μας, για να διαπιστωθεί αν όντως τη φέρουν (Εικόνα 26) και στη συνέχεια να ακολουθήσει η κατάταξη των ασθενών σε απλοομάδες.



**Εικόνα 26:** Στο αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου 8% (2,5 h, 220V) φαίνεται ότι όλοι οι ασθενείς (από τη δεύτερη διαδρομή και μετά) έχουν το πρότυπο της μετάλλαξης T7028C εκτός από αυτόν στην τελευταία διαδρομή που δεν την έχει.

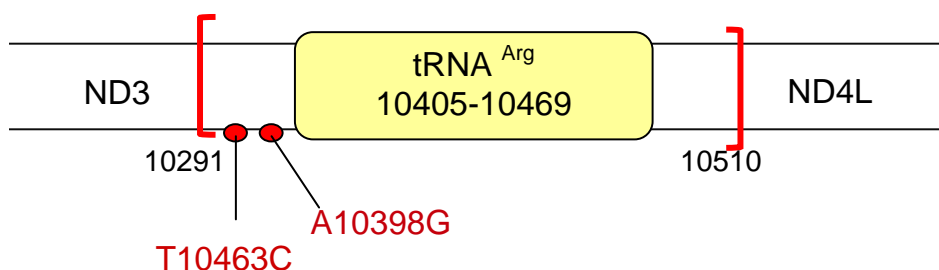


### 4.3 ΓΟΝΙΔΙΟ tRNA<sup>Arg</sup> ΚΑΙ ΠΑΡΑΚΕΙΜΕΝΕΣ ΠΕΡΙΟΧΕΣ ΣΕ ΑΤΟΜΑ ΠΟΥ ΔΕΝ ΕΜΦΑΝΙΖΟΥΝ ΚΑΠΟΙΟ ΚΛΙΝΙΚΟ ΣΥΜΠΤΩΜΑ

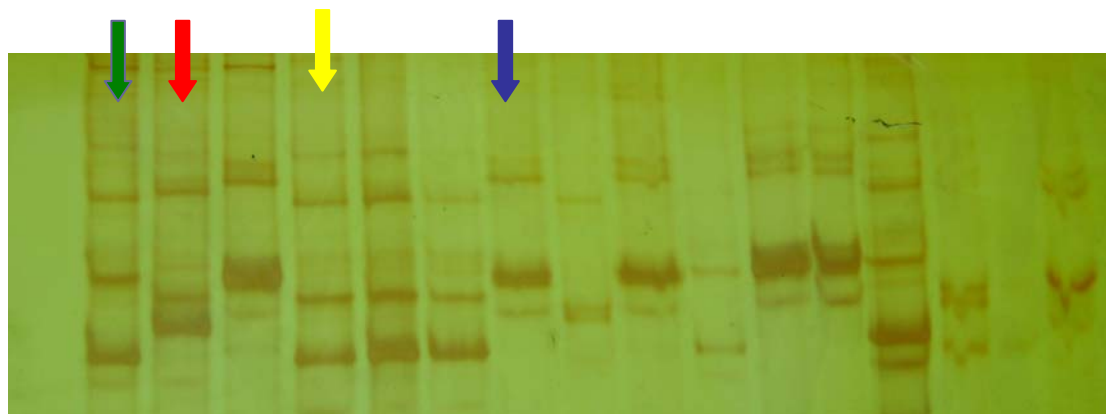
Για το τμήμα των 227bp που κωδικοποιεί το γονίδιο tRNA<sup>Arg</sup> καθώς και για τμήματα των παρακείμενων γονιδίων ND3 και ND4L εντοπίστηκαν 3 μεταλλάξεις. Η μία από αυτές βρέθηκε στο tRNA<sup>Arg</sup> και οι άλλες δύο στη ND3 υπομονάδα του συμπλόκου I της αναπνευστικής αλυσίδας (Πίνακας 7).

*Πίνακας 7: Οι μεταλλάξεις που βρέθηκαν στο γονίδιο tRNA<sup>Arg</sup> και στις παρακείμενες περιοχές.*

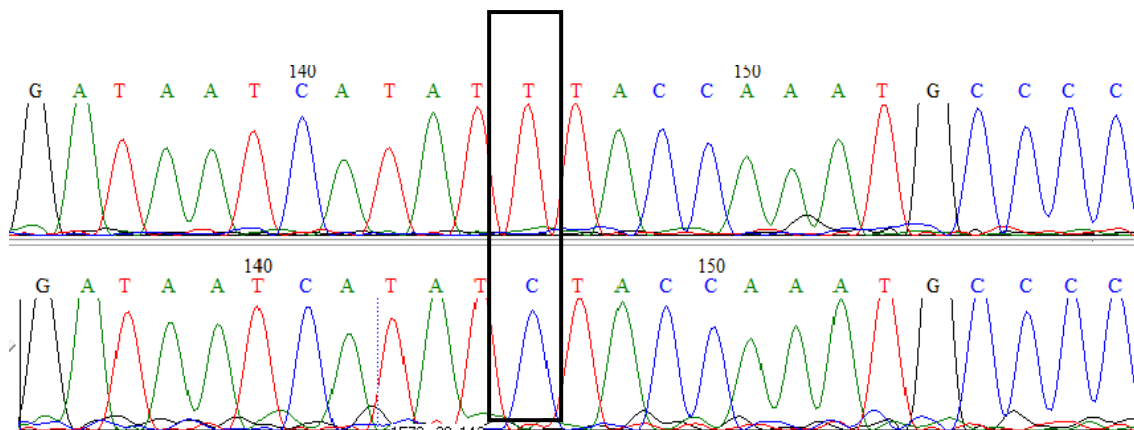
ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ	ΓΕΝΕΤΙΚΟΣ ΤΟΠΟΣ	ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ
A10398G	ND3	8/58 (13,7%)
T10321C	ND3	1/58 (1,7%)
T10463C	tRNA <sup>Arg</sup>	7/58 (12%)



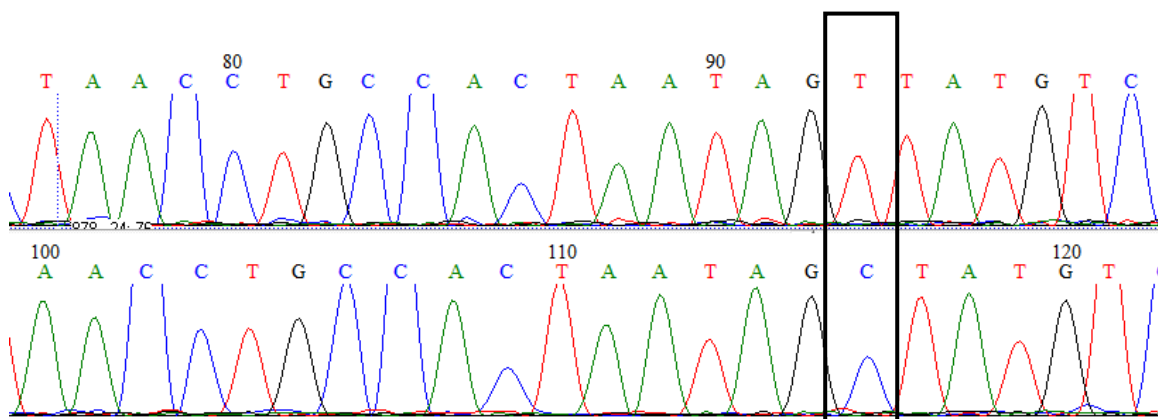
*Εικόνα 27: Οι μεταλλάξεις που βρέθηκαν σε παρακείμενη περιοχή (ND3) του tRNA<sup>Arg</sup>.*



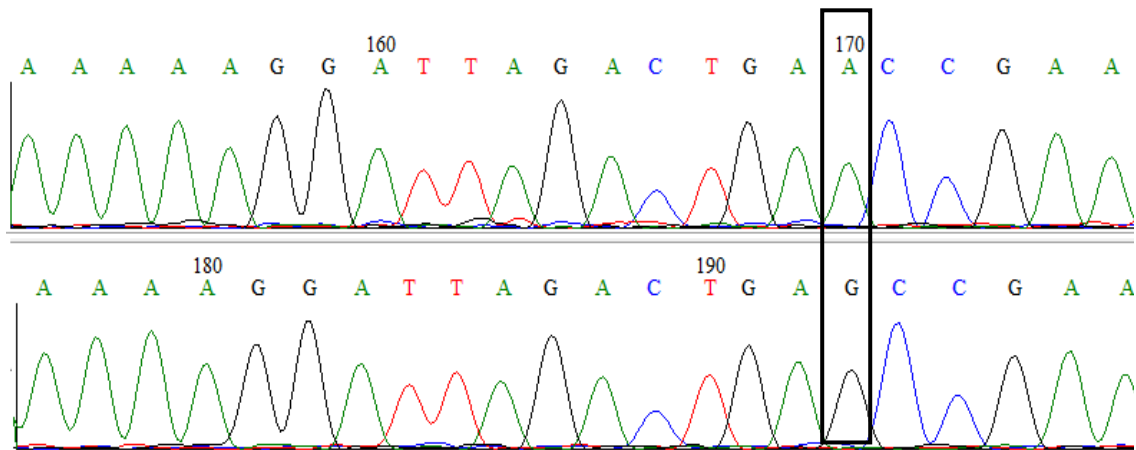
*Εικόνα 28: Στο πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου 10% (22h,220V,4°C) απεικονίζονται με το πράσινο βέλος το πρότυπο της μετάλλαξης tRNA<sup>Arg</sup> T10463C, με το κόκκινο βέλος το πρότυπο του συνδυασμού των πολυμορφισμών T10321C και A10398G (ND3), με το κίτρινο βέλος το πρότυπο που δε φέρει καμία μετάλλαξη, με το μπλε βέλος το πρότυπο της μετάλλαξης A10398G (ND3).*



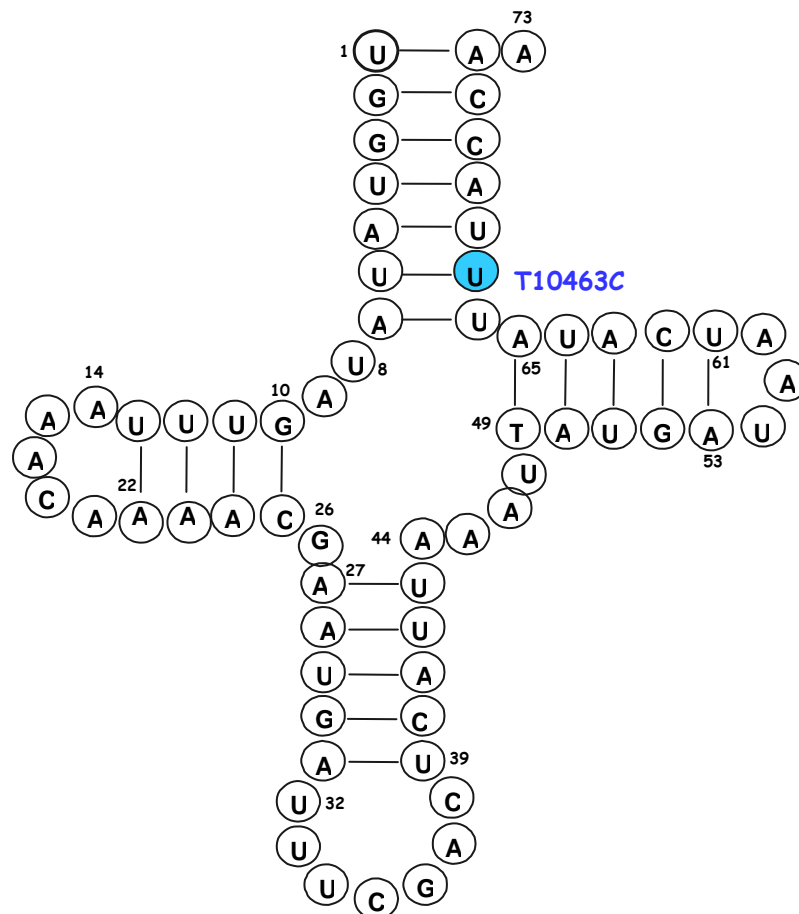
**Εικόνα 29:** Χρωματογράφημα sequencing τμήματος του γονιδίου tRNA<sup>Arg</sup> σε άτομο control (πάνω) και στο άτομο 7.8 (κάτω). Είναι εμφανής η μετάπτωση T→C στη θέση 10463.



**Εικόνα 30:** Χρωματογράφημα sequencing τμήματος του γονιδίου ND3 σε άτομο control (πάνω) και στο άτομο 8.2 (κάτω). Είναι εμφανής η μετάπτωση T→C στη θέση 10321.



**Εικόνα 31:** Χρωματογράφημα sequencing τμήματος του γονιδίου ND3 σε άτομο control (πάνω) και στο άτομο 8.2(κάτω). Είναι εμφανής η μετάπτωση A→G στη θέση 10398.



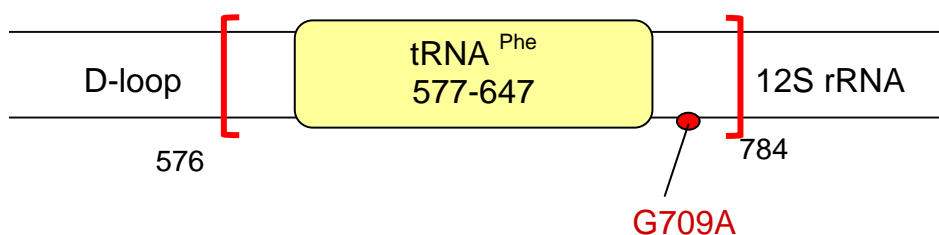
**Εικόνα 32::** Οι μεταλλάξεις που βρέθηκαν στο tRNA<sup>Arg</sup>. Η γαλάζια επισήμανση παραπέμπει στη θέση που επηρεάζει η μετάλλαξη.

#### 4.4 ΓΟΝΙΔΙΟ tRNA<sup>Phe</sup> ΚΑΙ ΠΑΡΑΚΕΙΜΕΝΕΣ ΠΕΡΙΟΧΕΣ ΣΕ ΑΤΟΜΑ ΠΟΥ ΔΕΝ ΕΜΦΑΝΙΖΟΥΝ ΚΑΠΟΙΟ ΚΛΙΝΙΚΟ ΣΥΜΠΤΩΜΑ

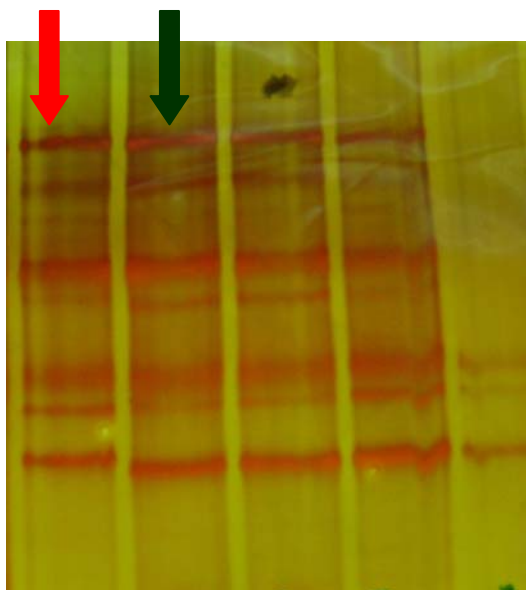
Για το τμήμα 158bp που κωδικοποιεί το γονίδιο tRNA<sup>Phe</sup> καθώς και για τμήματα των παρακείμενων γονιδίων βρέθηκε μία μετάλλαξη στην περιοχή 12S rRNA (Πίνακας 8).

*Πίνακας 8: Οι μεταλλάξεις που βρέθηκαν στο γονίδιο tRNA<sup>Phe</sup> και στις παρακείμενες περιοχές*

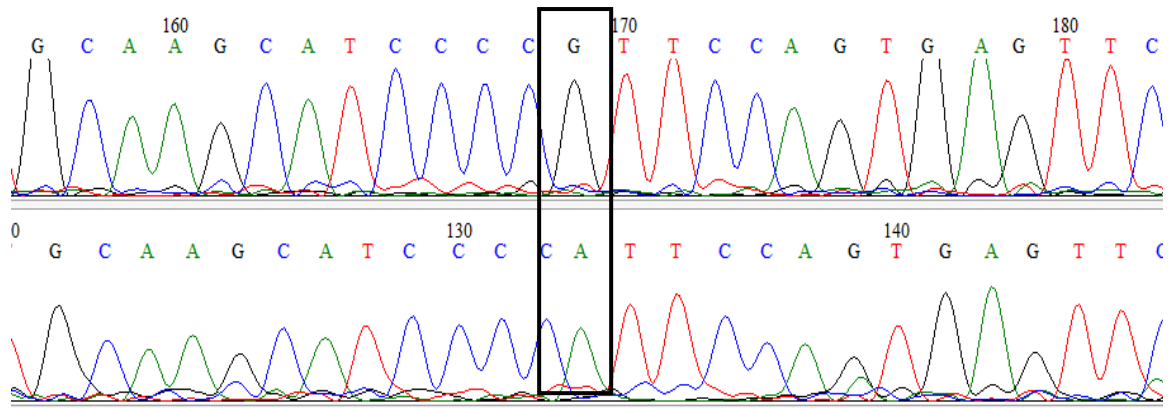
ΜΕΤΑΛΛΑΞΗ	ΓΕΝΕΤΙΚΟΣ ΤΟΠΟΣ	ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ
G709A	12S rRNA	5/46 (10,8%)



*Εικόνα 33: Η μετάλλαξη που βρέθηκε σε παρακείμενη περιοχή (12S rRNA) του tRNA<sup>Phe</sup>.*



*Εικόνα 34: Στο πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου 10% (22h, 220V, 4°C) απεικονίζονται με το κόκκινο βέλος το πρότυπο της μετάλλαξης G709A (12S rRNA) και με το πράσινο βέλος το πρότυπο που δε φέρει καμία μετάλλαξη.*



**Εικόνα 35:** Χρωματογράφημα *sequencing* τμήματος του γονιδίου 12S rRNA σε άτομο control (πάνω) και στο άτομο 7.8(κάτω).

## 5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν 2 μιτοχονδριακά tRNA γονίδια (tRNA<sup>Gly</sup>, tRNA<sup>Arg</sup>) 50 ασθενών με Alzheimer. Όσον αφορά τα tRNA γονίδια εντοπίστηκαν δύο σημειακές μεταλλάξεις στο tRNA<sup>Gly</sup>. Η T10007C και η T10034C. Επειδή όμως οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν δεν ενισχύουν μόνο τα tRNA γονίδια, αλλά και τμήματα των παρακείμενων γονιδίων βρέθηκαν και δύο μεταλλάξεις στη ND3 υπομονάδα του συμπλόκου I της αναπνευστικής αλυσίδας, η A10398G και η C10128T.

Από τις προαναφερθείσες μεταλλάξεις σε μεγαλύτερο ποσοστό 20% βρέθηκε η A10398G, η οποία εντοπίζεται στη ND3 υπομονάδα του συμπλόκου I της αναπνευστικής αλυσίδας. Η αλλαγή του A σε G έχει ως αποτέλεσμα την μετατροπή της θρεονίνης στη θέση 114 της υπομονάδας ND3 σε αλανίνη (T114A). Ο 10398G είναι ένας από τους πολυμορφισμούς που καθορίζουν τις απλοομάδες K,J,I,Z (Herrnstadt et al., 2002). Φαίνεται να έχει προστατευτικό χαρακτήρα για την ασθένεια του Parkinson καθώς είναι λιγότερο συχνή σε ασθενείς με τη νόσο (van der Walt et al., 2003, Pyle et al., 2005). Εκτός από τις ομάδες αναφοράς που έχει βρεθεί, εντοπίζεται και σε ασθενείς με MERRF (Noer et al., 1991), LHON (Brown et al., 2001), εγκεφαλομυοπάθειες (Pozzo et al., 2004), χωρίς όμως να χαρακτηρίζεται ως η υπεύθυνη μετάλλαξη για την ασθένεια (Da Pozzo et al., 2004). Θεωρείται ακόμη ως παράγοντας προδιάθεσης για τον καρκίνο του στήθους και του προστάτη, καθώς 23% ασθενών με καρκίνο του στήθους έφεραν τη μετάλλαξη 10398G ενώ στην ομάδα αναφοράς εμφανίστηκε σε ποσοστό 3% (Bai et al., 2007; Czarnicka et al., 2009).

Στην ομάδα αναφοράς που εξετάστηκε σε σχέση με τους ασθενείς με Alzheimer το ποσοστό εμφάνισης της συγκεκριμένης μετάλλαξης είναι 13,7%. Φαίνεται δηλαδή ότι έχει χαμηλότερο ποσοστό σε σχέση με τους ασθενείς με Alzheimer στους οποίους φτάνει 20%. Σε υψηλότερο ποσοστό εμφανίζεται και σε μία μελέτη ασθενών με Alzheimer όπου η συχνότητά της φτάνει 37,7% στους ασθενείς, ενώ στην ομάδα αναφοράς 26,5% (Chagnon et al., 1999). Ωστόσο δεν μπορούμε να υποθέσουμε ότι μόνη της η A10398G σχετίζεται με την εμφάνιση της ασθένειας, γιατί πρόκειται για έναν πολύ κοινό πολυμορφισμό. Παρ' όλα αυτά δεν αποκλείεται το ενδεχόμενο ο συνδυασμός αυτής της μετάλλαξης με άλλες να συμβάλλουν στην εμφάνιση της νόσου.

Όπως ήδη αναφέρθηκε η A10398G μαζί με άλλες μεταλλάξεις καθορίζει απλοομάδες. Τα 50 δείγματα ασθενών με Alzheimer που χρησιμοποιήθηκαν έχουν εξεταστεί στο εργαστήριό μας και για άλλες μεταλλάξεις. Σύμφωνα με αυτές και με τα στοιχεία από το RFLP για τη μετάλλαξη T7028C έγινε η κατάταξη κάποιων ασθενών σε απλοομάδες., σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα:

**Πίνακας 9:** Πολυμορφισμοί που χαρακτηρίζουν απλοομάδες. (Raule et al., 2006)

MtSNP								
Haplogroup	mt1719	mt4580	mt7028	mt8251	mt9055	mt10398	mt12308	mt13368
	G>A	G>A	T>C	G>A	G>A	A>G	A>G	G>A
H	G	G	C	G	G	A	A	G
I	A	•	T	A	•	G	•	•
J	•	•	T	•	•	G	•	•
K	•	•	T	•	A	G	G	•
K2	•	•	T	•	A	•	G	•
T	•	•	T	•	•	•	•	A
U	•	•	T	•	•	•	G	•
V	•	A	T	•	•	•	•	•
W	•	•	T	A	•	•	•	•
X	A	•	T	•	•	•	•	•
Z	•	•	T	•	•	•	•	•

ΑΣΘΕΝΕΙΣ	ΣΥΝΔΥΑΣΜΟΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ ΠΟΥ ΚΑΘΟΡΙΖΟΥΝ ΑΠΛΟΟΜΑΔΑ	ΑΠΛΟΟΜΑΔΑ
A19	G8251A (COII) T7028C	W
A20	G8251A (COII) T7028C	W

Προαναφέρθηκε ότι στο tRNA<sup>Gly</sup> εντοπίστηκαν δύο σημειακές μεταλλάξεις. Από αυτές η T10007C βρέθηκε σε έναν ασθενή, εμφανίζεται δηλαδή με συχνότητα 2%. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία χαρακτηρίζεται ως ουδέτερος πολυμορφισμός σε φυσιολογικούς πληθυσμούς (Wong et al., 2002). Ομοίως και η μετάλλαξη T10034C εντοπίστηκε σε έναν ασθενή και πρόκειται για έναν ταυτοποιημένο πολυμορφισμό τόσο σε άτομα χωρίς κάποιο κλινικό σύμπτωμα (Marzuki et al., 1991; Finnila et al., 2001) όσο και σε ασθενείς με MERRF και εγκεφαλομυοπάθειες (Noer et al., 1991). Πρέπει να αναφερθεί ότι σε μελέτη ασθενών με Alzheimer για την ανίχνευση μιτοχondριακών μεταλλάξεων βρέθηκε να εμφανίζεται σε ποσοστό 15,9% στους ασθενείς, ενώ στην ομάδα ελέγχου σε ποσοστό 10,8% (Chagnon et al., 1999). Ωστόσο, λόγω του ποσοστού με το οποίο συναντάται στο φυσιολογικό πληθυσμό και του γεγονότος ότι δεν αποδεικνύεται καμία αιτιολογική συσχέτιση με τις παραπάνω ασθένειες αναφέρεται ως πολυμορφισμός και όχι ως παθογόνος μετάλλαξη στη βάση δεδομένων του mitomap. Σε ομάδα αναφοράς που εξετάστηκε στο εργαστήριό μας για μεταλλάξεις στο tRNA<sup>Gly</sup> οι παραπάνω μεταλλάξεις δεν εντοπίστηκαν. Και σε αυτήν την περίπτωση δεν μπορούμε να ισχυριστούμε ότι οι μεταλλάξεις αυτές είναι οι υπεύθυνες για την εμφάνιση του Alzheimer αλλά η συνύπαρξή τους με άλλες μεταλλάξεις ίσως να συνεισφέρουν στην εμφάνισή της.

Τέλος ανιχνεύθηκε και η μετάλλαξη T10128C στη ND3 υπομονάδα του συμπλόκου I της αναπνευστικής αλυσίδας με συχνότητα 2% στους ασθενείς με Alzheimer. Η συγκεκριμένη μετάλλαξη δεν είναι καταχωρημένη στη βάση

δεδομένων του mitomap και δεν υπάρχει κάποια αναφορά στη βιβλιογραφία. Συνεπώς θα πρέπει να ερευνηθεί περισσότερο και να συγκριθεί με άτομα χωρίς Alzheimer για να διαπιστωθεί αν όντως εμφανίζεται πιο συχνά στην ασθένεια και αν σχετίζεται με αυτή.

Συνοψίζοντας για τις μεταλλάξεις που εντοπίστηκαν στους ασθενείς με Alzheimer καμία από αυτές δε φαίνεται να έχει αιτιολογική σχέση με την ασθένεια από μόνη της και καμία από αυτές δεν έχει αναφερθεί σε αυξημένο ποσοστό σε μελέτες για τη νόσο του Alzheimer. Είναι πιο πιθανό κάποιες mtDNA μεταλλάξεις δρώντας συνεργιστικά (Brown et al., 1996) να είναι παθογόνες για ένα μικρό μέρος του πληθυσμού που εμφανίζει τη νόσο του Alzheimer και ένα μικρό ποσοστό που δεν την εμφανίζει να φέρει μια mtDNA μετάλλαξη που έχει προστατευτικό ρόλο (Elson et al., 2006). Τα άτομα με Alzheimer που εξετάστηκαν για μεταλλάξεις στα δύο tRNA γονίδια έχουν εξεταστεί στο εργαστήριό μας και για μεταλλάξεις σε άλλα tRNA γονίδια. Πράγματι διαπιστώνεται ότι φέρουν περισσότερες από μία μεταλλάξεις οι οποίες όλες μαζί μπορεί να συμβάλλουν στην εκδήλωση του κλινικού φαινοτύπου του Alzheimer (Πίνακας 10).

**Πίνακας 10:** Ενδεικτική παρουσίαση κάποιων ασθενών με Alzheimer που εξετάστηκαν στο εργαστήριο και εμφανίζουν περισσότερες από μία μεταλλάξεις στα μιτοχονδριακά tRNA γονίδια.

tRNA γονίδια	ΑΣΘΕΝΕΙΣ		
	A6	A14	A23
Ile-Gln-Met	√	√	√
Asn-Cys-Tyr	√	√	√
Leu (UUR)	G3337A (ND1)	√	T3336C (ND1)
Lys	√	G8251A (COII)	√
Thr-Pro	C15946T (tRNA Thr)	A15924G (tRNA Thr)	√
Phe	√	ins568-572 (3C) (D-loop)	T669C (12S rRNA) ins568-573 (5C) (D- loop)
Trp-Ala	√	√	√
Ser (UCN)-Asp	√	√	√
Gly	√	T10034C (tRNA Gly)	C10128T (ND3)
Arg	A10398G (ND3)	A10398G (ND3)	A10398G (ND3)



Όσον αφορά τα μιτοχονδριακά tRNA γονίδια (tRNA<sup>Arg</sup>, tRNA<sup>Phe</sup>) που εξετάστηκαν σε ένα σύνολο ατόμων χωρίς κάποιο κλινικό σύμπτωμα βρέθηκαν 4 μεταλλάξεις. Μόνο μία από αυτές εντοπίζεται στο tRNA<sup>Arg</sup>, η T10463C. Οι άλλες δύο, A10398G και T10321C, βρίσκονται στη ND3 υπομονάδα του συμπλόκου I της αναπνευστικής αλυσίδας και η τελευταία, G709A, στην περιοχή 12S rRNA.

Και στην περίπτωση των ατόμων που δεν εμφανίζουν κάποιο κλινικό σύμπτωμα η μετάλλαξη με τη μεγαλύτερη συχνότητα από αυτές που βρέθηκαν είναι η A10398G, η οποία εμφανίζεται με ποσοστό 13,7%. Όπως ήδη αναφέρθηκε αυτή η μετάλλαξη είναι ένας ταυτοποιημένος πολυμορφισμός με αυξημένη συχνότητα εμφάνισης.

Στο tRNA<sup>Arg</sup> της ομάδας αναφοράς που εξετάστηκε ανιχνεύθηκε η μετάλλαξη T10463C με συχνότητα 12%. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία εντοπίζεται και στο φυσιολογικό πληθυσμό (Hofmann et al., 1997; Finnilla et al., 2001) και σε ασθενείς με μιτοχονδριακές διαταραχές όπως MELAS, MERRF, PEO, κώφωση, αταξία (Sternberg et al., 2008), σε ασθενείς με Parkinson (Vives-Bauza et al., 2002). Ωστόσο λόγω του ποσοστού με το οποίο συναντάται στο φυσιολογικό πληθυσμό και του γεγονότος ότι δεν αποδεικνύεται καμία αιτιολογική συσχέτιση με τις συγκεκριμένες ασθένειες αναφέρεται ως πολυμορφισμός και όχι ως παθογόνος μετάλλαξη στη βάση δεδομένων του mitomap.

Σε ποσοστό 10,8% του φυσιολογικού πληθυσμού ταυτοποιήθηκε η μετάλλαξη G709A που είναι ένας πολυμορφισμός (Finnilla et al., 2001). Σύμφωνα με μια μελέτη προτείνεται ότι αυτή η μετάλλαξη μπορεί να έχει προστατευτικό χαρακτήρα έναντι της νόσου του Alzheimer καθώς βρέθηκε ότι είναι 3 φορές πιο συχνή στην ομάδα αναφοράς σε σχέση με τους ασθενείς (Chagnon et al., 1999). Σημειώνεται ότι η ίδια μετάλλαξη εμφανίζεται σε ένα ποσοστό 20% ατόμων με άσθμα που εξετάστηκαν στο εργαστήριο. Φαίνεται δηλαδή ότι το ποσοστό είναι υψηλότερο στην περίπτωση ασθενών σε σχέση με το δείγμα των υγιών ατόμων. Γι' αυτό απαιτείται η περαιτέρω μελέτη της μετάλλαξης, ώστε να επιβεβαιωθεί η συσχέτισή της με την ασθένεια ή η ύπαρξή της ως απλός πολυμορφισμός.

Η μετάλλαξη T10321C στη ND3 υπομονάδα του συμπλόκου I της αναπνευστικής αλυσίδας εμφανίζεται με συχνότητα 1,7% στα άτομα χωρίς κάποιο κλινικό σύμπτωμα. Πρόκειται για έναν πολυμορφισμό (Herrnstadt et al., 2002) που αλλάζει τη βαλίνη σε αλανίνη. Πρέπει να σημειωθεί ότι ο πολυμορφισμός αυτός εντοπίζεται στο ίδιο άτομο το οποίο φέρει και τον πολυμορφισμό A10398G. Ωστόσο δεν μπορεί να εξαχθεί κάποιο συμπέρασμα για το αν αυτοί οι δύο πολυμορφισμοί συγκληρονομούνται, γιατί αυτός ο συνδυασμός βρέθηκε μόνο μία φορά σε ένα μικρό δείγμα πληθυσμού.

Για να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα για το ρόλο των σημειακών μεταλλάξεων στα μιτοχονδριακά tRNA γονίδια και γενικότερα για το ρόλο του μιτοχονδριακού DNA στην εμφάνιση της νόσου του Alzheimer πρέπει να ολοκληρωθεί η έρευνα σε όλα τα tRNA γονίδια στους ασθενείς και να γίνει σύγκριση με μεγάλη ομάδα του «φυσιολογικού» πληθυσμού.

## 6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Allen JF., Raven JA., Free-radical-induced mutation vs redox regulation: costs and benefits of genes in organelles, *J Mol Evol* 1996; 42:427-434.
2. Anderson S., Bankier AT., Barrell BG., de Bruijn MH., Coulson AR., Sequence and organization of the human mitochondrial genome, *Nature* 1981; 290:4-65.
3. Attardi G., Animal mitochondrial DNA: an extreme example of genetic economy, *Int.Rev. Cytol.* 1985; 93:93-145.
4. Bai Ren-Kui, M. Leal Suzanne, Covarrubias Daniel, Liu Aiyi and Wong Lee-Jun C, Mitochondrial Genetic Background Modifies Breast Cancer Risk, *Cancer Res* 2007; 67: 4687.
5. Bereiter-Hahn J., Vöth M., Dynamics of mitochondria in living cells: Shape changes, dislocations, fusion, and fission of mitochondria, *Microscopy Research and Technique* 2005; 27:198-219.
6. Blanchard B.J., A mitochondrial DNA deletion in normally aging and in Alzheimer brain tissue, *Neuroreport* 1993; 4(6):799-802.
7. Blass JP., Gibson GE., The role of oxidative abnormalities in the pathophysiology of Alzheimer's disease, *Rev Neurol* 1991;147:513-525.
8. Blass JP., Brown AM., Lower activity of Krebs cycle enzymes than of electron transport in human brain: disease implications, *Neurobiol Aging* 2000; 21(Suppl):81.
9. Brown Michael D., Shoffner John M., Kim Yoon L., Jun Albert S., Graham Brett H, Cabell Margaret F., Gurley Daniel S. and Wallace Douglas C., Mitochondrial DNA Sequence Analysis of our Alzheimer's and Parkinson's Disease Patients, *American Journal of Medical Genetics* 1996; 61:283-289.
10. Castellani Rudy, Hirai Keisuke, Aliev Gjumrakch, Drew Kelly L, Unomura Akihiko, Takeda Atsushi, Cash Adam D, Obrenovich Mark E, Perry George and Smith Mark A., Role of Mtochondrial Dysfunction in Alzheimer's Disease, *Journal of Neuroscience Research* 2002;70:357-360.
11. Chagnon Pierre, Gee Mark, Filion Mario, Robitaille Yves, Belouchi Majid, and Gauvreau Denis, Phylogenetic Analysis of the Mitochondrial Genome Indicates Significant Differences Between Patients With Alzheimer Disease and Controls in a French-Canadian Founder Population, *American Journal of Medical Genetics* 1999; 85:20-30.
12. Chang S.W. et al., The frequency of point mutations in mitochondrial DNA is elevated in the Alzheimer 's brain, *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 273(1): 203-208.
13. Corder EH., Saunders AM., Strittmatter WJ., Schmechel DE., Gaskell PC., Small GW., Roses AD., Haines JL., Pericak-Vance MA., Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families, *Science* 1993; 261 (5123): 921-923.
14. Corral-Debrinski, Horton, Lott, Marked changes in mitochondrial DNA deletion levels in Alzheimer brains, *Genomics*, 1994; 23:471-476.
15. Coskun Pinar E., Beal M. Flint and Wallace Douglas C., Alzheimer's brains harbor somatic mtDNA controlregion mutations that suppress mitochondrial transcription and replication, *PNAS* 2004; 101: 10726-10731.

16. Czarnecka Anna M., Krawczyk Tomasz, Zdrożny Marek, Lubiński Jan , Arnold Rebecca S. , Kukwa Wojciech , Ścińska Anna, Golik Paweł , Bartnik Ewa and Petros John A., Mitochondrial NADH-dehydrogenase subunit 3 (ND3) polymorphism (A10398G) and sporadic breast cancer in Poland, *Breast Cancer* 2009; 121:511-518.
17. Da Pozzo P., Cardaioli E., Radi E., Federico A., Sequence analysis of the complete mitochondrial genome in patients with mitochondrial encephalomyopathies lacking the common pathogenic DNA mutations, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2004; 324 (1): 360-364.
18. Desagher S. and Martinou J-C., Mitochondria as central control point of apoptosis, *Trends in Biology* 2000; 369-377.
19. DiMauro S., Schon EA., Mitochondrial respiratory-chain diseases, *N Engl J Med* 2003, 348:2656-68.
20. Elson Joanna L., Herrnstadt Corinna, Preston Gwen, Thal Leon, Morris Christopher M. , Edwardson J. A., Beal M. Flint, Turnbull Douglass M. , Howell Neil, Does the mitochondrial genome play a role in the etiology of Alzheimer's disease?, *Hum Genet* 2006; 119:241–254.
21. Farrer L.A., Cupples L.A., Haines J.L., Hyman B., Kukull W.A., Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease. A meta-analysis. APOE and Alzheimer Disease Meta Analysis Consortium, *J.Am.Med.Assoc.* 1997; 278:1349-1356.
22. Finnila S., Hassinen I. E., Majamaa K., Phylogenetic analysis of mitochondrial DNA in patients with an occipital stroke. Evaluation of mutations by using sequence data on the entire coding region, *Mutation Research* . 2001; 458 (1-2): 31-39.
23. Gibson Gary E., Karuppagounder Saravanan S. and Shi Qingli, Oxidant-induced Changes in Mitochondria and Calcium Dynamics in the Pathophysiology of Alzheimer's Disease, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2008 1147: 221–232.
24. Glenner GG and Wong CW., Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovasculae amyloid protein, *Biochem Biophys Res Commun* 1984; 120: 885-890.
25. Grazina Manuela, Silva Filipe, Santana Isabel, Pratas João, Santiago Beatriz , Oliveira Miguel, Carreira Isabel, Cunha Luís, Oliveira Catarina, Mitochondrial DNA Variants in a Portuguese Population of Patients with Alzheimer's Disease, *Eur Neurol* 2005; 53:121–124.
26. Grazina M., Pratas J., Silva F., Oliveira S., Santana I. and Oliveira C., Genetic basis of Alzheimer's dementia: role of mtDNA Mutations, *Genes, Brain and Behavior.* 2006; 5:92–107.
27. Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Tung Yc, Quinlan M., Wisniewski HM. and Binder Li, Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein t (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology, *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 4913–4917.
28. Hemachandra Reddya, Flint Beal, Are mitochondria critical in the pathogenesis of Alzheimer's disease? *Brain Research Reviews* 2005; 49:618 – 632.
29. Herrnstadt C., Elson J. L., Fahy E., Preston G., Turnbull D. M., Anderson C., Ghosh S. S., Olefsky J. M., Beal M. F., Davis R. E., Howell N., Reduced-median-network analysis of complete mitochondrial DNA coding-region

- sequences for the major African, Asian, and European haplogroups, *American Journal of Human Genetics* 2002; 70 (5): 1152-1171.
30. Hirai K, Aliev G, Nunomura A, Fujioka H, Russell RL, Atwood CS, Johnson AB, Kress Y, Vinters HV, Tabaton M, Shimohama S, Cash AD, Siedlak SL, Harris PLR, Jones PK, Petersen RB, Perry G, Smith MA., Mitochondrial abnormalities in Alzheimer's disease, *J Neurosci* 2001; 21:3017–3023.
  31. Hofmann S., Jaksch M., Bezold R., Mertens S., Aholt S., Paprotta A., Gerbitz K.D., Population genetics and disease susceptibility: characterization of central European haplogroups by mtDNA gene mutations, correlation with D loop variants and association with disease, *Human. Molecular Genetics* 1997; 6 (11): 1835-1846.
  32. Holt I.J., Harding A.E., and Morgan-Hughes J.A., Deletions of muscle mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathies, *Nature* 1988; 331:717–719.
  33. Horwitz B., Grady CL., Schlageter NL., Duara R., Rapoport SI., Intercorrelations of regional cerebral glucose metabolic rates in Alzheimer's disease, *Brain Res* 1987; 407:294–306.
  34. Hoyer S., Oesterreich K., Wagner O., Glucose metabolism as the site of the primary abnormality in early-onset dementia of Alzheimer type, *J Neurol.*1988; 235:143–148.
  35. Hutchin Timothy, Cortopassi Gino, A mitochondrial DNA clone is associated with increased risk for Alzheimer disease, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1995;92:6892-6895.
  36. Hutchison Iii, Clyde A. John, Newbold E., S.Steven Potter & Marshall Hall Edgell, Maternal inheritance of mammalian mitochondrial DNA, *Nature* 1974; 251: 536 –538.
  37. Johns Donald R., Paternal Transmission of Mitochondrial DNA is (Fortunately) Rare, *Annals of Neurology* 2003; 54:422-424.
  38. Jukes T. H. and S. Osawa, The genetic code in mitochondria and chloroplasts, *Experientia* 1990; 46:1117-1126.
  39. Kish SJ., Bergeron C., Rajput A., Dozic S., Mastrogiacomo F., Change LJ., Wilson JM., DiStefano LM., Nobrega JN., ,Brain cytochrome oxidase in Alzheimer's disease, *Neurochem* 1992; 59:776–779.
  40. Lin Fu-Hai, Lin Ruth, Wisniewski Henryic M., Hwang Yu-Wen, Grundke-Iqbal Inge, Healy Louie Gregory and Iqbal Khalid, Detection Of Point Mutations In Codon 331 Of Mitochondrial Nadh Deydrogenase Subunit 2 In Alzheimer's Brain, *Biochemical And Biophysical Research Communication* 1992; 182:238-246.
  41. Mancuso, Nardini , Micheli, Rocchi , Nesti, Giglioli , Petrozzi, Rossi, Ceravolo, Bacci,, Choub, Ricci, Tognoni , Manca, Siciliano, Murri, Lack of association between mtDNA haplogroups and Alzheimer's disease in Tuscany, *Neurol Sci* 2007;28:142–147.
  42. Mancuso M., Calsolaro V., Orsucci D., Carlesi C., Choub A., Piazza S. and Siciliano G. Mitochondria, Cognitive Impairment and Alzheimer's Disease. *International Journal of Alzheimer's Disease* 2009, Article ID 951548, 8 pages.
  43. Marzuki S., Noer A. S., Letrit P., Thyagarajan D., Kapsa R., Utthanaphol P., Byrne E., Normal variants of human mitochondrial DNA and translation products: the building of a reference data base, *Human Genetics.* 1991; 88: 139-145.

44. Mitchell P, Moyle J., Chemiosmotic hypothesis of oxidative phosphorylation, *Nature* 1967; 213:137–9.
45. Moreira Paula I., Nunomura Akihiko , Nakamura Masao , Takeda Atsushi , Shenk Justin C., Aliev Gjumrakch , Smith Mark A., Perry George, Nucleic acid oxidation in Alzheimer disease, *Free Radical Biology & Medicine* 44 2008; 1493–1505.
46. Mutisya EM., Bowling AC., Beal MF., Cortical cytochrome oxidase activity is reduced in Alzheimer's disease, *J Neurochem* 1994; 63:2179–2184.
47. Noer A.S., Sudoya H., Lertrit P., Thyagarajan D., Utthanaphol P., Kapsa R., Byrne,E., Marzuki S., A tRNALys mutation in the mtDNA is the causal genetic lesion underlying myoclonic epilepsy and ragged-red fiber (MERRF) syndrome, *American Journal of Human Genetics* 1991; 49 (4): 715-722.
48. Parker WD Jr., Boyson SJ., Parks JK., Abnormalities of the electron transport chain in idiopathic Parkinson's disease, *Ann Neurol* 1989; 26:719-723.
49. Pérez-Gracia, Esther,Torrejón-Escribano, Benjamín,Ferrer Isidre, Dystrophic neurites of senile plaques in Alzheimer's disease are deficient in cytochrome c oxidase, *Acta Neuropathol* 2008; 116:261–268.
50. Pericak-Vance MA., Bebout JL., Gaskell PC Jr., Yamaoka LH., Hung W-Y., Alberts MJ., Walker AP., Bartlett RJ., Haynes CA., Welsh KA., Earl NL., Heyman A., Clark CM., and Roses AD., Linkage studies in familial Alzheimer disease: Evidence for chromosome 19 linkage, *Am J Hum Genet* 1991; 48 (6): 1034–50.
51. Pertuzzella V., Chen and E.A. Schon, Is a point mutation in the mitochondrial ND2 gene associated with Alzheimer's disease, *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 186(1):491-497.
52. Pesole G., Gissi C., De Chirico A., Saccone C., Nucleotide substitution rate of mammalian mitochondrial genomes, *J Mol Evol* 1999 ; 48 :427-434.
53. Petersen Camilla, A.Hansson, Alikhani Nyosha, Behbahani Homira, Wiehager Birgitta, Pavlov Pavel F.,Alafuzoff Irina, Leinonen Ville, Ito Akira, Winblad Bengt, Glaser Elzbieta and Ankarcrona Maria, The amyloid  $\beta$ peptide is imported into mitochondria via the TOM import machinery and localized to mitochondrial cristae, *PNAS* 2008; 105:13145–13150.
54. Qiu, X., Chen Y. and Zhou M., Two point mutations in mitochondrial DNA of cytochrome c oxidase coexist with normal mtDNA in a patient with Alzheimer's disease, *Brain Res* 2001; 893:261–263.
55. Rappaport L., Oliviero P. and Samuel J.L., Cytoskeleton and mitochondrial morphology and function, *Molecular and Cellular Biochemistry* 1998; 184: 101–105.
56. Raule Nicola, Federica Sevini, Aurelia Santoro, Serena Altilia, Claudio Franceschi, Association studies on human mitochondrial DNA: Methodological aspects and results in the most common age-related diseases, *Mitochondrion* 7 2007; 29–38.
57. Reeve AK., Krishnan KJ., Turnbull D., Mitochondrial DNA mutations in disease, aging, and neurodegeneration, *Ann N Y Acad Sci.* 2008; 1147:21-9.
58. Schapira Anthony H V, Mitochondrial disease, *Lancet* 2006; 368:70–82.
59. Selkoe Dennis J., Alzheimer's Disease: Genes, Proteins and Therapy, *Physiological Reviews* 2001; 81:741-767.
60. Shoffner J. M., Brown M. D., Torroni A., et al., Mitochondrial DNA variants observed in Alzheimer disease and Parkinson disease patients, *Genomics*, 1993; 17: 171–184.

61. St George-Hyslop, P.H., Tanzi, R.E., Polinsky et al., The genetic defect causing familial Alzheimer's Disease maps on chromosome 21, *Science* 1987; 235:885–890.
62. St George-Hyslop, P., Haines, J. & Rogaev, E. et al., Genetic evidence for a novel familial Alzheimer's disease locus on chromosome 14, *Nat Genet* 1992; 2:330–334.
63. Sternberg D., Danan C., Lombes A., Laforet 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 (1): 33-42.
64. Su JH., Deng G., Cotman CW., Bax protein expression is increased in Alzheimer's brain: correlations with DNA damage, Bcl-2 expression, and brain pathology, *J Neuropathol Exp Neurol* 1997; 56:86–93.
65. Su JH., Kessler JP., Head E., et al., Caspase-cleaved amyloid precursor protein and activated caspase-3 are co-localized in the granules of granulovacuolar degeneration in Alzheimer's disease and Down's syndrome brain, *Acta Neuropathol* 2002; 104:1–6.
66. Taanman Jan-Willem, The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication, *Biochimica et Biophysica Acta* 1999; 1410:103-123.
67. Tanaka Noriko, Goto Yu-ichi , Akanuma Jun , Kato Mayuko , Kinoshita Toru, Yamashita Fumio , Tanaka Masashi, Asada Takashi, Mitochondrial DNA variants in a Japanese population of patients with Alzheimer's disease, *Mitochondrion* 2010; 10:32–37.
68. Turnbull Helen E., Lax Nichola Z., Diodato Daria, Ansorge Olaf, Turnbull Doug M., The mitochondrial brain: From mitochondrial genome to neurodegeneration, *Biochimica et Biophysica Acta* 2009; 1-11.
69. van Broeckhoven C., Backhovens H., Cruts M., De Winter G., Bruylant M., Cras P. & Martin J.J., Mapping of a gene predisposing to early-onset Alzheimer's disease to chromosome 14q24.3, *Nat Genet* 1992; 2:335–339.
70. van der Walt J. M., Nicodemus K. K., Martin E. R., Scott W. K., Nance M. A., Watts R. L., Hubble J. P., Haines J. L., Koller W. C., Lyons K., Pahwa R., Stern M. B., Colcher A., Hiner B. C., Jankovic, J, Ondo, W. G., Allen F. H., Jr., Goetz, C. G., Small G. W., Mastaglia, F., Stajich, J. M., McLaurin, A. C., Middleton, L. T., Scott, B. L., Schmechel, D. E., Pericak-Vance, M. A., Vance, J. M., Mitochondrial polymorphisms significantly reduce the risk of Parkinson disease, *American Journal of Human Genetics* 2003; 72 (4): 804-811.
71. van der Walt J.M., Dementieva Y.A., Martin E.R., Scott W.K., Nicodemus K.K., Kroner C.C., Welsh-Bohmer K.A., Saunders A.M., Roses A.D., Small G.W., Schmechel D.E., Murali Doraiswamy, P., Gilbert, J.R., Haines, J.L., Vance J.M., Pericak-Vance M.A., Analysis of European mitochondrial haplogroups with Alzheimer disease risk, *Neurosci. Lett.* 2004; 365:28–32.
72. Vives-Bauza C., Andreu A. L., Manfredi G., Beal M. F., Janetzky B., Gruenewald T. H., Lin M. T., Sequence analysis of the entire mitochondrial genome in Parkinson's disease, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2002; 290 (5): 1593-1601.

73. Wallace D.C., Shoffner J.M., Brown M.D., Torroni A., Lott M.T. & Cabell, M., Mitochondrial DNA mutations associated with Alzheimer's and Parkinson's disease, *Am J Hum Genet* 1992; 51, A30.
74. Wang Xinglong, Su Bo, Fujioka Hisashi and Zhu Xiongwei, Dynamin-Like Protein 1 Reduction Underlies Mitochondrial Morphology and Distribution Abnormalities in Fibroblasts from Sporadic Alzheimer's Disease Patients, *The American Journal of Pathology* 2008; 173:470-482.
75. Wang Xinglong , Su Bo , Siedlak Sandra L, Moreira Paula I , Fujioka Hisashi , Wang, Yang , Casadesus Gemma and Zhu Xiongwei, Amyloid- $\beta$  overproduction causes abnormal mitochondrial dynamics via differential modulation of mitochondrial fission/fusion proteins, *PNAS* 2008; 105:19318–19323.
76. Wei Yau-Huei, Lu Ching-You, Wei Chia-Yu, Ma Yi-Shing and Lee Hsin-Chen, Oxidative Stress in Human Aging and Mitochondrial Disease Consequences of Defective Mitochondrial Respiration and Impaired Antioxidant Enzyme System, *Chinese Journal of Physiology* 2001; 44(1):1-11.
77. Wong Lee-Jun C., Liang Min-Hui, Kwon Haeyoung, Park John, Bai Ren-Kui, and Tan Duan-Jun, Comprehensive Scanning of the Entire Mitochondrial Genome for Mutations, *Clinical Chemistry* 2002; 48:11 1901-1912.
78. Wragg M.A., Talbot C.J., Morris J.C., Lendon C.L. & Goate A.M., No association found between Alzheimer's disease and a mitochondrial tRNA glutamine gene variant, *Neurosci Lett* 1995; 201:07–110.
79. Yang Jenq-Lin, Weissman Lior, Bohr Vilhelm A and Mattson Mark P, Mitochondrial DNA damage and repair in neurodegenerative disorders, *DNA Repair* 2008; 7:1110-1120.
80. Zi-Bing Wang, Yu-Qing Liu, Yu-Fang Cui, Pathways to caspase activation, *Cell Biology International* 2005; 29:489-496.
81. Zifa E., Giannouli S., Theotokis P., Stamatis C., Mamuris Z., Stathopoulos C., Mitochondrial tRNA mutations: Clinical and functional perturbations, *RNA Biology* 2007; 4:1-30.
82. Zsurka G., Kálmánb J., Juhász A., Császár A., Raskód I., Jankab Z., Venetianera P., No mitochondrial haplotype was found to increase risk for Alzheimer's disease, *Biol Psychiatry* 1998; 44: 371–373.