



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

## ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Ανίχνευση μεταλλάξεων σε μιτοχονδριακά tRNA  
γονίδια, σε φυσιολογικά άτομα και σε ασθενείς με  
Alzheimer**

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ: ΑΙΜΙΛΙΑ ΖΙΦΑ

ΚΑΜΠΟΥΡΗΣ ΙΩΑΝΝΗΣ

ΛΑΡΙΣΑ 2012

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Γενετικής, Συγκριτικής & Εξελικτικής Βιολογίας στο τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κατά το ακαδημαϊκό έτος 2011-2012, υπό την επίβλεψη και την καθοδήγηση της κα. 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 τους υποψήφιους διδάκτορες Κώστα Σταμάτη και Θέμη Γιαννούλη και τις μεταπτυχιακές φοιτήτριες Μαρίνη Τερζενίδου και Ντίνα Σαρρή για τη βοήθεια που μου παρείχαν κατά τη διάρκεια εκτέλεσης του πειραματικού μέρους. Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω τον υποψήφιο διδάκτορα Πασχάλη Θεοτόκη για τις χρήσιμες συμβουλές του.

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

Περίληψη / Abstract.....	4
<b>Εισαγωγή.....</b>	<b>6</b>
Τα μιτοχόνδρια.....	7
Λειτουργία του μιτοχονδρίου.....	8
Οξειδωτική φωσφορυλίωση.....	10
Μιτοχόνδρια και οξειδωτικό στρες.....	12
Μιτοχόνδρια και απόπτωση.....	14
Ανθρώπινο μιτοχονδριακό γονιδίωμα.....	15
Μεταλλάξεις στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα και εμφάνιση μιτοχονδριακών νοσημάτων.....	17
Μεταλλάξεις σε μιτοχονδριακά γονίδια tRNA.....	19
Η νόσος του Alzheimer.....	20
Χαρακτηριστικά της νόσου.....	20
Νευροϊνιδικά δεμάτια.....	21
Αμυλοειδείς πλάκες.....	23
Γενετικό υπόβαθρο της νόσου Alzheimer.....	24
Διαταραχή στο μεταβολισμό του εγκεφάλου και οξειδωτικό στρες στη νόσο του Alzheimer.....	26
Μεταλλάξεις στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα και νόσος του Alzheimer.....	29
Σκοπός της εργασίας.....	34
<b>Υλικά και μέθοδοι.....</b>	<b>35</b>
Βιολογικό Υλικό.....	36
Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR, Polymerase Chain Reaction).....	36
Ανάλυση πολυμορφισμού μονοκλώνης αλυσίδας (SSCP, Single-Strand Conformation Polymorphism).....	43
Καθαρισμός PCR Προϊόντων.....	46
Αλληλούχιση.....	47
<b>Αποτελέσματα.....</b>	<b>50</b>
Γονίδια <i>tRNA<sup>Asn</sup></i> <i>tRNA<sup>Cys</sup></i> ΚΑΙ <i>tRNA<sup>Tyr</sup></i> σε δείγματα ελέγχου και σε ασθενείς με Alzheimer.....	51
Γονίδια <i>tRNA<sup>Ser</sup></i> και <i>tRNA<sup>Asp</sup></i> σε δείγματα ελέγχου.....	53
Γονίδια <i>tRNA<sup>Ser</sup></i> και <i>tRNA<sup>Asp</sup></i> σε δείγματα ασθενών με Alzheimer.....	55
<b>Συζήτηση.....</b>	<b>59</b>
<b>Βιβλιογραφία.....</b>	<b>64</b>

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα μιτοχόνδρια η κύρια πηγή ενέργειας ενός ευκαρυωτικού κυττάρου διαθέτουν γονιδίωμα (mtDNA) το οποίο περιέχει μερικά από τα βασικά γονίδια για την λειτουργία τους. Οι μεταλλάξεις στο mtDNA είναι υπεύθυνες για τα μιτοχονδριακά νοσήματα, μία ετερογενή ομάδα ασθενειών με κοινό χαρακτηριστικό τη βλάβη της αναπνευστικής αλυσίδα, ελαττωμένη παραγωγή ενέργειας και το οξειδωτικό στρες. Στη νόσο του Alzheimer εμφανίζεται έντονη μιτοχονδριακή δυσλειτουργία και οξειδωτικό στρες. Επειδή οι μεταλλάξεις στο mtDNA εμπλέκονται σε παρόμοιες καταστάσεις, θεωρείται πιθανή η συμβολή τους στη νόσο. Στην παρούσα μελέτη ελέγχθηκαν 50 ασθενείς με Alzheimer για την παρουσία μεταλλάξεων σε 5 από τα 22 μιτοχονδριακά tRNA γονίδια *tRNA<sup>Ser(UCN)</sup>*, *tRNA<sup>Asp</sup>*, *tRNA<sup>Asn</sup>*, *tRNA<sup>Cys</sup>* και *tRNA<sup>Tyr</sup>*. Τα δύο πρώτα γονίδια μελετήθηκαν σε μία ομάδα ελέγχου με 75 δείγματα υγιών ατόμων ενώ για τα υπόλοιπα σε μία ομάδα ελέγχου 54 ατόμων. Στους ασθενείς εντοπίστηκε η μετάλλαξη C7476T στο *tRNA<sup>Asp</sup>* σε ποσοστό 2%, ενώ δεν εντοπίστηκε στην ομάδα ελέγχου. Επιπλέον στην ομάδα ελέγχου των 75 υγιών ατόμων εντοπίστηκε η μετάλλαξη T7547C στο *tRNA<sup>Ser(UCN)</sup>* σε ποσοστό 2,7%, ενώ δεν εντοπίστηκε στους ασθενείς με Alzheimer. Η έρευνα αυτή αποτελεί μέρος μιας συνολικότερης έρευνας που περιλαμβάνει 100 ασθενείς με Alzheimer και όλα τα μιτοχονδριακά γονίδια των tRNAs. Οι μεταλλάξεις που βρέθηκαν στα γονίδια που μελετήθηκαν δεν μπορούν να μας δώσουν μια ξεκάθαρη εικόνα της εμπλοκής μιτοχονδριακών μεταλλάξεων tRNA στον εκφυλισμό των νευρώνων στους ασθενείς με Alzheimer.

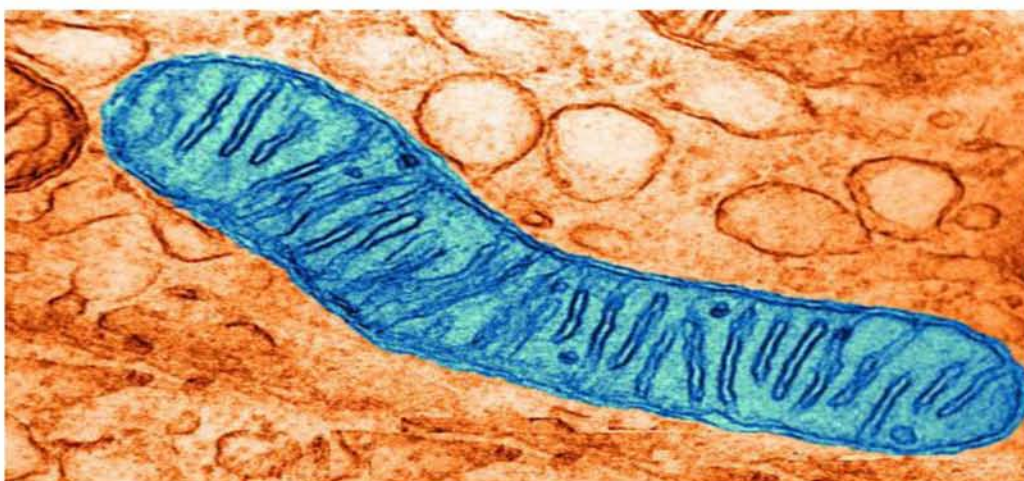
## ABSTRACT

Mitochondria, the main source of energy in eukaryotic cells, contain genome that codes basic genes from respiratory chain. Mutations in mitochondrial DNA (mtDNA) and the dysfunction of mitochondria are responsible for a heterogeneous group of diseases, the mitochondrial disorders. Mitochondrial dysfunction, mitochondrial morphological and respiratory chain's abnormalities have been reported to Alzheimer's disease. Mutations on mtDNA are involved in similar conditions, making possible the involvement of mitochondria in the disease. In this study, 50 samples of Alzheimer patients were examined for the presence of mutations in 5 of the 22 mitochondrial tRNA genes *tRNA<sup>Ser(UCN)</sup>*, *tRNA<sup>Asp</sup>*, *tRNA<sup>Asn</sup>*, *tRNA<sup>Cys</sup>* and *tRNA<sup>Tyr</sup>*. 75 samples of controls were examined for the presence of mutations in *tRNA<sup>Ser(UCN)</sup>* and *tRNA<sup>Asp</sup>*, and 55 samples of control were examined in *tRNA<sup>Asn</sup>*, *tRNA<sup>Cys</sup>* and *tRNA<sup>Tyr</sup>*. The mutation C7476T (*tRNA<sup>Asp</sup>*) was founded in a low percentage in the patients group (2%). In the 75 samples control group the mutation C7476T wasn't found, but the mutation T7547C (*tRNA<sup>Ser(UCN)</sup>*) was founded, in 2,7% percentage and with no detection in the Alzheimer's patients. These results indicate no contribution of these genes to the development of the disease. To deliver consistent results, it is needed a very large number of samples.

# Εισαγωγή

## Μιτοχόνδρια

Τα μιτοχόνδρια είναι ωσειδή οργανίδια τα οποία απαντούν στα ευκαρυωτικά κύτταρα και συνεπώς στην πληθώρα των κυττάρων των θηλαστικών. Έχουν συνήθως μήκος περίπου 2 μm και διάμετρο 0,5 μm. Ως προς τη μοριακή τους σύσταση περιέχουν 66% νερό, 22% πρωτεΐνες, 11% λιπίδια και 1% νουκλεοτίδια και ιόντα. Η μορφολογική δομή τους είναι χαρακτηριστική, αποτελούνται από δύο μεμβράνες, μία εξωτερική και μία εσωτερική, η οποία σχηματίζει πολυάριθμες πτυχώσεις που ονομάζονται ακρολοφίες. Ανακαλύφθηκαν ως συστατικά του κυττάρου από τον Altman το 1886, με χρήση μίας ειδικής χρωστικής που ονομάζεται πράσινο του Janus. Το 1898 ο Benda εισήγαγε τον όρο μιτοχόνδριο και το 1904 οι Bensley και Hoerr απομόνωσαν τα οργανίδια αυτά με υπερφυγοκέντρηση. Η λεπτομερειακή τους δομή έγινε γνωστή το 1952 και επέτρεψε την κατανόηση των βιοχημικών μηχανισμών καθώς και τη συσχέτιση της δομής του με τις βιοχημικές λειτουργίες. Συμφωνά με την θεωρία της ενδοσυμβίωσης τα μιτοχόνδρια προέρχονται από τη συμβίωση αερόβιων βακτηριών με τους πρώτους ευκαρυωτικούς οργανισμούς.



**Εικόνα 1:** Ενισχυμένη με χρώματα φωτογραφία μιτοχονδρίου από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο.

Αποτελούν το 18-20% του κυτταροπλασματικού όγκου και είναι υπεύθυνα για την παραγωγή ενέργειας με τη μορφή της τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP), με τη διαδικασία της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Τα παραγόμενα μόρια ATP κατά το μέσο όρο ζωής ενός τυπικού ευκαρυωτικού κυττάρου ανέρχονται στα 10.000.000.000.

Τα μιτοχόνδρια μέσω της παραγωγής ATP συμβάλουν στη διεξαγωγή λειτουργιών μεγάλης σημασίας για το κύτταρο όπως:

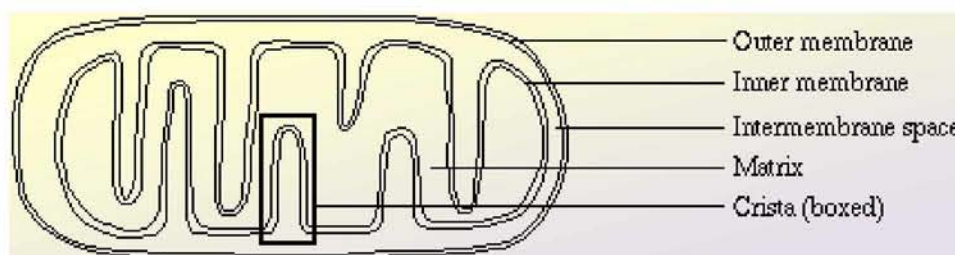
- Σύνθεση μακρομορίων (πρωτεΐνες, RNA, DNA, πολυσακχαρίτες κ.α.)
- Κίνηση μαστιγίων και βλεφαρίδων

- Πολυμερισμός ινιδίων κυτταρικού σκελετού
- Ενεργή μεταφορά ιόντων και ρυθμιστικών μορίων μέσω των μεμβρανών
- Ενδοκύτωση και έκκριση
- Ενζυμική κατάλυση

Ακόμη τα μιτοχόνδρια εμπλέκονται σε βασικές κυτταρικές διαδικασίες όπως ομοίωση ασβεστίου, διαφοροποίηση και απόπτωση.

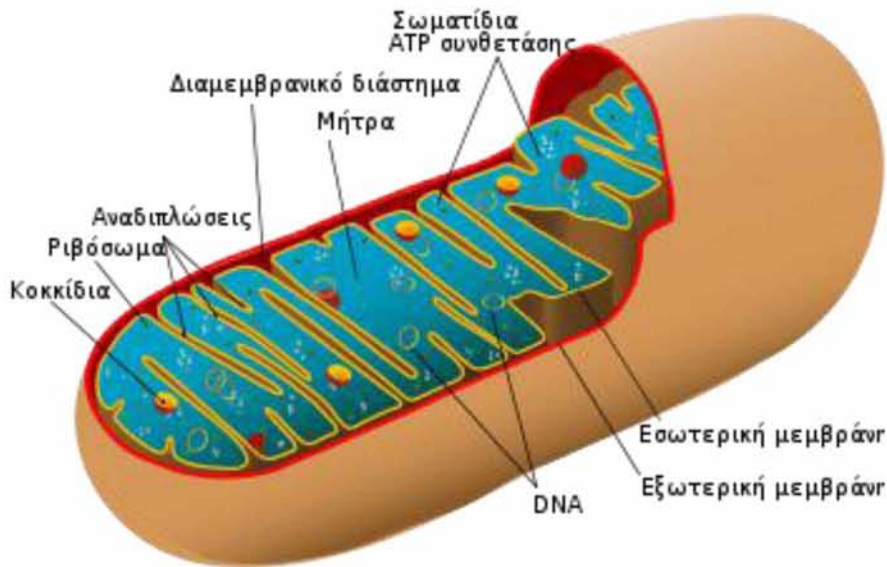
### Λειτουργία των μιτοχονδρίων

Η δομή του μιτοχονδρίου είναι σημαντική για τις λειτουργίες του. Το μιτοχόνδριο αποτελείται από δύο μεμβράνες (Εικόνα 2). Η εξωτερική του μεμβράνη είναι διαπερατή στα περισσότερα μικρά μόρια και ιόντα, και περιέχει οξειδωτικά ένζυμα καθώς και πρωτεΐνες μεταφοράς. Όσον αφορά τον ενδιάμεσο χώρο περιέχει κινάσες οι οποίες χρησιμοποιούν το ATP για να φωσφορυλιώσουν άλλα νουκλεοτίδια. Η εσωτερική μεμβράνη καλύπτει το χώρο του μιτοχονδρίου που ονομάζεται μήτρα. Είναι αδιαπέραστη σε όλα τα μόρια και ειδικοί μεταφορείς επιτελούν το έργο της μεταφοράς ιόντων. Περιέχει ιδιαίτερη λιπιδιακή σύσταση, που συμβάλει μαζί με την πλούσια πρωτεϊνική σύσταση στη διεξαγωγή διεργασιών, και πλήθος ενζύμων που σχετίζονται με την κυτταρική αναπνοή καθώς εκεί πραγματοποιείται η οξειδωτική φωσφορυλίωση. Η εσωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου σχηματίζει τις ακρολοφίες, δαχτυλοειδείς πτυχώσεις κάθετες προς τον επιμήκη άξονα του μιτοχονδρίου (Εικόνα 3), δημιουργώντας διαφράγματα που δε διακόπτουν το χώρο της μήτρας, και αυξάνουν δέκα φορές την επιφάνεια της μεμβράνης από τη μεμβράνη ενός δεδομένου κυττάρου. Ο αριθμός των πτυχώσεων είναι ανάλογος του ποσοστού της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης που επιτελείται σε κάθε μιτοχόνδριο. Η μήτρα, ο εσωτερικός χώρος του μιτοχονδρίου είναι μία παχύρρευστη μάζα καθώς περιλαμβάνει μεγάλα ποσά πρωτεϊνών όπως τα ένζυμα του κύκλου του κιτρικού οξέος, DNA και RNA (Chan DC 2006). Τα μιτοχόνδρια δεν είναι στατικά οργανίδια αλλά διαιρούνται και συγχωνεύονται διαρκώς στο κύτταρο όποτε το περιβάλλον και οι συνθήκες το απαιτούν (Bonda et al.,2010).



**Εικόνα 2:** Απεικόνιση της δομής του μιτοχονδρίου.

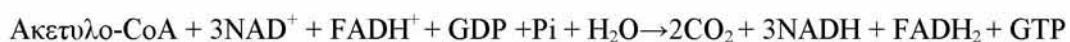




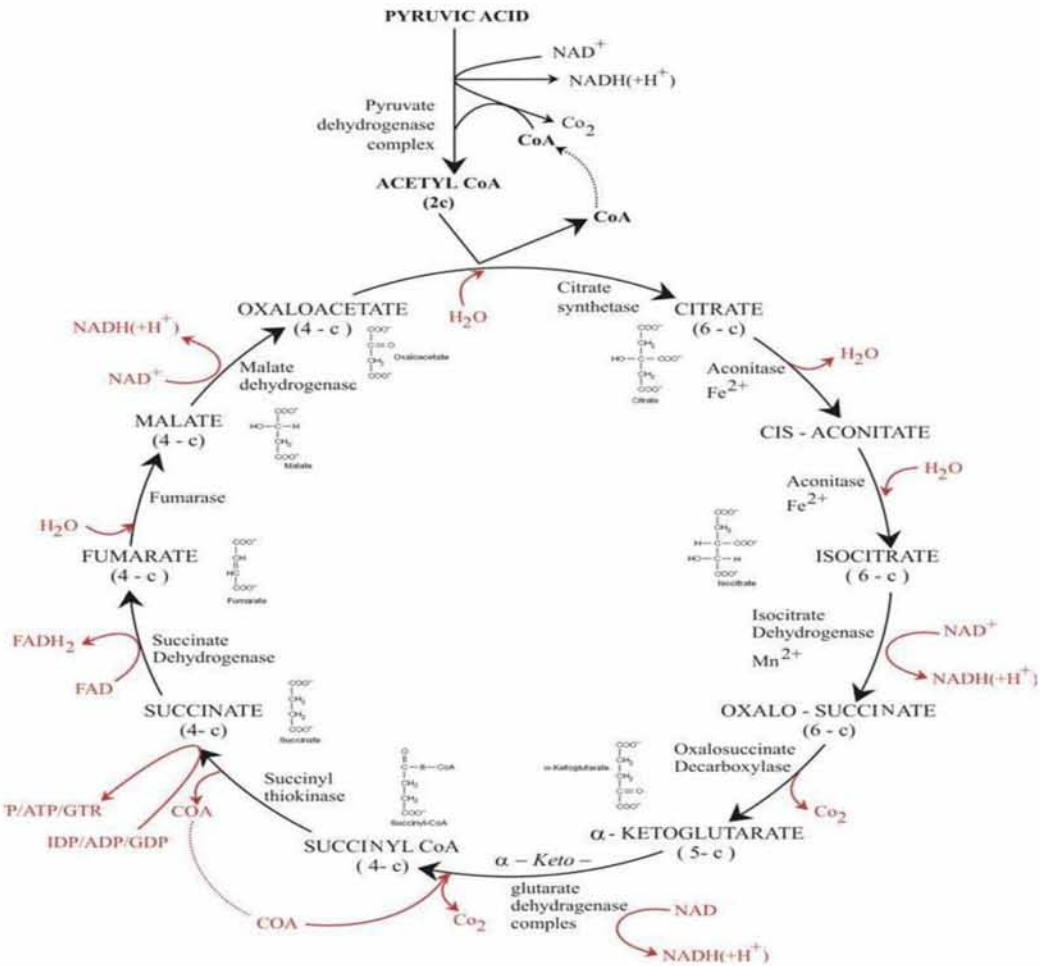
**Εικόνα 3:** Αναπαράσταση του εσωτερικού του μιτοχονδρίου. Η εσωτερική μεμβράνη σχηματίζει αναδιπλώσεις (ακρολοφίες) στις οποίες επιτελείται η οξειδωτική φωσφορυλίωση.

### Οξειδωτική φωσφορυλίωση: ο κύκλος του κιτρικού οξέος

Όπως προαναφέρθηκε στο μιτοχόνδριο επιτελείται η ύψιστης σημασίας λειτουργία της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Η διαδικασία αυτή χωρίζεται σε δύο μέρη, την οξείδωση των και καταβολισμό σακχάρων λιπαρών οξέων και αμινοξέων, και στη μετατροπή της ενέργειας που απελευθερώθηκε με την οξείδωση σε ATP. Η διαδικασία της οξείδωσης επιτελείται με τον κύκλο του Krebs (Εικόνα 4). Αυτός ο κύκλος αποτελεί το πέρασμα από τον αναερόβιο στον αερόβιο μεταβολισμό. Λιπίδια, κετογονικά αμινοξέα και σάκχαρα μετά από ενζυμική διάσπαση ή τροποποίηση, μπορούν να εισέλθουν στον κύκλο του Krebs με τη μορφή του ακετυλοσυνένζυμου-A (ακέτυλο-CoA). Αυτό στη συνέχεια αφού ισομεριωθεί σε ισοκιτρικό, οξειδώνεται και αποξυκαρβοξυλιώνεται σε α-κετογλουταρικό, με τη μετατροπή του  $\text{NAD}^+$  σε  $\text{NADH}$ . Το α-κετογλουταρικό στη συνέχεια αποκαρβοξυλιώνεται σε ηλεκτρυλο-συνένζυμο A, με ταυτόχρονη μετατροπή  $\text{NAD}^+$  σε  $\text{NADH}$ . Το ηλεκτρυλο-συνένζυμο A μετατρέπεται σε ηλεκτρικό με την παραγωγή  $\text{GTP}$ , από  $\text{GDP}$ . Το τελευταίο μετατρέπεται σε φουμαρικό με την παραγωγή  $\text{FADH}_2$  από  $\text{FADH}^+$ . Το φουμαρικό υδροξυλιώνεται σε μηλικό και αυτό σε οξαλοξικό, με ταυτόχρονη μετατροπή του  $\text{NAD}^+$  σε  $\text{NADH}$ . Στοιχειομετρικά η αντίδραση του κύκλου είναι:



Πέρα από τα κετογονικά αμινοξέα υπάρχουν και τα γλυκογονικά αμινοξέα, τα οποία εισέρχονται στον κύκλο με μετατροπή τους σε ενδιάμεσα μόρια του κύκλου ή σε πυροφωσφορικό οξύ, μία ένωση υπόστρωμα για το σχηματισμό ακετυλο-CoA.

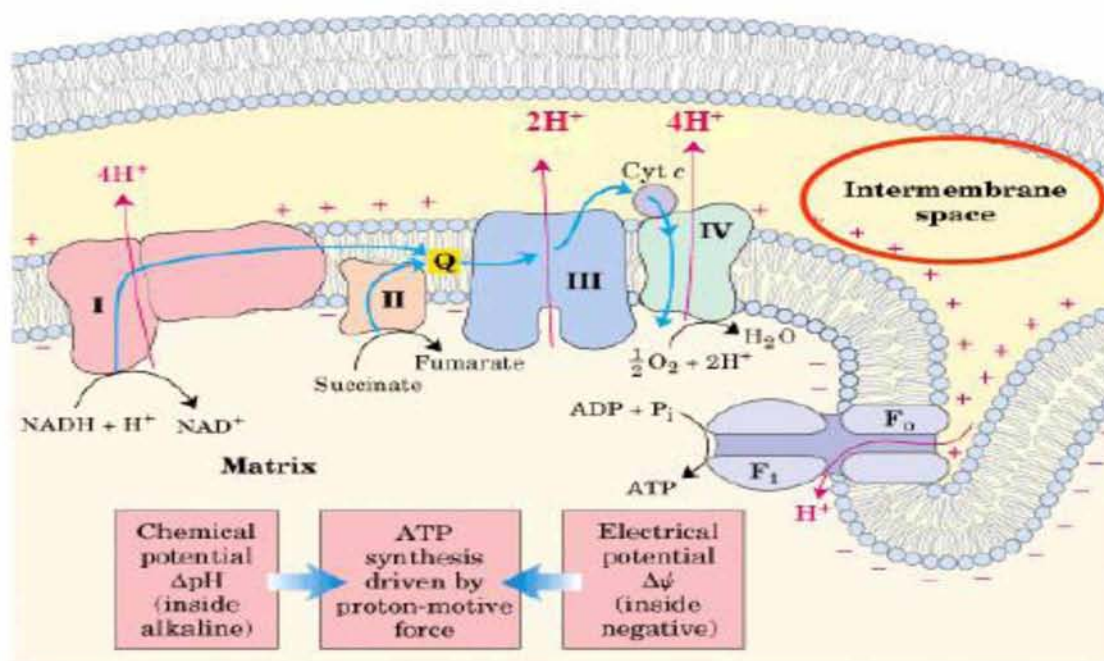


Εικόνα 4: Ο κύκλος του κίτρικού οξέος.

### Οξειδωτική φωσφορυλίωση: Αναπνευστική αλυσίδα και σχηματισμός ATP

Το NADH και το FADH<sub>2</sub> που σχηματίζονται είναι μόρια πλούσια σε ενεργεία καθώς το κάθε ένα από αυτά περιέχει ένα ζεύγος ηλεκτρονίων με υψηλό δυναμικό μεταφοράς. Τα ηλεκτρόνια θα αξιοποιηθούν για την παραγωγή ATP και μεταφέρονται μέσω μίας σειράς αντιδράσεων που ονομάζεται αναπνευστική αλυσίδα (Εικόνα 5). Τα οξειδοαναγωγικά συστήματα που συμμετέχουν στην αναπνευστική αλυσίδα, έχουν τέτοια διάταξη ώστε το οξειδωαναγωγικό δυναμικό να αυξάνεται από το NADH στο O<sub>2</sub>, έτσι κάθε σύστημα είναι ηλεκτροθετικότερο από το προηγούμενο και ηλεκτροναρνητικότερο από το επόμενο. Η ελάττωση της ενέργειας δε γίνεται ομοιόμορφα αλλά υπάρχουν τρεις περιοχές όπου

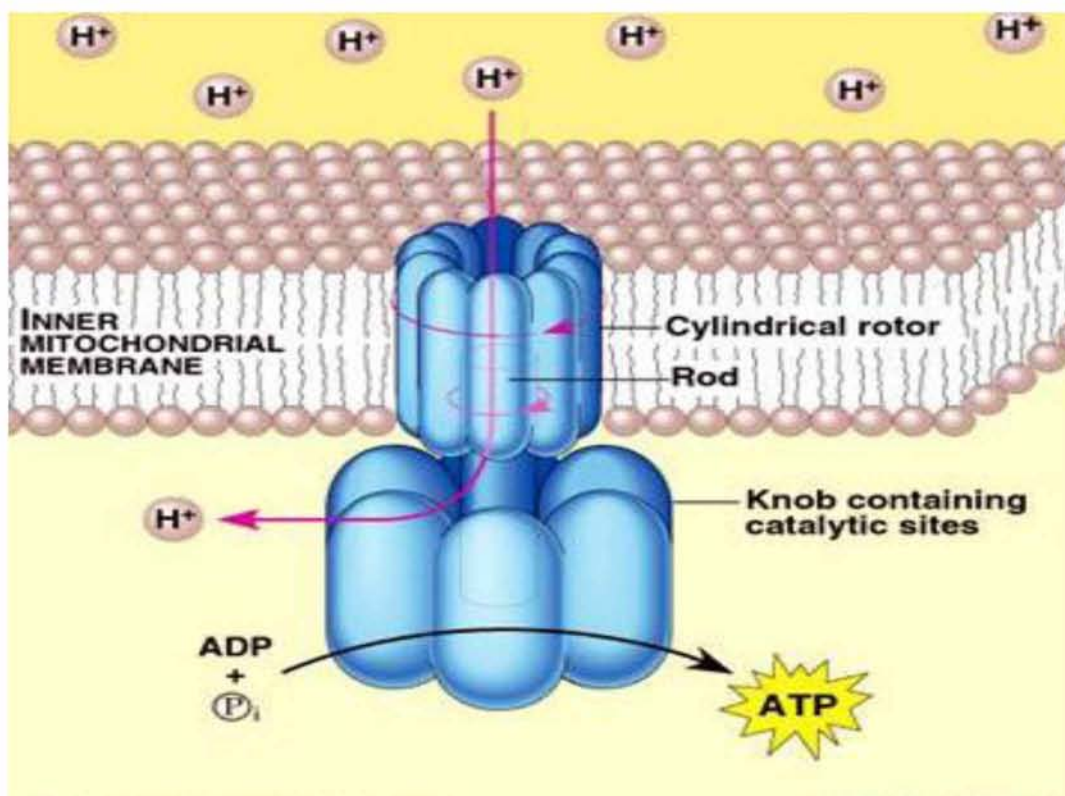
ελαττώνεται η ελεύθερη ενέργεια και σχηματίζεται ATP. Στην αναπνευστική αλυσίδα δύο είναι τα συνένζυμα τα οποία μεταφέρουν την αναγωγική δύναμη της αναπνευστικής αλυσίδας που θα μετατραπεί σε χημική ενέργεια, το NADH και η ουβικινόνη. Η αναπνευστική αλυσίδα ξεκινάει με την οξείδωση του NADH σε  $\text{NAD}^+$  από την αφυδρογονάση του NADH με σύγχρονη αναγωγή των συνδεδεμένων συνενζύμων (φλαβινোসυνενζύμα). Η αφυδρογονάση περιέχει και μία φλαβοπρωτεΐνη που μεταφέρει τα υδρογόνα στην ουβικινόνη. Η ουβικινόνη αποτελεί μία δεξαμενή υδρογόνου, καθώς συγκεντρώνει υδρογόνα από άλλες πηγές, όπως την οξείδωση του ηλεκτρικού σε φουμαρικό. Από την ουβικινόνη τα ηλεκτρόνια μεταφέρονται σε δύο στάδια, πρώτα σε ημικινόνη μεταφέροντας ένα ηλεκτρόνιο στην πρωτεΐνη Fe-S και μετά στην οξειδωμένη μορφή της μεταφέροντας ένα ηλεκτρόνιο στο κυτόχρωμα  $b_L$ . Το κυτόχρωμα  $b_L$  μεταφέρει το ηλεκτρόνιο του στο κυτόχρωμα  $b_H$ . Η Fe-S πρωτεΐνη μεταφέρει το ηλεκτρόνιο στο κυτόχρωμα C. Τέλος το κυτόχρωμα C μεταφέρει τα ηλεκτρόνια στην κυτοχρωμική οξειδάση, και εκείνη τα μεταφέρει στο οξυγόνο ανάγοντας το, οδηγώντας στο σχηματισμό νερού (Ernster & Schatz, 1981).



**Εικόνα 5:** Αναπνευστική αλυσίδα, μεταφοράς ηλεκτρονίων, Το ATP συντίθεται από άλας του ορθοφωσφορικού οξέος και ADP, μέσω της χημειοσμωτικής ροής των πρωτονίων, που προκαλείται εξαιτίας της βαθμίδωσης του pH και του φορτίου, εκατέρωθεν της εσωτερικής μεμβράνης.

Λόγω της μεταφοράς ηλεκτρονίων σχηματίζεται μεταξύ του διαμεμβρανικού χώρου και της μήτρας μία διαφορά δυναμικού, με αρνητική την πλευρά της μήτρας και θετική την πλευρά του διαμεμβρανικού χώρου. Τα πρωτόνια επανεισάγονται στη μήτρα μέσω της  $F_0$

υπομονάδας της ATP-συνθάσης, με αποτέλεσμα την αλλαγή διαμόρφωσης της  $F_1$  υπομονάδας και σχηματισμού ATP από ADP και  $P_i$  (Εικόνες 5,6).

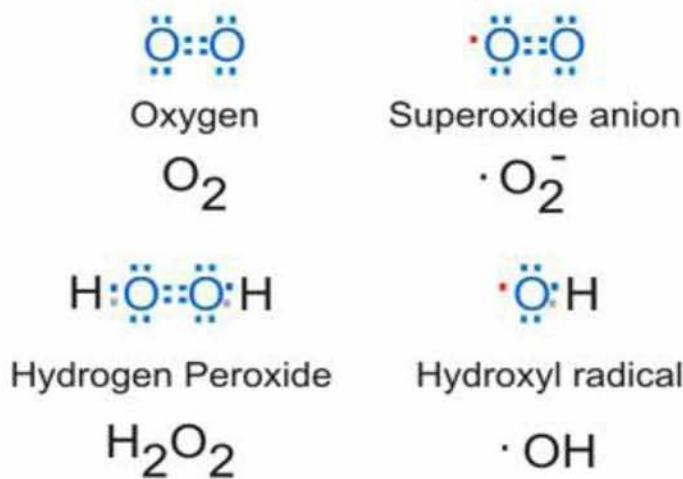


Εικόνα 6: Σχηματισμός ATP χημειωσμοτικά με βαθμίδωση pH και ροής πρωτονίων.

### Μιτοχόνδρια και οξειδωτικό stress

Τα μιτοχόνδρια επιπρόσθετα αποτελούν τη σημαντικότερη πηγή παραγωγής ελευθέρων ριζών (Reactive Oxygen Species, ROS). Ο όρος ελεύθερες ρίζες απευθύνεται σε μόρια ή άτομα που περιέχουν στην εξωτερική τους στιβάδα ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο. Λόγω αυτού του ασύζευκτου ηλεκτρονίου οι ελεύθερες ρίζες είναι χημικά εξαιρετικά ασταθείς και ικανές να αντιδράσουν με διάφορα θεμελιώδη και δομικά μόρια του κυττάρου όπως νουκλεϊκά οξέα, πρωτεΐνες και λιπίδια. Το μιτοχόνδριο είναι μία από τις σημαντικότερες πηγές παραγωγής ελευθέρων ριζών στο ευκαρυωτικό κύτταρο (Sarsour et al., 2010). Το 1-4% του οξυγόνου που αλληλεπιδρά με την αναπνευστική αλυσίδα μετατρέπεται σε ανιόν υπεροξειδίου ( $O_2^-$ ), μία ελεύθερη ρίζα, η οποία είναι υπερβολικά δραστική (Εικόνα 7). Η παραγωγή της οφείλεται σε διάφορες αιτίες που πηγάζουν κυρίως από τα σύμπλοκα I και το συνένζυμο Q της αναπνευστικής αλυσίδας, όπου λόγω συσσώρευσης ηλεκτρονίων τα ηλεκτρόνια προσφέρονται άμεσα στο μοριακό οξυγόνο. Λόγω της εξαιρετικής δραστικότητάς της αντιδρά με διαφορά συστατικά οδηγώντας σε ένα καταρράκτη αντιδράσεων

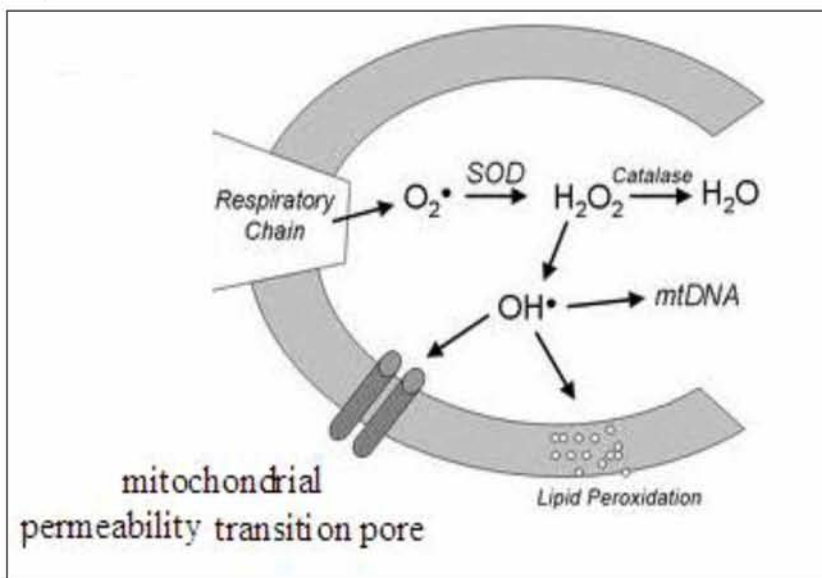
καταστρέφοντας συστατικά βασικά του κυττάρου, όπως πρωτεΐνες και νουκλεοτίδια (Εικόνα 8). Για να προστατευτεί το κύτταρο από τις επιδράσεις τους διαθέτει πληθώρα αντιοξειδωτικών μηχανισμών, ακόμα και στο εσωτερικό του μιτοχονδρίου. Οι μηχανισμοί αυτοί περιλαμβάνουν ένζυμα, όπως η δισμουτάση του μαγγανίου, η οποία μετατρέπει το υπεροξειδικό ανιόν σε υπεροξείδιο του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ) ταχύτατα. Η δισμουτάση του μαγγανίου είναι το μοναδικό αντιοξειδωτικό ένζυμο το οποίο είναι αναγκαίο για την επιβίωση κάθε αερόβιου ζωντανού οργανισμού. Στη συνέχεια, τα ένζυμα καταλάση, υπεροξειδοξινική αναγωγάση και υπεροξειδάση της γλουταθειόνης μετατρέπουν το υπεροξείδιο σε νερό και οξυγόνο. Το υπεροξείδιο του υδρογόνου μπορεί να συμμετέχει και σε αντιδράσεις κατάλυσης Fenton με μέταλλα, παράγοντας ρίζες υδροξυλίου ( $\cdot OH$ ) (Castellani et al., 2002). Συγχρόνως το διοξειδίο του αζώτου που παράγεται από το μεταβολισμό της αργινίνης αντιδρά με το υπεροξειδικό ανιόν σχηματίζοντας



υπεροξυνιτρώδη ρίζα ( $ONOO^-$ ). Οι ρίζες υδροξυλίου είναι εξίσου δραστικές με πρωτεΐνες, νουκλεϊκά οξέα (Εικόνα 9), λιπίδια και λοιπά συστατικά του κυττάρου (Mancuso et al., 2008).

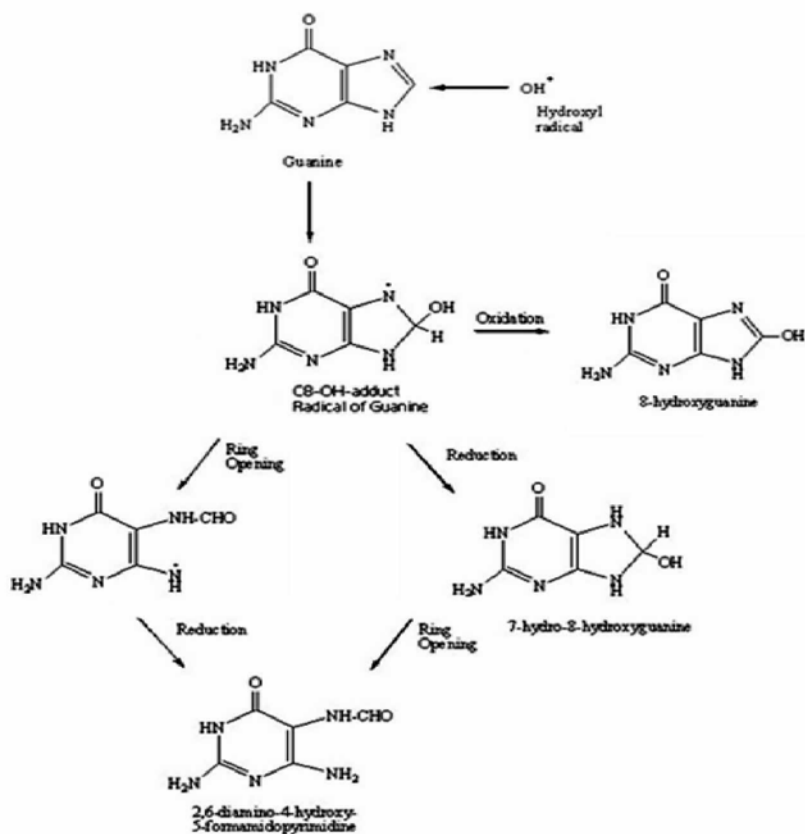
**Εικόνα 7:** Δραστικές ρίζες οξυγόνου. Αριστερά η θεμελιώδης κατάσταση

του οξυγόνου και υπεροξειδίου του υδρογόνου. Δεξιά οι ενεργές μορφές οξυγόνου, το υπεροξειδικό ανιόν και η ρίζα υδροξυλίου. Το υπεροξειδικό ανιόν σχηματίζεται όταν ηλεκτρόνια της αναπνευστικής αλυσίδας αποδοθούν κατευθείαν στο μοριακό οξυγόνο ενώ η υδροξυλική ρίζα μετά από συμμετοχή σε αντιδράσεις Fenton και Haber-Weiss με μεταπτωσηκά μέταλλα.



**Εικόνα 8:** Ένα σχεδιάγραμμα της αποτοξικοποίησης του υπεροξειδικού ανιόντος σε υπεροξείδιο και στη συνέχεια νερό. Το υπεροξείδιο λόγω αντιδράσεων Fenton και Haber-Weiss σχηματίζει την ρίζα υδροξυλίου που αντιδρά με κυτταρικά συστατικά.

Όπως είναι λογικό ύστερα από τις αντιδράσεις των κυτταρικών συστατικών με τις οξειδωτικές ρίζες η δομή των μορίων τους αλλάζει με αποτέλεσμα να αλλάζει και η δυνατότητα λειτουργίας τους καθιστώντας τα μη-λειτουργικά. Οξειδωτικό στρες στα κύτταρα προκύπτει όταν υπάρχει διαταραχή στην ισορροπία μεταξύ της παραγωγής οξειδωτικών ριζών και των μηχανισμών αποτοξικοποίησης τους. Η διαταραχή αυτή μπορεί να περιλαμβάνει την αυξημένη παραγωγή οξειδωτικών ριζών, τη μειωμένη λειτουργία αντιοξειδωτικών μηχανισμών ή και τα δύο γεγονότα ταυτόχρονα (Turro&Forman 2001).



**Εικόνα 9:** Αλλαγή της δομής του μορίου της γουανίνης από ρίζες υδροξυλίου. Η γουανίνη αποτελεί το νουκλεοτίδιο με την υψηλότερη ηλεκτρονιακή πυκνότητα, σε σχέση με τα υπόλοιπα νουκλεοτίδια και αντιδρά ευκολότερα με ελεύθερες ρίζες. Η γουανίνη οξειδώνεται σε ένα ενδιάμεσο και με περαιτέρω οξείδωση σχηματίζεται 8-υδροξυγουανίνη. Με άνοιγμα δακτυλίου και αναγωγή σχηματίζεται 2,6-διαμινο-4-υδροξυ-5-φορμαμιδοπυριμιδίνη.

### Μιτοχόνδρια και απόπτωση

Τα μιτοχόνδρια διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στον ελεγχόμενο θάνατο του κυττάρου (απόπτωση). Η κατάσταση της λειτουργίας των μιτοχονδρίων μπορεί να επηρεάσει την τύχη ενός κυττάρου μέσω της ελάττωσης της ενέργειας που του παρέχεται μέσω ATP ή της καταστροφής των κυτταρικών συστατικών από το οξειδωτικό στρες. Τα μιτοχόνδρια περιέχουν πολλές προ-αποπτωτικές πρωτεΐνες όπως το κυτόχρωμα c, SMAC/DIABLO και AIF (Apoptosis Inducing Factor) (Yang et al. 2009, C.Y. Liu et al., 2009). Ύστερα από κυτταρικό stress, καταστροφή από ελεύθερες ρίζες ή στέρση αυξητικών παραγόντων, ενεργοποιείται η πρωτεΐνη MPTP (Mitochondrial Permeability Transition Pore) οδηγώντας,

σε απελευθέρωση του κυτοχρώματος c και των υπολοίπων πρωτεϊνών στο κυτταρόπλασμα. Το κυτόχρωμα c συνδέεται με την πρωτεΐνη Araf1 και την προ-κασπάση 9, σχηματίζοντας το αποπτώσωμα ξεκινώντας ένα καταρράκτη αντιδράσεων από κασπάσες οδηγώντας στον κυτταρικό θάνατο (C.Y.Liu, et al. 2009). Η δράση της πρωτεΐνης SMAC/DIABLO είναι η αναστολή των αναστολέων των αποπτωτικών πρωτεϊνών IAP (Inhibitors of Apoptotic Proteins) οι οποίες είναι αναστολείς κασπασών (C. S. Duckett 2005). Ένα εναλλακτικό μονοπάτι, ανεξάρτητο των κασπασών από το οποίο μπορεί να προέλθει η απόπτωση ξεκινά με την απελευθέρωση του παράγοντα AIF, μεταφορά του στον πυρήνα όπου παίρνει μέρος στην καταστροφή της χρωματίνης και στον κατακερματισμό του DNA (C.Y.Liu, et al. 2009).

### **Μιτοχονδριακό γονιδίωμα**

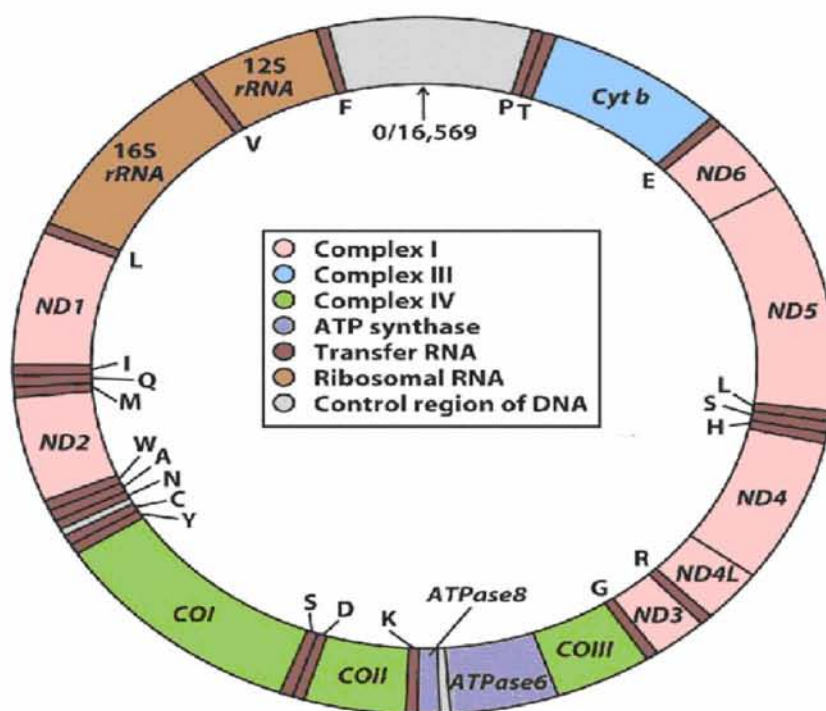
Τα μιτοχόνδρια και οι χλωροπλάστες των φυτών είναι τα μόνα οργανίδια, που υπόκεινται σε διπλή ρύθμιση. Τα μιτοχόνδρια περιέχουν γονιδίωμα που τους δίνει τη δυνατότητα να εκφράζουν γονίδια απαραίτητα για τις λειτουργίες τους. Ταυτόχρονα κάποια γονίδια απαραίτητα για τις μιτοχονδριακές λειτουργίες εκφράζονται από το πυρηνικό DNA. Το 1981 δημοσιεύτηκε για πρώτη φορά η πρωτοταγής δομή του γονιδιώματος των μιτοχονδρίων, το οποίο αποτελείται από 16.569 ζεύγη βάσεων (S.Anderson et al., 1981). Το μιτοχονδριακό DNA είναι κυκλικό δίκλωνο μόριο και εμφανίζεται από δύο μέχρι δέκα αντίγραφα στο κάθε μιτοχόνδριο. Ο ένας κλώνος ο οποίος είναι πλουσιότερος σε γουανίνη, ονομάζεται βαριά αλυσίδα, ενώ ο συμπληρωματικός του ονομάζεται ελαφριά αλυσίδα. Το μιτοχονδριακό DNA κωδικοποιεί 37 γονίδια, από τα οποία τα δύο είναι rRNA, 13 γονίδια που κωδικοποιούν υπομονάδες της αναπνευστικής αλυσίδας και 22 που κωδικοποιούν tRNAs (Εικόνα 10).

Το mtDNA είναι τουλάχιστον δέκα φορές πιο επιρρεπές σε μεταλλάξεις από το πυρηνικό. Αυτό πιθανότατα ευθύνεται στη θέση του μιτοχονδριακού γονιδιώματος στη μήτρα του μιτοχονδρίου, με αποτέλεσμα να εκτίθεται σε οξειδωτικές ρίζες που παράγονται ως παραπροϊόντα της αναπνευστικής αλυσίδας, καθώς και στην απουσία προστατευτικών ιστονών και μηχανισμών επιδιόρθωσης. Ακόμη το γεγονός ότι το μιτοχονδριακό γονιδίωμα είναι συμπυκνόμενο, με ένα 5% μονάχα να μην περιέχει γονίδια, αυξάνει την πιθανότητα μία τυχαία μετάλλαξη από οξειδωτικές ρίζες να συμβεί σε κωδική περιοχή, επηρεάζοντας τη λειτουργικότητα των γονιδίων.

Το μιτοχονδριακό γονιδίωμα αποτελεί πρότυπο εξοικονόμησης χώρου. Ιντρόνια απουσιάζουν από τα γονίδιά του, και όπως φαίνεται στην εικόνα 10, τα γονίδια που περιέχει δεν απέχουν πολύ μεταξύ τους μάλιστα δύο από αυτά, οι υπομονάδες 6 και 8 της ATP συνθάσης αλληλεπικαλύπτονται (Mitomap). Κατά τη μεταγραφή του μιτοχονδριακού

γονιδιώματος συντίθενται δύο πολυκιστρονικά πρόδρομα RNA, ένα από το βαρύ κλώνο και ένα από τον ελαφρύ κλώνο. Στο βαρύ κλώνο περιέχονται 10 mRNAs για 12 γονίδια, 2 rRNAs και 14 tRNAs, ενώ στο πρόδρομο RNA που προέρχεται από τον ελαφρύ κλώνο περιέχονται το γονίδιο ND6 και 8 tRNAs (Chujo et al., 2012).

Το μιτοχόνδριο εμφανίζει μητρική κληρονομικότητα. Κατά τη γονιμοποίηση όλα τα μιτοχόνδρια και συνεπώς το mtDNA προέρχονται από ωάριο καθώς τα μιτοχόνδρια του σπερματοζωαρίου βρίσκονται στην ουρά η οποία παραμένει έξω από το ωάριο κατά τη γονιμοποίηση. Συνεπώς τα μιτοχόνδρια κληρονομούνται από μητέρα στους απογόνους της ακολουθώντας ένα μη-Μενδελικό τρόπο κληρονομικότητας, με εξαίρεση μία περίπτωση πατρικής κληρονομής έχει καταγραφεί στην περίπτωση ενός ασθενή με έλλειψη 2bp στο γονίδιο *MT-ND2*. Στην περίπτωση εκείνη το γονιδίωμα των μιτοχονδρίων του ασθενούς διέθετε όμοιο απλότυπο με αυτό του πατέρα του με εξαίρεση την έλλειψη. (Schwartz and Vissing 2002).



**Εικόνα 10:** Τα μιτοχονδριακά γονίδια και η θέση τους στο mtDNA. Διακρίνονται με ροζ χρώμα τα γονίδια της NADH δευδρογονάσης (σύμπλοκο I), με μπλε χρώμα το γονίδιο του κυτοχρώματος-b (σύμπλοκο III) με πράσινο τα γονίδια της κυτοχρωμικής οξειδάσης (σύμπλοκο IV) με ανοιχτό καφέ τα γονίδια που κωδικοποιούν τις δύο rRNAs υπομονάδες και με σκούρο καφέ τα γονίδια που κωδικοποιούν tRNAs.



## **Μεταλλάξεις στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα και εμφάνιση μιτοχονδριακών νοσημάτων**

Τα γονίδια του μιτοχονδριακού γονιδιώματος εμφανίζουν έως και εκατονταπλάσιο ρυθμό εξέλιξης σε σχέση με τα αντίστοιχα πυρηνικά (Pesole et al., 1999) Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι τα μιτοχονδριακά γονιδιώματα μεταλλάσσονται ταχύτερα σε σχέση με το πυρηνικό. Το μιτοχονδριακό γονιδίωμα είναι ευαίσθητο σε μεταλλάξεις καθώς στο χώρο τον οποίο βρίσκεται, στη μήτρα του μιτοχονδρίου, υπάρχει παραγωγή ελευθέρων ριζών από τα σύμπλοκα II και III της αναπνευστικής αλυσίδας (Lenaz, 1999). Η απουσία ιστονών και οι ατελείς μηχανισμοί επιδιόρθωσης αφήνουν το μιτοχονδριακό γονιδίωμα εξαιρετικά εκτεθειμένο, παρά την προστασία που μπορεί να διαθέτει από αντιοξειδωτικά ένζυμα. Τέλος όπως ειπώθηκε και πριν το μοντέλο της γονιδιακής οικονομίας που διαθέτει, αυξάνει το ρίσκο μία μετάλλαξη να συμπέσει πάνω σε μία κωδική περιοχή.

Από το 1988 που αναγνωρίστηκε η πρώτη μετάλλαξη στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα, έχει εμφανιστεί συσχετίσή τους με πάνω από 200 ασθένειες. Οι μεταλλάξεις αυτές περιλαμβάνουν αμέτρητες ανακατατάξεις θέσεων (ελλείψεις ή διπλασιασμοί) και πάνω από 150 σημειακές μεταλλάξεις. Οι μιτοχονδριακές μεταλλάξεις που ευθύνονται για διάφορες διαταραχές, χωρίζονται σε δύο ομάδες. Στη μία ομάδα βρίσκονται οι μεταλλάξεις που επηρεάζουν τη λειτουργία πρωτεϊνών και στην άλλη οι μεταλλάξεις που επηρεάζουν το ποσοστό της πρωτεϊνοσύνθεσης. Οι μεταλλάξεις που επηρεάζουν το ποσοστό της πρωτεϊνοσύνθεσης εμφανίζονται σε γονίδια που παίζουν κρίσιμο ρόλο σε αυτή τη λειτουργία, στα δύο rRNAs και στα 22 tRNAs (DiMauro et al., 2005).

Λεδομένου ότι κάθε μιτοχόνδριο περιέχει 2-10 αντίγραφα του mtDNA και κάθε κύτταρο περιέχει από δεκάδες μέχρι χιλιάδες μιτοχόνδρια, σε κάθε κύτταρο το mtDNA θα απαντάται σε πολλά αντίγραφα. Συνήθως όλα τα mtDNA σε κύτταρα φυσιολογικού ατόμου είναι ίδια μεταξύ τους και δε φέρουν μεταλλάξεις, οπότε ανήκουν στην κατηγορία αγρίου τύπου (wild type, wt). Η ομοπλασμία είναι το φαινόμενο όπου μία μετάλλαξη εμφανίζεται σε όλα τα mtDNA ενός κυττάρου. Η ετεροπλασμία περιγράφει μία κατάσταση όταν μία μετάλλαξη βρίσκεται σε μερικά αντίγραφα του mtDNA, με αποτέλεσμα τη συνύπαρξη wt και μεταλλαγμένων mtDNAs σε διαφορετικές αναλογίες από κύτταρο σε κύτταρο.

Τα μιτοχονδριακά νοσήματα είναι οι διαταραχές που συμβαίνουν εξαιτίας δυσλειτουργιών της αναπνευστικής αλυσίδας. Στα μιτοχονδριακά νοσήματα, οι ιστοί οι οποίοι έχουν υψηλή ανάγκη κατανάλωσης ενέργειας όπως ο μυϊκός ή ο νευρικός ιστός πλήττονται σφόδρα. Αυτό σημαίνει ότι κατά την ετεροπλασμία κάποιοι ιστοί θα επηρεαστούν περισσότερο. Ένα ακόμη φαινόμενο που μπορεί να ενισχύσει ή να μειώσει τη δράση της ετεροπλασμίας είναι ο μιτωτικός διαχωρισμός: κατά τη μίτωση η αναλογία των

μεταλλαγμένων προς τα φυσιολογικά mtDNA μπορεί να αλλάξει λόγω τυχαίας κατανομής (DiMauro & Davidzon 2005).

Μερικά μιτοχονδριακά νοσήματα:

➤ MELAS (Μιτοχονδριακή εγκεφαλοπάθεια με γαλακτική οξείδωση και εγκεφαλικά επεισόδια

Το MELAS αποτελεί την πιο ευρέως διαδεδομένη μιτοχονδριακή εγκεφαλοπάθεια. Χαρακτηρίζεται από κρίσεις και άνοια, επαναλαμβανόμενα εγκεφαλικά επεισόδια από νεαρή ηλικία, μυοπάθεια και γαλακτική οξέωση. Σε κάποιους ασθενείς έχει αναφερθεί κώφωση, αταξία και χαμηλό ανάστημα. Η πρώτη διεθνώς καταγεγραμμένη περίπτωση διαταραχής που περιλάμβανε εγκεφαλικά επεισόδια, γαλακτική οξέωση και ερυθρές ανώμαλες ίνες περιγράφηκε το 1984 (Pavlakis et al., 1984). Περίπου το 80% ασθενών με MELAS φέρει τη μετάλλαξη A3243G (*tRNA<sup>Leu</sup>*).

➤ MERF (Μυοκλονική επιληψία με ερυθρές ανώμαλες μυϊκές ίνες)

Το MERF είναι μία διαταραχή η οποία χαρακτηρίζεται από μυοκλονίες (μικρούς σπασμούς μυϊκών ινών), επιληψία, αταξία και άνοια. Περίπου το 80% ασθενών φέρει τη μετάλλαξη A8344G (*tRNA<sup>Lys</sup>*).

➤ LHON (Leber Hereditary Optic Neuropathy)

Η κληρονομική νευροπάθεια του Leber είναι η πρώτη μιτοχονδριακή διαταραχή η οποία βρέθηκε που μπορεί να προκληθεί από σημειακή μετάλλαξη στα μιτοχόνδρια. Προκαλεί απώλεια της κεντρικής όρασης χωρίς πόνο. Μερικοί από τους ασθενείς ίσως έχουν δυστονία, παράλυση πνευματική υποβάθμιση και μυϊκή αδυναμία. Το 90% των ασθενών φέρει μία από τις εξής μετάλλαξης: *ND4*: G11778A, *ND1*: G3460A, *ND6*: T14484C.

➤ Σύνδρομο Keans-Sayre (KSS) και προοδευτική εξωτερική οφθαλμοπληγία

Το σύνδρομο Keans-Sayre είναι μία διαταραχή η οποία προκαλείται από έλλειψη μεγάλων κομματιών του μιτοχονδριακού DNA και χαρακτηρίζεται κλινικά από οφθαλμοπληγία, ρετινοπάθεια, αδυναμία, αταξία, μελαγχρωματική ρετινοπάθεια, απώλεια ακοής, άνοια και κρίσεις. Οι μη-νευρολογικές επιπλοκές του περιλαμβάνουν υπερτροφική και διατακτική καρδιομυοπάθεια, ανωμαλίες στην καρδιακή αγωγιμότητα, διαβήτη και άλλες ενδοκρινικές ανωμαλίες. Περίπου το 80% ασθενών φέρει τη μετάλλαξη G3249A (*tRNA<sup>Leu(UUR)</sup>*).

Το ποσοστό του μεταλλαγμένου mtDNA που χρειάζεται για να εμφανιστεί ο φαινότυπος ενός μιτοχονδριακού νοσήματος διαφέρει ανάλογα με τον τύπο μετάλλαξης. Για ελλείψεις ή διπλασιασμούς το όριο εμφάνισης είναι 60%. Για σημειακές μεταλλάξεις το όριο μπορεί να φτάσει και το 90%. Τα όρια για κάθε ιστό διαφέρουν, και αυτό εξηγεί την ευπάθεια κάποιων ιστών. Ο μιτωτικός διαχωρισμός μπορεί να προκαλέσει αλλαγή του φαινοτύπου, πολλές φορές απότομα (Rossignol et al., 2003).

Η συσχέτιση γονότυπου με φαινότυπο στα μιτοχονδριακά νοσήματα είναι αρκετά πολύπλοκη, καθώς άτομα με τον ίδιο φαινότυπο, εμφανίζουν διαφορετικές μεταλλάξεις και άτομα με την ίδια μετάλλαξη εμφανίζουν διαφορετικό φαινότυπο. Συχνά τα άτομα μπορεί να μεταπηδήσουν από τον ένα φαινότυπο στον άλλο κατά τη διάρκεια της ζωής τους. Ο κλινικός φαινότυπος είναι η αλληλεπίδραση του επιπέδου ετεροπλασμίας με τις ανάγκες των κυττάρων, των οργανιδίων ανάλογα σε ποιο ιστό βρίσκονται. Στον κλινικό φαινότυπο αυτών των ασθενειών παίζουν ρόλο και άλλοι παράγοντες όπως η ηλικία, το φύλλο και το περιβάλλον.

### **Μεταλλάξεις των tRNA γονιδίων του μιτοχονδριακού γονιδιώματος**

Οι μεταλλάξεις στα μιτοχονδριακά γονίδια των tRNAs είναι αρκετά συχνές. Σε κάποια από αυτά τα γονίδια εμφανίζονται κυρίως πολυμορφικές μεταλλάξεις ενώ σε μερικά οι μεταλλάξεις τους συχνά εμπλέκονται σε σοβαρά νοσήματα όπως νευροεκφυλιστικές διαταραχές, καρδιοπάθειες και κώφωση. Οι πολυμορφικές μεταλλάξεις στα tRNA γονίδια είναι ουσιαστικά μεταλλάξεις που δεν έχουν σημαντικό αντίκτυπο στην τριτοταγή δομή ενός μορίου tRNA. Αυτές οι πολυμορφικές μεταλλάξεις έχουν βρεθεί σε όλα τα tRNA γονίδια, που φαίνεται ότι δεν επηρεάζουν τη συνολική δομική ακεραιότητα του tRNA, έχει παρατηρηθεί ότι είναι σημειακές μεταλλάξεις.

Περίπου 139 μεταλλάξεις εμπλέκονται σε παθογένεια. Η συγκέντρωση των παθογόνων μεταλλάξεων που βρίσκονται σε tRNA γονίδια ξεπερνάει το 50% και τα μέχρι σήμερα εμπλέκονται τα 21 από τα 22 αυτά γονίδια. Η λευκίνη, το αμινοξύ με το μεγαλύτερο ποσοστό εμφάνισης στις πρωτεΐνες, διαθέτει δύο αλληλόμορφα το *MT-TL1(UUR)* και το *MT-TL2(CUN)*. Επειδή το αλληλόμορφο *UUR* χρησιμοποιείται μόνο 12% κατά την πρωτεϊνοσύνθεση και έτσι είναι πιο πιθανό να εντοπιστούν περισσότερες μεταλλάξεις σε αυτό, καθώς είναι λιγότερο θανατηφόρες σε σχέση με μεταλλάξεις του *CUN* αλληλόμορφου. Μάλιστα το *UUR* είναι το tRNA-γονίδιο που εμφανίζει την μεγαλύτερη ποικιλότητα από συχνότητα σε πολυμορφισμούς και συχνότητα σε παθογενείς μεταλλάξεις. Το μόνο tRNA-

γονίδιο που δεν εμπλέκεται σε κάποια παθολογία είναι το *tRNA<sup>Arg</sup>*. Το λιγότερο πολυμορφικό γονίδιο είναι το *tRNA<sup>Pro</sup>* με έξι μεταλλάξεις όπου οι τρεις είναι πολυμορφικές.

Οι περισσότερες μεταλλάξεις κατανέμονται ομοιόμορφα στο μόριο του tRNA, στις θηλιές και στους βραχίονες, και είναι περισσότερο μεταπτώσεις παρά μεταστροφές. Μεταλλάξεις στην τριπλέτα του αντικωδικονίου εμφανίζονται σπάνια καθώς έχουν άμεση επίπτωση στα επίπεδα πρωτεϊνοσύνθεσης. Για να οριστεί μία μετάλλαξη παθογόνος δεν είναι εύκολο, συνήθως παθολογία εμφανίζουν οι μεταλλάξεις που βρίσκονται σε συντηρημένες θέσεις των γονιδίων.

### **Νόσος του Alzheimer**

Ένα από τα μεγαλύτερα προβλήματα που έχουν εμφανιστεί στη σύγχρονη εποχή με την αύξηση του προσδόκιμου ζωής είναι η άνοια. Η άνοια είναι μία παθολογική κατάσταση η οποία χαρακτηρίζεται από σημαντική απώλεια γνωστικών λειτουργιών που είναι βασικές στην καθημερινότητα όπως αυτές της μνήμης. Η κύρια αιτία άνοιας είναι η νόσος Alzheimer. Είναι μία προοδευτική εκφυλιστική νόσος του εγκεφάλου, η οποία είναι πιο συχνή σε ανθρώπους μεγαλύτερης ηλικίας και εκτιμάται ότι ανά την υφήλιο περίπου 15 εκατομμύρια άνθρωποι πάσχουν από αυτή την ασθένεια. Τα συμπτώματα της εύκολα μπερδεύονται με τις επιδράσεις της κοινής γήρανσης και άλλες μορφές άνοιας.

Τα συμπτώματα μπορούν να διακριθούν σε δύο κατηγορίες :

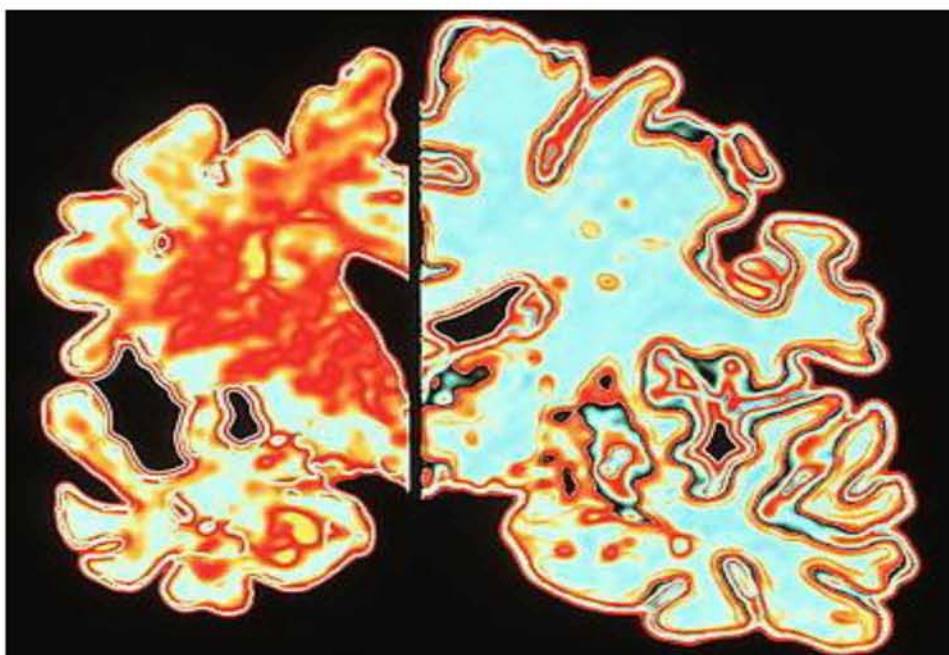
1. Γνωσιακές-νοητικές διαταραχές: απώλεια μνήμης και ιδιαίτερα πρόσφατης μνήμης, δυσκολία προσανατολισμού στο χώρο και στο χρόνο, δυσκολία στο λόγο στην πράξη, στη σκέψη, αγνωσία, απραξία.
2. Διαταραχές συμπεριφοράς: απάθεια, κατάθλιψη, επιθετικότητα, κοινωνική απόσυρση και σεξουαλική ανικανότητα

Όσο εξελίσσεται η ασθένεια υπάρχει πιθανότητα να εμφανιστούν κινητικές διαταραχές με απώλεια κινητικών λειτουργιών όπως βάδισμα και προσανατολισμός.

### **Χαρακτηριστικά της νόσου**

Η ασθένεια Alzheimer χαρακτηρίζεται από φλοιϊκή ατροφία, φλεγμονή στον εγκέφαλο, εκτεταμένη καταστροφή νευρώνων/νευροεκφυλισμό, απώλεια συνάψεων, μείωση συναπτικής λειτουργίας και εμφάνιση χαρακτηριστικών δομών, τις αμυλοειδείς πλάκες και τα νευροϊνιδικά συμπλέγματα. Ο εγκέφαλος των ασθενών με AD δείχνει εκτεταμένη αλλά όχι ομοιόμορφη ατροφία νευρώνων.

Οι περιοχές στις οποίες εμφανίζεται αυτή η ατροφία περιλαμβάνουν τον φλοιό, τον ιππόκαμπο, την αμυγδαλή, το μετωπιαίο τον κροταφικό και τον ινιακό λοβό, καθώς και το βασικό πυρήνα του πρόσθιου εγκεφάλου. Παράλληλα στις περιοχές αυτές, υπάρχει απώλεια της πυκνότητας των συνάψεων των νευρώνων στους ασθενείς, η οποία είναι ανάλογη του μεγέθους της άνοιας που έχει ο ασθενής. Ο νευροεκφυλισμός αρχίζει από τις μέσο-κροταφικές περιοχές περιλαμβάνοντας τον ενδορρινικό φλοιό και διάφορες περιοχές του ιππόκαμπου. Η απώλεια των νευρώνων συμβάλει στο 20-30% της απώλειας βάρους του εγκεφάλου που εμφανίζουν τα άτομα που πάσχουν από τη νόσο.



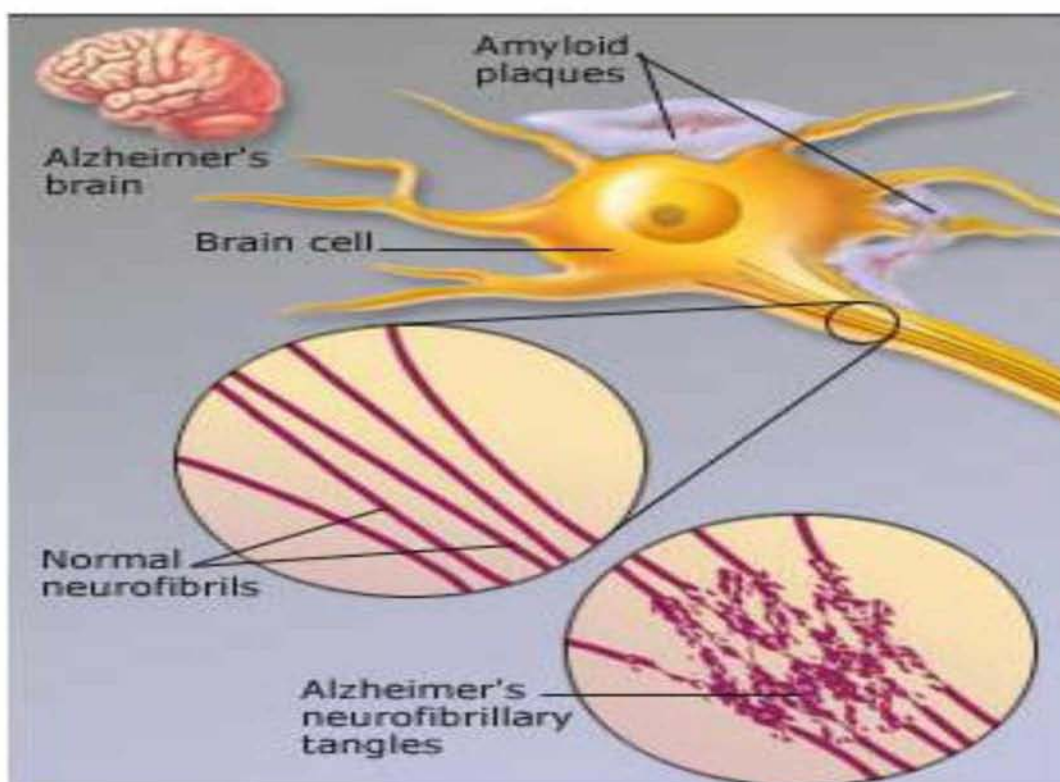
**Εικόνα 11:** Γραφικός σχεδιασμός κατακόρυφης τομής εγκεφάλου. Στα δεξιά είναι ο εγκέφαλος ενός υγιούς ατόμου, στα αριστερά ενός πάσχοντα από Alzheimer. Η συρρίκνωση της μάζας του φλοιού στον εγκέφαλο του ασθενούς είναι εμφανής.

Στον εγκέφαλο των ασθενών υπάρχουν κάποιες ευδιάκριτες με το μικροσκόπιο δομές, που αποτελούν τα χαρακτηριστικότερα φαινοτυπικά γνωρίσματα της νόσου. Αυτές οι δομές είναι οι αμυλοειδείς πλάκες και τα νευροϊνιδικά δεμάτια (Εικόνα 12). Οι αμυλοειδείς πλάκες εμφανίζονται στον εξωκυττάριο χώρο ανάμεσα στους νευρώνες του εγκεφάλου ενώ τα νευροϊνιδικά δεμάτια εμφανίζονται μέσα στον ενδοκυττάριο χώρο των νευρώνων (Swerdlow 2009).

### Νευροϊνιδικά δεμάτια

Τα νευροϊνιδικά δεμάτια έχουν την μορφή φλόγας καθώς η συσσωμάτωση και η κατακρήμνιση γίνεται στο σημείο του νευρώνα από όπου εκφύεται ο άξονας (Εικόνα

12).Υπάρχουν υποθέσεις ότι οι δομές αυτές είναι πιθανό να φράζουν και να εμποδίζουν τη μεταφορά ουσιών στις απομακρυσμένες απολήξεις των νευρώνων. Η πρωτεΐνη Tau, από την οποία συνθέτονται, ανήκει στις πρωτεΐνες που σχετίζονται με μικροσωληνίσκους (Map). Καθώς ο νευρώνας αναπτύσσεται αυτή η πρωτεΐνη μετακινείται στον άξονα, όπου εκεί σταθεροποιεί τους μικροσωληνίσκους. Δομικά διαθέτει πολλές περιοχές φωσφορυλίωσης, και όταν υπερφωσφορυλιωθεί αποκόπτεται από τους μικροσωληνίσκους. Σε διαφοροποιημένα κύτταρα η Tau παραμένει μη-φωσφορυλιωμένη και συνδεδεμένη στο κυτταροσκελετό. Στα αδιαφοροποίητα κύτταρα η πρωτεΐνη είναι φωσφορολυόμενη και έτσι οι μικροσωληνίσκοι και η Tau δε σχηματίζουν σταθερή μορφή κυτταροσκελετού. Υπό παθολογικές καταστάσεις η Tau διασπάται από τους μικροσωληνίσκους με αποτέλεσμα να καταρρεύσουν και η πρωτεΐνη αυτή να συσσωρευτεί στο σωματοδενδριτικό διαμέρισμα. Τα νευροϊνιδικά συμπλέγματα εμφανίζονται και σε αρκετές παθήσεις της πρωτεΐνης Tau. Μεταλλάξεις στο γονίδιο της Tau σχετίζονται με περιπτώσεις οικογενούς μετωποκροταφικής άνοιας με συνακόλουθο παρκινσονισμό και παθολογία νευροϊνιδιακών δεματίων, αλλά όχι με το Alzheimer.

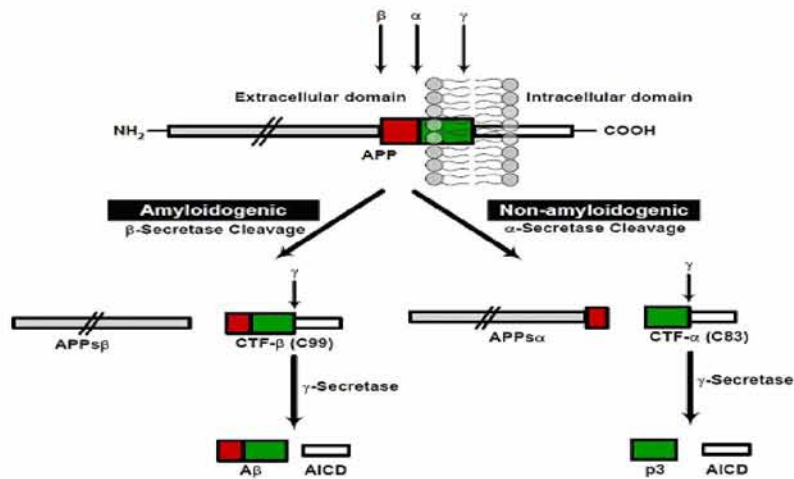


**Εικόνα 12:** Οι νευρώνες του εγκεφάλου σε πάσχοντες από την νόσο του Alzheimer αναπτύσσουν ένα ειδικό κυτταρικό φαινόμενο που χαρακτηρίζει την ασθένεια. Ο φαινόμενος αυτός περιλαμβάνει τις αμυλοειδείς πλάκες και τα νευροϊνιδιακά δεμάτια.

### Αμυλοειδείς πλάκες

Το άλλο κύριο χαρακτηριστικό της νόσου είναι οι αμυλοειδείς πλάκες. Πρόκειται για εξωκυττάριας εναποθέσεις που προκύπτουν από εναπόθεση και συσσώρευση ενός αδιάλυτου ινώδους πολυπεπτιδίου του β-αμυλοειδούς. Εντοπίζονται στο ρινικό εγκέφαλο και σε άλλες συνειρμικές περιοχές του εγκεφάλου. Περιγράφονται ως σφαιρικές βλάβες που αποτελούνται από έναν πυρήνα συμπαγούς ινώδους β-αμυλοειδούς που περιβάλλεται από χαλαρά οργανωμένα ινίδια του β-αμυλοειδούς, δυστροφικούς νευράξονες, πολλές άλλες πρωτεΐνες καθώς και από κυτταρικά υπολείμματα που προέρχονται από εκφυλισμένα κύτταρα ή απελευθερώνονται από αστροκύτταρα και μικρογλοιακά κύτταρα. Το β-αμυλοειδές είναι ένα πολυπεπτίδιο 40-42 αμινοξέων. Σχηματίζεται από την ενζυμική διάσπαση ενός πεπτιδίου που ονομάζεται πρόδρομο αμυλοειδές πεπτίδιο, ή αλλιώς APP και κωδικοποιείται από ένα γονίδιο που βρίσκεται στο χρωμόσωμα 21 (Swerdlow 2009).

Η επεξεργασία του APP γίνεται από δύο μονοπάτια, το αμυλοειδογενές και το μη-αμυλοειδογενές μονοπάτι. Στο πρώτο μονοπάτι αντίδραση καταλύεται από τη β-σекреτάση το APP διασπάται σε δύο πεπτίδια το sAPPβ και το αμυλοεδογενικό C99 μετέπειτα ενζυμική διάσπαση από τη γ-σекреτάση στο καρβοξυλικό άκρο παράγεται το β-αμυλοειδές. Στο δεύτερο μονοπάτι η α-σекреτάση καταλύει ενζυμικά τη διάσπαση μέσα στην περιοχή του αμυλοειδούς-β, και στη συνέχεια ακολουθεί περαιτέρω διάσπαση των πεπτιδίων από τις β- και γ-σекреτάσες (Εικόνα 13). Η γ-σекреτάση είναι υπεύθυνη για το μέγεθος του πεπτιδίου. Το πιο κοινό πεπτίδιο είναι το Αβ-40, ενώ το Αβ-42 έχει την τάση να σχηματίζει ινώδεις δομές πιο εύκολα. Το αμυλοειδές-β έχει βρεθεί ότι παρουσιάζει τοξικότητα ως προς τους νευρώνες. Στις συνάψεις το φαίνεται έχει βρεθεί ότι επηρεάζει τη μακροπρόθεσμη ενδυνάμωση και διαταράσσει τη συναπτική πλαστικότητα των νευρώνων συμβάλλοντας πιθανόν στην απώλεια των συνάψεων και στην εξασθένηση των γνωστικών λειτουργιών (Reddy and Beal 2007).



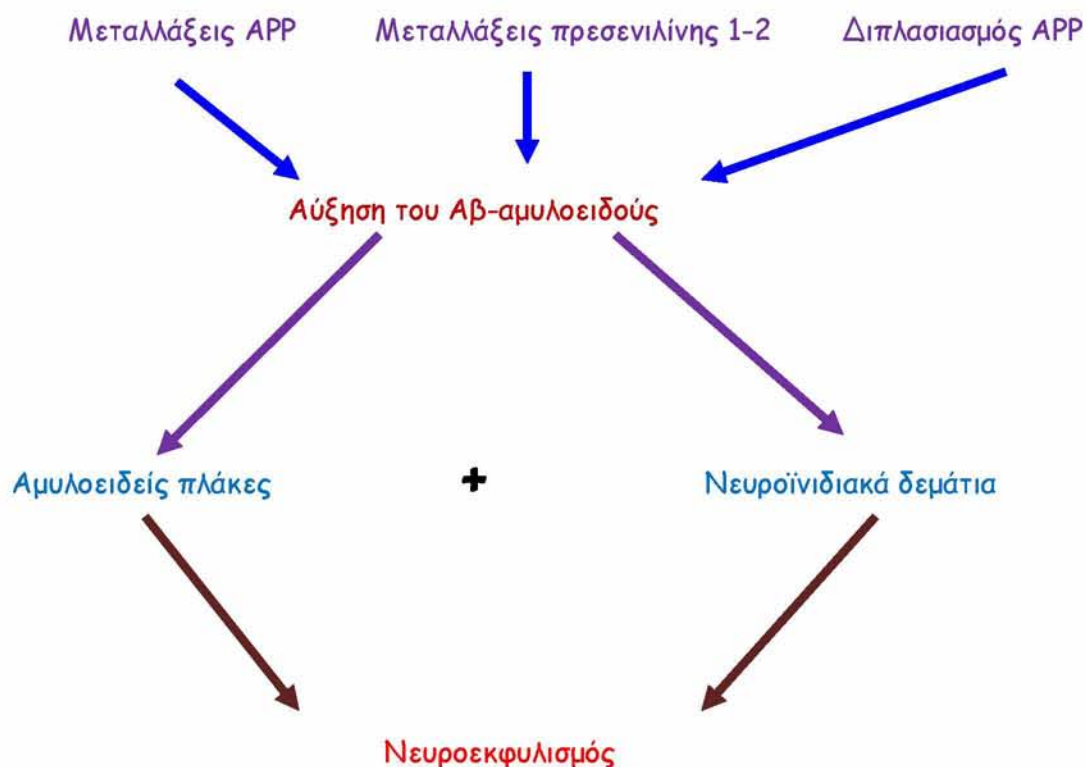
**Εικόνα 13:** Απεικόνιση της ενζυμικής επεξεργασίας της πρόδρομης πρωτεΐνης του αμυλοειδούς. Αριστερά φαίνεται το αμυλοειδογενές μονοπάτι, η β-σεκρετάση καταλύει πρώτη τη διάσπαση του APP σε δύο πεπτίδια το sAPPβ και το αμυλοειδογενές C99 από το οποίο παράγεται το αμυλοειδές-β με μετέπειτα ενζυμική διάσπαση από τη γ-σεκρετάση. Δεξιά έχουμε το μη-αμυλοειδογενές μονοπάτι όπου η α-σεκρετάση καταλύει πρώτη την διάσπαση της APP στην περιοχή του Αβ, ακολουθεί περαιτέρω διάσπαση των πεπτιδίων από τις α- και β-σεκρετάσες.

### Γενετικό υπόβαθρο της νόσου Alzheimer

Γενετικά η ασθένεια χωρίζεται σε δύο τύπους, την οικογενή και τη σποραδική μορφή της νόσου. Αν και η παθογένεια των δύο μορφών φαίνεται να είναι κοινή καθώς τα συμπτώματα των δύο μορφών της νόσου είναι όμοια, το βασικό χαρακτηριστικό που οδηγεί στη διάκριση των δύο μορφών είναι η ηλικία έναρξης των συμπτωμάτων. Η οικογενής μορφή της νόσου εμφανίζεται πριν την ηλικία των 60 ετών, με ελάχιστο ποσοστό από τους συνολικά νοσούντες να πάσχουν από αυτή. Κληρονομείται με αυτοσωμικό επικρατή χαρακτήρα (Kofie et al., 2011). Στην εμφάνιση της οικογενούς μορφής της νόσου του Alzheimer εμπλέκονται γονίδια που σχετίζονται με την επεξεργασία του αμυλοειδούς-β. Τα γονίδια της πρεσενιλίνης περιέχουν μέρος της γ-σεκρετάσης που συνδέεται με την επεξεργασία του πρόδρομου αμυλοειδούς πεπτιδίου (συντομογραφικά APP). Μετάλλαξη στα γονίδια της πρεσενιλίνης-1, πρεσενιλίνης-2 και του γονιδίου του APP μπορεί να οδηγήσει στην εμφάνιση της οικογενούς μορφής της νόσου (Εικόνα 14). Οι ασθενείς με σύνδρομο Down τρισωμίας 21, το χρωμόσωμα στο οποίο βρίσκεται το γονίδιο της APP, αναπτύσσουν σε πολύ νεαρή ηλικία παθολογία όμοια με το AD που περιλαμβάνει



αμυλοειδείς πλάκες και γνωσιακές διαταραχές. Αυτή η μορφή της νόσου ευθύνεται για το 5-10% των περιπτώσεων που πάσχουν από την νόσο (Goate et al., 1991).



**Εικόνα 14:** Αιτίες εμφάνισης της οικογενούς μορφή της νόσου. Δημιουργία μεταλλάξεων στην APP και στην στα γονίδια της πρεσενιλίνης τα οποία σχετίζονται την επεξεργασία του APP οδηγούν στην αυξημένη παραγωγή αμυλοειδούς με αποτέλεσμα την εμφάνιση των συμπτωμάτων της νόσου.

Πέρα από το 5-10% των ασθενών που εμφανίζουν την οικογενή μορφή της νόσου, οι περισσότεροι ασθενείς πάσχουν από τη σποραδική μορφή του Alzheimer. Η ηλικία εμφάνισης αυτής της μορφής της άνω των 60 ετών. Η γενετική της σποραδικής μορφής της νόσου δεν περιλαμβάνει κάποια ξεκάθαρη επικρατή ή υπολειπόμενη αυτοσωμική/φυλλοσύνδετη σύνδεση με συγκεκριμένα αλληλόμορφα και φαίνεται να επηρεάζεται ακόμα και από περιβαλλοντικούς παράγοντες. Σε διάφορες στατιστικές μελέτες υπάρχουν στοιχεία πως η πιθανότητα εμφάνιση της νόσου σε ένα άτομο αυξάνουν από τέσσερις έως δέκα φορές εάν κάποιος στενός συγγενής, ειδικά οι γονέας, έχει εμφανίσει την νόσο. Οι πιθανότητες αυτές είναι αρκετά μεγαλύτερες όταν ο γονέας που έχει εμφανίσει την νόσο είναι η μητέρα (Edland et al., 1996). Τα περισσότερα γονίδια που εμπλέκονται με τη σποραδική μορφή της νόσου εμφανίζονται ως παράγοντες κινδύνου εμφάνισης της νόσου. Σύμφωνα με το [alzgene.org](http://alzgene.org) περίπου έχουν βρεθεί περίπου 695 γονίδια τα οποία σχετίζονται με την εμφάνιση

της νόσου. Το γονίδιο της απολιπρωτεΐνης-E (*ApoE*), ειδικά το αλληλόμορφο *ApoE4*, φαίνεται να έχει αναγνωριστεί ότι προδιαθέτει με μεγαλύτερο ρίσκο σε σχέση με τα υπόλοιπα γονίδια την εμφάνιση της. Άλλα γονίδια που φαίνεται να συμμετάσχουν με υψηλό ποσοστό στον κίνδυνο εμφάνισης της νόσου είναι το *SORL1*, το *GAB2*, το *PCDH11X* και τα αλληλόμορφα *KIBRA* (Mosconi et al., 2011).

### **Διαταραχή στο μεταβολισμό εγκεφαλικών νευρώνων και οξειδωτικό στρες στη νόσο του Alzheimer**

Η λειτουργία των νευρώνων για να διατηρηθεί είναι αναγκαία υψηλά ποσά ενέργειας διαρκώς. Έτσι για την κάλυψη των μεταβολικών τους αναγκών οι νευρώνες διαθέτουν αφθονία μιτοχονδρίων. Επειδή η λειτουργία των μιτοχονδρίων επηρεάζει σημαντικά τη λειτουργία των νευρώνων, και η σποραδική μορφή αυτής της νευροεκφυλιστικής νόσου παρουσιάζει ένα πολυπαραγοντικό χαρακτήρα εμφάνισης, είναι αρκετά πιθανόν τα μιτοχόνδρια να σχετίζονται με την εμφάνιση της νόσου του Alzheimer.

Αρχική ένδειξη για την εμπλοκή των μιτοχονδρίων στην νόσο ήταν η παρατήρηση μειωμένου μεταβολισμού γλυκόζης σε εγκεφάλους ασθενών (Hoyer et al., 1988). Η ελαττωματική μεταβολική δραστηριότητα που παρουσιάζουν οι νευρώνες των ασθενών είναι μία από τις πιο ευδιάκριτες και παρατηρημένες ανωμαλίες της νόσου. Νευροαπεικονιστικές μελέτες έχουν δείξει την εμφάνιση τέτοιων ανωμαλιών πριν την εμφάνιση των κλασικών χαρακτηριστικών της νόσου σχετικά με το νευροεκφυλισμό όπως οι αμυλοειδείς πλάκες και τα νευροϊνιδικά δεμάτια (Bonda et al., 2011). Υπάρχουν αρκετές ενδείξεις ότι τα γεγονότα στα οποία οφείλεται ο εκφυλισμός των νευρώνων του εγκεφάλου πυροδοτούνται λόγω του διαταραγμένου μεταβολισμού τους.

Η ενζυμική δραστηριότητα ενζύμων –κλειδιά για τον οξειδωτικό μεταβολισμό, όπως το σύμπλοκο της α-κετογλουταρικής αφυδρογονάσης, της κυτοχρωμικής οξειδάσης, και της ισοκιτρικής αφυδρογονάσης παρουσιάζουν μειωμένη δραστηριότητα σε άτομα που πάσχουν από τη νόσο (Petrozzi et al., 2007). Η δράση της κυτοχρωμικής οξειδάσης έχει παρατηρηθεί μειωμένη σε αρκετές περιοχές του εγκεφάλου, ειδικά στον πρωτοταγή κινητικό φλοιό. Παράλληλα η δράση της κυτοχρωμικής οξειδάσης είναι προβληματική σε αιμοπετάλια και ινοβλάστες ασθενών. Οι νευρώνες των ασθενών με AD περιέχουν μικρότερο ποσοστό λειτουργικών μιτοχονδρίων και σχετικά υψηλά ποσοστά μιτοχονδρίων με κατεστραμμένες ακρολοφίες και πεπλατυσμένα σε σχέση με φυσιολογικά άτομα ίδιας ηλικίας. Οι ανωμαλίες στα μιτοχόνδρια των ασθενών δεν περιορίζονται μόνο στον εγκέφαλο, έχουν παρατηρηθεί και σε ινοβλάστες δέρματος και ενδοθηλιακά κύτταρα (Mancuso et al., 2008).

Σε εγκεφάλους ασθενών έχουν παρατηρηθεί αυξημένα ποσοστά δεικτών οξειδωτικού στρες, όπως αυξημένη οξείδωση λιπιδίων και νιτροσυλίωσης πρωτεϊνών. Επίσης έχει

παρατηρηθεί η ύπαρξη αυξημένων οξειδωτικών βλαβών και αυξημένα ποσά οξειδωμένων νουκλεοτιδίων, πρωτεϊνών και λιπιδίων. Οι νευρώνες παρουσιάζουν ευαισθησία σε οξειδωτικές βλάβες που προκαλούνται από ελεύθερες ρίζες για τους εξής λόγους:

α) Χαμηλή περιεκτικότητα σε γλουταθειόνη.

β) Μεγάλη αναλογία σε πολυακόρεστα οξέα στις μεμβράνες τους.

γ) Ανάγκη κατανάλωσης μεγάλων ποσών ενέργειας από τον εγκέφαλο, οι πλούσιοι σε μιτοχόνδρια νευρώνες του διαθέτουν πολύ υψηλές απαιτήσεις σε οξυγόνο.

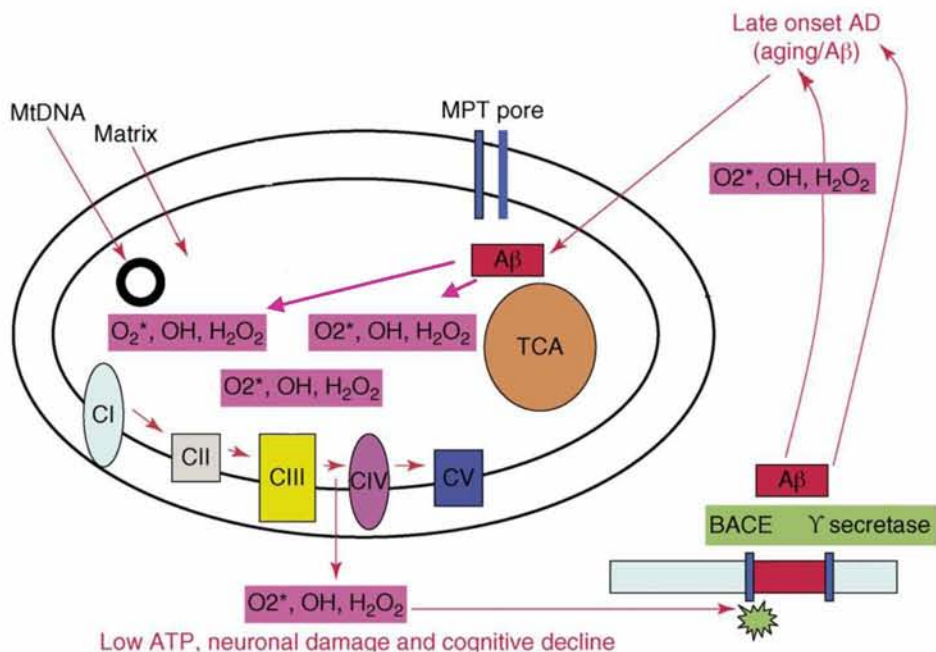
δ) Ο εγκέφαλος διαθέτει υψηλό ποσοστό μεταπτωσητικών μετάλλων όπως ο σίδηρος όπου συμμετέχουν καταλυτικά με τον οξυγόνο σε αντιδράσεις τύπου Fenton και Haber-Weiss σχηματίζοντας ρίζες υδροξυλίου.

Οι εγκέφαλοι των ασθενών διαθέτουν αυξημένα ποσοστά του οξειδωτικού στρες σε σχέση με τους εγκεφάλους φυσιολογικών ατόμων. Αυτό μπορεί να οφείλεται σε υπερπαραγωγή οξειδωτικών ριζών ή σε μείωση της ικανότητας των αντιοξειδωτικών μηχανισμών (Christen 2000). Ανοσοκυτταρικές μελέτες έδειξαν πως η περιφερειακή κατανομή της οξείδωσης του RNA στον εγκέφαλο των ασθενών ήταν ακριβής με την κατανομή της των ευπαθών περιοχών. Αυξημένα ποσοστά 8-υδροξυγουανοσίνης παρατηρήθηκαν στο νεοφλοιό και στον υπόκαμπο ασθενών, ενώ στη στην περιοχή της παρεγκεφαλίδας παρέμεναν σε φυσιολογικά επίπεδα (Mancuso et al., 2008).

Ένα από τα αίτια των αυξημένων οξειδωτικών βλαβών, παραγωγής ελευθερών ριζών και μείωσης του μεταβολισμού φαίνεται να είναι η δράση του β-αμυλοειδούς, αφού προκαλεί μείωση της λειτουργίας των μιτοχονδρίων και δημιουργία ελευθέρων ριζών σε αυτά. Το β-αμυλοειδές εισάγεται στα μιτοχόνδρια μέσω του μηχανισμού της τρανσλοκάσης της εξωτερικής μεμβράνης (Petersen et al., 2008). In vitro μελέτες έδειξαν ότι η κυτοχρωμική οξειδάση των μιτοχονδρίων αναστέλλεται από διμερή Αβ, εξαρτώμενα από την παρουσία χαλκού (Crouch et al., 2005). Επίσης καταστέλλει τη δράση της πυροσταφυλικής δεϋδρογονάσης και της α-κετογλουταρικής δεϋδρογονάσης (Perez-Gracia et al., 2008). Συνδέεται με την μιτοχονδριακή Αβ-συνδεόμενη αλκοολική αφυδρογονάση, ένα ακόμη γεγονός που πιθανόν να οδηγεί στην παραγωγή ελευθέρων ριζών από αυτό (Lustbader et al., 2003). Απομονωμένα μιτοχόνδρια εκτεθειμένα σε β-αμυλοειδές εμφανίζουν μειωμένη αναπνευστική ικανότητα ενώ διαγονιδιακά ποντίκια με μεταλλάξεις στην APP εμφανίζουν αλλαγμένη μιτοχονδριακή λειτουργία (Swerdlow 2009).

Παράλληλα υπάρχουν και κάποια αντιφατικά δεδομένα για την αλληλεπίδραση των μιτοχονδρίων με το β-αμυλοειδές. Πρώτον, όλο και περισσότερα στοιχεία συγκεντρώνονται που υποδεικνύουν ότι η ύπαρξη οξειδωτικού στρες παρουσιάζεται πριν την έναρξη των ιστοειδικών συμπτωμάτων της ασθένειας όπως η εμφάνιση πλακών (P.I. Moreira et al., 2008). Δεύτερον, πειράματα σε μοντέλα ζώων έδειξαν ότι η δυσλειτουργία των

μιτοχονδρίων προηγείται ακόμα και πριν την εναπόθεση του αμυλοειδούς (Pratico and Delanty 2000). Τρίτον, παρατηρήθηκε ότι υπό συνθήκες *in vitro* παρεμπόδισης της κυτοχρωμικής οξειδάσης της αναπνευστικής αλυσίδας αλλάζει η επεξεργασία της πρόδρομης πρωτεΐνης του αμυλοειδούς από μη-αμυλοειδογενες μονοπάτι σε αμυλοειδογενές (Gabuzda et al. 1994) και τέταρτον, η β-σεκρετάση η οποία καταλύει το πρώτο βήμα για την επεξεργασία της APP σε β-αμυλοειδές έχει παρατηρηθεί ότι ενεργοποιείται από το οξειδωτικό στρες (Tamagno, 2008). Στην αρχή το β-αμυλοειδές θεωρούνταν ως η αρχική αιτία οξειδωτικού στρες στους νευρώνες του εγκεφάλου και στους ασθενείς με τη σποραδική μορφή της νόσου (amyloid cascade hypothesis). Όμως τα γεγονότα αυτά υποδεικνύουν ότι οι δυσλειτουργίες των μιτοχονδρίων όχι απλώς προηγούνται της παραγωγής Αβ αλλά οδηγούν σε αυξημένη σύνθεση του β-αμυλοειδούς από νευρικά κύτταρα. Έτσι εμφανίζεται ένα φαινόμενο θετικής ανάδρασης καθώς όπως αναφέρθηκε προηγουμένως το αμυλοειδές-β αναστέλλει την κυτοχρωμική οξειδάση και συμβάλει στη δημιουργία ελευθέρων ριζών (mitochondrial cascade hypothesis), (Reddy and Beal 2007). Ένα γεγονός που ενισχύει την εμπλοκή των μιτοχονδρίων στη νόσο είναι οι επιδράσεις του πολυπεπτιδίου που παράγει το γονίδιο *ApoE4*. Το πολυπεπτίδιο του *ApoE4*, του γονιδίου που φέρει το μεγαλύτερο ρίσκο για την εμφάνιση της νόσου, αλληλεπιδρά με τα μιτοχόνδρια και προκαλεί δυσλειτουργίες. Ειδικότερα το τμήμα 1-272 που εκφράζεται στη Neuro2a σειρά κυττάρων αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη UQCRC2, το κυτόχρωμα c και την κυτοχρωμική οξειδάση. Υπερέκφραση αυτού του πεπτιδίου διαταράσσει τις λειτουργίες τις λειτουργίες των συμπλόκων IV και V της αναπνευστικής αλυσίδας (Nakamura et al. 2009).



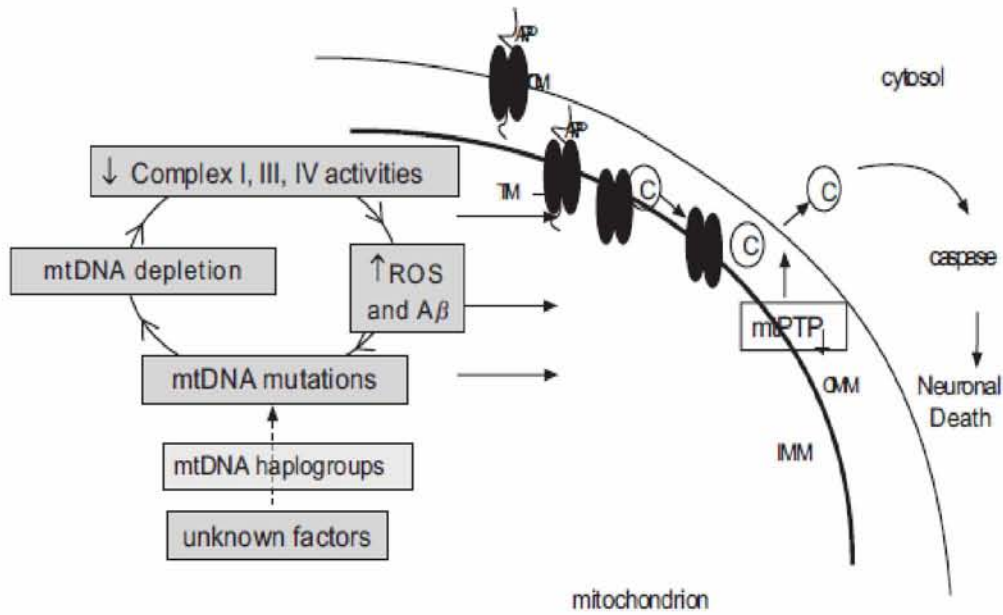
**Εικόνα 15:** Αναπαράσταση της υπόθεσης της εμπλοκής των μιτοχονδρίων στην νόσο του Alzheimer. Λόγω δυσλειτουργιών της αναπνευστική αλυσίδα δημιουργούνται αυξημένο ποσοστό ελευθέρων ριζών το οποίο ενεργοποιεί την β-σεκρεταση οδηγώντας στην σύνθεση β-αμυλοειδούς, χαρακτηριστικό γνώρισμα της νόσου του Alzheimer. Το β-αμυλοειδές εισέρχεται στο μιτοχόνδριο όπου εκεί παρατηρείται παράγει επιπλέον ελεύθερες ρίζες οδηγώντας σε περαιτέρω ελευθέρων ριζών οδηγώντας σε ένα κύκλο θετικής ανάδρασης με αύξηση του οξειδωτικό στρες.

### Μεταλλάξεις στο μιτοχόνδριακο γονιδίωμα και Alzheimer

Επειδή οι διαταραχές του μεταβολισμού και οι μεταβολές στη δομή και λειτουργία των μιτοχονδρίων προηγούνται των ιστοειδικών συμπτωμάτων, η εμπλοκή αυτών των δύο γεγονότων στην έναρξη της νόσου υποδεικνύει ότι κάποιο γονίδιο που σχετίζεται με τα μιτοχόνδρια συμβάλει στην εμφάνιση της νόσου ή τουλάχιστον αυξάνει την προδιάθεση εμφάνισης της. Τα γονίδια που είναι απαραίτητα για την ομαλή λειτουργία των μιτοχονδρίων κωδικοποιούνται από δύο γονιδιώματα, το πυρηνικό γονιδίωμα και το μιτοχονδριακό γονιδίωμα του κυττάρου, ωστόσο επειδή η σποραδική μορφή της νόσου φέρει κάποια φυλοσύνδετα χαρακτηριστικά, σε συνδυασμό με το ότι το μιτοχονδριακό γονιδίωμα κληρονομείται από την μητέρα στα παιδιά, η πιθανότητα να συμβάλλουν μιτοχονδριακές μεταλλάξεις στην εμφάνιση της νόσου αυξάνουν (Mosconi et al., 2011). Στην προσπάθεια διευκρίνισης αυτής της υπόθεσης, χρησιμοποιήθηκαν τα cybrids. Τα cybrids είναι κυτταροπλασματικά υβρίδια, κυττάρων νευροβλαστώματος με αιμοπετάλια. Τα κύτταρα νευροβλαστώματος έχουν επωαστεί με βρωμιούχο αιθίδιο με αποτέλεσμα το γενετικό υλικό των μιτοχονδρίων τους να έχει εκφυλιστεί πλήρως με αποτέλεσμα την πλήρη ανικανότητα

λειτουργίας τους. Τα αιμοπετάλια με τα οποία συντήκονται περιέχουν μιτοχόνδρια με τα οποία αποικίζονται τα κύτταρα του νευροβλαστώματος. Ετσι αν σε cybrids με αιμοπετάλια ασθενών παρατηρηθούν φαινοτυπικές διαφορές σε σχέση με τα cybrids με αιμοπετάλια υγείων απόμων θα οφείλονται σε δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων. Η δυσλειτουργία αυτή οφείλεται είτε στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα είτε στα ίδια τα μιτοχόνδρια τα οποία λόγω εκτεταμένης βλάβης κατά την νόσο αδυνατούν να την επαναφέρουν στα φυσιολογικά επίπεδα. Πράγματι σε πειράματα με cybrids, τα cybrids με αιμοπετάλια ασθενών εμφάνισαν προβλήματα μεταβολισμού, μειωμένη δραστηριότητα ενζύμων της αναπνευστικής αλυσίδας, αυξημένη ευαισθησία στο αμυλοειδές-β και αυξημένη παραγωγή ελεύθερων ριζών και αμυλοειδούς-β (Petrozzi et al., 2007).

Καθώς τα δεδομένα από τις έρευνες με cybrids έγειραν υποψίες για την πιθανή εμπλοκή του μιτοχονδριακού γονιδιώματος στη νόσο, ξεκίνησαν οι έρευνες για την ταυτοποίηση μεταλλάξεων στο mtDNA, οι οποίες θα μπορούσαν αν όχι να ευθύνονται τουλάχιστον να συμβάλλουν στη μιτοχονδριακή δυσλειτουργία που παρατηρείται στην νόσο (Εικόνα 16). Στη βιβλιογραφία αναφέρονται μεταλλάξεις σε όλες τις περιοχές του μιτοχονδριακού DNA, οι οποίες φαίνεται να εμφανίζονται με μεγαλύτερη συχνότητα στους ασθενείς με Alzheimer σε σχέση με τις ομάδες αναφοράς (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 συγκεκριμένη και ξεκάθαρη εικόνα. Η πιο διαδεδομένη 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 η μετάλλαξη εμφανιζόταν μόνο με ποσοστό 0,7% (Shoffner et al., 1993). Η συσχέτιση αυτής της μετάλλαξης με την ασθένεια έχει επιβεβαιωθεί και από άλλες ερευνητικές ομάδες (Hutchin and Contopassi., 1995). Ωστόσο υπάρχουν και μελέτες που υποστηρίζουν ότι δεν υπάρχει κάποια σύνδεση μεταξύ της συγκεκριμένης μετάλλαξης και της ασθένειας (Wragg et al., 1995).



**Εικόνα 16:** Σχεδιάγραμμα της υπόθεσης της εμπλοκής του μιτοχονδριακού γονιδιώματος στην νόσο του Alzheimer. Άγνωστοι παράγοντες, αλληλεπιδρούν με τις μεταλλάξεις και τις απλοομάδες οδηγώντας σε μείωση της δραστηριότητας των συμπλόκων I, II και III τα οποία οδηγούν σε αυξημένο οξειδωτικό στρες και κατά συνέπεια σε παραγωγή β-αμυλοειδούς. Επιπλέον οξειδωτικό στρες συντελείται λόγω της δράσης του β-αμυλοειδούς. Επειδή οι ελεύθερες αντιδρούν με το μιτοχονδριακό DNA προκαλώντας μεταλλάξεις οι οποίες πιθανό να μειώνουν την ενεργότητα των συμπλοκών δημιουργείται ένας κύκλος θετικής ανάδρασης με τη βλάβη να αυξάνεται εκθετικά.

Όσον αφορά τις απλοομάδες κάποιες έρευνες υποδεικνύουν την απλοομάδα J ως παράγοντα κινδύνου για την εμφάνιση της νόσου και την απλοομάδα T ως προστατευτικό παράγοντα που μειώνει την προδιάθεση εμφάνισης της ασθένειας (Chagnonet al., 1999). Επιπρόσθετα η απλοομάδα U έχει βρεθεί να υπέρ-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 υπό-αντιπροσωπεύεται (van der Walt et al., 2004). Εντούτοις υπάρχει και η αντίθετη άποψη ότι μεταξύ των mtDNA απλοομάδων και της νόσου δεν υπάρχει καμία σχέση (Zsurka et al., 1998).

<p><b>Πίνακας καταγραφής μελετών ανίχνευσης μιτοχονδριακών μεταλλάξεων σε ασθενείς με Alzheimer.</b></p>
<p>-10/19 ασθενείς με Alzheimer έφεραν τη μετάλλαξη G5460A στο ND2 γονίδιο χωρίς αυτή να εντοπιστεί στα 11 δείγματα ελέγχου (Lin et al., 1992).</p>

<p>- Η μετάλλαξη G5460A δεν επιβεβαιώθηκε σε καμία από τις 15 περιπτώσεις ασθενών που εξετάστηκαν (Petruzella et al., 1992).</p>
<p>- Παρατηρήθηκε έλλειψη 4977bp με μέση συχνότητα 0,14% σε 7 ασθενείς και με μέση συχνότητα 0,12% σε 7 δείγματα υγιών ατόμων (B.J. Blanchard et al., 1993).</p>
<p>- Εντοπίστηκε η μετάλλαξη A4336G στο tRNA<sup>Gln</sup> σε ποσοστό 3,2% σε 62 ασθενείς με Alzheimer και 0,8 σε 75 δείγματα ελέγχου. Βρέθηκαν ακόμη οι: 956-965 (προσθήκη C) στο 12S rRNA, G3196A στο 16S rRNA και A3397G στο ND1 (Shoffner J.M. et al., 1993).</p>
<p>- Η έλλειψη 4977bp παρατηρήθηκε 15 φορές πιο συχνά σε εγκεφάλους από ασθενείς με Alzheimer σε 20 δείγματα από εγκεφάλους ασθενών και 8 δείγματα υγιών ατόμων (Corral-Debrinski et al., 1994).</p>
<p>-Επιβεβαίωση της μετάλλαξης A4336G σε 8,3% από 72 ασθενείς και σε 0,34% σε 296 controls (Hutcin and Cortopassi, 1995).</p>
<p>-Εξέταση 155 δειγμάτων αίματος ασθενών για την εύρεση της A4336G. Δεν επιβεβαιώθηκε σε κανένα (Wragg et al., 1995).</p>
<p>-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).</p>
<p>- 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).</p>
<p>- Αλληλούχηση 69 δειγμάτων ασθενών και 83 δείγματα ελέγχου 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 δείγματα ελέγχου ήταν παρόμοιες. Βρέθηκαν ακόμη 34 νέες μεταλλάξεις (Chagnon et al., 1999).</p>
<p>- 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).</p>



<p>- Έρευνα για τη συσχέτιση της ασθένειας με συγκεκριμένες απλοομάδες. Εξετάστηκαν 989 ασθενείς και 328 δείγματα ελέγχου. Αρσενικά άτομα στην απλοομάδα U είχαν αυξημένο κίνδυνο για εμφάνιση Alzheimer σε αντίθεση με τα θηλυκά (van der Walt et al., 2004).</p>
<p>-Ανάλυση της D-loop περιοχής 23 ασθενών και 40 δειγμάτων ελέγχου. Βρέθηκε στο 65% η μετάλλαξη T414G (Coskun et al., 2004).</p>
<p>- Ανίχνευση των μεταλλάξεων T3197C και T3199C στο 16S rRNA και της T3338C στο ND1 σε 129 ασθενείς με Alzheimer και 125 δείγματα ελέγχου (Grazina et al., 2005).</p>
<p>- Ανίχνευση της ύπαρξης σύνδεσης της απλοομάδων με τη νόσο του Alzheimer σε 222 ασθενείς και 252 δείγματα ελέγχου. Πιθανή σύνδεση υπόαπλοομάδας HV με το Alzheimer, δεν υπήρξαν στοιχεία συμβολής μεταξύ U, K, J και T στην πιθανότητα εμφάνισης στο Alzheimer (Maruszak A. et al., 2009).</p>
<p>- Ανίχνευση της προσθήκης 956-965 (poly-C) και της A856G στο 12S rRNA σε 153 ασθενείς με Alzheimer και 129 δείγματα ελέγχου. Χαρακτηρισμός ως παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση της νόσου (N. Tanaka et al., 2010).</p>
<p>-Στοιχεία για την υπο-απλοομάδα h5 ως παράγοντας κινδύνου για την εμφάνιση της σποραδικής μορφής της νόσου Alzheimer ύστερα από ανάλυση σε 936 ασθενείς με Alzheimer και σε 776 δείγματα ελέγχου (Santoro et al., 2010).</p>
<p>-Δεν υπάρχουν στοιχεία συσχέτισης πολυμορφισμών του μιτοχονδριακού γονιδιώματος με το Alzheimer ύστερα από ανάλυση σε 4.113 ασθενείς και σε 1.602 δείγματα ελέγχου (Hudson G. et al., 2012).</p>

## Σκοπός της εργασίας

Γνωρίζοντας την εμπλοκή της μιτοχονδριακής δυσλειτουργίας στο Alzheimer και τις μορφολογικές ανωμαλίες των μιτοχονδρίων που εμφανίζονται σε ασθενείς με Alzheimer αλλά και λόγω του αριθμού των μεταλλάξεων στο mtDNA που αναφέρονται στη βιβλιογραφία, ο σκοπός της εξής εργασίας είναι η ανίχνευση και ταυτοποίηση μεταλλάξεων σε μιτοχονδριακά tRNA γονίδια σε ασθενείς με Alzheimer. Τα γονίδια που μελετήθηκαν είναι τα  $tRNA^{Ser}$ ,  $tRNA^{Asp}$ ,  $tRNA^{Asn}$ ,  $tRNA^{Cys}$  και  $tRNA^{Tyr}$ . Λόγω της γειτονικής τους θέσης στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα τα  $tRNA^{Ser}$  και  $tRNA^{Asp}$  αναλύθηκαν μαζί σε ένα τμήμα 150 bp ενώ τα  $tRNA^{Asn}$ ,  $tRNA^{Cys}$  και  $tRNA^{Tyr}$  σε ένα τμήμα 250bp. Τα δύο πρώτα γονίδια αναλύθηκαν σε 75 άτομα χωρίς κλινικά συμπτώματα. Τα υπόλοιπα αναλύθηκαν σε 55 φυσιολογικά άτομα χωρίς κλινικά συμπτώματα. Και τα πέντε αναλύθηκαν σε 50 ασθενείς με Alzheimer.

# **Υλικά και μέθοδοι**

## ΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΥΛΙΚΟ

Στην έρευνα αυτή χρησιμοποιήθηκαν δείγματα DNA από 75 φυσιολογικά άτομα για τα γονίδια tRNA<sup>asn</sup>, tRNA<sup>cyst</sup>, tRNA<sup>tyr</sup> και 55 φυσιολογικά άτομα για τα γονίδια tRNA<sup>ser</sup>, tRNA<sup>asp</sup>. Τα ίδια γονίδια ερευνήθηκαν και σε 50 δείγματα DNA από ασθενείς με AD. Τα παραπάνω δείγματα προμηθευθήκαμε από το Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας.

Για τη διεξαγωγή της μελέτης, τη διερεύνηση μεταλλάξεων και πολυμορφισμών σε γονίδια tRNA του μιτοχondριακού DNA, η πορεία που ακολουθήθηκε περιλαμβάνει τις εξής τεχνικές: PCR, SSCP, καθαρισμός PCR προϊόντος, αλληλούχιση και επεξεργασία αλληλούχισης.

### Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) είναι μία μέθοδος που επιτρέπει την in vitro αντιγραφή του DNA, χωρίς την ανάγκη παρουσίας ενός κυττάρου. Πρόκειται για μία ευαίσθητη, λεπτή και αποδοτική τεχνική, καθώς θεωρητικά είναι ικανή να δημιουργήσει ένα εκατομμύριο αντίγραφα από μόνο μία αλληλουχία στόχο. Η τεχνική αυτή διαθέτει διάφορες παραλλαγές όπως Nested PCR και Multiplex PCR. Η τεχνική που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη ήταν η απλή PCR.

Σκοπός της εργασίας είναι η μελέτη πέντε μιτοχondριακών γονιδίων: tRNA<sup>ser</sup>, tRNA<sup>asp</sup>, tRNA<sup>asn</sup>, tRNA<sup>cyst</sup>, tRNA<sup>tyr</sup>, για την εύρεση μεταλλάξεων. Επειδή είναι μικρά γονίδια τα δύο πρώτα ενισχύονται μαζί σε ένα τμήμα (SA) και τα τρία τελευταία ενισχύονται μαζί σε ένα τμήμα το οποίο ονομάζεται ACT. Γι αυτό το λόγο για την ενίσχυση των τριών γονιδίων χρησιμοποιούνται ζεύγη εκκινητών με τα παρακάτω χαρακτηριστικά:

Γονίδια tRNA	FW Primer 5'-3'	RV Primer 5'-3'	Μέγεθος (bp)	Θέση
SA Ser&Asp	CAATGGGACTTAAACCCACAA	GCGAACATCAGTGGGGGTGA	152bp	7424-7587
ACT Asn, Cyst & Tyr	ATTCTGAAGAACCCGTATACA	GCTCTTCTATGATAGGGGAA	248 bp	5663-5911

## Επισκόπηση της τεχνικής

Η PCR είναι μία τεχνική η οποία αξιοποιεί την ενζυμική δράση της DNA πολυμεράσης. Ως γνωστόν η DNA πολυμεράση χρησιμοποιεί ως εκμαγείο μονόκλωνο DNA για να συνθέσει συμπληρωματικό κλώνο DNA. Η σύνθεση επιτελείται με κατεύθυνση 5'-3'. Για να δημιουργηθεί μονόκλωνο DNA, δίκλωνο DNA θερμαίνεται σε υψηλές θερμοκρασίες και μετουσιώνεται με αποτέλεσμα την αποδιάταξη των κλώνων. Η DNA πολυμεράση καταλύει τον σχηματισμό 5'-3' φωσφοδιεστερικού δεσμού μόνο όταν υπάρχει 3'-υδροξυλομάδα, συνεπώς για να επιτελέσει την αντίδραση πρέπει να υπάρχει ένα τμήμα δίκλωνου DNA. Το ρόλο της σύνθεσης αυτού του μικρού δίκλωνου τμήματος DNA αναλαμβάνουν να επιτελέσουν μικρά συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια, οι εκκινητές. Κάθε ένας από αυτούς είναι συμπληρωματικός με μία περιοχή σε έναν από τους δύο κλώνους του DNA-εκμαγείου, ώστε να υβριδοποιηθεί σε αυτή. Ουσιαστικά η τεχνική βασίζεται στην επανάληψη του κύκλου των διαδικασιών αποδιάταξης, υβριδοποίησης και επέκτασης του δίκλωνου DNA. Μετά από n κύκλους αντίδρασης θεωρητικά έχουν παραχθεί  $2^n$  μόρια DNA. ενίσχυσης ενός τμήματος DNA συγκεκριμένης αλληλουχίας.

### Συστατικά της αντίδρασης PCR:

Τα συστατικά περιλαμβάνουν: δείγμα DNA από βιολογικό υλικό, ρυθμιστικό διάλυμα(buffer), διχλωριούχο μαγνήσιο( $MgCl_2$ ), ένας ζεύγος κατάλληλων εκκινητών μίγμα των τεσσάρων τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων δις-αποσταγμένο νερό  $ddH_2O$  και την ειδική Taq πολυμεράση.

- Το δείγμα DNA χρησιμεύει ως εκμαγείο
- Το ρυθμιστικό διάλυμα δημιουργεί το κατάλληλο περιβάλλον (pH, ιονική ισχύ) για την δραστηριότητα της πολυμεράσης
- Το  $MgCl_2$  είναι συμπαράγοντας του ενζύμου και σταθεροποιεί τα νουκλεοτίδια κατά την υβριδοποίηση.
- Η DNA πολυμεράση που χρησιμοποιείται, η Taq πολυμεράση, είναι ένα θερμοάντοχο ένζυμο και αντέχει σε επαναλαμβανόμενη θέρμανση στους 94-95°C με αποτέλεσμα να μην απαιτείται η προσθήκη νέου ενζύμου μετά από κάθε κύκλο της αντίδρασης. Η πολυμεράση αυτή απομονώθηκε από το θερμοφίλο είδος βακτηριίων *Thermus Aquaticus*. Αξίζει να σημειωθεί ότι η Taq πολυμεράση δεν έχει 3'-5' δράση εξωνουκλεάσης και έτσι στο τελικό προϊόν παραμένουν νουκλεοτίδια που έχουν εισαχθεί λανθασμένα.
- Οι εκκινητές (primers) είναι συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια μήκους 15-28 νουκλεοτιδίων με δομή συμπληρωματική στην αρχή και στο τέλος της αλληλουχίας στόχου.

Είναι σημαντικό να προσέχουμε την συγκέντρωσή τους καθώς 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%

- Να μην περιέχουν μονουκλεοτιδικές επαναλήψεις καθώς μπορεί να υβριδοποιηθούν σε ανεπιθύμητες περιοχές

- Να μην εμφανίζουν εσωτερική αυτό-συμπληρωματικότητα

- Οι θερμοκρασίες τήξεως των δύο εκκινητών να είναι παρόμοιες. Επειδή η θερμοκρασία τήξεως είναι ανάλογη των δεσμών υδρογόνου που σχηματίζει η κάθε βάση, η θερμοκρασία τήξεως κάθε εκκινητή θα εξαρτάται από την ποιοτική και ποσοτική περιεκτικότητα. Αδενίνη και θυμίνη σχηματίζουν δύο δεσμούς, ενώ γουανίνη και κυτοσίνη σχηματίζουν τρεις. Η θερμοκρασίας τήξεως δίνεται από τον τύπο  $T_m^{\circ}\text{C}=2(A/T)+3AG$ .

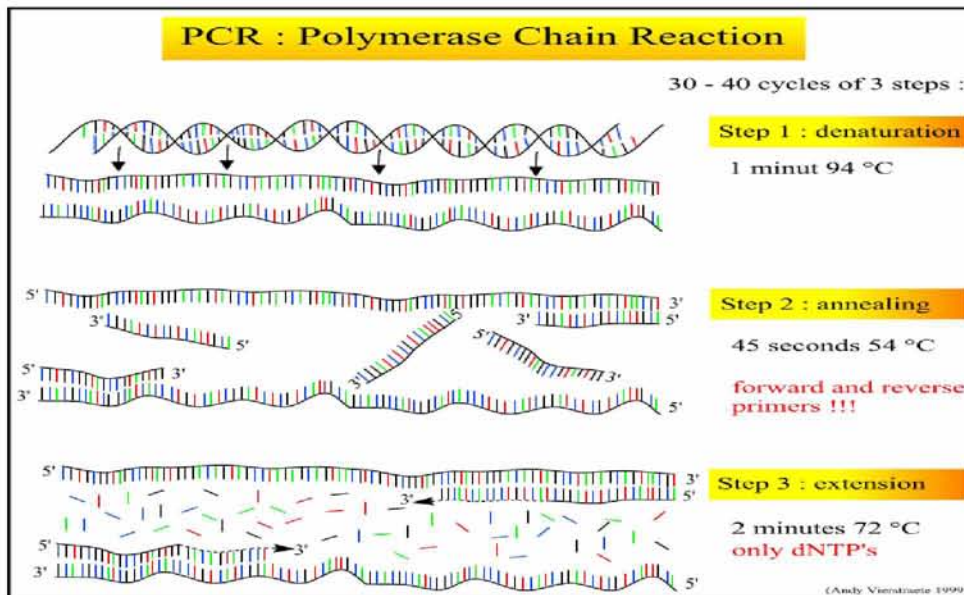
### **Στάδια της αντίδρασης:**

Οι επαναλαμβανόμενοι κύκλοι αποδιάταξης, υβριδοποίησης 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:

1. Στάδιο αποδιάταξης DNA (denaturation): Η θερμοκρασία ανέρχεται στους  $95^{\circ}\text{C}$  για 30sec. Οι δύο κλώνοι του DNA μετουσιώνονται καθώς διασπώνται οι δεσμοί υδρογόνου και διαχωρίζονται σε μονόκλωνες αλυσίδες.

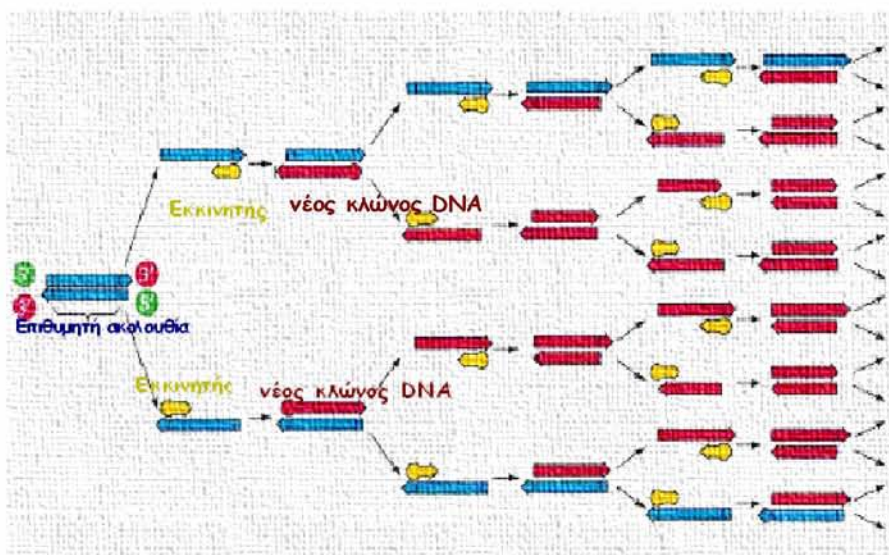
2. Στάδιο υβριδισμού (annealing): Σε αυτό το στάδιο η θερμοκρασία μειώνεται στους  $30-65^{\circ}\text{C}$  για 30sec επιτρέποντας την υβριδοποίηση των εκκινητών με το μονόκλωνο DNA. Η θερμοκρασία και ο χρόνος που χρειάζεται για την υβριδοποίηση των εκκινητών εξαρτάται από τη συγκέντρωσή τους στην αντίδραση, το μήκος και την αλληλουχία των βάσεων τους. Η θερμοκρασία του υβριδισμού ρυθμίζεται περίπου  $5^{\circ}\text{C}$  χαμηλότερα από το σημείο τήξης ( $T_m$ ).

3. Στάδιο επιμήκυνσης (extention): Η θερμοκρασία ανεβαίνει και πάλι στους  $65-75^{\circ}\text{C}$  για 2-5min ώστε η DNA πολυμεράση να ξεκινήσει τη σύνθεση των νέων κλώνων.



**Εικόνα 17:** Στην εικόνα διακρίνεται αναπαράσταση των βημάτων της PCR. Στο πρώτο βήμα έχουμε την αποδιάταξη στους 94 °C, στο δεύτερο την υβριδοποίηση των εκκινητών και στο τρίτο στην επέκτασή τους από την DNA πολυμεράση.

Πριν ξεκινήσουν οι επαναλαμβανόμενοι κύκλοι στον θερμικό κυκλοποιητή προηγείται ένα 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.



**Εικόνα 18:** Μετά από κάθε κύκλο για κάθε κλώνο παράγονται δύο μόρια DNA, μετά τον δεύτερο τέσσερα. Έτσι για  $n$  κύκλους θεωρητικά έχουμε  $2^n$  μόρια.

### Αντίδραση PCR (Τεχνικό μέρος)

Η αντίδραση πραγματοποιείται στα eppendorf των 500μl σε τελικό όγκο 50μl.

Αντιδραστήρια	Αρχική συγκέντρωση	Τελική Συγκέντρωση
DNA	100ng/μl	4ng/μl
MgCl <sub>2</sub>	50mM	2mM
PPrimers (F+R)	50pmol	1pmol/μl
dNTPs(dGTP, dATP, dCTP, dTTP)	10mM το καθένα	0,2mM
Buffer solution	10x	1x
Ταq πολυμεράση	5u/μl	1u/μl

Οι ποσότητες των αντιδραστηρίων για μια αντίδραση είναι οι ακόλουθες:

DNA	2 μl
Buffer solution	5 μl
MgCl <sub>2</sub>	1 μl
Primer Fw	1 μl
Primer Rv	1 μl
dNTPs 1 μl	dNTPs 1 μl
Ταq πολυμεράση	0,2 μl
ddH <sub>2</sub> O 39 μl	39 μl
V <sub>τελ</sub> =50μl	50μl



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
	75 °C	40sec
	75 °C	40sec
Τελική επέκταση	72 °C	10min

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

Για να επιβεβαιωθεί ο πολλαπλασιασμός του DNA το δείγμα ηλεκτροφóρεται σε πήκτωμα αγαρόζης. Το DNA μετακινείται σε ηλεκτρικό πεδίο λόγω του αρνητικού φορτίου. Για την παρασκευή πηκτώματος αγαρόζης απαιτούνται: αγαρόζη, TAE 1X, βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr) και loading buffer για την τοποθέτηση του δείγματος στην μήτρα (πηγαδάκι).

- αγαρόζη: πολυσακχαρίτης παράγοντας πήξης του πηκτώματος .
- TAE (Tris, Acetic, EDTA) 1X: ρυθμιστικό διάλυμα. Το ρυθμιστικό διάλυμα TAE 1X παρασκευάζεται από stock διάλυμα 50X με ανάμιξη 20ml 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 τη σωστή τοποθέτηση των δειγμάτων στα «πηγάδια». Η γλυκερόλη χρησιμοποιείται ως μεγαλομοριακή ουσία για να αυξηθεί 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 αгарόζης 2%, 40ml χρησιμοποιούνται οι ακόλουθες ποσότητες:

Αγαρόζη 0,6gr

TAE 1X 40ml

EtBr 4μl

Η διαδικασία έχει ως εξής:

1. Ζύγιση 0,6gr αгарόζης 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 αгарόζης)

3. Προσθήκη 4μl EtBr αφού κρύνει το διάλυμα.

4. Διάχυση του διαλύματος στη μήτρα όπου θα στερεοποιηθεί το πήκτωμα.

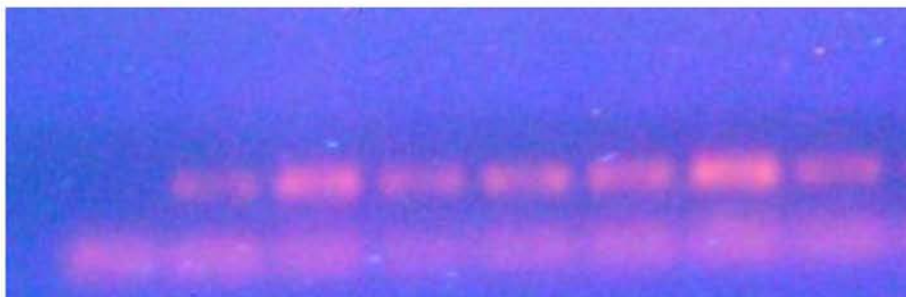
Προηγουμένως έχουν τοποθετηθεί στη μήτρα τα «χτενάκια» για να δημιουργηθούν οι θέσεις φόρτωσης των δειγμάτων, όταν πήξει η αгарόζη. Το διάλυμα αгарόζης πήζει σε 10-15min και τότε μπορούν να αφαιρεθούν και τα «χτενάκια».

5. Τοποθέτηση της μήτρας με το πήκτωμα σε οριζόντια συσκευή ηλεκτροφόρησης που περιέχει ρυθμιστικό διάλυμα TAE 1X.

6. Φόρτωση των δειγμάτων στα «πηγάδια»: αναμιγνύονται 3μl loading buffer και 5μl δείγματος.

Εφαρμόζεται τάση 180mA στο πήκτωμα και τα δείγματα ηλεκτροφορούνται 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. Τα

δείγματα που περιέχουν PCR προϊόν αποθηκεύονται στους  $-20^{\circ}\text{C}$  για να χρησιμοποιηθούν σε επόμενες τεχνικές.



**Εικόνα 19:** Φωτογραφία από πήκτωμα αγαρόζης 2% (180mA), για τον έλεγχο των PCR προϊόντων στη συσκευή ακτινοβολίας UV. Στην πρώτη διαδρομή βρίσκεται ο αρνητικός μάρτυρας και στις υπόλοιπες δείγματα στα οποία η PCR έχει δουλέψει.

### SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism)

Το SSCP είναι μία τεχνική η οποία βασίζεται στο διαχωρισμό μέσω ηλεκτροφόρησης μονόκλωνων αλυσίδων DNA σε πήκτωμα ακρυλαμίδης. Οι μονόκλωνες αλυσίδες αποκτούν τριτοταγή διαμόρφωση στον χώρο με βάση την πρωτοταγή τους δομή. Κατά την ηλεκτροφόρηση η ταχύτητα των αλυσίδων καθορίζεται από το μήκος του μορίου αλλά και από τη νουκλεοτιδική του σύσταση. Έτσι ακόμα και η αλλαγή ενός νουκλεοτιδίου μπορεί να οδηγήσει σε αλλαγή της τριτοταγούς δομής με αποτέλεσμα να αλλάξει η κινητικότητα μίας αλυσίδας κατά την ηλεκτροφόρηση. Με αυτό τον τρόπο μπορεί να παρατηρηθεί με ευκολία η ύπαρξη πολυμορφισμών. Η τεχνική αυτή είναι εύκολη στη χρήση οικονομική και άμεση ως προς την παρατήρηση ύπαρξης πολυμορφισμών.

Ως προς την προετοιμασία της η τεχνική αυτή χωρίζεται σε τρία στάδια: Παρασκευή πηκτώματος ακρυλαμίδης, αποδιάταξη και τοποθέτηση δειγμάτων στο πήκτωμα, overnight παραμονή του πηκτώματος σε 110volt και χρώση του πηκτώματος

#### Παρασκευή

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

Αντιδραστήριο	Αρχική ποσότητα	Τελική Συγκέντρωση
Ακρυλαμίδιο	12,375gr	9,9%w/v
Δίς- Ακρυλαμίδιο	0,33gr	0,264w/v
TBE 10x	10ml	0,8x
Γλυκερόλη 50%	12,5ml	5%
APS	650ml	0,008%
TEMED	125ml	0,0001%

- 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 (υπερθειικό αμμώνιο):  
ξεκινά την αντίδραση πολυμερισμού δημιουργώντας ελεύθερες ρίζες  
 $S_2O_8^{2-} \rightarrow 2SO_4^{\cdot -}$

### Τεχνικό μέρος

Τεχνικά για την παρασκευή του πηκτώματος τα 12,375gr ακρυλαμίδης αναμιγνύονται με 0,33g Bis-ακρυλαμίδης σε 10TBE10X. Το διάλυμα φιλτράρεται σε διηθητικό χαρτί και συμπληρώνεται με νερό σε τελικό όγκο 125ml. Τα 650μl APS και 125μl TEMED προστίθενται στο διάλυμα. Ακολουθεί γρήγορη ανάδευση και τοποθέτηση σε καλούπι. Η αντίδραση ολοκληρώνεται σε 30min περίπου και το πήκτωμα έχει σχηματιστεί. Στη συνέχεια τοποθετείται σε συσκευή κάθετης ηλεκτροφόρησης.

### Προετοιμασία δειγμάτων

5μl από κάθε δείγμα αναμιγνύονται με 10μl denaturing buffer. Τα 10 ml αποδιατακτικού διαλύματος περιέχουν:

95% φορμαμίδιο

20mM EDTA

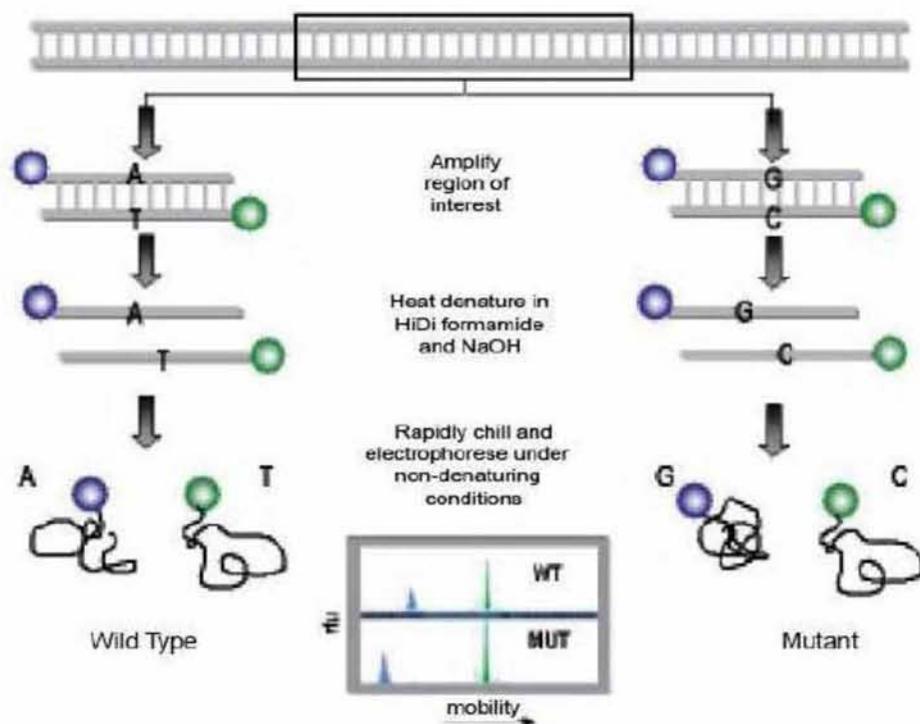
10mM NaOH

0,05% κυανούν ζυλενίου

0,05% μπλε της βρωμοφαινόλης

Κατά την αποδιάταξη τα δείγματα τοποθετούνται σε κυκλοποιητή. Εκεί επωάζονται για 2 λεπτά στους 92°C, για δύο λεπτά στους 95°C και για 7 λεπτά στους 97°C. Με την έξοδο

τους από τον κυκλοποιητή τοποθετούνται σε πάγο. Στη συνέχεια τα δείγματα φορτώνονται στο πήκτωμα όπου παραμένουν για 16-22 ώρες στα 220v.



**Εικόνα 20:** Αναπαράσταση της τεχνικής SSCP. Οι αλυσίδες ενός δίκλωνου μορίου DNA διαχωρίζονται με θέρμανση κάτω από την επώαση με τον αποδιατακτικό παράγοντα φορمامιμίδιο. Επειδή η τριτοταγής μορφή των κλώνων διαμορφώνεται με βάση την πρωτοταγή τους μορφή η κινητικότητα των κλώνων μπορεί να αλλάξει και μόνο από την αλλαγή μίας βάσης.

Χρώση των πηκτωμάτων

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)

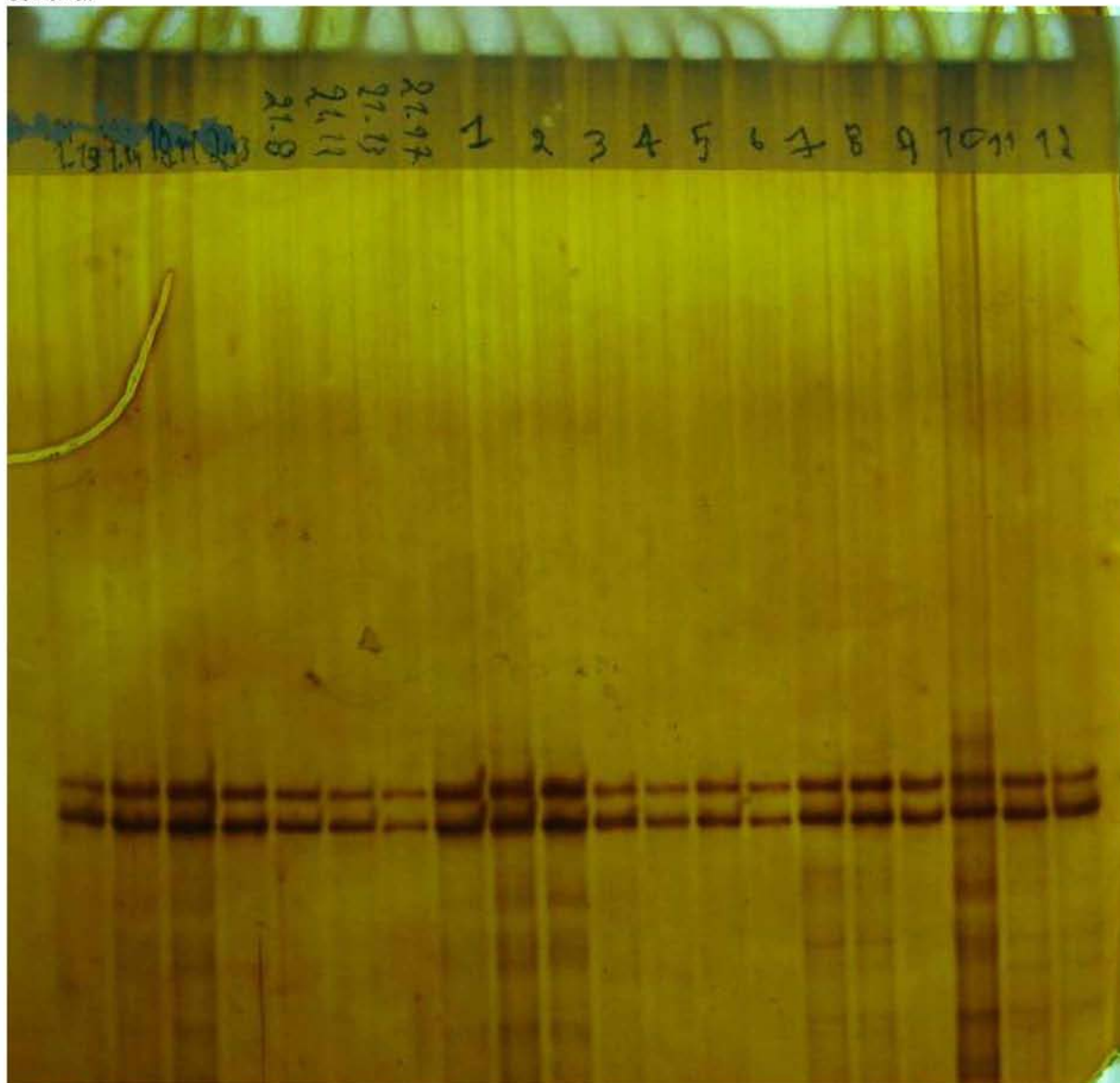
*Διάλυμα 3* : 6gr NaOH + 0,02gr NaBH<sub>4</sub> + 2 ml HCHO και ddH<sub>2</sub>O έως 400ml

*Βήμα1:* Πλύση κάθε πηκτωμάτος για καθαρισμό, με 800ml νερό, 20ml αιθανόλης και 1 ml οξικό σε δύο πλύσεις 200ml των τριών λεπτών. Ξέπλυμα με αποσταγμένο νερό

*Βήμα2:* Πλύση κάθε πηκτωμάτος με την 200ml διαλύματος χρωστική AgNO<sub>3</sub> για 15-20 λεπτά. Ξέπλυμα με αποσταγμένο δύο φορές

*Βήμα 3:* Πλύση κάθε πηκτώματος με ένα υδατικό διάλυμα 200ml το οποίο περιέχει 6gr NaOH, 0,04gr NaBH<sub>4</sub> και 1ml φορμαλδεΐδης, μέχρι την εμφάνιση των μπαντών των δειγμάτων. Ξέπλυμα με αποσταγμένο νερό

Στη συνέχεια αφού συσκευάσουμε τα πηκτώματα μπορούμε να διακρίνουμε τις μπάντες εύκολα.



**Εικόνα 21:** Πήκτωμα πολυακρυλαμίδης 10% (22 ώρες, 220V 40C) μετά από χρώση με νιτρικό άργυρο.

#### **Καθαρισμός PCR προϊόντος με Invitrogen Kit**

1. Τοποθετούμε 200ml διαλύματος δέσμευσης (binding buffer) σε νέο eppendof και προσθέτουμε σε αυτό τα 50μl του PCR προϊόντος. Στη συνέχεια ξεπλένουμε το eppendof του PCR προϊόντος με 50μl από το buffer, και τα προσθέτουμε στο νέο eppendof.

2. Μετακινούμε το περιεχόμενο του νέου eppendof σε PureLink σωλήνα συλλογής

3. Φυγοκέντρωση σε 10.000g για ένα λεπτό, ρίψη του υπερκειμένου

4. Προσθήκη 650ml με διάλυμα ξεπλύματος Wash Buffer στο σωλήνα συλλογής.

5. Φυγοκέντρηση στους 10.000 για ένα λεπτό, ρίψη του υπερκείμενου

6. Φυγοκέντρηση σε μέγιστη ταχύτητα για ένα λεπτό, είναι σημαντικό να απομακρυνθεί όλη η αιθανόλη, ρίψη του υπερκείμενου.

7. Προσθήκη 50 ml Elution Buffer αλλαγή του μέρους του σωλήνα συλλογής που χρησιμοποιούταν για τη συλλογή του υπερκείμενου με σωλήνα έκλουσης (Elution tube) και ένα λεπτό επώασης.

8. Φυγοκέντρηση στα 13.000g για 2 λεπτά. Το υπερκείμενο είναι το καθαρισμένο πλέον PCR προϊόν .

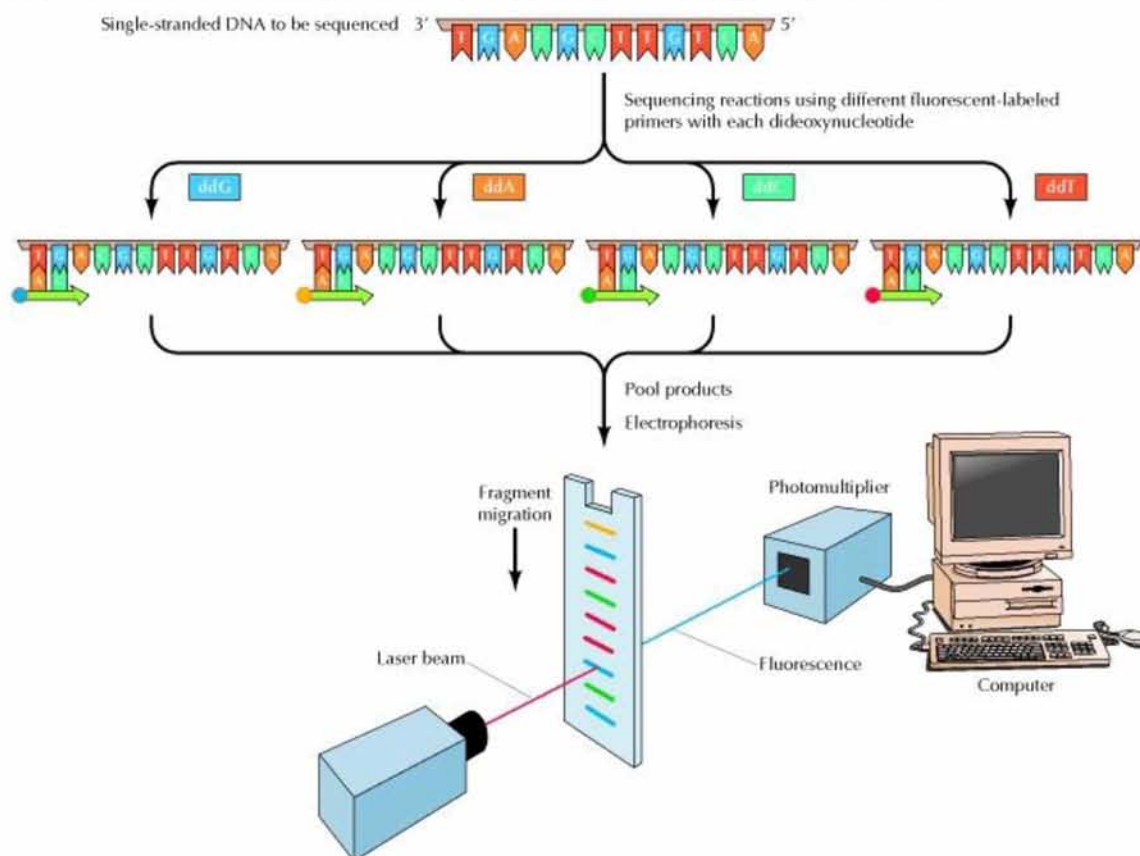
### **Αλληλούχιση**

- 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.

### **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.

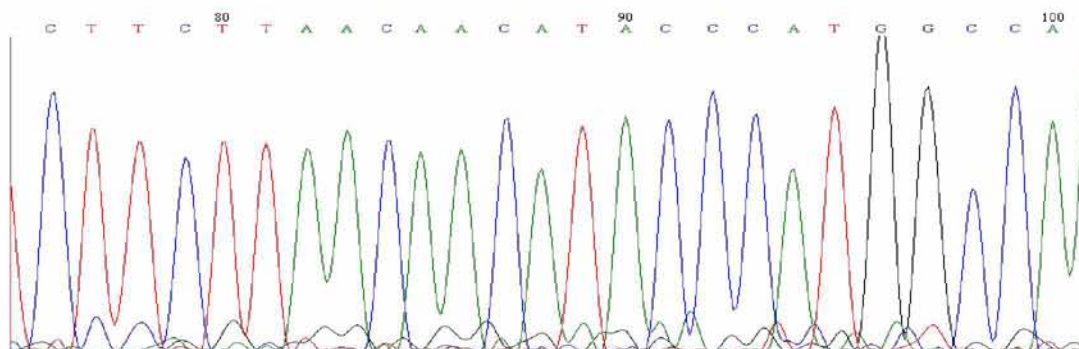


**Εικόνα 22:** Σχεδιαγραμματική απεικόνιση της διαδικασίας της αυτόματης αλληλούχισης. Τα συστατικά της αντίδρασης Sanger περιλαμβάνουν: dNTPs, ddNTPs σημασμένα το καθένα με διαφορετική φθορίζουσα χημική ομάδα, το DNA μήτρα, εκκινητές και DNA πολυμεράση. Κατά τις αντιδράσεις επέκτασης σχηματίζεται μίγμα 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. Η κλίμακα των σημασμένων προϊόντων τερματισμού ηλεκτροφορείται στη συσκευή αυτόματης αλληλούχισης και «φωτίζεται» από το λέιζερ του ανιχνευτή. Τα δεδομένα τελικώς επεξεργάζονται σε υπολογιστή.

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 23:** Χρωματογράφημα αλληλουχίας ενός τμήματος DNA που στάλθηκε για αλληλούχιση.

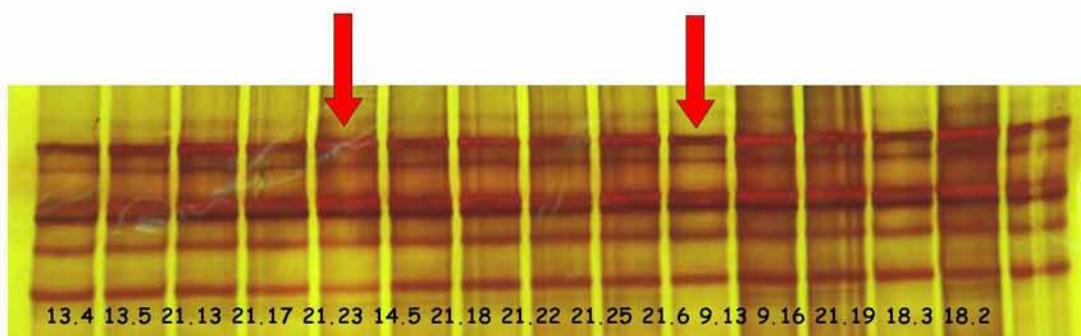
Για την επεξεργασία των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκαν τα προγράμματα: BIOEDIT 7.0 και CLUSTALX 1.8. Το πρώτο χρησιμεύει στην «ανάγνωση» της αλληλουχίας του κάθε γονιδίου που απεικονίζεται με τη μορφή χρωματογραφήματος. Με τον τρόπο αυτό συγκρίνοντας τη ζητούμενη αλληλουχία με μια πρότυπη, εντοπίζουμε 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.

# **ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**

Για τα γονίδια  $tRNA^{Asn}$ ,  $tRNA^{Cys}$  και  $tRNA^{Tyr}$ , στα 50 δείγματα ασθενών και σε 55 άτομα χωρίς κάποιο κλινικό σύμπτωμα δεν εντοπίστηκε κάποια μετάλλαξη. Στα γονίδια  $tRNA^{Ser}$  και  $tRNA^{Asp}$  τα οποία αναλύθηκαν μαζί εντοπίστηκε σε 76 άτομα χωρίς κάποιο κλινικό σύμπτωμα μία μετάλλαξη σε δύο άτομα να φέρουν τη μετάπτωση C7476T στο  $tRNA^{Asp}$ . Για τα ίδια γονίδια στα 50 δείγματα ασθενών με Alzheimer εμφανίστηκε μία μόνο μετάλλαξη, η μετάπτωση T7547C στο  $tRNA^{Ser}$  σε ένα δείγμα.

### ΓΟΝΙΔΙΑ $tRNA^{Asn}$ , $tRNA^{Cys}$ ΚΑΙ $tRNA^{Tyr}$ ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΕΛΕΓΧΟΥ ΚΑΙ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ALZHEIMER.

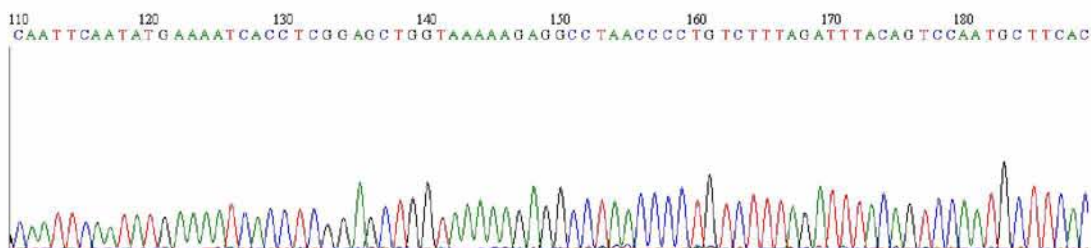
Για το τμήμα των 294 bp που κωδικοποιεί τα γονίδια  $tRNA^{Asn}$ ,  $tRNA^{Cys}$  και  $tRNA^{Tyr}$  δεν εντοπίστηκε καμία μετάλλαξη στα 50 δείγματα ασθενών και στα 55 δείγματα της ομάδας ελέγχου.



**Εικόνα 22:** Στο πήκτωμα απεικονίζονται δείγματα ατόμων χωρίς κάποιο κλινικό σύμπτωμα. Όλα τα δείγματα διαθέτουν το ίδιο πρότυπο και δεν υπάρχει κάποια διαφορά μεταξύ τους. Με κόκκινο βέλος απεικονίζονται τα δείγματα που στάλθηκαν για αλληλούχιση



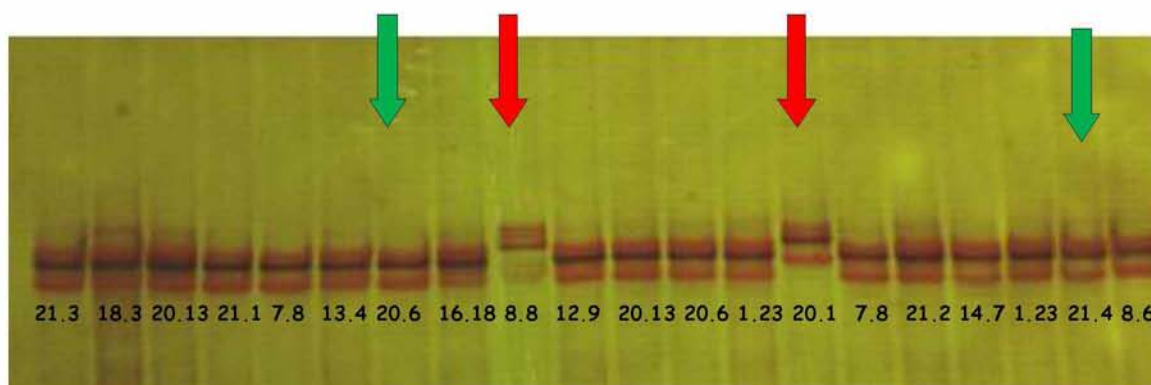
**Εικόνα 25:** Σε αυτό το πήκτωμα απεικονίζονται δείγματα ατόμων που πάσχουν από την νόσο του Alzheimer. Εδώ και πάλι διαθέτουν το ίδιο πρότυπο και δεν υπάρχει κάποια διάφορα. Με κόκκινο βέλος παριστάνονται τα δείγματα που στάλθηκαν για αλληλούχιση.



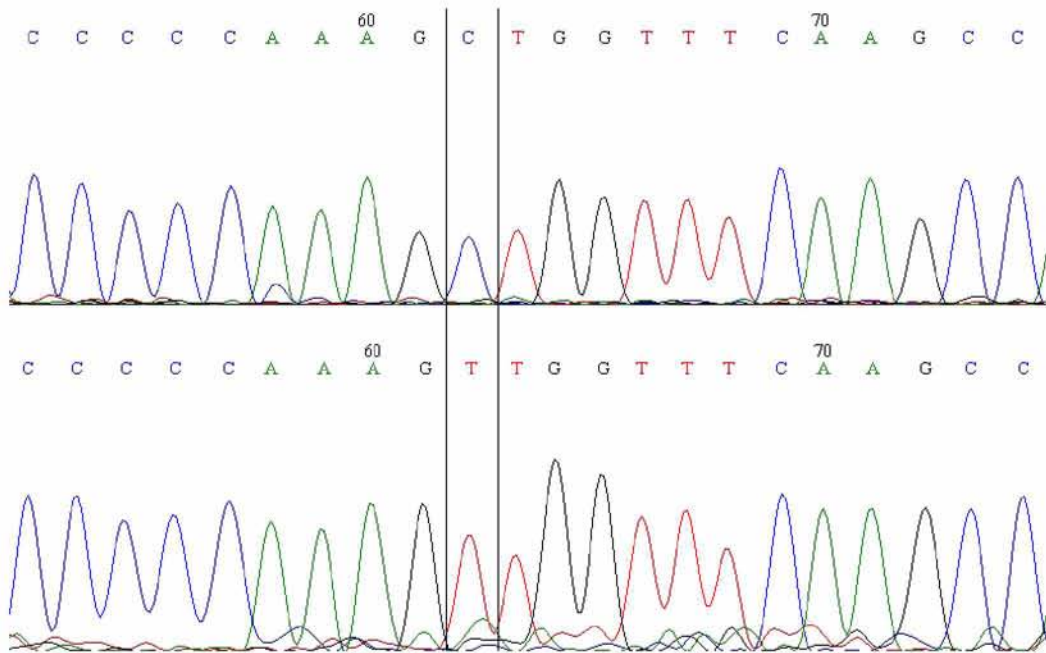
**Εικόνα 25:** Χρωματογράφημα αλληλούχισης του τμήματος ACT που περιέχει τα γονίδια  $tRNA^{Asn}$   $tRNA^{Cys}$  και  $tRNA^{Tyr}$ .

### ΓΟΝΙΔΙΑ $tRNA^{ser}$ και $tRNA^{asp}$ ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΑΤΟΜΩΝ ΧΩΡΙΣ ΚΑΠΟΙΟ ΚΛΙΝΙΚΟ ΣΥΜΠΤΩΜΑ.

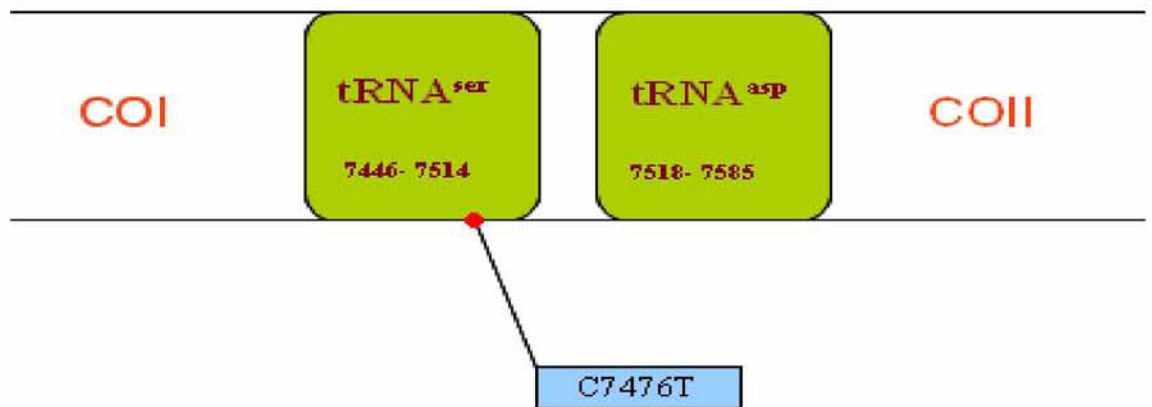
Τα γονίδια αυτά περιέχονται σε ένα τμήμα 160 bp. Από τα 76 δείγματα από άτομα χωρίς κάποιο κλινικό σύμπτωμα που αναλύθηκαν εντοπίστηκε μία μετάλλαξη σε δύο δείγματα. Πρόκειται για τη μετάπτωση C7476T η οποία βρίσκεται στο γονίδιο του  $tRNA^{ser}$



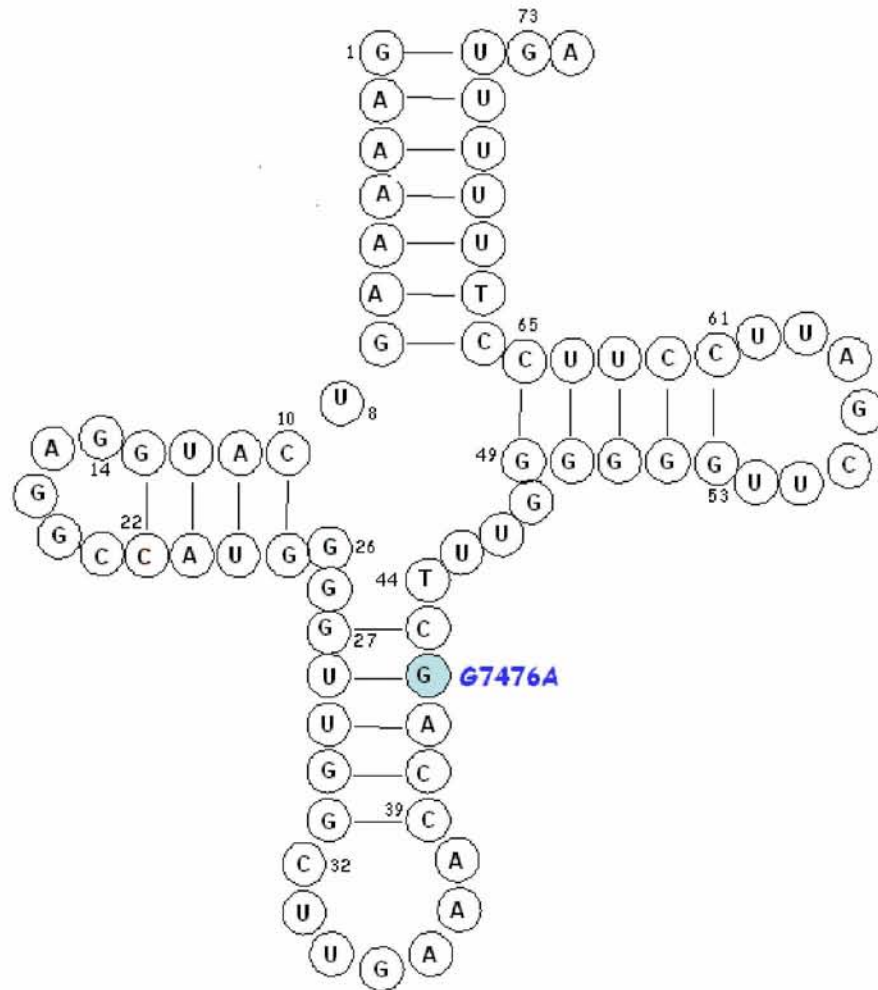
**Εικόνα 26:** Στο πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου 10% (22h, 220V, 40C), διακρίνονται μία σειρά από πρότυπα. Αυτά που απεικονίζονται με κόκκινο είναι τα δείγματα που φέρουν μεταλλάξεις, ξεχωρίζουν από τα φυσιολογικά δείγματα λόγω του διαφορετικού τους προτύπου.



**Εικόνα 27:** Χρωματογράφημα sequencing τμήματος 120bp που περιλαμβάνει τα γονίδια  $tRNA^{ser}$  και  $tRNA^{asp}$  σε άτομο control (πάνω) και στο άτομο 7.8 (κάτω). Είναι εμφανής η μετάπτωση  $C \rightarrow T$  στη θέση 7476 όπου βρίσκεται το γονίδιο του  $tRNA^{ser}$ .



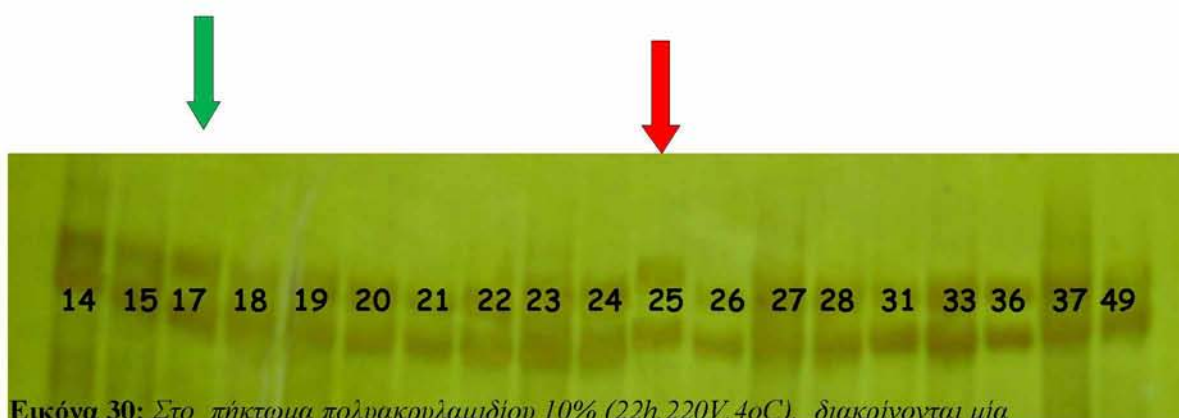
**Εικόνα 28:** Αναπαράσταση της θέσης της μετάλλαξης στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα. Η μετάλλαξη βρέθηκε στην θέση 7476, λίγο μετά την μέση του γονιδίου του  $tRNA^{ser}$ .



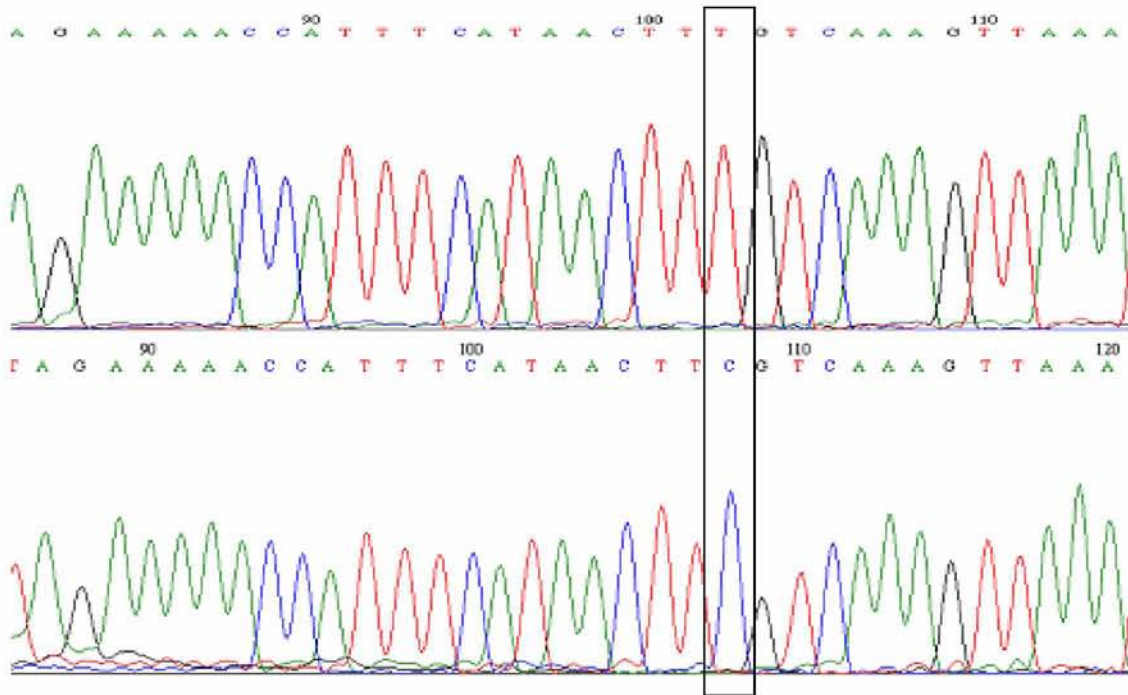
**Εικόνα 29:** Οι μεταλλάξεις που βρέθηκαν στο tRNA<sup>Ser</sup>. Η γαλάζια επισήμανση δείχνει που βρίσκεται η θέση που επηρεάζει η μετάλλαξη.

**ΓΟΝΙΔΙΑ  $tRNA^{Ser}$  και  $tRNA^{Asp}$  ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΑΠΟ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ALZHEIMER.**

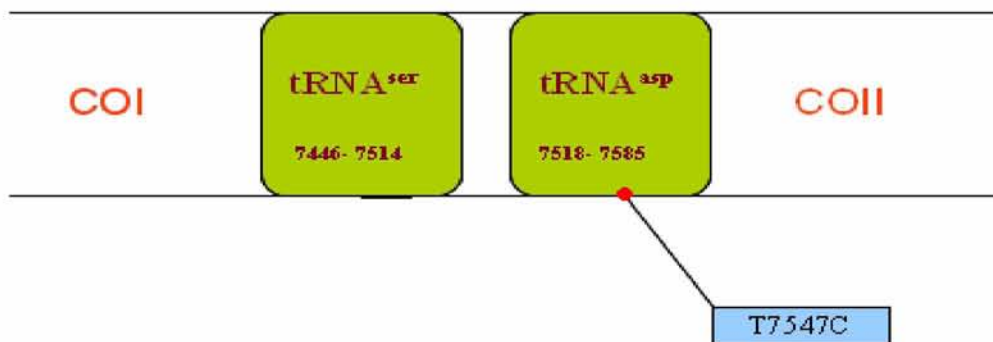
Στο τμήμα που περιέχει τα γονίδια  $tRNA^{Ser}$  και  $tRNA^{Asp}$  στους ασθενείς με Alzheimer , εντοπίστηκε μία μετάλλαξη σε ένα άτομο. Πρόκειται για την μετάπτωση T7547C στο γονίδιο  $tRNA^{Asp}$  .



**Εικόνα 30:** Στο πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου 10% (22h, 220V, 40C), διακρίνονται μία σειρά από πρότυπα. Το πρότυπο που απεικονίζεται με κόκκινο βέλος με είναι το δείγμα που φέρει μετάλλαξεις. Ξεχωρίζει από τα φυσιολογικά δείγματα λόγω του διαφορετικού του προτύπου από τα υπόλοιπα. Με πράσινο απεικονίζεται ένα φυσιολογικό πρότυπο που στάλθηκε για αλληλούχιση.

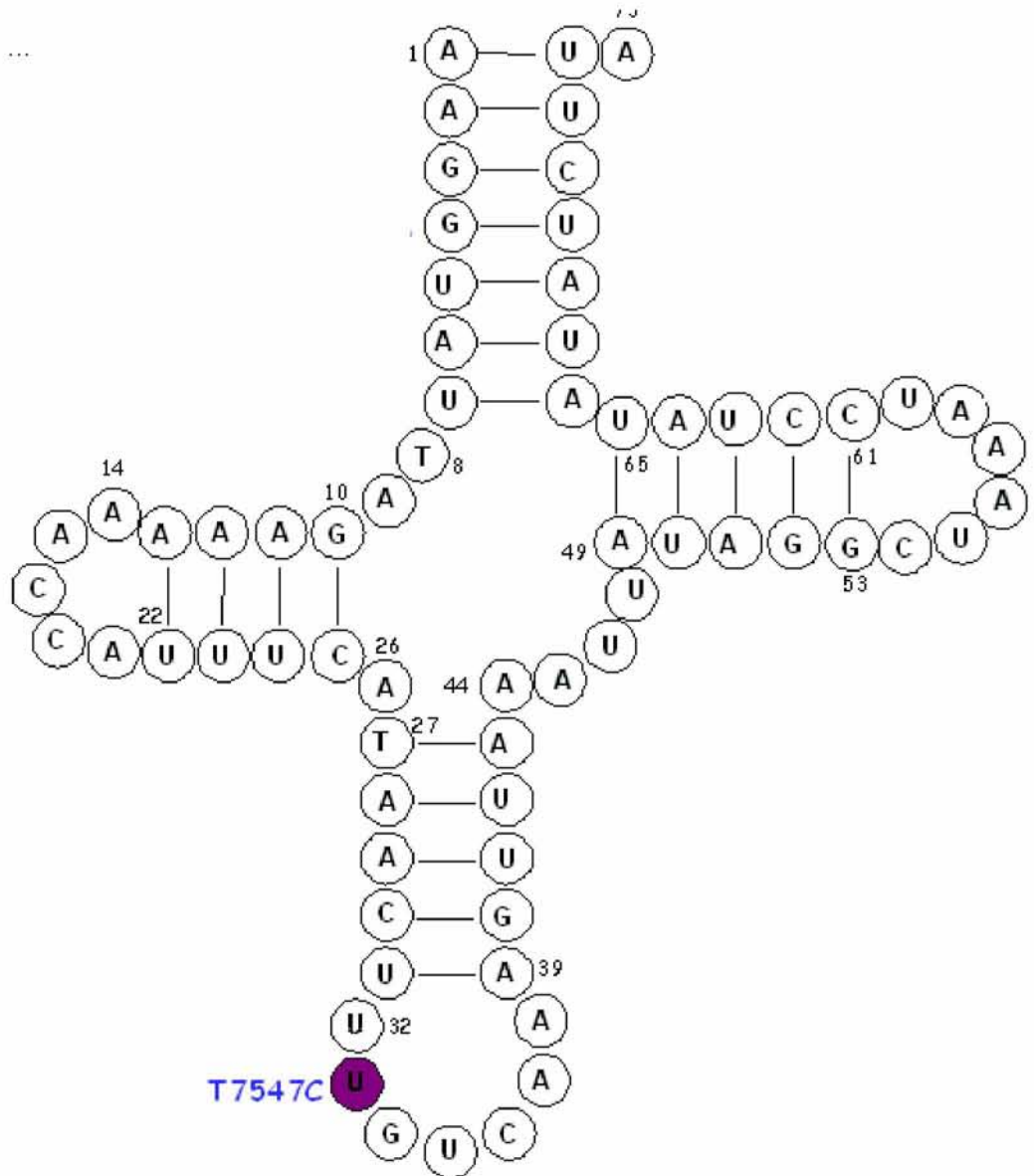


**Εικόνα 31:** Χρωματογράφημα sequencing τμήματος 120bp που περιλαμβάνει τα γονίδια *tRNA<sup>ser</sup>* και *tRNA<sup>asp</sup>* σε άτομο control (πάνω) και στο άτομο (κάτω). Είναι εμφανής η μετάπτωση T→C στη θέση 7547 όπου βρίσκεται το γονίδιο του *tRNA<sup>asp</sup>*.



**Εικόνα 32:** Αναπαράσταση της θέσης της μετάλλαξης στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα. Η μετάλλαξη βρέθηκε στην θέση 7547, στη μέση περίπου του γονίδιο του *tRNA<sup>asp</sup>*.





**Εικόνα 33:** Οι μεταλλάξεις που βρέθηκαν στο tRNA<sup>asp</sup>. Η μοβ επισήμανση παραπέμπει στη θέση που επηρεάζει η μετάλλαξη.

# Συζήτηση

Στην παρούσα εργασία έγινε ανάλυση πέντε γονιδίων tRNA ( $tRNA^{Ser}$ ,  $tRNA^{Asp}$ ,  $tRNA^{Asn}$ ,  $tRNA^{Cys}$  και  $tRNA^{Tyr}$ ) σε 50 ασθενείς με Alzheimer. Τα τρία από αυτά τα γονίδια ( $tRNA^{Asn}$ ,  $tRNA^{Cys}$  και  $tRNA^{Tyr}$ ) μελετήθηκαν και σε μία ομάδα έλεγχου 54 υγιών ατόμων ενώ τα δύο από αυτά ( $tRNA^{Ser}$  και  $tRNA^{Asp}$ ), σε μια ομάδα ελέγχου 75 υγιών ατόμων. Στα δείγματα από τους 50 ασθενείς με Alzheimer γονίδια βρέθηκε μόνο μία σημειακή μετάλλαξη, η μετάπτωση T7547C στο γονίδιο ( $tRNA^{Asp}$ ) σε ένα ασθενή (2%). Η μετάλλαξη αυτή δεν βρέθηκε στην ομάδα ελέγχου, όμως το ποσοστό αυτής της μετάλλαξης στους ασθενείς είναι μικρό για να θεωρηθεί ότι το συγκεκριμένο γονίδιο συμβάλει στην νόσο. Στην ομάδα ελέγχου των 75 υγιών ατόμων βρέθηκε μία σημειακή μετάλλαξη, η μετάπτωση C7476T στο γονίδιο  $tRNA^{Ser}$  σε δύο άτομα (2,7%) η οποία δεν υπήρχε στους ασθενείς. Ούτε αυτά τα ποσοστά επαρκούν για να υποδείξουν κάποια εμπλοκή αυτής της μετάλλαξης σε προστασία από την εξέλιξη της νόσου. Στον πίνακα παρακάτω αναφέρονται οι μεταλλάξεις που έχουν εντοπιστεί σε μιτοχονδριακά γονίδια ασθενών και κατά καιρούς έχουν συσχετιστεί με την νόσο:

<i>Μεταλλάξεις</i>	<i>Γονίδια</i>
G5460C	ND2
έλλειψη 4977 bp	ND2
προσθήκη 956-965 bp	12S rRNA
T856G	12S rRNA
G3196A	G3196A
T3197C	T3197C
T4336C	$tRNA^{Gln}$

Η μετάπτωση T4336C ( $tRNA^{Gln}$ ) αποτελεί την μετάλλαξη με τις περισσότερες αναφορές σε ασθενείς με Alzheimer.

Στη διεθνή βιβλιογραφία αναφορές για τη μετάπτωση T7547C, έχουν γίνει σε μία μελέτη όπου εντοπίστηκε σε ένα από τους 50 ασθενείς έχει γίνει σε μία ανάλυση σε 21 ασθενείς με ελαττωμένη δραστηριότητα κυτοχρωμική οξειδάσης μαζί με άλλες μεταλλάξεις στο γονίδιο  $tRNA^{Ser(UCN)}$  όπου βρέθηκε σε τέσσερις ασθενείς (Jaksch M. et al., 1998) και σε φυλογενετικές αναλύσεις (Oven & Kayser 2012). Το ίδιο ισχύει και για την μετάπτωση

T7476C που εμφανίστηκε μονάχα στην ομάδα ελέγχου. Και αυτή η μετάλλαξη αυτή έχει αναφερθεί σε πληθώρα ερευνών ως πολυμορφική χωρίς να συσχετιστεί με κάποια νόσο (Brown MD et al., 1992, Houshmand, M. et al., 1994, Howell, N. et al., 1995 Konnings et al., 2008)

Επιπροσθέτως δεδομένου του γεγονότος ότι το Alzheimer είναι ένα πολυπαραγοντικό νόσημα η πιθανή συμβολή του μιτοχονδριακού γονιδιώματος στην εξέλιξη της νόσου είναι μικρή, με αποτέλεσμα να είναι αναγκαίος ένας πάρα πολύ μεγάλος αριθμός δειγμάτων ώστε να παραχθεί ένα συνεπές αποτέλεσμα. Ο αριθμός των δειγμάτων της παρούσης μελέτης είναι μικρός για να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα από τα αποτελέσματα της μονάχα, μπορούν όμως να επαχθούν κάποια συμπεράσματα αν γίνει σύγκριση με τα αποτελέσματα προηγούμενων μελετών που έχουν αναφερθεί στον πίνακα στην εισαγωγή. Στον πίνακα στην εισαγωγή γίνεται αναφορά αποτελεσμάτων διαφόρων μελετών στη συσχέτιση του μιτοχονδριακού γονιδιώματος με τη νόσο Alzheimer. Τα αποτελέσματα μεταξύ τους είναι αντιφατικά με κάποιες έρευνες να βρίσκουν όντως σχέση και κάποιες άλλες να αναιρούν αυτή τη συσχέτιση των μιτοχονδριακών γονιδίων με τη νόσο. Πρόσφατα δημοσιεύτηκε μία μελέτη η οποία έχει το μεγαλύτερο αριθμό χρήσης δειγμάτων από ασθενείς με Alzheimer 4.113 και 1.602 υγιών ατόμων ως ομάδα ελέγχου με συνέπεια τη μεγαλύτερη αξιοπιστία σε σχέση με τις προηγούμενες έρευνες που αναφέρθηκαν (Hudson G. et al. 2012). Τα αποτελέσματα εκείνης της μελέτης ταιριάζουν με αυτά της παρούσης εργασίας, τουλάχιστον για αυτά τα πέντε γονίδια καθώς σύμφωνα με εκείνη τη μελέτη δεν υπήρχε κάποια συσχέτιση μεταξύ μιτοχονδριακών μεταλλάξεων ή απλοομάδων σε σχέση με το Alzheimer.

Πιθανότατα το ότι κάποιες μελέτες εντόπισαν συσχέτιση μεταξύ μεταλλάξεων στο mtDNA και στο Alzheimer, οφείλεται στο γεγονός ότι λόγω της μητρικής κληρονομικότητας των μιτοχονδρίων, το μιτοχονδριακό γονιδίωμα υφίσταται έλλειψη ανασυνδυασμού με αποτέλεσμα να εμφανίζεται αρκετά συχνά σε γενετικές μελέτες το φαινόμενο της πληθυσμιακής διαστρωμάτωσης, δίνοντας ψευδώς-θετικά αποτελέσματα.. Υπάρχει όμως και η πιθανότητα οι συγκεκριμένοι πολυμορφισμοί που εντοπίστηκαν στην εργασία και απέτυχαν να δείξουν συσχέτιση με τη νόσο σε κάποια άλλη ομάδα πληθυσμού διαφορετικής εθνικής ομάδας να υπάρχει όντως συσχέτιση λόγω του ότι η σχετική συμβολή των μιτοχονδριακών μεταλλάξεων στη νόσο πιθανόν να διαφέρει σε εκείνη την ομάδα εξαιτίας αλληλεπίδρασης τους με περιβαλλοντικούς παράγοντες και πυρηνικά γονίδια (Ruiz-Pesini et al. 2004, Hudson G et al. 2012) .

Τα τελευταία δεδομένα μαζί με αυτά της παρούσας μελέτης όμως δείχνουν ότι είναι πολύ πιθανόν το μιτοχονδριακό γονιδίωμα να μην συμβάλει στη νόσο το Alzheimer. Ωστόσο η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία και κυρίως το οξειδωτικό στρες πέρα από χαρακτηριστικά γνωρίσματα της νόσου είναι ίσως μερικές από τις σημαντικότερες επιπλοκές στο Alzheimer.

Στους ασθενείς τα προβλήματα μιτοχονδριακής λειτουργίας, όπως ελαττωμένος μεταβολισμός και οξειδωτικό στρες εμφανίζονται και σε άλλους τύπους κυττάρων πέρα των νευρικών κυττάρων όπως αιμοπετάλια και ινοβλάστες (Mancuso et al., 2008), υποδεικνύοντας ότι η νόσος του Alzheimer δεν περιορίζεται στον εγκέφαλο. Το οξειδωτικό στρες, ο ελαττωμένος μεταβολισμός στους νευρώνες, η μειωμένη δραστηριότητα των ενζύμων και η γενικότερη διαταραχή της μιτοχονδριακής λειτουργίας παρατηρούνται στους εγκεφάλους των ασθενών στα πρώιμα στάδια της νόσου και ανήκουν πια στα κύρια χαρακτηριστικά της ασθένειας. Αυτό διαπιστώνεται από τους συντελεστές της εμφάνισης της νόσου και στους παράγοντες συμβάλουν στην προστασία από αυτή. Στη πρώτη δεύτερη ομάδα συγκαταλέγονται η υπέρταση, υπερχοληστεριναιμία, το κάπνισμα, η υψηλή πρόσληψη θερμίδων και είναι γνωστό ότι αποτελούν αιτίες παραγωγής υψηλών επιπέδων οξειδωτικού στρες σε κυτταρικό επίπεδο (Maguszak & Żekanowski, 2007). Στη δεύτερη ομάδα ανήκουν διάφοροι αντιοξειδωτικοί παράγοντες, που μειώνουν την παραγωγή ελευθέρων ριζών και δραστικών μορφών οξυγόνου όπως οι βιταμίνες C, η βιταμίνη E τα μη-στεροειδή αντιφλεγμονώδη, η προσοχή στην κατανάλωση θερμίδων και η άσκηση (X. Zhu et al., 2007)

Παραμένει μυστήριο η ακριβής φύση των γεγονότων που κρύβονται πίσω από το οξειδωτικό στρες και την δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων στη σποραδική μορφή της νόσου. Στη νόσο του Alzheimer οι νευρώνες επιτελούνται αρκετά αλλόκοτες καταστάσεις όπως αποτυχημένη απόπτωση (abortosis) και επαν-είσοδο στον κυτταρικό κύκλο. Σε νευρώνες ασθενών με Alzheimer είναι γνωστή εδώ και καιρό η ύπαρξη αποπτωτικών δεικτών όπως ενεργοποιημένες κασπάσες (W. Dickson 2004). Ωστόσο ενώ οι νευρώνες στο Alzheimer οδεύουν σε απόπτωση, τελικά λόγω διαταραχής στη λειτουργία της απόπτωσης δεν καταστρέφονται. Πέρα από τις αποπτωτικές ενδείξεις στους νευρώνες των νοσούντων έχουν βρεθεί και μία σειρά από αλλαγές που σχετίζονται με την κυτταρική διαίρεση, όπως αυξημένα επίπεδα κυκλινών και εξαρτώμενες από τις κυκλίνες κινάσες. Οι κυκλίνες είναι πρωτεΐνες οι οποίες παίζουν ρόλο στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου ενεργοποιώντας τις εξαρτώμενες από τις κυκλίνες κινάσες οι οποίες εμπλέκονται στη ρύθμιση μεταγραφής γονιδίων και στην επεξεργασία του mRNA (Raina A.K. et al., 2004, Currais et al., 2009). Το φαινόμενο αυτό έχει ονομασθεί επαν-είσοδος στον κυτταρικό κύκλο και περιγράφει μία διαδικασία όπου διαφοροποιημένα μη-διαιρούμενα κύτταρα εμφανίζουν αλλαγές οι οποίες συνήθως σχετίζονται με την κυτταρική διαίρεση, όπως αύξηση στην ενεργότητα των κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών και ανεύπλουδία λόγω αντιγραφής των χρωμοσωμάτων. Τα κύτταρα κατορθώνουν να φτάσουν ως την φάση G<sub>2</sub> που προηγείται τη φάση της μίτωσης ωστόσο οι νευρώνες δεν είναι ικανοί να εκτελέσουν τη μίτωση και εισέρχονται σε μία φάση G<sub>2</sub>-M, όπου αρχίζει ο εκφυλισμός των νευρώνων (Swerdlow 2007). Αν και μοιάζουν αντιφατικές διαδικασίες εκλαμβάνεται ως πιθανό να υπάρχει μία σύνδεση μεταξύ της

απόπτωση και της επαν-εισόδου στον κυτταρικό κύκλο αλλά και μεταξύ του οξειδωτικού στρες και της δυσλειτουργίας των μιτοχονδρίων κατά το Alzheimer χωρίς όμως να υπάρχει διευκρίνιση της ξεκάθαρης φύσης της σχέσης τους (Moh et al. 2011). Είναι πιθανόν στην πρόκληση οξειδωτικού στρες να συμβάλει και η επαν-είσοδος στον κυτταρικό κύκλο, καθώς κατά τη φάση S του κυτταρικού κύκλου αυξάνεται ο αριθμός των μιτοχόνδριων σε ένα κύτταρο (Moh C. et al. 2011) και κάποιες εξαρτώμενες από κυκλίνες κινάσες όπως η Cdk5 προάγουν το οξειδωτικό στρες στα αρχικά στάδια της νόσου και τον κυτταρικό θάνατο στα τελικά στάδια διαταράζοντας αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς του κυττάρου. Ωστόσο οι μηχανισμοί με τους οποίους προκαλείται αυτή διαταραχή και το πόσο συμβάλει στην δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων απέχει από την πλήρη διευκρίνιση (Sun K.H. et al., 2007).

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MH, Coulson AR, Drouin, Eperon IC, Nierlich DP, Roe BA, Sanger F, Schreier PH, Smith AJ, Staden R, Young IG. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*. 1981 Apr 9;290(5806):457-65.
2. Blanchard BJ, Park T, Fripp WJ, Lerman LS, Ingram VM. A mitochondrial DNA deletion in normally aging and in Alzheimer brain tissue. *euroreport*. 1993 Jun;4(6):799-802.
3. Bonda D.J., Wang X., Perry G., Smith M.A., and Zhu X. Mitochondrial Dynamics in Alzheimer's Disease Opportunities for Future Treatment Strategies *Drugs Aging* 2010 Mar 1;27(3):181-92.
4. Brown MD, Shoffner JM, Kim YL, Jun AS, Graham BH, Cabell MF, Gurley DS, Wallace DC. Mitochondrial DNA sequence analysis of four Alzheimer's and Parkinson's disease patients. *Am J Med Genet*. 1996 Jan 22;61(3):283-9.
5. Castellani R., Hirai K., Aliev G., Drew K. L., Nunomura A., Takeda A., Cash A.D., Obrenovich M.E., Perry G., and Smith M.A. Role of Mitochondrial Dysfunction in Alzheimer's Disease. *J Neurosci Res* 2002 Nov 1;70(3):357-60.
6. Chagnon P, Gee M, Filion M, Robitaille Y, Belouchi M, Gauvreau D. Phylogenetic analysis of the mitochondrial genome indicates significant differences between patients with Alzheimer disease and controls in a French-Canadian founder population. *Am J Med Genet*. 1999 Jul 2;85(1):20-30.
7. Chan DC. Mitochondria: dynamic organelles in disease, aging, and development. *Cell*. 2006 Jun 30;125(7):1241-52.
8. Chang SW, Zhang D, Chung HD, Zassenhaus HP. The frequency of point mutations in mitochondrial DNA is elevated in the Alzheimer's brain. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000 Jun 24;273(1):203-8.
9. Christen Y. Oxidative stress and Alzheimer disease. *Am J Clin Nutr*. 2000 Feb;71(2):621S-629S.
10. Chujo T, Ohira T, Sakaguchi Y, Goshima N, Nomura N, Nagao A, Suzuki T. LRPPRC/SLIRP suppresses PNPase-mediated mRNA decay and promotes polyadenylation in human mitochondria. *Nucleic Acids Res*. 2012 May 31.
11. Corral-Debrinski M, Horton T, Lott MT, Shoffner JM, McKee AC, Beal MF, Graham BH, Wallace DC. Marked changes in mitochondrial DNA deletion levels in Alzheimer brains. *Genomics*. 1994 Sep 15;23(2):471-6.
12. Corral-Debrinski M., Horton T., Lott MT, Shoffner JM, McKee AC, Beal MF, Graham BH, Wallace DC, Marked changes in mitochondrial DNA deletion levels in Alzheimer brains. *Genomics*. 1994 Sep 15;23(2):471-6
13. Coskun PE, Beal MF, Wallace DC. Alzheimer's brains harbor somatic mtDNA control-region mutations that suppress mitochondrial transcription and replication. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Jul 20;101(29):10726-31.
14. Coskun PE, Beal MF, Wallace DC. Alzheimer's brains harbor somatic mtDNA control-region mutations that suppress mitochondrial transcription and replication. CA 92697-3940, USA.
15. Crouch PJ, Blake R, Duce JA, Ciccotosto GD, Li QX, Barnham KJ, Curtain CC, Cherny RA, Cappai R, Dyrks T, Masters CL, Trounce IA. Copper-dependent inhibition of human cytochrome c oxidase by a dimeric conformer of amyloid-beta 1-42. *J Neurosci*. 2005 Jan 19;25(3):672-9.
16. Dimauro S, Davidzon G. Mitochondrial DNA and disease. *Ann Med*. 2005;37(3):222-32.

17. Edland SD, Silverman JM, Peskind ER, Tsuang D, Wijsman E, Morris JC. Increased risk of dementia in mothers of Alzheimer's disease cases: evidence for maternal inheritance. *Neurology*. 1996 Jul;47(1):254-6.
18. Effects of ageing and Alzheimer's disease on mitochondrial function of human platelets
19. Elson JL, Andrews RM, Chinnery PF, Lightowlers RN, Turnbull DM, Howell N. Analysis of European mtDNAs for recombination. *Am J Hum Genet* 2001;68:145–153.
20. Elson JL, Herrnstadt C, Preston G, Thal L, Morris CM, Edwardson JA, Beal MF, Turnbull DM, Howell N., Does the mitochondrial genome play a role in the etiology of Alzheimer's disease?
21. Ernster L, Schatz G. Mitochondria: a historical review. *J Cell Biol*. 1981 Dec;91(3 Pt 2):227s-255s.
22. Fesahat F, Houshmand M, Panahi MS, Gharagozli K, Mirzajani F. Do haplogroups H and U act to increase the penetrance of Alzheimer's disease? *Cell Mol Neurobiol*. 2007 May;27(3):329-34.
23. Fukui H. and Moraes C.T., The mitochondrial impairment, oxidative stress and neurodegeneration connection: reality or just an attractive hypothesis? *Trends Neurosci*. 2008 May;31(5):251-6. Epub 2008 Apr 9
24. Gabuzda D, Busciglio J, Chen LB, Matsudaira P, Yankner BA. Inhibition of energy metabolism alters the processing of amyloid precursor protein and induces a potentially amyloidogenic derivative. *J Biol Chem*. 1994 May 6;269(18):13623-8
25. Gary E. Gibson, Saravanan S. Karuppagounder, and Qingli Shi, Mitochondria and Oxidative Stress in Neurodegenerative Disorders: *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1147: 221–232 (2008)
26. Ghosh SS, Swerdlow RH, Miller SW, Sheeman B, Parker WD Jr, Davis RE. Use of cytoplasmic hybrid cell lines for elucidating the role of mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Ann N Y Acad Sci*. 1999;893:176-91.
27. Grazina M, Silva F, Santana I, Pratas J, Santiago B, Oliveira M, Carreira I, Cunha L, Oliveira C. Mitochondrial DNA variants in a portuguese population of patients with Alzheimer's disease. *Eur Neurol*. 2005;53(3):121-4.
28. Hirai K., Aliev G., Nunomura A., Fujioka H., Russell R.L., Atwood C.S., Johnson A.B., Kress Y., Vinters H.V., Tabaton M., Shimohama S., Cash A.D., Siedlak S.L., R. Harris P.L., Jones P.K., Petersen R.B., Perry G., and Smith M.A., Mitochondrial Abnormalities in Alzheimer's Disease. *The Journal of Neuroscience*, May 1, 2001, 21(9):3017–3023
29. 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.
30. Hutchin T, Cortopassi G. A mitochondrial DNA clone is associated with increased risk for Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 Jul 18;92(15):6892-5.
31. Hutchin TP, Heath PR, Pearson RC, Sinclair AJ. Mitochondrial DNA mutations in Alzheimer's disease. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997 Dec 18;241(2):221-5.
32. Koffie R.M., Hyman B.T. and Spires-Jones T.L., Alzheimer's disease: synapses gone cold. *Molecular Neurodegeneration* 2011, 6:63
33. Lakatos A., Derbeneva O., Younes D., Keator D., Bakken T., Lvova M., Brandon M., Guffanti G., Reglodi D., Saykin A., Weiner M., Macciardi F., Schork N., Wallace D.C., Potkin S.G., . Association between mitochondrial DNA variations and Alzheimer's disease in the ADNI cohort. *Neurobiol Aging*. 2010 Aug;31(8):1355-63.
34. Lenaz G, Bovina C, Formiggini G, Parenti Castelli G. Mitochondria, oxidative stress, and antioxidant defences. *Acta Biochim Pol*. 1999;46(1):1-21.
35. Lovell MA, Markesbery WR. Oxidative DNA damage in mild cognitive impairment and late-stage Alzheimer's disease. *Nucleic Acids Res*. 2007;35(22):7497-504.



36. Lustbader JW, Cirilli M, Lin C, Xu HW, Takuma K, Wang N, Caspersen C, Chen X, Pollak S, Chaney M, Trinchese F, Liu S, Gunn-Moore F, Lue LF, Walker DG, Kuppusamy P, Zewier ZL, Arancio O, Stern D, Yan SS, Wu H. BAD directly links Abeta to mitochondrial toxicity in Alzheimer's disease. *Science*. 2004 Apr;304(5669):448-52.
37. Mancuso M, Orsucci D, Siciliano G, Murri L. Mitochondria, mitochondrial DNA and Alzheimer's disease. What comes first? *Curr Alzheimer Res*. 2008 Oct;5(5):457-68.
38. Maruszak A. and Żekanowski C. Mitochondrial dysfunction and Alzheimer's disease *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2011 Mar 30;35(2):320-30.
39. Maruszak A., Canter J.A., Styczyńska M., Żekanowski C., Barcikowska M., Mitochondrial haplogroup H and Alzheimer's disease—Is there a connection? *Neurobiol Aging* 2009 Nov;30(11):1749-55
40. Moh C, Kubiak JZ, Bajic VP, Zhu X, Smith MA, Lee HG. Cell cycle deregulation in the neurons of Alzheimer's disease. *Results Probl Cell Differ*. 2011;53:565-76. Review. PubMed PMID: 21630160.
41. Moreira P.I., Nunomura A., Nakamura M., Takeda A., Shenk J.C., Aliev f.g, Mark A. Smith G., Perry G., Nucleic acid oxidation in Alzheimer disease. *Free Radic Biol Med*. 2008 Apr 15;44(8):1493-505.
42. Mosconi L., Berti V., Swerdlow R.H., Pupi A., Duara R. and Leon M., Maternal transmission of Alzheimer's disease: Prodromal metabolic phenotype and the search for genes. *Hum Genomics*. 2010 February ; 4(3): 170–193.
43. Nakamura T, Watanabe A, Fujino T, Hosono T, Michikawa M. Apolipoprotein E4 (1-272) fragment is associated with mitochondrial proteins and affects mitochondrial function in neuronal cells. *Mol Neurodegener*. 2009 Aug 20;4:35.
44. Nunomura A., Hofer T., Moreira P.I., Castellani R.J., Smith M.A., Perry G., RNA oxidation in Alzheimer disease and related neurodegenerative disorders. Volume 118, Number 1 (2009), 151-166, DOI: 10.1007/s00401-009-0508-1
45. Pavlakis SG, Phillips PC, DiMauro S, De Vivo DC, Rowland LP. Mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes: a distinctive clinical syndrome. *Ann Neurol*. 1984 Oct;16(4):481-8.
46. Pérez-Gracia E, Torrejón-Escribano B, Ferrer I., Dystrophic neurites of senile plaques in Alzheimer's disease are deficient in cytochrome c oxidase. *Acta Neuropathol*. 2008 Sep;116(3):261-8
47. Pesole G., Gissi C., De Chirico A., Saccone C., Nucleotide substitution rate of mammalian mitochondrial genomes. *J Mol Evol* 1999 Apr;48(4) 427-34
48. Petrozzi L, Ricci G, Giglioli NJ, Siciliano G, Mancuso M. Mitochondria and neurodegeneration. *Biosci Rep*. 2007 Jun;27(1-3):87-104.
49. Petruzzella V, Chen X, Schon EA. Is a point mutation in the mitochondrial ND2 gene associated with Alzheimer's disease. *Biochem Biophys Res Commun*. 1992 Jul 15;186(1):491-7. PubMed PMID: 1352971.
50. Praticò D, Delanty N. Oxidative injury in diseases of the central nervous system: focus on Alzheimer's disease. *Am J Med*. 2000 Nov;109(7):577-85.
51. Pyle A, Foltynie T, Tiangyou W, Lambert C, Keers SM, Allcock LM, Davison J, Lewis SJ, Perry RH, Barker R, Burn DJ, Chinnery PF. Mitochondrial DNA haplogroup cluster UKJT reduces the risk of PD. *Ann Neurol*. 2005 Apr;57(4):5647.
52. Raina AK, Zhu X, Smith MA., Alzheimer's disease and the cell cycle. Institute of Pathology, Case Western Reserve University, 2085 Adelbert Road, Cleveland, Ohio 44106, USA.
53. Reddy PH, Beal MF. Amyloid beta, mitochondrial dysfunction and synaptic damage: implications for cognitive decline in aging and Alzheimer's disease. *Trends Mol Med*. 2008 Feb;14(2):45-53.
54. Rossignol R, Faustin B, Rocher C, Malgat M, Mazat JP, Letellier T. Mitochondrial threshold effects. *Biochem J*. 2003 Mar 15;370(Pt3):751-62.

55. Rukhsana Sultana and D. Allan Butterfield, Oxidatively modified, mitochondria-relevant brain proteins in subjects with Alzheimer disease and mild cognitive impairment. *JBioenergiomembr.* 2009 October ; 41(5): 441–446. doi:10.1007/s10863-009-9241-7.
56. Samuels DC, Carothers AD, Horton R, Chinnery PF. The power to detect disease associations with mitochondrial DNA haplogroups. *Am J Hum Genet* 2006;78:713–720
57. Santoro A, Balbi V, Balducci E, Pirazzini C, Rosini F, Tavano F, Achilli A, Siviero P, Minicuci N, Bellavista E, Mishto M, Salvioli S, Marchegiani F, Cardelli M, Olivieri F, Nacmias B, Chiamenti AM, Benussi L, Ghidoni R, Rose G, Gabelli C, Binetti G, Sorbi S, Crepaldi G, Passarino G, Torroni A, Franceschi C. Evidence for sub-haplogroup h5 of mitochondrial DNA as a risk factor for late onset Alzheimer's disease. *PLoS One.* 2010 Aug 6;5(8):e12037.
58. Sarsour EH, Goswami M, Kalen AL, Goswami PC. MnSOD activity protects mitochondrial morphology of quiescent fibroblasts from age associated abnormalities. *Mitochondrion.* 2010 Jun;10(4):342-9.
59. Schwartz M, Vissing J. Paternal inheritance of mitochondrial DNA. *N Engl J Med.* 2002 Aug 22;347(8):576-80.
60. Shao C, Xiong S, Li GM, Gu L, Mao G, Markesbery WR, Lovell MA. Altered 8-oxoguanine glycosylase in mild cognitive impairment and late-stage Alzheimer's disease brain. *Free Radic Biol Med.* 2008 Sep 15;45(6):813-9.
61. Shi C, Guo K, Yew DT, Yao Z, Forster EL, Wang H, Xu J. Effects of ageing and Alzheimer's disease on mitochondrial function of human platelets. *Exp Gerontol.* 2008 Jun;43(6):589-94.
62. Shoffner JM, Brown MD, Torroni A, Lott MT, Cabell MF, Mirra SS, Beal MF, Yang CC, Gearing M, Salvo R, et al. Mitochondrial DNA variants observed in Alzheimer disease and Parkinson disease patients. *Genomics.* 1993 Jul;17(1):171-84.
63. Sompol P, Ittarat W, Tangpong J, Chen Y, Doubinskaia I, Batinic-Haberle I, Abdul HM, Butterfield DA, St Clair DK. A neuronal model of Alzheimer's disease: an insight into the mechanisms of oxidative stress-mediated mitochondrial injury. *Neuroscience.* 2008 Apr 22;153(1):120-30.
64. Sun K.H., Pablo Y., Vincent F, Shah K. Deregulated Cdk5 promotes oxidative stress and mitochondrial dysfunction, *J. Neurochem.* (2008) 107, 265–278
65. Swerdlow R. H., Burns J.M., and Khan S.M., The Alzheimer's Disease Mitochondrial Cascade Hypothesis. *J Alzheimers Dis.* 2010 ; 20(Suppl 2): 265–279.
66. Swerdlow R.H. The Neurodegenerative Mitochondriopathies. *J Alzheimers Dis.* 2009 ; 17(4): 737–751. doi:10.3233/JAD-2009-1095
67. Swerdlow RH., Pathogenesis of Alzheimer's disease. *Clin Interv Aging.* 2007;2(3):347-59.
68. Tamagno E, Guglielmotto M, Aragno M, Borghi R, Autelli R, Giliberto L, Muraca G, Danni O, Zhu X, Smith MA, Perry G, Jo DG, Mattson MP, Tabaton M. Oxidative stress activates a positive feedback between the gamma- and beta-secretase cleavages of the beta-amyloid precursor protein. *J Neurochem.* 2008 Feb;104(3):683-95. Epub 2007 Nov 14.
69. Tanaka N, Goto Y, Akanuma J, Kato M, Kinoshita T, Yamashita F, Tanaka M, Asada T. Mitochondrial DNA variants in a Japanese population of patients with Alzheimer's disease. *Mitochondrion.* 2010 Jan;10(1):32-7.
70. Torroni A, Achilli A, Macaulay V, Richards M, Bandelt HJ. Harvesting the fruit of the human mtDNA tree. *Trends Genet* 2006;22:339–345.
71. Tuppo EE, Forman LJ. Free radical oxidative damage and Alzheimer's disease. *J Am Osteopath Assoc.* 2001 Dec;101(12 Suppl Pt 1):S11-5.
72. 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, Allen F.H., Goetz C.G., Small G.W.,

- Mastaglia F., Stajich F.M., McLaurin A.C., Middleton L.T. , Scott B.L., Schmechel D.E, Pericak-Vance M.A. and Vance J. M., Mitochondrial Polymorphisms Significantly reduce the Risk of Parkinson Disease. *Am J Hum Genet.* 2003 April; 72(4): 804–811.
73. Wallace DC, Lott MT, Shoffner JM, Brown MD. Diseases resulting from mitochondrial DNA point mutations. *J Inherit Metab Dis.* 1992;15(4):472-9.
74. Zsurka G, Kálmán J, Császár A, Raskó I, Janka Z, Venetianer P. No mitochondrial haplotype was found to increase risk for Alzheimer's disease. *Biol Psychiatry.* 1998 Sep 1;44(5):371-3.
75. Ruiz-Pesini E, Mishmar D, Brandon M, Procaccio V, Wallace DC. Effects of purifying and adaptive selection on regional variation in human mtDNA. *Science* 2004;303: 223–226.