



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

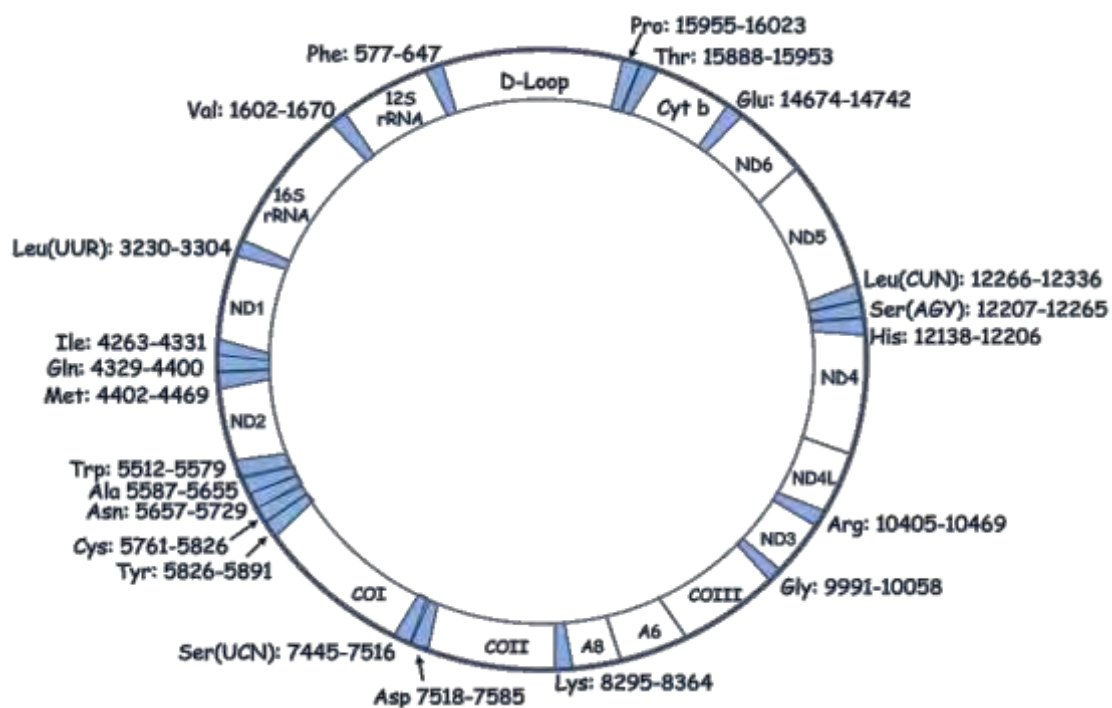
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ ΣΤΑ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΑ ΓΟΝΙΔΙΑ tRNA της Asn,
Cys, Tyr, Ser(UCN) και Asp ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ALZHEIMER**



ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ: ΑΙΜΙΛΙΑ ΖΙΦΑ

ΓΡΑΜΜΑΤΙΚΟΠΟΥΛΟΣ ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ

ΛΑΡΙΣΑ 2013

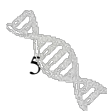
Η ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΑΙΜΙΛΙΑ ΖΙΦΑ, ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΡΙΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ
ΝΕΥΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΖΗΣΗΣ ΜΑΜΟΥΡΗΣ, ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΖΩΙΚΩΝ ΠΛΗΘΥΣΜΩΝ ΤΟΥ
ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

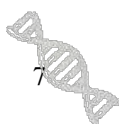
ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΧΑΤΖΗΓΕΩΡΓΙΟΥ, ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΝΕΥΡΟΛΟΓΙΑΣ
ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΤΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Στην οικογένεια μου



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

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τα μέλη της τριμελούς επιτροπής και ιδιαίτερα την κ. Ζίφα για την καθοδήγηση που μου παρείχε κατά την διάρκεια της διπλωματικής μου εργασίας, τον Κώστα Σταμάτη και τους υποψήφιους διδάκτορες Ντίνα Σαρρή και Θέμη Γιαννούλη για την βοήθεια που μου παρείχαν κατά το πειραματικό μέρος της.



ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη	11
Abstract.....	13
Εισαγωγή	15
1.1 Η νόσος του Alzheimer.....	15
1.2 Παρατήρηση των νευρώνων στον εγκέφαλο ασθενών με Alzheimer	15
1.3 Η Γενετική Βάση της νόσου του Alzheimer	17
1.4 Η συσχέτιση των μιτοχονδρίων με την νόσο του Alzheimer	18
1.5 Μεταλλάξεις στο μιτοχονδριακό DNA σε AD ασθενείς	20
2.1 Τα μιτοχόνδρια.....	23
2.2 Η δομή των μιτοχονδρίων.....	24
2.3 Οι λειτουργίες του μιτοχονδρίου.....	26
2.3.1 Η Παραγωγή ενέργειας στο κύτταρο	26
2.3.2 Η Παραγωγή ενεργών ριζών οξυγόνου (ROS).....	32
2.3.3 Ο Κυτταρικός θάνατος.....	34
2.3.3.1 Η Bax και η κασπάση 3	34
2.3.4 Η ρύθμιση της ομοιόστασης του ενδοκυτταρικού ασβεστίου (Ca^{2+})	36
2.4 Το μιτοχονδριακό DNA (mtDNA)	36
2.4.1 Το ανθρώπινο μιτοχονδριακό DNA.....	37
2.4.2 Μεταλλάξεις στα μιτοχονδριακά γονίδια tRNA.....	39
2.5 Ο σκοπός της εργασίας	41
3. Υλικά και μέθοδοι	43
3.1 Βιολογικό υλικό	43
3.2 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR).....	43
3.2.1 Η αρχή της μεθόδου της PCR	43
3.2.2 Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων PCR σε πήκτωμα (gel) αγαρόζης.....	46
3.3 Single Strand Conformation Polymorphism, SSCP	48
3.3.1 Η αρχή της μεθόδου SSCP.....	48
3.3.2 Η παρασκευή του πηκτώματος (gel) της SSCP.....	49
3.3.3 Η χρώση του πηκτώματος του πολυακρυλαμιδίου	50
3.4 Η μέθοδος της αλληλούχισης.....	51
4. Αποτελέσματα.....	53
5. Συζήτηση	56

Βιβλιογραφία 59

Περίληψη

Τα μιτοχόνδρια είναι υπεύθυνα για την παραγωγή ενέργειας στο κύτταρο. Λόγω μειωμένης επιδιορθωτικής ικανότητας και αυξημένης παραγωγής ελευθέρων ριζών συσσωρεύουν στο DNA τους πληθώρα μεταλλάξεων, πολλές από τις οποίες οδηγούν σε μειωμένη παραγωγή ενέργειας. Εξαιτίας των αυξημένων απαιτήσεών τους σε ενέργεια, τα νευρικά κύτταρα, πλήττονται περισσότερο. Τελευταία, παρατηρείται μια τάση συσχέτισης των μιτοχονδριακών μεταλλάξεων με διάφορες νευροεκφυλιστικές ασθένειες, όπως είναι το Parkinson και το Alzheimer. Συγκεκριμένα, στους ασθενείς με Alzheimer έχουν παρατηρηθεί τόσο λειτουργικές όσο και δομικές διαφορές στα μιτοχόνδριά τους. Στην παρούσα εργασία αναλύθηκαν 5 γονίδια tRNAs, αυτό του tRNA^{Asn}, tRNA^{Cys}, tRNA^{Tyr}, tRNA^{Ser(UCN)} και tRNA^{Asp}, σε 50 ασθενείς Alzheimer. Ταυτοποιήθηκαν 5 μεταλλάξεις σε 4 από τους 50 ασθενείς. Αναλυτικότερα, στο tRNA^{Asp} ταυτοποιήθηκε η μετάλλαξη T7547C στο 2% των ασθενών. Στο tRNA^{Tyr}, ταυτοποιήθηκαν οι μεταλλάξεις C5839T και ins5827C σε ποσοστό 2% στους ασθενείς. Στο tRNA^{Cys} ταυτοποιήθηκε η μετάλλαξη A5823G, στο ίδιο άτομο που έφερε την μετάλλαξη T7547C (2% των ασθενών) ενώ, στο tRNA^{Asn} ταυτοποιήθηκε η del5674A σε ποσοστό επίσης 2% των ασθενών. Κάποιες από αυτές τις μεταλλάξεις έχουν εντοπιστεί σε ασθενείς που πάσχουν από τη νόσο του Alzheimer, αλλά καμία δεν έχει συσχετισθεί ακόμη με αυτήν ή με άλλες ασθένειες. Η ολοκλήρωση της μελέτης και στα υπόλοιπα tRNA γονίδια, η οποία θα απευθύνεται σε μεγαλύτερο δείγμα ασθενών με Alzheimer, θα δώσει μια πιο ολοκληρωμένη εικόνα του ρόλου του mtDNA στην κληρονομικότητα της νόσου.

Abstract

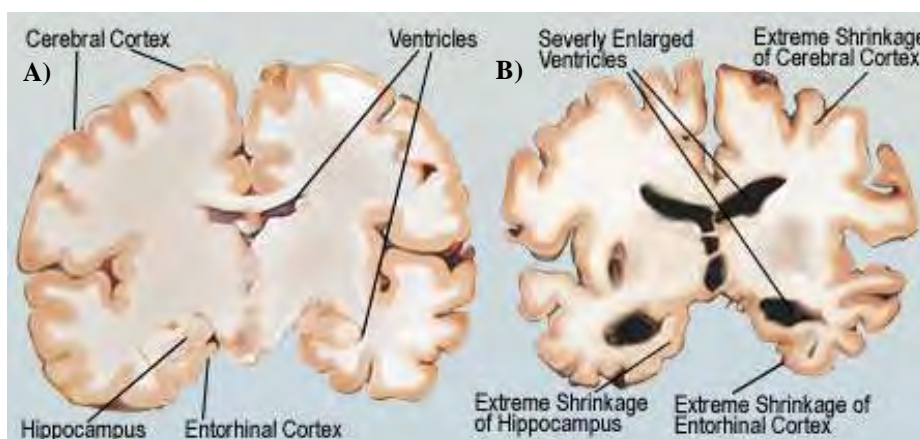
Mitochondria are responsible for energy production in cells. Because of their reduced DNA repair capacity and increased production of free radicals, they accumulate many mutations, some of which lead to reduced energy production. The neural cells are the first to be affected due to their increased needs in energy. Association between mitochondrial mutations and neurodegenerative diseases (Parkinson's, Alzheimer) has been observed. In Alzheimer patients have been noticed both functional and structural differences in their mitochondria. In this study, 5 tRNA genes were screened in 50 Alzheimer patients. Five mutations were identified in 5 of the patients. Specifically, the mutation T7547C in tRNA^{Asp} was identified in 2% of patients. Mutations C5839T and ins5827C were identified in tRNA^{Tyr} in 2% of patients. At last, A5823G (tRNA^{Cys}) was identified in the person that had also the T7547C mutation (2% of patients), while in tRNA^{Asn}, del5674A mutation was identified in 2% of patients as well. While none of these mutations have been associated with Alzheimer, or other diseases so far, some of them, have been found also in another group of Alzheimer patients. The completion of the study in the rest of tRNA genes and also in a bigger group of patients will provide more information for mtDNA's role in Alzheimer's inheritance.

Εισαγωγή

1.1 Η νόσος του Alzheimer

Η νόσος του *Alzheimer* (*Alzheimer Disease, AD*) αποτελεί μια προοδευτική, μη αναστρέψιμη νευροεκφυλιστική και πολυπαραγοντική ασθένεια του εγκεφάλου, η οποία περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1907 από τον ψυχίατρο και νευροπαθολόγο τον *Lois Alzheimer*. Πλήττει κυρίως τους **χολινεργικούς νευρώνες** σε διάφορες περιοχές του εγκεφάλου όπως είναι ο φλοιός, η αμυγδαλή, ο ιππόκαμπος, τα κέντρα ομιλίας, κίνησης, προσανατολισμού και μνήμης. Συγκεκριμένα, παρατηρείται αύξηση του μεγέθους των αυλάκων του εγκεφάλου, ατροφία του φλοιού, του ιππόκαμπου και μεγέθυνση της αμυγδαλής (**Εικόνα 1**). Η νόσος εμφανίζει μια πληθώρα συμπτωμάτων τα οποία χωρίζονται σε δύο κατηγορίες

- 1) **Τις γνωσιακές ή αλλιώς νοητικές διαταραχές**, στις οποίες περιλαμβάνονται η σταδιακή απώλεια μνήμης και συγκεκριμένα της πρόσφατης μνήμης, που αποτελεί και το χαρακτηριστικότερο σύμπτωμα της νόσου αυτής, τη δυσκολία στη σκέψη και στο λόγο, την απραξία, και την δυσκολία προσανατολισμού στον χώρο και
- 2) **Τις διαταραχές στην συμπεριφορά** στις οποίες περιλαμβάνονται η κατάθλιψη, η επιθετικότητα, ο κοινωνικός αποκλεισμός, η εμφάνιση αδιαφορίας και απάθειας για το περιβάλλον του ασθενούς και η σεξουαλική ανικανότητα.



Εικόνα 1. A) Απεικόνιση του εγκεφάλου ενός φυσιολογικού ατόμου και B) απεικόνιση του εγκεφάλου ενός ασθενούς με Alzheimer (<http://memory.ucsf.edu/education/diseases/alzheimer>).

Το Alzheimer εμφανίζεται κυρίως στα άτομα τρίτης ηλικίας και αποτελεί την πιο συχνή αιτία άνοιας των ατόμων αυτών. Διακρίνεται σε δύο τύπους **1) την οικογενή**, κατά την οποία κληρονομείται με αυτοσωμικό υπολειπόμενο τρόπο και **2) την σποραδική ή τυχαία** στην οποία δεν υπεισέρχεται ο παράγοντας της κληρονομικότητας.

Αν και στις δύο αυτές κατηγορίες δεν παρατηρούνται σημαντικές διαφορές ως προς τα συμπτώματα τους, η πρώτη εμφανίζεται πριν την ηλικία των 60 ετών και σε ποσοστό μικρότερο του 10% του συνολικού αριθμού των ασθενών, ενώ η δεύτερη σε ποσοστό 90% και ηλικία άνω των 60. Η μόνη δηλαδή διαφορά τους εντοπίζεται στην ηλικία εμφάνισης των συμπτωμάτων της νόσου (*Grazina et al., 2006*).

1.2 Παρατήρηση των νευρώνων στον εγκέφαλο ασθενών με Alzheimer

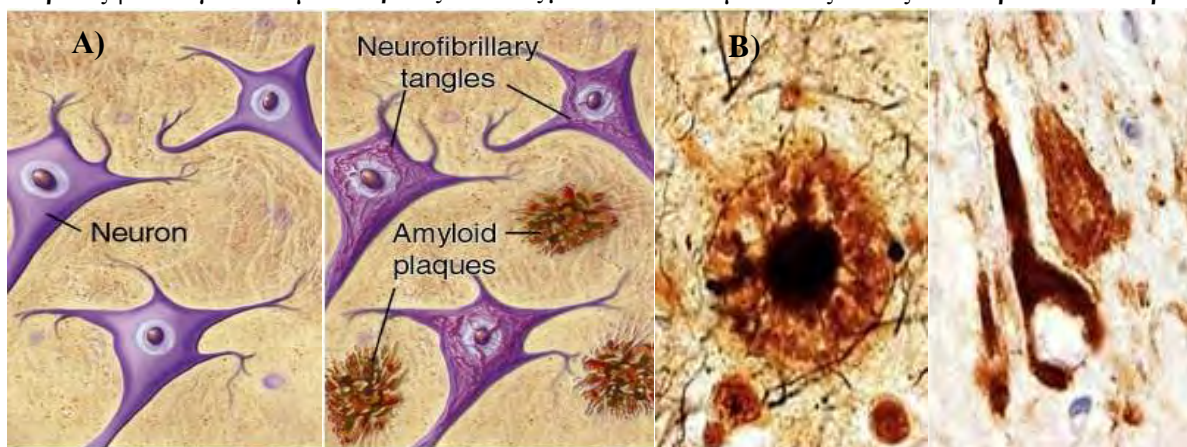
Σε μικροσκοπικό επίπεδο, στους νευρώνες των ασθενών που πάσχουν από την νόσο του Alzheimer και οι οποίοι, συγκεκριμένα, εντοπίζονται στον εγκέφαλο, εμφανίζονται

συγκεκριμένες διαμορφώσεις, συμβάλλοντας στην εκδήλωση των παθοφυσιολογικών συμπτωμάτων της νόσου. Πρόκειται για τις **αμυλοειδείς πλάκες** και τους **νευροϊνδιακούς σωρούς**.

Οι **αμυλοειδείς πλάκες** είναι πυκνές και αδιάλυτες εναποθέσεις πρωτεϊνών και κυτταρικών συστατικών που εντοπίζονται εξωτερικά και περιφερικά των νευρικών κυττάρων του εγκεφάλου, οι οποίες περιέχουν μεγάλα ποσά του πεπτιδίου Αμυλοειδούς β, τμήματα νευρικών και μη νευρικών κυττάρων (αστροκύτταρα, μικρογλοιακά). Η ανάπτυξη τους είναι σταδιακή και διαρκεί από μερικούς μήνες έως και χρόνια. Οι νευρώνες στους οποίους αναπτύσσονται οι αμυλοειδείς πλάκες φέρουν έναν μεγαλύτερο αριθμό μιτοχονδρίων, διογκωμένων λυσοσωμάτων και ελικοειδών ινιδίων στο εσωτερικό τους, ενώ οι ίδιοι αναφέρονται ως ελικοειδείς και διεσταλμένοι.

Οι **νευροϊνδιακοί σωροί** είναι συγκεντρώσεις ανώμαλων ινιδίων τα οποία εντοπίζονται στο εσωτερικό των νευρικών κυττάρων έχοντας ως κύριο συστατικό τους την πρωτεΐνη Tau. Η πρωτεΐνη αυτή πιστεύεται πως κατέχει σημαντικό ρόλο στον πολυμερισμό και την σταθεροποίηση των μικροσωληνίσκων στα νευρικά κύτταρα, οι οποίοι με την σειρά τους δημιουργούν τα μονοπάτια, τις διαδρομές, για την ενδοκυτταρική μεταφορά. Η πρωτεΐνη Tau φαίνεται να είναι ένας από τους πιο πρώιμους δείκτες της νόσου του Alzheimer, η οποία σημειωτέον διαφέρει στους φυσιολογικούς, από ότι στους παθολογικούς εγκεφάλους, με αρκετούς τρόπους. Συγκεκριμένα, η πρωτεΐνη Tau συγκεντρώνεται σε ζεύγη ελικοειδών νημάτων (PHF) τα οποία συνενώνονται στους νευροϊνδιακούς σωρούς, οι οποίοι μπορούν να εντοπιστούν μετά θάνατον με τη χρήση ειδικών τεχνικών χρώσης. Επιπλέον, η πρωτεΐνη Tau στην νόσο του Alzheimer τροποποιείται με διάφορους τρόπους, παραδείγματος χάριν, με φωσφορυλίωση, με πρωτεόλυση και ουβικιτιλίωση. Η ανώμαλη φωσφορυλίωση είναι ίσως η πρώτη και η πιο κρίσιμη τροποποίηση, η οποία συγκεκριμένα, είναι υπεύθυνη για την δημιουργία των νευροϊνδιακών σωρών, με τις άλλες δύο να είναι πιθανώς δευτερεύουσες αντιδράσεις του ανοσοποιητικού συστήματος του ασθενούς. Η ανώμαλη Tau εκτίνεται σε μια ιδιαίτερα χαρακτηριστική χωρική και χρονική ακολουθία, ξεκινώντας σε επιλεγμένους νευρώνες της ενδορρινικής περιοχής του εγκεφάλου. Το γεγονός αυτό αποτελεί την βάση της υποδιαίρεσης της νόσου σε 6 στάδια, εκ των οποίων τα τελευταία στάδια, 5 και 6, αποτελούν τα στάδια της κλινικής διάγνωσης του Alzheimer (*Eva-Maria Mandelkow and Eckhard Mandelkow 1994, Grundke et al., 1986*).

Νευρώνες φυσιολογικού ατόμου Νευρώνες ασθενούς με Alzheimer Αμυλοειδείς πλάκες Νευροϊνδιακοί σωροί



Εικόνα 2. Α) Απεικόνιση και κυτταρικός εντοπισμός των αμυλοειδών πλακών και των νευροϊνδιακών σωρών σε νευρικά κύτταρα φυσιολογικών ατόμων και ασθενών με Alzheimer. Β) Απεικόνιση αμυλοειδών πλακών και Νευροϊνδιακών σωρών σε νευρώνες φυσιολογικών και AD ασθενών.

1.3 Η Γενετική Βάση της νόσου του Alzheimer

Στην νόσο του Alzheimer, συνολικά, φαίνεται πως εμπλέκονται 660 γονίδια, τα περισσότερα από τα οποία κωδικοποιούν για μεμβρανικούς υποδοχείς, αυξητικούς παράγοντες, πρωτεολυτικά ένζυμα και πρωτεΐνες του πλάσματος. Πιο συγκεκριμένα, έχουν βρεθεί μεταλλάξεις σε γονίδια τα οποία σχετίζονται με τη σύνθεση, την πρωτεόλυση και την ενδοκύττωση της πρωτεΐνης APP, το οξειδωτικό stress εξαιτίας του Αβ πεπτιδίου, το μεταβολισμό της χοληστερόλης στον εγκέφαλο και τη δυσλειτουργία που εντοπίζεται στις συνάψεις των νευρώνων.

Όσον αφορά τις δύο μορφές της νόσου, την οικογενή και την σποραδική, έχει γίνει ένας πρώτος διαχωρισμός μεταξύ ορισμένων γονιδίων που έχουν εντοπιστεί σε ασθενείς που υπόκεινται στον παραπάνω διαχωρισμό, και αφορούν στο σύνολό τους τρία γονίδια.

Πιο συγκεκριμένα, στις περιπτώσεις της **οικογενούς μορφής** της νόσου αναφέρθηκαν δύο γονίδια, αυτό της *presenilin 1 (PS1)* και της *presenilin 2 (PS2)*, τα οποία και ευθύνονται για το 50% περίπου των περιπτώσεων πρώιμης έναρξης της νόσου, και σε οποιοδήποτε από τα οποία σημειωθούν μεταλλάξεις έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της συσσώρευσης του πεπτιδίου Αβ, το οποίο ευθύνεται για τον σχηματισμό των αμυλοειδών πλακών. Τα γονίδια αυτά κωδικοποιούν συστατικά ενός ενζύμου το οποίο κόβει την **πρόδρομη πρωτεΐνη του αμυλοειδούς β (APP)¹** σε συγκεκριμένη θέση. Μεταλλάξεις που εντοπίστηκαν σε αυτά τα γονίδια είχαν ως αποτέλεσμα το κόψιμο της APP με ανώμαλο τρόπο, γεγονός που αύξανε την συγκέντρωση του πεπτιδίου Αβ (Αμυλοειδούς β) στα άτομα που ανιχνεύθηκαν οι μεταλλάξεις αυτές. Επίσης, έχουν εντοπιστεί μεταλλάξεις και στο γονίδιο που κωδικοποιεί την πρόδρομη πρωτεΐνη του αμυλοειδούς β (APP), οι οποίες οδηγούν και πάλι στην αύξηση της συγκέντρωσης του πεπτιδίου Αβ (*St George Hyslop et al., 1987*).

Στις περιπτώσεις της **σποραδικής μορφής** της νόσου δεν εντοπίστηκαν μεταλλάξεις ούτε στα γονίδια που κωδικοποιούν την APP ούτε σε αυτά που κωδικοποιούν την *presenilin*. Προκειμένου λοιπόν να εντοπίσουν τα γονίδια εκείνα τα οποία εμπλέκονται στην εμφάνιση της συνηθέστερη μορφή της νόσου, την σποραδική, οι επιστήμονες, εξέτασαν τα γονίδια εκείνα τα οποία κωδικοποιούν πρωτεΐνες οι οποίες αλληλεπιδρούν με την APP και προκαλούν την αύξηση της συγκέντρωσης του πεπτιδίου Αβ. Εντόπισαν λοιπόν ένα γονίδιο που βρίσκεται στο μεγάλο βραχίονα του 19^{ου} χρωμοσώματος, το οποίο κωδικοποιεί την απολιποπρωτεΐνη Ε (APOE)² (*Pericak-Vance et al., 1991*). Συνολικά, υπάρχουν τρία κύρια αλληλόμορφα του γονιδίου APOE, το ε3, το ε3 και το ε4. Σύμφωνα με ένα άρθρο που

¹Η πρόδρομη πρωτεΐνη του αμυλοειδούς β (APP, *Amyloid β Precursor Protein*) αποτελεί το υπόστρωμα για κάποιες πρωτεάσες (α-, β-, γ-) οι οποίες εκκρίνονται μέσα στο κύτταρο και κόβουν η καθεμιά την APP σε συγκεκριμένες και διαφορετικές θέσεις. Για την αποτελεσματική δράση της γ-πρωτεάσης-σεκρετάσης απαιτείται η πρεσενιλίνη (*presenilin*). Το προϊόν της πρωτεόλυσης της APP είναι ένα πεπτίδιο μεγέθους 42 αμινοξέων, το πεπτίδιο Αβ, και το οποίο αποτελεί το κύριο συστατικό των αμυλοειδών πλακών.

²Η APOE προσδένεται με λιπίδια και σχηματίζει μόρια που ονομάζονται λιποπρωτεΐνες. Οι λιποπρωτεΐνες είναι υπεύθυνες για το «πακετάρισμα» της χοληστερόλης και άλλων λιπών και τα μεταφέρουν μέσω της κυκλοφορίας του αίματος. Η απολιποπρωτεΐνη Ε αποτελεί ένα σημαντικό συστατικό ενός συγκεκριμένου τύπου λιποπρωτεΐνης που ονομάζεται λιποπρωτεΐνη πολύ χαμηλής συγκέντρωσης (VLDLs). Οι VLDLs απομακρύνουν την περίσσεια χοληστερόλης από το αίμα και την μεταφέρουν στο ήπαρ προκειμένου να επεξεργαστεί. Η διατήρηση των φυσιολογικών επιπέδων χοληστερόλης είναι απαραίτητη για την πρόληψη διαταραχών που επηρεάζουν την καρδιά και τα αιμοφόρα αγγεία (καρδιοαγγειακές παθήσεις), συμπεριλαμβανομένου και του εμφράγματος (<http://ghr.nlm.nih.gov/gene/APOE>).

δημοσιεύτηκε το 1993 από τους *Corder et al.*, παρατηρήθηκε πως οι ασθενείς με την νόσο του Alzheimer έφεραν ένα τουλάχιστον αλληλόμορφο ε4 σε τριπλάσια συχνότητα από τα άτομα ελέγχου και πως οι διαφορετικοί γονότυποι του γονιδίου APOE επηρεάζουν την ηλικία εμφάνισης της νόσου.

Πιο συγκεκριμένα, τα άτομα τα οποία εκδηλώνουν την νόσο και φέρουν το αλληλόμορφο ε4 σε ετερόζυγη κατάσταση, εμφανίζουν τα πρώτα της συμπτώματα στην ηλικία των 75 χρόνων. Από την άλλη μεριά, τα άτομα τα οποία εκδηλώνουν την νόσο και φέρουν το αλληλόμορφο ε4 της APOE σε ομοζυγωτία, εμφανίζουν τα πρώτα συμπτώματα της νόσου σε ηλικία μεταξύ των 65 και 70 ετών, σύμφωνα με ένα άρθρο το οποίο δημοσιεύτηκε το 1997 από τους *Farrer et al.*. Ακόμη, στο ίδιο άρθρο δόθηκε πως η σύνδεση του αλληλομόρφου ε4 της APOE με την AD ήταν ισχυρότερη στους Ιάπωνες από ότι στους Καυκάσιους πληθυσμούς είτε αυτό βρισκόταν σε ομοζυγωτία είτε σε ετεροζυγωτία στα άτομα που μελετήθηκαν. Επίσης, υποστηρίζουν πως η επίδραση του ε4 της APOE είναι εμφανής σε όλες τις ηλικίες μεταξύ των 40 και των 90 χρόνων, αλλά μειώνεται μετά την ηλικία των 70 ετών και ότι ο κίνδυνος της AD που σχετίζεται με έναν συγκεκριμένο γονότυπο ποικίλει ανάλογα με το φύλο. Συμπερασματικά, το αλληλόμορφο ε4 αποτελεί ένα σημαντικό παράγοντα κινδύνου εμφάνισης της νόσου, ανάμεσα στις ομάδες ατόμων, που μελετήθηκαν τουλάχιστον από το παρόν άρθρο, που ανήκουν σε όλα τα έθνη, σε όλες τις ηλικίες μεταξύ των 40 και 90 χρόνων, ανεξάρτητα του φύλου. Αν και η APOE έχει συσχετιστεί βάσει πολυάριθμων μελετών με την AD, ο τρόπος που εμπλέκεται το μόριο αυτό με την νόσο δεν έχει διευκρινιστεί ακόμη. Όμως σε γενικές γραμμές, ο γονότυπος της APOE έχει δείχθει ότι ευθύνεται για το ήμισυ περίπου της προδιάθεσης της όψιμης έναρξης της νόσου, γεγονός όμως που δεν αποτελεί δέσμευση για την εκδήλωσή της.

Η νόσος του Alzheimer είναι αναμφισβήτητα μια πολυπαραγοντική νόσος, γεγονός που εμπλέκει στην εμφάνισή της τόσο γενετικούς όσο και περιβαλλοντικούς παράγοντες. Διάφορα και πολυάριθμα γονίδια είναι ικανά να αλληλεπιδράσουν μεταξύ τους ως προς την εμφάνιση της νόσου, αλλά δεν μπορούν σε καμία περίπτωση από μόνα τους να την προκαλέσουν, αντιθέτως συμβάλλουν αποτελεσματικά στην αύξηση της προδιάθεσης εμφάνισης της νόσου. Μια αλληλεπίδραση μεταξύ γενετικών παραγόντων, όπως περιγράφηκε προηγουμένως, σε συνδυασμό με κάποιους περιβαλλοντικούς παράγοντες είναι ικανά ώστε να προκαλέσουν και να εγκαθιδρύσουν την νόσο.

Τα τελευταία χρόνια έχει πραγματοποιηθεί μια εκτεταμένη και λεπτομερής μελέτη των μιτοχονδρίων των ασθενών με Alzheimer και σύγκρισή τους με αυτά των φυσιολογικών ατόμων, σε μια προσπάθεια συσχέτισής τους με την εμφάνιση της νόσου. Από την πρώτη στιγμή κιόλας παρατηρήθηκε μια πληθώρα, τόσο μορφολογικών όσο και λειτουργικών διαφορών, στα μιτοχόνδρια των ατόμων που έπασχαν από την νόσο του Alzheimer, γεγονός που τροφοδοτούσε όλο και περισσότερο τη θεωρία για συσχέτιση των μιτοχονδρίων με το Alzheimer.

1.4 Η συσχέτιση των μιτοχονδρίων με την νόσο του Alzheimer

Πριν από 26 χρόνια ήταν η πρώτη φορά που τέθηκαν τα θεμέλια της θεωρίας αυτής, βασισμένοι σε μια παρατήρηση που καθιστούσε τον μεταβολισμό της γλυκόζης μειωμένο στους AD ασθενείς και καταδείκνυε συνεχώς την μη φυσιολογική λειτουργία τους (*Horwitz et al., 1987, Hoyer et al., 1988*). Από εκεί και έπειτα μια ακόμη σειρά παρατηρήσεων, όπως ήταν η μειωμένη ενεργότητα κυτοχρωμικής οξειδάσης (COX), που εντοπίστηκε για πρώτη

φορά στα αιμοπετάλια AD ασθενών (Parker et al., 1989) και στη συνέχεια, στους νευρώνες του εγκεφάλου τους (Kish et al., 1992, Mutisya et al., 1994), η αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών (ROS)³, που υποδείχθηκε μέσω της αυξημένης συγκέντρωσης δεικτών⁴ που χρησιμοποιούνται για την ποσοτικοποίηση του οξειδωτικού stress σε ούρα, πλάσμα, ορό, εγκεφαλονωτιαίο υγρό, και στους νευρώνες των προσβεβλημένων περιοχών του εγκεφάλου ασθενών (Moreira et al., 2008), η αυξημένη ενεργοποίηση αποπτωτικών πρωτεϊνών, όπως είναι η **Bax** και η **κασπάση 3** (Su et al., 1997, Su et al., 2002), η μειωμένη ενεργότητα ενζύμων του κύκλου του Krebs, όπως είναι η πυροσταφυλική δεϋδρογονάση και η ακετογλουταρική δεϋδρογονάση (Blass και Brown, 2000, Gibson et al., 2008), αλλά και μορφολογικών αλλαγών, πέραν των λειτουργικών που αναφέρθηκαν προηγουμένως, όπως είναι η αλλαγή του σχήματος των μιτοχονδρίων, καθιστώντας τα διογκωμένα, επιμηκυσμένα και με κατεστραμμένες ακρολοφίες, ο μειωμένος αριθμός τους (Εικόνα 3.) (Hirai et al., 2001, Castellani et al., 2002) και η τάση που παρουσιάζουν να συγκεντρώνονται γύρω από τον πυρήνα του νευρικού κυττάρου των AD ασθενών (Wang et al., 2008), άρχισε να εδραϊώνει

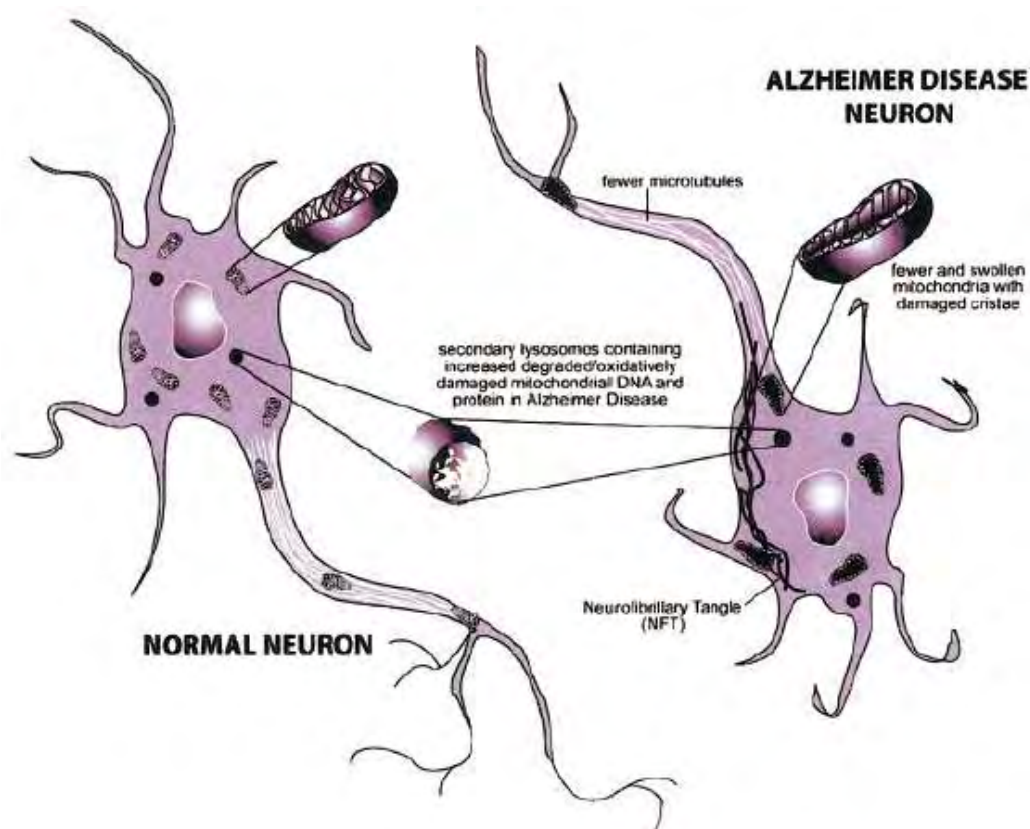
³Ο οργανισμός μας φυσιολογικά παράγει ενεργές ρίζες οξυγόνου και αζώτου, οι οποίες έχουν οξειδωτική δράση, αλλά και τους μηχανισμούς εκείνους που συμβάλουν στην αντιμετώπισή και καταστολή τους και συνεπώς έχουν αντιοξειδωτική δράση. Οι ελεύθερες ρίζες βρίσκονται στον οργανισμό μας είτε επειδή τις παράγει ενδογενώς κατά την διαδικασία της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης και του κύκλου του Krebs για την παραγωγή ενέργειας στο κύτταρο, είτε επειδή τις προσλαμβάνει από την τροφή του. Φυσιολογικά υπάρχει μια ισορροπία μεταξύ των ελευθέρων ριζών και των αντιοξειδωτικών μηχανισμών που χρησιμοποιεί ο οργανισμός μας προκειμένου να τις διαχειριστεί. Υπάρχουν ωστόσο περιπτώσεις που παρατηρείται διαταραχή στην ισορροπία αυτή και αύξηση των ελευθέρων ριζών όπου ο οργανισμός μας πλέον αδυνατεί να τις διαχειριστεί επαρκώς με την ποσότητα των αντιοξειδωτικών του, γεγονός το οποίο αναφέρεται και ως οξειδωτικό στρες.

Η παραπάνω ποσότητα των ελευθέρων ριζών μπορεί να ευθύνεται για τη μείωση των αμυντικών συστημάτων του οργανισμού και ακόμη μπορεί να προκαλέσει οξείδωση βιολογικών μορίων όπως είναι το DNA, τα λιπίδια της μεμβράνης των κυττάρων, οι πρωτεΐνες και οι υδατάνθρακες. Παρόλα αυτά όμως η διαταραχή της παραπάνω ισορροπίας προς την αντίθετη πλευρά, με την αύξηση δηλαδή των αντιοξειδωτικών και την μείωση των ελευθέρων ριζών, δεν είναι ούτε πάλι επιθυμητή, καθώς οι ενεργές ρίζες οξυγόνου (ROS) κατέχουν σημαντικό ρόλο στη φυσιολογική λειτουργία του οργανισμού μας, εφόσον εκκρίνονται από τα φαγοκύτταρα για την καταστροφή αντιγόνων και με αυτό τον τρόπο έχουν αμυντικό ρόλο, αλλά και στην διακυτταρική επικοινωνία και στη συστολή των μυών. Είναι συνεπώς σημαντικό να σημειωθεί πως οι δραστικές ρίζες οξυγόνου και αζώτου δεν αποτελούν μόνο απειλή για έναν οργανισμό αλλά συμβάλλουν και στην σωστή λειτουργία του. Ωστόσο, ο εγκέφαλος εξαιτίας των αυξημένων απαιτήσεών του σε ενέργεια, της αυξημένης συγκέντρωσης σε λιπίδια και των μειωμένων αντιοξειδωτικών μηχανισμών που διαθέτει, καθίσταται ιδιαίτερα ευαίσθητος στην μιτοχονδριακή δυσλειτουργία που εμφανίζουν οι AD ασθενείς.

Προκειμένου να αξιολογήσουμε το οξειδωτικό στρες σε έναν οργανισμό μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε μια πληθώρα από βιοχημικούς δείκτες. Στην παρούσα εργαστηριακή άσκηση θα χρησιμοποιήσουμε μεθόδους προκειμένου να προσδιορίσουμε **1)** την ανηγμένη γλουταθειόνη σε ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα, **2)** την δράση της καταλάσης σε ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα και **3)** την ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας ενός οργανισμού σε πλάσμα αίματος.

⁴όπως είναι η 8-υδροξυ-2'-δεοξυγουανωσίνη(8-OHdG), τα προϊόντα της λιπιδιακής υπεροξειδωσης και ο χαλκός (Cu), ο σίδηρος (Fe) οι οποίοι συμμετέχουν στην δημιουργία ελευθέρων ριζών. Έτσι, εξαιτίας της αυξημένης παραγωγής των ROS από τα δυσλειτουργικά μιτοχόνδρια του κυττάρου, προκαλείται βλάβη στα νουκλεϊκά οξέα, τις πρωτεΐνες και τα λιπίδια του τελευταίου που οδηγούν σε μεταλλάξεις στο DNA, στην παραγωγή λανθασμένα αναδιπλωμένων πρωτεϊνών προκαλώντας αλλαγή στη διαπερατότητας της μιτοχονδριακής μεμβράνης και αποσταθεροποίηση της κυτταρικής μεμβράνης.

ολοένα και περισσότερο την άποψη περί συμμετοχής των μιτοχονδρίων στην εμφάνιση της νόσου και τελικώς, να εγκαθιδρύει στην συσχέτισή τους με αυτή.



Εικόνα 3. Οι Μιτοχονδριακές διαταραχές στην νόσο του Alzheimer φαίνεται ότι συμβάλλουν σε πολλά από τα κύρια χαρακτηριστικά της νόσου, όπως είναι τα λιγότερα και διογκωμένα, με κατεστραμμένες ακρολοφίες μιτοχόνδρια και η ανάπτυξη των νευροϊνιδιακών σωρών στο εσωτερικό των νευρικών κυττάρων, όπως και φαίνονται στην παραπάνω εικόνα(<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jnr.10389/pdf>).

1.5 Μεταλλάξεις στο μιτοχονδριακό DNA σε AD ασθενείς

Αφορμή για την μελέτη του συνόλου των γονιδίων που εντοπίζονται στο μιτοχονδριακό DNA(mtDNA) αποτέλεσαν τόσο οι μορφολογικές όσο και οι λειτουργικές διαφορές που παρατηρήθηκαν μεταξύ των μιτοχονδρίων των ατόμων, που έπασχαν από Alzheimer, και αυτών του γενικού πληθυσμού, προσπαθώντας να αποδειχθεί, εάν οι διαφορετικές μεταλλάξεις, με μια περισσότερη έμφαση στις σημειακές μεταλλάξεις (*παρερμηνεύσιμη, ανερμηνεύσιμη, πλαισιοτροπική*⁵), που εντοπίζονται σε αυτά τα γονίδια, ευθύνονται τελικώς ή όχι για την μιτοχονδριακή δυσλειτουργία.

⁵Ο συνηθέστερος τρόπος ταξινόμησης των σημειακών μεταλλάξεων πραγματοποιείται με βάση το αποτέλεσμα, στο οποίο οδηγεί η αλλαγή βάσεων του DNA στην αμινοξική αλληλουχία της πρωτεΐνης. Εάν η μετάλλαξη οδηγεί στην αντικατάσταση ενός αμινοξέος στη πρωτεΐνη, τότε λέμε πως έχουμε μία *παρερμηνεύσιμη* μετάλλαξη (*missense mutation*). Υπάρχουν βέβαια περιπτώσεις όπου η λειτουργικότητα αυτής της πρωτεΐνης δεν μεταβάλλεται καθώς το νέο αμινοξύ που αντικαθιστά το παλαιό, έχει τις ίδιες φυσικοχημικές ιδιότητες με το προηγούμενο (*σιωπηλή μετάλλαξη*). Αν τώρα η μετάλλαξη οδηγήσει στην εμφάνιση ενός κωδικονίου λήξης τότε έχουμε μία *ανερμηνεύσιμη* μετάλλαξη (*nonsense mutation*), και τέλος εάν έχουμε προσθήκες ή απώλεια ενός νουκλεοτιδίου στην περιοχή του DNA που κωδικοποιεί για κάποια πρωτεΐνη, τότε η μετάλλαξη ονομάζεται *πλαισιοτροπική* (*frameshift mutation*) καθώς έχουμε αλλαγή του πλαισίου ανάγνωσης της

Αν πραγματοποιήσουμε μια ιστορική αναδρομή και καταγράψουμε τις μεταλλάξεις που έχουν εντοπιστεί στα γονίδια του mtDNA, θα διαπιστώσουμε πως στο σύνολό τους, σε όλα τα γονίδια του mtDNA, έχουν αναφερθεί μεταλλάξεις. Αν συγκρίνουμε την συχνότητα αυτών των μεταλλάξεων μεταξύ των AD ασθενών και διάφορων ομάδων ελέγχου, θα διαπιστώσουμε σίγουρα μεγαλύτερη συχνότητα στους πρώτους από ότι στους δεύτερους, που κάποιες φορές μπορεί να φτάσει και πενταπλάσια ποσοστά. Κάποιες ερευνητικές ομάδες, *Shoffner et al., 1993, Hutchin & Cortopassi 1995*, έχουν προσπαθήσει να συσχετίσουν κάποιες μεταλλάξεις που εντοπίζονται, συγκεκριμένα, σε γονίδια παραγωγής tRNA, πρόκειται για την T4336C μεταλλαγή στο tRNA της γλουταμίνης (tRNA^{Gln}), με την νόσο του Alzheimer, ανεπιτυχώς μέχρι στιγμής, καθώς το θεώρημά τους αντικρούεται από μελέτες άλλων ερευνητικών ομάδων που παρουσιάζουν το ακριβώς αντίθετο (*Wragg et al., 1995*).

Παρακάτω ακολουθεί μια χρονική τοποθέτηση των μεταλλάξεων που έχουν εντοπιστεί σε γονίδια που βρίσκονται στο mtDNA ασθενών με Alzheimer.

- 1) Σε ένα σύνολο 19 ασθενών που έπασχαν από Alzheimer, στους 10 εξ αυτών εντοπίστηκε η μετάλλαξη G5460A στο ND2 γονίδιο, χωρίς αυτή όμως να εντοπιστεί στα 11 άτομα ελέγχου της παρούσας έρευνας (*Lin et al., 1992*), σε αντίθεση με μια παρόμοια μελέτη που διεξήχθη από τους *Petruzella et al.*, το ίδιο έτος, σε 15 AD ασθενείς, και θέλει την παραπάνω μετάλλαξη να μην εντοπίζεται σε κανένα από αυτά.
- 2) Σύμφωνα με την έρευνα που διεξήγαγαν οι *Blanchard et al.*, το 1993, εντοπίστηκε, σε συχνότητα 0,14%, έλλειμμα συνολικά 4.997bp στο mtDNA ασθενών, σε σχέση με το 0,12% που εντοπίστηκε στα άτομα ελέγχου. Η ίδια έλλειψη παρατηρήθηκε 15 φορές πιο συχνά σε περιοχές του εγκεφάλου των ασθενών με Alzheimer, όπως είναι ο φλοιός και η παρεγκεφαλίδα, σε σύγκριση με τις αντίστοιχες περιοχές σε άτομα control ίδιας ηλικίας (*Corral-Debrinski et al., 1994*).
- 3) Στο tRNA^{Gln} ανιχνεύθηκε η μετάλλαξη A4336G σε ποσοστό 5,2%, στους ασθενείς (9/173), και σε ποσοστό 0,7% στα άτομα ελέγχου Καυκάσιου πληθυσμού. Από την ίδια ερευνητική ομάδα βρέθηκαν επίσης, η μετάλλαξη G3196A στο 16S rRNA γονίδιο, η A3397G μεταλλαγή στο ND1 γονίδιο, η προσθήκη 5 νουκλεοτιδίων στο τμήμα 956-965bp και η παρερμηνεύσιμη μετάλλαξη στο τμήμα 3397bp, όπου μια υψηλά συντηρημένη Μεθειονίνη μετατράπηκε σε Βαλίνη (*Shoffner et al., 1993*).
- 4) Η επιβεβαίωση της μετάλλαξης A4336G στο tRNA^{Gln} ήρθε από τους *Hutchin & Cortopassi* το 1995, όπου για πρώτη φορά χρησιμοποιήθηκε ένα μεγαλύτερο δείγμα μελέτης ατόμων που άγγιζε τους 72 ασθενείς και τα 296 άτομα ελέγχου. Η μετάλλαξη ανιχνεύθηκε σε ποσοστό 8,3% στα άτομα που έπασχαν από Alzheimer και σε ποσοστό 0,34% των ατόμων ελέγχου. Τον ίδιο χρόνο πραγματοποιήθηκε εξέταση 155 ασθενών από τους *Wragg et al.*, η οποία τελικά, δεν κατέληξε στην παραπάνω επιβεβαίωση. Ύστερα από ένα χρόνο, το 1996, οι *Brown et al.*, εξέτασαν συνολικά 4 ασθενείς, εκ των οποίων οι τρεις έπασχαν από Alzheimer και από Parkinson, ενώ ο ένας μόνο από Parkinson. Η μετάλλαξη A4336G εντοπίστηκε στους ασθενείς 7,4 φορές συχνότερη από ότι στα control (σε 1 από τους 3 παραπάνω ασθενείς). Ακόμη στους ίδιους τρεις ασθενείς εντοπίστηκαν, συνολικά, η **μετάπτωση**⁶ στο 3397bp στο ND1 γονίδιο, που αναφέραμε

νουκλεοτιδικής αλληλουχίας. Επίσης, αναφέρονται ορισμένες περιπτώσεις κατά τις οποίες η μετάλλαξη οδηγεί στην παραγωγή μιας πρωτεΐνης η οποία είναι λειτουργική, παραδείγματος χάριν στους 37° C και όχι στους 42° C. Στην περίπτωση αυτή έχουμε μία **θερμοευαίσθητη** μεταλλαγή.

⁶Η **σημειακή μετάλλαξη** (*point mutation*) αναφέρεται στην μεταβολή ενός μόνο ζεύγους βάσεων, με τον συνηθέστερο τύπο να είναι αυτός της **μετάπτωσης** (*transition*), κατά την οποία μια πυριμιδίνη

και προηγουμένως, η 4216bp μετάπτωση στο ND1 γονίδιο και η 13708bp μετάπτωση στο ND5 γονίδιο. Στον ασθενή που έπασχε μόνο από Parkinson εντοπίστηκε μια **υποκατάσταση**⁷ στο 1709bp στο 16S rRNA γονίδιο και μια 15851bp παρερμηνεύσιμη μεταλλαγή στο γονίδιο παραγωγής του *κυτοχρώματος b* (*cytb*).

- 5) Το 1998 από τους *Zsurka et al.*, εξετάστηκαν συνολικά 70 ασθενείς για τις μεταλλάξεις A4336G, T4216C, G13708A και A3397G, στα οποία όμως βρέθηκε μόνο A4336G σε έναν ασθενή.
- 6) Το 1999 πραγματοποιήθηκε από τους *Chagnon et al.*, μια εκτεταμένη μελέτη σε όλα τα tRNA γονίδια, και στα 22, αλλά και στα COI,II,III γονίδια σε ένα σύνολο 69 ασθενών και 83 ατόμων ελέγχου. Συνολικά εντοπίστηκαν 95 πολυμορφισμοί, εκ των οποίων οι 15 εντοπίστηκαν στα tRNA γονίδια, οι 9 στα rRNA γονίδια, 52 που δεν επέφεραν κάποια λειτουργική διαφορά στα προϊόντα των γονιδίων που εντοπίστηκαν (*σιωπηλή μετάλλαξη*) και 19 που επέφεραν αλλαγή του αμινοξέος (*παρερμηνεύσιμη μετάλλαξη*).
- 7) Έπειτα, το 2000, από τους *Chang et al.*, εξετάστηκαν 20 ασθενείς για την C16390T μετάλλαξη που εντοπίζεται στην D-loop περιοχή του μιτοχονδριακού DNA, και βρέθηκε ότι ήταν τριπλάσια η συχνότητα εμφάνισής της στους ασθενείς από ότι στα άτομα ελέγχου.
- 8) Στη συνέχεια αλληλουχήθηκε η D-loop περιοχή του mtDNA στους ασθενείς μεταξύ των θέσεων 333-785bp και εντοπίστηκε η πολυμορφική μεταλλαγή T466C (*Chinnery et al., 2001*). Το ίδιο έτος, από τους *Qui et al.*, εντοπίστηκαν στο γονίδιο COII οι μεταλλάξεις G8206T και A8224T.
- 9) Η μεταλλαγή T414G, που εντοπίζεται στην D-loop περιοχή του mtDNA, βρέθηκε σε ποσοστό 65% στους ασθενείς (*Coskun et al., 2004*).
- 10) Ανίχνευση των μεταλλάξεων T3197C και T3199C στο γονίδιο παραγωγής του 16S rRNA και της μεταλλαγής T3338C στο ND1 γονίδιο (*Grazina et al., 2005*).
- 11) Εντοπισμός της μετάλλαξης A856G και της προσθήκης του νουκλεοτιδικού τμήματος στην περιοχή 956-965bp του γονιδίου παραγωγής του 12S rRNA και χαρακτηρισμός ως παράγοντες κινδύνου εμφάνισης της νόσου (*Tanaka et al., 2010*).

Όπως είναι φυσικό η συμμετοχή των μιτοχονδρίων στη νόσο του Alzheimer αποτελεί ένα γεγονός το οποίο πλέον δεν αμφισβητείται από κανέναν και χαίρει της ευρείας αποδοχής του από το σύνολο της επιστημονικής κοινότητας. Το ερώτημα όμως που μένει να απαντηθεί τα επόμενα χρόνια, είναι το κατά πόσο, και εάν, τόσο η μορφολογική διαφορά όσο και η λειτουργική βλάβη που παρουσιάζουν τα μιτοχόνδρια στη νόσο, αποτελούν συνέπεια της νόσου ή εάν πρόκειται για το υποκυτταρικό οργανίδιο εκείνο το οποίο ευθύνεται για την εμφάνιση και την εξέλιξη της.

αντικαθίσταται από μια άλλη πυριμιδίνη, ή μια πουρίνη αντικαθίσταται από μια άλλη πουρίνη, παραδείγματος χάριν η G αντικαθίσταται από την A, και τον σπανιότερο τύπο να είναι η **μεταστροφή** (*transversion*), κατά την οποία μια πουρίνη αντικαθίσταται από μια πυριμιδίνη και αντίστροφα, παραδείγματος χάριν η A αντικαθίσταται από την T, και η G από την C.

⁷**Υποκατάσταση** (*Substitution*): Αλλαγή ενός ζεύγους βάσεων από ένα άλλο. Η υποκατάσταση του ζεύγους βάσεων χωρίζεται σε δύο κατηγορίες, την **μετάπτωση** (*transition*) και την **μεταστροφή** (*transversion*), δύο έννοιες οι οποίες περιγράφηκαν προηγουμένως.

2.1 Τα μιτοχόνδρια

Η ανακάλυψή τους πραγματοποιήθηκε από έναν Γερμανό παθολόγο, ιστολόγο τον *Richard Altmann* πολλά χρόνια πίσω, το **1886**, με την ονομασία τους να ακολουθεί 12 χρόνια μετά, το **1898**. Τα μιτοχόνδρια («μίτος» και «χόνδρος») εντοπίζονται σχεδόν σε όλα τα ευκαρυωτικά κύτταρα, στα φυτά, τα ζώα δηλαδή, υποκυτταρικά. Πρόκειται για το οργανίδιο εκείνο το οποίο είναι υπεύθυνο για την παραγωγή ενέργειας στο κύτταρο, με την μορφή του ATP, τριφωσφορική αδενοσίνη, και είναι αυτό που συνθέτει το μεγαλύτερο μέρος του ATP που χρειάζεται ένα κύτταρο. Η ύπαρξη των οργανιδίων αυτών είναι αναγκαία καθώς, χωρίς αυτά η ενεργειακή κάλυψη των αναγκών του κυττάρου σε ATP θα εξαρτιόνταν, αναποτελεσματικά, από την διαδικασία της γλυκόλυσης⁸, γεγονός που θα έθετε σε κίνδυνο την επιβίωση των πολυκύτταρων οργανισμών. Πιο αναλυτικά, όταν η γλυκόζη μετατρέπεται σε πυροσταφυλικό, με την διαδικασία της γλυκόλυσης, προκύπτει ένα ποσοστό ελεύθερης ενέργειας περισσότερο του 90% μειωμένο, από αυτό που θα μπορούσε να απελευθερώσει το μόριο της γλυκόζης. Συγκεκριμένα, κατά την γλυκόλυση, από ένα μόριο γλυκόζης προκύπτουν δύο μόρια ATP, σε αντίθεση με τα μιτοχόνδρια, όπου ένα μόριο γλυκόζης, όταν οξειδώνεται, να παράγονται 30 μόρια ATP. Συνεπώς, αντιλαμβανόμαστε πλήρως με αυτό τον τρόπο την αναγκαιότητα της ύπαρξης και της σωστής λειτουργικότητας των μιτοχονδρίων σε ένα κύτταρο.

Τα μιτοχόνδρια, λόγω του σχήματός τους, το οποίο είναι ωοειδές, και του μεγέθους τους, που κυμαίνεται από 0,3 έως 1μm σε διάμετρο και από 1-10μm σε μήκος, φαίνεται να μοιάζουν ιδιαίτερα με βακτήρια. Αν τώρα αποδώσουμε σε αυτά το γεγονός της ύπαρξης δικού τους DNA, RNA, συστήματος μεταγραφής και μετάφρασης, δικών τους ριβοσωμάτων, μπορούμε να μιλήσουμε για μια σχεδόν αυτόνομη οντότητα, που έχει την ικανότητα σύνθεσης ορισμένων εκ των πρωτεϊνών της. Ίσως αυτές οι παρατηρήσεις αποτέλεσαν την βάση για τη διατύπωση της **θεωρίας της ενδοσυμβίωσης** το **1971**, που ήθελε τα προκαρυωτικά κύτταρα να εγκολπώνουν κάποια αερόβια βακτήρια, τα οποία ήταν προστατευμένα μέσα στον προκαρυώτη και παρήγαγαν ενέργεια για αυτόν. Με το πέρασμα

⁸Οι αντιδράσεις της γλυκόλυσης έτσι όπως πραγματοποιούνται στο κύτταρο σε 10 βήματα:

- 1) Γλυκόζη + ATP → 6-φωσφορική γλυκόζη + ADP + H⁺ (Μεταφορά φωσφορικής ομάδας στο μόριο της γλυκόζης από το ένζυμο εξοκινάση)
- 2) 6-φωσφορική γλυκόζη ↔ 6-φωσφορική φρουκτόζη (Μία αντίδραση ισομερίωσης που καταλύεται από το ένζυμο Ισομεράση της φωσφογλυκόζης)
- 3) 6-φωσφορική φρουκτόζη + ATP → 1,6-διφωσφορική φρουκτόζη + ADP + H⁺ (Μεταφορά φωσφορικής ομάδας που καταλύεται από την Φωσφοφρουκτοκινάση)
- 4) 1,6-διφωσφορική φρουκτόζη ↔ φωσφορική διυδροξυακετόνη + 3-φωσφορική γλυκεραλδεΐδη (Αλδολική διάσπαση από το ένζυμο Αλδολάση)
- 5) Φωσφορική διυδροξυακετόνη ↔ 3-φωσφορική γλυκεραλδεΐδη (Ισομερίωση από την Ισομεράση των φωσφορικών τριοζών)
- 6) 3-φωσφορική γλυκεραλδεΐδη + Pi + NAD⁺ ↔ 1,3-διφωσφογλυκερικό + NADH + H⁺ (Σύζευξη φωσφορλίωσης με οξείδωση από την Αφυδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεΐδης)
- 7) 1,3-διφωσφογλυκερικό + ADP ↔ 3-φωσφογλυκερικό + ATP (Μεταφορά φωσφορικής ομάδας από την Κινάση του φωσφογλυκερικού)
- 8) 3-φωσφογλυκερικό ↔ 2-φωσφογλυκερικό (Μετατόπιση φωσφορικής ομάδας από την Μουτάση του φωσφογλυκερικού)
- 9) 2-φωσφογλυκερικό ↔ φωσφο-ενολοπυροσταφυλικό + H₂O (Αφυδάτωση από την Ενολάση)
- 10) Φωσφο-ενολοπυροσταφυλικό + ADP + H⁺ → πυροσταφυλικό + ATP (Μεταφορά φωσφορικής ομάδας από την κινάση του πυροσταφυλικού)

Με έντονη γραφή εικονίζονται παραπάνω τα δύο μόρια ATP τα οποία παράγονται κατά τη διαδικασία της γλυκόλυσης.

του χρόνου το βακτηριακό κύτταρο έχασε το δικό του DNA, έγινε μιτοχόνδριο, και το κύτταρο-ξενιστής εξαρτιόταν πλέον από την ενέργεια που παρήγαγε το βακτηριακό κύτταρο. Έτσι μέσα από μια διαδικασία συμβίωσης, όπου έδρευε η στήριξη, η αλληλοβοήθεια και η αλληλοεξάρτηση, προέκυψε το «νέο» ευκαρυωτικό κύτταρο, που πλέον διέθετε μιτοχόνδρια, και είναι ακριβώς έτσι όπως το γνωρίζουμε σήμερα. Μια θεωρία η οποία ακόμη δεν έχει επιβεβαιωθεί, αλλά ούτε έχει απορριφτεί, η οποία βασίζεται στις παραπάνω λειτουργικές παρατηρήσεις οι οποίες και επιβεβαιώθηκαν δέκα χρόνια αργότερα, το **1981**, με την αλληλούχιση του μιτοχονδριακού DNA. Αν εξετάσουμε τα μιτοχόνδρια από πλευρά κινήτικότητας, θα παρατηρήσουμε πως πρόκειται για ιδιαίτερα ευκίνητα οργανίδια, τα οποία έχουν την ικανότητα συνεχούς αλλαγής σχήματος και θέσεως εντός του κυττάρου. Αν τα εξετάσουμε τώρα από πλευρά αριθμού, ο αριθμός τους μπορεί να ποικίλει και να διαφοροποιείται ανάλογα το είδος του κυττάρου και τις ενεργειακές ανάγκες που το τελευταίο παρουσιάζει. Έτσι, σε ένα ηπατικό κύτταρο μπορεί να περιέχονται από 1000 μέχρι και 2000 μιτοχόνδρια, τα οποία μπορεί να σχηματίσουν κινητές και μακριές αλυσίδες μαζί με τους μικροσωληνίσκους του κυτταροσκελετού. Σε ένα κύτταρο του μυοκαρδίου, μπορεί να εντοπίζονται κοντά στην συστατική συσκευή, σε ένα σπερματοζώαριο να τυλίγονται περιφερικά του μαστιγίου του, να παραμένουν δηλαδή σε ένα συγκεκριμένο μέρος του κυττάρου, ώστε να μπορούν να καλύπτουν άμεσα τις αυξημένες ανάγκες της περιοχής αυτής σε ATP.

Παρακάτω ακολουθούν διάφορες ημερομηνίες οι οποίες συνδέθηκαν με ανακαλύψεις γύρω από την δομή και την λειτουργία των μιτοχονδρίων

1904 Όπου περιγράφηκαν τα μιτοχόνδρια στα φυτικά κύτταρα.

1934 Απομονώθηκαν για πρώτη φορά με υπερφυγοκέντρωση.

1952 Παρατήρηση της δομής τους με την χρήση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου και σύνδεσή της με την λειτουργία του οργανιδίου.

1961 Διατύπωση της Χημειοσμωτικής θεωρίας από τον Βρετανό Βιοχημικό *Peter Dennis Mitchell* για την σύνθεση του ATP στα μιτοχόνδρια του κυττάρου.

Εκτός από την παραγωγή ενέργειας, τα μιτοχόνδρια συμμετέχουν επίσης στην μεταγωγή σήματος, την διαφοροποίηση των κυττάρων, τον κυτταρικό θάνατο, τη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, τη διατήρηση της ομοιόστασης του ενδοκυτταρικού ασβεστίου και στην παραγωγή θερμότητας.

2.2 Η δομή των μιτοχονδρίων

Το μιτοχόνδριο περιβάλλεται από δύο μεμβράνες, την εξωτερική και την εσωτερική, οι οποίες εμφανίζουν μεγάλη εξειδίκευση και έχουν ως αποτέλεσμα τη δημιουργία δύο διαμερισμάτων στο μιτοχόνδριο, του διαμεμβρανικού χώρου (*intermembrane space*), ο οποίος δημιουργείται μεταξύ της εσωτερικής και της εξωτερικής μεμβράνης, και της μήτρας (*matrix*), την οποία περιβάλλει η εσωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου.

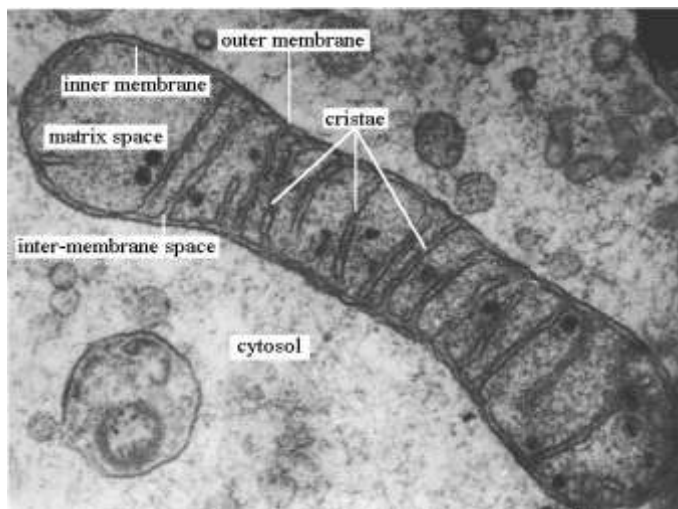
Η **εξωτερική μεμβράνη** (*outer membrane*) περιέχει ένα μεγάλο αριθμό μορίων που ονομάζονται *πορίνες*. Πρόκειται για μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη, με ρόλο μεταφορέα, η οποία σχηματίζει υδρόφιλους διαύλους, καθιστώντας ουσιαστικά την μεμβράνη αυτή, έναν ηθμό, ένα φίλτρο, από το οποίο θα επιτρέπεται η είσοδος μορίων στο μιτοχόνδριο μοριακού

βάρους έως 5000 Daltons, συμπεριλαμβανομένων και μικρών πρωτεϊνών. Με άλλα λόγια, καθιστά τον διαμεμβρανικό χώρο του μιτοχονδρίου, ως προς τα μικρά μόρια που περιέχει, ισοδύναμο με το κυτταρόπλασμα του κυττάρου.

Η **εσωτερική μεμβράνη** (*inner membrane*) είναι αδιαπέραστη από όλα τα μόρια σε όλη της την έκταση, εκτός από τα ιόντα και τα περισσότερα μικρά μόρια, σε περιοχές όπου υπάρχουν κατάλληλοι διάλυτοι που σχηματίζονται από μεταφορικές διαμεμβρανικές πρωτεΐνες και επιτρέπουν την μεταφορά τους από και προς την μήτρα του μιτοχονδρίου. Συνεπώς, η τελευταία περιέχει μόνο τα μόρια που επιτρέπει η εσωτερική μεμβράνη να περάσουν, καθιστώντας το περιεχόμενό της αρκετά εξειδικευμένο. Είναι ο τύπος που πραγματοποιείται η οξειδωτική φωσφορυλίωση. Άλλωστε, οι περισσότερες πρωτεΐνες που διαθέτει αποτελούν συστατικά της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων (*electron transport chain*), ή αλλιώς της αναπνευστικής αλυσίδας (*respiratory chain*), η οποία είναι απαραίτητη για τη διεργασία της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, της σύνθεσης δηλαδή του ATP. Ακόμη, φέρει ένα μεγάλο αριθμό πτυχώσεων, οι οποίες ονομάζονται **ακρολοφίες** (*cristae*), αυξάνοντας έτσι την επιφάνεια της μεμβράνης και δημιουργώντας μια μεγάλη επιφάνεια στην οποία μπορεί να πραγματοποιηθεί η οξειδωτική φωσφορυλίωση. Οι **ακρολοφίες** είναι κάθετες ως προς το μήκος του μιτοχονδρίου και ο αριθμός τους φαίνεται να έχει σχέση με την έκταση της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης που πραγματοποιείται σε ένα κύτταρο. Έτσι, ο αριθμός τους αυξάνεται καθώς αυξάνεται και ο ρυθμός της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Για παράδειγμα, σε ένα κύτταρο του μυοκαρδίου, ο αριθμός των ακρολοφιών που φέρουν τα μιτοχόνδριά του είναι τριπλάσιος από αυτόν ενός ηπατοκυττάρου, εξαιτίας προφανώς των μεγαλύτερων αναγκών του σε ATP.

Ο **διαμεμβρανικός χώρος** (*intermembrane space*), πρόκειται για μια περιοχή μικρής έκτασης, η οποία δημιουργείται μεταξύ της εσωτερικής και της εξωτερικής μεμβράνης του μιτοχονδρίου και περιέχει όλα τα ιόντα σε ισοδύναμες συγκεντρώσεις με το κυτταρόπλασμα εξαιτίας της διαλογής που πραγματοποιεί η εξωτερική μεμβράνη του οργανιδίου.

Η **μήτρα** (*matrix*) του μιτοχονδρίου αποτελεί ένα μεγάλο εσωτερικό χώρο που περιέχει ένα πυκνό μείγμα πολυάριθμων ενζύμων, ανάμεσα στα οποία συγκαταλέγονται ένζυμα που συμμετέχουν στην οξείδωση του πυροσταφυλικού οξέος και των λιπαρών οξέων καθώς και ένζυμα του κύκλου του Krebs. Περιέχει επίσης, μια πληθώρα αντιγράφων του μιτοχονδριακού DNA, μιτοχονδριακά ριβοσώματα, μόρια tRNA και διάφορα ένζυμα που απαιτούνται για την έκφραση των μιτοχονδριακών γονιδίων.



Εικόνα 4. Παρατήρηση της δομής ενός μιτοχονδρίου με την βοήθεια ηλεκτρονικού μικροσκοπίου (<http://www.bmb.leeds.ac.uk/illingworth/6form/>).

2.3 Οι λειτουργίες του μιτοχονδρίου

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, τα μιτοχόνδρια συμμετέχουν σε μία πληθώρα διεργασιών συμπεριλαμβανομένων του κυτταρικού θανάτου, της ρύθμισης και της διατήρησης της ομοιόστασης του ενδοκυτταρικού ασβεστίου και της δημιουργία ελευθέρων ριζών, τις οποίες θα προσπαθήσουμε να εξηγήσουμε παρακάτω, ξεκινώντας όμως, από τον βασικό τους ρόλο στο κύτταρο που είναι η παραγωγή της απαραίτητης ενέργειας που χρειάζεται το τελευταίο προκειμένου να επιβιώσει.

2.3.1 Η Παραγωγή ενέργειας στο κύτταρο

Κατά τη διάρκεια της ημέρας μπορούμε να αθλούμαστε, να εργαζόμαστε, να χαιρόμαστε έναν περίπατο στο πάρκο, να συζητάμε με τους φίλους μας και να κάνουμε ένα σωρό διεργασίες που σχετίζονται με την καθημερινότητά μας χάρη στην ενέργεια που αποκτούμε από την τροφή μας. Τρεφόμαστε δηλαδή, προκειμένου να χρησιμοποιήσουμε την ενέργεια που θα προκύψει από την καύση, τον μεταβολισμό, των μορίων της τροφής για να ζήσουμε.

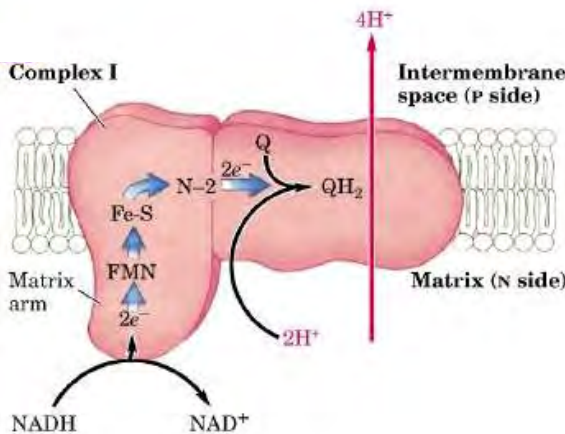
Ο μεταβολισμός των μορίων της τροφής μας ξεκινάει από την στιγμή της εισόδου τους στον οργανισμό μας, αλλά ολοκληρώνεται στα μιτοχόνδρια. Τα οργανίδια αυτά έχουν τη δυνατότητα να χρησιμοποιούν ως καύσιμα τόσο μόρια που προέρχονται από διάφορα σάκχαρα όπως είναι το πυροσταφυλικό οξύ, με χαρακτηριστικότερο παράδειγμα σακχάρου αυτό της γλυκόζης, αλλά και μόρια, όπως είναι τα λιπαρά οξέα που προέρχονται από τα λίπη. Και τα δύο όμως είδη, αν θέλετε, καυσίμων μεταφέρονται μέσω της εσωτερικής μεμβράνης των μιτοχονδρίων και αφού μετατραπούν στο Ακέτυλο-CoA, με τη δράση ενζύμων που εντοπίζονται στη μήτρα των μιτοχονδρίων, εισέρχονται στον κύκλο του κιτρικού οξέος. Πιο συγκεκριμένα, οι ακετυλομάδες του μορίου αυτού είναι που εισέρχονται στον **κύκλο του Krebs** (Εικόνα 5.) και οξειδώνονται προκειμένου να παραχθεί CO₂, το οποίο αποβάλλεται από το κύτταρο, και ηλεκτρόνια υψηλής ενέργειας που μεταφέρονται από συγκεκριμένους φορείς, το **NADH** και το **FADH₂**, που αποκαλούνται ως *φορείς ηλεκτρονίων υψηλής ενέργειας*. Τα εν λόγω μόρια φορείς μεταφέρουν αυτά τα ηλεκτρόνια στην **εσωτερική μεμβράνη** των μιτοχονδρίων ώστε να εισέλθουν στην **αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων** (Εικόνα 6.). Από εκεί και έπειτα ξεκινάει η διαδικασία της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης για την παραγωγή ενέργειας στο κύτταρο με την μορφή του ATP.

Η αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων αποτελείται από τέσσερα σύμπλοκα, την οξειδοαναγωγή του ζεύγους NADH-Q, την αναγωγή του ζεύγους ηλεκτρικού-Q, την οξειδοαναγωγή του ζεύγους Q-κυτοχρώματος c και την οξειδάση του κυτοχρώματος c, τα οποία λειτουργούν σαν αντλία πρωτονίων, που οδηγεί στην άντληση πρωτονίων από τη μιτοχονδριακή μήτρα στον διαμεμβρανικό χώρο του μιτοχονδρίου, και εντοπίζεται στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων. Η μεταφορά των ηλεκτρονίων κατά μήκος της αλυσίδας ενοείται ενεργειακά, καθώς όταν τα ηλεκτρόνια εισέρχονται στην αναπνευστική αλυσίδα βρίσκονται σε υψηλή ενεργειακή στάθμη και κατά την διάρκεια της μεταφοράς τους χάνουν ενέργεια για να καταλήξουν στην οξειδάση του κυτοχρώματος όπου αντιδρούν με ένα μόριο οξυγόνου για να σχηματίσουν νερό. Κατά την διάρκεια της αναπνευστικής αλυσίδας απαιτείται οξυγόνο, το οποίο και χρησιμοποιείται σε αυτό το βήμα και πρόκειται για το οξυγόνο εκείνο που ο οργανισμός εισπνέει από το περιβάλλον του. Ο τρόπος λειτουργίας της αναπνευστικής αλυσίδας βασίζεται στην ενέργεια που προκύπτει κατά την αξιοποίηση της ηλεκτροχημικής βαθμίδωσης των πρωτονίων διαμέσου της εσωτερικής μιτοχονδριακής

μεμβράνης, μέσω της μεταφοράς των ηλεκτρονίων κατά μήκος της μεταφορικής αλυσίδας, η οποία μετατρέπεται σε χημική ενέργεια για την σύνθεση ATP.

Στο σημείο αυτό θα προσπαθήσουμε να αναλύσουμε τον τρόπο με τον οποίο πραγματοποιείται η σύνθεση του ATP στο κύτταρο με μια ταυτόχρονη περιγραφή της δομής των συμπλόκων που συμμετέχουν στην αναπνευστική αλυσίδα.

Πιο αναλυτικά, ο φορέας NADH προσδένεται στην **οξειδοαναγωγή του ζεύγους NADH-Q⁹** (Εικόνα 7.), που αποτελεί και το πρώτο σύμπλοκο, *σύμπλοκο I* της αναπνευστικής



αλυσίδας, και μεταφέρει δύο ηλεκτρόνια υψηλού δυναμικού στην προσθετική ομάδα του συμπλόκου, στο φλαβινομονονουκλεοτιδίο(FMN), όπως φαίνεται στην παρακάτω αντίδραση. Το FMN δέχεται τα δύο αυτά ηλεκτρόνια από το NADH και στη συνέχεια, τα δίνει σε μια σειρά από σύμπλοκα σιδήρου-θείου (Fe-S), που αποτελούν την δεύτερη προσθετική ομάδα της οξειδοαναγωγής του ζεύγους NADH-Q.

Εικόνα 7. Η απεικόνιση της δομής της οξειδοαναγωγής του ζεύγους NADH-Q Το σύμπλοκο I της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων.



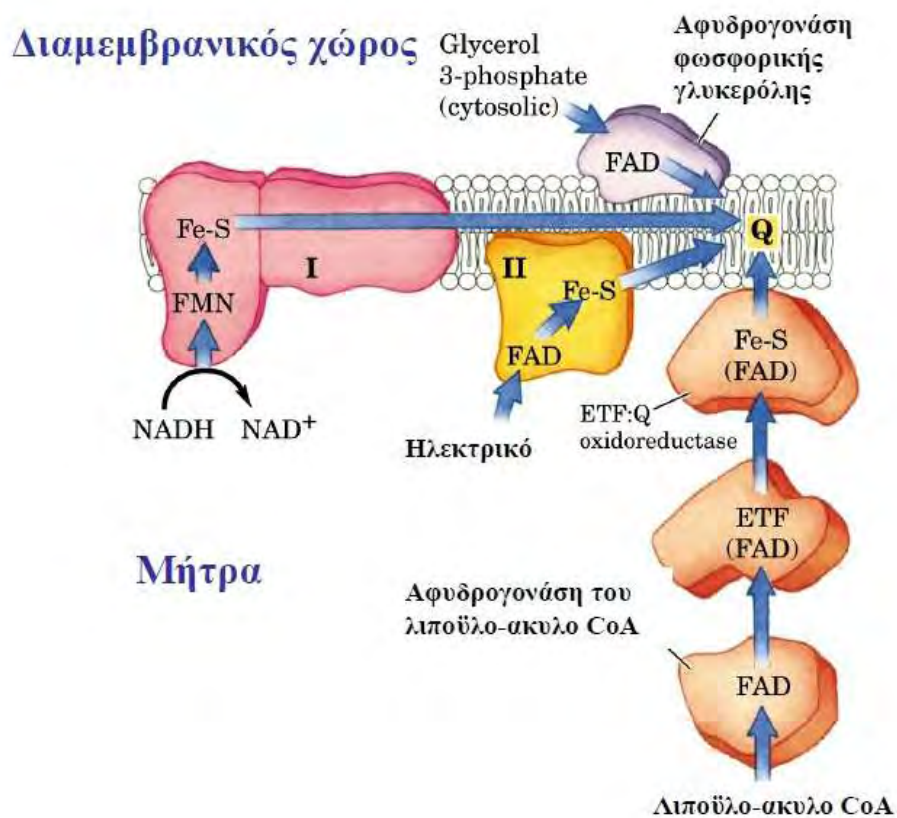
Έπειτα, τα ηλεκτρόνια από τα τρία κέντρα συμπλόκων 4Fe-4S μεταφέρονται σε μια ισχυρά συνδεδεμένη Q ή αλλιώς συνένζυμο Q ή αλλιώς όπως είναι περισσότερο γνωστή, στην ουβικινόνη. Όταν η ουβικινόνη (Q) προσλάβει ένα ηλεκτρόνιο ανάγεται σε μια ρίζα ενδιάμεσου ανιόντος ημικινόνης (Q[•]), η οποία με περαιτέρω αναγωγή από ένα δεύτερο ηλεκτρόνιο, μετατρέπεται σε ουβικινόλη (QH₂) που έχει ως αποτέλεσμα την άντληση δύο πρωτονίων. Τα δύο αυτά ηλεκτρόνια της ανηγμένης ουβικινόνης μεταφέρονται στο κέντρο συμπλόκου [2Fe-2S] και τελικά σε ένα κινητό μόριο ουβικινόνης (Q) που εντοπίζεται στο υδρόφοβο μέρος της εσωτερικής λιπιδιακής μεμβράνης των μιτοχονδρίων, και οδηγούμαστε στην άντληση δύο επιπλέον πρωτονίων. Στη συνέχεια, η ουβικινόλη (QH₂) που προκύπτει, διαχέεται στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη προκειμένου να συναντήσει το σύμπλοκο III.

Ποια είναι όμως η συνεισφορά του *συμπλόκου II*, της **αναγωγής του ζεύγους ηλεκτρικού-Q** (Εικόνα 8.) δηλαδή, στην οξειδωτική φωσφορυλίωση αν από το σύμπλοκο I, μέσω της ενεργοποίησή του από το NADH, πηγαίνουμε κατευθείαν στην ενεργοποίηση του συμπλόκου III ; Από τον κύκλο του Krebs δεν παράγεται μόνο το φορέας NADH αλλά και ο FADH₂ ο

⁹Η οξειδοαναγωγή του ζεύγους NADH-Q είναι ένα τεράστιο ένζυμο, μοριακού βάρους περίπου 1000kDa, που αποτελείται από τουλάχιστον 34 πολυπεπτιδικές αλυσίδες. Πρόκειται στην πραγματικότητα για μία αντλία πρωτονίων που αποτελείται από μια προσθετική ομάδα φλαβινομονονουκλεοτιδίου(FMN) και μια σειρά συμπλόκων Fe-S δύο όμως ειδών, του [2Fe-S] και του [4Fe-S].

Το σύμπλοκο Fe-S αποτελείται από ένα ιόν σιδήρου σχηματίζει τετραεδρικό σύμπλοκο με τέσσερις σουλφιδρικές ομάδες καταλοίπων κυστεΐνης, το Σύμπλοκο [2Fe-2S] αποτελείται από δύο ιόντα σιδήρου που ενώνονται μεταξύ τους μέσω γεφυρών σουλφιδίων και σχηματίζουν σύμπλοκα με τέσσερα κυστεϊνικά κατάλοιπα, ενώ το σύμπλοκο[4Fe-4S] αποτελείται από 4 άτομα σιδήρου που ενώνονται μεταξύ τους μέσω 4 γεφυρών σουλφιδίων και σχηματίζουν 4 κατάλοιπα κυστεΐνης.

οποίος ευθύνεται για την ενεργοποίηση του συμπλόκου II. Πιο συγκεκριμένα, και όπως φαίνεται και στην *Εικόνα 5*, το FADH_2 παράγεται κατά την οξείδωση του ηλεκτρικού σε φουμαρικό, μια αντίδραση που καταλύεται από το ένζυμο ηλεκτρική αφυδρογονάση, το οποίο είναι συστατικό της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης και μέρος του συμπλόκου II, το οποίο αποτελείται από ομοιοπολικά προσδεδεμένο FAD και κέντρα Fe-S . Η ηλεκτρική αφυδρογονάση μετατρέπει το FAD σε FADH_2 και τα ηλεκτρόνια από το τελευταίο μόριο μεταφέρονται στα κέντρα Fe-S και τελικά στην ουβικινόνη(Q), η οποία ανάγεται σε ουβικινόλη (QH_2). Το σύμπλοκο της αναγωγής του ζεύγους ηλεκτρικού-Q δεν αντλεί πρωτόνια, δεν είναι αντλία πρωτονίων, και για τον λόγο αυτό αποδίδει λιγότερο ATP από την οξείδωση του FADH_2 σε σχέση με αυτήν του NADH .



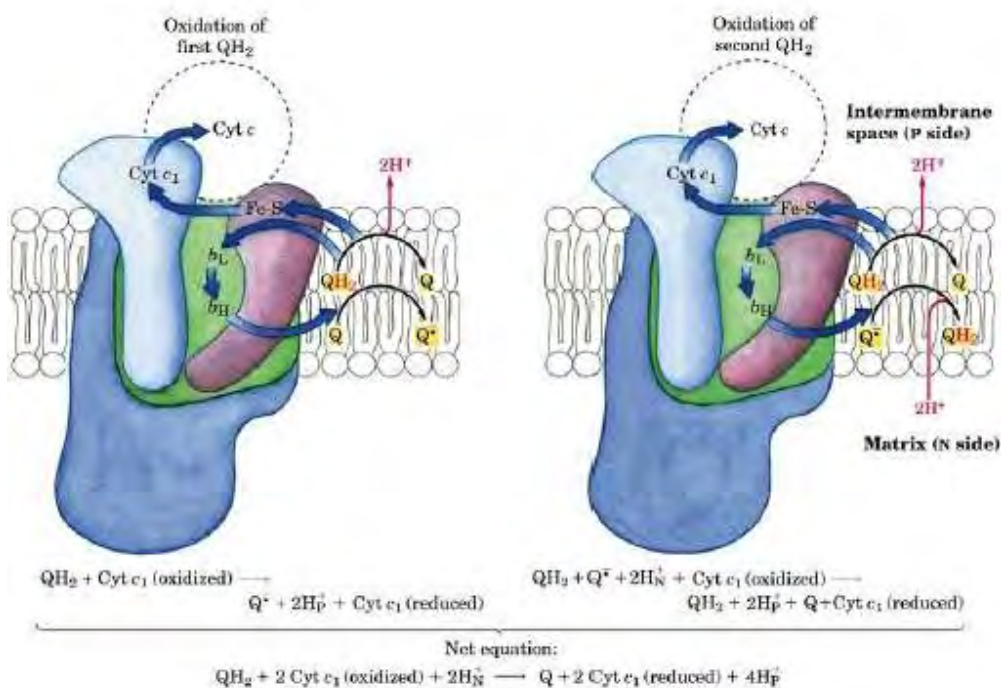
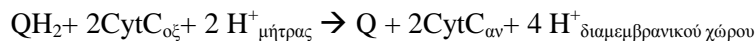
Εικόνα 8. Η απεικόνιση της αναγωγής του ζεύγους ηλεκτρικού-Q, του συμπλόκου II της αναπνευστικής αλυσίδας, όπως απεικονίζεται με κίτρινο χρώμα. Ακόμη μπορούμε να διακρίνουμε τους διάφορους τρόπους «ενεργοποίησης» της ουβικινόνης(Q).

Η ουβικινόνη(Q) μπορεί να δεχτεί επίσης ηλεκτρόνια και από την γλυκόλυση, μέσω της αναγωγής της φωσφορικής διυδροξυακετόνης σε 3-φωσφορική γλυκεραλδεΐδη, τη διάσπαση των τριακυλογλυκερών, την αφυδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκερόλης, και την β-οξείδωση των λιπαρών οξέων από την αφυδρογονάση του λιπούλο ακυλ-CoA. Στο σημείο αυτό να σημειωθεί πως η αφυδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκερόλης και η αφυδρογονάση του λιπούλο ακυλ-CoA είναι φλαβοπρωτεΐνες και χρησιμοποιούν τον φορέα FAD ως συνένζυμο.

Στη συνέχεια, η ουβικινόλη (QH_2) μεταφέρει τα ηλεκτρόνια που έχει προσλάβει προηγουμένως από τα δύο μόρια φορείς NADH και FADH_2 στην οξειδοαναγωγή του

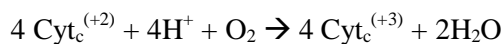
Το κυτόχρωμα c έχει παραμείνει συντηρημένο εξελικτικά σε όλους τους αερόβιους οργανισμούς για πάνω από 1.500.000.000 χρόνια !!!

ζεύγους Q-κυτοχρώματος c¹⁰ (Εικόνα 9.), το σύμπλοκο III της αναπνευστικής αλυσίδας, και συγκεκριμένα στο κυτόχρωμα c¹¹, το οποίο βρίσκεται στην οξειδωμένη του μορφή και με την πρόσληψη των παραπάνω ηλεκτρονίων ανάγεται, γεγονός που οδηγεί στην σχεδόν ταυτόχρονη άντληση πρωτονίων από τη μιτοχονδριακή μήτρα στο διαμεμβρανικό χώρο του μιτοχονδρίου. Η αντίδραση που μόλις περιγράφηκε απεικονίζεται παρακάτω.



Εικόνα 9. Η απεικόνιση της δομής της οξειδοαναγωγής του ζεύγους Q-κυτοχρώματος c, ή αλλιώς της κυτοχρωμικής αναγωγής, του συμπλόκου III της αναπνευστικής αλυσίδας.

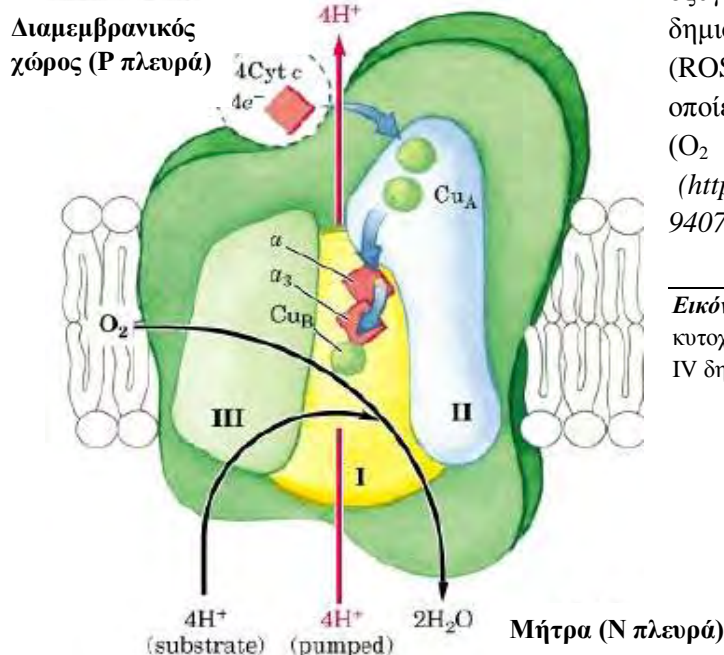
Έπειτα, το ανηγμένο κυτόχρωμα c μεταφέρει τα ηλεκτρόνια στην **οξειδάση του κυτοχρώματος c**, ή αλλιώς **οξειδάση του κυτοχρώματος c** (Εικόνα 10.), το σύμπλοκο IV της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων, τα οποία μέσω 3 ιόντων χαλκού (2Cu_A και 1Cu_B) και 2 ομάδων αίμης (αίμη a και αίμη a₃) καταλήγουν στον τελικό αποδέκτη, το O₂, το οποίο και ανάγεται σε H₂O (σηματίζεται δηλαδή H₂O μέσω της αντίδρασης που ακολουθεί).



¹⁰Η οξειδοαναγωγή του ζεύγους Q-κυτοχρώματος c, ή αλλιώς η κυτοχρωμική αναγωγή, είναι μια πρωτεΐνη διμερές, της οποίας τα μονομερή αποτελούνται από 11 υπομονάδες έκαστος. Διαθέτει τρεις κύριες προσθετικές ομάδες, μεταξύ των οποίων βρίσκονται τρία μόρια αίμης (bL, bH και c1), τα οποία εντοπίζονται στα κυτοχρώματα b και c αντίστοιχα, ένα σύμπλοκο 2Fe-2S, Κέντρο Rieske, όπως είναι γνωστό, και μια πρωτεΐνη σιδήρου-θείου.

¹¹Το κυτόχρωμα είναι μια πρωτεΐνη μεταφοράς ηλεκτρονίων που περιέχει μια προσθετική ομάδα αίμης, η οποία βοηθάει τη μεταφορά ηλεκτρονίων μέσω του σιδήρου της αίμης που διαθέτει, πραγματοποιώντας συγκεκριμένα, εναλλαγή μεταξύ της οξειδωμένης (+3) και της ανηγμένης μορφής του σιδήρου της αίμης (+2). Υπάρχουν δύο ειδών τύποι αίμης στα κυτοχρώματα του συμπλόκου III. Η σίδηρο-πρωτοπορφυρίνη IX που εντοπίζεται στο κυτόχρωμα b, η οποία είναι ίδια με την αιμοσφαιρίνη, και η αίμη C που εντοπίζεται στο κυτόχρωμα c και c1.

Προσφέρονται συνολικά 4 ηλεκτρόνια στο O₂ για την πλήρη αναγωγή του σε νερό, ενώ παρατηρείται ταυτόχρονη άντληση 4 πρωτονίων από τη μήτρα στον διαμεμβρανικό χώρο του μιτοχονδρίου. Υπάρχουν ωστόσο και περιπτώσεις όπου παρατηρείται μερική αναγωγή του



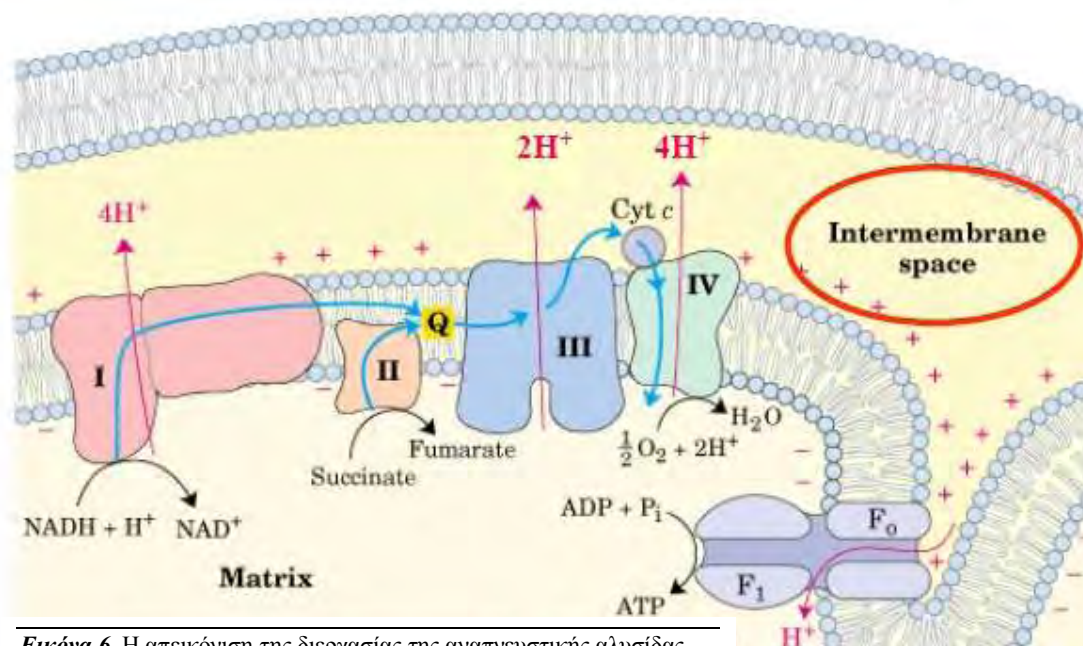
οξυγόνου, γεγονός που οδηγεί στη δημιουργία ενεργών ριζών οξυγόνου (ROS, υπεροξειδίου συγκεκριμένα) οι οποίες είναι βλαβερές για το κύτταρο ($O_2 + e^- \rightarrow O_2^{\cdot-} + e^- \rightarrow O_2^{2-}$) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19407826>).

Εικόνα 10. Η Απεικόνιση της δομής της κυτοχρωμικής οξειδάσης, του συμπλόκου IV δηλαδή της αναπνευστικής αλυσίδας

Η κυτοχρωμική οξειδάση των θηλαστικών αποτελείται από 13 υπομονάδες, 3 εκ των οποίων, η I, η II και η III, κωδικοποιούνται από το μιτοχονδριακό DNA, σε αντίθεση με αυτή των βακτηρίων η οποία αποτελείται από 3 έως 4 υπομονάδες.

Όλη αυτή η μεταφορά των ηλεκτρονίων κατά μήκος της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων, οδηγεί στην άντληση πρωτονίων από τη μήτρα προς τον διαμεμβρανικό χώρο των μιτοχονδρίων, προκαλώντας την δημιουργία ενός ηλεκτρικού και ενός χημικού δυναμικού μεταξύ των δύο πλευρών της μεμβράνης. Παρατηρείται δηλαδή μια κίνηση πρωτονίων προς τον διαμεμβρανικό χώρο των μιτοχονδρίων η οποία προκαλεί μια βαθμίδωση του pH, με βασική πλευρά αυτήν της μήτρας και όξινη αυτή του διαμεμβρανικού χώρου και ένα δυναμικό μεμβράνης, με αρνητικότερη την πλευρά της μήτρας του μιτοχονδρίου. Αυτή η ροή πρωτονίων διαμέσου του συμπλόκου της ATPάσης οδηγεί στην παραγωγή ATP από ADP και P_i. Η παραπάνω διαδικασία αποτελεί την χημειοσμωτική θεωρία (Mitchell et al., 1967).

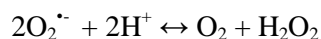
Η ATP συνθάση (Εικόνα 11.) αποτελεί το μεγαλύτερο ενζυμικό σύμπλοκο της εσωτερικής μεμβράνης των μιτοχονδρίων και όπως ήδη αναφέρθηκε είναι υπεύθυνο για τον σχηματισμό του ATP από ADP και P_i, μία διαδικασία που βασίζεται στην ροή των πρωτονίων από την πλευρά της μεμβράνης που βρίσκεται στον διαμεμβρανικό χώρο του μιτοχονδρίου, προς την πλευρά που βρίσκεται στη μήτρα του μιτοχονδρίου, καθιστώντας το έτσι ως το *σύμπλοκο V* της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων. Η ATP συνθάση αποτελείται από δύο μέρη, το F₁ που είναι μια περιφερειακή πρωτεΐνη που εντοπίζεται στην μεμβράνη των μιτοχονδρίων, και το F₀ που είναι ενσωματωμένο στη μεμβράνη. Όταν το τμήμα F₁ απομονώνεται από τη μεμβράνη καταλύει στην υδρόλυση του ATP αντί να προάγει την σύνθεσή του. Για τον λόγο αυτό προέκυψε και η ονομασία ATPάση. Όταν το τμήμα F₁ επιστρέψει και επανασυνδεθεί με το διαμεμβρανικό τμήμα F₀, τότε και πάλι το σύμπλοκο είναι έτοιμο να συνθέσει ATP.



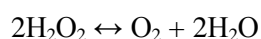
Εικόνα 6. Η απεικόνιση της διεργασίας της αναπνευστικής αλυσίδας.

2.3.2 Η Παραγωγή ενεργών ριζών οξυγόνου (ROS)

Όπως είδαμε πριν από λίγο, τα μιτοχόνδρια είναι αυτά τα οποία ευθύνονται για την παραγωγή των ενεργών ριζών οξυγόνου (ROS) κατά την διάρκεια της παραγωγής ενέργειας στο κύτταρο, και συγκεκριμένα κατά την διάρκεια της αναπνευστικής αλυσίδας. Όπως έχει αναφερθεί οι ROS είναι βλαβερές για ένα κύτταρο, για τον λόγο αυτό το κύτταρο, πρέπει να βρει κάποιον τρόπο ώστε να τις απομακρύνει ή να τις μετατρέψει σε μια ένωση η οποία δεν θα είναι τόσο βλαβερή για το ίδιο. Αυτή τη διαδικασία την αναλαμβάνουν οι αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί του κυττάρου. Πρόκειται για ένζυμα, και συγκεκριμένα για οξειδοαναγωγάσες, τα οποία αναλαμβάνουν την άμυνα του κυττάρου, και γενικότερα του οργανισμού, έναντι των ROS και κατά συνέπεια του οξειδωτικού stress. Ένα τέτοιο ένζυμο είναι και η δισμουτάση του υπεροξειδίου (SOD), η οποία με βάση την παρακάτω αντίδραση, αναλαμβάνει την μετατροπή των ανιόντων υπεροξειδίου ($O_2^{\cdot -}$), σε υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2).



Ωστόσο, το H_2O_2 εξακολουθεί να είναι τοξικό για ένα κύτταρο καθώς μπορεί να διασπαστεί σε OH^{\cdot} , η οποία είναι μια ενεργή ρίζα υδροξυλίου, και να προκαλέσει επίσης βλάβες στα μακρομόρια του κυττάρου. Για τον λόγο αυτό, το ένζυμο καταλάση¹² αναλαμβάνει την μετατροπή του, σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση, σε οξυγόνο και νερό, τα οποία προϊόντα της αντίδρασης είναι πλέον μη τοξικά για το κύτταρο.



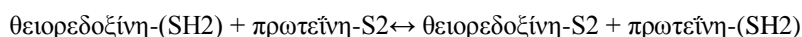
¹²Στα μιτοχόνδρια, τα υπεροξειδισώματα και το κυτταρόπλασμα βρίσκεται ένα ένζυμο με την μορφή τετραμερούς, στο οποίο σε κάθε μία από τις τέσσερις πολυπεπτιδικές του αλυσίδες υπάρχει μία πορφυρική ομάδα αίμης η οποία επιτρέπει την πρόσδεση και την διάσπαση του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) σε νερό και οξυγόνο. Το ένζυμο αυτό ονομάζεται καταλάση (CAT), δρα σε ουδέτερο pH και έχει αντιοξειδωτική ιδιότητα καθώς εμποδίζει την δημιουργία ελευθέρων ριζών OH^{\cdot} με τη διάσπαση του H_2O_2 σε νερό σε οξυγόνο.

Το σύνολο των αντιοξειδωτικών μηχανισμών του κυττάρου εντοπίζεται κυρίως στον πυρήνα του κυττάρου, ώστε να προστατεύει το χρωμοσωμικό DNA του τελευταίου από βλάβες. Το μιτοχόνδριο είναι ένα οργανίδιο στο οποίο εντοπίζονται τα αντιοξειδωτικά ένζυμα σε αρκετά μειωμένη ποσότητα σε σύγκριση με τον πυρήνα του κυττάρου. Παρόλα αυτά, έστω και μειωμένα, υπάρχουν μιτοχονδριακά ισοένζυμα των ενζύμων **GRX** (γλουταρεδοξίνες)¹³ και **TRX** (θειορεδοξίνες)¹⁴, τα οποία είναι τα Grx2 και Trx2, και φυσικά το ισοένζυμο της SOD στο μιτοχόνδριο που είναι το MnSOD, που εντοπίζονται στο μιτοχόνδριο και προστατεύουν το mtDNA από μεταλλάξεις και μονόκλωνα ή δίκλωνα σπασίματα της έλικάς του. Σε ένα φυσιολογικό κύτταρο υπάρχει ισορροπία μεταξύ των ROS και των αντιοξειδωτικών

¹³ Η γλουταρεδοξίνη (glutaredoxin, Grx) ή αλλιώς όπως είναι γνωστή θειολμεταφοράση (thioltransferase) μαζί με τη θειορεδοξίνη (Trx) ανήκουν στην ίδια ομάδα ενζύμων που ονομάζονται οξειδοαναγωγάσες θειολών-δισουλφιδίων (thiol-disulfide oxidoreductases). Η Grx βρίσκεται κυρίως στο κυτταρόπλασμα και σε αντίθεση με την Trx, ανάγεται απευθείας από την γλουταθειόνη (**GSH**), εξαιτίας μιας εξειδικευμένης περιοχής πρόσδεσης που διαθέτει για την GSH στο μόριό της, την οποία δεν φέρει η Trx (Bick, Aslund, Chen, et al., 1998). Εμπλέκονται σε αντιδράσεις ανταλλαγής θειολο-δισουλφιδίων (ThiolDisulfide Exchange reactions) κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών, αλλά και μορίων που δεν είναι πρωτεΐνες, όπως είναι το υδροξυαιθυλικό δισουλφίδιο (hydroxyethyl disulfide) (Gvakharia, Hanson, Koonin, et al., 1996 και Neal, Matthews, Lutz, et al., 2003). Η Grx είναι επίσης και αναγωγάση της οξειδωμένης μορφής της βιταμίνης C (Fernando, Satake, Monnier, et al., 2004 και Halliwell, Gutteridge, 1999).

Η γλουταθειόνη αποτελεί την πιο άφθονη θειόλη και το σημαντικότερο αντιοξειδωτικό στους ιστούς του ανθρώπου και των ζώων. Πρόκειται για ένα τριπεπτίδιο που αποτελείται από κυστεΐνη, γλυκίνη και γλουταμικό οξύ και συναντάται στον οργανισμό κυρίως στην ανηγμένη του μορφή, την **GSH** δηλαδή, περισσότερο από την οξειδωμένη του, την **GSSG** σε μια αναλογία $\frac{GSH}{GSSG} = \frac{10}{1}$. Το λόγο αυτό τον χρησιμοποιούμε αρκετά συχνά προκειμένου να προσδιορίσουμε την παρουσία ελευθέρων ριζών σε έναν οργανισμό, δηλαδή σαν ένα δείκτη για την ανίχνευση του οξειδωτικού στρες. Η γλουταθειόνη πέρα από τον καθοριστικό ρόλο της ως αντιοξειδωτικό στην απομάκρυνση των ελευθέρων ριζών από τον οργανισμό λειτουργεί και ως συνένζυμο σε μια πληθώρα ενζύμων όπως είναι η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης. Ακόμη, συμμετέχει στον μεταβολισμό τόσο του ασβεστίου όσο και των φαρμάκων, αλλά και στην λειτουργία των κυτταρικών μεμβρανών και των αιμοπεταλίων, ενώ συμμετέχει στην απομάκρυνση των ξеноβιοτικών ουσιών από τον οργανισμό.

¹⁴ Η **Θειορεδοξίνη** (Trx) αποτελεί ένα πολυπεπτίδιο μοριακού βάρους 12kDa, η οποία έχει βρεθεί τόσο σε προκαρυωτικά όσο και ευκαρυωτικά κύτταρα. Στα ζωικά κύτταρα εντοπίζεται κυρίως στο ενδοπλασματικό δίκτυο και σε μικρό όμως ποσοστό στην κυτταρική επιφάνεια. Φέρει δύο σουλφυδρυλομάδες που σχηματίζουν δισουλφιδική γέφυρα και συμμετέχει σε οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις με μια πληθώρα πρωτεϊνών σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση:



Δεσμεύεται στην πρωτεΐνη ανάγοντας τη δισουλφιδική της γέφυρα, οξειδώνοντας ταυτόχρονα της δικές της σουλφυδρυλομάδες. Ακόμη λειτουργεί ως δότης ηλεκτρονίων για την αναγωγάση των ριβονουκλεοτιδίων, μέσω της οποίας σχηματίζονται τα δεοξυριβονουκλεοτίδια και στο ένζυμο αναγωγάση της σουλφοξειδικής μεθειονίνης (methionine sulphoxide reductase), το οποίο επιδιορθώνει οξειδωτικές βλάβες που έχουν υποστεί μεθειονίνες των πρωτεϊνών. Η Trx ανάγει επίσης τα ένζυμα PDIs (Protein Disulfide Isomerases), μαζί με τα οποία αποτελούν μέλη μιας ομάδας ενζύμων που συχνά καλούνται οξειδοαναγωγάσες θειολών δισουλφιδίων (thiol-disulfide oxidoreductases). (Halliwell and Gutteridge, 1999).

Η Grx ανακαλύφθηκε για πρώτη φορά ως συμπαραγόντας της αναγωγάσης των ριβονουκλεοτιδίων στο βακτήριο *E. coli* και στη συνέχεια βρέθηκε και στα θηλαστικά, στους μύκητες, τα φυτά και τους ιούς (Gvakharia, Hanson, Koonin, et al., 1996).

μηχανισμών, οποιαδήποτε διαταραχή εντοπιστεί στην ισορροπία αυτή οδηγεί στο οξειδωτικό stress και συνεπώς στην μιτοχονδριακή(βλάβη στην αναπνευστική αλυσίδα και στην πρωτεϊνοσύνθεση) και κυτταρική βλάβη (Allen et al., 1996).

2.3.3 Ο Κυτταρικός θάνατος

Τα κύτταρα μπορούν να πεθάνουν μέσω μιας σειράς διαφορετικών μηχανισμών. Δύο από τους σημαντικότερους τύπους κυτταρικού θανάτου είναι η **νέκρωση** (*oncosis*) και η **απόπτωση**.

Ο **νεκρωτικός κυτταρικός θάνατος** συμβαίνει ως απάντηση σε πολλά είδη προσβολών, παραδείγματος χάριν, τραυματισμού, εμφράγματος, τοξινών, και επομένως είναι το αποτέλεσμα μιας παθολογικής διαδικασίας. Μορφολογικά, συνδέεται με τη διόγκωση κυττάρων και/ή με τη γρήγορη απώλεια της ακεραιότητας της μεμβράνης.

Αντίθετα, η **απόπτωση** είναι μια διαδικασία κυτταρικής αυτοκτονίας που μπορεί να συμβεί ως μέρος φυσιολογικών γεγονότων, όπως είναι η απώλεια των τροφικών παραγόντων, η εξάλειψη των κυττάρων κατά τη διάρκεια φυσιολογικών αναπτυξιακών διεργασιών ή, σε μερικές περιπτώσεις, παθολογικών γεγονότων, παραδείγματος χάριν ορισμένων ιικών μολύνσεων. Μορφολογικά, τα αποπτωτικά κύτταρα συρρικνώνονται και τουλάχιστον αρχικά διατηρούν την ακεραιότητα της πλασματικής τους μεμβράνης. Η απόκριση του ξενιστή σε αυτές τις δύο μορφές κυτταρικού θανάτου μπορεί να είναι διαφορετική (Kenneth L. Rock and Hajime Kono, 2008).

Ο νεκρωτικός κυτταρικός θάνατος διεγείρει μια ανοσολογική απάντηση στον ξενιστή (Majno G et al., 1960). Αντίθετα, έχει αναφερθεί συχνά ότι ο αποπτωτικός κυτταρικός θάνατος δεν προκαλεί φλεγμονή (Huynh ML et al., 2002).

Τα μιτοχόνδρια μπορούν να επάγουν τον κυτταρικό θάνατο, όπως θα δούμε αργότερα στη σχετική ενότητα «*H Bax και η κασπάση 3*», μέσω της απόπτωσης. Οποιαδήποτε διαταραχή στην μιτοχονδριακή λειτουργία που έχει ως αποτέλεσμα την ελλιπή παραγωγή ενέργειας, θα οδηγήσει το κύτταρο στο θάνατο μέσω της διαδικασίας της νέκρωσης. Κατά την διάρκεια της απόπτωσης απελευθερώνονται πρωτεΐνες, όπως είναι το κυτόχρωμα *c* και η *Bax*, οι οποίες θα ενεργοποιήσουν τις κασπάσες, και μέσω ενός καταρράχτη αντιδράσεων το κύτταρο θα οδηγηθεί στον θάνατο με τη διαδικασία της απόπτωσης (Desagher και Martinou, 2000).

2.3.3.1 Η *Bax* και η κασπάση 3

Η **απόπτωση** περιλαμβάνει την ενεργοποίηση ενός μονοπατιού που οδηγεί το κύτταρο στο θάνατο καθιστώντας το ίδιο το κύτταρο μορφολογικά περισσότερο συμπαγές, με την ταυτόχρονη δημιουργία αποπτωτικών κυστιδίων, και με την χρωματίνη του να συμπυκνώνεται και το DNA του να κατακερματίζεται.

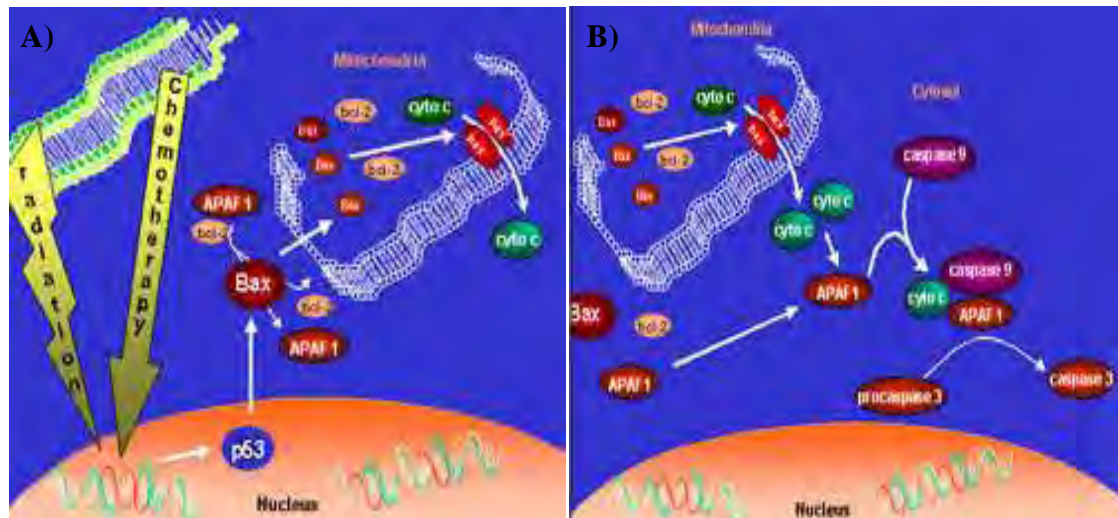
Κατά τη διάρκεια της απόπτωσης πραγματοποιούνται αλλαγές στη διαπερατότητα της μεμβράνης των μιτοχονδρίων που οδηγούν στην απελευθέρωση του κυτοχρώματος *c* στο κυτταρόπλασμα, η οποία πραγματοποιείται μέσω ενός συγκεκριμένου μονοπατιού το οποίο και θα περιγραφεί στη συνέχεια.

Αρχικά, προκαλείται κάποια βλάβη στο DNA του κυττάρου, είτε μέσω κάποιου χημικού παράγοντα, είτε εξαιτίας της έκθεσης του κυττάρου σε κάποιας μορφής ακτινοβολίας, η οποία ενεργοποιεί την *p53* και η οποία με την σειρά της ενεργοποιεί τον παράγοντα ***Bax***, ο οποίος απελευθερώνει τον αποπτωτικό παράγοντα *Bcl2* από την κυτταροπλασματική πρωτεΐνη *Araf-1*, όπου σε φυσιολογικές συνθήκες είναι συνδεδεμένος πάνω του. Γενικότερα όμως τα κύτταρα μπορούν να οδηγηθούν στην απόπτωση μέσω της ενεργοποίησης των

μονοπατιών TNF/TNF-R1(FasL/Fas). Σε ένα κύτταρο παρατηρείται μια αναλογία μεταξύ των παραγόντων Bcl2 και Bax. Όταν η πλάστιγγα γέρνει προς το μέρος του Bcl2 το κύτταρο θα ζήσει, ενώ όταν η αναλογία γέρνει υπέρ του παράγοντα **Bax** τότε το κύτταρο θα οδηγηθεί στο θάνατο μέσω της διαδικασίας της απόπτωσης (λόγος Bax/ Bcl2). Η πρωτεΐνη Bcl2, η οποία μπορεί να σχηματίσει είτε ομοδιμερή είτε ετεροδιμερή, φέρει μια καρβοξυτελική επικράτεια που την κρατάει προσκολλημένη στην εξωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων, την πυρηνική μεμβράνη και τις μεμβράνες του ενδοπλασματικού δικτύου(ΕΔ). Η Bcl2 αποτρέπει την έκλυση του κυτοχρώματος *c*. Η πρωτεΐνη Araf-1 απελευθερώνεται στο κυτταρόπλασμα και ο παράγοντας **Bax** εισέρχεται στα μιτοχόνδρια δημιουργώντας πόρους που οδηγούν στην έκλυση, εκτός των μιτοχονδρίων, του κυτοχρώματος *c* στο κυτταρόπλασμα, όπου προσδέεται στην πρωτεΐνη Araf-1.

Το μιτοχόνδριο αποτελεί ένα κρίσιμο σημείο ελέγχου για την επαγωγή της απόπτωσης. Η απελευθέρωση του κυτοχρώματος *c* πραγματοποιείται εξαιτίας των αλλαγών που συμβαίνουν στη διαπερατότητα της μιτοχονδριακής μεμβράνης. Στα μη φυσιολογικά μιτοχόνδρια των ασθενών που πάσχουν από Alzheimer παρατηρείται αλλαγή της διαπερατότητας της μιτοχονδριακής μεμβράνης, που οδηγεί, λανθασμένα βέβαια, στην απελευθέρωση στο κυτταρόπλασμα του κυτοχρώματος *c* και στην επαγωγή του μονοπατιού της απόπτωσης. Το *κυτόχρωμα c* πυροδοτεί με τη σειρά του την ενεργοποίηση της κασπάσης 9, μέσω της αλληλεπίδρασης της πρωτεΐνης Araf-1 με την κασπάση 9, σε ένα σύμπλοκο που ονομάζεται **αποπτώσωμα** (Εικόνα 12.). Πιο συγκεκριμένα το *κυτόχρωμα c* προσδέεται στην Araf-1 και τη διευκολύνει να προσδέσει ATP, προκαλώντας έτσι τον ολιγομερισμό της Araf-1, η οποία αλλάζει τη στερεοδιαμόρφωσή της και εκθέτει την επικράτεια πρόσδεσης της κασπάσης, όπου στη συνέχεια προσδέεται η προκασπάση 9. Η ενσωμάτωση αυτή οδηγεί στο κόψιμο της προκασπάσης 9 που θα δώσει τελικώς την ενεργοποιημένη μορφή της κασπάσης 9. Έπειτα η κασπάση 9 τέμνει την προκασπάση 3, ώστε να δημιουργηθεί η **κασπάση 3**. (Η κασπάση 9 ενεργοποιεί επίσης την κασπάση 6 και την κασπάση 7). Τότε η κασπάση 3 εισέρχεται στον πυρήνα του κυττάρου και διασπά την πρωτεΐνη PARP (polyADP ribose polymerase) και οδηγεί στην κατάτμηση του DNA. Η PARP βρίσκεται στον πυρήνα του κυττάρου και ο ρόλος του είναι να ανιχνεύει και να επισημαίνει μονόκλιωνα σπασίματα στην έλικα του DNA(Single-Strand DNA breaks, SSB) για τα ένζυμα που θα συμβάλλουν στην επιδιόρθωση των SSB. Η ενεργοποίηση της PARP είναι μια άμεση κυτταρική απόκριση σε χημικές ή επαγόμενες από μεταβολίτες και ακτινοβολία SSB DNA βλάβες. Μόλις η PARP εντοπίσει ένα SSB, προσδέεται στο DNA, και έπειτα από μια δομική αλλαγή, ξεκινάει την σύνθεση μιας πολύ (ADP-ριβόζη) αλυσίδας (PAR) η οποία θα λειτουργήσει ως ένα σήμα για τα άλλα DNA ένζυμα επιδιόρθωσης, όπως είναι η DNA λιγάση III και η DNApol β. Όταν ολοκληρωθεί η επιδιόρθωση, οι PAR αλυσίδες αποικοδομούνται από την PARG [Poly(ADP-ribose)glycohydrolase] (Boulares AH et al., 2001 Maxim Isabelle et al., 2010). Συγκεκριμένα, η **κασπάση 3** αποκόπτει μία υπομονάδα ενός διμερούς που ονομάζεται DFF (DNA fragmentation factor, παράγοντας θραυσματοποίησης του DNA) και η άλλη υπομονάδα του DFF είναι που ενεργοποιεί τη νουκλεάση που θα αποικοδομήσει το DNA.

Ωστόσο, το αποπτωτικό μονοπάτι μπορεί να ανασταλεί μέσω πρωτεϊνών που ονομάζονται **IAP** (inhibitor of apoptosis proteins, αναστολέας της απόπτωσης) μπορούν να προσδεθούν σε προκασπάσες και ενεργοποιημένες κασπάσες και να αναστείλουν την ενεργότητά τους. Τα κύτταρα των σπονδυλωτών περιέχουν μια πρωτεΐνη που ονομάζεται *Smac*, η οποία απελευθερώνεται από τα μιτοχόνδρια την ίδια στιγμή με το *κυτόχρωμα c* και δρα προσδέοντας τις IAP.



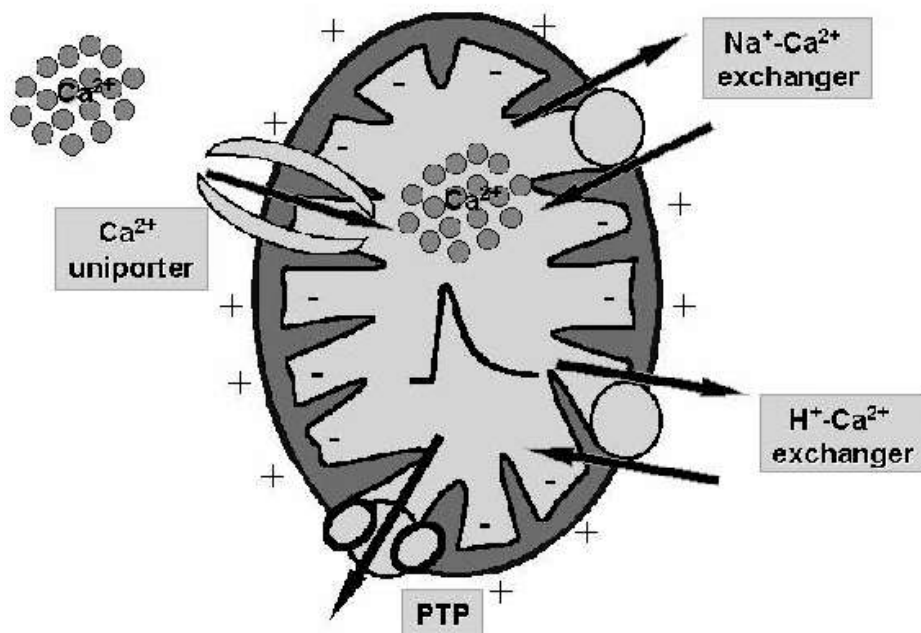
Εικόνα 12. Το μονοπάτι που οδηγεί στην απόπτωση του κυττάρου. **A)** Σχηματική αναπαράσταση της αλλαγής της διαπερατότητας της μεμβράνης του μιτοχονδρίου, εξαιτίας της πρωτεΐνης **Bax**, που έχει ως αποτέλεσμα την έξοδο, από το εσωτερικό του μιτοχονδρίου, στο κυτταρόπλασμα του **κυτοχρώματος c**. **B)** Απεικόνιση της επεξεργασίας που υφίσταται η προκάσπαση 3 από το **αποπτώσωμα**. (Διδακτικές σημειώσεις του μαθήματος «Μοριακή Ογκογένεση», Κεφάλαιο μεταλλάξεις, μεταλλαξογόνοι παράγοντες, μηχανισμοί επιδιόρθωσης, απόπτωση του κ. Παναγιώτη Μαρκουλάτου, Καθηγητή Εφαρμοσμένης Μικροβιολογίας με έμφαση στη Βιοτεχνολογία του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας).

2.3.4 Η ρύθμιση της ομοιόστασης του ενδοκυτταρικού ασβεστίου (Ca^{2+})

Το ενδοπλασματικό δίκτυο αποτελεί την κύρια αποθήκη Ca^{2+} στο κύτταρο. Ωστόσο, τα μιτοχόνδρια μπορούν να προσλάβουν Ca^{2+} σε περιπτώσεις που παρατηρείται αιφνίδια αύξηση της ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης του ασβεστίου, είτε ακόμη και όταν εντοπίζονται σε μικρή απόσταση από το ενδοπλασματικό δίκτυο. Η πρόσληψή του πραγματοποιείται μέσω ενός αρκετά επιλεκτικού καναλιού ιόντων (Kirichok *et al.*, 2004), ενώ η απομάκρυνσή του από τα μιτοχόνδρια πραγματοποιείται μέσω διαμεμβρανικών πρωτεϊνών ανταλλαγής ιόντων $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$ ή $\text{H}^+-\text{Ca}^{2+}$, καθώς επίσης και μέσω του πόρου μεταβατικής διαπερατότητας (*permeability transition pore, PTP*), όπως φαίνεται στην *Εικόνα 13*.

2.4 Το μιτοχονδριακό DNA (mtDNA)

Πρόκειται για ένα δίκλωνο, υπερελικωμένο και κυκλικό μόριο DNA το οποίο εντοπίζεται στην μήτρα των μιτοχονδρίων. Εάν αναλογιστούμε πως σε κάθε μιτοχόνδριο υπάρχουν από 2 έως 10 αντίγραφα του, το κύτταρο θα περιέχει συνολικά 10^3-10^4 αντίγραφα του. Στη βιβλιογραφία συχνά αναφέρονται ως ημιαυτόνομα οργανίδια, καθώς από την μία πλευρά πραγματοποιούν, ανεξάρτητα από το χρωμοσωμικό DNA του κυττάρου, τις αντίστοιχες διαδικασίες της αντιγραφής, της μεταγραφής και της μετάφρασης του γενώματός τους καθ' όλη την διάρκεια του κυτταρικού κύκλου, αλλά από την άλλη, δεν μπορούν να συνθέσουν σημαντικές πρωτεΐνες, τόσο για την κάλυψη των λειτουργικών όσο και των δομικών αναγκών τους. Παραδείγματος χάριν, οι πρωτεϊνικοί παράγοντες εκείνοι που ελέγχουν την αντιγραφή και την μεταγραφή του μιτοχονδριακού γενώματος προκύπτουν από το πυρηνικό DNA. Οι παράγοντες αυτοί συντίθενται στα κυτταροπλασματικά ριβοσώματα, και αφού ολοκληρωθεί η μετάφρασή τους, προστίθεται στο αμινοτελικό τους άκρο μια αλληλουχία οδηγός που τους πηγαίνει στο μιτοχόνδριο, και εισάγονται σε αυτό μέσω μεταφορέων που εντοπίζονται στην κυτταρική του μεμβράνη (Taanman *et al.*, 1999).



Εικόνα 13. Τα μιτοχονδριακά μονοπάτια μεταφοράς ασβεστίου (Ca^{2+}) όπως απεικονίζονται σχηματικά στον ρόλο του μιτοχονδρίου για τη ρύθμιση της ομοιόστασης στον ενδοκυτταρικό ασβεστίο. Τα ιόντα ασβεστίου εισέρχονται στα μιτοχόνδρια μέσω ενός ηλεκτρογενούς μονοπατιού, του Ca^{2+} uniporter, το οποίο πρόκειται για ένα κανάλι ιόντων υψηλής επιλογής. Η απομάκρυνση των ιόντων ασβεστίου πραγματοποιείται μέσω διαμεμβρανικών πρωτεϊνών ανταλλαγής ιόντων $\text{Na}^{+}\text{-Ca}^{2+}$ ή $\text{H}^{+}\text{-Ca}^{2+}$, καθώς επίσης και μέσω του πόρου μεταβατικής διαπερατότητας (*permeability transition pore*, PTP) (http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0716-97602004000400022&script=sci_arttext).

2.4.1 Το ανθρώπινο μιτοχονδριακό DNA

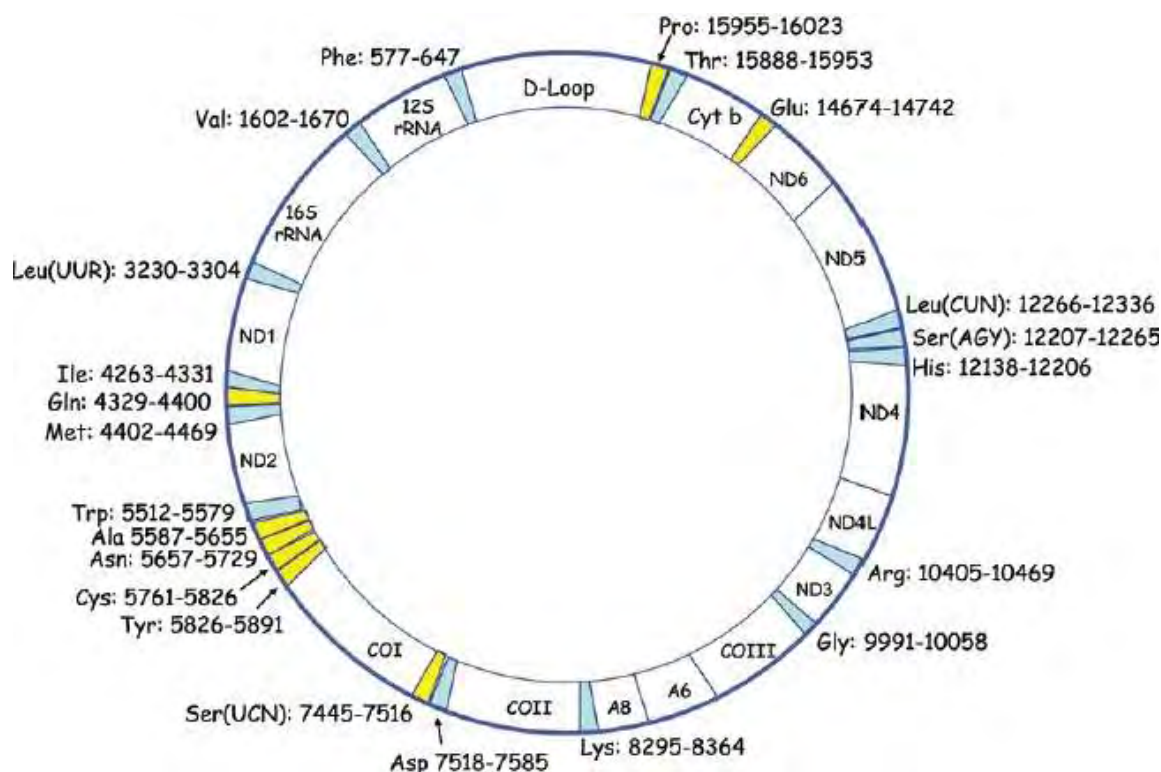
Το μιτοχονδριακό DNA στον άνθρωπο έχει μέγεθος 16.569kb (Εικόνα 14.) η αλληλουχία του οποίου βρέθηκε για πρώτη φορά το 1981(Anderson et al., 1981). Ο ένας του κλώνος είναι πλούσιος σε Γουανίνη (G) συνεπώς, αφού το mtDNA δίκλωνο, ο άλλος του κλώνος θα είναι πλούσιος σε Κυτοσίνη (C), με τον πρώτο να αναφέρεται ως βαρύ(*heavy strand*, H) και το δεύτερο ως ελαφρύ κλώνο(*light strand*, L). Περιέχει συνολικά 37 γονίδια από τα οποία, 13 κωδικοποιούν υπομονάδες της αναπνευστικής αλυσίδας, εκ των οποίων, 7 του συμπλόκου I(ND1,-2,-3,-4,-4L,-5 και -6), 1 του συμπλόκου III, 3 του συμπλόκου IV(COXI, COXII, COXIII) και 2 του συμπλόκου V(ATPase6 και ATPase8), 2 κωδικοποιούν για τα rRNA, 16S και 12S, και 22 για τα tRNA. Στο mtDNA εντοπίζεται ακόμη μια περιοχή πλούσια σε Αδενίνες (A) και Θυμίνες (T), η οποία αποτελεί το σημείο έναρξης της αντιγραφής του mtDNA και ονομάζεται D-loop(Βρόγχος D).

Τα χαρακτηριστικά του ανθρώπινου μιτοχονδριακού DNA

- Δεν περιέχει καθόλου ιντρόνια, γεγονός που υποδηλώνει πως οι δομές των πρωτεϊνών και των tRNA καθορίζονται από την νουκλεοτιδική τους αλληλουχία, ακριβώς έτσι όπως είναι, αυξάνοντας επικίνδυνα την πιθανότητα μεταλλάξιγένεσης, καθώς γύρω από τα γονίδια δεν υπάρχει «άχρηστο DNA» στο οποίο να συσσωρεύονται μεταλλάξεις ώστε να παραμένουν ανεπηρέαστες οι αλληλουχίες των γονιδίων.
- Κατά την διάρκεια της γονιμοποίησης το ωάριο, εκτός από το χρωμοσωμικό υλικό και το mtDNA του θηλυκού ατόμου, περιέχει και όλα εκείνα τα συστατικά τα οποία

είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη του εμβρύου, σε αντίθεση με το σπερματοζώαριο που παρέχει μόνο το χρωμοσωμικό υλικό του αρσενικού ατόμου. Συνεπώς, το mtDNA παρουσιάζει μητρικό πρότυπο κληρονομικότητας, με όλα του τα γονίδια να προέρχονται αποκλειστικά και μόνο από την μητέρα. Το mtDNA του σπερματοζωαρίου εντοπίζεται στην περιοχή του μαστιγίου του, και για το λόγο αυτό δεν εισέρχεται στο ωάριο (Hutchison *et al.*, 1974). Ωστόσο, έχουν αναφερθεί περιπτώσεις και, πατρικής κληρονομικότητας του mtDNA, με το τελευταίο να διαφεύγει, κατά λάθος, από την ουρά και να εισέρχεται στο ωάριο (Johns 2003, John 2004 και Attardi 1985).

- Ο γενετικός κώδικας του mtDNA, όχι μόνο στον άνθρωπο αλλά και όλα τα θηλαστικά, παρουσιάζει ορισμένες ιδιότητες και διαφορές σε σύγκριση με τον Παγκόσμιο Γενετικό Κώδικα (Jukes και Osawa, 1990). Το κωδικόνιο UGA κωδικοποιεί για το αμινοξύ τρυπτοφάνη, και δεν αποτελεί κωδικόνιο λήξης της μετάφρασης. Το κωδικόνιο AGA και το κωδικόνιο AGG αποτελούν κωδικόνια λήξης της μετάφρασης και δεν κωδικοποιούν για τον αμινοξύ αργινίνη. Τα κωδικόνια AUA και AUU αποτελούν κωδικόνια έναρξης, κωδικοποιώντας για τα αμινοξέα μεθειονίνη και ισολευκίνη αντίστοιχα, σε αντίθεση με τον Παγκόσμιο Γενετικό Κώδικα που κωδικοποιούν και τα δύο για το αμινοξύ ισολευκίνη.



Εικόνα 14. Απεικόνιση του ανθρώπινου μιτοχονδριακού γονιδιώματος, όπου με μπλε χρώμα απεικονίζονται τα tRNA που εντοπίζονται στον ελαφρύ κλώνο, ενώ με κίτρινο χρώμα απεικονίζονται τα tRNA που εντοπίζονται στο βαρύ κλώνο του mtDNA (Emily Zifa, Stamatina Giannouli, Paschalis Theotokis, Costas Stamatis, Zissis Mamuris, Constantinos Stathopoulos, *Mitochondrial tRNA Mutations Clinical and Functional Perturbations*, [RNA Biology 4:1, 38-66, January/February/March 2007]; ©2007 Landes Bioscience).

2.4.2 Μεταλλάξεις στα μιτοχondριακά γονίδια tRNA

Παρόλο που τα tRNA γονίδια αποτελούν μόνο το 10% του μιτοχondριακού γενώματος, έχει βρεθεί πως περισσότερες από τις μισές παθογόνες μεταλλάξεις που ευθύνονται για την εμφάνιση των μιτοχondριακών ασθενειών εντοπίζονται σε αυτά. Δεν είναι όλες όμως οι μεταλλάξεις παθογόνες. Οι μεταλλάξεις που πραγματοποιούνται στα tRNA μπορούν να εντοπίζονται στην περιοχή του 3'-άκρου του, εμποδίζοντας την πρόσδεση του αμινοξέος στο tRNA, στην περιοχή του αντικωδικονίου, αποτρέποντας την πρόσδεση του στο mRNA που προορίζεται για πρωτεϊνοσύνθεση (σύνδεση κωδικονίου-αντικωδικονίου) ή, στα υπόλοιπα νουκλεοτίδια του tRNA, διαταράσσοντας την διαμόρφωσή του και καθιστώντας το μη λειτουργικό. Οι μεταλλάξεις αυτές ονομάζονται παθογόνες και οδηγούν στην εμφάνιση κλινικών συμπτωμάτων. Ωστόσο, μπορεί να συμβούν και μεταλλάξεις (ουδέτερες μεταλλάξεις), οι οποίες δεν θα διαταράξουν τη δομή και τη λειτουργικότητα του μορίου tRNA. Συνήθως, πρόκειται για σημειακές μεταλλάξεις, οι οποίες βρίσκονται σε μεγάλο ποσοστό στο γενικό πληθυσμό και ονομάζονται ως πολυμορφισμοί. Μέχρι στιγμής, έχουν βρεθεί, συνολικά, 243 πολυμορφικές και 139 παθογόνες μεταλλάξεις (Πίνακας 1.).

Πίνακας 1. Οι παθογόνες και οι πολυμορφικές μεταλλάξεις στα γονίδια tRNA του ανθρώπινου mtDNA.

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

Κανένα από τα tRNA γονίδια δεν έχει συσχετιστεί ακόμη με την νόσο του Alzheimer. Ωστόσο, έχουν δημοσιευτεί έρευνες αποδέχονται τη συσχέτιση μεταξύ της νόσου και του tRNA^{Gln} και άλλες που την απορρίπτουν (Wragg et al., 1995 και Egensperger et al., 1997).

Στον παρακάτω πίνακα, (Πίνακας 2.), αναγράφονται ορισμένα από τα σημαντικότερα μιτοχondριακά νοσήματα, οι μεταλλάξεις που τα προκαλούν και ο κλινικός φαινότυπος των ασθενών που πάσχουν από αυτά, ενώ στον Πίνακα 3., παρατίθενται όλες οι μεταλλάξεις, όχι μόνο αυτές που εντοπίζονται στα **tRNA** γονίδια (εικονίζονται με **έντονη γραφή**), αλλά όλες όσες εντοπίζονται στο σύνολο των μιτοχondριακών γονιδίων σε ασθενείς με **Alzheimer**.

Πίνακας 2. Ορισμένα από τα σημαντικότερα μιτοχονδριακά νοσήματα και οι κυριότερες tRNA μεταλλάξεις που τα προκαλούν.

Μιτοχονδριακά νοσήματα	Μετάλλαξη	Κλινικός φαινότυπος
Μιτοχονδριακή εγκεφαλομυοπάθεια, γαλακτική οξέωση, εγκεφαλικά επεισόδια (MELAS)	Σε ένα ποσοστό 80% των ασθενών, εντοπίζεται η μετάλλαξη A3243G στο <i>tRNA^{Leu(UUR)}</i>	Εγκεφαλικά επεισόδια πριν την ηλικία των 40 ετών, και εμφάνιση μυοπάθειας, εγκεφαλοπάθειας, γαλακτικής οξέωσης, σπασμών, παράνοιας, καρδιοπάθειας, κώφωσης και διαβήτη
Μυοκλωνική επιληψία με ανώμαλες ερυθρές ίνες(MERRF)	Στο <i>tRNA^{Lys}</i> , το 80% περίπου των ασθενών, φέρει την μετάλλαξη A8344G	Μυοκλωνική επιληψία, σύγχυση, μυϊκή αδυναμία, ανώμαλες ερυθρές ίνες και κώφωση
Σύνδρομο Kearns-Sayre(KSS)	Στους ασθενείς εμφανίζεται η μετάλλαξη G3249A στο <i>tRNA^{Leu(UUR)}</i>	Μελαγχρωματική ρετινοπάθεια πριν την ηλικία των 20 ετών και οφθαλμοπάρεση

Πίνακας 3. Μεταλλάξεις που έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία σε ασθενείς με *Alzheimer* που εντοπίζονται στο σύνολο του ανθρώπινου mtDNA.

Μετάλλαξη	Γενετικός τόπος	Μετάλλαξη	Γενετικός τόπος
T146C	D Loop	A4732G	ND2
T414C	D Loop	C5633T	tRNA^{Ala}
T477C	D Loop	T5705C	tRNA^{Asn}
T593C	tRNA^{Phe}	G5773A	tRNA^{Cys}
A606G	tRNA^{Phe}	G6261A	COI
G709A	12S rRNA	C7476T	tRNA^{Ser(UCN)}
INS 956-965(CCCCC)	12S rRNA	G7521A	tRNA^{Asp}
C1721T	16S rRNA	G8206T	COII
INS 956-965(CCC)	12S rRNA	A8224T	COII
T3197C	16S rRNA	A10044G	tRNA^{Gly}
T3199C	16S rRNA	A12308G	tRNA^{Leu(CUN)}
A3243G	tRNA^{Leu(UUR)}	A13637G	ND5
A3338C	ND1	A15924G	tRNA^{Thr}
A3397G	ND1	G15928A	tRNA^{Thr}
A4295G	tRNA^{Ile}	T16304C	D Loop
A4336G	tRNA^{Gln}	G16390A	D Loop

2.5 Ο σκοπός της εργασίας

Είναι γνωστό πλέον πως στους ασθενείς με Alzheimer παρατηρούνται λειτουργικές και μορφολογικές μιτοχονδριακές διαταραχές ακολουθούμενες από μια πληθώρα μεταλλάξεων που εντοπίζονται στο μιτοχονδριακό DNA. Για τους λόγους αυτούς, και σύμφωνα με τις παραπάνω παρατηρήσεις, ο σκοπός της παρούσας εργασίας διακυβεύεται την ανίχνευση και την ταυτοποίηση των μεταλλάξεων που εντοπίζονται στα μιτοχονδριακά tRNA^{Asn}, tRNA^{Cys}, tRNA^{Tyr}, tRNA^{Ser(UCN)} και tRNA^{Asp} γονίδια, σε δείγμα 50 ασθενών με Alzheimer.

3. Υλικά και μέθοδοι

3.1 Βιολογικό υλικό

Για την παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν 50 δείγματα DNA ασθενών με Alzheimer ολικού αίματος τα οποία προμηθευτήκαμε από το Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο της Λάρισας.

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε με σκοπό τον εντοπισμό των μεταλλάξεων στα tRNA γονίδια που προαναφέρθηκαν βασίστηκε στις τεχνικές της PCR, της SSCP, του καθαρισμού των PCR προϊόντων, της αλληλούχισης και της επεξεργασίας της αλληλούχισης με κατάλληλα προγράμματα βιοπληροφορικής.

Πάμε τώρα να δούμε σιγά την αρχή της μεθόδου καθεμιάς από τις παραπάνω τεχνικές.

3.2 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR)

Η τεχνική της PCR αποτελεί ένα σημαντικό εργαλείο της Μοριακής Βιολογίας που αναπτύχθηκε το 1983 από τον Αμερικάνο Βιοχημικό Kary Banks Mullis, ο οποίος και για την ανακάλυψή του αυτή τιμήθηκε με το βραβείο Nobel το 1993. Πρόκειται για μια ενζυμική μέθοδο η οποία έχει ευρύτερες εφαρμογές στον χώρο της έρευνας και της διάγνωσης και επιτρέπει τον *in vitro* πολλαπλασιασμό μιας επιθυμητής αλληλουχίας DNA. Είναι μια ευαίσθητη μέθοδος με αρκετές παραλλαγές, παραδείγματος χάριν RT-PCR, multiplex PCR, με ικανότητα παραγωγής εκατομμυρίων αντιγράφων μιας DNA αλληλουχίας από ένα μόνο μόριο DNA.

3.2.1 Η αρχή της μεθόδου της PCR

Όπως είπαμε η PCR είναι μια ενζυμική μέθοδος, που σημαίνει πως για να πραγματοποιηθεί απαιτείται ένα ένζυμο, το οποίο είναι η DNA πολυμεράση, η οποία χρησιμοποιεί μονόκλωνο DNA για τη σύνθεση ενός συμπληρωματικού προς αυτό κλώνο με κατεύθυνση 5'→3'. Το DNA όμως, στο προς μελέτη δείγμα μας βρίσκεται με δίκλωνη μορφή, ένα εμπόδιο το οποίο υπερπηδούμε θερμαίνοντας το δείγμα σε υψηλή θερμοκρασία. Τότε, το δίκλωνο DNA «ανοίγει» και οι δύο κλώνοι του διαχωρίζονται επαρκώς. Η DNA πολυμεράση μπορεί να χρησιμοποιήσει και τους δύο κλώνους του DNA ως μήτρα, ως εκμαγείο, για την σύνθεση νέων συμπληρωματικών προς αυτών μορίων. Το ένζυμο όμως δεν μπορεί να δράσει απευθείας, καθώς απαιτεί ένα, μικρό σχετικά, τμήμα δίκλωνου DNA ώστε να ξεκινήσει την σύνθεση. Για τον λόγο αυτό προσθέτουμε στην αντίδραση δύο ολιγονουκλεοτιδικούς εκκινητές (*primers*) συγκεκριμένου μεγέθους και αλληλουχίας, που ο καθένας από αυτούς είναι συμπληρωματικός με την περιοχή του ενός εκ των δύο κλώνων DNA που επιθυμούμε να ενισχύσουμε, ώστε να υβριδοποιηθεί σε αυτήν, και χρησιμοποιώντας την ως «πάτημα», η DNA πολυμεράση, να ξεκινήσει την σύνθεση των νέων κλώνων.

Μια PCR αντίδραση αποτελείται από τρία βασικά στάδια(2, 3 και 4) τα οποία επαναλαμβάνονται κάθε φορά με τη σειρά, και στην περίπτωσή μας, για 35 φορές(Εικόνα 15.). Τα στάδια της αντίδρασης έχουν ως εξής:

1. Η θερμοκρασία των δειγμάτων αρχικά αυξάνεται στους 95°C και παραμένει για 4 λεπτά. Το στάδιο αυτό απαιτείται μόνο όταν η DNA πολυμεράση που χρησιμοποιούμε είναι hot-start, όταν δηλαδή υπάρχει συνδεδεμένο στο ενεργό

κέντρο του ενζύμου ένα πεπτιδίο, το οποίο εμποδίζει την ενεργότητα της πολυμεράσης και εάν δεν απομακρυνθεί, απομακρύνεται μόνο με θέρμανση, δεν θα μπορεί να δράσει (**Στάδιο εκκίνησης**).

2. **Στάδιο αποδιάταξης του δίκλωνου DNA** (*denaturation*), κατά το οποίο η θερμοκρασία των δειγμάτων ανέρχεται στους 95°C όπου παραμένει συνολικά για 30 δευτερόλεπτα. Στο στάδιο αυτό, όπως γίνεται εύκολα αντιληπτό και από την ονομασία του, αποδιατάσσεται, διαχωρίζεται, το δίκλωνο DNA καθώς διασπώνται οι δεσμοί υδρογόνου που εντοπίζονται μεταξύ των συμπληρωματικών βάσεων του DNA. Υπάρχουν συνολικά 3 δεσμοί υδρογόνου μεταξύ των δεοξυριβονουκλεοτιδίων G-C και 2 δεσμοί υδρογόνου μεταξύ των A-T.
3. **Στάδιο υβριδισμού** (*annealing*), κατά το οποίο η θερμοκρασία των δειγμάτων μειώνεται στους 50-55°C για 40 δευτερόλεπτα και έτσι επιτυγχάνεται η υβριδοποίηση των εκκινητών στο μονόκλωνο DNA. Το μήκος, η αλληλουχία και η συγκέντρωση στην αντίδραση που θα έχουν οι εκκινητές καθορίζουν την θερμοκρασία και τον χρόνο στο συγκεκριμένο στάδιο της αντίδρασης.
4. **Στάδιο επιμήκυνσης** (*extension/elongation*) κατά το οποίο η θερμοκρασία ανεβαίνει στους 70-75°C για 40 δευτερόλεπτα και η DNA πολυμεράση συνθέτει του νέους κλώνους DNA.
5. **Στάδιο τελικής επέκτασης** (*final elongation*) κατά το οποίο η θερμοκρασία παραμένει στους 70-75°C για 10 λεπτά προκειμένου να ολοκληρωθεί η επέκταση των τμημάτων των κλώνων των DNA εκείνων που δεν πρόλαβαν να ολοκληρωθούν κατά την επανάληψη του σταδίου 4.
6. **Τελικό στάδιο παραμονής** (*final hold*) κατά το οποίο η θερμοκρασία μειώνεται στους 4°C και παραμένει συντηρώντας το PCR προϊόν μας έως ότου επιθυμούμε να το παραλάβουμε.

Η αντίδραση διαρκεί συνολικά μιάμιση ώρα και μετά το πέρας της μπορούμε να διατηρήσουμε τα PCR προϊόντα μας στην κατάψυξη, στους -20°C για ένα αρκετά μεγάλο χρονικό διάστημα, προκειμένου να τα υποβάλλουμε σε διαφορετικές τεχνικές, όπως είναι η SSCP.

Φυσικά, για την εκτέλεση μιας επιτυχούς PCR δεν απαιτούνται μόνο τα αντιδραστήρια που αναφέρθηκαν προηγουμένως. Παρακάτω, αναγράφεται συνοπτικά το σύνολο των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιούμε σε μια PCR, αλλά και ο ρόλος του καθενός ξεχωριστά στην αντίδραση.

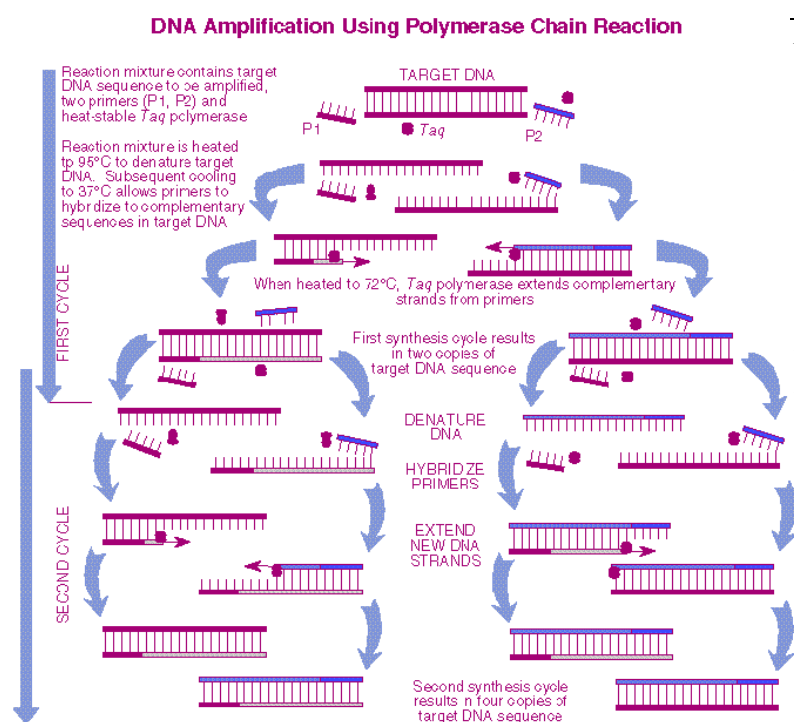
Συνολικά σε μια αντίδραση PCR, εκτός από την DNA πολυμεράση, το DNA από κάποιο βιολογικό δείγμα και τους εκκινητές (primers), απαιτούνται επίσης, ένα ρυθμιστικό διάλυμα (Solution Buffer), MgCl₂, ένα μείγμα τεσσάρων δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs) και νερό.

Το DNA είναι απομονωμένο από κάποιο βιολογικό δείγμα, στην περίπτωση μας από ολικό αίμα, χρησιμεύει ως εκμαγείο για την σύνθεση των νέων κλώνων DNA από την DNA πολυμεράση. Η DNA πολυμεράση που χρησιμοποιούμε είναι θερμοανθεκτική, δηλαδή δεν χάνει την ενεργότητά της κατά την υψηλή θερμοκρασία του σταδίου 2. Η συγκεκριμένη πολυμεράση απομονώθηκε από τα θερμοφιλά βακτήρια *Thermus Aquaticus* και για τον λόγο αυτό ονομάζεται Taq πολυμεράση. Το ρυθμιστικό διάλυμα (*solution buffer*) δημιουργεί το καταλληλότερο περιβάλλον, παραδείγματος χάριν δημιουργώντας και διατηρώντας στην αντίδραση συγκεκριμένο pH, στο οποίο το ένζυμο θα εμφανίσει την μέγιστη δραστηριότητά του. Το MgCl₂ το προσθέτουμε στην αντίδραση καθώς, τα ιόντα μαγνησίου (Mg²⁺)

Η Taq πολυμεράση δεν έχει δράση 3' → 5' εξωνουκλεάσης και για τον λόγο αυτό στο PCR προϊόν μας ενδέχεται να υπάρχουν νουκλεοτίδια τα οποία έχουν εισαχθεί λανθασμένα.

αποτελούν συμπαράγοντα της DNA πολυμεράσης. Οι εκκινητές (*primers*) είναι, όπως έχει ήδη αναφερθεί, ολιγονουκλεοτίδια συμπληρωματικά προς την ακολουθία που θέλουμε να ενισχύσουμε και τα οποία, για να ακριβολογούμε, «πιάνουν», πριν την αρχή του γονιδίου που θέλουμε να ενισχύσουμε. Σε κάθε αντίδραση χρησιμοποιούμε από ένα ζεύγος εκκινητών για το γονίδιο που θέλουμε να ενισχύσουμε, έναν για τον 5'-3' κλώνο του DNA (*Forward primer, Fw*) και έναν για τον 3'-5' κλώνο του DNA (*Reverse primer, Rv*). Το μήκος τους κυμαίνεται από 17-25 νουκλεοτίδια και κατά τον σχεδιασμό τους οφείλουμε η περιεκτικότητά τους σε G/C νουκλεοτίδια να είναι μεταξύ 50-60%, το Tm τους (θερμοκρασία τήξης) να είναι παρόμοιο, ώστε να αποφευχθεί η παραγωγή μη επιθυμητών προϊόντων στην αντίδραση εξαιτίας μη ειδικού υβριδισμού, και τα 3' άκρα τους να μην είναι συμπληρωματικά, ώστε να αποφεύγεται ο υβριδισμός τους και η επέκταση από το ένζυμο, προκαλώντας δομές που είναι γνωστές ως “διμερή εκκινητών” (*primer dimer*). Το διάλυμα των dNTPs που προσθέτουμε στην αντίδραση είναι ένα μείγμα από ίσες ποσότητες δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dATP, dTTP, dGTP και dCTP) τα οποία θα χρησιμοποιήσει η DNA πολυμεράση για να δομήσει τους νεοσυντιθέμενους κλώνους του DNA. Τέλος, συμπληρώνουμε με απεσταγμένο νερό ως προς τον τελικό όγκο της αντίδρασης ($V_{\text{τελ}}=50\mu\text{l}$).

Η PCR αντίδραση πραγματοποιείται σε ειδικά μηχανήματα PCR, θερμοκυκλοποιητές, που έχουν την ικανότητα να αυξομειώνουν την θερμοκρασία των δειγμάτων και να επαναλαμβάνουν τα στάδια 2, 3 και 4 όσες φορές επιθυμούμε.



Source: *DNA Science*, see Fig. 13.

Εικόνα 15. Σχηματική απεικόνιση της αντίδρασης της PCR και των σταδίων της αντίδρασης, με τον εντοπισμό των δύο εκκινητών Fw και Rv στους δύο κλώνους του DNA να είναι εμφανής. Όπως μπορούμε να διακρίνουμε μετά τον πρώτο κύκλο της αντίδρασης παράγονται 2 νέα μόρια DNA, ενώ μετά τον δεύτερο κύκλο παράγονται 4 νέα μόρια DNA. Εάν n ο αριθμός των κύκλων της αντίδρασης τότε, θεωρητικά μετά από 35 κύκλους PCR θα έχω $2^n=2^{35}$ δίκλωνα μόρια DNA.

Η αντίδραση PCR πραγματοποιείται σε eppendorf tube χωρητικότητας 500μl, με τον τελικό όγκο της αντίδρασης να προσδιορίζεται στα 50μl. Προκειμένου να πραγματοποιήσουμε μια αντίδραση PCR χρησιμοποιήσαμε τις παρακάτω ποσότητες που αναγράφονται στον Πίνακα 4. Σε κάθε αντίδραση PCR εκτός από τα δείγματα που θα εισάγουμε στον θερμοκυκλοποιητή για ενίσχυση, θα συμπεριλάβουμε και ένα δείγμα το οποίο δεν θα περιέχει καθόλου DNA δείγμα, εναλλακτικά για να συμπληρωθεί ο τελικός όγκος των 50μl που απαιτούνται για την

αντίδραση μπορούμε να εισάγουμε 2μl απεσταγμένο νερό, ώστε να διαπιστώσουμε εάν πραγματοποιήθηκε ή όχι η PCR αντίδραση(αρνητικός μάρτυρας). Εφόσον το δείγμα αυτό δεν περιείχε καθόλου DNA θα αναμένουμε την μη ύπαρξη προϊόντων μετά το πέρας της PCR.

Πίνακας 4. Τα συστατικά μιας PCR τελικού όγκου 50μl.	(μl)
DNA	2
Buffer 10X	5
MgCl ₂ 25mM	1
dNTPs 40mM	1
Primer Fw	1
Primer Rv	1
Taq polymerase	0,2
H ₂ O	39
V _{τελ}	50

3.2.2 Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων PCR σε πήκτωμα (gel) αγαρόζης

Μετά το πέρας της PCR ακολουθεί η παρατήρηση των PCR προϊόντων ηλεκτροφορώντας τα σε πήκτωμα αγαρόζης. Με τον τρόπο αυτό μας δίνετε η δυνατότητα τόσο του ποιοτικού προσδιορισμού, να διαπιστώσουμε δηλαδή αν όντως δούλεψε η PCR, όσο και του ποσοτικού, να διαπιστώσουμε δηλαδή, όχι με ακρίβεια φυσικά, την ποσότητα του DNA στο PCR προϊόν. Όπως γνωρίζουμε το DNA έχει αρνητικό φορτίο εξαιτίας των φωσφορικών ομάδων που διαθέτει, έτσι εάν το τοποθετήσουμε σε ηλεκτρικό πεδίο, θα μετακινηθεί στον θετικό πόλο του πεδίου αυτού. Αυτή η παρατήρηση αποτελεί την **αρχή της μεθόδου** στην οποία βασίζεται η τεχνική της ηλεκτροφόρησης. Η μέθοδος της ηλεκτροφόρησης αυτής επιτυγχάνει τον διαχωρισμό των DNA των PCR προϊόντων βάση του μεγέθους και του μήκους τους. Να αναφέρουμε επίσης πως το DNA στο PCR προϊόν βρίσκεται σε δίκλωνη μορφή.

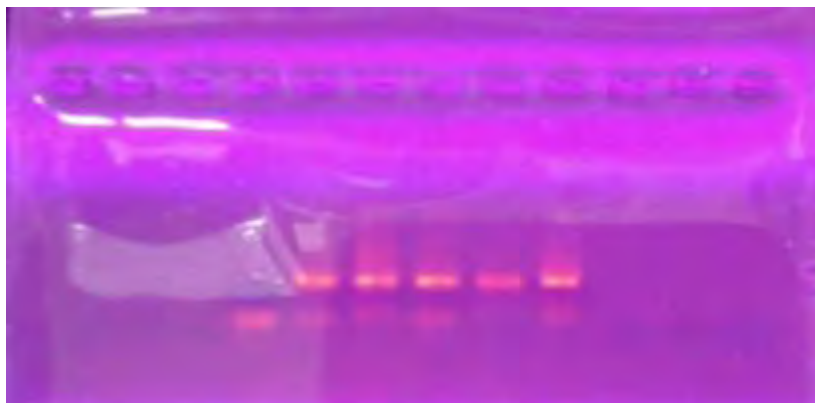
Για την εκτέλεση της ηλεκτροφόρησης του gel ακολουθούμε το παρακάτω **πρωτόκολλο παρασκευής και ηλεκτροφόρησης gel αγαρόζης 2%**.

Ζυγίζουμε 0,6gr αγαρόζης και σε μια κωνική φιάλη προσθέτουμε 45ml TAE, συγκέντρωσης 1X, και ρίχνουμε μέσα σε αυτήν τα 0,6gr αγαρόζης που ζυγίσαμε. Μετά παίρνουμε την κωνική φιάλη και την βάζουμε στο φούρνο μικροκυμάτων να ζεσταθεί προκειμένου να διαλυθεί η αγαρόζη στο ρυθμιστικό διάλυμα TAE και το συνολικό διάλυμα να γίνει εντελώς διάφανο. Κατά τη διαδικασία θέρμανσης πραγματοποιείται ο πολυμερισμός της αγαρόζης. Έπειτα, παίρνουμε την κωνική φιάλη και την κρύνουμε κάτω από το τρεχούμενο νερό της βρύσης, και στη συνέχεια, εισάγουμε σε αυτήν 4μl βρωμιούχο αιθίδιο¹⁵ κάτω από την απαγωγό εστία. Ρίχνουμε το διάλυμα στην ειδική θήκη για να δημιουργηθεί το gel μας, τοποθετούμε τα ειδικά «χτενάκια» σε αυτό προκειμένου να δημιουργηθούν οι θέσεις(πηγαδάκια) όπου θα φορτώσουμε τα PCR προϊόντα για να ηλεκτροφορηθούν και περιμένουμε περίπου 15λεπτά έως ότου σταθεροποιηθεί, πήξει το gel. Στη συνέχεια, το αφαιρούμε από την ειδική θήκη και το τοποθετούμε σε οριζόντια συσκευή ηλεκτροφόρησης

¹⁵Το βρωμιούχο αιθίδιο είναι μια φθορίζουσα χρωστική που έχει την ικανότητα να παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων του δίκλωνου DNA και να φθορίζει όταν εκτεθεί σε υπεριώδη ακτινοβολία(UV). Εξαιτίας της παρεμβολής του αυτής μεταξύ των βάσεων του DNA, καθίσταται ως ένας αρκετά επικίνδυνος μεταλλαξιγόνος παράγοντας. Ωστόσο, αυτή του η επικινδυνότητά φαίνεται να μειώνεται κάπως όταν το βρωμιούχο αιθίδιο βρίσκεται σε μορφή διαλύματος, από το οποίο και προσθέτουμε στο gel αγαρόζης, παρά σε μορφή σκόνης.

Για κάθε 10ml TAE ρυθμιστικού διαλύματος προσθέτω 1μl βρωμιούχο αιθίδιο στο διάλυμα παρασκευής του πηκτώματος της αγαρόζης. Σχέση δηλαδή βρωμιούχου αιθιδίου/TAE = 1/10.

που περιέχει ρυθμιστικό διάλυμα TAE, συγκέντρωσης 1X. Αναμιγνύουμε 5μl από το δείγμα μας και 3μl *loading buffer*¹⁶ και τα φορτώνουμε στο gel. Ρυθμίζουμε την συσκευή ηλεκτροφόρησης στα 100Volt και το DNA είναι έτοιμο να ηλεκτροφορηθεί. Περιμένουμε γύρω στα 15-20 λεπτά έως ότου το DNA καλύψει απόσταση ίση με τα 2/3 του gel, και το απομακρύνουμε από την συσκευή ηλεκτροφόρησης. Τοποθετούμε το gel σε ειδική συσκευή εκπομπής UV ακτινοβολίας ώστε να παρατηρήσουμε την ύπαρξη ή όχι ζωνών DNA. Όσα δείγματα περιέχουν την επιθυμητή ενισχυμένη αλληλουχία θα εμφανίσουν μια ζώνη, και συνεπώς κρατούνται στους -20° C, ενώ αντίθετα, όσα δείγματα δεν έχουν δεν εμφανίζουν καμία ζώνη, και συνεπώς πετιούνται και επαναλαμβάνεται από την αρχή η διαδικασία της PCR.



Εικόνα 16. Φωτογραφία από πήκτωμα αгарόζης 2% σε συσκευή UV ακτινοβολίας. Παρατηρούμε ζώνες του ενισχυμένου γονιδίου σε 5 δείγματα DNA, ενώ στην πρώτη διαδρομή του gel βρίσκεται ο αρνητικός μάρτυρας, και για τον λόγο αυτό δεν παρατηρείται καμία ζώνη.

Στον παρακάτω πίνακα, Πίνακα 5., παρατίθενται τα γονίδια tRNA, οι θέσεις τους στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα, οι αλληλουχίες των εκκινήτων και το μήκος των PCR προϊόντων για την παρούσα εργαστηριακή άσκηση.

Πίνακας 5. Τα tRNA γονίδια που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία, οι θέσεις τους στο μιτοχονδριακό DNA, το μήκος των PCR προϊόντων τους και οι αλληλουχίες των εκκινήτων, Fw και Rv.

Γονίδια tRNA			Θέση γονιδίων στο mtDNA	Μήκος PCR προϊόντων(bp)
Ασπαραγίνη (Asn)	Primer ACT	Fw: 5' CAA TGG GAC TTA	5657-5729	≈250
		AAC CCA CAA 3'		
Κυστεΐνη (Cys)		Rv: 5' GCG AAC ATC AGT	5761-5826	
		GGG GGT GA 3'		
Τυροσίνη (Tyr)			5826-5891	
Σείνη (Ser(UCN))	Primer SA	Fw: 5' ATT CGA AGA ACC	7445-7516	≈180
		CGT ATA CA 3'		
Ασπαρτικό (Asp)		Rv: 5'GCT CTT CTA TGA	7518-7585	
		TAG GGG AA 3'		

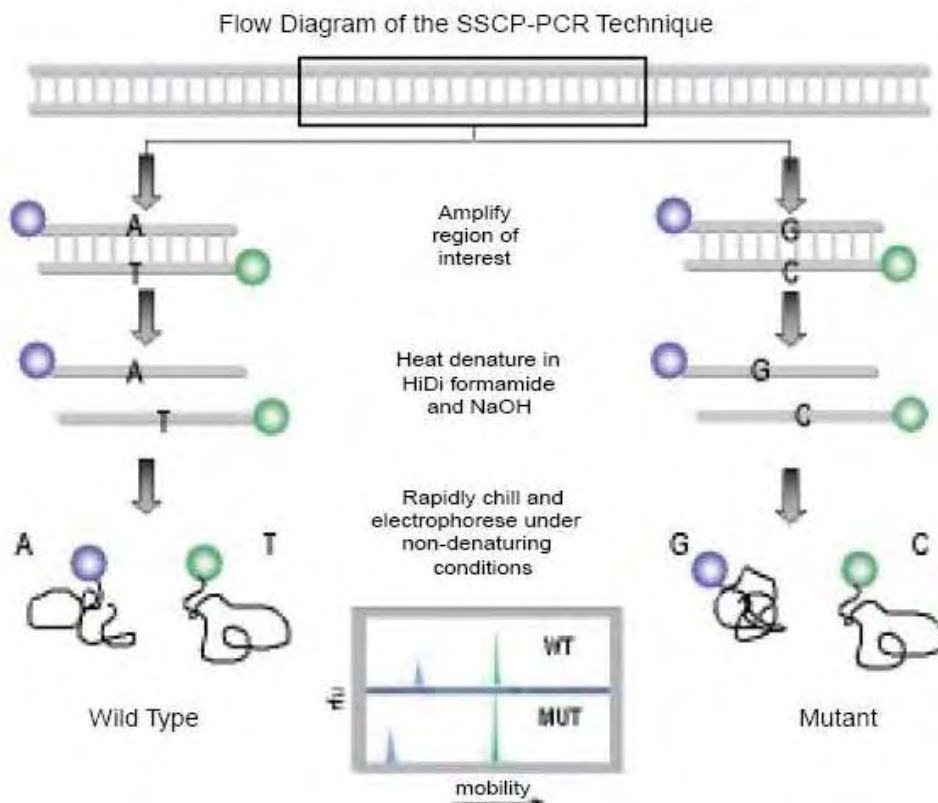
¹⁶Το loading buffer περιέχει τη χρωστική μπλε της βρωμοφαινόλης, προκειμένου να είμαστε σίγουροι πως η φόρτωση των δειγμάτων έγινε σωστά, αλλά και να μπορούμε να παρατηρούμε ανά πάσα στιγμή το σημείο στο οποίο βρίσκονται τα δείγματά μας στο gel όταν θα ηλεκτροφορούνται, γλυκερόλη, η οποία είναι μια μεγαλομοριακή ουσία που χρησιμοποιείται για να αυξήσει την ειδική πυκνότητα του DNA ώστε να καθιζάνει στον πάτο του πηγαδιού και να μην διαχέεται στην συσκευή της ηλεκτροφόρησης, TBE (Tris,Βορικό, EDTA) και νερό.

3.3 Single Strand Conformation Polymorphism, SSCP

Αφού πρώτα πήραμε ζώνες σε όλα τα δείγματα DNA που υποβάλλαμε σε PCR, γεγονός που υποδεικνύει την ύπαρξη του ενισχυμένου γονιδίου που επιθυμούμε, αναλύσαμε τα αποτελέσματά μας με την τεχνική της SSCP.

3.3.1 Η αρχή της μεθόδου SSCP

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται από το 1989 και πρόκειται για μια μέθοδο ανάλυσης τόσο των πολυμορφισμών όσο και των μεταλλάξεων που εντοπίζονται στην μονόκλωνη αλυσίδα του DNA. Η μέθοδος αυτή δεν είναι τίποτα παραπάνω από μια ηλεκτροφόρηση. Όπως και προηγουμένως, τα PCR προϊόντα μας υποβάλλονται σε μια ηλεκτροφόρηση, όμως η μέθοδος αυτή δεν στοχεύει στον διαχωρισμό των DNA μορίων βάση του μεγέθους και του μήκους τους, όπως συμβαίνει στην ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης όπου το DNA από το PCR product είναι δίκλωνο, αντιθέτως, στην διαφορετική ηλεκτροφορητική ικανότητα που εμφανίζουν οι δύο κλώνοι του τμήματος του DNA που ενισχύσαμε. Στην ηλεκτροφόρηση που πραγματοποιούμε στην SSCP καθιστούμε το PCR product μονόκλωνο, διαχωρίζουμε δηλαδή τους δύο κλώνους του DNA μέσω μια συγκεκριμένης διαδικασίας που θα αναφερθεί παρακάτω, ώστε βάση της διαφορετικής αλληλουχίας που ίσως διαθέτουν οι δύο κλώνοι από το DNA της ομάδας ελέγχου, που μπορεί να εντοπίζεται μέχρι και σε ένα μόνο νουκλεοτίδιο (μονονουκλεοτιδικός πολυμορφισμός, *single nucleotide polymorphism SNP*), να αποκτήσουν διαφορετική, μοναδική και χαρακτηριστική διαμόρφωση και άρα και διαφορετική ηλεκτροφορητική ικανότητα στο gel της SSCP. Τις διαφορετικές αυτές διαμορφώσεις που ίσως αποκτήσουν τα DNA των ατόμων που νοσούν από Alzheimer, μπορούμε έπειτα να τις παρατηρήσουμε στο gel και να τις συγκρίνουμε με αυτές της ομάδας ελέγχου (Εικόνα 17.).



Εικόνα 17. Σχηματική αναπαράσταση της μεθόδου PCR-SSCP. Αρχικά υποβάλλουμε το DNA, ενός ατόμου που πάσχει από Alzheimer και ενός ατόμου που δεν νοσεί, σε PCR προκειμένου να ενισχύσουμε το τμήμα εκείνο του DNA που επιθυμούμε, παραδείγματος χάριν, ένα γονίδιο. Στη συνέχεια και με κατάλληλες διεργασίες ανοίγουμε τους δύο κλώνους των DNA των PCR product, πραγματοποιούμε την ηλεκτροφόρηση της SSCP και εντοπίζουμε βάση της διαφορετικής ηλεκτροφορητικής ικανότητας των δειγμάτων DNA την ύπαρξη ενός SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*). Παραπάνω απεικονίζεται και η φορά της ηλεκτροφόρησης στο gel από αριστερά προς τα δεξιά αν και η SSCP ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε κατακόρυφη συσκευή ηλεκτροφόρησης. (*Wild Type, WT, η αλληλουχία του DNA του ατόμου που δεν πάσχει από Alzheimer και Mutant, MUT, η αλληλουχία του DNA του ατόμου που πάσχει από Alzheimer*).

3.3.2 Η παρασκευή του πηκτώματος (gel) της SSCP

Το gel που χρησιμοποιούμε στην μέθοδο της SSCP είναι gel πολυακρυλαμιδίου και η συγκέντρωσή του κυμαίνεται συνήθως από 7-12% και εξαρτάται από το μήκος του τμήματος του DNA που έχουμε ενισχύσει. Ένα παραδείγματος χάριν DNA μήκους 100bp θα απαιτεί gel μεγαλύτερης πυκνότητας από ένα DNA μήκους 200bp ώστε να επιτευχθεί καλύτερος διαχωρισμός των δύο κλώνων του DNA. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε gel πολυακρυλαμιδίου 10%.

Υλικά για 2 gel πολυακρυλαμιδίου 10%, διαστάσεων 19cm x 17,5cm x 2mm.

Προσθέτουμε σε ένα ποτήρι ζέσεως 12,375gr Ακρυλαμιδίου, 0,33gr Bis-ακρυλαμιδίου, 10ml TBE, συγκέντρωσης 10X, 12,5ml γλυκερόλη 50% και 125ml απεσταγμένο νερό και το τοποθετούμε με ένα μαγνητάκι σε μια μαγνητική εστία ώστε να επιτευχθεί πλήρης διάλυση των συστατικών του. Έπειτα με την βοήθεια ενός ογκομετρικού κυλίνδρου και ενός φίλτρου, φιλτράρουμε το διάλυμα και συμπληρώνουμε μέχρι τα 130ml με απεσταγμένο νερό. Μεταφέρουμε το διάλυμα σε μία κωνική φιάλη και προσθέτουμε 650μl APS (*ammonium persulphate*, υπερθειικό αμμώνιο¹⁷) 20% και 125μl TEMED (*tetramethylenediamine*) και το αποχύνουμε μεταξύ των δύο τζαμιών που έχουμε στήσει στην κατακόρυφη συσκευή ηλεκτροφόρησης της SSCP. Στη συνέχεια τοποθετούμε τα ειδικά «χτενάκια» που θα δημιουργήσουν τα πηγαδάκια της ηλεκτροφόρησης. Ακόμη, είναι σημαντικό να αναφερθεί πως, το gel δεν περιέχει κανέναν αποδιατακτικό παράγοντα, καθώς επιθυμούμε τον διαχωρισμό των δύο κλώνων του DNA βάση της μοναδικής διαμόρφωσης που θα αποκτήσουν εξαιτίας της νουκλεοτιδικής τους αλληλουχίας. Η σταθεροποίηση του gel ολοκληρώνεται σε μισή περίπου ώρα και πλέον είμαστε έτοιμοι για το φόρτωμα των δειγμάτων στο gel, αφού πρώτα ακολουθήσουμε μια ειδική διαδικασία προετοιμασίας για το DNA των PCR products, κατά την οποία αποδιατάσσουμε τους κλώνους του DNA ώστε να τρέξουν με μονόκλωνη μορφή στο gel πολυακρυλαμιδίου.

Πρωτόκολλο προετοιμασίας και αποδιάταξης του δίκλωνου DNA των PCR products

Παίρνουμε eppendorf χωρητικότητας 1,5ml και προσθέτουμε 5μl PCR product, στην περίπτωση που οι ζώνες της ηλεκτροφόρησης στο gel αγαρόζης είναι αχνές προσθέτουμε 7μl PCR product, και 10μl αποδιατακτικού διαλύματος (Denaturing Buffer)¹⁸. Έπειτα τα τοποθετούμε σε ένα θερμοκυκλοποιητή στους 95° C και στους 97°C για 2 λεπτά έκαστος και στους 99°C για 7 λεπτά. Ενάμισι λεπτό πριν την ολοκλήρωση του τελευταίου σταδίου, βγάζουμε τα δείγματα και τα τοποθετούμε στον πάγο, ώστε να αποφευχθεί η επαναδιάταξη

¹⁷Όταν το υπερθειικό αμμώνιο (APS) διαλύεται στο νερό παράγει ελεύθερες ρίζες, οι οποίες ενεργοποιούν τα μονομερή του ακρυλαμιδίου για να αντιδράσουν με άλλα μόρια ακρυλαμιδίου, ώστε να σχηματίσουν μακριές αλυσίδες, ξεκινώντας με αυτόν τον τρόπο τον πολυμερισμό του gel. Αυτές οι αλυσίδες συνδέονται με εγκάρσιο τρόπο με το Bis-ακρυλαμίδιο. Το TEMED ενεργεί ως καταλύτης για το σχηματισμό του gel εξαιτίας της ικανότητάς του να υφίσταται σε μορφή ελεύθερης ρίζας. Το ακρυλαμίδιο και το Bis-ακρυλαμίδιο χρησιμοποιούνται σε αναλογία 49:1. Αυτό 49:1 ακρυλαμίδιο-δισακρυλαμίδιο διάλυμα διαλύεται πλήρως χρησιμοποιώντας ένα μαγνητάκι και μια μαγνητική πλάκα (<http://www.protocol-online.org/prot/Protocols/Single-Strand-Conformation-Polymorphism--SSCP--Analysis-by-Nondenaturing-PAGE-3468.html>).

¹⁸Το αποδιατακτικό διάλυμα περιέχει φορμαμίδιο, EDTA, NaOH, και τις χρωστικές κυανού του ξυλενίου και μπλε της βρωμοφαινόλης, οι οποίες μας βοηθούν κατά το φόρτωμα των δειγμάτων στο gel και καθορίζουν επίσης το μέτωπο της ηλεκτροφόρησης.

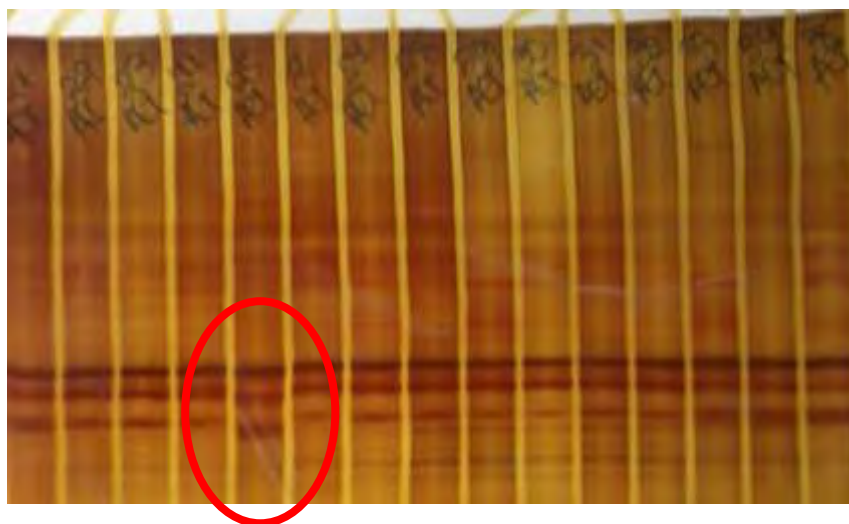
των δύο μονόκλωνων αλυσίδων του DNA. Έπειτα, γεμίζουμε την συσκευή της ηλεκτροφόρησης με ρυθμιστικό διάλυμα TBE 0,5X, το οποίο θα παρέχει τα κατάλληλα ιόντα για την πραγματοποίηση της ηλεκτροφόρησης, και φορτώνουμε τα δείγματα στο gel. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται για 19-22 ώρες στα 220Volt και στους 4°C.

3.3.3 Η χρώση του πήκτωματος του πολυακρυλαμιδίου

Η παρατήρηση των ζωνών στο gel πολυακρυλαμιδίου μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης τους δεν είναι δυνατή. Για τον λόγο αυτό, ακολουθούμε ένα ειδικό πρωτόκολλο βαφής του gel ώστε να εμφανιστούν οι ζώνες και να μπορέσουμε ύστερα να πραγματοποιήσουμε τις όποιες συγκρίσεις μεταξύ τους. Η βαφή που χρησιμοποιούμε για την εμφάνιση των ζωνών στο gel ονομάζεται νιτρικός άργυρος (*silver staining, AgNO₃*). Η όλη διαδικασία πραγματοποιείται με την χρήση τριών διαλυμάτων, η οποία μαζί με τα συστατικά τους αναγράφονται παρακάτω.

Αρχικά, τοποθετούμε τα gel σε ειδικά δοχεία βαφής και πάνω σε συσκευή ανάδευσης. Έπειτα, ετοιμάζουμε το **πρώτο διάλυμα**, που αποτελείται από 800ml απεσταγμένο νερό, 20ml αιθανόλη 100% και 1ml οξικό οξύ (CH_3COOH), και από το οποίο προσθέτουμε 200ml σε κάθε ένα gel. Αφήνουμε τα gel να ανακινηθούν για 3 λεπτά και έπειτα, απομακρύνουμε το διάλυμα, με απλή απόχυση. Εισάγουμε εκ νέου στα gel από 200ml του διαλύματος 1 και τα αφήνουμε να αναδευτούν και πάλι για 3 λεπτά. Στη συνέχεια, απομακρύνουμε το διάλυμα, αποχύνοντάς το, και ξεπλένουμε μία φορά τα gel με απεσταγμένο νερό. Με την ολοκλήρωση του σταδίου αυτού, και με την προσθήκη του διαλύματος 1, εξασφαλίζουμε την καθήλωση του DNA στο gel και την ταυτόχρονη απομάκρυνση, με την πλύση με απεσταγμένο νερό, όποιων «βρωμιών-σκουπιδιών» υπάρχουν στα δύο gel. Έπειτα, προσθέτουμε στα δύο gel από 200ml του **διαλύματος 2**, το οποίο αποτελείται από 400ml νιτρικό άργυρο, και τα αφήνουμε να αναδευτούν για 20 λεπτά. Απομακρύνουμε το διάλυμα 2 και πραγματοποιούμε 2 διαδοχικές πλύσεις των gel μας με απεσταγμένο νερό. Παράλληλα, ετοιμάζουμε το **τρίτο διάλυμα**, το οποίο αποτελείται από 6gr NaOH, 0,02gr NaBH₄, 2ml φορμαλδεΐδη ($HCHO$) και συμπλήρωση με νερό έως τα 400ml του ποτηριού ζέσεως, και το αποχύνουμε εξ ημισείας στα δύο gel μας, αφήνοντας τα να αναδευτούν μέχρι την εμφάνιση των ζωνών, για χρόνο περίπου 10-15 λεπτών (Το πρωτόκολλο που μόλις αναφέρθηκε προορίζεται για την **βαφή δύο gel πολυακρυλαμιδίου**).

Πλέον, οι ζώνες έχουν εμφανιστεί στα gel και είμαστε έτοιμοι να παρατηρήσουμε τα πρότυπα της ηλεκτροφόρησης τους(Εικόνα 18.).



Εικόνα18.

Ηλεκτροφόρηση 15 δειγμάτων σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου 10%, σε θερμοκρασία 4°C, 220Votl και χρονική διάρκεια 20 ωρών μετά από χρώση με νιτρικό άργυρο. Είναι εμφανής ο διαχωρισμός δύο διαφορετικών προτύπων ζωνών, όπου το ένα, και διαφορετικό πρότυπο, σημειώνεται με κόκκινο κύκλο, στην διαδρομή 5 του gel.

Έπειτα, επιλέγονται τα PCR προϊόντα που δίνουν διαφορετικά πρότυπα ζωνών στο gel πολυακρυλαμιδίου και καθαρίζονται, με την βοήθεια kit, ακολουθώντας το σχετικό πρωτόκολλο καθαρισμού PCR προϊόντων της προμηθεύτριας εταιρίας, και στέλνονται για αλληλούχιση. Μαζί με τα PCR προϊόντα αποστέλλεται επίσης, κάποια ποσότητα και από τους δύο εκκινητές, Fw και Rv, και μία μικρή ποσότητα της Taq πολυμεράσης. Πιο συγκεκριμένα, εάν έχουμε εντοπίσει διαφορετικά πρότυπα ζωνών για το γονίδιο tRNA^{Asn} σε δύο PCR product, στέλνουμε για αλληλούχιση τα δύο αυτά δείγματα και σε δύο διαφορετικά tube εισάγω 4μl από τον κάθε ένα εκκινητή, Fw και Rv του γονιδίου tRNA^{Asn}, και 16μl απεσταγμένο νερό.

3.4 Η μέθοδος της αλληλούχισης

Πριν από 40 περίπου χρόνια, το 1977, ο Βρετανός Βιοχημικός Frederick Sanger, ενδιαφερόταν να μάθει την πρωτεϊνική αλληλουχία της ινσουλίνης, βασιζόμενος όμως στην νουκλεοτιδική αλληλουχία του γονιδίου της. Έτσι, ανέπτυξε μια in vitro μέθοδο προσδιορισμού της ακολουθίας του γονιδίου αυτού. Επρόκειτο για την μέθοδο αλληλούχισης DNA που βασιζόταν στο τερματισμού της νουκλεοτιδικής αλυσίδας (*chain termination sequencing method*) ή, όπως είναι γνωστή, τη διδέοξυ-μέθοδο, της οποίας οι βασικοί βιοχημικοί πυλώνες χρησιμοποιούνται ακόμη και σήμερα. Μάλιστα, οι νουκλεοτιδικές αλληλουχίες των PCR products που στείλαμε για αλληλούχιση, προσδιορίστηκαν με βάση αυτήν την μέθοδο. Μοιάζει πάρα πολύ με την μέθοδο αντιγραφής του DNA που χρησιμοποιεί το κύτταρο και συνεπώς, με την αντίδραση PCR που χρησιμοποιούμε εργαστηριακά. Πρόκειται επομένως, για μια ενζυμική μέθοδο αλληλούχισης.

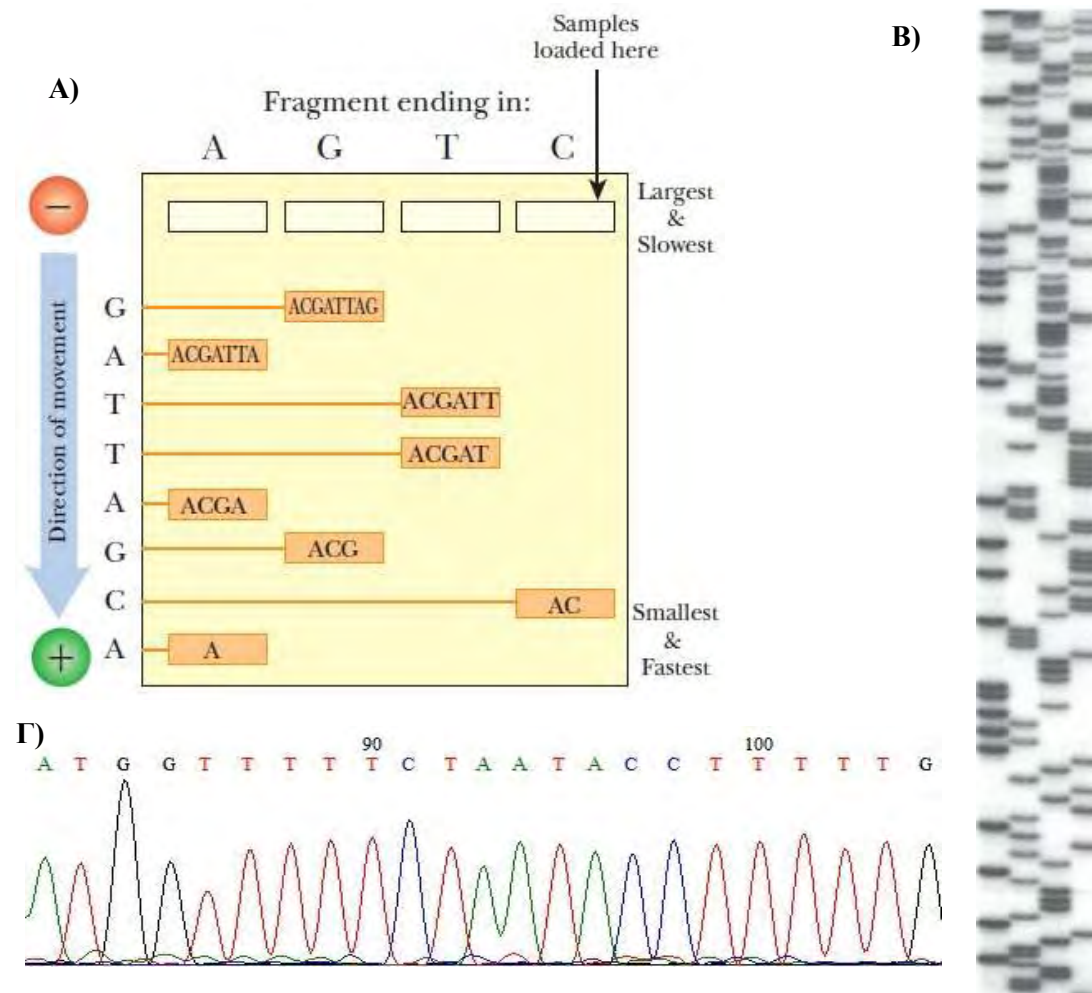
Η μέθοδος τερματισμού της νουκλεοτιδικής αλυσίδας απαιτεί την παρουσία ενός μονόκλωνου DNA εκμαγείου, κατάλληλων εκκινητών, DNA πολυμεράσης και διδεδοξυνουκλεοτιδίων (*ddNTPs*).

Ο ρόλος της DNA πολυμεράσης κατά την διάρκεια της αλληλούχισης είναι η σύνθεση πολλών αντιγράφων του DNA εκμαγείου, σχηματίζοντας φωσφοδιεστερικούς δεσμούς μεταξύ της 5'-φωσφορικής ομάδας του επόμενου και της 3'-υδροξυλομάδας του προηγούμενου δεοξυριβονουκλεοτιδίου. Εάν η υδροξυλομάδα αυτή απουσιάζει από το προηγούμενο δεοξυριβονουκλεοτίδιο, τότε η DNA πολυμεράση δεν μπορεί να προσθέσει νουκλεοτίδιο, δεν μπορεί να σχηματίσει τον 3'-5' φωσφοδιεστερικό δεσμό, μεταξύ του επόμενου και του προηγούμενου δεοξυριβονουκλεοτιδίου και συνεπώς, σταματάει την σύνθεση του νέου DNA κλώνου σε αυτό ακριβώς το σημείο. Τα διδεδοξυνουκλεοτίδια, είναι νουκλεοτίδια τα οποία έχουν στον 3' άνθρακα, αντί για υδροξυλομάδα, ένα υδρογόνο, καθιστώντας την δημιουργία του παραπάνω φωσφοδιεστερικού δεσμού αδύνατη. Εάν τώρα σε μια αντίδραση αλληλούχισης εισάγουμε ένα διδεδοξυνουκλεοτίδιο, παραδείγματος χάριν μια διδεδοξυ-γουανίνη (*ddGTP*), η αλληλουχία του νεοσυντιθέμενου DNA κλώνου θα σταματάει κάθε φορά που η DNA πολυμεράση επιχειρεί να εισάγει γουανίνη. Μέσα στην αντίδραση αλληλούχισης εισάγουμε επίσης και *ddNTPs* και *dNTPs* με την συγκέντρωση των τελευταίων να είναι αρκετά μεγαλύτερη σε σχέση με αυτή των πρώτων. Ένα σε μία αντίδραση εισάγουμε και τα 4 *ddNTPs*, τα τμήματα του DNA που θα συντεθούν θα διαφέρουν σε μέγεθος κατά ένα ζεύγος βάσεων. Αν τα τρέξω σε gel ηλεκτροφόρησης, και γνωρίζω το τελευταίο νουκλεοτίδιο που αντιστοιχεί σε κάθε ζώνη τότε θα μπορώ να διαβάσω την αλληλουχία του DNA τμήματος, από το κάτω μέρος του gel προς το πάνω. Ένας τρόπος σήμανσης των *ddNTPs*, όπως και ξεκίνησε αρχικά ήταν με ραδιενεργό ³²P, το οποίο και εντοπιζόταν στο τέλος κάθε τμήματος DNA. Λόγω της επικινδυνότητας της ραδιενεργούς

Ο Frederick Sanger γεννήθηκε στις 13 Αυγούστου του 1918, στο χωριό Rendcomb της Αγγλίας και αποτελεί το μόνο άτομο που τιμήθηκε μέχρι σήμερα δύο φορές με το βραβείο Nobel Χημείας.

ακτινοβολίας, ο ραδιενεργός φώσφορος αντικαταστήθηκε από μοναδικές για κάθε νουκλεοτίδιο φθορίζουσες χρωστικές.

Φανταστείτε λοιπόν να πραγματοποιούνται ταυτόχρονα 4 διαφορετικές αντιδράσεις, του ίδιου τμήματος DNA που στείλαμε για αλληλούχιση, όπου κάθε μια να περιλαμβάνει ένα εκ των τεσσάρων ddNTPs σημασμένο με διαφορετική όμως φθορίζουσα χρωστική, η οποία θα διεγείρεται, όταν οι αντιδράσεις τρέχουν σε τέσσερις διαφορετικές διαδρομές σε gel ηλεκτροφόρησης (η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε τριχοειδή σωληνάκια σε συσκευή αλληλούχισης), μία για κάθε ένα ddNTP, από ειδικές ακτίνες λέιζερ και θα φθορίζει, και ένας ανιχνευτής θα συλλέγει τις πληροφορίες και θα τις στέλνει, στον συνδεδεμένο με τη συσκευή αλληλούχισης, υπολογιστή (Εικόνα 19.). Θα μπορούμε συνεπώς, με αυτόν τον τρόπο να αποκτήσουμε την αλληλουχία του τμήματος DNA που στείλαμε για αλληλούχιση. Η επεξεργασία των αλληλουχιών πραγματοποιείται στην συνέχεια με το πρόγραμμα BIOEDIT. Επεξεργαζόμαστε τις αλληλουχίες που προκύπτουν από τους δύο εκκινητές για κάθε ένα PCR product και με την ενιαία αλληλουχία του γονιδίου πηγαίνουμε στο διαδικτυακό τόπο <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, όπου αναζητά μια παρόμοια αλληλουχία σε διάφορες Βάσεις Δεδομένων, ώστε να «στοιχηθεί» μαζί της, για να εντοπίσουμε τις διαφορές.



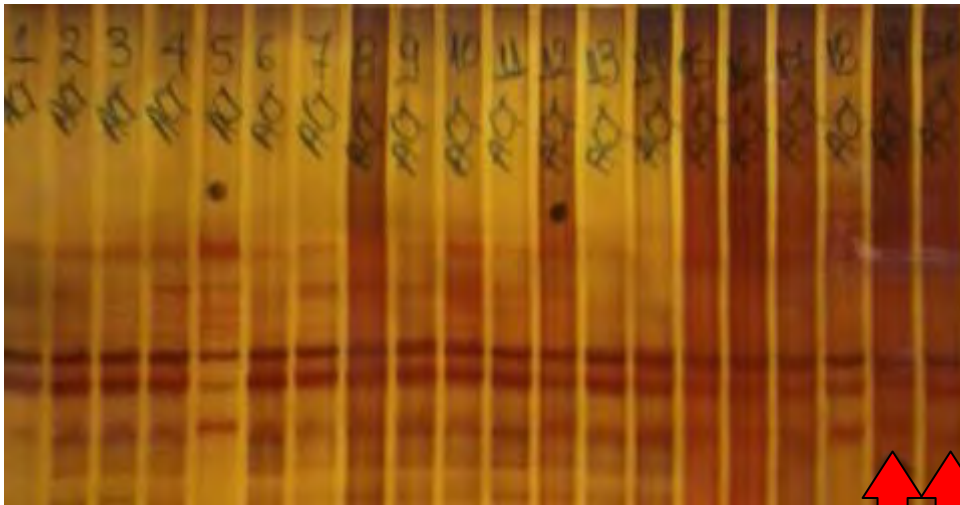
Εικόνα 19. Α) Η απεικόνιση της μεθόδου αλληλούχισης κατά Sanger κατά την οποία, η DNA πολυμεράση συνθέτει πολλούς διαφορετικούς κλώνους από ένα μονόκλωνο DNA εκμαγείο. Το ένζυμο θα σταματά σε κάθε ddNTP, έτσι θα προκύπτουν διαφόρου μήκους αλληλουχίες οι οποίες θα διαχωρίζονται με ηλεκτροφόρηση. Τα τμήματα που εντοπίζονται στο κάτω μέρος του gel αντιπροσωπεύουν την αλληλουχία του εκκινητή στην οποία έχει προστεθεί ένα ddNTP. Όσο ανεβαίνουμε στο gel τόσο αποκτούμε και παραπάνω πληροφορίες για την αλληλουχία του τμήματος DNA που στείλαμε για αλληλούχιση. Β) Η απεικόνιση ενός gel ηλεκτροφόρησης βασισμένο στη μέθοδο αλληλούχισης κατά Sanger με πορεία ηλεκτροφόρησης από πάνω προς τα κάτω (Βιβλίο *Biotechnology: Academic Cell, David P. Clark, Nanette J. Pazdernik*). Γ) Το σήμα του φθορισμού καταγράφεται στον υπολογιστή με τον τρόπο που απεικονίζεται στο σχήμα. Σε κάθε μια νουκλεοτιδική βάση αντιστοιχεί και μια διαφορετική χρωστική, π.χ. στην αδενίνη αντιστοιχεί η πράσινη, και όποτε ο ανιχνευτής συναντά μια χρωστική που φθορίζει στο πράσινο χρώμα, σημαίνει πως στην θέση εκείνη στην νουκλεοτιδική βρίσκεται μια αδενίνη. Ο οριζόντιος άξονας αντιπροσωπεύει το χρόνο από την έναρξη της αλληλούχισης και ο κάθετος άξονας την ένταση των σημάτων των νουκλεοτιδίων.

4. Αποτελέσματα

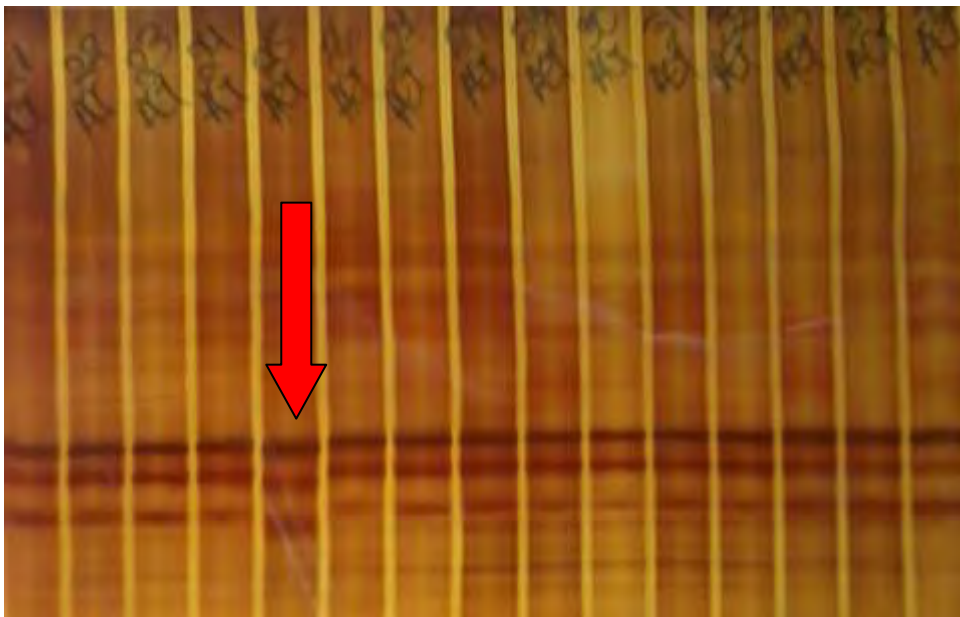
Η παρούσα εργασία αφορά την μελέτη γονιδίων tRNA μόνο σε άτομα που πάσχουν από τη νόσο του Alzheimer. Συνολικά, μελετήθηκαν 50 ασθενείς με Alzheimer και βρέθηκαν, συνολικά, 5 μεταλλάξεις, εκ των οποίων, η *T7547C* εντοπίστηκε στο tRNA^{Asp}, οι *C5839T* και *ins5827C* στο tRNA^{Tyr}, η *A5823G* στο tRNA^{Cys} και η *del5674A* στο tRNA^{Asn}.

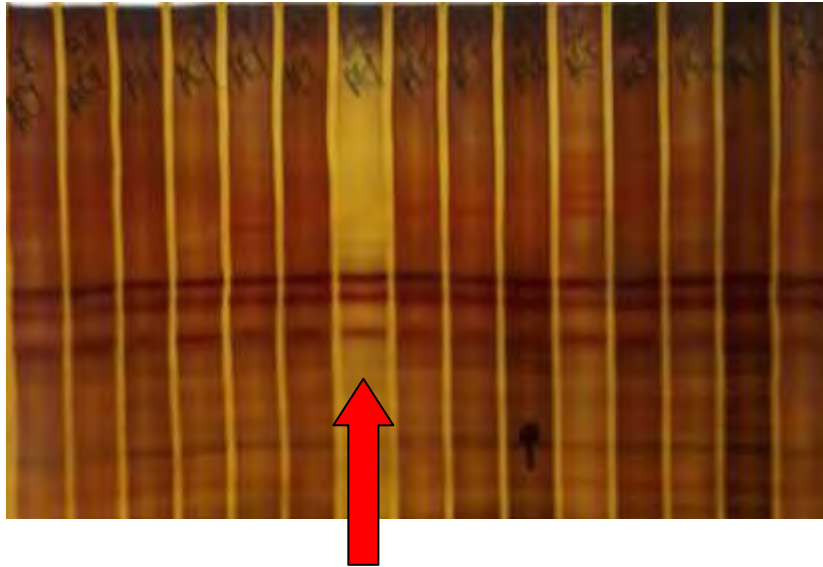
Στη συνέχεια, παρατίθενται φωτογραφίες των προτύπων των ζωνών των αντίστοιχων ενισχυμένων γονιδίων tRNA των ατόμων που έφεραν τις μεταλλάξεις(επισημαίνονται με **κόκκινα βέλη**) τα οποία ηλεκτροφορήθηκαν σε gel πολυακρυλαμιδίου 10%, αλλά και τα σημεία των μεταλλάξεων πάνω στα αντίστοιχα μόρια tRNA(επισημαίνονται με **μπλε χρώμα**).

Τα διαφορετικά πρότυπα ηλεκτροφόρησης των tRNA^{Tyr} στα άτομα που φέρουν τις μεταλλάξεις *T5839C* & *ins5827C* αντίστοιχα, “διαβάζοντας” το gel από αριστερά προς τα δεξιά.

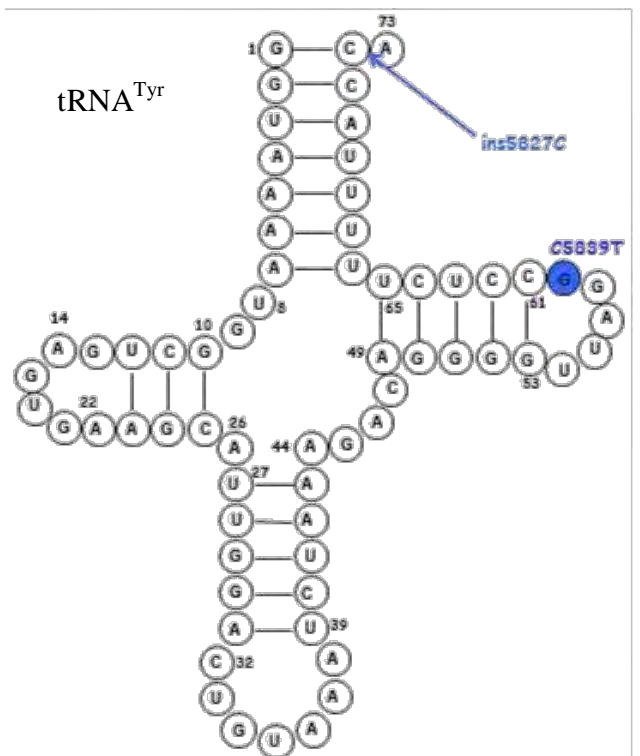
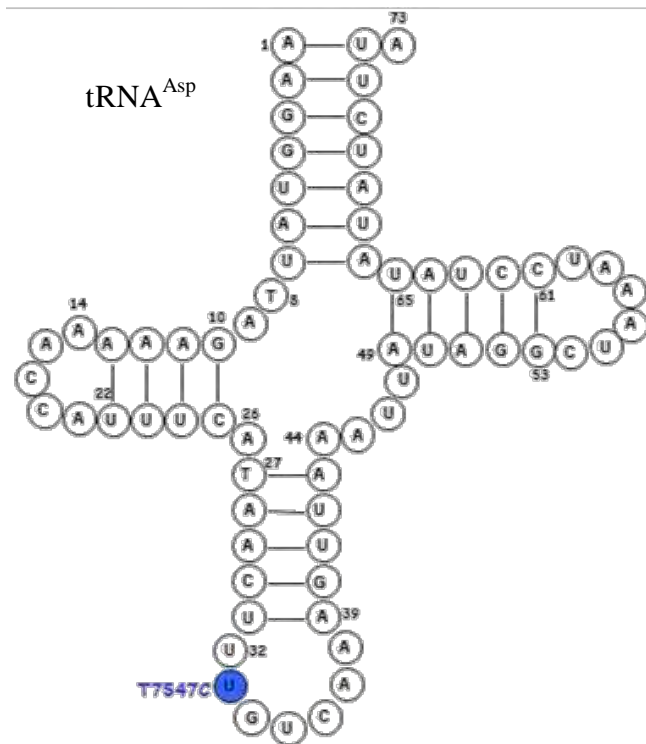


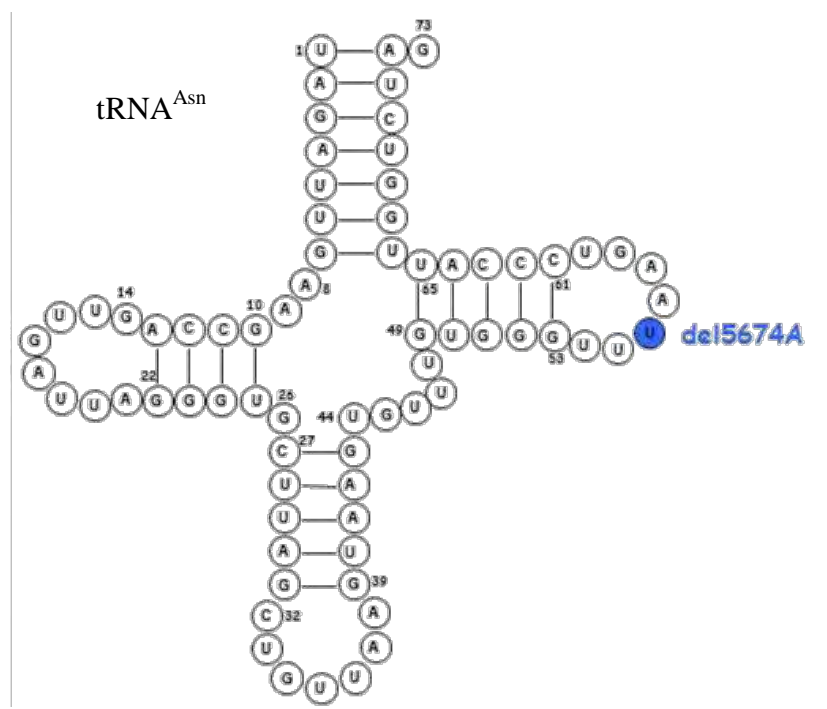
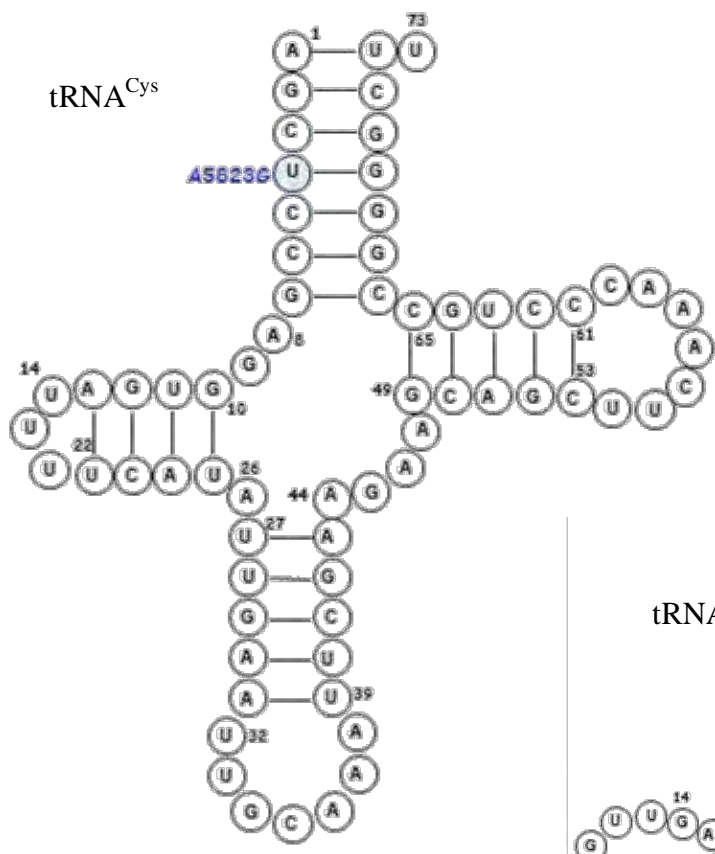
Το διαφορετικό πρότυπο ηλεκτροφόρησης του γονιδίου παραγωγής του tRNA^{Cys} του ατόμου που φέρει την *A5823G* μετάλλαξη, αποκτά και διαφορετική ηλεκτροφορητική ικανότητα στο gel της αλληλουχίας, σε σύγκριση με τα υπόλοιπα πρότυπα των ατόμων ελέγχου, όπως εικονίζονται στο gel.





Το διαφορετικό πρότυπο ηλεκτροφόρησης του ατόμου που φέρει την *de15674A* μετάλλαξη στο *tRNA^{Asp}*.





Τα διαφορετικά πρότυπα ζωνών της ηλεκτροφόρησης των γονιδίων των tRNA μας οδήγησαν στο να επιλέξουμε και να στείλουμε τις DNA αλληλουχίες τους για αλληλούχιση, καθώς η ύπαρξη διαφορετικής αλληλουχίας προσδίδει διαφορετική διαμόρφωση στα μόρια του DNA, τα οποία και αποκτούν, το καθένα ξεχωριστά, διαφορετική και μοναδική ηλεκτροφορητική ικανότητα στο gel ηλεκτροφόρησης, όπως εικονίζεται παραπάνω.

5. Συζήτηση

Η νόσος του *Alzheimer* (*Alzheimer Disease, AD*) αποτελεί μια προοδευτική, μη αναστρέψιμη νευροεκφυλιστική και πολυπαραγοντική ασθένεια του εγκεφάλου, η οποία εμφανίζεται κυρίως στα άτομα τρίτης ηλικίας, και πλήττει κυρίως τους *χολινεργικούς νευρώνες* σε διάφορες περιοχές του εγκεφάλου όπως είναι ο φλοιός, η αμυγδαλή, ο ιππόκαμπος, τα κέντρα ομιλίας, κίνησης, προσανατολισμού και μνήμης, με αποτέλεσμα, την εμφάνιση κλινικών συμπτωμάτων στους ασθενείς, μερικά από τα οποία σχετίζονται με την απώλεια μνήμης, τη δυσκολία στο λόγο, τη σκέψη, και την κίνηση και, την αύξηση του μεγέθους των αυλάκων του εγκεφάλου, την ατροφία του φλοιού, του ιππόκαμπου και τη μεγέθυνση της αμυγδαλής. Πρόκειται για μια πολυπαραγοντική νόσο που εμπλέκει στην εμφάνισή της τόσο γενετικούς, όσο και περιβαλλοντικούς παράγοντες, καθιστώντας την αλληλεπίδραση αυτή ικανή, ώστε να προκαλέσει την εμφάνιση και την εγκαθίδρυση της νόσου.

Κατά την διάρκεια των τελευταίων χρόνων, εξαιτίας των διάφορων κυτταρολογικών ιδιομορφιών που εμφάνιζαν τα νευρικά κύτταρα (*νευροϊνδιακοί σωροί, αμυλοειδείς πλάκες*), αλλά και των ποικίλων μορφολογικών και λειτουργικών διαφορών που παρουσίαζαν τα μιτοχόνδρια των ασθενών που νοσούσαν από *Alzheimer*, πραγματοποιήθηκαν αρκετές μελέτες, που στόχο τους είχαν την ανάλυση των γονιδίων των μιτοχονδρίων των ασθενών, σε μια προσπάθεια συσχέτισής τους με τα διάφορα κλινικά χαρακτηριστικά της νόσου και την εμφάνισή της.

Τα μιτοχόνδρια, αρχικά, θεωρήθηκαν υπεύθυνα για την παραγωγή ενέργειας στο κύτταρο, στη συνέχεια όμως, ανακαλύφθηκε μια σειρά από «*δευτεροταγείς*» ρόλους του οργανιδίου αυτού, μεταξύ των οποίων συγκαταλέγονται, ο κυτταρικός θάνατος, η ρύθμιση και η διατήρησης της ομοιόστασης του ενδοκυτταρικού ασβεστίου (Ca^{2+}), αλλά και μια τέταρτη ενέργεια που αφορά τη δημιουργία ελευθέρων ριζών (ROS).

Το μιτοχόνδριο περιβάλλεται από δύο μεμβράνες, την εξωτερική και την εσωτερική που έχουν ως αποτέλεσμα τη δημιουργία δύο διαμερισμάτων στο μιτοχόνδριο, του διαμεμβρανικού χώρου και της μήτρας. Στη μήτρα του μιτοχονδρίου βρίσκονται αρκετά αντίγραφα ενός δίκλωνου, υπερελικωμένου και κυκλικού μορίου DNA (mtDNA). Έτσι, το μιτοχόνδριο διαθέτει δικό του γένωμα. Ακόμη, αναφέρονται ως ημιαυτόνομα οργανίδια, καθώς μπορούν να αντιγράψουν, να μεταγράψουν και να μεταφράζουν το γενετικό τους υλικό ανεξάρτητα από το πυρηνικό καθ' όλη την διάρκεια του κυτταρικού κύκλου, αλλά από την άλλη μεριά, δεν μπορούν να συνθέσουν σημαντικές πρωτεΐνες που είναι απαραίτητες για την κάλυψη τόσο των λειτουργικών όσο και των δομικών τους αναγκών. Το mtDNA στον άνθρωπό έχει μέγεθος 16.569kb και περιέχει συνολικά 37 γονίδια. 13 από αυτά κωδικοποιούν υπομονάδες της αναπνευστικής αλυσίδας, εκ των οποίων, 7 του συμπλόκου I (*ND1, -2, -3, -4, -4L, -5 και -6*), 1 του συμπλόκου III, 3 του συμπλόκου IV (*COXI, COXII, COXIII*) και 2 του συμπλόκου V (*ATPase6 και ATPase8*), 2 ακόμη, κωδικοποιούν για τα rRNA, 16S και 12S, και τέλος 22 για τα tRNA. Επίσης, φέρουν μια περιοχή πλούσια σε Αδενίνες (A) και Θυμίνες (T), η οποία αποτελεί το σημείο έναρξης της αντιγραφής του mtDNA και ονομάζεται D-loop (*Βρόγχος D*).

Παρά το γεγονός ότι τα γονίδια των tRNA αποτελούν μόνο το 10% του μιτοχονδριακού DNA, έχει βρεθεί πως περισσότερες από τις μισές παθογόνες μεταλλάξεις που ευθύνονται για την εμφάνιση των μιτοχονδριακών ασθενειών ανιχνεύονται σε αυτά, οι οποίες και μπορούν

να εντοπιστούν είτε στην περιοχή του 3'-άκρου, είτε στην περιοχή του αντικωδικονίου του tRNA δημιουργώντας έτσι προβλήματα στην πρωτεϊνοσύνθεση, είτε ακόμη και στα υπόλοιπα νουκλεοτίδια του μορίου, διαταράσσοντας την τρισδιάστατη δομή του και καθιστώντας το μη λειτουργικό, γεγονότα που όπως και να έχει μπορούν να οδηγήσουν στην εμφάνιση κλινικών συμπτωμάτων. Από την άλλη μεριά, μπορεί να συμβούν και σημειακές ουδέτερες πολυμορφικές μεταλλάξεις οι οποίες όμως δεν θα διαταράξουν τη δομή και τη λειτουργικότητα του μορίου tRNA. Συνολικά, έχουν εντοπιστεί 243 πολυμορφικές και 139 παθογόνες μεταλλάξεις σε γονίδια παραγωγής των tRNA(Πίνακας 1.).

Για τους λόγους αυτούς, η συγκεκριμένη εργασία διακυβεύεται την ανίχνευση και την ταυτοποίηση των μεταλλάξεων που εντοπίζονται σε μιτοχονδριακά γονίδια παραγωγής tRNA, και συγκεκριμένα των tRNA^{Asn}, tRNA^{Cys}, tRNA^{Tyr}, tRNA^{Ser(UCN)} και tRNA^{Asp} γονιδίων. Εξετάστηκαν συνολικά, 50 δείγματα DNA, από ολικό αίμα ασθενών με Alzheimer, στα οποία με τη βοήθεια των τεχνικών της PCR, SSCP και της αλληλούχισης, εντοπίσαμε τις ακόλουθες μεταλλάξεις.

Συνολικά λοιπόν βρέθηκαν 5 μεταλλάξεις, εκ των οποίων, η T7547C εντοπίστηκε στο tRNA^{Asp}, οι C5839T και ins5827C στο tRNA^{Tyr}, η A5823G στο tRNA^{Cys} και η del5674A στο tRNA^{Asn}.

Οι μεταλλάξεις ins5827C, del5674A που εντοπίσαμε στον βραχίονα του γονιδίου του tRNA^{Tyr} και tRNA^{Asn} αντίστοιχα, δεν αναφέρονται στην βιβλιογραφία σε άτομα που νοσούν είτε από Alzheimer είτε από οποιαδήποτε άλλη ασθένεια. Στη νουκλεοτιδική θέση του tRNA που σημειώνεται η δεύτερη μετάλλαξη, εντοπίζεται η μεταλλαγή A5674G, σύμφωνα με τους Opdal, S. H et al., 2007).

Η μετάλλαξη C5839T, που εντοπίζεται επίσης στον βραχίονα του tRNA^{Tyr}, και η μετάλλαξη A5823G, που εντοπίζεται και αυτή σε αρχικό τμήμα του βραχίονα του tRNA^{Cys}, δεν έχουν συσχετιστεί με το AD ή με οποιαδήποτε άλλη ασθένεια. Στα σημεία όμως των μεταλλάξεων αυτών έχουν αναφερθεί οι αντίστοιχες μεταλλάξεις G5839A & T5823C, οι οποίες παρόλα αυτά δεν έχουν επίσης συσχετιστεί ούτε με το AD αλλά ούτε και με καμία ασθένεια (Achilli et al., 2004 και Phasukkijwatana et al., 2006 αντίστοιχα). Η μετάλλαξη T7547C ένα μόλις νουκλεοτίδιο πριν το αντικωδικόνιο του tRNA^{Asp} έχει αναφερθεί στην βιβλιογραφία, αλλά δεν έχει συσχετιστεί ούτε με το AD ούτε με καμία άλλη ασθένεια. Αξιοσημείωτη αποτελεί η παρατήρηση πως ένα άτομο εμφανίζει δύο μεταλλάξεις σε δύο διαφορετικά γονίδια παραγωγής tRNA, αυτά της Ασπαραγίνης (Asn) και της Κυστεΐνης (Cys) με τις αντίστοιχες μεταλλάξεις T7547C και A5823G. Όλες οι παραπάνω μεταλλάξεις εμφανίζονται με ποσοστό 2% στους ασθενείς με Alzheimer(1/50) και είναι ικανές να μεταβάλλουν τη δομή των αντίστοιχων μορίων tRNA επιφέροντας προβλήματα στη λειτουργικότητα τους.

Σε ένα δείγμα 204 φυσιολογικών ατόμων που μελετήθηκαν στο εργαστήριό μας, εντοπίστηκε μόνο η μετάλλαξη C5839T στο tRNA^{Tyr} με συχνότητα εμφάνισης 0,49% (1/204 άτομα). Η μετάλλαξη αυτή αναφέρεται ως πολυμορφική στην απλοομάδα H5a σε συχνότητα 100%. Η ίδια μετάλλαξη εντοπίζεται σε τετραπλάσιο περίπου ποσοστό, 2%, στους ασθενείς, χωρίς όμως να μεταβάλλει τη δομή και τη λειτουργικότητα του μορίου, εφόσον πρόκειται για πολυμορφική μετάλλαξη. Η μετάλλαξη T7547C δεν εμφανίζεται στα φυσιολογικά άτομα του εργαστηρίου παρά μόνο στο 2% των ασθενών ατόμων. Η μετάλλαξη αυτή όμως είναι πολυμορφική, στην απλοομάδα R1a (συχνότητα εμφάνισης 100%) και δεν μεταβάλλει την

δομή και συνεπώς την λειτουργικότητα του μορίου. Η μετάλλαξη A5823G είναι πολυμορφική και αναφέρεται στις απλοομάδες R1 και R1a σε ποσοστό 100%, ενώ στην απλοομάδα L2c αναφέρεται σε ποσοστό 8,62, ένα σχετικά χαμηλό ποσοστό το οποίο γεννάει εύλογα ερωτήματα για την συμμετοχή της μετάλλαξης στην εξέλιξη της νόσου του Alzheimer.

Ακόμη, καμία από τις παραπάνω υπόλοιπες μεταλλάξεις, *ins5827C*, *del5674A*, δεν εντοπίζεται στα 204 φυσιολογικά άτομα που μελετήθηκαν από το εργαστήριο, παρά μόνο στους ασθενείς σε ποσοστό 2%. Πιο συγκεκριμένα, οι *ins5827C*, *del5674A* μεταλλάξεις μεταβάλλουν την μεταγραφή των tRNA μορίων στα οποία εντοπίζονται, μεταβάλλοντας τη δομή τους και καθιστώντας τα μη λειτουργικά, συνεπώς, ο εντοπισμός τους είναι αρκετά σημαντικός.

Το Alzheimer είναι μια πολυπαραγοντική νόσος και σε καμία περίπτωση μια μετάλλαξη σε ένα tRNA δεν μπορεί να προκαλέσει την νόσο. Απαιτείται πληθώρα μεταλλάξεων στο σύνολο των mtDNA ή πιο συγκεκριμένα στο σύνολο των tRNA γονιδίων ώστε το άτομο να έχει αυξημένες πιθανότητες για την εμφάνιση της νόσου, χωρίς αυτό να σημαίνει πως μεταλλάξεις σε αυτά τα γονίδια προκαλούν αποκλειστικά και μόνο την ανάπτυξη του Alzheimer και όχι κάποιας άλλης μιτοχονδριακής νόσου, αλλά συμβάλλουν στην προδιάθεση για την εμφάνισή του. Συμπερασματικά, η διεξαγωγή μιας μελέτη που να απευθύνεται σε ένα μεγαλύτερο δείγμα ατόμων, τόσο ατόμων που νοσούν από Alzheimer, όσο και ατόμων που συγκαταλέγονται στον γενικό πληθυσμό, τόσο για τα παραπάνω, όσο και για τα υπόλοιπα tRNA γονίδια, θα δώσει μια πιο ολοκληρωμένη εικόνα της συσχέτισής τους ή μη με την κληρονομικότητα της νόσου.

Βιβλιογραφία

Achilli, A., Rengo, C., Magri, C., Battaglia, V., Olivieri, A., Scozzari, R., Cruciani, F., Zeviani, M., Briem, E., Carelli, V., Moral, P., Dugoujon, J. M., Roostalu, U., Loogvali, E. L., Kivisild, T., Bandelt, H. J., Richards, M., Villems, R., Santachiara-Benerecetti, A. S., Semino, O., Torroni, A. (2004) The molecular dissection of mtDNA haplogroup H confirms that the Franco-Cantabrian glacial refuge was a major source for the European gene pool *American Journal of Human Genetics* . 75 (5): 910-918 .

Attardi G., Animal mitochondrial DNA: an extreme example of genetic economy, *Int Rev Cytol.* 1985;93:93-145.

B. Horwitz, C.L. Grady, N.L. Schlageter, R. Duara, S.I. Rapoport, Intercorrelations of regional cerebral glucose metabolic rates in Alzheimer's disease, *Brain Research Volume 407, Issue 2, 31 March 1987, Pages 294–306.*

Bick, J.-A., Aslund, F., Chen, Y. and Leustek, T. (1998). Glutaredoxin function for the carboxylterminal domain of the plant-type 5'-adenylylsulfate reductase. *Plant Biology.* 95: 8404-8409.

Blass JP, Brown AM. Lower activity of Krebs cycle enzymes than of electron transport in human brain: disease implications. *Neurobiol. Aging.* 2000;21 Suppl:81.

Boulares AH, Zoltoski AJ, Yakovlev A, Xu M, Smulson ME, Roles of DNA fragmentation factor and poly(ADP-ribose) polymerase in an amplification phase of tumor necrosis factor-induced apoptosis, *J Biol Chem.* 2001 Oct 12;276(41):38185-92. Epub 2001 Jul 18.

Clyde A. Hutchison III, John E. Newbold, S. Steven Potter & Marshall Hall Edgell, Maternal inheritance of mammalian mitochondrial DNA, *Nature* 251, 536 – 538 (11 October 1974); doi:10.1038/251536a0

Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Small GW, Roses AD, Haines JL, Pericak-Vance MA, Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families, *Science.* 1993 Aug 13;261(5123):921-3.

Donald R. Johns MD, Paternal transmission of mitochondrial DNA is (fortunately) rare, Article first published online: 24 SEP 2003 DOI: 10.1002/ana.10771, *Annals of Neurology* Volume 54, Issue 4, pages 422–424, October 2003

Egensperger R, Kösel S, Schnopp NM, Mehraein P, Graeber MB., Association of the mitochondrial tRNA(A4336G) mutation with Alzheimer's and Parkinson's diseases, *Neuropathol Appl Neurobiol.* 1997 Aug;23(4):315-21.

Eva-Maria Mandelkow and Eckhard Mandelkow, Tau Protein and Alzheimer's Disease, Max-Planck-Gesellschaft Research Institute, Structural and Molecular Biology, Narkestrasse 85, D-22603, Hamburg, Germany, *Neurobiology of Aging*, Vol. 15. Suppl. 2, pp. S85-S86, 1994 Copyright ~ 1994 Elsevier Science Ltd Printed in the USA. All rights reserved 0197-4580/94 \$6.00 + .00.

Farrer LA, Cupples LA, Haines JL, Hyman B, Kukull WA, Mayeux R, Myers RH, Pericak-Vance MA, Risch N, van Duijn CM, Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease. A meta-analysis. APOE and Alzheimer Disease Meta Analysis Consortium, *JAMA.* 1997 Oct 22-29;278(16):1349-56.

Fernando, R. M., Satake, M., Monnier, M. V. and Lou, I. M. (2004). Thioltransferase mediated ascorbate recycling in human lens epithelial cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 45: 230-237

- Gibson GE, Blass JP, Huang H-M, Freeman GB. The cellular basis of delirium and its relevance to age related disorders including Alzheimer's disease. *International Psychogeriatrics*. 1991;3(2):373–395.
- Gibson GE, Haroutunian V, Zhang H, Park LC, Shi Q, Lesser M, Mohs RC, Sheu RK, Blass JP. Mitochondrial damage in Alzheimer's disease varies with apolipoprotein E genotype. *Ann. Neurol.* 2000;48(3):297–303.
- Gibson GE, Sheu KF, Blass JP, Baker A, Carlson KC, Harding B, Perrino P. Reduced activities of thiamine-dependent enzymes in the brains and peripheral tissues of patients with Alzheimer's disease. *Arch. Neurol.* 1988;45(8):836–840.
- Gibson GE, Sheu KF, Blass JP. Abnormalities of mitochondrial enzymes in Alzheimer disease. *J. Neural. Transm.* 1998;105(8–9):855–870.
- Gibson GE, Karuppagounder SS, Shi Q. Oxidant-induced changes in mitochondria and calcium dynamics in the pathophysiology of Alzheimer's disease, *Ann N Y Acad Sci.* 2008 Dec;1147:221-32. doi: 10.1196/annals.1427.038.
- Grazina M, Pratas J, Silva F, Oliveira S, Santana I, Oliveira C. Genetic basis of Alzheimer's dementia: role of mtDNA mutations, *Genes Brain Behav.* 2006;5 Suppl 2:92-107.
- Grundke-Iqbal, K Iqbal, Y C Tung, M Quinlan, H M Wisniewski, and L I Binder, Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986 July; 83(13): 4913–4917.
- Gvakharia, O. B., Hanson, E., Koonin, K. E. and Mathews, K. C. (1996). Identification of a second functional glutaredoxin encoded by the bacteriophage T4 genome. *J. Biol. Chem.* 271:15307-15310.
- Halliwell, B. and Gutteridge, C. M. J. (1999). *Free Radicals In Biology and Medicine*. New York, Oxford University Press.
- Hirai K, Aliev G, Nunomura A, Fujioka H, Russell RL, Atwood CS, Johnson AB, Kress Y, Vinters HV, Tabaton M, Shimohama S, Cash AD, Siedlak SL, Harris PL, Jones PK, Petersen RB, Perry G, Smith MA, Mitochondrial abnormalities in Alzheimer's disease, *J Neurosci.* 2001 May 1;21(9):3017-23.
- Huynh ML, Fadok VA, Henson PM. 2002. Phosphatidylserine-dependent ingestion of apoptotic cells promotes TGF- β 1 secretion and the resolution of inflammation. *J. Clin. Invest.* 109:41–50
- Jukes TH, Osawa S., The genetic code in mitochondria and chloroplasts, *Experientia.* 1990 Dec 1;46(11-12):1117-26.
- Justin C St John and Gerald Schatten, Paternal mitochondrial DNA transmission during nonhuman primate nuclear transfer, *Genetics.* 2004 June; 167(2): 897–905. doi: 10.1534/genetics.103.025049
- Kenneth L. Rock and Hajime Kono, The Inflammatory Response to Cell Death, *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 2008. 3:99–126
- Kirichok Y, Krapivinsky G, Clapham D.E (2004) The mitochondrial calcium uniporter is a highly selective ion channel. *Nature* 427: 360-364
- Kish SJ, Bergeron C, Rajput A, Dozic S, Mastrogiacomo F, Chang LJ, Wilson JM, DiStefano LM, Nobrega JN, Brain cytochrome oxidase in Alzheimer's disease, *J Neurochem.* 1992 Aug;59(2):776-9.

Majno G, La Gattuta M, Thompson TE. 1960. Cellular death and necrosis: chemical, physical and morphologic changes in rat liver. *Virchows Arch. Pathol. Anat. Physiol. Klin. Med.* 333:421–65

Maxim Isabelle,¹ Xavier Moreel,¹ Jean-Philippe Gagné,^{1,2} Michèle Rouleau,¹ Chantal Ethier,¹ Pierre Gagné,¹ Michael J Hendzel,³ and Guy G Poirier, Investigation of PARP-1, PARP-2, and PARG interactomes by affinity-purification mass spectrometry, *Proteome Sci.* 2010; 8: 22, Published online 2010 April 13. doi: 10.1186/1477-5956-8-22.

Mutisya EM, Bowling AC, Beal MF, Cortical cytochrome oxidase activity is reduced in Alzheimer's disease, *J Neurochem.* 1994 Dec;63(6):2179-84.

Neal, R., Matthews, H. R., Lutz, P. and Ercal, N. (2003). Antioxidant role of N-acetyl cysteine isomers following high dose irradiation. *Free Radic. Biol. Med.* 34: 689-695.

Opdal, S. H., Vege, A., Arnestad, M., Musse, M. A., Rognum, T. O. (2007) Mitochondrial tRNA genes and flanking regions in sudden infant death syndrome *Acta Paediatr.* 96 (2): 211-214 .

Parker WD Jr, Boyson SJ, Parks JK, Abnormalities of the electron transport chain in idiopathic Parkinson's disease, *Ann Neurol.* 1989 Dec;26(6):719-23.

Paula I. Moreira, Akihiko Nunomura, Masao Nakamura, Atsushi Takeda, Justin C. Shenk, Gjurmakch Aliev, Mark A. Smith, George Perry, Nucleic acid oxidation in Alzheimer disease, *Free Radical Biology & Medicine* 44 (2008) 1493–1505.

Pericak-Vance MA, Bebout JL, Gaskell PC Jr, Yamaoka LH, Hung WY, Alberts MJ, Walker AP, Bartlett RJ, Haynes CA, Welsh KA, et al., Linkage studies in familial Alzheimer disease: evidence for chromosome 19 linkage, *Am J Hum Genet.* 1991 Jun;48(6):1034-50.

PH St George-Hyslop, RE Tanzi, RJ Polinsky, JL Haines, L Nee, PC Watkins, RH Myers, RG Feldman, D Pollen, D Drachman, et al. The genetic defect causing familial Alzheimer's disease maps on chromosome 21, *Science* 20 February 1987:Vol. 235 no. 4791 pp. 885-890 DOI: 10.1126/science.2880399

Phasukkijwatana, N., Chuenkongkaew, W. L., Suphavilai, R., Luangtrakool, K., Kunhapan, B., Lertrit, P. (2006) Transmission of heteroplasmic G11778A in extensive pedigrees of Thai Leber hereditary optic neuropathy *Journal of Human Genetics.* 51 (12): 1110-1117 .

Rudy Castellani, Keisuke Hirai, Gjurmakch Aliev, Kelly L. Drew, Akihiko Nunomura, Atsushi Takeda, Adam D. Cash, Mark E. Obrenovich, George Perry, and Mark A. Smith, Role of Mitochondrial Dysfunction in Alzheimer's Disease, *Journal of Neuroscience Research* 70:357–360 (2002).

S. Hoyer, K. Oesterreich, O. Wagner, Glucose metabolism as the site of the primary abnormality in early-onset dementia of Alzheimer type?, *Journal of Neurology* January 1988, Volume 235, Issue 3, pp 143-148.

Su JH, Deng G, Cotman CW, Bax protein expression is increased in Alzheimer's brain: correlations with DNA damage, Bcl-2 expression, and brain pathology, *J Neuropathol Exp Neurol.* 1997 Jan;56(1):86-93.

Su JH, Kessler JP, Head E, Cotman CW, Caspase-cleaved amyloid precursor protein and activated caspase-3 are co-localized in the granules of granulovacuolar degeneration in Alzheimer's disease and Down's syndrome brain, *Acta Neuropathol.* 2002 Jul;104(1):1-6. Epub 2002 May 9.

Taanman JW, The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication, *Biochim Biophys Acta*. 1999 Feb 9;1410(2):103-23.

Wang X, Su B, Fujioka H, Zhu X, Dynamin-like protein 1 reduction underlies mitochondrial morphology and distribution abnormalities in fibroblasts from sporadic Alzheimer's disease patients, *The American journal of pathology*. 2008 Aug;173(2):470-82.

Wragg MA, Talbot CJ, Morris JC, Lendon CL, Goate AM., No association found between Alzheimer's disease and a mitochondrial tRNA glutamine gene variant, *Neurosci Lett*. 1995 Dec 8;201(2):107-10.