

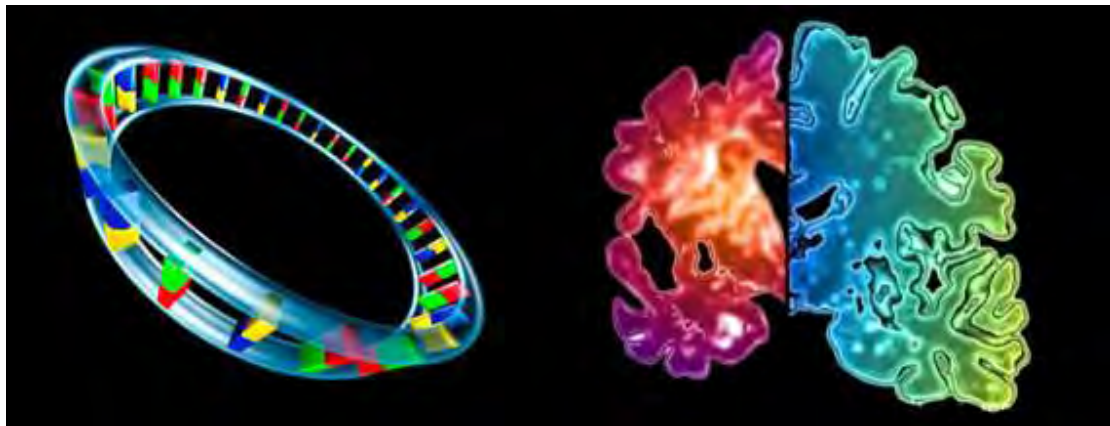


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ:

**ΜΕΛΕΤΗ ΚΑΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ ΣΕ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΑ ΓΟΝΙΔΙΑ  
ΣΕ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΟ ΠΛΗΘΥΣΜΟ ΚΑΙ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΤΗ ΝΟΣΟ  
ALZHEIMER**

**STUDY AND DETECTION OF MUTATIONS OF MITOCHONDRIAL GENES IN NORMAL  
POPULATION AND IN PATIENTS WITH ALZHEIMER'S DISEASE**

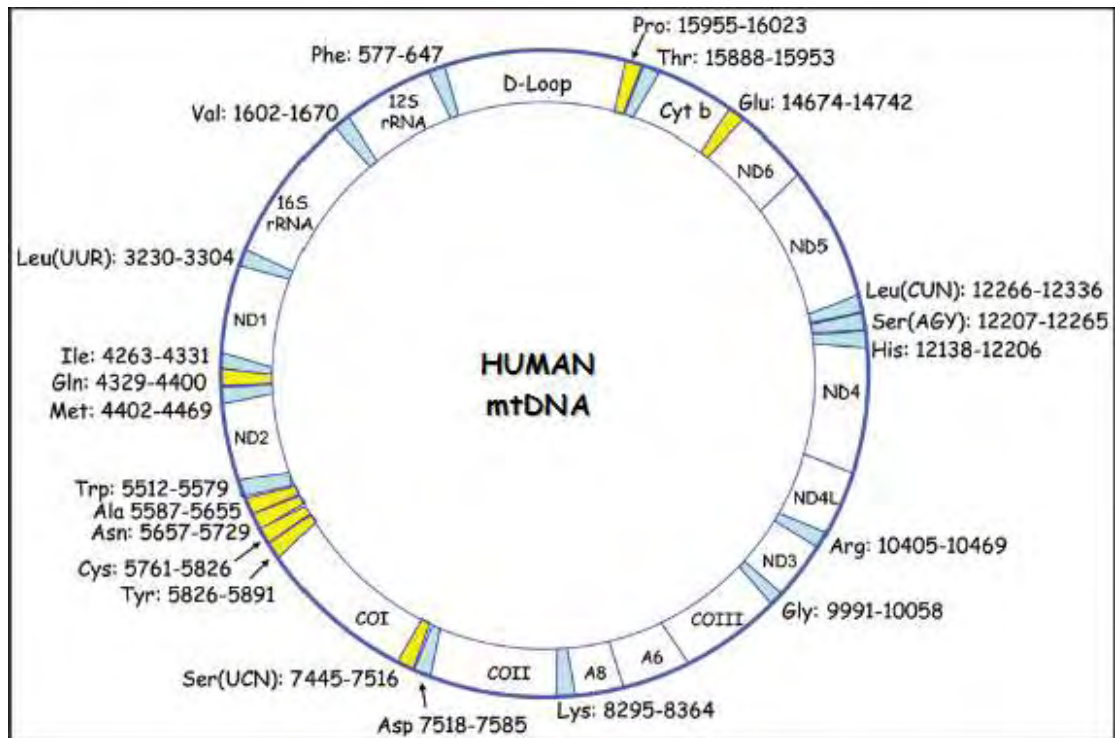


ΦΟΙΤΗΤΡΙΑ: ΠΑΥΛΙΝΑ ΧΑΛΥΒΟΠΟΥΛΟΥ

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ: ΑΙΜΙΛΙΑ ΖΙΦΑ

ΛΑΡΙΣΑ 2012





Η τριμελής εξεταστική επιτροπή αποτελείται από τους:

- Ζίφα Αιμιλία, Επίκουρος Καθηγήτρια Βιολογίας / Νευροβιολογίας, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
- Μαμούρης Ζήσης, Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
- Μπαλατσός Νικόλαος, Λέκτορας Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Γενετικής, Συγκριτικής & Εξελικτικής Βιολογίας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κατά το ακαδημαϊκό έτος 2011-2012, υπό την επίβλεψη και την καθοδήγηση της κ. Ζίφα Αιμιλίας.

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

Θα ήθελα ακόμη να ευχαριστήσω τον υποψήφιο διδάκτορα Κώστα Σταμάτη και τη μεταπτυχιακό φοιτήτρια Μαρία- Ειρήνη Τερζενίδου για τη βοήθεια που μου παρείχε κατά τη διάρκεια του πειραματικού μέρους.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

❖ ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	5
❖ ABSTRACT.....	6
❖ ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	7
➤ Η ΝΟΣΟΣ ΤΟΥ ALZHEIMER.....	7
➤ ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ.....	8
➤ ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ.....	8
➤ ΧΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΕΣ ΑΛΛΟΙΩΣΕΙΣ ΣΤΗΝ AD.....	9
▪ Αλλοιώσεις Μακροσκοπικά.....	9
▪ Αλλοιώσεις Μικροσκοπικά.....	11
➤ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΕΣ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ.....	20
➤ ΑΙΤΙΟΛΟΓΙΑ.....	23
➤ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑ.....	28
➤ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΩΝ ΜΕ ΤΗ ΝΟΣΟ ΤΟΥ ALZHEIMER.....	34
➤ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΕΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ.....	37
➤ ΣΚΟΠΟΣ.....	41
❖ ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	42
➤ ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ(PCR, Polymerase Chain Reaction).....	42
➤ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΤΩΝ PCR ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ (ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ).....	47
➤ SSCP(Single-Strand Conformation Polymorphism).....	49
➤ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ PCR ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ.....	52
➤ ΑΜΗΛΟΥΧΙΣΗ.....	53
❖ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	57
❖ ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	64
❖ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	75

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η νόσος του Alzheimer (Alzheimer Disease, AD) είναι μια νευροεκφυλιστική ασθένεια του εγκεφάλου με αδιάκοπη νευρολογική επιδείνωση και χαρακτηριστική παθολογοανατομία. Σήμερα, η AD είναι η πιο κοινή μορφή άνοιας (70%) στους ηλικιωμένους και έχει ως αποτέλεσμα τη μη αναστρέψιμη καταστροφή των νευρώνων, ιδίως στο φλοιό, στον ιππόκαμπο και στην αμυγδαλή. Παθολογοανατομικά χαρακτηριστικά αποτελούν επίσης οι αμυλοειδείς πλάκες και οι νευροϊνιδιακοί σωροί. Σε αυτές τις δύο δομές έχουν βρεθεί παθολογικές πρωτεΐνες (το πεπτιδίο αμυλοειδές β/Αβ, πρωτεΐνη tau). Η AD διακρίνεται σε οικογενή μορφή, η οποία συνδέεται με μεταλλάξεις στο πυρηνικό DNA (γονίδιο της πρόδρομης αμυλοειδούς πρωτεΐνης/ ΑβPP, γονίδια της πρεσενιλίνης) και σε σποραδικές περιπτώσεις AD όψιμης έναρξης συμπτωμάτων. Αυτή η μορφή έχει σύνθετη αιτιολογία λόγω αλληλεπιδράσεων μεταξύ περιβαλλοντικών συνθηκών και γενετικών χαρακτηριστικών του ατόμου. Οι μεταλλάξεις στο μιτοχονδριακό DNA (mtDNA) και η δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων είναι υπεύθυνες για μια ετερογενή ομάδα ασθενειών, γνωστές ως μιτοχονδριακά νοσήματα. Κοινό τους χαρακτηριστικό είναι η βλάβη της αναπνευστικής αλυσίδας με αποτέλεσμα την ελαττωμένη παραγωγή ενέργειας. Με την πάροδο της ηλικίας παρατηρείται μια ελάττωση της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης που ίσως να σχετίζεται με την άθροιση μεταλλάξεων στο μιτοχονδριακό DNA με αποτέλεσμα ανεπάρκεια ενέργειας, αύξηση του οξειδωτικού στρες και, τελικά, απόπτωση. Στην AD παρατηρείται μιτοχονδριακή δυσλειτουργία και μορφολογικές ανωμαλίες των μιτοχονδρίων υποδεικνύοντας την εμπλοκή τους στην ασθένεια.

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η ανίχνευση και ταυτοποίηση μεταλλάξεων σε μιτοχονδριακά tRNA γονίδια σε ασθενείς με τη νόσο και σε άτομα χωρίς κάποιο κλινικό σύμπτωμα. Τα γονίδια που μελετήθηκαν είναι: το tRNA<sup>Gly</sup> σε 50 δείγματα DNA ασθενών με Alzheimer και τα tRNA<sup>Gly</sup> (51 δείγματα) και tRNA<sup>His</sup>, tRNA<sup>Ser(AGY)</sup> και tRNA<sup>Leu(CUN)</sup> (10 δείγματα) για τα άτομα χωρίς κάποιο κλινικό σύμπτωμα. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής: PCR, SSCP, καθαρισμός των PCR προϊόντων, αλληλούχιση (sequencing) και επεξεργασία αλληλούχισης με υπολογιστικά προγράμματα. Τα αποτελέσματα που βρέθηκαν ήταν τα εξής: καμία μετάλλαξη στο γονίδιο tRNA<sup>Gly</sup> στους ασθενείς με AD, στα δείγματα ατόμων χωρίς κλινικό σύμπτωμα βρέθηκαν στο γονίδιο tRNA<sup>Gly</sup> οι μεταλλάξεις T10084C, C10142A και A10097G η καθεμία σε ποσοστό 2% στην ND3 υπομονάδα του συμπλόκου I της αναπνευστικής αλυσίδας, ενώ γονίδιο tRNA<sup>Leu(CUN)</sup> η A12308G εντός της περιοχής του γονιδίου Leu (CUN), σε ποσοστό 10%. Στα γονίδια ιστιδίνη και σερίνη δεν βρέθηκε κάποια μετάλλαξη. Για να εξαχθούν αξιόπιστα και εμπειριστατωμένα συμπεράσματα για το ρόλο των σημειακών μεταλλάξεων στα μιτοχονδριακά tRNA γονίδια και γενικότερα για το ρόλο του μιτοχονδριακού DNA στην εμφάνιση της νόσου του Alzheimer, πρέπει να ολοκληρωθεί η έρευνα σε όλα τα tRNA γονίδια στους ασθενείς και να γίνει σύγκριση με μεγάλη ομάδα του πληθυσμού χωρίς κλινικά συμπτώματα της νόσου.

## **ABSTRACT**

Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative brain disease with continuous neurological deterioration and typical pathology. Today, AD is the most common form of dementia (70%) in the elderly and results in the irreversible destruction of neurons, particularly in the cortex, hippocampus and amygdala. Pathological features are also the amyloid plaques and neurofibrillary tangles. Abnormal proteins (amyloid  $\beta$  peptide /  $A\beta$ , protein tau) have been found in these two structures. AD is divided into the familial form, which is associated with mutations in nuclear DNA (amyloid precursor protein gene/  $A\beta$ PP, presenilin genes) and in the sporadic late-onset AD. This form has a complex etiology due to interactions between environmental conditions and genetic characteristics of the individual. Mutations in mitochondrial DNA (mtDNA) and mitochondrial dysfunction are responsible for an heterogeneous group of diseases known as mitochondrial diseases. Their common feature is the failure of the respiratory chain resulting in reduced energy production. With advancing age there is a decrease in oxidative phosphorylation that may be associated with the accumulation of mutations in mitochondrial DNA resulting in energy failure, increased oxidative stress and ultimately apoptosis. In AD there is mitochondrial dysfunction and morphological abnormalities of mitochondria indicating their involvement in the disease.

The purpose of this study is the detection and identification of mutations in mitochondrial tRNA genes in patients with the disease and also in people without clinical symptoms. The genes studied are: tRNA<sup>Gly</sup> on 50 DNA samples in patients with Alzheimer's disease and tRNA<sup>Gly</sup> (51 samples) and tRNA<sup>His</sup>, tRNA<sup>Ser(AGY)</sup> and tRNA<sup>Leu(CUN)</sup> (10 samples) for subjects without clinical symptoms. The procedure was as follows: PCR, SSCP, cleaning of PCR products, sequencing and editing with computer programs. The results found were: none tRNA<sup>Gly</sup> gene mutation in patients with AD, in samples of individuals without clinical symptoms mutations found in tRNA<sup>Gly</sup> gene were T10084**C**, C10142**A** and A10097**G** each to 2% in the ND3 subunit of complex I of respiratory chain while in tRNA<sup>Leu(CUN)</sup> gene A12308**G** was found within the region of the gene Leu (CUN) to 10%. In genes histidine and serine no mutation was found. To obtain reliable and detailed conclusions about the role of point mutations in mitochondrial tRNA genes and generally the role of mitochondrial DNA in the onset of Alzheimer, an investigation must be completed in all tRNA genes of patients with Ad in comparison to a large group of people without clinical symptoms.

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### **Η ΝΟΣΟΣ ΤΟΥ ALZHEIMER**

Η νόσος του Alzheimer (Alzheimer Disease, AD) είναι μια νευροεκφυλιστική ασθένεια του εγκεφάλου. Το 1907 ο Alois Alzheimer περιέγραψε ένα περιστατικό μιας γυναίκας 51 ετών που παρουσίασε μια σχετικά γρήγορη επιδείνωση απώλειας μνήμης μαζί με ψυχικές διαταραχές και πέθανε 4 χρόνια αργότερα (Alzheimer A., 1907). Αν και μια ποικιλία από προοδευτικές και θανατηφόρες νευρολογικές παθήσεις ήταν ήδη γνωστές τότε, όπως η γεροντική άνοια, η πρώιμη ηλικία έναρξης των συμπτωμάτων και ένα νέο παθολογικό εύρημα οι νευροϊνιδιακοί σωροί (NFT) ήταν αυτά που έκαναν τη συγκεκριμένη κατάσταση μοναδική. Η αιτιολογία βέβαια για τη νόσο Αλτσχάιμερ (AD) εξακολουθεί να αποτελεί αντικείμενο συζητήσεων και αναπάντητων ερωτημάτων. Παρ' όλη την πρόοδο στην ιατρική και τη βιολογία, η AD εξακολουθεί να είναι μια νόσος με αδιάκοπη νευρολογική επιδείνωση συνοδευόμενη από χαρακτηριστική παθολογοανατομία.

Με την πάροδο του χρόνου η AD χωρίστηκε σε δύο κλινικές καταστάσεις ανάλογα με την ηλικία έναρξης συμπτωμάτων (Roth M, Tomlinson BE, Blessed G., 1966) :

A). Τη νόσο Alzheimer λόγω της αρχικής περιγραφής της σε σχετικά νεαρή γυναίκα (όρος που χρησιμοποιούνταν για ένα είδος «προγεροντικής» άνοιας) και επηρεάζει άτομα ηλικίας κάτω των 65 ετών και

B). ένα είδος παρόμοιας άνοιας σε ηλικιωμένους (άνω των 65 ετών) την αναφερόμενη ως γεροντική άνοια τύπου Alzheimer.

Δύο είναι και οι τύποι της νόσου όσον αφορά την κληρονομικότητα: η οικογενής AD, η οποία κληρονομείται με αυτοσωμικό επικρατή χαρακτήρα και η σποραδική AD όπου δεν έχει βρεθεί κάποια κληρονομική συσχέτιση. Οι περισσότερες περιπτώσεις της νόσου είναι σποραδικές.

Πρόκειται για μια πολυπαραγοντική ασθένεια που επηρεάζεται από περιβαλλοντικούς και γενετικούς παράγοντες. Το οικογενές με το σποραδικό Alzheimer είναι φαινοτυπικά όμοια, αλλά διαφέρουν στην ηλικία έναρξης συμπτωμάτων. Η οικογενής μορφή είναι πρώιμης έναρξης και ανήκει στην Α). παραπάνω μορφή, εκδηλώνεται δηλαδή πριν από την ηλικία των 65 ετών και εμφανίζεται σε ποσοστό μικρότερο από 10% του συνολικού αριθμού των περιπτώσεων. Η πλειονότητα των περιπτώσεων της νόσου ανήκει στη σποραδική μορφή δηλαδή στη Β). με εμφάνιση συμπτωμάτων σε άτομα ηλικίας άνω των 65 ετών. Παρ' όλη τη διαφορά στην ηλικία έναρξης των συμπτωμάτων οι δύο μορφές φαίνονται να έχουν κοινή παθογένεια (Grazina M., Pratas J. et al., 2006). Η AD αναγνωρίζεται σήμερα ως μια ενιαία οντότητα με επιπολασμό που αυξάνει απότομα μετά την ηλικία των 65.

## **ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ**

Η διάγνωση της AD απαιτεί κλινικές ενδείξεις απώλειας μνήμης και προσβολή ενός τουλάχιστον άλλου γνωστικού τομέα, με στοιχεία διαταραχής της κοινωνικής ή επαγγελματικής λειτουργικότητας (Rudy J. et al., 2010).

Τα συμπτώματα της νόσου διακρίνονται σε δύο κατηγορίες:

1. Γνωσιακές- νοητικές διαταραχές: σταδιακή απώλεια της μνήμης και ιδιαίτερα της πρόσφατης μνήμης, δυσκολία προσανατολισμού στο χώρο και στο χρόνο, δυσκολία στο λόγο, στη σκέψη, απραξία, αγνωσία.
2. Διαταραχές της συμπεριφοράς: εμφάνιση απάθειας, αδιαφορίας για το περιβάλλον, κοινωνική απόσυρση, κατάθλιψη, σεξουαλική ανικανότητα, επιθετικότητα. Επιπλέον με την εξέλιξη της ασθένειας μπορεί να εμφανιστεί και απώλεια κινητικών λειτουργιών, όπως βάδισμα και προσανατολισμός. Μια κλινική εικόνα που μοιάζει με εξωπυραμιδικές κινητικές διαταραχές, όπως η νόσος του Parkinson.

## **ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ**

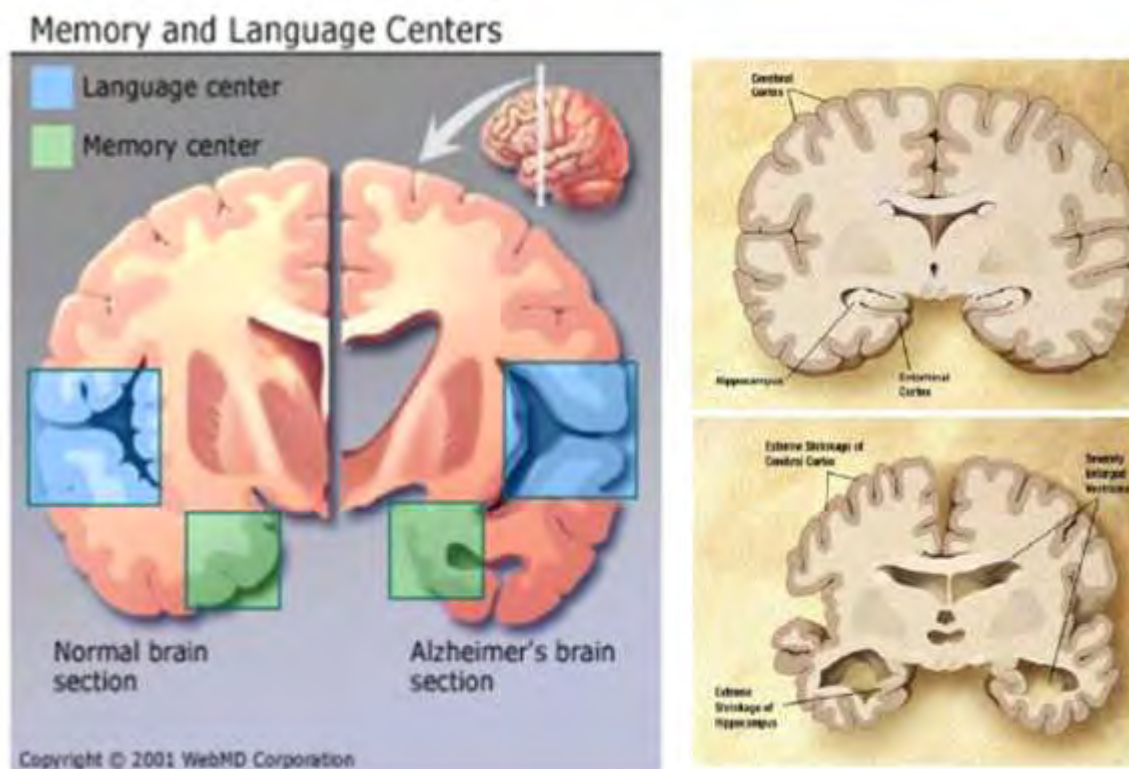
Η AD αποτελεί περίπου το 70% όλων των περιπτώσεων άνοιας (Fratiglioni L, et al., 1999). Η επίπτωση της AD αυξάνει με την ηλικία και διπλασιάζεται κάθε 5 με 10 χρόνια. Η AD πλήττει 25 εκατομμύρια ανθρώπους σε όλο τον κόσμο. Στις ΗΠΑ ο επιπολασμός υπολογίστηκε σε 5 εκατ. το 2007 και, μέχρι το 2050 προβλέπεται να αυξηθεί σε 13 εκατομμύρια μόνο στην Αμερική (Zhu CW, Sano M., 2006). Εκτός από την ηλικία, άλλοι παράγοντες κινδύνου περιλαμβάνουν το οικογενειακό ιστορικό άνοιας, τραύμα στο κεφάλι, γενετικοί παράγοντες (π.χ. απολιποπρωτεΐνη E [APOE] αλληλόμορφου ε4), το φύλο (ανεβασμένο το ποσοστό των γυναικών) χαμηλά επίπεδα εκπαίδευσης, αγγειακή νόσος και περιβαλλοντικοί παράγοντες.



## ΧΑΡΑΚΤΗΡΗΣΤΙΚΕΣ ΑΛΛΟΙΩΣΕΙΣ ΣΤΗΝ AD

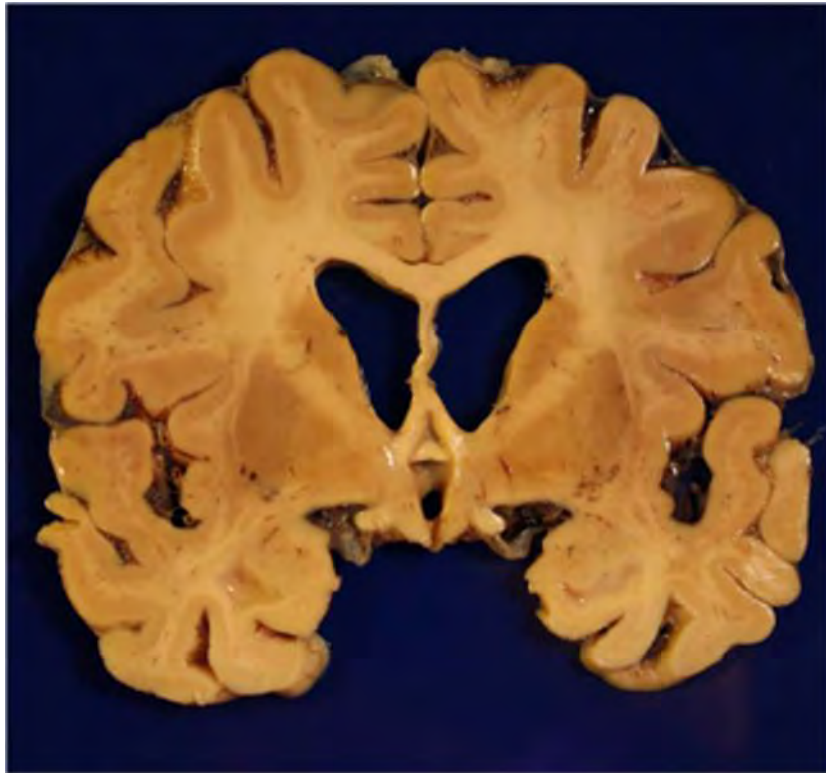
### Αλλοιώσεις Μακροσκοπικά

Οι εγκεφαλοι των ατόμων με AD είναι ατροφικοί με διευρυμένες αυλακώσεις και περιορισμένη ελίκωση. Οι περιοχές του εγκεφάλου που πλήττονται είναι ο φλοιός, ο ιππόκαμπος, η αμυγδαλή, ο μετωπικός, κροταφικός, πλευρικός και ινιακός λοβός.

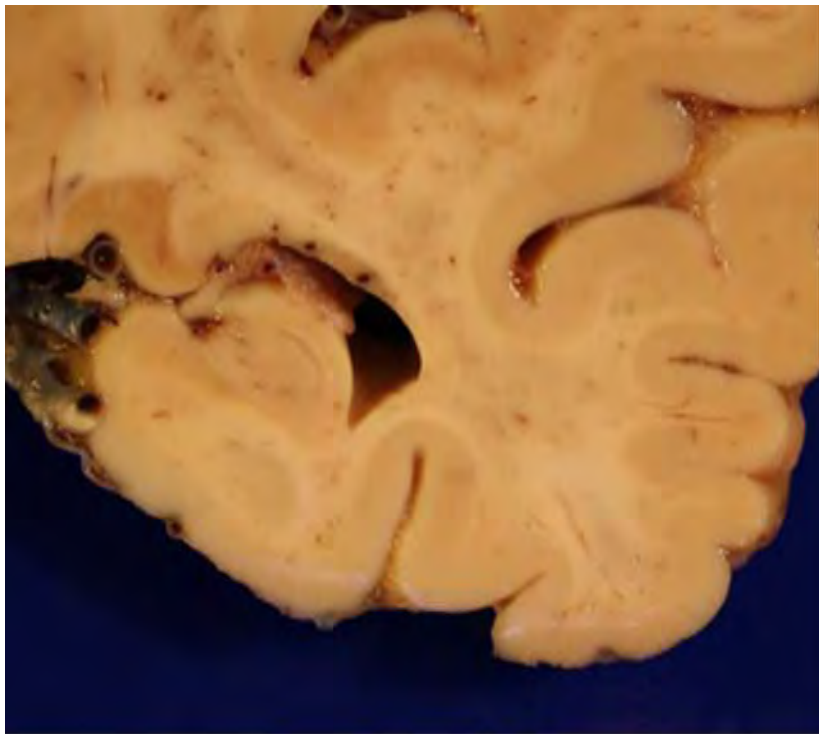


**Εικόνα 1:** Περιοχές του εγκεφάλου που πλήττονται στη νόσο του Alzheimer. Επηρεάζονται περισσότερο το κέντρο της μνήμης, του λόγου και η αμυγδαλή.

Ενώ η ατροφία είναι συχνά εμφανής σε νεότερους ασθενείς, όπου υπάρχει μεγαλύτερη απόκλιση με τις περιπτώσεις ελέγχου, σε πιο ηλικιωμένα άτομα, ιδιαίτερα από την έβδομη δεκαετία και πέρα, υπάρχει σημαντική επικάλυψη όσον αφορά το βαθμό της ατροφίας μεταξύ νοσούντων και ατόμων ίδιας ηλικίας της ομάδας ελέγχου (Terry RD, Peck A, et al., 1981). Στην πλειοψηφία των περιπτώσεων η ατροφία λόγω επιτόλαιης διάγνωσης, παραβλέπεται σε νεότερα άτομα κατά την τακτική παθολογική διάγνωση της νόσου. Οι εγκεφαλοι των ατόμων με νόσο Alzheimer, όπου η ατροφία είναι πιο έντονη στο φλοιό, τείνουν να είναι περίπου 8-15% μικρότεροι από ό,τι ίδιας ηλικίας άτομα της ομάδας ελέγχου.



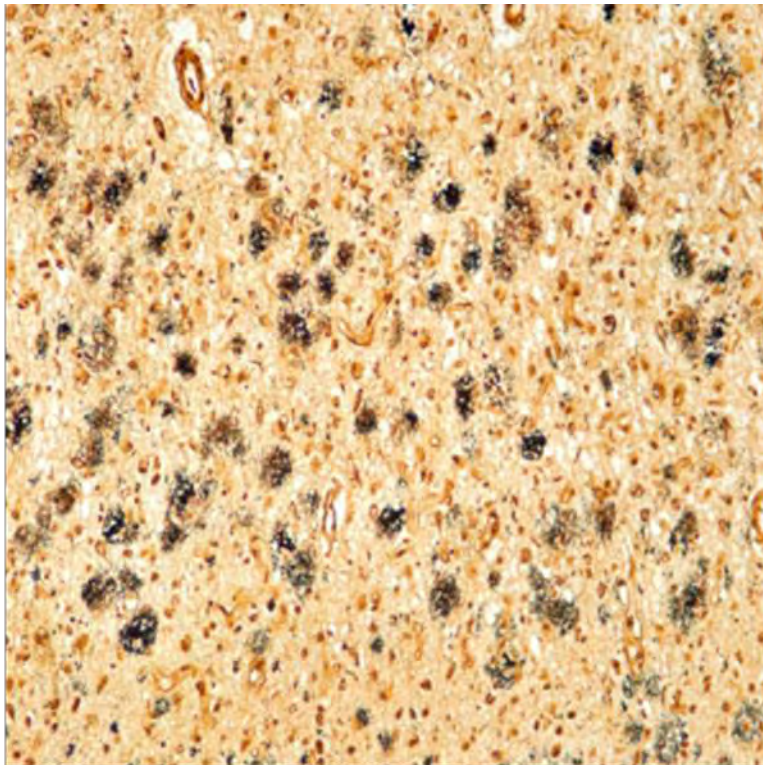
*Εικόνα 2: Εγκέφαλος ασθενούς με γενικευμένη ατροφία.*



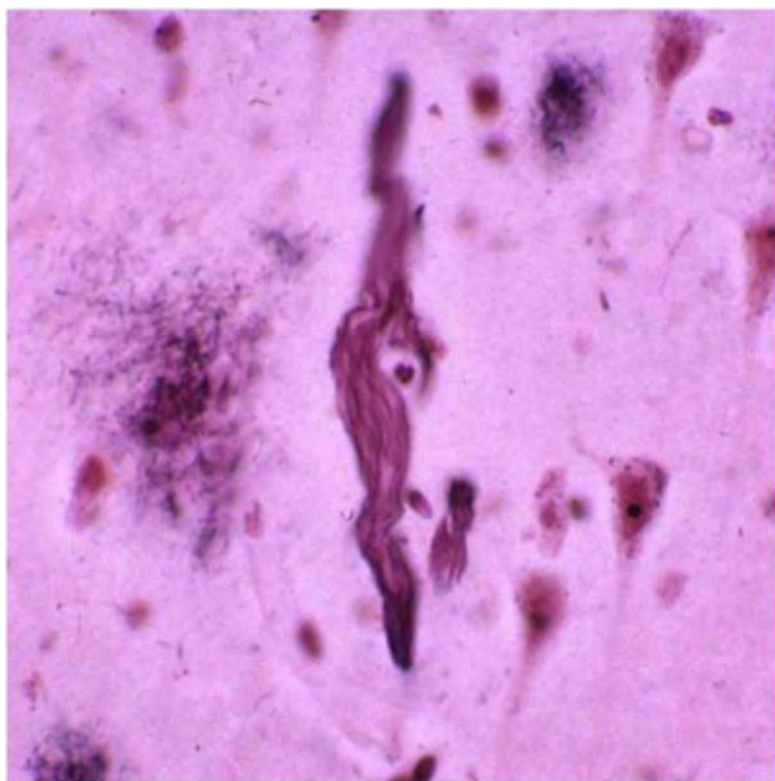
*Εικόνα 3: Ατροφία στην περιοχή του ιπποκάμπου.*

### **Αλλοιώσεις Μικροσκοπικά**

Οι πιο συνηθισμένες και διακριτές χαρακτηριστικές αλλοιώσεις παρούσες στον προσβεβλημένο εγκέφαλο είναι οι αμυλοειδείς πλάκες και τα NFTs (νευροϊνιδιακοί σωροί). Ένα επιπλέον στοιχείο είναι η απώλεια των συνάψεων των νευρικών κυττάρων. Τα δύο πρώτα ευθύνονται για την απώλεια της σύνδεσης του ενός νευρώνα με τον άλλο με αποτέλεσμα το θάνατο των νευρώνων. Καθώς πεθαίνουν οι νευρώνες ο εγκεφαλικός ιστός συρρικνώνεται και ατροφεί.



**Εικόνα 4:** Αμυλοειδής πλάκα όπως φαίνεται με την τεχνική εμπότισμού με ασήμι Bielshowsky.

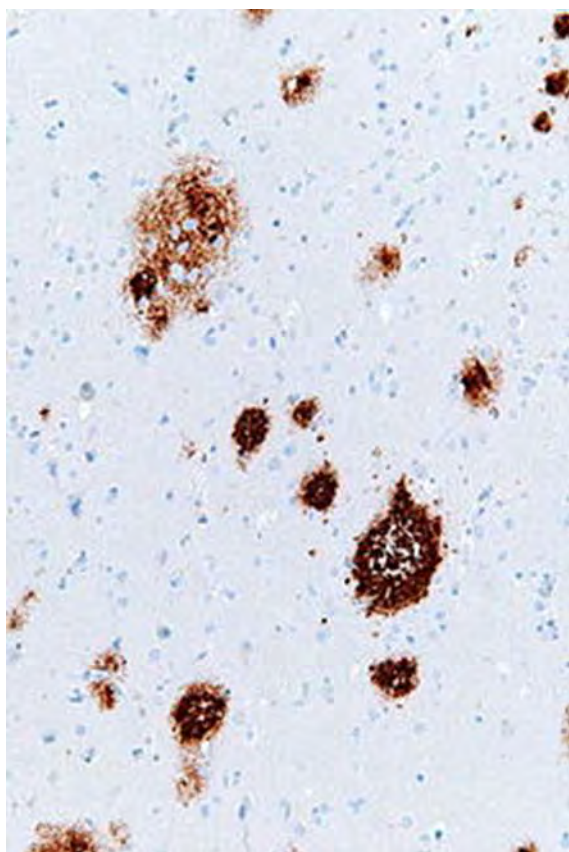


**Εικόνα 5:** Νευροϊνιδιακοί σωροί όπως φαίνονται με την τεχνική Bielschowsky .

Η νοσολογία των πλακών έχει εξελιχθεί με την πάροδο των χρόνων και συμπεριλαμβάνει πολλούς υποτύπους όπως διάχυτες (diffuse), νευριτικές (neuritic), συμπαγείς (compact) κ.α. Τα NFTs δεν περιλαμβάνονται ποσοτικά στα τυπικά κριτήρια αλλά η σημασία τους αποδίδεται βάσει της θέσης τους στον εγκέφαλο. Η απώλεια συνάψεων είναι το πρώτιστο παθολογικό χαρακτηριστικό της νόσου Αλτσχάιμερ.

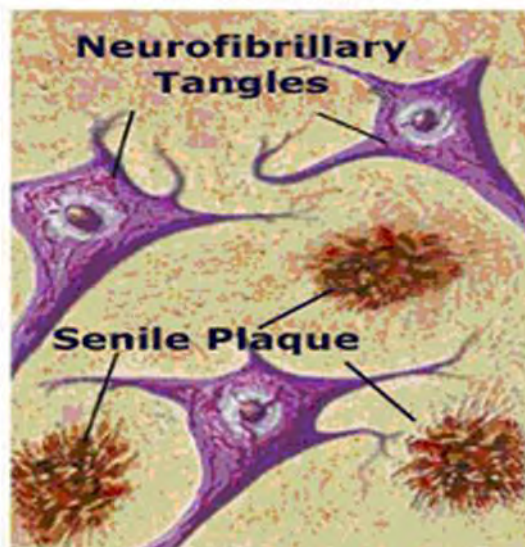
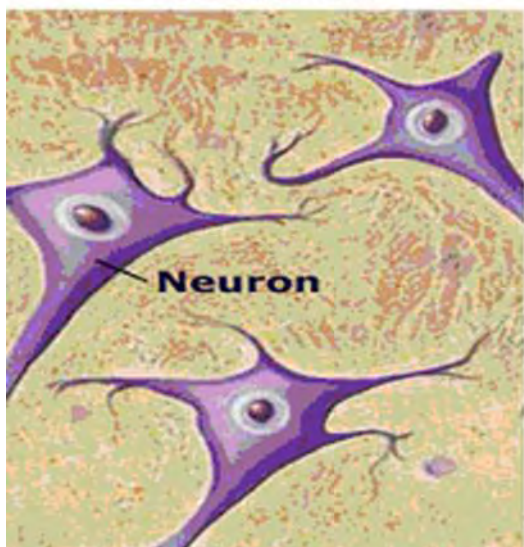
Πιο συγκεκριμένα,

Αμυλοειδείς πλάκες: Περιγράφονται στην αρχική έκθεση για το Αλτσχάιμερ ως “miliary foci”. Πρόκειται για πυκνές και αδιάλυτες εναποθέσεις πρωτεϊνών και κυτταρικών συστατικών έξω και γύρω από τους νευρώνες του εγκεφάλου. Περιέχουν μεγάλα ποσά β-αμυλοειδούς μαζί με τμήματα νευρώνων και μη νευρικών κυττάρων, όπως μικρογλοία και αστροκύτταρα. Μορφολογικά οι νευρώνες αυτοί είναι διογκωμένοι και ελικοειδείς και χαρακτηρίζονται από δομικές ανωμαλίες, συμπεριλαμβανομένων μεγάλων λυσοσωμάτων, πολλών μιτοχονδρίων και ελικοειδών ινιδίων. Η ανάπτυξη των πλακών γίνεται σταδιακά από μήνες ως χρόνια.



**NORMAL**

**ALZHEIMER**

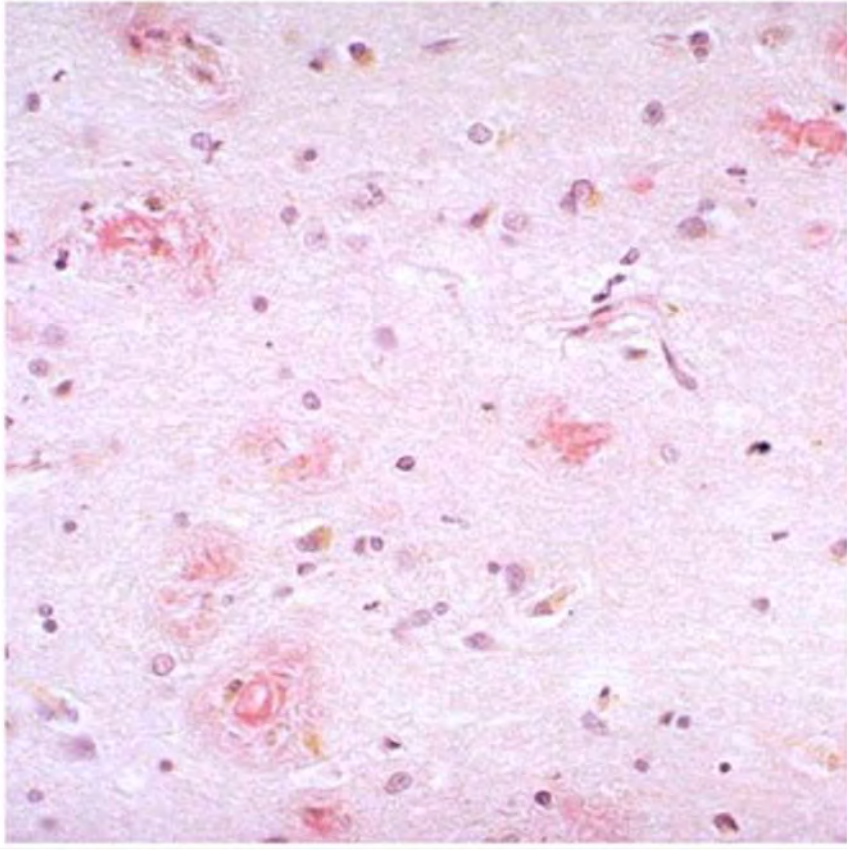


**Εικόνα 6:** Σχηματική αναπαράσταση των αμυλοειδών πλακών και των νευροϊνιδιακών σωρών (κάτω) σε νευρικά κύτταρα του εγκεφάλου.

Οι αμυλοειδείς πλάκες είναι σφαιρικές εξωκυττάρειες αλλοιώσεις 10-200 μm σε διάμετρο, που αρχικά αναγνωρίστηκαν και ταξινομήθηκαν με τη χρήση της τεχνικής της Bielschowsky silver, η οποία χρησιμοποιείται ακόμα και σήμερα. Αξίζει επίσης να σημειωθεί ότι είχαν περιγραφεί πριν από την αναφορά του Αλτσχάιμερ από τους Blocq και Marinesco στους ηλικιωμένους επιληπτικούς όπως και από τους Beljahow και Redlich και Neri σε σχέση με τη γεροντική άνοια. Συνεπώς οι αμυλοειδείς πλάκες δεν ήταν καινούργια παρατήρηση ενώ η

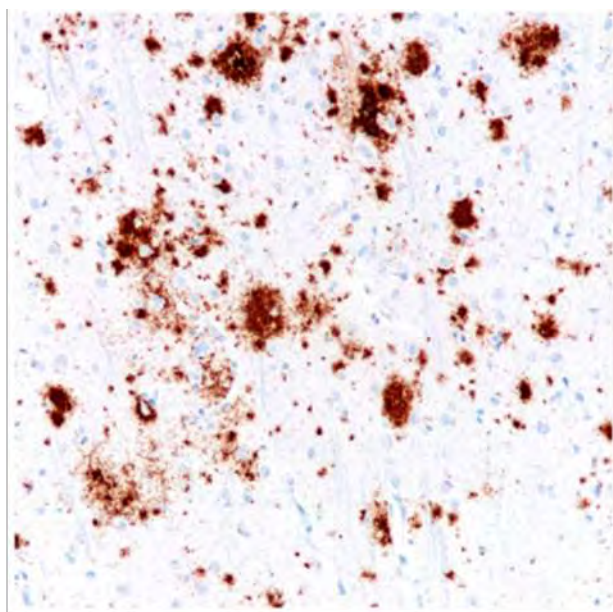
παρουσία των NFTs κυρίως στην πρώιμη εκδήλωση δικαιολογεί τη νοσολογική οντότητα. (Castellani RJ, Lee HG, et al., 2008).

Το αμυλοειδές αποδόθηκε στην Αβ (Amyloid beta), ένα μεταβολικό προϊόν της ΑβΡΡ (Amyloid-β Protein Precursor).



**Εικόνα 7:** Αμυλοειδείς πλάκες με την τεχνική Congo red stain.

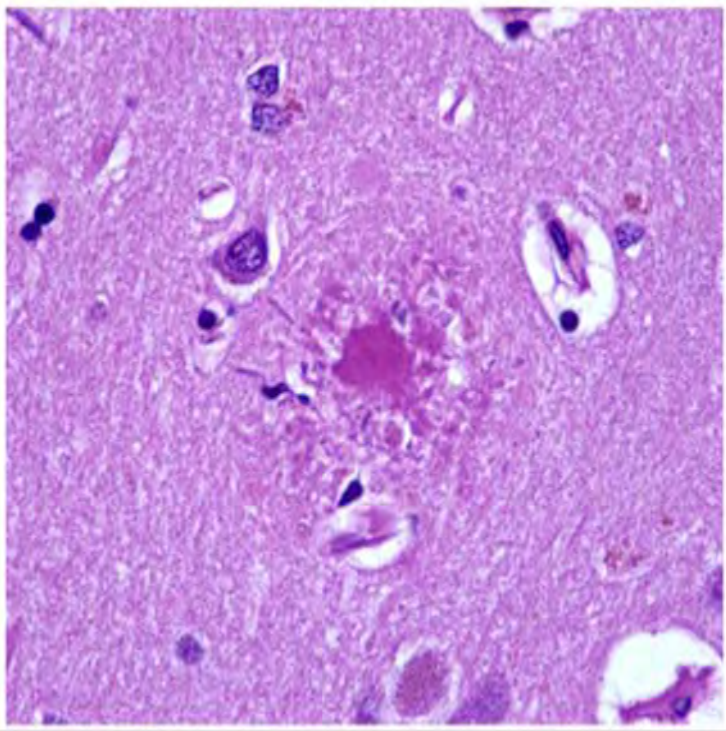
Συνήθως οι νευριτικές και οι διάχυτες (diffuse) αμυλοειδείς πλάκες χρησιμοποιούνται σε νευροπαθολογικές αναλύσεις. Οι διάχυτες (diffuse) αμυλοειδείς πλάκες αντιπροσωπεύουν τις πιο πρώιμες εγκεφαλικές βλάβες στο AD και έχει προταθεί (χωρίς να έχει αποδειχθεί) ότι η διάχυτη μορφή τους μετατρέπεται σε κλασικές και συμπαγείς πλάκες με αυξανόμενη ανάμειξη νευριτικών πλακών.



**Εικόνα 8:** Διάχυτες αμυλοειδείς πλάκες στον εγκεφαλικό φλοιό.

Δεν είναι γνωστό αν αυτές οι πλάκες αποτελούν κάποιο παθολογοανατομικό χαρακτηριστικό για φυσιολογική γήρανση ή για MCI (Mild Cognitive Impairment). Ωστόσο σε σοβαρές περιπτώσεις AD και συνδρόμου Down είναι υπεύθυνες για το ανοσοαντιδραστικό υλικό των Αβ πρωτεϊνών. Οι τυπικές νευριτικές κλασικές συμπυκνωμένες πλάκες είναι σφαιρικές εξωκυτταρικές αλλοιώσεις με διάμετρο 10- 15μm ενώ μια μέση διάμετρος είναι περίπου 30μm. Οι διάχυτες τείνουν να είναι πιο ετερογενείς σε μέγεθος με την πλειοψηφία των διάχυτων εναποθέσεων να έχει διάμετρο μικρότερη από 20μm.

Οι νευριτικές αμυλοειδείς πλάκες έχουν ένα κεντρικό πυρήνα από 6-10μm νηματίων Αβ πρωτεϊνών διατεταγμένα σαν δέσμες που ακτινοβολούν από το κέντρο. Η Αβ πρωτεΐνη και η προδρόμος της, η ΑβPP, καθώς και η ταυ και οι νευρονηματωειδείς πρωτεΐνες βρίσκονται στην περιφεριακή περιοχή της αμυλοειδούς πλάκας. Στις νευριτικές αμυλοειδείς πλάκες υπάρχει η αμετάβλητη παρουσία τις μικρογλοίας. (Perry G, Lipphardt S, et al., 1988) (Allsop D, Ikeda S, et al., 1988).



**Εικόνα 9:** Νευριτικές αμυλοειδείς πλάκες μαζί με μικρογλοία ρος τα αριστερά και κάτω από τον πυρήνα του αμυλοειδούς.

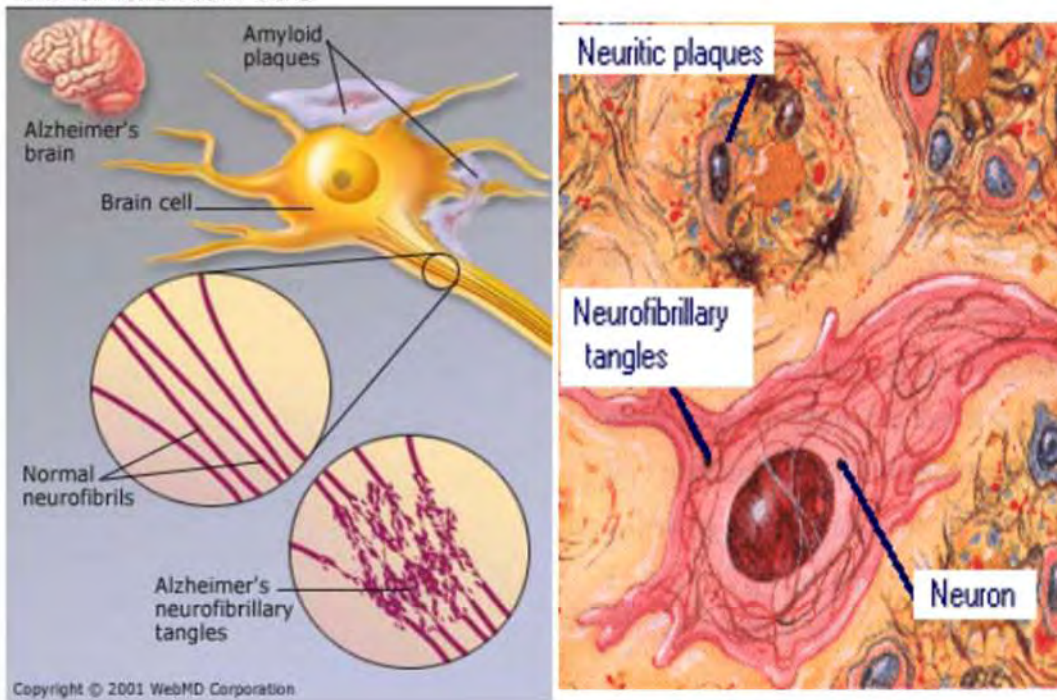
Οι αμυλοειδείς πλάκες όλων των τύπων βρίσκονται κυρίως μέσα στον εγκεφαλικό φλοιό και κατανέμονται ισάξια μέσα στις περιοχές του νεοφλοιού. Αυτό που έχει ενδιαφέρον είναι ότι η παθολογία των πλακών μειώνεται στις μέσες κροταφικές περιοχές του αλλοφλοιού. Μελέτες έχουν δείξει ότι στις διάφορες περιοχές του εγκεφάλου μπορεί να υπάρχουν ένας ή δύο συγκεκριμένοι τύποι πλακών ακόμα και στις σοβαρές περιπτώσεις AD. Αυτή η παρατήρηση μπορεί να σημαίνει ότι υπάρχει χρονολογική σειρά της ανάπτυξης των εναλλακτικών μορφολογιών των πλακών που απορρέει από την αλληλεπίδρασή τους με διαφορετικούς νευρονικούς πληθυσμούς (Pro JD, et al., 1980) (Wisniewski HM, et al J., 1989).

Η επίδραση του ανοσοποιητικού συστήματος στο ΚΝΣ θεωρείται σημαντικός παράγοντας στην παθογένεια της νόσου και διάφορες μελέτες καταδεικνύουν το ρόλο της φλεγμονής σε αυτήν (McGeer PL, et al., 2006).

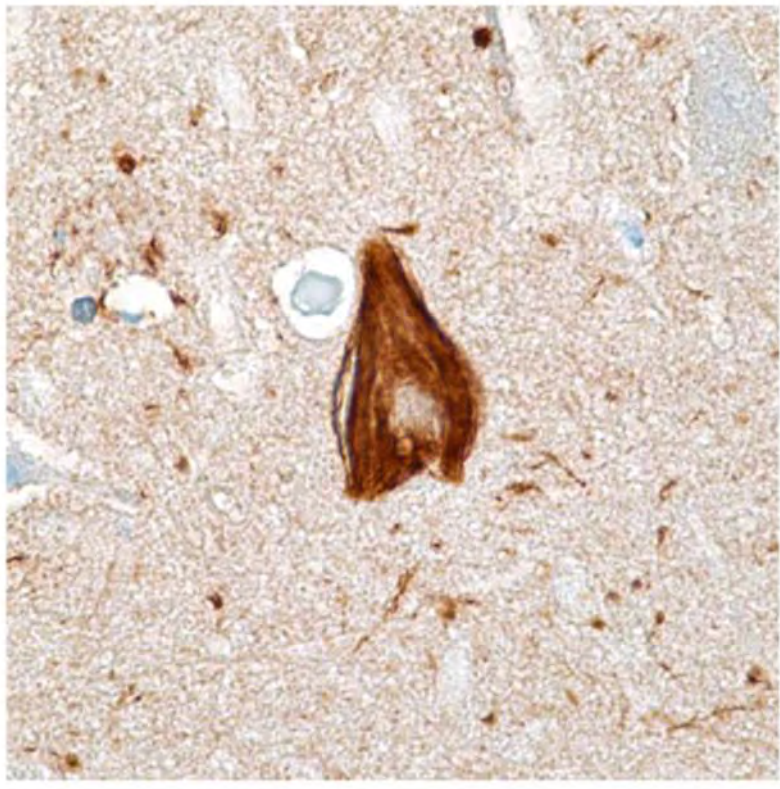
Νευροϊνδιακοί σωροί: Τα NFTs είναι σημαντική μικροσκοπική αλλοίωση στο AD και βρίσκονται αρχικά στους μεγάλους πυραμιδικούς νευρώνες του Αμμώνιου κέρατος και του εγκεφαλικού νεοφλοιού αν και η νευροϊνδιακή παθολογία συναντάται και σε άλλες δομές όπως το μεσεγκέφαλο, τον υποθάλαμο κ.α.



### Alzheimer's Brain Cells



**Εικόνα 10:** Σχηματική αναπαράσταση των νευροϊνδιακών σωρών και των αμυλοειδών πλακών νευροϊνδιακών σωρών σε νευρικά κύτταρα του εγκεφάλου.



**Εικόνα 11:** Νευροϊνδιακοί σωροί με ταυ.

Μορφολογικά τα NFTs περιγράφονται σαν ελικοειδή ζευγαρωμένα ινίδια που είναι φτιαγμένα από αξονικά σε αντιδιαστολή ελικοειδή ινίδια με διάμετρο των 10nm. Κάθε ινίδιο θεωρείται ότι αποτελείται από δύο ή τέσσερα πρωτοϊνίδια αν και κάποιοι θεωρούν πως απλά υπάρχουν οι σφαιρικοί τομείς διατεταγμένοι στη σειρά και όχι πρωτοϊνίδια. Εκτός από τα ζευγαρωμένα ελικοειδή ινίδια υπάρχει και μια σειρά από αντιγονικά σχετιζόμενες ινιδιακές δομές που αποτελούν το NFT. Αυτές περιλαμβάνουν τα ζευγαρωμένα ελικοειδή ινίδια που βρέθηκαν μαζί με δυστροφικούς νευρίτες.

Είναι ευρέως αποδεκτό ότι η σχετιζόμενη με μικροσωληνίσκους πρωτεΐνη tau είναι το κύριο πρωτεϊνούχο στοιχείο των NFTs. Αυτή η πρωτεΐνη προάγει τον πολυμερισμό της σωληνίνης και τη συγκρότηση των μικροσωληνίσκων και η ανώμαλη φωσφορυλίωσή της προκαλεί αυτές τις δομές. Ωστόσο βιοχημικές, ανοσοχημικές, αμινοξικές και πτωτεϊνικές τεχνικές αλληλούχησης έχουν αποδείξει την παρουσία των ακολούθων όπως φαίνεται στην αξιολόγηση του Smith (Smith MA., 1998):

- I. Κυτταροσκελετικά στοιχεία, συμπεριλαμβανομένης της πρωτεΐνης tau, των νευροϊνιδίων της υψηλού μοριακού βάρους συνδεόμενης με μικροσωληνίσκους πρωτεΐνης MAP2, βιμενετίνης και τροπομυοσίνης.
- II. Στοιχεία συνδεόμενα με πρωτεάση όπως ουβικουιτίνη, α1 αντιχυμοθριψίνη, α1 αντιθριψίνη, καθεψίνες B και D, θρυψίνη και ελαστάση.
- III. Πρωτεογλυκάνες συμπεριλαμβανομένων της ηπαρίνης, χονδροϊτίνης και κεράτινο – θειικών πρωτεογλυκανών.
- IV. Στοιχεία σχετιζόμενα με αμυλοειδογενή μόρια όπως ΑβΡΡ, πρεσενιλίνη και απολιποπρωτεΐνη E
- V. Μόρια σχετιζόμενα με τον ορό όπως το Ρ συστατικό
- VI. Παράγωγα του οξειδωτικού στρες όπως προηγμένη γλυκοζυλίωση και υπεροξειδωση λιπιδίων.

Τα NFTs δεν περιορίζονται μόνο στο AD αλλά βρίσκονται επίσης και σε μια ποικιλία άλλων καταστάσεων συμπεριλαμβανομένων της νόσου του Πάρκινσον μεταεγκεφαλικά, της παρκινσονικής άνοιας και του συνδρόμου Down της φυσιολογικής γήρανσης.

Για τις μικροσκοπικές αλλοιώσεις, εκτός από τα δύο προαναφερθέντα χαρακτηριστικά της AD, έμφαση πρέπει να δοθεί και στα παθολογοανατομικά χαρακτηριστικά γνωρίσματα της AD όσων αφορά στις περιοχές του εγκεφάλου που τα παρουσιάζουν. Αυτά τις περισσότερες φορές βρίσκονται εντός των περιοχών του εγκεφαλικού φλοιού και εντός του πλαισίου του κροταφικού λοβού (Braak H, Braak E., 1991). Οι πρώτες μικροσκοπικές αλλοιώσεις τείνουν να εμφανίζονται στον έσω κροταφικό λοβό και ιδίως στην αμυγδαλή, στην περιοχή του υποκάμπου CA-1 και στους οσφρητικούς βολβούς (Perry G, Castellani RJ, et al., 2003). Πρώιμες αλλοιώσεις έχουν περιγραφεί στο μεσαίο τμήμα του βρεγματικού λοβού και στις οπίσθιες φλοιώδεις περιοχές του μεταιχμιακού συστήματος (Frisoni GB, et al., 2009).

Κατά την πρώιμη έναρξη συμπτωμάτων της AD: Οι περιοχές της αμυγδαλής φαίνεται να είναι ιδιαίτερα ευάλωτες στις παθολογοανατομικές αλλοιώσεις που χαρακτηρίζουν το AD και έτσι τείνουν να περιέχουν άφθονες πλάκες αμυλοειδούς καθώς και νευροϊνδικούς σωρούς (Kromer Vogt LJ, et al., 1990).

Ο ιππόκαμπος από την άλλη πλευρά, συνήθως έχει άφθονη νευροϊνδική εκφύλιση σε σύγκριση με το νεοφλοιό, ενώ η ποσότητα της πλάκας είναι γενικά μικρότερη σε σύγκριση με το νεοφλοιό (Braak H, Braak E., 1991).

Η γενική διαπίστωση ότι η νευροϊνδική παθολογοανατομία, που είναι πιο πρώιμη και πιο σοβαρή, αφορά περιοχές του εγκεφάλου υπεύθυνες για την δηλωτική μνήμη υπογραμμίζει την ευρέως γνωστή σύλληψη ότι η νευροϊνδική εκφύλιση σχετίζεται περισσότερο με την κλινική νόσο από ό, τι η παθολογικές πλάκες. Επιπλέον, η ύπαρξη υψηλού επιπέδου NFTs στο νεοφλοιό είναι σχεδόν συνώνυμη με την κλινική άνοια (Nelson PT, et al 2009), ενώ σε ηλικιωμένα άτομα που είναι γνωστικά υγιή παρατηρούνται συχνά άφθονες παθολογικές πλάκες αμυλοειδούς (Driscoll I, Resnick SM, et al., 2006).

Αξίζει να σημειωθεί ότι η πειραματική βλάβη των δύο ανωτέρω μικροσκοπικών χαρακτηριστικών έχει ως αποτέλεσμα διαταραχές στη μάθηση και στη μνήμη παρόμοιες με εκείνες που βιώνουν οι πάσχοντες από τη μορφή με πρώιμη έναρξη συμπτωμάτων (Mahut H, Zola-Morgan S, Moss M., 1982) (Zola-Morgan S, Squire LR, Amaral DG., 1986).

Κατά τη μετέπειτα έναρξη των συμπτωμάτων της AD: Στους ασθενείς χωρίς πρώιμη έναρξη συμπτωμάτων η παθολογοανατομία στην περιοχή ιπποκάμπου και αμυγδαλής υπήρχε πάντα όμως με μικρότερη βαρύτητα. Ο ιππόκαμπος και ειδικά η περιοχή CA1 δείχνει μεγαλύτερη έκταση παθολογίας όσον αφορά στον εκφυλισμό των NFTs και των αμυλοειδών πλακών καθώς επιπληττεται περισσότερο από ότι άλλες περιοχές μέσα στη δομή του ιπποκάμπου (Mann DM, Esiri MM., 1989) (Hirano A, Zimmerman HM., 1962) (Wilcock GK, Esiri MM., 1982) (Ball MJ., 1978). Πράγματι, ο εκφύλισμός επιλεκτικών περιοχών του ιπποκάμπου οδηγεί σε λειτουργική απομόνωση του ιπποκάμπου και, ως εκ τούτου, έχει σαν αποτέλεσμα τη διαταραχή της βραχυπρόθεσμης μνήμης, που είναι εμφανής στα πρώτα στάδια της νόσου (Hyman BT, Van Hoesen GW, Damasio AR, Barnes CL., 1984). Περαιτέρω βλάβη στις υποφλοιώδεις περιοχές πιστεύεται ότι οφείλεται στην αρχιτεκτονική των κυττάρων του φλοιού και στις συνάψεις τους. Υπάρχουν συγκριτικά στοιχεία που υποστηρίζουν αυτό το αξίωμα: το πιο πειστικό είναι ότι νευρώνες από την κοιλιακή καλύπτρα του στελέχους που προβάλλουν στην αμυγδαλή και στον εγκεφαλικό φλοιό χάνονται στο AD (Mann DM, et al., 1987). Επιπλέον, η κατανομή των παθολογικών αλλαγών σχετίζεται στενά με τις φλοιώδεις και τις υποφλοιώδεις συνδέσεις υποδεικνύοντας μετασυναπτικό εκφυλισμό (Pearson RC, et al., 1985).

Μελέτες δείχνουν ότι, παρά την επιδείνωση της άνοιας, ο αριθμός των αμυλοειδών πλακών και NFTs μπορεί να παραμείνει σταθερός για πολλά χρόνια (Bennett DA, et al., 1993) (Masliah E, Terry RD, et al., 1989). Συνεπώς δεν είναι κανένα από τα δύο δείκτης για τη σοβαρότητα του AD εκτός από τους πολύ υψηλούς αριθμούς των NFTs. Αντ'αυτού, η απώλεια των πυραμιδικών νευρώνων ή η απώλεια συνάψεων ή νευριτικών αλλοιώσεων, φαίνεται να συσχετίζεται καλύτερα με τη μείωση της γνωστικής λειτουργίας. Εξάλλου οι βλάβες κατά το σχηματισμό νευρώνων και ο θάνατος των νευρώνων δεν είναι τόσο

διαδεδομένες και συχνές διαδικασίες όσο η νευρωνική λειτουργία που βρίσκεται σε κίνδυνο.

Αρκετές υποθέσεις έχουν προταθεί για να ερμηνευθούν οι βλάβες στους νευράξονες και στις συνάψεις στο AD, που περιλαμβάνουν Αβ τοξικότητα, ελλείψεις αξονικής μεταφοράς και οξειδωτικό στρες. Αυτοί οι παράγοντες επιδρούν σε ιδιότητες της μεμβράνης όπως η ρευστότητα, η σύσταση, η ακεραιότητα και η ροή ασβεστίου (Praprotnik D, et al., 1996) (Bosman GJ, et al., 1991).

Ενώ η απώλεια συνάψεων προτείνεται ως η πιο άμεση αιτία της γνωστικής δυσλειτουργίας, φαίνεται να είναι απλά μια πτυχή της παθοφυσιολογίας της νόσου που χρειάζεται περαιτέρω μελέτη.

## ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΕΣ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ

A. Πρόδρομη β αμυλοειδής πρωτεΐνη (ΑβPP): Το κύριο πρωτεϊνικό συστατικό των πυρήνων των αμυλοειδών πλακών είναι ένα μικρό πολυπεπτίδιο περίπου 4.2 kDa που ονομάζεται Αβ (Yamada T, et al., 1989), το οποίο έχει δειχθεί από γενετικές μελέτες ότι είναι μέρος μιας άλλης μεγαλύτερης πρωτεΐνης της πρόδρομης πρωτεΐνης του β αμυλοειδούς (ΑβPP) που κωδικοποιείται στο χρωμόσωμα 21. Το γονίδιο της ΑβPP περιέχει 18 εξώνια όπου η αλληλουχία Αβ διακόπτεται από ένα ιντρόνιο. Εναλλακτικό μάτισμα συμβαίνει όπου παράγονται διάφορες μεγαλύτερες εκδόσεις του ΑβPP. Δύο εξώνια συμμετέχουν στις παραλλαγές του εναλλακτικού ματίσματος: το ένα κωδικοποιεί μια περιοχή 56 αμινοξέων και δείχνει σημαντικό βαθμό διατήρησης σε όλη την εξέλιξη των θηλαστικών, ενώ το άλλο κωδικοποιεί 19 αμινοξέα και έχει ομολογία με το αντιγόνο MRC OX-2 που βρίσκεται στην επιφάνεια των νευρώνων και των θυμοκυττάρων. Τα τέσσερα πιθανά μόρια mRNA που κωδικοποιούν το πεπτίδιο Αβ έχουν εντοπιστεί σε ποντικούς και στον ανθρώπινο εγκέφαλο και είναι τα ΑβPP695, ΑβPP714, ΑβPP751, και ΑβPP770 (Golde TE, Estus S, et al., 1990). Η ΑβPP έχει θέσεις πρωτεόλυσης και αποτελεί υπόστρωμα για σεκρετάσες (α-, β-, γ-) που η καθεμία κόβει σε διαφορετικό σημείο. Για την αποτελεσματική δράση της γ-σεκρετάσης απαιτείται η πρεσενιλίνη.

B. β Αμυλοειδής: Τα εξωκυτταρικά Αβ ινίδια είναι κύριο συστατικό των πυρήνων των αμυλοειδών πλακών και μπορούν επίσης να αποτελούν συστατικό του ενδοκυττάρου NFT (Hyman BT, et al., 1989). Τα πρώτα στοιχεία της αμινοξικής σύστασης της πρωτεΐνης που απομονώθηκε από πυρήνες αμυλοειδών πλακών έδειξαν ότι η πρωτεΐνη είναι μοναδική έχοντας ένα ασυνήθιστα υψηλό επίπεδο βαλίνης και περιέχοντας πολύ λίγη θρεονίνη. Το μήκος του πολυπεπτιδίου φαίνεται να αποτελείται από 42-43 αμινοξέα που προέρχονται από το μεγαλύτερο ΑβPP μετά από σύγκριση με τη cDNA αλληλουχία (Kang J, et al., 1987).

Βιοχημική ανάλυση και αλληλούχιση αποκαλύπτουν διαφορετικά είδη της Αβ πρωτεΐνης με κατάλοιπα 40 ή 42 και υπάρχουν υποψίες ότι η Αβ42 είναι ύψιστης σημασίας στην παθογένεια του AD. Η Αβ42 μορφή είναι ζωτικής σημασίας για την παθογένεια της AD (Walsh DM, Selkoe DJ., 2007). Για παράδειγμα, η Αβ42 είναι το αρχικό και μεγαλύτερο συστατικό των εναποθεμάτων αμυλοειδούς πλάκας και αδρανοποιείται με ταχύτερο ρυθμό

από ό, τι η Αβ40. Επιπλέον, αρκετές μεταλλάξεις του ΑβΡΡ και της πρεσενιλίνης 1 και 2, σε συνδυασμό με οικογενείς περιπτώσεις ΑD, έχουν ως αποτέλεσμα μια αυξημένη έκκριση του Αβ, ιδιαίτερα της Αβ42.

Η Αβ πρωτεΐνη στο ΑD είναι πανομοιότυπη με εκείνη που βρέθηκε σε παρόμοιες αλλοιώσεις στο σύνδρομο Down (Masters CL, Simms G, et al., 1985). Μπορεί να υπάρξει ένας ορισμένος βαθμός Ν-τελικής ετερογένειας που βρέθηκε στον πυρήνα της αμυλοειδούς πλάκας ο οποίος είναι ελαφρώς διαφορετικός στις δύο ασθένειες, αν και αυτό μπορεί να είναι το αποτέλεσμα της χρήσης των πρωτεολυτικών διαδικασιών που χρησιμοποιούνται στην απομόνωση των πλακών. Εναλλακτικά, κάποιος βαθμός αμινοτελικής ετερογένειας ενδέχεται να αντανakλά εναλλακτική επεξεργασία της πρόδρομης πρωτεΐνης για την παραγωγή Αβ περικομμένων μορφών.

Γ. Πρωτεΐνη Tau: Ο καθορισμός της φωσφορυλιωμένης tau ως το βασικό πρωτεϊνικό συστατικό των NFTs οδήγησε σε μια σειρά επιστημονικών ερευνών που σχετίζονται με το μεταβολισμό της tau, τους μηχανισμούς φωσφορυλίωσης και αποφωσφορυλίωσής της, το ρόλο της επεξεργασίας της στην ασθένεια και γενικά την αντίληψη ότι η φωσφορυλιωμένη tau ήταν εγγενώς τοξική, τόσο ώστε η βελτίωση της φωσφορυλιωμένης tau σε μεγάλης ηλικίας εγκέφαλο μπορεί να αντιμετωπίζει με επιτυχία το ΑD. Πιο πρόσφατα πειράματα και στοιχεία θέτουν υπό αμφισβήτηση την έννοια της πρωτογενούς τοξικότητας και δείχνουν ότι οι βλάβες tau μπορεί να είναι μια εκδήλωση για προστασία ή κυτταρική προσαρμογή ανάλογα με την ηλικία.

Η tau είναι σχετικά άφθονη στους νευρώνες και παρούσα σε όλα τα εμπύρνηνα κύτταρα και λειτουργεί φυσιολογικά δεσμεύοντας μικροσωληνίσκους και σταθεροποιώντας τη συναρμολόγηση των μικροσωληνίσκων για πολυμερισμό. Το γονίδιο tau, αποτελείται από πάνω από 100 kb και περιέχει 16 εξόνια (Castellani RJ, Lee HG, et al., 2008). Περιέχει ομόλογες περιοχές δέσμευσης για μεταγραφικούς παράγοντες όπως τον AP2 και τον SP1. Στον εγκέφαλο των ενηλίκων, εναλλακτικό μάτισμα του πυρηνικού RNA tau που μεταγράφεται στα εξόνια 2, 3 και 10, έχει ως αποτέλεσμα έξι tau ισομορφές. Αυτές έχουν: i) τρεις ή τέσσερις επαναλήψεις των πεπτιδικών καταλοίπων 31 ή 32 στην C-τελική περιοχή που κωδικοποιούνται στο εξόνιο 10 και ii) την περιοχή πρόσδεσης μικροσωληνίσκων και αυτή που ελέγχει τη διαφοροποίηση για καμία, μια ή δύο ενθέσεις που κωδικοποιούνται στα εξόνια 2 και 3. Αυτές οι ισομορφές tau, καθώς και η κατάσταση φωσφορυλίωσης τους αλλάζει κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης, έτσι ώστε η 3 tau επανάληψη χωρίς ενθέσεις να εκφράζεται στο έμβρυο και στο πρώιμο μεταγεννητικό βρέφος, ενώ οι ετερογενείς ισομορφές να εκφράζονται στον ενήλικο εγκέφαλο.

Αυτός ο διακόπτης στην συρραφή του RNA αντιστοιχεί σε μείωση της φωσφορυλίωσης της tau. Κατά τη διάρκεια του νευροεκφυλισμού η tau φωσφορυλιώνεται ανώμαλα σε προλίνη κατευθυνόμενη στις θέσεις φωσφορυλίωσης σερίνης / θρεονίνης.

Ο γενικός όρος "tauopathy (ταουοπάθεια)" περιλαμβάνει την ευρεία κατάταξη των νευροεκφυλιστικών ασθενειών που συσσωρεύουν φωσφορυλιωμένη tau.

Ο συσχετισμός μεταξύ της περιφερειακής κατανομής της φωσφορυλιωμένης tau και των κλινικών συμπτωμάτων υποδηλώνει μια στενή σχέση μεταξύ tau και παθογένειας ΑD

(Castellani RJ, Lee HG, et al., 2008). Η αυξημένη φωσφορυλίωση της ταυ που συνοδεύει το AD μπορεί να οδηγήσει σε διαχωρισμό της ταυ από τους μικροσωληνίσκους, πιθανώς υποβοηθούμενη από άλλους παράγοντες (Αβ, το οξειδωτικό στρες, μεσολαβητές φλεγμονής) και να δεσμευτεί στα NFTs. Η απώλεια της φυσιολογικής λειτουργίας της ταυ (σταθεροποίηση και συντήρηση των μικροσωληνίσκων), σε συνδυασμό με ένα τοξικό κέρδος της λειτουργίας της, θα μπορούσε να διακυβεύσει την αξονική μεταφορά και να συμβάλει στον εκφυλισμό που είναι τώρα ένα κεντρικό θέμα.

Είναι ενδιαφέρον ότι η έννοια της τοξικότητας του NFT, όπως η τοξικότητα της αμυλοειδούς πλάκας, αμφισβητούνται ολοένα και εντονότερα. Σε ένα διαγονιδιακό μοντέλο, τα ποντίκια που εκφράζουν μια ανθρώπινη καταστέλλομενη ταυ ανέπτυξαν NFTs, απώλεια νευρώνων, και συμπεριφορικά προβλήματα. Μετά την καταστολή του ταυ, οι διαταραχές της συμπεριφοράς σταθεροποιήθηκαν, αλλά τα NFTs εξακολούθησαν να συσσωρεύονται, γεγονός που υποδηλώνει ότι δεν είναι επαρκή για να προκαλέσουν γνωστική εξασθένηση ή θάνατο των νευρώνων (Santacruz K, et al., 2005).

Σε ένα άλλο παρόμοιο με AD μοντέλο η αξονική παθολογία με συσσώρευση της ταυ προηγήθηκε της εναπόθεσης αμυλοειδούς πλάκας (Stokin GB, et al., 2005). Ενώ οι μελέτες ενός μοντέλου ταουοπάθειας P301S απέδειξε ενεργοποίηση της μικρογλοίας και απώλεια των συνάψεων πριν το σχηματισμό των NFT (Yoshiyama Y, et al., 2007).

Έτσι, οι υποστηρικτές της φωσφορυλίωσης της ταυ φαίνεται να κατευθύνονται προς την αναλογία του αναπροσαρμοσμένου μοντέλου καταρράκτη Αβ, προτείνοντας ότι η τοξικότητα της υπερφωσφορυλιωμένης ταυ αφορά την παρουσία των τοξικών ενδιάμεσων ταυ. Αυτό ήταν προβλέψιμο, αλλά δεν αντιμετωπίζει πλήρως τις ελλείψεις στην αρχική υπόθεση. Πράγματι, είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι τα NFTs (και υποτιθέμενα «ενδιάμεσα») υπάρχουν και στο κυτταρόπλασμα των βιώσιμων νευρώνων (Lee HG, et al., 2005). Μόνο σε προχωρημένο στάδιο της νόσου είναι μεγάλοι οι αριθμοί εξωκυτταρικών NFTs που προσδιορίζονται, και όταν συναντώνται, οι μεγαλύτεροι αριθμοί εμφανίζονται στη CA-1 περιοχή του ιπόκαμπου, μια περιοχή που είναι εκλεκτικά ευπαθής στην ισχαιμική βλάβη.

Σε μια άλλη μελέτη, τα NFTs (και πιθανώς ολιγομερή ταυ) επιβιώνουν μέσα στο κυτταρόπλασμα των νευρώνων για δεκαετίες (Morsch R, Simon W, Coleman PD., 1999) υποστηρίζοντας κατά της τοξικότητας της φωσφορυλιωμένης ταυ. Σε μια άλλη μελέτη, νευρώνων τα NFTs έδειξαν ανέπαφους μικροσωληνίσκους (Cash AD, et al., 2003), θέτοντας υπό αμφισβήτηση την έννοια ότι η συσσώρευση της φωσφορυλιωμένης ταυ και η αποσταθεροποίηση της συνάθροισης μικροσωληνίσκων πάνε μαζί.

**Δ. Pittsburgh Compound B (PiB):** Η ακριβής και τελική διάγνωση του AD γίνεται μόνο με βιοψία και αυτοψία του εγκεφάλου γιατί μόνο έτσι μπορεί να εντοπισθεί η παρουσία των αμυλοειδών πλακών και των NFTs και να προσδιοριστεί αν η παθολογία συνεισέφερε στον κλινικό φαινότυπο σε έναν ασθενή με άνοια. Το PET scanning με το 11C-labelled Pittsburgh compound B (PiB), μια βενζοθιαζόλη, παράγωγο της θειοφλαβίνης T, ίσως είναι μια μη επεμβατική μέθοδος για την αξιολόγηση του εγκεφαλικού αμυλοειδούς. Αυτή η ένωση διαπερνά εύκολα τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό και δεσμεύεται επιλεκτικά σε αποθέσεις Αβ στον εγκέφαλο που μπορεί να είναι υπό τη μορφή νευριτικών (αλλά όχι διάχυτων, μη

ινιδιακών) πλακών (Bacskai BJ, et al., 2007). Είναι πιθανό ότι η χρήση του σύντομα θα αλλάξει τον τρόπο που οι γιατροί κάνουν διάγνωση και θεραπεία των διαταραχών που σχετίζονται με τη συσσώρευση των Αβ στον εγκέφαλο.

Τα αποτελέσματα των πρώτων μελετών που χρησιμοποιούν αυτήν την μέθοδο σάρωσης, όμως, ήταν κάπως αντιφατικά. Φαίνεται ότι ΡΙΒ που δεσμεύεται στο αμυλοειδές δεν μπορεί να διαφοροποιήσει πάντα τους συμπτωματικούς ΑΔ από τους ασυμπτωματικούς (control) με αμυλοειδή πλάκα (Jack CR Jr, et al., 2008). Ενώ το ΡΙΒ είναι ένα νέο εργαλείο για τη μελέτη της ΑΔ που έχει ανοίξει το δρόμο για την απεικόνιση της λειτουργίας του εγκεφάλου in vivo κατά τρόπο που σχετίζεται με τη δημιουργία αμυλοειδούς πλάκας, απαιτούνται πιο μακροχρόνιες μελέτες για να καθορίσουν τη χρησιμότητά του (Villemagne VL, et al., 2009).

## ΑΙΤΙΟΛΟΓΙΑ

Α. Ηλικία: Μια πτυχή που συχνά αγνοείται είναι ότι η ηλικία αποτελεί, μακράν, έναν από τους μεγαλύτερους παράγοντες κινδύνου για την αιτιολογία της ΑΔ. Πράγματι, ακόμη και σε γενετικά προδιατεθειμένα άτομα, η ασθένεια ουσιαστικά δεν εμφανίζεται παρά μόνο στη μέση ηλικία. Ως εκ τούτου, ανεξάρτητα από το αν κάποιος είναι γενετικά προδιατεθειμένος ή όχι, η γήρανση είναι ουσιαστικός παράγοντας για την ΑΔ, γεγονός που υποδηλώνει έντονα ότι η σχετιζόμενη με την ηλικία διαδικασία εμπλέκεται στην ανάπτυξη της νόσου. Η σχετιζόμενη με την ηλικία διεισδυτικότητα δεν περιορίζεται στην ΑΔ και είναι επίσης ένας παράγοντας κινδύνου σε μια σειρά του άλλες χρόνιες ασθένειες, συμπεριλαμβανομένων άλλων νευροεκφυλιστικών ασθενειών, καρκίνου, αρτηριοσκλήρυνσης, αρθρίτιδας και του εμφυσήματος που δείχνει την πιθανότητα ότι μπορεί να υπάρχουν κοινές αιτίες με διαφορετικές συνέπειες.

Ωστόσο, παραμένει ανοικτό το ερώτημα αν η ΑΔ είναι καθαρά μια εκδήλωση της προχωρημένης ηλικίας, όπως έχει προταθεί, και αν εξακολουθεί να υπάρχει κάτι που χωρίζει τη "γεροντική άνοια", όπως ήταν γνωστή, από την "νόσο του Alzheimer". Η βιβλιογραφία έχει υπαινιχθεί το ενδεχόμενο ότι η παθολογία ΑΔ είναι πιο σοβαρή σε νεότερους ασθενείς που επηρεάζονται, αν και πρόσθετα στοιχεία έχουν καταφέρει να αντικρούσουν τον ισχυρισμό αυτό (Berrios G., 1990). Παρ' όλα αυτά, μια προοδευτική νευρολογική επιδείνωση, αρχής γενομένης από την 6η δεκαετία χωρίς οικογενειακό ιστορικό, δεν εμφανίζεται. Διαφέρει σημαντικά από την αργή απώλεια μνήμης σε έναν ασθενή στην 9<sup>η</sup> δεκαετία πάσχοντα ταυτόχρονα από αθηροσκληρωτική νόσο και από επίδραση πλήθους νοσηρών ασθενειών, των επιπλοκών τους, και ενός μεγάλου καταλόγου φαρμάκων.

Οι δυσχέρειες στη διάγνωση της ΑΔ στους πολύ μεγάλους (δηλαδή, το φάσμα της νευροπαθολογίας στους γνωστικά ανέπαφους ηλικιωμένους κυμαίνεται από ελάχιστες αλλαγές στο προχωρημένο στάδιο από παθολογικά "αποδεδειγμένη" ΑΔ) έχουν γίνει γνωστές από τις αρχικές περιγραφές της ΑΔ. Πράγματι, σε μία μελέτη, νευροπαθολόγοι κατευθυνόμενοι μόνο από την κλινική ιστορία διάγνωσαν ΑΔ στο 76% των ηλικιωμένων ατόμων που κλινικά δεν είχαν άνοια κατά τη διάρκεια της ζωής τους (Brayne C, et al., 2009). Τα στοιχεία αυτά φαίνεται να επισημαίνουν και πάλι μια διακριτή διαφορά, και παθολογική

και κλινική, μεταξύ AD και γεροντικής άνοιας. Η πρώτη που συμβαίνει από μια άγνωστη ακόμη αιτία, και η δεύτερη είναι μια εκδήλωση της προχωρημένης ηλικίας.

B. Γενετική: Σε ένα σημαντικό ποσοστό των ατόμων με νόσο Alzheimer υπάρχουν ενδείξεις για σημαντική γενετική συνιστώσα.

#### Genetic Factors Predisposing to AD.

Chromosome 21	AβPP mutation	↑ Aβ <sub>42</sub> peptide
Chromosome 14	Presenilin-1 mutation	↑ Aβ <sub>42</sub> peptide *
Chromosome 1	Presenilin-2 mutation	↑ Aβ <sub>42</sub> peptide
Down syndrome	AβPP overexpression	↑ Aβ <sub>42</sub> peptide
Chromosome 19	APOE polymorphism	↑ Aβ <sub>40</sub> plaques, CAA
Chromosome 8	CLU polymorphism	Aβ toxicity
Chromosome 11	PICALM polymorphism	Synaptic trafficking???

\* Recent studies suggest that in familial cases, only the Aβ<sub>42</sub>/40 ratio is increased, while the absolute levels decrease

#### **Πίνακας 1:** Γενετικοί παράγοντες προδιάθεσης της AD.

Συγγενείς πρώτου βαθμού ασθενών με AD έχουν κατά τη διάρκεια της ζωής τους υψηλότερη συχνότητα εμφάνισης της AD από τον γενικό πληθυσμό, και 15-35% των ασθενών με νόσο Alzheimer έχουν επηρεάσει πρώτου βαθμού συγγενείς. Με αυθαίρετη διάκριση μεταξύ πρόωρης (<65 ετών) και μεταγενέστερης (> 65 ετών) έναρξης, έχει αποδειχθεί ότι η έγκαιρη οικογενής μορφή της νόσου τείνει να είναι πιο επιθετική, με συγκεκριμένες οικογενείς μορφές που έχουν μια χαρακτηριστική ηλικία έναρξης. Δυστυχώς, η πραγματική επίπτωση των γενετικά συνδεδεμένων AD είναι πιθανό να διαταράσσεται από μία σειρά παραγόντων, δηλαδή: (α) εσφαλμένη διάγνωση ως σποραδική νόσο, λόγω του πρόωρου θανάτου άλλων μέλων της οικογένειας (β) μακράς ζωής οικογένειες που ανέπτυξαν «οικογενή νόσο του Αλτσχάιμερ» (γ) τοπικούς περιβαλλοντικούς παράγοντες που προκαλούν ομάδες με «οικογενή νόσο του Αλτσχάιμερ» (δ) πολλαπλές αλληλεπιδράσεις γονιδίων με το περιβάλλον (ε) εσφαλμένη διάγνωση της AD που οφείλεται σε ανεπαρκή μεταθανάτια δεδομένα.

Παρ' όλα αυτά, ένας αριθμός γενετικών τόπων έχουν εμπλακεί σε οικογενείς περιπτώσεις της AD:

1. Χρωμόσωμα 21: Η θέση του AβPP γονιδίου στο χρωμόσωμα 21 μπορεί να παρέχει μια σύνδεση μεταξύ της παθολογίας που παρατηρήθηκε σε άτομα με σύνδρομο Down (τρισωμία 21), και αυτής που παρατηρείται σε άτομα με AD (Schweber M., 1985). Μια περίπτωση ενός παλαιότερου περιστατικού με σύνδρομο Down, στο οποίο η τρίτη συνιστώσα του χρωμοσώματος 21 δεν είχε την κωδική περιοχή AβPP και στο οποίο ο εγκέφαλος δεν είχε μεγάλου βαθμού παθολογία AD, αποτελεί περαιτέρω απόδειξη της έννοιας της υπερέκφρασης του AβPP. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της τοξικότητας. Επιπλέον, η υπερέκφραση μεταλλαγμένης AβPP σε ποντίκια δείχνει σχετιζόμενες με την



ηλικία ελλείψεις (σε γνωστικά-συμπεριφορικά τεστ) και μορφολογικά προβλήματα στις συνάψεις των νευρώνων υποστηρίζοντας ότι η μεταλλαγμένη ΑβΡΡ παίζει παθογόνο ρόλο. Η απώλεια νευρώνων από την άλλη, δεν έχει αποδεχθεί. Η φωσφορυλίωση της tau δεν συμβαίνει αν δεν υπάρχουν πρόσθετες παθογόνες μεταλλάξεις ενσωματωμένες στο μοντέλο. Σε περιπτώσεις σποραδικής μορφής, όταν δηλαδή η ασθένεια εμφανίζεται σε άτομα ηλικίας άνω των 60 ετών, δεν εντοπίζονται μεταλλάξεις στα γονίδια που κωδικοποιούν την ΑβΡΡ ή την πρεσενιλίνη που θα δούμε παρακάτω.

2. Χρωμόσωμα 14/ Χρωμόσωμα 1: Η πλειονότητα (~ 70%) των περιπτώσεων της πρώιμης έναρξης οικογενούς AD σχετίζονται με μεταλλάξεις σε δύο γονίδια, της πρεσενιλίνης 1 (PS1) και πρεσενιλίνης 2 (PS2) , που βρίσκονται στα χρωμοσώματα 14 και 1, αντίστοιχα (Sherrington R, et al., 1995). Μέχρι σήμερα, πάνω από τριάντα διαφορετικές παθογόνες μεταλλάξεις σε αυτά τα γονίδια έχουν περιγραφεί από ένα σύνολο 60 άσχετων συγγενικά ανθρώπων (Tanzi RE, et al., 1996). Είναι πλέον γενικά αποδεκτό ότι οι πρεσενιλίνες αποτελούν μέρος του συμπλόκου γ-σεκρετάσης, απαραίτητο για τη σύνθεση των Αβ πεπτιδίων (κωδικοποιούν συστατικά ενός ενζύμου το οποίο ευθύνεται για το κόψιμο της ΑβΡΡ). Μεταλλάξεις στους τόπους αυτούς μεταβάλλουν προφανώς τη μεταποίηση του Αβ προς όφελος της αυξημένης σύνθεσης και εναπόθεσης και συνεπώς δημιουργούνται οι αμυλοειδείς πλάκες. Ωστόσο, στις περιπτώσεις οικογενούς πρώιμης έναρξης AD που σχετίζονται με μεταλλάξεις της πρεσενιλίνης είναι αξιοσημείωτες οι εκτεταμένες αποθέσεις του Αβ σε όλο τον εγκέφαλο, συμπεριλαμβανομένης της λευκής ουσίας και σε μεγάλο βαθμό εντός των αιμοφόρων αγγείων (Castellani RJ, Lee HG, et al., 2008).
  
3. Χρωμόσωμα 19: Σε περιπτώσεις σποραδικής μορφής, όταν δηλαδή η ασθένεια εμφανίζεται σε άτομα ηλικίας άνω των 60 ετών, δεν εντοπίζονται μεταλλάξεις στα γονίδια που κωδικοποιούν την ΑβΡΡ ή την πρεσενιλίνη. Προκειμένου οι ερευνητές να εντοπίσουν τους γενετικούς παράγοντες που εμπλέκονται στις συνηθέστερες μορφές της νόσου, έχουν εξετάσει γονίδια τα οποία κωδικοποιούν πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με την ΑβΡΡ και προκαλούν αύξηση της συσσώρευσης του πεπτιδίου Αβ. Χάρη σε πειράματα γενετικής σύνδεσης εντοπίστηκε μια περιοχή στο μεγάλο βραχίονα του χρωμοσώματος 19, η οποία περιλαμβάνει το γονίδιο που κωδικοποιεί την απολιποπρωτεΐνη Ε (APOE) (Pericak-Vance MA., et al., 1991). Η γενετική ανάλυση που ακολούθησε έδειξε ότι η συμβολή του APOE στη νόσο του Alzheimer είναι όντως σημαντική.

Η apoE4 είναι μια πρωτεΐνη 34kD, που παίζει ρόλο στο μεταβολισμό των λιπιδίων καθώς είναι μια πρωτεΐνη μεταφοράς (υπεύθυνη για το πακετάρισμα της χοληστερόλης και τη μεταφορά της μέσω της κυκλοφορίας του αίματος) και αποτελεί συστατικό των αμυλοειδών πλακών και του NFT. Υπάρχουν τρία κύρια αλληλόμορφα του γονιδίου APOE: το ε2, το ε3 και το ε4. Διαπιστώθηκε

ότι η παρουσία τουλάχιστον ενός αλληλομόρφου ε4 ήταν σχεδόν τρεις φορές συχνότερη στα άτομα που έπασχαν από τη νόσο του Alzheimer από ό,τι σε άτομα από ομάδα αναφοράς (Corder EH., et al., 1993). Διαπιστώθηκε επίσης ότι οι γονότυποι του γονιδίου APOE επηρεάζουν την ηλικία κατά την οποία εμφανίζεται η νόσος. Τυπικά η ηλικία εμφάνισης είναι τα 80-85 χρόνια, αλλά τα άτομα που φέρουν το αλληλόμορφο ε4 του APOE σε ετερόζυγη κατάσταση και εκδηλώνουν τη νόσο εμφανίζουν τα πρώτα συμπτώματά της συνήθως σε ηλικία περίπου 75 ετών. Τα άτομα που φέρουν το ε4 σε ομόζυγη κατάσταση και εκδηλώνουν τη νόσο εμφανίζουν τα πρώτα συμπτώματα ακόμα νωρίτερα, μεταξύ 65 και 70 ετών (Farrer L.A., et al 1997).

Αν και η συσχέτιση μεταξύ της νόσου του Alzheimer και της APOE έχει επιβεβαιωθεί από πολλές μελέτες, ο μηχανισμός που συνδέει το μόριο αυτό με την ασθένεια δεν είναι γνωστός. Ο γονότυπος του APOE θεωρείται ότι ευθύνεται για το 50% περίπου της προδιάθεσης για την όψιμη έναρξη της νόσου του Alzheimer, αλλά δεν αποτελεί ούτε αναγκαία ούτε ικανή συνθήκη για την εκδήλωσή της.

Ενδιαφέρον έχει το γεγονός ότι οι απολιποπρωτεΐνες αλληλεπιδρούν με άλλες πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην παθογένεια της AD, συμπεριλαμβανομένων των tau και Αβ (Strittmatter WJ, et al., 1993). Η APOE, πιθανώς με απομόνωση μέσω δεσμευτικών πρωτεϊνών, εξαλείφει την νευροτοξικότητα του Αβ σε καλλιέργειες κυττάρων από τον ιππόκαμπο (Whitson JS, et al., 1994). Επίσης, το οξειδωτικό στρες θα ήταν σημαντικό για την δράση της APOE, δεδομένου ότι ο σχηματισμός του APOE / Αβ συμπλόκου αυξάνεται στο οξυγονωμένο περιβάλλον και καταργείται πλήρως υπό συνθήκες μείωσης. Επιπλέον, η οξειδωμένη APOE ε4 σχηματίζει συμπλέγματα με το Αβ σε σημαντικά υψηλότερο ποσοστό από ό,τι με το APOE ε3. Ως εκ τούτου, η οξείδωση του APOE, μόνο της ή δεσμευμένης με την Αβ πρωτεΐνη, μπορεί να επηρεάσει τη συγγένεια των υποδοχέων και / ή άλλες καταβολικές αλληλεπιδράσεις.

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

Από τα παραπάνω φαίνεται ότι η νόσος είναι πιθανό να προκαλείται από πολλαπλούς γενετικούς παράγοντες. Στην πλειονότητα των περιπτώσεων οι γενετικοί παράγοντες δρουν σαν αιτίες προδιάθεσης, χωρίς να είναι ικανοί να προκαλέσουν την ασθένεια αλλά ικανοί να αυξήσουν τον κίνδυνο εμφάνισής της. Οι γενετικοί παράγοντες μπορούν να ασκήσουν

την παθογόνο δράση τους αλληλεπιδρώντας με περιβαλλοντικούς παράγοντες ή κάτω από φυσιολογικές ή παθολογικές συνθήκες. Μπορούν βέβαια να αλληλεπιδρούν και μεταξύ τους συμβάλλοντας έτσι στην εμφάνιση της νόσου.

Γ. Άλλοι Παράγοντες: Υπάρχουν και άλλοι παράγοντες που ευθύνονται για την AD σε διαφορετικό βαθμό ο καθένας. Στον παρακάτω πίνακα συνοψίζονται οι παράγοντες αυτοί:

ΒΕΒΑΙΟΙ	ΠΙΘΑΝΟΙ	ΥΠΟΤΙΘΕΜΕΝΟΙ
1. Ηλικία	1.Κρανιοεγκεφαλική κάκωση	1. Αλουμίνιο
2. Οικογενειακό ιστορικό	2.Θυρεοειδοπάθεια	2. Αντιφλεγμονώδη (προστατευτικός)
3. Σ.Down	3.Ηλικία της μητέρας	3. Οιστρογόνα (προστατευτικός)
4. Γονίδια υπεύθυνα για τη NA πρώιμης έναρξης (APP,PS1,PS2)	4.Κατάθλιψη	4. Αντιοξειδωτικά (προστατευτικός)
5. Γονίδια υπεύθυνα για τη NA όψιμης έναρξης (APO E4).	5.Κάπνισμα (προστατευτικός)	
	6.Επίπεδο εκπαίδευσης	

**Πίνακας 2:** Συνολικά οι παράγοντες που παίζουν ρόλο στην AD.

#### Δ. Θεραπεία:

1. Χολινεργικά: Η απώλεια της χολινεργικής λειτουργίας έχει βρεθεί να σχετίζεται στενά με τη γνωστική δυσλειτουργία. Η AD χαρακτηρίζεται από προοδευτική και μη αναστρέψιμη καταστροφή νευρώνων, κυρίως χολινεργικών, σε συγκεκριμένες περιοχές του εγκεφάλου. Οι αναστολείς της ακετυλοχολινεστεράσης χρησιμοποιούνται για τη μείωση του ρυθμού αποικοδόμησης της ακετυλοχολίνης (ACh), με αποτέλεσμα αύξηση της συγκέντρωσής της στον εγκέφαλο η οποία μειώνεται λόγω απώλειας των χολινεργικών νευρώνων. Κατά τη διάρκεια των δύο τελευταίων δεκαετιών, πραγματοποιήθηκε μια σειρά από θεραπείες που στοχεύουν στην αναστολή χολινεστεράσης και στη μετασυναπτική χολινεργική διέγερση με μουσκαρινικούς αγωνιστές. Έχει διερευνηθεί η στόχευση στην προσυναπτική χολινεργική διέγερση με νικοτινικούς αγωνιστές (Hebert LE, et al., 2003). Αυτά τα φάρμακα σταθεροποιούν την εξασθένηση των γνωστικών λειτουργιών μέχρι 3-6 μήνες, αν και δεν έχει επιτευχθεί καμία τροποποίηση της διάρκειας της νόσου ή της γενικής εξέλιξη της (Giacobini E., 2001) (Giacobini E., 2002).

2. Αντιοξειδωτικά: Πολλαπλές μελέτες υποδεικνύουν ότι το οξειδωτικό στρες είναι μια σημαντική παθογόνα διαδικασία που σχετίζεται με τη γήρανση και το AD, ενώ έχει αποδειχθεί ότι προηγείται των παθολογικών αλλοιώσεων του AD, συμπεριλαμβανομένων των πλακών και του NFT (Castellani RJ, Harris PL, et al., 2001) (Nunomura A, et al., 2001). Τα αντιοξειδωτικά μπορεί να επιβραδύνουν έτσι την γνωστική εξασθένηση στο AD ή να επιβραδύνουν την εξέλιξη της νόσου (Zandi PP, et al., 2004).

3. Στατίνες: Τα εγκεφαλικά επίπεδα Αβ έχει αποδειχθεί ότι μειώνονται in vivo και τα αποτελέσματα από τη χρήση στατινών δείχνουν μείωση των NFT κατά την αυτοψία (Li G, et al., 2007). Οι στατίνες μπορεί να επιβραδύνουν την εξέλιξη της νευροεκφυλιστικής διαδικασίας, αλλά μπορεί να μην είναι σε θέση να αντιστρέψουν τον εκφυλισμό των νευρώνων μετά την εμφάνισή του.

4. Ανταγωνιστές των υποδοχέων του γλουταμινικού NMDA: Το γλουταμινικό είναι διεγερτικός νευροδιαβιβαστής του νευρικού συστήματος, αλλά υπερβολικές ποσότητες στον εγκέφαλο λόγω υπερδιέγερσης των υποδοχέων γλουταμινικού μπορεί να οδηγήσουν σε νευρωνικό θάνατο. Ένας μη ανταγωνιστικός αναστολέας των υποδοχέων NMDA, η μεμαντίνη, αποτρέπει την υπερδιέγερσή τους από το γλουταμινικό. Η μεμαντίνη έχει αποδειχθεί ότι είναι μέτρια αποτελεσματική στη θεραπεία της μέτριας έως σοβαρής AD. Τα αποτελέσματά της στα αρχικά στάδια της νόσου είναι άγνωστα (Areosa Sastre A, et al., 2004).

5. Διατροφή: Η μεσογειακή διατροφή απέδειξε ότι σχετίζεται με χαμηλότερο κίνδυνο εμφάνισης της νόσου AD. Μια μεταγενέστερη μελέτη έδειξε ότι η μεσογειακή διατροφή συνδέεται επίσης με χαμηλότερη θνησιμότητα στην AD λόγω πιθανής επίδραση δόσης-απόκρισης. Αυτή η διατροφή χαρακτηρίζεται από υψηλή κατανάλωση λαχανικών, φρούτων και δημητριακών. Επιπλέον, μια χαμηλή έως μέτρια κατανάλωση των κορεσμένων λιπαρών οξέων, μέτρια υψηλή κατανάλωση ψαριών, χαμηλή έως μέτρια κατανάλωση γαλακτοκομικών προϊόντων, χαμηλή κατανάλωση κρέατος και πουλερικών, καθώς και μια μέτρια ποσότητα αιθανόλης (Scarmeas N, et al., 2006).

## **ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑ**

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

Μια σύντομη αναδρομή στη μελέτη των μιτοχονδρίων περιλαμβάνει τα ακόλουθα:

- 1886: Ανακάλυψη μιτοχονδρίων από τον R. Altmann.
- 1898: Εισαγωγή του όρου «μιτοχόνδριο» (μίτος + χόνδρος).
- 1904: Περιγραφή μιτοχονδρίων σε φυτικά κύτταρα.
- 1934: Απομόνωση των οργανιδίων με υπερφυγοκέντρηση.
- 1952: Παρατήρηση της δομής των μιτοχονδρίων με τη χρήση του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου και συσχέτιση δομής με λειτουργία.
- 1961: Χημειοσμοτική θεωρία από τον P. Mitchell.
- 1971: Διατύπωση της θεωρίας της ενδοσυμβίωσης.
- 1981: Αλληλούχιση του μιτοχονδριακού DNA.



**Εικόνα 12:** Δομή ενός μιτοχονδρίου όπως διακρίνεται με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο.

Τα μιτοχόνδρια αποτελούν συνήθως το 18-20% του συνολικού κυτταροπλασματικού όγκου ενός ευκαρυωτικού κυττάρου. Ο αριθμός των μιτοχονδρίων σε ένα κύτταρο ποικίλλει σε μεγάλο βαθμό στους διάφορους οργανισμούς και κυτταρικούς τύπους και ανάλογα με την κυτταρική δραστηριότητα, από ένα ως και αρκετές χιλιάδες. Το σχήμα τους είναι ωσειδές και οι διαστάσεις τους κυμαίνονται από 0,3-1μm σε διάμετρο και 1-10μm σε μήκος, έχουν δηλαδή τις διαστάσεις βακτηρίου. Όπως έχει βρεθεί με ανοσοφθορισμό, η κατανομή των μιτοχονδρίων μέσα στα κύτταρα ακολουθεί σε πολλές περιπτώσεις την κατανομή των μικροσωληνίσκων, ενώ με παρατήρηση σε μικροσκόπια αντίθετης φάσης και μικροκινηματογράφηση έχει διαπιστωθεί διαρκής κίνηση και αλλαγή σχήματος (Bereiter-Hahn J., Vöth M., 2005). Πιθανότητα αυτή η πλαστικότητα του σχήματός τους και η ικανότητά τους να αλλάζουν θέση οφείλεται στις αλληλεπιδράσεις με τον κυτταροσκελετό, με τον οποίο φαίνεται να βρίσκονται σε επαφή (Rappaport L., et al., 1998). Ακόμη έχουν την ικανότητα να συντήκονται και να πολλαπλασιάζονται με διαίρεση.

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

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

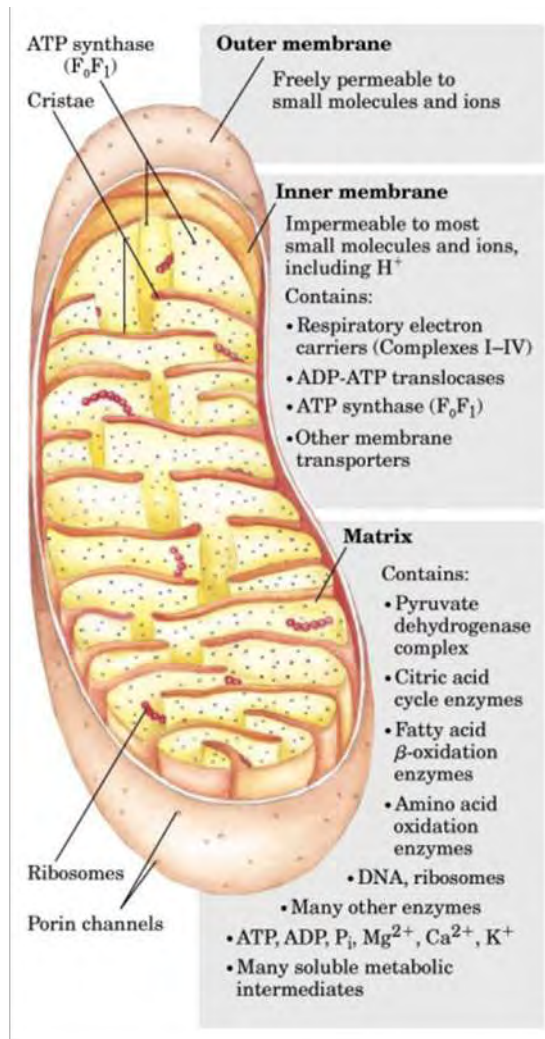
ΕΞΩΤΕΡΙΚΗ ΜΕΜΒΡΑΝΗ (outer membrane): Περιβάλλει ολόκληρο το μιτοχόνδριο. Περιέχει πορίνες, που σχηματίζουν πόρους και για αυτό είναι διαπερατή από όλα τα μικρά μόρια και ιόντα (μόρια με MW μικρότερο από 10kD).

ΔΙΑΜΕΜΒΡΑΝΙΚΟΣ ΧΩΡΟΣ (intermembrane space): Ο χώρος μεταξύ της εσωτερικής και εξωτερικής μεμβράνης, ο οποίος λόγω της διαπερατότητας της εξωτερικής μεμβράνης περιέχει ιόντα σε ισοδύναμες συγκεντρώσεις με το κυτταρόπλασμα.

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

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

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



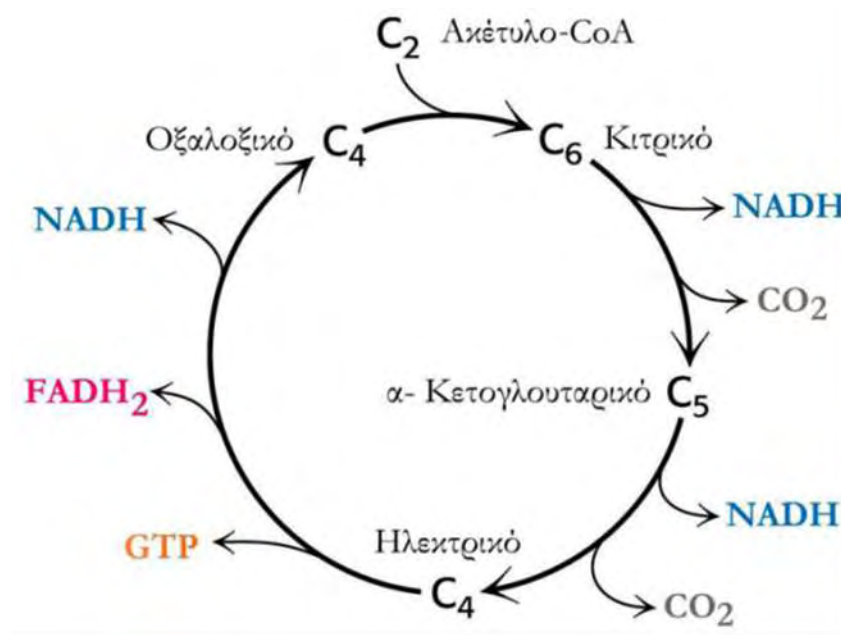
**Εικόνα 13:** Σχηματική απεικόνιση της δομής του μιτοχονδρίου

Λειτουργίες του μιτοχονδρίου:

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

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

από το κύτταρο, και e- υψηλής ενέργειας που μεταφέρονται από τα ενεργοποιημένα μόρια φορείς NADH και FADH<sub>2</sub>.



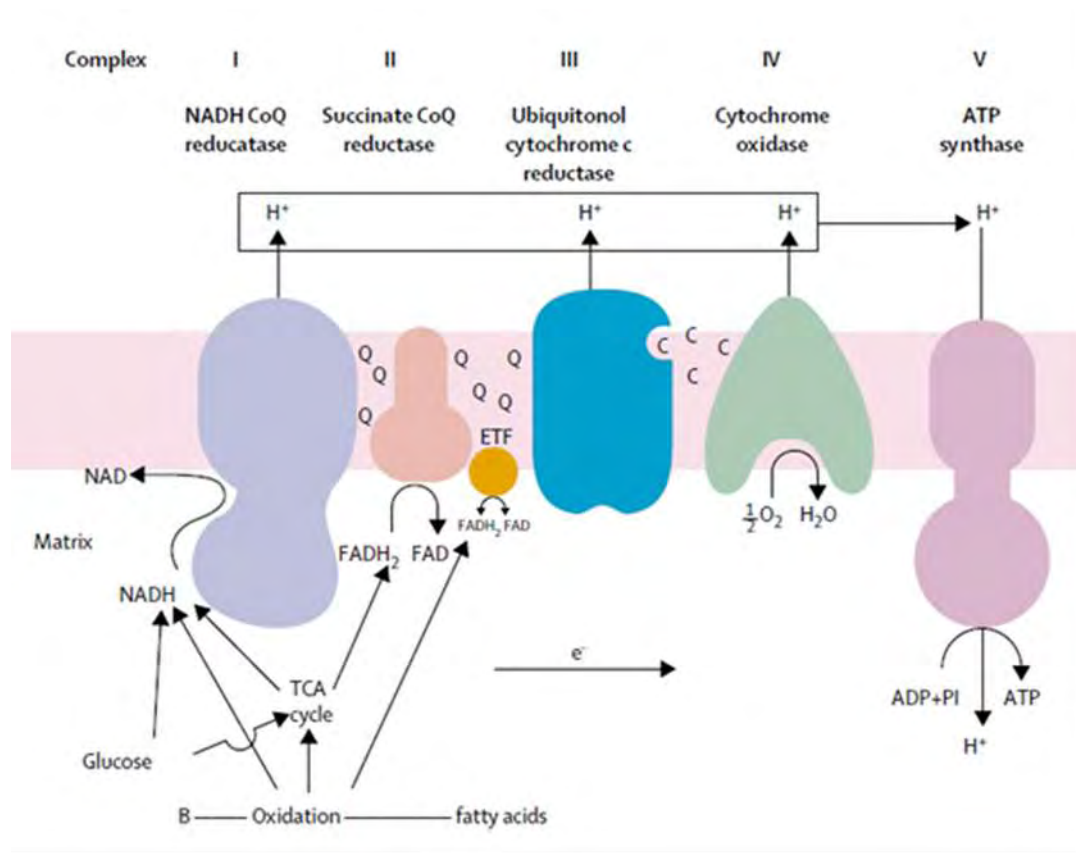
**Εικόνα 14:** Σχηματική απεικόνιση του κύκλου του κιτρικού οξέος.

Στη συνέχεια τα e- αυτά μεταφέρονται στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη, όπου εισέρχονται στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων, γνωστή επίσης και ως αναπνευστική αλυσίδα. Η αναπνευστική αλυσίδα αποτελείται από τέσσερα σύμπλοκα στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη τα οποία λειτουργούν σαν αντλία πρωτονίων. Είναι οργανωμένη με τέτοιο τρόπο ώστε να αυξάνεται το αναγωγικό δυναμικό σε κάθε βήμα της μεταφοράς των ηλεκτρονίων από το NADH στο O<sub>2</sub>. Η μεταφορά ηλεκτρονίων συνδέεται με τη μετακίνηση πρωτονίων κατά μήκος της εσωτερικής μεμβράνης και αυτή η ηλεκτροχημική διαβάθμιση μετατρέπεται σε χημική ενέργεια για την παραγωγή ATP από την ATP συνθάση. Τα ηλεκτρόνια από το NADH μεταφέρονται στην προσθετική ομάδα FMN της οξειδοαναγωγάσης του ζεύγους NADH-συνενζύμου Q (σύμπλοκο I). Τα ηλεκτρόνια εμφανίζονται στην QH<sub>2</sub>, την ανηγμένη μορφή της ουβικινόνης (Q). Το ένζυμο ηλεκτρική αφυδρογονάση του κύκλου του κιτρικού οξέος είναι συνιστώσα του συμπλόκου της αναγωγάσης του ζεύγους ηλεκτρικού συνενζύμου Q (σύμπλοκο II), το οποίο προσφέρει ηλεκτρόνια από το FADH<sub>2</sub> στην Q για το σχηματισμό QH<sub>2</sub>. Αυτός ο φορέας μεταφέρει τα ηλεκτρόνια του στην οξειδοαναγωγάση του ζεύγους Q-κυτοχρώματος c (σύμπλοκο III) το οποίο με τη σειρά του ανάγει το κυτόχρωμα c.

Το κυτόχρωμα c μεταφέρει τα ηλεκτρόνια προς την οξειδάση του κυτοχρώματος c (σύμπλοκο IV). Ένα άτομο σιδήρου και ένα άτομο χαλκού στην οξειδάση αυτή μεταφέρουν τα ηλεκτρόνια προς το O<sub>2</sub>, τον τελικό αποδέκτη, για το σχηματισμό H<sub>2</sub>O. Η ροή των ηλεκτρονίων μέσω των τριών ασύμμετρα προσανατολισμένων διαμεμβρανικών συμπλόκων (I, III, IV) έχει ως αποτέλεσμα την άντληση πρωτονίων έξω από τη μιτοχονδριακή μήτρα προς το διαμεμβρανικό χώρο και την παραγωγή ενός μεμβρανικού δυναμικού. Παράγεται μια πρωτονιοκίνητη δύναμη η οποία αποτελείται από μια βαθμίδωση του pH, με βασική την πλευρά της μήτρας, και ένα δυναμικό μεμβρανικό δυναμικό, με αρνητική την πλευρά



της μήτρας, Η ροή των πρωτονίων μέσω της ATP συνθάσης οδηγεί στην παραγωγή ATP από ADP και Pi. Η διαδικασία αυτή παρατηρήθηκε από τον Mitchell και ονομάζεται χημειόσμωση (Mitchell P, Moyle J., 1967).



**Εικόνα 15:** Σχηματική απεικόνιση της αναπνευστικής αλυσίδας. Αποτελείται από τέσσερα σύμπλοκα τα οποία λειτουργούν ως αντλία πρωτονίων. Η μεταφορά ηλεκτρονίων συνδέεται με τη μετακίνηση πρωτονίων κατά μήκος της εσωτερικής μεμβράνης και αυτή η ηλεκτροχημική διαβάθμιση μετατρέπεται σε χημική ενέργεια για την παραγωγή ATP από την ATP συνθάση.

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

Γ. Δημιουργία ενεργών ριζών οξυγόνου (ROS): Τα μιτοχόνδρια αποτελούν την κύρια πηγή δημιουργίας ενεργών ριζών οξυγόνου (ROS) μέσα στο κύτταρο, καθώς παράγονται σαν παραπροϊόντα της μεταφοράς ηλεκτρονίων. Δηλαδή μια μικρή ποσότητα μοριακού οξυγόνου μπορεί να υποστεί αναγωγή στα ενδιάμεσα βήματα της αναπνευστικής αλυσίδας και στη συνέχεια με τη δράση διαφόρων ενζύμων να σχηματιστούν ελεύθερες ρίζες. Για αυτό το λόγο τα μιτοχόνδρια έχουν αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς. Το  $O_2$  μετατρέπεται σε  $H_2O_2$  με τη βοήθεια του ενζύμου δισμουτάση του υπεροξειδίου (SOD). Παρ' όλα αυτά η αλληλεπίδραση του  $H_2O_2$  με Fe και Cu παράγει  $OH\bullet$  που μπορεί να δημιουργήσει βλάβες στο mtDNA και λιπιδιακή υπεροξειδωση. Διαταραχές στη δημιουργία των ROS ή στους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς προκαλούν οξειδωτικό stress και κατ' επέκταση μιτοχονδριακή και κυτταρική βλάβη (π.χ. βλάβες στην αναπνευστική αλυσίδα, βλάβες στο DNA, λιπιδιακή οξειδωση) (Allen JF., Raven JA., 1996).

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

## **ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΩΝ ΜΕ ΤΗ ΝΟΣΟ ΤΟΥ ALZHEIMER**

Η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία έχει εμφανιστεί ως μία από τις πιο συζητημένες υποθέσεις που ενεργούν ως έναυσμα για την παθογένεση της νόσου Alzheimer. Τα μιτοχόνδρια αναλαμβάνουν κεντρικές λειτουργίες του κυττάρου, συμπεριλαμβανομένης της παραγωγής ATP, της ομοίωσης του ασβεστίου, της παραγωγής δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) και της σηματοδότησης μέσω της απόπτωσης. Αν και ο ρόλος τους για την αιτιολογία της νόσου είναι αμφιλεγόμενος φαίνεται πως η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία εμφανίζεται κατά την εξέλιξη της νόσου συμβάλλοντας στην έναρξη και την εξέλιξή της (Renato X. Santos, et al., 2010).

Επιπλέον, οι μιτοχονδριακές διαταραχές κληρονομούνται εξ ολοκλήρου από τη μητέρα στο παιδί και χαρακτηρίζονται από μεταβλητή φαινοτυπική έκφραση. Αρσενικοί και θηλυκοί απόγονοι είναι εξίσου πιθανό να λάβουν μεταλλαγμένο μητρικό μιτοχονδριακό DNA (mtDNA). Η ίδια mtDNA μετάλλαξη μπορεί να προσβάλλει διαφορετικά όργανα σε διαφορετικούς ανθρώπους και μπορεί να οδηγήσει σε μικρές ή μεγάλες βλάβες. Ο πιο σημαντικός παράγοντας κινδύνου για την ανάπτυξη AD σε προχωρημένη ηλικία προϋποθέτει ασθενή γονιό με AD. Αν και έχουν βρεθεί σπάνιες γενετικές μεταλλάξεις στο οικογενές AD πρώιμης έναρξης συμπτωμάτων η γενετική των συνηθέστερων μορφών της όψιμης έναρξης AD παραμένει αόριστη (Lisa Mosconi, et al., 2010). Το 2007 δείχθηκε ότι τα παιδιά που ήταν γνωστικά φυσιολογικά αλλά με μητέρες με AD όψιμης έναρξης, εκφράζουν ένα βιολογικό φαινότυπο που χαρακτηρίζεται από προοδευτική μείωση στον εγκέφαλο του μεταβολισμού της γλυκόζης στις ίδιες περιοχές με τους ασθενείς με AD, όπως

μετρήθηκε σε 2 -[18F] φθορο-2-δεοξυ-D-γλυκόζης με τομογραφία εκπομπής ποζιτρονίων (18F-FDG PET) . (Mosconi L, et al. 2007). Αντίθετα τα παιδιά με προσβεβλημένους από AD πατέρες ή παιδιά γονιών χωρίς άνοια δε δείχνουν ανωμαλίες στο μεταβολισμό. Η γενετική βάση για τη μετάδοση μεταβολικών ελλειμμάτων από τη μητέρα με AD στο παιδί δεν είναι γνωστή.

Η εμπλοκή των μιτοχονδρίων στην παθογένεση της ασθένειας προτάθηκε αρχικά με βάση την παρατήρηση ότι ο μεταβολισμός της γλυκόζης είναι μειωμένος στη νόσο. Ο πρωταγωνιστικός ρόλος της λειτουργίας των μιτοχονδρίων στη ρύθμιση μοριακών διαδικασιών που εμπλέκονται στο μεταβολισμό της γλυκόζης υποδηλώνει την πιθανότητα ότι οι μεταλλάξεις του μιτοχονδριακού DNA, που έχουν ως αποτέλεσμα μιτοχονδριακή δυσλειτουργία και οξειδωτική βλάβη, μπορεί να εμπλέκονται στην παθοφυσιολογία της. Η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία μπορεί να είναι επίσης υπεύθυνη για αλλαγές στο μεταβολισμό της γλυκόζης στους ιστούς του εγκεφάλου με AD (Lin MT, Beal MF., 2006) και στη μεταβολική δυσλειτουργία των παιδιών από μητέρες με AD. Το γεγονός ότι το mtDNA κληρονομείται αποκλειστικά από τη μητέρα στον άνθρωπο προσφέρει υποστήριξη σε αυτή την υπόθεση.

Εκτός από τα μειωμένα επίπεδα του μεταβολισμού της γλυκόζης ακόμη ένα κύριο χαρακτηριστικό των ασθενών είναι η ανεπάρκεια κυτοχρωμικής οξειδάσης c (COX) στον εγκέφαλο (Swerdlow RH., 2007) (Mutisya EM., Bowling AC., Beal MF., 1994). Η COX (ETC σύμπλοκο IV) είναι το μιτοχονδριακό ένζυμο που είναι υπεύθυνο για την ενεργοποίηση του οξυγόνου για το μεταβολισμό αερόβιας ενέργειας και είναι κριτικά συνδεδεμένη με την παραγωγή ATP στα μιτοχόνδρια. Η COX εντοπίζεται κυρίως στα μιτοχόνδρια κοντά στις διεγερτικές συνάψεις στους δενδρίτες, και η δραστηριότητά της είναι στενά συνδεδεμένη με τη ρύθμιση του CMRglc (εγκεφαλικού μεταβολικού ρυθμού της κατανάλωσης γλυκόζης) στις συνάψεις (Wong-Riley MTT., 1989).

Έχουν βρεθεί επιπλέον αλλαγές στην ενεργότητα κάποιων ενζύμων του κύκλου του Krebs με βασικότερες τη μείωση της ενεργότητας της πυροσταφυλικής δεϋδρογονάσης και της α-κετογλουταρικής δεϋδρογονάσης, ένζυμα κλειδιά του κύκλου (Gibson Gary E., et al., 2008). In vitro πειράματα έχουν δείξει ότι το Αβ πεπτιδίο καταστέλλει την COX, την πυροσταφυλική δεϋδρογονάση και την α-κετογλουταρική δεϋδρογονάση προτείνοντας ότι το Αβ έχει άμεση επίδραση στην παραγωγή της ενέργειας στα μιτοχόνδρια (Pérez-Gracia, et al., 2008).

Οι μελέτες δείχνουν αλλαγές όχι μόνο στη μορφολογία των μιτοχονδρίων αλλά και στην κατανομή τους. Τα μιτοχόνδρια φαίνεται να συγκεντρώνονται γύρω από τον πυρήνα των προσβεβλημένων κυττάρων (Wang Xinglong, et al., 2008). Τα παραπάνω ευρήματα έχουν εντοπιστεί τόσο σε νευρώνες, που είναι ο πρώτος στόχος της ασθένειας και περιέχουν μεγάλο αριθμό μιτοχονδρίων, όσο και σε άλλα κύτταρα όπως οι ινοβλάστες. Επίσης, από αυτοψίες εγκεφάλων έχει εντοπιστεί Αβ αμυλοειδές στις μιτοχονδριακές ακρολοφίες (Petersen Camilla, et al., 2008).

Η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία είναι μια σημαντική αιτία για την εμφάνιση οξειδωτικού stress στον εγκέφαλο ασθενών. Ο εγκέφαλος είναι ευαίσθητος στο οξειδωτικό stress λόγω της υψηλής περιεκτικότητας του σε λιπίδια, των υψηλών απαιτήσεων του σε ενέργεια και

των χαμηλών επιπέδων του σε αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς. Πράγματι αυξημένοι δείκτες οξειδωτικού stress, έχουν βρεθεί σε προσβεβλημένες περιοχές του εγκεφάλου, στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό, στο πλάσμα, στον ορό και στα ούρα ασθενών με Alzheimer υποδεικνύοντας την αυξημένη παραγωγή ελεύθερων ριζών από τα μιτοχόνδρια. Η υπερπαραγωγή των ROS από τα δυσλειτουργικά μιτοχόνδρια μπορεί να προκαλέσει οξειδωτική βλάβη σε μακρομόρια όπως τα λιπίδια, τις πρωτεΐνες και τα νουκλεϊκά οξέα, με αποτέλεσμα την αποσταθεροποίηση της δομής της κυτταρικής μεμβράνης, αλλαγή στη διαπερατότητα της μεμβράνης των μιτοχονδρίων, τη συγκέντρωση μη αναδιπλωμένων ή μη φυσιολογικά αναδιπλωμένων πρωτεϊνών και μεταλλάξεις στο DNA.

Οι αλλαγές αυτές στα επίπεδα ελευθέρων ριζών είναι αντιστρόφως ανάλογες των εναλλαγών του μιτοχονδριακού μεμβρανικού δυναμικού μέσω τριών κυρίως μηχανισμών: 1) Διακοπή της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων, της οξειδωτικής φωσφορλίωσης και της παραγωγής ATP, 2) Απελευθέρωση πρωτεϊνών που ενεργοποιούν τις κασπάσες και 3) Αλλοίωση του οξειδοαναγωγικού δυναμικού, το οποίο οδηγεί στην παραγωγή ROS. Η μιτοχονδριακή βλάβη και δυσλειτουργία είναι βασικό χαρακτηριστικό του κυτταρικού θανάτου που μεσολαβείται από ROS. Το οξειδωτικό stress ή η κυτταροπλασματική υπερφόρτωση σε ιόντα ασβεστίου είναι παράγοντες που μπορεί να οδηγήσουν στη δημιουργία του πόρου μετάπτωσης της μιτοχονδριακής διαπερατότητας, (mitochondria Permeability Transition Pore, mPTP). Είναι ένα μη ειδικό πρωτεϊνικό κανάλι διαπερατό σε πρωτεΐνες μεγάλου μοριακού βάρους (μεγέθους μέχρι 1500Da) και σε ιόντα. Το οξειδωτικό stress ή η κυτταροπλασματική υπερφόρτωση σε ιόντα ασβεστίου είναι παράγοντες που μπορεί να οδηγήσουν στη δημιουργία του πόρου, η οποία έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια του μιτοχονδριακού μεμβρανικού δυναμικού (Douglas R. Green and John C. Reed., 1998). Το όριο των επιπέδων οξειδωτικού stress που απαιτούνται για αυτήν την ενεργοποίηση φαίνεται να είναι χαμηλότερο στα καταπονημένα μιτοχόνδρια. Η ενεργοποίηση του πόρου οδηγεί στη διάγκωση της μιτοχονδριακής θεμέλιας ουσίας (matrix) και την απελευθέρωση κυτοχρώματος c και άλλων παραγόντων, με τελικό αποτέλεσμα την απόπτωση. Σε εγκεφάλους ασθενών με Alzheimer έχουν παρατηρηθεί αυξημένα επίπεδα θρυμματισμένου DNA και αυξημένη ενεργοποίηση αποπτωτικών πρωτεϊνών όπως Bax και κασπάση-3 που δείχνουν την ενεργοποίηση μονοπατιών απόπτωσης (Su JH., et al., 2002).

Τα μη φυσιολογικά μιτοχόνδρια λόγω της αλλαγής στη διαπερατότητα της μεμβράνης τους ενεργοποιούν μονοπάτια απόπτωσης απελευθερώνοντας κυτόχρωμα c και  $Ca^{2+}$  σε καταστάσεις που αυτό δεν είναι απαραίτητο.

Ο ρόλος του μιτοχονδριακού γονιδιώματος που αλλάζει στην παθογένεια της γήρανσης και στο AD χρειάζεται περαιτέρω διεκκρίση, και είναι πιθανό ότι ο μητρικά κληρονομικός μεταβολικός ενδοφαινότυπος μπορεί να είναι χρήσιμος για τέτοιες έρευνες.

## ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΕΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ

Το μιτοχονδριακό γονιδίωμα υποβάλλεται σε 10 – 17 φορές υψηλότερο ποσοστό μεταλλάξεων από το πυρηνικό γονιδίωμα. Πιθανώς υπεύθυνο είναι το γεγονός ότι το μιτοχονδριακό DNA βρίσκεται κοντά στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη και είναι ιδιαίτερα εκτεθειμένο σε μεταλλαξιγόνες ελεύθερες ρίζες (ROS) που παράγονται από την ίδια την αναπνευστική αλυσίδα. Μια προστατευτική αλληλεπίδραση ιστονών, καθώς και ένας αποτελεσματικός μηχανισμός επιδιόρθωσης του DNA απουσιάζουν. Το γεγονός ότι το ανθρώπινο μιτοχονδριακό γονιδίωμα είναι εξαιρετικά συμπαγές και δεν περιέχει ιντρόνια (μόνο το 5% του μορίου είναι μη κωδικοποιήσιμο) μπορεί επίσης να διαδραματίσει σημαντικό ρόλο για ένα παρατηρούμενα υψηλό ποσοστό μεταλλάξεων. Βεβαία τα μιτοχόνδρια περιέχουν έναν αριθμό αντιοξειδωτικών ενζύμων π.χ. δισμουτάση του υπεροξειδίου (SOD), ώστε να προστατεύονται από τις ROS και επιδιορθωτικά ένζυμα για την επιδιόρθωση των βλαβών στο DNA (Yang Jenq-Lin, et al., 2008).

Πάνω από 200 μεταλλάξεις που σχετίζονται με παθολογία έχουν εντοπιστεί εντός τους μιτοχονδριακού γονιδιώματος του ανθρώπου. Περισσότερες από τις μισές από αυτές τις μεταλλάξεις που σχετίζονται με ασθένειες βρίσκονται στο tRNA γονιδίων, μια αξιοσημείωτη τάση, δεδομένου ότι οι tRNA ακολουθίες αποτελούν μόνο το 10% του μιτοχονδριακού γονιδιώματος. Αυτό μπορεί να εξηγηθεί από τον ουσιαστικό ρόλο των tRNAs στη σύνθεση των πρωτεϊνών που εμπλέκονται στο μεταβολισμό της ενέργειας. Ως εκ τούτου, οι μελέτες για μιτοχονδριακές μεταλλάξεις γονιδίων tRNA παρέχουν μια ενδιαφέρουσα ευκαιρία να εξερευνηθεί το περιβάλλον μεταξύ γενετικών και βιοχημικών σχέσεων που οδηγούν στην παθολογία.

Οι μιτοχονδριακές μεταλλάξεις χωρίζονται σε μεγάλης έκτασης ανακατατάξεις (ελλείψεις ή διπλασιασμοί) συνήθως σποραδικές και σε σημειακές μεταλλάξεις, οι οποίες αφορούν γονίδια που συμμετέχουν στην πρωτεϊνοσύνθεση των μιτοχονδρίων ή γονίδια που κωδικοποιούν υπομονάδες της αναπνευστικής αλυσίδας (Scharira Anthony H V., 2006). Σε βιοχημικό επίπεδο οι μιτοχονδριακές μεταλλάξεις μπορούν να επηρεάσουν την πρωτεϊνοσύνθεση και τη φυσιολογική λειτουργία της αναπνευστικής αλυσίδας. Το mtDNA βρίσκεται σε πολλαπλά αντίγραφα σε κάθε μιτοχόνδριο και σε μερικές εκατοντάδες σε κάθε κύτταρο. Σε φυσιολογικές καταστάσεις όλα τα αντίγραφα του mtDNA σε ένα κύτταρο είναι όμοια και με αγρίου τύπου (wild type wt) αλληλουχίες. Μια μιτοχονδριακή μετάλλαξη μπορεί να επηρεάσει όλα τα αντίγραφα του mtDNA, ένα φαινόμενο που αναφέρεται ως ομοπλάσμία. Παρ' όλα αυτά οι περισσότερες παθολογικές μεταλλάξεις επηρεάζουν μόνο κάποια mtDNA αντίγραφα, με αποτέλεσμα τη συνύπαρξη wt και μεταλλαγμένων mtDNA στο ίδιο μιτοχόνδριο, κύτταρο, όργανο, και κατ' επέκταση στο άτομο σε διαφορετικές αναλογίες (ετεροπλάσμία).

Οι διαταραχές που προκαλούνται από δυσλειτουργίες της αναπνευστικής αλυσίδας ονομάζονται μιτοχονδριακά νοσήματα. Τα μιτοχονδριακά νοσήματα έχουν ποικίλους φαινοτύπους και διαφορετικές ηλικίες έναρξης των συμπτωμάτων. Τα όργανα και οι ιστοί που πλήττονται περισσότερο είναι αυτά που εξαρτώνται άμεσα από την παραγωγή ενέργειας των μιτοχονδρίων, όπως ο νευρικός ιστός, ο καρδιακός και ο μυϊκός ιστός (DiMauro S., Schon EA., 2003). Το επίπεδο της ετεροπλάσμιας καθορίζει την εκδήλωση και

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

Τα tRNA που συνδέονται με παθήσεις καλύπτουν ένα ευρύ φάσμα των συνδρόμων. Τα πιο σημαντικά από αυτά είναι η μιτοχονδριακή εγκεφαλομυοπάθεια, γαλακτική οξέωση, με εγκεφαλικά επεισόδια (MELAS), η μυοκλωνική επιληψία με ανώμαλες ερυθρές ίνες (MERRF), το σύνδρομο του Leigh (LS), η κληρονομική οπτική νευροπάθεια του Leber (LHON) και το σύνδρομο Kearns-Sayre (KSS).

**Πίνακας 3:** Κάποια από τα κυριότερα μιτοχονδριακά νοσήματα, οι κυριότερες μεταλλάξεις που τα προκαλούν και ο κλινικός τους φαινότυπος.

ΑΣΘΕΝΕΙΑ	ΜΕΤΑΛΛΑΞΗ	ΚΛΙΝΙΚΟΣ ΦΑΙΝΟΤΥΠΟΣ
MELAS	A3243G tRNA <sup>Leu(UUR)</sup> (80% των ασθενών)	Εγκεφαλικά επεισόδια πριν από την ηλικία των 40 ετών, εγκεφαλοπάθεια, μυοπάθεια, γαλακτική οξέωση, ερυθρές μυϊκές ίνες. Με μικρότερη συχνότητα εμφανίζονται σπασμοί, παράνοια, καρδιομυοπάθεια, κώφωση, διαβήτης.
MERRF	A8344G tRNA <sup>Lys</sup> (80% των ασθενών)	Μυοκλωνική επιληψία, σύγχυση, μυϊκή αδυναμία, ανώμαλες ερυθρές μυϊκές ίνες, κώφωση.
LS	T8993G υπομονάδα του συμπλόκου V ATPase 6	Αδυναμία στήριξης του κεφαλιού, απώλεια ελέγχου συγκεκριμένων μυών, καρδιακά προβλήματα, υποτονία, γαλακτική οξέωση.
LHON	ND4: G11778A ND1: G3460A ND6: T14484C (90% των ασθενών φέρουν μια από αυτές)	Απώλεια όρασης, τύφλωση. Επιπρόσθετα μπορεί να δημιουργηθούν καρδιακές διαταραχές, αταξία, δυστονία.
KSS	G3249A tRNA <sup>Leu(UUR)</sup>	Οφθαλμοπάρεση, Μελαγχρωματική ρετινοπάθεια πριν από την ηλικία των 20 ετών.

Απαιτείται 70-90% μεταλλαγμένου mtDNA για την εμφάνιση ενός κλινικού φαινοτύπου, αλλά αυτό ποικίλλει ανάλογα με τη μετάλλαξη. Το όριο αυτό είναι διαφορετικό για κάθε κυτταρικό ιστό, κάτι που εξηγεί γιατί μερικοί ιστοί είναι πιο ευάλωτοι, ακόμη και με την ύπαρξη μικρού ποσοστού μεταλλαγμένου DNA, σε σχέση με κάποιους άλλους. Κατά τη διάρκεια της κυτταρικής διαίρεσης το mtDNA κατανέμεται τυχαία στα θυγατρικά κύτταρα οδηγώντας σε αλλαγή της αναλογίας των μεταλλαγμένων μορίων στη διάρκεια της ζωής ενός ασθενούς. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται μιτωτικός διαχωρισμός. Λόγω των αποτελεσμάτων του μιτωτικού διαχωρισμού κάποιιοι ασθενείς μεταπηδούν από έναν κλινικό φαινότυπο σε άλλο καθώς μεγαλώνουν.

Η ίδια μετάλλαξη μπορεί να οδηγήσει σε διαφορετικούς φαινοτύπους, ενώ ο ίδιος φαινότυπος μπορεί να προκαλείται από διαφορετικές μεταλλάξεις. Συνεπώς δεν υπάρχει σαφής συσχέτιση φαινοτύπου-γονοτύπου. Γενικά ένας κλινικός φαινότυπος είναι το

αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης του επιπέδου της ετεροπλασμίας και της κατανομής των μεταλλαγμένων γονιδιωμάτων στο χώρο (οργανίδια, κύτταρα, ιστοί, όργανο) και στο χρόνο. Για αυτό το λόγο τα μιτοχονδριακά νοσήματα είναι πιθανόν να εκδηλωθούν σε οποιοδήποτε ιστό και σε οποιαδήποτε ηλικία. Όμως, όπως ήδη αναφέρθηκε, οι μύες, η καρδιά και ο εγκέφαλος εξαρτώνται άμεσα από την οξειδωτική φωσφορυλίωση και είναι πιο ευάλωτοι από τους υπόλοιπους ιστούς, ακόμη και αν το ποσοστό μετάλλαξης είναι χαμηλό. Επιπλέον κι άλλοι παράγοντες συμβάλλουν στην εκδήλωση των φαινοτύπων που οφείλονται στην ίδια μετάλλαξη, όπως τα πυρηνικά γονίδια, η ηλικία, το φύλο και το περιβάλλον.

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

**Table 1 Pathogenic and polymorphic point mutations in human mitochondrial tRNAs**

	tRNA	Pathogenic Mutations	Polymorphic Mutations
1	tRNA <sup>Leu</sup> (UUR)	28	7
2	tRNA <sup>Lys</sup>	14	9
3	tRNA <sup>Ile</sup>	14	7
4	tRNA <sup>Leu</sup> (CUN)	10	11
5	tRNA <sup>Thr</sup>	8	29
6	tRNA <sup>Ser</sup> (UCN)	7	10
7	tRNA <sup>Phe</sup>	7	10
8	tRNA <sup>Val</sup>	6	10
9	tRNA <sup>Trp</sup>	6	13
10	tRNA <sup>Gly</sup>	5	12
11	tRNA <sup>Tyr</sup>	4	7
12	tRNA <sup>Pro</sup>	4	9
13	tRNA <sup>Asn</sup>	4	7
14	tRNA <sup>Gln</sup>	3	15
15	tRNA <sup>His</sup>	3	11
16	tRNA <sup>Met</sup>	3	6
17	tRNA <sup>Ala</sup>	3	11
18	tRNA <sup>Ser</sup> (AGY)	3	13
19	tRNA <sup>Glu</sup>	3	9
20	tRNA <sup>Cys</sup>	2	16
21	tRNA <sup>Asp</sup>	2	11
22	tRNA <sup>Arg</sup>	0	9
	Total	139	243

Data have been retrieved from updated databases [www.mitomap.org](http://www.mitomap.org) and [www.genpat.uu.se/mtDB](http://www.genpat.uu.se/mtDB). tRNAs are listed according to the number of the pathogenic mutations that have been detected (in decreasing order).

**Πίνακας 4:** Παθογόνες και πολυμορφικές μεταλλάξεις στα ανθρώπινα γονίδια μιτοχονδριακών tRNA.

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

Είναι δύσκολο να καθοριστεί πότε μία μετάλλαξη σε tRNA γονίδιο είναι παθογόνος. Συνήθως οι παθογόνες μεταλλάξεις με σοβαρή επίδραση στο φαινότυπο επηρεάζουν πολύ



συντηρημένες θέσεις σε αντίθεση με τις ουδέτερες που εντοπίζονται με μεγαλύτερη συχνότητα σε μη συντηρημένες περιοχές. Ωστόσο δεν υπάρχει σαφής διάκριση για την παθογένεια των μιτοχονδριακών tRNA μεταλλάξεων.

## ΣΚΟΠΟΣ

Με γνωστή τη μιτοχονδριακή δυσλειτουργία και τις μορφολογικές ανωμαλίες των μιτοχονδρίων που παρατηρούνται σε ασθενείς με Alzheimer αλλά και τον αριθμό των μεταλλάξεων στο mtDNA που αναφέρονται στη βιβλιογραφία, σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η ανίχνευση και ταυτοποίηση μεταλλάξεων σε μιτοχονδριακά tRNA γονίδια σε 50 ασθενείς με τη νόσο του Alzheimer και σε 51 άτομα χωρίς κάποιο κλινικό σύμπτωμα. Τα γονίδια που μελετήθηκαν είναι: tRNA<sup>Gly</sup> για τους ασθενείς με το Alzheimer και tRNA<sup>Gly</sup> και tRNA<sup>His</sup>, tRNA<sup>Ser(AGY)</sup> και tRNA<sup>Leu(CUN)</sup> για τα άτομα χωρίς κάποιο κλινικό σύμπτωμα.

## **ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

Κατά την εργαστηριακή μελέτη χρησιμοποιήθηκαν 50 δείγματα DNA ασθενών με AD και 51 δείγματα υγείων ατόμων (ομάδα ελέγχου) που τα προμηθευτήκαμε από το Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας.

Μελετήθηκαν τα γονίδια tRNAGly και tRNAHSL για την ομάδα ελέγχου και το γονίδιο tRNAGly για τους ασθενείς με AD με σκοπό την εύρεση μεταλλάξεων στο μιτοχονδριακό DNA. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής: PCR, SSCP, καθαρισμός των PCR προϊόντων, αλληλούχιση (sequencing) και επεξεργασία αλληλούχισης.

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

Η τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) αποτελεί σημαντικό εργαλείο της Μοριακής Βιολογίας τόσο για ερευνητικές όσο και για διαγνωστικές εφαρμογές. Πρόκειται για μια ενζυμική μέθοδο που επιτρέπει τον in vitro ειδικό πολλαπλασιασμό μιας αλληλουχίας DNA από κάποιο βιολογικό δείγμα. Είναι μια ευαίσθητη τεχνική που μπορεί να παράγει εκατομμύρια φορές μια αλληλουχία από ένα μόνο μόριο DNA, χωρίς πρώτα να κλωνοποιηθεί. Στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε η απλή PCR αν και ανάλογα με τις εκάστοτε απαιτήσεις η μέθοδος μπορεί να επιδέχεται τροποποιήσεις π.χ RT-PCR (reverse transcription PCR).

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

Συστατικά της αντίδρασης: Τα συστατικά της αντίδρασης περιλαμβάνουν το DNA από το βιολογικό δείγμα, την ειδική DNA πολυμεράση, το ρυθμιστικό διάλυμα (buffer solution), MgCl<sub>2</sub>, ένα ζεύγος κατάλληλων εκκινητών (primers), το μίγμα από τα τέσσερα δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs) και το ddH<sub>2</sub>O.

- Το DNA χρησιμεύει ως μήτρα.
- Η DNA πολυμεράση που χρησιμοποιείται είναι η Taq πολυμεράση η οποία είναι θερμοάντοχη, έχει δηλαδή την ιδιότητα να αντέχει στους 94- 95°C με επαναλαμβανόμενη θέρμανση χωρίς την προσθήκη του ενζύμου εκ νέου

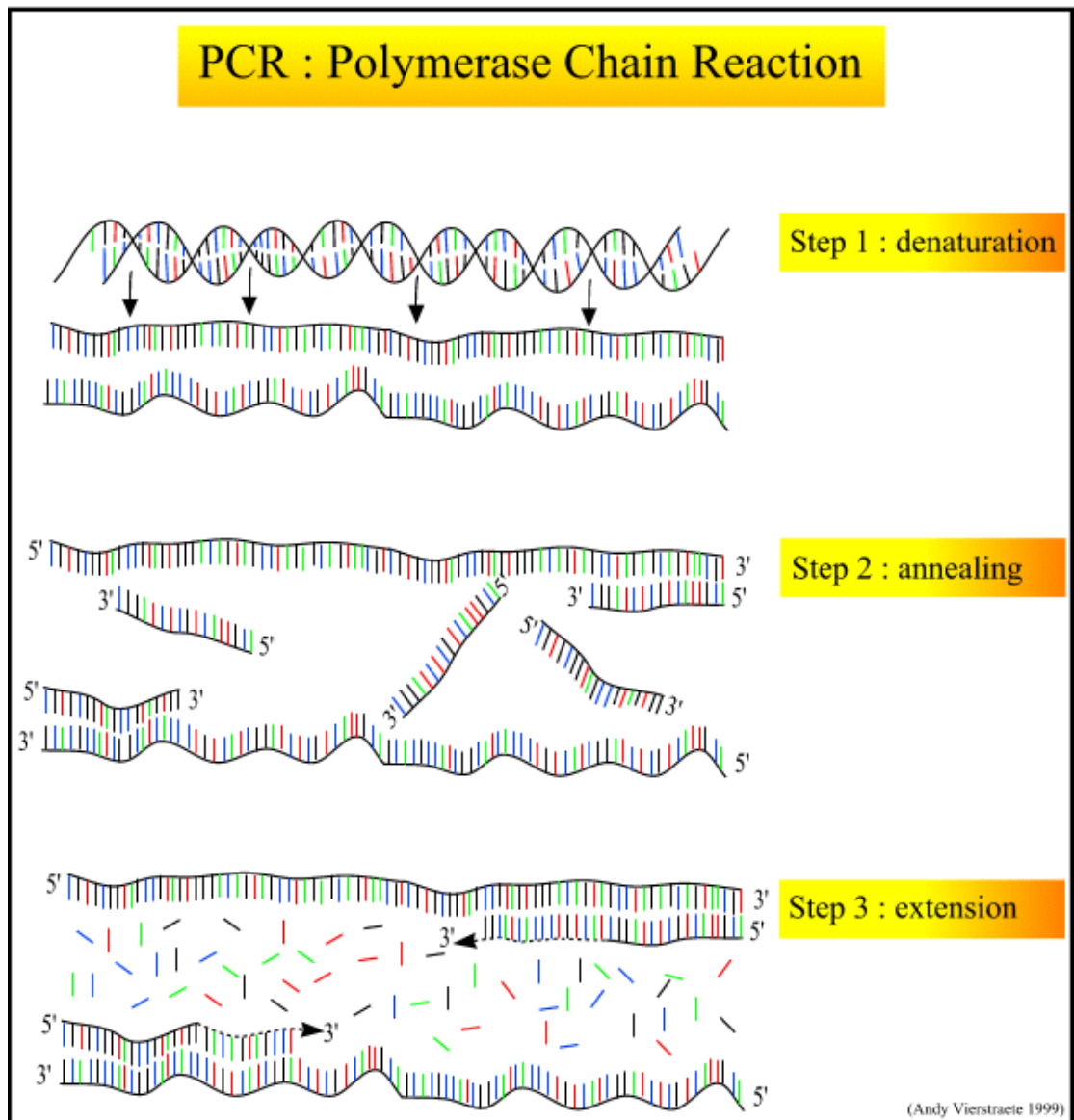
μετά τον κάθε κύκλο πολυμερισμού. Αυτές οι πολυμεράσες απομονώνονται από θερμοφίλα βακτήρια του γένους *Thermus Aquaticus* και από Αρχαία που ζουν σε υψηλές θερμοκρασίες. Όμως η Taq πολυμεράση δεν έχει 3' → 5' δράση εξωνουκλεάσης και για αυτό στο τελικό προϊόν παραμένουν νουκλεοτίδια που έχουν εισαχθεί λανθασμένα.

- Το ρυθμιστικό διάλυμα (buffer solution) δημιουργεί το κατάλληλο περιβάλλον π.χ. pH για τη βέλτιστη δραστηριότητα και σταθερότητα του ενζύμου.
- Το MgCl<sub>2</sub> αποτελεί συμπράγοντα για την DNA πολυμεράση, οπότε είναι απαραίτητο για τη δράση της.
- Οι εκκινητές (primers) είναι συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια μήκους 17-28 νουκλεοτιδίων με δομή συμπληρωματική στην αρχή και στο τέλος της αλληλουχίας στόχου. Μεγαλύτερες συγκεντρώσεις μπορούν να προκαλέσουν λανθασμένη έναρξη και παραγωγή μη ειδικών προϊόντων. Στο σχεδιασμό των εκκινητών πρέπει να δίνεται σημασία στα ακόλουθα:
- Τα 3' άκρα των δύο εκκινητών να μην είναι συμπληρωματικά, ώστε να αποφεύγεται η χρήση τους ως υπόστρωμα και συνεπώς ο σχηματισμός διμερών.
- Το περιεχόμενο σε G-C να είναι 50-60%.
- Οι θερμοκρασίες τήξεως των δύο εκκινητών να είναι παρόμοιες.

Στάδια της αντίδρασης: Οι επαναλαμβανόμενοι κύκλοι αποδιάταξης, ένωσης και αντιγραφής από την πολυμεράση μπορούν να αυτοματοποιηθούν με τη χρήση μιας συσκευής, του θερμικού κυκλοποιητή, που προγραμματίζεται ώστε να μεταβαίνει κυκλικά στις επιθυμητές θερμοκρασίες για συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα. Ένας κύκλος αποτελείται από τρία στάδια:

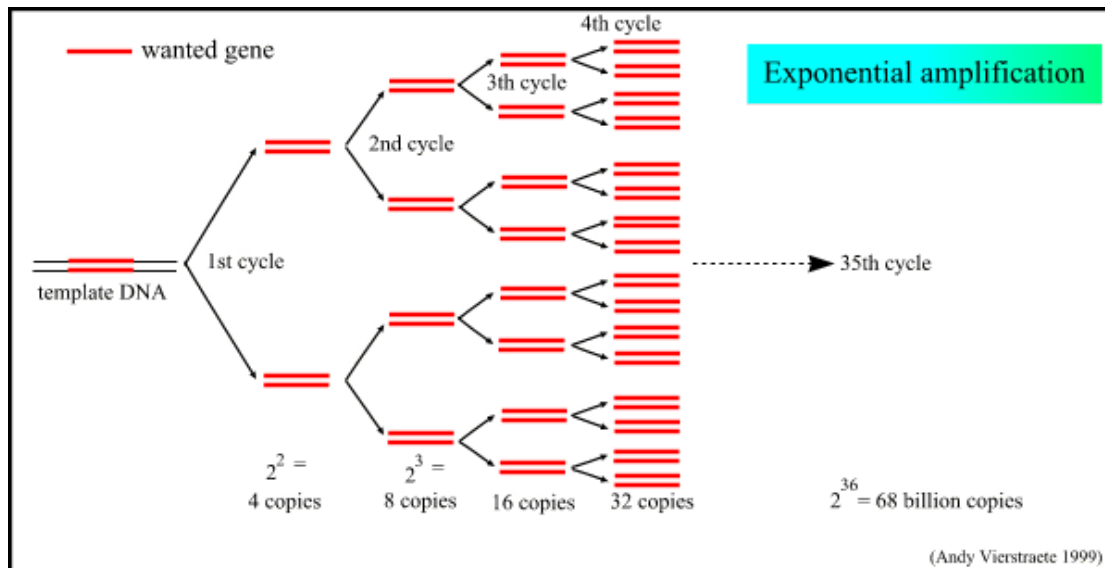
1. Στάδιο αποδιάταξης DNA (denaturation): Η θερμοκρασία ανέρχεται στους 95°C για 30sec. Οι δύο κλώνοι του DNA μετουσιώνονται καθώς διασπώνται οι δεσμοί υδρογόνου και διαχωρίζονται σε μονόκλωνες αλυσίδες.
2. Στάδιο υβριδισμού (annealing): Σε αυτό το στάδιο η θερμοκρασία μειώνεται στους 30-65°C για 30sec επιτρέποντας την υβριδοποίηση των εκκινητών με το μονόκλωνο DNA. Η θερμοκρασία και ο χρόνος που χρειάζεται για την υβριδοποίηση των εκκινητών εξαρτάται από τη συγκέντρωσή τους στην αντίδραση, το μήκος και την αλληλουχία των βάσεών τους. Η θερμοκρασία του υβριδισμού ρυθμίζεται περίπου 5°C χαμηλότερα από το σημείο τήξης (T<sub>m</sub>).

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



**Εικόνα 16:** Τα τρία στάδια της PCR: αποδιάταξη, υβριδοποίηση, επέκταση.

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



**Εικόνα 17:** Μετά τον 1ο κύκλο παράγονται 2 μόρια DNA, με τον 2ο κύκλο παίρνουμε 4 μόρια DNA και μετά από θεωρητικά  $n$  κύκλους παράγονται έως  $2^n$  δίκλινα μόρια DNA.

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

γονίδιο tRNA	FW Primer 5'-3'	Tm	RV Primer 5'-3'	Tm
Gly	5'-CCATCTATTGATGAGGGTCT - 3'	56	5'-GGATATAGGGTCCAAGCCGCA - 3'	63
His,Ser,Leu	5'-CATCATTACCGGGTTTTCCT - 3'	56	5'-TGGTTATAGTAGTGTGCATG -3'	54

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

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

Οι ποσότητες των αντιδραστηρίων για μια αντίδραση είναι:

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

Εκτός από τα δείγματα για κάθε σύνολο αντιδράσεων χρησιμοποιείται και ένας αρνητικός μάρτυρας(nude) για να διαπιστωθεί αν υπάρχει επιμόλυνση. Φυσιολογικά στον αρνητικό μάρτυρα δεν θα πρέπει να υπάρχουν προϊόντα αφού δεν έχει προστεθεί DNA.

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

Στάδιο	Θερμοκρασία	Χρόνος
Αρχική αποδιάταξη	95 °C	4min
Αποδιάταξη	95 °C	30sec
35 x Υβριδοποίηση	50 °C	40sec
Επέκταση	72 °C	40sec
Τελική επέκταση	72 °C	10min

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

## ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΤΩΝ PCR ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ (ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ)

Αρχή της μεθόδου: Η ηλεκτροφόρηση στο πήκτωμα αγαρόζης γίνεται για να επιβεβαιωθεί ο πολλαπλασιασμός του DNA το οποίο μέσα στο πήκτωμα μετακινείται στο ηλεκτρικό πεδίο βάσει του αρνητικού του φορτίου.

Συστατικά: Για την παρασκευή πηκτώματος αγαρόζης απαιτούνται:

1. αγαρόζη: παράγοντας πήξης του πηκτώματος
2. TAE (Tris, Acetic, EDTA) 1X: ρυθμιστικό διάλυμα. Το ρυθμιστικό διάλυμα TAE 1X παρασκευάζεται από stock διάλυμα 50X με ανάμιξη 20ml 50X TAE και 980ml dd-H<sub>2</sub>O. Τα 500 ml του 50x TAE περιέχουν :
  - Tris 121 gr
  - Οξικό οξύ 28,5ml
  - EDTA 0,5M 50ml
  - dd-H<sub>2</sub>O μέχρι τα 500ml
3. Βρωμιούχο αιθίδιο: φθορίζουσα χρωστική που παρεμβάλλεται ανάμεσα στις βάσεις του DNA και φθορίζει σε υπεριώδες φως. Είναι μεταλλαξιγόνο.
4. loading buffer (6X): Τα 10ml περιέχουν:
  - 1ml χρωστική μπλε της βρωμοφαινόλης
  - 5ml γλυκερόλη
  - 0,5ml TBE 20X
  - 3,5ml ddH<sub>2</sub>O

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

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

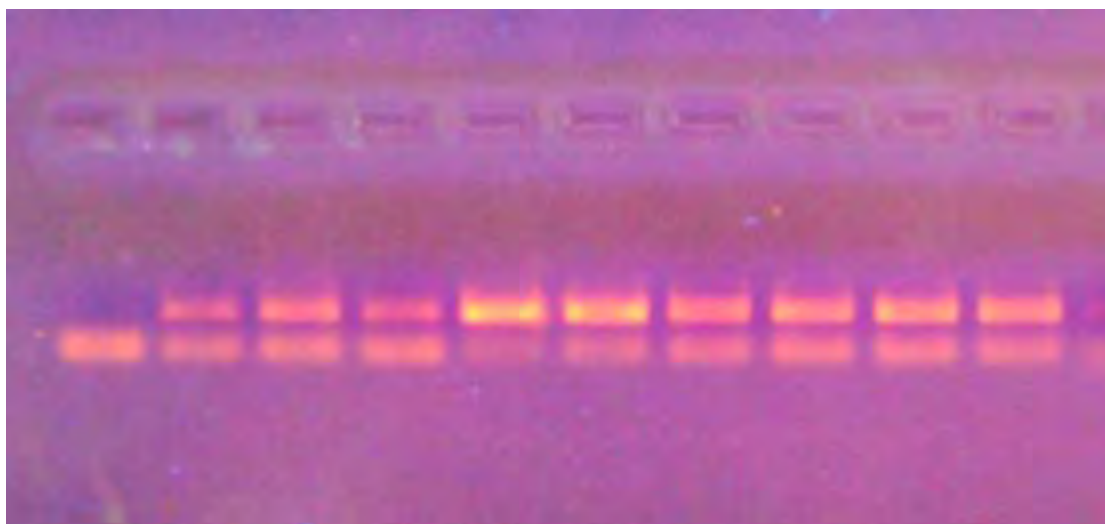
Χρησιμοποιήθηκε πήκτωμα αγαρόζης 2%, 40ml. Οι ποσότητες είναι οι εξής:

Αγαρόζη	0,6gr
TAE 1X	40ml
EtBr	4μl

Βήματα που ακολουθήθηκαν:

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

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



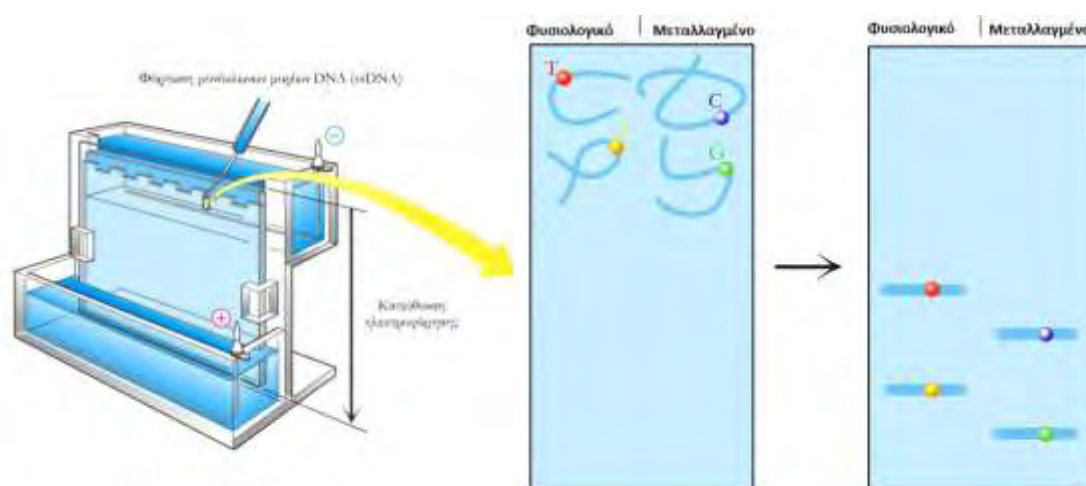
**Εικόνα 18:** Φωτογραφία από πήκτωμα αγαρόζης 2% (180mA), για τον έλεγχο PCR προϊόντων στη συσκευή ακτινοβολίας UV. Στην πρώτη διαδρομή είναι ο αρνητικός μάρτυρας και στις υπόλοιπες δείγματα στα οποία η PCR έχει δουλέψει.



## SSCP(Single-Strand Conformation Polymorphism)

Αρχή της μεθόδου: Η μέθοδος ανάλυσης πολυμορφισμού μονόκλωνης αλυσίδας χρησιμοποιείται για τον εντοπισμό πολυμορφισμών και μεταλλάξεων. Πρόκειται για τον

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



**Εικόνα 19:** Σχηματική αναπαράσταση της μεθόδου SSCP. Τα δείγματα DNA θα πρέπει να υποστούν αποδιάταξη πριν την φόρτωσή τους στο πήκτωμα. Μία σημειακή μετάλλαξη είναι ικανή να προσδώσει στη μονόκλωνη αλυσίδα τέτοια μοναδική διαμόρφωση, ώστε, μετά την ηλεκτροφόρηση, το πρότυπο της αντίστοιχης ζώνης να διαφέρει από αυτό του φυσιολογικού.

Συστατικά: Χρησιμοποιήθηκε πήκτωμα με συγκέντρωση 10%. Γενικά η συγκέντρωση του πηκτώματος κυμαίνεται από 8-12% και εξαρτάται από το μήκος του μορίου που έχει ενισχυθεί. Όσο πιο μικρό είναι τόσο πιο πυκνό πρέπει να είναι το πήκτωμα. Συνεπώς για 2 πηκτώματα 10% διαστάσεων 19cm x 17,5cm και πάχος 2mm με τελικό όγκο 125ml χρησιμοποιούνται:

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

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

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

Αποδιάταξη των PCR προϊόντων: Σε erpendorf του 0,5ml προστίθενται 5μl PCR προϊόντος και 10μl αποδιατακτικού διαλύματος (Denaturation Buffer). Τα 3ml αποδιατακτικού διαλύματος περιέχουν:

- 95% φορμαμίδιο
- 20mM EDTA
- 10mM NaOH
- 0,05% κυανού ξυλενίου
- 0,05% μπλε της βρωμοφαινόλης

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

Θερμοκρασία	Χρόνος
92 °C	2min
95 °C	2min
97 °C	7min

Πριν ολοκληρωθεί το τελευταίο στάδιο τα δείγματα βγαίνουν και τοποθετούνται απευθείας στον πάγο για την αποφυγή της επαναδιάταξης των μονόκλωνων μορίων DNA. Στη συνέχεια τα δείγματα φορτώνονται στο πήκτωμα που βρίσκεται στη συσκευή αφού πρώτα προστεθεί

σε αυτή ρυθμιστικό διάλυμα TBE 0,5X. Τα δείγματα ηλεκτροφορούνται για 22h σε τάση 220V και θερμοκρασία 4 °C.

Χρώση πηκτώματος πολυακρυλαμίδης με διάλυμα νιτρικού αργύρου(silver staining): Για την εμφάνιση των ζωνών στο πήκτωμα γίνεται χρώση του πηκτώματος με νιτρικό άργυρο. Για δύο πηκτώματα χρησιμοποιούνται:

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

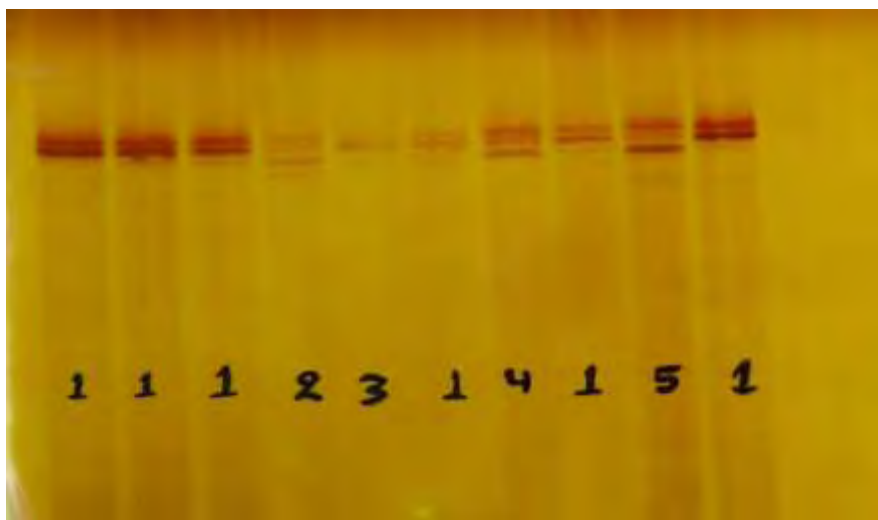
Διάλυμα 2 : 400ml AgNO<sub>3</sub> 1gr / l (1gr AgNO<sub>3</sub> σε 1 l ddH<sub>2</sub>O)

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

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

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

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



**Εικόνα 20:** Πήκτωμα πολυακρυλαμίδης 10% (22h, 220V, 4oC) μετά από χρώση με νιτρικό άργυρο. Στο συγκεκριμένο πήκτωμα εμφανίζονται πέντε διαφορετικά πρότυπα των δειγμάτων control του tRNA<sup>HSL</sup>.

#### ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ PCR ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ

Ο καθαρισμός των PCR προϊόντων που πρόκειται να σταλούν για αλληλούχιση έγινε με Invitrogen™ Kit.

Αρχή της μεθόδου: Με τη διαδικασία αυτή απομακρύνονται εκκινητές, νουκλεοτίδια, πολυμεράση, άλατα που μπορεί να έχουν παραμείνει στο διάλυμα μαζί με τα PCR προϊόντα και ίσως να προκαλέσουν προβλήματα ανάγνωσης στη διαδικασία της αλληλούχισης.

#### Συστατικά:

1. Προσθέτουμε 200μl από το διάλυμα σύνδεσης (Binding buffer) με 50μl PCR προϊόντος, σε erpendorf των 750μl. Για να ανακτήσουμε ολόκληρη την ποσότητα του PCR προϊόντος ξεπλένουμε με 50μl Binding buffer ακόμη το erpendorf του PCR προϊόντος και το προσθέτουμε στο erpendorf.
2. Τοποθετούμε τις στήλες PureLink™ Spin σε erpendorf των 2ml.
3. Μεταφέρουμε προσεκτικά το περιεχόμενο από το βήμα 1 στις στήλες PureLink™ Spin και φυγοκεντρούμε για 1 λεπτό στις 10000g. Σε αυτό το βήμα πραγματοποιείται η πρόσδεση των επιθυμητών αλληλουχιών πάνω στη στήλη.
4. Απομακρύνουμε το έκλουσμα και τοποθετούμε τη στήλη στον ίδιο σωλήνα συλλογής.
5. Προσθέτουμε 650μl από το διάλυμα πλύσης (washing buffer) και φυγοκεντρούμε για 1 λεπτό στις 10000g.

6. Απομακρύνουμε το έκλουσμα και τοποθετούμε τη στήλη στον ίδιο σωλήνα συλλογής. Φυγοκεντρούμε ξανά για 2-3 λεπτά. Είναι πολύ σημαντικό να μην μείνει καθόλου αιθανόλη από το διάλυμα πλύσης μέσα στη στήλη.
7. Τοποθετούμε τις στήλες PureLink™ Spin σε 1,7ml PureLink™ elution tube που δίνεται μαζί με το kit.
8. Προσθέτουμε προσεκτικά 50μl από το διάλυμα έκλουσης (elution buffer) και επωάζουμε τα δείγματα για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου.
9. Τέλος, φυγοκεντρούμε στις 13.000 στροφές για 2 λεπτά για ανάκτηση του καθαρισμένου DNA.

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

Λυοφιλίωση: Τα δείγματα που πρόκειται να σταλούν για αλληλούχιση πρέπει να είναι σε στερεή μορφή (ίζημα) και για να επιτευχθεί αυτό ακολουθείται η εξής διαδικασία, για κάθε δείγμα των 50μl:

1. Προσθήκη 300μl παγωμένης EtOH 100% και 10μl CH<sub>3</sub>COONa (3M)
2. Ελαφριά ανάδευση (flip-flop)
3. Επώαση των δειγμάτων overnight στους -20 οC
4. Την επόμενη μέρα: φυγοκέντρηση σε 13.000rpm για 20min στους 4 °C
5. Απομάκρυνση του υπερκειμένου
6. Ξήρανση στους 37 °C περίπου για 1h

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

## **ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗ**

Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε ήταν η Μέθοδος Τερματισμού Νουκλεοτιδικής Αλυσίδας Με Δι- Δεοξυνουκλεοτίδια (Μέθοδος Sanger).

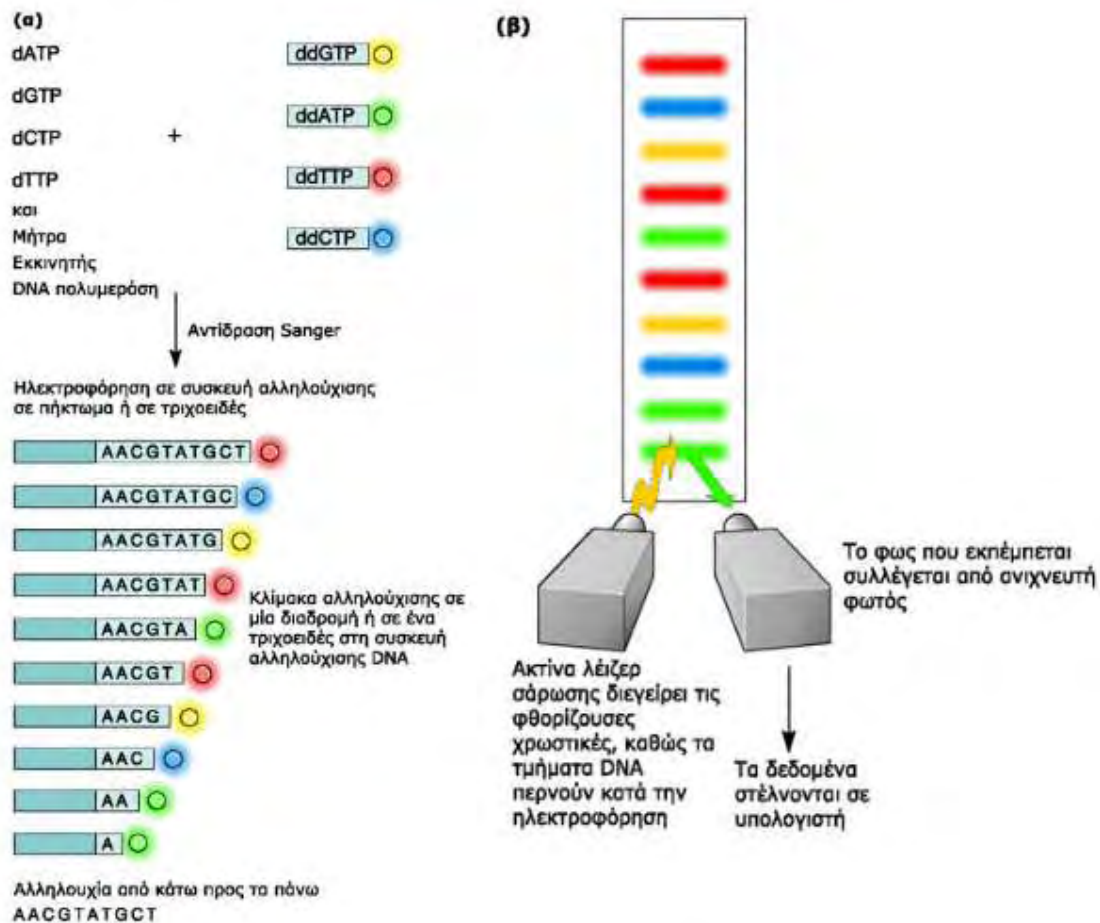
Αρχή της μεθόδου: Η ενζυμική μέθοδος κατά Sanger χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας μορίων DNA. Βασίζεται στην ενζυμική σύνθεση ενός σημασμένου μορίου DNA χρησιμοποιώντας ειδικά τροποποιημένα νουκλεοτίδια, τα διδεοξυνουκλεοτίδια (ddNTPs). Τα ddNTPs δεν έχουν στη θέση 3' την -OH ομάδα, που έχουν τα dNTPs, αλλά αντί αυτής έχουν -H. Αυτά τα μόρια ενσωματώνονται στην υπό σύνθεση αλυσίδα DNA από την DNA πολυμεράση μέσω των 5' φωσφορικών ομάδων, όπως και τα συνηθισμένα δεοξυνουκλεοτίδια. Όμως δεν έχουν την 3'-OH ομάδα που είναι

απαραίτητη για το σχηματισμό του φωσφοδιεστερικού δεσμού με το επόμενο νουκλεοτίδιο στην αναπτυσσόμενη αλυσίδα και συνεπώς, η ανάπτυξη της αλυσίδας σταματάει σε εκείνο ακριβώς το σημείο όπου έχει ενσωματωθεί το συγκεκριμένο ddNTP. Συνοπτικά η διαδικασία έχει ως εξής:

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

Αυτόματη αλληλούχιση: Για την αλληλούχιση ενός τμήματος DNA πραγματοποιείται μια σύνθετη αντίδραση τερματισμού. Η αντίδραση γίνεται παρουσία των τεσσάρων κανονικών dNTPs, σε σχετικά μεγάλη συγκέντρωση, και τεσσάρων ddNTPs, σε μικρότερη συγκέντρωση, τα οποία είναι σημασμένα το καθένα με διαφορετική φθορίζουσα χημική ομάδα. Η αλληλούχιση τεσσάρων χρωμάτων βασίζεται στην αρχή σήμανσης καθενός από τα τέσσερα ddNTPs με διαφορετική φθορίζουσα ομάδα. Οι φθορίζουσες χρωστικές συνδέονται στα ddNTPs με τρόπο που δεν εμποδίζει την DNA πολυμεράση να δράσει και να προσθέτει τη συμπληρωματική βάση τους στη DNA μήτρα. Κατά τις αντιδράσεις επέκτασης σχηματίζεται μίγμα προϊόντων τερματισμού που μπορεί να έχουν οποιαδήποτε από τις τέσσερις βάσεις στο 3' άκρο τους. Τα προϊόντα αυτά προκύπτουν από την ενσωμάτωση ενός ddNTP σε μια τυχαία θέση κατά τη σύνθεση. Επειδή οι τέσσερις φθορίζουσες χρωστικές που χρησιμοποιούνται εκπέμπουν φωτεινή ακτινοβολία σε διαφορετικό μήκος κύματος, λόγω των διαφορετικών χρωμάτων, η ταυτότητα της βάσης στην οποία τερματίζεται η σύνθεση αντιστοιχεί στο χρώμα του ddNTP που έχει ενσωματωθεί στο 3' άκρο. Τα προϊόντα της αντίδρασης φορτώνονται και αναλύονται στην ίδια διαδρομή του πηκτώματος ή σε ένα τριχοειδές σωληνάκι μιας συσκευής αυτόματης αλληλούχισης. Καθώς η κλίμακα των σημασμένων προϊόντων τερματισμού ηλεκτροφορείται στη συσκευή αυτόματης αλληλούχισης, κάθε τμήμα «φωτίζεται» από το λέιζερ του ανιχνευτή. Πρόκειται για μια ακτίνα φωτός με μήκος κύματος που διεγείρει και τις τέσσερις φθορίζουσες χρωστικές. Οι διεγερμένες χρωστικές επανέρχονται στο ενεργειακό επίπεδο ηρεμίας εκπέμποντας φως συγκεκριμένου μήκους κύματος χαρακτηριστικό για κάθε χρωστική. Ο αισθητήρας του

ανιχνευτή καταγράφει την ένταση και το μήκος κύματος του φωτός και στέλνει ένα σήμα στον υπολογιστή που είναι συνδεδεμένος με τη συσκευή αλληλούχισης.



**Εικόνα 21:** Σχεδιαγραμματική απεικόνιση της αυτόματης αλληλούχισης. (α): Τα συστατικά της αντίδρασης Sanger περιλαμβάνουν: dNTPs, ddNTPs σημασμένα το καθένα με διαφορετική φθορίζουσα χημική ομάδα, το DNA μήτρα, εκκινητές και DNA πολυμεράση. Κατά τις αντιδράσεις επέκτασης σχηματίζεται μίγμα προϊόντων τερματισμού που μπορεί να έχουν οποιαδήποτε από τις τέσσερις βάσεις στο 3' άκρο τους. Τα προϊόντα αυτά έχουν διαφορετικό μέγεθος προκύπτουν από την ενσωμάτωση ενός ddNTP σε μια τυχαία θέση κατά τη σύνθεση. (β): Η κλίμακα των σημασμένων προϊόντων τερματισμού ηλεκτροφορείται στη συσκευή αυτόματης αλληλούχισης και «φωτίζεται» από το λέιζερ του ανιχνευτή το οποίο διεγείρει τις φθορίζουσες ουσίες και δίνουν σήμα. Η κατανομή των σημάτων από την ακτινοβολία εκπομπής των τεσσάρων χρωστικών, κατά την ηλεκτροφόρηση ενός τμήματος, αναπαριστάται στο γράφημα εκπομπής. Στο γράφημα εκπομπής καθεμία από τις βάσεις παριστάνεται με διαφορετικό χρώμα. Στον οριζόντιο άξονα αντιπροσωπεύεται ο χρόνος από την έναρξη της ηλεκτροφόρησης, ενώ στον κατακόρυφο άξονα η ένταση των αντίστοιχων σημάτων. Κάποια τμήματα DNA δίνουν πολύ καθαρές, οξείες κορυφές, ενώ άλλες είναι πιο αμβλείες και επικαλύπτονται με γειτονικά σήματα.

Η κατανομή των σημάτων από την ακτινοβολία εκπομπής των τεσσάρων χρωστικών, κατά την ηλεκτροφόρηση ενός τμήματος, αναπαριστάται στο γράφημα εκπομπής. Στο γράφημα εκπομπής καθεμία από τις βάσεις παριστάνεται με διαφορετικό χρώμα. Στον οριζόντιο άξονα αντιπροσωπεύεται ο χρόνος από την έναρξη της ηλεκτροφόρησης, ενώ στον

κατακόρυφο άξονα η ένταση των αντίστοιχων σημάτων. Κάποια τμήματα DNA δίνουν πολύ καθαρές, οξείες κορυφές, ενώ άλλες είναι πιο αμβλείες και επικαλύπτονται με γειτονικά σήματα.



**Εικόνα 22:** Χρωματογράφημα για γονίδιο από δείγμα που στάλθηκε για αλληλούχιση.

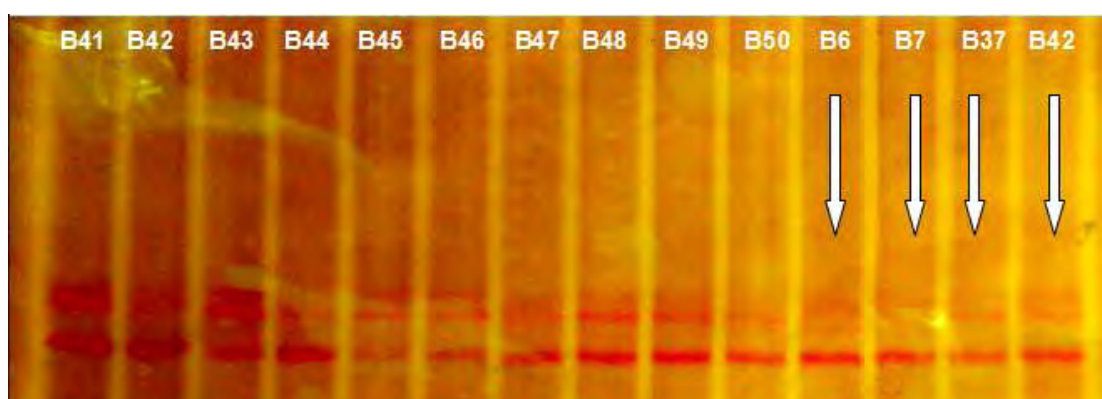
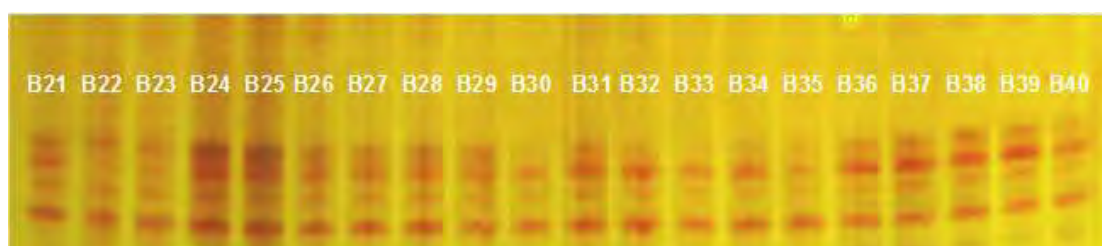
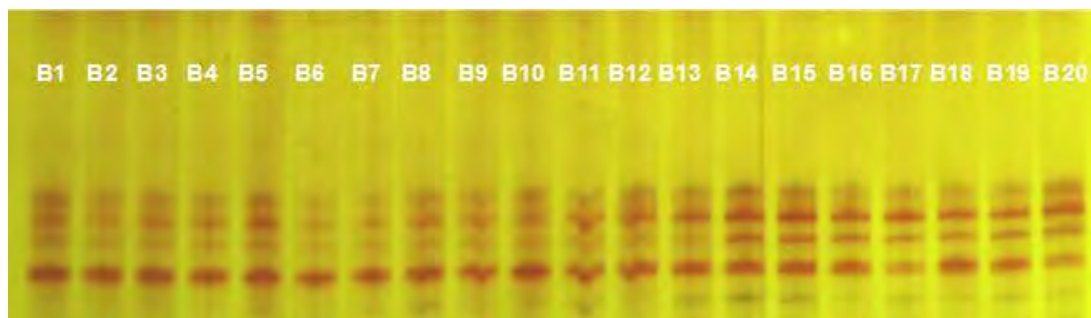
Για την επεξεργασία των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκαν τα προγράμματα: BIOEDIT 7.0 και CLUSTALX 1.8. Το πρώτο χρησιμεύει στην «ανάγνωση» της αλληλουχίας του κάθε γονιδίου που απεικονίζεται με τη μορφή χρωματογραφήματος. Με τον τρόπο αυτό συγκρίνοντας τη ζητούμενη αλληλουχία με μια πρότυπη, εντοπίζουμε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



## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1. Από τα 50 δείγματα ασθενών με AD, κατά τη μελέτη του γονιδίου tRNA<sup>Gly</sup>, δεν βρέθηκε κάποια μετάλλαξη.

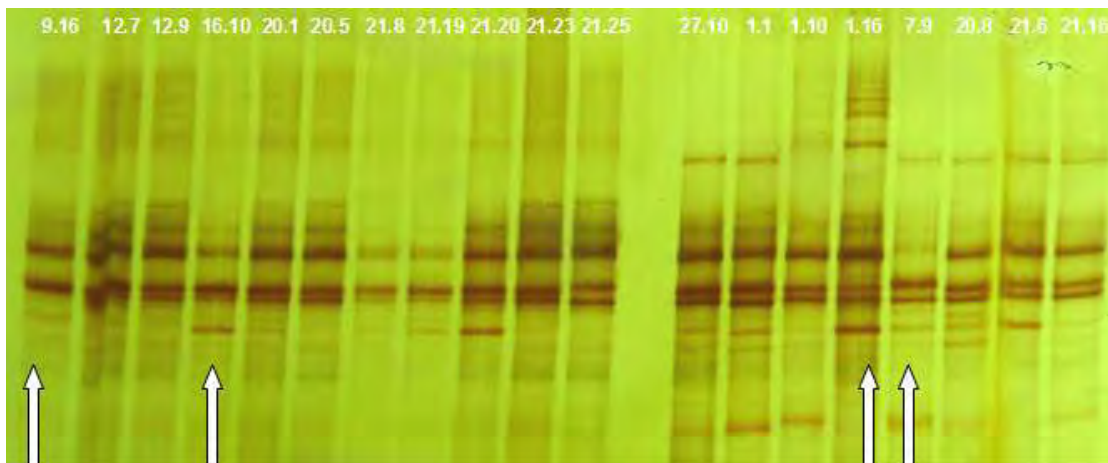
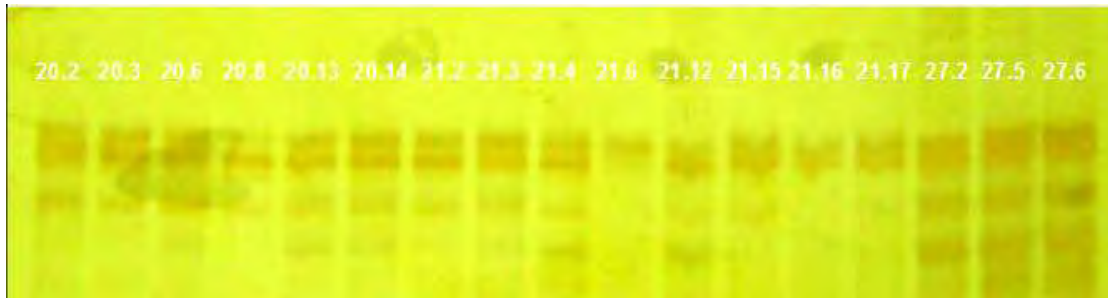
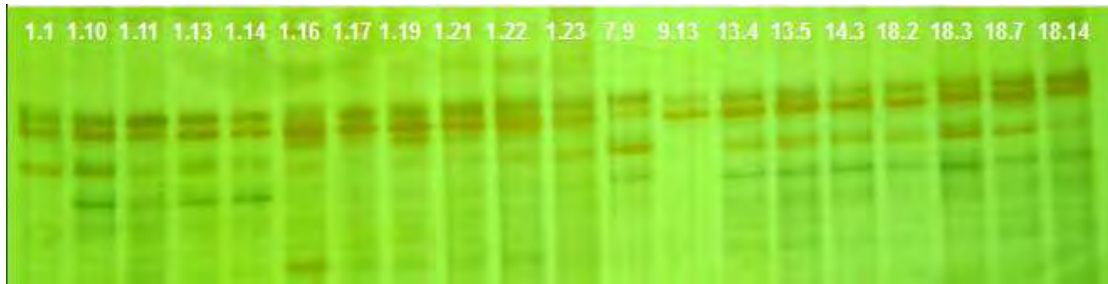
Στις παρακάτω εικόνες φαίνονται τα πηκτώματα πολυακρυλαμιδίου 10% (22h, 220V, 4 °C) όλων των δειγμάτων ασθενών με AD που μελετήθηκαν:



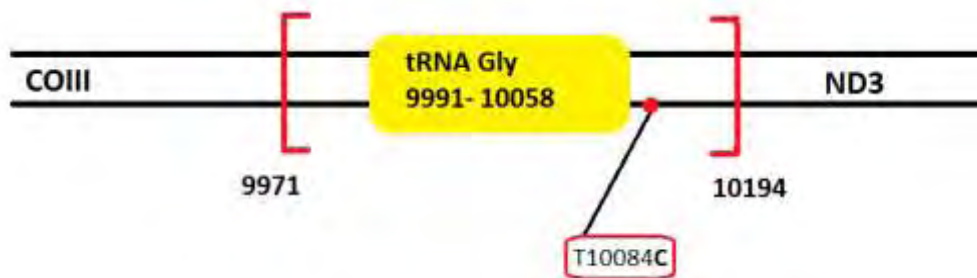
Τα άσπρα βέλη αντιπροσωπεύουν τα δείγματα τα οποία στάλθηκαν για sequencing λόγω διαφορετικού προτύπου στο SSCP. Δεν βρέθηκε όμως μετά το sequencing καμία μετάλλαξη σε κανένα από αυτά τα δείγματα.

2. Ως συνέχεια της έρευνας μεταλλάξεων στο mtDNA γένωμα μελετήθηκαν 51 δείγματα ατόμων χωρίς κάποιο κλινικό σύμπτωμα (ομάδα ελέγχου) για το γονίδιο tRNA<sup>Gly</sup> και βρέθηκαν οι μεταλλάξεις T10084C και C10142A στο ίδιο δείγμα και A10097G σε ένα άλλο δείγμα. Όλες στην ND3 υπομονάδα του συμπλόκου I της αναπνευστικής αλυσίδας.

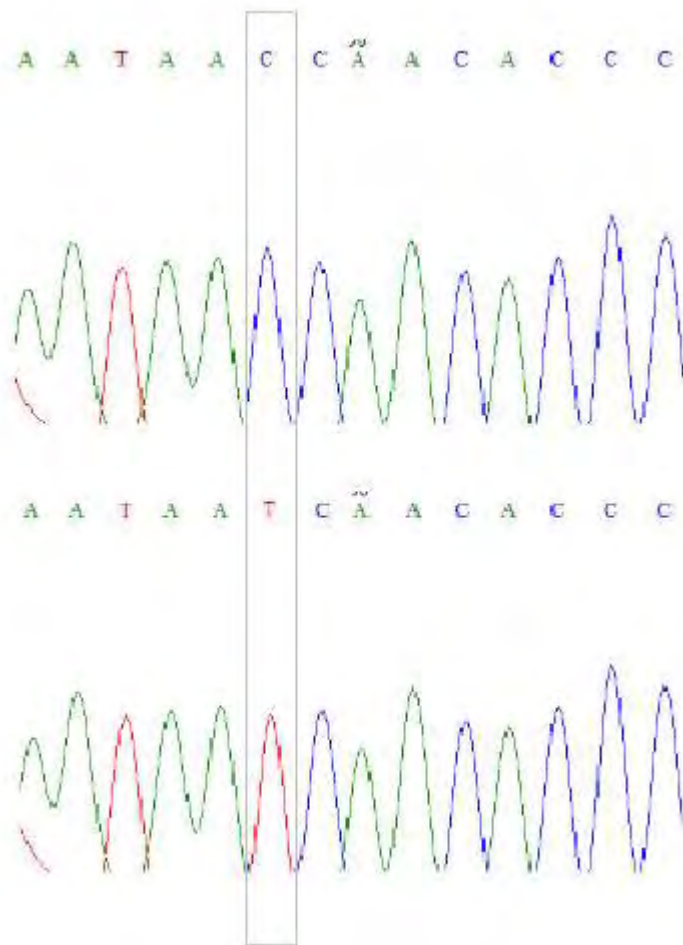
Στις παρακάτω εικόνες φαίνονται τα πηκτώματα πολυακρυλαμιδίου 10% (22h, 220V, 4 °C) όλων των δειγμάτων της ομάδας ελέγχου που μελετήθηκαν:



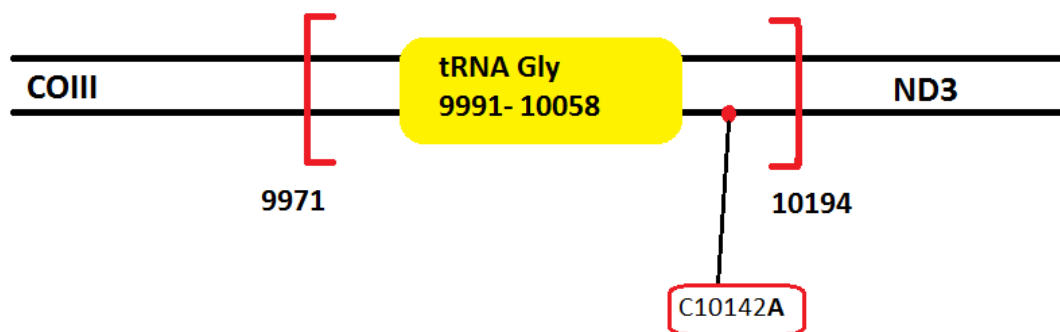
Τα άσπρα βέλη αντιπροσωπεύουν τα δείγματα τα οποία στάλθηκαν για sequencing λόγω διαφορετικού προτύπου στο SSCP. Στο δείγμα 7.9 βρέθηκαν οι μεταλλάξεις T10084C και C10142A η καθεμία με συχνότητα 1/51 (2%), ενώ στο δείγμα 9.16 η A10097G με συχνότητα 1/51 (2%) και οι τρεις στην ND3 υπομονάδα του συμπλόκου I της αναπνευστικής αλυσίδας.



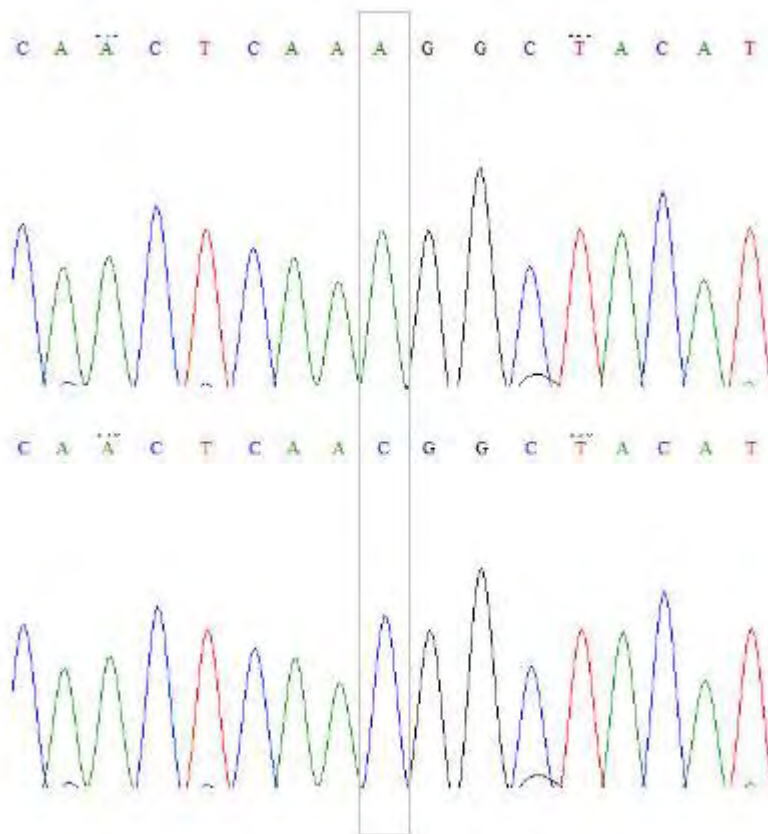
Η μετάλλαξη που βρέθηκε στην παρακείμενη περιοχή (ND3) του γονιδίου *tRNA<sup>Gly</sup>*.



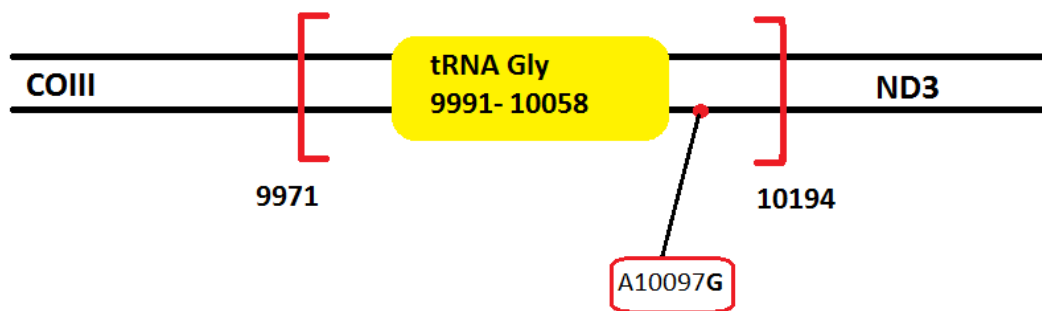
Χρωματογράφημα sequencing τμήματος του γονιδίου  $tRNA^{Gly}$  σε άτομο φυσιολογικό control κάτω και σε άτομο control επάνω με τη μετάλλαξη T10084C.



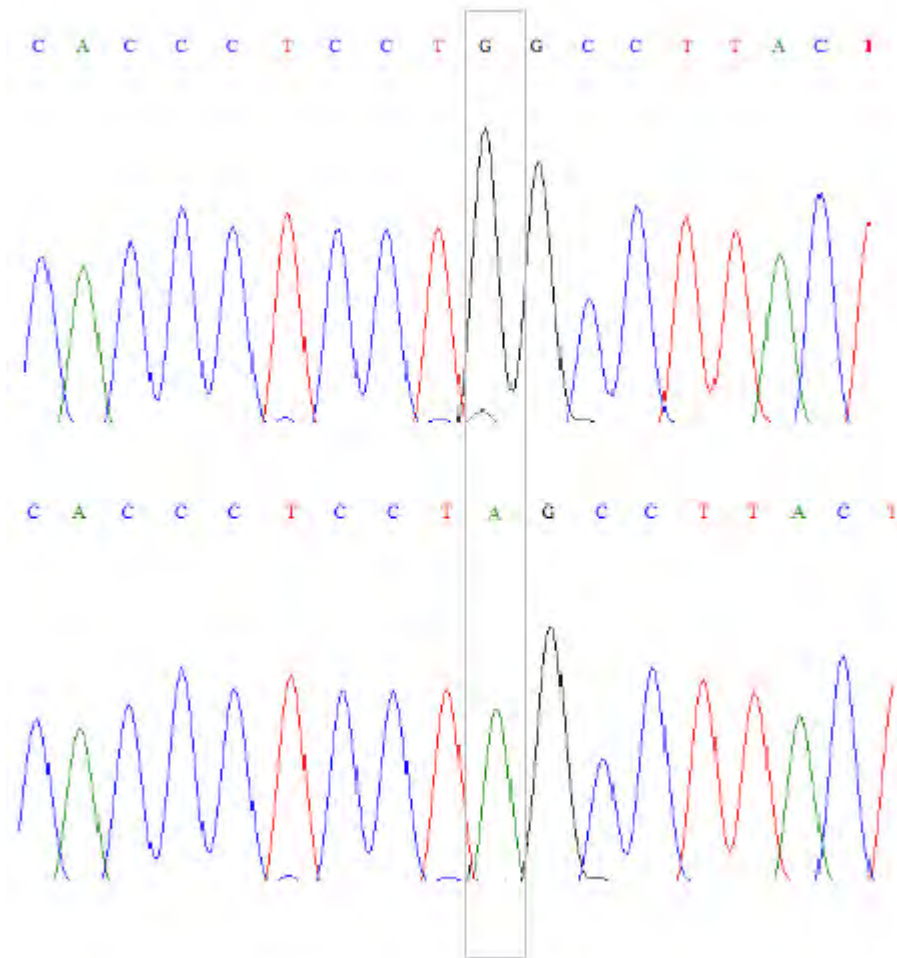
Η μετάλλαξη που βρέθηκε στην παρακείμενη περιοχή (ND3) του γονιδίου  $tRNA^{Gly}$ .



Χρωματογράφημα sequencing τμήματος του γονιδίου  $tRNA^{Gly}$  σε άτομο φυσιολογικό control κάτω και σε άτομο control επάνω με τη μετάλλαξη C10142A.



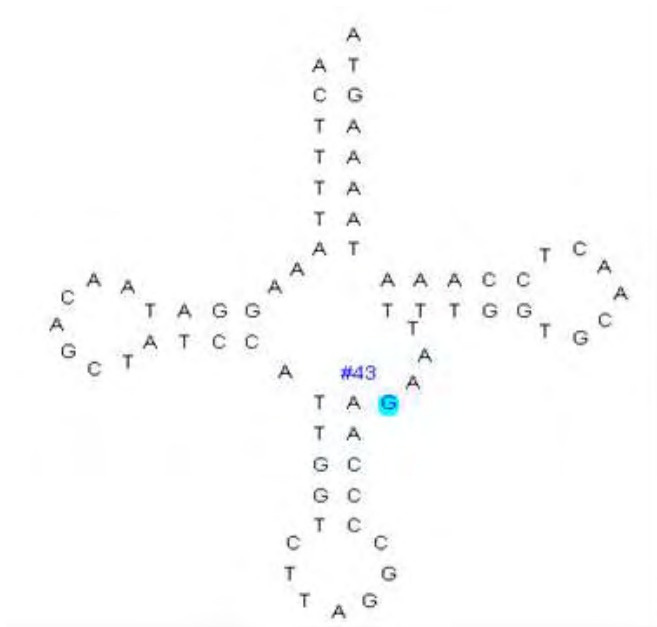
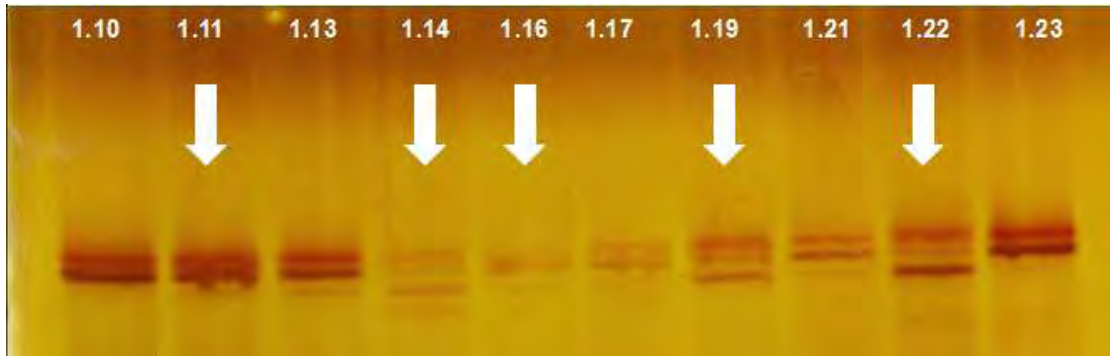
Η μετάλλαξη που βρέθηκε στην παρακείμενη περιοχή (ND3) του γονιδίου  $tRNA^{Gly}$ .



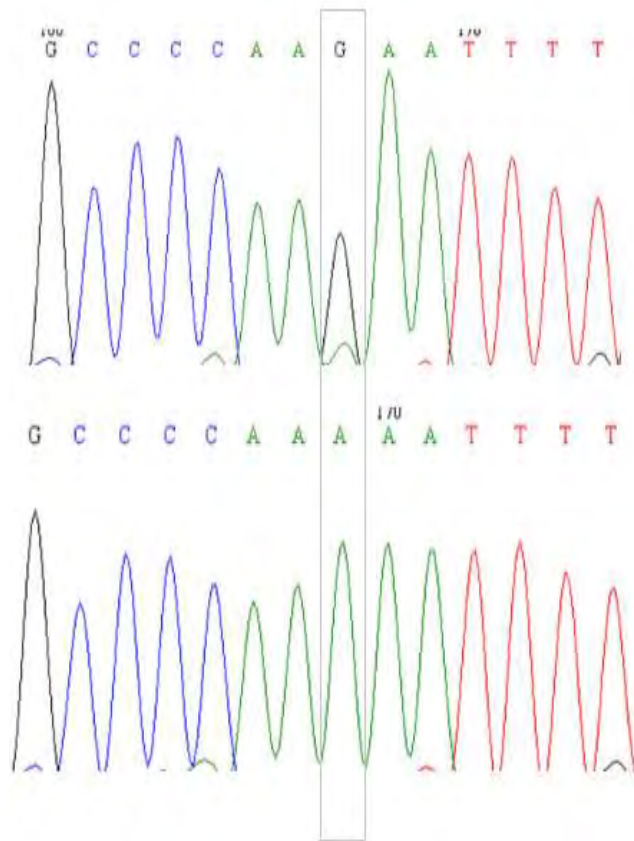
Χρωματογράφημα sequencing τμήματος του γονιδίου  $tRNA^{Gly}$  σε άτομο φυσιολογικό control κάτω και σε άτομο control επάνω με τη μετάλλαξη A10097G.

3. Από τα 10 δείγματα ατόμων χωρίς κάποιο κλινικό σύμπτωμα (ομάδα ελέγχου) για τα τρία γονίδια ιστιδίνη, σερίνη και λευκίνη (CUN), βρέθηκε μία μετάλλαξη η A12308G εντός της περιοχής του γονιδίου  $tRNA^{Leu(CUN)}$ , με συχνότητα 1/10 (10%).

Στις παρακάτω εικόνες φαίνονται τα πηκτώματα πολυακρυλαμιδίου 10% (22h, 220V, 4 °C) όλων των δειγμάτων της ομάδας ελέγχου που μελετήθηκαν:



Ο πολυμορφισμός A>G εντοπίζεται στο μεταβλητό βρόχο του tRNA<sup>Leu</sup>.



Χρωματογράφημα sequencing τμήματος του γονιδίου  $tRNA^{Leu(CUN)}$  σε άτομο φυσιολογικό control κάτω και σε άτομο control επάνω με τη μετάλλαξη A12308G.

## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η νόσος του Alzheimer έχει συνδεθεί σε πολλές μελέτες με τη μιτοχονδριακή δυσλειτουργία. Αυτές οι μελέτες βασίζονται σε πολλά χαρακτηριστικά των μιτοχονδρίων. Στην πλειονότητά τους οι σποραδικές μορφές της AD όψιμης έναρξης συμπτωμάτων έχουν σύνθετη αιτιολογία περιβαλλοντικών και γενετικών (π.χ αλληλόμορφο ε4 της απολιποπρωτεΐνης E ή ApoE 4) παραγόντων. Όμως, μεμονωμένα η ύπαρξη του κάθε παράγοντα δεν επαρκεί για την εμφάνιση της νόσου. Ωστόσο, στην πλειονότητα των ασθενών, οι τυχαίοι παράγοντες παραμένουν άγνωστοι.

Η οξειδωτική βλάβη και η δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων έχουν εμπλακεί ευρέως στην παθογένεια της AD που εμφανίζεται νωρίς στον εγκέφαλο πριν από την εμφάνιση των αμυλοειδών πλακών. Υπάρχουν σοβαρές αποδείξεις μορφολογικών, βιοχημικών και μοριακών ανωμαλιών στα μιτοχόνδρια σε διάφορους ιστούς των ασθενών με AD. Τα μιτοχόνδρια είναι βασικοί ρυθμιστές της επιβίωσης και του θανάτου των κυττάρων και η δυσλειτουργία του μεταβολισμού της ενέργειας οδηγεί σε μειωμένη παραγωγή ATP, μειωμένη ρύθμιση του ασβεστίου και αυξημένη παραγωγή των δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS).

Επιπλέον, το mtDNA είναι ιδιαίτερα ευαίσθητο στην οξειδωτική βλάβη. Λόγω της γεινιάσης του με την πηγή των ROS (αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων) και της απουσίας μηχανισμών επιδιόρθωσης παρουσιάζει υψηλό ρυθμό μεταλλάξεων. Η συσσώρευση των mtDNA μεταλλάξεων επιδεινώνει τη γήρανση, οδηγεί σε οξειδωτική βλάβη, προκαλεί ανεπάρκεια ενέργειας και αυξημένη παραγωγή ROS, δημιουργώντας ένα φαύλο κύκλο. Ο εγκέφαλος είναι ιδιαίτερα ευάλωτος στην οξειδωτική βλάβη λόγω της υψηλής περιεκτικότητάς του σε ακόρεστα λιπαρά οξέα, την υψηλή κατανάλωση οξυγόνου και τη σχετική έλλειψη αντιοξειδωτικών ενζύμων σε σύγκριση με άλλα όργανα. Η βλάβη που προκαλείται από τις ROS θεωρείται γενικά ως αιτιολογικός παράγοντας για τη νευρωνική εκφύλιση και έχει αναφερθεί σε πολλές νευροεκφυλιστικές ασθένειες (Perry G, Nunomura et al., 2002).

Το οξειδωτικό στρες και η υπερφόρτωση με ασβέστιο μπορούν να ευνοήσουν τη διάνοιξη του πόρου μετάπτωσης της μιτοχονδριακής διαπερατότητας (mPTP) με αποτέλεσμα την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c και την επαγωγή απόπτωσης από κασπάσες που οδηγεί στο νευρωνικό θάνατο.

Εκτός από σωματικές μεταλλάξεις το mtDNA χαρακτηρίζεται και από γενετικούς πολυμορφισμούς. Εικάζεται ότι οι πολυμορφισμοί μπορεί να προκαλέσουν μικρές διαφορές στις πρωτεΐνες της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης καθώς και υπερπαραγωγή ελεύθερων ριζών. Αυτό θα μπορούσε να προδιαθέτει ένα άτομο, ή ένα πληθυσμό που μοιράζεται τον ίδιο γονότυπο μιτοχονδριακού DNA, στο να εμφανίσει παθολογικό φαινότυπο. Οι κοινοί mtDNA πολυμορφισμοί ορίζουν μια ποικιλία μιτοχονδριακών γονοτύπων ειδικών για κάθε ήπειρο, που ονομάζονται απλοομάδες. Στην Ευρώπη, έχουν προσδιοριστεί εννέα διαφορετικές μιτοχονδριακές απλοομάδες (H, I, J, K, T, U, V, W, X). Ωστόσο, ο μηχανισμός δράσης των μιτοχονδριακών απλοομάδων δεν είναι σαφής. Οι μελέτες που έχουν γίνει πάνω στη συμμετοχή συγκεκριμένων γενετικών πολυμορφισμών σε νευροεκφυλιστικές ασθένειες αναφέρουν αντικρουόμενα δεδομένα. Υπάρχουν πολλά

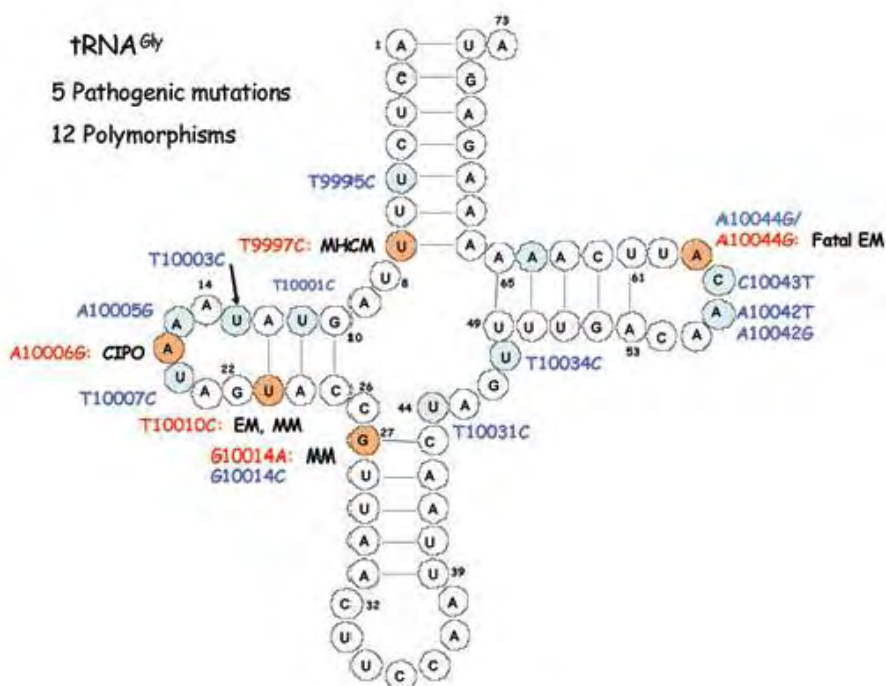


αποδεικτικά στοιχεία που δείχνουν ότι τα μιτοχόνδρια έχουν κεντρικό ρόλο στις νευροεκφυλιστικές ασθένειες που σχετίζονται με την ηλικία, αλλά είναι ακόμη υπό συζήτηση αν το οξειδωτικό στρες και η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία εμπλέκονται στην έναρξη και την εξέλιξη αυτών των διαταραχών ή είναι απλώς συνέπεια της νευροεκφύλισης.

Για να καθοριστεί αν μια μετάλλαξη του DNA είναι αιτιώδης σε μια ασθένεια ή αν πρόκειται για έναν πολυμορφισμό πραγματοποιείται έλεγχος για τον εντοπισμό της μετάλλαξης σε ομάδες ελέγχου, πληθυσμούς δηλαδή χωρίς κάποιο κλινικό σύμπτωμα. Η παθολογική σημασία των μεταλλάξεων του DNA γενικά αποκλείεται όταν η μετάλλαξη εντοπίζεται στο γενικό πληθυσμό. Ωστόσο, mtDNA μελέτες έχουν δείξει ότι οι περισσότερες mtDNA παραλλαγές είναι ήπειρο-ειδικές, και ότι ορισμένες παραλλαγές και απλοομάδες μπορούν να είναι εξαιρετικά κοινές σε ορισμένους πληθυσμούς και εντελώς απύσες σε άλλους. Κατά συνέπεια, η εφαρμογή του παρόντος κριτηρίου για τις mtDNA μελέτες ασθενειών απαιτεί οι πληθυσμοί ελέγχου να ταιριάζουν με ακρίβεια εθνικά με το εθνικό υπόβαθρο των ασθενών.

Δείγματα ασθενών με AD: Ως συνέχεια μιας έρευνας 100 δειγμάτων από άτομα με AD μελετήθηκε η ύπαρξη μεταλλάξεων στο tRNA του μιτοχονδριακού γενώματος. Στην παρούσα εργασία η μελέτη έγινε στο μιτοχονδριακό γονίδιο tRNA<sup>Gly</sup> σε 50 δείγματα ασθενών με AD. Δεν βρέθηκε σε αυτά καμία μετάλλαξη.

Στο συγκεκριμένο γονίδιο έχουν βρεθεί 5 παθογόνες μεταλλάξεις και 12 πολυμορφισμοί (Πίνακας 4).



**Εικόνα 23:** Μιτοχονδριακές μεταλλάξεις του γονιδίου tRNA<sup>Gly</sup> και παθογένεια.

Στην παραπάνω εικόνα φαίνονται με μπλε χρώμα οι πολυμορφισμοί και με κόκκινο οι παθολόγες μεταλλάξεις που έχουν βρεθεί στο γονίδιο. Φαίνεται λοιπόν ότι το γονίδιο σχετίζεται με τις εξής καταστάσεις παθολογίας: MHCM (Maternally inherited Hypertrophic Cardio-Myopathy), CIPO (Chronic Intestinal PseudoObstruction with myopathy), EM (EncephaloMyopathy), Fatal EM (Fatal EncephaloMyopathy) και MM (Mitochondrial Myopathy).

tRNA <sup>Gly</sup>	
1. T9997C	MHCM
2. A10006G	CIPO
3. T10010C	EM MM
4. G10014A	MM
5. A10044G	Fatal encephalopathy

**Εικόνα 24:** Παθολόγες σημειακές μεταλλάξεις και οι φαινότυποί τους στο tRNA<sup>Gly</sup>.

Όπως προαναφέρθηκε η παρούσα εργασία είναι συνέχεια μιας μεγαλύτερης έρευνας 100 συνολικά δειγμάτων και όπως ήταν αναμενόμενο στα προηγούμενα 50 δείγματα ασθενών με AD είχαν βρεθεί κάποιες μεταλλάξεις στο γονίδιο αυτό. Αυτές ήταν οι: T10007C, T10034C και C10128T (ND3) η καθεμία σε ποσοστό 2%.

Η T10007C μετάλλαξη χαρακτηρίζεται ως ουδέτερος πολυμορφισμός σε φυσιολογικούς πληθυσμούς (Wong Lee-Jun C., et al., 2002). Ομοίως και η μετάλλαξη T10034C είναι ταυτοποιημένος πολυμορφισμός τόσο σε άτομα χωρίς κάποιο κλινικό σύμπτωμα (Marzuki S., et al., 1991) όσο και σε ασθενείς με MERRF και εγκεφαλομυοπάθειες (Noer A.S., et al 1991). Πρέπει να αναφερθεί ότι σε μελέτη ασθενών με Alzheimer για την ανίχνευση μιτοχονδριακών μεταλλάξεων βρέθηκε να εμφανίζεται σε ποσοστό 15,9% στους ασθενείς, ενώ στην ομάδα ελέγχου σε ποσοστό 10,8% (Chagnon Pierre, et al., 1999). Ωστόσο, λόγω του ποσοστού με το οποίο συναντάται στο φυσιολογικό πληθυσμό και του γεγονότος ότι δεν αποδεικνύεται καμία αιτιολογική συσχέτιση με τις παραπάνω ασθένειες αναφέρεται ως πολυμορφισμός και όχι ως παθολόγος μετάλλαξη στη βάση δεδομένων του mitomap. Σε ομάδα αναφοράς που εξετάστηκε στο εργαστήριό μας για μεταλλάξεις στο tRNAGly οι παραπάνω μεταλλάξεις δεν εντοπίστηκαν. Και σε αυτήν την περίπτωση δεν μπορούμε να ισχυριστούμε ότι οι μεταλλάξεις αυτές είναι οι υπεύθυνες για την εμφάνιση του Alzheimer αλλά η συνύπαρξή τους με άλλες μεταλλάξεις ίσως να συνεισφέρουν στην εμφάνισή της.

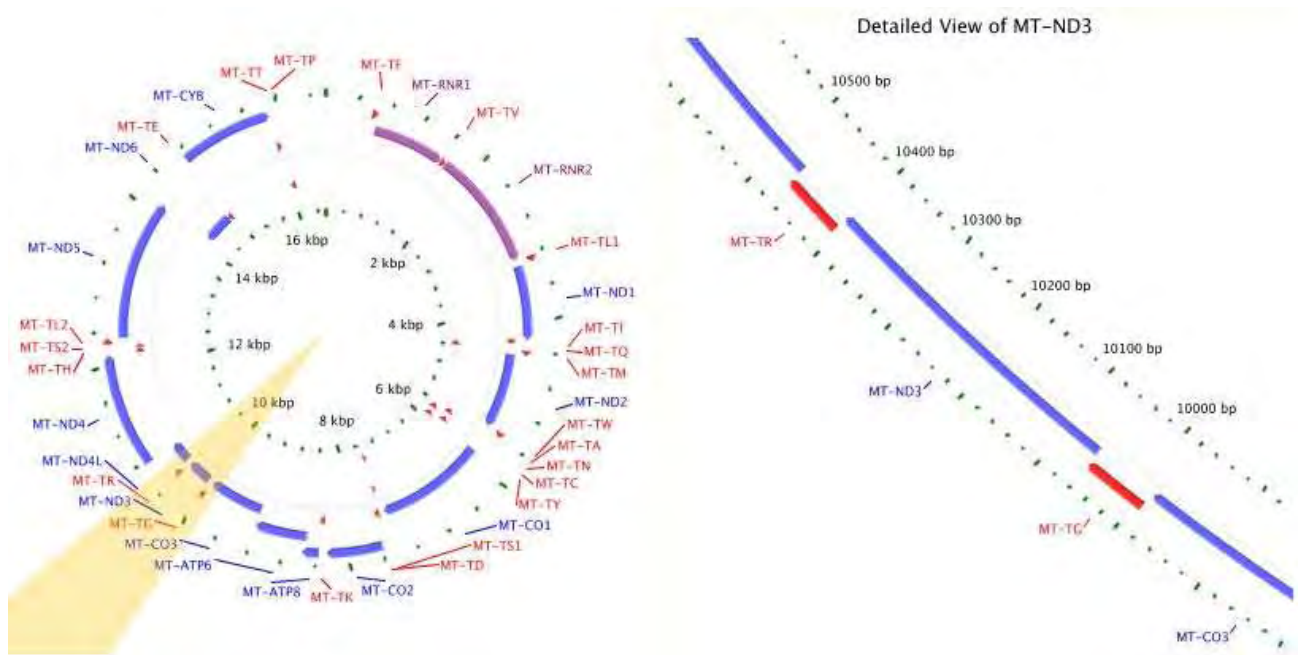
Τέλος ανιχνεύθηκε και η μετάλλαξη T10128C στη ND3 υπομονάδα του συμπλόκου I της αναπνευστικής αλυσίδας, καθώς οι εκκινητές ενισχύουν και τμήματα παρακείμενων γονιδίων εκτός από τα tRNA. Η συγκεκριμένη μετάλλαξη δεν είναι καταχωρημένη στη βάση δεδομένων του mitomap και δεν υπάρχει κάποια αναφορά στη βιβλιογραφία. Συνεπώς θα πρέπει να ερευνηθεί περισσότερο και να συγκριθεί με άτομα χωρίς Alzheimer για να διαπιστωθεί αν όντως εμφανίζεται πιο συχνά στην ασθένεια και αν σχετίζεται με αυτή. Συνοψίζοντας όμως για αυτές τις μεταλλάξεις που είχαν βρεθεί στο εργαστήριο στις προηγούμενες μελέτες για το tRNA<sup>Gly</sup> στους ασθενείς με Alzheimer καμία από αυτές δε φαίνεται να έχει αιτιολογική σχέση με την ασθένεια από μόνη της και καμία από αυτές δεν έχει αναφερθεί σε αυξημένο ποσοστό σε άλλες μελέτες για τη νόσο του Alzheimer. Είναι

πιο πιθανό κάποιες mtDNA μεταλλάξεις δρώντας συνεργιστικά (Brown Michael D., et al., 1996) να είναι παθογόνες για ένα μικρό μέρος του πληθυσμού που εμφανίζει τη νόσο του Alzheimer και ένα μικρό ποσοστό που δεν την εμφανίζει να φέρει μια mtDNA μετάλλαξη που έχει προστατευτικό ρόλο (Elson Joanna L., et al., 2006).

Τα δείγματα στο σύνολό τους εξετάστηκαν στο εργαστήριο και για άλλα γονίδια εκτός από το tRNA<sup>Gly</sup>. Διαπιστώθηκε ότι φέρουν περισσότερες από μία μεταλλάξεις οι οποίες όλες μαζί μπορεί να συμβάλλουν στην εκδήλωση του κλινικού φαινοτύπου του Alzheimer.

Δείγματα ατόμων χωρίς κάποιο κλινικό σύμπτωμα: Όσον αφορά τα δείγματα από άτομα χωρίς κάποιο κλινικό σύμπτωμα η μελέτη ήταν και εδώ συνέχιση μιας μεγαλύτερης έρευνας 207 δειγμάτων για διάφορα tRNA γονίδια. Στη συγκεκριμένη εργασία όμως μελετήθηκε το tRNA<sup>Gly</sup> 51 δειγμάτων και τα tRNA<sup>His,Ser,Leu</sup> (ιστιδίνης, σερίνης- AGY και λευκίνης- CUN) 10 δειγμάτων. Σε αυτά βρέθηκαν για το tRNA<sup>Gly</sup> οι μεταλλάξεις T10084C και C10142A στο ίδιο δείγμα και A10097G σε ένα άλλο δείγμα, η καθμία σε ποσοστό 2% στην ND3 υπομονάδα του συμπλόκου I της αναπνευστικής αλυσίδας. Στα γονίδια tRNA<sup>His,Ser,Leu</sup> βρέθηκε η μετάλλαξη A12308G εντός της περιοχής του γονιδίου (Leu CUN), σε ποσοστό 10%. Στα γονίδια ιστιδίνη και σερίνη δεν βρέθηκε κάποια μετάλλαξη.

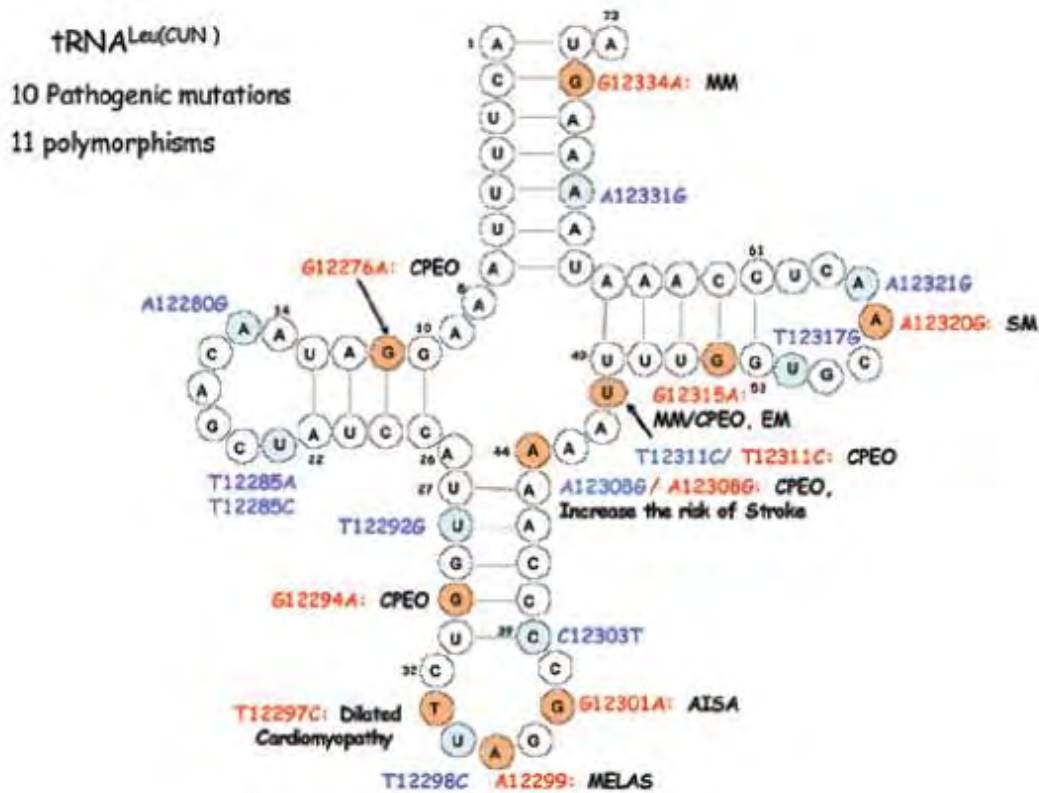
Η ND3 υπομονάδα του συμπλόκου I της αναπνευστικής αλυσίδας έχει προταθεί ότι παίζει έναν άγνωστο, αλλά σημαντικό ρόλο στη μεταφορά ηλεκτρονίων, στην άντληση πρωτονίων και στη δέσμευση ουβικουινόνης. Έχουν βρεθεί σε άλλες μελέτες μεταλλάξεις όπως η T10158C, που συνδέεται με το σύνδρομο Leigh (σερίνη > προλίνη)(Marco Crimi, et al., 2004) και τη μιτοχονδριακή εγκεφαλοπάθεια σε παιδιά (Robert McFarland, et al., 2004) και η T10191C. Και οι δύο μεταλλάξεις προκαλούν μείωση της ενζυμικής δραστηριότητας σε σχέση με το φυσιολογικό σύμπλοκο I. Επιπλέον, βλάβες στην MT- ND3 σχετίζονται με την ανεπάρκεια μιτοχονδριακού συμπλόκου I (McFarland, R., et al., 2004). Πρόκειται για μια διαταραχή της αναπνευστικής αλυσίδας των μιτοχονδρίων που προκαλεί ένα ευρύ φάσμα άλλων κλινικών διαταραχών, από τη θανατηφόρο νόσο των νεογνών ως την εμφάνιση νευροεκφυλιστικών διαταραχών στους ενήλικους. Φαινότυποι περιλαμβάνουν μακροκεφαλία με προοδευτική λευκοδυστροφία, μη ειδική εγκεφαλοπάθεια, μυοκαρδιοπάθεια, μυοπάθεια, ηπατική νόσο, σύνδρομο Leigh, κληρονομική οπτική νευροπάθεια Leber, καθώς και ορισμένες μορφές της νόσου Parkinson (Loeffen, J. L. C. M., Smeitink, et al., 2000).



**Εικόνα 25:** Αριστερά το γονίδιο του MT- ND3 στη θέση 10058- 10403. Δεξιά Πιο λεπτομερείς απεικόνιση του γονιδίου.

- Η μετάλλαξη T10084C εντοπίζεται στην ND3 υπομονάδα του συμπλόκου I της αναπνευστικής αλυσίδας και αυτή η αλλαγή έχει ως αποτέλεσμα την αλλαγή του αμινοξέος ισολευκίνη σε θρεονίνη χωρίς όμως να προκαλεί κάποια βιοχημική διαταραχή (Clark, K. M., et al., 1999). Αυτή η μετάλλαξη δεν έχει βρεθεί ξανά σε προηγούμενες μελέτες στο εργαστήριο, βρέθηκε όμως σε άλλες μελέτες και από τη βιβλιογραφία φαίνεται πως συμμετέχει πάντα μαζί με άλλες μεταλλάξεις στις απλοομάδες U και J σε φινλανδικούς πληθυσμούς (Finnila, S., et al., 2001), αλλά και πως υπάρχει σαν πολυμορφισμός στις J, K και L σε ευρωπαϊκούς κυρίως πληθυσμούς (Herrnstadt, C., et al., 2002). Δεν έχει βρεθεί συσχέτιση της με κάποια ασθένεια εκτός από την ύπαρξή της στην κληρονομική οπτική νευροπάθεια Leber σε ασθενείς κινεζικών οικογενειών χωρίς όμως να παίζει κάποιο σημαντικό ρόλο από μόνη της (Qu, J., et al., 2009) και ίσως η συγκληρονόμησή της μαζί με άλλη/ άλλες σχετίζεται με κάποια ασθένεια.
- Η μετάλλαξη C10142A στην ND3 υπομονάδα του συμπλόκου I της αναπνευστικής αλυσίδας δεν είναι καταχωρημένη στη βάση δεδομένων του mitomap και δεν υπάρχει κάποια αναφορά στη βιβλιογραφία. Συνεπώς θα πρέπει να ερευνηθεί περισσότερο και να συγκριθεί με άτομα με Alzheimer για να διαπιστωθεί αν όντως εμφανίζεται πιο συχνά στην ασθένεια και αν σχετίζεται με αυτή. Σε αυτή τη θέση όμως στη βάση δεδομένων του mitomap υπάρχει η C10142T. Πρόκειται για μια συνώνυμη μετάλλαξη η οποία έχει βρεθεί (χωρίς από μόνη της να παίζει κάποιο συγκεκριμένο ρόλο) σε ασθενείς με δυσλειτουργία νευροαισθητήριας ακοής (SNHI) (Lehtonen, M. S., Moilanen, J. S., Majamaa, K., 2003) και σε ασθενείς με μιτοχονδριακή εγκεφαλοπάθεια (Da Pozzo, P., et al., 2004).

- Η μετάλλαξη A10097G στην ND3 υπομονάδα του συμπλόκου I της αναπνευστικής αλυσίδας είναι συνώνυμη. Έχει βρεθεί σε πολύ μικρό ποσοστό σαν πολυμορφισμός στην απλοομάδα W σε ευρωπαϊκούς πληθυσμούς (Herrnstadt, C., et al., 2002), ενώ δεν έχει αναφερθεί κάπου η εμπλοκή της με κάποια ασθένεια.
- Η μετάλλαξη A12308G στο γονίδιο tRNA<sup>Leu(CUN)</sup> βρέθηκε εντός της περιοχής του γονιδίου (Leu CUN) και είναι non- coding.



**Εικόνα 26:** Μιτοχονδριακές μεταλλάξεις του γονιδίου tRNA<sup>HSL</sup> (Leu CUN) και παθογένεια.

Στην παραπάνω εικόνα φαίνονται με μπλε οι 11 πολυμορφισμοί του γονιδίου και με κόκκινο οι 10 παθογόνες μεταλλάξεις. Αυτές σχετίζονται με CPEO (Chronic Progressive External Ophthalmoplegia), MM (Mitochondrial Myopathy), SM (Skeletal Myopathy), AISA (Acquired Idiopathic Sideroblastic Anemia), MELAS (Mitochondrial Encephalomyopathy, Lactic Acidosis, Stroke-like episodes), Increased risk of Stroke και με Dilated Cardiomyopathy.

tRNA <sup>Leu(CUN)</sup>	
1. G12276A	CPEO
2. G12294A	CPEO
3. T12297C	Dilated cardiomyopathy
4. A12299C	MELAS
5. G12301A	AISA
6. A12308G	CPEO Increased risk of stroke
7. T12311C	CPEO
8. G12315A	MM and CPEO EM
9. A12320G	SM
10. A12334G	MM

**Εικόνα 27:** Παθογόνες σημειακές μεταλλάξεις και οι φαινότυποί τους στο tRNA<sup>HSL</sup> (Leu CUN).

Γενικά στην ευρύτερη μελέτη του εργαστηρίου έχει βρεθεί η μετάλλαξη A12308G αρκετές φορές στην ομάδα control και στους ασθενείς με AD σε μικρότερο ποσοστό, ενώ στην παρούσα εργασία έχει βρεθεί σε ποσοστό 10% στα άτομα χωρίς κλινικό σύμπτωμα.

Έχει δειχθεί ότι ο πολυμορφισμός A12308G στο tRNA<sup>Leu(CUN)</sup> αυξάνει τον κίνδυνο για εγκεφαλικό σε άτομο με τη μετάλλαξη A3243G με MELAS (Pulkes T, Sweeney MG, Hanna MG., 2000), την πιο συνηθισμένη μετάλλαξη στο γονίδιο tRNA<sup>Leu(UUR)</sup>. Ωστόσο, αυτή η παρατήρηση χρειάζεται περαιτέρω μελέτη. Επιπλέον, η μετάλλαξη A12308G που υπάρχει σε ασθενείς με CPEO βρίσκεται και στο φυσιολογικό πληθυσμό συνεπώς υπάρχει μεγάλη πιθανότητα να μη συνδέεται με την ασθένεια (Van den Ouweland JM, et al., 1992). Ακόμη, οι εξελικτικά συντηρημένες περιοχές στα μιτοχονδριακό tRNA γονίδια μπορεί να παρουσιάζουν ένα σημαντικό πολυμορφισμό στους ανθρώπους και η μετάλλαξη A12308G στο tRNA<sup>Leu(CUN)</sup> γονίδιο είναι απίθανο να σχετίζεται τόσο με τη CPEO όσο και με το Wolfram σύνδρομο, μια σπάνια ασθένεια που εμφανίζεται εκ γενετής και που χαρακτηρίζεται από διαβήτη, κώφωση, άπιοιο διαβήτη και οπτική ατροφία (Van den Ouweland, J. M., et al., 1992). Η συγκεκριμένη μετάλλαξη έχει βρεθεί και σε ασθενή με MM (Weber K, et al., 1997) και σε ασθενείς με EM (Houshmand, M., et al., 1994). Στους τελευταίους όμως υπήρχε σε πολύ μικρό ποσοστό και η σύγκρισή του με το ποσοστό των φυσιολογικών οδήγησε στο συμπέρασμα ότι δεν μπορεί να θεωρηθεί παθογόνος η μετάλλαξη. Σε ασθενείς με MERF, LHON και νευρομυϊκή ασθένεια ο πολυμορφισμός A12308G έχει καθοριστεί ακόμη και απαιτούνται περαιτέρω μελέτες (Howell, N., et al., 1992). Η A12308G έχει αναφερθεί επίσης να έχει σημαντικά υψηλή συχνότητα σε άτομα με μεγάλες ελλείψεις (macrodeletion) του μιτοχονδριακού DNA (M. Crimi, et al., 2003).

Ο πολυμορφισμός A12308G στο tRNA<sup>Leu(CUN)</sup> σε συνδυασμό με έναν άλλο κοινό πολυμορφισμό τον A11467G επιβεβαίωσε ότι η απλοομάδα του μιτοχονδριακού DNA είναι η U. Επιπλέον, σε ασθενή με καρδιομυοπάθεια έχει βρεθεί η A12308G μαζί με την T12297C (M. Grasso, et al., 2001). Η πιθανή συνεργιστική επίδραση αυτών των δύο και το αποτέλεσμα της απλοομάδας U στην έκφραση φαινοτύπου

πρέπει να διερευνηθούν περαιτέρω. Ο πολυμορφισμός A12308G βρέθηκε ότι σχετίζεται με την απλοομάδα K επίσης και συγκεκριμένα σε πληθυσμούς ευρωπαϊών μαζί με μεταλλάξεις στις περιοχές A9052G και C10394T (Torrioni A, et al., 1996). Επειδή όμως ο αριθμός των δειγμάτων στην παρούσα εργασία ήταν μικρός και δε μελετήθηκαν και δείγματα από ασθενείς με Alzheimer δεν μπορούμε να μιλήσουμε για το αν η μετάλλαξη αυτή μπορεί να συσχετισθεί με τη νόσο ή αν παίζει κάποιο προστατευτικό ρόλο σε αυτή.

Στον παρακάτω πίνακα φαίνονται συνολικά με κόκκινο τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας στα άτομα της ομάδας ελέγχου καθώς και ένα μέρος των αποτελεσμάτων άλλων μελετών που είχαν πραγματοποιηθεί ήδη στο εργαστήριο.

ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΟΙ													
No	Leu(UUR)	Lys	His-Ser-Leu(CUN)	TP	ACT	GLY	Phe	Val	SA	TA	Arg	Glu	IGM
1.10	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓
1.11	✓	✓	✓	Thr G15928A	✓	✓	✓	✓	✓	✓	Arg T10463C		✓
1.13	✓	✓	✓	Thr G15928A	✓	✓	✓	✓		NC3 G5585A	Arg T10463C		✓
1.14	✓	COII G8251A	✓	Cyt b G15884C	✓	✓	✓	✓		✓	✓		✓
1.16	✓	✓	Leu(CUN) A12308G	NC10 A15954C	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓
1.17	✓	✓	✓	Thr C15904T	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓
1.19	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓
1.21	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓
1.22	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓
1.23	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓
2.2	✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓			✓		✓
7.9	✓	✓	✓	Thr G15927A	✓	ND3 T10084C, C10142A		✓		✓	✓		✓
9.13	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓
9.16	✓	✓	✓	✓	✓	ND3 A10097G	✓	✓	✓	✓	✓		✓
12.7	✓	A8308G tRNA Lys	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓
12.9	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	12S rRNA G1598A	Ser C7472T	✓	✓		✓
13.4	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓
13.5	16S A3213G	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓

14.3	✓	✓	✓	Thr C15904T	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓
16.10	✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓
18.2	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓
18.3	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	ND3 A10398G		✓
18.7	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓	Arg T10463C		✓
18.14	✓	✓	Leu(CUN) A12308G	✓	✓	✓	✓	✓		✓	✓		✓
20.1	✓	NC7 G8292A	✓	✓	✓	✓	✓	✓	Ser C7472T	✓	✓		✓
20.2	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓
20.3	✓	✓	✓	✓	✓	✓	12S rRNA A750G	✓		✓	✓	✓	✓
20.5	✓	NC7 8290 - 8307 ins	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓
20.6	✓	✓	✓	Thr G15928A	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓
20.8	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓
20.13	✓	✓	Leu(CUN) A12308G	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓
20.14	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	ND3 A10301G + Arg T10463C		✓
21.2	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓
21.3	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓
21.4	✓	✓	✓	✓		✓	✓	✓		✓	✓		✓
21.6	✓	✓	Leu(CUN) A12308G	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	ND3 G10373A		✓
21.8	ND1 T3394G	✓	✓	Thr A15924G	✓	✓	✓	✓	✓	✓	ND3 A10398G+ C10400T		✓
21.12	✓	✓	Leu(CUN) A12308G	✓	✓	✓	✓	✓		✓	✓		✓
21.15	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
21.16	✓	✓	✓	✓		✓	✓	✓		✓	✓	✓	✓
21.17	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓	✓		✓
21.19	✓	✓	✓	✓	✓	✓	12S rRNA A750G	✓	✓	✓	✓		✓
21.20	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓	✓		✓



21.23	✓	✓	✓	Thr G15927A	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
21.25	✓	✓	Leu(CUN) A12308G	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
27.2	✓	✓	✓	Thr G15928A	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
27.5	✓	✓	Leu(CUN) A12308G	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
27.6	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	Val T1658C	Ser A7464C & C7476T	✓	✓	✓	✓
27.8	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	ND3 A10398G	✓	✓
27.10	✓	COII G8251A	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓

**Πίνακας 5:** Απεικόνιση με κόκκινο χρώμα των αποτελεσμάτων της παρούσας έρευνας των μιτοχονδριακών γονιδίων  $tRNA^{Gly}$  και  $tRNA^{HSL}$ . Με μαύρο χρώμα αποτελέσματα προηγούμενων μελετών του εργαστηρίου για άλλα  $tRNA$  γονίδια στα ίδια δείγματα ατόμων χωρίς κάποιο κλινικό σύμπτωμα.

Συνεχώς αυξανόμενα στοιχεία οδηγούν σε συμπεράσματα όπως ότι η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία εμπλέκεται σε διάφορα νευροεκφυλιστικά νοσήματα. Η εξαρτώμενη από την ηλικία συσσώρευση των μιτοχονδριακών διαταραχών και μεταλλάξεων οδηγεί σε δομικές και λειτουργικές αλλαγές στη νευρωνική λειτουργία και στο νευρωνικό θάνατο. Εκτός από τη γήρανση, επιγενετικοί παράγοντες και δραστηριότητες του τρόπου ζωής μπορεί πιθανώς να συμβάλλουν στο νευροεκφυλισμό και στον κυτταρικό θάνατο. Επιπλέον, στην AD οι μεταλλαγμένες ΑβΡΡ και Αβ εισέρχονται στα μιτοχόνδρια και μπλοκάρουν τη μεταφορά πυρηνικά κωδικοποιούμενων μιτοχονδριακών πρωτεϊνών προκαλώντας με τη σειρά τους παραγωγή ελευθέρων ριζών, αυξάνοντας την οξειδωτική βλάβη και οδηγώντας στον κυτταρικό θάνατο.

Μέσα από μελέτες που έχουν σκοπό τη διευκρίνιση του ρόλου των μιτοχονδρίων τόσο κατά την έναρξη της νόσου όσο και στη διάρκεια της εξέλιξής της, οι ερευνητές έχουν αρχίσει να επικεντρώνονται σε ερευνητικές προσπάθειες για την ανάπτυξη θεραπειών, όπως μορίων που στοχεύουν και προστατεύουν τα μιτοχόνδρια και τους νευρώνες από την τοξικότητα της γήρανσης και του πληθυσμού των μεταλλαγμένων πρωτεϊνών.

Από τη μεριά μας στο εργαστήριο Γενετικής, Συγκριτικής & Εξελικτικής Βιολογίας του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας για να εξαχθούν ασφαλή, αξιόπιστα και εμπειρισταωμένα συμπεράσματα για το ρόλο των σημειακών μεταλλάξεων στα μιτοχονδριακά  $tRNA$  γονίδια και γενικότερα για το ρόλο του μιτοχονδριακού DNA στην εμφάνιση της νόσου του Alzheimer, πρέπει να ολοκληρωθεί η έρευνα σε όλα τα  $tRNA$  γονίδια στους ασθενείς και να γίνει σύγκριση με μεγάλη ομάδα του φυσιολογικού πληθυσμού. Η αισιοδοξία είναι μεγάλη, ότι σημαντικά βήματα σε παγκόσμιο επίπεδο,

μπορούν να συνεχίσουν ώστε σε μελλοντικό χρόνο, διάφορες ασθένειες όπως και η νόσος του Alzheimer να μπορούν να ελεγχθούν.

## **BIBΛIOΓPAΦIA**

1. Alzheimer A. Uber eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. Allgemeine Zeits Psychiat PsychischYGerichtlich Med 1907; 64:146–148.
2. Roth M, Tomlinson BE, Blessed G. Correlation between scores for dementia and counts of 'senile plaques' in cerebral grey matter of elderly subjects. Nature 1966; 209:109–110.
3. Grazina M., Pratas J., Silva F., Oliveira S., Santana I. and. Oliveira C., Genetic basis of Alzheimer's dementia: role of mtDNA Mutations, Genes, Brain and Behavior. 2006; 5:92–107.
4. Rudy J. Castellani, Raj K. Rolston, and Mark A. Smith. Alzheimer Disease. Disease-A-Month 2010; 56(9): 484–546.
5. Fratiglioni L, De Ronchi D, Aguero-Torres H. Worldwide prevalence and incidence of dementia. Drugs Aging 1999; 15:365–375.
6. Zhu CW, Sano M. Economic considerations in the management of Alzheimer's disease. Clin Interv Aging 2006; 1:143–154.
7. Terry RD, Peck A, DeTeresa R, Schechter R, Horoupian DS. Some morphometric aspects of the brain in senile dementia of the Alzheimer type. Ann Neurol 1981; 10:184–192.
8. Castellani RJ, Lee HG, Zhu X, Perry G, Smith MA. Alzheimer disease pathology as a host response. J Neuropathol Exp Neurol 2008; 67:523–531.
9. Perry G, Castellani RJ, Smith MA, Harris PL, Kubat Z, Ghanbari K, et al. Oxidative damage in the olfactory system in Alzheimer's disease. Acta Neuropathol 2003; 106:552–556.
10. Allsop D, Ikeda S, Bruce M, Glenner GG. Cerebrovascular amyloid in scrapie-affected sheep reacts with antibodies to prion protein. Neurosci Lett 1988; 92:234–239.
11. Pro JD, Smith CH, Sumi SM. Presenile Alzheimer disease: amyloid plaques in the cerebellum. Neurology 1980; 30:820–825.
12. Wisniewski HM, Bancher C, Barcikowska M, Wen GY, Currie J. Spectrum of morphological appearance of amyloid deposits in Alzheimer's disease. Acta Neuropathol 1989; 78:337–347.
13. McGeer PL, Rogers J, McGeer EG. Inflammation, anti-inflammatory agents and Alzheimer disease: the last 12 years. J Alzheimers Dis 2006; 9:271–276.
14. Smith MA. Alzheimer disease. Int Rev Neurobiol 1998; 42:1–54.
15. Braak H, Braak E. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. Acta Neuropathol 1991;82:239–259.
16. Frisoni GB, Lorenzi M, Caroli A, Kemppainen N, Nagren K, Rinne JO. In vivo mapping of amyloid toxicity in Alzheimer disease. Neurology 2009; 72:1504–1511.
17. Kromer Vogt LJ, Hyman BT, Van Hoesen GW, Damasio AR. Pathological alterations in the amygdala in Alzheimer's disease. Neuroscience 1990; 37:377–385.
18. Nelson PT, Braak H, Markesbery WR. Neuropathology and cognitive impairment in Alzheimer disease: a complex but coherent relationship. J Neuropathol Exp Neurol 2009; 68:1–14.
19. Driscoll I, Resnick SM, Troncoso JC, An Y, O'Brien R, Zonderman AB. Impact of Alzheimer's pathology on cognitive trajectories in nondemented elderly. Ann Neurol 2006; 60:688–695.
20. Mahut H, Zola-Morgan S, Moss M. Hippocampal resections impair associative learning and recognition memory in the monkey. J Neurosci 1982; 2:1214–1220.

21. Zola-Morgan S, Squire LR, Amaral DG. Human amnesia and the medial temporal region: enduring memory impairment following a bilateral lesion limited to field CA1 of the hippocampus. *J Neurosci* 1986; 6:2950–2967.
22. Mann DM, Esiri MM. The pattern of acquisition of plaques and tangles in the brains of patients under 50 years of age with Down's syndrome. *J Neurol Sci* 1989; 89:169–179.
23. Hirano A, Zimmerman HM. Silver impregnation of nerve cells and fibers in celloidin sections. A simple impregnation technique. *Arch Neurol* 1962; 6:114–122.
24. Wilcock GK, Esiri MM. Plaques, tangles and dementia. A quantitative study. *J Neurol Sci* 1982; 56:343–356.
25. Bennett DA, Cochran EJ, Saper CB, Leverenz JB, Gilley DW, Wilson RS. Pathological changes in frontal cortex from biopsy to autopsy in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 1993; 14:589–596.
26. Masliah E, Terry RD, DeTeresa RM, Hansen LA. Immunohistochemical quantification of the synapse-related protein synaptophysin in Alzheimer disease. *Neurosci Lett* 1989; 103:234–239.
27. Praprotnik D, Smith MA, Richey PL, Vinters HV, Perry G. Filament heterogeneity within the dystrophic neurites of senile plaques suggests blockage of fast axonal transport in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 1996; 91:226–235.
28. Yamada T, Sasaki H, Dohura K, Goto I, Sakaki Y. Structure and expression of the alternatively spliced forms of mRNA for the mouse homolog of Alzheimer's disease amyloid beta protein  $\beta$  precursor. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 158:906–912.
29. Golde TE, Estus S, Usiak M, Younkin LH, Younkin SG. Expression of beta amyloid protein precursor mRNAs: recognition of a novel alternatively spliced form and quantitation in Alzheimer's disease using PCR. *Neuron* 1990; 4:253–267.
30. Hyman BT, Van Hoesen GW, Beyreuther K, Masters CL. A4 amyloid protein immunoreactivity is present in Alzheimer's disease neurofibrillary tangles. *Neurosci Lett* 1989; 101:352–355.
31. Kang J, Lemaire HG, Unterbeck A, Salbaum JM, Masters CL, Grzeschik KH, et al. The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature* 1987; 325:733–736.
32. Walsh DM, Selkoe DJ. A beta oligomers - a decade of discovery. *J Neurochem* 2007; 101:1172–1184.
33. Masters CL, Simms G, Weinman NA, Multhaup G, McDonald BL, Beyreuther K. Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985; 82:4245–4249.
34. Santacruz K, Lewis J, Spires T, Paulson J, Kotilinek L, Ingelsson M, et al. Tau suppression in a neurodegenerative mouse model improves memory function. *Science* 2005; 309:476–481.
35. Stokin GB, Lillo C, Falzone TL, Brusch RG, Rockenstein E, Mount SL, et al. Axonopathy and transport deficits early in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Science* 2005; 307:1282–1288.
36. Yoshiyama Y, Higuchi M, Zhang B, Huang SM, Iwata N, Saido TC, et al. Synapse loss and microglial activation precede tangles in a P301S tauopathy mouse model. *Neuron* 2007; 53:337–351.

37. Lee HG, Perry G, Moreira PI, Garrett MR, Liu Q, Zhu X, et al. Tau phosphorylation in Alzheimer's disease: pathogen or protector? *Trends Mol Med* 2005; 11:164–169. [PubMed: 15823754]
38. Morsch R, Simon W, Coleman PD. Neurons may live for decades with neurofibrillary tangles. *J Neuropathol Exp Neurol* 1999; 58:188–197.
39. Cash AD, Aliev G, Siedlak SL, Nunomura A, Fujioka H, Zhu X, et al. Microtubule reduction in Alzheimer's disease and aging is independent of tau filament formation. *Am J Pathol* 2003;162:1623–1627.
40. Bacskai BJ, Frosch MP, Freeman SH, Raymond SB, Augustinack JC, Johnson KA, et al. Molecular imaging with Pittsburgh Compound B confirmed at autopsy: a case report. *Arch Neurol* 2007; 64:431–434.
41. Jack CR Jr, Lowe VJ, Senjem ML, Weigand SD, Kemp BJ, Shiung MM, et al. 11C PiB and structural MRI provide complementary information in imaging of Alzheimer's disease and amnesic mild cognitive impairment. *Brain* 2008; 131:665–680.
42. Villemagne VL, Ataka S, Mizuno T, Brooks WS, Wada Y, Kondo M, et al. High striatal amyloid beta-peptide deposition across different autosomal Alzheimer disease mutation types. *Arch Neurol* 2009; 66:1537–1544.
43. Berrios G. Alzheimer's disease: A conceptual history. *International Journal of Geriatric Psychiatry* 1990; 5:355–365.
44. Brayne C, Richardson K, Matthews FE, Fleming J, Hunter S, Xuereb JH, et al. Neuropathological correlates of dementia in over-80-year-old brain donors from the population-based Cambridge city over-75s cohort (CC75C) study. *J Alzheimers Dis* 2009; 18:645–658.
45. Schweber M. A possible unitary genetic hypothesis for Alzheimer's disease and Down syndrome. *Ann N Y Acad Sci* 1985; 450:223–238.
46. Sherrington R, Rogaev EI, Liang Y, Rogaeva EA, Levesque G, Ikeda M, et al. Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature* 1995; 375:754–760.
47. Tanzi RE, Kovacs DM, Kim TW, Moir RD, Guenette SY, Wasco W. The gene defects responsible for familial Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis* 1996; 3:159–168.
48. Pericak-Vance MA., Bebout JL., Gaskell PC Jr., Yamaoka LH., Hung W-Y., Alberts MJ., Walker AP., Bartlett RJ., Haynes CA., Welsh KA., Earl NL., Heyman A., Clark CM., and Roses AD., Linkage studies in familial Alzheimer disease: Evidence for chromosome 19 linkage, *Am J Hum Genet* 1991; 48 (6):1034–50.
49. Corder EH., Saunders AM., Strittmatter WJ., Schmechel DE., Gaskell PC., Small GW., Roses AD., Haines JL., Pericak-Vance MA., Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families, *Science* 1993; 261 (5123): 921–923.
50. Farrer L.A., Cupples L.A., Haines J.L., Hyman B., Kukull W.A., Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease. A meta-analysis. APOE and Alzheimer Disease Meta Analysis Consortium, *J.Am.Med.Assoc.* 1997; 278:1349-1356.
51. Strittmatter WJ, Saunders AM, Schmechel D, Pericak-Vance M, Enghild J, Salvesen GS, et al. Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of

- type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90:1977–1981.
52. Whitson JS, Mims MP, Strittmatter WJ, Yamaki T, Morrisett JD, Appel SH. Attenuation of the neurotoxic effect of A beta amyloid peptide by apolipoprotein E. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 199:163–170.
  53. Hebert LE, Scherr PA, Bienias JL, Bennett DA, Evans DA. Alzheimer disease in the US population: prevalence estimates using the 2000 census. *Arch Neurol* 2003; 60:1119–1122.
  54. Giacobini E. Do cholinesterase inhibitors have disease-modifying effects in Alzheimer's disease? *CNS Drugs* 2001; 15:85–91.
  55. Giacobini E. Long-term stabilizing effect of cholinesterase inhibitors in the therapy of Alzheimer's disease. *J Neural Transm Suppl* 2002; 181–187.
  56. Castellani RJ, Harris PL, Sayre LM, Fujii J, Taniguchi N, Vitek MP, et al. Active glycation in neurofibrillary pathology of Alzheimer disease: N(epsilon)-(carboxymethyl) lysine and hexitollysine. *Free Radic Biol Med* 2001;31:175–180.
  57. Nunomura A, Perry G, Aliev G, Hirai K, Takeda A, Balraj EK, et al. Oxidative damage is the earliest event in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 2001; 60:759–767.
  58. Zandi PP, Anthony JC, Khachaturian AS, Stone SV, Gustafson D, Tschanz JT, et al. Reduced risk of Alzheimer disease in users of antioxidant vitamin supplements: the Cache County Study. *Arch Neurol* 2004; 61:82–88.
  59. Li G, Larson EB, Sonnen JA, Shofer JB, Petrie EC, Schantz A, et al. Statin therapy is associated with reduced neuropathologic changes of Alzheimer disease. *Neurology* 2007; 69:878–885.
  60. Areosa Sastre A, McShane R, Sherriff F. Memantine for dementia. Published Online 2004; doi:10.1002/14651858.
  61. Scarmeas N, Stern Y, Tang MX, Mayeux R, Luchsinger JA. Mediterranean diet and risk for Alzheimer's disease. *Ann Neurol*. 2006
  62. Bereiter-Hahn J., Vöth M., Dynamics of mitochondria in living cells: Shape changes, dislocations, fusion, and fission of mitochondria, *Microscopy Research and Technique* 2005; 27:198-219.
  63. Rappaport L., Oliviero P. and Samuel J.L., Cytoskeleton and mitochondrial morphology and function, *Molecular and Cellular Biochemistry* 1998; 184: 101–105.
  64. Mitchell P, Moyle J., Chemiosmotic hypothesis of oxidative phosphorylation, *Nature* 1967; 213:137–9.
  65. Allen JF., Raven JA., Free-radical-induced mutation vs redox regulation: costs and benefits of genes in organelles, *J Mol Evol* 1996; 42:427-434.
  66. Renato X. Santos, Sónia C. Correia, Xinglong Wang, George Perry, Mark A. Smith, Paula I. Moreira, Xiongwei Zhu. Alzheimer's disease: diverse aspects of mitochondrial malfunctioning. *www.ijcep.com* 2010; 3(6):570-581.
  67. Lisa Mosconi, Valentina Berti, Russell H. Swerdlow, Alberto Pupi, Ranjan Duara, and Mony de Leon. Maternal transmission of Alzheimer's disease: Prodromal metabolic phenotype and the search for genes. *Hum Genomics*. 2010 February ; 4(3): 170–193.
  68. Mosconi L, Brys M, Switalski R, Mistur R, et al. Maternal family history of Alzheimer's disease predisposes to reduced brain glucose metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2007;104:19067–19072.

69. Swerdlow RH. Treating neuro degeneration by modifying mitochondria: Potential solutions to a “complex” problem. *Antiox. Redox Signal* 2007; 9:1591–1604
70. Mutisya EM., Bowling AC., Beal MF., Cortical cytochrome oxidase activity is reduced in Alzheimer’s disease, *J Neurochem* 1994; 63:2179–2184.
71. Wong-Riley MTT. Cytochrome oxidase: An endogenous metabolic marker for neuronal activity. *Trends Neurosci* 1989; 12:94–101.
72. Gibson Gary E., Karuppagounder Saravanan S. and Shi Qingli, Oxidantinduced Changes in Mitochondria and Calcium Dynamics in the Pathophysiology of Alzheimer’s Disease, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2008 1147:221–232.
73. Pérez-Gracia, Esther, Torrejón-Escribano, Benjamín, Ferrer Isidre, Dystrophic neurites of senile plaques in Alzheimer’s disease are deficient in cytochrome c oxidase, *Acta Neuropathol* 2008; 116:261–268.
74. Wang Xinglong, Su Bo, Fujioka Hisashi and Zhu Xiongwei, Dynamin-Like Protein 1 Reduction Underlies Mitochondrial Morphology and Distribution Abnormalities in Fibroblasts from Sporadic Alzheimer’s Disease Patients, *The American Journal of Pathology* 2008; 173:470-482.
75. Petersen Camilla, A. Hansson, Alikhani Nyosha, Behbahani Homira, Wiehager Birgitta, Pavlov Pavel F., Alafuzoff Irina, Leinonen Ville, Ito Akira, Winblad Bengt, Glaser Elzbieta and Ankarcrona Maria, The amyloid  $\beta$  peptide is imported into mitochondria via the TOM import machinery and localized to mitochondrial cristae, *PNAS* 2008; 105:13145–13150.
76. Douglas R. Green and John C. Reed. Mitochondria and Apoptosis. *Science* 1998; 281: 1309-1312.
77. Su JH., Deng G., Cotman CW., Bax protein expression is increased in Alzheimer’s brain: correlations with DNA damage, Bcl-2 expression, and brain pathology, *J Neuropathol Exp Neurol* 1997; 56:86–93.
78. Su JH., Kesslak JP., Head E., et al., Caspase-cleaved amyloid precursor protein and activated caspase-3 are co-localized in the granules of granulovacuolar degeneration in Alzheimer’s disease and Down’s syndrome brain, *Acta Neuropathol* 2002; 104:1–6.
79. Yang Jenq-Lin, Weissman Lior, Bohr Vilhelm A and Mattson Mark P, Mitochondrial DNA damage and repair in neurodegenerative disorders, *DNA Repair* 2008; 7:1110-1120.
80. Schapira Anthony H V, Mitochondrial disease, *Lancet* 2006; 368:70–82.
81. DiMauro S., Schon EA., Mitochondrial respiratory-chain diseases, *N Engl J Med* 2003, 348:2656-68.
82. Zifa E., Giannouli S., Theotokis P., Stamatis C., Mamuris Z., Stathopoulos C., Mitochondrial tRNA mutations: Clinical and functional perturbations, *RNA Biology* 2007; 4:1-30.
83. Perry G, Nunomura A, Hirai K, Zhu X, Perez M, Avila J, Castellani RJ, Atwood CS, Aliev G, Sayre LM, Takeda A, Smith MA. Is oxidative damage the fundamental pathogenic mechanism of Alzheimer’s and other neurodegenerative diseases? . *Free Radic Biol Med* 2002. 33:1475–1479.
84. Wong Lee-Jun C., Liang Min-Hui, Kwon Haeyoung, Park John, Bai Ren-Kui, and Tan Duan-Jun, Comprehensive Scanning of the Entire Mitochondrial Genome for Mutations, *Clinical Chemistry* 2002; 48:11 1901-1912.

85. Marzuki S., Noer A. S., Letrit P., Thyagarajan D., Kapsa R., Utthanaphol P., Byrne E., Normal variants of human mitochondrial DNA and translation products: the building of a reference data base, *Human Genetics*. 1991; 88:139-145.
86. Noer A.S., Sudoya H., Lertrit P., Thyagarajan D., Utthanaphol P., Kapsa R., Byrne,E., Marzuki S., A tRNALys mutation in the mtDNA is the causal genetic lesion underlying myoclonic epilepsy and ragged-red fiber (MERRF) syndrome, *American Journal of Human Genetics* 1991; 49 (4): 715-722.
87. Chagnon Pierre, Gee Mark, Filion Mario, Robitaille Yves, Belouchi Majid, and Gauvreau Denis, Phylogenetic Analysis of the Mitochondrial Genome Indicates Significant Differences Between Patients With Alzheimer Disease and Controls in a French-Canadian Founder Population, *American Journal of Medical Genetics* 1999; 85:20–30.
88. Brown Michael D., Shoffner John M., Kim Yoon L., Jun Albert S., Graham Brett H, Cabell Margaret F., Gurley Daniel S. and Wallace Douglas C., Mitochondrial DNA Sequence Analysis of our Alzheimer's and Parkinson's Disease Patients, *American Journal of Medical Genetics* 1996; 61:283-289.
89. Elson Joanna L., Herrnstadt Corinna, Preston Gwen, Thal Leon, Morris Christopher M. , Edwardson J. A., Beal M. Flint, Turnbull Douglass M. , Howell Neil, Does the mitochondrial genome play a role in the etiology of Alzheimer's disease?, *Hum Genet* 2006; 119:241–254.
90. Robert McFarland, Denise M. Kirby, Kerry J. Fowler, Akira Ohtake, Michael T. Ryan , David J. Amor, Janice M. Fletcher, Joanne W. Dixon, Felicity A. Collins, Douglass M. Turnbull, Robert W. Taylor, David R. Thorburn. De novo mutations in the mitochondrial ND3 gene as a cause of infantile mitochondrial encephalopathy and complex I deficiency. *Annals of Neurology* 2004; 55: 58-64.
91. Marco Crimi, Alexandros Papadimitriou, Sara Galbiati, Phani Palamidou, Francesco Fortunato, Andreina Bordoni, Urania Papandreou, Dimitra Papadimitriou, George M. Hadjigeorgiou, Eurydiki Drogari, Nereo Bresolin and Giacomo Pietro Comi. A New Mitochondrial DNA Mutation in ND3 Gene Causing Severe Leigh Syndrome with Early Lethality. *PEDIATRIC RESEARCH* 2004; 55:842–846.
92. McFarland, R., Kirby, D. M., Fowler, K. J., Ohtake, A., Ryan, M. T., Amor, D. J., Fletcher, J. M., Dixon, J. W., Collins, F. A., Turnbull, D. M., Taylor, R. W., Thorburn, D. R. De novo mutations in the mitochondrial ND3 gene as a cause of infantile mitochondrial encephalopathy and complex I deficiency. *Ann. Neurol.* 55: 58-64, 2004.
93. Loeffen, J. L. C. M., Smeitink, J. A. M., Trijbels, J. M. F., Janssen, A. J. M., Triepels, R. H., Sengers, R. C. A., van den Heuvel, L. P. Isolated complex I deficiency in children: clinical, biochemical and genetic aspects. *Hum. Mutat.* 15: 123-134, 2000.
94. Clark, K. M., Taylor, R. W., Johnson, M. A., Chinnery, P. F., Chrzanowska-Lightowlers, Z. M., Andrews, R. M., Nelson, I. P., Wood, N. W., Lamont, P. J., Hanna, M. G., Lightowlers, R. N., Turnbull, D. M. (1999). An mtDNA mutation in the initiation codon of the cytochrome C oxidase subunit II gene results in lower levels of the protein and a mitochondrial encephalomyopathy. *American Journal of Human Genetics* . 64 (5): 1330-1339 .
95. Finnila, S., Lehtonen, M. S., Majamaa, K. Phylogenetic network for European mtDNA *American Journal of Human Genetics* ;2001. 68 (6): 1475-1484 .



96. Herrstadt, C., Elson, J. L., Fahy, E., Preston, G., Turnbull, D. M., Anderson, C., Ghosh, S. S., Olefsky, J. M., Beal, M. F., Davis, R. E., Howell, N. (2002) Reduced-median-network analysis of complete mitochondrial DNA coding-region sequences for the major African, Asian, and European haplogroups *American Journal of Human Genetics* . 70 (5): 1152-1171 .
97. Qu, J., Zhou, X., Zhang, J., Zhao, F., Sun, Y. H., Tong, Y., Wei, Q. P., Cai, W., Yang, L., West, C. E., Guan, M. X. (2009) Extremely low penetrance of Leber's hereditary optic neuropathy in 8 Han Chinese families carrying the ND4 G11778A mutation. *Ophthalmology* 116 (3): 558-564 e3.
98. Lehtonen, M. S., Moilanen, J. S., Majamaa, K. (2003) Increased variation in mtDNA in patients with familial sensorineural hearing impairment. *Human Genetics* . 113 (3): 220-227.
99. Da Pozzo, P., Cardaioli, E., Radi, E., Federico, A. (2004) Sequence analysis of the complete mitochondrial genome in patients with mitochondrial encephalomyopathies lacking the common pathogenic DNA mutations. *Biochemical and Biophysical Research Communications* . 324 (1): 360-364.
100. Pulkes T, Sweeney MG, Hanna MG. Increased risk of stroke in patients with the A12308G polymorphism in mitochondria. *Lancet* 2000; 356:2068-9.
101. Van den Ouweland JM, Bruining GJ, Lindhout D, Wit JM, Veldhuyzen BF, Maassen JA. Mutations in mitochondrial tRNA genes: Nonlinkage with syndromes of Wolfram and chronic progressive external ophthalmoplegia. *Nucleic Acids Res* 1992; 20:679-82.
102. Weber K, Wilson JN, Taylor L, Brierley E, Johnson MA, Turnbull DM, Bindoff LA. A new mtDNA mutation showing accumulation with time and restriction to skeletal muscle. *Am J Hum Genet* 1997; 60:37-80.
103. Houshmand, M., Larsson, N.G., Holme, E., Oldfors, A., Tulinius, M.H.,ersen, O. (1994) Automatic sequencing of mitochondrial tRNA genes in patients with mitochondrial encephalomyopathy *Biochimica et Biophysica Acta* . 1226 (1): 49-55.
104. Howell, N., McCullough, D., Kubacka, I., Halvorson, S., Mackey, D. (1992). The sequence of human mtDNA: the question of errors versus polymorphisms *American Journal of Human Genetics* . 50 (6): 1333-1337.
105. Van den Ouweland, J. M., Bruining, G. J., Lindhout, D., Wit, J. M., Veldhuyzen, B. F., Maassen, J. A. (1992) Mutations in mitochondrial tRNA genes: non-linkage with syndromes of Wolfram and chronic progressive external ophthalmoplegia *Nucleic Acids Research* . 20 (4): 679-682 .
106. M. Crimi, R. Del Bo, S. Galbiati, M. Sciacco, A. Bordoni, N. Bresolin, G.P. Comi, Mitochondrial A12308G polymorphism affects clinical features in patients with single mtDNA macrodeletion, *Eur. J. Hum. Genet.* 11 (2003) 896–898.
107. M. Grasso, M. Diegoli, A. Brega, C. Campana, L. Tavazzi, E. Arbustini, The mitochondrial DNA mutation T12297C affects a highly conserved nucleotide of tRNA(Leu(CUN)) and is associated with dilated cardiomyopathy, *Eur. J. Hum. Genet.* 9 (2001) 311–315.
108. Torroni A, Huoponen K, Francalacci P, Petrozzi M, Morelli L, et al. (1996) Classification of European mtDNAs from an analysis of three European populations. *Genetics* 144: 1835–1850.

109. Fischer O. Familial necrosis with drusy growths of neurofibrillary tangles, a regular verae change in the cerebral cortex in senile dementia. *Monatsschr Psychiatr Neurol* 1907; 22:361–372.
110. Khachaturian ZS. Diagnosis of Alzheimer's disease. *Arch Neurol* 1985;42:1097–1105.
111. Consensus recommendations for the postmortem diagnosis of Alzheimer's disease. *The National*
112. Institute on Aging, and Reagan Institute Working Group on Diagnostic Criteria for the Neuropathological Assessment of Alzheimer's Disease. *Neurobiol Aging* 1997; 18:S1–S2.
113. Ball MJ. Topographic distribution of neurofibrillary tangles and granulovacuolar degeneration in hippocampal cortex of aging and demented patients. A quantitative study. *Acta Neuropathol* 1978; 42:73–80.
114. Hyman BT, Van Hoesen GW, Damasio AR, Barnes CL. Alzheimer's disease: cell-specific pathology isolates the hippocampal formation. *Science* 1984; 225:1168–1170.
115. Mann DM, Yates PO, Marcyniuk B. Dopaminergic neurotransmitter systems in Alzheimer's disease and in Down's syndrome at middle age. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1987; 50:341–344.
116. Pearson RC, Esiri MM, Hiorns RW, Wilcock GK, Powell TP. Anatomical correlates of the distribution of the pathological changes in the neocortex in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985; 82:4531–4534.
117. Bosman GJ, Bartholomeus IG, de Grip WJ. Alzheimer's disease and cellular aging: membrane-related events as clues to primary mechanisms. *Gerontology* 1991; 37:95–112.
118. Perry G, Lipphardt S, Mulvihill P, Kancherla M, Mijares M, Gambetti P, et al. Amyloid precursor protein in senile plaques of Alzheimer disease. *Lancet* 1988; 2:746.
119. Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Tung Yc, Quinlan M., Wisniewski HM. and Binder Li, Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein t (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology, *Proc Natl Acad Sci USA*1986; 83: 4913–4917.
120. Lin MT, Beal MF. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature* 2006; 443:787–795.
121. Desagher S. and Martinou J-C., Mitochondria as central control point of apoptosis, *Trends in Biology* 2000; 369-377.
122. Taanman Jan-Willem, The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication, *Biochimica et Biophysica Acta* 1999; 1410:103-123.
123. Hutchison Iii, Clyde A. John, Newbold E., S.Steven Potter & Marshall Hall Edgell, Maternal inheritance of mammalian mitochondrial DNA, *Nature* 1974; 251: 536 –538.
124. Johns Donald R., Paternal Transmission of Mitochondrial DNA is (Fortunately) Rare, *Annals of Neurology* 2003; 54:422-424.

