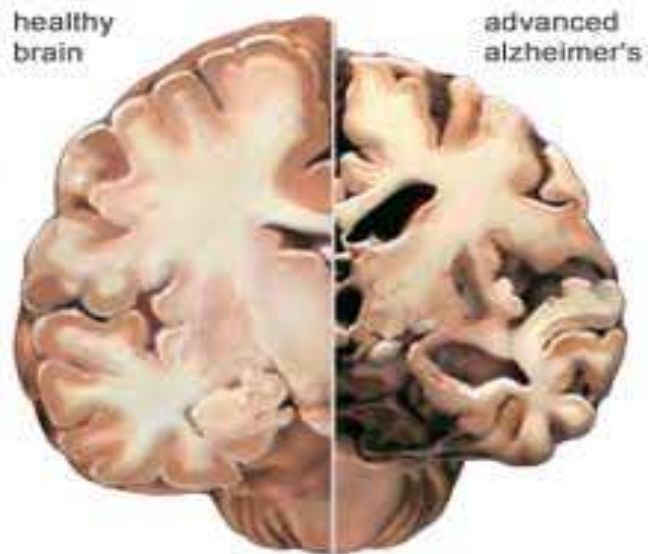
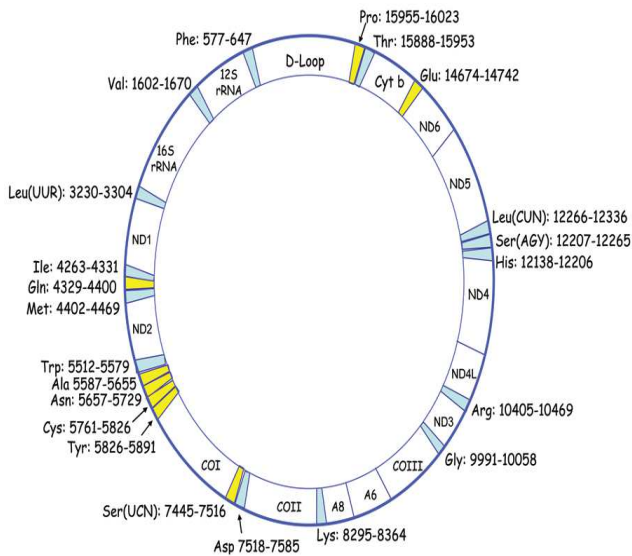


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

«ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ, ΜΟΡΙΑΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ, ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ»



Κωνσταντίνος Παπαδημητρίου

«Ταυτοποίηση μεταλλάξεων σε μιτοχονδριακά tRNA γονίδια σε ασθενείς με Alzheimer»

2010

Ταυτοποίηση μεταλλάξεων σε μιτοχονδριακά tRNA γονίδια σε ασθενείς με Alzheimer

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

Ζίφα Αιμιλία, Επίκουρος Καθηγήτρια Βιολογίας / Νευροβιολογίας, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Μαμούρης Ζήσης, Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Χατζηγεωργίου Γεώργιος, Αναπληρωτής Καθηγητής Νευρολογίας, Τμήμα Ιατρικής Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Πρόλογος

Η παρούσα Διπλωματική Εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Γενετικής, Συγκριτικής & Εξελικτικής Βιολογίας του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας στα πλαίσια του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών 'Εφαρμογές Μοριακής Βιολογίας - Μοριακή Γενετική - Διαγνωστικοί Δείκτες'.

Σε αυτό το σημείο θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες σε όλους όσους συνέβαλαν στην ολοκλήρωσή της.

Ιδιαίτερα ευχαριστώ την κα Αιμιλία Ζίφα για την ανάθεση του θέματος και για την επιστημονική της καθοδήγηση καθ' όλη τη διάρκεια της προσπάθειάς μου.

Ευχαριστώ τον κ. Ζήση Μαμούρη και τον κ. Γεώργιο Χατζηγεωργίου, για την τιμή που μου έκαναν να συμμετέχουν στην Τριμελή Συμβουλευτική Επιτροπή.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τη Λέκτορα του Τμήματος κα Θεολογία Σαραφίδου, την υποψήφια διδάκτορα Ευαγγελία Κουτσογιαννούλη και τον υποψήφιο διδάκτορα Κώστα Σταμάτη, για την προθυμία να βοηθήσουν όποτε αυτό τους ζητήθηκε.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στον μεταπτυχιακό φοιτητή Θέμη Γιαννούλη, για την βοήθεια που μου παρείχε κατά την εκτέλεση του πειραματικού μέρους, τον μεταπτυχιακό φοιτητή Βάιο Σαλγκάμη ο οποίος ανέλαβε τα δείγματα των φυσιολογικών ατόμων και στην προπτυχιακή φοιτήτρια Νικολέτα Σαχίνη η οποία ανέλαβε την εξέταση των άλλων γονιδίων στα δείγματα των ασθενών με Alzheimer.

Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου σε όλους τους μεταπτυχιακούς και προπτυχιακούς φοιτητές του Εργαστηρίου Γενετικής για την άφογη συνεργασία που είχαμε στο διάστημα που συνυπάρξαμε στο εργαστήριο.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	6
ABSTRACT	7
1 Εισαγωγή	8
1.1 Μιτοχόνδρια	8
1.2 Μιτοχονδριακές ασθένειες	9
1.3 Μεταλλάξεις του μιτοχονδριακού DNA	10
1.3.1 Μεταλλάξεις στα γονίδια που είναι υπεύθυνα για την μιτοχονδριακή πρωτεϊνοσύνθεση	12
• Μεταλλάξεις των μιτοχονδριακών tRNA	12
1.3.2 Μεταλλάξεις στα γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες	20
1.3.3 Επιβεβαίωση της παθογονικότητας των σημειακών μεταλλάξεων του mtDNA	21
1.3.4 Παθογένεση	22
1.3.5 Επιδημιολογία	23
1.4 Alzheimer	25
1.5 Η συμμετοχή των μιτοχονδρίων στο Alzheimer	27
1.5.1 Βιοχημικές ανωμαλίες των μιτοχονδρίων στο Alzheimer	27
1.5.2 Μορφολογικές αλλαγές των μιτοχονδρίων στο Alzheimer	33
1.5.3 Γενετικές αλλαγές των μιτοχονδρίων στο Alzheimer	35
1.5.4 Η υπόθεση του μιτοχονδριακού καταρράκτη	38
2. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ	41
2.1 ΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΥΛΙΚΟ	41
2.2 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)	41
2.2.1 ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ	41
2.2.2 ΠΟΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣ ΤΩΝ tRNA ΓΟΝΙΔΙΩΝ	44
2.2.3 ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ PCR ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ	47
2.3 ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥ ΜΟΝΟΚΛΩΝΗΣ ΑΛΥΣΙΔΑΣ (Single Stranded Conformation Polymorphism -SSCP)	48
2.3.1 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΠΗΚΤΗΣ ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΙΟΥ	49
2.3.2 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΤΩΝ PCR ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ	50
2.3.3 ΧΡΩΣΗ ΝΙΤΡΙΚΟΥ ΑΡΓΥΡΟΥ (SILVER STAINING)	51
2.4 ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ DNA (DNA SEQUENCING)	51
2.4.1 ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ PCR ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ	51
2.4.2 ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗ (SEQUENCING)	52
2.4.3 ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗΣ	53
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	54
3.1 ΓΟΝΙΔΙΑ tRNA^{Thr} ΚΑΙ tRNA^{Pro} & ΤΜΗΜΑΤΑ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΤΟΥ ΚΥΤΟΧΡΩΜΑΤΟΣ b ΚΑΙ ΤΟΥ ΒΡΟΧΟΥ D	54

3.2	ΓΟΝΙΔΙΑ tRNA ^{Ile} , tRNA ^{Gln} και tRNA ^{Met} ΚΑΙ ΤΜΗΜΑΤΑ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΤΩΝ ND1 ΚΑΙ ND2 ΥΠΟΜΟΝΑΔΩΝ ΤΟΥ ΣΥΜΠΛΟΚΟΥ I ΤΗΣ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΗΣ ΑΛΥΣΙΔΑΣ	57
3.3	ΓΟΝΙΔΙΑ tRNA ^{Asn} , tRNA ^{Cys} ΚΑΙ tRNA ^{Tyr} ΚΑΙ ΤΜΗΜΑ ΤΗΣ ΥΠΟΜΟΝΑΔΑΣ I ΤΗΣ ΟΞΕΙΔΑΣΗΣ ΤΟΥ ΚΥΤΟΧΡΩΜΑΤΟΣ C	58
3.4	ΓΟΝΙΔΙΑ tRNA ^{Trp} , tRNA ^{Ala} , & ΤΜΗΜΑ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΤΗΣ ND2 ΥΠΟΜΟΝΑΔΑΣ ΤΟΥ ΣΥΜΠΛΟΚΟΥ I ΤΗΣ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΗΣ ΑΛΥΣΙΔΑΣ	59
3.5	ΓΟΝΙΔΙΟ tRNA ^{Leu(UUR)} ΚΑΙ ΤΜΗΜΑΤΑ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΤΟΥ 16S rRNA ΚΑΙ ΤΗΣ ND1 ΥΠΟΜΟΝΑΔΑΣ ΤΟΥ ΣΥΜΠΛΟΚΟΥ I ΤΗΣ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΗΣ ΑΛΥΣΙΔΑΣ	60
3.6	ΓΟΝΙΔΙΟ tRNA ^{Lys} ΚΑΙ ΤΜΗΜΑΤΑ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΤΗΣ ΥΠΟΜΟΝΑΔΑΣ II ΤΗΣ ΟΞΕΙΔΑΣΗΣ ΤΟΥ ΚΥΤΟΧΡΩΜΑΤΟΣ C ΚΑΙ ΤΗΣ A8 ΥΠΟΜΟΝΑΔΑΣ ΤΟΥ ΣΥΜΠΛΟΚΟΥ V ΤΗΣ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΗΣ ΑΛΥΣΙΔΑΣ	62
3.7	ΓΟΝΙΔΙΟ tRNA ^{Phe} ΚΑΙ ΤΜΗΜΑΤΑ ΤΟΥ D-LOOP ΚΑΙ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΤΟΥ 12S rRNA	65
3.8	ΓΟΝΙΔΙΑ tRNA ^{Ser(UCN)} , tRNA ^{Asp} & ΠΑΡΑΚΕΙΜΕΝΕΣ ΠΕΡΙΟΧΕΣ	67
3.9	ΣΥΝΟΨΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ	68
4	ΣΥΖΗΤΗΣΗ	77
5	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	86

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το μιτοχονδριακό DNA (mtDNA) είναι επιρρεπές σε μεταλλάξεις. Οι μεταλλάξεις στο mtDNA έχουν συνδεθεί με σπάνια σύνδρομα βαριάς μορφής, παραδείγματος χάριν την μιτοχονδριακή εγκεφαλομυοπάθεια, γαλακτική οξέωση και συμπτώματα εγκεφαλικού (MELAS), και την κληρονομήσιμη οπτική νευροπάθεια Leber (LHON). Έχουν όμως συσχετιστεί και με πιο κοινές ασθένειες όπως ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2, το άσθμα και με νευροεκφυλιστικές ασθένειες όπως Parkinson και Alzheimer (AD). Μεταξύ των μεταλλάξεων του mtDNA, σημαντικότερο ρόλο παίζουν οι μεταλλάξεις στα γονίδια tRNA, καθώς μπορούν να επηρεάσουν συνολικά την πρωτεϊνοσύνθεση του μιτοχονδρίου.

Σε αυτή την μελέτη ελέγξαμε 50 ασθενείς με AD για την παρουσία μεταλλάξεων στα γονίδια των μιτοχονδριακών tRNA. Βρέθηκαν 20 μεταλλάξεις. 7 από αυτές βρέθηκαν σε γονίδια tRNA: T4336C στο tRNA^{Gln}, A5558G στο tRNA^{Trp}, G5772A στο tRNA^{Cys}, C15904T, A15924G, G15928A, C15946T στο tRNA^{Thr}. Οι υπόλοιπες 13 εντοπίστηκαν σε παρακείμενες περιοχές: T669C, T721C στο 12S rRNA, T3197C στο 16S rRNA, T8200C και G8251A στο γονίδιο COII, T3336C και G3337A στο γονίδιο ND1, ins568-572 (3C) και ins568-572 (5C) στο D-loop, A8271G, ins8277 (4C), G8292A και A15954C σε μη κωδικές περιοχές. Από το σύνολο των μεταλλάξεων, 5 μεταλλάξεις έχουν ήδη αναφερθεί σε ασθενείς με AD, 3 μεταλλάξεις ανιχνεύθηκαν για 1^η φορά, ενώ 10 μεταλλάξεις βρέθηκαν και σε φυσιολογικά άτομα, αλλά, κατά πλειοψηφία, σε μικρότερο ποσοστό.

Από την ανάλυση των παραπάνω αποτελεσμάτων και των αποτελεσμάτων μίας άλλης μελέτης που πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο μας, βρέθηκε ότι στο AD οι μεταλλάξεις στα γονίδια tRNA πιθανώς δεν διαδραματίζουν κάποιο σημαντικό ρόλο. Φαίνεται, αντίθετα, ότι οι μεταλλάξεις σε γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες είναι πιο σημαντικές. Από τις 5 μεταλλάξεις που έχουν αναφερθεί στην βιβλιογραφία σε ασθενείς με AD, οι 4 βρέθηκε ότι δεν παίζουν κάποιο ρόλο στην παθογένεια του Alzheimer. Από την άλλη πλευρά, η μετάλλαξη G15928A, λόγω της μεγαλύτερης συχνότητάς της στα φυσιολογικά άτομα, είναι πιθανό να διαδραματίζει έναν προστατευτικό ρόλο στο AD. Στο 30% (15/50) των ασθενών παρατηρήθηκε κληρονόμηση συνδυασμών δύο ή περισσότερων μεταλλάξεων οι οποίοι δεν εντοπίστηκαν στα φυσιολογικά άτομα. Δεν γνωρίζουμε πώς οι συνδυασμοί αυτοί επηρεάζουν την παθογένεια του AD επειδή δεν διαθέτουμε στοιχεία για το πώς οι μεταλλάξεις αυτές επηρεάζουν την λειτουργία του μιτοχονδρίου. Τέλος, για να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα για το ρόλο των σημειακών μεταλλάξεων του mtDNA στην εμφάνιση της νόσου Alzheimer πρέπει να ολοκληρωθεί η έρευνα σε όλα τα tRNA γονίδια στους ασθενείς και να γίνει σύγκριση με μεγάλη ομάδα του φυσιολογικού πληθυσμού. Ακόμα, είναι απαραίτητος ο προσδιορισμός της ακριβούς επίδρασης των μεταλλάξεων που έχουν βρεθεί στη λειτουργία των μιτοχονδρίων ώστε να προσδιοριστεί η ακριβής επίδραση (ευεργετική, βλαβερή ή μηδαμινή) αυτών των μεταλλάξεων στη εμφάνιση και εξέλιξη του AD.

ABSTRACT

Mitochondrial DNA (mtDNA) is susceptible to mutations. Mutations in mtDNA have been associated with rare syndromes with severe symptoms, such as mitochondrial myopathy, encephalomyopathy, lactic acidosis, stroke-like symptoms (MELAS) and Leber's hereditary optic neuropathy (LHON). They have also been correlated with more common disorders, such as diabetes mellitus type 2, asthma and neurodegenerative diseases such as Parkinson and Alzheimer (AD). Among the mutations of mtDNA, mutations in the genes of tRNA play a more important role, since they can affect the protein synthesis of mitochondria as a whole.

In this study we examined 50 Alzheimer patients for the presence of mutations in mitochondrial tRNA. 20 mutations were found in 25 of the patients. 7 of these were found in tRNA genes: T4336C in tRNA^{Gln}, A5558G in tRNA^{Trp}, G5772A in tRNA^{Cys}, C15904T, A15924G, G15928A, and C15946T in tRNA^{Thr}. The remaining 13 were found in surrounding regions: T669C, T721C in 12S rRNA, T3197C in 16S rRNA, T8200C and G8251A in COII gene, T3336C and G3337A in ND1 gene, ins568-572 (3C) and ins568-572 (5C) in D-loop, A8271G, ins8277 (4C), G8292A and A15954C in non coding regions. In this group of mutations, 5 mutations have already been mentioned in Alzheimer patients, 3 mutations were detected for the first time, while 7 mutations were also found in controls, but mostly, with lesser frequency.

From the analysis of the above results and the results of one other study that took place in our lab, we found that in AD the mutations of tRNA genes probably do not play an important role. In contrast, it seems that mutations in protein coding genes are more important. From the 5 mutations that have been mentioned in the literature on patients with AD, 4 were found to have no effect on the pathogenesis of Alzheimer. On the other hand, the G15928A mutation, because it appears with greater frequency in controls, it is likely to have a protective effect in AD. In 30% (15/50) of the patients we observed the inheritance of combinations of two or more mutations; these combinations were not detected in controls. We do not know how these combinations affect the pathogenicity of AD because we have no evidence about the way these mutations affect the function of mitochondria. Finally, in order to safely conclude about the role of point mutations of mtDNA in the occurrence of Alzheimer's disease we have to complete the research on all tRNA genes in the patients and compare the results with a big sample of controls. In addition, it is necessary to determine the exact effect of the mutations that have been found on the function of mitochondria in order to determine the exact effect (beneficial, deleterious, or null) of these mutations on the occurrence and progress of AD.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Μιτοχόνδρια

Στην κυτταρική βιολογία, το μιτοχόνδριο είναι ένα οργανίδιο που περικλείεται από μεμβράνη και βρίσκεται σε όλα τα ευκαρυωτικά κύτταρα· η εξαίρεση είναι η *Giardia intestinalis* η οποία διαθέτει μιτοσώματα τα οποία είναι εκφυλισμένα μιτοχόνδρια και δεν συμμετέχουν στον αερόβιο μεταβολισμό [Henze K, Martin W (2003)]. Η λέξη μιτοχόνδριο προέρχεται από τον συνδυασμό των λέξεων *μίτος*, νήμα και *χόνδριον*, κόκκος. Το μέγεθός τους κυμαίνεται από 0,5 - 10 μικρόμετρα (μm) σε διάμετρο. Τα μιτοχόνδρια μερικές φορές περιγράφονται ως "κυτταρικά εργοστάσια παραγωγής ενέργειας" επειδή παράγουν το μεγαλύτερο μέρος της διαθέσιμης ποσότητας τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP) του κυττάρου, που χρησιμοποιείται ως πηγή χημικής ενέργειας [Campbell et al. (2006)]. Επιπροσθέτως, τα μιτοχόνδρια εμπλέκονται σε πολλές άλλες διεργασίες, όπως τη μεταγωγή σήματος, την κυτταρική διαφοροποίηση, την απόπτωση, και τον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου και της κυτταρικής αύξησης [McBride HM, et al (2006)].

Αρκετά χαρακτηριστικά καθιστούν τα μιτοχόνδρια μοναδικά: i) Ο διαφορετικός αριθμός των μιτοχονδρίων του κυττάρου μεταξύ διαφορετικών οργανισμών και τύπων ιστών. Πολλά κύτταρα έχουν μόνο ένα μιτοχόνδριο, ενώ άλλα μπορεί να περιέχουν αρκετές χιλιάδες μιτοχόνδρια [Alberts, Bruce et al (1994) & Voet, Donald et al (2006)]. ii) Τα υποδιαμερίσματα με εξειδικευμένες λειτουργίες από τα οποία συντελείται το μιτοχόνδριο. Αυτά τα υποδιαμερίσματα περιλαμβάνουν την εξωτερική μεμβράνη, την ενδιάμεση περιοχή, την εσωτερική μεμβράνη, τις περιοχές μεταξύ των πτυχώσεων της εσωτερικής μεμβράνης και την μήτρα. iii) Η ποικιλία των μιτοχονδριακών πρωτεϊνών μεταξύ διαφορετικών ιστών και ειδών. Στον άνθρωπο, έχουν ταυτοποιηθεί 615 ξεχωριστοί τύποι πρωτεϊνών από μιτοχόνδρια της καρδιάς [Taylor SW, et al (2003)], ενώ στον ποντικό, έχουν αναφερθεί 940 πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από ξεχωριστά γονίδια [Zhang J, Li X et al (2008)]. Το μιτοχονδριακό πρωτόμα θεωρείται ότι ρυθμίζεται ενεργητικά [Zhang J, Liem DA, et al (2008)]. iv) Η παρουσία του μιτοχονδριακού γονιδιώματος. Παρόλο που σχεδόν όλο το DNA του κυττάρου βρίσκεται στον πυρήνα, το μιτοχόνδριο έχει το δικό του ανεξάρτητο γονιδίωμα το οποίο δείχνει σημαντική ομοιότητα με τα βακτηριακά γονιδιώματα [Andersson SG, et al (2003)].

Τα μιτοχόνδρια έχουν συσχετιστεί με αρκετές ανθρώπινες ασθένειες, συμπεριλαμβανομένων των μιτοχονδριακών ασθενειών [Gardner A, Boles RG (2005)] και των καρδιακών δυσλειτουργιών [Lesnefsky EJ, et al. (2001)], και μπορεί να παίζουν ρόλο στην διαδικασία της γήρανσης.

1.2 Μιτοχονδριακές ασθένειες

Λόγω του κεντρικού ρόλου των μιτοχονδρίων στον κυτταρικό μεταβολισμό, η βλάβη - και επακόλουθη δυσλειτουργία - των μιτοχονδρίων είναι ένας σημαντικός παράγοντας σε αρκετές ανθρώπινες ασθένειες. Οι μιτοχονδριακές διαταραχές συχνά εμφανίζονται ως νευρολογικές διαταραχές, αλλά μπορούν να εμφανιστούν και ως μυοπάθεια, διαβήτης, πολλαπλή ενδοκρινοπάθεια, ή μια ποικιλία από άλλες συστηματικές εκδηλώσεις [Zeviani M, Di Donato S (2004)]. Οι ασθένειες που οφείλονται σε μεταλλάξεις του μιτοχονδριακού DNA (mtDNA) περιλαμβάνουν το σύνδρομο Kearns-Sayre (KSS), το σύνδρομο MELAS και την κληρονομική οπτική νευροπάθεια Leber [Taylor RW, Turnbull DM (2005)]. Στην πλειοψηφία των περιπτώσεων, αυτές οι ασθένειες μεταδίδονται από την μητέρα στα παιδιά της, καθώς το ζυγωτό αποκτά τα μιτοχόνδριά του και επομένως το mtDNA του από το wάριο. Ασθένειες όπως το σύνδρομο Kearns-Sayre, το σύνδρομο του Pearson, και η προοδευτική εξωτερική οφθαλμοπληγία θεωρούνται ότι οφείλονται σε μεγάλες αναδιατάξεις του mtDNA, ενώ άλλες ασθένειες όπως το σύνδρομο MELAS, η κληρονομική οπτική νευροπάθεια Leber, το σύνδρομο MERRF, και άλλες οφείλονται σε σημειακές μεταλλάξεις του mtDNA [Zeviani M, Di Donato S (2004)].

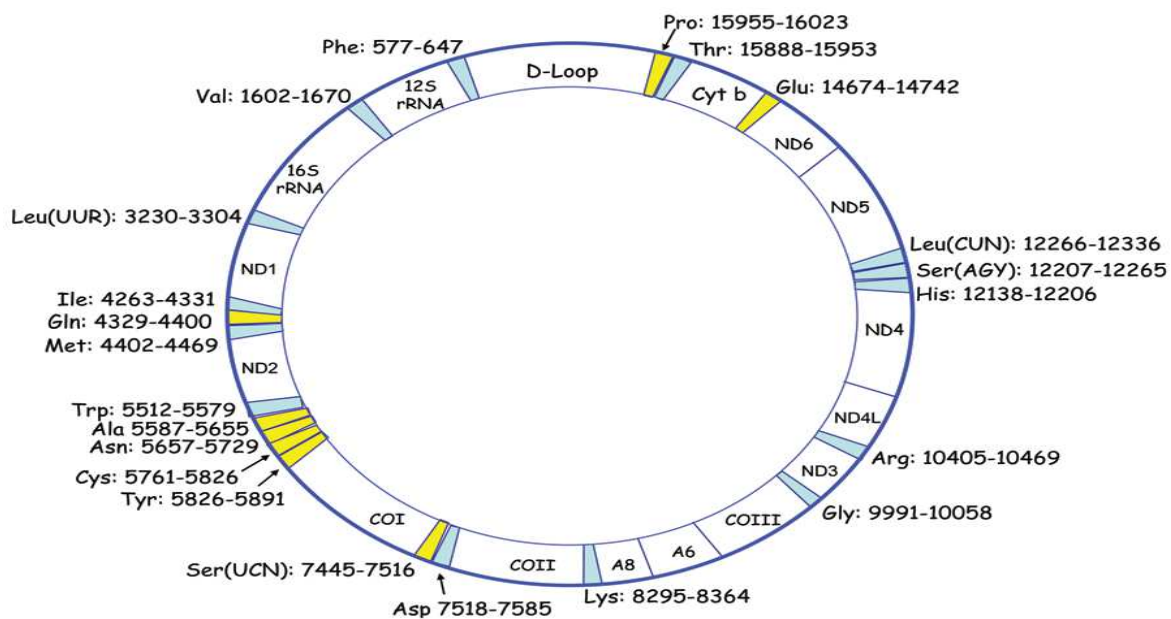
Σε άλλες ασθένειες, βλάβες σε πυρηνικά γονίδια οδηγούν σε δυσλειτουργία των μιτοχονδριακών πρωτεϊνών. Αυτό συμβαίνει στην αταξία του Friedreich, στην κληρονομική σπαστική παραπληγία, και στην ασθένεια του Wilson [Chinnery PF, Schon EA (2003)]. Αυτές οι ασθένειες οφείλονται σε μεταλλάξεις που κληρονομούνται με μεντελικό τρόπο, όπως συμβαίνει στις περισσότερες γενετικές ασθένειες. Μια ποικιλία ασθενειών οφείλονται σε πυρηνικές μεταλλάξεις των ενζύμων της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, όπως η ανεπάρκεια του συνενζύμου Q10 και το σύνδρομο Barth [Zeviani M, Di Donato S (2004)]. Ακόμα, οι επιδράσεις του περιβάλλοντος μπορεί να αλληλεπιδράσουν με τις κληρονομικές προδιαθέσεις και να προκαλέσουν μιτοχονδριακή ασθένεια. Για παράδειγμα, μπορεί να υπάρχει μία σύνδεση μεταξύ της έκθεσης σε εντομοκτόνα και το όψιμης εμφάνισης Parkinson [Scherer TB, et al (2002) & Gomez C, et al (2007)].

Άλλες παθολογικές καταστάσεις με αιτιολογία που εμπεριέχει μιτοχονδριακή δυσλειτουργία περιλαμβάνουν την σχιζοφρένεια, την διπολική διαταραχή, την άνοια, το Alzheimer, το Parkinson την επιληψία, τα εγκεφαλικά επεισόδια όταν εμφανίζονται σε νεαρή ηλικία, την καρδιοπάθεια, την αμφιβληστροειδίτιδα, και το σακχαρώδη διαβήτη [Scharif A H (2006) & Pieczenik SR, Neustadt J (2007)]. Ένα κοινό χαρακτηριστικό που θεωρείται ότι συνδέει αυτές τις κατά τα άλλα άσχετες μεταξύ τους διαταραχές είναι η κυτταρική βλάβη που προκαλεί το οξειδωτικό στρες. Δεν έχει διευκρινιστεί ακόμα πώς ακριβώς η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία επηρεάζει την αιτιολογία αυτών των παθολογικών καταστάσεων.

1.3 Μεταλλάξεις του μιτοχondριακού DNA

Το μιτοχondριακό γονιδίωμα είναι ένα μικρό, κυκλικό, δίκλωνο μόριο το οποίο έχει 37 γονίδια [Anderson S, et al (1981)]. Από αυτά, τα 24 [δύο γονίδια ριβοσωμικών RNA (rRNA) και 22 γονίδια μεταφορικών RNA (tRNA)] είναι απαραίτητα για την μετάφραση του μιτοχondριακού DNA (mtDNA), και τα 13 κωδικοποιούν υπομονάδες της αναπνευστικής αλυσίδας (7 υπομονάδες του συμπλόκου I, μία υπομονάδα του συμπλόκου III, τρεις υπομονάδες του συμπλόκου IV, και δύο υπομονάδες του συμπλόκου V) (Εικόνα 1).

Επειδή τόσες πολλές ανθρώπινες ασθένειες οφείλονται σε μεταλλάξεις του mtDNA, οι αρχές και η κλινική σημασία της "μιτοχondριακής γενετικής" θα πρέπει να είναι γνωστά στον θεράποντα ιατρό. Η μιτοχondριακή γενετική διαφέρει από την μεντελική γενετική σε τρία κυρίως σημεία [DiMauro S, Schon EA (2001)].



Εικ. 1. Χάρτης του ανθρώπινου μιτοχondριακού γονιδιώματος. Κάθε μιτοχόνδριο περιέχει 2-10 αντίγραφα ενός μικρού, δίκλωνου, κυκλικού DNA 16.569 kb. Οι δύο κλώνοι του mtDNA διαφοροποιούνται λόγω του νουκλεοτιδικού τους περιεχομένου με τον πλούσιο σε γουανίνη κλώνο να αναφέρεται ως βαριά (heavy, H) αλυσίδα, και τον πλούσιο σε κυτοσίνη κλώνο να αναφέρεται ως ελαφριά (light, L) αλυσίδα. Η βαριά αλυσίδα κωδικοποιεί (δρα ως μήτρα για την μεταγραφή) 28 γονίδια, και η ελαφριά αλυσίδα κωδικοποιεί 9 γονίδια. Δηλαδή, συνολικά το mtDNA κωδικοποιεί 37 γονίδια. Από τα 37 γονίδια, 13 κωδικοποιούν πρωτεΐνες, υπομονάδες της αναπνευστικής αλυσίδας (Cyt b, ND1-6, COI-III, A6/8), 2 γονίδια κωδικοποιούν rRNA (12S και 16S) και 22 γονίδια κωδικοποιούν tRNA. Τα tRNA είναι διασκορπισμένα μεμονωμένα ή σε μικρές συστοιχίες μεταξύ των άλλων λειτουργικών RNA. Τα tRNA που κωδικοποιούνται από την βαριά αλυσίδα υποδεικνύονται με γαλάζιο χρώμα, και τα tRNA που κωδικοποιούνται από την ελαφριά αλυσίδα υποδεικνύονται με κίτρινο χρώμα [Zifa E, et al (2007)]

Μητρική κληρονομία

Μετά την γονιμοποίηση, το mtDNA του σπέρματος αποικοδομείται ενεργητικά και επομένως το mtDNA κληρονομείται από την μητέρα. Επομένως, μία μητέρα που είναι φορέας μετάλλαξης στο mtDNA μπορεί να την κληροδοτήσει σε όλα τα παιδιά της, αλλά μόνο οι κόρες της θα την μεταδώσουν στα παιδιά τους [DiMauro S, Schon EA (2001)].

Ετεροπλασμία/ Φαινόμενο Ουδού

Σε αντίθεση με τα πυρηνικά γονίδια, κάθε ένα από τα οποία διαθέτει ένα πατρικό και ένα μητρικό αλληλόμορφο, τα μόρια mtDNA υπάρχουν σε εκατοντάδες ή χιλιάδες αντίγραφα σε κάθε κύτταρο. Οι μεταλλάξεις του mtDNA με βλαβερή επίδραση συχνά επηρεάζουν μερικά αλλά όχι όλα τα γονιδιώματα. Έτσι, κύτταρα, ιστοί, ακόμα και ολόκληροι οργανισμοί, μπορεί να έχουν δύο πληθυσμούς mtDNA: φυσιολογικά (αγρίου τύπου) και μεταλλαγμένα, μία κατάσταση που είναι γνωστή ως ετεροπλασμία. Σε φυσιολογικά άτομα, όλα τα mtDNA είναι πανομοιότυπα, μία κατάσταση που είναι γνωστή ως ομοπλασμία. Μεταλλάξεις του mtDNA χωρίς βλαβερή επίδραση (ουδέτεροι πολυμορφισμοί) συνήθως είναι ομοπλασμικές, ενώ παθογόνες μεταλλάξεις συνήθως είναι, αλλά όχι πάντα, ετεροπλασμικές.

Είναι λογικό ότι πρέπει να υπάρχει ένας κρίσιμος ελάχιστος αριθμός μεταλλαγμένων mtDNA πριν η δυσλειτουργία στον ιστό και τα κλινικά συμπτώματα γίνουν εμφανή. Η ουδός παθογένεσης της συγκέντρωσης των μεταλλαγμένων mtDNA είναι χαμηλότερος σε ιστούς που εξαρτώνται περισσότερο από τον αερόβιο μεταβολισμό σε σχέση με ιστούς που μπορούν να βασίζονται στην αναερόβια γλυκόλυση [DiMauro S, Schon EA (2001)].

Μιτωτικός διαχωρισμός

Στην κυτταρική διαίρεση, το ποσοστό των μεταλλαγμένων mtDNA στα θυγατρικά κύτταρα μπορεί να αλλάξει: αν και όταν η ουδός παθογένειας για έναν ιστό ξεπεραστεί, ο φαινότυπος μπορεί επίσης να αλλάξει. Αυτό συμβάλλει στην σχετιζόμενη με τον χρόνο μεταβλητότητα των κλινικών συμπτωμάτων που συχνά παρατηρείται σε διαταραχές που σχετίζονται με το mtDNA. Εξ' ορισμού, ο μιτωτικός διαχωρισμός δεν μπορεί να εξηγήσει μία μεταβολή στο ποσοστό των μεταλλαγμένων mtDNA σε μη διαιρούμενα κύτταρα όπως οι σκελετικοί μύες και οι νευρώνες. Η αντιγραφή του mtDNA που γίνεται ανεξάρτητα της αντιγραφής του πυρηνικού DNA έχει προταθεί ως μία εξήγηση για αυτές τις μεταβολές [Chinnery PF, Samuels DC (1999)].

Τα μιτοχόνδρια και το mtDNA είναι βρίσκονται σε όλους τους ιστούς, το οποίο εξηγεί γιατί κάθε ιστός στο σώμα μπορεί να επηρεαστεί από τις μεταλλάξεις του mtDNA. Λόγω της ετεροπλασμίας και του φαινομένου της ουδού, διαφορετικοί ιστοί που παρουσιάζουν την ίδια μετάλλαξη στο mtDNA μπορεί να επηρεαστούν σε διαφορετικό βαθμό ή και να μην επηρεαστούν καθόλου, πράγμα το οποίο εξηγεί την μερικές φορές αινιγματική ποικιλία συνδρόμων που σχετίζονται με τις μεταλλάξεις του mtDNA, ακόμα και σε συγκεκριμένο γενεαλογικό δέντρο. Συχνά λέγεται ότι κάθε ασθενής που παρουσιάζει συμπτώματα σε πάνω από ένα όργανα και υπάρχουν ενδείξεις μητρικής κληρονομικότητας θα πρέπει να θεωρείται ότι έχει μία παθογόνο μετάλλαξη στο mtDNA μέχρι αποδείξεως του εναντίου. Παρόλο που αυτός ο "χρυσός κανόνας" έχει μια πρακτική αξία, είναι σημαντικό να λαμβάνεται υπόψη ότι το αντίστροφο δεν ισχύει, δηλαδή, ασθενείς με συμπτώματα σε έναν μόνο ιστό και καμία ένδειξη μητρικής κληρονομικότητας μπορεί επίσης να έχουν παθογόνες μεταλλάξεις του mtDNA. Αυτό συχνά εξαρτάται από τον τύπο του γονιδίου του mtDNA που επηρεάζεται.

Υπάρχουν δύο κύριοι τύποι μιτοχονδριακών μεταλλάξεων, αυτές που επηρεάζουν την μιτοχονδριακή πρωτεϊνοσύνθεση στο σύνολό της και αυτές που εντοπίζονται στα γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες [DiMauro S, Schon EA (2001)].

1.3.1 Μεταλλάξεις στα γονίδια που είναι υπεύθυνα για την μιτοχονδριακή πρωτεϊνοσύνθεση

Οι μεταλλάξεις στα γονίδια που είναι υπεύθυνα για την μιτοχονδριακή πρωτεϊνοσύνθεση περιλαμβάνουν ελλείψεις (που πάντα συναντώνται σε ένα ή περισσότερα γονίδια tRNA), και σημειακές μεταλλάξεις στα γονίδια rRNA και tRNA. Ορισμένες από αυτές τις μεταλλάξεις είναι πολυμορφισμοί οι οποίοι δεν συνδέονται με κάποιο παθολογικό φαινότυπο ενώ οι υπόλοιπες επηρεάζουν κάποια σημαντική θέση των μορίων rRNA και tRNA οδηγώντας έτσι στην αλλαγή της δομής αυτών των μορίων και επομένως στην αλλαγή της λειτουργικότητάς τους. Η κλινική εμπειρία έχει δείξει ότι οι μεταλλάξεις που προκαλούν αλλαγές στην λειτουργικότητα των rRNA και tRNA συνήθως σχετίζονται με διαταραχές σε πολλά συστήματα, με γαλακτική οξέωση, και μαζικό πολλαπλασιασμό των μιτοχονδρίων ο οποίος οδηγεί στην εμφάνιση "τραχειών ερυθρών" μυϊκών ινών σε βιοψίες μυών [Engel WK, Cunningham CG (1963)]. Ιστοχημικές μελέτες έχουν δείξει ότι οι τραχιές ερυθρές ίνες (RRF) σε αυτές τις καταστάσεις αντιδρούν έντονα με την χρώση της αφυδρογονάσης του ηλεκτρικού οξέος (SDH) αλλά αντιδρούν ασθενώς ή και καθόλου με την χρώση της οξειδάσης του κυτοχρώματος c (COX) [DiMauro S, Schon EA (1998)]. Αυτό το πρότυπο χρώσης εξηγείται από το γεγονός ότι η SDH κωδικοποιείται εξ' ολοκλήρου από το πυρηνικό γονιδίωμα, ενώ τρεις από τις 13 υπομονάδες της COX κωδικοποιούνται από το mtDNA. Η μόνη εξαίρεση σε αυτόν τον "κανόνα" είναι το σύνδρομο μιτοχονδριακής εγκεφαλομυοπάθειας, γαλακτικής οξέωσης, και συμπτώματα εγκεφαλικού (MELAS), στο οποίο οι RRF είναι συνήθως θετικές στην COX. Η αιτία για αυτή την εξαίρεση μπορεί να είναι ότι το φορτίο των μεταλλαγών στους μύες των ασθενών με τυπικό MELAS δεν ξεπερνά το εξαιρετικά υψηλό κατώφλι που πρέπει να ξεπεραστεί για να επηρεαστεί η ενεργότητα του COX [Petruzzella V, et al (1994)]. Όσον αφορά την κληρονομικότητα, καταστάσεις που σχετίζονται με σημειακές μεταλλάξεις, όπως το MELAS, η μυοκλωνική επιληψία με τραχιές ερυθρές ίνες (MERRF), η νευροπάθεια αταξία και μελαγχρωστική αμφιβληστροειδοπάθεια (NARP)/ μητρικά κληρονομούμενο σύνδρομο Leigh (MILS), μεταδίδονται με μητρική κληρονομία, ενώ καταστάσεις που οφείλονται σε ελλείψεις του mtDNA είναι σποραδικά γεγονότα σε σχεδόν όλες τις περιπτώσεις. Ακόμα, παρόλο που οι μεταλλάξεις στα γονίδια tRNA συνήθως σχετίζονται με πολυσυστηματικές διαταραχές, σε σπάνιες περιπτώσεις επηρεάζεται μόνο ένας ιστός, συνηθέστερα οι σκελετικοί μύες [DiMauro S, Schon EA (2001)].

- **Μεταλλάξεις των μιτοχονδριακών tRNA**

Τα βιοχημικά μονοπάτια που συσχετίζονται με σχετιζόμενες με το tRNA παθολογίες αφορούν ανεπάρκειες του μηχανισμού της αερόβιας αναπνοής όπως χαμηλότερη κυτταρική αναπνοή (κατανάλωση οξυγόνου), χαμηλότερη δραστηριότητα των συμπλόκων της αναπνευστικής αλυσίδας (συχνά πρόκειται για

ανεπάρκεια στο σύμπλοκο I και στο σύμπλοκο IV) και χαμηλότερη σύνθεση του ATP. Αυτές οι ανωμαλίες συνδέονται με την απορύθμιση της μιτοχονδριακής μετάφρασης των συμπλόκων της αναπνευστικής αλυσίδας. Έχει παρατηρηθεί ένας ισχυρά μειωμένος ρυθμός μιτοχονδριακής πρωτεϊνοσύνθεσης για αρκετές μεμονωμένες μεταλλάξεις του tRNA. Όμως, η μειωμένη μιτοχονδριακή πρωτεϊνοσύνθεση δεν μπορεί να εξηγήσει την μειωμένη αναπνευστική δραστηριότητα επειδή τα επίπεδα της πρωτεϊνοσύνθεσης δεν φαίνεται να αντιστοιχούν στην ενζυμική δραστηριότητα που εμπλέκεται σε αυτές τις διεργασίες [Chomyn A, et al (1992)]. Από την άλλη πλευρά αναφέρθηκαν εξαιρέσεις όπου ο ρυθμός της μιτοχονδριακής μετάφρασης δεν επηρεάζεται (ή επηρεάζεται πολύ λίγο) από μία μετάλλαξη ενός γονιδίου tRNA, για παράδειγμα την μετάλλαξη του tRNA^{Leu(UUR)} A3243G [Janssen GM, et al (1999)], υποδηλώνοντας ότι εναλλακτικοί ή προσθετικοί μηχανισμοί μπορεί να συσχετίζουν μία μετάλλαξη ενός γονιδίου tRNA με έναν φαινότυπο.

Μελέτες των μοριακών και των κυτταρικών αποτελεσμάτων των μεταλλάξεων σε γονίδια mt tRNA έχουν προσφέρει σημαντικές πληροφορίες για τα δομικά και τα λειτουργικά ελαττώματα που προκαλούνται από τις μεταλλάξεις. Όμως, τέτοιες μελέτες συνεχίζουν να είναι δύσκολες λόγω της ετεροπλασμικής φύσης του μιτοχονδριακού DNA. Έχουν περιγραφεί πολλές διαφορετικές προσεγγίσεις: ένα πρώτο αποφασιστικό βήμα προήλθε από τη δημιουργία ζευγών ομοπλασμικών κυτταρικών σειρών κυτταροπλασματικών υβριδίων (cybrids), δηλαδή, κύτταρα με το ίδιο πυρηνικό περιβάλλον με μιτοχόνδρια που διαφέρουν μόνο στην απουσία ή στην παρουσία μίας συγκεκριμένης μετάλλαξης σε ένα δεδομένο γονίδιο tRNA. Η μελέτη των μεταλλάξεων στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα χρησιμοποιώντας ανθρώπινες κυτταρικές σειρές είναι τεχνικά δύσκολη λόγω της δυσκολίας εισαγωγής κατασκευασμένου DNA στο οργανίδιο. Μία μεθοδολογία για να ξεπεραστεί αυτό το πειραματικό εμπόδιο πρωτοπαρουσιάστηκε το 1989 από τους King και Attardi, που μπόρεσαν να μεταφέρουν μιτοχόνδρια απομονωμένα από ασθενείς που έφεραν παθολόγες μεταλλάξεις σε καλλιεργούμενα κύτταρα για να δημιουργήσουν κυτταρικές σειρές κυτταροπλασματικών υβριδίων. Αυτό το αποφασιστικό βήμα έδωσε την ευκαιρία να επιβεβαιωθεί το γεγονός ότι οι μεταλλάξεις που συνδέονται με την σωματική δυσλειτουργία παράγουν έναν ανιχνεύσιμο κυτταρικό φαινότυπο. Ακόμα, η ποικιλία των κυτταρικών τύπων που χρησιμοποιούνται για την δημιουργία cybrids με διαφορετικά πυρηνικά περιβάλλοντα (π.χ. HeLa, οστεοσαρκώματος και λεμφοβλαστικά) δεν επιτρέπει άμεσες συγκρίσεις.

Άλλες μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί σε βιοψίες ασθενών ή σε πρωτογενείς κυτταρικές σειρές. Αυτές οι *ex vivo* αναλύσεις, βασισμένες στον καθαρισμό ενός συγκεκριμένου tRNA από καλλιεργημένα κύτταρα ή από βιοψίες, είναι πολύ ισχυρές αλλά έχουν ποσοτικούς περιορισμούς. Τέλος, μία εναλλακτική προσέγγιση, που αποφεύγει τα φαινόμενα ετεροπλασμίας στην μελέτη των παθολογικών tRNA και δίνει πρόσβαση σε μία επαρκή ποσότητα υλικού, χρησιμοποιεί ως υποστρώματα μεταλλαγμένα tRNA που έχουν προετοιμαστεί με μεταλλαξιγένεση ειδικής θέσης των αντίστοιχων γονιδίων και *in vitro* μεταγραφή και περιλαμβάνει την χρήση ενζύμων που είτε είναι ανασυνδυασμένα είτε απομονώνονται από καλλιεργούμενα κύτταρα χωρίς μιτοχονδριακές ασθένειες. Αυτή η προσέγγιση έδωσε πρόσφατα την δυνατότητα της διερεύνησης των αποτελεσμάτων αρκετών σημειακών μεταλλάξεων σε διάφορα στάδια του μεταβολισμού του tRNA [Giegé R,

et al (1998)].

Η εικόνα που σχηματίζεται από αυτές τις μελέτες είναι ότι τα πολυποίκιλα και περίπλοκα αποτελέσματα των μεταλλάξεων των tRNA μπορεί να οφείλονται στην αποσταθεροποίηση των δομικών χαρακτηριστικών η οποία καταστρέφει την φυσιολογική αναδίπλωση των tRNA η οποία είναι απαραίτητη για όλες τις λειτουργίες τους. Για να εκπληρώσουν τον βιολογικό τους ρόλο, τα tRNA μπορεί να έχουν πολύ συγκεκριμένες δομικές ιδιότητες που επιτρέπουν την βέλτιστη τοποθέτηση των σημάτων για αλληλεπίδραση με διάφορους συνδότες όπως τις αμινοάκυλο-tRNA συνθετάσες, και τα ένζυμα που συμμετέχουν στην επεξεργασία των άκρων, στην σταθερότητα του tRNA, και στην αμινοακυλίωση, ή μπορεί να επάγουν μία ανώμαλη διαμόρφωση του tRNA η οποία τελικά οδηγεί σε ένα μειωμένο επίπεδο σταθερής κατάστασης του φυσιολογικού αμινοακυλιωμένου tRNA, το οποίο στην συνέχεια μειώνει την μιτοχονδριακή πρωτεϊνοσύνθεση [Florentz C (2002), Florentz C, et al (2003), Wittenhagen LM, Kelley SO (2003), Levinger L, et al (2004)] [Zifa E, et al (2007)].

Η δομή του tRNA. Η ιδιοσυγκρασία της δομής του tRNA (σχήμα-L) σε συνδυασμό με τις πολλές μεταμεταγραφικές τροποποιήσεις καθορίζει τον λειτουργικό ρόλο των μορίων tRNA κατά την πρωτεϊνοσύνθεση. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα μία σημειακή μετάλλαξη είτε να επηρεάζει την δομή του tRNA μόνο στο άμεσο περιβάλλον της μετάλλαξης (αφήνοντας την γενική δομή του tRNA ανέπαφη) ή να επηρεάζει σοβαρά την δομή του tRNA διαταράσσοντας επαφές που σταθεροποιούν την δευτεροταγή και τριτοταγή δομή του tRNA.

Οι μεταλλάξεις του tRNA^{Ile} T4285C, G4298A, και A4317G, προκαλούν μία δομική ευπάθεια [Kelley S, et al 2001], η μετάλλαξη του tRNA^{Ser(UCN)} G7497A προκαλεί ήπιες δομικές διαταραχές [Möllers M, et al (2005)]. Ακόμα η μετάλλαξη C5703T επάγει μία αλλαγή της διαμόρφωσης στο tRNA^{Asn} υποδηλώνοντας ότι η μετάλλαξη αποσταθεροποιεί την δευτεροταγή ή τριτοταγή δομή του tRNA^{Asn} [Hao H, Moraes CT (1997)]. Αντίθετα, η μετάλλαξη T12311C μειώνει την ευελιξία της δευτεροταγής δομής στο tRNA^{Leu(CUN)} [Hao R, et al (2005)]. Η δομική ανάλυση αποκάλυψε ότι η ευελιξία του tRNA^{Leu(CUN)} διευκολύνει ένα γλίστρημα του βραχίονα T (T-stem), που επηρεάζει την ικανότητα φόρτωσης του μορίου. Η μετάλλαξη T12311C καταστρέφει την ικανότητα γλιστρήματος του T-stem παρεμποδίζοντας έτσι την ρύθμιση της ικανότητας φόρτωσης του tRNA^{Leu(CUN)}.

Η μετάλλαξη του tRNA^{Leu(UUR)} A3243G επάγει μία δραματική δομική αλλαγή, τον σχηματισμό ενός διμερούς συμπλόκου μέσω του σχηματισμού διαμοριακών ζευγών βάσεων μεταξύ των βρόχων D (D-loop) των tRNA [Wittenhagen LM, Kelley SO (2002)]. Η σταθερότητα του διμερούς συμπλόκου ήταν αρκετά υψηλή (K_d = 150nM) για να θεωρηθεί ότι μπορεί να παρουσιάζεται και in vivo. Επιπρόσθετες μελέτες υποδεικνύουν ότι ο διμερισμός είναι μερικώς υπεύθυνος για την παρατηρούμενη απώλεια λειτουργίας του μεταλλαγμένου tRNA.

Σύμφωνα με τα δομικά τους χαρακτηριστικά, τα tRNA αναγνωρίζονται από πρωτεϊνικούς συνδότες μέλη του μεταφραστικού μηχανισμού και εισέρχονται στις ριβοσωμικές ενεργές θέσεις. Μία καθορισμένη

τριδιάστατη διαμόρφωση είναι σημαντική για την αποτελεσματική πρόσδεση και δραστικότητα του μορίου. Όταν το μεταλλαγμένο κατάλοιπο αποτελεί ένα σημαντικό στοιχείο της αρχιτεκτονικής του tRNA, είναι αναμενόμενη η παρουσία επιβλαβών επιδράσεων στις περισσότερες από τις αλληλεπιδράσεις με τα άλλα βιομόρια.

Ενδονουκλεολυτική πέψη των 5'- και 3'- άκρων και προσθήκη του CCA στο 3'- άκρο του tRNA. Τα μιτοχονδριακά tRNA μεταγράφονται ως πρόδρομα μόρια με 5' αλληλουχίες οδηγούς (που απομακρύνονται από την RNάση P) και 3' μετατερματικές αλληλουχίες (που απομακρύνονται ενδονουκλεολυτικά από την 3-tRNάση ή RNάση Z). Στο 3' άκρο που παράγεται μέσω της πέψης από την tRNάση Z προστίθεται ακολούθως, από μία tRNA νουκλεοτιδυλοτρανσφεράση (ένζυμο προσθήκης CCA, CCAse), μία τριπλέτα CCA, η οποία είναι απαραίτητη στην ωρίμανση και αμινοακυλίωση του tRNA. Αρκετές σημειακές μεταλλάξεις στα γονίδια των mt tRNA επηρεάζουν αυτά τα βήματα οδηγώντας έτσι σε μειωμένη έκφραση των αντίστοιχων ώριμων tRNA.

Το πιο ξεκάθαρο παράδειγμα μετάλλαξης που μείωσε την αποτελεσματικότητα της πέψης του 3'-άκρου είναι η σχετιζόμενη με την κώφωση μετάλλαξη T7445C, η οποία βρίσκεται ακριβώς στην 3' πλευρά της βάσης διαλογέα του tRNA^{Ser(UCN)} [Levinger L, et al (2001)]. Η μειωμένη αποτελεσματικότητα της πέψης του 3'-άκρου έχει παρατηρηθεί επίσης στις μεταλλάξεις του tRNA^{Leu(UUR)} A3243G, A3302G και C3303T, οι οποίες μειώνουν την αποτελεσματικότητα της αντίδρασης στο tRNA σε έως 10 φορές χαμηλότερα επίπεδα [Levinger L, et al (2004)] και στις μεταλλάξεις του tRNA^{Ile} A4269G, A4295G, G4309A και A4317G, οι οποίες μειώνουν την αποτελεσματικότητα σε 3 φορές χαμηλότερα επίπεδα [Levinger L, et al (2003)]. Η κινητική της επεξεργασίας μέσω tRNάσης Z έδειξε ότι η μειωμένη αποτελεσματικότητα οφειλόταν σε χαμηλότερο V_{max} για τις μεταλλάξεις του tRNA^{Leu(UUR)} A3243G, C3256T, A3260T, T3271C, [Rossmannith W, Karwan R (1998)] και την μετάλλαξη του tRNA^{Ser(UCN)} 7472insC [Toompuu M, et al (2004)] όταν χρησιμοποιήθηκαν in vitro μετάγραφα.

Οι μεταλλάξεις A4317G και A10044G που επηρεάζουν την τριδιάστατη δομή των tRNA^{Ile} και tRNA^{Gly} αντίστοιχα παρεμποδίζουν την αναγνώριση από τα ένζυμα που προσθέτουν CCA πιθανώς λόγω του ακατάλληλου προσανατολισμού του tRNA υποστρώματος στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου, χωρίς να επηρεάζεται η συγγένεια του ενζύμου για το υπόστρωμα [Tomari Y, et al (2003)]. Μεταξύ 5 μεταλλάξεων του tRNA^{Leu(UUR)} που μελετήθηκαν, η C3303T έδειξε μία σημαντική επίδραση στην προσθήκη CCA, μειώνοντας την ενσωμάτωση νουκλεοτιδίων κατά 5,5 φορές, χωρίς να επηρεάζεται το V_{max}, ενώ το K_m αυξήθηκε, υποδηλώνοντας ότι η C3303T μειώνει την συγγένεια του ενζύμου προσθήκης CCA για το tRNA χωρίς να επηρεάζει την κατάλυση [Levinger L, et al (2004)]. Αυτά τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι θεωρούμενες παθογόνες μεταλλάξεις μπορούν να επηρεάσουν και την ενζυμική αντίδραση (μέσω παρεμπόδισης της κατάλυσης) και την δύναμη της αλληλεπίδρασης ενζύμου-υποστρώματος [Zifa E, et al (2007)].

Τερματισμός της μεταγραφής κατά την βιοσύνθεση του 16S rRNA. Η θέση τερματισμού της

μεταγραφής του ανθρώπινου mtDNA βρίσκεται μεταξύ των γονιδίων που κωδικοποιούν το 16S rRNA και το tRNA^{Leu(UUR)}, και είναι ένας καθοριστικός παράγοντας που ελέγχει την σχετική σύνθεση του rRNA σε σύγκριση με άλλα μόρια RNA. Μία σοβαρή βλάβη του τερματισμού της μεταγραφής του 16S rRNA αναφέρθηκε αρχικά για την μετάλλαξη του MELAS A3243G στο tRNA^{Leu(UUR)}, σε μιτοχονδριακό εκχύλισμα από καλλιέργεια ανθρώπινων κυττάρων KB [Hess JF, et al (1991)]. Αυτό υποδεικνύει ότι το μοριακό ελάττωμα στο MELAS μπορεί να είναι η ανικανότητα παραγωγής του σωστού τύπου και σωστής ποσότητας του rRNA σε σχέση με τα άλλα προϊόντα των μιτοχονδριακών γονιδίων. Κυτταρικές σειρές κυτταροπλασματικών υβριδίων όπως και ιστοί ασθενών που φέρουν την μετάλλαξη A3243G του tRNA^{Leu(UUR)} περιείχαν αυξημένες ποσότητες μη επεξεργασμένου tRNA^{Leu(UUR)}. Η συσσώρευση αυτού του πρόδρομου μορίου (αναφερόμενου ως RNA19) το οποίο αντιστοιχεί σε ένα mRNA που περιλαμβάνει τις αλληλουχίες του 16S rRNA, του tRNA^{Leu(UUR)}, και του ND1 [King MP, et al (1992)], ήταν κάπως πιο έντονη στα κυτταροπλασματικά υβρίδια για την μετάλλαξη στη θέση 3243 σε σχέση με αυτά για την μετάλλαξη στη θέση 3271 [Koga Y, et al (1995)]. Όμως μία παρόμοια ανάλυση για την μετάλλαξη C3256T έδειξε μόνο μία πολύ αμυδρή αύξηση στην ποσότητα του RNA19, αλλά και σημαντικά μειωμένα επίπεδα του tRNA^{Leu(UUR)} και του mRNA του ND1 [Hao H, Moraes CT (1996)]. Σε ιστούς (μύες/ινοβλάστες) ενός ασθενούς που φέρει την μετάλλαξη A3302G επίσης παρατηρήθηκε μία σημαντική συσσώρευση του RNA19 [Bindoff L, et al (1993)]. Αυτό το μη επεξεργασμένο πρόδρομο μόριο θα μπορούσε είτε να στερεί το κύτταρο από τα επαρκή επίπεδα ώριμου μετάγραφου ή να παρεμβαίνει στην σωστή μιτοχονδριακή μετάφραση, μέσω της ενσωμάτωσής του στα μιτοχονδριακά ριβοσώματα [Zifa E, et al (2007)].

Μεταμεταγραφική τροποποίηση συγκεκριμένων νουκλεοτιδίων στο tRNA. Μετά την σύνθεση του tRNA, οι μεταμεταγραφικές τροποποιήσεις είναι υπεύθυνες για την παράδοση των τελικών προϊόντων [Yasukawa T, et al (2001)]. Αυτές οι τροποποιήσεις σταθεροποιούν την δομή του tRNA και/ή προσφέρουν απαραίτητα στοιχεία αναγνώρισης για τους διάφορους συνδέτες με τους οποίους αλληλεπιδρά το tRNA όπως τις αμινοάκυλο-tRNA συνθετάσες.

Έχει παρατηρηθεί μία μείωση της μεθυλίωσης στο tRNA^{Leu(UUR)} με την μετάλλαξη A3243G σε κύτταρα κυτταροπλασματικών υβριδίων/οστεοσαρκώματος [Helm M, et al (1999)] και στο tRNA^{Pro} με την μετάλλαξη G15990A σε in vitro μετάγραφα [Brulé H, et al (1998)]. Η απουσία της τροποποίησης που περιέχει ταυρίνη (5-ταυρινομεθυλοουριδίνη) στην θέση ταλάντωσης του αντικωδικονίου U34 έχει ανιχνευθεί στο tRNA^{Leu(UUR)} με τις μεταλλάξεις A3243G και T3271C σε κύτταρα κυτταροπλασματικών υβριδίων/HeLa [Yasukawa T, et al (2000)a] και στο tRNA^{Lys} με την μετάλλαξη A8344G επίσης σε κύτταρα κυτταροπλασματικών υβριδίων/HeLa [Yasukawa T, et al (2000)b]. Αυτή η απουσία της τροποποίησης της 5-ταυρινομεθυλοουριδίνης έχει παρατηρηθεί χαρακτηριστικά σε ιστούς ασθενών MELAS με τις μεταλλάξεις του tRNA^{Leu(UUR)} A3243G, G3244A, T3258C, T3271C και T3291C, όμως, οι μη-MELAS μεταλλάξεις G3242A, T3250C, C3254T, A3280G διατήρησαν φυσιολογικές τροποποιήσεις ταυρίνης [Kirino Y, et al (2005)]. Η τροποποίηση ταυρίνης στην θέση C5 της ουριδίνης της θέσης ταλάντωσης στο tRNA^{Leu(UUR)} και

στο tRNA^{Lys} φαίνεται να παίζει έναν κρίσιμο ρόλο στην αποκωδικοποίηση του κωδικονίου UUG μέσω της σταθεροποίησης του ζευγαρώματος των βάσεων ταλάντωσης U:G. Αυτό το εύρημα μπορεί να εξηγήσει το ελάττωμα της μετάφρασης των πλούσιων σε UUG γονιδίων όπως το ND6 το οποίο οδηγεί στην ανεπάρκεια του συμπλόκου I που παρατηρείται στους ασθενείς MELAS [Kirino Y, Suzuki T (2005)] [Zifa E, et al (2007)].

Η σταθερότητα και το επίπεδο σταθερής κατάστασης των μεταλλαγμένων tRNA. Η μειωμένη σταθερότητα των μεταλλαγμένων tRNA μπορεί να έχει ως συνέπεια την ταχύτερη αποικοδόμηση των μεταλλαγμένων μορίων ή την μείωση της ικανότητας αμινοακυλίωσης του tRNA. Οι μεταλλάξεις A3243G και T3271C μειώνουν τα επίπεδα σταθερής κατάστασης του tRNA^{Leu(UUR)} σε κύτταρα κυτταροπλασματικών υβριδίων/οστεοσαρκώματος [Chomyn A, et al (2000)] και σε κύτταρα κυτταροπλασματικών υβριδίων/HeLa [Yasukawa T, et al (2000)a]. Η παθολόγος σημειακή μετάλλαξη A4269G στο μιτοχονδριακό tRNA^{Ile} μείωσε την σταθερότητα του μεταλλαγμένου μορίου tRNA, οδηγώντας έτσι σε χαμηλά επίπεδα σταθερής κατάστασης του αμινοκύκλο-tRNA [Yasukawa T, Hino N, et al (2000)]. Πειράματα χημικού ελέγχου υπέδειξαν ότι η υποκατάσταση U3271C, η οποία αντικαθιστά ένα ζεύγος AU με ένα λανθασμένο ζεύγος CA, αποσταθεροποιεί σημαντικά τον βραχίονα του αντικωδικονίου. Αυτή η αποσταθεροποίηση οδηγεί σε μία μείωση της αντίδρασης αμινοακυλίωσης λόγω μίας αύξησης του K_M [Wittenhagen LM, et al (2003)].

Η μετάλλαξη G12276A προκαλεί μία σημαντική μείωση στα επίπεδα σταθερής κατάστασης του tRNA^{Leu(CUN)} πιθανώς λόγω της θέσης της στον υψηλά συντηρημένο βραχίονα DHU [Zsurka G, et al (2004)]. Η παθολόγος μετάλλαξη A8344G οδηγεί σε μία μείωση κατά 50-60% της ικανότητας αμινοακυλίωσης του tRNA^{Lys} σε κύτταρα κυτταροπλασματικών υβριδίων/οστεοσαρκώματος [Enriquez JA, et al (1995)] και σε in vitro μετάγραφα [Yasukawa T, et al (2000)b]. Οι παθολόγες σημειακές μεταλλάξεις T7512C και G7497A προκαλούν μία σοβαρή μείωση του tRNA^{Ser(UCN)} σε επίπεδα χαμηλότερα από το 10% των επιπέδων των φυσιολογικών ατόμων ελέγχου, πιθανώς λόγω μίας βλάβης στις διεργασίες των μεταμεταγραφικών τροποποιήσεων, οδηγώντας τελικά σε μία επικράτηση της αποικοδόμησης από νουκλεάσες έναντι της ωρίμανσης από τα ένζυμα τροποποίησης [Möllers M, et al (2005)]. Παρατηρήθηκαν ελαττώσεις κατά 75-83% των επιπέδων του tRNA^{Ser(UCN)} σε κυτταρικές σειρές κυτταροπλασματικών υβριδίων που έφεραν την σχετιζόμενη με την κώφωση μετάλλαξη T7511C [Li X, et al (2004)]. Μία άλλη σχετιζόμενη με την κώφωση μετάλλαξη, η 7472insC, σε κυτταροπλασματικά υβρίδια κυττάρων 143B οστεοσαρκώματος, έχει συσχετιστεί με μία ελάττωση κατά 60-70% των επιπέδων σταθερής κατάστασης του tRNA^{Ser(UCN)} [Toompuu M, et al (1999)] λόγω μίας βλάβης στην σύνθεση του μεταλλαγμένου tRNA^{Ser(UCN)} και όχι λόγω της ελαττωμένης σταθερότητας του tRNA [Toompuu M, et al (2002)] [Zifa E, et al (2007)].

Η αποτελεσματικότητα της αμινοακυλίωσης και η πρόσδεση του παράγοντα επιμήκυνσης EF-Tu. Τελικά, τα ώριμα και σωστά διαμορφωμένα tRNA εστεροποιούνται με αμινοξέα από τις αμινοκύκλο-tRNA συνθετάσες. Η αποτελεσματική αμινοακυλίωση εξαρτάται από τα στοιχεία ταυτότητας των tRNA (συγκεκριμένα νουκλεοτίδια σε ειδικές θέσεις), από δομικά χαρακτηριστικά μέσα στο tRNA και από

περισσότερο γενικές ιδιότητες της διαμόρφωσης που συνδυάζονται σε μερικές περιπτώσεις με συγκεκριμένες μεταμεταγραφικές τροποποιήσεις. Όμως τα mt tRNA είναι αρκετά διαφορετικά από τα κυτταροπλασματικά τους αντίστοιχα καθώς στερούνται επικρατειών και μεταμεταγραφικών τροποποιήσεων που μπορεί να είναι απαραίτητες για την πρόσδεση και την φόρτωση του σωστού αμινοξέος από τις αμινοάκυλο-tRNA συνθετάσες. Επομένως, είναι δύσκολο να προβλεφθεί το ακριβές αποτέλεσμα συγκεκριμένων μεταλλάξεων των mt tRNA στην αναγνώριση και στην σωστή αμινοακυλίωση. Κάποιες μεταλλάξεις φαίνεται να μειώνουν ισχυρά την ικανότητα αμινοακυλίωσης του tRNA, ενώ άλλες έχουν μόνο ένα περιορισμένο αποτέλεσμα.

Το σύνολο και ο βαθμός της λευκυλίωσης του tRNA^{Leu(UUR)} που φέρει την μετάλλαξη A3243G βρέθηκαν να είναι και τα δύο πολύ μειωμένα σε κυτταροπλασματικά υβρίδια κυττάρων οστεοσαρκώματος [Janssen GM, et al (1999), Chomyn A, et al (2000)], σε κυτταροπλασματικά υβρίδια κυττάρων καρκίνου του πνεύμονα [El Meziane A, et al (1998)], και σε in vitro μετάγραφα [Park H, et al (2003)]. Ακόμα, στις περισσότερες βιοψίες από ασθενείς MELAS που φέρουν την μετάλλαξη A3243G, η ικανότητα αμινοακυλίωσης του μεταλλαγμένου tRNA^{Leu(UUR)} ήταν μειωμένη· αντίθετα στις βιοψίες από ασθενείς MERRF που φέρουν την μετάλλαξη A8344G στο γονίδιο του tRNA^{Lys} η αμινοακυλίωση δεν επηρεάστηκε [Börner G, et al (2000)]. Ακόμα, παρουσιάζει ενδιαφέρον η διαφορετική μείωση της αποτελεσματικότητας της αμινοακυλίωσης που προκαλείται από δύο μεταλλάξεις του tRNA^{Leu(UUR)} στην ίδια θέση (A3243G και A3243T): η A3243G μειώνει κατά 10 φορές την αποτελεσματικότητα της αμινοακυλίωσης, ενώ η A3243T μειώνει κατά 300 φορές την αποτελεσματικότητα της αμινοακυλίωσης [Park H, et al (2003)].

Οι παθογόνες μεταλλάξεις A4269G, T4285G, G4298A, A4317G σε in vitro μετάγραφα μειώνουν την ικανότητα αμινοακυλίωσης του tRNA^{Ile} [Kelley S, et al 2001]. Το γεγονός ότι τα μεταλλάγματα με αντισταθμιστικές μεταλλάξεις (που επαναφέρουν το διαταραγμένο ζευγάρι βάσεων κατά Watson-Crick και επαναφέρουν την σταθερότητα, ακόμα και αν τα ζεύγη που σχηματίζονται είναι διαφορετικά από αυτά που βρίσκονται στο tRNA αγρίου τύπου) επανακτούν την αποτελεσματικότητα της αμινοακυλίωσης του αγρίου τύπου, υποδηλώνει ότι οι λειτουργικές βλάβες οφείλονται στην εγγενή δομική αστάθεια. Ακόμα, η μετάλλαξη A4269G μείωσε την σταθερότητα του μεταλλαγμένου μορίου tRNA^{Ile}, οδηγώντας σε χαμηλά επίπεδα σταθερής κατάστασης του αμινοάκυλο-tRNA [Yasukawa T, Hino N, et al (2000)]. Ένα ενδιαφέρον χαρακτηριστικό των μελετών για την αμινοακυλίωση στο tRNA^{Ile} ήταν το εύρημα ότι τα μεταλλαγμένα tRNA μπορούσαν να καταστείλουν την αμινοακυλίωση των tRNA^{Ile} αγρίου τύπου από την ισολεύκυλο-tRNA συνθετάση (IleRS) [Kelley S, et al 2001]. Αυτή είναι μία σημαντική ανακάλυψη επειδή σε ετεροπλασματικά μιτοχόνδρια συνυπάρχουν και τα μεταλλαγμένα και τα αγρίου τύπου tRNA. Η καταστολή της αμινοάκυλο-tRNA συνθετάσης από το μεταλλαγμένο tRNA παρεμποδίζει την διάσωση από έναν μικρότερο πληθυσμό αγρίου τύπου tRNA.

Οι μεταλλάξεις του tRNA^{Lys} που εντοπίζονται στον βραχίονα του αντικωδικονίου, G8313A και G8328A, οδηγούν σε μία πολύ ισχυρή μείωση (κατά 5.000 έως 7.000 φορές) στην αποτελεσματικότητα της

λυσυλίωσης (K_{cat}/K_M), με έναν μηχανισμό που πιθανώς εμπλέκει δομικές αναδιατάξεις, οδηγώντας έμμεσα στην αποτυχία της αναγνώρισης από την συνθετάση. Οι υπόλοιπες μεταλλάξεις του tRNA^{Lys} που έχουν μελετηθεί, οι οποίες εντοπίζονται στην αντίθετη πλευρά ή στον βραχίονα του αντικωδικονίου, είχαν ήπιες ή καθόλου επιδράσεις στην αμινοακυλίωση [Sissler M, et al (2004)]. Παρόλα αυτά, η μετάλλαξη A8344G του tRNA^{Lys} μείωσε την αποτελεσματικότητα της αμινοακυλίωσης σε κύτταρα κυτταροπλασματικών υβριδίων/οστεοσαρκώματος [Chomyn A, et al (2000)], όμως, σε κυτταροπλασματικά υβρίδια κυττάρων HeLa [Yasukawa T, et al (2000)b] και σε βιοψίες [Börner G, et al (2000)] δεν είχε κανένα αποτέλεσμα. Το μεταλλαγμένο tRNA^{Ser(UCN)} με την προσθήκη 7472C, σε κυτταροπλασματικά υβρίδια κυττάρων οστεοσαρκώματος, παρουσίασε μία κατά 25% μείωση της αμινοακυλίωσης [Toompuu M, et al (1999)]. Ακόμα, παρουσιάζει ενδιαφέρον το γεγονός ότι η ικανότητα αμινοακυλίωσης του tRNA ήταν αυξημένη στην παθολόγο μετάλλαξη του tRNA^{Leu(CUN)} T12311C [Hao R, et al (2005)], και στην μετάλλαξη του tRNA^{Ile} C4320T [Kelley S, et al 2001].

Μετά την αμινοακυλίωση, τα tRNA μπορούν να μεταφερθούν στο ριβόσωμα μέσω της παροδικής τους πρόσδεσης στους μεταφραστικούς παράγοντες, όπως τον παράγοντα επιμήκυνσης EF-Tu, επιτρέποντας έτσι την μεταφορά του αμινοξέος στην συντιθέμενη πολυπεπτιδική αλυσίδα, και ολοκληρώνοντας έτσι την πρωτεϊνοσύνθεση. Η παθολόγος μετάλλαξη A4269G στο tRNA^{Ile} αλλάζει την δομή του στελέχους T (T-stem) και μειώνει κατά 2 φορές την συγγένεια πρόσδεσης για τον EF-Tu [Hino N, et al (2004)]. Φαίνεται ότι τα τριμερή σύμπλοκα που σχηματίζονται μεταξύ του EF-Tu και των mt αμινοάκυλο-tRNA (aa-tRNA) είναι γενικά ασθενέστερα από αυτά που σχηματίζονται με τα κανονικά aa-tRNA. Λόγω των περιέργων δομικών τους χαρακτηριστικών, τα mt tRNA φέρουν κατάλοιπα ή περιοχές που θα μπορούσαν να συμβάλλουν στις ασθενέστερες αλληλεπιδράσεις με τον EF-Tu. Μία πρόσφατη βιοχημική ανάλυση που σύγκρινε την *E. coli* EF-Tu και την EF-Tu_{mt} εντόπισε διαφορές στην ικανότητα πρόσδεσης του tRNA και απέδειξε ότι το κατάλοιπο στην θέση 287 είναι σημαντικό για την αποτελεσματική πρόσδεση και μεταφορά των mt αμινοάκυλο-tRNA στο ριβόσωμα [Hunter SE, Spremulli LL (2004)]. Πρόσφατα, ανακαλύφθηκε ότι η EF-Tu_{mt} μπορεί ακόμα να διαθέτει ιδιότητες μοριακών συνοδών, εμποδίζοντας έτσι την θερμική συσσώρευση των πρωτεϊνών και προάγοντας έτσι την σωστή αναδίπλωση των πρωτεϊνών με έναν ανεξάρτητο του GTP τρόπο. Η EF-Tu_{mt} εντοπίζεται στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη όπου βρίσκονται τα περισσότερα μιτοχονδριακά ριβοσώματα και η ενεργότητα μοριακού συνοδού μπορεί να σχετίζεται με έναν πιθανό ρόλο στον έλεγχο ποιότητας των πρωτεϊνών στα μιτοχόνδρια [Suzuki H, et al (2007)]. Τέλος, οι γενετικές έρευνες που περιλαμβάνουν ασθενείς με ελαττωματική μιτοχονδριακή μετάφραση οδήγησαν στην ανακάλυψη νέων μεταλλάξεων στον μιτοχονδριακό παράγοντα επιμήκυνσης G1 (EFG1) σε ένα μωρό με ελαττωματική μιτοχονδριακή μετάφραση, και, για πρώτη φορά, στον EF-Tu_{mt} σε ένα άλλο μωρό. Και στις δύο περιπτώσεις αναφέρθηκε σοβαρή γαλακτική οξέωση και ταχέως εξελισσόμενη θανατηφόρος εγκεφαλοπάθεια [Valente L, et al (2007)] [Zifa E, et al (2007)].

1.3.2 Μεταλλάξεις στα γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες

Οι γενικεύσεις σχετικά με τις μεταλλάξεις στα γονίδια του mtDNA που κωδικοποιούν πρωτεΐνες έχουν κυρίως βασιστεί σε δύο διαταραχές, τις LHON και NARP/MILS. Το LHON σχετίζεται με τρεις κύριες μεταλλάξεις στα γονίδια του συμπλόκου I [αφυδρογονάση του NADH - οξειδοαναγωγή της ουβικινόνης, (ND)]: την G11778A στο ND4, την G3460A στο ND1, την T14484C στο ND6 [Huoronen K, et al (1991), Johns DR, et al (1992), Wallace DC, et al (1988)]. Το σύνδρομο NARP/MILS σχετίζεται κυρίως με την μετάλλαξη T8993G στο γονίδιο ATPase 6 [De Vries DD, et al (1993), Holt IJ, et al (1990)]. Επειδή και οι δύο διαταραχές κληρονομούνται μητρικά, δεν παρουσιάζουν πάντα γαλακτική οξέωση, και δεν έχουν συσχετιστεί με την παρουσία τραχειών ερυθρών ινών στους μύες, το συμπέρασμα που προέκυψε ήταν ότι όλες οι μεταλλάξεις του mtDNA στα γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες θα έχουν τα ίδια χαρακτηριστικά. Αντίθετα, πιο πρόσφατες έρευνες έχουν δείξει ότι και οι τρεις γενικεύσεις ήταν λανθασμένες. Αυτή η νέα πληροφορία προήλθε από την μελέτη ασθενών με δυσανεξία στην άσκηση.

Η δυσανεξία στην άσκηση είναι μία κοινή ενόχληση σε ασθενείς με μιτοχονδριακές εγκεφαλομυοπάθειες, αλλά συχνά επισκιάζεται από άλλα συμπτώματα και ενδείξεις. Όμως, φαίνεται ότι η δυσανεξία στην άσκηση, η μυαλγία, και η μυσσφαιρινουρία μπορεί να είναι οι μοναδικές ενδείξεις βλαβών της αναπνευστικής αλυσίδας. Αυτές οι βλάβες μπορεί να επηρεάσουν το σύμπλοκο I, ή το σύμπλοκο III, ή το σύμπλοκο IV, όμως φαίνεται να σχετίζονται πιο συχνά με ανεπάρκεια στο σύμπλοκο III [Andreu AL, et al (1999)].

Η πρώτη μοριακή βλάβη που ανιχνεύθηκε σε τέτοιες καταστάσεις ήταν μία μικρή έλλειψη 15 bp στο γονίδιο που κωδικοποιεί την υπομονάδα III του COX (COX III). Ο ασθενής στον οποίο ανιχνεύθηκε η έλλειψη ήταν μία 16-χρονη γυναίκα με επαναλαμβανόμενη εμφάνιση μυσσφαιρινουρίας που προκαλούνταν από εκτεταμένη άσκηση ή από ιώσεις [Keightley JA, et al (1996)]. Μεταξύ των επεισοδίων μυσσφαιρινουρίας, και οι κλινικές και οι νευρολογικές εξετάσεις ήταν φυσιολογικές, όπως και οι εργαστηριακές εξετάσεις, συμπεριλαμβανομένων των εξετάσεων κρεατινικής κινάσης και γαλακτικού οξέως του ορού. Δεν υπήρχαν επιδράσεις σε άλλους ιστούς πέρα από τον μυϊκό, και το οικογενειακό ιστορικό ήταν αρνητικό. Βιοψία των μυών έδειξε πολλές θετικές στο SDH και αρνητικές στο COX τραχιές ερυθρές ίνες (RRF) και ανεπάρκεια του COX. Μία χωρίς νόημα μετάλλαξη (G5920A) στο γονίδιο COX I ανιχνεύθηκε σε mtDNA μυών σε έναν 34-χρονο άντρα με ισόβια δυσανεξία στην άσκηση και επαναλαμβανόμενη μυσσφαιρινουρία που προκαλούνταν από έντονη ή επαναλαμβανόμενη άσκηση [Karadimas CL et al (2000)]. Η ιστοχημεία του μυός έδειξε διάσπαρτες αρνητικές στο COX RRF, αρκετές μη-RRF ίνες αρνητικές στο COX, και η βιοχημεία έδειξε ανεπάρκεια του COX. Η μετάλλαξη δεν βρέθηκε στο αίμα ή σε ινοβλάστες από τον ασθενή ούτε σε αίμα από τις ασυμπτωματικές μητέρα και αδερφή του ασθενούς. Οκτώ άλλες ξεχωριστές μεταλλάξεις στα γονίδια COX του mtDNA έχουν σχετιστεί με ένα μεγάλο εύρος κλινικών συμπτωμάτων, από σιδηροβλαστική αναιμία έως εγκεφαλομυοπάθεια [DiMauro S, Andreu AL (2000)]. Στις περισσότερες περιπτώσεις οι μεταλλάξεις αυτές είναι σποραδικές.

Η δυσανεξία στην άσκηση (χωρίς μυσσφαιρινουρία) παρατηρήθηκε ως το κύριο κλινικό χαρακτηριστικό σε δύο σποραδικούς ασθενείς με ανεπάρκεια του συμπλόκου I στους μύες και θετικές στο COX RRF ίνες στις βιοψίες των μυών τους. Ο ένας είχε μία χωρίς νόημα μετάλλαξη (G11832A) στο γονίδιο ND4 [Andreu AL, Tanji K, et al (1999)], ο άλλος [Bet L et al (1990)] είχε μία ενδογονιδιακή αναστροφή επτά νουκλεοτιδίων μέσα στο γονίδιο ND1 που είχε σαν αποτέλεσμα την αλλαγή τριών αμινοξέων [Musumeci O, et al (2000)]. Όπως φαίνεται από τον δεύτερο ασθενή, το ρεπερτόριο των παθογόνων μεταλλάξεων του mtDNA συνεχίζει να επεκτείνεται.

Τα "ασυνήθιστα" χαρακτηριστικά των τεσσάρων ασθενών που περιγράφηκαν παραπάνω - αρνητικό οικογενειακό ιστορικό, επιδράσεις μόνο στον μυϊκό ιστό, και παρουσία RRF στην μυϊκή βιοψία - παρουσιάστηκαν και σε εννέα ασθενείς με ανεπάρκεια του συμπλόκου III [DiMauro S (1999)]. Και οι εννέα ασθενείς παρουσίαζαν δυσανεξία στην άσκηση, αλλά μόνο δύο παρουσίασαν μυσσφαιρινουρία. Σε όλους τους ασθενείς στους οποίους εφαρμόστηκε ιστοχημεία σε δείγματα μυϊκού ιστού εντοπίστηκαν θετικές στο COX RRF. Και οι 9 ασθενείς εμφάνισαν μετάλλαξη στο γονίδιο του κυτοχρώματος *b* (η μόνη υπομονάδα του συμπλόκου III που κωδικοποιείται από το mtDNA). Οι 9 μεταλλάξεις ήταν διαφορετικές, όμως εκτός από μία η οποία ήταν έλλειψη, όλες οι υπόλοιπες ήταν μεταπτώσεις G→A. Δύο άλλοι ασθενείς παρουσίασαν παθογόνες μεταλλάξεις στο γονίδιο του κυτοχρώματος *b*. Ο ένας ήταν ένας 20-χρονος άντρας με συμπτώματα Parkinson και MELAS και μία κατά τα φαινόμενα de novo μικροέλλειψη στο γονίδιο του κυτοχρώματος *b* [De Coo IFM, et al (1999)]. Ο άλλος ήταν ένα κορίτσι νηπιακής ηλικίας που πέθανε λόγω ιστοκυτταροειδούς καρδιομυοπάθειας, σε δείγματα μύος από αυτό το κορίτσι βρέθηκε ανεπάρκεια του συμπλόκου III και μειωμένη συγκέντρωση αναγώγιμου κυτοχρώματος *b* [Paradimitriou A, et al (1984)]. Η μοριακή ανάλυση εντόπισε μία παρνοηματική μετάλλαξη (G15498A) στο γονίδιο του κυτοχρώματος *b* [Andreu AL, et al (2000)]. Είναι ενδιαφέρον να αναφέρουμε επίσης ότι μία άλλη μετάλλαξη στο γονίδιο του κυτοχρώματος *b* (G15243A) έχει συσχετιστεί με την σποραδική υπερτροφική καρδιομυοπάθεια [Valnot I, et al (1999)] [DiMauro S, Schon EA (2001)].

1.3.3 Επιβεβαίωση της παθογονικότητας των σημειακών μεταλλάξεων του mtDNA

Επειδή οι μεταλλάξεις του mtDNA εγκαθιδρύονται στον πληθυσμό με πολύ ταχύτερο ρυθμό σε σχέση με τις μεταλλάξεις στο πυρηνικό DNA (nDNA), το μιτοχονδριακό γονιδίωμα φιλοξενεί μεγάλο αριθμό ουδέτερων αλλαγών βάσεων οι οποίες δεν έχουν παθογονική σημασία αλλά μπορούν να αξιοποιηθούν σε ανθρωπολογικές μελέτες [Wallace DC et al (1999)] και στην ιατροδικαστική [Ivanov PL et al (1996)]. Όμως, αυτό το πλήθος ουδέτερων πολυμορφισμών δημιουργεί την ανάγκη να επιβεβαιώνεται η παθογονικότητα των νέων μεταλλάξεων που σχετίζονται με ασθένειες πέρα από κάθε αμφιβολία. Υπάρχουν τέσσερα "αναγνωρισμένα" κριτήρια που υποστηρίζουν την βλαβερή δράση μίας καινούριας μετάλλαξης: 1) Προφανώς, η μετάλλαξη δεν πρέπει να είναι ένας γνωστός ουδέτερος πολυμορφισμός. 2) Η αλλαγή βάσης πρέπει να επηρεάζει μία εξελικτικά συντηρημένη και λειτουργικά σημαντική θέση. 3) Οι βλαβερές

μεταλλάξεις συνήθως είναι ετεροπλασμικές, παρόλο που μερικές παθογόνες μεταλλάξεις είναι στην πραγματικότητα ομοπλασμικές. 4) Ο βαθμός ετεροπλασμίας σε διαφορετικά μέλη της οικογένειας θα πρέπει να συμφωνεί με την σοβαρότητα των συμπτωμάτων. Σε αυτά τα τέσσερα, μπορεί να προστεθεί ένα πέμπτο κριτήριο: η μέθοδος PCR της μίας ίνας (single fiber PCR) [Morales CT, Schon EA (1996)]. Αυτή η μέθοδος επιτρέπει την συσχέτιση του φορτίου μεταλλάξεων και της λειτουργικής ανωμαλίας, μέσω μηχανικού "μαδήματος" από τομές δειγμάτων μυών ιστολογικά φυσιολογικών και ανώμαλων ινών και μέσω μέτρησης της αφθονίας της μετάλλαξης σε κάθε ίνα μέσω της PCR. Οι ανώμαλες ίνες επιλέγονται με βάση τον εκτεταμένο πολλαπλασιασμό των μιτοχονδρίων (RRF) [DiMauro S, Schon EA (2001)].

1.3.4 Παθογένεση

Είναι λογικό ότι κάθε λειτουργική βλάβη της αναπνευστικής αλυσίδας, το σημαντικότερο μέρος του οξειδωτικού μεταβολισμού και η κύρια πηγή του κυτταρικού ATP, θα είναι παθογόνος. Αυτό που είναι πιο δυσνόητο είναι η σχέση γονότυπου/φαινοτύπου στις ασθένειες που σχετίζονται με το mtDNA. Η πιο απλή (ίσως απλοϊκή) διατύπωση του παραπάνω ερωτήματος είναι η εξής: γιατί θα πρέπει οι βλάβες σε ένα και μόνο μεταβολικό μονοπάτι, ενώ όλες φαινομενικά οδηγούν σε μία "ενεργειακή κρίση", να προκαλούν μία τόσο εκπληκτική ποικιλία συμπτωμάτων; Κάποιες εξηγήσεις δίνονται από τους ιδιόμορφους κανόνες της μιτοχονδριακής γενετικής, ειδικότερα της ετεροπλασμίας και του φαινομένου της ουδού. Για παράδειγμα, τα διαφορετικά πρότυπα επιδράσεων στους ιστούς ασθενών με την ίδια μοριακή βλάβη μπορεί να αποδοθεί στο διαφορετικό φορτίο μεταλλάξεων σε κάθε ιστό, ξεπερνώντας την ουδό παθογένειας σε κάποιους ιστούς αλλά όχι σε άλλους. Αυτό από ότι φαίνεται ισχύει για την μετάλλαξη "MELAS" A3243G, που προκαλεί τυπικό MELAS σε ένα μέλος της οικογένειας και μία ποικιλία ελαφρών συμπτωμάτων σε ολιγοσυμπτωματικούς συγγενείς από την πλευρά της μητέρας. Τα διαφορετικά φορτία μεταλλάξεων μπορούν να εξηγήσουν την διαφορετική σοβαρότητα των δύο εγκεφαλομυοπαθειών, NARP και MILS, όπου και οι δύο οφείλονται στην μετάλλαξη T8993G [Tatuch Y et al (1992)].

Οι εγκεφαλοπάθειες προκαλούν πολλά ερωτήματα, όπως: 1) γιατί η επιληψία παρουσιάζεται σχεδόν πάντα στα σύνδρομα MELAS και MERFF αλλά όχι στο KSS; 2) γιατί η μυοκλονία είναι τόσο κοινή στο MERFF; και 3) γιατί συμβαίνουν εγκεφαλικά στο MELAS; Με δεδομένη την ποικιλία των κυττάρων και την οργανωτική περιπλοκότητα του εγκεφάλου, κάποιος μπορεί να διατυπώσει μία παραλλαγή του μοτίβου ετεροπλασμίας/ φαινόμενο ουδού για να εξηγήσει τον επηρεασμό διαφορετικών ιστών. Επομένως, μπορεί να υποτεθεί ότι οι συγκεκριμένες μεταλλάξεις που σχετίζονται με το MELAS, το MERFF και το KSS μπορεί να συσσωρευθούν σε διαφορετικό βαθμό σε διαφορετικές περιοχές του εγκεφάλου, ξεπερνώντας τις ουδούς παθογένειας μόνο σε συγκεκριμένες δομές (π.χ. το χοριοειδές πλέγμα) ή σε ξεχωριστές περιοχές του φλοιού. Συγκριτικές ανοσοϊστοχημικές μελέτες που χρησιμοποιούσαν αντισώματα που αναγνώριζαν κωδικοποιούμενες από το mtDNA αντί κωδικοποιούμενες από το nDNA υπομονάδες της αναπνευστικής αλυσίδας δίνουν έμμεσα στοιχεία ότι αυτή η υπόθεση μπορεί να έχει κάποια αξία [Bonilla E, et al (1992), Bonilla E, et al (1996), Tanji K, et al (1999), Tanji K, Bonilla E (2000)].

Όμως, ακόμα και αν είχαμε την δυνατότητα να σχεδιάσουμε "χάρτες μεταλλάξεων" του εγκεφάλου οι οποίοι να μας έδιναν τις συχνότητες στο χώρο για διαφορετικές μεταλλάξεις, θα υπήρχε ακόμη το ερώτημα του γιατί συγκεκριμένες μεταλλάξεις θα πρέπει να "προτιμούν" ορισμένες περιοχές του εγκεφάλου. Γενικά, οι κανόνες της μιτοχονδριακής γενετικής δεν εξηγούν καλά το ζήτημα της "ειδικότητας του ιστού", για παράδειγμα, γιατί οι μεταλλάξεις σε ορισμένα γονίδια tRNA σχετίζονται κυρίως με την καρδιομυσπάθεια [DiMauro S, Hirano M (1998)]. Είναι πιθανόν τα γονίδια tRNA να έχουν και άλλο ρόλο εκτός από την μετάφραση του mtDNA, όπως συμβαίνει στο tRNA^{Leu(UUR)}, το οποίο έχει μία θέση τερματισμού της μεταγραφής για την σύνθεση rRNA [Kruse B, et al (1989)].

Η έλλειψη ζώων μοντέλων για μεταλλάξεις του mtDNA έχει εμποδίσει τις μελέτες για την παθογένεση *in vivo*. Ως υποκατάστατο, οι βιοχημικές και λειτουργικές συνέπειες των σημειακών μεταλλάξεων και ελλείψεων του mtDNA έχουν μελετηθεί σε κυτταρικές σειρές κυτταροπλασματικών υβριδίων (cybrid), δηλαδή, σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές από τις οποίες πρώτα έχει αφαιρεθεί το mtDNA τους και στις οποίες έπειτα προστέθηκαν διαφορετικά ποσοστά μεταλλαγμένων ή με ελλείψεις γονιδιωμάτων [King MP, Attardi G (1989)]. Ενώ αυτό το σύστημα έχει αποδειχθεί πολύτιμο, θα πρέπει να διατηρούνται κάποιες επιφυλάξεις όταν τα δεδομένα που προκύπτουν πρέπει να χρησιμοποιηθούν για να εξηγήσουν τι συμβαίνει στους ασθενείς. Για παράδειγμα, η υψηλή ουδός που έχει παρατηρηθεί σε κύτταρα cybrid που έχουν την μετάλλαξη MELAS A3243G φαίνεται να είναι πολύ χαμηλότερη *in vivo*. Συγκεκριμένα, σε μία μελέτη παρατηρήθηκε στους μύες της κνήμης ενός ολιγοσυμπτωματικού ασθενή μειωμένη μέγιστη παραγωγή ATP μέσω μέτρησης με φασματοσκοπία μαγνητικού συντονισμού, παρόλο του πολύ χαμηλού φορτίου μεταλλάξεων στα μιτοχόνδρια του μυός (χαμηλότερο από την προτεινόμενη ουδό για την συγκεκριμένη μετάλλαξη) [Chinnery PF et al (2000)] [DiMauro S, Schon EA (2001)].

1.3.5 Επιδημιολογία

Μέχρι πρόσφατα, οι μιτοχονδριακές μεταλλάξεις και οι μιτοχονδριακές ασθένειες θεωρούνταν ότι ήταν εξαιρετικά σπάνιες. Αυτές οι απόψεις δεν λάμβαναν υπόψη ότι οι μεταλλάξεις (κυρίως οι ουδέτερες) του μιτοχονδριακού γονιδιώματος είναι ένα εξαιρετικά σημαντικό εργαλείο στις μελέτες της εξελικτικής γενετικής, και ότι μπορούν να χρησιμοποιηθούν και στην ιατροδικαστική [Ivanov PL, et al (1996)]. Η αυξανόμενη ευκολία με την οποία το μιτοχονδριακό γονιδίωμα μπορεί να αναλυθεί, και η διαθεσιμότητα μίας πρότυπης αλληλουχίας του ανθρώπινου mtDNA [Andrews et al (1999)], έχουν βοηθήσει στην αναγνώριση των μιτοχονδριακών διαταραχών ως κοινή αιτία για την εμφάνιση γενετικών ασθενειών. Είναι παρόλα αυτά δύσκολο να εκτιμηθεί η πραγματική εξάπλωση των μιτοχονδριακών ασθενειών λόγω των πολλών διαφορετικών κλινικών τους χαρακτηριστικών, και την συμμετοχή πολλών μεταλλάξεων στην παθογένεια των ασθενειών αυτών. Σε μία μελέτη για την επιδημιολογία της σημειακής μετάλλαξης 3243A->G στην Φινλανδία βρέθηκε ότι περίπου 1 στα 6.000 άτομα φέρουν την μετάλλαξη [Majamaa K, et al (1998)]. Μία άλλη μελέτη για την επιδημιολογία των μιτοχονδριακών ασθενειών στον Βρετανικό πληθυσμό εκτίμησε ότι 1

στους 3.500 ανθρώπους είτε είχαν μιτοχονδριακή ασθένεια ή βρίσκονταν σε κίνδυνο να εκδηλώσουν μιτοχονδριακή ασθένεια [Schaefer AM, et al (2004)]. Παρόλα αυτά, οι παραπάνω εκτιμήσεις δεν περιλαμβάνουν την συσχέτιση μιτοχονδριακών μεταλλάξεων με κοινά κλινικά χαρακτηριστικά (για παράδειγμα, υπέρταση [Wilson FH, et al (2004)]), η οποία υποδεικνύει ότι η παρουσία των μεταλλάξεων αυτών στον πληθυσμό μπορεί να είναι πολύ μεγαλύτερη [Taylor RW, Turnbull DM (2005)].

1.4 Alzheimer

Η ασθένεια του Alzheimer (AD), γνωστή και ως γεροντική άνοια τύπου Alzheimer (SDAT), είναι η πιο κοινή μορφή άνοιας. Αυτή η ανίατη, εκφυλιστική, και καταληκτική ασθένεια περιγράφηκε για πρώτη φορά από τον Γερμανό ψυχίατρο και νευροπαθολόγο Alois Alzheimer το 1906 από τον οποίο πήρε το όνομά της [Berchtold NC, Cotman CW (1998)]. Γενικά, η ασθένεια διαγιγνώσκεται σε ανθρώπους ηλικίας άνω των 65 ετών [Brookmeyer R, et al (1998)], παρόλο η ασθένεια μπορεί να εμφανιστεί και σε μικρότερες ηλικίες. Το 2006, υπήρχαν 26,6 εκατομμύρια ασθενείς παγκοσμίως.

Τα κλινικά συμπτώματα που εμφανίζονται αρχικά συχνά θεωρείται ότι οφείλονται στην προχωρημένη ηλικία [Waldemar G, et al. (2007)]. Στα πρώιμα στάδια, το πιο κοινό αναγνωρίσιμο σύμπτωμα είναι δυσκολία στην ανάκληση πρόσφατων δεδομένων. Όταν υπάρχουν υποψίες για AD, η διάγνωση συνήθως επιβεβαιώνεται με δοκιμασίες της γνωστικής ικανότητας, οι οποίες σπανίως ακολουθούνται από την χρήση νευροαπεικονιστικών μεθόδων. Γενικότερα, η διάγνωση του AD απαιτεί έναν συνδυασμό ψυχολογικών δοκιμασιών, μεθόδων απεικόνισης και αποκλεισμό άλλων νευρολογικών διαταραχών, αλλά η οριστική διάγνωση μπορεί να γίνει μόνο κατά την νεκροψία. Κατά την εξέλιξη της ασθένειας, τα συμπτώματα που παρουσιάζονται περιλαμβάνουν σύγχυση, ευερεθιστότητα και επιθετικότητα, κυκλοθυμία, απώλεια της ευλωπτίας, απώλεια της μακροπρόθεσμης μνήμης, και η γενική αποξένωση του ασθενούς καθώς οι αισθήσεις του φθίνουν [Waldemar G, et al. (2007) & Tabert MH, et al (2005)] και σταδιακά, οι σωματικές λειτουργίες χάνονται.

Παθολογικά χαρακτηριστικά του Alzheimer

Τα παθολογικά χαρακτηριστικά του Alzheimer είναι η απώλεια των χολινεργικών νευρώνων, η παρουσία εξωκυτταρικών πλακών που περιέχουν το πεπτιδίο του βήτα αμυλοειδούς (Αβ) και η παρουσία νευροϊνιδίων, τα οποία αποτελούνται από μία υπερφωσφορυλιωμένη μορφή της πρωτεΐνης των μικροσωληνίσκων ταυ [Selkoe DJ (2001)].

Αναλυτικότερα, οι αμυλοειδείς πλάκες αποτελούνται από τα πεπτιδία Αβ, μήκους 39-43 αμινοξέων, τα οποία προέρχονται από πέψη μίας μεγαλύτερης πρωτεΐνης που ονομάζεται πρόδρομη πρωτεΐνη του αμυλοειδούς (APP), μία διαμεμβρανική πρωτεΐνη που βρίσκεται στην κυτταρική μεμβράνη των νευρώνων. Η APP είναι καθοριστικής σημασίας για την ανάπτυξη, την επιβίωση και την επιδιόρθωση του νευρώνα μετά από τραυματισμό [Priller C, et al (2006)] [Turner PR, et al (2003)]. Στο AD μία άγνωστη διεργασία προκαλεί την διάσπαση της APP σε μικρότερα τμήματα μέσω ενζυμικής πρωτεόλυσης [Hooper NM (2005)]. Ένα από αυτά τα τμήματα οδηγεί στην δημιουργία ινιδίων Αβ, τα οποία δημιουργούν συσσωματώματα που καθιζάνουν στο εξωτερικό των νευρώνων σε πυκνούς σχηματισμούς που ονομάζονται αμυλοειδείς πλάκες [Tiraboschi P, et al (2004)] [Ohnishi S, Takano K (2004)].

Η πρωτεΐνη ταυ σταθεροποιεί τους μικροσωληνίσκους όταν βρίσκεται σε φωσφορυλιωμένη μορφή, για

αυτό λέγεται ότι είναι μία σχετιζόμενη με τους μικροσωληνίσκους πρωτεΐνη. Οι μικροσωληνίσκοι αποτελούν μέρος του κυτταροσκελετού κάθε κυττάρου. Στους νευρώνες οι μικροσωληνίσκοι δρουν ως διάδρομοι, και έτσι καθοδηγούν την μεταφορά θρεπτικών στοιχείων και άλλων μορίων από το σώμα του νευρώνα στις συνάψεις του άξονα και αντίστροφα. Στο AD, η ταυ υπερφωσφορυλιώνεται και αρχίζει να συνδέεται με άλλα μόρια ταυ δημιουργώντας συσσωματώματα νευροϊνιδίων οδηγώντας έτσι στην ολική καταστροφή του συστήματος μεταφοράς των νευρώνων.

Δεν είναι ξεκάθαρο πως οι διαταραχές της παραγωγής και συσσώρευσης του Αβ οδηγούν στην παθολογία του AD [Van Broeck B, et al (2007)]. Η υπόθεση του αμυλοειδούς θεωρεί την συσσώρευση των πεπτιδίων Αβ ως το κεντρικό γεγονός στην πορεία της εκφύλισης των νευρώνων. Η συσσώρευση των συσσωματωμάτων ινιδίων αμυλοειδούς, τα οποία θεωρούνται ως η τοξική μορφή της πρωτεΐνης και είναι υπεύθυνα για την διαταραχή της ομοιόστασης των ιόντων ασβεστίου του κυττάρου, επάγει τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο (απόπτωση) [Yankner BA, et al (1990)]. Είναι επίσης γνωστό ότι το Αβ συσσωρεύεται επιλεκτικά στα μιτοχόνδρια των κυττάρων των εγκεφάλων ασθενών με Alzheimer, και καταστέλλει ορισμένες ενζυμικές λειτουργίες και την αξιοποίηση της γλυκόζης από τους νευρώνες [Chen X, Yan SD (2006)].

Γενετική του Alzheimer

Η πλειοψηφία των περιπτώσεων Alzheimer είναι σποραδικές, το οποίο σημαίνει ότι δεν κληρονομούνται γενετικά, παρόλα αυτά κάποια γονίδια πιθανώς δρουν ως παράγοντες κινδύνου. Από την άλλη πλευρά, περίπου 0,1% των περιπτώσεων είναι οικογενείς μορφές που παρουσιάζουν αυτοσωμική επικρατή κληρονομικότητα, και εμφανίζονται συνήθως πριν την ηλικία των 65 ετών [Blennow K, et al (2006)].

Η πλειοψηφία των αυτοσωμικών επικρατών οικογενών AD μπορεί να αποδοθεί σε μεταλλάξεις ενός από τρία γονίδια: το γονίδιο της πρόδρομης πρωτεΐνης του αμυλοειδούς (APP) και τα γονίδια της πρεσενιλίνης (PS) 1 και 2 [Waring SC, Rosenberg RN (2008)]. Οι περισσότερες μεταλλάξεις στα γονίδια APP και PS αυξάνουν την παραγωγή μίας μικρής πρωτεΐνης που ονομάζεται Αβ42, η οποία είναι το κύριο συστατικό των αμυλοϊδών πλακών [Selkoe DJ (1999)]. Μερικές από τις μεταλλάξεις απλά αλλάζουν τον λόγο μεγέθους μεταξύ της Αβ42 και των άλλων μείζονων - π.χ. Αβ40 - χωρίς να αυξάνουν τα επίπεδα της Αβ42 [Selkoe DJ (1999)] [Shioi J, et al. (2007)]. Αυτό υποδηλώνει ότι οι μεταλλάξεις του PS μπορούν να προκαλέσουν την ασθένεια με τρόπο ανεξάρτητο της επίδρασής τους στην παραγωγή του Αβ είτε λόγω της ύπαρξης κάποιων άλλων λειτουργιών της πρεσενιλίνης ή λόγω της πρόκλησης μεταβολών στην λειτουργία της APP και/ή των τμημάτων της εκτός του Αβ [Shioi J, et al. (2007)].

Οι περισσότερες περιπτώσεις της ασθένειας Alzheimer δεν παρουσιάζουν αυτοσωμική επικρατή κληρονομικότητα και χαρακτηρίζονται σποραδικό AD. Παρόλα αυτά γενετικές διαφορές μπορεί να δρουν ως παράγοντες κινδύνου. Ο πιο γνωστός γενετικός παράγοντας κινδύνου είναι η κληρονόμηση του ε4

αλληλομόρφου της απολιποπρωτεΐνης Ε (APOE) [Strittmatter WJ, et al (1993)] [Mahley RW, et al (2006)]. Περίπου το 40 με 80% των ασθενών με AD φέρουν τουλάχιστον ένα αλληλόμορφο apoE4 [Mahley RW, et al (2006)]. Το αλληλόμορφο APOE4 αυξάνει τον κίνδυνο εμφάνισης της νόσου κατά τρεις φορές στους ετεροζυγώτες και κατά 15 φορές στους ομοζυγώτες [Blennow K, et al (2006)]. Υπάρχει η γενική παραδοχή ότι πολλά άλλα γονίδια δρουν και αυτά ως παράγοντες κινδύνου ή έχουν προστατευτικά αποτελέσματα που επηρεάζουν την εξέλιξη της νόσου [Waring SC, Rosenberg RN (2008)]. Πάνω από 400 γονίδια έχουν εξεταστεί για συσχέτιση με το σποραδικό AD [Waring SC, Rosenberg RN (2008)], και τα περισσότερα δεν εμφάνισαν κάποια συσχέτιση [Blennow K, et al (2006)].

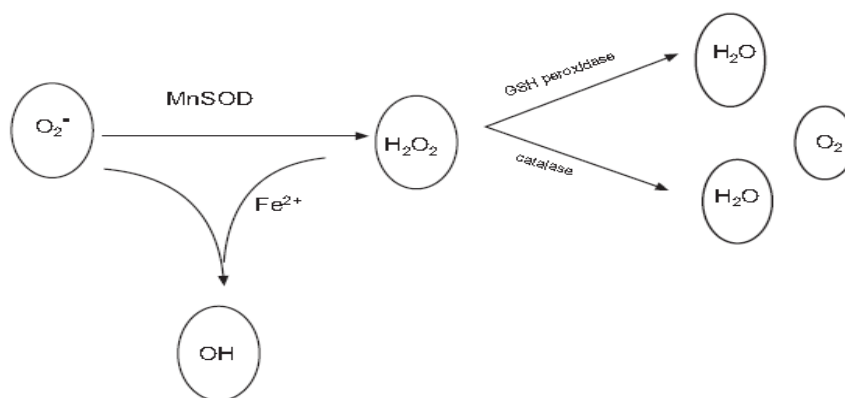
1.5 Η συμμετοχή των μιτοχονδρίων στο Alzheimer

Η πιο σημαντική λειτουργία του μιτοχονδρίου είναι η παραγωγή ενέργειας στην μορφή τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP), μέσω της λειτουργίας της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων (ETC) [DiMauro S, Schon EA (2003)]. Όμως, τα μιτοχόνδρια έχουν κεντρικό ρόλο και στον αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο, και φαίνεται ότι η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία έχει μεγάλη επίπτωση στην παθολογία αρκετών νευροεκφυλιστικών διαταραχών, όπως το Alzheimer (AD). Στη βιβλιογραφία συγκεντρώνονται όλο και περισσότερα στοιχεία που προτείνουν ότι στον εγκέφαλο και στους περιφερικούς ιστούς ασθενών με AD παρουσιάζεται μιτοχονδριακή δυσλειτουργία και οξειδωτικό στρες [Mancuso M, et al (2006)], και όλο και περισσότερα στοιχεία υποδεικνύουν ότι το οξειδωτικό στρες, το οποίο αυξάνεται στα μιτοχόνδρια που παρουσιάζουν βλάβη, είναι ένα πρώιμο γεγονός που σχετίζεται με την νευροεκφύλιση [Mancuso M, et al. (2006)]. Όμως παρόλο των στοιχείων που αναφέρουν την ύπαρξη μορφολογικών, βιοχημικών και μοριακών ανωμαλιών των μιτοχονδρίων σε διάφορους ιστούς ασθενών με AD, ο ρόλος του μιτοχονδριακού γονιδιώματος και των απλοτύπων του ως παράγοντες κινδύνου παραμένει αμφισβητήσιμος. Ακόμα υπάρχει αντιπαράθεση αν το οξειδωτικό στρες και η βλάβη των μιτοχονδρίων εμπλέκονται στην εκδήλωση και εξέλιξη των νευροεκφυλιστικών διαταραχών ή απλά είναι συνέπεια της νευροεκφύλισης [Mancuso M, et al (2008)].

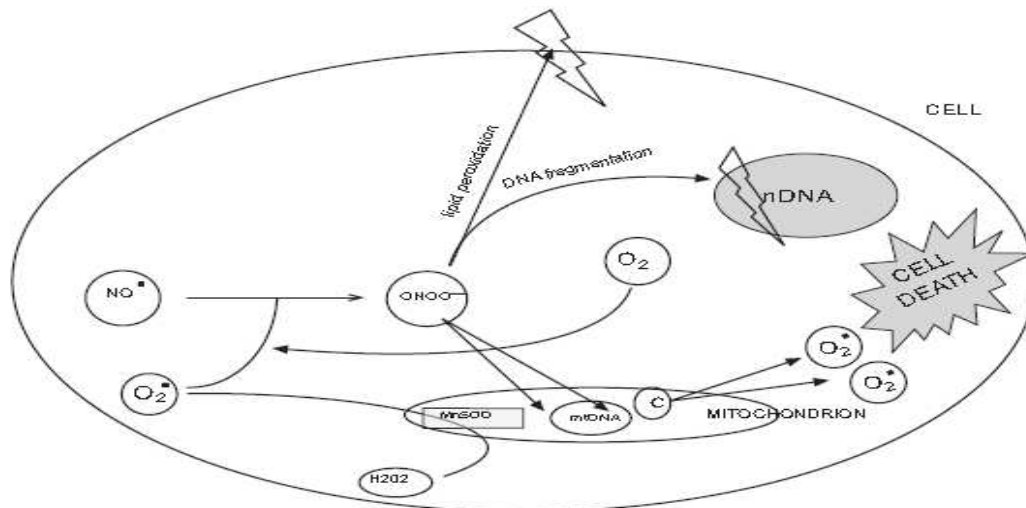
1.5.1 Βιοχημικές ανωμαλίες των μιτοχονδρίων στο Alzheimer

Η μεταφορά ηλεκτρονίων υψηλής ενέργειας μέσω της μιτοχονδριακής ETC είναι ένα απαραίτητο βήμα για την παραγωγή ATP, αλλά μπορεί να προκαλέσει επίσης την παραγωγή ενεργών ελευθέρων ριζών οξυγόνου (ROS). Στα σύμπλοκα I-III της αναπνευστικής αλυσίδας, τα ηλεκτρόνια υψηλής ενέργειας μπορούν να αντιδράσουν με μοριακό οξυγόνο (O_2) και να οδηγήσουν στον σχηματισμό υπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$) [Genova ML, et al (2004)]. Περίπου το 4-5% του O_2 που καταναλώνεται από υγιή μιτοχόνδρια μετατρέπεται σε υπεροξειδίο [Genova ML, et al (2004)], και αυτή η ποσότητα αυξάνεται σε μιτοχόνδρια που παρουσιάζουν βλάβη ή είναι γηρασμένα. Όταν η ETC παρεμποδίζεται τα ηλεκτρόνια συσσωρεύονται στα αρχικά στάδια της ETC (σύμπλοκο I και CoQ10), όπου αυτά προσφέρονται απευθείας στο μοριακό οξυγόνο

για να δημιουργήσουν ανιόντα υπεροξειδίου [Wong-Riley M, et al (1997)]. Η συσσώρευση ROS μπορεί να προκαλέσει βλάβη σε αρκετά βιομόρια, συμπεριλαμβανομένων λιπιδίων, πρωτεϊνών και νουκλεϊκών οξέων. Ο εγκέφαλος είναι πολύ πιο επιρρεπής στο οξειδωτικό στρες λόγω της αυξημένης κατανάλωσης οξυγόνου που συμβαίνει σε αυτόν [Mancuso M, et al (2006)]. Επίσης, σε σύγκριση με άλλους ιστούς, ο εγκέφαλος έχει χαμηλότερη ενεργότητα αντιοξειδωτικών ενζύμων όπως η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης και η καταλάση, και περιέχει αυξημένες συγκεντρώσεις πολυακόρεστων λιπαρών οξέων τα οποία είναι πολύ επιρρεπή σε λιπιδική υπεροξειδωση [Mancuso M, et al (2006)]. Τα υπεροξειδία μπορούν να αντιδράσουν με το μονοξείδιο του αζώτου (NO), ένα μόριο το οποίο στον εγκέφαλο δρα ως νευροδιαβιβαστής, για να σχηματίσει το υπεροξυνιτρώδες ανιόν (ONOO⁻), το οποίο είναι πολύ επιβλαβές για το DNA. Η συσσώρευση βλαβών στο nDNA και στο mtDNA θεωρείται ότι είναι πολύ επιβλαβής στα μεταμιτωτικά κύτταρα όπως οι νευρώνες, τα οποία δεν μπορούν να αντικατασταθούν μέσω ενός μηχανισμού κυτταρικής διαίρεσης. Όντως, οι αλλαγές των βάσεων στο mtDNA λόγω οξειδωτικής βλάβης θα μπορούσε πιθανώς να προκαλέσει βιοενεργητικές δυσλειτουργίες που οδηγούν στον θάνατο των νευρώνων [Weissman L, et al (2007)]. Τα κύτταρα διαθέτουν ένα περίπλοκο δίκτυο αμυντικών μηχανισμών (μιτοχονδριακή υπεροξειδική δισμουτάση του μαγγανίου, υπεροξειδάση της γλουταθειόνης και άλλα μόρια) για να αδρανοποιήσουν την εκτεταμένη συσσώρευση των ROS και, υπό φυσιολογικές συνθήκες, μπορούν να αντεπεξέλθουν με τις αυξομειώσεις των ROS [Mancuso M, et al (2007)]. Το οξειδωτικό στρες περιγράφει μία κατάσταση στην οποία οι κυτταρικές αντιοξειδωτικές άμυνες δεν επαρκούν για να διατηρήσουν τα επίπεδα των ROS χαμηλότερα από μία τοξική ουδό. Τα μονοπάτια του οξειδωτικού στρες και η σχέση μεταξύ του οξειδωτικού στρες, του μιτοχονδρίου και του κυτταρικού θανάτου φαίνονται στις Εικόνες 2 και 3.



Εικ. 2. Η παραγωγή ενεργών ελευθέρων ριζών οξυγόνου στο κύτταρο. Η μεταφορά των ηλεκτρονίων υψηλής ενέργειας διαμέσου του ETC μπορεί να είναι πηγή όχι μόνο του ATP αλλά και ROS, καθώς μπορούν να αντιδράσουν με O_2 για να σχηματιστεί υπεροξείδιο ($O_2^{\bullet-}$). Το ανιόν υπεροξειδίου αδρανοποιείται μέσω της μιτοχονδριακής υπεροξειδικής δισμουτάσης του Mn (MnSOD) και μετατρέπεται σε υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2). Το H_2O_2 είναι σχετικά πιο σταθερό από άλλες ελεύθερες ρίζες και είναι ένα από τα κυριότερα ενδοκυτταρικά ROS. Ενώ το H_2O_2 αποικοδομείται από την καταλάση ή την υπεροξειδάση της γλουταθειόνης σε νερό και οξυγόνο, το OH^{\bullet} (ρίζα υδροξυλίου) δημιουργείται μέσω των αντιδράσεων Fenton ή Haber-Weiss. [Από Mancuso M *et al.*, (2007)]



Εικ. 3. Ο μεταβολισμός του μονοξειδίου του αζώτου και ο κυτταρικός θάνατος που επάγεται από ROS. Υπό παθολογικές καταστάσεις που περιλαμβάνουν την παραγωγή ROS, το μονοξείδιο του αζώτου (NO) είναι ιδιαίτερα επιβλαβές και αυξάνει τις κυτταρικές βλάβες μέσω του σχηματισμού του ιδιαίτερα αντιδραστικού υπεροξυνιτρώδους ανιόντος (ONOO[•]). Το ONOO[•] και τα ROS μπορούν να προκαλέσουν βλάβη σε αρκετά βιομόρια, συμπεριλαμβανομένων των λιπιδίων, των πρωτεϊνών και των νουκλεϊκών οξέων, και μπορεί να ενεργοποιήσουν κυτταρικά μονοπάτια που οδηγούν στον κυτταρικό θάνατο. [Από Mancuso M *et al.*, (2007)]

Το mtDNA είναι ιδιαίτερα επιρρεπές στην οξειδωτική βλάβη λόγω της εγγύτητάς του στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη, στην οποία σχηματίζονται οξειδωτικές ουσίες, και λόγω της μη προστασίας του από ιστόνες και λόγω της ανεπαρκούς επιδιόρθωσής του. Επειδή αρκετά από τα γονίδια του mtDNA κωδικοποιούν υπομονάδες της μιτοχονδριακής αναπνευστικής αλυσίδας, οι οξειδωτικές βλάβες του mtDNA, αν δεν επιδιορθωθούν σωστά, μπορεί να οδηγήσουν σε μεταλλάξεις και ελλείψεις που διαταράσσουν την λειτουργία των γονιδίων που εμπλέκονται στην παραγωγή του ATP, οδηγώντας τελικά σε μιτοχονδριακές δυσλειτουργίες, αυξημένη παραγωγή ROS, και κυτταρικό θάνατο [Mancuso M, *et al* (2007)].

Όλο και περισσότερα στοιχεία υποδεικνύουν ότι η οξείδωση του DNA και του RNA λόγω του οξειδωτικού στρες παίζουν ρόλο στην παθοφυσιολογία του AD [Mancuso M, *et al* (2007)]. Σε εγκεφάλους με AD έχει ακόμα παρατηρηθεί αυξημένη υπεροξείδωση των λιπιδίων της κυτταρικής μεμβράνης, σχηματισμός καρβονυλίων στις πρωτεΐνες, αυξημένα επίπεδα νιτροτυροσίνωσης [Guix FX, *et al* (2005)] και αυξημένα επίπεδα 8-υδροξυ-2'-δεοξυγουανοσίνης (8-OHdG) στο nDNA και στο mtDNA [Mecocci P, *et al* (1994)]. Επειδή τα RNA είναι κυρίως μονόκλωνα και πιθανώς λιγότερα προστατευμένα από το DNA, ίσως είναι περισσότερο επιρρεπή στην οξειδωτική βλάβη. Ανοσοκυτταροχημικές μελέτες αποκάλυψαν ότι η περιφερειακή κατανομή της οξείδωσης του RNA στον εγκέφαλο ήταν σύμφωνη με την επιλεκτική περιφερειακή ευπάθεια των νευρώνων στο AD [Nunomura A, *et al* (1999)]. Υπήρχαν αυξημένα επίπεδα 8-υδροξυγουανοσίνης (8-OHG) στον ιππόκαμπο και στον εγκεφαλικό νεοφλοιό στο AD, ενώ δεν παρατηρήθηκαν αλλαγές στα επίπεδα 8-OHG στην παρεγκεφαλίδα [Nunomura A, *et al* (1999)]. Τα οξειδωμένα RNA εντοπίζονται κυρίως σε νευρωνικά και ενδοθηλιακά κύτταρα και λιγότερο στα κύτταρα γλοίας [Nunomura A, *et al* (2004)]. Η πρώιμη εμπλοκή της οξείδωσης του RNA στην παθοφυσιολογία της ασθένειας υποδεικνύει ότι το οξειδωμένο RNA έχει έναν κύριο ρόλο στην νευροεκφύλιση [Nunomura A, *et al* (1999), Nunomura A, *et al* (2004)]. Παρουσιάζει ενδιαφέρον το γεγονός ότι τα επίπεδα του 8-OHG είναι

αντιστρόφως ανάλογα της ποσότητας των ενδοκυτταρικών ολιγομερικών μορφών του Αβ, το οποίο υποδεικνύει μία περίπλοκη αλληλεπίδραση μεταξύ των ROS και του Αβ [Nunomura A, et al (2004)].

Μία πρόσφατη μελέτη έδειξε i) ότι το mtDNA είχε κατά προσέγγιση 10 φορές υψηλότερα επίπεδα οξειδωμένων βάσεων σε σύγκριση με το nDNA, ii) ότι η γουανίνη είναι η πιο επιρρεπής βάση σε βλάβες του DNA, και iii) ότι τα επίπεδα πολλαπλών οξειδωμένων βάσεων ήταν σημαντικά αυξημένα σε δείγματα εγκεφάλων με AD σε σύγκριση με τα δείγματα ελέγχου [Wang J, et al (2005)]. Ακόμα, με την χρήση της πρωτεομικής ταυτοποιήθηκαν οξειδωμένες πρωτεΐνες, των οποίων η τροποποιημένη λειτουργία είναι σύμφωνη με την ασθένεια [Butterfield DA (2004)].

Η ελαφρά γνωστική εξασθένηση (MCI) είναι μία κλινική κατάσταση μεταξύ της κανονικής γήρανσης και του AD, που χαρακτηρίζεται από απώλεια μνήμης χωρίς απώλεια των γενικών γνωστικών και λειτουργικών δεξιοτήτων. Αρκετές πρόσφατες μελέτες σε ασθενείς με MCI υποδεικνύουν ότι η οξειδωτική βλάβη μπορεί να είναι ένα από τα πιο πρώιμα γεγονότα στην διαδικασία νευροεκφύλισης που οδηγεί σε AD [Keller JN, et al (2005), Wang J, et al (2006), Migliore L, et al (2005)]. Μία μελέτη που αξιολόγησε τα επίπεδα πρωτοπαθούς και οξειδωτικής βλάβης του DNA σε λευκοκύτταρα ατόμων με AD, MCI και υγιών ατόμων ελέγχου έδειξε ότι τα επίπεδα και της πρωτοπαθούς βλάβης του DNA και των οξειδωμένων βάσεων ήταν σημαντικά αυξημένα στους ασθενείς με AD και MCI, σε σύγκριση με τα άτομα ελέγχου [Mancuso M, et al (2008)]. Αυτό δίνει ακόμα περισσότερες ενδείξεις ότι η οξειδωτική βλάβη, τουλάχιστον στο επίπεδο του DNA, είναι πιο πρώιμο γεγονός στην παθογένεση του AD [Migliore L, et al (2005)]. Δεν είναι ακόμα ξεκάθαρο αν η αυξημένη οξειδωτική βλάβη στο MCI και στο AD αντιπροσωπεύει μία επιτάχυνση του "φυσιολογικού" σχετιζόμενου με την ηλικία οξειδωτικού στρες ή αν οφείλεται σε εναλλακτικά μονοπάτια [Ding Q, et al (2007)].

Η οξειδωτική βλάβη του DNA απομακρύνεται κυρίως μέσω της διαδικασίας επιδιόρθωσης του DNA μέσω εκτομής βάσεων (BER) [Altieri F, et al (2008)]. Σημαντικά στοιχεία υποδεικνύουν ότι η BER παίζει έναν πρωταρχικό ρόλο στην ανάπτυξη και ομοίωση του εγκεφάλου, και ότι πιθανές ανισορροπίες στις ενεργότητες του BER μπορεί να συμβάλλουν στην απώλεια νευρώνων [Weissman L, et al (2007), Altieri F, et al (2008)]. Η BER λαμβάνει χώρα είτε στον πυρήνα ή στα μιτοχόνδρια. Τα μιτοχόνδρια διαθέτουν ανεξάρτητο μηχανισμό BER, που κωδικοποιείται από πυρηνικά γονίδια. Αρκετά ένζυμα BER έχουν και πυρηνικές και μιτοχονδριακές μορφές. Η pol γ είναι η μόνη DNA πολυμεράση που εντοπίζεται στα μιτοχόνδρια και μπορεί να καταλύσει την απομάκρυνση του 5' φωσφοσακχάρου, μία απαραίτητη ενεργότητα για την μικρής εμβέλειας BER [Weissman L, et al (2007)]. Το τελικό βήμα στην διαδικασία BER είναι το κλείσιμο της εγκοπής που απομένει μετά την δράση των DNA πολυμερασών. Ενώ στον πυρήνα δρουν δύο διαφορετικές DNA λιγάσες, λιγάση I και λιγάση III, μόνο η λιγάση III δρα στα μιτοχόνδρια, όπου συμμετέχει στην μικρής εμβέλειας μιτοχονδριακή BER [Lakshmirathy U, Campbell C (2001)]. Αρκετές μελέτες έχουν προτείνει ότι η ελαττωματική επιδιόρθωση του DNA μπορεί να είναι κρίσιμη στην αιτιολογία του AD [Lovell MA, et al (1999), Lovell MA, et al (2000), Jacobsen E, et al (2004), Davydov V, et al

(2003)]. Η μειωμένη ικανότητα λειτουργίας της BER και η μείωση της ελεύθερης 7,8-διυδρο-2-δεοξυγουανοσίνης, ένα παραπροϊόν της διαδικασίας BER, που παρατηρούνται στον εγκέφαλο ασθενών με AD, σχετίζονται με αυξημένα επίπεδα μη επιδιορθωμένου DNA [Fishel ML, et al (2007)]. Μία μείωση της ενεργότητας ενός ή περισσότερων ενζύμων BER μπορεί να οδηγήσει στην συσσώρευση μεταλλάξεων στο nDNA και στο mtDNA, οδηγώντας τελικά στην παραγωγή τροποποιημένων πρωτεϊνών και στην νευροεκφύλιση [Wilson DM 3rd, Bohr VA (2007)]. Όμως, οι πολυμορφισμοί στα γονίδια της επιδιόρθωσης του DNA δεν έχουν ακόμα συσχετιστεί σημαντικά με το AD [Dogru-Abbasoglu S, et al (2006), Coppédè F, et al (2007)]. Το ερώτημα αν το AD σχετίζεται ή όχι με αλλαγές στο μονοπάτι BER παραμένει ένα ενδιαφέρον ζήτημα, και επιπλέον μελέτες πρέπει να γίνουν για να διευκρινιστεί αυτό το ζήτημα [Weissman L, et al (2007)].

Ακόμα, έχει μελετηθεί η πιθανή επίδραση των μετάλλων στις νευροεκφυλιστικές ασθένειες [Coppédè F, et al (2006)]. Ο προκαλούμενος από μέταλλα σχηματισμός ROS (διαδικασία Fenton) μπορεί να συμβάλλει στο οξειδωτικό στρες. Μέταλλα, όπως σίδηρος, χαλκός, και μαγγάνιο, είναι απαραίτητα στην πλειοψηφία των κυτταρικών αντιδράσεων, και ο εγκέφαλος είναι το πιο ικανό όργανο στο να συγκεντρώνει μέταλλα [Coppédè F, et al (2006)]. Η ομοιόσταση του ψευδαργύρου, του χαλκού και του σιδήρου υπόκειται σε αλλαγές στον εγκέφαλο ατόμων με AD, και υπό ελαφρά όξινες συνθήκες, όπως αυτές που θεωρείται ότι επικρατούν στον εγκέφαλο με AD, αυτά τα μεταλλικά ιόντα έχει παρατηρηθεί ότι επάγουν την συσσωμάτωση του Αβ, υποδηλώνοντας έτσι την πιθανή τους εμπλοκή στον σχηματισμό των συσσωματωμάτων Αβ στον εγκέφαλο με AD [Cherny RA, et al (1999)]. Πρόσφατα αποτελέσματα επίσης υποστηρίζουν την ιδέα ότι η οξειδωτική βλάβη στις πλάκες του αμυλοειδούς μπορεί να είναι αποτέλεσμα της διαδικασίας Fenton η οποία καταλύεται από την συντοποθέτηση των πεπτιδίων Αβ με μέταλλα όπως Fe(II)/Fe(III) και Al(III) [Khan A, et al (2006)]. Έχει ήδη αναφερθεί ο ρόλος της οξειδωτικής μεταβολής του RNA στο AD [Nunomura A, et al (1999), Nunomura A, et al (2004)]. Σε μία μελέτη χρησιμοποιήθηκε χρώση 3,3'-διαμινοβενζιδίνης (DAB) [Sayre LM, et al (2000)] και χρώση Fe(II) {μία τροποποίηση της αντίδρασης μπλε της Πρωσίας (Prussian blue) [Smith MA, et al (1997)]} για την ανίχνευση in situ της ενεργότητας οξειδοαναγωγής και δισθενούς σιδήρου αντίστοιχα σε δείγματα ιστών εγκεφάλων με AD τα οποία έπειτα υπέστησαν επεξεργασία με RNase A (η επεξεργασία με RNase A καταστρέφει το RNA που υπάρχει στον ιστό). Στο κυτταρόπλασμα των νευρώνων του ιππόκαμπου παρατηρήθηκε σημαντικά υψηλότερη ενεργότητα οξειδοαναγωγής και χρώση Fe(II) σε σύγκριση με άτομα ελέγχου ίδιας ηλικίας. Και οι δύο παραπάνω χρώσεις μειώθηκαν ή/και εξαφανίστηκαν μετά την επεξεργασία με RNase [Honda K, et al (2005)]. Αυτό υποδηλώνει μία φυσιολογική συγγένεια του Fe(II) με το RNA. Το rRNA πιθανώς προσφέρει τον μεγαλύτερο αριθμό θέσεων πρόσδεσης σιδήρου μεταξύ των κυτταροπλασματικών RNA. Αντακλώντας την διαφορά της ικανότητας πρόσδεσης σιδήρου, η οξείδωση του rRNA από την αντίδραση Fenton δημιούργησε 13 φορές περισσότερη 8-υδρόξυ-2'-δεοξυγουανοσίνη (8-OHdG) από την οξείδωση του tRNA [Honda K, et al (2005)]. Επομένως, ο σίδηρος που προσδένεται στο RNA (και ειδικότερα στο rRNA) φαίνεται να παίζει έναν καίριο ρόλο στην οξείδωση

του RNA σε επιρρεπείς νευρώνες στον εγκέφαλο με AD [Honda K, et al (2005)] [Mancuso M, et al (2008)].

Στους ασθενείς με AD, οι μετρήσεις φθοροδεοξυγλυκόζης μέσω τομογραφία εκπομπής ποζιτρονίων (FDG PET) δείχνουν περιφερειακές μειώσεις του εγκεφαλικού μεταβολικού ρυθμού της γλυκόζης, οι οποίες φαίνεται να σχετίζονται με τις κλινικές αναπηρίες των ασθενών με AD και μπορεί ακόμα να παρουσιαστούν δεκαετίες ολόκληρες πριν την εμφάνιση των κλινικών συμπτωμάτων [Azari NP, et al (1993)]. Ο μειωμένος εγκεφαλικός μεταβολισμός έχει παρατηρηθεί στους βρεγματικούς φλοιούς, και έχει προηγηθεί και της νευροφυσιολογικής βλάβης και της ατροφίας του φλοιού που εντοπίστηκαν με παραδοσιακές μεθόδους νευροαπεικόνισης [Blass JP, et al (2000)].

Σε συμφωνία με αυτές τις μελέτες, έχει παρατηρηθεί μειωμένη χρήση της γλυκόζης σε ινοβλάστες δέρματος ασθενών με AD [Wallace DC (1999)]. Καθώς τα μιτοχόνδρια είναι τα εργοστάσια παραγωγής ενέργειας όλων των κυττάρων, βλάβες στα μιτοχόνδρια αναπόφευκτα θα βλάψουν τον μεταβολισμό για την παραγωγή ενέργειας. Το κύριο μονοπάτι για την οξειδωση της γλυκόζης στον εγκέφαλο είναι ο κύκλος του τρικαρβοξυλικού οξέος (TCA) (κύκλος του Krebs), οποίος λαμβάνει χώρα στα μιτοχόνδρια. Η οξειδωτική αποκαρβοξυλίωση του πυρουβικού, του προϊόντος της γλυκόλυσης, από το σύμπλοκο της αφυδρογονάσης του πυρουβικού (PDHC), παρέχει ακέτυλο-CoA για να ξεκινήσει ο κύκλος TCA, ο οποίος περιλαμβάνει οκτώ διαφορετικά ένζυμα. Η ανεπάρκεια στα δύο κύρια ένζυμα του βήματος που καθορίζει την ταχύτητα του κύκλου TCA, το PDHC και το σύμπλοκο της αφυδρογονάσης του α-κετογλουταρικού (KGDHC), μπορεί να εξηγήσει τις παρατηρούμενες βλάβες του μεταβολισμού της γλυκόζης στους εγκέφαλους με AD [Gibson GE, et al (2000), Bubber P, et al (2005)]. Άλλες αλλαγές που παρατηρούνται σε εγκέφαλους με AD περιλαμβάνουν την μειωμένη ενεργότητα της ισοκιτρικής αφυδρογονάσης και την αυξημένη ενεργότητα της αφυδρογονάσης του ηλεκτρικού και της αφυδρογονάσης του μηλικού [Bubber P, et al (2005)]. Όλες αυτές οι αλλαγές που παρατηρούνται στις ενεργότητες του κύκλου TCA συσχετίζονται με την κλινική κατάσταση, υποδηλώνοντας ότι μπορούν να οδηγήσουν σε μειωμένο μεταβολισμό του εγκεφάλου οδηγώντας έτσι στην εκφύλιση της εγκεφαλικής λειτουργίας [Bubber P, et al (2005)].

Μία πρόσφατη μελέτη του τρανσκριπτώματος σύγκρινε την έκφραση 80 σχετιζόμενων με τον μεταβολισμό πυρηνικών γονιδίων σε εγκέφαλους ατόμων με AD και φυσιολογικών ατόμων ελέγχου [Liang WS, et al (2008)]. Τα άτομα με AD είχαν σημαντικά μειωμένη έκφραση των πυρηνικών γονιδίων που κωδικοποιούσαν υπομονάδες της μιτοχονδριακής ETC στον οπίσθιο φλοιό του προσαγωγίου, στην μέση βρεγματική έλικα, στα κύτταρα CA1 του ιππόκαμπου, στον ενδορινικό φλοιό, και σε άλλες περιοχές του εγκεφάλου [Liang WS, et al (2008)]. Στυπώματα Western επιβεβαίωσαν την υποέκφραση των υπομονάδων της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων (ETC) [Liang WS, et al (2008)]. Επομένως, οι μεταβολικές ανωμαλίες σε μελέτες για το AD με χρήση FDG PET σχετίζονται με μειωμένη νευρωνική έκφραση των πυρηνικών γονιδίων που κωδικοποιούν υπομονάδες της μιτοχονδριακής ETC [Mancuso M, et al (2008)].

1.5.2 Μορφολογικές αλλαγές των μιτοχονδρίων στο Alzheimer

Έχουν αναφερθεί μορφολογικές αλλαγές στα μιτοχόνδρια των νευρώνων στο AD. Σε μία μελέτη που εξέτασε εγκεφάλους 22 ατόμων με AD, η πλειοψηφία των μιτοχονδρίων στον εγκεφαλικό και παρεγκεφαλιδικό φλοιό και στους βασικούς πυρήνες παρουσίαζαν διατάραξη των περιοχών μεταξύ των πτυχώσεων της εσωτερικής μεμβράνης ή οσμιοφιλικά έγκλειστα [Baloyannis SJ (2006)]. Μορφομετρικές μελέτες των μιτοχονδρίων αποκάλυψαν μία σημαντική μείωση της πυκνότητας των μιτοχονδρίων στα ενδοθηλιακά κύτταρα όπως και στους ινοβλάστες που λήφθηκαν από ασθενείς με AD [Stewart P, et al (1992)].

Πιο αναλυτικά, εξέταση της δομής των μιτοχονδρίων έδειξε ότι τα κυτταροπλασματικά υβριδικά (cybrid) κύτταρα του AD περιείχαν σημαντικά αυξημένο ποσοστό διογκωμένων μιτοχονδρίων τα οποία είχαν ωχρή μήτρα και πολύ λίγες πτυχώσεις της εσωτερικής μεμβράνης [Trimmer PA, Borland MK (2005)]. Η μέση ταχύτητα της μιτοχονδριακής και λυσοσωματικής κίνησης, όπως και το ποσοστό των κινούμενων μιτοχονδρίων, ήταν σημαντικά μειωμένα στα κυτταροπλασματικά υβρίδια του AD [Trimmer PA, Borland MK (2005)]. Επομένως, η κίνηση των μιτοχονδρίων προς τις συνάψεις ίσως είναι ελαττωματική στο AD. Βρέθηκαν και άλλα παθολογικά χαρακτηριστικά όπως κρυσταλλοειδή ενδομιτοχονδριακά έγκλειστα και κυτταροπλασματικά έγκλειστα σωμάτια [Trimmer PA, Borland MK (2005)]. Ακόμα, μία πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι τα μιτοχόνδρια είναι στόχοι κλειδιά της αυξημένης αυτοφαγικής αποικοδόμησης στο Alzheimer [Moreira PI, et al (2007)a, Moreira PI, et al (2007)b].

Σε ζώα μοντέλα του AD η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία φαίνεται να είναι ένα πρώιμο γεγονός, το οποίο έπειτα επιταχύνεται σημαντικά με την γήρανση [Hauptmann S, et al (2009)]. Η πιο κοινή βλάβη στην ενεργότητα των μιτοχονδριακών ενζύμων στο AD αφορά το σύμπλοκο IV της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων (ETC), δηλαδή την οξειδάση του κυτοχρώματος *c* (COX) [Castellani R, et al (2002)]. Οι βλάβες στην ETC παρεμποδίζουν την παραγωγή του ATP και αυξάνουν την παραγωγή των ενεργών ελευθέρων ριζών οξυγόνου (ROS). Ελλιπής ενεργότητα της COX έχει αναφερθεί από αρκετές μελέτες σε διαφορετικές περιοχές του εγκεφάλου [Wong-Riley M, et al (1997), Mutisya EM, et al (1994), Simonian SA, Hyman BT (1994), Maurer I, et al (2000), Bosetti F, et al (2002)], όπως και στα αιμοπετάλια και τους ινοβλάστες ασθενών με AD [Bosetti F, et al (2002), Parker W Jr, et al (1990), Cardoso SM, et al (2004), Valla J, et al (2006)]. Βρέθηκε ακόμα ότι η ενεργότητα της COX, αλλά όχι της F1F10-ATPase (σύμπλοκο V), ήταν μειωμένη στον ιππόκαμπο και στα αιμοπετάλια περιπτώσεων σποραδικού AD [Bosetti F, et al (2002), Mancuso M, et al (2003)], και ότι η μειωμένη ενεργότητα COX θα μπορούσε να έχει λειτουργικές συνέπειες στον ενεργειακό μεταβολισμό [Mancuso M, et al (2003)].

Σε μία μελέτη για να εκτιμηθεί αν η γενετικά προκαλούμενη ανεπάρκεια του συμπλόκου IV (COX) επηρεάζει το οξειδωτικό στρες και την συσσώρευση του Αβ, δημιουργήθηκαν ποντίκια με νευρωνοειδική επαγωγή απενεργοποίηση του γονιδίου *COX10* τα οποία μετά διασταυρώθηκαν με ποντίκια μοντέλα για το

AD. Έτσι δημιουργήθηκε ένα μοντέλο του AD με ανεπάρκεια του συμπλόκου IV (ποντίκια COXd/AD) [Fukui H, et al (2007)]. Το COX10 είναι μία υπομονάδα του συμπλόκου IV που κωδικοποιείται από το nDNA (ενώ το mtDNA κωδικοποιεί τις υπομονάδες COXI, COXII, COXIII). Τελικά, σε αντίθεση με ότι αναμενόταν, οι εγκέφαλοι των ποντικών COXd/AD εμφάνισαν λιγότερες αμυλοειδείς πλάκες, μειωμένη εναπόθεση Αβ και μειωμένη οξειδωτική βλάβη, σε σύγκριση με τα ποντίκια AD [Fukui H, et al (2007)]. Επομένως, ένα κύριο ελάττωμα του συμπλόκου IV δεν φαίνεται να συμβάλλει στο οξειδωτικό στρες και στην παθολογία του AD [Fukui H, Moraes CT (2008)]. Αυτή η παρατήρηση δεν αποκλείει μία δευτερεύουσα ανεπάρκεια του COX (π.χ. προκαλούμενη από οξειδωτική βλάβη του mtDNA) να παίζει κάποιο ρόλο στον φαύλο κύκλο που οδηγεί στην νευροεκφύλιση.

Η συμμετοχή των άλλων μιτοχονδριακών συμπλόκων της ETC έχει μελετηθεί λιγότερο και είναι περισσότερο αμφιλεγόμενη. Π.χ. τα μιτοχόνδρια που απομονώθηκαν από αιμοπετάλια ασθενών με AD έχουν μειωμένα επίπεδα ATP, αλλά δεν φαίνεται να διαφέρουν σε σχέση με τα μιτοχόνδρια των φυσιολογικών ατόμων στις ενεργότητες της οξειδοαναγωγής της NADH-ουβικινόνης (σύμπλοκο I) ή της αφυδρογονάσης του ηλεκτρικού (σύμπλοκο II) ή της αναγωγής του cyt c (σύμπλοκο III) [Cardoso SM, et al (2004)] [Mancuso M, et al (2008)].

Οι υπομονάδες της οξειδάσης του κυτοχρώματος c (COX) κωδικοποιούνται και από το nDNA και από το mtDNA, επομένως η χαμηλή ενεργότητα της COX μπορεί να προκύψει από αλλαγές στο nDNA, στο mtDNA ή στον μηχανισμό αναγνώρισης ή εισαγωγής των πρωτεϊνών διαμέσου της μιτοχονδριακής μεμβράνης. Για την καλύτερη κατανόηση της προέλευσης των βιοενεργητικών ελαττωμάτων στο AD (προέρχονται από το mtDNA ή από άλλους παράγοντες;), αναπτύχθηκαν τα μοντέλα των κυτταροπλασματικών υβριδίων. Στην τεχνική των κυτταροπλασματικών υβριδίων ("cybrid"), κύτταρα σε καλλιέργεια τα οποία έχουν χάσει το ενδογενές mtDNA (ρ0 κύτταρα) αποκτούν μιτοχόνδρια (με το δικό τους mtDNA) από ασθενείς με AD και από φυσιολογικά άτομα [King MP, Attardi G (1989)]. Οι φαινοτυπικές διαφορές μεταξύ των κυτταρικών σειρών cybrid προκαλούνται από το mtDNA του δότη, και όχι από το nDNA ή περιβαλλοντικούς παράγοντες.

Οι μελέτες με κυτταροπλασματικά υβρίδια δείχνουν ότι οι ενζυματικές βλάβες μπορούν να μεταφερθούν σε κύτταρα χωρίς mtDNA, εμπλέκοντας έτσι τις μεταλλάξεις του mtDNA. Το mtDNA από αιμοπετάλια ατόμων με AD, όταν εκφράζεται στο κυτταροπλασματικά υβρίδια, μειώνει την ενεργότητα της COX (ενώ η ενεργότητα της κιτρικής συνθάσης παραμένει αμετάβλητη), μειώνει τα επίπεδα του ATP και αυξάνει το οξειδωτικό στρες [Swerdlow RH, et al (1997)].

Επίσης, τα κυτταροπλασματικά υβρίδια του σποραδικού AD υπερπαράγουν τα μείζονα αμυλοειδογενή πεπτιδία Αβ (1-40, 1-42) με έναν εξαρτώμενο από τις κασπάσες τρόπο, και συσσωρεύουν αμυλοειδείς εναποθέσεις Congo red [Khan SM, et al (2000)], μιμούμενα τις αμυλοειδείς πλάκες που παρατηρούνται στον εγκέφαλο με AD. Οι αλλαγές στην οξειδωτική κατάσταση καθιστούν τα κυτταροπλασματικά υβρίδια του AD πιο επιρρεπή στην απόπτωση που επάγεται από το Αβ 1-40, πιθανώς λόγω μίας υπερβολικής μείωσης

του μιτοχονδριακού μεμβρανικού δυναμικού (Ψ), οδηγώντας στην απελευθέρωση από το μιτοχόνδριο του *cyt c* και στην ενεργοποίηση των κασπασών [Cardoso SM, et al (2004), Onyango IG, et al (2005)a]. Οι αυθόρμητες αλλαγές στα μονοπάτια κυτταρικού θανάτου και απόπτωσης που παρατηρούνται στα κυτταροπλασματικά υβρίδια του AD μπορούν να αναπαραχθούν με την έκθεση κυτταροπλασματικών υβριδίων των οποίων το mtDNA δεν προήλθε από μιτοχόνδρια του AD σε εξωγενή συσσωμάτωση βήτα αμυλοειδούς ή σε οξειδωτικό στρες [Onyango IG, et al (2005)a, Onyango IG, et al (2005)b].

Σε μακροπρόθεσμη καλλιέργεια τα κυτταροπλασματικά υβρίδια του AD αναπτύσσουν πληθυσμούς μιτοχονδρίων με ανωμαλίες ή βλάβες, (με χαμηλότερο Ψ σε σχέση με τα δείγματα ελέγχου), χειροτερεύουν την βιοενεργητική εξασθένηση και αυξάνουν την αντιγραφή του mtDNA [Trimmer PA, et al (2004)]. Οι αυθόρμητες διακυμάνσεις του Ψ , οι οποίες αντιπροσωπεύουν την σύνδεση μεταξύ της ροής των ηλεκτρονίων, της σύνθεσης του ATP (από την FOF1 ATP συνθάση) και της εξώθησης ασβεστίου από το μιτοχόνδριο, μειώνονται στα κυτταροπλασματικά υβρίδια του σποραδικού AD [Thiffault C, Bennett JP Jr (2005)]. Αυτό υποδηλώνει ότι η έκφραση του mtDNA του AD παράγει μία πιο περίπλοκη βιοενεργητική εξασθένηση από μια απλή μείωση της καταλυτικής ενεργότητας του συμπλόκου IV και μπορεί να οδηγήσει σε εξασθενημένη σύνθεση ATP και εξώθηση ασβεστίου από τα μιτοχόνδρια.

Από την άλλη πλευρά, μία άλλη μελέτη βρήκε ότι όλοι οι κλώνοι κυτταροπλασματικών υβριδίων με mtDNA που προήλθε από αιμοπετάλια ή ιστούς εγκεφάλου από ασθενείς με AD αποκατέστησαν την ενεργότητα της μιτοχονδριακής αναπνοής σχεδόν στα ίδια επίπεδα με αυτών των κλώνων κυτταροπλασματικών υβριδίων με mtDNA από φυσιολογικά άτομα ελέγχου ίδιας ηλικίας. Αυτό υποδηλώνει ότι υπάρχει δομική ακεραιότητα του mtDNA και στα αιμοπετάλια και στους εγκεφαλικούς ιστούς των ηλικιωμένων ατόμων με AD [Ito S, et al (1999)].

Η πλειοψηφία των παραπάνω μελετών δείχνουν ότι οι κυτταρικές σειρές κυτταροπλασματικών υβριδίων του σποραδικού AD εκφράζουν τον μορφολογικό και βιοχημικό φαινότυπο που παρατηρείται *in vivo* και στον εγκεφαλικό ιστό στο σποραδικό AD. Αυτό ενισχύει την άποψη ότι αλλαγές στο mtDNA μπορεί να είναι υπεύθυνες για την μιτοχονδριακή εξασθένηση στο σποραδικό AD. Αλλά το ερώτημα αν αυτές οι αλλαγές στο mtDNA είναι πρωτογενή γεγονότα στην παθογένεση του AD, ή οφείλονται σε σωματικούς παράγοντες (όπως οξειδωτική βλάβη) παραμένει αναπάντητο [Mancuso M, et al (2008)].

1.5.3 Γενετικές αλλαγές των μιτοχονδρίων στο Alzheimer

Έχει παρατηρηθεί μία αύξηση στις σωματικές ανακατατάξεις του mtDNA σε εγκεφάλους AD. Η "κοινή έλλειψη" 4977 ζευγών βάσεων μεταξύ των θέσεων 8469:13447 του mtDNA φαίνεται να παρουσιάζεται σε 15 φορές υψηλότερα επίπεδα στους εγκεφάλους ασθενών με AD [Corral-Debrinski M, et al (1994)]. Επίσης, η μετάπτωση A4336G στο mtDNA έχει παρατηρηθεί με μεγαλύτερη συχνότητα σε ασθενείς με AD [Shoffner JM, et al (1993)]. Αυτή η μετάλλαξη έχει παρατηρηθεί σε περίπου 5% των ασθενών με όψιμης

εμφάνισης AD, και αυτή η συσχέτιση έχει υποστηριχθεί σε 3 από 4 ανεξάρτητες Ευρωπαϊκές μελέτες [Egensperger R, et al (1997), Hutchin T, Cortopassi G (1995), Brown M, et al (1996), Tysoe C, et al (1996)]

Ακόμα, έχουν αναφερθεί μεταλλάξεις της περιοχής ελέγχου (CR) του mtDNA σε μεγαλύτερη συχνότητα στους εγκεφάλους με AD σε σχέση με τα άτομα ελέγχου [Coskun PE, et al (2004)]. Πιο συγκεκριμένα, δύο ετεροπλασμικές αλλαγές παρουσιάστηκαν μόνο σε εγκεφάλους με AD (T414C και T477C). Το 65% των εγκεφάλων με AD παρουσίασαν την μετάλλαξη T414C, ενώ αυτή η μετάλλαξη δεν παρουσιάστηκε σε κανένα από τα άτομα ελέγχου [Coskun PE, et al (2004)]. Η CR του mtDNA από εγκεφάλους ασθενών και ατόμων ελέγχου έχει κλωνοποιηθεί και αλληλουχηθεί. Οι εγκεφαλοι με AD είχαν μία κατά μέσο όρο 63% αύξηση στις ετεροπλασμικές μεταλλάξεις της CR του mtDNA (και μία 130% αύξηση σε ασθενείς άνω των 80 χρόνων) [Coskun PE, et al (2004)]. Αυτές οι μεταλλάξεις άλλαξαν επιλεκτικά κάποια γνωστά ρυθμιστικά στοιχεία του mtDNA. Οι εγκεφαλοι με AD παρουσίασαν επίσης μία κατά μέσο όρο 50% μείωση στο περιεχόμενο mtDNA και στο μετάγραφο ND6 του συμπλόκου I, τα οποία πιθανώς μείωσαν την μιτοχονδριακή οξειδωτική φωσφορυλίωση [Coskun PE, et al (2004)].

Μία άλλη μελέτη, που περιλάμβανε έναν μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων ιστού, δεν εντόπισε την μετάλλαξη T414C σε εγκεφάλους ασθενών με AD [Chinnery PF, et al (2001)]. Σε μία διαφορετική μελέτη, έγινε αλληλούχιση ολόκληρων των κωδικών περιοχών από 145 δείγματα εγκεφάλων AD από νεκροψία και από 128 δείγματα φυσιολογικών ατόμων ελέγχου. Παρατηρήθηκε ότι και για τις συνώνυμες και τις μη-σιωπηλές μεταλλάξεις ο συνολικός αριθμός των νουκλεοτιδικών αλλαγών ήταν ο ίδιος και για τις αλληλουχίες των ασθενών AD και των ατόμων ελέγχου [Elson JL, et al (2006)].

Μέχρι σήμερα δεν έχουν ανακαλυφθεί σίγουρες αιτιολογικές μεταλλάξεις του mtDNA σε ασθενείς με AD. Ακόμα μελέτες που προσπαθούν να ταυτοποιήσουν μεταλλάξεις του mtDNA σε εγκεφάλους ασθενών με AD είχαν αμφιλεγόμενα αποτελέσματα [Mancusio M, et al (2008)].

Μία εναλλακτική μέθοδος είναι να αναλυθούν οι συχνότητες των πολυμορφισμών του mtDNA που μπορεί να προκαλέσουν ή να σχετίζονται με μικρές διαφορές στις κωδικοποιούμενες πρωτεΐνες και, επομένως, με ελάχιστες αλλαγές στην ενεργότητα της μιτοχονδριακής αναπνοής και της υπερπαραγωγής ROS. Αυτό μπορεί να προδιαθέσει ένα άτομο, ή έναν πληθυσμό που φέρει τον ίδιο γονότυπο mtDNA, σε μία πιο πρώιμη έναρξη των αποπτωτικών διεργασιών, όπως η συσώρευση σωματικών μεταλλάξεων του mtDNA και η εξασθένηση της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων (ETC). Το αντίθετο θα μπορούσε να ισχύει για διαφορετικούς πολυμορφισμούς, οι οποίοι θα μπορούσαν να είναι ευεργετικοί προκαλώντας αύξηση της ενεργότητας της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης και/ή μείωση της παραγωγής ROS. Κοινοί πολυμορφισμοί του mtDNA καθορίζουν κλάσεις ειδικών για κάθε ήπειρο γονότυπων, απλότυπων, που μπορούν να ταυτοποιηθούν με ανάλυση πολυμορφισμών μήκους τμημάτων περιορισμού (RFLP). Στην Ευρώπη, έχουν ταυτοποιηθεί εννέα διαφορετικοί μιτοχονδριακοί απλότυποι (H, I, J, K, T, U, V, W, X), οι οποίοι αντιπροσωπεύουν περισσότερο από το 90% όλων των μιτοχονδριακών γονιδιωμάτων στον πληθυσμό

[Torroni A, et al (1996)]. Η κατανομή τους φάνηκε να διαφέρει μεταξύ των φυσιολογικών ατόμων ελέγχου και των ασθενών που υποφέρουν από κάποιες νευροεκφυλιστικές ασθένειες, όπως το Parkinson [Ghezzi D, et al (2005)].

Μία μελέτη ανέφερε ότι ο απλότυπος T εμφανίζεται με μικρότερη συχνότητα σε ασθενείς με AD, ενώ ο απλότυπος J φαίνεται να εμφανίζεται με μεγαλύτερη συχνότητα [Chagnon P, et al (1999)]. Σε μία άλλη μελέτη σε ένα δείγμα ατόμων από την Ιταλία βρέθηκε ότι οι απλότυποι K και U παρουσιάζονται με μικρότερη συχνότητα σε φορείς της *Απολιποπρωτεΐνης (Apo) E4* σε σχέση με ασθενείς AD που δεν ήταν φορείς (ενώ στα φυσιολογικά άτομα ελέγχου οι απλότυποι του mtDNA και το αλληλόμορφο *ApoE4* ήταν ανεξάρτητα μεταξύ τους). Αυτό υποδηλώνει ότι οι K και U μπορεί να δρουν αντισταθμιστικά στον μείζονα παράγοντα κινδύνου του AD, το αλληλόμορφο *ApoE4*. Η ίδια ομάδα ανακάλυψε μία μείωση του λόγου οφέλους του αλληλόμορφου *ApoE4* από στατιστικά σημαντικές σε μη στατιστικά σημαντικές τιμές σε ασθενείς με τους απλότυπους K και U [Carrieri G, et al (2001)]. Μία άλλη μελέτη έδειξε ότι (ανεξάρτητα από τον γονότυπο του *ApoE*) τα αρσενικά άτομα που είχαν τον γονότυπο U είχαν μία σημαντική αύξηση στον κίνδυνο για AD, ενώ τα θηλυκά άτομα παρουσίασαν μία σημαντική μείωση στον κίνδυνο για AD έχοντας τον απλότυπο U. Αυτό υποδηλώνει ότι η κληρονόμηση του απλότυπου U μπορεί να έχει αρνητικές συνέπειες στην γήρανση των Καυκάσιων ανδρών [van der Walt JM, et al (2004)].

Πρόσφατα, μία άλλη μελέτη αξιολόγησε την συμμετοχή των μιτοχονδριακών απλότυπων, των συμπλεγμάτων απλοτύπων (HV, UK, TJ, IWX) και δύο λειτουργικών πολυμορφισμών ενός νουκλεοτιδίου στο mtDNA (mtSNP 4216 και 4917) στην παθογένεση του AD στον Πολωνικό πληθυσμό. Αυτή η ομάδα παρατήρησε ότι το σύμπλεγμα HV φαινόταν να σχετίζεται σημαντικά με τον κίνδυνο για AD, ανεξάρτητα από την ύπαρξη ή όχι του *ApoE4* (OR = 1,59, 95% CI 1,04 -2,44, p = 0,032) [Maruszak A, et al (2009)].

Η ίδια πρόσφατη μελέτη δεν βρήκε κανένα στοιχείο για την συμμετοχή των απλοτύπων U, K, J ή T στον κίνδυνο για AD [Maruszak A, et al (2009)]. Δύο άλλες μελέτες (που περιλάμβαναν μόνο νευροπαθολογικά αποδεδειγμένες περιπτώσεις AD με Ευρωπαϊκή καταγωγή) υποδεικνύουν ότι οι απλότυποι του mtDNA δεν σχετίζονται με το AD [Elson JL, et al (2006), Chinnery PF, et al (2000)].

Σε ακόμα μία μελέτη δεν βρέθηκαν στοιχεία για έναν αιτιολογικό ρόλο των πολυμορφισμών που σχετίζονται με τους απλότυπους. Σε αυτή τη μελέτη μελετήθηκε η συχνότητα των Ευρωπαϊκών απλότυπων του mtDNA σε μία καλά καθορισμένη κλινικά ομάδα 209 μη συγγενών μεταξύ τους ασθενών και 191 φυσιολογικών ατόμων με ξεκάθαρη καταγωγή από την Τοσκάνη (ώστε να ελαχιστοποιηθεί ο κίνδυνος ψευδών συσχετισμών μεταξύ γενετικών δεικτών και ασθένειας). Οι συχνότητες των απλοτύπων H, I, J, K, T, U, V, W, και X δεν ήταν σημαντικά διαφορετικές μεταξύ των AD και των ατόμων ελέγχου. Ακόμα, δεν υπήρχε σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο φύλων όσον αφορά την κατανομή των απλότυπων mtDNA και στους ασθενείς AD και στις ομάδες ατόμων ελέγχου. Το αλληλόμορφο *ApoE4* επιβεβαιώθηκε ως παράγοντας κινδύνου για το AD, αλλά δεν παρατηρήθηκε καμία συσχέτιση μεταξύ των αλληλομόρφων *ApoE* και των απλότυπων του mtDNA. Ακόμα αποκλείστηκε κάθε συσχέτιση μεταξύ των απλότυπων του mtDNA,

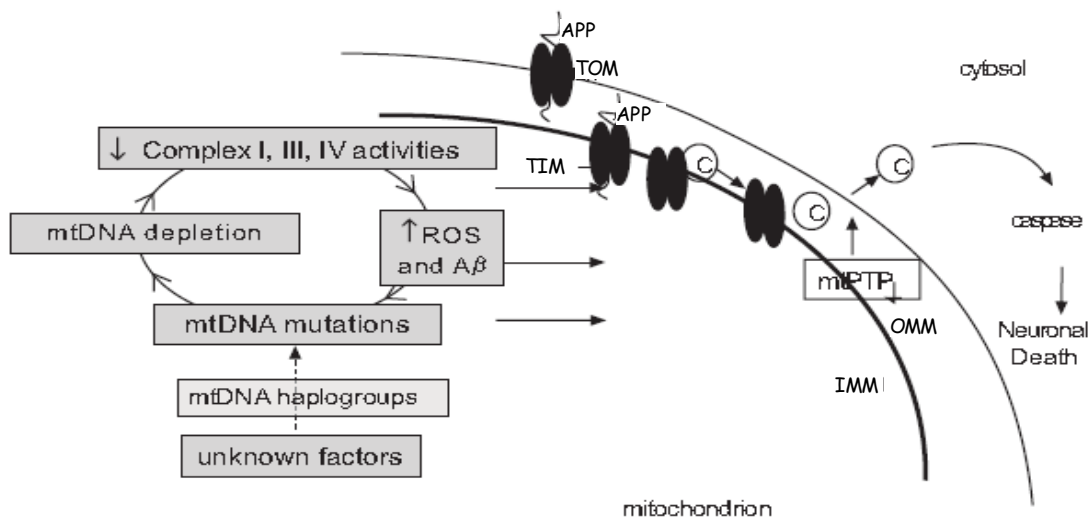
της ηλικίας εμφάνισης και του μέσου χρόνου επιβίωσης [Mancuso M, et al (2007)].

Τελικά, έχει προταθεί ότι οι κληρονομούμενοι απλότυποι K και U μπορεί να επηρεάσουν την προδιάθεση για AD στους Καυκάσιους, αλλά αυτή η συσχέτιση δεν έχει εξακριβωθεί πλήρως. Επειδή απαιτούνται πολύ μεγάλες ομάδες ατόμων για να εντοπιστεί αξιόπιστα ένας συσχετισμός με περίπλοκες ανθρώπινες ασθένειες, θα χρειαστεί περαιτέρω ανάλυση με μεγαλύτερα δείγματα για να αποκαλυφθεί με μεγαλύτερη βεβαιότητα η συμβολή των μεταλλάξεων του mtDNA ή των απλοτύπων, αν υπάρχει, στην παθογένεση του σποραδικού AD. Μέχρι σήμερα, οι απλότυποι του mtDNA δεν φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο στο AD. Οι αλλαγές του mtDNA που παρατηρούνται στα μοντέλα των κυτταροπλασματικών υβριδίων μπορεί να οφείλονται σε σωματικούς παράγοντες, π.χ. στην οξειδωτική βλάβη [Mancuso M, et al (2008)].

1.5.4 Η υπόθεση του μιτοχονδριακού καταρράκτη

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η "υπόθεση του μιτοχονδριακού καταρράκτη" θα μπορούσε να εξηγήσει πολλά από τα βιοχημικά χαρακτηριστικά του σποραδικού AD (Εικόνα 4). Η συσσώρευση των σωματικών μεταλλάξεων του mtDNA επιταχύνει την φυσιολογική γήρανση, οδηγεί σε οξειδωτική βλάβη, προκαλεί ανεπάρκεια του μηχανισμού παραγωγής ενέργειας, αυξημένη παραγωγή ROS και συσσώρευση του Αβ, τα οποία με έναν βίαιο τρόπο ενισχύουν την βλάβη στο mtDNA, την εξασθένηση της μιτοχονδριακής αναπνοής και το οξειδωτικό στρες. Αυτά τα γεγονότα οδηγούν στο άνοιγμα του PTP, επάγοντας την απελευθέρωση του cyt c και την επαγωγή της ρυθμιζόμενης από τις κασπάσες απόπτωση. Η παραγωγή ROS από τα μιτοχόνδρια φαίνεται να επάγει απόπτωση και με έναν εναλλακτικό τρόπο που ρυθμίζεται από το PARP-1 και το AIF. Αυτή η υπόθεση μπορεί να έχει μία ισχυρή σύνδεση με την υπόθεση του καταρράκτη αμυλοειδούς.

Πριν παρατηρηθούν οι πλάκες, σχηματίζονται πρώιμα στα ποντίκια που υπερεκφράζουν APP ενδοκυτταρικά συσσωματώματα του Αβ τα οποία σχετίζονται ισχυρά με την εξασθένηση της νοητικής λειτουργίας [Oddo S, et al (2003)]. Το Αβ μπορεί να προκαλεί κυτταρική δυσλειτουργία μέσω της δράσης του στο μιτοχόνδριο. Σε διαγονιδιακά ποντίκια μοντέλα για το AD έχει παρατηρηθεί ότι το APP, η πηγή του τοξικού Αβ, κατευθύνεται προς τα νευρωνικά μιτοχόνδρια. Η χημική σταυροσύνδεση μαζί με ανοσοηλεκτρονική μικροσκοπία έδειξε ότι το μιτοχονδριακό APP υπάρχει σε μία διαμεμβρανική μορφή με το N-τελικό άκρο προς το εσωτερικό και βρίσκεται σε επαφή με τις μιτοχονδριακές μετατοπώσεις. Η συσσώρευση των APP πλήρους μήκους στο μιτοχονδριακό διαμέρισμα, παγιδευμένα σε μία διαμεμβρανική μορφή, προκάλεσε μιτοχονδριακή δυσλειτουργία και εξασθενημένο ενεργειακό μεταβολισμό [Anandatheerthavarada HK, et al (2003)].



Εικ. 4. Ο προτεινόμενος μηχανισμός του κυτταρικού θανάτου που επάγεται από τα μιτοχόνδρια στο AD. Η "υπόθεση του μιτοχονδριακού καταρράκτη" θα μπορούσε να εξηγήσει πολλά από τα βιοχημικά, γενετικά και παθολογικά χαρακτηριστικά του σποραδικού AD. Οι σωματικές μεταλλάξεις του mtDNA θα μπορούσαν να προκαλέσουν απώλεια ενέργειας, αυξημένη παραγωγή αντιδραστικών ελευθέρων ριζών οξυγόνου (ROS) και συσσώρευση του αμυλοειδούς-β (Aβ), τα οποία σε έναν φαύλο κύκλο ενισχύουν την βλάβη του mtDNA και το οξειδωτικό στρες και μπορεί να διευκολύνουν το άνοιγμα του πόρου μετάπτωσης της διαπερατότητας (mPTP), ο οποίος επάγει τον κυτταρικό θάνατο στην απόπτωση. Ακόμα, η συσσώρευση της πρόδρομης πρωτεΐνης του αμυλοειδούς (APP) ανάμεσα στα μιτοχονδριακά κανάλια εισαγωγής (TIM και TOM) μπορεί να εμποδίζει την είσοδο των κωδικοποιούμενων από τον πυρήνα υπομονάδων του συμπλόκου IV, εξηγώντας έτσι την παρατηρούμενη μείωση της ενεργότητας του συμπλόκου IV και τα αυξημένα επίπεδα του H₂O₂.

Υπόμνημα: C, κυτόχρωμα c, IMM εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη, OMM εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη, APP πρόδρομη πρωτεΐνη του αμυλοειδούς, TOM και TIM μετατοπάσες εισαγωγής πρωτεϊνών της μιτοχονδριακής εξωτερικής και εσωτερικής μεμβράνης αντίστοιχα.

[Από Mancuso M *et al.*, (2007)]

Σε μία πρόσφατη μελέτη εγκεφάλων AD και ατόμων ελέγχου, οι ερευνητές παρατήρησαν ότι το μη γλυκοζυλιωμένο πλήρους μήκους και το κομμένο στο C-τελικό άκρο APP συσσωρεύονταν αποκλειστικά στα κανάλια εισαγωγής πρωτεϊνών των μιτοχονδρίων σε ανθρώπινους εγκεφάλους με AD, αλλά όχι στους εγκεφάλους ατόμων ελέγχου ίδιας ηλικίας [Devi L, *et al* (2006)]. Σε εγκεφάλους με AD το APP σχημάτιζε σταθερά σύμπλοκα με το κανάλι εισαγωγής μετατοπάση της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης-40 (TOM40), και ένα υπερασύμπλοκο και με το TOM40 και με την μετατοπάση της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης-23 (TIM23) [Devi L, *et al* (2006)]. Η συσσώρευση του APP διαμέσου των μιτοχονδριακών καναλιών εισαγωγής εμπόδιζε την είσοδο των κωδικοποιούμενων από τον πυρήνα υπομονάδων IV και Vb του COX [Devi L, *et al* (2006)]. Αυτό μπορεί να εξηγήσει την παρατηρούμενη μείωση στην ενεργότητα του COX και τα αυξημένα επίπεδα του H₂O₂. Το μιτοχονδριακό APP είχε υψηλότερα επίπεδα σε επιρρεπείς στο AD περιοχές του εγκεφάλου, όπως ο μετωπιαίος φλοιός, ο ιππόκαμπος, και η αμυγδαλή [Devi L, *et al* (2006)]. Τα επίπεδα του ακινητοποιημένου μιτοχονδριακού APP συσχετίζονται άμεσα με την μιτοχονδριακή δυσλειτουργία και την σοβαρότητα της ασθένειας. Ακόμα, τα άτομα με AD που έφεραν τα αλληλόμορφα *ApoE3/ApoE4* είχαν το υψηλότερο περιεχόμενο μιτοχονδριακού APP [Devi L, *et al* (2006)]. Επομένως, η ανώμαλη συσσώρευση του APP διαμέσου των μιτοχονδριακών καναλιών εισαγωγής προκαλεί οξειδωτικό στρες στα μιτοχόνδρια, μιτοχονδριακή δυσλειτουργία και φαίνεται να είναι ένα κύριο χαρακτηριστικό του ανθρώπινου AD.

Η προσδένουσα στο Αβ αλκοολική αφυδρογονάση (ΑΒΑD), η οποία εντοπίζεται στην μιτοχονδριακή μήτρα, μπορεί να είναι ένας άμεσος μοριακός σύνδεσμος μεταξύ του Αβ και της μιτοχονδριακής τοξικότητας. Η αλληλεπίδραση μεταξύ αυτών των δύο πρωτεϊνών επάγει την διαρροή ROS, την μιτοχονδριακή δυσλειτουργία, την απελευθέρωση του cyf c, τον κατακερματισμό του DNA και την απόπτωση [Lustbader JW, et al (2004)].

Περαιτέρω, η γ-σεκρετάση, η οποία είναι απαραίτητη για την πέψη του APP ώστε να δημιουργηθεί Αβ, παρουσιάζεται επίσης στα μιτοχόνδρια [Hansson CA, et al (2004)]. Στα μιτοχόνδρια το Αβ μπορεί να απομακρυνθεί μέσω χρήσης του ενζύμου αποικοδόμησης της ινσουλίνης (IDE) [Leissring MA, et al (2004)] και μέσω χρήσης της πεπτιδάσης της προακολουθίας (PreP) [Falkevall A, et al (2006)].

Ακόμα, η καταστολή του συμπλόκου IV από το Αβ μπορεί να ρυθμίζεται μέσω της απομόνωσης της αίμης από το Αβ [Atamna H (2006), Atamna H, Frey WH II (2004)]. Αυτό φαίνεται ακόμα να επάγει την παραγωγή ROS [Fukui H, Moraes CT (2008)].

Την ίδια στιγμή, η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία και το οξειδωτικό στρες μπορεί να αλλάξει την επεξεργασία του APP οδηγώντας στην ενδοκυτταρική συσσώρευση του Αβ [Ohyaqi Y, et al (2000), Gabuzda D, et al (1994)]. Ακόμα, το οξειδωτικό στρες αυξάνει την ενεργότητα της β-σεκρετάσης, του ενζύμου που είναι υπεύθυνο για το κόψιμο του N-τελικού άκρου του APP ώστε να προκύψει το Αβ [Drake J, et al (2003)].

Η αιτιολογία του AD είναι περίπλοκη, και μόνο μία μειοψηφία των περιπτώσεων φαίνεται να έχει κυρίως γενετική αιτιολογία. Οι πολλαπλές αλληλεπιδράσεις μεταξύ γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων φαίνεται να είναι αιτιολογικές για τις εναπομένουσες περιπτώσεις [Corpedè F, et al (2006)]. Τα δεδομένα που παρουσιάστηκαν παραπάνω ενισχύουν την ιδέα ότι το APP, η επαγόμενη από το Αβ τοξικότητα του μιτοχονδρίου, το οξειδωτικό στρες, η σωματική βλάβη του mtDNA, η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία και η απόπτωση μπορεί να συνδέονται στον καταρράκτη που οδηγεί στην νευροεκφύλιση και την άνοια [Wang X, et al (2007), Chen JX, Yan SD (2007)]. Ο προτεινόμενος μηχανισμός του επαγόμενου από τα μιτοχόνδρια κυτταρικού θανάτου στο AD συνοψίζεται στην Εικόνα 4.

Είναι δύσκολο να καθοριστεί αν το mtDNA παίζει τον πρωταρχικό ρόλο στην παθογένεση του AD. Είναι πιο πιθανό το mtDNA να μην παίζει πρωταρχικό ρόλο, και, επομένως, θα πρέπει να εμπλέκεται μεταγενέστερα. Όντως, το APP που μπλοκάρει τους μεταφορείς TOM φαίνεται να είναι βασικός παράγοντας, ικανός να προκαλέσει μιτοχονδριακή βλάβη, ανεπάρκεια της αναπνοής και οξειδωτικό στρες. Ακόμα, οι ελλείψεις του mtDNA φαίνεται να συμβάλλουν στην γήρανση και στην παθολογία, αλλά ο ακριβής μηχανισμός αυτής της συμβολής παραμένει ασαφής.

Είναι σημαντικό να υπάρξει καλύτερη κατανόηση του ρόλου του οξειδωτικού στρες και του μιτοχονδριακού ενεργειακού μεταβολισμού στο AD, και της σύνδεσής τους με την υπόθεση του αμυλοειδούς στη γήρανση και στο AD, καθώς μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη πιο αποτελεσματικών θεραπευτικών στρατηγικών για αυτή την καταστροφική διαταραχή [Mancuso M, et al (2008)].

2 ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 ΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΥΛΙΚΟ

Στη παρούσα πειραματική μελέτη χρησιμοποιήθηκε ως βιολογικό υλικό ολικό αίμα (στο οποίο προηγουμένως έχει προστεθεί αντιπηκτικό) από ένα σύνολο 50 ασθενών με Alzheimer από την ευρύτερη περιοχή της Θεσσαλίας. Τα άτομα επιλέχθηκαν τυχαία και δεν είναι συγγενή μεταξύ τους. Τα δείγματα αίματος διατηρήθηκαν σε θερμοκρασία -20°C μέχρι την εφαρμογή της διαδικασίας απομόνωσης DNA η οποία πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο του κύριου Χατζηγεωργίου.

2.2 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction) πρωτοεμφανίστηκε το 1987 από την ομάδα των ερευνητών Mullis, Fallona και Saiki της εταιρίας Cetus και αποτελεί αναμφίβολα μία σημαντική εξέλιξη στην τεχνολογία του DNA. Έχει τεράστιες επιπτώσεις στη βασική έρευνα και τη γενετική διαγνωστική, καθώς παρέχει την ικανότητα να ενισχύει μια μικρή αλληλουχία DNA από το σύνολο του γονιδιώματος. Αυτό επιτρέπει την ανάλυση ενός ειδικού τμήματος DNA χωρίς να κλωνοποιηθεί πρώτα, πράγμα το οποίο αυξάνει σημαντικά την ταχύτητα της ανάλυσης. Το βραβείο Νόμπελ Χημείας απενεμήθη στον Δρ. K. Mullis τον Οκτώβριο του 1993, για την καθοριστική του συμβολή στην ανακάλυψη και ανάπτυξη της τεχνικής PCR.

2.2.1 ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Με την PCR επιτυγχάνεται η ενίσχυση ενός τμήματος DNA, ανεξαρτήτου προελεύσεως, *in vitro*. Σε χρονικό διάστημα λίγων ωρών, η συγκεκριμένη περιοχή του DNA (DNA στόχος), ενισχύεται σε ένα μεγάλο αριθμό αντιγράφων. Επειδή κατά την τεχνική της PCR γίνεται ενίσχυση του DNA, η αρχική ποσότητα που απαιτείται είναι πολύ μικρή. Ο αριθμός των αντιγράφων εξαρτάται από τον αριθμό των κύκλων της αντίδρασης. Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στην κινητική επανασύνδεσης των αποδιαταγμένων συμπληρωτικών αλυσίδων δίκλωνου νουκλεϊκού οξέος, που ανέπτυξαν οι Britten και Kohne στα τέλη του 1960.

Το τμήμα του DNA που πρόκειται να ενισχυθεί μπορεί να είναι ένα μοναδικό γονίδιο, ένα μέρος ενός γονιδίου ή μια μη κωδική αλληλουχία. Για την αντίδραση απαιτούνται:

- Ένα τμήμα DNA ως εκμαγείο.
- Ένας ή περισσότεροι εκκινητές (primers), συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια 18-22 βάσεων, που έχουν δομή συμπληρωματική προς τις πλευρικές αλληλουχίες του DNA στόχου, το καθένα αντίστοιχα προς τον ένα κλώνο του στόχου και με αντίθετη κατεύθυνση.

! Προσέχουμε οι εκκινητές να μην έχουν συμπληρωματικές αλληλουχίες μεταξύ τους ώστε να

αποφεύγεται ο σχηματισμός διμερών, η περιεκτικότητα σε GC να μην ξεπερνάει το 50% των επιλεγόμενων βάσεων, να έχουν παραπλήσια θερμοκρασία τήξεως (T_m , *melting temperature*) - η θερμοκρασία τήξεως είναι αυτή στην οποία, στατιστικά, τα μισά μόρια του εκκινητή ζευγαρώνουν με την αλληλουχία-στόχο, ενώ τα άλλα μισά δεν σταθεροποιούνται πάνω σε αυτή και παραμένουν ελεύθερα - και η απόστασή τους να είναι μεγαλύτερη των 100 βάσεων ώστε να επιτρέπεται ο σχηματισμός του νέου κλώνου DNA.

- Μία DNA πολυμεράση, όπως η Taq πολυμεράση, που είναι θερμοσταθερή DNA πολυμεράση η οποία απομονώθηκε από το βακτήριο *Thermus aquaticus* (Taq) που ζει στο νερό σε θερμοκρασία 75°C. Έχει την ιδιότητα να μην αποδιατάσσεται σε υψηλές θερμοκρασίες, έχει βέλτιστη θερμοκρασία 72°C, ενώ είναι αρκετά σταθερή ακόμη και στους 95 °C, παραμένοντας έτσι ενεργή σε όλη τη διάρκεια των κύκλων του πολλαπλασιασμού.
- Τριφωσφορικά δεοξυνουκλεοτίδια (dNTPs), τα οποία αποτελούν τα δομικά συστατικά από τα οποία η DNA πολυμεράση συνθέτει τους νέους κλώνους DNA.
- Ρυθμιστικό διάλυμα (buffer solution), το οποίο δημιουργεί ένα κατάλληλο χημικό περιβάλλον για τη βέλτιστη δραστηριότητα και σταθερότητα της DNA πολυμεράσης.
- Διοσθενή κατιόντα Mg^{2+} , απαραίτητα για την ενζυμική δράση της Taq πολυμεράσης.

Η αντίδραση εκτελείται κυρίως σε όγκο 15-100 μl σε eppendorf των 0.2-0.5 ml σε θερμικό κυκλοποιητή, ο οποίος ρυθμίζει τη διαδοχική θέρμανση και ψύξη των δειγμάτων σε κάθε στάδιο. Τα στάδια ενίσχυσης για την PCR στον θερμικό κυκλοποιητή είναι τα ακόλουθα (τα στάδια 2-4 επαναλαμβάνονται για 35 κύκλους):

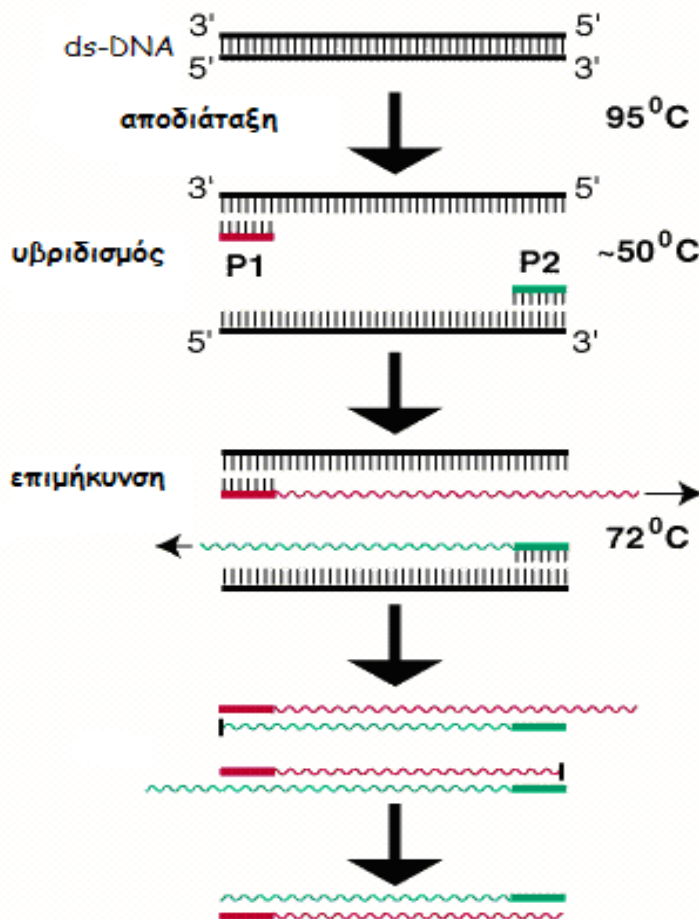
- 1. Αρχικό στάδιο:** Στο στάδιο αυτό η θερμοκρασία ανέρχεται στους 95 °C και διατηρείται για 4 λεπτά ώστε να γίνει αποδιάταξη των δίκλωνων μορίων DNA.
- 2. Στάδιο αποδιάταξης (denaturation):** Στο στάδιο αυτό η θερμοκρασία ανέρχεται στους 95 °C για 30 δευτερόλεπτα. Το γεγονός αυτό προκαλεί τήξη του τμήματος DNA καθώς διασπώνται οι δεσμοί υδρογόνου μεταξύ των συμπληρωματικών βάσεων των δύο κλώνων, δημιουργώντας μονούς κλώνους DNA.
- 3. Στάδιο υβριδισμού (annealing):** Στο στάδιο αυτό η θερμοκρασία κατέρχεται στους 55°C για 40 δευτερόλεπτα, επιτρέποντας την υβριδοποίηση των εκκινητών, οι οποίοι βρίσκονται σε περίσσεια, με το μονόκλωνο DNA-εκμαγείο. Όσο περισσότερο συμπληρωματική είναι η αλληλουχία των εκκινητών με την αλληλουχία του εκμαγείου, τόσο σταθερότεροι δεσμοί υδρογόνου σχηματίζονται μεταξύ τους. Η DNA πολυμεράση προσδένεται στο υβρίδιο εκμαγείο-εκκινητής και ξεκινά τη σύνθεση του νέου τμήματος DNA.
- 4. Στάδιο επιμήκυνσης (extention):** Στο στάδιο αυτό η θερμοκρασία ανέρχεται ξανά στους 72 °C για 40 δευτερόλεπτα, όπου η Taq πολυμεράση λειτουργεί βέλτιστα. Η DNA πολυμεράση συνθέτει το νέο κλώνο DNA, παρουσία $MgCl_2$, προσθέτοντας dNTPs συμπληρωματικά με τον κλώνο-εκμαγείο, με κατεύθυνση 5'-3' συμπυκνώνοντας τη 5'-φωσφορική ομάδα των dNTPs με την 3'-υδροξυλομάδα με το τέλος του

νεοσυντιθέμενου κλώνου. Η DNA πολυμεράση συνθέτει το νέο κλώνο προσθέτοντας περίπου 1.000 βάσεις ανά λεπτό.

5. Στάδιο τελικής επιμήκυνσης: Στο στάδιο αυτό η θερμοκρασία παραμένει στους 72 °C για 10 λεπτά, ύστερα από τον τελευταίο κύκλο PCR. Αυτό γίνεται για να εξασφαλισθεί ότι το απομένον μονόκλωνο DNA έχει πλήρως πολυμεριστεί.

Κατόπιν η θερμοκρασία κατέρχεται στους 4 °C. Έτσι το PCR δείγμα μπορεί να παραμείνει βραχυπρόθεσμα «αποθηκευμένο» στον θερμικό κυκλοποιητή για όσο χρόνο επιθυμούμε, μέχρι την εφαρμογή της επόμενης τεχνικής.

Διάρκεια: κατά μέσο όρο περίπου δύο ώρες για 35 κύκλους (εξαρτάται από την ταχύτητα εναλλαγής των θερμοκρασιών για την πραγματοποίηση των διαφόρων σταδίων στον κυκλοποιητή).



Εικόνα 5: Σχηματική απεικόνιση του κύκλου της τεχνικής PCR. Αποδιάταξη στους 95 °C, υβριδισμός στους ~50 °C και επιμήκυνση στους 72 °C.

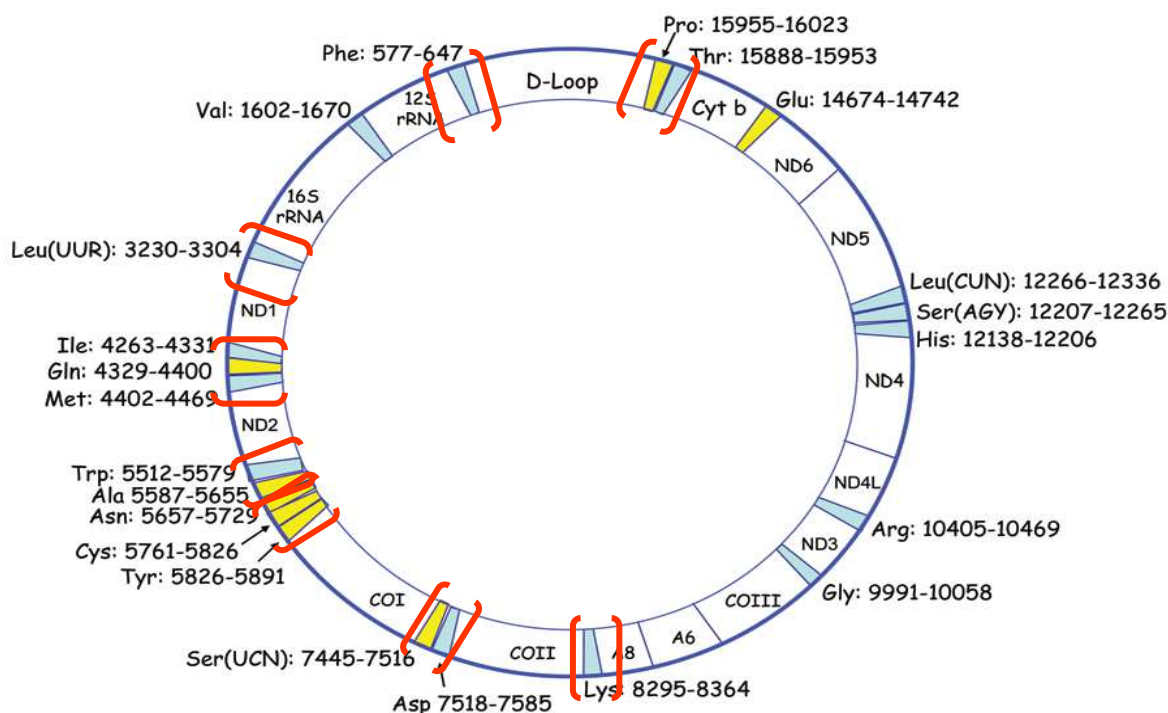
2.2.2 ΠΟΛΥΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣ ΤΩΝ tRNA ΓΟΝΙΔΙΩΝ

Ενισχύθηκαν 8 τμήματα του μιτοχονδριακού DNA των ασθενών με Alzheimer τα οποία περιέκλειαν 15 από τα 22 γονίδια tRNA του mtDNA. Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται τα ζεύγη των εκκινήτων που χρησιμοποιήθηκαν, η νουκλεοτιδική τους θέση καθώς και το μήκος τους.

ΠΙΝΑΚΑΣ 1: Ζεύγη των primers που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση των mt tRNA, η νουκλεοτιδική τους θέση καθώς και το μήκος τους.

A/A	tRNA	Primers	Νουκλεοτιδική θέση	μήκος(bp)
1	<u>tRNA</u> Ile-Gln-Met	<u>FW Primer 5' - 3'</u> CCAGCATTCCCCCTCAAACC	(FW 4241-4260)	<u>μήκος(bp)</u> 246
		<u>RV Primer 5' - 3'</u> TGGGCCAGGGGATTAATTA	(RV 4486-4468)	
2	<u>tRNA</u> Trp-Ala	<u>FW Primer 5' - 3'</u> CGCTACTCCTACCTATCTCC	(FW 5470-5489)	<u>μήκος(bp)</u> 242
		<u>RV Primer 5' - 3'</u> TTAGGGTGCTTAGCTGTTAC	(RV 5711-5691)	
3	<u>tRNA</u> Asn-Cys-Tyr	<u>FW Primer 5' - 3'</u> CAATGGGACTTAAACCCACAA	(FW 5663-5683)	<u>μήκος(bp)</u> 294
		<u>RV Primer 5' - 3'</u> GCGAACATCAGTGGGGTGA	(RV 5911-5892)	
4	<u>tRNA</u> Ser(UCN)-Asp	<u>FW Primer 5' - 3'</u> ATTCGAAGAACCCGTATACA	(FW 7415-7434)	<u>μήκος(bp)</u> 229
		<u>RV Primer 5' - 3'</u> GCTCTTCTATGATAGGGGAA	(RV 7643-7624)	
5	<u>tRNA</u> Thr-Pro	<u>FW Primer 5' - 3'</u> CTAATACCAACTATCTCCCT	(FW 15839-15858)	<u>μήκος(bp)</u> 212
		<u>RV Primer 5' - 3'</u> ACCCAAATCTGCTTCCCAT	(RV 16050-16031)	
6	<u>tRNA</u> Leu(UUR)	<u>FW Primer 5' - 3'</u> AGGACAAGAGAAATAAGGCC	(FW 3130-3149)	<u>μήκος(bp)</u> 293
		<u>RV Primer 5' - 3'</u> CACGTTGGGGCCTTTGCGTA	(RV 3423-3404)	
7	<u>tRNA</u> Lys	<u>FW Primer 5' - 3'</u> GCTCTGAAATCTGTGGAGCA	(FW 8173-8192)	<u>μήκος(bp)</u> 217
		<u>RV Primer 5' - 3'</u> ACGGTAGTATTTAGTTGGGG	(RV 8390-8371)	

8	tRNA Phe	FW Primer 5' - 3' CAACCAAACCCCAAAGACA	(FW 549-567)	μήκος(bp) 208
		RV Primer 5' - 3' GGATGCTTGCATGTGTAATC	(RV 757-738)	



Εικόνα 6: Οι περιοχές του mtDNA που αντιστοιχούν στα ζεύγη των εκκινήτων (8) που χρησιμοποιήθηκαν φαίνονται μέσα στα κόκκινα πλαίσια.

ΠΙΝΑΚΑΣ 2: Υλικά που χρησιμοποιήθηκαν σε μια αντίδραση PCR, αρχικές συγκεντρώσεις, ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν για $V_{TEA}=50\mu\text{l}$ και οι τελικές τους συγκεντρώσεις.

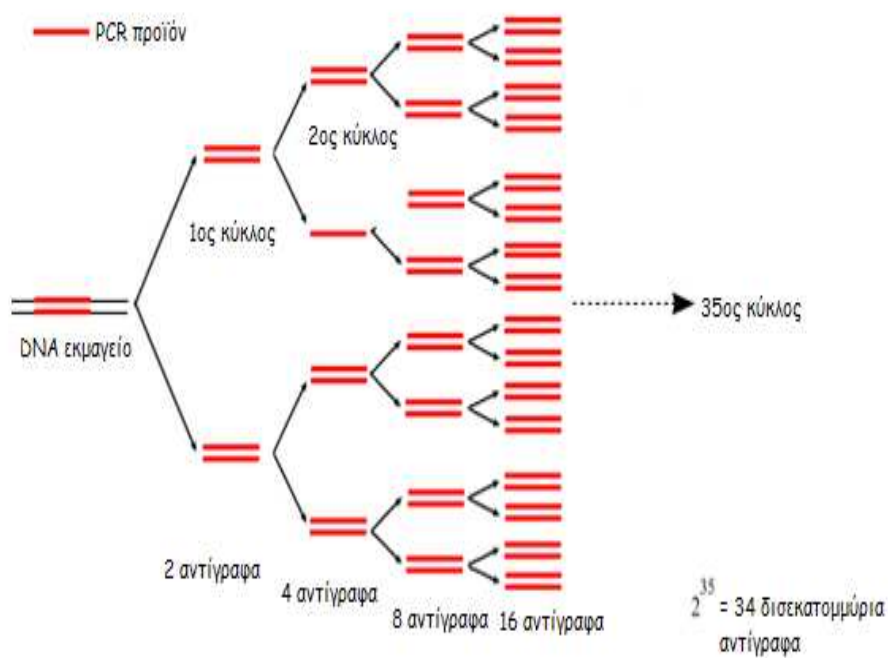
Υλικά	Αρχικές συγκεντρώσεις	Ποσότητες χρησιμοποιήθηκαν σε αντίδραση PCR των 50 μL	που σε μία	Τελικές συγκεντρώσεις
DNA		2 μl		200ng
Primers (FW + RV)	50pmol/ μL	1 μl + 1 μl		1pmol/ μl
Mg ₂ Cl ₂	50mM	2 μl		2mM
PCR Buffer	10x	5 μl		1x
dNTP's*	10mM x 4	1 μl		0,8mM
Taq DNA Πολυμεράση	5u/ μL	0,2 μl		1unit
ddH ₂ O		39 μl		

***dNTP's (Διάλυμα δεοξυνουκλεοτιδίων):** Παρασκευάζεται από dATP, dCTP, dGTP και dTTP με μίξη ίσων ποσοτήτων από ξεχωριστά διαλύματα stock από 0,2mM έκαστο dNTP.

Το προϊόν της αντίδρασης φυλάσσεται επ' αόριστον στους -20 °C.



Εικόνα 7: Θερμοκυκλοποιητής που χρησιμοποιείται για την πραγματοποίηση των αντιδράσεων PCR.



Εικόνα 8: Σχηματική παράσταση του εκθετικού πολλαπλασιασμού του DNA μέσω της τεχνικής της PCR. Έπειτα από n κύκλους προκύπτουν 2^n αντίγραφα.

2.2.3 ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ PCR ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ

Μετά το πέρας της αντίδρασης PCR γίνεται ηλεκτροφόρηση των PCR προϊόντων σε πήκτωμα αγαρόζης 2%, για τη διαπίστωση της επιτυχούς ενίσχυσης.

Για την παρασκευή **πηκτής αγαρόζης 2%** χρησιμοποιούνται :

- 40 ml TAE 1x (παρασκευάζεται από stock διάλυμα TAE 50x)
- 0,8 gr αγαρόζης
- 3 μl βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr)

Το stock διάλυμα TAE 50x παρασκευάζεται ως εξής:

- Tris 121 gr
- Οξικό οξύ 28,5 ml
- EDTA 0,5M 50 ml
- ddH₂O μέχρι τα 500 ml

Τοποθετούνται 0,8 gr αγαρόζης σε κωνική φιάλη των 100 ml και προστίθενται σε αυτά 40 ml TAE 1x. Το μίγμα θερμαίνεται (σε φούρνο μικροκυμάτων) για περίπου 1-2 λεπτά μέχρι η αγαρόζη να διαλυθεί πλήρως και στη συνέχεια προστίθενται προσεκτικά 3 μl βρωμιούχου αιθιδίου. Το βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr) έχει την χαρακτηριστική ιδιότητα να φθορίζει στο υπεριώδες φως καθώς παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων του DNA. Έτσι δίνει πρότυπα ζωνώσεων που αντιστοιχούν στην ποσότητα του DNA που δέσμευσε το EtBr. Το μίγμα μεταφέρεται σε κατάλληλη μήτρα, η οποία περιέχει τις απαραίτητες θέσεις υποδοχής του DNA όπου και στερεοποιείται.

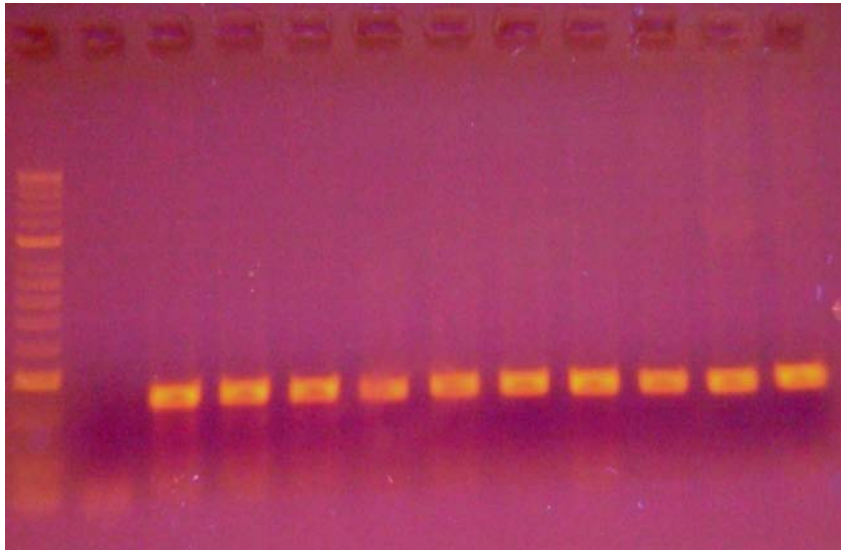
Η φόρτωση του δείγματος στη πηκτή αγαρόζης γίνεται αφού συμπληρωθεί η συσκευή με το ίδιο διάλυμα TAE 1x μέχρι η πηκτή να είναι πλήρως βυθισμένη στο διάλυμα αυτό. Ακολουθεί ανάμιξη 3μl loading buffer με 5 μl δείγματος και τοποθέτηση τους προσεκτικά σε κάθε πηγαδάκι της πηκτής.

Το **loading buffer** (6x) 10 ml παρασκευάζεται ως εξής:

- 1 ml χρωστική μπλε της βρωμοφαινόλης
- 5 ml γλυκερόλη
- 0,5 ml TBE 20x
- 3,5 ml ddH₂O

Η τάση που εφαρμόζεται είναι 100V και τα δείγματα ηλεκτροφορούνται στο πήκτωμα μέχρι να διανύσουν τα 2/3 της διαδρομής (για περίπου 20-30 λεπτά). Τέλος, το πήκτωμα παρατηρείται σε συσκευή UV (Εικόνα 8).

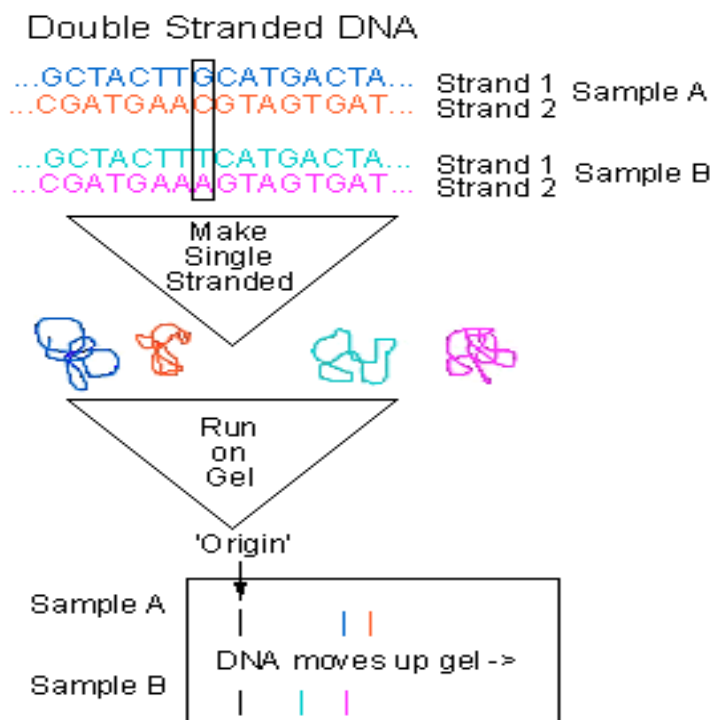
Η ηλεκτροφόρηση γίνεται παρουσία μάρτυρα γνωστού μοριακού βάρους και δείγματος αρνητικού ελέγχου. Η παρουσία του μάρτυρα είναι αναγκαία καθώς είναι ο μόνος τρόπος για να είμαστε σίγουροι ότι δεν ενισχύθηκαν μη ειδικά προϊόντα ενώ το αρνητικό δείγμα επιβεβαιώνει την απουσία επιμόλυνσης κατά τον πολλαπλασιασμό του επιθυμητού τμήματος DNA. Όσα δείγματα δίνουν θετικό αποτέλεσμα (ανίχνευση ζωνών) χρησιμοποιούνται στην ποιοτική ανάλυση πολυμορφισμών με τη μέθοδο SSCP.



Εικόνα 9: Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR σε πηκτή αγαρόζης 2%. Στην 1^η διαδρομή φαίνονται οι ζωνώσεις του μάρτυρα γνωστού μοριακού βάρους. Στην 2^η διαδρομή έχει ηλεκτροφορηθεί αρνητικό δείγμα το οποίο δεν εμφάνισε καμία ζώνωση. Στις άλλες 3 διαδρομές έχουν ηλεκτροφορηθεί προϊόντα PCR.

2.3 ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥ ΜΟΝΟΚΛΩΝΗΣ ΑΛΥΣΙΔΑΣ (Single Stranded Conformation Polymorphism -SSCP)

Η ανάλυση πολυμορφισμού μονόκλωνης αλυσίδας (Single Stranded Conformation Polymorphism) χρησιμοποιήθηκε πρώτη φορά το 1989 και αποτελεί μια φθηνή, ευαίσθητη και αξιόπιστη μέθοδο για τον προσδιορισμό της γενετικής ποικιλομορφίας. Στηρίζεται στον ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό μονόκλωνων τμημάτων DNA βάσει μικρών διαφορών στην αλληλουχία τους, οι οποίες έχουν ως αποτέλεσμα το σχηματισμό μιας διαφορετικής δευτεροταγούς δομής, η οποία προκαλεί διαφορά στη κινητικότητα των μορίων αυτών μέσα σε πήκτωμα. Η κινητικότητα των δίκλωνων μορίων DNA μέσα σε ένα ηλεκτροφορητικό πήκτωμα εξαρτάται από το μέγεθος και το μήκος του μορίου και είναι σχετικά ανεξάρτητη από την αλληλουχία των νουκλεοτιδίων του. Εν τούτοις, στα μονόκλινα μόρια DNA η κινητικότητα επηρεάζεται αισθητά όταν συμβαίνουν μικρές αλλαγές στην νουκλεοτιδική αλληλουχία, όπως είναι οι πολυμορφισμοί SNP. Αυτό συμβαίνει λόγω της ασταθούς φύσης του μονόκλωνου DNA: απουσία συμπληρωματικού κλώνου, ο μονός κλώνος δύναται να σχηματίσει ενδομοριακούς δεσμούς, οι οποίοι έχουν ως αποτέλεσμα τη δημιουργία αναδιπλώσεων και θηλειών, προσδίδοντάς του μία χαρακτηριστική τρισδιάστατη δομή. Η μέθοδος SSCP εκμεταλλεύεται ακριβώς αυτή την ιδιότητα του μονόκλωνου DNA (Orita et al., 1989). Τμήματα DNA έως 300-600 bp αναλύονται επιτυχώς. Τροποποιώντας συνθήκες όπως η θερμοκρασία, η σύνθεση του ρυθμιστικού διαλύματος (buffer) και του πηκτώματος μπορούμε να πάρουμε πληροφορίες για όλες τις διαφορές που προκύπτουν μεταξύ των δειγμάτων.



Εικόνα 10: Σχηματική αναπαράσταση της ανάλυσης SSCP. Τα δείγματα DNA A και B πρέπει να υποστούν αποδιάταξη πριν την ηλεκτροφόρησή τους στο πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου. Μία σημειακή μετάλλαξη είναι ικανή να προσδώσει στη μονόκλωνη αλυσίδα τέτοια μοναδική διαμόρφωση ώστε μετά την ηλεκτροφόρηση, το πρότυπο της αντίστοιχης ζώνης να διαφέρει στα δύο διαφορετικά δείγματα.

2.3.1 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΠΗΚΤΗΣ ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΙΟΥ

Συνήθως επιλέγονται συγκεντρώσεις πηκτής πολυακρυλαμιδίου από 8% έως 12%. Όσο πιο μικρό σε μήκος είναι το τμήμα του εξεταζόμενου μονόκλωνου μορίου, τόσο πιο πυκνό θα πρέπει να είναι το πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου. Στη παρούσα μελέτη η συγκέντρωση του πολυακρυλαμιδίου που επιλέχθηκε να χρησιμοποιηθεί ήταν 10%, καθώς κρίθηκε η καταλληλότερη, ύστερα από δοκιμές, που επέτρεπε την καλύτερη εμφάνιση των αποτελεσμάτων.

Για 2 πηκτώματα πυκνότητας 10% και 125mL χρησιμοποιήθηκαν:

- 12,5 gr Ακρυλαμίδιο
- 0,33 gr Δις-ακρυλαμίδιο
- 10 ml TBE 10x
- 12,5 ml Γλυκερόλη 50%

Τα πηκτώματα δημιουργούνται ύστερα από πολυμερισμό των δύο αντιδραστηρίων. Το μέγεθος των πόρων του πολυμερούς που προκύπτει είναι συνάρτηση του βαθμού του πολυμερισμού, ο οποίος ποικίλει ανάλογα με τις συγκεντρώσεις των μονομερών.

Η προσθήκη γλυκερόλης στο πήκτωμα ελαττώνει την τιμή του pH του διαλύματος ηλεκτροφόρησης που καθορίζεται από την παρουσία του ρυθμιστικού διαλύματος TBE, με αποτέλεσμα να αυξάνεται η ευαισθησία της SSCP ανάλυσης και να λαμβάνονται πιο ευδιάκριτα αποτελέσματα.

Στο σημείο αυτό ακολουθεί διήθηση και συμπλήρωση με H₂O έως τα 125 ml και έπειτα προσθήκη των:

- 125 μl TEMED
- 650 μl APS 20%

Η αντίδραση πολυμερισμού αρχίζει με την προσθήκη του υπερθειϊκού αμμωνίου (APS: ammonium persulfate) που δημιουργεί ελεύθερες ρίζες : $S_2O_8^{2-} \rightarrow 2 SO_4^{\bullet -}$ που μαζί με το φωτοχημικό καταλύτη N,N'-τετραμεθυλοαιθυλενοδιαμίνη (TEMED) διαδίδονται στο σύστημα πολυμερισμού.

Αφού προστεθούν οι κατάλληλες χτένες (πάχους 2mm) για το σχηματισμό πηγαδιών, το ρευστό πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου απαιτεί περίπου 30 λεπτά για να πήξει πλήρως. Έπειτα το τοποθετούμε στην κατάλληλη συσκευή κάθετης ηλεκτροφόρησης.

2.3.2 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΤΩΝ PCR ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ

Καθώς αναμένεται να πήξει το πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου προετοιμάζονται τα PCR προϊόντα που έδωσαν θετικό αποτέλεσμα. Σε erpendorf των 0,5 μl προσθέτονται:

- 5 μl δείγματος
- 10μl αποδιατακτικού διαλύματος (denaturation buffer).

Το **Αποδιατακτικό Διάλυμα (Denaturation Buffer)** περιέχει:

- 95% φορμαμίδιο
- 20 mM EDTA
- 10 mM NaOH
- 0.05% κυανό του ξυλενίου
- 0.05% κυανό της βρωμοφαινόλης

Ακολούθως, τα δείγματα τοποθετούνται στη συσκευή του θερμοκυκλοποιητή, ώστε να πραγματοποιηθεί η πλήρης αποδιάταξη των δίκλωνων μορίων DNA επιλέγοντας το ακόλουθο πρόγραμμα:

1. 95°C για 2 λεπτά
2. 97°C για 2 λεπτά
3. 99°C για 7 λεπτά. (Τα δείγματα πριν το τέλος του 7^{ου} λεπτού εξέρχονται της συσκευής και τοποθετούνται αμέσως σε πάγο προκειμένου να αποφευχθεί η επανασύνδεση των μονόκλωνων μορίων DNA).

Τέλος, τα αποδιαταγμένα δείγματα φορτώνονται στο πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου αφού πρώτα στη συσκευή προστεθεί ρυθμιστικό διάλυμα TBE 0,5x . Εφαρμόζεται τάση 220V και τα δείγματα ηλεκτροφορούνται στο πήκτωμα για 22 ώρες (overnight) σε θερμοκρασία 4°C. Ακολουθεί χρώση του πηκτώματος με νιτρικό άργυρο.

2.3.3 ΧΡΩΣΗ ΝΙΤΡΙΚΟΥ ΑΡΓΥΡΟΥ (SILVER STAINING)

Για 2 πηκτώματα χρησιμοποιούνται:

1. Δ/μα 1 : 800 ml dd-H₂O + 20 ml Et100% + 1 ml CH₃COOH 90%
2. Δ/μα 2 : 400 ml AgNO₃ 1gr/ltr
3. Δ/μα 3 : 6 gr NaOH + 0,02 gr NaBH₄ + 2 ml HCHO και ddH₂O έως 400 ml

Τα διαλύματα εμποτίζονται στα πηκτώματα και ξεπλένονται με ddH₂O το κάθε ένα με την ακόλουθη σειρά:

- 3.1 Α' εμποτισμός με 200 ml του διαλύματος 1 για 3 min.
- 3.2 Β' εμποτισμός με 200 ml του διαλύματος 1 για 3 min & πλύση με ddH₂O.
- 3.3 Εμποτισμός με 200 ml του διαλύματος 2 για 20 min & διπλή πλύση με ddH₂O.
- 3.4 Εμποτισμός με 200 ml του διαλύματος 3 έως την εμφάνιση χρώματος & πλύση με ddH₂O.

2.4 ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ DNA (DNA SEQUENCING)

Τα δείγματα εκείνα που εμφάνισαν διαφορετικά πρότυπα συγκριτικά με τα δείγματα με φυσιολογικό πρότυπο, αποστέλλονται για ταυτοποίηση της DNA αλληλουχίας τους (DNA sequencing), αφού προηγουμένως υποστούν κατάλληλο καθαρισμό.

2.4.1 ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ PCR ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ

Για τον καθαρισμό των PCR προϊόντων χρησιμοποιήθηκαν στήλες QIAquick Spin^R. Ο λόγος που πραγματοποιείται είναι για να απομακρυνθούν οι ελεύθεροι ή/και διμερισμένοι primers, τα νουκλεοτίδια, η DNA πολυμεράση και άλατα που τυχόν υπάρχουν στο διάλυμα μαζί με τα PCR προϊόντα, ούτως ώστε να μη προκαλέσουν προβλήματα ανάγνωσης κατά τη διαδικασία του sequencing. Ακολουθήθηκε το παρακάτω πρωτόκολλο καθαρισμού:

1. Τοποθέτηση των στηλών QIAquick Spin σε erpendorf των 1,5 ml.
2. Προσθήκη 250 μl από το διάλυμα συλλογής (capture buffer) και 50 μl PCR προϊόντος στις στήλες QIAquick Spin.
3. Φυγοκέντριση του περιεχόμενου των στηλών για 1 λεπτό στις 13.000 rpm. Σε αυτό το βήμα πραγματοποιείται η πρόσδεση των επιθυμητών αλληλουχιών πάνω στη στήλη.
4. Απομάκρυνση του εκλούσματος και επανατοποθέτηση των στηλών στα erpendorf.
5. Προσθήκη 750 μl από το διάλυμα πλύσης (wash buffer) στις στήλες και φυγοκέντριση για 1 λεπτό στις 13.000 rpm.

6. Απομάκρυνση του εκλούσματος, επανατοποθέτηση των στηλών στα erppendorf και ξανά φυγοκέντριση για 1 λεπτό στις 13.000 rpm. Το βήμα αυτό είναι σημαντικό, καθώς είναι αναγκαίο να απομακρυνθεί πλήρως η αιθανόλη από το διάλυμα πλύσης μέσα στη στήλη.
7. Εκ νέου τοποθέτηση των στηλών QIAquick Spin σε αποστειρωμένα erppendorf των 1,5 ml.
8. Προσθήκη 50 μl από το διάλυμα έκλουσης (elution buffer) και επώαση των δειγμάτων για περίπου 1 λεπτό.
9. Τέλος, φυγοκέντριση για 1,5 λεπτό στις 13.000 rpm για ανάκτηση του καθαρισμένου DNA από τα erppendorf.

Στη συνέχεια, ακολουθεί υπολογισμός της ποσότητας του PCR προϊόντος ποσοτικά με φωτόμετρο (1μl και 49μl ddH₂O) ή ποιοτικά με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αραρόζης 2%. Ενδείξεις φωτόμετρου γύρω στα 100 ng/μl είναι ικανοποιητικές.

Το DNA που στέλνεται για αλληλούχιση πρέπει να είναι σε στερεά μορφή (ίζημα) και όχι σε διάλυμα. Αυτό επιτυγχάνεται με κατακρήμιση του DNA με αιθανόλη και CH₃COONa (οξικό νάτριο). Για 50μl δείγμα απαιτούνται 300 μl αιθανόλη και 5μl CH₃COONa. Τα δείγματα μένουν overnight στους -20°C και την επόμενη μέρα φυγοκεντρώνται στις 13.000 rpm, για 20 λεπτά, στους 4°C. Το υπερκείμενο απομακρύνεται προσεκτικά και το ίζημα τοποθετείται στους 37°C για 1 ώρα. Τέλος, μαζί με τα δείγματα που αποστέλλονται για αλληλούχιση αποστέλλονται επίσης και οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν κατά την αντίδραση PCR. Οι primers αραιώνονται κατά 1/5 από συγκέντρωση 50pmoles/μl σε τελική συγκέντρωση 10pmoles/μl σε τελικό όγκο ανάλογο του αριθμού των δειγμάτων που θα αλληλουχιθούν με τους συγκεκριμένους εκκινητές.

2.4.2 ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗ (SEQUENCING)

Η τεχνολογική επανάσταση στις μεθόδους ανάλυσης του γενετικού υλικού ξεκίνησε το 1977, όταν οι Maxam & Gilbert περιέγραψαν μία μέθοδο ανάλυσης της αλληλουχίας με ειδική χημική αποικοδόμηση των βάσεων. Τον ίδιο χρόνο ο Sanger με τους συνεργάτες του πρότειναν μία ενζυμική μέθοδο για ανάγνωση της αλληλουχίας του DNA χρησιμοποιώντας διδεοξυνουκλεοτίδια (ddNTP's), τα οποία οδηγούν στον πρόωρο τερματισμό της νουκλεϊκής σύνθεσης. Οι δύο αυτές μέθοδοι παράγουν πληθυσμούς σημασμένων πολυνουκλεοτιδίων τα οποία αρχίζουν από ένα συγκεκριμένο σημείο και τελειώνουν σε σημεία εξαρτώμενα από τη θέση μιας συγκεκριμένης βάσης του αρχικού κλώνου.

Τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί αυτόματοι αναλυτές που μειώνουν εξαιρετικά το χρόνο αλληλούχισης. Τα σημασμένα τμήματα του DNA ανιχνεύονται από μία πηγή laser και τα δεδομένα αποθηκεύονται για να αναλυθούν. Όλοι οι αυτόματοι αναλυτές περιέχουν προγράμματα περαιτέρω επεξεργασίας ή επιτρέπουν την εξαγωγή των δεδομένων για ανάλυση σε άλλα προγράμματα επεξεργασίας νουκλεϊνικών αλληλουχιών.

2.4.3 ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗΣ

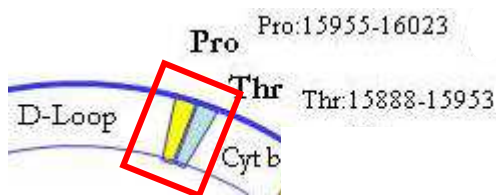
Για την στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων των δεδομένων της αλληλούχισης χρησιμοποιήθηκαν τα προγράμματα βιοπληροφορικής: BIOEDIT 7.0 και CLUSTALX 1.81. Το πρώτο χρησιμεύει στην «ανάγνωση» της αλληλουχίας του κάθε γονιδίου που απεικονίζεται σε μορφή χρωματογραφήματος, με κάθε κορυφή του να αντιστοιχεί και σε μια συγκεκριμένη βάση. Με τον τρόπο αυτό συγκρίνοντας τη ζητούμενη αλληλουχία με μια πρότυπη, εντοπίζουμε τη σημειακή μετάλλαξη, την προσθήκη ή την έλλειψη βάσει των διαφορών στις κορυφές τους. Το δεύτερο χρησιμεύει για την εκτέλεση πολλαπλής ομοπαράθεσης της ζητούμενης αλληλουχίας με μια πρότυπη, ως επιβεβαίωση της ορθής «ανάγνωσης» της αλληλουχίας με το BIOEDIT. Επιπλέον, με το CLUSTALX μπορούμε να προσδιορίσουμε και αν η σημειακή μετάλλαξη οδηγεί σε αλλαγή ή όχι του αρχικού νοήματος της αλληλουχίας.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στους 50 ασθενείς με Alzheimer που μελετήθηκαν εντοπίστηκαν 20 μεταλλάξεις. Εφτά από αυτές εντοπίζονται σε γονίδια tRNA (στο tRNA^{Thr}, στο tRNA^{Gln}, tRNA^{Trp} και στο tRNA^{Cys}) ενώ ο υπόλοιπες 13 εντοπίζονται σε παρακείμενες περιοχές (στο 12S rRNA, στο 16S rRNA, στο γονίδιο COII, στο γονίδιο ND1, στο D-loop και σε μη κωδικές περιοχές). Από το σύνολο των μεταλλάξεων, 5 μεταλλάξεις έχουν ήδη αναφερθεί σε ασθενείς με Alzheimer, ενώ 3 μεταλλάξεις ανιχνεύθηκαν για 1^η φορά, δηλαδή δεν αναφέρονται στη δικτυακή βάση δεδομένων για το μιτοχόνδριο www.mitomap.org.

3.1 ΓΟΝΙΔΙΑ tRNA^{Thr} ΚΑΙ tRNA^{Pro} & ΤΜΗΜΑΤΑ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΤΟΥ ΚΥΤΟΧΡΩΜΑΤΟΣ b ΚΑΙ ΤΟΥ ΒΡΟΧΟΥ D

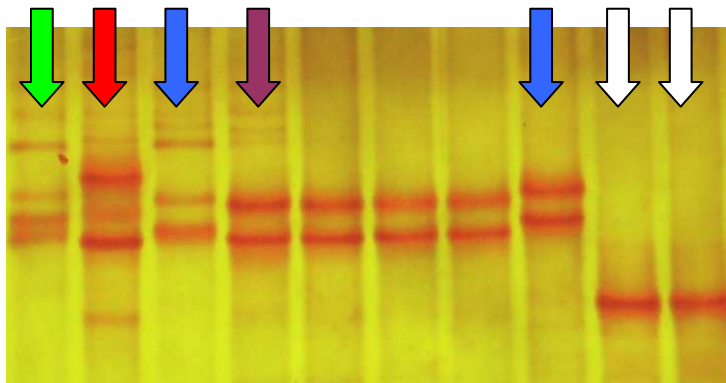
Για το τμήμα των 212 bp που κωδικοποιεί τα γονίδια tRNA^{Thr} και tRNA^{Pro} καθώς και τμήματα των παρακείμενων γονιδίων του κυτοχρώματος b και του βρόχου D, εντοπίστηκαν 5 διαφορετικά πρότυπα με τη μέθοδο του SSCP.



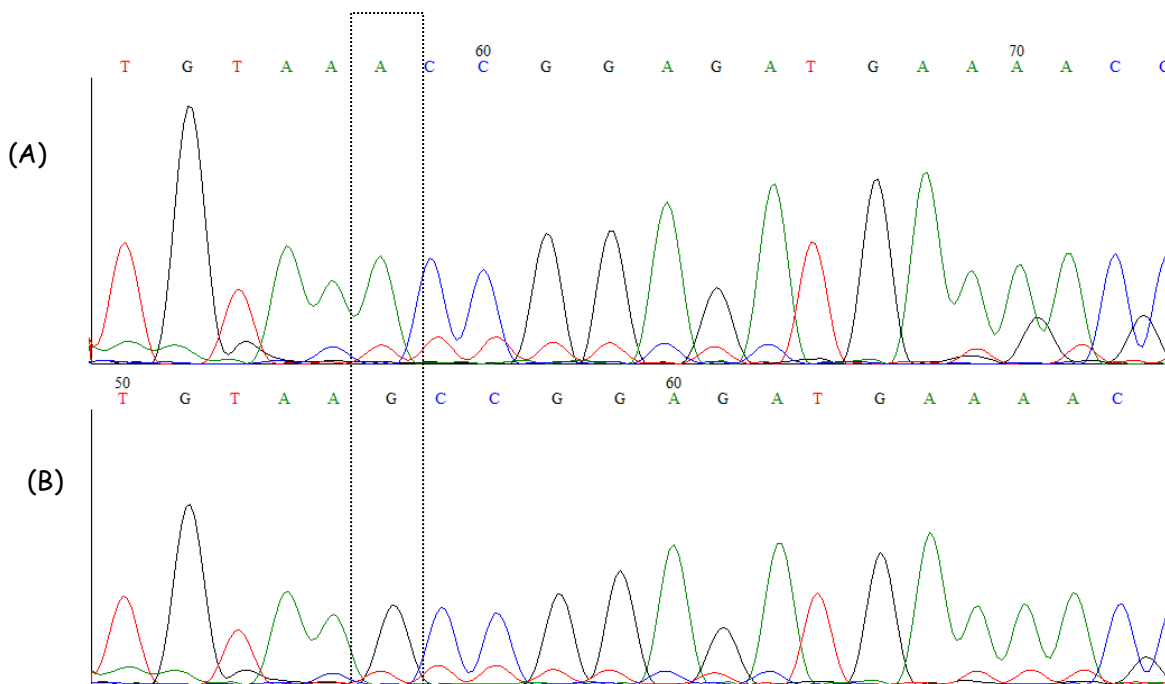
Εικόνα 11: Τμήμα του mtDNA. Με το πλαίσιο κόκκινου χρώματος φαίνονται τα άκρα των εκκινήτων που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση των γονιδίων tRNA^{Thr} και tRNA^{Pro}.

ΠΙΝΑΚΑΣ 3: Μεταλλάξεις που βρέθηκαν στο γονίδιο tRNA^{Thr} και στην NC10 σε σύνολο 50 ατόμων.

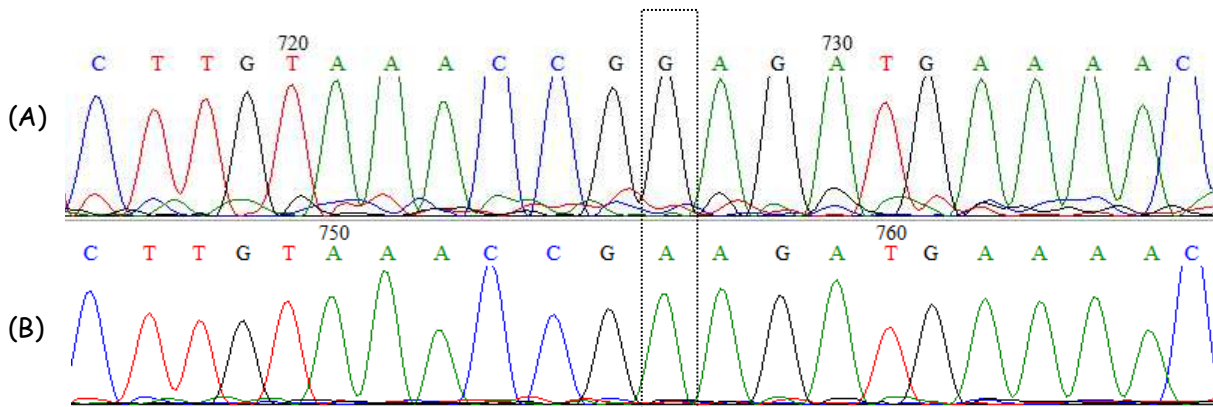
<u>Άτομα (9)</u>	<u>Μεταλλάξεις</u>
No 21	tRNA ^{Thr} C15904T
No 14 16	tRNA ^{Thr} A15924G
No 35 39	tRNA ^{Thr} G15928A
No 6 15	tRNA ^{Thr} C15946T
No 17 32	NC10 A15954C



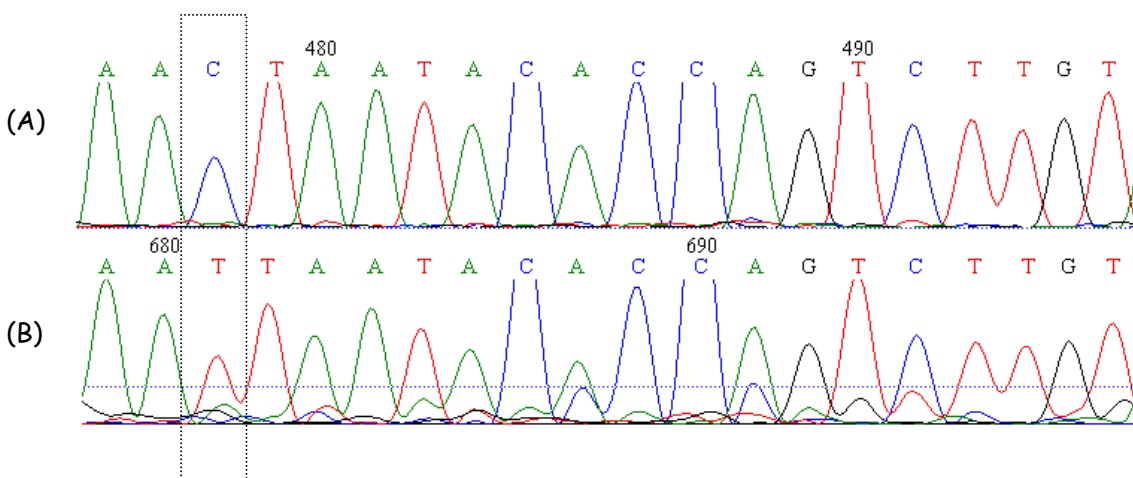
Εικόνα 12: Στο πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου 10% (22 ώρες, 220Volt, 4°C) απεικονίζονται με το πράσινο βελάκι το πρότυπο της μετάλλαξης *tRNA^{Thr} C15946T*, με το κόκκινο βελάκι το πρότυπο της μετάλλαξης *tRNA^{Thr} A15924G*, με τα λευκά βελάκια το πρότυπο της μετάλλαξης *tRNA^{Thr} G15928A*, με το μωβ βελάκι το πρότυπο της μετάλλαξης *tRNA^{Thr} C15904T*, και με τα μπλε βελάκια το πρότυπο της μετάλλαξης *NC10 A15954C*. Τα υπόλοιπα δείγματα εμφανίζουν το φυσιολογικό γονότυπο.



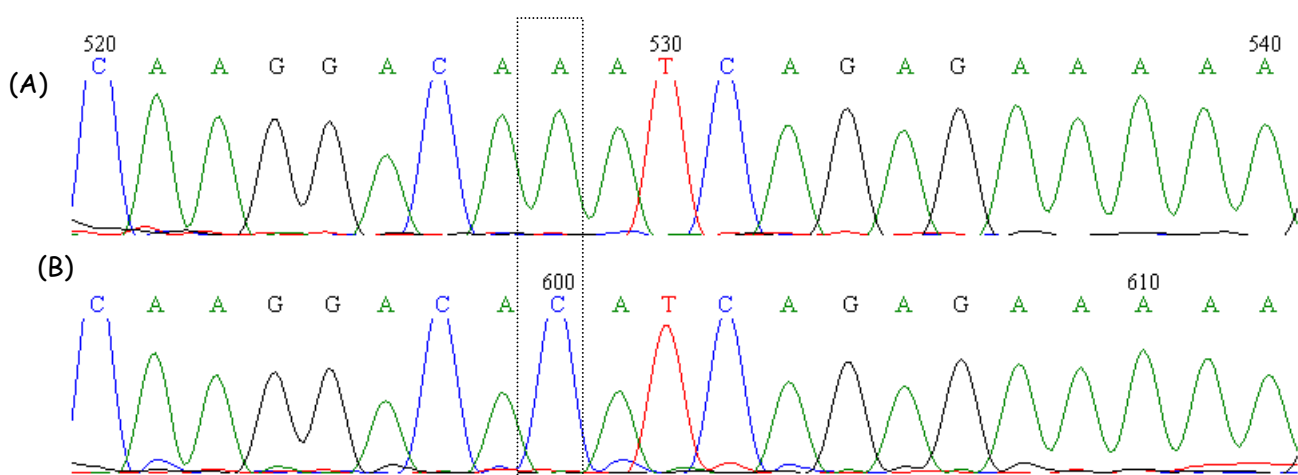
Εικόνα 13: Χρωματογράφημα *sequencing* τμήματος του γονιδίου *tRNA^{Thr}* σε άτομο *control* (A) και στο άτομο 14 (B). Είναι εμφανής η μετάπτωση *A→G* στη θέση 15924.



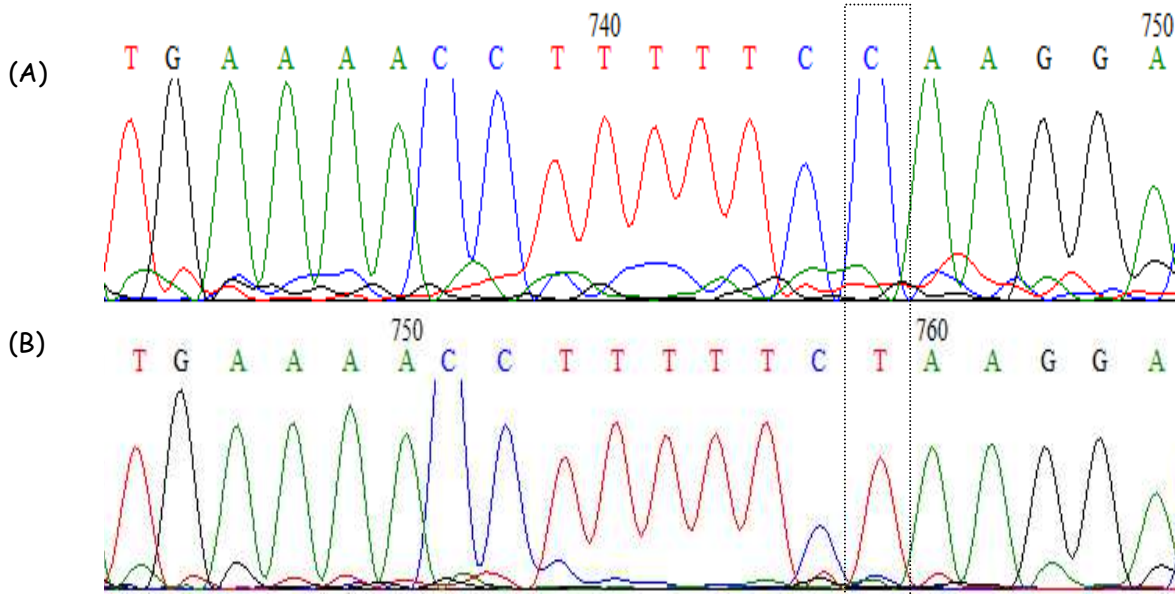
Εικόνα 14: Χρωματογράφημα sequencing τμήματος του γονιδίου $tRNA^{Thr}$ σε άτομο control (A) και στο άτομο 35 (B). Είναι εμφανής η μετάπτωση $G \rightarrow A$ στη θέση 15928.



Εικόνα 15: Χρωματογράφημα sequencing τμήματος του γονιδίου $tRNA^{Thr}$ σε άτομο control (A) και στο άτομο 21 (B). Είναι εμφανής η μετατροπή $C \rightarrow T$ στη θέση 15904.



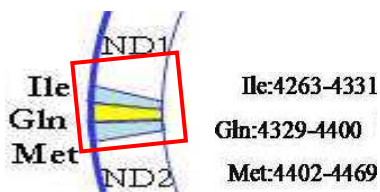
Εικόνα 16: Χρωματογράφημα sequencing τμήματος του γονιδίου $tRNA^{Thr}$, της περιοχής NC10 και του $tRNA^{Pro}$ σε άτομο control (A) και στο άτομο 32 (B). Είναι εμφανής η μετατροπή $A \rightarrow C$ στη θέση 15954.



Εικόνα 17: Χρωματογράφημα *sequencing* τμήματος του γονιδίου $tRNA^{Thr}$ στο άτομο 6 (A) και σε άτομο control (B). Είναι εμφανής η μετατροπή C→T στη θέση 15946.

3.2 ΓΟΝΙΔΙΑ $tRNA^{Ile}$, $tRNA^{Gln}$ και $tRNA^{Met}$ ΚΑΙ ΤΜΗΜΑΤΑ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΤΩΝ ND1 ΚΑΙ ND2 ΥΠΟΜΟΝΑΔΩΝ ΤΟΥ ΣΥΜΠΛΟΚΟΥ Ι ΤΗΣ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΗΣ ΑΛΥΣΙΔΑΣ

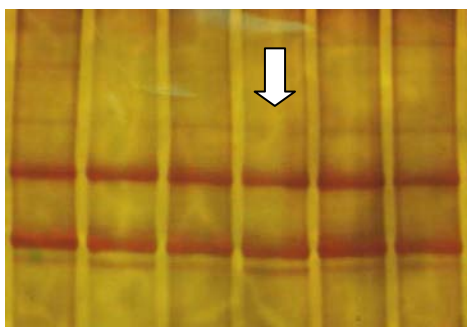
Για το τμήμα των 246 bp που κωδικοποιεί τα γονίδια $tRNA^{Ile}$, $tRNA^{Gln}$ και $tRNA^{Met}$ καθώς και τμήματα των παρακείμενων γονιδίων των ND1 και ND2 υπομονάδων του συμπλόκου Ι της αναπνευστικής αλυσίδας εντοπίστηκε 1 διαφορετικό πρότυπο με τη μέθοδο του SSCP.



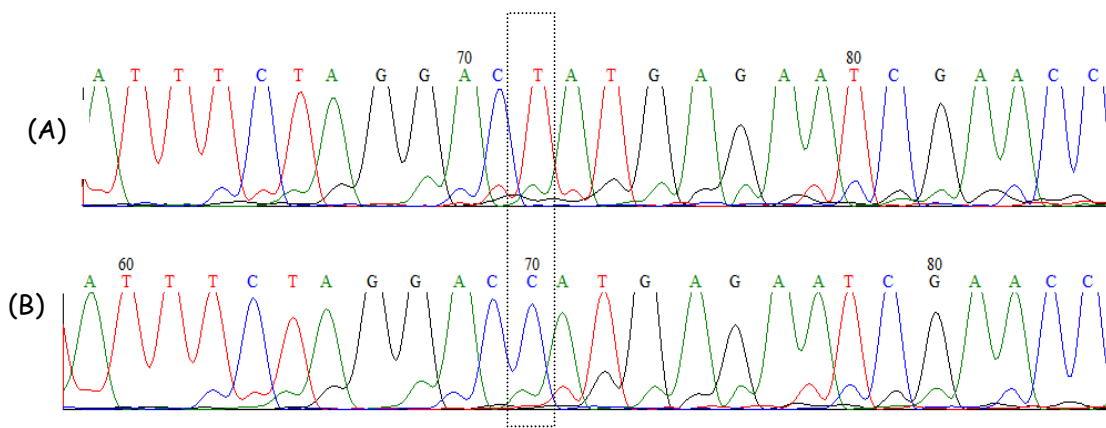
Εικόνα 18: Τμήμα του mtDNA. Με το πλαίσιο κόκκινου χρώματος φαίνονται τα άκρα των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση των γονιδίων $tRNA^{Ile}$, $tRNA^{Gln}$ και $tRNA^{Met}$.

ΠΙΝΑΚΑΣ 4: Μεταλλάξεις που βρέθηκαν στο γονίδιο $tRNA^{Gln}$ σε σύνολο 50 ατόμων.

Άτομο (1)	Μεταλλάξεις
No 8	$tRNA^{Gln}$ T4336C



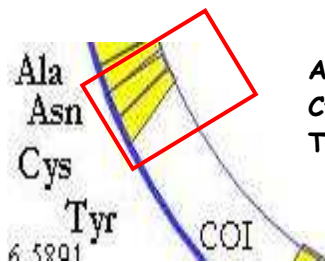
Εικόνα 19: Στο πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου 10% (22 ώρες, 220Volt, 4°C) απεικονίζεται με το λευκό βελάκι το πρότυπο της μετάλλαξης $tRNA^{Gln}$ T4336C. Τα υπόλοιπα δείγματα εμφανίζουν το φυσιολογικό γονότυπο.



Εικόνα 20: Χρωματογράφημα sequencing τμήματος του γονιδίου $tRNA^{Gln}$ σε άτομο control (A) και στο άτομο 8 (B). Είναι εμφανής η μετάπτωση T→C στη θέση 4336.

3.3 ΓΟΝΙΔΙΑ $tRNA^{Asn}$, $tRNA^{Cys}$ ΚΑΙ $tRNA^{Tyr}$ ΚΑΙ ΤΜΗΜΑ ΤΗΣ ΥΠΟΜΟΝΑΔΑΣ I ΤΗΣ ΟΞΕΙΔΑΣΗΣ ΤΟΥ ΚΥΤΟΧΡΩΜΑΤΟΣ C

Για το τμήμα των 294 bp που κωδικοποιεί τα γονίδια $tRNA^{Asn}$, $tRNA^{Cys}$ και $tRNA^{Tyr}$ καθώς και τμήμα του γονιδίου της υπομονάδας I της οξειδάσης του κυτοχρώματος c εντοπίστηκε 1 διαφορετικό πρότυπο με τη μέθοδο του SSCP. Το συγκεκριμένο πρότυπο, το οποίο εμφανίστηκε σε ένα μόνο δείγμα, μετά την επεξεργασία των αποτελεσμάτων του sequencing αποδείχτηκε ότι παρουσιάζει ένα νέο πολυμορφισμό.

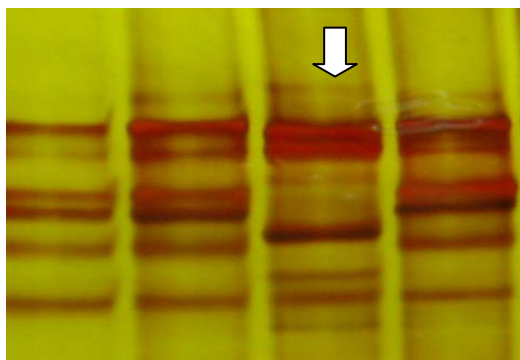


Asn: 5657-5729
Cys: 5761-5826
Tyr: 5826-5891

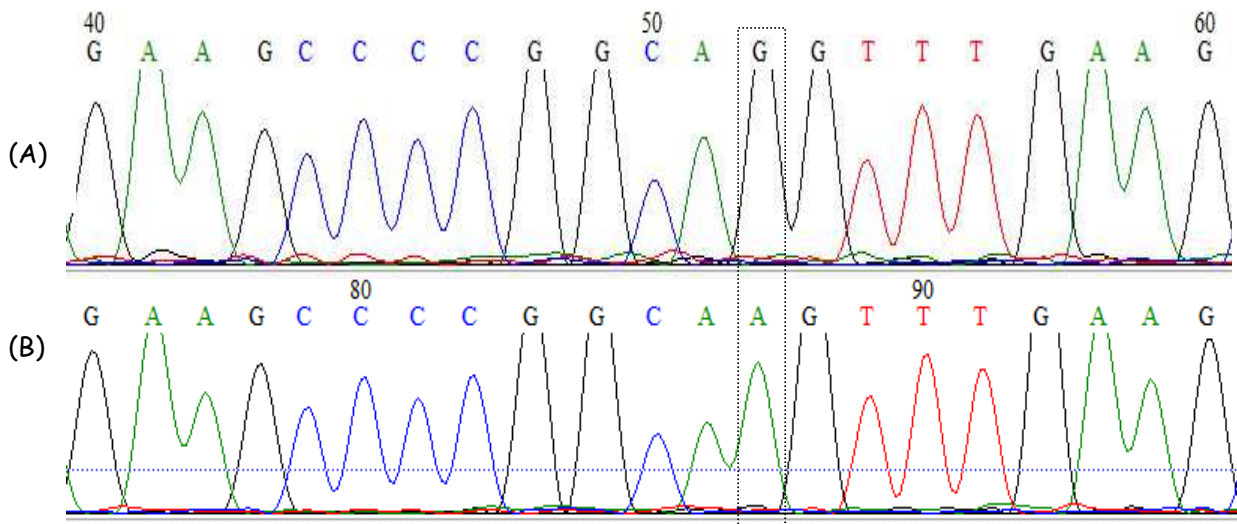
Εικόνα 21: Τμήμα του mtDNA. Με το πλαίσιο κόκκινου χρώματος φαίνονται τα άκρα των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση των γονιδίων $tRNA^{Asn}$, $tRNA^{Cys}$ και $tRNA^{Tyr}$.

ΠΙΝΑΚΑΣ 5: Μεταλλάξεις που βρέθηκαν στο $tRNA^{Cys}$ σε σύνολο 50 ατόμων.

Άτομο (1)	Μεταλλάξεις
No 42	$tRNA^{Cys}$ G5772A



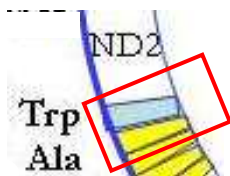
Εικόνα 22: Στο πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου 10% (22ώρες, 220Volt, 4°C) απεικονίζονται με το λευκό βελάκι το πρότυπο της μετάλλαξης $tRNA^{Cys}$ G5772A. Τα υπόλοιπα δείγματα εμφανίζουν τον φυσιολογικό γονότυπο.



Εικόνα 23: Χρωματογράφημα sequencing τμήματος του γονιδίου *tRNA^{Cys}* σε άτομο control (A) και στο άτομο 42 (B). Είναι εμφανής η μετάπτωση G→A στη θέση 5772.

3.4 ΓΟΝΙΔΙΑ *tRNA^{Trp}*, *tRNA^{Ala}*, & ΤΜΗΜΑ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΤΗΣ ND2 ΥΠΟΜΟΝΑΔΑΣ ΤΟΥ ΣΥΜΠΛΟΚΟΥ I ΤΗΣ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΗΣ ΑΛΥΣΙΔΑΣ

Για το τμήμα 242bp που κωδικοποιεί τα γονίδια *tRNA^{Trp}* και *tRNA^{Ala}* καθώς και το τμήμα του γονιδίου της ND2 υπομονάδας του συμπλόκου I εντοπίστηκε 1 διαφορετικό πρότυπο με τη μέθοδο του SSCP. Το συγκεκριμένο πρότυπο, το οποίο εμφανίστηκε σε ένα μόνο δείγμα, μετά την επεξεργασία των αποτελεσμάτων του sequencing αποδείχτηκε ότι παρουσιάζει ένα νέο πολυμορφισμό.



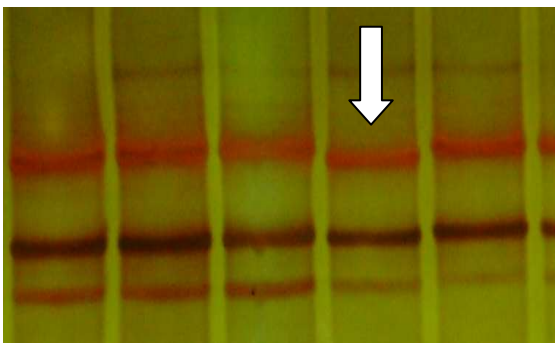
Trp:5512-5579

Ala:5587-5655

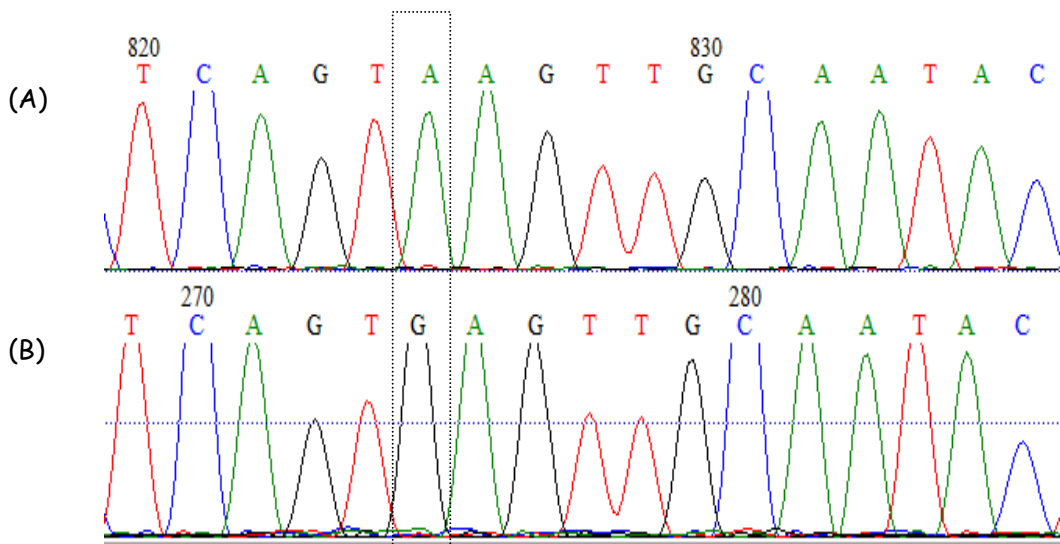
Εικόνα 24: Τμήμα του mtDNA. Με το πλαίσιο κόκκινου χρώματος φαίνονται τα άκρα των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση των γονιδίων *tRNA^{Trp}* και *tRNA^{Ala}*.

ΠΙΝΑΚΑΣ 6: Μεταλλάξεις που βρέθηκαν στο γονίδιο *tRNA^{Trp}* σε σύνολο 50 ατόμων.

<u>Άτομα (1)</u>	<u>Μεταλλάξεις</u>
No 33	<i>tRNA^{Trp}</i> A5558G



Εικόνα 25: Στο πήκτωμα πολυακρυλαμίδιου 10% (22ώρες, 220Volt, 4°C) απεικονίζονται με το λευκό βελάκι το πρότυπο της μετάλλαξης *tRNA^{Trp}* A5558G. Τα υπόλοιπα δείγματα εμφανίζουν τον φυσιολογικό γονότυπο.



Εικόνα 26: Χρωματογράφημα sequencing τμήματος του γονιδίου $tRNA^{Trp}$ σε άτομο control (A) και στο άτομο 33 (B). Είναι εμφανής η μετάπτωση A→G στη θέση 5558.

3.5 ΓΟΝΙΔΙΟ $tRNA^{Leu(UUR)}$ ΚΑΙ ΤΜΗΜΑΤΑ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΤΟΥ 16S rRNA ΚΑΙ ΤΗΣ ND1 ΥΠΟΜΟΝΑΔΑΣ ΤΟΥ ΣΥΜΠΛΟΚΟΥ I ΤΗΣ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΗΣ ΑΛΥΣΙΔΑΣ

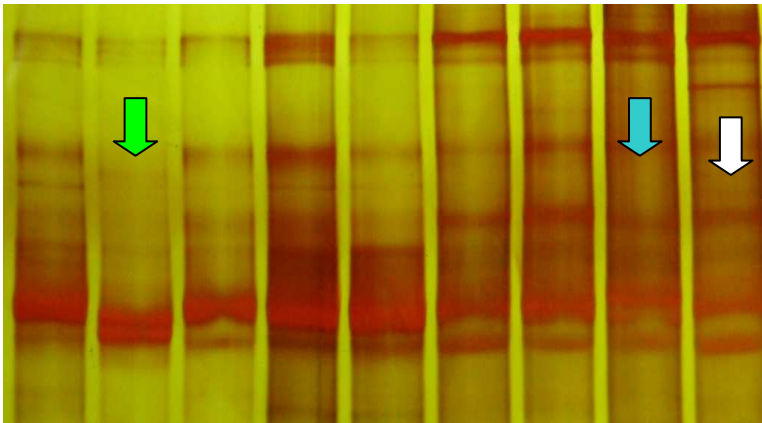
Για το τμήμα των 293 bp που κωδικοποιεί το γονίδιο $tRNA^{Leu(UUR)}$ καθώς και τμήματα των γονιδίων του 16S rRNA και της ND1 υπομονάδας του συμπλόκου I της αναπνευστικής αλυσίδας εντοπίστηκαν 3 διαφορετικά πρότυπα με τη μέθοδο του SSCP.



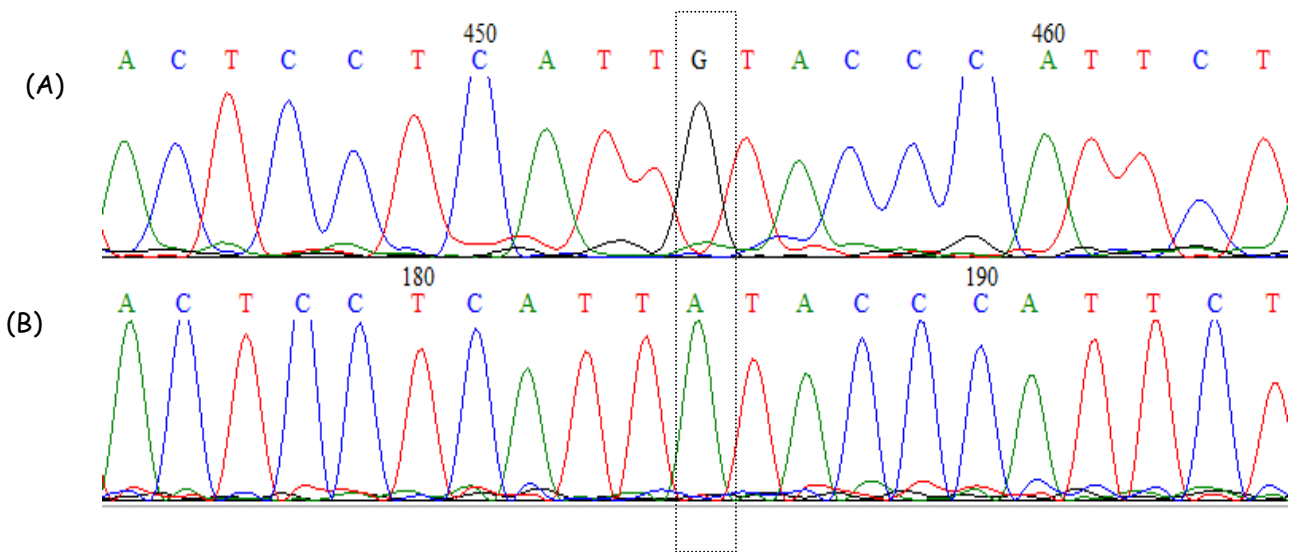
Εικόνα 27: Τμήμα του mtDNA. Με το πλαίσιο κόκκινου χρώματος φαίνονται τα άκρα των εκκίνητων που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση των γονιδίων $tRNA^{Leu(UUR)}$.

ΠΙΝΑΚΑΣ 7: Μεταλλάξεις που βρέθηκαν στο γονίδιο ND1 και στο γονίδιο 16S rRNA σε σύνολο 50 ατόμων.

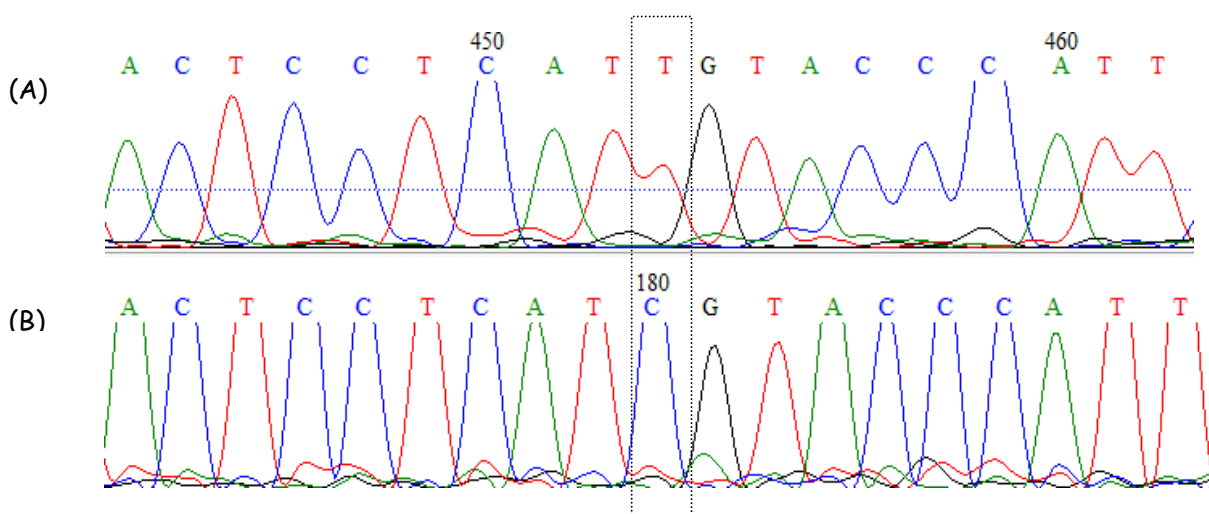
<u>Άτομα (3)</u>	<u>Μεταλλάξεις</u>
No 6	ND1 G3337A
No 23	ND1 T3336C
No 24	16S rRNA T3197C



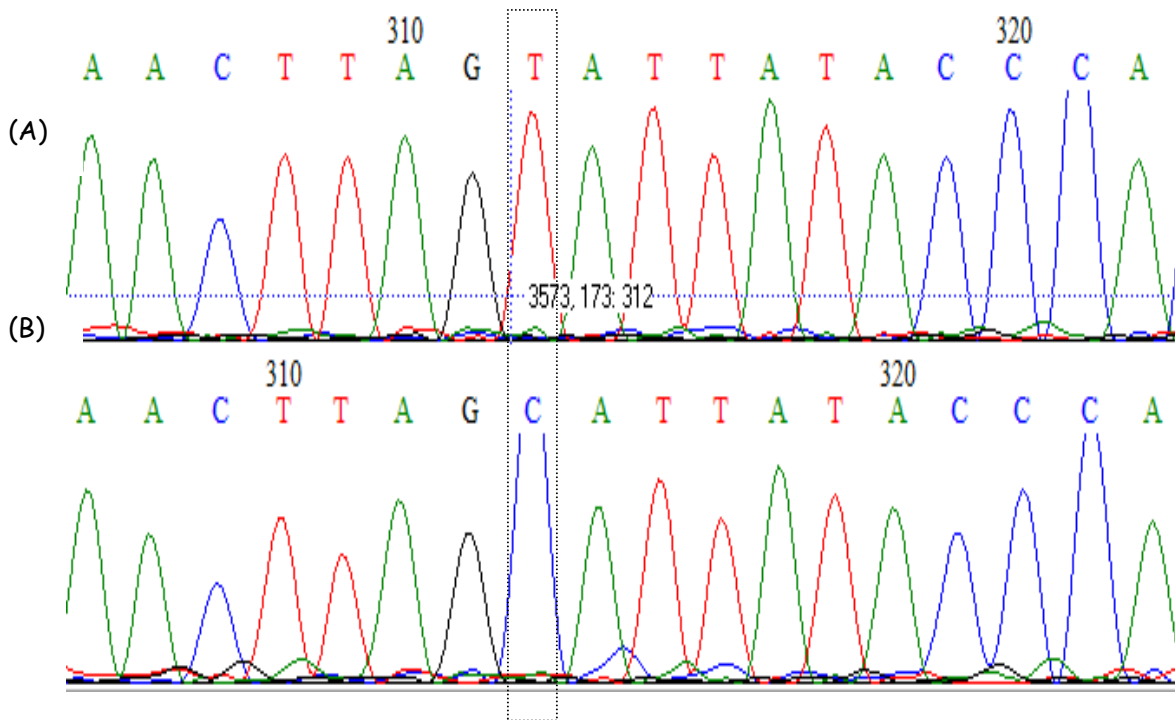
Εικόνα 28: Στο πηκτωμα πολυακρυλαμιδίου 10% (22 ώρες, 220Volt, 4°C) απεικονίζονται με το πράσινο βελάκι το πρότυπο της μετάλλαξης **ND1 63337A** με το μπλε βελάκι το πρότυπο της μετάλλαξης **ND1 T3336C** και με το λευκό βελάκι το πρότυπο της μετάλλαξης **16S rRNA T3197C**. Τα υπόλοιπα δείγματα εμφανίζουν το φυσιολογικό γονότυπο.



Εικόνα 29: Χρωματογράφημα sequencing τμήματος του γονιδίου ND1 σε άτομο control (A) και στο άτομο 6 (B). Είναι εμφανής η μετάπτωση G→A στη θέση 3337.



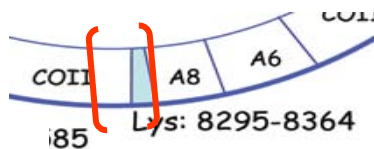
Εικόνα 30: Χρωματογράφημα sequencing τμήματος του γονιδίου ND1 σε άτομο control (A) και στο άτομο 23 (B). Είναι εμφανής η μετάπτωση T→C στη θέση 3336.



Εικόνα 31: Χρωματογράφημα *sequencing* τμήματος του γονιδίου **16S rRNA** σε άτομο *control* (A) και στο άτομο 24 (B). Είναι εμφανής η μετάπτωση T→C στη θέση 317.

3.6 ΓΟΝΙΔΙΟ $tRNA^{Lys}$ ΚΑΙ ΤΜΗΜΑΤΑ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΤΗΣ ΥΠΟΜΟΝΑΔΑΣ ΙΙ ΤΗΣ ΟΞΕΙΔΑΣΗΣ ΤΟΥ ΚΥΤΟΧΡΩΜΑΤΟΣ C ΚΑΙ ΤΗΣ A8 ΥΠΟΜΟΝΑΔΑΣ ΤΟΥ ΣΥΜΠΛΟΚΟΥ V ΤΗΣ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΗΣ ΑΛΥΣΙΔΑΣ

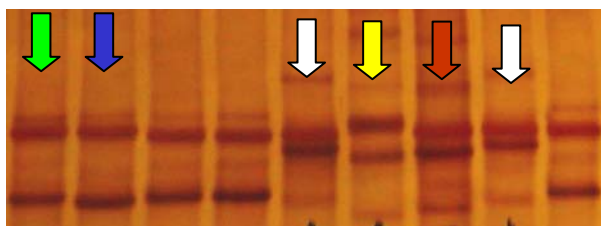
Για το τμήμα των 217 bp που κωδικοποιεί το γονίδιο $tRNA^{Lys}$ καθώς και τμήματα των γονιδίων της υπομονάδας ΙΙ της οξειδάσης του κυτοχρώματος c και της A8 υπομονάδας του συμπλόκου V της αναπνευστικής αλυσίδας εντοπίστηκαν 5 διαφορετικά πρότυπα με τη μέθοδο του SSCP.



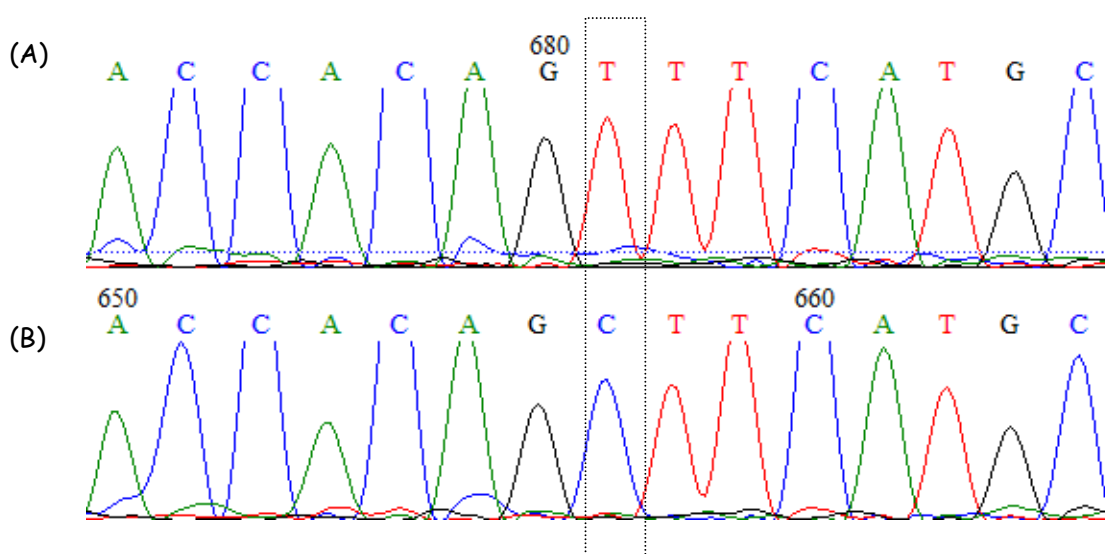
Εικόνα 32: Τμήμα του mtDNA. Με το πλαίσιο κόκκινου χρώματος φαίνονται τα άκρα των εκκινήτων που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση των γονιδίων $tRNA^{Lys}$.

ΠΙΝΑΚΑΣ 8: Μεταλλάξεις που βρέθηκαν στο γονίδιο *COII* και στην μη κωδική περιοχή 7 (NC7) σε σύνολο 50 ατόμων.

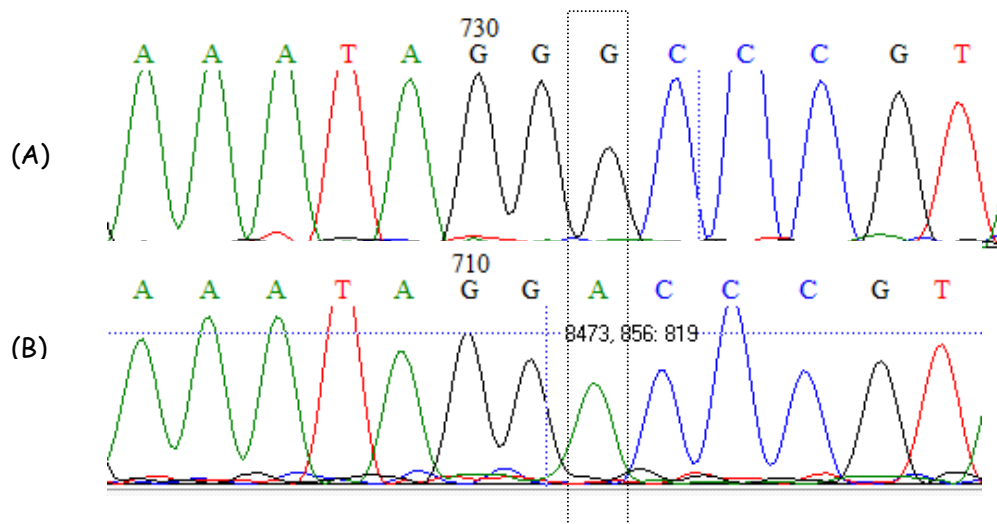
<u>Άτομα (11)</u>	<u>Μεταλλάξεις</u>
No 13	<i>COII</i> T8200C
No 14 19 20	<i>COII</i> G8251A
No 39	NC7 A8271G
No 38	NC7 ins8277 (4C)
No 26 27 28 29 41	NC7 G8292A



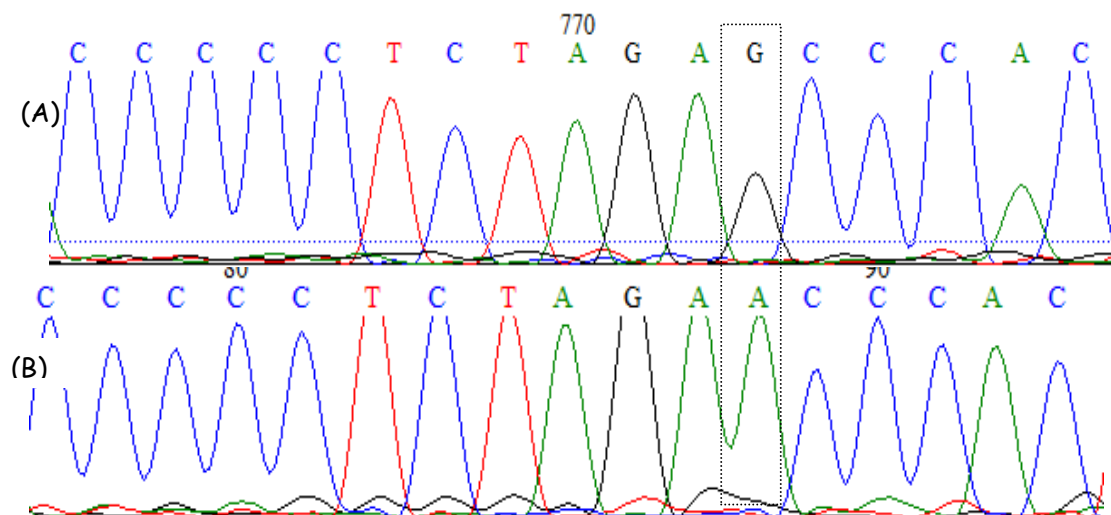
Εικόνα 33: Στο πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου 10% (22 ώρες, 220Volt, 4°C) απεικονίζονται με το πράσινο βελάκι το πρότυπο της μετάλλαξης *COII* T8200C, με το μπλε βελάκι το πρότυπο της μετάλλαξης *COII* G8251A, με τα λευκά βελάκια το πρότυπο της μετάλλαξης NC7 G8292A, με το κίτρινο βελάκι το πρότυπο της μετάλλαξης NC7 ins8277 (4C), και με το κόκκινο βελάκι το πρότυπο της μετάλλαξης NC7 A8271G. Τα υπόλοιπα δείγματα εμφανίζουν το φυσιολογικό γονότυπο.



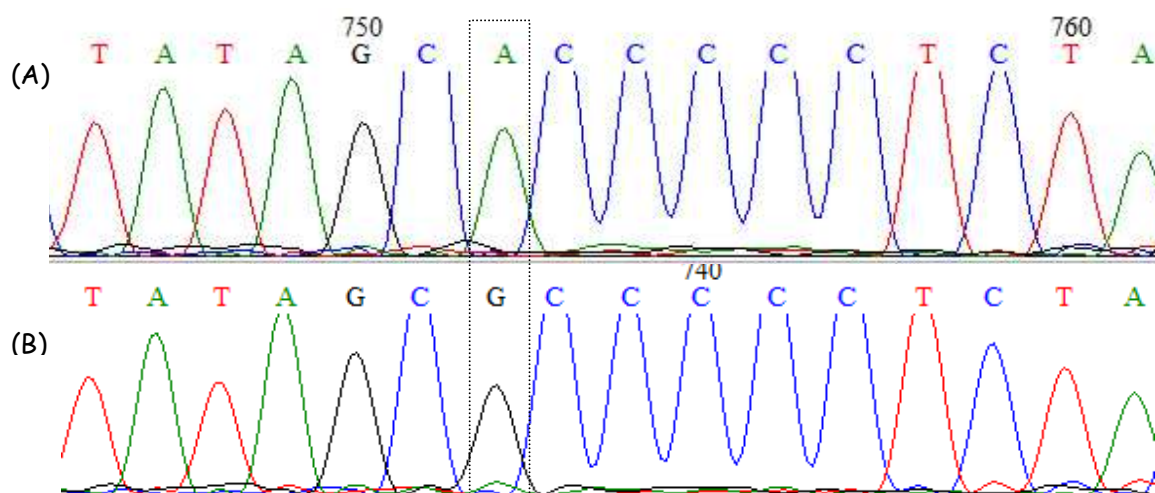
Εικόνα 34: Χρωματογράφημα sequencing τμήματος του γονιδίου *COII* σε άτομο control (A) και στο άτομο 13 (B). Είναι εμφανής η μετάπτωση T→C στη θέση 8200.



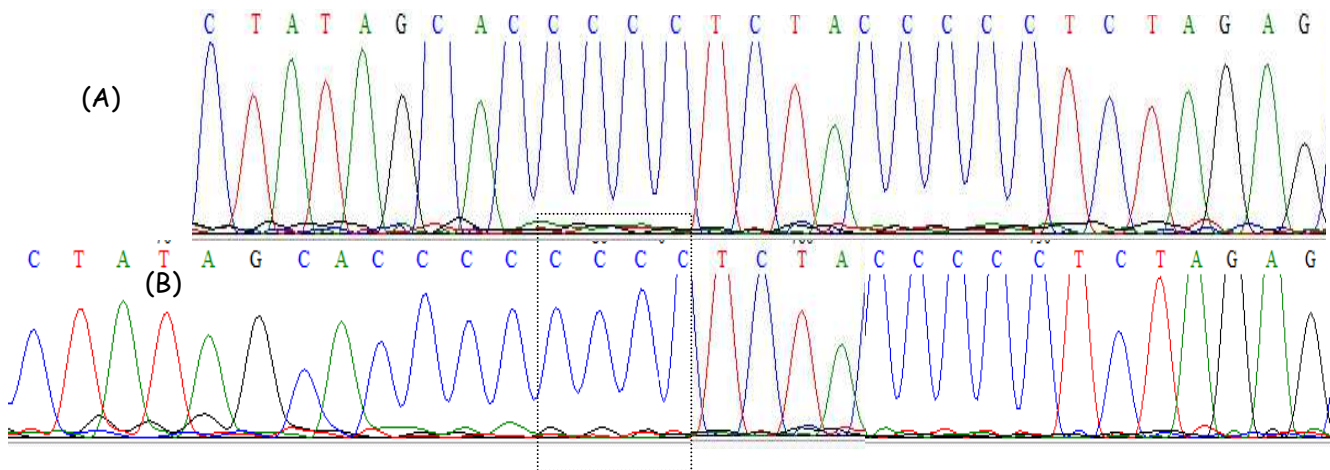
Εικόνα 35: Χρωματογράφημα sequencing τμήματος του γονιδίου *COII* σε άτομο control (A) και στο άτομο 14 (B). Είναι εμφανής η μετάπτωση G→A στη θέση 8251.



Εικόνα 36: Χρωματογράφημα sequencing τμήματος της περιοχής *NC7* σε άτομο control (A) και στο άτομο 28 (B). Είναι εμφανής η μετάπτωση G→A στη θέση 8292.



Εικόνα 37: Χρωματογράφημα sequencing τμήματος της περιοχής *NC7* σε άτομο control (A) και στο άτομο 39 (B). Είναι εμφανής η μετάπτωση A→G στη θέση 8271.



Εικόνα 38: Χρωματογράφημα sequencing τμήματος της περιοχής NC7 σε άτομο control (A) και στο άτομο 38 (B). Είναι εμφανής η προσθήκη 4C στη θέση 8277.

3.7 ΓΟΝΙΔΙΟ tRNA^{Phe} ΚΑΙ ΤΜΗΜΑΤΑ ΤΟΥ D-LOOP ΚΑΙ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΤΟΥ 12S rRNA

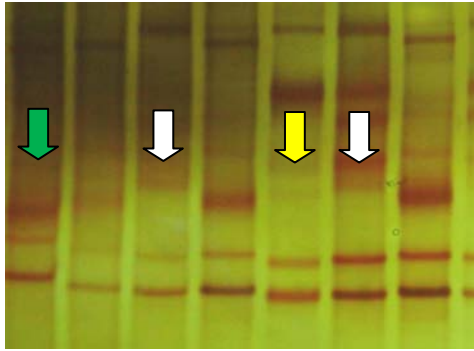
Για το τμήμα των 208 bp που κωδικοποιεί το γονίδιο tRNA^{Phe} καθώς και τμήματα του D-loop και του γονιδίου του 12S rRNA εντοπίστηκαν 3 διαφορετικά πρότυπα με τη μέθοδο του SSCP.



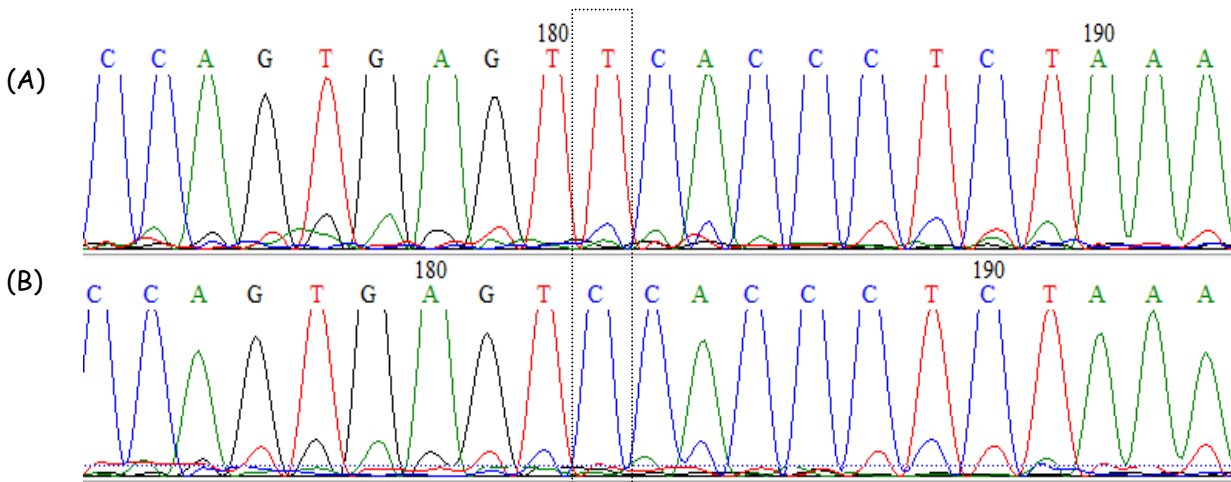
Εικόνα 39: Τμήμα του mtDNA. Με το πλαίσιο κόκκινου χρώματος φαίνονται τα άκρα των εκκνητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση των γονιδίων tRNA^{Phe}.

ΠΙΝΑΚΑΣ 9: Μεταλλάξεις που βρέθηκαν στο γονίδιο 12S rRNA και στο D-loop σε σύνολο 50 ατόμων.

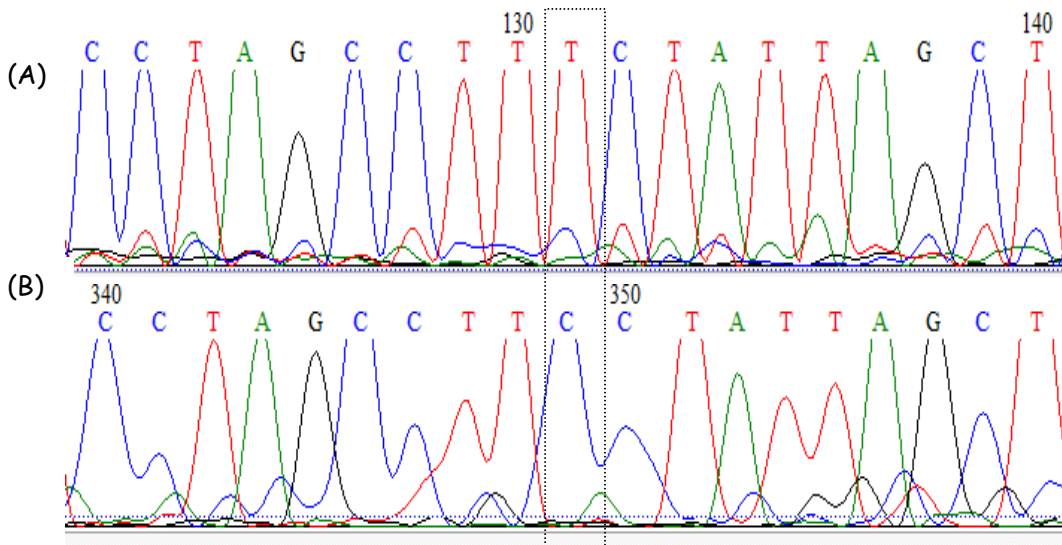
<u>Άτομα (6)</u>	<u>Μεταλλάξεις</u>
No 8	12S rRNA T721C
No 14	
24	D-loop
30	ins568-573 (3C)
37	
No 23	D-loop ins568-573 (5C) και 12S rRNA T669C



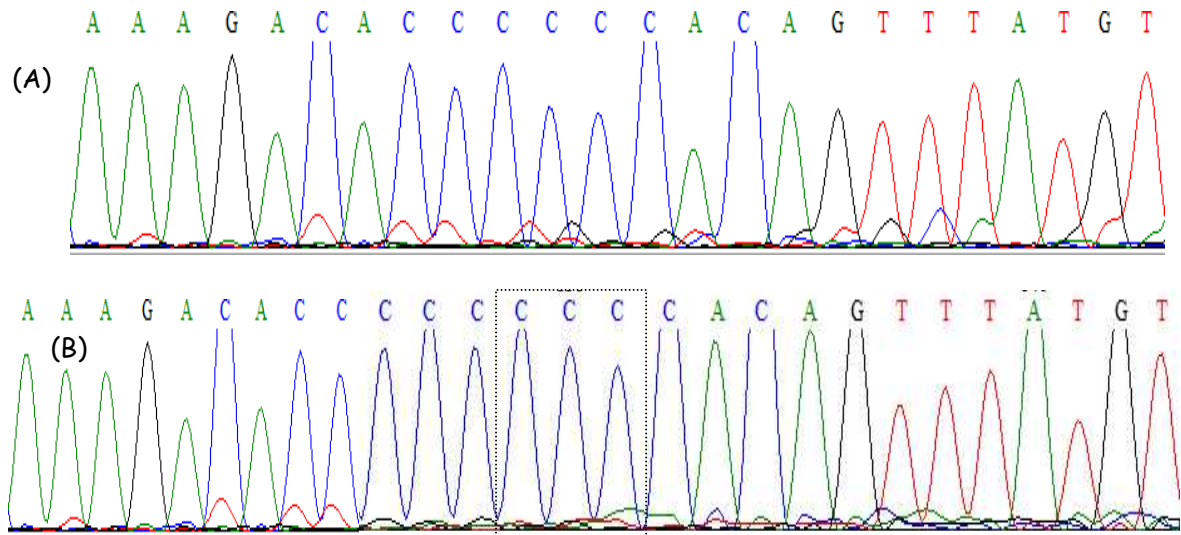
Εικόνα 40: Στο πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου 10% (22 ώρες, 220Volt, 4°C) απεικονίζονται με το πράσινο βελάκι το πρότυπο της μετάλλαξης **12S rRNA T721C**, με το λευκό βελάκι το πρότυπο της μετάλλαξης **D-loop ins568-573 (3C)**, και με το κίτρινο βελάκι το πρότυπο του συνδυασμού της μετάλλαξης **D-loop ins568-573 (5C)** και της μετάλλαξης **12S rRNA T669C**. Τα υπόλοιπα δείγματα εμφανίζουν το φυσιολογικό γονότυπο.



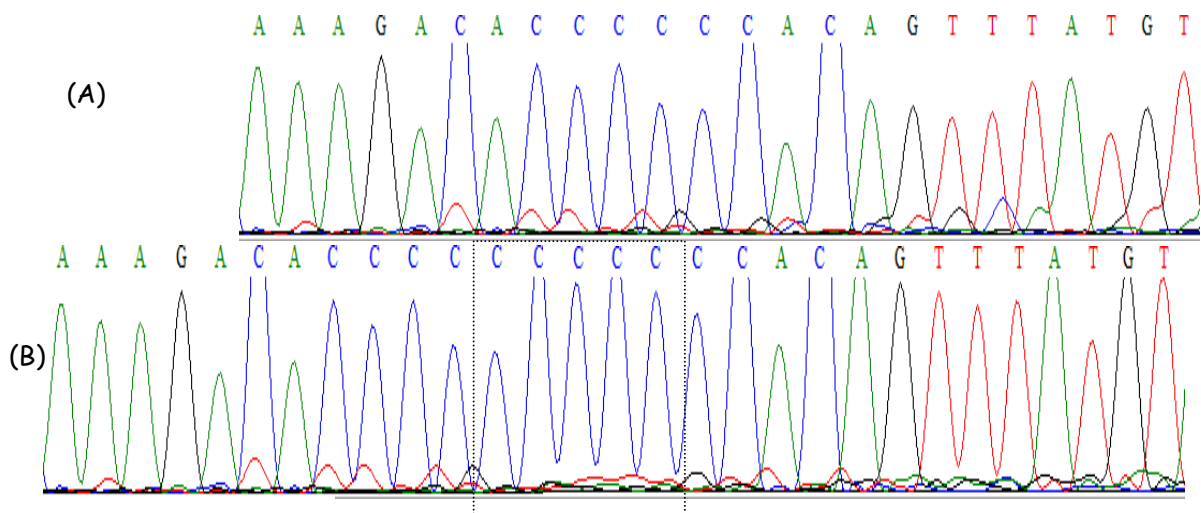
Εικόνα 41: Χρωματογράφημα sequencing τμήματος του γονιδίου 12S rRNA σε άτομο control (A) και στο άτομο 6 (B). Είναι εμφανής η μετάπτωση **T→C** στη θέση 721.



Εικόνα 42: Χρωματογράφημα sequencing τμήματος του γονιδίου 12S rRNA σε άτομο control (A) και στο άτομο 23 (B). Είναι εμφανής η μετάπτωση **T→C** στη θέση 669.



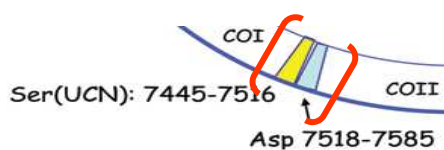
Εικόνα 43: Χρωματογράφημα sequencing τμήματος της περιοχής D-loop σε άτομο control (A) και στο άτομο 24 (B). Είναι εμφανής η προσθήκη 3C στη θέση 568.



Εικόνα 44: Χρωματογράφημα sequencing τμήματος της περιοχής D-loop σε άτομο control (A) και στο άτομο 23 (B). Είναι εμφανής η προσθήκη 5C στη θέση 568.

3.8 ΓΟΝΙΔΙΑ $tRNA^{Ser(UCN)}$, $tRNA^{Asp}$ & ΠΑΡΑΚΕΙΜΕΝΕΣ ΠΕΡΙΟΧΕΣ

Όσον αφορά τα γονίδια $tRNA^{Ser(UCN)}$, $tRNA^{Asp}$ καθώς και τα τμήματα των γονιδίων COI και COII του συμπλόκου III της αναπνευστικής αλυσίδας στην παρούσα εργασία δεν ανιχνεύθηκε κανένας πολυμορφισμός.

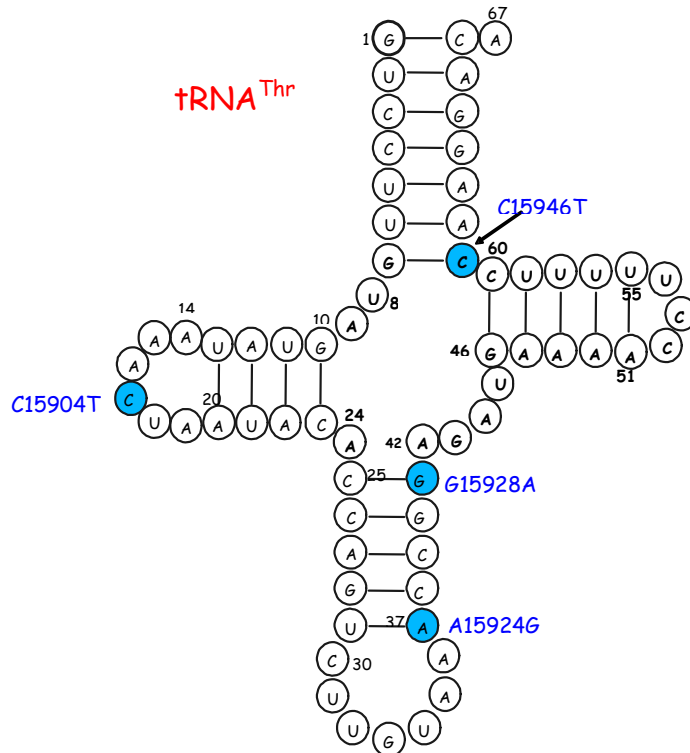


Εικόνα 45: Τμήμα του mtDNA. Με το πλαίσιο κόκκινου χρώματος φαίνονται τα άκρα των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση των γονιδίων $tRNA^{Ser(UCN)}$, και $tRNA^{Asp}$. Στα συγκεκριμένα γονίδια δεν βρέθηκε καμία μετάλλαξη στην παρούσα εργασία.

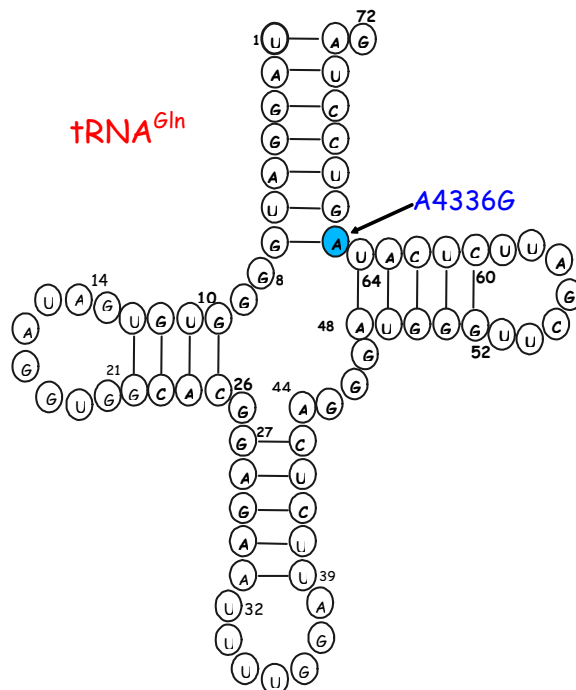
3.9 ΣΥΝΟΨΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

ΠΙΝΑΚΑΣ 10: Συγκεντρωτικός πίνακας με τις 20 μεταλλάξεις που εντοπίστηκαν στους 50 ασθενείς με Alzheimer που μελετήθηκαν. Αναφέρεται οι αριθμός των ατόμων που εμφάνισαν τη μετάλλαξη και οι θέσεις των μεταλλάξεων στο tRNA.

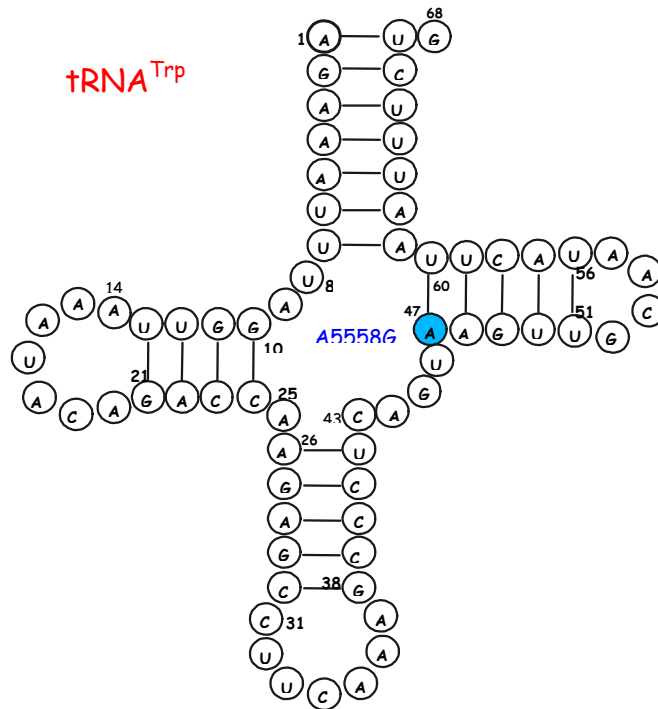
Γονίδιο	Νουκλεοτιδική αλλαγή	Αποτέλεσμα αλλαγής	Αριθμός ατόμων	Θέση στο tRNA	Αριθμός νουκλεοτιδίου στο γονίδιο
tRNA ^{Gln}	T4336C	μη κωδικοποιούσα	1	Βραχίονας υποδοχής	8
tRNA ^{Cys}	C5772T	μη κωδικοποιούσα	1	Θηλιά TψC	13
tRNA ^{Trp}	A5558G	μη κωδικοποιούσα	1	Θηλιά TψC	47
tRNA ^{Thr}	C15904T	μη κωδικοποιούσα	1	Θηλιά D	17
tRNA ^{Thr}	A15924G	μη κωδικοποιούσα	2	Βραχίονας Αντικωδικονίου	37
tRNA ^{Thr}	G15928A	μη κωδικοποιούσα	2	Βραχίονας Αντικωδικονίου	41
tRNA ^{Thr}	C15946T	μη κωδικοποιούσα	2	Βραχίονας υποδοχής	59
12S rRNA	T669C	μη κωδικοποιούσα	1	—	22
12S rRNA	T721C	μη κωδικοποιούσα	1	—	74
16S rRNA	T3197C	μη κωδικοποιούσα	1	—	1527
MT-CO2	T8200C	συνώνυμη	1	—	615
MT-CO2	G8251A	συνώνυμη	3	—	666
MT-ND1	T3336C	συνώνυμη	1	—	30
MT-ND1	G3337A	V—M	1	—	31
NC7	A8271G	μη κωδικοποιούσα	1	—	—
NC7	ins8277 (4C)	μη κωδικοποιούσα	1	—	—
NC7	G8292A	μη κωδικοποιούσα	5	—	—
NC10	A15954C	μη κωδικοποιούσα	2	—	—
D-loop	ins568-572 (3C)	μη κωδικοποιούσα	3	—	—
D-loop	ins568-572 (5C)	μη κωδικοποιούσα	1	—	—



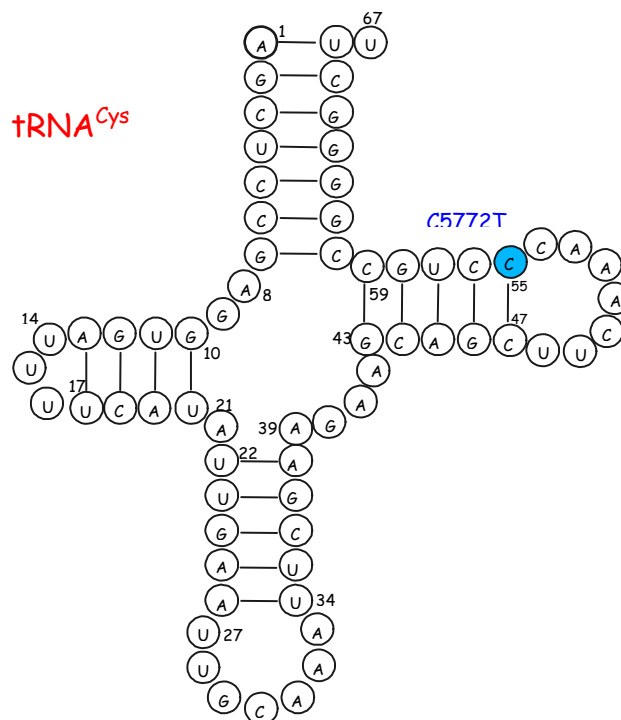
Εικόνα 46: Μεταλλάξεις που βρέθηκαν στο γονίδιο tRNA^{Thr} στους 50 ασθενείς με Alzheimer στην παρούσα μελέτη και η θέση τους στο μόριο του tRNA^{Thr}.



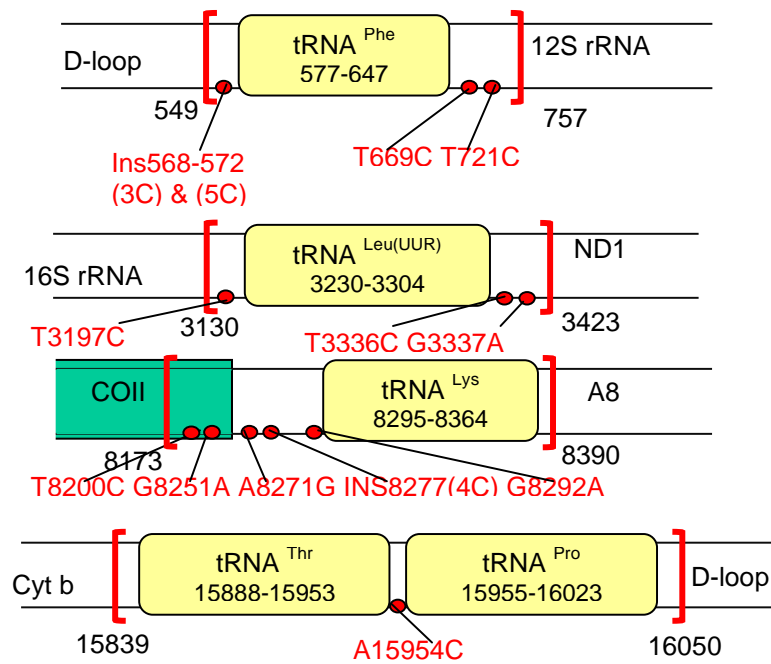
Εικόνα 47: Μεταλλάξεις που βρέθηκαν στο γονίδιο tRNA^{Gln} στους 50 ασθενείς με Alzheimer στην παρούσα μελέτη και η θέση τους στο μόριο του tRNA^{Gln}.



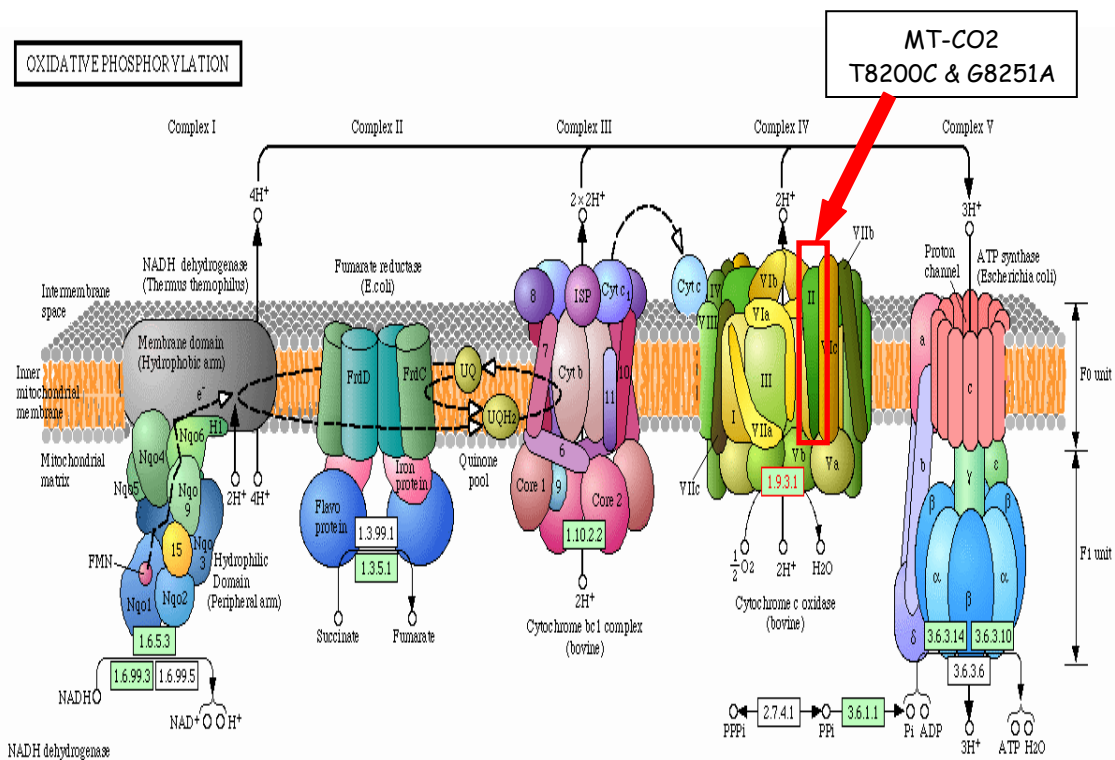
Εικόνα 48: Μεταλλάξεις που βρέθηκαν στο γονίδιο tRNA^{Trp} στους 50 ασθενείς με Alzheimer στην παρούσα μελέτη και η θέση τους στο μόριο του tRNA^{Trp}.



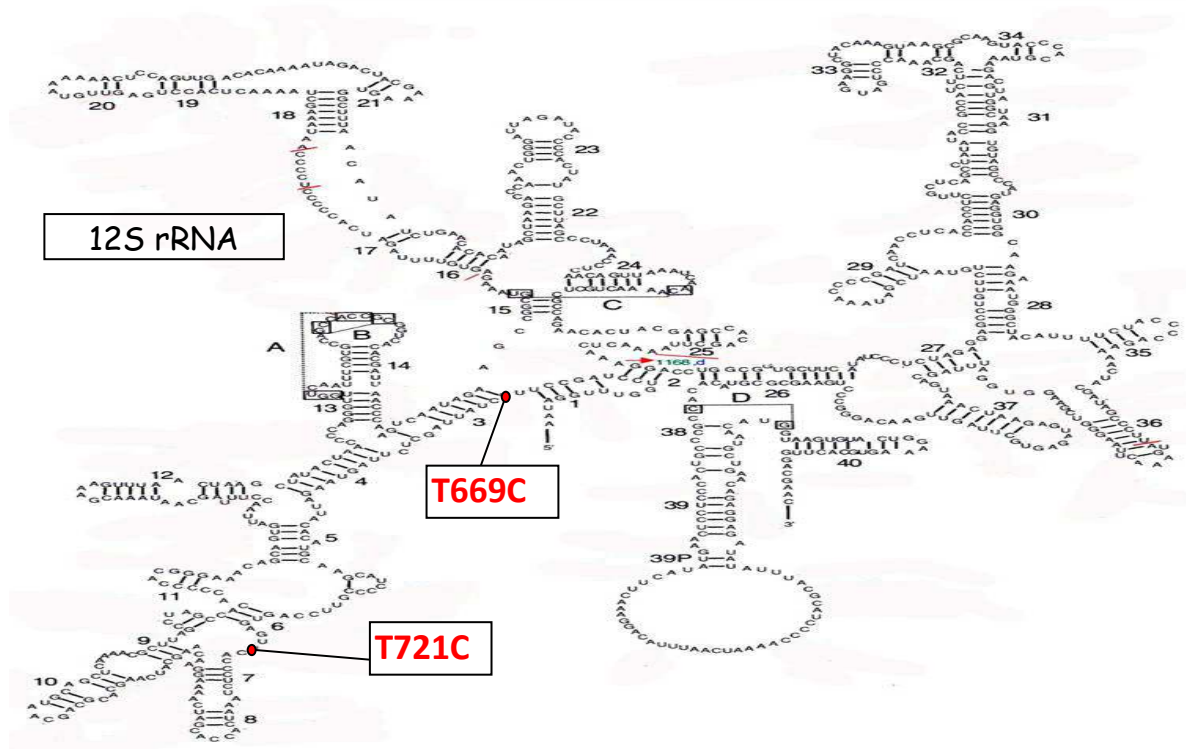
Εικόνα 49: Μεταλλάξεις που βρέθηκαν στο γονίδιο tRNA^{Cys} στους 50 ασθενείς με Alzheimer στην παρούσα μελέτη και η θέση τους στο μόριο του tRNA^{Cys}.



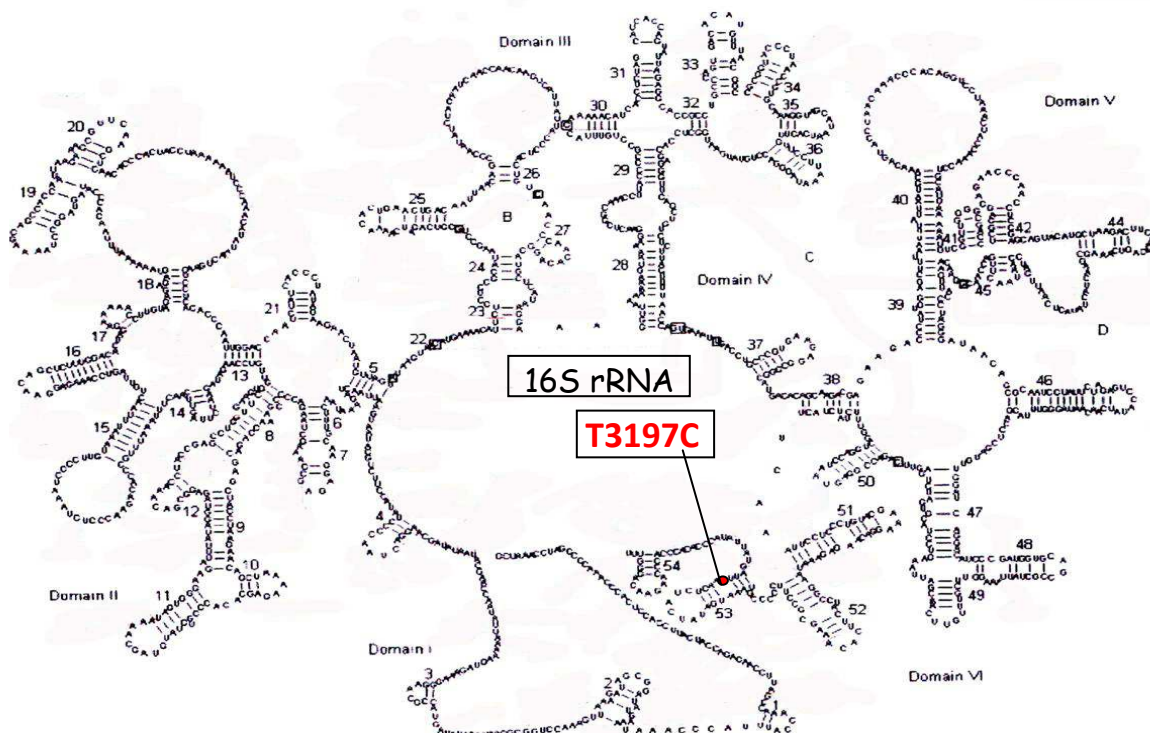
Εικόνα 50: Στην εικόνα φαίνονται οι μεταλλάξεις που βρέθηκαν στους 50 ασθενείς με Alzheimer στην παρούσα μελέτη σε παρακείμενες περιοχές των γονιδίων tRNA που εξετάστηκαν.



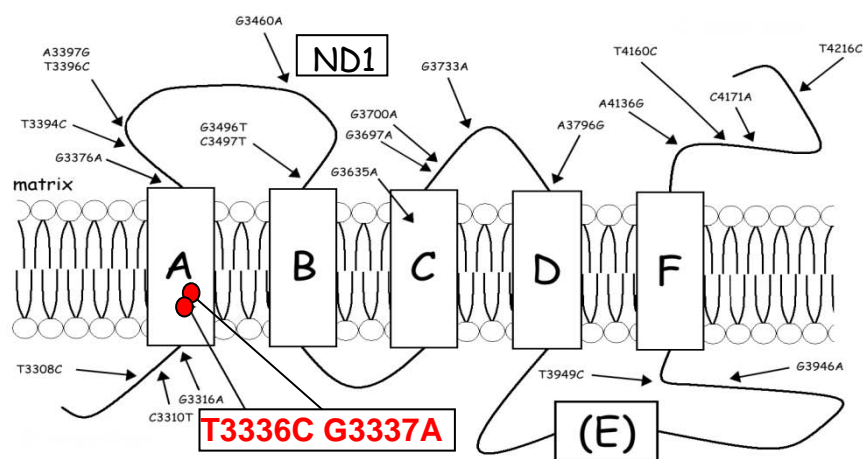
Εικόνα 51: Στην εικόνα φαίνεται η οξειδωτική φωσφορυλίωση και τα σύμπλοκα που συμμετέχουν σ' αυτή. Με κόκκινο πλαίσιο επισημαίνεται η υπομονάδα II της οξειδάσης του κυτοχρώματος c στο σύμπλοκο IV όπου εντοπίστηκαν οι μεταλλάξεις T8200C & G8251A.



Εικόνα 52: Στην εικόνα φαίνεται το μόριο του 12S rRNA και επισημαίνονται οι μεταλλάξεις T669C & T721C που βρέθηκαν σε αυτό το γονίδιο στους 50 ασθενείς με Alzheimer στην παρούσα μελέτη.



Εικόνα 53: Στην εικόνα φαίνεται το μόριο του 16S rRNA και επισημαίνεται η μετάλλαξη T3197C που βρέθηκε σε αυτό το γονίδιο στους 50 ασθενείς με Alzheimer στην παρούσα μελέτη.



Εικόνα 54: Στην εικόνα φαίνεται το μόριο του ND1 και επισημαίνονται οι μεταλλάξεις T3336C & G3337A που βρέθηκαν σε αυτό το γονίδιο στους 50 ασθενείς με Alzheimer στην παρούσα μελέτη.

Πίνακας 11α. Οι μεταλλάξεις που ανιχνεύθηκαν στα γονίδια tRNA στους 50 ασθενείς με Alzheimer και η συχνότητα με την οποία βρέθηκαν στους ασθενείς και στα άτομα ελέγχου. Με πράσινο χρώμα επισημαίνονται οι μεταλλάξεις που βρέθηκαν στα αποτελέσματα μίας άλλης μελέτης που πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο.

Γενετικός τόπος	Αλλαγή νουκλεοτιδίου	Alzheimer	Φυσιολογικοί
tRNA Gln	T4336C	1/50 (2%)	1/72 (~1,4%)
tRNA Trp	A5558G	1/50 (2%)	0/98
tRNA Cys	G5772A	1/50 (2%)	0/121
tRNA Thr	C15904T	1/50 (2%)	1/121 (~0,83%)
tRNA Thr	A15924G	2/50 (4%)	4/121 (~3,3%)
tRNA Thr	G15928A	2/50 (4%)	11/121 (~9,1%)
tRNA Thr	C15946T	2/50 (4%)	0/121
tRNA Gly	T10007C	1/50 (2%)	0/117
tRNA Gly	T10034C	1/50 (2%)	0/117

Πίνακας 11β. Οι μεταλλάξεις που ανιχνεύθηκαν στα γονίδια rRNA στους 50 ασθενείς με Alzheimer και η συχνότητα με την οποία βρέθηκαν στους ασθενείς και στα άτομα ελέγχου

Γενετικός τόπος	Αλλαγή νουκλεοτιδίου	Alzheimer	Φυσιολογικοί
12S rRNA	T669C	1/50 (2%)	0/61
12S rRNA	T721C	1/50 (2%)	1/61 (~1,6%)
16S rRNA	T3197C	1/50 (2%)	1/175 (~0,6%)

Πίνακας 11γ. Οι μεταλλάξεις που ανιχνεύθηκαν στα γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες στους 50 ασθενείς με Alzheimer και η συχνότητα με την οποία βρέθηκαν στους ασθενείς και στα άτομα ελέγχου. Με πράσινο χρώμα επισημαίνονται οι μεταλλάξεις που βρέθηκαν στα αποτελέσματα μίας άλλης μελέτης που πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο.

Γενετικός τόπος	Αλλαγή νουκλεοτιδίου	Alzheimer	Φυσιολογικοί
ND1	T3336C	1/50 (2%)	0/175
ND1	G3337A	1/50 (2%)	0/175
COII	T8200C	1/50 (2%)	0/175
COII	G8251A	3/50 (6%)	4/175 (~2,3%)
ND3	C10124T	1/50 (2%)	1/117 (~0,9%)
ND3	A10398G	10/50 (20%)	6/62 (~9,7%)

Πίνακας 11δ. Οι μεταλλάξεις που ανιχνεύθηκαν στις μη κωδικές περιοχές του mtDNA στους 50 ασθενείς με Alzheimer και η συχνότητα με την οποία βρέθηκαν στους ασθενείς και στα άτομα ελέγχου

Γενετικός τόπος	Αλλαγή νουκλεοτιδίου	Alzheimer	Φυσιολογικοί
NC7	A8271G	1/50 (2%)	0/175
NC7	ins8277 (4C)	1/50 (2%)	0/175
NC7	G8292A	5/50 (10%)	2/175 (~1,2%)
NC10	A15954C	2/50 (4%)	2/121 (~1,7%)
D-loop	ins568-573 (3C)	3/50 (6%)	1/61 (~3,5%)
D-loop	ins568-573 (5C)	1/50 (2%)	0/61

Πίνακας 12. Οι συνδυασμοί μεταλλάξεων που ανιχνεύθηκαν στους ασθενείς με Alzheimer. Κανένας από αυτούς δεν ανιχνεύθηκε σε φυσιολογικά άτομα.

Συνδυασμός των μεταλλάξεων του mtDNA (με βάση τα συνολικά αποτελέσματα)	50 ασθενείς με Alzheimer
G3337A-ND1, C15946T-tRNA ^{Thr} , A10398G-ND3, C7028T-COI	1/50 (2%)
T4336C-tRNA ^{Gln} , T721C-12S rRNA	1/50 (2%)
G8251A- COII, A15924G-tRNA ^{Thr} , ins568-573 (3C)-(D-loop), T10034C-tRNA ^{Gly} , A10398G-ND3, C7028T-COI	1/50 (2%)
C15946T-tRNA ^{Thr} , A10398G-ND3, C7028T-COI	1/50 (2%)
G8251A- COII, C7028T-COI	2/50 (4%)
T3336C-ND1, T669C-12S rRNA, ins568-573 (5C)-(D-loop), C10128T-(ND3), A10398G-ND3, C7028T-COI	1/50 (2%)
T3197C-16S rRNA, ins568-573 (3C)-(D-loop), C7028T-COI	1/50 (2%)
A10398G-ND3, C7028T-COI	5/50 (10%)
G15928A-tRNA ^{Thr} , A10398G-ND3, C7028T-COI	1/50 (2%)
A8271G-NC7, G15928A-tRNA ^{Thr}	1/50 (2%)

Πίνακας 13: Πολυμορφισμοί που χαρακτηρίζουν απλομάδες. [Raule et al (2006)]

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

ΠΙΝΑΚΑΣ 14: Μεταλλάξεις που ανιχνεύθηκαν στους 50 ασθενείς με Alzheimer που εξετάστηκαν στο εργαστήριο. Είναι ξεκάθαρο ότι ορισμένοι ασθενείς φέρουν συνδυασμούς μεταλλάξεων του mtDNA. Αυτοί οι συνδυασμοί δεν έχουν παρατηρηθεί σε άτομα ελέγχου που εξετάστηκαν παράλληλα με την παρούσα μελέτη

Ασθενείς που εμφάνισαν μετάλλαξη	Μεταλλάξεις που ανιχνεύθηκαν					
6	(ND1) G3337A	(tRNA Thr) C15946T	(ND3) A10398G	(COI) C7028T		
8	(tRNA Gln) T4336C			(12S rRNA) T721C		
12	(tRNA Gly) T10007C					
13	(COII) T8200C					
14	(COII) G8251A	(tRNA Thr) A15924G	(D-loop) Ins568-573 (3C)	(tRNA Gly) T10034C	(ND3) A10398G	(COI) C7028T
15	(tRNA Thr) C15946T		(ND3) A10398G		(COI) C7028T	
16	(tRNA Thr) A15924G					
17	(NC10) A15954C					
19	(COII) G8251A			(COI) C7028T		
20	(COII) G8251A			(COI) C7028T		
21	(tRNA Thr) C15904T					
23	(ND1) T3336C	(12S rRNA) T669C	(D-loop) ins568-573 (5C)	(ND3) C10128T	(ND3) A10398G	(COI) C7028T
24	(16S rRNA)T3197C		(D-loop) ins568-573 (3C)		(COI) C7028T	
26	(NC7) G8292A					
27	(NC7) G8292A					

28	(NC7) G8292A		
29	(NC7) G8292A		
30	(D-loop) ins568-573 (3C)		
32	(NC10) A15954C		
33	(tRNATrp) A5558G		
34	(ND3) A10398G	(COI) C7028T	
35	(tRNA Thr) G15928A	(ND3) A10398G	(COI) C7028T
36	(ND3) A10398G	(COI) C7028T	
37	(D-loop) ins568-573 (3C)		
38	(NC7) ins8277 (4C)		
39	(NC7) A8271G	(tRNA Thr) G15928A	
40	(ND3) A10398G	(COI) C7028T	
41	(NC7) G8292A		
42	(tRNA Cys) G5772A		
45	(ND3) A10398G	(COI) C7028T	
47	(ND3) A10398G	(COI) C7028T	

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα εργασία, όπου μελετήθηκαν τα 15 από τα 22 tRNA γονίδια 50 ατόμων με Alzheimer, εντοπίστηκε με τη χρήση μοριακών τεχνικών ένας αξιοσημείωτος αριθμός μεταλλάξεων. Καθώς οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν δεν ενίσχυαν επακριβώς τα γονίδια των tRNA, αλλά ενίσχυαν και τμήματα των παρακείμενων γονιδίων τους, ανιχνεύθηκαν αλλαγές και στις παρακείμενες περιοχές. Συγκεκριμένα, εντοπίστηκαν 20 σημειακές μεταλλάξεις από τις οποίες οι 7 αφορούν γονίδια tRNA, ενώ οι 13 τις παρακείμενες περιοχές.

Οι 7 μεταλλάξεις που βρέθηκαν σε γονίδια tRNA αφορούν τα γονίδια **tRNA^{Thr}**, **tRNA^{Gln}**, **tRNA^{Trp}**, και **tRNA^{Tyr}**.

Η μετάλλαξη **tRNA^{Thr} A15924G** εμφανίζεται στο 4% (2/50) των ασθενών που εξετάστηκαν και στο 3,3% (4/121) του πληθυσμού της Θεσσαλίας. Εντοπίζεται στο τελευταίο ζεύγος βάσεων του στελέχους του αντικωδικονίου που βρίσκεται παρακείμενα με τη θηλιά του αντικωδικονίου (Εικόνα 46). Αναφέρεται ως παθογόνος μετάλλαξη και έχει συνδεθεί με τη θανατηφόρο βρεφική μυσπάθεια (LIMM). Ωστόσο, η συγκεκριμένη μετάλλαξη δεν προκαλεί απαραίτητα τη νόσο αφού σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε φυσιολογικούς Καυκάσιους βρέθηκε στο 11% (11/103) του πληθυσμού [Brown et al, (1992)]. Έχει επίσης ταυτοποιηθεί σε ένα περιστατικό σε ένα βρέφος 10 μηνών σε συνδυασμό με την μετάλλαξη **tRNA^{Asn} T5693C**.

Η αλλαγή στο **tRNA^{Thr} G15928A** εντοπίστηκε στο 4% (2/50) των ασθενών που εξετάστηκαν και στο 9,1% (11/121) του πληθυσμού της Θεσσαλίας και η θέση της στο tRNA είναι στον βραχίονα του αντικωδικονίου (Εικόνα 46). Η θέση αυτή είναι ελάχιστα διατηρημένη. Σε μία μελέτη όπου εξετάστηκε ολόκληρο το mtDNA ασθενών για την μοριακή επιβεβαίωση μιτοχονδριακών διαταραχών, βρέθηκε ότι η συχνότητα της αλλαγής αυτής στους ασθενείς και η συχνότητα στην ομάδα ελέγχου δεν παρουσίαζαν στατιστικά σημαντική διαφορά [Wong L, et al (2002)], οδηγώντας έτσι στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για μη παθογόνο πολυμορφισμό. Ακόμα, μία μελέτη επιβεβαίωσε ότι αυτή η αλλαγή παρουσιάζεται μόνο στον απλότυπο T [Ruiz-Pesini E, et al (2000)]. Από την άλλη, οι Mayr-Wohlfart et al έφτασαν στο συμπέρασμα ότι αυτή η αλλαγή πιθανώς συμβάλει στην σκλήρυνση κατά πλάκας [Mayr-Wohlfart U, et al (1996)] και στο Parkinson [Mayr-Wohlfart U, et al (1997)]. Ακόμα, σε μία φυλογενετική ανάλυση του mtDNA ασθενών Alzheimer και φυσιολογικών ατόμων σε έναν Γαλλο-Καναδικό πληθυσμό, βρέθηκε ότι αυτή η αλλαγή παρουσιάζεται με μεγαλύτερη συχνότητα στα φυσιολογικά άτομα σε σύγκριση με τους ασθενείς με Alzheimer [Chagnon P, et al (1999)].

Η μετάλλαξη **tRNA^{Thr} C15904T** εμφανίζεται στο 2% (1/50) των ασθενών που εξετάστηκαν και στο 0,83% (1/121) του πληθυσμού της Θεσσαλίας. Εντοπίζεται στην θηλιά της διυδροουρακίλης (DHU) (Εικόνα 46). Αυτή η αλλαγή θεωρείται χαρακτηριστική του απλότυπου V [Macaulay et al (1999), Fraumene C, et al (2006)]. Αυτή η αλλαγή έχει ακόμα βρεθεί σε έναν ασθενή με σύνδρομο MERFF σε συνδυασμό με την

μετάλλαξη **tRNA^{Lys} A8344G** η οποία έχει συσχετιστεί με αυτό το σύνδρομο [Houshmand M. et al (1994)], και έχει βρεθεί και σε φυσιολογικά άτομα [Van den Ouweland JMW et al (1992)]. Στην μελέτη των Wong L et al (2002) όπου εξετάστηκε ολόκληρο το mtDNA ασθενών για την μοριακή επιβεβαίωση μιτοχονδριακών διαταραχών, βρέθηκε ότι η συχνότητα αυτής της αλλαγής στους ασθενείς και στην ομάδα ελέγχου δεν παρουσίαζε στατιστικά σημαντική διαφορά, οδηγώντας έτσι στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για μη παθογόνο πολυμορφισμό. Έχει, τέλος, αναφερθεί ως συχνός πολυμορφισμός που παρουσιάζεται στα φυσιολογικά άτομα σε συχνότητα τουλάχιστον 1% [Sternberg D, et al (1998)].

Η μετάλλαξη **tRNA^{Thr} C15946T** εμφανίζεται στο 4% (2/50) των ασθενών που εξετάστηκαν και εντοπίζεται στο 1^ο ζεύγος βάσεων του βραχίονα υποδοχής (Εικόνα 46). Αυτή η αλλαγή αναφέρεται ως σχετικά σπάνιος πολυμορφισμός [Sternberg D, et al (2001)]. Ακόμα, αναφέρεται στις βάσεις δεδομένων για το μιτοχόνδριο (mitomap) ως κοινός πολυμορφισμός και δεν έχει σχετισθεί με κάποιο κλινικό φαινότυπο.

Στο γονίδιο **tRNA^{Gln} T4336C** στο 2% (1/50) των ασθενών που εξετάστηκαν και στο 1,4% (1/72) του φυσιολογικού πληθυσμού. Η θέση της εντοπίζεται στο βραχίονα υποδοχής του tRNA (Εικόνα 47). Αναφέρεται και ως παθογόνος μετάλλαξη με πιθανή συσχέτιση με τις νόσους Alzheimer και Parkinson [Wallace et al (1992)]. Έχει βρεθεί στο 5% των ασθενών με Alzheimer σύμφωνα με κάποιες μελέτες [Hutchin et al (1995), Brown et al (1996)]. Σε κάποιες άλλες μελέτες το ποσοστό της συγκεκριμένης μετάλλαξης σε άτομα που πάσχουν από τις δύο αυτές νευροεκφυλιστικές ασθένειες είναι ανάλογο με το ποσοστό που απαντάται και στο γενικό πληθυσμό και δεν αποδεικνύεται κάποια συσχέτιση [Leroy and Norby (1994), Mayr-Wohlfart et al (1997)]. Σε κάθε περίπτωση είναι δύσκολο να εκτιμηθεί ο ρόλος των μιτοχονδριακών μεταλλάξεων στις ασθένειες αυτές για τις οποίες η παθοφυσιολογία δεν είναι πλήρως γνωστή. Η ίδια μετάλλαξη έχει ανιχνευθεί σε άτομα που παρουσίασαν ημικρανίες αλλά και απώλεια ακοής [Finnila et al (2001)].

Στο γονίδιο **tRNA^{Trp} A5558G** στο 2% (1/50) των ασθενών που εξετάστηκαν. Η συγκεκριμένη αλλαγή εντοπίζεται στο 1^ο ζεύγος βάσεων της θηλιάς TψC (Εικόνα 48) και αναφέρεται για πρώτη φορά (δεν υπάρχει καμία καταχώρηση στις σχετικές βάσεις δεδομένων πολυμορφισμών - μεταλλάξεων για το μιτοχονδριακό DNA). Στην ίδια περιοχή του γονιδίου **tRNA^{Trp}** έχει ανιχνευθεί μία ακόμα μετάλλαξη. Αυτή είναι η **A5559G** και έχει αναφερθεί στο σύνδρομο Leigh [Mkaouer-Rebai E, et al (2009)].

Στο γονίδιο **tRNA^{Tyr} G5772A** στο 2% (1/50) των ασθενών που εξετάστηκαν. Η συγκεκριμένη αλλαγή εντοπίζεται στη θηλιά TψC (Εικόνα 49) και αναφέρεται για πρώτη φορά (δεν υπάρχει καμία καταχώρηση στις σχετικές βάσεις δεδομένων πολυμορφισμών - μεταλλάξεων για το μιτοχονδριακό DNA). Στην ίδια περιοχή του γονιδίου **tRNA^{Tyr}** έχουν ανιχνευθεί 2 ακόμα μεταλλάξεις οι οποίες αναφέρονται στην βιβλιογραφία ως πολυμορφισμοί και δεν έχουν συσχετιστεί με κάποιο νόσημα. Είναι ενδιαφέρον το γεγονός ότι η περιοχή στην οποία βρίσκεται αυτή η μετάλλαξη είναι το σημείο έναρξης της αντιγραφής του κλώνου L (L-strand origin).

Οι 13 μεταλλάξεις που απομένουν εντοπίστηκαν σε παρακείμενες περιοχές των γονιδίων tRNA που εξετάστηκαν. Αυτές οι περιοχές είναι το 12S rRNA, το 16S rRNA, το γονίδιο COII, το γονίδιο ND1, η D-loop και 2 μη κωδικοποιούσες περιοχές του mtDNA.

Στο **12S rRNA** εντοπίστηκε η μετάλλαξη **T669C** στο 2% (1/50) των ασθενών που εξετάστηκαν. Η μετάλλαξη αυτή έχει αναφερθεί ότι σχετίζεται με την μη συμπτωματική απώλεια ακοής (NSHL) και έχει προταθεί ως μία νέα πιθανή παθογόνος αλλαγή του mtDNA. Έχει εντοπιστεί σε μία οικογένεια με μητρικά κληρονομούμενη NSHL, αλλά παρατηρήθηκε μερική διεισδυτικότητα, και διαφορετική ένταση και ηλικία εμφάνισης των συμπτωμάτων [Leveque M, et al (2007)]. Η συχνότητα αυτής της αλλαγής αναφέρεται ως χαμηλή στην βάση δεδομένων mtDB (0,04%) [Ingman M & Gyllensten U (2006)], αποκλείοντας έτσι την περίπτωση αυτή η μετάπτωση να είναι μία συχνή παραλλαγή της αλληλουχίας του 12S rRNA. Ακόμα βρέθηκε ότι η παρουσία T στην θέση 669 είναι σχετικά καλά διατηρημένη στα θηλαστικά [Rydzanicz M, et al (2010)]. Παρόλα αυτά η παθογόνος φύση της μετάπτωσης αυτής παραμένει αμφισβητήσιμη. Εκτός από την μελέτη των Leveque M, et al, δεν υπάρχει άλλη απόδειξη για την παθογονικότητα αυτής της μετάπτωσης. Σε άλλες δύο μελέτες η **T669C** εντοπίστηκε στα άτομα της ομάδας ελέγχου [Konings A et al (2008), Elstner M, et al (2008)] και σχετίζεται με τον απλότυπο N1a.

Στο **12S rRNA** εντοπίστηκε επίσης η μετάλλαξη **T721C** στο 2% (1/50) των ασθενών που εξετάστηκαν και στο 1,6% (1/61) του πληθυσμού της Θεσσαλίας. Αυτή η αλλαγή βρίσκεται σε μία δομή θηλιάς στην προβλεπόμενη δισδιάστατη δομή του 12S rRNA και έτσι είναι λιγότερο πιθανό να μπορεί να επηρεάσει την διαμόρφωση του μορίου (Εικόνα 51). Η αλλαγή αυτή βρίσκεται σε μία μη καλά διατηρημένη περιοχή και δεν υπάρχουν αρκετά πειστικά στοιχεία για την παθογονικότητα αυτής της αλλαγής στην βιβλιογραφία [Elstner M, et al (2008)].

Στο **16S rRNA** εντοπίστηκε η μετάλλαξη **T3197C** στο 2% (1/50) των ασθενών που εξετάστηκαν και στο 0,6% (1/175) του πληθυσμού της Θεσσαλίας. Σε μία μελέτη όπου εξετάστηκαν όλα τα γονίδια των μιτοχονδριακών tRNA για παρουσία μεταλλάξεων σε ασθενείς με μιτοχονδριακές διαταραχές, η μετάλλαξη **T3197C** βρέθηκε με την ίδια συχνότητα και στους ασθενείς και στα άτομα της ομάδας ελέγχου, οδηγώντας έτσι στο συμπέρασμα ότι αυτή η παραλλαγή του 16S rRNA είναι ένας συχνός πολυμορφισμός στους Καυκάσιους πληθυσμούς [Sternberg D, et al (1998)]. Σε μία άλλη μελέτη σε ασθενείς με εγκεφαλικά στον ινιακό λοβό, βρέθηκε ότι στους ασθενείς στους οποίους η αιτιολογία για το εγκεφαλικό ήταν η ημικρανία, αν το mtDNA παίζει κάποιο ρόλο στην πρόκληση εγκεφαλικού επεισοδίου, αυτό μπορεί να καθοριστεί από τον πολυμορφισμό **T3197C** στο 16S rRNA και τον πολυμορφισμό **A9477G** στο γονίδιο COX III ο οποίος οδηγεί στην αντικατάσταση μίας βαλίνης από ισολευκίνη [Finnilä S, et al (2001)].

Στο γονίδιο **COII** εντοπίστηκε η μετάλλαξη **T8200C** στο 2% (1/50) των ασθενών που εξετάστηκαν. Η μετάλλαξη αυτή δεν προκαλεί αντικατάσταση αμινοξέος, είναι δηλαδή συνώνυμη, και αποτελεί χαρακτηριστικό πολυμορφισμό του απλότυπου G1 μαζί με τις μεταλλάξεις **T7867C** (συνώνυμη) στο **COII** και **G15323A** και **G15497A** που προκαλούν αντικατάσταση αμινοξέος, Ala193Thr και Gly251Ser αντίστοιχα,

στο γονίδιο *Cytb* [Kong et al (2003), Tanaka et al (2004)]. Σε μία μελέτη στον Ιαπωνικό πληθυσμό για την εύρεση μιτοχονδριακών απλοτύπων που σχετίζονται με το έμφραγμα του μυοκαρδίου βρέθηκε ότι οι άντρες που εξετάστηκαν και έφεραν τον απλότυπο *G1*, εμφάνιζαν αυξημένο κίνδυνο μυοκαρδιακού εμφράγματος [Nishigaki Y, et al (2007)]. Παρόλα αυτά, η μετάλλαξη αυτή αναφέρεται στις βάσεις δεδομένων για το μιτοχόνδριο (mitomap) ως κοινός πολυμορφισμός και δεν έχει σχετισθεί με κάποιο κλινικό φαινότυπο.

Στο γονίδιο **COII** εντοπίστηκε η μετάλλαξη **G8251A** στο 6% (3/50) των ασθενών που εξετάστηκαν και στο 2,3% (4/175) του πληθυσμού της Θεσσαλίας. Η μετάλλαξη αυτή είναι συνώνυμη και είναι χαρακτηριστική του απλότυπου *I* [μαζί με τις μεταλλάξεις **G1719A** (16S rRNA), **C7028T** (*COI*), **A10398G** (*ND3*) και **G16391A** (*D-loop*)] και του απλότυπου *W* (μαζί με την μετάλλαξη **C7028T**) [Wallace DC (1994)]. Σε μία μελέτη σε Ιαπωνικό πληθυσμό η **G8251A** βρέθηκε ότι συμβάλλει σημαντικά στην μακροζωία [Bilal E, et al (2008)]. Στις βάσεις δεδομένων για το μιτοχόνδριο (mitomap) αναφέρεται ως κοινός πολυμορφισμός και δεν έχει σχετισθεί με κάποιο κλινικό φαινότυπο.

Στο γονίδιο **NDI** εντοπίστηκε η μετάλλαξη **T3336C** στο 2% (1/50) των ασθενών που εξετάστηκαν. Είναι συνώνυμη μετάλλαξη και αναφέρεται στις βάσεις δεδομένων για το μιτοχόνδριο (mitomap) ως κοινός πολυμορφισμός και δεν έχει σχετισθεί με κάποιο κλινικό φαινότυπο.

Στο γονίδιο **NDI** εντοπίστηκε η μετάλλαξη **G3337A** στο 2% (1/50) των ασθενών που εξετάστηκαν. Η μετάλλαξη προκαλεί αντικατάσταση του 11^{ου} αμινοξέος της υπομονάδας 1 της αφυδρογονάσης του NADH από βαλίνη σε μεθειονίνη. Η θέση της μετάλλαξης δεν είναι συντηρημένη. Η μετάλλαξη αναφέρθηκε για πρώτη φορά σε δύο ασθενείς με καρδιομυοπάθεια σε συνδυασμό με τις μεταλλάξεις tRNA^{Leu(CUN)} **A12308G** and tRNA^{Thr} **C15946T**. Σε αυτούς τους ασθενείς η μετάλλαξη ήταν σε ομοπλασμία. Η μελέτη αυτή αποφάνθηκε ότι η παρουσία των τριών παραπάνω μεταλλάξεων προδιαθέτει τους φορείς σε καρδιομυοπάθεια δρώντας συνεργιστικά ή προκαλώντας αθροιστική αρνητική δράση στην λειτουργία της καρδιάς [Zifa E, et al (2008)].

Στη **D-loop** βρέθηκαν μία προσθήκη 3 κυτοσινών στην περιοχή 568-573 (**ins568-573 (3C)**) στο 6% (3/50) των ασθενών που εξετάστηκαν και στο 1,6% (1/61) του πληθυσμού της Θεσσαλίας, και μία προσθήκη 5 κυτοσινών στην περιοχή 568-573 (**ins568-573 (5C)**) στο 2% (1/50) των ασθενών που εξετάστηκαν. Στη βιβλιογραφία αναφέρεται ότι σε αυτή την θέση μπορεί να γίνει προσθήκη 2 έως 6 κυτοσινών και στην μελέτη που αναφέρθηκε για πρώτη φορά, η προσθήκη των κυτοσινών σε αυτή τη θέση προδιαθέτει την εμφάνιση σωματικών μεταλλάξεων του mtDNA. Σε αυτή την μελέτη αναφέρθηκε ότι αυτή η προσθήκη παρουσιάζεται σε mtDNA του απλότυπου *I* και ότι σε μερικές περιπτώσεις ακόμα και μεταξύ συγγενών από την πλευρά της μητέρας και μεταξύ διαφορετικών ιστών στο ίδιο άτομο μπορεί να υπάρχει διαφορετικός αριθμός πλεοναζόντων κυτοσινών σε αυτή την θέση. Έτσι, φαίνεται ότι σε αυτή την θέση αν συμβεί προσθήκη, η περιοχή αυτή γίνεται ασταθής, πιθανώς μέσω ενός μηχανισμού «γλιστρίματος» της πολυμεράσης κατά την αντιγραφή [Torroni A, et al (1994)].

Στη περιοχή μεταξύ των γονιδίων **COII** και tRNA^{Lys} (**NC7**) εντοπίστηκε η μετάλλαξη **A8271G** στο 2%

(1/50) των ασθενών που εξετάστηκαν. Η συγκεκριμένη αναφέρεται για πρώτη φορά (δεν υπάρχει καμία καταχώρηση στις σχετικές βάσεις δεδομένων πολυμορφισμών - μεταλλάξεων για το μιτοχονδριακό DNA). Στην ίδια θέση έχει αναφερθεί ο πολυμορφισμός **A8271T** που αναφέρεται στις βάσεις δεδομένων για το μιτοχόνδριο (mitomap) ως κοινός πολυμορφισμός και δεν έχει σχετισθεί με κάποιο κλινικό φαινότυπο.

Στη περιοχή μεταξύ των γονιδίων **COII** και **tRNA^{Lys} (NC7)** εντοπίστηκε μία προσθήκη 4 κυτοσινών στην θέση 8277 (**ins8277 (4C)**) στο 2% (1/50) των ασθενών που εξετάστηκαν. Έχει ανιχνευθεί σε μία μελέτη για LHON στον Φινλανδικό πληθυσμό αλλά δεν συσχετίστηκε με την ασθένεια [Vilkki J, et al (1989)]

Στη περιοχή μεταξύ των γονιδίων **COII** και **tRNA^{Lys} (NC7)** εντοπίστηκε η μετάλλαξη **G8292A** στο 10% (5/50) των ασθενών που εξετάστηκαν και στο 1,2% (2/175) του πληθυσμού της Θεσσαλίας. Η μετάλλαξη αυτή βρέθηκε για 1^η φορά σε έναν ασθενή από την Δυτική Τουρκία με εντοπισμένη μιτοχονδριακή μυοπάθεια και θεωρήθηκε πολυμορφισμός που δεν είχε κάποια επίδραση στην ασθένεια. Σε αυτόν τον ασθενή βρέθηκε μία άλλη πρωτοεμφανιζόμενη μετάλλαξη στο **tRNA^{Phe} (T618C)** η οποία επηρεάζει σημαντικά την δευτεροταγή και τριτοταγή δομή του **tRNA^{Phe}** και πιθανόν καταστρέφει την λειτουργία του [Kleinle S, et al (1998)].

Στη θέση 15954 (το ζεύγος βάσεων μεταξύ των γονιδίων **tRNA^{Thr}** και **tRNA^{Pro}**) βρέθηκε η μετάλλαξη **A15954C** στο 4% (2/50) των ασθενών που εξετάστηκαν και στο 1,7% (2/121) του πληθυσμού της Θεσσαλίας. Η μετάλλαξη αποτελεί χαρακτηριστικό πολυμορφισμό του υποαπλότυπου U1a μαζί με τις μεταλλάξεις **T195C**, **C285T**, **A663G**, **C2218T**, **G4991A**, **G6026A**, **A7403G**, **T7581C**, **T11116C**, **T12879C**, **A13104G**, **T13656C**, **A14070G**, **G14364A**, **T15115C**, **G15148A**, **G15217A**, **G16145A**, **T16189C** [Fraumene C, et al (2006)] και αναφέρεται στις βάσεις δεδομένων για το μιτοχόνδριο (mitomap) ως κοινός πολυμορφισμός και δεν έχει σχετισθεί με κάποιο κλινικό φαινότυπο.

Όσον αφορά τους απλότυπους του mtDNA, κοινοί πολυμορφισμοί του mtDNA καθορίζουν κλάσεις ειδικών για κάθε ήπειρο γονότυπων, απλότυπων, που μπορούν να ταυτοποιηθούν με ανάλυση πολυμορφισμών μήκους τμημάτων περιορισμού (RFLP). Στην Ευρώπη, έχουν ταυτοποιηθεί εννέα διαφορετικοί μιτοχονδριακοί απλότυποι (H, I, J, K, T, U, V, W, X), οι οποίοι αντιπροσωπεύουν περισσότερο από το 90% όλων των μιτοχονδριακών γονιδιωμάτων στον πληθυσμό [Torroni A, et al (1996)]. Οι πολυμορφισμοί που καθορίζουν τους παραπάνω απλότυπους φαίνονται στον Πίνακα 13.

Με βάση τις μεταλλάξεις που βρέθηκαν στους ασθενείς που εξετάσαμε, έγινε δυνατή η κατάταξη κάποιων από τους ασθενείς σε απλοομάδες, σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα:

ΑΣΘΕΝΕΙΣ	ΣΥΝΔΥΑΣΜΟΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ ΠΟΥ ΚΑΘΟΡΙΖΟΥΝ ΑΠΛΟΟΜΑΔΑ	ΑΠΛΟΟΜΑΔΑ
A19	(COII) και (COI) G8251A C7028T	W
A20	(COII) και (COI) G8251A C7028T	W

Για να γίνει η κατάταξη και των υπόλοιπων ασθενών σε απλότυπους θα πρέπει να εξεταστούν οι ασθενείς για τους πολυμορφισμούς που καθορίζουν απλότυπους. Μέχρι να συμβεί αυτό δεν μπορούμε να έχουμε πλήρη εικόνα για την παρουσία των απλοτύπων στους ασθενείς που εξετάστηκαν.

Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα και τα αποτελέσματα μίας άλλης μελέτης η οποία πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριό μας, μπορούμε να σχηματίσουμε μία πλήρη εικόνα για τις μεταλλάξεις που ανιχνεύθηκαν στους 50 ασθενείς με Alzheimer σε 17 από τα 22 γονίδια tRNA και στις παρακείμενες περιοχές τους.

Η μετάλλαξη που ανιχνεύθηκε με μεγαλύτερη συχνότητα στους ασθενείς με Alzheimer ήταν η **A10398G** στο γονίδιο **ND3**, η οποία ανιχνεύθηκε στο 20% (10/50) των ασθενών και στο 9,7% (6/62) των φυσιολογικών ατόμων. Η μετάλλαξη αυτή προκαλεί αντικατάσταση του μη συντηρημένου αμινοξέος στη θέση 114 της ND3 από Thr σε Ala. Είναι χαρακτηριστικός πολυμορφισμός των απλοτύπων I, J, K [Raule et al (2006)]. Έχει αναφερθεί ότι το αλληλόμορφο 10398A, το οποίο βρέθηκε στο 80% (40/50) των ασθενών με Alzheimer που εξετάσαμε, σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο για Alzheimer στους άντρες [van der Walt JM, et al (2004)], με διπολική διαταραχή [Kato T (2001)] και καρκίνο [Mims MP, et al (2006)], ενώ το αλληλόμορφο 10398G αναφέρθηκε ότι σχετίζεται με την μακροζωία [Niemi AK, et al (2005)]. Η 2^η μετάλλαξη που βρέθηκε σε μεγάλη συχνότητα στους ασθενείς με Alzheimer ήταν η **G8292A** στην μη κωδική περιοχή μεταξύ των γονιδίων **COII** και tRNA^{Lys} η οποία ανιχνεύθηκε στο 10% (5/50) των ασθενών και στο 1,2% (2/175) του φυσιολογικού πληθυσμού. Για αυτή την μετάλλαξη δεν υπάρχουν αναφορές στην βιβλιογραφία σχετικά με το ρόλο της στην εμφάνιση παθογένειας. Το γεγονός ότι η μετάλλαξη αυτή εμφανίστηκε με σημαντικά μεγαλύτερη συχνότητα στους ασθενείς με Alzheimer είναι ενδιαφέρον, υποδηλώνοντας ότι πιθανώς σχετίζεται με την ασθένεια. Η 3^η μετάλλαξη που εμφανίστηκε με σχετικά μεγάλη συχνότητα στους ασθενείς με Alzheimer ήταν η **G8251A** στο γονίδιο **COII**, η οποία ανιχνεύθηκε στο 6% (3/50) των ασθενών και στο 2,3% (4/175) του φυσιολογικού πληθυσμού, δηλαδή με μικρή διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων. Οι υπόλοιπες μεταλλάξεις εμφανίστηκαν με μικρότερη συχνότητα στους ασθενείς που εξετάστηκαν και οι συχνότητες εμφάνισής τους στους ασθενείς δεν είχαν σημαντική διαφορά με τις συχνότητες εμφάνισής τους στα φυσιολογικά άτομα. Από τα παραπάνω φαίνεται ότι οι μεταλλάξεις που εμφανίστηκαν με μεγαλύτερη συχνότητα στους ασθενείς με Alzheimer που εξετάστηκαν αφορούσαν πρωτεϊνικά γονίδια (ND3, COII) και μη κωδικές περιοχές. Στα γονίδια tRNA βρέθηκαν μεταλλάξεις αλλά εμφανίστηκαν με πολύ μικρή συχνότητα στους ασθενείς. Έτσι, μπορούμε να συμπεράνουμε ότι στο Alzheimer οι μεταλλάξεις στα γονίδια tRNA πιθανώς δεν διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην εμφάνιση και εξέλιξη της ασθένειας. Φαίνεται, αντίθετα, ότι οι μεταλλάξεις σε γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες είναι πιο σημαντικές. Παρόλα αυτά δεν έχουμε βιοχημικά δεδομένα για την επίδραση των μεταλλάξεων που βρέθηκαν στην λειτουργία του μιτοχονδρίου, επομένως δεν μπορούμε να καταλήξουμε σε ασφαλή συμπεράσματα για την επίδραση των μεταλλάξεων στην εμφάνιση και εξέλιξη της ασθένειας.

Από τις μεταλλάξεις που ανιχνεύσαμε στους ασθενείς με Alzheimer, 5 από αυτές έχουν αναφερθεί και

παλαιότερα στην βιβλιογραφία σε ασθενείς με Alzheimer. Αυτές είναι οι ακόλουθες: **tRNA^{Gln} T4336C** [Wallace et al (1992), Hutchin et al (1995), Brown et al (1996), Leroy and Norby (1994), Mayr-Wohlfart et al (1997)], **tRNA^{Thr} A15924G** [Elson JL, et al (2005)], **tRNA^{Thr} G15928A** [Chagnon P, et al (1999)], **16S rRNA T3197C** [Brown M, et al (1996), Elson JL, et al (2005)], και **12S rRNA T721C** [Brown M, et al (1996)].

Από τις παραπάνω μεταλλάξεις η **tRNA^{Gln} T4336C** έχει αναφερθεί σε ασθενείς με Alzheimer από το 1992. Στη δική μας μελέτη βρέθηκε στο 2% (1/50) των ασθενών και στο 1,4% (1/72) των φυσιολογικών ατόμων, δηλαδή με ελάχιστη διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων. Η μετάλλαξη **tRNA^{Thr} A15924G** έχει αναφερθεί σε ασθενείς με Alzheimer και σε άτομα ελέγχου σε διάφορες μελέτες με μη στατιστικά σημαντική διαφορά στη συχνότητα εμφάνισής της μεταξύ των ασθενών και των φυσιολογικών ατόμων. Στη δική μας μελέτη βρέθηκε στο 4% (2/50) των ασθενών και στο 3,3% (4/121) των φυσιολογικών ατόμων, δηλαδή με ελάχιστη διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων. Η μετάλλαξη **tRNA^{Thr} G15928A** έχει αναφερθεί ως μετάλλαξη με πιθανό προστατευτικό ρόλο στο Alzheimer. Πιο συγκεκριμένα, στη μελέτη των Chagnon P, et al (1999) βρέθηκε στο 5,8% (4/69) των ασθενών με Alzheimer και στο 16,9% (14/83) των φυσιολογικών ατόμων. Βρέθηκε δηλαδή με μεγαλύτερη συχνότητα σε φυσιολογικά άτομα με στατιστικά σημαντική διαφορά. Η μεγάλη συχνότητα της μετάλλαξης στα φυσιολογικά άτομα σε σχέση με τα άτομα με Alzheimer υποδηλώνει ότι πιθανώς έχει προστατευτικό ρόλο στο Alzheimer. Στη δική μας μελέτη βρέθηκε στο 4% (2/50) των ασθενών και στο 9,1% (11/121) των φυσιολογικών ατόμων. Επομένως, η μετάλλαξη αυτή εμφανίζεται με μεγαλύτερη συχνότητα στα φυσιολογικά άτομα ενισχύοντας έτσι την υπόθεση ότι η μετάλλαξη αυτή έχει πιθανώς κάποιον προστατευτικό ρόλο στο Alzheimer. Η μετάλλαξη **12S rRNA T721C** έχει αναφερθεί σε έναν ασθενή με Alzheimer στη μελέτη των Brown M, et al (1996). Σε αυτή την μελέτη βρέθηκε στο 1,43% (1/70) των ασθενών και σε κανένα από τα φυσιολογικά άτομα. Ακόμα, η μετάλλαξη αυτή είχε συκληρονομηθεί στο ίδιο άτομο με την μετάλλαξη **tRNA^{Gln} T4336C**. Στη δική μας μελέτη βρέθηκε στο 2% (1/50) των ασθενών και στο 1,6% (1/61) των φυσιολογικών ατόμων. Ακόμα, όπως φαίνεται στον πίνακα 12, συκληρονομείται στο ίδιο άτομο με την μετάλλαξη **tRNA^{Gln} T4336C**. Η μετάλλαξη **16S rRNA T3197C** έχει αναφερθεί σε ασθενείς με Alzheimer και σε άτομα ελέγχου. Στη δική μας μελέτη βρέθηκε στο 2% (1/50) των ασθενών και στο 0,6% (1/175) των φυσιολογικών ατόμων, δηλαδή με πολύ μικρή διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων.

Το συμπέρασμα που προκύπτει από την εξέταση των μεταλλάξεων που είχαν αναφερθεί στη βιβλιογραφία σε ασθενείς με Alzheimer είναι ότι σχεδόν όλες χαρακτηρίζονται ως πολυμορφισμοί και στις μελέτες που εντοπίστηκαν βρέθηκαν και στα φυσιολογικά άτομα χωρίς να διαφέρει σημαντικά η συχνότητα εμφάνισής τους μεταξύ ασθενών και φυσιολογικών ατόμων. Η εξαίρεση είναι η μετάλλαξη **tRNA^{Thr} G15928A** η οποία έχει αναφερθεί με υψηλότερη συχνότητα στα φυσιολογικά άτομα. Και στη δική μας μελέτη, αυτή η μετάλλαξη βρέθηκε με μεγαλύτερη συχνότητα στα φυσιολογικά άτομα. Με βάση τα παραπάνω μπορούμε να συμπεράνουμε ότι αυτές οι μεταλλάξεις δεν παίζουν κάποιο ρόλο στην παθογένεια του

Alzheimer. Όσον αφορά την μετάλλαξη **G15928A**, λόγω της μεγαλύτερης συχνότητάς της στα φυσιολογικά άτομα, είναι πιθανό να διαδραματίζει έναν προστατευτικό ρόλο στο Alzheimer.

Όσον αφορά τις μεταλλάξεις που βρέθηκαν στην παρούσα μελέτη, εκτός από την μετάλλαξη **A10398G** στο γονίδιο **ND3**, δεν υπάρχουν στοιχεία στη βιβλιογραφία για την επίδραση αυτών των μεταλλάξεων στη λειτουργία των μιτοχονδρίων.

Για την μετάλλαξη **A10398G** στο γονίδιο **ND3**, έχουν αναφερθεί τα εξής. Σε μία μελέτη χρησιμοποιήθηκαν κυτταροπλασματικά υβρίδια στα οποία εκφραζόταν δυο πρωτεΐνες ραδιομετρικού φθορισμού (radiometric fluorescent protein, RP) οι οποίες δρούσαν ως δείκτες ασβεστίου [Nagai T, et al (2001)] και οι οποίες ήταν στοχευμένες στον πυρήνα και στα μιτοχόνδρια, για να ανιχνευθούν πολυμορφισμοί οι οποίοι είχαν ενδοκυτταρική λειτουργική σημασία. Έγινε ανάλυση της πλήρους αλληλουχίας του mtDNA των σειρών κυτταροπλασματικών υβριδίων και βρέθηκε ότι οι μη συνώνυμοι πολυμορφισμοί **8701A** και **10398A**, προκαλούσαν αύξηση του φθορισμού της στοχευμένης στο μιτοχόνδριο RP. Ακόμα βρέθηκε ότι το pH της μιτοχονδριακής μήτρας ήταν χαμηλότερο στα κυτταροπλασματικά υβρίδια με **8701A/10398A** σε σχέση με αυτό των κυτταροπλασματικών υβριδίων με **8701G/10398G**, υποδηλώνοντας ότι η διαφορά που παρατηρείται μέσω της RP προκλήθηκε κυρίως λόγω αλλαγών στα επίπεδα του μιτοχονδριακού ασβεστίου. Ακόμα, η απόκριση του κυτταροπλασματικού ασβεστίου στην ισταμίνη έτεινε να είναι υψηλότερη στα κυτταροπλασματικά υβρίδια με **8701A/10398A**. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, το αλληλόμορφο **10398A** σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο για Parkinson, Alzheimer, διπολική διαταραχή, και καρκίνο, ενώ το αλληλόμορφο **10398G** σχετίζεται με την μακροζωία. Έτσι, αυτή η μελέτη πρότεινε ότι αυτοί οι πολυμορφισμοί του mtDNA μπορεί να παίζουν κάποιο ρόλο στην παθοφυσιολογία αυτών των ασθενειών επηρεάζοντας το pH της μιτοχονδριακής μήτρας και την δυναμική ισορροπία του ενδοκυτταρικού ασβεστίου [Kazuno AA, et al (2006)]. Δηλαδή το αλληλόμορφο **10398A** διαταράσσει το pH της μιτοχονδριακής μήτρας και την ισορροπία του ασβεστίου, ενώ το αλληλόμορφο **10398G** δρα προστατευτικά σε αυτές τις ασθένειες διατηρώντας το pH και την ισορροπία του ασβεστίου στη φυσιολογική τους κατάσταση.

Σε ορισμένους από τους ασθενείς που εξετάσαμε παρατηρήθηκε συγκληρονόμηση δύο ή περισσότερων μεταλλάξεων στο ίδιο άτομο. Με βάση τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας και τα αποτελέσματα μίας άλλης εργασίας που εξέτασε δύο άλλα γονίδια μιτοχονδριακών tRNA, τα tRNA^{Gly} και tRNA^{Arg}, στους ίδιους ασθενείς (Πίνακας 12) παρατηρούμε ότι το 30% (15/50) των ασθενών παρουσιάζει το φαινόμενο συγκληρονόμησης δύο ή περισσότερων μεταλλάξεων. Συγκεκριμένα, σε ένα άτομο συγκληρονομούνται οι μεταλλάξεις tRNA^{Thr} **C15946T**, **ND1 G3337A**, **ND3 A10398G**, και **COI C7028T**, σε ένα άλλο άτομο οι μεταλλάξεις tRNA^{Gln} **T4336C** και **12S rRNA T721C**, σε ένα άλλο άτομο οι μεταλλάξεις **COII G8251A**, tRNA^{Thr} **A15924G**, **D-Loop ins568-573 (3C)**, tRNA^{Gly} **T10034C**, **ND3 A10398G**, και **COI C7028T**, σε ένα άλλο άτομο οι μεταλλάξεις tRNA^{Thr} **C15946T**, **ND3 A10398G**, και **COI C7028T**, σε δύο άτομα οι μεταλλάξεις **COII G8251A**, και **COI C7028T**, σε ένα άλλο άτομο οι μεταλλάξεις **ND1 T3336C**, **12S rRNA T669C**, **D-loop ins568-573 (5C)**, **ND3 C10128T**, **ND3 A10398G**, και **COI C7028T**, σε ένα

άλλο άτομο οι μεταλλάξεις **16S rRNA T3197C**, **D-loop ins568-573 (3C)**, και **COI C7028T**, σε πέντε άτομα οι μεταλλάξεις **ND3 A10398G**, και **COI C7028T**, σε ένα άλλο άτομο οι μεταλλάξεις **tRNA^{Thr} G15928A**, **ND3 A10398G**, και **COI C7028T**, και, τέλος, σε ένα άλλο άτομο οι μεταλλάξεις **NC7 A8271G** και **tRNA^{Thr} G15928A**. Οι παραπάνω συνδυασμοί μεταλλάξεων δεν παρουσιάστηκαν στα άτομα ελέγχου που εξετάστηκαν. Δεν μπορούμε να ξέρουμε τον τρόπο με τον οποίο οι συνδυασμοί αυτοί επηρεάζουν την παθογένεια του Alzheimer επειδή δεν διαθέτουμε κανένα στοιχείο για τον τρόπο με τον οποίο οι μεταλλάξεις αυτές επηρεάζουν την λειτουργία του μιτοχονδρίου.

Όσον αφορά τους απλότυπους, με βάση τη μέχρι σήμερα βιβλιογραφία, οι απλότυποι δεν φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο στο Alzheimer. Ορισμένες μελέτες έχουν βρει συσχέτιση ορισμένων απλοτύπων με το Alzheimer, ενώ άλλες δεν βρήκαν καμία συσχέτιση της ασθένειας με κάποιον συγκεκριμένο απλότυπο. Με βάση τις μεταλλάξεις που βρέθηκαν στους ασθενείς που εξετάσαμε, έγινε δυνατή η κατάταξη δύο ασθενών στην απλοομάδα W. Για να γίνει η κατάταξη και των υπόλοιπων ασθενών σε απλότυπους θα πρέπει να εξεταστούν όλοι οι ασθενείς για τους πολυμορφισμούς που καθορίζουν απλότυπους. Μέχρι να συμβεί αυτό δεν μπορούμε να έχουμε πλήρη εικόνα για την παρουσία των απλοτύπων στους ασθενείς που εξετάστηκαν.

Τέλος, για να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα για το ρόλο των σημειακών μεταλλάξεων στα μιτοχονδριακά tRNA γονίδια και γενικότερα για τον ρόλο του mtDNA στην εμφάνιση της νόσου Alzheimer πρέπει να ολοκληρωθεί η έρευνα σε όλα τα tRNA γονίδια στους ασθενείς και να γίνει σύγκριση με μεγάλη ομάδα του «φυσιολογικού» πληθυσμού. Ακόμα, θα πρέπει να ελεγχθεί ολόκληρο το μιτοχονδριακό γονιδίωμα ώστε να χαρακτηριστούν οι απλοομάδες στις οποίες ανήκουν οι ασθενείς με Alzheimer και θα πρέπει να μελετηθεί η συνεισφορά αυτών των απλοτύπων στην εμφάνιση της ασθένειας.

Ακόμα, οι μεταλλάξεις του mtDNA μπορεί να έχουν ευεργετική, βλαβερή ή και μηδαμινή επίδραση στην λειτουργία του μιτοχονδρίου. Επομένως, είναι απαραίτητο να προσδιοριστεί η ακριβής επίδραση των μεταλλάξεων και των συνδυασμών μεταλλάξεων που έχουν βρεθεί στη λειτουργία των μιτοχονδρίων. Με αυτό τον τρόπο, θα μπορέσει να προσδιοριστεί η ακριβής επίδραση (ευεργετική, βλαβερή ή μηδαμινή) αυτών των μεταλλάξεων στη εμφάνιση και εξέλιξη των συμπτωμάτων του Alzheimer.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Alberts, Bruce; Alexander Johnson, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, Peter Walter (1994). *Molecular Biology of the Cell*. New York: Garland Publishing Inc.
- Altieri F, Grillo C, Maceroni M, Chichiarelli S (2008). "DNA damage and repair: from molecular mechanisms to health implications." *Antioxid Redox Signal* **10**: 891-937
- Anandatheerthavarada HK, Biswas G, Robin MA, Avadhani NG (2003). "Mitochondrial targeting and a novel transmembrane arrest of Alzheimer's amyloid precursor protein impairs mitochondrial function in neuronal cells." *J Cell Biol* **161**: 41-54
- Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, DeBruijn M, Coulson AR, Drouin J, Eperon IC, Nierlich DP, Roe BA, Sanger F, Schreier PH, Smith A, Staden R, Young IG. (1981). "Sequence and organization of the human mitochondrial genome." *Nature* **290**: 457-465.
- Andersson SG, Karlberg O, Canbäck B, Kurland CG (2003). "On the origin of mitochondria: a genomics perspective". *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* **358** (1429): 165-77; discussion 177-9.
- Andreu AL, Hanna MG, Reichmann H, Bruno C, Penn AS, Tanji K, Pallotti F, Iwata S, Bonilla E, Lach B, Morgan-Hughes JA, DiMauro S (1999). "Exercise intolerance due to mutations in the cytochrome b gene of mitochondrial DNA." *N Engl J Med* **341**: 1037-1044.
- Andreu AL, Tanji K, Bruno C, Hadjigeorgiou GM, Sue CM, Jay C, Ohnishi T, Shanske S, Bonilla E, DiMauro S (1999). "Exercise intolerance due to a nonsense mutation in the mtDNA ND4 gene." *Ann Neurol* **45**: 820-823.
- Andreu AL, Checcarelli N, Iwata S, Shanske S, DiMauro S (2000). "A missense mutation in the mitochondrial cytochrome b gene in a revisited case with histiocytoid cardiomyopathy." *Pediatr Res* **48**: 311-314.
- Andrews RM, Kubacka I, Chinnery PF, Lightowlers RN, Turnbull DM, Howell N (1999) "Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA." *Nat Genet* **23**(2): 147.
- Atamna H, Frey WH II (2004). "A role for heme in Alzheimer's disease: heme binds amyloid b and has altered metabolism." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 11153-11158
- Atamna H (2006). "Heme binding to amyloid-b peptide: mechanistic role in Alzheimer's disease." *J Alzheimers Dis* **10**: 255-266
- Azari NP, Pettigrew KD, Schapiro MB, Haxby JV, Grady CL, Pietrini P, et al (1993). "Early detection of Alzheimer's disease: a statistical approach using positron emission tomographic data." *J Cereb Blood Flow Metab* **13**: 438-447
- Baloyannis SJ (2006). "Mitochondrial alterations in Alzheimer's disease." *J Alzheimers Dis* **9**: 119-126
- Berchtold NC, Cotman CW (1998). "Evolution in the conceptualization of dementia and Alzheimer's disease: Greco-Roman period to the 1960s". *Neurobiol. Aging* **19** (3): 173-89.
- Bet L, Bresolin N, Moggio M, Meola G, Prella A, Schapira AH, Binzoni T, Chomyn A, Fortunato F, Cerretelli P, et al (1990). "A case of mitochondrial myopathy, lactic acidosis and complex I deficiency." *J Neurol* **237**: 399-404.
- Bilal E, Rabadan R, Alexe G, Fuku N, Ueno H, Nishigaki Y, Fujita Y, Ito M, Arai Y, Hirose N, Ruckenstein A, Bhanot G, Tanaka M (2008) "Mitochondrial DNA haplogroup D4a is a marker for extreme longevity in Japan." *PLoS One*. **3**(6): e2421.
- Bindoff L, Howell N, Poulton J, McCullough D, Morten K, Lightowlers R, Turnbull D, Weber K (1993). "Abnormal RNA processing associated with a novel tRNA mutation in mitochondrial DNA: A potential disease mechanism." *J Biol Chem* **268**: 19559-19564
- Blass JP, Sheu RK, Gibson GE (2000). "Inherent abnormalities in energy metabolism in Alzheimer disease. Interaction with cerebrovascular compromise." *Ann NY Acad Sci* **903**: 204-221
- Blennow K, de Leon MJ, Zetterberg H (2006). "Alzheimer's disease". *Lancet* **368**(9533): 387-403.
- Bonilla E, Sciacco M, Tanji K, Sparaco M, Petruzzella V, Moraes CT (1992). "New morphological approaches to the study of mitochondrial encephalomyopathies." *Brain Pathol* **2**: 113-119.
- Bonilla E, Tanji K, Vu TH, Schon EA, DiMauro S (1996). "Kearns-Sayre syndrome (KSS): patterns of expression of subunits of the respiratory chain in the cerebellum." *Neuropath Appl Neurobiol* **22** (Suppl 1): 31.
- Börner G, Zeviani M, Tiranti V, Carrara F, Hoffman S, Gerbitz K (2000). "Decreased aminoacylation of mutant tRNAs in MELAS but not in MERRF patients." *Human Mol Genet* **9**: 467-475.
- Bosetti F, Brizzi F, Barogi S, Mancuso M, Siciliano G, Tendi EA, et al (2002). "Cytochrome c oxidase and mitochondrial F1FO-ATPase (ATP synthase) activities in platelets and brain from patients with Alzheimer's disease." *Neurobiol Aging* **23**: 371-376

- Brookmeyer R, Gray S, Kawas C (1998). "Projections of Alzheimer's disease in the United States and the public health impact of delaying disease onset". *Am J Public Health* **88** (9): 1337-42.
- Brown MD, Torroni A, Shoffner JM, Wallace DC (1992). "Mitochondrial tRNAThr Mutations and Lethal Infantile Mitochondrial Myopathy." *Am. J. Hum. Genet.* **51**: 446-447.
- Brown MD, Shoffner JM, Kim YL, Jun AS, Graham BH, Cabell MF, Gurley DS, Wallace DC (1996) "Mitochondrial DNA sequence analysis of four Alzheimer's and Parkinson's disease patients" *American Journal of Human Genetics*, **61**: 283-289.
- Brulé H, Holmes W, Keith G, Giegé R, Florentz C (1998). "Effect of a mutation in the anticodon of human mitochondrial tRNAPro on its post-transcriptional modification pattern." *Nucleic Acids Res* **26**: 537-543
- Bubber P, Haroutunian V, Fisch G, Blass JP, Gibson GE (2005). "Mitochondrial abnormalities in Alzheimer brain: mechanistic implications." *Ann Neurol* **57**: 695-703
- Butterfield DA (2004). "Proteomics: a new approach to investigate oxidative stress in Alzheimer's disease brain." *Brain Res* **1000**: 1-7
- Campbell, Neil A.; Brad Williamson; Robin J. Heyden (2006). *Biology: Exploring Life*. Boston, Massachusetts: Pearson Prentice Hall.
- Cardoso SM, Proenca MT, Santos S, Santana I, Oliveira CR (2004). "Cytochrome c oxidase is decreased in Alzheimer's disease platelets." *Neurobiol Aging* **25**: 105-110
- Cardoso SM, Santana I, Swerdlow RH, Oliveira CR (2004). "Mitochondria dysfunction of Alzheimer's disease cybrids enhances Abeta toxicity." *J Neurochem* **89**: 1417-1426
- Carrieri G, Bonafè M, De Luca M, Rose G, Varcasia O, Bruni A, et al (2001). "Mitochondrial DNA haplogroups and ApoE4 allele are nonindependent variables in sporadic Alzheimer's disease." *Hum Genet* **108**: 194-198
- Castellani R, Hirai K, Aliev G, Drew KL, Nunomura A, Takeda A, et al (2002). "Role of mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease." *J Neurosci Res* **70**: 357-360
- Chagnon P, Gee M, Filion M, Robitaille Y, Belouchi M, Gauvreau D (1999). "Phylogenetic analysis of the mitochondrial genome indicates significant differences between patients with Alzheimer disease and controls in a French-Canadian founder population." *Am J Med Genet* **85**: 20-30
- Chen JX, Yan SD (2007). "Amyloid-beta-induced mitochondrial dysfunction." *J Alzheimers Dis* **12**:177-184
- Chen X, Yan SD (2006). "Mitochondrial Abeta: a potential cause of metabolic dysfunction in Alzheimer's disease". *IUBMB Life* **58**(12): 686-694
- Cherny RA, Legg JT, McLean CA, Fairlie DP, Huang X, Atwood CS, et al (1999). "Aqueous dissolution of Alzheimer's disease Abeta amyloid deposits by biometal depletion." *J Biol Chem* **274**: 23223-23228
- Chinnery PF, Samuels DC (1999). "Relaxed replication of mtDNA: a model with implications for the expression of disease." *Am J Hum Genet* **64**: 1158-1165.
- Chinnery PF, Taylor DJ, Brown DT, Manners D, Styles P, Lodi R (2000). "Very low levels of the mtDNA A3243G mutation associated with mitochondrial dysfunction in vivo." *Ann Neurol* **47**: 381-384.
- Chinnery PF, Taylor GA, Howell N, Andrews RM, Morris CM, Taylor RW, et al (2000). "Mitochondrial DNA haplogroups and susceptibility to AD and dementia with Lewy bodies." *Neurology* **55**: 302-304
- Chinnery PF, Taylor R, Howell N, Brown DT, Parsons TJ, Turnbull DM (2001). "Point mutations of the mtDNA control region in normal and neurodegenerative human brains." *Am J Hum Genet* **68**: 529-532
- Chinnery PF, Schon EA (2003). "Mitochondria". *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr.* **74** (9): 1188-99.
- Chomyn A, Martinuzzi A, Yoneda M, Daga A, Hurko O, Johns D, Lai ST, Nonaka I, Angelini C, Attardi G (1992). "MELAS mutation in mtDNA binding site for transcription termination factor causes defects in protein synthesis and in respiration but no change in levels of upstream and downstream mature transcripts." *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 4221-4225
- Chomyn A, Enriquez JA, Micol V, Fernandez-Silva P, Attardi G (2000). "The mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episode syndrome-associated human mitochondrial tRNA^{Leu}(UUR) mutation cause aminoacylation deficiency and concomitant reduced association of mRNA with ribosomes." *J Biol Chem* **275**: 19198-19209
- Coppedè F, Mancuso M, Siciliano G, Migliore L, Murri L (2006). "Genes and the environment in neurodegeneration." *Biosci Rep* **26**: 341-367
- Coppedè F, Mancuso M, Lo Gerfo A, Manca ML, Petrozzi L, Migliore L, et al (2007). "A Ser326Cys polymorphism in the DNA repair gene hOGG1 is not associated with sporadic Alzheimer's disease." *Neurosci Lett* **414**: 282-285
- Corral-Debrinski M, Horton T, Lott MT, Shoffner JM, McKee AC, Beal MF, et al (1994). "Marked changes in mitochondrial DNA deletion levels in Alzheimer brains." *Genomics* **23**: 471-476
- Coskun PE, Beal MF, Wallace DC (2004). "Alzheimer's brains harbor somatic mtDNA control-region mutations that suppress mitochondrial transcription and replication." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 10726-10731
- Davydov V, Hansen LA, Shackelford DA (2003). "Is DNA repair compromised in Alzheimer's disease?"

Neurobiol Aging **24**: 953-968

- De Coo IFM, Renier WO, Ruitenbeek W, Ter Laak HJ, Bakker M, Schagger H, Van Oost BA, Smeets HJM (1999). "A 4-base pair deletion in the mitochondrial cytochrome b gene associated with Parkinsonism/MELAS overlap syndrome." *Ann Neuro* **45**: 130-133.
- De Vries DD, van EB, Gabreels F, Ruitenbeek W, van Oost BA (1993). "A second missense mutation in the mitochondrial ATPase 6 gene in Leigh's syndrome." *Ann Neuro* **34**: 410-412.
- Devi L, Prabhu BM, Galati DF, Avadhani NG, Anandatheerthavarada HK (2006). "Accumulation of amyloid precursor protein in the mitochondrial import channels of human Alzheimer's disease brain is associated with mitochondrial dysfunction." *J Neurosci* **26**: 9057-9068
- DiMauro S, Schon EA (1998). "Mitochondrial DNA and diseases of the nervous system: the spectrum." *The Neuroscientist* **4**: 53-63.
- DiMauro S, Hirano M (1998). "Mitochondria and heart disease." *Curr Opin Cardiol* **13**: 190-197.
- DiMauro S (1999). "Exercise intolerance and the mitochondrial respiratory chain." *Ital J Neurol Sci* **20**: 387-393.
- DiMauro S, Andreu AL (2000). "Mutations in mtDNA: are we scraping the bottom of the barrel?" *Brain Pathol* **10**: 431-441.
- DiMauro S, Schon EA (2001). "Mitochondrial DNA Mutations in Human Disease". *American Journal of Medical Genetics* **106**: 18-26.
- DiMauro S, Schon EA (2003). "Mitochondrial respiratory-chain diseases." *N Engl J Med* **348**: 2656-2668.
- Ding Q, Dimayuga E, Keller JN (2007). "Oxidative damage, protein synthesis, and protein degradation in Alzheimer's disease." *Curr Alzheimer Res* **4**: 73-79
- Dogru-Abbasoglu S, Inceoglu M, Parildar-Karpuzoglu H, Hanagasi HA, Karadag B, Gurvit H, et al (2006). "Polymorphisms in the DNA repair genes XPD (ERCC2) and XPF (ERCC4) are not associated with sporadic late-onset Alzheimer's disease." *Neurosci Lett* **404**: 258-261
- Drake J, Link CD, Butterfield DA (2003). "Oxidative stress precedes fibrillar deposition of Alzheimer's disease amyloid beta-peptide (1-42) in a transgenic *Caenorhabditis elegans* model." *Neurobiol Aging* **24**: 415-420
- Egensperger R, Kosel S, Schnopp NM, Mehraein P, Graeber MB (1997). "Association of the mitochondrial tRNA (A4336G) mutation with Alzheimer's and Parkinson's diseases." *Neuropathol Appli Neurobiol* **23**: 315-321
- El Meziane A, Lehtinen SK, Holt IJ, Jacobs HT (1998). "Mitochondrial tRNA^{Leu} isoforms in lung carcinoma cybrid cells containing the np 3243 *mtDNA* mutation." *Hum Mol Genet* **7**: 2141-2147
- Elson JL, Herrnstadt C, Preston G, Thal L, Morris CM, Edwardson JA, Beal MF, Turnbull DM, Howell N (2006) "Does the mitochondrial genome play a role in the etiology of Alzheimer's disease?" *Hum Genet.* **119**(3):241-254.
- Elstner M, Schmidt C, Zingler VC, Prokisch H, Bettecken T, Elson JL, Rudolph G, Bender A, Halmagyi GM, Brandt T, Strupp M, Klopstock T. (2008) "Mitochondrial 12S rRNA susceptibility mutations in aminoglycoside-associated and idiopathic bilateral vestibulopathy" *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **377**: 379-383.
- Engel WK, Cunningham CG (1963). "Rapid examination of muscle tissue: an improved trichome stain method for fresh-frozen biopsy sections." *Neurology* **13**: 919-923.
- Enriquez JA, Chomyn A, Attardi G (1995). "*MtDNA* mutation in MERRF syndrome cause defective aminoacylation of tRNA^{Lys} and premature translation termination." *Nat Genet* **10**: 47-55
- Falkevall A, Alikhani N, Bhushan S, Pavlov PF, Busch K, Johnson KA, et al (2006). "Degradation of the amyloid beta-protein by the novel mitochondrial peptidosome, PreP." *J Biol Chem* **281**: 29096-29104
- Finnila S, Autere J, Lehtovirta M, Hartikainen P, Mannermaa A, Soininen H, Majamaa K (2001) "Increased risk of sensorineural hearing loss and migraine in patients with a rare mitochondrial DNA variant 4336A>G in tRNA^{Gln}" *Journal of Medical Genetics*, **38**: 400-405
- Finnilä S, Hassinen IE, Majamaa K. (2001) "Phylogenetic analysis of mitochondrial DNA in patients with an occipital stroke. Evaluation of mutations by using sequence data on the entire coding region." *Mutat Res.* **458**(1-2): 31-39.
- Fishel ML, Vasko MR, Kelley MR (2007). "DNA repair in neurons: so if they don't divide what's to repair?" *Mutat Res* **614**: 24-36
- Florentz C (2002). "Molecular investigations on tRNAs involved in human mitochondrial disorders." *Biosci Rep* **22**: 81-98.
- Florentz C, Sohm B, Tryoen-Toth P, Putz J, Sissler M (2003). "Human mitochondrial tRNAs in health and disease." *Cell Mol Life Sci* **60**: 1356-1375.
- Fraumene C, Belle EM, Castri L, Sanna S, Mancosu G, Cosso M, Marras F, Barbujani G, Pirastu M, Angius A (2006) "High resolution analysis and phylogenetic network construction using complete mtDNA sequences in

sardinian genetic isolates." *Mol Biol Evol.* **23**(11): 2101-2111.

- Fukui H, Diaz F, Garcia S, Moraes CT (2007). "Cytochrome *c* oxidase deficiency in neurons decreases both oxidative stress and amyloid formation in a mouse model of Alzheimer's disease." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 14163-14168
- Fukui H, Moraes CT (2008). "The mitochondrial impairment, oxidative stress and neurodegeneration connection: reality or just an attractive hypothesis?" *Trends Neurosci* **31**(5): 1682-9
- Gabuzda D, Busciglio J, Chen LB, Matsudaira P, Yankner BA (1994). "Inhibition of energy metabolism alters the processing of amyloid precursor protein and induces a potentially amyloidogenic derivative." *J Biol Chem* **269**: 13623-13628
- Gardner A, Boles RG (2005). "Is a "Mitochondrial Psychiatry" in the Future? A Review". *Curr. Psychiatry Review* **1** (3): 255-271
- Genova ML, Pich MM, Bernacchia A, Bianchi C, Biondi A, Bovina C, et al (2004). "The mitochondrial production of reactive oxygen species in relation to aging and pathology." *Ann N Y Acad Sci* **1011**: 86-100
- Ghezzi D, Marelli C, Achilli A, Goldwurm S, Pezzoli G, Barone P, et al (2005). "Mitochondrial DNA haplogroup K is associated with a lower risk of Parkinson's disease in Italians." *Eur J Hum Genet* **13**: 748-752
- Gibson GE, Haroutunian V, Zhang H, Park LC, Shi Q, Lesser M, et al (2000). "Mitochondrial damage in Alzheimer's disease varies with apolipoprotein E genotype." *Ann Neurol* **48**: 297-303
- Giegé R, Sissler M, Florentz C (1998). "Universal rules and idiosyncratic features in tRNA identity." *Nucleic Acids Res* **26**: 5017-5035
- Gomez C, Bandez MJ, Navarro A (2007). "Pesticides and impairment of mitochondrial function in relation with the parkinsonian syndrome". *Front. Biosci.* **12**: 1079-93.
- Guix FX, Uribesalgo I, Coma M, Munoz FJ (2005). "The physiology and pathophysiology of nitric oxide in the brain." *Prog Neurobiol* **76**: 126-152
- Hansson CA, Frykman S, Farmery MR, Tjernberg LO, Nilsberth C, Pursglove SE, et al (2004). "Nicastrin, presenilin, APH-1, and PEN-2 form active gamma-secretase complexes in mitochondria." *J Biol Chem* **279**: 51654-51660
- Hao H, Moraes CT (1996). "Functional and molecular mitochondrial abnormalities associated with a C>T transition at position 3256 of the human mitochondrial genome: The effects of a pathogenic mitochondrial tRNA point mutation in organelle translation and RNA processing." *J Biol Chem* **271**: 2347-2352
- Hao H, Moraes CT (1997). "A disease-associated G5703A mutation in human mitochondrial DNA cause a conformational change and a marker decrease in steady-state levels of mitochondrial tRNAAsn." *Mol Cell Biol* **17**: 6831-6837
- Hao R, Zhao MW, Hao ZX, Yao YN, Wang ED (2005). "A T-stem slip in human mitochondrial tRNA^{Leu}(CUN) governs its charging capacity." *Nucleic Acids Res* **33**: 3606-3613
- Hauptmann S, Scherping I, Dröse S, Brandt U, Schulz KL, Jendrach M, et al (2009). "Mitochondrial dysfunction: an early event in Alzheimer pathology accumulates with age in AD transgenic mice." *Neurobiol Aging* **30**(10): 1574-1586
- Helm M, Florentz C, Chomyn A, Attardi G (1999). "Search for differences in post-transcriptional modification patterns of mitochondrial DNA-encoded wild-type and mutant human tRNA^{Lys} and tRNA^{Leu}(UUR)." *Nucleic Acids Res* **27**: 756-763
- Henze K, Martin W (2003). "Evolutionary biology: essence of mitochondria". *Nature* **426** (6963): 127-8.
- Hess JF, Parisi MA, Bennett JL, Clayton DA (1991). "Impairment of mitochondrial transcription termination by a point mutation associated with the MELAS subgroup of mitochondrial encephalomyopathies." *Nature*; **351**: 236-239.
- Hino N, Suzuki T, Yasukawa T, Seio K, Watanabe K, Ueda T (2004). "The pathogenic A4269G mutation in human mitochondrial tRNA^{Ile} alters the T-stem structure and decreases the binding affinity for elongation factor Tu." *Genes Cells* **9**: 243-252
- Holt IJ, Harding AE, Petty RK, Morgan Hughes JA (1990). "A new mitochondrial disease associated with mitochondrial DNA heteroplasmy." *Am J Hum Genet* **46**: 428-433.
- Honda K, Smith MA, Zhu X, Baus D, Merrick WC, Tartakoff AM, et al (2005). "Ribosomal RNA in Alzheimer disease is oxidized by bound redox-active iron." *J Biol Chem* **280**: 20978-20986
- Hooper NM (2005) "Roles of proteolysis and lipid rafts in the processing of the amyloid precursor protein and prion protein" *Biochem. Soc. Trans.* **33**(2): 335-338
- Houshmand M., Larsson N.-G., Holme E., Oldfors A., Tulinius M.H., Andersen O (1994) "Automatic sequencing of mitochondrial tRNA genes in patients with mitochondrial encephalomyopathy" *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease* **1226** (1): 49-55.
- Hunter SE, Spremulli LL (2004). "Mutagenesis of Arg335 in bovine mitochondrial elongation factor Tu and the corresponding residue in the *Escherichia coli* factor affects interactions with mitochondrial aminoacyl-

tRNAs." *RNA Biol* **1**: 95-102

- Huoponen K, Vilkkii J, Aula P, Nikoskelainen EK, Savontaus ML (1991). "A new mtDNA mutation associated with Leber hereditary optic neuroretinopathy." *Am J Hum Genet* **48**: 1147-1153.
- Hutchin T, Cortopassi G (1995). "A mitochondrial DNA clone is associated with increased risk for Alzheimer disease." *Proc Natl Acad Sci (USA)* **92**: 6892-6895
- Ingman M, Gyllensten U (2006) "mtDB: Human Mitochondrial Genome Database, a resource for population genetics and medical sciences." *Nucleic Acids Res* **34**: D749-D751.
- Ito S, Ohta S, Nishimaki K, Kagawa Y, Soma R, Kuno SY, et al (1999). "Functional integrity of mitochondrial genomes in human platelets and autopsied brain tissues from elderly patients with Alzheimer's disease." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 2099-2103
- Ivanov PL, Wadhams MJ, Roby RK, Holland MM, Weedn VW, Parsons TJ (1996). "Mitochondrial DNA sequence heteroplasmy in the Grand Duke of Russia Georgij Romanov establishes the authenticity of the remains of Tsar Nicholas II." *Nature Genet* **12**: 417-420.
- Jacobsen E, Beach T, Shen Y, Li R, Chang Y (2004). "Deficiency of the Mre11DNA repair complex in Alzheimer's disease brains." *Brain Res Mol* **128**: 1-7
- Janssen GM, Maassen JA, van Den Ouweland JM (1999). "The diabetes-associated 3243 mutation in the mitochondrial tRNA^{Leu}(UUR) gene causes severe mitochondrial dysfunction without a strong decrease in protein synthesis rate." *J Biol Chem* **274**: 29744-29748
- Johns DR, Neufeld MJ, Park RD (1992). "An ND-6 mitochondrial DNA mutation associated with Leber hereditary optic neuropathy." *Biochem Biophys Res Comm* **187**: 1551-1557.
- Karadimas CL, Greenstein P, Sue CM, Joseph JT, Tanji K, Haller RG, Taivassalo T, Davidson MM, Shanske S, Bonilla E, DiMauro S (2000). "Recurrent myoglobinuria due to a nonsense mutation in the COX I gene of mtDNA." *Neurology* **55**: 644-649.
- Kato T (2001) "DNA polymorphisms and bipolar disorder." *Am J Psychiatry*. **158**(7):1169-1170.
- Kazuno AA, Munakata K, Nagai T, Shimozono S, Tanaka M, Yoneda M, Kato N, Miyawaki A, Kato T. (2006) "Identification of mitochondrial DNA polymorphisms that alter mitochondrial matrix pH and intracellular calcium dynamics." *PLoS Genet*. **2**(8): e128.
- Keightley JA, Hoffbuhr KC, Burton MD, Salas V, Johnston WSW, Penn AMW, Buist NRM, Kennaway NG (1996). "A microdeletion in cytochrome c oxidase (COX) subunit III associated with COX deficiency and recurrent myoglobinuria." *Nature Genet* **12**: 410-415.
- Keller JN, Schmitt FA, Scheff SW, Ding Q, Chen Q, Butterfield DA, et al (2005). "Evidence of increased oxidative damage in subjects with mild cognitive impairment." *Neurology* **64**: 1152-1156
- Kelley S, Steinberg S, Schimmel P 2001. "Fragile T-stem in disease-associated human mitochondrial tRNA sensitizes structure to local and distant mutations." *J Biol Chem* **276**: 10607-10611
- Khan SM, Cassarino DS, Abramova NN, Keeney PM, Borland MK, Trimmer PA, et al (2000). "Alzheimer's disease cybrids replicate betaamyloid abnormalities through cell death pathways." *Ann Neurol* **48**: 148-155
- Khan A, Dobson JP, Exley C (2006). "Redox cycling of iron by Abeta(42)." *Free Radic Biol Med* **40**: 557-569
- King MP, Attardi G (1989). "Human cells lacking mtDNA: repopulation with exogenous mitochondria by complementation." *Science* **246**: 500-503.
- King MP, Koga Y, Davidson M, Schon EA (1992). "Defects in mitochondrial protein synthesis and respiratory chain activity segregate with the tRNA^{Leu}(UUR) mutation associated with mitochondrial myopathy encephalopathy, lactic acidosis and strokelike episodes." *Mol Cell Biol* **12**: 480-490
- Kirino Y, Goto Y, Campos Y, Arenas J, Suzuki T (2005). "Specific correlation between the wobble modification deficiency in mutant tRNAs and the clinical features of a human mitochondrial disease." *Proc Natl Acad Sci (USA)* **102**: 7127-7132
- Kirino Y, Suzuki T (2005). "Human mitochondrial diseases associated with tRNA wobble modification deficiency." *RNA Biol* **2**: 41-44
- Kleinle S, Schneider V, Moosmann P, Brandner S, Krahenbuhl S, Liechti-Gallati S (1998) "A novel mitochondrial tRNA(Phe) mutation inhibiting anticodon stem formation associated with a muscle disease" *Biochemical and Biophysical Research Communications* **247**(1): 112-115 .
- Koga Y, Davidson M, Schon EA, King MP (1995). "Analysis of cybrids harboring MELAS mutations in the mitochondrial tRNA(Leu(UUR)) gene." *Muscle Nerve* **3**: S119-23
- Kong QP, Yao YG, Sun C, Bandelt HJ, Zhu CL, Zhang YP (2003) "Phylogeny of East Asian mitochondrial DNA lineages inferred from complete sequences." *Am J Hum Genet* **73**: 671-676
- Konings A, Van Camp G, Goethals A, Van Eyken E, Vandeveldel A, Ben Azza J, Peeters N, Wuyts W, Smeets H, Van Laer L. (2008) "Mutation analysis of mitochondrial DNA 12SrRNA and tRNA^{Ser}(UCN) genes in non-syndromic hearing loss patients" *Mitochondrion* **8**:377-382.
- Kruse B, Narasimhan N, Attardi G (1989). "Termination of transcription in human mitochondria: identification

and purification of a DNA binding protein factor that promotes termination." *Cell* **58**: 391-397.

- Lakshmipathy U, Campbell C (2001). "Antisense-mediated decrease in DNA ligase III expression results in reduced mitochondrial DNA integrity." *Nucleic Acids Res* **29**: 668-676
- Leroy AD, Norby S, (1994) "A new human mtDNA polymorphism: tRNAGln/4336(T-C)" *Clinical Genetics*, **45**: 109-110.
- Leissring MA, Farris W, Wu X, Christodoulou DC, Haigis MC, Guarente L, et al (2004). "Alternative translation initiation generates a novel isoform of insulin-degrading enzyme targeted to mitochondria." *Biochem J* **383**: 439-446
- Lesnefsky EJ, et al. (2001). "Mitochondrial dysfunction in cardiac disease ischemia-reperfusion, aging and heart failure". *J. Mol. Cell. Cardiol.* **33** (6): 1065-1089.
- Leveque M, Marlin S, Jonard L, Procaccio V, Reynier P, Amati-Bonneau P, Baulande S, Pierron D, Lacombe D, Duriez F, Francannet C, Mom T, Journal H, Catros H, Drouin-Garraud V, Obstoy MF, Dollfus H, Eliot MM, Faivre L, Duvillard C, Couderc R, Garabedian EN, Petit C, Feldmann D, Denoyelle F (2007) "Whole mitochondrial genome screening in maternally inherited non-syndromic hearing impairment using a microarray resequencing mitochondrial DNA chip." *Eur. J. Hum. Genet.* **15**: 1145-1155
- Levinger L, Jacobs O, James M (2001). "In vitro 3'-end endonucleolytic processing defect in a human mitochondrial tRNA^{Ser}(UCN) precursor with the T7445C substitution, with cause nonsyndromic deafness." *Nucleic Acids Res*, **29**: 4334-4340
- Levinger L, Giegé R, Florentz C (2003). "Pathology-related substitutions in human mitochondrial tRNA^{Ile}-end processing efficiency in vitro." *Nucleic Acids Res*, **31**: 1904-1912
- Levinger L, Mörl M, Florentz C (2004). "Mitochondrial tRNA 3' end metabolism and human disease." *Nucleic Acids Res* **32**: 5430-5441.
- Li X, Fischel-Ghodsian N, Schwartz F, Yan Q, Friedman RA, Guan MX (2004). "Biochemical characterization of the mitochondrial tRNA^{Ser}(UCN) T7511C mutation associated with nonsyndromic deafness." *Nucleic Acids Res* **32**: 867-877
- Liang WS, Reiman EM, Valla J, Dunckley T, Beach TG, Grover A, et al (2008). "Alzheimer's disease is associated with reduced expression of energy metabolism genes in posterior cingulate neurons." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 4441-4446
- Lovell MA, Gabbita SP, Markesbery WR (1999). "Increased DNA oxidation and decreased levels of repair products in Alzheimer's disease ventricular CSF." *J Neurochem* **72**: 771-776
- Lovell MA, Xie C, Markesbery WR (2000). "Decreased base excision repair and increased helicase activity in Alzheimer's disease brain." *Brain Res* **855**: 116-123
- Lustbader JW, Cirilli M, Lin C, Xu HW, Takuma K, Wang N, et al (2004). "ABAD directly links Abeta to mitochondrial toxicity in Alzheimer's disease." *Science* **304**: 448-452
- Macaulay V, Richards M, Hickey E, Vega E, Cruciani F, Guida V, Scozzari R, Bonn -Tamir B, Sykes B, Torroni A (1999) "The emerging tree of West Eurasian mtDNAs: a synthesis of control-region sequences and RFLPs." *Am J Hum Genet* **64**:232-249
- Mahley RW, Weisgraber KH, Huang Y (2006). "Apolipoprotein E4: a causative factor and therapeutic target in neuropathology, including Alzheimer's disease". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**(15): 5644-5651
- Majamaa K, Moilanen JS, Uimonen S, Remes AM, Salmela PI, Karppa M, Majamaa-Voltti KAM, Rusanen H, Sorri M, Peuhkurinen KJ, Hassinen IE (1998). "Epidemiology of A3243G, the mutation for mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis, and strokelike episodes: prevalence of the mutation in an adult population." *Am J Hum Genet* **63**: 447-454.
- Mancuso M, Filosto M, Bosetti F, Ceravolo R, Rocchi A, Tognoni G, et al (2003). "Decreased platelet cytochrome c oxidase activity is accompanied by increased blood lactate concentration during exercise in patients with Alzheimer disease." *Exp Neurol* **182**: 421-426
- Mancuso M, Coppede F, Migliore L, Siciliano G, Murri L. (2006). "Mitochondrial dysfunction, oxidative stress and neurodegeneration." *J Alzheimer's Dis* **10**: 59-73.
- Mancuso M, Coppede F, Murri L, Siciliano G (2007). "Mitochondrial cascade hypothesis of Alzheimer's disease: myth or reality?" *Antioxid Redox Signal* **9**: 1631-1646.
- Mancuso M, Nardini M, Micheli D, Rocchi A, Nesti C, Giglioli NJ, et al (2007). "Lack of association between mtDNA haplogroups and Alzheimer's disease in Tuscany." *Neurol Sci* **28**: 142-147
- Mancuso M, Orsucci D, Siciliano G, Murri L (2008). "Mitochondria, Mitochondrial DNA and Alzheimer's Disease. What Comes First?" *Current Alzheimer Research*, **5**: 457-468
- Maruszak A, Canter JA, Styczyńska M, Zekanowski C, Barcikowska M (2009). "Mitochondrial haplogroup H and Alzheimer's disease-Is there a connection?" *Neurobiol Aging*, **30**(11): 1749-1755
- Maurer I, Zierz S, Moller HJ (2000). "A selective defect of cytochrome c oxidase is present in brain of Alzheimer disease patients." *Neurobiol Aging* **21**: 455-462

- Mayr-Wohlfart U, Paulus C, Henneberg A, Rodel G (1996). "Mitochondrial DNA mutations in multiple sclerosis patients with severe optic involvement." *Acta Neurol. Scand.* **94**: 167-171.
- Mayr-Wohlfart U, Rodel G, Henneberg A (1997) "Mitochondrial tRNA(Gln) and tRNA(Thr) gene variants in Parkinson's disease." *Eur J Med Res* **2** : 111-113.
- McBride HM, Neuspiel M, Wasiak S (2006). "Mitochondria: more than just a powerhouse". *Curr. Biol.* **16** (14): R551.
- Mecocci P, MacGarvey U, Beal MF (1994). "Oxidative damage to mitochondrial DNA is increased in Alzheimer's disease." *Ann Neurol* **36**: 747-751
- Migliore L, Fontana I, Trippi F, Colognato R, Coppedè F, Tognoni G, et al (2005). "Oxidative DNA damage in peripheral leukocytes of mild cognitive impairment and AD patients." *Neurobiol Aging* **26**: 567-573
- Mims MP, Hayes TG, Zheng S, Leal SM, Frolov A, Ittmann MM, Wheeler TM, Prchal JT. (2006) "Mitochondrial DNA G10398A polymorphism and invasive breast cancer in African-American women." *Cancer Res.* **66**(3): 1880; author reply 1880-1.
- Mkaouer-Rebai E, Chamkha I, Kammoun F, Kammoun T, Aloulou H, Hachicha M, Triki C, Fakhfakh F (2009) "Two new mutations in the MT-TW gene leading to the disruption of the secondary structure of the tRNA(Trp) in patients with Leigh syndrome" *Molecular Genetics and Metabolism* **97**(3): 179-184
- Möllers M, Maniura-Weber K, Kiseljakovic E, Bust M, Hayrapetyan A, Jaksch M, Helm M, Wiesner RJ, von Kleist-Retzow JC (2005). "A new mechanism for mtDNA pathogenesis: Impairment of post-transcriptional maturation leads to severe depletion of mitochondrial tRNASer(UCN) caused by T7512C and G7497A point mutations." *Nucleic Acids Res* **33**: 5647-5658
- Moraes CT, Schon EA (1996). "Detection and analysis of mitochondrial DNA and RNA in muscle by in situ hybridization and single-fiber PCR." *Meth Enzymol* **264**: 522-540.
- Moreira PI, Siedlak SL, Wang X, Santos MS, Oliveira CR, Tabaton M, et al (2007)a. "Autophagocytosis of mitochondria is prominent in Alzheimer disease." *J Neuropathol Exp Neurol* **66**: 525-532
- Moreira PI, Siedlak SL, Wang X, Santos MS, Oliveira CR, Tabaton M, et al (2007)b. "Increased autophagic degradation of mitochondria in Alzheimer disease." *Autophagy* **3**: 614-615
- Musumeci O, Andreu AL, Shanske S, Bresolin N, Comi GP, Rothstein R, Schon EA, DiMauro S (2000). "Intragenic inversion of mtDNA: a new type of pathogenic mutation in a patient with mitochondrial myopathy." *Am J Hum Genet* **66**: 1900-1904.
- Mutisya EM, Bowling AC, Beal MF (1994). "Cortical cytochrome oxidase activity is reduced in Alzheimer's disease." *J Neurochem* **63**: 2179-2184
- Nagai T, Sawano A, Park ES, Miyawaki A. (2001) "Circularly permuted green fluorescent proteins engineered to sense Ca²⁺." *Proc Natl Acad Sci U S A.* **98**(6): 3197-3202.
- Niemi AK, Moilanen JS, Tanaka M, Hervonen A, Hurme M, Lehtimäki T, Arai Y, Hirose N, Majamaa K. (2005) "A combination of three common inherited mitochondrial DNA polymorphisms promotes longevity in Finnish and Japanese subjects." *Eur J Hum Genet.* **13**(2): 166-170.
- Nishigaki Y, Yamada Y, Fuku N, Matsuo H, Segawa T, Watanabe S, Kato K, Yokoi K, Yamaguchi S, Nozawa Y, Tanaka M (2007) "Mitochondrial haplogroup N9b is protective against myocardial infarction in Japanese males." *Hum Genet.* **120**(6): 827-36
- Nunomura A, Perry G, Pappolla MA, Wade R, Hirai K, Chiba S, et al (1999). "RNA oxidation is a prominent feature of vulnerable neurons in Alzheimer's disease." *J Neurosci* **19**: 1959-1964
- Nunomura A, Chiba S, Lippa CF, Cras P, Kalaria RN, Takeda A, et al (2004) "Neuronal RNA oxidation is a prominent feature of familial Alzheimer's disease." *Neurobiol Dis* **17**: 108-113
- Oddo S, Caccamo A, Shepherd JD, Murphy MP, Golde TE, Kaye R, et al (2003). "Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction." *Neuron* **39**: 409-421
- Ohnishi S, Takano K (2004) "Amyloid fibrils from the viewpoint of protein folding". *Cell. Mol. Life Sci.* **61**(5): 511-524
- Ohyagi Y, Yamada T, Nishioka K, Clarke NJ, Tomlinson AJ, Naylor S, et al (2000). "Selective increase in cellular A beta 42 is related to apoptosis but not necrosis." *Neuroreport* **11**: 167-171
- Onyango IG, Bennett JP Jr, Tuttle JB (2005)a. "Endogenous oxidative stress in sporadic Alzheimer's disease neuronal cybrids reduces viability by increasing apoptosis through pro-death signaling pathways and is mimicked by oxidant exposure of control cybrids." *Neurobiol Dis* **19**: 312-322
- Onyango IG, Tuttle JB, Bennett JP Jr (2005)b. "Altered intracellular signaling and reduced viability of Alzheimer's disease neuronal cybrids is reproduced by beta-amyloid peptide acting through receptor for advanced glycation end products (RAGE)." *Mol Cell Neurosci* **29**: 333-343
- Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T (1989). "Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphism." *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 2766-70.

- Papadimitriou A, Neustein HB, DiMauro S, Stanton R, Bresolin N (1984). "Histiocytoid cardiomyopathy of infancy: deficiency of reducible cytochrome b in heart mitochondria." *Pediatr Res* **18**: 1023-1028.
- Park H, Davidson E, King MP (2003). "The pathogenic A3243G mutation in human mitochondrial tRNA^{Leu}(UUR) decreases the efficiency of aminoacylation." *Biochemistry* **4**: 958-964
- Parker W Jr, Filley CM, Parks JK (1990). "Cytochrome oxidase deficiency in Alzheimer's disease." *Neurology* **40**: 1302-1303
- Petruzzella V, Moraes CT, Sano MC, Bonilla E, DiMauro S, Schon EA (1994). "Extremely high levels of mutant mtDNAs co-localize with cytochrome c oxidase-negative ragged red fibers in patients harboring a point mutation at nt 3243." *Hum Mol Genet* **3**: 449-454.
- Pieczenik SR, Neustadt J (2007). "Mitochondrial dysfunction and molecular pathways of disease". *Exp. Mol. Pathol.* **83** (1): 84-92
- Priller C, Bauer T, Mitteregger G, Krebs B, Kretzschmar HA, Herms J (2006). "Synapse formation and function is modulated by the amyloid precursor protein" *J. Neurosci.* **26**(27): 7212-7221
- Pyle A, Foltynie T, Tiangyou W, Lambert C, Keers SM, Allcock LM, Davison J, Lewis SJ, Perry RH, Barker R, Burn DJ, Chinnery PF. (2005) "Mitochondrial DNA haplogroup cluster UKJT reduces the risk of PD." *Ann. Neurol.* **57**: 564-567
- Raule N, Sevinci F, Santoro A, Altiglia S, Franceschi C (2007) "Association studies on human mitochondrial DNA: methodological aspects and results in the most common age-related diseases." *Mitochondrion.* **7**(1-2): 29-38
- Rossmanith W, Karwan R (1998). "Impairment of tRNA processing by point mutations in mitochondrial tRNA^{Leu}(UUR) associated with mitochondrial disease." *FEBS Lett* **433**: 269-274
- Ruiz-Pesini E, Lapeña A, Díez-Sánchez C, Pérez-Martos A, Montoya J, Alvarez E, Díaz M, Urriés A, Montoro L, López-Pérez MJ, Enríquez JA (2000). "Human mtDNA Haplogroups Associated with High or Reduced Spermatozoa Motility." *Am. J. Hum. Genet.* **67**: 682-696
- Rydzanicz M, Wrobel M, Pollak A, Gawecki W, Brauze D, Kostrzewska-Poczekaj M, Wojsyk-Banaszak I, Lechowicz U, Mueller-Malesińska M, Ołdak M, Płoski R, Skarżyński H, Szyfter K (2010) "Mutation analysis of mitochondrial 12S rRNA gene in Polish patients with non-syndromic and aminoglycoside-induced hearing loss." *Biochemical and biophysical research communications* **395**(1): 116-121.
- Sayre LM, Perry G, Harris PL, Liu Y, Schubert KA, Smith MA. (2000) "In situ oxidative catalysis by neurofibrillary tangles and senile plaques in Alzheimer's disease: a central role for bound transition metals." *J Neurochem.* **74**(1):270-9
- Schaefer AM, Taylor RW, Turnbull DM, Chinnery PF (2004) "The epidemiology of mitochondrial disorders--past, present and future." *Biochim Biophys Acta* **1659**(2-3): 115-120.
- Schapira AH (2006). "Mitochondrial disease". *Lancet* **368** (9529): 70-82.
- Selkoe DJ (1999). "Translating cell biology into therapeutic advances in Alzheimer's disease". *Nature* **399**(6738 Suppl): A23-A31
- Selkoe DJ (2001). "Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy." *Physiol Rev* **81**: 741-766.
- Sherer TB, Betarbet R, Greenamyre JT (2002). "Environment, mitochondria, and Parkinson's disease". *The Neuroscientist.* **8** (3): 192-7.
- Shioi J, Georgakopoulos A, Mehta P, Kouchi Z, Litterst CM, Baki L, Robakis NK (2007). "FAD mutants unable to increase neurotoxic Aβ 42 suggest that mutation effects on neurodegeneration may be independent of effects on Aβeta." *J Neurochem.* **101**(3): 674-681.
- Shoffner JM, Brown MD, Torroni A, Lott MT, Cabell MF, Mirra SS, et al (1993). "Mitochondrial DNA variants observed in Alzheimer disease and Parkinson disease patients." *Genomics* **17**: 171-184
- Simonian SA, Hyman BT (1994). "Functional alterations in Alzheimer's disease: selective loss of mitochondrial-encoded cytochrome oxidase mRNA in the hippocampal formation." *J Neuropathol Exp Neurol* **53**: 508-512
- Sissler M, Helm M, Frugier M, Giergé R, Florentz C (2004). "Aminoacylation properties of pathology-related variants of human mitochondrial tRNA^{Lys} variants." *RNA* **10**: 841-853
- Smith MA, Harris PLR, Sayre LM, Perry G (1997) "Iron accumulation in Alzheimer disease is a source of redox-generated free radicals" *PNAS* **94**(18): 9866-9868
- Sternberg D, Danan C, Lombès A, Laforêt P, Girodon E, Goossens M, Amselem S (1998) "Exhaustive scanning approach to screen all the mitochondrial tRNA genes for mutations and its application to the investigation of 35 independent patients with mitochondrial disorders." *Hum Mol Genet.* **7**(1): 33-42.
- Sternberg D, Chatzoglou E, Laforêt P, Fayet G, Jardel C, Blondy P, Fardeau M, Amselem S, Eymard B, Lombès A (2001) "Mitochondrial DNA transfer RNA gene sequence variations in patients with mitochondrial disorders." *Brain* **124**(Pt 5): 984-994.
- Stewart P, Hayakawa K, Akers M, Vinters H (1992). "A morphometric study of the blood-brain barrier in

Alzheimer's disease." *Lab Invest* **67**: 734-742

- Strittmatter WJ, Saunders AM, Schmechel D, Pericak-Vance M, Enghild J, Salvesen GS, Roses AD. (1993). "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. USA* **90**(5): 1977-1981
- Suzuki H, Ueda T, Taguchi H, Takeuchi N (2007). "Chaperone properties of mammalian mitochondrial translation elongation factor Tu." *J Biol Chem* **282**: 4076-4084
- Swerdlow RH, Parks JK, Cassarino DS, Maguire DJ, Maguire RS, Bennett JP Jr, et al (1997). "Cybrids in Alzheimer's disease: a cellular model of the disease?" *Neurology* **49**: 918-925
- Tabert MH, Liu X, Doty RL, Serby M, Zamora D, Pelton GH, Marder K, Albers MW, Stern Y, Devanand DP (2005). "A 10-item smell identification scale related to risk for Alzheimer's disease". *Ann. Neurol.* **58** (1): 155-160.
- Tanaka M, Cabrera VM, Gonzalez AM, Larruga JM, Takeyasu T, Fuku N, Guo LJ, Hirose R, Fujita Y, Kurata M, Shinoda K, Umetsu K, Yamada Y, Oshida Y, Sato Y, Hattori N, Mizuno Y, Arai Y, Hirose N, Ohta S, Ogawa O, Tanaka Y, Kawamori R, Shamoto-Nagai M, Maruyama W, Shimokata H, Suzuki R, Shimodaira H (2004) "Mitochondrial genome variation in eastern Asia and the peopling of Japan." *Genome Res* **14**: 1832-1850
- Tanji K, Vu TH, Schon EA, DiMauro S, Bonilla E (1999). "Kearns-Sayre syndrome: unusual pattern of expression of subunits of the respiratory chain in the cerebellar system." *Ann Neurol* **45**: 377-383.
- Tanji K, Bonilla E (2000). "Neuropathologic aspects of cytochrome c oxidase deficiency." *Brain Pathol* **10**: 422-430.
- Tatuch Y, Christodoulou J, Feigenbaum A, Clarke J, Wherret J, Smith C, Rudd N, Petrova-Benedict R, Robinson BH (1992). "Heteroplasmic mtDNA mutation (TÆG) at 8993 can cause Leigh disease when the percentage of abnormal mtDNA is high." *Am J Hum Genet* **50**: 852-858.
- Taylor SW, Fahy E, Zhang B, Glenn GM, Warnock DE, Wiley S, Murphy AN, Gaucher SP, Capaldi RA, Gibson BW, Ghosh SS (2003 March). "Characterization of the human heart mitochondrial proteome". *Nat Biotechnol.* **21** (3): 281-6.
- Taylor RW, Turnbull DM (2005). "Mitochondrial DNA mutations in human disease". *Nat. Rev. Genet.* **6** (5): 389-402.
- Thiffault C, Bennett JP Jr (2005). "Cyclical mitochondrial δ psi fluctuations linked to electron transport, FOF1 ATP-synthase and mitochondrial Na⁺/Ca²⁺ exchange are reduced in Alzheimer's disease cybrids." *Mitochondrion* **5**: 109-119
- Tiraboschi P, Hansen LA, Thal LJ, Corey-Bloom J (2004) "The importance of neuritic plaques and tangles to the development and evolution of AD" *Neurology* **62**(11): 1984-1989
- Tomari Y, Hino N, Nagaike T, Suzuki T, Ueda T (2003). "Decreased CCA-addition in human mitochondrial tRNAs bearing a pathogenic A4317G or A10044G mutation." *J Biol Chem* **278**: 16828-16833
- Toompuu M, Levinger LL, Nadal A, Gomez J, Jacobs HT (2004). "The 7472insC mtDNA mutation impairs 5' and 3' processing of tRNA(Ser(UCN))." *Biochem Biophys Res Commun* **322**: 803-813
- Toompuu M, Tiranti V, Zeviani M, Jacobs HT (1999). "Molecular phenotype of the np 7472 deafness-associated mitochondrial mutation in osteosarcoma cell cybrids." *Hum Mol Genet* **8**: 2275-2283
- Toompuu M, Yasukawa T, Suzuki T, Hakkinen T, Spelbrink JN, Watanabe K, Jacobs HT (2002). "The 7472insC mitochondrial DNA mutation impairs the synthesis and extent of aminoacylation of tRNA^{Ser}(UCN) but not its structure or rate of turnover." *J Biol Chem* **277**: 22240-22250
- Torroni A, Lott MT, Cabell MF, Chen YS, Lavergne L, Wallace DC (1994) "mtDNA and the origin of Caucasians: identification of ancient Caucasian-specific haplogroups, one of which is prone to a recurrent somatic duplication in the D-loop region." *Am J Hum Genet.* **55**(4): 760-776.
- Torroni A, Huoponen K, Francalacci P, Petrozzi M, Morelli L, Scozzari R, et al (1996). "Classification of European mtDNAs from an analysis of three European populations." *Genetics* **144**: 1835-1850
- Trimmer PA, Keeney PM, Borland MK, Simon FA, Almeida J, Swerdlow RH, et al (2004). "Mitochondrial abnormalities in cybrid cell models of sporadic Alzheimer's disease worsen with passage in culture." *Neurobiol Dis* **15**: 29-39
- Trimmer PA, Borland MK (2005). "Differentiated Alzheimer's disease transmitochondrial cybrid cell lines exhibit reduced organelle movement." *Antioxid Redox Signal* **7**: 1101-1109
- Turner PR, O'Connor K, Tate WP, Abraham WC (2003). "Roles of amyloid precursor protein and its fragments in regulating neural activity, plasticity and memory" *Prog. Neurobiol.* **70**(1): 1-32.
- Tysoe C, Robinson D, Brayne C, Dening T, Paykel ES, Huppert FA, Rubinsztein DC (1996). "The tRNA(Gln) 4336 mitochondrial DNA variant is not a high penetrance mutation which predisposes to dementia before the age of 75 years." *J Med Genet* **33**: 1002-1006
- Valente L, Tiranti V, Marsano RM, Malfatti E, Fernandez-Vizarra E, Donnini C, Mereghetti P, De Gioia L, Burlina A, Castellan C, Comi GP, Savasta S, Ferrero I, Zeviani M (2007). "Infantile encephalopathy and

defective mitochondrial DNA translation in patients with mutations of mitochondrial elongation factors EFG1 and EFTu." *Am J Hum Genet* **80**: 44-58

- Valla J, Schneider L, Niedzielko T, Coon KD, Caselli R, Sabbagh MN, et al (2006). "Impaired platelet mitochondrial activity in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment." *Mitochondrion* **6**: 323-330
- Valnot I, Kassis J, Chretien D, de Lonlay P, Parfait B, Munnich A, Kachaner J, Rustin P, Rotig A (1999). *Hum Genet* **104**: 460-466.
- Van Broeck B, Van Broeckhoven C, Kumar-Singh S (2007). "Current insights into molecular mechanisms of Alzheimer disease and their implications for therapeutic approaches". *Neurodegener Dis* **4**(5): 349-365
- Van den Ouweland JMW, Bruining GJ, Lindhout D, Wit J-M, Veldhuyzen BFE, Maassen JA (1992) "Mutations In mitochondrial tRNA genes: non-linkage with syndromes of Wolfram and chronic progressive external ophthalmoplegia" *Nucl. Acids Res.* **20**: 679-682
- van der Walt JM, Nicodemus KK, Martin ER, Scott WK, Nance MA, Watts RL, Hubble JP, Haines JL, Koller WC, Lyons K, Pahwa R, Stern MB, Colcher A, Hiner BC, Jankovic J, Ondo WG, Allen FH Jr, Goetz CG, Small GW, Mastaglia F, Stajich JM, McLaurin AC, Middleton LT, Scott BL, Schmechel DE, Pericak-Vance MA, Vance JM. (2003) "Mitochondrial polymorphisms significantly reduce the risk of Parkinson disease." *Am J Hum Genet.* **72**(4):804-811.
- van der Walt JM, Dementieva YA, Martin ER, Scott WK, Nicodemus KK, Kroner CC, et al (2004). "Analysis of European mitochondrial haplogroups with Alzheimer disease risk." *Neurosci Lett* **365**: 28-32
- Vilkki J, Savontaus ML, Kalimo H, Nikoskelainen EK (1989) "Mitochondrial DNA polymorphism in Finnish families with Leber's hereditary optic neuroretinopathy" *Human Genetics* **82**: 208-212
- Voet, Donald; Judith G. Voet, Charlotte W. Pratt (2006). *Fundamentals of Biochemistry, 2nd Edition*. John Wiley and Sons, Inc.. pp. 547.
- Waldemar G, Dubois B, Emre M, et al. (2007). "Recommendations for the diagnosis and management of Alzheimer's disease and other disorders associated with dementia: EFNS guideline". *Eur J Neurol* **14** (1): e1-26.
- Wallace DC, Singh G, Lott MT, Hodge JA, Schurr TG, Lezza A, Elsas LJ, Nikoskelainen EK (1988). "Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy." *Science* **242**: 1427-1430.
- Wallace DC, Shoffner, JM, Brown MD, Torroni A, Lott MT, Cabell M (1992) "Mitochondrial DNA mutations associated with Alzheimer's and Parkinson's disease" *American Journal of Human Genetics*, **51**: A30.
- Wallace DC (1994) "Mitochondrial DNA sequence variation in human evolution and disease" *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**: 8739-8746.
- Wallace DC (1999). "Mitochondrial diseases in man and mouse." *Science* **283**: 1482-1488
- Wallace DC, Brown MD, Lott MT (1999). "Mitochondrial DNA variation in human evolution and disease." *Gene* **238**: 211-230.
- Wang H, Yu SW, Koh DW, Lew J, Coombs C, Bowers W, et al (2004). "Apoptosis-inducing factor substitutes for caspase executioners in NMDA-triggered excitotoxic neuronal death." *J Neurosci* **24**: 10963-10973
- Wang J, Xiong S, Xie C, Markesbery WR, Lovell MA (2005). "Increased oxidative damage in nuclear and mitochondrial DNA in Alzheimer's disease." *J Neurochem* **93**: 953-962
- Wang J, Markesbery WR, Lovell MA (2006). "Increased oxidative damage in nuclear and mitochondrial DNA in mild cognitive impairment." *J Neurochem* **96**: 825-32
- Wang X, Su B, Perry G, Smith MA, Zhu X (2007). "Insights into amyloid-beta-induced mitochondrial dysfunction in Alzheimer disease." *Free Radic Biol Med* **43**: 1569-1573
- Waring SC, Rosenberg RN (2008). "Genome-wide association studies in Alzheimer disease". *Arch Neurol* **65**(3): 329-334
- Weissman L, de Souza-Pinto NC, Stevnsner T, Bohr VA (2007). "DNA repair, mitochondria, and neurodegeneration." *Neuroscience* **145**: 1318-1329
- Wilson DM 3rd, Bohr VA (2007). "The mechanics of base excision repair, and its relationship to aging and disease." *DNA Repair (Amst)* **6**: 544-659
- Wilson FH, Hariri A, Farhi A, Zhao H, Petersen KF, Toka HR, Nelson-Williams C, Raja KM, Kashgarian M, Shulman GI, Scheinman SJ, Lifton RP (2004) "A cluster of metabolic defects caused by mutation in a mitochondrial tRNA." *Science.* **306**(5699): 1190-1194.
- Wittenhagen LM, Kelley SO (2002). "Dimerization of a pathogenic human mitochondrial tRNA." *Nat Struct Biol* **7**: 586-590
- Wittenhagen LM, Kelley SO (2003). "Impact of disease-related mitochondrial mutations on tRNA structure and function." *Trends Biochem Sci* **28**: 605-611.
- Wittenhagen LM, Roy MD, Kelley SO (2003). "The pathogenic U3271C human mitochondrial tRNA(Leu(UUR)) mutation disrupts a fragile anticodon stem." *Nucleic Acids Res* **31**: 596-601
- Wong-Riley M, Antuono P, Ho KC, Egan R, Hevner R, Liebl W, et al (1997). "Cytochrome oxidase in Alzheimer's

disease: biochemical, histochemical, and immunohistochemical analyses of the visual and other systems." *Vision Res* **37**: 3593-3608

- Wong L, Liang M, Kwon H, Park J, Bai R, Tan D (2002). "Comprehensive Scanning of the Entire Mitochondrial Genome for Mutations." *Clinical Chemistry* **48**(11): 1901-1912
- Yasukawa T, Hino N, Suzuki T, Watanabe K, Ueda T, Ohta S (2000). "A pathogenic point mutation reduces stability of mitochondrial mutant tRNA^{Ile}." *Nucleic Acids Res* **27**: 3779-3784
- Yankner BA, Duffy LK, Kirschner DA (1990). "Neurotrophic and neurotoxic effects of amyloid beta protein: reversal by tachykinin neuropeptides". *Science* **250**(4978): 279-282
- Yasukawa T, Suzuki T, Ishi N, Ueda T, Ohta S, Watanabe K (2000)a. "Modification defect at anticodon wobble nucleotide of mitochondrial tRNAs^{Leu}(UUR) with pathogenic mutation of mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes." *J Biol Chem* **275**: 4251-4257
- Yasukawa T, Suzuki T, Ishi N, Ueda T, Ohta S, Watanabe K (2000)b. "Defect in modification at the anticodon wobble nucleotide of mitochondrial tRNA^{Lys} with the MERRF encephalomyopathy pathogenic mutation." *FEBS Lett* **467**: 175-178.
- Yasukawa T, Suzuki T, Ishii N, Ohta S, Watanabe K (2001). "Wobble modification defect in tRNA disturbs codon-anticodon interaction in a mitochondrial disease." *EMBO J* **20**: 4794-4802
- Zeviani M, Di Donato S (2004). "Mitochondrial disorders". *Brain*. **127** (Pt 10): 2153-2172.
- Zhang J, Li X, Mueller M, Wang Y, Zong C, Deng N, Vondriska TM, Liem DA, Yang J, Korge P, Honda H, Weiss JN, Apweiler R, Ping P (2008). "Systematic characterization of the murine mitochondrial proteome using functionally validated cardiac mitochondria". *Proteomics* **8** (8): 1564-1575
- Zhang J, Liem DA, Mueller M, Wang Y, Zong C, Deng N, Vondriska TM, Yang J, Korge P, Drews O, Maclellan WR, Honda H, Weiss JN, Apweiler R, Ping P (2008). "Altered Proteome Biology of Cardiac Mitochondria Under Stress Conditions". *J. Proteome Res* **7** (6): 2204
- Zifa E, Giannouli S, Theotokis P, Stamatis C, Mamuris Z, Stathopoulos C (2007). "Mitochondrial tRNA mutations: clinical and functional perturbations." *RNA Biol* **4**(1): 38-66
- Zifa E, Theotokis P, Kaminari A, Maridaki H, Leze H, Petsiava E, Mamuris Z, Stathopoulos C. (2008) "A novel G3337A mitochondrial ND1 mutation related to cardiomyopathy co-segregates with tRNA^{Leu}(CUN) A12308G and tRNA^{Thr} C15946T mutations." *Mitochondrion*. **8**(3): 229-236.
- Zsurka G, Schroder R, Kornblum C, Rudolph J, Wiesner RJ, Elger CE, Kunz WS (2004). "Tissue dependent cosegregation of the novel pathogenic G12276A mitochondrial tRNA^{Leu}(CUN) mutation with the A185G D-loop polymorphism." *J Med Genet* **41**: e124