

**ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΩΝ tRNA ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ ΜΕ ΤΗ ΝΟΣΟ  
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

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

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.

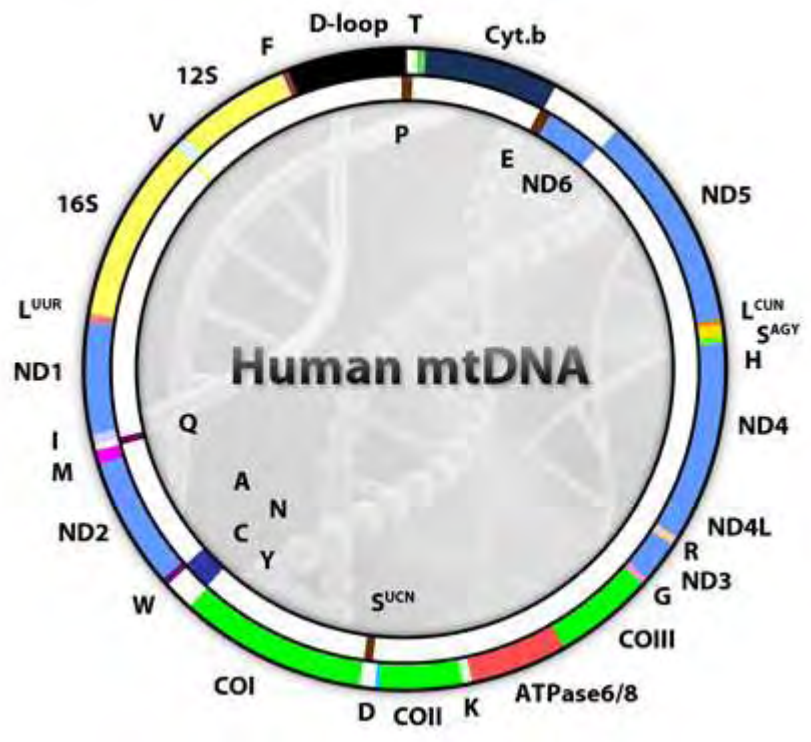
Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω την κα. Αιμιλία Ζίφα για την ανάθεση αυτού του ιδιαίτερα ενδιαφέροντος θέματος, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε καθώς και για την επιστημονική της καθοδήγηση καθ’ όλη τη διάρκεια της προσπάθειάς μου.

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

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στον υποψήφιο διδάκτορα Κώστα Σταμάτη για την πολύτιμη βοήθειά του κατά την εκτέλεση του πειραματικού μέρους, αλλά και για την υπομονή και την προθυμία του. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τη Λέκτορα του Τμήματος κα. Θεολογία Σαραφίδου και τον υποψήφιο διδάκτορα Θέμη Γιαννούλη για τις χρήσιμες συμβουλές τους.

Θα ήθελα επίσης να εκφράσω τις ευχαριστίες μου σε όλους τους μεταπτυχιακούς και προπτυχιακούς φοιτητές του Εργαστηρίου Γενετικής και ιδιαίτερα στον Κωνσταντίνο Παπαδημητρίου για την άψογη συνεργασία μας και το ευχάριστο κλίμα που επικρατούσε στο εργαστήριο.

Τέλος, ευχαριστώ τους γονείς μου Συμεών και Μαγδαληνή που χωρίς την οικονομική και ψυχική στήριξή τους δε θα ήμουν σε θέση να πραγματοποιήσω την παρούσα εργασία.



## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ .....	8
ABSTRACT .....	<b>Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.</b> 9
ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....	10
Η Νόσος Alzheimer .....	11
Χαρακτηριστικά .....	12
Προ-άνοια.....	12
Πρώιμη άνοια .....	13
Μέτρια άνοια.....	13
Προχωρημένη άνοια.....	14
Αίτια .....	14
Ποιά είναι τα γονίδια που σχετίζονται με τη νόσο Alzheimer; .....	15
Αμυλοειδές β.....	16
Απολιποπρωτεΐνη E.....	20
Υπάρχει στενή συσχέτιση μεταξύ της νόσου του Alzheimer και της μιτοχονδριακής δυσλειτουργίας .....	21
Το Μιτοχόνδριο .....	24
Μιτοχονδριακή κληρονομικότητα .....	28
Μιτοχόνδρια και Οξειδωτικό stress .....	29
Δραστικές μορφές οξυγόνου .....	30
Οι συνέπειες του οξειδωτικού stress στα κύτταρα.....	31
Πηγές οξειδωτικού stress στα μιτοχόνδρια.....	32
Επίδραση των ROS στα μιτοχόνδρια .....	32
Αντιοξειδωτικοί αμυντικοί μηχανισμοί .....	35
Μεταλλάξεις στα μιτοχονδριακά γονίδια tRNA .....	36
Χαρακτηριστικά των μιτοχονδριακών tRNA .....	36
Κλινικές επιπτώσεις των μεταλλάξεων στα μιτοχονδριακά γονίδια tRNA.....	38
Απλοομάδες - Συσχέτιση με τη νόσο Alzheimer .....	39
Φαρμακευτική αντιμετώπιση.....	40
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ .....	42
Υλικά .....	43
Μέθοδοι.....	44
Δείγματα.....	44

Απομόνωση του DNA .....	45
Παρασκευή των αντιδραστηρίων .....	46
Ρόλος των αντιδραστηρίων .....	47
Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) ..	48
Taq Polymerase .....	49
Primers .....	49
Mg <sup>++</sup> .....	50
Buffer .....	50
dNTPs .....	50
Πρωτόκολλο PCR .....	51
Πρόγραμμα PCR .....	52
Εκκινητές .....	52
Ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αγαρόζη .....	52
Παράγοντες που επηρεάζουν την κινητικότητα των μορίων DNA στο πήκτωμα αγαρόζης .....	53
Παρασκευή πηκτώματος αγαρόζης .....	53
Ανάλυση Πολυμορφισμών Διαμόρφωσης Μονόκλώνου DNA (Single Strand Conformational Polymorphism, SSCP) .....	56
Παρασκευή πηκτώματος ακρυλαμίδης .....	56
Παρασκευή των αντιδραστηρίων .....	59
Περιορισμοί της μεθόδου SSCP .....	59
Καθαρισμός PCR προϊόντος .....	60
Διαδικασία .....	60
Αυτοματοποιημένη αλληλούχιση .....	60
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....	64
ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....	72
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	79

## ΛΙΣΤΑ ΕΙΚΟΝΩΝ

<u>Εικόνα 1:</u> Μοριακή Θέση του γονιδίου της APP στο χρωμόσωμα 21: ζεύγη βάσεων 27.252.860 ως 27.543.137 Πηγή: Genetics Home Reference .....	16
<u>Εικόνα 2:</u> Μοριακή Θέση του γονιδίου της PSEN1 στο χρωμόσωμα 14: ζεύγη βάσεων 73,603,142 ως 73,690,398 Πηγή: Genetics Home Reference .....	16
<u>Εικόνα 3:</u> Μοριακή Θέση του γονιδίου της PSEN2 στο χρωμόσωμα 1: ζεύγη βάσεων 227,058,272 ως 227,083,803 Πηγή: Genetics Home Reference .....	16
<u>Εικόνα 4:</u> Σχηματική αναπαράσταση της επεξεργασίας της APP. Το τμήμα Αβ του μορίου δείχνεται με μαύρο χρώμα .....	17
<u>Εικόνα 5:</u> Απεικόνιση νευρώνων του ιππόκαμπτου με ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης [47]. (Α) Μη επεξεργασμένος νευρώνας παρουσιάζει στρογγυλό, λείο κυτταρικό σώμα με νευράξονες (Β) Νευρώνας μετά από 24-h καλλιέργεια με Ab42 παρουσιάζει συρρίκνωση του κυτταρικού σώματος, εξογκώματα στην επιφάνεια της μεμβράνης (βέλη) και απώλεια νευραξόνων. (C) Συρρικνωμένος αποπτωτικός νευρώνας σε μεταγενέστερο στάδιο, με λίγα εναπομείναντα εξογκώματα (βέλη) .....	18
<u>Εικόνα 6:</u> Αναπαράσταση υγιούς νευρώνα (αριστερά) και παθολογικού νευρώνα με αμυλοειδείς πλάκες και νευροϊνιδιακές αλλοιώσεις .....	20
<u>Εικόνα 7:</u> (1) Εσωτερική μεμβράνη, (2) Εξωτερική μεμβράνη, (3) Αναδιπλώσεις, (4) Μήτρα .....	24
<u>Εικόνα 8:</u> Διαγραμματική απεικόνιση της εσωτερικής δομής ενός τυπικού μιτοχονδρίου .....	25
<u>Εικόνα 9:</u> Διαδικασία παραγωγής ATP Πηγή: Stryer, Lubert (2000) Biochemistry, 4 <sup>th</sup> ed., W.H. Freeman: New York .....	26
<u>Εικόνα 10:</u> Το μιτοχονδριακό DNA .....	27
<u>Εικόνα 11:</u> Αλληλουχία των φορέων ηλεκτρονίων στην αναπνευστική αλυσίδα .....	29
<u>Εικόνα 12:</u> Το άνοιγμα του πόρου μετάπτωσης της μιτοχονδριακής διαπερατότητας οδηγεί στον κυτταρικό θάνατο .....	33
<u>Εικόνα 13:</u> Σηματοδοτικό μονοπάτι αποπτωτικών σημάτων .....	34
<u>Εικόνα 14:</u> Σχηματική απεικόνιση της δευτεροταγούς και τριτοταγούς δομής του μορίου του tRNA Πηγή: <a href="http://www.bio.miami.edu">www.bio.miami.edu</a> .....	37

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η νόσος του Alzheimer (AD) είναι μια νευροεκφυλιστική διαταραχή που έχει ως αποτέλεσμα τη μη αναστρέψιμη απώλεια των νευρώνων, ιδίως στο νεοφλοιό και τον ιππόκαμπο. Η AD είναι η πιο κοινή μορφή άνοιας στους ηλικιωμένους. Εκτός από την απώλεια νευρώνων, τα παθολογικά χαρακτηριστικά είναι εξωκυττάρια γεροντικές πλάκες που περιέχουν το πεπτιδίο αμυλοειδές β (Aβ) και νευροϊνιδιακές αλλοιώσεις. Η οικογενής μορφή της AD που αντιπροσωπεύει το 5% των ασθενών έχει συνδεθεί με μεταλλάξεις στο πυρηνικό DNA, κυρίως στο γονίδιο της πρόδρομης αμυλοειδούς πρωτεΐνης και τα γονίδια της πρεσενιλίνης. Το υπόλοιπο 95% των ασθενών με AD είναι ως επί το πλείστον σποραδικές περιπτώσεις όψιμης έναρξης, με σύνθετη αιτιολογία λόγω αλληλεπιδράσεων μεταξύ περιβαλλοντικών συνθηκών και γενετικών χαρακτηριστικών του ατόμου. Τα μιτοχόνδρια διαδραματίζουν κεντρικό ρόλο στην βιοενεργητική του κυττάρου και στον αποπτωτικό θάνατο. Έχουν αναφερθεί μορφολογικές, βιοχημικές και γενετικές ανωμαλίες των μιτοχονδρίων σε αρκετούς ιστούς AD. Διαταραγμένη μιτοχονδριακή αναπνοή, ιδιαίτερα ανεπάρκεια της COX, έχει παρατηρηθεί σε αιμοπετάλια, εγκέφαλο και ινοβλάστες των ασθενών με AD. Με την πάροδο της ηλικίας παρατηρείται μια ελάττωση της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης που ίσως να σχετίζεται με την άθροιση μεταλλάξεων στο μιτοχονδριακό DNA με αποτέλεσμα ανεπάρκεια ενέργειας, αύξηση του οξειδωτικού στρες και, τελικά, απόπτωση. Στην παρούσα εργασία μελετάμε το ρόλο των μεταλλάξεων στα γονίδια tRNA ως εναρκτήριο γεγονός της μιτοχονδριακής δυσλειτουργίας.

Αναλύθηκαν τα γονίδια που κωδικοποιούν για τα tRNA της συστοιχίας HSL (His, Ser, Leu-UUR), της Val, του Glu, της συστοιχίας IGM (Ile, Gln, Met) και του CO1 σε 50 δείγματα ασθενών με Alzheimer και 142 δείγματα υγιών ατόμων. Βρέθηκαν οι εξής μεταλλάξεις: 10/50 ασθενείς έφεραν το συνδιασμό μεταλλάξεων A12308G/C7028T στο γονίδιο tRNA<sup>Leu</sup> και στο γονίδιο που κωδικοποιεί για το CO1. Επομένως κατατάσσονται στην απλοομάδα U. Τον ίδιο συνδιασμό έφεραν και 24/142 άτομα από την ομάδα ελέγχου. 5/50 ασθενείς εμφάνισαν τη μετάλλαξη T12189C στο γονίδιο tRNA<sup>His</sup> ενώ η ίδια μετάλλαξη εντοπίστηκε μόνο σε 1/142 από την ομάδα ελέγχου. Η μετάλλαξη T1658C στο γονίδιο tRNA<sup>Val</sup> βρέθηκε μόνο σε 1/142 από την ομάδα ελέγχου. Το γονίδιο tRNA<sup>Glu</sup> δεν παρουσίασε καμία μετάλλαξη. 1/50 ασθενείς και 3/142 υγιείς εμφάνισαν τη μετάλλαξη T4336C στο γονίδιο tRNA<sup>Gln</sup>. Τέλος, 1/142 υγιείς εμφάνισε τη μετάλλαξη A4310G και C4312T αντίστοιχα στο γονίδιο tRNA<sup>Ile</sup>. Οι



μεταλλάξεις στα tRNA φαίνεται να παίζουν ρόλο στην προδιάθεση για Alzheimer λόγω του σημαντικού ρόλου των μιτοχονδρίων στην διαδικασία της απόπτωσης.

## ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disorder which results in the irreversible loss of cortical neurons, particularly in the associative neocortex and hippocampus. AD is the most common form of dementia in the elderly people. Apart from the neuronal loss, the pathological hallmarks are extracellular senile plaques containing the peptide amyloid beta (A $\beta$ ) and neurofibrillary tangles. Familial AD which represents 5% of patients is associated to nuclear DNA mutations, mainly in amyloid precursor protein and presenilin genes. The remaining 95% of AD patients are mostly sporadic late-onset cases, with a complex etiology due to interactions between environmental conditions and genetic features of the individual. Mitochondria play a central role in the bioenergetics of the cell and apoptotic cell death. Morphological, biochemical and genetic abnormalities of the mitochondria in several AD tissues have been reported. Impaired mitochondrial respiration, particularly COX deficiency, has been observed in brain, platelets and fibroblasts of AD patients. Somatic mutations in mitochondrial DNA (mtDNA) could cause energy failure, increased oxidative stress and, finally, apoptosis. In the present work we study the role of tRNA genes mutations as the inaugural event of mitochondrial dysfunction.

Genes coding for the tRNA array HSL (His, Ser, Leu-UUR), tRNA Val, tRNA Glu, the array IGM (Ile, Gln, Met) and CO1 were analyzed in 50 samples from patients with Alzheimer's disease (case) and 142 healthy individuals (control). We found the following mutations: 10/50 patients carried the combination of mutations A12308G/C7028T in tRNA<sup>Leu</sup> gene and gene coding for CO1. Therefore classified as haplogroup U. 24/142 individuals of control group brought the same combination. 5/50 patients had the mutation T12189C in tRNA<sup>His</sup> gene while the same mutation was detected in only 1/142 in control group. T1658C mutation in tRNA<sup>Val</sup> gene was found in only 1/142 in control group. tRNA<sup>Glu</sup> gene showed no mutation. 1/50 patients as well as 3/142 controls had the mutation T4336C in tRNA<sup>Gln</sup> gene. Finally, 1/142 controls had the mutation A4310G and C4312T in tRNA<sup>Ile</sup> gene respectively. Mitochondrial mutations appear to play a role in predisposition to Alzheimer's Disease because of the very important role of mitochondria in the process of apoptosis.

# ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## Η Νόσος Alzheimer

Η νόσος του Alzheimer (Alzheimer's Disease, AD), που ονομάζεται επίσης ασθένεια Alzheimer, γεροντική άνοια τύπου Alzheimer (Senile Dementia of the Alzheimer Type, SDAT) ή απλά Alzheimer, είναι η πιο κοινή μορφή άνοιας. Αυτή η ανίατη, εκφυλιστική και θανατηφόρος ασθένεια περιγράφηκε για πρώτη φορά από τον γερμανό ψυχίατρο και νευροπαθολόγο Alois Alzheimer το 1906 από τον οποίο πήρε και το όνομά της [1]. Γενικά, η σποραδική μορφή εμφανίζεται σε άτομα ηλικίας άνω των 75 ετών [2], αν και οι λιγότερο διαδεδομένες περιπτώσεις πρόωρης εκδήλωσης της νόσου του Alzheimer που αφορούν στην οικογενή μορφή, μπορεί να συμβούν πολύ νωρίτερα. Το 2006, υπήρξαν κατ' εκτίμηση 26,6 εκατομμύρια πάσχοντες σε όλο τον κόσμο. Η νόσος του Alzheimer αναμένεται να προσβάλλει 1 στους 85 ανθρώπους παγκοσμίως μέχρι το 2050 [3]. Αν και η πορεία της νόσου Alzheimer είναι μοναδική για κάθε άτομο, υπάρχουν πολλά κοινά συμπτώματα [4]. Τα πρώτα παρατηρήσιμα συμπτώματα συχνά θεωρούνται, εσφαλμένα, ότι σχετίζονται με την ηλικία ή ότι πρόκειται για εκδηλώσεις άγχους [5]. Στα πρώτα στάδια, το πιο κοινώς αναγνωρισμένο σύμπτωμα είναι η απώλεια μνήμης, όπως και η δυσκολία ανάκτησης πρόσφατων γεγονότων. Όταν υπάρχει υποψία για AD, η διάγνωση επιβεβαιώνεται συνήθως με αξιολογήσεις της συμπεριφοράς και γνωστικά τεστ και συχνά ακολουθείται από ακτινογραφίες του εγκεφάλου. Η νευροπαθολογική διάγνωση της AD βασίζεται στην ανίχνευση των πλακών αμυλοειδούς και των νευροϊνιδιακών αλλοιώσεων στο νεοφλοιό και τον ιππόκαμπο του εγκεφάλου, περιοχές που σχετίζονται με ανώτερες διανοητικές λειτουργίες. Η νευροαπεικονιστική μέθοδος διακρίνεται σε δύο μεγάλες κατηγορίες:

1. Δομική απεικόνιση, η οποία ασχολείται με τη δομή του εγκεφάλου και τη διάγνωση μεγάλης κλίμακας ενδοκρανιακής νόσου (όπως όγκοι) και
2. Λειτουργική απεικόνιση, η οποία χρησιμοποιείται για τη διάγνωση μεταβολικών ασθενειών και βλαβών σε μικρότερη κλίμακα (όπως η νόσος του Alzheimer), καθώς επίσης για νευρολογικές μελέτες και έρευνα της γνωστικής ψυχολογίας [6].

Καθώς προχωρά η ασθένεια, τα συμπτώματα περιλαμβάνουν σύγχυση, ευερεθιστότητα και επιθετικότητα, εναλλαγές της διάθεσης, δυσκολία στην ομιλία και απώλεια της μακροπρόθεσμης μνήμης [7]. Βαθμιαία χάνονται και οι σωματικές λειτουργίες με αποτέλεσμα το θάνατο [8]. Η ατομική πρόγνωση είναι δύσκολο να επιτευχθεί, καθώς η διάρκεια της νόσου ποικίλλει. Η AD αναπτύσσεται για ένα αόριστο χρονικό διάστημα πριν να γίνει πλήρως εμφανής και μπορεί να μείνει αδιάγνωστη για χρόνια. Η μέση προσδοκώμενη διάρκεια ζωής μετά τη διάγνωση είναι περίπου επτά έτη [9]. Λιγότερο από 3% των ατόμων ζουν πάνω από δεκατέσσερα χρόνια μετά τη

διάγνωση [10]. Η αιτία και η εξέλιξη της νόσου Alzheimer δεν είναι πλήρως κατανοητές. Η έρευνα δείχνει ότι η νόσος σχετίζεται με νευρικές πλάκες και παθολογικά συσσωματώματα πρωτεϊνών στον εγκέφαλο [11]. Οι θεραπείες που χρησιμοποιούνται μέχρι στιγμής προσφέρουν μικρό όφελος, ενώ θεραπείες για να καθυστερήσει ή να σταματήσει η εξέλιξη της νόσου δεν είναι ακόμη διαθέσιμες. Από το 2008, περισσότερες από 500 κλινικές δοκιμές έχουν διεξαχθεί για εύρεση πιθανής θεραπείας για τη νόσο, αλλά είναι άγνωστο αν κάποια από τις στρατηγικές που δοκιμάζονται θα δείξει ελπιδοφόρα αποτελέσματα [12]. Η διανοητική διέγερση-εγρήγορση, η άσκηση και μια ισορροπημένη διατροφή είναι πιθανό να βοηθούν στην πρόληψη και στη διαχείριση της ασθένειας [13]. Επειδή η AD δεν μπορεί να θεραπευτεί και είναι εκφυλιστική ασθένεια, η διαχείριση των ασθενών είναι πολύ σημαντική. Συνήθως τη φροντίδα αναλαμβάνει ο σύζυγος ή στενός συγγενής [14]. Είναι γνωστό ότι η ασθένεια του Alzheimer επιφέρει μεγάλη επιβάρυνση στους ανθρώπους που αναλαμβάνουν τη φροντίδα του ασθενούς. Η πίεση που δέχονται μπορεί να είναι κοινωνικής, ψυχολογικής και οικονομικής φύσεως για τα άτομα που φροντίζουν τους ασθενείς [15, 16, 17]. Στις αναπτυσσόμενες χώρες, η AD είναι μία από τις πλέον δαπανηρές νόσους στην κοινωνία [18, 19].

## **Χαρακτηριστικά**

Η πορεία της νόσου χωρίζεται σε τέσσερα στάδια, με προοδευτικές μορφές γνωστικών και λειτουργικών βλαβών.

### ***Προ-άνοια***

Τα πρώτα συμπτώματα σχετίζονται εσφαλμένα με γήρας ή στρες. Μια αναλυτική νευρο-ψυχολογική έρευνα μπορεί να αποκαλύψει ήπιες γνωστικές δυσκολίες μέχρι και οκτώ χρόνια πριν την κλινική διάγνωση της AD [20]. Αυτά τα πρώιμα συμπτώματα επηρεάζουν τις σύνθετες καθημερινές δραστηριότητες [21]. Η πιο αξιοσημείωτη έλλειψη είναι η απώλεια μνήμης η οποία εμφανίζεται ως δυσκολία ανάκλησης πρόσφατων γεγονότων και ανικανότητα αποθήκευσης νέων πληροφοριών [22]. Προβλήματα στις λειτουργίες της προσοχής, της διανοητικής ευελιξίας και της σκέψης αποτελούν επίσης συμπτώματα των αρχικών σταδίων της AD. Σε αυτό το στάδιο μπορεί επίσης να παρατηρηθεί απάθεια η οποία παραμένει το πιο επίμονο σύμπτωμα κατά τη διάρκεια της ασθένειας [23]. Το προκλινικό στάδιο της νόσου έχει επίσης ονομαστεί “ήπια γνωστική δυσλειτουργία” [22], αλλά κατά πόσο αυτός ο όρος αντιστοιχεί σε διαφορετικό διαγνωστικό στάδιο ή προσδιορίζει το πρώτο στάδιο της AD είναι ακόμα υπό συζήτηση [24].

## **Πρώιμη άνοια**

Στους ανθρώπους με AD η διάγνωση γίνεται μέσω της αυξανόμενης βλάβης της μάθησης και της μνήμης. Σε μικρό ποσοστό ασθενών οι δυσκολίες στην ομιλία, στην εκτέλεση λειτουργιών, στην αντίληψη (αγνωσία), ή στην εκτέλεση κινήσεων (απραξία) είναι πιο έντονες από τα προβλήματα μνήμης [25]. Η AD δεν επηρεάζει όλες τις ικανότητες της μνήμης εξίσου. Οι παλιότερες μνήμες ενός ανθρώπου (επεισοδιακή μνήμη, episodic memory), τα γεγονότα που έχει μάθει (σημασιολογική μνήμη, semantic memory) και η μνήμη που αφορά στο πως να κάνει διάφορα πράγματα (implicit memory) επηρεάζονται σε μικρότερο βαθμό από ότι τα καινούρια γεγονότα ή μνήμες. [26, 27]

Τα προβλήματα στη γλώσσα χαρακτηρίζονται κυρίως από συρρίκνωση του λεξιλογίου και μείωση της ευφράδειας που οδηγεί σε γενική έκπτωση του γραπτού και προφορικού λόγου [28]. Σε αυτό το στάδιο, ο ασθενής είναι ικανός να χρησιμοποιήσει βασικά στοιχεία επικοινωνίας [29], ενώ δυσκολίες στο να επιτελέσει λεπτούς χειρισμούς είναι ανεπαίσθητες. Καθώς η ασθένεια προχωράει οι ασθενείς είναι πιθανό να χρειαστούν βοήθεια με τις πιο απαιτητικές δραστηριότητες.

## **Μέτρια άνοια**

Η προοδευτική επιδείνωση τελικά περιορίζει την ανεξαρτησία του ασθενούς. Οι δυσκολίες στην ομιλία γίνονται εμφανείς εξαιτίας της περιορισμένης χρήσης του λεξιλογίου που οδηγεί σε λανθασμένη χρήση λέξεων (παραφρασία). Η ικανότητα γραφής και ανάγνωσης χάνονται επίσης προοδευτικά. Τα προβλήματα μνήμης χειροτερεύουν και ο ασθενής ίσως δεν είναι σε θέση να αναγνωρίζει στενούς συγγενείς. Η μακροπρόθεσμη μνήμη, που ήταν ακέραια σε προηγούμενα στάδια, αρχίζει τώρα να διαταράσσεται. Οι συμπεριφορικές και νευροψυχιατρικές αλλαγές γίνονται πιο έντονες. Συνήθεις εκδηλώσεις είναι η ευερεθιστότητα και η συναισθηματική αστάθεια που οδηγεί σε κλάμα, ξεσπάσματα απρομελέτητης επιθετικότητας ή αντίσταση στην προσφορά φροντίδας. Επίσης εμφανίζεται το φαινόμενο "Sundowning" το οποίο περιλαμβάνει όξυνση των συμπεριφορικών συμπτωμάτων της AD κατά τις απογευματινές και βραδινές ώρες [30]. Περίπου 30% των ασθενών αναπτύσσουν παραισθήσεις και δεν έχουν επίγνωση της ασθένειάς τους (ανοσογνωσία). Επιπλέον μπορεί να εμφανιστεί ακράτεια ούρων. Εφόσον κριθεί απαραίτητο είναι πιθανό ο ασθενής να μεταφερθεί σε ειδική κλινική [31].

## **Προχωρημένη άνοια**

Σε αυτό το τελικό στάδιο της AD, ο ασθενής είναι πλήρως εξαρτημένος από το άτομο που έχει αναλάβει τη φροντίδα του. Η ομιλία περιορίζεται σε απλές φράσεις ή λέξεις καταλήγοντας τελικά σε ολική απώλεια του λόγου. Παρά την απώλεια λεκτικής επικοινωνίας, συχνά οι ασθενείς καταλαβαίνουν και ανταποδίδουν συναισθηματικά σήματα. Παρ'όλο που η επιθετικότητα μπορεί να είναι παρούσα, η απάθεια και η εξάντληση είναι πολύ πιο συχνά συμπτώματα. Οι ασθενείς καταλήγουν τελικά να μην μπορούν να εκτελέσουν ακόμα και τις πιο απλές δραστηριότητες χωρίς βοήθεια. Η μυϊκή μάζα και η κινητικότητά τους επιδεινώνονται σε σημείο που γίνονται κλινήρεις και χάνουν την ικανότητα να τρέφονται μόνοι τους. Στην AD η αιτία του θανάτου είναι στην ουσία εξωτερικός παράγοντας και όχι η ασθένεια αυτή κάθε αυτή.

## **Αίτια**

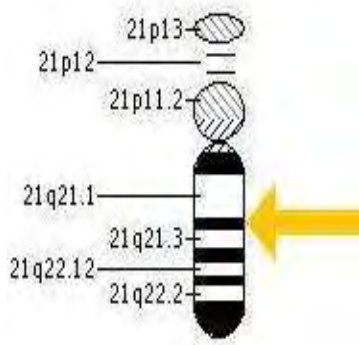
Υπάρχουν διάφορες θεωρίες που προσπαθούν να εξηγήσουν τα αίτια αυτής της ασθένειας. Η παλαιότερη, πάνω στην οποία βασίζονται οι περισσότερες θεραπείες, είναι η χολινεργική υπόθεση [32] η οποία υποστηρίζει ότι η AD προκαλείται από μείωση της σύνθεσης του νευροδιαβιβαστή ακετυλοχολίνη. Η ακετυλοχολίνη (Acetylcholine, ACh) συντίθεται από χολίνη (choline) και ακετυλοσυνένζυμο Α (Acetyl-CoA) με τη βοήθεια του ενζύμου ακετυλοτρανσφεράση της χολίνης (ChAT) η οποία βρίσκεται στους χολινεργικούς νευρώνες [33]. Σε διαμολυσμένα με το γονίδιο των m1 μουσκαρινικών υποδοχέων της ακετυλοχολίνης του αρουραίου PC12 κύτταρα, η διέγερση των m1 μουσκαρινικών υποδοχέων μειώνει τη φωσφορυλίωση της TAU πρωτεΐνης [34]. Αυτό σημαίνει ότι μείωση των επιπέδων της ακετυλοχολίνης θα μπορούσε να προκαλέσει υπερ-φωσφορυλίωση της TAU πρωτεΐνης, μια διαδικασία θεμελιώδους σημασίας για το σχηματισμό των νευροϊνιδιακών αλλοιώσεων. Επιπλέον, έχει αποδειχθεί ότι η διέγερση των m1 και m3 μουσκαρινικών υποδοχέων των νευρώνων προωθεί την πέψη της πρόδρομης αμυλοειδούς πρωτεΐνης (APP) από την α-σεκρετάση [35]. Η α-σεκρετάση κόβει την APP στη μέση της επικράτειας του αμυλοειδούς β και ως εκ τούτου εμποδίζει την επακόλουθη απελευθέρωση του δυνητικά νευροτοξικού πεπτιδίου. Αυτά τα πειράματα υποδηλώνουν ότι μείωση των επιπέδων της ακετυλοχολίνης μπορεί όχι μόνο να αυξήσει την παραγωγή του αμυλοειδούς β, αλλά και τις τοπικές νευροτοξικές επιδράσεις του. Πολυάριθμα πειράματα έχουν δείξει επίσης ότι το αμυλοειδές β διαταράσσει τη σύνθεση της ακετυλοχολίνης και τη μεταγωγή του σήματος που συνδέεται με τη χολινεργική νευροδιαβίβαση [36]. Φαίνεται, επομένως, ότι η AD μπορεί να συνδέεται με έναν φαύλο κύκλο όπου η χολινεργική καταστροφή αυξάνει την παραγωγή και τη νευροτοξικότητα

του αμυλοειδούς β, η οποία, με τη σειρά της, αυξάνει περαιτέρω τη χολινεργική καταστροφή και τη φωσφορυλίωση της TAU πρωτεΐνης. Η χολινεργική υπόθεση δεν κατάφερε να διατηρήσει πολλούς υποστηρικτές καθώς οι θεραπείες που στόχευαν στην αποκατάσταση της ανεπάρκειας της ακετυλοχολίνης δεν αποδείχτηκαν ιδιαίτερα αποτελεσματικές. Μια άλλη θεωρία στηρίζεται στην υψηλή συγκέντρωση του αμυλοειδούς [37], η οποία οδηγεί σε γενικευμένη φλεγμονή [38].

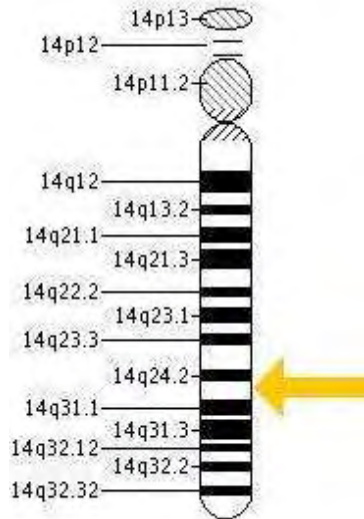
Το 1991, η υπόθεση του αμυλοειδούς εισήγαγε ότι οι εναποθέσεις του αμυλοειδούς β (Amyloid beta, Aβ) είναι η βασική αιτία της ασθένειας προσδίδοντάς της γενετική βάση [39, 40]. Η υπόθεση αυτή υποστηρίζεται από το γεγονός ότι το γονίδιο της πρόδρομης πρωτεΐνης του αμυλοειδούς β (Amyloid beta Precursor Protein, APP) εδράζεται στο χρωμόσωμα 21 και ότι τα άτομα με τρισωμία 21 (σύνδρομο Down) που έχουν ένα παραπάνω αντίγραφο του γονιδίου παρουσιάζουν σχεδόν καθολικά AD μέχρι το 40<sup>ο</sup> έτος της ζωής τους [41, 42]. Περαιτέρω στοιχεία προέρχονται από την ανακάλυψη ότι διαγονιδιακά ποντίκια που εκφράζουν μια μεταλλαγμένη μορφή του γονιδίου της ανθρώπινης APP αναπτύσσουν αμυλοειδείς πλάκες και παθολογική εικόνα εγκεφάλου [43].

## **Ποια είναι τα γονίδια που σχετίζονται με τη νόσο Alzheimer;**

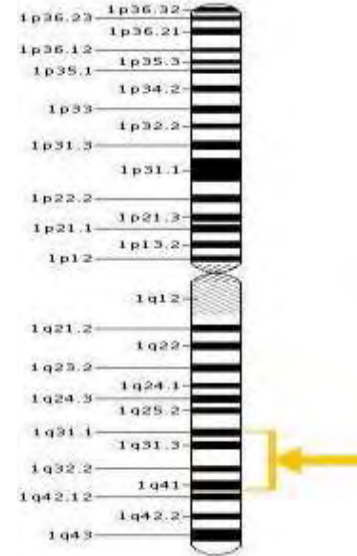
Υπάρχουν δύο κύριες μορφές της νόσου Alzheimer: η οικογενής ή κληρονομική που εμφανίζεται σε άτομα ηλικίας άνω των 60 ετών (πρώιμη έναρξη της νόσου) και η σποραδική που εμφανίζεται σε άτομα άνω των 75 ετών (όψιμη/καθυστερημένη έναρξη της νόσου), που αφορούν το 5% και το 95 % των περιπτώσεων, αντίστοιχα [44]. Οι περισσότερες περιπτώσεις πρώιμης έναρξης της νόσου του Alzheimer προκαλούνται από μεταλλάξεις γονιδίων που κληρονομούνται από το γονέα στο παιδί και ακολουθούν επικρατούσα μενδελική κληρονομικότητα. Έχει διαπιστωθεί ότι αυτή η μορφή της διαταραχής μπορεί να προκληθεί από μεταλλάξεις σε περισσότερα από 50 γονίδια τα κυριότερα εκ των οποίων είναι: APP (εικ. 1), PSEN1 (εικ. 2), ή PSEN2 (εικ. 3) (πίνακας 1). Όταν κάποιο από αυτά τα 3 γονίδια μεταλλάσσεται, παράγονται στον εγκέφαλο μεγάλες ποσότητες ενός τοξικού θραύσματος πρωτεΐνης, της APP, που ονομάζεται αμυλοειδές β. Αυτό το πεπτίδιο μπορεί να συσσωρευτεί στον εγκέφαλο και να σχηματίσει συσσωματώματα που ονομάζονται πλάκες αμυλοειδούς, οι οποίες είναι χαρακτηριστικές της νόσου Alzheimer. Η συσσώρευση τοξικού αμυλοειδούς β και πλακών αμυλοειδούς μπορούν να οδηγήσουν στο θάνατο των νευρικών κυττάρων και στα συμπτώματα αυτής της διαταραχής [45].



Εικόνα 1: Μοριακή Θέση του γονιδίου της APP στο χρωμόσωμα 21: ζεύγη βάσεων 27.252.860 ως 27.543.137 Πηγή: Genetics Home Reference



Εικόνα 2: Μοριακή Θέση του γονιδίου της PSEN1 στο χρωμόσωμα 14: ζεύγη βάσεων 73,603,142 ως 73,690,398 Πηγή: Genetics Home Reference



Εικόνα 3: Μοριακή Θέση του γονιδίου της PSEN2 στο χρωμόσωμα 1: ζεύγη βάσεων 227,058,272 ως 227,083,803 Πηγή: Genetics Home Reference

Πίνακας 1: Τα τρία γονίδια που έχουν ταυτοποιηθεί για την πρόωμη έναρξη της AD

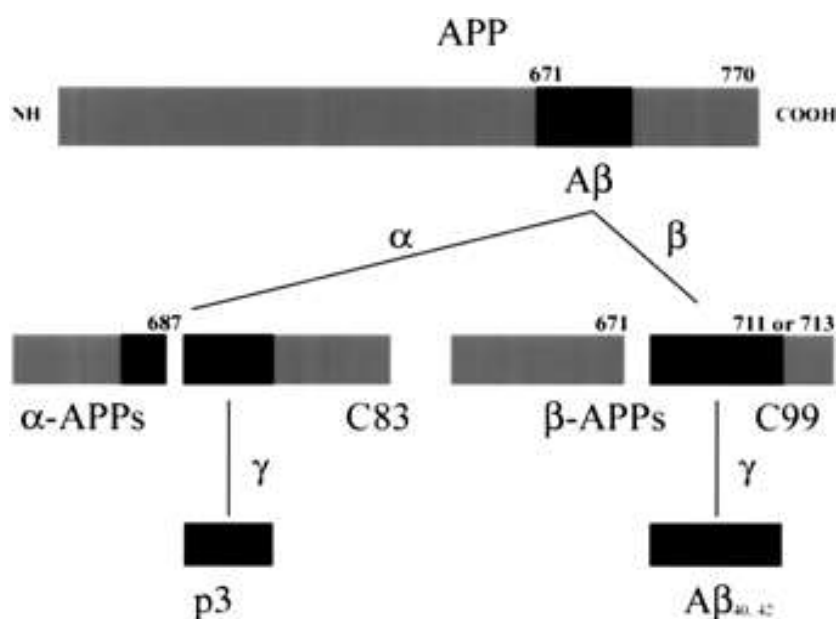
Γονίδιο	Χρωμοσωμική Θέση	Προϊόν
APP	21q21	Πρόδρομη αμυλοειδής πρωτεΐνη
PSEN1	14q24	γ-εκκριτική υπομονάδα
PSEN2	1q31	γ-εκκριτική υπομονάδα

## Αμυλοειδές β

Το προϊόν του γονιδίου του αμυλοειδούς β ανιχνεύεται ως πεπτίδιο που κυκλοφορεί στο πλάσμα και στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό σε υγιείς ανθρώπους και άλλα θηλαστικά. Το Αβ προέρχεται από ενδοπρωτεολυτική πέψη της APP, η οποία έχει ένα μεγάλο εξωκυττάριο τμήμα, μία μικρή διαμεμβρανική περιοχή καθώς και ένα



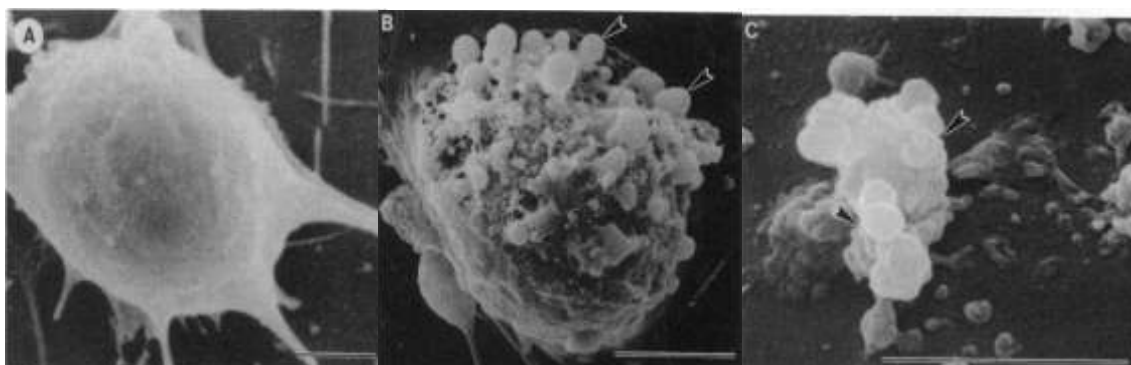
μικρό κυτταροπλασματικό τμήμα. Η APP εμφανίζεται σε πολλές διαφορετικές ισομορφές, οι οποίες προκύπτουν από το εναλλακτικό μάτισμα ενός και μόνο γονιδίου. Η μικρότερη από της ισομορφές (695 αμινοξέα) εκφράζεται σχεδόν αποκλειστικά στους νευρώνες, ενώ δύο άλλες ισομορφές (751 και 770 αμινοξέα, αντίστοιχα) εκφράζονται τόσο σε νευρωνικά όσο και μη-νευρικά κύτταρα. Ποντίκια που στερούνται APP είναι βιώσιμα, αλλά παρουσιάζουν γλοιώμα και έχουν μειωμένη κινητική δραστηριότητα και δύναμη των πρόσθιων άκρων. Η APP έχει μικρό χρόνο ημιζωής και μεταβολίζεται από πρωτεάσες (ορίζονται ως σεκρετάσες) με δύο τρόπους, ένα μη-αμυλοειδογονικό και έναν αμυλοειδογονικό (εικ. 4). Η α-σεκρετάση ξεκινά την μη-αμυλοειδογονική οδό πέπτοντας την APP μεταξύ των εξωκυττάριων καταλοίπων 687 και 688 στην περιοχή του Αβ, απελευθερώνοντας τη μεγάλη διαλυτή υπομονάδα, αAPPs. Ακολούθως, πραγματοποιείται ενδοπρωτεολυτική πέψη του C-τελικού τμήματος εντός της διαμεμβρανικής του περιοχής από το ένζυμο γ-σεκρετάση για την παραγωγή ενός θραύσματος, του P3. Η β-σεκρετάση ξεκινά την αμυλοειδογονική οδό πέπτοντας την APP μετά το αμινοξύ 671, δημιουργώντας ένα C-τελικό τμήμα 99 καταλοίπων που έχει το κατάλοιπο 1 του Ab ως N-τελικό άκρο του. Απελευθερώνεται έτσι το περικομμένο N-τελικό τμήμα του APP, βAPPs. Στη συνέχεια, το C-τελικό τμήμα διασπάται από τη γ-σεκρετάση μεταξύ των αμινοξέων 712 και 713 για την παραγωγή του αμυλοειδούς β. Ωστόσο, αν το C-τελικό τμήμα κοπεί μετά το αμινοξύ 714, σχηματίζεται το μεγαλύτερο Ab42. Η πλειοψηφία των εκκρινόμενων πεπτιδίων Αβ είναι βραχεία διαλυτά Ab40. Ωστόσο, περίπου το 10% είναι οι πιο αδιάλυτες Αβ42 μορφές, που εύκολα συναθροίζονται με τη μορφή εξωκυττάριων ινιδίων. Αυτή η ετερογένεια του Αβ είναι σημαντική διότι το Αβ42 εμφανίζεται πρώτο στον εγκέφαλο ασθενών με σύνδρομο Down ενώ το Ab40 δεν εντοπίζεται παρά μετά από κάποιες δεκαετίες [46].



Εικόνα 4: Σχηματική αναπαράσταση της επεξεργασίας της APP. Το τμήμα Αβ του μορίου δείχνεται με μαύρο χρώμα

Αν και πολλές λειτουργίες αποδίδονται στην APP, κανένα στοιχείο δε δείχνει ότι μια θεμελιώδης κυτταρική λειτουργία της χάνεται στους ασθενείς με AD. Αντιθέτως, οι μεταλλάξεις της APP φαίνεται ότι ενεργούν μέσα από ένα τοξικό μηχανισμό αυξημένης λειτουργίας ("gain-of-function"), δηλαδή με αύξηση της παραγωγής του κυτταροτοξικού τεμαχίου Αβ.

In vitro και in vivo μελέτες υποστηρίζουν περαιτέρω την υπόθεση ότι το Αβ42 είναι τοξικό και συμβάλλει άμεσα στο νευροεκφυλιστικό φαινόμενο της AD. Συνθετικά Αβ42 πεπτίδια επάγουν τον εκφυλισμό σε καλλιέργεια νευρώνων του φλοιού και του ιππόκαμπου μέσω της ενεργοποίησης του αποπτωτικού μονοπατιού [47]. Σε πρωτογενείς καλλιέργειες νευρώνων, συσσωματώματα αμυλοειδούς β προκαλούν δυστροφικούς νευρώνες που καταλήγουν σε κυτταρικό θάνατο (εικ. 5). Επιπλέον, in vivo μελέτες έχουν δείξει ότι ενδοεγκεφαλική έγχυση αμυλοειδούς επάγει νευρωνική εκφύλιση σε ενήλικους αρουραίους και γηρασμένα πρωτεύοντα θηλαστικά. Ωστόσο, αν και οι πειραματικές μελέτες επιβεβαιώνουν την προβλεπόμενη νευροτοξικότητα ο μηχανισμός και τα μοριακά γεγονότα που προκαλούν νευρωνικό θάνατο μέσω του αμυλοειδούς δεν έχουν εντοπιστεί.



Εικόνα 5: Απεικόνιση νευρώνων του ιππόκαμπου με ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης [47]. (A) Μη επεξεργασμένος νευρώνας παρουσιάζει στρογγυλό, λείο κυτταρικό σώμα με νευράξονες (B) Νευρώνας μετά από 24-h καλλιέργεια με Αβ42 παρουσιάζει συρρίκνωση του κυτταρικού σώματος, εξογκώματα στην επιφάνεια της μεμβράνης (βέλη) και απώλεια νευραξόνων. (C) Συρρικνωμένος αποπτωτικός νευρώνας σε μεταγενέστερο στάδιο, με λίγα εναπομείναντα εξογκώματα (βέλη).

Έρευνες που πραγματοποιήθηκαν πάνω στη συσχέτιση του αμυλοειδούς β με το νευρωνικό θάνατο έχουν καταδείξει ότι το Αβ ενεργοποιεί τον κυτταρικό κύκλο στους νευρώνες, απρογραμμάτιστα, προκαλώντας την έκφραση του τυπικού μοριακού αντιγραφικού συστήματος που απαιτείται για τη μετάβαση από τη G1 φάση στην S. Αυτό που παρατηρείται επιπλέον στους νευρώνες που εκτίθενται σε Αβ, είναι ότι εισέρχονται στη φάση S πριν τον αποπτωτικό τους θάνατο. Αντιγραφή του DNA έχει επίσης εντοπιστεί μέσω φθορισμού in situ υβριδοποίησης σε νευρώνες σε ευάλωτες

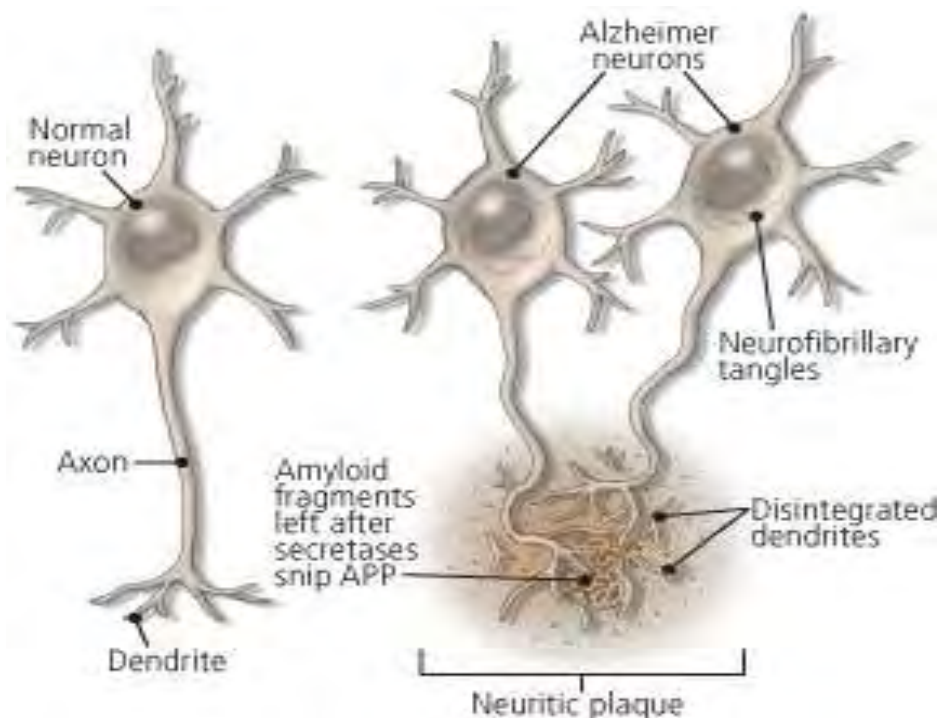
περιοχές του εγκεφάλου με AD. Σε καλλιέργεια νευρώνων που έχουν διαμολυνθεί με Αβ, είναι η μηχανή αντιγραφής του DNA που προκαλεί κυτταρικό θάνατο. Στους νευρώνες το Αβ επάγει τις p49 και p58 υπομονάδες της πριμάσης, το ένζυμο που ξεκινά την de novo σύνθεση του DNA στη διχάλα αντιγραφής. Ωστόσο, σε αντίθεση με τα κοινώς διαιρούμενα κύτταρα, οι νευρώνες που εισέρχονται στη φάση S ως απόκριση στο Αβ αδυνατούν να εκφράσουν την DNA πολυμεράση-α (DNA pol-α), η οποία είναι απαραίτητη για την κανονική σύνθεση του DNA. Αντ' αυτού, οι νευρώνες υπερεκφράζουν την DNA Pol-β, ένα ένζυμο επιδιόρθωσης του DNA που μόνο περιστασιακά εκτελεί de novo σύνθεσή του. Η DNA pol-β έχει αιτιώδη ρόλο στην αντιγραφή του DNA που προκαλείται από το Αβ και στο νευρωνικό θάνατο, όπως φαίνεται από την απαλοιφή του ενζύμου ή αναστολή της δράσης του [48].

Εν ολίγοις, η έκθεση μεταμιτωτικών νευρώνων σε επίπεδα Αβ τέτοια που υπάρχουν στον εγκέφαλο με AD μπορεί να επάγει σηματοδοτικό μονοπάτι που οδηγεί στην έναρξη αποτυχημένου νευρωνικού κυτταρικού κύκλου [49].

Οι PS1 και PS2 είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες που εκφράζονται καθολικά, αποτελούνται από 6-9 διαμεμβρανικές υπομονάδες και εντοπίζονται κυρίως στο ενδοπλασματικό δίκτυο και στο σύστημα Golgi. Υποθέτουμε ότι συμμετέχουν άμεσα στο μηχανισμό επεξεργασίας της APP από τη γ-σεκρετάση ως μέρος του καταλυτικού συμπλόκου και ελλείψεις στο γονίδιό τους έχουν ως αποτέλεσμα μεταβολές στην επεξεργασία της APP έτσι ώστε το Αβ42 να αυξάνεται χωρίς επίδραση στα συνολικά επίπεδα του Αβ. Αν και ο ρόλος που διαδραματίζουν οι πρεσενιλίνες στην παθογένεια των σποραδικών περιπτώσεων AD παραμένει άγνωστος, μεταλλάξεις τους αντιπροσωπεύουν ένα σημαντικό ποσοστό των περιπτώσεων της οικογενούς μορφής [46].

Μια μελέτη του 2004 [50] εισήγαγε ότι η εναπόθεση των πλακών αμυλοειδούς δεν σχετίζεται επαρκώς με την απώλεια νευρώνων. Η παρατήρηση αυτή στηρίζει την TAU υπόθεση, σύμφωνα με την οποία η υπερ-φωσφορυλίωση ή η ανώμαλη φωσφορυλίωση της εγγενούς TAU πρωτεΐνης, οδηγεί σε δομικές διαταραχές του μορίου της, με αποτέλεσμα την εμφάνιση τοξικότητας στο κύτταρο μετατρέποντας την TAU πρωτεΐνη από διαλυτή σε αδιάλυτη.

Κάθε νευρώνας έχει κυτταροσκελετό που αποτελείται εν μέρει από δομές που ονομάζονται μικροσωληνίσκοι. Μια πρωτεΐνη που ονομάζεται TAU σταθεροποιεί τους μικροσωληνίσκους όταν φωσφορυλιώνεται. Η υπερ-φωσφορυλιωμένη TAU πρωτεΐνη, που προκύπτει εξαιτίας κινασών και η μειωμένη αποδόμηση της υπερ-φωσφορυλιωμένης TAU από πρωτεολυτικά σύμπλοκα, οδηγούν στην αύξηση της ποσότητάς της στο κύτταρο και στη δημιουργία συσσωματωμάτων (εικ. 6). Αυτό μπορεί να οδηγήσει στην αποσύνθεση των μικροσωληνίσκων στα κύτταρα του εγκεφάλου και αργότερα στο νευρωνικό θάνατο [51].



Εικόνα 6 : Αναπαράσταση υγιούς νευρώνα (αριστερά) και παθολογικού νευρώνα με αμυλοειδής πλάκες και νευροϊνιδιακές αλλοιώσεις

Οι αιτίες της καθυστερημένης έναρξης της νόσου Alzheimer είναι λιγότερο σαφείς. Η μορφή καθυστερημένης έναρξης δεν έχει σαφές οικογενειακό υπόβαθρο. Η διαταραχή αυτή είναι πιθανόν να σχετίζεται με μεταβολές σε ένα ή περισσότερα γονίδια σε συνδυασμό με τον τρόπο ζωής και περιβαλλοντικούς παράγοντες. Ένα γονίδιο που ονομάζεται απολιποπρωτεΐνη E (apolipoprotein E, APOE), έχει μελετηθεί εκτενώς ως παράγοντας κινδύνου για την ασθένεια και ενισχύει τη γενετική προσέγγιση της νόσου.

### Απολιποπρωτεΐνη E

Το γονίδιο APOE (γονίδιο APOE, πρωτεΐνη ApoE) εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 19 και κωδικοποιεί για μια πρωτεΐνη που ονομάζεται απολιποπρωτεΐνη E η οποία παράγεται και εκκρίνεται στο κεντρικό νευρικό σύστημα από τα αστροκύτταρα. Ο εγκέφαλος περιέχει μεγάλες ποσότητες APOE mRNA και δευτερευόντως το ήπαρ. Η σύνθεση της ApoE αυξάνεται μετά από τραυματισμό και έχει εμπλακεί στην ανάπτυξη και επιδιόρθωση του νευρικού συστήματος κατά τη διάρκεια ή μετά τον τραυματισμό [52].

Στο περιφερικό νευρικό σύστημα, η ApoE αποτελεί το 5% του συνόλου της διαλυτής εξωκυττάριας πρωτεΐνης. Η πρωτεΐνη αυτή ενώνεται με λιπίδια στο σώμα για να σχηματιστούν μόρια που ονομάζονται λιποπρωτεΐνες. Οι λιποπρωτεΐνες είναι

υπεύθυνες για το πακετάρισμα της χοληστερόλης και άλλων λιπών και τη μεταφορά τους μέσω της κυκλοφορίας του αίματος. Η απολιποπρωτεΐνη E είναι σημαντικό συστατικό ενός συγκεκριμένου τύπου λιποπρωτεΐνης που ονομάζεται λιποπρωτεΐνη πολύ χαμηλής πυκνότητας (VLDL). Οι VLDLs απομακρύνουν την περίσσεια χοληστερόλης από το αίμα και τη μεταφέρουν στο ήπαρ.

Λόγω γενετικού πολυμορφισμού η απολιποπρωτεΐνη E υπάρχει σε τρεις ισομορφές (E2, E3, και E4) οι οποίες κωδικοποιούνται από τρία αλληλόμορφα (ε2, ε3 και ε4) του γονιδίου της απολιποπρωτεΐνης E. Η συχνότητα με την οποία εμφανίζονται στον άνθρωπο οι τρεις ισομορφές είναι 75%, 15% και 10% αντίστοιχα. Το αλληλόμορφο ε4 έχει συσχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο όψιμης εμφάνισης σποραδικού και οικογενούς Alzheimer [53].

Τα επίπεδα της ApoE είναι επίσης αυξημένα σε πολλές χρόνιες νευροεκφυλιστικές παθήσεις. Στην AD, δεσμεύεται στις εξωκυττάρια γεροντικές πλάκες και στα ενδοκυτταρικά νευροϊνιδιακά συσσωματώματα της υπερ-φωσφορυλιωμένης TAU πρωτεΐνης. Η συγγένεια και η ειδικότητα της δέσμευσης πρωτεϊνών σε ακινητοποιημένο σε μεμβράνη αμυλοειδές έχουν εξεταστεί *in vitro*. Στην έρευνα αυτή [52], χρησιμοποιήθηκαν αναστολείς πρωτεασών σερίνης που έχουν την ιδιότητα να δεσμεύουν το Αβ και διαπιστώθηκε ότι η ApoE ήταν ένας μικρός, πρωτεϊνικός, μολυσματικός παράγοντας που παρέμεινε στενά συνδεδεμένος με αυτό. Τα συμπεράσματα ήταν τα εξής: (i) στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό (ENY) η ApoE προσδένεται με υψηλή συγγένεια στο Αβ και σε μικρές υπομονάδες του, (ii) οι γεροντικές πλάκες, το Αβ και οι νευροϊνιδιακές αλλοιώσεις της υπερ-φωσφορυλιωμένης TAU πρωτεΐνης περιέχουν ApoE *in vivo* και (iii) αναλύσεις της συχνότητας εμφάνισης των APOE αλληλομόρφων σε ασθενείς με AD αποκαλύπτουν μια αναπάντεχη υπερεκπροσώπηση του APOE-ε4 αλληλόμορφου στους ασθενείς με τη μορφή όψιμης έναρξης της νόσου σε σύγκριση με της ίδιας ηλικίας ομάδα ελέγχου.

Έχει προταθεί ότι η ApoE μπορεί να ενεργεί ως μοριακός συνοδός, που ορίζεται ως "πρωτεΐνη που μεσολαβεί στο σχηματισμό της β-πύκνωσης του αμυλοειδούς ως πεπτιδικό θραύσμα" [54].

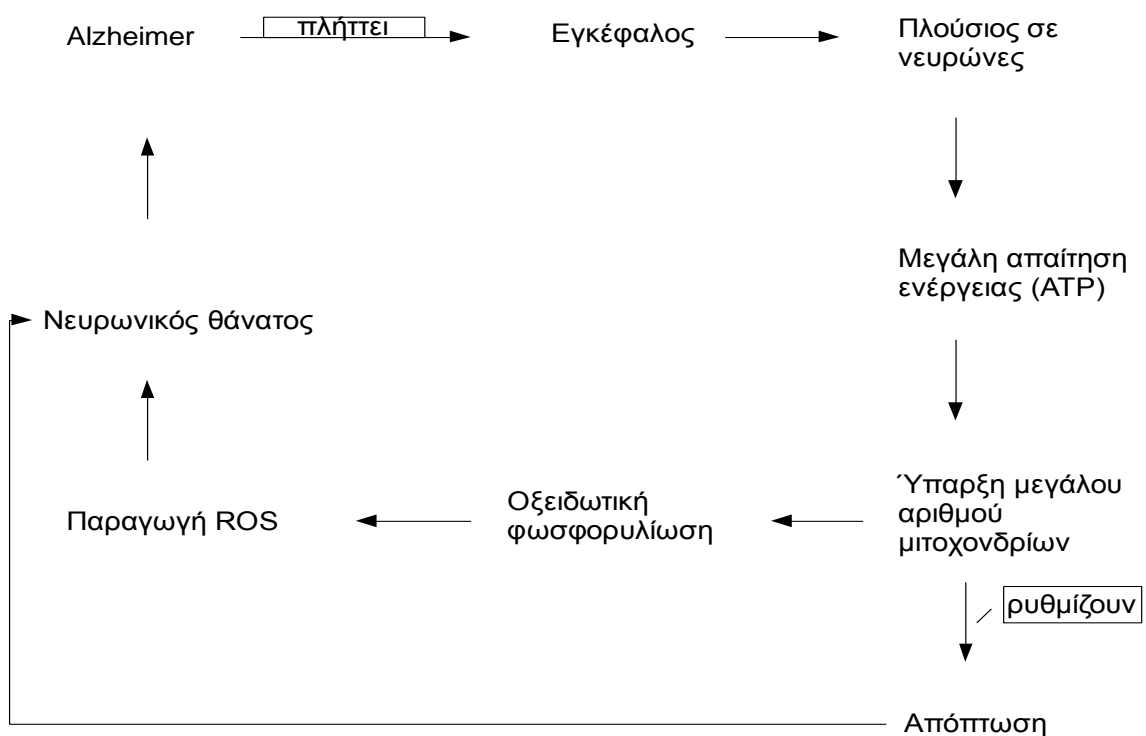
## **Υπάρχει στενή συσχέτιση μεταξύ της νόσου Alzheimer και της μιτοχονδριακής δυσλειτουργίας**

Η αιτιολογία των νευροεκφυλιστικών νοσημάτων παραμένει ασαφής. Τα τελευταία χρόνια οι έρευνες έχουν στραφεί προς τις μιτοχονδριακές ανωμαλίες στο μεταβολισμό της ενέργειας και τις οξειδωτικές βλάβες. Είναι πιθανό ότι υπάρχει μια περίπλοκη αλληλεπίδραση μεταξύ αυτών των μηχανισμών. Πάνω από 100 μεταλλάξεις

του μιτοχονδριακού DNA (mitochondrial DNA, mtDNA), συμπεριλαμβανομένων ελλείψεων, διπλασιασμών και σημειακών tRNA μεταλλάξεων, έχουν συσχετιστεί με ασθένειες του ανθρώπου. Το μιτοχονδριακό DNA είναι ιδιαίτερα ευπαθές στο οξειδωτικό στρες και υπάρχουν στοιχεία που συσχετίζουν τη μείωση της δραστηριότητας των ενζύμων της αναπνευστικής αλυσίδας με τη φυσιολογική γήρανση. Αυτό το γεγονός μπορεί να συμβάλει στην καθυστερημένη και ηλικιο-εξαρτώμενη έναρξη των νευροεκφυλιστικών νοσημάτων [55].

Στα κύτταρα των θηλαστικών, τα μιτοχόνδρια παρέχουν ενέργεια μέσω του αερόβιου μεταβολισμού. Διαδραματίζουν επίσης σημαντικό ρυθμιστικό ρόλο στην απόπτωση, την παραγωγή και την αποτοξίνωση των ελευθέρων ριζών και χρησιμεύουν ως κυτταρικός ρυθμιστής του ασβεστίου [56]. Οι νευροεκφυλιστικές διαταραχές στις οποίες συμμετέχουν μιτοχόνδρια συνδέονται με ανωμαλίες στην οξειδωτική φωσφορυλίωση (OXPHOS) και μπορούν να διαιρεθούν σε αυτές που προκαλούνται είτε λόγω μεταλλάξεων του μιτοχονδριακού DNA (mtDNA) ,όπως η νόσος του Πάρκινσον και η νόσος του Alzheimer, είτε λόγω μεταλλάξεων του πυρηνικού DNA (nDNA).

Η συσχέτιση της AD με τη μιτοχονδριακή δυσλειτουργία παρουσιάζεται συνοπτικά στο παρακάτω διάγραμμα:



Η συμμετοχή μη νευρωνικών ιστών, όπως τα αιμοπετάλια και οι ινοβλάστες, δείχνει ότι η οξειδωτική βλάβη δεν είναι απλώς μια τοπική συνέπεια της νόσου, αλλά μπορεί να είναι γενετικά καθορισμένη [57]. Η τεχνική των κυτταροπλασματικών υβριδίων ("cybrid"), η οποία περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1989, υποστηρίζει αυτή

την πρόταση [58]. Κύτταρα που στερούνται δικό τους mtDNA ανασυστάθηκαν με εξωγενές mtDNA ασθενών με AD και υγείων ατόμων. Επομένως, οι φαινοτυπικές διαφορές μεταξύ των cybrid καλλιέργειών προέκυπταν από την ενίσχυση του mtDNA του δότη και όχι από πυρηνικούς ή περιβαλλοντικούς παράγοντες. Ιδιαίτερα, μιτοχονδριακά γονίδια αιμοπεταλίων ασθενών με σποραδική AD που εκφράζονταν σε cybrids, προκαλούσαν μείωση στα επίπεδα του ATP και αύξηση του οξειδωτικού στρες [59] και, μακροπρόθεσμα, ανάπτυξη πληθυσμών μη φυσιολογικών και κατεστραμμένων μιτοχονδρίων [60].

Ένα χρόνο αργότερα, το 1990, ανεξάρτητη έρευνα αναφέρει ότι τμήματα αιμοπεταλίων από ασθενείς με AD είχαν χαμηλότερα επίπεδα δραστικότητας της οξειδάσης του κυτοχρώματος (COX), δηλαδή του συμπλόκου IV της μιτοχονδριακής αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων, από αυτά της ίδιας ηλικίας ομάδας ελέγχου [61]. Διάφορες ομάδες ερευνητών έχουν έκτοτε αναφέρει μειωμένα επίπεδα δραστικότητας της COX σε πολλούς ιστούς ασθενών με AD, συμπεριλαμβανομένων δειγμάτων εγκεφάλου από αυτοψία [62, 63, 64]. Τα ευρήματα συμπληρώνουν έρευνες του 2002 [65] οι οποίες έδειξαν ότι νευρώνες ελλιπείς σε COX εμφανίζονται πιο συχνά στους εγκεφάλους ασθενών με AD σε σχέση με την ομάδα ελέγχου και μάλιστα χωρίς να συνδέονται με αμυλοειδείς πλάκες, νευροϊνιδιακές αλλοιώσεις ή απόπτωση.

Με βάση τις προηγούμενες αναλύσεις των ασθενειών που είναι γνωστό ή υπάρχει υποψία ότι έχουν μιτοχονδριακή γενετική συνιστώσα, υπάρχουν τρία πρότυπα αποτελεσμάτων που θα μπορούσαν να προκύψουν αν οι κληρονομήσιμες μεταλλάξεις του μιτοχονδριακού DNA διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην αιτιολογία της AD:

1. Έχει παρατηρηθεί σε αρκετές περιπτώσεις ότι μια διαταραχή συνδέεται σημαντικά με μια mtDNA απλοομάδα (Herrnstadt και Howell 2004), γεγονός που δείχνει ότι ένας ή περισσότεροι πολυμορφισμοί που σχετίζονται με αυτή την απλοομάδα θα μπορούσαν να τροποποιήσουν τον κίνδυνο της νόσου.

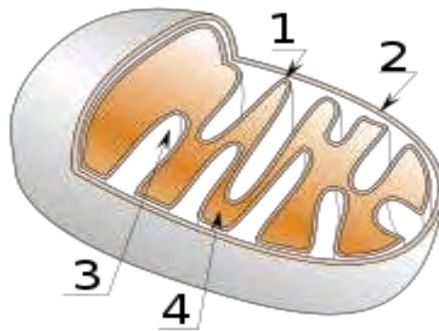
2. Μια συγκεκριμένη υποκατάσταση εμφανίζεται σε σημαντική συχνότητα είτε στην ομάδα των ασθενών (παθογόνος μετάλλαξη) ή στην ομάδα ελέγχου (προστατευτική μετάλλαξη). Αυτό είναι το πιο απλό σενάριο. Ωστόσο, η κατάσταση περιπλέκεται αν υπάρχουν πολλές σπάνιες mtDNA μεταλλάξεις στον πληθυσμό, κάθε μια από τις οποίες αυξάνει τον κίνδυνο ανάπτυξης AD. Αυτή η υπόθεση είναι πολύ δύσκολο να εξεταστεί σε μεγάλη κλίμακα λόγω του υψηλού ποσοστού εξέλιξης του mtDNA που καθιστά δύσκολο τον εντοπισμό σπανίων παθογόνων μεταλλάξεων.

3. Η τρίτη πιθανότητα είναι ότι, στους ασθενείς με AD, οι σωρευτικές επιπτώσεις των πολλαπλών φαινοτυπικά ανεπαίσθητων mtDNA μεταλλάξεων αποτελούν παράγοντα κινδύνου. Για τον έλεγχο αυτής της υπόθεσης πρέπει να καθοριστεί εάν υπάρχει αυξημένο mtDNA "φορτίο μετάλλαξης" στους ασθενείς. Σε αυτό το σενάριο, το αυξημένο "φορτίο μετάλλαξης" μπορεί να αφορά ολόκληρο το μιτοχονδριακό

γονιδίωμα, ένα μόνο γονίδιο, ή ένα σύνολο γονιδίων που συνδέονται με βάση τις λειτουργίες τους (για παράδειγμα, τα επτά γονίδια που κωδικοποιούν για τις υπομονάδες του συμπλόκου I της αναπνευστικής αλυσίδας) [66].

## Το Μιτοχόνδριο

Το μιτοχόνδριο είναι κυτταρικό οργανίδιο το οποίο περιβάλλεται από διπλή μεμβράνη. Μιτοχόνδρια απαντούν μόνο στα αερόβια ευκαρυωτικά κύτταρα με εξαίρεση ορισμένα πολύ διαφοροποιημένα (π.χ. ώριμα ερυθροκύτταρα). Η μορφή, το μέγεθος και ο αριθμός των μιτοχονδρίων ποικίλλει και εξαρτάται από τον τύπο και τη μεταβολική κατάσταση του κυττάρου. Η τυπική μορφή των μιτοχονδρίων έχει σωληνοειδές σχήμα με διάμετρο 0,2-1,0  $\mu\text{m}$  και μήκος 3-10  $\mu\text{m}$  (εικ. 7).

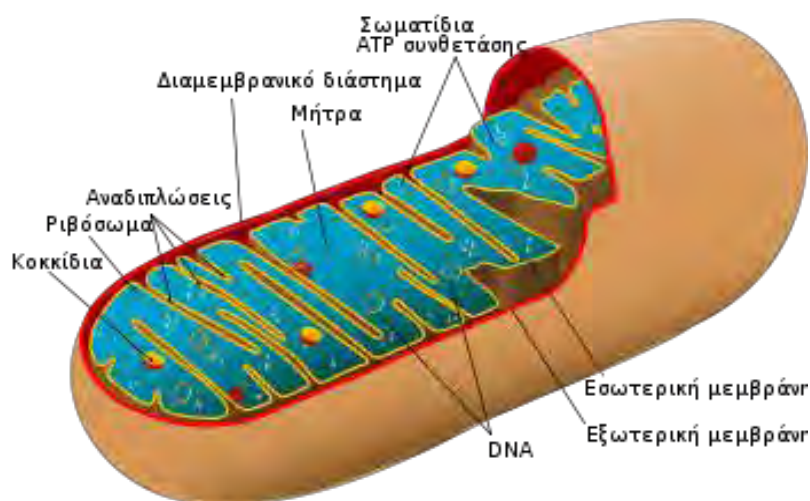


Εικόνα 7: (1) Εσωτερική μεμβράνη, (2) Εξωτερική μεμβράνη, (3) Αναδιπλώσεις, (4) Μήτρα.

Το μιτοχόνδριο περιβάλλεται από δύο μεμβράνες. Μια εξωτερική που διαχωρίζει το μιτοχόνδριο από το υπόλοιπο κυτταρόπλασμα και μια εσωτερική. Η εξωτερική μεμβράνη είναι λεία, δεν έχει αναδιπλώσεις και είναι διαπερατή σε μόρια μικρότερα των 5 kDa. Η εσωτερική μεμβράνη είναι πολλές φορές αναδιπλωμένη και σχηματίζει ένα μεγάλο αριθμό εγκοιλώσεων που ονομάζονται πτυχές (cristae). Οι πτυχές ποικίλλουν σε αριθμό και μορφολογία στα διάφορα κύτταρα. Σημαντικές ακόμη αλλαγές στην τοπολογία της εσωτερικής μεμβράνης διαπιστώνονται κατά τη μετάπτωση ενός μιτοχονδρίου από την ενεργό στην ανενεργό κατάσταση. Βασικός προορισμός των πτυχών είναι η αύξηση της επιφάνειας της εσωτερικής μεμβράνης σε σχέση με τον όγκο του μιτοχονδρίου. Οι δύο μεμβράνες διαχωρίζουν το μιτοχόνδριο σε δύο διακριτά διαμερίσματα. Στον ενδομεμβρανικό χώρο που ορίζεται ως ο χώρος μεταξύ της εξωτερικής και της εσωτερικής μεμβράνης και πληρούται υπό υγρού που χρησιμεύει στη λειτουργική επικοινωνία των δύο μεμβρανών και στον εσωτερικό χώρο που



περικλείεται από την εσωτερική μεμβράνη. Ο εσωτερικός χώρος βρίσκεται σε κατάσταση πηκτώματος μάλλον παρά λύματος και καλείται μήτρα (εικ. 8). Η σύσταση των δύο μεμβρανών διαφέρει. Η εσωτερική μεμβράνη χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη πολλών πρωτεϊνών σε σύγκριση με την εξωτερική καθώς και από την ύπαρξη καρδιολιπίνης (λιπίδιο).

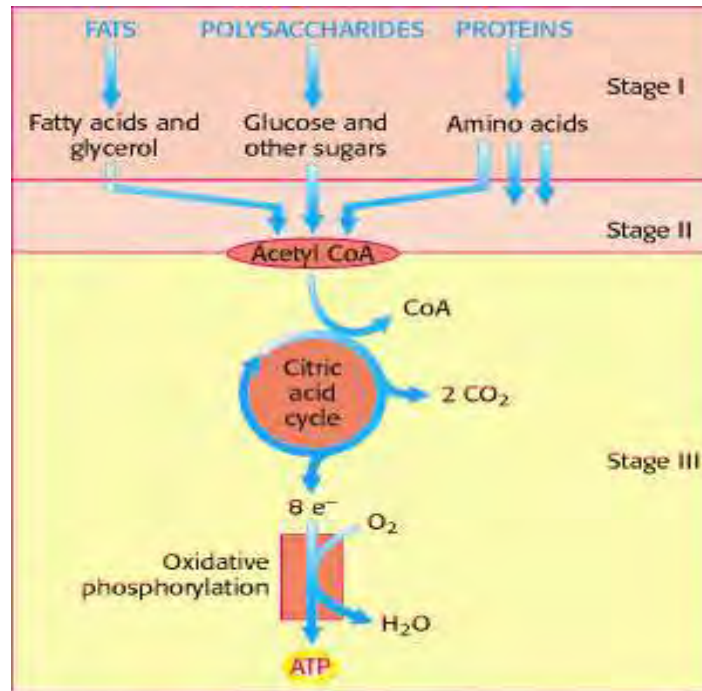


Εικόνα 8: Διαγραμματική απεικόνιση της εσωτερικής δομής ενός τυπικού μιτοχονδρίου

Τα μιτοχόνδρια σε μεγάλη ποσότητα εμφανίζονται σε κύτταρα με υψηλές απαιτήσεις σε ενέργεια (μυϊκά κύτταρα, νευρικά κύτταρα, κύτταρα των αισθητηρίων οργάνων, ωάρια κ.λ.π.). Δείκτης έντονης μεταβολικής δραστηριότητας του κυττάρου είναι επίσης η παρουσία εκτεταμένων πτυχών στα μιτοχόνδρια. Στα μυϊκά κύτταρα της καρδιάς για παράδειγμα παρατηρείται μεγάλος αριθμός πτυχών και ένα ποσοστό μιτοχονδρίων του 36%. Τα κύτταρα του σώματος δεν μπορούν να λειτουργήσουν κανονικά αν δε λαμβάνουν μια σταθερή παροχή ενέργειας. Μέχρι σήμερα, έχουν γνωστοποιηθεί περίπου 50 ασθένειες οφειλόμενες στα μιτοχόνδρια (Μιτοχονδριοπάθειες) οι οποίες συμπεριλαμβάνονται στα μεταβολικά νοσήματα.

Στα ευκαρυωτικά κύτταρα όπου το οξυγόνο είναι απαραίτητο για την επιβίωσή τους, οι περισσότερες μεταβολικές διεργασίες που αποδίδουν ATP βρίσκονται στα μιτοχόνδρια. Οι κύριες μεταβολικές διεργασίες που επιτελούνται στα μιτοχόνδρια είναι ο κύκλος του Krebs, η μεταφορά των ηλεκτρονίων και η οξειδωτική φωσφορυλίωση. Η συνεργασία των τριών μεταβολικών διεργασιών έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή ATP, καθώς επίσης  $\text{CO}_2$  και  $\text{H}_2\text{O}$ . Η ένωση-κλειδί για τον κύκλο του Krebs είναι το ακέτυλο-CoA. Το ακέτυλο-CoA προέρχεται από το μεταβολισμό της γλυκόζης, των λιπών και των πρωτεϊνών. Η γλυκόζη μεταβολίζεται στο κυτταρόπλασμα σε

πυροσταφυλικό οξύ το οποίο στη συνέχεια εισέρχεται στο μιτοχόνδριο και μετατρέπεται σε ακέτυλο-CoA. Τα λίπη μετατρέπονται σε ακέτυλο-CoA διαμέσου της β-οξειδωσης. Τέλος, οι πρωτεΐνες και τα ελεύθερα αμινοξέα μετατρέπονται με τρανσαμίνωση, οξειδωτική απαμίνωση καθώς και με πιο πολύπλοκες μεταβολικές οδούς σε ακέτυλο-CoA ή άλλα ενδιάμεσα μεταβολικά προϊόντα του κύκλου του Krebs (εικ. 9). Η παραγωγή ATP στα μιτοχόνδρια το καθιστά κέντρο της ενεργειακής κατάστασης του κυττάρου.



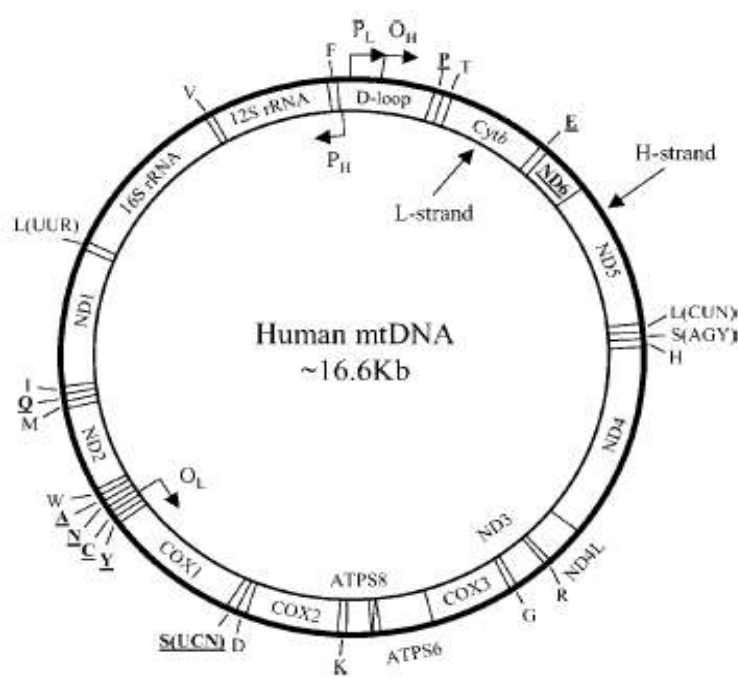
Εικόνα 9: Διαδικασία παραγωγής ATP Πηγή: Stryer, Lubert (2000) *Biochemistry*, 4<sup>th</sup> ed., W.H. Freeman: New York

Ελαττωματικά μιτοχονδριακά γονίδια έχουν ως αποτέλεσμα απουσία των ενζύμων που οδηγούν τις βιοχημικές αντιδράσεις για παραγωγή ενέργειας ή ένζυμα που έχουν υποστεί βλάβη και δεν λειτουργούν σωστά. Έτσι μειώνεται η παροχή ATP και οδηγούμαστε σε προβλήματα στις λειτουργίες του σώματος (πίνακας 2).

Πίνακας 2: Οι επιδράσεις των μιτοχονδριακών δυσλειτουργιών στο ανθρώπινο σώμα

Όργανο ή Ιστός	Επίδραση στο φαινότυπο
Γενικά	Μικρό ανάστημα και ανορεξία
Κεντρικό Νευρικό Σύστημα	Αναπτυξιακή καθυστέρηση / διανοητική αναπηρία, προοδευτική νευρολογική φθορά (άνοια όπως η μορφή καθυστερημένης έναρξης της νόσου Αλτσχάιμερ), επιληπτικές κρίσεις, εγκεφαλικά επεισόδια (συχνά αναστρέψιμα), δυσκολίες στην κατάποση, προβλήματα όρασης και κώφωση
Σκελετός και Μύες	Λιποθυμία, αδυναμία και δυσανοχή στην άσκηση
Καρδιά	Καρδιακή ανεπάρκεια (μυοκαρδιοπάθεια) και αρρυθμίες
Νεφρός	Προβλήματα στη λειτουργία των νεφρών

Με βάση τον πλήρη καθορισμό της αλληλουχίας των νουκλεοτιδίων, το μιτοχονδριακό DNA του ανθρώπου είναι κυκλικό και περιέχει 2 γονίδια rRNA, 22 γονίδια tRNA και 13 γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες. Μεταξύ των πρωτεϊνών είναι οι υπομονάδες της συνθετάσης του ATP, της αφυδρογονάσης του NADPH, της οξειδάσης του κυτοχρώματος c και το κυτόχρωμα b. Όλα τα νουκλεοτίδια κωδικοποιούν είτε για RNA είτε για πρωτεΐνες. Συνεπώς, δεν υπάρχουν εκτεταμένες αλληλουχίες ρύθμισης (εικόνα 10).



Εικόνα 10: Το μιτοχονδριακό DNA

Το μιτοχονδριακό DNA κληρονομείται μόνο από τη μητέρα. Αυτό συμβαίνει επειδή το μαστίγιο του σπερματοζωαρίου, το οποίο φέρει τη συντριπτική πλειοψηφία των μιτοχονδρίων του, δεν εισέρχεται στο ωάριο κατά τη γονιμοποίηση. Αυτή η σχετική αυτοδυναμία κάνει τους επιστήμονες να υποθέτουν πως τα μιτοχόνδρια προέρχονται από προκαρυωτικούς οργανισμούς, οργανισμούς δηλαδή που δε διαθέτουν πυρήνα οι οποίοι ενσωματώθηκαν σε ευκαρυωτικά κύτταρα, συμβιώνοντας με αυτά [67].

## Μιτοχονδριακή Κληρονομικότητα

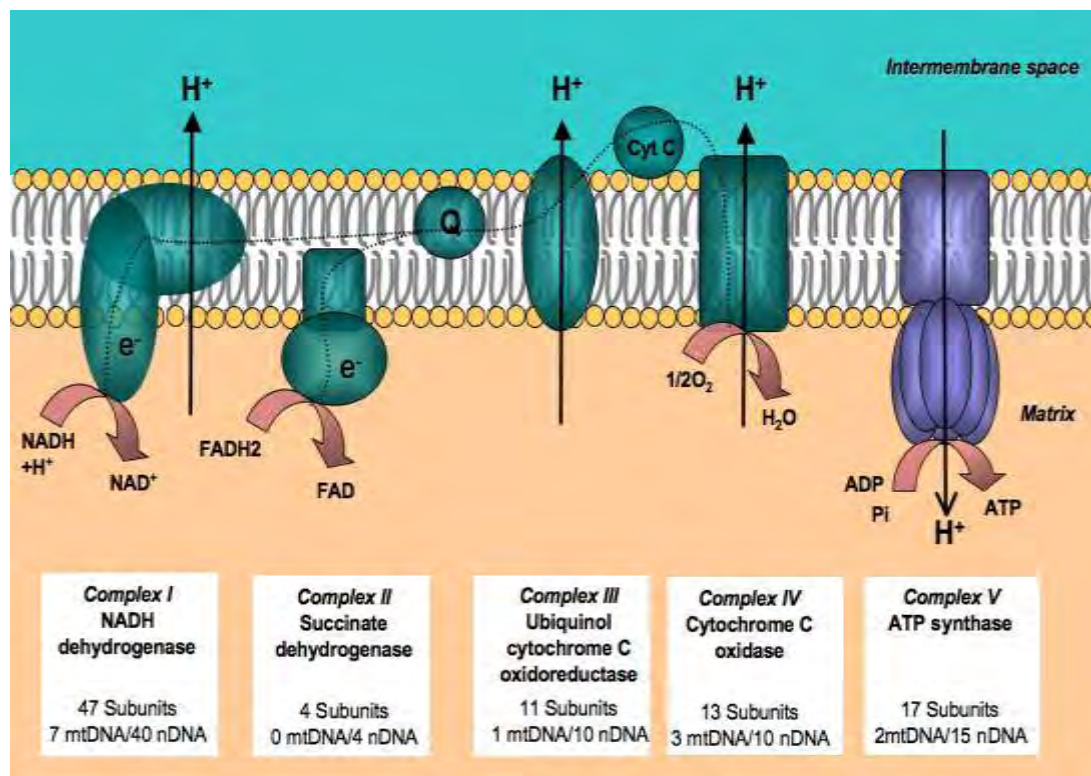
Το πρότυπο κληρονομικότητας των ασθενειών που οφείλονται σε ελαττωματικά μιτοχονδριακά γονίδια αποκαλείται μητρική κληρονομικότητα. Συνήθως η μητέρα θα έχει ένα μείγμα των μιτοχονδρίων που φέρουν το λειτουργικό αντίγραφο του γονιδίου και άλλων που φέρουν το ελαττωματικό γονίδιο, μια κατάσταση που ονομάζεται ετεροπλασμία. Για να δημιουργηθεί μια παθολογική κατάσταση, ο αριθμός των μιτοχονδρίων με το ελαττωματικό γονίδιο θα πρέπει να ξεπερνά ένα κρίσιμο επίπεδο (το κατώφλι). Τα κύτταρα διαφόρων ιστών και οργάνων μπορούν να έχουν ποικίλες ποσότητες μιτοχονδρίων με ελαττωματικό γονίδιο, και ο αριθμός των κυττάρων με ελαττωματικά μιτοχόνδρια σε κάθε ιστό ή όργανο μπορεί να διαφέρει.

Ασθένειες λόγω ελαττωματικών μιτοχονδριακών γονιδίων δημιουργούν περιπλοκές κατά την εκτίμηση του κινδύνου μια μητέρα να διαβιβάσει το ελαττωματικό μιτοχονδριακό γονίδιο σε ένα παιδί και αν, ή πόσο σοβαρά, θα μπορούσε να επηρεαστεί το παιδί. Ενώ είναι δυνατό να εξετάσουμε την παρουσία ή απουσία ορισμένων ελαττωματικών μιτοχονδριακών γονιδίων και των προϊόντων τους κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης, τα αποτελέσματα μπορεί να είναι δύσκολο να ερμηνευθούν. Το αν τα συμπτώματα της ασθένειας θα εμφανιστούν ή όχι εξαρτάται από το αν ο αριθμός των μιτοχονδρίων με ελαττωματικά γονίδια είναι πάνω από το κρίσιμο όριο σε αρκετά κύτταρα για να επηρεάσει την παραγωγή ενέργειας [67].

Ωστόσο, οι ασθενείς με mtDNA ελλείψεις, η πιο κοινή μορφή μετάλλαξης, παρουσιάζονται ως σποραδικές περιπτώσεις και, για παράδειγμα, το 40% των ασθενών με κληρονομική οπτική νευροπάθεια Leber (Leber hereditary optic neuropathy, LHON) που φέρει μετάλλαξη στη θέση 11.778 του mtDNA, δεν έχουν οικογενειακό ιστορικό. Έτσι, ενώ η μητρική κληρονομικότητα μιας ασθένειας υποδηλώνει μετάλλαξη στο mtDNA, πολλοί ασθενείς με μιτοχονδριακές μεταλλάξεις ενδέχεται να μην έχουν τέτοιου είδους οικογενειακό ιστορικό.

## Μιτοχόνδρια και Οξειδωτικό stress

Τα μιτοχόνδρια παράγουν την περισσότερη από την ενέργεια που χρειάζεται το κύτταρο μέσω της διαδικασίας οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, παραπροϊόν της οποίας είναι η παραγωγή ελευθέρων ριζών. Ως οξειδωτική φωσφορυλίωση ορίζεται η σύζευξη της μεταφοράς ηλεκτρονίων κατά μήκος της αναπνευστικής αλυσίδας και της παραγωγής ενέργειας με τη μορφή ATP (εικ. 11). Τα ηλεκτρόνια μεταφέρονται από το NADH ή το FADH<sub>2</sub> προς το O<sub>2</sub> μέσω μιας βαθμίδωσης συγκέντρωσης πρωτονίων μεταξύ των δύο πλευρών της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης. Η μετατροπή της ηλεκτρονιοκίνητης δύναμης σε πρωτονιοκίνητη δύναμη επιτελείται από τρεις ηλεκτρονιοκίνητες αντλίες πρωτονίων: την οξειδοαναγωγή του ζεύγους NADH-συνενζύμου Q, την οξειδοαναγωγή του ζεύγους συνενζύμου Q-κυτοχρώματος c και την οξειδοαναγωγή του κυτοχρώματος c. Η τελική φάση της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης επιτελείται από ένα ενζυμικό σύμπλοκο, τη συνθάση της ATP [68].



Εικόνα 11: Αλληλουχία των φορέων ηλεκτρονίων στην αναπνευστική αλυσίδα

Είναι γνωστό πλέον, ότι εκτός της παραγωγής ενέργειας, τα μιτοχόνδρια συμμετέχουν σε πολλές, διαφορετικές διαδικασίες που σχετίζονται με τη φυσιολογία του κυττάρου, όπως είναι η ομοιόσταση ασβεστίου, η διατήρηση του οξειδοαναγωγικού δυναμικού, ο έλεγχος βασικών διαδικασιών, όπως είναι η απόπτωση και η απόκριση

σε παθολογικό stress [69]. Το οξειδωτικό stress προέρχεται από την ανατροπή της ισορροπίας ανάμεσα στην παραγωγή δραστικών ενώσεων οξυγόνου ή αζώτου και αντιοξειδωτικών μηχανισμών. Η βλάβες που προκαλούνται επηρεάζουν τη λειτουργικότητα πολλών κυτταρικών ομοιοστατικών συστημάτων και ανάμεσα σε αυτά τη λειτουργικότητα των νευρωνικών κυττάρων.

## Δραστικές μορφές οξυγόνου (reactive oxygen species, ROS)

Σήμερα είναι γνωστό ότι όλες σχεδόν οι επιβλαβείς επιδράσεις του οξυγόνου οφείλονται στο σχηματισμό ελεύθερων ριζών (free radicals) και άλλων δραστικών μορφών οξυγόνου (reactive oxygen species, ROS), στα οποία περιλαμβάνονται τα πρωτογενή δραστικά παράγωγα του οξυγόνου αλλά και όλα εκείνα (ρίζες ή μη), τα οποία προκύπτουν δευτερογενώς κατά τις διάφορες χημικές αλληλεπιδράσεις με τα στοιχεία του κυτταρικού περιβάλλοντος (π.χ. ελεύθερες υπεροξυλ-ρίζες R-C-O-O• και αλκοξυλ-ρίζες R-C-O•, ενδιάμεσα προϊόντα της υπεροξειδωσης λιπιδίων). Οι ROS σχηματίζονται αναπόφευκτα στον αερόβιο μεταβολισμό και είναι η κύρια αιτία εκδήλωσης του φαινομένου του οξειδωτικού stress στα κύτταρα.

Μια ελεύθερη ρίζα σχηματίζεται από μία μη-ρίζα η οποία (α) χάνει ένα ηλεκτρόνιο, (β) δέχεται ένα ηλεκτρόνιο ή (γ) υφίσταται ομολυτική διάσπαση (homolytic fission) ενός ομοιοπολικού δεσμού (στην ομολυτική διάσπαση τα δύο ηλεκτρόνια του ομοιοπολικού δεσμού δεν μένουν με το πιο ηλεκτραρνητικό άτομο αλλά μοιράζονται μεταξύ των δύο αποχωρισμένων ατόμων):



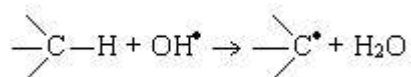
Αντίστροφα από την ομολυτική διάσπαση, δύο ελεύθερες ρίζες μπορούν να αντιδράσουν μεταξύ τους και να συνδεθούν ομοιοπολικά, οπότε προκύπτει μια μη-ρίζα ( $X\cdot + Y\cdot \rightarrow XY$ ), γεγονός που είναι πολύ σπάνιο, αφού η συγκέντρωση των ελευθέρων ριζών διατηρείται σε πολύ χαμηλά επίπεδα ακόμη και σε καταστάσεις έντονου οξειδωτικού stress. Αντίθετα, μια ελεύθερη ρίζα συνήθως αντιδρά με μια μη-ρίζα (τα περισσότερα βιολογικά μόρια δεν είναι ελεύθερες ρίζες) με τους εξής τρόπους:

α) προσθετικά, όταν η ελεύθερη ρίζα συνδέεται με τη μη-ρίζα (π.χ. προσθήκη του OH• στην γουανίνη του DNA):  $X\cdot + Y \rightarrow [X-Y]\cdot$

β) αναγωγικά, όταν η ελεύθερη ρίζα δρα ως αναγωγικός παράγοντας, παραχωρώντας το ασύζευκτο της ηλεκτρόνιο στη μη-ρίζα:  $X\cdot + Y \rightarrow X^+ + Y\cdot^-$

γ) οξειδωτικά, όταν η ελεύθερη ρίζα δρα ως οξειδωτικός παράγοντας, δεχόμενη ένα ηλεκτρόνιο από τη μη-ρίζα:  $X\cdot + Y \rightarrow X^- + Y\cdot^+$

δ) αφαιρετικά, όταν η ελεύθερη ρίζα αποσπά ένα άτομο υδρογόνου από τον ανθρακικό σκελετό μιας οργανικής ένωσης:



Έτσι σχηματίζεται μια νέα ελεύθερη ρίζα, η οποία αν είναι επίσης δραστική μπορεί να αντιδράσει εκ νέου με ένα άλλο μόριο κ.ο.κ. Παράδειγμα τέτοιων αλυσιδωτών αντιδράσεων ελευθέρων ριζών είναι η υπεροξειδωση των λιπιδίων που αποτελεί τον κύριο μηχανισμό πρόκλησης οξειδωτικής βλάβης σε βιολογικές μεμβράνες.

Εκτός από τις ROS πολύ σημαντικές στο οξειδωτικό stress είναι και οι δραστικές μορφές (ρίζες ή μη) άλλων χημικών στοιχείων και μορίων, που διακρίνονται ανάλογα με την προέλευσή τους σε εκείνες που υπάρχουν στο περιβάλλον των κυττάρων και σε εκείνες που σχηματίζονται από τη δράση των ROS επί των διαφόρων κυτταρικών συστατικών. Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν τα ιόντα Fe, Cu και άλλων μετάλλων μετάπτωσης (που καταλύουν αντιδράσεις του οξειδωτικού stress και προάγουν οξειδωτικές βλάβες στο κύτταρο), τα ιόντα Cl και το NO<sup>•</sup> (που παράγεται από την L-αργινίνη με τη δράση του ενζύμου συνθετάση του NO και έχει οξειδωτική και αντιοξειδωτική δράση). Στη δεύτερη κατηγορία ανήκουν οι ελεύθερες ρίζες θείου RS<sup>•</sup> (προϊόντα της οξειδωτικής βλάβης ή αντιοξειδωτικής δράσης διαφόρων θειολών), ελεύθερες ρίζες άνθρακα R-C<sup>•</sup> (ενδιάμεσα προϊόντα της υπεροξειδωσης λιπιδίων), ο υπεροξυνιτρίτης ONOO<sup>-</sup> (προϊόν της αντίδρασης O<sub>2</sub><sup>-</sup> και NO<sup>•</sup>), το υποχλωριώδες οξύ HOCl (προϊόν της αντίδρασης H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> και Cl<sup>-</sup>) κ.α.

## Οι συνέπειες του οξειδωτικού stress στα κύτταρα

Το οξειδωτικό stress είναι υπεύθυνο για την πρόκληση πληθώρας βλαβών στα κύτταρα, προκαλώντας αλλαγές στα μακρομόρια του κυττάρου. Η ρίζα OH<sup>•</sup> είναι η πιο δραστική ελεύθερη ρίζα οξυγόνου και αποτελεί έναν εξαιρετικά ισχυρό οξειδωτικό παράγοντα που αντιδρά σχεδόν ακαριαία με οποιοδήποτε τύπο μορίου τυγχάνει να βρίσκεται πλησίον της θέσης σχηματισμού της. Ένα από τα σημαντικά συστατικά του κυττάρου είναι τα νουκλεϊκά οξέα (DNA και RNA), που μπορεί να υποστούν αλλαγές στις βάσεις (π.χ. προσθήκη του OH<sup>•</sup>, απαμινώσεις, απομάκρυνση του H) αλλά και στα σάκχαρα ή ακόμα και δημιουργία σπασιμάτων και DNA-protein cross links. Εκτός από τα νουκλεϊκά οξέα, συνήθεις είναι και οι βλάβες στις πρωτεΐνες, όπως η δημιουργία υπεροξειδίων στον πεπτιδικό κορμό ή στις πλευρικές αλυσίδες αμινοξέων, η οξείδωση ομάδων του S, τα πρωτεϊνικά καρβονύλια, και οι απαμινώσεις, που επιφέρουν αλλαγές στη δομή και την λειτουργία των πρωτεϊνών. Τέλος, τα λιπιδικά συστατικά των κυττάρων είναι από τους πλέον σημαντικούς στόχους των δραστικών μορφών οξυγόνου.



## Πηγές οξειδωτικού stress στα μιτοχόνδρια

Τα μιτοχόνδρια αποτελούν μείζονα πηγή ελευθέρων ριζών για το κύτταρο. Έχει υπολογιστεί ότι το 0,15% του μοριακού οξυγόνου που φυσιολογικά ανάγεται στο σύμπλοκο IV για τη δημιουργία νερού μετατρέπεται σε υδροξυλική ρίζα [70]. Συνολικά, σχεδόν το 1-2% του οξυγόνου που εισέρχεται στο μιτοχόνδριο ανάγεται ατελώς και οδηγεί στην παραγωγή  $O_2^{\bullet-}$ .

Η β-οξείδωση λιπαρών οξέων, κυρίως στα μιτοχόνδρια, αλλά και στα υπεροξεισώματα, οδηγεί στην παραγωγή ROS ως παραπροϊόντων της αναπνοής. Στην αντίδραση αυτή τα ηλεκτρόνια μεταφέρονται κατευθείαν στο οξυγόνο με αποτέλεσμα την παραγωγή  $H_2O_2$  [71].

## Επίδραση των ROS στα μιτοχόνδρια

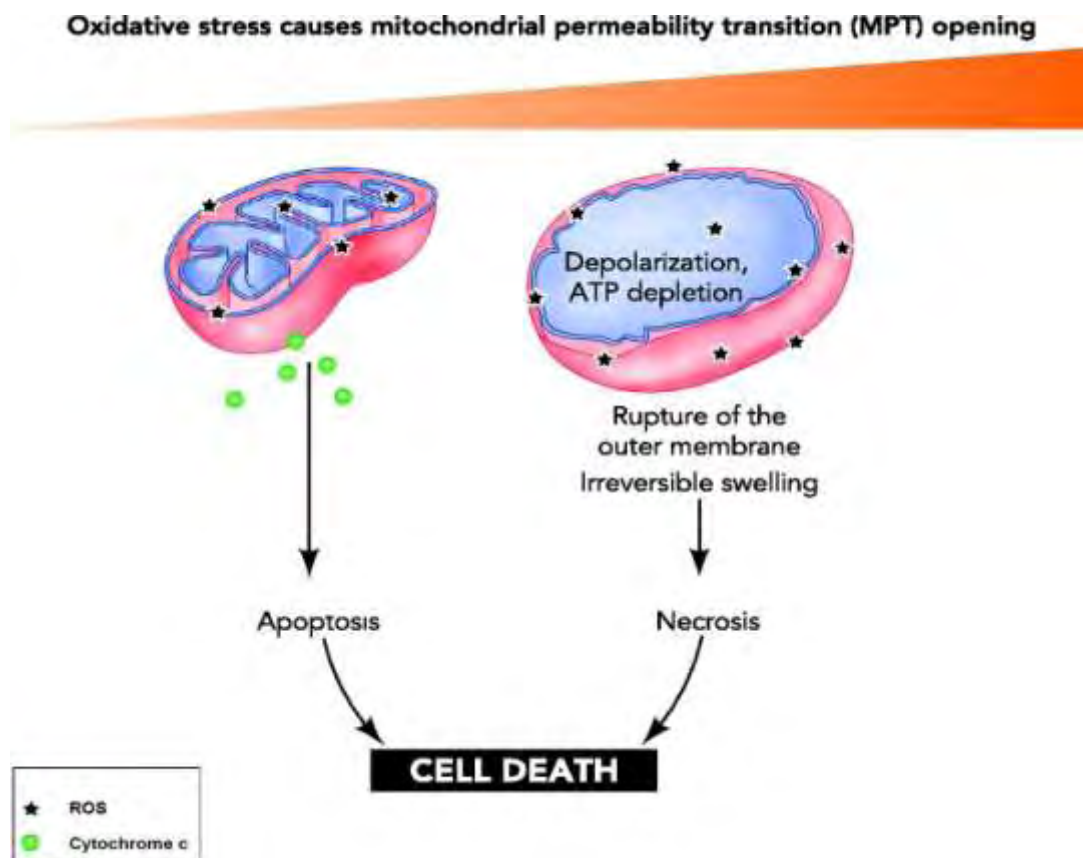
Τα μιτοχόνδρια περιέχουν μη κορεσμένα λιπίδια, γεγονός που τα κάνει πιο επιρρεπή σε οξειδωτική τροποποίηση. Έχει βρεθεί ότι οι πρωτεΐνες που βρίσκονται προς τη μιτοχονδριακή μήτρα υπόκεινται σε υψηλότερο βαθμό οξειδωτικής τροποποίησης (π.χ., καρβονυλίωση και νιτροσυλίωση) καθώς και το μιτοχονδριακό DNA αφού δεν έχει την πολύπλοκη οργάνωση και τη δυνατότητα επιδιόρθωσης του πυρηνικού DNA ώστε να προστατευθεί [72]. Τέλος, σημαντικό μέρος του υπεροξειδικού ανιόντος που σχηματίζεται δεν μπορεί να διαπεράσει τις μεμβράνες και συνεπώς, αν δε διασπαστεί από την υπεροξειδική δυσμουτάση, τροποποιεί το DNA.

Χρόνια αύξηση των επιπέδων ROS συσχετίζεται με μιτοχονδριακή βλάβη και δυσλειτουργία, γεγονός που μπορεί να οδηγήσει σε αλυσιδωτές αντιδράσεις περιορισμού της μιτοχονδριακής λειτουργίας, δημιουργίας ROS και κυτταρικής βλάβης.

Η έκθεση σε ελεύθερες ρίζες και η αλλαγή της οξειδοαναγωγικής κατάστασης του μιτοχονδρίου μπορεί να οδηγήσει σε αύξηση της παραγωγής ελευθέρων ριζών από το μιτοχόνδριο, με τελικό αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός ασταθούς συστήματος, το οποίο «αυτό-τροφοδοτείται» μεταδίδοντας τις διαταραχές στα γειτονικά μιτοχόνδρια. Είναι δυνατό, δηλαδή, μία τοπική αλλοίωση, να πολλαπλασιαστεί και να επεκταθεί σε όλο το κύτταρο ή και σε γειτονικά κύτταρα. Το φαινόμενο αυτό περιγράφεται ως ευαισθησία στις ελεύθερες ρίζες, ή ROS-Induced ROS Release (RIRR). Οι αλλαγές αυτές στα επίπεδα ελευθέρων ριζών είναι αντιστρόφως ανάλογες των εναλλαγών του μιτοχονδριακού μεμβρανικού δυναμικού. Η μιτοχονδριακή βλάβη και δυσλειτουργία είναι βασικό χαρακτηριστικό του κυτταρικού θανάτου που μεσολαμβάνεται από ROS. Τα μιτοχόνδρια έχουν θεμελιώδη ρόλο στον έλεγχο του κυτταρικού θανάτου μέσω τριών κυρίως μηχανισμών: 1) Διακοπή της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων, της

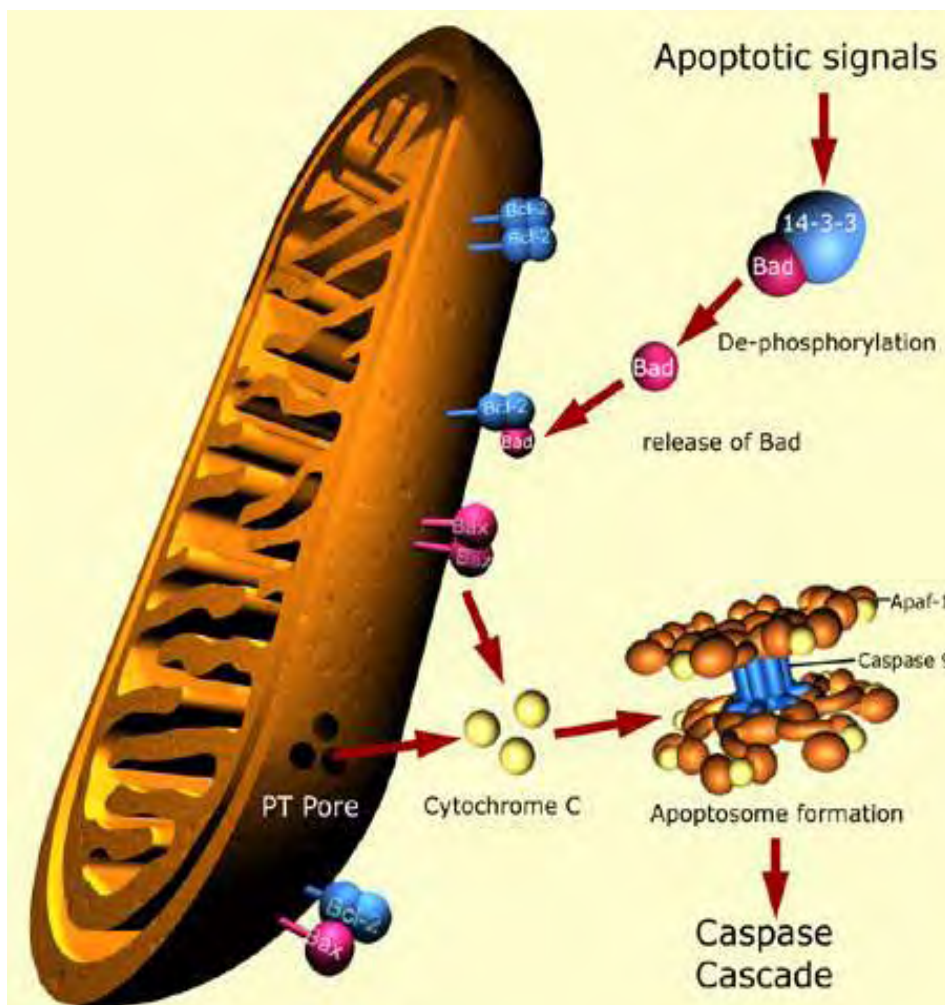


οξειδωτικής φωσφορυλίωσης και της παραγωγής ATP, 2) Απελευθέρωση πρωτεϊνών που ενεργοποιούν τις κασπάσες και 3) αλλοίωση του οξειδοαναγωγικού δυναμικού, το οποίο οδηγεί στην παραγωγή ROS. Ο πόρος μετάπτωσης της μιτοχονδριακής διαπερατότητας, (mitochondria Permeability Transition Pore, mPTP) είναι ένα μη ειδικό πρωτεϊνικό κανάλι διαπερατό σε πρωτεΐνες μεγάλου μοριακού βάρους (μεγέθους μέχρι 1500Da) και σε ιόντα. Αποτελείται από τις πρωτεΐνες VDAC (Voltage Dependent Anion Channel), ANT (Adenine Nucleotide Translocator) και κυκλοφιλίνη D (Cyc-D, cyclophilin D) [73]. Το οξειδωτικό stress ή η κυτταροπλασματική υπερφόρτωση σε ιόντα ασβεστίου είναι παράγοντες που μπορεί να οδηγήσουν στη δημιουργία του πόρου, η οποία έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια του μιτοχονδριακού μεμβρανικού δυναμικού [74]. Το όριο των επιπέδων οξειδωτικού stress που απαιτούνται για αυτήν την ενεργοποίηση φαίνεται να είναι χαμηλότερο στα καταπονημένα μιτοχόνδρια. Η ενεργοποίηση του πόρου οδηγεί στη διόγκωση της μιτοχονδριακής θεμέλιας ουσίας (matrix) και την απελευθέρωση κυτοχρώματος c και άλλων παραγόντων, με τελικό αποτέλεσμα την απόπτωση (εικ. 12).



Εικόνα 12: Το άνοιγμα του πόρου μετάπτωσης της μιτοχονδριακής διαπερατότητας οδηγεί στον κυτταρικό θάνατο

Επιπλέον, το μονοπάτι της απόπτωσης μέσω ROS μπορεί να συντελείται είτε με έλλειψη σημάτων επιβίωσης (αυξητικοί παράγοντες, ορμόνες), είτε με παρουσία σημάτων θανάτου (ακτινοβολήση, χημειοθεραπευτικά φάρμακα, συνδέτες, όπως Fas-L και υποδοχέας Fas, TNF και TNF-R). Στο μιτοχόνδριο γίνεται προσπάθεια αναστολής της απόπτωσης από πρωτεΐνες της bcl-2 πρωτεϊνικής οικογένειας (Bcl-2 / Bcl-xl). Οι πρωτεΐνες bcl-2 είναι μια οικογένεια πρωτεϊνών που εμπλέκονται στην αντιμετώπιση της απόπτωσης. Μερικές από αυτές τις πρωτεΐνες (όπως η bcl-2 και η Bcl-XL) καλούνται αντι-αποπτωτικές, ενώ άλλες (όπως η Bad, η Bax και η Bid) καλούνται προ-αποπτωτικές. Η ευαισθησία των κυττάρων σε αποπτωτικά ερεθίσματα μπορεί να εξαρτάται από το ισοζύγιο των προ- και των αντι-αποπτωτικών bcl-2 πρωτεϊνών. Αυτή η αλληλεπίδραση διαταράσσει τη φυσιολογική λειτουργία των αντι-αποπτωτικών bcl-2 πρωτεϊνών και μπορεί να οδηγήσει στο σχηματισμό των πόρων στα μιτοχόνδρια και στην απελευθέρωση του κυτοχρώματος c (εικ. 13). Αυτό με τη σειρά του οδηγεί στο σχηματισμό του αποπτωσώματος και στην ενεργοποίηση του καταρράκτη κασπασών [75].



Εικόνα 13: Σηματοδοτικό μονοπάτι αποπτωτικών σημάτων

Τα μιτοχόνδρια παίζουν, επίσης, σημαντικό ρόλο στην ομοίωση του ασβεστίου, συμμετέχοντας στην ταχεία απορρόφησή του από το κυτταρόπλασμα. Οι ROS είναι δυνατό να προκαλούν αύξηση του κυτταροπλασματικού ασβεστίου μέσω της διπλής επιβλαβούς δράσης τους στις αντλίες που καθορίζουν την ομοίωσή του. Η τροποποίηση των καναλιών αυτών έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση ασβεστίου από τις αποθήκες του και την αδυναμία επαναρρόφησής του.

Η διατήρηση της μιτοχονδριακής ομοίωσης κάτω από φυσιολογικές συνθήκες είναι απαραίτητη, ώστε να αντιμετωπιστούν οι ενεργειακές ανάγκες και πραγματοποιείται μέσω πολύπλοκων διαδικασιών επικοινωνίας μεταξύ του μιτοχονδριακού και του πυρηνικού γενετικού υλικού. Η επικοινωνία αυτή έχει σημαντικές εκφάνσεις στον έλεγχο του μιτοχονδριακού κύκλου, του περιεχομένου και του αριθμού τους, ώστε να εξασφαλίζεται η ομοίωση του κυττάρου. Τα μόρια που ελέγχουν τη διαδικασία αυτή είναι οι NRF1 και 2 (Nuclear Respiratory Factors), η CREB (cAMP Response Element Binding protein) και ο μεταγραφικός παράγοντας μιτοχονδρίων A (TFAM – Transcriptional Factor A of Mitochondria). Τα ρυθμιστικά αυτά μόρια ελέγχονται από τους παράγοντες PGC1α (transcriptional coactivator peroxisome-proliferator-activated receptor  $\gamma$  coactivator 1 $\alpha$ ) και PRC (PGC-1-Related Coactivator). Οι παράγοντες αυτοί ελέγχουν γονίδια που σχετίζονται με γονίδια της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης και ρύθμισης ROS .

Με άλλα λόγια, οι ROS έχουν επίδραση στην κυτταρική λειτουργία, η οποία εξαρτάται από τη συγκέντρωσή τους. Οι ROS σε φυσιολογικά/χαμηλά επίπεδα, τέτοια που μην υπάρχει οξειδωτική καταπόνηση, ελέγχουν την κυτταρική επιβίωση μέσω διαφόρων οδών. Υπάρχουν πολλά μονοπάτια μεταγωγής σήματος που σχετίζονται με την κυτταρική υπερτροφία και το θάνατο. Κύριο ρόλο παίζουν οι MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) μέσω τριών μονοπατιών: 1) ERKs (Extracellular signal-regulated kinases), 2) JNKs (c-Jun N Terminal Kinases) και 3) p38-MAPKs. Το μονοπάτι των ERKs έχει συσχετισθεί εκτός από την υπερτροφία και με την επιβίωση, ενώ τα μονοπάτια JNK και p38-MAPK και με κυτταρικό θάνατο [76].

## **Αντιοξειδωτικοί αμυντικοί μηχανισμοί**

Οι αερόβιοι οργανισμοί έχουν αναπτύξει αρκετούς αμυντικούς μηχανισμούς ώστε να μπορούν να επιβιώσουν σε έντονα οξειδωτικές συνθήκες. Είναι σημαντικό ότι κατορθώνουν να διατηρούν την ενδοκυτταρική συγκέντρωση του O<sub>2</sub> σε επίπεδα χαμηλότερα από της ατμόσφαιρας (21%) καθώς και την ικανότητα αποτελεσματικής λειτουργίας της αναπνευστικής αλυσίδας σε αυτά τα χαμηλά επίπεδα. Το οξειδωτικό φορτίο (ROS και προϊόντα δράσης τους) που δημιουργείται σε αυτές τις συνθήκες

αντιμετωπίζεται από την αντιοξειδωτική άμυνα των οργανισμών που συνίσταται σε ένα πολύπλοκο σύστημα με επιμέρους στοιχεία. Οι αντιοξειδωτικοί αμυντικοί μηχανισμοί διακρίνονται σε ενζυμικούς και μη ενζυμικούς.

Στους ενζυμικούς περιλαμβάνονται 1) οι υπεροξειδικές δυσμουτάσες (Superoxide Dismutase, SOD) οι οποίες διασπούν το υπεροξειδικό ανιόν [77], 2) η καταλάση (οξειρεδοκτάση του υπεροξειδίου του υδρογόνου) που καταλύει την αποικοδόμηση του  $H_2O_2$  σε νερό και οξυγόνο, 3) η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (Glutathione Peroxidase, GP) η οποία είναι αντιοξειδωτικό ένζυμο το οποίο αποτοξινώνει το κύτταρο από λιπιδικά και μη υδροξυπεροξειδία καθώς και από το  $H_2O_2$ , 4) η υπεροξειρεδοξίνη (Prx), το αναγεννητικό της σύστημα η θειορεδοξίνη (Trx) και η ρεδοκτάση της θειορεδοξίνης (TrcR) αποτελούν ένα επιπλέον αντιοξειδωτικό και οξειδοαναγωγικό ρυθμιστικό σύστημα, το οποίο έχει βρεθεί ότι συμμετέχει σε πληθώρα διεργασιών, που σχετίζονται με ROS.

Στους μη ενζυμικούς αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς περιλαμβάνονται ενδοκυτταρικά αντιοξειδωτικά μόρια όπως είναι οι βιταμίνες E, C και β-καροτένιο και πρωτεΐνες όπως η μεταλλοθειονίνη.

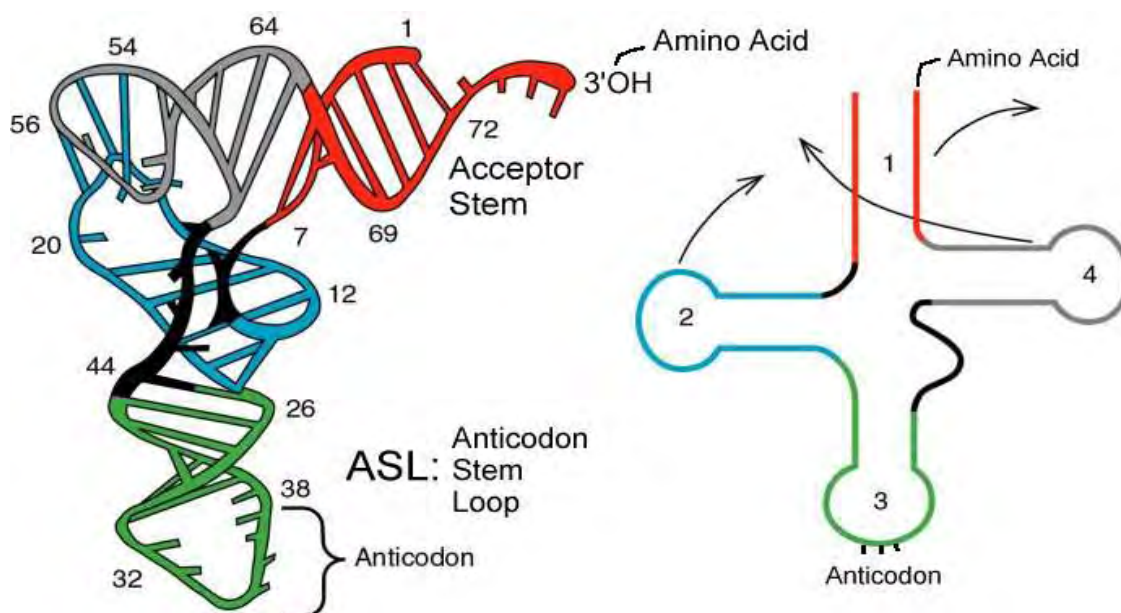
## Μεταλλάξεις στα μιτοχονδριακά γονίδια tRNA

Από το mtDNA κωδικοποιούνται 37 γονίδια, τα 24 από τα οποία κωδικοποιούν για τη μεταφραστική μηχανή του (22 tRNAs, 2 rRNAs). Παθογόνες σημειακές μεταλλάξεις στα μιτοχονδριακά γονίδια των tRNAs είναι υπεύθυνες για την πλειοψηφία των μιτοχονδριακών ασθενειών παρόλο που αντιπροσωπεύουν μόνο το 5-10% του συνολικού mtDNA. Η σχέση γονότυπου-φαινότυπου των ασθενειών που προκαλούνται από μεταλλάξεις των γονιδίων των tRNAs είναι εξαιρετικά πολύπλοκη και δυσνόητη. Η γενετική ετερογένεια μεταξύ κυττάρων και ιστών φαίνεται να κατέχει μεγάλη σημασία στην παθογένεια της νόσου. Αν και το mtDNA είναι μητρικής κληρονομησης, η διαβίβαση των μιτοχονδριακών παθήσεων και η σοβαρότητά τους είναι δύσκολο να προβλεφθούν. Και τα δύο είναι πιθανό να επηρεάζονται από τη φυσική επιλογή και το φαινόμενο της στενωπού [78].

## Χαρακτηριστικά των μιτοχονδριακών tRNA

Η αποδεκτή δευτεροταγής δομή για τα μιτοχονδριακά tRNAs είναι αυτή ενός «τριφυλλιού», που αποτελείται από τέσσερα στελέχη και τρεις βρόχους (εικ. 14). Στα

κυτοσολικά tRNAs, ο D-βραχίονας περιέχει μια συντηρημένη βάση διϋδροουρακίλης και ο T-βραχίονας περιέχει μια συντηρημένη ακολουθία ριβοθυμιδίνης-ψευδοουριδίνης-κυτοσίνης. Ωστόσο, αυτές δεν διατηρούνται στα mt-tRNAs. Ο βρόχος του αντικωδικονίου φέρει τις τρεις βάσεις που συνιστούν το αντικωδικόνιο ειδικό για το εκάστοτε κωδικόνιο του mRNA που εξασφαλίζει ότι το σωστό αμινοξύ προστίθεται κατά τη διάρκεια της μετάφρασης. Το στέλεχος του βραχίονα-δέκτη υφίσταται ωρίμανση και συνδέεται με το κατάλληλο αμινοξύ. Με εξαίρεση ορισμένες αποκλίσεις στο μέγεθος του στελέχους και του βρόχου, όλα εκτός από δύο mt-tRNAs έχουν την κλασική δομή τριφυλλιού. Από το mt-tRNA<sup>Ser(AGY)</sup> λείπει ολόκληρος ο D-βραχίονας, ενώ το mt-tRNA<sup>Ser(UCN)</sup> έχει μόνο ένα νουκλεοτιδίο που συνδέει το D-βραχίονα με το βρόχο του αντικωδικονίου. Ο D- και ο T-βραχίονας των mt-tRNAs, είναι πιο μεταβλητοί σε μέγεθος από ότι στα κυτταροπλασματικά tRNAs, ενώ η μεταβλητή περιοχή είναι πολύ μικρότερη. Η δομική ευελιξία είναι σημαντικό χαρακτηριστικό των mt-tRNAs, αλλά τα συντηρημένα ζεύγη βάσεων στα στελέχη υποδηλώνουν ότι υπάρχει μια κοινή καθολική τριτοταγής δομή. Τα mt-tRNAs έχουν δομή σχήματος ανάποδου L που προκύπτει από τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των στελεχών [78].



Εικόνα 14 : Σχηματική απεικόνιση της δευτεροταγούς και τριτοταγούς δομής του μορίου του tRNA Πηγή: [www.bio.miami.edu](http://www.bio.miami.edu)

Η διαδικασία της μετάφρασης ξεκινά με φορμυλίωση της α-αμίνης του mt-tRNA<sup>Met</sup>. Το mt-tRNA<sup>Met</sup> χρησιμοποιείται τόσο στην έναρξη όσο και στην επιμήκυνση. Το mt-tRNA<sup>Met</sup> μεταφέρεται στο ριβόσωμα από τον παράγοντα έναρξης της μετάφρασης (IF2), πριν να δεσμευτεί από τον παράγοντα επιμήκυνσης EF-Tu για να

ξεκινήσει τη μετάφραση του mRNA. Στη συνέχεια, προστίθενται από τον EF-Tu διαδοχικά, τα κατάλληλα mt-tRNAs κατά τη διάρκεια της επιμήκυνσης. Τα αμινοξέα εισέρχονται στο μονοπάτι της πρωτεϊνοσύνθεσης μέσω των αμινοακυλο-tRNA συνθετασών, οι οποίες μεσολαβούν για τη σύνδεσή τους με τα νουκλεϊκά οξέα. Κάθε συνθετάση αναγνωρίζει ένα μόνο αμινοξύ και όλα τα tRNAs τα οποία συνδέονται με αυτό το αμινοξύ. Είναι γνωστό από τις κρυσταλλικές δομές ότι το στέλεχος του βραχίονα-δέκτη και ο βρόχος του αντικωδικονίου δημιουργούν ισχυρές επαφές με τη συνθετάση. Αρκετές από τις μεταλλάξεις που αλλάζουν την αναγνώριση ενός tRNA απαντώνται στις δύο αυτές περιοχές [79].

Αρκετές μετα-μεταγραφικές τροποποιήσεις πραγματοποιούνται ώστε να διασφαλιστεί ότι τα mt-tRNAs είναι σωστά αναδιπλωμένα και πλήρως λειτουργικά. Τα mt-tRNAs υφίστανται ωρίμανση με πέψη του 5'-άκρου τους από την RNaseP και του 3'-άκρου τους από την RNaseZ. Σε όλα τα mt-tRNAs προστίθεται η αλληλουχία 5'-CCA-3' στο ώριμο 3-άκρο τους από μια τρανσφεράση [78].

### **Κλινικές επιπτώσεις των μεταλλάξεων στα μιτοχονδριακά γονίδια tRNA**

Πληθώρα κλινικών χαρακτηριστικών έχουν συσχετιστεί με μεταλλάξεις στα γονίδια tRNA, πολλά από τα οποία συναντώνται επίσης και σε άλλες μορφές μιτοχονδριακών παθήσεων. Αν και τα περισσότερα από αυτά τα κλινικά χαρακτηριστικά είναι κοινά σε μεταλλάξεις, άλλα, όπως στην περίπτωση της μυοκλονικής επιληψίας, φαίνεται να επικεντρώνονται σε συγκεκριμένα γονίδια tRNA. Γενικά, υπάρχει μικρή συσχέτιση μεταξύ των κλινικών χαρακτηριστικών και του γονότυπου του tRNA. Μεταλλάξεις σε διαφορετικά σημεία στο ίδιο γονίδιο tRNA μπορούν να προκαλέσουν αρκετά διαφορετικά κλινικά σύνδρομα. Επιπλέον, σε ορισμένες περιπτώσεις, η ίδια σημειακή μετάλλαξη μπορεί να οδηγήσει σε πολλούς διαφορετικούς κλινικούς φαινότυπους.

Η μετάλλαξη A3243G στο γονίδιο tRNA<sup>Leu(UUR)</sup>, για παράδειγμα, έχει αναφερθεί ότι προκαλεί τη μιτοχονδριακή εγκεφαλομυοπάθεια, γαλακτική οξέωση και συμπτώματα εγκεφαλικού (MELAS), τη χρόνια προοδευτική εξωτερική οφθαλμοπληγία (CPEO) ή το μητρικά κληρονομούμενο διαβήτη και κώφωση (MIDD). Δύο ή και περισσότεροι από αυτούς τους φαινότυπους μπορεί να εμφανιστούν εντός της ίδιας οικογένειας. Βέβαια, αυτά τα κλινικά σύνδρομα δεν είναι ειδικά για την μετάλλαξη A3243G αλλά συμβαίνουν σε συνεργασία με μεταλλάξεις σε άλλα γονίδια tRNA.

Πιθανές παθογόνες μεταλλάξεις έχουν εντοπιστεί και στα 22 mt-tRNAs. Υπάρχει τεράστια ποικιλία στους προκύπτοντες φαινότυπους, αν και ο τρόπος με τον οποίο ο γονότυπος σχετίζεται με το φαινότυπο είναι κάθε άλλο παρά σαφής. Πολλές

από αυτές τις διαφορές μπορούν να αποδοθούν στην ετεροπλάσμια αλλά οι βασικοί μοριακοί μηχανισμοί μέσω των οποίων οι μεταλλάξεις προκαλούν ασθένειες είναι ελάχιστα κατανοητοί. Έχουν εντοπιστεί πολλές διαφορετικές πιθανές επιπτώσεις των μεταλλάξεων, μεταξύ των οποίων η παρεμπόδιση της ωρίμανσης του 3'-άκρου, της αμινοακυλίωσης, της πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων καθώς και προβλήματα με την αναγνώριση του κωδικονίου. Το μόνο κοινό χαρακτηριστικό είναι η απώλεια της σταθερότητας του mt-tRNA. Η διαβίβαση των ασθενειών που οφείλονται σε τέτοιου είδους μεταλλάξεις είναι επίσης ελάχιστα κατανοητή, με παράγοντες όπως ο τύπος της μετάλλαξης και η θέση της εντός του tRNA να είναι δυνητικά σημαντικοί [78].

## **Απλοομάδες – Συσχέτιση με τη νόσο Alzheimer**

Δύο πτυχές του mtDNA το καθιστούν ιδιαίτερα χρήσιμο στις ανθρώπινες εξελικτικές μελέτες. Πρώτον, ακολουθεί μητρική κληρονομικότητα και κατά συνέπεια δεν υφίσταται ανασυνδιασμό και δεύτερον, ο ρυθμός εξέλιξης του είναι πολύ υψηλότερος από αυτόν του nDNA [80].

Κατά τα τελευταία 200.000 χρόνια παραλλαγές του mtDNA έχουν συσσωρευτεί σε μακρές μητρικές γενεαλογίες με αποτέλεσμα ατομικές mtDNA απλοομάδες να συσχετίζονται με τη γεωγραφική προέλευση των πληθυσμών στους οποίους εντοπίζονται. Πολλές απλοομάδες εδρεύθηκαν λόγω γενετικής ποικιλομορφίας και SNPs (πίνακας 3). Η γενετική ποικιλομορφία μπορεί να τροποποιήσει τη μιτοχονδριακή ΟΧΡΗΟΣ ούτως ώστε να διευκολύνει την προσαρμογή των μιτοχονδρίων του εκάστοτε πληθυσμού στο περιβάλλον του. Οι απλοομάδες ολοένα και περισσότερο συσχετίζονται με ένα ευρύ φάσμα κοινών ασθενειών [81].

Σύμφωνα με μελέτη του 2004 [82] υπάρχει αξιοσημείωτη επίδραση των κληρονομούμενων μιτοχονδριακών παραλλαγών στην εμφάνιση της σποραδικής μορφής της AD που είναι φυλο-ειδική και ανεξάρτητη από τον γονότυπο APOE. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων της έρευνας έδειξε μια ιδιαίτερη φυλο-ειδική συσχέτιση της απλοομάδας U με προδιάθεση για AD. Πιο συγκεκριμένα οι άρρενες που έφεραν τη απλοομάδα U είχαν μεγαλύτερο κίνδυνο να νοσήσουν από ότι οι γυναίκες-φορείς των πολυμορφισμών της απλοομάδας U. Το φυλο-ειδικό αποτέλεσμα είναι ιδιαίτερα ενδιαφέρον καθώς η προδιάθεση για AD φαίνεται να είναι υψηλότερη στις γυναίκες από τους άνδρες. Υποψιαζόμαστε ότι αυτό το αποτέλεσμα θα μπορούσε να αντικατοπτρίζει μια λειτουργική διαφορά των mt SNPs της απλοομάδα U που εξαρτάται από κάποιο παράγοντα που σχετίζεται με το φύλο. Επιπλέον, η απλοομάδα U παρατηρήθηκε λιγότερο συχνά σε άρρενες αιωνόβιους και υγιείς σε σύγκριση με τους ασθενείς.



Συνεπώς η κληρονομηση της απλοομάδας U μπορεί να έχει αρνητικές επιπτώσεις για τη γήρανση στους Καυκάσιους άνδρες.

Πίνακας 3: Οι Ευρωπαϊκές απλοομάδες Πηγή *Am J Hum Genet.* 2003 April; 72(4): 804–811 PubMed

Haplogroup	SNP									
	1719	4580	7028	8251	9055	10398	12308	13368	13708	16391
H	...	...	C	...	...	A	...	...	...	...
I	A	...	T	A	...	G	...	...	...	A
J	...	...	T	...	...	G	...	...	A	...
K	...	...	T	...	A	G	G	...	...	...
T	...	...	T	...	...	A	...	A	...	...
<b>U</b>	...	...	<b>T</b>	...	...	...	<b>G</b>	...	...	...
V	...	A	T	...	...	A	...	...	...	...
W	...	...	T	A	...	A	...	...	...	...
X	A	...	T	...	...	A	...	...	...	...

## Φαρμακευτική αντιμετώπιση της νόσου Alzheimer

Τέσσερα φάρμακα έχουν εγκριθεί μέχρι σήμερα από οργανισμούς όπως η Αμερικανική Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA) και ο Ευρωπαϊκός Οργανισμός Φαρμάκων (EMA) για τη θεραπεία των γνωστικών εκδηλώσεων της AD: τα τρία είναι αναστολείς της ακετυλοχολινεστεράσης και το τέταρτο είναι ανταγωνιστής των υποδοχέων του γλουταμινικού NMDA. Ωστόσο κανένα φάρμακο δεν έχει αποδειχθεί να καθυστερεί ή να σταματά την εξέλιξη της νόσου.

Η μείωση της δραστηριότητας των χολινεργικών νευρώνων είναι πολύ γνωστό χαρακτηριστικό της AD [83]. Οι αναστολείς της ακετυλοχολινεστεράσης χρησιμοποιούνται για τη μείωση του ρυθμού αποικοδόμησης της ακετυλοχολίνης (ACh), με αποτέλεσμα αύξηση της συγκέντρωσής της στον εγκέφαλο η οποία μειώνεται λόγω απώλειας των χολινεργικών νευρώνων [84]. Από το 2008 έχουν εγκριθεί για τη διαχείριση των συμπτωμάτων της AD η δονεπεζίλη (Aricept) [85], η γκαλανταμίνη (Razadyne) [86] και η ριβασπιγμίνη (Exelon [87] και Exelon Patch [88]).

Το γλουταμινικό είναι διεγερτικός νευροδιαβιβαστής του νευρικού συστήματος, αλλά υπερβολικές ποσότητες στον εγκέφαλο λόγω υπερδιέγερσης των υποδοχέων γλουταμινικού μπορεί να οδηγήσουν σε νευρωνικό θάνατο. Η μεμαντίνη (Akatinol, Axura, Ebixa / Abixa, Memox και Namenda) [89], είναι ένας μη ανταγωνιστικός αναστολέας των υποδοχέων NMDA που αποτρέπει την υπερδιέγερσή τους από το γλουταμινικό. Η μεμαντίνη έχει αποδειχθεί ότι είναι μέτρια αποτελεσματική στη θεραπεία της μέτριας



έως σοβαρής AD. Τα αποτελέσματά της στα αρχικά στάδια της νόσου είναι άγνωστα [90].

Οι αναστολείς της AChE αποτελούν σήμερα την κύρια και πιο επιτυχημένη φαρμακευτική αγωγή που βελτιώνει μόνο παροδικά τις γνωστικές λειτουργίες αφού δεν έχει καμιά φανερή επίδραση στην εξέλιξη του νευροεκφυλισμού.

# ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

## Υλικά

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ
• Acetic Acid, Οξικό οξύ, $\text{CH}_3\text{COOH}$
• Acrylamide, Ακρυλαμίδη, $\text{CH}_2=\text{CHCONH}_2$
• Agarose, Αγαρόζη, $\text{C}_{24}\text{H}_{38}\text{O}_{19}$
• Ammonium persulfate 20% (APS 20%), Υπερθειικό αμμώνιο 20%, $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$
• Binding Buffer, Διάλυμα πρόσδεσης
• Bis-Acrylamide, N,N – μεθυλεν-δισ-ακρυλαμίδη, $[\text{H}_2\text{C}=\text{CHCONHCH}(\text{OH})-]_2$
• Bromophenol Blue, Μπλε βρωμοφαινόλης, $\text{C}_{19}\text{H}_{10}\text{Br}_4\text{O}_5\text{S}$
• Chloroform, Χλωροφόρμιο, $\text{CHCl}_3$
• Deoxynucleotide Triphosphate, dNTPs
• Elution Buffer, Διάλυμα έκλουσης
• Ethanol, Αιθανόλη, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$
• Ethidium bromide, Βρωμιούχο αιθίδιο, $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{BrN}_3$
• Formaldehyde, Φορμαλδεΰδη, $\text{HCHO}$
• Formamide, Φορμαμίδιο, $\text{HCONH}_2$
• Glycerol 50x, Γλυκερόλη 50x, $\text{HOCH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{OH}$
• 10x High yield PCR reaction buffer with $\text{Mg}^{++}$ , 10x Ρυθμιστικό διάλυμα υψηλής απόδοσης για PCR με $\text{Mg}^{++}$
• Magnesium chloride buffer, Διάλυμα χλωριούχου μαγνησίου, $\text{MgCl}_2$
• Phenol, Φαινόλη, $\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$
• Primers, Εκκινητές
• 2-propanol, Ισοπροπανόλη, $\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$
• Proteinase K 10U/ml, Πρωτεϊνάση K 10U/ml
• Saline-sodium citrate buffer 1x (SSC 1x), Αλατούχο κιτρικό νάτριο
• Silver Nitrate, Νιτρικός άργυρος, $\text{AgNO}_3$
• Sodium acetate, Οξικό νάτριο, $\text{CH}_3\text{COONa}$
• Sodium borohydride, Βορο-υδρίδιο του νατρίου, $\text{NaBH}_4$
• Sodium dodecyl sulphate 5% (SDS 5%)
• Sodium hydroxide, Υδροξειδίο του νατρίου, $\text{NaOH}$
• Taq DNA Polymerase, Taq DNA πολυμεράση
• N,N,N',N'-Tetra-methyl-ethylen-diamine (TEMED), N,N,N',N'-Τετρα-μεθυλ-εθυλεν-διαμίνη, $(\text{CH}_3)_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$
• Tris-Borate-EDTA 0.5x/10x (TBE 0.5x/10x)
• Wash Buffer, Διάλυμα πλύσης
• Xylene Cyanol, Κυανούν ξυλενίου, $\text{C}_{25}\text{H}_{27}\text{N}_2\text{NaO}_6\text{S}_2$
• 100bp DNA Ladder

## ΣΥΣΚΕΥΕΣ

- Abductor
- Beaker
- Casting
- Centrifuge
- Electronic U.V. transilluminator
- Electrophoresis power supply
- Electrophoresis tank
- Eppendorfs
- Erlenmeyer flask
- Filter paper
- Light box
- Measuring cylinder
- Mold
- Oven
- Parafilm
- Photometer
- Pipettes Gilson
- Pipette tips
- PureLink™ Spin Column
- Shaker
- Thermalcycler
- Vortex

## Μέθοδοι

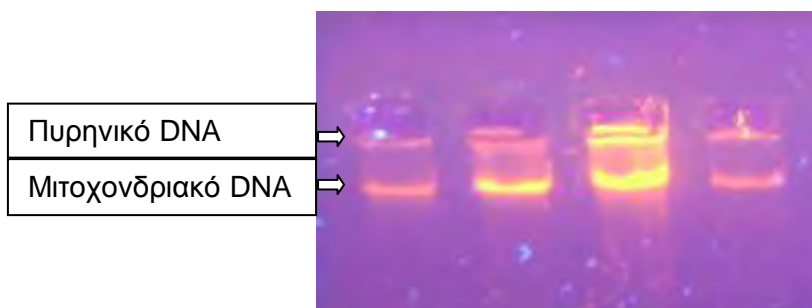
### Δείγματα

Για την παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν δείγματα ολικού αίματος από 50 άτομα-ασθενείς με τη νόσο Alzheimer και από 142 υγιή άτομα τα οποία αποτέλεσαν την ομάδα ελέγχου.

## Απομόνωση του DNA

1. Αρχικά, αφήνουμε τα δείγματα να ξεπαγώσουν σε θερμοκρασία δωματίου. Ανακινούμε ελαφρά κάθε δείγμα ώστε να μην πήξει το αίμα.
2. Όταν ξεπαγώσουν, μεταφέρουμε 0,5ml αίματος σε σωλήνα erpendorf (2ml) και προσθέτουμε 1ml SSC 1x. Ακολουθεί ανάδευση στη συσκευή vortex και φυγοκέντρηση στις 13000 rpm στους 4 °C για 3 min.
3. Στη συνέχεια, απομακρύνουμε το υπερκείμενο και προσθέτουμε εκ νέου 1 ml SSC 1x. Ακολουθεί ανάδευση στη συσκευή vortex και φυγοκέντρηση στις 13000 rpm στους 4 °C για 1 min.
4. Έπειτα, αφού απομακρύνουμε ξανά το υπερκείμενο, προσθέτουμε 0,5 ml CH<sub>3</sub>COONa 0,2M, 50 μl SDS 5% και 5 μl proteinase K (20ng/μl). Αναδεύουμε τους σωλήνες στο vortex και ακολουθεί επώαση για 1h στους 55 °C, με ανακίνηση των σωλήνων κάθε ένα τέταρτο.
5. Μετά την επώαση, προσθέτουμε 0,5 ml φαινόλη και 0,5 ml χλωροφόρμιο [24:1 (v/v) chloroform - isoamyl alcohol], ακολουθεί ανάδευση στο vortex και φυγοκέντρηση για 10 min στους 4° C στις 13000 rpm. Με τη φυγοκέντρηση, δημιουργούνται τρεις στρώσεις, μία ανώτερη υδατική φάση, μία κατώτερη οργανική φάση και μία ενδιάμεση στοιβάδα μεταξύ των δύο προηγούμενων φάσεων. Στο στάδιο αυτό γίνεται ο διαχωρισμός της διαλυτής φάσης που περιέχει το DNA, από την οργανική.
6. Μεταφέρουμε το υπερκείμενο σε νέο erpendorf και προσθέτουμε 1ml χλωροφόρμιο [24:1 (v/v) chloroform - isoamyl alcohol], αναδεύουμε στο vortex και πραγματοποιείται φυγοκέντρηση για 10min στους 4 °C στις 13000 rpm.
7. Μεταφέρουμε το υπερκείμενο σε νέα erpendorf και προσθέτουμε 1ml isopropanol. Ακολουθεί ανάδευση των δειγμάτων και παραμονή στους -20 °C για 15min ή overnight. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 20 min στις 13000 rpm, στους 4 °C.
8. Αφαιρούμε το υπερκείμενο και προσθέτουμε 1 ml διαλύματος παγωμένης αιθανόλης 70%. Πραγματοποιείται φυγοκέντρηση για 10min στους 4 °C στις 13000 rpm.
9. Αφαιρούμε το υπερκείμενο προσεκτικά ώστε να μην φύγει το ίζημα και στη συνέχεια τοποθετούμε τα δείγματα στον κλίβανο για ξήρανση για 1 ώρα στους 55 °C. Όταν εξατμιστεί η αιθανόλη, θα μείνει το DNA στα erpendorfs λόγω της προηγούμενης φυγοκέντρωσης.
10. Αφότου στεγνώσει το DNA, προσθέτουμε 100μl ddH<sub>2</sub>O για επαναδιάλυση του DNA.
11. Αφήνουμε τα δείγματα σε θερμοκρασία δωματίου για να επαναδιαλυθούν overnight. Μπορούμε να αποθηκεύσουμε τα δείγματα στους -20 °C για μελλοντική χρήση.

12. Τέλος, για να βεβαιωθούμε ότι έχει πραγματοποιηθεί επιτυχώς η απομόνωση του DNA, πραγματοποιούμε ποιοτική και ποσοτική ανίχνευση. Ηλεκτροφορούμε 2μl από το επαναδιαλυμένο δείγμα μας σε πηκτή αγαρόζης πυκνότητας 1% w/v (εικ. 15) και κατόπιν φωτομετρούμε 1μl δείγματος διαλυμένο σε 49μl ddH<sub>2</sub>O.



Εικόνα 15: Ηλεκτροφόρηση απομονωμένου DNA σε gel αγαρόζης 1%

Το DNA που λήφθηκε μετά τη μέτρηση είχε μέση συγκέντρωση ~50 ng/μl.

### Παρασκευή των αντιδραστηρίων

Τα stock διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση του DNA είναι τα εξής:

**20x SSC (3M NaCl, 0,3M sodium citrate, pH 7.0):** Προσθήκη 175,4 g NaCl και 88,2 gr Sodium citrate dehydrate σε 500 ml ddH<sub>2</sub>O. Ρύθμιση του pH του διαλύματος στο 7.0 με σταγόνες HCl. Τελικός όγκος διαλύματος 1 lt. Ακολουθεί αποστείρωση. Το διάλυμα **SSC 1x** που χρησιμοποιήθηκε στην απομόνωση DNA προέκυπτε από την αρραίωση του παραπάνω διαλύματος.

**3M Sodium Acetate (NaOAc):** Διαλύονται 40,81gr sodium citrate σε 80ml ddH<sub>2</sub>O. Ρυθμίζουμε το pH του διαλύματος στο 5.2 με σταγόνες glacial acetic acid (CH<sub>3</sub>COOH). Συμπληρώνουμε με ddH<sub>2</sub>O ως τα 100ml. Ακολουθεί αποστείρωση. Για την απομόνωση του DNA χρησιμοποιήθηκε **Sodium Acetate (NaOAc) 0,2 M**, το οποίο προέκυπτε από την αρραίωση του πυκνού διαλύματος.

**10% SDS:** Αναμειγνύονται 10 g Electrophoresis grade SDS σε 90ml ddH<sub>2</sub>O. Ανάδευση στους 68° C για επιτάχυνση της διάλυσης. Ρυθμίζουμε το pH του διαλύματος στο 7,2 προσθέτοντας σταγόνες HCl. Προσθήκη ddH<sub>2</sub>O ώστε να έχουμε τελικό όγκο 100ml.

Μετά την αραιώση του διαλύματος 10% SDS προέκυπτε το διάλυμα **5% SDS** που χρησιμοποιήθηκε.

**Chloroform [24:1 (v /v) chloroform - isoamyl alcohol]:** Για την παρασκευή του διαλύματος αναμειγνύονταν 24 ml χλωροφορμίου και 1 ml ισοαμυλικής αλκοόλης.

### **Ρόλος των αντιδραστηρίων**

**EDTA 0,5M:** αντιπηκτικός παράγοντας που αποτρέπει την πήξη του αίματος και τη συγκόλληση των ερυθροκυττάρων. Γι' αυτό το λόγο το αίμα των ασθενών με Alzheimer μετά τη λήψη του διατηρήθηκε σε σωληνάκια falcon των 15ml που περιέχουν 0,5ml EDTA 0,5M.

**SSC:** ήπιο διάλυμα με λυτικό ρόλο. Καταστρέφει τις κυτταρικές μεμβράνες ώστε να μπορέσουν τα επόμενα διαλύματα να επιδράσουν στις πυρηνικές μεμβράνες.

**NaOAc:** χρησιμοποιείται για την κατακρήμνιση του DNA.

**SDS:** ιονικό απορρυπαντικό που διασπά την πυρηνική μεμβράνη και γαλακτωματοποιεί τα λιπίδια και τις πρωτεΐνες του κυττάρου. Παρεμβαίνει στις πολικές αλληλεπιδράσεις που συγκρατούν τη δομή της κυτταρικής μεμβράνης. Το αποτέλεσμα είναι να σχηματίζονται πολύπλοκες δομές των λιπιδίων και των πρωτεϊνών οι οποίες κατακρημνίζονται, προστατεύοντας έτσι το DNA από τις νουκλεάσες.

**Πρωτεΐνάση K 20ng/μl:** προκαλεί πέψη των πρωτεϊνών, όπως οι νουκλεάσες που αποικοδομούν το DNA. Το ένζυμο παραμένει ενεργό κατά την παρουσία διάφορων χημικών ουσιών που αποδιατάσσουν πρωτεΐνες όπως το SDS.

**Φαινόλη:** αποδιατάσσει τις πρωτεΐνες και διαχωρίζει τα λιπίδια, τις πρωτεΐνες και τα νουκλεϊκά οξέα κατά την εκχύλιση του DNA. Το διάλυμα φαινόλης που χρησιμοποιείται είναι εξισορροπημένο σε pH >7 ώστε το DNA να κατανέμεται στην υπερκείμενη υδατική φάση. Η προσθήκη του χλωροφορμίου στην συνέχεια έχει ως στόχο τον καλύτερο διαχωρισμό των φάσεων λόγω μεγάλης πυκνότητας. Προκαλεί επίσης τη μετουσίωση των πρωτεϊνών και την απομάκρυνση της διαλυμένης φαινόλης από την υδατινή φάση. Η ισοαμυλική αλκοόλη μειώνει τον αφρό και σταθεροποιεί την ενδιάμεση φάση μεταξύ της υδατικής και της οργανικής, όπου συλλέγονται οι πρωτεΐνες.

**Χλωροφόρμιο [24:1 (v /v) chloroform - isoamyl alcohol]:** η προσθήκη του χλωροφορμίου έχει ως σκοπό τον καλύτερο διαχωρισμό των φάσεων λόγω μεγάλης πυκνότητας. Είναι ένας οργανικός, πτητικός παράγοντας που προκαλεί μετουσίωση

των πρωτεϊνών και συμβάλει στην απομάκρυνση της διαλυμένης φαινόλης από την υδατινή φάση. Η ισοαμυλική αλκοόλη σταθεροποιεί την ενδιάμεση φάση μεταξύ υδατικής και οργανικής στην οποία συγκεντρώνονται πρωτεΐνες.

**Ισοπροπανόλη-Παγωμένη αιθανόλη 70%:** το DNA κατακρημνίζεται με ισοπροπανόλη και στη συνέχεια ακολουθεί πλύση με αιθανόλη 70%. Το DNA, λόγω της ιονικής του φύσης, παραμένει αδιάλυτο στους συγκεκριμένους οργανικούς διαλύτες.

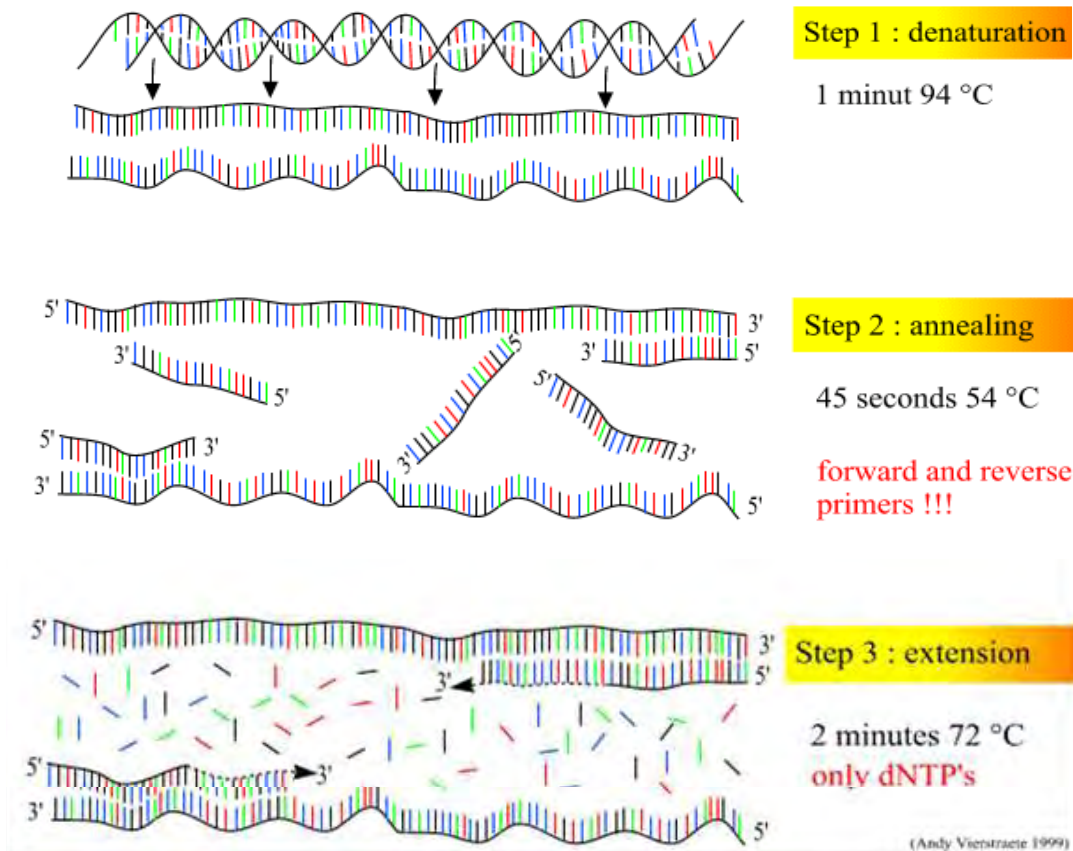
## **Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR)**

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) αναπτύχθηκε το 1983 από τον Kary Mullis και εφαρμόζεται για να ενισχύσει ένα τμήμα DNA που βρίσκεται ανάμεσα σε δυο περιοχές γνωστής αλληλουχίας. Δύο ολιγονουκλεοτίδια χρησιμοποιούνται ως εκκινητές (primers) για μια σειρά συνθετικών αντιδράσεων που καταλύονται από τη DNA πολυμεράση. Αυτά τα ολιγονουκλεοτίδια τυπικά έχουν διαφορετικές αλληλουχίες που είναι συμπληρωματικές των αλληλουχιών οι οποίες βρίσκονται στις απέναντι αλυσίδες δίκλωνου μορίου DNA. Αρχικά, το δίκλωνο DNA αποδιάσσεται σε υψηλή θερμοκρασία υπό την παρουσία περίσσειας από κάθε ένα από τα δύο ολιγονουκλεοτίδια και τεσσάρων τριφωσφονουκλεοτιδίων (dNTPs, 2'-deoxynucleoside 5'-triphosphate, dATP, dTTP, dCTP, dGTP). Το μείγμα της αντίδρασης ψύχεται σε θερμοκρασία που επιτρέπει την αναδιάταξη των ολιγονουκλεοτιδίων στις αλληλουχίες-στόχους. Οι αναδιαταγμένοι εκκινητές προεκτείνονται με τη δράση της DNA πολυμεράσης συμπληρωματικά με τη μία αλυσίδα του DNA στόχου (εικ. 16). Ο κύκλος της αποδιάταξης, αναδιάταξης και σύνθεσης του DNA επαναλαμβάνεται αρκετές φορές. Επειδή τα προϊόντα ενός κύκλου χρησιμεύουν ως μητρικά μόρια για τα επόμενα, κάθε κύκλος διπλασιάζει το ποσό του επιθυμητού προϊόντος DNA. Το μεγαλύτερο προϊόν αυτής της εκθετικής αντίδρασης είναι ένα τμήμα διπλής έλικας DNA του οποίου το τελευταίο άκρο ορίζεται από το 5'-τελικό άκρο των ολιγονουκλεοτιδίων και το μήκος του είναι η απόσταση ανάμεσα στους εκκινητές. Το μεγαλύτερο μήκος που πολλαπλασιάζεται δεν μπορεί να υπερβεί τις 1000-1300 βάσεις [91].



# PCR : Polymerase Chain Reaction

30 - 40 cycles of 3 steps :



Εικόνα 16: Τα τρία στάδια μιας τυπικής αντίδρασης PCR  
Πηγή: <http://users.ugent.be/~avierstr/principles/pcrsteps.gif>

## Taq Polymerase

Χρησιμοποιήθηκε η θερμοανθεκτική DNA πολυμεράση που απομονώνεται από το θερμόφιλο βακτήριο *Thermus aquaticus* (*Taq* DNA polymerase). Το ένζυμο εξυπηρετεί την παρατεταμένη επώαση στους 95°C, δεν καταστρέφεται στο στάδιο της αποδιάταξης και δε χρειάζεται να αντικαθίσταται σε κάθε κύκλο της αντίδρασης. Κάτω από τις συνηθισμένες συνθήκες, το ποσό της *Taq* πολυμεράσης περιορίζεται μετά από τους 25-30 κύκλους [91]. Οι πολυμεράσες έχουν πιθανότητα λάθους κατά την αντιγραφή του στόχου DNA. Η ακρίβεια αντιγραφής εξαρτάται από την πολυμεράση αλλά και από τις συνθήκες της αντίδρασης (συγκέντρωση dNTPs και ιόντων μαγνησίου, pH, θερμοκρασία).

## Primers

Τα ολιγονουκλεοτίδια έχουν μήκος 16-24 βάσεις και χρησιμοποιούνται στην PCR συνήθως σε συγκέντρωση 0,3-9 μM. Η παρουσία υψηλής συγκέντρωσης

ολιγονουκλεοτιδίων μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα την ενίσχυση μη-θεμιτών αλληλουχιών. Η PCR είναι μη αποδοτική όταν η συγκέντρωση των εκκινητών είναι περιορισμένη. Επίσης, τα προϊόντα της αντίδρασης εξαρτώνται από την ποιότητα και την καθαρότητα των εκκινητών. Τα dNTPs χρησιμοποιούνται σε κορεσμένη συγκέντρωση (200  $\mu$ M για κάθε dNTP) [92].

### **Mg<sup>++</sup>**

Η Taq πολυμεράση χρησιμοποιεί ιόντα Mg<sup>++</sup> ως μεταλλικό συμπράγοντα. Η συγκέντρωση των ιόντων μαγνησίου, που συνήθως προέρχονται από την προσθήκη χλωριούχου μαγνησίου, επηρεάζει τον υβριδισμό του εκκινητή, τη θερμοκρασία αποδιάταξης του DNA και των PCR προϊόντων, τη δημιουργία διμερών από τους εκκινητές, την εξειδίκευση των προϊόντων και τη δραστικότητα και πιστότητα της πολυμεράσης. Προϊόντα που δεν αντιστοιχούν στην αλληλουχία του στόχου DNA μπορούν να παραχθούν όταν η συγκέντρωση Mg<sup>++</sup> είναι υψηλή. Τα προϊόντα αυτά προκύπτουν γιατί το Mg<sup>++</sup> μπορεί να σταθεροποιεί το δίκλωνο DNA, με αποτέλεσμα να έχουμε τυχαίες προσκολλήσεις εκκινητών σε μη ομόλογα τμήματα του DNA. Αντίθετα, η χαμηλή συγκέντρωση μειώνει την απόδοση του PCR, γιατί το Mg<sup>++</sup>, ως συνένζυμο της πολυμεράσης, είναι απαραίτητο για την λειτουργία της. Η συγκέντρωση του χλωριούχου μαγνησίου πρέπει να είναι 0.5-2.5 mM. Η παρουσία EDTA ή άλλων χηλικών παραγόντων που δεσμεύουν Mg<sup>++</sup> στο διάλυμα των εκκινητών ή στο DNA μπορεί να διαταράξει την συγκέντρωση του μαγνησίου.

### **Buffer**

Το διάλυμα θα πρέπει να δημιουργεί ένα ιοντικό περιβάλλον για να διευκολύνεται η αναδιάταξη (annealing) του εκκινητή με το στόχο DNA, το οποίο παρέχεται από την παρουσία NaCl ή KCl. Εάν η συγκέντρωση των δύο αλάτων υπερβαίνει τα 50 mM, αναστέλλεται η δράση της Taq πολυμεράσης. Στο διάλυμα επίσης υπάρχει Tris-HCl σε συγκέντρωση 10-50mM με pH 8,3 (στους 20oC). Κατά την διάρκεια της αντίδρασης, όπου οι θερμοκρασίες φτάνουν έως τους 94oC, το pH κυμαίνεται μεταξύ 6,8 και 7,8. Τέλος στο διάλυμα υπάρχουν και σταθεροποιητές ενζύμου όπως ζελατίνη ή ορολευκωματίνη (bovine serum albumin-BSA) και μη ιοντικά απορρυπαντικά

### **dNTPs**

Νουκλεοτίδια που περιέχουν τριφωσφορικές ομάδες (Deoxyribonucleotide triphosphates) και προστίθενται από την Taq πολυμεράση στους εκκινητές για να αποτελέσουν το νεοσυντιθέμενο κλώνο. Είναι πολύ σημαντικό τα dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) να βρίσκονται σε ίσες συγκεντρώσεις καθώς ανακρίβεια στη

συγκέντρωση έστω και ενός dNTP αυξάνει δραματικά το βαθμό λανθασμένης ενσωμάτωσης.

Οι εφαρμογές της τεχνικής της PCR είναι οι ακόλουθες:

1. Παραγωγή ειδικών αλληλουχιών ενός κλωνοποιημένου διπλής έλικας μορίου DNA για τη χρήση του ως ανιχνευτή σε πειράματα υβριδισμού.
2. Παραγωγή ανιχνευτών ειδικών για μη-κλωνοποιημένα γονίδια από επίλεκτη ενίσχυση ενός εξειδικευμένου τμήματος cDNA.
3. Παραγωγή βιβλιοθήκης cDNA από μικρά ποσά mRNA.
4. Παραγωγή μεγάλων ποσών DNA για ανάλυση αλληλουχιών.
5. Αναλύσεις μεταλλάξεων.
6. Τυποποίηση βακτηρίων με βάση το αποτύπωμα DNA (DNA fingerprinting).

### Πρωτόκολλο PCR

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	STOCK ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ	ΟΓΚΟΙ
Μήτρα DNA	50 ng/μl	2 μl
Buffer A	10x	5 μl
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	1 μl
dNTPs	10 mM το καθένα	1 μl
Εκκινητής Forward	50 pmol/μl	1 μl
Εκκινητής Reverse	50 pmol/μl	1 μl
Taq DNA Polymerase	5 U/μl	0,2 μl
ddH <sub>2</sub> O		39 μl
<b>Συνολικός όγκος</b>		<b>50 μl</b>

## Πρόγραμμα PCR

95 °C : αποδιάταξη μήτρας/ενεργοποίηση Taq	4 min
95 °C : αποδιάταξη μήτρας	30 sec
50 °C : υβριδοποίηση εκκινητών	40 sec
72 °C : επέκταση εκκινητών	40 sec
72 °C : τελικό βήμα επέκτασης	10 min



35 κύκλοι

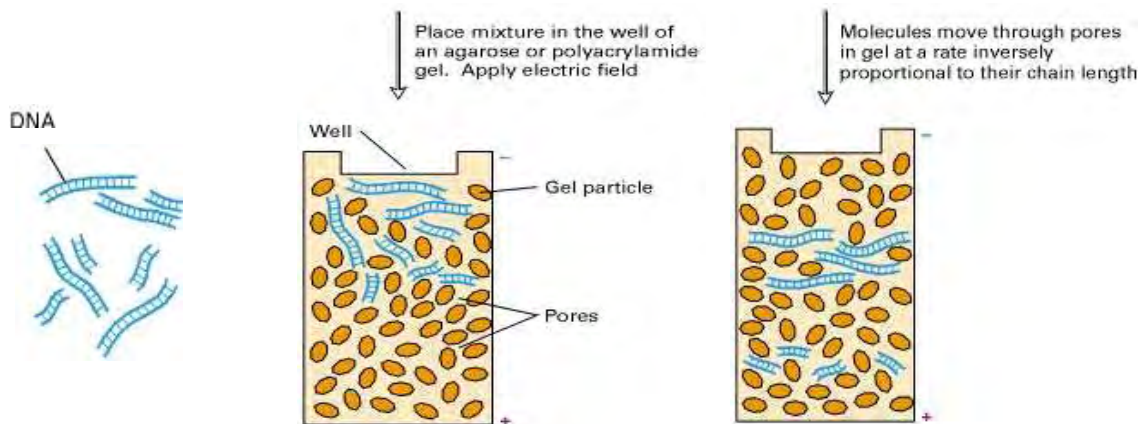
## Εκκινητές

Forward		Tm	Reverse		Tm
Val	5'-GTACTGGAAAGTGCACCTTGG-3'	58	5'-GGTTGTCTGGTAGTAAGG-3'	54	
Glu	5'-CCCACACTCAACAGAAACA-3'	55	5'-TTGCGTATTGGGGTCATTG-3'	55	
Arg	5'-GCCCTACAAACAACCTAACCT-3'	56	5'-AGTGAGATGGTAAATGCTAG-3'	54	
TA	5'-CGCTACTCCTACCTATCTCC-3'	60	5'-TTAGGGTGCTTAGCTGTTAAC-3'	57	
HSL	5'-CATCATTACCGGGTTTTTCCT-3'	56	5'-TGGTTATAGTAGTGTGCATG-3'	54	
IGM	5'-CCAGCATTCCCCCTCAAACC-3'	63	5'-TGGGCCAGGGGATTAATTA-3'	55	

## Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό τμημάτων DNA ανάλογα με το μέγεθος τους. Το μέγεθος των τμημάτων εκτιμάται με βάση κάποιο μάρτυρα γνωστών μοριακών μεγεθών τμημάτων DNA. Επομένως, αυτή η τεχνική μπορεί να μας βοηθήσει να οπτικοποιήσουμε το αποτέλεσμα της PCR. Τα μόρια του DNA είναι αρνητικά φορτισμένα σε ουδέτερο pH λόγω των φωσφορικών ομάδων. Ως αποτέλεσμα, θα κινούνται προς το θετικό ηλεκτρόδιο αν εφαρμόσουμε ηλεκτρικό πεδίο κατά τη διάρκεια της ηλεκτροφόρησης. Τα μικρότερα μόρια κινούνται

πιο εύκολα και άρα πιο γρήγορα από τα μεγαλύτερα μόρια, ούτως ώστε τα μόρια διαφορετικού μήκους να διαχωρίζονται (εικ. 17) [93].



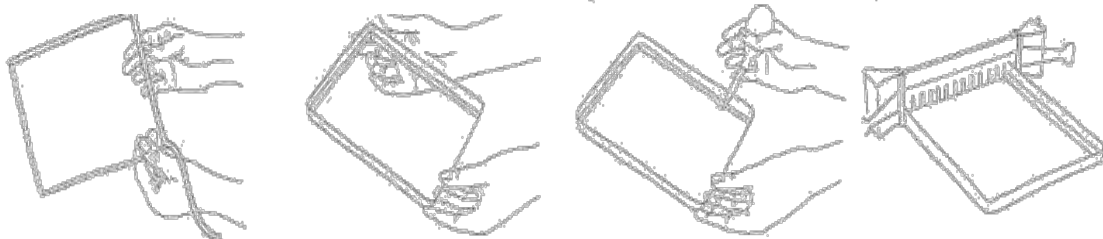
Εικόνα 17: Διαχωρισμός τμημάτων DNA διαφορετικού μήκους με ηλεκτροφόρηση σε πηκτική  
Πηγή: *Molecular Cell Biology*. 4th edition. Lodish H, Berk A, Zipursky SL, et al. New York: W. H. Freeman 2000.

### Παράγοντες που επηρεάζουν την κινητικότητα των μορίων DNA στο πήκτωμα αγαρόζης [94, 95]

- Το μοριακό βάρος του DNA
- Η συγκέντρωση της πηκτικής
- Η διαμόρφωση των μορίων
- Η προσθήκη χρωστικών
- Το εφαρμοζόμενο ηλεκτρικό πεδίο

### Παρασκευή πηκτώματος αγαρόζης

1. Σφραγίζουμε τις ανοιχτές πλευρές της πλαστικής θήκης με κολλητική ταινία, έτσι ώστε να σχηματίσουμε ένα καλούπι και κατόπιν τοποθετούμε τα χτενάκια.



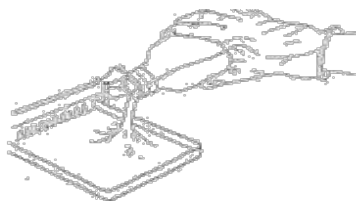
2. Προετοιμάζουμε επαρκές διάλυμα ηλεκτροφόρησης (συνήθως TAE 1x) για να γεμίσει η συσκευή ηλεκτροφόρησης και να φοιιάξουμε την πηκτική. Προσθέτουμε την κατάλληλη ποσότητα αγαρόζης σε σκόνη σε καθορισμένη ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης σε μια κωνική φιάλη. Είναι σημαντικό να χρησιμοποιούμε

το ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα τόσο στη συσκευή ηλεκτροφόρησης όσο και στην πηκτή. Μικρές διαφορές στο pH μπορεί να επηρεάσουν σε μεγάλο βαθμό την κινητικότητα των τμημάτων DNA.

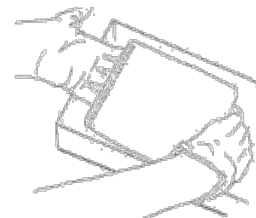
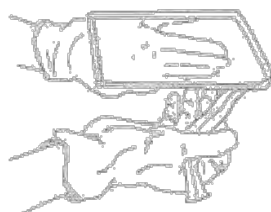
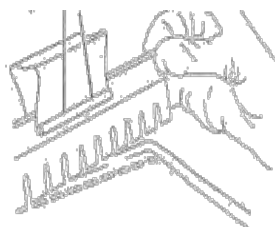
3. Ζεσταίνουμε το μείγμα σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρις ότου να διαλυθεί η αγαρόζη.

4. Τοποθετούμε την κωνική φιάλη κάτω από κρύο νερό προκειμένου να κρυώσει το διάλυμα και, αφού το μεταφέρουμε στον απαγωγό, προσθέτουμε βρωμιούχο αιθίδιο και ανακινούμε τη φιάλη μέχρι να αναμειχθεί.

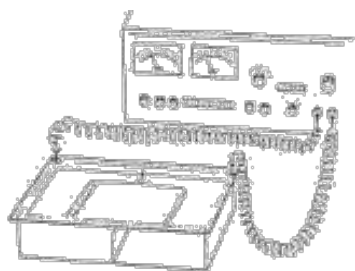
5. Ρίχνουμε το διάλυμα στο καλούπι και το αφήνουμε στον απαγωγό μέχρι να πήξει (~15min σε θερμοκρασία δωματίου).



6. Αφού πήξει το διάλυμα αφαιρούμε προσεκτικά τα χτενάκια και την κολλητική ταινία και τοποθετούμε το πήκτωμα στη συσκευή ηλεκτροφόρησης προσθέτοντας αρκετό διάλυμα ηλεκτροφόρησης ώστε να καλυφθεί. Ανακατεύουμε 5μl του δείγματος DNA με 3μl διάλυμα φόρτωσης (loading buffer) και ρίχνουμε το μείγμα στις υποδοχές του πηκτώματος με τη χρήση μιας πιπέτας. Τοποθετούμε επίσης μάρτυρα ο οποίος καθιστά ευκολότερο τον καθορισμό του μεγέθους τυχόν άγνωστου τμήματος DNA.



7. Κλείνουμε το καπάκι της συσκευής και συνδέουμε τα καλώδια με μια πηγή ηλεκτρικού ρεύματος έτσι ώστε τα μόρια του DNA να μεταναστεύσουν προς την άνοδο. Εφαρμόζουμε τάση 100-150 Volts. Λόγω της ηλεκτρόλυσης θα δημιουργηθούν φυσαλίδες στην άνοδο και την κάθοδο και τα δείγματα θα αρχίσουν να μεταναστεύουν από τα πηγαδάκια κατά μήκος του πηκτώματος.



Η παρουσία του βρωμιούχου αιθιδίου μας επιτρέπει να εξετάσουμε τα δείγματα σε οποιοδήποτε στάδιο κατά τη διάρκεια της ηλεκτροφόρησης. Αυτό το μόριο παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων του DNA. Ως αποτέλεσμα, όταν το πήκτωμα φωτίζεται με υπεριώδες φως, οι περιοχές που περιέχουν DNA και άρα αυξημένη συγκέντρωση βρωμιούχου αιθιδίου φθορίζουν πολύ πιο έντονα από τις περιοχές χωρίς DNA 9 (εικ. 18).

Τα διαλύματα που χρησιμοποιούνται για την τεχνική αυτή είναι τα εξής:

TAE 50x (500ml)	Loading buffer 6x (10ml)
Tris Base 121gr	Bromophenol blue 1% w/v 1ml
Acetic Acid 28,5ml	TBE 20x 0,5ml
EDTA 0,5M 50ml	Glycerol 5ml
ddH <sub>2</sub> O έως τα 500ml	ddH <sub>2</sub> O έως τα 10ml

Αρχικά παρασκευάζουμε διάλυμα TAE 1x αραιώνοντας το διάλυμα stock 50x (20ml σε τελικό όγκο 1lt). Για την προετοιμασία της πηκτής διαλύουμε 0,6gr αγαρόζης σε 40ml TAE 1x (τελική συγκέντρωση 2% w/v) και προσθέτουμε 4μl βρωμιούχου αιθιδίου (10mg/ml). Η συγκέντρωση της πηκτής αγαρόζης διαφοροποιείται ανάλογα με το μέγεθος των τμημάτων DNA που πρέπει να διαχωριστούν.



Εικόνα 18: Ηλεκτροφόρηση του PCR προϊόντος σε πηκτή αγαρόζης 2% w/v. Στο πρώτο πηγαδάκι φορτώνεται ο αρνητικός μάρτυρας. Η ανίχνευση γίνεται σε συσκευή που εκπέμπει υπεριώδες φως παρουσία βρωμιούχου αιθιδίου.

## **Ανάλυση Πολυμορφισμών Διαμόρφωσης Μονόκλωνου DNA (Single Strand Conformational Polymorphism, SSCP)**

Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης η οποία μας πιστοποιεί τον επιλεκτικό πολλαπλασιασμό του επιθημητού γονιδίου, πραγματοποιείται η ανάλυση πολυμορφισμών διαμόρφωσης μονόκλωνου DNA. Η μέθοδος αυτή περιγράφηκε για πρώτη φορά από τον Orita το 1989 [96] και είναι ικανή να ταυτοποιήσει παραλλαγές στην αλληλουχία ενός μονόκλωνου τμήματος DNA μήκους μεταξύ 150-250 νουκλεοτιδίων. Η γενική ιδέα είναι να αποδιατάξουμε το προϊόν της PCR και να το ηλεκτροφορήσουμε σε ένα μη-αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου. Κάτω από μη αποδιατακτικές συνθήκες, ένα μονόκλωνο τμήμα DNA θα αποκτήσει δευτεροταγή διαμόρφωση που εξαρτάται αποκλειστικά από την αλληλουχία του και θα είναι διαφορετική αν αλλάξει ακόμα και μία μόνο βάση. Η κινητικότητα του μονόκλωνου PCR προϊόντος εξαρτάται από τη δευτεροταγή δομή του. Ως εκ τούτου, PCR προϊόντα που φέρουν διαφορές στην αλληλουχία τους ακόμα και σε μία μόνο θέση καθώς και προσθήκες ή ελλείψεις θα παρουσιάζουν διαφορές στην κινητικότητα.

Το σημαντικότερο πλεονέκτημα της SSCP είναι ότι μπορούν να ελεγχθούν πολλά μεμονωμένα προϊόντα PCR ταυτόχρονα. Έτσι, μειώνεται το ποσό των δειγμάτων που στη συνέχεια αλληλουχούνται.

### **Παρασκευή πηκτώματος ακρυλαμίδης**

Σε ποτήρι ζέσεως παρασκευάζουμε το διάλυμα του πηκτώματος, ο όγκος του οποίου εξαρτάται από το πάχος των spacers που χρησιμοποιούμε για να φτιάξουμε το καλούπι. Χρησιμοποιώντας spacers των 2mm παρασκευάζουμε διάλυμα τελικού όγκου 125ml (62,5ml/gel). Οι τελικές συγκεντρώσεις των συστατικών του είναι:

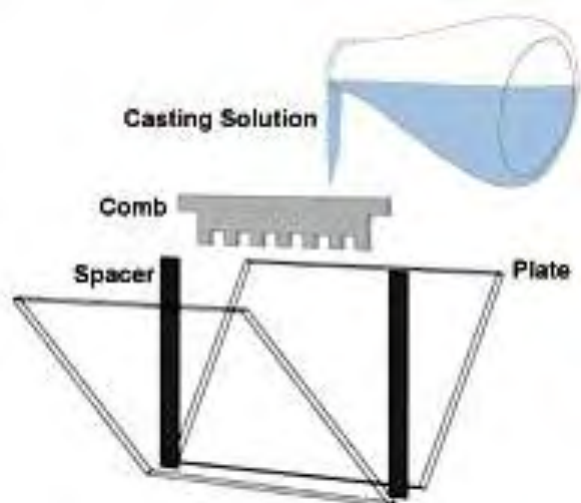


Διάλυμα Ακρυλαμίδης 10%	
Acrylamide	12,375gr
Bis-Acrylamide	0,330gr
TBE 10x	10ml
Glycerol 50x	12,50ml
APS 20%),	650μl
TEMED	125μl

Ανάλογα με το μέγεθος των τμημάτων DNA που θα ηλεκτροφορηθούν μπορούμε να φτιάξουμε πήκτωμα συγκέντρωσης 11% ή 12% w/v.

Αρχικά τοποθετούμε το ποτήρι ζέσεως με τις κατάλληλες ποσότητες ακρυλαμίδης, bis- ακρυλαμίδης, TBE και γλυκερόλης πάνω στο μαγνητικό αναδευτήρα όπου, με τη βοήθεια ενός μαγνήτη, διαλύονται σε ddH<sub>2</sub>O. Όταν το διάλυμα γίνει διαυγές, συμπληρώνουμε με ddH<sub>2</sub>O μέχρι τα 125ml και το μεταφέρουμε σε ογκομετρικό κύλινδρο φιλτράροντάς το με διηθητικό χαρτί. Στη συνέχεια, μεταφέρουμε το διάλυμα σε κωνική φιάλη και προσθέτουμε APS (που ξεκινάει τον πολυμερισμό) και TEMED (που καταλύει το σχηματισμό ελεύθερων ριζών από το APS).

Τοποθετούμε το διάλυμα στη συσκευή ηλεκτροφόρησης όπου και στερεοποιείται (εικ. 19).



Εικόνα 19: Το καλούπι όπου πήζει το διάλυμα της πολυακρυλαμίδης

Κατόπιν, ετοιμάζουμε τα δείγματα ως εξής: Σε 5μl προϊόντος PCR προσθέτουμε 10μl διαλύματος αποδιάταξης, αποδιατάσσουμε τα δείγματα με θέρμανση στους 92°C για 2min, στους 95°C για 2min ,στους 97°C για 7min και τα τοποθετούμε σε πάγο ώστε να διατηρηθεί η μονόκλωνη κατάσταση. Τοποθετούμε τα δείγματα στα πηγαδάκια και πραγματοποιούμε την ηλεκτροφόρηση στα 220V στους 4°C overnight (εικ. 20).



*Εικόνα 20: Τυπική συσκευή ηλεκτροφόρησης πηκτώματος πολυακρυλαμίδης*

Την επόμενη ημέρα πραγματοποιείται χρώση με διάλυμα νιτρικού αργύρου (Silver Staining), επωάζοντας το πηκτώμα διαδοχικά στα Διαλύματα I, II και III υπό ανάδευση. Στο Διάλυμα I πραγματοποιείται η σταθεροποίηση του DNA στο πηκτώμα. Η διαδικασία διαρκεί 3min με μία επανάληψη. Στο Διάλυμα II, πραγματοποιείται η σύνδεση του νιτρικού αργύρου με το DNA και η ανάδευση διαρκεί 20min ενώ στο Διάλυμα III γίνεται η αντίδραση της φορμαλδεΰδης παρουσία βάσης και η εμφάνιση των ζωνών. Η επώαση διαρκεί ~20min, μέχρι να εμφανιστούν οι ζώνες των δειγμάτων σε ικανοποιητικό βαθμό. Μεταξύ των διαλυμάτων γίνεται ξέπλυμα της πηκτής με απεσταγμένο νερό.

Διάλυμα I: 20ml αιθανόλης, 1ml οξικό οξύ. Προσθήκη H<sub>2</sub>O μέχρι τα 800ml.

Διάλυμα II: 400ml AgNO<sub>3</sub> 1gr/lt.

Διάλυμα III: 6gr NaOH, 0,02gr NaBH<sub>4</sub>, 2ml HCHO. Προσθήκη H<sub>2</sub>O μέχρι τα 400ml.

## Παρασκευή των αντιδραστηρίων

Τα stock διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση SSCP είναι τα εξής:

**0,5x TBE:** Παρασκευάζεται με αραιώση πυκνότερου διαλύματος 10x TBE (0,9M Trizma base, 0,9M βορικό οξύ, 20mM EDTA pH 8.0)

**APS:** Παρασκευάζεται ως διάλυμα 20% w/v

**Διάλυμα αποδιάταξης:** 95% φορμαμίδη, 10mM NaOH, 0,05% Bromophenol blue, 0,5% Xylene Cyanol

## Περιορισμοί της μεθόδου SSCP

Υπάρχουν τέσσερις σημαντικές μεταβλητές που πρέπει να ληφθούν υπόψη για το βέλτιστο σχεδιασμό της μεθόδου

- Το μέγεθος του μονόκλωνου τμήματος: Το βέλτιστο μήκος ενός μονόκλωνου τμήματος είναι ~ 150 - 200 νουκλεοτίδια. Σε αυτό το μέγεθος, το 70-90% των σημειακών υποκαταστάσεων μπορεί να γίνει εμφανές στην SSCP.
- Η επίδραση της θερμοκρασίας: Οι συνήθεις συνθήκες θερμοκρασίας για την SSCP είναι η θερμοκρασία δωματίου ή οι 4 ° C με 50 ή 100 ml/l γλυκερόλη.
- Η αποδιάταξη του PCR προϊόντος: Για λόγους ευκολίας, δεν πραγματοποιείται καθαρισμός στα δείγματα αλλά μπορεί να προκύψουν ψευδείς ζώνες αν ο αριθμός των κύκλων PCR είναι υπερβολικός ή αν υπάρχει περίσσεια εκκινητών που μπορεί να προσδεθούν σε μονόκλινα τμήματα. Η προσθήκη ισχυρών αποδιατακτικών όπως το φορμαμίδιο, το υδροξείδιο του νατρίου και η ουρία, μπορεί να βοηθήσει. Τα περισσότερα πρωτόκολλα περιλαμβάνουν θέρμανση του δείγματος, άμεση ψύξη σε πάγο και φόρτωμα σε μια συσκευή σε θερμοκρασία 4°C-25°C. Έχει προταθεί η ενσωμάτωση ενός ανώτερου στρώματος πηκτώματος με φορμαμίδιο για την αποδιάταξη του δείγματος, χωρίς όμως να μπορούμε να αποφύγουμε την επαναδιάταξη των κλώνων που θα προκύψει όταν τα μονόκλινα τμήματα εισέλθουν στο μη-αποδιατακτικό πήκτωμα.
- Τα χαρακτηριστικά του πηκτώματος: Η αναλογία ακρυλαμίδης/bis-ακρυλαμίδης (cross-linking) και το συνολικό ποσοστό ακρυλαμίδης καθορίζουν τη διαπερατότητα του πηκτώματος. Η αγωγιμότητα του ρυθμιστικού διαλύματος μπορεί επίσης να επηρεάσει την κινητικότητα των δειγμάτων όπως η θερμοκρασία και η γλυκερόλη. Ο Kukita [97] διαπίστωσε ότι η προσθήκη μειώνει το pH του ρυθμιστικού διαλύματος

ηλεκτροφόρησης με αποτέλεσμα αυξημένη ευαισθησία και σαφέστερα δεδομένα.

## Καθαρισμός PCR προϊόντος

Τα δείγματα που επελέγησαν με βάση τις διαφορές στην κινητικότητα τους καθαρίστηκαν στη συνέχεια με PureLink™ PCR Purification Kit προκειμένου να απομακρυνθούν εκκινητές, dNTPs, ένζυμα και άλατα.

### Διαδικασία

1. Αναμειγνύουμε 200μl Binding Buffer με το PCR προϊόν και το μεταφέρουμε σε μια στήλη PureLink™ Spin Column τοποθετημένη σε σωλήνα eppendorf του 1,5 ml.
2. Φυγοκεντρούμε για 1min στις 12.000 rpm σε θερμοκρασία δωματίου. Το DNA έχει προσδεθεί στη στήλη.
3. Απομακρύνουμε το υγρό και προσθέτουμε στη στήλη 650μl Wash Buffer για ξέπλυμα.
4. Φυγοκεντρούμε για 1min στις 12.000 rpm σε θερμοκρασία δωματίου. Απομακρύνουμε το υγρό και φυγοκεντρούμε ξανά για 2-3min στη μέγιστη ταχύτητα σε θερμοκρασία δωματίου.
5. Μεταφέρουμε τη στήλη σε καινούριο σωλήνα eppendorf του 1,5 ml.
6. Προσθέτουμε 50μl Elution Buffer στο κέντρο της στήλης και επωάζουμε για 1min σε θερμοκρασία δωματίου.
7. Φυγοκεντρούμε για 2min στη μέγιστη ταχύτητα σε θερμοκρασία δωματίου. Το καθαρισμένο DNA βρίσκεται τώρα στο σωλήνα eppendorf.

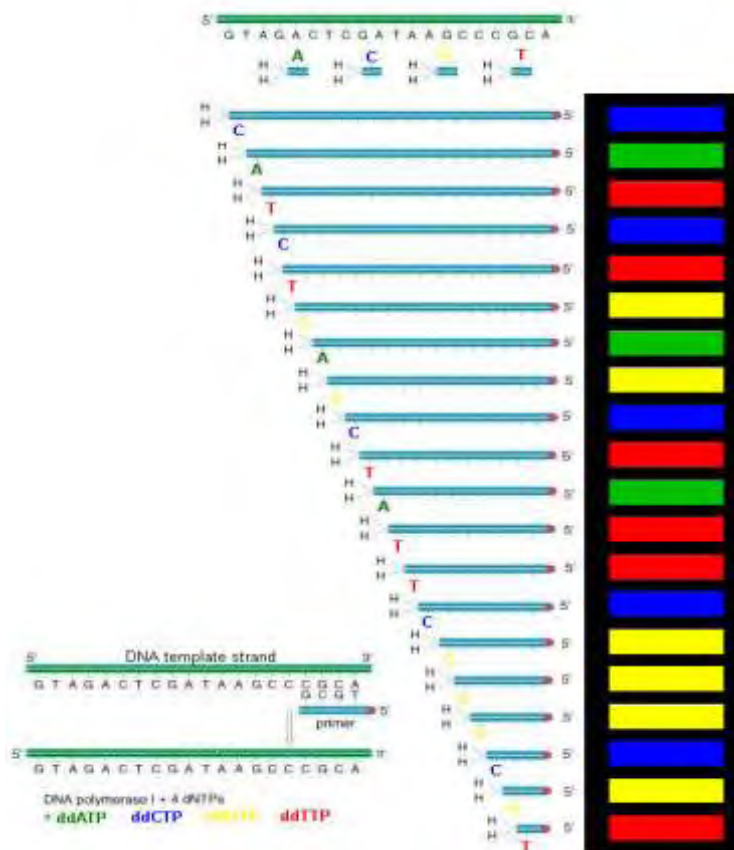
Για να βεβαιωθούμε ότι έχει πραγματοποιηθεί επιτυχώς ο καθαρισμός του DNA, πραγματοποιούμε ποιοτική και ποσοτική ανίχνευση. Ηλεκτροφορούμε 2μl από το δείγμα σε πηκτική αгарόζης πυκνότητας 2% w/v και φωτομετρούμε 1μl δείγματος διαλυμένο σε 49μl ddH<sub>2</sub>O.

Εφόσον πάρουμε ικανοποιητικά αποτελέσματα από τις μετρήσεις, στέλνουμε τα δείγματα για αλληλούχιση.

## Αυτοματοποιημένη αλληλούχιση

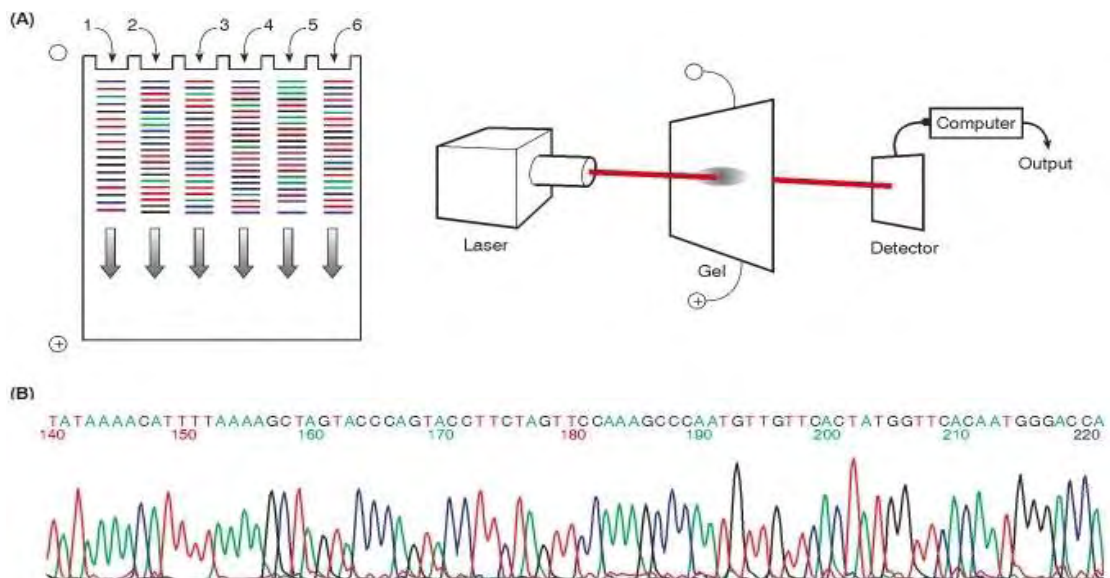
Για την αλληλούχιση ενός τμήματος DNA πραγματοποιείται μια σύνθετη αντίδραση τερματισμού. Η αντίδραση γίνεται παρουσία των τεσσάρων κανονικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs) σε σχετικά μεγάλη συγκέντρωση και τεσσάρων

διεοξυριβονουκλεοτιδίων (ddNTPs) σε μικρότερη ποσότητα (1% της συνολικής συγκέντρωσης νουκλεοτιδίων) τα οποία είναι σημασμένα το καθένα με διαφορετική φθορίζουσα χημική ομάδα. Έτσι, σχηματίζεται μείγμα προϊόντων τερματισμού που μπορεί να έχουν οποιαδήποτε από τις τέσσερις βάσεις στο 3' άκρο τους. Τα προϊόντα αυτά προκύπτουν από την ενσωμάτωση ενός ddNTP σε μια τυχαία θέση κατά τη σύνθεση. Οι φθορίζουσες χρωστικές συνδέονται στα ddNTPs με τρόπο που δεν εμποδίζει την DNA πολυμεράση να τα προσθέσει στη συμπληρωματική τους βάση στη μήτρα. Επειδή τα φωτεινά σήματα που εκπέμπονται από καθεμιά από τις χρωστικές διακρίνονται μεταξύ τους, μπορούν να γίνουν και οι τέσσερις αντιδράσεις τερματισμού των αλυσίδων ταυτόχρονα στο ίδιο σωληνάκι και να διαχωριστούν σε μία μόνο διαδρομή ενός πηκτώματος ή σε ένα τριχοειδές σωληνάκι μιας συσκευής αυτόματης αλληλούχισης. Τα τμήματα διαχωρίζονται ανάλογα με το μέγεθός τους (εικ. 21).

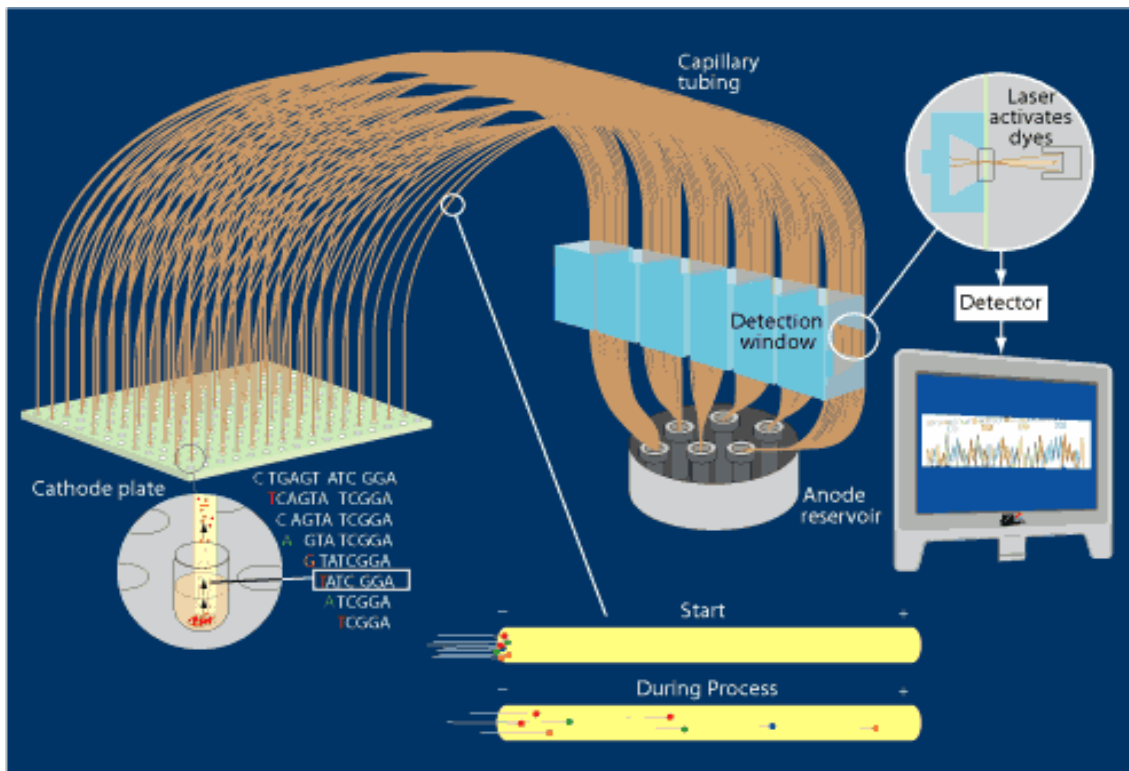


Εικόνα 21: Η αντιγραφή των μητρικών κλώνων DNA πραγματοποιείται με ένα μείγμα αντίδρασης που περιλαμβάνει τα τεσσάρων dNTPs και τέσσερα ddNTPs το καθένα σημασμένο με μια διαφορετική φθορίζουσα χρωστική ουσία (ddATP, ddCTP, ddGTP, και ddTTP). Η τυχαία ενσωμάτωση των σημασμένων ddNTPs παράγει μια σειρά από τμήματα DNA στα οποία η ανάπτυξη της αλυσίδας έχει τερματιστεί σε διαδοχικές θέσεις, καθεμία κατά ένα νουκλεοτίδιο μακρύτερη από την προηγούμενη. Ο διαχωρισμός των τμημάτων με βάση το μέγεθος παράγει μια κλίμακα αλληλουχιών ως μια σειρά από χρωματιστές ζώνες. Πηγή: Figure & text © 2010 by Steven M. Carr

Οι τέσσερις φθορίζουσες χρωστικές που χρησιμοποιούνται εκπέμπουν φωτεινή ακτινοβολία σε διαφορετικό μήκος κύματος. Συνεπώς, η ταυτότητα της βάσης στην οποία τερματίζεται η σύνθεση αντιστοιχεί στο χρώμα του ddNTP που έχει ενσωματωθεί στο 3' άκρο του. Τα φθοροσημασμένα τμήματα εντοπίζονται αυτόματα σε πραγματικό χρόνο κατά την ηλεκτροφόρηση, καθώς κάθε διαδοχικό τμήμα, μεγαλύτερο από το προηγούμενο κατά μία βάση, διέρχεται από το σύστημα ανίχνευσης του μηχανήματος αλληλούχισης που λειτουργεί με λέιζερ. Η χρωστική που έχει προσδεθεί σε κάθε ddNTP διέρχεται από το λέιζερ και εκπέμπει ένα χαρακτηριστικό σήμα. Κάθε σήμα αντιστοιχεί σε μία από τις τέσσερις διαφορετικές βάσεις και η ανίχνευσή του αποκαλύπτει την ταυτότητα της βάσης που υπάρχει στο άκρο όπου έχει τερματιστεί η σύνθεση της αλυσίδας. Ευαίσθητοι ανιχνευτές συλλέγουν τα σήματα αυτά, τα οποία στέλνονται σε έναν υπολογιστή για ανάλυση (εικ. 22, 23).



Εικόνα 22: (Α) Αρχές της αυτοματοποιημένης αλληλούχισης του DNA σε πήκτωμα: φόρτωση και των τεσσάρων προϊόντων της αντίδρασης σε λωρίδες του πηκτώματος ηλεκτροφόρησης και συλλογή των δεδομένων κατά τη διεξαγωγή της ηλεκτροφόρησης. Μια ακτίνα λέιζερ εστιάζει σε συγκεκριμένη σταθερή θέση του πηκτώματος. Καθώς τα τμήματα DNA διέρχονται από αυτή τη θέση, οι χρωστικές φθορίζουν. Ο μέγιστος φθορισμός εμφανίζεται σε διαφορετικά μήκη κύματος για τις τέσσερις χρωστικές. (Β) Παράδειγμα εξόδου DNA αλληλουχίας (χρωματογράφημα). Πηγή: Human Molecular Genetics. 2nd edition. Chapter 6, PCR, DNA sequencing and in vitro mutagenesis, NCBI Bookshelf, ID: NBK7580 PMID: 21089233



Εικόνα 23: Αυτοματοποιημένη αλληλούχηση του DNA σε τριχοειδή. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως διάγραμμα ηλεκτροφόρησης που δείχνει μια κορυφή για κάθε βάση. Από τα ύψη και τα πλάτη των κορυφών, καταχωρείται μια βαθμολογία Phred σε κάθε μεμονωμένη βάση. Υψηλή βαθμολογία Phred δείχνει μεγάλη βεβαιότητα ως προς την ταυτότητα της συγκεκριμένης βάσης. Πηγή: Joint Genome Institute, [jgi.doe.gov](http://jgi.doe.gov)

Ωστόσο, τα σήματα που ανιχνεύονται δεν αντιστοιχούν σε ομοιόμορφες κορυφές έντασης φωτός και δεν κατανέμονται σε ίσες αποστάσεις μεταξύ τους. Ένα υπολογιστικό πρόγραμμα, που ονομάζεται Phred, χρησιμοποιείται για την ταυτοποίηση των βάσεων σε κάθε προϊόν τερματισμού κατά τη συλλογή των σημάτων. Ο αλγόριθμος Phred υπολογίζει ένα δείκτη εμπιστοσύνης (probability score) για κάθε θέση της αλληλουχίας που ταυτοποιείται, δηλαδή παράγει ένα μέτρο της βεβαιότητας με την οποία γίνεται η ανάγνωση της κάθε βάσης. Η μέθοδος της αυτοματοποιημένης αλληλούχησης σε τριχοειδή είναι εξέλιξη της μεθόδου Sanger [98].

# ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ



Για την εξαγωγή των αποτελεσμάτων ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία:

1. Απομόνωση πυρηνικού και μιτοχονδριακού DNA από δείγματα ολικού αίματος ασθενών και υγιών ατόμων.
2. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αгарόζης 1% w/v για την ποιοτική ανίχνευση του απομονωμένου DNA.
3. PCR με κατάλληλους εκκινητές για την ενίσχυση των μιτοχονδριακών γονιδίων που κωδικοποιούν για τα tRNA της συστοιχίας HSL (His, Ser, Leu-UUR), της Val, του Glu, της συστοιχίας IGM (Ile, Gln, Met) και του CO1.
4. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αгарόζης 2% w/v για την ποιοτική ανίχνευση του PCR προϊόντος.
5. Ανάλυση SSCP για την κατάταξη των δειγμάτων σε πρότυπα ανάλογα με την ηλεκτροφορητική τους κινητικότητα.
6. Αλληλούχηση των δειγμάτων που παρουσίασαν διαφορετικό πρότυπο στην ανάλυση SSCP.

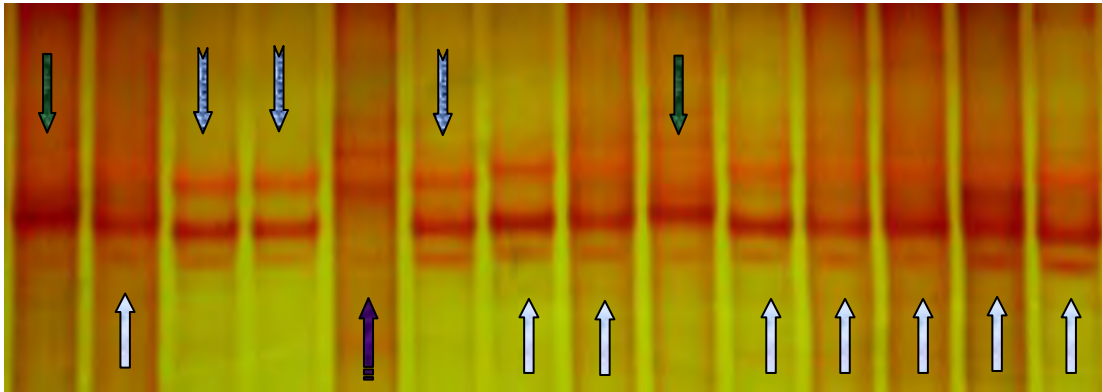
Τα αποτελέσματα που προέκυψαν μετά από αυτή τη διαδικασία ήταν τα εξής:

Genetic loci	Nucleotide change	Alzheimer	Control
tRNA Leu/CO1	A12308G/C7028T	10/50	24/142
tRNA His	T12189C	5/50	1/142
tRNA Val	T1658C	---	1/142
tRNA Glu	---	---	---
tRNA Gln	T4336C	1/50	3/142
tRNA Ile	A4310G+C4312T	---	1/142+1/142

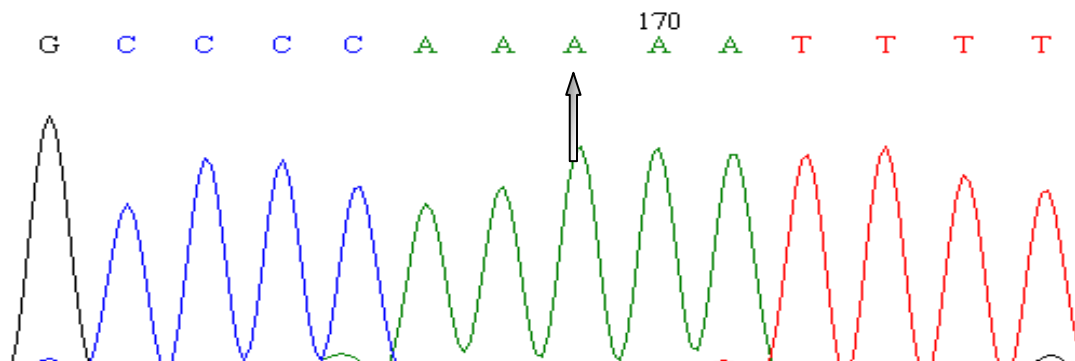
Παρατίθενται εικόνες από τα πηκτώματα πολυακρυλαμίδης της ανάλυσης SSCP και των χρωματογραφημάτων που προέκυψαν από την αλληλούχηση των προϊόντων της PCR.

Ενδεικτικά παρουσιάζονται τα δείγματα A24-A37 τα οποία προέρχονται από ασθενείς με Alzheimer. Από την ανάλυση SSCP προκύπτουν τέσσερα διαφορετικά πρότυπα για τη συστοιχία HSL: A24/A32, A25/A30/A31/A33-A37, A26/A27/A29 και το A28. Μετά την αλληλούχιση και την εξέταση των χρωματογραφημάτων καταλήξαμε σε δύο διαφορετικούς πολυμορφισμούς, τον A12308G στα δείγματα A24/A32 και τον T12189C στα δείγματα A26-A29. Τα υπόλοιπα δείγματα έφεραν την πρότυπη αλληλουχία σύμφωνα με την GeneBank.

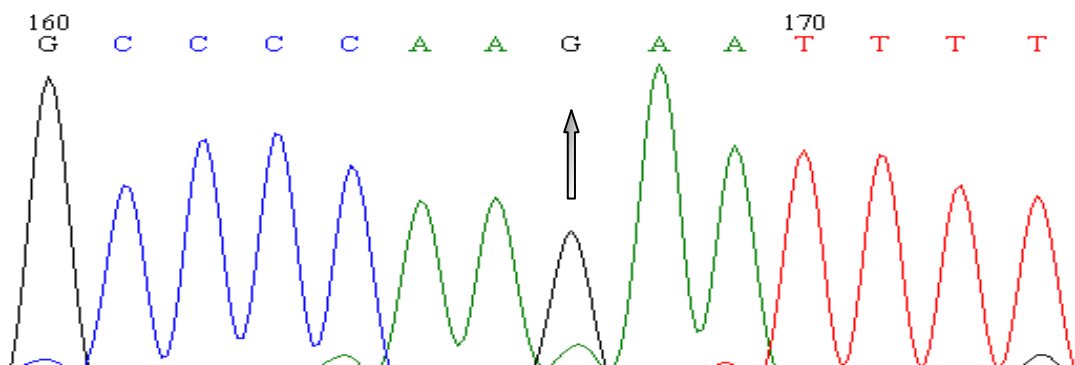
**A24 A25 A26 A27 A28 A29 A30 A31 A32 A33 A34 A35 A36 A37**



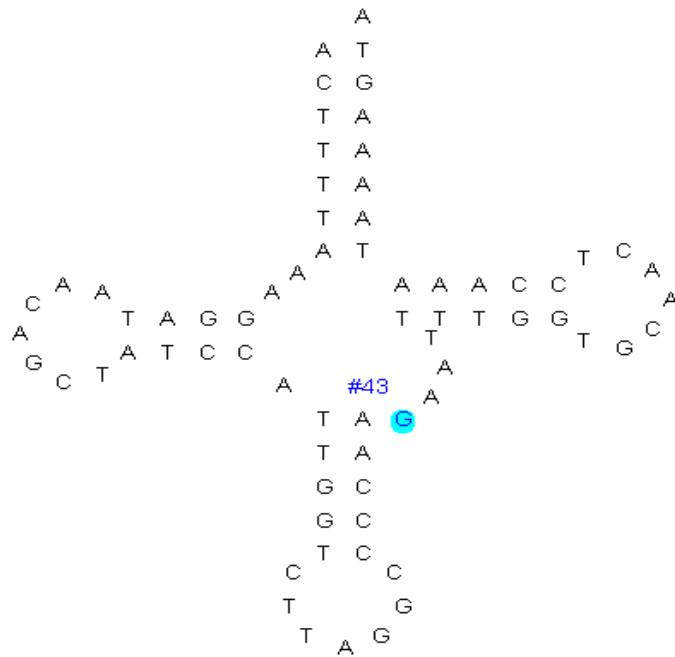
**tRNA Leu**



Πρότυπη αλληλουχία του γονιδίου tRNA<sup>Leu</sup>

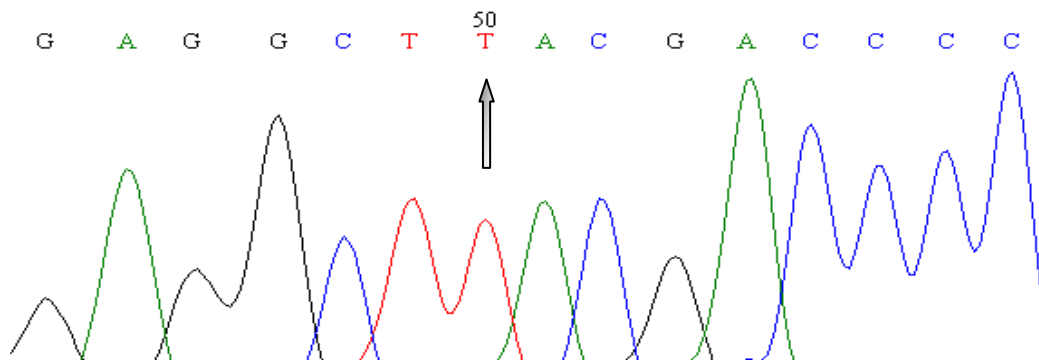


Αλληλουχία που φέρει τον πολυμορφισμό A>G στο γονίδιο tRNA<sup>Leu</sup>

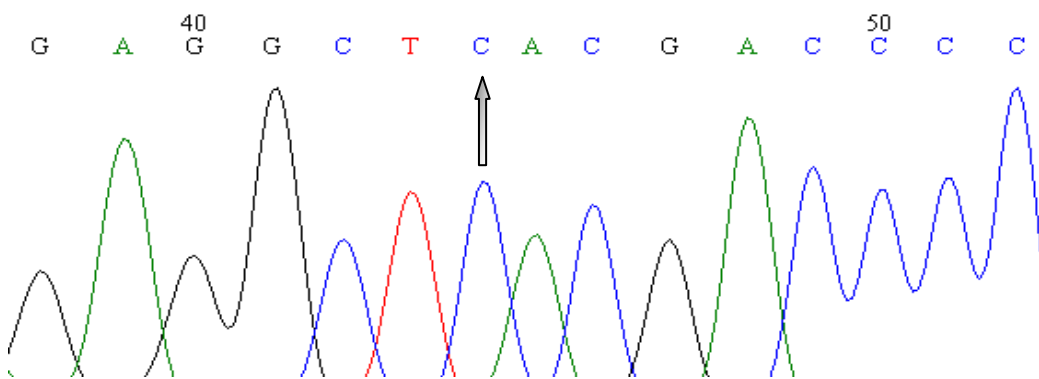


Ο πολυμορφισμός A>G εντοπίζεται στο μεταβλητό βρόχο του tRNA<sup>Leu</sup>

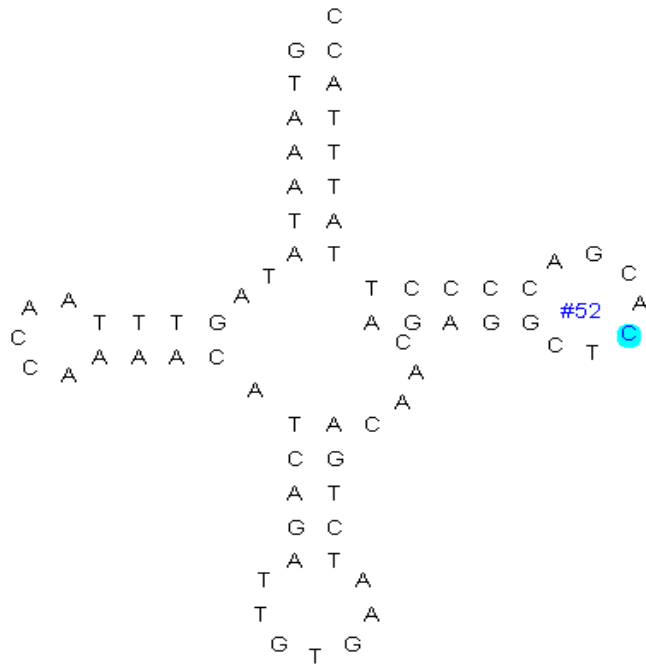
### tRNA His



Πρότυπη αλληλουχία του γονιδίου tRNA<sup>His</sup>

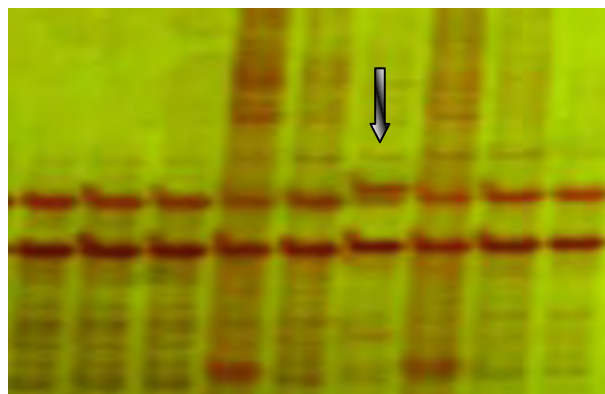


Αλληλουχία που φέρει τον πολυμορφισμό T>C στο γονίδιο tRNA<sup>His</sup>

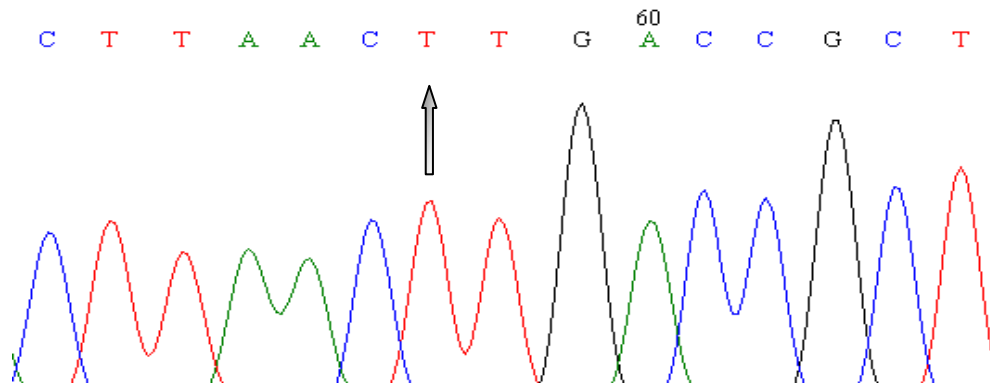


Ο πολυμορφισμός T>C εντοπίζεται στον ΤψC βρόχο του tRNA<sup>His</sup>

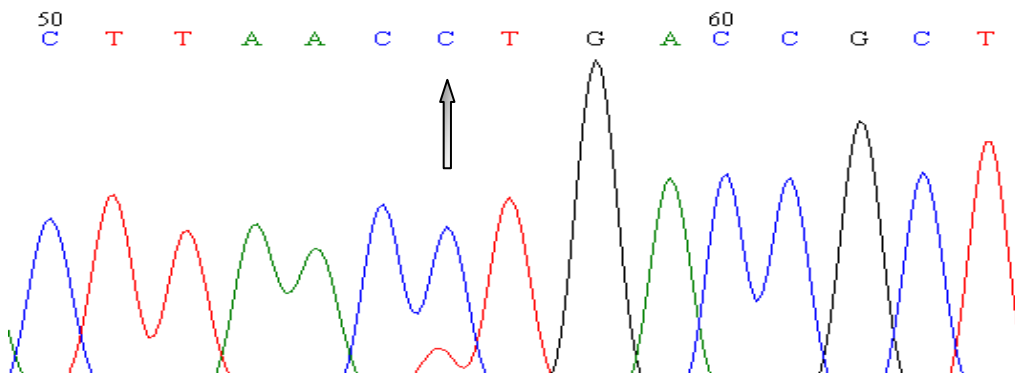
Τμήμα του πηκτώματος πολυακρυλαμίδης όπου ηλεκτροφορήθηκαν τα PCR προϊόντα του tRNA της Val για ανάλυση SSCP. Φαίνεται το διαφορετικό ηλεκτροφορητικό πρότυπο του δείγματος. Τα χρωματογραφήματα της αλληλούχισης επιβεβαιώνουν τον πολυμορφισμό.



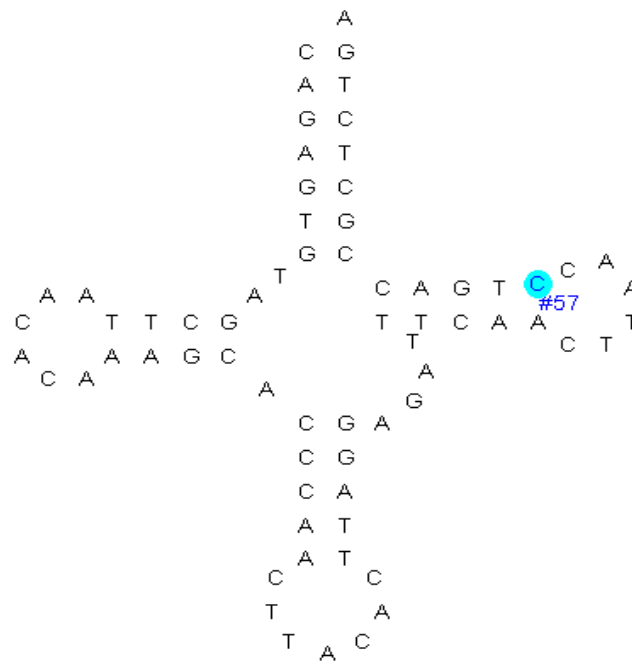
## tRNA Val



Πρότυπη αλληλουχία του γονιδίου tRNA<sup>Val</sup>

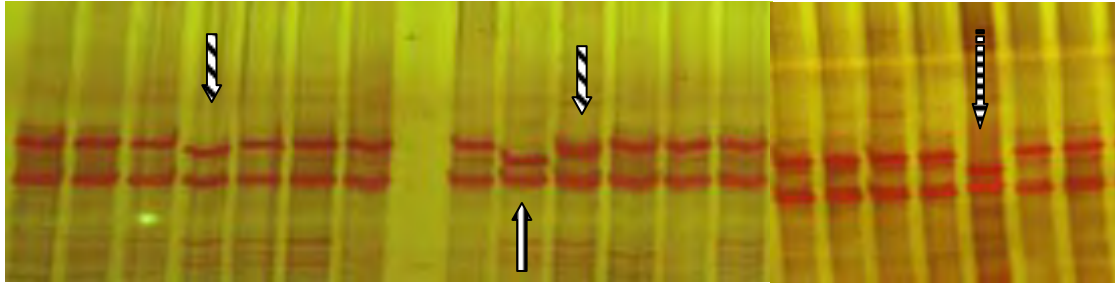


Αλληλουχία που φέρει τον πολυμορφισμό T>C στο γονίδιο tRNA<sup>Val</sup>

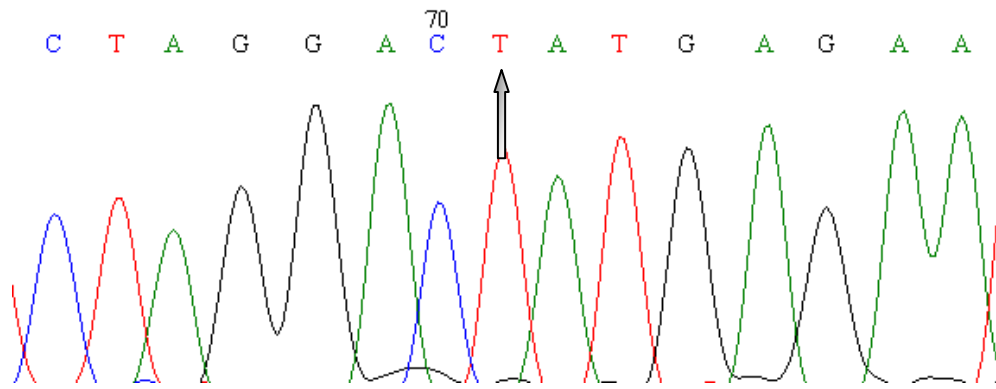


Ο πολυμορφισμός T>C εντοπίζεται στον T-βραχίονα του tRNA<sup>Val</sup>

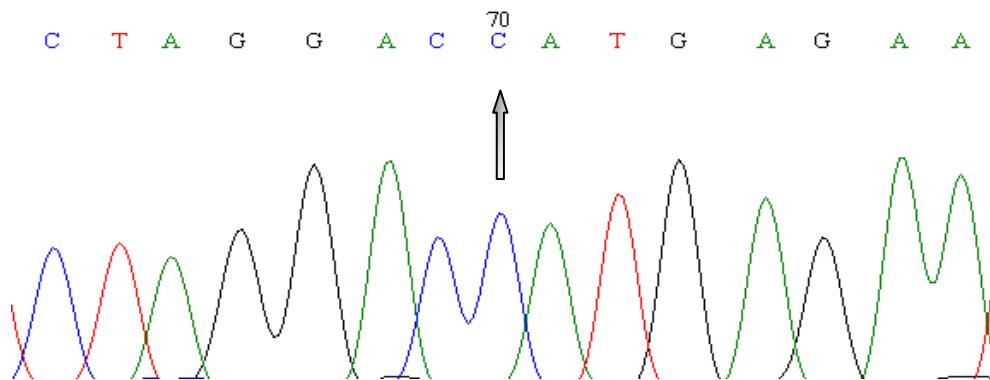
Τμήματα των πηκτωμάτων πολυακρυλαμίδης όπου ηλεκτροφορήθηκαν τα PCR προϊόντα των tRNA της συστοιχίας IGM για ανάλυση SSCP. Φαίνονται τα διαφορετικά ηλεκτροφορητικά πρότυπα των δειγμάτων. Τα χρωματογραφήματα της αλληλούχησης επιβεβαιώνουν τους πολυμορφισμούς.



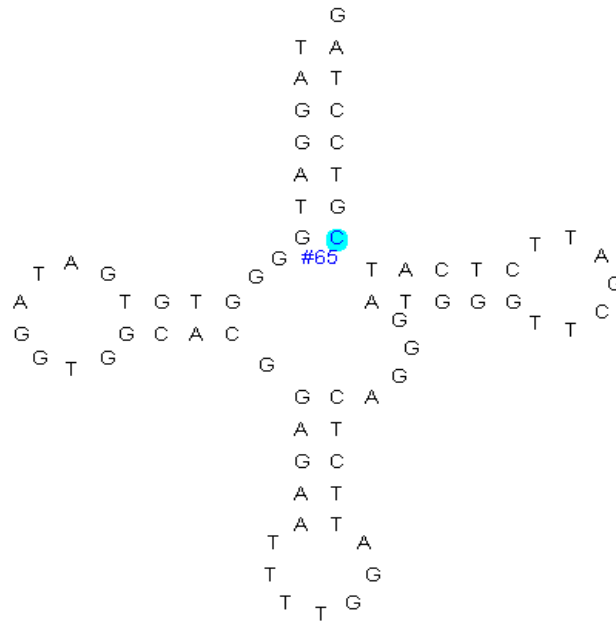
**tRNA Gln**



Πρότυπη αλληλουχία του γονιδίου tRNA<sup>Gln</sup>

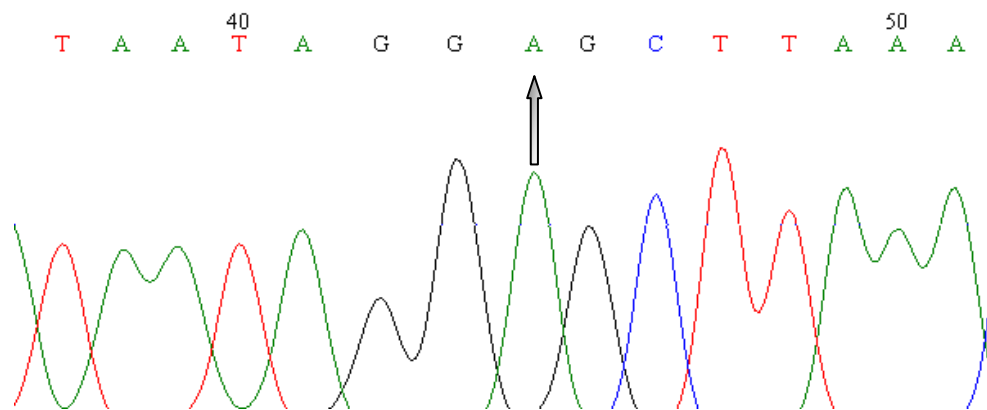


Αλληλουχία που φέρει τον πολυμορφισμό T>C στο γονίδιο tRNA<sup>Gln</sup>

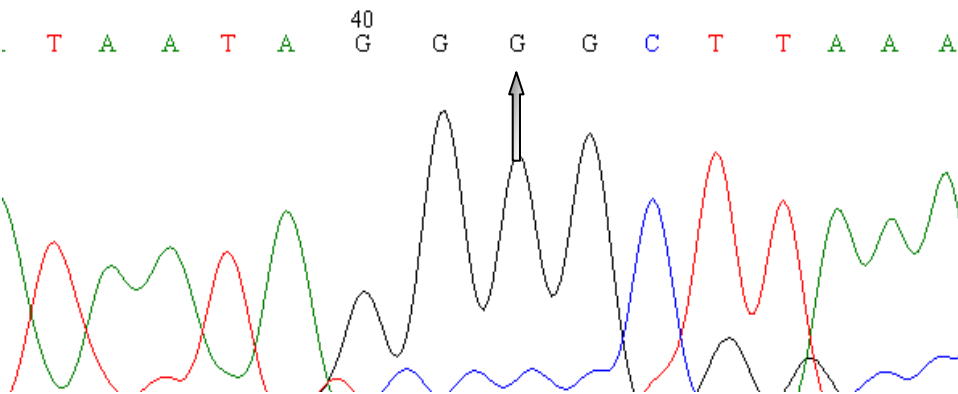


Ο πολυμορφισμός T>C βρίσκεται στο βρόχος του αντικωδικονίου του tRNA<sup>Gln</sup>

### tRNA Ile



Πρότυπη αλληλουχία του γονιδίου tRNA<sup>Ile</sup>



Αλληλουχία που φέρει τον πολυμορφισμό A>G στο γονίδιο tRNA<sup>Ile</sup>

# ΣΥΖΗΤΗΣΗ



Συνοψίζοντας λοιπόν, οι περισσότερες μορφές της σποραδικής όψιμης έναρξης AD έχουν σύνθετη αιτιολογία που περιλαμβάνει περιβαλλοντικούς και γενετικούς παράγοντες οι οποίοι μεμονωμένα δεν επαρκούν για να αναπτύξουν τη νόσο. Επί του παρόντος ο σημαντικότερος παράγοντας κινδύνου αναγνωρίζεται το αλληλόμορφο ε4 της απολιποπρωτεΐνης E (ApoE 4). Ωστόσο, στην πλειονότητα των ασθενών, οι τυχαίοι παράγοντες παραμένουν άγνωστοι. Η οξειδωτική βλάβη και η δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων έχει εμπλακεί ευρέως στην παθογένεια της AD διότι, όπως φαίνεται και σε πειραματόζωα, εμφανίζεται νωρίς στον εγκέφαλο πριν από την εμφάνιση γεροντικών πλακών. Υπάρχουν σοβαρές αποδείξεις των μορφολογικών, βιοχημικών και μοριακών ανωμαλιών στα μιτοχόνδρια σε διάφορους ιστούς των ασθενών με AD.

Τα μιτοχόνδρια είναι βασικοί ρυθμιστές της επιβίωσης και του θανάτου των κυττάρων και η δυσλειτουργία του μεταβολισμού της ενέργειας οδηγεί σε μειωμένη παραγωγή ATP, μειωμένη ρύθμιση του ασβεστίου και αυξημένη παραγωγή των δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) [99].

Το mtDNA είναι ιδιαίτερα ευαίσθητο στην οξειδωτική βλάβη. Λόγω της εγγύτητάς του με την πηγή των ROS (αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων) και της απουσίας μηχανισμών επιδιόρθωσης παρουσιάζει υψηλό ρυθμό μετάλλαξης. Η συσσώρευση των mtDNA μεταλλάξεων επιδυνώνει τη φυσιολογική γήρανση, οδηγεί σε οξειδωτική βλάβη, προκαλεί ανεπάρκεια ενέργειας και αυξημένη παραγωγή ROS, δημιουργώντας ένα φαύλο κύκλο. Ο εγκέφαλος είναι ιδιαίτερα ευάλωτος στην οξειδωτική βλάβη λόγω της υψηλής περιεκτικότητάς του σε ακόρεστα λιπαρά οξέα, την υψηλή κατανάλωση οξυγόνου και τη σχετική έλλειψη αντιοξειδωτικών ενζύμων σε σύγκριση με άλλα όργανα [100]. Η βλάβη που προκαλείται από τις ROS θεωρείται γενικά ως αιτιολογικός παράγοντας στη νευρωνική εκφύλιση και έχει αναφερθεί σε πολλές νευροεκφυλιστικές ασθένειες [101].

Επιπλέον, το οξειδωτικό στρες και η υπερφόρτωση με ασβέστιο μπορούν να ευνοήσουν τη διάνοιξη του mPTP με αποτέλεσμα την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c και την επαγωγή απόπτωσης από κασπάσες που οδηγεί στο νευρωνικό θάνατο [102].

Εκτός από σωματικές μεταλλάξεις, το mtDNA χαρακτηρίζεται, επίσης, από γενετικούς πολυμορφισμούς. Εικάζεται ότι οι πολυμορφισμοί μπορεί να προκαλέσουν μικρές διαφορές στις πρωτεΐνες της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης και υπερπαραγωγή ελεύθερων ριζών. Αυτό θα μπορούσε να προδιαθέτει ένα άτομο, ή ένα πληθυσμό που μοιράζεται τον ίδιο γονότυπο μιτοχονδριακού DNA, σε εμφάνιση του παθολογικού φαινότυπου. Οι κοινοί mtDNA πολυμορφισμοί ορίζουν μια ποικιλία μιτοχονδριακών γονοτύπων ειδικών για κάθε ήπειρο, που ονομάζονται απλοομάδες. Στην Ευρώπη,

έχουν προσδιοριστεί εννέα διαφορετικές μιτοχονδριακές απλοομάδες (H, I, J, K, T, U, V, W, X).

Ωστόσο, ο μηχανισμός με τον οποίο δρουν οι απλοομάδες είναι είναι κάθε άλλο παρά σαφής [103]. Οι μελέτες που έχουν γίνει πάνω στη συμμετοχή συγκεκριμένων γενετικών πολυμορφισμών σε νευροεκφυλιστικές ασθένειες αναφέρουν αντικρουόμενα δεδομένα. Υπάρχουν πολλά αποδεικτικά στοιχεία που δείχνουν ότι τα μιτοχόνδρια έχουν κεντρικό ρόλο στις νευροεκφυλιστικές ασθένειες που σχετίζονται με την ηλικία αλλά είναι ακόμη υπό συζήτηση αν το οξειδωτικό στρες και η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία εμπλέκονται στην έναρξη και την εξέλιξη αυτών των διαταραχών ή είναι απλώς συνέπεια της νευροεκφύλισης.

Ένα από τα σημαντικότερα και συνηθέστερα κριτήρια για τον καθορισμό του αν μια μετάλλαξη του DNA είναι αιτιώδης σε μια ασθένεια ή είναι πολυμορφισμός είναι ο έλεγχος της μετάλλαξης σε πληθυσμούς ελέγχου. Η παθολογική σημασία των μεταλλάξεων του DNA γενικά αποκλείεται όταν η μετάλλαξη εντοπίζεται στο γενικό πληθυσμό. Ωστόσο, mtDNA μελέτες έχουν δείξει ότι οι περισσότερες mtDNA παραλλαγές είναι ήπειρο-ειδικές, και ότι ορισμένες παραλλαγές και απλοομάδες μπορούν να είναι εξαιρετικά κοινές σε ορισμένους πληθυσμούς και εντελώς απύσες σε άλλες εθνικές ομάδες. Κατά συνέπεια, η εφαρμογή του παρόντος κριτηρίου για τις mtDNA μελέτες ασθένειας απαιτεί οι πληθυσμοί ελέγχου να ταιριάζουν με ακρίβεια εθνικά με το εθνικό υπόβαθρο των ασθενών.

ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΠΟΥ ΦΕΡΟΥΝ ΜΙΑ ΜΟΝΟ ΜΕΤΑΛΛΑΞΗ									
✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	tRNA Gly T10007C	✓	✓
✓	✓	✓	NC7 T8200C	✓	✓	✓	✓	✓	✓
✓	✓	✓	NC7 G8292A	✓	✓	✓	✓	✓	✓
✓	✓	✓	NC7 G8251A	✓	✓	✓	✓	✓	✓
✓	✓	✓	NC7 G8251A	✓	✓	✓	✓	✓	✓
✓	✓	✓	NC7 ins8277 (4C)	✓	✓	✓	✓	✓	✓
✓	✓	✓	✓	tRNA Thr A15924G	✓	✓	✓	✓	✓
✓	✓	✓	✓	tRNA Thr C15904T	✓	✓	✓	✓	✓
✓	✓	✓	✓	NC10 A15954C	✓	✓	✓	✓	✓
✓	✓	✓	✓	✓	D-loop ins568- 572 (3C)	✓	✓	✓	✓
✓	✓	✓	✓	✓	D-loop ins568- 572 (3C)	✓	✓	✓	✓
✓	✓	✓	✓	✓	✓	tRNATrp A5558G	✓	✓	✓
✓	tRNA Cys G5772A	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	tRNA Leu A12308G
✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	ND3 A10398G	✓
✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	ND3 A10398G	✓
✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	ND3 A10398G	✓
✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	ND3 A10398G	✓
✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	ND3 A10398G	✓
ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΠΟΥ ΦΕΡΟΥΝ ΔΥΟ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ									
tRNA Gln T4336C	✓	✓	✓	✓	12S rRNA T721C	✓	✓	✓	✓

√	√	16S rRNA T3197C	√	√	D-loop ins568- 572 (3C)	√	√	√	√
√	√	√	NC7 G8292A	√	√	√	√	√	tRNA His T12189C
√	√	√	NC7 G8292A	√	√	√	√	√	tRNA His T12189C
√	√	√	NC7 G8292A	√	√	√	√	√	tRNA His T12189C
√	√	√	NC7 A8271G	tRNA Thr G15928A	√	√	√	√	√
√	√	√	NC7 G8292A	√	√	√	√	√	tRNA His T12189C
√	√	√	√	NC10 A15954C	√	√	√	√	tRNA Leu A12308G
√	√	√	√	tRNA Thr G15928A	√	√	√	ND3 A10398G	√
√	√	√	√	tRNA Thr C15946T	√	√	√	ND3 A10398G	√
<b>ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΠΟΥ ΦΕΡΟΥΝ 4 / 5 ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ</b>									
√	√	ND1 G3337A	√	tRNA Thr C15946T	√	√	√	ND3 A10398G	tRNA Leu A12308G
√	√	ND1 T3336C	√	√	12S rRNA T669C D-loop ins568- 573 (5C)	√	ND3 C10128T	ND3 A10398G	√
√	√	√	NC7 G8251A	tRNA Thr A15924G	D-loop ins568- 572 (3C)	√	tRNA Gly T10034C	ND3 A10398G	√

### Μεταλλάξεις στο mtDNA με αναφορές των σχετιζόμενων ασθενειών

MITOMAP	Locus	Disease	Allele	RNA
	MT-TL	CPEO / Stroke / CM / Breast & Renal & Prostate Cancer Risk / Altered brain pH	A12308G	tRNA Leu (CUN)
	MT-TH	-	-	-
	MT-TV	-	-	-
	MT-TQ	ADPD/Hearing Loss & Migraine	T4336C	tRNA Gln
	MT-TI	-	-	-
	MT-TI	-	-	-

### Πολυμορφισμοί στο mtDNA

MITOMAP	Locus	Nucleotide Position	Nucleotide Change	Amino Acid Change
	MT-TL	12308	A-G	noncoding
	MT-TH	12189	T-C	noncoding
	MT-TV	-	-	-
	MT-TQ	4336	T-C	noncoding
	MT-TI	4310	A-G	noncoding
	MT-TI	4312	C-T	noncoding

Για τα τους ασθενείς και τα άτομα από την ομάδα ελέγχου που παρουσίασαν πολυμορφισμούς στα tRNA<sup>Leu</sup>/CO1 και tRNA<sup>His</sup> πραγματοποιήθηκε ανάλυση με Fisher's exact test για να ελεγχθεί η στατιστική σημαντικότητα των αποτελεσμάτων. Οι τιμές p-Value που προέκυψαν ήταν  $p = 0.668$  και  $p = 0.005$  αντίστοιχα. Όσον αφορά στη στατιστική σημαντικότητα των πολυμορφισμών A<G και C<T στις θέσεις 12308 και 7028 του tRNA<sup>Leu</sup> και του γονιδίου CO1, αντίστοιχα, φαίνεται πως δεν μπορεί να γίνει αποδεκτή εφόσον  $p = 0.668 \gg p = 0.05$ . Αυτό σημαίνει ότι οι ομοιότητες που παρατηρήθηκαν μεταξύ ασθενών και ομάδας ελέγχου για αυτούς τους πολυμορφισμούς πρέπει να αποδοθούν στην τύχη. Συνεπώς, δε θα ήταν αυθαίρετο να συμπεράνουμε ότι η απλοομάδα U όχι μόνο δε σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο για AD αλλά θα μπορούσε ενδεχομένως να δρα προστατευτικά. Για τον πολυμορφισμό T12189C που βρέθηκε στο tRNA<sup>His</sup> μπορούμε με βάση την τιμή p-Value του να πούμε

ότι υπάρχει μόνον 0.5% πιθανότητα αυτό το αποτέλεσμα να παρατηρηθεί κατά τύχη σε τυχαία δειγματοληψία από όμοιους πληθυσμούς. Μπορούμε λοιπόν με τα δεδομένα της τρέχουσας έρευνας να κατατάξουμε αυτόν τον πολυμορφισμό, που δεν έχει αναφερθεί ξανά ως μετάλλαξη (MITOMAP), ως εν δυνάμει παθογόνο σε συνδιασμό πάντα με συσσώρευση άλλων μιτοχονδριακών μεταλλάξεων.

Τέλος, καθώς η έρευνα πάνω στις μεταλλάξεις στα μιτοχονδριακά γονίδια των tRNAs συνεχίζεται με περισσότερα δείγματα ασθενών με AD και υγιών ατόμων στο εργαστήριο Γενετικής, Συγκριτικής & Εξελικτικής Βιολογίας του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, θα είμαστε σύντομα σε θέση να εξάγουμε ακόμα πιο αξιόπιστα και εμπειριστατωμένα αποτελέσματα επί του θέματος.

# **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

- [1] 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. DOI:10.1016/S0197-4580(98)00052-9. PMID 9661992
- [2] Brookmeyer R, Gray S, Kawas C (September 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. DOI:10.2105/AJPH.88.9.1337. PMID 9736873
- [3] World population prospects: the 2006 revision highlights. Working Paper No. ESA/PWP.202. Population Division, Department of Economic and Social Affairs, United Nations. 2007. Retrieved 2008-08-27
- [4] "What is Alzheimer's disease?", [Alzheimers.org.uk](http://Alzheimers.org.uk). August 2007. Retrieved 2008-02-21
- [5] Waldemar G, Dubois B, Emre M, et al. (January 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. DOI:10.1111/j.1468-1331.2006.01605.x. PMID 17222085
- [6] "Alzheimer's diagnosis of AD". Alzheimer's Research Trust. Retrieved 2008-02-29
- [7] 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. DOI:10.1002/ana.20533. PMID 15984022
- [8] "Understanding stages and symptoms of Alzheimer's disease". National Institute on Aging. 2007-10-26. Retrieved 2008-02-21
- [9] Mölsä PK, Marttila RJ, Rinne UK (August 1986). "Survival and cause of death in Alzheimer's disease and multi-infarct dementia". *Acta Neurol Scand* 74 (2): 103–7. DOI:10.1111/j.1600-0404.1986.tb04634.x. PMID 3776457
- [10] Mölsä PK, Marttila RJ, Rinne UK (March 1995). "Long-term survival and predictors of mortality in Alzheimer's disease and multi-infarct dementia". *Acta Neurol Scand* 91 (3): 159–64. PMID 7793228
- [11] Tiraboschi P, Hansen LA, Thal LJ, Corey-Bloom J (June 2004). "The importance of neuritic plaques and tangles to the development and evolution of AD". *Neurology* 62 (11): 1984–9. PMID 15184601
- [12] "Alzheimer's Disease Clinical Trials". US National Institutes of Health. Retrieved 2008-08-18
- [13] "Can Alzheimer's disease be prevented". National Institute on Aging. 2006-08-29. Retrieved 2008-02-29



- [14] "The MetLife study of Alzheimer's disease: The caregiving experience". MetLife Mature Market Institute. August 2006. Archived from the original on 2008-06-25. Retrieved 2008-02-12
- [15] Thompson CA, Spilsbury K, Hall J, Birks Y, Barnes C, Adamson J (2007). "Systematic review of information and support interventions for caregivers of people with dementia". *BMC Geriatr* 7: 18. Doi:10.1186/1471-2318-7-18. PMID 17662119
- [16] Schneider J, Murray J, Banerjee S, Mann A (August 1999). "EUROCARE: a cross-national study of co-resident spouse carers for people with Alzheimer's disease: Factors associated with carer burden". *International Journal of Geriatric Psychiatry* 14 (8): 651–661. DOI:10.1002/(SICI)1099-1166(199908)14:8<651::AID GPS992> 3.0.CO;2-B. PMID 10489656
- [17] Murray J, Schneider J, Banerjee S, Mann A (August 1999). "EUROCARE: a cross-national study of co-resident spouse carers for people with Alzheimer's disease: II--A qualitative analysis of the experience of caregiving". *International Journal of Geriatric Psychiatry* 14 (8): 662–667. Doi:10.1002/(SICI)1099-1166(199908)14:8< 662::AID-GPS993>3.0.CO;2-4. PMID 10489657
- [18] Bonin-Guillaume S, Zekry D, Giacobini E, Gold G, Michel JP (January 2005). "Impact économique de la démence (English: The economical impact of dementia)" (in French). *Presse Med* 34 (1): 35–41. ISSN 0755-4982. PMID 15685097
- [19] Meek PD, McKeithan K, Schumock GT (1998). "Economic considerations in Alzheimer's disease". *Pharmacotherapy* 18 (2 Pt 2): 68–73; discussion 79–82. PMID 9543467
- [20] Bäckman L, Jones S, Berger AK, Laukka EJ, Small BJ (Sep 2004). "Multiple cognitive deficits during the transition to Alzheimer's disease". *J Intern Med* 256 (3): 195–204. DOI:10.1111/j.1365-2796.2004.01386.x. PMID 15324363
- [21] Nygård L (2003). "Instrumental activities of daily living: a stepping-stone towards Alzheimer's disease diagnosis in subjects with mild cognitive impairment?". *Acta Neurol Scand Suppl* (179): 42–6. doi:10.1034/j.1600-0404.107.s179.8.x. PMID 12603250
- [22] Arnáiz E, Almkvist O (2003). "Neuropsychological features of mild cognitive impairment and preclinical Alzheimer's disease". *Acta Neurol. Scand., Suppl.* 179: 34–41. DOI:10.1034/j.1600-0404.107.s179.7.x. PMID 12603249
- [23] Landes AM, Sperry SD, Strauss ME, Geldmacher DS (Dec 2001). "Apathy in Alzheimer's disease". *J Am Geriatr Soc* 49 (12): 1700–7. DOI:10.1046/j.1532-5415.2001.49282.x. PMID 11844006

- [24] Petersen RC (February 2007). "The current status of mild cognitive impairment—what do we tell our patients?". *Nat Clin Pract Neurol* 3 (2): 60–1. DOI:10.1038/ncpneuro0402. PMID 17279076
- [25] Förstl H, Kurz A (1999). "Clinical features of Alzheimer's disease". *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience* 249 (6): 288–290. DOI:10.1007/s004060050101. PMID 10653284
- [26] Carlesimo GA, Oscar-Berman M (June 1992). "Memory deficits in Alzheimer's patients: a comprehensive review". *Neuropsychol Rev* 3 (2): 119–69. DOI:10.1007/BF01108841. PMID 1300219
- [27] Jelicic M, Bonebakker AE, Bonke B (1995). "Implicit memory performance of patients with Alzheimer's disease: a brief review". *International Psychogeriatrics* 7 (3): 385–392. DOI:10.1017/S1041610295002134. PMID 8821346
- [28] Taler V, Phillips NA (Jul 2008). "Language performance in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment: a comparative review". *J Clin Exp Neuropsychol* 30 (5): 501–56. DOI:10.1080/13803390701550128. PMID 1856925
- [29] Frank EM (September 1994). "Effect of Alzheimer's disease on communication function". *J S C Med Assoc* 90 (9): 417–23. PMID 7967534
- [30] Volicer L, Harper DG, Manning BC, Goldstein R, Satlin A (May 2001). "Sundowning and circadian rhythms in Alzheimer's disease". *Am J Psychiatry* 158 (5): 704–11. DOI:10.1176/appi.ajp.158.5.704. PMID 11329390. Retrieved 2008-08-27
- [31] Gold DP, Reis MF, Markiewicz D, Andres D (January 1995). "When home caregiving ends: a longitudinal study of outcomes for caregivers of relatives with dementia". *J Am Geriatr Soc* 43 (1): 10–6. PMID 7806732
- [32] Francis PT, Palmer AM, Snape M, Wilcock GK (February 1999). "The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress". *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr.* 66 (2): 137–47. DOI:10.1136/jnnp.66.2.137. PMID 10071091
- [33] M. Mesulam "The Cholinergic Lesion of Alzheimer's Disease: Pivotal Factor or Side Show?" *Learn. Mem.* 2004 11: 43-49 DOI:10.1101/lm.69204
- [34] Sadot et al. (1996). "Activation of m<sub>1</sub> Muscarinic Acetylcholine Receptor Regulates  $\tau$  Phosphorylation in Transfected PC12 Cells". E. Sadot, D. Gurwitz, J. Barg, L. Behar, I. Ginzburg, A. Fisher, DOI: 10.1046/j.1471-4159.1996.66020877
- [35] Nitsch RM, Slack BE, Wurtman RJ, Growdon JH (1992). "Release of Alzheimer amyloid precursor derivatives stimulated by activation of muscarinic acetylcholine receptors". *Science* 258:304 –307

- [36] D. Auld, F. Mennicken, R. Quirion (May 15, 2001). "Nerve Growth Factor Rapidly Induces Prolonged Acetylcholine Release from Cultured Basal Forebrain Neurons: Differentiation between Neuromodulatory and Neurotrophic Influences". *The Journal of Neuroscience*, 21(10):3375–3382
- [37] Shen ZX (2004). "Brain cholinesterases: II. The molecular and cellular basis of Alzheimer's disease". *MedHypotheses* 63 (2): 30821. Doi: 10.1016/ j.mehy. 2004. 02.031. PMID 15236795
- [38] Wenk GL (2003). "Neuropathologic changes in Alzheimer's disease". *J Clin Psychiatry* 64 Suppl 9: 7–10. PMID 12934968
- [39] Hardy J, Allsop D (October 1991). "Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease". *Trends Pharmacol. Sci.* 12 (10): 383–88. DOI:10.1016/0165-6147(91)90609-V. PMID 1763432
- [40] Mudher A, Lovestone S (January 2002). "Alzheimer's disease-do tauists and baptists finally shake hands?". *Trends Neurosci.* 25 (1): 22–26. DOI:10.1016/ S0166-2236(00)02031-2. PMID 11801334
- [41] Nistor M, Don M, Parekh M, et al. (October 2007). "Alpha- and beta-secretase activity as a function of age and beta-amyloid in Down syndrome and normal brain". *Neurobiol Aging* 28 (10): 1493–1506. DOI: 10.1016/ j.neurobiolaging. 2006.06.023. PMID 16904243
- [42] Lott IT, Head E (March 2005). "Alzheimer disease and Down syndrome: factors in pathogenesis". *Neurobiol Aging* 26 (3): 383–89. doi:10.1016 /j.neurobiolaging. 2004.08.005. PMID 15639317
- [43] Games D, Adams D, Alessandrini R, et al. (February 1995). "Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F beta-amyloid precursor protein". *Nature* 373 (6514): 523–27. doi:10.1038/373523a0. PMID 7845465
- [44] Hanyu H, Sato T (2010 Feb). "Alzheimer's disease". *Department of Geriatric Medicine, Tokyo Medical University.* 68(2):330-4. PMID: 20158105
- [45] "New Clinical Genetics". (2007). Andrew Read, Dian Donnai. Department of medical genetics, University of Manchester, St Mary's hospital, Manchester, UK
- [46] J. Richardson, D. Burns (2002) "Mouse Models of Alzheimer's Disease: A Quest for Plaques". *ILAR Journal* V43(2)
- [47] D. Loo, A. Copani, C. Pike, E. Whitemore, A. Walencewicz, C. Cotman (September 1993). "Apoptosis is induced by  $\beta$ -amyloid in cultured central nervous system neurons". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* Vol. 90, pp. 7951-7955, *Neurobiology*
- [48] A. Copani, J. Hoozemans, F. Caraci, M. Calafiore, E. Haastert, R. Veerhuis A. Rozemuller, E. Aronica, M. A. Sortino, F. Nicoletti (October 25, 2006). "DNA

- Polymerase- $\beta$  is expressed early in neurons of Alzheimer's disease brain and is loaded into DNA replication forks in neurons challenged with  $\beta$ - amyloid". *The Journal of Neuroscience*, 26(43):10949 –10957
- [49] A. Currais, B. Malik, T. Hortobágyi, S. Soriano (2008). "The neuronal cell cycle as a mechanism of pathogenesis in Alzheimer's disease". PMID: 20157524
- [50] Schmitz C, Rutten BP, Pielen A, et al. (April 2004). "Hippocampal neuron loss exceeds amyloid plaque load in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease". *Am J Pathol* 164 (4): 1495–1502. PMID 15039236
- [51] "Ο ρόλος της πρωτεΐνης TAU στην παθογένεια των νευροεκφυλιστικών ασθενειών". 6ο Τεύχος *HelMedica*, Άρθρο 7<sup>ο</sup>, Review-Νευρολογίας
- [52] 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 U S A*, 1;90(5):1977-81, PMID: 8446617
- [53] Corder E, Saunders A, Strittmatter W, Schmechel D, Gaskell P, Small G, Roses A, Haines J, Pericak-Vance M (August 13, 1993). "Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late-onset families". *Science, New series*, Vol. 261, No. 5123, 921-923
- [54] Wisniewski T, Frangione B (1992). "Apolipoprotein E: A pathological chaperone protein in patients with cerebral and systemic amyloid". *Neurosci. Lett.* 135:235-238
- [55] Dr M. Flint Beal MD, "Aging, energy, and oxidative stress in neurodegenerative diseases", *Neurochemistry Laboratory, Neurology Service, Massachusetts General Hospital and Harvard Medical School, Boston*, doi:10.1002/ana.410380304
- [56] Orth M, Schapira A (2001). "Mitochondria and Degenerative Disorder". *American Journal of Medical Genetics (Semin. Med. Genet.)*. 106:27±36
- [57] Ojaimi J, Masters CL, McLean C, Opeskin K, McKelvie P, Byrne E (1999). "Irregular distribution of cytochrome c oxidase protein subunits in aging and Alzheimer's disease". *Ann Neurol* 46:656–660
- [58] King MP, Attardi G (1989). "Human cells lacking mtDNA: repopulation with exogenous mitochondria by complementation". *Science* 246:500–503
- [59] Swerdlow RH, Parks JK, Cassarino DS, Maguire DJ, Maguire RS, Bennett JP Jr, Davis RE, Parker WD. Jr (1997). "Cybrids in Alzheimer's disease: a cellular model of the disease?". *Neurology* 49:918–925
- [60] Trimmer PA, Keeney PM, Borland MK, Simon FA, Almeida J, Swerdlow RH, Parks JP, Parker WD Jr, Bennett JP Jr (2004). "Mitochondrial abnormalities in

- cybrid cell models of sporadic Alzheimer's disease worsen with passage in culture". *Neurobiol Dis* 15:29–39
- [61] Parker WD, Filley CM, Parks JK (1990). "Cytochrome oxidase deficiency in Alzheimer's disease". *Neurol* 40:1302–1303
- [62] Mutisya EM, Bowling AC, Beal MF (1994). "Cortical cytochrome oxidase activity is reduced in Alzheimer's disease". *J Neurochem* 63:2179–2184
- [63] Parker WD, Parks JK, Filley CM, Kleinschmidt-Demasters BK (1994). "Electron transport chain defects in Alzheimer's disease brain". *Neurol* 44:1090–1096
- [64] Maurer I, Zierz S, Moller H-J (2000). "A selective defect of cytochrome c oxidase is present in brain of Alzheimer's disease patients". *Neurobiol Aging* 21:455–462
- [65] Cottrell DA, Borthwick GM, Johnson MA, Ince PG, Turnbull DM (2002). "The role of cytochrome c oxidase deficient hippocampal neurons in Alzheimer's disease". *J Neuropath Appl Neurobiol.* 28:390–396
- [66] J. Elson, C. Herrstadt, G. Preston, L. Thal, C. Morris, J. Edwardson, M. Beal, D. Turnbull, N. Howell (2006). "Does the mitochondrial genome play a role in the etiology of Alzheimer's disease?". *Hum Genet* 119: 241-254. DOI: 10.1007/s00439-005-0123-8
- [67] "Βιολογία Κυπάρου". (1995). Βασίλης Μαρμαράς, Μαρία Λαμπροπούλου-Μαρμαρά, Τρίτη έκδοση, Πάτρα
- [68] "Biochemistry, 5<sup>th</sup> Edition" (2001). J. Berg. Johns Hopkins University School of Medicine, J. Tymoczko. Carleton College, L. Stryer. Stanford University
- [69] Brady NR, Elmore SP, van Beek JJ, et al. "Coordinated behavior of mitochondria in both space and time: a reactive oxygen species activated wave of mitochondrial depolarization". *Biophys J* 2004; 87: 2022-34
- [70] Turrens JF. "Mitochondrial formation of reactive oxygen species". *J. Physiol.* 2003; 552: 335-44
- [71] Ritchie RH, Delbridge LM. "Cardiac hypertrophy, substrate utilization and metabolic remodelling: cause or effect?". *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2006;33:159-66
- [72] E. Mariani, M.C. Polidori, A. Cherubini, P. Mecocci (28 April 2005). "Oxidative stress in brain aging, neurodegenerative and vascular diseases: An overview". DOI:10.1016 /j.jchromb.2005.04.023
- [73] Green, John C. Reed (28 August 1998). "Mitochondria and Apoptosis". *Science*: 1309-1312. DOI:10.1126/science.281.5381.1309
- [74] Halestrap AP (Apr. 2006). "Calcium, mitochondria and reperfusion injury: a pore way to die" Department of Biochemistry, University of Bristol, School of Medical

- Sciences, University Walk, Bristol BS8 1TD, UK. A.Halestrap@bristol.ac.uk.34  
(Pt 2):232-7
- [75] Phil Dash. "Apoptosis". Basic Medical Sciences, St.George's, University of London. www.sgul.ac.uk/dept/immunology/~dash
- [76] K. Herrup, R. Neve, S. Ackerman, A. Copani (October 20, 2004) "Divide and Die: Cell Cycle Events as Triggers of Nerve Cell Death". *The Journal of Neuroscience*, 24(42):9232–9239
- [77] Fridovich (July 1975). "Superoxide Dismutases". *Annual Review of Biochemistry* Vol. 44: 147-159 DOI:10.1146/annurev.bi.44.070175.001051
- [78] J. Yarham, J. Elson, E. Blakely, R. McFarland, R. Taylor (2010). "Mitochondrial tRNA mutations and disease". Mitochondrial Research Group, Institute for Ageing and Health, The Medical School, Newcastle University, Newcastle upon Tyne, NE2 4HH, UK DOI: 10.1002
- [79] "Genes VIII, Πρώτος Τόμος" (2004). Benjamin Lewin. Κεφ 6, Η πρωτεϊνοσύνθεση
- [80] Torroni A, Huoponen K, Francalacci P, Petrozzi M, Morelli L, Scozzari R, Obinu D, Savontaus ML, Wallace DC. "Classification of European mtDNAs from an analysis of three European populations". Department of Genetics and Molecular Medicine, Emory University School of Medicine, Atlanta, Georgia 30322, USA. PMID:8978068
- [81] N. Udar, S. Atilano, M. Memarzadeh, D. Boyer, M. Chwa , S. Lu, B. Maguen, J. Langberg, P. Coskun, D. Wallace, A. Nesburn, N. Khatibi, D. Hertzog, K. Le, D. Hwang, C. Kenney. "Mitochondrial DNA Haplogroups Associated with Age-Related Macular Degeneration". DOI:10.1167/iovs.08-2646 Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. June 2009 vol. 50 no. 6 2966-2974
- [82] J. van der Walt, Y. Dementieva, E. Martin, W. Scott, K. Nicodemus, C. Kroner, K. Welsh-Bohmer, A. Saunders, A. Roses, G. Small, D. Schmechel, M. Doraiswamy, J. Gilbert, J. Haines, J. Vance, M. Pericak-Vance (2004). "Analysis of European mitochondrial haplogroups with Alzheimer disease risk". *Neuroscience Letters* 365. 28–328
- [83] Geula C, Mesulam M (1995). "Cholinesterases and the pathology of Alzheimer disease". PMID 8534419] anuary 2004, *Neuroscience Letters* 365 (2004) 28–32
- [84] Stahl SM (2000). "The new cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease, Part 2: illustrating their mechanisms of action". *J Clin Psychiatry* 61 (11): 813–814. PMID:11105732
- [85] "Donepezil". US National Library of Medicine (Medline Plus). 2007-01-08. Retrieved 2010-02-03

- [86] "Galantamine". US National Library of Medicine (Medline Plus). 2007-01-08. Retrieved 2010-02-03
- [87] "Rivastigmine". US National Library of Medicine (Medline Plus). 2007-01-08. Retrieved 2010-02-03
- [88] "Rivastigmine Transdermal". US National Library of Medicine (Medline Plus). 2007-01-08. Retrieved 2010-02-03
- [89] "Memantine". US National Library of Medicine (Medline). 2004-01-04. Retrieved 2010-02-03
- [90] Areosa Sastre A, McShane R, Sherriff F (2004). "Memantine for dementia". doi:10.1002/14651858.CD003154.pub2. PMID:15495043
- [91] Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel SJ, Scharf SJ, Higushi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988; 239: 487. DOI: 10.1126/science.2448875
- [92] Oste et al., "Product Application Focus Polymerase Chain Reaction", *Biotechniques* 6:162-167, 1988. PMID: 3273182 *Biotechniques* 1988 Feb;6(2):162-7
- [93] Sambrook et al *Molecular Cloning* 2nd Ed. Vol.
- [94] M.P. Fisher, C.W. Dingman (1971). "Role of molecular conformation in determining the electrophoretic properties of polynucleotides in agaroseacrylamide composite gels". *Biochemistry*, 10, pp. 1895–1899
- [95] C. Aaij, P. Borst, "The gel electrophoresis of DNA". Department of Medical Enzymology, Laboratory of Biochemistry, University of Amsterdam, Amsterdam The Netherlands DOI:10.1016/0005-2787(72)90426
- [96] Orita, M., Y. Suzuki, T. Sekiya, K. Hayashi (1989). "Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction". *Genomics* 5: 874-879
- [97] Kukita Y., et al. "SSCP Analysis of Long DNA Fragments in Low pH Gel". *Human Mutation*; 1997, (10): 400-7
- [98] "Ανασυνδιασμένο DNA". Γονίδια και γονιδιώματα, μια συνοπτική παρουσίαση. J. Watson, A. Caudy
- [99] Beal MF (2005). "Mitochondria take center stage in aging and neurodegeneration". *Ann Neurol* 58:495–505
- [100] Nunomura A, Honda K, Takeda A, Hirai K, Zhu X, Smith MA, Perry G (2006) "Oxidative Damage to RNA in Neurodegenerative Diseases". *J Biomed Biotechnol* 2006:82323
- [101] Perry G, Nunomura A, Hirai K, Zhu X, Perez M, Avila J, Castellani RJ, Atwood CS, Aliev G, Sayre LM, Takeda A, Smith MA (2002). "Is oxidative damage the

- fundamental pathogenic mechanism of Alzheimer's and other neurodegenerative diseases? ". *Free Radic Biol Med* 33:1475–1479
- [102] Stavrovskaya IG, Kristal BS (2005) "The powerhouse takes control of the cell: is the mitochondrial permeability transition a viable therapeutic target against neuronal dysfunction and death?". *Free Radic Biol Med* 38:687–697
- [103] Santoro A, Salvioli S, Raule N, Capri M, Sevini F, Valensin S, Monti D, Bellizzi D, Passarino G, Rose G, De Benedictis G, Franceschi C (2006) " Mitochondrial DNA involvement in human longevity" . *Biochim Biophys Acta* 1757:1388–1399