

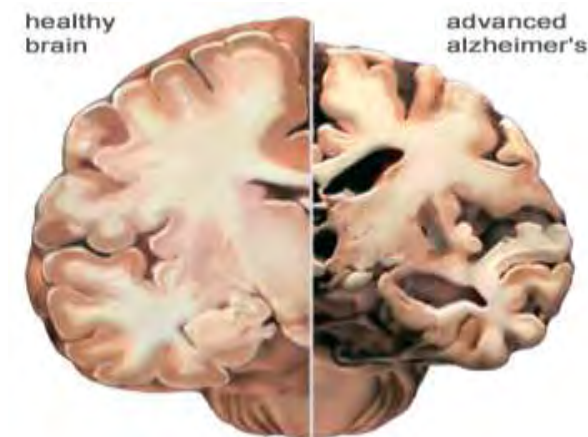


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών  
Του Τμήματος Βιοχημείας Και Βιοτεχνολογίας

Εφαρμογές Μοριακής Βιολογίας – Μοριακή Γενετική,  
Διαγνωστικοί Δείκτες

Γιακομίδα Ζωή

Κληρονομικότητα και Alzheimer



ΛΑΡΙΣΑ 2012

**ΚΑΗΡΟΝΟΜΙΚΟΤΗΤΑ & ΑΛΖΧΕΙΜΕΡ**  
**ΙΝΗΕΡΙΤΑΝΣΕ & ΑΛΖΧΕΙΜΕΡ**

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:  
Αιμιλία Ζίφα, Επίκουρος Καθηγήτρια Βιολογίας / Νευρολογίας  
Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

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

Χατζηγεωργίου Γεώργιος, Αναπληρωτής Καθηγητής Νευρολογίας  
Τμήμα Ιατρικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

## Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας στα πλαίσια του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών «Εφαρμογές Μοριακής Βιολογίας - Μοριακή Γενετική - Διαγνωστικοί Δείκτες».

Θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες σε όλους όσους συνέβαλαν στη διεκπεραίωση της διαδικασίας.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω την κυρία Αιμιλία Ζίφα για την ανάθεση του ενδιαφέροντος αυτού θέματος, την εμπιστοσύνη που μου έδειξε όπως επίσης και την επιστημονική καθοδήγηση σε όλη τη διάρκεια της προσπάθειας μου.

Ευχαριστώ επίσης τον κύριο Μαμούρη Ζήση και την κύριο Χατζηγεργίου Γεώργιο, για την τιμή να συμμετάσχουν στην Τριμελή Συμβουλευτική Επιτροπή.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στον διδάκτορα Σταμάτη Κωσταντίνο και τον υποψήφιο διδάκτορα Γιαννούλη Θέμη για τις πολύτιμες συμβουλές και την βοήθεια που μου έδωσαν κατά τη διάρκεια των πειραματικών διαδικασιών.

## Περιεχόμενα

Περίληψη.....	6
Abstract.....	7
Εισαγωγή	
Νόσος Alzheimer.....	9
Στάδια της νόσου Alzheimer.....	10
Πρώτο στάδιο (προ - άνοια).....	10
Δεύτερο στάδιο (πρώιμη άνοια).....	11
Τρίτο στάδιο (μέτρια άνοια).....	11
Τέταρτο στάδιο(προχωρημένη άνοια).....	11
Μακροσκοπική και μικροσκοπική εικόνα της νόσου Alzheimer.....	12
Γονίδια που σχετίζονται με την εμφάνιση της νόσου του Alzheimer.....	14
Πρεσενιλίνη και Β - αμυλοειδής πρωτεΐνη (APP).....	14
Λιποπρωτεΐνη (APOE).....	15
Μιτοχόνδρια.....	16
Το γενετικό υλικό των μιτοχονδρίων.....	18
Μιτοχονδριακή κληρονομικότητα.....	20
Οξειδωτική Φωσφορυλίωση και Δραστικές Ρίζες Οξυγόνου ROS.....	21
Χαρακτηριστικά και μεταλλάξεις στα μιτοχονδριακά γονίδια tRNA.....	25
Συσχέτιση μιτοχονδριακής δυσλειτουργίας και Alzheimer.....	28
Απλοομάδες και συσχέτιση με τη νόσο του Alzheimer.....	29
Υλικά και μέθοδοι	
Απομόνωση DNA.....	32
PCR (Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης).....	34
Αρχή μεθόδου.....	34
Προετοιμασία δειγμάτων και ποιοτικός προσδιορισμός των PCR προϊόντων.....	38
Ηλεκτροφόρηση.....	39
Διαδικασία.....	39
SSCP (Ανάλυση Πολυμορφισμού Μονόκλωνης Αλυσίδας).....	41
Καθαρισμός δειγμάτων.....	43
Διαδικασία.....	43
Αλληλούχιση.....	44
Ανάλυση αποτελεσμάτων.....	44

Αποτελέσματα.....	45
Συζήτηση.....	56
Βιβλιογραφία.....	59

## Περίληψη

Η νόσος του Alzheimer είναι η πιο κοινή μορφή άνοιας στους ηλικιωμένους. Είναι νευροεκφυλιστική ασθένεια κατά την οποία επέρχεται η εκφύλιση των νευρώνων σε συγκεκριμένες περιοχές του εγκεφάλου, ειδικά στο νεοφλοιό και τον ιππόκαμπο. Η ασθένεια του Alzheimer, παρουσιάζεται με δύο μορφές, την οικογενή και τη σποραδική. Η σποραδική μορφή αφορά το μεγαλύτερο μέρος των ασθενών αλλά μέχρι σήμερα δεν υπάρχουν σαφή στοιχεία για το πώς αναπτύσσεται. Τα μιτοχόνδρια έχουν βασικό ρόλο στην ανάπτυξη της ασθένειας αυτής. Τα μιτοχόνδρια, επιτελούν βασικές λειτουργίες στο κύτταρο και σχετίζονται με πολλές διεργασίες. Μια βασική λειτουργία του μιτοχονδρίου είναι η παραγωγή της απαιτούμενης ενέργειας για το κύτταρο σε μορφή ATP. Όταν υπάρξει δυσλειτουργία σε αυτή την διαδικασία, παράγονται οι ελεύθερες ρίζες (ROS) οι οποίες συμβάλουν στην επαγωγή οξειδωτικού stress που οδηγεί σε νευρωνικό θάνατο.

Στη συγκεκριμένη εργασία γίνεται έλεγχος για ανίχνευση μεταλλάξεων στα μιτοχονδριακά γονίδια των tRNA<sup>Ile</sup>, tRNA<sup>Gln</sup>, tRNA<sup>Met</sup> και tRNA<sup>Lys</sup> σε ασθενείς με τη νόσο Alzheimer (σε 50 άτομα), και σε 20 άτομα που δεν πάσχουν από την ασθένεια. Συνολικά βρέθηκαν 5 μεταλλάξεις σε 7 ασθενείς από 50. Σε ένα άτομο βρέθηκε η μετάλλαξη A4310G στο tRNA<sup>Ile</sup>, σε 2 άτομα η μετάλλαξη T4336C στο tRNA<sup>Gln</sup>, ενώ σε 4 άτομα βρέθηκαν 3 μεταλλάξεις στο γονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη της υπομονάδας 2 στην οξειδάση του κυτοχρώματος (COII) (σε 2 άτομα βρέθηκε η μετάλλαξη G8251A σε ένα άτομο βρέθηκε η μετάλλαξη T8260C και τέλος σε ένα άτομο βρέθηκε και η μετάλλαξη G8269A). Μόνο η μετάλλαξη T4336C στο tRNA<sup>Gln</sup> βρέθηκε σε 1/20 άτομα που δεν έπασχαν από τη νόσο. Επομένως λόγω του σημαντικού ρόλου του tRNA θεωρείται πως οι μεταλλάξεις σε αυτό έχουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη της ασθένειας του Alzheimer.

## Abstract

Alzheimer's disease is the most common form of dementia in the elderly. Alzheimer's disease is the most common form of dementia in the elderly. It is a neurodegenerative disease in which occurs the degeneration of neurons in specific brain regions, especially in the neocortex and hippocampus. The disease of Alzheimer, is presented in two forms, familial and sporadic. The sporadic form found a higher rate of familial of patients but so far there are no reliable data on how it develops. Mitochondria have a key role in the development of this disease. Mitochondria, perform basic functions in the cell and associated with many processes. A key function of mitochondria is to produce the required energy for the cell as ATP. When there is dysfunction in this process are produced free radicals (ROS) which contribute to the induction of oxidative stress leading to neuronal death.

In this paper is checked for detection of mutations in mitochondrial genes tRNA<sup>Ile</sup>, tRNA<sup>Gln</sup>, tRNA<sup>Met</sup> and tRNA<sup>Lys</sup> in patients with Alzheimer's disease (at 50 people), and in 20 people who did not have the disease. A total of 5 mutations were found in 7 patients of 50 we had for examination. In one person was found the A4310G mutation in tRNA<sup>Ile</sup>, in 2 patients was found the T4336C mutation tRNA<sup>Gln</sup>, and in 4 patients was found 3 mutations in the gene encoding the protein subunit 2 of cytochrome oxidase in (COII) (in 2 patients has been found the mutation G8251A, in one person has been found the T8260C mutation, and finally in one person has been found the G8269A mutation). Only the T4336C mutation in tRNA<sup>Gln</sup> has been found in 1/20 individuals who did have the disease. So because of the important role of tRNA is believed that mutations in it have an important role in the development of Alzheimer' disease.



# ΕΙΣΑΓΩΓΗ

# Alzheimer

Η νόσος Alzheimer (AD) ή αλλιώς γεροντική άνοια τύπου Alzheimer αποτελεί μία νευροεκφυλιστική διαταραχή. Χαρακτηρίζεται από προοδευτική απώλεια της μνήμης και δυσλειτουργία της γνωστικής ικανότητας (Berchtold ND., 1998). Ο Γερμανός ψυχίατρος και νευροπαθολόγος Alois Alzheimer, ήταν ο πρώτος που την περιέγραψε και ανέφερε τα αποτελέσματα της αυτοψίας μίας 55χρονης γυναίκας, το 1907, η οποία παρουσίαζε άνοια και διαταραχές συμπεριφοράς. Το 10% περίπου των ατόμων που νοσούν από την ασθένεια του Alzheimer, είναι ηλικίας άνω των 70 ετών ενώ το 25% - 45% είναι πάνω από 80 ετών (Brookmayer R., 1998). Όμως, η νόσος εμφανίζεται και σε μικρότερες ηλικίες.

Η ασθένεια του Alzheimer μπορεί να ταξινομηθεί σε 2 μορφές: η πρώτη είναι η σποραδική μορφή, δηλαδή η ασθένεια δεν κληρονομείται γενετικά, και αντιπροσωπεύει την πλειοψηφία των περιπτώσεων της νόσου όπου η γήρανση αποτελεί το βασικό λόγο εμφάνισης της, και η δεύτερη μορφή αφορά την κληρονομικότητα όπου έχουν εντοπιστεί σπάνιες γονιδιακές μεταλλάξεις (Weatherall D. J., 1996).



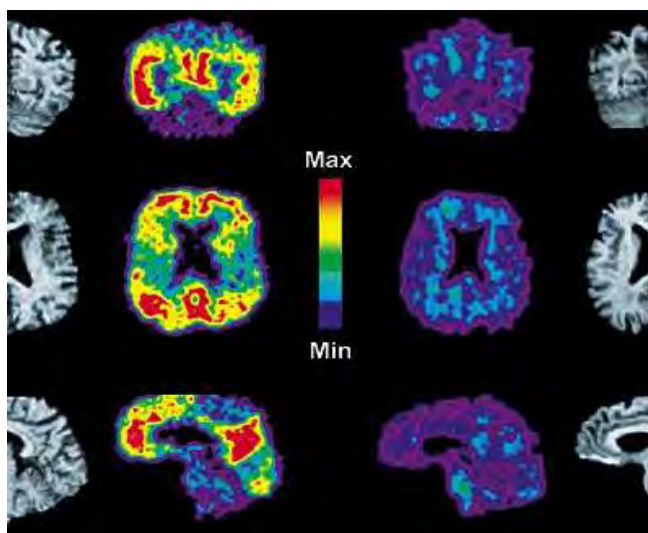
Εικόνα 1. Alois Alzheimer

Η σποραδική μορφή της νόσου εμφανίζεται στο μεγαλύτερο ποσοστό των ασθενών, περίπου 75% και δυστυχώς δεν υπάρχουν σαφή στοιχεία που να οδηγούν στο λόγο ύπαρξης της ασθένειας με αυτή τη μορφή, σε αντίθεση με την κληρονομική η οποία εμφανίζεται σε ποσοστό περίπου 25%. Από τους ασθενείς που έχουν νοσήσει, το 2% περίπου έχει πρόωρη εμφάνιση της ασθένειας ενώ το 20% εμφανίζει την ασθένεια καθυστερημένα (Brookmayer R., 1998).

Το 2006 υπήρξαν περίπου 26,6 εκατομμύρια περιπτώσεις της ασθένειας του Alzheimer σε όλο τον κόσμο. Εκτιμάται, ότι μέχρι το 2050, παγκοσμίως θα έχουν νοσήσει 1 στους 85 ανθρώπους (Brookmayer R., 1998). Παρόλο που η νόσος έχει διαφορετική πορεία σε κάθε άτομο που νοσεί, υπάρχουν ορισμένα

κοινά συμπτώματα. Στα αρχικά στάδια, το κύριο σύμπτωμα είναι η απώλεια μνήμης όπως για παράδειγμα η δυσκολία ανάκτησης πρόσφατων γεγονότων. Για περαιτέρω αξιολόγηση του ασθενή, εκτός από εξετάσεις αίματος και εξέταση του εγκεφαλονωτιαίου υγρού (ENY), που αποτελούν συνηθισμένο έλεγχο (Khachaturian Z.

S., 1987), ακολουθούν εξετάσεις συμπεριφοράς, γνωστικά τεστ και στη συνέχεια γίνεται μαγνητική τομογραφία εγκεφάλου (MRI) (Waldemar G. 2007).



Εικόνα 2. Σχηματική απεικόνιση μαγνητικής τομογραφίας εγκεφάλου. Οι 2 στήλες αριστερά, αντιστοιχούν σε άτομο που πάσχει από τη νόσο Alzheimer. Οι δύο στήλες δεξιά αντιστοιχούν σε άτομο φυσιολογικό, χωρίς τη νόσο του Alzheimer. Η διαβάθμιση του χρώματος δείχνει τα επίπεδα πυκνότητας του αμυλοειδούς στον εγκέφαλο

Με το πέρασμα του χρόνου, τα συμπτώματα περιλαμβάνουν σύγχυση, ευερεθιστότητα, επιθετικότητα, εναλλαγές στη διάθεση, δυσκολία στη γλώσσα, μακροπρόθεσμα απώλεια μνήμης καθώς και αποξένωση από τους υπόλοιπους ανθρώπους. Τελικά ο ασθενής οδηγείται στο θάνατο μετά από απώλεια των σωματικών του λειτουργιών (Tabert MH., 2005).

Η νόσος του Alzheimer, δεν μπορεί να θεραπευτεί και τα άτομα που πάσχουν από την ασθένεια, χρειάζονται συνεχόμενη φροντίδα κυρίως από άτομα του περιβάλλοντος τους όπως κάποιος στενός συγγενής.

## Στάδια Της Νόσου Alzheimer

Η πορεία της νόσου αποτελείται από 4 στάδια.

Πρώτο στάδιο (προ - άνοια): Αρχικά τα πρώτα συμπτώματα φαίνεται πως οδηγούν σε γήρας. Όμως με περαιτέρω εξετάσεις γίνεται η διάγνωση της ασθένειας. Τα αρχικά συμπτώματα, επηρεάζουν καθημερινές δραστηριότητες του πάσχοντος, όπως είναι η απώλεια της μνήμης και η αδυναμία αφομοίωσης νέων πληροφοριών. Επίσης,

παρατηρείται απάθεια, κατά την οποία υπάρχει έλλειψη ενδιαφέροντος για πράγματα που παλαιότερα είχαν σημασία στη ζωή του ασθενούς όπως διάφορα πρόσωπα, ονόματα ή σημαντικά γεγονότα (Nagard L., 2003).

Δεύτερο στάδιο (πρώιμη άνοια): Στο στάδιο αυτό, η απώλεια μνήμης του ασθενούς καθώς και τα προβλήματα της μάθησης και της γραφής γίνονται πιο έντονα. Παράλληλα, μειώνεται το λεξιλόγιο και παρατηρείται δυσκολία επικοινωνίας με τους ανθρώπους που τον περιστοιχίζουν. Σε μικρότερο βαθμό επηρεάζεται η μνήμη εκτέλεσης διαφόρων δραστηριοτήτων (Talen V., 2008, Frank EM., 1994).

Τρίτο στάδιο (μέτρια άνοια): Στη μέτρια άνοια, λόγω προοδευτικής επιδείνωσης, η ανεξαρτησία του ασθενούς περιορίζεται. Τα προβλήματα στην ομιλία μεγιστοποιούνται και οι ασθενείς δυσκολεύονται να βρουν το κατάλληλο λεξιλόγιο για να μιλήσουν όπως επίσης να εκφραστούν, διότι δεν υπάρχει συνοχή στη σκέψη και την έκφραση τους. Η μακροχρόνια μνήμη αρχίζει να επηρεάζεται σημαντικά ενώ υπάρχουν αλλαγές στη συμπεριφορά με αποτέλεσμα να παρουσιάζουν εκρήξεις βίας και έντονη επιθετικότητα (Nagard L., 2003). Ένα ποσοστό των ασθενών αναπτύσσουν παραισθήσεις και σε κάποιες περιπτώσεις, μπορεί να εμφανιστεί ακράτεια ούρων. Επομένως όταν αυτό κριθεί απαραίτητο ο ασθενής μεταφέρεται σε κλινική (Gold DP., 1995).

Τέταρτο στάδιο (προχωρημένη άνοια): Στο τελευταίο στάδιο, η επικοινωνία του ασθενούς με τους ανθρώπους γύρω του περιορίζεται σε απλές φράσεις ή λέξεις. Η αλλαγή της συμπεριφοράς του είναι ριζική καθώς η επιθετική στάση αυξάνεται, όπως και η απάθεια, δεν μπορεί να εκτελέσει μόνος τους καμία δραστηριότητα και αυτό τον καθιστά πλήρως εξαρτημένο από άλλα άτομα. Στο τέλος, λόγω ατονίας του μυϊκού συστήματος καθλώνεται στο κρεβάτι. Ο θάνατος σε ασθενείς με τη νόσο Alzheimer επέρχεται από άλλους, εξωτερικούς παράγοντες, με τον πιο συχνό παράγοντα την βρογχοπνευμονία.

# Μακροσκοπική Και Μικροσκοπική Εικόνα Της Νόσου Alzheimer

Η εγκεφαλική ατροφία είναι ένα χαρακτηριστικό τόσο της γήρανσης όσο και της νόσου του Alzheimer. Για αυτό το λόγο δεν μπορεί να θεωρηθεί μόνο του ένα αδιαμφισβήτητο χαρακτηριστικό για τη διάγνωσή της. Η μακροσκοπική και η μικροσκοπική εξέταση αποκαλύπτουν τα χαρακτηριστικά της ασθένειας.

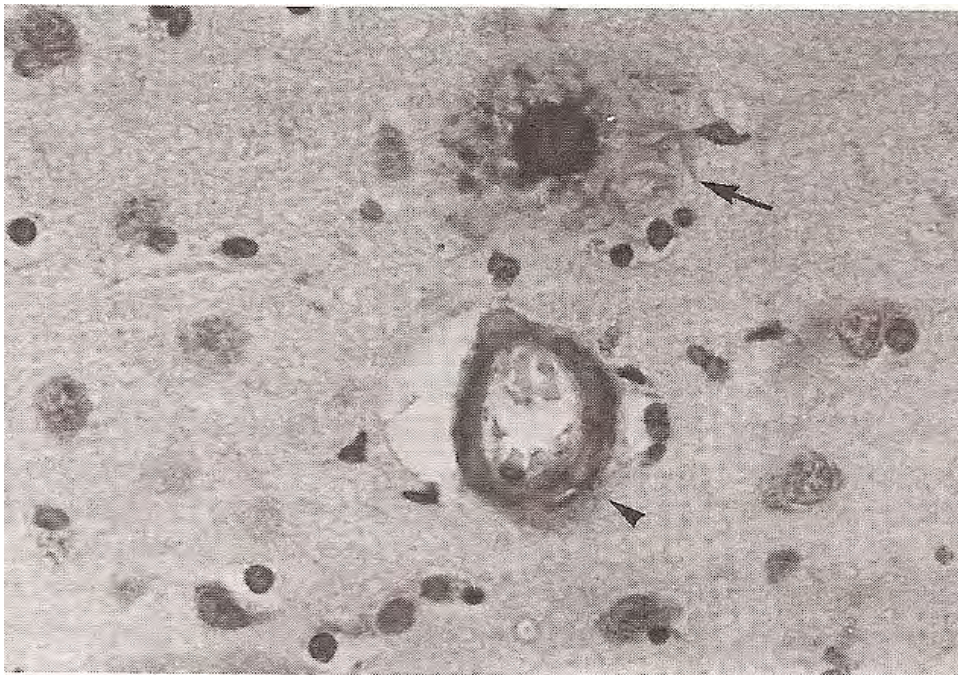
Στον εγκεφαλικό φλοιό υπάρχουν διάσπαρτες οι γεροντικές πλάκες και οι νευροϊνιδιακοί σοροί, οι οποίες εντοπίζονται έντονα σε ασθενείς με Alzheimer και κυρίως επηρεάζουν τον κροταφικό λοβό και τον ιππόκαμπο. Οι νευροϊνιδιακοί σοροί προέρχονται από ανώμαλα φωσφορυλιωμένες ινιδιακές πρωτεΐνες οι οποίες αθροίζονται μέσα στους νευρώνες. Στο μικροσκόπιο διακρίνονται ως συσσωματωμένα ζεύγη ελικοειδών νημάτων κι έχουν ως κύριο συστατικό την πρωτεΐνη Tau. Οι νευρώνες περιέχουν μικροσωληνίσκους, για τη διακίνηση συστατικών από και προς τις συνάψεις, στους οποίους προκαλούνται αλλοιώσεις από την πρωτεΐνη Tau, όταν αυτή βρίσκεται σε μία ασυνήθιστα φωσφορυλιωμένη κατάσταση (υπεύθυνη για την υπερφωσφορυλίωση της πρωτεΐνης Tau είναι η ακετυλοχολίνη) (Sadot et al. 1996). Λόγω της υπερφωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης Tau, αυξάνεται η συσσώρευσή της, δημιουργούνται συσσωματώματα και στο τέλος προκαλείται νευρωνικός θάνατος. Για αυτό το λόγο η ανάπτυξη των νευροϊνιδιακών σορών θεωρείται πως είναι ο κύριος λόγος θανάτου των νευρώνων (Murthy M., 1992).

Οι γεροντικές πλάκες αποτελούνται από συναθροίσεις του πεπτιδίου ΑΒ - προϊόν επεξεργασίας της Β - αμυλοειδούς πρωτεΐνης (APP) - που περιβάλλονται από δυστροφικούς νευρώνες και αστροκύτταρα. Οι συναθροίσεις του πεπτιδίου ΑΒ δεν παρουσιάζουν καμία τοξικότητα και θεωρούνται προστάδιο μεταγενέστερα σχηματιζόμενων τοξικών πλακών (γεροντικές πλάκες). Χαρακτηρίζονται προ - αμυλοειδείς πλάκες. Οι γεροντικές πλάκες αρχίζουν να σχηματίζονται με την συνάθροιση αυτών των προ - αμυλοειδικών πλακών και το σχηματισμό ενός πυκνού ινιδιακού πυρήνα. Το γονίδιο που κωδικοποιεί την APP βρίσκεται στο χρωμόσωμα 21. Τα άτομα που πάσχουν από σύνδρομο Down εμφανίζουν σχεδόν πάντα την νόσο του Alzheimer, διότι έχουν τρία χρωμοσώματα 21 και επομένως τρία γονίδια που παράγουν την APP. Για αυτό το λόγο θεωρήθηκε ότι οι γεροντικές πλάκες αποτελούσαν τη βασική αιτία ανάπτυξης της ασθένειας (Rossor M. N., 1992).

Οι γεροντικές πλάκες και οι νευροϊνιδιακοί σοροί εμφανίζονται, εκτός από τη νόσο του Alzheimer, και στη γήρανση. Επομένως για να θεωρήσουμε ότι ένα άτομο είναι ασθενής, θα πρέπει να εμφανίζει αυξημένο αριθμό των πλακών και των σωρών.



Εικόνα 3. Απεικονίζονται οι νευροϊνιδιακοί σοροί (με τα πιο μακριά βέλη) και οι γεροντικές πλάκες (με τα μικρότερα βέλη)



Εικόνα 4. Απεικονίζεται η γεροντική πλάκα (με το βέλος) η οποία περιστοιχίζεται από το β - αμυλοειδές

# Γονίδια Που Σχετίζονται Με Την Εμφάνιση Της Νόσου Του Alzheimer

## Γονίδια PS1 και PS2 (της πρεσενιλίνης) και Αβ αμυλοειδές (της πρόδρομης β – αμυλοειδής πρωτεΐνης (APP))

Η παρατήρηση της σύνδεσης του χρωμοσώματος 14 και συγκεκριμένα της περιοχής 14q, με ορισμένες περιπτώσεις της οικογενούς μορφής της ασθένειας του Alzheimer, οδήγησε στην ανακάλυψη του γονιδίου της πρεσενιλίνης 1 (PS1) και της σύνδεσης της με τη νόσο. Οι μεταλλάξεις στο PS1, έχουν βρεθεί τόσο σε οικογενής περιπτώσεις της νόσου του Alzheimer όσο και σε σποραδικές (Weatherall D. J., 1996).

Το γονίδιο της πρεσενιλίνης 2 (PS2), προσδιορίστηκε ότι βρίσκεται στο χρωμόσωμα 1 και παρουσιάζει ομολογία με το PS1 σε ποσοστό 62%. Και οι μεταλλάξεις που οφείλονται στο PS2 συνδέονται με την οικογενή και τη σποραδική μορφή της νόσου (Levy-Lahad E., 1995).

Οι περισσότεροι ερευνητές θεωρούν ότι ο πιο σημαντικός παθολογικός ρόλος των PS1 και PS2, είναι η ικανότητά τους να διευκολύνουν την παραγωγή του β - αμυλοειδούς πεπτιδίου Αβ42 που εμφανίζεται στην πρώιμη έναρξη της ασθένειας. Ανοσοιστοχημικές μελέτες πάνω στα 2 αυτά γονίδια, έδειξαν πως εκφράζονται στον εγκέφαλο, τους νευρώνες και τους πυραμιδικούς νευρώνες του ιππόκαμπου (Tang., 2003).

Η γ - σεκρετάση, αποτελεί ένα σύμπλεγμα που περιέχει πρεσενιλίνη και η πρεσενιλίνη δρα από μόνη της ως γ - σεκρετάση. Πράγματι, έχουν προκύψει στοιχεία που υποστηρίζουν το ρόλο αυτό των PS1 και PS2 στην πρωτεόλυση της APP από τη γ - σεκρετάση, όπως επίσης σε διαμεμβρανικές πρωτεΐνες απαραίτητες για τη νευρογένεση και σε άλλα υποστρώματα. Επομένως οποιαδήποτε μείωση της λειτουργίας τη πρεσενιλίνης, οδηγεί σε μειωμένη παραγωγή των πεπτιδίων Αβ. Η αλληλεπίδραση αυτή, των PS1 και PS2 και της APP έχει σημαντικό ρόλο για την ανάπτυξη της νόσου του Alzheimer (Tang., 2003).

Το γονίδιο της β - αμυλοειδής πρωτεΐνης (APP) είναι το πρώτο γονίδιο στο οποίο εντοπίστηκε μετάλλαξη που θεωρήθηκε υπεύθυνη για την εμφάνιση της ασθένειας του Alzheimer. Μετά από αναλύσεις, παρατηρήθηκε ότι ανιχνεύεται στο γενετικό υλικό ατόμων με οικογενή μορφή της νόσου και λιγότερο σε σποραδικές περιπτώσεις (Kang J, 1987). Τα Αβ πεπτιδία που παράγονται από τη β - αμυλοειδή πρωτεΐνη, είναι νευροτοξικά με αποτέλεσμα η συσσώρευση τους στον εγκέφαλο να προκαλεί

παθοφυσιολογικές και παθολογοανατομικές αλλαγές όπως παρατηρούνται στον εγκέφαλο ασθενών με Alzheimer, συμπεριλαμβανομένου του σχηματισμού των γεροντικών πλακών και του νευρωνικού εκφυλισμού. Η APP εμφανίζεται με διάφορες ισομορφές εκ των οποίων η πιο μικρή, που αποτελείται από 695 αμινοξέα, εκφράζεται στους νευρώνες ενώ οι άλλες δύο ισομορφές σε νευρωνικά και μη νευρικά κύτταρα. Θεωρείται ότι υποβάλλεται σε μια σειρά από ενδοπρωτεολυτικές διασπάσεις. Η πρώτη διάσπαση γίνεται από την  $\alpha$  - σεκρετάση όπου γίνεται πέψη της APP, απελευθερώνοντας την υπομονάδα  $\alpha$ APPs και στη συνέχεια ακολουθεί πέψη από τη  $\gamma$  - σεκρετάση του C - τελικού άκρου και παράγεται το θραύσμα p3. Εκτός από την πέψη με την  $\alpha$  - σεκρετάση, γίνεται διάσπαση και με τη  $\beta$  - σεκρετάση η οποία κάνει και αυτή πέψη στην APP και απελευθερώνεται το κομμάτι  $\beta$ APPs. Στην συνέχεια ακολουθεί και σε αυτό το κομμάτι διάσπαση με τη  $\gamma$  - σεκρετάση όπου παράγεται το  $\beta$  - αμυλοειδές. Οι πιο πολλές μορφές του  $\beta$  που παράγεται είναι  $\beta$ 40 και λιγότερο  $\beta$ 42. Το  $\beta$ 40, διακρίνεται σε φυσιολογικούς γερασμένους εγκεφάλους αλλά και στην ασθένεια του Alzheimer στις καθυστερημένες μορφές έναρξης. Αντίθετα το  $\beta$ 42 εμφανίζεται στην πρόωμη έναρξη της ασθένειας. Όλα αυτά τα ευρήματα δείχνουν πως ο μεταβολισμός του  $\beta$ , είναι ένα σημαντικό στοιχείο για την θεραπευτική αγωγή της ασθένειας. Σε μελέτες σε διαγονιδιακά ποντίκια στα οποία έγινε εμβολιασμός με παθολογική αλλαγή στην APP και ανέπτυξαν παθολογικά δεδομένα, έγιναν προσπάθειες ανεύρεσης ενός συστατικού που θα εμπόδιζε την εναπόθεση των  $\beta$  - αμυλοειδών (Richardson J. 2002).

Τα άτομα που πάσχουν από το σύνδρομο Down, μέχρι το 40<sup>ο</sup> έτος της ζωής τους αναπτύσσουν την νόσο του Alzheimer καθώς το σύνδρομο αυτό είναι μία τρισωμία του χρωμοσώματος 21 στο οποίο υπάρχει η APP, και επομένως λόγω μεγαλύτερης ποσότητας της, εμφανίζουν σχεδόν πάντα την ασθένεια (Lott IT., 2004).

## Απολιποπρωτεΐνη E (APOE)

Το γονίδιο ApoE εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 19 και είναι υπεύθυνο για τη σύνθεση της απολιποπρωτεΐνης E. Η τελευταία παράγεται και εκκρίνεται στο κεντρικό νευρικό σύστημα από τα αστροκύτταρα. Η απολιποπρωτεΐνη E αποτελεί σημαντικό συστατικό ενός συγκεκριμένου τύπου λιποπρωτεΐνης, την λιποπρωτεΐνη χαμηλής πυκνότητας (VLDL) που απομακρύνουν την περίσσεια χοληστερόλης από το αίμα και τη μεταφέρουν στο ήπαρ. Το γονίδιο APOE αρχικά αναφέρθηκε ότι αποτελεί σημαντικό παράγοντα κινδύνου για την ανάπτυξη καρδιαγγειακών παθήσεων ενώ μόλις το 1993 (Thinakaran G., 1996) έγινε η αναφορά για τη σύνδεση του με τη νόσο του Alzheimer καθυστερημένης έναρξης. Στην ασθένεια του Alzheimer δεσμεύεται στις εξωκυττάριας γεροντικές πλάκες όσο και στους ενδοκυττάριας νευροϊνιδιακού σωρούς της υπερφωσφορυλιωμένης πρωτεΐνης Tau (Wisniewski T., 1992). Τα επίπεδα της APOE στο



πλάσμα έχει προσδιοριστεί ότι είναι χαμηλότερα σε ασθενείς με τη νόσο του Alzheimer σε σύγκριση με αυτούς που παρουσιάζουν ήπια γνωστικά προβλήματα.

Λόγω του γενετικού πολυμορφισμού, η APOE εμφανίζεται σε 3 ισομορφές E2, E3 και E4. Το αλληλόμορφο ε3 είναι το πιο κοινό, με ποσοστό να φτάνει στο 75%. Το αλληλόμορφο ε4 αποτελεί σημαντικό παράγοντα κινδύνου ανάπτυξης καθυστερημένης έναρξης της νόσου του Alzheimer τόσο σε οικογενής περιπτώσεις εμφάνισης όσο και σε σποραδικές (Corder E., 1993). Η παρουσία του αλληλομόρφου ε4 είτε σε κατάσταση ομοζυγωτίας ή ετεροζυγωτίας, δείχνει αυξημένο κίνδυνο εκδήλωσης της νόσου του Alzheimer. Μελέτες για τις μεταλλάξεις στην APOE απέδειξαν ότι μέχρι το 2003 υπήρξαν τουλάχιστον 22 νουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί (SNPs) και από αυτούς οι 7 πολυμορφισμοί εντοπίστηκαν σε θέσεις του υποκινητή (Fullerton SM., 2000).

Μετά από έρευνες βρέθηκε μία σύνδεση μεταξύ του γονιδίου του APOE και των Αβ πεπτιδίων που δημιουργούν τις γεροντικές πλάκες καθώς παρατηρήθηκε πως σε ασθενείς με τη νόσο Alzheimer, οι γεροντικές πλάκες παρουσιάζουν υψηλότερη επιβάρυνση όταν υπάρχει και το αλληλόμορφο ε4 σε σχέση με την εικόνα των γεροντικών πλακών όταν δεν εμφανίζεται το αλληλόμορφο ε4 (Sisodia SS., 2002).

## Μιτοχόνδρια

Οι πρώτες παρατηρήσεις των ενδοκυττάρων δομών που αντιπροσωπεύουν κατά πάσα πιθανότητα μιτοχόνδρια, δημοσιεύτηκαν στη δεκαετία του 1840. Ο όρος «μιτοχόνδρια» επινοήθηκε από τον Carl Benda, το 1898 ενώ ο Meves Friedrich, το 1904, έκανε την πρώτη καταγεγραμμένη παρατήρηση των μιτοχονδρίων σε φυτά. (Emster L, 1981). Η λέξη μιτοχόνδριο προέρχεται από το σύνθετο μίτος (που σημαίνει νήμα) και χόνδριον (που σημαίνει κόκκος).

Τα μιτοχόνδρια προέρχονται από βακτήρια που αφομοιώθηκαν από τα ευκαρυωτικά κύτταρα (θεωρία συμβίωσης) (Castro J., 1998). Βρίσκονται σε όλα τα ευκαρυωτικά κύτταρα (με λίγες εξαιρέσεις όπως είναι τα ώριμα ερυθροκύτταρα), αποτελούν ημιαυτόνομα οργανίδια, τα οποία συνυπάρχουν σε μία συμβιωτική σχέση με το κύτταρο και θεωρούνται ως το «ενεργειακό κέντρο» του (Stryer L. 2004). Σχηματικά διαφέρουν από κύτταρο σε κύτταρο και μπορεί να είναι κυκλικά με πλάτος περίπου 0,2μm και μήκος μέχρι 7μm όπως επίσης μπορεί να είναι σφαιρικά ή επιμήκη που είναι και η πιο συχνή μορφή (Θωμόπουλος Γ., 1995). Επίσης διαφέρει και ο αριθμός τους από κύτταρο σε κύτταρο, καθώς και η κατανομή τους η οποία είναι τυχαία μέσα στο κυτταρόπλασμα ή σε κάποιες περιπτώσεις μπορεί να συγκεντρώνονται σε

συγκεκριμένες περιοχές. Η μορφολογία των μιτοχονδρίων αλλάζει κατά την ενηλικίωση ή σε περιπτώσεις μετατροπής ενός κανονικού κυττάρου σε καρκινικό.

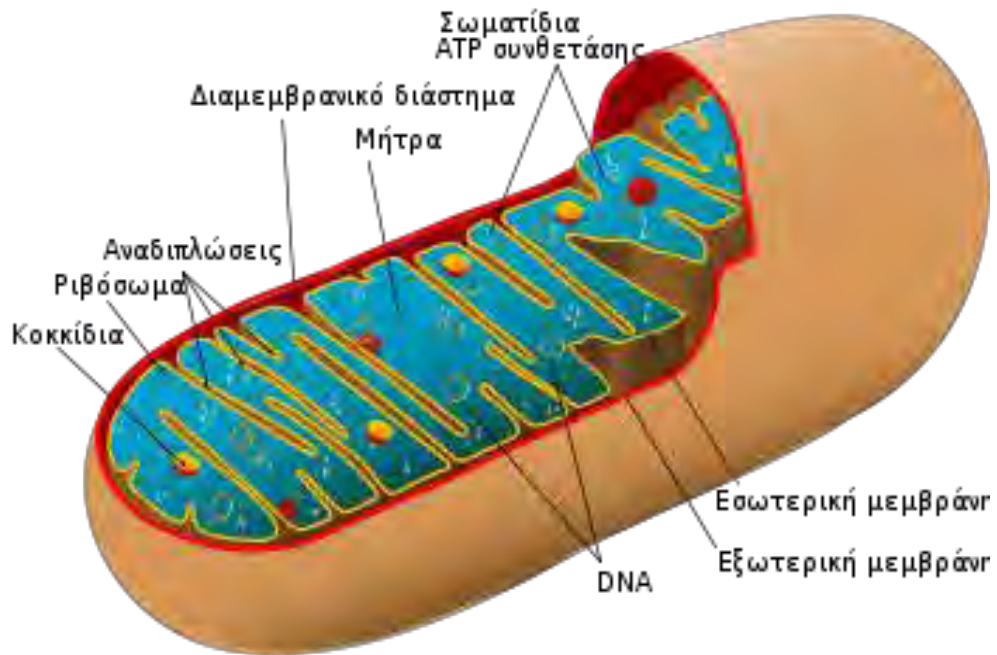
Τα κύτταρα που έχουν τις υψηλότερες απαιτήσεις σε ενέργεια, έχουν μεγαλύτερο αριθμό μιτοχονδρίων, όπως για παράδειγμα συμβαίνει με τα μυϊκά κύτταρα, τα ωάρια, τα κύτταρα των αισθητηρίων οργάνων και τα νευρικά κύτταρα.

Αποτελούνται από δύο μεμβράνες, μία εξωτερική (με πάχος 7nm) η οποία διαχωρίζει το μιτοχόνδριο από το υπόλοιπο κυτταρόπλασμα και μία εσωτερική (με πάχος 5nm). Οι πτυχώσεις της εσωτερικής μεμβράνης ονομάζονται ακρολοφίες και σχηματίζονται λόγω των πολλών αναδιπλώσεων της μεμβράνης. Οι πτυχώσεις αυτές ποικίλουν σε αριθμό και μορφολογία στα διάφορα κύτταρα και έχουν σα ρόλο την αύξηση της επιφάνειας της εσωτερικής μεμβράνης. Η εσωτερική μεμβράνη, περιέχει 25% φωσφολιπίδια και 75% πρωτεΐνες και είναι αδιαπέραστη από όλα τα ιόντα και τα πολικά μόρια. Αντίθετα, η εξωτερική μεμβράνη, είναι λεία, χωρίς αναδιπλώσεις και περιέχει περίπου 40% φωσφολιπίδια 60% πρωτεΐνες, είναι διαπερατή από όλα τα μικρά μόρια και ιόντα επειδή περιέχει πολλά μόρια της μιτοχονδριακής πορίνης (Alberts B., 1994).

Μεταξύ αυτών των μεμβρανών δημιουργείται ο διαμεμβρανικός χώρος που πληρείται με υγρό που χρησιμεύει στη λειτουργική επικοινωνία μεταξύ των δύο μεμβρανών. Ενώ ο εσωτερικός χώρος που περιβάλλεται από την εσωτερική μεμβράνη, ονομάζεται μήτρα. Κύτταρα που περιέχουν μιτοχόνδρια, εξαρτώνται από αυτά, για τη διαδικασία της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης η οποία λαμβάνει χώρα στην εσωτερική μεμβράνη (Stryer L., 2004).

Οι κύριες μεταβολικές διεργασίες που επιτελούνται στα μιτοχόνδρια είναι η οξειδωτική φωσφορυλίωση από την οποία παράγεται η απαιτούμενη ενέργεια που χρειάζεται το κύτταρο με τη μορφή ATP, ο κύκλος του Krebs και η μεταφορά ηλεκτρονίων. Επίσης τα μιτοχόνδρια συμμετέχουν και στις διαδικασίες απόπτωσης του κυττάρου.

Τα ελαττωματικά μιτοχονδριακά γονίδια που έχουν ως αποτέλεσμα την απουσία των ενζύμων τα οποία έχουν σχέση με τις βασικές λειτουργίες του μιτοχονδρίου για την παραγωγή ενέργειας, προκαλούν μείωση της παραγωγής ATP που οδηγεί σε λειτουργικά προβλήματα.



Εικόνα 5. Σχηματική απεικόνιση του μιτοχονδρίου. Διακρίνονται η εξωτερική και η αναδιπλωμένη εσωτερική μεμβράνη.

## Το Γενετικό Υλικό Των Μιτοχονδρίων

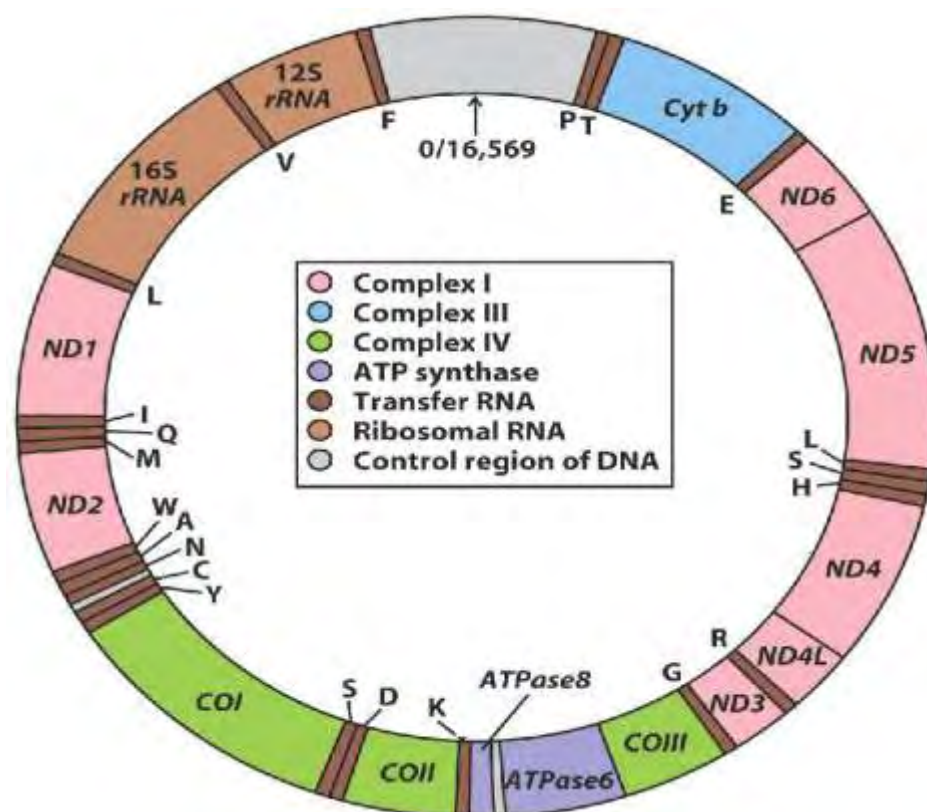
Τα μιτοχόνδρια περιέχουν το δικό τους DNA. Το μιτοχονδριακό DNA έχει διαφορετικά μεγέθη στα διάφορα είδη, όπως για παράδειγμα στη *Drosophila subobscura* που έχει μέγεθος 15.8kb ή στο φυτό *Zea mays* που έχει μέγεθος 570kb (Anderson S., 1981). Στον άνθρωπο το γενετικό υλικό του μιτοχονδρίου είναι κυκλικό, διπλής έλικας, με μία βαριά (H) αλυσίδα, πλούσια σε γουανίνες και μία ελαφριά (L) αλυσίδα, πλούσια σε κυτοσίνες, που αντανakλά τη συμπεριφορά του σε διαφορετικές πυκνότητες (Shoubridge E. A., 2007) και κωδικοποιεί μία ποικιλία πρωτεϊνών και μορίων RNA. Συγκεκριμένα αποτελείται από 37 γονίδια από τα οποία τα 22 είναι γονίδια μεταφορικού RNA (tRNA), 2 γονίδια ριβοσωμικού RNA (rRNA) με μία μικρή (12S) και μία μεγάλη (16S) υπομονάδα και 13 γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεϊνικές υπομονάδες της αναπνευστικής αλυσίδας. Η αλυσίδα αυτή αποτελείται από 5 σύμπλοκα I, II, III, IV και V. Κάθε ένα από αυτά τα σύμπλοκα απαρτίζεται, από ένα αριθμό πρωτεϊνών όπου οι οδηγίες για την παραγωγή αυτών των πρωτεϊνών βρίσκονται σε ένα μεγάλο αριθμό γονιδίων. Το μιτοχονδριακό DNA είναι πολύ συμπαγές, δεν υπάρχουν ιντρόνια ενώ υπάρχει μόνο μία περιοχή ελέγχου 1kb (Shoubridge E. A., 2007). Το mtDNA στα σωματικά κύτταρα αποτελείται από  $10^3 - 10^4$  αντίγραφα τα οποία συσπειρώνονται σε

«πακέτα» και δημιουργούν μία δομή πρωτεΐνης που περιέχει 2 έως 10 αντίγραφα του μιτοχονδριακού DNA (Legros, 2004). Κάθε μόριο έχει μήκος 16.569 ζεύγη βάσεων.

Το μιτοχονδριακό DNA συσσωρεύει πολύ πιο γρήγορα μεταλλάξεις σε σχέση με το πυρηνικό DNA και η αλληλουχία του διαφέρει από άτομο σε άτομο κατά 25 περίπου βάσεις και μέχρι σήμερα έχουν εντοπιστεί πάνω από 50 μιτοχονδριακές ασθένειες (Chinnery P. F. 1999). Αλλαγές σε οποιοδήποτε από τα μιτοχονδριακά γονίδια μπορεί να οδηγήσουν σε παραγωγή λανθασμένης πρωτεΐνης.

Ένα από τα κύρια χαρακτηριστικά του DNA των μιτοχονδρίων είναι η ιδιομορφία του στο γενετικό κώδικα, καθώς υπάρχουν κωδικόνια για τα οποία δεν ισχύει ο ίδιος κανόνας κωδικοποίησης όπως στον παγκόσμιο γενετικό κώδικα. Για παράδειγμα το κωδικόνιο AUA κωδικοποιεί για την ισολευκίνη στον παγκόσμιο γενετικό κώδικα ενώ στο μιτοχονδριακό DNA κωδικοποιεί για μεθειονίνη (Stryer L. 2004).

Παρά την αυτονομία του μιτοχονδρίου, υπάρχει στενή σχέση μεταξύ του μιτοχονδριακού DNA και του πυρηνικού DNA καθώς ορισμένες μιτοχονδριακές πρωτεΐνες κωδικοποιούνται και από τα δύο (mtDNA και nDNA), επίσης το mtDNA κωδικοποιεί ορισμένες υπομονάδες της αναπνευστικής αλυσίδας και οι υπόλοιπες κωδικοποιούνται από το nDNA. Shoubridge E. A., 2001).



Εικόνα 6. Σχηματική απεικόνιση του κυκλικού μιτοχονδριακού DNA. Διακρίνονται τα 22 γονίδια των tRNA, τα 2 γονίδια των rRNA και τα 13 γονίδια που κωδικοποιούν τις πρωτεϊνικές υπομονάδες της αναπνευστικής αλυσίδας.

## Μιτοχονδριακή Κληρονομικότητα

Ο αριθμός των μιτοχονδρίων σε κάθε κύτταρο, όπως προαναφέρθηκε, διαφέρει, και κυμαίνεται από λίγα μέχρι και εκατοντάδες. Κατά τη γονιμοποίηση τα μιτοχόνδρια που κληρονομούνται προέρχονται από το ωάριο. Για το λόγο αυτό, το πρότυπο της κληρονομικότητας των ασθενειών που οφείλεται σε μιτοχονδριακά γονίδια ονομάζεται μητρική κληρονομικότητα (Parasivam G. 2007). Επομένως μία μητέρα με μετάλλαξη στο μιτοχονδριακό DNA, μπορεί να την περάσει στους απογόνους της, ανεξαρτήτου φύλου. Το ποσοστό κατά το οποίο ένα παιδί μπορεί να κληρονομήσει μία μιτοχονδριακή πάθηση, εξαρτάται από τα αντίγραφα του μιτοχονδριακού DNA που θα λάβει. Όμως, υπάρχει και η πιθανότητα να γεννηθεί ένας υγιής απόγονος μητέρας με μιτοχονδριακή ασθένεια εάν δεν έχει κληρονομήσει κανένα παθολογικό μιτοχόνδριο. Στην περίπτωση που τα κύτταρα διαθέτουν δύο πληθυσμούς μιτοχονδριακού DNA σε διάφορες ποσότητες, δηλαδή έναν πληθυσμό φυσιολογικό (αγρίου τύπου) και ένα μεταλλαγμένο, τότε το φαινόμενο αυτό ονομάζεται ετεροπλασμία. Ενώ όταν όλα τα αντίγραφα είναι όμοια τότε έχουμε ομοπλασμία (Davis J., 1995).

Τα κύτταρα διαφόρων ιστών και οργάνων μπορεί να έχουν διαφορετικό αριθμό μιτοχονδρίων με ελαττωματικό γονίδιο όπως επίσης και ο αριθμός των κυττάρων που έχουν τα ελαττωματικά μιτοχόνδρια να διαφέρει σε κάθε ιστό και όργανο. Επομένως για να νοσήσει ένα παιδί θα πρέπει να έχει περάσει σε αρκετά κύτταρα ένα κρίσιμο επίπεδο (επίπεδο ουδού) μεταλλάξεων. Επομένως τα συμπτώματα της ασθένειας εξαρτάται αν θα εμφανιστούν ή όχι, από τον αριθμό των ελαττωματικών μιτοχονδρίων που θα πάρουν ώστε να επηρεαστεί η παραγωγή ενέργειας και άρα να εμφανιστεί η παθολογική εικόνα.

Οι ασθενείς με ελλείψεις στο μιτοχονδριακό DNA, παρουσιάζονται ως σποραδικές περιπτώσεις. Ένα παράδειγμα είναι η κληρονομική οπτική νευροπάθεια Leber (Leber hereditary optic neuropathy, LHON) η οποία δεν παρουσιάζει οικογενειακό ιστορικό σε ποσοστό άνω του 40%.

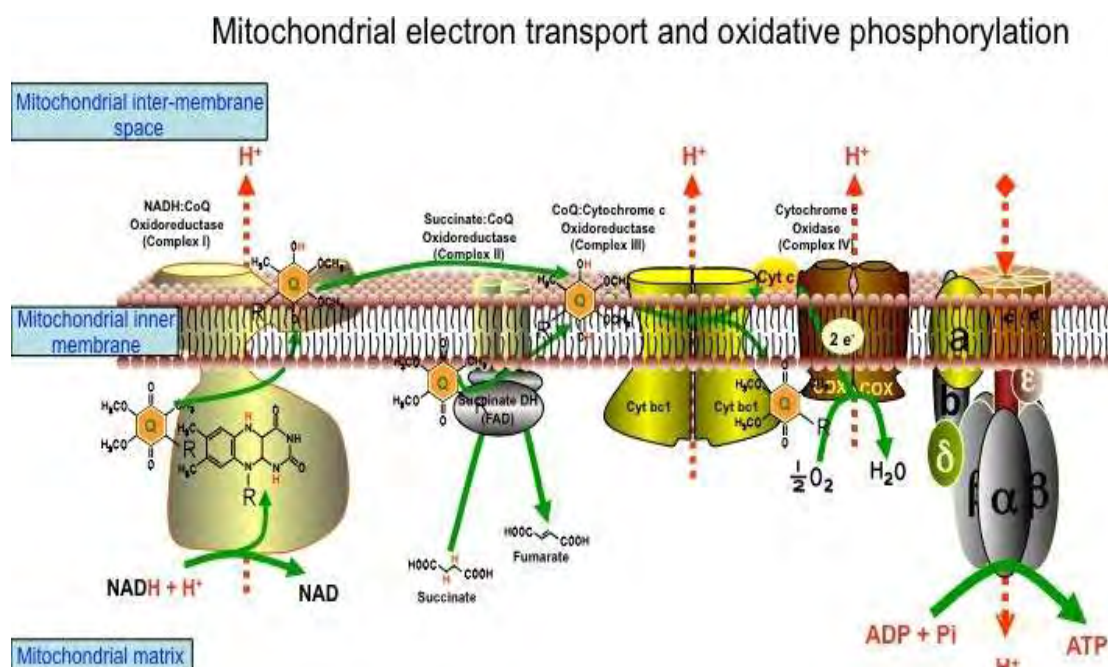
Αντίθετα τα σπερματοζωάρια συμμετέχουν ελάχιστα στην μιτοχονδριακή κληρονομικότητα. Ένας λόγος που ισχύει αυτό είναι, ότι τα μιτοχόνδρια των σπερματοζωαρίων βρίσκονται στην ουρά, η οποία δεν εισέρχεται στο έμβρυο μετά τη γονιμοποίηση (Brumhan L., 2003).

## Οξειδωτική Φωσφορυλίωση Και Δραστικές Ρίζες Οξυγόνου (ROS)

Η οξειδωτική φωσφορυλίωση είναι η διεργασία κατά την οποία παράγεται ATP αλλά και ελεύθερες ρίζες ROS (που αποτελούν τα παραπροϊόντα της διαδικασίας της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης) κι επιτελείται από τις πρωτεϊνικές υπομονάδες της αναπνευστικής αλυσίδας. Από τα σύμπλοκα αυτά μόνο το δεύτερο περιλαμβάνει πολυπεπτίδια που κωδικοποιούνται από το πυρηνικό DNA ενώ τα υπόλοιπα περιλαμβάνουν στη δομή τους μιτοχονδριακά κωδικοποιούμενες υπομονάδες (Shoffner J., 1997). Τα ηλεκτρόνια μεταφέρονται από το NADH ή το FADH<sub>2</sub> προς το O<sub>2</sub> δια μέσου μιας βαθμίδωσης συγκέντρωσης πρωτονίων μεταξύ των δύο πλευρών της εσωτερικής μεμβράνης (Stryer L. 2004). Η μετατροπή της ηλεκτρονιοκίνητης δύναμης σε πρωτονιοκίνητη, επιτελείται από τρεις ηλεκτρονιοκίνητες αντλίες πρωτονίων:

1. Την οξειδοαναγωγή του ζεύγους NADH - συνενζύμου Q.
2. Την οξειδοαναγωγή του ζεύγους συνενζύμου Q - κυτοχρώματος c.
3. Την οξειδάση του κυτοχρώματος c.

Τελικό προϊόν της λειτουργίας της αναπνευστικής αλυσίδας είναι το ενεργειακό νόμισμα του κυττάρου, δηλαδή το ATP.



Εικόνα 7. Σχηματική απεικόνιση της μεταφοράς των ηλεκτρονίων και της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης

Οι δραστικές ρίζες οξυγόνου (ROS), είναι σύμπλοκα τα οποία παράγονται από το μοριακό οξυγόνο μέσω μερικής χημικής αναγωγής με αποτέλεσμα οι ενώσεις αυτές να έχουν παραπάνω ηλεκτρόνια (Alessio H. 2006).

Εχουν πολύ σημαντικό ρόλο στην βιολογική εξέλιξη, αφήνοντας ευεργετικά αποτελέσματα για τους οργανισμούς. Οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου εμπλέκονται σε πολλές φυσιολογικές βιοχημικές δραστηριότητες των κυττάρων, όπως η μετάδοση του σήματος και η μεταγραφή των γονιδίων. Το μονοξειδίο του αζώτου (NO) είναι ένα σημαντικό μόριο, που έχει διάφορες λειτουργίες, μερικές εκ των οποίων είναι η ρύθμιση της χαλάρωσης και του πολλαπλασιασμού των αγγειακών λείων μυϊκών κυττάρων και η αγγειογένεση. Οι άνθρωποι είναι συνεχώς εκτεθειμένοι σε ελεύθερες ρίζες που δημιουργούνται στο περιβάλλον, όπως οι ρύποι και ο καπνός του τσιγάρου αλλά και από φυσικούς πόρους (Uttara B. 2009) Στις ROS συμπεριλαμβάνονται το υπεροξειδίο ( $O_2^{\cdot-}$ ), η ρίζα του υδροξυλίου ( $OH^{\cdot}$ ) και το υπεροξειδίο του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ).

Εκτός της παραγωγής της ATP, τα μιτοχόνδρια συμμετέχουν και σε άλλες διεργασίες σχετικά με τη φυσιολογία του κυττάρου, για παράδειγμα ο έλεγχος βασικών λειτουργιών, όπως η απόπτωση και η απόκριση σε παθολογικό stress. Ως οξειδωτικό stress ορίζεται η διαταραχή ισορροπίας μεταξύ της παραγωγής των ελεύθερων ριζών και της αντιοξειδωτικής άμυνας. Το οξειδωτικό stress μπορεί να προκαλέσει βλάβες σε όλα τα μακρομόρια (DNA, πρωτεΐνες, λιπίδια), δηλαδή αλλαγές στην τριτοταγή δομή και εκφυλισμό. Οι επιπτώσεις της πρωτεϊνικής καταστροφής σχετίζονται με την απώλεια της φυσιολογικής λειτουργίας των πρωτεϊνών. Στο DNA, η οξειδωτική βλάβη προκαλεί τροποποιήσεις στις πουρίνες, στις πυριμιδίνες και θραύσεις στις αλυσίδες. Οι τροποποιήσεις αυτές είναι δυνητικά μεταλλαξογόνες και οδηγούν στον καρκίνο, την πρόωρη γήρανση και τις νευροεκφυλιστικές ασθένειες. Ορισμένες μελέτες δείχνουν ότι ο εγκεφαλικός ιστός είναι πολύ ευάλωτος στην οξειδωτική επίθεση. (Betteridge D. 2000).

Η έκθεση σε ελεύθερες ρίζες και η αλλαγή της οξειδοαναγωγικής κατάστασης του μιτοχονδρίου, οδηγεί σε αύξηση παραγωγής των ελεύθερων ριζών από το μιτοχόνδριο (από δυσλειτουργία της αναπνευστικής αλυσίδας από τα συμπλέγματα I και III, που είναι και η κύρια πηγή της παραγωγής των ROS), με αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός συστήματος, υπεύθυνο για τη μετάδοση των διαταραχών σε γειτονικά μιτοχόνδρια. Επομένως, μία μεταλλαγή μπορεί να πολλαπλασιαστεί και να επεκταθεί σε όλο το κύτταρο αλλά και σε γειτονικά. Το φαινόμενο αυτό είναι γνωστό ως RIRR (ROS - Induced ROS Release). Η υπερβολική παραγωγή των ROS, που προκαλείται από τη μιτοχονδριακή δυσλειτουργία, μπορεί να οδηγήσει στην οξείδωση των μακρομορίων και έχει εμπλακεί σε μεταλλάξεις του μιτοχονδριακού DNA όπως επίσης στη γήρανση και το θάνατο των κυττάρων. Η παραγωγή τους διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην

απελευθέρωση του κυτοχρώματος c και άλλων προ - αποπτωτικών πρωτεϊνών και προκαλεί την παραγωγή των κασπασών και την απόπτωση (Ott M. 2007).

Ο πόρος μετάπτωσης της μιτοχονδριακής διαπερατότητας (MPTP, Mitochondrial Permeability transition pore), που έχει σημαντικό ρόλο στην απόπτωση, είναι ένα μονοπάτι υψηλής αγωγιμότητας που επιτρέπει τη μετάβαση σε μόρια μεγάλου μοριακού βάρους. Ο πόρος μετάπτωσης αποτελείται από τις ANT (Adenine Nucleotide Translocase) πρωτεΐνες που εντοπίζονται στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη, την κυκλοφιλίνη D (CypD) στη μήτρα και τις πρωτεΐνες VDAC (Voltage dependent Anion Channels).

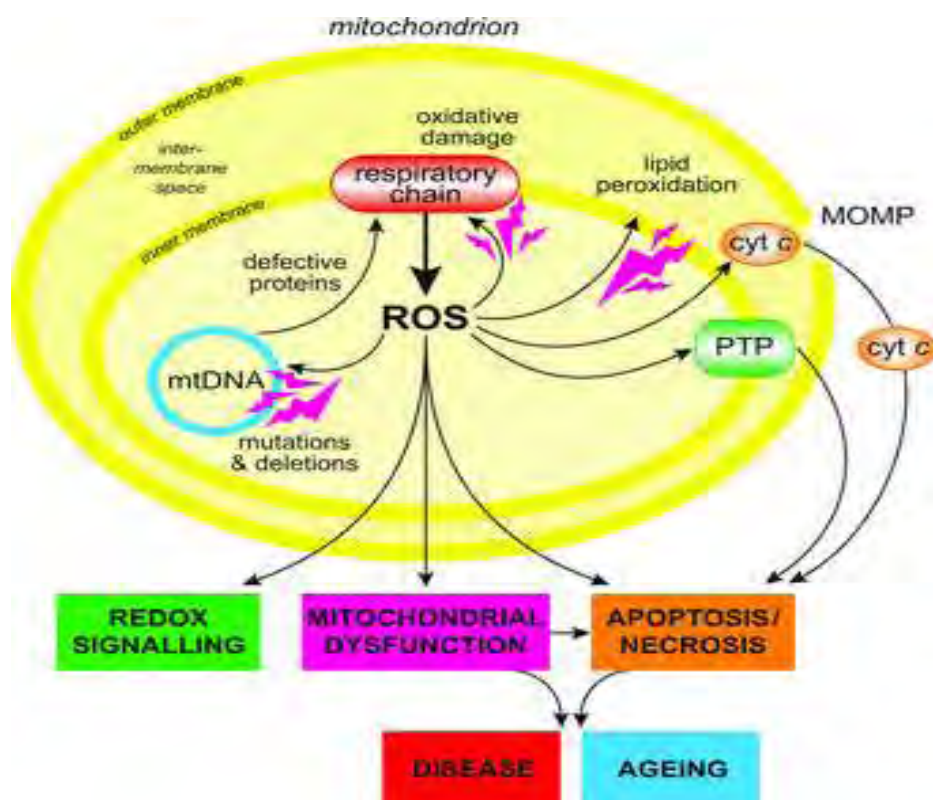
Το οξειδωτικό stress και τα υψηλά επίπεδα του  $Ca^{2+}$  στα μιτοχόνδρια, αποτελούν αιτίες ώστε να ανοίξει ο MPTP. Η ενεργοποίηση του πόρου προκαλεί τη διόγκωση του χώρου της μήτρας στην εσωτερική μεμβράνη και την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c (cyt c) που οδηγεί στην απόπτωση του κυττάρου. Ο Du και οι συνεργάτες του το 2009 διατύπωσαν ότι η συσσώρευση του πεπτιδίου Aβ (που όπως αναφέρθηκε συμμετέχει στην ανάπτυξη της παθολογίας της νόσου) επάγει το σχηματισμό επιπλέον mMPTPs, διαταραχή του μιτοχονδριακού μεμβρανικού δυναμικού και αυξημένη απελευθέρωση ROS. Η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία που προκαλείται εξαιτίας της παρουσίας του πεπτιδίου, ακολουθείται από διόγκωση των μιτοχονδρίων και απελευθέρωση του κυτοχρώματος c. Το τελευταίο γεγονός πυροδοτεί σειρά αντιδράσεων σε μονοπάτια κυτταρικού θανάτου (Du et al., 2009). Αντίστοιχες μελέτες αναφέρουν ότι και η κυκλοφιλίνη D υπερεκφράζεται σε εγκεφάλους ασθενών με τη νόσο Alzheimer, σε σχέση με άτομα που δεν πάσχουν από τη νόσο κι αυτή η αύξηση επάγει το άνοιγμα των mPTPs (Du et al., 2008, Eliseev et al., 2007).

Τα σύμπλοκα I έως V της αναπνευστικής αλυσίδας εμπλέκονται στη μεταφορά ηλεκτρονίων και την οξειδωτική φωσφορυλίωση. Μία έρευνα από τον Liu et al, κατά την οποία φάρμακα που περιέχουν διαζοξίδη (diazoxide) επηρεάζουν την αναστολή του συμπλέγματος II αυξάνοντας την παραγωγή των ελευθέρων ριζών (Duchen M. R. 2004). Σε μία παρόμοια έρευνα, αποδείχθηκε ότι και η νιτρογλικερίνη (GTN), το πιο κοινό φάρμακο για τη θεραπεία ασθενών με καρδιαγγειακές παθήσεις, που δρα στη μιτοχονδριακή μήτρα προκαλεί αύξηση της παραγωγής των δραστικών ριζών ROS λόγω πρόκλησης βλάβης στην αναπνευστική αλυσίδα (Gori T., 2007).

Τα μιτοχόνδρια περιέχουν μη κορεσμένα λιπίδια και για αυτό το λόγο είναι πιο επιρρεπή στην οξειδωτική τροποποίηση. Οι πρωτεΐνες που βρίσκονται στη μιτοχονδριακή μήτρα, δέχονται υψηλότερο βαθμό οξειδωτικής τροποποίησης όπως επίσης και το μιτοχονδριακό DNA, το οποίο επειδή δεν έχει πολύπλοκη οργάνωση και τη δυνατότητα επιδιόρθωσης όπως συμβαίνει με το πυρηνικό DNA, δεν μπορεί



προστατευθεί. Σε μία μελέτη που έγινε από τους Yankes F. και Van Houten B., όπου χρησιμοποίησαν ένα γονίδιο που είχε υποστεί βλάβη στο DNA, και ο προσδιορισμός του βασίστηκε στην διαδικασία της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR), αποκάλυψε πως τα κατεστραμμένα νουκλεοτίδια μπλοκάρουν την πρόοδο της πολυμεράσης με αποτέλεσμα τη μειωμένη ενίσχυση της ακολουθίας - στόχου, γεγονός που επιβεβαιώνει ότι το μιτοχονδριακό DNA είναι πιο επιρρεπές από το πυρηνικό (Yau-Huei W. 2008).

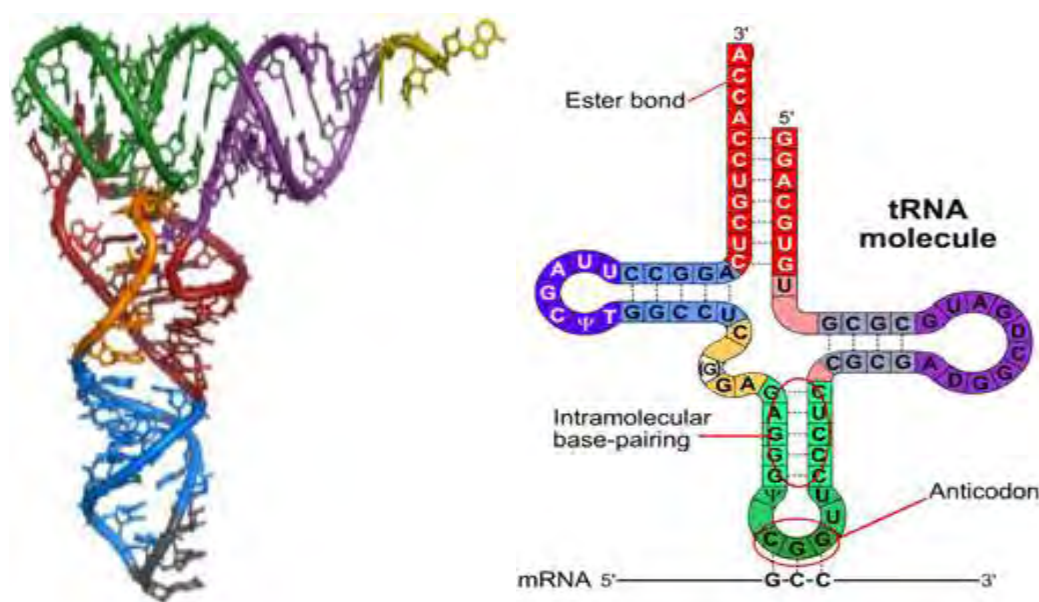


Εικόνα 8. Η παραγωγή των ROS από τα μιτοχόνδρια μπορεί να οδηγήσει σε οξειδωτική βλάβη στις μιτοχονδριακές πρωτεΐνες, τη μεμβράνη και το DNA, μειώνει την ικανότητα σύνθεσης ATP από τα μιτοχόνδρια και αδυνατεί να πραγματοποιήσει τις μεταβολικές λειτουργίες συμπεριλαμβανομένου του κύκλου του τρικαρβοξυλικού οξέος, την οξείδωση των λιπαρών οξέων, τον κύκλο της ουρίας, το μεταβολισμό των αμινοξέων, τη σύνθεση της αίμης και του FeS σημαντικές διεργασίες για την ομαλή κεντρικής σημασίας λειτουργία των περισσότερων κυττάρων. Η μιτοχονδριακή οξειδωτική βλάβη μπορεί επίσης να αυξήσει την τάση των μιτοχονδρίων να απελευθερώσει στο χώρο της εσωτερικής μεμβράνης πρωτεΐνες όπως το κυτόχρωμα c. Επιπλέον, η μιτοχονδριακή παραγωγή ROS οδηγεί στην επαγωγή του μιτοχονδριακού πόρου μεταβατικής διαπερατότητας (PTP), η οποία καθιστά την εσωτερική μεμβράνη διαπερατή σε μικρά μόρια σε καταστάσεις όπως ισχαιμία. Κατά συνέπεια, δεν είναι έκπληξη το γεγονός ότι η μιτοχονδριακή οξειδωτική βλάβη συμβάλλει σε ένα ευρύ φάσμα παθήσεων.

## Χαρακτηριστικά Και Μεταλλάξεις Των Μιτοχονδριακών Γονιδίων tRNA

Η ύπαρξη του tRNA αναφέρθηκε για πρώτη φορά από τον Francis Crick, ενώ στις αρχές της δεκαετίας του '60 έγινε η πρώτη αναφορά για τη δομή του. Είναι το μικρότερο μόριο του RNA, γιατί αποτελείται από 75 περίπου νουκλεοτίδια, με μάζα 25kd.

Η δευτεροταγής δομή είναι αυτή του τριφυλλιού που έχει τέσσερα στελέχη και τρεις βρόγχους. Ο βρόγχος του αντικωδικονίου έχει τρεις βάσεις που δημιουργούν το αντικωδικόνιο που είναι ειδικό για το κάθε κωδικόνιο του mRNA (και αποτελεί το στέλεχος του βραχίονα - δέκτη) και εξασφαλίζει την πρόσθεση του σωστού αμινοξέος κατά τη διάρκεια της μετάφρασης. Η κλασική μορφή του τριφυλλιού δεν ισχύει για τα mt - tRNAs της Ser(AGY) όπου λείπει όλος ο D βραχίονας ενώ της Ser(UCN) έχει μόνο ένα νουκλεοτίδιο που συνδέει το D - βραχίονα με το βρόγχο του αντικωδικονίου (Yarham J., 2010). Οι βραχίονες D και T είναι πιο μεταβλητοί σε μέγεθος σε σχέση με τα κυτταροπλασματικά tRNAs και η μεταβλητή περιοχή πολύ μικρότερη. Τα ζεύγη των βάσεων στα στελέχη των mt - tRNAs δείχνουν ότι υπάρχει μία καθολική τριτοταγής δομή. Το σχήμα είναι αυτό του ανάποδου L και προκύπτει από αλληλεπιδράσεις μεταξύ των στελεχών (Torroni A. 2001).



Εικόνα 9. Σχηματική απεικόνιση της τριτοταγούς και δευτεροταγούς δομής του μορίου του tRNA όπου διακρίνουμε τον βρόγχο του αντικωδικονίου με τις τρεις βάσεις. Στη δευτεροταγή δομή διακρίνουμε από τα αριστερά τον T (TΨC loop) βραχίονα και αριστερά τον D βραχίονα (βραχίονας διϋδροουριδίνης).

Οι μιτοχονδριακές ασθένειες προκαλούνται από ελαττώματα είτε στο μιτοχονδριακό DNA (mtDNA) είτε στο πυρηνικό (nDNA). Οι μεταλλάξεις στο μιτοχονδριακό DNA είναι υπεύθυνες για πολλές εκφυλιστικές ασθένειες, οι οποίες κυρίως επηρεάζουν το κεντρικό νευρικό σύστημα, την καρδιά, τους μύς και το ενδοκρινικό σύστημα.

Υπάρχουν δύο τύποι μιτοχονδριακών μεταλλάξεων που αφορούν τις αναδιοργανώσεις (αναφέρονται κυρίως σε διαγραφές ή επαναλήψεις) και τις σημειακές μεταλλάξεις. Οι σημειακές μεταλλάξεις εντοπίζονται κυρίως στο tRNA και το rRNA οι οποίες επηρεάζουν και την πρωτεϊνική μετάφραση προκαλώντας προβλήματα στην αναπνευστική αλυσίδα.

Μεταλλάξεις σε διαφορετικές θέσεις στο ίδιο γονίδιο tRNA μπορούν να προκαλέσουν αρκετά διαφορετικά κλινικά σύνδρομα. Οι μιτοχονδριακές διαταραχές χαρακτηρίζονται επίσης από ποικιλία φαινοτύπων, κατά τις οποίες οι ίδιες σημειακές μεταλλάξεις μπορεί να οδηγήσουν σε διαφορετικούς φαινοτύπους μίας νόσου. Χαρακτηριστικό παράδειγμα, είναι η μετάλλαξη στο tRNA<sup>Leu</sup> A3243G ευθύνεται για το σύνδρομο MELAS αλλά έχει επίσης βρεθεί σε ασθενείς με διαβήτη, κώφωση ή CPEO (Yarham J., 2010). Και στα 22 tRNA έχουν εντοπιστεί παθογόνες μεταλλάξεις που παρουσίαζαν μεγάλη ποικιλία στους φαινοτύπους.

Με το πέρασμα του χρόνου, γίνονται έρευνες σε διάφορα γονίδια tRNA και διαπιστώνονται όλο και πιο πολλές μεταλλάξεις. Μέχρι πριν μερικά χρόνια, τα γονίδια του tRNA στα οποία εντοπίστηκαν οι πιο πολλές μεταλλάξεις ήταν το tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> και το tRNA<sup>Ile</sup>.

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

Πίνακας 1. Απεικονίζονται οι παθογόνες και πολυμορφικές σημειακές μεταλλάξεις στα tRNAs των γονιδίων του ανθρώπινου μιτοχονδρίου, όπως είχαν καταγραφεί μέχρι το 2007.

## Συσχέτιση Μιτοχονδριακής Δυσλειτουργίας Και Alzheimer

Το 1989 φάνηκε για πρώτη φορά μέσω της τεχνικής των κυτταροπλασματικών υβριδίων (cybrid) ότι η οξειδωτική βλάβη που επάγεται από τη μιτοχονδριακή δυσλειτουργία μπορεί να είναι γενετικά καθορισμένη (και άρα αίτιο της νόσου Alzheimer και όχι συνέπείά της). Σύμφωνα με την τεχνική των cybrid, έγινε ανασύσταση του μιτοχονδριακού πληθυσμού κυττάρων που δεν είχαν δικό τους mtDNA, με εξωγενές mtDNA ασθενών με Alzheimer. Οι φαινοτυπικές διαφορές που αναπτύχθηκαν στα cybrid, οφείλονταν στο mtDNA που περιείχαν και όχι σε περιβαλλοντικούς παράγοντες (Trimmer PA. 2004).

Το 1990, σε μία δεύτερη έρευνα που έγινε από τον Parker et al, αναφέρθηκε πως τμήματα αιμοπεταλίων από ασθενείς που είχαν τη νόσο του Alzheimer, είχαν χαμηλότερα επίπεδα δραστικότητας της οξειδάσης του κυτοχρώματος, δηλαδή στο σύμπλοκο IV της αναπνευστικής αλυσίδας, σε σχέση με τα αντίστοιχα δείγματα που εξετάστηκαν από άτομα που δεν έπασχαν από την ασθένεια. Με το συμπέρασμα αυτό, πολλοί επιστήμονες ανέφεραν μειωμένη δραστικότητα της οξειδάσης του κυτοχρώματος σε διάφορους ιστούς, συμπεριλαμβανομένου του εγκεφάλου (Mutisya EM. 1994). Τα παραπάνω επιβεβαιώθηκαν σε νέα έρευνα το 2002 από τον Cottrell et al, σύμφωνα με την οποία βρέθηκε πως νευρώνες στον εγκέφαλο ασθενών της νόσου Alzheimer, είναι ελλιπείς σε δραστικότητα της οξειδάσης. Παρόλα αυτά, σε αυτή την έρευνα η ελλιπής δραστικότητα της οξειδάσης δεν συνδέθηκε με τις αμυλοειδικές πλάκες και τους νευροϊνιδιακούς σωρούς ή με στοιχεία απόπτωσης. Παρόμοια αποτελέσματα έδειξε έρευνα του 2001 (Valla et al), όπου και πάλι διαπιστώθηκε έλλειψη της δραστικότητας της οξειδάσης στον οπίσθιο φλοιό, σε ασθενείς με Alzheimer, χωρίς να παρουσιάζουν όμως τη χαρακτηριστική παθολογική εικόνα.

Με βάση τις αναλύσεις που έγιναν στους ασθενείς της νόσου του Alzheimer, δημιουργήθηκαν τρεις υποθέσεις σχετικά με τη συσχέτιση της ασθένειας με τη μιτοχονδριακή δυσλειτουργία (Elson J. L. 2006).

Αρχικά η πρώτη υπόθεση είναι ότι οι επιπτώσεις που συσσωρεύονται από τις πολλαπλά φαινοτυπικά ανεπαίσθητες μεταλλάξεις του tRNA αποτελούν κίνδυνο εμφάνισης της ασθένειας. Βέβαια, για να επιβεβαιωθεί αυτό θα πρέπει να εξεταστεί ο αριθμός των συσσωρευμένων μεταλλάξεων στον ασθενή (που μπορεί να είναι ένα γονίδιο, σύνολο γονιδίων που συνδέονται με τις λειτουργίες των μιτοχονδρίων όπως για παράδειγμα στα σύμπλοκα της αναπνευστικής αλυσίδας). Η δεύτερη υπόθεση είναι η ύπαρξη παθογόνου μετάλλαξης σε σημαντική συχνότητα στον πληθυσμό. Όμως επειδή μπορεί να υπάρχουν πολλές μεταλλάξεις που να είναι σπάνιες στον πληθυσμό,

αυξάνεται ο κίνδυνος ανάπτυξης της ασθένειας. Η συγκεκριμένη όμως υπόθεση δύσκολα μπορεί να επιβεβαιωθεί λόγω της εξέλιξης του mtDNA, που καθιστά δύσκολη την έρευνα του για τον εντοπισμό σπάνιων παθογόνων μεταλλάξεων. Η Τρίτη υπόθεση αφορά τη σύνδεση μιας διαταραχής με τις απλοομάδες του mtDNA, όπου όταν πολυμορφισμοί σχετίζονται με συγκεκριμένη απλοομάδα τότε θεωρείται παράγοντας κινδύνου ανάπτυξης της ασθένειας (Elson J., 2006).

## Απλοομάδες Και Συσχέτιση Με Τη Νόσο Του Alzheimer

Πολλές απλοομάδες εδρεώθηκαν λόγω της γενετικής ποικιλομορφίας και των νουκλεοτιδικών πολυμορφισμών (SNPs). Στην Ευρωπαϊκό πληθυσμό έχει διαπιστωθεί ότι υπάρχουν εννέα μιτοχονδριακές απλοομάδες (H, I, J, K, T, U, V, W, X) (Wallace D.C., 1994).

Σύμφωνα με μελέτη που έγινε το 2004, απεδείχθη ότι υπάρχει συσχέτιση των κληρονομούμενων μιτοχονδριακών παραλλαγών στην εμφάνιση της σποραδικής μορφής της ασθένειας του Alzheimer, που είναι φυλο - ειδική και ανεξάρτητη από την απολιποπρωτεΐνη APOE. Πιο συγκεκριμένα, οι άνδρες που είχαν την απλοομάδα U, εμφάνιζαν μεγαλύτερο κίνδυνο ανάπτυξης της νόσου του Alzheimer σε σχέση με τα άτομα της απλοομάδας H, ενώ οι γυναίκες είχαν μικρότερο κίνδυνο εμφάνισης της νόσου, στην απλοομάδα U σε σχέση με την H. Επίσης σημαντικό χαρακτηριστικό είναι η εμφάνιση συγκεκριμένων αλληλομόρφων σε άντρες και γυναίκες. Οι άνδρες που εμφάνιζαν το αλληλόμορφο 10398A, είχαν μεγαλύτερο κίνδυνο εμφάνισης της ασθένειας του Alzheimer, ενώ στις γυναίκες ο κίνδυνος εμφάνισης της νόσου αυξανόταν με την εμφάνιση του αλληλόμορφου 7028T, ενώ όσες γυναίκες είχαν το αλληλόμορφο 12308G, είχαν μειωμένο κίνδυνο να νοσήσουν (Van De Walt J. M., 2004).

Επομένως σύμφωνα με την έρευνα η απλοομάδα U και τα αλληλόμορφα 10398A και 7028T είναι η πιο επικίνδυνη για την εμφάνιση και την ανάπτυξη της ασθένειας του Alzheimer. Το αποτέλεσμα αυτό είναι ιδιαίτερα ενδιαφέρον εφόσον γνωρίζουμε πως η νόσος του Alzheimer, είναι μία ασθένεια που κληρονομείται από τη γυναίκα.

Table 1  
Characterization of European haplogroups

Haplogroup	1719	4580	7028	8251	9055	10398	12308
H			C			A	
I	A		T	A		G	
J			T			G	
K			T		A	G	G
T			T			A	
U			T			A	G
V		A	T			A	
W			T	A		A	
X	A		T			A	

Πίνακας 2. Ο παραπάνω πίνακας δείχνει της 9 απλοομάδες σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή έρευνα. Διακρίνουμε επίσης τα δύο αλληλόμορφα που είναι επικίνδυνα για την εμφάνιση της νόσου.

Ακολουθεί το πειραματικό μέρος της εργασίας. Η μελέτη έγινε πάνω στα μιτοχονδριακά γονίδια tRNA<sup>Ile</sup>, tRNA<sup>Gln</sup>, tRNA<sup>Met</sup> και tRNA<sup>Lys</sup> με σκοπό την εύρεση πιθανών μεταλλάξεων που οφείλονται στην ασθένεια του Alzheimer.







# **ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**



## Υλικά Και Μέθοδοι

Οι πειραματικές διαδικασίες που έγιναν, πραγματοποιήθηκαν σε 50 δείγματα DNA ασθενών με Alzheimer τα οποία δεν είχαν καμία συγγενική σχέση μεταξύ τους, καθώς και σε 20 δείγματα DNA (στα οποία έχει γίνει πρώτα απομόνωση, αφού λάβαμε δείγματα αίματος) όπου όμως τα άτομα αυτά δεν πάσχουν από την ασθένεια. Αυτό γίνεται με σκοπό την σύγκριση του γενετικού υλικού ασθενών και μη ασθενών. Τα γονίδια που εξετάσαμε ήταν δύο, τα γονίδια tRNA<sup>Ile</sup>, tRNA<sup>Gln</sup>, tRNA<sup>Met</sup> και Lys.

Οι τεχνικές που έγιναν είναι οι εξής:






-  Απομόνωση
-  PCR
-  Ηλεκτροφόρηση
-  SSCP
-  Καθαρισμός δειγμάτων
-  Αλληλούχιση

Στη συνέχεια ακολούθησε έλεγχος των μεταλλάξεων που εντοπίστηκαν μέσω προγράμματος υπολογιστή (BLAST) καθώς και μέσω του προγράμματος Mitomap βρέθηκαν τα σημεία αλλαγής στη νουκλεοτιδική σειρά σε σύγκριση με ένα αριθμό φυσιολογικών δειγμάτων.

## Απομόνωση DNA

Η απομόνωση του DNA γίνεται με σκοπό τις επόμενες διαδικασίες από δείγματα αίματος.

Τα στάδια της απομόνωσης του DNA είναι τα ακόλουθα:

-  Σε erpendorf των 2ml τοποθετούμε 0,5ml ολικού αίματος και 1ml SSC 1x
-  Αναδεύουμε στο vortex
-  Κάνουμε φυγοκέντρηση για 3 λεπτά στις 13.000 στροφές
-  Απομακρύνουμε το υπερκείμενο
-  Προσθέτουμε 1ml SSC 1x και ξανααναδεύουμε στο vortex ώστε να ξεκολλήσει το ίζημα

- ✚ Φυγοκεντρούμε για 2 λεπτά στις 13.000 στροφές
- ✚ Απομακρύνουμε το υπερκείμενο
- ✚ Ακολουθεί διάλυση του ιζήματος σε 0,5ml NaOAc 0,2M
- ✚ Προσθέτουμε 50μl SDS 5%
- ✚ Προσθέτουμε 10μl πρωτεΐνάσης K αφού γίνει πρώτα spin της K
- ✚ Αναδεύουμε στο vortex και επωάζουμε στους 55 οC για μισή ή μία ώρα (όπου όπως αν δεν έχει μπει σε ειδική συσκευή ανάδευσης πρέπει να αναδεύουμε ελαφρά κάθε 10 λεπτά)
  - ✚ Στη συνέχεια προσθέτουμε 0,5ml φαινόλη και 0,5ml χλωροφόρμιο (με προσοχή στον απαγωγό)
  - ✚ Αναδεύουμε στο vortex
  - ✚ Φυγοκεντρούμε για 7 λεπτά στις 13.000 στροφές
  - ✚ Μεταφέρουμε το υπερκείμενο σε νέο erpendorf με προσοχή
  - ✚ Προσθέτουμε 1ml χλωροφόρμιο
  - ✚ Ακολουθεί ήπια ανακίνηση
  - ✚ Φυγοκεντρούμε για 10 λεπτά στις 13.000 στροφές
  - ✚ Μεταφέρουμε το υπερκείμενο σε νέο erpendorf με προσοχή
  - ✚ Προσθέτουμε 1ml ισοπροπανόλης (με προσοχή στον απαγωγό)
  - ✚ Επωάζουμε στους -20 οC για 15 λεπτά
  - ✚ Φυγοκεντρούμε για 20 λεπτά στις 13.000 στροφές
  - ✚ Απομακρύνουμε το υπερκείμενο
  - ✚ Προσθέτουμε 1 ml παγωμένης αιθανόλης 70%
  - ✚ Φυγοκεντρούμε για 15 λεπτά στις 13.000 στροφές
  - ✚ Απομακρύνουμε το υπερκείμενο και ακολουθεί ξήρανση με ανοιχτό καπάκι για μία ώρα στους 55 οC
    - ✚ Προσθέτουμε 100μl ddH<sub>2</sub>O και αφήνουμε να διαλυθεί σε θερμοκρασία δωματίου

## PCR (Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης) - PCR (Polymerase Chain Reaction)

Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης είναι μία επαναστατική μέθοδος που αναπτύχθηκε από την ομάδα του ερευνητή Kary Mullis τη δεκαετία του 1980. Βασίζεται στην ικανότητα της πολυμεράσης του DNA να συνθέτει νέα σκέλη του DNA συμπληρωματικά προς τα πρότυπα σκέλη και παρέχει τη δυνατότητα ενίσχυσης μιας μικρής αλληλουχίας του γονιδιώματος χωρίς προηγούμενη κλωνοποίηση.



Εικόνα 10. Μηχάνημα PCR

### Αρχή Μεθόδου

Η ενίσχυση του τμήματος του DNA που λειτουργεί ως εκμαγείο, γίνεται μέσα σε λίγες ώρες και δίνει ένα μεγάλο αριθμό αντιγράφων. Το τμήμα του γονιδιώματος που θέλουμε να ενισχύσουμε δεν χρειάζεται να είναι μεγάλο ενώ ο αριθμός των αντιγράφων, εξαρτάται από τον αριθμό των κύκλων της αντίδρασης. Ενώ το τμήμα που θα ενισχυθεί μπορεί να είναι μέρος γονιδίου, ένα μόνο γονίδιο ή ακόμα και μη κωδική περιοχή του γονιδίου. Η PCR είναι εξαιρετικά επιλεκτική και ευαίσθητη μέθοδος. Μικροποσότητες RNA μπορούν επίσης να αναλυθούν με τον ίδιο τρόπο, μετά τη μεταγραφή τους σε DNA από την ανάστροφη τρανσκριπτάση (RT-PCR - reverse transcription PCR).

Για την αντίδραση της PCR απαιτούνται:

✚ Τμήμα DNA - στόχος

✚ Εκκινητές (primers)

Ολιγονουκλεοτίδια (18 - 22 βάσεις) με συμπληρωματική δομή προς τις πλευρικές αλληλουχίες του DNA.

✚ DNA πολυμεράση (Taq πολυμεράση)

Θερμοσταθερή DNA πολυμεράση, με βέλτιστη θερμοκρασία 72oC, αρκετά σταθερή στους 95oC και παραμένει ενεργή σε όλη τη διάρκεια των κύκλων του πολλαπλασιασμού.

✚ Τριφωσφορικά Δεοξυνουκλεοτίδια (dNTPs)

Μεμονωμένες βάσεις (A, T, C, G) που αποτελούν τα δομικά στοιχεία του DNA.

✚ Ρυθμιστικό διάλυμα (buffer solution)

Δημιουργεί τις κατάλληλες συνθήκες για την καλύτερη δράση και τη σταθερότητα της DNA πολυμεράσης.

✚ Κατιόντα Mg<sup>2+</sup>

Απαραίτητα για την αντίδραση της DNA πολυμεράσης.

Τα παραπάνω υλικά τοποθετούνται σε erpendorf των 0,5ml με τελευταίο να τοποθετείται η Taq πολυμεράση ώστε να μην ξεκινήσει η διαδικασία σε λάθος χρονική στιγμή πριν τοποθετηθούν τα erpendorf στη συσκευή. Μεγάλη προσοχή θα πρέπει να δοθεί στη διαδικασία καθώς οι συνθήκες αποστείρωσης θα πρέπει να τηρούνται στο έπακρον για να αποφευχθούν πιθανές επιμολύνσεις των δειγμάτων.

Ένας πλήρης κύκλος μιας PCR αντίδρασης περιλαμβάνει τρία βασικά στάδια:

✚ Αποδιάταξη του DNA (denaturation)

✚ Προσαρμογή των εκκινητήρων στο DNA εκμαγείο (annealing)

✚ Επιμήκυνση των εκκινητήρων (extension).

Αναλυτικά τα στάδια ενίσχυσης του DNA στην PCR στον θερμικό κυκλοποιητή είναι τα εξής:

✚ Πρώτο στάδιο: Η θερμοκρασία ανέρχεται στους 95οC για 4 λεπτά ώστε να πραγματοποιηθεί αποδιάταξη των δίκλωνων μορίων του DNA.

✚ Στάδιο Αποδιάταξης (denaturation): Η θερμοκρασία ανέρχεται στους 95οC για 30 δευτερόλεπτα ώστε να προκληθεί τήξη του τμήματος DNA καθώς διασπώνται οι δεσμοί υδρογόνου μεταξύ των συμπληρωματικών βάσεων των δύο κλώνων δημιουργώντας τελικά μονούς κλώνους.

✚ Στάδιο Υβριδισμού (annealing): Η θερμοκρασία πέφτει στους 55οC για 40 δευτερόλεπτα, για να γίνει υβριδοποίηση των εκκινητών που βρίσκονται σε περίσσεια με το μονόκλωνο DNA - στόχο.

✚ Στάδιο Επιμήκυνσης (extension): Η θερμοκρασία ανεβαίνει στους 72οC για 40 δευτερόλεπτα, στην οποία η Taq πολυμεράση λειτουργεί βέλτιστα. Η DNA πολυμεράση συνθέτει το νέο κλώνο του DNA, παρουσία των ιόντων Mg<sup>2+</sup>, προσθέτοντας τα τριφωσφορικά δεοξυνουκλεοτίδια τα οποία είναι συμπληρωματικά με τον κλώνο - στόχο, με κατεύθυνση 5' - 3'. Η DNA πολυμεράση συνθέτει το νέο κλώνο προσθέτοντας περίπου 1.000 βάσεις το λεπτό.

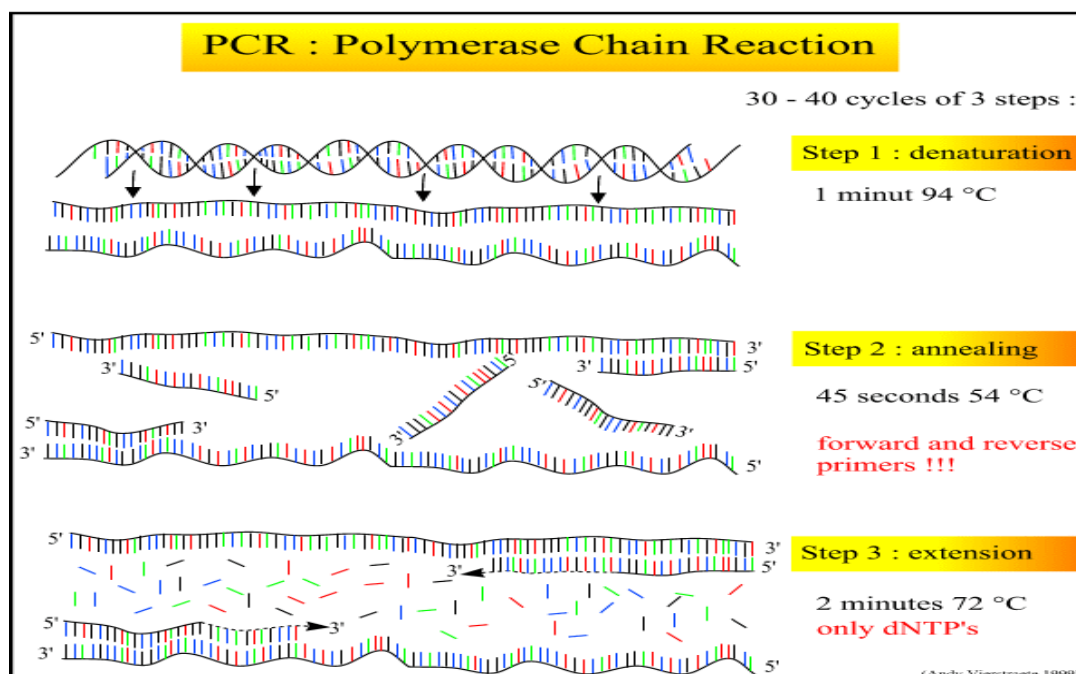
✚ Στάδιο Τελικής Επιμήκυνσης: Η θερμοκρασία παραμένει στους 72οC για 10 λεπτά, μετά από τον τελευταίο κύκλο PCR. Σκοπός αυτού είναι να εξασφαλιστεί ότι το απομένων μονόκλωνο DNA έχει πλήρως πολυμεριστεί.

Στη συνέχεια μπορεί το δείγμα να αποθηκευτεί στους 4οC μέχρι να χρησιμοποιηθεί για την επόμενη τεχνική.

Η διάρκεια της διαδικασίας είναι περίπου μιάμιση με δύο ώρες για 35 κύκλους της PCR.

Οι αλληλουχίες των primers που χρησιμοποιήθηκαν για τα tRNA της πειραματικής μας διαδικασίας (tRNA<sup>Ile</sup>, tRNA<sup>Gln</sup>, tRNA<sup>Met</sup> και tRNA<sup>Lys</sup>) καθώς επίσης η νουκλεοτιδική θέση των Fw και Rv όπως και το μήκος τους αναφέρονται στον παρακάτω πίνακα.

tRNA	Primers	Νουκλεοτιδική Θέση	Μήκος (bp)
IGM Ile-Gln-Met	FW 5' - 3' CCAGCATTCCCCCTCAAACC	FW 4241 - 4260	246
	RV 5' - 3' TGGGCCAGGGGATTAATTA	RV 4486 - 4468	
Lys	FW 5' - 3' GCTCTGAAATCTGTGGAGCA	FW 8173 - 8192	217
	RV 5' - 3' ACGGTAGTATTTAGTTGGGG	RV 8390 - 8371	



Εικόνα 11. Τα τρία στάδια μιας τυπικής αντίδρασης PCR.

## Προετοιμασία Δειγμάτων Και Ποιοτικός Προσδιορισμός Των PCR Προϊόντων (Ηλεκτροφόρηση)

Το πρώτο βήμα για να πάρουμε τα προϊόντα της PCR είναι η προετοιμασία του δείγματος. Συγκεκριμένα για κάθε δείγμα που θα ετοιμάσουμε βάζουμε τις εξής ποσότητες:

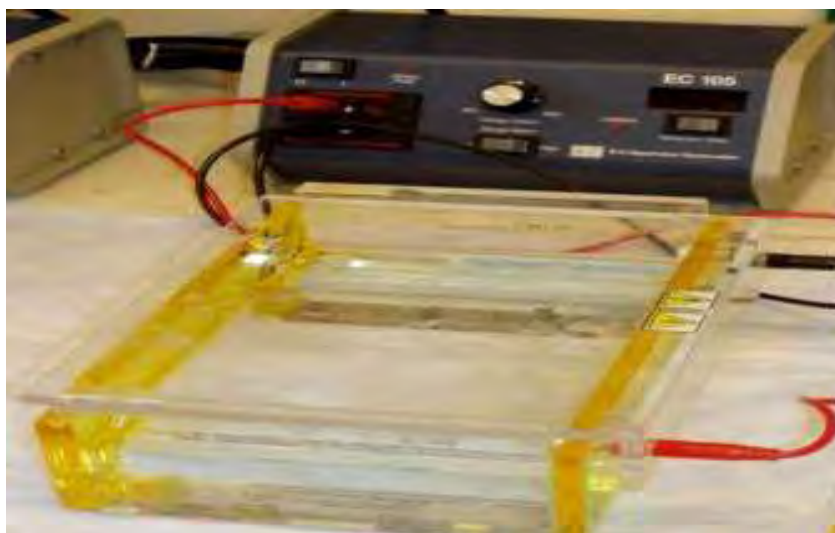
1. ddH<sub>2</sub>O → 39μl
2. Solution Buffer → 5μl
3. MgCl → 1μl
4. Primers (fw - rv) → 1μl ( το καθένα)
5. dNTPs → 1μl
6. Taq → 0,2 μl
7. DNA → Η ποσότητα του εξαρτάται από το γονίδιο που

χρησιμοποιούμε καθώς τα γονίδια δεν «λειτουργούν» όλα στην ίδια ποσότητα. Πιο συγκεκριμένα, για τις πειραματικές διαδικασίες που διεξήχθησαν στο εργαστήριο, για τα γονίδια IGM χρησιμοποιήθηκαν 3μl δείγματος ενώ για τη Lys χρησιμοποιήθηκαν 0,5μl.

Βάζουμε το DNA δείγμα μας σε μικρά erpendorf και σε πιο μεγάλα βάζουμε τα υπόλοιπα υλικά με τελευταία την Taq η οποία θα πρέπει να μένει σε μικρές θερμοκρασίες για να μην αλλιώνεται. Κάνουμε ένα spin στη φυγόκεντρο, και στη συνέχεια όσο πιο γρήγορα είναι εφικτό, τοποθετούμε το μείγμα στα μικρά erpendorf που έχουμε το δείγμα μας. Σε κάθε erpendorf βάζουμε ποσότητα του μείγματος ανάλογα με την ποσότητα του DNA που έχουμε. Δηλαδή θα πρέπει σε κάθε tube να υπάρχει ποσότητα 50μl. Άρα, για τα γονίδια IGM βάζουμε 47μl του μείγματος, γιατί έχουμε βάλει 3μl του δείγματος ενώ στη Lys που έχουμε βάλει 0,5μl τότε βάζουμε 49,5μl του μείγματος. Κάνουμε για δεύτερη φορά spin και τοποθετούμε τα erpendorf στη συσκευή της PCR.

## Ηλεκτροφόρηση

Η ηλεκτροφόρηση, είναι η ηλεκτροχημική μέθοδος διαχωρισμού ηλεκτρικά φορτισμένων σωματιδίων (συνήθως πρωτεϊνικής ή νουκλεϊνικής φύσεως).



Εικόνα 12. Μηχάνημα ηλεκτροφόρησης

Κατά την ηλεκτροφόρηση διοχετεύεται ηλεκτρικό ρεύμα μέσω ηλεκτροδίων σε ένα μέσο (πηκτική αγαρόζης) που πάνω του έχουν τοποθετηθεί τα προς ανάλυση δείγματα. Το αποτέλεσμα είναι ότι τα φορτισμένα σωματίδια κινούνται προς τα ηλεκτρόδια με ταχύτητες διαφορετικές ανάλογα με το φορτίο τους και αντιστρόφως ανάλογα με το μέγεθος τους. Έτσι τα περισσότερο φορτισμένα και μικρότερα μόρια απομακρύνονται περισσότερο από το αρχικό σημείο, ενώ τα μεγαλύτερα και λιγότερο φορτισμένα λιγότερο, οπότε επέρχεται ο διαχωρισμός μεταξύ τους.

### Διαδικασία

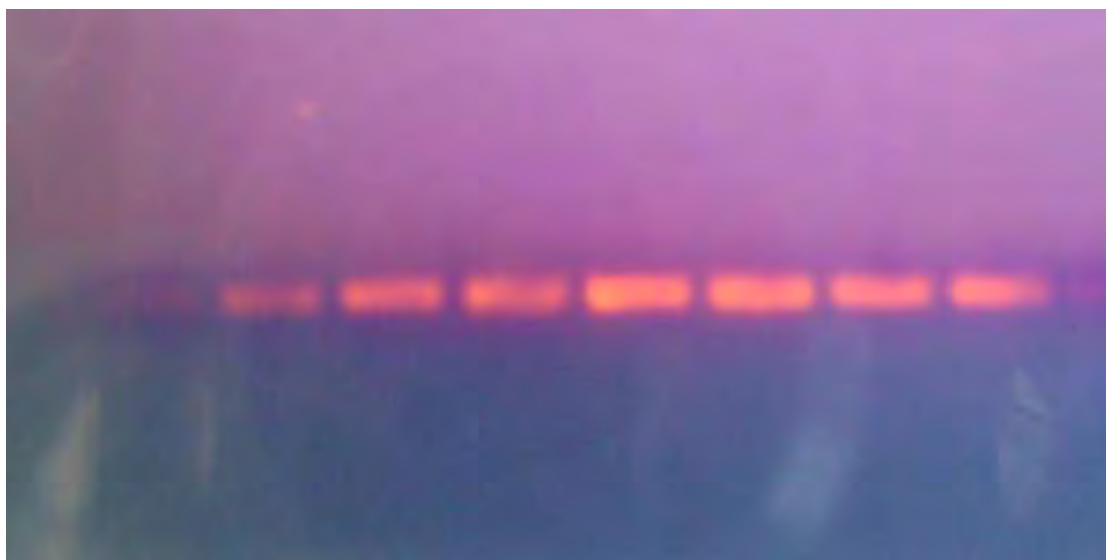
Τα υλικά για να φτιάξουμε την πηκτική αγαρόζη είναι τα εξής (η ποσότητες έχουν σχέση με το πόσα δείγματα θα εξετάσουμε και άρα ποιο «καλούπι» (μικρό 24 θέσεων ή αντίστοιχα μεγάλο 40 θέσεων) θα χρησιμοποιήσουμε για τη συσκευή):

- ✚ Αγαρόζη → 0,6gr ή 1,2gr
- ✚ TBE 1X → 40ml ή 45ml
- ✚ Βρωμιούχο Αιθίδιο (χρωστική) → 4μl ή 8μl

Βάζουμε σε μία κωνική φιάλη τα δύο πρώτα υλικά και σε υψηλή θερμοκρασία λιώνουμε την αγαρόζη μέσα στο TBE. Στη συνέχεια, και αφού η αγαρόζη έχει λιώσει



καλά, βάζουμε τη χρωστική, ανακατεύουμε ελαφρά και τοποθετούμε το μείγμα στο καλούπι. Με τα χτενάκια που χρησιμοποιούμε μπορούμε να έχουμε 24 ή 40 πηγαδάκια. Αφού κρυώσει το μείγμα, το τοποθετούμε στη συσκευή και βάζουμε με προσοχή τα δείγματα μας σε κάθε πηγαδάκι, με πρώτο σε κάθε σειρά το τυφλό μας διάλυμα, δηλαδή το αρνητικό μας, που δεν έχει μέσα δείγμα παρά μόνο το μείγμα ώστε να διαπιστωθεί τυχόν επιμόλυνση. Όταν φορτώσουμε τα δείγματα, τοποθετούμε ηλεκτρόδια με ρεύμα έντασης 100-150 volt για 10-20 λεπτά ανάλογα με την ένταση έως ότου τα δείγματα διανύσουν τα 2/3 της διαδρομής στο πήκτωμα. Έπειτα τοποθετείται σε συσκευή με υπεριώδη ακτινοβολία για να δούμε τις μπάντες που δημιουργούνται. Εφόσον δούμε μπάντες και διαπιστώσουμε ότι δεν υπάρχει επιμόλυνση, αποθηκεύουμε τα δείγματα μας στην κατάψυξη για να τα χρησιμοποιήσουμε για τις επόμενες διαδικασίες.



Εικόνα 13. Χαρακτηριστικό παράδειγμα ηλεκτροφόρησης PCR προϊόντος σε πηκτή αγαρόζης 2% w/v. Το πρώτο πηγαδάκι που διακρίνουμε είναι ο αρνητικός μάρτυρας. Η ανίχνευση γίνεται σε συσκευή που εκπέμπει υπεριώδη ακτινοβολία

## SSCP Ανάλυση Πολυμορφισμού Μονόκλωνης Αλυσίδας - SSCP (Single Strand Conformation Polymorfism)

Η μέθοδος της Ανάλυσης Πολυμορφισμού Μονόκλωνης Αλυσίδας, είναι αξιόπιστη και ευαίσθητη και χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά το 1989. η συγκεκριμένη μέθοδος στηρίζεται στην κινητικότητα των μονόκλωνων DNA σε ηλεκτροφορητικό πήκτωμα, η οποία εξαρτάται από τις μικρές αλλαγές που πιθανώς να έχουν συμβεί σε αυτό σε αντίθεση με το δίκλωνο DNA που η κινητικότητα του εξαρτάται από το μέγεθος και το μήκος του μορίου.

Η διαδικασία της SSCP γίνεται σε 2 μέρες. Τα υλικά που χρησιμοποιούνται για τη συγκεκριμένη διαδικασία είναι τα εξής (οι ποσότητες έχουν σχέση με το αν θα χρησιμοποιήσουμε ένα gel ή δύο αντίστοιχα):

1. Acrylamide → 6,18gr ή 12,375gr
2. Bis - Acrylamide → 0,165gr ή 0,33gr
3. TBE 10X → 5ml ή 10ml
4. Glycerol 50% → 6,25ml ή 12,5ml
5. APS 20% → 325μl ή 650μl
6. TEMED → 62,5μl ή 125μl
7. Ειδική χρωστική για SSCP → 10μl σε κάθε tube μαζί με 5μl δείγματος από το δείγμα της PCR




(Η συγκέντρωση του πολυακρυλαμιδίου που χρησιμοποιήθηκε ήταν 10%)

Τα παραπάνω υλικά τα χρησιμοποιούμε την πρώτη μέρα που θα φτιάξουμε τα gel πολυακρυλαμιδίου, με τη σειρά που αναφέρονται, μέσα στα οποία θα βάλουμε τα δείγματα μας, μετά την PCR. Μόλις φτιάξουμε το μείγμα με τα παραπάνω υλικά, το τοποθετούμε ανάμεσα στα τζαμάκια που έχουμε τοποθετήσει στην ειδική συσκευή κάθετης ηλεκτροφόρησης και βάζουμε τα χτενάκια με τον κατάλληλο αριθμό για τα πηγαδάκια. Τα χτενάκια αυτά, έχουν πάχος 2mm. Προσέχουμε ώστε το gel να μην φεύγει από τη συσκευή. Το αφήνουμε να σταθεροποιηθεί για περίπου 40 λεπτά και έπειτα βγάζουμε με προσοχή τα τζαμάκια με τα gel και καθαρίζουμε με προσοχή με τη χρήση λεπτής βελόνας τα πηγαδάκια για να μπει το δείγμα. Στα erpendorfs που θα βάλουμε τη χρωστική και το δείγμα μας, κάνουμε spin στη φυγόκεντρο και έπειτα μπαίνουν στο μηχάνημα αποδιάταξης, στο οποίο γίνεται αποδιάταξη του διπλού κλώνου του DNA. Η διαδικασία αυτή είναι περίπου για 10 λεπτά. Έπειτα μεταφέρουμε με πιπέτα το περιεχόμενο των erpendorfs στα πηγαδάκια. Έπειτα αφήνουμε τη συσκευή στο

ψυγείο, αφού βάλουμε πρώτα TBE, ώστε να καλύπτεται το μισό τζαμάκι και στη μέση να καλύπτει τα πηγαδάκια. Τοποθετείται στο ψυγείο, και βάζουμε καλώδια για ρεύμα έντασης 220 volt, για 20 ώρες. Στο ψυγείο βάζουμε τη συσκευή όταν έχουμε διαφορετικά γονίδια. Αλλιώς μπορούμε να την αφήσουμε και έξω από το ψυγείο.

Μετά το πέρας των 20 ωρών, την επόμενη δηλαδή μέρα, βγάζουμε τη συσκευή και απομακρύνουμε τα gel από τα τζάμια με προσοχή ώστε να μην κοπούν. Τα τοποθετούμε σε ζελατίνες, μέσα σε μεταλλικές θήκες και τα αφήνουμε πάνω στον κατάλληλο αναδευτήρα. Έπειτα φτιάχνουμε τα διαλύματα για τη χρώση χρησιμοποιώντας τα εξής υλικά:





#### 1ο ΔΙΑΛΥΜΑ ΓΙΑ ΧΡΩΣΗ

-  ddH<sub>2</sub>O → 800ml
-  EtOH 100% → 20ml
-  CH<sub>3</sub>COOH → 1ml

#### 2ο ΔΙΑΛΥΜΑ ΓΙΑ ΧΡΩΣΗ

-  AgNO<sub>3</sub> → 400ml

#### 3ο ΔΙΑΛΥΜΑ ΓΙΑ ΧΡΩΣΗ

-  NaOH → 6gr
-  NaBH<sub>4</sub> → 0,02gr
-  ddH<sub>2</sub>O → 400ml
-  Φορμαλδεΐδη → 2ml

Ανάμεσα στα διαλύματα αυτά ρίχνουμε ddH<sub>2</sub>O.

Η διαδικασία της δεύτερης μέρας ξεκινά όταν βάλουμε τις μεταλλικές θήκες πάνω στον αναδευτήρα, και ρίξουμε το πρώτο διάλυμα. 2 φορές, από 400ml αν έχουμε 2 gel, για 3 λεπτά. Έπειτα ξεπλένουμε τα gel με άφθονο ddH<sub>2</sub>O για ένα λεπτό. Στη συνέχεια, βάζουμε το δεύτερο διάλυμα, 200ml σε κάθε gel, για 18 περίπου λεπτά, ξεπλένουμε και πάλι με ddH<sub>2</sub>O για 1 λεπτό και τέλος ρίχνουμε το τελευταίο διάλυμα, 200ml σε κάθε gel και πάλι, μέχρι να χρωματιστεί το gel, περίπου δηλαδή 15 - 20 λεπτά. Και ολοκληρώνουμε τη διαδικασία ρίχνοντας τελευταία φορά νερό, 2 φορές, για ένα λεπτό. Όταν φτιάξουμε τα gel, τα βλέπουμε στο ειδικό μηχάνημα υπεριώδους ακτινοβολίας, όπου βλέπουμε τυχόν ύπαρξη μεταλλάξεων. Αυτό το διαπιστώνουμε εάν παρατηρήσουμε τις μπάντες στο Gel, για κάθε δείγμα, και υπάρχει διαφορά στο




μέγεθος ή στη σειρά. Η σύγκριση γίνεται με όλα τα δείγματα.

**ΣΗΜΕΙΩΣΗ:** Η προετοιμασία του gel είναι σημαντική για να γίνει σωστά ο χρωματισμός του όπως επίσης μεγάλη προσοχή πρέπει να δωθεί και κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας για να μην κοπεί.

## Καθαρισμός Δειγμάτων (DNA Purification)


Ο λόγος που γίνεται ο καθαρισμός είναι για να απομακρυνθούν οι primers, τα νουκλεοτίδια, η DNA πολυμεράση και άλατα που μπορεί αν υπάρχουν στο διάλυμα μαζί με τα προϊόντα της PCR ώστε να γίνει στα δείγματα αλληλούχιση (sequencing) για τη διαπίστωση μεταλλάξεων.


Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για τον καθαρισμό είναι τα εξής:

-  Eppendorfs 1,5ml και 50ml
-  Αντιδραστήρια (PCR Purification Kit)
-  Column (Στήλες QIAquick spin)

## Διαδικασία

Η διαδικασία του καθαρισμού έχει 3 στάδια και αναλυτικά είναι τα εξής:

 1ο στάδιο: Τοποθετούμε στο erpendorf με το δείγμα μας που έχουμε αποφασίσει να κάνουμε τον καθαρισμό (το οποίο δείγμα έχει περίπου ποσότητα 45ml), 200μl από το Binding Buffer (B2). Παίρνουμε όλη την ποσότητα αυτή και τη μεταφέρουμε σε άλλο erpendorf προσθέτοντας επιπλέον 50μl από το B2. Μεταφέρουμε και πάλι το περιεχόμενο σε Purelink™ Spin Column τα οποία έχουμε τοποθετήσει μέσα σε μεγάλα erpendorf. Κάνουμε φυγοκέντρηση για ένα λεπτό στις 12.000 στροφές, αφαιρούμε το έκλουσμα, και επανατοποθετούμε τα Column. Με αυτό τον τρόπο μένει δεσμευμένο το DNA στη στήλη.

 2ο στάδιο: Προσθέτουμε 650μl Wash Buffer με αιθανόλη στο Column. Φυγοκεντρούμε για δεύτερη φορά, και πάλι για ένα λεπτό στις 12.000 στροφές, αφαιρούμε το έκλουσμα και ξανατοποθετούμε το Column στη θέση.

Στη συνέχεια φυγοκεντρούμε στη μέγιστη ταχύτητα (14.000 στροφές σε συνθήκες δωματίου για 2 περίπου λεπτά για την απομάκρυνση τυχόν υπολειμμάτων του Wash Buffer και τοποθετούμε τα Column σε νέα eppendorfs.

✚ 3ο στάδιο: Στο κέντρο του Column βάζουμε 50μl από το Elution Buffer και το αφήνουμε σε θερμοκρασία δωματίου για ένα λεπτό. Κάνουμε φυγοκέντρηση στη μέγιστη ταχύτητα για 2 λεπτά. Τέλος, το eppendorf αυτό, περιέχει το καθαρισμένο DNA προϊόν το ποίο έχει ποσότητα περίπου 48μl. Κάνουμε ηλεκτροφόρηση, σε πηκτή αγαρόζης 2% για να βεβαιωθούμε πως υπάρχει προϊόν. τοποθετώντας 3μl χρωστικής και 2μl του δείγματος μας σε νέα eppendorf. Αν δεν γίνει αμέσως η αλληλούχιση τότε βάζουμε τα δείγματα μας σε κατάψυξη -20oC. Για την αλληλούχιση χρειαζόμαστε 25 - 30μl του δείγματος μας και κρατάω αποθηκευμένο το υπόλοιπο. Στην αλληλούχιση χρειάζεται να στείλουμε και τους primers του γονιδίου που θέλουμε να ελέγξουμε.

## Αλληλούχιση

Το 1977, ο Allan Maxam και ο Walter Gilbert ανέπτυξε μια μέθοδο αλληλουχίας του DNA η οποία βασίζεται στην χημική τροποποίηση της διάσπασης του DNA και στη συνέχεια σε συγκεκριμένες βάσεις. Την ίδια χρονιά ο Sanger και η ομάδα του, πρότειναν μία μέθοδο ανάγνωσης της αλληλουχίας του DNA με τα ddNTPs,

Πλέον οι μέθοδοι αυτοί χρησιμοποιούνται μέσω ειδικού μηχανήματος που μειώνει το χρόνο που χρειάζονται για να πάρουμε αποτέλεσμα. Στη συνέχεια τα σημασμένα κομμάτια του δείγματος μας ανιχνεύονται με laser και τα αποτελέσματα αποθηκεύονται για ανάλυση η οποία γίνεται μέσω προγραμμάτων υπολογιστή.

## Ανάλυση Αποτελεσμάτων

Αφού λάβουμε τα αποτελέσματα από το μηχάνημα που θα μας δίνουν την αλληλουχία του κάθε δείγματος μας, το Fw και το Rv, κάνουμε την επεξεργασία μέσω BIOEDIT και CLUSTAL, προγραμμάτων βιοπληροφορικής.

Με το πρώτο πρόγραμμα γίνεται η ανάγνωση της αλληλουχίας μας. Στα διαγράμματα εμφανίζεται η αλληλουχία μας, με τις κορυφές του διαγράμματος να αντιστοιχούν σε κάθε βάση. Εκεί μπορούμε να εντοπίσουμε τις τυχόν αλλαγές από

αλλαγή βάσης, προσθήκη ή έλλειψη.

Με το δεύτερο πρόγραμμα μπορούμε να ελέγξουμε πολλές αλληλουχίες ταυτόχρονα και με μία πρότυπη για να εντοπίσουμε καλύτερη την αλλαγή της βάσης και να βρούμε το σημείο - θέση που γίνεται.

## Αποτελέσματα

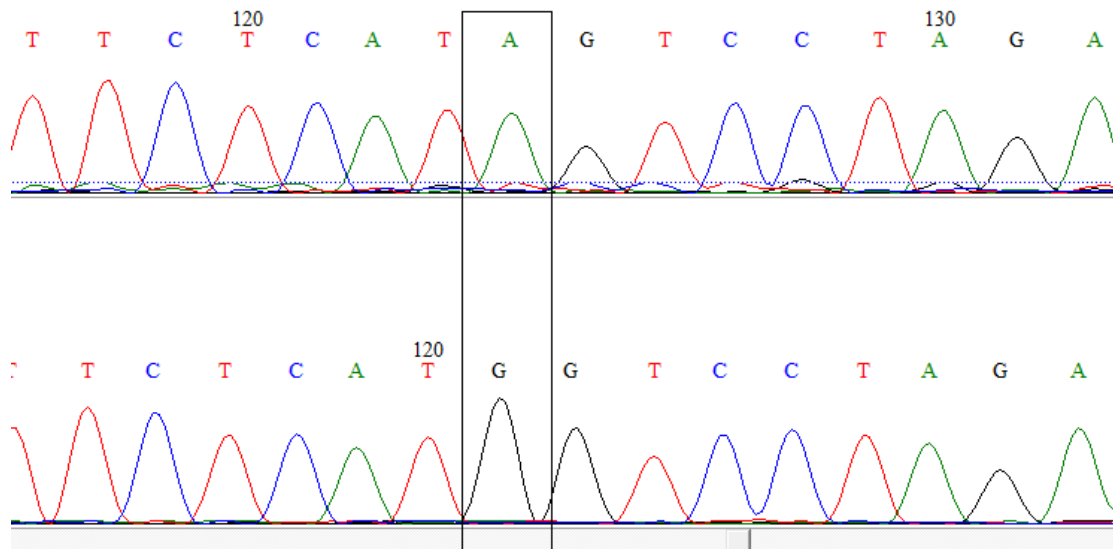
Στο σύνολο των ατόμων που πάσχουν από τη νόσο του Alzheimer (50 άτομα) διαπιστώθηκαν 2 μεταλλάξεις στα tRNA<sup>Ile</sup>, tRNA<sup>Gln</sup>, tRNA<sup>Met</sup> και 3 μεταλλάξεις στο tRNA<sup>Lys</sup>.

### Αναλυτικά

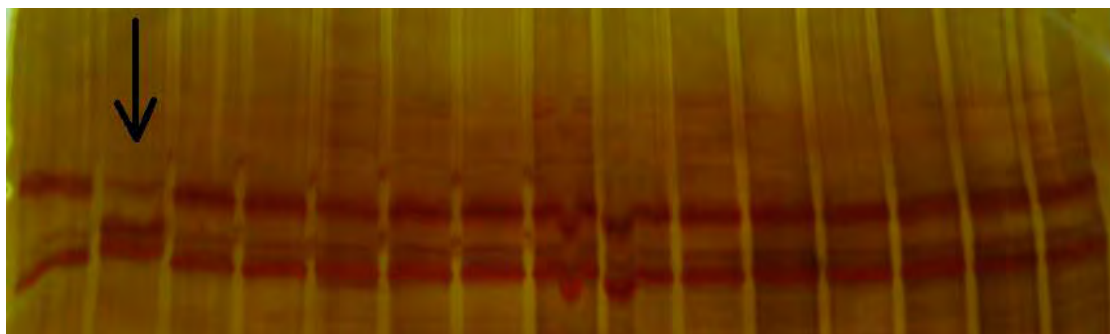
	ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ				
	tRNA <sup>Ile</sup>	tRNA <sup>Gln</sup>	COII		
	A4310G	T4336C	G8251A	G8269A	T8260C
Αριθμός Ασθενή					
B2	.				
B8			.		
B11				.	
B18		.			
B38			.		
B39					.
B43			.		

Πίνακας 4. Αναφέρονται όλες οι μεταλλάξεις που βρήκαμε στα 50 άτομα που έγινε η έρευνα στα δύο tRNA

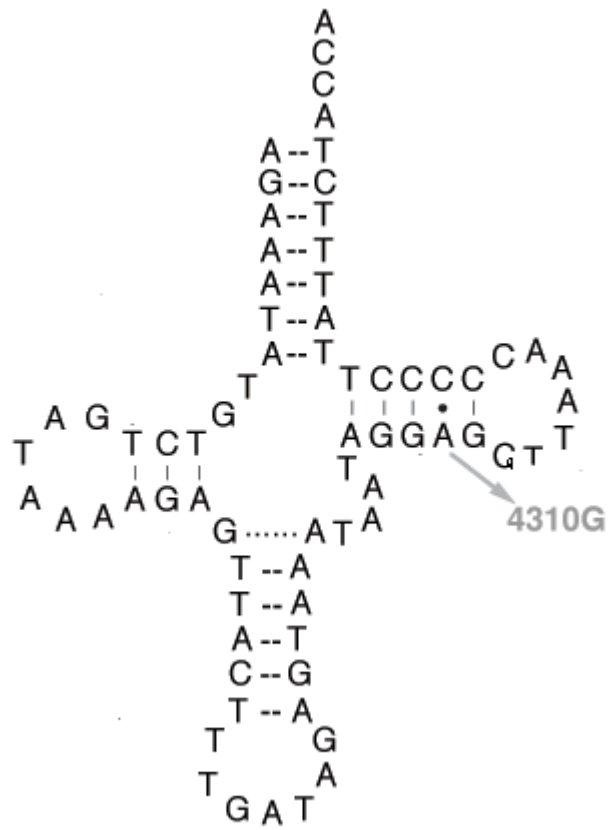
Η μετάλλαξη A4310G βρίσκεται στο γονίδιο tRNA<sup>le</sup>



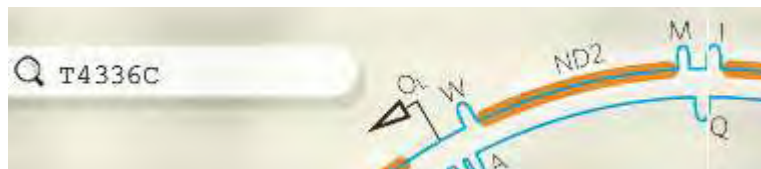
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15



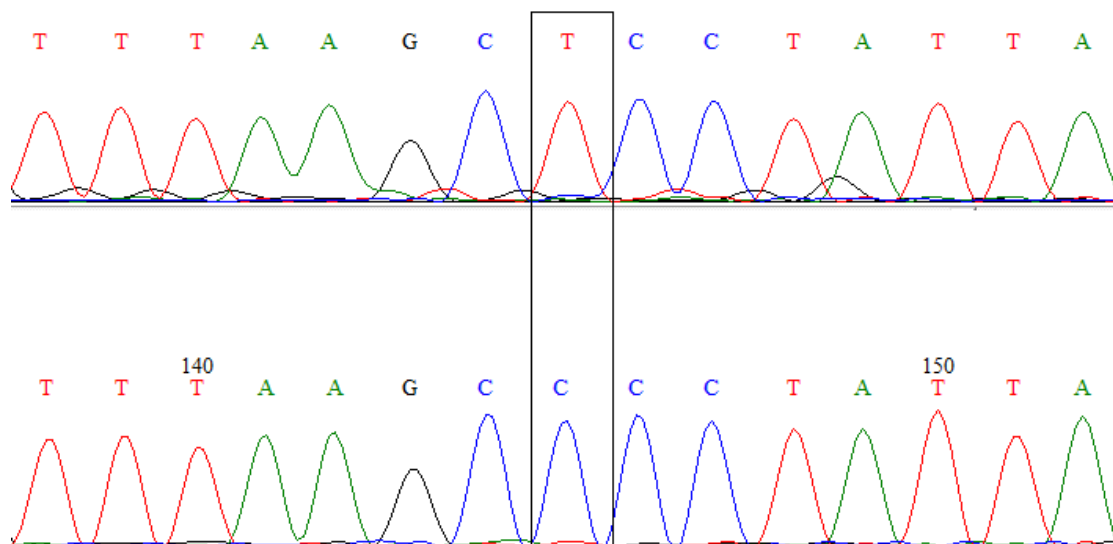
Η πρώτη μετάλλαξη είναι η A4310G, στο tRNA<sup>le</sup> η οποία βρίσκεται στο γονίδιο MT - T1, το οποίο βρίσκεται σε μη κωδικοποιούσα περιοχή. Η μετάλλαξη βρέθηκε σε ένα άτομο από τα 50 που είχαμε στην έρευνα μας, έχοντας δηλαδή συχνότητα 2%.



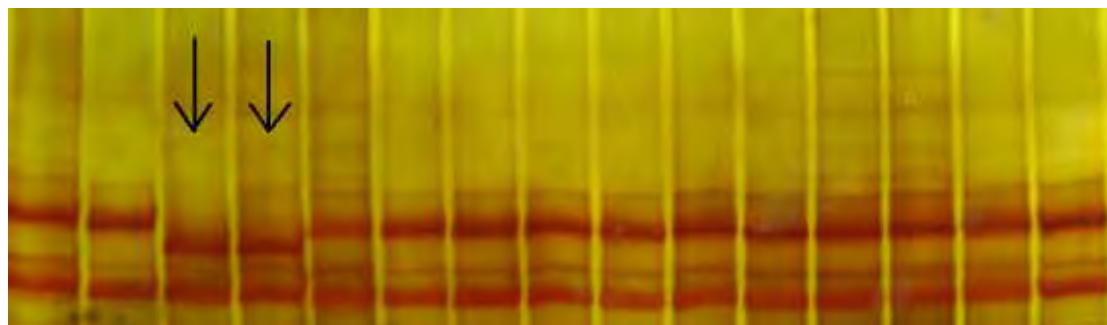
Η μετάλλαξη T4336C βρίσκεται στο γονίδιο tRNA<sup>Gln</sup>



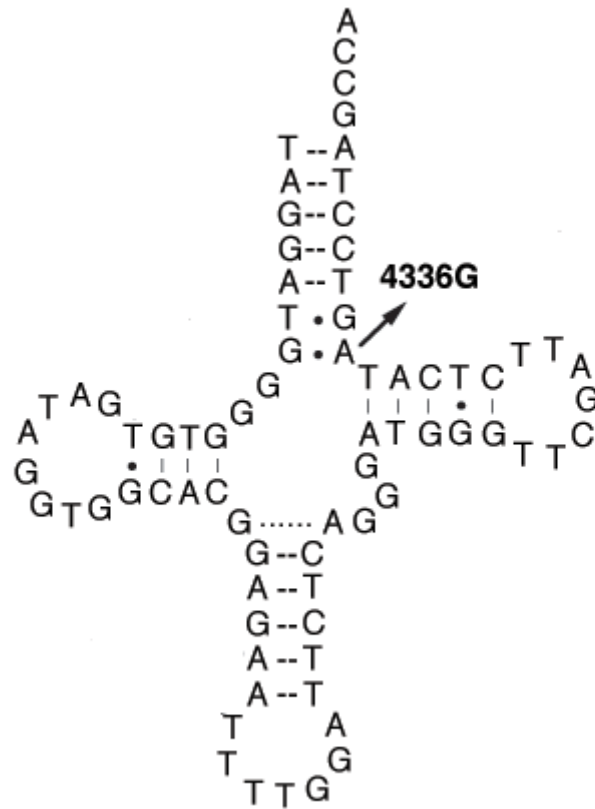




16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30

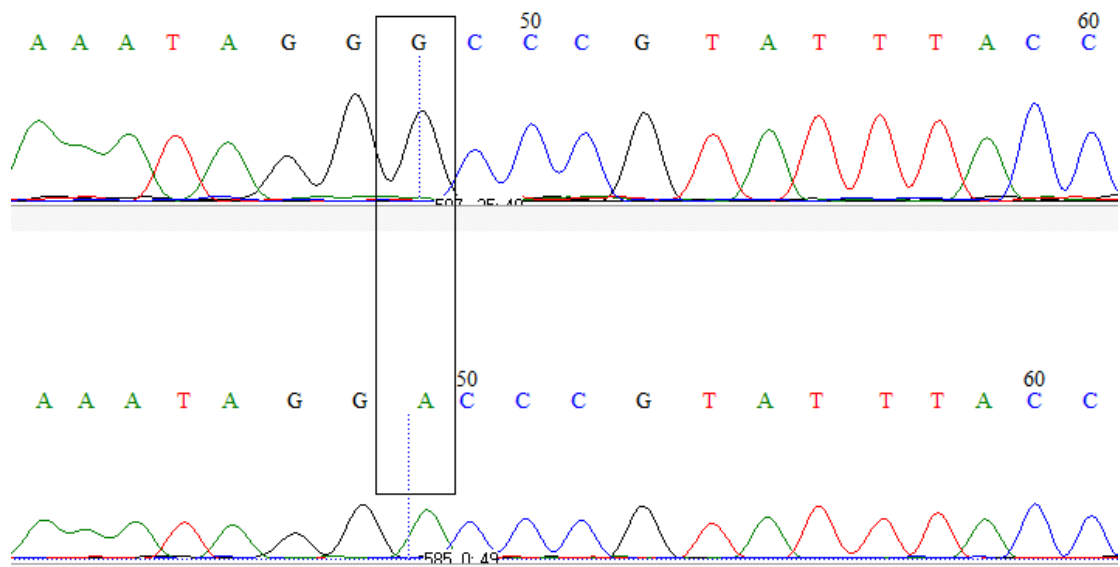


Η δεύτερη μετάλλαξη είναι η T4336C, η οποία βρίσκεται στο tRNA<sup>Gln</sup>, στο γονίδιο MT - TQ, το οποίο και αυτό βρίσκεται σε μη κωδικοποιούσα περιοχή. Βρέθηκε σε 2 άτομα στο σύνολο των 50 ατόμων που εξετάζαμε, έχοντας δηλαδή συχνότητα 4%.

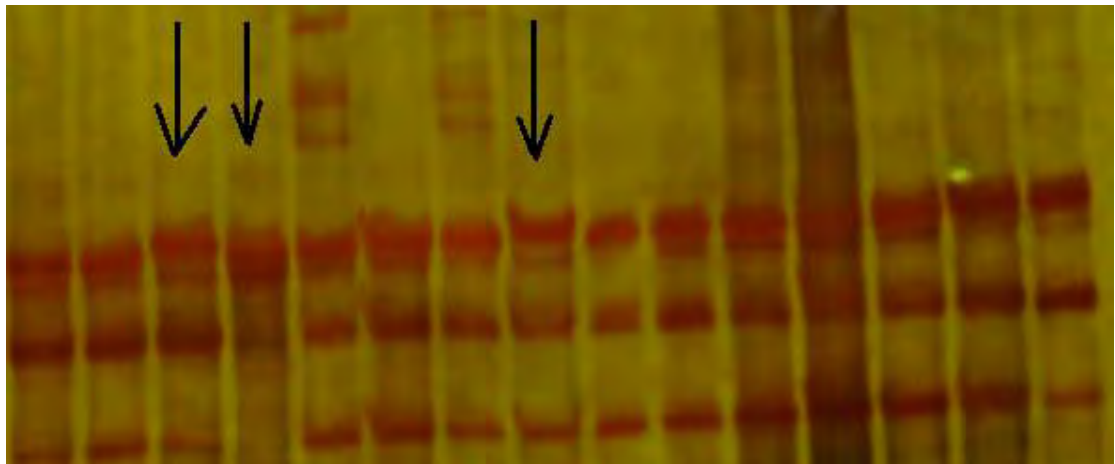


Η μετάλλαξη G8251A βρίσκεται στο γονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη της υπομονάδας 2 στην οξειδάση του κυτοχρώματος (COII)





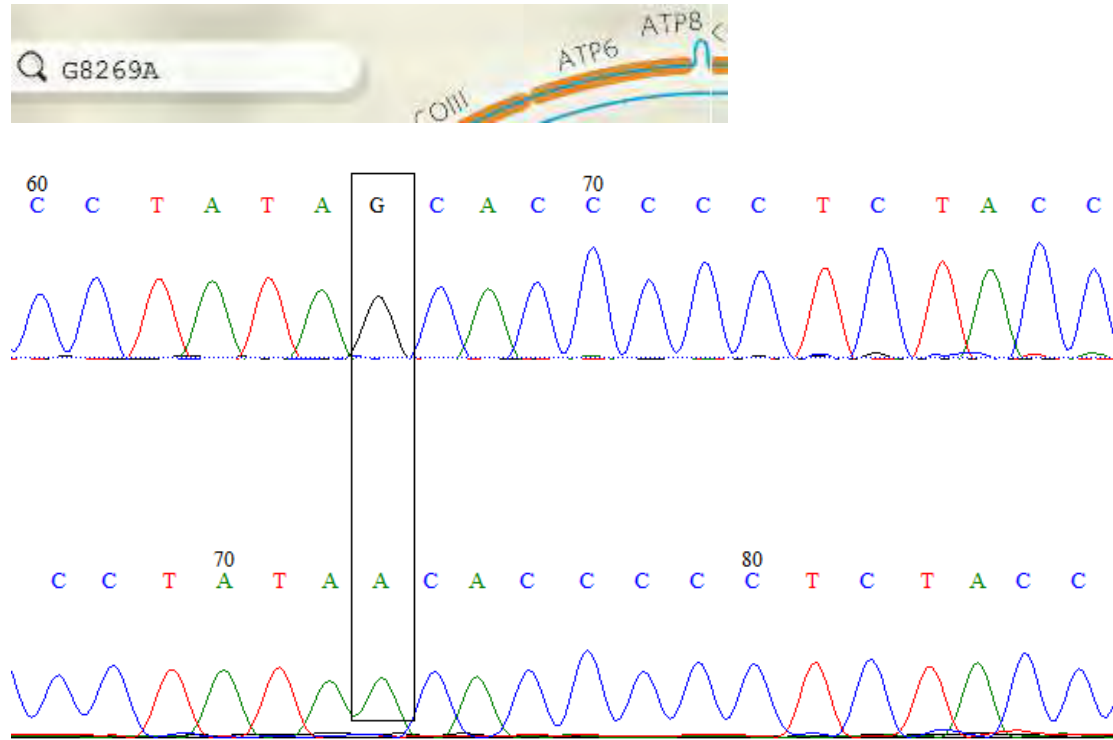
36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50



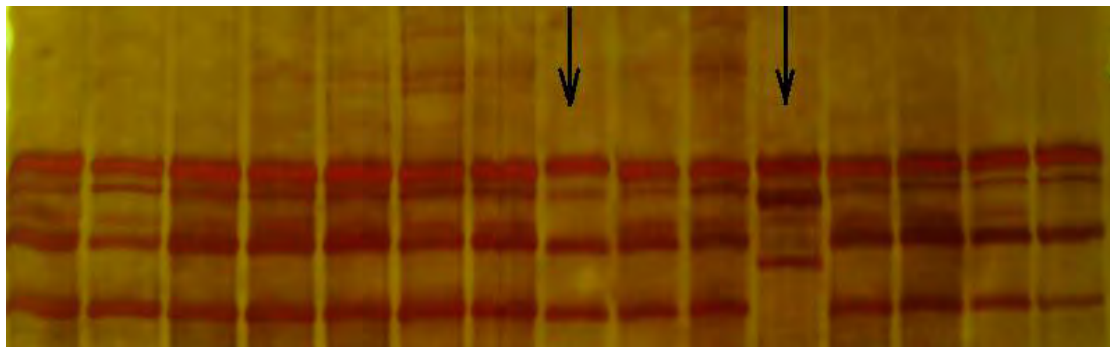
Εικόνα. Τα δείγματα 38 και 43 αντιστοιχούν στη μετάλλαξη G8251A. Στην ίδια κατηγορία μεταλλάξεων αντιστοιχεί και το δείγμα 8 που φαίνεται στην πιο κάτω εικόνα.

Στα γονίδια του tRNA<sup>Lys</sup> διαπιστώσαμε 3 μεταλλάξεις. Η G8251A, είναι στο γονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη της υπομονάδας 2 στην οξειδάση του κυτοχρώματος (COII) , το οποίο βρίσκεται σε συνώνυμη περιοχή. Η μετάλλαξη βρέθηκε σε δύο άτομα από τα 50 που είχαμε στην έρευνα μας, έχοντας δηλαδή συχνότητα 6%.

Η μετάλλαξη G8269A βρίσκεται στο γονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη της υπομονάδας 2 στην οξειδάση του κυτοχρώματος (COII)



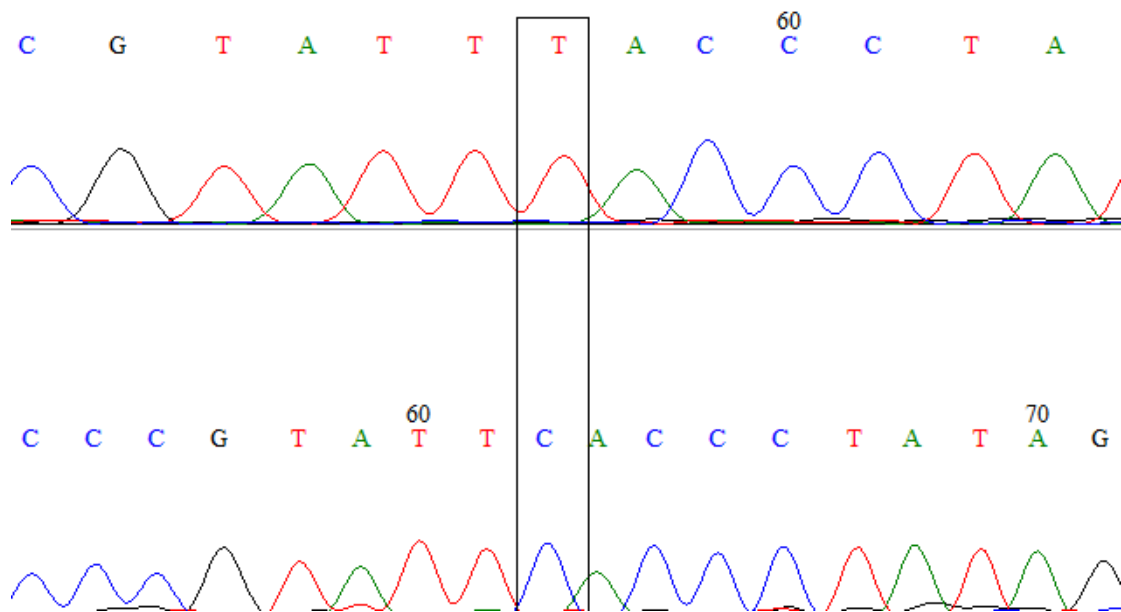
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15



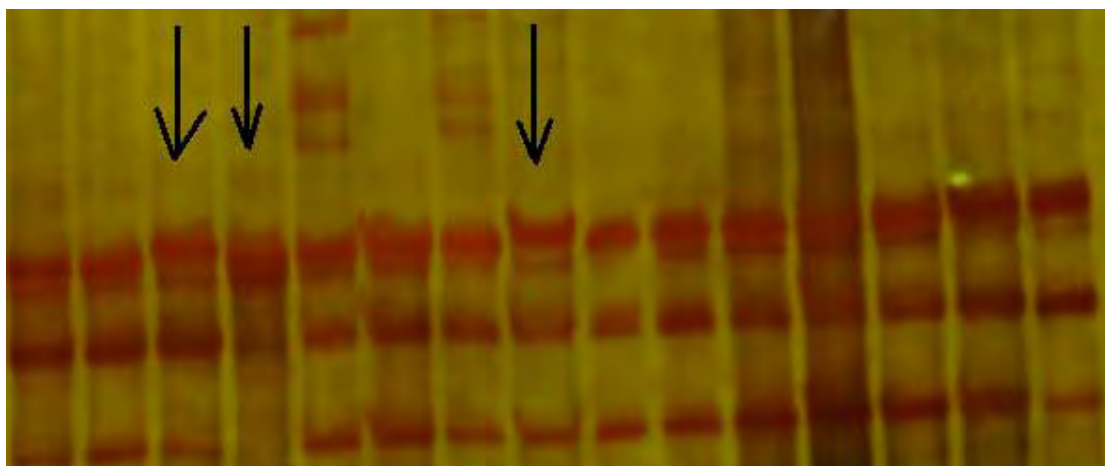
Εικόνα. Στο δείγμα 11 αντιστοιχεί η μετάλλαξη G8269A

Η δεύτερη μετάλλαξη είναι η G8269A, βρίσκεται και αυτή στο γονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη της υπομονάδας 2 στην οξειδάση του κυτοχρώματος (COII), το οποίο και αυτό βρίσκεται σε μη κωδικοποιούσα περιοχή. Βρέθηκε σε ένα άτομο στο σύνολο των 50 ατόμων που εξετάζαμε, έχοντας δηλαδή συχνότητα 2%.

Η μετάλλαξη T8260C βρίσκεται στο γονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη της υπομονάδας 2 στην οξειδάση του κυτοχρώματος (COII)



36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50



Εικόνα. Το δείγμα 39 αντιστοιχεί στη μετάλλαξη T8260C

Η τρίτη μετάλλαξη είναι η T8260C, είναι στο γονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη της υπομονάδας 2 στην οξειδάση του κυτοχρώματος (COII), το οποίο βρίσκεται σε συνώνυμη περιοχή. Η μετάλλαξη βρέθηκε σε ένα άτομο από τα 50 που είχαμε στην έρευνα μας, έχοντας δηλαδή συχνότητα 2%. Η συγκεκριμένη μετάλλαξη δεν έχει διαπιστωθεί σε φυσιολογικά άτομα μέχρι στιγμής.

Ακολουθούν συγκεντρωτικοί πίνακες με τις μεταλλάξεις των γονιδίων

Μεταλλάξεις	A4310G	T4336C
Γονίδιο	MT-TI	MT-TQ
Αποτέλεσμα Μεταλλαγής	Μη κωδικοποιούσα	Μη κωδικοποιούσα
Αριθμός ατόμων	1/50	2/50
Συχνότητα	2%	4%
Ανίχνευση σε φυσιολογικά άτομα	Ναι	Ναι
Αριθμός φυσιολογικών ατόμων με μετάλλαξη	0/20	1/20
Συχνότητα σε φυσιολογικά άτομα	0%	2%

Πίνακας 5. Μεταλλάξεις των tRNA<sup>lle</sup>, tRNA<sup>Gln</sup>

<b>Μεταλλάξεις</b>	<b>G8251A</b>	<b>G8269A</b>	<b>T8260C</b>
<b>Γονίδιο</b>	MT-CO2	MT-CO2	MT-CO2
<b>Αποτέλεσμα Μεταλλαγής</b>	Συνώνυμη	Μη κωδικοποιούσα	Συνώνυμη
<b>Αριθμός ατόμων</b>	2/50	1/50	1/50
<b>Συχνότητα</b>	4%	2%	2%
<b>Ανίχνευση σε φυσιολογικά άτομα</b>	Ναι	Ναι	Όχι
<b>Αριθμός φυσιολογικών ατόμων με μετάλλαξη</b>	0/20	0/20	0/20
<b>Συχνότητα σε φυσιολογικά άτομα</b>	0%	0%	0%

Πίνακας 6. Μεταλλάξεις στο γονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη της υπομονάδας 2 στην οξειδάση του κυτοχρώματος (COII)

# ΣΥΖΗΤΗΣΗ



Οι μεταλλάξεις που βρέθηκαν στην έρευνα μας, ήταν στο σύνολο 5 και βρέθηκαν σε 7 άτομα από τα 50 που είχαμε προς εξέταση.

Η μετάλλαξη A4310G βρέθηκε στο tRNA<sup>Le</sup> και δεν είναι παθογόνος. Σύμφωνα με μελέτες έχει βρεθεί ότι ανήκει στην απλοομάδα H, η οποία είναι και η πιο κοινή απλοομάδα. Συγκεκριμένα βάση της έρευνας, ανήκει στην υποκατηγορία H9 της H6 της απλοομάδας H όπως βεβαιώνεται από το μοτίβο της περιοχής της μετάλλαξης όπως επιβεβαιώνεται από το Howanrd et al 2003 (Achilli A., 2004). Η απλοομάδα H παρουσιάζει συχνότητα στην Δυτική Ευρώπη 41% ενώ στην Ανατολική 35%. Η αλλαγή βρίσκεται στο νουκλεοτίδιο 52 του T - βραχίονα του tRNA, και δημιουργείται ένα mismatch των βάσεων A και C όταν το κανονικό ζευγάρι βάσεων είναι G και C. Η μετάλλαξη εμφανίστηκε σε 1/50 άτομα με τη νόσο του Alzheimer που είχαμε προς εξέταση (συχνότητα 2%).

Η T4336G στο tRNA<sup>Gln</sup>, είναι παθογόνος, αποτελεί συχνή μετάλλαξη για την ασθένεια του Alzheimer και σύμφωνα με έρευνες (Shoffner JM., 1993) μπορεί να είναι σημαντικός παράγοντας κινδύνου. Συγκεκριμένα εντοπίζεται σε άτομα που παρουσιάζουν την ασθένεια πριν την ηλικία των 76 ετών όπως διαπιστώθηκε σε 10/256 περιπτώσεις, που επιβεβαιώθηκαν με νεκροψία. Στις έρευνες αυτές τα άτομα που εξετάστηκαν παρουσίαζαν προβλήματα σε γνωστικές λειτουργίες. Στην πρώτη έρευνα τα άτομα που βρέθηκαν με τη συγκεκριμένη μετάλλαξη ηλικίας από 74 ετών μέχρι και 102 ετών, δεν παρουσίαζαν άνοια. Αντίθετα στη δεύτερη έρευνα, τα άτομα που βρέθηκαν με τη μετάλλαξη, παρουσίαζαν άνοια, σε ηλικίες κάτω των 76 ετών (Tysoe C. 1996). Η μετάλλαξη αυτή έχει ανιχνευθεί επίσης σε άτομα που πάσχουν από τη νόσο του Parkinson όπως επίσης και σε άτομα που παρουσίαζαν ημικρανίες και απώλεια ακοής (Finnila et al 2001). Η μετάλλαξη εντοπίζεται στο βραχίονα υποδοχής και δημιουργείται ένα mismatch των βάσεων A και G όταν το κανονικό ζευγάρι βάσεων είναι C και G. Η μετάλλαξη εμφανίστηκε σε 2/50 άτομα με τη νόσο του Alzheimer που είχαμε προς εξέταση (συχνότητα 4%).

Το κυτόχρωμα c είναι συστατικό της αναπνευστικής αλυσίδας που προκαλεί την αναγωγή του οξυγόνου σε νερό. Μέσω της υπομονάδας 2 γίνεται η μεταφορά των ηλεκτρονίων και έχει συμπαράγοντα τον χαλκό A. Το μήκος της αλληλουχίας της πρωτεΐνης της υπομονάδας 2 οξειδάσης του κυτοχρώματος, είναι 227 AA. Ελαττώματα στο MT-CO2 είναι η αιτία της μιτοχονδριακής ανεπάρκειας του συμπλόκου IV της αναπνευστικής αλυσίδας, επίσης γνωστή και ως ανεπάρκεια της οξειδάσης του

κυτοχρώματος c. Μια διαταραχή της αναπνευστικής αλυσίδας του μιτοχονδρίου με ετερογενείς κλινικές εκδηλώσεις, που κυμαίνονται από απομονωμένες μυοπάθεια με σοβαρή ασθένεια, επηρεάζουν διάφορους ιστούς και όργανα. Τα χαρακτηριστικά του περιλαμβάνουν υπερτροφική μυοκαρδιοπάθεια, ηπατομεγαλία και ηπατική δυσλειτουργία, υποτονία, μυϊκή αδυναμία, αναπτυξιακή καθυστέρηση, καθυστέρηση στην κινητική ανάπτυξη και νοητική στέρωση. Μια υποομάδα των ασθενών εκδηλώνουν σύνδρομο Leigh.

Η μετάλλαξη G8251A, που εντοπίζεται στο γονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη της υπομονάδας 2 της οξειδάσης του κυτοχρώματος (COII) έχει βρεθεί, σύμφωνα με έρευνες που έγιναν στις αρχές του 21<sup>ου</sup> αιώνα ότι χαρακτηρίζει δύο απλοομάδες. Την απλοομάδα I και την απλοομάδα W (Elson J. L., 2001, Herrnstadt C., 2002). Η απλοομάδα I εμφανίζει συχνότητα 2% τόσο στη Δυτική όσο και στην Ανατολική Ευρώπη. Στις βάσεις δεδομένων για το μιτοχόνδριο εμφανίζεται ως κοινός πολυμορφισμός που δεν σχετίζεται με κλινικό φαινότυπο και δημιουργεί μια συνώνυμη μετάλλαξη (GGG>GGA) στο αμινοξύ G222 της γλυκίνης. Η μετάλλαξη εμφανίστηκε σε 2/50 άτομα με τη νόσο του Alzheimer που είχαμε προς εξέταση (συχνότητα 4%).

Οι μεταλλάξεις T8260C και G8269A, εντοπίζονται και αυτές στο γονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη της υπομονάδας 2 της οξειδάσης του κυτοχρώματος (COII). Η πρώτη αποτελεί σιωπηλό πολυμορφισμό και κωδικοποιεί το αμινοξύ F225 της φαινυλαλανίνης δημιουργώντας μία συνώνυμη μετάλλαξη (TTT>TTC) λόγω αλλαγής στο τρίτο νουκλεοτίδιο. Η μετάλλαξη βρέθηκε σε 1/50 άτομα που είχαμε προς εξέταση και είχαν τη νόσο του Alzheimer (με συχνότητα 2%). Η δεύτερη μετάλλαξη βρέθηκε ότι βρίσκεται στην απλοομάδα J και συγκεκριμένα στη J1b, σε κωδικοποιούσα περιοχή και στην απλοομάδα H (Hum A. J., 1998, Abu-Amero K. K., 2008, Herrnstadt C., 2002). Η απλοομάδα J εμφανίζει συχνότητα 9% στη Δυτική Ευρώπη και 8% στην Ανατολική Ευρώπη ενώ η απλοομάδα H παρουσιάζει συχνότητα στην Δυτική Ευρώπη 41% και στην Ανατολική 35%. Εντοπίστηκε αλλαγή στο τρίτο νουκλεοτίδιο της τριπλέτας TAG (TAG>TAA) που αποτελεί την τριπλέτα τερματισμού. Η μετάλλαξη εμφανίστηκε σε 1/50 άτομα με τη νόσο του Alzheimer που είχαμε προς εξέταση (συχνότητα 2%).

# ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Γεώργιος Ν. Θωμόπουλος Ο Υποκυτταρικός Κόσμος - Οργανίδια Και Ασθένειες Εκδόσεις  
University Studio Press

Abu-Amero K. K., Larruga J/ M., CabreraV. M. and González A. M. Mitochondrial DNA structure in the Arabian Peninsula BMC Evolutionary Biology 2008, 8:45  
doi:10.1186/1471-2148-8-45

Achilli A., Rengo C., Magri C., Battaglia V., Olivieri A., Scozzari R., Cruciani F., Zeviani M., Briem E., Carelli V., Moral P., Dugoujon J. M., Roostalu U., Loogvali E. L., Kivisild T., Bandelt H. J., Richards M., Villems R., Santachiara-Benerecetti A. S., Semino O., Torroni A. The Molecular Dissection of mtDNA Haplogroup H Confirms That the Franco-Cantabrian Glacial Refuge Was a Major Source for the European Gene Pool 2004 75:910-918

Allen, J. Separate sexes and the mitochondrial theory of ageing. (1995)  
J. Theor. Biol. (180), 135-140

Alzheimer.org.uk August 2007 What Is Alzheimer's Disease? Retrieved 2008 - 02 - 21

Alzheimer's Research Trust. Alzheimer's diagnosis of AD retrieved 2008 - 02 - 29

Allessio H.M., Hangerman A. E. Oxidative Stress Exercise And Aging (2006)

Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MHL, Coulson AR, Drouin J, Eperon IC, Nierlich DP, Roe BA, Sanger F, Schreier PH, Smith AJH, Staden R, Young IG (1981) Sequence and organization of the human mitochondrial genome. Nature 290:457-465

Bielski HHJ and Cabelli DE Superoxide And Hydroxyl Radical Chemistry In Aqueous Solution. (1995) In:Active Oxygen In Chemistry. Foole CS., Valentine JS., Greenber A., Liebman JF. Chapman And Hall, London pp 66 - 104

Berchtold ND. Cotman CW. Evolution on the conceptualization of dementia and Alzheimer's Disease: Greco - Roman period to the 1960's (1998) Neurobiol Aging 19 (3): 173 - 89

Betteridge D. J., What Is Oxidative Stress? Metabolism (2000) 49 (2):pp 3 - 8

Bohr VA Repair Of Oxidative DNA Damage In Nuclear And Mitochondrial DNA And Some Changes With Aging In Mammalian Cell. *Free Radic Biol Med* (2002) 32:804 - 812

Brookmeyer R., Gray S., Kawas C. 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

Brady NR., Elmore SP., Van Beek JJ at al. Coordinated Behaviour Of Mitochondria In Both Space And Time: A Reaction Oxygen Species Activated Wave Of Mitochondria Depolarization *Biophys J* (2004) 87:2022 - 34

Brandon, M.C., Lott, M.T., Nguyen, K.C., Spolim, S., Navathe, S.B., Baldi, P., and Wallace, D.C. MITOMAP: a human mitochondrial genome database-2004 update (2005) *Nucleic Acids Res* 33, D611-613

Bromham L., Eyre-Walker A., Smith N. H., Smith J. M. Mitochondrial Steve: paternal inheritance of mitochondria in humans (2003)

Butterfield, D. A.; Reed, T.; Newman, S. F. & Sultana, R. (2007). Roles of amyloid betapeptide-associated oxidative stress and brain protein modifications in the pathogenesis of Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Free Radic Biol Med*, Vol. 43, No. 5, (Sep 1 2007), pp. 658-677, ISSN 0891-5849

Castro J. A., Picornell A., Ramon M. Mitochondrial DNA: a tool for populational genetics studies (1998) 1:327-332

Chinnery P. F., Howell N., Andrews R. M., Turnbull D. M. Mitochondrial DNA analysis: polymorphisms and pathogenicity (1999) 36:505-510

Corral-Debrinski, M., Horton, T., Lott, M.T., Shoffner, J.M., Beal, M.F., and Wallace, D.C. Mitochondrial DNA deletions in human brain: regional variability and increase with advanced age. (1992) *Nat Genet* 2, 324 - 329

Du, Heng, and Shirley Shi Du Yan, 'Mitochondrial Permeability Transition Pore in Alzheimer's Disease: Cyclophilin D and Amyloid Beta.', *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1802 (2010), 198-204

Duchen M.R. Mitochondria, B - Cell Function, And Type 2 Diabetes. Roles Of Mitochondria In Health And Disease 2004 Vol. 53

Elson J. L., Andrews R. M., Chinnery P. F., Lightowers R. N., Turnbull D. M. and Howell N. Analysis of European mtDNAs for Recombination 68:145-153, 2001

Ernster L, Schatz G, Mitochondria: a historical review. J. Cell Biology (1981) 91 (3 Pt 2): 227s-255s. ^ Siekevitz P (1957).

Frank EM., Effect of Alzheimer's disease on communication function 1994 (9): 417 - 23

Finnila S., Autere J., Lehtovirta M., Hartikainen P., Manermaa A., Soininen H., Majamaa K. Increased risk of sensorineural hearing loss and migraine in patients with a rare mitochondrial DNA variant 4336A>G in tRNA<sup>Gln</sup> Journal of medical Genetics 2001 38 400-405

Genaro G. G. Or. et al. Role of Mitochondria in Alzheimer's Disease

Gold DP., Reis MF., Markiewicz D., Andres D. When home care giving ends. A longitudinal study of outcomes for caregivers of relatives with dementia 1995 (1): 10 - 6

Gori T., Daiber A., Di Stolfo G., Sicuro S., Dragoni S. Nitroglycerine causes mitochondrial reactive oxygen species production: In vitro mechanistic insights (2007) Vol 23

Monica Lisi MD1, Thomas Münzel MD3, Sandro Forconi MD1, John D Parker MD2

Grzybowski Tomasz Extremely High Levels Of Human Mitochondria NDA Heteroplasmy In Single Hair Roots (2000) (21) 548 - 553

Jeremy M. Berg, John L. Tymoczko, Lubert Stryer Βιοχημεία Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης

Halliwell B., Free Radicals, Antioxidants And Human Disease: Curiosity, Cause Or Consequence Lancet (1994) 344:721 - 724

Herrnstadt C., Elson J. L., Fahy E., Preston G., Turnbull D. M., Anderson C., Ghosh S. S., Olefsky J . M., Beal M. F., Davis R. E. and Howell N. Reduced Median Network

Analysis of Complete Mitochondrial DNA Coding-Region Sequences for the Major African, Asian, and European Haplogroups 70:1152-1171, 2002

Hum A. J. A De Novo Mutation (Gln2Stop) at the 5' End of the SRY Gene Leads to Sex Reversal with Partial Ovarian Function Genet. 62:189-192, 1998

Hutchin T, Cortopassi G. A mitochondrial clone is associated with increased risk for Alzheimer's disease. Proc Natl Acad Sci USA (1995) 92:6892-5.

Kang J, Lemaire HG, Unterbeck A, et al. The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. Nature. (1987);325:733-736.

Kerr, J.F., Wyllie, A.H., and Currie, A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics (1972) Br J Cancer 26, 239-257

Kokotas H., Grigoriadou M., Korres G. S., Giannoulia - Karantana A., Petersen M. B. Mitochondrion, that tiny demon (2009)

Logan D. C. The Mitochondrial Compartment (2006) (6) 1225 - 1243

Liu Y, Sato T, O'Rourke B, Marban E: Mitochondrial ATP-dependent potassium channels: novel effectors of cardioprotection? Circulation 97:2463-2469, 1998

Friederich M., Hansell P., Palm F. Diabetes, Oxidative Stress, Nitric Oxide and Mitochondria Function (2009) (5) 120 - 144

Khachaturian Z. S. Diagnosis of Alzheimer's Disease Archives of Neurology (1985) 42, 1097 - 105

Legros, F., Malka, F., Frachon, P., Lombes, A., and Rojo, M. (2004). Organization and dynamics of human mitochondrial DNA. J. Cell Sci. 117, 2653-2662.

Levy-Lahad E, Wasco W, Poorkaj P, et al. Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. Science. 1995;269:973-977.

Mariani E., Polidori M.C., Cherubini A., Mecocci P. Oxidative Stress In Brain Aging, Neurodegenerative And Vascular Diseases: An Overview (2005)

Martin Ott., Gogvadre V., Orrenius S., Zhivotovsky B. Mitochondria, Oxidative Stress And Cell Death (2007) 12:913 - 922

MetLife Mature market institute The metlife study of Alzheimer's disease: the caregiving experience 2006 Archived from the original on 2008 - 06 - 02

McGill University, Montreal, Quebec H3A 2B4, Canada Current Topics in Developmental Biology, Vol. 77 Copyright 2007, Elsevier Inc. All rights reserved DOI: 10.1016/S0070-2153(06)77004-1

McKusick N., Hopkins Johns Mitochondrial Inheritance - Complex Patterns of Inheritance 2 (2007) 6th Edition

Nygaard L. instrumental activities of daily living: a stepping - stone towards Alzheimer's disease diagnosis in subjects with mild cognitive impairment 2003 176: 42 - 6

Rand, D.M. Thermal habit, metabolic rate and the evolution of mitochondrial DNA. (1994) Trends Ecol. Evol. (9), 125-131

Rossignol R, Faustin B, Rocher C. Mitochondrial threshold effects. Biochem J 2003; 370: 751-762.

Sadot et al. Activation of m1 muscarinic Acetylcholine receptor regulates  $\tau$  phosphorylation in transfected pc12 cells 1996

Shoffner JM, Brown MD, Torroni A, et al. Mitochondrial DNA variants observed in Alzheimer disease and Parkinson disease patients. Genomics (1993) 17: 171-84.

Shoubridng E. A. Nuclear genetic defects of oxidative phosphorylation. Hum Mol Genet 10 (2001) 2277 - 84

Shoubridge E. A. and Wai T. Mitochondrial DNA and the Mammalian Oocyte Department of Human Genetics, Montreal Neurological Institute

Sisodia SS, St George-Hyslop PH.  $\gamma$ -Secretase, Notch, AB and Alzheimer's disease: where do the presenilins fit in? Nat Rev Neurosci. 2002;3:281-290.



St George-Hyslop P, Haines J, Rogaev E, et al. Genetic evidence for a novel familial Alzheimer's disease locus on chromosome 14. *Nat Genet.* 1992;2:330-334.

Sutovsky, P. et al. Ubiquitin tag for sperm mitochondria. (1999) *Nature* 402, 371-372

Tabert MH., Liu X., Doty RL., Serby M., Zamora D., Pelton GH., Mardek K., Albers MW., Stern Y., Devanand DP. A 10 - item smell identification scale related to risk for Alzheimer's disease. (2005) *Ann. Neurol.* 58 (1): 155 - 160 doi:10.1002/ana.20533 PMID 15984022

Taler V., Philips NA Language performance in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment: a comparative review 1994

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

Tysoe C., Robinson D., Brayne C., Denning T., Paykel E. S., Huppert F. A., Rubinsztein D. C. The tRNA<sup>Gln</sup> 4336 mitochondrial DNA variant is not a high penetrance mutation which predisposes to dementia before the age of 75 years (1996);33:1002-1006

Yarham J., Elson J., Blakery E., McFarland R., Taylor R. Mitochondrial tRNA Mutation And Disease (2010) Mitochondrial Research Group, Institute For Ageing And Health, The Medical School, Newcastle University, Newcastle Upon Tyne, NE2 4HH, UK DOI:10.1002

Uttara B., Singh A., Zamboni P., Mahajan RT. Oxidative Stress and Neurodegenerative Diseases: A Review of Upstream and Downstream Antioxidant Therapeutic Options (2009) 7 (1): 65 - 74

Waldman G., Dubois B., Emre M., 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

