



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

**ΥΠΑΡΞΗ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ ΣΕ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΑ  
ΓΟΝΙΔΙΑ tRNA ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΝΕΥΡΙΚΗ  
ΚΑΙ ΜΥΪΚΗ ΔΥΣΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ**

Καλογρίδη Αμαλία

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΛΑΡΙΣΑ 2009



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**  
**ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ**  
**ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»**

Αριθ. Εισ.: 6950/1  
Ημερ. Εισ.: 11-03-2009  
Δωρεά: Π.Θ.  
Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ  
2009  
ΚΑΛ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ  
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087351

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΠΕΡΙΣΤΡΟΦΩΝ ΚΤΙΣΙΟ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Αριθ. Πρωτ. 163  
Ημερομηνία 20-2-2009

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο  
Γενετικής, Συγκριτικής & Εξελικτικής Βιολογίας  
του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας  
του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κατά το έτος 2008-2009,  
υπό την επίβλεψη και καθοδήγηση της κ. Αιμιλίας Ζίφα

#### Εξεταστική επιτροπή

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

Κωνσταντίνος Σταθόπουλος, Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα  
Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας 

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

#### Ευχαριστίες

την καθηγήτρια μου κ. Α. Ζίφα για την εμπιστοσύνη, την πολύτιμη καθοδήγηση και τις συμβουλές που μου παρείχε σε όλη τη διάρκεια της μελέτης.

τον καθηγητή μου κ. Κ. Σταθόπουλο για την πολύτιμη βοήθεια του και τις συμβουλές του.

τις συναδέλφους μου Α. Καμινάρη και Μ. Σταύρου για την ομαδική συνεργασία τους.

τον καθηγητή κ. Μαμούρη για τις συμβουλές του σε φάσεις της εργασίας, καθώς και τους υποψήφιους διδάκτορες Κ. Σταμάτη και Λ. Κουτσογιαννούλη και τον μεταπτυχιακό φοιτητή Θ. Γιαννούλη για την επιστημονική υποστήριξη τους κατά την εκτέλεση του πειραματικού μέρους της εργασίας, όπου συνέβαλαν σημαντικά με τις συμβουλές και τη βοήθεια που μου παρείχαν.

## Περιεχόμενα

Περίληψη .....	5
Abstract .....	6
Εισαγωγή.....	7
1. Μιτοχόνδρια: Δομή, Μεμβρανικό σύστημα.....	7
2. Παραγωγή ενέργειας: Πρωτεΐνες αναπνευστικής αλυσίδας.....	8
3. Μιτοχονδριακό γονιδίωμα .....	9
4. Έκφραση μιτοχονδριακού γονιδιώματος.....	11
5. Γενετικός κώδικας μιτοχονδρίων.....	11
6. Η κληρονομικότητα του μιτοχονδριακού DNA.....	13
7. Μιτοχονδριακές μεταλλάξεις.....	13
7.1 Σύνδεση μεταλλάξεων με ασθένειες.....	13
7.2 Μεταλλάξεις σε μιτοχονδριακά tRNA γονίδια.....	15
7.3 Κλινικός φαινότυπος μιτοχονδριακών ασθενειών.....	21
7.3.1 Μιτοχονδριακή εγκεφαλομυοπάθεια, και εγκεφαλικά επεισόδια (MELAS).....	23
7.3.2 Μυοκλονική επιληψία με ανώμαλες ερυθρές μυϊκές ίνες (MERRF).....	23
7.3.3 Οφθαλμοπληγίες : Σύνδρομο Kearns-Sayre (KSS), χρόνια προοδευτική έξω οφθαλμοπληγία (CPEO), προοδευτική έξω οφθαλμοπληγία (PEO).....	24
7.3.4 Πολλαπλή (κατά πλάκας) σκλήρυνση (MS).....	25
7.3.5 Σακχαρώδης διαβήτης.....	25
7.3.6 Αυτισμός.....	26
8. Σκοπός Εργασίας.....	27
Υλικά και Μέθοδοι .....	28
1. Βιολογικό υλικό .....	28
2. Απομόνωση DNA.....	30
3. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης PCR.....	33
3.1. Η αρχή της μεθόδου .....	33
3.2. Πολλαπλασιασμός των γονιδίων tRNA.....	34
3.3 Διαδικασία ενίσχυσης με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης .....	36
3.4. Ποιοτικός προσδιορισμός των PCR προϊόντων.....	37
4. Ανάλυση πολυμορφισμού μονόκλωνης αλυσίδας (SSCP).....	38
4.1 Προετοιμασία των προϊόντων PCR.....	39
4.2 Παρασκευή πηκτής πολυακρυλαμίδης .....	39
4.3 Χρώση νιτρικού αργύρου .....	41
5. Προσδιορισμός της αλληλουχίας DNA (DNA sequencing).....	41
5.1 Καθαρισμός PCR προϊόντων.....	41
5.2 Μέθοδος τερματισμού νουκλεοτιδικής αλυσίδας με διδεοξυνουκλεοτίδια (Μέθοδος Sanger).....	43
5.3 Αυτοματοποιημένη φθορίζουσα αλληλούχιση DNA .....	44
6. Πολυμορφισμός Μήκους τμημάτων Περιορισμού (RFLP).....	45

6.1 Διαδικασία πέψης .....	46
6.2 Παρασκευή πηκτης πολυακρυλαμιδιου.....	46
Αποτελέσματα.....	48
Συζήτηση .....	51
Βιβλιογραφία.....	55

## Περίληψη

Μιτοχονδριακές σημειακές μεταλλάξεις στα γονίδια tRNA παίζουν κεντρικό ρόλο σε ασθένειες με μιτοχονδριακή προέλευση, οι οποίες συνιστούν μια ετερογενή ομάδα, που κυρίως εκδηλώνονται σε ιστούς με υψηλές απαιτήσεις σε ενέργεια, όπως ο νευρικός και ο μυϊκός, με κοινή βιοχημική δυσλειτουργία την γαλακτική οξέωση. Στην παρούσα μελέτη ερευνήσαμε για την παρουσία μεταλλάξεων σε 14 γονίδια tRNA, 30 ατόμων σε νεαρή ηλικία με νευρικές ή μυϊκές δυσλειτουργίες με κοινό χαρακτηριστικό υψηλά επίπεδα γαλακτικού οξέος. Τα κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών ποικίλουν από αναπτυξιακή καθυστέρηση, νοητική καθυστέρηση, αταξία, αυτισμό, σπασμούς, νευροψυχιατρικές διαταραχές, επιληψία, σύνδρομο Down, υποτονία, αδυναμία, έως δυσανεξία άθλησης με καρδιομυϊκές δυσλειτουργίες. Τα 14 γονίδια tRNA, tRNA<sup>Pro</sup>, tRNA<sup>Thr</sup>, tRNA<sup>Glu</sup>, tRNA<sup>Arg</sup>, tRNA<sup>Gly</sup>, tRNA<sup>Asp</sup>, tRNA<sup>Ser</sup>, tRNA<sup>Tyr</sup>, tRNA<sup>Cys</sup>, tRNA<sup>Asn</sup>, tRNA<sup>Ala</sup>, tRNA<sup>Trp</sup>, tRNA<sup>Val</sup>, tRNA<sup>Phe</sup> και οι περιβάλλουσες περιοχές, συμπεριλαμβάνοντας τμήματα του ND3 και 12S rRNA, ενισχύθηκαν με PCR και αναλύθηκαν με SSCP, PCR-RFLP και τη μέθοδο άμεσης αλληλούχισης. Ανιχνεύτηκαν γνωστές μεταλλάξεις που έχουν προαναφερθεί σε παθολογικές καταστάσεις στα γονίδια των tRNA<sup>Asp</sup>, tRNA<sup>Thr</sup>, tRNA<sup>Tyr</sup>, ND3, 12S rRNA. Επιπλέον, σε παιδί με αυτισμό ανιχνεύτηκε μια νέα μετάλλαξη στο γονίδιο tRNA<sup>Thr</sup>. Το γεγονός ότι στο 33% παιδιών νεαρής ηλικίας που εμφανίζουν ψυχοκινητική καθυστέρηση και καρδιακά προβλήματα ανιχνεύτηκαν μεταλλάξεις tRNA που ήταν ήδη γνωστές ως παθογόνες, μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η ανάλυση του μιτοχονδριακού γονιδιώματος μπορεί να έχει καθοριστικό ρόλο στην ανίχνευση μιτοχονδριακών δυσλειτουργιών, παρουσία μεγάλου αριθμού συμπτωμάτων.

## Abstract

Mitochondrial tRNA point mutations are the hot spot of disorders with mitochondrial origin, which consist a heterogeneous group of diseases commonly manifesting in tissues with high - energy demand, as nerve and muscle. A common biochemical hallmark of these multi - functional diseases is lactic acidosis. In the present study we screened for the presence of mutations in 14 tRNA genes, 30 children with nerve and muscle dysfunction exhibiting as common symptom hyperlactic acidosis. Their clinical features varied from developmental delay, mental retardation, ataxia, autism, seizures, neuropsychiatric disturbances, epilepsy, Down syndrome, hypotonia, fatigue, exercise intolerance to cardiovascular disease. The 14 tRNA genes, tRNA<sup>Pro</sup>, tRNA<sup>Thr</sup>, tRNA<sup>Glu</sup>, tRNA<sup>Arg</sup>, tRNA<sup>Gly</sup>, tRNA<sup>Asp</sup>, tRNA<sup>Ser</sup>, tRNA<sup>Tyr</sup>, tRNA<sup>Cys</sup>, tRNA<sup>Asn</sup>, tRNA<sup>Ala</sup>, tRNA<sup>Trp</sup>, tRNA<sup>Val</sup>, tRNA<sup>Phe</sup> and part of their flanking regions, including fragments of ND3 and 12S rRNA, were amplified by PCR and analyzed by SSCP, PCR - RFLP and direct sequence methods. A number of mutations previously identified with diseased conditions were detected in tRNA<sup>Asp</sup>, tRNA<sup>Thr</sup>, tRNA<sup>Tyr</sup>, ND3, 12S rRNA genes. In addition, a novel mutation in tRNA<sup>Thr</sup> gene was identified in a child with autism. The fact that 33% of the children revealing psychomotor delay and cardiovascular disorders were detected with pathological tRNA mutations makes it clear how crucial analysis of mitochondrial DNA may be in detecting mitochondrial diseases, in the presence of numerous disorders.

# Εισαγωγή

## 1. Μιτοχόνδρια: Δομή, Μεμβρανικό σύστημα

Τα μιτοχόνδρια (μίτος + χόνδριον, κόκκος) είναι ωοειδή οργανίδια που υπάρχουν σε όλα τα ευκαρυωτικά κύτταρα και χρησιμοποιούνται για το μεταβολισμό των βιολογικών μακρομορίων που προσλαμβάνουν οι οργανισμοί με τις τροφές (Σχήμα 1). Κάθε κύτταρο διαθέτει 2-100 μιτοχόνδρια, τα οποία παρουσιάζουν δυο συστήματα μεμβρανών. Μια εξωτερική και μια πτυχωτή εσωτερική μεμβράνη. Οι



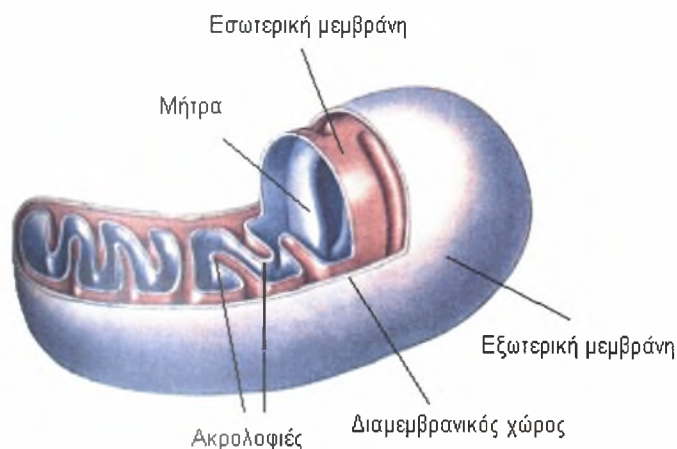
Σχήμα 1. Μιτοχόνδριο

πτυχές της εσωτερικής μεμβράνης ονομάζονται ακρολοφιές (*cristae*) και αυξάνουν σημαντικά την συνολική επιφάνεια της. Ως αποτέλεσμα δημιουργούνται δυο διαμερίσματα στα μιτοχόνδρια: ο διαμεμβρανικός χώρος μεταξύ της εσωτερικής και της εξωτερικής μεμβράνης και η μήτρα ή στρώμα (*matrix*) η οποία περιβάλλεται από την εσωτερική μεμβράνη (Σχήμα 2).<sup>1</sup>

Η εσωτερική μεμβράνη είναι από την φύση της αδιαπέραστη από όλα τα ιόντα και τα πολικά μόρια, που απαιτούν ειδικούς μεμβρανικούς μεταφορείς για να εισέλθουν στη μήτρα. Περιέχει μεγάλο αριθμό πρωτεϊνών που εκτελούν διαφορετικές λειτουργίες. Πρωτεΐνες που διεκπεραιώνουν τις οξειδωτικές αντιδράσεις της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων (κυτταρική αναπνοή), τη συνθάση του ATP που παράγει ATP στο στρώμα, και μεταφορικές πρωτεΐνες που επιτρέπουν τη δίοδο μεταβολιτών προς και από το στρώμα. Διαμέσου αυτής της μεμβράνης σχηματίζεται μια βαθμίδωση  $H^+$  που προωθεί τη συνθάση του ATP. Η



αυξημένη παραγωγή ATP, ειδικά σε κύτταρα με μεγαλύτερες απαιτήσεις, όπως τα μυϊκά κύτταρα, εξασφαλίζεται από το μεγάλο συνολικό μέγεθος της εσωτερικής μεμβράνης μέσω των πτυχώσεων που παρουσιάζει.



**Σχήμα 2.** Δομή μιτοχονδρίου

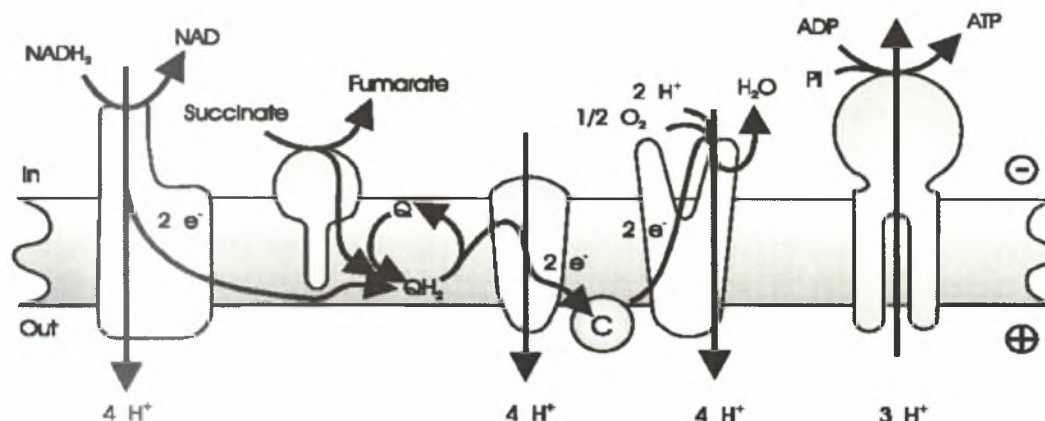
## 2. Παραγωγή ενέργειας: Πρωτεΐνες αναπνευστικής αλυσίδας

Τα μιτοχόνδρια συχνά αναφέρονται ως «κυτταρικά εργοστάσια παραγωγής ηλεκτρικής ενέργειας», επειδή παρέχουν την μεγαλύτερη ποσότητα τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP) που είναι απαραίτητη για το κύτταρο ως πηγή χημικής ενέργειας. Υπάρχουν ιστοί που παρουσιάζουν υψηλότερο μεταβολικό ρυθμό επομένως έχουν μεγαλύτερες απαιτήσεις σε ενέργεια, όπως η καρδιά, οι σκελετικοί μύς και το κεντρικό νευρικό σύστημα. Για το λόγο αυτό, τα μιτοχονδριακά νοσήματα χαρακτηρίζονται συχνά από μυοπάθειες και εγκεφαλοπάθειες.

Κατά την παραγωγή ενέργειας ηλεκτρόνια ( $e^-$ ) υψηλής ενέργειας μεταφέρονται από τα ενεργειακά μόρια φορείς NADH και  $FADH_2$ . Αφού εισέλθουν στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων, αρχίζει η μεταφορά τους κατά μήκος της αλυσίδας, επίσης γνωστή ως αναπνευστική αλυσίδα (Σχήμα 3).

Η αναπνευστική αλυσίδα περιέχει πάνω από 40 πρωτεΐνες, από τις οποίες περίπου 15 εμπλέκονται άμεσα στη μεταφορά των ηλεκτρονίων και κατατάσσονται σε τρία μεγάλα σύμπλοκα αναπνευστικών ενζύμων (*respiratory enzyme complexes*). Τα τρία σύμπλοκα των αναπνευστικών ενζύμων είναι της NADH - αναγωγάσης του συνενζύμου Q ή αφυδρογονάση NADH (complex I), της

οξειδοαναγωγή του ζεύγους Q - κυτοχρώματος c ή κυτοχρωμική αναγωγή (complex III) και την οξειδάση του κυτοχρώματος c (complex IV). Η ροή των ηλεκτρονίων δια μέσου αυτών των διαμεμβρανικών συμπλόκων οδηγεί στην άντληση πρωτονίων της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης προς το κυτταρόπλασμα με ταυτόχρονη φωσφορυλίωση ενός μόριου ADP σε ATP, μέσω του ενζυμικού συμπλόκου της ATP συνθάσης.

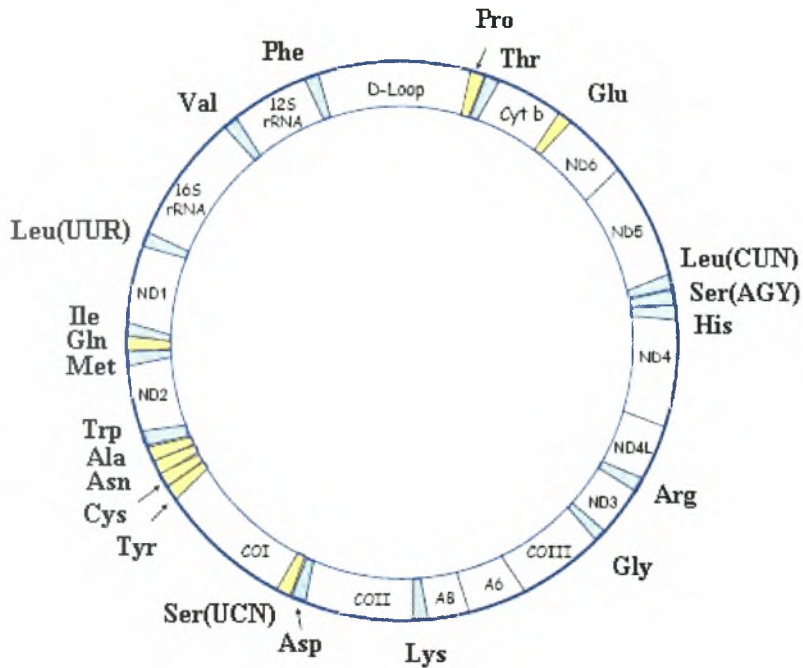


**Σχήμα 3.** Τα σύμπλοκα της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων που συμμετέχουν στην οξειδωτική φωσφορυλίωση και βρίσκονται στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη. C: κυτόχρωμα c, Q: ουβικινόνη.

### 3. Μιτοχονδριακό γονιδίωμα

Παρατηρήσεις, που έγιναν στα τέλη του 50 και στις αρχές του 60, απέδειξαν την ύπαρξη ενός μιτοχονδριακού γενετικού συστήματος που ξεχώριζε από τον πυρήνα. Πειράματα που είχαν προηγηθεί, είχαν αποδείξει ότι απομονωμένα μιτοχόνδρια είχαν ένα μηχανισμό πρωτεϊνοσύνθεσης και ήταν ικανά να συνθέσουν έναν μικρό αριθμό πρωτεϊνών. Περαιτέρω μελέτες θεμελίωσαν την ύπαρξη μιτοχονδριακών ριβοσωμάτων, rRNA, και tRNA. Μετά από τις αρχικές αυτές ανακαλύψεις, πολλά έχουν ακολουθήσει για να καθοριστεί η γονιδιακή οργάνωση του mtDNA. Το γονιδίωμα του ανθρώπινου μιτοχονδρίου αλληλουχήθηκε το 1981 από το Fred Sanger και τους συναδέλφους τους στο Chambridge, ενώ πλέον έχουν κατηγοριοποιηθεί αλληλουχίες από περισσότερους οργανισμούς.<sup>2</sup> Εντυπωσιακό εύρημα αποτελεί η ανίχνευση ενός συντηρημένου συνόλου γονιδίων σε όλους τους πολυκύτταρους οργανισμούς. Στον άνθρωπο, το mtDNA

περιλαμβάνει γονίδια που εκφράζουν 2 μόρια rRNA, 22 tRNA και 13 πολυπεπτίδια που ανήκουν στα σύμπλοκα I, III, IV, V της αναπνευστικής αλυσίδας (Σχήμα 4).

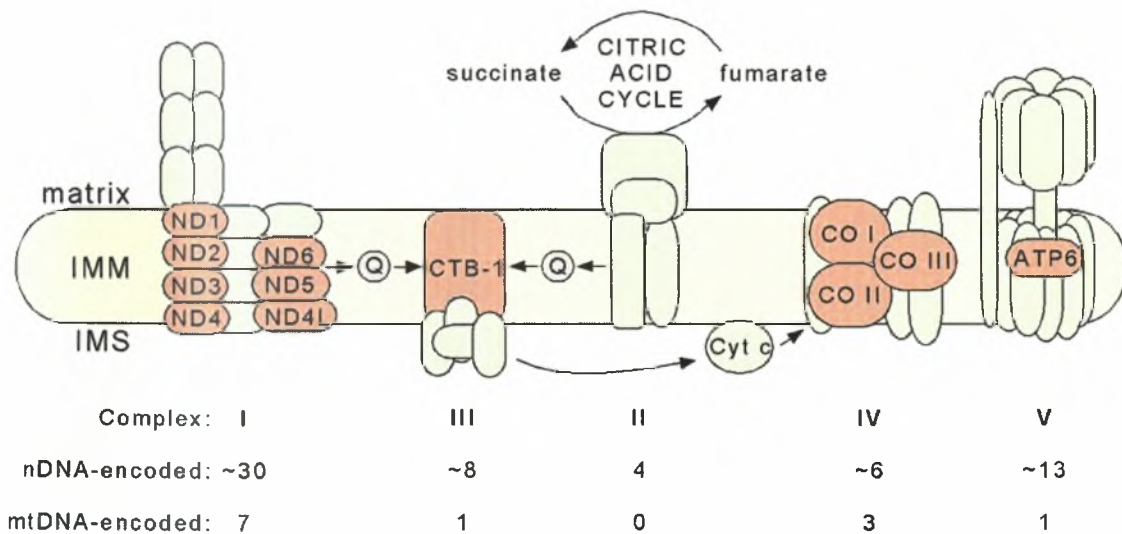


**Σχήμα 4.** Το μιτοχονδριακό γονιδίωμα. Με κίτρινο απεικονίζονται τα tRNA που προκύπτουν από τη μεταγραφή του κλώνου L, ενώ με μπλε αυτά που προκύπτουν από τη μεταγραφή του κλώνου H.

Σε αντίθεση με το πυρηνικό γονιδίωμα, το μιτοχονδριακό εκθέτει μεγάλη οργάνωση στην αλληλουχία του. Το μιτοχονδριακό γένωμα αποτελείται από 16.596 ζεύγη βάσεων σε μήκος, ενώ είναι ένα κλειστό κυκλικό μόριο που τοποθετείται εντός της μιτοχονδριακής μήτρας στο κύτταρο. Έχει δυο κλώνους, έναν πλούσιο σε γουανίνη κλώνο H (Heavy strand) και έναν πλούσιο σε κυτοσίνη κλώνο L (Light strand). Ιντρόνια απουσιάζουν και όλες οι κωδικοποιούσες περιοχές είναι συνεχιζόμενες. Το μόνο μη εκφραζόμενο τμήμα του είναι η περιοχή του βρόγχου D (d - loop), μια περιοχή από 1121 bp που περιέχει την αφετηρία αντιγραφής του κλώνου H και τους υποκινητές μεταγραφής των δυο κλώνων.<sup>3</sup>

#### 4. Έκφραση μιτοχονδριακού γονιδιώματος

Η έκφραση του μιτοχονδριακού γονιδιώματος οδηγεί στην σύνθεση 2 μορίων rRNA, 22 tRNA και 13 πολυπεπτιδίων. Τα 13 πολυπεπτιδία περιλαμβάνουν 7 υπομονάδες της αφυδρογονάσης NADH, 3 υπομονάδες της κυτοχρωμικής αναγωγάσης, 2 υπομονάδες της ATP συνθάσης και το κυτόχρωμα b (Σχήμα 5). Το σύνολο των συμπλόκων της αναπνευστικής αλυσίδας συγκροτείται, από υπομονάδες που εκφράζονται στο μιτοχόνδριο, αλλά και στο πυρηνικό DNA. Γεγονός που φανερώνει την εξάρτηση του μιτοχονδρίου από τον πυρήνα για την σωστή διεξαγωγή παραγωγής ενέργειας.



**Σχήμα 5.** Οι συνολικές υπομονάδες των συμπλόκων της αναπνευστικής αλυσίδας. Άλλες προκύπτουν από έκφραση του μιτοχονδριακού DNA και άλλες από το πυρηνικό γονιδίωμα.

#### 5. Γενετικός κώδικας μιτοχονδρίων

Το ανθρώπινο μιτοχονδριακό γονιδίωμα κωδικοποιεί 22 είδη tRNA, τα οποία είναι τα μόνα που χρησιμοποιούνται για την μετάφραση των μιτοχονδριακών mRNA. Αυτό επιτυγχάνεται σύμφωνα με την υπόθεση αστάθειας, όπου U του αντικωδικονίου στο tRNA μπορεί να συζευχθεί με οποιαδήποτε από τις τέσσερις βάσεις στην τρίτη θέση του κωδικονίου στο mRNA, επιτρέποντας την αναγνώριση

τεσσάρων κωδικονίων από ένα μόνο μόριο tRNA. Επιπλέον, μερικά κωδικόνια καθορίζουν διαφορετικά αμινοξέα στο μιτοχονδριακό γενετικό κώδικα σε σχέση με τον παγκόσμιο (Πίνακας 1). Πρέπει να σημειωθεί ότι το κωδικόνιο AUU στα μιτοχόνδρια κωδικοποιεί ισολευκίνη κατά την επιμήκυνση, αλλά μπορεί να κωδικοποιήσει και την μεθειονίνη κατά την έναρξη της μετάφρασης. Από τα γονίδια που εδράζονται στο μιτοχονδριακό χρωμόσωμα, δύο κωδικοποιούν ριβοσωμικό RNA, το 12S και το 16S rRNA. Τα μιτοχονδριακά ριβοσώματα σχηματίζονται από μια μικρή υπομονάδα με συντελεστή καθίζησης 28S και μια μεγάλη με συντελεστή καθίζησης 39S. Η μικρή υπομονάδα αποτελείται από το 16S και 29 πρωτεΐνες πυρηνικής προέλευσης, ενώ η μεγάλη υπομονάδα αποτελείται από το 12S RNA και 48 πρωτεΐνες πυρηνικής προέλευσης. Τα μιτοχονδριακά ριβοσώματα βρίσκονται στη μήτρα είτε ελεύθερα, είτε συνδεδεμένα στις πτυχώσεις της εσωτερικής μεμβράνης. Η έναρξη της μετάφρασης στα μιτοχονδριακά ριβοσώματα μοιάζει με εκείνη των ευκαρυωτών. Παρόλα αυτά, η πρωτεϊνοσύνθεση αρχίζει με N-φορμυλομεθειονίνη (fmet). Τα πολυπεπτίδια που καθορίζονται από το μιτοχονδριακό γένωμα αποτελούν το 5-10% του συνόλου των μιτοχονδριακών πρωτεϊνών. Οι υπόλοιπες πρωτεΐνες που είναι απαραίτητες για τη βιογένεση και την φυσιολογική λειτουργία των μιτοχονδρίων, κωδικοποιούνται από το πυρηνικό γένωμα, μεταφράζονται στα κυτταροπλασματικά ριβοσώματα και μεταφέρονται στα μιτοχόνδρια.

**Πίνακας 1.** Κωδικόνια ειδικά για τα ανθρώπινα μιτοχόνδρια

Κωδικόνιο	Παγκόσμιος κώδικας	Κώδικας στα μιτοχόνδρια
<b>UGA</b>	stop	Trp
<b>AGA</b>	Arg	stop
<b>AGG</b>	Arg	stop
<b>AUA</b>	Ile	Met

## 6. Η κληρονομικότητα του μιτοχονδριακού DNA

Τα μη πυρηνικά γονιδιώματα μεταβιβάζονται κατά κανόνα μέσω του ενός από τους δύο γονείς, πάντα του ίδιου φύλου, στις επόμενες γενιές. Σύγχρονες προσεγγίσεις υποστηρίζουν ότι τα μιτοχόνδρια του σπέρματος καταστρέφονται με ενεργό τρόπο λίγο μετά τη γονιμοποίηση μέσω διεργασιών που παρουσιάζουν υψηλή ειδίκευση για κάθε είδος. Η μητρική κληρονόμηση των κυτταροπλασματικών γονιδιωμάτων ερμηνεύεται εξελικτικά σαν ένας χαρακτήρας που ελέγχεται από τον πυρήνα και προστατεύει τα μη-πυρηνικά γονιδιώματα από τις αρνητικές επιδράσεις. Η συγκεκριμένη υπόθεση, προκειμένου να εξηγήσει τους λόγους που συνέβαλαν στην εγκαθίδρυση της μητρικής κληρονόμησης, λαμβάνει υπόψη τις ιδιαιτερότητες που παρουσιάζουν τα γονιδιώματα των οργανιδίων, σε αντιπαράθεση με τα πυρηνικά. Τέτοιες ιδιαιτερότητες είναι ο μεγάλος αριθμός αντιγράφων ανά κύτταρο, η μικρή έως ελάχιστη επίδραση του ανασυνδυασμού, η φυσική επιλογή που συμβαίνει στο επίπεδο του κυττάρου και οι συνακόλουθες επιδράσεις της τυχαίας παρέκκλισης. Επιπλέον, σημειώνεται ότι η ετεροπλασμία και ο ανασυνδυασμός που μπορεί να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη των κυτταροπλασματικών συστημάτων μετριάζοντας τις αρνητικές συνέπειες της μητρικής κληρονόμησης, βασικότερη από τις οποίες είναι η ταχεία συσσώρευση παθογόνων μεταλλάξεων.

## 7. Μιτοχονδριακές μεταλλάξεις

### 7.1 Σύνδεση μεταλλάξεων με ασθένειες

Το μιτοχονδριακό γονιδίωμα παρουσιάζει υψηλό ρυθμό μεταλλαξιγένεσης, περίπου 10 με 15 φορές μεγαλύτερο από αυτόν του πυρηνικού DNA. Το γεγονός πιθανόν οφείλεται, στην απουσία προστατευτικών πρωτεϊνών (όπως ιστόνες), που έχει ως αποτέλεσμα το mtDNA να ενώνεται με την εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων, όπου παράγονται σε μεγάλες συγκεντρώσεις μεταλλαξογόνες ελεύθερες ρίζες οξυγόνου, αλλά και στην μη αποτελεσματική επιδιόρθωση του DNA. Λόγω της κυτταροπλασματικής του εντόπισης, το mtDNA κληρονομείται,



όπως έχουμε ήδη αναφέρει, αποκλειστικά μητρικά. Ως εκ τούτου μόνο τα θηλυκά μπορούν να μεταδώσουν τις μιτοχονδριακές ασθένειες και να μεταβιβάσουν τη μετάλλαξη σε όλους τους απογόνους τους ανεξαρτήτως φύλου. Το ποσοστό των μιτοχονδρίων, που φέρουν στο γενετικό τους υλικό τη μετάλλαξη, μπορεί να διαφέρει σημαντικά μεταξύ διαφορετικών σωματικών κυττάρων και ιστών, δεδομένου ότι το μιτοχονδριακό DNA διπλασιάζεται αυτόνομα και ανεξάρτητα από το πυρηνικό DNA, και ότι τα μιτοχόνδρια διαχωρίζονται στα θυγατρικά κύτταρα ανεξάρτητα από τα πυρηνικά χρωμοσώματα (μία διαδικασία γνωστή ως πολλαπλασιαστικός διαχωρισμός). Αυτή η ετερογένεια ονομάζεται ετεροπλάσμια και παίζει σημαντικό ρόλο στον φαινότυπο μιας μιτοχονδριακής νόσου, που κατά κανόνα χαρακτηρίζεται από ποικιλομορφία και ιστοειδικότητα. Όπως αναφέραμε, οι ιστοί διαφέρουν ως προς την εξάρτησή σε ενέργεια, με την καρδιά, τους σκελετικούς μυς και το κεντρικό νευρικό σύστημα που είναι τα πιο εξαρτημένα. Έτσι, τα μιτοχονδριακά νοσήματα χαρακτηρίζονται συχνά από μυοπάθειες και εγκεφαλοπάθειες (διαταραχές του μυϊκού ιστού και του εγκεφάλου αντίστοιχα).

Η αλληλεπίδραση ανάμεσα στο πυρηνικό και μιτοχονδριακό γονιδίωμα είναι αρκετά πολύπλοκη για να εκτιμηθεί. Παρόλα αυτά, ένας μεγάλος αριθμός πυρηνικών γονιδίων, τα οποία ελέγχουν την ακεραιότητα και τον αριθμό των mtDNA αντιγράφων, έχει ταυτοποιηθεί. Μεταλλάξεις σε αυτά τα γονίδια επηρεάζουν είτε τη μιτοχονδριακή αντιγραφή είτε την ενζυμική διαδικασία αυτή καθαυτή οδηγώντας σε μείωση του αριθμού των αντιγράφων.

Παθογόνες και πολυμορφικές μεταλλάξεις έχουν βρεθεί στα 13 μιτοχονδριακά γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεϊνικές υπομονάδες της αναπνευστικής αλυσίδας αλλά και στα 2 rRNA, το 12S και 16S. Στις κώδικες περιοχές των 13 γονιδίων έχουν αναφερθεί 163 παθογόνες και 1329 πολυμορφικές μεταλλάξεις ενώ στις μη κώδικες των 2 rRNA, 12 παθογόνες και 168 πολυμορφικές. Εννέα από τις 12 είναι υπεύθυνες για περιπτώσεις κώφωσης ενώ ποικίλοι φαινότυποι αντιστοιχούν στις μεταλλάξεις των γονιδίων που κωδικοποιούν υπομονάδες της αναπνευστικής αλυσίδας.

Η διάγνωση μιτοχονδριακών διαταραχών εξαρτάται από τον συνδυασμό διαφόρων προσεγγίσεων, περιλαμβάνοντας κλινική ανάλυση, μέτρηση της

ενζυμικής δραστηριότητας της αναπνευστικής αλυσίδας και μορφολογική ανάλυση. Μιτοχονδριακές δυσλειτουργίες που συσχετίζονται με μεταβολή της ενζυμικής δραστηριότητας της αναπνευστικής αλυσίδας έχουν συνδεθεί με γαλακτική οξέωση, δηλαδή υψηλή αναλογία γαλακτικού / πυροσταφυλικού.<sup>4</sup> Το γαλακτικό οξύ προέρχεται από το μεταβολισμό του πυροσταφυλικού με την καταλυτική δράση της γαλακτικής αφυδρογονάσης (LDH) και την ταυτόχρονη οξειδωση του NADH και NAD<sup>+</sup>. Η μεγαλύτερη ποσότητα του παραγόμενου πυροσταφυλικού εισέρχεται στα μιτοχόνδρια και μεταβολίζεται στον κύκλο των τρικαρβοξυλικών οξέων προς παραγωγή CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O και επιπρόσθετων ATP μορίων. Οι κυριότερες συνθήκες που προάγουν υπερπαραγωγή και άθροιση γαλακτικού αφορούν στις καταστάσεις ιστικής υποάδρευσης και υποξίας. Σε κυτταρικό επίπεδο συνέπεια αυτών είναι η εξάντληση των αποθεμάτων ενέργειας ATP και η διαταραχή των μιτοχονδριακών λειτουργιών λόγω έλλειψης οξυγόνου.<sup>5</sup> Η ετερογένεια των μεταλλάξεων που έχουν συνδεθεί με ποικίλα κλινικά συμπτώματα τις έχει κατατάξει σε δυο κατηγορίες, αυτές που επηρεάζουν την μιτοχονδριακή πρωτεϊνοσύνθεση και αυτές τις μεταλλάξεις σε μιτοχονδριακά γονίδια που κωδικοποιούν 13 ενζυμικές υπομονάδες της αναπνευστικής αλυσίδας.

## 7.2 Μεταλλάξεις σε μιτοχονδριακά tRNA γονίδια

Στη διάρκεια των τελευταίων δυο δεκαετιών περισσότερες από 250 μεταλλάξεις μιτοχονδριακών γονιδίων έχουν συνδεθεί με ένα αυξανόμενο φάσμα ποικίλων κλινικών συμπτωμάτων. Παρόλο που οι tRNA αλληλουχίες αποτελούν μόνο το 10% του μιτοχονδριακού γενώματος, περισσότερες από τις μισές παθογόνες μεταλλάξεις εντοπίζονται σε αυτά τα γονίδια, επηρεάζοντας την μιτοχονδριακή πρωτεϊνοσύνθεση (Πίνακας 2).

Έως τώρα, 136 παθογόνες μεταλλάξεις και 243 πολυμορφισμοί έχουν ταυτοποιηθεί σε όλα τα tRNA γονίδια (Σχήμα 7).<sup>6</sup> Ως πολυμορφισμοί αναφέρονται οι ουδέτερες μεταλλάξεις που βρίσκονται σε όλα τα γονίδια tRNA και γενικά δεν επηρεάζουν τη δομική ακεραιότητα και το λειτουργικό ρόλο των tRNA. Πρόκειται,



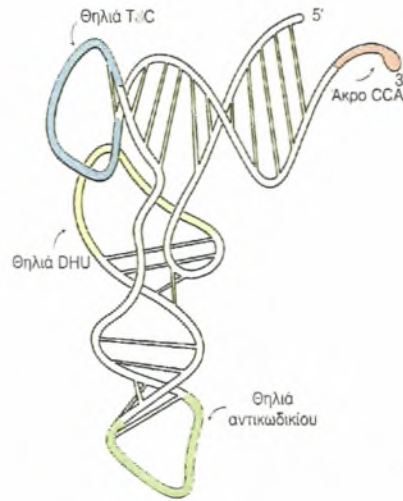
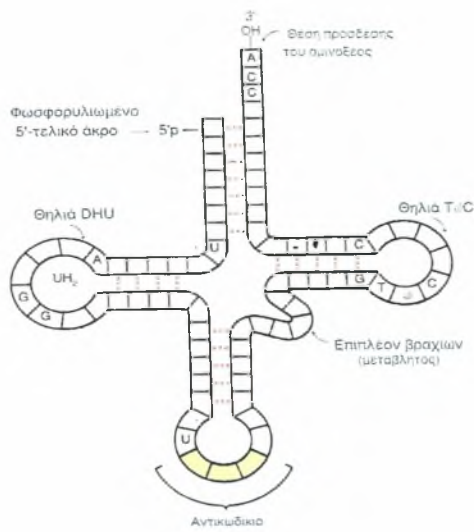
συνήθως, για αντικαταστάσεις ενός νουκλεοτιδίου και χρησιμοποιούνται σε πολλές μελέτες με σκοπό να καθοριστεί η φυλογενετική κατανομή μεγάλων πληθυσμών.

Παθογόνες μεταλλάξεις εντοπίζονται σε όλα τα tRNA γονίδια εκτός από το γονίδιο tRNA<sup>Arg</sup>. Επίσης, υπάρχουν μεταλλάξεις και σε άλλες περιοχές του mtDNA που μπορούν να θεωρηθούν σημαντικοί παράγοντες παθογένεσης, ωστόσο πληροφορίες για αυτούς τους παράγοντες είναι περιορισμένες. Σε όλο το μόριο των tRNA, τόσο στους βρόγχους όσο και στις θηλιές, κατανέμονται μεταλλάξεις

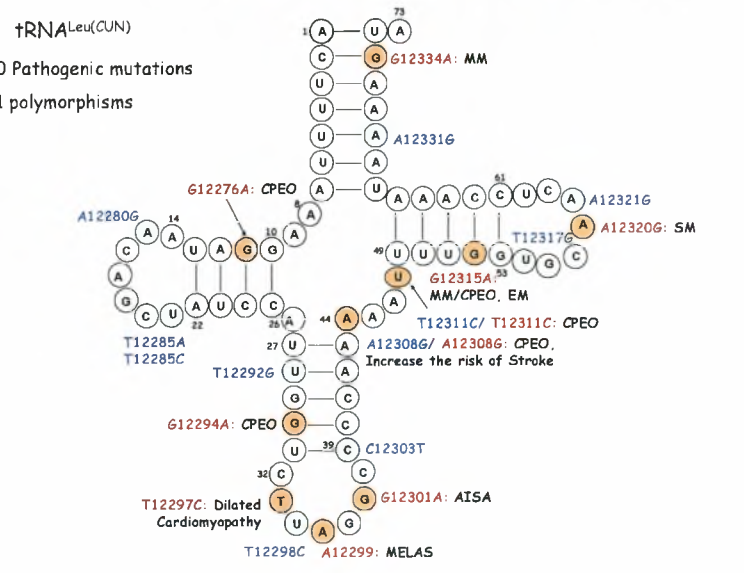
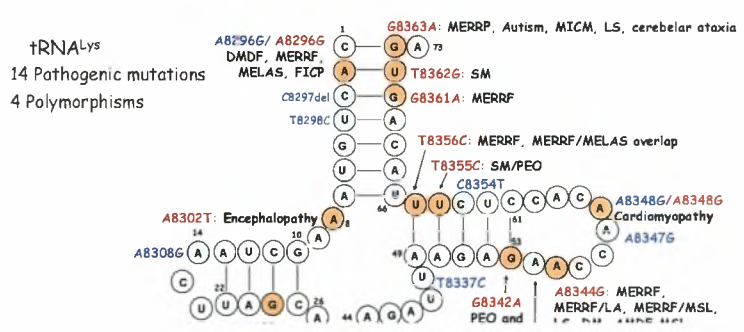
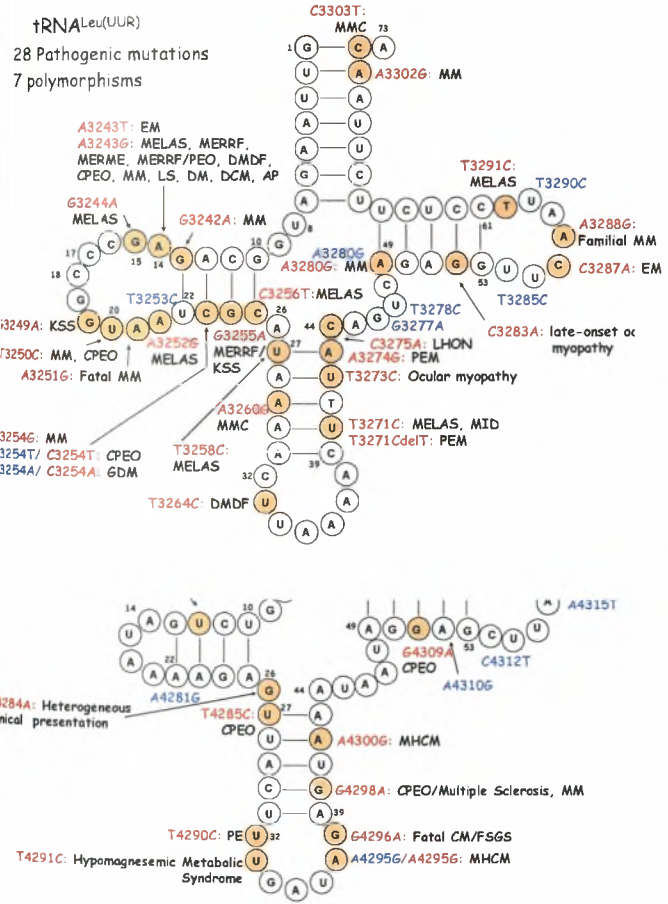
που σε μεγαλύτερο βαθμό είναι μεταπτώσεις (πυριμιδίνη σε πυριμιδίνη και πουρίνη σε πουρίνη) σε σχέση με μετατροπές (πυριμιδίνη σε πουρίνη και το αντίστροφο). Αυτές που βρίσκονται στους βραχίονες διαταράσσουν το φυσιολογικό ζευγάρι των βάσεων που έχει διατυπωθεί από τους Watson και Crick, και συνήθως εμφανίζονται ως C-A και G-U. Σημαντική είναι η παρατήρηση ότι απουσιάζουν μεταλλάξεις στη θηλιά του αντικωδικονίου, αφού οποιαδήποτε αλλαγή στο σημείο θα ήταν κρίσιμη για την διαδικασία της πρωτεϊνοσύνθεσης (Σχήμα 6). Η πλειοψηφία των παθογόνων μεταλλάξεων εντοπίζονται σε θέσεις με υψηλό βαθμό συντήρησης κατά την εξέλιξη, ενώ οι πολυμορφικές σε όχι τόσο συντηρημένες θέσεις.<sup>7</sup>

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

**Πίνακας 2.** Μεταλλάξεις στα γονίδια tRNA.

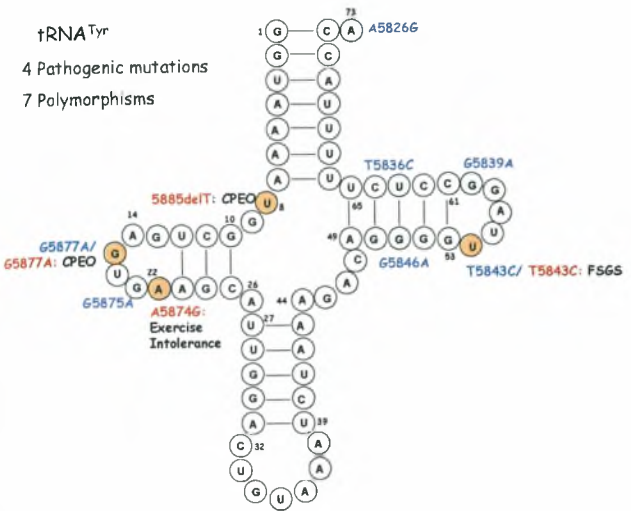


**Σχήμα 6.** Κοινά χαρακτηριστικά μορίων tRNA σε (α) δευτεροταγή και (β) τριτοταγή δομή.

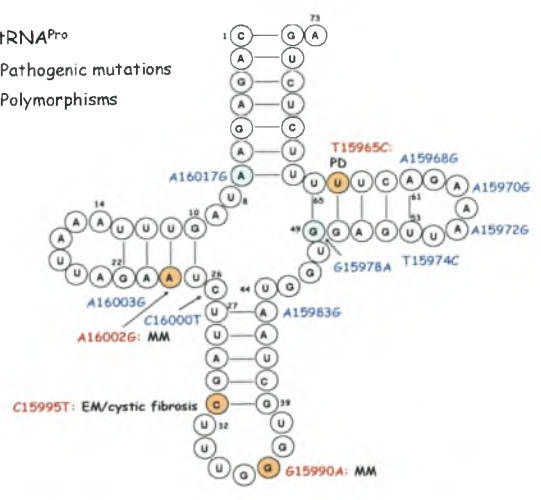




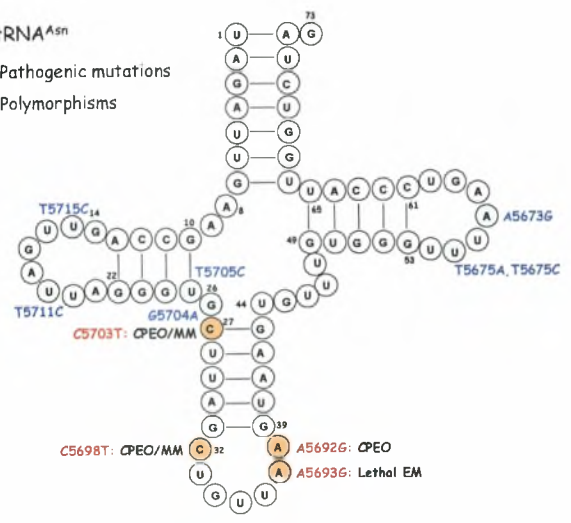
†RNA<sup>Tyr</sup>  
 4 Pathogenic mutations  
 7 Polymorphisms



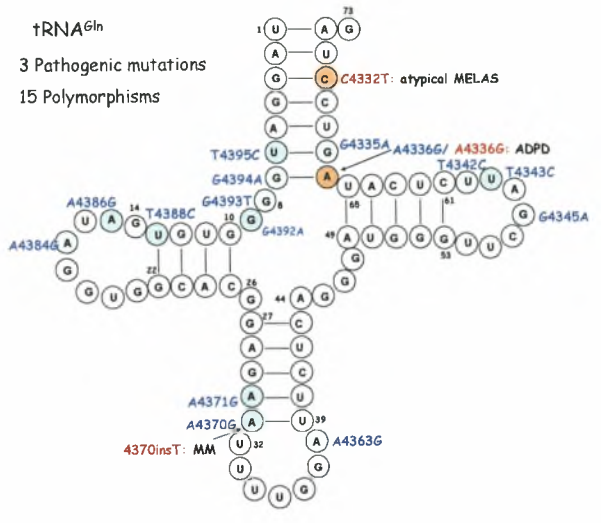
†RNA<sup>Pro</sup>  
 4 Pathogenic mutations  
 9 Polymorphisms



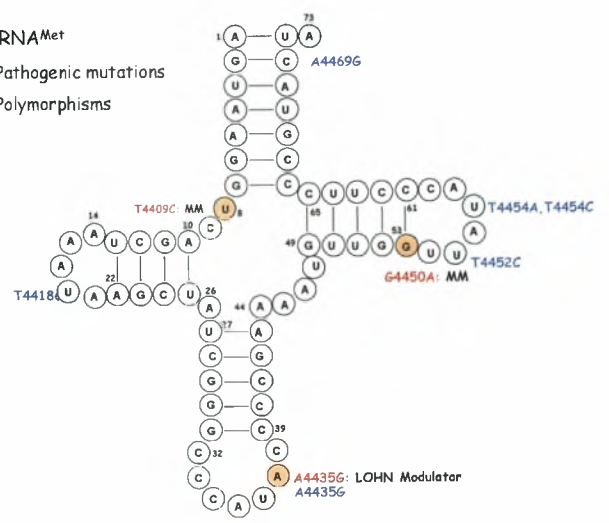
†RNA<sup>Asn</sup>  
 4 Pathogenic mutations  
 7 Polymorphisms



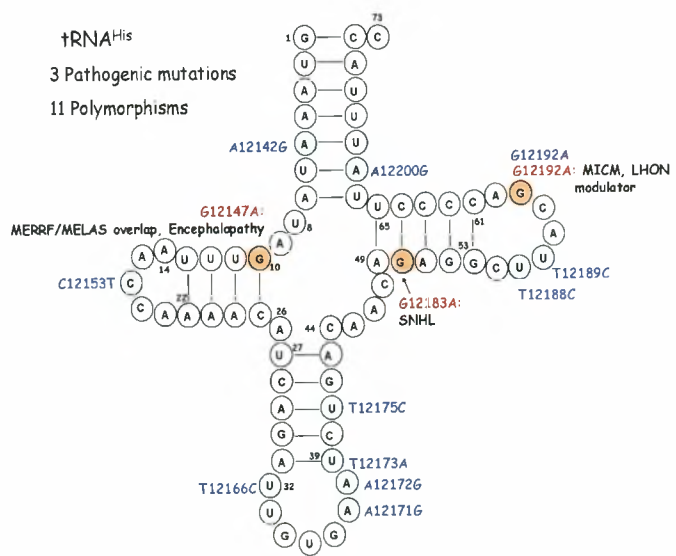
†RNA<sup>Gln</sup>  
 3 Pathogenic mutations  
 15 Polymorphisms



†RNA<sup>Met</sup>  
 3 Pathogenic mutations  
 6 Polymorphisms



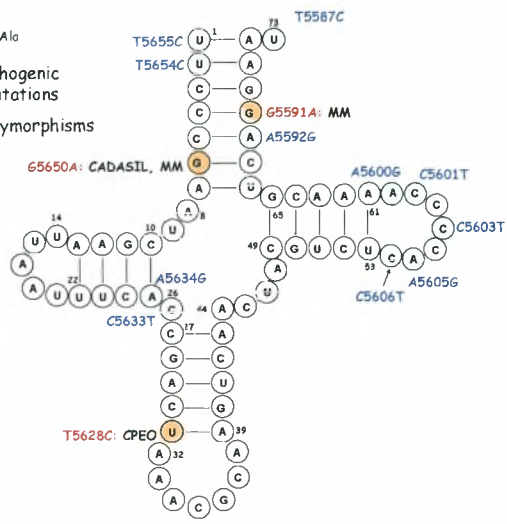
†RNA<sup>His</sup>  
 3 Pathogenic mutations  
 11 Polymorphisms





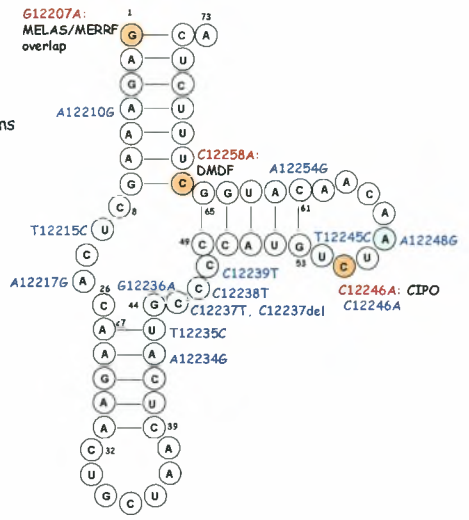
†RNA<sup>Ala</sup>

3 Pathogenic mutations  
11 Polymorphisms



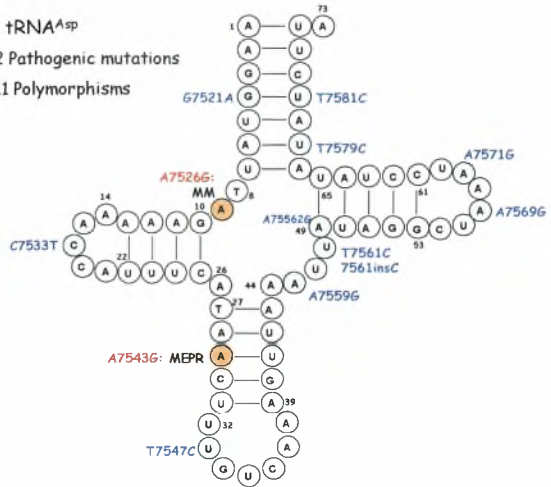
†RNA<sup>Ser(AGY)</sup>

3 Pathogenic mutations  
13 Polymorphisms



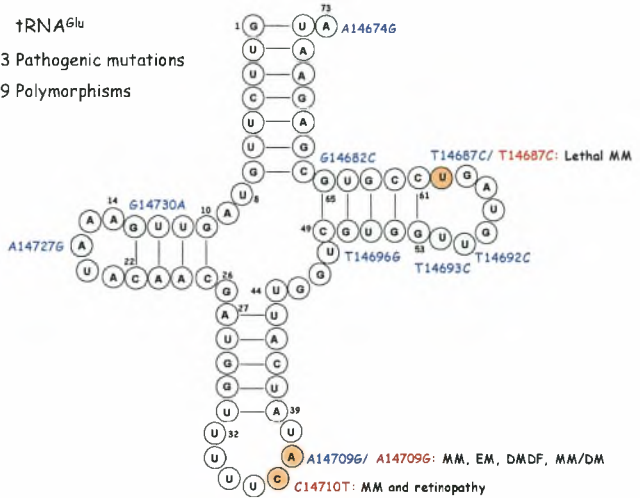
†RNA<sup>Asp</sup>

2 Pathogenic mutations  
11 Polymorphisms



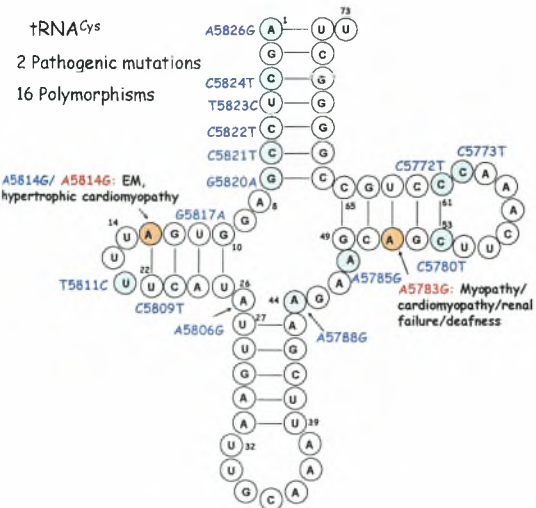
†RNA<sup>Glu</sup>

3 Pathogenic mutations  
9 Polymorphisms



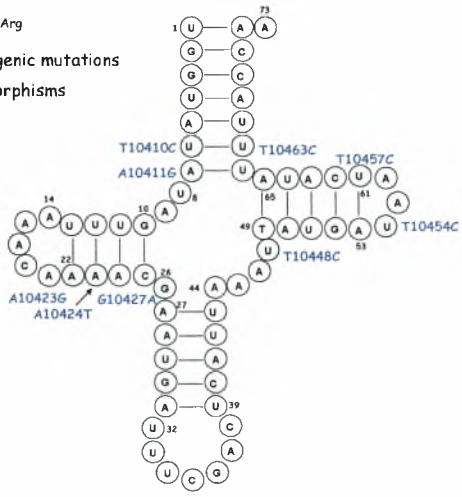
†RNA<sup>Cys</sup>

2 Pathogenic mutations  
16 Polymorphisms



†RNA<sup>Arg</sup>

0 Pathogenic mutations  
9 Polymorphisms



**Σχήμα 7.** Παθογόνες και πολυμορφικές μεταλλάξεις στα ανθρώπινα μιτοχονδριακά tRNA. Οι παθογόνες μεταλλάξεις απεικονίζονται με κόκκινο ενώ οι πολυμορφισμοί με μπλε. Οι αλληλουχίες των tRNA πάρθηκαν από την βάση δεδομένων αναφοράς [www.tRNA.uni-bayreuth.de](http://www.tRNA.uni-bayreuth.de) και οι παθογόνες και πολυμορφικές μεταλλάξεις από τις [www.mitomap.org](http://www.mitomap.org) και [www.genpat.uu.se/ImtUB](http://www.genpat.uu.se/ImtUB) βάσεις δεδομένων. Στο σχήμα αναφέρονται επίσης οι ασθένειες που οφείλονται σε αυτές τις μεταλλάξεις. ADPD: Νόσος Alzheimer και Parkinson, AISA: Επίκτητη ιδιοπαθής σιδηροβλαστική αναιμία, AP: Ασυμπτωματική πρωτεϊνουρία, BD: Διπολική διαταραχή, CIP0: Χρόνια εντερική ψευδοαπόφραξη, CPEO: Χρόνια προοδευτική έξω οφθαλμοπληγία, DCM: Διατακτική καρδιομυοπάθεια, DEAF: Μητρικά κληρονομούμενη κώφωση, DM: Σακχαρώδης διαβήτης, DMDF: Κληρονομούμενος σακχαρώδης διαβήτης με κώφωση, ECM: εγκεφαλοκαρδιομυοπάθεια, EEM: Εγκεφαλοεντερομυοπάθεια, EI: Μη ανοχή στην άσκηση, EM: Εγκεφαλομυοπάθεια, FSGS: Είδος νεφρίτιδας με πρόβλημα 'εστιασμένο' σε τμήμα των νεφρικών σπειραμάτων, GDM: Σακχαρώδης διαβήτης σε περίοδο εγκυμοσύνης, KSS: Σύνδρομο Kearns-Sayre, LA: Γαλακτική οξέωση, LHON: Κληρονομική οπτική νευροπάθεια του Leber, LIMM: Θανατηφόρος βρεφική μυοπάθεια, LS: Σύνδρομο Leigh, MELAS: Μιτοχονδριακή εγκεφαλομυοπάθεια, γαλακτική οξέωση και εγκεφαλικά επεισόδια, MEPR Μυοκλονική επιληψία με ψυχοκινητική καθυστέρηση, MERRF: Μυοκλονική επιληψία με ανώμαλες ερυθρές μυϊκές ίνες, MERME: επικάλυψη των συνδρόμων MERRF/MELAS, MHCM: Μητρικά κληρονομούμενη υπερτροφική καρδιομυοπάθεια, MICM: Μητρικά κληρονομούμενη καρδιομυοπάθεια, MID: Μητρικά κληρονομούμενος διαβήτης, MM: Μιτοχονδριακή μυοπάθεια, MNGIE: μιτοχονδριακή νευρογαστροεντερική εγκεφαλοπάθεια, MS: Σκλήρυνση κατά πλάκας, MSL: Πολλαπλή λιπομάτωση, PEM: Προοδευτική εγκεφαλομυοπάθεια, PEO: προοδευτική έξω οφθαλμοπληγία, SNHL: Νευροαισθητήρια κώφωση.

### 7.3 Κλινικός φαινότυπος μιτοχονδριακών ασθενειών

Είναι πολύ δύσκολο να συσχετίσουμε ένα συγκεκριμένο φαινότυπο μιτοχονδριακής ασθένειας με τον αντίστοιχο γενότυπο του ασθενή διότι μια συγκεκριμένη παθογόνα μετάλλαξη, τις περισσότερες φορές, οδηγεί σε περισσότερους από έναν φαινοτύπους και το αντίστροφο. Δεν υπάρχει καθαρή σύνδεση μεταξύ μετάλλαξης και φαινοτύπου, που μπορεί να εξηγηθεί μερικώς από τα ειδικά χαρακτηριστικά των μιτοχονδρίων, όπως το επίπεδο ετεροπλάσμιας και ο μιτωτικός διαχωρισμός.

*Ετεροπλασμία* ονομάζεται η συνύπαρξη mtDNA άγριου τύπου και μεταλλαγμένου στο ίδιο μιτοχόνδριο, στο ίδιο κύτταρο και ιστό σε ποικίλες αναλογίες. Το επίπεδο ετεροπλασμίας παίζει κρίσιμο ρόλο στον καθορισμό του κλινικού φαινοτύπου. Αν η μετάλλαξη είναι παθογόνος, η αναλογία των μεταλλαγμένων μιτοχονδρίων (πιο συγκεκριμένα, των μορίων DNA που βρίσκονται σε αυτά σε ένα ετεροπλασμικό πληθυσμό κυττάρων ενός ιστού, είναι αυτή που καθορίζει τη σοβαρότητα του βιοχημικού ελαττώματος για το συγκεκριμένο ιστό. Παθογόνες μεταλλάξεις γονιδίων tRNA είναι συνήθως ετεροπλασμικές, ενώ οι ουδέτεροι πολυμορφισμοί είναι ομοπλασμικοί. Παρόλα αυτά, η ομοπλασμία, δεν είναι ασυμβίβαστη με την παθογένεια, αφού πολλοί φαινότυποι έχουν αποδοθεί σε ομοπλασμικές μεταλλάξεις tRNA γονιδίων.

Κατά την διάρκεια της κυτταρικής διαίρεσης, η αντιγραφή και κληρονόμηση του mtDNA είναι ένα τυχαίο φαινόμενο, που συχνά καταλήγει να αλλάζει τις αναλογίες των μεταλλαγμένων μορίων κατά την διάρκεια της ζωής ενός ασθενή, στα διάφορα κύτταρα και ιστούς. Αυτό το φαινόμενο, που λέγεται *μιτωτικός διαχωρισμός*, εξηγεί πως κάποιοι ασθενείς μεταπίπτουν από ένα φαινότυπο σε ένα άλλο, διαφορετικό, καθώς μεγαλώνουν. Έτσι, ένας συγκεκριμένος κλινικός φαινότυπος είναι ουσιαστικά το προϊόν της αλληλεπίδρασης του επιπέδου της ετεροπλασμίας με την κατανομή των μεταλλαγμένων γονιδιωμάτων, όπως αυτή καθορίζεται από τον μιτωτικό διαχωρισμό, μέσα σε ένα οργανίδιο, κύτταρο, ιστό ή όργανο. Προφανώς, οι μύες, η καρδιά και ο εγκέφαλος, που είναι σε μεγάλο βαθμό εξαρτημένοι σε ενέργεια, θα συμβιβάζονταν πολύ ευκολότερα από κάθε άλλο ιστό, ακόμη και αν ο αριθμός των μεταλλάξεων είναι σχετικά χαμηλός.

Έτσι, τα κύρια συμπτώματα μπορεί να είναι μεμονωμένα και να αφορούν κάποια είδη εγκεφαλοπάθειας<sup>8</sup>, μυοπάθειας<sup>9,10</sup> και καρδιομυοπάθειας<sup>11,12</sup> είτε να δρουν αθροιστικά και να παράγουν έναν πολύ επικίνδυνο για την ζωή του ασθενή φαινότυπο (MELAS, MERRF, CPEO), αλλά και να έχουν μικρότερο αντίκτυπο με ποικίλα κλινικά χαρακτηριστικά, ανάλογα πάντα με τους παράγοντες που καθορίζουν την έκταση και το βαθμό της παθογονικότητας που αναφέραμε παραπάνω. Παρακάτω θα περιγράψουμε ασθένειες με ποικίλα γνωρίσματα που

συνδέονται με μεταλλάξεις στο μιτοχονδριακό DNA, στις περισσότερες από τις οποίες έχουμε υψηλά επίπεδα γαλακτικού οξέος.

### 7.3.1 Μιτοχονδριακή εγκεφαλομυοπάθεια, και εγκεφαλικά επεισόδια (MELAS)

Το MELAS είναι η πιο κοινή μητρικά κληρονομούμενη εγκεφαλομυοπάθεια. Είναι μια κλινικά και γενετικά ετερογενής ασθένεια. Όπως υποδεικνύει και το όνομα της, τα εγκεφαλικά επεισόδια είναι το χαρακτηριστικό που την προσδιορίζει και συχνά συμβαίνει πριν την ηλικία των δεκαπέντε. Η κλινική πορεία της ασθένειας ποικίλει αρκετά, από συμπτωματική έναρξη της ανάπτυξης, σε σταδιακή μυϊκή αδυναμία, γαλακτική οξέωση, γνωστική δυσλειτουργία, σπασμούς, εγκεφαλοπάθεια και πρόωρο θάνατο. Ένα αξιοσημείωτο βιοχημικό χαρακτηριστικό του MELAS είναι οι αυξημένες συγκεντρώσεις γαλακτικού στον ορό και στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό, οι οποίες αυξάνονται σημαντικά με την άσκηση. Τα ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά του MELAS συμπεριλαμβάνουν ανώμαλες και ερυθρές μυϊκές ίνες που συνιστούν το κύριο χαρακτηριστικό όλων των μιτοχονδριακών μυοπαθειών και υποδηλώνουν μη φυσιολογικό πολλαπλασιασμό των μιτοχονδρίων που βρίσκονται κάτω από τη σαρκοπλασματική μεμβράνη των μυϊκών ινών. Αρκετές σημειακές μεταλλάξεις σε γονίδια tRNA έχουν συσχετιστεί με τον MELAS φαινότυπο. Η πιο κοινή όμως, η οποία έχει βρεθεί στο 80% των περιπτώσεων με το σύνδρομο MELAS, είναι η ετεροπλασμική (85% στο μυ και 61% στο αίμα) μετάλλαξη A3243G στο γονίδιο του tRNA<sup>Leu(UUR)</sup>.<sup>13</sup> Έξι ακόμη μεταλλάξεις που έχουν συσχετιστεί με το MELAS έχουν περιγραφεί στο συγκεκριμένο γονίδιο καθώς και αρκετές άλλες σε λοιπά γονίδια tRNA.

### 7.3.2 Μυοκλονική επιληψία με ανώμαλες ερυθρές μυϊκές ίνες (MERRF)

Το MERRF είναι μιας βαριάς μορφής εγκεφαλομυοπάθεια που χαρακτηρίζεται από μυοκλονική επιληψία, παρεγκεφαλιδική αταξία, μυϊκή αδυναμία και εξάντληση. Ιστολογική ανάλυση εγκάρσιας τομής σκελετικού μυ ασθενών με MERRF, βαμμένη με ειδική χρώση (Gomori's trichrome), αποκαλύπτει την παρουσία ανώμαλων ερυθρών μυϊκών ινών, που εκθέτουν περιφερικές ατέλειες,



κόκκινες κηλίδες και αντιπροσωπεύουν μη φυσιολογική συσσώρευση μιτοχονδρίων.<sup>14</sup> Τα συμπτώματα του MERRF συνήθως ξεκινούν την 2<sup>η</sup> ή 3<sup>η</sup> δεκαετία της ζωής του ασθενή. Οι πιο συχνές μεταλλάξεις που σχετίζονται με το MERRF εντοπίζονται στο γονίδιο του tRNA<sup>Lys</sup> και περίπου το 80% των πασχόντων είναι φορείς της μετάλλαξης A8344G σε ετεροπλασμική κατάσταση.<sup>15</sup> Εντοπίζονται και άλλες μεταλλάξεις στο ίδιο γονίδιο, ενώ έχουν συσχετιστεί σε μικρότερο βαθμό ετεροπλασμικές μεταλλάξεις στα γονίδια tRNA<sup>Thr</sup>, tRNA<sup>Met</sup>, tRNA<sup>His</sup>, οι οποίες επηρεάζουν την φαινοτυπική έκφραση της "πρωταρχικής" μετάλλαξης G11778A, στο γονίδιο της ND-4 υπομονάδας.

### 7.3.3 Οφθαλμοπληγίες : Σύνδρομο Kearns-Sayre (KSS), χρόνια προοδευτική έξω οφθαλμοπληγία (CPEO), προοδευτική έξω οφθαλμοπληγία (PEO)

Η έναρξη της οφθαλμοπάρεσης και της μελαγχρωστικής ρετινοπάθειας πριν την ηλικία των είκοσι είναι χαρακτηριστικό μιας απειλητικής ασθένειας γνωστής και ως σύνδρομο Kearns-Sayre. Πολύ συχνά αυτά τα κλινικά συμπτώματα συνοδεύονται από άλλα, όπως παρεγκεφαλιδική αταξία, μυοπάθεια, πλήρη φραγή της καρδιακής παροχής και ενδοκρινική δυσλειτουργία (σακχαρώδης διαβήτης, υπερπαραθυρεοειδισμός και κοντό ανάστημα). Η μυϊκή αδυναμία επηρεάζει κυρίως τους μύες του προσώπου, του φάρυγγα και των ώμων, οδηγώντας σε δυσαρθρία και δυσφαγία σε πολλούς ασθενείς. Βιοχημικές ανωμαλίες που εντοπίζονται σε αυτό το σύνδρομο συμπεριλαμβάνουν γαλακτική οξέωση και αυξημένα επίπεδα πρωτεϊνών στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό. Επίσης, βιοψία μυών έχει επιβεβαιώσει και την παρουσία ανώμαλων ερυθρών μυϊκών ινών. Στην πραγματικότητα, λίγες μιτοχονδριακές μεταλλάξεις έχουν συνδεθεί με το σύνδρομο Kearns-Sayre, συνήθως ελλείψεις χιλιάδων βάσεων. Επιπλέον, το συγκεκριμένο σύνδρομο δείχνει συχνά αλληλοεπικάλυψη με άλλα όπως το MERRF. Επειδή το σύνδρομο Kearns-Sayre είναι μια μιτοχονδριακή μυοπάθεια που χαρακτηρίζεται από προοδευτική έξω οφθαλμοπληγία (PEO), έχει διατυπωθεί ότι η PEO και η KSS περιγράφουν διαφορετικούς βαθμούς σοβαρότητας της ίδιας ασθένειας.

Η χρόνια προοδευτική έξω οφθαλμοπληγία (CPEO) είναι μια περίπτωση μυοπάθειας χαρακτηριζόμενη από παράλυση των εξοφθάλμιων μυών. Η ηλικία έναρξης της συγκεκριμένης ασθένειας ποικίλει. Σε πολλούς ασθενείς παρατηρείται αμφίπλευρη πτώση στην τρίτη με τέταρτη δεκαετία της ζωής τους, ενώ αργότερα αναπτύσσεται προοδευτική πάρεση όλων των εξοφθάλμιων μυών με αποτέλεσμα ακόμη και την πλήρη οφθαλμοπληγία. Άλλα χαρακτηριστικά συμπεριλαμβάνουν κούραση, καταρράκτη, αταξία, περιφερική νευροπάθεια, κώφωση, καρδιομυοπάθεια και κατάθλιψη. Η CPEO σαν σύνδρομο είναι γενετικά ετερογενές. Σε περισσότερο από το 60% των περιπτώσεων, η πιο κοινή αιτία φαίνεται να είναι μια μεγάλη έλλειψη 4977 βάσεων, που συμβαίνει συνήθως σποραδικά και δεν μεταβιβάζεται στην επόμενη γενιά. Σημιακές μεταλλάξεις όμως έχουν βρεθεί και σε γονίδια tRNA.

#### 7.3.4 Πολλαπλή (κατά πλάκας) σκλήρυνση (MS)

Η σκλήρυνση κατά πλάκας είναι μια νευροεκφυλιστική ασθένεια, η οποία εμφανίζεται από σχετικά ήπια έως σοβαρά για τον ασθενή συμπτώματα. Εμφανίζεται όταν το ανοσοποιητικό σύστημα στρέφεται ενάντια των εαυτών μορίων μυελίνης, μιας πρωτεΐνης που επικαλύπτει τους νευράξονες των νευρικών κυττάρων. Οι περισσότεροι ασθενείς βιώνουν μεγάλου βαθμού μυϊκή αδυναμία, δυσκολία στην κίνηση και τον προσανατολισμό και στην χειρότερη περίπτωση μερική ή πλήρη παράλυση. Δυο μεταλλάξεις στο γονίδιο του tRNA<sup>Thr</sup>, η G15927A και η G15928A βρέθηκαν σε αυξημένη συχνότητα σε ασθενείς με σκλήρυνση κατά πλάκας και σοβαρή οπτική δυσλειτουργία σε σχέση με τα φυσιολογικά άτομα. Παρόλα αυτά σε μια μεγάλης κλίμακας μελέτη ανίχνευσης μιτοχονδριακών μεταλλάξεων σε 77 Καυκάσιους ασθενείς με προοδευτική μορφή σκλήρυνσης κατά πλάκας και 84 άτομα ως control, καμία παθογόνος μετάλλαξη δε βρέθηκε να έχει σχέση με την ασθένεια.

#### 7.3.5 Σακχαρώδης διαβήτης

Μεταλλάξεις στο mtDNA έχουν πρόσφατα αναγνωριστεί ως αιτία πρόκλησης του μητρικά κληρονομούμενου σακχαρώδη διαβήτη, ο οποίος τις

περισσότερες φορές είναι συνδεδεμένος με κωφωση. Ωστόσο έχουν αναφερθεί περιπτώσεις ασθενών με μιτοχονδριακές μεταλλάξεις σε tRNA, που εμφάνιζαν μόνο διαβήτη χωρίς κώφωση. Στις μεταλλάξεις αυτές περιλαμβάνεται η T3271C στο tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> και η A8344G στο tRNA<sup>Lys</sup>.

### 7.3.6 Αυτισμός

Ο αυτισμός είναι μία αναπτυξιακή διαταραχή που εμφανίζεται συνήθως στα δύο με τρία πρώτα χρόνια της ζωής του παιδιού. Είναι αποτέλεσμα μιας νευρολογικής διαταραχής που επηρεάζει την ομαλή λειτουργία του εγκεφάλου, την ανάπτυξη στις περιοχές της κοινωνικής συναλλαγής και των κοινωνικών δεξιοτήτων. Τόσο τα παιδιά όσο και οι ενήλικες με αυτισμό έχουν δυσκολίες στη λεκτική ή μη λεκτική επικοινωνία, στην κοινωνική αλληλεπίδραση, σε δραστηριότητες ελεύθερου χρόνου και παιχνιδιού. Ωστόσο είναι σημαντικό να έχουμε υπόψη ότι ο αυτισμός επηρεάζει τα άτομα διαφορετικά και σε διαφορετικό βαθμό. Έρευνα που έγινε σε 25 ασθενείς, στους οποίους είχαν διαγνωσθεί αυτιστικές διαταραχές, καθόρισε την εμφάνιση ενζυμικής δυσλειτουργίας της μιτοχονδριακής αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων. Οι κύριες διαταραχές συσχετίστηκαν με ανεπάρκεια δραστηριότητας στα σύμπλοκα I και III κατά 64% και 20% αντίστοιχα.<sup>16</sup> Ενώ, οι κύριες δυο μεταλλάξεις που ανιχνεύτηκαν είναι η A3243G στο γονίδιο tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> και η G8363A στο γονίδιο tRNA<sup>Lys</sup>.

## 8. Σκοπός Εργασίας

Η παρούσα διπλωματική εργασία είχε ως στόχο την μελέτη και ανίχνευση μεταλλάξεων σε μιτοχονδριακά tRNA γονίδια από ασθενείς με ποικίλα κλινικά συμπτώματα, βαριάς αλλά και ηπιότερης μορφής. Εστιάσαμε σε μια μικρή ομάδα ατόμων με εγκεφαλικά επεισόδια ηλικίας κάτω των 50 ετών, με υποψία ο κλινικός φαινότυπος τους να οφείλεται σε μιτοχονδριακή δυσλειτουργία, και ένα σύνολο ασθενών σε νεαρή ηλικία που έπασχαν από νευρομυϊκές ασθένειες με κοινό κλινικό χαρακτηριστικό αυξημένα επίπεδα γαλακτικού οξέος.

Μελετήθηκαν 14 γονίδια tRNA: tRNAPro, tRNAThr, tRNAGlu, tRNAArg, tRNAGly, tRNAAsp, tRNASer, tRNATyr, tRNACys, tRNAAsn, tRNAAla, tRNATrp, tRNAVal, tRNAPhe και οι περιβάλλουσες περιοχές, συμπεριλαμβανομένων τμημάτων των MT-ND3 και MT-RNR1 (12S rRNA), καθώς τα υπόλοιπα γονίδια tRNA είχαν μελετηθεί σε προηγούμενη μελέτη. Ο συνδυασμός αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR), πολυμορφισμού διαμόρφωσης ενός κλώνου (SSCP) και PCR-RFLP ήταν οι τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν για την παρούσα μελέτη. Παράλληλα, τα ίδια γονίδια μελετήθηκαν σε φυσιολογικό πληθυσμό προσφέροντας την δυνατότητα σύγκρισης των αποτελεσμάτων. Τα δείγματα που παρουσίασαν διαφορετικά πρότυπα στάλθηκαν για αλληλούχιση ώστε να γίνει ταυτοποίηση της μετάλλαξης.

## Υλικά και Μέθοδοι

### 1. Βιολογικό υλικό

Ένα σύνολο 30 ασθενών με ποικίλα κλινικά συμπτώματα εξετάστηκαν στην παρούσα μελέτη (Πίνακας 3). Η κατάταξη που ακολούθησε έγινε βάση των κύριων κλινικών χαρακτηριστικών, άσχετα αν κάποιοι ασθενείς εμφάνιζαν δευτερογενή και τριτογενή συμπτώματα. Το κοινό γνώρισμα για το σύνολο των παιδιών σε νεαρή ηλικία (με εξαίρεση τα εγκεφαλικά) είναι το υψηλό επίπεδο γαλακτικού οξέος. Το βιολογικό υλικό προς μελέτη ήταν ολικό αίμα, στο οποίο είχε προστεθεί αντιπηκτικό. Όλα τα δείγματα πάρθηκαν από την Α.Γ.Ν.Ν. Βόλου, εκτός από τα εγκεφαλικά που πάρθηκαν από την νευροχειρουργική κλινική ΠΠΝ Λάρισας. Τα δείγματα αίματος διατηρήθηκαν σε θερμοκρασία  $-20^{\circ}\text{C}$  μέχρι την εφαρμογή διαδικασίας απομόνωσης.

*Πίνακας 3. Οι 30 ασθενείς που συμπεριλήφθηκαν στη μελέτη*

<i>Ασθενείς</i>	<i>Κλινικό Σύμπτωμα</i>
<b>Ασθενείς σε άτομα με ηλικία &lt; 50 χρονών</b>	
<i>Εγκεφαλικά</i>	
No 1	Αιμορραγία βασικών γαγγλίων, υπαραχνοειδή αιμορραγία
No 2	Υπαραχνοειδή αιμορραγία
No 3	Υπαραχνοειδή αιμορραγία
No 4	Υπαραχνοειδή αιμορραγία
No 5	Αιμορραγία βασικών γαγγλίων
No 6	Υπαραχνοειδή αιμορραγία
No 7	Ενδοπαρεγχυματική αιμορραγία
<b>Ασθενείς σε νεαρά άτομα με κοινό κλινικό γνώρισμα υψηλά επίπεδα γαλακτικού οξέος</b>	
<i>Προβλήματα καρδιακού συστήματος</i>	
No 8	Επικαρδίτιδα - Λιποθυμικό επεισόδιο
No 9	Αρρυθμίες (έκτακτες - κοιλιακές) πυρετούς - σπασμούς, PFAPA*
No 10	Αρρυθμίες (έκτακτες-κοιλιακές) - σπασμούς
No 11	Υπερκοιλιακή ταχυκαρδία
No 12	Συγγενή καρδιοπάθεια

*Ψυχοκινητική καθυστέρηση\*\**

---

No 13	Ψυχοκινητική καθυστέρηση & Νευρομυοπάθεια
No 14	Ψυχοκινητική καθυστέρηση
No 15	Μητρικά κληρονομούμενη διανοητική καθυστέρηση & καθυστέρηση ομιλίας
No 16	Στραβισμός & σπασμοί, ψυχοκινητική καθυστέρηση
No 17	Ψυχοκινητική καθυστέρηση
No 18	Ψυχοκινητική καθυστέρηση
No 19	Επιληπτικοί σπασμοί / οικογένεια με διανοητική καθυστέρηση

*Μεταβολικές διαταραχές*

---

No 20	Γαλακτική οξέωση, ηλεκτρολυτικές διαταραχές
No 21	Σακχαρώδη διαβήτη, υποθυρεοειδισμό, καθυστέρηση ομιλίας

*Σκλήρυνση κατά πλάκας*

---

No 22	Σκλήρυνση κατά πλάκας
No 23	Σκλήρυνση κατά πλάκας
No 24	Σκλήρυνση κατά πλάκας

*Διάφορα*

---

No 25	Σύνδρομο Down - ιστορικό σπασμών κ ιστορικό βαρικοΐας
No 26	Σύνδρομο Down
No 27	Σύνδρομο Down, καρδιακή ανεπάρκεια, αγγειοκαρδιοπάθεια
No 28	Αυτισμός
No 29	Νόσος του Crohn***
No 30	Πομφολυγώδης επιδερμόλυση

\*PFAPA: Σύνδρομο κυκλικού πυρετού (Periodic Fever, Aphthous stomatitis, Pharyngitis, and cervical Adenitis)

\*\*Ψυχοκινητική καθυστέρηση: Ασθένεια με χαρακτηριστικά νευρολογικά προβλήματα και μυϊκή δυσλειτουργία. Πολλές φορές συνοδεύεται από μυοκλωνικούς επιληπτικούς σπασμούς, τετραπληγία και τύφλωση.

\*\*\*Νόσος του Crohn: Μια πάθηση στην οποία το τοίχωμα ενός ή περισσότερων τμημάτων του πεπτικού συστήματος πρήζεται, ερεθίζεται και φουσκώνει, με άγνωστη αιτιολογία.

## 2. Απομόνωση DNA

Το πρώτο βήμα για την μελέτη ανίχνευσης μεταλλάξεων σε γονιδιακό επίπεδο, αποτελεί η απομόνωση DNA από ολικό αίμα. Σύμφωνα με το πρωτόκολλο<sup>17</sup> τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν είναι:

### A. TE Buffer (100mL).

Το διάλυμα αυτό αποτελείται από :

- 10mM Tris pH 7.4     δηλ. 0,5 mL από 2 M stock
- 0,1mM EDTA pH 8.0   δηλ. 20  $\mu$ L από 0,5 M stock
- dd-H<sub>2</sub>O                     99,5 mL

Το Tris χρησιμοποιείται ως ρυθμιστικό του pH.

Το EDTA χρησιμοποιείται ως χηλικός παράγοντας, δεσμεύοντας κατιόντα Ca<sup>2+</sup> και Mg<sup>2+</sup>, τα οποία είναι απαραίτητα για τη δράση νουκλεασών.

Το απιονισμένο νερό (double distilled H<sub>2</sub>O) είναι απαλλαγμένο από ιόντα.

Το TE Buffer αποθηκεύεται στους 4°C.

### B. Lysis Buffer (100mL & παραγωγή aliquots του 1mL)

- 0,2M NaCl                 1,17 gr
- 0,025M EDTA pH 8     δηλ. 5 mL από 0,5 M stock
- 0,5% SDS                 δηλ. 5 mL από 10% stock
- 0,2 M Tris     pH 8,5   δηλ. 10 mL από 2 M stock
- dd-H<sub>2</sub>O                     μέχρι τα 100 mL

Το NaCl συμβάλλει στην διάσπαση των κυτταρικών μεμβρανών.

Το δωδεκακυλοθειικό νάτριο (SDS: Sodium Dodecyl Sulfate), είναι ένα ανιονικό απορρυπαντικό, το οποίο συμβάλλει στη διάσπαση των κυτταρικών μεμβρανών, ενώ ταυτόχρονα συντελεί στην αποδιάταξη πρωτεϊνών. Το γεγονός αυτό προστατεύει το DNA από την δράση νουκλεασών.

Το Lysis Buffer αποθηκεύεται στους -20°C

Η διαδικασία που ακολουθείται είναι η εξής :

1. Ανάμιξη 100  $\mu\text{L}$  αίματος με 1 mL TE σε eppendorf του 1,5 mL.
2. Ανακίνηση και φυγοκέντρηση για 10 sec στις 13000 rpm.
3. Απομάκρυνση του υπερκείμενου και διάλυση του ιζήματος σε 1mL.
4. Ανακίνηση και φυγοκέντρηση για 10 sec στις 13000 rpm.
5. Απομάκρυνση του υπερκείμενου και διάλυση του ιζήματος ξανά σε 1mL.
6. Ανακίνηση και φυγοκέντρηση για 10 sec στις 13000 rpm.
7. Απομάκρυνση του υπερκείμενου και διάλυση του ιζήματος ξανά σε 200  $\mu\text{L}$  Lysis buffer, προσθέτοντας 20  $\mu\text{L}$  πρωτεΐνάσης K (10mg/mL).
8. Επώαση των δειγμάτων στους 56°C για 45 λεπτά και στη συνέχεια στους 95°C για 10 λεπτά. Το τελευταίο βήμα της σύντομης θέρμανσης στους 95°C, για να επιτευχθεί απενεργοποίηση της πρωτεΐνάσης K.
9. Πρόσθεση 1mL παγωμένης αιθανόλης 100% (έτσι πραγματοποιείται κατακρήμνιση μόνο του DNA, λόγω της μεγάλης διηλεκτρικής σταθεράς της).

Τα δείγματα παραμένουν overnight στους -20°C

- 
10. Την επόμενη μέρα, τα δείγματα φυγοκεντρούνται στις 13000 rpm, για 20 min, στους 4°C.
  11. Απομάκρυνση του υπερκείμενου προσεκτικά και τοποθέτηση του ιζήματος στους 37°C για 1 ώρα.
  12. Πρόσθεση 50  $\mu\text{L}$  dd-H<sub>2</sub>O και ήπια ανάδευση σε vortex.
  13. Ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πηκτή αгарόζης 1% με σκοπό την ποιοτική ανίχνευση του mtDNA.

*Παρασκευή πηκτής αгарόζης 1%:*

- 40 ml TAE 1x \*
- 0,3 gr αгарόζης
- 3  $\mu\text{L}$  βρωμιούχο αιθίδιο



Ζυγίζονται και τοποθετούνται 0,3 gr αγαρόζης σε κωνική φιάλη των 100 mL αφού έχουν προστεθεί προηγουμένως 30 mL TAE. Το μίγμα θερμαίνεται (σε φούρνο μικροκυμάτων) για περίπου 1-2 λεπτά μέχρι η αγαρόζη να διαλυθεί πλήρως, και στη συνέχεια προστίθενται προσεκτικά 3 mL βρωμιούχου αιθιδίου. Το βρωμιούχο αιθίδιο (BrEt) έχει την χαρακτηριστική ιδιότητα να φθορίζει στο υπεριώδες καθώς παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων του DNA. Έτσι δίνει πρότυπα ζωνώσεων που αντιστοιχούν στην ποσότητα του DNA που δέσμευσε το BrEt. Το διάλυμα, αφού έχει μεταφερθεί σε κατάλληλη πλάκα οριζόντιας ηλεκτοφόρησης και έχουν προστεθεί κατάλληλες χτένες για το σχηματισμό πηγαδιών, απαιτεί περίπου 20-30 λεπτά για να πήξει πλήρως.

\*Το ρυθμιστικό διάλυμα TAE 1x παρασκευάζεται από stock διάλυμα 50x.

Ανάμιξη 20 mL 50xTAE + 980ml dd-H<sub>2</sub>O.

Τα 500 mL του 50x TAE περιέχουν :

- Tris 121 gr
- Οξικό οξύ 28.5 mL
- EDTA 0.5M 121 gr
- dd-H<sub>2</sub>O μέχρι τα 500 mL

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

Το *loading buffer* (6x) 10 mL περιέχει:

- 1 mL χρωστική μπλε της βρωμοφαινόλης
- 5 mL γλυκερόλη (συμβάλλει στην καθίζηση του δείγματος μέσα στα πηγαδάκια)
- 0,5 mL TBE 20x
- 3,5mL dd-H<sub>2</sub>O

Η τάση που εφαρμόζεται είναι 100V και τα δείγματα τρέχουν στο πήκτωμα έως να διανύσουν τα 2/3 της διαδρομής (για περίπου 20 - 30 λεπτά). Τέλος, το πήκτωμα παρατηρείται σε συσκευή UV. Όσα δείγματα δίνουν θετικό αποτέλεσμα (ανίχνευση ζωνών) χρησιμοποιούνται στην αντίδραση της PCR.

### 3. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης PCR

#### 3.1. Η αρχή της μεθόδου

Η τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR, Polymerase Chain Reaction) επινοήθηκε από τον Karyl Mullis στα μέσα της δεκαετίας του 1980 και έφερε επανάσταση στη βιοϊατρική έρευνα με ευρύτατο φάσμα εφαρμογών. Είναι μια ευαίσθητη, γρήγορη, εύκολη και αυτοματοποιημένη τεχνική και αποτελεί ένα σύνηθες και απαραίτητο εργαλείο που χρησιμοποιείται τόσο στα ιατρικά όσο και στα βιολογικά εργαστήρια με πληθώρα εφαρμογών σε συνδυασμό με άλλες μοριακής τεχνικής ανάλυσης, όπως τα ένζυμα περιορισμού και ο πολυμορφισμός μονόκλωνης αλυσίδας (SSCP). Με την διεξαγωγή της μεθόδου επιτυγχάνεται η σύνθεση ενός τμήματος DNA, ανεξαρτήτου προελεύσεως, "in vitro". Σε χρονικό διάστημα λίγων ωρών, η συγκεκριμένη περιοχή του DNA που επεκτείνεται (DNA στόχος), πολλαπλασιάζεται σε ένα μεγάλο αριθμό αντιγράφων. Ο αριθμός των αντιγράφων εξαρτάται από τον αριθμό των κύκλων της αντίδρασης. Η σύνθεση επιτυγχάνεται με την βοήθεια ειδικών μορίων εκκινητών (primers), που είναι εξαιρετικά ευαίσθητα σε συνήθεις θερμοκρασίες καθώς αποτελούνται από μονόκλωνη αλυσίδα συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων και έχουν μέγεθος βάσεων το οποίο δεν ξεπερνά τα 15 – 20 ζεύγη βάσεων. Μετά την προσκόλληση εκκινητών στα αποδιαταγμένα μόρια DNA ακολουθεί επιμήκυνση των αλυσίδων με την βοήθεια της Taq πολυμεράσης, με την ιδιότητα να είναι ανθεκτική σε υψηλές θερμοκρασίες (η οποία απομονώθηκε από το θερμόφιλο βακτήριο *Thermus aquaticus*), ειδικού ρυθμιστικού διαλύματος και διαλυμάτων dNTPs και MgCl<sub>2</sub>.

Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στην κινητική επανασύνδεσης των αποδιαταγμένων συμπληρωματικών αλυσίδων δίκλωνου νουκλεϊκού οξέος, που ανέπτυξαν οι Britten και Kohne στα τέλη της δεκαετίας του 60.<sup>18</sup> Η ειδικότητα της

μεθόδου εξαρτάται από την ειδική σύνδεση των εκκινητικών μορίων στο DNA στόχο η οποία εξαρτάται κυρίως από την θερμοκρασία υβριδισμού (Ta). Η ειδικότητα εξαρτάται επίσης από την συγκέντρωση ιόντων Mg<sup>++</sup>, τον αριθμό των κύκλων, τη συγκέντρωση του ενζύμου Taq πολυμεράση καθώς και από τη συγκέντρωση των εκκινητικών μορίων και του DNA στόχου. Έτσι γονίδια που απαντώνται ακόμη και ως ένα αντίγραφο μόνο μπορούν να εντοπιστούν από ένα πλήθος αλληλουχιών, να ενισχυθούν και να απεικονιστούν στη συνέχεια σε ζώνες με την χρήση πηκτών αγαρόζης.

### 3.2. Πολλαπλασιασμός των γονιδίων tRNA

Ενισχύθηκαν εννέα τμήματα DNA που περιέκλειαν 14 γονίδια tRNA. Το μέγεθος κάθε τμήματος και τα ζεύγη primers που χρησιμοποιήθηκαν παρουσιάζονται στον πίνακα 4.

Για μια αντίδραση PCR των 50  $\mu$ L χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω:

➤ DNA (περίπου 200ng)	2-3 $\mu$ L
➤ 50 pmol από τον κάθε primer	1 $\mu$ L + 1 $\mu$ L
➤ 800 $\mu$ M dNTPs (από 40mM)	1 $\mu$ L
➤ 2 mM MgCl <sub>2</sub> (από 50mM)	2 $\mu$ L
➤ 1xPCR Buffer (από 10x)	5 $\mu$ L
➤ 1U Taq πολυμεράση (5U/ $\mu$ L)	0,2 $\mu$ L
➤ dd-H <sub>2</sub> O μέχρι τα 50 $\mu$ L	+ 37-38 $\mu$ L
	<hr/>
	50 $\mu$ L

tRNAs	FW Primer 5' – 3'	RV Primer 5' – 3'	νουκλεοτιδική θέση	μήκος (bp)
Thr / Pro	CTAATACCAACTATCTCCCT	ACCCAATCTGCTTCCCCAT	(FW 15839-15858) (RV 16050-16031)	212
Asn / Cys / Tyr	CAATGGGACTTAAACCCACAA	GCGAACATCAGTGGGGGTGA	(FW 5663-5683) (RV 5911-5892)	249
Gly	CCATCTATTGATGAGGGTCT	GGATATAGGGTCCAAGCCGCA	(FW 9970-9989) (RV 10193-10173)	224
Phe	CAGCACACACACCCGCTGC	CAGCTGCATTGCTGCGTGCT	(FW 549-567) (RV 706-687)	158
Val	GTA CTGGAAAGTCCACTTGG	GGTTGCTGGTAGTAAGG	(FW 1576-1595) (RV 1715-1698)	140
Trp / Ala	CGCTACTCCTACCTATCTCC	TTAGGGTGCTTAGCTGTTAAC	(FW 5470-5489) (RV 5711-5691)	242
Ser(UCN) / Asp	ATTCGAAGAACC CGTATACA	GCTCTTCTATGATAGGGGAA	(FW 7415-7434) (RV 7643-7624)	229
Arg	GCCCTACAACAACCTAACCT	AGTGAGATGGTAAATGCTAG	(FW 10290-10309) (RV 10516-10497)	227
Glu	CCCACACTCAACAGAAACA	TTGCGTATTGGGGTCATTG	(FW 14642-14660) (RV 14763-14745)	122

**Πίνακας 4.** Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση και των 14 tRNAs με σκοπό την ανάλυση SSCP. Η επιλογή των primers γίνεται με βάση την περιεκτικότητα σε GC, η οποία θα πρέπει να ξεπερνάει το 50% των επιλεγόμενων βάσεων. Επιπλέον θα πρέπει να μην υπάρχουν αλληλουχίες που να περιέχουν πολυπυρίνες, πολυπυριμιδίνες και άλλες ασυνήθιστες αλληλουχίες διότι κάτι τέτοιο οδηγεί σε σχηματισμό διμερών μορφών. Παράλληλα, θα πρέπει να έχουν παραπλήσια θερμοκρασία τήξεως  $T_m$ , την οποία μπορούμε να υπολογίσουμε εύκολα από τον τύπο  $4*(GC) + 2*(AT)$ .

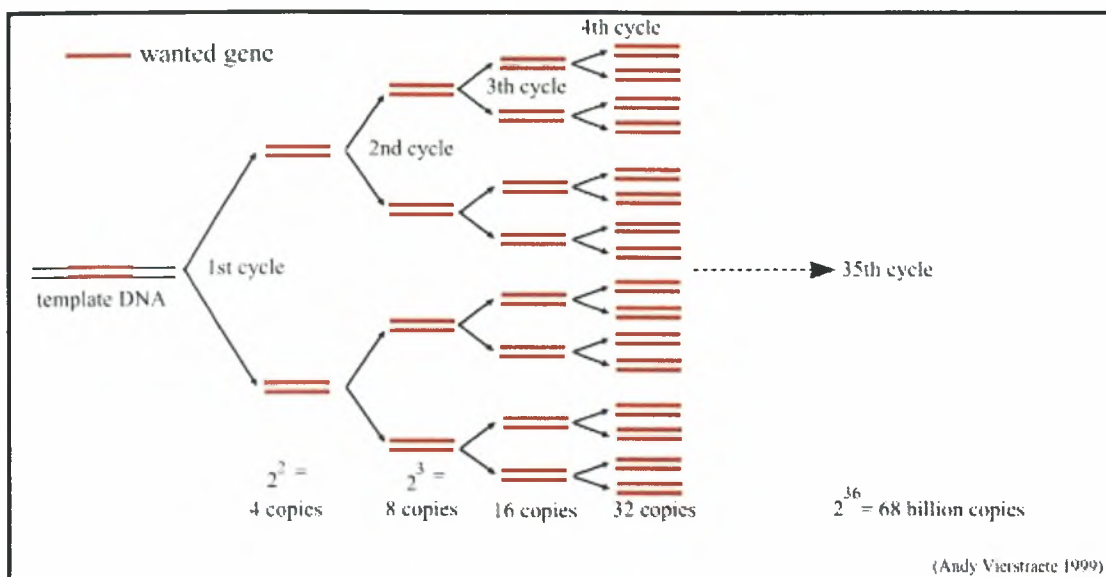
### 3.3 Διαδικασία ενίσχυσης με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης

Η αντίδραση θα έχει τις ακόλουθες συνθήκες στον θερμοκυκλοποιητή:

Αρχικός κύκλος αποδιάταξης	95°C για 4 min
35 κύκλοι	95°C για 30 sec (Αποδιάταξη)
	50°C για 40 sec (Υβριδοποίηση εκκινητών)
	72°C για 40 sec (Επέκταση)
Τελικό βήμα επέκτασης	72°C για 10 min

Αναλυτικότερα σε κάθε βήμα της αντίδρασης συμβαίνουν τα εξής (Σχήμα 8):

Η PCR ξεκινά με ένα δίκλωνο μόριο DNA και κάθε κύκλος της αντίδρασης αρχίζει με βραχεία θέρμανση στους 95°C για 4 λεπτά, ώστε να επέλθει σπάσιμο των διπλών και τριπλών δεσμών μεταξύ των δίκλωνων αλυσίδων των μορίων DNA. Μετά τον διαχωρισμό των κλώνων η θερμοκρασία του μείγματος της αντίδρασης ελαττώνεται στους 50°C για 40 δευτερόλεπτα, οπότε οι εκκινητές που βρίσκονται σε μεγάλη περίσσεια μπορεί να υβριδιστούν με τις συμπληρωματικές προς αυτούς αλληλουχίες στους δυο κλώνους του DNA (μητρικά μόρια). Στη συνέχεια, η μικρή άνοδος της θερμοκρασίας στους 72°C εμποδίζει την προσκόλληση επιπλέον εκκινητικών μορίων και επιτρέπει στην Taq πολυμεράση να προσθέτει 35-100 νουκλεοτίδια το δευτερόλεπτο, παρουσία dNTPs και MgCl<sub>2</sub>, επεκτείνοντας την συμπληρωματική αλυσίδα του μορίου που συντίθεται. Κατόπιν, ο κύκλος αρχίζει ξανά την θέρμανση έτσι ώστε να διαχωριστούν οι νεοσυντιθέμενοι κλώνοι του DNA. Τελικά, έχουμε θέρμανση στους 72°C για 10 λεπτά που αποτελεί το τελικό βήμα επέκτασης, ώστε να δοθεί χρόνος στην Taq πολυμεράση να συμπληρώσει την επέκταση ημιτελών PCR προϊόντων.



**Σχήμα 8.** Τα στάδια της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR).

### 3.4. Ποιοτικός προσδιορισμός των PCR προϊόντων

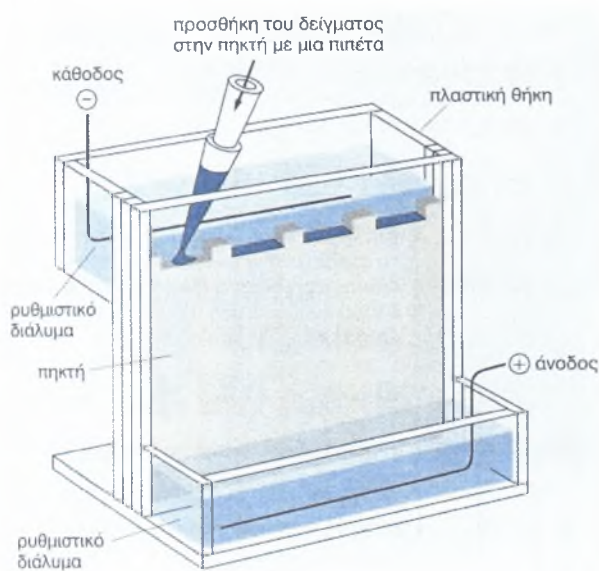
Η όλη αντίδραση της PCR πραγματοποιείται σε αυτοματοποιημένους αναλυτές που λέγονται "θερμοκυκλοποιητές". Με αυτές τις συσκευές επιτυγχάνεται γρήγορη και ακριβής αυξομείωση στις κατάλληλες θερμοκρασίες που απαιτεί η αντίδραση. Ο μέσος όρος που διαρκεί η ανάλυση είναι περίπου 2 ώρες. Έπειτα, για να διαπιστώσουμε αν όντως έχει πραγματοποιηθεί επιτυχής ενίσχυση, πραγματοποιείται ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR σε πήκτωμα αγαρόζης 2% (0,6gr + 30ml TAE 1x) ακολουθώντας την ίδια διαδικασία με τα προϊόντα απομόνωσης, παρουσία μάρτυρα (blank). Η παρουσία του μάρτυρα καθίσταται αναγκαία καθώς είναι ο μόνος τρόπος για να είμαστε σίγουροι ότι δεν ενισχύθηκαν μη ειδικά προϊόντα. Όσα δείγματα δίνουν θετικό αποτέλεσμα (ανίχνευση ζωνών) χρησιμοποιούνται στην ποιοτική ανάλυση πολυμορφισμών με τη μέθοδο SSCP.



#### 4. Ανάλυση πολυμορφισμού μονόκλωνης αλυσίδας (SSCP)

Η ανάλυση πολυμορφισμού μονόκλωνης αλυσίδας (SSCP: Single-Strand Conformation Polymorphism) είναι ηλεκτροφόρηση διαχωρισμού μονόκλωνων νουκλεϊκών οξέων με βάση ελάχιστες διαφορές στη αλληλουχία (συνήθως μιας μόνο βάσης) που έχουν ως αποτέλεσμα μια διαφορετική δευτεροταγή δομή και μια μετρήσιμη διαφοροποίηση στην κινητικότητα μέσα σε πήκτωμα. Για την λήψη και ανάγνωση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιούνται πηκτώματα πολυακρυλαμίδιου (Σχήμα 9), τα οποία υπόκεινται σε ειδική χρώση με κατάλληλες χρωστικές, όπως  $\text{AgNO}_3$ .<sup>19</sup>

Η κινητικότητα του δίκλωνου DNA σε πήκτωμα ηλεκτροφόρησης εξαρτάται από το μέγεθος και το μήκος της αλληλουχίας, αλλά είναι σχετικά ανεξάρτητο από την



**Σχήμα 9.** Πήκτωμα πολυακρυλαμίδης

αλληλουχίας, δημιουργώντας βρόγχους και θηλιές οι οποίες δίνουν στη μονόκλωνη αλυσίδα μια μοναδική τριτοταγή δομή.

Η μέθοδος SSCP εκμεταλλεύεται την παραπάνω ιδιότητα των μονόκλωνων μορίων και πετυχαίνει ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό μονόκλωνων αλυσίδων νουκλεϊκών οξέων. Από το 1989 που πρωτοαναφέρθηκε η ως ένας νέος τρόπος

συγκεκριμένη νουκλεοτιδική αλληλουχία. Η κινητικότητα μονόκλωνων τμημάτων, ωστόσο, επηρεάζεται από πολύ μικρές αλλαγές στην αλληλουχία, πιθανώς ακόμη και από μια αλλαγή νουκλεοτιδίου σε σύνολο εκατοντάδων. Οι μικρές αλλαγές είναι αξιοσημείωτες λόγω της σχετικά ασταθούς φύσης του μονόκλωνου DNA, καθώς απουσία συμπληρωματικής αλυσίδας, το μονόκλωνο τμήμα μπορεί να υποστεί διμερισμό με τμήμα της ίδιας

ανίχνευσης πολυμορφισμών DNA ή ποικιλομορφίας αλληλουχιών, η ανάλυση SSCP αποτελεί μια φθηνή, απλή, και ευαίσθητη μέθοδο για καθορισμό γενετικών αλλαγών.<sup>20</sup>

#### 4.1 Προετοιμασία των προϊόντων PCR

Από τα θετικά δείγματα των PCR προϊόντων που προέκυψαν μετά την ανίχνευση σε πηκτή αγαρόζης, αφαιρέθηκαν 4μL από κάθε δείγμα και προστέθηκαν σε 10μL αποδιατακτικού διαλύματος (denaturation buffer) που περιείχε (3mL):

- 95% φορμαμίδιο (2,85 mL)
- 20 mM EDTA
- 10 mM NaOH
- 0.05% κυανού του ξυλένιου (1,5μL)
- 0.05% μπλε της βρωμοφαινόλης (1,5μL)

Στη συνέχεια με ειδικό πρόγραμμα της συσκευής του θερμοκυκλοποιητή (2 λεπτά στους 92°C, 2 λεπτά στους 95°C και τέλος 7 λεπτά στους 97°C) πραγματοποιείται πλήρης αποδιάταξη των δίκλωνων μορίων DNA. Τα δείγματα πριν το τέλος του 7<sup>ου</sup> λεπτού εξέρχονται της συσκευής και τοποθετούνται αμέσως σε πάγο προκειμένου να μην συμβεί επανασύνδεση των μονόκλωνων μορίων DNA. Ακολούθως τα δείγματα φορτώνονται σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου.

#### 4.2 Παρασκευή πηκτής πολυακρυλαμιδής

Ανάλογα με το πόσο μικρό σε μήκος είναι το τμήμα του εξεταζόμενου μονόκλωνου μορίου τόσο πιο πυκνό θα πρέπει να είναι το πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου για να επιτευχθεί καλύτερη ανάγνωση των αποτελεσμάτων. Οι συνήθεις συγκεντρώσεις πολυακρυλαμιδίου που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή πηκτών είναι 8% έως 12%. Εμείς χρησιμοποιήσαμε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου 10%, καθώς ήταν το μόνο που, ύστερα από δοκιμές, επέτρεπε τελικώς την καλύτερη ανάγνωση των αποτελεσμάτων.



Για 100mL (για 2 gel) και πυκνότητας 10% οι ποσότητες των αντιδραστηρίων είναι:

- 10gr Ακρυλαμίδιο
- 0,25 gr Δις-ακρυλαμίδιο
- 7,5 mL TBE 10x
- 10 mL Γλυκερόλη 50%

Διηθούμε και συμπληρώνουμε με H<sub>2</sub>O έως τα 100mL και προσθέτουμε:

- 100 μL TEMED
- 600 μL APS 20%

Τα πηκτώματα του πολυακρυλαμιδίου δημιουργούνται με πολυμερισμό του ακρυλαμιδίου και του N,N'-μεθυλενο-δις ακρυλαμιδίου. Το μέγεθος των πόρων του πολυμερούς που προκύπτει είναι συνάρτηση του βαθμού του πολυμερισμού, ο οποίος ποικίλει ανάλογα με τις συγκεντρώσεις των μονομερών. Η αντίδραση πολυμερισμού αρχίζει με την προσθήκη του αντιδραστηρίου υπερθειϊκού αμμωνίου (APS: ammonium persulfate) που δημιουργεί ελεύθερες ρίζες:  $S_2O_8^{2-} \longrightarrow 2 SO_4^{\bullet-}$  που μαζί με το φωτοχημικό καταλύτη N,N' τετραμεθυλοαιθυλενοδιαμίνη (TEMED) διαδίδονται στο σύστημα πολυμερισμού. Η προσθήκη γλυκερόλης στο πήκτωμα ελαττώνει την τιμή του pH του διαλύματος ηλεκτροφόρησης που καθορίζεται από την παρουσία του ρυθμιστικού διαλύματος TBE, με αποτέλεσμα να αυξάνεται η ευαισθησία της SSCP ανάλυσης και να λαμβάνονται πιο ευδιάκριτα αποτελέσματα.

Το πήκτωμα αφού έχει πήξει (παιρνει περίπου 30 λεπτά) τοποθετείται σε κατάλληλη συσκευή κάθετης ηλεκτροφόρησης με ρυθμιστικό TBE 0,5x (100mL TBE 10x + 1900mL H<sub>2</sub>O). Στη συσκευή εφαρμόζεται τάση 210V και τα δείγματα αφήνονται να τρέξουν στο πήκτωμα για 20 ώρες (overnight) σε θερμοκρασία 4°C. Για τη λήψη των αποτελεσμάτων ακολουθεί χρώση του πηκτώματος. Αυτό γίνεται είτε με βρωμιούχο αιθίδιο είτε με AgNO<sub>3</sub>. Στο πείραμα μας χρησιμοποιήσαμε AgNO<sub>3</sub> (Silver Staining).

### 4.3 Χρώση νιτρικού αργύρου

Παρασκευή διαλυμάτων για 2 gel:

- Δ/μα 1 : 800mL dd-H<sub>2</sub>O + 20mL Et100% + 1mL CH<sub>3</sub>COOH
- Δ/μα 2 : 400mL AgNO<sub>3</sub> 1gr / L (1gr AgNO<sub>3</sub> σε 1 L dd-H<sub>2</sub>O)
- Δ/μα 3 : 6gr NaOH, + 0,02gr NaBH<sub>4</sub> + 2 mL HCHO και dd-H<sub>2</sub>O έως 400mL

Η προσθήκη των διαλυμάτων στη συσκευή πλύσης γίνεται με την σειρά. Για το κάθε 1 από τα 2 gel έχουμε :

- Α' πλύση 200 mL του Δ/μα 1 για 3 min Απομάκρυνση
- Β' πλύση 200 mL του Δ/μα 1 για 3 min Απομάκρυνση
- Πλύση με dd-H<sub>2</sub>O  
Απομάκρυνση
- Εμποτισμός με 200 mL του Δ/μα 2 για 20 min  
Απομάκρυνση
- Πλύση με dd-H<sub>2</sub>O Απομάκρυνση Πλύση με dd-H<sub>2</sub>O  
Απομάκρυνση
- Εμποτισμός με 200 mL του Δ/μα 3 έως εμφάνιση χρώματος  
Απομάκρυνση
- Πλύση με dd-H<sub>2</sub>O

## 5. Προσδιορισμός της αλληλουχίας DNA (DNA sequencing)

Μετά την σύγκριση όλων των δειγμάτων στα πηκτώματα πολυακρυλαμιδίου, επιλέχθηκαν τα άτομα εκείνα που εμφάνισαν καθαρά διαφορετικά πρότυπα ηλεκτροφόρησης σε σχέση με φυσιολογικά άτομα, τα οποία μετά από κατάλληλο καθαρισμό στάλθηκαν για ανάλυση της αλληλουχίας τους (sequencing).

### 5.1 Καθαρισμός PCR προϊόντων

Ο καθαρισμός των PCR προϊόντων έγινε σε στήλες QIAquick Spin<sup>R</sup>. Ο καθαρισμός αυτός συμπεριλαμβάνει απομάκρυνση ελεύθερων ή/και διμερισμένων

εκκινητών, νουκλεοτιδίων, πολυμερασών και αλάτων που τυχόν υπάρχουν στο διάλυμα μαζί με τα PCR προϊόντα. Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε ήταν το εξής :

1. Προσθέτουμε 250μL από το διάλυμα συλλογής (capture buffer) σε 50μL PCR προϊόντος, σε erpendorf των 750μL (Δ/μα 1)
2. Τοποθετούμε τις στήλες QIAquick Spin σε erpendorf των 2mL.
3. Μεταφέρουμε προσεκτικά το περιεχόμενο του Δ/τος 1 στις στήλες QIAquick Spin και φυγοκεντρούμε για 1 λεπτό. Σε αυτό το βήμα πραγματοποιείται η πρόσδεση των επιθυμητών αλληλουχιών πάνω στη στήλη.
4. Απομακρύνουμε το έκλουσμα και τοποθετούμε την στήλη στον ίδιο σωλήνα συλλογής.
5. Προσθέτουμε 750μL από το διάλυμα πλύσης (wash buffer) και φυγοκεντρούμε για 1 λεπτό.
6. Απομακρύνουμε το έκλουσμα και τοποθετούμε τη στήλη στον ίδιο σωλήνα συλλογής. Φυγοκεντρούμε για 1 λεπτό. Είναι πολύ σημαντικό να μην μείνει καθόλου αιθανόλη από το διάλυμα πλύσης μέσα στη στήλη.
7. Τοποθετούμε τις στήλες QIAquick Spin σε αποστειρωμένα erpendorf των 1,5mL.
8. Προσθέτουμε προσεκτικά 50μL από το διάλυμα έκλουσης (elution buffer) και επωάζουμε τα δείγματα για 1 λεπτό.
9. Τέλος, φυγοκεντρούμε στις 13.000 στροφές για 1 λεπτό για ανάκτηση του καθαρισμένου DNA.

Ακολουθεί υπολογισμός της ποσότητας του PCR προϊόντος ποσοτικά με φωτόμετρο (1μL και 49μL dd-H<sub>2</sub>O) ή, ποιοτικά με gel αγαρόζης 2%. Ενδείξεις φωτόμετρου γύρω στα 100ng/μL είναι ικανοποιητικές. Συνήθως στέλνουμε το DNA σε στερεά μορφή (ίζημα) και όχι σε διάλυμα. Γι' αυτό κατακρημνίζουμε το DNA με αιθανόλη και CH<sub>3</sub>COONa (sodium acetate). Για 50μL δείγμα χρειαζόμαστε 500μL Et και 5μL CH<sub>3</sub>COONa. Τα αφήνουμε overnight στους -20°C και την επόμενη μέρα φυγοκεντρούμε τα δείγματα στις 13.000 στροφές, για 20 λεπτά, στους 4°C.

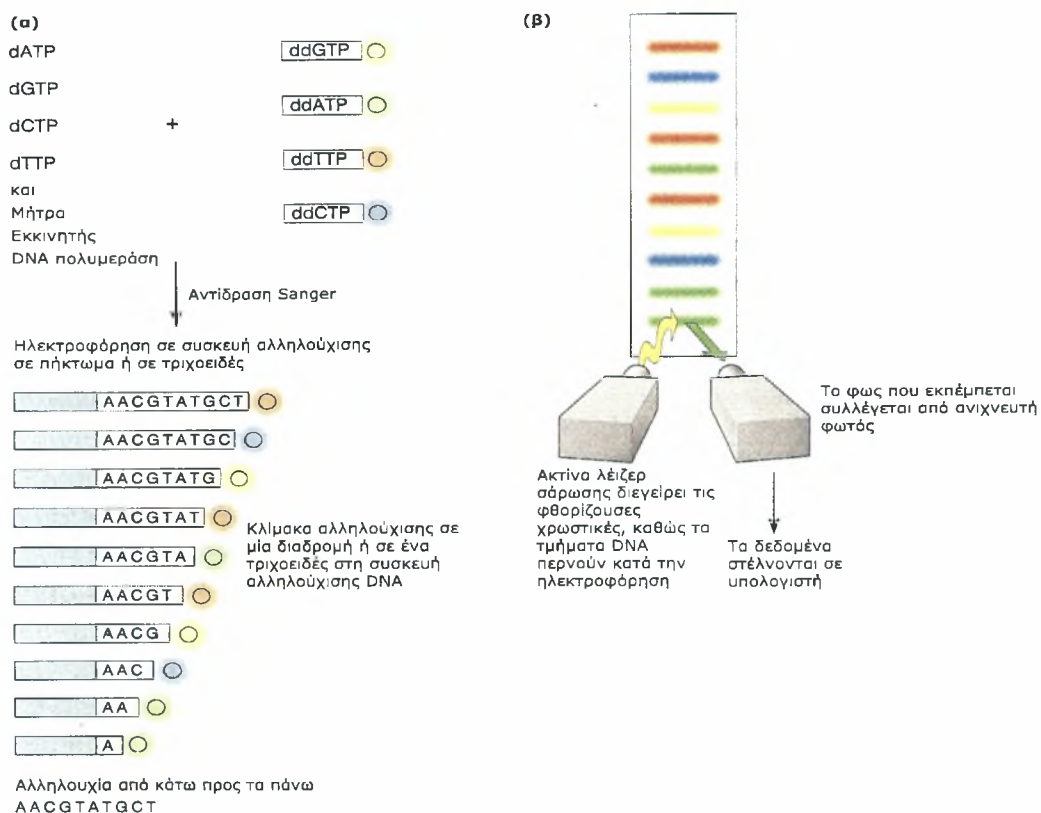
Απομακρύνουμε το υπερκείμενο προσεκτικά και τοποθετούμε το ίζημα στους 37°C για 1 ώρα. Τέλος, πριν τα στείλουμε, θα πρέπει να ετοιμάσουμε και τους primers για την αλληλούχιση. Ζητείται η τελική συγκέντρωση να είναι 5mM/μL, ενώ εμείς χρησιμοποιούμε την 10πλάσια. Έτσι, κάνουμε μια αραίωση 1/10 σε τελικό όγκο 40 μL (4μL primer + 36μL H<sub>2</sub>O).

## 5.2 Μέθοδος τερματισμού νουκλεοτιδικής αλυσίδας με διδεοξυνουκλεοτίδια (Μέθοδος Sanger)

Η μέθοδος Sanger είναι η πλέον διαδεδομένη μέθοδος για τον προσδιορισμό της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας μορίων DNA.<sup>21</sup> Σύμφωνα με αυτή τη μέθοδο, ενσωματώνονται από DNA πολυμεράσες σε μια αναπτυσσόμενη αλυσίδα 2',3'-διδεοξυνουκλεοτίδια (ddNTPs) μέσω των 5'-φωσφορικών τους ομάδων. Όμως, δεν έχουν την 3'-OH ομάδα που είναι απαραίτητη για το σχηματισμό του φωσφοδιεστερικού δεσμού με το επόμενο νουκλεοτίδιο και συνεπώς, η ανάπτυξη της αλυσίδας σταματάει εκεί όπου έχει ενσωματωθεί ένα συγκεκριμένο ddNTP. Τέσσερις διαφορετικές αντιδράσεις εκτελούνται για κάθε μόριο DNA που θέλουμε να αλληλουχίσουμε, μια για κάθε ένα από τα 4 είδη ddNTP που έχουμε προσθέσει. Ο λόγος dNTP:ddNTP επιλέγεται προσεκτικά έτσι ώστε τα σημασμένα τμήματα που παράγονται να δημιουργούν μια σειρά επανεντοπισμένων τμημάτων DNA μήκους έως και αρκετών χιλιάδων βάσεων νουκλεοτιδίων, το καθένα από τα οποία τερματίζεται σε μια συγκεκριμένη από τις 4 βάσεις. Αυτά τα τμήματα διαχωρίζονται με βάση το μέγεθος τους από υψηλής ευκρίνειας ηλεκτροφόρηση σε αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου. Η ηλεκτροφόρηση παράγει μια βαθμιαία «σκάλα» τμημάτων DNA από την οποία μπορεί να αναγνωσθεί η νουκλεοτιδική αλληλουχία. Επειδή τα μικρότερα τμήματα DNA μεταναστεύουν και γρηγορότερα, η πρώτη ζώνη στη βάση του πηκτώματος υποδεικνύει το πρώτο διδεοξυνουκλεοτίδιο το οποίο προστέθηκε στην αντίδραση Sanger. Στην πραγματικότητα, η μέθοδος Sanger χρησιμοποιείται σήμερα σε μια τροποποιημένη μορφή, αυτή της αυτοματοποιημένης φθορίζουσα αλληλούχισης.

### 5.3 Αυτοματοποιημένη φθορίζουσα αλληλούχιση DNA

Η πρόοδος στις φθορίζουσες χρωστικές των τερματιστών και στην τεχνολογία της σήμανσης έχει οδηγήσει στην ανάπτυξη τεχνικών αλληλούχισης υψηλής παραγωγής. Ουσιαστικά τα περισσότερα συστήματα περιλαμβάνουν την χρήση διδεοξυνουκλεοτιδίων σημασμένα με διαφορετικές φθοροχρωστικές. Οπότε η σήμανση ενσωματώνεται στα ddNTP και αυτά χρησιμοποιούνται για να τερματιστεί η αναπτυσσόμενη αλυσίδα όπως και στην τυπική αντίδραση Sanger που παρουσιάζεται στην ενότητα 3.5.2. Το πλεονέκτημα αυτής της τροποποίησης



**Σχήμα 10.** Αυτοματοποιημένη φθορίζουσα αλληλούχιση DNA

είναι ότι, από την στιγμή που διαφορετικά μόρια σήμανσης ενσωματώνονται με κάθε ddNTP, είναι περιττό να εκτελούνται τέσσερις ξεχωριστές αντιδράσεις. Οπότε και τα τέσσερα προϊόντα ηλεκτροφορούνται στο ίδιο αποδιατακτικό gel. Το κάθε προϊόν με την ειδική χρωστική για κάθε βάση, διεγείρεται από ένα λέιζερ και η

χρωστική εκλύει ακτινοβολία στο χαρακτηριστικό της μήκος κύματος (Σχήμα 10). Ένα σύστημα περίθλασης διαχωρίζει τις εκπομπές των κυμάτων, οι οποίες ανιχνεύονται από μια συσκευή ανίχνευσης και οι αλληλουχίες αποκωδικοποιούνται από έναν υπολογιστή. Τα πλεονεκτήματα αυτής της τεχνικής περιλαμβάνουν σε πραγματικό χρόνο εντόπιση των αλληλουχιών. Επιπλέον τα μήκη των αλληλουχιών που αναλύονται φτάνουν έως και 1000 bp.

## 6. Πολυμορφισμός Μήκους τμημάτων Περιορισμού (RFLP)

Πολλά βακτήρια παράγουν ένζυμα που ονομάζονται ενδονουκλεάσες περιορισμού. Τα ένζυμα αυτά προστατεύουν τα βακτήρια αποικοδομώντας ξένο προς αυτά DNA. Κάθε ένζυμο περιορισμού αναγνωρίζει μια συγκεκριμένη αλληλουχία μήκους τεσσάρων με οκτώ νουκλεοτιδίων. Αυτές οι αλληλουχίες, που υπάρχουν στο γενετικό υλικό του ίδιου του βακτηρίου, προστατεύονται χάρη στη μεθυλίωση μιας τριφωσφορικής αδενοσίνης ή τριφωσφορικής κυτοσίνης, ενώ αλληλουχίες ξενιστών που δεν είναι μεθυλιωμένες, αποκόπτονται από τις ενδονουκλεάσες περιορισμού. Περισσότερες από 100 τέτοιες ενδονουκλεάσες έχουν απομονωθεί από διαφορετικά είδη βακτηριών και ταξινομούνται βιοχημικά σε τρεις κατηγορίες : τύπου I, II & III. Στην κατηγορία τύπου I, η δραστηριότητα περιορισμού υπερπεριλαμβάνει αναγνώριση της συγκεκριμένης αλληλουχίας και τομή του DNA σε μια απόσταση 1000 έως 5000bp μακριά. Το ίδιο ισχύει και για τις ενδονουκλεάσες τύπου III, μόνο που ο περιορισμός συμβαίνει 20bp από το σημείο αναγνώρισης. Αντίθετα, για τις ενδονουκλεάσες τύπου II, το σημείο τομής βρίσκεται εντός της αλληλουχίας αναγνώρισης. Η συντριπτική πλειοψηφία των γνωστών ενζύμων περιορισμού είναι τύπου II και είναι αυτά τα ένζυμα που εφαρμόζονται περισσότερο στα σύγχρονα εργαστήρια.

Μια συγκεκριμένη ενδονουκλεάση περιορισμού θα κόψει σε μια σειρά συγκεκριμένων τμημάτων οποιοδήποτε δίκλωνο μόριο DNA που έχει απομονωθεί από ένα κύτταρο. Τα τμήματα αυτά ονομάζονται τμήματα περιορισμού. Συγκρίνοντας το μέγεθος των τμημάτων περιορισμού που έχουν παραχθεί από μια συγκεκριμένη γενετική περιοχή μετά την επεξεργασία της με ένα συνδυασμό διαφορετικών ενζύμων περιορισμού, δημιουργείται ένας χάρτης περιορισμού. Η



διαφορά στους χάρτες περιορισμού μεταξύ δυο, ή περισσότερων τμημάτων γενετικού υλικού, απόρροια των διαφορετικών τους νουκλεοτιδικών αλληλουχιών ονομάζεται πολυμορφισμός μήκους τμημάτων περιορισμού. Αυτός ο πολυμορφισμός είναι συχνός και κάθε οργανισμός έχει ένα μοναδικό και συγκεκριμένο συνδυασμό τμημάτων περιορισμών που τον χαρακτηρίζουν.

### 6.1 Διαδικασία πέψης

4μL από τα καθαρισμένα PCR προϊόντα του σταδίου που περιγράφεται στο τμήμα 5.1, είναι αρκετά για να χρησιμοποιηθούν στην αντίδραση πέψης. Ετσι, σε τελικό όγκο 10μL το διαλυμα θα περιέχει:

- 4μLDNA
- 4U ενζύμου (0,4μL)
- 1μL buffer (10x)
- 4μL dd-H<sub>2</sub>O

Τα δείγματα επωάζονται overnight στους 37°C.

### 6.2 Παρασκευή πηκτης πολυακρυλαμιδίου

Η πηκτή μας αυτή τη φορά έχει 7% περιεκτικότητα σε ακρυλαμίδιο καθώς επίσης και αποδιατακτικές ιδιότητες λόγω της παρουσίας ουρίας. Για 62,5mL (για 1 gel) οι ποσότητες των αντιδραστηριων είναι:

- 7gr Ουρίας
- 14,38gr από μητρικό διάλυμα ακρυλαμιδίου 30% ( $V_{\text{τελ}}=100\text{mL}$ )
  - ✓ 29 gr Ακρυλαμίδιο
  - ✓ 1 gr Δις-ακρυλαμίδιο
  - ✓ Συμπληρώνουμε με H<sub>2</sub>O έως τα 100mL
- 7,25 mL TBE 10x

Διηθούμε και συμπληρώνουμε με H<sub>2</sub>O έως τα 62,5mL και προσθέτουμε:

- 60 μL TEMED
- 350 μL APS 20%

Ο χρόνος που απαιτείται για να πήξει το πήκτωμα κυμαίνεται από μισή με 1 ώρα.

Παράλληλα με τα δείγματα είναι απαραίτητη, η παρουσία ladder. Έτσι για την ηλεκτροφόρηση στο πήκτωμα ετοιμάζουμε:

- ❖ Ladder (100bp) 3  $\mu$ L + 4  $\mu$ L loading buffer
- ❖ DNA δείγμα (το οποίο επωάστηκε με το ένζυμο overnight) 10 $\mu$ L + 4 $\mu$ L loading buffer

Το loading buffer είναι αυτό που χρησιμοποιήθηκε και στην απομόνωση και περιέχει:

- 1mL χρωστική μπλε της βρωμοφαινόλης
- 5 mL γλυκερόλη
- 0,5 mL TBE 20x
- 3,5 mL dd-H<sub>2</sub>O

Οι συνθήκες ηλεκτροφόρησης ήταν:

- ❖ 2,5 ώρες (έως η χρωστική αγγίξει το κάτω μέρος της πηκτής)
- ❖ 220V / 73 mA

## Αποτελέσματα

Στο σύνολο των ασθενών που μελετήθηκαν για τα 14 γονίδια tRNA, tRNA<sup>Pro</sup>, tRNA<sup>Thr</sup>, tRNA<sup>Glu</sup>, tRNA<sup>Arg</sup>, tRNA<sup>Gly</sup>, tRNA<sup>Asp</sup>, tRNA<sup>Ser</sup>, tRNA<sup>Tyr</sup>, tRNA<sup>Cys</sup>, tRNA<sup>Asn</sup>, tRNA<sup>Ala</sup>, tRNA<sup>Trp</sup>, tRNA<sup>Val</sup>, tRNA<sup>Phe</sup>, ανιχνεύθηκαν 13 διαφορετικές μεταλλάξεις, που εντοπίστηκαν σε 17 άτομα. Οι πέντε αποτελούν παθογόνες μεταλλάξεις, από τις οποίες δυο δεν έχουν αναφερθεί στο mitomap (διαδικτυακή βάση δεδομένων [www.mitomap.org](http://www.mitomap.org)). Οι υπόλοιπες αναφέρονται ως πολυμορφισμοί και ως παθογόνες μεταλλάξεις.

Πιο συγκεκριμένα για το γονίδιο tRNA<sup>Thr</sup> ανιχνεύτηκαν 4 μεταλλάξεις, από τις οποίες η A15914G που ανιχνεύτηκε σε ασθενή με αυτισμό δεν έχει προαναφερθεί. Στο ίδιο γονίδιο ανιχνεύτηκαν οι G15928A σε τρεις ασθενείς, η A15924G σε ασθενή με στραβισμό και σπασμούς και ανάμεσα στα δυο γονίδια tRNA<sup>Pro</sup> και tRNA<sup>Thr</sup> ανιχνεύτηκε η A15954C.

Επίσης, στο γονίδιο tRNA<sup>Tyr</sup> ανιχνεύτηκε η μετάλλαξη A5843G σε ασθενή με σύνδρομο Down και στο γονίδιο tRNA<sup>Asp</sup> ανιχνεύτηκε η T7581C σε ασθενή με συγγενή καρδιοπάθεια.

Στην παρακείμενα γονίδια που ενισχύθηκαν μέσω των primers ανιχνεύθηκαν τέσσερις μεταλλάξεις στο γονίδιο της υπομονάδας ND3 και τρεις στο γονίδιο του 12S rRNA. Ακόμη, πρέπει να σημειωθεί η ανίχνευση συνύπαρξης μεταλλάξεων σε διαφορετικά γονίδια ασθενών (Πίνακας 5).

Αρχικά τα δείγματα έδειξαν διαφορετικά πρότυπα στο SSCP οπότε στάλθηκαν για αλληλούχιση με σκοπό την ανίχνευση των μεταλλάξεων που προσδίδουν στα μονόκλινα μόρια την διαφορετική ηλεκτροφορητική κινητικότητα. Για την στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκαν τα προγράμματα Bioedit 7.0 και ClustalX 1.8. Μετά την σύγκριση των αλληλουχιών των γονιδίων με την διορθωμένη πλήρη αλληλούχιση του μιτοχονδριακού γονιδιώματος,<sup>22</sup> προέκυψε η ταυτοποίηση κάθε μετάλλαξης.

Γονίδιο tRNA	Μετάλλαξη	Κλινικό σύμπτωμα	Συνυπάρχουσες μεταλλάξεις
Thr	A15914G	1. Αυτισμός 14 ετών	12S rRNA A663G
Thr	A15924G	1. Στραβισμός και σπασμοί 10 ετών	16S T3197C, Leu <sup>(CUN)</sup> A12308G
Thr	G15928A	1. εγκεφαλικό 45 ετών	
		2. Αρρυθμίες, σπασμοί 13 ετών	
		3. Νευρομυϊκά προβλήματα 5 ετών	12S G709A, 12S A750G
Tyr	A5843G	1. Σύνδρομο Down	ND1 T3394C ND3 A10398G
Asp	T7581C	1. Συγγενή καρδιοπάθεια 1 έτους	12S G709A, 12S A750G
Leu <sup>(CUN)</sup>	A12308G	1. PFAPA	16S 3158insT, Thr / Pro A15954C
		2. Στραβισμός και σπασμοί 10 ετών	16 T3197C, Thr A15924G
		3. Σκλήρυνση κατά πλάκας	Thr / Pro A15954C
		4. Διαβήτης, υποθυρεοειδισμός, προβλήματα ομιλίας 3 ετών	ND3 T10084C, ND3 C10142T
		Ψυχοκινητική καθυστέρηση	12S G709A, 12S A750G
		Νευρολογικό σύνδρομο	12S A750G
		Εγκεφαλικό 32 ετών	12S A750G, ND3 A10398G
		Εγκεφαλικό 50 ετών	12S A750G
		Εγκεφαλικό 58 ετών	12S A750G
		Εγκεφαλικό	12S G709A, 12S A750G, ND3 A10398G

**Πίνακας 5.** Το σύνολο των μεταλλάξεων που ανιχνεύτηκαν στην μελέτη όλων των tRNA του μιτοχονδριακού γονιδιώματος, καθώς και οι μεταλλάξεις που συνυπάρχουν στο ίδιο δείγμα ασθενή. Με κόκκινο σημειώνεται η νέα μετάλλαξη.

Ακολουθεί **πίνακας 6** με το σύνολο των ασθενών που παρουσίασαν μεταλλάξεις. *Consensus, syn, non-coding* είναι συναινετική, συνώνυμη και μη κωδικοποιούσα μετάλλαξη αντίστοιχα.

Ασθενείς	Μετάλλαξη	Γονίδιο	Αλλαγή αμινοξέος	Ασθένεια που αναφέρονται
No 1	A750G	12S rRNA	consensus	Μη παθογόνος
	A10398G	ND3	T → A	Μη παθογόνος
No 3	G15928A	tRNA <sup>Thr</sup>	-	Multiple sclerosis
No 4	A750G	12 S rRNA	consensus	Μη παθογόνος
No 5	A750G	12 S rRNA	Consensus	Μη παθογόνος
No 7	G709A	12 S rRNA	Non-coding	Μη παθογόνος
	A750G	12 S rRNA	Consensus	Μη παθογόνος
	A10398G	ND3	T → A	Μη παθογόνος
No 9	3158insT	16S rRNA	Νέα	PFAPPA
	A12308G	tRNA <sup>Leu(CUN)</sup>	-	CPEO, stroke, CM, Renal & Prostate cancer risk
	A15954C	tRNA <sup>Thr</sup> /tRNA <sup>Pro</sup>	Non-coding	Μη παθογόνος
No 10	G15928A	tRNA <sup>Thr</sup>	-	Multiple sclerosis
No 12	G709A	12 S rRNA	Non-coding	Μη παθογόνος
	A750G	12 S rRNA	consensus	Μη παθογόνος
	T7581C	tRNA <sup>Asp</sup>	Non-coding	Μη παθογόνος
No 13	G709A	12 S rRNA	Non-coding	Μη παθογόνος
	A750G	12 S rRNA	Consensus	Μη παθογόνος
	G15928A	tRNA <sup>Thr</sup>	-	Multiple sclerosis
No 14	G709A	12 S rRNA	Non-coding	Μη παθογόνος
	A750G	12 S rRNA	consensus	Μη παθογόνος
No 16	T3197C	16S rRNA	Non-coding	Μη παθογόνος
	A12308G	tRNA <sup>Leu(CUN)</sup>	-	CPEO, stroke, CM, Renal & Prostate cancer risk
	A15924G	tRNA <sup>Thr</sup>	-	LIMM
No 17	A750G	12 S rRNA	consensus	Μη παθογόνος
No 21	T10084C	ND3	I → T	Μη παθογόνος
	C10142T	ND3	syn	Μη παθογόνος
	A12308G	tRNA <sup>Leu(CUN)</sup>	-	CPEO, stroke, CM, Renal & Prostate cancer risk
No 24	A12308G	tRNA <sup>Leu(CUN)</sup>	-	CPEO, stroke, CM, Renal & Prostate cancer risk
	A15954C	tRNA <sup>Thr</sup> /tRNA <sup>Pro</sup>	Non-coding	Μη παθογόνος
No 25	T3394C	ND1	Y → H	Μη παθογόνος
	A5843G	tRNA <sup>Tyr</sup>	-	FSGS, mitochondrial cytopathy
	A10398G	ND3	T → A	Μη παθογόνος
No 28	A663G	12S rRNA	Non-coding	Μη παθογόνος
	A15914G	tRNA <sup>Thr</sup>	Νέα	Αυτισμός

## Συζήτηση

Η μιτοχονδριακή βιολογία είναι ένα ταχέως αναπτυσσόμενο τμήμα της γενετικής, που μέχρι σήμερα έχει οδηγήσει στην αναγνώριση πλήθους ασθενειών που οφείλονται σε μιτοχονδριακές ανωμαλίες. Οι μιτοχονδριακές ασθένειες αποτελούν μια τάξη πολυσυμπτωματικών συνδρόμων με καθορισμένο γενετικό και έως κάποιο βαθμό, βιοχημικό υπόβαθρο και στην πραγματικότητα έχουν αναδειχθεί από τις πιο κοινές μητρικά κληρονομήσιμες δυσλειτουργίες.<sup>23,24</sup>

Μιτοχονδριακές ασθένειες προκύπτουν κατά κύριο λόγο σε άτομα που εμφανίζουν δυσλειτουργίες στα σύμπλοκα της αναπνευστικής αλυσίδας μέσω μεταλλάξεων στα γονίδια των υπομονάδων τους και σε μεγάλο βαθμό σε αυτά που ανιχνεύονται σημειακές μεταλλάξεις σε γονίδια tRNA που μπορεί να επηρεάσουν την τριτοταγή δομή τους, με αποτέλεσμα την διαφοροποίηση της δραστηριότητας τους κατά την πρωτεϊνοσύνθεση. Κοινό γνώρισμα, αν όχι αποκλειστικά διότι έχει παρατηρηθεί σε φυσιολογικό πληθυσμό, είναι τα υψηλά επίπεδα γαλακτικού οξέος σε νεαρά άτομα. Έρευνα σε άτομα με αυξημένα επίπεδα γαλακτικού οξέος έχει υποδείξει ότι υπάρχει σύνδεση των μιτοχονδριακών ασθενειών με δυσλειτουργία στα σύμπλοκα I και IV της αναπνευστικής αλυσίδας.<sup>25</sup>

Στην παρούσα μελέτη, εξετάσαμε ένα σύνολο ασθενών με κοινά χαρακτηριστικά γνωρίσματα μυϊκά και νευρικά προβλήματα, καθώς και υψηλά επίπεδα γαλακτικού οξέος στις μικρές ηλικίες. Μελετήσαμε 14 γονίδια tRNA καθώς, όπως αναφέραμε, έχουν καθοριστικό ρόλο στην πρωτεϊνοσύνθεση και ανίχνευση μεταλλάξεων, σε αυτά, επιφέρουν πολλές δυσλειτουργίες στο κύτταρο. Επιπρόσθετα, μελετήθηκαν παρακείμενες περιοχές συμπεριλαμβάνοντας τμήματα των γονιδίων της υπομονάδας της αναπνευστικής αλυσίδας ND3 και της υπομονάδας του ριβοσώματος 12S rRNA.

Αναλυτικότερα, στο γονίδιο tRNA<sup>Thr</sup> ανιχνεύτηκαν τρεις διαφορετικές μεταλλάξεις σε πέντε ασθενείς. Η μετάλλαξη **A15924G** ανιχνεύτηκε σε παιδί 10



χρονών με στραβισμό και σπασμούς. Σε έρευνα που έγινε σε μια ομάδα ασθενών με καρδιομυοπάθεια, η συγκεκριμένη μετάλλαξη έχει συνδεθεί με ανεπάρκεια της ενζυμικής δραστηριότητας της αναπνευστικής αλυσίδας. Έχει αναλυθεί ότι επηρεάζει το τελευταίο ζεύγος βάσεων του αντικωδικονίου του βρόγχου της αντικωδικής θηλιάς του tRNA<sup>Thr</sup>.<sup>26,27,28</sup> Ακόμη, έχει συνδεθεί με μιτοχονδριακές μυοπάθειες, όπως την θανατηφόρα παιδική μιτοχονδριακή μυοπάθεια (LIMM Lethal Infantile Mitochondrial Myopathy), όμως λόγω της ανίχνευσης της και σε φυσιολογικό πληθυσμό ως πολυμορφισμό, μπορούμε να υποθέσουμε ότι πρόκειται για μια κοινή μετάλλαξη και όχι την αιτία της ασθένειας.<sup>19</sup> Από προηγούμενη μελέτη, στον ίδιο ασθενή είχε ανιχνευθεί συνύπαρξη ακόμη δυο μεταλλάξεων, στο γονίδιο του 12S rRNA T3197C και στο γονίδιο της Leu<sup>(CUN)</sup> A12308G.

Σε τρεις ασθενείς με διαφορετικό προφίλ, με εγκεφαλικό (45 ετών), αρρυθμίες και σπασμούς (18 ετών) και σε ασθενή με νευρομυϊκά προβλήματα (5 ετών), ανιχνεύτηκε η μετάλλαξη **G15928A** του tRNA<sup>Thr</sup>. Η μετάλλαξη αυτή έχει ήδη συσχετιστεί με αύξηση της πιθανότητας εμφάνισης πολλαπλής σκλήρυνσης και με το σύνδρομο Parkinson. Ανίχνευση της μετάλλαξης έχει μελετηθεί δίνοντας μόρια tRNA λιγότερα ενεργά σε σχέση με μόρια που απουσιάζει η αλλαγή.<sup>29</sup> Ακόμη ανάλυση με RFLP έχει υποδείξει την παρουσία της μετάλλαξης σε ασθενείς με καρδιομυοπάθειες, λόγω απουσίας της θέσης κοπής παρουσία της αλλαγής.<sup>19</sup> Στο παιδί με νευρομυϊκά προβλήματα ανιχνεύτηκαν ακόμη δυο αλλαγές στο γονίδιο 12S rRNA, G709A και A750G.

Σε ένα κορίτσι 14 ετών που πάσχει από αυτισμό βρέθηκε μια νέα μετάλλαξη, η **A15914G** στο tRNA<sup>Thr</sup>. Η ασθένεια είναι αποτέλεσμα μιας νευρολογικής διαταραχής που επηρεάζει την ομαλή λειτουργία του εγκεφάλου, την ανάπτυξη στις περιοχές της κοινωνικής συναλλαγής και των κοινωνικών δεξιοτήτων. Για να διαπιστωθεί η επίδραση που μπορεί να έχει η συγκεκριμένη μετάλλαξη στη δράση των συμπλόκων, θα πρέπει να ακολουθήσει περαιτέρω βιοχημική ανάλυση. Στο συγκεκριμένο άτομο ανιχνεύτηκε ακόμα μια μετάλλαξη στο γονίδιο του 12S rRNA **A663G**. Το σημείο που ανιχνεύεται η μετάλλαξη είναι σε κοντινή περιοχή του D-loop. Έχει ανιχνευθεί σε ασθενής με ποικίλα κλινικά

συμπτώματα, όπως θυροειδή καρκίνωμα<sup>30</sup>, νασοφαρυγγειακό καρκίνωμα<sup>31</sup>, χωρίς όμως να έχει γίνει σύνδεση του ως αιτία της δυσλειτουργίας.

Η μετάλλαξη **A15954C** βρέθηκε στην περιοχή ανάμεσα στο τέλος του γονιδίου tRNA<sup>Thr</sup> και στην αρχή του γονιδίου της tRNA<sup>Pro</sup>. Βρέθηκε σε δυο διαφορετικούς ασθενείς, με PFAPA και σκλήρυνση κατά πλάκας. Πρόκειται για μια μη κωδικοποιούσα περιοχή και η αλλαγή αυτή έχει αναφερθεί σε ασθενείς με εγκεφαλικά και καρδιομυοπάθειες.<sup>32,33</sup>

Σε κοριτσάκι 8 ετών με σύνδρομο Down ανιχνεύτηκε μετάλλαξη στο γονίδιο tRNA<sup>Tyr</sup>, η **A5843G**. Η μετάλλαξη βρίσκεται κοντά στην περιοχή D-loop και έχει συνδεθεί με εστιακή τμηματική σπειραματοσκλήρωση (FSGS focal segmental glomerulosclerosis)<sup>34</sup> και γλαύκωμα (pseudoexfoliation glaucoma).<sup>35</sup> Επίσης, ανιχνεύτηκε συνύπαρξη άλλων δυο μεταλλάξεων της ND3 A10398G και της ND1 T3394G.

Στο γονίδιο tRNA<sup>Asp</sup> βρέθηκε η μιτοχονδριακή μετάλλαξη **T7581C** σε παιδάκι ενός έτους με συγγενή καρδιοπάθεια. Σε αναφορές που έχουν γίνει έχει ανιχνευτεί σε εγκεφαλομυοπάθειες και μυοπάθειας άκρων του σώματος.<sup>36</sup> Στο ίδιο άτομο συνυπήρχαν άλλες δυο μετάλλαξη στο γονίδιο 12S rRNA, η G709A και η A750G.

Εκτός, από τα γονίδια tRNA τροποποιήσεις αλληλουχίας ανιχνεύτηκαν σε παρακείμενες περιοχές στα γονίδια των 12S rRNA και ND3. Σε τρεις ασθενείς με κοινό γνώρισμα το εγκεφαλικό και σε κοριτσάκι 8 χρονών με σύνδρομο Down, βρέθηκε η μετάλλαξη **A10398G** στο γονίδιο του ND3. Πρόκειται για υποκατάσταση στη θέση 114 της θρεονίνης από αλανίνη και έχει παρατηρηθεί σύνδεση διεισδυτικότητας με τη μετάλλαξη G11778A στο σύνδρομο LHON (οπτική νευροπάθεια του Leber)<sup>37</sup>, ενώ έχει αναφερθεί και σε ασθενείς με εγκεφαλομυοπάθεια MERRF.<sup>38</sup> Ακόμη, έχει βρεθεί ότι σε συνδυασμό με την ύπαρξη της μετάλλαξης A8701G επηρεάζουν το pH της μιτοχονδριακής μήτρας και τα ενδοκυτταρικά επίπεδα Ca<sup>2+</sup>.<sup>39</sup>

Στο γονίδιο του ND3 ανιχνεύθηκαν, επίσης, οι μεταλλάξεις **T10084C** και **C10142T** σε ασθενή 3 ετών με σακχαρώδη διαβήτη, υποθυροειδισμό και προβλήματα ομιλίας. Αναφέρεται ότι έχουν βρεθεί σε εγκεφαλομυοπάθειες.<sup>40</sup>

Επίσης, η μετάλλαξη T10084C, που πρόκειται για μετατροπή ισολευκίνης σε θρεονίνη, έχει βρεθεί να συνυπάρχει με μεταλλάξεις που επηρεάζουν το κυτόχρωμα C και οδηγούν στην μειωμένη παραγωγή πρωτεΐνης.<sup>41</sup>

Στο 12S rRNA ανιχνεύτηκαν ακόμη τρεις μεταλλάξεις, η **A750G**, η **G709A** και η **A663G** (που αναλύσαμε πιο πάνω). Η πρώτη ανιχνεύτηκε σε τέσσερις ασθενείς με εγκεφαλικό, συγγενή καρδιοπάθεια, νευρομυϊκά προβλήματα, ψυχοκινητική καθυστέρηση και η δεύτερη συνυπήρχε στους ίδιους ασθενείς και βρέθηκε σε ακόμη τέσσερις, τρεις με εγκεφαλικό και έναν με νευρολογικό σύνδρομο. Έχουν αναφερθεί σε ασθενείς με ποικίλες μιτοχονδριακές ασθένειες.<sup>42</sup>

Συμπερασματικά, η ανάλυση του συνόλου των γονιδίων tRNA μας επέτρεψε να ανιχνεύσουμε ήδη γνωστές μεταλλάξεις και μια καινούργια σε ασθενής νεαρής ηλικίας που παρουσίαζαν ασύνδετους κλινικούς φαινότυπους. Γνωρίζοντας ότι οι μιτοχονδριακές ασθένειες παρουσιάζουν ποικίλα γνωρίσματα και κλινικά χαρακτηριστικά έχει ως αποτέλεσμα να είναι δύσκολη η κατάταξη τους. Ανίχνευση μεταλλάξεων σε ασθενείς με χαρακτηριστικά όπως υψηλά επίπεδα γαλακτικού οξέος, καρδιακά και μυϊκά προβλήματα, διάφορα σύνδρομα και μεταβολικές διαταραχές ενδυναμώνει την εμπλοκή τους στις ασθένειες και πιθανή παθογένεια, που μπορεί να συσχετιστεί στο μέλλον με διάγνωση τους ως μιτοχονδριακές ασθένειες. Η καινούργια μετάλλαξη που ανιχνεύτηκε στο παιδί με αυτισμό μπορεί να είναι πιθανή έναρξη για περαιτέρω μελέτες, όπως βιοχημική ανάλυση της δραστηριότητας της αναπνευστικής αλυσίδας και μοριακή ανάλυση της επίδρασης της μετάλλαξης στην δομή του tRNA, που τη φέρει. Καθώς επίσης μπορεί να γίνει μέτρηση του επιπέδου γαλακτικού οξέος. Αναλύσεις που θα εγκαθιδρύσουν την σχέση μεταξύ της επίπτωσης και του ρόλου που θα έχει η συγκεκριμένη μετάλλαξη στον καθορισμό της ασθένειας.

## Βιβλιογραφία

- <sup>1</sup> Stryer L., Biochemistry, 3<sup>rd</sup> edition. W.H. Freeman and company 1988, 17:417-419.
- <sup>2</sup> Anderson S. Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MH, Coulson AR. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 1981, 290:4-65.
- <sup>3</sup> Smeitink J., Sengers R.C.A., Trijbels J.M.F. Oxidative Phosphorylation in Health and Disease. Publishing, Inc., 2000, 7:28-29.
- <sup>4</sup> McFarland R., Taylor R.W., Turnbull D.M., The neurology of mitochondrial DNA disease. *Lancet Neurol* 2002, 1(6):343-351.
- <sup>5</sup> Γ. Τσουφάκης. Γαλακτική οξέωση. *Αρχεία ελληνικής ιατρικής* 2001, 18(5):451-456
- <sup>6</sup> Zifa E., Giannouli S., Theotokis P., Stamatis C., Mamuris Z., Stathopoulos C. Mitochondrial tRNA mutations: clinical and factional perturbations. *RNA Biol* 2007, 4:38-66.
- <sup>7</sup> Florentz C., Sissler M. Disease-related versus polymorphic mutations in human mitochondrial tRNAs. Where is the difference? *EMBO Rep* 2001, 2:481-486.
- <sup>8</sup> Limongelli A., Schaefer J., Jackson S., Invernizzi F., Kirino Y., Suzuki T., Reichmann H., Zeviani M. Variable penetrance of a familial progressive necrotising encephalopathy due to a novel tRNA (Ile) homoplasmic mutation in the mitochondrial genome. *J med Genet* 2004, 41:342-349.
- <sup>9</sup> Kawarai, Kawakami, Kozuka, Izumi, Matsuyama, Watanabe, Kohriyama, Nakamura. A new mitochondrial DNA mutation associated with mitochondrial myopathy: tRNA Leu (UUR) 3254C to G. *Neurology* 1997, 49:598-600.
- <sup>10</sup> Taylor, Schaefer, Mcfarland, Maddison, Turnbull. A novel mitochondrial DNA tRNA(Ile) (A4267G) mutation in sporadic patients with mitochondrial myopathy. *Neuromuscul Disord* 2002, 12:659-664.
- <sup>11</sup> Akita, koga, Iwanaga, Wada, Tsubone, Fukuda, Nakamura, Kato. Fatal hypertrophic cardiomyopathy associated with an A8296G mutation in the mitochondrial tRNA Lys gene. *Hum. Mutat.* 2000, 12:659-664
- <sup>12</sup> Grasso, Diegoli, Brega, Campana, Tavazzi, Arbustini. The mitochondrial DNA mutation T12297C affects highly conserved nucleotide of tRNA Leu (CUN) and is associated with dilated cardiomyopathy. *Eur. J. Hum. Genet* 2001, 9:311-315.
- <sup>13</sup> Matsumoto, Saver, Brennan, Ringman. Mitochondrial encephalomyopathy with lactic acidosis and stroke (MELAS). *Rev. Neurol. Dis.* 2005, 2:30-34.
- <sup>14</sup> Comyn. The myoclonic epilepsy and ragged-red fiber mutation provides new insights into human mitochondrial function and genetics. *Am. J Hum. Genet* 1998, 62:745-751.
- <sup>15</sup> Hummans, Sweeney, Brockington, Lennox, Lawton, Kennedy, Morgan-Hughes, Harding. The mitochondrial transfer RNA Lys A-G 8344 mutation and the syndrome of epilepsy and ragged-red fibers (MERRF). Relationship of clinical phenotype to proportion of mutant mitochondrial DNA. *Brain* 1993, 116:617-632.

- 
- <sup>16</sup> J.R. Weissman, R.I. Kelley, M.L. Bauman, B.H. Cohen, K.F. Murray, R.L. Mitchell, R.L. Kern, M.R. Natowicz. Mitochondrial Disease in Autism Spectrum Disorder Patients: A Cohort Analysis. *PLoS ONE* 2008, Volume 3 / Issue 11.
- <sup>17</sup> Lewin HA, Stewart-Haynes JA. A simple method for DNA extraction from leukocytes for use in PCR. *Biotechniques* 1992, 13:522-524.
- <sup>18</sup> Markoulatos P., Samara V., Marinakis J., Kaparos C., Fountoukidou P., Krikelis V., Spirou N., Vamvakopoulos N. Polymerase Chain Reaction in Iology Diagnose. *Hellenic Virology* 1996, 1(1):83-88.
- <sup>19</sup> Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T., Hrsg. *Molecular Cloning: a laboratory manual*, 2nd Edotion. Cold Sping Harbour Laboratory Press 1989, NY.
- <sup>20</sup> Orita M., Iwahana H., Kanazawa H., Hayashi K., Sekiya T. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989, 86:2766-2770.
- <sup>21</sup> Sanger F., Nicklen S., Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977, 74:5463-5467.
- <sup>22</sup> Andrews RM., Kubacha I., Chinnery PF., Lightwlers RN., Turnbull DM., Howell N. Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. *Nat Genet* 1999, 23:147.
- <sup>23</sup> Wrong LJ. Pathogenic mitochondrial DNA mutations in protein coding genes. *Muscle Nerve* 2007, 36:279-293.
- <sup>24</sup> Inoue K., Nakada K., Ogura A., Isobe K., Goto Y., Nonaka I., Hayashi JI. Generation of mice with mitochondrial dysfunction by introducing mouse mtDNA carrying a deletion into zygotes. *Nat Genet* 2000, 26:176-181.
- <sup>25</sup> Ueki I., Koga Y., Povalko N., Akita Y., Nishioka J., Yatsuga S., Fukiyama., Matsuishi T. Mitochondrial tRNA gene mutations in patients havind mitochondrial disease with lactic acidosis. *Mitochondrion* 2006, 6:29-36.
- <sup>26</sup> Yoon K.L., Aprille J.R., Ernst S.G. Mitochondrial tRNA<sup>Thr</sup> mutation in fatal infantile respiratory enzyme deficiency. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1991, 176(3):1112-1115.
- <sup>27</sup> Ozawa T., Tanaka M., Sugiyama S., Ino H., Ohno K., Hattori K., Ohbayashi T., Ito T., Daguchi H., Kawamura K. Patients with idiopathic cardiomyopathy belong to the same mitochondrial DNA gene family of Parkinson's disease and mitochondrial encephalopathy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1991, 177(1):518-525.
- <sup>28</sup> Brown M.D., Torroni A., Shoffner J.M, WallaceD.C. Mitochondrial tRNA<sup>Thr</sup> mutations and lethal infantile mitochondrial myopathy. *Am. J. Hum. Genet.* 1992, 51(2):446-447.
- <sup>29</sup> Vilmi T., Moilanen J.S., Finnila S., Majamaa K. Sequence Variation in the tRNA Genes of Human Mitochondrial DNA. *Mol. Evol.* 2005, 60:587-597.
- <sup>30</sup> Yeh1 J.J., Lunetta K.L., Orsouw N.J., Moore Jr F.D., Mutter G.L, Vijg J., Dahia P. LM and Eng C. Somatic mitochondrial DNA (mtDNA) mutations in papillary thyroid carcinomas and differential mtDNA sequence variants in cases with thyroid tumours. *Oncogene* 2000, 19:2060-2066.



- 
- <sup>31</sup> Ling-Juan Pang, Jian-Yong Shao, Xiao-Man Liang, Yun-Fei Xia and Yi-Xin Zeng.. Mitochondrial DNA somatic mutations are frequent in nasopharyngeal carcinoma. *Landes Bioscience* 2008, 7(2):198-207.
- <sup>32</sup> Da Pozzo, P., Cardaioli, E., Radi, E., Federico, A. (2004) "Sequence analysis of the complete mitochondrial genome in patients with mitochondrial encephalomyopathies lacking the common pathogenic DNA mutations " *Biochemical and Biophysical Research Communications* . 324 (1): 360-364 .
- <sup>33</sup> Ruppert, V., Nolte, D., Aschenbrenner, T., Pankuweit, S., Funck, R., Maisch, B. (2004) "Novel point mutations in the mitochondrial DNA detected in patients with dilated cardiomyopathy by screening the whole mitochondrial genome " *Biochemical and Biophysical Research Communications* . 318 (2): 535-543
- <sup>34</sup> Scaglia F., H. Vogel, E.P. Hawkins, G.D. Vladutiu, L.L. Liu, L.J.C. Wong. Novel homoplasmic mutation in the mitochondrial tRNA<sup>Tyr</sup> gene associated with atypical mitochondrial cytopathy presenting with focal segmental glomerulosclerosis. *Med Genet* 2003, 123A(2):172-178.
- <sup>35</sup> Khaled K. Abu-Amero, Bosley T.M., Morales J. Analysis of nuclear and mitochondrial genes in patients with pseudoexfoliation glaucoma. *Molecular Vision* 2008, 14:29-36.
- <sup>36</sup> Sternberg D., Chatzoglou E., Laforet P., Fayet G., Jardel C., Blondy P., Fardeau M., Amselem S., Eymard B., Lombes A. Mitochondrial DNA transfer RNA gene sequence variations in patients with mitochondrial disorders. *Brain* 2001, 124:984-994.
- <sup>37</sup> Herawati Sudoyo, Helena Suryadi, Patcharee Lertrit, Patcharin Pramoongjago, Diana Lyrawati, Sangkot Marzuki. Asian-specific mtDNA backgrounds associated with the primary G11778A mutation of Leber's hereditary optic neuropathy. *J Hum Genet* 2002, 47:594-604.
- <sup>38</sup> Noer, Sudoyo, Lertrit, Thyagarajan, Utthanaphol, Kapsa, Byrnet, Marzuki. A tRNA<sup>Lys</sup> Mutation in the mtDNA Is the Causal Genetic Lesion Underlying Myoclonic Epilepsy and Ragged-Red Fiber (MERRF) Syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* 1991, 49:715-722.
- <sup>39</sup> An-a Kazuno, Kae Munakata, Takeharu Nagai, Satoshi Shimoazono, Masashi Tanaka, Makoto Yoneda, Nobumasa Kato, Atsushi Miyawaki, Tadafumi Kato. Identification of Mitochondrial DNA Polymorphisms That Alter Mitochondrial Matrix pH and Intracellular Calcium Dynamics. *PLoS Genetics* 2006, 2(8):1167-1177.
- <sup>40</sup> Herawati Sudoyo, Helena Suryadi, Patcharee Lertrit, Patcharin Pramoongjago, Diana Lyrawati, Sangkot Marzuki. Asian-specific mtDNA backgrounds associated with the primary G11778A mutation of Leber's hereditary optic neuropathy. *J Hum Genet* 2002, 47:594-604.
- <sup>41</sup> Kim M. Clark, Robert W. Taylor, Margaret A. Johnson, Patrick F. Chinnery, Zofia M.A. Chrzanowska-Lightowlers, Richard M. Andrews, Isobel P. Nelson, Nicholas W. Wood, Phillipa J. Lamont, Michael G. Hanna, Robert N. Lightowlers, and Douglass M. Turnbull. An mtDNA Mutation in the Initiation Codon of the Cytochrome C Oxidase Subunit II Gene Results in Lower Levels of the Protein and a Mitochondrial Encephalomyopathy. *Am. J. Hum. Genet.* 1999, 64:1330-1339.
- <sup>42</sup> Carlos T. Moraes, Federica Ciacci, Eduardo Bonilla, Christopher Jansen, Michio Hirano, Nagbhushan Rao, Robert E. Lovelace, Lewis P. Rowland, Eric A. Schon, Salvatore DiMauro. Two Novel Pathogenic Mitochondrial DNA Mutations Affecting Organelle Number and Protein Synthesis Is the tRNA<sup>LU(UUR)</sup> Gene an Etiologic Hot Spot? 1993, 92:2906-2915



