

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΤΟΜΕΑΣ ΝΕΥΡΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΔΙΣΘΗΤΗΡΙΩΝ ΟΡΓΑΝΩΝ  
ΟΦΘΑΛΜΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ  
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΕΠΙΚ. ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΕΥΑΓΓΕΛΙΑ ΤΣΙΡΩΝΗ

## **ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΟΙΚΟΓΕΝΩΝ ΜΟΡΦΩΝ ΒΛΕΦΑΡΟΠΤΩΣΗΣ**

**ΔΗΜΗΤΡΑΣ ΚΑΦΕΤΣΟΥΛΗ**  
**ΙΑΤΡΟΥ**

ΥΠΟΒΛΗΘΗΚΕ ΣΤΟ ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ  
ΤΗΣ ΣΧΟΛΗΣ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΛΑΡΙΣΑ 2009

«Η έγκριση της Διδακτορικής Διατριβής από την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας  
δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα»

(Νόμος 5343/32, άρθρο 202 παρ. 2)

## **ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

Δημήτριος Χατζούλης	Καθηγητής Οφθαλμολογίας
Γεώργιος Χατζηγεωργίου	Αναπλ. Καθηγητής Νευρολογίας
Ευαγγελία Τσιρώνη	Επίκ. Καθηγήτρια Οφθαλμολογίας

## **ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ**

Χατζούλης Δημήτριος	Καθηγητής Οφθαλμολογίας
---------------------	-------------------------

## **ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

Δημήτριος Χατζούλης	Καθηγητής Οφθαλμολογίας
Γεώργιος Χατζηγεωργίου	Αναπλ. Καθηγητής Νευρολογίας
Ευαγγελία Τσιρώνη	Επίκ. Καθηγήτρια Οφθαλμολογίας
Αλέξανδρος Παπαδημητρίου	Καθηγητής Νευρολογίας
Π.Α Μολυβδάς	Καθηγητής Φυσιολογίας
Ασπασία Τσέζου	Επίκ. Καθηγήτρια Ιατρικής Γενετικής
Γεώργιος Κουκούλης	Αναπλ. Καθηγητής Παθολογίας-Ενδοκρινολογίας

*Στους γονείς μου,  
Αντώνη και Χριστίνα*

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Με την ολοκλήρωση της παρούσας διατριβής, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον Καθηγητή Οφθαλμολογίας κ. Δημήτριο Χατζούλη για την εμπιστοσύνη του και τη στήριξη στην πραγματοποίηση του παρόντος ερευνητικού έργου.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την Επίκ. Καθηγήτρια Οφθαλμολογίας κ. Ευαγγελία Τσιρώνη για τον πολύτιμο χρόνο που διέθεσε, την υπομονή, τις εύστοχες παρατηρήσεις της και για την αμέριστη βοήθειά που πρόθυμα διέθεσε όποτε χρειάστηκε.

Επίσης θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές ευχαριστίες και την ευγνωμοσύνη μου στον Αναπλ. Καθηγητή κ. Γεώργιο Χατζηγεωργίου για τη συμπαράσταση, τις συμβουλές, τη πολύτιμη καθοδήγηση και την καθοριστική του συνεισφορά στην ολοκλήρωση της παρούσας διατριβής, η οποία δε θα είχε αυτό το αποτέλεσμα χωρίς τη συμβολή του.

Ευχαριστώ επίσης τον Επίκ. Καθηγητή Οφθαλμολογίας κ. Κωνσταντίνο Καραμπάτσα για τη συμβολή του στα αρχικά στάδια του ερευνητικού μου έργου.

Θα ήθελα ακόμα να ευχαριστήσω τη βιολόγο και φίλη μου Νατάσα Γαρουφαλή για τις πολύτιμες παρατηρήσεις της και την αμέριστη βοήθειά της. Ευχαριστώ τη γραμματέα του Οφθαλμολογικού τμήματος Κατερίνα Σατήρα για τον άψογο επαγγελματισμό της και την ουσιαστική της βοήθεια σε θέματα γραφειοκρατίας και όχι μόνο.

Τη φίλη μου Νευρολόγο Βανέσσα Γκουρμπαλή ευχαριστώ για τη συμβολή της στα πρώτα στάδια της εργαστηριακής μου εμπειρίας.

Θα ήθελα να εκφράσω τις θερμότερες ευχαριστίες μου στα μέλη των οικογενειών που έλαβαν μέρος στην παρούσα έρευνα, χωρίς τη συμβολή και την εμπιστοσύνη των οποίων δε θα ήταν δυνατή η ολοκλήρωσή της.

Τέλος ευχαριστώ τον σύζυγό μου Bobby για την αγάπη, την κατανόηση και την υπομονή του και τον γιό μου Ριάζ-Αντώνη, το δικό μου πρωινό άστρο.

Η παρούσα διατριβή αφιερώνεται στην αγαπημένη μνήμη του πατέρα μου Αντώνη, Χειρουργού Ουρολόγου που αποτελεί για μένα πρότυπο ανθρώπου, γονιού και ιατρού και στη μητέρα μου Χριστίνα για την άοκνη στήριξή της σαν ελάχιστος φόρος τιμής σε όσα μου έχουν προσφέρει.

## **ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ**

**ME:** Μιτοχονδριακές εγκεφαλομυοπάθειες

**CPEO** (Chronic progressive external ophthalmoplegia): χρόνια προοδευτική  
εξωτερική οφθαλμοπληγία

**mtDNA** (mitochondrial DNA): μιτοχονδριακό DNA

**nDNA** (nuclear DNA): πυρηνικό DNA

**MNGIE** (Myoneurogastrointestinal encephalopathy): μιτοχονδριακή  
νευρογαστρεντερική εγκεφαλομυοπάθεια

**AD-CPEO** (autosomal dominant CPEO): αυτοσωμική επικρατής CPEO

**AR-CPEO** (autosomal recessive CPEO): αυτοσωμική υπολειπόμενη CPEO

**PCR** (polymerase chain reaction): αλυσωτή αντίδραση πολυμεράσης

## ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΟΙΚΟΓΕΝΩΝ ΜΟΡΦΩΝ ΒΛΕΦΑΡΟΠΤΩΣΗΣ

### ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

<b>ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b> .....	3
<b>A. ΣΚΟΠΟΣ</b> .....	3
<b>B. ΒΛΕΦΑΡΑ</b> .....	4
1. <b>ΑΝΑΤΟΜΙΑ ΤΩΝ ΒΛΕΦΑΡΩΝ</b> .....	4
2. <b>ΜΥΕΣ ΤΩΝ ΒΛΕΦΑΡΩΝ</b> .....	10
3. <b>ΑΙΤΙΑ ΒΛΕΦΑΡΟΠΤΩΣΗΣ</b> .....	13
<b>Γ. ΧΡΟΝΙΑ ΠΡΟΟΔΕΥΤΙΚΗ ΕΞΩΤΕΡΙΚΗ ΟΦΘΑΛΜΟΠΛΗΓΙΑ</b> .....	16
<b>Δ. ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΕΣ ΕΓΚΕΦΑΛΟΜΥΟΠΑΘΕΙΕΣ (ΜΕ)</b> .....	19
1. <b>ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑ</b> .....	20
Δομή των μιτοχονδρίων.....	20
Το μιτοχονδριακό DNA (mtDNA).....	25
Φαινόμενο ουδού.....	27
Συσσωρευση (Segregation).....	28
2. <b>ΚΑΤΗΓΟΡΙΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΩΝ ΕΓΚΕΦΑΛΟΜΥΟΠΑΘΕΙΩΝ</b> .....	31
<b>POLG</b> .....	38
<b>POLG2</b> .....	40
<b>ANT1 (Adenine Nucleotide Translocator 1)</b> .....	40
<b>TWINKLE (C10orf2) ή PEO1</b> .....	42
<b>ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b> .....	45
<b>A. ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ</b> .....	45
Αλυσωτή αντίδραση πολυμεράσης, <i>Polymerase Chain Reaction (PCR)</i> ..	45
Πολυμορφισμός μήκους θραύσματος .....	56
Αποτύπωση κατά <i>Southern</i> ( <i>Southern Blotting</i> ) .....	58
Προσδιορισμός αλληλουχίας ( <i>DNA Sequencing</i> ) .....	62
<b>B. ΥΛΙΚΟ</b> .....	65
<b>Γ. ΜΕΘΟΔΟΙ</b> .....	66
1) Ιστορικό ασθενούς/Κλινική εξέταση .....	66
2) Οικογενειακά δέντρα/Φωτογραφίες .....	70
3) Λήψη αίματος με σκοπό την απομόνωση πυρηνικού DNA.....	82
4) Λήψη δείγματος μυός (δελτοειδή μυ) από πάσχοντα μέλη.....	83

5) Διαχωρισμός επικρατών και υπολειπομένων χαρακτήρων ( <i>Segregation study</i> ) .....	83
<b>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b> .....	84
<b>ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b> .....	90
<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b> .....	105
<b>SYNOPSIS</b> .....	107
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ</b> .....	110



# ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΟΙΚΟΓΕΝΩΝ ΜΟΡΦΩΝ ΒΛΕΦΑΡΟΠΤΩΣΗΣ

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### A. ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας μελέτης, είναι η ιστολογική και γενετική διερεύνηση Ελλήνων ασθενών της περιοχής της Θεσσαλίας με οικογενή μορφή βλεφαρόπτωσης ή εξωτερικής οφθαλμοπληγίας, στους οποίους έχει αποκλειστεί το ενδεχόμενο υποκλινικής μορφής μυασθένειας, με σκοπό την αναζήτηση συμμετοχής μιτοχονδριακών και πυρηνικών γονιδίων της αναπνευστικής αλυσού. Είναι η πρώτη φορά που οικογένειες από την περιοχή της Θεσσαλίας με πάσχοντα μέλη από βλεφαρόπτωση ή εξωτερική οφθαλμοπληγία υποβάλλονται σε τόσο λεπτομερή κλινικό, ιστολογικό, ιστοχημικό και γενετικό έλεγχο με σκοπό την διερεύνηση και καταγραφή τυχόν μεταλλάξεων σε γονίδια που σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία εμπλέκονται στην παθογένεια της χρόνιας προοδευτικής εξωτερικής οφθαλμοπληγίας.

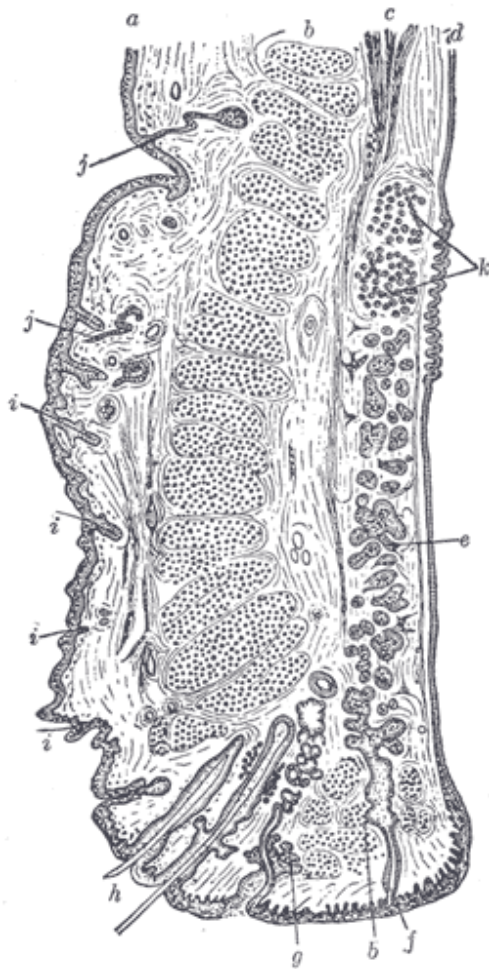
## **B. ΒΛΕΦΑΡΑ**

### **1. ΑΝΑΤΟΜΙΑ ΤΩΝ ΒΛΕΦΑΡΩΝ**

Τα βλέφαρα, είναι δύο λεπτές, ευκίνητες πτυχές του δέρματος, μηννοειδούς σχήματος, που βρίσκονται μπροστά από τους οφθαλμούς. Ο βασικός τους ρόλος είναι να προστατεύουν τους οφθαλμούς από εξωτερικούς βλαπτικούς παράγοντες καθώς και από το έντονο φως με το κλείσιμό τους. Επίσης βοηθούν στη διασπορά του δακρυϊκού φιλμ σε όλη τη πρόσθια επιφάνεια του οφθαλμικού βολβού.<sup>1, 2,3</sup>

Κάθε βλέφαρο χωρίζεται μέσω μίας οριζόντια πτυχής, τη βλεφαρική αύλακα, σε δύο μέρη, το βολβικό και το ταρσικό. Η αύλακα του άνω βλεφάρου σχηματίζεται από την διείσδυση στο δέρμα των απονευρωτικών ινών του ανελκτήρα μυός του βλεφάρου. Η αύλακα του κάτω βλεφάρου, που είναι λιγότερο εμφανής, σχηματίζεται από λίγες συνδέσεις μεταξύ του δέρματος και του σφιγκτήρα μυός του βλεφάρου. Το άνω βλέφαρο είναι μεγαλύτερο και με μεγαλύτερη κινητικότητα από το κάτω.

Όταν ο οφθαλμός είναι κλειστός, το άνω βλέφαρο καλύπτει πλήρως τον κερατοειδή. Όταν ο οφθαλμός είναι ανοιχτός στην πρωτεύουσα θέση, το άνω βλέφαρο μόλις καλύπτει το άνω όριο του κερατοειδούς, περίπου 1,5-2mm από το σκληροκερατοειδές όριο, ενώ το κάτω βλέφαρο βρίσκεται ακριβώς κάτω από τον κερατοειδή ή περίπου 1mm πάνω από το σκληροκερατοειδές όριο. Με το κλείσιμο του οφθαλμού το κάτω βλέφαρο ανυψώνεται ελάχιστα. Η μεταξύ τους φυσιολογική απόσταση είναι 7-10mm στους άνδρες και 8-12mm στις γυναίκες. Το κάθε ελεύθερο βλεφαρικό χείλος έχει πάχος περίπου 2mm και μήκος περίπου 30mm.



Εικ. 1 Κάθετη τομή του άνω βλεφάρου<sup>2</sup>

a)Δέρμα, b)Σφιγκτήρας μυς, c)Ανεκτήρας μυς του βλεφάρου, d) Επιπεφυκότας, e)Ταρσός, f)Ταρσικός αδένας, g)Σμηγματογόνος αδένας, h)Βλεφαρίδες, i)Μικρές τρίχες του δέρματος. Ίδρωτοποιί αδένες, k)Οπίσθιοι ταρσικοί αδένες .

Ξεκινώντας από την εξωτερική επιφάνεια και προς την εσωτερική, τα βλέφαρα αποτελούνται από τα εξής ανατομικά στοιχεία (Εικ.1):

- 1.δέρμα
- 2.υποδόριος ιστός
- 3.γραμμωτές ίνες του σφιγκτήρα μύος του βλεφάρου
4. υπομυϊκό στρώμα
- 5.κογχικό διάφραγμα και ταρσικά πτέαλα

6.λείες μυϊκές ίνες

7.επιπεφυκότας

Στο άνω βλέφαρο βρίσκεται επίσης η κατάφυση του ανελκτήρα μυός του βλεφάρου.

Το **δέρμα** των βλεφάρων είναι εξαιρετικά λεπτό και πολύ εύκολα δημιουργεί πτυχές. Σε μία μικροσκοπική εξέταση φαίνονται πολλές μικρές τρίχες με ιδρωτοποιούς και σμηγματογόνους αδένες. Η επιδερμίδα περιέχει αρκετά μελανοκύτταρα. Στο χείλος του βλεφάρου το χόριο γίνεται πιο πυκνό και οι θηλές είναι υψηλότερες. Το δέρμα συνεχεται με τον επιπεφυκότα ακριβώς μπροστά από το οπίσθιο όριο του βλεφαρικού χείλους, στο σημείο που βρίσκονται τα στόμια των αδένων του ταρσού (μειβομιοανοί αδένες). Το δέρμα φέρει τις βλεφαρίδες οι οποίες βρίσκονται στο ελεύθερο βλεφαρικό χείλος και δεν έχουν ανορθωτήρες μύες. Είναι κοντές, παχιές, κυρτές τρίχες οργανωμένες σε διπλές ή τριπλές γραμμές. Αυτές του άνω βλεφάρου είναι περισσότερες (περίπου 150) και μακρύτερες από αυτές του κάτω βλεφάρου (περίπου 75) και κυρτές προς τα επάνω. Οι βλεφαρίδες του κάτω βλεφάρου είναι κυρτές προς τα κάτω έτσι ώστε να μη διασταυρώνονται κατά το κλείσιμο των βλεφάρων. Κοντά στις προσφύσεις των βλεφαρίδων βρίσκονται τα στόμια των βλεφαρικών αδένων του Moll, που βρίσκονται παρατεταγμένοι σε αρκετές σειρές κοντά στο ελεύθερο βλεφαρικό χείλος. Οι σμηγματογόνοι αδένες του Zeis εκβάλουν στους θύλακες των βλεφαρίδων.

Ο **υποδόριος ιστός** είναι πολύ χαλαρός και εύθραυστος συνδετικός ιστός και είναι πλούσιος σε ελαστικές ίνες. Πολύ σπάνια περιέχει λίπος.

Οι **γραμμωτές ίνες τού βλεφαρικού τμήματος του σφιγκτήρα μυός**, είναι λεπτές, ανοιχτόχρωμες και εκφύονται από τον έσω βλεφαρικό σύνδεσμο, καθώς και από το γειτονικό οστό. Ο σφιγκτήρας μυς περιγράφεται λεπτομερώς παρακάτω με τους υπόλοιπους μύες των βλεφάρων.

Το **υπομυϊκό στρώμα** είναι συνέχεια του αντίστοιχου στρώματος που υπάρχει κάτω από την κρανιακή απονεύρωση. Τα νεύρα που νευρώνουν τα βλέφαρα πορεύονται μέσα σ' αυτό το υπομυϊκό στρώμα.

Το **κογχικό διάφραγμα και τα ταρσικά πέταλα** αποτελούν το ινώδες πλαίσιο του βλεφάρου.

Το **κογχικό διάφραγμα** είναι ένας μεμβρανώδης υμένας συνδετικού ιστού, που προσφύεται στο όριο του οφθαλμικού κόγχου και είναι συνεχόμενος με το περίοστεο. Το κογχικό διάφραγμα διαχωρίζει τα βλέφαρα από το περιεχόμενο του κογχικής κοιλότητας. Εσωτερικά είναι λεπτό και βρίσκεται πίσω από τον έσω βλεφαρικό σύνδεσμο, ενώ προσφύεται στο δακρυϊκό οστό ακριβώς πίσω από τον δακρυϊκό σάκο. Στην εξωτερική πλευρά βρίσκεται πίσω από την έξω ραφή του σφιγκτήρα μυός, αλλά μπροστά από τον έξω βλεφαρικό σύνδεσμο. Το κογχικό διάφραγμα διαπερνάται από νεύρα και αγγεία που εξέρχονται από τον οφθαλμικό κόγχο και φτάνουν στο πρόσωπο και το κρανίο, καθώς και από τις απονευρωτικές ίνες του ανελκτήρα μυός και το βλεφαρικό τμήμα του δακρυϊκού αδένου. Μέσα στα βλέφαρα το κογχικό διάφραγμα γίνεται πιο παχύ και σχηματίζει τα ταρσικά πέταλα.

Τα **ταρσικά πέταλα** αποτελούνται από πυκνό ινώδη ιστό και προσδίδουν στα βλέφαρα σταθερότητα και σχήμα. Το ταρσικό πέταλο του άνω βλεφάρου είναι κατά πολύ μεγαλύτερο από αυτό του κάτω βλεφάρου και έχει ελλειψοειδές σχήμα. Έχει ύψος περίπου 10mm στο κέντρο και σταδιακά μικραίνει προς τα άκρα. Στο άνω άκρο του ενώνεται με το κογχικό διάφραγμα και τις λείες μυϊκές ίνες του ανελκτήρα μυός. Το ταρσικό πέταλο του κάτω βλεφάρου είναι μικρότερο, με ύψος περίπου στα 5mm στο κέντρο του και επίσης μικραίνει σταδιακά προς τα άκρα του. Στο κατώτερο άκρο του ενώνεται επίσης με το κογχικό διάφραγμα. Η εξωτερική γωνία των ταρσικών πετάλων προσφύεται στο ζυγωματικό οστό με την εξωτερική βλεφαρική ραφή. Η εσωτερική γωνία των πετάλων καταλήγει στην δακρυϊκή ακρολοφία και προσφύεται στη μετωπιαία απόφυση της άνω γνάθου με τον έσω βλεφαρικό σύνδεσμο.

Οι Μείβομιοι αδένες του ταρσού (Meibomian glands) βρίσκονται στην εσωτερική επιφάνεια των βλεφάρων μεταξύ του ταρσού και του επιπεφυκότα. Είναι ταξινομημένοι σε μονή σειρά (περίπου 30-40 στο άνω βλέφαρο και 20-30 στο κάτω βλέφαρο). Σε αναστροφή του βλεφάρου μπορούν εύκολα να διακριθούν μέσα από τον επιπεφυκότα. Είναι τροποποιημένοι σμηγματογόνοι αδένες και αποτελούνται από έναν μακρύ κεντρικό πόρο που περιβάλλεται από 10-15 λόβια. Το κανάλι υποστηρίζεται από βασική μεμβράνη. Τα στόμια των πόρων είναι επιστρωμένα με πολύστιβο πλακώδες επιθήλιο ενώ τα κύτταρα των αδενοκυψελών είναι πολυεδρικά κύτταρα. Οι εκκρίσεις των ταρσικών αδένων είναι ελαιώδεις σε σύσταση και εμποδίζουν την υπερχειλίση των δακρύων. Επίσης βοηθούν στο ερμητικό κλείσιμο των οφθαλμών. Αυτό το ελαιώδες υλικό σχηματίζει την εξωτερική επιφάνεια της δακρυϊκής στοιβάδας μπροστά από τον κερατοειδή και εμποδίζει την γρήγορη εξάτμιση των δακρύων.

Οι **Λείες μυϊκές ίνες** σχηματίζονται από τους άνω και κάτω ταρσιαίους μύες. Ο άνω ταρσιαίος μυς είναι συνεχόμενος στο άνω μέρος του με τον ανελκτήρα μυ και στο κάτω μέρος του ενώνεται με το άνω άκρο του ταρσικού πετάλου του άνω βλεφάρου. Η λειτουργία του άνω ταρσιαίου μυός είναι η ανόρθωση του άνω βλεφάρου και η συνέργεια με τη γραμμωτή μοίρα του ανελκτήρα μυός. Ο κάτω ταρσιαίος μυς προσφύεται στο κάτω όριο του κάτω ταρσικού πετάλου και το συνδέει με την περιτονία του κάτω ορθού μυός. Η λειτουργία του κάτω ταρσικού μυός είναι η κατάσπασση του κάτω βλεφάρου. Οι δύο ταρσικοί μύες νευρώνονται από συμπαθητικές ίνες του άνω αυχενικού γαγγλίου.

Ο **επιπεφυκότας** είναι μία λεπτή βλεννώδης μεμβράνη. Καλύπτει την εσωτερική πλευρά των βλεφάρων και ανακάμπτει στο άνω και κάτω κόλπωμα καλύπτοντας το μπροστινό μέρος του βολβού. Έτσι καλύπτει μέρος του σκληρού χιτώνα, ενώ το επιθήλιο του είναι συνεχόμενο με αυτό του κερατοειδούς. Στο βλεφαρικό χείλος ο επιπεφυκότας συνεχίζει μέσα στο δέρμα κατά το οπίσθιο όριο των στομιών των ταρσικών αδένων. Σε αυτό το σημείο το λεπτό μη κερατινοποιημένο πλακώδες επιθήλιο του επιπεφυκότα μετατρέπεται σε κερατινοποιημένο πολύστιβο πλακώδες επιθήλιο της επιδερμίδας. Στο πίσω

μέρος του βλεφάρου, περίπου 2mm από το οπίσθιο όριο του χείλους του, ο επιπεφυκότας σχηματίζει την υποταρσική αύλακα. Η αύλακα είναι κλινικά σημαντική γιατί εκεί συνήθως παγιδεύονται μικρά ξένα σώματα που εισβάλλουν στον σάκο του επιπεφυκότα. Ο επιπεφυκότας που καλύπτει την εσωτερική πλευρά των βλεφάρων είναι υπεύθυνος για το ελαφρά ερυθρό χρώμα τους εξ αιτίας της έντονης αιμάτωσης του. Ο επιπεφυκότας που καλύπτει το άνω ταρσικό πέταλο είναι σταθερά προσκολλημένος σε αυτό. Ο επιπεφυκότας που καλύπτει το κάτω ταρσικό πέταλο είναι προσκολλημένος μόνο στο άνω μισό.

## 2. ΜΥΕΣ ΤΩΝ ΒΛΕΦΑΡΩΝ

Στους μύες των βλεφάρων συγκαταλέγονται: α) ο σφιγκτήρας μυς των βλεφάρων β) ο επισκήνιος ή μονήρης πυραμοειδής μυς γ) ο ανελκτήρας μυς του άνω βλεφάρου.

Ο **σφιγκτήρας μυς του βλεφάρου** εκφύεται από το ρινικό τμήμα του μετωπιαίου οστού, από τη μετωπιαία απόφυση της άνω γνάθου και από την άνω επιφάνεια και τα όρια του έσω βλεφαρικού σύνδεσμου. Είναι ένας επίπεδος, ελλειπτικού σχήματος μυς που περιβάλλει το κογχικό χείλος εκτεινόμενος προς την κροταφική περιοχή και την παρειά (κογχική μοίρα). Επίσης εισδύει εντός των βλεφάρων (βλεφαρική μοίρα) καθώς και όπισθεν του δακρυϊκού ασκού (δακρυϊκή μοίρα). Αποτελείται από γραμμωτές μυϊκές ίνες.

Η κογχική μοίρα του μυός είναι λεπτή και ωχρή, εκφύεται από τον έσω βλεφαρικό σύνδεσμο σχηματίζει μία σειρά από ομόκεντρες καμπύλες και προσφύεται στην έξω βλεφαρική ραφή. Η βλεφαρική μοίρα είναι παχύτερη και έχει ερυθρό χρώμα. Οι μυϊκές ίνες έχουν πλήρες ελλειπτικό σχήμα χωρίς καμία διακοπή στον έξω κανθό. Οι άνω ίνες αυτού του τμήματος ενσωματώνονται με τον μετωπιαίο μυ και τον επισκήνιο μυ. Στο βλεφαρικό χείλος υπάρχει μία μικρή ομάδα λεπτών μυϊκών ινών γνωστή ως βλεφαριδικός μυς. Η δακρυϊκή μοίρα του σφιγκτήρα μυός είναι ένας μικρός και λεπτός μυς γύρω στα 6mm σε πάχος και 12mm σε μήκος. Βρίσκεται πίσω από τον έσω βλεφαρικό σύνδεσμο και τον δακρυϊκό σάκο. Ο έσω βλεφαρικός σύνδεσμος έχει περίπου 4mm μήκος και 2mm πάχος, προσφύεται στη μετωπιαία απόφυση της άνω γνάθου μπροστά από τη δακρυϊκή αύλακα. Καθώς διασχίζει το δακρυϊκό σάκο χωρίζεται σε δύο μέρη, κάθε ένα από τα οποία προσφύεται στην έσω πλευρά των αντίστοιχων ταρσών. Η δράση της βλεφαρικής μοίρας του σφιγκτήρα μυός είναι το μαλακό κλείσιμο των βλεφάρων όπως κατά τη διάρκεια του ύπνου ή κατά το βλεφαρισμό. Τα βλέφαρα κλείνουν με τρόπο ώστε το άνω βλέφαρο να κατέρχεται και το κάτω βλέφαρο να ανυψώνεται. Η δράση αυτή μπορεί να είναι τόσο ακούσια όσο και



εκούσια. Με τον βλεφαρισμό εξασφαλίζεται η διαβροχή της επιφάνειας του κερατοειδούς.

Ο **επισκηνίος ή μονήρης πυραμοειδής μυς** είναι ένας μικρός στενός μυς πυραμιδικού σχήματος που βρίσκεται στο έσω άκρο του όφρυος, κάτω από τον μετωπιαίο μυ και τον σφιγκτήρα μυ του βλεφάρου. Εκφύεται από το έσω άκρο του υπερόφρυου τόξου. Οι ίνες του προχωρούν προς τα άνω και έξω μεταξύ της κογχικής και βλεφαρικής μοίρας του σφιγκτήρα μυός. Προσφύεται στη βαθύτερη επιφάνεια του δέρματος πάνω από τη μέση του κογχικού τόξου.

Ο σφιγκτήρας μυς και ο επισκηνίος μυς νευρώνονται από κροταφικούς και ζυγωματικούς κλάδους του προσωπικού νεύρου.

Ο **ανεκκτήρας μυς του βλεφάρου** είναι ένας λεπτός, επίπεδος και τριγωνικού σχήματος γραμμωτός μυς. Το μήκος του είναι περίπου 40mm και ξεκινάει από την ελάσσονα πτέρυγα του σφηνοειδούς οστού, άνω και μπροστά από το οπτικό τρήμα από το οποίο διαχωρίζεται από την πρόσφυση του άνω ορθού μυός. Στην αρχή είναι στενός και τενοντώδης, όμως πολύ σύντομα γίνεται πλατύς και πιο 'μυώδης'. Ο καταφυτικός τένοντας του μυός είναι μία πλατιά απονεύρωση, που κατέρχεται εντός του άνω βλεφάρου και χωρίζεται σε τρεις μοίρες. Η πιο επιφανειακή εισχωρεί στο άνω τμήμα του κογχικού διαφράγματος και στη συνέχεια προεκτείνεται μπροστά, πάνω από τον άνω ταρσό, στο βλεφαρικό τμήμα του σφιγκτήρα μυός και στην βαθιά επιφάνεια του δέρματος του άνω βλεφάρου. Η μέση μοίρα εισέρχεται στο άνω όριο του άνω ταρσού. Η πιο έσω μοίρα ενώνεται με μία επέκταση της περιτονίας του άνω ορθού μυός και με αυτή ενώνεται στο άνω κόλπωμα του επιπεφυκότος. Η απονεύρωση του ανεκκτήρα είναι πολύ πιο ευρεία από τη γαστέρα του μυός. Η προς τα έσω και έξω επέκταση της απονεύρωσης ονομάζονται έσω και έξω κέρας. Το έξω (πλάγιο) κέρας εγκόπτει τα δακρυϊκό αδένες με τρόπο ώστε ο τελευταίος να περιβάλλει το έξω χείλος της απονεύρωσης. Το πλάγιο κέρας καταφύεται στο πλάγιο φύμα του ζυγωματικού οστού μαζί με τον έξω βλεφαρικό σύνδεσμο. Το έσω κέρας συγχωνεύεται με το κογχικό διάφραγμα και τον έσω κανθικό σύνδεσμο. Οι καταφύσεις του έσω και έξω κέρατος ελέγχουν τη δράση του

ανεκκτήρα μυός του βλεφάρου. Από την άνω επιφάνεια της απονεύρωσης ορμάται ένα στρώμα συνδετικού ιστού το οποίο ανέρχεται πίσω από το κογχικό διάφραγμα για να καταλήξει στο χείλος του κόγχου προσφυόμενο στο περιόστεο. Η κύρια γραμμωτή μοίρα του ανεκκτήρα μυός νευρώνεται από τον άνω κλάδο του κοινού κινητικού νεύρου. Η δράση του ανεκκτήρα μυός είναι η ανύψωση του άνω βλεφάρου.

### 3. ΑΙΤΙΑ ΒΛΕΦΑΡΟΠΤΩΣΗΣ<sup>4,5</sup>

Η φυσιολογική θέση του άνω βλεφάρου σε έναν ενήλικα, όταν ο οφθαλμός βρίσκεται στην πρωτεύουσα θέση, είναι περίπου 1,5mm κάτω από το άνω σκληροκερατοειδές όριο. Ως βλεφαρόπτωση, ή πτώση βλεφάρου, περιγράφεται η ασυμμετρία στο ύψος των άνω βλεφάρων (ετερόπλευρη πτώση βλεφάρου) ή η συμμετρική μείωση του φυσιολογικού ύψους των άνω βλεφάρων (αμφοτερόπλευρη πτώση βλεφάρου).

Ανάλογα με την ηλικία εμφάνισης, η πτώση βλεφάρου μπορεί να είναι συγγενής ή επίκτητη. Συγγενής ονομάζεται η πτώση βλεφάρου, η οποία εμφανίζεται από τη γέννηση ή και κατά τη διάρκεια του πρώτου χρόνου ζωής του παιδιού. Ανάλογα με την αιτιολογία η βλεφαρόπτωση ταξινομείται σε μυογενή, απονευρωτική, νευρογενή, μηχανική και τραυματική. Η πιο συχνή αιτία συγγενούς πτώσης είναι μυογενής, λόγω κακής λειτουργικότητας του ανελκτήρα μυός. Αυτό συμβαίνει είτε λόγω πάρεσης είτε λόγω μη φυσιολογικής ανάπτυξής του. Η πιο συχνή αιτία επίκτητης βλεφαρόπτωσης είναι η επιμήκυνση ή απόσπαση της απονεύρωσης του ανελκτήρα μυός του βλεφάρου.

#### **Μυογενής πτώση**

Η συγγενής μυογενής πτώση βλεφάρου οφείλεται σε δυσγενεσία του ανελκτήρα μυός. Ιστολογικά ο μυς παρουσιάζει δυστροφία, ενώ οι περισσότερες μυϊκές ίνες έχουν αντικατασταθεί από συνδετικό και λιπώδη ιστό. Λόγω της κακής ανάπτυξης του ο μυς παρουσιάζει μειωμένη λειτουργικότητα και άρα ικανότητα για σύσπαση και χάλαση.

Η επίκτητη μυογενής πτώση βλεφάρου οφείλεται ή σε εντοπισμένη ή σε διάχυτη βλάβη του ανελκτήρα μυός. Οι βλάβες αυτές είναι συνήθως η μυϊκή δυστροφία, η βαρεία μυασθένεια, η χρόνια προοδευτική εξωτερική οφθαλμοπληγία ή η οφθαλμοφαρυγγική δυστροφία.

### **Απονευρωτική πτώση**

Η *συγγενής απονευρωτική* πτώση βλεφάρου οφείλεται σε αποτυχία της απονεύρωσης του ανελκτήρα μυός να φθάσει στην φυσιολογική θέση κατάφυσης, στην πρόσθια επιφάνεια του ταρσού. Το βλέφαρο παρουσιάζει καλή κινητικότητα, ενώ η βλεφαρική αύλακα είναι σε υψηλότερη θέση ή δυσδιάκριτη. Αποτελεί σπάνια μορφή συγγενούς πτώσης.

Η *επίκτητη απονευρωτική* πτώση βλεφάρου οφείλεται σε απόσπαση, διάνοιξη ή λέπτυνση της απονεύρωσης του ανελκτήρα μυός από την φυσιολογική του θέση στην πρόσθια επιφάνεια του ταρσού. Μπορεί να οφείλεται στην ηλικία ή σε κάποια προϋπάρχουσα φλεγμονή. Μπορεί επίσης να εμφανισθεί ή να επιδεινωθεί μια ήδη υπάρχουσα πτώση βλεφάρου μετά από ενδοβόβια εγχείρηση. Στα βλέφαρα με βλάβη της απονεύρωσης, υπάρχει βλεφαρική πτυχή σε υψηλότερη θέση, με φυσιολογική όμως λειτουργικότητα του ανελκτήρα μυός.

### **Νευρογενής πτώση**

Η *συγγενής νευρογενής* πτώση βλεφάρου οφείλεται σε διαταραχή της νεύρωσης κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη. Η διαταραχή αυτή μπορεί να προκληθεί από συγγενή πάρεση του κοινού κινητικού νεύρου. Το σύνδρομο Horner μπορεί επίσης να οδηγήσει σε ελαφρά πτώση που συνοδεύεται από μύση, ανιδρωσία και ελάτωση της χρωστικής στην ίριδα και της θηλής του μαστού σύστοιχα. Το συγγενές σύνδρομο Horner οφείλεται σε διακοπή της συμπαθητικής οδού. Νευρογενής πτώση εμφανίζεται και κατά το φαινόμενο Marcus Gunn jaw winking, που οφείλεται σε παράδοξη σύνδεση του κινητικού κλάδου του τρίδυμου νεύρου με τον ανελκτήρα μυ και είναι υπεύθυνο για το 5% των συγγενών πτώσεων. Σπανιότερα συνοδεύεται με ανώμαλες συνδέσεις με άλλα εγκεφαλικά νεύρα και με το κοινό κινητικό νεύρο. Τα κύρια κλινικά σημεία του φαινομένου είναι η ανέλκυση του πεσμένου βλεφάρου όταν ο ασθενής κάνει κινήσεις μάσησης ή ανοίγει το στόμα ή καταπίνει ή μετακινεί τη σιαγόνα σε αντίθετες κατευθύνσεις. Το

φαινόμενο δεν βελτιώνεται με την ηλικία, αν και οι ασθενείς μαθαίνουν με τον καιρό να το καλύπτουν.<sup>6</sup>

Η *επίκτητη νευρογενής* πτώση βλεφάρου εμφανίζεται μετά από διακοπή της φυσιολογικά αναπτυχθείσης νεύρωσης. Μπορεί να είναι δευτεροπαθής μετά από πάρεση του κοινού κινητικού νεύρου ή μετά από επίκτητο σύνδρομο Horner. Το επίκτητο σύνδρομο Horner μπορεί να οφείλεται σε τραύμα, νεοπλασματική εξεργασία ή αγγειακή νόσο της συμπαθητικής οδού. Στη μορφή αυτή του συνδρόμου δεν εμφανίζεται ο αποχρωματισμός της ίριδας και της θηλής. Άλλο αίτιο επίκτητης νευρογενούς πτώσης βλεφάρου είναι η βαρεία μυασθένεια, λόγω βλάβης της λειτουργικότητας της νευρομυϊκής σύναψης.

### ***Μηχανική πτώση***

Αυτή μπορεί να οφείλεται στην παρουσία κάποιας συγγενούς ανωμαλίας όπως πλεξοειδές νευρίνωμα ή σε κάποιο επίκτητο νεόπλασμα όπως νευρίνωμα ή αιμαγγείωμα. Μπορεί επίσης να οφείλεται σε επίκτητες βλάβες των βλεφάρων όπως δερματοχάλαση ή βλεφαροχάλαση.

### ***Τραυματική πτώση***

Αμβλύ ή οξύ τραύμα της του ανελκτήρα μύος ή και της απονεύρωσης αυτού, μπορεί να οδηγήσει σε πλήρη πτώση. Τραυματική πτώση μπορούμε να έχουμε επίσης μετά από ενδοκογχική ή νευροχειρουργική επέμβαση.

## Γ. ΧΡΟΝΙΑ ΠΡΟΟΔΕΥΤΙΚΗ ΕΞΩΤΕΡΙΚΗ ΟΦΘΑΛΜΟΠΛΗΓΙΑ CHRONIC PROGRESSIVE EXTERNAL OPHTHALMOPLÉGIA (CPEO)

Η αρχική περιγραφή της χρόνιας προοδευτικής εξωτερικής οφθαλμοπληγίας (CPEO), έγινε από τον von Graefe το 1868.<sup>7, 8</sup> Χαρακτηρίζεται από βλεφαρόπτωση, λόγω διαταραχής της λειτουργίας του ανελκτήρα μυός του βλεφάρου<sup>9</sup>, και αδυναμία των εξοφθάλμιων μυών. Η βλεφαρόπτωση συχνά δεν είναι συμμετρική στους δύο οφθαλμούς.<sup>10</sup> Η CPEO αποτελεί την πιο κοινή έκφραση μεταλλάξεων του μιτοχονδριακού DNA (mitochondrial DNA, mtDNA) και μπορεί να εμφανιστεί οποιαδήποτε στιγμή από τη γέννηση έως την έκτη δεκαετία.<sup>11</sup> Οφείλεται συνήθως σε ελλείμματα του mtDNA (40%), μεταλλάξεις στο πυρηνικό DNA (nuclear DNA, nDNA) και σε σημειακές μεταλλάξεις στο mtDNA.<sup>12</sup>

Πρόκειται για ανώδυνη, σταδιακά προοδευτική αδυναμία των εξοφθάλμιων μυών που μπορεί να καταλήξει σε πλήρη ακινησία του οφθαλμού.<sup>8</sup> Για την ακρίβεια η πλειονότητα των ασθενών σπάνια παραπονούνται για διπλωπία και ως επί το πλείστον δεν έχουν προσέξει τον περιορισμό των οφθαλμικών κινήσεων.<sup>13</sup> Ασθενείς με χρόνια προοδευτική εξωτερική οφθαλμοπληγία δεν μπορούν να παράγουν εκούσιες σακκαδικές κινήσεις προς οποιαδήποτε κατεύθυνση, ενώ ο ερεθισμός του αιθουσαίου-οφθαλμικού αντανακλαστικού επίσης αποτυγχάνει να προκαλέσει οφθαλμικές κινήσεις.<sup>14, 15</sup> Χαρακτηριστικό των ασθενών είναι η προς τα πίσω θέση της κεφαλής με το πηγούνι προτεταμένο προς τα επάνω. Η παραπάνω θέση διευκολύνει τους ασθενείς να βλέπουν κάτω από τα πεσμένα βλέφαρα.<sup>9</sup> Η λειτουργία της κόρης παραμένει φυσιολογική.<sup>16</sup>

Παρά το μεγάλο εύρος ηλικίας εμφάνισης της CPEO, όσο πιο μικρή είναι η ηλικία αυτή, τόσο πιο μεγάλη είναι συνήθως η πιθανότητα να συνδέεται με συστηματικές παθήσεις. Η μικρή ηλικία εμφάνισης CPEO συνδέεται επίσης με πιο βεβαρημένη κλινική εικόνα των συστηματικών παθήσεων. Όταν η CPEO συνδέεται με συστηματικές νόσους, η βλεφαρόπτωση ή η αδυναμία των εξοφθάλμιων μυών μπορεί να είναι το πρώτο σύμπτωμα. Οι εξοφθάλμιοι μύες

προσβάλλονται πρωτίστως, λόγω της μεγαλύτερης συγκέντρωσης μιτοχονδρίων (τρεις έως τέσσερις φορές περισσότερα) σε σχέση με τους μύες των άκρων. Αργότερα μπορεί να εμφανιστεί καταρράκτης, αμφιβληστροειδοπάθεια, κώφωση, κόπωση, αταξία, αδυναμία των άκρων, νευροπάθεια, καρδιομυοπάθεια ή νεφρική ανεπάρκεια.<sup>17</sup>

Η πιθανότητα CPEO πρέπει πάντα να διερευνάται σε ασθενείς με επίκτητη αμφοτερόπλευρη βλεφαρόπτωση και/ή ανωμαλία της οφθαλμοκινητικότητας η οποία δεν εμπίπτει σε γνωστές παθολογικές καταστάσεις. Προκειμένου να τεθεί η διάγνωση της CPEO, πρέπει να αποκλειστούν άλλες ασθένειες που συνδέονται με περιορισμό των οφθαλμικών κινήσεων. Αυτές περιλαμβάνουν παθήσεις των νευρομυϊκών συνάψεων όπως η Myasthenia gravis ή το σύνδρομο Eaton-Lambert, πολλαπλή μονονευρίτιδα των εγκεφαλικών συζυγιών, ενδοφθάλμιες φλεγμονές, παθήσεις που προκαλούν ίνωση των οφθαλμικών μυών όπως θυρεοειδική οφθαλμοπάθεια ή συγγενής μυϊκή ίνωση, καθώς και νευρολογικές διαταραχές που μπορούν να προκαλέσουν παρόμοια προοδευτική απώλεια των οριζόντιων ή κάθετων οφθαλμικών κινήσεων, όπως είναι η νόσος του Parkinson, η προϊούσα υπερπυρηνική παράλυση, η κληρονομική αταξία, η νόσος του Canavan, η νόσος του Wilson ή το σύνδρομο Leigh.<sup>8,16,13</sup>

Σχεδόν 90% των ασθενών με CPEO παρουσιάζει αδυναμία στους μύες του προσώπου, του οφθαλμού ή των άκρων.<sup>18</sup> Πολύ συχνά η CPEO είναι η αρχική εκδήλωση πολυσυστηματικών νοσημάτων. Έτσι πολλοί ασθενείς χαρακτηρίζονται ως “CPEO plus” επειδή παρουσιάζουν επιπλέον πολυσυστηματικά συμπτώματα όπως νευρολογικά, διαταραχές της ακοής ή διαβήτη.<sup>18</sup>

Αρχικά ο όρος “CPEO plus” χρησιμοποιούταν για να χαρακτηρίσει μια ομάδα ασθενών που παρουσίαζαν νευροεκφυλιστικές ασθένειες μαζί με CPEO. Κάποιες διαταραχές όμως έχουν ιδιαίτερα χαρακτηριστικά και έτσι αποτελούν πλέον ξεχωριστές ασθένειες. Τέτοιες είναι το σύνδρομο Kearns-Sayre (KSS) και η οφθαλμοφαρυγγική μυϊκή δυστροφία. Τα συμπτώματα του συνδρόμου Kearns-Sayre εμφανίζονται πριν από την ηλικία των 20 ετών.<sup>9</sup> Τα κύρια συμπτώματα

είναι CPEO και άτυπη μελαγχρωστική αμφιβληστροειδοπάθεια. Για να τεθεί διάγνωση για KSS πρέπει τα κύρια αυτά συμπτώματα να συνοδεύονται από τουλάχιστον ένα από τα παρακάτω: Καρδιακό αποκλεισμό, μυϊκή αδυναμία, αυξημένα επίπεδα πρωτεΐνης στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό και παρεγκεφαλιδική αταξία.<sup>9</sup> Μπορεί επίσης να συνοδεύεται από απώλεια της ακοής, νοητική στέρηση, μυϊκή αδυναμία, ενδοκρινολογικές διαταραχές, διαβήτη, αναπνευστική ανεπάρκεια. Η πρόγνωση του KSS είναι πολύ χειρότερη από αυτή της CPEO, και οι ασθενείς σπάνια επιβιώνουν πέραν της ηλικίας των 30 ετών αν δεν τεθεί έγκαιρα η διάγνωση και ως εκ τούτου τοποθετηθεί καρδιακός βηματοδότης.<sup>19</sup> Η οφθαλμοφαρυγγική δυστροφία είναι μυοπάθεια, η οποία οφείλεται σε γενετική διαταραχή στο γονίδιο PABP2. Χαρακτηρίζεται από μεγάλη ηλικία έναρξης (τέταρτη ή πέμπτη δεκαετία), προοδευτική αμφοτερόπλευρη βλεφαρόπτωση, δυσφαγία, πάρεση προσωπικού και αδυναμία των άνω άκρων. Η δυσκολία στην κατάποση μπορεί να προκαλέσει πνευμονία ή πνιγμό εάν δεν αντιμετωπισθεί.<sup>9</sup>

Οι περισσότερες σποραδικές περιπτώσεις CPEO οφείλονται σε επίκτητη γενετική ανωμαλία του mtDNA όπως διπλασιασμούς ή ελλείμματα.<sup>20</sup> Στις οικογενείς μορφές CPEO, μπορούν να ισχύουν διάφορες μορφές κληρονομικότητας και κάποιες φορές είναι δύσκολο να προσδιοριστεί η ακριβής μορφή αυτών. Η κληρονομούμενη από τη μητέρα CPEO οφείλεται σε σημειακές μεταλλάξεις του mtDNA<sup>21</sup> ή από διαγραφή ενός νουκλεοτιδίου.<sup>22</sup> Στις αυτοσωμικές επικρατείς καθώς και στις αυτοσωμικές υπολειπόμενες μορφές, υπεύθυνες θεωρούνται βλάβες στο nDNA.<sup>23,24</sup> Στις πρώτες περιπτώσεις τα γονίδια τα οποία εμπλέκονται είναι: TWINKLE (10q24), ANT1 (4q34-35), POLG (15q22-26), POLG2 (17q23-24). Οι αυτοσωμικές επικρατείς μορφές μπορεί να οφείλονται επίσης σε επέκταση της GCG τριπλέτας, με υπεύθυνο γονίδιο το PABP2. Για τις αυτοσωμικές υπολειπόμενες μορφές, που είναι και πιο σπάνιες,<sup>18</sup> υπεύθυνο είναι συνήθως το POLG 15q22-26.<sup>15,17,25, 26</sup>

Τυπικά, η βιοψία μυός με τροποποιημένη κατά Gomori χρώση, αναδεικνύει τις λεγόμενες 'ragged red fibers' ή "ρακώδεις μυϊκές ίνες" που οφείλονται σε παθολογικές συσσωρεύσεις μιτοχονδρίων καθώς και ίνες με ανεπάρκεια στη κυτόχρωμα c οξειδάσης.<sup>20,27</sup>



#### Δ. ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΕΣ ΕΓΚΕΦΑΛΟΜΥΟΠΑΘΕΙΕΣ (ΜΕ)

Ως Μιτοχονδριακές Εγκεφαλομυοπάθειες (ΜΕ) χαρακτηρίζονται τα νοσήματα που συνδέονται με διαταραχές της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης.<sup>28</sup> Οφείλονται είτε σε σποραδικές είτε σε κληρονομούμενες μεταλλάξεις των γονιδίων του mtDNA ή του nDNA (πρωτοπαθείς ΜΕ) καθώς και σε εξωγενείς παράγοντες όπως φάρμακα, τοξίνες ή λοιμώξεις (δευτεροπαθείς ΜΕ).<sup>29</sup>

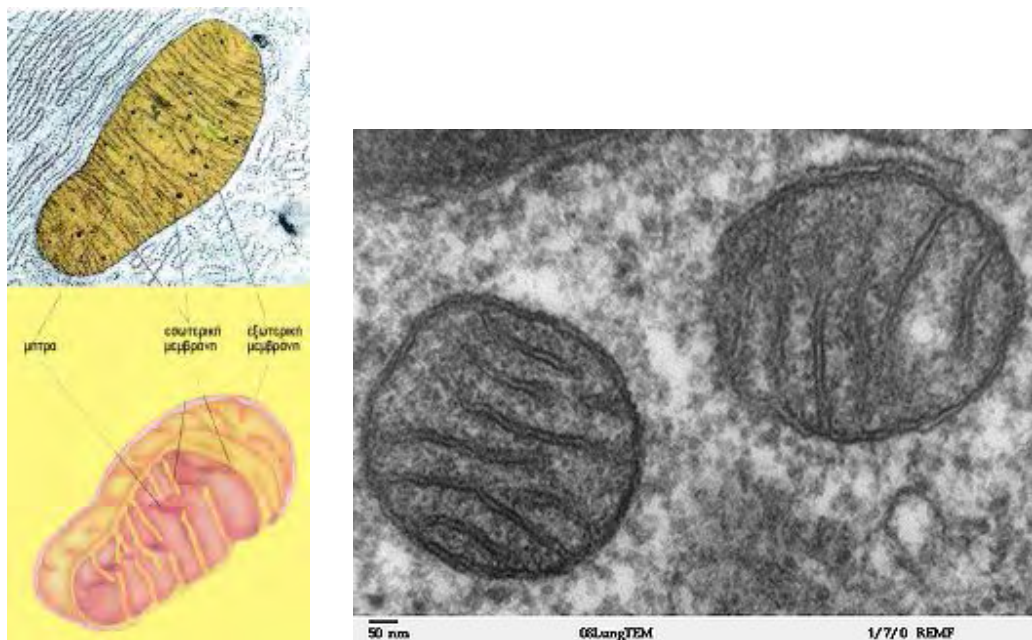
Οι πρωτεΐνες που επηρεάζονται συχνότερα είναι αυτές της αναπνευστικής αλυσού και της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης.<sup>19</sup> Από γενετική σκοπιά, η οξειδωτική φωσφορυλίωση αποτελεί τη μοναδική μεταβολική οδό του κυττάρου που βρίσκεται κάτω από τον έλεγχο δύο διαφορετικών γονιδιωμάτων, του μιτοχονδριακού (mtDNA) και του πυρηνικού (nDNA),<sup>30</sup> με εξαίρεση το σύμπλεγμα II της αναπνευστικής αλυσίδας, που κωδικοποιείται μόνο από πυρηνικά γονίδια.<sup>31</sup> Από τις 100 περίπου πρωτεΐνες της αναπνευστικής αλυσού μόνο οι 13 κωδικοποιούνται από μιτοχονδριακά γονίδια, ενώ οι υπόλοιπες κωδικοποιούνται από πυρηνικά γονίδια.<sup>32</sup> Οι κλινικές εκδηλώσεις εμφανίζονται σε διάφορα όργανα ή ιστούς ανάλογα με την ανάγκη τους για ενέργεια. Τα πιο συνήθη συμπτώματα εμφανίζονται είτε από το μυϊκό σύστημα συμπεριλαμβανομένων των εξωφθάλμιων μυών είτε από νευρικό σύστημα και ειδικότερα τον εγκέφαλο.<sup>18</sup>

Ιστορικά, η πρώτη φορά που περιγράφηκαν ΜΕ είναι από τους Kearns και Sayre (1958) αργότερα από τον Ernster (1959) και από τον Luft (1962)<sup>14</sup>. Το 1963 εντοπίστηκε για πρώτη φορά το mtDNA, ενώ το 1974 ανακαλύφθηκαν τα γονίδια που κωδικοποιούν στοιχεία της αναπνευστικής αλυσού. Το 1980 διευκρινίστηκε ότι το mtDNA κληρονομείται αποκλειστικά από τη μητέρα<sup>33</sup> και η πρώτη μετάλλαξη του mtDNA, αναφέρθηκε το 1988,<sup>34</sup> ενώ το 1992 εντοπίστηκε η πρώτη μετάλλαξη nDNA που συνδέεται με ΜΕ.<sup>35</sup> Σήμερα είναι γνωστές περισσότερες από 200 σημειακές μεταλλάξεις στο mtDNA και πολλές

μεταλλάξεις στο mtDNA που οδηγούν σε πρωτοπαθείς ή δευτεροπαθείς ΜΕ<sup>36</sup> (www.mitomap.org).

## 1. ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑ

### Δομή των μιτοχονδρίων



Εικ. 2 Μιτοχόνδριο όπως απεικονίζεται στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο και σχηματική αναπαράσταση. (βιβλίο Γ. Νιτράνος)

Τα μιτοχόνδρια είναι ενδοκυττάρια σφαιροειδή ή ωοειδή οργανίδια με διάμετρο 0,1-0,5μm και ποικίλο μήκος.<sup>37</sup> Σύμφωνα με την ενδοσυμβιωτική υπόθεση, τα μιτοχόνδρια προέρχονται από προκαρυωτικά κύτταρα τα οποία ενσωματώθηκαν σε κύτταρα που περιείχαν πυρήνα. Ο αριθμός των μιτοχονδρίων που περιέχονται σε κάθε κύτταρο κυμαίνεται από 0 (ερυθροκύτταρα) έως 10000 (κύτταρα λείων μυών). Ο μέσος αριθμός είναι 500 -

2000 ανά κύτταρο. Ο αριθμός των μιτοχονδρίων που περιέχονται σε κάθε κύτταρο συνδέεται με την ανάγκη του για ενέργεια και οξυγόνο. Τα μιτοχόνδρια αποτελούνται από 4 μέρη: Την εξωτερική μεμβράνη, την εσωτερική μεμβράνη, το διαμεμβρανικό διάστημα και τη μήτρα Εικ.2

Η εξωτερική μεμβράνη είναι μια διπλή λιπιδική μεμβράνη, διαπερατή σε μόρια μικρότερα των 10000Da. Μη αναδιπλούμενες πρωτεΐνες, που είναι κωδικοποιημένες σε πρόδρομες από το πυρηνικό γονιδίωμα, περνούν την εξωτερική μεμβράνη μέσω του συμπλέγματος πρωτεϊνών TOM/TIM.<sup>37</sup> Μέσω αυτού του συμπλέγματος εισαγωγής, οι πρωτεΐνες αντιδρούν με υποδοχείς της μεμβράνης προτού διαχωριστούν από αυτούς.<sup>38</sup> Κατόπιν αναδιπλώνονται και τοποθετούνται στο σωστό σημείο ενδομιτοχονδριακά. Η εσωτερική μεμβράνη είναι αδιαπέραστη σε σωστά αναδιπλούμενες πρωτεΐνες.<sup>37</sup> Μέσα στην εξωτερική μεμβράνη ή πολύ κοντά σε αυτή, βρίσκονται πρωτεΐνες όπως πορίνη, η NADH cytochrome-b5-reductase, palmitoyl-CoA-synthetase, carnitine-palmitoyl-transferase και mono-amino-oxidase.<sup>19</sup>

Η εσωτερική μεμβράνη είναι επίσης μία διπλή λιπιδική μεμβράνη αλλά είναι αδιαπέραστη για τα περισσότερα μόρια και πρωτόνια. Αποτελείται από πρωτεΐνες κατά το 70%.<sup>37</sup> Στην εσωτερική μεμβράνη βρίσκονται ενσωματωμένα τα 4 συμπλέγματα της αναπνευστικής αλυσού, το σύμπλεγμα V (ATP-synthase), η ubiquinone και η carnitine-palmitoyl-transferase-II.<sup>37,39</sup> Είναι διαπερατή για ελεύθερα μόρια όπως O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O. Υπάρχουν μεταφορείς για ανιόντα, κατιόντα και redox ισοδύναμα.

Στο διαμεμβρανικό διάστημα βρίσκονται η αδενυλική κινάση (adenylat kinase), η μιτοχονδριακή κρεατίνη-φωσφοκινάση, η πρωτεΐνη κώφωσης/δυστονίας (deafness dystonia protein) και το κυτόχρωμα c.

Στη μήτρα των μιτοχονδρίων βρίσκεται ένας μεγάλος αριθμός ενζύμων, καθώς και άλλων πρωτεϊνών και πεπτιδίων συμπεριλαμβανομένων συμπλεγμάτων της αναπνευστικής αλυσού, DNA-πολυμεράσες, mRNAs, tRNAs καθώς και το μιτοχονδριακό DNA.

Τα μιτοχόνδρια εξυπηρετούν 4 βασικούς βιολογικούς ρόλους:

1. Παραγωγή ATP
2. Μεσάζωντες του κυτταρικού θανάτου μέσω της απόπτωσης
3. Παραγωγή θερμότητας
4. Γενετική συνεισφορά

Η παραγωγή ενέργειας με τη μορφή ATP είναι η βασική λειτουργία των μιτοχονδρίων. Αυτή γίνεται μέσω του συμπλέγματος της πυρουβικής διαναγωγιάσης (PDC), του κιτρικού κύκλου, της αναπνευστικής αλυσού και της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης.<sup>40</sup> Λιπαρά οξέα, αμινοξέα και το πυρουβικό οξύ μεταφέρονται από το κυτταρόσωμα μέσα στο μιτοχόνδριο, όπου μεταβολίζονται σε ακέτυλο-συνένζυμο Α, το οποίο μεταβολίζεται περαιτέρω μέσω του κύκλου του κιτρικού οξέως. Τα ηλεκτρόνια που προκύπτουν μπαίνουν στην αναπνευστική αλυσίδα. Ο πυρήνας της αναπνευστικής αλυσού και της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης είναι 5 ενζυμικά συμπλέγματα I-V.

Πιο αναλυτικά αυτά είναι:

α) το σύμπλεγμα I NADH-συνένζυμο Q<sub>10</sub> (CoQ<sub>10</sub>) δεϋδρογενάση (NADH dehydrogenase). Αποτελείται από 41 πρωτεΐνες, εκ των οποίων οι 34 κωδικοποιούνται από το πυρηνικό DNA και οι 7 κωδικοποιούνται από το μιτοχονδριακό DNA.

β) το σύμπλεγμα II κιτρική-CoQ<sub>10</sub> δεϋδρογονάση (succinate dehydrogenase). Αποτελείται από 4 πρωτεΐνες όλες εκ των οποίων κωδικοποιούνται από το πυρηνικό DNA.

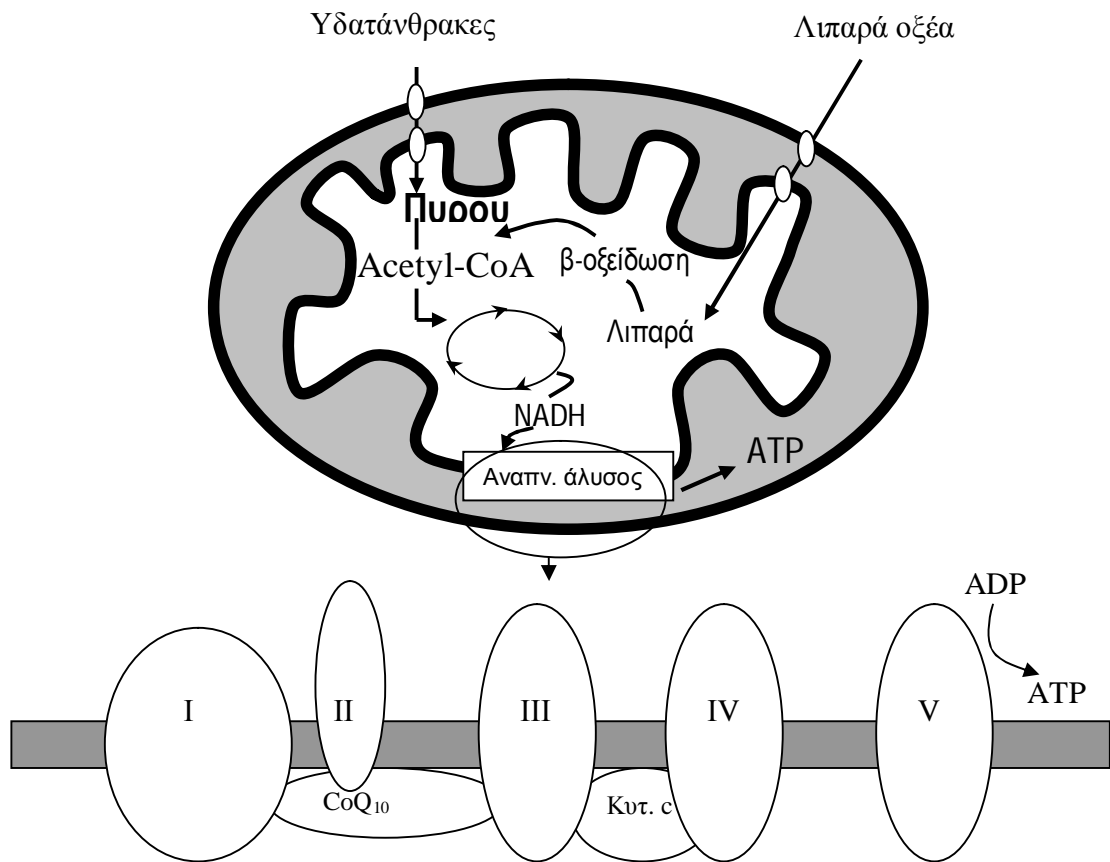
γ) το σύμπλεγμα III αναγμένο CoQ<sub>10</sub>-κυτόχρωμα c αναγωγίαση (ubiquinone cytochrome-c oxidoreductase). Αποτελείται από 11 πρωτεΐνες με 10 από αυτές να κωδικοποιούνται από το πυρηνικό DNA και 1 από το μιτοχονδριακό DNA.

δ) το σύμπλεγμα IV κυτόχρωμα c οξειδάση (cytochrome c oxidase). Αποτελείται από 13 πρωτεΐνες εκ των οποίων οι 10 ελέγχονται από το πυρηνικό DNA και οι 3 από το μιτοχονδριακό DNA.

ε) το σύμπλεγμα V ATP συνθετάση (ATP synthase). Αποτελείται από 14 πρωτεΐνες 12 από τις οποίες ελέγχονται από το πυρηνικό DNA και 2 από το μιτοχονδριακό DNA 14 22.

Ηλεκτρόνια από διάφορα υποστρώματα περνούν στην αναπνευστική αλυσίδα προσφέροντας ενέργεια, ώστε να αντληθούν πρωτόνια από τη μήτρα στο διαμεμβρανικό διάστημα, διαμέσου της εσωτερικής μεμβράνης, μέσω των συμπλεγμάτων I, III, IV. Πιο συγκεκριμένα από το σύμπλεγμα I μεταφέρονται 4 πρωτόνια, από το σύμπλεγμα II μεταφέρονται 2 πρωτόνια και από το σύμπλεγμα IV μεταφέρονται άλλα 2.<sup>19</sup> Το ηλεκτροχημικό ισοζύγιο πρωτονίων που δημιουργείται οδηγεί στη δημιουργία ATP μέσω του συμπλέγματος V. Η ubiquinone μεταφέρει ηλεκτρόνια από τα συμπλέγματα I και II στο σύμπλεγμα III. Από εκεί τα ηλεκτρόνια περνάνε στο σύμπλεγμα IV μέσω του κυτοχρώματος c, που είναι μία διαμεμβρανική πρωτεΐνη. Το σύμπλεγμα V επιτρέπει στα πρωτόνια να εισρέουν πίσω στη μήτρα του μιτοχονδρίου, χρησιμοποιώντας την ενέργεια που εκλύεται για την σύνθεση ATP.<sup>41</sup>(Εικ.3) Για κάθε μόριο NADH που οξειδώνεται, παράγονται 3 μόρια ATP.<sup>32</sup>

Εικ 3 Περίληπτική παρουσίαση του μιτοχονδριακού μεταβολισμού και της δομής της αναπνευστικής αλυσού<sup>28</sup>



Πρωτεΐνες Συμπλέγματος	I	II	III	IV	V
Μιτοχονδριακό DNA	35	4	10	10	12
Πυρηνικό DNA	7	0	1	3	2

## *Το μιτοχονδριακό DNA (mtDNA)*

Το μιτοχονδριακό γονιδίωμα των θηλαστικών είναι μικρό και συμπυκνωμένο. Από το γονιδίωμα απουσιάζουν ιντρόνια και σε μερικές περιοχές τα γονίδια επικαλύπτονται, δηλαδή πρακτικά κάθε ζεύγος βάσεων ανήκει σε κάποιο γονίδιο.

Το mtDNA βρίσκεται στη μιτοχονδριακή μήτρα και τα λειτουργικά και δομικά του χαρακτηριστικά διαφέρουν κατά πολύ από αυτά του πυρηνικού DNA.

Είναι ένα κυκλικό μόριο και αποτελείται από δύο συμπληρωματικές αλυσίδες, τη βαριά H (που είναι πλούσια σε γουανίνες) και την ελαφριά L (που είναι πλούσια σε κυτοσίνες). Αποτελείται από 16.569 ζεύγη βάσεων(bp). Τα γονίδιά του (37) κωδικοποιούν 2 rRNAs, 22 tRNAs και 13 πολυπεπτίδια (28 στην H αλυσίδα και 9 στην L αλυσίδα) για ένζυμα που εμπλέκονται στην οξειδωτική φωσφορυλίωση. Σε αντίθεση με το nDNA, οι κωδικοποιητικές αλληλουχίες του mtDNA είναι συνεχείς χωρίς την παρεμβολή ιντρονίων<sup>42, 43</sup> (93% του μιτοχονδριακού γονιδιώματος κωδικοποιείται) (Εικ. 4)

Το mtDNA είναι ιδιαίτερα ευάλωτο γεγονός το οποίο οδηγεί σε ιδιαίτερα αυξημένο ποσοστό μεταλλάξεων (Εικ.5). Αυτό οφείλεται κυρίως στην έλλειψη προστατευτικών DNA δεσμευτικών πρωτεϊνών όπως οι ιστόνες (histones),<sup>44</sup> στον περιορισμένο αριθμό DNA επιδιορθωτικών μηχανισμών<sup>45, 46</sup> αλλά και στο γεγονός ότι βρίσκεται πολύ κοντά στην περιοχή παραγωγής ενεργών στοιχείων οξυγόνου (reactive oxygen species) μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης.

Επειδή το mtDNA περιέχει μόνο 37 γονίδια εκ των οποίων 24 χρειάζονται για τη μετάφραση του mtDNA, οι περισσότερες από τις περίπου 1000 πρωτεΐνες των μιτοχονδρίων κωδικοποιούνται από το nDNA και εισάγονται από το κυτταρόσωμα.<sup>47</sup> Το mtDNA εξαρτάται από το nDNA όσον αφορά τα ένζυμα που χρειάζεται για αναπαραγωγή, μεταγραφή, μετάφραση και επιδιόρθωση. Επιπλέον, τα μιτοχόνδρια βασίζονται στον πυρήνα για τις περισσότερες απαραίτητες πρωτεΐνες για τη μιτοχονδριακή λειτουργία.<sup>19</sup>

Τα μιτοχόνδρια διαθέτουν ανεξάρτητους μηχανισμούς αντιγραφής, μεταγραφής και μετάφρασης. Το mtDNA αντιγράφεται σε δύο φάσεις. Η αντιγραφή αρχίζει στο σημείο έναρξης της αντιγραφής της βαριάς αλυσίδας και ακολουθεί ωρολογιακή φορά. Όταν εκτεθεί το σημείο έναρξης της αντιγραφής της ελαφριάς αλυσίδας ως μονή αλυσίδα, η ελαφριά αλυσίδα αρχίζει να αντιγράφεται προς την αντίθετη κατεύθυνση. Συνεπώς, η αντιγραφή του mtDNA χαρακτηρίζεται ως αμφίδρομη αλλά ασύγχρονη.<sup>48</sup> Σύμφωνα με ένα πιο πρόσφατο μοντέλο, η αντιγραφή του mtDNA ξεκινά ταυτόχρονα από πολλές αφετηρίες με ένα μηχανισμό ανεξάρτητο για κάθε αλυσίδα<sup>181</sup>.

## *Γενετική του mtDNA*

***Η γενετική του mtDNA έχει τα εξής μοναδικά χαρακτηριστικά:***

### *α) Μητρική κληρονομικότητα*

Σε αντίθεση με το nDNA, το mtDNA υπάρχει σε εκατοντάδες έως χιλιάδες αντίγραφα σε κάθε κύτταρο και αντιγράφεται κατά τη διάρκεια της ζωής. Κατά τη γονιμοποίηση, όλα τα μιτοχόνδρια του ζυγωτού προέρχονται από το ωάριο. Έτσι η μητέρα μεταδίδει το mtDNA του ωαρίου της σε όλους τους απογόνους της και οι κόρες της μεταδίδουν το mtDNA τους στην επόμενη γενιά.<sup>28</sup> Με τον ίδιο τρόπο έχουν τη δυνατότητα να μεταφέρονται και οι μιτοχονδριακές μεταλλάξεις. Στην πράξη αυτό παρατηρείται με τις σημειακές μεταλλάξεις του mtDNA στα γονίδια τόσο για κωδικοποίηση πρωτεϊνών όσο και στα tRNA.<sup>49, 50</sup>



## *β) Ετεροπλασμία*

Λόγω του μεγάλου αριθμού αντιγράφων mtDNA σε κάθε κύτταρο, κάθε μετάλλαξη θα εμφανίζεται σαν ένα ποσοστό ολόκληρου του μικτού ενδοκυττάρου πληθυσμού. Έτσι, διάφορα κύτταρα, ιστοί, όργανα ή και ολόκληρα άτομα μπορεί να περιέχουν δύο πληθυσμούς mtDNA (φυσιολογικό και μεταλλαγμένο). Η κατάσταση αυτή ονομάζεται ετεροπλασμία. Τα φυσιολογικά άτομα περιέχουν ίδια φυσιολογικά μόρια mtDNA γεγονός που ονομάζεται ομοπλασμία.<sup>51</sup>

Οι ουδέτεροι πολυμορφισμοί είναι τυπικά ομοπλασμικοί, αν και ετεροπλασμικοί πολυμορφισμοί έχουν περιγραφεί στην αγκύλη D (D loop).<sup>52</sup> Οι παθογόνες μεταλλάξεις είναι ετεροπλασμικές, αν και κάποιες, όπως οι σημειακές μεταλλάξεις συσχετιζόμενες με το LOOP, είναι ομοπλασμικές.<sup>53</sup>

## *γ) Φαινόμενο ουδού*

Για να γίνει μία μετάλλαξη mtDNA παθογόνος για τη λειτουργία ενός κυττάρου και κατ' επέκταση ενός οργάνου, πρέπει τα μεταλλαγμένα αντίγραφα να υπερβούν σε αριθμό ένα συγκεκριμένο όριο (ουδό).<sup>54, 55</sup> Προκειμένου να παρατηρηθεί μείωση στη λειτουργία της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων, πρέπει να υπάρχει ένα συγκεκριμένο ποσοστό μεταλλαγμένων μορίων. Εν προκειμένω, όταν για μια συγκεκριμένη ετεροπλασμική μετάλλαξη τα μεταλλαγμένα αντίγραφα υπερβούν σε αριθμό ένα συγκεκριμένο όριο (ουδό), τα παθολογικά αποτελέσματα της μετάλλαξης δεν αντισταθμίζονται από τα συνυπάρχοντα φυσιολογικά μόρια mtDNA, οδηγώντας σε φαινοτυπική έκφραση, δηλαδή κυτταρική δυσλειτουργία και εκδήλωση νοσήματος.<sup>56</sup> Το όριο για τη βιοχημική έκφραση μιας μεταλλάξεως mtDNA πιστεύεται ότι είναι γύρω στο 60% μεταλλαγμένου για ελλείμματα mtDNA και περισσότερο από 90% για μεταλλάξεις tRNA.<sup>17,39</sup> Ο ουδός αυτός είναι χαμηλότερος σε ιστούς που εξαρτώνται από οξειδωτικό μεταβολισμό σε σχέση με ιστούς που για τη λειτουργία τους χρησιμοποιούν αναεροβική γλυκόλυση.

### δ) Συσσώρευση (Segregation)

Καθώς ένα ετεροπλασμικό κύτταρο πολλαπλασιάζεται, διαφορετικές ποσότητες μεταλλαγμένου mtDNA μεταφέρονται στα θυγατρικά κύτταρα. Με αυτόν τον τρόπο ο γονότυπος του mtDNA τείνει προς την ομοπλασμία, είτε είναι φυσιολογικού ή μεταλλαγμένου τύπου.<sup>49</sup> Η διαδικασία αυτή ονομάζεται αναπαραγωγική συσσώρευση (replicative segregation), και δικαιολογεί εν μέρει την ποικιλία του κλινικού φαινότυπου σε σχέση με το χρόνο σε ασθενείς με μιτοχονδρική εγκεφαλομυοπάθεια (ME). Αρχικά, η αναπαραγωγική συσσώρευση θεωρείτο τυχαία διαδικασία, όμως πρόσφατες έρευνες έχουν δείξει πως ο διαχωρισμός συμβαίνει όχι μόνο ανάλογα με τον εκάστοτε ιστό, αλλά βρίσκεται και υπό πυρηνικό γενετικό έλεγχο.<sup>57, 58</sup>

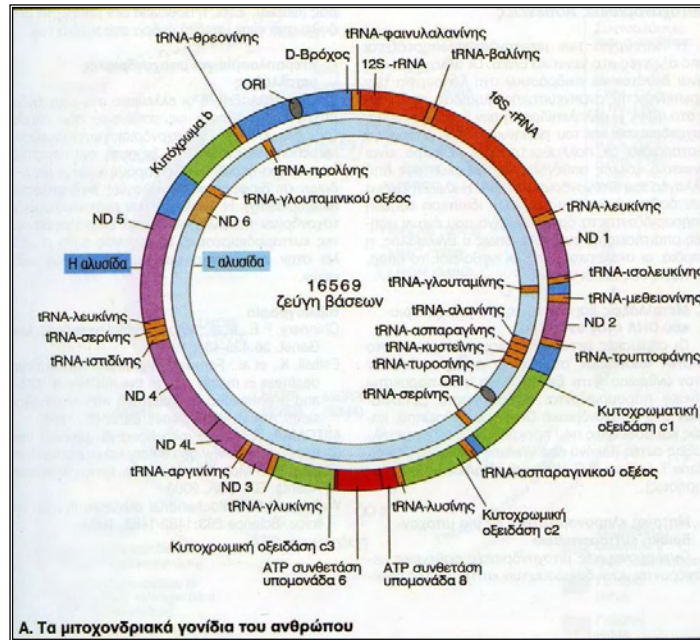
Η φαινοτυπική έκφραση των ME εξαρτάται, πέραν των παραπάνω και από το πυρηνικό υπόβαθρο, την ηλικία, το φύλο καθώς και από περιβαλλοντολογικούς παράγοντες.<sup>39</sup> Οι μεταλλάξεις του mtDNA έχουν 10–20 φορές μεγαλύτερη συχνότητα από αυτή των μεταλλάξεων του nDNA, και περιλαμβάνουν σημειακές μεταλλάξεις, ενθέσεις και ελλείμματα.<sup>17</sup> Λόγω της έλλειψης ιντρονίων δεν υπάρχουν μεταλλάξεις των σημείων κοπής (splice site). Οι σημειακές μεταλλάξεις είναι συνήθως κληρονομούμενες, ενώ οι ενθέσεις και τα ελλείμματα είναι συνήθως σποραδικά. Το γιατί οι επίκτητες μεταλλάξεις δεν μεταδίδονται στην επόμενη γενιά εξηγείται από το φαινόμενο του <<λαιμού μπουκαλιού>>.<sup>19</sup> Κατά το φαινόμενο αυτό σε μια τυχαία χρονική στιγμή, ένα γενετικό φαινόμενο, γνωστό ως μιτωτικός διαχωρισμός καθορίζει τη διαίρεση των δύο γονιδιωμάτων σε δύο διακριτές κυτταρικές σειρές, με καθεμία να περιέχει μόνο έναν τύπο mtDNA. Αυτό συμβαίνει γιατί κατά την ωογένεση, ο αριθμός των μιτοχονδρίων αυξάνει εντυπωσιακά, χωρίς όμως ταυτόχρονη αύξηση των αντιγράφων mtDNA, με αποτέλεσμα ο λόγος mtDNA/μιτοχόνδρια να πλησιάζει τη μονάδα. Έτσι, μιτοχόνδρια με μειωμένο αριθμό αντιγράφων mtDNA κατανέμονται στα διαιρούμενα κύτταρα του εμβρύου. Συνέπεια των παραπάνω θα είναι ο καθορισμός του μιτοχονδριακού γονοτύπου από τη μία γενιά στην επόμενη από

ένα πολύ μικρό αριθμό μορίων mtDNA.<sup>28,59</sup> Παρά το γεγονός ότι οι μεταλλάξεις του mtDNA είναι γνωστές αιτίες ME, πιστεύεται ότι για περισσότερες από 95% των ME αιτία είναι μεταλλάξεις του nDNA.<sup>41</sup>

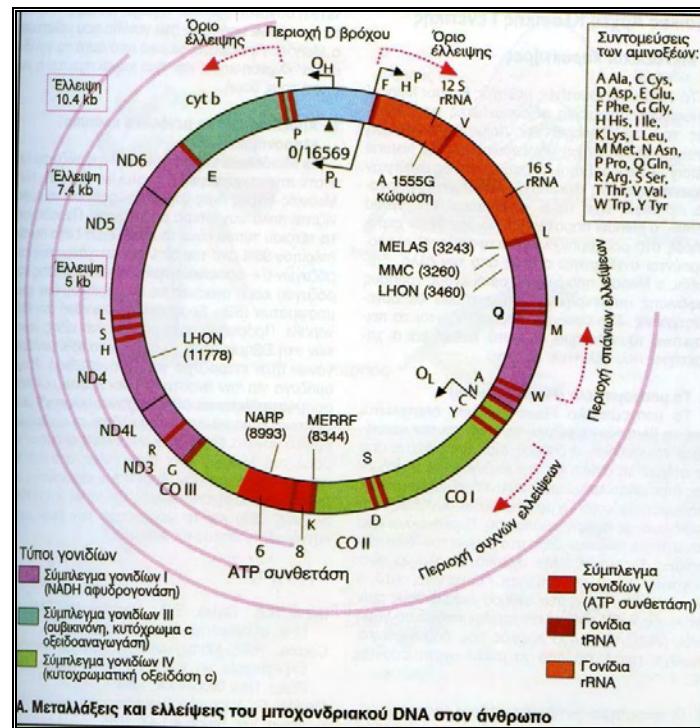
Τα κριτήρια για να χαρακτηριστεί μία μετάλλαξη mtDNA παθογόνος είναι:

1. η ετεροπλασμία (εκτός από την LHON)
2. η ποσότητα μεταλλαγμένου mtDNA να είναι μεγαλύτερη από τον ουδό
3. η συσχέτιση με έναν συγκεκριμένο φαινότυπο σε περισσότερο από έναν ασθενή που όμως δεν είναι συγγενείς
4. η απουσία της μετάλλαξης σε υγιή άτομα, εκτός από ασυμπτωματικούς συγγενείς
5. η μεταδοτικότητα της μεταβολικής βλάβης mtDNA μέσα σε μελέτες υβριδικού κυτταροπλάσματος
6. η μετάλλαξη να συνδέεται με μία βιοχημική βλάβη.<sup>19</sup>

Οι ME που οφείλονται σε μεταλλάξεις του nDNA, ακολουθούν τους Μεντελιανούς κανόνες κληρονομικότητας (αυτοσωμικό υπολειπόμενο (autosomal recessive), αυτοσωμικό επικρατές (autosomal dominant) και φυλοσύνδετες (x-linked)). Εκτός των 70 πρωτεϊνών της αναπνευστικής αλυσού, γονίδια του nDNA κωδικοποιούν περίπου άλλες 1000 μιτοχονδριακές πρωτεΐνες, που δεν εμπλέκονται άμεσα στη λειτουργία της αναπνευστικής αλυσίδας αλλά χρειάζονται για την μεταφορά των πρωτεϊνών στο μιτοχόνδριο, την σταθερότητα του μιτοχονδρίου, κλπ. Γενικά χαρακτηριστικά των μιτοχονδριακών πρωτεϊνών που ελέγχονται πυρηνικά, είναι ότι η σύνθεσή τους γίνεται στο κυτταρόπλασμα και εισχωρούν στο μιτοχόνδριο μέσω ενός ειδικού συστήματος μεταφοράς.<sup>19</sup>



Εικ 4 Το γονιδίωμα του mtDNA (Εγχειρίδιο Γενετικής, Eberhard Passarge)



Εικ. 5 Περιοχές συχνών μεταλλάξεων στο mtDNA. (Εγχειρίδιο Γενετικής, Eberhard Passarge)

## 2.ΚΑΤΗΓΟΡΙΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΩΝ ΕΓΚΕΦΑΛΟΜΥΟΠΑΘΕΙΩΝ

Εκτός από το διαχωρισμό σε πρωτοπαθείς και δευτεροπαθείς, οι ΜΕ χωρίζονται και ανάλογα με γενετικά, βιοχημικά και κλινικά κριτήρια.

Σύμφωνα με τον *γενετικό διαχωρισμό*, η υπεύθυνη μετάλλαξη μπορεί να βρίσκεται στο mtDNA ή στο nDNA και μπορεί να επηρεάζει πρωτεΐνες του συμπλέγματος της αναπνευστικής αλυσίδας ή μιτοχονδριακές πρωτεΐνες που δεν εμπλέκονται άμεσα στην αναπνευστική αλυσίδα. Έτσι μπορούμε να έχουμε:

1. Διαταραχές λόγω μεταλλάξεων σε γονίδια του mtDNA που κωδικοποιούν πρωτεΐνες της αναπνευστικής αλυσίδας, tRNAs ή rRNAs.
2. Διαταραχές λόγω μεταλλάξεων σε γονίδια του nDNA που κωδικοποιούν πρωτεΐνες της αναπνευστικής αλυσίδας.
3. Διαταραχές λόγω μεταλλάξεων σε γονίδια του nDNA που κωδικοποιούν μιτοχονδριακές πρωτεΐνες που δε βρίσκονται στην αναπνευστική αλυσίδα.
4. Διαταραχές που συνδέονται με μεταβολές στην αναπνευστική αλυσίδα λόγω μεταλλάξεων σε γονίδια του nDNA υπεύθυνα για την κωδικοποίηση μη μιτοχονδριακών πρωτεϊνών.

*Σύμφωνα με βιοχημικές διαταραχές οι ΜΕ μπορούν να χωριστούν σε:*

1. Διαταραχή της μεταφοράς υποστρώματος
2. Διαταραχή στη χρήση του υποστρώματος
3. Διαταραχή του κύκλου του Krebs
4. Διαταραχή της σύνδεσης οξειδωσης - φωσφορυλίωσης
5. Διαταραχή της αναπνευστικής αλυσίδας

6. Συνδυασμός διαταραχών της οξειδωτικής φωσφορλίωσης και της αναπνευστικής αλύσου.

Σύμφωνα με τα *κλινικά κριτήρια* οι ΜΕ χωρίζονται σε διαταραχές ενός οργάνου ή σε πολυσυστηματικές διαταραχές. Οι διαταραχές ενός οργάνου είναι σπάνιες και τείνουν να μετατρέπονται σε πολυσυστηματικές με την πάροδο του χρόνου. Δεδομένου ότι τα περισσότερα από τα παρακάτω σύνδρομα εμφανίζουν ιδιαίτερα συμπτώματα ανάλογα με την ηλικία, πολλοί υποστηρίζουν ότι κάθε ασθενής θα πρέπει να καταγράφεται ως ξεχωριστός φαινότυπος.<sup>60</sup>

**CPEO** (chronic progressive external ophthalmoplegia): Οφθαλμοπάρεση ή εξωτερική οφθαλμοπληγία, βλεφαρόπτωση

**KSS** (Kearns-Sayre syndrome): CPEO, μελαγχρωστική αμφιβληστροειδοπάθεια, αυξημένη πρωτεΐνη ENY, διαταραχές καρδιακής αγωγιμότητας, αταξία, κώφωση, αναιμία, ενδοκρινική δυσλειτουργία.

**Σύνδρομο Pearson**: Σιδηροπλαστική αναιμία με κυμαινόμενου βαθμού θρομβοπενία και ουδετεροπενία, ηπατική ανεπάρκεια, εξωγενής ανεπάρκεια παγκρέατος.

**MELAS** (Myopathy, Encephalopathy, Lactic Acidosis and Stroke-like syndromes): Επεισόδια μιμούμενα αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο, σακχαρώδης διαβήτης, επιληψία, αταξία, οπτική ατροφία, κώφωση, ημικρανία, έμετοι, καρδιομυοπάθεια.

**MERRF** (Myoclonic epilepsy and ragged-red fibres): Μυοπάθεια, αταξία, άνοια, CPEO, κώφωση, μυοκλονική επιληψία

**LHON** (Leber's hereditary optic neuropathy): Μείωση της οπτικής οξύτητας, τύφλωση

**Σύνδρομο Leigh**: Καθυστέρηση ανάπτυξης, επιληπτικές κρίσεις, σημεία άνω κινητικού νευρώνα, αταξία οπτική ατροφία, μελαγχρωστική αμφιβληστροειδοπάθεια, υποτονία, CPEO.

**MNGIE** (Myoneurogastrointestinal encephalopathy): Μυοπάθεια, νευροπάθεια, γαστρεντερικές διαταραχές ή εγκεφαλοπάθεια.

**NARP** (Neuropathy, ataxia, retinitis pigmentosa): Αισθητική και κινητική πολυνευροπάθεια, αταξία, μελαγχρωστική αμφιβληστροειδοπάθεια, νοητική καθυστέρηση, άνοια, επιληψία.

**Σύνδρομο Wolfram:** Σακχαρώδης διαβήτης, οπτική ατροφία, κώφωση, νευρογενή κύστη, δυσκινησία εντέρου.

**MIMYCA** (Mitochondrial myopathy with cardiomyopathy): Μιτοχονδριακή μυοπάθεια με μυοκαρδιοπάθεια.

**NIDDM** (Non-insulin-dependent diabetes melitus): Κληρονομούμενος από τη μητέρα μη ινσουλινοεξαρτώμενος διαβήτης.

**Σύνδρομο Alpers:** Βρεφική πολυοδυστροφία, καθυστέρηση ανάπτυξης, υποτονία, έμετοι, ηπατοπάθεια, γλοίωσης.

**Ανεπάρκεια CoQ** (Coenzyme Q): Νοητική υστέρηση, μυοπάθεια.

**Σύνδρομο May-White:** Μυοκλονία, αταξία, κώφωση.

**Σύνδρομο Fanconi-Debre-DeToni:** Νοητική υστέρηση, νεφρική δυσλειτουργία, γλυκοζουρία, φωσφατουρία, υπερουρισαιμία

**Σύνδρομο Luft:** Υπερίδρωση, πολυφαγία, πολυδιψία, αδυναμία, δυσανεξία στην άσκηση.

**Σύνδρομο Menkes:** Επιληψία, καθυστέρηση ανάπτυξης, ανωμαλίες στην τριχοφυΐα, εύθραυστα οστά, αστάθεια θερμοκρασίας.

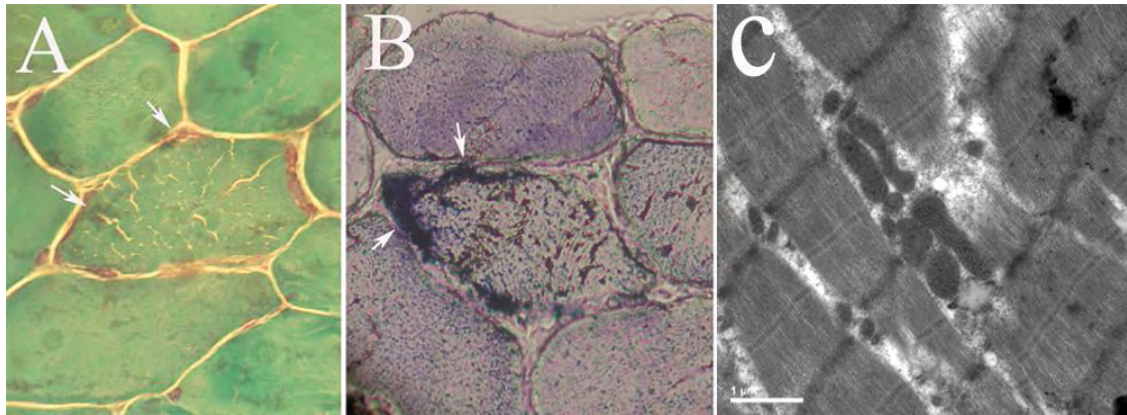
**Σύνδρομο Canavan:** Νοητική υστέρηση,

**Οικογενές MSL** (Multiple symmetric lipomas): Συμμετρικά πολλαπλά λιπώματα

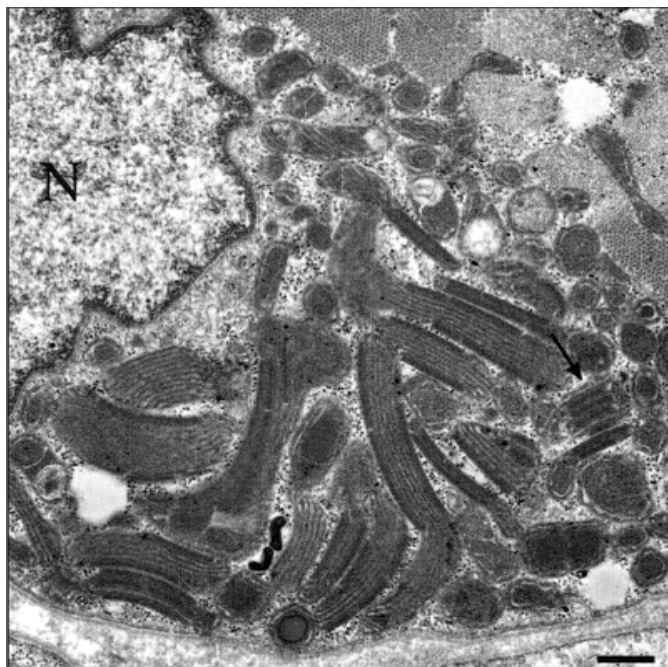
Το πιο σημαντικό διαγνωστικό κριτήριο για την ανίχνευση μιτοχονδριακών ανωμαλιών παραμένει η ιστολογική και ιστοχημική ανάλυση βιοψίας μυός.<sup>61,62,63,64</sup> Ένας συνήθης τρόπος για την ανίχνευση παθολογικής συσσώρευσης μιτοχονδρίων είναι η τρίχρωμη χρώση Gomori , η οποία μπορεί να αναδείξει τη συσσώρευση μιτοχονδρίων υπό το σαρκείλημα, τις

επονομαζόμενες “ρακώδεις μυϊκές ίνες” ( ragged red fibers).<sup>18</sup> Μία πιο ειδική μέθοδος για την εκτίμηση της μιτοχονδριακής λειτουργία είναι η ιστοχημική αντίδραση ενζύμου για τα μιτοχονδριακά ένζυμα κιτρική δεϋδρογονάση (succinate dehydrogenase SDH) και κυτόχρωμα C οξειδάση (cytochrome C oxidase COX). Η αντίδραση COX είναι ιδιαίτερα χρήσιμη στην εκτίμηση των μιτοχονδριακών μυοπαθειών γιατί αναδεικνύει υπομονάδες που κωδικοποιούνται και από το μιτοχονδριακό και από το πυρηνικό γονιδίωμα (Εικ.6) Ένα μοτίβο μωσαϊκού στη δράση της COX είναι σοβαρή ένδειξη ετεροπλασμικής διαταραχής του mtDNA. Μονήρης COX-αρνητικές ίνες, που συχνά ανταποκρίνονται σε “ρακώδεις μυϊκές ίνες”, μπορεί επιπλέον να εμφανίζουν εναπόθεση λίπους. Σε περιπτώσεις που τα αποτελέσματα δείχνουν χαμηλό ποσοστό COX-αρνητικών ινών, μπορεί να φανεί χρήσιμη περαιτέρω χρώση για COX/SDH. Η SDH κωδικοποιείται αποκλειστικά από το πυρηνικό γονιδίωμα, και έτσι η λειτουργία της είναι ανεξάρτητη από το mtDNA.<sup>18</sup> Μία καθολική μείωση της δραστηριότητας της COX, συχνά σημαίνει πυρηνική μετάλλαξη σε κάποια από τις βοηθητικές πρωτεΐνες που χρειάζονται για τη σταθερότητα και τη λειτουργία της COX. Η ηλεκτρονική μικροσκόπηση αποδεικνύεται χρήσιμη σε κάποιες περιπτώσεις, καθώς αναδεικνύει μεγεθυμένα μιτοχόνδρια, απουσία ή μη φυσιολογικών πτυχώσεων και την παρουσία παρακρυσταλλικών εγκλείστρων<sup>18</sup> (Εικ. 7) Η ανεπάρκεια των συμπλεγμάτων της αναπνευστικής αλυσίδας εντοπίζεται από τη μέτρηση της ενζυμικής δραστηριότητας σε ομογενοποιημένους μυς. Στην περίπτωση της CPEO και της KSS έχει αναφερθεί ανεπάρκεια στα συμπλέγματα I,II,III,IV και I+IV.<sup>60,61,63,65,66,67,68,69,70</sup> Παρ’ όλα αυτά υπάρχουν ασθενείς με τελείως φυσιολογικά ιστολογικά και ιστοχημικά αποτελέσματα. Επίσης η παρουσία χαμηλών επιπέδων COX-αρνητικών ινών ή ρακωδών μυϊκών ινών πρέπει να ερμηνεύεται με προσοχή καθώς είναι γνωστή η ανεύρεση κλωνικής διασποράς mtDNA σε ίνες γηρασμένων μυών.<sup>18</sup>





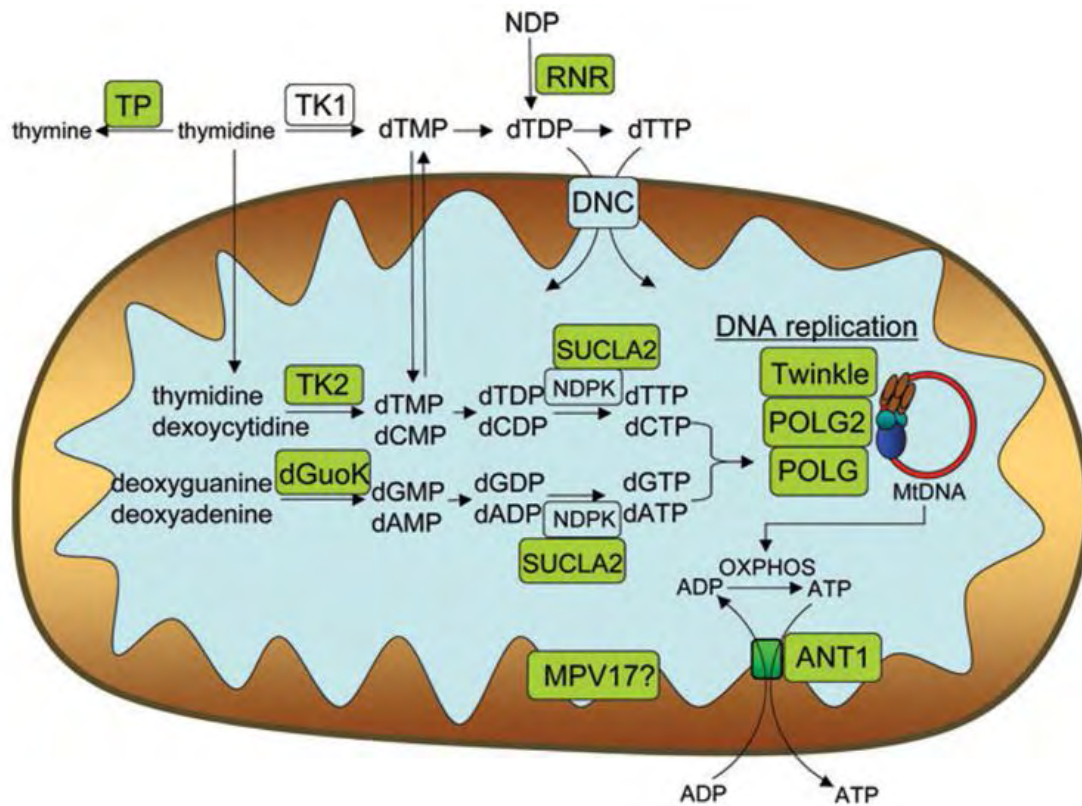
Εικ. 6 Μικροσκοπική και ηλεκτρονική εξέταση μύος. Α)Εφαρμογή τρίχρωμης Χρώσης βαφής Gomori καταδεικνύει red ragged fiber (RRF). Β)Χρώση Κιτρικής δευδρογονάσης (SDH) παρουσιάζει έντονη χρώση στα άκρα της ίνας. C)Ηλεκτρονική εξέταση δεικνύει μιτοχονδριακό πολλαπλασιασμό και αυξημένου μεγέθους μιτοχόνδρια σε κάποιες μυϊκές ίνες, χωρίς παρουσία κρυστάλλων.<sup>131</sup>



Εικ.7 Ηλεκτρική μικροσκόπηση που αποκαλύπτει αυξημένο ποσοστό δομικών ανωμαλιών σε μιτοχόνδριο με παρακρυσταλλικά έγκλειστρα (βέλος) σε μυϊκή ίνα (N,πυρήνας), bar, 1.1 μm<sup>71</sup>

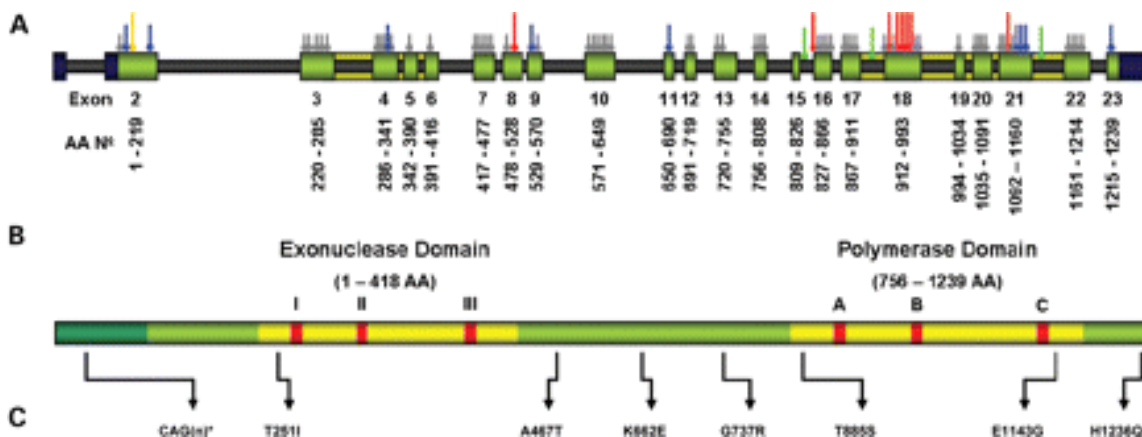
## ***Ε. ΧΡΟΝΙΑ ΠΡΟΟΔΕΥΤΙΚΗ ΕΞΩΤΕΡΙΚΗ ΟΦΘΑΛΜΟΠΛΗΓΙΑ ΚΑΙ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΕΣ ΕΓΚΕΦΑΛΟΜΥΟΠΑΘΕΙΕΣ***

Οι Μεντελιανές μορφές της χρόνιας προοδευτικής εξωτερικής οφθαλμοπληγίας (CPEO), αυτοσωμική επικρατής (autosomal dominant AD-CPEO) και αυτοσωμική υπολειπόμενη (autosomal recessive AR-CPEO), είναι κλινικά και γενετικά ετερογενείς διαταραχές που χαρακτηρίζονται από συσσώρευση πολλαπλών ελλειμμάτων και σημειακών μεταλλάξεων του μιτοχονδριακού DNA (mtDNA) σε μεταμιτωτικούς ιστούς.<sup>72</sup> Το mtDNA αναπαράγεται με τη συνδυασμένη δράση της DNA πολυμεράσης γ (pol γ), την υποβοηθητική υπομονάδα p55, και αναπαραγωγικούς παράγοντες όπως η δεσμευτική (binding) πρωτεΐνη του μιτοχονδριακού (μονής αλυσίδας) DNA, και της TWINKLE ελικάσης.<sup>73</sup> Η πολυμεράση γ είναι η μόνη γνωστή πολυμεράση που βρίσκεται στα μιτοχόνδρια των θηλαστικών και έτσι φέρει το μεγαλύτερο βάρος της αναπαραγωγής του DNA και των διορθωτικών μηχανισμών του DNA.<sup>74</sup> Από το 1999 και έως σήμερα η CPEO έχει συνδεθεί με μεταλλάξεις σε 4 πυρηνικά γονίδια. Τα γονίδια αυτά είναι τα : POLG, POLG2, ANT1 και TWINKLE ή PEO1 (Εικ. 8)



Εικ. 8 Σχηματική αναπαράσταση του μιτοχονδρίου, παρουσιάζοντας τα ενζυμικά μονοπάτια τα οποία μπορούν να οδηγήσουν σε μεταλλάξεις ή εξασθενήσεις, όταν διαταραχθούν. Γονιδιακά προϊόντα συσχετιζόμενα με MDS (Mitochondrial Depletion Syndrome) ή mtDNA μεταλλάξεις βρίσκονται στα πράσινα κουτιά<sup>73</sup>

## POLG



Εικ. 9 Νουλεοτιδικές υποομάδες στο POLG<sup>77</sup> (Α) Το POLG γονίδιο στο ανθρώπινο χρωμόσωμα 15q25 δείχνοντας τα 22 εξώνια (εξώνια 2–23) (Β) Pol- πρωτεΐνη δείχνοντας τις διαφορετικές περιοχές της πρωτεΐνης και τα όρια των αμινοξέων (AA)

Οι ασθένειες που προκύπτουν από μεταλλάξεις στο γονίδιο που είναι υπεύθυνο για την κωδικοποίηση της καταλυτικής υπομονάδας pol γ, είναι εξαιρετικά ετερογενείς.<sup>75, 76, 77</sup> Μεταλλάξεις στο POLG έχουν συνδεθεί με CPEO, Parkinsons', πρόωμη εμμηνόπαυση, σύνδρομο Alpers, μιτοχονδριακή νευρογαστρεντερική εγκεφαλομυοπάθεια (MNGIE), αισθητική αταξική νευροπάθεια και οφθαλμοπάρεση (SANDO).<sup>76,78</sup> Στο POLG έχουν βρεθεί έως τώρα 90 παθογόνες μεταλλάξεις.

Η πρώτη φορά που αναγνωρίστηκε μετάλλαξη στο POLG σε θέση (locus) για CPEO ήταν το 2001 και χαρτογραφήθηκε στο χρωμόσωμα 15q22-q26.<sup>79</sup> (Εικ. 9)

Έως σήμερα, με μία εξαίρεση, όλες οι αυτοσωμικές επικρατείς μεταλλάξεις στο POLG γονίδιο που είναι υπεύθυνες για CPEO εντοπίζονται στην περιοχή πολυμεράσης της pol γ. Δύο από της αντικαταστάσεις, R943H και Y955C, αλλάζουν αλυσίδες που αντιδρούν απευθείας με το dNTP (45-fold increased Km).<sup>80,20</sup> Τα ένζυμα αυτά διατηρούν λιγότερο από το 1% της δράσης του υγιούς τύπου πολυμεράσης και έτσι παρουσιάζεται σημαντική μείωση της διαδικασίας.

Η εξαιρετικά χαμηλή καταλυτική δράση και η επακόλουθη παύση της σύνθεσης DNA, είναι οι δύο πιο πιθανές αιτίες για τη σοβαρή κλινική εικόνα σε R943H και Y955C ετεροζυγώτες<sup>60</sup>. Μελέτες σε τεχνητές μεταλλάξεις σε καλλιέργειες ανθρώπινων κυττάρων έχουν δείξει στοιχεία ότι η λειτουργία τόσο της POLG εξωνουκλεάσης όσο και της POLG πολυμεράσης είναι απαραίτητες για τη διατήρηση του mtDNA.<sup>81</sup>

Στο POLG γονίδιο έχουν αναγνωρισθεί μεταλλάξεις υπεύθυνες τόσο για αυτοσωμικές επικρατείς μορφές CPEO (autosomal dominant, AD-CPEO), όσο και αυτοσωμικές υπολειπόμενες μορφές CPEO (autosomal recessive, AR-CPEO).

Η αρχική κλινική εικόνα ασθενών με AD-CPEO που οφείλεται σε POLG μετάλλαξη, είναι πτώση και εξωτερική οφθαλμοπληγία. Καθώς η νόσος προχωρεί εμφανίζεται δυσφαγία και πιο γενικευμένη μυϊκή αδυναμία κυρίως στον λαιμό και τα άνω άκρα.<sup>82,169</sup> . Στις AD-CPEO οι μεταλλάξεις σε λειτουργικά POLG μοτίβα είναι αυτές που έχουν τον πιο επιβαρυσμένο φαινότυπο, σε σχέση με τις AD-CPEO που οφείλονται σε μεταλλάξεις στα υπόλοιπα γονίδια (ANT1, TWINKLE), ενώ η συχνότητα εκδήλωσης (penetrance) εξαρτάται πλήρως από την ηλικία.

Οι αυτοσωμικές υπολειπόμενες μορφές CPEO (AR-CPEO) έχουν συνδυαστεί ως επί το πλείστον επίσης με μεταλλάξεις στο POLG. Διάφορες συνδυασμένες ετεροζυγωτικές μεταλλάξεις έχουν αναγνωρισθεί με δύο διαφορετικά CPEO μεταλλαγμένα αλληλία.<sup>73,79,83,84,154</sup> Έχει επίσης βρεθεί και μία ομοζυγωτική υπολειπόμενη μετάλλαξη, με διαφορετικό φαινότυπο.<sup>20</sup> Στις AR-CPEO μορφές η κλινική εικόνα γενικά εμφανίζεται με πτώση βλεφάρων και εξωτερική οφθαλμοπληγία. Μπορεί όμως να συνοδεύεται από μυοκαρδιοπάθεια, δυσαρθρία, δυσφαγία, γενικευμένη μυϊκή αδυναμία, καχεξία, γαστρεντερικά συμπτώματα, Parkinsons' και αμφιβλιστροειδοπάθεια.<sup>20</sup> Σε γενικές γραμμές οι υπολειπόμενες μεταλλάξεις έχουν πιο βεβαρυσμένο φαινότυπο, με πιο μικρή ηλικία έναρξης των συμπτωμάτων και σχεδόν πάντα προκαλούν περιφερική νευροπάθεια

## **POLG2**

Πρόσφατα, αναφέρθηκε μία μετάλλαξη στο γονίδιο POLG2, υπεύθυνο για την κωδικοποίηση της υποβοηθητικής υπομονάδας p55, σε ασθενή με AD-CPEO<sup>85</sup>. Η μετάλλαξη αυτή οδηγεί σε αντικατάσταση του G451E. Η μεταλλαγμένη βοηθητική υπομονάδα αδυνατεί να ενωθεί με την καταλυτική ροι γ υπομονάδα και έτσι μειώνεται η τάση σύνθεσης DNA με αποτέλεσμα τη συσσώρευση ελλειμμάτων mtDNA στην CPEO.

## **ANT1(Adenine Nucleotide Translocator 1)**

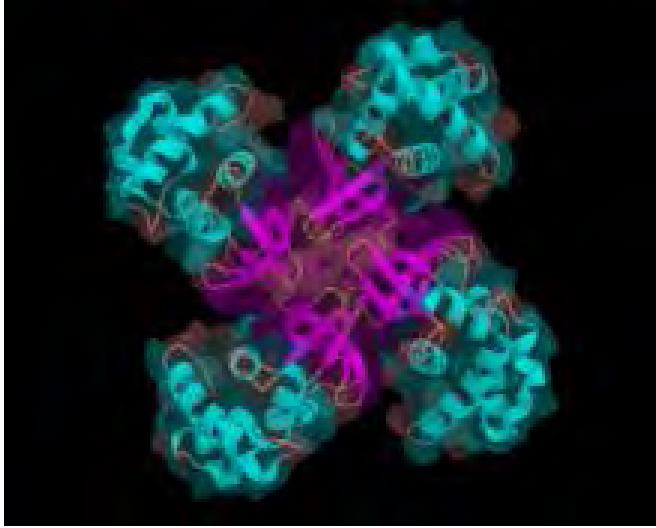
Η ANT1 είναι μία από τις 3 ANT πρωτεΐνες που βρίσκονται σαν έσω-διαμεμβρανικές μιτοχονδριακές πρωτεΐνες.<sup>73</sup> Η ANT1 λειτουργεί ως μία ομοδιμερή (homodimer) πρωτεΐνη που αποτελείται από 30-kDa μονομερή (monomers) και εκφράζεται ως επί το πλείστον στην καρδιά, τους νεφρούς, το ήπαρ και τους σκελετικούς μύες. Η πρωταρχική της λειτουργία είναι η μεταφορά ATP έξω από την μιτοχονδριακή μήτρα και η ανταλλαγή του με ADP. Αρχικά, AD-CPEO σε ιταλικές οικογένειες συνδέθηκε με το χρωμόσωμα 4q34-35 ( το χρωμόσωμα 4q περιέχει το ANT1 και 64 άλλα γονίδια).<sup>86</sup> Το ANT1 θεωρήθηκε ως το κύριο υποψήφιο γονίδιο για AD-CPEO σε σχέση με τα κλινικά και μοριακά ευρήματα, και εντοπίστηκε στο 4q35.<sup>87, 88, 89</sup> Η ανάλυση αλληλουχίας (sequence analysis) του ANT1, σε πέντε οικογένειες και έναν ασθενή με σποραδική μορφή AD-CPEO, έδειξε δύο ετερόζυγες παρερμηνεύσιμες (missense) μεταλλάξεις.<sup>90</sup> Η αυτοσωμική μετάλλαξη A114P και η σποραδική μετάλλαξη V289M βρέθηκαν σε διαμεμβρανικές περιοχές της πρωτεΐνης. Μία ετερόζυγη T293C ANT1 μετάλλαξη βρέθηκε σε μία ελληνική οικογένεια με AD-CPEO,<sup>91</sup> μία ετερόζυγη V289M

μετάλλαξη σε ιταλό ασθενή με σποραδική CPEO<sup>92</sup> και μία ετερόζυγη μετάλλαξη σε μία γερμανική οικογένεια με AD-CPEO<sup>150</sup>.

Τα τρία ισομερή της ANT λειτουργούν σε διάυλοι που λειτουργούν με τη μεταφορά ADP μέσα και ATP έξω από τη μιτοχονδριακή μήτρα. Είναι επίσης δομικά στοιχεία των μιτοχονδριακών πόρων διαπερατότητας (mitochondrial permeability transition pore) και η πλήρης διάνοιξη αυτών των πόρων αποτελεί μη αναστρέψιμο στοιχείο στη διαδικασία της απόπτωσης<sup>93</sup>. Για το πώς οι μεταλλάξεις του ANT1 οδηγούν σε πολλαπλά ελλείμματα του mtDNA σε μεταμιτωτικούς ιστούς, υπάρχουν διάφορες απόψεις. Έχει αναφερθεί πως τα ελλείμματα του mtDNA μπορεί να γεννώνται από διαταραγμένες δεξαμενές (pools) τριφωσφορικών δεοξυνουκλεοτιδίων (dNTP). Αυτό θα μπορούσε να επηρεαστεί από τη διαταραχή του ισοζυγίου της συγκέντρωσης του ADP και του ATP στο μιτοχόνδριο και / ή στο κυτταρόσωμα, που είναι αποτέλεσμα της διαταραγμένης λειτουργίας της ANT1.<sup>20</sup> Στο κυτταρόσωμα, πληθώρα ADP και έλλειψη ATP, προκαλεί βλάβη στο ένζυμο ριβονουκλεϊκή αναγωγή που είναι το μόνο ένζυμο που εμπλέκεται στη σύνθεση dNTP.

Η κλινική εικόνα ασθενών με μετάλλαξη στο ANT1 είναι αυτή με τα πιο ήπια χαρακτηριστικά σε σχέση με την εικόνα ασθενών με μεταλλάξεις στα υπόλοιπα γονίδια. Τα συνήθη χαρακτηριστικά είναι εξωτερική οφθαλμοπληγία, πτώση βλεφάρων αλλά όχι γενικευμένη μυϊκή αδυναμία. Η ηλικία εμφάνισης είναι γύρω στα 35 έτη. Έχουν επίσης αναφερθεί νευροαισθητηριακή υποακουσία, μελαγχρωστική αμφιβληστροειδοπάθεια, θυρεοειδικές διαταραχές, και άνοια σε μεγαλύτερους ασθενείς.<sup>94</sup>

## TWINKLE (C10orf2) ή PEO1



Εικ. 10 Υπολογιστική απεικόνιση τεταρτογενούς δομής ελικάσης (en.wikipedia)

Η mtDNA ελικάση (Εικ10), κωδικοποιείται από το γονίδιο TWINKLE και έχει δομικές ομοιότητες με την πρωτεΐνη phage T7gp4 helicase/primase όμως στερείται σημαντικές, σχετικές με πριμάση, αλληλουχίες που βρίσκονται στην T7gp4.<sup>95, 96</sup> Η ονομασία TWINKLE δόθηκε λόγω του ότι η πρωτεΐνη ομοιάζει με αστέρι σε μιτοχόνδρια που έχουν υποστεί επεξεργασία με φθορίζουσα ουσία.<sup>95</sup> Η ανακάλυψη του γονιδίου ξεκίνησε όταν σε μία φιλανδική οικογένεια μία θέση στο χρωμόσωμα 10q24 συνδέθηκε με AD-CPEO.<sup>97</sup> Η έρευνα για πιθανό υποψήφιο γονίδιο οδήγησε στην αναγνώριση του γονιδίου C10orf2 που είναι υπεύθυνο για την προαναφερθείσα πρωτεΐνη. Σε έλεγχο του TWINKLE γονιδίου σε ασθενείς με AD-CPEO σχετιζόμενη με πολλαπλά ελλείμματα mtDNA, αναγνωρίστηκαν 11 μεταλλάξεις που κωδικοποιούν διαφορετικές περιοχές και οι οποίες συνδυάζονται με την διαταραχή σε 11 προσβεβλημένες οικογένειες.<sup>95</sup> Στους ασθενείς της φιλανδικής οικογένειας βρέθηκε ένας ετερόζυγος 39-bp διπλασιασμός στο C10orf2 που οδηγεί σε διπλασιασμό των αμινοξέων 352-364 της TWINKLE



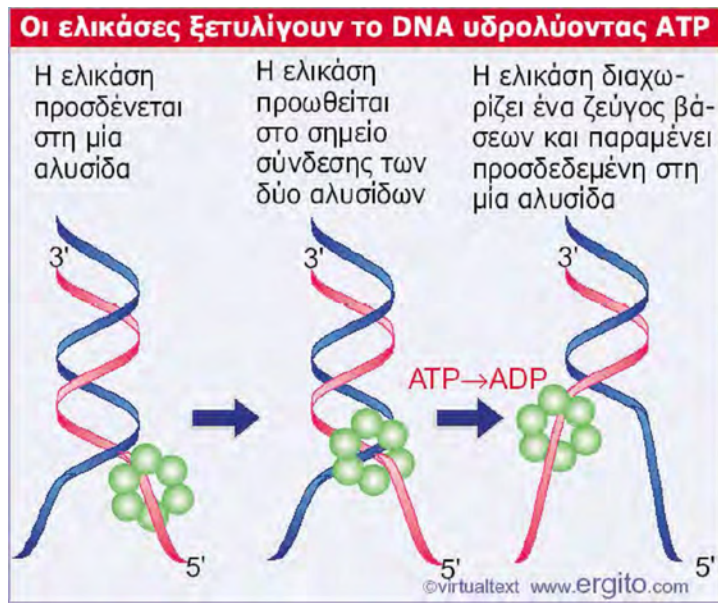
πρωτεΐνης. Σε ασθενείς από πακιστανικές, ιταλικές, βρετανικές και αυστραλιανές οικογένειες με AD-CPEO βρέθηκαν ετερόζυγες παρερμηνεύσιμες μεταλλάξεις.<sup>98</sup>

Οι μεταλλάξεις στο TWINKLE έχουν κυρίως συνδεθεί με AD-CPEO, αλλά υπάρχει μία αναφορά για υπολειπόμενη TWINKLE μετάλλαξη σαν αιτία SANDO.<sup>99</sup> Οι οκτώ από τις έντεκα μεταλλάξεις στο Twinkle, συσσωρεύονται σε μία μικρή περιοχή 30 αμινοξέων που αντιστοιχεί στην περιοχή που συνδέει την πριμάση και την ελικάση στην T7 gp4. Αυτές οι μεταλλάξεις μπορεί να επηρεάζουν την αλληλεπίδραση των υπομονάδων. Αυτό θα μπορούσε να εξηγήσει την αρνητική επίδραση των μεταλλάξεων του TWINKLE στη διατήρηση του mtDNA που οδηγεί σε διάσπασή του. Η πρωτεΐνη είναι λειτουργική όταν βρίσκεται στην εξαγωνική μορφή της. Το πώς ακριβώς οι μεταλλάξεις στο TWINKLE οδηγούν στο σχηματισμό ελλειμμάτων mtDNA δεν είναι ακόμα εξακριβωμένο. Όπως και στις μεταλλάξεις του ANT1 αυξημένος κατακερματισμός dNTP θα μπορούσε να οδηγήσει σε λειτουργική διαταραχή των dNTP και ξανά βλάβη στην αναπαραγωγή mtDNA μέσω της πολυμεράσης γ. Εντούτοις υπάρχουν πολλές ακόμα υποθέσεις. Γενικά πάντως, οι DNA ελικάσες συμβάλλουν στην αναπαραγωγή, διόρθωση, αναπροσαρμογή και μεταγραφή του DNA.<sup>100</sup> (Εικ. 11)

Τα κλινικά χαρακτηριστικά των Φιλανδών ασθενών ήταν κατά κύριο λόγο πτώση βλεφάρων και εξωτερική οφθαλμοπληγία. Επίσης συχνά παρατηρήθηκε κατάθλιψη στα μέλη που παρουσίασαν ελλείμματα DNA.<sup>101,167</sup> Οι Πακιστανοί ασθενείς παρουσίασαν πτώση βλεφάρων με περιορισμό των οφθαλμικών κινήσεων, συνοδευόμενη από ποικίλου βαθμού αδυναμία των άνω άκρων.<sup>102</sup>

Στις Ιταλικές οικογένειες δύο ομόζυγα άτομα είχαν πιο βεβαρυσμένο φαινότυπο και μικρότερη ηλικία έναρξης από ότι οι ετερόζυγοι συγγενείς τους.<sup>95</sup> Οι αυστραλιανές οικογένειες με σημειακές μεταλλάξεις του TWINKLE έχουν παρόμοια πορεία νόσου με τους Ιταλούς και τους Πακιστανούς ασθενείς αν και συχνά παρουσιάζονται συνοδά συμπτώματα όπως μυϊκό άλγος, αταξία, διάχυτη απονεύρωση στο EMG, που υποδεικνύει νόσο του κινητικού νευρώνα.<sup>98</sup>

Σε γενικές γραμμές η κλινική εικόνα των ασθενών με μετάλλαξη στο TWINKLE είναι λιγότερο βαριά από τους ασθενείς με μετάλλαξη στο POLG αλλά περισσότερο από αυτούς με μεταλλάξεις στο ANT1.



Εικ. 11 Μία εξαμερής ελικάση διατρέχει τη μία αλυσίδα του DNA. Όταν η ελικάση προσδένεται στο δίκλωνο DNA, η διαμόρφωση της αλλάζει, και υδρολύει ATP, για να διαχωρίσει τις δύο αλυσίδες. Μετά το διαχωρισμό, υιοθετεί πάλι τη διαμόρφωση που έχει όταν είναι προσδεσμένη σε μονόκλωνο DNA. (www.ergito.com)

## ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### A.ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ

#### Αλυσωτή αντίδραση πολυμεράσης, *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

Η αλυσωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR) επιτρέπει την ενίσχυση πολύ μικρών ποσοτήτων DNA. Έτσι γίνεται δυνατή η παραγωγή τεράστιου αριθμού πιστών αντιγράφων μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA με τη χρήση διαδοχικών μεταβολών της θερμοκρασίας<sup>103</sup> χωρίς την χρήση ζωντανών κυττάρων(όπως τα βακτήρια).

Η ανάπτυξη αυτής της τεχνικής το 1984 από τον Kary Mullins,<sup>104</sup> οδήγησε σε μια έκρηξη νέων τεχνικών στην μοριακή βιολογία και του χάρισε το βραβείο Nobel το 1993<sup>105</sup> καθώς γινόταν όλο και πιο εμφανής η σπουδαιότητα της μεθόδου <sup>106</sup> σε πολλές εφαρμογές.<sup>107,108</sup>

Η τεχνική της PCR βασίζεται στην ανακάλυψη της DNA πολυμεράσης Taq, η οποία προέρχεται από το βακτήριο *Thermus aquaticus* που αναπτύσσεται κοντά σε θερμές πηγές.

Αυτή η DNA πολυμεράση είναι σταθερή στις υψηλές θερμοκρασίες που απαιτούνται προκειμένου να πραγματοποιηθεί η ενίσχυση του στόχου DNA, ενώ στις ίδιες συνθήκες οι υπόλοιπες πολυμεράσες απενεργοποιούνται.

Η αντίδραση PCR εκμεταλλεύεται ορισμένα χαρακτηριστικά του in-vitro μηχανισμού αντιγραφής του DNA με σκοπό την in vitro ενίσχυση συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA. Η DNA πολυμεράση χρησιμοποιεί μονόκλωνο μόριο DNA ως εκμαγείο για την σύνθεση ενός νέου συμπληρωματικού κλώνου. Τα μονόκλιωνα μόρια μπορούν να παραχθούν από δίκλιωνα μόρια DNA, όταν αυτά θερμανθούν σε υψηλές θερμοκρασίες, οπότε διαχωρίζονται. Η DNA πολυμεράση απαιτεί την ύπαρξη ενός μικρού τμήματος δίκλωνου DNA για την έναρξη της σύνθεσης. Η έναρξη της σύνθεσης του DNA μπορεί να καθοριστεί με την χρήση ενός

ολιγονουκλεοτιδικού εναρκτήριου μορίου (εκκινητής-primer) 10-15(bp), που συνδέεται με την μήτρα ακριβώς στο σημείο έναρξης.<sup>109</sup>

Η μέθοδος αυτή ορίσθηκε ως «αλυσιδωτή αντίδραση» επειδή οι νεοσυντιθέμενες “αλυσίδες” DNA χρησιμοποιούνται ως εκμαγείο για σύνθεση νέας “αλυσίδας” DNA.

Μέσω της αντίδρασης PCR μπορούμε με κατάλληλους εκκινητές να κατευθύνουμε την DNA πολυμεράση να συνθέσει συγκεκριμένη περιοχή του DNA.<sup>110</sup> Και οι δύο κλώνοι του DNA μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως εκμαγεία για την σύνθεση DNA εφόσον υπάρχει εκκινητής για κάθε μία. Επιτυγχάνουμε εκθετική “ενίσχυση”(amplification) της συγκεκριμένης περιοχής του DNA στόχου. Το τελικό αποτέλεσμα μιας αντίδρασης PCR μετά από  $n$  κύκλους είναι η παραγωγή  $2^n$  δίκλωνων μορίων DNA που είναι πιστά αντίγραφα της αλληλουχίας του DNA που περικλείεται μεταξύ των εκκινητών. Δεν είναι έτσι απαραίτητο να έχει απομονωθεί μόνο η αλληλουχία-DNA που πρόκειται να ενισχυθεί διότι αυτή μπορεί να καθορισθεί από τους εκκινητές που χρησιμοποιούνται στην αντίδραση.

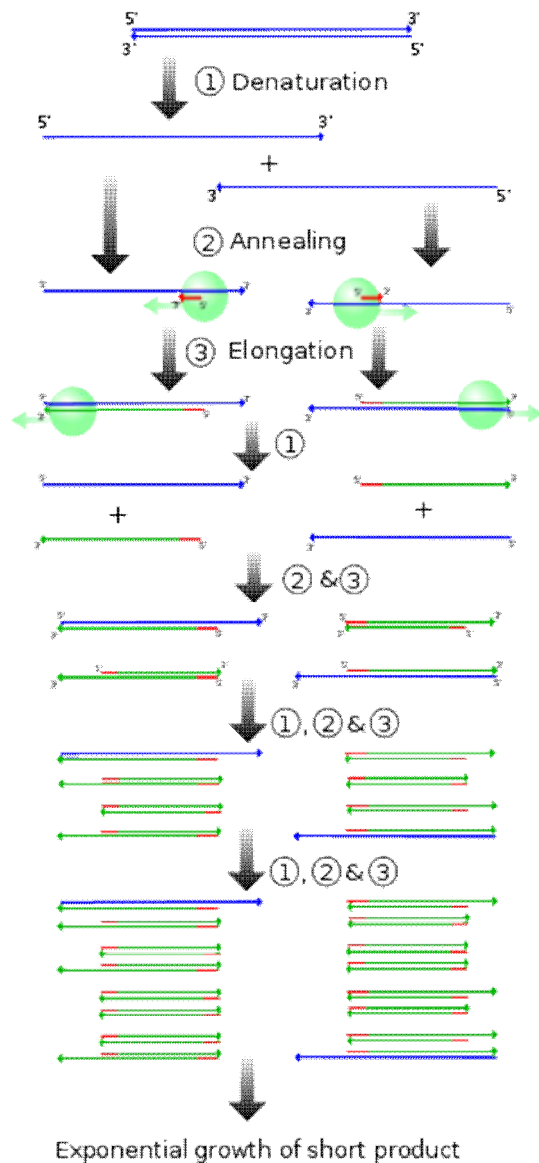
Ένα τυπικό πρωτόκολλο PCR περιλαμβάνει πολλούς κύκλους (συνήθως 25-35), καθένας εκ των οποίων περιλαμβάνει επώαση των δειγμάτων σε 3 διαφορετικές θερμοκρασίες, με βάση τα ακόλουθα βήματα : <sup>111, 112, 113</sup> (Εικ.12)

*1.Αποδιάταξη (denaturation) αρχικού δείγματος :* το μείγμα θερμαίνεται αρχικά στους 94-96°C για περίπου 15 min. ώστε να αποδιαταχθεί το DNA με τη διάσπαση των δεσμών υδρογόνου και την καταστροφή των δευτεροταγών και τριτοταγών δομών και η διπλή έλικα να ανοίξει σε δύο μονόκλωνες αλυσίδες. Έτσι τα δίκλινα μόρια DNA αποχωρίζονται τελείως και παράγονται οι μονόκλωνες αλυσίδες που θα χρησιμεύσουν ως εκμαγεία για τους εκκινητές και τη DNA πολυμεράση.

2. *Υβριδισμός (annealing)* : στη συνέχεια η θερμοκρασία μειώνεται μεταξύ 50 και 71°C για 30-60 sec, ώστε να γίνει η πρόσδεση των εκκινητών στο μονόκλωνο DNA-εκμαγείο στο 3' άκρο κάθε αλυσίδας. Οι εκκινητές υβριδοποιούνται με τις συμπληρωματικές τους αλληλουχίες στα μόρια του μονόκλωνου DNA. Η θερμοκρασία υβριδισμού αποτελεί καθοριστικό παράγοντα για την εξειδίκευση της αντίδρασης. Οι θερμοκρασίες και οι χρόνοι που χρησιμοποιούνται ποικίλουν ανάλογα με τις αλληλουχίες που ενισχύονται, για τη βέλτιστη θερμοκρασία υβριδισμού των εκκινητών, η οποία για μήκος εκκινητών περίπου 20 βάσεων προσεγγίζεται θεωρητικά από τον τύπο:  $T_m = (A+T)2 + (G+C)4 \text{ } ^\circ\text{C}$ <sup>114</sup>

3. *Προέκταση (Extension-Elongation)* : στο επόμενο βήμα η θερμοκρασία αυξάνεται στους 72°C, περιοχή βέλτιστης θερμοκρασίας για τη θερμοσταθερή TaqDNA πολυμεράση, ώστε να εκτελέσει τη σύνθεση της συμπληρωματικής αλυσίδας DNA χρησιμοποιώντας δεοξυνουκλεοτίδια (dNTPs) του διαλύματος. Ο χρόνος επώασης στους 72°C ποικίλει από 1-3 λεπτά ανάλογα με το μήκος του τμήματος στόχου που θέλουμε να ενισχύσουμε.<sup>115,116</sup>

4. *Αποδιάταξη προϊόντων*: Τέλος, η θερμοκρασία αυξάνεται και πάλι στους 94°C, μόνο για λίγα δευτερόλεπτα, έτσι ώστε τα μικρά τμήματα δίκλωνου DNA (που αποτελούνται από την αρχική και τη νεοσυντιθέμενη συμπληρωματική αλυσίδα) να αποχωριστούν και πάλι. Αυτές οι μονόκλωνες αλυσίδες αποτελούν εκμαγεία για τον επόμενο κύκλο σύνθεσης DNA και επαναλαμβάνονται συνήθως 25-35 τέτοιοι κύκλοι. Ο χρόνος του τελικού κύκλου προέκτασης είναι συνήθως μεγαλύτερος έτσι ώστε να δοθεί χρόνος στην πολυμεράση για την ολοκλήρωση της προέκτασης όλων των προϊόντων.



Εικ. 12 Σχηματική αναπαράσταση του PCR κύκλου. (1)Αποδιάταξη(Denaturing) 94-96°C. (2)Υβριδισμός(Annealing) ~65°C (3)Προέκταση(Elongation) 72°C. Τέσσερεις κύκλοι παρουσιάζονται στο σχήμα. Οι μπλε γραμμές αντιπροσωπεύουν το DNA εκμαγείο στο οποίο εκκινητές(κόκκινες γραμμές) υβριδοποιούνται εκτεινόμενο από την DNA πολυμεράση (πράσινοι κύκλοι), για να δώσουν DNA προϊόντα(πράσινες γραμμές), τα οποία με την σειρά τους θα χρησιμεύσουν ως εκμαγεία για την συνέχιση της PCR (*UpToDate*)

Κατά τη διάρκεια του πρώτου κύκλου, το παραγόμενο προϊόν έχει ενδιάμεσο μέγεθος, αφού αρχίζει από το σημείο πρόσδεσης του εκκινητή στην αρχική αλυσίδα του DNA και τελειώνει στο σημείο εκείνο που σταματάει η δράση της DNA πολυμεράσης. Στο δεύτερο κύκλο έχουμε επίσης προϊόντα ενδιάμεσου μεγέθους, ενώ από τον τρίτο κύκλο εμφανίζονται οι αλυσίδες του DNA που έχουν το επιθυμητό μέγεθος. Από το σημείο αυτό και πέρα, η παραγωγή προϊόντων επιθυμητού μεγέθους αυξάνεται εκθετικά, ώστε στο τελικό προϊόν της αντίδρασης να ανιχνεύονται ουσιαστικά μόνο μόρια συγκεκριμένου μεγέθους

Στα **πλεονεκτήματα** του PCR προσμετρούνται η μεγάλη ευαισθησία, η μεγάλη ειδικότητα και η μεγάλη ταχύτητα. Μπορούμε να σχεδιάσουμε εκκινητές (primers) συμπληρωματικούς σε ειδικές και μοναδικές αλληλουχίες DNA για το εκάστοτε υπό αναζήτηση γονίδιο.

Στα **προβλήματα** του PCR καταγράφονται οι ψευδώς θετικές αντιδράσεις, οι οποίες κυρίως οφείλονται στις επιμολύνσεις, οι ψευδώς αρνητικές αντιδράσεις, με το συνηθέστερο αίτιο τους να είναι η ύπαρξη αναστολέων και γι' αυτό έχει αναπτυχθεί ένας αριθμός τεχνικών για καλύτερα αποτελέσματα PCR.<sup>117, 118,119</sup>

Η απόδοση της PCR δεν είναι πάντοτε 100% εξαιτίας μιας σειράς παραγόντων:

1. Η απόδοση του ενζύμου μειώνεται μετά από 25-30 κύκλους, αφενός εξαιτίας της περίσσειας μορίων DNA προς αντιγραφή και αφετέρου εξαιτίας της θερμικής αποδιάταξης του ενζύμου.
2. Με την αύξηση των αντιγράφων παρατηρείται ανταγωνισμός μεταξύ αυτών και των εκκινητών στη σύνδεση με τα μόρια του DNA-εκμαγείου.
3. Πολλές φορές υπάρχει αδυναμία διαχωρισμού του DNA από άλλα μακρομόρια καθώς και κακή ποιότητα του αρχικού DNA.
4. Η αποδιάταξη της διπλής έλικας δεν γίνεται σε όλα τα μόρια.

Η απόδοση της PCR μπορεί επίσης να επηρεάζεται, θετικά ή αρνητικά, από συστατικά που υπάρχουν στο βιολογικό δείγμα, από το οποίο προέρχεται το DNA, ή από αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται για την απομόνωσή του. Για παράδειγμα όταν το δείγμα προέρχεται από περιφερικό αίμα είναι καλύτερο να συλλέγεται σε συλλέκτες EDTA και όχι ηπαρίνης ως συντηρητικό, αφού αυτή θεωρείται αναστολέας της αντίδρασης. Μη ιοντικά απορρυπαντικά (Triton X 100, Tween 20 ) δεν επιδρούν στην αντίδραση, ενώ αντίθετα ιοντικές απορρυπαντικές ουσίες (π.χ. SDS) δρουν ως αναστολείς και πρέπει να απομακρύνονται από το δείγμα (εκχύλιση με φαινόλη και κατακρήμνιση με αιθανόλη). Επιπλέον υπάρχουν συστατικά που μπορούν να βελτιώσουν την απόδοση της αντίδρασης (π.χ. φορμαμίδιο 5%, PEG 5-15%, γλυκερόλη 10-15%)

Η ανίχνευση των προϊόντων της PCR μπορεί να γίνει με διάφορους τρόπους, που εξαρτώνται από τον πιθανό ιχνηθέτη με τον οποίο είναι σεσημασμένο το προϊόν της αντίδρασης. Ο πιο κλασσικός τρόπος είναι η **ηλεκτροφόρηση σε gel αγαρόζης** του δείγματος, παράλληλα με γνωστή ποσότητα DNA-δείκτη μοριακού βάρους (M.W. DNA marker), ώστε να μπορεί να καθοριστεί το μέγεθος των μορίων του προϊόντος. Η χρώση του gel με βρωμιούχο αιθίδιο δίνει πορτοκαλί χρώμα στα σημεία που υπάρχει DNA, όταν αυτό εκτεθεί σε υπεριώδη ακτινοβολία, οπότε έχουμε ποιοτικό προσδιορισμό του προϊόντος.

## **Συστατικά της PCR αντίδρασης**

### **Ταq DNA πολυμεράση**

Το ένζυμο DNA πολυμεράση είναι αυτό που καταλύει την επέκταση των εκκινητών. Χρησιμοποιώντας την θερμοάνοχη Taq DNA πολυμεράση είναι δυνατή η χρήση υψηλότερων θερμοκρασιών για τον υβριδισμό των εκκινητών και την επέκταση της αλληλουχίας, με μη ειδική πρόσδεση των εκκινητών, και αυξάνοντας την αποτελεσματικότητα και την απόδοση του προϊόντος. Η Taq DNA πολυμεράση αποτελείται από μια απλή πολυπεπτιδική αλυσίδα με μοριακό



βάρος 94kDa, και έχει δραστηριότητα εξωνουκλεάσης κατά την κατεύθυνση 5'→3' (διορθωτική). Το ένζυμο είναι υψηλά καθαρό από μη ειδικές ενδο- και εξωνουκλεάσες. Η συγκέντρωση του ενζύμου που χρησιμοποιείται είναι 5U/λ (U=unit=μονάδα)

Οι **περιοριστικές ενδονουκλεάσες** είναι ένζυμα που παράγονται από βακτήρια. Διασπών τους φωσφοδιεστερικούς δεσμούς στο εσωτερικό του μορίου. Αναγνωρίζουν και κόβουν τις ίδιες πάντα ειδικές αλληλουχίες του δίκλωνου DNA, αφήνοντας μονόκλωνες ουρές από αζευγάρωτα νουκλεοτίδια στα κομμένα άκρα. (Υπάρχουν ορισμένες περιοριστικές ενδονουκλεάσες, που κόβουν το DNA χωρίς να δημιουργούν μονόκλωνες ουρές). Τα άκρα αυτά μπορούν να σχηματίσουν υδρογονικούς δεσμούς με τις συμπληρωματικές βάσεις του φορέα κλωνοποίησης που έχει κοπεί με το ίδιο ένζυμο. Τα δύο είδη DNA μπορεί να αναμειχθούν, και επειδή έχουν συμπληρωματικά άκρα, ενώνονται μεταξύ τους με τη μεσολάβηση της DNA δεσμάσης. Έτσι, δημιουργούνται ανασυνδυσασμένα μόρια DNA.

### **Ρυθμιστικά διαλύματα**

Στο εμπόριο, κάθε ένζυμο συνοδεύεται και με το αντίστοιχο ρυθμιστικό διάλυμα που του εξασφαλίζει βέλτιστες συνθήκες λειτουργίας. Το πιο κοινό ρυθμιστικό διάλυμα της PCR περιέχει 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3) και 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>. Τα ιόντα Mg<sup>2+</sup> είναι σημαντικός παράγοντας που επηρεάζει την απόδοση της Taq DNA πολυμεράσης. Απουσία των ελευθέρων ιόντων μαγνησίου, η DNA πολυμεράση είναι ανενεργή, ενώ σε περίσσεια αυτής η ακρίβεια του ενζύμου μειώνεται και είναι πιο πιθανή η πραγματοποίηση μη ειδικής ενίσχυσης. Η συγκέντρωση χηλικών παραγόντων, όπως είναι το EDTA, ή αρνητικά φορτισμένοι παράγοντες, όπως είναι τα φωσφορικά ιόντα, πρέπει να διατηρούνται σε χαμηλά επίπεδα και αυτό γιατί χηλικοί ή αρνητικά φορτισμένοι παράγοντες θα δημιουργούσαν σύμπλοκα με τα ιόντα Mg<sup>2+</sup> με αρνητικά αποτελέσματα στη δράση της Taq DNA πολυμεράσης.

### **Μείγμα τριφωσφορικών δεοξυνοθκλεοτιδίων (dNTPs):**

Το μείγμα των τριφωσφορικών δεοξυνοκλεοτιδίων πρέπει να περιέχει ίσες συγκεντρώσεις των dATP, dTTP, dCTP και dGTP. Συνήθως χρησιμοποιείται σε συγκέντρωση 20-200μM. Χαμηλότερες συγκεντρώσεις (10-100μM) εξασφαλίζουν μεγαλύτερη αξιοπιστία στο αποτέλεσμα, ενώ πολύ υψηλές συγκεντρώσεις (>200μM) ελαττώνουν την ειδικότητα και την αξιοπιστία της αντίδρασης. Ωστόσο, κάθε φορά η βέλτιστη συγκέντρωση των dNTPs καθορίζεται εμπειρικά και εξαρτάται από διάφορους παράγοντες, όπως η συγκέντρωση ιόντων μαγνησίου, η συγκέντρωση των εκκινητών, το μήκος των αντιγράφων του DNA και ο αριθμός

### **Ιόντα μαγνησίου (Mg<sup>2+</sup>)**

Τα ιόντα μαγνησίου προστίθενται στο μείγμα με τη μορφή χλωριούχου μαγνησίου (MgCl<sub>2</sub>). Η συγκέντρωσή του μπορεί να κυμαίνεται μεταξύ 0,5-50mM, με συνηθέστερη 1-1,5 mM. Και σε αυτή την περίπτωση απαιτείται βελτιστοποίηση της αντίδρασης για να βρεθεί η ιδανικότερη συγκέντρωση ιόντων μαγνησίου για μια συγκεκριμένη αντίδραση. Χαμηλότερες συγκεντρώσεις της ιδανικής οδηγούν σε χαμηλή απόδοση της αντίδρασης, ενώ υψηλότερες συγκεντρώσεις διευκολύνουν την παραγωγή μη ειδικών προϊόντων.

Τα ιόντα μαγνησίου σχηματίζουν διαλυτά σύμπλοκα με τα dNTPs, γεγονός που διευκολύνει την ενσωμάτωσή τους στην αλυσίδα του DNA. Επίσης είναι απαραίτητα για τη δράση της πολυμεράσης, ενώ αυξάνουν την θερμοκρασία τήξης T<sub>m</sub> (melting temperature) του δίκλωνου μορίου του DNA και επηρεάζουν την αναδιάταξη των εκκινητών.

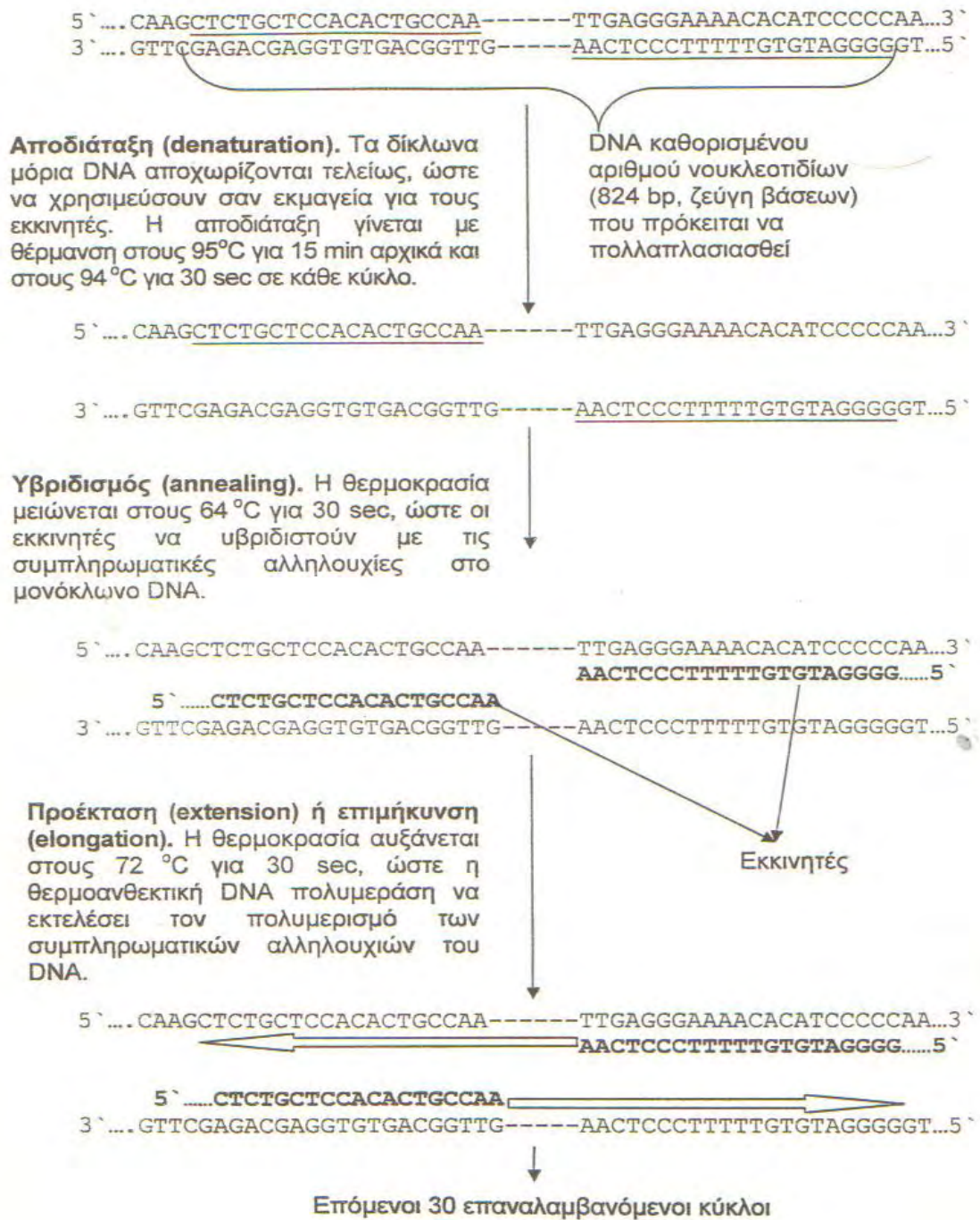
## **Αλληλουχίες-στόχοι**

Το DNA που περιέχει την αλληλουχία-στόχο μπορεί να προστεθεί στο μείγμα αντίδρασης της PCR σε μονο- αλλά και δίκλωνη μορφή. Το μέγεθος του DNA δεν αποτελεί κρίσιμο παράγοντα, αλλά έχει αποδειχθεί ότι είναι καλύτερο μεγάλα τμήματα DNA να χρησιμοποιούνται αφού πρώτα γίνει η διάσπασή τους με διάφορα ένζυμα περιορισμού. Η συγκέντρωση της αλληλουχίας-στόχου μέσα στο τμήμα του DNA που χρησιμοποιείται δεν είναι συχνά υπό τον έλεγχο του ερευνητή. Θα ήταν ωφέλιμο, πριν από την πραγματοποίηση των πειραμάτων, να γινόταν μια σειρά πειραμάτων ελέγχου με διαφορετικά ποσά των γνωστών αλληλουχιών έτσι ώστε να ελεγχθεί η ευαισθησία της αντίδρασης.<sup>179</sup>

## **Ολιγονουκλεοτίδια - Εκκινητές**

Η επιλογή των εκκινητών είναι ένα κρίσιμο σημείο στο σχεδιασμό της τεχνικής της PCR. Οι εκκινητές πρέπει να έχουν τέλεια συμπληρωματικότητα με τα άκρα του τμήματος του DNA που πρόκειται να πολλαπλασιαστεί. Το μήκος των ολιγονουκλεοτιδίων που θα χρησιμοποιηθούν ως εκκινητές κυμαίνεται, μεταξύ 20-30 νουκλεοτιδίων, παράγοντας ο οποίος καθορίζεται από την θερμοκρασία τήξης  $T_m$  και κατά συνέπεια τη θερμοκρασία αναδιάταξης και πάντα πρέπει να αποτελούνται από τουλάχιστον 16 νουκλεοτίδια. Μικρότεροι εκκινητές ενδέχεται να συνδεθούν με άλλα τμήματα του DNA και να δώσουν μη ειδικά προϊόντα, ενώ μεγαλύτεροι μειώνουν την απόδοση της αντίδρασης. Οι αλληλουχίες αυτές πρέπει να περιέχουν 40-60% γουανίνη και κυτοσίνη (G+C) και δεν πρέπει να είναι συμπληρωματικές, έτσι ώστε να αποφευχθεί ο σχηματισμός διμερών κατά την διάρκεια της PCR. Οι εκκινητές χρησιμοποιούνται σε συγκεντρώσεις 0,05-0,5  $\mu\text{M}$ , ενώ υψηλότερες συγκεντρώσεις δίνουν μη ειδικά προϊόντα και διμερή των εκκινητών.

Η θερμοκρασία υβριδισμού των εκκινητών εκτιμάται κάθε φορά βάση των σημείων τήξης τους, τα οποία όμως σημεία πρέπει να είναι παρόμοια για τους δυο εκκινητές. (Εικ.13)



Εικ. 13 Ενδεικτικό σχήμα αντίδρασης PCR. Ενίσχυση τμήματος του ογκογονιδίου ERBB2 μήκους 824 ζευγών βάσεων (bp). Η βέλτιστη θερμοκρασία υβριδισμού των ειδικών εκκινητών είναι 64°C (Από βιβλίο Α.Σκορίλας «Στοιχεία Κλινικής Βιοχημείας και Μοριακής Διαγνωστικής»)

## **Αποκάλυψη Προϊόντων PCR.**

Η πιο συνηθισμένη μέθοδος ανίχνευσης των προϊόντων PCR είναι η **ηλεκτροφόρηση σε γέλη** (gel electrophoresis). Τα περιεχόμενα του PCR φορτώνονται σε ένα gel αγαρόζης, εφαρμόζεται ένα ηλεκτρικό πεδίο μέσω ενός buffer και τα προϊόντα μετακινούνται μέσα στο gel αναλόγως του μεγέθους τους, με τα μικρότερα να διανύουν μεγαλύτερες αποστάσεις λόγω των μικρότερων αντιστάσεων που συναντούν.

Παράλληλα με τα άγνωστα προϊόντα “τρέχουμε” και κομμάτια DNA γνωστού μεγέθους (ladders), με τη βοήθεια των οποίων μπορούμε να προσδιορίσουμε αδρά το μέγεθος του PCR-προϊόντος. Τις μπάντες που σχηματίζει το DNA τις χρωματίζουμε με αιθίδιο (ethidium bromide) και τις βλέπουμε με υπεριώδες φως (UV). Ένα δεδομένο ζεύγος εκκινητών οφείλει να δημιουργήσει ένα προϊόν με συγκεκριμένο μέγεθος. Η εμφάνιση ενός τέτοιου προϊόντος στο gel, μάς επιτρέπει να πούμε ότι έχουμε ένα θετικό- PCR.

Επειδή το PCR με συγκεκριμένους εκκινητές (primers) μπορεί τυχαίως να δώσει μη ειδικά προϊόντα, οφείλομε να διερευνούμε την **ταυτότητα του προϊόντος**. Αυτό μπορεί να γίνει πχ. με αλληλούχηση (Sequencing), όπου μέσω ειδικών αντιδράσεων και με τη χρήση ειδικών μηχανημάτων (sequencers), αποκρυπτογραφείται η ακριβής αλληλουχία του προϊόντος PCR. Άλλος τρόπος είναι η σήμανση με ανιχνευτή (probe). Συνήθως πρόκειται για ένα ειδικό ολιγονουκλεοτιδικό probe, την παρουσία του οποίου έχουμε τη δυνατότητα να ανιχνεύσουμε. Ο ανιχνευτής συνδέεται συμπληρωματικά με μια ειδική περιοχή του PCR προϊόντος και μας επιτρέπει έτσι να ταυτοποιήσουμε το προϊόν.

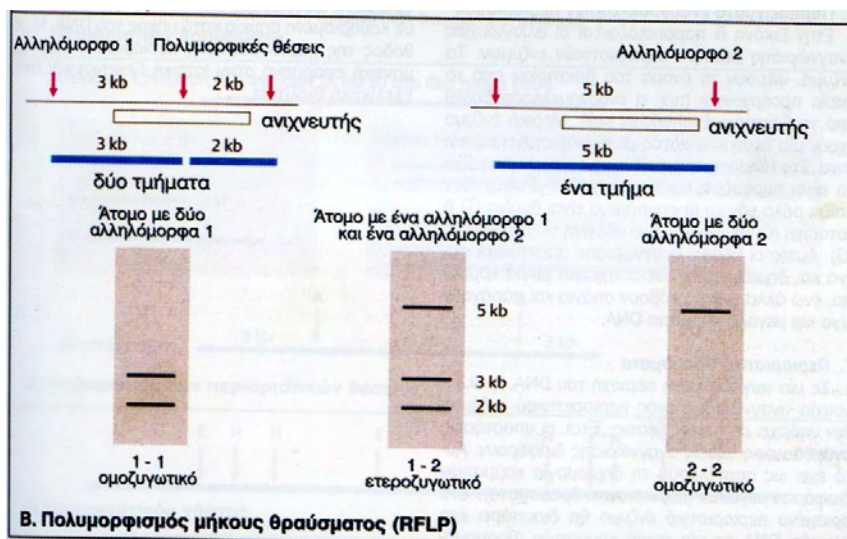
## **RFLP**(Restriction fragment length polymorphism)

### *Πολυμορφισμός μήκους θραύσματος*

Η νουκλεοτιδική αλληλουχία διαφέρει μεταξύ ατόμων περίπου ανά 100 ζεύγη βάσεων DNA (DNA πολυμορφισμός- **Πολυμορφισμοί**: Αλλαγές μονήρων νουκλεοτιδίων που έχουν κληρονομηθεί). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, οι θέσεις αναγνώρισης του περιοριστικού ενζύμου να υπάρχουν στο ένα χρωμόσωμα αλλά όχι στο άλλο. Επομένως, σε ορισμένες περιοχές του γονιδιώματος, τα μεγέθη των περιοριστικών τμημάτων θα διαφέρουν (πολυμορφισμός μήκους θραυσμάτων, RFLP). Στο παράδειγμα φαίνονται δύο τμήματα DNA μεγέθους 5 kb (5.000 ζευγών βάσεων). Στο ένα τμήμα υπάρχει μία θέση αναγνώρισης για ένα ένζυμο περιορισμού (αλληλόμορφο 1), ενώ στο άλλο, η θέση αυτή, απουσιάζει (αλληλόμορφο 2) Με την ανάλυση κατά Southern μπορεί να καθοριστεί εάν ένα άτομο είναι ομόζυγο 1-1 σε αυτή τη θέση (δύο αλληλόμορφο 1, απουσία τμήματος 5 kb), ετερόζυγο 1-2 (ένα αλληλόμορφο από το καθένα, 1 και 2), ή ομόζυγο 2-2 (δύο αλληλόμορφο 2). Στην περίπτωση που μία μετάλλαξη εντοπίζεται στο χρωμόσωμα που φέρει το τμήμα των 5 kb, τότε η παρουσία αυτού του τμήματος υποδηλώνει και την παρουσία της μετάλλαξης (Εικ.14)

Είναι σημαντικό να γίνει κατανοητό πως ο πολυμορφισμός μήκους θραύσματος (RFLP), δεν σχετίζεται με τη μετάλλαξη. Με τη μέθοδο αυτή καθίσταται δυνατός ο διαχωρισμός τμημάτων DNA διαφορετικού μεγέθους της ίδιας περιοχής και ο εντοπισμός πολυμορφικών θέσεων. Τα τμήματα αυτά μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως μάρτυρες (markers) σε μία ανάλυση διαχωρισμού αλληλόμορφων. Εκτός από τον πολυμορφισμό μήκους θραύσματος (RFLP), διάφοροι τύποι DNA πολυμορφισμού μπορούν να εντοπιστούν μέσω υβριδοποίησης κατά Southern. Εντούτοις, η ανάλυση των μικροδορυφορικών περιοχών DNA πραγματοποιείται κυρίως με τη χρήση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης.

Η **PCR –RFLP** ανάλυση αναφέρθηκε πρώτη φορά το 1984.<sup>120</sup> Είναι μία μοριακή τεχνική βασιζόμενη στην PCR χρησιμοποιώντας περιοριστικά ένζυμα. Είναι ειδικά ένζυμα (περιοριστικές ενδονουκλεάσες) και έχουν την ικανότητα να κόβουν την διπλή έλικα του DNA σε σημεία με ειδικές αλληλουχίες βάσεων, έτσι ώστε να σχηματίζουν στα άκρα της διπλής έλικας συμπληρωματικές μονόκλωνες ουρές (κολλώδη άκρα). Δεν είναι σπάνιο μία σημειακή μετάλλαξη ή ένας πολυμορφισμός στο DNA ενός γονιδίου να καταστρέφει ή να δημιουργεί ένα σημείο αναγνώρισης –τομής του περιοριστικού ενζύμου.<sup>121</sup> Στις περιπτώσεις αυτές η μετάλλαξη αναγνωρίζεται εύκολα, εάν πολλαπλασιασθεί το τμήμα του DNA το οποίο περιλαμβάνει την υπό αναζήτηση μετάλλαξη και κατόπιν το πολλαπλασιασμένο αυτό τμήμα να επωασθεί με το κατάλληλο περιοριστικό ένζυμο. Ο διαχωρισμός των νουκλεοτιδίων που προκύπτουν προσδιορίζεται λόγω του μήκους τους σε gel ηλεκτροφόρησης και μεταφέρεται με Southern Blot αποτύπωση σε μία μεμβράνη. Έπεται υβριδισμός του DNA με σεσημασμένο ανιχνευτή (label probe DNA) και έτσι προσδιορίζεται το μέγεθος των νουκλεοτιδίων που είναι συμπληρωματικά του ανιχνευτή. Κάθε νουκλεοτίδιο μπορεί να θεωρηθεί αλληλόμορφο και να χρησιμοποιηθεί για γενετική ανάλυση.



Εικ, 14 Πολυμορφισμός μήκους θραύσματος-RFLP (Εγχειρίδιο Γενετικής, Eberhard Passarge)

## Αποτύπωση κατά Southern (Southern Blotting)

Πρόκειται για την πιο γνωστή από τις τεχνικές της μοριακής βιολογίας. Συνίσταται στην μεταφορά κομματιών (θραυσμάτων) DNA, που έχουν προέλθει από επώαση DNA με περιοριστική ενδονουκλεάση (ένζυμο ειδικό για αναγνώριση και κόψιμο μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας νουκλεοτιδίων στο δίκλωνο DNA) και έχουν διαχωρισθεί με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης, σε αδρανές υπόστρωμα π.χ. φίλτρο νιτροκυτταρίνης ή μεμβράνη νάυλον (Southern Transfer). Τα ακινητοποιημένα στο φίλτρο κομμάτια DNA, μπορούν στη συνέχεια να υβριδοποιηθούν με σεσημασμένο ανιχνευτή για τον εντοπισμό αλληλουχιών συμπληρωματικών ως προς τον ανιχνευτή.

Με τον τρόπο αυτό καθίσταται δυνατή η κατάτμηση του ολικού DNA ενός οργανισμού και η συλλογή τμημάτων διαφορετικού μεγέθους. Τα τμήματα αυτά μπορούν να κλωνοποιηθούν σε κατάλληλους φορείς, να πολλαπλασιαστούν και να μελετηθούν. Τα τμήματα DNA διαφορετικού μεγέθους, υπόκεινται σε διαχωρισμό, ανάλογα με το μέγεθος τους. Υπάρχουν δύο κύριες μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την ανάλυση τμημάτων DNA ή RNA που έχουν διαχωριστεί μετά από ηλεκτροφόρηση σε πηκτή. Η μία ονομάζεται *Υβριδισμός DNA* κατά *Southern* και η άλλη ονομάστηκε *Υβριδισμός RNA* κατά *Northern*. Οι δύο μέθοδοι ανακαλύφθηκαν από τον Southern (1975). Μία ακόμη τεχνική, η ανάλυση κατά *Western* (*Western blot*, *Immunoblotting*), εφαρμόζεται για τον εντοπισμό πρωτεϊνών και βασίζεται στη χρήση αντισωμάτων.

### Υβριδισμός κατά Southern

Η ανάλυση κατά Southern, αρχίζει με την απομόνωση του ολικού DNA ενός οργανισμού Εικ.15-1 και ακολουθεί η κατάτμηση του με επιλεγμένα περιοριστικά ένζυμα Εικ.15-2. Ένα από τα τμήματα που πρόκειται να προσδιοριστεί περιέχει το γονίδιο που μελετάται ή μέρος αυτού. Τα τμήματα διαχωρίζονται κατά μέγεθος σε ένα πήκτωμα (συνήθως αγαρόζης) με ηλεκτρικό πεδίο (ηλεκτροφόρηση) Σχηματική αναπαράσταση και Εικ.15-3. Όσο μικρότερο είναι το τμήμα DNA, τόσο πιο γρήγορα μετακινείται διαμέσου της πηκτής. Στη συνέχεια,

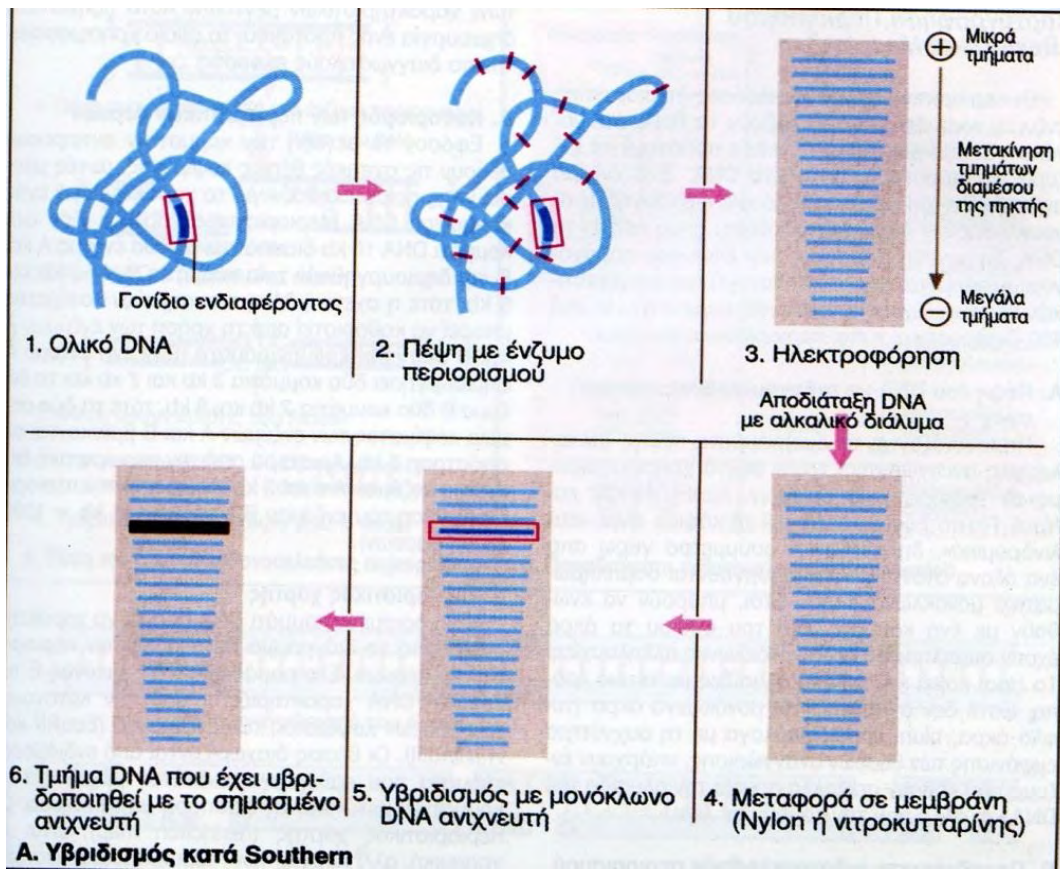


πραγματοποιείται μεταφορά των τμημάτων DNA από την πηκτή σε μεμβράνες νιτροκυτταρίνης (ή νάιλον μεμβράνες) Εικ.15-4. Ακολουθεί αποδιάταξη της δίκλωνης έλικας του DNA με αλκαλικό διάλυμα. Η σταθεροποίηση του αποδιαταγμένου DNA στη μεμβράνη πραγματοποιείται είτε με θέρμανση της μεμβράνης (περίπου 80° C), είτε με έκθεση της σε υπεριώδεις (UV) ακτίνες. Ακολουθεί υβριδισμός των μεμβρανών με κατάλληλο ανιχνευτή (DNA ή cDNA) Εικ.15-5. Ο κατάλληλα επιλεγμένος ανιχνευτής υβριδοποιείται μόνο με το συμπληρωματικό κομμάτι που μελετάται και όχι με άλλα Εικ.15-6. Εφόσον ο ανιχνευτής είναι ραδιενεργά σσημασμένος (π.χ. με <sup>32</sup>P), το τμήμα του DNA που έχει υποστεί υβριδισμό, εντοπίζεται μέσω της τοποθέτησης ενός φιλμ ακτινογραφίας επάνω στη μεμβράνη. Μετά την αυτοραδιογραφία και την εμφάνιση του φιλμ, το τμήμα DNA, που έχει υβριδοποιηθεί με τον ανιχνευτή, διακρίνεται με τη μορφή μίας μαύρης ζώνης στο φιλμ (αυτοραδιογράφημα) Εικ.15-6. Το μέγεθος κάθε διαφορετικού τμήματος DNA στην πηκτή, προσδιορίζεται με τη χρήση ειδικών DNA γνωστού μεγέθους.

Η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται κυρίως για εντοπισμό χρωμοσωμικών ανωμαλιών (ελλείμματα τμημάτων DNA, μετατοπίσεις γονιδίων, διπλασιασμό γονιδίων κλπ), για την δημιουργία περιοριστικών χαρτών, για ανίχνευση πολυμορφισμών, για διαγνωστικούς σκοπούς σε κληρονομικές παθήσεις και σε απομόνωση γονιδίων.

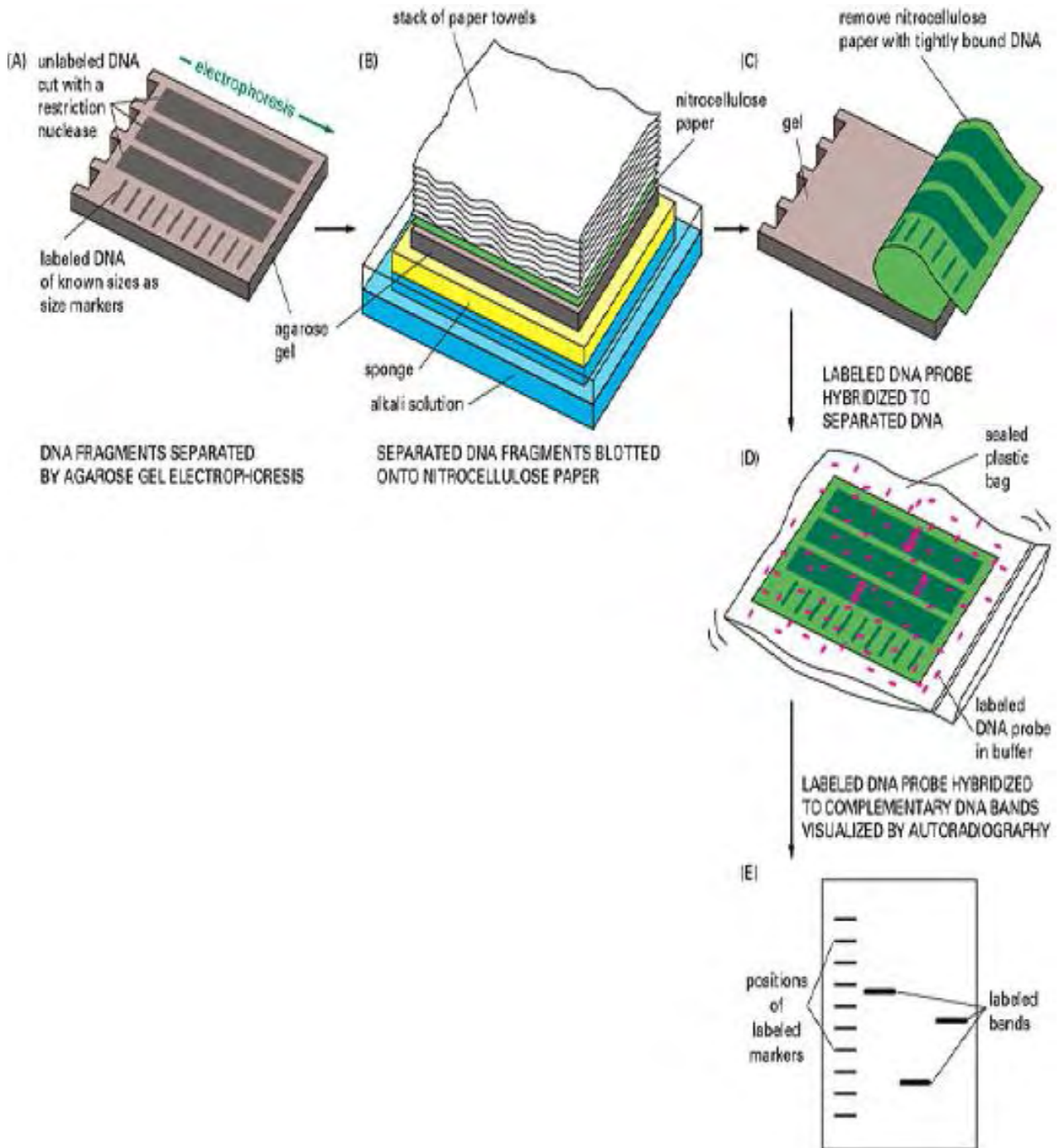
Η όλη διαδικασία εφαρμογής της τεχνικής περιλαμβάνει διάφορα στάδια τα οποία και αναφέρουμε συνοπτικά.

1. Εξαγωγή ολικού DNA. Αρχικό υλικό συνήθως είναι τα λευκοκύτταρα του περιφερικού αίματος ή ιστός. Από τα κύτταρα εκχυλίζουμε το DNA
2. Επώαση του DNA με περιοριστικές ενδονουκλεάσες οι οποίες κόβουν όταν αναγνωρίζουν στο DNA ειδικές παλίνδρομες αλληλουχίες.
3. Ηλεκτροφόρηση των κομματιών που προκύπτουν από τη πέψη του DNA με περιοριστικές ενδονουκλεάσες σε πήκτωμα αγαρόζης για τον διαχωρισμό αυτών αναλόγως του μεγέθους τους (Εικ.16)



Εικ. 15 Υβριδισμός κατά Southern (Εγχειρίδιο Γενετικής, Eberhard Passarge)

Εικ. 16 Σχηματική αναπαράσταση σε ένα πήκτωμα (συνήθως αγαρόζης) με ηλεκτρικό πεδίο (ηλεκτροφόρηση) (*UpToDate*)



## *Προσδιορισμός αλληλουχίας (DNA Sequencing)*

Είναι η διαδικασία του προσδιορισμού της σειράς των νουκλεοτιδίων αδενίνη, γουανίνη κυτοσίνη και θυμίνη σε ένα τμήμα DNA, αποτελεί τον πιο άμεσο τρόπο για τον προσδιορισμό μεταλλάξεων ή πολυμορφισμών ενός γονιδίου και αποκαλύπτει σημαντικές πληροφορίες που αφορούν τη δομή και τη λειτουργία του. Επιπλέον, η εύρεση της πρωτοταγούς δομής ενός γονιδίου επιτρέπει τη σύγκριση της με άλλες γνωστές ακολουθίες προερχόμενες από τον ίδιο ή από διαφορετικούς οργανισμούς.

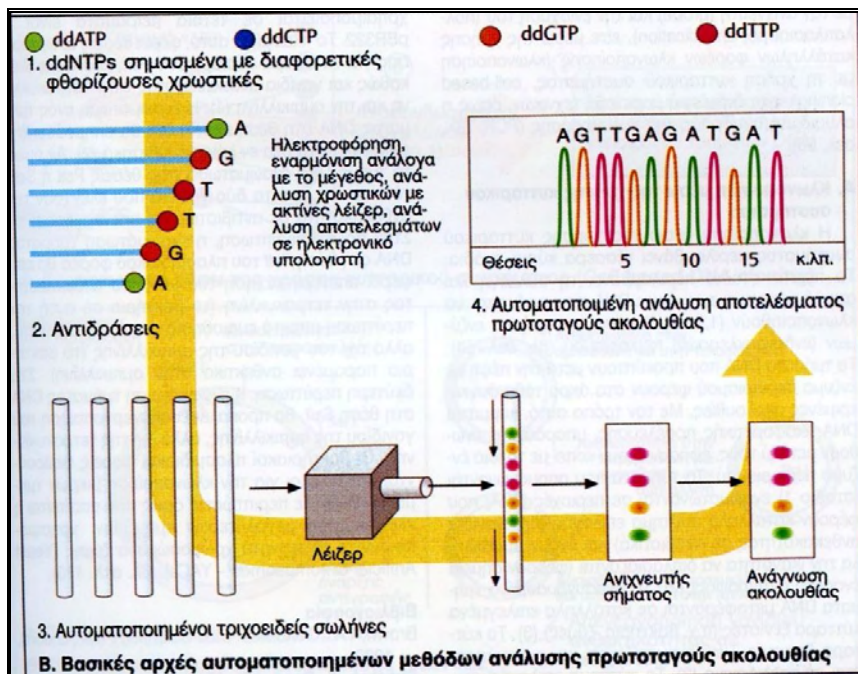
Στα τέλη της δεκαετίας 1970 αναπτύχθηκαν οι τεχνικές για τον καθορισμό της αλληλουχίας των βάσεων του DNA. Αυτές οι μέθοδοι είναι σχετικά απλές και γρήγορες και επιτρέπουν την ανάγνωση της αλληλουχίας ακόμα και μεγάλων τμημάτων DNA. Υπάρχουν δύο κύριες μέθοδοι προσδιορισμού της αλληλουχίας του DNA: η χημική μέθοδος (A.M. Maxam και W. Gilbert) και η ενζυμική μέθοδος (F. Sanger).

Η τεχνική βασίζεται στον τερματισμό της επιμήκυνσης μιας αλληλουχίας με τη χρήση αποληκτικών διδεοξυνουκλεοτιδίων. Η PCR διευκόλυνε την εφαρμογή της τεχνικής σε κλινικά δείγματα, χωρίς να είναι απαραίτητη προηγούμενη κλωνοποίηση ενός γονιδίου. Ο προσδιορισμός της αλληλουχίας των γονιδίων γίνεται σήμερα με μεγαλύτερη ευαισθησία και ταχύτητα με τη χρήση αυτοματοποιημένων τεχνολογιών που βασίζονται όμως πάντα στην κλασική μέθοδο του Sanger.<sup>122</sup>

### Εύρεση πρωτοταγούς ακολουθίας με τη χημική μέθοδο

Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στην εξειδίκευση που παρουσιάζουν διάφορες χημικές ενώσεις, ώστε να τροποποιούν ειδικά τις πουρινικές και πυριμιδινικές βάσεις του DNA. Στη μέθοδο αυτή χρησιμοποιούνται τέσσερα διαφορετικά αντιδραστήρια σε τέσσερις διαφορετικές αντιδράσεις (μία για κάθε βάση του DNA). Μετά το τέλος κάθε αντίδρασης, παράγεται ένα σύνολο τμημάτων DNA,

διαφορετικού μεγέθους, τα οποία υπόκεινται σε περαιτέρω ανάλυση. Το τμήμα του DNA που υποβάλλεται προς εύρεση πρωτοταγούς ακολουθίας σημαίνεται ραδιενεργά στο 5' τελικό του άκρο (1). Το σεσημασμένο ραδιενεργά DNA υποβάλλεται σε χημική αντίδραση με κάποια χημική ένωση, όπως για παράδειγμα το θειικό διμεθύλιο (DMS) που μεθυλιώνει τη γουανίνη (G). Η πρόσθεση στη συνέχεια μίας δεύτερης χημικής ένωσης, της πιπεριδίνης (piperidine), προκαλεί κατάλυση του φωσφοδιεστερικού δεσμού της αλυσίδας του DNA στα σημεία εκείνα στα οποία οι βάσεις (στη συγκεκριμένη περίπτωση η γουανίνη) έχουν υποστεί τροποποίηση. Σε παρόμοιες χημικές αντιδράσεις υπόκεινται και οι υπόλοιπες βάσεις της δομής του DNA (A, T και C). Τα τελικά σεσημασμένα προϊόντα (ολιγονουκλεοτίδια) των τεσσάρων αντιδράσεων διαχωρίζονται, μετά από ηλεκτροφόρηση, σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου και στη συνέχεια αυτοραδιογραφούνται. Το αποτέλεσμα της αυτοραδιογραφίας «διαβάζεται» από το κάτω προς το επάνω μέρος, διότι τα μικρότερα ολιγονουκλεοτιδικά τμήματα μετακινούνται ταχύτερα διαμέσου της πηκτής (Εικ.17)



Εικ. 17 Σχηματική αναπαράσταση αυτοποιημένης μεθόδου προσδιορισμού αλληλουχίας (Εγχειρίδιο Γενετικής, Eberhard Passarge)

Ονομασίες και συμβολισμοί των αμινοξέων (βιβλίο Γ. Νιτράνος)

Αμινοξύ	Συμβολισμός	Συμβολισμός
Αλανίνη	Ala	A
Αργινίνη	Arg	R
Ασπαραγίνη	Asn	N
Ασπαρτικό οξύ	Asp	D
Κυστεΐνη	Cys	C
Γλουταμίνη	Gln	Q
Γλουταμινικό οξύ	Glu	E
Γλυκίνη	Gly	G
Ιστιδίνη	His	H
Ισολευκίνη	Ile	I
Λευκίνη	Leu	L
Λυσίνη	Lys	K
Μεθειονίνη	Met	M
Φαινυλαλανίνη	Phe	F
Προλίνη	Pro	P
Σερίνη	Ser	S
Θρεονίνη	Thr	T
Τρυπτοφάνη	Trp	W
Τυροσίνη	Tyr	Y
Βαλίνη	Val	V

Γενετικός κώδικας

	U		C		A		G		
U	UUU	Phe	UCU	Ser	UAU	Tyr	UGU	Cys	U
	UUC		UCC		UAC		UGC		C
	UUA	Leu	UCA		UAA	ΛΗΕΗ	UGA	ΛΗΕΗ	A
	UUG		UCG		UAG	ΛΗΕΗ	UGG	Trp	G
C	CUU	Leu	CCU	Pro	CAU	His	CGU	Arg	U
	CUC		CCC		CAC		CGC		C
	CUA		CCA		CAA	Gln	CGA		A
	CUG		CCG		CAG		CGG		G
A	AUU	Ile	ACU	Thr	AAU	Asn	AGU	Ser	U
	AUC		ACC		AAC		AGC		C
	AUA		ACA		AAA	Lys	AGA	Arg	A
	AUG	*Met	ACG		AAG		AGG		G
G	GUU	Val	GCU	Ala	GAU	Asp	GGU	Gly	U
	GUC		GCC		GAC		GGC		C
	GUA		GCA		GAA	Glu	GGA		A
	GUG		GCG		GAG		GGG		G

## **B. ΥΛΙΚΟ**

Στην παρούσα μελέτη, έγινε η ιστολογική και γενετική διερεύνηση ασθενών με οικογενή μορφή βλεφαρόπτωσης ή εξωτερικής οφθαλμοπληγίας, στους οποίους έχει αποκλειστεί το ενδεχόμενο υποκλινικής μορφής μυοπάθειας, με σκοπό την αναζήτηση συμμετοχής μιτοχονδριακών και πυρηνικών γονιδίων της αναπνευστικής αλύσου.

Στην έρευνα αυτή έλαβαν μέρος τα μέλη τριών οικογενειών (οικογένεια 1, οικογένεια 2, οικογένεια 3) από την ευρύτερη περιοχή της Θεσσαλίας. Όλες οι οικογένειες είχαν περισσότερα από ένα μέλη τα οποία παρουσίασαν τα παραπάνω κλινικά ευρήματα. Ο εντοπισμός των οικογενειών έγινε μέσω των Οφθαλμολογικών και Νευρολογικών εξωτερικών ιατρείων του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας. Τα μέλη των δύο οικογενειών (1 και 3) προσήλθαν στο νοσοκομείο λόγω της βλεφαρόπτωσης, ενώ τα μέλη της άλλης (2) προσήλθαν στα εξωτερικά Νευρολογικά Ιατρεία για άλλη αιτία. Συνολικά εξετάστηκαν 26 μέλη εκ των οποίων 5 ανήκαν στην οικογένεια 1, 14 ανήκαν στην οικογένεια 2 και 7 ανήκαν στην οικογένεια 3.

Όσα μέλη είχαν τη δυνατότητα πρόσβασης, εξετάστηκαν στο χώρο των Οφθαλμολογικών εξωτερικών ιατρείων. Οι υπόλοιποι εξετάστηκαν στις οικίες τους. Όλα τα μέλη που δέχθηκαν, υπεβλήθησαν σε λήψη ιατρικού ιστορικού και σε κλινική εξέταση. Επίσης πραγματοποιήθηκε :1) λήψη φωτογραφιών 2) λήψη αίματος 3) βιοπτική λήψη δείγματος μυός μόνο σε δύο ασθενείς (έναν από την οικογένεια 1 και έναν από την οικογένεια 2)

## Γ. ΜΕΘΟΔΟΙ

### 1) Ιστορικό ασθενούς/Κλινική εξέταση

Η λήψη του ιστορικού των ασθενών καθώς και η κλινική τους εξέταση έγινε βάση του παρακάτω πρωτόκολλου.

#### 1. ΓΕΝΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ

Όνοματεπώνυμο

Ημ. Γέννησης

Τόπος γεννήσεως (καταγωγή)

Διεύθυνση

Τηλέφωνο

Επάγγελμα

Οικογενειακή κατάσταση

#### 2. ΑΤΟΜΙΚΟ ΑΝΑΜΝΗΣΤΙΚΟ

##### A. ΓΕΝΙΚΟ ΑΤΟΜΙΚΟ ΑΝΑΜΝΗΣΤΙΚΟ

Χειρ/κες επεμβάσεις

Χρόνια νοσήματα

Τραυματισμοί

Επαφή με τοξικούς παράγοντες

Φαρμακευτική αγωγή

##### B. ΟΦΘΑΛΜΟΛΟΓΙΚΟ ΑΤΟΜΙΚΟ ΑΝΑΜΝΗΣΤΙΚΟ

Χειρ/κες επεμβάσεις

Οφθ. Τραυματισμοί

Χρόνιες οφθ/κες παθήσεις

Φαρμακευτική αγωγή

#### 3. ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΚΟ ΙΣΤΟΡΙΚΟ

##### A. ΓΕΝΙΚΟ ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΚΟ ΙΣΤΟΡΙΚΟ

##### B. ΟΦΘΑΛΜΟΛΟΓΙΚΟ ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΚΟ ΙΣΤΟΡΙΚΟ

##### Γ. ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΚΟ ΔΕΝΤΡΟ

#### 4. ΟΦΘΑΛΜΟΛΟΓΙΚΗ ΕΞΕΤΑΣΗ



A. ΟΠΤΙΚΗ ΟΞΥΤΗΤΑ

ΔΟ

ΑΟ

sc

cc

ph

B. ΘΕΣΗ ΒΛΕΦΑΡΩΝ

ΔΟ

ΑΟ

Margin-reflex distance (MRD)

Palpebral fissure height (IPF)

Upper lid crease

Γ. ΚΙΝΗΤΙΚΟΤΗΤΑ ΒΛΕΦΑΡΩΝ

ΔΟ

ΑΟ

Upper lid excursion (LF)

Jaw winking phenomenon

Δ. ΘΕΣΗ ΟΦΘΑΛΜΩΝ

ΔΟ

ΑΟ

Στραβισμός

PCT 6m

PCT 1/3m

Ενόφθαλμος

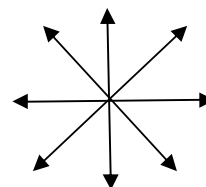
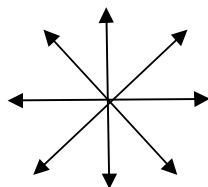
Εξώφθαλμος

Ε. ΚΙΝΗΤΙΚΟΤΗΤΑ ΟΦΘΑΛΜΩΝ

ΔΟ

ΑΟ

FEOM



Z. ΑΛΛΕΣ ΟΦΘΑΛΜΟΛΟΓΙΚΕΣ ΕΞΕΤΑΣΕΙΣ

ΔΟ		ΑΟ
	S/L	
	T	
	Κορικά αντανάκλαστικά	
	Βυθοσκόπηση	
	Bell's phenomenon	
	<b>5. ΝΕΥΡΟΛΟΓΙΚΗ ΕΞΕΤΑΣΗ</b>	
Μυϊκή ισχύς	Δ	A
Άνω άκρα		
Κάτω άκρα		
Barre		
Αισθητικότητα	Δ	A
Άνω άκρα		
Κάτω άκρα		
Εν τω βάθη αισ/τα		
Εγκεφαλικές Συζυγίες	Δ	A
Οπτικό πεδίο (αδρά)		
Αισθ/τα κερατοειδούς		
Τρίδυμο-Προσωπικό		
Νυσταγμός		
Πνευμονογαστρικό		
Γλωσσοφαρυγγικό		
Παρεγκεφαλιδικές δοκιμασίες	Δ	A

Το κομμάτι 4Α του πρωτοκόλλου περιλαμβάνει την εκτίμηση της οπτικής οξύτητας του ασθενούς χωρίς διόρθωση (sc), με διορθωτικούς φακούς (cc) και την εκτίμηση της καλύτερα διορθούμενης όρασης (ph).

Στο κομμάτι 4Β εξετάζεται η θέση των βλεφάρων σύμφωνα με τις παρακάτω εξετάσεις:

*Margin reflex distance (MRD)*: είναι η απόσταση μεταξύ του ορίου του άνω βλεφάρου και της αντανάκλασης που σχηματίζεται πάνω στον κερατοειδή από έναν φακό που κρατάει ο εξεταστής και τον οποίο ο ασθενής κοιτάζει ευθέως. Η φυσιολογικές τιμές είναι 4-4,5mm

*Palpebral fissure height (PFH IPF)*: είναι η απόσταση μεταξύ των ορίων του άνω και κάτω βλεφάρου. Η φυσιολογική τιμή της μέτρησης είναι χαμηλότερη στους άντρες (7-10mm) από ότι στις γυναίκες (8-12mm). Το άνω βλέφαρο φυσιολογικά βρίσκεται περίπου 2mm κάτω από το άνω σκληροκερατοειδές όριο και το κάτω βλέφαρο περίπου 1mm πάνω από το κάτω σκληροκερατοειδές όριο.

*Upper lid crease*: είναι η απόσταση από το βλεφαρικό χείλος έως τη βλεφαρική πτυχή όταν ο ασθενής κοιτάει προς τα κάτω. Στις γυναίκες η φυσιολογική τιμή είναι περίπου 10mm, ενώ στους άντρες είναι περίπου 8mm.

Στο κομμάτι 4Γ εκτιμάται η κινητικότητα των βλεφάρων, σύμφωνα με τις εξής εξετάσεις.

*Upper lid excursion (levator function LF)*: Με αυτή την εξέταση εκτιμάται η λειτουργικότητα του ανελκτήρα μυός του βλεφάρου. Κατ' αρχάς ο εξεταστής τοποθετεί τον αντίχειρά του πάνω στον όφρυ του εξεταζόμενου προκειμένου να εξουδετερωθεί η δράση του μετωπιαίου μυός. Ο εξεταζόμενος έχει στραμμένο το βλέμμα του προς τα κάτω και κατόπιν καλείται να κοιτάξει όσο πιο ψηλά μπορεί. Ο εξεταστής μετράει την απόσταση που διανύει το βλέφαρο με τη βοήθεια ενός χάρακα. Η δράση του ανελκτήρα μυός βαθμολογείται σε φυσιολογική (15mm και άνω), καλή (12-14mm), ικανοποιητική (5-11mm) και πτωχή (4mm και κάτω).

*Φαινόμενο Jaw-winking*: Εντοπίζεται ζητώντας από τον ασθενή να μασήσει και να κινήσει την κάτω σιαγόνα από την μία άκρη στην άλλη.

Στο τμήμα 4Δ εξετάζεται η πιθανότητα στραβισμού με τις δοκιμασίες κάλυψης-αποκάλυψης (PCT 6m και PCT 1/3m) για το ενδεχόμενο έξω- ή εσωφορίας και έξω- ή εσωτροπίας. Επίσης εξετάζεται η κινητικότητα των εξοφθάλμιων μυών και ιδιαίτερα του άνω ορθού. Ο ασθενής καλείται να στρέψει τα μάτια του προς όλες τις κύριες βλεμματικές θέσεις. Οι εξοφθάλμιοι μύες νευρώνονται από το κοινό κινητικό, εκτός από τον άνω λοξό που νευρώνεται από το τροχλιακό και τον έξω ορθό που νευρώνεται από το απαγωγό.

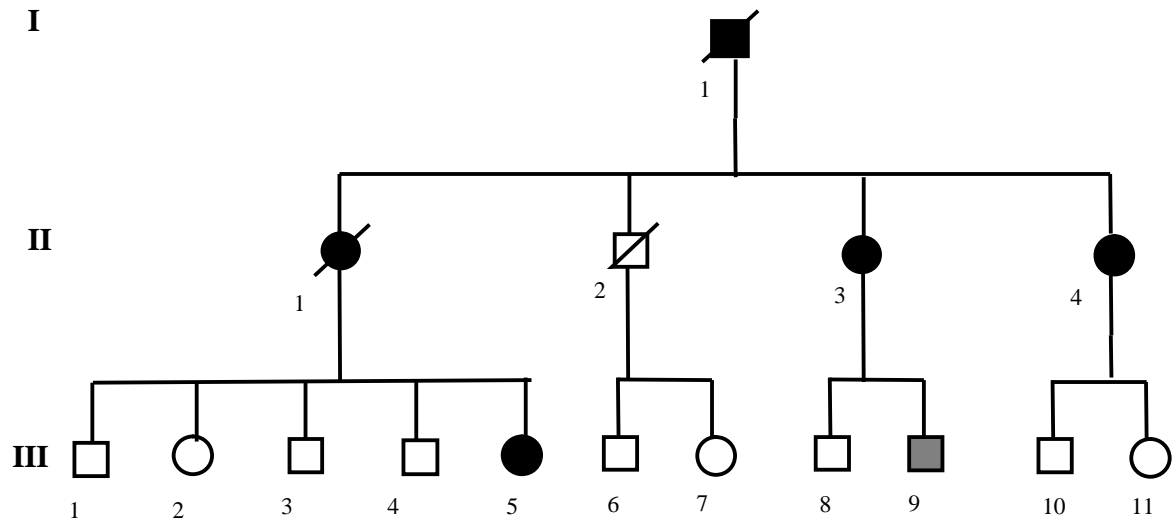
Το *φαινόμενο Bell*, στο τμήμα 4Z, ελέγχεται κρατώντας τα βλέφαρα του ασθενούς ανοιχτά από τον εξεταστή ενώ την ίδια στιγμή ο ασθενής καλείται να προσπαθήσει να κλείσει τα μάτια του. Αυτό που παρατηρούμε είναι αν ο βολβός εκτελεί άνω στροφή. Εάν αυτό δε συμβαίνει, υπάρχει κίνδυνος κερατοπάθειας μετά από ενδεχόμενη επέμβαση ανόρθωσης των βλεφάρων.

Συνολικά εξετάστηκαν 26 άτομα: 5 από την οικογένεια 1, 14 από την οικογένεια 2, 7 από την οικογένεια 3. Εκτός από την κλινική εξέταση και τη λήψη του ιστορικού, έγιναν αιμοληψίες με σκοπό την εξαγωγή DNA, καθώς και λήψη φωτογραφιών. Επιπλέον έγινε λήψη δείγματος μυός (από δαλτοειδή μυ) από ένα μέλος από την οικογένεια 1 και ένα από την οικογένεια 2 με σκοπό τον ιστολογικό και ιστοχημικό έλεγχο. Στην οικογένεια 3 δεν υπήρξε μέλος που δέχτηκε να προχωρήσει σε βιοψία μυός.

## **2) Οικογενειακά δέντρα/Φωτογραφίες**

Παρουσιάζονται τα οικογενειακά δέντρα που προέκυψαν από την εξέταση των μελών, καθώς και τα χαρακτηριστικά των ατόμων που εξετάστηκαν.

## ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ1



II 1 Πέθανε σε ηλικία 84 ετών. Έπασχε από βλεφαρόπτωση. Δεν υπάρχουν πληροφορίες για περιορισμό των οφθαλμικών κινήσεων και εξωτερική οφθαλμοπληγία.

III 1 Πέθανε σε ηλικία 79 ετών. Σύμφωνα με τους συγγενείς παρουσίασε βαριάς μορφής βλεφαρόπτωση με ηλικία έναρξης 55-60 ετών. Δεν αναφέρονται χαρακτηριστικά εξωτερικής οφθαλμοπληγίας

II 2 Δεν παρουσίασε σημεία βλεφαρόπτωσης

III 3 64 ετών. Αναφέρει έναρξη των συμπτωμάτων περίπου 6 μήνες πριν την εξέταση. Παρουσίασε βλεφαρόπτωση και περιορισμό των οριζόντιων οφθαλμικών κινήσεων σε βαθμό 5-10%. MRD: 0mm δεξιό και αριστερό οφθαλμό (ΔΑΟ) IPF: 6mm στο δεξιό οφθαλμό (ΔΟ) και 7mm στον αριστερό οφθαλμό (ΑΟ) LF: 7-8mm στο ΔΟ και 11mm στον ΑΟ. Δεν υπήρχε σαφής βλεφαρική πτυχή. Παρουσίασε περιορισμός στο φαινόμενο Bell.

III 4 61 ετών. Αναφέρει έναρξη των συμπτωμάτων σε ηλικία 55 ετών. Παρουσίασε βλεφαρόπτωση και περιορισμό των οριζόντιων οφθαλμικών κινήσεων σε ποσοστό 20%. MRD: 0mm ΔΑΟ IPF: 4mm ΔΟ και 3mm ΑΟ LF: 7mm ΔΟ και 4mm ΑΟ. Υπήρχε απουσία της βλεφαρικής σχισμής. Μη φυσιολογικό φαινόμενο Bell.

III1 60 ετών. Δεν παρουσίασε βλεφαρόπτωση ή εξωτερική οφθαλμοπληγία. Όλες οι μετρήσεις είχαν φυσιολογικά αποτελέσματα. Επίσης παρουσίασε φυσιολογικό φαινόμενο Bell

III2 57 ετών. Δεν δέχτηκε να εξεταστεί. Δεν παρουσίασε βλεφαρόπτωση σύμφωνα με τους συγγενείς.

III3 56 ετών. Δεν δέχτηκε να εξεταστεί. Δεν παρουσίασε βλεφαρόπτωση σύμφωνα με τους συγγενείς.

III4 52 ετών. Δεν δέχτηκε να εξεταστεί. Δεν παρουσίασε βλεφαρόπτωση σύμφωνα με τους συγγενείς.

III5 49 ετών. Δεν μπορεί να προσδιορίσει την ακριβή ηλικία έναρξης. Σύμφωνα με φωτογραφίες της ασθενούς είχε βλεφαρόπτωση για πολλά χρόνια. Η κινητικότητα των οφθαλμών ήταν φυσιολογική, καθώς και το φαινόμενο Bell. MRD: 0,5mm ΔΟ και 0,5-1mm ΑΟ IPF:9-10mm ΔΑΟ LF:14-15mm ΔΑΟ Upper lid crease:15mm ΔΑΟ

III6 35 ετών. Δεν δέχτηκε να εξεταστεί. Δεν παρουσίασε βλεφαρόπτωση σύμφωνα με τους συγγενείς.

III7 32ετών. Δεν δέχτηκε να εξεταστεί. Δεν παρουσίασε βλεφαρόπτωση σύμφωνα με τους συγγενείς.

III8 43ετών. Δεν παρουσίασε βλεφαρόπτωση ή εξωτερική οφθαλμοπληγία. Όλες οι μετρήσεις είχαν φυσιολογικά αποτελέσματα. Επίσης παρουσίασε φυσιολογικό φαινόμενο Bell

III9 40ετών. Παρουσίασε ήπια βλεφαρόπτωση την οποία ο ίδιος ο ασθενής δεν μπορεί να αναγνωρίσει. MRD: 2mm ΔΟ και 3mm ΑΟ IPF: 9mm ΔΟ και 10mm ΑΟ LF: 14-15mm ΔΑΟ. Δεν παρουσίασε περιορισμό των οφθαλμικών κινήσεων. Το φαινόμενο Bell ήταν φυσιολογικό.

III10 42ετών. Δεν παρουσίασε βλεφαρόπτωση ή εξωτερική οφθαλμοπληγία. Όλες οι μετρήσεις είχαν φυσιολογικά αποτελέσματα. Επίσης παρουσίασε φυσιολογικό φαινόμενο Bell

III11 39 ετών. Δεν δέχτηκε να εξεταστεί. Δεν παρουσίασε βλεφαρόπτωση σύμφωνα με τους συγγενείς

## Φωτογραφίες ασθενών από την οικογένεια 1

(Οι φωτογραφίες δημοσιεύονται με τη γραπτή συγκατάθεση των ασθενών)



Η ασθενής II4

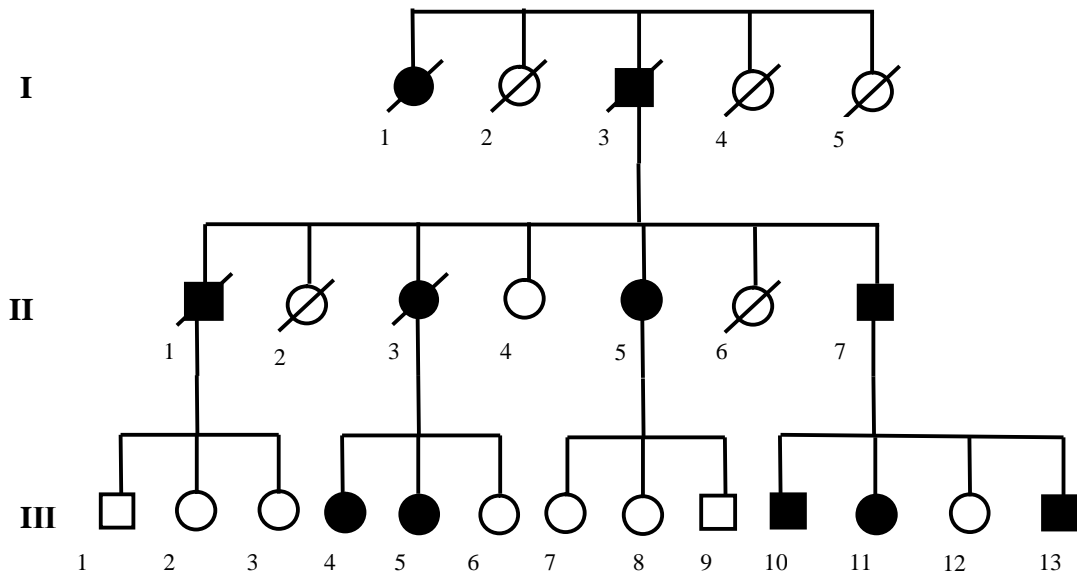


Ο ασθενής III9



Η ασθενής II3

## ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ 2



I1 Πέθανε σε μεγάλη ηλικία. Παρουσίασε βλεφαρόπτωση, σύμφωνα τις μαρτυρίες των συγγενών.

I2 Δεν είναι εν ζωή. Δεν παρουσίασε βλεφαρόπτωση ή σημεία εξωτερικής οφθαλμοπληγίας σύμφωνα με τις μαρτυρίες των συγγενών.

I3 Πέθανε σε μεγάλη ηλικία. Παρουσίασε βλεφαρόπτωση, σύμφωνα τις μαρτυρίες των συγγενών.

I4 Δεν είναι εν ζωή. Δεν παρουσίασε βλεφαρόπτωση ή σημεία εξωτερικής οφθαλμοπληγίας σύμφωνα με τις μαρτυρίες των συγγενών.

I5 Δεν είναι εν ζωή. Δεν παρουσίασε βλεφαρόπτωση ή σημεία εξωτερικής οφθαλμοπληγίας σύμφωνα με τις μαρτυρίες των συγγενών.

II1 Πέθανε σε μεγάλη ηλικία. Παρουσίασε βλεφαρόπτωση, σύμφωνα τις μαρτυρίες των συγγενών.



- Π2 Δεν είναι εν ζωή. Δεν παρουσίασε βλεφαρόπτωση ή σημεία εξωτερικής οφθαλμοπληγίας σύμφωνα με τις μαρτυρίες των συγγενών.
- Π3 Δεν είναι εν ζωή. Παρουσίασε βλεφαρόπτωση, σύμφωνα τις μαρτυρίες των συγγενών.
- Π4 82 ετών. Δεν παρουσίασε βλεφαρόπτωση. Παρουσίασε μικρού βαθμού περιορισμό των κάθετων οφθαλμικών κινήσεων και πτωχό φαινόμενο Bell στο ΔΟ.
- Π5 74 ετών. Παρουσίασε βλεφαρόπτωση και περιορισμό των οριζόντιων οφθαλμικών κινήσεων (απαγωγής) του ΑΟ. MRD: 2mm ΔΟ και 1mm ΑΟ, IPF: 11mm ΔΟ και 8mm ΑΟ, LF: 10mm ΔΟ και 11mm ΑΟ. Επίσης παρουσίασε παθολογικό φαινόμενο Bell.
- Π6 Δεν είναι εν ζωή. Δεν παρουσίασε βλεφαρόπτωση ή σημεία εξωτερικής οφθαλμοπληγίας σύμφωνα με τις μαρτυρίες των συγγενών.
- Π7 82 ετών. Παρουσίασε βλεφαρόπτωση και περιορισμό των οριζόντιων οφθαλμικών κινήσεων. MRD: 2mm ΔΟ και 1mm ΑΟ, LF: 9mm ΔΟ και 7mm ΑΟ. Το φαινόμενο Bell ήταν φυσιολογικό.
- Π11 50 ετών. Δεν παρουσίασε βλεφαρόπτωση ή εξωτερική οφθαλμοπληγία. Όλες οι μετρήσεις είχαν φυσιολογικά αποτελέσματα. Επίσης παρουσίασε φυσιολογικό φαινόμενο Bell
- Π12 48 ετών. Δεν παρουσίασε βλεφαρόπτωση ή εξωτερική οφθαλμοπληγία. Όλες οι μετρήσεις είχαν φυσιολογικά αποτελέσματα. Επίσης παρουσίασε φυσιολογικό φαινόμενο Bell
- Π13 43 ετών. Δεν παρουσίασε βλεφαρόπτωση ή εξωτερική οφθαλμοπληγία. Όλες οι μετρήσεις είχαν φυσιολογικά αποτελέσματα. Επίσης παρουσίασε φυσιολογικό φαινόμενο Bell
- Π14 68 ετών. Παρουσίασε βλεφαρόπτωση. Η κινητικότητα των εξοφθάλμιων μυών ήταν φυσιολογική. MRD: 2,5mm ΔΟ και 1mm ΑΟ, IPF: 8mm ΔΟ και 7mm ΑΟ, LF: 12mm ΔΟ και 11mm ΑΟ, Upper lid crese: 9mm ΔΟ και 10mm ΑΟ. Φυσιολογικό φαινόμενο Bell.

III5 65 ετών. Παρουσίασε ήπια βλεφαρόπτωση. Η κινητικότητα των εξοφθάλμιων μυών ήταν φυσιολογική. MRD: 3mm ΔΟ και 4mmΑΟ, IPF: 9mm ΔΑΟ, LF: 12mm ΔΑΟ, Φαινόμενο Bell: φυσιολογικό.

III6 Δεν δέχτηκε να εξεταστεί. Δεν παρουσίασε βλεφαρόπτωση σύμφωνα με τους συγγενείς.

III7 49 ετών. Δεν παρουσίασε βλεφαρόπτωση ή εξωτερική οφθαλμοπληγία. Όλες οι μετρήσεις είχαν φυσιολογικά αποτελέσματα. Επίσης παρουσίασε φυσιολογικό φαινόμενο Bell

III8 44ετών. Δεν παρουσίασε βλεφαρόπτωση ή εξωτερική οφθαλμοπληγία. Όλες οι μετρήσεις είχαν φυσιολογικά αποτελέσματα. Επίσης παρουσίασε φυσιολογικό φαινόμενο Bell

III9 Δεν δέχτηκε να εξεταστεί. Δεν παρουσίασε βλεφαρόπτωση σύμφωνα με τους συγγενείς.

III10 57 ετών. Παρουσίασε βλεφαρόπτωση και σαφή περιορισμό των οριζόντιων και λοξών οφθαλμικών κινήσεων. MRD: 2-3mm ΔΑΟ, LF: 9mm ΔΟ και 12mm ΑΟ. Παθολογικό φαινόμενο Bell.

III11 54 ετών. Παρουσίασε βλεφαρόπτωση. Η κινητικότητα των εξοφθάλμιων μυών ήταν φυσιολογική. MRD: 1mm ΔΟ και 0,5mm ΑΟ IPF: 7mm ΔΟ και 6mm ΑΟ LF: 8mm ΔΑΟ Upper lid crease 10mm. Μη φυσιολογικό φαινόμενο Bell.

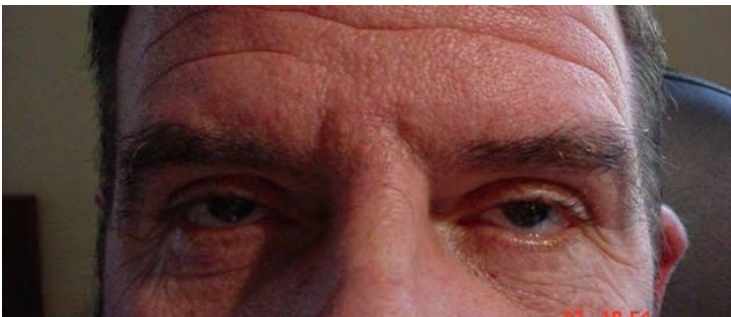
III12 52 ετών. Δεν παρουσίασε βλεφαρόπτωση ή εξωτερική οφθαλμοπληγία. Όλες οι μετρήσεις είχαν φυσιολογικά αποτελέσματα. Επίσης παρουσίασε φυσιολογικό φαινόμενο Bell

III13 50 ετών. Παρουσίασε βλεφαρόπτωση. Η κινητικότητα των εξοφθάλμιων μυών ήταν φυσιολογική. MRD: 0,5mm ΔΑΟ, IPF: 7mm ΔΟ και 8mmΑΟ, LF: 9mm ΔΑΟ, Upper lid crease: 9mm ΔΟ και 10mm ΑΟ.

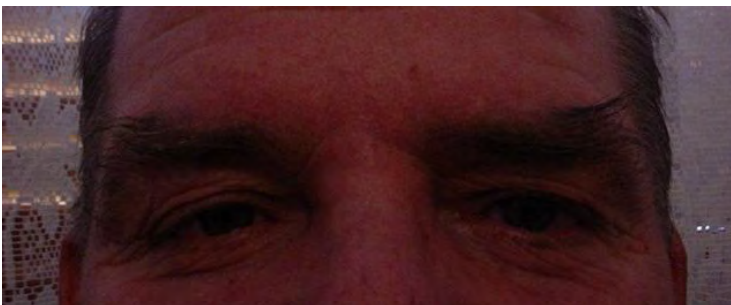
**Φωτογραφίες ασθενών από την οικογένεια 2**  
(Οι φωτογραφίες δημοσιεύονται με τη γραπτή συγκατάθεση των ασθενών)



Ο ασθενής II7

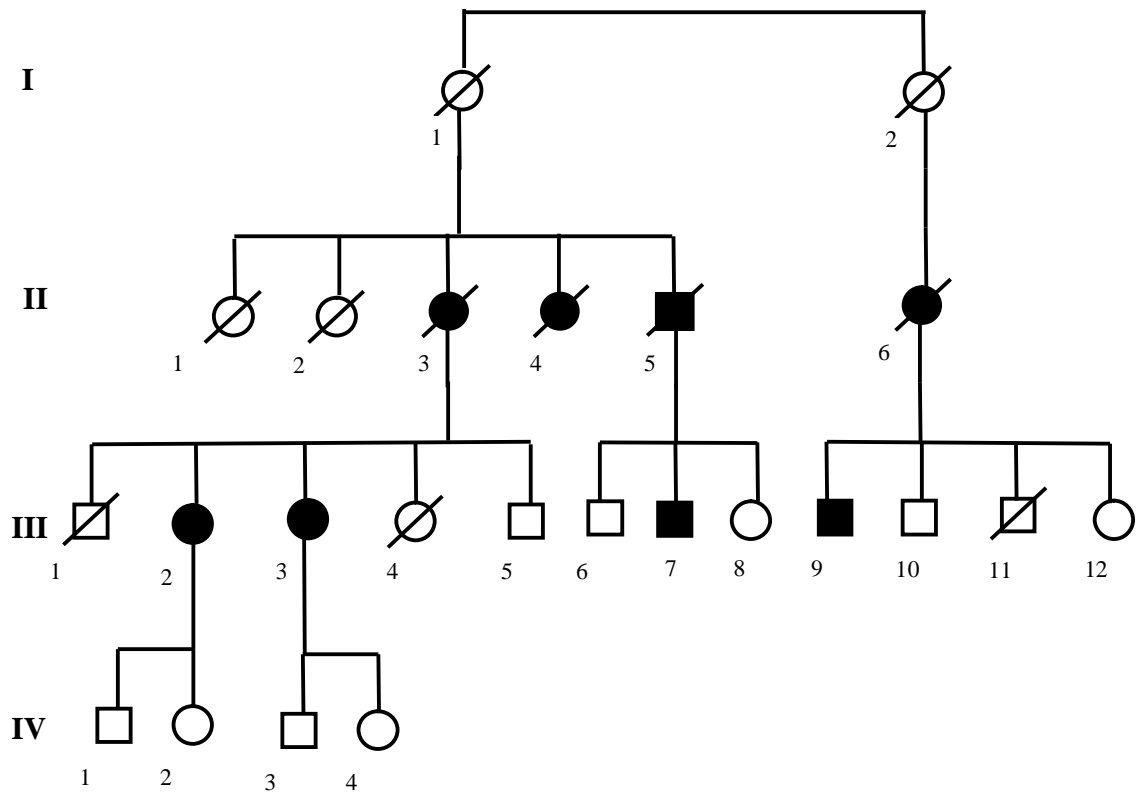


Ο ασθενής III3



Ο ασθενής III10

### ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ 3



II1 Δεν είναι εν ζωή. Δεν παρουσίασε βλεφαρόπτωση ή σημεία εξωτερικής οφθαλμοπληγίας σύμφωνα με τις μαρτυρίες των συγγενών.

II2 Δεν είναι εν ζωή. Δεν παρουσίασε βλεφαρόπτωση ή σημεία εξωτερικής οφθαλμοπληγίας σύμφωνα με τις μαρτυρίες των συγγενών.

II3 Δεν είναι εν ζωή. Παρουσίασε βλεφαρόπτωση, σύμφωνα τις μαρτυρίες των συγγενών.

II4 Δεν είναι εν ζωή. Παρουσίασε βλεφαρόπτωση, σύμφωνα τις μαρτυρίες των συγγενών.

- II5 Δεν είναι εν ζωή. Παρουσίασε βλεφαρόπτωση, σύμφωνα τις μαρτυρίες των συγγενών.
- II6 Δεν είναι εν ζωή. Παρουσίασε βλεφαρόπτωση, σύμφωνα τις μαρτυρίες των συγγενών.
- III1 Δεν είναι εν ζωή. Δεν παρουσίασε βλεφαρόπτωση ή σημεία εξωτερικής οφθαλμοπληγίας σύμφωνα με τις μαρτυρίες των συγγενών.
- III2 Δε δέχθηκε να εξεταστεί. Παρουσίαζε βαριά βλεφαρόπτωση σύμφωνα με τους συγγενείς.
- III3 65 ετών. Παρουσίασε βαριά βλεφαρόπτωση για την οποία υπεβλήθη σε χειρουργική ανόρθωση των βλεφάρων πριν από την εξέταση. Η κινητικότητα των οφθαλμών ήταν φυσιολογική. Φυσιολογικό φαινόμενο Bell.
- III4 Δεν είναι εν ζωή. Δεν παρουσίασε βλεφαρόπτωση ή σημεία εξωτερικής οφθαλμοπληγίας σύμφωνα με τις μαρτυρίες των συγγενών.
- III5 Δεν δέχθηκε να εξεταστεί. Δεν παρουσίασε βλεφαρόπτωση σύμφωνα με τους συγγενείς.
- III6 Δεν δέχθηκε να εξεταστεί. Δεν παρουσίασε βλεφαρόπτωση σύμφωνα με τους συγγενείς.
- III7 73 ετών. Παρουσίασε βαριά βλεφαρόπτωση για την οποία υπεβλήθη σε χειρουργική ανόρθωση των βλεφάρων πριν από την εξέταση. Η κινητικότητα των οφθαλμών ήταν φυσιολογική. Φυσιολογικό φαινόμενο Bell.
- III8 Δεν δέχθηκε να εξεταστεί. Δεν παρουσίασε βλεφαρόπτωση σύμφωνα με τους συγγενείς.

III9 58 ετών. Παρουσίασε βλεφαρόπτωση και περιορισμό των οφθαλμικών κινήσεων. MRD:0,5 mm ΔΑΟ, IPF: 5,5mm ΔΑΟ, LF: 7mm ΔΟ και 6mm ΑΟ, Upper lid crease: 10mm ΔΑΟ. Φυσιολογικό φαινόμενο Bell.

III10 Δεν δέχθηκε να εξεταστεί. Δεν παρουσίασε βλεφαρόπτωση σύμφωνα με τους συγγενείς.

III11 Δεν είναι εν ζωή. Δεν παρουσίασε βλεφαρόπτωση ή σημεία εξωτερικής οφθαλμοπληγίας σύμφωνα με τις μαρτυρίες των συγγενών.

III12 Δεν δέχθηκε να εξεταστεί. Δεν παρουσίασε βλεφαρόπτωση σύμφωνα με τους συγγενείς.

IV1 Δεν δέχθηκε να εξεταστεί. Δεν παρουσίασε βλεφαρόπτωση σύμφωνα με τους συγγενείς.

IV2 Δεν δέχθηκε να εξεταστεί. Δεν παρουσίασε βλεφαρόπτωση σύμφωνα με τους συγγενείς.

IV3 40 ετών. Δεν παρουσίασε βλεφαρόπτωση ή εξωτερική οφθαλμοπληγία. Όλες οι μετρήσεις είχαν φυσιολογικά αποτελέσματα. Επίσης παρουσίασε φυσιολογικό φαινόμενο Bell.

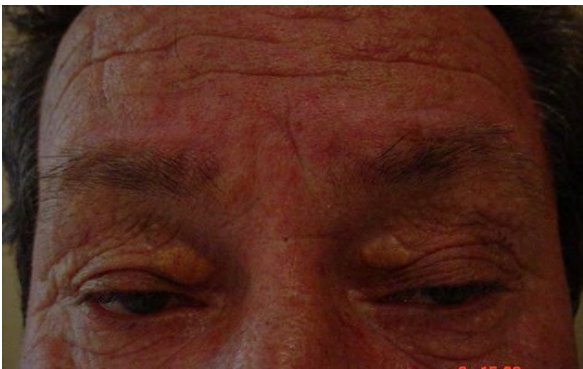
IV4 34 ετών. Δεν παρουσίασε βλεφαρόπτωση ή εξωτερική οφθαλμοπληγία. Όλες οι μετρήσεις είχαν φυσιολογικά αποτελέσματα. Επίσης παρουσίασε φυσιολογικό φαινόμενο Bell

### Φωτογραφίες ασθενών από την οικογένεια 3

(Οι φωτογραφίες δημοσιεύονται με τη γραπτή συγκατάθεση των ασθενών)



Ο ασθενής III9



Ο ασθενής III7



Ο ασθενής III7 κατά την εξέταση της λειτουργικότητας του ανελεκτήρα μύος του βλεφάρου

### 3)Λήψη αίματος με σκοπό την απομόνωση πυρηνικού DNA.

Για την απομόνωση του πυρηνικού DNA (με εξαλάτωση) από ολικό αίμα ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία.

Αρχικά απομακρύνθηκαν τα ερυθρά αιμοσφαίρια μετά από αιμόλυσή τους σε υπότονο δισαπνεσταγμένο νερό (ddH<sub>2</sub>O). Τα εμπύρνηνα κύτταρα απομονώθηκαν με φυγοκέντρηση στις 3000 στροφές/λεπτό στους 4° C, για 15 λεπτά. Ακολούθησε προσθήκη των διαλυμάτων θραύσης των πυρήνων Lysis I και Lysis II τα οποία σπάζουν τους πυρήνες των κυττάρων και έτσι προκύπτει το DNA. Το Lysis I περιέχει NH<sub>4</sub>Cl(155mM), KHCO<sub>3</sub> (10mM), EDTA (1mM), pH 7.4. Το Lysis II περιέχει Tris (10mM), NaCl (400mM), di-Na EDTA (2mM), pH 8,2.

Στη συνέχεια οι πρωτεΐνες απομακρύνθηκαν μετά από επώαση στους 37° C για 24 ώρες παρουσία 100 μl διαλύματος πρωτεϊνάσης K του μήκητα *Tritichium album* (10 mg/ml), η οποία προκαλεί πεπτική υδρόλυση οδηγώντας σε αποικοδόμηση των πρωτεϊνών και διαλύματος 10% w/v SDS (n- Sodium Dodecylsulfate salt), που ανοίγει τη πυρηνική μεμβράνη. Η κατακρήμνιση των πρωτεϊνών έγινε με προσθήκη κορεσμένου διαλύματος 6 M NaCl και φυγοκέντρηση στις 3500 στροφές/λεπτό, στους 4° C, για 15 λεπτά. Το υπερκείμενο που προέκυψε περιέχει το DNA και φυγοκεντρήθηκε στις ίδιες συνθήκες. Συλλέχθηκε ξανά το υπερκείμενο μέρος του διαλύματος και ακολούθησε καταβύθιση με δύο όγκους απόλυτης αιθανόλης (διπλάσιος όγκος σε σχέση με το αρχικό διάλυμα) και προσθήκη CH<sub>3</sub>COONa σε ποσότητα ίση με το 1/10 του όγκου του αρχικού διαλύματος.

Στη συνέχεια έγινε επώαση στους -20° C για 24 ώρες και ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 3000 στροφές/λεπτό, στους 4° C, για 60 λεπτά.

Αφού ξεπλύθηκε το ίζημα με διάλυμα απόλυτης αιθανόλης 70% πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση στις 12000 στροφές/λεπτό, στους 4° C, για 30 λεπτά, στάδιο το οποίο επαναλήφθηκε άλλες δύο φορές με διάρκεια φυγοκέντρησης 20 λεπτά.



Η καθαρότητα και η επάρκεια του DNA ελέγχθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αγαρόζη 1,2%. Τα δείγματα του DNA αποθηκεύθηκαν στους -20° C

#### **4) Λήψη δείγματος μυός (δελτοειδή μυ) από πάσχοντα μέλη.**

Στην οικογένεια 1 η λήψη του δείγματος έγινε από τον ασθενή II3, ενώ στην οικογένεια 2 έγινε από τον ασθενή II7. Στην οικογένεια 3 δε βρέθηκε κάποιος πάσχων μέλος το οποίο να δέχθηκε να υποβληθεί σε αυτή τη διαδικασία. Η λήψη των δειγμάτων έγινε στο χειρουργείο του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας και στη συνέχεια διατηρήθηκαν σε υγρό άζωτο στο εργαστήριο Νευρογενετικής της Νευρολογικής Κλινικής του ίδιου Νοσοκομείου, μέχρι τη μεταφορά τους στο Εργαστήριο Νευρογενετικής του Πανεπιστημίου του Μιλάνο όπου και υπεβλήθησαν σε:

- A) Ιστολογική επιβεβαίωση της νόσου
- B) Ανοσοϊστοχημική χρώση COX και SDH
- Γ) PCR ανάλυση του πυρηνικού και του μιτοχονδριακού DNA
- Δ) Southern blot ανάλυση
- E) Προσδιορισμό αλληλουχίας (DNA Sequencing)
- Z) Πολυμορφισμό μήκους θραύσματος RFLP-PCR

#### **5) Διαχωρισμός επικρατών και υπολειπομένων χαρακτήρων (Segregation study)**

Ως ανάλυση διαχωρισμού αναφέρεται η μελέτη του τρόπου με τον οποίο μία ασθένεια μεταδίδεται σε μία οικογένεια, έτσι ώστε να καθοριστεί ο τρόπος κληρονόμησης (επικρατής ή υπολειπόμενη). Βασίζεται σε μαθηματικούς τύπους και σε μία αυτοσωμική επικρατής διαταραχή η πιο απλή προσέγγιση είναι η σύγκριση του αριθμού των νοσούντων τέκνων από νοσούντες γονείς με τον

αριθμό που θα περιμέναμε βάση της διεισδυτικότητας της νόσου π.χ. 50% αν η διεισδυτικότητα είναι πλήρης.<sup>180</sup>

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

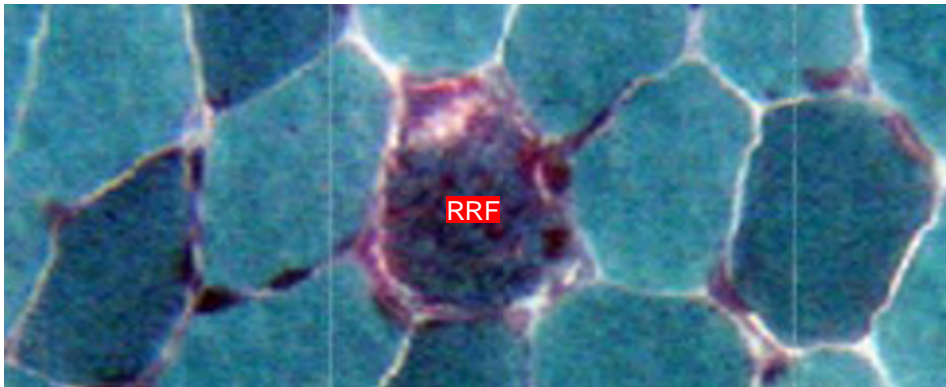
### A) Ιστολογική επιβεβαίωση της νόσου

Αιματοξυλίνη Ηωσίνη, Τριχρωμική του Gomori

Η δομή των μυϊκών ινών ήταν κυρίως πολυγωνική, παρουσίασαν μία ελαφρά μεταβλητότητα του μεγέθους και μερικές πυρηνικές συσσωρεύσεις και διασπάσεις των ινών

Δεν υπήρχαν νεκρώσεις ούτε ενδιάμεσες διηθήσεις.

Τα αγγεία και ο συνδετικός ιστός απεικονίζοντο φυσιολογικά. Στο δείγμα υπήρχαν μερικές συνδετικές ίνες που εμφανίζονται ως «ακτινωτές-ρακώδεις ερυθρές ίνες». (Ragged Red Fibers.) (Εικ 18)



Εικ. 18 Με κόκκινο φαίνονται οι παθολογικές συσσωρεύσεις μιτοχονδρίων (RRF) σε μία μυϊκή ίνα

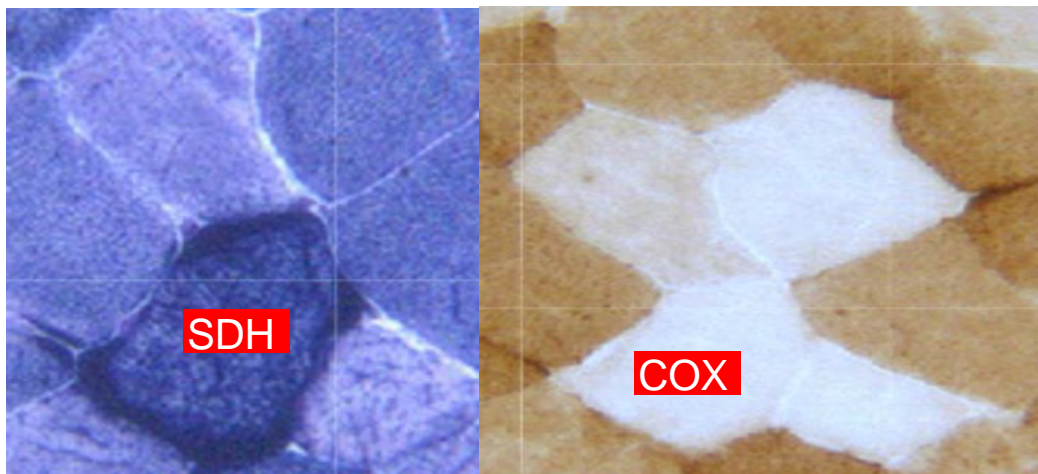
### B) Ανοσοϊστοχημική χρώση COX και SDH

Με χρώσεις για COX και SDH εμφανίστηκαν πολλές ίνες που παρουσίασαν αυξημένη θετική αντίδραση για SDH και έλλειψη(αρνητική) για COX. Αυτή η

εικόνα κατέστη σαφέστατη(έλλειψη της COX) στην διπλή χρώση COX – SDH (Εικ. 19)

**Συμπέρασμα:** Η βιοψία παρουσίασε μια διακριτική μυϊκή πάθηση μιτοχονδριακής φύσεως. Χρήζει Southern blot του μιτοχονδριακού DNA.

**Τα αποτελέσματα της ιστολογικής εξέτασης και της ανοσοϊστοχημικής χρώσης ήταν κοινά και για τους δύο ασθενείς**



Εικ. 19 Οι RRF ίνες εμφάνιζαν έντονη χρώση με SDH και αποχρωματισμό με COX

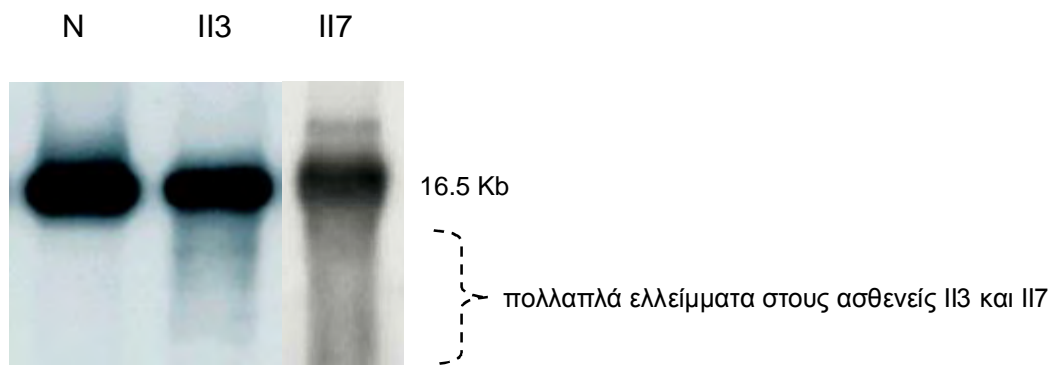
### **Γ-Δ) Αποτύπωση κατά Southern Blot (Southern Blotting)- PCR**

Εφαρμόσθηκε *PCR*<sup>123</sup> και *Southern Blot* στο mtDNA χρησιμοποιώντας το *Expand Long Template PCR System*(Μεγάλου μήκους εκτεινόμενο εκμαγείο PCR σύστημα της Roche, Mannheim, Germany) σε DNA εκχυλιζόμενο από αίμα και από ομογενοποιημένο μυ, εφαρμόζοντας καθιερωμένο πρωτόκολλο ενίσχυσης<sup>124 125</sup>

Στον ασθενή II3 της οικογένειας 1 η PCR ανάλυση ανέδειξε την παρουσία πολλαπλών PCR προϊόντων που πιθανώς αντιστοιχούν σε ελλείμματα.

Η Southern blot ανάλυση του ΙΙ3 ασθενούς της οικογένειας 1 έδειξε πρότυπο πολλαπλών mtDNA ελλειμμάτων (Εικ. 20)

Στον ασθενή ΙΙ7 της οικογένειας 2 η PCR ανάλυση ανέδειξε την παρουσία πολλαπλών PCR προϊόντων που πιθανώς αντιστοιχούν σε ελλείμματα. Η Southern blot ανάλυση του ΙΙ7 ασθενούς της οικογένειας 2 έδειξε ένα τυπικό πρότυπο που παρατηρείται σε σύνδρομο πολλαπλών mtDNA ελλειμμάτων, αλλά και ένα εξασθενημένο και επικολημένο σήμα υβριδισμού πάνω από τη ζώνη του υγιούς τύπου mtDNA (Εικ. 20)



Εικ. 20 Ενδεικτικά αποτελέσματα του Southern Blot σε υγιή μάρτυρα (N), του ασθενούς ΙΙ3 της οικογένειας 1 και του ασθενούς ΙΙ7 της οικογένειας 2.

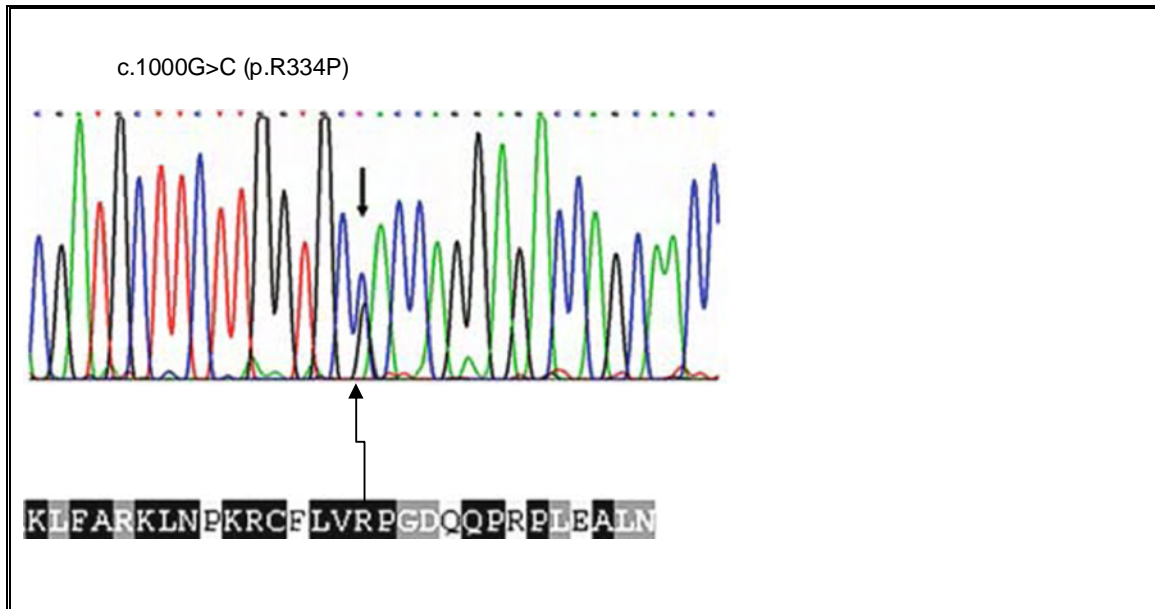
## Ε) Προσδιορισμός αλληλουχίας (DNA Sequencing)

Έγινε προσδιορισμός αλληλουχίας (sequencing) για την ανεύρεση μεταλλάξεων στα γονίδια ANT1, POLG και TWINKLE, με Beckman Coulter CEQ 8000 fluorescent DNA αναλυτή.

Στον ασθενή ΙΙ7 της οικογένειας 2 δε βρέθηκε μετάλλαξη σε κάποιο από τα τρία γονίδια που συνδέονται με CPEO.

Στον ασθενή ΙΙ3 της οικογένειας 1 δε βρέθηκε μετάλλαξη στα γονίδια ANT1 και POLG. Ο προσδιορισμός αλληλουχίας του TWINKLE ή PEO1 γονιδίου οδήγησε στην **Ταυτοποίηση μίας καινούργιας ετερόζυγης, παρερμηνεύσιμης μετάλλαξης η οποία προστίθεται στο μεταλλαγμένο**

φορτίο του γονιδίου, την c.G1001C που οδηγεί στην υποκατάσταση p.R334P του αμινοξέως και η οποία εντοπίζεται στο εξώνιο 1 (Εικ. 21)



Εικ. 21 Σε Ηλεκτροφόρημα της ετερόζυγης νουκλεοτιδικής αλληλουχίας, παρατηρείται αλλαγή σε 5'-3' κατεύθυνση στον ασθενή της, που φέρει την R334P μετάλλαξη

TTG-UUG=L=Leu= Λευκίνη

GTG-GUG=V=Βαλίνη

CCA=P=Προλίνη

GGA=G=Γλυκίνη

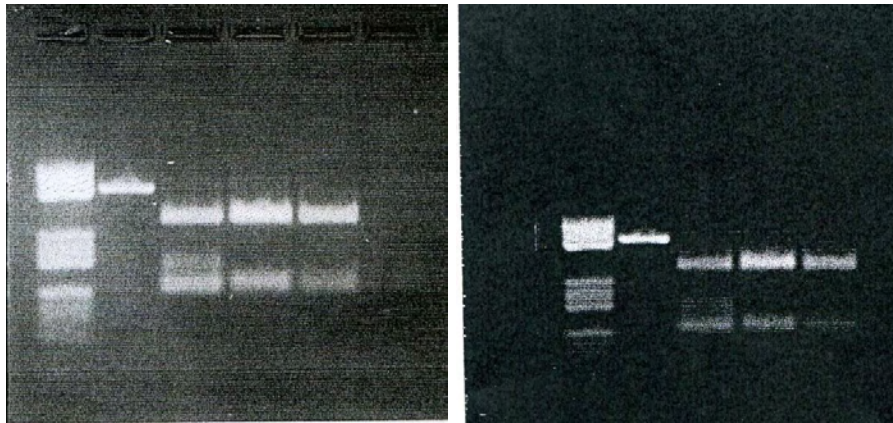
CGA=R=Αργινίνη

Όπως προκύπτει από τον γενετικό κώδικα, έχουμε μία αλλαγή (αντικατάσταση) στη τριπλέτα-κωδικόνιο R(αργινίνη) του φυσιολογικού τύπου, με την τριπλέτα P(προλίνη) στον ασθενή λόγω της αλλαγής αντικατάστασης της βάσεως G με την βάση C

## Z) RFLP-PCR(Restriction fragment length polymorphism)

### Πολυμορφισμός μήκους θραύσματος

Η νέα ταυτοποιημένη μεταλλάξη επιβεβαιώθηκε με Restriction fragment length polymorphism με ξεχωριστά PCR προϊόντα χρησιμοποιώντας το περιοριστικό ένζυμο ((New England Biolabs) *Nla*IV (R334P). Η *Nla*IV είναι μία Type II REase (Restriction enzymes) η οποία αναγνωρίζει την διακοπτόμενη παλινδρομική αλληλουχία GGNNCC (όπου N οποιαδήποτε βάση) και διαχωρίζει στην μέση, αφήνοντας αμβλέα άκρα.<sup>178</sup>



Οι εκκινητές ήταν: FORWARD 5' CTT ACC CCC TGC CTT ACT CC 3'  
και REVERSE 5' CCC ACT TGC TTT TGT CAC GTG

PCR/RFLP bp	ND	P <sub>2</sub>	R334P WT
443	■		
311		■	■
177		■	
134/132		■	■

bp(base pair): ζεύγη βάσεων, ND(no digestive): χωρίς πέψη με ενδονουκλεάση

P<sub>2</sub> (Patient): Ασθενής, WT(wild type): Φυσιολογικός τύπος

## **H) Διαχωρισμός επικρατών και υπολειπομένων χαρακτήρων(Segregation study)**

Προκειμένου να γίνει σύνδεση της μετάλλαξης με την ασθένεια έγινε εξέταση πυρηνικού DNA αίματος σε όσα μέλη, πάσχοντα και μη, της οικογένειας δέχθηκαν.

**Η ίδια μετάλλαξη ανεδείχθη στο DNA και των υπολοίπων πασχόντων μελών και δεν βρέθηκε αντιστοίχως στο TWINKLE των υγιών.**

*Από την ανάλυση του διαχωρισμού εδείχθη ότι η μετάλλαξη είναι **επικρατής** και **αυτοσωμική**.*

## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η φυσιολογική λειτουργία των ανθρώπινων μιτοχονδρίων, εξαρτάται από μία αρκετά περίπλοκη σχέση μεταξύ του πυρηνικού και του μιτοχονδριακού γονιδιώματος. Έτσι, μεταλλάξεις τόσο στα μιτοχονδριακά όσο και στα πυρηνικά γονίδια μπορούν να προκαλέσουν μιτοχονδριακή δυσλειτουργία και κατ' επέκταση ME. Υπάρχει μία ομάδα αυτοσωμικά κληρονομούμενων ME που χαρακτηρίζονται από ελλείμματα του mtDNA<sup>126</sup>. Η CPEO είναι μία κύρια εκδήλωση αυτών, η οποία όμως μπορεί να συνοδεύεται και από άλλες πολυσυστηματικές εκδηλώσεις. Η CPEO ήταν η πρώτη μεντελιανή διαταραχή που συνδέθηκε με πολλαπλά ελλείμματα του mtDNA και ο πρώτος ασθενής αναφέρεται στα τέλη της δεκαετίας του 1980.<sup>127</sup>

Αυτή τη στιγμή η AD-CPEO είναι η πιο συνήθης γενετικά ετερογενής κλινική οντότητα που ανήκει στην υποομάδα των ανθρώπινων μιτοχονδριακών διαταραχών που προκαλούνται από μεταλλάξεις σε πυρηνικά γονίδια. Τα τυπικά χαρακτηριστικά της νόσου είναι η βλεφαρόπτωση και η αδυναμία των εξοφθάλμιων μυών, καθώς και αρχόμενη γενικευμένη μυϊκή αδυναμία που εμφανίζεται στην ενήλικη περίοδο του ασθενούς. Πολύ συχνά συνοδεύεται από κλινικά σημεία πολυσυστηματικής προσβολής με αταξία, περιφερική νευροπάθεια, εγκεφαλοπάθεια, κατάθλιψη, καταρράκτη, απώλεια της ακοής, καρδιομυοπάθεια, ενδοκρινική δυσλειτουργία<sup>128, 129, 130</sup> καθώς και εξωπυραμιδική συνδρομή.<sup>131</sup> Επίσης αναφέρεται εμφάνιση CPEO με υπολειπόμενα κληρονομούμενη μιτοχονδριακή γαστρεντερική εγκεφαλομυοπάθεια (MNGIE). Σαν υπεύθυνο μεταλλαγμένο γονίδιο σε αυτή την περίπτωση αναγνωρίστηκε η TP (thymidine phosphorylase) το 1999.<sup>132</sup> Σημαντική συμβολή στην ανακάλυψη του υπεύθυνου γονιδίου είχε και η μελέτη μίας ελληνικής οικογένειας.<sup>182,183</sup>

Η βιοψία μυός στους περισσότερους ασθενείς εμφανίζει ρακώδεις μυϊκές ίνες (ragged-red fibres) με μειωμένη αντίδραση στην οξειδάση του κυτοχρώματος c (COX), ενώ η Southern blot ανάλυση αναδεικνύει πολλαπλά ελλείμματα του mt(DNA).<sup>133,134</sup>



Τα μονήρη ετεροπλασμικά ελλείμματα του mtDNA συνδέονται με περίπου το 80% των περιστατικών του συνδρόμου Kearns-Sayre<sup>135, 136</sup> και το 40-70% των περιστατικών CPEO.<sup>137, 138</sup> Αυτοί οι ασθενείς παρουσιάζονται σα σποραδικά περιστατικά.<sup>139,92</sup>

Άλλοι ασθενείς με CPEO εμφανίζουν κληρονόμηση από τη μητέρα και σε αυτές τις περιπτώσεις εντοπίζονται σημειακές μεταλλάξεις του mtDNA, με πιο συχνή αλλά όχι αποκλειστική την 3243A-G MELAS μετάλλαξη.<sup>142</sup>

Οι αυτοσωμικά επικρατείς(AD-CPEO) και αυτοσωμικά υπολειπόμενες(AR-CPEO) κληρονομούμενες μορφές της CPEO εμφανίζονται σε ποσοστό 15% των περιπτώσεων CPEO. Αυτές συνδέονται με πολλαπλά ελλείμματα του mtDNA που προκύπτουν δευτερογενώς από βλάβες σε πυρηνικά γονίδια.<sup>140</sup>

Τα πυρηνικά γονίδια που μέχρι σήμερα έχει βρεθεί ότι συνδέονται με CPEO είναι τα ακόλουθα: α) POLG2, που κωδικοποιεί την p55 βοηθητική υπομονάδα της pol-γ<sup>85</sup> β) ANT1, που κωδικοποιεί μία ειδική μιτοχονδριακή αδενονουκλεοτιδική πρωτεΐνη μεταφοράς ή ADP/ATP (SLC25A4)<sup>90</sup> γ) POLG1, που κωδικοποιεί την καταλυτική υπομονάδα της mtDNA-ειδικής πολυμεράσης-γ (pol-γ)<sup>141,142</sup> δ) TWINKLE ή PEO1 που κωδικοποιεί μία θεωρούμενη mtDNA ελικάση.<sup>95</sup> Τελευταία, μεταλλάξεις σε ακόμα ένα γονίδιο (OPA1), αρχίζει να αναδεικνύεται σαν μία νέα αιτία αυτοσωμικού επικρατούς “οπτικής ατροφίας plus” φαινότυπου, με συσσώρευση πολλαπλών ελλειμμάτων mtDNA στους μύες.<sup>143,144,145</sup>

### *POLG2*

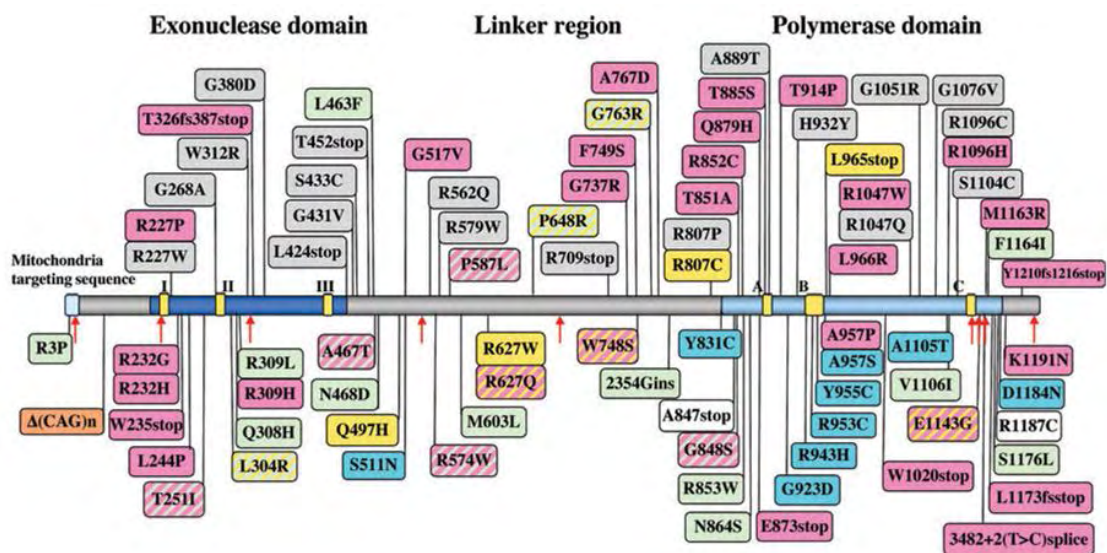
Μέχρι σήμερα, έχει αναφερθεί μόνο μία μετάλλαξη στο POLG2 γονίδιο που συνδέεται με CPEO. Η μετάλλαξη αυτή έχει σαν αποτέλεσμα την αντικατάσταση του G451E, και αναφέρεται μόλις το 2006 από τους Longley MJ et al.<sup>85</sup>

### *ANT1*

Η ANT1 είναι πρωτεΐνη που βρίσκεται στα μιτοχόνδρια της καρδιάς, των νεφρών, του ήπατος και των σκελετικών μυών. Η κύρια δράση της είναι η μεταφορά ATP έξω από τη μιτοχονδριακή μήτρα σε ανταλλαγή με ADP. Το 1999

οι Kaukonen et al.<sup>86</sup> μέσω κλωνοποίησης διαφόρων θέσεων (positional cloning) σε οικογένεια με AD-CPEO, περιόρισαν την περιοχή για AD-CPEO στο χρωμόσωμα 4q που περιλαμβάνει το ANT1 και 64 ακόμη γονίδια. Το 2000 η ανάλυση αλληλουχίας σε 5 οικογένειες και έναν ασθενή με σποραδική AD-CPEO, έδειξε 2 ετερόζυγες παρερμηνεύσιμες μεταλλάξεις στο ANT1, που εντοπίστηκαν, στο 4q35. Αυτές είναι η αυτοσωμική A114P και η σποραδική V289M.<sup>90</sup> Το 2001 οι Napolì et al βρήκαν μια ετερόζυγη μετάλλαξη, την T293C, σε μία ελληνική οικογένεια με CPEO<sup>91</sup>. Το 2003 οι Agostino et al. εντόπισαν μία ετερόζυγη V289M μετάλλαξη σε έναν ιταλό ασθενή με σποραδική CPEO<sup>92</sup>, ενώ το 2005 οι Deschauer et al αναγνώρισαν μία ετερόζυγη A90D μετάλλαξη σε μία γερμανική οικογένεια με CPEO.<sup>146</sup>

## POLG1



Εικ. 22 Σχηματικό διάγραμμα της ανθρώπινης pol-γ πρωτεΐνης που δείχνει τις περιοχές των παθολόγων αντικαταστάσεων αμινοξέων (στα κουτιά) και πολυμορφισμών (κόκκινα βέλη). Γαλάζιο κουτιά: AD-CPEO, Πράσινα κουτιά: AR-CPEO, Γκρι κουτιά: σποραδική CPEO, Πορτοκαλί κουτιά: σύνδρομο Alpers, Κίτρινα κουτιά: σύνδρομο αταξικής νευροπάθειας, Πορτοκαλί κουτιά: ανδρική υπογονιμότητα. Τα κουτιά με γραμμώσεις αντιπροσωπεύουν αντικαταστάσεις που έχουν βρεθεί σε περισσότερες από μία ασθένειες<sup>73</sup>

Περίπου 90 μεταλλάξεις έχουν βρεθεί έως σήμερα στο γονίδιο που κωδικοποιεί την καταλυτική υπομονάδα της pol-γ οι οποίες συνδέονται με ME. Μέχρι σήμερα οι περισσότερες μεταλλάξεις που συνδέονται με CPEO έχουν βρεθεί στο POLG και όλες, πλην μίας, εντοπίζονται στην περιοχή της πολυμεράσης της pol-γ (Εικ.22).

Το 2000 οι Van Goethem et al εντόπισαν μέσω μίας βελγικής οικογένειας μία επιπλέον γενετική αιτία AD-CPEO.<sup>147</sup> Η καινούργια θέση χαρτογραφήθηκε από τους ίδιους το 2001 στο χρωμόσωμα 15q22-q26.<sup>79</sup> Σε αυτή την περιοχή βρίσκεται και το POLG γονίδιο το οποίο θεωρήθηκε προφανές υποψήφιο γονίδιο για AD-CPEO.<sup>23,81</sup> Η πρώτη μετάλλαξη που συνδέθηκε με CPEO στο ίδιο γονίδιο είναι μία ετερόζυγη παρερμηνεύσιμη μετάλλαξη το 2001.<sup>151</sup> Η ίδια μετάλλαξη παρατηρήθηκε αργότερα, το 2002, σε μία ελληνική και τέσσερις ιταλικές οικογένειες από τους Lamantea et al. και θεωρήθηκε θερμό σημείο "hotspot".<sup>82</sup> Άλλες επικρατείς παρερμηνεύσιμες μεταλλάξεις στο POLG έχουν αναφερθεί σε μία ιαπωνική το 2002 και αρκετές ιταλικές οικογένειες.<sup>148, 82</sup> Επίσης αναφέρθηκαν διαφορετικές ετερόζυγες υπολειπόμενες μεταλλάξεις σε CPEO οικογένειες και σποραδικούς CPEO ασθενείς.<sup>79,82,83</sup> Το 2004 οι Graziewicz et al αναφέρουν τις R943H και Y955C αντικαταστάσεις.<sup>80</sup> Την ίδια χρονιά οι Luoma P et al αναφέρουν συνύπαρξη παρκινσονισμού και AD-CPEO σε δύο ασθενείς με μεταλλάξεις στο POLG.<sup>149</sup> Τα συμπτώματα του παρκινσονισμού εμφανίστηκαν πολλά χρόνια μετά από αυτά της CPEO.

Οι περισσότερες μεταλλάξεις του POLG συνδέονται με αυτοσωμική υπολειπόμενη CPEO(AR-CPEO) και οι ασθενείς με CPEO είναι συχνά συνδυασμένοι ετεροζυγώτες με δύο διαφορετικά μεταλλαγμένα αλληλία.<sup>73</sup> Για παράδειγμα η A467T μετάλλαξη έχει βρεθεί σε θέση trans με άλλες παρερμηνεύσιμες POLG μεταλλάξεις σε CPEO, αταξική νευροπάθεια και σύνδρομο Aplers.<sup>150,151</sup> Αξίζει να σημειωθεί ότι η ίδια μετάλλαξη είναι αρκετά συχνή και βρίσκεται στο 0,6% του βελγικού πληθυσμού.<sup>155</sup>

Το 2003 οι Agostino et al σε διερεύνηση σποραδικών περιπτώσεων CPEO ιταλών και βρετανών ασθενών αναφέρουν την αναγνώριση δύο ήδη

γνωστών και οκτώ νέων μεταλλάξεων στο POLG. Οι δύο ήδη γνωστές μεταλλάξεις είναι οι T251I και A467T. Οι νέες μεταλλάξεις είναι οι R227W, W312R, G431V, L424Δ>452X, R1047Q, R1096C, S1104C 10.

### *TWINKLE ή PEO1*

Το γονίδιο αυτό αρχικά απομονώθηκε σε locus για CPEO στο χρωμόσωμα 10, C10orf2, το 2001 από τους Spelbrink et al.<sup>95</sup> Η σύνδεση του χρωμοσώματος 10q με την CPEO ήταν ήδη γνωστή από τους Li et al το 1999 και τους Suomalainen et al το 1995, δεδομένου ότι δύο μεγάλες οικογένειες με AD-CPEO, μία από τη Φιλανδία και μία από το Πακιστάν, συνδέθηκαν με το χρωμόσωμα 10q24.<sup>152,153,97</sup>

Το TWINKLE κωδικοποιεί την mtDNA ελικάση μία πρωτεΐνη παρόμοια με την T7 πριμάση/ελικάση (gp4) που όμως στερείται σημαντικών σχετιζομένων με τη πριμάση αλληλουχιών που βρίσκονται T7gp4.<sup>45,46</sup>

Οι DNA ελικάσες καταλύουν το διπλό ελικοειδές double-stranded DNA (dsDNA) σε απλό single-stranded DNA (ssDNA), μια διαδικασία ενεργειακής σύζευξης σε τριφωσφορική υδρόλυση του νουκλεοτιδίου (Εικ.23). Αυτή η ομάδα των ενζύμων εμπλέκεται στην σταθερότητα του DNA κατά τον διπλασιασμό, διορθώνοντας και ανασυνδυάζοντας.<sup>154</sup> Μεταλλάξεις που παρεμποδίζουν την λειτουργία της ελικάσης, επηρεάζουν αυτόν τον βασικό κυτταρικό μηχανισμό και οδηγούν σε ασθένειες, συμπεριλαμβανομένων του καρκίνου και της πρόωμης γήρανσης.<sup>155</sup>

Η Twinkle είναι η μόνη γνωστή DNA ελικάση η οποία εμπλέκεται στην αντιγραφή του ανθρώπινου μιτοχονδριακού DNA. Η υπόθεση ότι η Twinkle λειτουργεί σαν mtDNA ελικάση βασίζεται στο ότι έχει σημαντική ομοιότητα με την gp4 πρωτεΐνη, του φάγου T7, κυρίως στην περιοχή της ελικάσης. Πολλαπλές ευθύγραμμες αλληλουχίες δείχνουν ότι η θεωρούμενη περιοχή της TWINKLE ελικάσης έχει την ίδια διατηρημένη οργάνωση όπως άλλα μέλη της υπέρ-οικογένειας RecA/DnaB και αμετάβλητα αμινοξέα αυτής της υπέρ-οικογένειας είναι αυστηρά διατηρημένα στην Twinkle. (η RecA είναι πρωτεΐνη της Escherichia

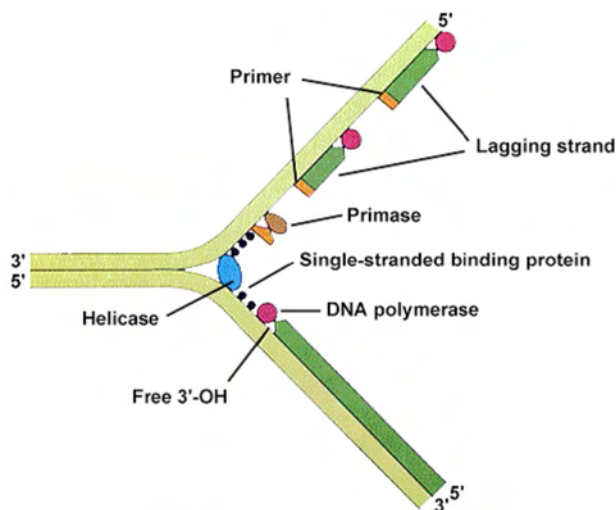
coli (recombinationA) η οποία διορθώνει το DNA σε φάση ανασυνδυασμού. Ανάλογη στον άνθρωπο η RAD51/ η DnaB είναι ένα ένζυμο στα βακτήρια το οποίο ανοίγει την φουρκέτα αντιγραφής κατά την αντιγραφή του DNA. Αρχικά όταν η DnaB συνδέεται στην DnaA και συνεργάζεται με την DnaC, έναν αρνητικό ρυθμιστή. Μετά η DnaC αποσυνδέεται και η DnaB συνδέεται με την DnaG) Αυτά τα αμινοξέα περιλαμβάνουν τα G420/K421 του μοτίβου Walker A, το οποίον αποτελεί μέρος της NTP θέσεως σύνδεσης και υδρόλυσης, το E445 του μοτίβου H<sub>1</sub>A, το D516 του μοτίβου Walker B και ποικίλα άλλα γονιδιακά τμήματα τα οποία θεωρούνται σημαντικά για την λειτουργία της ελικάσης. Η Twinkle είναι μία εξαμερής ελικάση η οποία μπορεί να ξετυλίγει μικρά ευθύγραμμα (<20 bp) ) τμήματα του dsDNA( double-stranded DNA διπλή έλικα ) σε 5' προς 3' κατεύθυνση<sup>156</sup>.

Η Twinkle σχηματίζει πολυμερή in vitro, περιλαμβάνοντας εξαμερή, όμοια προς αυτά που σχηματίζει η T7 πριμάση/ελικάση και άλλες κυκλικές ελικάσες με τις εξαμερείς να αποτελούν το λειτουργικό τμήμα του ενζύμου. Μέσα στο μιτοχόνδριο η Twinkle βρίσκεται κοντά στο mtDNA, όπως θα αναμενόταν για μία πρωτεΐνη η οποία εμπλέκεται στον μεταβολισμό του mtDNA. Η Twinkle μαζί με το mtDNA σχηματίζουν δομές που ονομάζονται μιτοχονδριακά νουκλεοειδή και είναι ορατά με EtBr χρώση. Ο λόγος που ονομάζονται έτσι είναι η ομοιότητα τους με τα νουκλεοειδή συμπλέγματα που βρίσκονται στους μύκητες, τα φυτά και τα πρωτόζωα και είναι μεγάλα συμπλέγματα πρωτεϊνών και mtDNA.<sup>157, 158</sup> Η DAPI χρώση ανθρώπινων κυττάρων αναδεικνύει συμπαγείς δομές που περιέχουν mtDNA.<sup>159</sup> Τα συμπλέγματα αυτά είναι πιθανώς οι λειτουργικές μονάδες του διαχωρισμού του mtDNA. Ο αριθμός των φθορίζοντων Twinkle εστιών ανά κύτταρο είναι περίπου σταθερός ανά κυτταρική σειρά, αλλά συστηματικά διαφέρει μεταξύ διαφορετικών κυτταρικών σειρών. Είναι επίσης σημαντικά μικρότερος από ότι εκτιμάτο από το αριθμό αντιγράφων του mtDNA των θηλαστικών,<sup>160,161</sup> το οποίο συνεπάγεται ότι τα mtDNA νουκλεοειδή είναι πολλαπλά αντίγραφα σε σχέση με το mtDNA.

Επί πλέον, κύτταρα τα οποία υπέρ-εκφράζουν την Twinkle δείχνουν μία μετρίως αυξημένη ATP/dATP – εξαρτώμενης δραστηριότητα της ελικάσης του

mtDNA, δείχνοντας ότι η Twinkle είναι μία αδενίνη νουκλεοτιδο-εξαρτώμενη DNA ελικάση παρόμοια με αυτήν των μιτοχονδρίων των βοοειδών.<sup>162</sup>

Αμφιβολίες για τον ρόλο της Twinkle ως πριμάσης-εκκινήτσης (καθορίζει την έναρξη της αντιγραφής του DNA) αναφέρουν και οι Géraldine Farge et al,<sup>159</sup> διότι η περιοχή του N-άκρου της ανθρώπινης Twinkle περιλαμβάνει κάποια από τα χαρακτηριστικά μοτίβα, τα οποία βρίσκονται στο N-άκρο της πριμάσης του T7 gp4, αλλά κάποια άλλα σημαντικά μοτίβα δεν υφίστανται. Επιπλέον *in vitro* δεν συμπεριφέρεται σαν πριμάση. Το N-άκρο της Twinkle απαιτείται για αποτελεσματική πρόσδεση στο μονό ελικοειδές DNA. Ελλείμματα αυτής της περιοχής μειώνουν την δραστηριότητα της DNA ελικάσης και την τάση του μιτοχονδριακού DNA ρεπλισώματος. Η gp4 και η Twinkle λειτουργικά διαφέρουν. Η Twinkle δε προσδένεται στο διπλό ελικοειδές DNA σε αντίθεση με την gp4. Επιπλέον η Twinkle δημιουργεί εξαμερή ακόμη και απουσία Mg<sup>2+</sup> και NTPs, γεγονός το οποίο δημιουργεί την υπόθεση ότι μια συνεργή πρωτεΐνη, με λειτουργία ελικάσης DNA πρόσδεσης απαιτείται για να προσκολληθεί η Twinkle πάνω στο γονιδίωμα του κυκλικού mtDNA.



Εικ.23 Σχηματική αναπαράσταση

DNA ελικάσης που καταλύει το ddDNA σε ssDNA (Lysis of *E. coli* by Penicillin James A. Sullivan Quill Graphics Charlottesville, VA USA)

Οι Spelbrink et al ταυτοποίησαν αρχικά 11 διαφορετικές C10orf2 μεταλλάξεις σε 12 οικογένειες με AD-CPEO. Μία οικογένεια ήταν Φιλανδικής καταγωγής, μία Πακιστανικής καταγωγής, κάποιες ήταν Βρετανικής, Ουγγρικής και Αμερικανικής καταγωγής, ενώ οι περισσότερες ήταν Ιταλικής καταγωγής. Από τη Φιλανδική οικογένεια προέκυψε ένας ετερόζυγος διπλασιασμός 39-bp (nt1053-1092 μετρώντας από το ATG start codon) που οδηγεί σε διπλασιασμό των 352-364 αμινοξέων του TWINKLE. Η PCR σε μέλη της οικογένειας έδειξε πλήρη διαχωρισμό (segregation) της μετάλλαξης με τον φαινότυπο της ασθένειας. Η Πακιστανική οικογένεια έδειξε μία μονή, ετερόζυγη, παρερμηνεύσιμη G>C αντικατάσταση πουρίνης από πυριμιδίνη (transversion) (1423bp), που οδηγεί σε αλλαγή του αμινοξέου Ala-475 σε Pro (A475P). Η ίδια μετάλλαξη (A475P) βρέθηκε επίσης σε Ιρανούς ασθενείς με CPEO το 2006 από τους Houshmand et al. Όλα τα πάσχοντα μέλη βρέθηκαν ετερόζυγα ως προς τη μετάλλαξη. Από τις υπόλοιπες οικογένειες ταυτοποιήθηκαν ακόμη 9 μεταλλάξεις, 8 σε Ιταλικές οικογένειες και 1 σε Βρετανική οικογένεια. Μία από τις μεταλλάξεις βρέθηκε δύο φορές σε οικογένειες που δεν είχαν συγγένεια αλλά όμως είχαν καταγωγή από την ίδια περιοχή της Ιταλίας. Μία μεγάλη Ιταλική οικογένεια με την A359T μετάλλαξη, έδειξε πολλαπλές περιπτώσεις συγγένειας αίματος, με δύο ομόλογα άτομα να έχουν πιο επιβαρυσμένο φαινότυπο και με πιο μικρή ηλικία έναρξης των συμπτωμάτων από τους ετερόζυγους συγγενείς τους. Αξίζει να σημειωθεί πως 8 από τις 11 αυτές μεταλλάξεις συσσωρεύονται σε μία μικρή περιοχή περίπου 30 αμινοξέων, που ανταποκρίνεται στην περιοχή σύνδεσης (linker region) του φάγου T7 gp4 μεταξύ της περιοχής της πριμάσης και της ελικάσης. Δύο από τις υπόλοιπες τρεις μεταλλάξεις, η W474C και η A475P, εντοπίζονται σε μία σχετικά περιορισμένη περιοχή μεταξύ του μοτίβου Walker A και B της περιοχής της ελικάσης. Η μετάλλαξη W315L βρίσκεται επίσης σε ένα σχετικά περιορισμένο τμήμα πάνω από την περιοχή σύνδεσης (linker region).<sup>95</sup> Οι ασθενείς της Φιλανδικής οικογένειας που έδειξαν τον διπλασιασμό των 13 αμινοξέων παρουσίασαν πέραν της CPEO και συμπτώματα όπως νοητική στέρηση, και κατάθλιψη. Από τρεις αυτοψίες μελών αυτής της οικογένειας βρέθηκε πως τα περισσότερα ελλείμματα mtDNA εντοπίστηκαν στον φλοιό του

εγκεφάλου και στα βασικά γάγγλια, σε ποσοστό περίπου 60% του mtDNA, ακολουθούμενα από τους σκελετικούς μύες και την καρδιά και με πολύ μικρά ποσά στους νεφρούς.<sup>163,157</sup> Παρόλα αυτά, αυτή η διανομή δεν ανταποκρίνεται επακριβώς στο πρότυπο έκφρασης του TWINKLE, ενισχύοντας την άποψη για διαφορετική ευαισθησία των ιστών στη δυσλειτουργία του TWINKLE.<sup>95</sup>

Το 2002 οι Lewis et al διερεύνησαν 11 οικογένειες της Αυστραλίας, καυκασιανής προέλευσης, στις οποίες υπήρχαν μέλη πάσχοντα από CPEO. Το αποτέλεσμα ήταν η ανάδειξη δύο νέων μεταλλάξεων σε τρεις από τις οικογένειες. Μία από τις μεταλλάξεις, η μονή, ετερόζυγη, παρερμηνεύσιμη, S369Y, βρέθηκε σε δύο θεωρητικά μη συγγενικές οικογένειες, που όμως προέρχονταν από την ίδια περιοχή της Αυστραλίας και συγκεκριμένα την Τασμανία. Περαιτέρω ανάλυση του απλότυπου, έδειξε ότι οι δύο οικογένειες συνδέονταν συγγενικά. Η S369Y μετάλλαξη εντοπίστηκε στην περιοχή σύνδεσης (linker region) του γονιδίου. Σε μία άλλη οικογένεια βρέθηκε μία καινούργια παρερμηνεύσιμη, (transition) αντικατάσταση πουρίνης ή πυριμιδίνης από πουρίνη ή πυριμιδίνη αντιστοίχως (A <-> G) ή C <-> T), P335L μετάλλαξη. Αυτή εντοπίστηκε στην περιοχή της πριμάσης.<sup>98</sup> Οι μεταλλάξεις που εντοπίζονται στην περιοχή σύνδεσης (linker region) του γονιδίου δείχνουν να έχουν μεγάλη επίπτωση στην ικανότητα των πρωτεϊνικών υπομονάδων να ολιγομερίζονται.<sup>158</sup> Οι Spelbrink et al έδειξαν ότι δύο από τις μεταλλάξεις που είχαν βρει, η W474C και ο 39-br διπλασιασμός, που εντοπίστηκαν στη συνδετική περιοχή του γονιδίου δεν επηρέαζαν τον πολυμερισμό και συμπέραναν ότι οι μεταλλάξεις σε εκείνη την περιοχή πρέπει να έχουν άλλες επιπτώσεις στη λειτουργία της ανθρώπινης TWINKLE πρωτεΐνης.<sup>95</sup> Σε μία άλλη από τις οικογένειες από την Αυστραλία ταυτοποιήθηκε η V368I μετάλλαξη, που είχε ήδη αναφερθεί σε δύο οικογένειες από την Σικελία.<sup>95</sup> Όμως το 2003 οι Arenas et al απέδειξαν πως η V368I δεν ήταν μετάλλαξη αλλά σπάνιος πολυμορφισμός καθώς δεν διαχωριζόταν με AD-CPEO, αλλά βρέθηκε σε 10 υγιή άτομα ισπανών και ιταλών από την ομάδα ελέγχου.<sup>164</sup> Στην έρευνα των Lewis et al φαίνεται ότι οι μεταλλάξεις στο TWINKLE γονίδιο είναι η κύρια αιτία CPEO στον πληθυσμό της Αυστραλίας. Ο φαινότυπος των ασθενών κυμαίνονταν από μόνο εμφάνιση πτώσης και οφθαλμοπληγίας



μέχρι ταυτόχρονη εμφάνιση συμπτωμάτων όπως γενικευμένη κόπωση, κακή ισορροπία, θολερότητα όρασης, διπλωπία, αδυναμία του θώρακος και αδυναμία στήριξης των άνω άκρων πάνω από το κεφάλι για παρατεταμένο χρονικό διάστημα. Ενδιαφέρον έχει το γεγονός ότι διαφορετικοί ασθενείς από δύο διαφορετικές οικογένειες δείχνουν κοινό πρότυπο ελλειμμάτων, ενώ παρουσιάζουν πολύ διαφορετικό φαινότυπο. Το γεγονός αυτό είχε επισημανθεί σε μέλη της οικογένειας από τη Φιλανδία με τον 39-yr διπλασιασμό και δύο αδέρφια από μία Βελγική οικογένεια που έχουν μετάλλαξη στο POLG γονίδιο<sup>165</sup>.<sup>166</sup> Αυτό εγείρει ερωτήματα για το μηχανισμό με τον οποίο δημιουργούνται τα ελλείμματα. Όμοια πρότυπα ελλειμμάτων υποδηλώνουν την ύπαρξη θερμών σημείων “hot spots” από όπου προκύπτουν τα ελλείμματα.<sup>98</sup>

Το 2003 οι Kiechl et al διερεύνησαν δύο οικογένειες από την Αυστρία με μέλη πάσχοντα από CPEO. Ο φαινότυπος των ασθενών ήταν σχετικά επιβαρυσμένος με συμπτώματα όπως καρδιομυοπάθεια, γενικευμένη μυοπάθεια, αξονική πολυνευροπάθεια, σακχαρώδης διαβήτης και απώλεια ακοής. Στη μία οικογένεια βρέθηκε μία νέα ετερόζυγη, παρερμηνεύσιμη μετάλλαξη, η F485L. Η μετάλλαξη εντοπίστηκε σε μία περιορισμένη περιοχή της ελικάσης του TWINKLE, πολύ κοντά σε δύο προηγούμενως καταγεγραμμένες μεταλλάξεις, τις W474C και A475P.<sup>171</sup> Στην άλλη Αυστριακή οικογένεια δε βρέθηκε κάποια μετάλλαξη σε κάποιο από τα γονίδια που συνδέονται με CPEO, παρόλο που παρουσίασαν ίδιο φαινότυπο με τα μέλη της πρώτης οικογένειας.<sup>167</sup>

Την ίδια χρονιά οι Deschauer et al ανακοίνωσαν την ταυτοποίηση μίας νέας ετερόζυγης TWINKLE μετάλλαξης (K319T) που εντοπίστηκε πολύ κοντά σε μία ήδη καταγεγραμμένη μετάλλαξη, την W315L. Η οικογένεια που διερευνήθηκε έχει καταγωγή από τη Γερμανία και ο φαινότυπος είναι ήπιος, μη παρουσιάζοντας εκδηλώσεις από μυς πλην των εξοφθάλμιων. Το ενδιαφέρον σε αυτή την περίπτωση είναι τα χαμηλά επίπεδα COX-deficient μυϊκών ινών που βρέθηκαν στο δείγμα μυ του ασθενούς, το οποίο σημειωτέων, προήλθε από τον δαλτοειδή μυ. Την ίδια περίπου περίοδο το ίδιο είχε αναφερθεί και σε ασθενή με σποραδική μορφή CPEO, στον οποίο βρέθηκε η παθογόνος μετάλλαξη R627W

στο POLG γονίδιο, ενώ τα αποτελέσματα της βιοψία του τετρακέφαλου μυ του και η Southern blot ανάλυση ήταν εντελώς φυσιολογικά.<sup>168,154</sup>

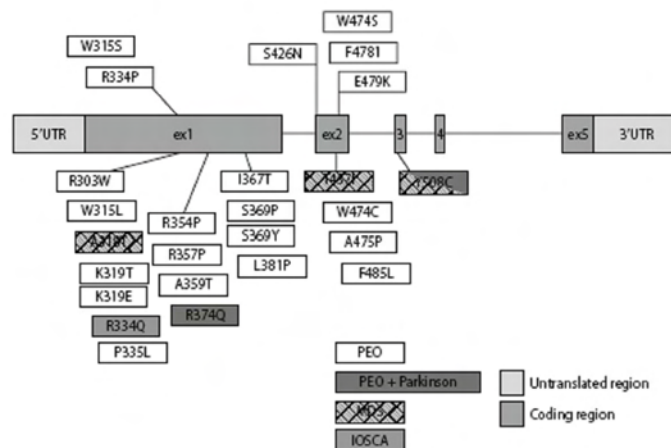
Αξίζει να σημειωθεί πως το 2005 οι Barron et al, σε COX ιστοχημικές συγκρίσεις που έκαναν μεταξύ διαφόρων μυών σε διαφορετικούς ασθενείς με μιτοχονδριακές μυοπάθειες, παρατήρησαν ότι το ποσοστό COX-ανεπαρκών μυϊκών ινών είναι σημαντικά υψηλότερο στον εξοφθάλμιο μυ από ότι στον τετρακέφαλο μυ του ίδιου ασθενούς. Τα δείγματα μυών ελήφθησαν από ασθενείς με mtDNA αναδιατάξεις κατά τη διάρκεια επέμβασης βλεφαροπλαστικής.<sup>169</sup>

Το 2007 οι Rivera et al αναφέρουν την ταυτοποίηση μίας νέας ετερόζυγης παρερμηνεύσιμης μετάλλαξης, την R357P, σε μία ισπανική οικογένεια με PEO, με ήπιο φαινότυπο καθώς οι ασθενείς παρουσίαζαν αμφοτερόπλευρη βλεφαρόπτωση, ήπια οφθαλμοπάρεση και αδυναμία των άνω άκρων. Η μετάλλαξη εντοπίστηκε στο σημείο σύνδεσης (linker region) του γονιδίου TWIKLE, που πλέον θεωρούνταν θερμό σημείο “hot spot”.<sup>170</sup> Η Southern blot ανάλυση δεν έδειξε πολλά mtDNA ελλείμματα, γεγονός το οποίο είχε αναφερθεί και στο παρελθόν σε ασθενείς με την A359T μετάλλαξη, ή με την R627W μετάλλαξη στο POLG1 γονίδιο.<sup>95</sup> Η παρουσία πολύ λίγων mtDNA ελλειμμάτων μπορεί να συνδέεται περισσότερο με τη γήρανση, παρά με επιπτώσεις της μεταλλαγμένης TWINKLE πρωτεΐνης.<sup>171,172</sup>

Τον Οκτώβριο του 2008 οι Virgilio et al προκειμένου να καθορίσουν τη σχετική συμμετοχή των ANT1, POLG1, POLG2, και TWINKLE γονιδίων στα σύνδρομα πολλαπλών mtDNA ελλειμμάτων, ανέλυσαν μία μεγάλη σειρά ασθενών με μιτοχονδριακή μυοπάθεια, με ή χωρίς την παρουσία CPEO. Οι ασθενείς ανήκαν σε ιταλικές και δυο ελληνικές οικογένειες. Συνολικά διερευνήθηκαν 67 ασθενείς. Το αποτέλεσμα ήταν η ανεύρεση μίας ήδη ταυτοποιημένης (R303W) και έξι νέων ετερόζυγων μεταλλάξεων παρερμηνεύσιμων που οδηγούνε στις παρακάτω αντικατάστασης αμινοξέων: R334P, W315S, S426N, W474S, F478I, E479K.<sup>72</sup> Όλες οι νέες μεταλλάξεις εντοπίστηκαν στο εξώνιο 1 και 2 του TWINKLE γονιδίου. Βάση των παραπάνω αποτελεσμάτων και σε συνδυασμό με άλλα προηγούμενα από Αμερικανούς και

Βρετανούς ασθενείς, το TWINKLE γίνεται το πιο σύνηθες μεταλλαγμένο γονίδιο σε AD-CPEO ασθενείς με ποσοστό 26,8% των ασθενών, ενώ μεταλλάξεις στο ANT1 και το POLG1 παρουσιάζονται σε ποσοστό 14,6% και 9,8% αντίστοιχα. Αντίθετα σε σποραδικές μορφές CPEO που διερευνήθηκαν από τους ίδιους, το ποσοστό μεταλλάξεων στο POLG1 είναι 34,6% ενώ του TWINKLE είναι 3,8%.<sup>72</sup> Από τους Agostino et al το 2003 διερευνήθησαν σποραδικές περιπτώσεις ασθενών με CPEO με καταγωγή από την Ιταλία και την Βρετανία. Το αποτέλεσμα ήταν η ανάδειξη δύο νέων μεταλλάξεων στο TWINKLE, που οδηγούν στις R303W και R334Q αντικαταστάσεις αμινοξέων.<sup>143</sup>

Η πιο πρόσφατη νέα μετάλλαξη του TWINKLE γονιδίου αναφέρεται από τους Liu et al τον Νοέμβριο του 2008 σε μία κινεζική οικογένεια με ήπιο φαινότυπο που περιελάμβανε οφθαλμοπληγία, βλεφαρόπτωση και διπλωπία. Η μετάλλαξη, που οδηγούσε στην A475T αντικατάσταση και εντοπίζεται στην αρχή μίας πολύ μικρής έλικας της περιοχής της ελικάσης, είναι η πρώτη μετάλλαξη στο TWINKLE γονίδιο, και γενικότερα η πρώτη μετάλλαξη που συνδέεται με CPEO, που αναφέρεται στον κινεζικό πληθυσμό.<sup>132</sup> (Εικ.24)



Εικ.24 Σχηματική αναπαράσταση της οργάνωσης του ιντρονίου/εξωνίου του TWINKLE γονιδίου και της κατανομής των μεταλλάξεων πάνω στο γονίδιο. Πάνω από το σχήμα καταγράφονται οι νέες μεταλλάξεις που αναφέρονται από τους Virgilio et al, ενώ από κάτω οι μεταλλάξεις που είχαν ήδη καταγραφεί.<sup>72</sup> Στο σχήμα δεν καταγράφεται η A475T μετάλλαξη των Liu et al. Η R334P μετάλλαξη που διακρίνεται στην πάνω πλευρά είναι η μετάλλαξη που βρέθηκε στην οικογένεια 1 της παρούσας διατριβής

Οι οικογένειες που διερευνήθηκαν στην παρούσα διατριβή είναι οι πρώτες από την περιοχή της Θεσσαλίας που υποβάλλονται σε τόσο πλήρη κλινικό και μοριακό έλεγχο για CPEO, και κατ' επέκταση ME.

Οι τρεις οικογένειες παρουσιάζουν κοινό φαινότυπο, ο οποίος μπορεί να χαρακτηριστεί σχετικά ήπιος δεδομένου ότι τα μόνα συμπτώματα είναι βλεφαρόπτωση και περιορισμός της λειτουργίας των εξοφθάλμιων μυών, χωρίς εκδηλώσεις από άλλα συστήματα ή μυϊκές ομάδες. Η οικογένεια 2 είναι αυτή με τις πιο ήπιες εκδηλώσεις και χαρακτηριστικό είναι ότι η βλεφαρόπτωση ή η οφθαλμοπληγία δεν ήταν οι λόγοι για τους οποίους εμφανίστηκαν στο νοσοκομείο. Τα πάσχοντα μέλη των δύο άλλων οικογενειών ή είχαν ήδη υποβληθεί σε επέμβαση ανόρθωσης των βλεφάρων ή το επιθυμούσαν πολύ έντονα δεδομένου ότι η βλεφαρόπτωση τους επηρέαζε πλέον λειτουργικά εκτός από αισθητικά.

Ο σχετικά ήπιος φαινότυπος συμβαδίζει με την ύπαρξη μετάλλαξης στο TWINKLE γονίδιο στην οικογένεια 1, καθώς παρόλο που δεν υπάρχει λεπτομερής καταγραφή της κλινικής εικόνας όλων των οικογενειών που έχουν αναφερθεί στη διεθνή βιβλιογραφία, στις περισσότερες από αυτές με μετάλλαξη στο TWINKLE γονίδιο δεν καταγράφονται πολυσυστηματικές εκδηλώσεις ανάμεσα στα συμπτώματα. Οι κύριες και πιο κοινές εκδηλώσεις είναι βλεφαρόπτωση, οφθαλμοπληγία και αδυναμία των άνω άκρων. Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με το ότι οι μεταλλάξεις στο POLG γονίδιο που συνδέονται με CPEO, φαίνεται να προκαλούν πιο επιβαρυσμένο φαινότυπο με συμμετοχή από διάφορα όργανα και συστήματα μπορεί ίσως να είναι σημαντικό στην επιλογή του γονιδίου που θα πρέπει να ερευνηθεί σε οικογένειες που παρουσιάζουν CPEO.

Είναι σημαντικό πάντως να σημειωθεί πως δεν φαίνεται να υπάρχει ταύτιση μεταξύ φαινότυπου και γονότυπου στα μιτοχονδριακά νοσήματα. Αυτό πηγάζει από το γεγονός ότι έχουν καταγραφεί περιπτώσεις όπου η ίδια μετάλλαξη στο ίδιο γονίδιο εκφράζεται με τελείως διαφορετικό φαινότυπο σε δύο διαφορετικούς ασθενείς.<sup>173</sup> Αντίστοιχα όμοια συμπτώματα μπορεί να προκαλούνται από διαφορετικές μεταλλάξεις.

Η R334P (G1001C) TWINKLE μετάλλαξη είναι ή πρώτη επιβεβαιωμένη μετάλλαξη στο TWINKLE γονίδιο σε οικογένεια από την περιοχή της Θεσσαλίας και γενικότερα της Ελλάδας. Οι Virgilio et al αναφέρουν άλλες δύο μεταλλάξεις σε Έλληνες ασθενείς με CPEO και θετικό οικογενειακό ιστορικό, την W315S και την F478I, όμως τα υπόλοιπα μέλη των οικογενειών δεν ήταν διαθέσιμα για περαιτέρω έλεγχο και επιβεβαίωση.<sup>95</sup> Η παθογένεια της R334P (G1001C) μετάλλαξης αποδεικνύεται από τα εξής: 1) Από τη μετάλλαξη προκύπτει αντικατάσταση της τριπλέτας R (αργινίνης) στον φυσιολογικό τύπο από την τριπλέτα P (προλίνη) στον ασθενή. 2) Βρίσκεται σε μία περιορισμένη περιοχή του TWINKLE γονιδίου (εξώνιο 1) στην οποία έχουν ήδη εντοπιστεί άλλες παθογόνες μεταλλάξεις για CPEO. 3) Η μετάλλαξη βρέθηκε σε όλα τα πάσχοντα μέλη της οικογένειας και δείχνει να διαχωρίζεται (segregates) με την ασθένεια. Επίσης η μετάλλαξη δε βρέθηκε στα υγιή μέλη της οικογένειας.

Στην οικογένεια 2, η Southern blot ανάλυση έδειξε ένα τυπικό πρότυπο που παρατηρείται σε σύνδρομα πολλαπλών mtDNA ελλειμμάτων, αλλά και ένα εξασθενημένο και επικολημένο σήμα υβριδισμού κάτω από τη ζώνη του υγιούς τύπου mtDNA. Η διερεύνηση όμως των πυρηνικών γονιδίων υπευθύνων για CPEO δεν ανέδειξε κάποια μετάλλαξη. Όπως αναφέρεται και παραπάνω στο παρελθόν έχουν καταγραφεί περιπτώσεις ασθενών με CPEO των οποίων η Southern blot ανάλυση ήταν ακόμα και απολύτως φυσιολογική και παρ' όλα αυτά η διερεύνηση των γονιδίων ανέδειξε μεταλλάξεις στο POLG1 ή στο TWINKLE γονίδιο.

Η μη ανεύρεση μετάλλαξης σε κάποιο από τα ήδη γνωστά γονίδια που συνδέονται με CPEO σε οικογένειες με φαινότυπο CPEO ή και εργαστηριακά επιβεβαιωμένης ME είναι κάτι που καταγράφεται σε πολλές βιβλιογραφικές αναφορές, όπως για παράδειγμα από τους Lewis et al ή τους Kiechl et al.<sup>98,168</sup> Το γεγονός αυτό αποκαλύπτει την γενετική ετερογένεια της CPEO και υποδεικνύει την παρουσία ακόμη άγνωστων πυρηνικών γονιδίων που ενδεχομένως εμπλέκονται στην παθογένεια της CPEO.

Αυτό το οποίο καλούμαστε να ερευνήσουμε στη συνέχεια είναι η καταγραφή περισσότερων νέων μεταλλάξεων ενδεχομένως και σε νέα πυρηνικά

γονίδια, πράγμα το οποίο θα συμβεί με τον μοριακό έλεγχο περισσότερων οικογενειών και σποραδικών μορφών βλεφαρόπτωσης. Επίσης καθοριστικής σημασίας είναι η έρευνα με σκοπό τη καλύτερη κατανόηση των παθογενετικών μηχανισμών της CPEO και γενικότερα των μιτοχονδριακών εγκεφαλομυοπαθειών.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

### *Εισαγωγή*

Ως μιτοχονδριακές εγκεφαλομυοπάθειες (ME) ή μιτοχονδριοπάθειες αναφέρονται οι ασθένειες που οφείλονται σε ανεπάρκεια των πρωτεϊνικών συμπλεγμάτων της αναπνευστικής αλυσού που έχει σαν αποτέλεσμα την ανεπαρκή κατανάλωση οξυγόνου και τη μειωμένη παραγωγή ενέργειας. Η πορεία τους είναι συνήθως αργή και προοδευτική, παρουσιάζουν πολυσυστηματικές εκδηλώσεις και η ηλικία έναρξης ποικίλει από τη γέννηση έως πολύ προχωρημένες ηλικίες. Οι ME προκαλούνται από σποραδικές ή κληρονομούμενες μεταλλάξεις σε μιτοχονδριακά ή πυρηνικά γονίδια (πρωτοπαθείς ME) ή από εξωγενείς παράγοντες (δευτεροπαθείς ME). Η πιο συνήθης εκδήλωση της μιτοχονδριακής δυσλειτουργίας είναι η προοδευτική εξωτερική οφθαλμοπληγία (chronic progressive external ophthalmoplegia, CPEO), πιθανώς λόγω της υψηλής συγκέντρωσης μιτοχονδρίων στους εξοφθάλμιους μύες. Πρόκειται για μία ανώδυνη, αργά εξελισσόμενη νόσο στην οποία εμπλέκονται όλοι οι εξοφθάλμιοι μύες και που σταδιακά οδηγεί στην πλήρη ακινησία του οφθαλμού. Κυρίως παρουσιάζεται με πτώση βλεφάρου και αδυναμία των εξοφθάλμιων μυών και η ηλικία έναρξης ποικίλει από την παιδική έως την έκτη δεκαετία. Οι σποραδικές μορφές CPEO οφείλονται σε ελλείμματα ή διπλασιασμούς στο μιτοχονδριακό DNA (mitochondrial DNA, mtDNA), ενώ οι οικογενείς μορφές της νόσου οφείλονται σε μεταλλάξεις γονιδίων του πυρηνικού DNA (nuclear DNA, nDNA). Έως σήμερα έχουν εντοπιστεί μεταλλάξεις σε τέσσερα πυρηνικά γονίδια, τα οποία συνδέονται με CPEO. Αυτά είναι: POLG, POLG2, ANTF και TWINKLE

### *Υλικό και μέθοδοι*

Εξετάστηκαν τα μέλη τριών οικογενειών Ελληνικής καταγωγής από την ευρύτερη περιοχή της Θεσσαλίας, που παρουσίασαν πτώση βλεφάρου και/ή εξωτερική οφθαλμοπληγία. Όλα τα μέλη που ήταν διαθέσιμα υπεβλήθησαν σε

κλινική εξέταση και λήψη ιστορικού. Έγιναν επίσης αιμοληψίες με σκοπό την εξαγωγή nDNA. Δύο ασθενείς από διαφορετικές οικογένειες υπεβλήθησαν σε βιοψία μυός με σκοπό τον περαιτέρω ιστολογικό και ιστοχημικό έλεγχο. Ο μοριακός έλεγχος περιελάμβανε Southern blot ανάλυση του μυϊκού DNA, προσδιορισμό αλληλουχίας βάσεων DNA και επιβεβαίωση της μετάλλαξης με πολυμορφισμό μήκους θραύσματος (RFLP).

### **Αποτελέσματα**

Στον ασθενή 1 η PCR ανάλυση ανέδειξε την παρουσία πολλαπλών PCR προϊόντων που πιθανώς αντιστοιχούν σε ελλείμματα. Η Southern blot ανάλυση έδειξε πρότυπο πολλαπλών mtDNA ελλειμμάτων. Ο DNA προσδιορισμός αλληλουχίας απεκάλυψε μία νέα αυτοσωμική παρερμηνεύσιμη μετάλλαξη στο TWINKLE γονίδιο (R334P). Η νέα μετάλλαξη επιβεβαιώθηκε με πολυμορφισμό μήκους θραύσματος. Ο προσδιορισμός αλληλουχίας έδειξε αυτοσωμικό επικρατές μοντέλο κληρονομησης. Αυτή είναι η πρώτη επιβεβαιωμένη TWINKLE μετάλλαξη σε οικογενή CPEO σε ελληνική οικογένεια.

Στον ασθενή 2 η PCR ανάλυση ανέδειξε την παρουσία πολλαπλών PCR προϊόντων που πιθανώς αντιστοιχούν σε ελλείμματα. Η Southern blot ανάλυση έδειξε ένα τυπικό πρότυπο που παρατηρείται σε σύνδρομο πολλαπλών mtDNA ελλειμμάτων, αλλά και ένα εξασθενημένο και επικολημένο σήμα υβριδισμού πάνω από τη ζώνη του υγιούς τύπου mtDNA. Ο DNA προσδιορισμός αλληλουχίας δεν ανέδειξε κάποια μετάλλαξη σε κάποιο από τα τέσσερα πυρηνικά γονίδια που συνδέονται με CPEO.



## SYNOPSIS

### *Introduction*

Mitochondrial disorders or mitochondriopathies is the term used to describe diseases which are due to respiratory chain protein complex deficiencies which consequently lead to impaired cell oxygen utilization and reduced energy production. They usually show a chronic, slowly progressive course and present with multi-organ involvement with varying onset between birth and late adulthood. Mitochondriopathies are caused by either sporadic or inherited mutations in nuclear or mitochondrial DNA located genes (primary MCPs), or by exogenous factors (secondary MCPs). The most common manifestation of mitochondrial dysfunction is chronic progressive external ophthalmoplegia (CPEO), probably because of the high concentration of mitochondria in the extraocular muscles. It is a painless, slowly progressive disorder involving all the extraocular muscles, leading to complete ocular immobility. It mainly presents with ptosis and weakness of the extraocular muscles and the onset may vary from childhood to late adulthood. Sporadic cases of CPEO are due to mtDNA rearrangements (deletions, duplications), whether familial cases of CPEO are due to mutations in nuclear DNA genes. So far mutations in four nuclear genes have been associated with CPEO. These are POLG; POLG2; ANT1 and TWINKLE

### *Materials and methods*

Members of three Greek families from the region of Thessaly (Greece), presenting with ptosis and/or external ophthalmoplegia were examined. All families' members which were available underwent clinical examination and history review. Blood samples were also taken for nuclear DNA extraction. Two patients from different families underwent muscle biopsy for histology and histopathology examinations. The molecular investigation involved Southern blot

analysis and long-range polymerase chain reaction (PCR) of the muscle DNA, DNA sequencing and restriction fragment length polymorphisms (RFLP).

### *Results*

For patient 1 PCR analysis showed the presence of multiple PCR products probably corresponding to deletions. Southern blot analysis showed a pattern of multiple mtDNA deletions. DNA sequencing revealed a novel autosomal mis-sense mutation in TWINKLE gene (R334P). The new mutation was verified by PCR-RFLP. The segregation study showed an autosomal dominant pattern of inheritance. This is the first confirmed TWINKLE mutation in familial CPEO in a Greek family to be reported.

For patient 2 PCR analysis showed the presence of multiple PCR products probably corresponding to deletions. Southern blot analysis showed a faint and smeared hybridization signal above the wild-type mtDNA band. DNA sequencing did not reveal a mutation in any of the four nuclear genes involved in CPEO.

Μέρος των αποτελεσμάτων της παρούσας Διδακτορικής Διατριβής συμπεριλήφθησαν στην παρακάτω δημοσίευση:

Roberta Virgilio, Dario Ronch, Georgios M. Hadjigeorgiou, Andreina Bordoni, Francesca Saladino, Maurizio Moggio, Laura Adobbati, Demetra Kafetsouli, Evangelia Tsironi, Stefano Previtali, Alexandros Papadimitriou, Nereo Bresolin, Giacomo P. Comi. **Novel Twinkle (PEO1) gene mutations in mendelian progressive external ophthalmoplegia.** *J Neurol* (2008) 255:1384–1391 DOI 10.1007/s00415-008-0926-3

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ

- 
- <sup>1</sup> Richard S Snell, Michael H. Lemp. **Clinical Anatomy of the eye.** *Blackwell Science 1998, second edition*
- <sup>2</sup> Henry Gray. **Anatomy of the Human body.** Philadelphia: *Lea & Febiger, 1918*  
New york: *Bartleby.com, 2000*
- <sup>3</sup> Ψύλλας Κωνσταντίνος Γ. **Εισαγωγή στην Οφθαλμολογία και στη Νευροοφθαλμολογία.** *University studio press. 2005*
- <sup>4</sup> American academy of ophthalmology. **Basic and clinical science course.** Section 7: *Orbit, Eyelids and lacrimal system*
- <sup>5</sup> Kenneth W Wright, Peter H Spiegel **Pediatric Ophthalmology and Strabismus** *Springer 2nd edition*
- <sup>6</sup> Kanski JJ **Clinical Ophthalmology** *Butterworth, Heineman, Elsevier*
- <sup>7</sup> Frank JW, France TD. **Familial Ophthalmoplegia plus Syndrome.** In **Orthoptics Research and Practice. Transactions of the IVth International Orthoptic Congress.** *Mein J Moore S(eds). London: H klimton, 1979.p.118-121*
- <sup>8</sup> Griffiths PG, Andrews RM: **Chronic progressive external ophthalmoplegia.** *Br Orthopt J 2000;57:1-10*
- <sup>9</sup> Shimko J W **Chronic Progressive Ophthalmoplegia** *Am. Orth. J;55:13-18 2005*
- <sup>10</sup> Benedict GH, Schoser BG, Pongratz D. **Extraocular mitochondrial myopathies and their differential diagnoses.** *Strabismus. 2006 Jun;14(2):107-13*
- <sup>11</sup> Hart PE, De Vivo DC, Schapira AHV. **Clinical features of the mitochondrial encephalomyopathies.** In *Schapira AHV, Di Mauro S, eds. Mitochondrial Disorders in Neurology 2. Woburn, MA: Butterworth- Heinemann 2002:35-67*
- <sup>12</sup> Zeviani M, Servidei S, Gellera C, Bertini E, DiMauro S, DiDonato S. **An autosomal dominant disorder with multiple deletions of mitochondrial DNA starting at the D-loop region.** *Nature. 1989 May 25;339(6222):309-11*

- 
- <sup>13</sup> Borchert MS: **Diseases of the ocular muscles.** In *principles and Practice of Ophthalmology:Vol. 5. Clinical Practice*, Albert DM, Jakobiec FA,(eds). Philadelphia: WB Saunders, 1984.p.4065-4074
- <sup>14</sup> Newman NJ: **Mitochondrial diseases and the eye.** *Ophthalmol Clin North Am* 1992;5:405-424
- <sup>15</sup> Phillips PH, Newman NJ: **Mitochondrial diseases in pediatric ophthalmology.** *JAAPOS* 1997;1:115-122
- <sup>16</sup> Lee AG, Brazis PW **Chronic progressive external ophthalmoplegia** *Curr Neurol Neurosci Rep.* 2002 Sep;2(5):413-7.
- <sup>17</sup>Schapira AHV Cook HR (2002) **Mitochondrial myopathies and encephalomyopathies.** *Eur J Clin Invest* 29:886-898
- <sup>18</sup> Bau V, Zierz S. **Update on chronic progressive external ophthalmoplegia Strabismus.** 2005 Sep;13(3):133-42
- <sup>19</sup> Finsterer J,(2004). **Mitochondriopathies.** *Eur. J.of Neur.*11: 163-186
- <sup>20</sup> Van Goethem G, Martin JJ, Van Broeckhoven C. **Progressive external ophthalmoplegia characterized by multiple deletions of mitochondrial DNA: unraveling the pathogenesis of human mitochondrial DNA instability and the initiation of a genetic classification.***Neuromolecular Med.* 2003;3(3):129-46. Review.
- <sup>21</sup> Marsac C, Kadenbach B, **Mutations in mitochondrial tRNA genes: a frequent cause of neuromuscular diseases.***Nucleic Acids Res.*1991 Apr 11;19(7):1393-7
- <sup>22</sup> Raffelsberger T, Rossmanith W, Thaller-Antlanger H, Bittner RE .**CPEO associated with a single nucleotide deletion in the mitochondrial tRNA(Tyr) gene.***Neurology.* 2001 Dec 26;57(12):2298-301.PMID: 11756614 [PubMed - indexed for MEDLINE]
- <sup>23</sup> Zeviani M, Bresolin N, Gellera C, Bordoni A, Pannacci M, Amati P, et al.(1990) **Nucleus driven multiple large-scale deletions of the human mitochondrial genome: a new autosomal dominant disease.** *Am. J. Hum. Genet.* 47,904-914

- 
- <sup>24</sup> Bohlega S, Tanji K, Santorelli FM, Hirano M, al-Jishi A, DiMauro S. **Multiple mitochondrial DNA deletions associated with autosomal recessive ophthalmoplegia and severe cardiomyopathy.** *Neurology*. 1996 May;46(5):1329-34
- <sup>25</sup> Biousse V, Newman NJ. **Neuro-ophthalmology of mitochondrial diseases.** *Semin Neurol* 2001;21: 275-288
- <sup>26</sup> Biousse V, Newman NJ. **Neuro-ophthalmology of mitochondrial diseases.** *Curr Opin Neurol*. 2003 Feb;16(1):35-43. Review. PMID: 12544855 [PubMed - indexed for MEDLINE]
- <sup>27</sup> Kosmorsky G, Johns DR. **Neuro-ophthalmologic manifestations of mitochondrial DNA disorders: Chronic progressive external ophthalmoplegia, Kearns-Sayre syndrome, Leber's hereditary optic neuropathy.** *Neurol Clin* 1991;9:147-161
- <sup>28</sup> Γεώργιος Κίτσιος, Γεώργιος Χατζηγεωργίου, Φίλιππος Τρυποσκιάδης **ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΩΝ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΩΝ ΜΥΟΚΑΡΔΙΟΠΑΘΕΙΩΝ.**
- <sup>29</sup> Morgan-Hughes JA(1994) **The mitochondrial myopathies.** In Engel AG Franzini-Armstrong C, eds. **Myology Basic and Clinical.** McGraw-Hill, New York, pp1610-1651
- <sup>30</sup> Hateli Y. **The mitochondrial electron transport antioxidative phosphprylation system.** *Annu Rev Biochem* 1985; 54:1015-1069
- <sup>31</sup> DiMauro S, Hirano M. **Mitochondrial encephalomyopathies: an update.** *Neuromuscul Disord*. 2005 Apr;15(4):276-86. Review. PMID: 15792866 [PubMed - indexed for MEDLINE]
- <sup>32</sup> Rötig A, Munnich A. **Genetic features of mitochondrial respiratory chain disorders.** *JAm Soc Nephrol*. 2003 Dec;14(12):2995-3007. Review. PMID: 14638899 [PubMed - indexed for MEDLINE]
- <sup>33</sup> Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MH, Coulson AR, Drouin J, Eperon IC, Nierlich DP, Roe BA, Sanger F, Schreier PH, Smith AJ, Staden R, Young IG **Sequence and organization of the human mitochondrial genome.** *Nature*. 1981 Apr 9;290(5806):457-65.

- 
- <sup>34</sup> Holt IJ, Morgan-Hughes JA, Harding AE. **Deletions of muscle mitochondrial DNA in patient with mitochondrial myopathies.** *Nature* 331:717-719
- <sup>35</sup> Bourgeois M, Goutieres F and al.(1992) **Deficiency in complex II of the respiratory chain presenting as a leukodystrophy in two sisters with Leigh syndrome.** *Brain Dev* 14;404-408
- <sup>36</sup> Finsterer J,(1997). **Mitochondriopathies.** *Akt Neurol* 24:231-241
- <sup>37</sup> Stryer L (1996) **Biochemie.** *Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.*
- <sup>38</sup> Schapira AHV(2002) **The 'new' mitochondrial disorders.** *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 72:144-149
- <sup>39</sup> Sue CM, Schon EA (2002). **Mitochondrial respiratory chain diseases and mutations in nuclear DNA: a promising start?** *Brain Pathol* 10;442-450
- <sup>40</sup> Leonard JV, Schapira AH.Lancet. **Mitochondrial respiratory chain disorders I: mitochondrial DNA defects.** 2000 Jan 22;355(9200):299-304. Review.PMID: 10675086 [PubMed - indexed for MEDLINE
- <sup>41</sup> Gillis L, Kaye E. **Diagnosis and management of mitochondrial diseases** *Pediatr Clin North Am.* 2002 Feb;49(1):203-19
- <sup>42</sup> Clayton D. A. 2000. **Transcription and replication of mitochondrial DNA.** *Hum. Reprod.* 15(Suppl 2):11-17
- <sup>43</sup> Bibb, M.J., Van Etten, R.A., Wright, C.T., Walberg, M.W., and Clayton, D.A. (1981). **Sequence and gene organization of mouse mitochondrial DNA.** *Cell* 26, 167-180
- <sup>44</sup> Richter C, Park JW, Ames BN **Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988 Sep;85(17):6465-7
- <sup>45</sup> David A. Clayton, Jackie N. Doda, and Errol C. Friedberg **The Absence of a Pyrimidine Dimer Repair Mechanism in Mammalian Mitochondria.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1974 July; 71(7): 2777–2781.
- <sup>46</sup> Croteau DL, Stierum RH, Bohr VA. **Mitochondrial DNA repair pathways.** *Mutat Res.* 1999 Jul 30;434(3):137-48

- 
- <sup>47</sup> DiMauro S, Pons R, Andreetta F, Wang CH, Vu TH, Bonilla E, De Vivo DC. (1996) **Mitochondrial myopathy simulating spinal muscular atrophy** *Pediatr Neurol.* 1996 Sep;15(2):153-8
- <sup>48</sup> Wallace DC. **Structure and evolution of organelles genome.** *Microbiol Rev.* Jun 1982;46(2):208-240
- <sup>49</sup> Hammans SR, Sweeney MG, Brockington M, Lennox GG, Lawton NF, Kennedy CR, Morgan-Hughes JA, Harding AE **The mitochondrial DNA transfer RNA(Lys)A-->G(8344) mutation and the syndrome of myoclonic epilepsy with ragged red fibres (MERRF). Relationship of clinical phenotype to proportion of mutant mitochondrial DNA.** *Brain.* 1993 Jun;116 ( Pt 3):617-32
- <sup>50</sup> Harding AE, Sweeney MG, Govan GG, Riordan-Eva P. **Pedigree analysis in Leber hereditary optic neuropathy families with a pathogenic mtDNA mutation.** *Am J Hum Genet.* 1995 Jul;57(1):77-86
- <sup>51</sup> McKenzie M, Liolitsa D, Hanna MG. **Mitochondrial disease: mutations and mechanisms.** *Neurochem Res.* 2004 Mar;29(3):589-600.
- <sup>52</sup> Tully Lois A. ,Thomas J. Parsons, Robert J. Steighner, Mitchell M. Holland, Michael A. Marino, and Valerie L. Prenger. **A Sensitive Denaturing Gradient-Gel Electrophoresis Assay Reveals a High Frequency of Heteroplasmy in Hypervariable Region 1 of the Human mtDNA Control Region.** *Am J Hum Genet.* 2000 August; 67(2): 432–443.
- <sup>53</sup> Huoponen K, Vilkki J, Aula P, Nikoskelainen EK, Savontaus ML. **A new mtDNA mutation associated with Leber hereditary optic neuroretinopathy :** *Am J Hum Genet.* 1991 Jun;48(6):1147-53.
- <sup>54</sup> Novotny EJ Jr, Singh G, Wallace DC, Dorfman LJ, Louis A, Sogg RL, Steinman L **Leber's disease and dystonia: a mitochondrial disease.** *Neurology* 1986 Aug;36(8):1053-60.
- <sup>55</sup> Tatuch Y, Christodoulou J, Feigenbaum A, Clarke JT, Wherret J, Smith C, Rudd N, Petrova-Benedict R, Robinson BH. **Heteroplasmic mtDNA mutation (T----G) at 8993 can cause Leigh disease when the percentage of abnormal mtDNA is high.** *Am J Hum Genet.* 1992 Apr;50(4):852-8



- 
- <sup>56</sup> Thorburn DR, Dahl HH. **Mitochondrial disorders: genetics, counseling, prenatal diagnosis and reproductive options.** *Am J Med Genet.* 2001 Spring;106(1):102-14. Review.PMID: 11579429 [PubMed - indexed for MEDLINE]
- <sup>57</sup>.Battersby BJ, Loredó-Ostí JC, Shoubridge EA. **Nuclear genetic control of mitochondrial DNA segregation.** *Nat Genet.* 2003 Feb;33(2):183-6. Epub 2003 Jan 21.
- <sup>58</sup> Jenuth J.P, Peterson A.C. 1977 **Tissue-specific selection for different mtDNA genotypes in heteroplasmic mice.** *Nat Genet.* 16: 93-95
- <sup>59</sup> Hirano M, Davidson M, DiMauro S. **Mitochondria and the heart.** *Curr Opin Cardiol.* 2001 May;16(3):201-10. Review.PMID: 11357017 [PubMed - indexed for MEDLINE]
- <sup>60</sup> Fadic R, Johns DR **Clinical spectrum of mitochondrial diseases** *Semin Neurol.* 1996 Mar;16(1):11-20
- <sup>61</sup> Schmiedel J, Jackson S, Schaefer J, Reichmann H. **Mitochondrial cytopathies.** *J Neurol.*2003;250:267-277.
- <sup>62</sup> Girlanda P, Toscano A, Nicolosi C, et al **Electrophysiological study of neuromuscular system involvement in mitochondrial cytopathy.** *Clin. Neurophysiol.* 1999;110:1284-1289
- <sup>63</sup> Taylor RW, Schaefer AM, Barron MJ, McFarland R, Turnbull. **The diagnosis of mitochondrial muscle disease.** *Neuromuscul Disord.* 2004 Apr;14(4):237-45. Review
- <sup>64</sup> Yu Wai Man CY, Chinnery PF, Griffiths PG. **Extraocular muscles have fundamentally distinct properties that make them selectively vulnerable to certain disorders.** *Neuromuscul Disord.* 2005 Jan;15(1):17-23. Epub 2004 Nov 26. Review
- <sup>65</sup> Chinnery PF, DiMauro S, Shanske S, Schon EA, Zeviani M, Mariotti C, Carrara F, Lombes A, Laforet P, Ogier H, Jaksch M, Lochmüller H, Horvath R, Deschauer M, Thorburn DR, Bindoff LA, Poulton J, Taylor RW, Matthews JN, Turnbull DM.

- 
- Risk of developing a mitochondrial DNA deletion disorder.** *Lancet.* 2004 Aug 14-20;364(9434):592-6.
- <sup>66</sup> Kärppä M, Mahjneh I, Karttunen A, Tolonen U, Majamaa K. **Muscle computed tomography patterns in patients with the mitochondrial DNA mutation 3243A>G.** *J Neurol.* 2004 May;251(5):556-63.
- <sup>67</sup> Larsson NG, Oldfors A. **Mitochondrial myopathies.** *Acta Physiol Scand.* 2001 Mar;171(3):385-93. Review.
- <sup>68</sup> Mitchell P. **Keilin's respiratory chain concept and its chemiosmotic consequences.** *Science.* 1979 Dec 7;206(4423):1148-59. Review.
- <sup>69</sup> Petty RK, Harding AE, Morgan-Hughes JA. **The clinical features of mitochondrial myopathy.** *Brain.* 1986 Oct;109 ( Pt 5):915-38.
- <sup>70</sup> Richardson C, Smith T, Schaefer A, Turnbull D, Griffiths P. **Ocular motility findings in chronic progressive external ophthalmoplegia.** *Eye.* 2005 Mar;19(3):258-63
- <sup>71</sup> **Human Molecular Genetics Advance Access originally published online on May 25, 2005** *Human Molecular Genetics* 2005 14(14):1907-1920; doi:10.1093/hmg/ddi196
- <sup>72</sup> Roberta Virgilio, Dario Ronch, Georgios M. Hadjigeorgiou, Andreina Bordoni, Francesca Saladino, Maurizio Moggio, Laura Adobbati, Demetra Kafetsouli, Evangelia Tsironi, Stefano Previtali, Alexandros Papadimitriou, Nereo Bresolin, Giacomo P. Comi. **Novel Twinkle (PEO1) gene mutations in mendelian progressive external ophthalmoplegia.** *J Neurol* (2008) 255:1384–1391 DOI 10.1007/s00415-008-0926-3
- <sup>73</sup> Copeland W. **Inherited Mitochondrial Diseases of DNA Replication** *Annu Rev Med.* 2008;59:131-46. Review.
- <sup>74</sup> Graziewicz MA, Longley MJ, Copeland W. **CDNA polymerase gamma in mitochondrial DNA replication and repair.** *Chem Rev.* 2006 Feb;106(2):383-405.
- <sup>75</sup> Tzoulis C, Engelsen BA, Telstad W, et al. **The spectrum of clinical disease caused by the A467T and W748S POLG mutations: a study in 26 cases.** *Brain* 2006;129:1637-1639

- 
- <sup>76</sup> DiMauro S, Davidzon G, Hirano M. **A polymorphic polymerase.***Brain.* 2006 Jul;129(Pt 7):1637-9.
- <sup>77</sup> Hudson G, Chinnery PF **Mitochondrial DNA polymerase-gamma and human disease** 2006 Oct 15;15 Spec No 2:R244-52
- <sup>78</sup> Longley MJ Graziewicz MA, Bienstock RJ, Copeland WC. **Consequences of mutations in human DNA polymerase gamma.** *Gene.* 2005 Jul 18;354:125-31. Review
- <sup>79</sup> Van Goethem G, Dermaut B, Löfgren A, Martin JJ, Van Broeckhoven C. **Mutation of POLG is associated with progressive external ophthalmoplegia characterized by mtDNA deletions.** *Nat Genet.* 2001 Jul;28(3):211-2.
- <sup>80</sup> Graziewicz MA Longley MJ, Bienstock RJ, Zeviani M, Copeland WC. **Structure-function defects of human mitochondrial DNA polymerase in autosomal dominant progressive external ophthalmoplegia.** *Nat Struct Mol Biol.* 2004 Aug;11(8):770-6. Epub 2004 Jul 18.PMID: 15258572 [PubMed - indexed for MEDLINE]
- <sup>81</sup> Spelbrink JN, Toivonen JM, Hakkaart GA, Kurkela JM, Cooper HM, Lehtinen SK, Lecrenier N, Back JW, Speijer D, Foury F, Jacobs HT. **In vivo functional analysis of the human mitochondrial DNA polymerase POLG expressed in cultured human cells.** *J Biol Chem.* 2000 Aug 11;275(32):24818-28.PMID: 10827171 [PubMed - indexed for MEDLINE]
- <sup>82</sup> Servidei S, Zeviani M, Manfredi G, Ricci E, Silvestri G, Bertini E, Gellera C, Di Mauro S, Di Donato S, Tonali P. **Dominantly inherited mitochondrial myopathy with multiple deletions of mitochondrial DNA: clinical, morphologic, and biochemical studies.** *Neurology.* 1991 Jul;41(7):1053-9.
- <sup>83</sup> Lamantea E, Tiranti V, Bordoni A, Toscano A, Bono F, Servidei S, Papadimitriou A, Spelbrink H, Silvestri L, Casari G, Comi GP, Zeviani M. **Mutations of mitochondrial DNA polymerase gammaA are a frequent cause of autosomal dominant or recessive progressive external ophthalmoplegia.** *Ann Neurol.* 2002 Aug;52(2):211-9

- 
- <sup>84</sup> Van Goethem G, Schwartz M, Löfgren A, Dermaut B, Van Broeckhoven C, Vissing J. **Novel POLG mutations in progressive external ophthalmoplegia mimicking mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy.** *Eur J Hum Genet.* 2003 Jul;11(7):547-9.
- <sup>85</sup> Longley MJ, Clark S, Yu Wai Man C, et al. **Mutant POLG2 disrupts DNA polymerase gamma subunits and causes PEO.** *Am. J. Hum. Genet* 2006;78:1026-1034
- <sup>86</sup> Kaukonen J, Zeviani M, Comi GP, Piscaglia MG, Peltonen L, Suomalainen A. **A third locus predisposing to multiple deletions of mtDNA in autosomal dominant progressive external ophthalmoplegia.** *Am J Hum Genet.* 1999 Jul;65(1):256-61.. PMID: 10364542 [PubMed - indexed for MEDLINE]
- <sup>87</sup> Graham BH, Waymire KG, Cottrell B, Trounce IA, MacGregor GR, Wallace DC. **A mouse model for mitochondrial myopathy and cardiomyopathy resulting from a deficiency in the heart/muscle isoform of the adenine nucleotide translocator.** *Nat Genet.* 1997 Jul;16(3):226-34.PMID: 9207786 [PubMed - indexed for MEDLINE]
- <sup>88</sup> Esposito LA, Melov S, Panov A, Cottrell BA, Wallace DC. **Mitochondrial disease in mouse results in increased oxidative stress.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Apr 27;96(9):4820-5.PMID: 10220377 [PubMed - indexed for MEDLINE]
- <sup>89</sup> Wijmenga C, Winokur ST, Padberg GW, Skraastad MI, Altherr MR, Wasmuth JJ, Murray JC, Hofker MH, Frants RR. **The human skeletal muscle adenine nucleotide translocator gene maps to chromosome 4q35 in the region of the facioscapulohumeral muscular dystrophy locus.** *Hum Genet.* 1993 Sep;92(2):198-203.PMID: 8103757 [PubMed - indexed for MEDLINE]
- <sup>90</sup> Kaukonen J, Juselius JK, Tiranti V, Kyttälä A, Zeviani M, Comi GP, Keränen S, Peltonen L, Suomalainen A. **Role of adenine nucleotide translocator 1 in mtDNA maintenance.** *Science* 2000 Aug 4;289(5480):782-5
- <sup>91</sup> Napoli L, Bordoni A, Zeviani M, Hadjigeorgiou GM, Sciacco M, Tiranti V, Terentiou A, Moggio M, Papadimitriou A, Scarlato G, Comi GP. **A novel missense adenine nucleotide translocator-1 gene mutation in a Greek adPEO family** *Neurology.* 2001 Dec 26;57(12):2295-8

- 
- <sup>92</sup> Agostino A, Valletta L, Chinnery PF, Ferrari G, Carrara F, Taylor RW, Schaefer AM, Turnbull DM, Tiranti V, Zeviani M. **Mutations of ANT1, Twinkle, and POLG1 in sporadic progressive external ophthalmoplegia (PEO).** *Neurology*. 2003 Apr 22;60(8):1354-6.
- <sup>93</sup> Marzo I, Brenner C, Zamzami N, Jurgensmeier J M, Susin S A, Vieira H L, et al. **Bax and adenine nucleotide translocator cooperate in the mitochondrial control of apoptosis.** *Science* 1998 281, 2027-2031
- <sup>94</sup> Kaukonen J, Amati P, et al (1996) **An autosomal locus predisposing to multiple deletions of mtDNA on chromosome 3p** *Am J Hum. Genet* 58:763-769
- <sup>95</sup> Spelbrink JN, Li FY, Tiranti V, Nikali K, Yuan QP, Tariq M, Wanrooij S, Garrido N, Comi G, Morandi L, Santoro L, Toscano A, Fabrizi GM, Somer H, Croxen R, Beeson D, Poulton J, Suomalainen A, Jacobs HT, Zeviani M, Larsson C. **Human mitochondrial DNA deletions associated with mutations in the gene encoding Twinkle, a phage T7 gene 4-like protein localized in mitochondria.** *Nat Genet*. 2001 Jul;28(3):223-31. Erratum in: *Nat Genet* 2001 Sep;29(1):100. PMID: 11431692 [PubMed - indexed for MEDLINE]
- <sup>96</sup> Garrido N, Griparic L, Jokitalo E, Wartiovaara J, van der Bliek AM, Spelbrink JN. **Composition and dynamics of human mitochondrial nucleoids.** *Mol Biol Cell*. 2003 Apr;14(4):1583-96. PMID: 12686611 [PubMed - indexed for MEDLINE]
- <sup>97</sup> Suomalainen A, Kaukonen J, Amati P, Timonen R, Haltia M, Weissenbach J, Zeviani M, Somer H, Peltonen L. **An autosomal locus predisposing to deletions of mitochondrial DNA.** *Nat Genet*. 1995 Feb;9(2):146-51. PMID: 7719341 [PubMed - indexed for MEDLINE]
- <sup>98</sup> Lewis S, Hutchison W, Thyagarajan D, Dahl HH. **Clinical and molecular features of adPEO due to mutations in the Twinkle gene.** *J Neurol Sci*. 2002 Sep 15;201(1-2):39-44
- <sup>99</sup> Hudson G, Deschauer M, Busse K, Zierz S, Chinnery PF. **Sensory ataxic neuropathy due to a novel C10Orf2 mutation with probable germline mosaicism.** *Neurology*. 2005 Jan 25;64(2):371-3. PMID: 15668446 [PubMed - indexed for MEDLINE]

- 
- <sup>100</sup> Brosh RM Jr, Li JL, Kenny MK, Karow JK, Cooper MP, Kureekattil RP, Hickson ID, Bohr VA. **Replication protein A physically interacts with the Bloom's syndrome protein and stimulates its helicase activity.** *J Biol Chem.* 2000 Aug 4;275(31):23500-8. PMID: 10825162 [PubMed - indexed for MEDLINE]
- <sup>101</sup> Mariotti C, Savarese N, Suomalainen A, Rimoldi M, Comi G, Prella A, Antozzi C, Servidei S, Jarre L, DiDonato S, Zeviani M. **Genotype to phenotype correlations in mitochondrial encephalomyopathies associated with the A3243G mutation of mitochondrial DNA.** *J Neurol.* 1995 May;242(5):304-12.
- <sup>102</sup> Li FY, Tariq M, Croxen R, Morten K, Squier W, Newsom-Davis J, Beeson D, Larsson C. **Mapping of autosomal dominant progressive external ophthalmoplegia to a 7-cM critical region on 10q24.** *Neurology.* 1999 Oct 12;53(6):1265-71
- <sup>103</sup> Olson M, Hood, L, Cantor, C, Botstein, D. **A common language for physical mapping of the human genome.** *Science* 1989; 245:1434.
- <sup>104</sup> Bartlett & Stirling (2003)—**A Short History of the Polymerase Chain Reaction.** In: *Methods Mol Biol.* 226:3-6
- <sup>105</sup> Kary Mullis Nobel Lecture, December 8, 1993
- <sup>106</sup> Templeton, NS. **The polymerase chain reaction. history, methods and applications.** *Diagn Mol Pathol* 1992; 1:58.
- <sup>107</sup> Valasek MA, Repa JJ. **The power of real-time PCR** *Adv Physiol Educ.* 2005 Sep;29(3):151-9
- <sup>108</sup> Saiki, RK; Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1988). **"Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase".** *Science* **239:** 487–91. doi:10.1126/science.2448875. PMID 2448875, <http://sunsite.berkeley.edu/cgi-bin/ebind2html/pcr/009>.
- <sup>109</sup> Mullis K.B., Fallona F. **Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalysed chain reaction.** *Meth. Enzymol.* 55:335-350,1987
- <sup>110</sup> Rychlik W, Spencer WJ, Rhoads RE (1990). **"Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro".** *Nucl Acids Res* 18: 6409–6412. doi

- 
- <sup>111</sup> Rozen, S, Skaletsky, HJ. Primer 3. Whitehead Institute for Biomedical Research 1997.
- <sup>112</sup> Primers! for the world-wide web, Williamstone Enterprises 1999.
- <sup>113</sup> Meyer, F. Schleiermacher, GeneFisher. University of Beilefeld 1999.
- <sup>114</sup> Joseph Sambrook and David W. Russel (2001). ***Molecular Cloning: A Laboratory Manual***, 3rd ed., Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press. ISBN 0-87969-576-5. Chapter 8: *In vitro* Amplification of DNA by the Polymerase Chain Reaction
- <sup>115</sup> Chien A, Edgar DB, Trela JM (1976). **"Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*".** *J. Bacteriol* **174**: 1550–1557. PMID 8432.
- <sup>116</sup> Lawyer FC, Stoffel S, Saiki RK, Chang SY, Landre PA, Abramson RD, Gelfand DH (1993). **"High-level expression, purification, and enzymatic characterization of full-length *Thermus aquaticus* DNA polymerase and a truncated form deficient in 5' to 3' exonuclease activity".** *PCR Methods Appl.* **2**: 275–287. PMID 8324500
- <sup>117</sup> Haliassos, A, Chomel, JC, Grandjouan, S, et al. **Detection of minority point mutations by modified PCR technique: A new approach for a sensitive diagnosis of tumor-progression markers.** *Nucleic Acids Res* 1989; 17:8093.
- <sup>118</sup> PCR from problematic templates. *Focus* 22:1 p.10 (2000)
- <sup>119</sup> Helpful tips for PCR. *Focus* 22:1 p.12 (2000).
- <sup>120</sup> Saiki, RK; Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Erlich HA, Arnheim N (Dec 20 1985). **"Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia".** *Science* **230** (4732): 1350–4.
- <sup>121</sup> Kazazian HHH 1989. **Use of PCR in the Diagnosis of monogenic diseases.** *In Erlich HA(ed):"PCR Technology". New York:Stocton Press. P153*
- <sup>122</sup> Sudbery P. **Human Molecular Genetics Longman 1998**

- 
- <sup>123</sup> He L, Chinnery PF, Durham SE, Blakely EL, Wardell TM, Borthwick GM, Taylor RW, Turnbull DM (2002) **Detection and quantification of mitochondrial DNA deletions in individual cells by real-time PCR.** *Nucleic Acids Res* 30:e68 [PubMed] doi: 10.1093/nar/gnf067.
- <sup>124</sup> Blakely EL, He L, Taylor RW, Chinnery PF, Lightowlers RN, Schaefer AM, Turnbull DM (2004) **Mitochondrial DNA deletion in “identical” twin brothers.** *J Med Genet* 41:e19 [PubMed] doi: 10.1136/jmg.2003.011296.
- <sup>125</sup> Durham SE, Bonilla E, Samuels DC, DiMauro S, Chinnery PF (2005) **Mitochondrial DNA copy number threshold in mtDNA depletion myopathy.** *Neurology* 65:453–455
- <sup>126</sup> Reinecke F, Smeitink JA, Van der Westhuizen FH. **OXPHOS genes expression and control in mitochondrial disorders.** *Biochim Biophys Acta.* 2009 Apr 20
- <sup>127</sup> Zeviani M, Servidei S, Gellera C, Bertini E, DiMauro S, DiDonato S. **An autosomal dominant disorder with multiple deletions of mitochondrial DNA starting at the D-loop region.** *Nature.* 1989 May 25;339(6222):309-11
- <sup>128</sup> Suomalainen A, Kaukonen J. **Diseases caused by nuclear genes affecting mtDNA stability.** *Am J Med Genet.* 2001 Spring;106(1):53-61. Review.
- <sup>129</sup> Kawai H, Akaike M, Yokoi K, Nishida Y, Kunishige M, Mine H, Saito S. **Mitochondrial encephalomyopathy with autosomal dominant inheritance: a clinical and genetic entity of mitochondrial diseases.** *Muscle Nerve.* 1995 Jul;18(7):753-60. Review.
- <sup>130</sup> Moslemi AR, Melberg A, Holme E, Oldfors A. **dominant progressive external ophthalmoplegia: distribution of multiple mitochondrial DNA deletions.** *Neurology.* 1999 Jul 13;53(1):79-84
- <sup>131</sup> Liu Z, Ding Y, Du A, Zhang B, Zhao G, Ding M. **A novel Twinkle (PEO1) gene mutation in a Chinese family with adPEO.** *Mol Vis.* 2008;14:1995-2001. Epub 2008 Nov 3.



- 
- <sup>132</sup> Nishino I, Spinazzola A, Hirano M. **Thymidine phosphorylase gene mutations in MNGIE, a human mitochondrial disorder.** *Science.* 1999 Jan 29;283(5402):689-92
- <sup>133</sup> Zeviani M, Bresolin N, Gellera C, Bordoni A, Pannacci M, Amati P, Moggio M, Servidei S, Scarlato G, DiDonato S. **Nucleus-driven multiple large-scale deletions of the human mitochondrial genome: a new autosomal dominant disease.** *Am J Hum Genet.* 1990 Dec;47(6):904-14.
- <sup>134</sup> Chalmers RM, Brockington M, Howard RS, Lecky BR, Morgan-Hughes JA, Harding AE. **Mitochondrial encephalopathy with multiple mitochondrial DNA deletions: a report of two families and two sporadic cases with unusual clinical and neuropathological features.** *J Neurol Sci.* 1996 Nov;143(1-2):41-5.
- <sup>135</sup> Zeviani M, Moraes CT, DiMauro S, Nakase H, Bonilla E, Schon EA, Rowland LP. **Deletions of mitochondrial DNA in Kearns-Sayre syndrome. 1988.** *Neurology.* 1998 Dec;51(6):1525 and 8 pages following. No abstract available.
- <sup>136</sup> Moraes CT, DiMauro S, Zeviani M, Lombes A, Shanske S, Miranda AF, Nakase H, Bonilla E, Werneck LC, Servidei S, et al. **Mitochondrial DNA deletions in progressive external ophthalmoplegia and Kearns-Sayre syndrome.** *N Engl J Med.* 1989 May 18;320(20):1293-9.
- <sup>137</sup> Holt IJ, Harding AE, Cooper JM, Schapira AH, Toscano A, Clark JB, Morgan-Hughes JA. **Mitochondrial myopathies: clinical and biochemical features of 30 patients with major deletions of muscle mitochondrial DNA.** *Ann Neurol.* 1989 Dec;26(6):699-708.
- <sup>138</sup> Mariotti C, Savarese N, Suomalainen A, Rimoldi M, Comi G, Prella A, Antozzi C, Servidei S, Jarre L, DiDonato S, Zeviani M. **Genotype to phenotype correlations in mitochondrial encephalomyopathies associated with the A3243G mutation of mitochondrial DNA.** *J Neurol.* 1995 May;242(5):304-12.
- <sup>139</sup> Di Fonzo A, Bordoni A, Crimi M, Sara G, Del Bo R, Bresolin N, Comi GP. **POLG mutations in sporadic mitochondrial disorders with multiple mtDNA deletions.** *Hum Mutat.* 2003 Dec;22(6):498-9.

- 
- <sup>140</sup> Zeviani M, Corona P, Nijmans L, Tiranti V. (2000). **Nuclear gene defects in mitochondrial disorders.** *Ital. J. Neurol. Sci* 20:401-408
- <sup>141</sup> Van Goethem G, Martin JJ, Van Broeckhoven C. **Progressive external ophthalmoplegia and multiple mitochondrial DNA deletions.** *Acta Neurol Belg.* 2002 Mar;102(1):39-42.
- <sup>142</sup> Horvath R, Hudson G, Ferrari G, Fütterer N, Ahola S, Lamantea E, Prokisch H, Lochmüller H, McFarland R, Ramesh V, Klopstock T, Freisinger P, Salvi F, Mayr JA, Santer R, Tesarova M, Zeman J, Udd B, Taylor RW, Turnbull D, Hanna M, Fialho D, Suomalainen A, Zeviani M, Chinnery PF. **Phenotypic spectrum associated with mutations of the mitochondrial polymerase gamma gene.** *Brain.* 2006 Jul;129(Pt 7):1674-84. Epub 2006 Apr 18.
- <sup>143</sup> Hudson G, Amati-Bonneau P, Blakely EL, Stewart JD, He L, Schaefer AM, Griffiths PG, Ahlqvist K, Suomalainen A, Reynier P, McFarland R, Turnbull DM, Chinnery PF, Taylor RW. **Mutation of OPA1 causes dominant optic atrophy with external ophthalmoplegia, ataxia, deafness and multiple mitochondrial DNA deletions: a novel disorder of mtDNA maintenance.** *Brain.* 2008 Feb;131(Pt 2):329-37. Epub 2007 Dec 7.
- <sup>144</sup> Amati-Bonneau P, Valentino ML, Reynier P, Gallardo ME, Bornstein B, Boissière A, Campos Y, Rivera H, de la Aleja JG, Carroccia R, Iommarini L, Labauge P, Figarella-Branger D, Marcorelles P, Furby A, Beauvais K, Letournel F, Liguori R, La Morgia C, Montagna P, Liguori M, Zanna C, Rugolo M, Cossarizza A, Wissinger B, Verny C, Schwarzenbacher R, Martín MA, Arenas J, Ayuso C, Garesse R, Lenaers G, Bonneau D, Carelli V. **OPA1 mutations induce mitochondrial DNA instability and optic atrophy 'plus' phenotypes.** *Brain.* 2008 Feb;131(Pt 2):338-51. Epub 2007 Dec 24.
- <sup>145</sup> Ferraris S, Clark S, Garelli E, Davidzon G, Moore SA, Kardon RH, Bienstock RJ, Longley MJ, Mancuso M, Gutiérrez Ríos P, Hirano M, Copeland WC, DiMauro S. **Progressive external ophthalmoplegia and vision and hearing loss in a patient with mutations in POLG2 and OPA1.** *Arch Neurol.* 2008 Jan;65(1):125-31

- 
- <sup>146</sup> Deschauer M, Hudson G, Müller T, Taylor RW, Chinnery PF, Zierz S. **A novel ANT1 gene mutation with probable germline mosaicism in autosomal dominant progressive external ophthalmoplegia.** *Neuromuscul Disord.* 2005 Apr;15(4):311-5. Epub 2005 Jan 28.
- <sup>147</sup> Van Goethem G, Löfgren A, Martin JJ, van Broeckhoven C. **Further evidence for genetic heterogeneity of autosomal dominant disorders with accumulation of multiple deletions of mitochondrial DNA.** *J Med Genet.* 2000 Jul;37(7):547-8.
- <sup>148</sup> Adachi Y, Kurihara S, Wada K, Fukuhara Y, Nakano T, and Nakashima K. A. (2002) **Japanese family with autosomal dominant progressive external ophthalmoplegia caused by POLG mutation** *J Neurol Sci* 199,S47
- <sup>149</sup> Luoma P, Melberg A, Rinne JO, Kaukonen JA, Nupponen NN, Chalmers RM, Oldfors A, Rautakorpi I, Peltonen L, Majamaa K, Somer H, Suomalainen A. **Parkinsonism, premature menopause, and mitochondrial DNA polymerase gamma mutations: clinical and molecular genetic study.** *Lancet.* 2004 Sep 4-10;364(9437):875-82.
- <sup>150</sup> Van Goethem G, Martin JJ, Dermaut B, Löfgren A, Wibail A, Ververken D, Tack P, Dehaene I, Van Zandijcke M, Moonen M, Ceuterick C, De Jonghe P, Van Broeckhoven C. **Recessive POLG mutations presenting with sensory and ataxic neuropathy in compound heterozygote patients with progressive external ophthalmoplegia.** *Neuromuscul Disord.* 2003 Feb;13(2):133-42.
- <sup>151</sup> Naviaux RK, Nguyen KV. **POLG mutations associated with Alpers' syndrome and mitochondrial DNA depletion.** *Ann Neurol.* 2004 May;55(5):706-12.
- <sup>152</sup> Li FY, Tariq M, Croxen R, Morten K, Squier W, Newsom-Davis J, Beeson D, Larsson C. **Mapping of autosomal dominant progressive external ophthalmoplegia to a 7-cM critical region on 10q24.** *Neurology.* 1999 Oct 12;53(6):1265-71.
- <sup>153</sup> Suomalainen A, Majander A, Haltia M, Somer H, Lönnqvist J, Savontaus ML, Peltonen L. **Multiple deletions of mitochondrial DNA in several tissues of a patient with severe retarded depression and familial progressive external ophthalmoplegia.** *J Clin Invest.* 1992 Jul;90(1):61-6.

- 
- <sup>154</sup> Bachrati CZ, Hickson ID. RecQ helicases: **Suppressors of tumorigenesis and premature aging.** *Biochem. J.* (2003) 374:577–606.
- <sup>155</sup> Géraldine Farge,<sup>1</sup> Teresa Holmlund,<sup>1</sup> Julia Khvorostova,<sup>1</sup> Reza Rofougaran,<sup>2</sup> Anders Hofer,<sup>2</sup> and Maria Falkenberg<sup>1\*</sup> **The N-terminal domain of TWINKLE contributes to single-stranded DNA binding and DNA helicase activities** *Nucleic Acids Res.* 2008 February; 36(2): 393–403. PMID: PMC2241861
- <sup>156</sup> Korhonen JA, Gaspari M, Falkenberg M. **TWINKLE Has 5' -> 3' DNA helicase activity and is specifically stimulated by mitochondrial single-stranded DNA-binding protein.** *J. Biol. Chem.* (2003) 278:48627–48632
- <sup>157</sup> Miyakawa I, Sando N, Kawano S, Nakamura S, Kuroiwa T. **Isolation of morphologically intact mitochondrial nucleoids from the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*.** *J Cell Sci.* 1987 Nov;88 ( Pt 4):431-9.
- <sup>158</sup> Kaufman BA, Newman SM, Hallberg RL, Slaughter CA, Perlman PS, Butow RA. **In organello formaldehyde crosslinking of proteins to mtDNA: identification of bifunctional proteins.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Jul 5;97(14):7772-7.
- <sup>159</sup> Satoh M, Kuroiwa T. **Organization of multiple nucleoids and DNA molecules in mitochondria of a human cell.** *Exp Cell Res.* 1991 Sep;196(1):137-40.
- <sup>160</sup> Robin, E.D. & Wong, R. **Mitochondrial DNA molecules and virtual number of mitochondria per cell in mammalian cells.** *J. Cell. Physiol.* **136**, 507–513 (1988).
- <sup>161</sup> Zhang, H. *et al.* **Quantitation of mitochondrial DNA in human lymphoblasts by a competitive polymerase chain reaction method: application to the study of inhibitors of mitochondrial DNA content.** *Mol. Pharmacol.* **46**, 1063–1069 (1994).
- <sup>162</sup> .Hehman, G.L. & Hauswirth, W.W. **DNA helicase from mammalian mitochondria.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 8562–8566 (1992).
- <sup>163</sup> Suomalainen A, Majander A, Wallin M, Setälä K, Kontula K, Leinonen H, Salmi T, Paetau A, Haltia M, Valanne L, Lonnqvist J, Peltonen L, Somer H. **Autosomal dominant progressive external ophthalmoplegia with multiple deletions of**

- 
- mtDNA: clinical, biochemical, and molecular genetic features of the 10q-linked disease.** *Neurology.* 1997 May;48(5):1244-53.
- <sup>164</sup> Arenas J, Briem E, Dahl H, Hutchison W, Lewis S, Martin MA, Spelbrink H, Tiranti V, Jacobs H, Zeviani M. **The V368I mutation in Twinkle does not segregate with AdPEO.** *Ann Neurol.* 2003 Feb;53(2):278.
- <sup>165</sup> Van Goethem G, Martin JJ, Lofgren A, Fahaene I, Tack P, Van Zandycke M, et al. **Unusual presentation and clinical variability in Belgian pedigrees with progressive external ophthalmoplegia and multiple deletions of mitochondrial DNA.** *Eur J Neurol* 1997;4:476-84
- <sup>166</sup> Van Goethem G, Dermaut B, Löfgren A, Martin JJ, Van Broeckhoven C **Mutation of POLG is associated with progressive external ophthalmoplegia characterized by mtDNA deletions.** *Nat Genet.* 2001 Jul;28(3):211-2.
- <sup>167</sup> Kiechl S, Horváth R, Luoma P, Kiechl-Kohlendorfer U, Wallacher-Scholz B, Stucka R, Thaler C, Wanschitz J, Suomalainen A, Jaksch M, Willeit J. **Two families with autosomal dominant progressive external ophthalmoplegia.** *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2004 Aug;75(8):1125-8.
- <sup>168</sup> Van Goethem G, Löfgren A, Dermaut B, Ceuterick C, Martin JJ, Van Broeckhoven C. **Digenic progressive external ophthalmoplegia in a sporadic patient: recessive mutations in POLG and C10orf2/Twinkle.** *Hum Mutat.* 2003 Aug;22(2):175-6.
- <sup>169</sup> Barron MJ, Chinnery PF, Howel D, Blakely EL, Schaefer AM, Taylor RW, Turnbull DM. **Cytochrome c oxidase deficient muscle fibres: substantial variation in their proportions within skeletal muscles from patients with mitochondrial myopathy.** *Neuromuscul Disord.* 2005 Nov;15(11):768-74. Epub 2005 Sep 28
- <sup>170</sup> Rivera H, Blázquez A, Carretero J, Alvarez-Cermeño JC, Campos Y, Cabello A, Gonzalez-Vioque E, Borstein B, Garesse R, Arenas J, Martín MA. **Mild ocular myopathy associated with a novel mutation in mitochondrial twinkle helicase.** *Neuromuscul Disord.* 2007 Oct;17(9-10):677-80. Epub 2007 Jul 5.

- 
- <sup>171</sup> Brierley EJ, Johnson MA, Lightowers RN, James OF, Turnbull DM. **Role of mitochondrial DNA mutations in human aging: implications for the central nervous system and muscle.** *Ann Neurol.* 1998 Feb;43(2):217-23.
- <sup>172</sup> Deschauer M, Kiefer R, Blakely EL, He L, Zierz S, Turnbull DM, Taylor RW. **A novel Twinkle gene mutation in autosomal dominant progressive external ophthalmoplegia.** *Neuromuscul Disord.* 2003 Sep;13(7-8):568-72.
- <sup>173</sup> McFarland R, Taylor RW, Turnbull DM. **The neurology of mitochondrial DNA disease.** *Lancet Neurol.* 2002 Oct;1(6):343-51. Review
- <sup>178</sup> Chmiel, Agnieszka A.<sup>1</sup>; Radlinska, Monika<sup>2</sup>; Pawlak, Sebastian D.<sup>1</sup>; Krowarsch, Daniel<sup>3</sup>; Bujnicki, Janusz M.<sup>1</sup>; Skowronek, Krzysztof J.<sup>1</sup> **A theoretical model of restriction endonuclease NlaIV in complex with DNA, predicted by fold recognition and validated by site-directed mutagenesis and circular dichroism spectroscopy** *Protein Engineering, Design and Selection, Volume 18, Number 4, 15 April 2005 , pp. 181-189(9)*
- <sup>179</sup> E. Makatsori, K. Fermani, A. Aletras, N. K. Karamanos and T. Tsegenidis, **Screening of N-acylneuraminic acids in serum and tissue specimens of mouse C57Bl with Lewis' lung cancer by high-performance liquid chromatography.** *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications. Volume 712, Issues 1-2, 7 August 1998, Pages 23-29*
- <sup>180</sup> Mueller R. F, Young I A. **Emery's Elements of Medical Genetics.** *Churchill Livingstone*
- <sup>181</sup> Yang MY, Bowmaker M, Reyes A, et al. **Biased incorporation of ribonucleotides on the mitochondrial L-strand accounts for apparent strand-asymmetric DNA replication.** *Cell.* Nov 15 2002;111(4):495-505
- <sup>182</sup> Papadimitriou A, Comi GP, Hadjigeorgiou GM, Bordoni A, Sciacco M, Napoli L, Prella A, Moggio M, Fagiolari G, Bresolin N, Salani S, Anastasopoulos I, Giassakis G, Divari R, Scarlato G. **Partial depletion and multiple deletions of muscle mtDNA in familial MNGIE syndrome.** *Neurology.* 1998 Oct;51(4):1086-92.

- 
- <sup>183</sup> Nishino I, Spinazzola A, Papadimitriou A, Hammans S, Steiner I, Hahn CD, Connolly AM, Verloes A, Guimarães J, Maillard I, Hamano H, Donati MA, Semrad CE, Russell JA, Andreu AL, Hadjigeorgiou GM, Vu TH, Tadesse S, Nygaard TG, Nonaka I, Hirano I, Bonilla E, Rowland LP, DiMauro S, Hirano M. **Mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy: an autosomal recessive disorder due to thymidine phosphorylase mutations.** *Ann Neurol.* 2000 Jun;47(6):792-800.