



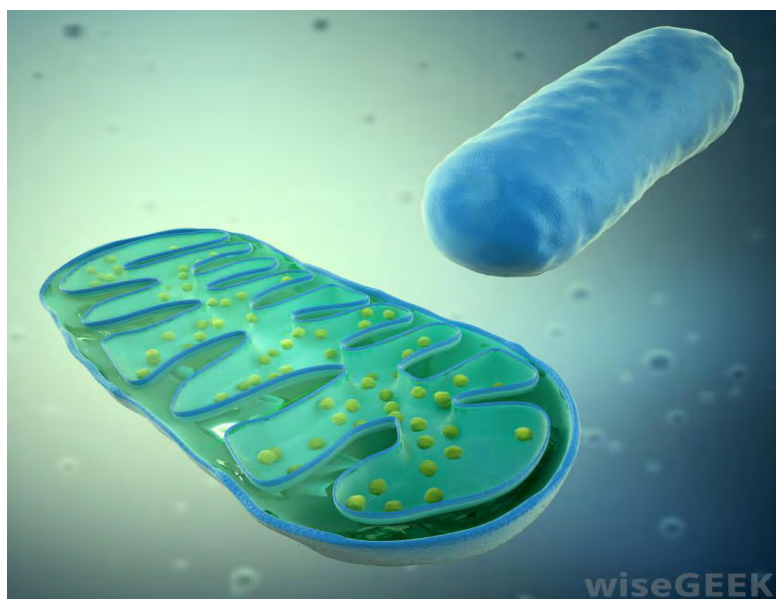
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών σπουδών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας
«ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ – ΜΟΡΙΑΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ, ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ ΟΞΕΙΔΟΑΝΑΓΩΓΑΣΗΣ ΤΟΥ ΖΕΥΓΟΥΣ NADH-Q (ΣΥΜΠΛΟΚΟ Ι) ΣΕ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΑ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΣΑΡΚΟΕΙΔΩΣΗ

ΠΑΝΑΓΙΩΤΙΔΟΥ ΕΛΕΝΗ



Λάρισα, 2016

ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ ΟΞΕΙΔΟΑΝΑΓΩΓΑΣΗΣ ΤΟΥ
ΖΕΥΓΟΥΣ NADH-Q (ΣΥΜΠΛΟΚΟ Ι) ΣΕ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΑ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ
ΣΑΡΚΟΕΙΔΩΣΗ

ASSESSMENT OF NADH:UBIQUINONE OXIDOREDUCTASE (COMPLEX I)
ACTIVITY IN LYMPHOCYTES OF PATIENTS WITH SARCOIDOSIS

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΖΙΦΑ ΑΙΜΙΛΙΑ	Επίκουρος καθηγήτρια Βιολογίας- Νευροβιολογίας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
ΨΑΡΡΑ ANNA- ΜΑΡΙΑ	Επίκουρος καθηγήτρια Βιοχημείας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
ΔΑΝΙΗΛ ΖΩΗ	Αναπληρώτρια καθηγήτρια Πνευμονολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών 'Εφαρμογές Μοριακής Βιολογίας-Μοριακή Γενετική-Διαγνωστικοί Δείκτες', του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Η εργασία πραγματοποιήθηκε υπό την επίβλεψη της κ. Αιμιλία Ζίφα (Επίκουρος Καθηγήτρια Βιολογίας-Νευροβιολογίας) και της κ. Άννα-Μαρία Ψάρρα (Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοχημείας) στις οποίες και θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες και την ευγνωμοσύνη μου για την ανάθεση του θέματος, την πολύτιμη βοήθεια τους, το ενδιαφέρον τους αλλά και το χρόνο που διέθεσαν για τη διεκπεραίωσή της. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κ. Ζωή Δανιήλ (Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Πνευμονολογίας) για την αποτελεσματική συνεργασία και τη συμβολή της στην παρούσα εργασία.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να απευθύνω στους προπτυχιακούς φοιτητές Ευγένιο Μπουζέτο και Μαρία Φούκα για τη συμμετοχή τους, την άριστη συνεργασία και τη βοήθειά τους στη διεκπεραίωση του εργαστηριακού μέρους, καθώς επίσης και στον υποψήφιο διδάκτωρ Βύρων Γοργογιέτα για τις συμβουλές και τις γνώσεις του.

Τέλος, ένα ευχαριστώ στην οικογένειά μου για τη διαρκή στήριξή τους, είναι λίγο.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	5
1.1 ΣΑΡΚΟΕΙΔΩΣΗ.....	5
1.2 ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ	6
1.3 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΥ ΣΤΡΕΣ ΣΤΗΝ ΠΝΕΥΜΟΝΙΚΗ ΣΑΡΚΟΕΙΔΩΣΗ	8
1.4 ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΑΝΤΙΑΠΟΠΤΩΤΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΣΜΩΝ ΣΤΗ ΔΙΑΤΗΡΗΣΗ ΤΗΣ ΦΛΕΓΜΟΝΗΣ	10
1.5 ΠΙΘΑΝΗ ΕΜΠΛΟΚΗ ΤΗΣ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΗΣ ΑΛΥΣΙΔΑΣ ΤΩΝ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΩΝ ΣΤΗ ΣΑΡΚΟΕΙΔΩΣΗ	11
1.6 ΣΤΟΧΟΣ.....	12
2. ΥΛΙΚΑ-ΜΕΘΟΔΟΙ.....	14
2.1 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΜΟΝΟΠΥΡΗΝΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΑΠΟ ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΟ ΑΙΜΑ	14
2.2 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΕΜΠΛΟΥΤΙΣΜΕΝΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΩΝ ΑΠΟ ΗΠΑΡ ΚΑΙ ΣΚΕΛΕΤΙΚΟ ΜΥ ΠΟΝΤΙΚΟΥ	16
2.3 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΕΜΠΛΟΥΤΙΣΜΕΝΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΩΝ ΑΠΟ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΑ ..	17
2.4 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ.....	18
2.5 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΣΥΜΠΛΟΚΟΥ I	20
2.6 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΟΛΙΚΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΚΑΤΑ BRADFORD.....	23
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	24
5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ	32
6. ΠΕΡΙΛΗΨΗ	35
7. ABSTRACT	36
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	37

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΣΑΡΚΟΕΙΔΩΣΗ

Η σαρκοείδωση είναι μια αυτοάνοση κοκκιωματώδης διαταραχή με άγνωστη, μέχρι στιγμής, αιτία εμφάνισης. Χαρακτηρίζεται ως πολυσυστηματική νόσος η οποία συνήθως εκδηλώνεται σε ενήλικες νεαρής ή μέσης ηλικίας και στο μεγαλύτερο ποσοστό των περιπτώσεων (>90%) προσβάλλει τους πνεύμονες και άλλα όργανα όπως το ήπαρ, τους λεμφαδένες, τους σιελογόνους αδένες, την καρδιά, το νευρικό σύστημα, τους μύες και τα οστά (πίνακας 1).

Αν και είναι νόσημα άγνωστης αιτιολογίας γενικά, θεωρείται αποτέλεσμα έκθεσης σε ένα αντιγόνο (λοιμώδεις/περιβαλλοντικοί παράγοντες, χημικές ουσίες, φάρμακα, κλπ.) σε γενετικά προδιατεθειμένους επιρρεπείς ξενιστές (ThomasKW.etal.2003). Οι απόψεις που εμπλέκουν τους λοιμώδεις και άλλους εξωγενείς παράγοντες στην αιτιοπαθογένεση της σαρκοείδωσης βασίζονται στην παρατήρηση ότι η σαρκοείδωση απαντάται συχνότερα σε ορισμένες εποχές του έτους και περιοχές της Γης και σε ειδικές κατηγορίες εργαζομένων. Στην Ελλάδα το 70% των περιπτώσεων εκδηλώνεται στους μήνες Μάρτιο-Μάιο στην Ισπανία το 50% στο διάστημα των μηνών Απρίλιο-Ιούνιο, ενώ στην Ιαπωνία το μεγαλύτερο ποσοστό της διάγνωσης των ατόμων που πάσχουν από σαρκοείδωση γίνεται τον Ιούνιο και τον Ιούλιο (PanayiasS.etal.1991 ;BardinasF.etal.1989; HosodaY.etal.1976).

Λαμβάνοντας υπόψη τις παραπάνω παρατηρήσεις, δεν αποτελεί έκπληξη το γεγονός ότι τα όργανα που εμπλέκονται κυρίως στη σαρκοείδωση είναι οι πνεύμονες, τα μάτια και το δέρμα, δηλαδή εκείνα που έρχονται σε συχνότερη επαφή με το περιβάλλον. Η πνευμονική σαρκοείδωση προσβάλλει τόσο τους λεμφαδένες των πυλών, όσο και του μεσοθωρακίου. Η αμφοτερόπλευρη πυλαία λεμφαδενοπάθεια είναι το συχνότερο ακτινολογικό εύρημα στα παιδιά και παρατηρείται σε όλες σχεδόν τις περιπτώσεις. Η προσβολή πνευμονικού παρεγχύματος χαρακτηρίζεται από μικρές, ακανόνιστες διάμεσες διηθήσεις και πλευριτικές συλλογές (SprockA.etal.1978). Ιστολογικά, ο διάμεσος πνευμονικός ιστός παρουσιάζει σαφώς οριοθετημένα ρευστοποιά κοκκιώματα, τα οποία ακολουθούν εκλεκτικά τις βρογχαγγειακές δέσμες. Η κοκκιωματώδης φλεγμονή συχνά συνοδεύεται από άτυπες μονοπυρηνικές κυτταρικές διηθήσεις. Σε σοβαρές περιπτώσεις, η προσβολή του παρεγχύματος μπορεί να οδηγήσει σε μη αναστρέψιμη ίνωση.

Πίνακας 1: Όργανα τα οποία προσβάλλονται από σαρκοείδωση

Προσβεβλημένο όργανο	Συχνότητα εμφάνισης (%)	Κοινά ευρήματα
Πνεύμονες και λεμφαδένες του θώρακα	>90	Δύσπνοια, βήχας, πόνος στο στήθος, πνευμονική υπέρταση
Δέρμα	20-30	Οζίδια, πλάκες, οζώδες ερύθημα (μη κοκκιωματώδης υποδερματίτιδα)
Οφθαλμοί	20-25	Ραγοειδίτιδα, επιτεφυκίτιδα, διεύρυνση δακρυϊκού αδένα, σύνδρομο ξηρότητας, οπτική νευροπάθεια
Ήπαρ ή/και σπλήνα	10-20	Ηπατοσπληνομεγαλία, ίκτερο, δοκιμή αυξημένης λειτουργίας του ήπατος, κίρρωση
Καρδιαγγειακό σύστημα	10-20	Εκτοπία, καρδιακός αποκλεισμός, αρρυθμίες, μυοκαρδιοπάθεια, αιφνίδιος θάνατος
Κεντρικό νευρικό σύστημα	10-25	Κρανιακή νευροπάθεια, άσηπτη μηνιγγίτιδα ή / και εγκεφαλίτιδα, μυελίτιδα, περιφερική νευροπάθεια και νευροπάθεια του νωτιαίου μυελού, πόνος
Ιγμόρεια και άνω Αναπνευστική οδός	5-10	Χρόνια ιγμορίτιδα
Οστά, αρθρώσεις, μύες	5-15	Η χρόνια αρθρίτιδα, δακτυλίτιδα, μυοπάθεια
Αιματολογικό σύστημα	>50	Περιφερική λεμφοπενία, υπεργαμμασφαιριναιμία
Νεφρικό σύστημα	5-10	Υπερασβεστιαμία και / ή υπερασβεστιουρία, νεφρασβέστωση, νεφρολιθίαση
Ενδοκρινικό σύστημα	5-10	Συμμετοχή υποθαλάμου-υπόφυσης
Γαστρεντερικό και αναπαραγωγικό σύστημα	<1	Γαστρικά οζίδια, μάζες των ωοθηκών ή των όρχεων

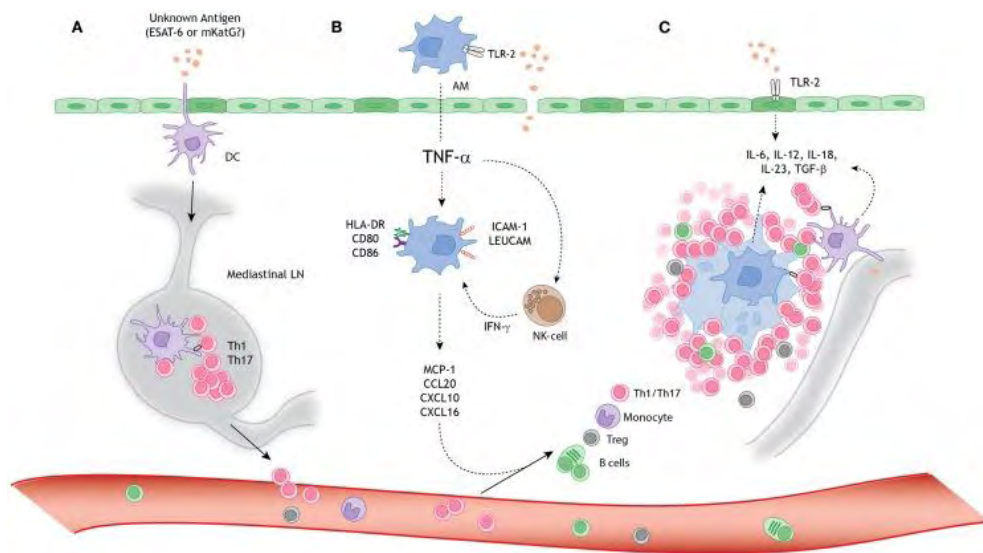
Πηγή :Nat. Rev. Rheumatol.Nature Publishing Group

1.2 ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ

Η ανάπτυξη και η συσσώρευση μη νεκρωτικών κοκκιωμάτων, αποτελούν τη βασική ανωμαλία στην σαρκοείδωση. Παρ' όλο που η αιτία εμφάνισης των κοκκιωμάτων στη σαρκοείδωση παραμένει άγνωστη, ο φυσιολογικός ρόλος της δημιουργίας τους είναι ο περιορισμός των παθογόνων, η αποφυγή της φλεγμονής και η προστασία του γύρω ιστού. Τα κοκκιώματα είναι συμπαγείς, κεντρικά οργανωμένες συγκεντρώσεις μακροφάγων και επιθηλιοειδών κυττάρων, οι οποίες περικυκλώνονται από λεμφοκύτταρα. Τα μακροφάγα, υπό χρόνια διέγερση κυτοκινών, διαφοροποιούνται σε επιθηλιοειδή κύτταρα, κερδίζοντας εκκριτική βακτηριοκτόνο δράση, χάνουν ένα μέρος της φαγοκυτταρικής τους ικανότητας και σχηματίζουν γιγαντιαία πολυπύρρηνα κύτταρα (Hernandez-Pando R.etal.2000). Σε πιο ώριμα κοκκιώματα, ινοβλάστες και κολλαγόνο ενθυλακώνουν το σύμπλεγμα των κυττάρων, και σε

ορισμένες περιπτώσεις, ακολουθεί σκλήρυνση, μεταβάλλοντας την αρχιτεκτονική δομή και τη λειτουργία των οργάνων.

Η ειδική ανοσολογική απόκριση στη σαρκοείδωση ξεκινάει με τη συλλογή του αντιγόνου από τα δενδριτικά κύτταρα και την παρουσίασή του στα αδιαφοροποίητα T κύτταρα. Ακολουθεί στη συνέχεια η διαφοροποίηση και ο πολλαπλασιασμός των T κυττάρων και η μετανάστευσή τους στο σημείο της φλεγμονής. Πρωτεύον χαρακτηριστικό της σαρκοείδωσης είναι η παρουσία των CD4+ T κυττάρων τα οποία αλληλεπιδρούν με τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα, για την έναρξη του σχηματισμού και της σύντηξης των κοκκιωμάτων. Τα ενεργοποιημένα CD4+ στη σαρκοείδωση διαφοροποιούνται σε βοηθητικά T κύτταρα τύπου 1 (Th1) και Th17 ευνοώντας την παραγωγή κυτοκινών, όπως IL-1, IL-6, IL-12, IL-18, IL-23, του TGF-β, της INF-γ και του TNF-α από τα μακροφάγα, και τα DCs (Facco M. et al. 2011; Shigehara K. et al. 2001; Kriegova E. et al. 2011).



Πηγή: Caroline E. Brooet al. Granuloma Formation in Pulmonary Sarcoidosis. Front Immunol. 2013; 4: 437.

Εικόνα 1: Σχηματικό μοντέλο δημιουργίας κοκκιωμάτων στην πνευμονική σαρκοείδωση: ένα άγνωστο αντιγόνο ενεργοποιεί ταυτόχρονα Α) διάμεσα δενδριτικά κύτταρα (DCs) Β) κυψελιδικά μακροφάγα (AMs) Γ) κυψελιδικά επιθηλιακά κύτταρα τύπου II (AEC-II) (σκούροπράσινο). Α Τα διάμεσα δενδριτικά κύτταρα συλλέγουν το αντιγόνο και μεταναστεύουν προς τους λεμφαδένες του μεσοθωρακίου (LNs) όπου οδηγούν στη διαφοροποίηση και την κλωνική έκπτυξη των βοηθητικών Th1 και Th17 κυττάρων. Β ταυτόχρονα τα κυψελιδικά μακροφάγα (AMs) παράγουν TNF-α προωθώντας τη θετική ρύθμιση της ενεργοποίησης (HLA-DR και CD80/86) προσκόλλησης (LeuCAM) μορίων. Τα μακροφάγα παράγουν προσδέτες χημειοκινών (MCP-1, CCL20, CXCL10, και CXCL16) υπό την διέγερση τόσο του TNF-α όσο και της INF-γ που παράγεται από τα NK κύτταρα, προσελκύοντας έτσι Th1/17 κύτταρα, μονοκύτταρα, T ρυθμιστικά κύτταρα (Tregs) και B κύτταρα. Γ Το περιβάλλον του πνεύμονα χαρακτηρίζεται από την παρουσία των Th1 και Th17 κυττάρων, ευνοώντας την παραγωγή κυτοκινών, όπως IL-6, IL-12, IL-18, IL-23 και του TGF-β από τα μακροφάγα, τα DCs και τα AEC-II. Επίμονη διέγερση προκαλείται από τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα προκαλώντας τη συνεχή στρατολόγηση κυττάρων στο σημείο της φλεγμονής, οδηγώντας στο σχηματισμό των κοκκιωμάτων.

Οι φλεγμονώδεις μεταβολές που προκαλούνται από τη συσσώρευση των κυτοκινών δημιουργούν ένα μικροπεριβάλλον που επηρεάζει τις οξειδοαναγωγικές οδούς, την έκφραση γονιδίων και την κυτταρική επιβίωση.(BaughmanR.P.etal.1998; HaddadJ.J.etal.2002; BarnesP.J.etal.2005).Έχουν αποκαλυφθεί αρκετά σημεία των ανοσοπαθολογικών γεγονότων που συμβαίνουν κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης των μη νεκρωτικών κοκκιωμάτων, τα οποία συνδέονται με την οξειδοαναγωγική ανισορροπία που παρατηρείται στη σαρκοείδωση (MaY.etal.2007; Muller-QuernheimJ.etal.1998).

1.30 ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΥ ΣΤΡΕΣ ΣΤΗΝ ΠΝΕΥΜΟΝΙΚΗ ΣΑΡΚΟΕΙΔΩΣΗ

Το οξειδωτικό στρες αντιπροσωπεύει μια διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ της παραγωγής δραστικών ριζών οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS) και της ικανότητας ενός βιολογικού συστήματος να αδρανοποιεί,με τη βοήθεια αντιοξειδωτικών παραγόντων, τα τοξικά αυτά μόρια και να επισκευάζει τις βλάβες που προκαλούν. Οι δραστικές ρίζες οξυγόνου βλάπτουν όλα τα συστατικά του κυττάρου, συμπεριλαμβανομένων των πρωτεϊνών, των λιπιδίων και του DNA.

Ελεύθερες ρίζες καλούνται άτομα, μόρια ή στοιχεία που φέρουν ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια (HalliwellB.etal.1990). Οι ελεύθερες ρίζες είναι ασταθείς δραστικές ενώσεις γιατί εμφανίζουν ισχυρή τάση να ζευγαρώσουν το ασύζευκτο ηλεκτρόνιό τους. Η χαρακτηριστική αυτή ιδιότητα καθιστά τις ελεύθερες ρίζες ικανές να συμμετέχουν σε εκατοντάδες αλυσιδωτές αντιδράσεις που μπορεί σε βιολογικά συστήματα να προκαλέσουν τοξικές βλάβες σε βιομόρια, όπως υπεροξειδωση λιπιδίων μεμβρανικών κυττάρων ή θραύσεις κλώνων σε DNA (HalliwellB.etal.1999). Από το πλήθος των ελευθέρων ριζών, εκείνες που παρουσιάζουν μεγαλύτερο ενδιαφέρον στα βιολογικά συστήματα, είναι οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου.

Ο πνεύμονας αποτελεί μεταξύ των άλλων οργάνων ένα εξαιρετο στόχο για το οξειδωτικό στρες λόγω της άμεσης έκθεσης του στις υψηλές πιέσεις οξυγόνου. Είναι γνωστό πως η μερική πίεση του οξυγόνου στις κυψελίδες είναι πολύ υψηλότερη συγκριτικά με άλλα ζωτικά όργανα όπως καρδιά, ήπαρ και εγκέφαλος. Πίεση του οξυγόνου στον εισπνεόμενο αέρα είναι 150 mmHg, μέσα στις κυψελίδες μειώνεται στα 100 mmHg, ενώ στο φλεβικό αίμα φθάνει στα 45mmHg και τέλος καταλήγει στο 1 mmHg στους ιστούς ορισμένων οργάνων. Ένα άλλο

ιδιαίτερο χαρακτηριστικό του πνεύμονα είναι η μεγάλη επιφάνεια του, περίπου 70 m στον ενήλικα. Λόγω της άμεσης έκθεσης στον ατμοσφαιρικό αέρα, τα κύτταρα του πνεύμονα υφίστανται οξειδωτικό stress από τα ερεθίσματα του περιβάλλοντος όπως καπνός του τσιγάρου, το όζον, το διοξείδιο του αζώτου και του θείου. Επιπλέον, τα φλεγμονώδη κύτταρα που εμφανίζονται στις περισσότερες παθήσεις του πνεύμονα, παράγουν και απελευθερώνουν ελεύθερες ρίζες.

Μελέτες υποστηρίζουν τη συμμετοχή των ελευθέρων ριζών στην παθογένεια πολλών διάμεσων πνευμονοπαθειών όπως η πνευμονική ίνωση και η σαρκοείδωση. Έχουν παρατηρηθεί αυξημένα επίπεδα οξειδωτικού στρες στον ορό και σε κυψελιδικά μακροφάγα ασθενών με σαρκοείδωση συγκριτικά με υγιή άτομα (Koutsokera A.etal.2009; Cassatella MA.etal.1989). Τα κυψελιδικά μακροφάγα νοσούντων ατόμων διαθέτουν μια αυξημένη ικανότητα να μεταβολίζουν το οξυγόνο και να παράγουν υπεροξειδίου του υδρογόνου και το ανιόντα υπεροξειδίου.

Είναι σημαντικό ότι σε κάθε σημείο του κυττάρου, η παραγωγή των ριζών έχει μια ειδική λειτουργία, όχι μόνο στο μεταβολισμό του κυττάρου αλλά και σε άλλες διαδικασίες όπως οι λοιμώξεις και οι φλεγμονές. Οι ελεύθερες ρίζες συμβάλλουν στη φλεγμονή με διάφορους τρόπους, ένας από αυτούς είναι η ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB (Rahman I.etal.2002). Ο NF-κB παρουσιάζει αυξημένα επίπεδα σε κυψελιδικά μακροφάγα (Culver DA.etal.2004) και σε μονοκύτταρα του αίματος ασθενών με σαρκοείδωση (Drent M.etal.2001), επάγοντας την παραγωγή κυτοκινών όπως την IL-8 (Rahman I.etal.2002). Με τη σειρά του, ο NF-κB προωθεί τον σχηματισμό ελευθέρων ριζών συνεισφέροντας τόσο στην ενίσχυση της φλεγμονής όσο και του οξειδωτικού στρες (Boots AW.etal.2011). Επιπλέον, οι ROS αυξάνουν την έκκριση του αυξητικού παράγοντα TGF-β και μεσολαβούν στην επαγωγή του αναστολέα του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου PAI-Ιπροωθώντας έτσι την ίνωση (Bellocq A.etal.1999 ; Liu RM.etal.2008). Τέλος, φαίνεται να υπάρχει μία πιθανή σχέση μεταξύ του οξειδωτικού στρες και της διαφοροποίησης των μονοκυττάρων σε μακροφάγα οδηγώντας στο σχηματισμό των κοκκιωμάτων (Ivanisevic J.etal.2012).

Αρκετοί αντιοξειδωτικοί παράγοντες παρουσιάζουν αύξηση στον πνευμονικό ιστό ως απόκριση στο οξειδωτικό στρες ή μείωση, σε συστημικό επίπεδο, είτε λόγω της αυξημένης κατανάλωσής τους είτε λόγω συσσώρευσής τους στον πνεύμονα. Έχουν βρεθεί χαμηλά επίπεδα του υπεροξειδίου της δισμουτάσης (SOD) στον ορό και στα ερυθροκύτταρα ασθενών με σαρκοείδωση σε σύγκριση με υγιή άτομα (Ivanisevic J.etal.2012). Σε χαμηλά επίπεδα

βρίσκονται, στο αίμα νοσούντων ατόμων, και άλλοι αντιοξειδωτικοί παράγοντες όπως η βιταμίνη C και η ανηγμένη μορφή της γλουταθειόνης (GSH), ωστόσο, η βιταμίνη C ανιχνεύεται σε υψηλές συγκεντρώσεις σε δείγμα του κυψελιδικού εκπλύματος (BAL) από άτομα που πάσχουν από σαρκοείδωση (BootsAW.etal.2009; MasrkatP.etal.2009). Σε υψηλά επίπεδα σε BAL βρίσκονται επίσης η α-τοκοφερόλη και η ρετινόλη. Αυτή η αύξηση πιθανόν αντιπροσωπεύει μία προσαρμοστική απόκριση στο οξειδωτικό στρες.

1.4 ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΑΝΤΙΑΠΟΠΤΩΤΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΣΜΩΝ ΣΤΗ ΔΙΑΤΗΡΗΣΗ ΤΗΣ ΦΛΕΓΜΟΝΗΣ

Η απόπτωση ή προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος είναι ζωτικής σημασίας για την ανάπτυξη και τη διατήρηση της ομοιόστασης των οργανισμών. Πρόκειται για αναπτυξιακά ελεγχόμενη διαδοχή γεγονότων η οποία προϋποθέτει ενεργοποίηση συγκεκριμένων γονιδίων. Απορύθμιση της απόπτωσης οδηγεί σε πλήθος παθολογικών καταστάσεων, συμπεριλαμβανομένων νεοπλασιών και αυτοάνοσων διαταραχών.

Όπως ήδη αναφέρθηκε η συσσώρευση κυτοκινών, από τα εμπλεκόμενα στην ανοσολογική απόκριση κύτταρα, έχουν σημαντικό ρόλο στη δημιουργία των κοκκιωμάτων. Μία λεπτή ισορροπία, μεταξύ της απόπτωσης και της επιβίωσης των κυττάρων που συμμετέχουν στη φλεγμονή, διατηρεί την ομοιόσταση του ανοσοποιητικού συστήματος. Θεωρείται πως η κοκκιωματώδης φλεγμονή μπορεί να ανασταλεί είτε μέσω της απομάκρυνσης των κυτοκινών είτε μέσω της επαγωγής της απόπτωσης (TagayaY.etal.1996; Bulfone-PausS.etal.1997). Επομένως, ανοχή στην απόπτωση είναι πολύ πιθανό να συμβάλλει στην παθογένεση της σαρκοείδωσης.

Έχει παρατηρηθεί αντιαποπτωτική δράση σε λεμφοκύτταρα βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος (BAL) αλλά και σε λεμφοκύτταρα περιφερικού αίματος σε ασθενείς με σαρκοείδωση (StridhH.etal.2002; StridhH.etal.2001). T-λεμφοκύτταρα της γύρω περιοχής των κοκκιωμάτων φαίνεται να παρουσιάζουν αυξημένα επίπεδα παραγωγής BCL-2 (MermigkisC.etal.2006). Υπερέκφραση της BCL-2 δείχνει να προστατεύει τα λεμφοκύτταρα, από τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο, όταν αρχίζουν να αποσύρονται αυξητικοί παράγοντες όπως η IL-2.

Στην κυτταρική επιβίωση φαίνεται να συμβάλλει σημαντικά και ο κικλινοεξαρτώμενος αναστολέας κινασών p21waf1. Συγκεκριμένα, *in vitro* ενεργοποίηση των μακροφάγων μέσω

INF- γ οδηγεί σε καταστολή της απόπτωσης (XausJ.etal.1999; XausJ.etal.2001). Αυτή η αντιαποπτωτική δράση μεσολαβείται από τον p21. Ο p21 παρουσιάζει αυξημένα επίπεδα έκφρασης σε πνευμονικό σαρκοείδωμα, ενισχύοντας την υπόθεση ότι ο παράγοντας αυτός θα μπορούσε να εξηγήσει την απουσία απόπτωσης στα κοκκιώματα και τη διατήρηση της φλεγμονής (XausJ.etal.2003).

1.5 ΠΙΘΑΝΗ ΕΜΠΛΟΚΗ ΤΗΣ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΗΣ ΑΛΥΣΙΔΑΣ ΤΩΝ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΩΝ ΣΤΗ ΣΑΡΚΟΕΙΔΩΣΗ

Στη διάρκεια των τελευταίων ετών έχει προταθεί ο ρόλος των μιτοχονδριακών δυσλειτουργιών σε φλεγμονώδεις πνευμονολογικές διαταραχές όπως η ιδιοπαθής πνευμονική ίνωση και το άσθμα. Ενδιαφέρον παρουσιάζει η συμμετοχή του οξειδωτικού στρες και η ανοχή στην απόπτωση στη σαρκοείδωση, δύο καταστάσεις οι οποίες συνδέονται άμεσα με τα μιτοχόνδρια.

Κύριος ρόλος των μιτοχονδρίων είναι η παραγωγή ενέργειας στα ευκαρυωτικά κύτταρα με τη μορφή της τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP), μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης (OXPHOS). Είναι πλέον γνωστό πως η απόπτωση είναι μία διαδικασία που απαιτεί ενέργεια, καθώς είναι μία πολύ καλά ρυθμισμένη διαδικασία η οποία περιλαμβάνει μία σειρά από ATP-εξαρτώμενα στάδια όπως την ενεργοποίηση κασπασών, την ενζυμική υδρόλυση μακρομορίων, τη συμπύκνωση χρωματίνης και το σχηματισμό του αποπτωτικού σωματίου (KassG.etal.1996; RichterC.etal.1996; HuY.etal.1999). Επιπλέον, τα μιτοχόνδρια αποτελούν σημαντική πηγή οξειδωτικών ριζών γιατί σε αυτά βρίσκεται η αλυσίδα των αναπνευστικών ενζύμων που είναι υπεύθυνα για την οξειδωτική φωσφορυλίωση. Στην πραγματικότητα η μεταφορά ηλεκτρονίων δεν καταλήγει αποκλειστικά στη δημιουργία του μορίου του νερού ενώ μικρά αλλά σημαντικά ποσά των ηλεκτρονίων (1-2%) μεταφέρονται από τα ένζυμα της αναπνευστικής αλυσίδας κατευθείαν στο μοριακό οξυγόνο δημιουργώντας ανιόντα υπεροξειδίου ή ρίζες υδροξυλίου ή υπεροξειδία του υδρογόνου.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει μία έρευνα του εργαστηρίου μας όπου παρατηρήθηκε αυξημένη συχνότητα μεταλλάξεων σε μιτοχονδριακά tRNA γονίδια και σε γονίδια παρακείμενων περιοχών σε άτομα που φέρουν τη νόσο (PeletidouS.etal.2014). Τέτοιου είδους μεταλλάξεις μπορούν να διακριθούν σε δύο κατηγορίες, α) τις μεταλλάξεις που επηρεάζουν την πρωτεϊνική σύνθεση των μιτοχονδρίων και β) τις μεταλλάξεις γονιδίων που

κωδικοποιούν για 13 ενζυμικές υπομονάδες της αναπνευστικής αλυσίδας των μιτοχονδρίων (ZevianiM.etal.2004; WongLJ.etal.2007). Οι περισσότερες μεταλλάξεις στα tRNA και rRNA γονίδια προκαλούν βλάβες στην πρωτεϊνική σύνθεση, επιφέροντας αρνητικές συνέπειες για τα σύμπλοκα της αναπνευστικής αλυσίδας.

Πρόσφατες μελέτες αναφέρουν αρνητική ρύθμιση στο μονοπάτι της οξειδωτική φωσφορλίωσης σε μακροφάγα από BALασθενών με σαρκοείδωση (KjellinH.etal.2016). Δυσλειτουργία λοιπόν των συμπλόκων της οξειδωτικής φωσφορλίωσης θα μπορούσε να επιφέρει αυξημένα επίπεδα ROS και πιθανή μείωση στην παραγωγή ATPσυμβάλλοντας θετικά στην επιβίωση των κοκκιωμάτων και τη διατήρηση/επιδείνωση της σαρκοείδωσης. Οι παραπάνω παρατηρήσεις καθιστούν τα σύμπλοκα της αναπνευστικής αλυσίδας των μιτοχονδρίων ιδιαίτερα ελκυστικό στόχο μελέτης.

1.6 ΣΤΟΧΟΣ

Στόχος της συγκεκριμένης έρευνας, είναι η διερεύνηση της πιθανής συσχέτισης λειτουργικότητας της αναπνευστικής αλυσίδας των μιτοχονδρίων με την εμφάνιση της νόσου. Συγκεκριμένα, έγινε προσπάθεια εκτίμησης της δραστηριότητας της οξειδοαναγωγάσης του ζεύγους NADH-Q (ΣύμπλοκοI).

Το Σύμπλοκο I είναι το πρώτο από τα πέντε σύμπλοκα της αναπνευστικής αλυσίδας και αποτελεί προϊόν 7 μιτοχονδριακών (ND1-6, ND4L) και 38 πυρηνικών γονιδίων (Carroll.etal.2006). Μείωση της δραστηριότητάς του αποτελεί πιθανόν την συχνότερη αιτία μιτοχονδριακών ασθενειών και μπορεί να επιφέρει αρνητικές συνέπειες στην παραγωγή ATPκαι στη συσσώρευση των ROS (JanssenRJ.etal.2006; DistelmaierF.etal.2009). Έχει παρατηρηθεί αντίστροφη σχέση λειτουργικότητάς του και παραγωγής προϊόντων υπεροξειδίου (VercaatS.etal.2007).Επιπλέον, μεταλλάξεις σε mtDNA, οι οποίες έχουν αρνητικό αντίκτυπο στη λειτουργία του Συμπλόκου I, ανιχνεύονται σε διάφορους τύπους όγκων προωθώντας την κυτταρική επιβίωση (GasparreG.etal.2007; BrandonM.etal.2006). Μειωμένη δραστηριότητα του Συμπλόκου I έχει βρεθεί σε ασθενείς με κυστική ίνωση (ValdiviesoAG.etal.2012). Τέλος, κυτοκίνες οι οποίες συμμετέχουν στη φλεγμονή, όπως η IL-1 και ο TNF-α είναι γνωστό πως επηρεάζουν τη λειτουργία των μιτοχονδρίων επιφέροντας δυσλειτουργία του Συμπλόκου I (ZellR.etal.1999; Lopez-ArmadoMJ.etal.2006).

Βασικοί άξονες της μελέτης:

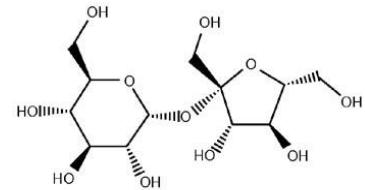
- i. Ανίχνευση κατάλληλου πρωτοκόλλου για τον φασματοφωτομετρικό προσδιορισμό της ενζυμικής δραστηριότητας του Συμπλόκου I σε λεμφοκύτταρα περιφερικού αίματος.
- ii. Συγκριτική μελέτη προσδιορισμού της ενζυμικής δραστηριότητας του Συμπλόκου I σε λεμφοκύτταρα από περιφερικό αίμα ατόμων που πάσχουν από τη συγκεκριμένη νόσο καθώς και σε υγιή άτομα.

2. ΥΛΙΚΑ-ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΜΟΝΟΠΥΡΗΝΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΑΠΟ ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΟ ΑΙΜΑ

Για την απομόνωση των μονοπύρηνων κυττάρων από το περιφερικό αίμα χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο φυγοκέντρησης πυκνότητας με το αντιδραστήριο φικόλη.

Αυτή η μέθοδος βασίζεται στην διαβάθμιση των κυττάρων που πραγματοποιείται με υγρό μέσο διαχωρισμού των λεμφοκυττάρων. Το υγρό αυτό έχει ειδικό βάρος αντίστοιχο με το ειδικό βάρος των λεμφοκυττάρων. Με το μέσο αυτό επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός του αίματος σε τρεις στιβάδες,



Εικόνα 2: φικόλη

1. Ορός (ανώτερη στοιβάδα)
2. Λευκά αιμοσφαίρια (μεσαία στοιβάδα)
3. Ερυθροκύτταρα (κατώτερη στοιβάδα)

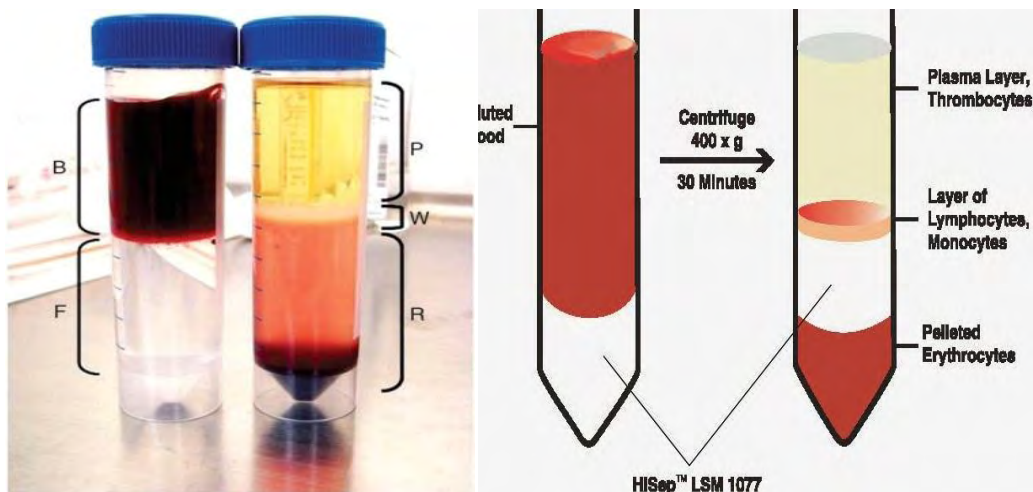
Υλικά

- Φλεβικό αίμα ασθενή
- Φιαλίδια γενικής αίματος που περιέχουν EDTA
- Φυσιολογικός ορός 0,9% NaCl
- Μέσο διαχωρισμού λεμφοκυττάρων φικόλη
- ΔιάλυμαέκπλυσηςPBS 1x (PhosphateBufferSaline)

Πειραματική Διαδικασία

1. Αρχικά λαμβάνονται 20ml αίμα ασθενών με σαρκοείδωση ή υγιών ατόμων και τοποθετούνται σε φιαλίδια γενικής αίματος που περιέχουν EDTA.
2. Στη συνέχεια το αίμα μεταφέρεται σε σωληνάριο των 50ml και αραιώνεται σε ίσο όγκο ισότονου διαλύματος 0,9% NaCl.
3. Σε δύο νέα σωληνάρια των 50ml τοποθετούνται 15 ml φικόλης στο καθένα, στα οποία μοιράζουμε ισόποσα το αραιωμένο αίμα (20ml αραιωμένου αίματος προστίθενται με αργό ρυθμό πάνω στην επιφάνεια της φικόλης, υπό γωνία).

4. Έπειτα, φυγοκεντρούμε για 30 λεπτά χωρίς φρένο στις 1800 στροφές ανά λεπτό (1800rpm) και στους 4°C.
5. Μετά τη φυγοκέντρηση, η στοιβάδα των μονοπύρηνων κυττάρων βρίσκεται μεταξύ της στήλης της φικόλης και της στήλης του πλάσματος. Η φικόλη έχοντας ειδική πυκνότητα μεταξύ των μονοκυττάρων και λεμφοκυττάρων αφενός και των ερυθροκυττάρων και κοκκιοκυττάρων αφετέρου έχει διαχωρίσει τις δύο στοιβάδες και επομένως γίνεται δυνατή η λήψη των PBMCs.
6. Η στοιβάδα των μονοπύρηνων κυττάρων συλλέγεται και μεταφέρεται σε νέο σωληνάριο, στο οποίο προστίθεται 40mlPBS.
7. Ακολουθεί άλλη μία φυγοκέντρηση για 10 λεπτά με φρένο στις 1600 στροφές και στους 4°C. Συλλέγεται το ίζημα.



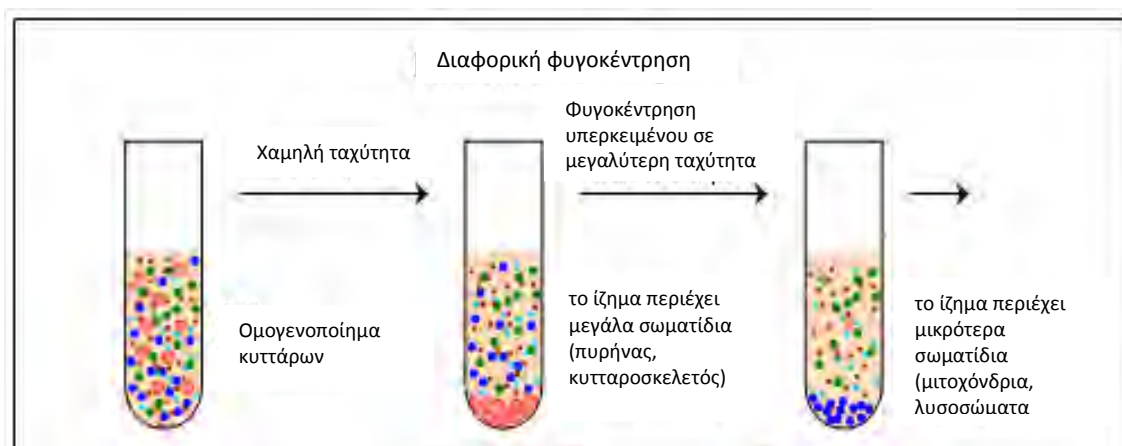
Εικόνα 3: Επιστοιβάση ολικού αίματος σε φικόλη (αριστερά) και εικόνα του ίδιου σωληναρίου έπειτα από φυγοκέντρηση (δεξιά). PBMCs: περιφερικά μονοπύρηννα κύτταρα (PeripheralBloodMononuclearCells).

2.2 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΩΝ ΑΠΟ ΗΠΑΡ ΚΑΙ ΣΚΕΛΕΤΙΚΟ ΜΥ ΠΟΝΤΙΚΟΥ

- Απομόνωση ήπατος και μυϊκού ιστού από μυ
- Ομογενοποίηση των ιστών σε γυάλινο ομογενοποιητή με έμβολο από τεφλόν. Το διάλυμα ομογενοποίησης αποτελείται από : 10mM Tris-HCl pH 7,4 , 250mM Sucrose, 1mM EDTA (διάλυμα ομογενοποίησης 2.2) και μίγμα αναστολέων πρωτεασών και φωσφατασών. Πραγματοποιούνται 10 upsanddowns X με 30sec αναμονή ενδιάμεσα. Η διαδικασία της ομογενοποίησης πραγματοποιείται σε πάγο.



- Φυγοκέντρηση ομογενοποιημένου σε 1000g για 10min
- Συλλογή υπερκείμενου και επαναφυγοκέντρηση σε 12000rpm για 20min στους 4°C
- Αφαίρεση υπερκείμενου
- Έκπλυση του ιζήματος με 1ml διαλύματος ομογενοποίησης
- Φυγοκέντρηση σε 12000rpm για 20min στους 4°C
- Αφαίρεση υπερκείμενου
- Τοποθέτηση και διατήρηση των δειγμάτων στους -80°C



Εικόνα 4: Διαχωρισμός των κυτταρικών συστατικών με βάση το μέγεθος και την πυκνότητα. Τα μεγαλύτερα και μεγαλύτερης πυκνότητας συστατικά κατακρημνίζονται πρώτα. Η πρώτη φυγοκέντρηση οδηγεί στο σχηματισμό ενός ιζήματος και ενός υπερκείμενου. Τα μικρότερα σωματίδια μένουν στο υπερκείμενο το οποίο στη συνέχεια φυγοκεντρείται σε μεγαλύτερες ταχύτητες και η διαδικασία επαναλαμβάνεται.

2.3 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΕΜΠΛΟΥΤΙΣΜΕΝΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΩΝ ΑΠΟ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΑ

Το ίζημα των λεμφοκυττάρων που συλλέχθηκε με τη χρήση του αντιδραστηρίου φικόλης (2.1) υφίσταται είτε ολική λύση (2.3) είτε συνεχίζεται η επεξεργασία για την απομόνωση εμπλουτισμένου εκχυλίσματος μιτοχονδρίων. Για την απομόνωση των μιτοχονδρίων επιλέχθηκαν δύο διαφορετικά πρωτόκολλα, ένα με τη χρήση διγιτονίνης (DG) και ένα χωρίς. Και στις δύο περιπτώσεις τα μιτοχόνδρια απομονώνονται μέσω διαφορεικής φυγοκέντρησης ωστόσο η DG βοηθάει στην διαπερατοποίηση της μιτοχονδριακής μεμβράνης, έτσι το δείγμα μπορεί να χρησιμοποιηθεί απευθείας για φωτομέτρηση.

i. Απουσία διγιτονίνης:

Υλικά

Πίνακας 2: Διάλυμα ομογενοποίησης

Αντιδραστήρια	Όγκοι/συγκεντρώσεις
1MTris-HClpH 7.4	10μl/ 10mM
Sucrose	0,085gr/0,25M
0,5MEDTA	2μl/1mM
dd H ₂ O	Μέχρι τελικό όγκο 1ml

*Στην ποσότητα του διαλύματος που θα χρησιμοποιηθεί προστίθενται αναστολείς πρωτεασών

Διαδικασία:

1. Προσθήκη 100μl διαλύματος ομογενοποίησης στο δείγμα.
2. Ομογενοποίηση των κυττάρων σε γυάλινο ομογενοποιητή με έμβολο από τεφλόν. Κατά την ομογενοποίηση με την συγκεκριμένη συσκευή σπάνε μηχανικά οι πλασματικές μεμβράνες των κυττάρων και αρκετές από τις πυρηνικές. Πραγματοποιούνται 10 upsanddownsX με 30secαναμονή ενδιάμεσα. Η διαδικασία της ομογενοποίησης πραγματοποιείται σε πάγο.
3. Ακολουθεί φυγοκέντρηση ομογενοποιημένου σε 1000g για 10min στους 4°C
4. Συλλογή υπερκειμένου και επαναφυγοκέντρηση σε 12000rpm για 20min στους 4°C
5. Αφαίρεση υπερκειμένου
6. Έκπλυση του ιζήματος με 1ml διαλύματος ομογενοποίησης

7. Φυγοκέντρωση σε 12000rpm για 20min στους 4°C
8. Αφαίρεση υπερκειμένου
9. Τοποθέτηση και διατήρηση των δειγμάτων στους -80°C

ii. Παρουσία διγιτονίνη:

Υλικά

Πίνακας 3: Διάλυμα απομόνωσης μιτοχονδρίων

Αντιδραστήρια	Όγκοι/συγκεντρώσεις
1M Tris-HCl pH 7.4	10μl/ 10mM
Sucrose	0,25mM
0,5M EDTA	2μl/1mM
dd H ₂ O	Μέχρι τελικό όγκο 1ml

*Στην ποσότητα του διαλύματος που θα χρησιμοποιηθεί προστίθενται αναστολείς πρωτεασών

Λιαδικασία:

1. Τα κύτταρα διαλύονται στο διάλυμα απομόνωσης σε συγκέντρωση 5mg/ml
2. Προσθήκη διγιτονίνης σε τελική συγκέντρωση 0,1mgr/ml
3. Προσθήκη τριαιθανολαμίνης (TEA) σε τελική συγκέντρωση 10mM
4. Επάωση σε πάγο για 10λεπτά
5. Ομογενοποίηση: 15 upanddowns σε 500rpm σε πάγο
6. Φυγοκέντρωση σε 1000g για 10 λεπτά στους 4°C
7. Συλλογή υπερκειμένου και επανάληψη βημάτων 1-6 στο ίζημα
8. Ανάμιξη των δύο υπερκειμένων και φυγοκέντρωση σε 12.000g για 15 λεπτά στους 4°C
9. Επαναδιαλυτοποίηση του ιζήματος σε διάλυμα απομόνωσης και αποθήκευση των δειγμάτων στους -80°C

2.4 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Η ακριβής μέτρηση της δραστηριότητας του Συμπλόκου I της αναπνευστικής αλυσίδας εξαρτάται από την πρόσβαση του NADH στον διαμεμβρανικό χώρο. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί με αύξηση της διαπερατότητας της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης είτε με

μηχανική λύση (υπέρηχους) είτε με τη μέθοδο πάγωμα ξεπάγωμα (freeze/thaw) σε ομογενοποίηση κυττάρων ή σε απομονωμένα μιτοχόνδρια.

i. Λύση με τη μέθοδο ψύξη/απόψυξη

Υλικά

Πίνακας 4: Ισότονο διάλυμα

Αντιδραστήρια	Όγκοι/συγκεντρώσεις
0,1M HEPES pH 7.4	100μl/ 10mM
Sucrose	0,085gr/0,25M
0,5M EDTA	2μl/1mM
dd H ₂ O	Μέχρι τελικό όγκο 1ml

*Στην ποσότητα του διαλύματος που θα χρησιμοποιηθεί προστίθενται αναστολείς πρωτεασών

Λαδικασία:

Τα λεμφοκύτταρα διαλύονται σε ισότονο διάλυμα και υφίστανται τρεις κύκλους Ψύξης/Απόψυξης (freeze/thaw) με εναλλαγές στη θερμοκρασία από τους -80°C στους 37°C.

ii. Λύση με υπέρηχους

Η συσκευή των υπέρηχων αποτελείται από δύο κύριες μονάδες:

- Τη συσκευή που παράγει υπερήχους και
- Ένα μεταδότη που μεταφέρει τα υπερήχους στο διάλυμα των κυττάρων.

Εκτός από την ενέργεια των υπερηχητικών κυμάτων που λύει τα κύτταρα, αυτά δέχονται και τη δόνηση του μεταδότη, την οποία έχει προκαλέσει η ενέργεια των κυμάτων, και αυτή η δόνηση επίσης συντελεί στο σπάσιμο των κυττάρων.

Υλικά:

Πίνακας 5: Διάλυμα λύσης

Αντιδραστήρια/συγκεντρώσεις
20mM TRIS-HCl pH 7.5
0,5% TritonX-100
250mM NaCl
3mM EDTA

*Στην ποσότητα του διαλύματος που θα χρησιμοποιηθεί προστίθενται αναστολείς πρωτεασών

Λαδικασία

Ακολουθεί λύση των κυττάρων με υπέρηχους. Ο δείκτης “amplitude” ρυθμίζεται στην τιμή 40 και ο δείκτης “cycle” ρυθμίζεται στην τιμή 0.1, 10sec λειτουργία 30 sec ηρεμία X3.

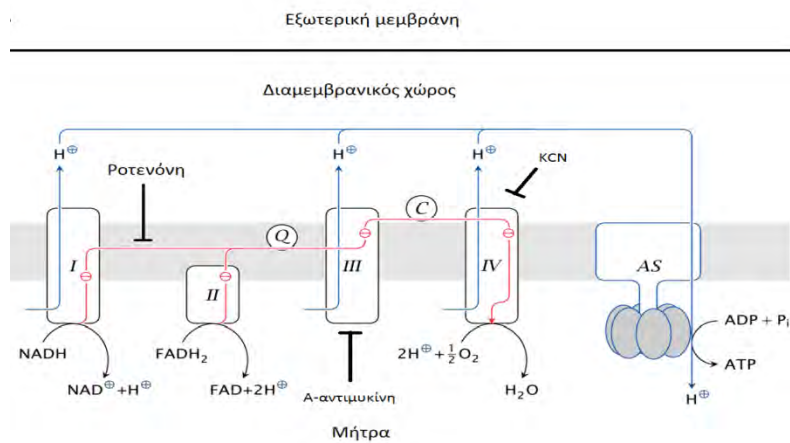
2.5 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΣΥΜΠΛΟΚΟΥ I

Η εκτίμηση της δραστηριότητας του Συμπλόκου I μπορεί να γίνει με αρκετές μεθόδους. Ο φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός αποτελεί την πιο εύχρηστη, γρήγορη και συχνότερα χρησιμοποιούμενη μέθοδο. Η πιο συμβατική μέθοδος είναι η καταγραφή της μείωσης της απορρόφησης του NADH στα 340nm ενώ μία πιο πρόσφατη μέθοδος αφορά τον προσδιορισμό της αναγωγής της 2,6 διχλωροϊνοφενόλης (DCIP).

i. Προσδιορισμός της ενζυμικής δραστηριότητας του Συμπλόκου βάσει των μεταβολών της απορρόφησης του DCIP.

Το Σύμπλοκο I (οξειδοαναγωγή του ζεύγους NADH-Q), όπως αναφέρθηκε και στην εισαγωγή, είναι το πρώτο σύμπλοκο του συστήματος της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Το Σύμπλοκο I λοιπόν αποτελεί το σημείο εισόδου για τα ηλεκτρόνια στην αναπνευστική αλυσίδα μέσω της οξείδωσης του NADH και τη μεταφορά των ηλεκτρονίων στο συνένζυμο Q. Η συγκεκριμένη μέθοδος προσδιορισμού της ενζυμικής δραστηριότητας του Συμπλόκου I βασίζεται στη μέτρηση της αναγωγής του DCIP από τη δεσουλουβικινόλη. Η δεσουλουβικινόλη αποτελεί την ανηγμένη μορφή της δεσουλουβικινόνης DQ, ενός αναλόγου του συνενζύμου Q-10. Η αναγωγή της DCIP μετράται με τη χρήση φασματοφωτόμετρου τα 600nm. Η

αντίδραση επαναλαμβάνεται με την προσθήκη ροτενόνης, η οποία αναστέλλει τη δράση του Συμπλόκου I, προκειμένου να εκτιμηθεί η ειδικότητά της (Richardetal. 2007).



Εικόνα 5: Μέθοδος για τον καθορισμό της σειράς των φορέων ηλεκτρονίων. Αυτή η μέθοδος μετρά την επίδραση αναστολέων της μεταφοράς ηλεκτρονίων στην κατάσταση οξειδωσης κάθε φορέα. Παρουσία ενός δότη ηλεκτρονίων, κάθε αναστολέας προκαλεί ένα χαρακτηριστικό πρότυπο οξειδωμένων/ανηγμένων φορέων.

Προετοιμασία αντιδραστηρίων:

- 70gr/L BSA: Η BSA αποτελεί σημαντικό συστατικό για την εκτίμηση της δραστηρότητας του Συμπλόκου I, για το λόγο αυτό είναι σημαντική η ακρίβεια στη συγκέντρωση της BSA στο μίγμα της αντίδρασης. Προκειμένου να επιτευχθεί αυτό, αρχικά φτιάχτηκε ένα διάλυμα συγκέντρωσης 80 g/ LBSA σε 5 mmol/L ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικού καλίου, pH 7.8 και μετρήθηκε φασματοφωτομετρικά η συγκέντρωση στα 280 nm (A₂₈₀ 1 g / LBSA 0,667). Τέλος, το διάλυμα αραιώθηκε σε τελική συγκέντρωση Ct: 70 gr/L.
- 0,1M KH₂PO₄ pH 7.8 : Για τη δημιουργία του ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικού καλίου, pH 7.8 δημιουργήθηκαν αρχικά δύο διαλύματα τα οποία αναμείχθηκαν σύμφωνα με την αναλογία που αναγράφεται στον παρακάτω πίνακα.

Διάλυμα A: K₂HPO₄x2H₂O με συγκέντρωση 1M

Διάλυμα B: KH₂PO₄xH₂O συγκέντρωση 1M

Πίνακας 6: Προετοιμασία 0,1M διαλύματος KH_2PO_4

pH	Όγκος από 1M K_2HPO_4 (ml)	Όγκος από 1M KH_2PO_4 (ml)
5.8	8.5	91.5
6.0	13.2	86.8
6.2	19.2	80.8
6.4	27.8	72.2
6.6	38.1	61.9
6.8	49.7	50.3
7.0	61.5	38.5
7.2	71.7	28.3
7.4	80.2	19.8
7.6	86.6	13.4
7.8	90.8	9.2
8.0	94.0	6.0

Υλικά

Πίνακας 7: Μίγμα της αντίδρασης

Αντιδραστήρια	Όγκοι/συγκεντρώσεις
0,1M KH_2PO_4 pH 7.8	247,5μl/ 25mM
70gr/L BSA	50μl/3,5gr/L
15mM DCIP	4μl/60μM
17,5mM DU	4μl/70μM
1mM A-a	1μM
dd H_2O	Μέχρι τελικό όγκο 1ml

*Στον τελικό όγκο λαμβάνονται υπόψη ο όγκος του δείγματος και του NADH που θα προστεθούν με την έναρξη της αντίδρασης

Διαδικασία:

- Τοποθετούνται σε κυψελίδα χαλαζία 880μl από το μίγμα της αντίδρασης.
- Προσθήκη 90μgr δείγματος για 3 λεπτά μέχρι να επέλθει εξισορρόπηση.

- Προστίθενται 0,3mM NADH και καταγράφεται φωτομετρικά η αναγωγή του DCIP για 3-4 min (μέτρηση ανά 15 sec).
- Προσθήκη 15μM ροτενόνης στην αντίδραση και συνέχιση της φωτομετρικής καταγραφής της αναγωγής του DCIP για 3-4 min (μέτρηση ανά 15 sec).

ii. Προσδιορισμός ενζυμικής δραστηριότητας του Συμπλόκου I βάσει των μεταβολών απορρόφησης του NADH.

Το NADH απορροφά σε λ_{max} 340 nm, ενώ η οξειδωμένη μορφή NAD^+ δεν απορροφά σε αυτό το μήκος κύματος. Με αυτόν τον τρόπο μπορεί κανείς να παρακολουθήσει την πορεία της ενζυμικής αντίδρασης, μετρώντας είτε την αύξηση είτε τη μείωση της απορρόφησης στα 340 nm, όπου το NADH οξειδώνεται. Στην αντίδραση οξείδωσης του NADH παρατηρείται μείωση της απορρόφησης στα 340 nm. Η κατανάλωση NADH είναι άμεσα σχετιζόμενη με το μέγεθος της ενζυμικής ενεργότητας της οξειδοαναγωγής του ζεύγους NADH-συνενζύμου Q. Συνεπώς, τόσο η ανωτέρω αντίδραση, όσο και η αντίδραση οποιασδήποτε άλλης αφυδρογονάσης που μετέχουν τα ανωτέρω συνένζυμα, είναι δυνατόν να προσδιοριστεί καθώς καταγράφεται η μείωση ($NADH \rightarrow NAD^+$) ή αύξηση ($NAD^+ \rightarrow NADH$) της οπτικής απορρόφησης της αντιδράσεως στα 340 nm.

Υλικά

Πίνακας 8: Μίγμα της αντίδρασης

Αντιδραστήρια	Όγκοι/συγκεντρώσεις
0,1M KH_2PO_4 pH 7.8	250 μ l/25mM
70gr/L BSA	35,7 μ l/4%
0,5M $MgCl_2$	50 μ l/25mM
1M KCN	1,7 μ l/1,7mM
1mM A-a	3,5 μ l/3,7 μ M
dd H_2O	Μέχρι τελικό όγκο 1ml

*Στον τελικό όγκο λαμβάνονται υπόψη ο όγκος του δείγματος και του NADH που θα προστεθούν με την έναρξη της αντίδρασης

Διαδικασία:

- Στο διάλυμα φωτομέτρησης προστίθενται 90μM NADH και 70μg από το δείγμα

- Το διάλυμα επωάζεται για 1 λεπτό στους 37°C
- Η αντίδραση ξεκινά με την προσθήκη 60μM συνενζύμου Q₁ στο διάλυμα
- Καταγράφεται η κατανάλωση του NADH φωτομετρικά στα 340nm για 3-4 min (μέτρηση ανά 15 λεπτά).

Η αντίδραση επαναλαμβάνεται με την προσθήκη 15μM ροτενόνης στο μίγμα πριν την επώαση. Έτσι μπορεί να διαχωριστεί η δράση του συμπλόκου I από άλλες NADH αφυδρογονάσες.

2.6 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΟΛΙΚΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΚΑΤΑ BRADFORD

Η μέθοδος βασίζεται στην ιδιότητα της χρωστικής Coomassie αλλάζει το μήκος κύματος όπου παρουσιάζει τη μέγιστη απορρόφηση όταν αλληλεπιδρά με πρωτεΐνες σε όξινο περιβάλλον. Για τη δημιουργία της πρότυπης καμπύλης χρησιμοποιήθηκε μια σειρά πρότυπων διαλυμάτων πρωτεΐνης αλβουμίνης βόειου ορού (Bovine Serum Albumin, BSA) γνωστής συγκέντρωσης. Σε όγκο 20μl από το εκάστοτε πρότυπο δείγμα, συγκέντρωσης 0-20mg/ml προστίθενται 980μl αντιδραστηρίου Bradford 1×. Τα διαλύματα (όγκου 1ml) αναδεύονται και αφήνονται για επώαση για 30min σε θερμοκρασία δωματίου, στο σκοτάδι. Μετά το πέρας των 30 λεπτών τα διαλύματα αναδεύονται καλά και φασματοφωτομετρούνται σε λ= 595nm. Οι τιμές της απορρόφησης των πρότυπων διαλυμάτων χρησιμοποιήθηκαν για το σχεδιασμό της πρότυπης καμπύλης αναφοράς.

Πίνακας 9: Συγκεντρώσεις BSA για την κατασκευή πρότυπης καμπύλης

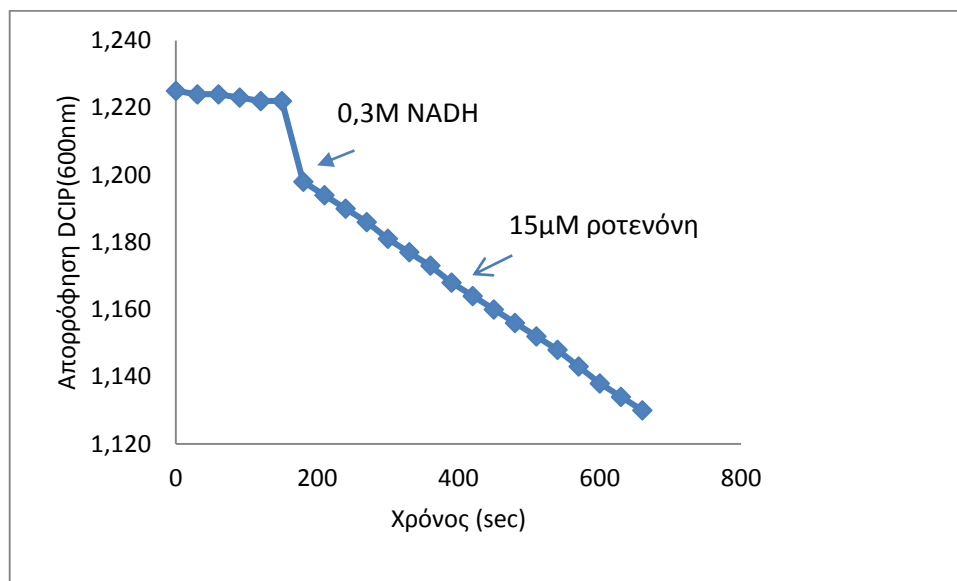
BSA 1mg/ml (μl)	Tris 10mM pH 7.4 (μl)	Αντιδραστήριο Bradford 1× (μl)	BSA (μg)	BSA (μg/ml)
0	20	980	0	0
2.5	17.5	980	2.5	2.5
5	15	980	5	5
10	10	980	10	10
15	5	980	15	15
20	0	980	20	20

μgr BSA	0	2,5	5	10	15	20
A595nm	0	0,092	0,148	0,277	0,421	0,510

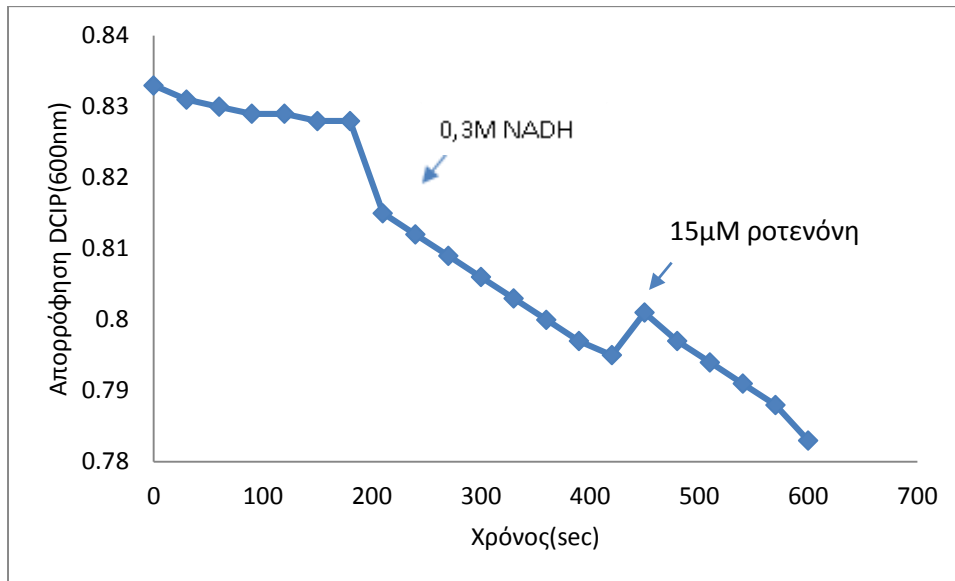
3.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στην συγκεκριμένη μελέτη πραγματοποιήθηκε εκτίμηση της ενζυμικής δραστηριότητας του Συμπλόκου I σε λεμφοκύτταρα περιφερικού αίματος 7 ασθενών που πάσχουν από σαρκοείδωση και 10 υγιών ατόμων (control). Οι ασθενείς που συμμετείχαν στην μελέτη παρακολουθούνται στην Πνευμονολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας (Π.Γ.Ν.Λ.).

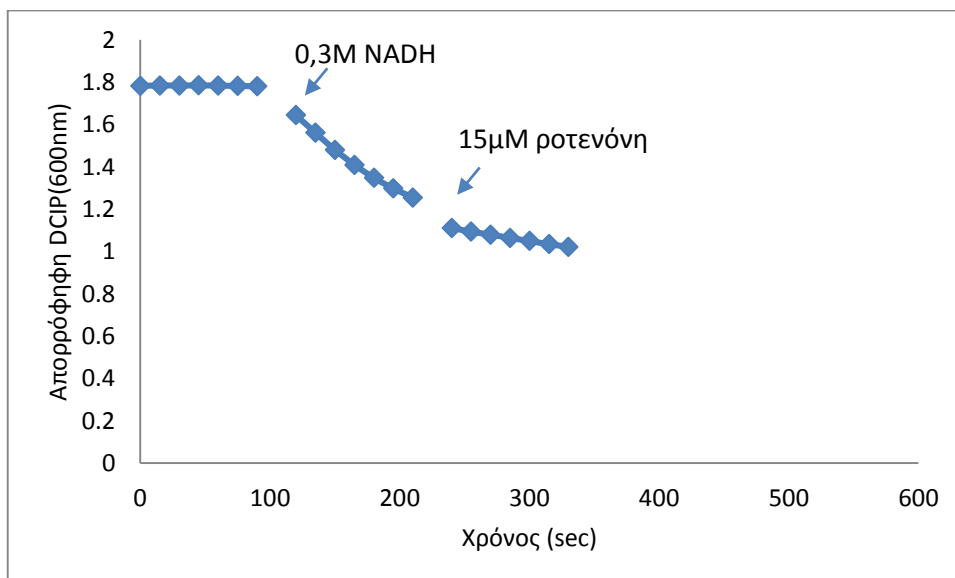
Σημαντικό σημείο της παρούσας έρευνας ήταν η ανίχνευση κατάλληλου assay για την περαιτέρω μελέτη σε ασθενείς. Έγιναν αρκετές δοκιμές τόσο σε ανθρώπινα λεμφοκύτταρα περιφερικού αίματος όσο και σε κύτταρα ήπατος και σκελετικού μυός ποντικού, κύτταρα δηλαδή τα οποία παρουσιάζουν αυξημένη μιτοχονδριακή δραστηριότητα. Οι δοκιμές πραγματοποιήθηκαν σε ολικό ομογενοποίημα κυττάρων και σε απομονωμένα μιτοχόνδρια.



Διάγραμμα 1: Μεταβολή της απορρόφησης του DCIP σε συνάρτηση με το χρόνο σε ομογενοποίημα λεμφοκυττάρων περιφερικού αίματος (50μgr δείγματος). Λύση με υπέρηχους. Η αντίδραση ξεκίνησε με την προσθήκη 0,3M NADH και η μέτρηση έγινε με το πρωτόκολλο φωτομέτρησης βάσει των μεταβολών της απορρόφησης του DCIP στα 600nm. Δεν παρατηρήθηκε αναστολή της αντίδρασης μετά από την προσθήκη 15μM ροτενόνης.

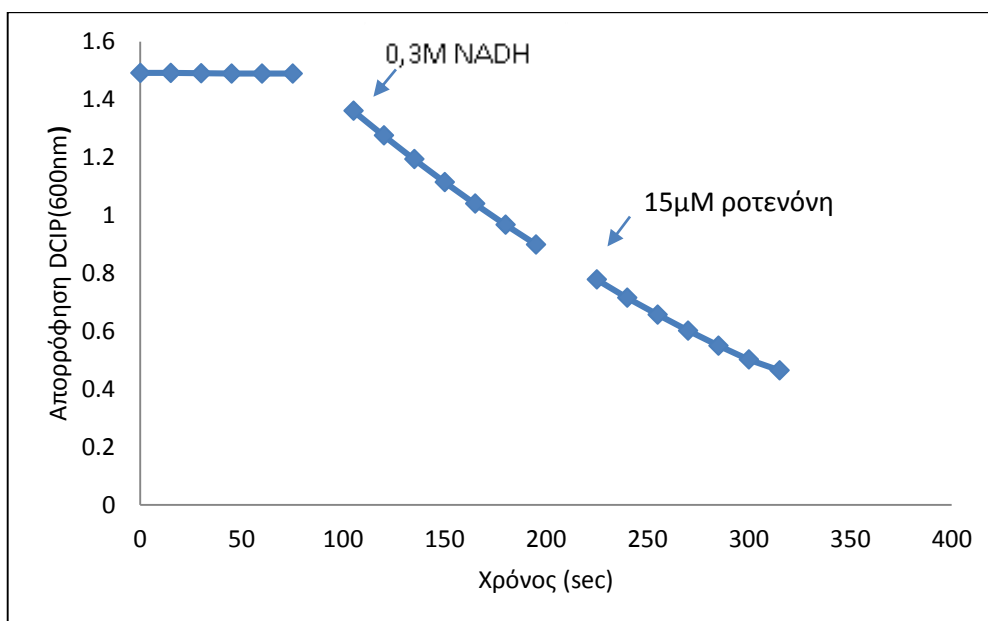


Διάγραμμα 2: Κινητική της αντίδρασης αναγωγής του DCIP σε μιτοχόνδρια λεμφοκυττάρων (50μgr δείγματος). Απομόνωση μιτοχονδρίων χωρίς DG, η λύση με υπέρηχους. Η αντίδραση ξεκίνησε με την προσθήκη NADH (σε τελική συγκέντρωση 0,3M) και η μέτρηση έγινε με το πρωτόκολλο φωτομέτρησης βάσει των μεταβολών απορρόφησης του DCIP στα 600nm. Δεν παρατηρήθηκε αναστολή της αντίδρασης μετά από την προσθήκη 15μM ροτενόνης.

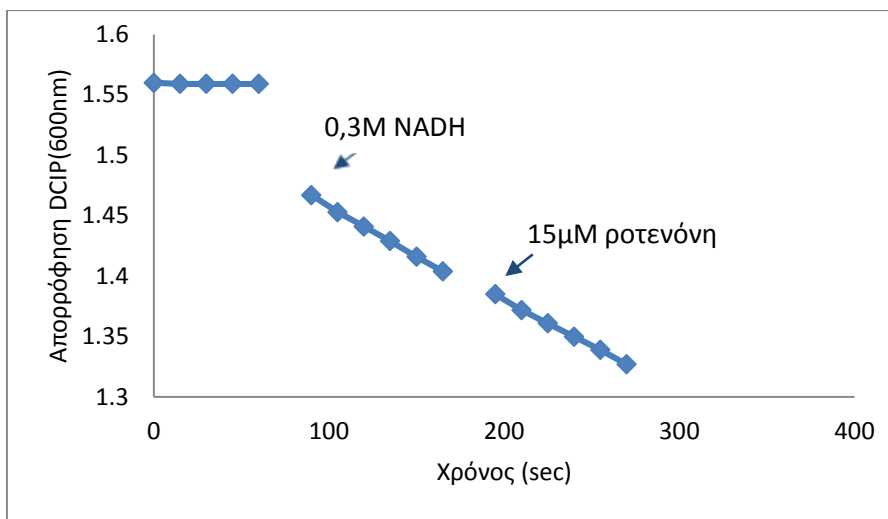


Διάγραμμα 3: Κινητική της αντίδρασης αναγωγής του DCIP σε μιτοχόνδρια από μυποντικού (120μgr δείγματος). Απομόνωση μιτοχονδρίων απουσία διγτιονίνης. Η ρήξη της μιτοχονδριακής μεμβράνης έγινε με ψύξη/απόψυξη (3 κύκλους). Η αντίδραση ξεκίνησε με

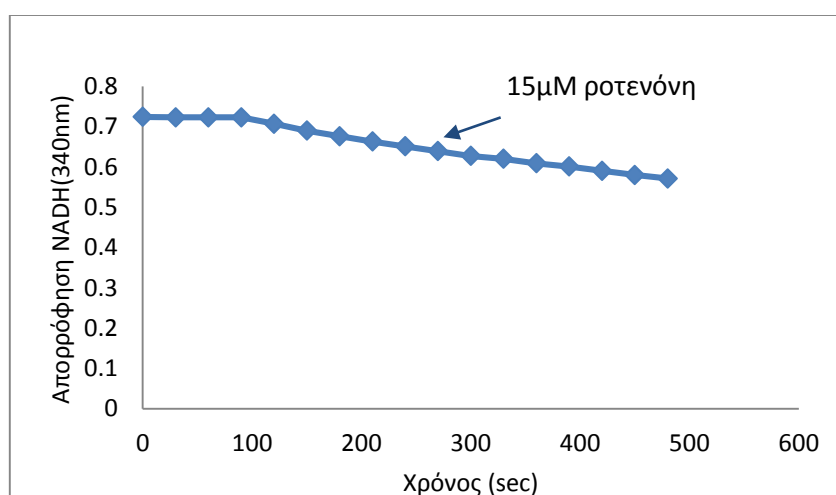
την προσθήκη NADH (σε τελική συγκέντρωση 0,3M) και ο προσδιορισμός της ενζυμικής δραστηριότητας έγινε με τον φασματοφωτομετρικό προσδιορισμό της ταχύτητας αναγωγής του DCIP στα 600nm. Η διαφορά της απορρόφησης του DCIP πριν και μετά την προσθήκη ροτενόνης αντικατοπτρίζει την ειδική ενζυμική δραστηριότητα του Συμπλόκου I. Με την προσθήκη ροτενόνης γίνεται κατά 75% αναστολή της αντίδρασης, ποσοστό που αντιστοιχεί στην ειδική ενζυμική δραστηριότητα του Συμπλόκου I. Μικρότερος κύκλος ψύξης/απόψυξης δεν έδειξε κάποιο αποτέλεσμα.



Διάγραμμα 4: Κινητική της αντίδρασης αναγωγής του DCIP σε μιτοχόνδρια από ήπαρ ποντικού(120μgr δείγματος). Απομόνωση μιτοχονδρίων χωρίς DG. Η ρήξη της μιτοχονδριακής μεμβράνης έγινε με ψύξη/απόψυξη (3 κύκλους). Η αντίδραση ξεκίνησε με την προσθήκη NADH (σε τελική συγκέντρωση 0,3M) και η εκτίμηση της ενζυμικής δραστηριότητας έγινε με το πρωτόκολλο φωτομέτρησης με το φασματοφωτομετρικό προσδιορισμό αναγωγής της απορρόφησης του DCIP στα 600nm. Δεν παρατηρήθηκε αναστολή της αντίδρασης μετά από την προσθήκη 15μM ροτενόνης.

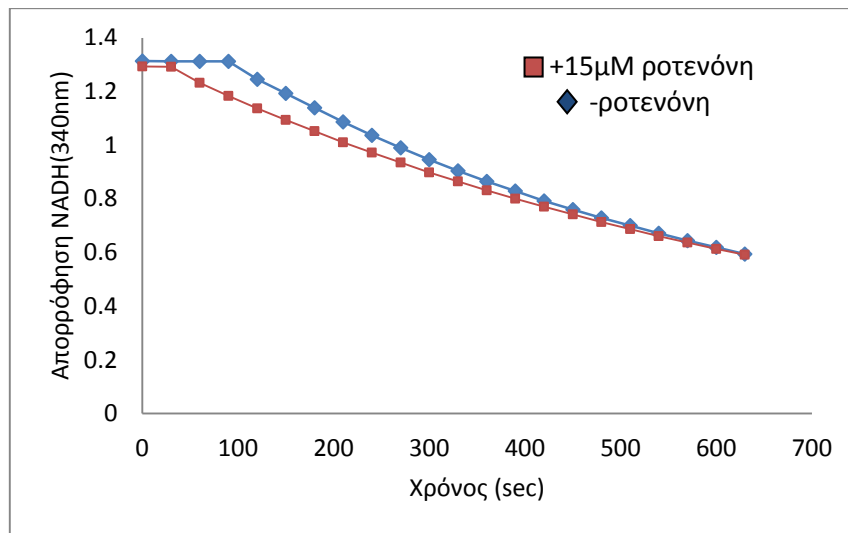


Διάγραμμα 5: Κινητική της απορρόφησης του DCIP σε ομογενοποίηση από μυοντικό(240μgr δείγματος). Απομόνωση μιτοχονδρίων χωρίς DG. Η διαπερατοποίηση έγινε με ψύξη/απόψυξη (3 κύκλους). Η αντίδραση ξεκίνησε με την προσθήκη NADH (σε τελική συγκέντρωση 0,3M) και η εκτίμηση της ενζυμικής δραστηριότητας έγινε με το πρωτόκολλο φωτομέτρησης βάσει μεταβολών της απορρόφησης του DCIP στα 600nm. Δεν παρατηρήθηκε αναστολή της αντίδρασης μετά από την προσθήκη 15μM ροτενόνης. Πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις με μικρότερη συγκέντρωση δείγματος (120 μgr) στις οποίες παρατηρήθηκε μικρότερη ταχύτητα της αντίδρασης ενώ δεν υπήρξε αναστολή με την προσθήκη ροτενόνης.

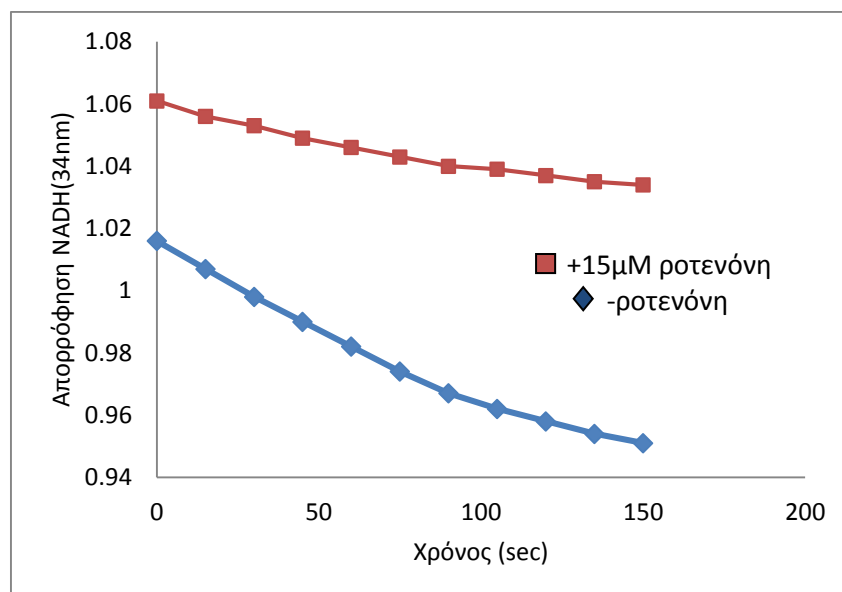


Διάγραμμα 6: Μεταβολή της απορρόφησης του NADH σε συνάρτηση με το χρόνο σε μιτοχόνδρια λεμφοκυττάρων (70μgr δείγματος). Ρήξη της μιτοχονδριακής μεμβράνης με διγιτονίνη. Η εκτίμηση της ενζυμικής δραστηριότητας έγινε με το πρωτόκολλο φωτομέτρησης βάσει μεταβολών της απορρόφησης του NADH στα 340nm. Η συγκέντρωση του NADH ήταν

90μM. Δεν παρατηρήθηκε αλλαγή στην κατανάλωση του NADH με την προσθήκη ροτενόνης (15μM).



Διάγραμμα 7: Κινητική της απορρόφησης του NADH σε μιτοχόνδρια λεμφοκυττάρων(70μgr δείγματος). Απομόνωση και διαπερατοποίηση με διγλιτονίνη. Η μέτρηση έγινε με το πρωτόκολλο φωτομέτρησης βάσει της απορρόφησης του NADH στα 340nm. Η συγκέντρωση του NADH ήταν 90mM. Στο διάγραμμα παρουσιάζονται δύο καμπύλες μία χωρίς ■ και μία με ροτενόνη (15μM). ■ Η ροτενόνη επώαστηκε με το δείγμα στους 37°C για 1,5min. Δεν παρατηρήθηκε διαφορά στην απορρόφησης του NADH.



Διάγραμμα 8: Μεταβολή της απορρόφησης του NADH σε συνάρτηση με το χρόνο σε ομογενοποίημα λεμφοκυττάρων περιφερικού αίματος (70μgr δείγματος): Η μέτρηση έγινε

με το πρωτόκολλο φωτομέτρησης βάσει των μεταβολών της απορρόφησης του NADH στα 340nm μετά από τρεις κύκλους ψύξης/απόψυξης. Η συγκέντρωση του NADH ήταν 90μM. Στο διάγραμμα παρουσιάζονται δύο καμπύλες μία χωρίς ■ και μία με ροτενόνη (15μM) ■. Η ροτενόνη επωάστηκε με το δείγμα στους 37°C για 1 min. Η διαφορά της απορρόφησης του NADH πριν και μετά την προσθήκη ροτενόνης αντικατοπτρίζει την ειδική ενζυμική δραστηριότητα του Συμπλόκου I.

Η κατανάλωση του NADH φαίνεται να είναι μεγαλύτερη σε μιτοχόνδρια στα οποία η διαπερατοποίηση πραγματοποιήθηκε με διγτονίνη (διάγραμμα 7) σε σύγκριση με την κατανάλωσή του σε ομογενοποίημα λεμφοκυττάρων (διάγραμμα 8). Ωστόσο, η ροτενόνη δείχνει να αναστέλλει την αντίδραση μόνο στο ομογενοποίημα των λεμφοκυττάρων.

Για τον προσδιορισμό της ενζυμικής δραστηριότητας του Συμπλόκου I επιλέχθηκε το πρωτόκολλο φασματοφωτομετρικού προσδιορισμού του ρυθμού οξειδωσης του NADH σε ολικό ομογενοποίημα λεμφοκυττάρων περιφερικού αίματος. Για τη διαπερατοποίηση των κυττάρων προτιμήθηκε η μέθοδος ψύξη/απόψυξη.

ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΕΙΔΙΚΗΣ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ENZYMOY

Από τη μεταβολή της απορρόφησης (ΔA) του NADH μπορεί να υπολογιστεί η ενζυμική ενεργότητα (E) με βάση τον παρακάτω τύπο:

$$E(\text{mU}) = (\Delta A \times Vt) / (t \times \epsilon \times b)$$

Όπου : ΔA : η μεταβολή στην απορρόφηση του NADH του δείγματος σε μια καθορισμένη χρονική περίοδο t (min),

ϵ : ο συντελεστής μοριακής απορρόφησης του NADH ($6.22 \times 10^3 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$),

b : το μήκος οπτικής διαδρομής

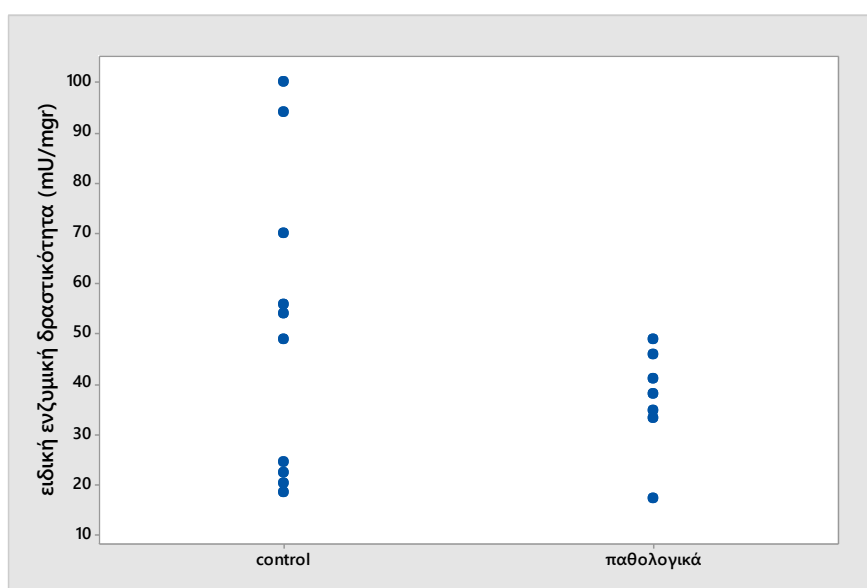
Vt : ο ολικός όγκος του μίγματος της αντίδρασης (ml),

Πίνακας 10: Ειδική ενζυμική δραστηριότητα του Συμπλόκου I

ΔΕΙΓΜΑ	ΕΙΔΙΚΗ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΧΩΡΙΣ ΡΟΤΕΝΟΝΗ	ΕΝΖΥΜΙΚΗ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΜΕ ΡΟΤΕΝΟΝΗ	ΕΙΔΙΚΗ ΕΝΖΥΜΙΚΗ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΣΥΜΠΛΟΚΟΥ I
C1	30	9,6	20,4
C2	28,14	9,7	18,4
C3	38	15,57	22,43
C4	60	4	56
Δ5	87	33	54
Δ6	188	94,2	94
C7	55,22	30,6	24,62
C8	140,8	91,85	48,95
C9	160	59,71	100,29
C10	143	71,85	70,15
Π1	54	36,7	17,3
Π2	114,8	68,8	46
Π3	121,26	80	41,26
Π4	128,6	79,5	49,1
Π5	73,7	39	34,7
Π6	82	44	38
Π7	86,2	52,8	33,35

*C: Ομάδα ελέγχου, Π: παθολογικά

Τα δείγματα που έχουν τονιστεί με κίτρινο χρώμα προέρχονται από ασθενείς οι οποίοι συμμετείχαν σε προηγούμενη μελέτη του εργαστηρίου μας, κατά την οποία παρατηρήθηκε αυξημένη συχνότητα μεταλλάξεων στα mt-tRNA γονίδια σε ασθενείς με σαρκοείδωση.



Διάγραμμα 9: Σύγκριση της δραστηριότητας του Συμπλόκου I ανάμεσα σε μία ομάδα ελέγχου ($N_1=10$) και μία ομάδα κλινικών δειγμάτων ($N_2=7$) οι μέσες τιμές ήταν αντίστοιχα $\mu_1=55,05$ ($SD=28,59$) και $\mu_2=37,1$ ($SD=10,43$).

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η σαρκοείδωση είναι μια αυτοάνοση διαταραχή που προκαλεί μη τυροειδοποιημένα κοκκιώματα σε ένα ή περισσότερα όργανα με μεγαλύτερη συχνότητα τους πνεύμονες. Ένας σημαντικός αριθμός μελετών υποστηρίζει το ρόλο του οξειδωτικού στρες στην παθογένεση της νόσου, ενώ πιο συγκεκριμένα, υπάρχουν ενδείξεις της συμβολής του οξειδωτικού στρες στον σχηματισμό των κοκκιωμάτων. Όπως είναι γνωστό τα μιτοχόνδρια παράγουν μεγάλες ποσότητες ROS ως παραπροϊόντα της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Η αναπνευστική αλυσίδα των μιτοχονδρίων αποτελεί λοιπόν το μείζων σημείο παραγωγής ROS στο κύτταρο. Στη δημιουργία των κοκκιωμάτων φαίνεται επίσης να συμμετέχουν και αντιαποπτωτικοί μηχανισμοί. Η απόπτωση είναι μία καλά ρυθμισμένη διαδικασία η οποία περιλαμβάνει μία σειρά από ATP-εξαρτώμενα στάδια. Δυσλειτουργία της αναπνευστικής αλυσίδας θα μπορούσε να επιφέρει αρνητικές επιπτώσεις στην παραγωγή ATP ενισχύοντας την αντιαποπτωτική δράση και επιβίωση των κοκκιωμάτων. Οι παραπάνω παρατηρήσεις καθιστούν τα σύμπλοκα της αναπνευστικής αλυσίδας των μιτοχονδρίων ιδιαίτερα ελκυστικό στόχο μελέτης.

Το Σύμπλοκο I αποτελεί το πρώτο από τα πέντε σύμπλοκα της αναπνευστικής αλυσίδας των μιτοχονδρίων και η έλλειψη της δραστηριότητάς του αποτελεί πιθανόν την συχνότερη αιτία μιτοχονδριακών ασθενειών, ενώ έχει παρατηρηθεί αντίστροφη σχέση λειτουργικότητάς του και παραγωγής προϊόντων υπεροξειδίου (Janssen RJ.etal.2006; Vercaat S.etal.2007). Στην παρούσα έρευνα επιχειρήσαμε να μελετήσουμε την ενζυμική δραστηριότητα του Συμπλόκου I σε λεμφοκύτταρα περιφερικού αίματος ασθενών με σαρκοείδωση και σε σύγκριση με υγιή άτομα. Αρχικός στόχος ήταν η ανίχνευση κατάλληλου πρωτοκόλλου για τον φασματοφωτομετρικό προσδιορισμό της ενζυμικής δραστηριότητας.

Το Σύμπλοκο I λοιπόν αποτελεί το σημείο εισόδου για τα ηλεκτρόνια στην αναπνευστική αλυσίδα μέσω της οξείδωσης του NADH και τη μεταφορά των ηλεκτρονίων στο συνένζυμο Q. Αρχικά, χρησιμοποιήθηκε ένα πρωτόκολλο με βάση τον προσδιορισμό αναγωγής της 2,6 διχλωροϊνοφενόλης (DCIP) από τη δεσουλουβικινόλη. Η δεσουλουβικινόλη αποτελεί την ανηγμένη μορφή της δεσουλουβικινόνης DQ, ενός αναλόγου του συνενζύμου Q-10. Η αναγωγή του DCIP μετράται φασματοφωτομετρικά με προσδιορισμό απορρόφησης στα 600nm. Η αντίδραση επαναλαμβάνεται με την προσθήκη ροτενόνης, η οποία αναστέλλει τη δράση του Συμπλόκου I, προκειμένου να εκτιμηθεί η ειδικότητά της (de Wit LE.etal.2009).

Δοκιμή της συγκεκριμένης τεχνικής έγινε σε λεμφοκύτταρα περιφερικού αίματος και σε κύτταρα από σκελετικό μυ και ήπαρ ποντικού. Από τους παραπάνω τύπους κυττάρων χρησιμοποιήθηκε τόσο ολικό κυτταρικό εκχύλισμα όσο και εμπλουτισμένο εκχύλισμα μιτοχονδρίων.

Ωστόσο, με το πρωτόκολλο αυτό δεν παρατηρήθηκε διαφορά στην απορρόφηση του DCIP με την προσθήκη ροτενόνης τόσο σε ολικό εκχύλισμα λεμφοκυττάρων όσο και σε μιτοχόνδρια. Εκτίμηση της ειδικής ενζυμικής δραστηριότητας του Συμπλόκου I παρατηρήθηκε μόνο σε εμπλουτισμένο εκχύλισμα μιτοχονδρίων σκελετικού μυός ποντικού. Η λύση του δείγματος πραγματοποιήθηκε με τρεις κύκλους ψύξης/απόψυξης. Η λύση με υπέρηχους, αν και είναι πιο αποτελεσματική μέθοδος διαπερατοποίησης της μιτοχονδριακής μεμβράνης αυξάνοντας την ευαισθησία του Συμπλόκου I στη ροτενόνη, είναι πιθανό να επηρεάζει την ακεραιότητα των μιτοχονδρίων (LongJ.etal.2009). Επιπλέον, μελέτες έχουν δείξει πως η DQ στην ανηγμένη της μορφή μπορεί να λειτουργήσει ανασταλτικά στη δράση του Συμπλόκου I (BenitP.etal.2008). Για το λόγο αυτό έγινε δοκιμή ενός πρωτοκόλλου στο οποίο ως ανάλογο ουβικινόνης χρησιμοποιείται το συνένζυμο Q1 (CoQ1). Ωστόσο, η επιλογή του συνενζύμου φαίνεται να επηρεάζει την ανασταλτική δράση της ροτενόνης καθώς μελέτες υποδεικνύουν την αυξημένη δράση της παρουσία DQ σε σύγκριση με το συνένζυμο Q1 (70% vs 60% αντίστοιχα) (FatoR.etal.2009).

Η εκτίμηση της ενζυμικής δραστηριότητας στο πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε, γίνεται μέσω της μέτρησης της απορρόφησης του NADH στα 340nm (JanssenAJ.etal.2007). Αρχικά, επιχειρήθηκε η δοκιμή του σε εμπλουτισμένο εκχύλισμα μιτοχονδρίων από λεμφοκύτταρα, η παρασκευή και διαπερατοποίηση του οποίου έγινε με τη χρήση DG, αλλά δεν παρατηρήθηκε διαφορά στην κατανάλωση του NADH πριν και μετά την προσθήκη ροτενόνης. Αντιθέτως, η ροτενόνη φάνηκε να αναστέλλει κατά ένα σημαντικό ποσοστό τη λειτουργία του συμπλόκου Ι σε ολικό ομογενοποίημα λεμφοκυττάρων. Η λύση των δειγμάτων έγινε με τρεις κύκλους ψύξης/απόψυξης. Ωστόσο, η κατανάλωση του NADH ήταν μεγαλύτερη σε μιτοχόνδρια απομονωμένα με DG, είναι πιθανό βελτίωση της απομόνωσης των μιτοχονδρίων να μπορέσει να αυξήσει την ευαισθησία της συγκεκριμένης τεχνικής.

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε εκτίμηση της ενζυμικής δραστηριότητας του Συμπλόκου I σε λεμφοκύτταρα περιφερικού αίματος 7 ασθενών που πάσχουν από σαρκοείδωση και 10 υγιών ατόμων (control). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν τρεις από του ασθενείς, οι οποίοι συμμετείχαν σε προηγούμενη μελέτη του εργαστηρίου μας κατά την οποία παρατηρήθηκε

αυξημένη συχνότητα μεταλλάξεων σε μιτοχονδριακά t-RNAγονίδια αλλά και σε γονίδια παρακείμενων περιοχών σε ασθενείς με σαρκοείδωση. Και στους τρεις ασθενείς ανιχνεύθηκαν μεταλλάξεις στα mt-tRNA(ThrG15928A, ArgT10463C, Leu(CUN) A12308G) οι οποίες έχουν αναφερθεί σε ασθένειες όπως η νόσος Alzheimer, καρδιαγγειακές παθήσεις και στην αύξηση κινδύνου εμφάνισης εγκεφαλικού επεισοδίου (Grasbon-FrodIEM.etal.1999; LiuY.etal.2016; PulkesT.etal.2000). Εκτός από τις μεταλλάξεις στα mt-tRNA, ένας από τους ασθενείς έφερε μετάλλαξη στο γονίδιο nd2 (ND2 T5495G). Το ND2είναι ένα από τα 7 μιτοχονδριακά γονίδια του Συμπλόκου I. Μεταλλάξεις του mt-ND2 έχουν προταθεί για τη συμμετοχή τους στην ενίσχυση της κυτταρικής αύξησης και στη δυνατότητα επέκτασης (ZhankC.etal.2012).

Τα αποτελέσματά μας έδειξαν ένα πλεονέκτημα της λειτουργικότητας του Συμπλόκου I σε υγιείς δότες σε σύγκριση με άτομα που φέρουν τη νόσο. Απαιτείται ωστόσο, ανάλυση μεγαλύτερου αριθμού δειγμάτων για τη διεξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων αφενός για τη συσχέτιση της ενζυμικής ενεργότητας του Συμπλόκου I και της ύπαρξης μεταλλάξεων στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα και αφετέρου την αποσαφήνιση του ρόλου των μιτοχονδρίων στη παθογένεση της νόσου.

6. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα μιτοχόνδρια είναι ημιαυτόνομα κυτταρικά οργανίδια με πρωταρχική λειτουργία την παραγωγή ενέργειας στο κύτταρο. Στη διάρκεια των τελευταίων ετών έχει προταθεί ο ρόλος των μιτοχονδριακών δυσλειτουργιών σε φλεγμονώδεις πνευμονολογικές διαταραχές, καθώς έχουν παρατηρηθεί μεταλλάξεις των μιτοχονδριακών t-RNA γονιδίων σε ασθένειες όπως η πνευμονική ίνωση, το άσθμα και η σαρκοείδωση. Η σαρκοείδωση πρόκειται για μια αυτοάνοση διαταραχή που προκαλεί μη τυροειδοποιημένα κοκκιώματα σε ένα ή περισσότερα όργανα με μεγαλύτερη συχνότητα τους πνεύμονες. Μεταλλάξεις στα mt-tRNA μπορούν να προκαλέσουν δυσλειτουργία των συμπλόκων της αναπνευστικής αλυσίδας με πιθανή συνέπεια την αύξηση της παραγωγής mt-ROS που με τη σειρά τους συμβάλλουν στον σχηματισμό του κοκκιώματος και στην επαγωγή της φλεγμονής που παρατηρούνται στην σαρκοείδωση. Στην παρούσα έρευνα επιχειρήσαμε να διερευνήσουμε την πιθανή συσχέτιση λειτουργικότητας της αναπνευστικής αλυσίδας των μιτοχονδρίων με την εμφάνιση της νόσου. Για το σκοπό έγινε συγκριτική μελέτη προσδιορισμού της ενζυμικής δραστηριότητας της οξειδοαναγωγής του ζεύγους NADH-Q (Σύμπλοκο I) σε λεμφοκύτταρα από περιφερικό αίμα ατόμων που πάσχουν από τη συγκεκριμένη νόσο καθώς και σε υγιή άτομα. Η εκτίμηση της δραστηριότητας της οξειδοαναγωγής του Συμπλόκου I επιτεύχθηκε με φασματοφωτομετρικό προσδιορισμό της οξείδωσης του NADH από το Σύμπλοκο I, αντίδραση η οποία αναστέλλεται από ροτενόνη. Συμπερασματικά, παρόλο που η έρευνά μας βρίσκεται ακόμα σε αρχικό στάδιο, παρουσιάζεται μία ένδειξη μειωμένης λειτουργικότητας του Συμπλόκου I σε ασθενείς με σαρκοείδωση συγκριτικά με τα υγιή άτομα.

7. ABSTRACT

Mitochondria are semi-autonomous cellular organelles and their primary function is energy production in cell. During the last years, a number of studies suggest that mitochondrial dysfunction plays a role in inflammatory disorders of the lungs. Specifically, has been observed association between mitochondrial t-RNA mutations and disorders such as fibrosis, asthma and sarcoidosis. Sarcoidosis is a systemic inflammatory disease with a predilection for the respiratory system. Mutations in mt-tRNA can cause dysfunction of respiratory chain complexes resulting in increased production of mt-ROS which contribute to granuloma formation and induction of inflammation in sarcoidosis. In this study, we examined the function of mitochondrial respiratory chain in patients with sarcoidosis through the assessment of NADH:Ubiquinone Oxidoreductase (ComplexI) activity. ComplexI is the first of the four complexes of mitochondrial respiratory chain and its deficiency is probably the most common enzyme defect among the group of OXPHOS disorders. To evaluate a deficiency of Complex I activity we used a spectrophotometric assay measuring rotenone-sensitive NADH oxidation by Complex I in lymphocytes from peripheral blood of patients and health people. In conclusion, although our research is still in a basic stage, we observed an indication of reduced activity of ComplexI in patients with sarcoidosis compared to healthy population.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Bardinas F, Morera J, Fite E, Plasencia A. Seasonal clustering of sarcoidosis. *Lancet* 1989; 2: 455–56.
- Barnes P.J, Adcock I.M, K. Ito Histone acetylation and deacetylation: importance in inflammatory lung diseases *Eur Respir J*, 25 (2005), pp. 552–563
- Baughman R.P, Lower E.E, G. Pierson, S. Strohofer Spontaneous hydrogen peroxide release from alveolar macrophages of patients with active sarcoidosis: comparison with cigarette smokers *J Lab Clin Med*, 111 (1988), pp. 399–404
- Bellocq A, Azoulay E, Marullo S, Flahault A, Fouqueray B, Philippe C et al (1999) Reactive oxygen and nitrogen intermediates increase transforming growth factor-beta1 release from human epithelial alveolar cells through two different mechanisms. *Am J Respir Cell Mol Biol* 21(1):128–136
- Bénit P, Slama A, Rustin P. Decylubiquinol impedes mitochondrial respiratory chain complex I activity. *Mol Cell Biochem*. 2008 Jul;314(1-2):45-50.
- Boots AW, Drent M, Swennen EL, Moonen HJ, Bast A, Haenen GR (2009) Antioxidant status associated with inflammation in sarcoidosis: a potential role for antioxidants. *Respir Med* 103(3):364–372
- Boots AW, Drent M, de Boer VC, Bast A, Haenen GR (2011) Quercetin reduces markers of oxidative stress and inflammation in sarcoidosis. *Clin Nutr* 30(4):506–512, Epub 2011/02/18
- Brandon M., Baldi P., Wallace D.C. Mitochondrial mutations in cancer. *Oncogene* 2006; 25:4647-4662.
- Bulfone-Paus S, Ungureanu D, Pohl T, et al. Interleukin-15 protects from lethal apoptosis in vivo. *Nature Med* 1997; 3:1124–8.
- Carroll J, Fearnley IM, Skehel JM, Shannon RJ, Hirst J, Walker JE. Bovine complex I is a complex of forty-five different subunits. *J Biol Chem* 2006;281:32724-27.
- Casatella MA, Berton G, Agostini C, Zambelo R, Trentin I, Cipriani A, Semenzato G. Generation of superoxide anion by alveolar macrophages in sarcoidosis: evidence for the activation of the oxygen metabolism in patients with high-intensity alveolitis. *Immunology* 1989; 66:451-458

- Culver DA, Barna BP, Raychaudhuri B, Bonfield TL, Abraham S, Malur A et al (2004) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activity is deficient in alveolar macrophages in pulmonary sarcoidosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 30(1):1–5
- Distelmaier F, Koopman WJ, vandenHeuvel LP, Rodenburg RJ, Mayatepek E, Willemis PH, et al Mitochondrial complex I deficiency: from organelle dysfunction to clinical disease. *Brain* 2009;132:833-42.
- Drent M, van den Berg R, Haenen GR, van den Berg H, Wouters EF, Bast A (2001) NF-kappaB activation in sarcoidosis. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis* 18(1):50–56
- Facco M, Cabrelle A, Teramo A, Olivieri V, Gnoato M, Teolato S, et al. Sarcoidosis is a Th1/Th17 multisystem disorder. *Thorax* (2011) 66(2):144
- Fato R, Bergamini C, Bortolus M, Maniero AL, Leoni S, Ohnishi T, Lenaz G. Differential effects of mitochondrial Complex I inhibitors on production of reactive oxygen species. *Biochim Biophys Acta*. 2009 May;1787(5):384-92.
- Gasparre G., Porcelli A.M., Bonora E., Pennisi L.F., Toller M., Iommarini L., Ghelli A., Moretti M., Betts C.M., Martinelli G.N., et al. Disruptive mitochondrial DNA mutations in complex I subunits are markers of oncocytic phenotype in thyroid tumors. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 2007;104:9001-9006.
- Grasbon-Frodl EM, Kösel S, Sprinzi M, von Eitzen U, Mehraein P, Graeber MB. Two novel point mutations of mitochondrial tRNA genes in histologically confirmed Parkinson disease. *Neurogenetics*. 1999 Apr;2(2):121-7.
- Haddad J.J. Oxygen-sensing mechanisms and the regulation of redox-responsive transcription factors in development and pathophysiology *Respir Res*, 3 (2002), p. 26
- Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radicals in biology and medicine*. Oxford: Oxford University Press, 1999: 246-350.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. In: Parker L, Glazer AN, eds. *Methods in Enzymology*. San Diego: Academic Press Inc., 1990; 186: 1-85.
- Harris RO 3rd, Spock A. Childhood sarcoidosis: pulmonary infiltrates as an early sign in a very young child. *Clin Pediatr (Phila)*. 1978 Feb; 17(2):119-21.
- Hernandez-Pando R, Bornstein QL, Aguilar Leon D, Orozco EH, Madrigal VK, Martinez Cordero E. Inflammatory cytokine production by immunological and foreign body multinucleated giant cells. *Immunology* 2000; 100:352-8.

- Hosoda Y, Hiraga Y, Odaka M, et al. A cooperative study of sarcoidosis in Asia and Africa: analytic epidemiology. *Ann N Y Acad Sci* 1976; 278: 355–67.
- Hu Y , Benedict MA, Ding L & Nunez G. 1999 ; Role of cytochrome *c* and dATP/ATP hydrolysis in Apaf-1-mediated caspase-9 activation and apoptosis. *EMBO J*. 18: 3586–3595.
- Ivanisevic J, Kotur-Stevuljevic J, Stefanovic A, Jelic-Ivanovic Z, Spasic S, Videnovic-Ivanov J et al (2012) Dyslipidemia and oxidative stress in sarcoidosis patients. *Clin Biochem* 45(9):677–682, Epub 2012/03/28
- Janssen AJ, Trijbels FJ, Sengers RC, Smeitink JA, van den Heuvel LP, Wintjes LT, Stoltenberg-HogenkampBJ, RodenburgRJ. Spectrophotometric assay for complex I of the respiratory chain in tissue samples and cultured fibroblasts. *Clin Chem*. 2007 Apr;53(4):729-34.
- Janssen RJ, Nijtmans LG, van den Heuvel LP, Smeitink JA Mitochondrial complex I: structure, function and pathology *J Inherit Metab Dis*. 2006 Aug;29(4):499-515
- Kass GEN, Eriksson JE, Weis M, Orrenius S & Chow SC. 1996; Chromatin condensation during apoptosis requires ATP. *Biochem. J*. 318: 749–752.
- Kjellin H, Silva E, Branca R, Eklund A, Jakobsson PJ, Grunewald J, Wheelock ÅM. Alterations in the membrane-associated proteome fraction of alveolar macrophages in sarcoidosis. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis*. 2016 Mar 29;33(1):17-28
- Koutsokera A¹, Papaioannou AI, Malli F, Kiropoulos TS, Katsabeki A, Kerenidi T, Gourgoulianis KI, Daniil ZD. Systemic oxidative stress in patients with pulmonary sarcoidosis. *Pulm Pharmacol Ther*. 2009 Dec; 22(6):603-7.
- Kriegova E, Fillerova R, Tomankova T, Hutyrova B, Mrazek F, Tichy T, et al. T-helper cell type-1 transcription factor T-bet is upregulated in pulmonary sarcoidosis. *Eur Respir J* (2011) 38(5):1136–4410
- Liu RM (2008) Oxidative stress, plasminogen activator inhibitor 1, and lung fibrosis. *Antioxid Redox Signal* 10(2):303–319
- Liu Y, Li Y, Wang X, Ma Q, Zhu C, Li Z, Yin T, Yang J, Chen Y, Guan M. Mitochondrial tRNA mutations in Chinese hypertensive individuals. *Mitochondrion*. 2016 May;28:1-7.

- Long J, Ma J, Luo C, Mo X, Sun L, Zang W, Liu J. Comparison of two methods for assaying complex I activity in mitochondria isolated from rat liver, brain and heart. *Life Sci.* 2009 Aug 12;85(7-8):276-80.
- López-Armada MJ, Caramés B, Lires-Deán M, Cillero-Pastor B, Ruiz-Romero C, Galdo F, Blanco FJ Cytokines, tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta, differentially regulate apoptosis in osteoarthritis cultured human chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage.* 2006 Jul; 14(7):660-9.
- Ma Y, Gal A, M.N. Koss The pathology of pulmonary sarcoidosis: update *Semin Diagn Pathol*, 24 (2007), pp. 150–161
- Markart P, Luboinski T, Korfei M, Schmidt R, Wygrecka M, Mahavadi P et al (2009) Alveolar oxidative stress is associated with elevated levels of non-enzymatic low-molecular-weight antioxidants in patients with different forms of chronic fibrosing interstitial lung diseases. *Antioxid Redox Signal* 11(2):227–240
- Mermigkis C, Polychronopoulos V, Mermigkis D, Tsakanika K, Heretis M, Karagianidis N, Bouros D, Overexpression of bcl-2 protein in bronchoalveolar lavage lymphocytes and macrophages in sarcoidosis. *Respiration.* 2006;73(2):221-6.
- Muller-Quernheim J.Sarcoidosis: immunopathogenetic concepts and their clinical application *Eur Respir J*, 12 (1998), pp. 716–738
- Panayias S, Theodorakopoulos P, Bouras A, Constantopoulos S.Seasonal occurrence of sarcoidosis in Greece. *Lancet* 1991; 338:510–11.
- Peletidou S, Zifa E, Grammatikopoulos A, Malli F, Bardaka F, Gourgoulianis K, Mamuris Z, Daniil Z. ‘Mitochondrial tRNA gene mutations in patients with idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) and sarcoidosis’; *European Respiratory Journal* (2014)
- Pulkes T, Sweeney MG, Hanna MG. Increased risk of stroke in patients with the A12308G polymorphism in mitochondria. *Lancet.* 2000 Dec 16;356(9247):2068-9.
- Rahman I (2002) Oxidative stress, transcription factors and chromatin remodelling in lung inflammation. *Biochem Pharmacol* 64(5–6):935–942.
- Richter C, Schweizer M, Cossarizza A & Franceschi C. 1996; Control of apoptosis by the cellular ATP level. *FEBS Lett.* 378: 107–110.

- Shigehara K, Shijubo N, Ohmichi M, Takahashi R, Kon S, Okamura H, et al. IL-12 and IL-18 are increased and stimulate IFN-gamma production in sarcoid lungs. *J Immunol* (2001) 166(1):642–9
- Stridh H, Planck A, Gigliotti D, Eklund A, Grunewald J Apoptosis resistant bronchoalveolar lavage (BAL) fluid lymphocytes in sarcoidosis *Thorax*. 2002 Oct;57(10):897-901.
- Stridh H¹, Cotgreave I, Müller M, Orrenius S, Gigliotti D Organotin-induced caspase activation and apoptosis in human peripheral blood lymphocytes *Chem Res Toxicol*. 2001 Jul; 14(7):791-8
- Tagaya Y, Bamford RN, DeFilippis AP, et al. IL-15: a pleiotropic cytokine with diverse receptor/signaling pathway whose expression is controlled at multiple levels. *Immunity* 1996;4: 329–36.
- Thomas KW, Hunninghake. Sarcoidosis. *JAMA*. 2003 Jun 25;289(24):3300-3
- Valdivieso AG, Clauzure M, Marín MC, Taminelli GL, Massip Copiz MM, Sánchez F, Schulman G, Teiber ML, Santa-Coloma TA The mitochondrial complex I activity is reduced in cells with impaired cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) function. *PLoS One*. 2012; 7(11):e48059.
- Vercaart S, KoopmanWJ, van Emst-de Vries SE, Nijtmans LG, Smeitink JA, Willems PH (2007) Superoxide production is inversely related to complex I activity in inherited complex I deficiency *Biochim Biophys Acta* 2007 Mar;1772(3):373-81
- Wong, L.J., 2007. Pathogenic mitochondrial DNA mutations in protein-coding genes. *Muscle Nerve* 36, 279–293.
- Xaus J, Cardó M, Valledor AF, Soler C, Lloberas J, Celada A Interferon gamma induces the expression of p21waf-1 and arrests macrophage cell cycle, preventing induction of apoptosis. *Immunity*. 1999 Jul;11(1):103-13.
- Xaus J, Comalada M, Cardó M, Valledor AF, Celada A. Decorin inhibits macrophage colony-stimulating factor proliferation of macrophages and enhances cell survival through induction of p27 (Kip1) and p21(Waf1) *Blood*. 2001 Oct 1;98(7):2124-33
- Xaus J, Besalduch N, Comalada M, Marcoval J, Pujol R, Mañá J, Celada A High expression of p21 Waf1 in sarcoid granulomas: a putative role for long-lasting inflammation *J Leukoc Biol*. 2003 Aug;74(2):295-301

- Zell R, Geck P, Werdan K, Boekstegers P. TNF-alpha and IL-1 alpha inhibit both pyruvate dehydrogenase activity and mitochondrial function in cardiomyocytes: evidence for primary impairment of mitochondrial function. *Mol Cell Biochem.* 1997 Dec; 177(1-2):61-7.
- Zeviani M, Di Donato S. Mitochondrial disorders. *Brain* 2004; 127:2153:72.
- Zhang C, Huang VH, Simon M, Sharma LK, Fan W, Haas R, Wallace DC, Bai Y, Huang T. Heteroplasmic mutations of the mitochondrial genome cause paradoxical effects on mitochondrial functions. *FASEB J.* 2012 Dec; 26(12):4914-24.
- Zifa E, Giannouli S, Theotokis P, Stamatis C, Mamuris Z & Stathopoulos C. Mitochondrial tRNA Mutations: Clinical and Functional Perturbations (2007) *RNA Biology*, 4:1, 38-66