

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

b. biochim

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ-ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ
ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ ΣΕ
ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΑ tRNA
ΓΟΝΙΔΙΑ ΑΠΟ ΑΣΘΕΝΕΙΣ
ΜΕ ΠΟΙΚΙΛΑ ΚΛΙΝΙΚΑ
ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΑ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Πασχάλης Θεοτόκης

ΛΑΡΙΣΑ 2007



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

Αριθ. Εισ.: 5917/1
Ημερ. Εισ.: 11-03-2009
Δωρεά: Π.Θ.
Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ
2007
ΘΕΟ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087353

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Γενετικής,
Συγκριτικής & Εξελικτικής Βιολογίας του τμήματος Βιοχημείας &
Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κατά το έτος 2006-2007,
υπό την επίβλεψη και καθοδήγηση της κ. Αιμιλίας Ζίφα

Η τριμελής εξεταστική επιτροπή αποτελείται από τους :

Αιμιλία Ζίφα, Επίκουρος Καθηγήτρια Βιολογίας / Νευροβιολογίας,
Τμήμα Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας.

Κωνσταντίνος Σταθόπουλος, Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας,
Τμήμα Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας.

Ζήσης Μαμούρης, Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών,
Τμήμα Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ:

τον καθηγητή μου κ. Κ. Σταθόπουλο για την πολύτιμη βοήθεια του σε όλες τις φάσεις της μελέτης

και τον υποψήφιο διδάκτορα Κ. Σταμάτη για τις συμβουλές και την όλη επιστημονική υποστήριξη κατά την διάρκεια των πειραμάτων

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΠΕΡΙΛΗΨΗ / ABSTRACT	4
2. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	6
2.1 ΔΟΜΗ, ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ & ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ ΤΟΥ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΟΥ....	6
2.2 ΤΟ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑ & Η ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΟΥ.....	11
2.2.1 Αντιγραφή του mtDNA	12
2.2.2 Μεταγραφή του mtDNA.....	13
2.2.3 Μιτοχονδριακή πρωτεϊνοσύνθεση.....	14
2.3 ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΒΑΣΗ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΩΝ ΑΣΘΕΝΕΙΩΝ	14
2.3.1 Μεταλλάξεις που έχουν συνδεθεί με ασθένειες στον άνθρωπο.....	15
2.3.1.1 Σε μιτοχονδριακά tRNA γονίδια.....	15
2.3.1.2 Σε rRNA και κωδικές περιοχές	20
2.3.1.3 Σε πυρηνικά γονίδια	21
2.3.2 Κλινικός φαινότυπος των μιτοχονδριακών ασθενειών	21
2.4 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	29
3. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ.....	30
3.1 ΔΕΙΓΜΑΤΑ	30
3.2 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA.....	31
3.3 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ	33
3.4 ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥ ΜΟΝΟΚΛΩΝΗΣ ΑΛΥΣΙΔΑΣ.....	37
3.5 ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗ.....	41
3.6 ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΣ ΜΗΚΟΥΣ ΤΜΗΜΑΤΩΝ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΥ.....	44
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	46
4.1 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΤΩΝ ΠΗΚΤΩΜΑΤΩΝ SSCP.....	46
4.2 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗΣ.....	47
4.3 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΝΕΑΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΗΣ G3337A.....	50
4.4 ΑΝΑΛΥΣΗ ΕΠΙΠΕΔΟΥ ΕΤΕΡΟΠΛΑΣΜΙΑΣ.....	52
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	54
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	58

1. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα τελευταία χρόνια σύνδρομα με βαριά κλινικά συμπτώματα όπως το MELAS και το MERRF έχουν συνδεθεί με την ανίχνευση μεταλλάξεων σε συγκεκριμένα μιτοχονδριακά γονίδια που κωδικοποιούν μόρια tRNA. Το γονίδιο το οποίο συγκεντρώνει τις περισσότερες σε αριθμό αναφερόμενες μεταλλάξεις, είναι αυτό του tRNA^{Leu(UUR)} (*MT-TL1*). Δεδομένης της σημασίας των μορίων tRNA στη μιτοχονδριακή πρωτεϊνοσύνθεση μελετήθηκε σε μία ομάδα 32 ασθενών με ποικίλα κλινικά συμπτώματα η ύπαρξη μεταλλάξεων στην ευρύτερη περιοχή του *MT-TL1* συμπεριλαμβανομένων και τμημάτων των παρακείμενων γονιδίων, *MT-RNR2* (16S rRNA) και *MT-ND1* (αφυδρογονάση του NADH). Παράλληλα, η μελέτη επεκτάθηκε και σε τρία επιπλέον μιτοχονδριακά tRNA γονίδια [tRNA^{His}, tRNA^{Ser(AGY)} και tRNA^{Leu(CUN)}]. Ο αρχικός έλεγχος για την ύπαρξη ή όχι διαφορετικού προτύπου στην ομάδα των ασθενών έγινε με SSCP και τα PCR προϊόντα στα οποία εντοπίστηκαν διαφορές σε σχέση με τους μάρτυρες αλληλουχήθηκαν προκειμένου να ταυτοποιηθεί η ακριβής θέση των μεταλλάξεων. Καμία μετάλλαξη δεν ανιχνεύθηκε στο γονίδιο του tRNA^{Leu(UUR)}. Παρατηρήθηκαν μεταλλάξεις σε θέσεις που έχουν προαναφερθεί στα γονίδια tRNA^{Leu(CUN)}, ND1 και 16S rRNA και οι οποίες έχουν συνδεθεί με συγκεκριμένα σύνδρομα σε ανθρώπινους πληθυσμούς. Επιπλέον όμως βρέθηκαν δύο νέες μεταλλάξεις στα γονίδια των ND1 και 16S rRNA που δεν έχουν αναφερθεί προηγουμένως στη διεθνή βιβλιογραφία και οι οποίες πιθανότατα σχετίζονται με τη γενικότερη κλινική εικόνα των ασθενών.

1. ABSTRACT

Over the last decade, mutations in specific mitochondrial tRNA genes have become increasingly recognized as important markers of multisystemic disorders, such as mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and stroke like episodes (MELAS) and myoclonus epilepsy with ragged red fibers (MERRF). The broadest sequence variability (23 pathogenic and 7 polymorphic changes) and highest pathogenic mutation to neutral variant ratio is observed in the tRNA^{Leu(UUR)} gene (*MT-TL1*). Given the fact that tRNA molecules have a central role in mitochondrial protein synthesis, 30 patients with various clinical perturbations were screened to determine the presence of existing mutations in the genetic loci of *MT-TL1* and its neighbouring *MT-RNR2* (16S rRNA) and *MT-ND1* (NADH dehydrogenase) genes. In parallel, the survey was extended to three additional mitochondrial tRNA genes [tRNA^{His}, tRNA^{Ser(AGY)} and tRNA^{Leu(CUN)}]. The method used to detect the presence of mutations was single strand conformation polymorphism (SSCP). In an attempt to identify the exact location of the mutations that result different profiles in comparison to the controls we extended our analysis by direct sequencing of the respective PCR products. None of the 30 patients were found to carry any mutation in the tRNA^{Leu(UUR)} gene. A number of mutations in tRNA^{Leu(CUN)}, ND1 and 16S rRNA genes were observed that have been associated with specific clinical features in human populations. Interestingly, two novel mutations in ND1 and 16S rRNA genes that have never been reported before were identified and they are most likely related to the abnormal clinical phenotype of the patients.

2. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα μιτοχόνδρια (μίτος + χονδρίον, κόκκος) είναι ωσειδή οργανίδια με τυπικές διαστάσεις 2μm σε μήκος και 0,5 μm σε διάμετρο, που περιβάλλονται από μεμβράνες και υπάρχουν σε όλα, ουσιαστικά, τα ευκαρυωτικά κύτταρα. Τα μιτοχόνδρια πολλές φορές χαρακτηρίζονται και ως «κυτταρικές γεννήτριες ενέργειας» επειδή παράγουν την περισσότερη ποσότητα τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP) που χρειάζεται το κύτταρο. Ο αριθμός των μιτοχονδρίων σε ένα κύτταρο ποικίλει σε μεγάλο βαθμό στους διαφόρους οργανισμούς και κυτταρικούς τύπους, από ένα έως και αρκετές χιλιάδες.¹ Παρόλο που το μεγαλύτερο ποσοστό του κυτταρικού DNA βρίσκεται στον πυρήνα του κυττάρου, τα μιτοχόνδρια έχουν το δικό τους ανεξάρτητο γένωμα και αναπαράγονται διαιρούμενα στα δύο. Εξαιτίας των πολλών ομοιοτήτων τους με τα βακτήρια, θεωρείται ότι προέρχονται από βακτήρια που εγκοιλώθηκαν σε κάποιον πρόγονο των σημερινών ευκαρυωτικών κυττάρων.

2.1 ΔΟΜΗ, ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ ΚΑΙ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ ΤΟΥ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΟΥ

2.1.1 Δομή

Μελέτες ηλεκτρονικής μικροσκοπίας των George Palade και Fritjof Sjöstrand αποκάλυψαν ότι τα μιτοχόνδρια έχουν δύο συστήματα μεμβρανών : μια εξωτερική μεμβράνη και μια εσωτερική με πολλές πτυχώσεις. Η εσωτερική μεμβράνη αναδιπλώνεται σε μια σειρά εσωτερικών πτυχώσεων, οι οποίες καλούνται *ακρολοφίες* (cristae). Έτσι δημιουργούνται δύο διαμερίσματα στα μιτοχόνδρια : ο *διαμεμβρανικός χώρος* μεταξύ της εσωτερικής και της εξωτερικής μεμβράνης και η *μήτρα* ή *στρώμα* το οποίο περιβάλλεται από την εσωτερική μεμβράνη (Σχήμα 1).

Η εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη, η οποία περικλείει ολόκληρο το οργανίδιο, έχει μια αναλογία πρωτεϊνών / φωσφολιπιδίων ίση με την πλασματική μεμβράνη ενός ευκαρυωτικού κυττάρου (περίπου 1:1 κατά βάρος). Περιέχει επίσης πολλά μόρια *πορίνης*, μιας μεταφορικής πρωτεΐνης η οποία σχηματίζει ευρείς υδρόφιλους διαύλους διαμέσου της διπλοστοιβάδας των λιπιδίων. Έτσι, λειτουργεί σαν ένας ηθμός, διαπερατός από όλα τα μόρια με μοριακό βάρος έως 5 kD συμπεριλαμβανομένων και των μικρών πρωτεϊνών. Αυτό καθιστά το διαμεμβρανικό χώρο χημικώς ισοδύναμο με το κυτταροδιάλυμα, όσον αφορά τα μικρά μόρια που περιέχει.



Σχήμα 1. Δομή μιτοχονδρίου.

Αντίθετα, η εσωτερική μεμβράνη δεν περιέχει πορίνες και είναι αδιαπέραστη σχεδόν σε όλα τα ιόντα και τα πολικά μόρια, τα οποία απαιτούν ειδικούς μεμβρανικούς μεταφορείς με σκοπό να εισέλθουν της μήτρας. Περιέχει περισσότερα από 100 διαφορετικά πολυπεπίδια και έχει μια πολύ υψηλή αναλογία πρωτεϊνών / φωσφολιπιδίων (περισσότερο από 3:1 κατά βάρος, δηλαδή κατά αντιστοιχία περίπου 1 πρωτεΐνη για κάθε 15 φωσφολιπίδια). Η εσωτερική μεμβράνη επίσης, είναι πλούσια σε ένα ασυνήθιστο φωσφολιπίδιο, την καρδιολιπίνη. Λόγω των πολυάριθμων εσωτερικών πτυχώσεων οι οποίες προβάλλουν στο μιτοχονδριακό στρώμα και αυξάνουν κατά πολύ την επιφάνεια της μεμβράνης, η παραγωγή ATP εξασφαλίζεται σαφώς σε μεγαλύτερο βαθμό με αυτό τον τρόπο. Μιτοχόνδρια κυττάρων με μεγαλύτερες απαιτήσεις για ATP, όπως τα μυϊκά κύτταρα, έχουν και περισσότερες πτυχώσεις.

Η εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη, όπως θα δούμε και παρακάτω, είναι ο τόπος που επιτελείται η μεταφορά e^- , η άντληση H^+ και ο εντοπισμός της ATP συνθάσης. Οι περισσότερες πρωτεΐνες που είναι ενσωματωμένες σ' αυτήν αποτελούν συστατικά των αλυσίδων μεταφοράς ηλεκτρονίων οι οποίες είναι απαραίτητες για την *οξειδωτική φωσφορυλίωση*, την διαδικασία δηλαδή προσθήκης μιας φωσφορικής ομάδας στο ADP προς σχηματισμό ATP, με παράλληλη κατανάλωση O_2 .

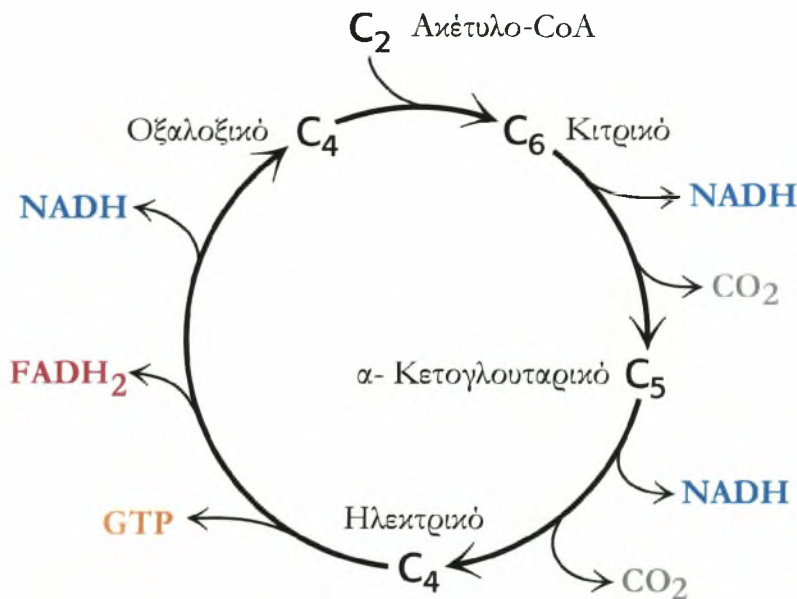
2.1.2 Λειτουργίες

Τα μιτοχόνδρια ήταν απαραίτητα για την εξέλιξη των πολυκύτταρων ζώων και φυτών. Χωρίς αυτά, οι σύγχρονοι ευκαρυώτες θα εξαρτώνταν από την σχετικά αναποτελεσματική διεργασία της γλυκόλυσης όσον αφορά την παραγωγή ενέργειας. Στα μιτοχόνδρια, ο μεταβολισμός των σακχάρων ολοκληρώνεται και η ενέργεια που απελευθερώνεται αξιοποιείται τόσο αποτελεσματικά ώστε περίπου 36 μόρια ATP παράγονται ανά μόριο γλυκόζης που οξειδώνεται αντιθέτως με τα μόλις δύο μόρια που παράγονται κατά την γλυκόλυση (Πίνακας 1).

Πίνακας 1. Απόδοση σε ATP από την πλήρη οξείδωση της γλυκόζης.

Αντιδράσεις	ATP
Γλυκόλυση (κυτταρόπλασμα)	+2
Σχηματίζονται 2 μόρια NADH	
Οξειδωτική αποκαρβοξυλίωση του πυροσταφυλικού (μήτρα)	
Σχηματίζονται 2 μόρια NADH	
Κύκλος του κιτρικού οξέος (μήτρα)	
Σχηματίζονται 2 μόρια GTP	+2
Σχηματίζονται 6 μόρια NADH	
Σχηματίζονται 2 μόρια $FADH_2$	
Οξειδωτική φωσφορυλίωση (εσωτερική μεμβράνη)	
2 NADH από την γλυκόλυση / το καθένα αποδίδει 2 ATP	+4
2 NADH από την αποκαρβοξυλίωση του πυροσταφυλικού / το καθένα αποδίδει 3 ATP	+6
2 $FADH_2$ από τον κύκλο του κιτρικού οξέος / το καθένα αποδίδει 2 ATP	+4
6 NADH από τον κύκλο του κιτρικού οξέος / το καθένα αποδίδει 3 ATP	+18
<i>Καθαρή απόδοση ανά μόριο γλυκόζης</i>	<i>+36</i>

Τα μιτοχόνδρια έχουν τη δυνατότητα να χρησιμοποιούν ως καύσιμα τόσο το πυροσταφυλικό οξύ, το κύριο προϊόν της γλυκολυτικής οδού, όσο και τα λιπαρά οξέα. Και τα δύο είδη καυσίμων εισέρχονται της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης με ενεργή μεταφορά και κατόπιν μετατρέπονται στο καίριο μεταβολικό ενδιάμεσο μέσο, το ακέτυλο-CoA, με τη δράση ενζύμων που εντοπίζονται στη μιτοχονδριακή μήτρα. Στη συνέχεια, οι ακετυλομάδες του ακέτυλο-CoA οξειδώνονται στη μήτρα μέσω του κύκλου του κιτρικού οξέος, γνωστός και ως *κύκλος του τρικαρβοξυλικού οξέος ή κύκλος του Krebs* (Σχήμα 2). Ο κύκλος παράγει CO₂ το οποίο αποβάλλεται από το κύτταρο, και e⁻ υψηλής ενέργειας που μεταφέρονται από τα ενεργοποιημένα μόρια φορείς NADH και FADH₂. Αυτοί οι ανηγμένοι φορείς e⁻ οξειδώνονται κατόπιν από την αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων, παράγοντας έτσι 22 μόρια ATP ανα μόριο γλυκόζης, αφού 3 ATP παράγονται για κάθε NADH, ενώ 2 ATP παράγονται για κάθε FADH₂ αντίστοιχα. Επιπροσθέτως 1 φωσφορικός δεσμός υψηλής ενέργειας δημιουργείται (με την μορφή του GTP) σε κάθε κύκλο.

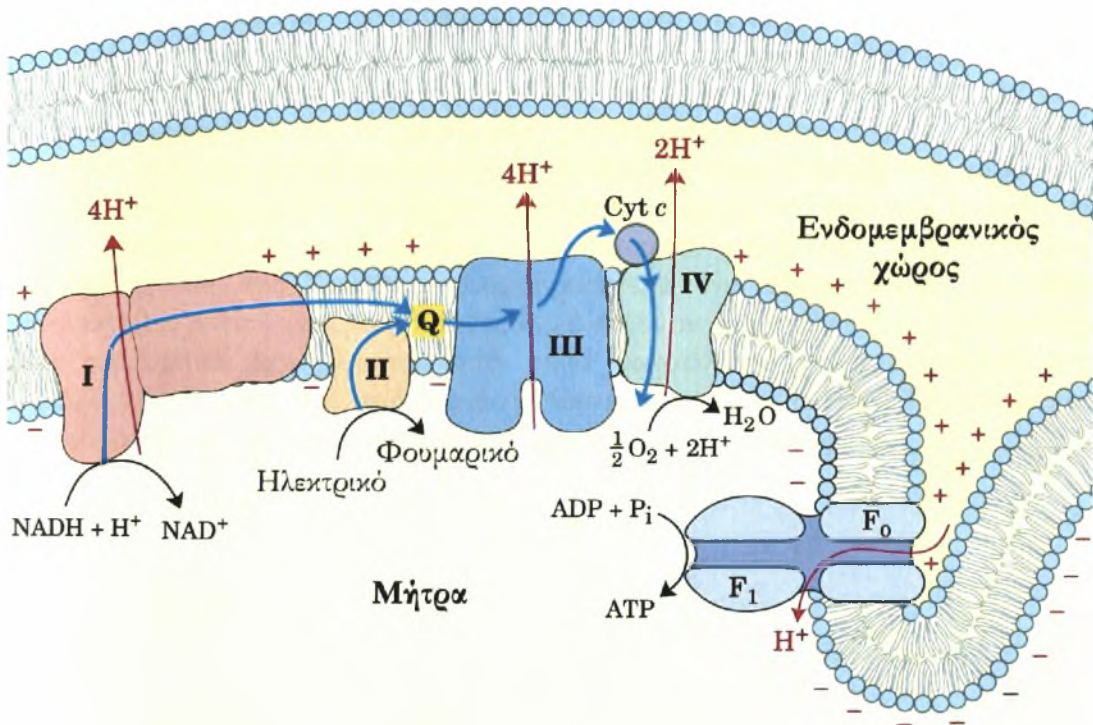


Σχήμα 2. Σχηματική απεικόνιση του κύκλου του κιτρικού οξέος.

Στη συνέχεια τα e⁻ αυτά μεταφέρονται στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη, όπου εισέρχονται στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων, γνωστή επίσης και ως *αναπνευστική αλυσίδα*. Η αναπνευστική αλυσίδα περιέχει πάνω από 40 πρωτεΐνες, από τις οποίες περίπου 15 εμπλέκονται άμεσα στη μεταφορά των ηλεκτρονίων και οι οποίες αποτελούν υπομονάδες των τριών βασικών ενζυμικών συμπλόκων της αναπνευστικής αλυσίδας : της NADH-αναγωγάσης του συνενζύμου Q ή αφυδρογονάση του NADH (σύμπλοκο I), της κυτοχρωμικής αναγωγάσης (σύμπλοκο III) και της κυτοχρωμικής οξειδάσης (σύμπλοκο IV) (Σχήμα 3). Τα e⁻ αφού ελευθερωθούν από την οξείδωση του ισχυρά αναγωγικού NADH το οποίο λόγω του αρνητικού δυναμικού αναγωγής (E'₀ -0,32 V) έχει μικρή συγγένεια για τα e⁻, μεταφέρονται από την αφυδρογονάση του NADH στην κυτοχρωμική αναγωγάση, από την ανηγμένη μορφή της *ουβικινόνης (συνένζυμο Q)*, μιας υδρόφοβης κινόνης. Η ουβικινόνη επίσης μεταφέρει e⁻ από το FADH₂ (που παράγεται από την οξείδωση του ηλεκτρικού στο

κύκλο του κυτρινικού οξέος) στην κυτοχρωμική αναγωγή. Το *κυτόχρωμα c*, μια μικρή πρωτεΐνη, μεταφέρει τα e^- από την κυτοχρωμική αναγωγή στην κυτοχρωμική οξειδάση, τον τελικό αποδέκτη στην αλυσίδα. Εκεί, το O_2 λόγω του θετικού δυναμικού αναγωγής ($E^{\circ} 0,82\text{ V}$) έχει μεγάλη συγγένεια για τα e^- , και έτσι ανάγεται προς H_2O .

Η σταδιακή μεταφορά ηλεκτρονίων από το $NADH$ και το $FADH_2$ προς το O_2 με τους παραπάνω φορείς, οδηγεί στην παράλληλη άντληση πρωτονίων από το μιτοχονδριακό στρώμα στο διαμεμβρανικό χώρο με αποτέλεσμα την παραγωγή ενός μεμβρανικού δυναμικού καθώς επίσης και μιας βαθμίδωσης pH. Τα αναπνευστικά σύμπλοκα είναι οι θέσεις που γίνεται η άντληση ενόσω e^- μεταφέρονται από αυτά. Η ηλεκτροχημική βαθμίδωση των πρωτονίων χρησιμοποιείται για να προωθήσει τη σύνθεση του ATP κατά τη διεργασία της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Το υπεύθυνο ένζυμο, η *ATP συνθάση*, δημιουργεί μια υδρόφιλη δίοδο στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη μέσω της οποίας τα πρωτόνια είναι ελεύθερα να κινηθούν προς την κατεύθυνση της ηλεκτροχημικής τους βαθμίδωσης (Σχήμα 3). Με αυτόν τον τρόπο προωθείται η ενεργειακά μη ευνοϊκή αντίδραση ανάμεσα στο ADP και το P_i σχηματίζοντας το ATP. Έτσι, σύμφωνα με την χημειωσμωτική υπόθεση που προτάθηκε από τον Peter Mitchell το 1961, η οξείδωση και η φωσφορυλίωση είναι συζευγμένες με μια βαθμίδωση πρωτονίων μεταξύ των δύο πλευρών της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης.



Σχήμα 3. Σχηματική απεικόνιση της αναπνευστικής αλυσίδας.

Κάτω από κατάλληλες συνθήκες, πρωτόνια μπορούν να εισέλθουν του στρώματος χωρίς να συνεισφέρουν στην σύνθεση του ATP. Η διαδικασία αυτή γνωστή και ως *διαρροή πρωτονίων* ή *αποσύζευξη της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης* οφείλεται στην

υποβοηθούμενη διάχυση πρωτονίων στο στρώμα με αποτέλεσμα την παραγωγή θερμότητας. Ο φαιός λιπώδης ιστός, που είναι πλούσιος σε μιτοχόνδρια, έχει εξειδικευτεί σε αυτή την διαδικασία, η οποία αποκαλείται *θερμογένεση*. Η εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων αυτών περιέχει μια μεγάλη ποσότητα θερμογενίνης, ενός διμερούς 33kD, που ουσιαστικά βραχυκυκλώνει τον πρωτονιακό συσσωρευτή των μιτοχονδρίων. Η βιολογική χρησιμότητα αυτού του μηχανισμού είναι έντονη σε ζώα που πέφτουν σε χειμερία νάρκη καθώς και στα νεογένητα.

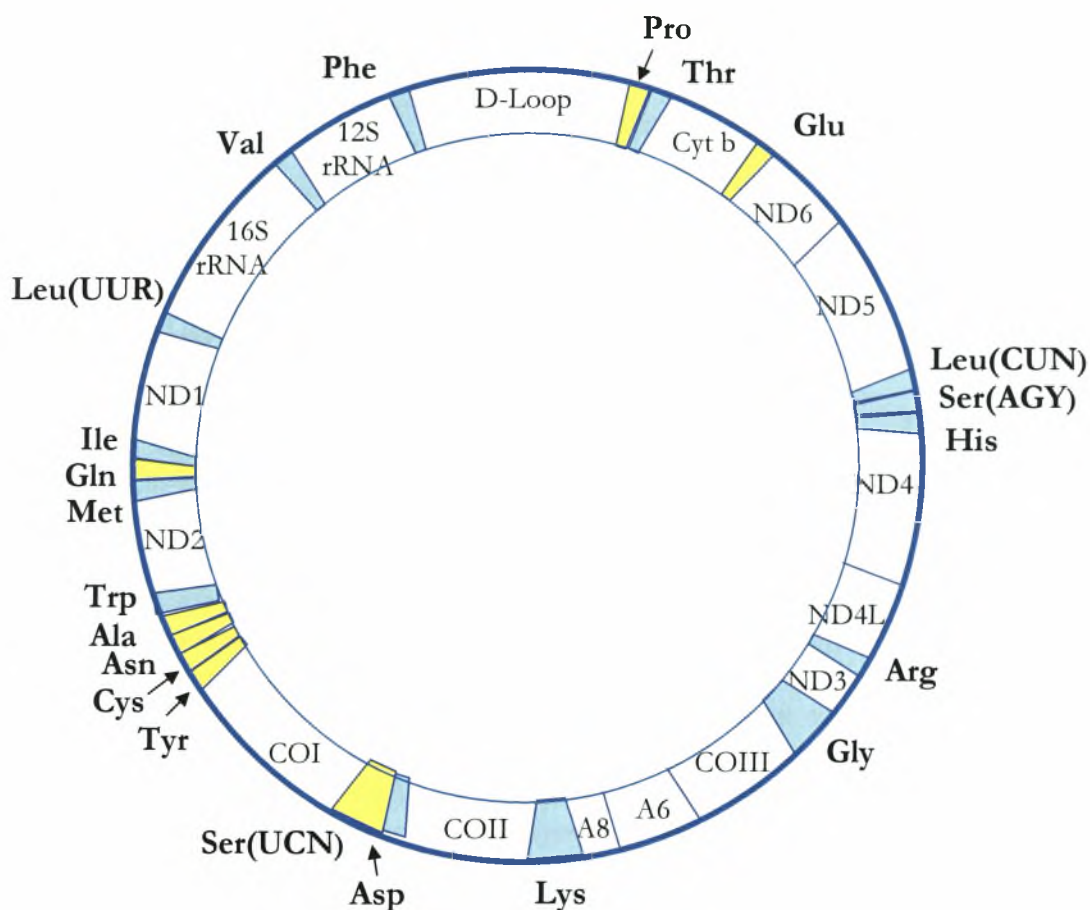
Τα μιτοχόνδρια παίζουν επίσης πολύ σημαντικό ρόλο και σε πολλές μεταβολικές διεργασίες όπως : στην απόπτωση (προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος), στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, στη ρύθμιση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης του κυττάρου, στη σύνθεση της αίμης και στεροειδών κτλ. Κάποιες λειτουργίες εκτελούνται μόνο σε συγκεκριμένους τύπους κυττάρων. Για παράδειγμα, τα μιτοχόνδρια ηπατικών κυττάρων περιέχουν ένζυμα τα οποία καταλύουν την μετατροπή της αμμωνίας, ενός τοξικού προϊόντος του μεταβολισμού των πρωτεϊνών.

2.1.3 Προέλευση

Ο τρόπος με τον οποίο διαιρούνται τα μιτοχόνδρια, δηλαδή με αύξηση και διχοτόμηση, καθώς επίσης και η ύπαρξη ριβοσωματίων βακτηριακού τύπου 70S (σε αντίθεση με τα 80S ριβοσώματα που υπάρχουν οπουδήποτε αλλού στο κύτταρο) αποτελούν ενδείξεις της βακτηριακής προέλευσής τους. Η άποψη αυτή έχει επικρατήσει να λέγεται “ενδοσυμβιωτική θεωρία”. Υπάρχουν ενδείξεις ότι τα μιτοχόνδρια εμφανίστηκαν πολύ πριν από ένα δισεκατομμύριο χρόνια, όταν ένα αερόβιο βακτήριο ενδοκυτταρώθηκε από ένα αναερόβιο ευκαρυωτικό κύτταρο. Από τότε, τα περισσότερα από τα βακτηριακά γονίδια μετατοπίστηκαν στον πυρήνα του κυττάρου, ενώ στο μιτοχόνδριο παρέμειναν σχετικά λίγα. Η ικανότητα αυτών των συμβιωτικών βακτηρίων να διεξάγουν κυτταρική αναπνοή στα κύτταρα ξενιστές, τα οποία προηγουμένως περιορίζονταν στις βασικές μεταβολικές διεργασίες της γλυκόλυσης και της ζύμωσης, τους προσέφερε ένα αξιοσημείωτο εξελικτικό πλεονέκτημα. Αντιστοίχως, το ίδιο εξελικτικό πλεονέκτημα απέκτησαν και οι ξενιστές όταν συμβιωτικά βακτήρια που ήταν ικανά φωτοσύνθεσης, ενσωματώθηκαν στο κυτταρόπλασμα τους. Και στις δύο περιπτώσεις, ο αριθμός των περιβαλλόντων που θα μπορούσαν να επιζήσουν αυτά τα κύτταρα ήταν σίγουρα διευρυμένος.

2.2 ΤΟ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑ & Η ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΟΥ

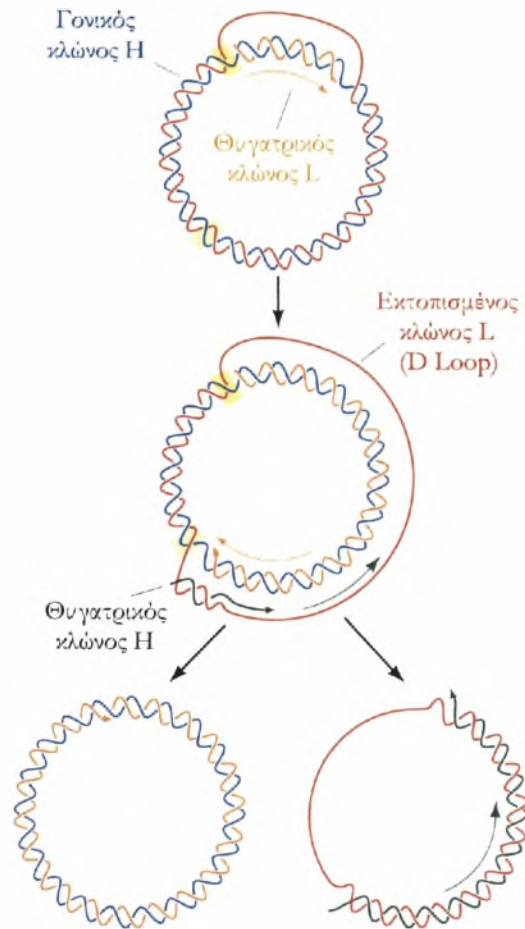
Πειράματα με ειδικές χρωστικές, αυτοραδιογραφία και ηλεκτρονικό μικροσκόπιο απέδειξαν ότι το DNA δεν περιορίζεται αποκλειστικά στον πυρήνα. Έτσι, το 1963 έγινε γνωστό ότι τα μιτοχόνδρια περιέχουν το δικό τους γενετικό υλικό, ένα μικρό κυκλικό και δίκλωνο μόριο το οποίο δεν συνδέεται με ιστόνες και έχει την μορφή υπερελίκων. Υπάρχει σε 2 έως 10 αντίγραφα ανά κύτταρο και μεταβιβάζεται στους απογόνους με μητρική κληρονομήση. Το 1981 δημοσιεύτηκε η πρωτοταγής δομή του ανθρώπινου mt DNA.² Τα 16.569 ζεύγη βάσεων που το απαρτίζουν, κωδικοποιούν για 37 γονίδια: 2 μόρια rRNA, 22 μόρια tRNA και 13 μόρια mRNA που μεταφράζονται σε πολυπεπτιδικές αλυσίδες. Από αυτές, τρεις είναι υπομονάδες (I, II και III) της κυτοχρωμικής οξειδάσης, μια υπομονάδα του κυτοχρώματος b, δύο υπομονάδες (6^η και 8^η) της μιτοχονδριακής ATPάσης και επτά υπομονάδες της αφυδρογονάσης του NADH (Σχήμα 4). Ωστόσο, τα γονίδια αυτά δεν είναι αρκετά ώστε τα μιτοχόνδρια να μπορούν να εκπληρώσουν το σύνολο των λειτουργιών τους. 70 ακόμη υπομονάδες πυρηνικής προέλευσης εισέρχονται στα μιτοχόνδρια από το κυτταρόπλασμα με σκοπό τον σχηματισμό ενεργών συμπλόκων της αναπνευστικής αλυσίδας για την παραγωγή ATP.



Σχήμα 4. Το μιτοχονδριακό γονιδίωμα. Με κίτρινο απεικονίζονται τα tRNA που προκύπτουν από τη μεταγραφή του κλώνου L, ενώ με μπλε αυτά που προκύπτουν από τη μεταγραφή του κλώνου H (βλέπε ενότητα 2.2.2)

2.2.1 Αντιγραφή του mtDNA

Η αντιγραφή του DNA των μιτοχονδρίων γίνεται με ημισυντηρητικό τρόπο και δεν περιορίζεται μόνο στη φάση S. Η μιτοχονδριακή πολυμεράση αρχίζει την αντιγραφή από καθορισμένο σημείο έναρξης (O_H), απ' όπου ξεκινάει τοπική αποδιάταξη. Αρχικά αντιγράφεται ένας μόνο από τους δύο γονικούς κλώνους, συνήθως ο κλώνος H, για την βιοσύνθεση θυγατρικού κλώνου L. Η αντιγραφή προχωράει σε σχετικά λίγα νουκλεοτίδια και με αυτό τον τρόπο εκτοπίζεται ο γονικός κλώνος L, που παραμένει μονόκλωνος ενώ παράλληλα επεκτείνεται ο νεοσυντιθέμενος θυγατρικός κλώνος L προς το 3' άκρο. Η όλη διαμόρφωση της περιοχής ονομάζεται βρόγχος D. Ο γονικός κλώνος L παραμένει μονόκλωνος, μέχρις ότου η αντιγραφή του DNA του κλώνου H φτάσει στα 2/3 του μεγέθους του κυκλικού μορίου και αποκαλυφθεί το σημείο έναρξης της αντιγραφής του κλώνου L (O_L). Από το σημείο αυτό και έπειτα μια μιτοχονδριακή πολυμεράση DNA χρησιμοποιώντας ως μήτρα τον κλώνο L και με αντίθετη κατεύθυνση αντιγραφής συνθέτει τον θυγατρικό κλώνο H (Σχήμα 5).



Σχήμα 5. Αντιγραφή του mtDNA

Η όλη διαδικασία της αντιγραφής διαρκεί μια ώρα περίπου, γεγονός που δείχνει πως η ταχύτητα αντιγραφής του mtDNA είναι 100 φορές βραδύτερη από εκείνη του πυρηνικού. Μια άλλη διαφορά ανάμεσα στη μιτοχονδριακή και την πυρηνική αντιγραφή είναι ότι στην πρώτη απουσιάζει η επιδιόρθωση λαθών από τη δράση εξωνουκλεάσης της μιτοχονδριακής DNA πολυμεράσης. Αυτό οδηγεί σε υψηλότερο ρυθμό μεταλλαξιγένεσης στο μιτοχονδριακό γένωμα από ότι στο πυρηνικό, με συνέπεια το πρώτο να εξελίσσεται εξαιρετικά γρήγορα. Εφόσον η ετεροδιμερής μιτοχονδριακή DNA πολυμεράση [που αποτελείται από μια καταλυτική υπομονάδα (PolgA) και μια υπομονάδα με δράση ελικάσης 5'-3' (PolgB)] καθώς και άλλες απαραίτητες πρωτεΐνες για την αντιγραφή του mtDNA κωδικοποιούνται από το πυρηνικό γένωμα, είναι ευνόητο ότι η αντιγραφή του mtDNA βρίσκεται κάτω από τον έλεγχο του πυρηνικού DNA.

2.2.2 Μεταγραφή του mtDNA

Το mtDNA του ανθρώπου μεταγράφεται από μια μιτοχονδριακή RNA πολυμεράση (POLRMT) και απαιτεί την ύπαρξη του μιτοχονδριακού μεταγραφικού παράγοντα A (TFAM) και του μεταγραφικού παράγοντα B1 (TFB1M) ή B2 (TFB2M). Η μεταγραφή αρχίζει μόνο από δύο προαγωγείς, έναν για τον βαρύ κλώνο H (HSP) και έναν για τον ελαφρύ L (LSP). Είναι σχεδόν συμμετρική και κάθε κλώνος μεταγράφεται σε ένα μεγάλο μόριο RNA. Αυτά τα δύο γιγαντιαία πρωταρχικά μόρια RNA διασπώνται με τη δράση ενδονουκλεάσης και δημιουργούνται τα ώριμα μόρια RNA. Η μεταγραφή του κλώνου H δίνει πρόδρομο μόριο RNA που μετά τη διάσπαση του από νουκλεάσες προκύπτουν: δύο μόρια rRNA, 14 μόρια tRNA και 12 μόρια mRNA. Αντίθετα η μεταγραφή του κλώνου L και η διάσπαση του δίνει 8 μόρια tRNA και ένα μόριο mRNA. Αξίζει να σημειωθεί ότι αλληλουχίες-σήματα έναρξης ή τερματισμού απουσιάζουν από τα μιτοχονδριακά μετάγραφα. Οι τελευταίες δημιουργούνται με την προσθήκη poly-A αλληλουχιών. Τα mRNA έχουν κωδικόνια έναρξης (AUG, AUA, AUU) ακριβώς στο 5' άκρο τους ή μερικές βάσεις μετά από αυτό. Αντίθετα, δεν αποκτούν ποτέ τη δομή της καλύπτρας.

Ο γενετικός κώδικας του mtDNA των θηλαστικών διαφέρει από τον παγκόσμιο κώδικα σε αρκετά σημεία (Πίνακας 2). Τα σπουδαιότερα από αυτά είναι : α) τα κωδικόνια AUA, AUU και AUG χρησιμοποιούνται ως κωδικόνια έναρξης, καθορίζοντας την ένταξη της μεθειονίνης, β) το κωδικόνιο UGA κωδικοποιεί το αμινοξύ τρυπτοφάνη και δεν αποτελεί σήμα τερματισμού και γ) τα κωδικόνια AGA και AGG δεν κωδικοποιούν το αμινοξύ αργινίνη, αλλά αποτελούν σήματα τερματισμού της πρωτεϊνοσύνθεσης.

Πίνακας 2. Ο γενετικός κώδικας του mtDNA του ανθρώπου.

Phe F	UUU UUC	Thr T	ACU ACA ACC ACG	Asp D	GAU GAC
Leu (1) L(UUR)	UUA UUG	Ala A	GCU GCA GCC GCG	Glu E	GAA GAG
Leu (2) L(CUN)	CUU CUA CUC CUG	Tyr Y	UAU UAC	Cys C	UGU UGC
Ile I	AUU* AUC	Ter	UAA UAG	Trp W	UGA UGG
Met M	AUA AUG	His H	CAU CAC	Arg R	CGU CGA CGC CGG
Val V	GUU GUA GUC GUG	Gln Q	CAA CAG	Ser (2) S(AGY)	AGU AGC
Ser (1) S(UCN)	UCU UCA UCC UCG	Asn N	AAU AAC	Ter	AGA AGG
Pro P	CCU CCA CCC CCG	Lys K	AAA AAG	Gly G	GGU GGA GGC GGG

* Το κωδικόνιο AUU κωδικοποιεί για την ισολευκίνη κατά την επιμήκυνση, αλλά μπορεί να κωδικοποιήσει και την μεθειονίνη κατά την έναρξη της μετάφρασης.

2.2.3 Μιτοχονδριακή πρωτεϊνοσύνθεση

Σύμφωνα με την υπόθεση αστάθειας (wobbling effect), χρειάζονται τουλάχιστον 32 μόρια tRNA για να αναγνωριστούν και τα 61 κωδικόνια του πυρηνικού γενετικού κώδικα. Αλλά στα μιτοχόνδρια του ανθρώπου υπάρχουν 22 διαφορετικά μόρια tRNA [ένα tRNA ειδικό για καθένα από τα δεκαοκτώ αμινοξέα, δύο tRNA ειδικά για τη σερίνη (tRNA^{Ser}(AGY) και tRNA^{Ser}(UCN)), και δύο tRNA ειδικά για τη λευκίνη (tRNA^{Leu}(UUR) και tRNA^{Leu}(CUN))], άρα και αντικωδικόνια. Πώς όμως αυτός ο περιορισμένος αριθμός μορίων tRNA επαρκεί για να διαβαστούν σωστά όλα τα κωδικόνια; Η απάντηση βρίσκεται στην απλούστευση του ζευγαρώματος κωδικονίου-αντικωδικονίου : α) Καθένα από τα 14 tRNA που μεταγράφονται από τον κλώνο H, μπορούν να αναγνωρίζουν δύο διαφορετικά κωδικόνια αφού έχουν G ή τροποποιημένη U στην τρίτη θέση του αντικωδικονίου. Αυτό τους επιτρέπει να ζευγαρώσουν σε κωδικόνια που έχουν C ή U και A ή G, αντίστοιχα. β) Καθένα από τα υπόλοιπα 8 tRNA αναγνωρίζει και τα 4 μέλη μιας οικογένειας κωδικονίων. Αυτό γίνεται γιατί στην ασταθή θέση έχουν U, η οποία έχει την ικανότητα να ζευγαρώσει ασθενικά με όλες τις βάσεις. Για παράδειγμα, τα τέσσερα κωδικόνια αλανίνης, GCU, GCC, GCA και GCG αναγνωρίζονται από ένα είδος tRNA, αντί δύο. Με αυτό τον τρόπο μειώνονται τα απαιτούμενα μόρια tRNA από 32 σε 22.

Από τα γονίδια που εδράζονται στο μιτοχονδριακό χρωμόσωμα, δύο κωδικοποιούν για ριβωσωμικό RNA, το 12S και το 16S rRNA. Τα μιτοχονδριακά ριβοσώματα σχηματίζονται από μια μικρή υπομονάδα με συντελεστή καθίζησης 28S και μια μεγάλη με συντελεστή καθίζησης 39S. Η μικρή υπομονάδα αποτελείται από το 16S RNA και 29 πρωτεΐνες πυρηνικής προέλευσης, ενώ η μεγάλη υπομονάδα αποτελείται από το 12S RNA και 48 πρωτεΐνες πυρηνικής προέλευσης. Τα μιτοχονδριακά ριβοσώματα βρίσκονται στη μήτρα είτε ελεύθερα, είτε συνδεδεμένα στις πτυχώσεις της εσωτερικής μεμβράνης. Η έναρξη της μετάφρασης στα μιτοχονδριακά ριβοσώματα μοιάζει με εκείνη των ευκαρυωτών. Παρόλα αυτά, η πρωτεϊνοσύνθεση αρχίζει με fmet. Τα πολυπεπίδια που καθορίζονται από το μιτοχονδριακό γένωμα αποτελούν το 5-10% του συνόλου των μιτοχονδριακών πρωτεϊνών. Οι υπόλοιπες πρωτεΐνες που είναι απαραίτητες για τη βιογένεση και την φυσιολογική λειτουργία των μιτοχονδρίων, κωδικοποιούνται από το πυρηνικό γένωμα, μεταφράζονται στα κυτταροπλασματικά ριβοσώματα και μεταφέρονται στα μιτοχόνδρια.

2.3 ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΒΑΣΗ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΩΝ ΑΣΘΕΝΕΙΩΝ

Το μιτοχονδριακό γονιδίωμα υφίσταται 10- έως 17- φορές περισσότερες μεταλλάξεις απ' ό,τι το πυρηνικό.³ Πολύ πιθανόν, υπεύθυνο για αυτό να είναι το γεγονός ότι το mtDNA ευρίσκεται πολύ κοντά στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη και εκτίθεται σε μεγάλο βαθμό σε μεταλλαξιγόνες ελεύθερες ρίζες που παράγονται από την αναπνευστική αλυσίδα όταν το O₂ ανάγεται ατελώς προς H₂O.⁴ Όπως προαναφέραμε, απουσιάζει η προστατευτική αλληλεπίδραση από την παρουσία ιστονών, όπως επίσης και ένας αποτελεσματικός μηχανισμός επιδιόρθωσης του DNA. Το γεγονός ότι το ανθρώπινο mtDNA είναι εξαιρετικά συμπαγές, ελεύθερο ιντρονίων αλλά και το ότι γειτονικά γονίδια μπορεί να επικαλύπτονται, παίζουν επίσης κρίσιμο ρόλο για το παρατηρούμενο αυξημένο ποσοστό μεταλλάξεων.

Οι μεταλλάξεις που έχουν αναφερθεί έως τώρα εντοπίζονται σε όλο το μήκος του μιτοχονδριακού γενώματος, αλλά και σε πυρηνικά γονίδια των οποίων τα πρωτεϊνικά προϊόντα εισέρχονται στο μιτοχόνδριο και συμμετέχουν στο μιτοχονδριακό οξειδωτικό μεταβολισμό.^{5,6} Οι περισσότερες από αυτές, έχουν συσχετισθεί με την πρόκληση ασθενειών στον άνθρωπο, ασθένειες που αναφέρονται ως "μιτοχονδριακές". Ο φαινότυπος των "μιτοχονδριακών" ασθενειών ποικίλει από βαριάς και θανατηφόρας μορφής κλινικά σύνδρομα έως και ασθένειες με ηπιότερα, ποικίλα συμπτώματα, τόσο κοινά, που μέχρι πριν λίγα χρόνια κάποιος θα αδυνατούσε να συνδέσει αυτές τις ασθένειες με μεταλλάξεις που παρατηρούνται σε μιτοχονδριακά γονίδια. Παρακάτω θα αναφερθούμε σε πρώτο στάδιο σε ποια μιτοχονδριακά και πυρηνικά γονίδια έχουν εντοπιστεί μεταλλάξεις που σχετίζονται με παθογένεια και σε ένα δεύτερο στάδιο θα περιγράψουμε τους κλινικούς φαινοτύπους που αντιστοιχούν στις μεταλλάξεις αυτές.

2.3.1 Μεταλλάξεις που έχουν συνδεθεί με πρόκληση ασθενειών στον άνθρωπο

2.3.1.1 Μεταλλάξεις σε μιτοχονδριακά tRNA γονίδια

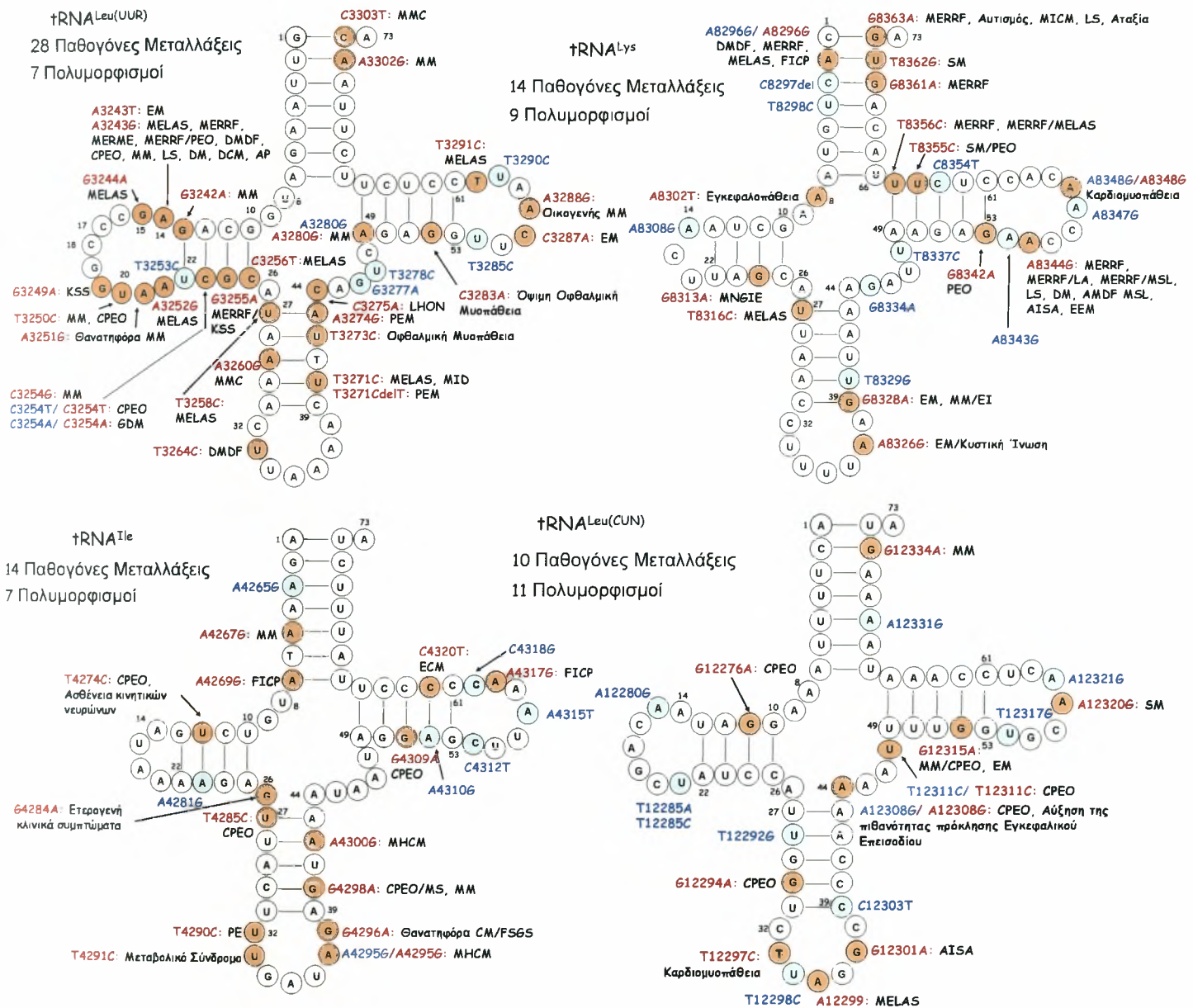
Από το 1988, όταν χαρακτηρίστηκαν οι πρώτες μεταλλάξεις που σχετίστηκαν με την παθογένεια, πάνω από 200 μεταλλάξεις έχουν αναγνωριστεί στο ανθρώπινο

Πίνακας 3. Παθογόνες και πολυμορφικές μεταλλάξεις στα ανθρώπινα μιτοχονδριακά tRNA. Τα δεδομένα πάρθηκαν από διαδικτυακές βάσεις δεδομένων (www.mitomap.org και www.genpat.uu.se/mitoDB).

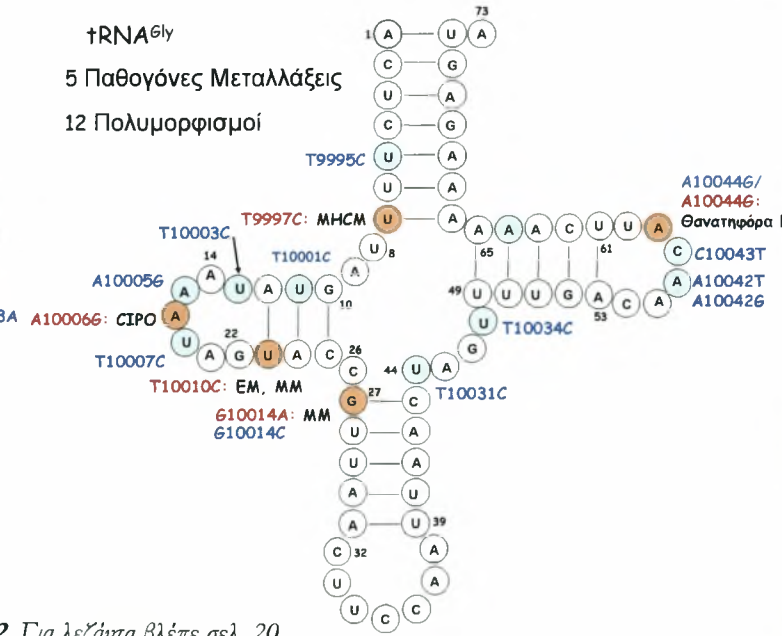
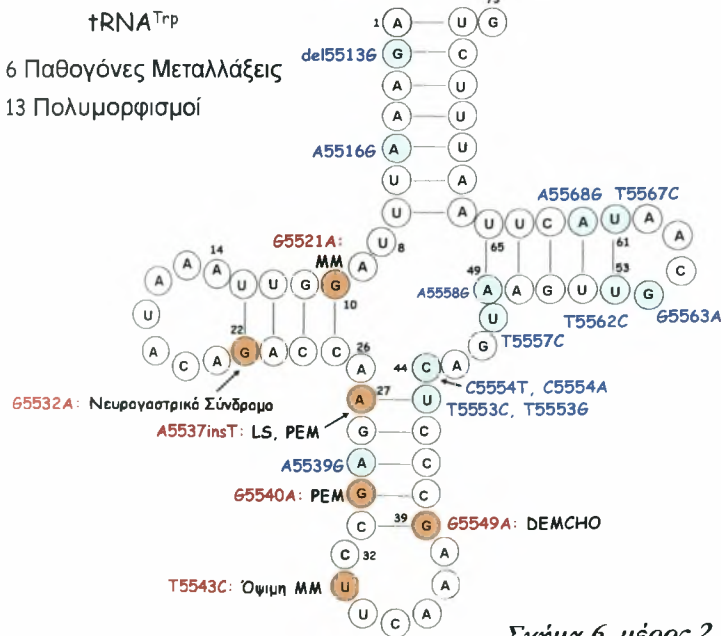
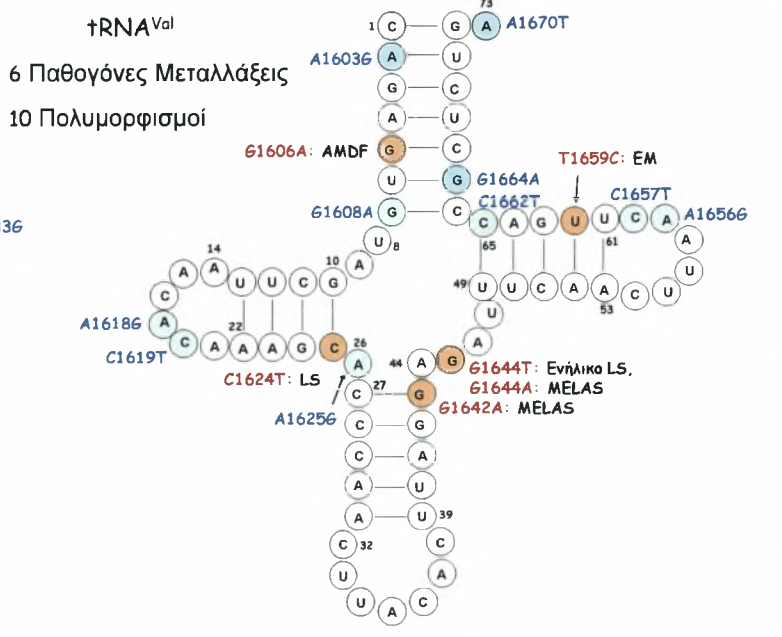
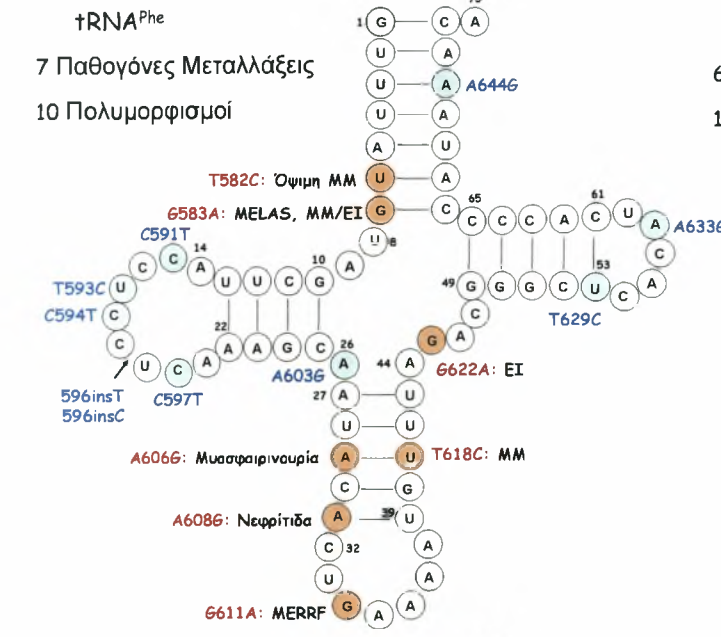
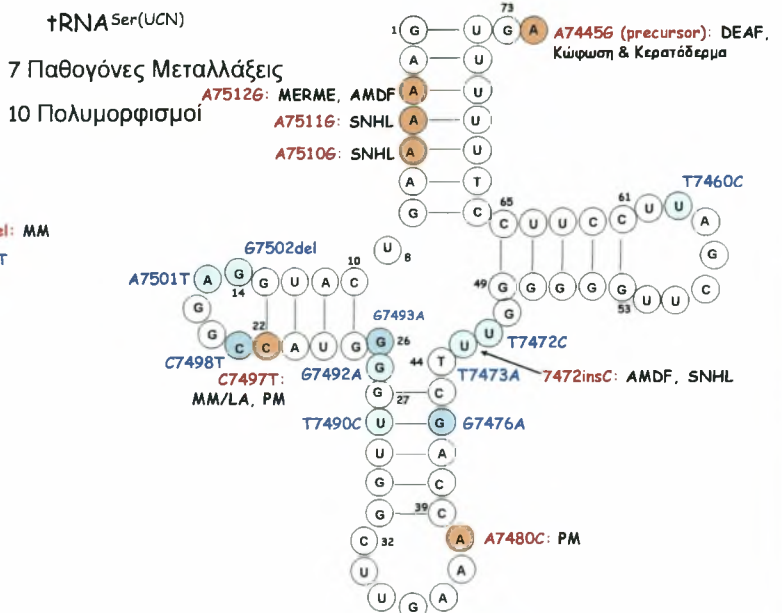
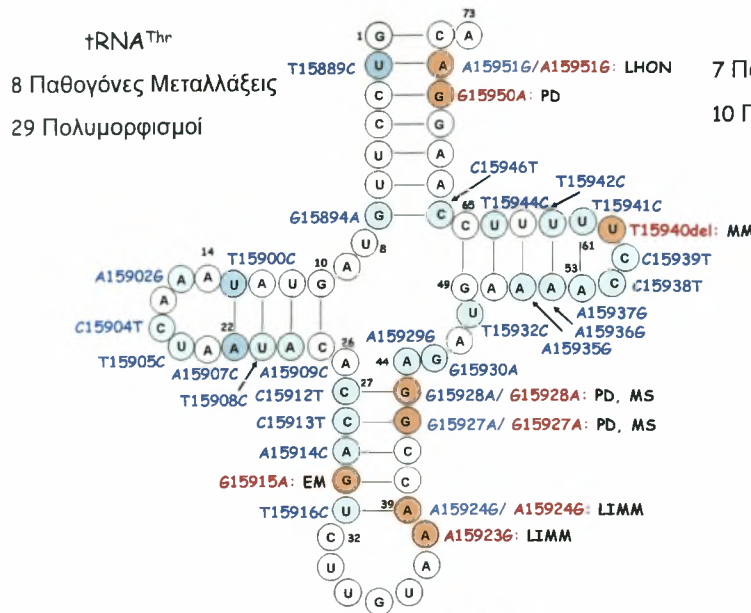
tRNA	Αριθμός παθογόνων μεταλλάξεων	Αριθμός πολυμορφικών μεταλλάξεων	
1	tRNA ^{Leu} (LUR)	28	7
2	tRNA ^{Lys}	14	9
3	tRNA ^{Ile}	14	7
4	tRNA ^{Leu} (CUN)	10	11
5	tRNA ^{Thr}	8	29
6	tRNA ^{Ser} (UCN)	7	10
7	tRNA ^{Phe}	7	10
8	tRNA ^{Val}	6	10
9	tRNA ^{Trp}	6	13
10	tRNA ^{Gly}	5	12
11	tRNA ^{Tyr}	4	7
12	tRNA ^{Pro}	4	9
13	tRNA ^{Asn}	4	7
14	tRNA ^{Gln}	3	15
15	tRNA ^{His}	3	11
16	tRNA ^{Met}	3	6
17	tRNA ^{Ala}	3	11
18	tRNA ^{Ser} (AGY)	3	13
19	tRNA ^{Glu}	3	9
20	tRNA ^{Cys}	2	16
21	tRNA ^{Asp}	2	11
22	tRNA ^{Arg}	0	9
	Ολικά	139	243

μιτοχονδριακό DNA που σχετίζονται με παθογένεια. Περισσότερες από τις μισές από αυτές εντοπίζονται σε γονίδια tRNA, μια σαφώς αξιοσημείωτη παρατήρηση, αν σκεφτούμε ότι οι tRNA αλληλουχίες συνιστούν μόνο το 10% του μιτοχονδριακού γενώματος. Αυτό μπορεί να εξηγηθεί βάση του ουσιαστικού ρόλου των tRNA στην πρωτεϊνοσύνθεση και στον ενεργειακό μεταβολισμό. Στην πραγματικότητα, ο κύριος λόγος που τα ανθρώπινα μιτοχονδριακά γονίδια tRNA κέρδισαν το ενδιαφέρον μελέτης ήταν η συσχέτιση σημειακών μεταλλάξεων στα γονίδια τους με διάφορες νευρομυϊκές και νευροεκφυλιστικές ασθένειες.

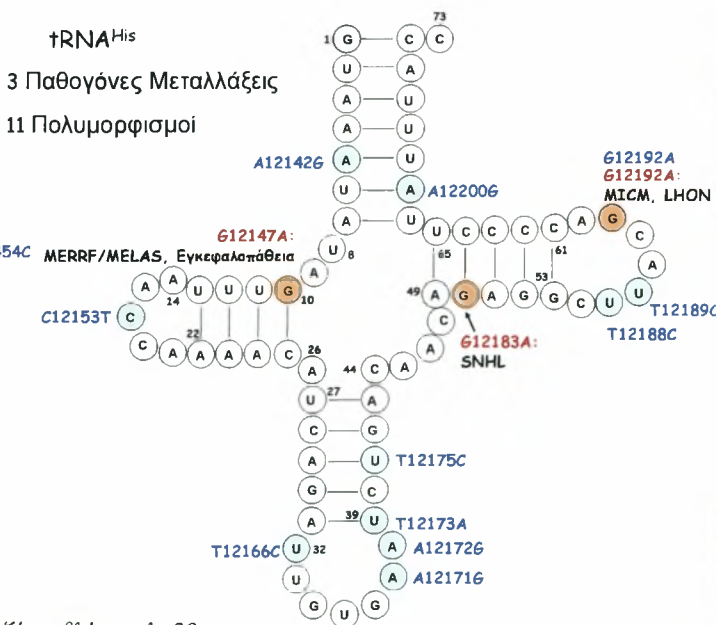
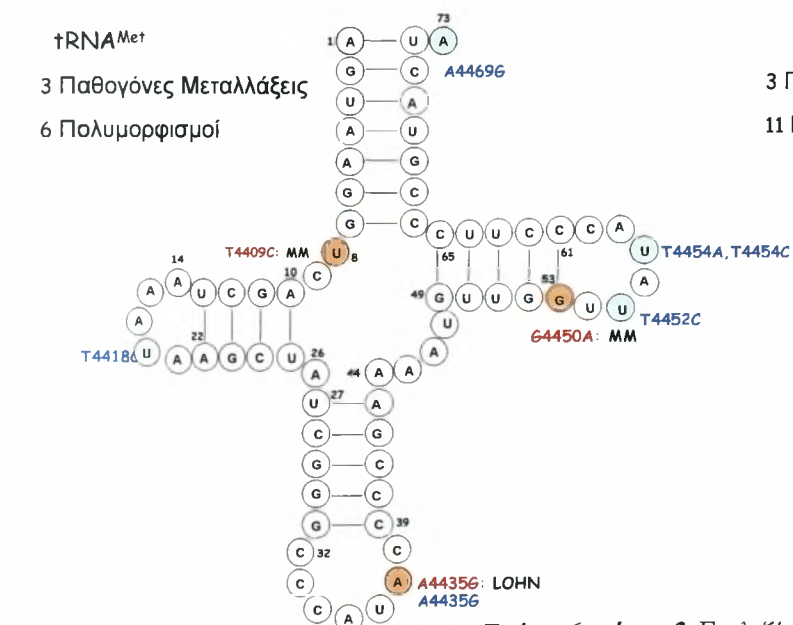
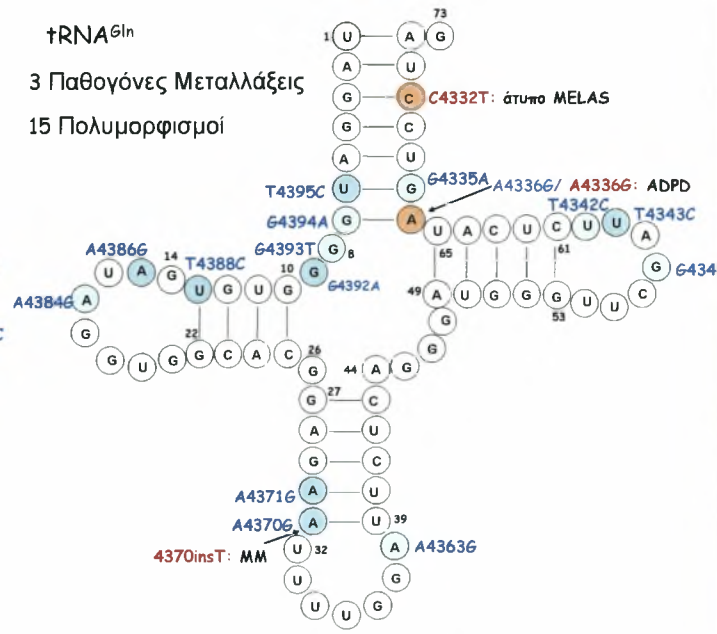
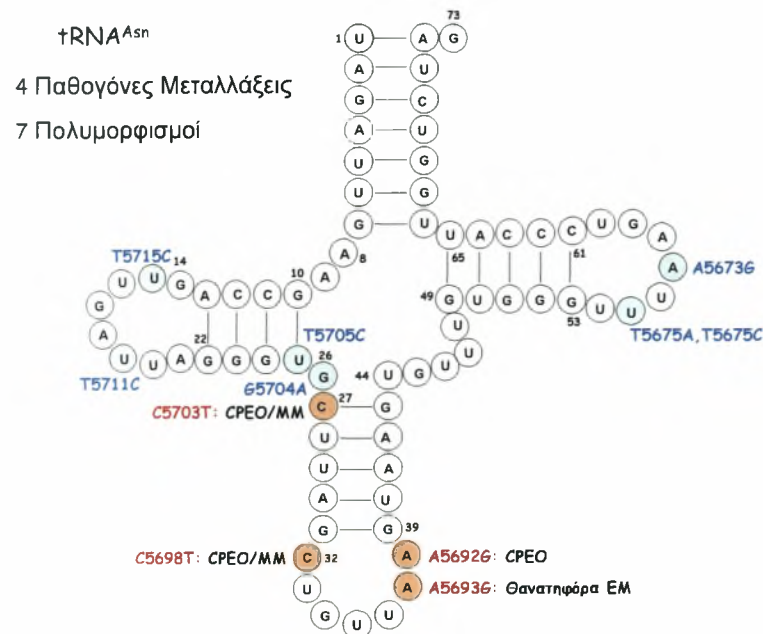
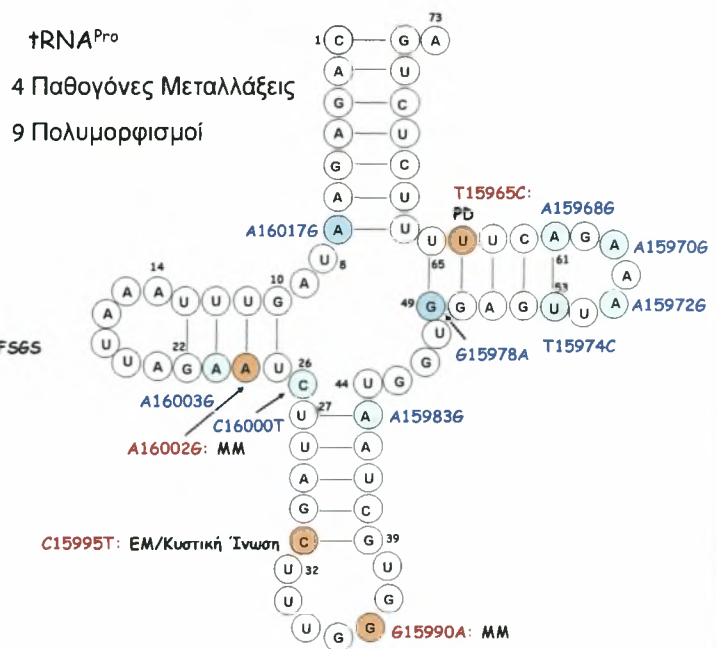
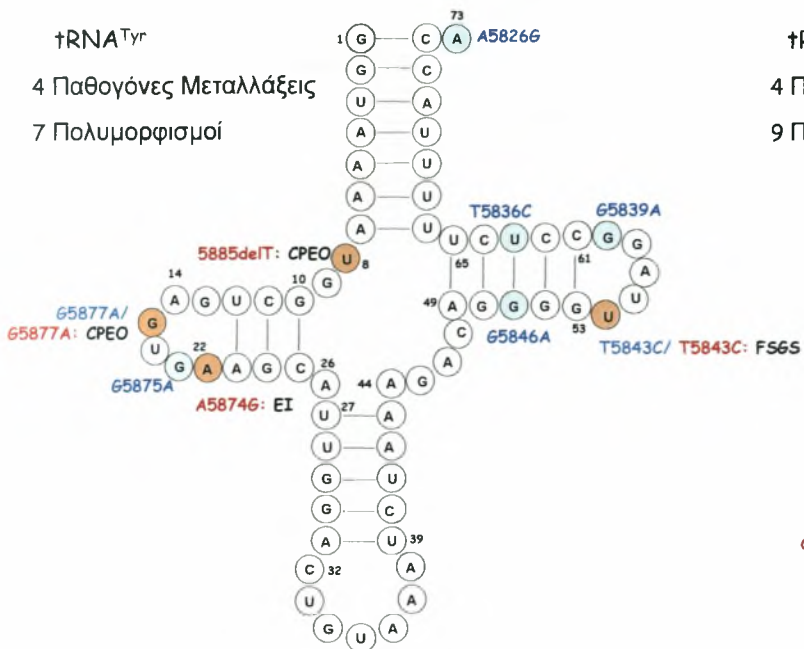
Τα γονίδια tRNA συγκεντρώνουν πολυμορφικές και παθολόνες μεταλλάξεις (Πίνακας 3). Έως τώρα, 243 πολυμορφικές και 139 παθολόνες mt tRNA μεταλλάξεις έχουν περιγραφεί και έχουν γίνει η αφορμή μελέτης πολυάριθμων μεμονωμένων αναφορών (Σχήμα 6).⁷ Οι **πολυμορφισμοί**, είναι ουδέτερες μεταλλάξεις που βρίσκονται σε όλα τα γονίδια tRNA και γενικά δεν επηρεάζουν τη δομική ακεραιότητα και το λειτουργικό ρόλο των tRNA. Αυτές οι μεταλλάξεις είναι συνήθως αντικαταστάσεις ενός νουκλεοτιδίου και συνεισφέρουν στην ποικιλοότητα των ανθρώπινων πληθυσμών. Αυτός είναι και ο λόγος που χρησιμοποιούνται σε πολλές μελέτες με σκοπό να καθοριστεί η φυλογενετική κατανομή μεγάλων πληθυσμών.⁸ Όσον αφορά τις **παθολόνες μεταλλάξεις**, έχει βρεθεί ότι εντοπίζονται σε όλα τα tRNA γονίδια εκτός από αυτό του tRNA της αργινίνης. Είναι επίσης σημαντικό να τονίσουμε ότι μόνο σε τρία γονίδια tRNA εντοπίζονται σχεδόν το 50% όλων των γνωστών παθολόνων μεταλλάξεων στον άνθρωπο (tRNA^{Leu(UUR)}, tRNA^{Lys} και tRNA^{Ile}).



Σχήμα 6. μέρος 1. Για λεζάντα βλέπε σελ. 20



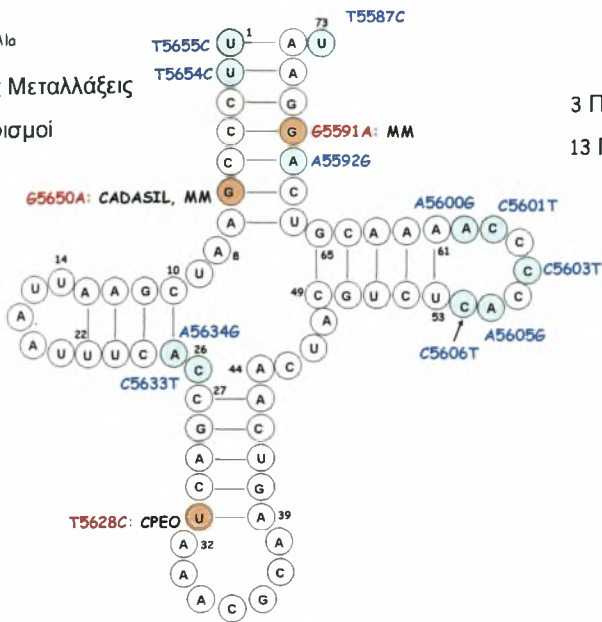
Σχήμα 6. μέρος 2. Για λεζάντα βλέπε σελ. 20
 17



Σχήμα 6. μέρος 3. Για λεζάντα βλέπε σελ. 20

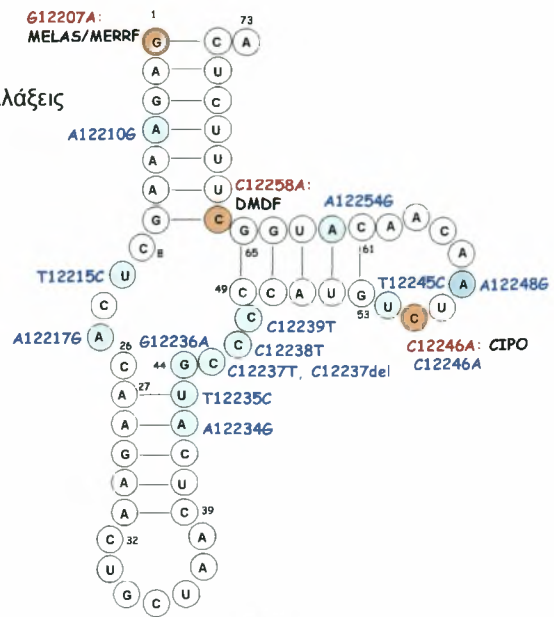
†RNA^{Ala}

3 Παθογόνες Μεταλλάξεις
11 Πολυμορφισμοί



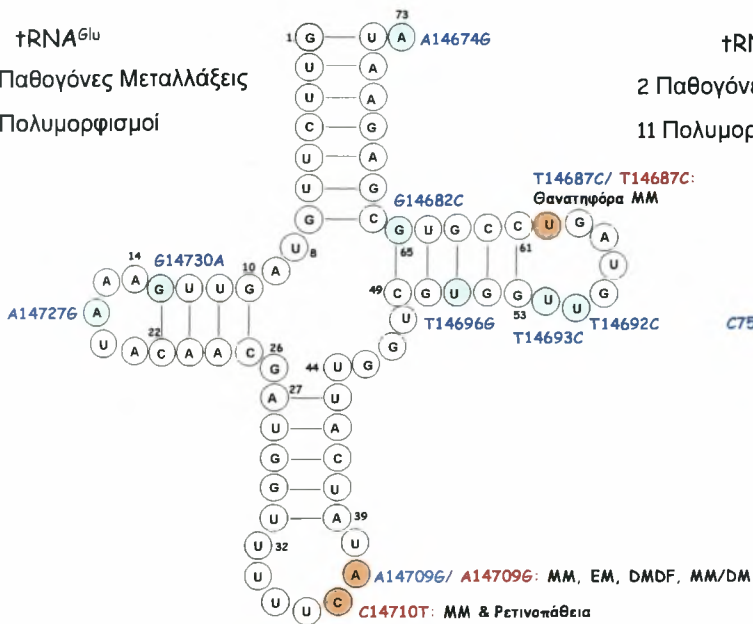
†RNA^{Ser(AGY)}

3 Παθογόνες Μεταλλάξεις
13 Πολυμορφισμοί



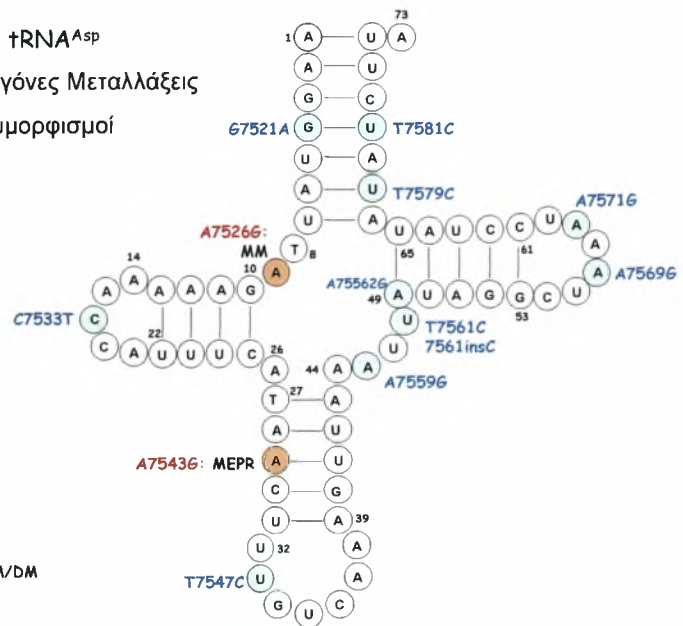
†RNA^{Glu}

3 Παθογόνες Μεταλλάξεις
9 Πολυμορφισμοί



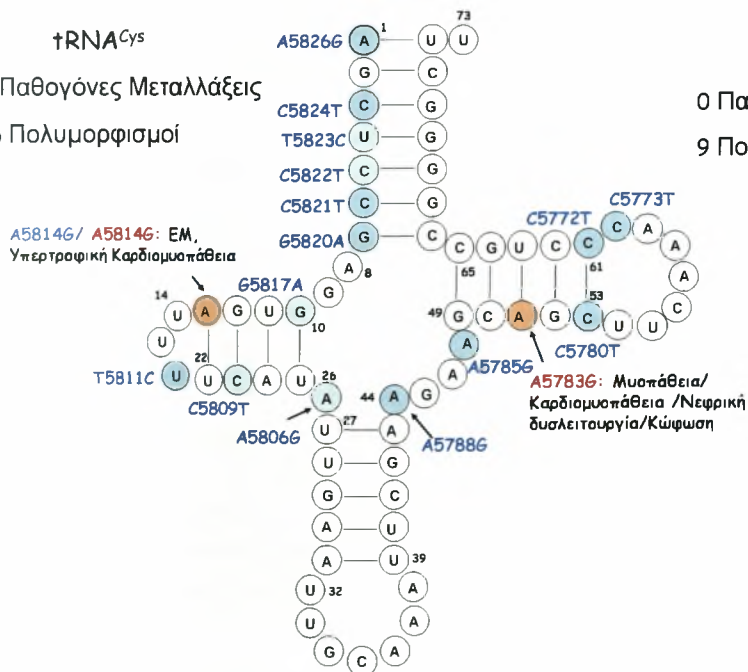
†RNA^{Asp}

2 Παθογόνες Μεταλλάξεις
11 Πολυμορφισμοί



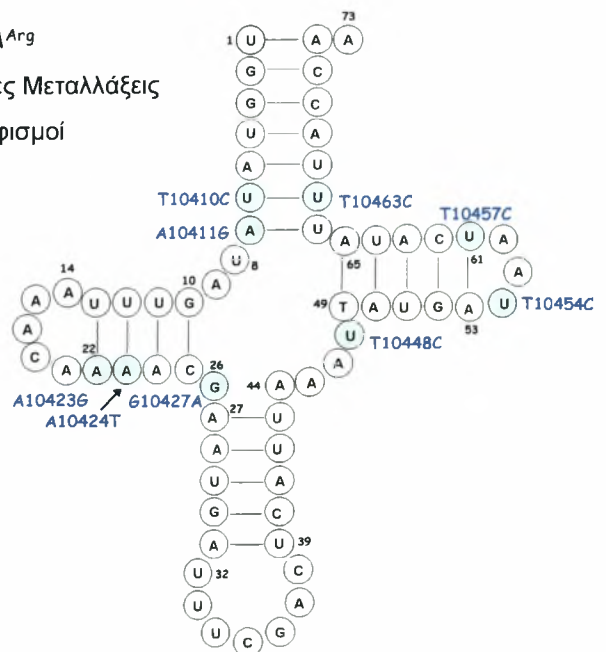
†RNA^{Cys}

2 Παθογόνες Μεταλλάξεις
16 Πολυμορφισμοί



†RNA^{Arg}

0 Παθογόνες Μεταλλάξεις
9 Πολυμορφισμοί



Σχήμα 6. μέρος 4. Για λεζάντα βλέπε σελ. 20

Σχήμα 6. Παθογόνες και πολυμορφικές μεταλλάξεις στα ανθρώπινα μιτοχονδριακά tRNA. Οι παθογόνες μεταλλάξεις απεικονίζονται με κόκκινο ενώ οι πολυμορφισμοί με μπλε. Οι αλληλουχίες των tRNA πάρθηκαν από την βάση δεδομένων αναφοράς www.tRNA.uni-bayreuth.de και οι παθογόνες και πολυμορφικές μεταλλάξεις από τις www.mitomap.org και www.genpat.uu.se/mitDB βάσεις δεδομένων. Στο σχήμα αναφέρονται επίσης οι ασθένειες που οφείλονται σε αυτές τις μεταλλάξεις. ADPD: Νόσος Alzheimer και Parkinson, AISA: Επίκτητη ιδιοπαθής σιδηροβλαστική αναιμία, AP: Ασυμπτωματική πρωτεϊνουρία, BD: Διπολική διαταραχή, CIPO: Χρόνια εντερική ψευδοαπόφραξη, CPEO: Χρόνια προοδευτική έξω οφθαλμοπληγία, DCM: Διατακτική καρδιομυοπάθεια, DEAF: Μητρικά κληρονομούμενη κώφωση, DM: Σακχαρώδης διαβήτης, DMDF: Κληρονομούμενος σακχαρώδης διαβήτης με κώφωση, ECM: εγκεφαλοκαρδιομυοπάθεια, EEM: Εγκεφαλοεντερομυοπάθεια, EI: Μη ανοχή στην άσκηση, EM: Εγκεφαλομυοπάθεια, FSGS: Είδος νεφρίτιδας με πρόβλημα 'εστιασμένο' σε τμήμα των νεφρικών σπειραμάτων, GDM: Σακχαρώδης διαβήτης σε περίοδο εγκυμοσύνης, KSS: Σύνδρομο Kearns-Sayre, LA: Γαλακτική οξέωση, LHON: Κληρονομική οπτική νευροπάθεια του Leber, LMM: Θανατηφόρος βρεφική μυοπάθεια, LS: Σύνδρομο Leigh, MELAS: Μιτοχονδριακή εγκεφαλομυοπάθεια, γαλακτική οξέωση και εγκεφαλικά επεισόδια, MEPR: Μυοκλονική επιληψία με ψυχοκινητική καθυστέρηση, MERRF: Μυοκλονική επιληψία με ανώμαλες ερυθρές μυϊκές ίνες, MERME: επικάλυψη των συνδρόμων MERRF/MELAS, MHCM: Μητρικά κληρονομούμενη υπερτροφική καρδιομυοπάθεια, MICM: Μητρικά κληρονομούμενη καρδιομυοπάθεια, MID: Μητρικά κληρονομούμενος διαβήτης, MM: Μιτοχονδριακή μυοπάθεια, MNGIE: μιτοχονδριακή νευρογαστροεντερική εγκεφαλοπάθεια, MS: Σκλήρυνση κατά πλάκας, MSL: Πολλαπλή λιπομάτωση, PEM: Προοδευτική εγκεφαλομυοπάθεια, PEO: προοδευτική έξω οφθαλμοπληγία, SNHL: Νευροαισθητήρια κώφωση.

Οι περισσότερες μεταλλάξεις είναι μεταπτώσεις (δηλαδή πυριμιδίνη σε πυριμιδίνη και πουρίνη σε πουρίνη) παρά μετατροπές (δηλαδή πυριμιδίνη σε πουρίνη και το αντίστροφο) και είναι διασπαρμένες σε όλη την νουκλεοτιδική αλληλουχία των tRNAs, τόσο στους βραχίονες όσο και στις θηλιές. Αυτές που εντοπίζονται στους βραχίονες, συνήθως διαταράσσουν το φυσιολογικό ζευγάρισμα των βάσεων που έχει διατυπωθεί από τους Watson και Crick, και συνήθως εμφανίζονται ως C·A ή G·U. Υπάρχει επίσης απουσία μεταλλάξεων, πλην ελάχιστων εξαιρέσεων, στη θηλιά του αντικωδικονίου, αφού οποιαδήποτε αλλαγή βάσεως σε τέτοιο σημείο θα μπορούσε να αποβεί μοιραία για την διαδικασία της πρωτεϊνοσύνθεσης. Μια εκτενής μελέτη που σύγκρινε τα βασικά χαρακτηριστικά τόσο των πολυμορφικών όσο και των παθογόνων μεταλλάξεων έδειξε ότι οι περισσότερες παθογόνες μεταλλάξεις επηρεάζουν νουκλεοτιδία που έχουν δείξει υψηλό βαθμό συντήρησης με το χρόνο, ενώ οι περισσότερες πολυμορφικές στοχεύουν όχι σε τόσο συντηρημένα κατάλοιπα, χωρίς βέβαια αυτό να αποτελεί τον κανόνα.⁹ Παρόλα αυτά οι γνώσεις μας στους παράγοντες που καθορίζουν την παθογένεια των μιτοχονδριακών tRNA μεταλλάξεων, είναι πολύ περιορισμένες.

2.3.1.2 Μεταλλάξεις σε μιτοχονδριακά tRNA γονίδια και σε γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεϊνικές υπομονάδες της αναπνευστικής αλυσίδας

Όπως έχει αναφερθεί παραπάνω, μεταλλάξεις έχουν βρεθεί σε όλο το μήκος του μιτοχονδριακού γενώματος, τόσο σε κωδικές όσο και σε μη κωδικές περιοχές. Έτσι, παθογόνες και πολυμορφικές μεταλλάξεις έχουν βρεθεί στα 13 μιτοχονδριακά γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεϊνικές υπομονάδες της αναπνευστικής αλυσίδας αλλά και στα 2 rRNA, το 12S και 16S. Στις κωδικές περιοχές των 13 γονιδίων έχουν αναφερθεί 163 παθογόνες και 1329 πολυμορφικές μεταλλάξεις ενώ στις μη κωδικές των 2 rRNA, 12 παθογόνες και 168 πολυμορφικές. 9 από τις 12 παθογόνες μεταλλάξεις των γονιδίων rRNA είναι υπεύθυνες για περιπτώσεις κώφωσης ενώ ποικίλοι φαινότυποι αντιστοιχούν στις 163 παθογόνες των γονιδίων που κωδικοποιούν υπομονάδες της αναπνευστικής αλυσίδας.

2.3.1.3 Μεταλλάξεις σε πυρηνικά γονίδια

Η έκταση των πυρηνικών-μιτοχονδριακών αλληλεπιδράσεων είναι αρκετά πολύπλοκη για να εκτιμηθεί στο μεγαλύτερο ποσοστό. Παρόλα αυτά, ένας μεγάλος αριθμός πυρηνικών γονιδίων τα οποία ελέγχουν την ακεραιότητα και τον αριθμό των mtDNA αντιγράφων έχουν ταυτοποιηθεί και συμπεριλαμβάνουν τα γονίδια *POLG1*,¹⁰ *PEO1*,¹¹ *ANT1*,¹² *TP*,¹³ *DGOUK*¹⁴ και *TK2*¹⁵. Μεταλλάξεις σε αυτά τα γονίδια επηρεάζουν είτε τη διαθέσιμη νουκλεοτιδική δεξαμενή της μιτοχονδριακής αντιγραφής (*ANT1*, *TP*, *DGOUK*, *TK2*) είτε την ενζυμική διαδικασία αυτή καθαυτή (*POLG1*, *PEO1*) οδηγώντας σε μείωση του αριθμού των αντιγράφων. Επιπροσθέτως, μεταλλάξεις στο γονίδιο *SURF-1* που κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη αναγκαία για το σχηματισμό του συμπλόκου της κυτοχρωμικής οξειδάσης (COX) έχει δειχθεί να προκαλεί το σύνδρομο Leigh.¹⁶ Παρομοίως, μεταλλάξεις στο γονίδιο *SCO2*, το οποίο εδράζεται στο χρωμόσωμα 22 και έχει παρόμοια λειτουργία με το προηγούμενο, έχει συνδεθεί με θανατηφόρα βρεφική καρδιομυοπάθεια και σοβαρή δυσλειτουργία της COX στην καρδιά και τους σκελετικούς μύες.^{17,18} Η πυρηνική συνεισφορά γίνεται ακόμη πιο φανερή σε παραδείγματα συνεργασίας με μιτοχονδριακά γονίδια. Το πρωτόζωο *Leishmania tropica* έχει αναπτύξει μηχανισμούς ενεργής μεταφοράς μορίων tRNA μέσω πρωτεϊνικών συμπλοκών (RIC – RNA Import Complex) που εντοπίζονται στην εσωτερική μεμβράνη, των οποίων οι υπομονάδες κωδικοποιούνται τόσο από μιτοχονδριακά όσο και από πυρηνικά γονίδια.¹⁹

2.3.2 Κλινικός φαινότυπος των μιτοχονδριακών ασθενειών

Είναι πολύ δύσκολο να συσχετίσουμε ένα συγκεκριμένο φαινότυπο μιτοχονδριακής ασθένειας με τον αντίστοιχο γενότυπο του ασθενή και αυτό γιατί μια συγκεκριμένη παθογόνα μετάλλαξη, τις περισσότερες φορές, οδηγεί σε περισσότερους από έναν φαινότυπους και το αντίστροφο, δηλαδή ο ίδιος φαινότυπος μπορεί να συνδέεται με περισσότερες από μία διαφορετικές μεταλλάξεις.

Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η A3243G μετάλλαξη στο γονίδιο του tRNA^{Leu(UUR)}, η οποία συνήθως συναντάται σε ασθενείς που εμφανίζουν μιτοχονδριακή εγκεφαλομυοπάθεια, γαλακτική οξέωση και εγκεφαλικά επεισόδια (MELAS). Ωστόσο, η συγκεκριμένη μετάλλαξη έχει βρεθεί να εμφανίζεται και σε άτομα με μυοκλονική επιληψία με ανώμαλες ερυθρές μυϊκές ίνες (MERRF), σε άτομα με το σύνδρομο του Leigh, σε καρδιομυοπάθειες, σε περιπτώσεις διαβήτη, κώφωσης και οφθαλμοπληγίας. Επιπροσθέτως, ο φαινότυπος MELAS έχει συσχετιστεί και με αρκετές άλλες σημειακές μεταλλάξεις σε γονίδια tRNA, όπως οι A3243G, G3244A, A3252G, G3256T, A3258C, T3271C και η T3291C στο γονίδιο του tRNA^{Leu(UUR)}, η G1642A και η G1644A στο γονίδιο του tRNA^{Val}, η G4332A στο tRNA^{Gln} και η T8316C στο γονίδιο του tRNA^{Lys}. Οπότε, όπως βλέπουμε, δεν υπάρχει μια καθαρή σύνδεση μεταξύ μετάλλαξης και φαινοτύπου. Αυτή η παρατήρηση μπορεί να εξηγηθεί μερικώς από τα ειδικά χαρακτηριστικά των μιτοχονδρίων, όπως το *επίπεδο ετεροπλασμίας* και ο *μιτωτικός διαχωρισμός*.

Ετεροπλασμία ονομάζεται η συνύπαρξη mtDNA αγρίου τύπου και μεταλλαγμένου στο ίδιο μιτοχόνδριο, στο ίδιο κύτταρο και ιστό σε ποικίλες αναλογίες. Το επίπεδο ετεροπλασμίας παίζει πολύ κρίσιμο ρόλο στον καθορισμό του κλινικού φαινοτύπου. Αν η μετάλλαξη είναι παθογόνος, η αναλογία των μεταλλαγμένων μιτοχονδρίων (πιο συγκεκριμένα, των μορίων DNA που βρίσκονται σε αυτά) σε ένα ετεροπλασμικό πληθυσμό κυττάρων ενός ιστού, είναι αυτή που καθορίζει τη σοβαρότητα του βιοχημικού ελαττώματος για το συγκεκριμένο ιστό. Παθογόνες μεταλλάξεις γονιδίων tRNA είναι συνήθως ετεροπλασμικές, ενώ οι ουδέτεροι πολυμορφισμοί είναι ομοπλασμικοί. Παρόλα αυτά, η ομοπλασμία δεν είναι ασυμβίβαστη με την παθογένεια, αφού πολλοί κλινικοί φαινότυποι έχουν αποδοθεί σε ομοπλασμικές μεταλλάξεις tRNA γονιδίων.^{20,21}

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

Έτσι, τα κύρια συμπτώματα μπορεί να είναι μεμονωμένα και να αφορούν κάποια είδη εγκεφαλοπάθειας,²² μυοπάθειας^{23,24} και καρδιομυοπάθειας^{25,26} να δρουν αθροιστικά και να παράγουν έναν πολύ επικίνδυνο για την ζωή του ασθενή φαινότυπο (MELAS, MERRF, CPEO), αλλά και να έχουν μικρότερο αντίκτυπο με ποικίλα κλινικά χαρακτηριστικά, ανάλογα πάντα με τους παράγοντες που καθορίζουν την έκταση και το βαθμό της παθογονικότητας που αναφέραμε παραπάνω. Οι ασθένειες δηλαδή που έχουν ποικίλα κλινικά χαρακτηριστικά, μπορούν είτε να συνυπάρχουν με τα βαριά σύνδρομα (γαλακτική οξέωση, σακχαρώδης διαβήτης) είτε να εμφανίζονται αυτούσια (νευροεμφυλιστικές ασθένειες, εντερικές και νεφρικές διαταραχές, σιδηροβλαστική αναιμία, αυτισμός, σχιζοφρένεια, πολλαπλή λιπομάτωση). Παρακάτω θα περιγράψουμε τις κύριες συνδρομικές μορφές αλλά και τις ασθένειες με ποικίλα γνωρίσματα που συνδέονται με μεταλλάξεις στο μιτοχονδριακό DNA.

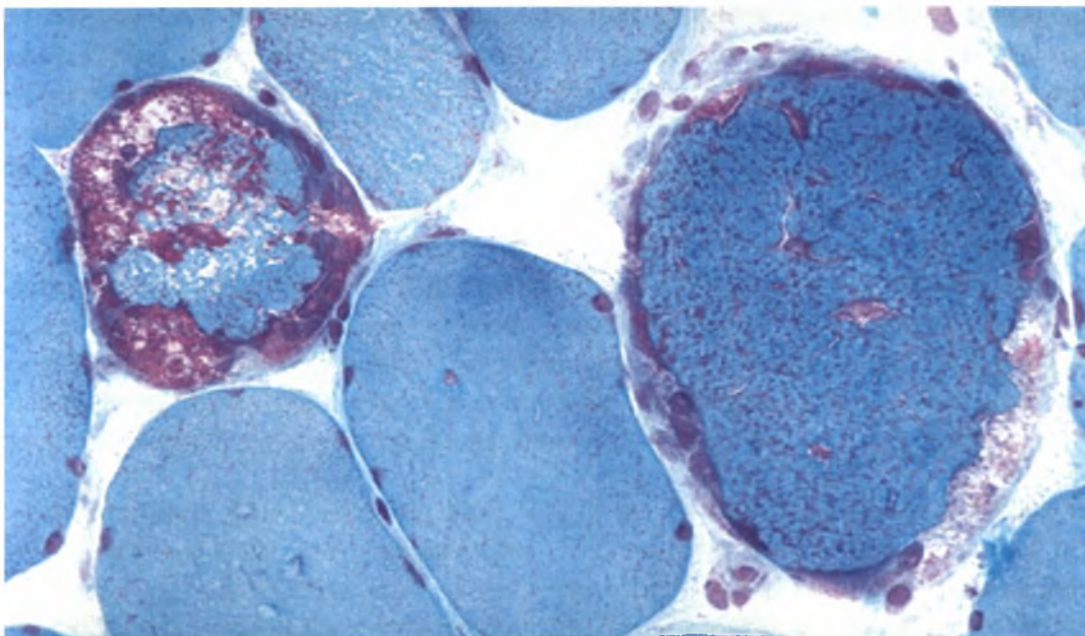
2.3.2.1 Μιτοχονδριακή εγκεφαλομυοπάθεια, γαλακτική οξέωση και εγκεφαλικά επεισόδια (MELAS)

Το MELAS είναι η πιο κοινή μητρικά κληρονομούμενη εγκεφαλομυοπάθεια.²⁷ Είναι μια κλινικά και γενετικά ετερογενής ασθένεια. Όπως υποδεικνύει και το όνομα της, τα εγκεφαλικά επεισόδια είναι το χαρακτηριστικό που την προσδιορίζει και συχνά συμβαίνει πριν την ηλικία των δεκαπέντε. Η κλινική πορεία της ασθένειας ποικίλει αρκετά, από ασυμπτωματική έναρξη της ανάπτυξης, σε σταδιακή μυϊκή αδυναμία, γαλακτική οξέωση, γνωστική δυσλειτουργία, σπασμούς, εγκεφαλοπάθεια και πρόωρο

θάνατο. Ένα αξιοσημείωτο βιοχημικό χαρακτηριστικό του MELAS είναι οι αυξημένες συγκεντρώσεις γαλακτικού στον ορό και στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό, οι οποίες αυξάνονται σημαντικά με την άσκηση. Τα ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά του MELAS συμπεριλαμβάνουν ανώμαλες και ερυθρές μυϊκές ίνες που συνιστούν το κύριο χαρακτηριστικό όλων των μιτοχονδριακών μυοπαθειών και υποδηλώνουν μη φυσιολογικό πολλαπλασιασμό των μιτοχονδρίων που βρίσκονται κάτω από τη σαροπλασματική μεμβράνη των μυϊκών ινών. Αρκετές σημειακές μεταλλάξεις σε γονίδια tRNA έχουν συσχετιστεί με τον MELAS φαινότυπο. Η πιο κοινή όμως, η οποία έχει βρεθεί στο 80% των περιπτώσεων με το σύνδρομο MELAS, είναι η ετεροπλάσμική (85% στο μυ και 61% στο αίμα) μετάλλαξη A3243G στο γονίδιο του tRNA^{Leu(UUR)}.²⁸ Έξι ακόμη μεταλλάξεις που έχουν συσχετιστεί με το MELAS έχουν περιγραφεί στο γονίδιο του tRNA^{Leu(UUR)}: G3244A,²⁹ A3252G,³⁰ G3256T,^{31,32} T3258C,³³ T3271C³⁴ και η T3291C³⁵ καθώς επίσης και αρκετές άλλες σε λοιπά γονίδια tRNA (Σχήμα 6).

2.3.2.2 Μυοκλονική επιληψία με ανώμαλες ερυθρές μυϊκές ίνες (MERRF)

Το MERRF είναι μιας βαριάς μορφής εγκεφαλομυοπάθεια που χαρακτηρίζεται από μυοκλονική επιληψία, παρεγκεφαλιδική αταξία, μυϊκή αδυναμία και εξάντληση. Ιστολογική ανάλυση εγκάρσιας τομής σιελεκτικού μυ ασθενών με MERRF, βαμμένη με ειδική χρώση (Gomori's trichrome), αποκαλύπτει την παρουσία ανώμαλων ερυθρών μυϊκών ινών, μυϊκών ινών που εκθέτουν περιφερικές ατελείς, κόκκινες κηλίδες και αντιπροσωπεύουν μη φυσιολογική συσσώρευση μιτοχονδρίων (Σχήμα 7).³⁶ Τα συμπτώματα του MERRF συνήθως ξεκινούν την 2^η ή 3^η δεκαετία της ζωής του ασθενή. Οι πιο συχνές μεταλλάξεις που σχετίζονται με το MERRF εντοπίζονται στο γονίδιο του tRNA^{Lys} και περίπου το 80% των πασχόντων είναι φορείς της μετάλλαξης A8344G σε ετεροπλάσμική κατάσταση.^{37,38} Άλλες μεταλλάξεις που εντοπίζονται στο ίδιο γονίδιο και έχουν συνδεθεί με το σύνδρομο MERRF είναι οι : A8296G,³⁹ T8356C,⁴⁰ G8361A,⁴¹ και G8363A^{39,42}.



Σχήμα 7. Ανώμαλες ερυθρές μυϊκές ίνες ύστερα από χρώση με Gomori's trichrome.

2.3.2.3 Σύνδρομο του Leigh (LS)

Το σύνδρομο του Leigh, το οποίο πρωτοπεριγράφηκε το 1951, είναι μια προοδευτική νευροεκφυλιστική νόσος, που συνήθως εμφανίζεται σε ηλικίες μεταξύ τριών μηνών και δύο χρόνων. Η νόσος επιδεινώνεται ραγδαία με πρώτα συμπτώματα να είναι η απώλεια ελέγχου του κεφαλιού και η απώλεια ελέγχου συγκεκριμένων μυών. Καθώς η διαταραχή χειροτερεύει, αναπτύσσονται και άλλα συμπτώματα όπως καρδιακά προβλήματα, υποτονία και γενικευμένη αδυναμία, όπως επίσης και γαλακτική οξέωση. Τα στάδια εκδήλωσης είναι συνήθως τρία: Το πρώτο μεταξύ οκτώ και 12 μηνών, το οποίο συμπεριλαμβάνει εμετούς και αδυναμία ανάπτυξης, το δεύτερο στη νηπιακή ηλικία με ελαττωμένη ικανότητα κίνησης, οφθαλμικά προβλήματα, αναπνευστικές ανωμαλίες ενώ το τρίτο μεταξύ 2 και 10 χρόνων και χαρακτηρίζεται από υποτονία και διατροφικές δυσκολίες.

Τα βιοχημικά χαρακτηριστικά του συνδρόμου του Leigh είναι οι αυξημένες συγκεντρώσεις γαλακτικού και πυροσταφυλικού οξέος τόσο στον ορό όσο και στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό. Σοβαρή δυσλειτουργία του μιτοχονδριακού ενεργειακού μεταβολισμού είναι γενικώς εμφανής και συνδέεται με την αιτιολογία αυτής της νευροεκφυλιστικής νόσου του κεντρικού νευρικού συστήματος. Η τυπική σημειακή μετάλλαξη που έχει παρατηρηθεί σε ασθενείς με το σύνδρομο του Leigh είναι στη θέση 8993, στο γονίδιο ATPase 6, που κωδικοποιεί για μια υπομονάδα της ATPάσης. Αν η μετάλλαξη βρίσκεται σε επίπεδα πάνω από 90%, τότε ο ασθενής πάσχει από το σύνδρομο αδιαμφισβήτητα. Αντιθέτως, αν βρίσκεται σε επίπεδα χαμηλότερα του 70%, τα άτομα αυτά είναι ασυμπτωματικά. Παρόλα αυτά, πρόσφατα το σύνδρομο Leigh συνδέθηκε με μεταλλάξεις σε πυρηνικά γονίδια που κωδικοποιούν για υπομονάδες των αναπνευστικών ενζύμων καθώς επίσης και σε γονίδια tRNA.^{43,44,45}

2.3.2.4 Κληρονομική οπτική νευροπάθεια του Leber (LHON)

Η κληρονομική οπτική νευροπάθεια του Leber εδραιώθηκε ως ασθένεια εδώ και περισσότερο από 100 χρόνια. Η LHON είναι από τις κυριότερες αιτίες απώλειας όρασης συμπεριλαμβάνοντας περίπου το 3% των περιπτώσεων τύφλωσης σε νεαρά ενήλικα αρσενικά άτομα. Αυτή η ασθένεια κληρονομείται μητρικά και οι περισσότεροι ασθενείς είναι άνδρες ηλικίας 20 έως 30 χρόνων, αλλά υπάρχουν και περιπτώσεις γυναικών που έχουν προσβληθεί (περίπου το 15% των περιπτώσεων). Παρόλα αυτά ο λόγος της υπεροχής των ανδρών που πάσχουν από αυτή την ασθένεια, δεν είναι γνωστός έως τώρα. Η LHON χαρακτηρίζεται κλινικά από αμφίπλευρη οξεία απώλεια όρασης προκαλούμενη από εκφυλισμό των αμφιβληστροειδικών γαγγλιακών κυττάρων και των αξόνων τους. Επιπρόσθετα συμπτώματα που συνήθως εμφανίζουν ασθενείς που πάσχουν από αυτή την ασθένεια είναι: καρδιακές διαταραχές, αταξία και δυστονία.⁴⁶

Τρεις σημειακές μεταλλάξεις, οι 3460, 11778 και 14484 (θέσεις εντός γονιδίων τα οποία κωδικοποιούν για πολυπεπτίδια του συμπλόκου I), έχουν οριστεί ως “πρωταρχικές” μεταλλάξεις που οδηγούν στην LHON και οι οποίες αντιστοιχούν στο 90% των περιπτώσεων παγκοσμίως. Οι δευτερεύουσες, μεταλλάξεις οι οποίες

έχουν συσχετιστεί, αλλά σε μικρότερο βαθμό όσον αφορά την πρόκληση της παθογένειας της ασθένειας, συμπεριλαμβάνουν τις ετεροπλάσμιες μεταλλάξεις A15951G στο γονίδιο του tRNA^{Thr},⁴⁶ A4435G στο γονίδιο του tRNA^{Met}⁴⁷ και την G12192A στο γονίδιο του tRNA^{His}⁴⁸ οι οποίες επηρεάζουν την φαινοτυπική έκφραση της “πρωταρχικής” μετάλλαξης G11778A, στο γονίδιο της ND-4 υπομονάδας.

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

Η έναρξη της οφθαλμοπάρεσης και της μελαγχρωστικής ρετινοπάθειας πριν την ηλικία των είκοσι είναι χαρακτηριστικό μιας απειλητικής ασθένειας γνωστής και ως σύνδρομο Kearns-Sayre. Πολύ συχνά αυτά τα κλινικά συμπτώματα συνοδεύονται από άλλα, όπως παρεγκεφαλιδική αταξία, μυοπάθεια, πλήρη φραγή της καρδιακής παροχής και ενδοκρινική δυσλειτουργία (σακχαρώδης διαβήτης, υπερπαραθυρεοειδισμός και κοντό ανάστημα). Η μυϊκή αδυναμία επηρεάζει κυρίως τους μύες του προσώπου, του φάρυγγα και των ώμων, οδηγώντας σε δυσαρθρία και δυσφαγία σε πολλούς ασθενείς. Βιοχημικές ανωμαλίες που εντοπίζονται σε αυτό το σύνδρομο συμπεριλαμβάνουν γαλακτική οξέωση και αυξημένα επίπεδα πρωτεϊνών στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό. Επίσης, βιοψία μυών έχει επιβεβαιώσει και την παρουσία ανώμαλων ερυθρών μυϊκών ινών. Στην πραγματικότητα, λίγες μιτοχονδριακές μεταλλάξεις έχουν συνδεθεί με το σύνδρομο Kearns-Sayre, συνήθως ελλείψεις χιλιάδων βάσεων. Επιπλέον, το συγκεκριμένο σύνδρομο δείχνει συχνά αλληλοεπικάλυψη με άλλα όπως το MERRF.⁴⁹ Επειδή το σύνδρομο Kearns-Sayre είναι μια μιτοχονδριακή μυοπάθεια που χαρακτηρίζεται από προοδευτική έξω οφθαλμοπληγία (PEO), έχει διατυπωθεί ότι η PEO και η KSS περιγράφουν διαφορετικούς βαθμούς σοβαρότητας της ίδιας ασθένειας.

Η χρόνια προοδευτική έξω οφθαλμοπληγία (CPEO) είναι μια περίπτωση μυοπάθειας χαρακτηριζόμενη από παράλυση των εξοφθάλμιων μυών (Σχήμα 8).⁵⁰ Η ηλικία έναρξης της συγκεκριμένης ασθένειας ποικίλει. Σε πολλούς ασθενείς παρατηρείται αμφίπλευρη πτώση στην τρίτη με τέταρτη δεκαετία της ζωής τους, ενώ αργότερα αναπτύσσεται προοδευτική πάρεση όλων των εξοφθάλμιων μυών με αποτέλεσμα ακόμη και την πλήρη οφθαλμοπληγία. Άλλα χαρακτηριστικά συμπεριλαμβάνουν κούραση, καταρράκτη, αταξία, περιφερική νευροπάθεια, κώφωση, καρδιομυοπάθεια και κατάθλιψη. Η CPEO σαν σύνδρομο είναι γενετικά ετερογενές. Σε περισσότερο από το 60% των περιπτώσεων, η πιο κοινή αιτία φαίνεται να είναι μια μεγάλη έλλειψη 4977 βάσεων, που συμβαίνει συνήθως σποραδικά και δεν μεταβιβάζεται στην επόμενη γενιά. Σημειακές μεταλλάξεις όμως έχουν βρεθεί και σε γονίδια tRNA.^{51,52,53}



Σχήμα 8. Ασθενής με CPEO

2.3.2.6 Νευροαισθητήρια κώφωση (SNHL): Συνδρομική (Μητρικά κληρονομούμενος σακχαρώδης διαβήτης με κώφωση: MIDD ή DMDF) και μη συνδρομική

Η νευροαισθητήρια κώφωση αποτελεί το 90% των περιπτώσεων απώλειας της ακοής (γνωστή και ως “νευρική κώφωση”). Εκτιμάται ότι το 23% του πληθυσμού, ηλικίας μεγαλύτερης των 65 ετών, πάσχει από αυτή την ασθένεια. Η νευροαισθητήρια κώφωση οφείλεται σε βλάβη της μετάδοσης των ηχητικών παλμών από τα τριχοκύτταρα του έσω αυτιού στο ακουστικό νεύρο και τον εγκέφαλο. Η SNHL μπορεί να είναι κληρονομούμενη ή επίκτητη. Η κληρονομούμενη με την σειρά της μπορεί να είναι συνδρομική ή μη. Η μη συνδρομική νευροαισθητήρια κώφωση είναι εμφανής σε περιπτώσεις όπου δεν υπάρχουν άλλα σημαντικά χαρακτηριστικά πέρα από την απώλεια ακοής. Η συνδρομική αντιθέτως, περιλαμβάνει και άλλα κλινικά ευρήματα εκτός της κώφωσης, όπως για παράδειγμα ο σακχαρώδης διαβήτης. Σχεδόν όλα τα άτομα με νεανικού τύπου διαβήτη και χωρίς άλλα νευρολογικά συμπτώματα, αναπτύσσουν αμφίπλευρη νευροαισθητήρια κώφωση μετά την έναρξη του διαβήτη. Το ορόσημο της ανακάλυψης του μιτοχονδριακού διαβήτη ήταν η ταυτοποίηση μιας έλλειψης 10.4 Kb και της μετάλλαξης A3243G του tRNA^{Leu(UUR)} που σχετιζόνταν με το σύνδρομο, σε μια μεγάλη οικογένεια.⁵⁴ Αντίστοιχα, για τη μη συνδρομική νευροαισθητήρια κώφωση βρέθηκε ότι η ομοπλασμική μετάλλαξη A1555G του γονιδίου του 12S ριβοσωμικού RNA σχετίζεται άμεσα με την ασθένεια, όπως και άλλες σημειακές μεταλλάξεις στο γονίδιο του tRNA^{Leu(CUN)}.⁵⁵

2.3.2.7 Νευροεκφυλιστικές ασθένειες: Νόσος Alzheimer (AD), Νόσος Parkinson (PD) και πολλαπλή (κατά πλάκας) σκλήρυνση (MS)

Παρά τα διαφορετικά κλινικά χαρακτηριστικά των διαφόρων νευροεκφυλιστικών ασθενειών, το γεγονός ότι οι νευρώνες εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από τον ενεργειακό μεταβολισμό, έχει οδηγήσει στην υπόθεση ότι η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία είναι υπεύθυνη για τον εκφυλισμό των νευρώνων. Διάφορες σημειακές μεταλλάξεις έχουν συνδεθεί με νευροεκφυλιστικές ασθένειες όπως η νόσος Alzheimer (AD), η νόσος Parkinson (PD) και η σκλήρυνση κατά πλάκας (MS).⁵⁶ Συγκεκριμένα για τη νόσο Alzheimer, τη συνηθέστερη αιτία πρόκλησης άνοιας, έχει βρεθεί μια σημαντική ανεπάρκεια ενεργειακού μεταβολισμού στα μιτοχόνδρια, λόγω της ελαττωμένης δραστηριότητας της κυτοχρωμικής οξειδάσης. Η μετάλλαξη A4336G στο γονίδιο του tRNA^{Gln} φαίνεται ως πιθανή αιτία, αφού έχει παρατηρηθεί στο 5% ασθενών με όψιμη έναρξη των συμπτωμάτων και αυτός ο συσχετισμός έχει υποστηριχθεί από αρκετές ανεξάρτητες ευρωπαϊκές μελέτες.^{57,58,59} Παρόλα αυτά, και άλλες μεταλλάξεις έχουν προταθεί, άλλα καμία δεν έχει καταστεί ως επαρκής και αναγκαίος παράγοντας για την πρόκληση της ασθένειας.

Αντίστοιχα για την νόσο του Parkinson, μια από τις πρώτες νευροεκφυλιστικές ασθένειες που συνδέθηκαν με μιτοχονδριακή δυσλειτουργία, υπάρχουν πολλές αναφορές ελαττωματικής λειτουργίας του συμπλόκου I της αναπνευστικής αλυσίδας στη μέλαινα ουσία, και δευτερευόντως σε περιφερικούς ιστούς των ασθενών. Η μετάλλαξη A4336G στο γονίδιο του tRNA^{Gln}, όπως και προηγουμένως για τη νόσο Alzheimer, έχει προταθεί ότι συνεισφέρει αλλά και ότι αυξάνει τις πιθανότητες εμφάνισης της νόσου του Parkinson, παρόλο που έχει αναφερθεί και ως

πολυμορφισμός.⁶⁰ Δύο άλλες μεταλλάξεις, η G15950A στο tRNA^{Thr} και η T15965C στο tRNA^{P^{ro}}, που ανιχνεύτηκαν σε ασθενείς με τη νόσο, πιθανόν να παίζουν καθοριστικό ρόλο στον πρόωρο εκφυλισμό των ντοπαμινεργικών νευρώνων, την κύρια αιτία της νόσου του Parkinson.⁶¹

Η σκλήρυνση κατά πλάκας, μια απρόβλεπτη ασθένεια του κεντρικού νευρικού συστήματος η οποία εμφανίζεται από σχετικά ήπια έως σοβαρά για τον ασθενή συμπτώματα, εμφανίζεται όταν το ανοσοποιητικό σύστημα στρέφεται ενάντια των εαυτών μορίων μυελίνης, μιας πρωτεΐνης που επικαλύπτει τους νευράξονες των νευρικών κυττάρων. Οι περισσότεροι ασθενείς βιώνουν μεγάλου βαθμού μυϊκή αδυναμία, δυσκολία στην κίνηση και τον προσανατολισμό και στην χειρότερη περίπτωση μερική ή πλήρη παράλυση. Δύο μεταλλάξεις στο γονίδιο του tRNA^{Thr}, η G15927A και η G15928A βρέθηκαν σε αυξημένη συχνότητα σε ασθενείς με σκλήρυνση κατά πλάκας και σοβαρή οπτική δυσλειτουργία σε σχέση με τα φυσιολογικά άτομα.⁶² Παρόλα αυτά σε μια μεγάλης κλίμακας μελέτη ανίχνευσης μιτοχονδριακών μεταλλάξεων σε 77 Καυκάσιους ασθενείς με προοδευτική μορφή σκλήρυνσης κατά πλάκας και 84 άτομα ως control, καμιά παθογόνος μετάλλαξη δε βρέθηκε να έχει σχέση με την ασθένεια.⁶³

2.3.2.8 Χρόνια εντερική ψευδοαπόφραξη (CIPO)

Η χρόνια εντερική ψευδοαπόφραξη είναι μια σπάνια διαταραχή του πεπτικού συστήματος και εμφανίζεται κυρίως κατά την γέννηση. Τα εντερικά τοιχώματα παρουσιάζουν μια αδυναμία στη σύσπαση τους για να παράγουν την φυσιολογική περισταλτική κίνηση. Δύο σημειακές μεταλλάξεις έχουν βρεθεί σε ασθενείς με CIPO, η C12246A στο tRNA^{Ser(AGY)}, και η A10006G στο tRNA^{Gly}.⁶⁴

2.3.2.9 Νεφρικές ασθένειες: Χρόνια νεφρίτιδα και σπειραματονεφρίτιδα (FSGS)

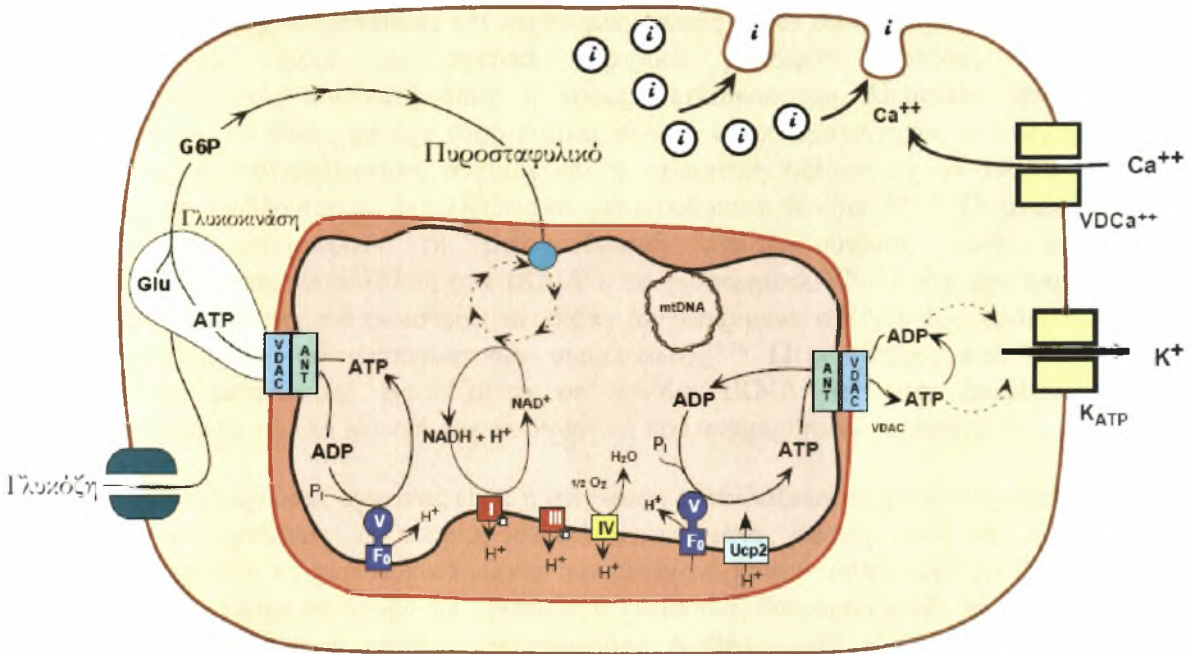
Νεφρικές ασθένειες που έχουν συσχετιστεί με μιτοχονδριακή δυσλειτουργία έχουν αναφερθεί σε παιδιά ηλικίας 1 έως 6 ετών με πιο συχνό πρόβλημα στο εγγύς σπειροειδές σωληνάριο των νεφρώνων, κύριο χαρακτηριστικό του συνδρόμου Toni Debré-Fanconi. Μεταλλάξεις σε tRNA γονίδια έχουν βρεθεί σε ασθενείς με χρόνια νεφρίτιδα⁶⁵ και σπειραματονεφρίτιδα (FSGS)⁶⁶.

2.3.2.10 Επίκτητη ιδιοπαθής σιδηροβλαστική αναιμία (AISA)

Η επίκτητη ιδιοπαθής σιδηροβλαστική αναιμία (AISA) έχει προταθεί ως μιτοχονδριακή ασθένεια, λόγω των άφθονων δακτυλιοειδών σιδηροβλαστών (βλαστικά κύτταρα, πρόδρομα των ερυθροκυττάρων, που περιέχουν υψηλή συγκέντρωση φερριτίνης) που χαρακτηρίζονται από την υπερσυσσώρευση σιδήρου εντός των μιτοχονδρίων τους. Άλλα χαρακτηριστικά της ασθένειας είναι η υπερπλασία του μυελού των οστών και ο ελαττωμένος αριθμός ερυθροκυττάρων. Ωστόσο δεν είναι ακόμη γνωστός ο ακριβής μηχανισμός μοριακής παθογένεσης.⁶⁷ Σημειακές μεταλλάξεις έχουν βρεθεί στα γονίδια του κυτοχρώματος b, στα COX I και II και σε πολλά tRNA συμπεριλαμβανομένων των μεταλλάξεων G12301A στο tRNA^{Leu(CUN)}⁶⁸ και A8344G στο tRNA^{Lys}.⁶⁹ Άλλες είναι οι G5631A στο tRNA^{Ala}, C12237T στο tRNA^{Ser(AGY)} και T10034C στο tRNA^{Gly}.⁶⁷

2.3.2.11 Σακχαρώδης διαβήτης

Μεταλλάξεις στο mtDNA έχουν πρόσφατα αναγνωριστεί ως αιτία πρόκλησης του μητρικά κληρονομούμενου σακχαρώδη διαβήτη, ο οποίος τις περισσότερες φορές είναι συνδεδεμένος με κώφωση⁷⁰ (βλέπε ενότητα 2.3.2.6). Ωστόσο έχουν αναφερθεί περιπτώσεις ασθενών με μιτοχονδριακές μεταλλάξεις σε tRNA, που εμφάνιζαν μόνο διαβήτη χωρίς κώφωση. Στις μεταλλάξεις αυτές περιλαμβάνεται η T3271C στο tRNA^{Leu(UUR)}⁷¹ και η A8344G στο tRNA^{Lys}⁷². Η πιθανή μεταβολική βάση του σακχαρώδη διαβήτη απεικονίζεται στο Σχήμα 9.



Σχήμα 9. Πιθανή μεταβολική βάση του σακχαρώδη διαβήτη. Η αυξημένη είσοδος της γλυκόζης στα κύτταρα ύστερα από ένα γεύμα πλούσιο σε υδατάνθρακες ενεργοποιεί τη γλυκολυτική οδό να παράγει περισσότερο ATP μέσω της οξειδωτικής φωσφορλίωσης. Ο αυξημένος λόγος ATP/ADP προκαλεί την εκπόλωση των καναλιών καλίου που εξαρτώνται από ATP (K_{ATP}). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα το άνοιγμα καναλιών Ca²⁺ (VDCa²⁺) και την είσοδο ασβεστίου στο κύτταρο. Το ασβέστιο με την σειρά του επάγει την απελευθέρωση της ινσουλίνης. Έτσι οποιαδήποτε μετάλλαξη θα έβλαπτε την φυσιολογική μιτοχονδριακή λειτουργία και άρα τη σωστή παραγωγή ATP μέσω της οξειδωτικής φωσφορλίωσης, θα καθιστούσε το κύτταρο ανίκανο να ανταποκριθεί στα αυξημένα επίπεδα γλυκόζης με αποτέλεσμα την εκδήλωση του σακχαρώδη διαβήτη.

2.4 ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Οι λειτουργίες των μιτοχονδρίων συνδέονται στενά με πολλές κυτταρικές διεργασίες αλλά πρωταρχική θέση σε αυτές τις λειτουργίες κατέχει η παροχή ενέργειας που απαιτείται για την φυσιολογική λειτουργία και διατήρηση του κυττάρου. Διακοπή αυτής της ενεργειακής παροχής, μπορεί να έχει καταστροφικές συνέπειες για το κύτταρο, τον ιστό, το όργανο ή ακόμη και τον ίδιο τον οργανισμό. Οι ιστοί που προσβάλλονται κυρίως από τη μιτοχονδριακή δυσλειτουργία συμπεριλαμβάνουν αυτούς του εγκεφάλου, του νευρικού συστήματος, του μυοκαρδίου καθώς επίσης και των σκελετικών μυών, γιατί οι συγκεκριμένοι ιστοί απαιτούν την πλήρη διασφάλιση ενέργειας για τη σωστή λειτουργία τους. Πράγματι, πολλά βαριά κλινικά σύνδρομα με κύρια χαρακτηριστικά τις εγκεφαλοπάθειες, νευροπάθειες και καρδιομυοπάθειες έχουν συνδεθεί με μεταλλάξεις σε μιτοχονδριακά αλλά και σχετικά πυρηνικά γονίδια.^{5,6} Ωστόσο, πρόσφατα, νευροεμφυλιστικές ασθένειες όπως η νόσος Parkinson και Alzheimer καθώς και μεταβολικές ασθένειες με όχι τόσο έντονα κλινικά συμπτώματα, όπως ο σακχαρώδης διαβήτης, η σιδηροβλαστική αναιμία και η γαλακτική οξέωση έχουν αναφερθεί σε μελέτες να συνδέονται με μεταλλάξεις σε μιτοχονδριακά γονίδια.^{5,6,7,71} Οι μεταλλάξεις αυτές είτε επηρεάζουν τη μιτοχονδριακή πρωτεϊνσύνθεση αυτή καθαυτή (περιλαμβάνοντας μεταλλάξεις στα tRNA ή τα ριβοσωμικά RNA) είτε την παραγωγή ενέργειας μέσω της αναπνευστικής αλυσίδας (συγκεκριμένα mRNA που κωδικοποιούν για υπομονάδες των αναπνευστικών συμπλόκων).^{73,74} Περισσότερες από τις μισές παθογόνες μεταλλάξεις εντοπίζονται σε γονίδια tRNA και είναι υπεύθυνες για φαινοτύπους με όλα τα κλινικά χαρακτηριστικά που αναφέρθηκαν παραπάνω.⁷

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η ανίχνευση μεταλλάξεων σε μιτοχονδριακά tRNA γονίδια από ασθενείς με ποικίλα κλινικά συμπτώματα, βαριάς αλλά και ηπιότερης μορφής, εφόσον το φαινοτυπικό εύρος των μιτοχονδριακών ασθενειών έχει διευρυνθεί. Έτσι εστιαστήκαμε σε άτομα με εγκεφαλικά επεισόδια, διαφόρων ειδών καρδιοπάθειες, μεταβολικές ασθένειες όπως ο σακχαρώδης διαβήτης και η γαλακτική οξέωση, νευροεμφυλιστικές ασθένειες όπως η σκλήρυνση κατά πλάκας και τέλος σε ένα σύνολο ασθενών που έπασχαν από νευρομυϊκά προβλήματα που αναφέρονται συνολικά ως *ψυχοκινητική καθυστέρηση*.

Επιλέχθηκαν για μελέτη 4 γονίδια tRNA: 2 από τα οποία συγκεντρώνουν το μεγαλύτερο αριθμό παθογόνων μεταλλάξεων: το tRNA^{Leu(UUR)} και το tRNA^{Leu(CUN)} (28 και 10 αντίστοιχα) καθώς και 2 με χαμηλότερο αριθμό, το tRNA^{His} και το tRNA^{Ser(AGY)}. Συγκεκριμένα για το tRNA^{Leu(UUR)} η μελέτη επεκτάθηκε στην ευρύτερη περιοχή του γονιδίου που το κωδικοποιεί (*MT-TL1*) συμπεριλαμβανομένων και τμημάτων των παρακείμενων γονιδίων, *MT-RNR2* (16S tRNA) και *MT-ND1* (αφυδρογονάση του NADH) και αυτό γιατί και αυτά τα γονίδια έχουν ενοχοποιηθεί για την πρόκληση διαφόρων μιτοχονδριακών παθήσεων.^{75,76} Ο συνδυασμός PCR-SSCP ήταν τεχνική που χρησιμοποιήσαμε για αυτή την ανίχνευση μεταλλάξεων. Μια παράλληλη μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε φυσιολογικό πληθυσμό, μας προσέφερε την δυνατότητα να συγκρίνουμε τα δείγματα μας με φυσιολογικά άτομα. Στα δείγματα, όπου εντοπίστηκαν διαφορές, στάλθηκαν για αλληλούχιση προκειμένου να ταυτοποιηθεί η μετάλλαξη. Ο προσδιορισμός μεταλλάξεων σε συνδυασμό με αναλύσεις από βιοχημική σκοπιά, αποτελούν μια κριτική προσέγγιση για το αν και κατά πόσο αυτές οι ανωμαλίες στα tRNA γονίδια παίζουν ρόλο στην παθογένεια.

3. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 ΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΥΛΙΚΟ / ΔΕΙΓΜΑΤΑ

Ένα σύνολο 32 ασθενών με ποικίλα κλινικά συμπτώματα εξετάστηκαν στην παρούσα μελέτη (Πίνακας 4). Η κατάταξη που ακολουθήθηκε έγινε βάση των κύριων κλινικών χαρακτηριστικών, άσχετα αν κάποιοι ασθενείς εμφάνιζαν δευτερογενή και τριτογενή συμπτώματα. Το βιολογικό υλικό προς μελέτη ήταν ολικό αίμα, στο οποίο είχε προστεθεί αντιπηκτικό. Όλα τα δείγματα πάρθηκαν από την Παιδιατρική Κλινική Α.Γ.Ν.Ν Βόλου, εκτός από τα εγκεφαλικά που πάρθηκαν από την Νευροχειρουργική κλινική ΠΠΝ Λάρισας. Τα δείγματα αίματος διατηρήθηκαν σε θερμοκρασία -20°C μέχρι την εφαρμογή διαδικασίας απομόνωσης DNA.

Πίνακας 4. Οι 32 ασθενείς που συμπεριλήφθηκαν στην μελέτη.

Ασθενείς	Ηλικία	Κλινικό σύμπτωμα
Εγκεφαλικά επεισόδια		
№1	32	Αιμορραγία βασικών γαγγλίων, υπαραχνοειδή αιμορραγία
№2	41	Υπαραχνοειδή αιμορραγία
№3	42	Υπαραχνοειδή αιμορραγία
№4	45	Υπαραχνοειδή αιμορραγία
№5	50	Υπαραχνοειδή αιμορραγία
№6	58	Αιμορραγία βασικών γαγγλίων
№7	62	Υπαραχνοειδή αιμορραγία
№8	65	Ενδοπαρεγχυματική αιμορραγία
Καρδιοπάθειες		
№9		Επικαρδίτιδα - λιποθυμικό επεισόδιο
№10	14 μηνών	Αρρυθμίες (έκτακτες - κοιλιακές) πυρετούς - σπασμούς, ΡFAPA *
№11	13 χρονών	Αρρυθμίες (έκτακτες - κοιλιακές) - σπασμούς
№12	75 χρονών	Καρδιοπάθεια & σακχαρώδη διαβήτη
№13	2,5 χρονών	Υπερκοιλιακή ταχυκαρδία
№14	11 μηνών	Συγγενή καρδιοπάθεια
№15	6 χρονών	Καρδιακή ανεπάρκεια, αγγειοκαρδιοπάθεια - σύνδρομο Down
Ψυχοκινητική καθυστέρηση **		
№16		Ψυχοκινητική καθυστέρηση & νευρομυοπάθεια
№17		Ψυχοκινητική καθυστέρηση
№18		Μητρικά κληρονομούμενη διανοητική καθυστέρηση & καθυστέρηση ομιλίας
№19		Ψυχοκινητική καθυστέρηση, σπασμοί & στραβισμός
№20	νεογέννητο	Ψυχοκινητική καθυστέρηση
№21	νεογέννητο	Ψυχοκινητική καθυστέρηση

Σκλήρυνση κατά πλάκας

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

Μεταβολικές διαταραχές

№25	3 χρονών	Σακχαρώδη διαβήτη, υποθυρεοειδισμό, καθυστέρηση ομιλίας
№26	2,5 μηνών	Γαλακτική οξέωση, ηλεκτρολυτικές διαταραχές, αναιμία, ψυχοκινητικά & καρδιακά προβλήματα
№27	πρόωρο	Γαλακτική οξέωση, ηλεκτρολυτικές διαταραχές

Διάφορα

№28		Επιληπτικοί σπασμοί / οικογένεια με διανοητική καθυστέρηση
№29	8 χρονών	Ιστορικό σπασμών και ιστορικό βαρυκοΐας - σύνδρομο Down
№30	14 χρονών	Αυτισμός
№31		Νόσος του Crohn ***
№32	4 μηνών	Πομφολυγώδης επιδερμόλυση

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

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

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

3.2 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA

Το πρώτο βήμα για την μελέτη ανίχνευσης μεταλλάξεων σε γονιδιακό επίπεδο, αποτελεί η απομόνωση του μιτοχondριακού DNA. Τα κύρια διαλύματα που χρησιμοποιούνται σε αυτό το πρωτόκολλο⁷⁷ είναι:

A. TE Buffer (100mL). Το διάλυμα αυτό αποτελείται από :

- 10 mM Tris pH 7.4 δηλ. 0,5mL από 2M stock
- 0,1mM EDTA pH 8 δηλ. 20 μ L από 0,5M stock
- dd-H₂O 99,5 mL

Το Tris χρησιμοποιείται ως ρυθμιστικό του pH.

Το EDTA χρησιμοποιείται ως χηλικός παράγοντας δεσμεύοντας κατιόντα Ca²⁺ και Mg²⁺ τα οποία είναι απαραίτητα για τη δράση νουκλεασών.

Το παραπάνω διάλυμα αποθηκεύεται στους 4°C.

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

- 0,2 M NaCl 1,17 gr
- 0,025M EDTA pH 8 5 mL από 0,5M stock
- 0,5% SDS 5 mL από 10% stock
- 0,2 M Tris pH 8,5 10mL από 2M stock
- dd-H₂O συμπληρώνω μέχρι τα 100 mL

Το NaCl συμβάλλει στην διάσπαση των κυτταρικών μεμβρανών.

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

Η πρωτεϊνάση K συντελεί στην αποδιάταξη των πρωτεϊνών.

Το Lysis Buffer αποθηκεύεται στους -20°C

Η διαδικασία που ακολουθείται είναι η εξής :

1. Αναμιγνύουμε 100μL αίματος με 1mL TE σε eppendorf του 1,5mL.
2. Ανακινούμε και φυγοκεντρούμε για 10 δευτερόλεπτα στις 13000 στροφές.
3. Απομακρύνουμε το υπερκείμενο και διαλύουμε το ίζημα ξανά σε 1mL TE.
4. Ανακινούμε και φυγοκεντρούμε για 10 δευτερόλεπτα στις 13000 στροφές.
5. Απομακρύνουμε το υπερκείμενο και διαλύουμε το ίζημα ξανά σε 1mL TE.
6. Ανακινούμε και φυγοκεντρούμε για 10 δευτερόλεπτα στις 13000 στροφές.
7. Απομακρύνουμε το υπερκείμενο και διαλύουμε το ίζημα ξανά σε 200 μL Lysis buffer, προσθέτοντας 20 μL πρωτεϊνάσης K (10mg/mL).
8. Επιάζουμε τα δείγματα στους 56°C για 45 λεπτά και στη συνέχεια στους 95°C για 10 λεπτά. Το τελευταίο βήμα της σύντομης θέρμανσης στους 95°C, αποσκοπεί στην απενεργοποίηση της πρωτεϊνάσης K.
9. Προσθέτουμε 1mL παγωμένης αιθανόλης 100% (έτσι πραγματοποιείται κατακρήμνιση μόνο του DNA, λόγω της μεγάλης διηλεκτρικής σταθεράς της) και αφήνουμε τα δείγματα όλη νύχτα στους -20°C.

-
10. Την επόμενη μέρα, φυγοκεντρούμε τα δείγματα στις 13000 στροφές, για 20 λεπτά, στους 4°C.
 11. Απομακρύνουμε το υπερκείμενο προσεκτικά και τοποθετούμε το ίζημα στους 37°C για 1 ώρα.
 12. Προσθέτουμε 50 μL dd-H₂O και αναδεύουμε ήπια σε vortex.
 13. Ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πηκτή αγαρόζης 1% με σκοπό την ποιοτική ανίχνευση του mtDNA.

> Για την παρασκευή πηκτής αγαρόζης 1% χρησιμοποιούμε τα εξής :

- 40ml TAE 1x *
- 0,3gr αγαρόζης
- 3μL βρωμιούχο αιθίδιο

Ζυγίζουμε και τοποθετούμε 0,3gr αγαρόζης σε κωνική φιάλη των 100mL αφού έχουμε προσθέσει προηγουμένως 30mL TAE. Το μίγμα θερμαίνεται (σε φούρνο μικροκυμάτων) για περίπου 1-2 λεπτά έως ότου η αγαρόζη έχει διαλυθεί πλήρως, και

στη συνέχεια προσθέτουμε προσεκτικά 3μL βρωμιούχο αιθίδιο. Το βρωμιούχο αιθίδιο (BrEt) έχει την χαρακτηριστική ιδιότητα να φθορίζει στο υπεριώδες καθώς παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων του DNA και έτσι να δίνει τα πρότυπα ζωνώσεων που αντιστοιχούν στην ποσότητα του DNA που δέσμευσαν το BrEt. Το διάλυμα αφού έχει μεταφερθεί σε κατάλληλη πλάκα οριζόντιας ηλεκτροφόρησης και έχουν προστεθεί οι κατάλληλες χτένες για το σχηματισμό πηγαδιών, απαιτεί περίπου 20-30 λεπτά για να πήξει πλήρως.

* Το ρυθμιστικό διάλυμα TAE 1x παρασκευάζεται από stock διάλυμα 50x. Αναμιγνύουμε 20mL 50xTAE + 980ml dd-H₂O.

Τα 500 mL του 50x TAE περιέχουν :

- Tris 121 gr
- Οξικό οξύ 28,5mL
- EDTA 0,5M 50mL
- dd-H₂O μέχρι τα 500mL

Καλύτερη ρυθμιστική ικανότητα μπορούμε να πετύχουμε αν αντί για οξικό οξύ, προσθέσουμε βορικό οξύ (TBE) ή φωσφορικό, που δίνουν εξίσου καλό διαχωρισμό κι έχουν υψηλότερη ρυθμιστική ικανότητα. Παρόλα αυτά, στα πειράματά μας διαλέξαμε να χρησιμοποιήσουμε TAE στις πηκτές αγαρόζης και TBE στις πηκτές πολυακρυλαμιδίου των αναλύσεων SSCP & RFLP.

Η φόρτωση του δείγματος στη πηκτική αγαρόζης γίνεται αφού συμπληρώσουμε τη συσκευή με το ίδιο διάλυμα TAE 1x έως ότου η πηκτική είναι πλήρως βυθισμένη στο διάλυμα αυτό. Αναμιγνύω 3μL loading buffer με 5μL δείγματος και τα προσθέτω προσεκτικά σε κάθε πηγαδάκι της πηκτής.

Το loading buffer (6x) 10mL περιέχει:

- 1mL χρωστική μπλε της βρωμοφαινόλης
- 5 mL γλυκερόλη (συμβάλλει στην καθίζηση του δείγματος μέσα στα πηγαδάκια)
- 0,5 mL TBE 20x
- 3,5 mL dd-H₂O

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

3.3 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR: Polymerase Chain Reaction) είναι ένα έξυπνο εργαλείο της μοριακής βιολογίας και ανακαλύφθηκε σχετικά πρόσφατα μόλις το 1984 από τον βιοχημικό Kary Mullis και χρησιμοποιείται σήμερα συχνά και σε συνδυασμό με άλλες μοριακές τεχνικές ανάλυσης όπως τα ένζυμα περιορισμού και ο πολυμορφισμός μονόκλωνης αλυσίδας (SSCP). Είναι τόσο ευαίσθητη, γρήγορη, εύκολη και αυτοματοποιημένη τεχνική, ώστε ένα απλό μόριο DNA μπορεί να πολλαπλασιαστεί ενζυμικά in vitro με την βοήθεια ειδικών πολυμερασών και να ενισχυθεί. Η πιο συνήθης DNA πολυμεράση που χρησιμοποιείται σε αντιδράσεις

PCR σήμερα, είναι η Taq πολυμεράση η οποία απομονώθηκε από το θερμόφιλο βακτήριο *Thermus aquaticus* και η οποία δρα σε αρκετά υψηλές για ένζυμα θερμοκρασίες, έως και τους 100°C. Η ιδιότητα αυτή συμβάλλει στην άμεση δράση του ενζύμου πάνω στα μόρια DNA τα οποία οι συνθήκες των 100°C έχουν αποδιαταχθεί και μπορεί η Taq να επιμηκύνει τις πολυνουκλεοτιδικές αλυσίδες. Έτσι γονίδια που απαντώνται ακόμη και ως ένα αντίγραφο μόνο μπορούν να εντοπιστούν από ένα πλήθος αλληλουχιών, να ενισχυθούν και να απεικονιστούν στη συνέχεια σε ζώνες με την χρήση πηκτών αγαρόζης.

Η αρχή λειτουργίας της μεθόδου στηρίζεται στη χρήση πολύ μικρής ποσότητας γενετικού υλικού που χρησιμοποιείται ως μόριο στόχος για τη σύνθεση πανομοιότυπων μορίων.⁷⁸ Η σύνθεση επιτυγχάνεται με τη βοήθεια ειδικών μορίων εκκινητών (primers). Τα πιο πάνω μόρια είναι εξαιρετικά ευαίσθητα σε συνήθεις θερμοκρασίες, διότι αποτελούνται από μονόκλωνη αλυσίδα συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων και έχουν μέγεθος βάσεων το οποίο δεν ξεπερνά τα 15-20 ζεύγη βάσεων. Μετά την προσκόλληση των εκκινητικών μορίων στα αποδιαταγμένα μόρια DNA, η επιμήκυνση των αλυσίδων γίνεται με την βοήθεια της Taq πολυμεράσης, ειδικού ρυθμιστικού διαλύματος για την Taq καθώς και διαλύματος MgCl₂ και διαλύματος dNTPs.

3.3.1 Πολλαπλασιασμός των γονιδίων tRNA

Δύο τμήματα DNA ενισχύθηκαν που περιέκλειαν 4 γονίδια tRNA. Το πρώτο μήκος 294bp και με primers τους: MT3 FW 5'-AGGACAAGAGAAATAAGGCC- 3' (nt 3130-3149) και MT4 RV 5' -CACGTTGGGGCCTTTGCGTA- 3' (nt 3423-3404), επιλέχθηκε για να ενισχύσει το γονίδιο του tRNA^{Leu(UUR)} (*MT-TL1*) καθώς επίσης και τμήματα των παρακείμενων γονιδίων, *MT-RNR2* (16S rRNA) και *MT-ND1* (αφυδρογονάση του NADH).⁷⁹ Το δεύτερο τμήμα μήκος 247bp και με primers: FW 5'- CATCATTACCGGGTTTCCT- 3' (nt 12115-12134) RV 5' - TGGTTATAGTAGTGTGCATG- 3' (nt 12361-12342), επιλέχθηκε για να ενισχύσει αντίστοιχα τα γονίδια των tRNA^{His}, tRNA^{Ser(AGY)} και tRNA^{Leu(CUN)}.⁸⁰ 11 ακόμη ζεύγη εκκινητών που αποσκοπούσαν στη ενίσχυση των υπολοίπων 18 tRNA (Πίνακας 5) χρησιμοποιήθηκαν επιπλέον στη μελέτη μας και αφορούσαν μόνο τους ασθενείς 12 και 26(και οικογένεια της). Για μια αντίδραση PCR των 50μL χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω :

✓ DNA (περίπου 200ngr)	2-3μL
✓ 50 pmol από τον κάθε primer	1μL + 1μL
✓ 800 μM dNTP's (από 40mM)	1μL
✓ 2 mM MgCl ₂ (από 50mM)	2μL
✓ 1x PCR Buffer (από 10x)	5μL
✓ 1U Taq πολυμεράση (5U/μL)	0,2μL
✓ dd-H ₂ O μέχρι τα 50μL	+ 37-38μL
	<hr/>
	50μL

Πίνακας 5. Οι αλληλουχίες των εκκνητιών που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση και των 22 tRNAs με σκοπό την ανάλυση SSCP. Η επιλογή των primers γίνεται με βάση την περιεκτικότητα σε GC, η οποία θα πρέπει να ξεπερνάει το 50% των επιλεγόμενων βάσεων. Επιπλέον θα πρέπει να μην υπάρχουν αλληλουχίες που να περιέχουν πολυουρίνες, πολυουριμιδίνες και άλλες ασυνήθιστες αλληλουχίες διότι κάτι τέτοιο οδηγεί σε σχηματισμό διμερών μορφών. Παράλληλα, θα πρέπει να έχουν παραπλήσια θερμοκρασία τήξεως T_m , την οποία μπορούμε να υπολογίσουμε εύκολα από τον τύπο $4*(GC) + 2*(AT)$.

tRNA's	FW Primer 5' - 3'	RV Primer 5' - 3'	νοουκλεοτιδική θέση	μήκος (bp)
Leu(UUR)	AGGACAAGAGAAATAAGGCC	CACGTTGGGGCCCTTTGGGTA	(FW 3130-3149) & (RV 3423-3404)	294
His/Ser(AGY) /Leu(CUN)	CATCATTACCGGGTTTCCT	TGGTTATAGTAGTGTGCATG	(FW 12115-12134) & (RV 12361-12342)	247
Thr / Pro	CTAATACCAACTATCTCCCT	ACCCAAATCTGCTTCCCCAT	(FW 15839-15858) & (RV 16050-16031)	212
Lys	GCTCTGAAATCTGTGGAGCA	ACGGTAGTATTAGTTGGGG	(FW 8172-8191) & (RV 8388-8369)	217
Ile / Gln / Met	CCAGCATTCCCCCTCAAACC	TGGGCCAGGGGATTAATTA	(FW 4241-4260) & (RV 4486-4468)	246
Asn / Cys / Tyr	CAATGGGACITTAACCACAA	GCGAACATCAGTGGGGTGA	(FW 5663-5683) & (RV 5911-5892)	249
Gly	CCATCTATTGATGAGGGTCT	GGATATAGGGTCCAAAGCCGCA	(FW 9970-9989) & (RV 10193-10173)	224
Phe	CAACCAAAACCCAAAGACA	GGATGCTTGCAATGTGTAATC	(FW 549-567) & (RV 706-687)	158
Val	GTA CTGGAAAGTGCACITGG	GGTTGCTIGGTAAGTAAGG	(FW 1576-1595) & (RV 1715-1698)	140
Trp / Ala	CGCTACTCCTACCTATCTCC	TTAGGGTGCCTTAGCTGTTAAC	(FW 5470-5489) & (RV 5711-5691)	242
Ser(UCN) / Asp	ATTTCGAAAGAACCCGTATACA	GCTCTTCTATGATAGGGGAA	(FW 7415-7434) & (RV 7643-7624)	229
Arg	GCCCTACAAACAACCTAACCT	AGTGAGATGGTAAATGCTAG	(FW 10290-10309) & (RV 10516-10497)	227
Glu	CCCACACTCAACAGAAACA	TTGCGTATTGGGGTCATTG	(FW 14642-14660) & (RV 14763-14745)	122

Οι συνθήκες ενίσχυσης για την PCR στον θερμικό κυκλοποιητή ήταν (βήματα):

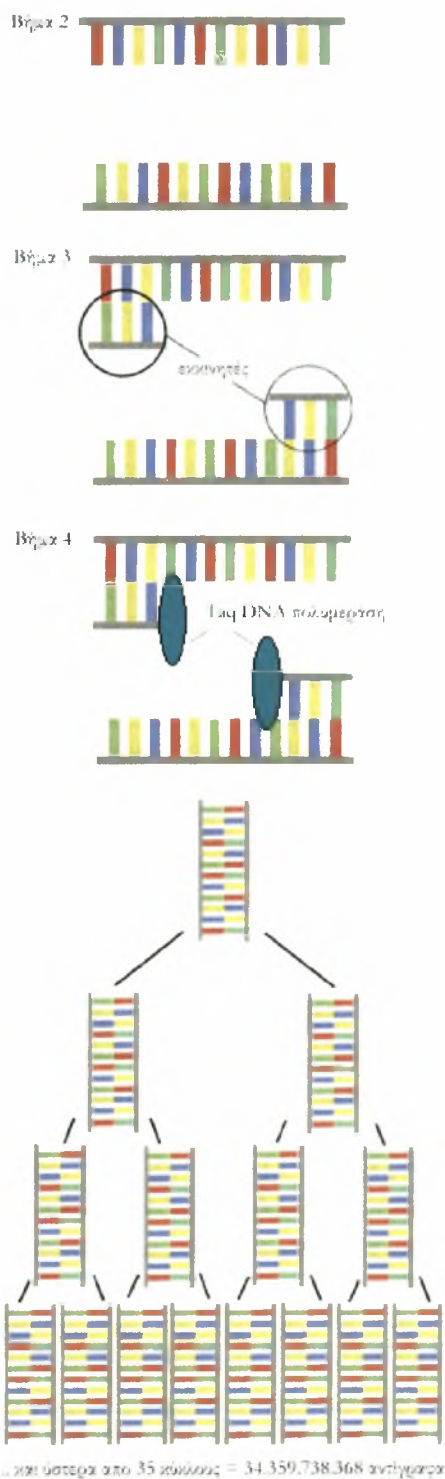
- | | |
|---------------------------|------------------|
| 1. Αρχική αποδιάταξη | 95 °C για 4 min |
| 2. Αποδιάταξη | 95 °C για 30 sec |
| 3. Υβριδοποίηση εκκινητών | 55 °C για 40 sec |
| 4. Επέκταση | 72 °C για 40 sec |
| 5. Τελικό βήμα επέκτασης | 72 °C για 10 min |

Τα βήματα 2 έως 4 της διαδικασίας PCR επαναλαμβάνονται για 35 κύκλους (Σχήμα 10). Αναλυτικότερα σε κάθε ένα από τα βήματα αυτά συμβαίνουν τα εξής :

Με την θέρμανση στους 95°C για 30 δευτερόλεπτα επιτυγχάνεται το σπάσιμο των διπλών και τριπλών δεσμών μεταξύ των δίκλωνων αλυσίδων των μορίων DNA και η μετατροπή τους από τη δίκλωνη στη μονόκλωνη μορφή. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι η θερμοκρασία της αρχικής αποδιάταξης όσο και της αποδιάταξης είναι υψηλή και θα πρέπει να μη διαρκεί περισσότερο χρόνο γιατί ελαττώνεται η ενεργότητα του ενζύμου.

Ακολουθεί μείωση της θερμοκρασίας η οποία μπορεί να κυμαίνεται από 50 °C έως 65 °C. Στο στάδιο αυτό πραγματοποιείται πρόσδεση-υβριδισμός των εκκινητών με τις συμπληρωματικές αλυσίδες DNA (μητρικά μόρια). Αυξάνοντας τη θερμοκρασία σταδιακά αυξάνεται και η ειδικότητα του τελικού προϊόντος με αποτέλεσμα να περιορίζεται η υβριδοποίηση των ολιγονουκλεοτιδίων σε μη ειδικές περιοχές.

Στη συνέχεια η μικρή άνοδος της θερμοκρασίας στους 72 °C για 40 δευτερόλεπτα εμποδίζει την προσκόλληση επιπλέον εκκινητικών μορίων και επιτρέπει την Taq πολυμεράση να προσθέτει 35-100 νουκλεοτίδια / δευτερόλεπτο, παρουσία MgCl₂ και dNTPs, επεκτείνοντας την συμπληρωματική αλυσίδα του μορίου που συντίθεται. Τέλος ακολουθεί τελική επέκταση στους 70-78 °C.



Σχήμα 10. Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης. "Ύστερα από 35 κύκλους των βημάτων 2 έως 4, το αρχικό μόριο DNA θα έχει πολλαπλασιαστεί 2³⁵ φορές.

3.3.2 Ποιοτικός προσδιορισμός των PCR προϊόντων

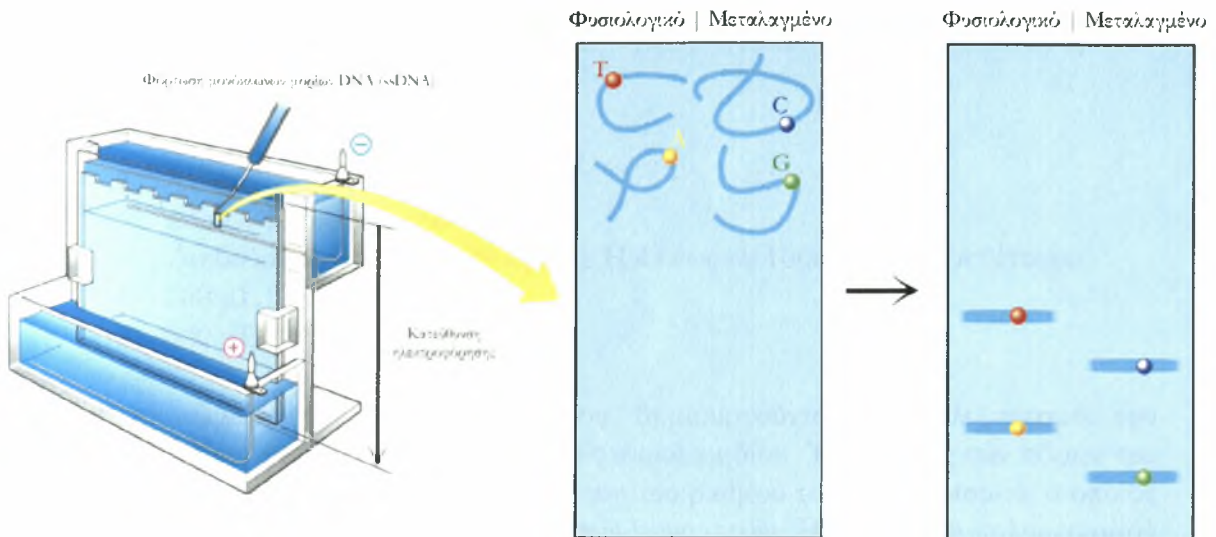
Η όλη αντίδραση της PCR πραγματοποιείται σε αυτοματοποιημένους αναλυτές που λέγονται “θερμοκυκλοποιητές”. Με αυτές τις συσκευές επιτυγχάνεται γρήγορη και ακριβής αυξομείωση στις κατάλληλες θερμοκρασίες που απαιτεί η αντίδραση. Ο μέσος όρος που διαρκεί η ανάλυση είναι περίπου 2 ώρες. Έπειτα, για να διαπιστώσουμε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

3.4 ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥ ΜΟΝΟΚΛΩΝΗΣ ΑΛΥΣΙΔΑΣ (SSCP)

Η ανάλυση πολυμορφισμού μονόκλωνης αλυσίδας (SSCP: Single-Strand Conformation Polymorphism) είναι μια απλή, φθηνή και ευαίσθητη μέθοδος ικανή να προσδιορίζει εάν κλάσματα DNA είναι πανομοιότυπα σε αλληλουχία ή όχι.⁸¹ Κάτω από σταθερές εργαστηριακές συνθήκες μπορεί να ανιχνεύσει όλες τις δυνατές αλλαγές βάσεων σε ποσοστό που φτάνει το 80-90%. Για τη λήψη και ανάγνωση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιούνται πηκτώματα πολυακρυλαμιδίου τα οποία υπόκεινται σε ειδική χρώση με κατάλληλες χρωστικές, όπως AgNO₃.⁸²

Είναι γνωστό ότι η κινητικότητα των δικλωνων μορίων DNA σε πήκτωμα εξαρτάται από το μήκος και το μέγεθος, αλλά είναι σχετικά ανεξάρτητη από το είδος της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας. Η κινητικότητα των μονόκλωνων αλυσίδων, ωστόσο επηρεάζεται από πολύ μικρές αλλαγές της αλληλουχίας, πιθανώς ακόμη και από μια αλλαγή σε σύνολο αραιών εκατοντάδων βάσεων. Οι μικρές αλλαγές είναι αξιοσημείωτες εξαιτίας της ασταθούς φύσης του μονόκλωνου μορίου DNA. Αυτό συμβαίνει διότι απουσία της συμπληρωματικής αλυσίδας, το μονόκλωνο τμήμα μπορεί να υποστεί διμερισμό με τμήμα της ίδιας αλληλουχίας, δημιουργώντας με αυτό τον τρόπο βρόγχους και αναδιπλώσεις οι οποίες δίνουν στη μονόκλωνη αλυσίδα μοναδική τριτοταγή δομή.

Η μέθοδος SSCP εκμεταλλεύεται την παραπάνω ιδιότητα των μονόκλωνων μορίων DNA (ssDNA) και πετυχαίνει ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό μονόκλωνων αλυσίδων νουκλεϊικών οξέων (Σχήμα 11). Η ευαισθησία της τεχνικής έγκειται γενικά στην αναλογία μεγέθους των κλασμάτων ssDNA. Αλυσίδες έως 300-600bp αναλύονται επιτυχώς. Τροποποιώντας συνθήκες όπως η θερμοκρασία, η σύνθεση του ρυθμιστικού διαλύματος (buffer) και του πηκτώματος καθώς και τις συνθήκες που



Σχήμα 11. Σχηματική αναπαράσταση της μεθόδου SSCP. Τα δείγματα DNA θα πρέπει να υποστούν αποδιάταξη πριν την φόρτωση τους στο πήκτωμα. Μία σημειακή μετάλλαξη είναι ικανή να προσδώσει στη μονόκλωνη αλυσίδα τέτοια μοναδική διαμόρφωση ώστε μετά την ηλεκτροφόρηση, το πρότυπο της αντίστοιχης ζώνης να διαφέρει από αυτό του φυσιολογικού.

3.4.1 Προετοιμασία των PCR προϊόντων

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

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

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

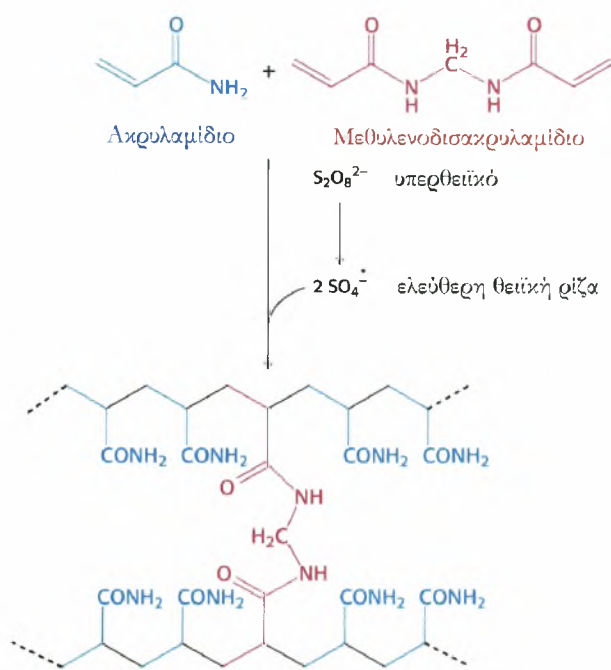
3.4.2 Παρασκευή πηκτής πολυακρυλαμιδίου

Όσο πιο μικρό σε μήκος είναι το τμήμα του εξεταζόμενου μονόκλωνου μορίου τόσο πιο πυκνό θα πρέπει να είναι το πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου για να επιτευχθεί καλύτερη ανάγνωση των αποτελεσμάτων. Οι συνήθεις συγκεντρώσεις πολυακρυλαμιδίου που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή πηκτών είναι 8% έως 12%. Εμείς έχοντας τμήματα 294 και 247 βάσεων, χρησιμοποιήσαμε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου 10%.

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

- 10 gr Ακρυλαμίδιο
- 0,25 gr Δις-ακρυλαμίδιο
- 7,5 mL TBE 10x
- 10 mL Γλυκερόλη 50%
Διηθούμε και συμπληρώνουμε με H₂O έως τα 100mL και προσθέτουμε:
- 100 μL TEMED
- 600 μL APS 20%

Τα πηκτώματα του πολυακρυλαμιδίου δημιουργούνται με πολυμερισμό του ακρυλαμιδίου και του N,N'-μεθυλενο-δις ακρυλαμιδίου. Το μέγεθος των πόρων του πολυμερούς που προκύπτει είναι συνάρτηση του βαθμού του πολυμερισμού, ο οποίος ποικίλει ανάλογα με τις συγκεντρώσεις των μονομερών. Η αντίδραση πολυμερισμού αρχίζει με την προσθήκη του υπερθειϊκού αμμωνίου (APS: ammonium persulfate) που δημιουργεί ελεύθερες ρίζες: $S_2O_8^{2-} \rightarrow 2 SO_4^{\bullet -}$ που μαζί με το φωτοχημικό καταλύτη N,N' τετραμεθυλοαιθυλενοδιαμίνη (TEMED) διαδίδονται στο σύστημα πολυμερισμού σύμφωνα με την αντίδραση που φαίνεται στο Σχήμα 12. Η προσθήκη γλυκερόλης στο πήκτωμα ελαττώνει την τιμή του pH του διαλύματος ηλεκτροφόρησης που καθορίζεται από την παρουσία του ρυθμιστικού διαλύματος TBE, με αποτέλεσμα να αυξάνεται η ευαισθησία της SSCP ανάλυσης και να λαμβάνονται πιο ευδιάκριτα αποτελέσματα.



Σχήμα 12. Αντίδραση πολυμερισμού του ακρυλαμιδίου.

Το πήκτωμα αφού έχει πήξει (παιρνει περίπου 30 λεπτά) τοποθετείται σε κατάλληλη συσκευή κάθετης ηλεκτροφόρησης με ρυθμιστικό TBE 0,5x (100mL TBE 10x + 1900mL H₂O). Στη συσκευή εφαρμόζεται τάση 210V και τα δείγματα αφήνονται να τρέξουν στο πήκτωμα για 20 ώρες (overnight) σε θερμοκρασία 4°C. Για τη λήψη των αποτελεσμάτων ακολουθεί χρώση του πηκτώματος. Αυτό γίνεται είτε με βρωμιούχο αιθίδιο είτε με AgNO₃.⁸² Στο πείραμα μας χρησιμοποιήσαμε AgNO₃ (Silver Staining).

3.4.3 Χρώση νιτρικού αργύρου (Silver Staining)

Πρώτα ετοιμάζω τα διαλύματα (για 2 gel).

Δ/μα 1 : 800mL dd-H₂O + 20mL Et100% + 1mL CH₃COOH

Δ/μα 2 : 400mL AgNO₃ 1gr / L (1gr AgNO₃ σε 1 L dd-H₂O)

Δ/μα 3 : 6gr NaOH, + 0,02gr NaBH₄ + 2 mL HCHO και dd-H₂O έως 400mL

Η προσθήκη των διαλυμάτων στη συσκευή πλύσης γίνεται με την σειρά.

Για το κάθε 1 από τα 2 gel έχουμε :

- Α' πλύση 200 mL του Δ/μα 1 για 3 min
- Απομάκρυνση
- Β' πλύση 200 mL του Δ/μα 1 για 3 min
- Απομάκρυνση
- Πλύση με dd-H₂O
- Απομάκρυνση
- 200 mL Δ/μα 2 για 20 min
- Απομάκρυνση
- Πλύση με dd-H₂O
- Απομάκρυνση
- Πλύση με dd-H₂O
- Απομάκρυνση
- 200 mL Δ/μα 3 έως εμφάνιση χρώματος
- Απομάκρυνση
- Πλύση με dd-H₂O

3.5 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ DNA (sequencing)

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

3.5.1 Καθαρισμός PCR προϊόντων

Ο καθαρισμός των PCR προϊόντων έγινε σε στήλες QIAquick Spin[®]. Ο καθαρισμός αυτός συμπεριλαμβάνει απομάκρυνση ελεύθερων ή/και διμερισμένων εκκινητών, νουκλεοτιδίων, πολυμερασών και αλάτων που τυχόν υπάρχουν στο διάλυμα μαζί με τα PCR προϊόντα. Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε ήταν το εξής :

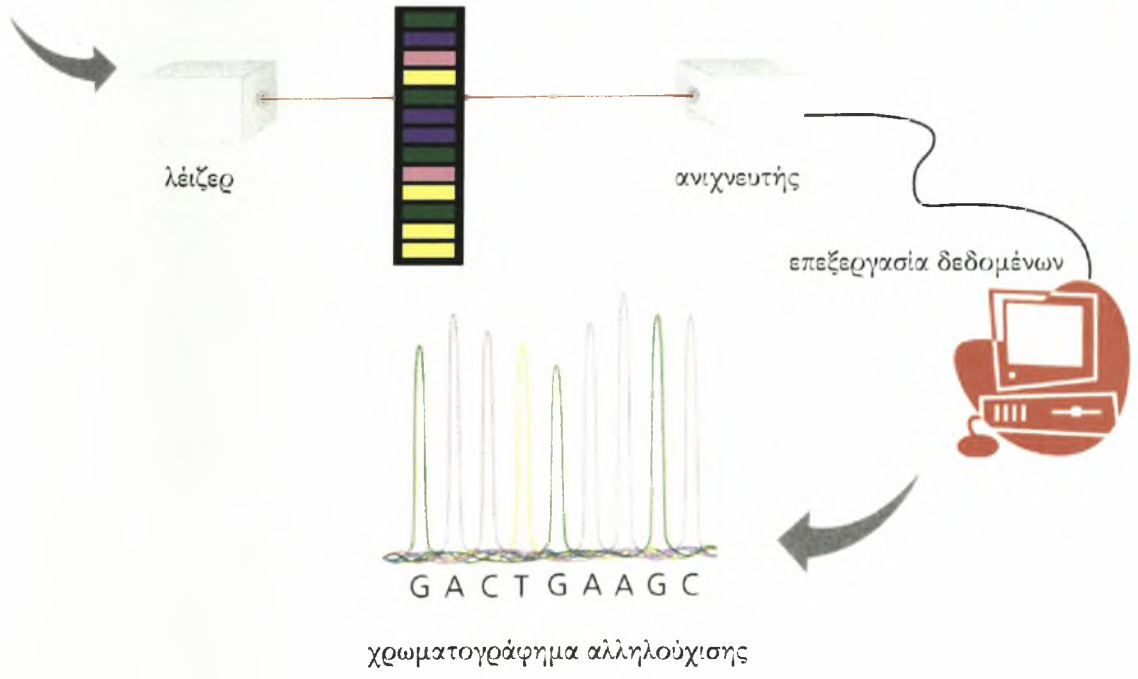
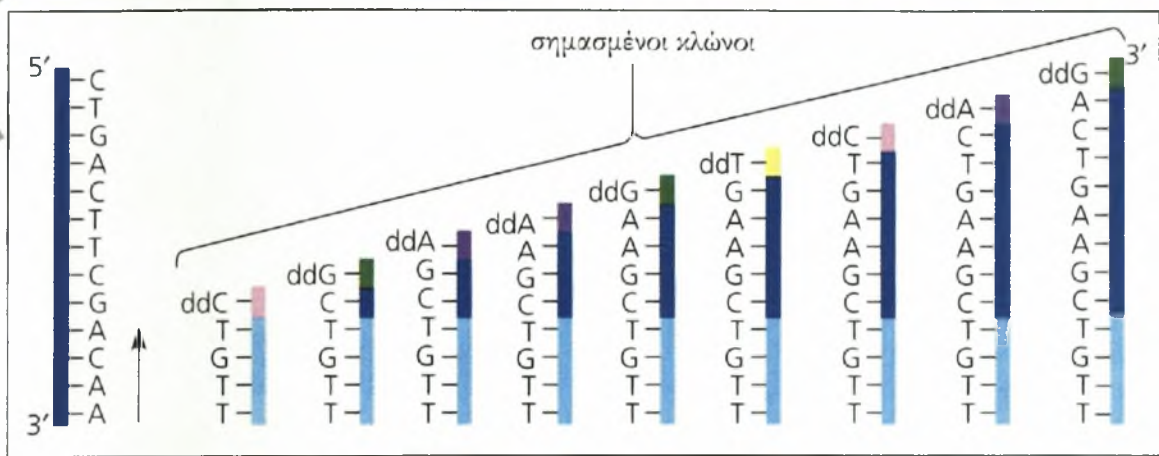
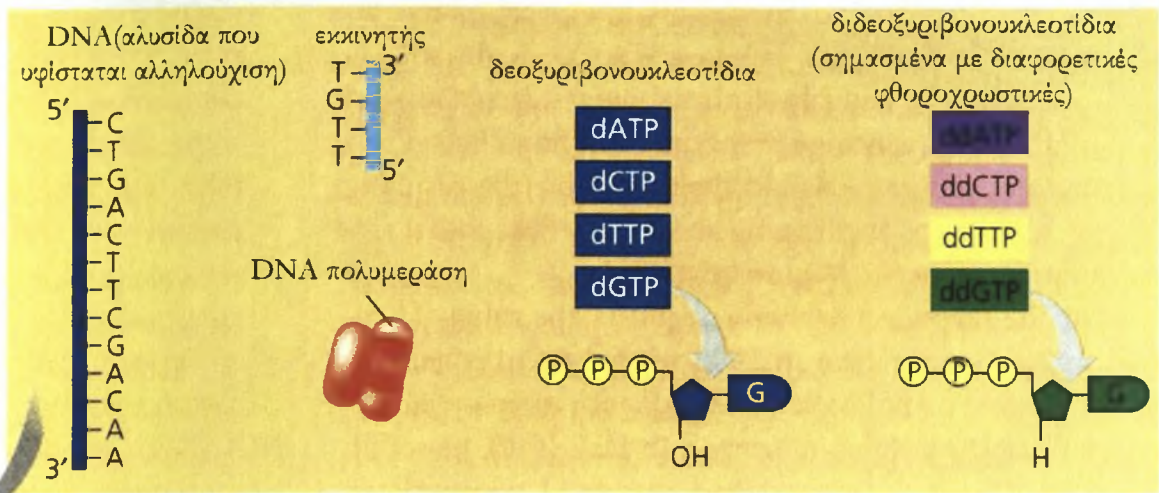
1. Προσθέτουμε 250μL από το διάλυμα συλλογής (capture buffer) σε 50μL PCR προϊόντος, σε eppendorf των 750μL (Δ/μα 1)
2. Τοποθετούμε τις στήλες QIAquick Spin σε eppendorf των 2mL.

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

Ακολουθεί υπολογισμός της ποσότητας του PCR προϊόντος ποσοτικά με φωτόμετρο (1μL και 49μL dd-H₂O) ή ποιοτικά με gel αγαρόζης 2%. Ενδείξεις φωτόμετρου γύρω στα 100ng/μL είναι ικανοποιητικές. Συνήθως στέλνουμε το DNA σε στερεά μορφή (ιζήμα) και όχι σε διάλυμα. Γι' αυτό κατακρημνίζουμε το DNA με αιθανόλη και CH₃COONa (sodium acetate). Για 50μL δείγμα χρειαζόμαστε 500μL Et και 5μL CH₃COONa. Τα αφήνουμε overnight στους -20°C και την επόμενη μέρα φυγοκεντρούμε τα δείγματα στις 13.000 στροφές, για 20 λεπτά, στους 4°C. Απομακρύνουμε το υπερκείμενο προσεκτικά και τοποθετούμε το ιζήμα στους 37°C για 1 ώρα. Τέλος, πριν τα στείλουμε, θα πρέπει να ετοιμάσουμε και τους primers για την αλληλούχιση. Ζητείται η τελική συγκέντρωση να είναι 5pmol/μL ενώ εμείς χρησιμοποιούμε την 10πλάσια. Έτσι, κάνουμε μια αρραίωση 1/10 σε τελικό όγκο 40 μL (4μL primer + 36μL H₂O).

3.5.2 Μέθοδος τερματισμού νουκλεοτιδικής αλυσίδας με διδεοξυνουκλεοτιδία ή μέθοδος Sanger

Η μέθοδος Sanger είναι η πλέον διαδεδομένη μέθοδος για τον προσδιορισμό της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας μορίων DNA.⁸³ Σύμφωνα με αυτή τη μέθοδο, ενσωματώνονται από DNA πολυμεράσες σε μια αναπτυσσόμενη αλυσίδα 2',3'-διδεοξυνουκλεοτιδία (ddNTPs) μέσω των 5'-φωσφορικών τους ομάδων. Όμως, δεν έχουν την 3'-OH ομάδα που είναι απαραίτητη για το σχηματισμό του φωσφοδιεστερικού δεσμού με το επόμενο νουκλεοτίδιο και συνεπώς, η ανάπτυξη της αλυσίδας σταματάει εκεί όπου έχει ενσωματωθεί ένα συγκεκριμένο ddNTP. Τέσσερις διαφορετικές αντιδράσεις εκτελούνται για κάθε μόριο DNA που θέλουμε να αλληλουχίσουμε, μια για κάθε ένα από τα 4 είδη ddNTP που έχουμε προσθέσει. Ο λόγος dNTP:ddNTP επιλέγεται προσεκτικά έτσι ώστε τα σημασμένα τμήματα που παράγονται να δημιουργούν μια σειρά επανεντοπισμένων τμημάτων DNA μήκους έως και αρκετών χιλιάδων βάσεων νουκλεοτιδίων, το καθένα από τα οποία τερματίζεται σε μια συγκεκριμένη από τις 4 βάσεις.



Σχήμα 13. Αυτοματοποιημένη φθορίζουσα αλληλούχιση DNA. Διδεοξυριβονουκλεοτίδια σημασμένα με διαφορετικές φθοροχρωστικές χρησιμοποιούνται για να τερματιστεί η αναπτυσσόμενη αλυσίδα όπως και στην τυπική αντίδραση Sanger, με την διαφορά ότι πραγματοποιείται μία και μόνο αντίδραση. Τα δεδομένα επεξεργάζονται σε υπολογιστή και το αποτέλεσμα της αλληλούχισης παρουσιάζεται με την μορφή χρωματογραφήματος.

Αυτά τα τμήματα διαχωρίζονται με βάση το μέγεθος τους από υψηλής ευκρίνειας ηλεκτροφόρηση σε αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου. Η ηλεκτροφόρηση παράγει μια βαθμιαία «σκάλα» τμημάτων DNA από την οποία μπορεί να αναγνωσθεί η νουκλεοτιδική αλληλουχία. Επειδή τα μικρότερα τμήματα DNA μεταναστεύουν και γρηγορότερα, η πρώτη ζώνη στη βάση του πηκτώματος υποδεικνύει το πρώτο διδεοξυνουκλεοτίδιο το οποίο προστέθηκε στην αντίδραση Sanger. Στην πραγματικότητα, η μέθοδος Sanger χρησιμοποιείται σήμερα σε μια τροποποιημένη μορφή, αυτή της αυτοματοποιημένης φθορίζουσα αλληλούχισης.

3.5.3 Αυτοματοποιημένη φθορίζουσα αλληλούχιση DNA

Η πρόοδος στις φθορίζουσες χρωστικές των τερματιστών και στην τεχνολογία της σήμανσης έχει οδηγήσει στην ανάπτυξη τεχνικών αλληλούχισης υψηλής παραγωγής. Ουσιαστικά τα περισσότερα συστήματα περιλαμβάνουν την χρήση διδεοξυνουκλεοτιδίων σημασμένα με διαφορετικές φθοροχρωστικές. Οπότε η σήμανση ενσωματώνεται στα ddNTP και αυτά χρησιμοποιούνται για να τερματιστεί η αναπτυσσόμενη αλυσίδα όπως και στην τυπική αντίδραση Sanger που παρουσιάζεται στην ενότητα 3.5.2. Το πλεονέκτημα αυτής της τροποποίησης είναι ότι, από την στιγμή που διαφορετικά μόρια σήμανσης ενσωματώνονται με κάθε ddNTP, είναι περιττό να εκτελούνται τέσσερις ξεχωριστές αντιδράσεις. Οπότε και τα τέσσερα προϊόντα ηλεκτροφορούνται στο ίδιο αποδιατακτικό gel. Το κάθε προϊόν με την ειδική χρωστική για κάθε βάση, διεγείρεται από ένα λέιζερ και η χρωστική εκλύει ακτινοβολία στο χαρακτηριστικό της μήκος κύματος. Ένα σύστημα περίθλασης διαχωρίζει τις εκπομπές των κυμάτων, οι οποίες ανιχνεύονται από μια συσκευή ανίχνευσης και η αλληλουχία αποκωδικοποιούνται από έναν υπολογιστή (Σχήμα 13). Τα πλεονεκτήματα αυτής της τεχνικής περιλαμβάνουν σε πραγματικό χρόνο εντόπιση των αλληλουχιών. Επιπλέον τα μήκη των αλληλουχιών που αναλύονται φτάνουν έως και 1000 bp.

3.6 ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΣ ΜΗΚΟΥΣ ΤΜΗΜΑΤΩΝ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΥ (RFLP)

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

Μια συγκεκριμένη ενδονουκλεάση περιορισμού θα κόψει σε μια σειρά συγκεκριμένων τμημάτων οποιοδήποτε δίκλωνο μόριο DNA που έχει απομονωθεί από ένα κύτταρο. Τα τμήματα αυτά ονομάζονται *τμήματα περιορισμού*. Συγκρίνοντας το μέγεθος των τμημάτων περιορισμού που έχουν παραχθεί από μια συγκεκριμένη γενετική περιοχή μετά την επεξεργασία της με ένα συνδυασμό διαφορετικών ενζύμων περιορισμού, δημιουργείται ένας χάρτης περιορισμού. Η διαφορά στους χάρτες περιορισμού μεταξύ δύο, ή περισσότερων τμημάτων γενετικού υλικού, απόρροια των διαφορετικών τους νουκλεοτιδικών αλληλουχιών ονομάζεται πολυμορφισμός μήκους τμημάτων περιορισμού. Αυτός ο πολυμορφισμός είναι συχνός και κάθε οργανισμός έχει ένα μοναδικό και συγκεκριμένο συνδυασμό τμημάτων περιορισμών που τον χαρακτηρίζουν.

Εκμεταλλεούμενοι και εμείς αυτή την ιδιότητα που έχουν τα ένζυμα περιορισμού, επιλέξαμε το ένζυμο Rsa I (New England, BioLabs) γιατί αναγνωρίζει μια συγκεκριμένη αλληλουχία στο γονίδιο *MT-ND1* της πρώτης υπομονάδας της αφυδρογονάσης του NADH. Εκεί, όπως θα δούμε αργότερα, ανακαλύψαμε μια συγκεκριμένη σημειακή μετάλλαξη, η οποία τροποποιεί το σημείο αναγνώρισης και έτσι το ένζυμο αδυνατεί να πέψει την συγκεκριμένη περιοχή. Στη συνέχεια, τρέξαμε τα προϊόντα πέψης σε ένα αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου, με σκοπό τον ποιοτικό αλλά και ποσοτικό προσδιορισμό των μεταλλαγμένων μορίων DNA. Το γεγονός αυτό μας βοηθάει να υπολογίσουμε το επίπεδο ετεροπλασμίας για τον συγκεκριμένο κυτταρικό τύπο που κάνουμε την ανάλυση, στην περίπτωση μας το αίμα. Επίσης, για να αυξηθεί η ευαισθησία της μεθόδου, στο τελευταίο βήμα της PCR προστίθενται ραδιενεργά κατάλοιπα. Η μέθοδος DGGE⁸⁴ αναφέρθηκε επίσης ως μια ευαίσθητη τεχνική προσδιορισμού της ετεροπλασμίας του μιτοχονδριακού DNA.

3.6.1 Διαδικασία πέψης

4μL από τα καθαρισμένα PCR προϊόντα του σταδίου που περιγράφεται στο τμήμα 3.4.1, είναι αρκεία για να χρησιμοποιηθούν στην αντίδραση πέψης. Έτσι, σε τελικό όγκο 10μL το διάλυμα θα περιέχει:

- 4μL DNA
- 4U ενζύμου Rsa I (0,4μL)
- 1μL buffer (10x)
- 4μL dd-H₂O

Τα δείγματα επωάζονται overnight στους 37°C.

3.6.2 Παρασκευή πηκτής πολυακρυλαμιδίου

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

- 7 gr Ουρία
- 14,38 gr από μητρικό διάλυμα ακρυλαμιδίου 30% ($V_{\text{τελ}}=100\text{mL}$)
 - 29 gr Ακρυλαμίδιο
 - 1 gr Δις-ακρυλαμίδιο
 - Συμπληρώνουμε με H_2O έως τα 100mL
- 7,25 mL TBE 10x
Διηθούμε και συμπληρώνουμε με H_2O έως τα 62,5mL και προσθέτουμε:
- 60 μL TEMED
- 350 μL APS 20%

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

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

- Ladder (100bp) 3 μL + 4 μL loading buffer

- DNA δείγμα (το οποίο επώαστηκε με το RsaI overnight) 10 μL + 4 μL loading buffer

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

- 1mL χρωστική μπλε της βρωμοφαινόλης
- 5 mL γλυκερόλη
- 0,5 mL TBE 20x
- 3,5 mL dd- H_2O

Οι συνθήκες ηλεκτροφόρησης ήταν:

- 2,5 ώρες (έως η χρωστική αγγίζει το κάτω μέρος της πηκτής)

- 220V / 73 mA

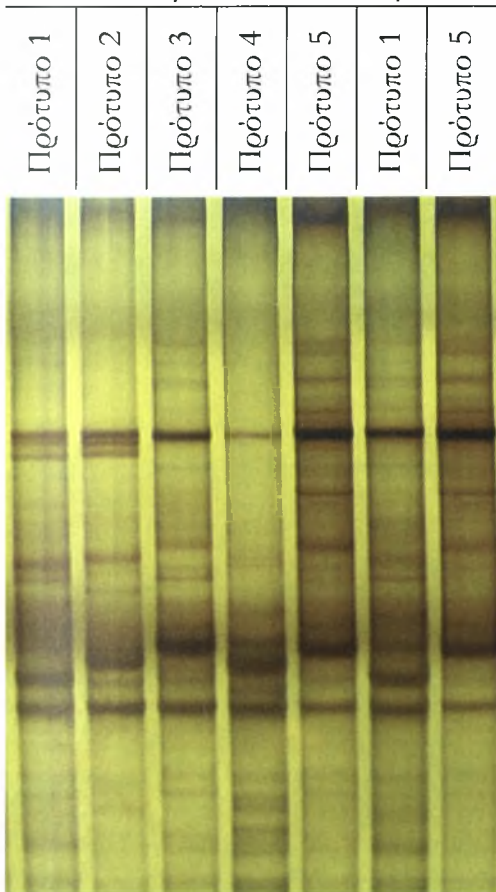
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΠΟΥ ΠΡΟΕΚΥΨΑΝ ΑΠΟ ΤΑ ΠΗΚΤΩΜΑΤΑ SSCP

5 διαφορετικά πρότυπα ηλεκτροφόρησης προέκυψαν μετά από ανάλυση SSCP για το πρώτο τμήμα μήκους 294bp που περιέκλειε το γονίδιο του $tRNA^{Leu(UUR)}$ και τα τμήματα των παρακείμενων γονιδίων του 16S rRNA και ND1 (Σχήμα 14). Το πρότυπο 1 ανήκει στους ασθενείς 12 και 26, το δεύτερο πρότυπο στον ασθενή 19, το τρίτο στον ασθενή 29, το τέταρτο στον ασθενή 10 ενώ το πέμπτο ανήκει στους ασθενείς 1 και 22, αλλά ουσιαστικά είναι αυτό το οποίο εμφανίζουν και όλοι οι υπόλοιποι 25 ασθενείς.

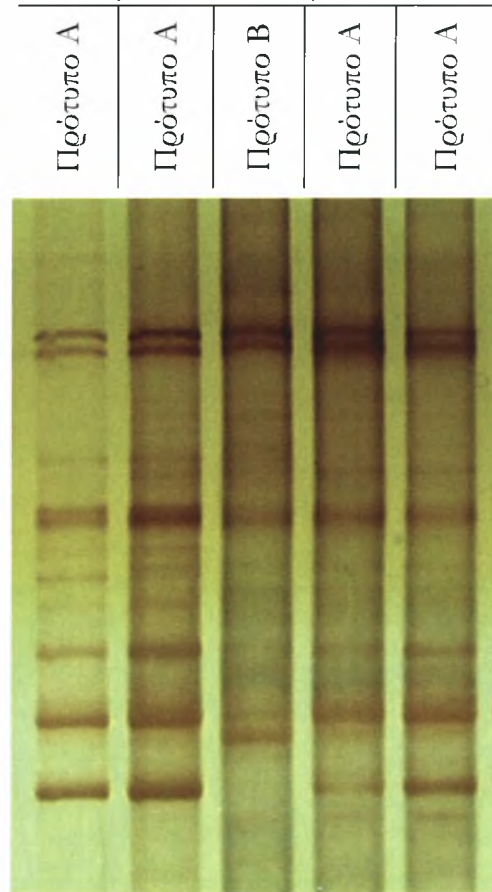
Αντιθέτως, 2 μόνο διαφορετικά πρότυπα ηλεκτροφόρησης εμφανίστηκαν για το δεύτερο τμήμα μήκους 247bp των γονιδίων $tRNA^{His}$, $tRNA^{Ser(AGY)}$ και $tRNA^{Leu(CUN)}$. Το πρότυπο Β εμφάνισαν 6 άτομα: οι ασθενείς 10, 12, 19, 24, 25 & 26 ενώ το επικρατές Α, όλοι οι υπόλοιποι (Σχήμα 15). Όλα αυτά τα διαφορετικά πρότυπα των 2 τμημάτων, στάλθηκαν για αλληλούχιση με σκοπό την ανίχνευση αυτών των μεταλλάξεων που προσδίδουν στα μονόκλινα μόρια την διαφορετική ηλεκτροφορητική κινητικότητα.

16S rRNA / $tRNA^{Leu(UUR)}$ / ND1



Σχήμα 14. Πρότυπα ηλεκτροφόρησης για το τμήμα 16S rRNA/ $tRNA^{Leu(UUR)}$ /ND1 σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδιου 10%

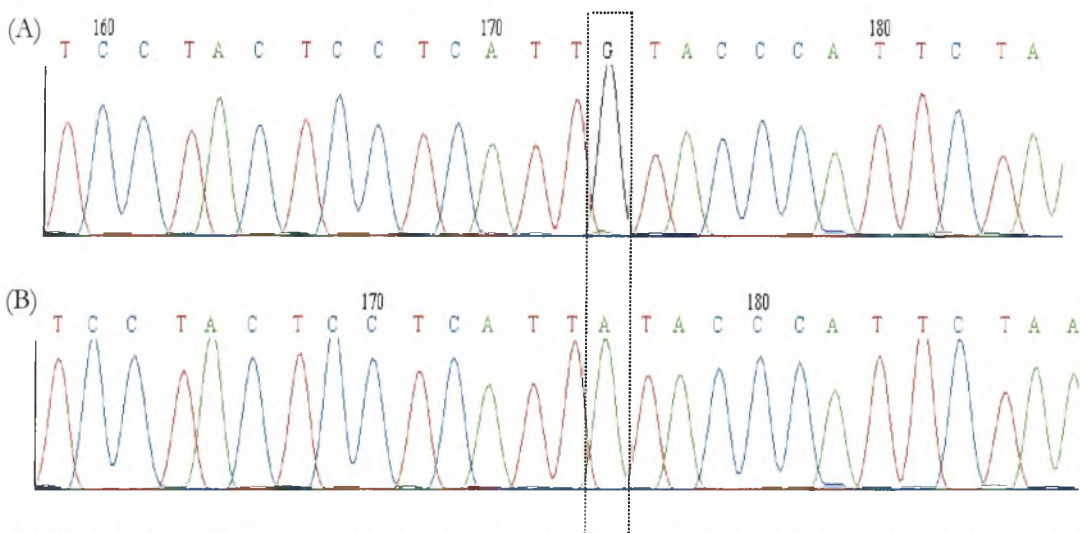
$tRNA^{His}$ / $tRNA^{Ser(AGY)}$ / $tRNA^{Leu(CUN)}$



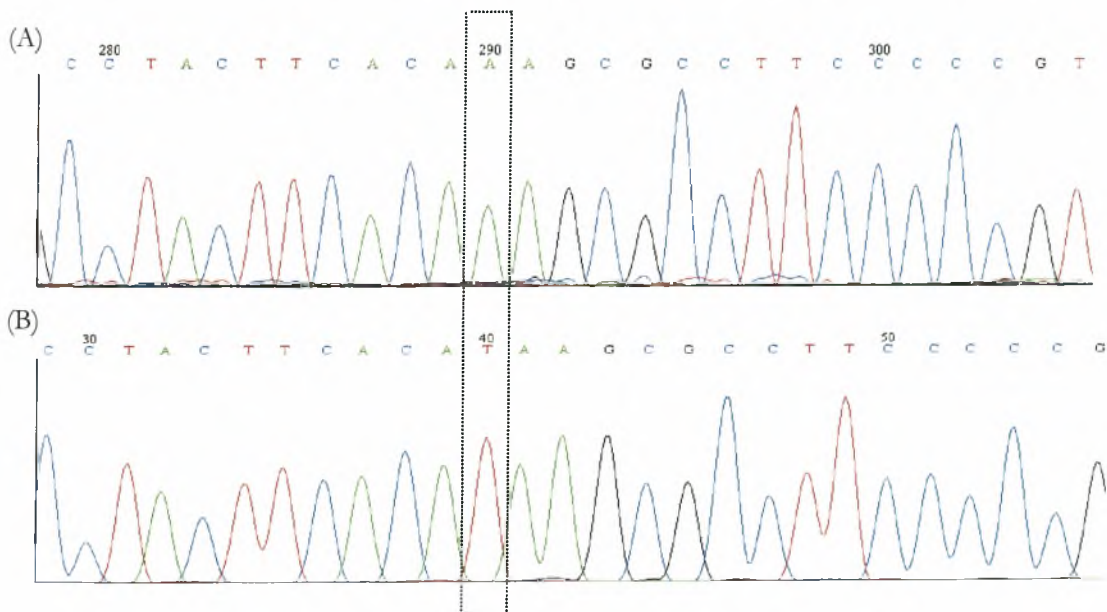
Σχήμα 15. Πρότυπα ηλεκτροφόρησης για το τμήμα $tRNA^{His}$ / $tRNA^{Ser(AGY)}$ / $tRNA^{Leu(CUN)}$ σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδιου 10%

4.2 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗΣ

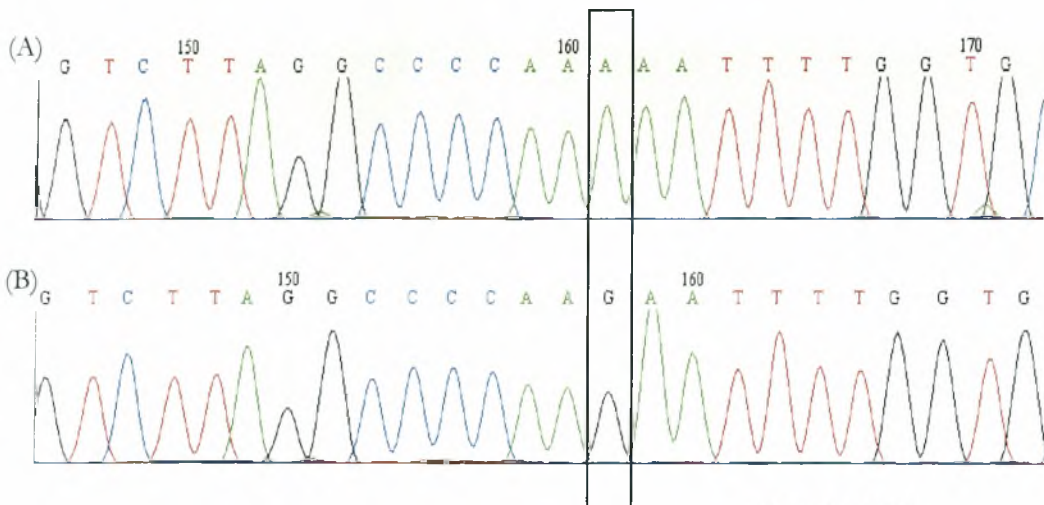
Για την στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκαν τα προγράμματα: BIOEDIT 7.0 και CLUSTALX 1.8 (Σχήματα 16 – 18). Μετά την σύγκριση των αλληλουχιών των 5 προτύπων του τμήματος 16SrRNA/tRNA^{Leu(UUR)}/ND1 και των υπολοίπων 2 προτύπων του τμήματος tRNA^{His}/tRNA^{Ser(AGY)}/tRNA^{Leu(CUN)}, με την διορθωμένη πλήρη αλληλούχιση του ανθρώπινου μιτοχονδριακού γονιδιώματος,⁸⁵ προέκυψαν ολιγά 5 μεταλλάξεις στο σύνολο των ασθενών. Αναλυτικότερα, τα πρότυπα 1 έως 4 του πρώτου τμήματος αντιστοιχούσαν σε 4 διαφορετικές μεταλλάξεις, 2 στο γονίδιο του 16S και 2 σε αυτό του ND1, ενώ το πέμπτο αντιπροσώπευε την wild type αλληλουχία. Αντίστοιχα, η διαφορετική ηλεκτροφορητική κινητικότητα του προτύπου B του δεύτερου τμήματος, οφειλόταν σε 1 μετάλλαξη στο γονίδιο του tRNA^{Leu(CUN)} (Πίνακας 6 & 7).



Σχήμα 16. Χρωματογράφημα αλληλούχισης ενός τμήματος του γονιδίου ND1, σε φυσιολογικό άτομο (A) και ενός με το πρότυπο 1 (B). Είναι εμφανής η μετάπτωση G→A στη θέση 3337.



Σχήμα 17. Χρωματογράφημα αλληλούχισης τμήματος του γονιδίου 16SrRNA, σε φυσιολογικό άτομο (A) και στον ασθενή 10 (B). Είναι εμφανής η προσθήκη T στη θέση 3158.



Σχήμα 18. Χρωματογράφημα αλληλούχισης ενός τμήματος του γονιδίου του $tRNA^{Leu}(CUN)$, σε φυσιολογικό άτομο (A) και ενός με πρότυπο B (B). Εμφανής η μετάπτωση $A \rightarrow G$ στη θέση 12308.

Πίνακας 6. Ομαδοποίηση των ασθενών οι οποίοι έδειξαν διαφορετικό ηλεκτροφορητικό προφίλ από τους υπόλοιπους, ανάλογα με τις μεταλλάξεις που βρέθηκαν στα μιτοχονδριακά γονίδια τους.

Πρότυπο	Μετάλλαξη	Γονίδιο	№	Κλινικό σύμπτωμα
4	3158insT*	16S	10	Αρρυθμίες (έκτακτες-κοιλιακές) πυρετούς - σπασμούς, PFAPPA
2	T3197C	16S	19	Ψυχοκινητική καθυστέρηση, σπασμοί & στραβισμός
1	G3337A*	ND1	12	Καρδιοπάθεια & σακχαρώδη διαβήτη
			26	Γαλακτική οξέωση, ηλεκτρολυτικές διαταραχές, αναιμία, ψυχοκινητικά & καρδιακά προβλήματα
3	T3394C	ND1	29	Ιστορικό σπασμών και ιστορικό βαρικοϊας - σύνδρομο Down
B	A12308G	$tRNA^{Leu}(CUN)$	10	Αρρυθμίες (έκτακτες-κοιλιακές) πυρετούς - σπασμούς, PFAPPA
			12	Καρδιοπάθεια & σακχαρώδη διαβήτη
			19	Ψυχοκινητική καθυστέρηση, σπασμοί & στραβισμός
			24	Σκλήρυνση κατά πλάκας
			25	Σακχαρώδη διαβήτη, υποθυρεοειδισμό, καθυστέρηση ομιλίας
			26	Γαλακτική οξέωση, ηλεκτρολυτικές διαταραχές, αναιμία, ψυχοκινητικά & καρδιακά προβλήματα

* Οι μεταλλάξεις που επισημαίνονται με κόκκινο δεν έχουν αναφερθεί προηγουμένως στη διεθνή βιβλιογραφία.

Πίνακας 7. Οι 32 ασθενείς και οι μεταλλάξεις που εμφάνισαν.

Ασθ.	Κλινικό σύμπτωμα	16SrRNA/ tRNA ^{Leu(UUR)} / ND1	tRNA ^{His} / tRNA ^{Ser(AGY)} / tRNA ^{Leu(CUN)}
Εγκεφαλικά επεισόδια			
Λ#1	Αιμορραγία βασικών γαγγλίων, υπαραχνοειδή αιμορραγία	✓	✓
Λ#2	Υπαραχνοειδή αιμορραγία	✓	✓
Λ#3	Υπαραχνοειδή αιμορραγία	✓	✓
Λ#4	Υπαραχνοειδή αιμορραγία	✓	✓
Λ#5	Υπαραχνοειδή αιμορραγία	✓	✓
Λ#6	Αιμορραγία βασικών γαγγλίων	✓	✓
Λ#7	Υπαραχνοειδή αιμορραγία	✓	✓
Λ#8	Ενδοπαρεγχυματική αιμορραγία	✓	✓
Καρδιοπάθειες			
Λ#9	Επικαρδίτιδα - λιποθυμικό επεισόδιο	✓	✓
Λ#10	Αρρυθμίες (έκτακτες - κοιλιακές) πυρετούς - σπασμούς, PFAPA	3158insT	A12308G
Λ#11	Αρρυθμίες (έκτακτες - κοιλιακές) - σπασμούς	✓	✓
Λ#12	Καρδιοπάθεια & σακχαρώδη διαβήτη	G3337A	A12308G
Λ#13	Υπερκοιλιακή ταχυκαρδία	✓	✓
Λ#14	Συγγενή καρδιοπάθεια	✓	✓
Λ#15	Καρδιακή ανεπάρκεια, αγγειοκαρδιοπάθεια - σύνδρομο Down	✓	✓
Ψυχοκινητική καθυστέρηση			
Λ#16	Ψυχοκινητική καθυστέρηση & νευρομυοπάθεια	✓	✓
Λ#17	Ψυχοκινητική καθυστέρηση	✓	✓
Λ#18	Μητρικά κληρονομούμενη διανοητική καθυστέρηση & καθυστέρηση ομιλίας	✓	✓
Λ#19	Ψυχοκινητική καθυστέρηση, σπασμοί & στραβισμός	T3197C	A12308G
Λ#20	Ψυχοκινητική καθυστέρηση	✓	✓
Λ#21	Ψυχοκινητική καθυστέρηση	✓	✓
Σκλήρυνση κατά πλάκας			
Λ#22	Σκλήρυνση κατά πλάκας	✓	✓
Λ#23	Σκλήρυνση κατά πλάκας	✓	✓
Λ#24	Σκλήρυνση κατά πλάκας	✓	A12308G
Μεταβολικές διαταραχές			
Λ#25	Σακχαρώδη διαβήτη, υποθυρεοειδισμό, καθυστέρηση ομιλίας	✓	A12308G
Λ#26	Γαλακτική οξέωση, ηλεκτρολυτικές διαταραχές, αναιμία, ψυχοκινητικά & καρδιακά προβλήματα	G3337A	A12308G
Λ#27	Γαλακτική οξέωση, ηλεκτρολυτικές διαταραχές	✓	✓
Διάφορα			
Λ#28	Επιληπτικοί σπασμοί / οικογένεια με διανοητική καθυστέρηση	✓	✓
Λ#29	Ιστορικό σπασμών και ιστορικό βαρυνκότητας - σύνδρομο Down	T3394C	✓
Λ#30	Αυτισμός	✓	✓
Λ#31	Νόσος του Crohn	✓	✓
Λ#32	Πομφολυγώδης επιδερμόλυση	✓	✓

4.3 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΝΕΑΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΗΣ G3337A

Αφού πήραμε τα αποτελέσματα, θελήσαμε να εστιάσουμε στη νέα μετάλλαξη G3337A στο γονίδιο της ND1, η οποία βρέθηκε σε δύο διαφορετικούς ασθενείς με διαφορετικό κλινικό προφίλ ο καθένας. Ο συνδυαστικός κρίκος αλλά και το κίνητρο για να συνεχίσουμε αυτή τη μελέτη αποτέλεσε το κοινό γνώρισμα που είχαν οι δύο ασθενείς: τα καρδιακά προβλήματα που αντιμετώπιζαν.

Πρώτο βήμα στη μελέτη μας ήταν να κοιτάζουμε αν υπάρχει και κάποια άλλη μετάλλαξη στα υπόλοιπα 18 γονίδια tRNA. Θεωρήθηκε σκόπιμο να ελέγξουμε και το οικογενειακό περιβάλλον των ασθενών για καλύτερη εκτίμηση της κατάστασης. Έτσι στα πειράματα μας προστέθηκαν ο πατέρας, η μητέρα και η γιαγιά (από την πλευρά της μητέρας) του ασθενούς 26. Κανένα συγγενικό πρόσωπο του ασθενούς 12 δεν μπόρεσε να συγκαταλεχθεί. Τα υπόλοιπα 11 ζεύγη εκκινήτων του πίνακα 5 χρησιμοποιήθηκαν προς αυτή την κατεύθυνση και όλα τα δείγματα αφού καθαρίστηκαν με τη διαδικασία που περιγράφηκε στην ενότητα 3.5.1, στάλθηκαν για άμεση αλληλούχιση. Βρήκαμε ότι οι δύο ασθενείς (12 και 26) έφεραν μια επιπλέον μετάλλαξη, την **C15946T** στο γονίδιο του tRNA^{Thr}. Την μετάλλαξη αυτή ο ασθενής 26 κληρονομούσε από την γιαγιά του· από πλευρά της μητέρα του. Μια δεύτερη αξιοπρόσεκτη και αναπάντεχη παρατήρηση που προήλθε από την ανάγνωση των sequencing, ήταν η μετάλλαξη **T3338C** που βρέθηκε στο γονίδιο της ND1 του πατέρα του ασθενούς 26. Τα έως τώρα δεδομένα συνοψίζονται στο Σχήμα 19 και στον Πίνακα 8.

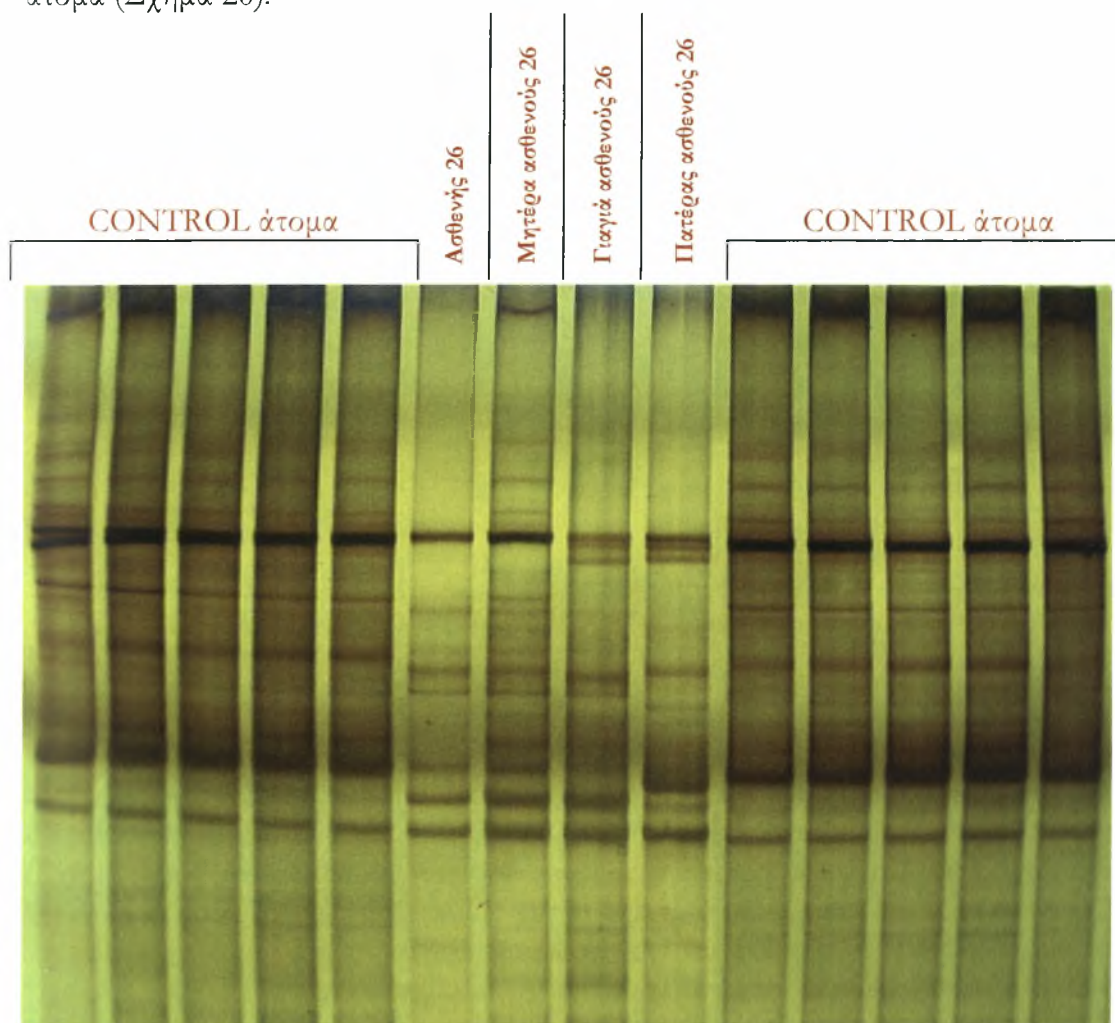
ND1	CATACCCATGGCCAACCTCCTACTCCTCATTGTACCCATTCTAATCGCAATGGCATTCCCTA
A26 A
M26 A
P26 C
G26 A
A12 A
Leu (CUN)	AGGATAACAGCTATCCATTGGTCTTAGGCCCCAAAAATTTTGGTGCAACTCCAAATAAAAG
A26 G
M26 G
P26 G
G26 G
A12 G
Thr	CTTGTAAACCGGAGATGAAAACCTTTTTCCAAGGACAAATCAGAGAAAAAGTCTTTAACTC
A26 T
M26 T
P26 T
G26 T
A12 T

Σχήμα 19. Αποτελέσματα πολλαπλής ομοπαράθεσης των 5 ατόμων που υποβλήθηκαν σε ενίσχυση και των 22 γονιδίων tRNA τους. Η πρώτη σειρά σε κάθε μια από τις 3 ομάδες ομοπαράθεσεων αντιστοιχεί στη *wild type* αλληλουχία της rCRS (*revised Cambridge Reference Sequence*) πάνω στην οποία έγινε η σύγκριση. Το A26 αντιστοιχεί στον ασθενή 26, το M26 στην μητέρα του, το G26 στην γιαγιά του, το P26 στον πατέρα του, ενώ το A12 στον ασθενή 12. Καμιά από τις 3 μεταλλάξεις που βρέθηκαν στον ασθενή 26 (**G3337A**, **A12308G** και **C15946T**) δεν είναι *de novo*, αφού όπως βλέπουμε λόγω μητρικής κληρονομιάς του mtDNA, όλες προέρχονται από την γιαγιά του. Η επεξεργασία των δεδομένων έγινε όπως και προηγουμένως με το Bioedit 7.0.

Πίνακας 8. Σύνολο των μεταλλάξεων που βρέθηκαν στα 5 άτομα που υποβλήθηκαν σε ενίσχυση και των 22 μιτοχονδριακών γονιδίων tRNA.

	ND1	tRNA ^{Leu(CUN)}	tRNA ^{Thr}
№26	G3337A	A12308G	C15946T
Μητέρα №26	G3337A	A12308G	C15946T
Πατέρας №26	T3338C	-	-
Γιαγιά №26	G3337A	A12308G	C15946T
№12	G3337A	A12308G	C15946T

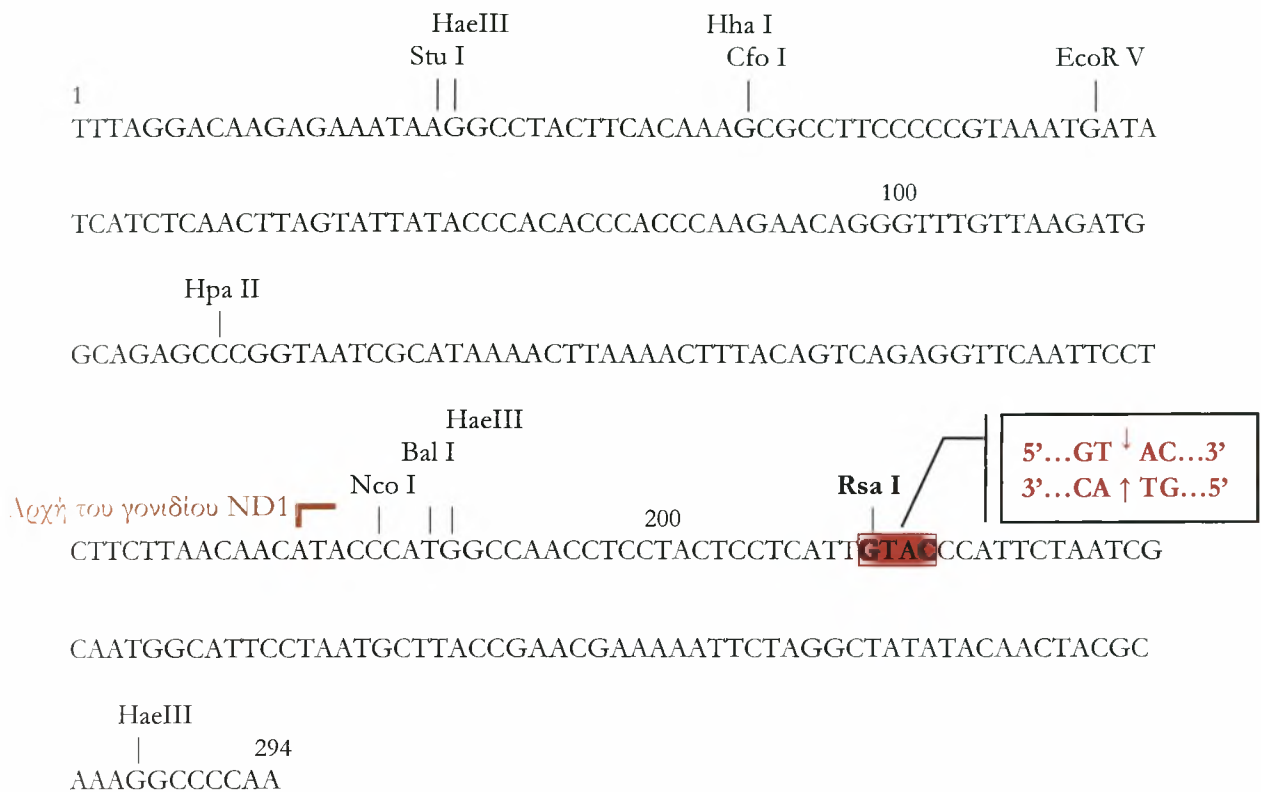
Επαληθεύοντας το αποτέλεσμα εκ των υστέρων και με την μέθοδο SSCP για τον γονιδιακό τόπο 16SrRNA/tRNA^{Leu(UUR)}/ND1, ηλεκτροφορήσαμε τα δείγματα μονόκλωνων μόριων DNA όλης της οικογένειας του ασθενούς 26 μαζί με 10 control άτομα (Σχήμα 20).



Σχήμα 20. Πρότυπα μονόκλωνων μορίων DNA ύστερα από αποδιάταξη και ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδιου 10%. Τα δείγματα 1 έως 5 και 10 έως 14 αντιστοιχούν σε φυσιολογικά άτομα ενώ τα 6-8 έχουν διαφορετική ηλεκτροφορητική ικανότητα λόγω της μετάπτωσης G3337A που εμφανίζεται στο γονίδιο ND1. Διαφορετική ηλεκτροφορητική ικανότητα παρουσιάζει επίσης και το δείγμα 9 με την μετάλλαξη T3338C, το οποίο αντιστοιχεί στον πατέρα του ασθενούς 26 (πρότυπο 6).

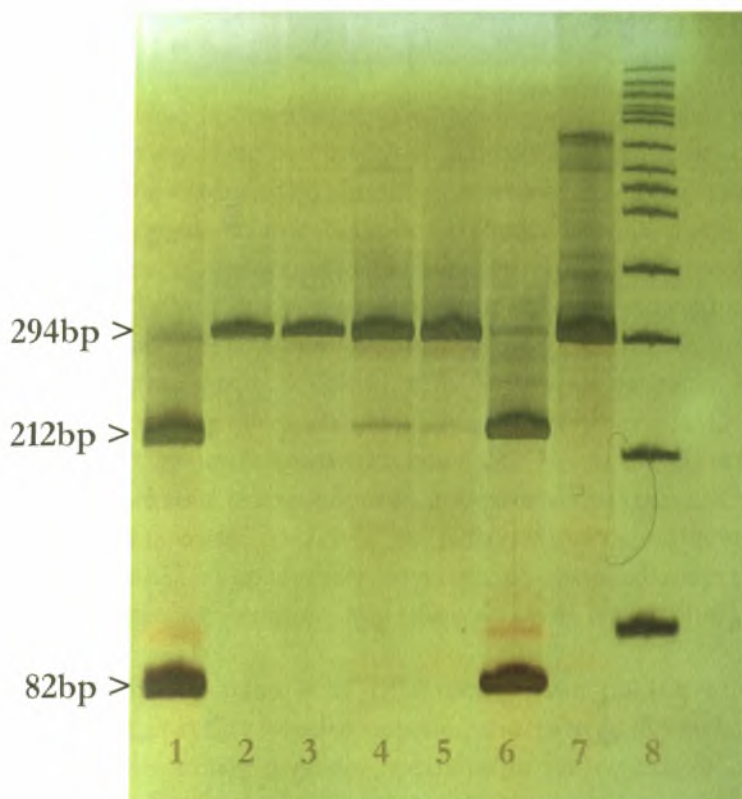
4.4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΤΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΕΠΙΠΕΔΟΥ ΕΤΕΡΟΠΛΑΣΜΙΑΣ ΜΕ ΤΟ ΕΝΖΥΜΟ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΥ Rsa I ΓΙΑ ΤΗΝ ΜΕΤΑΛΛΑΞΗ G3337A

Ένας χάρτης περιορισμού σχεδιάστηκε με το πρόγραμμα DNAClub για το τμήμα 16S rRNA/tRNA^{Leu(UUR)}/ND1, με σκοπό να δούμε ποιο ένζυμο και αν αυτό κόβει στην ή κοντά στο σημείο της μετάλλαξης (Σχήμα 21).



Σχήμα 21. Χάρτης περιορισμού του τμήματος 16S rRNA/tRNA^{Leu(UUR)}/ND1 που σχεδιάστηκε με το πρόγραμμα DNAClub. Το ένζυμο που μας ενδιαφέρει (Rsa I) αναγνωρίζει την τετρανουκλεοτιδική αλληλουχία GTAC και τέμνει ακριβώς μετά το T.

Το ένζυμο που κόβει στο σημείο της μετάλλαξης είναι το Rsa I και δημιουργεί 2 τμήματα μήκους 212 και 82bp αντίστοιχα για το DNA των φυσιολογικών ατόμων, ενώ αδυνατεί να πέσει τα μεταλλαγμένα DNA δίνοντας το αρχικό μόριο των 294bp (Σχήμα 22). Αυτό συμβαίνει γιατί αναγνωρίζει την τετρανουκλεοτιδική αλληλουχία GTAC των φυσιολογικών μορίων DNA και τέμνει ακριβώς μετά το T, αφήνοντας 2 μη κολλώδη άκρα. Το παραπάνω μας δίνει την δυνατότητα να προβλέψουμε το ποσοστό παρουσίας μεταλλαγμένων ή/και φυσιολογικών μορίων DNA στο ίδιο κύτταρο, δηλαδή το επίπεδο ετεροπλάσμιας του. Έτσι ηλεκτροφορώντας τα PCR προϊόντα όλων των ατόμων με την μετάλλαξη G3337A, τα οποία είχαν προηγουμένως επωαστεί με το ένζυμο, παρατηρήσαμε ότι ενώ στα δύο control άτομα η πέψη ήταν πλήρης και έδινε τα τμήματα 212 και 82bp, σε όλα τα άτομα με την μετάλλαξη G3337A, το ένζυμο δεν αναγνώριζε την θέση κοπής σε βαθμό που άγγιζε το 100%. Άρα, και τα 4 άτομα είναι πλήρως ομοπλάσμια για την μετάλλαξη.



Σχήμα 22. Ηλεκτροφόρηση δειγμάτων όλων των ασθενών με την μετάλλαξη G3337A σε αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδιου 7% ύστερα από πέψη με το Rsa I. Οι διαδρομές ήταν αντίστοιχα:

Διαδρομή 1: control άτομο

Διαδρομή 2: Ασθενής 26

Διαδρομή 3: Μητέρα ασθενούς 26

Διαδρομή 4: Γιαγιά ασθενούς 26

Διαδρομή 5: Ασθενής 12

Διαδρομή 6: control άτομο

Διαδρομή 7: απουσία ενζύμου

Διαδρομή 8: ladder 100bp

Το επίπεδο ετεροπλασμίας στο αίμα για τα δείγματα των διαδρομών 2,3 και 5 αγγίζει το 100% ενώ αυτό του 4^{ου} τουλάχιστον το 95%.

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Έως πρόσφατα, η γενετική των μιτοχονδρίων και των ασθενειών που οφείλονται σε ανωμαλίες του μιτοχονδριακού γενώματος, θεωρούνταν ως κάτι το περίεργο, έξω από τα πλαίσια της κλασικής γενετικής λόγω της γενικότερης άγνοιας της αιτιολογίας και της δύσκολης διάγνωσης τους. Παρόλα αυτά, σήμερα έχουν αναγνωριστεί ως μια τάξη πολυσυμπτωματικών συνδρόμων με καθορισμένο γενετικό και έως κάποιο βαθμό, βιοχημικό υπόβαθρο και στην πραγματικότητα έχουν αναδειχθεί από τις πιο κοινές μητρικά κληρονομήσιμες δυσλειτουργίες.^{74,86} Δεδομένα για τη σημειακή μετάλλαξη A3243G στην Φιλανδία δείχνουν ότι σχεδόν 1 στα 6.000 άτομα είναι φορέας της συγκεκριμένης μετάλλαξης ενώ αντίστοιχες μελέτες σε βρετανικό πληθυσμό γνωστοποίησαν ότι 1 στα 3.500 άτομα είναι είτε προσβεβλημένα από κάποια μιτοχονδριακή ασθένεια είτε έχουν αυξημένο κίνδυνο να την εμφανίσουν.^{87,88} Γι' αυτό το λόγο, οι μιτοχονδριακές ασθένειες έχουν αποσπάσει την προσοχή πολλών ερευνητών παγκοσμίως υποδεικνύοντας την αναγκαιότητα εκτενούς έρευνας των μηχανισμών που οδηγούν σε αυτές τις δυσλειτουργίες, σε πολλαπλά επίπεδα.

Εμείς, μέσα από τη συγκεκριμένη μελέτη που έγινε σε μια ομάδα ασθενών που εμφάνιζαν ποικίλα συμπτώματα μιτοχονδριακής κυρίως φύσεως, με την χρήση απλών μοριακών τεχνικών, εντοπίσαμε ένα σημαντικό αριθμό μεταλλάξεων, οι οποίες πολύ πιθανόν να έχουν σχέση με τον κλινικό φαινότυπο των φορέων τους. Οι μεταλλάξεις βρέθηκαν τόσο σε μιτοχονδριακά γονίδια tRNA, rRNA αλλά και σε γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες απαραίτητες για την δόμηση συμπλόκων της αναπνευστικής αλυσίδας (Πίνακας 6).

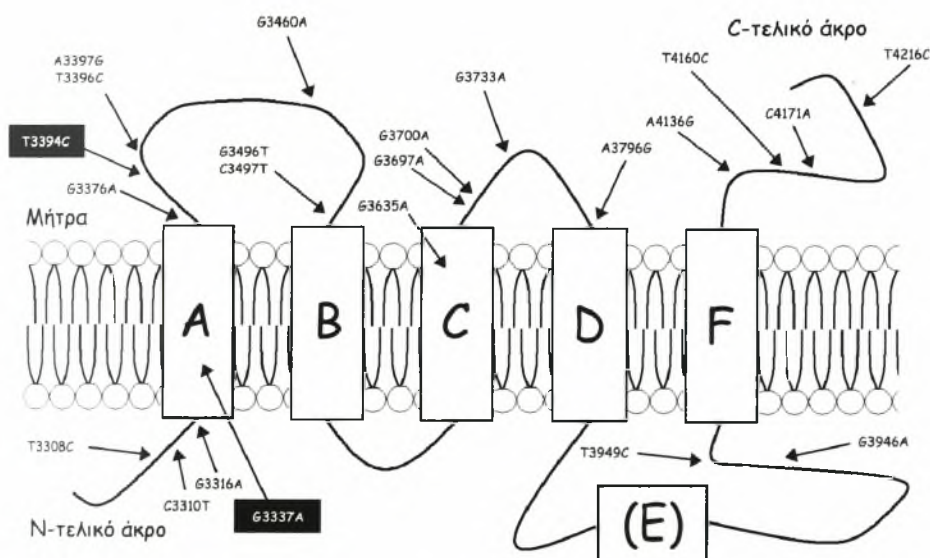
Αν και ο αρχικός μας στόχος ήταν το tRNA^{Leu(UUR)}, το γονίδιο του οποίου συγκεντρώνει τις περισσότερες σε αριθμό παθογόνες μεταλλάξεις, **δεν βρέθηκε καμία μετάλλαξη στο tRNA^{Leu(UUR)}**. Αυτό θα μπορούσε να εξηγηθεί από το γεγονός ότι οι περισσότερες μεταλλάξεις που έχουν βρεθεί στο tRNA^{Leu(UUR)} συνδέονται με ασθένειες πολύ βαριάς μορφής έως θανατηφόρες.^{28,89} Η παρατήρηση αυτή ενισχύεται από μια πρόσφατη μελέτη που έγινε σε 128 Τυνησίους ασθενείς με μιτοχονδριακές ασθένειες για την ύπαρξη μεταλλάξεων στο γονίδιο του tRNA^{Leu(UUR)}. Καμία μετάλλαξη δεν βρέθηκε στο συγκεκριμένο γονίδιο ούτε στους ασθενείς ούτε και στα 100 φυσιολογικά άτομα που συμμετείχαν.⁹⁰

Ενδιαφέρον παρουσιάζει η **μετάλλαξη A12308G που βρέθηκε στο tRNA^{Leu(CUN)} σε 6 ασθενείς με εντελώς διαφορετικό προφίλ**. Δύο από τους 6 ασθενείς παρουσίαζαν καρδιακά προβλήματα, άλλοι 2 μεταβολικές διαταραχές, ένας ασθενής αντιμετώπιζε ψυχοκινητική καθυστέρηση και ένας ακόμη ήταν προσβεβλημένος από σκλήρυνση κατά πλάκας. Η μετάλλαξη αυτή έχει ήδη συσχετισθεί με αύξηση της πιθανότητας εμφάνισης εγκεφαλικού επεισοδίου⁹¹ και CPEO⁹² αλλά έχει αναφερθεί και ως απλός πολυμορφισμός⁹³. Το γεγονός αυτό δεν μας παραξενεύει εφόσον είναι γνωστό ότι μια μετάλλαξη μπορεί να συνδέεται με περισσότερους από έναν φαινότυπους. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η A3243G μετάλλαξη στο γονίδιο του tRNA^{Leu(UUR)}, η οποία συνήθως συναντάται σε ασθενείς που εμφανίζουν

MELAS αλλά και MERRF, σε άτομα με το σύνδρομο του Leigh, σε καρδιομυοπάθειες, σε περιπτώσεις διαβήτη, κώφωσης και οφθαλμοπληγίας.²⁸

Σε ένα αγοράκι 14 μηνών που εμφάνιζε αρρυθμίες και επαναλαμβανόμενους περιοδικά πυρετούς (σύνδρομο PFAPA) βρέθηκε μια νέα μετάλλαξη, η **3158insT στο 16S rRNA**. Αν και είναι άγνωστη η αιτιολογία αυτού του συνδρόμου, πρόσφατες έρευνες έδειξαν ότι σε ασθενείς με σύνδρομο PFAPA παρατηρείται μια απορρύθμιση της ανοσοαπόκρισης, με επαναλαμβανόμενη ενεργοποίηση των προ-φλεγμονωδών κυτοκινών και ελάττωση της ισχύος του αντιφλεγμονώδους μηχανισμού, ανά τακτά χρονικά πυρετώδη διαστήματα.⁹⁴ Ακριβώς επειδή δεν είναι γνωστά τα αίτια που οδηγούν στο συγκεκριμένο σύνδρομο, κρίνεται απαραίτητη η διερεύνηση για το αν αυτή η μετάλλαξη στο 16S rRNA παίζει σημαντικό ρόλο στην παθολογία του συνδρόμου. Δυστυχώς, πολύ λίγα είναι γνωστά για τον πρωτεϊνοσυνθετικό μηχανισμό των μιτοχονδρίων και έτσι δεν μπορέσαμε να συλλέξουμε πληροφορίες για να αποσαφηνίσουμε την επίδραση της μετάλλαξης στο 16S rRNA. Παρόλα αυτά μια σάρωση όλων των γονιδίων του μιτοχονδριακού γενώματος για την ύπαρξη και άλλων μεταλλάξεων παράλληλα με μία βιοχημική μελέτη που θα εξέταζε την λειτουργικότητα του ριβοσώματος, θα βοηθούσε πολύ προς αυτή την κατεύθυνση.

Σε ασθενή με ψυχοκινητική καθυστέρηση βρέθηκαν δύο μεταλλάξεις: η **T3197C στο 16S rRNA** και η **A12308G στο tRNA^{Leu}(CUN)**. Μια έρευνα που έγινε σε δύο Κινέζικες οικογένειες, βρέθηκε ότι 2 μεταλλάξεις, μια σε rRNA (η C1494T στο 12S rRNA) και μια σε tRNA (η G7444A στο tRNA^{Ser}(UCN)) δρούσαν συνεργατικά με αποτέλεσμα μέλη των οικογενειών να πάσχουν από μη συνδρομική κώφωση.⁹⁵ Αυτό είναι ένα παράδειγμα συνεργασίας δύο διαφορετικών μιτοχονδριακών γονιδίων (rRNA και tRNA) και θα μπορούσε να είναι ένας πιθανός μηχανισμός εκδήλωσης μιας συγκεκριμένης μιτοχονδριακής ασθένειας.



Σχήμα 23. Η πρώτη υπομονάδα της αφυδρογονάσης του NADH (ND1) και όλες οι παθολόνες μεταλλάξεις που έχουν βρεθεί στο γονίδιο της. Σε μαύρο πλαίσιο απεικονίζονται οι μεταλλάξεις που εντοπίσαμε σε ασθενείς που συμμετείχαν στην έρευνα μας.

Σε δυο ανεξάρτητους ασθενείς (12 και 26) με κοινό χαρακτηριστικό τα καρδιακά προβλήματα, σαρώνοντας όλα τα μιτοχονδριακά tRNA βρήκαμε τρεις μεταλλάξεις: την G3337A, A12308G και C15946T. Η C15946T, η οποία έχει προταθεί ως πολυμορφισμός σε ένα από τα πιο πολυμορφικά γονίδια tRNA, αυτό της θρεονίνης, αποτελεί μαζί με την A12308G τις μόνες μεταλλάξεις που βρέθηκαν στα μιτοχονδριακά tRNA των δύο ασθενών ύστερα από πλήρη έλεγχο και των 22 tRNA. Μια νέα μετάλλαξη, η G3337A που εντοπίζεται στην ND1 (Σχήμα 23), συνιληρονομείται με τις μεταλλάξεις A12308G και C15946T των tRNA και ο πιθανότερος μηχανισμός παθογένειας της νέας μετάλλαξης φαίνεται να οφείλεται στην ύπαρξη και συνεργατική δράση των 2 tRNA μεταλλάξεων. Η συγκεκριμένη υπόθεση ενισχύεται από πρόσφατες δημοσιεύσεις που επιβεβαιώνουν τον αθροιστικό ρόλο μεταλλάξεων σε γονίδια tRNA.^{95,98}



Σχήμα 24. Τα 956 νουκλεοτιδικά κατάλοιπα του γονιδίου της ND1 κωδικοποιούν ένα πρωτεϊνικό προϊόν 318 αμινοξέων το οποίο αποτελεί μία από τις 25 υπομονάδες της αφυδρογονάσης του NADH. Η μετάλλαξη G3337A τροποποιεί το μη πολικό αμινοξύ βαλίνη (Val) της 11^{ης} τριπλέτας (GTA) κοντά στην αρχή του γονιδίου, στο μη πολικό αμινοξύ μεθειονίνη (Met). Στο σχήμα φαίνεται ένα μέρος της ND1 όπου με κόκκινο έχει χρωματιστεί το τροποποιημένο αμινοξύ. Όπως βλέπουμε η μετάλλαξη εντοπίζεται εντός της πρώτης α-έλικας από το αμινο-τελικό άκρο (αριστερά). Η πρωτεΐνη μοντελοποιήθηκε στο πρόγραμμα SPDB με την βοήθεια της κρυσταλλογραφημένης οξειδοοξειδάσης της B8 υπομονάδας του συμπλόκου I ανθρώπου όπου και έγινε η προσαρμογή.

Για την νέα μετάλλαξη G3337A, προχωρήσαμε σε επόμενο επίπεδο με σκοπό να δούμε τι επιπτώσεις έχει στη δομή της πρωτεΐνης που κωδικοποιείται, αν αλλάζει αμινοξύ, πόσο καλά συντηρημένο είναι αυτό στους υπόλοιπους οργανισμούς που εξαρτώνται από τον αερόβιο μεταβολισμό και ποιες μπορούν να είναι οι βιοχημικές συνέπειες αυτής της μετάλλαξης. Με την βοήθεια πρωτεϊνικών βάσεων δεδομένων και προγραμμάτων βιοπληροφορικής, καταφέραμε όχι μόνο να μοντελοποιήσουμε έως έναν αποδεκτό βαθμό τμήμα της ND1 που εντοπίζεται η μετάλλαξη (Σχήμα 24), αλλά και να προσδιορίσουμε το βαθμό συντήρησης των αμινοξικών καταλοίπων σε διάφορα είδη (Σχήμα 25). Όπως φαίνεται στο Σχήμα 25, ο βαθμός συντήρησης του 11^{ου} αμινοξέος αλλάζει καθώς κατεβαίνουμε τη κλίμακα μεγέθους και πολυπλοκότητας των ευκαρυωτικών οργανισμών. Η αλλαγή αμινοξέος που παρατηρείται λόγω της μετάλλαξης, μπορεί να μην έχει τόσο σημαντική επίδραση στην τριτοταγή διαμόρφωση της ND1, αφού ένα μη πολικό αμινοξύ αντικαθίσταται από ένα μη πολικό (Val → Met), ωστόσο η αλληλεπίδραση της

υπομονάδας με γειτονικά μόρια ίσως να επηρεάζεται και αυτό να έχει επίπτωση στη λειτουργικότητα του ενζύμου. Έτσι ένας βιοχημικός έλεγχος που συμπεριλαμβάνει τόσο μελέτη του επιπέδου της ετεροπλασμίας όσο και εξέταση της δραστηριότητας των συμπλόκων της αναπνευστικής αλυσίδας, κυρίως του συμπλόκου I που εντοπίζεται η μετάλλαξη, κρίνεται απαραίτητος. Εφόσον ο έλεγχος για το επίπεδο ετεροπλασμίας έγινε στο αίμα και έδειξε ότι και οι δύο ασθενείς είναι ομοπλασμικοί σχεδόν 100%, θα πρέπει να επαναληφθεί σε μυϊκό ιστό, αφού μαζί με τον εγκέφαλο αποτελούν τους κυριότερους ιστούς που προσβάλλονται από τη μιτοχονδριακή δυσλειτουργία. Παρόλα αυτά, η ομοπλασμία δεν είναι ασυμβίβαστη με την παθογένεια, αφού πολλοί κλινικοί φαινότυποι έχουν αποδοθεί σε ομοπλασμικές μεταλλάξεις tRNA γονιδίων.^{20,21}

	' ' ' ' ' ' ' ' '	10	' ' ' ' ' ' ' ' '	20
Hommo sapiens	MP	MANLLLLLI	V	PILIAMAF LML
Gorilla	MS	MANLLLLLI	V	PILIAMAF LML
Chimpanzee	TP	M T N L L L L L I	V	PILIAMAF LML
Bovine	MF	MIN I L M L I	I	PIL L A V A F L T L
Mouse	MF	FIN I L T L L	V	PILIAMAF L T L
Rat	MY	FIN I L T L L	I	PILIAMGL L T L
Xenopus	LIN	PLLYMVP	I	LLAVAF L T L I E
Drosophila	LS	LIGS L L L L I	I	CVLVSVAF L T L
C.elegans	L	V L L M V I L M M	M	FIVQ S I A F I T L

Σχήμα 25. Βαθμός συντήρησης του ενδέκατου αμινοξέος της ND1 σε διάφορα είδη. Οι αμινοξικές αλληλουχίες πάρθηκαν από τις διαδικτυακές βάσεις δεδομένων www.ihop-net.org/UniPub/iHOP/bng/90341.html και www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?hsa+4535

Σε ένα σύνολο 32 ασθενών, βρήκαμε 5 μεταλλάξεις, ένα σημαντικό αριθμό αν σκεφτεί κανένας ότι αντιστοιχεί σε ποσοστό 15% ανά άτομο. Κάποιες από τις μεταλλάξεις αυτές έχουν αναφερθεί ως ουδέτεροι πολυμορφισμοί ενώ άλλες ως το αίτιο παθογονικότητας. Ωστόσο, για να βγάλουμε σαφή συμπεράσματα για το αν και κατά πόσο οι συγκεκριμένες μεταλλάξεις παίζουν σημαντικό ρόλο στη δημιουργία του φαινοτύπου των ασθενών, αναγκαία κρίνεται η μελέτη και των υπολοίπων 18 tRNA στους ασθενείς που δεν έγινε η διαδικασία αυτή. Το επόμενο βήμα της έρευνας μας, το οποίο έχουμε ξεκινήσει για την νέα μετάλλαξη G3337A και περιγράψαμε παραπάνω, συμπεριλαμβάνει βιοχημική μελέτη της μιτοχονδριακής λειτουργίας σε πολλαπλά επίπεδα με παράλληλο προσδιορισμό του επιπέδου ετεροπλασμίας, για όλους τους ασθενείς που βρέθηκαν μεταλλάξεις. Το μέλλον στο προσδιορισμό των μιτοχονδριακών ασθενειών φαίνεται πολλά υποσχόμενο, διότι νέες τεχνικές έχουν χρησιμοποιηθεί προς αυτή την κατεύθυνση,⁹⁹ δυστυχώς δεν ισχύει το ίδιο και για την θεραπεία τους, αφού πολύ λίγα έχουν γίνει σε αυτό τον τομέα.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Henze K, Martin W. Evolutionary biology: essence of mitochondria. *Nature* 2003, 426:127-128.
2. Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MH, Coulson AR. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 1981, 290:4-65.
3. Pesole G, Gissi C, De Chirico A, Saccone C. Nucleotide substitution rate of mammalian mitochondrial genomes. *J Mol Evolution* 1999, 48:427-434.
4. Allen JF, Raven JA. Free-radical-induced mutation vs redox regulation: costs and benefits of genes in organelles. *J Mol Evol* 1996, 42:482-492.
5. Shoubridge EA. Nuclear genetic defects of oxidative phosphorylation. *Hum Mol Genet* 2001, 10:2277-84.
6. DiMauro S, Schon EA. Mitochondrial respiratory-chain diseases. *N Engl J Med* 2003, 348:2656-68.
7. Zifa E, Giannouli S, Theotokis P, Stamatis C, Mamuris Z, Stathopoulos C. Mitochondrial tRNA mutations: Clinical and functional perturbations. *RNA Biol* 2007, 4:38-66.
8. Ingman M, Kaessmann H, Pääbo S, Gyllenstein U. Mitochondrial genome variation and the origin of modern humans. *Nature* 2000; 408:708-713.
9. Florentz C, Sissler M. Disease-related versus polymorphic mutations in human mitochondrial tRNAs. Where is the difference? *EMBO Rep* 2001; 2:481-486.
10. Van Goethem G, Dermaut B, Lofgren A, Martin J, Van Broeckhoven C. Mutation of POLG is associated with PEO characterized by mtDNA deletions. *Nat Genet* 2001, 28:211-212.
11. Spelbrink JN, Li FY, Tiranti V, Nikali K, Yuan QP, Wanrooij S, Garrido N, Comi GP, Morandi L, Santoro L, Toscano A, Fabrizi GM. Human mitochondrial DNA deletions associated with mutations in the gene encoding Twinkle. *Nat Genet* 2001, 28:223-231.
12. Kaukoken J, Juselius JK, Tiranti V, Kyttala A, Zeviani M, Comi GP, Keranen S, Peltonen L, Suomalainen A. Role of adenine nucleotide translocator 1 in mtDNA maintenance. *Science* 2000, 289:782-785.
13. Nishino I, Spinazzola A, Hirano M. Thymidine phosphorylase gene mutations in MNGIE, a human mitochondrial disorder. *Science* 1999, 283:689-692.
14. Mandel H, Szargel R, Labay V, Elpeleg O, Saada A, Shalata A, Anbinder Y, Berkowitz D, Hartman C, Barak M, Eriksson S, Cohen N. The deoxyguanosine kinase gene is mutated in individuals with depleted hepatocerebral mitochondrial DNA. *Nat Genet* 2001, 29:337-341.
15. Saada A, Shaag A, Mandel H, Nevo Y, Eriksson S, Elpeleg O. Mutant mitochondrial thymidine kinase in mitochondrial DNA depletion myopathy. *Nat Genet* 2001, 29:342.
16. Tiranti V, Hoertnagel K, Carrozzo R, Galimberti C, Munaro M, Granatiero M, Zelante L, Gasparini P, Marzella R, Rocchi M, Bayona-Bafluy MP, Enriquez JA. Mutations of SURF-1 in Leigh disease associated with cytochrome c oxidase deficiency. *Am J Hum Genet* 1998, 63:1609-21.

17. Jaksch M, Ogilvie I, Yao J, Kortenhaus G, Bresser HG, Gerbitz KD, Shoubridge EA. Mutations in SCO_2 are associated with a distinct form of hypertrophic cardiomyopathy and cytochrome c oxidase deficiency. *Hum Mol Genet* 2000, 9:795-801.
18. Papadopoulou LC, Sue CM, Davidson M. Fatal infantile cardioencephalopathy with cytochrome c oxidase deficiency due to mutations in SCO_2 , a human COX assembly gene. *Nat Genet* 1999, 23:333-337.
19. Mukherjee S, Basu S, Home P, Dhar G, Adhya S. Necessary and sufficient factors for the import of transfer RNA into the kinetoplast mitochondrion. *EMBO Rep* 2007, [Epub ahead of print]
20. Taylor RW, Giordano C, Davidson MM, d'Amati G, Bain H, Hayes CM, Leonard H, Barron MJ, Casali C, Santorelli FM, Hirano M, Lightowlers RN, DiMauro S, Turnbull DM. A homoplasmic mitochondrial transfer ribonucleic acid mutation as a cause of maternally inherited hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Col Cardiol* 2003, 41:1786-96.
21. McFarland R, Clark KM, Morris AA, Taylor RW, Macphail S, Lightowlers RN, Turnbull DM. Multiple neonatal deaths due to a homoplasmic mitochondrial DNA mutation. *Nat Genet* 2002, 30:145-146.
22. Limongelli A, Schaefer J, Jackson S, Invernizzi F, Kirino Y, Suzuki T, Reichmann H, Zeviani M. Variable penetrance of a familial progressive necrotising encephalopathy due to a novel tRNA(Ile) homoplasmic mutation in the mitochondrial genome. *J Med Genet* 2004, 41:342-349.
23. Kawarai T, Kawakami H, Kozuka K, Izumi Y, Matsuyama Z, Watanabe C, Kohriyama T, Nakamura S. A new mitochondrial DNA mutation associated with mitochondrial myopathy: tRNA^{Leu}(UUR) 3254C-to-G. *Neurology* 1997, 49:598-600.
24. Taylor RW, Schaefer AM, McFarland R, Maddison P, Turnbull DM. A novel mitochondrial DNA tRNA(Ile) (A4267G) mutation in a sporadic patient with mitochondrial myopathy. *Neuromuscul Disord* 2002, 12:659-664.
25. Akita Y, Koga Y, Iwanaga R, Wada N, Tsubone J, Fukuda S, Nakamura Y, Kato H. Fatal hypertrophic cardiomyopathy associated with an A8296G mutation in the mitochondrial tRNA(Lys) gene. *Hum Mutat* 2000, 15:382.
26. Grasso M, Diegoli M, Brega A, Campana C, Tavazzi L, Arbustini E. The mitochondrial DNA mutation T12297C affects a highly conserved nucleotide of tRNA(Leu(CUN)) and is associated with dilated cardiomyopathy. *Eur J Hum Genet* 2001, 9:311-315.
27. Thambisetty M, Newman N. Diagnosis and management of MELAS. *Expert Rev. Mol Diagn* 2004, 4:631-644.
28. Matsumoto J, Saver JL, Brennan KC, Ringman JM. Mitochondrial encephalomyopathy with lactic acidosis and stroke (MELAS). *Rev Neurol Dis* 2005, 2:30-34.
29. Kirino Y, Goto Y, Campos Y, Arenas J, Suzuki T. Specific correlation between the wobble modification deficiency in mutant tRNAs and the clinical features of a human mitochondrial disease. *Proc Natl Acad Sci (U.S.A.)* 2005, 102:7127-32.

30. Morten KJ, Cooper JM, Brown GK, Lake BD, Pike D, Poulton J. A new point mutation associated with mitochondrial encephalomyopathy. *Hum Mol Genet* 1993, 2:2081-87.
31. Sato W, Hayasaka K, Shoji Y, Takahashi T, Takada G, Saito M, Fukawa O, Wachi E. A mitochondrial tRNA(Leu)(UUR) mutation at 3256 associated with mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes (MELAS). *Biochem Mol Biol Int (Sydney)* 1994, 33:1055-61.
32. Jeppesen TD, Schwartz M, Hansen K, Danielsen ER, Wibrand F, Vissing J. Late onset of stroke-like episode associated with a 3256C>T point mutation of mitochondrial DNA. *J Neurol Sci* 2003, 214:17-20.
33. Campos Y, Garcia A, del Hoyo P, Jara P, Martin M, Rubio J, Berbel A, Barbera JR, Ribacoba R, Astudillo A, Cabello A, Ricoy J, Arenas J. Two pathogenic mutations in the mitochondrial DNA tRNA^{Leu}(UUR) gene (T3258C and A3280G) resulting in variable clinical phenotypes. *Neuromusc Disord* 2003, 13:416-420.
34. Tay SK, Shanske S, Crowe C, Shanske A, Schafer I, Pancrudo J, Lu J, Bonilla E, DiMauro S. Clinical and genetic features in two families with MELAS and the T3271C mutation in mitochondrial DNA. *J Child Neurol* 2005, 20:142-146.
35. Goto Y, Tsugane K, Tanabe Y, Nonaka I, Horai S. A new point mutation at nucleotide pair 3291 of the tRNA^{Leu}(UUR) gene in a patient with mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes (MELAS). *Biochem Biophys Res Commun* 1994, 202:1624-30.
36. Chomyn A. The myoclonic epilepsy and ragged-red fiber mutation provides new insights into human mitochondrial function and genetics. *Am J Hum Genet* 1998, 62:745-751.
37. 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, 116:617-632.
38. Remes AM, Karppa M, Moilanen JS, Rusanen H, Hassinen IE, Majamaa K, Uimonen S, Sorri M, Salmela PI, Karvonen SL. Epidemiology of the mitochondrial DNA 8344A>G mutation for the myoclonus epilepsy and ragged red fibres (MERRF) syndrome. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2003, 74:1158-59.
39. Arenas J, Campos Y, Bornstein B, Ribacoba R, Martin M, Rubio J, Santorelli F, Zeviani M, DiMauro S, Garesse R. A double mutation (A8296G and G8363A) in the mitochondrial DNA tRNA (Lys) gene associated with myoclonus epilepsy with ragged-red fibers. *Neurology* 1999, 52:377-382.
40. Silvestri G, Moraes CT, Shanske S, Oh SJ, DiMauro S. A new mtDNA mutation in the tRNA(Lys) gene associated with mitochondrial epilepsy and ragged-red fibers (MERRF). *Am J Hum Genet* 1992, 51:1213-17.
41. Rossmannith W, Raffelsberger T, Roka J, Kornek B, Feucht M, Bittner RE. The expanding mutational spectrum of MERRF substitution G8361A in the mitochondrial tRNA^{Lys} gene. *Ann Neurol* 2003, 54:820-823.

42. Ozawa M, Nishino I, Horai S, Nonaka I, Goto YI. Myoclonus epilepsy associated with ragged-red fibers: a G-to-A mutation at nucleotide pair 8363 in mitochondrial tRNA(Lys) in two families. *Muscle Nerve* 1997, 20:271-278.
43. Shtilbans A, Shanske S, Goodman S, Sue CM, Bruno C, Johnson TL, Lava NS, Waheed N, DiMauro S. G8363A mutation in the mitochondrial DNA transfer ribonucleic acid Lys gene: another cause of Leigh syndrome. *J Child Neurol* 2000, 15:759-761.
44. Tsao CY, Herman G, Boue DR, Prior TW, Lo WD, Atkin JF, Rusin J. Leigh disease with mitochondrial DNA A8344G mutation: case report and brief review. *J Child Neurol* 2003, 18:62-64.
45. Chalmers R, Lamont P, Nelson I, Ellison DW, Thomas NH, Harding AE, Hammans SR. A mitochondrial DNA tRNA(Val) point mutation associated with adult-onset Leigh syndrome. *Neurology* 1997, 49:589-592.
46. Man PY, Turnbull DM, Chinnery PF. Leber hereditary optic neuropathy. *J Med Genet* 2002, 39:162-169.
47. Li R, Qu J, Zhou X, Tong Y, Hu Y, Qian Y, Lu F, Mo JQ, West CE, Guan MX. The mitochondrial tRNAThr A15951G mutation may influence the phenotypic expression of the LHON-associated ND4 G11778A mutation in a Chinese family. *Gene* 2006, 376:79-86.
48. Qu J, Li R, Zhou X, Tong Y, Lu F, Qian Y, Hu Y, Mo JQ, West CE, Guan MX. The novel A4435G mutation in the mitochondrial tRNAMet may modulate the phenotypic expression of the LHON-associated ND4 G11778A mutation. *Invest Ophthalmol Visual Sci* 2006, 47:475-483.
49. Nishigaki Y, Tadesse S, Bonilla E, Shungu D, Hersh S, Keats BJ, Berlin CI, Goldberg MF, Vockley J, DiMauro S, Hirano M. A novel mitochondrial tRNALeu(UUR) mutation in a patient with features of MERRF and Kearns-Sayre syndrome. *Neuromuscul Disord* 2003, 13:334-340.
50. Bau V, Zierz S. Update on chronic progressive external ophthalmoplegia. *Strabismus* 2005, 13:133-142.
51. Chinnery PF, Johnson MA, Taylor RW, Durward WF, Turnbull DM. A novel mitochondrial tRNA isoleucine gene mutation causing chronic progressive external ophthalmoplegia. *Neurology* 1997, 49:1166-68.
52. Cardaioli E, Da Pozzo P, Radi E, Dotti M, Federico A. A novel heteroplasmic tRNALeu(CUN) mtDNA point mutation associated with chronic progressive external ophthalmoplegia. *Biochem Biophys Res Commun* 2005, 327:675-678.
53. Seibel P, Lauber J, Klopstock T, Marsac C, Kadenbach B, Reichmann H. Chronic progressive external ophthalmoplegia is associated with a novel mutation in the mitochondrial tRNA^{Asn} gene. *Biochem Biophys Res Commun* 1994, 204:482-489.
54. Van den Ouweland JM, Bruining GJ, Lindhout D, Wit JM, Veldhuyzen BF, Maassen JA. Mutations in mitochondrial tRNA genes: non-linkage with syndromes of Wolfram and chronic progressive external ophthalmoplegia. *Nucleic Acids Res* 1992, 20:679-682.
55. Van Camp G, Smith RJ. Maternally inherited hearing impairment. *Clin Genet* 2000, 57:409-414.
56. Howell N, Elson JL, Chinnery PF, Turnbull DM. mtDNA mutations and common neurodegenerative disorders. *Trends Genet* 2005; 21:583-586.

57. Egensperger R, Kosel S, Schnopp NM, Mehraein P, Graeber MB. Association of the mitochondrial tRNA(A4336G) mutation with Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1997, 23:315-321.
58. Tysoe C, Robinson D, Brayne C, Denning T, Paykel ES, Huppert FA, Rubinsztein DC. The tRNA(Gln) 4336 mitochondrial DNA variant is not a high penetrance mutation which predisposes to dementia before the age of 75 years. *J Med Genet* 1996, 33:1002-06.
59. Hutchin T, Cortopassi G. A mitochondrial DNA clone is associated with increased risk for Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci (U.S.A.)* 1995, 92:6892-95.
60. Leroy D, Norby S. A new human mtDNA polymorphism: tRNAGln/4336 T(C). *Clin Genet* 1994, 45:109-110.
61. Grasbon-Frodl EM, Kosel S, Sprinzl M, von Eitzen U, Mehraein P, Graeber MB. Two novel point mutations of mitochondrial tRNA genes in histologically confirmed Parkinson disease. *Neurogenetics* 1999, 2:121-127.
62. Mayr-Wohlfart U, Paulus C, Henneberg A, Rodel G. Mitochondrial DNA mutations in multiple sclerosis patients with severe optic involvement. *Acta Neurol Scand* 1996, 94:167-171.
63. Kalman B, Li S, Chatterjee D, O'Connor J, Voehl MR, Brown MD, Alder H. Large scale screening of the mitochondrial DNA reveals no pathogenic mutations but a haplotype associated with multiple sclerosis in Caucasians. *Acta Neurol Scand* 1999, 99:16-25.
64. Lauber J, Marsac C, Kadenbach B, Seibel P. Mutations in mitochondrial tRNA genes: a frequent cause of neuromuscular diseases. *Nucleic Acids Res* 1991, 19:1393-97.
65. Tzen CY, Tsai JD, Wu TY, Chen BF, Chen ML, Lin SP, Chen SC. Tubulointerstitial nephritis associated with a novel mitochondrial point mutation. *Kidney Int* 2001, 59:846-854.
66. Scaglia F, Vogel H, Hawkins EP, Vladutiu GD, Liu LL, Wong LJ. Novel homoplasmic mutation in the mitochondrial tRNA^{Tyr} gene associated with atypical mitochondrial cytopathy presenting with focal segmental glomerulosclerosis. *Am J Med Genet* 2004, 131:107-108.
67. Gattermann N. From sideroblastic anemia to the role of mitochondrial DNA mutations in myelodysplastic syndromes. *Leukemia Res* 1999, 24:141-151.
68. Gattermann N, Retzlaff S, Wang YL, Berneburg M, Heinisch J, Wlaschek M, Aul C, Schneider W. A heteroplasmic point mutation of mitochondrial tRNA^{Leu}(CUN) in non-lymphoid haemopoetic cell lineages from a patient with acquired idiopathic sideroblastic anaemia. *Br J Haematol* 1996, 93:845-855.
69. Wang YL, Choi HK, Hinish J, Aul C, Gattermann N. The MERRF mutation of mitochondrial DNA in the bone marrow of a patient with acquired idiopathic sideroblastic anemia. *Am J Hematol* 1999, 60:83.
70. Van den Ouweland JM, Lemkes HH, Trembath RC, Ross R, Velho G, Cohen D, Froguel P, Maassen JA. Maternally inherited diabetes and deafness is a distinct subtype of diabetes and associates with a single point mutation in the mitochondrial tRNA^{Leu}(UUR) gene. *Diabetes* 1994, 43:746-751.

71. Tsukuda K, Suzuki Y, Kameoka K, Osawa N, Goto Y, Katagiri H, Asano T, Yazaki Y, Oka Y. Screening of patients with maternally transmitted diabetes for mitochondrial gene mutations in the tRNA[Leu(UUR)] region. *Diabet Med* 1997, 14:1032-37.
72. Suzuki S, Hinokio Y, Hirai S, Onoda M, Matsumoto M, Ohtomo M, Kawasaki H, Satoh Y, Akai H, Abe K, Toyota, T. Diabetes with mitochondrial gene tRNA^{Lys} mutation. *Diabetes Care* 1994, 17:1428-32.
73. Zeviani M. Mitochondrial disorders. *Suppl Clin Neurophysiol* 2004, 57:304-312
74. Wong LJ. Pathogenic mitochondrial DNA mutations in protein-coding genes. *Muscle Nerve* 2007, 36:279-293.
75. Blakely EL, Rennie KJ, Jones L, Elstner M, Chrzanowska-Lightowlers ZM, White CB, Shield JP, Pillz DT, Turnbull DM, Poulton J, Taylor RW. Sporadic intragenic inversion of the mtDNA *MTND1* gene causing fatal infantile lactic acidosis. *Pediatric Research* 2006, 59:440-444.
76. Munakata K, Fujii K, Nanko S, Kunugi H, Kato T. Sequence and functional analyses of mtDNA in a maternally inherited family with bipolar disorder and depression. *Mutation Research* 2007, 617:119-124.
77. Lewin HA, Stewart-Haynes JA. A simple method for DNA extraction from leukocytes for use in PCR. *Biotechniques* 1992, 13:522-524.
78. Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 1987, 155:335-350.
79. Ohkubo K, Yamano A, Nagashima M, Mori Y, Anzai K, Akehi Y, Nomiyama R, Asano T, Urae A, Ono J. Mitochondrial gene mutations in the tRNA^{Leu(UUR)} region and diabetes: Prevalence and clinical phenotypes in Japan. *Clinical Chemistry* 2001, 47:1641-48.
80. Ueki I, Koga Y, Povalko N, Akita Y, Nishioka J, Yatsuga S, Fukiyama R, Matsuishi T. Mitochondrial tRNA gene mutations in patients having mitochondrial disease with lactic acidosis. *Mitochondrion* 2006, 6:29-36.
81. Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989, 86:2766-2770.
82. Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T.; Hrsg. (1989). *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*, 2nd Edition. Cold Spring Harbour Laboratory Press, NY.
83. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1977, 74:5463-5467.
84. Fischer SG, Lerman LS. DNA fragments differing by single base-pair substitutions are separated in denaturing gradient gels. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983, 80:1579-1583.
85. Andrews RM, Kubacha I, Chinnery PF, Lightowlers RN, Turnbull DM, Howell N. Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. *Nat Genet* 1999, 23:147.
86. Inoue K, Nakada K, Ogura A, Isobe K, Goto Y, Nonaka I, Hayashi JI. Generation of mice with mitochondrial dysfunction by introducing mouse mtDNA carrying a deletion into zygotes. *Nat Genet* 2000, 26:176-181.

87. Majamaa K. Epidemiology of A3243G, the mutation for MELAS: Prevalence of the mutation in an adult population. *Am J Hum Genet* 1998, 63:447-454.
88. Schaefer AM, Taylor RW, Turnbull DM, Chinnery PF. The epidemiology of mitochondrial disorders – past, present and future. *Biochim Biophys Acta* 2004, 1659:115-120.
89. Houshmand M, Larsson NG, Oldfors A, Tulinius M, Holme E. Fatal mitochondrial myopathy, lactic acidosis, and complex I deficiency associated with a heteroplasmic A>G mutation at position 3251 in the mitochondrial tRNA^{Leu(UUR)} gene. *Hum Genetics* 1996, 97:269-273.
90. Mkaouar-Rebai E, Tlili A, Masmoudi S, Belguith N, Charfeddine I, Mnif M, Triki C, Fakhfakh F. Mutational analysis of the mitochondrial tRNA^{Leu(UUR)} gene in Tunisian patients with mitochondrial diseases. *Biochem Biophys Res Commun* 2007, 355:1031-1037.
91. Pulkes T, Sweeney MG, Hanna MG. Increased risk of stroke in patients with the A12308G polymorphism in mitochondria. *Lancet* 2000, 356:2068-69.
92. Lauber J, Marsac C, Kadenbach B, Seibel P. Mutations in mitochondrial tRNA genes: a frequent cause of neuromuscular diseases. *Nucleic Acids Res* 1991, 19:1393-1397.
93. Van den Ouweland JM, Bruining GJ, Lindhout D, Wit JM, Veldhuyzen BF, Maassen JA. Mutations in mitochondrial tRNA genes: non-linkage with syndromes of Wolfram and chronic progressive external ophthalmoplegia. *Nucleic Acids Res* 1992, 20:679-682.
94. Murata T, Okamoto N, Shimizu T, Tamai H. Diagnosis and management of periodic fever with aphthous pharyngitis and adenitis (PFAPA). *Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi* 2007, 30:101-107.
95. Yuan H, Chen J, Liu X, Cheng J, Wang X, Yang L, Yang S, Cao J, Kang D, Dai P, Zhai S, Han D, Young WY, Guan MX. Coexistence of mitochondrial 12S rRNA C1494T and CO1/tRNA^{Ser(UCN)} G7444A mutations in two Han Chinese pedigrees with aminoglycoside-induced and non-syndromic hearing loss. *Biochem Biophys Res Commun* 2007, 362:94-100.
96. Sciacco M, Prella A, Fagiolari G, Bordoni A, Crimi M, Di Fonzo A, et al. A case of CPT deficiency, homoplasmic mtDNA mutation and ragged red fibers at muscle biopsy. *Journal Neuro Sci* 2005, 239:21-24.
97. Tang DL, Zhou Xin, Li X, Zhao L, Liu F. Variation of mitochondrial gene and the association with type 2 DM in a Chinese population. *Diabetes* 2006, 73:77-82.
98. Möllers M, Maniura-Weber K, Kiseljakovic E, Bust M, Hayrapetyan A, Jaksch M, Helm M, Wiesner RJ. A new mechanism for mtDNA pathogenesis: impairment of post-transcriptional maturation leads to severe depletion of mitochondrial tRNA^{Ser(UCN)} caused by T7512C and G7497A point mutations. *Nucleic Acids Res* 2005, 33:5647-5658.
99. Rabilloud T, Strub JM, Carte N, Luches S, Van Dorsselaer A, Lundardi J, Giege R, Florentz C. Comparative proteomics as new tool for exploring human mitochondrial tRNA disorders. *Biochemistry* 2002; 41:144-150.

