

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ ΣΕ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΑ tRNA
ΓΟΝΙΔΙΑ ΩΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΡΟΔΙΑΘΕΣΗΣ
ΣΤΗΝ ΕΜΦΑΝΙΣΗ ΤΟΥ ΑΣΘΜΑΤΟΣ**

Σταύρου Μαρία

ΛΑΡΙΣΑ 2010

ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

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

Η τριμελής εξεταστική επιτροπή αποτελείται από τους:

Αιμιλία Ζίφα, Επίκουρος Καθηγήτρια Βιολογίας/Νευροβιολογίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Ζήσης Μαμούρης, Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Κωνταντίνος Σταθόπουλος, Αναπληρωτής Καθηγητής Βιολογικής Χημείας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Πατρών

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ:

Την καθηγήτρια μου Α. Ζίφα για την πολύτιμη καθοδήγηση της και τις συμβουλές που μου παρείχε στη διάρκεια εκπόνησης της παρούσας εργασίας.

Τους διδάκτορες Κ. Σταμάτη και Λ.Κουτσογιαννούλη για την επιστημονική υποστήριξη τους κατά την εκτέλεση του πειραματικού μέρους.

Τη συνάδελφο μου Α.Καλογρίδη για τη συνεργασία και βοήθεια στην εκτέλεση της πειραματικής εργασίας.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΠΕΡΙΛΗΨΗ / ABSTRACT	3
2. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	5
2.1 ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ ΤΟΥ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΟΥ	5
2.1.1 Δομή	5
2.1.2 Λειτουργίες.....	7
2.2 ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑ	10
2.2.1 Αντιγραφή του mtDNA	11
2.2.1 Μεταγραφή του mtDNA	12
2.2.3 Πρωτεϊνοσύνθεση στα μιτοχόνδρια	13
2.3 ΔΟΜΗ ΜΟΡΙΩΝ tRNA.....	14
2.4 ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ ΠΟΥ ΣΥΝΔΕΟΝΤΑΙ ΜΕ ΑΝΘΡΩΠΙΝΕΣ ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ ..	16
2.4.1 Μεταλλάξεις μιτοχονδριακών tRNA γονιδίων	16
2.4.2 Μεταλλάξεις σε μιτοχονδριακά γονίδια rRNA, γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες και πυρηνικά γονίδια	22
2.4.3. Ετεροπλασμία.....	22
2.5 ΒΡΟΓΧΙΚΟ ΑΣΘΜΑ	23
2.5.1 Τύποι Άσθματος	24
2.5.2 Παράγοντες που αυξάνουν τον κίνδυνο εμφάνισης άσθματος	25
2.5.3 Παθοφυσιολογία άσθματος	26
2.5.4 Μιτοχόνδρια και Άσθμα.....	31
2.6 ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	34
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	35
3.1 ΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΥΛΙΚΟ	35
3.2 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA	36
3.3 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR).....	38
3.3.1 Γενικά για την PCR.....	38
3.3.2 Διαδικασία της PCR-Στάδια.....	39
3.4 ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥ ΔΙΑΜΟΡΦΩΣΗΣ ΜΟΝΟΚΛΩΝΗΣ ΑΛΥΣΙΔΑΣ (SSCP).....	43
3.4.1 Προετοιμασία των προϊόντων της PCR	44
3.4.2 Παρασκευή πηκτώματος πολυακρυλαμίδιου	45
3.4.3 Χρώση νιτρικού αργύρου (Silver Staining)	46
3.5 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ DNA (SEQUENCING).....	47
3.5.1 Καθαρισμός των PCR προϊόντων	47
3.5.2 Μέθοδος Sanger	48
3.5.3 Φθορίζουσα ταυτοποίηση αλληλουχίας DNA	49
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	50
4.1 Γονίδια tRNA ^{Thr/Pro}	50
4.2 Γονίδιο tRNA ^{Phe}	52
4.3 Γονίδιο tRNA ^{Arg}	54
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	58
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	61

1. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ένας μεγάλος αριθμός συνδρόμων με σοβαρά κλινικά συμπτώματα, έχουν συσχετιστεί τα τελευταία χρόνια με μεταλλάξεις σε μιτοχονδριακά γονίδια που κωδικοποιούν μόρια tRNA. Τα μόρια tRNA κατέχουν καίρια θέση στη διαδικασία της σύνθεσης των μιτοχονδριακών πρωτεϊνών, που αποτελούν μέρος της αναπνευστικής αλυσίδας των μιτοχονδρίων και άρα είναι κρίσιμες για το μεταβολισμό. Στα περισσότερα γονίδια που κωδικοποιούν tRNA έχουν εντοπιστεί τόσο πολυμορφισμοί όσο και παθογόνες μεταλλάξεις. Με δεδομένο το σημαντικό ρόλο των μορίων mt tRNA σε βασικές λειτουργίες στον οργανισμό, μελετήσαμε σε μια ομάδα 26 ασθενών με άσθμα, την ύπαρξη μεταλλάξεων σε συγκεκριμένα γονίδια tRNA (αλλά και παρακείμενες περιοχές τους, κωδικές και μη) προκειμένου να δούμε κατά πόσο τέτοιες μεταλλάξεις θα μπορούσαν να συσχετιστούν με την εμφάνιση του άσθματος. Παράλληλα με τους ασθενείς μελετήσαμε και ένα σύνολο 30 υγιών ατόμων ώστε τα αποτελέσματα από τις δύο ομάδες ατόμων (ασθενείς και υγιείς) να συγκριθούν μεταξύ τους. Συνολικά μελετήσαμε την ύπαρξη μεταλλάξεων σε 9 τμήματα μιτοχονδριακού DNA, τα οποία περιελάμβαναν 14 γονίδια tRNA (tRNA^{Thr}/tRNA^{Pro}, tRNA^{Ser(UCN)}/tRNA^{Asp}, tRNA^{Asn}/tRNA^{Cys}/tRNA^{Tyr}, tRNA^{Trp}/tRNA^{Ala}, tRNA^{Val}, tRNA^{Gly}, tRNA^{Phe}, tRNA^{Arg} και tRNA^{Glu}) καθώς και τμήματα άλλων παρακείμενων γονιδίων όπως 12S rRNA και ND3 ή και μη κωδικών περιοχών. Αφού τα τμήματα αυτά ενισχύθηκαν με PCR, ακολούθησε ανάλυση SSCP που αποσκοπούσε στον εντοπισμό διαφορετικών προτύπων στους ασθενείς, σε σχέση με τα πρότυπα που παρουσίαζαν οι μάρτυρες (με τη φυσιολογική DNA αλληλουχία). Τα δείγματα με τα διαφορετικά πρότυπα, στάλθηκαν για αλληλούχιση προκειμένου να βρεθεί η ακριβής θέση των μεταλλάξεων. Συνολικά εντοπίστηκαν 6 μεταλλάξεις στα γονίδια tRNA^{Phe}, tRNA^{Arg}, tRNA^{Thr}, 12S rRNA και ND3 αλλά και στο μη κωδικό τμήμα MT-NC10 στους ασθενείς. Στα δείγματα υγιών ατόμων εντοπίστηκαν 11 μεταλλάξεις, στα γονίδια tRNA^{Phe}, tRNA^{Asp}, tRNA^{Gly}, tRNA^{Thr}, 12S rRNA, ND3 και cytB. Ανάμεσα στα δείγματα ασθματικών και υγιών ατόμων, κοινές είναι δύο μεταλλάξεις. Η συγκεκριμένη μελέτη, παρουσιάζει στοιχεία ότι μεταλλάξεις σε μιτοχονδριακά γονίδια, αυξάνουν τον κίνδυνο εμφάνισης του άσθματος.

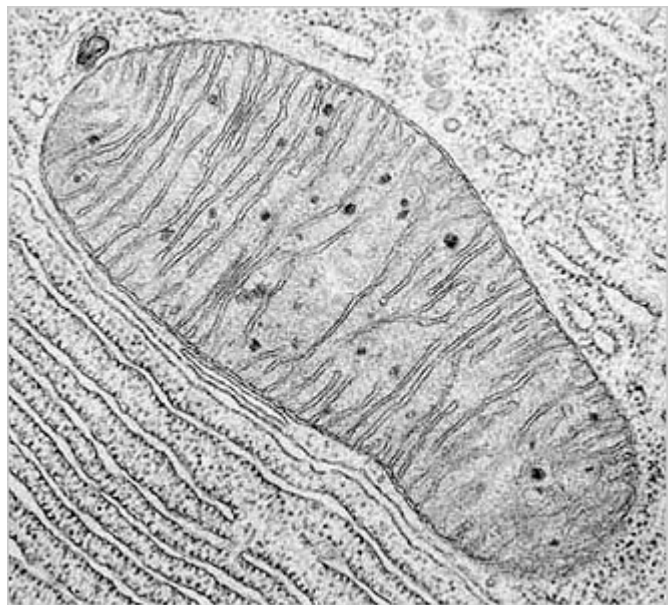
1. ABSTRACT

A considerable number of syndromes which present severe clinical symptoms, have been correlated to mutations of mitochondrial tRNA genes. tRNA molecules, are crucial for the synthesis of mitochondrial proteins which are part of the respiratory chain and subsequently are of great importance for the metabolism. Many polymorphisms and pathogenic mutations have been identified in most mitochondrial tRNA genes over the past years. Considering the huge importance of tRNA molecules in basic functions of the organisms, we examined a group of 26 asthmatic patients in order to identify the presence of mutations in specific mt tRNA genes. In this way we could decide whether such mutations could be associated with asthma appearance. In parallel to the asthmatic patients, we also examined a group of 30 healthy individuals. The acquisition of the results of both groups, would give us the opportunity to compare and come to conclusions. We tried to identify mutations in a total of 9 segments of mitochondrial DNA sequence, which included 14 tRNA genes (tRNA^{Thr}/tRNA^{Pro}, tRNA^{Ser(UCN)}/tRNA^{Asp}, tRNA^{Asn}/tRNA^{Cys}/tRNA^{Tyr}, tRNA^{Trp}/tRNA^{Ala}, tRNA^{Val}, tRNA^{Gly}, tRNA^{Phe}, tRNA^{Arg} and tRNA^{Glu}), as well as neighbour coding and non coding regions (such as 12S rRNA, ND3 and NC10). After the enhancement of each of the 9 segments, we analysed our samples, performing Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP). SSCP aimed in the detection of different patterns in our samples in comparison to the ones of control samples. Samples that presented different patterns after SSCP, were sequenced, so that we could identify the exact sites of the mutations. We found a total of 6 mutations in tRNA^{Phe}, tRNA^{Arg}, tRNA^{Thr}, 12S rRNA, ND3 genes and in MT-NC10 non coding region, in patients. Results of healthy individuals, showed a number of 11 mutations in tRNA^{Phe}, tRNA^{Asp}, tRNA^{Gly}, tRNA^{Thr}, 12S rRNA, ND3 and cytB genes. Two mutations, were common in both patients and healthy individuals. This study, presents evidence that mutations of mitochondrial genes, increase the risk of asthma.

2. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Μιτοχόνδριο

Τα μιτοχόνδρια (μίτος + χονδρίον, κόκκος) αποτελούν θεμελιώδη οργανίδια όλων των ευκαρυωτικών κυττάρων. Εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα και καταλαμβάνουν περίπου το 18-20% του συνολικού κυτταροπλασματικού όγκου. Πρόκειται για ωσειδή οργανίδια που έχουν διαστάσεις ανάλογες με αυτές των βακτηρίων, δηλαδή περίπου 2μm μήκος και 0,5μm διάμετρο. Τα μιτοχόνδρια είναι υπεύθυνα για την παραγωγή ενέργειας υπό τη μορφή τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP) και κατέχουν τον κεντρικό ρόλο στην όλη διαδικασία παραγωγής ενέργειας στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Γι' αυτό ακριβώς το λόγο χαρακτηρίζονται και σαν «εργοστάσια παραγωγής ενέργειας». Ο αριθμός των μιτοχονδρίων σε ένα κύτταρο ποικίλλει, ανάλογα με το είδος του οργανισμού αλλά και τον κυτταρικό τύπο στον οποίο αναφερόμαστε. Γενικά, κύτταρα με μεγάλες ενεργειακές απαιτήσεις διαθέτουν μεγάλο αριθμό μιτοχονδρίων, που μπορεί να φτάσει μέχρι και αρκετές χιλιάδες. Βασικό χαρακτηριστικό των μιτοχονδρίων είναι ημιαυτονομία τους. Αυτό σημαίνει ότι δεν εξαρτώνται αποκλειστικά από το πυρηνικό DNA για τη σύνθεση των απαραίτητων πρωτεϊνών και μορίων RNA που χρειάζονται, αλλά διαθέτουν και δικό τους DNA που κωδικοποιεί μια ποικιλία πρωτεϊνών και μορίων RNA. Τα μιτοχόνδρια δηλαδή, φέρουν δικό τους ανεξάρτητο γονιδίωμα, το οποίο μοιάζει σε μεγάλο βαθμό με εκείνο των βακτηρίων.



Εικόνα 1: Μιτοχόνδριο όπως φαίνεται στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο

2.1 ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ ΤΟΥ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΟΥ

2.1.1 Δομή

Μέσω μελετών ηλεκτρονικής μικροσκοπίας που πραγματοποιήθηκαν το 1952 από τους George Palade και Fritjof Sjostrand, έγινε γνωστή με λεπτομέρεια η δομή των μιτοχονδρίων.

Τα μιτοχόνδρια περιλαμβάνουν δύο συστήματα μεμβρανών: μια εξωτερική μεμβράνη και μια πτυχωτή εσωτερική μεμβράνη. Πιο συγκεκριμένα η εσωτερική μεμβράνη είναι μια μεμβράνη μεγάλων διαστάσεων η οποία αναδιπλώνεται δημιουργώντας μεγάλο αριθμό πτυχώσεων που ονομάζονται *ακρολοφίες*. Η ύπαρξη της διπλής μεμβράνης, έχει σαν αποτέλεσμα τη δημιουργία δύο διαμερισμάτων στο μιτοχόνδριο: το *διαμεμβρανικό χώρο*, μεταξύ εξωτερικής και εσωτερικής μεμβράνης και τη *μήτρα* ή *στρώμα*, το χώρο που περιβάλλεται από την εσωτερική μεμβράνη. Οι δύο μεμβράνες του μιτοχονδρίου έχουν διαφορετική σύσταση. Η εξωτερική μεμβράνη περιέχει 52% λιπίδια και 48% πρωτεΐνες (περίπου 1:1 κατά βάρος), ενώ η εσωτερική μεμβράνη περιέχει 24% λιπίδια και 76% πρωτεΐνες (περισσότερο από 3:1 κατά βάρος).

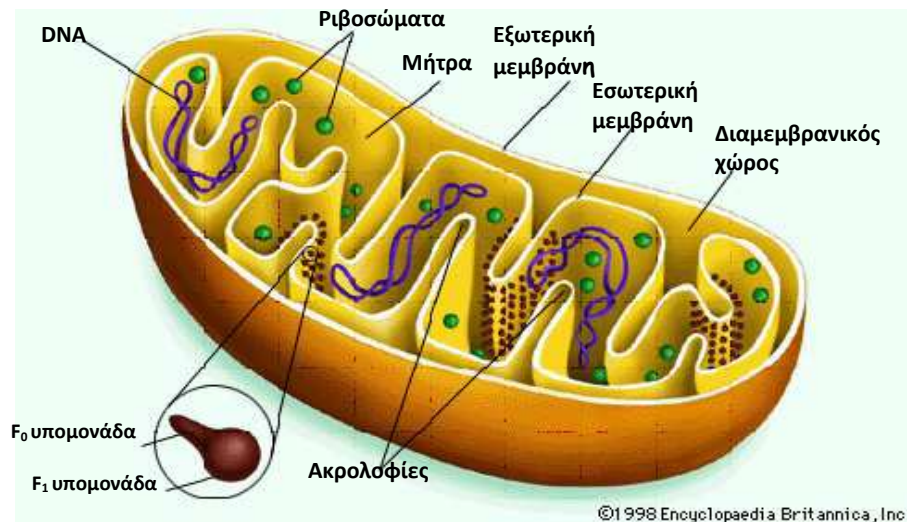
Η εξωτερική μεμβράνη έχει σα βασικό χαρακτηριστικό, τη διαπερατότητά της στα περισσότερα μικρά μόρια και ιόντα. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι περιέχει μεγάλο αριθμό μορίων μιτοχονδριακής πορίνης (γνωστής και σα VDAC-τασσεοεξαρτώμενος διάυλος ιόντων). Η πορίνη είναι μια μεταφορική πρωτεΐνη η οποία δημιουργεί πόρους (υδρόφιλους διαύλους), διαμέσου της λιπιδικής διπλοστιβάδας. Πρόκειται για μια πρωτεΐνη που αποτελείται από β-πτυχώσεις, που συνδέονται μεταξύ τους μέσω υδρογονικών δεσμών, σχηματίζοντας μια β-πτυχωτή επιφάνεια. Η επιφάνεια αυτή κάμπτεται δημιουργώντας ένα κοίλο κύλινδρο. Ο πόρος διατρέχει το μέσο της κυλινδροειδούς πρωτεΐνης. Τέτοιοι πόροι επιτρέπουν τη διέλευση όσων μορίων έχουν μοριακό βάρος μικρότερο των 5kD από τη μια πλευρά της μεμβράνης στη άλλη.

Ο διαμεμβρανικός χώρος, που βρίσκεται ανάμεσα στις δύο μεμβράνες, θεωρείται ότι παρουσιάζει την ίδια κατανομή ιόντων με αυτή του κυτταροπλάσματος. Αυτό οφείλεται στη διαπερατότητα της εξωτερικής μεμβράνης. Επίσης το τμήμα αυτό του μιτοχονδρίου περιλαμβάνει την αδενυλική κυκλάση και άλλα ένζυμα, που φωσφορυλιώνουν νουκλεοτίδια χρησιμοποιώντας τα εξερχόμενα μόρια ATP.

Η εσωτερική μεμβράνη σε αντίθεση με την εξωτερική μεμβράνη είναι αδιαπέραστη, από όλα τα ιόντα και τα πολικά μόρια. Για τη μετατόπιση μορίων διαμέσου αυτής της μεμβράνης, είναι απαραίτητη η δράση ειδικών μεμβρανικών μεταφορέων. Η εσωτερική μεμβράνη χαρακτηρίζεται επίσης και από την παρουσία σε αυτή του ασυνήθιστου φωσφολιπιδίου καρδιολιπίνη. Στη μεμβράνη αυτή είναι που επιτελείται η διεργασία της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, κατά την οποία η ενέργεια που απελευθερώνεται από την οξείδωση των τροφών χρησιμοποιείται για την παραγωγή ATP.

Οι ακρολοφίες, αναδιπλώσεις της εσωτερικής μεμβράνης, οδηγούν στην αύξηση της επιφάνειας της, διασφαλίζοντας την παραγωγή ATP στο μεγαλύτερο δυνατό βαθμό. Η κατανομή των πτυχώσεων σχετίζεται με την έκταση της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Ο αριθμός των πτυχώσεων αυξάνει με την αύξηση του ρυθμού της φωσφορυλίωσης.

Η μήτρα, ο χώρος που περιβάλλεται από την εσωτερική μεμβράνη, περιλαμβάνει μεγάλο αριθμό ενζύμων, ριβοσώματα, tRNAs και αντίγραφα του μιτοχονδριακού γονιδιώματος.



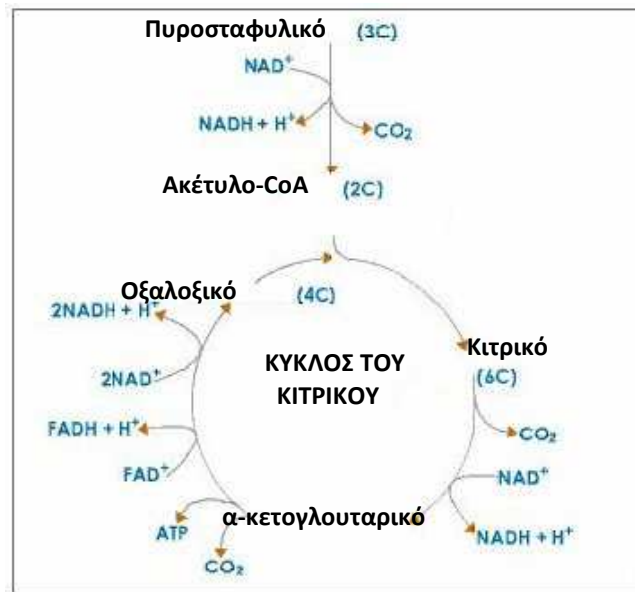
Εικόνα 2:
Διάγραμμα
ενός μιτοχονδρίου.

2.1.2 Λειτουργίες

Τα μιτοχόνδρια σχετίζονται με πολλές βασικές λειτουργίες των ευκαρυωτικών οργανισμών, όπως είναι η παραγωγή ενέργειας, η απόπτωση και ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός.

Τα μιτοχόνδρια είναι οργανίδια θεμελιώδους σημασίας για την παραγωγή ATP στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Απουσία των συγκεκριμένων οργανιδίων, η παραγωγή ενέργειας θα στηριζόταν αποκλειστικά και μόνο στη διεργασία της γλυκόλυσης. Η γλυκόλυση όμως, δεν αποδίδει παρά μόνο ένα πολύ μικρό μέρος της ενέργειας που περικλείεται στο μόριο της γλυκόζης (μόλις 2 μόρια ATP ανά μόριο γλυκόζης). Επομένως δε θεωρείται ιδιαίτερα αποτελεσματική διεργασία, κυρίως σε οργανισμούς όπως οι πολυκύτταροι ευκαρυώτες, που έχουν μεγάλες ενεργειακές απαιτήσεις. Αντίθετα, παρουσία μιτοχονδρίων, κατά την αερόβια αναπνοή (παρουσία οξυγόνου), επιτυγχάνεται ο πλήρης καταβολισμός των προϊόντων της γλυκόλυσης και η ενέργεια που απελευθερώνεται, αποδίδει περίπου 36 μόρια ATP ανά μόριο γλυκόζης. Απουσία οξυγόνου, τα γλυκολυτικά προϊόντα μπορούν να μεταβολιστούν μέσω αναερόβιων διαδικασιών στις οποίες δε συμμετέχουν τα μιτοχόνδρια. Σημαντικό είναι ότι τα μιτοχόνδρια, δεν χρησιμοποιούν αποκλειστικά και μόνο το πυροσταφυλικό οξύ (κύριο προϊόν τη γλυκόλυσης), σαν καύσιμη ουσία. Μπορούν να αξιοποιήσουν επίσης και τα λιπαρά οξέα, τα οποία προκύπτουν από τη διάσπαση των λιπών, αλλά και αμινοξέα. Μετά την είσοδο των καυσίμων μέσω της εσωτερικής μεμβράνης των μιτοχονδρίων, που γίνεται με ενεργή μεταφορά, ακολουθεί η μετατροπή τους από ένζυμα της μήτρας στο κύριο μεταβολικό ενδιάμεσο, το ακετύλο- CoA.

Το ακετύλο- CoA, είναι αυτό που τελικά εισέρχεται σε μια πορεία οξειδωσης των καυσίμων οργανικών μορίων, που ονομάζεται κύκλος του κιτρικού οξέος ή του τρικαρβοξυλικού οξέος ή του *Krebs* και που λαμβάνει χώρα στο κυτοσόλιο. Στην πραγματικότητα, ο κύκλος του κιτρικού οξέος περιλαμβάνει μια σειρά από αντιδράσεις οξειδοαναγωγής, που έχουν σαν τελικό αποτέλεσμα την οξείδωση μιας ακετυλικής ομάδας και την παραγωγή 2 μορίων διοξειδίου του άνθρακα. Στο αρχικό στάδιο του κύκλου, έχουμε τη συμπύκνωση του ακετύλο-CoA με το οξαλοξικό οξύ, δίνοντας το κιτρικό οξύ. Ακολουθεί μια σειρά οξειδοαναγωγικών αντιδράσεων, που οδηγεί στην παραγωγή και απελευθέρωση από το κύτταρο, 2 μορίων διοξειδίου του άνθρακα (από τα 2 άτομα C της αρχικής ακετυλομάδας), καθώς και ενεργοποιημένα μόρια, φορείς ηλεκτρονίων υψηλής ενέργειας, τα NADH και FADH₂. Επίσης σημαντικό είναι ότι σε κάθε κύκλο αντιδράσεων, παράγεται και ένα μόριο GTP το οποίο περιέχει ένα φωσφορικό δεσμό υψηλής ενέργειας.



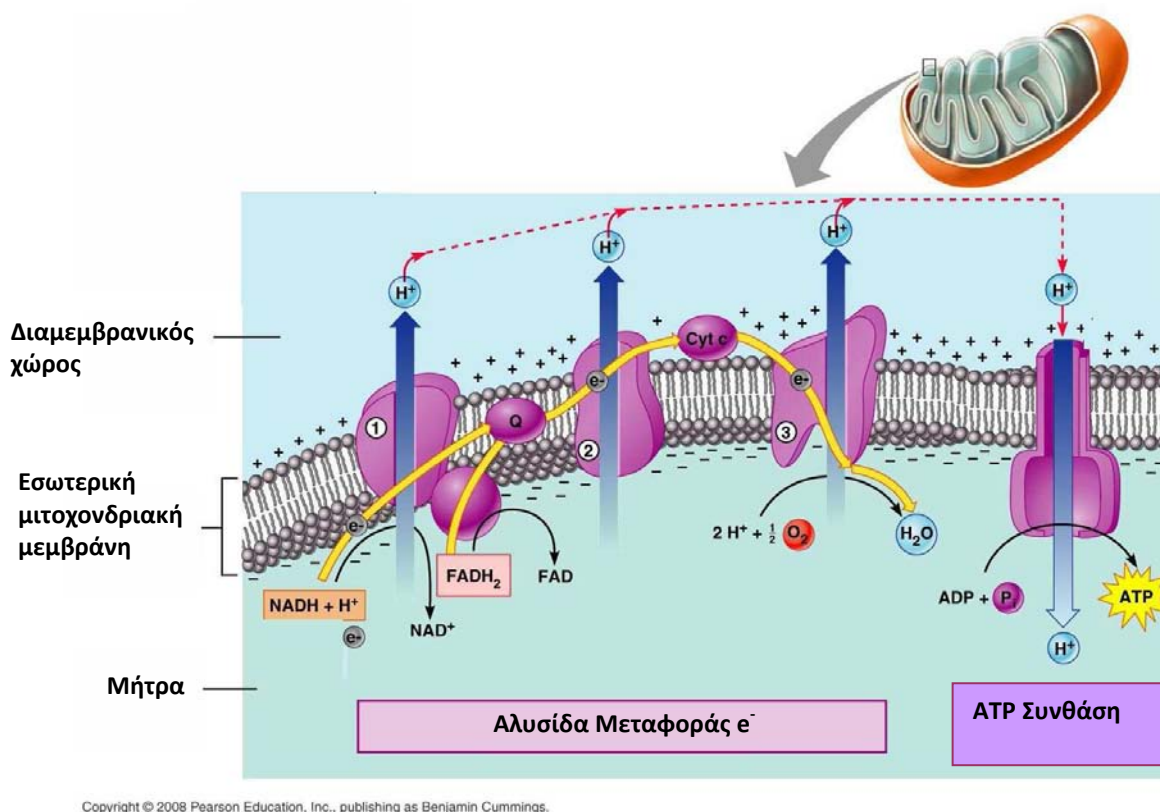
Εικόνα 3: Σχηματική απεικόνιση του κύκλου του κιτρικού οξέος

Τα e^- από τα ανηγμένα μόρια NADH και FADH₂ μεταφέρονται στην εσωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου και εισέρχονται σε μια αλυσίδα μεταφοράς e^- , την αναπνευστική αλυσίδα. Η πορεία μέσω αυτής της αλυσίδας οδηγεί στην οξείδωση των μορίων NADH και FADH₂ και την παραγωγή 3 μορίων ATP για κάθε μόριο NADH και 2 μορίων ATP για κάθε FADH₂. Έτσι παράγονται συνολικά 22 μόρια ATP για κάθε μόριο γλυκόζης. Η όλη διαδικασία παραγωγής ATP, μέσω αυτής της μεταφοράς e^- που τελικά καταλήγουν σε ένα μόριο οξυγόνου, αναφέρεται σαν οξειδωτική φωσφορυλίωση.

Στην οξειδωτική φωσφορυλίωση συμμετέχουν 3 κύρια ενζυμικά σύμπλοκα, τα οποία βρίσκονται στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη. Πρόκειται για την NADH αφυδρογονάση (σύμπλοκο I), την κυτοχρωμική αναγωγάση (σύμπλοκο III) και την κυτοχρωμική οξειδάση (σύμπλοκο IV). Τα e^- του NADH ελευθερώνονται από αυτό, εφόσον λόγω του αρνητικού δυναμικού του, έχουν μικρή συγγένεια με αυτό. Έτσι τα e^- αποδίδονται στο πρώτο σύμπλοκο, την αφυδρογονάση του NADH από την οποία μεταφέρονται ακολούθως προς την κυτοχρωμική αναγωγάση, μέσω της ουβικινόνης (υδρόφοβη κίνηση). Σημαντικό είναι ότι η ουβικινόνη αποτελεί και το σημείο εισόδου των e^- του FADH₂ στην αναπνευστική αλυσίδα (το FADH₂ μεταφέρεται στην ουβικινόνη από άλλο σύμπλοκο και όχι από τη NADH αφυδρογονάση, το οποίο δεν αντλεί πρωτόνια και γι' αυτό το FADH₂ αποδίδει λιγότερη ενέργεια). Από την κυτοχρωμική αναγωγάση, τα e^- μεταφέρονται μέσω μιας μικρής πρωτεΐνης, γνωστής σαν κυτόχρωμα c, στην κυτοχρωμική οξειδάση. Εκεί το O₂ το οποίο λόγω θετικού δυναμικού αναγωγής έχει μεγάλη συγγένεια για τα e^- , γίνεται ο τελικός αποδέκτης τους και ανάγεται σε νερό.

Παράλληλα με τη μεταφορά e^- μέσω της αλυσίδας, παρατηρείται και άντληση πρωτονίων (H⁺) από τη μήτρα προς το διαμεμβρανικό χώρο. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα η συγκέντρωση των H⁺ στη μήτρα να μειώνεται και να δημιουργείται μια διαφορά ηλεκτρικού δυναμικού ανάμεσα στις δύο πλευρές της εσωτερικής μεμβράνης (αρνητική στην πλευρά της μήτρας). Το pH μάλιστα είναι κατά 1,4 μονάδες περίπου μικρότερο εξωτερικά της μεμβράνης. Η παρουσία στην εσωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου, της ATP συνθάσης, ενός ενζυμικού συμπλόκου που δημιουργεί υδρόφιλη δίοδο στην εσωτερική μεμβράνη, δίνει τη δυνατότητα στα πρωτόνια να μεταφερθούν και πάλι προς τη μήτρα. Κατ' αυτή τη μεταφορά, το ενεργειακό δυναμικό των πρωτονίων, χρησιμοποιείται για την πραγματοποίηση μιας μη ευνοούμενης ενεργειακά αντίδρασης, που είναι η παραγωγή ATP

από ADP και Pi. Ο συγκεκριμένος τρόπος παραγωγής ATP, που στηρίζεται σε μια πρωτονιοκίνητη δύναμη, ονομάζεται **χημειώσμωση**.



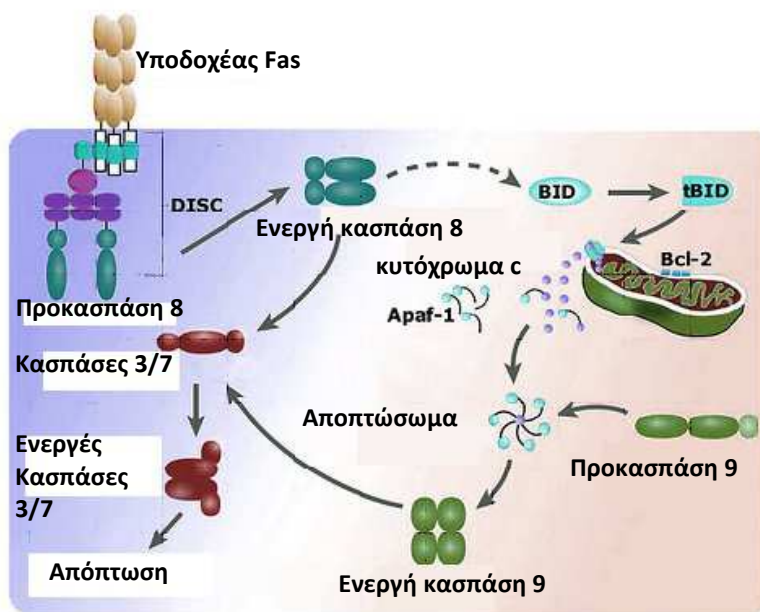
Copyright © 2008 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

Εικόνα 4: Σχηματική απεικόνιση της αναπνευστικής αλυσίδας. Φαίνεται η πορεία που ακολουθούν τα e⁻ μέσω των αναπνευστικών συμπλόκων μέχρι να φτάσουν στον τελικό αποδέκτη τους, το O₂. Διακρίνουμε επίσης, τον τρόπο με τον οποίο η διαβάθμιση στη συγκέντρωση H⁺ ανάμεσα στις δύο πλευρές της μεμβράνης, αποτελεί την κινητήριου δύναμη για τη σύνθεση ATP, μέσω του ενζυμικού συμπλόκου ATP συνθάση.

Τα μιτοχόνδρια παίζουν επίσης σημαντικό ρόλο στην απόπτωση (προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο). Η απόπτωση είναι μια φυσική διαδικασία με την οποία το κύτταρο θανατώνεται. Είναι πολύ σημαντική για την απαλλαγή του οργανισμού από γερασμένα κύτταρα, κύτταρα τα οποία έχουν υποστεί κάποια βλάβη ή είναι γενικά ανεπιθύμητα από τον οργανισμό. Τα κύτταρα τα οποία πρόκειται να εξουδετερωθούν, συρρικνώνονται, παρουσιάζουν προεξοχές στη μεμβράνη τους και συμπύκνωση της χρωματίνης. Ακολούθως, το DNA κατακερματίζεται και τελικά ο πυρήνας διασπάται μέσα σε αποπτωτικά κυστίδια.

Κεντρικά στοιχεία του μονοπατιού απόπτωσης είναι κάποιες εξειδικευμένες πρωτεάσες, γνωστές σαν κασπάσες. Οι κασπάσες πραγματοποιούν την πρωτεόλυση διάφορων κύριων πρωτεϊνών και οδηγούν το κύτταρο στο θάνατο. Πρόσφατα δεδομένα αποκάλυψαν συσχέτιση των μιτοχονδρίων με την απόπτωση, εφόσον βρέθηκε ότι στα αρχικά στάδια της διαδικασίας, τα μιτοχόνδρια υφίστανται μορφολογικές αλλαγές (ελάττωση μεγέθους, συμπύκνωση θεμέλιας ουσίας). Στη συνέχεια βρέθηκε να απελευθερώνουν το κυτόχρωμα c και τελικά να συγκεντρώνονται γύρω από τον πυρήνα του κυττάρου. Πιο συγκεκριμένα, φαίνεται ότι πολλά αποπτωτικά σήματα στοχεύουν στην ενεργοποίηση του υποδοχέα Fas, που έχει σαν αποτέλεσμα το σχηματισμό ενός τριμερούς συμπλόκου, που περιλαμβάνει τον

υποδοχέα, ένα συμπαράγοντα και την κασπάση 8. Μέσα σε αυτό το σύμπλοκο γίνεται η ενεργοποίηση της κασπάσης 8 η οποία πρωτεολύει την πρωτεΐνη Bid, της οποίας ένα τμήμα μεταφέρεται στο μιτοχόνδριο. Το τμήμα αυτό της Bid είτε άμεσα είτε μέσω της πρωτεΐνης Bax, προκαλεί απελευθέρωση του κυτόχρωμας c από το μιτοχόνδριο. Το κυτόχρωμας c μεταφερόμενο στο κυτταρόπλασμα σχηματίζει μαζί με την προκασπάση 9 και ένα συμπαράγοντα (τον Araf1), το σύμπλοκο του αποπτωσώματος. Μέσα στο σύμπλοκο ενεργοποιείται η κασπάση 9, η οποία με τη σειρά της ενεργοποιεί τον όλο καταρράκτη των κασπασών τελεστών. Αυτές θα οδηγήσουν τελικά στην αποικοδόμηση του κυττάρου μέσω πρωτεόλυσης μεγάλου αριθμού πυρηνικών και κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών. Επομένως, το μιτοχόνδριο κρίνεται απαραίτητο στην όλη διαδικασία, αφού το κυτόχρωμας c έχει κρίσιμο ρόλο στη μετέπειτα ενεργοποίηση των κασπασών.



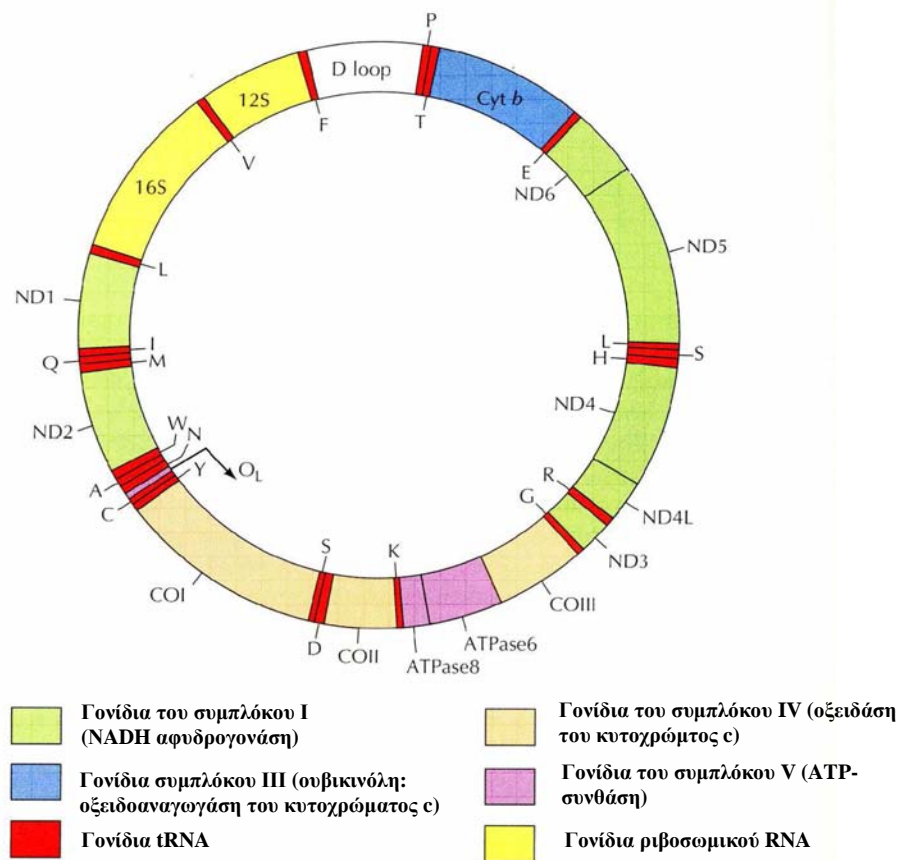
Εικόνα 5: Σχηματική αναπαράσταση της διαδικασίας απόπτωσης μέσω ενεργοποίησης του καταρράκτη των κασπασών.

2.2 ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑ

Αφορμή για την ανακάλυψη της ύπαρξης εξωπυρηνικών γονιδίων στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, αποτέλεσε η παρατήρηση μη μεντελικής κληρονομικότητας σε ορισμένες περιπτώσεις στα φυτά. Πειράματα τα οποία ακολούθησαν, απέδειξαν ότι το DNA δεν εντοπίζεται αποκλειστικά στον πυρήνα, αλλά το συναντάμε και σε οργανίδια και συγκεκριμένα στα μιτοχόνδρια (όλων των ευκαρυωτικών κυττάρων) και στους χλωροπλάστες (φυτικά κύτταρα). Το ανθρώπινο μιτοχονδριακό γονιδίωμα αποτελείται από ένα κυκλικό, δίκλωνο, υπερελικωμένο μόριο DNA με μέγεθος 16.569 bp. Πρόκειται για γονιδίωμα μικρού μεγέθους, το οποίο κωδικοποιεί περιορισμένο αριθμό λειτουργιών. Ωστόσο εμφανίζει εξαιρετικά συμπυκνωμένη οργάνωση, ενώ χαρακτηρίζεται από απουσία ιντρονίων αλλά και ιστονών (πρωτεΐνες με τις οποίες συνδέεται το πυρηνικό DNA). Με εξαίρεση την περιοχή του βρόχου D, σχεδόν κάθε βάση του μιτοχονδριακού DNA αντιστοιχεί σε κάποιο γονίδιο και μόλις περίπου 87 βάσεις από το σύνολο των 16569, δεν περιλαμβάνονται σε κάποιο γονίδιο. Ο βρόχος D παρόλο που αποτελεί μη κωδικοποιούσα περιοχή του γονιδιώματος, είναι μια περιοχή κρίσιμη για την έκφραση του μιτοχονδριακού γονιδιώματος, που φέρει πολλά ρυθμιστικά στοιχεία. Συνολικά το μιτοχονδριακό γονιδίωμα κωδικοποιεί 37 γονίδια: 2 μόρια rRNA, 22 μόρια tRNA, και 13 μόρια mRNA που μεταφράζονται σε πρωτεΐνες. Όλες οι πρωτεΐνες, είναι συστατικά του μηχανισμού της

κυτταρικής αναπνοής. Ειδικότερα, πρόκειται για μια υπομονάδα του κυτοχρώματος c, 3 υπομονάδες της οξειδάσης του κυτοχρώματος, 2 υπομονάδες της μιτοχondριακής ΑΤΡασης (6 και 8) και 7 υπομονάδες της αφυδρογονάσης του NADH. Τα γονίδια του μιτοχondρίου καλύπτουν μόνο μικρό μέρος των λειτουργιών που επιτελούνται στο οργανίδιο. 70 επιπρόσθετες υπομονάδες που κωδικοποιούνται από το πυρηνικό γονιδίωμα, εισέρχονται από το κυτταρόπλασμα στο οργανίδιο. Έτσι επιτυγχάνεται ο σχηματισμός, όλων των απαραίτητων συμπλόκων της αναπνευστικής αλυσίδας.

Η κληρονομία του μιτοχondριακού γονιδιώματος γίνεται αποκλειστικά από τη μητέρα, δηλαδή κληρονομείται μόνο ο γονότυπος της μητέρας στα μιτοχondρια του θυγατρικού κυττάρου ενώ ο πατρικός γονότυπος χάνεται. Αυτό το φαινόμενο αναφέρεται σε **μητρική κληρονομία**.



Εικόνα 6: Χάρτης του μιτοχondριακού γονιδιώματος όπου παρουσιάζονται οι θέσεις των γονιδίων του μεταφορικού RNA (tRNA), του ριβοσωμικού RNA (rRNA) καθώς και των γονιδίων που κωδικοποιούν υπομονάδες των συμπλόκων της αναπνευστικής αλυσίδας.

2.2.1 Αντιγραφή του mtDNA

Η αντιγραφή του μιτοχondριακού γονιδιώματος γίνεται με τρόπο ημισυντηρητικό, όπως συμβαίνει και στο πυρηνικό DNA. Δηλαδή, καθένας από τους κλώνους χρησιμοποιείται σε μήτρα για τη σύνθεση του συμπληρωματικού του. Η αντιγραφή στο κυκλικό μόριο ξεκινά πάντα από μια ειδική θέση έναρξης, όπου προσδένεται η μιτοχondριακή πολυμεράση. Μόνο η μια από τις δύο αλυσίδες (H), χρησιμοποιείται στην αρχή για τη σύνθεση μιας νέας, συμπληρωματικής προς αυτή αλυσίδας. Καθώς η σύνθεση του DNA προχωρά, η αλυσίδα που ήταν αρχικά συμπληρωματική προς την αλυσίδα H, η L, εκτοπίζεται και παραμένει στη

μονόκλωνη μορφή της. Η περιοχή της εκτοπισμένης αλυσίδας, εξαιτίας της διαμόρφωσης της ονομάζεται βρόχος D ή εκτόπιση. Με την πρόοδο της αντιγραφής, ο βρόχος D επεκτείνεται ολοένα και περισσότερο. Η επέκταση αυτή σταματά σε μια θέση, όταν πλέον καλυφθούν περίπου τα 2/3 της περιφέρειας του κύκλου. Η αντιγραφή αυτής της θέσης έχει σαν αποτέλεσμα να εκτίθεται η θέση έναρξης της αντιγραφής της αλυσίδας L, η οποία είναι πλέον διαθέσιμη. Έτσι ξεκινά και η αντιγραφή της αλυσίδας L από την DNA πολυμεράση, με κατεύθυνση αντιγραφής αντίθετη από αυτή της αλυσίδας H.

Η αντιγραφή του μιτοχονδριακού DNA γίνεται με πολύ βραδύτερο ρυθμό σε σύγκριση με του πυρηνικού DNA (100 φορές βραδύτερη). Σημαντικό είναι ότι τα μιτοχόνδρια αντιγράφονται ανεξάρτητα από τον κυτταρικό κύκλο, ανάλογα με τις ενεργειακές απαιτήσεις του κυττάρου. Όταν το κύτταρο έχει υψηλές απαιτήσεις σε ενέργεια, τότε τα μιτοχόνδρια αντιγράφουν το DNA τους και διαιρούνται, αυξάνοντας τον αριθμό τους στο κύτταρο.

2.2.2 Μεταγραφή του mtDNA

Για τη μεταγραφή του mtDNA στον άνθρωπο, είναι υπεύθυνη μια μιτοχονδριακή RNA πολυμεράση (POLMRT), ενώ κρίσιμη είναι και η παρουσία του μιτοχονδριακού μεταγραφικού παράγοντα A (TFAM) καθώς και του μεταγραφικού παράγοντα B1 (TFB1M) ή B2 (TFB2M). Η μεταγραφή της βαριάς αλυσίδας (H), ξεκινά είτε από τον υποκινητή 1 (HSP1), δημιουργώντας ένα μικρό μετάγραφο, το οποίο τερματίζει στο 16S RNA, είτε από τον υποκινητή 2 (HSP2), δίνοντας ένα πολυκιστρονικό μήνυμα το οποίο περιλαμβάνει τα 2 γονίδια rRNA, τα 12 γονίδια mRNA και τα 14 γονίδια tRNA. Η μεταγραφή της ελαφριάς αλυσίδας (L) που γίνεται από τον υποκινητή ελαφριάς αλυσίδας (LSP), δημιουργεί ένα μετάγραφο το οποίο περιλαμβάνει το mRNA της ND6 καθώς και τα υπόλοιπα 8 tRNA.

Η μεταγραφή από όλους τους υποκινητές απαιτεί την εμπλοκή του μεταγραφικού ενεργοποιητή TFAM, ο οποίος προσδέεται ανοδικά των υποκινητών, καθώς και την υπομονάδα της RNA πολυμεράσης (POLMRT) η οποία σχηματίζει ένα ετεροδιμερές σύμπλοκο με ένα εκ των δύο παραγόντων TFB1M ή TFB2M. Τα αρχικά μόρια RNA που δημιουργούνται, υφίστανται επεξεργασία από μια ενδονουκλεάση και μετατρέπονται στα ώριμα μόρια RNA.

Πρόσφατα ανακαλύφθηκε η ύπαρξη ενός παράγοντα, του MTERF3, ο οποίος φαίνεται ότι δρα ανασταλτικά στην όλη διαδικασία της μεταγραφής. Αυτό το επιτυγχάνει με την πρόσδεση του στους υποκινητές του mtDNA, ή κοντά σε αυτούς, προφανώς παρεμποδίζοντας την επακόλουθη πρόσδεση της RNA πολυμεράσης και την έναρξη της μεταγραφής. Ο παράγοντας MTERF φαίνεται να αλληλεπιδρά με άλλους παράγοντες κρίσιμους για τη λειτουργία του, που ωστόσο δεν έχουν ακόμη ταυτοποιηθεί.

Είναι σημαντικό το γεγονός ότι από τα μιτοχονδριακά μετάγραφα απουσιάζουν οι αλληλουχίες-σήματα έναρξης, ενώ τα σήματα τερματισμού δημιουργούνται με την προσθήκη poly-A αλληλουχιών στο 3' άκρο τους. Επίσης τα μιτοχονδριακά μετάγραφα στερούνται και τη δομή της καλύπτρας στο 5' άκρο τους. Τα κωδικόνια έναρξης της μετάφρασης των mRNA μορίων (AUG, AUA, AUU) εντοπίζονται είτε στο 5' άκρο τους, είτε μερικές βάσεις πιο καθοδικά.

Είναι αξιοσημείωτο το γεγονός, ότι ο γενετικός κώδικας του mtDNA των θηλαστικών παρουσιάζει αρκετές διαφορές από τον παγκόσμιο κώδικα. Μια κρίσιμη διαφορά είναι η χρήση των κωδικονίων AUG, AUA, AUU ως κωδικόνια έναρξης, τα οποία καθορίζουν την ενσωμάτωση της μεθειονίνης σαν πρώτο αμινοξύ στο αμινοτελικό άκρο της νεοσυντιθέμενης πολυπεπτιδικής αλυσίδας. Οι βασικές αποκλίσεις του mtDNA από τον παγκόσμιο γενετικό κώδικα παρουσιάζονται συνοπτικά στον πίνακα 1.

Πίνακας 1: Βασικές αποκλίσεις μιτοχondριακού κώδικα από τον παγκόσμιο γενετικό κώδικα στα θηλαστικά

Κωδικόνιο	Παγκόσμιος Γενετικός Κώδικας	Μιτοχόνδρια
AGA, AGG	Αργινίνη	Κωδικόνιο τερματισμού
AUA	Ισολευκίνη	Μεθειονίνη
UGA	Κωδικόνιο τερματισμού	Τρυπτοφάνη

2.2.3 Πρωτεϊνοσύνθεση στα μιτοχόνδρια

Η διαδικασία της πρωτεϊνοσύνθεσης στα μιτοχόνδρια δεν έχει ακόμη κατανοηθεί σε μεγάλο βαθμό, κυρίως λόγω της δυσκολίας της πειραματικής της μελέτης *in vitro*. Αυτό οφείλεται κατά ένα μεγάλο μέρος στο γεγονός ότι δεν είναι εύκολη η απομόνωση επαρκούς για μελέτη, ποσότητας mt mRNA και rRNA. Επιπρόσθετα είναι δύσκολο να επιτευχθούν *in vitro* οι περίπλοκες τροποποιήσεις στις οποίες υπόκειται το mRNA πριν αυτό μεταφραστεί.

Τα μιτοχondριακά ριβοσώματα συνίστανται από δύο υπομονάδες, μια μικρή, η οποία έχει συντελεστή καθίζησης 28S και μια μεγάλη με συντελεστή καθίζησης 39S. Βασικό είναι ότι το ριβοσωμικό RNA, απαραίτητο για τη δόμηση των ριβοσωμάτων, κωδικοποιείται από το μιτοχondριακό γονιδίωμα από τα δύο γονίδια 12S και 16S rRNA. Βέβαια για τη σύσταση των δύο ριβοσωμικών υπομονάδων είναι απαραίτητη και η ύπαρξη πρωτεϊνών που κωδικοποιούνται από γονίδια του πυρηνικού γονιδιώματος. Η μικρή υπομονάδα αποτελείται από το 16 S rRNA και 29 πρωτεΐνες πυρηνικής προέλευσης, ενώ η μεγάλη υπομονάδα αποτελείται από το 12S rRNA και 48 πρωτεΐνες πυρηνικής προέλευσης. Τα ριβοσώματα των μιτοχondρίων εντοπίζονται είτε σε ελεύθερη μορφή στη μήτρα, είτε συνδεδεμένα στις πτυχώσεις της εσωτερικής μεμβράνης.

Η έναρξη της μετάφρασης παρουσιάζει αρκετές ομοιότητες με τη μετάφραση που επιτελείται από τα ριβοσώματα στο κυτταρόπλασμα των ευκαρυωτών. Ωστόσο το εναρκτήριο tRNA, μεταφέρει αντί για ένα κατάλοιπο μεθειονίνης όπως συμβαίνει στους ευκαρυώτες, ένα κατάλοιπο μεθειονίνης το οποίο έχει φορμυλιωθεί στην αμινομάδα του, το fmet (όπως συμβαίνει στα βακτήρια). Το μιτοχondριακό γονιδίωμα δεν είναι σε θέση να κωδικοποιήσει το σύνολο των πρωτεϊνών που απαιτούνται για τη διεκπεραίωση των λειτουργιών αλλά και τη βιογένεση των μιτοχondρίων (κωδικοποιεί μόλις το 5-10% του συνόλου των πρωτεϊνών). Οι υπόλοιπες πρωτεΐνες κωδικοποιούνται από γονίδια που εδράζονται στο πυρηνικό γονιδίωμα και αφού γίνει η σύνθεσή τους στο κυτταρόπλασμα μεταφέρονται στο μιτοχόνδριο.

Είναι γνωστό ότι στο πυρηνικό γονιδίωμα υπάρχουν 64 κωδικόνια, από τα οποία τα 61 είναι υπεύθυνα για την κωδικοποίηση αμινοξέων και τα 3 αποτελούν κωδικόνια λήξης της μετάφρασης. Για την αναγνώριση των 61 κωδικονίων είναι απαραίτητη η ύπαρξη τουλάχιστον 32 μορίων tRNA, ούτως ώστε η αναγνώριση να είναι όσο το δυνατό πιο ακριβής. Αυτό που παρατηρούμε στα ανθρώπινα μιτοχόνδρια είναι ότι ο αριθμός των ειδικών για την αναγνώριση μορίων tRNA είναι αρκετά μικρότερος, εφόσον υπάρχουν μόλις 22 διαφορετικά μόρια tRNA. Από αυτά τα 22 μόρια, τα 20 αντιστοιχούν σε καθένα από τα 20 διαφορετικά αμινοξέα και τα εναπομείναντα 2, είναι επιπρόσθετα tRNA ειδικά για τη Ser και τη Leu, με αποτέλεσμα σε καθένα από τα δύο αυτά αμινοξέα να αντιστοιχούν από δύο ειδικά μόρια tRNA.

Η ύπαρξη μειωμένου αριθμού μορίων tRNA εγείρει το ερώτημα αν μπορεί να γίνει σωστή αναγνώριση όλων των κωδικονίων. Η απάντηση σε αυτό είναι ότι όντως τα κωδικόνια μπορούν να διαβαστούν σωστά, ενώ ο περιορισμός στον αριθμό των μορίων

αναγνώρισης τους στα μιτοχόνδρια, έχει να κάνει με τη μικρότερη εξειδίκευση, που παρατηρείται στο ζευγάρι κωδικονίου- αντικωδικονίου στο μιτοχόνδριο. Πιο συγκεκριμένα, τα 14 μόρια tRNA που παράγονται από τον Η κλώνο, φέρουν στην τρίτη θέση του αντικωδικονίου είτε G είτε τροποποιημένη U. Αυτό τους δίνει τη δυνατότητα να ζευγαρώσουν, με κωδικόνια που έχουν C ή U και A ή G αντίστοιχα. Επιπρόσθετα, όσον αφορά τα υπόλοιπα 8 tRNA, έχουν στην πρώτη θέση του αντικωδικονίου (ασταθή θέση), τη βάση U. Η συγκεκριμένη βάση έχει την ικανότητα να ζευγαρώνει ασθενώς με όλες τις βάσεις. Αυτό λοιπόν έχει σαν αποτέλεσμα, το ίδιο μόριο tRNA να αναγνωρίζει και τα τέσσερα μέλη μιας οικογένειας κωδικονίων. Δηλαδή κωδικόνια που έχουν τις ίδιες δύο πρώτες βάσεις, π.χ AG και καθένα φέρει στην τρίτη θέση μια από τις τέσσερις βάσεις A,G, C,U μπορούν να ζευγαρώσουν με το ίδιο μόριο tRNA. Με βάση τα πιο πάνω μπορεί να εξηγηθεί η μείωση του αριθμού των μορίων tRNA, από 32 που απαιτούνται για τη σύνθεση των πρωτεϊνών του πυρηνικού DNA, σε 22 στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα.

2.3 ΜΟΡΙΑ tRNA

Η όλη διαδικασία της σύνθεσης των πρωτεϊνών είναι κοινή σε όλα τα βασίλεια των ζωντανών οργανισμών, κάτι που αποδεικνύει και την εμφάνιση του συστήματος πρωτεϊνοσύνθεσης πολύ νωρίς στην εξέλιξη. Η σύνθεση μιας πολυπεπτιδικής αλυσίδας επιτελείται με κατεύθυνση από το αμινοτελικό προς το καρβοξυτελικό της άκρο με διαδοχική προσθήκη αμινοξέων που γίνεται στο καρβοξυτελικό της άκρο.

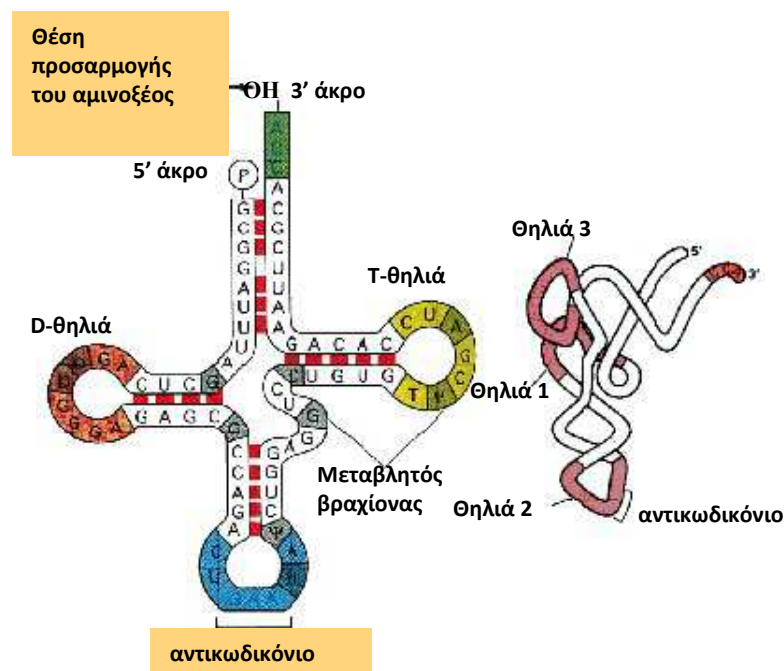
Τα αμινοξέα φτάνουν στα ριβοσώματα για να ενσωματωθούν στην πολυπεπτιδική αλυσίδα στην ενεργοποιημένη μορφή του αμινοακυλο-tRNA. Τα αμινοακυλο-tRNA, δημιουργούνται μέσω της ένωσης της καρβοξυλικής ομάδας ενός αμινοξέος με το 3' άκρο του μορίου tRNA, διαδικασία που επιτελείται από το ένζυμο συνθετάση του αμινοακυλο-tRNA. Η σύνδεση αυτή γίνεται με σχηματισμό ενός ομοιοπολικού δεσμού, αντίδραση που προάγεται με ενέργεια από την υδρόλυση ATP. Βασικά χαρακτηριστικά των μορίων tRNA είναι, το 3' τελικό τους άκρο μέσω του οποίου επιτυγχάνουν την σύνδεση τους με το κατάλληλο αμινοξύ, καθώς και το αντικωδικόνιο τους μέσω του οποίου αναγνωρίζουν το κατάλληλο κωδικόνιο του mRNA και ζευγαρώνουν με αυτό, εισάγοντας στην αυξανόμενη πολυπεπτιδική αλυσίδα το σωστό αμινοξύ.

Δομή μορίων tRNA

Τα μόρια tRNA (transfer RNA), αποτελούν μικρά μόρια RNA (73-93 νουκλεοτίδια) με πρότυπο σχήμα τριφυλλίου στη δευτεροταγή τους δομή και σχήμα γράμματος Γ στην τριτοταγή τους δομή. Στη δευτεροταγή τους δομή τριφυλλίου, τα συγκεκριμένα μόρια έχουν περίπου τις μισές από τις βάσεις τους ζευγαρωμένες ενώ ανακαλύφθηκε ότι το συγκεκριμένο πρότυπο είναι κοινό για όλα τα μόρια tRNA. Αυτή η συμπεριφορά είναι απόλυτα λογική, εφόσον θα πρέπει όλα τα μόρια να διατηρούν την ικανότητα αλληλεπίδρασης με τον ίδιο περίπου τρόπο, με τα ριβοσώματα, τα mRNA και τους πρωτεϊνικούς παράγοντες κατά τη μετάφραση. Βασικά δομικά χαρακτηριστικά των μορίων tRNA είναι τα ακόλουθα:

- Κάθε μόριο είναι μια μονόκλωνη αλυσίδα που περιλαμβάνει από 73-93 ριβονουκλεοτίδια

- Περίπου τα μισά από τα νουκλεοτίδια συνδέονται με ζεύγη βάσεων, δημιουργώντας διπλές έλικες. Διακρίνονται 5 ομάδες βάσεων οι οποίες δεν είναι ζευγαρωμένες: α) η περιοχή του 3' άκρου CCA, που αποτελεί τμήμα του βραχίονα υποδοχής β) η θηλιά TψC, ονομάστηκε έτσι λόγω της αλληλουχίας ριβοθυμιδίνης-ψευδοουρακίλης-κυτοσίνης γ) ο επιπλέον βραχίονας, με ποικίλο αριθμό καταλοίπων δ) η θηλιά διδροουρακίλης (DHU) που περιλαμβάνει κατάλοιπα διδροουρακίλης και ε) η θηλιά του αντικωδικονίου
- Το 5' άκρο του μορίου είναι φωσφορυλιωμένο ενώ το 3' τελικό κατάλοιπο είναι συνήθως η G (pG).
- Η σύνδεση του μορίου tRNA με το αμινοξύ, γίνεται στο βραχίονα υποδοχής. Συγκεκριμένα, το ενεργοποιημένο αμινοξύ συνδέεται σε μια υδροξυλική ομάδα του καταλοίπου αδενοσίνης στο 3' άκρο της αλληλουχίας CCA που εντοπίζουμε στο βραχίονα υποδοχής. Στο βραχίονα υποδοχής, συναντώνται κατάλοιπα τα οποία ζευγαρώνουν με τρόπο διαφορετικό από τον κλασικό κατά Watson-Crick.
- Το αντικωδικόνιο εντοπίζεται υπό τη μορφή μιας θηλιάς στο κέντρο της αλληλουχίας.
- Τα μόρια tRNA περιλαμβάνουν και πολλές ασυνήθιστες βάσεις. Οι περισσότερες από αυτές προκύπτουν, σαν αποτέλεσμα μεθυλίωσης ή διπλής μεθυλίωσης των φυσιολογικών βάσεων (εκτός της περιοχής του αντικωδικονίου), μέσω ενζυμικής τροποποίησης του πρόδρομου μορίου tRNA. Η μεθυλίωση εμποδίζει το σχηματισμό ορισμένων ζευγών βάσεων, ενώ παράλληλα προσδίδει υδρόφοβο χαρακτήρα σε κάποιες περιοχές των μορίων, διευκολύνοντας έτσι αλληλεπιδράσεις με ένζυμα και ριβοσωμικές πρωτεΐνες.



Εικόνα 7: Αριστερά, δευτεροταγής δομή του μορίου tRNA όπου παρουσιάζονται με πράσινο η αλληλουχία CCA του βραχίονα υποδοχής όπου προσαρμόζεται το αμινοξύ, με κίτρινο η θηλιά TψC, με μπλε η θηλιά του αντικωδικονίου και με κόκκινο η θηλιά DHU. Το βέλος δείχνει την περιοχή όπου εντοπίζεται ο επιπλέον βραχίονας (μεταβλητός). Δεξιά, τριτοταγής διαμόρφωση του μορίου tRNA με σχήμα παρόμοιο με το ελληνικό Γ.

2.4 ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ ΠΟΥ ΣΥΝΔΕΟΝΤΑΙ ΜΕ ΑΝΘΡΩΠΙΝΕΣ ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ

Το μιτοχονδριακό γονιδίωμα υπόκειται σε μεταλλάξεις με πολύ μεγαλύτερο ρυθμό (10-17 φορές περισσότερες), σε σχέση με το πυρηνικό γονιδίωμα. Αυτό μπορεί να οφείλεται σε διάφορους λόγους. Καταρχήν, πολύ σημαντικό είναι το γεγονός ότι τα μιτοχόνδρια στερούνται κάποιου αποτελεσματικού μηχανισμού επιδιόρθωσης του DNA. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα οποιοδήποτε λάθος εισάγεται στο γονιδίωμα κατά την αντιγραφή του mtDNA, να διατηρείται. Επιπρόσθετα το mtDNA εντοπίζεται κοντά στην εσωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου. Αποτέλεσμα αυτού είναι να εκτίθεται σε μεγάλο βαθμό στις μεταλλαξιγόνες ελεύθερες ρίζες οξυγόνου, που παράγονται στην αναπνευστική αλυσίδα του ίδιου του μιτοχονδρίου. Σημαντικό φαίνεται να είναι και το γεγονός ότι από το μιτοχόνδριο απουσιάζουν και οι προστατευτικές για το DNA, αλληλεπιδράσεις με τις ιστόνες. Έτσι το DNA είναι πιο προσιτό στους διάφορους μεταλλαξιγόνους παράγοντες. Τέλος πρέπει να ληφθεί υπόψη και το γεγονός ότι το μιτοχονδριακό γονιδίωμα είναι ιδιαίτερα συμπυκνωμένο και στερείται ιντρονίων, ενώ τα γονίδια του, είναι τοποθετημένα το ένα δίπλα στο άλλο και πολλές φορές αλληλεπικαλύπτονται (μόλις 5% του DNA αντιστοιχεί σε μη κωδικοποιούσα αλληλουχία). Αυτός θα μπορούσε να είναι άλλος ένας λόγος για το υψηλό ποσοστό μεταλλάξεων που παρατηρείται.

Οι διάφορες μεταλλάξεις του μιτοχονδριακού γονιδιώματος, έχουν συσχετιστεί με ένα μεγάλο αριθμό ανθρώπινων ασθενειών, γνωστές σα «μιτοχονδριακές» ασθένειες. Οι συγκεκριμένες ασθένειες παρουσιάζουν ποικίλους φαινοτύπους και μπορούν να είναι από ασθένειες με ήπια συμπτώματα, μέχρι ασθένειες με βαριά κλινικά συμπτώματα που οδηγούν στο θάνατο. Στους πιο χαρακτηριστικούς φαινοτύπους μιτοχονδριακών ασθενειών περιλαμβάνονται, νευρολογικές δυσλειτουργίες, εγκεφαλοπάθειες, καρδιομυοπάθειες, διαβήτη και ποικίλες άλλες σωματικές διαταραχές. Πρέπει να ληφθεί βέβαια υπόψη, ότι αρκετές πρωτεΐνες που είναι απαραίτητες για τις μιτοχονδριακές λειτουργίες, κωδικοποιούνται και από πυρηνικά γονίδια. Τέτοιες μεταλλάξεις που μπορούν επίσης να προκαλέσουν δυσλειτουργίες στο μιτοχονδριακό μεταβολισμό, ενέχονται στην πρόκληση μιτοχονδριακών ασθενειών.

2.4.1 Μεταλλάξεις μιτοχονδριακών tRNA γονιδίων

Η πρώτη φορά που χαρακτηρίστηκαν μεταλλάξεις του μιτοχονδριακού γονιδιώματος που συσχετίστηκαν με παθολογία, ήταν το 1988. Από τότε, ανιχνεύθηκαν πάνω από 200 τέτοιες μεταλλάξεις στο ανθρώπινο μιτοχονδριακό γονιδίωμα. Πάνω από τις μισές μεταλλάξεις που σχετίζονται με ασθένειες, εντοπίζονται στα γονίδια tRNA, κάτι που είναι ιδιαίτερα αξιοσημείωτο δεδομένου του ότι τα tRNA γονίδια συνιστούν μόλις το 10% του μιτοχονδριακού γονιδιώματος. Αυτό ωστόσο εξηγείται, μέσω της ζωτικής σημασίας των μορίων tRNA, στη σύνθεση των πρωτεϊνών που εμπλέκονται στον ενεργειακό μεταβολισμό.

Το ενδιαφέρον γύρω από τα μιτοχονδριακά μόρια tRNA εξαπλώθηκε με πολύ γρήγορους ρυθμούς, εξαιτίας της ανακάλυψης ότι σημειακές μεταλλάξεις στα γονίδια τους συσχετίζονται με την εμφάνιση νευρομυικών και νευροεκφυλιστικών διαταραχών. Τα μόρια tRNA συγκεντρώνουν μεγάλο αριθμό, τόσο παθογόνων, όσο και ουδέτερων μεταλλάξεων (Πίνακας 3). Μέχρι σήμερα έχουν καταγραφεί 139 παθογόνες μεταλλάξεις σε όλα τα tRNA γονίδια με μόνη εξαίρεση το γονίδιο tRNA^{Arg}. Αξιοσημείωτο είναι ότι περίπου το 50% των γνωστών παθογόνων μεταλλάξεων, συγκεντρώνεται σε μόνο τρία γονίδια και πιο συγκεκριμένα στα tRNA^{Leu(UUR)}, tRNA^{Lys} και tRNA^{Ile}. Όσον αφορά τις ουδέτερες μεταλλάξεις ή πολυμορφισμούς, έχουν μέχρι στιγμής καταγραφεί 243 και εντοπίζονται σε όλα τα tRNA γονίδια. Πρόκειται για σημειακές αντικαταστάσεις, οι οποίες

ως επί το πλείστον, δεν επηρεάζουν τη δομική ακεραιότητα ή τη λειτουργικότητα των μορίων tRNA, ενώ φαίνεται να συμβάλλουν σε μεγάλο βαθμό στη γενετική ποικιλομορφία των ανθρώπινων πληθυσμών.

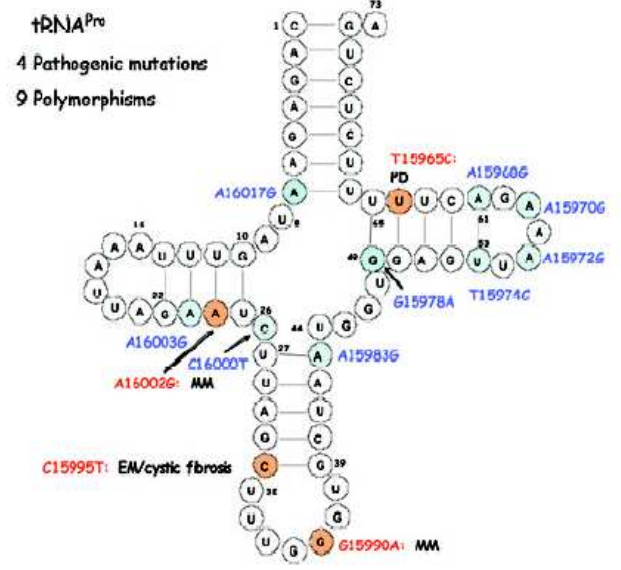
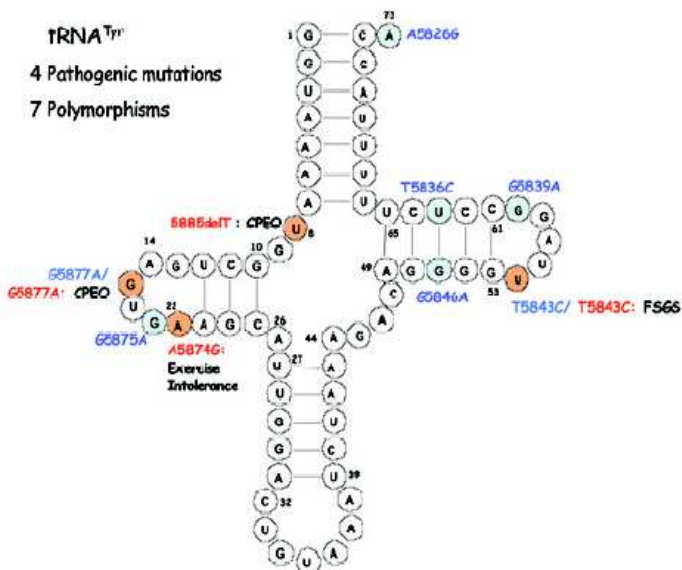
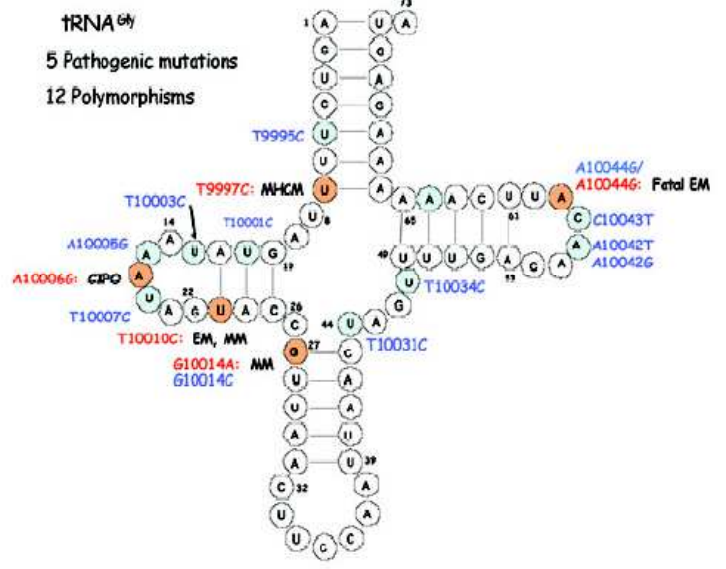
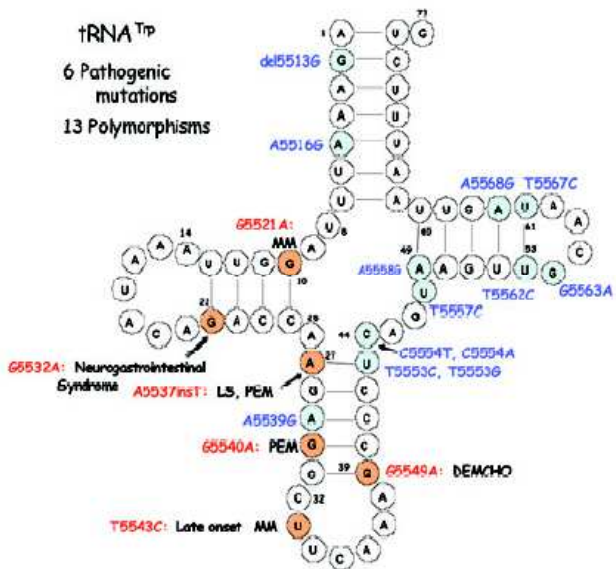
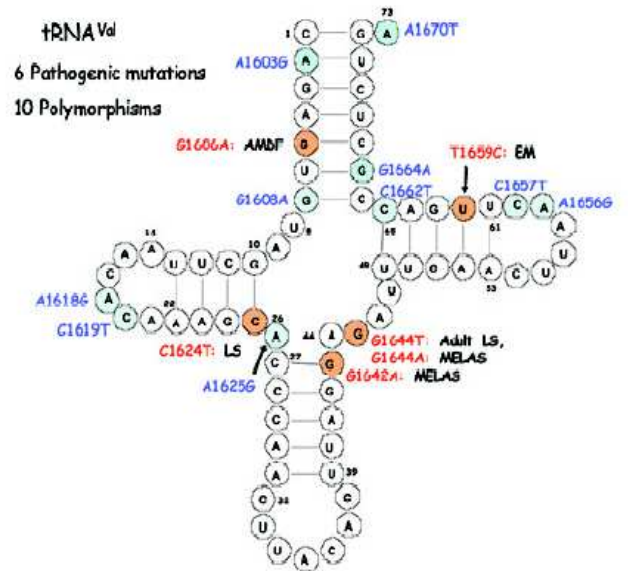
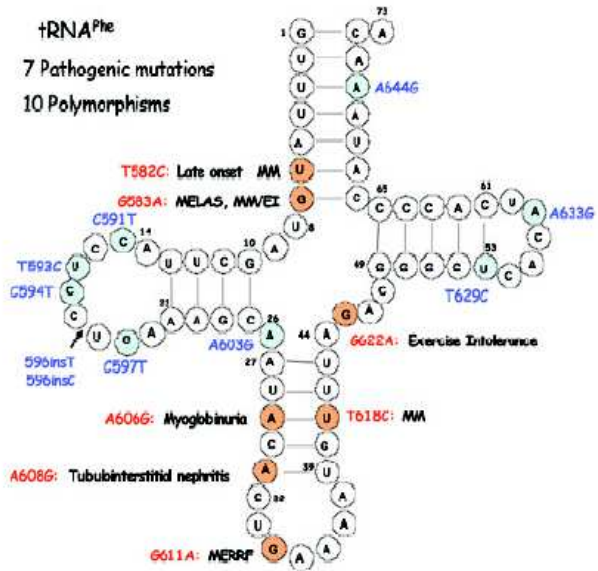
Οι περισσότερες μεταλλάξεις κατανέμονται σε όλη την έκταση του μορίου tRNA με ομοιόμορφο τρόπο, τόσο στους βραχίονες όσο και στις θηλιές (Εικόνα 8). Πολύ βασικό είναι ωστόσο ότι παρατηρείται σχεδόν πλήρης απουσία αυτών των μεταλλάξεων από την περιοχή του αντικωδικονίου, κάτι απόλυτα λογικό, αν αναλογιστεί κανείς τον κρίσιμο ρόλο της συγκεκριμένης περιοχής του μορίου για την αναγνώριση των κωδικονίων στο mRNA. Η οποιαδήποτε μετάλλαξη σε αυτή την περιοχή, θα μπορούσε να έχει θανατηφόρες επιπτώσεις στον οργανισμό, εφόσον θα διατάρασσε την όλη διαδικασία της πρωτεϊνοσύνθεσης.

Συνήθως οι μεταλλάξεις των tRNA, αφορούν μεταπτώσεις (πουρίνη σε πουρίνη και πυριμιδίνη σε πυριμιδίνη) και πιο σπάνια μεταστροφές (πουρίνη σε πυριμιδίνη και αντίστροφα). Μια γενική παρατήρηση που προέκυψε μέσα από διάφορες μελέτες, είναι ότι συνήθως στις παθογόνες μεταλλάξεις επηρεάζονται κατάλοιπα με υψηλό βαθμό συντήρησης, ενώ στις ουδέτερες λιγότερο συντηρημένα κατάλοιπα. Αυτό ωστόσο δεν μπορεί να διατυπωθεί σαν κανόνας.

Παθογόνες και πολυμορφικές μεταλλάξεις στα μιτοχονδριακά tRNA γονίδια

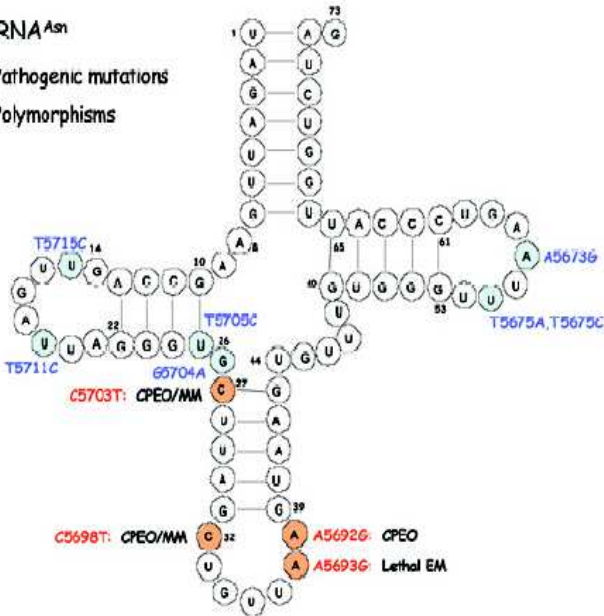
tRNA	Παθογόνες μεταλλάξεις	Πολυμορφικές μεταλλάξεις
tRNA ^{Leu(UUR)}	28	7
tRNA ^{Lys}	14	9
tRNA ^{Ile}	14	7
tRNA ^{Leu(CUN)}	10	11
tRNA ^{Thr}	8	29
tRNA ^{Ser(UCN)}	7	10
tRNA ^{Phe}	7	10
tRNA ^{Val}	6	10
tRNA ^{Trp}	6	13
tRNA ^{Gly}	5	12
tRNA ^{Tyr}	4	7
tRNA ^{Pro}	4	9
tRNA ^{Asn}	4	7
tRNA ^{Gln}	3	15
tRNA ^{His}	3	11
tRNA ^{Met}	3	6
tRNA ^{Ala}	3	11
tRNA ^{Ser(AGY)}	3	13
tRNA ^{Glu}	3	9
tRNA ^{Cys}	2	16
tRNA ^{Asp}	2	11
tRNA ^{Arg}	0	9
Συνολικά	139	243

Πίνακας 3: Τα δεδομένα του πίνακα έχουν ληφθεί από διαδικτυακές βάσεις δεδομένων (www.mitomap.org και www.genpat.uu.se/mtDB)



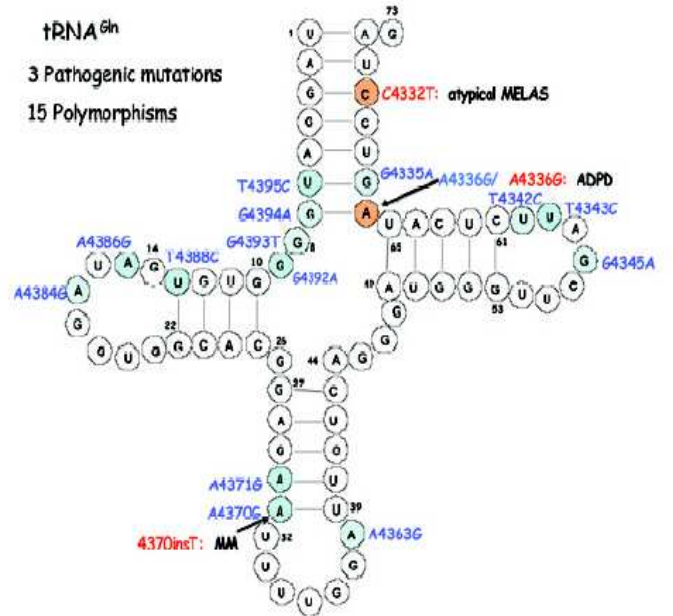
tRNA^{Asn}

4 Pathogenic mutations
7 Polymorphisms



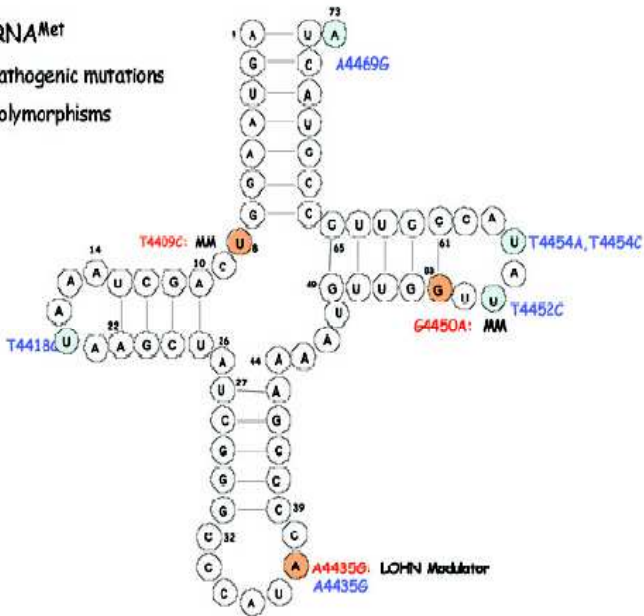
tRNA^{Gln}

3 Pathogenic mutations
15 Polymorphisms



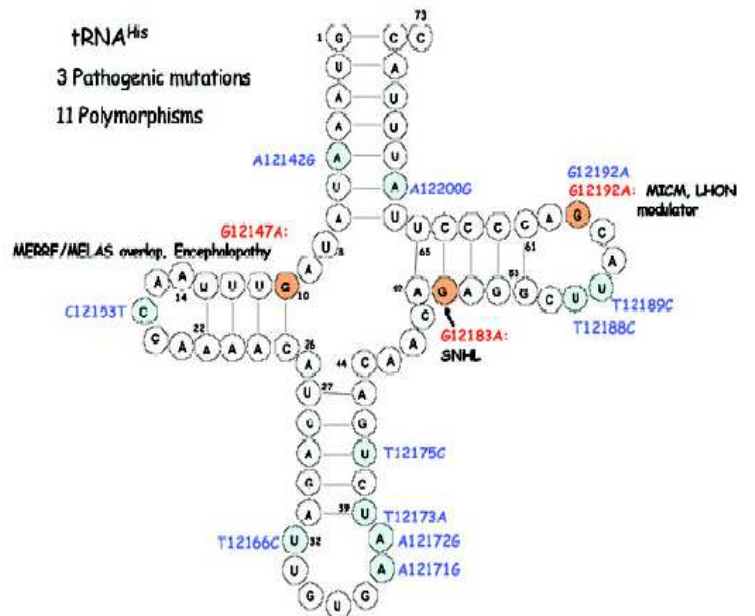
tRNA^{Met}

3 Pathogenic mutations
6 Polymorphisms



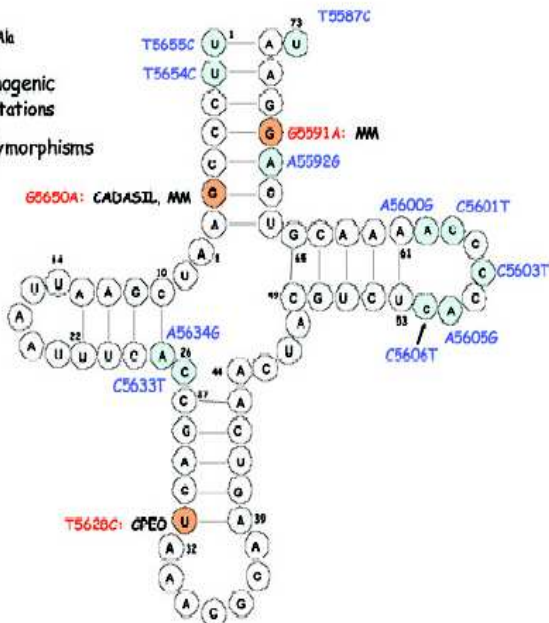
tRNA^{His}

3 Pathogenic mutations
11 Polymorphisms



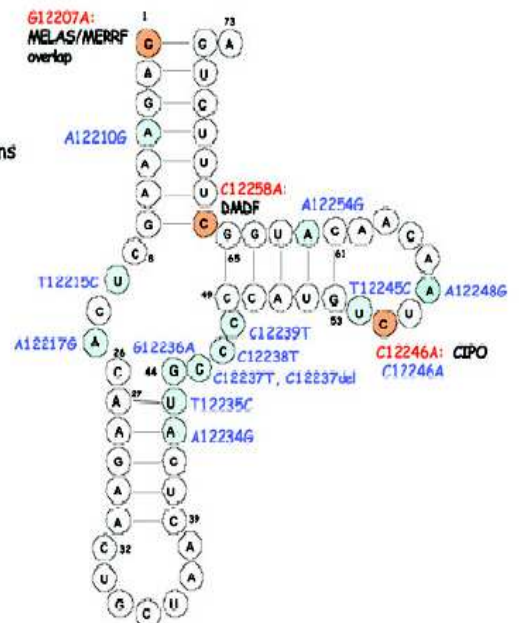
tRNA^{Ala}

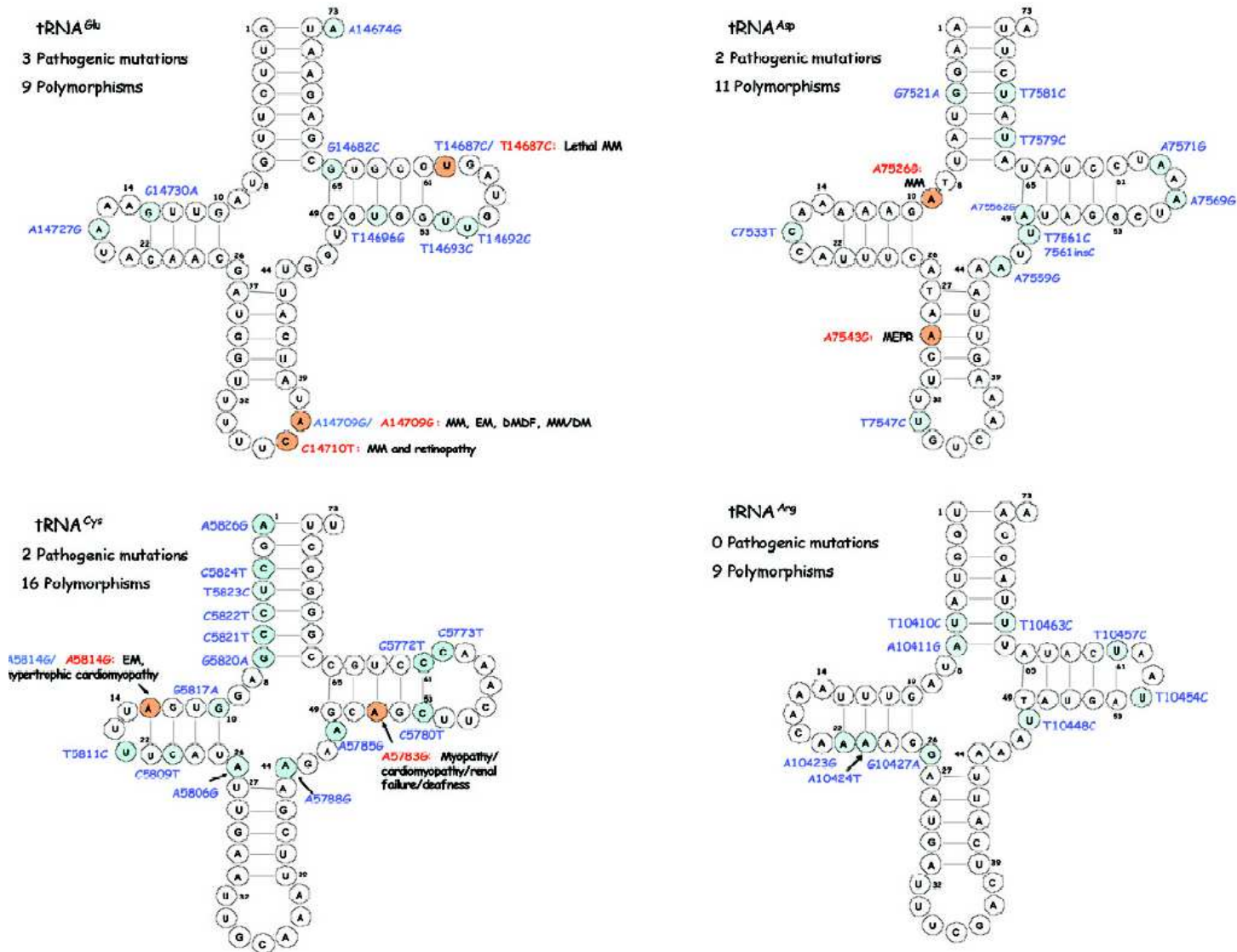
3 Pathogenic mutations
11 Polymorphisms



tRNA^{Ser(AGY)}

3 Pathogenic mutations
13 Polymorphisms





Εικόνα 8: Παθογόνες και πολυμορφικές μεταλλάξεις στα ανθρώπινα μιτοχondριακά tRNA γονίδια. Τα μόρια tRNA αναπαρίστανται στη δευτεροταγή τους δομή. Οι παθογόνες μεταλλάξεις απεικονίζονται με κόκκινο χρώμα ενώ οι πολυμορφικές με μπλε. Οι αλληλουχίες των μιτοχondριακών tRNA έχουν ληφθεί από τη βάση δεδομένων αναφοράς www.tRNA.uni-bayreuth.de ενώ οι παθογόνες και πολυμορφικές μεταλλάξεις από τις www.mitomap.org και www.genpat.uu.se/mtDB. Στην εικόνα παρουσιάζονται επίσης οι ασθένειες που οφείλονται στις συγκεκριμένες 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 κατά την περίοδο της εγκυμοσύνης, KSS: Σύνδρομο Kearns-Sayre, LA: Γαλακτική οξέωση, LHON: Κληρονομική οπτική νευροπάθεια του Leber, LMM: Θανατηφόρο βρεφική μυοπάθεια, LS: Σύνδρομο του Leigh, MELAS: Μιτοχondριακή εγκεφαλομυοπάθεια, γαλακτική οξέωση και εγκεφαλικά επεισόδια, MEPR: Μυοκλονική επιληψία με ψυχοκινητική καθυστέρηση, MERRF: Μυοκλονική επιληψία με ανώμαλες ερυθρές μυικές ίνες, MERME: επικάλυψη των συνδρόμων MERRF/MELAS, MHCM: Μητρικά κληρονομούμενη υπερτροφική καρδιομυοπάθεια, MICM: Μητρικά κληρονομούμενη καρδιομυοπάθεια, MID: Μητρικά κληρονομούμενος διαβήτης, MM: Μιτοχondριακή μυοπάθεια, MNGIE: Μιτοχondριακή νευρογαστρεντερική εγκεφαλοπάθεια, MS: Σκλήρυνση κατά πλάκας, MSL: Πολλαπλή λιπομάτωση, PEM: Προοδευτική εγκεφαλομυοπάθεια, PEO: Προοδευτική έξω οφθαλμοπληγία, SNHL: Νευροαισθητήρια κώφωση, SM: σκελετική μυοπάθεια.

2.4.2 Μεταλλάξεις σε μιτοχονδριακά γονίδια rRNA, γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες και πυρηνικά γονίδια.

Μεταλλάξεις στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα δεν εντοπίζονται αποκλειστικά στα γονίδια tRNA, αλλά σε όλη την έκταση του μιτοχονδριακού γονιδιώματος. Αυτό σημαίνει ότι μεταλλάξεις μπορούν να εντοπιστούν και στα 2 μιτοχονδριακά rRNA, που συμβάλλουν στη σύνθεση των ριβοσωμάτων αλλά και στα 13 γονίδια που μεταγράφονται σε mRNA και κωδικοποιούν υπομονάδες της αναπνευστικής αλυσίδας. Στα rRNA έχουν μέχρι στιγμής ανιχνευθεί 12 παθογόνες μεταλλάξεις και 168 πολυμορφικές μεταλλάξεις. Στα 13 γονίδια των υπομονάδων της αναπνευστικής αλυσίδας, έχουν βρεθεί 163 παθογόνες και 1329 πολυμορφικές μεταλλάξεις.

Όπως ήδη αναφέρθηκε, μεταλλάξεις σε πυρηνικά γονίδια ενδέχεται να επηρεάσουν τη λειτουργικότητα των μιτοχονδρίων, εφόσον τα μιτοχόνδρια δεν είναι σε θέση να συνθέσουν όλες τις απαραίτητες για τη λειτουργία τους πρωτεΐνες. Αρκετές πρωτεΐνες κωδικοποιούνται από πυρηνικά γονίδια, συντίθενται στο κυτταρόπλασμα και μεταφέρονται στα μιτοχόνδρια. Αν αυτές οι πρωτεΐνες αποτελούν μέρος της αναπνευστικής αλυσίδας, τότε τυχόν μεταλλάξεις στα γονίδια τους θα προκαλέσουν προβλήματα στον οξειδωτικό μεταβολισμό που επιτελείται στα μιτοχόνδρια. Επίσης πολύ βασικό, είναι ότι και οι υπομονάδες της DNA πολυμεράσης (POLG), η οποία ευθύνεται για την αντιγραφή του μιτοχονδριακού γονιδιώματος κωδικοποιούνται από πυρηνικά γονίδια. Μεταλλάξεις σε αυτά τα γονίδια θα μπορούσαν να παρεμποδίσουν την αντιγραφή του mtDNA και κατά συνέπεια τον έλεγχο των αντιγράφων του mtDNA εντός των κυττάρων. Άρα προκύπτει ότι και μεταλλάξεις που συμβαίνουν σε πυρηνικά γονίδια, τα οποία όμως κωδικοποιούν πρωτεΐνες που είναι κρίσιμες για τη λειτουργία των μιτοχονδρίων, μπορούν να αποβούν εξίσου σοβαρές με μεταλλάξεις που απαντώνται στο ίδιο το μιτοχονδριακό γονιδίωμα και να συμβάλουν στην εμφάνιση ασθενειών που σχετίζονται με τα μιτοχόνδρια.

2.4.3 Ετεροπλασμία

Το μιτοχονδριακό γονιδίωμα είναι πολυπλοειδές, δηλαδή υπάρχουν πολλαπλά αντίγραφα του mtDNA σε κάθε μιτοχόνδριο, ενώ κάθε κύτταρο μπορεί να περιλαμβάνει αρκετές εκατοντάδες ή και περισσότερα μιτοχόνδρια. Εντός των κυττάρων σε φυσιολογικούς ιστούς, όλα τα μιτοχονδριακά DNA είναι πανομοιότυπα, μια κατάσταση που αναφέρεται σαν ομοπλασμία. Υπάρχουν όμως και περιπτώσεις που παρατηρούνται μεταλλάξεις στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα, οι οποίες όμως μπορεί να εμφανίζονται σε ορισμένα μόνο μόρια mtDNA και όχι σε όλα τα μόρια mtDNA ενός κυττάρου, ή ενός ιστού.

Η συνύπαρξη άγριου τύπου και μεταλλαγμένου mtDNA στο ίδιο μιτοχόνδριο, κύτταρο, όργανο ή άτομο, σε ποικίλες αναλογίες αναφέρεται σαν ετεροπλασμία. Ο καθορισμός του κλινικού φαινοτύπου, καθορίζεται κατά ένα πολύ μεγάλο βαθμό από το επίπεδο της ετεροπλασμίας. Στην περίπτωση που μια μετάλλαξη είναι παθογόνος, τότε η αναλογία των μεταλλαγμένων μορίων mtDNA, σε ένα ετεροπλασμικό πληθυσμό μπορεί να επηρεάσει σημαντικά τη σοβαρότητα της βιοχημικής δυσλειτουργίας στο συγκεκριμένο ιστό ή όργανο. Ο φαινότυπος της ασθένειας, συνήθως εκφράζεται μόνο πάνω από μια συγκεκριμένη σχετική αναλογία μεταλλαγμένων μορίων mtDNA έναντι μορίων mtDNA άγριου τύπου. Συνήθως οι παθογόνες μεταλλάξεις γονιδίων φαίνεται να είναι ετεροπλασμικές, ενώ οι ουδέτεροι πολυμορφισμοί είναι ομοπλασμικοί.

Κατά την κυτταρική διαίρεση, η αντιγραφή και η κληρονόμηση του mtDNA αποτελεί ένα τυχαίο φαινόμενο που συχνά έχει σαν αποτέλεσμα τη μεταβολή της αναλογίας των μεταλλαγμένων μορίων κατά τη διάρκεια ζωής του ασθενή και επίσης σε διάφορα κύτταρα

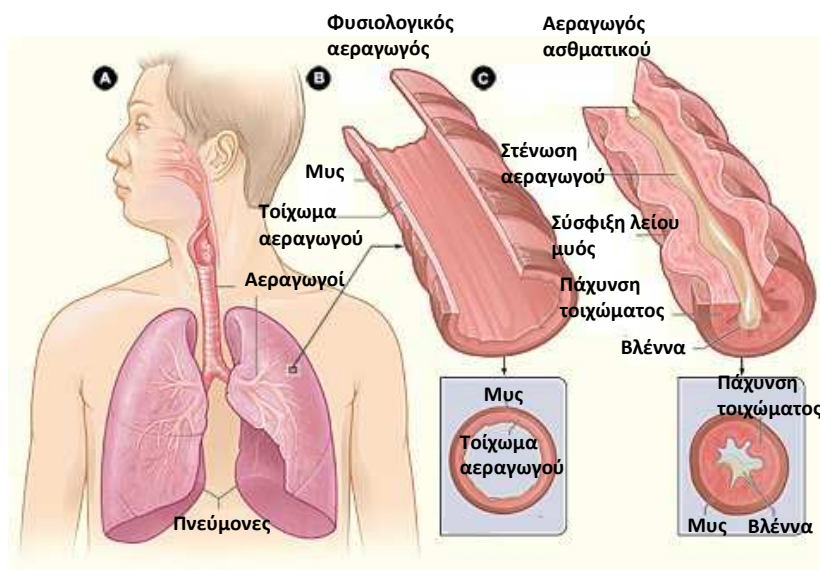
ή ιστούς. Το συγκεκριμένο φαινόμενο, αναφέρεται σα **μιτωτικός διαχωρισμός** και με βάση αυτό είμαστε σε θέση να εξηγήσουμε τη μετάπτωση ασθενών σε κάποιο διαφορετικό, από τον αρχικό φαινότυπο που παρουσίαζαν, με την πάροδο των χρόνων. Έτσι λοιπόν μπορούμε να καταλάβουμε ότι ένας φαινότυπος καθορίζεται από την αλληλεπίδραση ανάμεσα στο επίπεδο ετεροπλασμίας και της κατανομής των μεταλλαγμένων γονιδιωμάτων τόσο χρονικά όσο και χρονικά.

2.5 ΒΡΟΓΧΙΚΟ ΑΣΘΜΑ

Το βρογχικό άσθμα αποτελεί μια από τις πιο κοινές ασθένειες των σύγχρονων βιομηχανοποιημένων χωρών, η οποία προσβάλλει σημαντικό ποσοστό του πληθυσμού (σε ορισμένες περιπτώσεις μέχρι και το 20%). Συνεχώς έρχονται στο φως καινούρια στοιχεία που υποστηρίζουν ότι παρά την ολοένα και καλύτερη κατανόηση του άσθματος και εφαρμογή κατάλληλης θεραπείας, η ασθένεια εξακολουθεί να εξαπλώνεται στους πληθυσμούς και η νοσηρότητα αυξάνεται σε μεγάλο βαθμό. Αυτό το παράδοξο, υποδεικνύει ότι είναι απαραίτητο να μελετηθούν και να κατανοηθούν ακόμη καλύτερα οι μηχανισμοί που εμπλέκονται στην εμφάνιση του άσθματος και να επινοηθούν πιο αποτελεσματικές θεραπευτικές προσεγγίσεις για την αντιμετώπιση του.

Το βρογχικό άσθμα, είναι μια χρόνια πάθηση του αναπνευστικού συστήματος. Πρόκειται για μια φλεγμονώδη νόσο των αεραγωγών που προκαλεί μια σειρά από σοβαρά, πολλές φορές συμπτώματα. Χαρακτηρίζεται κυρίως από σποραδικά επεισόδια κατά τα οποία παρατηρούνται βήχας, συριγμός στην αναπνοή, σφίξιμο στο στήθος και γενικά δυσκολία στην αναπνοή. Μπορεί να επηρεάσει άτομα κάθε ηλικίας, ωστόσο συνήθως εμφανίζεται από την παιδική ηλικία.

Για χρόνια επικρατούσε η αντίληψη ότι το βασικό ελάττωμα που οδηγούσε στην εμφάνιση των συμπτωμάτων του άσθματος ήταν η υπερβολική συσταλτικότητα των λείων μυών στους αεραγωγούς, οδηγώντας σε παρεμπόδιση της φυσιολογικής ροής του αέρα. Εντούτοις μελέτες που έγιναν, αποκάλυψαν ότι αυτός ο παράγοντας από μόνος του, δεν είναι σε θέση να προκαλέσει άσθμα⁽¹⁴⁾. Επίσης αποκαλύφθηκε ότι πολλές φορές δεν παρατηρείται καν, συστολή μυός σαν άμεση απόκριση σε κάποιο ερέθισμα στο οποίο ο οργανισμός παρουσιάζει ευαισθησία. Είναι πιο πιθανό, το πρωταρχικό πρόβλημα να είναι η μη σωστή ρύθμιση της διαμέτρου των αεραγωγών, παρά η συσταλτικότητα των μυών.



Εικόνα 9: Διαφορές στους αεραγωγούς, ανάμεσα σε φυσιολογικά άτομα και ασθματικούς ασθενείς.

2.5.1 Τύποι άσθματος

Το άσθμα διαχωρίζεται κυρίως σε δύο κατηγορίες: το **εξωγενές** και το **ενδογενές** άσθμα. Το εξωγενές άσθμα μπορούμε να το συναντήσουμε και σαν αλλεργικό άσθμα. Πρόκειται για μια μορφή άσθματος η οποία οφείλεται σε εξωτερικούς παράγοντες, δηλαδή περιβαλλοντικούς παράγοντες στους οποίους ο οργανισμός παρουσιάζει κάποια ευαισθησία, με αποτέλεσμα να διεγείρει ανοσοαποκρίσεις έναντι τους. Αυτοί οι παράγοντες δεν είναι άλλοι από μια κατηγορία αντιγόνων που αναφέρονται σαν αλλεργιογόνα, εφόσον προκαλούν την ενεργοποίηση μιας αλλεργικής αντίδρασης από μέρος του οργανισμού, προκειμένου να καταφέρει να τα εξουδετερώσει. Η δεύτερη κατηγορία άσθματος, το ενδογενές άσθμα, αναφέρεται επίσης και σε μη αλλεργικό άσθμα ή αλλιώς άσθμα άγνωστης αιτιολογίας. Ο λόγος για τον οποίο δόθηκε η τελευταία ονομασία, είναι ότι τις περισσότερες φορές είναι αδύνατο να εντοπιστεί ο παράγοντας που ευθύνεται για την εμφάνιση του. Το μόνο σίγουρο είναι ότι δεν οφείλεται σε κάποιο αλλεργιογόνο, ενώ συχνά οφείλεται σε μολύνσεις του αναπνευστικού συστήματος, άγχος, μολυσμένο αέρα και χημικά που προκαλούν ερεθισμούς. Το εξωγενές άσθμα, εμφανίζεται συνήθως κατά την παιδική ηλικία και στις περισσότερες περιπτώσεις η αντιμετώπιση του είναι πολύ πιο αποτελεσματική, σε σύγκριση με αυτή του ενδογενούς άσθματος.

Σημαντικό, είναι ότι υπάρχουν περιπτώσεις ατόμων που έχουν άσθμα που αποτελεί συνδυασμό και των δύο κατηγοριών (εξωγενούς και ενδογενούς). Προφανώς σε τέτοιες περιπτώσεις η εμφάνιση του άσθματος οφείλεται ταυτόχρονα και σε αλλεργιογόνα αλλά και σε άλλους μη αλλεργιογόνους παράγοντες.

Πέραν από αυτές τις δύο μεγάλες κατηγορίες άσθματος, μπορεί να γίνει διαχωρισμός του και σε κάποιες άλλες μορφές, που παρουσιάζουν συγκεκριμένες ιδιότητες. Τέτοιες μορφές είναι οι ακόλουθες:

Νυχτερινό άσθμα: είναι μια περίπτωση άσθματος που τα συμπτώματα του (κρίσεις δύσπνοιας, βήχας), εμφανίζονται κατά τη διάρκεια της νύχτας ή τις πρώτες πρωινές ώρες με αποτέλεσμα να προκαλούνται προβλήματα στον ύπνο του ατόμου. Πιθανός λόγος εμφάνισης των συμπτωμάτων τη νύχτα, είναι η καθυστερημένη αντίδραση του οργανισμού σε ερεθίσματα στα οποία είχε εκτεθεί τις προηγούμενες ώρες. Επίσης ίσως συμβάλλει και το γεγονός ότι όταν το άτομο είναι ξαπλωμένο, η βλέννα η οποία συνεχώς παράγεται δε διοχετεύεται κατάλληλα, με αποτέλεσμα να συσσωρεύεται και να προκαλεί τη στένωση των αεραγωγών και άρα την εμφάνιση των συμπτωμάτων.

Εποχιακό άσθμα: αυτή η μορφή άσθματος έχει να κάνει με συγκεκριμένες εποχές του χρόνου. Σε κάποια άτομα παρατηρείται επιδείνωση του άσθματος μια συγκεκριμένη εποχή, για παράδειγμα την άνοιξη λόγω της άνθησης των λουλουδιών. Ανάλογα με το άτομο η εποχή επιδείνωσης του άσθματος διαφέρει και αυτό εξαρτάται από τον παράγοντα πρόκλησης του άσθματος και την εποχή που το άτομο εκτίθεται περισσότερο σε αυτό τον παράγοντα.

Επαγόμενο από άσκηση άσθμα: ο συγκεκριμένος τύπος άσθματος κάνει την εμφάνιση του κατά τη διάρκεια ή μετά από εξαντλητική σωματική άσκηση. Πιστεύεται ότι προκύπτει σαν αντίδραση σε αλλαγές στη θερμοκρασία του αέρα στους πνεύμονες.

Επαγγελματικό άσθμα: εμφανίζεται σε άτομα που λόγω του εργασιακού τους περιβάλλοντος, έρχονται σε επαφή με διάφορες εισπνεόμενες ουσίες στις οποίες αντιδρά ο οργανισμός, όπως σκόνη ξύλου, αλεύρι, βαφές χρωμάτων. Αποτελεί μια από τις πλέον κοινές μορφές άσθματος με κύριο χαρακτηριστικό τη βελτίωση της κατάστασης του ατόμου όταν αυτό απομακρυνθεί για κάποιο διάστημα από το χώρο εργασίας.

2.5.2 Παράγοντες που αυξάνουν τον κίνδυνο εμφάνισης άσθματος

Παρά το γεγονός ότι συνεχώς αυξάνονται οι γνώσεις μας σχετικά με το άσθμα, εξακολουθούν να παραμένουν πολλά αναπάντητα ερωτήματα, ειδικότερα για τους παράγοντες που είναι υπεύθυνοι για την ανάπτυξη του. Η γενετική προδιάθεση για την εμφάνιση του άσθματος είναι προφανής. Οι ευρείες διακυμάνσεις ωστόσο που παρατηρούνται στο βαθμό εμφάνισης του άσθματος αλλά και της αλλεργίας παγκοσμίως, θα μπορούσαν να εξηγηθούν καλύτερα από τις αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στα γονίδια και το περιβάλλον⁽¹⁹⁾. Δηλαδή, δεν αρκεί η γενετική προδιάθεση για την εκδήλωση της κατάστασης, αλλά σημαντικό ρόλο διαδραματίζει και το περιβάλλον διαβίωσης του ατόμου.

Περιβαλλοντικοί παράγοντες, όπως για παράδειγμα μολύνσεις ή έκθεση σε ενδοτοξίνες αποτελούν συχνά παράγοντες πρόκλησης άσθματος ενώ υπάρχουν και περιπτώσεις που μπορούν να δράσουν και προστατευτικά απέναντι στο άσθμα (επάγοντας ανάπτυξη του ανοσοποιητικού συστήματος), ανάλογα με τη χρονική στιγμή έκθεσης του ατόμου στους συγκεκριμένους παράγοντες κατά τη βρεφική και παιδική ηλικία

Προγεννητικοί παράγοντες πρόκλησης άσθματος:

Ένας από τους σημαντικότερους προγεννητικούς παράγοντες πρόκλησης άσθματος, αποτελεί το *κάπνισμα* από τη μητέρα κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης. Σημαντικό ρόλο παίζει και το πόσο έντονο είναι το κάπνισμα (δόση, αριθμός τσιγάρων) στο αν το παιδί θα παρουσιάσει άσθμα, ενώ μπορεί να οδηγήσει και στην εμφάνιση και άλλων ειδών ευαισθησίας όπως τροφικές αλλεργίες. Σημαντικό ρόλο στην εμφάνιση του άσθματος, φαίνεται να κατέχει και το *διαιτολόγιο* της μητέρας κατά την εγκυμοσύνη. Έρευνες που έγιναν έχουν οδηγήσει στο συμπέρασμα ότι κατανάλωση ορισμένων τροφών, όπως ψάρια, γάλα και αυγά και γενικά τροφές που περιέχουν βιταμίνη E και ψευδάργυρο, μειώνουν την πιθανότητα το παιδί να παρουσιάσει συμπτώματα νωρίς στην παιδική ηλικία. Ρόλο στην ανάπτυξη άσθματος φαίνεται να παίζει και το *άγχος* από πλευράς της μητέρας αλλά, και η *λήψη αντιβιοτικών* από τη μητέρα κατά την κύηση.

Παράγοντες πρόκλησης άσθματος κατά την παιδική ηλικία:

Ένας παράγοντας ο οποίος είναι *αμφιλεγόμενο* κατά πόσο είναι ευεργετικός ή αυξάνει την πιθανότητα το παιδί να ασθενήσει είναι ο *θηλασμός*. Έρευνες που έχουν γίνει, απέδειξαν ότι σε ορισμένες περιπτώσεις, ο θηλασμός έχει προστατευτικό ρόλο απέναντι στο άσθμα ενώ σε άλλες ότι αυξάνει τον κίνδυνο εμφάνισης του. Προφανώς η λήψη αντισωμάτων μέσω του γάλακτος, βοηθά το βρέφος να προστατευτεί από διάφορα αντιγόνα, μέχρι να αναπτυχθεί πλήρως το δικό του ανοσοποιητικό σύστημα. Ο κίνδυνος ανάπτυξης του άσθματος ίσως να έχει να κάνει με τη λήψη μέσω του μητρικού γάλακτος κάποιων τροφικών αλλεργιογόνων. Παιδιά τα οποία έχουν αμέσως μετά τη γέννηση *μικρότερης διαμέτρου αεραγωγούς*, βρέθηκε να έχουν επίσης αυξημένη πιθανότητα να νοσήσουν με άσθμα. Αυτό πιθανόν να οφείλεται στο ότι μικρότερης διαμέτρου αεραγωγοί, ακόμη και με μικρής έντασης ερεθίσματα, επηρεάζονται και έτσι τα συμπτώματα γίνονται εμφανή. Η *δομή της οικογένειας* βρέθηκε να σχετίζεται με την εμφάνιση του άσθματος. Συγκεκριμένα αποδείχθηκε ότι παιδιά που έχουν και άλλα αδέρφια και κυρίως μεγαλύτερα, λόγω του ότι από πολύ νωρίς έρχονται σε επαφή με μολύνσεις και βακτήρια, αναπτύσσουν πιο γρήγορα το ανοσοποιητικό τους σύστημα. Η *έκθεση των παιδιών σε ζώα* μπορεί επίσης να προκαλέσει εμφάνιση άσθματος, κυρίως μέσω ευαισθητοποίησης των παιδιών σε αλλεργιογόνα. Εντούτοις υπάρχουν περιπτώσεις που η έκθεση σε ζώα π.χ. σκύλους, βοηθά στην καλύτερη ανάπτυξη του ανοσοποιητικού συστήματος. Ο *καπνός του τσιγάρου*, επίσης αποτελεί σοβαρό παράγοντα πρόκλησης άσθματος στην παιδική ηλικία. Τέλος, το *φύλο* μπορεί να είναι παράγοντας που επηρεάζει την εμφάνιση άσθματος εφόσον βρέθηκε ότι η επίδραση ορισμένων αλλεργιογόνων είναι διαφορετική ανάλογα με το φύλο.

Άσθμα στους ενήλικες:

Ενήλικες που παρουσιάζουν άσθμα, μπορεί να το έχουν από την παιδική ηλικία χωρίς να έχουν θεραπευτεί. Υπάρχουν περιπτώσεις που τα συμπτώματα σταματούν για κάποια χρόνια και γίνεται εκ νέου «επίθεση» κατά την ενήλικη ζωή. Υπάρχουν όμως και περιπτώσεις ατόμων που μπορεί να εμφανίσουν άσθμα για πρώτη φορά στην ενήλικη ζωή τους, λόγω έκθεσης τους σε διάφορες ουσίες στις οποίες παρουσιάζουν ευαισθησία, στο χώρο εργασίας τους (*επαγγελματικό άσθμα*). Κυρίως πρόκειται για διάφορα χημικά, σκόνη, καθαριστικά, λάτεξ κ.λ.π. Δεν αποκλείεται βέβαια και το ενδεχόμενο εμφάνισης άσθματος λόγω *καπνίσματος* τσιγάρων (ή και ναρκωτικών ουσιών), αλλά σε αυτές τις περιπτώσεις είναι πιο συνήθης η εμφάνιση χρόνιας βρογχίτιδας.

2.5.3 Παθοφυσιολογία άσθματος

Άτομα τα οποία έχουν πεθάνει από σοβαρά επεισόδια άσθματος, έχει βρεθεί ότι παρουσίαζαν εκτεταμένη φλεγμονή στους αεραγωγούς τους. Σε αυτές τις περιπτώσεις, η κοιλότητα των αεραγωγών βρέθηκε να φράσσεται από ένα βλεννώδες στρώμα το οποίο αποτελείται από πρωτεΐνες του πλάσματος που απελευθερώνονται από τα αιμοφόρα αγγεία των αεραγωγών καθώς και γλυκοπρωτεΐνες, οι οποίες εκκρίνονται από την επιφάνεια των επιθηλιακών κυττάρων. Επιπρόσθετα στο τοίχωμα των αεραγωγών είχαν εισχωρήσει κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, με κυριότερους εκπροσώπους τα ηωσινόφιλα και τα λεμφοκύτταρα, ενώ στην κοιλότητα των αεραγωγών απαντώνται και συμπαγείς μάζες επιθηλιακών κυττάρων. Αντίστοιχα φαινόμενα, όχι όμως τόσο έντονα παρατηρήθηκαν σε αεραγωγούς ασθματικών ατόμων, που πέθαναν από κάποια άλλη αιτία⁽²⁶⁾.

Μέθοδοι που αναπτύχθηκαν πιο πρόσφατα όπως η βρογχοσκόπια με χρήση οπτικών ινών και η βρογχική βιοψία επέτρεψαν τη μελέτη αεραγωγών σε ζώντες ασθενείς. Τέτοιες μελέτες αποκάλυψαν επίσης, ότι παρουσιάζεται ερεθισμός και πρήξιμο των αεραγωγών σε ασθενείς που πάσχουν από άσθμα, όπως και αύξηση του αριθμού των λεμφοκυττάρων, των σιτευτικών κυττάρων και των ηωσινοφίλων στην ίδια περιοχή⁽²⁷⁾. Επίσης στους αεραγωγούς παρατηρείται και ενεργοποίηση των μακροφάγων κάτι που δεν παρατηρείται σε φυσιολογικά άτομα. Όλες αυτές οι παρατηρήσεις ισχύουν και για ασθενείς με ήπιο άσθμα, υποστηρίζοντας ότι η συγκεκριμένη νόσος, είναι μια φλεγμονώδης κατάσταση των αεραγωγών. Αυτό το οποίο μέχρι στιγμής δεν έχει διασαφηνιστεί, είναι η σύνδεση ανάμεσα στη φλεγμονή και τα κλινικά συμπτώματα του άσθματος.

Υπάρχουν στοιχεία που δείχνουν ότι το μέγεθος της φλεγμονής σχετίζεται με την **υπεραπόκριση** και **ευαισθησία** των αεραγωγών. Αυτή η αυξημένη ευαισθησία των αεραγωγών, εκδηλώνεται με στένωση τους σαν απόκριση σε διάφορα ερεθίσματα, κάτι που αποτελεί χαρακτηριστικό του άσθματος. Ο βαθμός εντούτοις αυτής της ευαισθησίας και απόκρισης τους, συνδέεται με τα συμπτώματα του άσθματος. Η φλεγμονή, φαίνεται να είναι σε θέση να αυξάνει την απόκριση των αεραγωγών σε διάφορα ερεθίσματα, με αποτέλεσμα παράγοντες που κανονικά δε θα προκαλούσαν στένωση των αεραγωγών, τελικά να την προκαλούν. Παράλληλα, η φλεγμονή είναι δυνατό να προκαλέσει άμεσα, συμπτώματα άσθματος με ενεργοποίηση των απολήξεων των αισθητήριων νευρώνων που εντοπίζονται στην περιοχή των αεραγωγών. Παρά το γεγονός ότι τα περισσότερα δεδομένα που έχουμε για το άσθμα, προέρχονται από μελέτες σε ασθενείς που εκδήλωναν τα συμπτώματα της ασθένειας τη δεδομένη περίοδο (οξεία μορφή άσθματος), είναι πολύ σημαντικό ότι το άσθμα είναι μια χρόνια πάθηση και η φλεγμονή είναι παρούσα για πολλά χρόνια.

Τύποι κυττάρων που εμπλέκονται στο άσθμα

Πολλοί είναι οι τύποι των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος που εμπλέκονται στο άσθμα, παρόλο που δεν έχει ακόμα προσδιοριστεί με ακρίβεια ο ρόλος του καθενός ξεχωριστά^(28,29). Κανένας όμως μεμονωμένος κυτταρικός τύπος δεν μπορεί να θεωρηθεί κύριος υπεύθυνος, για την απόκριση που οδηγεί τελικά στα συμπτώματα του άσθματος.

Σιτευτικά κύτταρα: Από τα πιο σημαντικά κύτταρα για την έναρξη της οξείας απόκρισης στα αλλεργιογόνα, είναι τα σιτευτικά κύτταρα. Η ενεργοποίηση των κυττάρων αυτών γίνεται ως εξής: η έκθεση του ατόμου σε ένα αλλεργιογόνο στο οποίο παρουσιάζει ευαισθησία και στο οποίο έχει εκτεθεί ξανά, οδηγεί στην ενεργοποίηση των Β-λεμφοκυττάρων μνήμης. Τα κύτταρα αυτά παράγουν αμέσως αντισώματα για το συγκεκριμένο αντιγόνο. Τα αντισώματα που παράγονται σε τέτοιες περιπτώσεις είναι τα IgE. Στη συνέχεια τα IgE αντισώματα τα οποία σχηματίζουν σύμπλοκο με το αντιγόνο, προσδένονται στους υποδοχείς των σιτευτικών κυττάρων, ενεργοποιώντας τα. Η ενεργοποίησή τους αυτή προκαλεί την αποκοκκίωση τους με αποτέλεσμα την απελευθέρωση του περιεχομένου των κοκκίων (αγγειοδραστικές αμίνες, πρωτεάσες) καθώς και τη σύνθεση και έκκριση διαφόρων φλεγμονωδών παραγόντων όπως ισταμίνη, λευκοτριένια και κυτταροκίνες (ιντερλευκίνες IL-4, IL-5). Ενώ τα σιτευτικά κύτταρα εμπλέκονται στην πρώιμη φάση της ανοσοαπόκρισης, οι κυτταροκίνες που παράγουν, αποτελούν στοιχεία της όψιμης φάσης, επιστρατεύοντας τα λευκοκύτταρα.

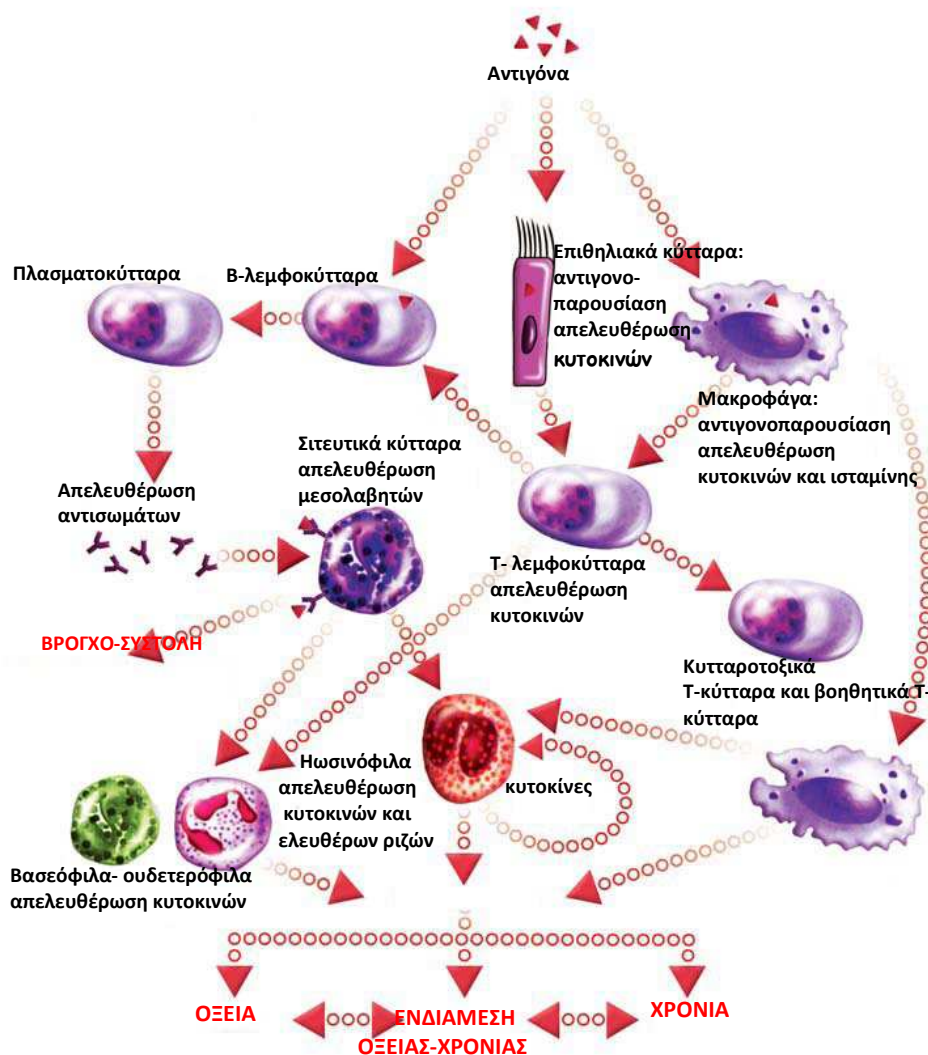
Μακροφάγα: Κύτταρα τα οποία επίσης σχετίζονται με την πρώιμη φάση της ανοσοαπόκρισης, είναι τα μακροφάγα τα οποία προκύπτουν από τα μονοκύτταρα του αίματος και κυκλοφορούν στους αεραγωγούς. Η ενεργοποίησή τους, επίσης επιτυγχάνεται μέσω υποδοχέων χαμηλής συγγένειας για τα IgE αντισώματα. Λόγω του πλούσιου ρεπερτορίου τους είναι σε θέση να παράγουν μεγάλη ποικιλία κυτοκινών, ενώ μπορούν να ξεκινήσουν και συγκεκριμένο τύπο απόκρισης παράγοντας συγκεκριμένους συνδυασμούς κυτοκινών. Τα μακροφάγα τα οποία εντοπίζονται στο κυψελιδικό υγρό των βρόγχων φαίνεται να έχουν σε κάποιο βαθμό κατασταλτική δράση⁽³⁰⁾, όσον αφορά την ανάπτυξη της φλεγμονής, κυρίως μέσω καταστολής της λειτουργίας των λεμφοκυττάρων. Εντούτοις η παρατεταμένη έκθεση στο αλλεργιογόνο προκαλεί εξασθένηση αυτής της δράσης. Μπορούν επίσης σε ορισμένες περιπτώσεις να λειτουργήσουν και σαν αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα, οδηγώντας τα αλλεργιογόνα στα Τ-λεμφοκύτταρα.

Δενδριτικά κύτταρα: Τα κύτταρα αυτά είναι τα κατεξοχήν αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα, τα οποία επίσης θεωρείται ότι παίζουν σημαντικό ρόλο, στην έναρξη μιας επαγόμενης από αλλεργιογόνο φλεγμονώδους αντίδρασης.

Ηωσινόφιλα: Τα κύτταρα των οποίων το όνομα έχει συνδεθεί πιο πολύ με το άσθμα, δεν είναι άλλα από τα ηωσινόφιλα. Δεν είναι τυχαίο ότι το 1916 είχε δοθεί στο άσθμα ο χαρακτηρισμός «χρόνια ηωσινοφιλική βρογχίτιδα». Μεγάλος αριθμός αυτών των κυττάρων φαίνεται να διηθείται στους αεραγωγούς σαν αποτέλεσμα της απόκρισης του οργανισμού στο αλλεργιογόνο. Τα κύτταρα αυτά, τα οποία εμπλέκονται στην όψιμη φάση της ανοσοαπόκρισης, ενεργοποιούνται κυρίως μέσω των κυτοκινών που παράγονται κατά την πρώιμη φάση (π.χ. IL-4 και IL-5). Η στρατολόγηση των συγκεκριμένων κυττάρων περιλαμβάνει την πρόσδεση τους στα αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα των αεραγωγών, την επακόλουθη μετανάστευση τους στον υποβλεννογόνο και τελικά την ενεργοποίησή τους. Η πρόσδεση στα αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα περιλαμβάνει την έκφραση ιντεγρινών στην επιφάνεια των ηωσινοφίλων και μόρια διακυτταρικής προσκολλησης όπως το ICAM-1 στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων. Η μετανάστευση τους προς τους αεραγωγούς, είναι πιθανό να ελέγχεται από κάποιους χημειοτακτικούς παράγοντες και είναι ιδιαίτερα σημαντικό ότι κυτοκίνες όπως IL-3 και GM-CSF μπορούν να διεγείρουν τα ηωσινόφιλα, ώστε να αυξηθεί η απόκριση τους σε τέτοια χημειοτακτικά μόρια. Επίσης αυτές οι κυτοκίνες προάγουν και την επιβίωση των ηωσινοφίλων στους αεραγωγούς. Ενώ τα

ηωσινόφιλα αρχικά θεωρήθηκαν σαν κύτταρα που προκαλούσαν καταστολή της φλεγμονής, στη συνέχεια αποδείχθηκε ότι την εντείνουν, μέσω απελευθέρωσης βασικών πρωτεϊνών αλλά και ελευθέρων ριζών οξυγόνου⁽³¹⁾. Αποτέλεσμα της έκκρισης τέτοιων κυτταροτοξικών παραγόντων είναι η βλάβη του αναπνευστικού κροσσωτού επιθηλίου. Αυτό έχει σαν άμεσο επακόλουθο την ευερεθιστότητα των αεραγωγών σε διάφορα αντιγόνα αλλά και την έκθεση αισθητήριων νευρώνων, που αντανακλαστικά αντιδρώντας σε κάποιους παράγοντες, προκαλούν τη συστολή των λείων μυών των αεραγωγών.

Ουδετερόφιλα: Τα κύτταρα αυτά, επίσης εμπλέκονται στην όσιμη φάση της ανοσοαπόκρισης. Επιστρατεύονται από τις κυτοκίνες που παράγονται από τα σιτευτικά κύτταρα ή από τα βοηθητικά T-λεμφοκύτταρα και απελευθερώνουν κυρίως πρωτεάσες, των οποίων στόχος είναι η αποικοδόμηση του αλλεργιογόνου. Η απελευθέρωση των πρωτεασών έχει σαν αποτέλεσμα την πρόκληση ιστικής βλάβης του επιθηλίου.



Εικόνα 10: Στην εικόνα παρουσιάζονται οι κυριότεροι τύποι κυττάρων που συμμετέχουν στην αντίδραση φλεγμονής καθώς και ο τρόπος με τον οποίο η είσοδος των αντιγόνων πυροδοτεί όλες αυτές τις αντιδράσεις από μέρους του ανοσοποιητικού συστήματος.

T-λεμφοκύτταρα: Τα T-λεμφοκύτταρα αποτελούν τους κύριους συντονιστές της όψιμης φάσης της φλεγμονώδους αντίδρασης στο άσθμα. Κύριος ρόλος των βοηθητικών T-λεμφοκυττάρων (T_H2), είναι η παραγωγή και απελευθέρωση κυτοκινών (IL-3, IL-4, IL-5)⁽³²⁾ που είναι υπεύθυνες για τη στρατολόγηση αλλά και την επιβίωση των ηωσινοφίλων στους αεραγωγούς. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την παράταση της φλεγμονώδους αντίδρασης. Επιπρόσθετα η αντιγονοπαρουσίαση ενεργοποιεί και τα κυτταροτοξικά T-λεμφοκύτταρα που είναι υπεύθυνα για την εξουδετέρωση του εισβολέα μέσω παραγωγής διαφόρων κυτταροτοξικών ουσιών, που δρουν σκοτώνοντας τα μολυσμένα κύτταρα.

Επιθηλιακά κύτταρα: Τα επιθηλιακά κύτταρα κατέχουν σημαντικό ρόλο στη φλεγμονώδη αντίδραση μέσω παραγωγής μεσολαβητών (χημειοκινών, ενδοθηλινών και αυξητικών παραγόντων)⁽³³⁾ που παράγουν και εντείνουν την ανοσοαπόκριση.

Επιδράσεις μεσολαβητών στους αεραγωγούς

Πολλοί είναι οι μεσολαβητές οι οποίοι παράγονται από κύτταρα που εμπλέκονται στη φλεγμονή. Οι επιδράσεις του καθενός από αυτούς είναι ποικίλες, με αποτέλεσμα την ίδια επίδραση να έχουν περισσότεροι του ενός, μεσολαβητές. Έτσι είναι αδύνατη η αντιμετώπιση του άσθματος με τη χρήση ανταγωνιστή για ένα συγκεκριμένο μεσολαβητή.

Η **ισταμίνη**, οι **προσταγλανδίνες** και τα **λευκοτριένια** που παράγονται κυρίως από τα σιτευτικά κύτταρα προκαλούν συστολή του λείου μυός των αεραγωγών, αυξημένη παραγωγή βλέννας, διαστολή των μικρών αγγείων αλλά και συσσώρευση άλλων φλεγμονωδών κυττάρων στους αεραγωγούς. Τα **κυστεϊνιλικά λευκοτριένια** (π.χ LTC₄) πιθανόν να προκαλούν συστολή και σύσφιξη των αεραγωγών και επίσης εντείνουν την υπεραπόκριση των αεραγωγών στα διάφορα ερεθίσματα⁽³⁴⁾.

Στους κυριότερους μεσολαβητές συγκαταλέγονται οι **κυτοκίνες**, που παράγονται από τα περισσότερα φλεγμονώδη κύτταρα (σιτευτικά, μακροφάγα, ηωσινόφιλα, T-λεμφοκύτταρα) αλλά και από δομικά κύτταρα όπως τα επιθηλιακά. Οι κυτοκίνες κατέχουν κυρίαρχη θέση στη χρόνια φλεγμονή και πιο συγκεκριμένα δρουν στα όψιμα στάδια της⁽³⁵⁾. Οι κυτοκίνες είναι κυρίως σημαντικές για την επιβίωση των σιτευτικών κυττάρων στους ιστούς (IL-3), για τη διέγερση των B-λεμφοκυττάρων ώστε να παραγάγουν αντισώματα (IL-4), για τη διαφοροποίηση, τη διέγερση αλλά και την επιβίωση των ηωσινοφίλων στους αεραγωγούς (IL-5). Γενικότερα οι κυτοκίνες είναι υπεύθυνες για τη διατήρηση της φλεγμονής για όσο το δυνατό μεγαλύτερο χρονικό διάστημα (χρόνια φλεγμονή).

Οι **ενδοθηλίνες** αποτελούν πιθανούς πεπτιδικούς μεσολαβητές. Θεωρούνται υπεύθυνες για την πρόκληση αγγειοσυστολής και βρογχοσυστολής, καθώς και την επαγωγή του πολλαπλασιασμού των κυττάρων του λείου μυός των αεραγωγών και ίνωση.

Από πολλά κύτταρα παράγεται και απελευθερώνεται **οξείδιο του αζώτου** (NO). Αυξημένη συγκέντρωση (NO) βρέθηκε και στον εκπνεόμενο αέρα ατόμων με άσθμα. Το NO συμπεριφέρεται σαν αγγειοδιασταλτικό με αποτέλεσμα να προκαλεί αυξημένη έκκριση πλάσματος στους αεραγωγούς. Επίσης θεωρείται πιθανό να ενισχύει και την απόκριση που επιτυγχάνεται μέσω των T-λεμφοκυττάρων⁽³⁶⁾.

Αποτελέσματα της χρόνιας φλεγμονής - παθοφυσιολογικές αλλαγές στο άσθμα

Οι επιπτώσεις στους αεραγωγούς από τη χρόνια φλεγμονώδη αντίδραση είναι πολλές. Στο σύνολο τους οδηγούν στη χαρακτηριστική κλινική εικόνα του άσθματος. Από τις πιο χαρακτηριστικές συνέπειες της δράσης μεσολαβητών που παράγονται από τα διάφορα κύτταρα, όπως οι βασικές πρωτεΐνες και οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου από τα ηωσινόφιλα ή οι πρωτεάσες από τα σιτευτικά κύτταρα, είναι βλάβες στο αναπνευστικό κροσσωτό επιθήλιο. Πιο συγκεκριμένα παρατηρείται **καταστροφή του επιθηλίου**, με αποτέλεσμα τα

επιθηλιακά κύτταρα να βρίσκονται υπό τη μορφή συσσωματωμάτων μέσα στο κυψελιδικό υγρό των βρόγχων, έχοντας απωλέσει τη σύνδεση τους με τη βασική μεμβράνη⁽¹⁴⁾.

Αυτή η καταστροφή του επιθηλίου οδηγεί με τη σειρά της σε **ευερεθιστότητα** των αεραγωγών σε διάφορα αντιγόνα, εφόσον διάφορες λειτουργίες του επιθηλίου χάνονται από τη διάσπαση του. Για παράδειγμα σταματά να παράγει ένζυμα που διασπούν τους μεσολαβητές, παύει να αποτελεί φραγμό στην είσοδο των αλλεργιογόνων στους αεραγωγούς, ενώ η διάσπαση του αφήνει και εκτεθειμένες τις νευρικές απολήξεις αισθητήριων νευρώνων (αντανακλαστικά προκαλούν συστολή του λείου μυός των αεραγωγών).

Μια άλλη σημαντική αλλαγή που παρατηρείται στο επιθήλιο, είναι η **πάχυνση της βασικής του μεμβράνης**⁽²⁶⁾. Αυτό έχει κατά κύριο λόγο παρατηρηθεί σε περιπτώσεις θανατηφόρου άσθματος. Η πάχυνση οφείλεται σε εναπόθεση κολλαγόνου τύπου I και κολλαγόνου τύπου V, που παράγονται από μυοινοβλάστες που βρίσκονται κάτω από το επιθήλιο. Το πώς ακριβώς αυτά τα κύτταρα διεγείρονται και παράγουν μεγάλες ποσότητες κολλαγόνου δεν είναι ξεκάθαρο. Πιθανό όμως να οφείλεται στη δράση κυτοκινών που παράγονται από διάφορα κύτταρα στους αεραγωγούς.

Κάποιες σημαντικές αλλαγές που παρατηρούνται στους λείους μύες των αεραγωγών, μπορεί να σχετίζονται επίσης με τα συμπτώματα του άσθματος. Πιο συγκεκριμένα, έχει παρατηρηθεί ότι σε βρόγχους ασθματικών ατόμων, η **απόκριση των β-αδρενεργικών υποδοχέων στους αγωνιστές τους είναι μειωμένη**⁽³⁷⁾. Κάτι τέτοιο θα μπορούσε να είναι αποτέλεσμα της χρόνιας φλεγμονώδους αντίδρασης και θα μπορούσε να οφείλεται σε φωσφορυλίωση και απενεργοποίηση της G-πρωτεΐνης που συνδέει τον υποδοχέα με το επόμενο μόριο του μονοπατιού. Η φωσφορυλίωση γίνεται μέσω της ενεργοποιημένης, από φλεγμονώδεις μεσολαβητές πρωτεϊνικής κινάσης C. Εφόσον το μονοπάτι στο οποίο εμπλέκονται οι β-αδρενεργικοί υποδοχείς, έχει βρογχοδιασταλτική επίδραση, η μειωμένη απόκριση των υποδοχέων εντείνει περισσότερο τη συστολή των λείων μυών των αεραγωγών. Επίσης είναι αξιοσημείωτη η **υπερτροφία και υπερπλασία των αεραγωγών** που προκύπτει από τη διέγερση του λείου μυός, από αυξητικούς κυρίως παράγοντες που απελευθερώνονται από τα φλεγμονώδη κύτταρα⁽³⁸⁾.

Μια άλλη χαρακτηριστική επίπτωση της φλεγμονής, είναι η **διαστολή των αγγείων** των αεραγωγών. Η κυκλοφορία του αίματος στους αεραγωγούς μπορεί να παίζει ρόλο ρυθμιστικό, όσον αφορά τη διάμετρο τους. Αυτό προφανώς οφείλεται στο γεγονός ότι η αυξημένη ροή αίματος και η αύξηση του όγκου των αγγείων συμβάλλουν στη στένωση των αεραγωγών.

Τέλος μια από τις πιο κοινές συνέπειες της φλεγμονής, είναι η **αυξημένη έκκριση βλέννας** από τους εκκριτικούς ιστούς. Η μεγάλη συσσώρευση βλέννας έχει σαν άμεσο επακόλουθο την απόφραξη των αεραγωγών. Μελέτες, έχουν αποκαλύψει υπερπλασία των υποβλεννογόνων αδένων αλλά και αυξημένο αριθμό των επιθηλιακών κυπελλοειδών κυττάρων που είναι υπεύθυνα για την παραγωγή βλέννας, σε ασθματικούς ασθενείς. Πιθανότατα τα κύτταρα αυτά διεγείρονται για παραγωγή βλέννας από τους μεσολαβητές, αλλά και μέσω νευρικών ώσεων από ορισμένους αισθητήριους νευρώνες.

Ο συνδυασμός όλων αυτών των αλλαγών που προκαλούνται στους αεραγωγούς λόγω της φλεγμονής, οδηγεί τελικά στην εμφάνιση των χαρακτηριστικών συμπτωμάτων του άσθματος και στη διαμόρφωση της κλινικής του εικόνας.

2.5.4 Μιτοχόνδρια και άσθμα

Μιτοχονδριακές δυσλειτουργίες και συσχέτιση με την εμφάνιση του άσθματος

Γενετικές και επιδημιολογικές μελέτες που έγιναν, αποκάλυψαν ότι παρατηρείται ένα είδος μητρικής κληρονομιάς⁽²¹⁾, όσον αφορά την εμφάνιση του άσθματος. Δεδομένου ότι οι μητρικά κληρονομούμενες ασθένειες είναι κυρίως μιτοχονδριακές (λόγω της κληρονομιάς του μιτοχονδριακού γονιδιώματος μόνο από τη μητέρα), είναι απόλυτα λογικό να μελετηθεί η πιθανή εμπλοκή του μιτοχονδρίου στην εμφάνιση του άσθματος. Οι κύριοι λόγοι, για τους οποίους διερευνάται η συμβολή του μιτοχονδρίου στην εμφάνιση του άσθματος παρουσιάζονται πιο κάτω.

Καταρχήν, είναι γνωστό ότι το μιτοχόνδριο αποτελεί μια από τις κύριες πηγές ενδογενών ριζών στον οργανισμό. Ο λόγος είναι ακριβώς ότι κατά το μεταβολισμό των καύσιμων οργανικών ενώσεων για παραγωγή ενέργειας, έχουμε ροή e^- κατά μήκος της αναπνευστικής αλυσίδας. Παρά το γεγονός ότι τα ένζυμα της αναπνευστικής αλυσίδας είναι όσο το δυνατό πιο αποτελεσματικά στη διαχείριση των e^- , ώστε να μην σχηματιστούν ελεύθερες ρίζες, εντούτοις κάποιο μικρό ποσοστό e^- μπορεί να διαφύγει και τελικά να έχουμε παραγωγή ελευθέρων ριζών και συνεπώς οξειδωτικού στρες. Οι ενδογενείς ελεύθερες ρίζες που παράγονται μέσω των μιτοχονδρίων στον οργανισμό δε δημιουργούν κανένα σοβαρό πρόβλημα υπό φυσιολογικές συνθήκες, αφού παράγονται σε περιορισμένες ποσότητες. Εντούτοις αύξηση της ποσότητας των ελευθέρων ριζών λόγω κάποιας μιτοχονδριακής δυσλειτουργίας θα μπορούσε να έχει σοβαρές συνέπειες. Σημαντικό είναι να αναφερθεί και η παρουσία αντιοξειδωτικών συστημάτων στο μιτοχόνδριο, όπως η δισμουτάση του σουπεροξειδίου και η γλουταθειόνη, των οποίων η αδράνεια θα μπορούσε να επαγάγει το οξειδωτικό στρες στον οργανισμό^(41,42).

Χαρακτηριστικό των ελευθέρων ριζών είναι η εμπλοκή τους σε διάφορους τύπους ανοσοαποκρίσεων, ανάμεσα στις οποίες συγκαταλέγονται και οι αποκρίσεις του ανοσοποιητικού που έχουν καίριο ρόλο στην εμφάνιση του άσθματος. Πιο συγκεκριμένα, οι ελεύθερες ρίζες, μπορούν να επηρεάσουν τη δράση των κυττάρων που εμπλέκονται στη φλεγμονή^(21,22). Για παράδειγμα μπορούν να επαγάγουν τη διαφοροποίηση των δενδριτικών κυττάρων, τον πολλαπλασιασμό των T και B-λεμφοκυττάρων, την ενεργοποίηση των T-λεμφοκυττάρων, τη διαφοροποίηση των B-λεμφοκυττάρων (για σύνθεση IgE αντισωμάτων), την απελευθέρωση μεσολαβητών από τα σιτευτικά κύτταρα (απαραίτητοι για διαφοροποίηση των T-λεμφοκυττάρων). Επομένως, οι ελεύθερες ρίζες, διεγείροντας τις φλεγμονώδεις αποκρίσεις μπορούν να εντείνουν ακόμη περισσότερο τη φλεγμονή, σε κάποιο άτομο που παρουσιάζει ευαισθησία σε κάποιο αλλεργιογόνο και έτσι να αυξήσουν την πιθανότητα εμφάνισης άσθματος. Επιπρόσθετα οι ελεύθερες ρίζες είναι καταστροφικές για τα κύτταρα, εφόσον στρέφονται εναντίον τους, διασπώντας λιπίδια, πρωτεΐνες και νουκλεϊκά οξέα, οδηγώντας έτσι σε τραυματισμούς των ιστών. Η καταστροφή του επιθηλίου των πνευμόνων, που μπορεί να επαχθεί από τις ελεύθερες ρίζες, είναι σημαντικός παράγοντας πρόκλησης άσθματος. Με βάση τα πιο πάνω οδηγούμεστε στο συμπέρασμα ότι μιτοχονδριακές δυσλειτουργίες, που οδηγούν σε αυξημένες ποσότητες ελευθέρων ριζών, ενισχύουν την πιθανότητα εμφάνισης άσθματος.

Δυσλειτουργίες στο μεταβολισμό θα μπορούσαν να προκύψουν για πολλούς λόγους. Μια πιθανή περίπτωση είναι η ύπαρξη μεταλλάξεων στα γονίδια που κωδικοποιούν τα ένζυμα της αναπνευστικής αλυσίδας. Αυτό θα οδηγούσε στην παραγωγή μη λειτουργικών ενζύμων ή ακόμη και στη μη σύνθεση τους. Μια άλλη πιθανότητα θα ήταν αν υπήρχαν μεταλλάξεις στα γονίδια tRNA των μιτοχονδρίων, που θα μπορούσαν να επηρεάσουν τη λειτουργικότητα τους ως προς τη μεταφορά αμινοξέων. Αποτέλεσμα και πάλι θα ήταν να υπάρξουν προβλήματα στη σύνθεση των πρωτεϊνών του μιτοχονδρίου, που είναι υπομονάδες των ενζυμικών συμπλόκων του μεταβολισμού.

Μια άλλη παράμετρος η οποία μελετάται τα τελευταία χρόνια σε σχέση με την εμφάνιση του άσθματος, είναι η πιθανότητα να υπάρχουν κάποιες ανωμαλίες στο μονοπάτι απόπτωσης των κυττάρων που συμμετέχουν στη φλεγμονή. Η απόπτωση αποτελεί ένα ιδιαίτερα σημαντικό μονοπάτι για την ομοιοστάση του οργανισμού και τη διατήρηση του σωστού κυτταρικού φορτίου στους διάφορους ιστούς. Η έναρξη της απόπτωσης των φλεγμονωδών κυττάρων είναι επίσης κρίσιμη, προκειμένου να τερματιστεί η φλεγμονώδης διαδικασία, μέσω ελάττωσης του αριθμού των φλεγμονωδών κυττάρων. Η επίμονη λοιπόν και χρόνια παρουσία της φλεγμονής στην περίπτωση του άσθματος, πιθανότατα σχετίζεται με προβλήματα στο αποπτωτικό μονοπάτι, οδηγώντας σε αύξηση της διάρκειας ζωής των φλεγμονωδών κυττάρων (ηωσινοφίλων, ουδετεροφίλων) στους αεραγωγούς. Πολλές είναι οι μελέτες που υποστηρίζουν ότι μπορεί να ισχύει κάτι τέτοιο και ότι υπάρχουν πολλοί παράγοντες φλεγμονώδεις όπως είναι οι κυτοκίνες που έχουν την ικανότητα να αποσυντονίζουν το όλο αποπτωτικό μονοπάτι δρώντας σε διάφορα επιμέρους στοιχεία του και αναστέλλοντας τη δράση τους^(16,17). Εφόσον τα μιτοχόνδρια είναι άρρηκτα συνδεδεμένα με το μονοπάτι της απόπτωσης (μέσω της απελευθέρωσης και δράσης του κυτοχρώματος c-ενεργοποίηση καταρράκτη κασπασών), θα μπορούσαμε να θεωρήσουμε ότι κάποιο πρόβλημα στην απελευθέρωση και δράση του κυτοχρώματος c θα μπορούσε να παρεμποδίσει την όλη διαδικασία της απόπτωσης.

Άλλες έρευνες που πραγματοποιήθηκαν αποκάλυψαν ότι εξωγενείς παράγοντες πρόκλησης άσθματος έχουν την ικανότητα να προάγουν την απόπτωση των κυττάρων του επιθηλίου των βρόγχων, μέσω του μιτοχονδριακού μονοπατιού⁽⁴³⁾. Τέτοιοι παράγοντες δρουν είτε άμεσα είτε μέσω παραγωγής ελευθέρων ριζών, οδηγώντας σε απελευθέρωση του κυτοχρώματος c και ενεργοποιώντας το αποπτωτικό μονοπάτι μέσω της κασπάσης 9. Η απόπτωση των κυττάρων του επιθηλίου και η νέκρωση του επιθηλίου, αποτελούν κρίσιμους παράγοντες για την εμφάνιση του άσθματος. Επίσης κρίσιμο είναι και το γεγονός ότι οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να διεγείρουν την απόπτωση των κυττάρων του επιθηλίου. Μελέτες που έγιναν, αποκάλυψαν ότι οι αλλαγές στους αεραγωγούς που οφείλονταν στη νέκρωση του επιθηλίου, ήταν ανεξάρτητες από την IL-4 (προάγει τη διαφοροποίηση των T-λεμφοκυττάρων σε TH2 που προκαλούν οξειδωτικό στρες)⁽²⁰⁾. Αυτό αποδεικνύει ότι η απόπτωση προάγεται και άμεσα από τις ελεύθερες ρίζες χωρίς την παρέμβαση των T-λεμφοκυττάρων.

Μια παρατήρηση εξίσου μεγάλης σημασίας, είναι η αυξημένη βιογένεση των μιτοχονδρίων στα φλεγμονώδη κύτταρα ασθματικών ατόμων. Δεδομένου ότι τα μιτοχόνδρια πέρα από το μονοπάτι της απόπτωσης σχετίζονται και με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, θεωρήθηκε ότι θα μπορούσε ο αυξημένος αριθμός τους να οδηγεί σε πολλαπλασιασμό των φλεγμονωδών κυττάρων, κάτι που επίσης εντείνει τη φλεγμονή⁽²³⁾. Πιο συγκεκριμένα, βρέθηκε ότι στο λείο μυ των βρόγχων σε ασθματικούς, υπήρχαν μεταβολές στην ομοιοστάση του ασβεστίου με αποτέλεσμα την αυξημένη βιογένεση των μιτοχονδρίων. Ο αυξημένος αριθμός των μιτοχονδρίων, οδηγεί σε ενίσχυση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και προάγει τις χαρακτηριστικές για το άσθμα αλλαγές στους αεραγωγούς⁽²³⁾.

Τέλος, έχει ανακαλυφθεί ότι ο μεταβολισμός στο μιτοχόνδριο είναι απαραίτητος για τη διαφοροποίηση των δενδριτικών κυττάρων (τα κατεξοχήν αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα). Η διαφοροποίηση των κυττάρων αυτών, επάγεται από την έκθεση του οργανισμού σε κάποιο αλλεργιογόνο και συνοδεύεται από μορφολογικές αλλαγές σε αυτά τα κύτταρα, συμπεριλαμβανομένης της αύξησης στον αριθμό των μιτοχονδρίων. Τα δενδριτικά κύτταρα που λαμβάνονται από ζώα στα οποία είχε χορηγηθεί ένας αναστολέας της υπεραπόκρισης και φλεγμονής των αεραγωγών, παρατηρήθηκε μειωμένος αριθμός μιτοχονδρίων, υποδεικνύοντας μειωμένη λειτουργία και ικανότητα των δενδριτικών κυττάρων να διεγείρουν τον πολλαπλασιασμό των T-λεμφοκυττάρων⁽⁴⁵⁾.

Με βάση όλα τα πιο πάνω, καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι το μιτοχόνδριο θα μπορούσε να συνδεθεί με την εμφάνιση του άσθματος. Διαταραχές στην οξειδωτική φωσφορυλίωση που λαμβάνει χώρα στο μιτοχόνδριο, μπορούν να οδηγήσουν στην εμφάνιση των συμπτωμάτων του άσθματος λόγω της παραγωγής μεγάλων ποσοτήτων ελευθέρων ριζών που καταστρέφουν το επιθήλιο των αεραγωγών. Αναστολή της λειτουργίας του αποπτωτικού μονοπατιού^(16,17), το οποίο σχετίζεται άμεσα με το μιτοχόνδριο, προκαλεί παράταση της ζωής των φλεγμονωδών κυττάρων, κάτι που επίσης προάγει την εμφάνιση της κλινικής εικόνας του άσθματος. Επίσης επαγωγή του αποπτωτικού μονοπατιού από εξωγενείς παράγοντες⁽⁴³⁾, οδηγεί σε θάνατο των επιθηλιακών κυττάρων και νέκρωση του επιθηλίου. Τέλος και η σύνδεση του μιτοχονδρίου με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό μπορεί να συσχετιστεί με το άσθμα, αφού έχει βρεθεί σε περιπτώσεις άσθματος, τόσο αυξημένη βιογένεση των μιτοχονδρίων⁽²³⁾, όσο και αυξημένος πολλαπλασιασμός των κυττάρων της φλεγμονής. Με βάση την εμπλοκή του μιτοχονδρίου σε κρίσιμες λειτουργίες του οργανισμού όπως ο μεταβολισμός και η απόπτωση, των οποίων ο αποσυντονισμός θα μπορούσε αποδεδειγμένα να προκαλέσει την εμφάνιση του άσθματος, είναι απόλυτα λογικό να ανατρέξουμε τις αιτίες εμφάνισης της συγκεκριμένης πάθησης στο μιτοχόνδριο.

Μιτοχονδριακό Γονιδίωμα και Γενετική Άσθματος

Η μητρική κληρονομήση του άσθματος σε συνδυασμό με τη μεγάλη ποικιλομορφία που παρατηρείται στη γενετική της πάθησης ανάμεσα σε διαφορετικούς πληθυσμούς, μας υποδεικνύουν την πιθανή εμπλοκή του μιτοχονδριακού γονιδιώματος στο άσθμα. Το γεγονός ότι η ποικιλομορφία του μιτοχονδριακού γονιδιώματος, επηρεάζει το φαινότυπο του άσθματος, είναι άλλη μια απόδειξη της μητρικής κληρονομής της πάθησης και του κινδύνου εμφάνισης άσθματος σε περίπτωση ιστορικού άσθματος από τη μητέρα^(46,47). Η ποικιλομορφία στην αλληλουχία του μιτοχονδριακού γονιδιώματος, θεωρείται ότι εμπλέκεται στην παθογένεση του άσθματος. Αυτό υποστηρίζεται από το γεγονός ότι σε 654 ασθματικά παιδιά 9 διαφορετικών απλοομάδων, αυτά που ανήκαν στην απλοομάδα U παρουσίασαν αυξημένα επίπεδα αντισωμάτων IgE στον ορό του αίματος⁽²¹⁾.

Αρκετές μιτοχονδριακές μεταλλάξεις που ανιχνεύθηκαν, συσχετίστηκαν με διαφορετικές ασθένειες που έχουν όμως σαν κοινό παρονομαστή τη φλεγμονή. Δεκατρία (13) γονίδια, με διαφορεική έκφραση, ανιχνεύθηκαν σαν πιθανά γονίδια για την εμφάνιση του άσθματος. Εννέα (9) από αυτά τα γονίδια είναι μιτοχονδριακά γονίδια (γονίδια οξειδάσης του κυτοχρώματος II, III, NADH αφυδρογονάσης κ.λ.π) που σχετίζονται με το μεταβολισμό στο μιτοχόνδριο⁽⁴⁸⁾. Ένας πολυμορφισμός που συσχετίζεται με την προδιάθεση για εμφάνιση άσθματος, εντοπίστηκε στο γονίδιο του κυτοχρώματος b. Πρόκειται για τον πολυμορφισμό A930G, του οποίου η συσχέτιση με το άσθμα εξαρτάται και από το αν ο ασθενής είναι καπνιστής⁽⁴⁹⁾. Μια σπάνια μετάλλαξη, η A3243G στο γονίδιο tRNA^{Leu(UUR)} η οποία έχει αναφερθεί στο 75% των ασθενών με μιτοχονδριακή μυοπάθεια, εγκεφαλοπάθεια και σύνδρομο MELAS, παρουσιάστηκε επίσης σε ένα ασθενή με δερματοπάθεια, απώλεια ακοής, υπέρταση και άσθμα⁽⁵⁰⁾. Η ίδια μετάλλαξη εμφανίστηκε και σε ένα εννιάχρονο αγόρι, με χρόνια άσθμα και κατάθλιψη, το οποίο παρουσίαζε ανωμαλίες στα μιτοχόνδρια και μερική δυσλειτουργία σε ένζυμα της αναπνευστικής αλυσίδας⁽⁵¹⁾. Τέλος, παθήσεις του αναπνευστικού συστήματος, βρέθηκε να συσχετίζονται και με συγκεκριμένους μονονουκλεοτιδικούς πολυμορφισμούς στην υπερμεταβλητή περιοχή II του βρόγχου D του μιτοχονδριακού γονιδιώματος. Πρόκειται για μια περιοχή που παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της λειτουργίας του ανθρώπινου μιτοχονδριακού DNA⁽⁵²⁾.

2.6 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Ο σκοπός μας μέσα από την παρούσα εργασία, ήταν η ανίχνευση και ταυτοποίηση μεταλλάξεων στα μιτοχονδριακά γονίδια που κωδικοποιούν tRNA, σε μια ομάδα ασθενών με άσθμα, προκειμένου να ανακαλύψουμε αν υπάρχει κάποια συσχέτιση ανάμεσα σε τέτοιες μεταλλάξεις και τη συγκεκριμένη πάθηση. Το άσθμα είναι μια πάθηση πολύ κοινή στις σύγχρονες κοινωνίες, που προσβάλλει μεγάλο μέρος των πληθυσμών. Επειδή συνεχώς τα κρούσματα άσθματος αυξάνονται, κρίνεται κρίσιμο να κατανοήσουμε τις αιτίες εμφάνισης του, αλλά και τους μηχανισμούς που κρύβονται πίσω από την ανάπτυξη του, ώστε να μπορέσουμε να το αντιμετωπίσουμε όσο το δυνατό πιο αποτελεσματικά. Η μελέτη έγινε χρησιμοποιώντας δείγματα 26 ασθενών με άσθμα, είτε ήπιας είτε σοβαρής μορφής, από την Πνευμονολογική κλινική του ΠΠΝ Λάρισας. Παράλληλα με τους ασθενείς μελετήθηκε και ένα σύνολο από υγιή άτομα, ούτε ώστε να μας παρέχουν τη δυνατότητα σύγκρισης των αποτελεσμάτων, για να αποφανθούμε αν όντως υπάρχει συσχέτιση της πάθησης με τις μεταλλάξεις των μιτοχονδριακών tRNA γονιδίων. Τα γονίδια tRNA που επιλέξαμε να μελετήσουμε ήταν συνολικά 14 και περιλαμβάνονται σε 9 τμήματα μιτοχονδριακού DNA τα οποία ενισχύσαμε. Παράλληλα με τα γονίδια tRNA ενισχύθηκαν και παρακείμενα τμήματα τους τα οποία ήταν είτε κωδικά ή μη κωδικά. Τα γονίδια tRNA που μελετήθηκαν είναι: tRNA^{Thr}/tRNA^{Pro}, tRNA^{Ser(UCN)}/tRNA^{Asp}, tRNA^{Asn}/tRNA^{Cys}/tRNA^{Tyr}, tRNA^{Trp}/tRNA^{Ala}, tRNA^{Val}, tRNA^{Gly}, tRNA^{Phe}, tRNA^{Arg} και tRNA^{Glu}. Ενισχύθηκαν επίσης κωδικά τμήματα από τα: 12S rRNA, ND3 (υπομονάδα της αφυδρογονάσης), cyt b (κυτόχρωμα b) ενώ χαρακτηριστικό μη κωδικό τμήμα που ενισχύθηκε είναι το NC10, ανάμεσα στα γονίδια tRNA θρεονίνης και tRNA προλίνης και μέρος της D-θηλιάς του γονιδιώματος. Η όλη εργασία περιλαμβάνει την ενίσχυση των τμημάτων, την ανάλυση τους με τη μέθοδο SSCP και ακολούθως τη σύγκριση των προτύπων με πρότυπα φυσιολογικών δειγμάτων control. Δείγματα με διαφορετικά πρότυπα σε σχέση με τα φυσιολογικά, στέλλονται για αλληλούχιση προκειμένου να γίνει επιβεβαίωση της ύπαρξης μεταλλάξεων και ταυτοποίησης της θέσης τους.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 ΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΥΛΙΚΟ

Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκε ένα σύνολο 26 ασθενών που παρουσίαζαν βρογχικό άσθμα. Οι 15 από αυτούς παρουσίαζαν ήπιας έως μέτριας μορφής άσθμα, ενώ οι υπόλοιποι 11 παρουσίαζαν βαριά μορφή άσθματος. Παράλληλα με τους ασθενείς μελετήθηκε και ένα σύνολο 30 υγιών ατόμων από την ευρύτερη περιοχή του νομού Θεσσαλίας. Το βιολογικό υλικό το οποίο χρησιμοποιήθηκε ήταν ολικό αίμα στο οποίο είχε γίνει προσθήκη αντιπηκτικού. Όλα τα δείγματα ασθενών με άσθμα λήφθηκαν από την Πνευμονολογική Κλινική του ΠΠΝ Λάρισας. Όλα τα δείγματα παρέμειναν στη θερμοκρασία των -20°C μέχρι την εφαρμογή της διαδικασίας απομόνωσης του DNA.

Πίνακας 4: Οι 26 ασθενείς που συμπεριλήφθηκαν στη μελέτη.

Ασθενής	Αριθμός δείγματος	Μορφή Άσθματος
ΚΕ	51	Σοβαρό
ΤΔ	52	Ήπιο έως μέτριο
ΓΠ	53	Ήπιο έως μέτριο
ΝΒ	54	Σοβαρό
ΜΣ	55	Ήπιο έως μέτριο
ΤΒ	56	Σοβαρό
ΧΜ	57	Σοβαρό
ΒΒ	58	Ήπιο έως μέτριο
ΣΒ	59	Ήπιο έως μέτριο
ΤΑ	60	Σοβαρό
ΚΕ	61	Ήπιο έως μέτριο
ΚΓ	62	Σοβαρό
ΓΔ	63	Σοβαρό
ΜΜ	64	Ήπιο έως μέτριο
ΚΑ	65	Ήπιο έως μέτριο
ΓΘ	66	Ήπιο έως μέτριο
ΚΜ	67	Σοβαρό
ΠΕ	68	Ήπιο έως μέτριο
ΖΑ	69	Σοβαρό
ΘΦ	70	Σοβαρό
ΤΕ	71	Ήπιο έως μέτριο
ΒΕ	72	Ήπιο έως μέτριο
ΣΓ	73	Ήπιο έως μέτριο
ΠΕ	74	Ήπιο έως μέτριο
ΜΖ	75	Ήπιο έως μέτριο
ΣΑ	76	Σοβαρό

3.2 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA

Πρωταρχικό βήμα για τη μελέτη της ύπαρξης μεταλλάξεων σε γονιδιακό επίπεδο, είναι η απομόνωση του μιτοχονδριακού DNA από τα δείγματα ολικού αίματος. Απαραίτητα διαλύματα στο πρωτόκολλο απομόνωσης που χρησιμοποιήθηκε είναι τα ακόλουθα:

A. TE Buffer (100mL). Το συγκεκριμένο διάλυμα περιέχει:

- 10mM Tris pH 7.4 (0,5mL από 2M stock)
- 0,1mM EDTA pH 8.0 (20μL από 0,5M stock)
- dd-H₂O 99,5mL

Το Tris στο παραπάνω διάλυμα χρησιμεύει στη ρύθμιση του pH.

Το EDTA λειτουργεί σαν χηλικός παράγοντας, δεσμεύοντας τα κατιόντα Ca²⁺ και Mg²⁺ τα οποία απαιτούνται για τη δράση των νουκλεασών. Έτσι διασφαλίζεται η ακεραιότητα του DNA αφού αποτρέπεται η δράση των πιο πάνω ενζύμων.

Το νερό που χρησιμοποιείται στην παρασκευή του διαλύματος, είναι απαλλαγμένο από την παρουσία ιόντων.

Μετά την παρασκευή του το διάλυμα αποθηκεύεται στους 4⁰C.

B. Lysis Buffer (100mL και φτιάχνουμε aliquots του 1ml)

- 0,2M NaCl 1,17gr
- 0,025M EDTA pH 8 5ml από 0,5M stock
- 0,5% SDS 5ml από 10% stock
- 0,2M Tris pH 8.5 10ml από 2M stock
- dd-H₂O συμπλήρωση μέχρι τελικό όγκο 100ml

Στο παραπάνω διάλυμα:

Το NaCl συμβάλλει στη διάσπαση των κυτταρικών μεμβρανών.

Το δωδεκακυλοθειϊκό νάτριο (Sodium Dodecyl Sulfate: SDS) αποτελεί ένα ανιονικό απορρυπαντικό το οποίο διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη διάσπαση των μεμβρανών. Παράλληλα είναι σε θέση να προστατεύει το DNA από τη δράση των νουκλεασών, αποδιατάσσοντας τις (είναι δηλαδή και αποδιατακτικό πρωτεϊνών).

Μετά την παρασκευή του το Lysis Buffer αποθηκεύεται στους -20⁰C.

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για την απομόνωση του DNA είναι η εξής:

1. Αρχικά αναμιγνύουμε 100μL αίματος με 1ml διαλύματος TE σε eppendorf του 1,5ml.
2. Αφού ανακινήσουμε φυγοκεντρούμε για 10 δευτερόλεπτα στις 13000 στροφές.
3. Γίνεται απομάκρυνση του υπερκείμενου και το ίζημα επαναδιαλυτοποιείται σε 1ml TE.
4. Ανακινούμε και φυγοκεντρούμε για 10 δευτερόλεπτα στις 13000 στροφές.
5. Απομακρύνουμε το υπερκείμενο και το ίζημα διαλύεται ξανά σε 1ml TE.
6. Ανακινούμε και φυγοκεντρούμε εκ νέου στις 13000 στροφές.
7. Αφού απομακρύνουμε το υπερκείμενο, διαλύουμε ξανά το ίζημα σε 200μL Lysis Buffer, προσθέτοντας και 20μL πρωτεϊνάσης K (10mg/mL).
8. Ακολουθεί επώαση των δειγμάτων στους 56⁰C για 45 λεπτά και στη συνέχεια στους 95⁰C για 10 λεπτά. Η σύντομη θέρμανση στην υψηλή θερμοκρασία των

95°C έχει σαν σκοπό την απενεργοποίηση της πρωτεΐνάσης K.

9. Γίνεται προσθήκη 1mL παγωμένης αιθανόλης 100% (η αιθανόλη χάρη στη μεγάλη διηλεκτρική σταθερά της επιτρέπει την κατακρήμνιση μόνο του DNA) και αφήνουμε τα δείγματα όλη τη νύχτα (overnight) στους -20°C.

10. Την επόμενη μέρα, γίνεται φυγοκέντρηση των δειγμάτων στις 13000 στροφές, για 20 λεπτά, στους 4°C.

11. Γίνεται προσεκτικά απομάκρυνση του υπερκειμένου και το ίζημα τοποθετείται στους 37°C για 1 ώρα.

12. Προσθέτουμε 50μL dd-H₂O και αναδεύουμε ήπια σε vortex.

13. Τέλος πραγματοποιούμε ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πηκτή αγαρόζης 1%, που έχει σα σκοπό την ποιοτική ανίχνευση του μιτοχονδριακού DNA.

> Για την παρασκευή της **πηκτής αγαρόζης 1%** χρησιμοποιούνται τα ακόλουθα:

- 40mL TAE 1X*
- 0,3gr αγαρόζης
- 3μL βρωμιούχο αιθίδιο

Αρχικά ζυγίζουμε 0,3gr αγαρόζης και τα τοποθετούμε σε κωνική φιάλη των 100mL. Στη συνέχεια προσθέτουμε 40mL διαλύματος TAE και θερμαίνουμε το μίγμα σε φούρνο μικροκυμάτων για 1-2 λεπτά περίπου μέχρι η αγαρόζη να διαλυθεί πλήρως. Αφήνουμε το διάλυμα λίγα λεπτά στον απαγωγό ώστε να μειωθεί λίγο η θερμοκρασία του, όχι όμως να στερεοποιηθεί και έπειτα προσθέτουμε πολύ προσεκτικά 3μL βρωμιούχο αιθίδιο (είναι καλό να μην προσθέτουμε αμέσως μετά τη θέρμανση του μίγματος το βρωμιούχο αιθίδιο γιατί όταν το διάλυμα είναι πολύ ζεστό δημιουργούνται αναθυμιάσεις). Το βρωμιούχο αιθίδιο (BrEt) έχει την χαρακτηριστική ιδιότητα να παρεμβάλλεται ανάμεσα στις βάσεις του DNA και να φθορίζει στο υπεριώδες φως. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα να δίνει πρότυπα ζωνώσεων που αντιστοιχούν στην ποσότητα του DNA που έχει δεσμεύσει το βρωμιούχο αιθίδιο. Εφόσον γίνει προσθήκη του BrEt στο διάλυμα, αυτό μεταφέρεται σε κατάλληλη πλάκα οριζόντιας ηλεκτροφόρησης με τις κατάλληλες χτένες για το σχηματισμό των πηγαδιών. Απαιτούνται περίπου 20-30 λεπτά για την πλήρη πήξη του διαλύματος.

* Το TAE 1X αποτελεί ένα ρυθμιστικό διάλυμα το οποίο παρασκευάζεται από stock διάλυμα 50X. Αυτό επιτυγχάνεται με ανάμιξη 20mL 50X TAE με 980 mL dd-H₂O. Πιο συγκεκριμένα στα 500mL TAE περιέχονται:

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

Το TAE θα μπορούσε να αντικατασταθεί από TBE (όπου αντί για οξικό οξύ περιέχεται βορικό), ή διάλυμα που στη θέση του οξικού περιέχει φωσφορικό. Και τα δύο αυτά διαλύματα επιτυγχάνουν εξίσου καλό διαχωρισμό με το TAE και έχουν μάλιστα υψηλότερη ρυθμιστική ικανότητα. Ωστόσο στα πειράματά μας επιλέξαμε να χρησιμοποιήσουμε το διάλυμα TAE στις πηκτές αγαρόζης και το διάλυμα TBE στις πηκτές πολυακρυλαμιδίου των αναλύσεων SSCP.

Στη συσκευή ηλεκτροφόρησης προστίθεται επίσης διάλυμα TAE 1X σε τέτοια ποσότητα ώστε η πηκτή να είναι πλήρως βυθισμένη σε αυτό το διάλυμα. Έτσι είναι πλέον έτοιμη η συσκευή για τη φόρτωση του δείγματος. Για να φορτώσουμε αναμιγνύουμε με 5μL από το κάθε δείγμα μας 3μL loading buffer και έπειτα τα φορτώνουμε με προσοχή σε κάθε πηγαδάκι της πηκτής.

Το **loading buffer** (6X) 10mL που χρησιμοποιούμε περιέχει τα εξής:

- 1mL χρωστική μπλε της βρωμοφαινόλης
- 5mL γλυκερόλη
- 0,5mL TBE 20X
- 3,5mL dd-H₂O

Η γλυκερόλη που περιέχεται στο loading buffer είναι πολύ σημαντική για την καταβύθιση του DNA στα πηγαδάκια, εφόσον η πυκνότητα της είναι μεγαλύτερη από αυτή του νερού, καθιστώντας έτσι και τα μόρια του DNA βαρύτερα.

Η χρωστική (συνήθως χρώματος μπλε) καθιστά τα δείγματα που πρόκειται να φορτώσουμε ορατά, κάτι που επίσης διευκολύνει την τοποθέτηση τους στα πηγαδάκια.

Η τάση που εφαρμόζουμε στη συσκευή ηλεκτροφόρησης είναι 100V. Αφήνουμε τα δείγματα να τρέξουν μέχρι να ολοκληρωθούν περίπου τα 2/3 της διαδρομής, κάτι που απαιτεί περίπου 20-30 λεπτά. Στο τέλος απομακρύνουμε την πηκτή από τη συσκευή και την παρατηρούμε σε υπεριώδες φως (UV). Τα δείγματα εκείνα που μας δίνουν ζωνώσεις όταν τα παρατηρήσουμε στο υπεριώδες, είναι αυτά τα οποία περιέχουν DNA και κατ' επέκταση αυτά που θα χρησιμοποιήσουμε στη συνέχεια για την αντίδραση της PCR.

3.3 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)

3.3.1 Γενικά για την PCR

Η ιδέα της δημιουργίας πολλαπλών αντιγράφων ενός συγκεκριμένου μορίου DNA, χρησιμοποιώντας μια DNA πολυμεράση και ολιγονουκλεοτιδικούς εκκινήτες, είχε διατυπωθεί για πρώτη φορά ήδη από το 1971. Ωστόσο υπήρχαν τότε αρκετοί περιορισμοί που δεν επέτρεπαν την εφαρμογή μιας τέτοιας ιδέας με μεγάλη ευκολία, όπως το μεγάλο κόστος και η δυσκολία στο σχεδιασμό ολιγονουκλεοτιδίων, η μη διαθεσιμότητα θερμοανθεκτικών πολυμερασών καθώς και η έλλειψη αυτοματοποιημένων θερμοκυκλοποιητών. Η τεχνική της PCR (Polymerase Chain Reaction), ήταν αυτή που υλοποίησε τελικά την πιο πάνω ιδέα και άρχισε να εφαρμόζεται περίπου από το 1984. Εμπνευστής της ήταν ο βιοχημικός Kary Mullis ο οποίος μερικά χρόνια αργότερα (1993), κέρδισε νόμπελ για αυτή του την ανακάλυψη. Σήμερα η τεχνική της PCR αποτελεί μια από τις πιο χρήσιμες τεχνικές και ένα απαραίτητο εργαλείο της μοριακής βιολογίας. Τα παλιότερα προβλήματα αντιμετωπίστηκαν, εφόσον πλέον υπάρχουν εύκολες μέθοδοι για την παρασκευή των ολιγονουκλεοτιδίων, έγινε ανακάλυψη θερμοανθεκτικών DNA πολυμερασών (όπως η Taq) και υπάρχουν αυτοματοποιημένοι θερμοκυκλοποιητές. Κατ' αυτό τον τρόπο η PCR εξελίχθηκε σε μια πολύ γρήγορη, εύκολη και αυτοματοποιημένη τεχνική με μεγάλη ευαισθησία. Χρησιμοποιείται είτε μόνη της για την ενίσχυση μορίων DNA, είτε σε συνδυασμό με μεγάλο αριθμό άλλων τεχνικών όπως είναι χαρακτηριστικά η πέψη με περιοριστικά ένζυμα ή ο πολυμορφισμός διαμόρφωσης μονόκλωνης αλυσίδας (SSCP). Το όνομα της συγκεκριμένης τεχνικής οφείλεται στο συστατικό που

χρησιμοποιείται για την ενίσχυση ενός τμήματος DNA, που δεν είναι άλλο από το ένζυμο DNA πολυμεράση. Η αντίδραση PCR είναι πολύ γρήγορη, επιτρέποντας έτσι τη δημιουργία εκατομμυρίων αντιγράφων μιας δεδομένης αλληλουχίας DNA σε περίπου 2 ώρες. Έτσι σε πολύ μικρό χρονικό διάστημα μπορούμε να έχουμε επαρκή ποσότητα DNA, που μπορεί να χρησιμοποιηθεί ποικιλοτρόπως όπως για παράδειγμα για την ανάλυση της αλληλουχίας του, για ανίχνευση πολυμορφισμών, ή ακόμα και για κλωνοποίηση. Η DNA πολυμεράση που χρησιμοποιείται σήμερα ευρέως στην PCR είναι η Taq πολυμεράση. Το συγκεκριμένο ένζυμο απομονώθηκε από ένα θερμοφίλο βακτήριο, το *Thermus aquaticus* με αποτέλεσμα να διατηρεί τη δραστηριότητα του σε πολύ υψηλές θερμοκρασίες (έως και 100°C), στις οποίες τα περισσότερα ένζυμα είναι αδρανή. Έτσι το ένζυμο αυτό, μπορεί να δράσει στα υποστρώματα DNA τα οποία έχουν αποδιαταχθεί εφαρμόζοντας υψηλές θερμοκρασίες (περίπου 95°C) και να επιμηκύνει τις πολυνουκλεοτιδικές αλυσίδες. Χάρη στην ανθεκτικότητα του ενζύμου δεν χρειάζεται ανανέωση του μετά από κάθε κύκλο της αντίδρασης και επομένως μπορούν να γίνουν με το ίδιο ένζυμο πολλοί διαδοχικοί κύκλοι της αντίδρασης πολυμερισμού. Η δυνατότητα της PCR να πολλαπλασιάζει μια δεδομένη αλληλουχία DNA δίνοντας μας πολλά αντίγραφα της, μας επιτρέπει να εντοπίσουμε γονίδια τα οποία βρίσκονται ακόμη και σε ένα μόνο ή λίγα αντίγραφα από ένα σύνολο αλληλουχιών και να τα ενισχύσουμε.

Η λειτουργία της τεχνικής PCR στηρίζεται στη χρήση μιας μικρής μόνο ποσότητας γενετικού υλικού, που αποτελεί το μόριο στόχο προκειμένου να συντεθεί στη συνέχεια ένας μεγάλος αριθμός πανομοιότυπων με αυτό, μορίων. Για να επιτευχθεί η σύνθεση των μορίων DNA, είναι απαραίτητη η παρουσία ειδικών ολιγονουκλεοτιδικών μορίων που ονομάζονται εκκινητές (primers). Τα μόρια αυτά αποτελούνται από μια μονόκλωνη αλυσίδα συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων και έχουν μήκος μόλις 15-28 ζεύγη βάσεων. Λόγω της μονόκλωνης διαμόρφωσης και του μικρού τους μεγέθους, τα μόρια αυτά είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα στις συνήθεις θερμοκρασίες. Εφόσον γίνει η αποδιάταξη του δίκλωνου μορίου DNA, ακολουθεί η προσκόλληση των μορίων των εκκινητών σε κάθε μια από τις αποδιαταγμένες αλυσίδες. Στη συνέχεια η DNA πολυμεράση ξεκινά να προσθέτει νουκλεοτίδια αρχίζοντας από το άκρο του κάθε εκκινητή, επιμηκύνοντας κατ' αυτό τον τρόπο τις αλυσίδες. Για τον πολυμερισμό των αλυσίδων, εκτός από το ένζυμο Taq πολυμεράση, είναι απαραίτητο να περιλαμβάνονται στο μίγμα της αντίδρασης και το ειδικό ρυθμιστικό διάλυμα της Taq, διάλυμα MgCl₂ καθώς και διάλυμα dNTPs.

3.3.2 Διαδικασία της PCR-στάδια

Η αντίδραση της PCR μπορεί να διαχωριστεί σε τρία βασικά στάδια:

i. Αποδιάταξη

Έχει σα σκοπό τη διάσπαση του δίκλωνου μορίου του DNA στόχου στις δύο μονόκλωνες αλυσίδες από τις οποίες αποτελείται. Κάθε μια από αυτές τις αλυσίδες θα λειτουργήσει στη συνέχεια σα μήτρα για τη σύνθεση της συμπληρωματικής της, με αποτέλεσμα από κάθε ένα μόριο DNA να προκύπτουν δύο θυγατρικά. Κάθε θυγατρικό μόριο θα αποτελείται από μια νεοσυντιθέμενη αλυσίδα και από μια πατρική αλυσίδα (ημισυντηρητική αντιγραφή του DNA). Για την αποδιάταξη του δίκλωνου DNA εφαρμόζονται υψηλές θερμοκρασίες περίπου 94-95°C. Συνήθως αρκούν 30 δευτερόλεπτα για την ολική αποδιάταξη του DNA σε κάθε κύκλο αντίδρασης. Στην περίπτωση που η αλληλουχία που θέλουμε να ενισχύσουμε έχει υψηλή περιεκτικότητα σε G+C, τότε ίσως χρειαστεί υψηλότερη θερμοκρασία για την αποδιάταξη (Τα ζεύγη G-C συγκρατούνται με 3 δεσμούς

υδρογόνου και επομένως απαιτούν περισσότερη ενέργεια για τη διάσπαση τους από ότι τα ζεύγη A-T που συνδέονται με 2 δεσμούς υδρογόνου). Σημαντικό είναι ωστόσο να μη διαρκεί η θέρμανση περισσότερο χρόνο από όσο χρειάζεται γιατί μπορεί να οδηγήσει στην απενεργοποίηση του ενζύμου.

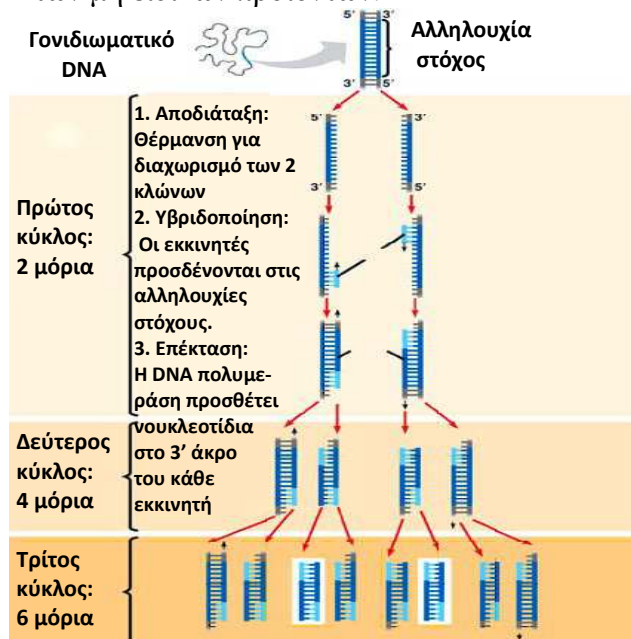
ii. Υβριδοποίηση των εκκινητών

Στην υβριδοποίηση οι εκκινητές συνδέονται (υβριδοποιούνται) με τις αποδιαταγμένες αλυσίδες του DNA, στα σημεία εκείνα που η αλληλουχία του μορίου στόχου είναι συμπληρωματική με εκείνη του εκκινητή. Η θερμοκρασία και ο χρόνος της υβριδοποίησης εξαρτώνται από τη συγκέντρωση των εκκινητών, καθώς επίσης και από το μήκος και την αλληλουχία των βάσεων τους. Συνήθως οι θερμοκρασίες που δίνουν τα καλύτερα αποτελέσματα είναι μεταξύ 55⁰C και 65⁰C. Σημαντικό είναι ότι όσο αυξάνεται η θερμοκρασία της υβριδοποίησης, τόσο αυξάνεται και η ειδικότητα του τελικού προϊόντος που λαμβάνουμε, γιατί με αυτό τον τρόπο περιορίζεται η σύνδεση των εκκινητών στις περιοχές της αλληλουχίας με τη μέγιστη συμπληρωματικότητα.

iii. Επέκταση των εκκινητών (πολυμερισμός)

Εφόσον έχει γίνει ήδη η υβριδοποίηση των εκκινητών, η DNA πολυμεράση ξεκινάει σε αυτό το σημείο να συνθέτει DNA αρχίζοντας από το τέλος του κάθε εκκινητή. Η σύνθεση επιτυγχάνεται με προσθήκη νουκλεοτιδίων από την Taq πολυμεράση η οποία χρησιμοποιεί την κάθε αποδιατεταγμένη αλυσίδα του DNA σα μήτρα για τη σύνθεση της συμπληρωματικής της. Έτσι δημιουργούνται τα δίκλινα θυγατρικά μόρια DNA που είναι πανομοιότυπα με το DNA στόχο. Η επέκταση γίνεται συνήθως σε θερμοκρασία 72⁰C. Η συγκεκριμένη θερμοκρασία επιτρέπει μεν στο ένζυμο να προσθέτει νουκλεοτίδια με ικανοποιητική ταχύτητα (35-100 νουκλεοτίδια/δευτερόλεπτο), αποτρέπει όμως την προσκόλληση επιπλέον εκκινητών και συνεπώς τη δημιουργία μη ειδικών μορίων.

Τα 3 πιο πάνω στάδια επαναλαμβάνονται σε κάθε κύκλο της αντίδρασης. Η αντίδραση είναι εκθετική. Έτσι από ένα μόριο DNA μετά από 30 κύκλους αντίδρασης, παίρνουμε 2³⁰ μόρια. Ο αριθμός των κύκλων της PCR εξαρτάται από την αρχική συγκέντρωση του DNA στόχου. Όσο πιο μικρή η αρχική συγκέντρωση, τόσο πιο πολλοί πρέπει να είναι οι κύκλοι. Ωστόσο αν γίνουν περισσότεροι κύκλοι από όσοι χρειάζονται υπάρχει κίνδυνος να αυξηθεί ο αριθμός των μη ειδικών προϊόντων.



Εικόνα 12: Σχηματική αναπαράσταση της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης. Διακρίνονται τα 3 κύρια στάδια: αποδιάταξη, υβριδοποίηση, επέκταση. Η αντίδραση είναι εκθετική, ώστε μετά την ολοκλήρωση 30 κύκλων να έχουν παραχθεί συνολικά 2³⁰ μόρια DNA.

Στην παρούσα μελέτη ενισχύθηκαν 9 τμήματα μιτοχονδριακού DNA που συνολικά περιελάμβαναν 14 γονίδια tRNA. Κατ' επέκταση χρησιμοποιήσαμε 9 διαφορετικά ζεύγη εκκινητών. Τα γονίδια tRNA τα οποία ενισχύθηκαν είναι τα ακόλουθα: tRNA Θρεονίνη-tRNA Προλίνη (τμήμα μήκους 212bp), tRNA Ασπαραγίνη- tRNA Κυστεΐνη-tRNA Τυροσίνη (τμήμα μήκους 249bp), tRNA Σερίνη UCN – tRNA Ασπαρτικό (τμήμα μήκους 229bp), tRNA Τρυπτοφάνη-tRNA Αλανίνη (τμήμα μήκους 242bp), tRNA Βαλίνη (τμήμα μήκους 140bp), tRNA Φαινυλαλανίνη (τμήμα μήκους 252bp), tRNA Γλουταμικό (τμήμα μήκους 122bp), tRNA Αργινίνη (τμήμα μήκους 227bp) και tRNA Γλυκίνη (τμήμα μήκους 224bp). Ο σχεδιασμός των εκκινητών έγινε με τέτοιο τρόπο ώστε πέρα από τα επιθυμητά γονίδια να ενισχύονται και μικρά τμήματα παρακείμενων γονιδίων ή ακόμα και μη κωδικοποιών περιοχών. Αυτός είναι και ο λόγος που τα τμήματα που ενισχύθηκαν έχουν ως επί το πλείστον μεγαλύτερο μέγεθος από αυτό των tRNA γονιδίων. Τα 9 ζεύγη εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για κάθε τμήμα DNA παρουσιάζονται στη συνέχεια (πίνακας 5). Οι αντιδράσεις PCR για την ενίσχυση των πιο πάνω γονιδίων, ήταν αντιδράσεις με τελικό όγκο 50mL. Για μια τέτοια αντίδραση χρησιμοποιούνται τα εξής:

▪ DNA (περίπου 200ng)	2-3μL
▪ 50pmol από κάθε primer (RV-FW)	1μL+1μL
▪ 800μM dNTPs (από 40mM)	1μL
▪ 2mM MgCl ₂ (από 50mM)	2μL
▪ 1X PCR Buffer (από 10X)	5μL
▪ 1U Taq πολυμεράση (5U/μL)	0,2μL
▪ dd-H ₂ O μέχρι συμπλήρωση 50μL	+ 37-38μL
	<u>50μL</u>

Σε κάθε αντίδραση PCR φροντίζουμε να έχουμε και ένα μάρτυρα (blank), ο οποίος περιέχει όλα τα παραπάνω εκτός από το DNA στόχο. Η παρουσία του μάρτυρα είναι σημαντική εφόσον είναι ο μοναδικός τρόπος να ξέρουμε ότι δεν έχουμε ενίσχυση μη ειδικών προϊόντων.

Οι συνθήκες που εφαρμόσαμε για την ενίσχυση των tRNA γονιδίων ήταν οι ακόλουθες:

1. Αρχική αποδιάταξη	95 ⁰ C για 4min
2. Αποδιάταξη	95 ⁰ C για 30sec
3. Υβριδοποίηση εκκινητών	50 ⁰ C για 40sec
4. Πολυμερισμός	72 ⁰ C για 40sec
5. Τελικό στάδιο πολυμερισμού	72 ⁰ C για 10min

Τα στάδια 2 μέχρι 4 επαναλαμβάνονται 35 φορές. Πραγματοποιούνται δηλαδή 35 κύκλοι της αντίδρασης PCR. Η αντίδραση πραγματοποιείται σε ειδικούς αυτοματοποιημένους αναλυτές, γνωστούς σα θερμοκυκλοποιητές. Οι συγκεκριμένες συσκευές επιτρέπουν τη γρήγορη και ακριβή αυξομείωση της θερμοκρασίας, ανάλογα με τις απαιτήσεις του κάθε σταδίου της αντίδρασης. Συνολικά μια αντίδραση PCR διαρκεί περίπου 2 ώρες.

Οι παραπάνω συνθήκες δε διατηρήθηκαν απόλυτα αναλλοίωτες σε όλα τα γονίδια. Υπήρξαν περιπτώσεις όπως χαρακτηριστικά στα γονίδια tRNA Arg, tRNA Gly, tRNA Phe, που χρειάστηκε να αυξηθεί κατά 2-3⁰C η θερμοκρασία υβριδοποίησης των εκκινητών ούτως ώστε να αυξηθεί και η ειδικότητα των προϊόντων που λαμβάναμε. Είναι πολύ σημαντικό ότι η αύξηση της θερμοκρασίας υβριδοποίησης σε μια αντίδραση PCR μπορεί να αυξήσει και την ειδικότητα της, εφόσον ο εκκινητής προσκολλάται μόνο στις αλληλουχίες με τις οποίες παρουσιάζει μέγιστη συμπληρωματικότητα. Εντούτοις θα πρέπει να δοθεί ιδιαίτερη προσοχή στις θερμοκρασίες που επιλέγονται, γιατί σε πολύ υψηλές θερμοκρασίες (πάνω από

την T_m), μειώνεται το ποσοστό των μορίων του εκκινητή που υβριδοποιούνται και υπάρχει ο κίνδυνος να μην ενισχυθεί ούτε καν το επιθυμητό τμήμα. Σε αντίθετη περίπτωση, δηλαδή σε χαμηλές θερμοκρασίες υβριδοποίησης, ο εκκινητής προσδένεται και σε μη επιθυμητές αλληλουχίες, γιατί μειώνεται η ειδικότητα του.

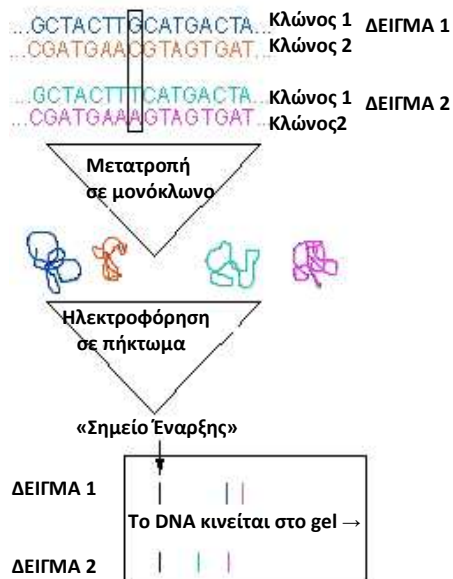
Πίνακας 5: Παρουσιάζονται οι αλληλουχίες των εκκινητών (*primers*), που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση των 14 γονιδίων tRNA, που είχε σα σκοπό την περαιτέρω ανάλυση με τη μέθοδο SSCP. Οι εκκινητές επιλέγονται πάντα με βάση συγκεκριμένα κριτήρια ώστε να ενισχύονται τα τμήματα της επιλογής μας και να αποφεύγεται η ενίσχυση ανεπιθύμητων τμημάτων DNA (παραπροϊόντα). Βασικά κριτήρια για την επιλογή των εκκινητών είναι: να έχουν μήκος 17-28nt, να έχουν παραπλήσιες τιμές T_m , η περιεκτικότητα τους σε GC να είναι περίπου 50-60%, να μην έχουν συμπληρωματικά 3' άκρα ή συνεχόμενες αλληλουχίες πολυπουρινών ή πολυπυριμιδινών (σχηματισμός διμερών μορφών και παραπροϊόντων) και να μη διαθέτουν παλίνδρομες περιοχές.

tRNA's	Primers	Νουκλεοτιδική Θέση	Μήκος (bp)
Thr/Pro	FW Primer 5'-3' CTAATACCAACTATCTCCCT RV Primer 5'-3' ACCCAAATCTGCTTCCCAT	(FW 15839-15858) (RV 16050-16031)	212
Asn/Cys/Tyr	FW Primer 5'-3' CAATGGGACTTAAACCCACAA RV Primer 5'-3' GCGAACATCAGTGGGGGTGA	(FW 5663-5683) (RV 5911-5892)	249
Gly	FW Primer 5'-3' CCATCTATTGATGAGGGTCT RV Primer 5'-3' GGATATAGGGTCCAAGCCGCA	(FW 9970-9989) (RV 10193-10173)	224
Phe	FW Primer 5'-3' CAGCACACACACACCGCTGC RV Primer 5'-3' GAGCTGCATTGCTGCGTGCT	(FW 511-530) (RV 780-761)	252
Val	FW Primer 5'-3' GTACTGGAAAGTGCACCTGG RV Primer 5'-3' GGTTGTCTGGTAGTAAGG	(FW 1576-1595) (RV 1715-1698)	140
Ser (UCN)/Asp	FW Primer 5'-3' ATTCGAAGAACCCGTATACA RV Primer 5'-3' GCTCTTCTATGATAGGGGAA	(FW 7415-7434) (RV 7643-7624)	229
Trp/Ala	FW Primer 5'-3' CGCTACTCCTACCTATCTCC RV Primer 5'-3' TTAGGGTGCTTAGCTGTTAAC	(FW 5470-5489) (RV 5711-5691)	242
Arg	FW Primer 5'-3' GCCCTACAAACAACCTAACCT RV Primer 5'-3' AGTGAGATGGTAAATGCTAG	(FW 10290-10309) (RV 10516-10497)	227
Glu	FW Primer 5'-3' CCCACACTCAACAGAAACA RV Primer 5'-3' TTGCGTATTGGGGTCATTG	(FW 14642-14660) (RV 14763-14745)	122

Εφόσον ολοκληρωθεί η αντίδραση της PCR, θα πρέπει να ελέγξουμε αν έχει γίνει επιτυχής ενίσχυση, ώστε να μπορούμε να προχωρήσουμε σε περαιτέρω ανάλυση των προϊόντων. Ο έλεγχος αυτός επιτυγχάνεται με ηλεκτροφόρηση των PCR προϊόντων σε πήκτωμα αγαρόζης 2% (0,6gr αγαρόζη+ 40mL TAE). Η όλη διαδικασία ηλεκτροφόρησης είναι όμοια με την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων απομόνωσης. Σημαντικό είναι ότι στην περίπτωση της ηλεκτροφόρησης των PCR προϊόντων έχουμε και την παρουσία του μάρτυρα (blank). Τα δείγματα που δίνουν θετικό αποτέλεσμα ενίσχυσης, είναι αυτά στα οποία ανιχνεύονται ζωνώσεις όταν δούμε το πήκτωμα στο UV. Στο μάρτυρα θα πρέπει να μην έχουμε ανίχνευση ζωνώσεων ώστε να είμαστε σίγουροι ότι ενισχύθηκαν μόνο ειδικά προϊόντα.

3.4 ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥ ΔΙΑΜΟΡΦΩΣΗΣ ΜΟΝΟΚΛΩΝΗΣ ΑΛΥΣΙΔΑΣ (SSCP)

Η ανάλυση πολυμορφισμού διαμόρφωσης μονόκλωνης αλυσίδας (Single Stranded Conformation Polymorphism) είναι μια πολύ βασική μέθοδος της μοριακής βιολογίας για τον έλεγχο ύπαρξης μεταλλάξεων και γενικότερα πολυμορφισμών στο γενετικό υλικό. Είναι μια φθηνή, αξιόπιστη και ευαίσθητη μέθοδος που μας δίνει τη δυνατότητα προσδιορισμού διαφορών σε αλληλουχίες DNA. Αρχή της συγκεκριμένης μεθόδου είναι ο ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός μονόκλωνων νουκλεϊκών οξέων με βάση μικρές διαφορές στην αλληλουχία τους. Πιο συγκεκριμένα από υλικό το οποίο έχει πολλαπλασιαστεί με PCR σχηματίζονται μονόκλωνα DNA μόρια, τα οποία διαχωρίζονται σε πήκτωμα βάσει των διαφορών στην κινητικότητα τους. Ενώ η κινητικότητα δίκλωνων μορίων DNA σε πήκτωμα εξαρτάται από το μήκος και το μέγεθος τους και είναι ανεξάρτητη από τη νουκλεοτιδική τους αλληλουχία, στην περίπτωση που έχουμε μονόκλωνα μόρια, δεν ισχύει το ίδιο. Στις μονόκλωνες αλυσίδες, ακόμη και αλλαγή μιας μόνο βάσης σε ένα σύνολο εκατοντάδων βάσεων, μπορεί να επηρεάσει την κινητικότητα του μορίου DNA. Αυτό συμβαίνει εξαιτίας της ασταθούς φύσης των μονόκλωνων αλυσίδων DNA, οι οποίες όταν απουσιάζει ο συμπληρωματικός τους κλώνος είναι σε θέση να σχηματίζουν ενδομοριακούς δεσμούς ανάμεσα σε τμήματα της ίδιας αλυσίδας. Αυτό οδηγεί στη δημιουργία βρόγχων και αναδιπλώσεων που δίνουν στη μονόκλωνη αλυσίδα μια μοναδική διαμόρφωση και κατ' επέκταση τριτοταγή δομή. Δηλαδή η διαμόρφωση του κάθε κλώνου θα διαφέρει ελαφρώς ανάλογα με την ακριβή αλληλουχία του και αυτές οι αλλαγές στη διαμόρφωση οδηγούν σε διαφορές στην κινητικότητα στο πήκτωμα. Έτσι λοιπόν η τεχνική SSCP εκμεταλλεύεται τη συγκεκριμένη ιδιότητα και επιτυγχάνει τον ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό μονόκλωνων αλυσίδων νουκλεϊκών οξέων. Κάτω από βέλτιστες συνθήκες, με SSCP μπορούμε να ανιχνεύσουμε μέχρι και 80% των διαφορών της αλληλουχίας. Η ευαισθησία της τεχνικής εξαρτάται από την αναλογία μεγέθους των κλασμάτων ssDNA. Ωστόσο με κατάλληλη τροποποίηση των συνθηκών, όπως η θερμοκρασία, η σύνθεση ρυθμιστικού διαλύματος και πηκτώματος καθώς και οι συνθήκες στις οποίες τρέχουν τα δείγματα μπορούμε να λάβουμε τις απαραίτητες πληροφορίες για τις διαφορές στην αλληλουχία των δειγμάτων.



Εικόνα 13: Σχηματική αναπαράσταση της ανάλυσης SSCP. Εφόσον γίνει η αντίδραση PCR και ενισχυθούν οι αλληλουχίες DNA που θέλουμε να ελέγξουμε, πραγματοποιούμε αποδιάταξη των μορίων DNA μετατρέποντας τα σε μονόκλινα. Στη μονόκλινη μορφή τους ανάλογα με την ακριβή αλληλουχία τους αποκτούν μια μοναδική διαμόρφωση και συνεπώς μια χαρακτηριστική κινητικότητα στο πήκτωμα. Έτσι μπορούμε να δούμε αν οι υπό εξέταση αλληλουχίες είναι όμοιες ή αν παρουσιάζουν πολυμορφισμούς.

3.4.1 Προετοιμασία των προϊόντων PCR

Για την πραγματοποίηση της μεθόδου SSCP και την ανίχνευση πολυμορφισμών μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε μόνο τα προϊόντα της PCR τα οποία παρουσίασαν χαρακτηριστικές ζωνώσεις στην ηλεκτροφόρηση (αυτά δηλαδή που ενισχύθηκαν). Από κάθε ένα από τα ενισχυμένα προϊόντα λαμβάνουμε 5μL και τα μεταφέρουμε σε eppendorf που περιέχει 10μL από το ειδικό αποδιατακτικό διάλυμα (denaturation buffer) το οποίο περιέχει τα ακόλουθα (ανά 3mL):

- 95% φορμαμίδιο (2,85mL)
- 20mM EDTA
- 10mM NaOH
- 0,05% κυανούν του ξυλενίου (1,5μL)
- 0,05% μπλε της βρωμοφαινόλης (1,5μL)

Στη συνέχεια τοποθετούμε τα δείγματα στο θερμοκυκλοποιητή στο ειδικό πρόγραμμα αποδιάταξης των δίκλωνων μορίων (denature). Οι συνθήκες για την πλήρη αποδιάταξη των μορίων DNA είναι οι ακόλουθες: 2 λεπτά στους 92°C, 2 λεπτά στους 95°C και 7 λεπτά στους 97°C. Πριν ακόμη ολοκληρωθεί το έβδομο λεπτό του τελευταίου σταδίου απομακρύνουμε τα δείγματα από τη συσκευή και τα τοποθετούμε γρήγορα σε πάγο. Ο πάγος είναι απαραίτητος ώστε να αποτρέψουμε την επανασύνδεση των συμπληρωματικών αλυσίδων του DNA και να τις διατηρήσουμε στη μονόκλινη τους διαμόρφωση. Αμέσως μετά φορτώνουμε τα δείγματα σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου, το οποίο είναι ήδη έτοιμο όταν ολοκληρωθεί η αποδιάταξη στο θερμοκυκλοποιητή.

3.4.2 Παρασκευή πηκτώματος πολυακρυλαμιδίου

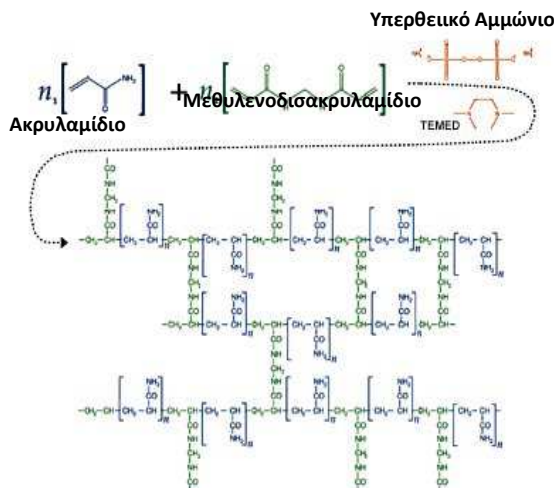
Πολύ σημαντικό πριν προχωρήσουμε στην παρασκευή του πηκτώματος, είναι να έχουμε αποφασίσει ποια είναι η κατάλληλη συγκέντρωση για τις αλληλουχίες DNA που θέλουμε να τρέξουμε. Τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα πηκτώματα είναι αυτά που έχουν συγκεντρώσεις από 8% έως 12%. Γενικά ισχύει ότι όσο μικρότερο σε μήκος είναι το τμήμα της μονόκλωνης αλυσίδας που θέλουμε να μελετήσουμε, τόσο πιο μεγάλη θα πρέπει να είναι η πυκνότητα του πηκτώματος, για την καλύτερη δυνατή ανάγνωση των αποτελεσμάτων. Στην παρούσα εργασία τα τμήματα DNA τα οποία εξετάστηκαν είχαν μήκος από 122 έως 252bp γι' αυτό και σαν κατάλληλη συγκέντρωση, επιλέγηκε η συγκέντρωση 10% πολυακρυλαμιδίου, εφόσον ήταν αυτή που έδινε τη βέλτιστη ανάγνωση των αποτελεσμάτων.

Για 125mL (2 gel) με πυκνότητα 10%, χρησιμοποιούμε τις εξής ποσότητες των αντιδραστηρίων:

- 12,375gr Ακρυλαμίδιο
- 0,33gr Δις-ακρυλαμίδιο
- 10mL TBE 10X
- 12,5mL Γλυκερόλη 50%
- 125μL TEMED
- 600μL APS 20%

>Αρχικά μεταφέρουμε σε ποτήρι ζέσεως την κατάλληλη ποσότητα του ακρυλαμιδίου και δις-ακρυλαμιδίου και εφόσον προσθέσουμε dd-H₂O μέχρι περίπου την ένδειξη των 80mL, τοποθετούμε το ποτήρι σε μαγνητικό αναδευτήρα (stirrer). Προσθέτουμε το TBE και τη γλυκερόλη και αφήνουμε στον αναδευτήρα μέχρι να διαλυθεί πλήρως το ακρυλαμίδιο και να δώσει ένα διαυγές διάλυμα. Στη συνέχεια το διάλυμα διηθείται και συμπληρώνουμε με dd-H₂O μέχρι να συμπληρωθεί ο όγκος των 125mL. Τέλος προσθέτουμε το TEMED και το APS, ανακινούμε και μεταφέρουμε γρήγορα στα ειδικά τζαμάκια της συσκευής κάθετης ηλεκτροφόρησης για να πήξει το διάλυμα και να μας δώσει τα πηκτώματα.

Η δημιουργία των πηκτωμάτων του πολυακρυλαμιδίου, στηρίζεται στον πολυμερισμό του ακρυλαμιδίου και του N,N'-μεθυλένο-δις ακρυλαμιδίου. Η έναρξη της αντίδρασης πολυμερισμού γίνεται με την προσθήκη υπερθειικού αμμωνίου (APS: ammonium persulfate). Το APS όταν διαλυθεί στο νερό έχει την ικανότητα να δημιουργεί ελεύθερες ρίζες ($S_2O_8^{2-} \rightarrow 2 SO_4^{\bullet-}$). Οι ρίζες αυτές, μαζί με τη N,N'-τετραμεθυλοαιθυλενοδιαμίνη (TEMED), που λειτουργεί σα φωτοχημικός καταλύτης (εξαιτίας της ικανότητας του να υφίσταται στη μορφή ελεύθερης ρίζας), διαδίδονται στο σύστημα πολυμερισμού. Πιο συγκεκριμένα οι ελεύθερες ρίζες ενεργοποιούν τα μονομερή ακρυλαμιδίου προάγοντας την αντίδραση τους με άλλα μόρια ακρυλαμιδίου και οδηγώντας τελικά στο σχηματισμό μακρών αλυσίδων. Αυτός ο πολυμερισμός έχει ουσιαστικά σαν αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός τρισδιάστατου δικτύου, στο οποίο οι αλυσίδες διασυνδέονται μέσω του N,N'-μεθυλένο-δις-ακρυλαμιδίου. Η αντίδραση πολυμερισμού παρουσιάζεται στην εικόνα 14.



Εικόνα 14: Αντίδραση πολυμερισμού του ακρυλαμίδιου. Οι αλυσίδες που δημιουργούνται από την ένωση μορίων ακρυλαμίδιου συνδέονται μεταξύ τους μέσω μεθυλενο-δισ-ακρυλαμίδιου.

Η τιμή του pH του διαλύματος καθορίζεται από την παρουσία του ρυθμιστικού διαλύματος TBE ενώ η προσθήκη της γλυκερόλης στο διάλυμα, ελαττώνει την τιμή αυτή αυξάνοντας την ευαισθησία της ανάλυσης. Κατ' αυτό τον τρόπο τα αποτελέσματα είναι πιο ευδιάκριτα.

Εφόσον δημιουργηθεί το πήκτωμα (για να πήξει το δ/μα χρειάζονται περίπου 30 λεπτά), αφαιρούμε τα χτενάκια και καθαρίζουμε τα πηγαδάκια με βελόνα ώστε να μην υπάρχουν μέσα σε αυτά ακαθαρσίες ή κομμάτια από πήκτωμα. Έπειτα μεταφέρουμε τα τζαμάκια σε ειδική συσκευή κάθετης ηλεκτροφόρησης. Η συσκευή περιέχει ρυθμιστικό διάλυμα TBE 0,5X (100mL TBE 10X +1900mL H₂O). Αφού ολοκληρωθεί και η αποδιάταξη των προϊόντων της PCR, φορτώνουμε τα δείγματα στα πηγαδάκια και ενεργοποιούμε τη συσκευή. Η τάση που εφαρμόζουμε είναι 220V. Τα δείγματα αφήνονται να τρέξουν για 22 ώρες (overnight), σε θερμοκρασία 4⁰C (στο ψυγείο). Προκειμένου να είναι εφικτή η ανάγνωση των αποτελεσμάτων πρέπει να ακολουθήσει χρώση των πηκτωμάτων. Η χρώση μπορεί να γίνει είτε χρησιμοποιώντας βρωμιούχο αιθίδιο, είτε με νιτρικό άργυρο (AgNO₃). Στα πειράματα μας χρησιμοποιήσαμε AgNO₃ (Silver Staining).

3.4.3 Χρώση νιτρικού αργύρου (Silver Staining)

Για τη χρώση νιτρικού αργύρου είναι απαραίτητα 3 διαλύματα τα οποία χρησιμοποιούνται διαδοχικά. Τα διαλύματα είναι τα ακόλουθα (για 2 gel):

Διάλυμα 1: 800mL dd-H₂O + 20mL Et100% + 1mL CH₃COOH

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

Διάλυμα 3: 6gr NaOH + 0,02gr NaBH₄ + 2mL HCHO +dd-H₂O έως 400mL

Αρχικά χρησιμοποιούμε 200mL από το διάλυμα 1 σε κάθε ένα από τα gel και αφήνουμε για 3min. Στη συνέχεια απομακρύνουμε και ξεπλένουμε με dd-H₂O. Ακολούθως προσθέτουμε εκ νέου 200mL από το διάλυμα 1 σε κάθε gel και αφήνουμε πάλι για 3min. Τέλος απομακρύνουμε και ξεπλένουμε πάλι με dd-H₂O.

200mL από το διάλυμα 2 προστίθενται σε κάθε ένα από τα gel και αφήνουμε για 20min. Με το πέρας των 20min απομακρύνουμε το διάλυμα 2 και ξεπλένουμε 2 φορές με dd-H₂O.

Τέλος 200mL από το διάλυμα 3 προστίθενται σε κάθε gel και αφήνουμε μέχρι την εμφάνιση χρώματος. Έπειτα απομακρύνουμε το διάλυμα και ξεπλένουμε με νερό.

Αφού ολοκληρωθεί και η χρώση είμαστε πλέον σε θέση να διαβάσουμε τα αποτελέσματα και να δούμε κατά πόσο τα δείγματα μας παρουσιάζουν το ίδιο πρότυπο στο πήκτωμα ή όχι (και συνεπώς αν οι αλληλουχίες είναι ίδιες ή διαφέρουν).

3.5 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ DNA (sequencing)

Μετά τη σύγκριση όλων των δειγμάτων στα πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου, επιλέξαμε όσα δείγματα εμφάνισαν διαφορετικά πρότυπα σε σχέση με εκείνα των φυσιολογικών ατόμων (control). Αυτά τα δείγματα μετά από κατάλληλο καθαρισμό, ώστε να περιέχεται σε αυτά μόνο καθαρό DNA χωρίς οποιεσδήποτε προσμίξεις, στάλθηκαν για ανάλυση της αλληλουχίας τους (sequencing).

3.5.1 Καθαρισμός των PCR προϊόντων

Τα δείγματα τα οποία παρουσίασαν διαφορετικά πρότυπα σε σχέση με τα φυσιολογικά, είναι αυτά τα οποία πρέπει να σταλούν για ανάλυση της αλληλουχίας τους προκειμένου να ξέρουμε ποια είναι η ακριβής τους αλληλουχία και συγκρίνοντας τη με τη φυσιολογική αλληλουχία να δούμε ποια είναι τα διαφορετικά νουκλεοτίδια (εάν όντως υπάρχουν διαφορές). Προτού όμως σταλούν τα ενισχυμένα προϊόντα για αλληλούχιση θα πρέπει να γίνει ο καθαρισμός τους. Ο καθαρισμός αποσκοπεί στην απομάκρυνση οποιουδήποτε άλλου μορίου πέραν του ενισχυμένου προϊόντος. Αυτό μπορεί να αφορά εκκινητές (ελεύθερους ή ακόμη και διμερισμένους), νουκλεοτίδια, μόρια πολυμεράσης, άλατα τα οποία μπορεί να βρίσκονται μέσα στο διάλυμα μαζί με τα προϊόντα της PCR. Για την επίτευξη του καθαρισμού ο οποίος γίνεται με χρήση στηλών QIAquick Spin ακολουθήσαμε το εξής πρωτόκολλο:

1. Τοποθέτηση στηλών QIAquick Spin μέσα σε eppendorf (1,5mL).
2. Μέσα στις στήλες, μεταφέρουμε 50μL από κάθε PCR προϊόν και έπειτα προσθέτουμε 250μL διαλύματος συλλογής (capture buffer).
3. Φυγοκεντρούμε για ένα λεπτό στις 13000 στροφές. Αυτό το στάδιο έχει σαν αποτέλεσμα την προσκόλληση των επιθυμητών αλληλουχιών πάνω στη στήλη.
4. Απομακρύνουμε το έκλουσμα και γίνεται επανατοποθέτηση της στήλης στον ίδιο σωλήνα συλλογής (eppendorf).
5. Ακολουθεί προσθήκη 750μL διαλύματος πλύσης (wash buffer) και γίνεται φυγοκέντρωση για 1 λεπτό στις 13.000 rpm.
6. Απομακρύνουμε και πάλι το έκλουσμα και οι στήλες επανατοποθετούνται στα eppendorf. Ακολουθεί εκ νέου φυγοκέντρωση στις 13.000 rpm. Η φυγοκέντρωση σε αυτό το σημείο κρίνεται απαραίτητη, ώστε να γίνει πλήρης απομάκρυνση από τη στήλη, της αιθανόλης που περιέχεται στο διάλυμα πλύσης.
7. Οι στήλες QIAquick Spin, τοποθετούνται στη συνέχεια σε αποστειρωμένα eppendorf των 1,5mL.
8. Γίνεται προσθήκη 50μL διαλύματος έκλυσης (elution buffer), ακολουθεί επώαση των δειγμάτων για 1 λεπτό.
9. Τέλος, πραγματοποιείται φυγοκέντρωση για 1,5 λεπτό.

Επόμενο βήμα, είναι ο προσδιορισμός της ποσότητας του PCR προϊόντος του κάθε δείγματος (στα eppendorf). Αυτό γίνεται είτε ποσοτικά, με φωτόμετρο (1μL προϊόντος και 49μL dd-H₂O) είτε ποιοτικά με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 2%. Θεωρούνται σαν ικανοποιητικές, όσον αφορά την ποσότητα του DNA, οι ενδείξεις φωτομέτρου που είναι γύρω στα 100ng/μL.

Το DNA, αποστέλλεται στερεή μορφή (ίζημα) και όχι σε διάλυμα προκειμένου να γίνει η αλληλούχιση. Ως εκ τούτου είναι απαραίτητη η κατακρήμνιση του, κάτι το οποίο επιτυγχάνεται χρησιμοποιώντας αιθανόλη και CH_3COONa (sodium acetate). Για ποσότητα δείγματος 50μL, γίνεται προσθήκη 500μL Et και 5μL CH_3COONa . Τα δείγματα θα πρέπει να παραμείνουν overnight στους -20°C και την επόμενη μέρα, γίνεται φυγοκέντρωση τους στις 13.000 στροφές, για 20 λεπτά, στους 4°C . Μετά τη φυγοκέντρωση γίνεται με προσοχή, απομάκρυνση του υπερκείμενου και ακολούθως το ίζημα τοποθετείται στους 37°C για 1 ώρα. Τέλος είναι σημαντικό ότι για την αλληλούχιση θα πρέπει να αποσταλούν και οι primers που χρησιμοποιήθηκαν στην αντίδραση ενίσχυσης. Η συγκέντρωση των primers που απαιτείται για την αλληλούχιση είναι 5pmol/μL. Επειδή εμείς χρησιμοποιούμε τη δεκαπλάσια συγκέντρωση, προτού στείλουμε τους primers πραγματοποιούμε μια αραίωση 1/10 σε τελικό όγκο 40μL (4μL primer + 36μL H_2O).

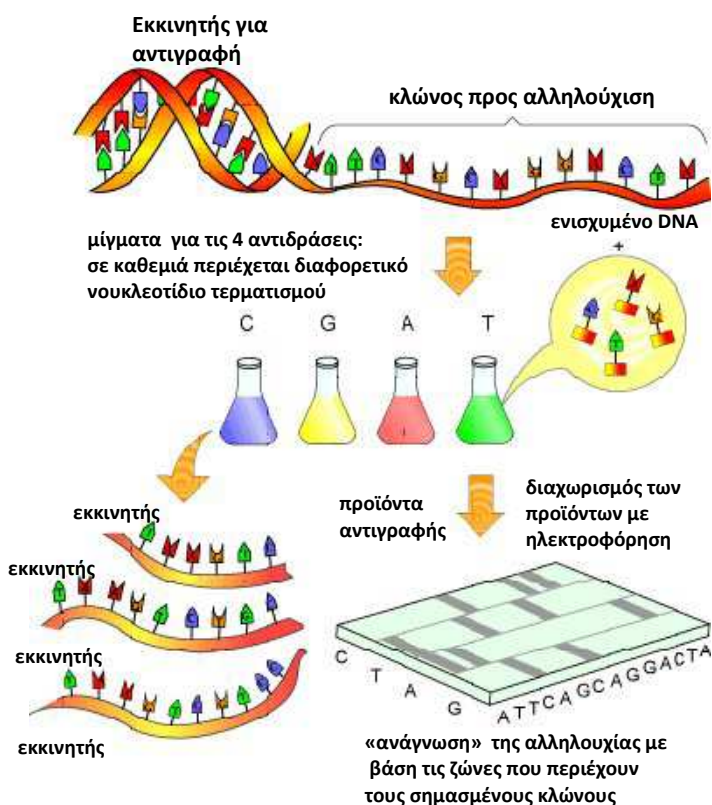
3.5.2 Μέθοδος Sanger

Η κύρια μέθοδος αλληλούχισης η οποία εφαρμόζεται σήμερα, είναι η μέθοδος Sanger και οφείλει την ονομασία της στον επιστήμονα που την επινόησε, τον Frederick Sanger. Πρόκειται για την πλέον πάγια τεχνική, για τον προσδιορισμό των αλληλουχιών DNA και στηρίζεται στη χρήση τριφωσφορικών 2',3'-διδεοξυνουκλεοτιδίων (ddNTPs), τα οποία όταν ενσωματωθούν στην αναπτυσσόμενη αλυσίδα του DNA, προκαλούν τερματισμό της επιμήκυνσης της. Πιο συγκεκριμένα, τα ddNTP έχουν την ικανότητα να ενσωματώνονται φυσιολογικά σε μια αλυσίδα DNA κατά τη σύνθεση της, μέσω των 5' φωσφορικών τους ομάδων. Ωστόσο, δε διαθέτουν 3' υδροξυλική ομάδα, με αποτέλεσμα να μην μπορούν να σχηματίσουν φωσφοδιεστερικό δεσμό με το επόμενο νουκλεοτιδικό κατάλοιπο που θα προστεθεί στην επιμηκνόμενη αλυσίδα. Ως εκ τούτου, η ενσωμάτωση ενός ddNTP σε μια αντιγραφόμενη αλυσίδα DNA προκαλεί τερματισμό της επιμήκυνσης της στο σημείο εισαγωγής του συγκεκριμένου ddNTP. Έτσι λοιπόν αν σε μια *in vitro* αντίδραση αντιγραφής ενός μορίου, προστεθεί στο μίγμα της αντίδρασης μαζί με τα 4 dNTP που χρειάζονται για να συντεθεί το DNA από την πολυμεράση, μικρή ποσότητα ενός ddNTP, τότε θα προκύψουν πολλές διαφορετικού μήκους αλυσίδες που θα έχουν τερματιστεί ειδικά στο σημείο ενσωμάτωσης του ddNTP. Επομένως για κάθε μόριο DNA που θέλουμε να αλληλουχηθεί, πραγματοποιούμε 4 ξεχωριστές αντιδράσεις, χρησιμοποιώντας σε καθεμιά ένα διαφορετικό από τα 4 ddNTPs (ATP, GTP, CTP, TTP). Σε κάθε αντίδραση, συμμετέχει ο ένας εκ των δύο κλώνων του μορίου που θα αλληλουχηθεί (ο οποίος χρησιμοποιείται σα μήτρα για τη σύνθεση του συμπληρωματικού του), ένας εκκινητής συμπληρωματικός προς το 3' άκρο της μήτρας, DNA πολυμεράση, τα 4 φυσιολογικά dNTPs και μια καλά προσδιορισμένη ποσότητα από ένα συγκεκριμένο ddNTP. Επίσης χρησιμοποιείται μικρή ποσότητα από ένα ή περισσότερα ραδιοσημασμένα dNTPs ώστε να μπορεί να γίνει ανίχνευση των παραγόμενων τμημάτων με αυτοραδιογραφία. Ιδιαίτερη προσοχή δίνεται στο λόγο dNTP:ddNTP, ώστε να παράγεται μια σειρά από τμήματα DNA διαφορετικών μηκών, που μπορεί να φτάνουν μέχρι και μερικές χιλιάδες βάσεις, και το καθένα τους να τερματίζει σε μια συγκεκριμένη βάση. Σαν αποτέλεσμα, σε κάθε αντίδραση προκύπτουν πολλές διαφορετικού μήκους αλυσίδες DNA για τις οποίες γνωρίζουμε πού έχουν τερματιστεί, με βάση το ddNTP που έχουμε χρησιμοποιήσει στη δεδομένη αντίδραση. Ακολούθως γίνεται ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης, ούτως ώστε να διαχωριστούν τα τμήματα DNA με βάση το μέγεθος τους. Τα διαφορετικού μεγέθους τμήματα ανιχνεύονται μέσω αυτοραδιογραφίας, όπου κάθε τμήμα που είναι προϊόν τερματισμού αλυσίδας εμφανίζεται σα μια σκούρα ζώνη. Έτσι μπορεί πλέον να γίνει ανάγνωση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας. Γνωρίζοντας ότι τα μικρότερα τμήματα DNA

κινούνται πιο γρήγορα κατά την ηλεκτροφόρηση, θεωρούμε ότι η ζώνη στη βάση του ηλεκτρόδου είναι αυτή που αντιστοιχεί στο πρώτο νουκλεοτίδιο που έχει ενσωματωθεί κατά την αντίδραση Sanger.

3.5.3 Φθορίζουσα ταυτοποίηση της αλληλουχίας DNA

Ένα ακόμη σημαντικό βήμα προόδου στον τομέα της αλληλούχισης DNA, έγινε όταν οι Michael Hunkapiller και Leroy Hood ανέπτυξαν μια μέθοδο σήμανσης του κάθε ddNTP με χρωστική διαφορετικού χρώματος. Έτσι πλέον χρησιμοποιείται ευρέως μια τροποποιημένη μορφή της αντίδρασης Sanger, η οποία στηρίζεται στη χρήση ddNTPs τα οποία είναι σημασμένα με διαφορετικές φθοροχρωστικές. Η συγκεκριμένη μέθοδος έχει σα βασικό της πλεονέκτημα το γεγονός ότι πλέον η διαδικασία αλληλούχισης μπορεί να πραγματοποιηθεί σε μια και μόνο αντίδραση, χωρίς να απαιτούνται οι τέσσερις μεμονωμένες αντιδράσεις της μεθόδου Sanger. Εφόσον διαφορετικού χρώματος φθορίζουσες χρωστικές είναι ενσωματωμένες σε κάθε ddNTP, αυτό σημαίνει ότι μπορούμε να προσδιορίσουμε το συγκεκριμένο ddNTP στο οποίο τερματίζει ένα τμήμα DNA με βάση το χρώμα που αποδίδεται από τη διέγερση της χρωστικής. Έτσι και τα τέσσερα προϊόντα της αντίδρασης μπορούν να ηλεκτροφορηθούν στο ίδιο αποδιατακτικό πήκτωμα. Στη συνέχεια το κάθε προϊόν που έχει ενσωματωμένη διαφορετική χρωστική, διεγείρεται με λέιζερ και η χρωστική εκπέμπει ακτινοβολία συγκεκριμένου μήκους κύματος και συνεπώς συγκεκριμένου χρώματος. Ακολούθως χρησιμοποιείται ένα σύστημα περίθλασης το οποίο διαχωρίζει τις εκπομπές των κυμάτων, που ανιχνεύονται από μια συσκευή ανίχνευσης. Τελικά οι αλληλουχίες αποκωδικοποιούνται από ένα υπολογιστή. Οι αλληλουχίες που μπορούν να αναλυθούν με τη συγκεκριμένη μέθοδο, φτάνουν σε μήκος έως και 1.000 bp. Βασικά πλεονεκτήματα της συγκεκριμένης μεθόδου αλληλούχισης είναι η ταχύτητα, η μεγαλύτερη ευκολία στην πραγματοποίηση της (εφόσον γίνεται σε μια μόνο αντίδραση) καθώς και η μεγάλο βαθμού αυτοματοποίηση της (χρησιμοποιούνται αυτοματοποιημένες συσκευές που πλέον ως επί το πλείστον βασίζονται στη χρήση τριχοειδών σωληναρίων αντί ηλεκτροφόρων).



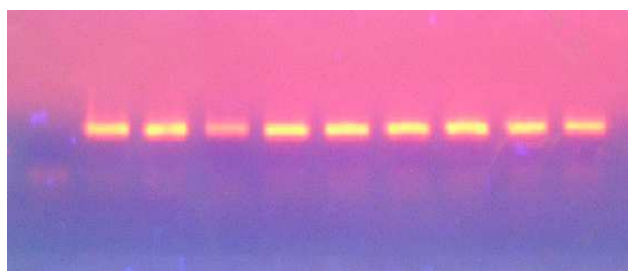
Εικόνα 15: Σχηματική αναπαράσταση της μεθόδου Sanger. Μονόκλωνο DNA της υπό προσδιορισμό αλληλουχίας ενιχέται σε 4 διαφορετικές αντιδράσεις, σε καθεμία από τις οποίες περιέχεται διαφορετικό ddNTP. Από κάθε αντίδραση προκύπτουν διαφορετικού μήκους αλυσίδες DNA που έχουν τερματιστεί στο ειδικό ddNTP που χρησιμοποιήθηκε. Τα τμήματα DNA που παράγονται, διαχωρίζονται σε πήκτωμα με ηλεκτροφόρηση και τελικά η αλληλουχία διαβάζεται μετά από αυτοραδιογραφία ή διέγερση με λέιζερ και χρήση υπολογιστή.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

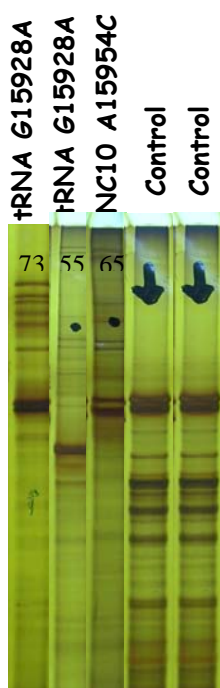
Με την ολοκλήρωση των πειραμάτων και έπειτα από την ανάλυση των αποτελεσμάτων, διαπιστώθηκε ότι ανάμεσα στα 26 δείγματα των ασθενών με άσθμα που εξετάστηκαν, υπήρχαν 6 μεταλλάξεις. Πιο συγκεκριμένα οι μεταλλάξεις αυτές εντοπίστηκαν στα γονίδια $tRNA^{Thr}$, $tRNA^{Phe}$, $tRNA^{Arg}$, 12S rRNA, ND3 και στο μη κωδικό τμήμα MT-NC10. Καμιά μετάλλαξη δεν εντοπίστηκε στα γονίδια των $tRNA^{Asp/tRNA^{Cys/tRNA^{Tyr}}$, $tRNA^{Gly}$, $tRNA^{Val}$, $tRNA^{Ser/tRNA^{Asp}}$, $tRNA^{Trp/tRNA^{Ala}}$ και $tRNA^{Glu}$. Ανάμεσα στα δείγματα των υγιών ατόμων, παρουσιάστηκαν συνολικά 11 μεταλλάξεις. Οι μεταλλάξεις αυτές ανιχνεύθηκαν στα γονίδια $tRNA^{Thr}$, $tRNA^{Gly}$, $tRNA^{Asp}$, *cytB*, ND3 καθώς και στο μη κωδικό τμήμα D-θηλιάς (D-loop). Στη συνέχεια παρουσιάζονται αναλυτικότερα τα γονίδια που φέρουν τις μεταλλάξεις στους ασθματικούς ασθενείς.

4.1 ΓΟΝΙΔΙΑ $tRNA^{Thr/tRNA^{Pro}}$

Το τμήμα το οποίο ενισχύθηκε και το οποίο περιλαμβάνει τα γονίδια $tRNA$ θρεονίνης (Thr) και $tRNA$ προλίνης (Pro) είναι ένα τμήμα μήκους 212bp (15839-16050bp του μιτοχondριακού γονιδιώματος). Στο τμήμα αυτό εντοπίστηκαν 2 μεταλλάξεις. Πρόκειται για τη μετάλλαξη G15928A στο γονίδιο $tRNA^{Thr}$, η οποία βρέθηκε σε 2 ασθενείς και τη μετάλλαξη A15954C, στο μη κωδικό τμήμα MT-NC10 η οποία βρέθηκε σε ένα ασθενή.

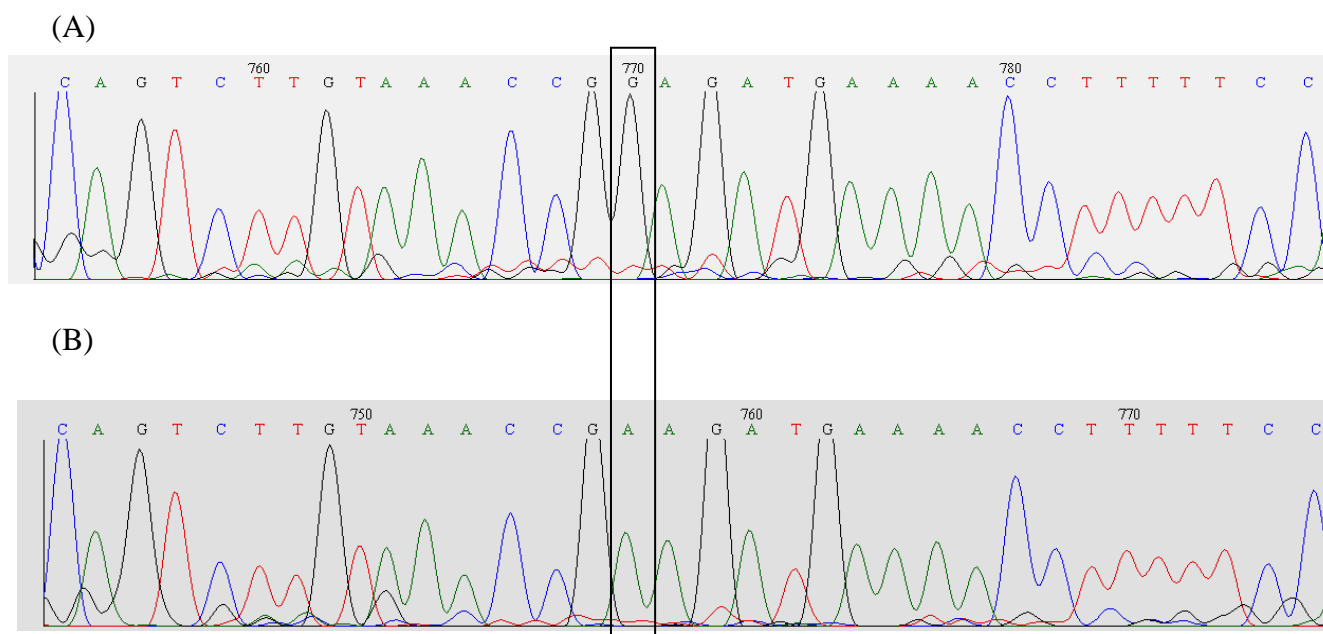


Εικόνα 15: Απεικόνιση της ηλεκτροφόρησης PCR προϊόντων σε πήκτωμα αγαρόζης για επιβεβαίωση της ενίσχυσης τους. Οι φωτεινές ζώνες αντιστοιχούν στα προϊόντα ενίσχυσης, ενώ το πρώτο πηγαδάκι από αριστερά είναι το τυφλό.



Εικόνα 16: Απεικόνιση των 3 διαφορετικών προτύπων μετά από ανάλυση που έγινε με τη μέθοδο SSCP για το ενισχυμένο τμήμα που περιλαμβάνει τα γονίδια $tRNA$ θρεονίνης και προλίνης. Όπως φαίνεται στην εικόνα, τα 3 δείγματα στα οποία η αλληλούχιση που ακολούθησε αποκάλυψε διαφορές, σε σχέση με την αλληλουχία $tRNA$ των φυσιολογικών δειγμάτων, παρουσιάζουν διαφορετικά πρότυπα όταν συγκρίνονται με δείγματα control. Τα δείγματα τα οποία παρουσιάζουν τα διαφορετικά πρότυπα, είναι τα 73, 55, και 65.

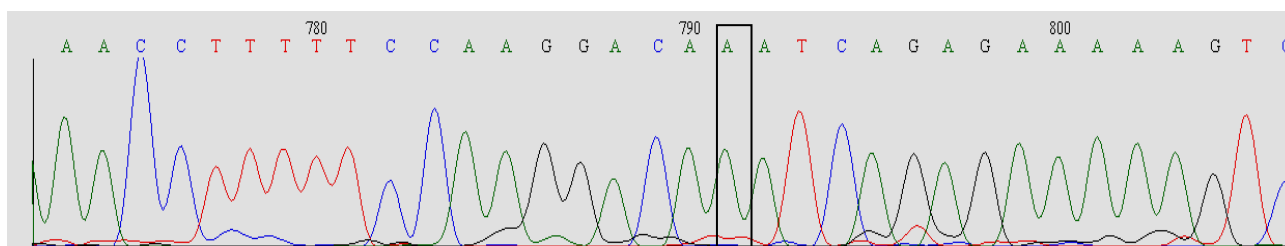
- Με τη χρήση των προγραμμάτων BIOEDIT 7.0 και CLUSTALX 1.8, πραγματοποιήθηκε στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων της αλληλούχισης. Με το πρόγραμμα BIOEDIT επιτυγχάνεται η «ανάγνωση» της αλληλουχίας του κάθε γονιδίου το οποίο ενισχύσαμε και το οποίο λόγω εμφάνισης διαφορετικού προτύπου μετά από πραγματοποίηση SSCP, κρίναμε ότι έπρεπε να σταλεί για αλληλούχιση. Η αλληλουχία βρίσκεται υπό μορφή χρωματογραφήματος, όπου σε κάθε κορυφή αντιστοιχεί και μια βάση της αλληλουχίας. Έτσι χρησιμοποιώντας το BIOEDIT η αλληλουχία «διαβάζεται» και κατόπιν μπορεί να συγκριθεί με το αντιστοιχο χρωματογράφημα μιας πρότυπης αλληλουχίας η οποία δεν φέρει καμιά μεταλλαγή, δίνοντας μας τη δυνατότητα να εντοπίσουμε τυχόν διαφορές ανάμεσα στις δύο αλληλουχίες. Αυτό μας επιτρέπει να εντοπίσουμε στην υπό εξέταση αλληλουχία σημειακές αντικαταστάσεις καθώς και προσθήκη ή έλλειψη βάσεων, στηριζόμενοι στις διαφορές στις κορυφές των δύο αλληλουχιών. Με το πρόγραμμα CLUSTALX μπορούμε να επιτελέσουμε πολλαπλή ομοπαράθεση της υπό εξέταση αλληλουχίας με μια πρότυπη αλληλουχία. Κατ' αυτό τον τρόπο, μπορούμε να δούμε αν ανάμεσα στις δύο αλληλουχίες υπάρχουν όντως διαφορές και έτσι να επιβεβαιώσουμε την ορθότητα των αποτελεσμάτων στα οποία καταλήξαμε χρησιμοποιώντας το BIOEDIT.
- Πιο κάτω παρουσιάζονται τα χρωματογραφήματα των δειγμάτων που είχαν σταλεί για αλληλούχιση, σε σύγκριση με το χρωματογράφημα μιας πρότυπης αλληλουχίας. Τρία δείγματα παρουσίασαν διαφορές στην αλληλουχία τους σε σχέση με την πρότυπη αλληλουχία του τμήματος που περιλαμβάνει τα γονίδια tRNA Thr/tRNA^{Pro}. Τα δύο δείγματα είχαν ακριβώς την ίδια αλλαγή, μια αντικατάσταση βάσης εντός του γονιδίου tRNA θρεονίνης, ενώ το τρίτο παρουσίασε μια αντικατάσταση βάσης που βρίσκεται στο όριο ανάμεσα στα δύο γονίδια tRNA Thr/tRNA^{Pro} (MT-NC10).



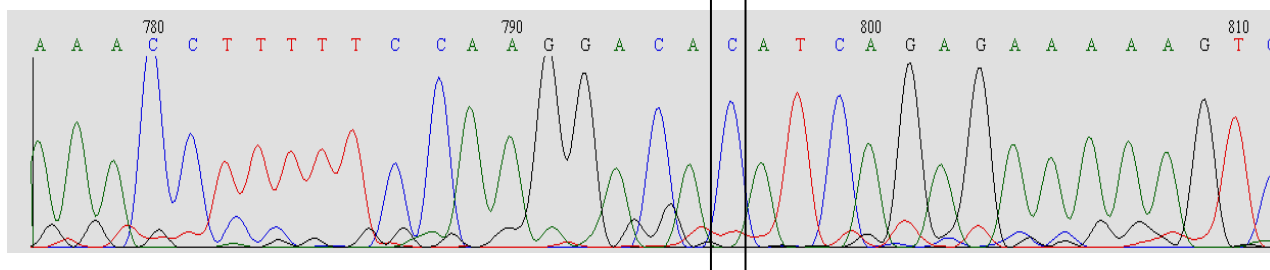
Εικόνα 17: Χρωματογράφημα από sequencing ενός τμήματος του γονιδίου tRNA θρεονίνης (tRNA^{Thr}) σε ένα άτομο control (A) και σε ένα άτομο με άσθμα (B). Δύο ήταν τα δείγματα που παρουσίασαν αυτή τη διαφορά στην αλληλουχία, το δείγμα 55 και το 73. Στο χρωματογράφημα του ασθενούς είναι εμφανής η μετάπτωση G σε A στη θέση 15928.

- Η μετάλλαξη στην αλληλουχία του γονιδίου tRNA^{Thr} στους δύο ασθενείς (**G15928A**), είναι μια αντικατάσταση βάσης η οποία βρίσκεται στο στέλεχος του αντικωδικονίου (ζεύγος βάσεων C27:G43) στο μόριο tRNA.

(A)



(B)



Εικόνα 18: Χρωματογράφημα από sequencing, τμήματος το οποίο περιλαμβάνει μέρος και από τα δύο γονίδια $tRNA^{Thr}/tRNA^{Pro}$ (κοντά στο όριο γονιδίων $tRNA^{Thr}/tRNA^{Pro}$). Στο (A) έχουμε το άτομο control και στο (B) τον ασθενή (δείγμα 65). Είναι εμφανής η μεταστροφή της A σε C στη θέση 15954 (στο μη κωδικό τμήμα MT-NC10)

- Η αλλαγή η οποία εντοπίστηκε στην αλληλουχία του ασθενή, στο όριο των γονιδίων $tRNA$ θρεονίνης- $tRNA$ προλίνης (**A15954C**), είναι μια μετάλλαξη του μη κωδικού τμήματος MT-NC10..

Στον επόμενο πίνακα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των μελετών μας για το τμήμα που περιλαμβάνει τα δύο γονίδια $tRNA^{Thr}/tRNA^{Pro}$, καθώς και τα αντίστοιχα δείγματα στα οποία βρέθηκαν οι μεταλλάξεις.

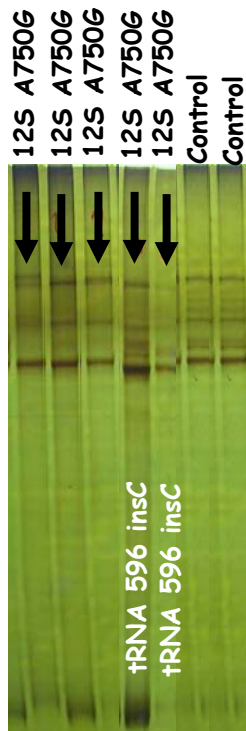
Ασθενείς	Μεταλλάξεις
No 55	$tRNA^{Thr}$ G15928A
No 73	$tRNA^{Thr}$ G15928A
No 65	NC10 A15954C

Πίνακας 6: Στον πίνακα παρουσιάζεται η μετάλλαξη στο γονίδιο $tRNA^{Thr}$ που βρέθηκε σε δύο ασθενείς και η μετάλλαξη στο MT-NC10 που παρουσιάστηκε σε ένα ασθενή.

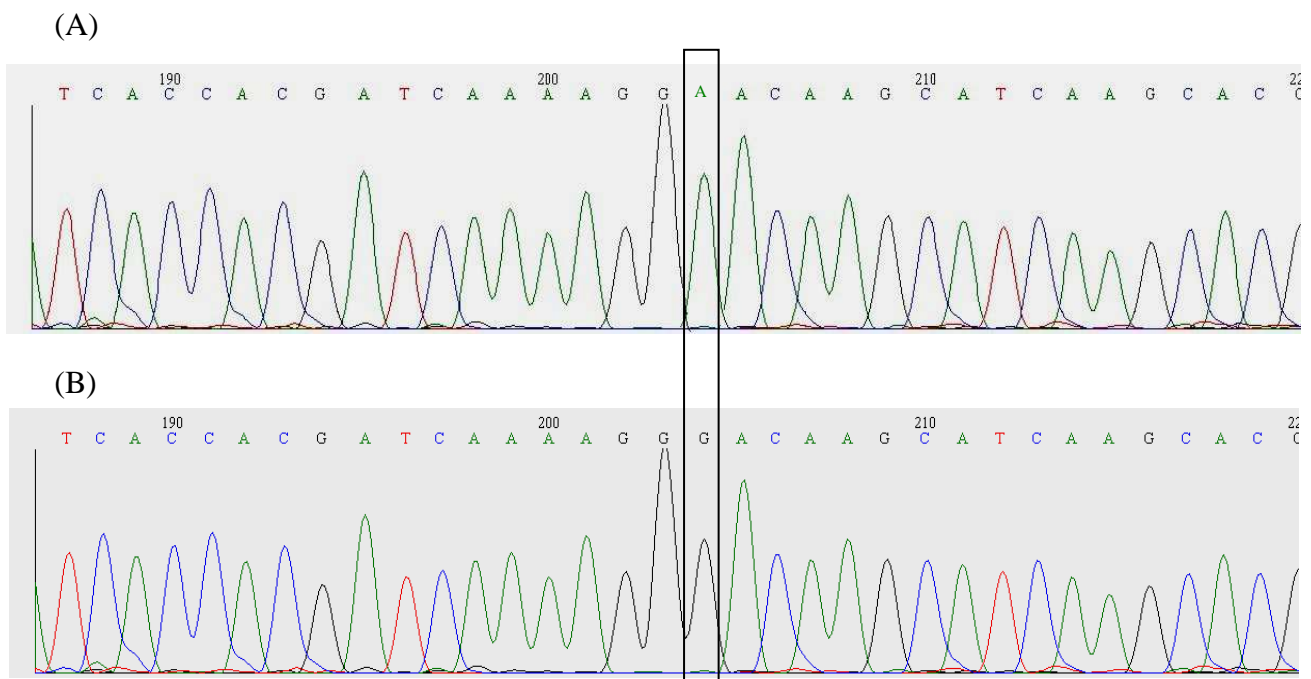
4.2 ΓΟΝΙΔΙΟ $tRNA^{Phe}$

Το γονίδιο $tRNA$ φαινυλαλανίνης ($tRNA^{Phe}$), είναι γονίδιο μήκους 71bp (καταλαμβάνει το τμήμα 577-647bp του μιτοχondριακού γονιδιώματος). Μετά την ενίσχυση του τμήματος που περιλαμβάνει το γονίδιο (τμήμα 252bp εφόσον περιλαμβάνει και κομμάτι του 12S rRNA γονιδίου), με κατάλληλους εκκινητές και την πραγματοποίηση SSCP, βρέθηκαν 5 δείγματα ασθενών με άσθμα, τα οποία παρουσίαζαν διαφορετικά πρότυπα σε σύγκριση με τα πρότυπα φυσιολογικών δειγμάτων control που χρησιμοποιήσαμε. Μετά την αλληλούχιση των 5 αυτών δειγμάτων, εντοπίστηκαν πράγματι αλλαγές στην αλληλουχία τους, σε σχέση

με την πρότυπη αλληλουχία του ενισχυμένου τμήματος. Πιο κάτω παρουσιάζονται τόσο τα αποτελέσματα που είχαμε μετά την πραγματοποίηση SSCP όσο και τα χρωματογραφήματα που προέκυψαν μετά την αλληλούχιση των δειγμάτων.

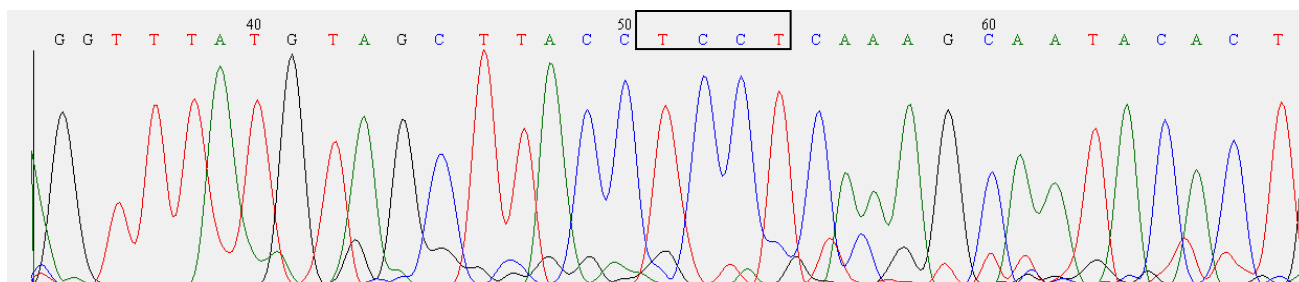


Εικόνα 19: Απεικόνιση των 5 διαφορετικών προτύπων που προέκυψαν μετά από ανάλυση με τη μέθοδο SSCP. Τα 5 δείγματα ασθενών με άσθμα υποδεικνύονται με μαύρα βέλη και από αριστερά προς τα δεξιά είναι τα εξής: 53, 54, 55, 66, 71. Όπως φαίνεται στην εικόνα, τα 5 αυτά δείγματα παρουσιάζουν διαφορετικά πρότυπα σε σχέση με τα δύο τελευταία που αντιστοιχούν στα control. Πάνω από το κάθε δείγμα αναγράφεται η αλλαγή που τελικά εντοπίστηκε στην αλληλουχία του μετά από sequencing. Στα δύο τελευταία δείγματα 66 και 71, υπάρχουν στο καθένα από 2 αλλαγές στην αλληλουχία τους. Η δεύτερη που αφορά την προσθήκη μιας βάσης αναγράφεται με λευκό χρώμα πάνω στο σχήμα.

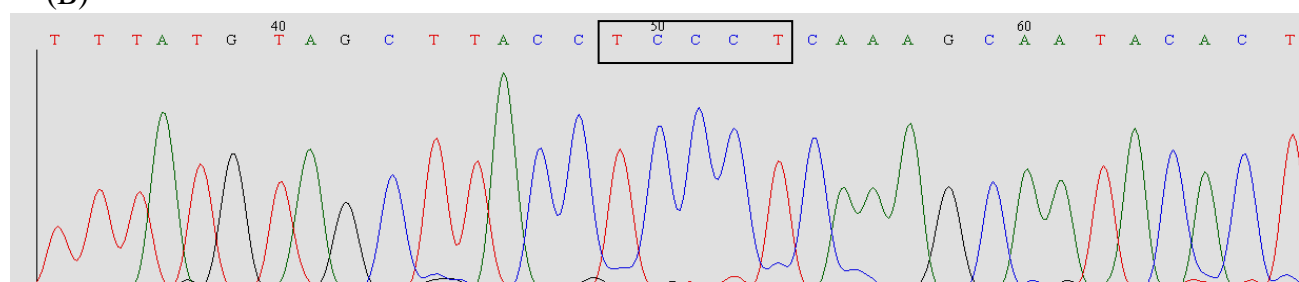


Εικόνα 20: Χρωματογράφημα από sequencing, τμήματος του 12S rRNA, που βρίσκεται αμέσως μετά το γονίδιο tRNA φαινυλαλανίνης (η ενίσχυση γονιδίων τις περισσότερες φορές εκτείνεται και στα παρακείμενα τμήματα του γονιδίου). Στο (A) έχουμε το άτομο control και στο (B) άτομο με άσθμα. Παρατηρούμε ότι στον ασθενή υπάρχει μετάπτωση A σε G στη θέση 750 του 12S rRNA.

(A)



(B)



Εικόνα 21: Χρωματογράφημα από sequencing τμήματος του γονιδίου tRNA φαινυλαλανίνης. Στο (A) έχουμε το άτομο control και στο (B) τον ασθενή. Φαίνεται καθαρά η ενσωμάτωση ενός πρόσθετου καταλοίπου C στη θέση 595 στην περίπτωση του ασθενή. Η αλλαγή αυτή στην αλληλουχία του γονιδίου tRNA^{Phe} σε συνδυασμό με την προηγούμενη αντικατάσταση βάσης στο 12S rRNA εντοπίστηκε σε δύο ασθενείς (δείγματα 66 και 71).

- Όπως φαίνεται και με βάση τα προηγούμενα χρωματογραφήματα, η μια διαφορά που εντοπίσαμε σε 5 δείγματα από ασθενείς με άσθμα, αφορά την αντικατάσταση μιας βάσης στο 12S rRNA, στη θέση 750. Πιο συγκεκριμένα έχουμε μετάπτωση μιας A σε G (**A750G**).
- Η δεύτερη διαφορά σε σχέση με την πρότυπη αλληλουχία του μιτοχondριακού DNA, εντοπίστηκε μέσα στο γονίδιο tRNA φαινυλαλανίνης και αφορά την προσθήκη μιας C στη θέση 595 (**595 ins C**). Η συγκεκριμένη προσθήκη βάσης βρίσκεται στη θηλιά DHU του μορίου tRNA^{Phe}. Η αλλαγή αυτή εντοπίστηκε σε δύο από τους 5 ασθενείς οι οποίοι είχαν επίσης εμφανίσει και την αντικατάσταση βάσης στο 12S rRNA.

Ασθενείς	Μεταλλάξεις
No 53	12S rRNA A750G
No 54	12S rRNA A750G
No 55	12SrRNA A750G
No 66	12S rRNA A750G/tRNA^{Phe} 595 insC
No 71	12S rRNA A750G/tRNA^{Phe} 595 insC

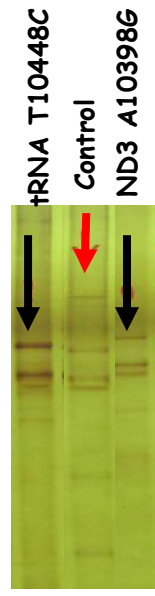
Πίνακας 7:

Στον πίνακα παρουσιάζονται οι μεταλλάξεις που εντοπίστηκαν στα γονίδια tRNA^{Phe} και 12S rRNA.

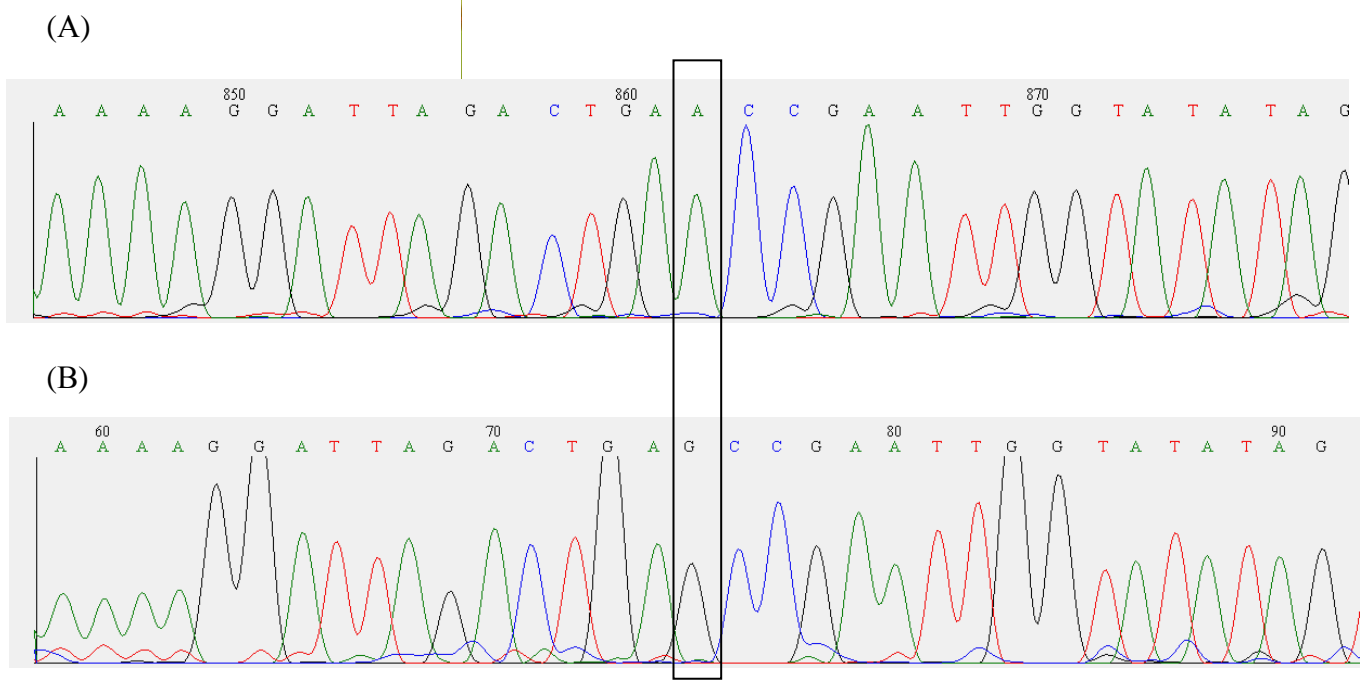
4.3 ΓΟΝΙΔΙΟ tRNA^{Arg}

Το γονίδιο tRNA αργινίνης (tRNA^{Arg}) είναι γονίδιο μεγέθους 65bp (καταλαμβάνει το τμήμα 10405-10469bp του μιτοχondριακού γονιδιώματος). Το ενισχυμένο τμήμα περιλαμβάνει και

μέρος του γονιδίου ND3 και έχει μήκος 227bp. Η ανάλυση SSCP που ακολούθησε την ενίσχυση του γονιδίου, αποκάλυψε 3 δείγματα τα οποία είχαν διαφορετικό πρότυπο σε σύγκριση με την αλληλουχία control. Τα 3 αυτά δείγματα στάλθηκαν για αλληλούχιση και τελικά αποκαλύφθηκε ότι παρουσίαζαν σημειακές αντικαταστάσεις βάσεων σε σχέση με την πρότυπη αλληλουχία του μιτοχondριακού γονιδιώματος. Τα διαφορετικά πρότυπα στην ανάλυση SSCP αλλά και τα χρωματογραφήματα που προέκυψαν μετά από sequencing παρουσιάζονται πιο κάτω.

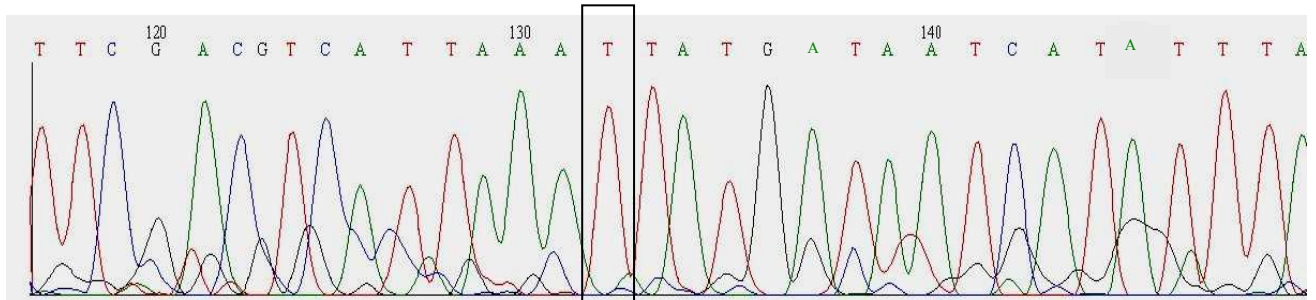


Εικόνα 22: Απεικόνιση 2 διαφορετικών προτύπων που προέκυψαν κατά την ανάλυση με τη μέθοδο SSCP. Τα 2 δείγματα εκατέρωθεν του control (κόκκινο βέλος), παρουσιάζουν διαφορετικά πρότυπα. Η αλληλούχιση του ενός δείγματος αποκάλυψε μια αντικατάσταση στο $tRNA^{Arg}$ (δείγμα 53) ενώ του άλλου μια αντικατάσταση στο ND3 (παρακείμενο του γονιδίου $tRNA^{Arg}$). Η ίδια αντικατάσταση στο ND3 παρουσιάστηκε σε 2 ασθενείς με άσθμα (δείγματα 59 και 66).

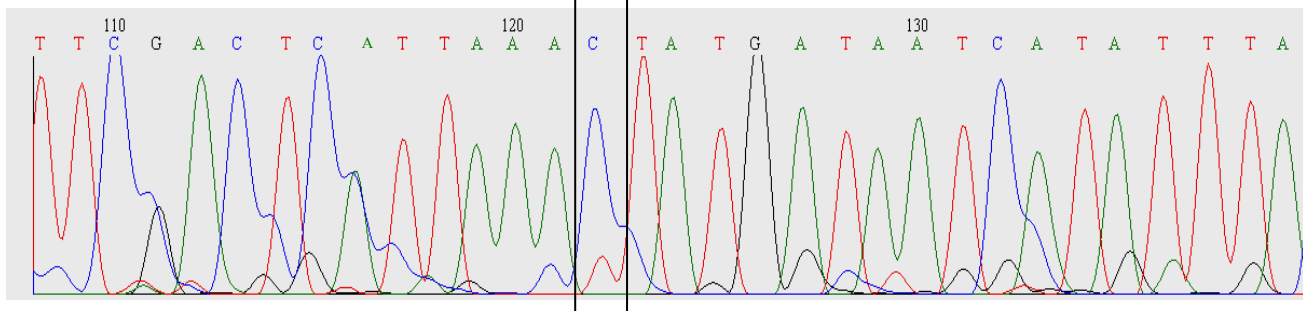


Εικόνα 23: Χρωματογράφημα από sequencing, τμήματος του γονιδίου ND3, που κωδικοποιεί μια υπομονάδα της αφυδρογονάσης (η ενίσχυση γονιδίων τις περισσότερες φορές εκτείνεται και στα παρακείμενα τμήματα του γονιδίου και ακριβώς γι' αυτό βλέπουμε εδώ ότι εκτός από το γονίδιο $tRNA^{Arg}$ ενισχύθηκε και τμήμα του ND3). Στο (A) έχουμε το άτομο control και στο (B) ένα δείγμα από ασθενή. Παρατηρώντας το χρωματογράφημα μπορούμε να διαπιστώσουμε τη μετάπτωση της A σε G στη θέση 10398 του ατόμου με άσθμα. Η αντικατάσταση αυτή εντοπίστηκε σε 2 ασθενείς.

(A)



(B)



Εικόνα 24: Χρωματογράφημα από sequencing τμήματος του γονιδίου tRNA αργινίνης. Στο (A) έχουμε το control και στο (B) τον ασθενή. Όπως φαίνεται στον ασθενή, υπάρχει μια μετάπτωση T σε C στη θέση 10448 στο tRNA^{Arg}. Η μετάπτωση αυτή εντοπίστηκε μόνο σε ένα ασθενή (δείγμα 53).

- Από τα χρωματογραφήματα μπορούμε να δούμε την αντικατάσταση μιας βάσης στη θέση 10398 στο γονίδιο ND3. Πιο συγκεκριμένα έχουμε μια μετάπτωση A σε G (**A10398G**). Η αντικατάσταση αυτή εντοπίστηκε σε 2 ασθενείς με άσθμα.
- Η δεύτερη αντικατάσταση βάσης εντοπίζεται μέσα στο γονίδιο tRNA^{Arg} και αφορά τη μετάπτωση μιας T σε C στη θέση 10448 (**T10448C**). Η συγκεκριμένη αλλαγή εντοπίζεται στο μεταβλητό βραχίονα του μορίου tRNA^{Arg}.

Ασθενής	Μεταλλάξεις
No 53	ND3 A10398G
No 59	ND3 A10398G
No 66	tRNA^{Arg} T10448C

Πίνακας 8: Στον πίνακα παρουσιάζονται οι 2 μεταλλάξεις που ανιχνεύθηκαν σε 3 ασθενείς στα γονίδια tRNA^{Arg} και ND3.

Πιο κάτω παρουσιάζονται συγκεντρωτικά τα αποτελέσματα μας για όλα τα γονίδια στα οποία εντοπίστηκαν μεταλλάξεις στους ασθενείς με άσθμα.

Πίνακας 9: Στον πίνακα φαίνονται συγκεντρωτικά τα αποτελέσματα μας στους ασθενείς. Παρουσιάζονται τα γονίδια (και το μη κωδικό τμήμα MT-NC10), όπου εντοπίστηκαν μεταλλάξεις.

Γονίδιο	Νουκλεοτιδική Αλλαγή	Αποτέλεσμα Αλλαγής	Αριθμός ατόμων	Θέση στο tRNA	Αριθμός nt στο tRNA
tRNA ^{Thr}	G15928A	Μη κωδικοποιούσα	2	Στέλεχος αντικωδικονίου	43
MT-NC10	A15954C	Μη κωδικοποιούσα	1	-	-
12S rRNA	A750G	Συνώνυμη	5	-	-
tRNA ^{Phe}	595 insC	Μη κωδικοποιούσα	2	Θηλιά DHU	20
ND3	A10398G	Thr σε Ala	2	-	-
tRNA ^{Arg}	T10448C	Μη κωδικοποιούσα	1	Μεταβλητός βραχίονας	47

■ Σημαντικό είναι το γεγονός, ότι 3 από τα δείγματα μας παρουσίασαν περισσότερες από μια αλλαγές στην αλληλουχία των τμημάτων που εξετάσαμε. Πιο συγκεκριμένα:

Δείγμα 53: tRNA^{Arg} **T10448C** και 12S rRNA **A750G**

Δείγμα 55: tRNA^{Thr} **G15928A** και 12S rRNA **A750G**

Δείγμα 66: tRNA^{Phe} **595 insC**, ND3 **A10398G** και 12S rRNA **A750G**

Επίσης είναι εμφανές ότι η μια αλλαγή είναι κοινή και στα 3 πιο πάνω δείγματα.

Όπως προκύπτει από τα αποτελέσματα μας, ανάμεσα στους ασθενείς με άσθμα και τα υγιή άτομα, υπάρχουν 2 κοινές μεταλλάξεις. Πρόκειται για την **A750G** στο 12S rRNA και τη **G15928A** στο tRNA^{Thr}.

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα τελευταία χρόνια ανακαλύφθηκε ότι πολλές ασθένειες με ποικίλα κλινικά συμπτώματα, οι οποίες είναι κατά βάση μητρικά κληρονομήσιμες οφείλονται σε καλά χαρακτηρισμένες μεταλλάξεις στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα. Ο ρόλος των μιτοχονδρίων στον οργανισμό, είναι καίριος, εφόσον εμπλέκονται σε βασικές για τη ζωή λειτουργίες, όπως ο μεταβολισμός, η απόπτωση και ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός. Κάποιες πρωτεΐνες μάλιστα, οι οποίες συμμετέχουν στο μεταβολισμό μέσω της αναπνευστικής αλυσίδας, κωδικοποιούνται από το ίδιο το μιτοχονδριακό γονιδίωμα, κάτι που σημαίνει ότι μεταλλάξεις των γονιδίων που τις κωδικοποιούν θα μπορούσαν να αποβούν μοιραίες, γιατί θα επηρέαζαν την ομαλή λειτουργία του οργανισμού. Με δεδομένη λοιπόν την τεράστια σημασία των μιτοχονδρίων στον οργανισμό και στηριζόμενοι σε μελέτες που αποκάλυψαν ότι η μητρική κληρονομιά είναι ουσιαστικός παράγοντας εμφάνισης του άσθματος⁽²¹⁾, προχωρήσαμε στην παρούσα εργασία, προκειμένου να διερευνήσουμε το ρόλο του μιτοχονδριακού γονιδιώματος στην εμφάνιση του άσθματος.

Μέσα από τη συγκεκριμένη μελέτη, προσπαθήσαμε να ανιχνεύσουμε μεταλλάξεις σε μιτοχονδριακά tRNA γονίδια και τις γειτονικές περιοχές τους, ώστε να ελέγξουμε την πιθανότητα τέτοιες μεταλλάξεις να αποτελούν παράγοντες πρόκλησης του βρογχικού άσθματος. Είναι σημαντικό να αναφερθεί, ότι μεταλλάξεις σε γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες, συνήθως προκαλούν δυσλειτουργίες μεμονωμένων συμπλόκων. Αντίθετα οι μεταλλάξεις σε γονίδια mt tRNA, επηρεάζουν γενικά την πρωτεϊνοσύνθεση στο μιτοχόνδριο, με αποτέλεσμα να προκαλούν δυσλειτουργίες στο σύνολο των συμπλόκων της αναπνευστικής αλυσίδας. Πρόκειται επομένως για κρίσιμες μεταλλάξεις με σοβαρές επιπτώσεις στον οργανισμό.

Στα 26 δείγματα ασθενών που μελετήσαμε, εντοπίσαμε 6 μεταλλάξεις. Προκειμένου να ανιχνεύσουμε εάν οι συγκεκριμένες αντικαταστάσεις βάσεων μπορούν να έχουν παθολογικές επιπτώσεις στον οργανισμό, ελέγξαμε την παρουσία τους και στα 30 δείγματα υγιών ατόμων που εξετάσαμε. Οι τέσσερις από τις έξι μεταλλάξεις που εντοπίστηκαν στους ασθενείς, δε βρέθηκαν στα υγιή άτομα τα οποία εξετάστηκαν. Πρόκειται για τις 595insC στο tRNA^{Phe}, T10448A στο tRNA^{Arg}, A10398G στο ND3 και A15954C στο MT-NC10. Δύο από τις έξι μεταλλάξεις που εντοπίστηκαν στους ασθενείς βρέθηκαν επίσης και στα υγιή άτομα. Αυτές είναι οι: G15928A στο γονίδιο tRNA^{Thr} και A750G στο γονίδιο 12S rRNA. Επιπρόσθετα, για κανένα από τους συνδυασμούς μεταλλάξεων, που βρέθηκαν στα δείγματα των ασθενών, δεν υπήρξε αντίστοιχος του στα δείγματα των υγιών ατόμων.

Η μετάλλαξη **A10398G**, στο γονίδιο ND3, βρέθηκε σε 2 από τους 26 ασθενείς με άσθμα. Το γονίδιο ND3 του μιτοχονδριακού γονιδιώματος, κωδικοποιεί μια από τις 45 πολυπεπτιδικές αλυσίδες της NADH αφυδρογονάσης (του μεγαλύτερου από τα ενζυμικά σύμπλοκα της αναπνευστικής αλυσίδας). Η νουκλεοτιδική θέση 10398 στο γονίδιο ND3, παρουσιάζεται ιδιαίτερα πολυμορφική. Σύμφωνα με την αναθεωρημένη πρότυπη αλληλουχία του μιτοχονδριακού γονιδιώματος του Cambridge⁽⁵⁸⁾, η βάση για την άγριου τύπου αλληλουχία είναι η A. Εντούτοις σε πολλούς πληθυσμούς σε αυτή τη θέση κυριαρχεί η παρουσία της βάσης G. Η περαιτέρω ανάλυση της συγκεκριμένης νουκλεοτιδικής θέσης σε πληθυσμούς με κλινικά συμπτώματα, οδήγησε σε αντικρουόμενα αποτελέσματα για το ποια από τις δύο βάσεις A ή G σχετίζεται με την εμφάνιση ασθενειών. Πιο συγκεκριμένα, ο πολυμορφισμός **10398A** παρουσιάζει αυξημένη συχνότητα εμφάνισης σε νευροεγκεφαλίστικες ασθένειες όπως η νόσος του Parkinson και το Alzheimer⁽⁶⁰⁾. Ο πολυμορφισμός **10398G**,

θεωρείται σαν παράγοντας προδιάθεσης για τον καρκίνο του μαστού^(61,62). Στη μελέτη μας εντοπίστηκε μόνο ο πολυμορφισμός **10398G**.

Μια άλλη μετάλλαξη η οποία εντοπίστηκε σε δύο δείγματα ασθενών με άσθμα είναι η **G15928A** στο γονίδιο tRNA^{Thr}. Η συγκεκριμένη μετάλλαξη έχει βρεθεί με μεγάλη συχνότητα σε άτομα που παρουσιάζουν σκλήρυνση κατά πλάκας και νόσο του Parkinson^(63,64). Πρόσφατα έχει επίσης ανιχνευθεί στο 10% των γυναικών που παρουσίαζαν ιδιοπαθείς επαναλαμβανόμενες αποβολές⁽⁶⁵⁾.

Οι μεταλλάξεις tRNA^{Phe} **595insC**, tRNA^{Arg} **T10448**, και **MT-NC10 A15954C** είναι αλλαγές που στη μελέτη μας παρουσιάστηκαν μόνο στα δείγματα ασθματικών ατόμων (δεν εντοπίστηκαν σε υγιή άτομα). Ωστόσο, οι συγκεκριμένες αλλαγές, έχουν αναφερθεί μόνο σαν ουδέτεροι πολυμορφισμοί⁽⁶⁶⁾ και ποτέ σαν παθογόνες μεταλλάξεις. Η μετάλλαξη **12S rRNA A750G**, η οποία εντοπίστηκε τόσο σε ασθενείς, όσο και σε υγιή άτομα, έχει επίσης αναφερθεί σαν ένας ουδέτερος πολυμορφισμός⁽⁶⁷⁾.

Φαίνεται αρκετά δύσκολο ένας απλός ουδέτερος πολυμορφισμός ενός νουκλεοτιδίου, να έχει τόσο μεγάλη επίδραση στην αποτελεσματικότητα της διαδικασίας παραγωγής ενέργειας στα μιτοχόνδρια, ώστε να είναι ικανός να προκαλέσει μια ασθένεια. Εντούτοις, υπάρχουν στοιχεία που αποδεικνύουν ότι ένα συγκεκριμένο μιτοχονδριακό γενετικό υπόβαθρο, είναι ικανό να συμβάλει στη φαινοτυπική έκφραση, άλλων κύριων μεταλλάξεων του μιτοχονδριακού DNA⁽⁶⁸⁾. Επιπρόσθετα, δεν μπορούμε να αποκλείσουμε την πιθανή παρουσία και άλλων διαφοροποιήσεων στην αλληλουχία του μιτοχονδριακού γονιδιώματος, στους ασθενείς που εξετάσαμε, εφόσον ακόμη δεν έχει αποτιμηθεί το πλήρες μιτοχονδριακό γονιδίωμα.

Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι πολλές φορές, για την εκδήλωση ενός φαινοτύπου, δεν αρκεί η παρουσία μιας μεμονωμένης μετάλλαξης. Πολλές φορές, διαφορετικές αλλαγές στην αλληλουχία του μιτοχονδριακού DNA (είτε μεταλλάξεις είτε πολυμορφισμοί), μπορούν να αλληλεπιδρούν μεταξύ τους, ή ακόμη και με άλλους παράγοντες (π.χ. επιγενετικούς), αυξάνοντας έτσι τον κίνδυνο εμφάνισης μιας ασθένειας. Επίσης αλλαγές στην αμινοξική αλληλουχία των πρωτεϊνών οι οποίες είναι φαινομενικά ουδέτερες, θα μπορούσαν να καταστήσουν τις πρωτεΐνες περισσότερο ευπαθείς σε οξειδωτικές βλάβες και επομένως να επηρεάσουν τη λειτουργικότητα τους.

Οι μεταλλάξεις που ανιχνεύθηκαν στους ασθενείς, στη συγκεκριμένη μελέτη, δεν μπορούν με απόλυτη βεβαιότητα να χαρακτηριστούν σαν παθογόνες μεταλλάξεις. Προκειμένου να αποφασίσουμε για την παθογένεια τους, θα πρέπει να γίνουν περαιτέρω βιοχημικές αναλύσεις.

Στηριζόμενοι στα αποτελέσματα της έρευνας μας, μπορούμε να θεωρήσουμε ότι το μιτοχονδριακό γενετικό υπόβαθρο, μπορεί να σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης άσθματος. Οι μεταλλάξεις που εντοπίστηκαν στον πληθυσμό των ασθματικών ασθενών, μπορούν να συνδεθούν με την πιθανότητα εμφάνισης άσθματος στον ελληνικό πληθυσμό. Θα πρέπει βέβαια, να γίνουν περισσότερες μελέτες, οι οποίες θα εξετάσουν την παρουσία μεταλλάξεων και στα υπόλοιπα γονίδια του μιτοχονδριακού DNA, ώστε να μπορούμε να συζητήσουμε και το ενδεχόμενο της συνεργιστικής δράσης μεταλλάξεων του μιτοχονδριακού γονιδιώματος στην εμφάνιση του άσθματος. Ακόμη θα πρέπει να γίνουν μελέτες μεγαλύτερης κλίμακας, που θα περιλαμβάνουν περισσότερα άτομα (πιο αντιπροσωπευτικό δείγμα του πληθυσμού), ώστε να μπορούμε με μεγαλύτερη στατιστική ακρίβεια να επιβεβαιώσουμε τις παρατηρήσεις μας.

Καινούριοι δρόμοι έρευνας, έχουν επίσης χαραχθεί προς την κατεύθυνση του μονοπατιού της απόπτωσης και της σχέσης που μπορεί να έχει το συγκεκριμένο μονοπάτι με

την εμφάνιση του άσθματος. Τα στοιχεία που συνηγορούν υπέρ της πιθανής εμπλοκής του αποπτωτικού μονοπατιού στην εμφάνιση του άσθματος, αυξάνονται συνεχώς. Αλλαγές στους μηχανισμούς του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου, των κυττάρων που βρίσκονται μόνιμα στους αεραγωγούς, ή των κυττάρων που μεταφέρονται εκεί λόγω της φλεγμονώδους απόκρισης, μπορούν να συμβάλουν στην ανάπτυξη του άσθματος, αλλά και στον καθορισμό της σοβαρότητας του. Μεγαλύτερη διερεύνηση του ρόλου του αποπτωτικού μονοπατιού στο άσθμα, θα μας οδηγήσει σε μεγαλύτερη κατανόηση και διαμόρφωση μιας πιο ολοκληρωμένης εικόνας σε σχέση με τους παράγοντες που μπορούν να αυξήσουν τον κίνδυνο εμφάνισης του άσθματος.

6. Βιβλιογραφία

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. Mitchell P. Proton current flow in mitochondrial systems. *Nature*, 1967, 25:1327-1328.
4. Huang K, K.G. Manton. The role of oxidative damage in mitochondria during aging: A review. *Frontiers in Bioscience*, 2004, 9:1100-1117.
5. Mitchell P, Moyle J. Chemiosmotic hypothesis of oxidative phosphorylation. *Nature*, 1967, 213:137-9.
6. DiMauro S, Schon EA. Mitochondrial respiratory-chain diseases. *N Engl J Med* 2003, 348:2656-68.
7. Fernández-Silva P, Enriquez A.J, Montoya J. Replication and transcription of mammalian mitochondrial DNA. *Experimental Physiology*, 2003, 88.1: 41-56
8. Brian F.C. Clark. The crystal structure of tRNA. *J. Biosci.*, 2006, 31:453-457
9. Varani G, McClain W. The G x U wobble base pair. A fundamental building block of RNA, crucial to RNA function in diverse biological systems. *EMBO Rep*, 2001, 2:481-486.
10. Taylor RW, Turnbull DM. Mitochondrial DNA mutations in human disease. *Nat. Rev. Genet.*, 2005, 6 (5):389-402.
11. Zifa E., Giannouli S., Theotokis P., Mamuris Z., Stathopoulos C., Mitochondrial tRNA mutations: Clinical and functional perturbations. *RNA Biology*, 2007, 4:1-3.
12. Christoph von Kleist-Retzow J., Schauseil-Zipf U, Michalk V.D., Kunz S.W. Mitochondrial Diseases –an expanding spectrum of disorders and affected genes. *Experimental Physiology*, 2003, 88.1: 155-166.
13. Florentz C, Sissler M Disease- related versus polymorphic mutations in human mitochondrial tRNAs. Where is the difference? *EMBO Rep*, 2001, 2:481-486.
14. Peter J. Barnes. Pathophysiology of asthma. *Br J Clin. Pharmacol.*, 1996, 42:3-10.
15. Vignola A., Chiappara G, Gagliardo R., Gjemarkaj M.. Apoptosis and airway inflammation in asthma. *Apoptosis*, 2000, 5:473-485.
16. Jayaraman S., Castro M., O' Sullivan M. Resistance to Fas –mediated T-cell apoptosis in asthma. *The Journal of Immunology*, 1999, 162:1717-1722.
17. Kankaanranta H., Lindsay A.M., Gjembycz A.M. Delayed eosinophil apoptosis in asthma. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2000, 106:77-83.
18. Arnedo Pena A., Puig Barbera J., Pac-Sa R.M. Risk factors and prevalence of asthma in schoolchildren in Castellon: a cross-sectional study. *Allergol Immunopathol*, 2009, 37(3):135-142.
19. Subbarao P., Mandhane J.P., Sears R.M. Asthma epidemiology, etiology and risk factors. *CMAJ*, 2009, 181 (9):
20. Mabalirajan U., Dinda A.K., Kumar S. Mitochondrial Structural changes and dysfunction are associated with experimental allergic asthma. *The Journal of Immunology*, 2008, 181:3540-3548.
21. Raby B. A., Klanderman B., Murphy A. A common mitochondrial haplogroup is associated with elevated total serum IgE levels. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2007, 120:351-358.

22. Del Prete A., Zaccagnino P., Di Paola M. Role of mitochondria and reactive oxygen species in dendritic cell differentiation and functions. *Free Radical Biol.*, 2008, 44:1443-1451.
23. Trian T., Benard G, Begueret H., Rossignol R. Bronchial smooth muscle remodelling involves calcium dependent enhanced mitochondrial biogenesis in asthma. *JEM*, 2007, 204:3173-3181.
24. Seow Y.C., Schellenberg R.R., Pare D.P. Structural and functional changes in the airway smooth muscle of asthmatic subjects. *AM J RESPIR CRIT CARE MED*, 1998, 158:179-186.
25. Kumar A., Ghosh B. Genetics of asthma: a molecular biologist perspective. *Clinical and Molecular Allergy*, 2009, 7:7-15
26. Dunnill MS. The pathology of asthma, with special reference to the changes in the bronchial mucosa. *J Clin Pathol*, 1960, 13:27-33.
27. Djukanovic R, Roche UR, Wilson JW, et al. Mucosal inflammation in asthma. *Am Rev Respir Dis*, 1990, 142:434-457.
28. Barnes PJ. New concepts in the pathogenesis of bronchial hyperresponsiveness and asthma *J Allergy Clin Immunol*, 1989, 83: 1013–1026.
29. Barnes PJ. New aspects of asthma. *J Int Med*, 1992, 231: 453–461.
30. Spiteri MA, Knight RA, Jeremy JY, Barnes PJ, Chung KF. Alveolar macrophage-induced suppression of peripheral blood mononuclear cell responsiveness is reversed by in vitro allergen exposure in bronchial asthma. *Eur Resp J*, 1994, 7: 1431-1438.
31. Gleich GJ. The eosinophil and bronchial asthma: current understanding. *J Allergy Clin Immunol*, 1990, 85: 422–436.
32. Kay AB. Asthma and inflammation. *J Allergy Clin Immunol*, 1991, 87: 893–913.
33. Devalia JL, Davies RJ. Airway epithelial cells and mediators of inflammation. *Resp Med*, 1993, 6: 405–408.
34. Arm JP, Lee TH. Sulphidopeptide leukotrienes in asthma. *Clin Sci*, 1993, 84: 501–510.
35. Barnes PJ. Cytokines as mediators of chronic asthma. *Am J Resp Crit Care Med*, 1994, 150: S42-S49.
36. Barnes PJ, Liew FY. Nitric oxide and asthmatic inflammation. *Immunol, Today* 1995, 16: 128–130.
37. Bai TR, Mak JCW, Barnes PJ. A comparison of beta- adrenergic receptors and in vitro relaxant responses to isoproterenol in asthmatic airway smooth muscle. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1992, 6: 647–651.
38. Ebina M, Yaegashi H, Chiba R, Takahashi T, Motomiya M, Tanemura M. Hyperreactive site in the airway tree of asthmatic patients recoded by thickening of bronchial muscles: a morphometric study. *Am Rev Respir Dis*, 1990, 141: 1327–1332.
39. Vignola A., Chanez P., Campbell M.A. Airway inflammation in mild intermittent and persistent asthma. *AM J RESPIR CRIT CARE MED*, 1998, 157:403-409.
40. Corry B.D., Kheradmand F. Toward a comprehensive understanding of allergic lung disease. *Transactions of the American Clin and Climatological Association*, 2009, 120:33-48.
41. Hansen JM, Zhang H, Jones DP. Mitochondrial thioredoxin-2 has a key role in determining tumor necrosis factor-alpha-induced reactive oxygen species generation, NF-kappaB activation and apoptosis. *Toxicol Sci*, 2006, 91, 643-50.
42. Sutipornpalangkul W, Morales NP, Charoencholvanich K, Harnroogroi T. Lipid peroxidation, glutathione, vitamin E and antioxidant enzymes in synovial fluid from patients with osteoarthritis. *Int J Rheum Dis.*, 2009, 4:324-8.

43. Robertson JD, Orrenius S., Molecular mechanisms of apoptosis induced by cytotoxic chemicals. *Crit Rev Toxicol.*, 2000, 30, 609-27.
44. Li N, Sioutas C, Cho A, Schmitz D, Misra C, Sempf J, Wang M, Oberley T, Froines J, Nel A. Ultrafine particulate pollutants induce oxidative stress and mitochondrial damage. *Environ Health Perspect.*, 2003, 111, 455-60.
45. Bharadwaj AS, Agrawal DK., Flt3 ligand generates morphologically distinct semimature dendritic cells in ovalbumin-sensitized mice. *Exp Mol Pathol.*, 2007, 83, 17-24.
46. Barrett EG., Maternal influence in the transmission of asthma susceptibility. *Pulm Pharmacol Ther.*, 2008, 21,474-84.
47. Lim RH, Kobzik L. Maternal transmission of asthma risk., *Am J Reprod Immunol.*, 2009, 61, 1-10.
48. Fukuda T, Mochida S, Fukushima Y, Makino S. Detection of allergen-induced genes in peripheral blood mononuclear cells of patients with allergic asthma using subtractive hybridization. *J Allergy Clin Immunol.*, 1995, 96, 1076-82.
49. Polonikov AV, Ivanov VP, Solodilova MA, Kozhukhov MA, Panfilov VI, Bulgakova IV. Polymorphism -930A > G of the cytochrome b gene is a novel genetic marker of predisposition to bronchial asthma. *Ter Arkh.*, 2009, 81, 31-5.
50. Jones M, Mitchell P, Wang JJ, Sue C. MELAS A3243G mitochondrial DNA mutation and age related maculopathy. *Am J Ophthalmol.*, 2004, 138, 1051-3.
51. Shanske AL, Shanske S, Silvestri G, Tanji K, Wertheim D, Lipper S. MELAS point mutation with unusual clinical presentation. *Neuromuscul Disord.*, 1993, 3, 191-3.
52. Schmuczerova J, Brdicka R, Dostal M, Sram RJ, Topinka J. Genetic variability of HVRII mt DNA in cord blood and respiratory morbidity in children. *Mutat Res.*, 2009, 666(1-2):1-7.
53. Lewin HA, Stewart-Haynes JA. A simple method for DNA extraction from leukocytes for use in PCR. *Biotechniques*, 1992, 13:522-524.
54. Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase – catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol*, 1987,155:335-350.
55. 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.
56. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 1977, 74:5463-5467.
57. 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.
58. 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.
59. Schaefer AM, Taylor RW, Turmbull DM, Chinnery PF. The epidemiology of mitochondrial disorders- past, present and future. *Biochim Biophys Acta*, 2004, 1659:115-120.
60. Van der Walt JM, Dementieva YA, Martin ER, Scott WK, Nicodemus KK, Kroner CC, Welsh-Bohmer KA, Saunders AM, Roses AD, Small GW, Schmechel DE, Murali Doraiswamy P, Gilbert JR, Haines JL, Vance JM, Pericak-Vance MA. Analysis of European mitochondrial haplogroups with Alzheimer disease risk. *Neurosci Lett.*, 2004, 365, 28-32.
61. Bai RK, Leal SM, Covarrubias D, Liu A, Wong LJ. Mitochondrial genetic background modifies breast cancer risk. *Cancer Res.*, 2007, 67, 4687-94.

62. Czarnecka AM, Krawczyk T, Zdrozny M, Lubiński J, Arnold RS, Kukwa W, Scińska A, Golik P, Bartnik E, Petros JA. Mitochondrial NADH-dehydrogenase subunit 3 (ND3) polymorphism (A10398G) and sporadic breast cancer in Poland. *Breast Cancer Res Treat.*, 2010, 121, 511-8.
63. Mayr-Wohlfart U, Paulus C, Henneberg A, Rödel G. Mitochondrial DNA mutations in multiple sclerosis patients with severe optic involvement. *Acta Neurol Scand.*, 1996, 94, 167-71.
64. Mayr-Wohlfart U, Rödel G, Henneberg A. Mitochondrial tRNA(Gln) and tRNA(Thr) gene variants in Parkinson's disease. *Eur J Med Res.*, 1997, 2, 111-3.
65. Seyedhassani SM, Houshmand M, Kalantar SM, Aflatoonian A, Modabber G, Hadipour F, Fallahzadeh M, The point mutations of mitochondrial tRNAthreonine and proline in idiopathic repeated pregnancy loss Iranian. *Journal of Reproductive Medicine*, 2010, 8, 45-50.
66. Carter RW. Mitochondrial diversity within modern human populations. *Nucleic Acids Res.*, 2007, 35, 3039-45.
67. Brown, M.D., Voljavec, A.S., Lott, M.T., Torroni, A., Yang, C.-C., Wallace, D.C.) Mitochondrial DNA complex I and III mutations associated with Leber's hereditary optic neuropathy *Genetics*, 1992, 130 (1): 163-173.
68. Pello R, Martín MA, Carelli V, Nijtmans LG, Achilli A, Pala M, Torroni A, Gómez-Durán A, Ruiz-Pesini E, Martinuzzi A, Smeitink JA, Arenas J, Ugalde C. Mitochondrial DNA background modulates the assembly kinetics of OXPHOS complexes in a cellular model in mitochondrial disease. *Hum Mol Genet.*, 2008, 17(24):4001-11.