



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

*Ανίχνευση μεταλλάξεων στα
μιτοχονδριακά tRNA σε ασθενείς με
Σαρκοείδωση και
Ιδιοπαθή Πνευμονική Ύνωση*

**Mitochondrial tRNA mutation spotting in
Sarcoidosis and Idiopathic Pulmonary
Fibrosis patients**

Μαντζανή Ελευθερία Νίκη

2014

Τριμελής Επιτροπή

Ζίφα Αιμιλία, Επίκουρος Καθηγήτρια Βιολογίας
(Νευροβιολογίας), Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας,
ΠΘ.

Δανιήλ Ζωή, Αναπληρώτρια καθηγήτρια Πνευμονολογίας,
Τμήμα Ιατρικής, ΠΘ.

Γουργουλιάνης Κωνσταντίνος, Καθηγητής
Πνευμονολογίας, Τμήμα Ιατρικής, ΠΘ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ - ΑΦΙΕΡΩΣΕΙΣ

Θα ήθελα πρώτα πρώτα να ευχαριστήσω και να αφιερώσω την πτυχιακή μου εργασία ιδιαίτερα στην μητέρα μου, στον πατέρα μου και σε όλη την οικογένειά μου που ήταν δίπλα μου κάθε στιγμή και με βοήθησαν με κάθε τρόπο να φτάσω ως εδώ.

Ευχαριστώ ιδιαίτερα την κυρία Αιμιλία Ζίφα που ως επιβλέπουσα καθηγήτρια με προσανατόλισε και με κατατόπισε πλήρως.

Την κυρία Δανιήλ Ζωή και τον κύριο Γουργουλιάνη Κωνσταντίνο τους ευχαριστώ θερμά που μου έδωσαν την ευκαιρία να συνεργαστώ μαζί τους συμμετέχοντας στις ερευνητικές τους δραστηριότητες.

Τέλος ενα μεγάλο ευχαριστώ θα ήθελα να δώσω σε όλα τα άτομα που με βοήθησαν και με κατατόπισαν μέσα στο εργαστήριο κατά τη διάρκεια των πειραμάτων, Γραμματικόπουλο Αλέξανδρο, Γιαννούλη Θέμη, Σαρρή Ντίνα και ιδιαίτερα τον κύριο Σταμάτη Κώστα.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	6
ABSTRACT.....	7
A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	
ΤΑ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑ.....	8
1) Προέλευση - Θεωρία ενδοσυμβίωσης.....	8
2) Κατανομή μιτοχονδρίων.....	9
3)Μορφολογία-Δομή.....	10
4) Το γενετικό υλικό μιτοχονδρίων.....	12
4.1) Γενετική δομή του μιτοχονδριακού DNA.....	12
4.2) 14rRNA.....	14
4.3) mt-tRNA.....	14
4.4) mt-mRNA.....	15
5) Λειτουργίες του μιτοχονδρίου.....	16
5.1) Παραγωγή ενέργειας στα μιτοχόνδρια:	16
5.1α)NADH και FADH ₂ - Ο Κύκλος του Krebs.....	16
5.1β) ATP - Μεταφορά ηλεκτρονίων μέσω αναπνευστικής αλυσίδας.....	18
5.1γ) ATP - οξειδωτική φωσφορυλίωση	19
5) Ο Ρόλος του μιτοχονδρίου στην απόπτωση.....	20
6) Μιτοχόνδρια και οξειδωτικό stress.....	23
6.1)Τι είναι το οξειδωτικό stress.....	23
6.2)Παραγωγή ROS από την αναπνευστική αλυσίδα.....	23
7) Μεταλλαγές στο μιτοχονδριακό γονοδίωμα.....	25
8) Μιτοχονδριακά νοσήματα.....	25
8.1) Η γενετική των μιτοχονδριακών νοσημάτων.....	30
9) Μεταλλάξεις στα mt-tRNA.....	31
9.1) Ασθένειες που σχετίζονται με μεταλλάξεις στα mt-tRNAs.....	32
10) Σαρκοείδωση και Ιδιοπαθής Πνευμονική Ίνωση.....	34
Σαρκοείδωση.....	34

Ιδιοπαθής πνευμονική ίνωση (IPF).....	39
Β. Σ Κ Ο Π Ο Σ	44
Γ. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	
I) ΥΛΙΚΑ	
ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ -ΣΥΣΚΕΥΕΣ -ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΑΙΜΑΤΟΣ.....	45
II) ΜΕΘΟΔΟΙ	
1)ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA.....	46
2)ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ.....	51
3)ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ PCR.....	57
4) ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΤΩΝ ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ PCR.....	64
5) SSCP.....	65
6)ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΩΝ ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ PCR.....	75
7) ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗ.....	79
8) ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ ΚΑΙ ΕΥΡΕΣΗ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ.....	79
Δ. Α Π Ο Τ Ε Λ Ε Σ Μ Α Τ Α	
ACT.....	80
HSL.....	80
TA.....	82
GLY.....	84
VAL.....	86
GLU.....	87
Πίνακες αποτελεσμάτων.....	88
Ε. Σ Υ Ζ Η Τ Η Σ Η	
Ευρήματα μελέτης.....	89
Συσχέτιση σαρκοειδωσης με το οξειδωτικό stress.....	92
Συσχέτιση ipf με το οξειδωτικό stress.....	93
Ros σαρκοειδωση και ipf.....	94
Νέες έρευνες.....	94
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	98

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα μιτοχόνδρια είναι τα υπεύθυνα για την παραγωγή ενέργειας κυτταρικά οργανίδια. Παραπροϊόν της λειτουργίας τους αποτελούν οι ελεύθερες ρίζες οι οποίες όταν υπερπαράγονται αυξάνουν κατά πολύ το, λόγω απουσίας επιδιορθωτικών μηχανισμών, ήδη μεγάλο ποσοστό μεταλλαγών στο μιτοχονδριακό DNA. Οι περισσότερες από αυτές τις μεταλλάξεις δημιουργούν μιτοχονδριακά νοσήματα, μία ετερογενή ομάδα παθήσεων που όλες χαρακτηρίζονται από δυσλειτουργία στην αναπνευστική αλυσίδα. Η εν λόγω μελέτη είναι τμήμα μιας ευρύτερης η οποία ξεκίνησε με την προοπτική συσχέτισης με μεταλλαγές στα mt-tRNAs της σαρκοείδωσης και της IPF, δύο αγνώστου αιτιολογίας ασθένειες που παρουσιάζουν πολλά κοινά με τα μιτοχονδριακά νοσήματα. Η παρούσα μελέτη περιλαμβάνει την ανάλυση δειγμάτων αίματος από 14 ασθενείς με Σαρκοείδωση και 11 με IPF. Τα δείγματα αναλύθηκαν σε 11 mt-tRNA γονίδια: t-RNAAsn, t-RNACys, t-RNATyr, t-RNAHis, t-RNASer(AGY), t-RNALeu(CUN), t-RNATrp, t-RNAAla, t-RNAGly, t-RNAVal, t-RNAGlu. Οι μεταλλάξεις που βρέθηκαν ήταν η 12308 A>G στο t-RNALeu(CUN) στο 7% των ασθενών με Σαρκοείδωση, η 5495T>C (MT-ND2) στο 57% των σαρκοειδικών και στο 36,4% των ασθενών με IPF, και η 10034 T>C στο t-RNAGly στο 9% των ατόμων με IPF. Τα συγκεκριμένα αποτελέσματα δεν είναι πλήρως επαρκή για να στηρίξουν τον συσχετισμό που επιδιώκουμε γι αυτό τα αποτελέσματα της ύπαρξης η όχι συσχέτισης, θα προκύψουν από την ανάλυση και των υπόλοιπων γονιδίων των mt-tRNAs και για περισσότερα δείγματα ασθενών στην ευρύτερη μελέτη, που βρίσκεται ήδη σε εξέλιξη.

ABSTRACT

Mitochondria are these subcellular organelles which are in charge of producing energy. This function's byproduct are the free radicals. When free radicals are over produced they elevate DNA mutation ratio which is already high due to the absence of mitochondrial dna-repair mechanisms. Most of such mutations lead to mitochondrial diseases, an heterogeneous group of diseases which are characterised by mitochondrial respiration chain dysfunction. The present study is a piece of a bigger investigation which takes place in order to correlate two diseases of yet unidentified cause, Sarcoidosis and IPF, with mt-tRNA mutations. These diseases seem to have a lot in common with mitochondrial diseases. The study includes 14 patient's blood sample analysis for Sarcoidosis and 11 for IPF. Blood samples were investigated for mutations in 11 mt-tRNAs 11 genes: t-RNAAsn, t-RNACys, t-RNATyr, t-RNAHis, t-RNASer(AGY), t-RNALeu(CUN), t-RNATrp, t-RNAAla, t-RNAGly, t-RNAVal, t-RNAGlu. The findings were three different mutations: 12308 A>G in t-RNALeu(CUN) in 7% of Sarcoidosis patients, 5495T>C (MT-ND2) in 57% of Sarcoidosis patients and in 36,4% of IPF patients, 10034 T>C in t-RNAGly in 9% of IPF patients. These results are not sufficient enough to conclude in the correlation we expect. So, the strong evidence will come out of the further analysis of all the rest mt-tRNA genes in a bigger sample number. These actions are already in progress in terms of the wide investigation.

A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

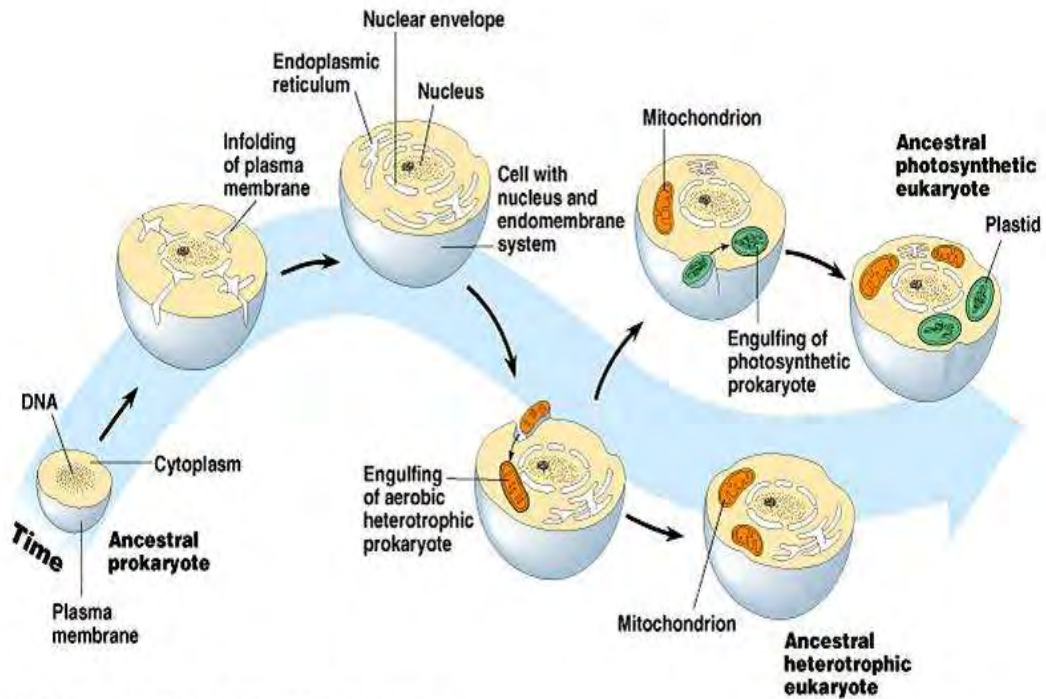
ΤΑ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑ

Το μιτοχόνδριο είναι ένα από τα πιο σημαντικά και πολυμελετημένα υποκυτταρικά οργανίδια. Ως οντότητα είναι πολύ ιδιαίτερο γιατί συγκεντρώνει μερικά πολύ διαφορετικά και αξιόλογα χαρακτηριστικά όπως:

1. Παράγεται από προϋπάρχοντα μιτοχόνδρια (αυτοανανέωση)
2. Διαθέτει κυκλικό DNA όπως οι προκαρυωτικοί οργανισμοί με τους οποίους εμφανίζει και ομοιότητες στα γονίδια.
3. Έχει διπλή μεμβράνη.
4. Η σύσταση της εσωτερικής μεμβράνης του μοιάζει με την πλασματική μεμβράνη των βακτηρίων.
5. Η πρωτεϊνοσυνθεση που εκτελεί μοιάζει με αυτήν των προκαρυωτικών οργανισμών.
6. Διαθέτει αλυσίδα μεταφοράς e⁻ παρόμοια με μερικών αερόβιων βακτηρίων.

1) Προέλευση - Θεωρία ενδοσυμβίωσης

Οι παρατηρήσεις αυτές οδήγησαν στην ανάπτυξη της ενδοσυμβιωτικής υπόθεσης με βάση την οποία τα μιτοχόνδρια και οι χλωροπλάστες προέρχονται από την συμβίωση ενός αερόβιου προκαρυώτη με ένα αρχέγονο αναερόβιο ευκαρυωτικό κύτταρο. Με αυτόν τον τρόπο το αναερόβιο κύτταρο αποκτούσε την δυνατότητα μεταφοράς ηλεκτρονίων στο οξυγόνο μέσω του αερόβιου προκαρυώτη. Αυτή η συμβιωτική σχέση διατηρήθηκε γιατί παρείχε πολλά πλεονεκτήματα και στα δύο μέλη. Στην πορεία ο ξενιστής χρησιμοποίησε αρκετές λειτουργίες του προκαρυώτη μέχρι που η μεταφορά λειτουργιών γενικεύτηκε με τη μετακίνηση και ενσωμάτωση πολλών γονιδίων του προκαρυώτη στο γονιδίωμα του ξενιστή. Η προσαρμογή αυτή στις νέες συνθήκες οδήγησε στην αλλαγή του αερόβιου συμβιώτη σε μιτοχόνδριο.



ΕΙΚΟΝΑ 1: ΤΑ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑ ΑΡΧΙΚΑ ΗΤΑΝ ΑΝΕΞΑΡΤΗΤΟΙ ΑΕΡΟΒΙΟΙ ΕΤΕΡΟΤΡΟΦΟΙ ΠΡΟΚΑΡΥΩΤΕΣ. ΤΗΝ ΓΝΩΣΤΗ ΣΗΜΕΡΙΝΗ ΜΟΡΦΗ ΚΑΙ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΟΥΣ ΑΠΕΚΤΗΣΑΝ ΛΟΓΩ ΤΗΣ ΕΙΣΟΔΟΥ ΤΟΥΣ ΣΤΟΥΣ ΠΡΟΓΟΝΙΚΟΥΣ ΠΡΟΚΑΡΥΩΤΕΣ. ΜΕ ΤΙΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΜΕΤΑΞΥ ΤΩΝ ΔΥΟ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΤΑ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑ ΕΓΙΝΑΝ ΤΑ ΙΔΙΑΙΤΕΡΑ ΚΥΤΤΑΡΙΚΑ ΟΡΓΑΝΙΔΙΑ ΠΟΥ ΥΠΑΡΧΟΥΝ ΣΗΜΕΡΑ ΕΝΩ Ο ΞΕΝΙΣΤΗΣ ΕΞΕΛΙΧΘΗΚΕ ΣΕ ΕΤΕΡΟΤΡΟΦΟ ΕΥΚΑΡΥΩΤΗ.

2) Κατανομή μιτοχονδρίων

Τα μιτοχόνδρια καταλαμβάνουν κατά μέσο όρο το 18-20% του συνολικού κυτταροπλασματικού όγκου του ευκαρυωτικού κυττάρου. Η ανάγκη του κάθε κυτταρικού τύπου σε ενέργεια καθορίζει τον αριθμό των μιτοχονδρίων. Σε κύτταρα με έντονη πρωτεϊνοσύνθεση το ποσοστό αυτό αυξάνεται σε μεγάλο βαθμό (το 40% περίπου του κυτταροπλάσματος των μυϊκών κυττάρων της καρδιάς στον άνθρωπο καταλαμβάνεται από μιτοχόνδρια). Η κατανομή των μιτοχονδρίων μέσα στα κύτταρα ακολουθεί σε πολλές περιπτώσεις την κατανομή των μικροσωληνίσκων. Είναι γνωστό ότι μπορούν να αλλάζουν θέση ή παραμένουν μόνιμα σε συγκεκριμένες κυτταρικές περιοχές ανάλογα με την τοπική ανάγκη για παραγωγή ενέργειας.

3)Μορφολογία-Δομή

Το **σχήμα και το μέγεθος** των μιτοχονδρίων δεν είναι σταθερό, ποικίλει ανάλογα με τον τύπο, τη μεταβολική κατάσταση και τις συγκεκριμένες λειτουργικές ανάγκες των κυττάρων. Συνήθως είναι επίμηκη, και οι διαστάσεις τους είναι 0,3-1 μm σε διάμετρο με 1-10 μm σε μήκος. Στα κύτταρα με έντονο οξειδωτικό μεταβολισμό, τα μιτοχόνδρια είναι μεγάλα και αρκετά επιμήκη.

Κάθε μιτοχόνδριο περιβάλεται από **δύο μεμβράνες**, μια εξωτερική και μια εσωτερική. Οι δύο αυτές μεμβράνες ορίζουν το διαμεμβρανικό χώρο (λεπτός χώρος ανάμεσα στις δύο μεμβράνες) και το χώρο της μήτρας (matrix).

Η **εξωτερική** μιτοχονδριακή μεμβράνη είναι σχετικά διαπερατή. Περιέχει ειδικές πρωτεΐνες μεταφοράς όπως η πορίνη, οι οποίες επιτρέπουν ελεύθερη διαπερατότητα στα μόρια με μοριακό βάρος μέχρι 10 kD, από το κυτταρόπλασμα στο διαμεμβρανικό χώρο. Περιέχει επίσης ένζυμα που μετατρέπουν ορισμένα λιπίδια σε ενώσεις ικανές να μεταβολισθούν μέσα στο μιτοχόνδριο.

Η **εσωτερική** μιτοχονδριακή μεμβράνη είναι αδιαπέραστη στα μικρά ιόντα, της μεγάλης περιεκτικότητάς της σε καρδιολιπίνη. Αυτή η ιδιότητα της εσωτερικής μεμβράνης είναι ουσιώδης για τη μιτοχονδριακή λειτουργία καθώς επιτρέπει τη **δημιουργία ηλεκτροχημικής διαβάθμισης κατά τη διάρκεια της παραγωγής των υψηλής ενέργειας κυτταρικών μεταβολιτών**. Η εσωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου εμφανίζει πολλαπλές πτυχώσεις τις ακρολοφίες, οι οποίες αυξάνουν την επιφάνειά της. Στις ακρολοφίες βρίσκονται τα ένζυμα της αναπνευστικής αλυσίδας και η συνθετάση του ATP, που είναι υπεύθυνα για την παραγωγή ενέργειας.

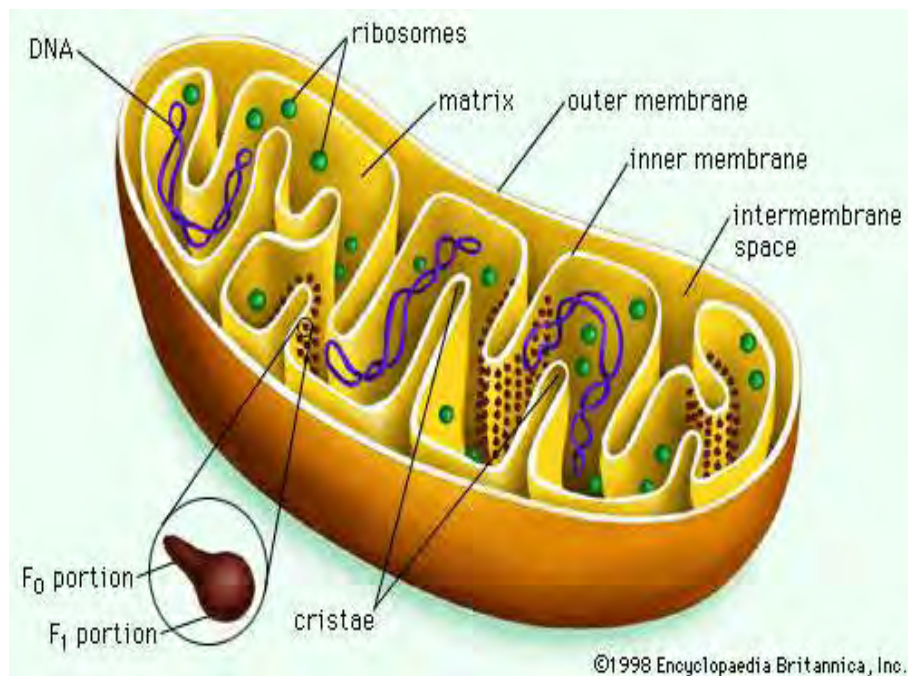
Ο **διαμεμβρανικός χώρος** περιέχει:

- Τους μεταβολίτες που εισέρχονται διαμέσου της εξωτερικής μεμβράνης.
- Τα ιόντα από το χώρο της μήτρας που αντλούνται από αυτήν κατά τη διάρκεια της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης.
- Το ATP που παράγεται στο μιτοχόνδριο.

Η **μιτοχονδριακή μήτρα** είναι η κοκκιώδης περιοχή που περικλείεται από τις πτυχώσεις της εσωτερικής μεμβράνης

Ο χώρος της μήτρας περιέχει:

- Ριβοσώματα
- Κοκκία ασβεστίου
- Ένζυμα υπεύθυνα για την οξείδωση των λιπαρών οξέων καθώς επίσης για τον κύκλο του πυροσταφυλικού (πυροσταφυλική αφυδρογονάση) και του κιτρικού οξέος (κύκλος Krebs) .
- DNA και ένζυμα υπεύθυνα για τη μεταγραφή του.
- RNA



ΕΙΚΟΝΑ 2: ΣΤΗΝ ΕΙΚΟΝΑ ΦΑΙΝΕΤΑΙ Η ΔΟΜΗ ΤΟΥ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΟΥ ΚΑΙ ΟΙ ΘΕΣΕΙΣ ΤΩΝ ΚΥΡΙΟΤΕΡΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΤΟΥ. ΤΑ ΡΙΒΟΣΩΜΑΤΑ ΚΑΙ ΤΟ mt-DNA ΕΔΡΑΖΟΝΤΑΙ ΣΤΗ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΗ ΜΗΤΡΑ, Η f_1-f_0 ATPase ΒΡΙΣΚΕΤΑΙ ΣΤΗΝ ΕΣΩΤΕΡΙΚΗ ΜΕΜΒΡΑΝΗ ΜΕ ΠΡΟΣΑΝΑΤΟΛΙΣΜΟ ΠΑΝΤΑ ΜΕ ΤΗΝ ΥΠΟΜΟΝΑΔΑ f_0 ΠΡΟΣ ΤΟΝ ΔΙΑΜΕΜΒΡΑΝΙΚΟ ΧΩΡΟ.

4) Το γενετικό υλικό μιτοχονδρίων

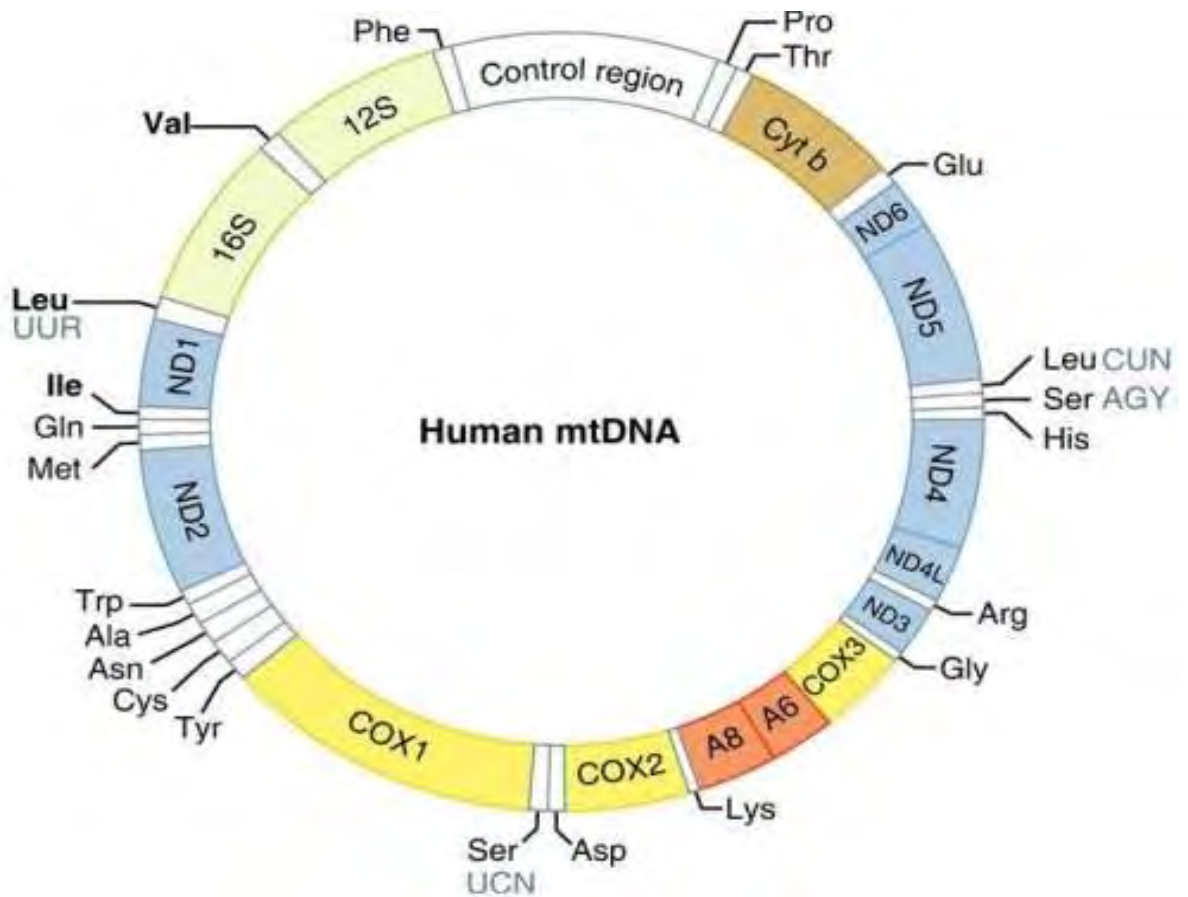
Τα μιτοχόνδρια καλούνται ημιαυτόνομα οργανίδια. Αυτός ο χαρακτηρισμός τους έχει δοθεί διότι διαθέτουν το δικό τους γενετικό υλικό το οποίο όμως δεν επαρκεί για να στηρίξει μόνο του την ύπαρξη του οργανιδίου. Αυτό συμβαίνει όπως θα δούμε γιατί κάποια απαραίτητα γι αυτό γονίδια βρίσκονται στο πυρηνικό DNA.

Το mtDNA αποτελείται από ένα δίκλωνο κυκλικό μόριο DNA, που σε αντίθεση με το πυρηνικό περιέχει κωδικές αλληλουχίες οι οποίες απαντούν μόνο μία φορά στο γονιδίωμα του. Χαρακτηριστική επίσης είναι η έλλειψη νουκλεοτιδικών αλληλουχιών μεταξύ των γονιδίων καθώς και η απουσία ιντρονίων και ψευδογονιδίων.

Το ανθρώπινο mtDNA έχει μήκος 16.569 ζεύγη βάσεων και βρίσκεται σε δυο έως δέκα αντίγραφα σε κάθε μιτοχόνδριο

4.1) Γενετική δομή του μιτοχονδριακού DNA

Το μιτοχονδριακό DNA περιλαμβάνει: τα **rRNA** γονίδια **12S** και **16S**, που κωδικοποιούν τη μικρή και τη μεγάλη υπομονάδα του ριβοσώματος το οποίο λαμβάνει μέρος στο μεταφραστικό σύστημα του μιτοχονδρίου. Περιλαμβάνει επίσης τα γονίδια των **22 μιτοχονδριακών tRNAs** και τα γονίδια των **13 αγγελιοφόρων RNAs (mRNAs)** που μεταφράζονται σε πρωτεΐνες οι οποίες συμμετέχουν στο σύστημα της αναπνοής. Αυτές οι πρωτεΐνες είναι μόνο 13 ή 14. Οι υπόλοιπες προέρχονται από τη μετάφραση του πυρηνικού DNA του κυττάρου.



ΕΙΚΟΝΑ 3: ΤΑ ΓΟΝΙΔΙΑ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΥ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟΥ DNA: ΜΕ ΑΣΠΡΟ ΤΑ ΓΟΝΙΔΙΑ ΤΩΝ mtRNAs, ΜΕ ΜΠΛΕ ΤΑ ΓΟΝΙΔΙΑ ΤΩΝ ΥΠΟΜΟΝΑΔΩΝ ΤΗΣ NADH ΑΦΥΔΡΟΓΟΝΑΣΗΣ, ΜΕ ΚΙΤΡΙΝΟ ΤΗΣ ΚΥΚΛΟΞΥΓΟΝΑΣΗΣ, ΜΕ ΚΑΦΕ ΤΟΥ ΚΥΤΟΧΡΩΜΑΤΟΣ Β, ΜΕ ΜΠΕΖ ΤΩΝ ΡΙΒΟΣΩΜΙΚΩΝ RNA, ΜΕ ΚΟΚΚΙΝΟ Η 8η ΚΑΙ Η 6η ΥΠΟΜΟΝΑΔΑ ΤΗΣ ΚΑΡΒΟΞΥΠΕΠΤΙΔΑΣΗΣ ΚΑΙ ΜΕ ΑΣΠΡΟ Η ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ.

Γενικά, για την κωδικοποίηση των μιτοχονδριακών πρωτεϊνών απαιτούνται περίπου 3000 γονίδια. Από αυτά τα 37 μόνο βρίσκονται στο μιτοχονδριακό DNA ενώ τα υπόλοιπα βρίσκονται στα χρωμοσώματα του πυρηνικού DNA.

Άρα το μεγαλύτερο μέρος της γενετικής πληροφορίας του συνόλου των πρωτεϊνών των μιτοχονδρίων είναι στο χρωμοσωμικό DNA και παίρνει μέρος σε διαδικασίες εκτός από τη σύνθεση ATP.

Από την έρευνα της νουκλεοτιδικής ανάλυσης του μιτοχονδριακού γονιδιώματος γνωρίζουμε επίσης ότι οι περιοχές μεταξύ των γονιδίων είτε είναι κενές είτε αποτελούνται από ένα έως μερικά μόνο νουκλεοτίδια. Το υπόλοιπο ποσοστό το οποίο δε μεταγράφεται αποτελεί μια διακριτή ρυθμιστική περιοχή πλούσια σε αδενίνη και θυμίνη, η οποία είναι υπεύθυνη για την αντιγραφή του γονιδιώματος.

4.2) mt-rRNA

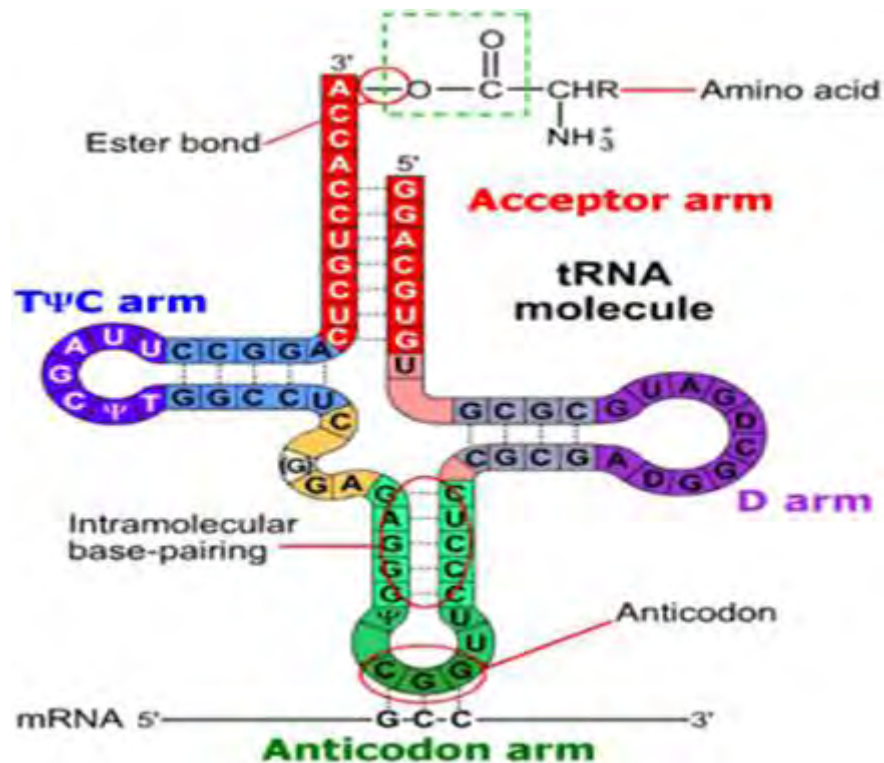
Τα μιτοχονδριακό σύστημα μετάφρασης είναι απλούστερο του πυρηνικού το οποίο μπορεί να περιέχει μέχρι και πέντε υπομονάδες. Το μιτοχονδριακό σύστημα μετάφρασης αποτελείται από δύο μόνο ριβοσωμικές υπομονάδες (12S, 16S), οι οποίες απαντώνται στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα σε ένα μόνο αντίγραφο. Κάθε ριβοσωμικό γονίδιο σχηματίζει μια μονόκλωνη αλυσίδα RNA, της οποίας η δευτεροταγή δομή προκύπτει από την αναδίπλωσή της, συνθέτοντας ένα σύνολο βρόγχων (loop) και κλάδων (stem). Όπως θα ήταν αναμενόμενο λόγω λειτουργικών περιορισμών ο πυρήνας της δευτεροταγούς αυτής δομής του ριβοσώματος παρουσιάζει υψηλό ποσοστό συντήρησης στο σύνολο όλων των γονιδιωμάτων.

4.3) mt-tRNA

Τα γονίδια των μιτοχονδριακών tRNA υφίστανται λιγότερους δομικούς και λειτουργικούς περιορισμούς και περισσότερες φθορές σε σχέση με τα γονίδια των tRNA του πυρήνα και γι'αυτό το λόγο ο ρυθμός της εξέλιξής τους είναι μεγαλύτερος. Ωστόσο εξελίσσονται με πολύ μικρότερο ρυθμό σε σχέση με το ρυθμό εξέλιξης των γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες.

Ο ρυθμός εξέλιξης μεταβάλλεται τόσο μεταξύ των μιτοχονδριακών tRNA όσο και εντός των διαφόρων περιοχών της δομής τους. Μεγαλύτερη σταθερότητα παρουσιάζουν οι βρόγχοι οι οποίοι συνθέτουν την περιοχή του αντικωδικονίου και ακολουθούν οι περιοχές των κορμών. Μεταβολές στο μέγεθος καθώς και στην αλληλουχία των tRNA εστιάζονται κυρίως στους βρόγχους D και T .

Ο διαφορετικός ρυθμός της εξέλιξης των tRNA μπορεί να είναι αποτέλεσμα του γεγονότος ότι tRNA τα οποία γειτονεύουν με το 5' άκρο πρωτεϊνικών γονιδίων αποτελούν σημαντικές περιοχές για τη μεταγραφή τους. Συνεπώς, αφού αποτελούν σημαντικές αλληλουχίες, συντηρούνται. Το αποτέλεσμα αυτού του περιορισμού οδηγεί σε μικρούς σχετικά ρυθμούς εξέλιξης των αντιστοιχών tRNA.



ΕΙΚΟΝΑ 4: Η ΔΟΜΗ ΚΑΙ Η ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΕΝΟΣ ΠΡΟΤΥΠΟΥ ΜΟΡΙΟΥ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟΥ tRNA. ΦΑΙΝΟΝΤΑΙ ΟΙ ΠΕΡΙΟΧΕΣ ΠΡΟΣΔΕΣΗΣ ΤΟΥ ΑΜΙΝΟΞΕΟΣ ΚΑΙ ΤΟΥ ΑΝΤΙΚΩΔΙΚΟΝΙΟΥ.

4.4) mt-mRNA

Γενικά ο ρυθμός εξέλιξης των πρωτεϊνικών γονιδίων παρουσιάζεται μεγαλύτερος από τον αντίστοιχο ρυθμό των RNA γονιδίων. Η μεγαλύτερη διαφορά μεταξύ τους εστιάζεται στο γεγονός ότι οι δομικοί και λειτουργικοί περιορισμοί για οποιαδήποτε αλλαγή της αλληλουχίας των γονιδίων αυτών δεν ελέγχονται άμεσα από την νουκλεοτιδική αλληλουχία, αλλά έμμεσα από την αντίστοιχη αμινοξική. Λόγω του εκφυλιστικού χαρακτήρα του γενετικού κώδικα οι κωδικές αλληλουχίες των αμινοξέων (τριπλέτες) μπορούν να κωδικοποιούνται από μία ή περισσότερες καταστάσεις.

Αυτό όμως δεν ισχύει για τα tRNAs τα οποία θα επηρεαστούν σίγουρα από την οποιαδήποτε αλλαγή στα νουκλεοτίδια.

5) Λειτουργίες του μιτοχονδρίου

Κάθε μια ξεχωριστή λειτουργία του μιτοχονδρίου εντοπίζεται και σε διαφορετικό τμήμα του (π.χ. μήτρα, διαμεμβρανικός χώρος, εσωτερική μεμβράνη). Ο διαχωρισμός αυτός των λειτουργιών συμβαίνει επειδή τα υπεύθυνα για την κάθε λειτουργία ένζυμα εντοπίζονται σε διαφορετικά διακριτά μέρη του οργανιδίου.

Τα μιτοχόνδρια είναι **το κέντρο παραγωγής ATP**, άρα είναι τα μόνα οργανίδια που είναι υπεύθυνα για την παραγωγή ενέργειας στα κύτταρα και αυτή συνιστά την σημαντικότερη τους λειτουργία.

Μια ακόμη πολύ σημαντική λειτουργία των μιτοχονδρίων που θα αναφερθεί είναι η συνεισφορά τους στον θάνατο των κυττάρων, μια διαδικασία γνωστή ως απόπτωση ή **κυτταρικός θάνατος**.

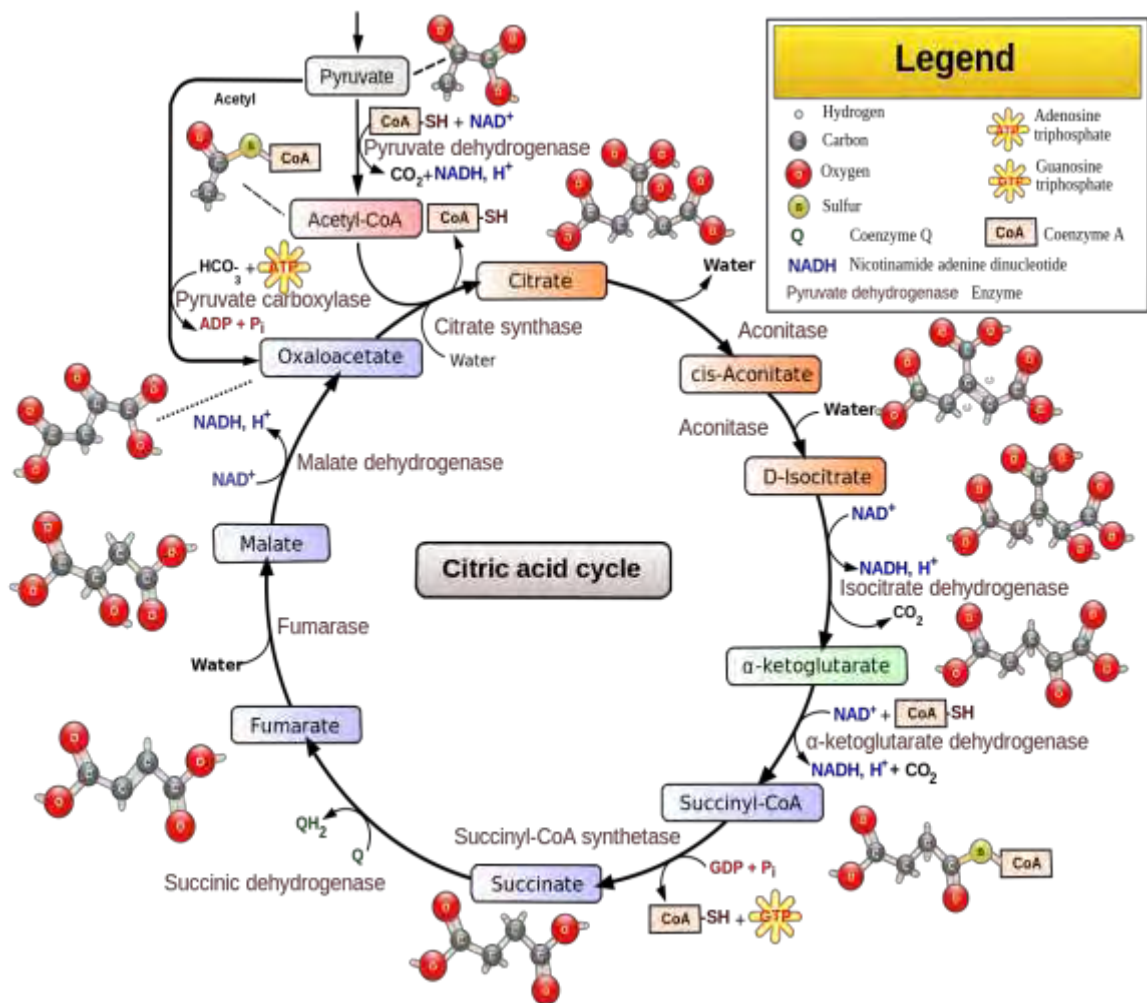
5.1) Παραγωγή ενέργειας στα μιτοχόνδρια:

Τα μιτοχόνδρια τροφοδοτούν το κύτταρο με ενέργεια είτε έμμεσα μέσω παραγωγής των φορέων ηλεκτρονίων **NADH και FADH₂** είτε άμεσα μέσω παραγωγής του **ATP**.

5.1α) NADH και FADH₂ - Ο Κύκλος του Krebs

Ο κύκλος του κιτρικού οξέος είναι μια κυκλική αλληλουχία αντιδράσεων. Στον κύκλο αυτό συμμετέχουν πολλά ένζυμα τα οποία λαμβάνουν μέρος σε μια πληθώρα αντιδράσεων που λαμβάνουν χώρα στη μιτοχονδριακή μήτρα. **Ο κύκλος του κιτρικού οξέος προσφέρει ενέργεια στα κύτταρα με άμεσο αλλά κυρίως με έμμεσο τρόπο, μέσω της παραγωγής NADH και FADH₂**, τα οποία είναι φορείς ηλεκτρονίων υψηλής ενέργειας και υδρογόνου. Τα **NADH και FADH₂**, θα χρησιμοποιηθούν στη συνέχεια σε πολλαπλές αντιδράσεις και μπορούν να μετατραπούν σε **ATP** κάτω από αερόβιες συνθήκες εισερχόμενα στην **αναπνευστική αλυσίδα** της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης που **καταλήγει στην οξειδωτική φωσφορυλίωση του ADP προς ATP**.

Ο κύκλος του κιτρικού οξέος, όπως και όλες οι αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα στον οργανισμό, πρέπει να ελέγχεται, ώστε τα προϊόντα του να βρίσκονται στη σωστή συγκέντρωση ανάλογα με τις ανάγκες. Ο έλεγχος αυτός επιτυγχάνεται σε τέσσερα στάδια με την αναστολή ή τη διέγερση των ενζύμων αφυδρογονάση του πυροσταφυλικού, συνθετάση του κιτρικού, αφυδρογονάση του ισοκιτρικού και α κετογλουταρική αφυδρογονάση.



ΕΙΚΟΝΑ 5: Ο ΚΥΚΛΟΣ ΤΟΥ ΚΙΤΡΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ: ΤΟ ΠΥΡΟΣΤΑΦΥΛΙΚΟ ΟΞΥ ΑΠΟ ΤΗΝ ΓΛΥΚΟΛΥΣΗ ΕΙΣΕΡΧΕΤΕΙ ΑΦΟΥ ΜΕΤΑΤΡΑΠΕΙ ΣΕ ΑΚΕΤΥΛΟΣΥΝΕΝΖΥΜΟ Α ΣΤΟΝ ΚΥΚΛΟ ΤΟΥ ΚΙΤΡΙΚΟΥ. ΕΚΕΙ ΜΕΣΑ ΑΠΟ ΤΟ ΣΥΝΟΛΟ ΤΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΩΝ ΜΙΑΣ ΠΛΗΡΟΥΣ ΠΕΡΙΣΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΚΥΚΛΟΥ ΚΑΤΑΛΗΓΕΙ ΣΤΗ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΔΥΟ ΜΟΡΙΩΝ ΔΙΟΞΕΙΔΙΟΥ ΤΟΥ ΑΝΘΡΑΚΑ, ΤΡΙΩΝ ΜΟΡΙΩΝ NADH, ΕΝΟΣ ΜΟΡΙΟΥ FADH₂ ΚΑΙ ΕΝΟΣ ΜΟΡΙΟΥ GTP, ΤΟ ΟΠΟΙΟ ΕΝΖΥΜΙΚΑ ΜΠΟΡΕΙ ΝΑ ΜΕΤΑΤΡΑΠΕΙ ΣΕ ATP.

Η σημασία του κύκλου του κιτρικού οξέος, επεκτείνεται πέρα από την παραγωγή CO₂ και ανηγμένων συνενζύμων καθώς οι ενδιάμεσοι μεταβολίτες του κύκλου χρησιμεύουν και στη σύνθεση νέου κυτταρικού υλικού, καθώς τα μιτοχόνδρια είναι επίσης υπεύθυνα και για την βιοσύνθεση λιπαρών οξέων.

5.1β) ATP - Μεταφορά ηλεκτρονίων μέσω αναπνευστικής αλυσίδας

Η μεταφορά των ηλεκτρονίων λαμβάνει χώρα στην εσωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου και είναι υπεύθυνη για τη δημιουργία της ηλεκτροχημικής βαθμίδωσης και άρα της δημιουργίας του ATP αφού η λειτουργία της ATP συνθάσης βασίζεται στην ηλεκτροχημική βαθμίδωση.

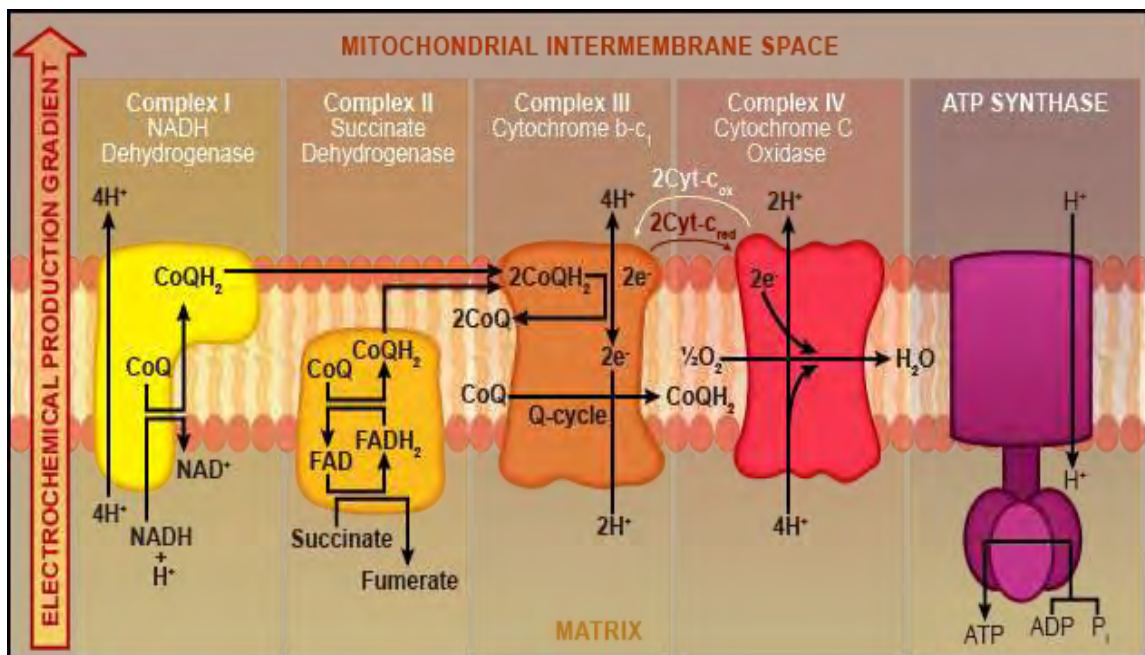
Αρχίζει με τη συμμετοχή του **συμπλόκου της NADH αφυδρογονάσης**, όπου το ιόν υδριδίου (H^-) αποβάλλεται από το NADH και αποδίδει ένα πρωτόνιο και δύο ηλεκτρόνια.

Στη συνέχεια τα ηλεκτρόνια περνούν από μια ομάδα φλαβίνης που συνδέεται με το σύμπλοκο και από τα κέντρα σιδήρου-θείου για να καταλήξουν στην ουβικινόνη.

Επίσης, τα ηλεκτρόνια μπορούν να εισέλθουν στην αναπνευστική αλυσίδα μέσω του $FADH_2$ και του **συμπλόκου II της ηλεκτρικής αφυδρογονάσης**, που αποδίδουν τα ηλεκτρόνια στην ουβικινόνη.

Το μικρό αυτό υδρόφοβο, ευδιάλυτο στη μεμβράνη μόριο αποδίδει τα ηλεκτρόνια στο **σύμπλοκο των κυτοχρωμάτων b-c₁**, όπου ο φορέας των ηλεκτρονίων είναι πλέον το άτομο του σιδήρου που περιέχεται στα μόρια της αίμης.

Το κυτόχρωμα παραλαμβάνει τα ηλεκτρόνια και τα μεταφέρει στην **κυτοχρωμική οξειδάση**. Τέσσερα ηλεκτρόνια από το κυτόχρωμα c και τέσσερα πρωτόνια που λαμβάνονται από το υδάτινο περιβάλλον μεταφέρονται σε ένα μόριο O_2 σχηματίζοντας δύο μόρια νερού. Το αποτέλεσμα είναι να αντλούνται από την οξειδάση 4 πρωτόνια από το μιτοχονδριακή μήτρα προς το διαμεμβρανικό χώρο δημιουργώντας την **ηλεκτροχημική διαβάθμιση των πρωτονίων**.



ΕΙΚΟΝΑ 6: ΤΑ ΕΝΖΥΜΑ ΤΗΣ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΗΣ ΑΛΥΣΙΔΑΣ: ΜΕ ΚΙΤΡΙΝΟ ΕΝΤΟΝΟ Η NADH ΑΦΥΔΡΟΓΟΝΑΣΗ, ΜΕ ΣΚΟΥΡΟ ΚΙΤΡΙΝΟ Η ΑΦΥΔΡΟΓΟΝΑΣΗ ΤΟΥ ΗΛΕΚΤΡΙΚΟΥ, ΜΕ ΠΟΡΤΟΚΑΛΙ ΤΟ ΚΥΤΟΧΡΩΜΑ b, ΜΕ ΡΟΖ Η ΚΥΤΟΧΡΩΜΙΚΗ ΟΞΕΙΔΑΣΗ ΚΑΙ ΜΕ ΜΩΒ Η ΣΥΝΘΑΣΗ ΤΟΥ ATP.

5.1γ) ATP - οξειδωτική φωσφορυλίωση

Ο κύκλος του κιτρικού οξέος πραγματοποιείται κάτω από αερόβιες συνθήκες, γιατί απαιτεί συνεχή τροφοδοσία με NAD^+ και FAD . Αυτοί οι δέκτες ηλεκτρονίων αναγεννώνται, όταν το **NADH και FADH_2 μεταφέρουν τα ηλεκτρόνιά τους στο O_2 , μέσω της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων με παράλληλη φωσφορυλίωση του ADP σε ATP** . Η τελευταία αυτή διεργασία ονομάζεται οξειδωτική φωσφορυλίωση (παραγωγή ATP κατά τη μεταφορά ηλεκτρονίων από το NADH ή το FADH_2 προς το O_2 , διαμέσου μίας σειράς φορέων ηλεκτρονίων). Η μεταβολική αυτή πορεία αποτελεί την κυριότερη πηγή δημιουργίας ATP στους αερόβιους οργανισμούς.

Η μεταφορά ηλεκτρονίων από τα ανηγμένα συνένζυμα προς το O_2 (αναπνευστική αλυσίδα) και η φωσφο-ρυλίωση του ADP για τη δημιουργία του ATP είναι πορείες συζευγμένες άρρηκτα η μια με την άλλη.

Η μεγαλύτερη συγκέντρωση των πρωτονίων στον διαμεμβρανικό χώρο σε σχέση με τη συγκέντρωσή τους στη μιτοχονδριακή μήτρα, προκαλεί μια αυθόρμητη συνεχή ροή των πρωτονίων από τον πρώτο χώρο στον δεύτερο, μέσω ενός διαύλου που παρέχει η **ATP-συνθάση**.

Η ελεύθερη ενέργεια που απελευθερώνεται με αυτήν την αυθόρμητη ροή αξιοποιείται για τη σύνθεση του ATP . Η ροή των πρωτονίων έχει αποτέλεσμα την περιστροφή ενός τμήματος του ενζύμου. η ροή αυτή είναι συνεχής, αφού συνεχώς λειτουργεί και η αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων που περιγράφηκε προηγουμένως.

ATP-συνθάση

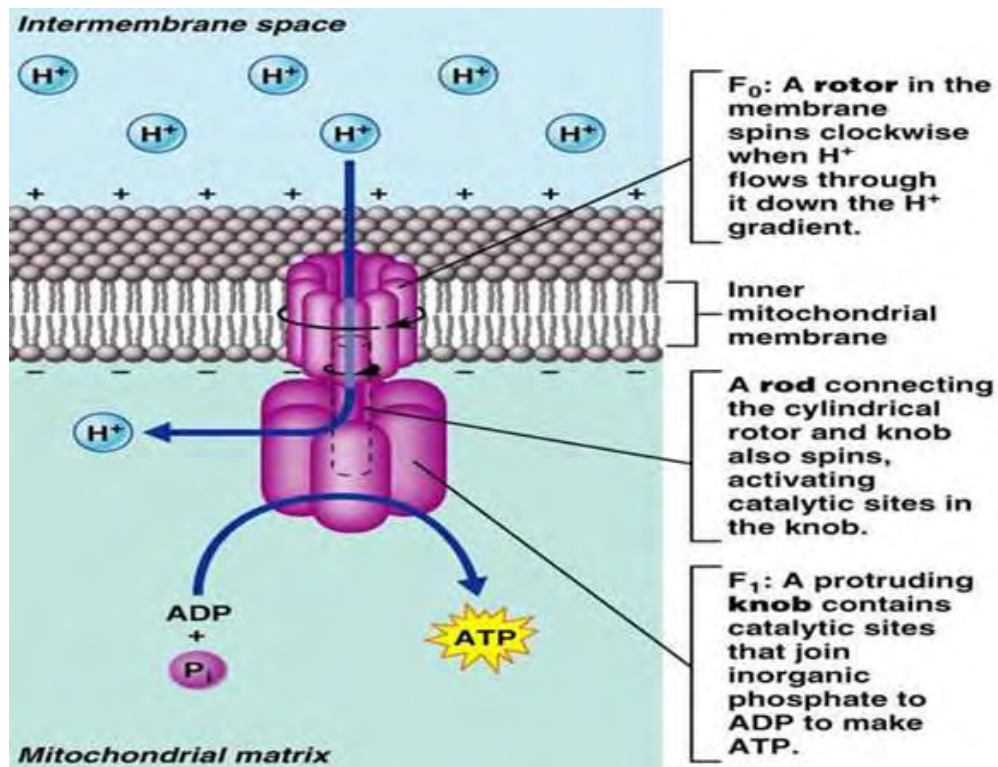
Διακρίνονται δύο χαρακτηριστικά τμήματα στην ATP-συνθάση: Το λιπόφιλο τμήμα F_0 που περιβάλλεται από την εσωτερική μεμβράνη και το υδρόφιλο τμήμα F_1 το οποίο προεξέχει και βρίσκεται στη μιτοχονδριακή μήτρα. Αποτελείται από 6 υπομονάδες: Τρεις όμοιες υπομονάδες με καταλυτικές θέσεις, εναλλάξ με τρεις όμοιες υπομονάδες χωρίς.

Σε τρεις φάσεις πραγματοποιούνται:

(α) Η "σύλληψη" του ADP και του φωσφορικού ιόντος,

(β) η σύνδεσή τους με σχηματισμό ATP και

(γ) η απελευθέρωση του σχηματισμένου ATP προς τη μιτοχονδριακή μήτρα, από την οποία διαχέεται προς τον διαμεμβρανικό χώρο και τελικά προς το κυτταρόπλασμα.



ΕΙΚΟΝΑ 7: Η ΔΟΜΗ ΚΑΙ Η ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΩΝ ΤΜΗΜΑΤΩΝ ΤΗΣ ΑΤΡ ΣΥΝΘΕΣΗΣ

5) Ο Ρόλος του μιτοχονδρίου στην απόπτωση

Η διαδικασία της απόπτωσης ενεργοποιείται όταν το φυσιολογικό κύτταρο υποστεί μη αναστρέψιμη βλάβη του DNA εξ αιτίας χημικών μεταλλαξιγόνων, οξειδωτικού stress, ακτινοβολίας, προκειμένου να διακοπεί ο πολλαπλασιασμός του και η αντιγραφή ενός προβληματικού DNA, πράγμα που θα μπορούσε να οδηγήσει σε μεταλλάξεις.

Η ποικιλία ερεθισμάτων που αναφέρθηκε παραπάνω οδηγεί στην ενεργοποίηση του **p53**. Από κει ξεκινά ένα μονοπάτι ενεργοποίησης διάφορων πρωτεϊνών που είτε βρίσκονται στην μεμβράνη με απευθείας δράση στα μιτοχόνδρια, είτε βρίσκονται ενδοκυττάρια και κωδικοποιούνται από το BAX και το p53 που εν τέλει ενεργοποιούν τα μιτοχόνδρια

Στο μιτοχόνδριο κατά την απόπτωση παρατηρείται κατάρρευση του μηχανισμού μεταφοράς e^- (πτώση επιπέδων ATP), απελευθέρωση ενεργοποιητών πρωτεϊνικής φύσεως (CYTO-C / AIF) και απελευθέρωση ROS (reactive oxygen species).

Ο **BAX** πιο συγκεκριμένα απελευθερώνει τον αποπτωτικό παράγοντα Bcl2 από την κυτταροπλασματική πρωτεΐνη **Apaf-1**.

Η **αναλογία BAX/BCL-2** καθορίζει την επιβίωση ή το θάνατο ενός κυττάρου. Τα ομοδιμερή BAX/BAX επάγουν την απόπτωση, ενώ τα ομοδιμερή BCL-2/BCL-2 λειτουργούν ως καταστολείς της ως εξής:

Οι **πρωτεΐνες Bcl-2** είναι ικανές να προάγουν ή να καταστείλουν την απόπτωση δρώντας άμεσα πάνω στο MAC. Οι πρωτεΐνες Bax σχηματίζουν το δίαυλο, ενώ οι πρωτεΐνες Bcl-2, Bcl-xL ή Mcl-1 εμποδίζουν το σχηματισμό του. Το MAC (mitochondrial apoptosis-induced channel) είναι ένας διαύλος, στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη.

Το **κυτόχρωμα C**, περιέχει 100 αμινοξέα και συγκρατείται χαλαρά με ιοντικές αλληλεπιδράσεις στην εσωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου. Πυροδοτεί την ενεργοποίηση κασπασών μέσω της δημιουργίας του αποπτωσωματίου (Cyto-C/Apaf-1/Pro-caspase 9/ATP).

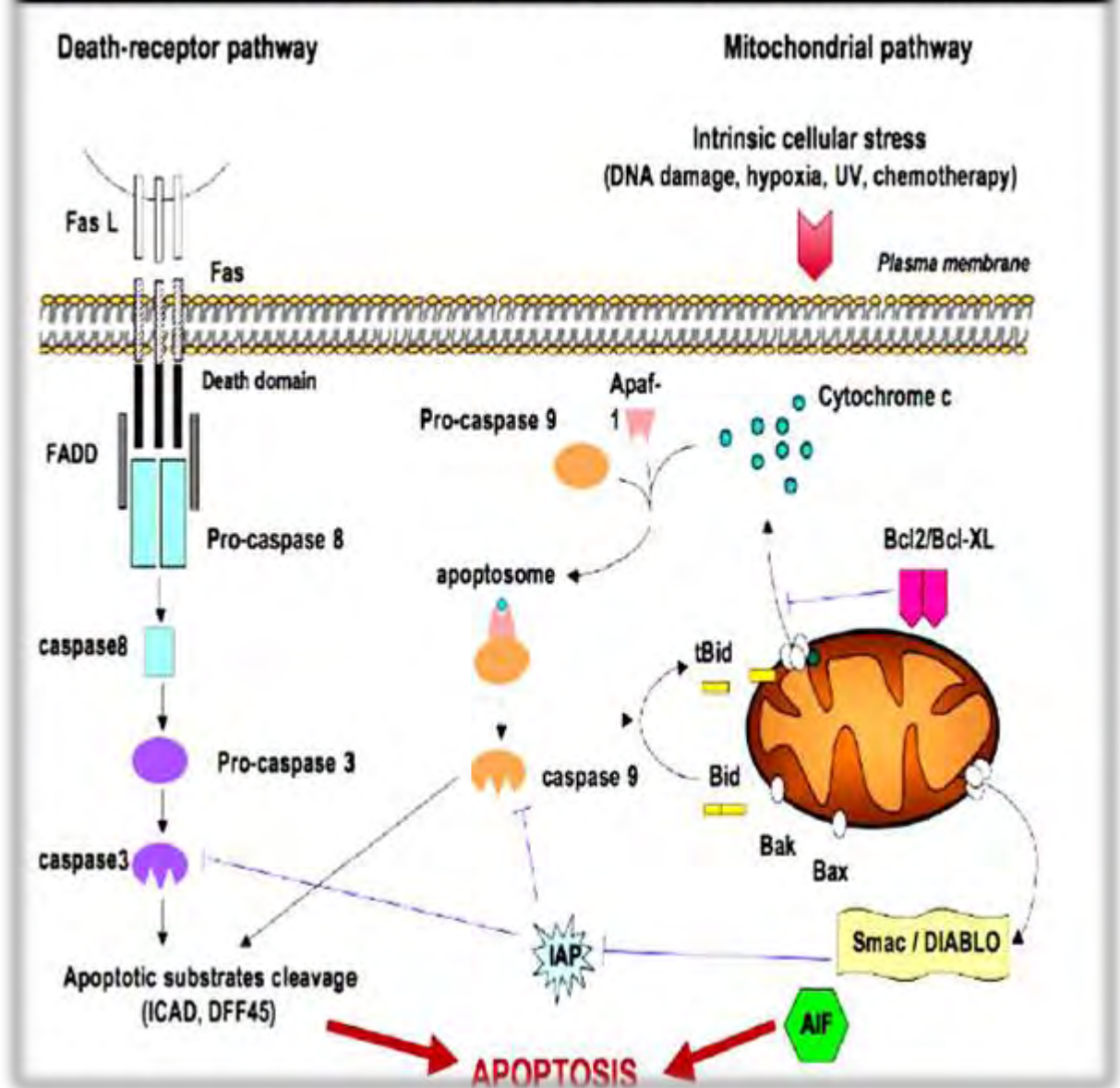
Το Cyto-C αποτελεί την «εκκίνηση» ενός μηχανισμού ενεργοποίησης ενός μεγάλου αριθμού κασπασών, ο οποίος και τελικά θα οδηγήσει στην απόπτωση. Αυτή η «εκκίνηση» συμβαίνει μόλις αρχίσει το κυτόχρωμα C να διαχέεται στο κυτταρόπλασμα λόγω των διαύλων MAC.

Μόλις το κυτόχρωμα c απελευθερωθεί, προσδένεται στην πρωτεΐνη ενεργοποίησης της απόπτωσης 1 (**APAF-1**) που πλέον είναι αποδεσμευμένη από τον Bcl όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, και σε ATP, και στη συνέχεια προσδένεται στην προκασπάση-9 με αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός πρωτεϊνικού συμπλόκου γνωστού ως αποπτώσωμα.

Στο αποπτώσωμα η προκασπάση μεταπίπτει στην ενεργή μορφή της, την κασπάση-9, η οποία με τη σειρά της ενεργοποιεί την πρωτεΐνη καθοριστή κασπάση-3. Η κασπάση 3 εισέρχεται στον πυρήνα του κυττάρου και διασπά την πρωτεΐνη PARP (polyADP ribose polymerase) και οδηγεί στην **κατάτμηση του DNA**.

Με την απελευθέρωση του κυτοχρώματος C από τα μιτοχόνδρια διαχέεται επίσης και ο παράγοντας επαγωγής της απόπτωσης (AIF), ο οποίος στη συνέχεια μεταφέρεται στον πυρήνα και ρυθμίζει την **ενζυμική δράση ενδονουκλεασών**.

ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑ ΚΑΙ ΑΠΟΠΤΩΤΙΚΟΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΘΑΝΑΤΟΣ



ΕΙΚΟΝΑ 8: ΤΑ ΔΥΟ ΜΟΝΟΠΑΤΙΑ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗΣ ΤΗΣ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ, ΑΡΙΣΤΕΡΑ Ο ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΝΕΚΡΩΣΗΣ Ο ΟΠΟΙΟΣ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΕΙΤΑΙ ΑΠΟ ΤΗ ΣΥΝΔΕΣΗ ΕΙΔΙΚΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΜΕ ΤΟΝ ΕΙΔΙΚΟ ΠΡΟΣΔΕΤΗ ΤΟΥ, ΔΕΞΙΑ Ο ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΙΣΜΕΝΟΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΘΑΝΑΤΟΣ Ο ΟΠΟΙΟΣ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΕΙΤΑΙ ΑΠΟ ΚΑΤΑΣΤΑΣΕΙΣ ΣΤΡΕΣ ΚΑΙ ΣΤΗΡΙΖΕΤΑΙ ΣΕ ΜΕΓΑΛΟ ΒΟΗΘΟ ΣΤΟ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΟ .

6) Μιτοχόνδρια και οξειδωτικό stress

Η παραγωγή του οξειδωτικού stress μπορούμε να θεωρήσουμε ότι είναι άλλη μια λειτουργία των μιτοχονδρίων. Στην πραγματικότητα είναι ένα παραπροϊόν της λειτουργίας της αναπνευστικής αλυσίδας.

6.1) Τι είναι το οξειδωτικό stress

Ο όρος οξειδωτικό στρες αναφέρεται σε μια σοβαρή δυσαναλογία μεταξύ της παραγωγής δραστικών ειδών οξυγόνου (ROS) και αζώτου (RNS) και του αντιοξειδωτικού μηχανισμού του οργανισμού. Έχει οριστεί ως μια διαταραχή στην προοξειδωτική και αντιοξειδωτική ισορροπία του οργανισμού, γεγονός το οποίο μπορεί να οδηγήσει σε καταστροφή βιομορίων. Το οξειδωτικό στρες μπορεί να προκαλέσει μείωση των αμυντικών συστημάτων του οργανισμού και οξείδωση μορίων όπως λιπιδίων, πρωτεϊνών, υδατανθράκων και DNA.

Ωστόσο, οι δραστικές ρίζες οξυγόνου συμμετέχουν και σε διαδικασίες σημαντικές για τη λειτουργία του οργανισμού. Χρησιμεύουν στην άμυνα του οργανισμού απομακρύνοντας αντιγόνα με τη διαδικασία της φαγοκύτωσης, ενώ έχουν συμμετοχή στη σηματοδότηση των κυττάρων αλλά και τη μυική συστολή. Είναι λοιπόν σημαντικό να σημειωθεί ότι οι δραστικές ρίζες οξυγόνου και αζώτου δεν είναι μόνο επιβλαβείς για τον οργανισμό αλλά τον βοηθούν και στην ομαλή λειτουργία του.

6.2) Παραγωγή ROS από την αναπνευστική αλυσίδα

Η κυριότερη πηγή ROS στον άνθρωπο είναι η δημιουργία O_2^- από τα μιτοχόνδρια, το οποίο φυσιολογικά εμφανίζεται ως ενδιάμεσο κατά τη διάρκεια της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης και η τελική του τύχη είναι ο σχηματισμός μορίων νερού.

Επίσης οι **αντιδράσεις ουβικινόνης** της αναπνευστικής αλυσίδας έχουν και αυτές μια τάση να προκαλούν την ροή ηλεκτρονίων απευθείας στο οξυγόνο. Συνολικά, μέχρι και 2% του οξυγόνου που εισέρχεται στην αναπνευστική αλυσίδα σχηματίζει ανιόντα υπεροξειδίου ($\cdot O_2^-$). Υποστηρίζεται ότι οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις στις οποίες συμμετέχουν **φλαβινοπρωτεΐνες** επίσης συνεισφέρουν ένα ποσοστό των συνολικών ROS.

Υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2) μπορούν να παράγουν ποικίλα ένζυμα, μεταξύ των οποίων αρκετές **οξειδάσες**. Τα κυριότερα από αυτά είναι η **οξειδάση της ξανθίνης, η οξειδάση του NADPH και το σύμπλεγμα του κυτοχρώματος P450**.

Προκειμένου να διατηρηθεί η κυτταρική ομοιόσταση, είναι αναγκαίο να εγκατασταθεί μια ισορροπία μεταξύ δημιουργίας και αδρανοποίησης των ROS. Τα κυριότερα αντιοξειδωτικά που διαθέτει το κύτταρο είναι:

Η **δισμουτάση του σουπεροξειδίου (SOD)**, που καταλύει την αντίδραση: $\cdot O_2^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2$

Η **καταλάση**, που καταλύει την αντίδραση: $2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$

Η **υπεροξειδάση της γλουταθειόνης**, που καταλύει την αντίδραση: $2GSH + H_2O_2 \rightarrow GSSG + 2H_2O$

Αρκετά ακόμη ένζυμα είναι γνωστό ότι έχουν αντιοξειδωτικές ιδιότητες, όπως η τρανσφεράση γλουταθειόνης-S και οι αφυδρογονάσες αλδευδών.

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως το οξειδωτικό stress προκύπτει όταν τόσο τα ενζυμικά όσο και τα μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά δεν μπορούν να ουδετεροποιήσουν τελείως τα παραγόμενα ROS, με αποτέλεσμα οι ROS να παραμένουν για αρκετό χρονικό διάστημα και να προκαλούν περαιτέρω αντιδράσεις. Έτσι, όταν ένα οξειδωτικό γεγονός επισυμβαίνει, βιομόρια οξειδώνονται από τις ενεργές ρίζες, ενώ η έκταση της καταστροφής εξαρτάται από την επιρρέπεια αυτών των βιομορίων να ενωθούν με ROS.

Μόρια-κλειδιά στη Βιολογία, όπως το **DNA**, οι πρωτεΐνες, τα λιπίδια, επηρεάζονται αρνητικά από αυτήν την οξειδωση. Επίπλέον, **η αντίδραση των ROS με αυτά τα μόρια δημιουργεί περαιτέρω παραγωγή τους, η οποία οδηγεί σε καταιγισμό καταστροφής, αν αφεθεί χωρίς έλεγχο**.

Εκτιμάται ότι αυτές οι ενεργές ρίζες οξειδίου είναι υπεύθυνες για περίπου **10.000 μετατροπές βάσεων DNA ανά κύτταρο ανά ημέρα**. Η **οξειδωση ή η μεθυλίωση των βάσεων θεωρείται ότι έχει τις σημαντικότερες φαινοτυπικές επιπτώσεις**.

Το μιτοχονδριακό DNA είναι παρα πολύ επιρρεπές σε αυτές τις καταστροφές, αφ' ενός λόγω της εγγύτητάς του στην παραγωγή ROS και αφ' ετέρου επειδή η επισκευή του είναι περιορισμένη λόγω απουσίας επιδιορθωτικών μηχανισμών στο μιτοχονδριο. Το γεγονός αυτό αποκαλύπτει την αιτία των περισσότερων μεταλλαγών που συμβαίνουν στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα

7) Μεταλλαγές στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα

Όλες οι γενετικές μεταβολές κατά την αναπαραγωγή που υφίσταται το πυρηνικό γονιδίωμα δε λαμβάνουν χώρα στην περίπτωση του μιτοχονδριακού γονιδιώματος γιατί αυτό κληρονομείται κυτοπλασματικά μόνο από την μητέρα.

Έτσι οι γονότυποι του mtDNA αντιπροσωπεύουν μη ανασυνδυασμένους χαρακτήρες οι οποίοι μεταφέρονται μητρικά στις επόμενες γενιές. Οι γονότυποι αυτοί είναι οι γνωστοί απλότυποι.

Ο ρυθμός εξέλιξης του ανθρώπινου mtDNA είναι πέντε με δέκα φορές μεγαλύτερος από τον αντίστοιχο ρυθμό εξέλιξης του πυρηνικού DNA λόγω της έλλειψης επιδιορθωτικού μηχανισμού των μεταλλάξεων που λαμβάνουν χώρα κατά τη διάρκεια της αντιγραφής και όσων δημιουργούνται από την επίδραση του περιβάλλοντα χώρου δηλαδή κυρίως του οξειδωτικού stress όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως. Είναι λοιπόν εμφανές ότι όποια αλλαγή συμβεί στην αλληλουχία των βάσεων του mtDNA θα οφείλεται στα λάθη του μηχανισμού αντιγραφής και στην επίδραση του περιβάλλοντος (ακτινοβολία, ελεύθερες ρίζες, μεταλλαξιγόνες ουσίες).

8) Μιτοχονδριακά νοσήματα

Καταννοούμε λοιπόν ότι **το ίδιο το μιτοχόνδριο μπορεί να θεωρηθεί υπεύθυνο για την δημιουργία των κρίσιμων μεταλλαγών στο γενετικό του υλικό** που πιθανώς θα οδηγήσουν σε έναν παθολογικό φαινότυπο όπως είναι ένα μιτοχονδριακό νόσημα.

Τα μιτοχονδριακά νοσήματα περιεγράφησαν για πρώτη φορά από τον Luft πριν από 43 χρόνια (1962). Υπολογίζεται ότι η συχνότητά τους είναι από 1:5.000-1:10.000 γεννήσεις. Εμπλέκονται περίπου 800 διαφορετικές πρωτεΐνες.

Τα μιτοχόνδρια περιέχουν πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται τόσο από το πυρηνικό, όσο και από το μιτοχονδριακό DNA. Το γονιδίωμα του μιτοχονδρίου (mtDNA) κληρονομείται από τη μητέρα. Έχουν περιγραφεί ανωμαλίες στα σύμπλοκα I, II, III και IV, στο κυτόχρωμα c, στη συνθάση της ATP και στη βιοσύνθεση της ουβικινόνης. Οι περισσότερες ελλείψεις, διπλασιασμοί, εισαγωγές, αναστροφές ή άλλες σύνθετες ανακατατάξεις, περιλαμβάνουν αρκετά γονίδια, αφού τα μιτοχονδριακά γονίδια βρίσκονται πολύ κοντά το ένα με το άλλο (37 γονίδια σε 16,5 kb). Οι νουκλεοτιδικές αντικαταστάσεις του μιτοχονδριακού DNA κληρονομούνται μόνο από την μητέρα. (H. Kokotas et al, 2009). Οι σημειακές μεταλλαγές του μιτοχονδριακού DNA μπορούν να εμφανίζονται σε όλα τα γονίδια και οι συνέπειες τους μπορεί να εξαρτώνται από τις αλλαγές που επιφέρουν στα προϊόντα των γονιδίων αυτών, από το εύρος των ιστών που φέρουν τις

μεταλλαγές, τη μεταβολή της παραγωγής ATP στους ιστούς αυτούς, άλλους πολυμορφισμούς του μιτοχονδριακού DNA (Lamminen T et al, Eur J Hum Genet 1997; 5: 271-279.), (Howell N. et al, Am J Med Genet 2003; 119A: 147-151), παράγοντες που κωδικοποιούνται από τον πυρήνα και αλληλεπιδρούν με τα προϊόντα των γονιδίων του μιτοχονδριακού DNA (Bykhovskaya Y et al, Am J Hum Genet 2000; 66: 1905-1910), Sasarman F. et al, Hum Mol Genet 2002; 11: 1669-1681), καθώς επίσης και από περιβαλλοντικούς παράγοντες (Estivill X. et al 1998; 62: 27-35). Το ενδομιτοχονδριακό και ενδοκυτταρικό περιβάλλον αποτελούν τόπους σύνθετων αλληλεπιδράσεων και συνεπώς οι παθογενείς μηχανισμοί των σημειακών μεταλλαγών δεν είναι ακόμα αρκετά κατανοητοί. Οι περισσότερες μεταλλαγές του μιτοχονδριακού DNA είναι σημειακές. Οι ελλείψεις μικρών ή μεγάλων κομματιών είναι σπάνιες. Οι μεγάλες ελλείψεις γενικά περιλαμβάνουν τουλάχιστον ένα tRNA, κάτι που σημαίνει ότι μπορούν να προκαλέσουν προβλήματα στη μεταγραφή και δυσλειτουργία της αναπνευστικής αλυσίδας. Gellerich F. et al Biochim Biophys Acta 2002; 1556: 41-52). Διπλασιασμοί στο μιτοχονδριακό DNA έχουν περιγραφεί, όμως δε θεωρούνται ότι είναι παθογενείς και μπορούν να προκαλέσουν παθολογικό φαινότυπο μόνο έμμεσα. Manfredi G. et al 1997; 61: 953-960). Παλαιότερα είχε προταθεί πως το μιτοχονδριακό DNA δεν έχει μηχανισμούς επιδιόρθωσης, όμως πρόσφατες μελέτες έδειξαν πως υπάρχει κάποια επιδιορθωτική δραστηριότητα, μικρότερου όμως εύρους συγκρινόμενη με το πυρηνικό DNA (Croteau D. et al, Mutat Res 1999; 434: 137-148)

Οι περισσότερες μεταλλάξεις των μιτοχονδριακών πρωτεϊνών έχουν ως αποτέλεσμα τη συσσώρευση γαλακτικού οξέος, ενός προϊόντος του αναερόβιου μεταβολισμού της γλυκόζης και τη μείωση της παραγωγής ATP, η οποία είναι δυνατό να οδηγήσει σε κυτταρικό θάνατο, ιδιαίτερα στους σκελετικούς μυς, στο μυοκάρδιο και στο νευρικό ιστό, που είναι ιστοί με κατεξοχήν αερόβιο μεταβολισμό. Έτσι, τα μιτοχονδριακά νοσήματα χαρακτηρίζονται συχνά από μυοπάθεια, μυοκαρδιοπάθεια και εγκεφαλοπάθεια.

Παρ' όλο που δεν υπάρχει ομοφωνία, υπάρχουν μερικές ενδείξεις ότι η χορεία του Huntington, η νόσος του Parkinson και η νόσος του Alzheimer, επίσης, είναι δυνατό να σχετίζονται με νόσο των μιτοχονδρίων.

Ένα μιτοχονδριακό νόσημα μπορεί να είναι αποτέλεσμα μεταλλάξεων του πυρηνικού DNA ή, στις περισσότερες περιπτώσεις, μεταλλάξεων γονιδίων του μιτοχονδριακού DNA. Είναι μια μεγάλη και ετερογενής ομάδα γενετικών νοσημάτων, τα οποία όλα οδηγούν σε **ανωμαλίες της μιτοχονδριακής αναπνευστικής αλυσίδας.**

Η **μεγάλη ετερογένεια** τους οφείλεται εν μέρει στη βιοχημική πολυπλοκότητα του μηχανισμού της μιτοχονδριακής αναπνοής, αλλά και

στο γεγονός ότι δύο γονιδιώματα, το μιτοχονδριακό και το πυρηνικό, κωδικοποιούν τις υπομονάδες των πρωτεϊνών των αναπνευστικών συμπλόκων. Γενικά, όργανα και ιστοί με την υψηλότερη ενεργειακή απαίτηση, όπως ο **εγκέφαλος** και οι **μύες**, είναι πιο πιθανό να επηρεαστούν και γι'αυτό τα νοσήματα αυτά αναφέρονται κι ως "μιτοχονδριακές εγκεφαλομυοπάθειες".

Γενικότερα, σε κάθε αδιευκρίνιστο οξύ, χρόνιο, προοδευτικό ή υποτροπιάζον νόσημα με πολυσυστηματική, κυρίως, συμμετοχή (3 συστήματα τουλάχιστον), πρέπει να τίθεται η υποψία μιτοχονδριακής διαταραχής.

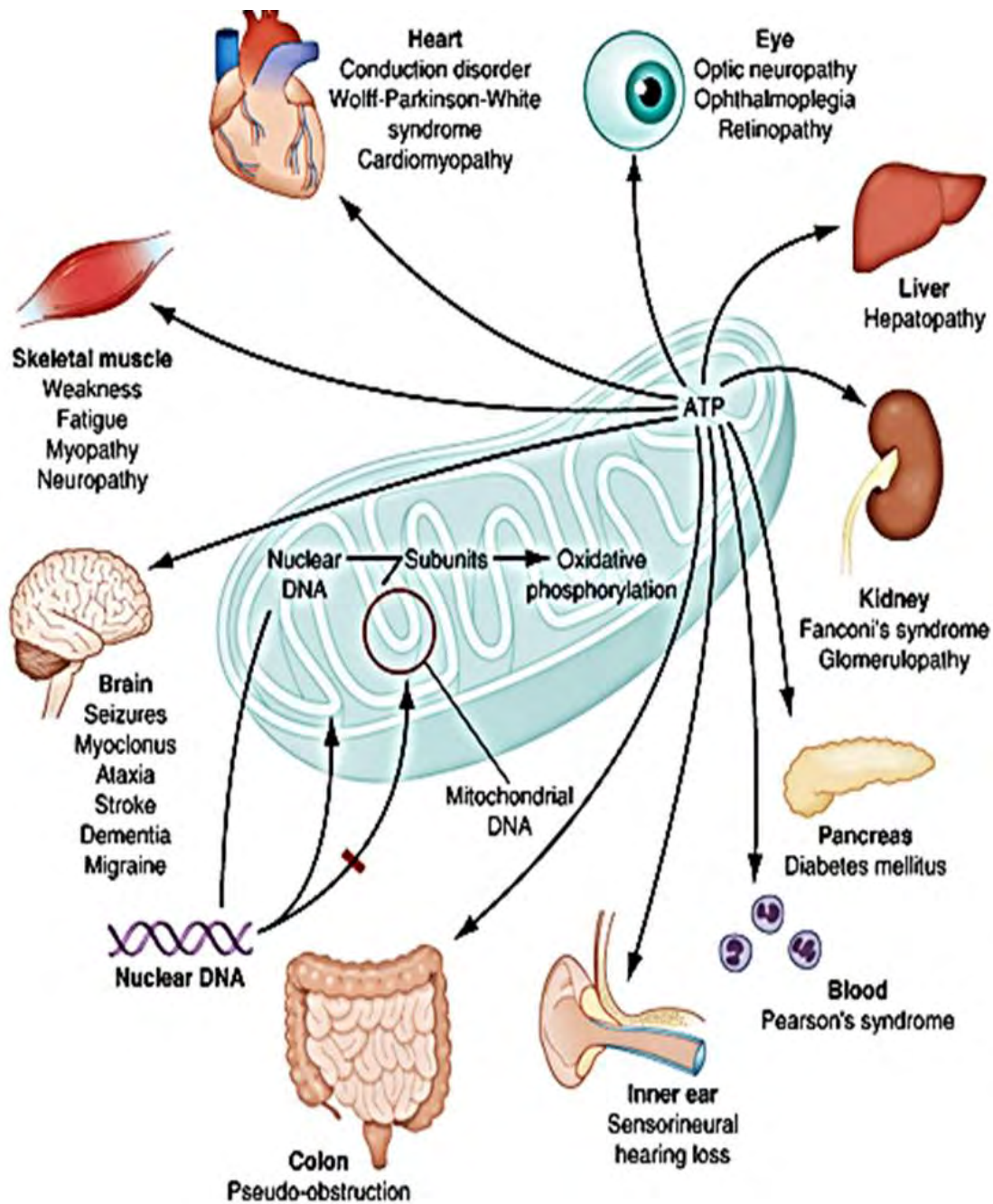
Παρακάτω αναφέρονται μερικές μόνο από αυτές τις ασθένειες που δημιουργούνται από τη μιτοχονδριακή δυσλειτουργία:

- **MM Mitochondrial Myopathy**
- **EM EncephaloMyopathy**
- **ECM EncephaloCardioMyopathy**
- **MELAS Mitochondrial Encephalomyopathy, Lactis Acidose, Stroke-like episodes**
- **MNGIE Mitochondrial NeuroGastroIntestinal Encephalomyopathy**
- **MHCM Maternally inherited Hypertrophic CardioMyopathy**
- **MICM Maternal Inherited CardioMyopathy**
- **MMC Maternal Myopathy and Cardiomyopathy**

Οι κύριες αιτίες για τη **μεγάλη ποικιλία των φαινοτυπικών χαρακτηριστικών** που εκδηλώνουν οι ασθενείς είναι η **ετερογένεια στην κατανομή του μιτοχονδριακού DNA** (ετεροπλασμία) και η **ιστο-ειδική έκφραση πολλών γονιδίων του πυρηνικού DNA**.

ΟΡΓΑΝΟ ΛΙΣΤΟΣ	ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΑ	Δ-mtDNA		tRNA		ATPase	
		KSS	PEARSON	MERRF	MELAS	NARP	MILS
ΚΝΣ	σπασμοί	-	-	+	+	-	+
	αταξία	+	-	+	+	+	±
	μυόκλονος	-	-	+	±	-	-
	ΨΚ-ισχαιμία	-	-	-	-	-	+
	παλινδρόμηση	+	-	±	+	-	-
	ημιπάρεση/ημιανοπία	-	-	-	+	-	-
	τύφλωση	-	-	-	+	-	-
	ημικρανία	-	-	-	+	-	-
δυστονία	-	-	-	±	-	+	
ΠΝΣ	περιφερική νευροπάθεια	±	-	±	+	+	-
ΜΥΣ	αδυναμία μετά κόπωση	+	-	+	-	+	+
	ορθόληψη	+	±	-	-	-	-
	βλεφαρόπτωση	+	-	-	-	-	-
ΟΦΘΑΛΜΟΙ	αμφιβληστροειδοπάθεια	+	-	-	-	+	±
	οπτική ατροφία	-	-	-	-	±	±
	καταράκτης	-	-	-	-	-	-
ΑΙΜΑ	σδηροβλαστική αναιμία	±	+	-	-	-	-
ΕΝΔΟΚΡΙΝΕΙΣ	σακχαρώδης διαβήτης	±	-	-	±	-	-
	κοντό ανάστημα	+	-	+	+	-	-
	υποπαραθυρεοειδισμός	±	-	-	-	-	-
	υποθυρεοειδισμός	±	-	-	-	-	-
ΚΑΡΔΙΑ	κολποκοιλιακός αποκλεισμός	+	-	-	±	-	-
	καρδιομυοπάθεια	±	-	-	±	-	±
ΓΕΣ	δυσλειτουργία εξωκρινούς μοίρας παγκρέατος	±	+	-	-	-	-
	ψευδοσπόγγραξη εντέρου	-	-	-	-	-	-
ΩΤΑ	αισθητηριακή απώλεια ακοής	-	-	+	+	±	-
ΝΕΦΡΟΙ	σύνδρομο Fanconi	±	±	-	±	-	-
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΑ ΕΥΡΗΜΑΤΑ	γαλακτική οξύωση	+	+	+	+	-	±
	βιοψία μυός: RRF	+	±	+	+	-	-
ΚΛΗΡΟΝΟ- ΜΙΚΟΤΗΤΑ	μητρική	-	-	+	+	+	+
	σποραδική	+	+	-	-	-	-

ΠΙΝΑΚΑΣ 1 : ΣΤΟΝ ΠΙΝΑΚΑ ΦΑΙΝΟΝΤΑΙ ΕΞΙ ΜΙΤΟΧΟΔΡΙΑΚΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ ΚΑΙ ΤΑ ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΑ-ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ ΤΟΥ ΑΣΘΕΝΗ ΣΤΟ ΚΑΘΕΝΑ. ΟΙ ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ KSS ΚΑΙ PEARSON ΟΦΕΙΛΟΝΤΑΙ ΣΕ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ ΣΤΟ mt-DNA ΠΟΥ ΚΩΔΙΚΟΠΟΙΕΙ ΠΡΩΤΕΙΝΕΣ, ΟΙ ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ MERRF ΚΑΙ MELAS ΟΦΕΙΛΟΝΤΑΙ ΣΕ ΜΕΤΑΛΛΑΓΕΣ ΣΤΑ mt-tRNAs ΚΑΙ ΟΙ ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ NARP ΚΑΙ MILS ΣΕ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ ΣΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ ΤΗΣ ΑΤΡάσης.



Source: Faud AS, Kasper DL, Braunwald E, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL, Loscalzo J: *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 17th Edition: <http://www.accessmedicine.com>
 Copyright © The McGraw-Hill Companies, Inc. All rights reserved.

ΕΙΚΟΝΑ 9: ΣΤΗΝ ΕΙΚΟΝΑ ΠΑΡΑΤΗΡΟΥΜΕ ΟΤΙ ΤΑ ΟΡΓΑΝΑ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΝΤΑΙ ΠΕΡΙΣΣΟΤΕΡΟ ΑΠΟ ΤΗ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΗ ΔΥΣΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΕΙΝΑΙ ΑΥΤΑ ΤΑ ΟΠΟΙΑ ΕΧΟΥΝ ΚΑΙ ΤΗ ΜΕΓΑΛΥΤΕΡΗ ΑΠΑΙΤΗΣΗ ΣΕ ΕΝΕΡΓΕΙΑ (ΜΥΕΣ ΕΓΚΕΦΑΛΟΣ) ΚΑΙ ΑΥΤΑ ΤΑ ΟΠΟΙΑ ΕΧΟΥΝ ΙΣΤΟΕΙΔΙΚΗ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ ΠΗΡΥΝΙΚΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΠΟΥ ΑΦΟΡΟΥΝ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΕΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ.

8.1) Η γενετική των μιτοχονδριακών νοσημάτων

Το μιτοχονδριακό DNA διαβιβάζεται μόνο μέσω της μητρικής γενεαλογικής γραμμής (Giles RE. et all, USA 1980). Οι ακριβείς μοριακοί μηχανισμοί πίσω από την αυστηρή μητρική διαβίβαση του μιτοχονδριακού DNA δεν έχουν ακόμα καθοριστεί. Αν και αρχικά πιστευόταν ότι τα πατρικά μιτοχόνδρια δεν προσχωρούσαν στο ωκύτταρο, τελικά φαίνεται πως δεν είναι αυτή η αιτία. Πατρικά μόρια μιτοχονδριακού DNA έχουν εντοπισθεί σε πρώιμα προεμφυτευτικά έμβρυα ανθρώπου (St John J. et all Lancet 2000), τα οποία καταστρέφονται με κάποιο μηχανισμό (Sutovsky P. et all Nature 1999).

Συνεπώς, ένα νόσημα που οφείλεται αποκλειστικά σε μεταλλάξεις στο μιτοχονδριακό DNA κληρονομείται πάντα από τη μητέρα και έτσι τα άρρενα τέκνα δεν μεταδίδουν τη νόσο στους απογόνους τους.

Ο πατέρας του πάσχοντος δεν είναι σε κίνδυνο να φέρει την παθολογική μετάλλαξη στο mtDNA, αλλά η μητέρα έχει συνήθως τη μιτοχονδριακή μετάλλαξη και είναι δυνατό να εκδηλώνει συμπτώματα της νόσου ή όχι. Ελλείψεις στο μιτοχονδριακό DNA είναι γενικά *de novo* κι έτσι δεν υπάρχει αυξημένος κίνδυνος για άλλα μέλη της οικογένειας. Αντίστοιχα, σημειακές μεταλλάξεις του μιτοχονδριακού DNA και διπλασιασμοί μπορεί να μεταδίδονται από τη μητρική γραμμή, ενώ μια γυναίκα που φέρει σε ετεροπλασμία μια μετάλλαξη μπορεί να μεταδώσει ένα μεταβλητό ποσό του μεταλλαγμένου mtDNA στους απογόνους της, με αποτέλεσμα τη σημαντική κλινική ετερογένεια μεταξύ πασχόντων μέσα στην ίδια οικογένεια.

Η αποκάλυψη της συγκεκριμένης γενετικής βλάβης στα μιτοχονδριακά νοσήματα είναι συχνά δύσκολη. Πολλά άτομα δεν εμπίπτουν σε μια συγκεκριμένη κατηγορία ασθενειών, ενώ η κατάσταση γίνεται ακόμη πιο περίπλοκη από την ασαφή συσχέτιση μεταξύ γονοτύπου και φαινοτύπου. Οι ασθενείς μπορεί δηλαδή να έχουν ίδια κλινικά συμπτώματα, αλλά μερικοί μπορεί να φέρουν μια έλλειψη του mtDNA, άλλοι μπορεί να φέρουν μια σημειακή μετάλλαξη του mtDNA κι άλλοι μπορεί να φέρουν μια αυτοσωματική επικρατή μετάλλαξη σε πυρηνικό γονίδιο, που σχετίζεται με δευτερογενείς ανωμαλίες του mtDNA

Επιπλέον, η ίδια γενετική μετάλλαξη μπορεί να προκαλέσει μια σειρά από πολύ διαφορετικά κλινικά σύνδρομα.

Πως αποδεικνύεται η παθογένεια μίας νέας μεταλλαγής

Επειδή οι μεταλλαγές του μιτοχονδριακού DNA μπορούν να δημιουργούνται αυθόρμητα σε μεγάλη συχνότητα και οι περισσότερες αλλαγές του γονιδιώματος είναι ουδέτεροι πολυμορφισμοί χωρίς κλινική σημασία, έχουν δημιουργηθεί ορισμένοι κανόνες σύμφωνα με τους οποίους αποδεικνύεται η παθογένεια μίας νέας μεταλλαγής του μιτοχονδριακού DNA (DiMauro S. et al, Ann Med 2005). Πρώτον, η μεταλλαγή δεν θα πρέπει να είναι παρούσα σε υγιή άτομα του ίδιου εθνικού υπόβαθρου. Δεύτερον, η μεταλλαγή θα πρέπει να δημιουργεί αλλαγές σε ένα τμήμα του μιτοχονδριακού DNA το οποίο είναι συντηρητικό στην εξέλιξη και κατά συνέπεια σημαντικό λειτουργικά. Τρίτον, **θα πρέπει να δημιουργεί μία ή περισσότερες βλάβες στην ενζυμική αλυσίδα της αναπνοής ή βλάβες στη σύνθεση των μιτοχονδριακών πρωτεϊνών**. Τέταρτον, θα πρέπει να υπάρχει συσχέτιση μεταξύ του βαθμού της ετεροπλασμίας και την βαρύτητας της κλινικής εικόνας, καθώς και συσχέτιση μεταξύ του βαθμού της ετεροπλασμίας και της κυτταρικής παθολογίας (DiMauro S. et al, Ann Med 2005).

Το τελευταίο κριτήριο πάντως, δεν είναι τόσο ισχυρό, αφού ο συσχετισμός δεν είναι πάντα τόσο αντιπροσωπευτικός. Επίσης, **παρατηρούνται αλληλεπιδράσεις των πυρηνικών γονιδίων με περιβαλλοντικούς παράγοντες οι οποίοι επηρεάζουν τη βαρύτητα της νόσου**

9) Μεταλλάξεις στα mt-tRNAs

Από ολο το μιτοχονδριακό γονιδίωμα οι έρευνες για τα αίτια των νοσημάτων, που φαίνεται να είναι μιτοχονδριακά αλλά δεν έχει βρεθεί ακόμα η αιτιολογία τους, στρέφονται πιο στοχευμένα προς την εύρεση μεταλλαγών συγκεκριμένα **στα γονίδια των μιτοχονδριακών tRNAs**.

Μια σημειακή μετάλλαξη στην περιοχή του αντικωδικονίου, δεν αφήνει την πρόσδεση του στο αντίστοιχο κωδικόνιο του στο mRNA που πρόκειται να μεταφραστεί. Στην περιοχή του 3'-άκρου του θα εμποδίζει την πρόσδεση του αμινοξέος και άρα την μεταφορά του και την σύνδεση του με το αναπτυσσόμενο πολυπεπίδιο. Στα υπόλοιπα νουκλεοτίδια του tRNA, η κάθε μετάλλαξη μπορεί να αλλάξει την διαμόρφωσή του.

Μια τέτοια αλλαγή έστω και μηδαμινή δεν του επιτρέπει την πλήρη λειτουργικότητα του η του την στερεί και πλήρως.

Συνεπώς αυτό θα σήμαινε πως από όλες τις παραγόμενες πρωτείνες θα έλλειπε το συγκεκριμένο αμινοξύ γεγονός που θα δημιουργούσε σοβαρές δυσλειτουργίες στις περισσότερες από αυτές.

Δηλαδή με μια μόνο σημειακή μετάλλαξη σε ένα tRNA επηρεάζονται όλες οι κατηγορίες των μιτοχονδριακών πρωτεϊνών ενώ με μια τέτοια αλλαγή στο γονίδιο ενός mRNA είναι αμφίβολο το κατά πόσο θα επηρεαστεί η παραγόμενη πρωτεΐνη. Αυτός είναι και ο λόγος της διερεύνησης συγκεκριμένα των γονιδίων των mt-tRNAs.

9.1) Ασθένειες που σχετίζονται με μεταλλάξεις στα mt-tRNAs

Όσο οι έρευνες περί των μιτοχονδριακών νοσημάτων εξελίσσονται τόσο μεγαλύτερο ποσοστό αυτών συνδέονται με μεταλλαγές στα μιτοχονδριακά tRNAs. Σε αυτό το αποτέλεσμα αποσκοπούμε και εμείς εκπονώντας την συγκεκριμένη μελέτη για την ταυτοποίηση της αιτιολογίας της Σαρκοείδωσης και της IPF, οι οποίες επισημαίνεται πως **δεν ανήκουν ακόμα στα εξακριβωμένα μιτοχονδριακά νοσήματα λόγω έλλειψης αποδείξεων**.

Η εικόνα που ακολουθεί δείχνει συνολικά όλα τα νοσήματα που έχουν χαρακτηριστεί ως μιτοχονδριακά, σε αντιστοιχία με τις περιοχές του mt-DNA που εντοπίζεται η αλλαγή της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας που έχει χαρακτηριστεί ως υπεύθυνη για την ασθένεια. Παρατηρούμε ότι οι περισσότερες ασθένειες οφείλονται σε μεταλλάξεις στα γονίδια των tRNAs (ανοιχτόμπλε).

10) Σαρκοείδωση και Ιδιοπαθής Πνευμονική Ύψωση

Οι ασθένειες για τις οποίες έχει γίνει η παρούσα μελέτη είναι η **Σαρκοείδωση** και η **Ιδιοπαθής Πνευμονική Ύψωση (IPF)** των οποίων **δεν είναι μέχρι στιγμής γνωστή η αιτιολογία** άρα **ούτε έχουν ενταχθεί στα μιτοχονδριακά νοσήματα**.

Με βάση την παραπάνω συζήτηση, προκύπτει προφανώς ότι ο καθορισμός ενός νοσήματος ως μιτοχονδριακό θα πρέπει να γίνεται εφ' όσον το νόσημα διαθέτει τα περισσότερα χαρακτηριστικά (εάν όχι όλα) εντός του πλαισίου που περιγράφηκε παραπάνω στην ενότητα των μιτοχονδριακών νοσημάτων.

Μετά απο μελέτη και παρατήρηση των ασθενών που πάσχουν από τις δύο αυτές παθήσεις, φάνηκε ότι ταιριάζουν σε πολύ μεγάλο βαθμό στο προφίλ των μιτοχονδριακών νοσημάτων εμφανίζοντας σημαντικά χαρακτηριστικά τους όπως η μεγάλη ετερογένεια φαινοτύπου, η γενετική ετερογένεια, η δύσκολη διάγνωση λόγω ανάγκης προσεκτικής ταυτοποίησης των συμπτωμάτων, η κληρονομικότητα (και ισχυρές ενδείξεις μητρικής κληρονομιάς).

Σαρκοείδωση

Είναι μια συστηματική κοκκιωματώδης φλεγμονώδης νόσος που μπορεί να προσβάλλει οποιοδήποτε όργανο και ιστό. Η κατανομή των αλλοιώσεων και η κλινική πορεία ποικίλλουν πάρα πολύ. Η νόσος είναι συχνότερη στις γυναίκες παρά στους άνδρες. Η χαρακτηριστική ιστολογική αλλοίωση της σαρκοείδωσης είναι το κοκκίωμα. Αυτό αποτελείται από επιθηλιοειδή κύτταρα και από ποικίλο αριθμό γιγαντοκυττάρων τύπου Langhans ή ξένων σωμάτων. Σε 80% πλέον των περιπτώσεων τα κοκκιώματα αυτά παρουσιάζουν δύο ιδιαίτερα ιστολογικά στοιχεία : α) Τα σωματίδια Schaumann, που αποτελούνται από συγκεντρικές εναποθέσεις πρωτεϊνών και αλάτων ασβεστίου. β) Τα αστεροειδή σωματίδια. Αυτά ανευρίσκονται μέσα στα γιγαντοκύτταρα. Οι δύο αυτοί σχηματισμοί δεν είναι παθολογικοί για τη σαρκοείδωση, γιατί απαντούν και σε άλλες κοκκιωματώδεις διαταραχές.

Τα όργανα, που προσβάλλονται συχνότερα στη σαρκοείδωση, είναι τα ακόλουθα:

1. Λεμφαδένες. Προσβάλλονται σχεδόν δε όλες τις περιπτώσεις. Οποιαδήποτε λεμφαδενική ομάδα του σώματος είναι δυνατό να προσβληθεί. Η τυπικότερη όμως και συνηθέστερη είναι η λεμφαδενοπάθεια των πυλών του πνεύμονα και του μεσοθωρακίου και των τραχηλικών λεμφαδένων. Σε πρόσφατες περιπτώσεις οι λεμφαδένες είναι μαλακοί, λοβιώδεις. Σε προχωρημένες και χρόνιες περιπτώσεις παρουσιάζουν ινώδη σκλήρυνση.

2. Πνεύμονες. Αποτελούν επίσης μια από τις πιο συχνές εντοπίσεις της νόσου. Συχνά δεν υπάρχουν μακροσκοπικά ορατές αλλοιώσεις. Ιστολογικά ανευρίσκονται κοκκιώματα, που κατανέμονται διάχυτα συνήθως και στους δύο πνεύμονες. Παρουσιάζουν προτίμηση για τις περιοχές κοντά σε αγγεία, βρόγχους και λεμφαγγεία. Πολλές φορές τα κοκκιώματα συρρέουν και σχηματίζουν μακροσκοπικά ορατά οζίδια. Τα κοκκιώματα αυτά παρουσιάζουν μια μεγάλη τάση να ινοποιούνται και να προκαλούν διάμεση ίνωση του πνεύμονα.

3. Σπλήνας, στο 75% των περιπτώσεων, ενώ το ήπαρ κάπως συχνότερα. Η διόγκωση των οργάνων αυτών μπορεί να είναι σημαντική. Πολλές φορές το μέγεθος τους είναι κανονικό, χωρίς ιδιαίτερες μακροσκοπικές αλλοιώσεις. Ιστολογικά τα κοκκιώματα ανευρίσκονται διάσπαρτα σε όλο το παρέγχυμα των οργάνων χωρίς ιδιαίτερη τοπογραφική προτίμηση.

4. Μυελός των οστών. Προσβάλλεται σε ποσοστό μεγαλύτερο από 20%. Ακτινολογικές αλλοιώσεις παρουσιάζουν κλασικά οι φάλαγγες των χεριών και ποδιών. Παρατηρούνται αλλοιώσεις του οστού με διεύρυνση του αυλού και εναποθέσεις νέου οστού περιφερικά. Ιστολογικά παρατηρούνται άφθονα κοκκιώματα στη μυελική κοιλότητα.

5. Δερματικές αλλοιώσεις. Ανευρίσκονται στις μισές περίπου περιπτώσεις. Και αυτές ιστολογικά χαρακτηρίζονται από κατάληψη του χορίου από μη τυροειδοποιούμενα κοκκιώματα. Μερικές φορές υπάρχουν βαθύτερες οζοειδείς αλλοιώσεις κατά τον υποδόρειο ιστό, που χαρακτηρίζουν το οζώδες ερύθημα.

6. Οφθαλμοί και σιελογόνοι αδένες. Με τη χαρακτηριστική κοκκιωματώδη διήθηση των δακρυικών και σιελογόνων αδένων.

7. Καρδιά : Η προσβολή του καρδιακού μυός από τη σαρκοείδωση, είναι μεν σπάνια, αλλά υπαρκτή και πολλές φορές δυσδιάγνωστη. Υποστηρίζεται ότι η συχνότερη αιτία θανάτου σήμερα είναι η καρδιακή προσβολή και όχι η αναπνευστική ανεπάρκεια.

8. Νευρικό σύστημα : Η μονόπλευρη πάρεση του προσωπικού νεύρου, είναι η πιο συνηθισμένη (49%) εκδήλωση της προσβολής του νευρικού συστήματος από τη σαρκοείδωση. Ο μηχανισμός είναι αδιευκρίνιστος. Δεν οφείλεται στη διόγκωση της παρωτίδος. Δεύτερη σε σειρά συχνότητας έρχεται η προσβολή του οπτικού νεύρου σε ποσοστό 5% των ασθενών με νευροσαρκοείδωση. Παρατηρείται, απώλεια οπτικών πεδίων, οπτική νευρίτιδα, ατροφία του νεύρου, θάμβος οράσεως, τύφλωση. Οίδημα οπτικής θηλής, παρατηρείται ως αποτέλεσμα της αύξησης της ενδοκρανιακής πίεσεως λόγω παρεμπόδισης της κυκλοφορίας του Ε.Ν.Υ. από χρόνια μηνιγγίτιδα ή γεγάλο κοκκίωμα. Έχουμε θεαματική βελτίωση μετά από τη χορήγηση κορτικοειδών. Επίσης κρίσεις επιληψίας όλων των τύπων έχουν παρατηρηθεί σε 5-22% των ασθενών με νευροσαρκοείδωση. Δεν δρουν τα κορτικοειδή αλλά έχει αναφερθεί περίπτωση κρίσεων grand mal λόγω σαρκοειδικής μηνιγγίτιδας, στην οποία δεν έδρασαν τα κορτικοειδή, αλλά επετεύχθη βελτιώση με χαμηλές δόσεις ολοκρανιακής ακτινοβολίας.

9. Ενδοκρινείς αδένες : Τα αυτοάνοσα νοσήματα και η σαρκοείδωση φαίνεται να σχετίζεται και ειδικότερα φαίνεται να υπάρχει από μακρού συσχέτιση της σαρκοείδωσης με τα αυτοάνοσα νοσήματα του θυρεοειδούς. Έχει παρατηρηθεί συνύπαρξη νόσου του Graves, αυτοάνοσης θυρεοειδίτιδας και σακχαρώδους διαβήτη με τη σαρκοείδωση. Το ποσοστό των πασχόντων από σαρκοείδωση που παρουσιάζουν παράλληλα και ενδοκρινοπάθεια αυτοάνοσου τύπου, φαίνεται να είναι γύρω στο 20%.

10. Μαστός - Όργανα αναπαραγωγής : Στο μαστό, το συνηθέστερο είναι να υπάρχει ένα κοκίωμα μονήρες, που παραμένει τοπικά για μεγάλο διάστημα. Το ενδομήτριο μπορεί να προσβληθεί, ειδικά αν έχει προηγηθεί χειρουργική επέμβαση. Οι ωθήκες προσβάλλονται σπάνια. Κατά την εγκυμοσύνη η υπάρχουσα σαρκοείδωση μπορεί να υποχωρεί, πιθανόν λόγω των παραγόμενων στεροειδών. Μετά το πέρας της είναι δυνατόν να εμφανισθεί εκ νέου. Οι όρχεις μπορεί επίσης να προσβληθούν. Η επιδιδιμίδα προσβάλλεται σπάνια και προσβολή του προστάτη έχει αναφερθεί ακόμη σπανιότερα.

Αιτιολογία και παθογένεια της νόσου.

Η αιτιολογία της νόσου είναι ουσιαστικά άγνωστη. Σαν αίτια έχουν προταθεί : α) Τα μυκοβακτηρια της Φυματίωσης ή τα άτυπα μυκοβακτηρια και τα παράγωγά τους. Υπολείμματα μυκολικού οξέος έχουν ανιχνευθεί σε σαρκοειδικές αλλοιώσεις. β) Μη βακτηριακοί παράγοντες, όπως η γύρη των πεύκων, ρητίνες και ο πηλός, όταν μασώνται ή εισπέονται. Στη γύρη των πεύκων π.χ. υπάρχουν κηροειδή, που ομοιάζουν με τα κηροειδή των μυκοβακτηριδίων . Για όλα τα πιο πάνω αίτια υπάρχουν ενδείξεις, όχι όμως και αποδείξεις.

Κλινικές Εκδηλώσεις

Μπορεί να είναι ασυμπτωματική νόσος και να αποκαλυφθεί τυχαία μετά από ακτινογραφία θώρακα ως πυλαία λεμφαδενοπάθεια και ελαφρά διηθητική νόσος του πνευμονικού παρεγχύματος.

-**Γενικά συμπτώματα** : πυρετός, απώλεια βάρους, ανορεξία, αίσθημα κοπώσεως.

-**Πνεύμονας** : μπορεί να εμφανισθεί λεμφαδενοπάθεια, κυψελίτιδα, διάμεση πνευμονίτιδα, βήχας, δύσπνοια, υπεζωκοτική νόσος και αιμόπτυση σπανίως. Μπορεί να προσβληθούν οι αεραγωγοί και προκαλέσουν αποφρακτική πνευμονοπάθεια. Ο πνεύμονας είναι το συχνότερα προσβαλλόμενο όργανο το 90% περιπτώσεων με σαρκοειδωση θα έχουν παθολογική ακτινογραφία θώρακα κάποια στιγμή στην πορεία της νόσου.

-**Λεμφαδένες** : μπορεί να είναι διογκωμένοι τόσο οι ενδοθωρακικοί όσο και οι περιφερικοί λεμφαδένες.

-**Δέρμα** : 25% των ασθενών θα έχουν προσβολή του δέρματος, οι βλάβες περιλαμβάνουν οζώδες ερύθημα, πλάκες, κηλιδοβλατιδώδη εξανθήματα, υποδερματικά οζίδια και χειμετλοειδή λύκο.

-**Ήπαρ** : θετική βιοψία σε 60 έως 90% των ασθενών με σαρκοειδωση. Σπανίως όμως τα ευρήματα έχουν κλινική αξία.

-**Νεφρά** : μπορεί να εκδηλωθεί περεγχυματική νόσος ή πιο συχνά δευτροπαθής νεφρολιθίαση λόγω διαταραχών του μεταβολισμού του ασβεστίου.

-**Νευρικό σύστημα** : μπορεί να προσβληθεί το ΚΝΣ, και τα περιφερικά νεύρα.

-**Καρδιά** : μπορεί να προσβληθεί το τοίχωμα της αριστερής κοιλίας ή το σύστημα αγωγής, προκαλώντας διαταραχές του ρυθμού και/ή της συσταλτότητας.

Επιπλοκές

Με τη μελέτη του ιστορικού και τη φυσική εξέταση επιχειρείται ο αποκλεισμός εκδηλώσεως άλλων διάμεσων πνευμονοπαθειών που θα επιδείνωναν την κατάσταση του ασθενή.

Θεραπεία

Πολλές περιπτώσεις παρουσιάζουν αυτόματη ύφεση, οπότε η λήψη αποφάσεως για το πότε είναι απαραίτητη η θεραπεία είναι δύσκολη και αμφισβητήσιμη. Βαθμιαία προσβολή των πνευμόνων, οφθαλμική και καρδιακή νόσος είναι σαφείς ενδείξεις για την έναρξη θεραπείας. Η βρογχοκυψελιδική έκπλυση και το σπινθηρογράφημα με γάλλιο μπορεί να βοηθήσουν στην αναγνώριση των ασθενών με υψηλό κίνδυνο προοδευτικής εξελίξεως στο τελικό στάδιο πνευμονικής νόσου, χωρίς όμως να υπάρχει γενική αποδοχή στο θέμα αυτό. Τα κορτικοστεροειδή είναι το κύριο φάρμακο της νόσου. Σε ασθενείς με προοδευτική εξέλιξη της νόσου όπου αποτυγχάνουν τα στεροειδή, μπορεί να είναι χρήσιμα τα κυτταροτοξικά φάρμακα.

Διάγνωση

Για τη ακριβή και σίγουρη διάγνωση της πρέπει να συνυπάρχουν όταν κλινικά και καρδιολογικά ευρήματα και μάλιστα να υποστηρίζονται από ιστολογική εξέταση (βιοψία) που να αποδεικνύει νεκρωτικά κοκκιώματα επιθηλιακών κυττάρων των πνευμόνων. Κοκκιώματα εξ αιτίας άλλων γνωστών αιτιών και τοπικές σαρκοειδικές αντιδράσεις πρέπει να αποκλείονται από τις ιστολογικές εξετάσεις. Συχνά παρατηρούνται κάποια συγκεκριμένα ανοσολογικά χαρακτηριστικά όπως η καταστολή της όψιμης αντίδρασης υπερευαισθησίας και μια αυξημένη ανοσοαπόκριση των T βοηθητικών κυττάρων τύπου 1 (Th1) στα σημεία που εκδηλώνεται η νόσος. Μπορεί επίσης να ανιχνευθεί υπερενεργότητα των B κυττάρων και αύξηση των κυκλοφορούντων ανασοσυμπλεγμάτων. Η πορεία της νόσου μπορεί να συσχετίζεται με τον τύπο της έναρξης της. Μια οξεία έναρξη με οζώδες ερύθημα ή ασυμπτωματική πυλαία λεμφαδενοπάθεια συνήθως σηματοδοτεί μια πορεία αυτοπεριοριζόμενη, ενώ μια ύπουλη έναρξη, ειδικά όταν συνοδεύεται με πολλαπλές εξωπνευμονικές βλάβες, μπορεί να ακολουθείται από αμείλικτη, προοδευτική ίνωση των πνευμόνων και άλλων οργάνων (American thoracic society (ATS), february 1999).

Ιδιοπαθής πνευμονική ίνωση (IPF)

Η IPF είναι η πιο κοινή ιδιοπαθής διάμεση πνευμονοπάθεια. Χαρακτηρίζεται από συσσώρευση εξωκυτταρικής ουσίας στον χώρο των κυψελιδικών σάκων και έπειτα και στους κατώτερους αεραγωγούς με προοδευτική αναδιαμόρφωση των πνευμόνων και τελική αλλαγή της μορφολογίας και του όγκου τους.

Η πνευμονική ίνωση αποτελεί μια ειδική μορφή χρόνιας νόσου του πνεύμονα που χαρακτηρίζεται από αντικατάσταση του φυσιολογικού πνεύμονα με ινώδη εξωκυττάριο ιστό. Οι ινοβλάστες , και ιδιαίτερα οι μυοϊνοβλάστες , διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην παραγωγή της εξωκυτταρικής ουσίας , η οποία αποτελείται κυρίως από κολλαγόνο .

Η πιο συχνή μορφή πνευμονικής ίνωσης είναι η λεγόμενη ιδιοπαθής πνευμονική ίνωση (Idiopathic Pulmonary Fibrosis). Όπως δηλώνει ο όρος «ιδιοπαθής» πρόκειται για νόσο αγνώστου αιτιολογίας που προσβάλλει το διάμεσο χώρο του πνεύμονα (χώρος μεταξύ των κυψελίδων και των αγγείων).

Η νόσος δεν είναι λοιμώδης, δεν μεταδίδεται δηλαδή από άνθρωπο σε άνθρωπο, ούτε κακοήθης . Ανήκει σε μια κατηγορία 200 περίπου νοσημάτων που λέγονται **διάμεσες πνευμονοπάθειες** (interstitial lung diseases-ILD), εμφανίζουν κοινά χαρακτηριστικά γνωρίσματα και μπορούν να καταλήξουν σε πνευμονική ίνωση.

Συχνότητα της νόσου

Η νόσος προσβάλλει περίπου 5 εκατομμύρια ανθρώπους σε όλο τον κόσμο, εκ των οποίων 40.000 πεθαίνουν κάθε χρόνο, ενώ η συχνότητά της αυξάνεται διαρκώς (10-20 νέα περιστατικά ανά 100.000 πληθυσμού ετησίως).

Προσβάλλει συχνότερα άντρες καπνιστές, ηλικίας μεγαλύτερης των 50 ετών με σχεδόν διπλάσια συχνότητα από τις γυναίκες.

Η μέση επιβίωση των ασθενών είναι 3-5 χρόνια από τη στιγμή της διάγνωσης. Η πρόγνωση της νόσου είναι δυστυχώς παρόμοια με εκείνη του καρκίνου του πνεύμονα. Οι ασθενείς καταλήγουν είτε από την ίδια τη νόσο λόγω αναπνευστικής ανεπάρκειας, είτε από επιπλοκές της όπως πνευμονική υπέρταση, μικροβιακές λοιμώξεις, καρκίνος πνεύμονα.

Αίτια

Νεότερα δεδομένα έχουν αναδείξει μια σειρά από δυνητικούς παράγοντες κινδύνου, όπως το κάπνισμα, η γαστροοισοφαγική παλινδρόμηση, διάφορες ιογενείς λοιμώξεις, η έκθεση σε χημικές ουσίες του εργασιακού περιβάλλοντος, σε σκόνη, σε βαρέα μέταλλα. Σε σπάνιες περιπτώσεις μπορεί να προσβάλει και άλλα άτομα στην οικογένεια.

Ωστόσο καμία από τις παραπάνω καταστάσεις δεν έχει άμεσα ενοχοποιηθεί για την ανάπτυξη πνευμονικής ίνωσης. Το μοναδικό που γνωρίζουμε μέχρι σήμερα είναι ότι η νόσος χαρακτηρίζεται από σημαντικές αλλαγές στη διαδικασία φυσιολογικής επούλωσης τραύματος του πνευμονικού παρεγχύματος.

Πιο συγκεκριμένα η παθογενετική διαδικασία περιλαμβάνει επαναλαμβανόμενα βλαπτικά ερεθίσματα αγνώστου αιτιολογίας, τα οποία οδηγούν σε ένα φαύλο κύκλο ανεξέλεγκτης επούλωσης τραύματος που προοδευτικά οδηγεί στην παραγωγή ουλώδους ιστού με καταστροφή της αρχιτεκτονικής του πνεύμονα λόγω προσβολής του διάμεσου χώρου και κυρίως των κυψελίδων.

Η πρόωρη γήρανση των βρογχοκυψελιδικών κυττάρων ίσως να αποτελεί μια πιθανή αιτία δημιουργίας της νόσου. Το ατομικό γενετικό υπόβαθρο , καθώς επίσης και η έκθεση σε μια ποικιλία τοξικών ουσιών επιταχύνει σημαντικά την πνευμονική γήρανση . (Marco chilosi et all, Verona, Italy).

Η Κυτταρική γήρανση είναι μια μη αναστρέψιμη κατάσταση διακοπής της ανάπτυξης που προκλήθηκε από πολλαπλούς μηχανισμούς όπως βράχυνση των τελομερών , **το οξειδωτικό στρες** ,ενεργοποίηση ογκογονιδίου, και άλλους. (Collado M. et all 2007, von Zglinicki T. et all 2005) Η πρόωρη γήρανση μπορεί να επηρεάσει τη λειτουργία των πνευμόνων με διάφορους τρόπους:

- παρεμβαίνει στους μηχανισμούς επιδιόρθωσης των ιστών μετά από βλάβη
- προκαλεί συστηματική και / ή τοπική τροποποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος , αλλοιώνοντας έτσι τους μηχανισμούς άμυνας του πνεύμονα κατά των λοιμώξεων
- υπερενεργοποιεί τους μηχανισμούς της τοπικής και / ή συστηματικής φλεγμονώδους αντίδρασης
- προσβάλλει τα πρόδρομα κύτταρα του κυψελιδικού επιθηλίου οδηγώντας στην εξάντληση των αποθεμάτων σε βλαστικά κύτταρα.

Η σχέση μεταξύ γήρανσης των πνευμόνων και πνευμονικής ίνωσης εξηγείται περαιτέρω σε πειράματα σε ποντίκια, στην οποία τα μεγαλύτερα αρσενικά αναπτύξουν περισσότερο ποσοστό ινωτικών πνευμονικών ιστών από τα νεότερα θηλυκά ποντίκια . (Jean-Francois Cordier and Vincent Cottin)

Αποτέλεσμα των βλαβών είναι η προοδευτική καταστροφή του πνεύμονα, κυρίως στις βάσεις, με αποτέλεσμα διαταραχές στην ανταλλαγή των αερίων και τελικά υποξυγοναιμία λόγω μειωμένης συγκέντρωσης οξυγόνου στο αίμα και υποξία λόγω μειωμένης συγκέντρωσης οξυγόνου στους ιστούς.

Συμπτώματα

Η υποξυγοναιμία προκαλεί προοδευτικά επιδεινούμενη δύσπνοια, αρχικά στην κόπωση (όταν ο ασθενής εκτελεί δραστηριότητες) και στην συνέχεια στην ηρεμία (όταν ξεκουράζεται), καθώς και χρόνιο ξηρό βήχα. Πολλές φορές παρατηρείται πληκτροδακτυλία (ανώδυνη διόγκωση στα δάκτυλα), ενώ η απώλεια βάρους, η ανορεξία και η αδυναμία είναι επίσης συχνά συμπτώματα.

Διάγνωση

Η ίνωση εκδηλώνεται με μη ειδικά συμπτώματα, τα οποία μπορεί να χαρακτηρίζουν πολλές άλλες παθολογικές καταστάσεις, πολλές φορές υποδιαγιγνώσκεται με αποτέλεσμα οι ασθενείς να προσέρχονται στο θρόνοντα ιατρό όταν η νόσος έχει προχωρήσει σημαντικά και οι βλάβες είναι μη αναστρέψιμες.

Τις περισσότερες φορές η διάγνωση της νόσου γίνεται με αποκλεισμό άλλων πιθανών νοσημάτων.

Η Αμερικανική Πνευμονολογική Εταιρεία, σε συνεργασία με την αντίστοιχη Ευρωπαϊκή, εξέδωσαν το 2000 τα κριτήρια διάγνωσης της νόσου τα οποία διακρίνονται σε μείζονα και ελάσσονα.

Τα μείζονα κριτήρια αναφέρονται στην λειτουργική αξιολόγηση (γίνεται σπιρομέτρηση), στην ακτινολογική αξιολόγηση (γίνει αξονική τομογραφία θώρακα υψηλής ευκρίνειας) και στη βιοψία του πνεύμονα (ο ασθενής υποβάλλεται σε πλήρη αναισθησία και στη συνέχεια γίνεται λήψη μικρής βιοψίας με βιντεοσκοπική θωρακοχειρουργική τεχνική, την οποία πρέπει να την εξετάσει έμπειρος παθολογοανατόμος.

Τα ελάσσονα κριτήρια είναι τα κλινικά χαρακτηριστικά της νόσου, δηλαδή η ηλικία (συνήθως πάνω από 50 ετών), η ύπουλη έναρξη των συμπτωμάτων που δεν μπορεί να αποδοθούν σε άλλη αιτία, η διάρκεια της νόσου (πάνω από 3 μήνες) και τα χαρακτηριστικά ακροαστικά του πνεύμονα.

Για την ορθή διάγνωση της νόσου, επομένως, είναι απαραίτητη η συνεργασία ειδικού πνευμονολόγου, ακτινολόγου και παθολογοανατόμου

(goldstandard). Απαραίτητος είναι επίσης ο ειδικός θωρακοχειρουργός σε περιπτώσεις που απαιτείται βιοψία με ειδική τεχνική (VATS).

Νέα μέθοδο στη διάγνωση ή/και και δείκτη της σοβαρότητας της νόσου πιθανόν να αποτελέσει η μέτρηση των επιπέδων του οξειδωτικού στρες του ορού των ασθενών (Zoe D. Daniil et al 2006)

Η εξέλιξη

Η πνευμονική ίνωση προσβάλλει κάθε ασθενή σε διαφορετικό βαθμό και εξελίσσεται με διαφορετικούς ρυθμούς. Προοδευτικά ο ασθενής θα χρειάζεται οξυγόνο για να μπορέσει να εκτελέσει τις καθημερινές του δραστηριότητες. Λόγω της υποξαιμίας το έργο της καρδιάς δυσχεραίνεται με αποτέλεσμα την εμφάνιση πνευμονικής υπέρτασης και καρδιακής ανεπάρκειας.

Η νόσος δυνητικά μπορεί να εμφανίσει απειλητικές για τη ζωή καταστάσεις, όπως το οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου, το αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο, ο καρκίνος του πνεύμονα (10% των πασχόντων) και η πνευμονική εμβολή. Οι ασθενείς πρέπει να παρακολουθούνται τακτικά από ειδικό κέντρο για να αξιολογείται η πορεία της ασθένειάς τους και να αντιμετωπίζονται εγκαίρως οι επιπλοκές της.

Θεραπεία

Η αιτιοπαθογένεια της νόσου παραμένει εν πολλοίς άγνωστη και μέχρι σήμερα δεν υπάρχει καμία θεραπεία, η οποία να είναι αποτελεσματική όσον αφορά την επιβίωση του ασθενούς.

Η συμβατική θεραπεία της πνευμονικής ίνωσης συμπεριλαμβάνει συνδυασμό κορτικοστεροειδών, αντιοξειδωτικών (N-ακετυλοκυστεΐνη) ανοσοκατασταλτικών και ανοσοτροποποιητικών φαρμάκων. Δυστυχώς η αποτελεσματικότητά τους δεν είναι ικανοποιητική.

Κατά καιρούς έχουν δοκιμασθεί διαφορά φάρμακα, όπως η ιντερφερόνη-γ. (BourosD. European Respiratory Journal, Σεπτέμβριος 2006) , (Lancet, *inpress*).

Παραπάνω, παραθέσαμε στοιχεία για το μιτοχόνδριο ως οργανίδιο, ασχοληθήκαμε με τη δομή και το γενετικό του υλικό και αναφέραμε συνοπτικά τις κυριότερες λειτουργίες του. Στη συνέχεια καταλήξαμε στο ότι το μιτοχόνδριο είναι ένα ζωτικής σημασίας οργανίδιο που εάν έστω και μια από τις λειτουργίες του επηρεαστεί θα προκληθεί μεγάλη ζημιά στον οργανισμό. Αυτή η διατάραξη οφείλεται σε δυσλειτουργία κάποιων πρωτεϊνών, ριβοσωμικών RNAs ή tRNAs λόγω μεταλλάξεων στα αντίστοιχα

γονίδια. Όπως αναφέραμε οι μεταλλάξεις δημιουργούνται στο mt-DNA πολύ συχνότερα από το πυρηνικό και μπορεί να είναι απόρροια ακόμη και της ίδιας της μιτοχονδριακής λειτουργίας. Συγκεκριμένα η παραγωγή ελεύθερων ριζών από την αναπνευστική αλυσίδα επιδεινώνει την μεταλλαξιγένεση. Οι ασθένειες που προκύπτουν από μία ή από τη συσσώρευση περισσότερων μεταλλάξεων στο mt-DNA είναι τα μιτοχονδριακά νοσήματα που αναφέρθηκαν παραπάνω.

Το ερώτημα όμως είναι γιατί οι έρευνες επικεντρώθηκαν στο μιτοχόνδριο στην προσπάθεια εύρεσης των αιτιών των δυο ασθενειών. Η απάντηση είναι απλή. Μία ασθένεια η οποία προκαλείται από μιτοχονδριακή δυσλειτουργία εμφανίζεται πρώτα από όλα σε πολλούς ιστούς και ποτέ δεν αφορά ένα συγκεκριμένο μόνο όργανο αφού τα μιτοχόνδρια είναι αναγκαία για κάθε κύτταρο. Επίσης τα μιτοχόνδρια έχουν περισσότερα αντίγραφα του γονιδιώματος τους άρα μπορεί η μεταλλαγή να υπάρχει σε όλα (ομοπλασμία) ή σε μερικά αντίγραφα (ετεροπλασμία) γεγονός που καθορίζει τη σοβαρότητα των συμπτωμάτων η οποία διαφέρει μεταξύ των ασθενών. Αυτή η πολυσυστηματικότητα και η ετερογένεια φαινοτύπου εμφανίζονται σε κάθε μιτοχονδριακό νόσημα όπως και στις δύο υπο μελέτη ασθένειες γεγονός που τις καθιστά 'ύποπτες' για μιτοχονδριακή αιτιολογία. Υπάρχουν όμως ακόμα πιο ισχυρά στοιχεία που τις 'ενοχοποιούν' ως μιτοχονδριακές. Όπως θα δούμε αναλυτικότερα παρακάτω, στους ασθενείς με Σαρκοείδωση παρατηρείται τοπική οξειδοαναγωγική ανισσορροπία σε κάθε ιστό που μπορεί να εκδηλώνει τη νόσο (Respiratory Medicine Department, University of Thessaly Medical School Address, University Hospital of Larissa, Larissa 41110, Greece) γεγονός που παραπέμπει σε δυσλειτουργία της αναπνευστικής αλυσίδας ή σε δυσλειτουργία των μιτοχονδριακών ενζύμων εξουδετέρωσης ριζών. Αυξημένη τοπική παραγωγή ROS έχει διαπιστωθεί και στην IPF όπου επιπρόσθετα διαπιστώθηκε υπερπαραγωγή από τα κυψελιδικά μακροφάγα και τα κυψελιδικά κύτταρα καθώς και αυξημένη απόπτωση των κυψελιδικών κυττάρων (Zoe D. Daniil et al, Larissa, Greece, October 2006).

Βλέπουμε λοιπόν ότι υπάρχουν αρκετές ενδείξεις που παραπέμπουν στη "μιτοχονδριακή αιτία" και δικαίως λοιπόν οι έρευνες προσανατολίστηκαν στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα, και ακόμα πιο συγκεκριμένα στα t-RNAs για τον λόγο που ήδη αναφέρθηκε στην ενότητα 9 (Μεταλλάξεις στα mt-tRNAs).

B. ΣΚΟΠΟΣ

Στόχος της συγκεκριμένης έρευνας είναι η εύρεση των μεταλλάξεων στα γονίδια των mt-tRNAs των αμινοξέων Asn, Cys, Tyr, His, Ser, Leu, Trp, Ala, Gly, Val, Glu σε ασθενείς με διαπιστωμένη σαρκοείδωση και ιδιοπαθή πνευμονική ίνωση (IPF) και η συσχέτιση των μεταλλαγών αυτών με τα συγκεκριμένα νοσήματα.

Στην έρευνα συμμετείχαν , με την σύμφωνη γνώμη τους μετά από ανάλογη ενημέρωση, δύο ομάδες ασθενών η μία περιείχε τους ασθενείς με σαρκοείδωση και η άλλη αυτούς με IPF.

Προυπόθεση συμμετοχής στην έρευνα ήταν:

- οι ασθενείς να βρίσκονται σε φάση καταστολής της ασθένειας
- να μην παρουσιάζουν άλλα αναπνευστικά προβλήματα, είτε χρόνια, όπως άσθμα και χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια είτε εποχιακά όπως λοιμώξεις του ανώτερου αναπνευστικού (ρινίτιδες κλπ)
- να μην παρουσιάζουν συνοσηρότητες όπως καρδιολογικές, νευρολογικές, μεταβολικές παθήσεις και άλλες διαταραχές

Η λήψη πλήρους εξειδικευμένου ιστορικού του κάθε ασθενή και η συμπλήρωση ειδικών ερωτηματολογίων έδωσε μια πλήρη εικόνα για τον κάθε ασθενή αλλά και διασφάλισε ότι πληρούνται οι προϋποθέσεις συμμετοχής στην έρευνα.

Αυτές οι διαδικασίες πραγματοποιήθηκαν στα εξωτερικά ιατρεία του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λαρίσης όπου έλαβαν χώρα και οι αιμοληψίες.

Γ. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

I) ΥΛΙΚΑ

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

- Acetic Acid, **Οξικό οξύ**, CH_3COOH
- Acrylamide, **Ακρυλαμίδα**, $\text{CH}_2=\text{CHCONH}_2$
- Agarose, **Αγαρόζη**, $\text{C}_{24}\text{H}_{38}\text{O}_{19}$
- Ammonium persulfate 20% (APS 20%), **Υπερθειικό αμμώνιο 20%**, $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$
- Binding Buffer, **Διάλυμα πρόσδεσης**
- Bis-Acrylamide, **N,N - μεθυλεν-δισ-ακρυλαμίδα**, $[\text{H}_2\text{C}=\text{CHCONHCH}(\text{OH})-]_2$
- Bromophenol Blue, **Μπλε βρωμοφαινόλης**, $\text{C}_{19}\text{H}_{10}\text{Br}_4\text{O}_5\text{S}$
- Chloroform, **Χλωροφόρμιο**, CHCl_3
- Deoxynucleotide Triphosphate, **dNTPs**
- Elution Buffer, **Διάλυμα έκλουσης**
- Ethanol, **Αιθανόλη**, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$
- Ethidium bromide, **Βρωμιούχο αιθίδιο**, $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{BrN}_3$
- Formaldehyde, **Φορμαλδεΐδη**, HCHO
- Formamide, **Φορμαμίδιο**, HCONH_2
- Glycerol 50x, **Γλυκερόλη 50x**, $\text{HOCH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{OH}$
- 10x High yield PCR reaction buffer with Mg^{++} , **10x Ρυθμιστικό διάλυμα υψηλής απόδοσης για PCR με Mg^{++}**
- Magnesium chloride buffer, **Διάλυμα χλωριούχου μαγνησίου**, MgCl_2
- Phenol, **Φαινόλη**, $\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$
- Primers, **Εκκινητές**
- 2-propanol, **ισοπροπανόλη**, $\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$
- Proteinase K 10U/ml, **Πρωτεϊνάση K 10U/ml**
- Saline-sodium citrate buffer 1x (SSC 1x), **Αλατούχο κιτρικό νάτριο**
- Silver Nitrate, **Νιτρικός άργυρος**, AgNO_3
- Sodium acetate, **Οξικό νάτριο**, CH_3COONa
- Sodiumborohydride, **Βορο-υδρίδιο του νατρίου**, NaBH_4
- Sodiumdodecylsulphate 5% (SDS 5%)
- Sodiumhydroxide, **Υδροξειδίο του νατρίου**, NaOH
- TaqDNA Polymerase, **TaqDNA πολυμεράση**
- N,N,N',N'-Tetra-methyl-ethylen-diamine (TEMED), **N,N,N',N'-Τετρα-μεθυλ-εθυλεν-διαμίνη**, $(\text{CH}_3)_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$
- Tris-Borate-EDTA 0.5x/10x (TBE 0.5x/10x)
- Wash Buffer, **Διάλυμα πλύσης**
- Xylene Cyanol, **Κυανούν ξυλενίου**, $\text{C}_{25}\text{H}_{27}\text{N}_2\text{NaO}_6\text{S}_2$
- 100bp DNA Ladder

ΣΥΣΚΕΥΕΣ

- Abductor
- Beaker
- Casting
- Centrifuge
- Thermal Cyclor
- Electronic U.V. transilluminator
- Electrophoresis power supply
- Electrophoresis tank
- Eppendorfs
- Filter paper
- Light box
- Measuring cylinder
- Mold
- Oven
- Parafilm
- Pipettes Gilson
- Pipette tips
- PureLink™ Spin Column
- Thermalcycler
- Vortex

ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΑΙΜΑΤΟΣ

Τα δείγματα αίματος από τα οποία έγινε η απομόνωση του DNA προέρχονται από ασθενείς της Πνευμονολογικής κλινικής του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας, με Ιδιοπαθή Πνευμονική Ινωση ή Σαρκοείδωση. Οι αιμοληψίες πραγματοποιήθηκαν στην Πνευμονολογική κλινική και τα δείγματα μεταφέρθηκαν στο κτήριο της Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας στο εργαστήριο Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας όπου έγινε η απομόνωση DNA καθώς και όλη η λοιπή διαδικασία.

II) ΜΕΘΟΔΟΙ

1.ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA

1α) Παρασκευή αντιδραστηρίων

Τα stock διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση του DNA είναι τα εξής:

- **20x SSC (3M NaCl, 0,3M sodium citrate, pH 7.0):**

175,4 g NaCl και

88,2 gr Sodium citrate dehydrate

500 ml ddH₂O.

pH = 7.0 (+HCl) .

ddH₂Oως 1 lt.

Αποστείρωση

SSC1x : αραιώση του **20xSSC**

- **3M Sodium Acetate (NaOAc):**

40,81gr sodium citrate

80ml ddH₂O.

pH = 5.2 (+glacial acetic acid (CH₃COOH)).

ddH₂Oως 100ml.

Αποστείρωση

Sodium Acetate (NaOAc) 0,2M: προέκυπτε από την αραιώση του πυκνού
3M Sodium Acetate (NaOAc)

- **10% SDS:**

10 g Electrophoresis grade SDS

90 ml ddH₂O.

Ανάδευση

pH = 7,2 (+ HCl).

ddH₂O έως τα 100 ml.

5% SDS : αραιωση του παραπανω

- **Chloroform (24:1 (v /v) chloroform - isoamylalcohol):** 24 ml χλωροφορμίου και 1 ml ισοαμυλικής αλκοόλης

1β) Ρόλος των αντιδραστηρίων

EDTA 0,5M: αντιπηκτικός παράγοντας, αποτρέπει την πήξη του αίματος και τη συγκόλληση των ερυθροκυττάρων.

SSC: ήπιος λυτικός ρόλος: Καταστροφή κυτταρικών μεμβράνων για να μπορέσουν τα επόμενα διαλύματα να έχουν πρόσβαση στις πυρηνικές μεμβράνες.

NaOAc: κατακρήμνιση του DNA.

SDS: ιονικό απορρυπαντικό, διασπά την πυρηνική μεμβράνη παρεμβαίνοντας στις πολικές αλληλεπιδράσεις που τη συγκρατούν. Σχηματίζονται έτσι λιποπρωτεϊνικές δομές που κατακρημνίζονται. Έτσι το DNA προστατεύεται από τις νουκλεάσες.

Πρωτεΐνάση K 20ng/μl: Αποικοδομεί τις πρωτεΐνες προσφέροντας επιπλέον προστασία από νουκλεάσες και καθαρότητα του τελικού προϊόντος απομόνωσης

Φαινόλη: δρα ως αποδιατακτικός παράγοντας για τις πρωτεΐνες. Διαχωρίζει έτσι τα λιπίδια από τις πρωτεΐνες και τα νουκλεϊκά οξέα κατά την εκχύλιση του DNA.

Το $pH > 7$ απαιτείται ώστε το DNA να κατανέμεται στην υπερκείμενη υδατική φάση λόγω του αρνητικού του φορτίου.

ισοαμυλική αλκοόλη: αντιαφρώδης παράγοντας. Σταθεροποιητής της ενδιάμεσης φάσης μεταξύ της υδατικής και της οργανικής (πρωτεΐνες).

Χλωροφόρμιο[24:1 (v /v) chloroform - isoamylalcohol]: Οργανικός, πτητικός παράγοντας. Προκαλεί μετουσίωση των πρωτεϊνών. Βοηθά στην απομάκρυνση της φαινόλης από την υδατική φάση.

Επίσης έχει μεγάλη πυκνότητα με αποτέλεσμα να βοηθά στον καλύτερο διαχωρισμό των φάσεων.

Ισοπροπανόλη: το DNA κατακρημνίζεται με ισοπροπανόλη

Παγωμένη αιθανόλη 70%: στη συνέχεια ακολουθεί πλύση με αιθανόλη 70%.

Το DNA, λόγω της ιονικής του φύσης, παραμένει αδιάλυτο στους συγκεκριμένους οργανικούς διαλύτες.

1γ) Διαδικασία απομόνωσης

Αρχικά, τα δείγματα αφήνονται να ξεπαγώνουν σε θερμοκρασία δωματίου. Ανακινούμε μερικές φορές ελαφρά προς αποφυγή πήξης του αίματος.

Μόλις τα δείγματα ξεπαγώσουν εντελώς παίρνουμε 0,5ml αίματος από το καθένα και το μεταφέρουμε σε σωλήνα eppendorf (2ml). Έπειτα προσθέτουμε 1ml SSC 1x. Αναδεύουμε στο vortex και πραγματοποιούμε φυγοκέντρηση για 3 min στα 13000 rpm στους 4 °C .

Στη συνέχεια, το υπερκείμενο απομακρύνεται και προσθέτουμε ξανά 1 ml SSC 1x, αναδεύουμε και φυγοκεντρούμε όπως και προηγουμένως.

Απομακρύνεται ξανά το υπερκείμενο.

Προστίθεται 0,5 ml CH_3COONa 0,2M, 50 μ l SDS 5% και 5 μ l proteinase K (20ng/ μ l). Αναδεύουμε το κάθε δείγμα στο vortex και τα αφήνουμε για επώαση 1h στους 55 °C, Κάθε 15 min περίπου ανακινούμε ελαφρά.

Μόλις ολοκληρωθεί η επώαση, προστίθεται 0,5 ml φαινόλη και 0,5 ml χλωροφόρμιο (24:1 (v/v) chloroform - isoamyl alcohol), έπειτα γίνεται ανάδευση στο vortex και φυγοκέντρηση για 10 min στους 4o C στα 13000 rpm.

Μετα τη φυγοκέντρηση, μπορούμε να διακρίνουμε τρεις στρώσεις: την υδατική φάση η οποία αποτελεί την ανώτερη στρώση, την οργανική φάση που βρίσκεται κάτω κάτω και μια ενδιάμεση μικρή στρώση στην οποία βρίσκεται και το DNA . Στην ουσία το DNA βρίσκεται στην υδατική ανώτερη φάση αλλά λόγω βάρους πέφτει στον πυθμένα της και συναντά την επιφάνεια της οργανικής.

σε καινούριο erpendorf μεταφέρεται το υπερκείμενο και προστίθεται 1ml χλωροφόρμιο (24:1 (v/v) chloroform - isoamyl alcohol), αναδεύουμε στο vortex και φυγοκεντρούμε για 10min στους 4 oC στα 13000 rpm.

Ξανά το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέα erpendorf και προσθέτουμε 1ml isopropanol. Αναδεύουμε τα δείγματα και τα τοποθετούμε στους -20 oC για 15min. Έπειτα γίνεται φυγοκέντρηση για 20 min στις 13000 rpm, στους 4 oC.

Αφαιρούμε το υπερκείμενο προσεκτικά. Προσθέτουμε 1 ml διαλύματος παγωμένης αιθανόλης 70%. Γίνεται έπειτα φυγοκέντρηση για 10min στους 4 oC στα 13000 rpm.

Αφαιρούμε πάλι το υπερκείμενο προσεκτικά ώστε να μην πάρουμε μαζί και ίζημα και στη συνέχεια τοποθετούμε τα δείγματα στον κλίβανο για ξήρανση για 1 h στους 55 oC. Με την ξήρανση εξατμίζεται η αιθανόλη και παραμένει το DNA.

Μόλις ξηρανθεί εντελώς το DNA, προστίθεται 100μl ddH₂O για επαναδιάλυση του.

Τα δείγματα μένουν σε θερμοκρασία δωματίου ώστε να επαναδιαλυθούν.

Τέλος, μπορούμε να αποθηκεύσουμε τα δείγματα στους -20 oC για πιθανή μελλοντική χρήση τους.

Προκειμένου να βεβαιωθούμε πως έχει πραγματοποιηθεί η απομόνωση του DNA, προχωράμε σε ποιοτική και ποσοτική ανίχνευση του απομονωμένου DNA.

Για να επιτευχθεί αυτό πρέπει τα δείγματα να ηλεκτροφορηθούν σε πηκτή αγαρόζης ως εξής:

2) ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ

Ηλεκτροφόρηση

Η ηλεκτροφόρηση αποτελεί μια πολύτιμη αναλυτική μέθοδο για το διαχωρισμό ιονισμένων σωματιδίων, κυρίως βιομακρομορίων όπως είναι οι πρωτεΐνες και το DNA. Χρησιμοποιείται ευρύτατα για διαχωρισμό πεπτιδίων, πρωτεϊνών του πλάσματος, των αιμοσφαιρινών, των ισοενζύμων, των λιποπρωτεϊνών, αλλά και ερευνητικά στον διαχωρισμό και την ταυτοποίηση πρωτεϊνών, DNA, RNA.

Η μέθοδος αυτή είναι ένα από τα πιο σημαντικά και θεμελιώδη εργαλεία στην εργαστηριακή διαγνωστική ιατρική και στη μοριακή βιολογία. Βάση της είναι η κίνηση φορτισμένων σωματιδίων μέσα σ'ένα υγρό μέσον υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου.

2α) Θεωρητική βάση της τεχνικής

Μόρια που φέρουν ηλεκτρικό φορτίο κινούνται προς την άνοδο (+) ή την κάθοδο (-) όταν τοποθετηθούν σε ηλεκτρικό πεδίο, ανάλογα με το φορτίο που διαθέτουν.

Οι πρωτεΐνες και τα νουκλεϊκά οξέα είναι βιομόρια με φυσικοχημικές ιδιότητες αμφολυτών, μπορούν άρα να συμπεριφέρονται τόσο ως οξέα όσο και ως βάσεις. Οι ομάδες που ιονίζονται και συμβάλλουν στην αμφολυτική τους συμπεριφορά ανήκουν κυρίως στα πολικά αμινοξέα (πρωτεΐνες) ή φωσφορικές ομάδες (νουκλεϊκά οξέα).

Έτσι το DNA ως αρνητικά φορτισμένο θα μεταφερθεί από το αρνητικό προς το θετικό ηλεκτρόδιο διαμέσου της πηκτής αгарόζης.

2β) Παράγοντες που επηρεάζουν τον ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό

- pH
- θερμοκρασία
- ένταση του ηλεκτρικού πεδίου
- είδος του ηλεκτροφορητικού υλικού
- μέγεθος και σχήμα του βιομορίου
- φύση του ρυθμιστικού διαλύματος pH

pH

Τα βιομακρομόρια όπως οι πρωτεΐνες και το DNA είναι αμφολύτες, μικρή μεταβολή του pH μπορεί να προκαλέσει μεταβολή στο συνολικό ηλεκτρικό φορτίο και να επιδράσει στο διαχωρισμό.

Θερμοκρασία

Η ροή ρεύματος i κατά την ηλεκτροφόρηση προκαλεί απελευθέρωση θερμότητας .

$$Q = E \times i \times t$$

όπου E η διαφορά δυναμικού και

t ο χρόνος ηλεκτροφόρησης.

Η απελευθέρωση θερμότητας προκαλεί αύξηση της αγωγιμότητας. Εάν η τάση διατηρείται σταθερή, η αύξηση της εντάσεως που προκαλείται έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της ταχύτητας κινήσεως των βιομορίων και αύξηση της εξάτμισης του νερού από το ρυθμιστικό διάλυμα, η οποία επιτείνει την ελάττωση της αντίστασης και την παραπέρα αύξηση του i και του Q .

Η αύξηση της θερμοκρασίας αποτελεί σοβαρό κίνδυνο διότι μπορεί να προκαλέσει μετουσίωση και καταστροφή των βιομορίων. Γι' αυτό το λόγο σε συστήματα ηλεκτροφόρησης όπου αναπτύσσονται υψηλές θερμοκρασίες χρησιμοποιούνται και συστήματα ψύξης.

Η ένταση του ηλεκτρικού πεδίου

Επηρεάζει άμεσα την πραγματική απόσταση που διανύουν τα βιομόρια σ' ένα δεδομένο χρόνο. Υπό την επίδραση ισχυρού πεδίου επιτυγχάνεται καλύτερος διαχωρισμός. Όσο αυξάνεται το δυναμικό και η ένταση του ρεύματος, τόσο περισσότερη ηλεκτρική ενέργεια μετατρέπεται σε θερμότητα .

Για κάθε ηλεκτροφορητική συσκευή και μέθοδο, το μέγιστο δυναμικό που μπορεί να εφαρμοσθεί καθορίζεται μέσα σε αυστηρά όρια και η ηλεκτροφόρηση μπορεί να γίνει με σταθερή τάση ή ένταση ρεύματος.

Η φύση του ρυθμιστικού διαλύματος

Η ιοντική ισχύς και οι χημικές ιδιότητες των ρυθμιστικών διαλυμάτων ασκούν διαφορετική επίδραση στις διάφορες πρωτεΐνες.

Η ιοντική ισχύς του ρυθμιστικού διαλύματος επηρεάζει την ταχύτητα κίνησης, διότι το μόριο που κινείται περιβάλλεται από το "ιοντικό νέφος" των μορίων του ρυθμιστικού διαλύματος, το οποίο εμποδίζει την κίνησή του. Ρυθμιστικά διαλύματα πολύ υψηλής ιοντικής ισχύος προκαλούν την απελευθέρωση μεγάλου ποσού θερμότητας (Joule) με πιθανό κίνδυνο τη μετουσίωση των πρωτεϊνών ή την αλλοίωση της δομής των νουκλεϊκών οξέων.

Αύξηση της ιοντικής ισχύος του ρυθμιστικού διαλύματος δίνει καλύτερα διαχωριζόμενα κλάσματα.

Πρωτεΐνες: ρυθμιστικό διάλυμα βαρβιτουρικών, pH 8,6

Νουκλεϊκά οξέα: διάλυμα TAE ή TBE

2γ) Ανίχνευση προϊόντων PCR με ηλεκτροφόρηση αγαρόζης

Η Ηλεκτροφόρηση πηκτής αγαρόζης (agarose gel electrophoresis) χρησιμοποιείται ευρύτατα στο διαχωρισμό των πρωτεϊνών του ορού των ισοενζύμων (LDH, CK, ALP, αιμοσφαιρινών κ.α.) των κλασμάτων λιποπρωτεϊνών των νουκλεϊνικών οξέων (DNA, RNA)

Η πηκτή αγαρόζης ως ηλεκτροφορητικό υλικό αποτελείται από πυκνό δίκτυο ουδέτερων πολυσακχαριτών (επαναλαμβανομένων μονάδων αγαρόζης), των οποίων οι αλυσίδες σχηματίζουν πόρους κατά το σχηματισμό της πηκτής, Διάλυμα αγαρόζης σε θερμοκρασία ~100ο C πολυμερίζεται δημιουργώντας ένα κολλοειδές διάλυμα που πήζει σε θερμοκρασία μικρότερη των 45ο C. Η πηκτή αγαρόζης, λόγω των μεγάλων πόρων που σχηματίζονται κατά τον πολυμερισμό, αποτελεί ένα ικανοποιητικό ηλεκτροφορητικό υλικό που δεν εμποδίζει στερεοχημικά την ελεύθερη μετακίνηση των βιομακρομορίων.

Το **DNA** στην πηκτή αγαρόζης (σε ουδέτερο pH) είναι αρνητικά φορτισμένο, λόγω των φωσφορικών ομάδων του τα μόρια DNA μετακινούνται, κατά την ηλεκτροφόρηση προς την άνοδο, με ταχύτητα αντιστρόφως ανάλογη του λογάριθμου του αριθμού των βάσεων τους. **Τα μικρότερα μόρια DNA, μετακινούνται μέσα στο πήκτωμα πιο γρήγορα από τα μεγαλύτερα κι έτσι επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός μορίων διαφορετικού μεγέθους.**

Επειδή το πήκτωμα εμποδίζει την τυχαία διάχυση των μορίων, τα μόρια διαφορετικού μήκους διαχωρίζονται σε "ζώνες" και γίνονται ορατά με βρωμιούχο αιθίδιο. Μπορεί λοιπόν να ανιχνευθεί ακόμα και ποσότητα 1 ngDNA με άμεση εξέταση του πηκτώματος κατόπιν διέγερσης από U.V. ακτινοβολία.

Έτσι, μετά την απομόνωση του DNA πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφορηση σε πηκτή αгарόζης (1,5 % w/v). Για να εξακριβώσουμε εάν η απομόνωση ήταν αποτελεσματική και όχι μόνο ποιοτικά αν δηλαδή υπάρχει DNA αλλά και ποσοτικά δηλαδή αν η ποσότητα του DNA είναι επαρκής για τη μελέτη του.

2δ) Διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν

TAE 50x (500ml):

Tris Base 121gr
Acetic Acid 28,5ml
EDTA 0,5M 50ml
ddH₂O έως τα 500ml

Το διάλυμα **TAE 0,5x** παρασκευάζεται αραιώνοντας το διάλυμα stock 50x (10ml σε τελικό όγκο 2lt).

Loading buffer 6x (10ml):

Bromophenol blue 1% w/v 1ml
TBE 20x 0,5ml
Glycerol 5ml
ddH₂O έως τα 10ml

2ε) Διαδικασία ηλεκτροφόρησης

Για την παραγωγή της πηκτής χρησιμοποιήθηκαν 80 ml διαλύματος TAE αραιώσης 0,5X, τα οποία αναμίχθηκαν με 1,2 gr αгарόζης.

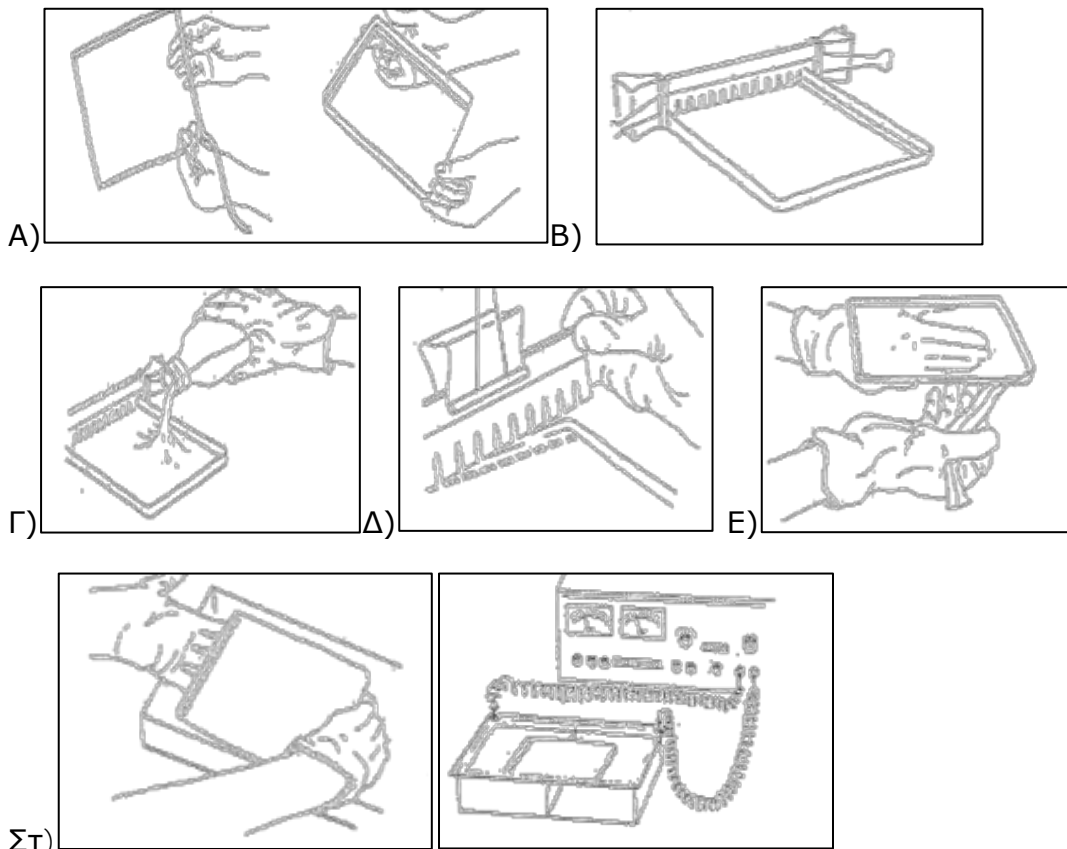
Μετά την πλήρη διάλυση της αгарόζης στο TAE προστέθηκαν 9 μl βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr) και το μίγμα αφέθηκε να πήξει στο ειδικό καλούπι.

Στη συνέχεια για την φόρτωση των δειγμάτων στα πηγαδάκια του gel αναμίχθηκαν σε parafilm 3 μl του κάθε δείγματος με 5μl διαλύματος φόρτωσης (Loading Buffer - Χρωστική Bromophenol Blue 0.25% + 30% Glycerol).

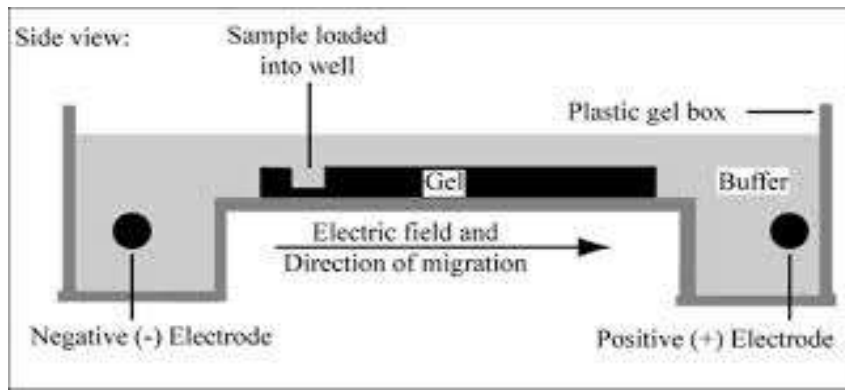
Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση στα 100 mV για περίπου 15 min.

Η οπτικοποίηση έγινε σε συσκευή UV όπου εμφανίστηκε μια αχνή ζώνη κάτω από κάθε πηγαδάκι.

Η κάθε ζώνη αντιστοιχούσε στο DNA που απομονώθηκε από το αντίστοιχο δείγμα αίματος.



ΕΙΚΟΝΕΣ 12, Α-ΣΤ: ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗΣ



ΕΙΚΟΝΑ 13: ΣΧΗΜΑΤΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ ΣΥΣΚΕΥΗΣ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗΣ

Από το κάθε δείγμα DNA έπρεπε στη συνέχεια να ενισχυθούν με την τεχνική της PCR τα γονίδια των μιτοχονδριακών tRNAs. Για την ενίσχυση των συγκεκριμένων τμημάτων χρησιμοποιήθηκαν ειδικά ζεύγη εκκινητικών μορίων για το κάθε γονίδιο της **VBC Biotech**.

Εκκινητές

Forward		Tm	Reverse	Tm
GLY	5'-CCATCTATTGATGAGGGT-3'	55,3	5'-GGATATAGGGTCCAAGCCGCA-3'	61,8
VAL	5'-GTACTGGAAAGTGCACTTGG-3'	57,3	5'-GGTTGTCTGGTAGTAAGG-3'	53,7
GLU	5'-CCCACACTCAACAGAAACA-3'	54,5	5'-TTGCGTATTGGGGTCATTG-3'	54,5
TA	5'-CGCTACTCCTACCTATCTCC-3'	60	5'-TTAGGGTGCTTAGCTGTAAAC-3'	57
HSL	5'-CATCATTACCGGGTTTTTCCT-3'	56	5'-TGGTTATAGTAGTGTGCATG-3'	54
IGM	5'-CCAGCATTCCCCCTCAAACC-3'	63	5'-TGGGCCAGGGGATTAATTA-3'	55

3) ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ PCR

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (polymerase chain reaction, PCR, amplification) είναι μια μέθοδος που αναπτύχθηκε το 1985 από τους Mullis και Silverstein και άρχισε να χρησιμοποιείται ευρέως το 1987 με την χρήση θερμοανθεντικών DNA πολυμερασών. Με τη μέθοδο αυτή συντίθεται μεγάλος αριθμός αντιγράφων ενός συγκεκριμένου τμήματος DNA σε μια ενζυμική αντίδραση in vitro.

Η PCR βασίζεται στον ενζυμικό πολλαπλασιασμό μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA που οριοθετείται δεξιά και αριστερά από δύο εκκινητές - ολιγονουκλεοτίδια (primers). Η αλληλουχία του κάθε εκκινητή είναι συμπληρωματική προς τη μία από τις δύο αλυσίδες του δίκλωνου DNA - εκμαγείου. Η αντίδραση περιλαμβάνει 25-35 επαναλαμβανόμενους κύκλους.

Κάθε κύκλος αποτελείται από τρία στάδια:

1. Αποδιάταξη του δίκλωνου DNA (denaturation)

Συνήθεις συνθήκες: 94°C- 96°C, 20"-60"

2. Πρόσδεση των εκκινητών με τις συμπληρωματικές προς αυτούς ακολουθίες (primer annealing).

Συνήθεις συνθήκες: 37°C-65°C, 20"-60".

3. Επιμήκυνση των συνδεδεμένων εκκινητών και σύνθεση DNA με κατεύθυνση 5'→3' (elongation).

Συνήθεις συνθήκες: 72°C, 0.5 - 2 min.

Το προϊόν επιμήκυνσης του κάθε εκκινητή από τον πρώτο κύκλο της αντίδρασης αποτελεί το καλούπι για τον άλλο εκκινητή στον επόμενο κύκλο. Μετά από n κύκλους το προϊόν PCR περιέχει 2n δίκλινα μόρια DNA που είναι αντίγραφα της αλληλουχίας που ορίζεται και οριοθετείται από τους εκκινητές.

3α) Αντιδραστήρια και ρόλος του καθενός

Αντιδραστήρια απαραίτητα για την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης

Τα απαραίτητα συστατικά μιας αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης είναι:

1. DNA (template DNA)
2. εκκινητής (primer)
3. τριφωσφορικά δεοξυνουκλεοτίδια (dNTPs)
4. DNA πολυμεράση (DNA polymerase)
5. ιόντα μαγνησίου (Mg^{++})
6. ισοτονικό διάλυμα της αντίδρασης (buffer)

Ρόλος των αντιδραστηρίων

1. DNA

Τα πιο σημαντικά συστατικά μιας αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης που καθορίζουν τα προϊόντα είναι οι εκκινητές και το DNA. Το DNA περιέχει το στόχο DNA, τις αλληλουχίες δηλαδή που θέλουμε να πολλαπλασιάσουμε. Τα κύρια χαρακτηριστικά του DNA που μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε μία αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης είναι:

- α. να μην είναι κατεστραμμένο (degraded) στην περιοχή του στόχου DNA, ώστε να υπάρχει η δυνατότητα να πολλαπλασιαστεί αυτή η περιοχή, και
- β. να είναι υψηλής καθαρότητας χωρίς φαινόλες, πολυσακχαρίτες, απορρυπαντικά, EDTA ή άλλα χημικά που μπορούν να έχουν ανασταλτική δράση.

Η ποσότητα DNA που απαιτείται για μία αντίδραση κυμαίνεται μεταξύ 10 και 500 ng. Όταν ο στόχος DNA βρίσκεται σε πολλά αντίγραφα μέσα στο γονιδίωμα η ποσότητα του DNA που χρειάζεται για την αντίδραση κυμαίνεται από 10 έως 100ng, ενώ όταν ο στόχος DNA είναι μοναδικός ή σε λίγα αντίγραφα τότε η ποσότητα κυμαίνεται από 100 έως 500 ng. Όταν η ποσότητα του DNA είναι μεγάλη (>1000ng), υπάρχει πιθανότητα να δημιουργηθούν προϊόντα που δεν αντιστοιχούν στον επιθυμητό στόχο DNA.

2. Εκκινητές

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, οι εκκινητές αποτελούν ένα από τα πιο σημαντικά συστατικά της αντίδρασης, γιατί αντιπροσωπεύουν τα νουκλεοτιδικά άκρα του DNA στόχου και είναι απαραίτητοι προκειμένου να προστεθούν τα υπόλοιπα νουκλεοτίδια της αλληλουχίας. Οι εκκινητές είναι συνήθως ολιγονουκλεοτίδια, το μήκος των οποίων κυμαίνεται ανάλογα με την χρήση τους (για να απομονώσουμε και να πολλαπλασιάσουμε μία μοναδική αλληλουχία στόχο DNA, οι εκκινητές θα πρέπει να έχουν μέγεθος από 18 έως 30 βάσεις). Η συγκέντρωση των εκκινητών στην αντίδραση πρέπει να είναι 0,1-0,5 μM . Όταν η συγκέντρωση είναι πολύ υψηλή αυξάνεται η πιθανότητα να δημιουργηθούν μη ομόλογοι (τυχαίοι) υβριδισμοί μεταξύ εκκινητή και DNA, με αποτέλεσμα την δημιουργία DNA τμημάτων που δεν αντιστοιχούν στα αναμενόμενα προϊόντα.

Για την κατασκευή των δύο εκκινητών μιας αντίδρασης πρέπει να λαμβάνουμε υπόψη τα παρακάτω:

- α. οι αλληλουχίες τους δεν πρέπει να είναι συμπληρωματικές μεταξύ τους, ειδικά στο 3' άκρο (εικόνα 3),
- β. οι αλληλουχίες τους πρέπει να έχουν παρόμοια περιεκτικότητα σε G και C νουκλεοτίδια, ώστε οι T_m θερμοκρασίες τους (melting temperature) να μην διαφέρουν σημαντικά,
- γ. η αλληλουχία του κάθε εκκινητή δεν πρέπει να περιλαμβάνει περιοχές συμπληρωματικές, γιατί κατά την διάρκεια της αναδιάταξης δημιουργούνται φουρκέτες (hair-pins) (εικόνα 4),
- δ. κατά τον σχεδιασμό τους θα πρέπει η κατανομή των νουκλεοτιδίων να είναι τυχαία και να αποφεύγονται περιοχές με πολυπυρίνες ή πολυυριμιδίνες. Επίσης θα πρέπει να αποφεύγονται επαναλήψεις νουκλεοτιδίων (πχ. 5' AGCATCTCTCTCTCAGG 3').

Προκειμένου να πολλαπλασιαστεί επιλεκτικά μόνο ο επιθυμητός στόχος DNA οι εκκινητές πρέπει να έχουν υψηλή εξειδίκευση και αποδοτικότητα, συνεπώς ο επιτυχής σχεδιασμός τους είναι πολύ σημαντικός.

3. Τριφωσφορικά δεοξυνουκλεοτίδια

Τα τέσσερα τριφωσφορικά δεοξυνουκλεοτίδια, dATP, dTTP, dCTP και dGTP, είναι απαραίτητα για την σύνθεση της συμπληρωματικής αλυσίδας κατά την διάρκεια του πολυμερισμού. Είναι σημαντικό τα δεοξυνουκλεοτίδια να βρίσκονται σε ίση συγκέντρωση μεταξύ τους για να μην γίνονται λάθη κατά την αντιγραφή του στόχου DNA. Η συγκέντρωση των δεοξυνουκλεοτιδίων πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 20 και 200 μM .

4. DNA πολυμεράση

Η πολυμεράση είναι το ένζυμο με το οποίο επιτυγχάνεται η σύνθεση της συμπληρωματικής αλυσίδας του στόχου DNA μετά από κάθε αποδιάταξη και υβριδισμό των εκκινητών. Αρχικά χρησιμοποιήθηκε η πολυμεράση Klenow. Η Klenow είναι DNA πολυμεράση τύπου I, που της έχει αφαιρεθεί η 5' - 3' εξωνουκλεϊκή δράση ενώ παραμένει η 3' - 5' εξωνουκλεϊκή δράση. Τα μειονεκτήματα της Klenow είναι ότι:

- α. καταστρέφεται στις υψηλές θερμοκρασίες αποδιάταξης (90-95°C), συνεπώς είναι αναγκαία η προσθήκη ενζύμου μετά από κάθε κύκλο, με αποτέλεσμα να επιβαρύνεται ο χρόνος (πρόσθεση ενζύμου μετά από κάθε κύκλο) και το κόστος (οι πολυμεράσες είναι ακριβά ένζυμα) της διαδικασίας, και
- β. η θερμοκρασία στην οποία πολυμερίζει είναι οι 37°C, θερμοκρασία η οποία ενδέχεται να είναι μικρότερη της T_m των εκκινητών, με αποτέλεσμα να μην υπάρχει απόλυτη νουκλεοτιδική ομολογία μεταξύ των εκκινητών και του στόχου DNA.

Τα παραπάνω προβλήματα λύθηκαν με την χρησιμοποίηση της πολυμεράσης Taq. Η **πολυμεράση Taq** έχει απομονωθεί από βακτήρια (*Thermus aquaticus*) που ζουν σε περιβάλλον με υψηλή θερμοκρασία (θερμοπίδακες) και είναι πολυμεράση τύπου I με 5' - 3' εξωνουκλεϊκή δράση. Η ιδανική θερμοκρασία για την δράση της είναι 55-75°C (pH 8,2-9,0) και ο χρόνος ημιζωής της είναι 50 κύκλοι στους 95°C. Η πολυμεράση Taq είναι διαθέσιμη από πολλές εταιρίες βιολογικών προϊόντων. Εκτός της Taq πολυμεράσης, έχουν απομονωθεί πολυμεράσες και από άλλα θερμόφιλα βακτήρια.

Οι πολυμεράσες έχουν πιθανότητα λάθους κατά την αντιγραφή του στόχου DNA. Η ακρίβεια αντιγραφής εξαρτάται από την πολυμεράση (εικόνα 5) αλλά και από τις συνθήκες της αντίδρασης (συγκέντρωση dNTPs και ιόντων μαγνησίου, pH, θερμοκρασία).

5. Ιόντα μαγνησίου

Η συγκέντρωση των ιόντων μαγνησίου, που συνήθως προέρχονται από την προσθήκη χλωριούχου μαγνησίου, επηρεάζει τον υβριδισμό του εκκινητή, τη θερμοκρασία αποδιάταξης του DNA και των PCR προϊόντων, τη δημιουργία διμερών από τους εκκινητές, την εξειδίκευση των προϊόντων και τη δραστικότητα και πιστότητα της πολυμεράσης. Προϊόντα που δεν αντιστοιχούν στην αλληλουχία του στόχου DNA μπορούν να παραχθούν όταν η συγκέντρωση Mg^{++} είναι υψηλή. Τα προϊόντα αυτά προκύπτουν γιατί το Mg^{++} μπορεί να σταθεροποιεί το δίκλωνο DNA, με αποτέλεσμα να έχουμε τυχαίες προσκολλήσεις εκκινητών σε μη ομόλογα τμήματα του DNA. Αντίθετα, η χαμηλή συγκέντρωση μειώνει την απόδοση του PCR, γιατί το Mg^{++} , ως συνένζυμο της πολυμεράσης, είναι απαραίτητο για την λειτουργία της. Η συγκέντρωση του χλωριούχου μαγνησίου πρέπει να είναι 0.5-2.5 mM. Η παρουσία EDTA ή άλλων χηλικών παραγόντων που δεσμεύουν Mg^{++} στο διάλυμα των εκκινητών ή στο DNA μπορεί να διαταράξει την συγκέντρωση του μαγνησίου.

6. Ισοτονικό διάλυμα της αντίδρασης, Buffer

Το διάλυμα θα πρέπει να δημιουργεί ένα ιοντικό περιβάλλον για να διευκολύνεται η αναδιάταξη (annealing) του εκκινητή με το στόχο DNA, το οποίο παρέχεται από την παρουσία NaCl ή KCl. Εάν η συγκέντρωση των δύο αλάτων υπερβαίνει τα 50 mM, αναστέλλεται η δράση της Taq πολυμεράσης. Στο διάλυμα επίσης υπάρχει Tris-HCl σε συγκέντρωση 10-50mM με pH 8,3 (στους 20°C). Κατά την διάρκεια της αντίδρασης, όπου οι θερμοκρασίες φθάνουν έως τους 94°C, το pH κυμαίνεται μεταξύ 6,8 και 7,8. Τέλος στο διάλυμα υπάρχουν και σταθεροποιητές ενζύμου όπως ζελατίνη ή ορολευκωματίνη (bovine serum albumin-BSA) και μη ιοντικά απορρυπαντικά (Tween 20 και Triton X-100).

Δεν υπάρχει συγκεκριμένη σειρά με την οποία αναμειγνύονται τα αντιδραστήρια. Το χλωριούχο μαγνήσιο, τα dNTPs, το ισοτονικό διάλυμα και όσο νερό (δύο αποσταγμένο και αποστειρωμένο) χρειάζεται για να συμπληρωθεί ο όγκος της αντίδρασης μπορούν να αναμειχθούν και να μοιραστούν στα φιαλίδια ή να προστεθούν ξεχωριστά σε κάθε φιαλίδιο. Στο στάδιο αυτό μπορούν να εκτεθούν σε υπεριώδη ακτινοβολία (UV 254nm) για την καταστροφή εξωγενούς DNA. Μετά προστίθενται οι εκκινητές (αν έχουν μικρό μήκος -έως 10 βάσεις- μπορούν να προστεθούν πριν την έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία), το DNA και τέλος η πολυμεράση

3β) Παρασκευή αντιδραστηρίων

Τα αντιδραστήρια δεν παρασκευάζονται στο εργαστήριο. Χρησιμοποιείται ειδικό PCR Kit το οποίο περιέχει όλα τα απαραίτητα στις κατάλληλες συγκεντρώσεις. Το PCR Kit είναι της εταιρείας Kapa Taq.

Η αντίδραση πολυμερισμού γίνεται συνήθως σε όγκους 25 -100 μl σε ένα σωληνάριο erpendorf και περιλαμβάνει :

- το δείγμα DNA (0.1-1 μg ανθρώπινου γονιδιώματος)
- 1x Buffer(ρυθμιστικό διάλυμα: 20mM Tris-HCl, pH 8.0, 50mM KCl, 0.01% ζελατίνη)
- MgCl₂ συγκέντρωσης 1.5 mM - 2.5mM
- Διάλυμα του κάθε εκκινητή (forward και reversed) συγκέντρωσης..
- Διάλυμα dNTPs, με ίση ποσότητα από κάθε δεοξυριβονουκλεοτίδιο (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
- DNA πολυμεράση (Taq πολυμεράση) 5u/μl

Η αντίδραση λαμβάνει χώρα σε ειδικές συσκευές που ονομάζονται **θερμοκυκλοποιητές (thermal cycler)** που εναλλάσσουν τη θερμοκρασία βάσει προγραμματισμού.

Η επιτυχία της αντίδρασης πιστοποιείται μετά από ηλεκτροφόρηση ενός μικρού κλάσματος προϊόντος της αντίδρασης σε πήκτωμα αγαρόζης και χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο.

3γ) Διαδικασία

Αρχικά ετοιμάζεται σε tube των 1,5 ml το μίγμα το οποίο θα μοιραστεί σε κάθε PCR tube(200 μl)

Το μίγμα περιέχει τις παρακάτω ποσότητες καθενός εκ των αντιδραστηρίων πολλαπλασιασμένες με τον αριθμό των δειγμάτων που υπόκεινται την PCR κάθε φορά συν ένα για τον αρνητικό μάρτυρα ο οποίος χρησιμοποιείται για να φανερώνει τις επιμολύνσεις εκτός του DNA το οποίο προστίθεται σε κάθε ένα αριθμημένο pcr-tube που αντιστοιχεί στο απομονωμένο δείγμα.

DNA	1 μ l *
Buffer	5 μ l
MgCl₂	5 μ l
Primer Fw	1 μ l
Primer Rv	1 μ l
dNTPs	1 μ l
Taq Pol	0,2 μ l
ddH₂O	39 μ l*

ΠΙΝΑΚΑΣ 2: ΠΟΣΟΤΗΤΕΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ PCR ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ ΣΕ ΚΑΘΕ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ.

*από το κάθε δείγμα χρησιμοποιούσαμε αρχικά 1 μ l και αν αυτό δεν επαρκούσε για την δημιουργία προϊόντος επαναλαμβάναμε την PCR για όσα δείγματα δεν εμφάνισαν ζώνη στην ηλεκτροφορηση αγαρόζης με κατά 1 μ l μεγαλύτερη ποσότητα μέχρι την απόκτηση του PCRproduct.

Μόλις προσθέσουμε όλα τα παραπάνω προσθέτουμε και την ανάλογη ποσότητα του ενζύμου στο υπόλοιπο μίγμα, κάνουμε ένα spin για την ανάμιξη του και μοιράζουμε από (50 – DNA μ l) στο κάθε pcr-tube ώστε ο τελικός όγκος να είναι 50 μ l. Πραγματοποιούμε ένα spin στα pcr-tubes και τα τοποθετούμε στον θερμοκυκλοποιητή.

Συγκεκριμένα, σε κάθε αντίδραση PCR πραγματοποιήθηκε ένα αρχικό στάδιο αποδιάταξης του μορίου-στόχου στους 95^oC για 4min. Ακολούθησαν τα εξής τρία στάδια: αποδιάταξη, υβριδοποίηση και επιμήκυνση, για 35 κύκλους τελευταίο στάδιο σε όλες τις αντιδράσεις ήταν μια επώαση στους 72^oC για 10 min.

95°C	4 min	Στον πρώτο κύκλο	Αρχική αποδιάταξη
95°C	40 sec	35 κύκλοι	Αποδιάταξη
52°C *	40 sec		Υβριδοποίηση εκκινητών
72°C	40 sec		Επιμήκυνση
72°C	10 min	Στον τελευταίο κύκλο	Τελική επιμήκυνση-επώαση

ΠΙΝΑΚΑΣ 3: ΤΑ ΣΤΑΔΙΑ ΤΗΣ PCR ΜΕ ΤΙΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΤΟΥ ΚΑΘΕΝΟΣ

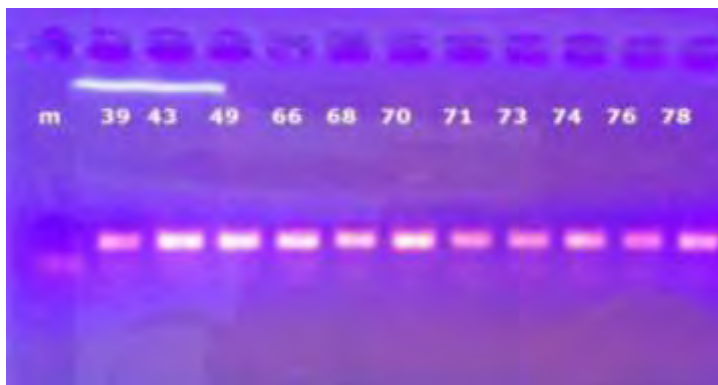
*η θερμοκρασία υβριδοποίησης των εκκινητών προγραμματιζόταν στους **52°C** αρχικά και αν δεν βλέπαμε τα αναμενόμενα αποτελέσματα την μειώναμε στους **50°C**. Συγκεκριμένα το ζεύγος εκκινητών GLU χρειάστηκε αυτήν την αλλαγή για να δώσει προϊόντα.

4) ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΤΩΝ ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ PCR

Παρασκευάζουμε την πηκτή αгарόζης όπως αναφέραμε και προηγουμένως και πραγματοποιούμε την ηλεκτροφορηση για να ελέγξουμε αν το DNA που ενισχύθηκε από την PCR είναι ποιοτικά και ποσοτικά επαρκές.

Η μόνη διαφορά αυτή τη φορά είναι ότι η ποσότητα του DNA σε κάθε πηγαδάκι θα είναι 5 μl.

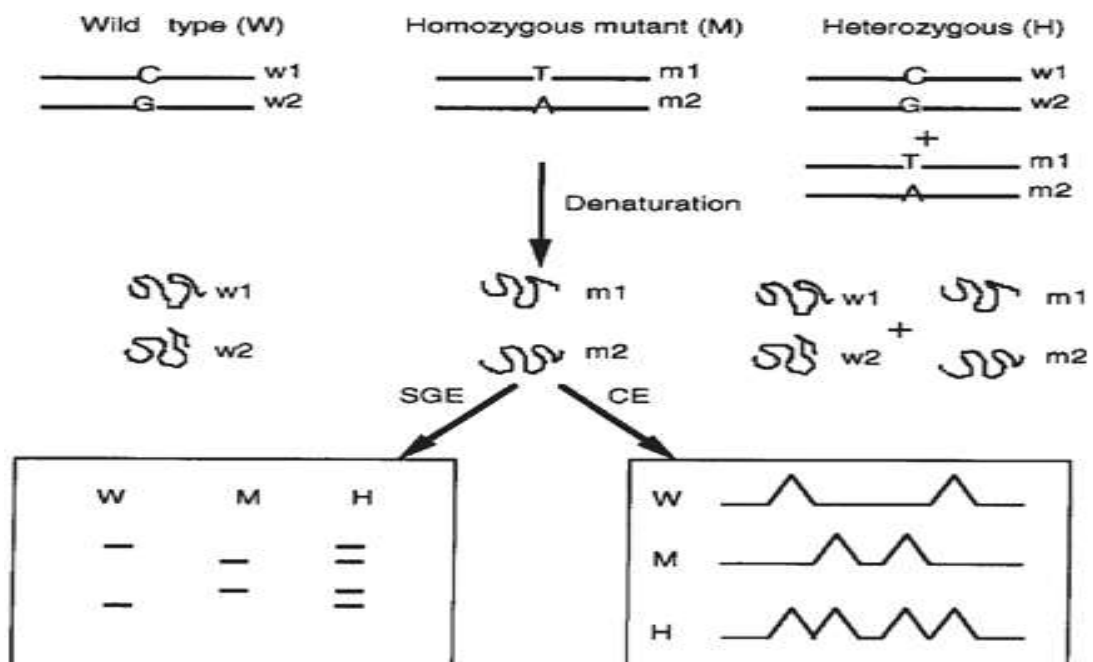
Παρακάτω φαίνεται η ηλεκτροφόρηση των προϊόντων απο μία απο τις PCR που έγιναν για το γονίδιο του mt-tRNA της βαλίνης.



5) SSCP

Η ανάλυση SSCP είναι μια από τις πιο απλές μεθόδους ανίχνευσης άγνωστων μεταλλάξεων. Η μέθοδος είναι χρήσιμη για ανίχνευση μικρών ελλειμμάτων ή ενθέσεων και μονονουκλεοτιδικών μεταλλάξεων και πολυμορφισμών σε τμήματα εκατοντάδων βάσεων, ενώ για τμήματα κιλοβάσεων η μέθοδος αυτή δεν ενδείκνυται. Μάλιστα, για τμήματα μικρότερα των 300bp η μέθοδος είναι πάνω από 85% αποτελεσματική με ένα και μόνο πείραμα, ενώ η αποτελεσματικότητα της μεθόδου μειώνεται όσο μεγαλώνει το υπό μελέτη τμήμα του γονιδίου. Η ηλεκτροφορητική ικανότητα ενός μορίου σε ένα πήκτωμα εξαρτάται τόσο από το μέγεθος όσο και από το σχήμα του μορίου. Σε μη αποδιατακτικές συνθήκες το μονόκλωνο DNA έχει μια δευτεροταγή δομή η οποία καθορίζεται από ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις, επομένως από την αλληλουχία του DNA. Γι αυτόν τον λόγο και αποδιατάσουμε το προϊόν της PCR και έπειτα το ηλεκτροφορούμε σε ένα μη-αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου. Κάτω από μη αποδιατακτικές συνθήκες, ένα μονόκλωνο τμήμα DNA θα αποκτήσει δευτεροταγή διαμόρφωση που εξαρτάται αποκλειστικά από την αλληλουχία του και θα είναι διαφορετική αν αλλάξει ακόμα και μία μόνο βάση. Η κινητικότητα του μονόκλωνου PCR προϊόντος εξαρτάται από τη δευτεροταγή δομή του. Συνεπώς τα PCR προϊόντα που φέρουν μεταλλαγές (τους ακόμα και σε μία μόνο θέση) προσθήκης ή ελλείψεις θα παρουσιάζουν διαφορές στην κινητικότητα.

Στην ανάλυση SSCP λοιπόν η μεταλλαγμένη αλληλουχία ανιχνεύεται ως αλλαγή στην κινητικότητα σε ένα πήκτωμα ακρυλαμιδίου, η οποία προκαλείται από τη διαφορετική δευτεροταγή δομή.



ΕΙΚΟΝΑ 14: ΤΑ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΑ ΠΡΟΤΥΠΑ ΜΕΤΑΞΥ ΑΓΡΙΟΥ ΤΥΠΟΥ, ΟΜΟΖΥΓΟΥ ΚΑΙ ΕΤΕΡΟΖΥΓΟΥ ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΑΤΟΣ.

Παρόλο που η μέθοδος αυτή είναι πολύ ευαίσθητη, απαιτεί χρόνο και προσεκτικούς χειρισμούς. Τα πηκτώματα πρέπει να ηλεκτροφορούνται σε χαμηλή τάση (ολονύκτια) για να αποφευχθούν αλλαγές στη δομή λόγω της θερμοκρασίας. Η θερμοκρασία πρέπει να ελέγχεται με ακρίβεια, κάτι που συνήθως είναι δύσκολο.

Η ανίχνευση των μεταλλάξεων εξαρτάται από τις δευτεροταγείς δομές του μονόκλωνου μορίου που επηρεάζονται από τις μεταλλάξεις και επομένως επηρεάζεται από τις συνθήκες ηλεκτροφόρησης, όπως είναι η **θερμοκρασία**, η **συγκέντρωση ιόντων** και άλλοι παράγοντες.

Η κινητικότητα του μονόκλωνου μορίου αλλάζει δραματικά με την αλλαγή της θερμοκρασίας, καθώς αυξανόμενης της θερμοκρασίας αλλάζει η δευτεροταγής δομή του μορίου.

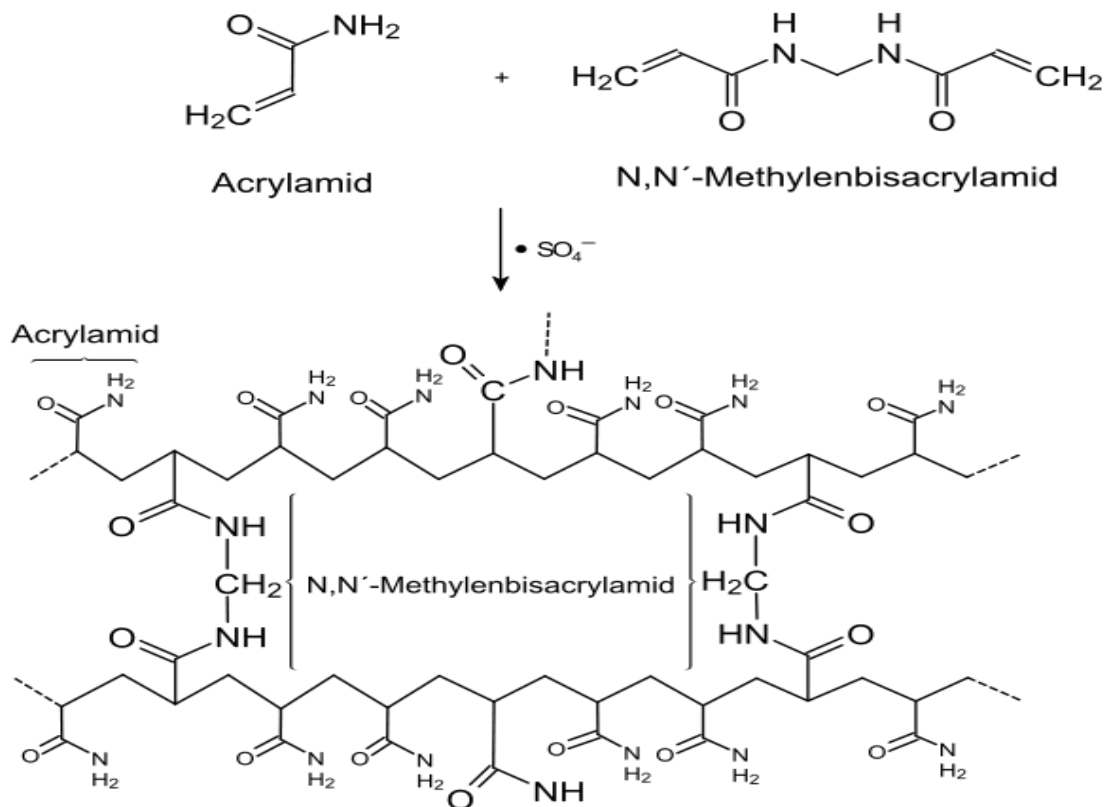
Η **συγκέντρωση του ακρυλαμιδίου** είναι ένας άλλος παράγοντας που παίζει ρόλο στον αποτελεσματικό διαχωρισμό των μορίων, καθώς καθορίζει το μέγεθος των πόρων στο πήκτωμα.

Τα gel ακρυλαμιδίου που δημιουργήθηκαν για την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων PCR ήταν τα περισσότερα συγκέντρωσης 10% . Για τα PCR products του εκκινήτη του t-RNA του γλουταμινικού, GLU , χρειάστηκε μεγαλύτερη συγκέντρωση ακρυλαμιδίου και έτσι κατασκευάστηκε πηκτή συγκέντρωσης 14% αφού και στις συγκεντρώσεις 10% και 12% οι ζώνες δεν διαχωρίστηκαν τόσο ώστε να εμφανιστούν τα πρότυπα.

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω η αύξηση της συγκέντρωσης του ακρυλαμιδίου μειώνει το μέγεθος των πόρων που θα έχει η πηκτή δυσκολεύοντας την διέλευση των μεγαλύτερων μορίων DNA με αποτέλεσμα τον καλύτερο διαχωρισμό τους από τα πιο μικρά. Συνεπώς όταν τα προϊόντα που ενισχύθηκαν στην PCR περιέχουν μικρά τμήματα DNA λόγω του ότι τα αντίστοιχα γονίδια (mt t-RNA^{GLU}) αποτελούνται από λιγότερα νουκλεοτίδια απαιτούνται πηκτές μεγαλύτερων συγκεντρώσεων για τον επιτυχή διαχωρισμό των ζωνών και την εμφάνιση των προτύπων.

5α) Αρχή μεθόδου

Η πηκτή ακρυλαμιδίου χρησιμοποιείται για την ανάλυση του DNA με εξειδικευμένα συστήματα ρυθμιστικού διαλύματος, χωρίς ουρία. Σε μη μετουσιωτικές μεθόδους τα συστατικά που χρησιμοποιούνται για να συνθέσουν την πηκτή είναι μονομερή ακρυλαμιδίου, N, N-μεθυλενοδισακρυλαμιδίου, υπερθειικό αμμώνιο (APS) και N, N, N', N'-τετραμεθυλενοδιαμίνη (TEMED). Το υπερθειικό αμμώνιο (APS) όταν διαλύεται σε νερό δημιουργεί ελεύθερες ρίζες, οι οποίες ενεργοποιούν τα μονομερή ακρυλαμιδίου επάγοντας τα να αντιδρούν με άλλα μόρια ακρυλαμιδίου και έτσι σχηματίζουν μακρές αλυσίδες. Αυτές οι αλυσίδες διασυνδέονται με το Bis. Το TEMED δρα ως καταλύτης για τον σχηματισμό της πηκτής, λόγω της ικανότητάς του να υπάρχει σε μορφή ελεύθερης ρίζας.



ΕΙΚΟΝΑ 15: ΠΟΛΥΜΕΡΙΣΜΟΣ ΑΚΡΥΛΑΜΙΔΙΟΥ ΚΑΙ ΔΙΣΑΚΡΥΛΑΜΙΔΙΟΥ ΠΡΟΣ ΤΗ ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΓΕΦΥΡΩΝ.

5β) Διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν

Τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν για την SSCP είναι τα εξής:

0,5x TBE: Παρασκευάζεται με αραιώση πυκνότερου διαλύματος 10x TBE (0,9M Trizma base, 0,9M βορικό οξύ, 20mM EDTA pH 8.0)

APS: Παρασκευάζεται ως διάλυμα 20% w/v

Διάλυμα αποδιάταξης: 95% φορμαμίδη, 10mM NaOH, 0,05% Bromophenol blue, 0,5% Xylene Cyanol

5γ) Δημιουργία πηκτής πολυακρυλαμιδίου

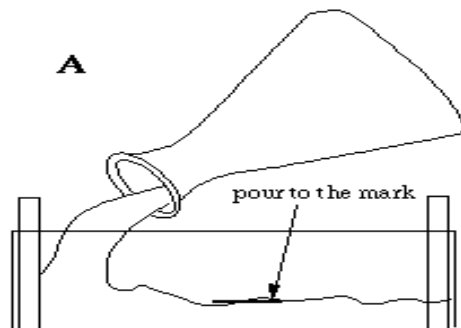
- **2 gel 10%**

Ζυγίζουμε 12,375 gr Acrylamide $\geq 99\%$ και 0,33 gr N,N'-Methylenebis (acrylamide) 99% της SIGMA-ALDRICH.

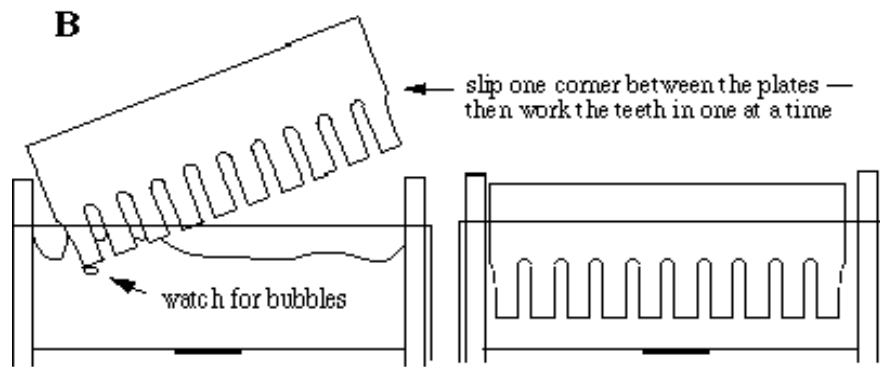
Σε ποτήρι ζέσεως που έχουμε βάλει 10 ml TBE 10X και 12,5 glycerol προσθέτουμε την ακρυλαμίδη και την δισακρυλαμίδη καθώς και δισ αποσταγμένο νερό (ddH₂O) έως τα 120 ml. Το μίγμα αναδεύεται μέχρι την διάλυση των κοννιδίων.

Έπειτα με ειδικό διηθητικό χαρτί και χωνί γίνεται διήθηση του μίγματος σε ογκομετρικό κύλινδρο των 250 ml. Μόλις διηθηθεί όλος ο όγκος του μίγματος προστίθεται ddH₂O μέχρι τα 125 ml και γίνεται μεταφορά σε κωνική φιάλη

Στην κωνική προσθέτουμε 125 μl TEMED και 750-800 μl APS. Με γρήγορες κινήσεις αναδεύουμε ήπια και αποχύνουμε το μισό μίγμα που έχει αρχίσει να πήζει μεταξύ των δυο τζαμιών της μιας πλευράς και το υπόλοιπο στα τζάμια της άλλης πλευράς της συσκευής στησίματος που έχει ήδη συναρμολογηθεί.

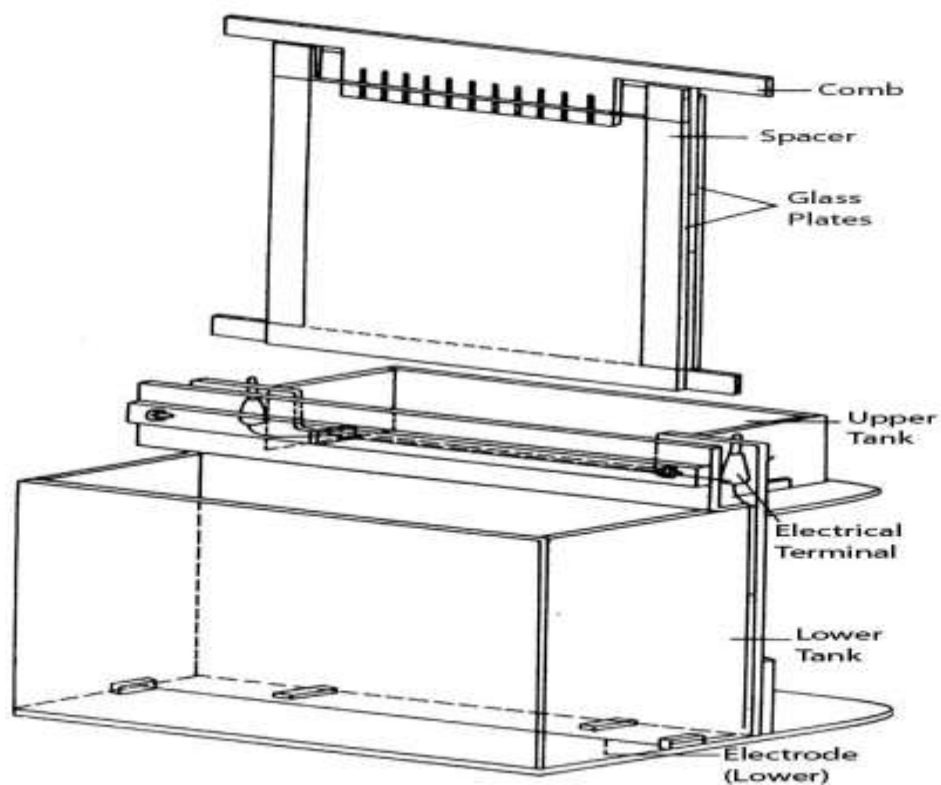


Τέλος προσθέτουμε προσεκτικά τα καλούπια με τα οποία θα δημιουργηθούν τα πηγαδάκια.



Μετά από 25-30 min τα gel έχουν σταθεροποιηθεί, βγάζουμε τα καλούπια για τα πηγαδάκια και τα καθαρίζουμε προσεκτικά από τα υπολείμματα της πηκτής αφού έχουμε αφαιρέσει τα τζαμιά από τη συσκευή.

Έπειτα επανατοποθετούμε τα δυο ζεύγη τζαμιών που περιβάλλουν τα gel στη συσκευή την οποία τοποθετούμε μέσα στη συσκευή ηλεκτροφόρησης. Γεμίζουμε με διάλυμα TBE 0,5X τον ενδιάμεσο χώρο μεταξύ των ζευγών τζαμιών καθώς και περίπου το 1/3 του χώρου του δοχείου της συσκευής ηλεκτροφόρησης.



ΕΙΚΟΝΑ 16 : Η ΣΥΣΚΕΥΗ ΤΗΣ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗΣ SSCP

Η συσκευή είναι τώρα έτοιμη για την φόρτωση των δειγμάτων.

5δ) Προετοιμασία δειγμάτων για ηλεκτροφορηση- Αποδιάταξη

Σε νέα eppendorf βάζουμε 10ml από το SSCP buffer (αποδιάταξης) και 7ml από το κάθε δείγμα-προϊόν PCR. Τα τοποθετούμε σε θερμοκυκλοποιητή με ειδικό πρόγραμμα αποδιάταξης: 92°C για 2min
95°C για 2min
97°C για 7min

1.5min πριν σταματήσει το μηχάνημα το βγάζουμε για να μην ανεβεί πάλι η θερμοκρασία των δειγμάτων.

Αμέσως τα τοποθετούμε σε πάγο για να μην επαναυβριδοποιηθούν οι μονόκλωνες αλυσίδες.

Τέλος φορτώνουμε τα δείγματα στα πηγαδάκια

Τοποθετούμε την συσκευή στο ψυγείο προσέχοντας να είναι αυστηρά σε οριζόντια θέση.

Συνδέουμε τα ηλεκτρόδια στο τροφοδοτικό μηχάνημα και αφού το ρυθμίσουμε στα 200 με 220 mV το ενεργοποιούμε και το αφήνουμε να «τρέξει» γύρω στις 20h (18-20h).

Οι πηκτές περιεκτικότητας 14% απαιτούν 240mV.

5ε) Χρώση με διάλυμα νιτρικού αργύρου (Silver Staining)

Την επόμενη ημέρα πραγματοποιείται χρώση με διάλυμα νιτρικού αργύρου (Silver Staining)

Αρχικά αποσυνδέουμε το μηχάνημα, το βγάζουμε με προσοχή από το ψυγείο και αποχύνουμε το περιεχόμενο του (TAE).

Παίρνουμε δύο ειδικές ζελατίνες και τις ανοίγουμε έτσι ώστε μέσα να τοποθετήσουμε τα τζέλ

Βγάζουμε στη συνέχεια τα τζάμια από τη συσκευή και τα ανοίγουμε προσεκτικά χωρίς να προκαλέσουμε κάποια φθορά στο τζέλ.

Γυρίζουμε το ένα τζάμι με το τζελ, πάνω στην ανοιγμένη ζελατίνη και το ξεκολλάμε με απαλές κινήσεις από το τζάμι ώστε να κολλήσει στη ζελατίνη.

Αντιδιαμετρικά (κάτω δεξιά συνήθως) από το πρώτο δείγμα που φορτώσαμε κόβουμε λίγο τη γωνία του τζελ για να σημαδέψουμε την αρχή.

Τοποθετούμε τη ζελατίνα με το τζελ σε μεταλλικό δοχείο και την σταθεροποιούμε για να ξεκινήσουμε τις πλύσεις της χρώσης με 3 διαφορετικά διαλύματα.

Τα ίδια ισχύουν και για το δεύτερο τζελ όταν υπάρχει.

διάλυμα I (ποσότητες για 2 τζελ):

- 780ml ddH₂O
- 20ml αλκοόλη
- 1ml οξικό οξύ (acetic acid glacial)

Ρίχνουμε 200ml σε κάθε μεταλλικό δοχείο με τα τζελ και τα αφήνουμε για 3min στο μηχάνημα για την ήπια ανακίνηση τους. Έπειτα αποχύνουμε, προσθέτουμε πάλι τις ίδιες ποσότητες του διαλύματος I σε κάθε δοχείο και αφήνουμε 3min για ανάδευση.

Ξεπλένουμε τα τζελ 1 φορά με ddH₂O

Διάλυμα II (2 τζελ):

- 400ml διάλυμα νιτρικού αργύρου (100ml H₂O + 1gr Silver Nitrate)

Ρίχνουμε πάλι από 200ml σε κάθε τζελ ανακινώντας ταυτόχρονα ελαφρά και τα αφήνουμε στη συσκευή ανακίνησης για περίπου 10-15 min. Έπειτα ξεπλένουμε πολύ καλά 2 φορές με ddH₂O.

Διάλυμα III (2 τζελ):

- 6gr NaOH
- ελάχιστη ποσότητα NaBH₄ (βορουβρίδιο του νατρίου)
- ddH₂O μέχρι τα 400ml
- 2ml φορμαλδεΐδη

Ρίχνουμε από 200ml σε κάθε τζελ και το αφήνουμε σε ανακίνηση μέχρι να εμφανιστούν επαρκώς έντονα οι ζώνες των προτύπων.

Ξεπλένουμε 1 φορά με ddH₂O.

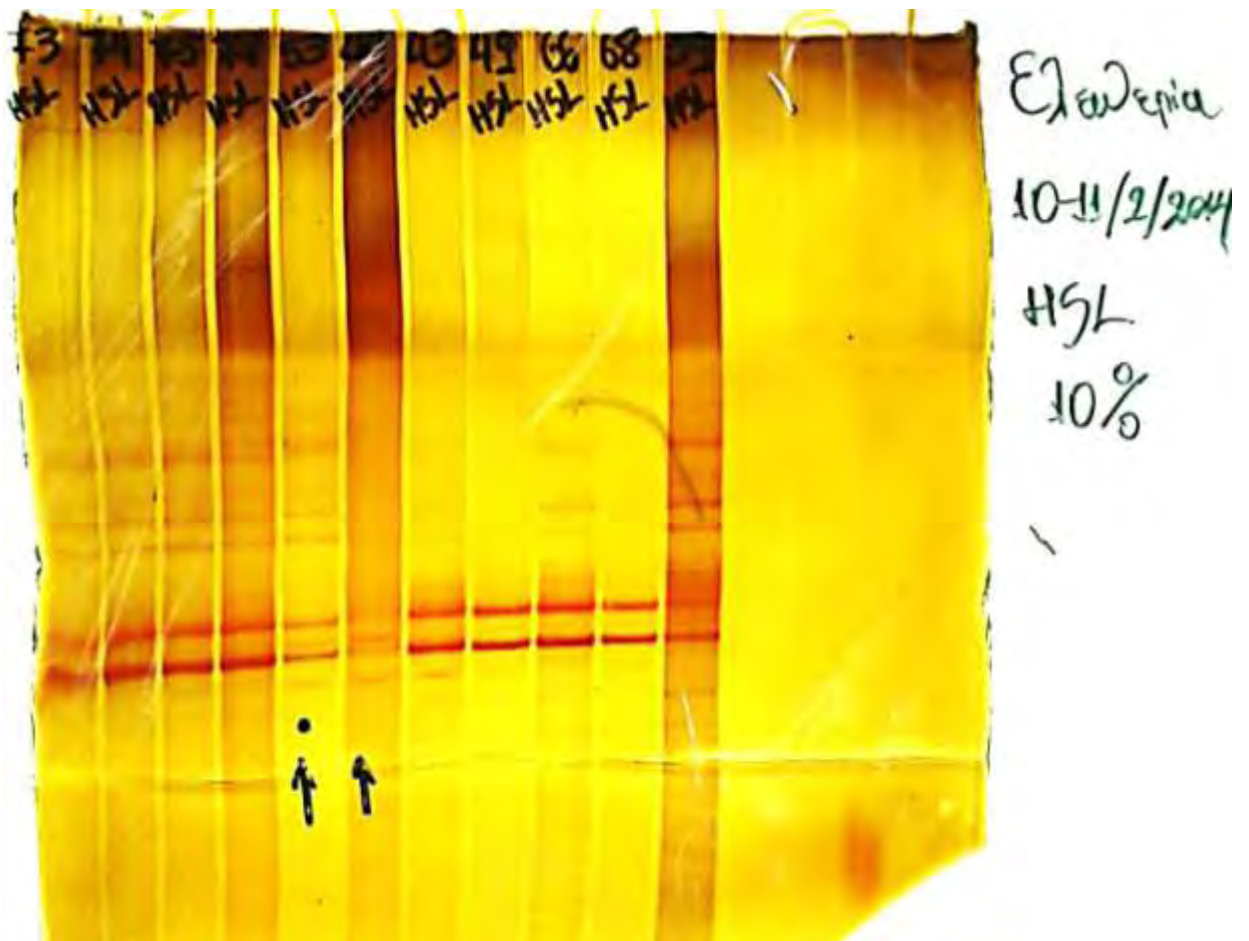
Βγάζουμε τα τζελ από τα δοχεία. Και σκουπίζουμε πολύ προσεκτικά με απορροφητικό χαρτί ώστε να φύγει όσο το δυνατόν περισσότερη υγρασία. Τα τοποθετούμε τέλος σωστά πάνω στις ζελατίνες, τα τυλίγουμε και σταθεροποιούμε με συρραπτικό.

Σημειώνουμε με ανεξίτηλο τον αριθμό του κάθε δείγματος και άλλες πληροφορίες επάνω στη ζελατίνη και τις τοποθετούμε στην ειδική συσκευή με το φως ώστε να τις μελετήσουμε με ευκολία.

Παρατηρούμε τις ζώνες και προσπαθούμε να ξεχωρίσουμε αν υπάρχουν διαφορετικά πρότυπα. Το πρότυπο που διακρίνουμε στα περισσότερα δείγματα είναι και συνήθως το γενικό πρότυπο μέσα στον πληθυσμό.

Μικρές αποκλίσεις από αυτό δείχνουν πιθανό νέο πρότυπο που έχει δημιουργηθεί εξ αιτίας μετάλλαξης. Βρίσκοντας λοιπόν τα άτομα με διαφορετικό πρότυπο επιτυχαίνουμε μια ομαδοποίηση τους.

Ένα δείγμα, αυτό που έχει εμφανίσει τις πιο διακριτές και έντονες ζώνες, από το κάθε πρότυπο στάλθηκε για αλληλουχισή αφού πρώτα έγινε ο καθαρισμός του με ειδικό Kit.



ΕΙΚΟΝΑ 17: ΕΤΟΙΜΗ ΠΗΚΤΗ ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΗΣ ΣΤΗΝ ΟΠΟΙΑ ΦΑΙΝΟΝΤΑΙ ΤΑ ΠΡΟΤΥΠΑ ΖΩΝΩΝ.

5στ) Παράγοντες που επηρεάζουν την ηλεκτροφορήση SSCP

Το Περιβάλλον

- **Η θερμοκρασία:**

Οι συνήθεις συνθήκες θερμοκρασίας για την SSCP είναι η θερμοκρασία δωματίου ή οι 4 ° C με 50 ή 100 ml/l γλυκερόλη. Στους 4°C βελτιώνεται κατά ένα μεγάλο βαθμό η σταθερότητα της διαμόρφωσης οποιουδήποτε μονόκλωνου τμήματος DNA.

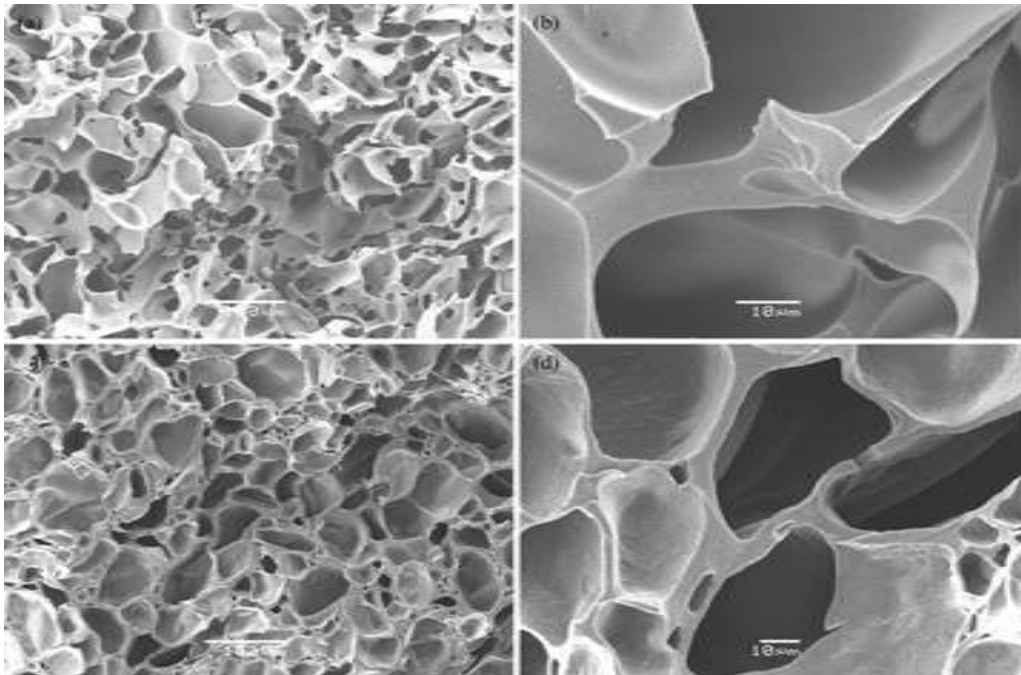
- **Σύσταση του ρυθμιστικού διαλύματος:**

Συγκέντρωση άλατος: Με την αύξηση της η δομή του πλέγματος των πολυμερών γίνεται πιο συμπαγής.

- **Σύσταση πηκτής**

Η αναλογία ακρυλαμίδιου /bis-ακρυλαμίδιους: όχι μόνο η αναλογία αλλά και η συνολική περιεκτικότητα του πηκτώματος σε ακρυλαμίδιου καθορίζει το μέγεθος των πόρων και άρα την ευκολία με την οποία διέρχονται τα πιο ογκώδη (ανάλογα με την διαμόρφωση που έχουν πάρει) τμήματα DNA. Έτσι με την αύξηση της περιεκτικότητας σε ακρυλαμίδη η πηκτή γίνεται πιο συμπαγής, στενεύουν οι πόροι και αυξάνεται η δυσκολία διέλευσης και άρα η διακριτική ικανότητα. Αυτό απαιτείται για διαχωρισμό τμημάτων που έχουν μικρές διαφορές στον όγκο τους.

Ακόμα υψηλότερη διακριτική ικανότητα επιτυγχάνεται με την προσθήκη σακχαρόζης ή γλυκερόλης σε ποσοστό 10 - 15 %.



ΕΙΚΟΝΑ 18: ΟΙ ΠΟΡΟΙ ΤΗΣ ΠΗΚΤΗΣ ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΗΣ

- **Μήκος ηλεκτροφόρου και διάρκεια ηλεκτροφόρησης:**

Η εφαρμοζόμενη τάση καθώς και το μήκος της ηλεκτροφόρου είναι οι παράγοντες που θα καθορίσουν και την διάρκεια ηλεκτροφόρησης. Το μήκος του ηλεκτροφόρου μπορεί να είναι από 20 έως 40cm. Όσο μεγαλύτερο είναι το μήκος του ηλεκτροφόρου, τόσο καλύτερος μπορεί να γίνει ο διαχωρισμός των μικρών τμημάτων που έχουν μικρή διαφορά στον όγκο της διαμόρφωσής τους. Αυτό συμβαίνει γιατί αυτά τα τμήματα διαχωρίζονται προς το κάτω μέρος του τζελ και μάλιστα η απόσταση μεταξύ των ζωνών τους είναι πολύ μικρή.

Το DNA

- **Το μέγεθος του μονόκλωνου τμήματος:**

Το ιδανικότερο μήκος ενός μονόκλωνου τμήματος ώστε να μπορεί να γίνει εμφανές με την SSCP το μεγαλύτερο ποσοστό των σημειακών μεταλλαγών (έως και 90%) είναι περίπου 150 - 200 νουκλεοτίδια.

- **Η αποδιάταξη του PCR προϊόντος:**

Ψευδείς ζώνες ή ζώνες παραπροϊόντων μπορεί να εμφανιστούν είτε λόγω ύπαρξης επαναυβριδισμένων τμημάτων με εκκινητές (εάν υπάρχει περίσσεια εκκινητών) είτε λόγω παραπροϊόντων της PCR και αυτό επειδή δεν γίνεται καθαρισμός των δειγμάτων πριν την SSCP αλλά μετά.

Ισχυρά αποδιατακτικό στο SSCP Buffer όπως το φορμαμίδιο, το υδροξείδιο του νατρίου και η ουρία, βοηθούν σε μεγάλο βαθμό, όπως και η θέρμανση του δείγματος στον θερμοκυκλοποιητή (97 °C)

Η άμεση ψύξη σε πάγο και η χαμηλή θερμοκρασία (4°C) όπου θα τοποθετηθεί η συσκευή αποτρέπει την επαναυβριδοποίηση.

- **Συγκέντρωση του DNA:**

Όταν η ποσότητα του DNA που αναμιγνύουμε με το SSCP Buffer ξεπερνά τα 7μl αυξάνεται πολύ η περιεκτικότητα του στο μίγμα που τελικά θα φορτωθεί στην ηλεκτροφόρου. Έτσι υπάρχει κίνδυνος μεγάλης αύξησης του ποσοστού επαναυβριδισμού των μονόκλωνων τμημάτων. Γιατί σε υψηλές συγκεντρώσεις τα δύο μονόκλινα μόρια τείνουν να επανασυνδέονται προς δίκλινο DNA. Άρα θα πρέπει να διατηρείται μια χαμηλή συγκέντρωση DNA στο διάλυμα φόρτωσης.

6)ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ PCR

Όπως ήδη αναφέρθηκε τα προϊόντα PCR τα οποία έχουμε επιλέξει (ένα από την κάθε ομάδα με διαφορετικό πρότυπο ζωνών) πρέπει πριν σταλούν για αλληλουχισή να καθαριστούν. Με τον καθαρισμό επιτυγχάνεται η απομάκρυνση των εκκινήτων, των dNTPs, των ενζύμων και αλάτων.

Ακλουθεί αναλυτικά το πρωτόκολλο του Kit Nucleospin Gel and PCR Clean-Up της εταιρείας Macherey-Nagel που χρησιμοποιήθηκε για τον καθαρισμό.



ΕΙΚΟΝΑ 19: Kit ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΥ NUCLEOSPIN GEL AND PCR CLEAN-UP ΤΗΣ MACHEREY-NAGEL

5 Protocols

5.1 PCR clean-up

The following protocol is suitable for PCR clean-up as well as DNA concentration and removal of salts, enzymes, etc. from enzymatic reactions (SDS < 0.1 %).

Before starting the preparation:

- Check if Wash Buffer NT3 was prepared according to section 3.

1 Adjust DNA binding condition

*For very small sample volumes < 30 µL adjust the volume of the reaction mixture to 50–100 µL with water.
It is not necessary to remove mineral oil.*

Mix 1 volume of sample with 2 volumes of Buffer NT1 (e.g., mix 100 µL PCR reaction and 200 µL Buffer NT1).

Note: For removal of small fragments like primer dimers dilutions of Buffer NT1 can be used instead of 100 % Buffer NT1. Please refer to section 2.3.



+ 2 vol NT1
per
1 vol sample

2 Bind DNA

Place a NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Column into a Collection Tube (2 mL) and load up to 700 µL sample.

Centrifuge for 30 s at 11,000 x g. Discard flow-through and place the column back into the collection tube.

Load remaining sample if necessary and repeat the centrifugation step.



Load sample



11,000 x g
30 s

3 Wash silica membrane

Add 700 µL Buffer NT3 to the NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Column. Centrifuge for 30 s at 11,000 x g. Discard flow-through and place the column back into the collection tube.



+ 700 µL NT3



11,000 x g
30 s

NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up

Recommended: Repeat previous washing step to minimize chaotropic salt carry-over and improve A_{260}/A_{280} values (see section 2.7 for detailed information).



+ 700 μ L NT3



11,000 x g
30 s

4 Dry silica membrane

Centrifuge for 1 min at 11,000 x g to remove Buffer NT3 completely. Make sure the spin column does not come in contact with the flow-through while removing it from the centrifuge and the collection tube.



Note: Residual ethanol from Buffer NT3 might inhibit enzymatic reactions. Total removal of ethanol can be achieved by incubating the columns for 2–5 min at 70 °C prior to elution.



11,000 x g
1 min

5 Elute DNA

Place the NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Column into a new 1.5 mL microcentrifuge tube (not provided). Add 15–30 μ L Buffer NE and incubate at room temperature (18–25 °C) for 1 min. Centrifuge for 1 min at 11,000 x g.



+ 15–30 μ L NE

RT
1 min

Note: DNA recovery of larger fragments (> 1000 bp) can be increased by multiple elution steps with fresh buffer, heating to 70 °C and incubation for 5 min. See section 2.6 for detailed information.



11,000 x g
1 min

6α) Διαδικασία

Προσθέτουμε 150 μl Binding Buffer (NT1) στο κάθε PCR προϊόν μέσα στα PCR-tubes. Στα δείγματα των οποίων η ζώνη των PCR products ήταν αχνή προσθέσαμε 120 μl NT1 για να μην αραιωθεί η περιεκτικότητα του δείγματος σε DNA. και το μεταφέρουμε σε μια στήλη PureLink™ Spin Column τοποθετημένη σε σωλήνα eppendorf του 1,5 ml.

Τοποθετούμε μια στήλη καθαρισμού Nucleospin® Gel and PCR Clean-up Column μέσα στο κάθε ένα Collection Tube των 2 mL για το κάθε δείγμα προς καθαρισμό έπειτα μεταφέρουμε όλη την ποσότητα των PCR-Tubes μέσα στις στήλες.

Φυγοκεντρούμε για 30sec στις 12.000 rpm σε θερμοκρασία δωματίου. Έτσι το DNA προσδένεται στη στήλη. Απορρίπτουμε το μετά το υγρό των Collection Tubes και τοποθετούμε πάλι τις στήλες στη θέση τους.

Προσθέτουμε στην κάθε μια στήλη 650 μl Wash Buffer (NT3).

Φυγοκεντρούμε για 30sec στις 12.000 rpm σε θερμοκρασία δωματίου . Απορρίπτουμε το το υγρό των Tubes.

Επαναλαμβάνουμε όλο το βήμα 3 και ξανά φυγοκεντρούμε για 1min στις 12.000 rpm σε θερμοκρασία δωματίου ώστε να απομακρυνθεί όλο το NT3.

Μεταφέρουμε τις στήλες σε καινούρια microcentrifuge tubes των 1,5 ml και προσθέτουμε 50 μl Elution Buffer (NE) , το οποίο περιέχει και αιθανόλη, με προσοχή στο κέντρο της στήλης. Αφήνουμε τα δείγματα για μερικά λεπτά (~5min) σε θερμοκρασία δωματίου. Με αυτόν τον τρόπο το DNA αποκολλάται από το υλικό της στήλης.

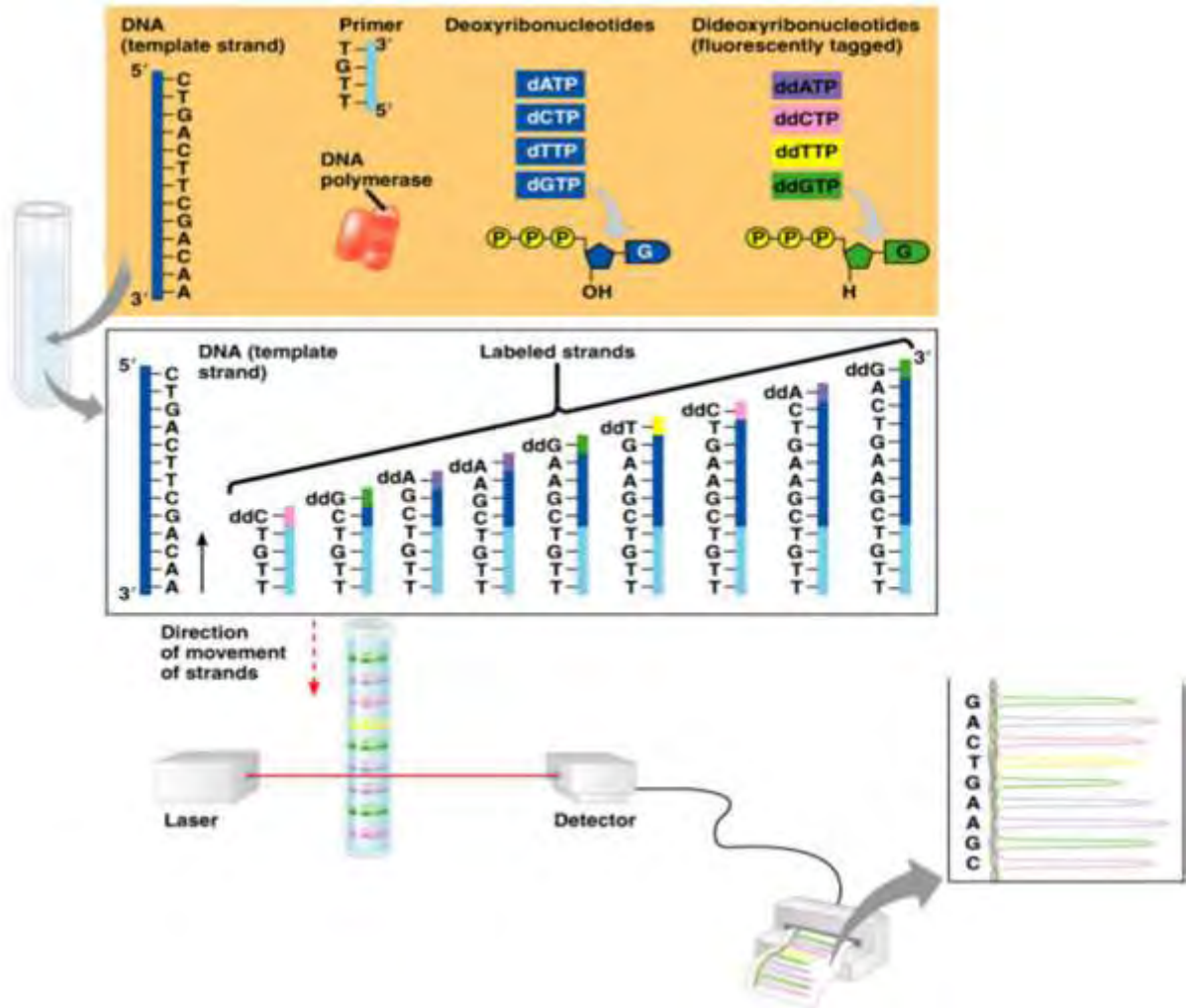
Φυγοκεντρούμε για 2min σε μέγιστη ταχύτητα σε θερμοκρασία δωματίου.

Το DNA της κάθε στήλης βρίσκεται τώρα μέσα στα αντίστοιχα microcentrifuge tubes «καθαρισμένο»

Για να βεβαιωθούμε ότι το DNA υπάρχει και είναι ελεύθερο από παραπροϊόντα και primers, πραγματοποιούμε ηλεκτροφορηση σε πηκτή αγαρόζης με ακριβώς την ίδια διαδικασία όπως έχει αναφερθεί προηγουμένως μόνο που τώρα χρησιμοποιούμε 2 μl δείγματος. Αφού λοιπόν βεβαιωθούμε ότι ο καθαρισμός ήταν επιτυχής στέλνουμε τα δείγματα για αλληλούχηση.

7) ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗ

Μαζί με τα δείγματα που θα σταλούν για αλληλουχισή πρέπει να υπάρχουν και 6 ζεύγη *pendorf* με τους εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στις PCR αραιωμένους σε αναλογία 1 προς 10 καθώς (5pmol/μl) και 1 *pendorf* με τα dNTPs.



ΕΙΚΟΝΑ 22: Η ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΤΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗΣ

8) ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ ΚΑΙ ΕΥΡΕΣΗ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ

Οι αλληλουχίες των δειγμάτων που στάλθηκαν για αλληλουχισή πρέπει τώρα να επεξεργαστούν με το Bioedit ώστε να μπορέσουμε να διορθώσουμε κάποια σημεία τους και να εντοπίσουμε τις σημειακές μεταλλάξεις (αν υπάρχουν).

Δ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Παρακάτω παρατίθενται τα αποτελέσματα των αναλύσεων SSCP, τα αποτελέσματα που βρέθηκαν μετά την επεξεργασία των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών (που έφτασαν στα χέρια μας μετά την αλληλούχιση τους) δηλαδή οι μεταλλαγές που υπάρχουν στο mtDNA των ασθενών και τέλος σχήματα που δείχνουν την ακριβή θέση των μεταλλαγών επάνω στα tRNA μόρια.

ACT

Ο εκκινητής ACT χρησιμοποιήθηκε στην PCR για την ενίσχυση τριών γονιδίων, των mt-tRNA_{Asn}, mt-tRNA_{Cys}, mt-tRNA_{Tyr}. Με την SSCP, όπως φαίνεται στις εικόνες παρακάτω, οι ασθενείς ομαδοποιήθηκαν σε 3 (1,2,3) ομάδες και ένα δείγμα κάθε ομάδας στάλθηκε για αλληλούχιση (1:γενικό πρότυπο, 2:76, 3:66).

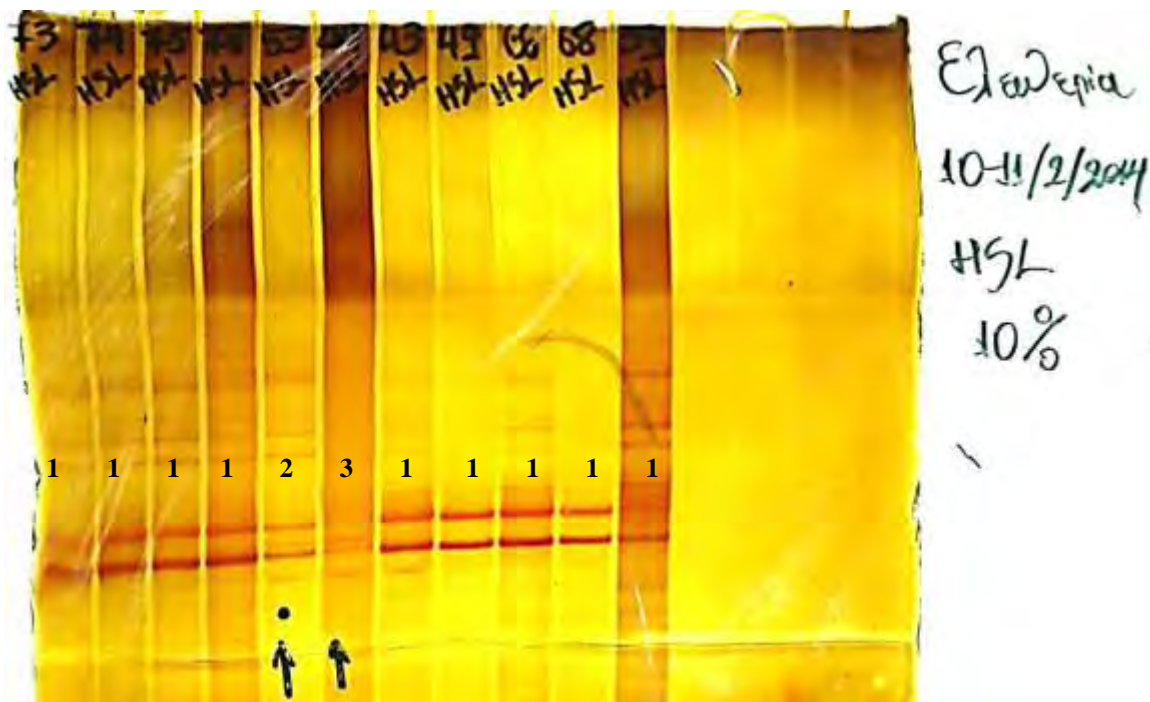
Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων αλληλούχισης έδειξε ότι δεν υπάρχουν μεταλλάξεις μεταξύ των ασθενών σε αυτά τα γονίδια. Όλα τα δείγματα άρα ανήκουν στο γενικό πρότυπο



ΕΙΚΟΝΑ 23: ΠΗΚΤΗ ΑΚΡΥΛΑΜΙΔΗΣ ΤΩΝ PCR ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΤΟΥ ΕΚΚΙΝΗΤΗ ACT, ΦΑΙΝΟΝΤΑΙ ΟΙ 3 ΟΜΑΔΕΣ ΤΩΝ ΠΡΟΤΥΠΩΝ.

HSL

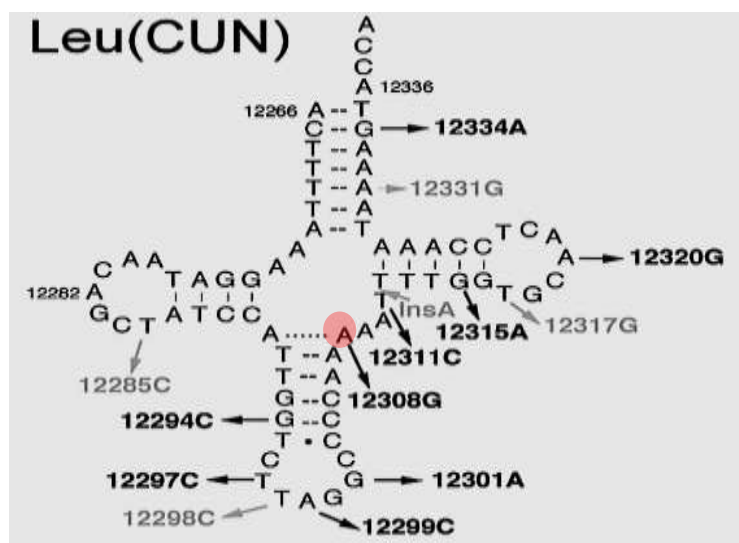
Ο εκκινητής HSL χρησιμοποιήθηκε για την ενίσχυση τριών γονιδίων, των mt-tRNA_{His}, mt-tRNA_{SerAGY}, mt-tRNA_{LeuCUN}. Με την SSCP οι ασθενείς ομαδοποιήθηκαν σε 3 (1,2,3) ομάδες και ένα δείγμα κάθε ομάδας στάλθηκε για αλληλουχισμός (1:γενικό πρότυπο, 2:53, 3:44).



ΕΙΚΟΝΑ 24: ΠΗΚΤΗ ΑΚΡΥΛΑΜΙΔΗΣ ΤΩΝ PCR ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ ΤΟΥ ΕΚΚΙΝΗΤΗ HSL, ΦΑΙΝΟΝΤΑΙ ΟΙ 3 ΟΜΑΔΕΣ ΤΩΝ ΠΡΟΤΥΠΩΝ ΚΑΙ ΜΕ ΒΕΛΗ ΤΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΠΟΥ ΑΛΛΗΛΟΥΧΗΘΗΚΑΝ.

Με την επεξεργασία των αποτελεσμάτων της αλληλούχισής βρέθηκε ότι 1 στα 21 δείγματα έχει μια σημειακή μετάλλαξη και τα υπόλοιπα ανήκουν στο γενικό πρότυπο. Το δείγμα **53** παρουσιάζει την εξής μεταλλαγή:

Μετάλλαξη: A12308G



Η συγκεκριμένη μετάλλαξη δεν αποτελεί φυσιολογικό πολυμορφισμό του γονιδίου και όπως θα δούμε παρακάτω έχει συσχετιστεί με διάφορες παθήσεις. Ο ασθενής που την φέρει πάσχει από Σαρκοείδωση.

TA

Ο εκκινητής TA χρησιμοποιήθηκε για την ενίσχυση τριών γονιδίων, των mt-tRNA_{Trp} και mt-tRNA_{Ala}. Η SSCP βοήθησε στην ομαδοποίηση των δειγμάτων σε (1,2) ομάδες και ένα δείγμα κάθε ομάδας στάλθηκε για αλληλουχία (1:73, 2:70).

Από την επεξεργασία των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών βρέθηκε ότι το δείγμα 73 παρουσιάζει μια σημειακή αντικατάσταση του T προς C:

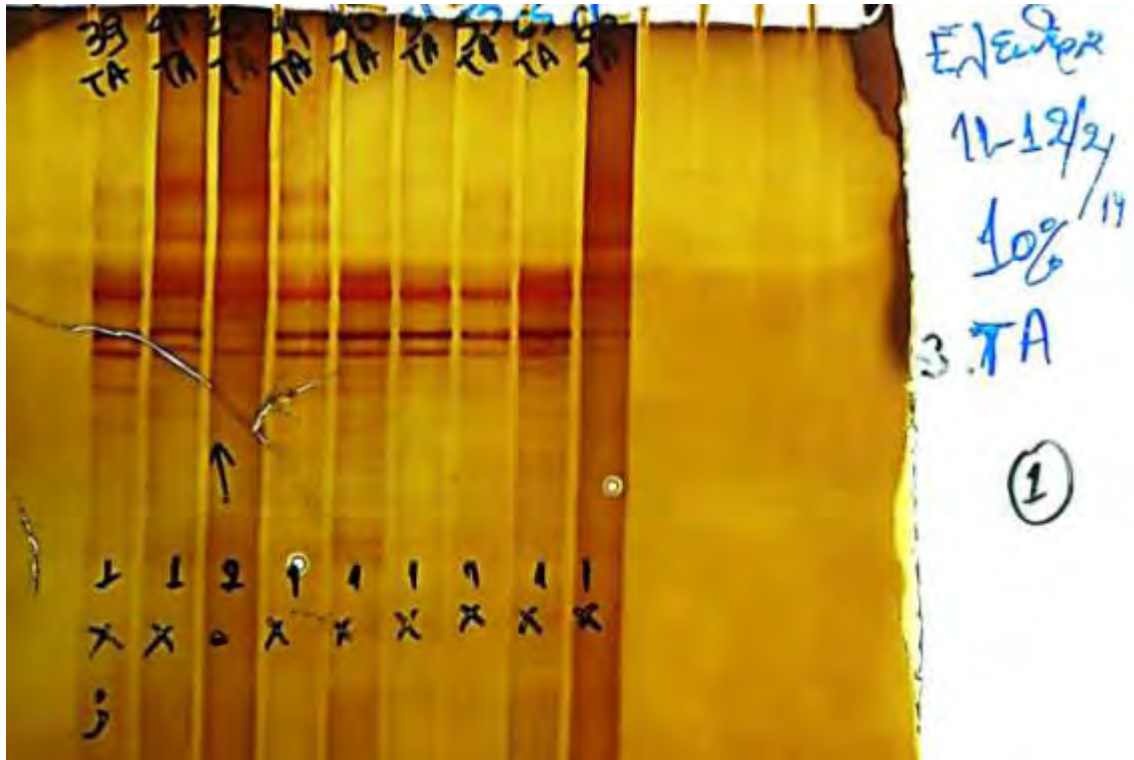
Μετάλλαξη: T5495C

Η συγκεκριμένη μετάλλαξη έχει γίνει όχι στο αμινοξύ της τρυπτοφάνης αλλά πιο πριν, στην περιοχή ND2 η οποία κωδικοποιεί την υπομονάδα 2 της NADH αφυδρογονάσης της αναπνευστικής αλυσίδας.

Τα 12 από τα 18 άτομα φέρουν αυτή τη μετάλλαξη τα υπόλοιπα 14 ανήκουν στο γενικό πρότυπο. Τα 4 από αυτά τα άτομα έχουν διαγνωσμένη IPF (73,74,76,78) ενώ τα υπόλοιπα Σαρκοείδωση.



Συνολικά
4-12/2/14
no
3-TA
(2)
1



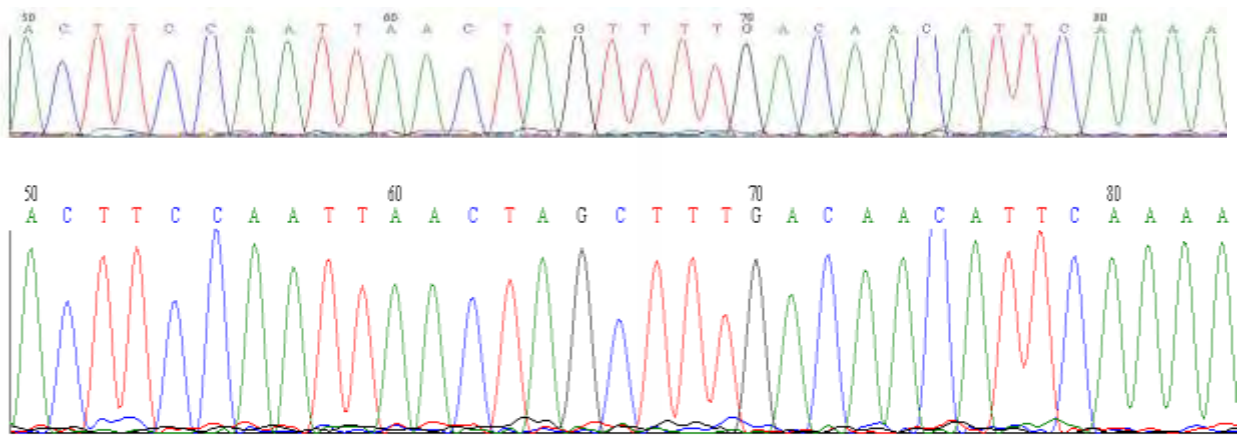
ΕΙΚΟΝΕΣ 25-26: ΠΗΚΤΕΣ ΑΚΡΥΛΑΜΙΔΗΣ ΤΩΝ PCR ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ ΤΟΥ ΕΚΚΙΝΗΤΗ ΤΑ, ΦΑΙΝΟΝΤΑΙ ΟΙ 2 ΟΜΑΔΕΣ ΤΩΝ ΠΡΟΤΥΠΩΝ ΚΑΙ ΣΤΗΝ 24 ΜΕ ΒΕΛΗ ΤΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΠΡΟΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗ.

GLY

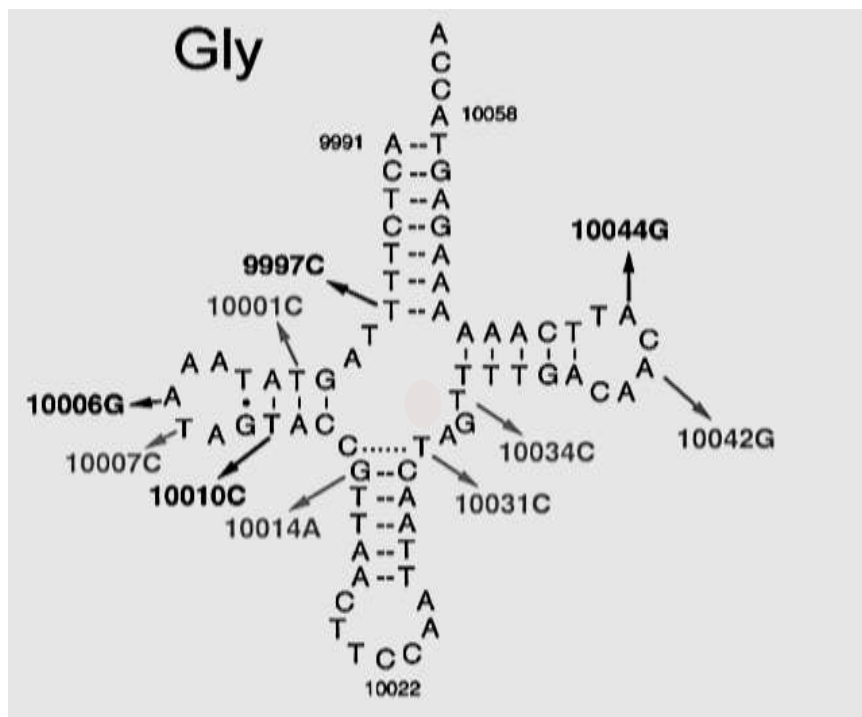
Στο γονίδιο την γλυκίνης στο τζέλ ακρυλαμίδης βρέθηκαν πέντε διαφορετικά πρότυπα και ένα δείγμα κάθε ομάδας στάλθηκε για αλληλούχιση (1:67,2:48,3:76, 4:43, 5:75).

Από την επεξεργασία των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών βρέθηκε ότι το δείγμα 67 παρουσιάζει μια σημειακή αντικατάσταση του T προς C:

Μετάλλαξη T10034C

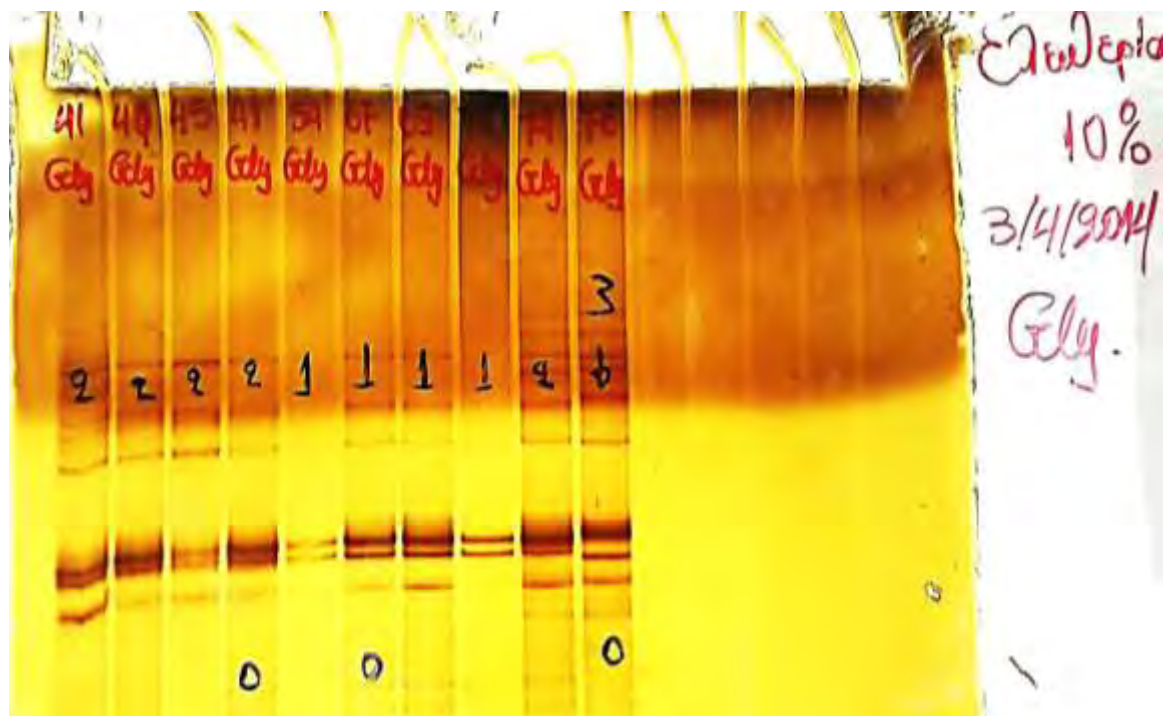


ΕΙΚΟΝΑ 27: ΤΑ ΓΡΑΦΗΜΑΤΑ ΤΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗΣ, ΜΕΣΩ ΤΟΥ Bioedit ΒΡΕΘΗΚΕ Η ΕΠΙΣΗΜΑΣΜΕΝΗ ΜΕΤΑΛΛΑΞΗ.



ΕΙΚΟΝΑ 28: ΤΟ MT-TRNA GLY ΚΑΙ ΟΙ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΕΣ ΚΑΙ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΚΕΣ ΜΕΤΑΛΛΑΓΕΣ ΤΟΥ.

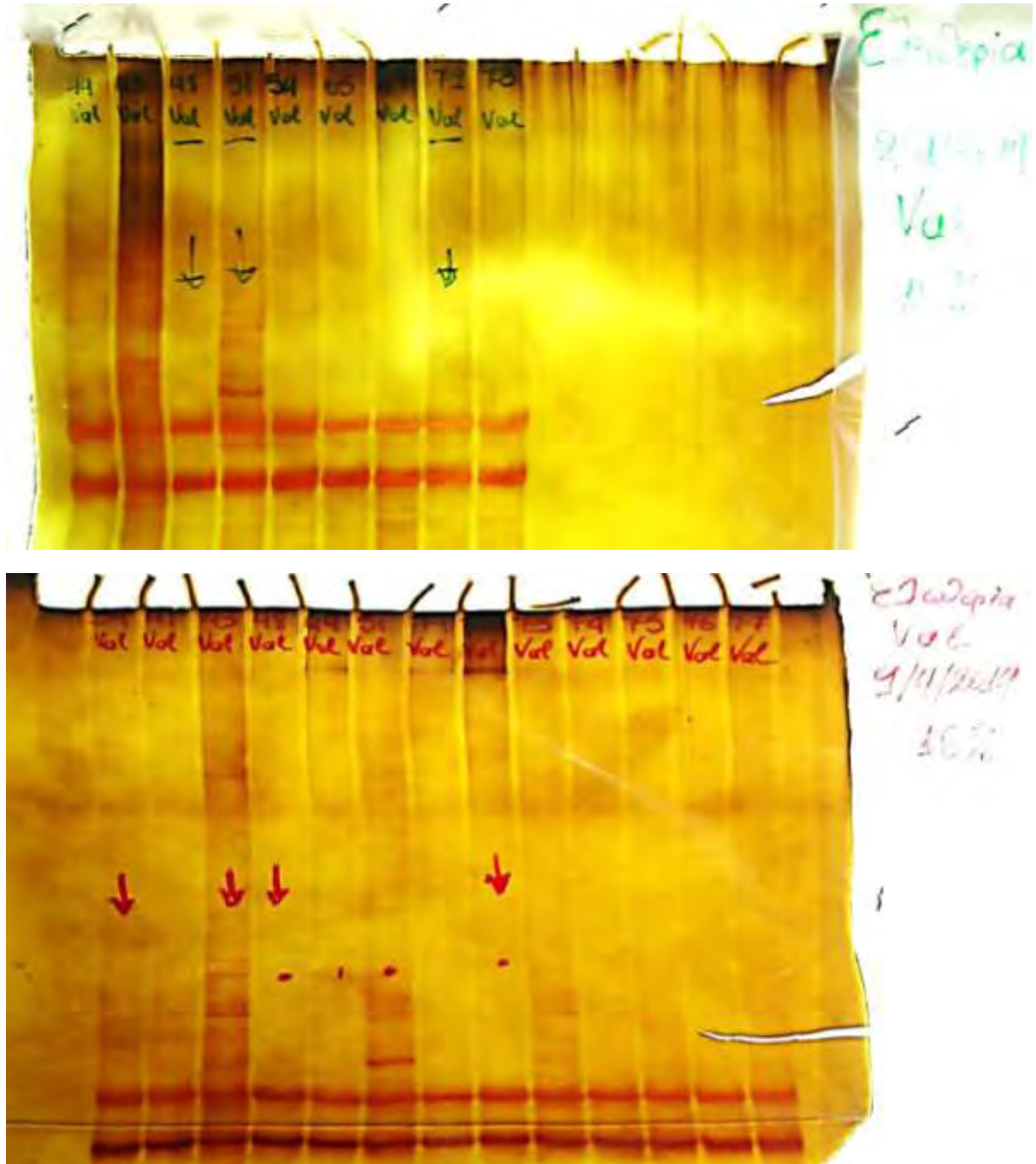
Η συγκεκριμένη μετάλλαξη ταυτοποιήθηκε σε 1 από τα 21 άτομα(76) αποτελεί πολυμορφισμό και συνεπώς δεν κατατάσσεται στις παθολογικές.



ΕΙΚΟΝΕΣ 29-30: ΠΗΚΤΕΣ ΑΚΡΥΛΑΜΙΔΗΣ ΤΩΝ PCR ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ ΤΟΥ ΕΚΚΙΝΗΤΗ GLY, ΦΑΙΝΟΝΤΑΙ ΟΙ 5 ΟΜΑΔΕΣ ΤΩΝ ΠΡΟΤΥΠΩΝ ΚΑΙ ΜΕ ΒΕΛΗ ΤΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΠΡΟΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗ.

VAL

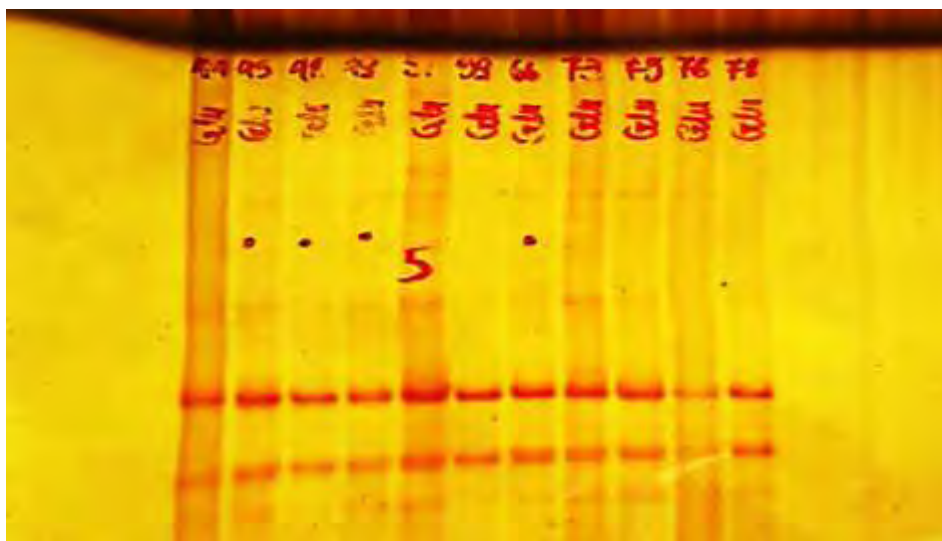
Η ανάλυση των δειγμάτων στο γονίδιο της βαλίνης έδειξε τον σχηματισμό τεσσάρων προτύπων (1:39, 2:43, 3:48, 4:72). Όμως μετά την επεξεργασία των αλληλουχιών δεν φάνηκε σε κανένα γονίδιο να υπάρχει κάποια μεταλλαγή που να το διαφοροποιεί από το γενικό πρότυπο. Όλα τα δείγματα συνεπώς εντάχθηκαν στο γενικό πρότυπο



ΕΙΚΟΝΕΣ 31-32 : ΠΗΚΤΕΣ ΑΚΡΥΛΑΜΙΔΗΣ ΤΩΝ PCR ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ ΤΟΥ ΕΚΚΙΝΗΤΗVAL , ΦΑΙΝΟΝΤΑΙ ΟΙ 4 ΟΜΑΔΕΣ ΤΩΝ ΠΡΟΤΥΠΩΝ ΚΑΙ ΜΕ ΒΕΛΗ, ΣΤΗΝ 31, ΤΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΠΡΟΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗ.

GLU

Στο γονίδιο του γλουταμινικού στο τζελ ακρυλαμίδης ξεχώρισαν πέντε διαφορετικές ομάδες (1:45, 2:49, 3:66, 4:69, 5:51).



ΕΙΚΟΝΕΣ 33-34 : ΠΗΚΤΕΣ ΑΚΡΥΛΑΜΙΔΗΣ ΤΩΝ PCR ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΤΟΥ ΕΚΚΙΝΗΤΗ GLU, ΦΑΙΝΟΝΤΑΙ ΟΙ 5 ΟΜΑΔΕΣ ΤΩΝ ΠΡΟΤΥΠΩΝ ΚΑΙ ΜΕ ΒΕΛΗ ΤΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΠΡΟΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗ.

Αυτά τα αντιπροσωπευτικά δείγματα από κάθε ομάδα στάλθηκαν για αλληλουχισή και έπειτα έγινε όπως και σε κάθε προηγούμενη περίπτωση επεξεργασία των ακολουθιών με το Bioedit. Όμως μετά την επεξεργασία φάνηκε πως κανένα γονίδιο δεν εμφανίζει κάποια μεταλλαγή που να το διαφοροποιεί. Άρα όλα τα δείγματα ανήκουν στο γενικό πρότυπο

Πίνακες αποτελεσμάτων

		ACT			HSL			TA		GLY	VAL	GLU
Ασθενείς	Δείγμα	Γονίδιο										
		t-RNA ^{Asn}	t-RNA ^{Cys}	t-RNA ^{Tyr}	t-RNA ^{His}	t-RNA ^{Ser/Ala}	t-RNA ^{Leu/CUN}	t-RNA ^{Trp}	t-RNA ^{Ala}	t-RNA ^{Gly}	t-RNA ^{Val}	t-RNA ^{Glu}
Sarcoidosis												
Φαραζούμη Ελευθερία	39							5495T>C (MT-ND2)				
Χατζηκώργου Βασιλική	41							5495T>C (MT-ND2)				
Ροντούλης	43							5495T>C (MT-ND2)				
	44							5495T>C (MT-ND2)				
	46							5495T>C (MT-ND2)				
Κάτσικας Στέφανος	48											
Μιχαλόπουλος Πέτρος	49											
Γιαλαμάς Αθανάσιος	51											
	53						12308 A>G					
	55							5495T>C (MT-ND2)				
Τίκα Αικατερίνη	65							5495T>C (MT-ND2)				
Κωστούλης Γιώργος	66							5495T>C (MT-ND2)				
Μαραμή Γιαννούλα	67											
Εγγλέζου Ελένη	68											
IPF												
Σταύρου Δημήτρης	45											
Βαρδάκας Ιωάννης	69											
Βαρδάκας Αθανάσιος	70											
Σπύρος Κωνσταντίνος	71											
Σταθόγαμπρος	72											
Καποδιστριας Δημήτρης	73							5495T>C (MT-ND2)				
Αφάντη Μέλπω	74							5495T>C (MT-ND2)				
Καπτσιανός Νικόλαος	75											
Σιμήτας Νικόλαος	76							5495T>C (MT-ND2)		10034 T>C		

ΜΕΤΑΛΛΑΞΗ	ΑΣΘΕΝΕΙΣ		
	Σαρκοείδωση	IPF	Σύνολο
12308 A>G t-RNA ^{Leu} (CUN)	7%	0%	4%
5495T>C (MT-ND2)	57%	36,4%	48%
10034 T>C t-RNA ^{Gly}	0%	9%	4%

Ε. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα μελέτη απομονώθηκε το DNA από 12 ασθενείς με Σαρκοείδωση (2 δείγματα προήλθαν απο παλαιότερη απομόνωση) και από 11 ασθενείς με IPF. Η ανάλυση έγινε για 11 γονίδια μιτοχονδριακών tRNAs: t-RNAAsn, t-RNACys, t-RNATyr, t-RNAHis, t-RNASer(AGY), t-RNALeu(CUN), t-RNATrp, t-RNAAIa, t-RNAGly, t-RNAVal, t-RNAGlu.

Οι μεταλλάξεις που βρέθηκαν ήταν οι εξής:

12308 A>G στο t-RNALeu(CUN) στο 7% των ασθενών με Σαρκοείδωση,

5495T>C (MT-ND2) στο 57% των σαρκοειδικών και στο 36,4% των ασθενών με IPF, και

10034 T>C στο t-RNAGly στο 9% των ατόμων με IPF.

Ευρήματα μελέτης

Μετάλλαξη 12308 A>G

Στο **tRNA της λευκίνης** βρέθηκε η μετάλλαξη A12308G η οποία έχει αναφερθεί και προηγουμένως στην βιβλιογραφία ως παθολογική και έχει συσχετιστεί με αρκετά νοσήματα η φαινότυπος όπως φαίνεται στην παρακάτω εικόνα

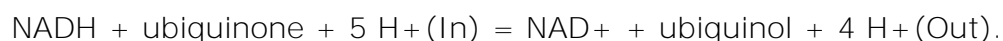
12299	<u>MT-TL2</u>	<u>MELAS</u>	A12299C	tRNA Leu (CUN)
12300	<u>MT-TL2</u>	3243 suppressor mutant	G12300A	tRNA Leu (CUN)
12308	<u>MT-TL2</u>	CPEO / Stroke / CM / Breast & Renal & Prostate Cancer Risk / Altered brain pH	A12308G	tRNA Leu (CUN)
12311	<u>MT-TL2</u>	<u>CPEO</u>	T12311C	tRNA Leu (CUN)
12313	<u>MT-TL2</u>	<u>FSHD</u>	T12313C	tRNA Leu (CUN)

Συγκεκριμένα τα περισσότερα άτομα που έχουν βρεθεί με τη συγκεκριμένη αλλαγή παρουσίαζαν χρόνια προοδευτική εξωτερική οφθαλμοπληγία, CPEO (Chronic Progressive External Ophthalmoplegia).

Μετάλλαξη 5495 T>C

Η μετάλλαξη T5495C έχει γίνει όπως στην **περιοχή ND2** η οποία κωδικοποιεί την υπομονάδα 2 της NADH αφυδρογονάσης της αναπνευστικής αλυσίδας.

Η NADH αφυδρογονάση εδράζεται στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη και ως διαμεμβρανική πρωτεΐνη την διαπερνά αρκετές φορές. Η λειτουργία της είναι η μεταφορά των ηλεκτρονίων από NADH στην αναπνευστική αλυσίδα. Ο ενδιάμεσος δέκτης αυτών των ηλεκτρονίων είναι η ουβικινόνη:



Η μετάλλαξη που βρέθηκε δεν έχει προηγουμένως αναφερθεί ούτε έχει καταχωρηθεί σχετιζόμενη με κάποιο νόσημα.

Μπορούμε να προτείνουμε μια πιθανή συσχέτιση της συγκεκριμένης μεταλλαγής με την παθογένεση των δύο ασθενειών γιατί μία δυσλειτουργία της NADH αφυδρογονάσης προκαλεί δυσλειτουργία στην αναπνευστική αλυσίδα και άρα υπερπαραγωγή ROS (που βρέθηκε και στις 2 ασθένειες), διατάραξη του δυναμικού της μεμβράνης και άρα μειωμένη απόδοση σε ATP. Όμως η συσχέτιση τουλάχιστον σε αυτό το στάδιο είναι αδύνατη λόγω του μικρού αριθμού δειγμάτων που αναλύθηκαν ως τώρα.

4633	MT-ND2	LHON candidate	C4633G	C-G	A-G
4640	MT-ND2	LHON	C4640A	C-A	I-M
4648	MT-ND2	PEG	T4648C	T-C	F-S
4659	MT-ND2	possible PD risk factor	G4659A	G-A	A-T
4681	MT-ND2	Leigh Syndrome	T4681C	T-C	L-P
4769	MT-ND2	SZ-associated	A4769A	A-A	syn
4833	MT-ND2	NIDDM helper mutation; AD, PD	A4833G	A-G	T-A
4852	MT-ND2	LHON	T4852A	T-A	L-Q
4917	MT-ND2	LHON / Insulin Resistance / AMD / NRTI-PN	A4917G	A-G	N-D
5001	MT-ND2	Developmental delay, seizure, cardiomyopathy, lactic acidosis	A5001AA	A-AA	frameshift
5134	MT-ND2	Exercise intolerance (EXIT)	AA5134d	AAA-A	frameshift
5178	MT-ND2	Longevity; Extraversion MI / AMS protection; blood iron metabolism	C5178A	C-A	L-M
5244	MT-ND2	LHON	G5244A	G-A	G-S
5452	MT-ND2	Progressive Encephalomyopathy	C5452T	C-T	T-M
5460	MT-ND2	AD / PD	G5460A	G-A	A-T
5460	MT-ND2	AD	G5460T	G-T	A-S

ΠΙΝΑΚΑΣ 4: Μεταλλάξεις στην ND2 και αντίστοιχες ασθένειες

Μετάλλαξη 10034 T>C

Η μετάλλαξη στο **mt-tRNA της γλυκίνης** που ανιχνεύτηκε στο εργαστήριο αποτελεί **πολυμορφισμό** και συνεπώς δεν κατατάσσεται στις παθολογικές.

Συσχέτιση Σαρκοείδωσης με το οξειδωτικό stress

Μια τοπική οξειδοαναγωγική ανισορροπία έχει αναφερθεί στην πνευμονική σαρκοείδωση, δηλαδή τοπικά μόνο στους πνεύμονες των ασθενών . Επίσης έχει περιγραφεί και συστηματική οξειδοαναγωγική ανισορροπία σε κάθε σημείο δηλαδή που υπάρχει εστία της νόσου.

Ο ρόλος του οξειδωτικού στρες έχει τεκμηριωθεί καλά σε αρκετές πνευμονικές ασθένειες , συμπεριλαμβανομένης της οξείας πνευμονικής βλάβης, του άσθματος , της χρόνιας αποφρακτικής πνευμονοπάθειας (ΧΑΠ) και της πνευμονική ίνωσης . **Η αλληλουχία των γεγονότων που οδηγούν σε αυξημένη οξειδωτική επιβάρυνση θεωρείται ότι ξεκινά όταν ένας συνήθως άγνωστος παράγοντας ενεργοποιεί μία οξεία φλεγμονώδη απόκριση.** Τα ενεργοποιημένα φλεγμονώδη κύτταρα παράγουν και απελευθερώνουν ουσίες με κυτταροτοξική δράση , όπως δραστικές ρίζες οξυγόνου (ROS) , οι οποίες κάνουν την έναρξη ενός φαύλου κύκλου πολλαπλής ιστικής καταστροφής και δημιουργίας νέων ελευθέρων ριζών. (Angela Koutsokera et all, Larisa, Greece)

Το Οξειδωτικό στρες έχει επίσης ενοχοποιηθεί στην παθογένεση της σαρκοείδωσης . Μολονότι σε καμία μελέτη δεν έχει περιγραφεί ακόμα μια συστηματική οξειδοαναγωγική ανισορροπία στο πλαίσιο αυτό , αρκετοί ερευνητές έχουν αποδείξει ότι τα κυψελιδικά μακροφάγα που απομονώνονται από το βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα (BAL) των ασθενών με σαρκοείδωση τοπικά ενεργοποιείται και **παράγουν ρίζες οξυγόνου in vitro.** (Angela Koutsokera et all, Larisa, Greece)

Αυτή η αυξημένη οξειδωτική δραστηριότητα εκφράζεται επίσης in vivo όπως βρέθηκε από τα επίπεδα του 8-isoprostane (προϊόν οξείδωσης του αραχιδονικού) σε ειδικές εξετάσεις (BAL, EBC) (Montuschi P et al. Am J Respir Crit Care Med 1998] , (Psathakis K. et al Chest 2004) **ασθενών με σαρκοείδωση στο Πανεπιστημικό Γενικό Νοσοκομείο Λάρισας.**

Συσχέτιση IPF με το οξειδωτικό stress

Έχουν πραγματοποιηθεί πολυάριθμες μελέτες που δείχνουν ότι η οξειδωτική επιβάρυνση στους πνεύμονες των ασθενών με πνευμονική ίνωση είναι αυξημένη και ότι **τα φλεγμονώδη κύτταρα αυτών των ασθενών παράγουν περισσότερες ρίζες από τα κύτταρα των υγιών άτομα της ομάδας ελέγχου**. Τραυματισμός κυψελιδικών κυττάρων και απόπτωση έχει βρεθεί σε βιοψίες πνεύμονα ατόμων με IPF . Ένας μηχανισμός που προτείνεται να δικαιολογήσει την απόπτωση αυτή είναι η **αυξημένη παραγωγή των ενεργών ριζών στα κυψελιδικά κύτταρα των ασθενών** . Επιπλέον ένδειξη αποτελεί το ότι οι ελεύθερες ρίζες ενεργοποιούν τον **TGF-β** τον σημαντικότερο αυξητικό παράγοντα της παθογένεσης της ινωτικής ασθeneιών των πνευμόνων , ο οποίος προάγει την απόπτωση των επιθηλιακών κυττάρων. (Bellocq A. et all Am J Respir Cell Mol Biol 1999), (Zoe D. Daniil et all, **10 October 2006**).

Φαίνεται λοιπόν ότι οι δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) υπερπαραγονται από τουλάχιστον δύο είδη κυττάρων στους ασθενείς με IPF (Rahman I. et all, Free Radical Biol Med 1999) . Η παραπάνω ποσότητα τους είναι αυτή που δημιουργεί πολλά από τα κλινικά συμπτώματα των ασθενών αλλά και περεταίρω οξειδωση των κυτταρικών συστατικών (μεταλλάξεις στο DNA). Μιλάμε συνεπώς για έναν φαύλο κύκλο.

ROS ΣΑΡΚΟΕΙΔΩΣΗ ΚΑΙ IPF

Η παραγωγή ελεύθερων ριζών όπως έχει ήδη περιγραφεί λαμβάνει χώρα στη μήτρα των μιτοχονδρίων, κατά την διαδικασία της μεταφοράς των ηλεκτρονίων, από τα ενζυμα της αναπνευστικής αλυσίδας. Σε φυσιολογικές καταστάσεις για να υπάρξει ισορροπία και να αποφευχθεί η παθολογική αύξηση του οξειδωτικού stress η περίσσεια αυτή των ενδιάμεσων ελευθέρων ριζών εξουδετερώνεται τοπικά από τα ενζυμα (GSH, SOD, καταλάση) των ενδογενών μηχανισμών εξουδετέρωσης.

Η υπερπαραγωγή αυτή των ελεύθερων ριζών και στις δυο ασθένειες υπάρχει μεγάλη πιθανότητα να οφείλεται **είτε στη δυσλειτουργία των ενζύμων εξουδετέρωσης** τους είτε **στην υπερλειτουργία των ενζύμων παραγωγής τους** (ουβικινόνη, φλαβινοπρωτείνες, οξειδάση της ξανθίνης, οξειδάση του NADPH και το σύμπλεγμα του κυτοχρώματος P450). Κάποια από αυτά τα ενζυμα κωδικοποιούνται εξ ολοκλήρου, κατά ένα μέρος τους (συγκεκριμένες υπομονάδες) η/και ρυθμίζονται από γονίδια του μιτοχονδριακού γονιδιώματος. Το γεγονός αυτό, σε συνδυασμό με τα ευρήματα των ερευνών που έχουν γίνει στην προσπάθεια συσχέτισης του οξειδωτικού stress με την παθογένεση και την διάγνωση αυτών των δυο ασθενειών οδήγησε τις έρευνες για την γενετική βάση τους στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα και στις μεταλλάξεις του.

ΝΕΕΣ ΕΡΕΥΝΕΣ

Παράλληλα με την έρευνα για την συσχέτιση της Σαρκοείδωσης και IPF με μεταλλαγές στα γονίδια των mt-tRNAs ξεκίνησε η ίδια διαδικασία για μία άλλη διαταραχή του αναπνευστικού συστήματος, το Αποφρακτικού τύπου Σύνδρομο Απνοιών Υποπνοιών κατά τον Ύπνο (ΣΑΑΥΥ)(OSAS: Obstructive Sleep Apnea Syndrome).

Το **OSAS** είναι μια νόσος που χαρακτηρίζεται από πλήρη διακοπή (άπνοια), ή μείωση της αναπνοής (υπόπνοια) τουλάχιστον για 10 δευτερόλεπτα και που επαναλαμβάνεται πολλές φορές κατά την διάρκεια του ύπνου.

Φυσιολογικά οι αεραγωγοί, κατά την διάρκεια του ύπνου παραμένουν ανοικτοί με την δράση των μυών που ελέγχουν την γλώσσα. Όταν οι μύες αυτοί χαλαρώσουν το άνοιγμα του αεραγωγού στενεύει πράγμα που δυσκολεύει την αναπνοή και προκαλεί ροχαλητό. Εάν οι μύς αυτοί χαλαρώσουν πολύ ο αεραγωγός θα κλείσει τελείως και η αναπνοή διακόπτεται

Το σύνδρομο αρχίζει με ένα θορυβώδες ροχαλητό στην διάρκεια του ύπνου. Η απότομη διακοπή του ροχαλητού ισοδυναμεί με την έναρξη της άπνοιας. Στην συνέχεια ακολουθεί ένας βαθμός αφύπνισης του ασθενούς, αποκαθιστά την αναπνοή και ξαναρχίζει το ροχαλητό. Η αφύπνιση δεν γίνεται πάντα αντιληπτή από τον ασθενή αφού πολλές φορές δεν πρόκειται για πλήρη αφύπνιση αλλά για μεταφορά από κάποιο βαθύτερο επίπεδο ύπνου σε ένα ελαφρύτερο. Άλλοτε πάλι ο ασθενής μπορεί να αισθανθεί ένα αίσθημα ασφυξίας που τον αφυπνίζει τελείως για να μπορέσει να ανασάνει. Επίσης πολλές φορές δεν γίνεται πλήρης παύση του ροχαλητού αλλά απλή ελάττωση (υπόπνοια) με τις ίδιες όμως συνέπειες όπως της άπνοιας, δηλ. μειωμένη πρόσληψη οξυγόνου από τον οργανισμό.

Το σοβαρότερο αποτέλεσμα της διακοπής της αναπνοής είναι η προσωρινή διακοπή αερισμού του πνεύμονα. Το τελευταίο έχει ως συνέπεια να ελαττώνεται το οξυγόνο που προσλαμβάνει ο οργανισμός. Είναι μία μορφή προσωρινής ασφυξίας με σοβαρές συνέπειες από την έλλειψη οξυγόνου, και ιδιαίτερα όσον αφορά ζωτικά όργανα όπως είναι ο εγκέφαλος και η καρδιά κ.λπ.

Η νόσος εξελίσσεται στην διάρκεια πολλών ετών και τα συμπτώματα περιλαμβάνουν, έντονο και θορυβώδες ροχαλητό, ανήσυχος ύπνος, διακοπές του ροχαλητού που τις αντιλαμβάνεται ο σύντροφος ως διακοπές της αναπνοής (όχι πάντα), νυκτερινοί ιδρώτες, αναγωγές γαστρικού υγρού, παραμιλητό (όχι απαραίτητα), τινάγματα των άκρων.

Κατά την διάρκεια της μέρας παρατηρείται ξηροστομία (το πρωί μόλις ξυπνήσει), πρωινή κόπωση, πρωινοί πονοκέφαλοι, ημερήσια υπνηλία, διαταραχές προσωπικότητας και συμπεριφοράς, νευρική κατάσταση, καταθλιπτικές

εκδηλώσεις, μείωση σεξουαλικού ενδιαφέροντος, μείωση ακοής, μείωση απόδοσης στην εργασία, μείωση της μνήμης και προσοχής.

Οι επιπτώσεις στον οργανισμό εκτείνονται κυρίως στο νευρικό και στο αναπνευστικό σύστημα και μπορεί να είναι ολέθριες.

Στους περισσότερους ασθενείς το σύνδρομο προκαλεί ένα ή περισσότερα από τις εξής συνέπειες: υπέρταση, οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου, καρδιακή ανεπάρκεια, αρρυθμίες, αναπνευστική ανεπάρκεια, αγγειακά εγκεφαλικά επεισόδια, αιφνίδιος νυκτερινός θάνατος.

Τέλος το 17 % των τροχαίων ατυχημάτων οφείλεται στην νόσο λόγω έντονης υπνηλίας η ύπνου κατά την οδήγηση. Επίσης παρατηρούνται και άλλες σοβαρές επιπτώσεις σε άλλα όργανα του οργανισμού όπως νευρικά και νευρομυϊκά νοσήματα, ορμονικά προβλήματα, ψυχιατρικά προβλήματα.

Η OSAS έχει παρατηρηθεί σε πολλούς ασθενείς με IPF. Αυτές οι παρατηρήσεις ήταν η αιτία να υπάρξει υποψία πιθανής γενετικής σύνδεσης μεταξύ αυτών των δυο ασθενειών. Προκειμένου να εξακριβωθεί αυτό, καθώς και τα αίτια του OSAS, τα οποία επίσης παραμένουν άγνωστα, ζητείται η αιμοδοσία από ασθενείς με OSAS για την ανάλυση του DNA τους με την ίδια διαδικασία όπως και για την IPF.

Σε αυτό το πλαίσιο πραγματοποιείται λήψη πλήρους εξειδικευμένου ιστορικού από ασθενείς με IPF και συμπλήρωση ενός ερωτηματολογίου-κλίμακας σχετικό με ερωτήσεις για τον ύπνο ώστε να δούμε εάν διαφαίνεται η πιθανότητα να πάσχουν ήδη και από OSAS η να νοσήσουν αργότερα.

Επιπρόσθετα, οι ασθενείς με OSAS υποβάλλονται μετά από την λεπτομερή ενημέρωση και την σύμφωνη γνώμη τους σε αιμοληψία. Καλούνται επίσης να απαντήσουν και αυτοί σε ένα διαφορετικό ερωτηματολόγιο σχετικό με τον ύπνο (BERLIN QUESTIONNAIRE) για να φανεί η οξύτητα των συμπτωμάτων τους.

Name _____

City, State and Zip _____

1. Complete the following:

Height _____ Age _____
 Weight _____ Male/Female _____
 Has your weight changed?
 Increased
 Decreased
 No change

2. Do you snore?

Yes No Don't know

If you snore:

3. Your snoring is...

Slightly louder than breathing
 As loud as talking
 Louder than talking
 Very loud

4. How often do you snore?

Almost every day
 3-4 times a week
 1-2 times a week
 1-2 times a month
 Never or almost never

5. Does your snoring bother other people?

Yes No

6. Has anyone noticed that you quit breathing during your sleep?

Almost every day
 3-4 times a week
 1-2 times a week
 1-2 times a month
 Never or almost never

7. Are you tired after sleeping?

Almost every day
 3-4 times a week
 1-2 times a week
 1-2 times a month
 Never or almost never

8. Are you tired during waketime?

Almost every day
 3-4 times a week
 1-2 times a week
 1-2 times a month
 Never or almost never

9. Have you ever nodded off or fallen asleep while driving?

Yes No Don't know

If yes, how often does it occur?

Every day
 3-4 times a week
 1-2 times a week
 1-2 times a month
 Never or almost never

10. Do you have high blood pressure?

Yes No Don't know

BMI = _____

$$BMI = \frac{\text{Weight}}{\text{Height} \times \text{Height}} \times 703$$

Category 1, questions 2-6

High Risk: 2 or more positive responses to answers highlight in gray

Category 2, questions 7-9

High Risk: 2 or more positive responses to answers highlight in gray

Category 3, question 10

High Risk: A YES response and/or BMI > 30

Final Result: 2 or more checked categories indicates **high likelihood of sleep apnea**

©Copyright Annals of Internal Medicine 1999. The Berlin Questionnaire is reproduced with the permission of American College of Physicians.

Physician Copy

ΕΙΚΟΝΑ 35 : BERLIN QUESTIONNAIRE, ΤΟ ΕΡΩΤΗΜΑΤΟΛΟΓΙΟ ΠΟΥ ΓΙΝΕΤΑΙ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΔΙΑΓΝΩΣΜΕΝΟ OSAS ΓΙΑ ΤΗΝ ΚΑΤΑΤΑΞΗ ΤΟΥΣ Η ΟΧΙ ΣΤΗΝ ΟΜΑΔΑ ΥΨΗΛΟΥ ΚΙΝΔΥΝΟΥ.

Κλείνοντας θα πρέπει να αναφέρω ότι η συγκεκριμένη μελέτη είναι απλά ένα μικρό τμήμα της έρευνας που πραγματοποιείται για την εύρεση μεταλλαγών στα μιτοχονδριακά tRNAs των ασθενών με σαρκοείδωση και IPF. Σε αυτήν την μελέτη λοιπόν δεν υπήρξε σημαντικό ποσό ευρημάτων ώστε να μπορέσουμε να μιλήσουμε για συσχέτιση ασθένειας - μετάλλαξης. Αυτό το γεγονός δεν είναι ούτε αποθαρρυντικό ούτε ανησυχητικό γιατί πιθανότατα έγκειται στον ιδιαίτερα περιορισμένο αριθμό δειγμάτων. Επίσης πρέπει να λάβουμε υπ όψη ότι μεταξύ των γονιδίων των mt-tRNAs κάποια εμφανίζουν πιο συντηρημένες αλληλουχίες από άλλα, με λιγότερους πολυμορφισμούς και καταγεγραμμένες παθογόνες μεταλλαγές. Επιπρόσθετα πολλές μιτοχονδριακές ασθένειες οφείλονται στη συσσώρευση περισσότερων μεταλλαγών στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα και όχι αποκλειστικά σε μια μόνο μεταλλαγή.

Συνεπώς καταλαβαίνουμε ότι για να καταλήξουμε σε ένα εμπειριστωμένο αποτέλεσμα απαιτείται η συλλογή περισσότερων στοιχείων από τις αναλύσεις και των υπόλοιπων εκκινήτων και μάλιστα για περισσότερα δείγματα ασθενών, πρέπει με λίγα λόγια να λάβουμε υπ όψη όλα τα στοιχεία που θα προκύψουν με την ολοκλήρωση της έρευνας που τώρα βρίσκεται σε εξέλιξη.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Masato Orita, Hiroyuki Iwahana, Hiroshi Kanazawa, Kenshi Hayashi and Takato Sekiya Detection of polymorphisms of human DNA by gelelectrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. Proc. Natd.Acad. Sci. USA 86, 2766-2770, 1989.
- Michiei Oto, Satoshi Miyake and Yasuhito Yuasa. Optimization of Nonradioisotopic Single Strand Conformation Polymorphism Analysis with a Conventional Minislab Gel Electrophoresis Apparatus. Analytical Biochemistry, 213, 19-22, 1993.
- Karen Sumire Kubo, R. M. Stuart, J. Freitas-**Astúa**¹, **R. Antonioli-Luizon**, E. C. Locali-Fabris, H. D. Coletta-Filho¹, M. A. Machado and E. W. Kitajima. Evaluation of the genetic variability of orchid fleck virus by single-strand conformational polymorphism analysis and nucleotide sequencing of a fragment from the nucleocapsid gene. Archives of Virology, Official Journal of the Virology Division of the International Union of Microbiological Societies, 21 May 2009.
- Orita, M., Iwahana, H., Kanazawa, H., Hayashi, K., and Sekiya, T. Detection of polymorphism of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 2766-2770 (1989).
- Macroporous elastic polyacrylamide gels prepared at subzero temperatures: control of porous structure Fatima Plieva,^a Xiao Huiting,^a Igor Yu. Galaev,^a **Björn Bergenståhl**^c and Bo Mattiasson^{*a} J. Mater. Chem., 2006,16, 4065-4073 DOI: 10.1039/B606734D
- SSCP Analysis by Capillary Electrophoresis with Laser-Induced Fluorescence Detector Jicun Ren Capillary Electrophoresis of Nucleic Acids **Methods in Molecular Biology**[™] Volume 163, 2001.
- Willett K: "Mitochondria: The aerobic engines", BikeTech Review, May 2006
- Dickson VK, Silvester JA, Fearnley IM, Leslie AGW, Walker JE: "On the structure of the stator of the mitochondrial ATP synthase", The EMBO Journal 25: 2911-2918, 2006.

- Xing J, Liao J-C, Oster G: "Making ATP", Proc. Natl. Acad. Sci. 102:16539-16546, 2005.
- Human mitochondrial tRNAs: biogenesis, function, structural aspects, and diseases., Suzuki T1, Nagao A, Suzuki T. Six unidentified reading frames of human mitochondrial DNA encode components of the respiratory-chain NADH dehydrogenase. Chomyn A, Mariottini P, Cleeter MW, Ragan CI, Matsuno-Yagi A, Hatefi Y, Doolittle RF, Attardi G.
- **ΟΦΘΑΛΜΙΚΕΣ ΜΥΑΣΘΕΝΕΙΕΣ – ΜΥΟΠΑΘΕΙΕΣ – ΕΞΩΤΕΡΙΚΗ ΟΦΘΑΛΜΟΠΛΗΓΙΑ** Μάθημα προς τους ειδικευόμενους της Οφθαλμολογίας. Αθήνα, Κ.Οφ.Κ.Α., 27 Νοεμβρίου 2012. Υπό: Δρος Κωνσταντίνου Ρούγγα, MD, PhD, FEBOph Συντ. Δ/ντή Οφθαλμολογικής Κλινικής Νοσ. «Άγιος Σάββας».
- Systemic oxidative stress in patients with pulmonary sarcoidosis Angela Koutsokera, Andriana I. Papaioannou, FoteiniMalli, Theodoros S. Kiropoulos, Alexandra Katsabeki, Theodora Kerenidi, Konstantinos I. Gourgouljanis, Zoe D. Daniil* Respiratory Medicine Department, University of Thessaly Medical School Address, University Hospital of Larissa, Larissa 41110, Greece.
- Neglected evidence in idiopathic pulmonary fibrosis: from history to earlier diagnosis Jean-Francois Cordier and Vincent Cottin. Affiliations: Reference Centre for Rare Pulmonary Diseases, Competence Centre for Pulmonary Hypertension, Dept of Respiratory Medicine, University of Lyon, University Claude Bernard Lyon 1, INRA, UMR754, IFR 128, Lyon, France.
- Premature lung aging and cellular senescence in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis and copd/emphysema, marco chilosì, angelo carloni, andrea rossi, and venerino poletti. Verona, Italy.
- **Zoe D. Daniil, Evangelia Papageorgiou, Agela Koutsokera, Konstantinos Kostikas, Theodoros Kiropoulos, Andriana I. Papaioannou, Konstantinos I. Gourgouljanis. Department of Respiratory Medicine, University Hospital of Larissa, University of Thessaly, Larissa, Greece . Received 15 March 2006; received in revised form 27 June 2006; accepted 10 October 2006**

- Montuschi P, Ciabattoni G, Paredi P, Pantelidis P, du Bois RM, Kharitonov SA, et al. 8-Isoprostane as a biomarker of oxidative stress in interstitial lung diseases. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 158: 1524–7.
- [9] Psathakis K, Papatheodorou G, Plataki M, Panagou P, Loukides S, Siafakas NM, et al. 8-Isoprostane, a marker of oxidative stress, is increased in the expired breath condensate of patients with pulmonary sarcoidosis. *Chest* 2004; 125: 1005–11.
- **Rahman I, Skwarska E, Henry M, Davis M, Davis M, O'Connor CM, Fitzgerald MX, Greening A, MacNee W.** Systemic and pulmonary oxidative stress in idiopathic pulmonary fibrosis. *Free Radical Biol Med* 1999; 27: 60–8.
- Bellocq A, Azoulay E, Marullo S, Flahault A, Phillipe C, Cadranel J, Baud L. Reactive oxygen and nitrogen intermediates increase transforming growth factor beta 1 release from human epithelial alveolar cells through two different mechanisms. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999; 21: 128–36
- Hagimoto N, Kuwano K, Inoshima I, Yoshimi M, Nakamura N, Fujita M, Maeyama T, Hara N. TGF-beta 1 as an enhancer of Fas-mediated apoptosis of lung epithelial cells. *J Immunol* 2002; 168: 6470.