

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

**«ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ - ΜΟΡΙΑΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ,
ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ»**

Τσαχουρίδης Στέφανος

**ΥΠΑΡΧΕΙ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΗ ΔΥΣΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΣΤΟ ΑΣΘΜΑ;
ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΣΥΜΠΛΟΚΟΥ IV**

Λάρισα 2011

Υπάρχει μιτοχονδριακή δυσλειτουργία στο άσθμα; Μελέτη του
συμπλόκου IV

Τριμελής Επιτροπή

Ζίφα Αιμιλία, Επίκουρη Καθηγήτρια Βιολογίας / Νευροβιολογίας
Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Μαμούρης Ζήσης, Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών
Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Γουργουλιάνης Κωνσταντίνος, Καθηγητής Πνευμονολογίας
Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Ευχαριστίες

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Γενετικής, Εξελικτικής και Συγκριτικής Βιολογίας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, στα πλαίσια του μεταπτυχιακού προγράμματος "Εφαρμογές Μοριακής Βιολογίας - Μοριακή Γενετική, Διαγνωστικοί Δείκτες", υπό την επίβλεψη της Επίκουρης Καθηγήτριας Βιολογίας/Νευροβιολογίας Αιμιλίας Ζίφα.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την κ.Αιμιλία Ζίφα για την καλή συνεργασία που είχαμε και τη βοήθεια που μου προσέφερε κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της εργασίας, όπως και τον κ. Ζήση Μαμούρη και τον κ. Κωνσταντίνο Γουργουλιάνη για τη συμμετοχή τους στην τριμελή επιτροπή.

Εκφράζω επίσης τις ευχαριστίες μου σε όλα τα μέλη του εργαστηρίου και κυρίως στον κ.Κωνσταντίνο Σταμάτη για την συνεισφορά του στην ολοκλήρωση αυτής της εργασίας.

Και φυσικά ένα μεγάλο ευχαριστώ σε οικογένεια και φίλους που με στήριξαν με το δικό τους μοναδικό, πολύτιμο τρόπο.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη/Abstract

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1
1.1 Άσθμα-Στατιστικά στοιχεία.....	2
1.2 Ανοσοπαθολογία του άσθματος.....	4
1.3 Παράγοντες που προκαλούν άσθμα.....	8
1.3.1 Περιβαλλοντικοί παράγοντες.....	8
1.3.2 Παράγοντες προδιάθεσης.....	9
1.4 Ο ρόλος του μιτοχονδρίου σε ασθένειες και στο άσθμα - οξειδάση του κυτοχρώματος c (Complex IV).....	13
1.4.1 Δομή και λειτουργία του μιτοχονδρίου.....	13
1.4.2 Οξειδάση του κυτοχρώματος c.....	17
1.4.3 Μιτοχονδριακό γενετικό υλικό (mtDNA).....	20
1.4.4 Μιτοχόνδριο και Ασθένειες.....	22
1.4.5 Άσθμα και μιτοχόνδριο.....	26
1.5 Σκοπός του πειράματος.....	34
 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	35
2.1 Απόμονωση DNA.....	36
2.2 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης.....	38
2.3 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης.....	39
2.4 Καθαρισμός PCR προϊόντων.....	43
2.5 Προσδιορισμός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας μορίων DNA (Sequencing).....	44
 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	45
3.1 Μεταλλάξεις στο γονίδιο COI.....	46
3.2 Μεταλλάξεις στο γονίδιο COII.....	50
3.3 Συνδυασμοί μεταλλάξεων.....	53
 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	54
 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	60

Περίληψη

Το άσθμα είναι μια χρόνια φλεγμονώδης διαταραχή του αναπνευστικού, η οποία προκαλεί υπερευαισθητοποίηση και στένωση των αεραγωγών. Η εμφάνιση της ασθένειας οφείλεται σε ένα συνδυασμό γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων, βάσει ενός αρκετά πολύπλοκου μηχανισμού. Η παρουσία υψηλών επιπέδων δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS), οι οποίες προκαλούν ανωμαλίες στην απόπτωση των βρογχικών επιθηλιακών και άλλων ειδών κυττάρων κι επηρεάζουν την ανοσολογική απάντηση, όπως επίσης η μειωμένη λειτουργικότητα της αναπνευστικής αλυσίδας σε ασθματικούς και τα σημαντικά ποσοστά μητρικής κληρονομικότητας της ασθένειας, συνδέουν το άσθμα με τη μιτοχονδριακή δυσλειτουργία. Σκοπός της εργασίας είναι η ανίχνευση μεταλλάξεων σε δύο γονίδια του μιτοχονδριακού DNA, το COI και το COII, τα οποία κωδικοποιούν τις δύο από τις δεκατρείς υπομονάδες της οξειδάσης του κυτοχρώματος c, του τέταρτου συμπλόκου της αναπνευστικής αλυσίδας, καθώς έχει παρατηρηθεί δυσλειτουργία του συμπλόκου αυτού σε ασθματικούς ασθενείς. Αυτές οι δύο υπομονάδες μαζί με την υπομονάδα III, η οποία κωδικοποιείται επίσης από το mtDNA, σχηματίζουν το λειτουργικό πυρήνα του ενζύμου.

Για την παρούσα μελέτη εξετάστηκαν 25 ασθενείς και 23 φυσιολογικά άτομα. Η ανάλυση των 2 γονιδίων του mtDNA με PCR κι εν συνεχεία αλληλούχιση, αποκάλυψε 14 μεταλλάξεις σε 16 από τους 25 ασθενείς. Οι 11 από αυτές βρίσκονται στο COI γονίδιο και είναι οι εξής: C5999T, G6047A, C6221T, T6371C, C6671T, C6776T, C6827T, A6915G, T7028C, A7196C, και C7220T. Οι υπόλοιπες τρεις βρίσκονται στο COII γονίδιο και είναι οι G7768A, T8084A και A8152G. Όλες οι παραπάνω μεταλλάξεις είναι σιωπηλές εκτός από δύο, τις A6915G και T8084A, οι οποίες εμφανίστηκαν μόνο σε ασθενείς, σε ποσοστό 4%. Η μετάλλαξη T8084A στο γονίδιο COII αναφέρεται στη βιβλιογραφία ως πολυμορφισμός, ενώ η μετάλλαξη A6915G είναι μια καινούργια μετάλλαξη καθώς δεν υπάρχει κάποια αναφορά. Η αλλαγή που επιφέρει στην αμινοξική αλληλουχία της ένατης διαμεμβρανικής α-έλικας της υπομονάδας I, είναι η αντικατάσταση της βαλίνης από μεθειονίνη. Ενδιαφέρον επίσης παρουσιάζει και η μετάλλαξη T7028C στο γονίδιο COI, η οποία εντοπίζεται σε μεγάλο ποσοστό τόσο σε ασθενείς (48%) όσο και σε φυσιολογικούς (47,8%) και είναι γνωστό ότι σχετίζεται με κάποιες απλοομάδες όπως η U. Τα άτομα που ανήκουν σε αυτήν την απλοομάδα έχει δείχθει ότι παρουσιάζουν αυξημένα επίπεδα ολικής IgE ορού, ενός σημαντικού παράγοντα για την εμφάνιση αλλεργιών και άσθματος. Στον υποκλάδο U5 αυτής της απλοομάδας ανήκει και η μετάλλαξη G7768A. Από τις υπόλοιπες μεταλλάξεις, όλες αναφέρονται ως απλοί πολυμορφισμοί και μόνο οι C6221T και A7196C ανήκουν στις απλοομάδες X και C αντίστοιχα. Οι μεταλλάξεις που εντοπίστηκαν είναι στην πλειοψηφία τους γνωστοί πολυμορφισμοί, εκτός από την A6915G που θα πρέπει να εξεταστεί περαιτέρω, και δεν εμπλέκονται σε κάποια ασθένεια. Τα ποσοστά αυτών των μεταλλάξεων στους ασθενείς δεν είχαν μεγάλη διαφορά με αυτά στους φυσιολογικούς, οπότε είναι δύσκολο να καταλήξουμε σε κάποιο συμπέρασμα σχετικά με την εμπλοκή τους στο άσθμα. Ίσως μια μελλοντική έρευνα με μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων θα μπορούσε να βγάλει πιο ακριβή συμπεράσματα. Επιπλέον, απαραίτητος θεωρείται ο έλεγχος και των υπολοίπων γονιδίων που κωδικοποιούν υπομονάδες της οξειδάσης του κυτοχρώματος c, τόσο του πυρηνικού DNA όσο και του μιτοχονδριακού, όπως και η μελέτη της λειτουργικότητας του συμπλόκου με βιοχημικές μεθόδους, ώστε να απφανθούμε για την εμπλοκή της οξειδάσης του κυτοχρώματος c στο άσθμα.

Abstract

Asthma is a chronic inflammatory disorder of the lungs that causes intermittent airway obstruction and increased airway hyperresponsiveness. Asthma is the result of the interaction of multiple genetic and environmental factors, and the mechanisms controlling its development and expression are complex and interactive. Reactive oxygen species (ROS) have been related in bronchial asthma because in high levels they can induce apoptosis in cells like epithelial cells they also affect immune response. Furthermore, the decreased activity of electron transport chain (ETC) in asthmatic patients and the high contribution of the maternal inheritance to development of asthma, link mitochondrion with the disease. The aim of this study is the detection of mutations in two mtDNA genes, COI and COII, which encode two of 13 subunits of cytochrome c oxidase (Complex IV). These two subunits along with subunit III, also encoded by mtDNA, form the functional core of the enzyme. Dysfunction of cytochrome c oxidase has been observed in asthmatic patients.

In this study 25 patients with asthma and 23 healthy volunteers as controls, were examined. Analysis of the 2 mtDNA genes with PCR and sequencing, revealed a total of 14 mutations in 16 of the 25 asthmatic patients. Eleven of the mutations were located in COI gene: C5999T, G6047A, C6221T, T6371C, C6671T, C6776T, C6827T, A6915G, T7028C, A7196C, and C7220T. The other three mutations were detected in COII gene: G7768A, T8084A and A8152G. The mutations detected in two genes were silent mutations except A6915G and T8084A, which appeared in 4% of patients. Mutation T8084A in COII gene is referred as a polymorphism in bibliography, whereas A6915G is a new mutation and it causes the replacement of valine by methionine in aminoacidic sequence of ninth transmembrane α -helix of subunit I. Also, it is interesting that mutation T7028C was detected in both patients (48%) and healthy controls (47,8%). T7028C is associated with haplogroup U. Carriers of haplogroup U have been shown to have higher total serum IgE levels compared with non-carriers. IgE is a crucial factor for development of allergy and asthma. Mutation G7768A is classified to sub-haplogroup U5 of haplogroup U, while C6221T and A7196C classified to haplogroups X and C respectively. According to bibliography, the most of mutations identified in this study is polymorphisms, except A6915G which have to be studied further, and they are not involved in any disease. These mutations occur at similar frequency in both asthmatic patients and controls, thus it is difficult to be deduced that they are implicated in asthma. A study in the future, in a large cohort, is likely to extract more specific conclusions. Moreover, is essential to test the genes of nuclear DNA which encode 10 subunits of cytochrome c oxidase and enzyme's assembly factors in order to uncover the role of mitochondrion and specifically of cytochrome c oxidase in asthma.

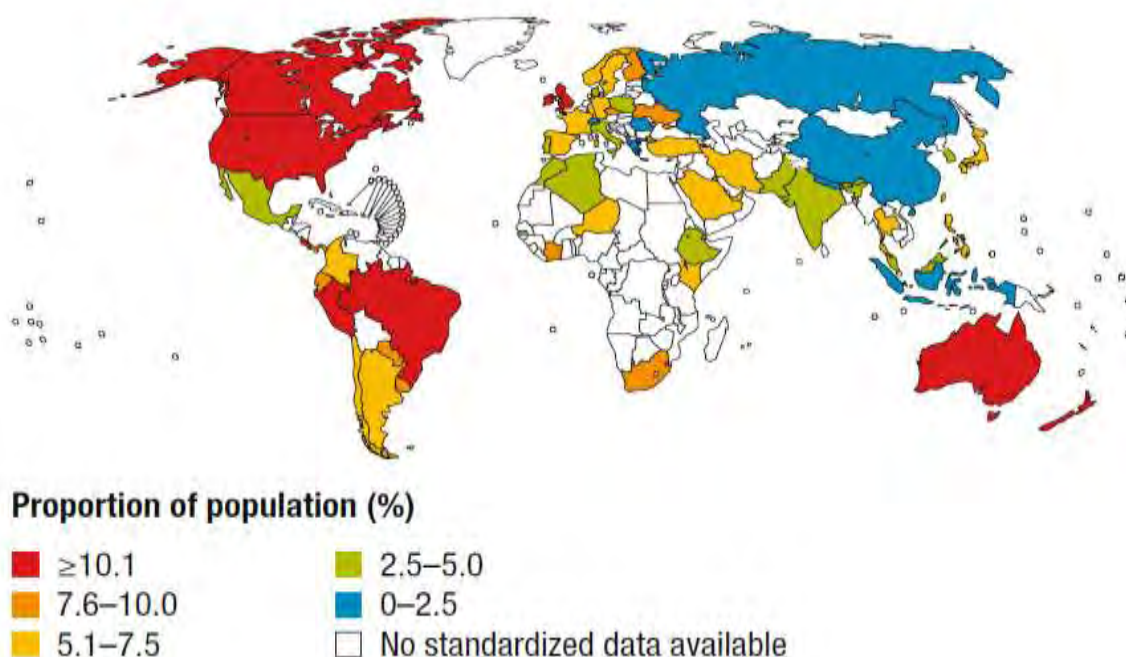
1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Άσθμα-Στατιστικά στοιχεία

Οι χρόνιες παθήσεις του αναπνευστικού (των αεραγωγών και άλλων δομών των πνευμόνων), αντιπροσωπεύουν ένα ευρύ φάσμα σοβαρών ασθενειών. Ορισμένες από αυτές όπως το άσθμα και οι άλλες αλλεργίες του αναπνευστικού, η χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια (ΧΑΠ), το σύνδρομο αποφρακτικής άπνοιας ύπνου (ΣΑΑΥ) και η πνευμονική αρτηριακή υπέρταση αποτελούν σοβαρό πρόβλημα για τη δημόσια υγεία σε όλο τον πλανήτη και κυρίως στις χαμηλού και μέσου εισοδήματος χώρες.

Το άσθμα ορίζεται ως μια χρόνια φλεγμονώδης νόσος των αεραγωγών, στην οποία συμμετέχουν αρκετοί τύποι κυττάρων όπως τα Τ λεμφοκύτταρα, τα ηωσινόφιλα, τα σιτευτικά κύτταρα, τα ουδετερόφιλα και τα επιθηλιακά κύτταρα των αεραγωγών. Η φλεγμονή αυτή προκαλεί αυξημένη υπεραντιδραστικότητα και στένωση των αεραγωγών με αποτέλεσμα την μειωμένη ροή αέρα από και προς τους πνεύμονες. Για το λόγο αυτό παρατηρούνται επανειλημμένα επεισόδια συρίττουσας αναπνοής, δύσπνοιας, συσφιγκτικού αισθήματος στο στήθος και βήχα ιδιαίτερα τις νυχτερινές και τις πρώτες πρωινές ώρες. Τα συμπτώματα αυτά είναι συχνά αναστρέψιμα είτε αυτόματα είτε με την κατάλληλη φαρμακευτική αγωγή (WHO/NHLBI Workshop Report. 1995). Πρόσφατα ο Wenzel (Wenzel 2006) πρότεινε τον προσδιορισμό του άσθματος βάσει τριών φαινοτυπικών χαρακτηριστικών. Τον κλινικό φαινότυπο, ο οποίος δηλώνει την σοβαρότητα της ασθένειας (ήπιο, μέτριο, βαριάς μορφής) και την ηλικία έναρξης της ασθένειας (παιδί, ενήλικας), τον φαινότυπο που προσδιορίζει την αιτία που προκαλεί τα συμπτώματα (επαγόμενο από ασπιρίνη, επαγόμενο από άσκηση, κλπ.) και τον φαινότυπο που προσδιορίζει τον τύπο της φλεγμονής (ηωσινοφιλική, ουδετεροφιλική, κλπ.). Η ποικιλία των διαφόρων φαινοτύπων που προκύπτουν, υποδεικνύουν την ετερογένεια της ασθένειας.

Το άσθμα προσβάλλει τόσο παιδιά όσο και ενήλικες, ο αριθμός των οποίων σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO) υπολογίζεται στα 300.000.000 παγκοσμίως. Η εξάπλωση του άσθματος στον παγκόσμιο πληθυσμό έχει υπολογιστεί από δύο διεθνείς μελέτες, την ISAAC (International Study of Asthma and Allergies in Childhood) σε παιδιά και την ECRHS (European Community Respiratory Health Survey) σε ενήλικες (Εικόνα 1). Η εξάπλωση του άσθματος ποικίλει ανάμεσα στις διάφορες χώρες. Σύμφωνα με την έρευνα GINA, η Σκωτία είναι στην πρώτη θέση με ποσοστό ασθενών 18,4%, ενώ ακολουθούν το Jersey και το Guernsey, δύο ημιαυτόνομα νησιάκια που υπάγονται στη Μ. Βρετανία, με ποσοστά 17,6 και 17,5% αντίστοιχα. Το Macau από την άλλη, μια πρώην πορτογαλική αποικία που πλέον ανήκει στην Κίνα, έχει το μικρότερο ποσοστό ασθενών, μόλις 0,7%. Σύμφωνα με την ίδια έρευνα, στην Ελλάδα το 1,9% του πληθυσμού πάσχει από άσθμα.



Εικόνα 1. Παγκόσμιος χάρτης της εξάπλωσης του άσθματος. Τα μεγαλύτερα ποσοστά παρατηρούνται κυρίως στις Αγγλόφωνες χώρες, ενώ τα μικρότερα στην ασιατική ήπειρο. Για αρκετές χώρες, κυρίως στην Αφρική, δεν υπάρχουν επίσημα στοιχεία. (The global burden of asthma: executive summary of the GINA Dissemination Committee Report, Matthew Masoli, Denise Fabian, Shaun Holt, Richard Beasley, *Allergy* 2004; 59: 469–478)

Τα τελευταία 40 χρόνια παρατηρείται άνοδος των περιπτώσεων άσθματος, ανάλογη με αυτή των αλλεργιών καθώς όλο και περισσότερες κοινωνίες υιοθετούν έναν αστικοποιημένο τρόπο ζωής (Bousquet et al. 2003; Law et al. 2005; Rosado-Pinto & Morais-Almeida 2004). Καθώς αυτή η τάση αυξάνεται, εκτιμάται μια αύξηση 100 εκατομμυρίων ασθενών μέχρι το 2025 (Masoli et al. 2004). Επίσης, η ποιότητα ζωής των ατόμων με άσθμα επηρεάζεται αρνητικά τόσο σε προσωπικό όσο και σε κοινωνικό επίπεδο. Κλινικές έρευνες έδειξαν ότι αποτελεί την πρώτη αιτία απουσίας από το σχολείο και την τέταρτη αιτία απουσίας από την εργασία (Rabe et al. 2000; ERS 2004). Ένα επιπλέον πρόβλημα που προκύπτει είναι και η επιβάρυνση του κρατικού αλλά και του οικογενειακού προϋπολογισμού. Το κόστος της ιατροφαρμακευτικής και της ενδονοσοκομειακής περίθαλψης (άμεσο κόστος) είναι αρκετά μεγάλο, ενώ και η οικογένεια του ασθενούς δαπανά περίπου το 5,5-15% του συνολικού ετήσιου εισοδήματός της για την αντιμετώπιση της ασθένειας (Marion et al. 1985). Το άσθμα θεωρείται υπεύθυνο για 250.000 θανάτους ετησίως με το υψηλότερο ποσοστό θυμάτων στις χώρες με τη χαμηλότερη πρόσβαση στα απαραίτητα φάρμακα (Bousquet & Khaltaev 2007).

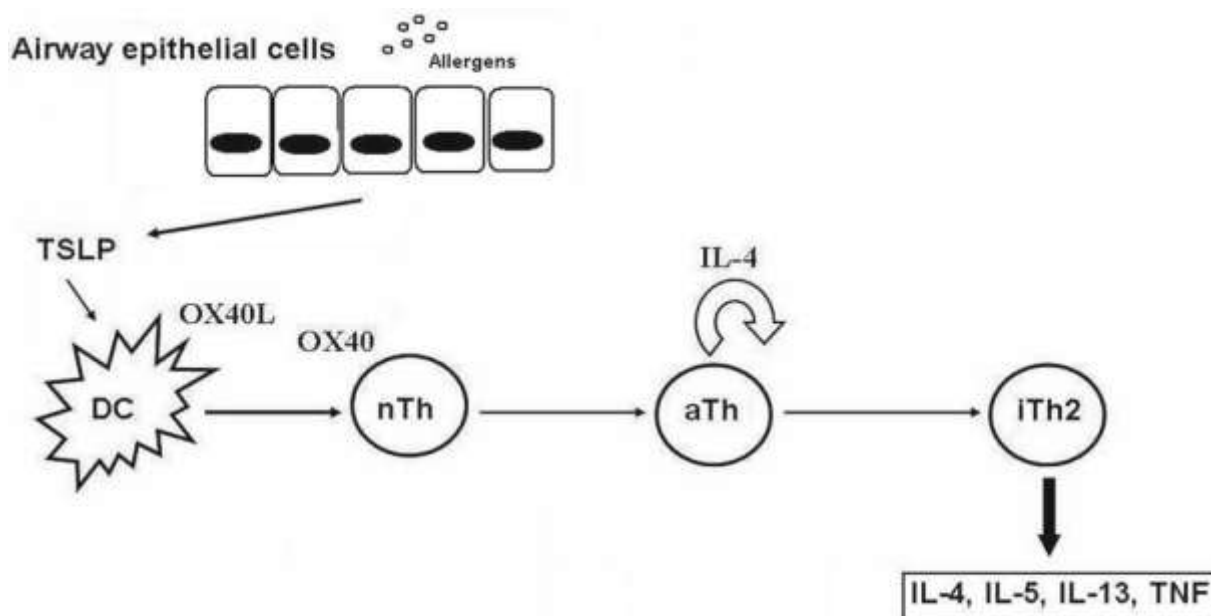
1.2 Ανοσοπαθολογία του άσθματος

Όπως προαναφέραμε, το άσθμα χαρακτηρίζεται από μια κατάσταση χρόνιας φλεγμονής. Η φλεγμονή, υπό φυσιολογικές συνθήκες βελτιστοποιεί την απόκριση του οργανισμού έναντι παθογόνων μικροοργανισμών, διαφόρων τοξινών ενώ επίσης συμβάλλει στην επούλωση και στην επαναφορά του ιστού στην αρχική κατάσταση.

Το επιθήλιο φυσιολογικά, αποτελεί έναν καλά οργανωμένο κι αδιαπέραστο φραγμό, εμποδίζοντας τα εισπνεόμενα αλλεργιογόνα και παθογόνα να εισέλθουν. Τα δενδριτικά κύτταρα (DCs), τα οποία βρίσκονται στο επιθήλιο των αεραγωγών και ελέγχουν για την ύπαρξη αντιγόνων στον αέρα που εισέρχεται στους πνεύμονες, ως αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (APCs), μόλις εντοπίσουν και αλληλεπιδράσουν με κάποιον επίτοπο του αντιγόνου, μεταφέρονται στους λεμφαδένες. Εκεί, παρουσιάζουν το αντιγόνο μέσω των μορίων HLA τύπου II στα T λεμφοκύτταρα, οδηγώντας στην ενεργοποίησή τους και στην έναρξη μιας ανοσολογικής απάντησης. Η αλληλεπίδραση των DCs με το αντιγόνο, γίνεται συνήθως μέσω των υποδοχέων τύπου Toll (TLRs) που διαθέτουν τα δενδριτικά κύτταρα. Αρκετά αλλεργιογόνα, όπως αυτά που προέρχονται από κατσαρίδες ή ακάρεα, περιέχουν τμήματα λιποπολυσακχαρίτη ή πεπτιδογλυκάνης και αναγνωρίζονται από τους TLRs (Tromppete et al. 2009), ενώ άλλα, όπως η γύρη, χάρη στην ενεργότητα πρωτεάσης που διαθέτουν, ενεργοποιούν τα DCs αποκόπτοντας εξωκυτταρικό τμήμα των υποδοχέων PARs (protease activated receptors). Αλλεργιογόνα με ενεργότητα πρωτεάσης διαταράσσουν τη συνοχή του επιθηλίου αφού καταστρέφουν τους στεγανούς συνδέσμους μεταξύ των επιθηλιακών κυττάρων (Wan H et al. 1999). Τα επιθηλιακά κύτταρα διαθέτουν επίσης TLRs, με τους οποίους μπορούν να αλληλεπιδράσουν με διάφορα αλλεργιογόνα και να προχωρήσουν στην παραγωγή κυτταροκινών, με σημαντικότερη την TSLP (Thymic stromal lymphopoietin). Όπως αναφέραμε και προηγουμένως, η διαφοροποίηση των T λεμφοκυττάρων προς τον Th2 υπότυπο, θεωρείται αρκετά σημαντική για την εξέλιξη της ασθένειας. Η κυτταροκίνη TSLP επάγει την έκφραση του OX-40L στην μεμβράνη των DCs. Τα ανώριμα T λεμφοκύτταρα (nTh) αλληλεπιδρούν με το μόριο αυτό μέσω του OX-40 και παράγουν IL-4 που οδηγεί στη μεταστροφή τους προς τον Th2 υπότυπο (Hammad and Lambrecht 2008; Ito et al. 2005; Ziegler and Artis 2010).

Χαρακτηριστικό του άσθματος είναι επίσης και η συγκέντρωση μεγάλου αριθμού φλεγμονωδών κυττάρων στην περιοχή των αεραγωγών. Μια ακόμα κυτταροκίνη που παράγεται από τα επιθηλιακά κύτταρα είναι η GM-CSF (Granulocyte-monocyte colony-stimulating factor), η παραγωγή της οποίας επάγεται από πρωτεολυτικά αλλεργιογόνα, από σωματίδια που προέρχονται από καύση πετρελαίου, από αιωρούμενα σωματίδια κι από

καπνό τσιγάρου (Bleck et al. 2006). Η κυτταροκίνη αυτή ενισχύει σημαντικά την έκφραση προσκολλητικών μορίων (LFA-1, Mac-1) στην επιφάνεια κυττάρων όπως τα ουδετερόφιλα, τα ηωσινόφιλα και τα μονοκύτταρα, διευκολύνοντας την μετάβαση τους στη θέση της φλεγμονής (Buc et al. 2009).



Εικόνα 2. Μόλις τα επιθηλιακά κύτταρα αλληλεπιδράσουν με το αλλεργιογόνο, παράγουν την κυτταροκίνη TSLP, η οποία προκαλεί την έκφραση του OX40L στην επιφάνεια των δενδριτικών κυττάρων (DCs). Τα ανώριμα T λεμφοκύτταρα (nTh) αλληλεπιδρούν με το μόριο αυτό μέσω του OX-40 και παράγουν IL-4 που οδηγεί στη μεταστροφή τους προς τον Th2 υπότυπο (aTh). Μετά τη ωρίμασή τους (iTh2) προχωρούν στην παραγωγή των κυτταροκινών IL-4, IL-5, IL-13 και TNF-α. (Buc M, Dzurilla M, Vrlík M, Bucova M. Immunopathogenesis of bronchial asthma. Arch Immunol Ther Exp, 2009, 57, 331–344)

Τα Th2 έχουν πλέον ωριμάσει (iTh2) και προχωρούν στη σύνθεση IL-4, IL-5, IL-13 και TNF-α. Η διαδικασία αυτή ενισχύεται από την IL-25 η οποία παράγεται από επιθηλιακά κύτταρα, βασεόφιλα και ηωσινόφιλα, προάγοντας επίσης την αύξηση του αριθμού των Th2 και την περαιτέρω παραγωγή IL-5 (Wang et al. 2007). Οι κυτταροκίνες των Th2 λεμφοκυττάρων πυροδοτούν την ενεργοποίηση και την ωρίμαση των B λεμφοκυττάρων (IL-4 κυρίως) και διεγείρουν την ανάπτυξη σιτευτικών κυττάρων και ηωσινόφιλων. Τα B λεμφοκύτταρα παίζουν σημαντικό ρόλο στο άσθμα λόγω των IgE αντισωμάτων που παράγουν. Τα συγκεκριμένα αντισώματα συνδεδεμένα με τους FcεRI υποδοχείς (υψηλής συγγένειας) της μεμβράνης των σιτευτικών κυττάρων, οδηγούν στην ενεργοποίησή τους με αποτέλεσμα την απελευθέρωση ισταμίνης, τρυπτάσης και άλλων πρωτεασών, ηπαρίνης, κυτταροκινών αλλά και νεοσυντιθέμενων εικοσανοειδών (LTC₄, LTD₄, LTE₄, PG₂ και TXA₂). Αυτοί οι διαμεσολαβητές μπορούν να προκαλέσουν σύσπαση των λείων μυών, αύξηση της

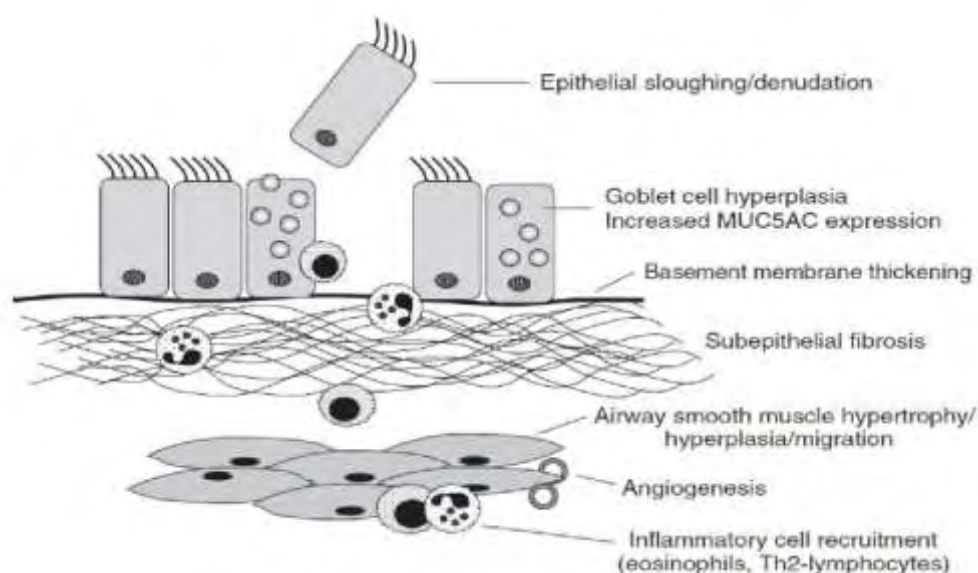
διαπερατότητας των μικροαγγείων, υπερευαισθησία, ενώ συμβάλλουν και στην επαναδιαμόρφωση των αεραγωγών (Page et al. 2001; Tam & Caughey 1990; Clark et al. 1995; Hauck et al. 1999; Buc et al. 2009). Με τον ίδιο τρόπο ενεργοποιούνται και τα βασεόφιλα, καθώς διαθέτουν τους συγκεκριμένους υποδοχείς (FcεRI) (Min 2008; Min & Paul 2008). Εκτός από την ισταμίνη και τους λιπιδικούς διαμεσολαβητές, τα βασεόφιλα παράγουν επίσης κυτταροκίνες όπως η IL-4, η IL-13 και η IL-25 αμέσως μετά την επαφή με το αλλεργιογόνο, ενισχύοντας τον Th2 υπότυπο (Wang et al. 2007).

Η IL-5 προωθεί τη διαφοροποίηση και την ενεργοποίηση των ηωσινόφιλων, των κυττάρων με το σημαντικότερο ρόλο στην ανάπτυξη του άσθματος, από τα πρόδρομα CD34⁺ που βρίσκονται στο μυελό των οστών (Campbell et al. 1987; Rådinger et al. 2006; Rådinger et al. 2007). Μετά την ενεργοποίηση τους μεταναστεύουν στους πνεύμονες βάσει χημειοτακτικών παραγόντων όπως η χημειοκίνη CCL11 (εοταξίνη-1) και η CCL24 (εοταξίνη-2), οι οποίες παράγονται από το επιθήλιο των αεραγωγών και η έκφραση τους ενισχύεται από την IL-13 (Horie et al. 1997; Zimmermann et al. 2003). Τα ηωσινόφιλα παράγουν αρκετές κυτταροκίνες που δρουν ως αυτοκρινείς αυξητικοί παράγοντες (GM-CSF, IL-5), ενώ άλλες έχουν φλεγμονώδη δράση (IL-6, TNF-α). Είναι, επίσης, η κύρια πηγή κατιονικών πρωτεϊνών όπως η μείζονα βασική πρωτεΐνη, η υπεροξειδάση των ηωσινόφιλων (EPO), η νευροτοξίνη των ηωσινόφιλων, καθώς και οξειδωτικών παραγόντων όπως το υπεροξείδιο του υδρογόνου. Ακόμα, παράγουν λευκοτριένια (LTB₄, LTC₄, PGE₂) μεταβολίζοντας το αραχιδονικό οξύ. Η νευροτοξίνη των ηωσινόφιλων δείχθηκε ότι ενεργοποιεί το σηματοδοτικό μονοπάτι TLR2-MyD88 στα δένδριτικά κι έτσι ενισχύει την Th2 ανοσολογική απάντηση (Yang et al. 2008). Τα παράγωγα των ηωσινόφιλων σε συνδυασμό με αυτά των σιτευτικών κυττάρων είναι υπεύθυνα για τις οξείες και χρόνιες φάσεις της φλεγμονής.

Φυσιολογικά, μετά την ολοκλήρωση της έντονης αυτής ανοσοαπόκρισης, το ανοσοποιητικό σύστημα επιστρέφει στην αρχική κατάσταση, επάγοντας την απόπτωση ενός μεγάλου αριθμού κυττάρων που συμμετείχαν στη διαδικασία της φλεγμονώδους αντίδρασης. Στην περίπτωση του άσθματος, οι Th2 κυρίως κυτταροκίνες επάγουν σήματα επιβίωσης, εμποδίζοντας την απόπτωση αυτών των παραγόντων (Spinozzi et al. 2008). Λεμφοκύτταρα από βρογχοκυψελιδικό υγρό (BALF) βρέθηκαν να είναι ανθεκτικά στην απόπτωση, μετά την εισπνοή αλλεργιογόνου, σε αντίθεση με περιφερειακά λεμφοκύτταρα (Muller et al. 2006). Συνέπεια αυτής της παρατεταμένης ενεργοποίησης είναι οι εκτεταμένες βλάβες που παρατηρούνται στους ιστούς των αεραγωγών.

Οι δομικές μεταβολές στους ιστούς των αεραγωγών προκύπτουν ως αποτέλεσμα της χρόνιας φλεγμονής. Η έκθεση σε ένα περιβάλλον, αποτελούμενο από μια πληθώρα

οξειδωτικών παραγόντων, κυτταροκινών και χημειοκινών επιφέρει σημαντικές αλλαγές στη δομή των αεραγωγών όπως αυξημένη μάζα των λείων μυών, υπερτροφία των βλεννογόνων αδένων και αγγειογένεση, προκαλώντας διόγκωση των τοιχωμάτων των αεραγωγών και μείωση της διαμέτρου τους (Saetta et al. 1991; Kuwano et al. 1993; Carroll et al. 1993; Carroll et al. 1996; Carrol et al. 1997).



Εικόνα 3. Ως αποτέλεσμα της χρόνιας φλεγμονής παρατηρούνται κάποιες δομικές μεταβολές στους αεραγωγούς των ασθματικών. Ο τραυματισμός του επιθηλίου από κάποια αλλεργιογόνα, διαταράσσει τη συνοχή του, με αποτέλεσμα, εκτός από την παραγωγή διαφόρων κυτταροκινών και χημειοκινών που προσελκύουν φλεγμονώδη κύτταρα (ηωσινόφιλα, Th2 λεμφοκύτταρα) στην περιοχή των αεραγωγών, παράγει και ορισμένους αυξητικούς παράγοντες όπως τον TGF (Transforming Growth Factor), τον EGF (Epidermal Growth Factor) και τον VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), οι οποίοι προωθούν την επαναδιαμόρφωση των αεραγωγών. Στη διαδικασία αυτή συμβάλλουν και ορισμένες κυτταροκίνες των Th2 λεμφοκυττάρων όπως η IL-13 και VEGF (παράγεται και από λεμφοκύτταρα). Η επαναδιαμόρφωση (remodeling) των αεραγωγών περιλαμβάνει υπερπλασία των καλυκοειδών κυττάρων που οδηγεί σε υπερέκκριση βλέννης (MUC5AC), υποεπιθηλιακή ίνωση που προκαλείται από εναπόθεση κολλαγόνου στην βασική μεμβράνη, υπερτροφία και υπερπλασία των λείων μυών και αγγειογένεση. (Mechanisms of airway remodeling in asthma, Etsuko Taagaya and Jun Tamaoki, *Allergology International*. 2007;56:331-340).

Τα χαρακτηριστικά αυτά πιθανόν ευθύνονται για την αύξηση της αντίστασης των αεραγωγών, περιορίζοντας τον όγκο του αέρα που εισέρχεται κι εξέρχεται από τους πνεύμονες. Σε αυτό επίσης συμβάλλουν και η αυξημένη ποσότητα βλέννης όπως και η παρουσία εξοιδήματος πλάσματος που όχι μόνο παρεμποδίζουν τη ροή του αέρα αλλά επιπλέον προκαλούν μια επιφανειακή τάση για σύσπαση των αεραγωγών (Saetta & Turato 2001). Η υπερέκκριση βλέννης που παρατηρείται δεν οφείλεται μόνο στη υπερτροφία των

βλεννογόνων αδένων αλλά και στην υπερπλασία των καλυκοειδών κυττάρων (goblet cells), τα οποία βρίσκονται στο επιθήλιο (Shimura et al. 1996). Στη διαδικασία της στένωσης των αεραγωγών επίσης συμβάλλει και η πάχυνση της δικτυωτής βασικής μεμβράνης (reticular basement membrane) που προκαλείται από εναπόθεση κολλαγόνου και καλείται υποεπιθηλιακή ίνωση (Roche et al. 1989).

Ανακεφαλαιώνοντας, στην περίπτωση του άσθματος, η ηωσινοφιλική φλεγμονώδης αντίδραση προκαλείται από κάποιο αλλεργιογόνο, μη παθογόνο συνήθως, το οποίο πυροδοτεί μια ακολουθία γεγονότων που έχουν σαν αποτέλεσμα την αύξηση των επιπέδων των κυτταροκινών, των χημειοκινών, των IgE αντισωμάτων, των ηωσινόφιλων και άλλων φλεγμονωδών κυττάρων, υπερέκκριση βλέννης, όπως και αυξημένη ευαισθησία και υπεραντιδραστικότητα των αεραγωγών. Ως αποτέλεσμα της χρόνιας φλεγμονής, παρατηρούνται δομικές μεταβολές στους ιστούς των αεραγωγών (remodeling), όπως η υπερτροφία των λείων μυών, η υπερπλασία των καλυκοειδών κυττάρων του επιθηλίου και η απόθεση κολλαγόνου στην υποεπιθηλιακή μεμβράνη που οδηγούν στη στένωση των αεραγωγών. Αρκετά σημαντικός παράγοντας για την ανάπτυξη της ασθένειας φαίνεται να είναι η επικράτηση των Th2 λεμφοκυττάρων κατά την ανοσοαπόκριση, η οποία δημιουργεί συνθήκες οξειδωτικού στρες στους αεραγωγούς προκαλώντας φλεγμονή που μπορεί να οδηγήσει σε άσθμα (Buc et al. 2009; Nakagome and Nagata 2011). Εξίσου σημαντικός φαίνεται να είναι και ο ρόλος των επιθηλιακών κυττάρων, τόσο στη φλεγμονή όσο και στην επαναδιαμόρφωση (Malavia et al. 2009; Holgate 2011).

1.3 Παράγοντες που προκαλούν άσθμα

Οι παράγοντες που προκαλούν άσθμα χωρίζονται σε δύο κατηγορίες, τους περιβαλλοντικούς και τους παράγοντες προδιάθεσης.

1.3.1 Περιβαλλοντικοί παράγοντες

Οι περιβαλλοντικοί παράγοντες ευθύνονται για την πρόκληση ήπιων ή σοβαρών ασθματικών παροξυσμών, δηλαδή επιδεινώνουν ένα προϋπάρχον άσθμα ή διατηρούν τα συμπτώματα για μεγάλο χρονικό διάστημα. Οι περιβαλλοντικοί παράγοντες διακρίνονται σε δύο κατηγορίες: τα ειδικά ερεθίσματα (αλλεργιογόνα) και τα μη-ειδικά ερεθίσματα (εκλυτικοί ή ερεθιστικοί παράγοντες).

Τα πιο κοινά αλλεργιογόνα είναι:

- τα ακάρεα της οικιακής σκόνης, οι κατσαρίδες, οι γάτες, και άλλα κατοικίδια, η γύρη και διάφοροι μύκητες
- τα τροφικά αλλεργιογόνα (αβγό, γάλα, ξηροί καρποί κ.α.)
- τα επαγγελματικά αλλεργιογόνα στα οποία εκτίθενται εργαζόμενοι, κυρίως φυτικής και ζωικής προέλευσης (τρίχες, κύτταρα της επιδερμίδας, εκκρίματα)

Οι εκλυτικοί ή ερεθιστικοί παράγοντες είναι οι εξής:

- τα ακάρεα της οικιακής σκόνης, οι κατσαρίδες, οι γάτες, και άλλα κατοικίδια, η γύρη και διάφοροι μύκητες
- εισπνεόμενες χημικές ουσίες όπως τα οξείδια του αζώτου, το διοξείδιο του θείου, το όζον και η έκθεση σε αυξημένη ατμοσφαιρική ρύπανση
- ο καπνός του τσιγάρου
- οι αναπνευστικές λοιμώξεις κυρίως από ιούς
- η άσκηση
- οι ακραίες καιρικές συνθήκες, όπως έντονη υγρασία, και οι απότομες αλλαγές στη θερμοκρασία
- οι τροφές (προσθετικά, συντηρητικά, χρωστικές)
- τα φάρμακα, όπως ασπιρίνη, μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη, β-αδρενεργικοί ανταγωνιστές
- επαγγελματικές ερεθιστικές ουσίες (ανόργανες και οργανικές χημικές ουσίες)
- η συναισθηματική φόρτιση, όπως υπεραερισμός λόγω έντονου γέλιου, κλάματος, θυμού, φόβου, άγχους μπορεί να προκαλέσει επιδείνωση του άσθματος

1.3.2 Παράγοντες προδιάθεσης

Οι παράγοντες προδιάθεσης είναι οι παράγοντες οι οποίοι προδιαθέτουν ένα άτομο να αναπτύξει την ασθένεια, και χωρίζονται σε περιβαλλοντικούς και γενετικούς προδιαθεσιακούς παράγοντες.

➤ *Περιβαλλοντικοί παράγοντες προδιάθεσης*

Οι περιβαλλοντικοί προδιαθεσιακοί παράγοντες επηρεάζουν την ανάπτυξη άσθματος κυρίως σε συνδυασμό με γενετικούς παράγοντες. Για παράδειγμα, η γενετική προδιάθεση και η ευαισθητοποίηση σε κάποιον εξωγενή προδιαθεσιακό παράγοντα κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης, μπορεί να οδηγήσουν στη γέννηση παιδιού με αλλεργία και άσθμα. Τέτοιοι παράγοντες είναι τα ενδοοικιακά αλλεργιογόνα, το κάπνισμα της μητέρας, το οποίο φαίνεται να αυξάνει τον κίνδυνο εκδήλωσης άσθματος στο παιδί (Ehrlich et al. 1996, Jaakkola & Gissler 2004), η διατροφή και η λήψη φαρμάκων από τις εγκύους.

➤ *Γενετικοί παράγοντες*

Σε αντίθεση με τους περιβαλλοντικούς παράγοντες, οι γενετικοί είναι περισσότερο πολύπλοκοι και αρκετά δυσκολότεροι ο προσδιορισμός τους. Μελέτες συσχέτισης στο γενικό πληθυσμό αλλά και μελέτες σύνδεσης βασισμένες στο γενεαλογικό δέντρο των ασθενών έχουν δείξει ότι το άσθμα είναι μια αρκετά πολύπλοκη περίπτωση, με κληρονομικότητα από 36% - 79% (Beasley 2002), η οποία παρουσιάζει γενετική και φαινοτυπική ετερογένεια. Το άσθμα είναι μια πολυπαραγοντική ασθένεια και για το λόγο αυτό δεν υπακούει στην μεντελική κληρονομικότητα. Η ύπαρξη ενός αριθμού ελαττωματικών γονιδίων σε συνδυασμό με περιβαλλοντικούς παράγοντες, αποτελεί τη γενετική βάση για την εμφάνιση της ασθένειας.

Σε μονοζυγωτικούς και διζυγωτικούς διδύμους, οι οποίοι εξετάστηκαν για ορισμένα χαρακτηριστικά της ασθένειας όπως συμπτώματα άσθματος, επίπεδα ολικής IgE και ευαισθησία σε δερματικά τεστ, βρέθηκε σημαντική κληρονομική συνεισφορά (Sandford et al. 1996), ενώ σύμφωνα με άλλες μελέτες φαίνεται να υπάρχει αυξημένο ρίσκο για την ανάπτυξη αλλεργίας και άσθματος όταν υπάρχει προσβεβλημένη μητέρα (Magnusson 1988; Åberg 1993; Kuehr et al. 1993; Sears et al. 1996; Raby et al. 2007)

Ορισμένα βασικά χαρακτηριστικά της ασθένειας όπως η μεγάλη παραγωγή IgE μετά την επαφή με κάποιο αλλεργιογόνο (ατοπία), η βρογχική υπεραντιδραστικότητα και η επαναδιαμόρφωση των αεραγωγών, σχετίζονται με κάποια γονίδια (Howard et al. 2003, Kumar & Ghosh 2009). Οι χρωμοσωμικές περιοχές που φαίνεται να συνδέονται με το άσθμα είναι οι 1p, 2q, 4q, 5q, 6p, 11q, 12q, 13q, 14q, 16q, 17q, 19q και 21q.

Η περιοχή 5q31-q33 είναι αρκετά σημαντική λόγω της ύπαρξης γονιδίων, τα προϊόντα των οποίων σχετίζονται άμεσα με την παθογένεια του άσθματος. Αρκετές μελέτες

έχουν συνδέσει την περιοχή αυτή με φαινοτυπικά χαρακτηριστικά της ασθένειας (Noguchi et al. 1997; Martinez et al. 1998; Yokouchi et al. 2000; Shek et al. 2001). Οι ιντερλευκίνες IL-3, IL-4, IL-5, IL-9, IL-12b και IL-13 εμπλέκονται στη ρύθμιση της ανοσοφαιρίνης IgE και κυττάρων με καίριο ρόλο στη διαδικασία της φλεγμονής όπως τα ηωσινόφιλα, τα βασεόφιλα και τα σιτεντικά. Έχειδειχθεί ότι ένα λειτουργικό SNP στον προαγωγέα του γονιδίου της IL-4 (*IL4*) και του υποδοχέα της (*IL4RA*) που βρίσκεται στη χρωμοσωμική περιοχή 16p12.1, συνδέεται με το άσθμα (Beghe et al. 2003).

Η περιοχή 6p21 είναι επίσης μεγάλης σημασίας αφού εκεί εδράζεται το μείζον σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας από το οποίο προκύπτουν τα απαραίτητα για την παρουσίαση των αντιγόνων, HLA μόρια. Τα γονίδια για τα οποία υπάρχουν ενδείξεις είναι το HLA-DRB1 (*HLA-DRB1*), το TNF-α (*TNFA*) και αυτό της λεμφοτοξίνης-α (*LTA*). Ο Moffatt et al. παρατήρησε μια σχέση ανάμεσα στην ατοπία, την λειτουργία των πνευμόνων και του *HLA-DR* σε γηγενής Αυστραλούς (Moffatt et al. 2003). Μια μετάπτωση G → A στον προαγωγέα του *TNFA* στη θέση -308 εμπλέκει τον παράγοντα αυτό με το άσθμα (Di Somma et al. 2003). Στο χρωμόσωμα 11 επίσης και συγκεκριμένα στην περιοχή 11q13 βρίσκεται το γονίδιο της β αλυσίδας του υποδοχέα υψηλής συγγένειας (*FCER1B*) της ανοσοσφαιρίνης IgE. Το τμήμα αυτό του υποδοχέα είναι απαραίτητο για τη μετάδοση του σήματος μετά την πρόσδεση της IgE. Πολυμορφισμοί στο γονίδιο αυτό έχουν συσχετισθεί με το άσθμα (Blumenthal et al. 2002).

Στην περιοχή 12q βρίσκεται το γονίδιο ενός ενεργοποιητή της μεταγραφής, του STAT6 (*STAT6*), ο ρόλος του οποίου είναι να ρυθμίζει την έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα GATA3. Ο GATA3 είναι απαραίτητος για τη διαφοροποίηση των ανώριμων T λεμφοκυττάρων προς τον Th2 υπότυπο. Ο STAT6 ενεργοποιείται ύστερα από την πρόσδεση της IL-4 στον υποδοχέα της (Barnes 2008). Αλληλόμορφα του γονιδίου αυτού φαίνεται να συνδέονται με το άσθμα, με αλλεργικές ασθένειες και με την ολική IgE ορού (Gao et al. 2000; Tamura et al. 2003).

Ακόμα, για τη χρωμοσωμική περιοχή 17q21, ο Moffatt et al. βρήκε 317.000 SNPs τα οποία συνδέονται με το άσθμα, μετά από μελέτη σε 994 παιδιά με άσθμα και 1243 φυσιολογικά (Moffatt et al. 2007). Ένα σημαντικό, ως αναφορά το άσθμα, γονίδιο στην περιοχή αυτή είναι το *SCYA11*, το γονίδιο της εοταξίνης-1 (*CCL11*), σημαντικού χημειοτακτικού παράγοντα για την προσέλκυση κυττάρων, όπως τα ηωσινόφιλα, στη θέση της φλεγμονής. SNPs στον προαγωγέα αυτού του γονιδίου εμπλέκονται στο άσθμα (Shin et al. 2004).

Ένα ακόμη γονίδιο είναι το *ADAM33*. Το *ADAM33* βρίσκεται στο χρωμόσωμα 20 και κωδικοποιεί την πρωτεΐνη ADAM33 (A Disintegrin And Metalloproteinase), μέλος της

οικογένειας των συνδεδεμένων με ψευδάργυρο μεταλλοπρωτεΐναισών (Van Eerdewegh et al. 2002). Υψηλά επίπεδα έκφρασης παρατηρήθηκαν στους λείους μύες και στους ινοβλάστες ασθενών, όπως και στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα (BALF) (Lee et al. 2006). Υπάρχουν ενδείξεις ότι η ADAM33 σχετίζεται με τη βρογχική υπεραντιδραστικότητα και με τη μειωμένη λειτουργία των πνευμόνων (Shapiro & Owen 2002), όπως και με την επαναδιαμόρφωση (remodeling) και τις δομικές μεταβολές που επιφέρει το άσθμα.

Το οξείδιο του αζώτου (NO) χρησιμοποιείται από τις μη-αδρενεργικές μη-χολινεργικές ίνες (NANC) και θεωρείται απαραίτητο για τη διαδικασία της βρογχοδιαστολής. Γενετική ανάλυση στο γονίδιο της *συνθετάσης του NO* των νευρώνων, που συνθέτει NO από αργινίνη, αποκάλυψε ότι πολυμορφισμοί στο συγκεκριμένο γονίδιο αυξάνουν τις πιθανότητες προσβολής του ατόμου από την ασθένεια (Grasemann et al. 1999; Gao et al. 2000; Holla et al. 2004). Ασθματικοί με αυτές τις μεταλλάξεις βρέθηκε ότι έχουν χαμηλότερες συγκεντρώσεις NO στον αέρα που εκπνέουν (Wechsler et al. 2000).

1.4 Ο ρόλος του μιτοχονδρίου σε ασθένειες και στο άσθμα-οξειδάση του κυτοχρώματος c (Complex IV)

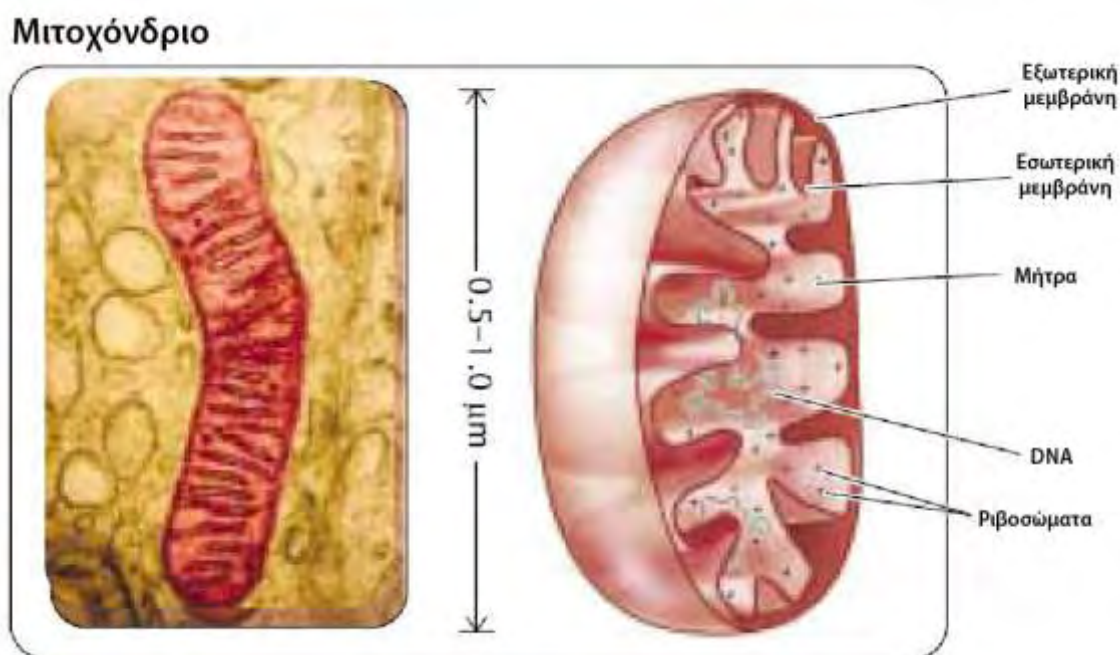
Τα μιτοχόνδρια είναι τα οργανίδια στα οποία συμβαίνουν κάποια από τα σημαντικότερα μεταβολικά μονοπάτια όπως ο κύκλος του τρικαρβοξυλικού οξέος (TCA), η β-οξειδωση των λιπιδίων και η οξειδωτική φωσφορυλίωση (OXPHOS) κατά την οποία παράγεται η μεγαλύτερη ποσότητα ATP του κυττάρου. Συμμετέχουν ακόμα σε αποπτωτικά μονοπάτια και στη ρύθμιση της ομοιόστασης του ενδοκυτταρικού ασβεστίου. Δυσλειτουργία του μιτοχονδρίου έχει συσχετιστεί με αρκετές ασθένειες. Οι μιτοχονδριακές ασθένειες χαρακτηρίζονται από ελαττωματική λειτουργία της αναπνευστικής αλυσίδας με διεισδυτικότητα 1 στις 5000 (Schaefer et al. 2008). Είναι ετερογενείς ασθένειες κι επηρεάζουν διάφορα όργανα με υψηλές κυρίως ενεργειακές απαιτήσεις όπως οι μύες κι ο εγκέφαλος. Τα μιτοχόνδρια έχουν το δικό τους DNA, το οποίο κωδικοποιεί περίπου το 1% των συνολικών μιτοχονδριακών πρωτεϊνών, για αυτό και η βιογένεση των μιτοχονδρίων απαιτεί συνεργασία ανάμεσα στο πυρηνικό και το μιτοχονδριακό γονιδίωμα. Εξαιτίας αυτού του γεγονότος, οι μιτοχονδριακές ασθένειες προκαλούνται τόσο από μεταλλάξεις σε μιτοχονδριακά γονίδια, όσο κι από μεταλλάξεις σε γονίδια του πυρηνικού DNA που κωδικοποιούν είτε υπομονάδες της αναπνευστικής αλυσίδας, είτε πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην επικοινωνία μεταξύ πυρήνα και μιτοχονδρίου (DiMauro and Schon 2008).

Σχετικά με το άσθμα, τα μιτοχόνδρια φαίνεται να συγκεντρώνουν μεγάλο ενδιαφέρον λόγω της σύνδεσης της παθογένειας του άσθματος με το οξειδωτικό στρες αλλά και με τις ανωμαλίες που παρατηρούνται στην απόπτωση σημαντικών παραγόντων για την εξέλιξη της ασθένειας, όπως τα επιθηλιακά κύτταρα και τα ηωσινόφιλα. Επιπλέον, ο ρόλος τους στον έλεγχο της ομοιόστασης του ασβεστίου, το οποία συμμετέχει σε μονοπάτια βιογένεσης αλλά και οξειδωτικού στρες (Peng and Jou 2010), και το μητρικό πρότυπο κληρονόμησης, ενισχύουν την πιθανότητα της εμπλοκής των μιτοχονδρίων στην έναρξη και την εξέλιξη του άσθματος.

1.4.1 Δομή και λειτουργία του μιτοχονδρίου

Ο βιολογικός προορισμός του οξυγόνου που εισέρχεται στον οργανισμό μέσω της αναπνοής είναι τα μιτοχόνδρια, τα κυτταρικά θεμελιώδη οργανίδια που βρίσκονται σχεδόν σε όλα τα κύτταρα των θηλαστικών. Τα μιτοχόνδρια, σύμφωνα με την ενδοσυμβιωτική θεωρία, προήλθαν πριν από 1 – 1.5 δισεκατομμύριο χρόνια, ύστερα από την ενδοκυττάρωση ενός αερόβιου ευβακτηρίου (α-πρωτεοβακτηρίου) από ένα αναερόβιο ευκαρυωτικό κύτταρο.

Ένα μιτοχόνδριο έχει σωληνόμορφο σχήμα με μήκος περίπου 2μm και διάμετρο 0,5-1μm. Διαθέτει μια λεία και χωρίς αναδιπλώσεις εξωτερική μεμβράνη και μια εσωτερική μεμβράνη με πολυάριθμες πτυχώσεις ή ακρολοφίες (cristae). Οι δύο μεμβράνες διαχωρίζουν το μιτοχόνδριο σε δύο διακριτά διαμερίσματα. Το διαμεμβρανικό χώρο, που ορίζεται ως ο χώρος μεταξύ της εξωτερικής και της εσωτερικής μεμβράνης, και τον εσωτερικό χώρο που περικλείεται από την εσωτερική μεμβράνη και ονομάζεται μήτρα, όπου και περιέχονται μικρά κυκλικά δίκλωνα μόρια DNA, RNA και ριβοσώματα προκαρυωτικού τύπου. Η βασική λειτουργία των μιτοχονδρίων είναι να υποστηρίζουν την αερόβια αναπνοή και να εφοδιάζουν με ενεργειακά υποστρώματα (ATP) τα ενδοκυτταρικά μεταβολικά μονοπάτια. Να παρέχουν, ουσιαστικά, την απαραίτητη για τις λειτουργίες του οργανισμού ενέργεια.



Εικόνα 4. Δομή του μιτοχονδρίου (Don Fawcett/Visuals Unlimited)

Η διαδικασία που ακολουθείται στα μιτοχόνδρια για την παραγωγή ATP ονομάζεται οξειδωτική φωσφορυλίωση. Η οξειδωτική φωσφορυλίωση επιτελείται από αναπνευστικά συγκροτήματα που βρίσκονται μέσα στην εσωτερική μεμβράνη, σε αντίθεση με τον κύκλο του κιτρικού οξέος και την πορεία οξείδωσης των λιπαρών οξέων που επιτελούνται στη γειτονική μιτοχονδριακή μήτρα και παράγουν τη μεγαλύτερη ποσότητα NADH και FADH₂.

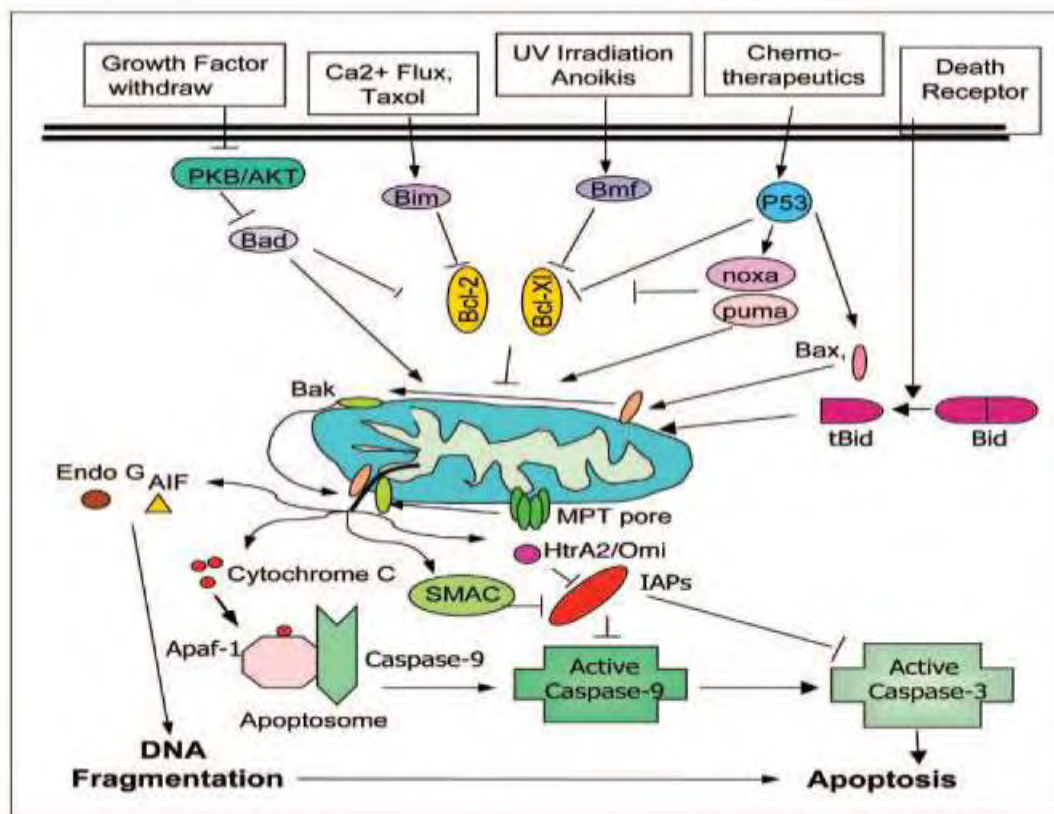
Τα NADH και FADH₂ είναι μόρια πλούσια σε ενέργεια γιατί το κάθε ένα περιέχει ένα ζεύγος ηλεκτρονίων με υψηλό δυναμικό μεταφοράς. Τα ηλεκτρόνια αυτά μεταφέρονται στο Ο μέσω μιας αλυσίδας τριών μεγάλων πρωτεϊνικών συμπλόκων τα οποία ονομάζονται

NADH-αναγωγή, κυτοχρωμική αναγωγή και κυτοχρωμική οξειδάση. Η ηλεκτρονική ροή σε αυτά τα σύμπλοκα, η οποία διαπερνά την ενδότερη μεμβράνη του μιτοχονδρίου, οδηγεί στην άντληση πρωτονίων δια μέσου της μεμβράνης. Οι ομάδες που μεταφέρουν τα ηλεκτρόνια σε αυτά τα ένζυμα είναι φλαβίνες, σύμπλοκα σιδήρου-θείου, αίμη και ιόντα χαλκού. Τα ηλεκτρόνια μεταφέρονται από τη NADH-αναγωγή του συνενζύμου Q (Complex I) στην κυτοχρωμική αναγωγή (Complex III) από την ανηγμένη μορφή της ουβικινόνης, μίας υδρόφοβης κινόνης. Τα ηλεκτρόνια μέσω της ουβικινόνης μεταφέρονται στην κυτοχρωμική αναγωγή κι από εκεί μέσω του κυτοχρώματος c, μιας μικρής πρωτεΐνης, στην κυτοχρωμική οξειδάση (Complex IV). Η κυτοχρωμική οξειδάση χρησιμοποιεί τα ηλεκτρόνια αυτά για την αναγωγή του O_2 σε H_2O . Μια βαθμίδωση των πρωτονίων μεταξύ των δύο πλευρών της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης παράγεται κατά τη διάρκεια της μεταφοράς ηλεκτρονίων. Το pH στη μήτρα του μιτοχονδρίου αυξάνεται όπως και η συγκέντρωση των πρωτονίων στο διαμεμβρανικό χώρο, προκαλώντας τη μεταβολή του δυναμικού της μεμβράνης προς περισσότερο θετικό στην εξωτερική πλευρά. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία μιας πρωτονιοκίνητης δύναμης που ωθεί τα πρωτόνια πίσω στη μήτρα, μέσω του ενζυμικού συμπλόκου συνθετάση του ATP, ενεργοποιώντας την και οδηγώντας την στη σύνθεση ATP από ADP.

Το μιτοχόνδριο παίζει επίσης σημαντικό ρόλο στο σηματοδοτικό μονοπάτι της απόπτωσης. Η απόπτωση περιλαμβάνει την ενεργοποίηση ενός μονοπατιού που οδηγεί στην αυτοκτονία του κυττάρου με μια χαρακτηριστική διαδικασία. Το κύτταρο γίνεται πιο συμπαγές, δημιουργούνται αποπτωτικά κυστίδια, η χρωματίνη συμπυκνώνεται και το DNA κατακερματίζεται. Τα νεκρά κύτταρα διασπώνται σε οριοθετημένα από μεμβράνη θραύσματα και μπορεί να εγκολπωθούν από γειτονικά κύτταρα (φαγοκυττάρωση). Η απόπτωση μπορεί να ενεργοποιηθεί από μια ποικιλία ερεθισμάτων, συμπεριλαμβανομένης της απουσίας απαραίτητων αυξητικών παραγόντων, της ακτινοβολίας γ και της ενεργοποίησης συγκεκριμένων υποδοχέων (Fas από FasL, TNF-R1 από TNF). Η απόπτωση είναι πολύ σημαντική όχι μόνο στην ανάπτυξη των ιστών, αλλά και στην ανοσοποιητική άμυνα, καθώς και στην εξάλειψη των καρκινικών κυττάρων (Jin & El-Deiry 2005).

Τα προαποπτωτικά σήματα ενεργοποιούν κάποιες BH3 πρωτεΐνες, μέλη της Bcl-2 πρωτεϊνικής οικογένειας, και άλλες πρωτεΐνες που με τη σειρά τους επάγουν τον ολιγομερισμό των προαποπτωτικών BH123 πρωτεϊνών, όπως η Bax και η Bak, και την εισαγωγή τους στην εξωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου, όπου δημιουργούν πόρους και αυξάνουν σημαντικά τη διαπερατότητα επιτρέποντας την εκροή αποπτωτικών πρωτεϊνών στο κυτταρόπλασμα. Μια από τις πρωτεΐνες που απελευθερώνονται είναι το κυτόχρωμα c, συστατικό της αναπνευστικής αλυσίδας, το οποίο προσδένεται στην Apaf-1 και τη

διευκολύνει να προσδέσει ATP. Το γεγονός αυτό προκαλεί τον ολιγομερισμό της Araf-1, η οποία αλλάζει τη στερεοδιαμόρφωσή της και εκθέτει την επικράτεια πρόσδεσης κασπάσης όπου προσδένεται η προκασπάση-9. Η ενσωμάτωση της προκασπάσης-9 στο αποπτώσωμα πυροδοτεί την αυτό-ενεργοποιητική τομή της προς κασπάση-9 που στη συνέχεια θα ενεργοποιήσει άλλες σημαντικές κασπάσες όπως την κασπάση-3, την κασπάση-6 και την κασπάση-7 (Zou et al. 1997; Li et al. 1997). Μια ακόμη ομάδα πρωτεϊνών που απελευθερώνονται από το μιτοχόνδριο είναι και οι ανταγωνιστές των IAPs, όπως η Smac/DIABLO, η HtrA2/Omi και η GSPT1/eRF3. Οι πρωτεΐνες της οικογένειας IAPs αποτελούν ίσως τους σημαντικότερους καταστολείς των κασπασών. Οι ανταγωνιστές ελευθερώνονται μαζί με το κυτόχρωμα c και προσδένονται στις IAPs, τις οποίες απενεργοποιούν, δίνοντας ώθηση στην διαδικασία της απόπτωσης (Du et al. 2000; Suzuki et



al. 2001; Hegde et al. 2003).

Εικόνα 5. Ενδογενή αποπτωτικά μονοπάτια. Προ-αποπτωτικές πρωτεΐνες όπως η Bax και η Bak, αφού λάβουν τα κατάλληλα σήματα, ολιγομερίζονται και εισέρχονται στην εξωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου όπου δημιουργούν πόρους, προκαλώντας την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c στο κυτταρόπλασμα. Το κυτόχρωμα c συνδέεται στην πρωτεΐνη Araf-1, διευκολύνοντας την πρόσδεση της προκασπάσης-9, η οποία μετατρέπεται στην ενεργή κασπάση-9 κι ενεργοποιεί τον καταρράκτη των κασπασών που οδηγεί το κύτταρο στην απόπτωση. Εκτός από το κυτόχρωμα c, κι άλλες μιτοχονδριακές πρωτεΐνες, όπως η AIF και η EndoG, συμμετέχουν σε ανεξάρτητα από κασπάσες αποπτωτικά μονοπάτια (Overview of cell death signaling pathways, Zhaoyu Jin, Wafik S. El-Deiry, *Cancer Biology & Therapy* 4:2, 139-163, February 2005).

Τα μιτοχόνδρια επίσης εμπλέκονται και σε αποπτωτικά μονοπάτια ανεξάρτητα κασπασών. Η μιτοχονδριακή πρωτεΐνη AIF ελευθερώνεται στο κυτταρόπλασμα και μεταφέρεται στον πυρήνα, σε απάντηση σε κάποιο αποπτωτικό ερέθισμα όπως ο πνευμονιόκοκκος, η p53, η ακτινοβολία UVB, το H_2O_2 και το N-μέθυλο-ασπαρτικό, προκαλώντας συμπίκνωση της χρωματίνης και κατακερματισμό του DNA. Ακόμη, σε συνεργασία με κάποιον παράγοντα του κυτταροπλάσματος, μπορεί να αυξήσει σημαντικά τη διαπερατότητα της μιτοχονδριακής μεμβράνης, σχηματίζοντας πόρους σε αυτήν. Από αρκετά στοιχεία, η AIF φαίνεται να έχει ουσιαστικό ρόλο στα πρώιμα στάδια της ανάπτυξης των θηλαστικών (Jozsa et al. 2001). Η endoG επίσης απελευθερώνεται από το μιτοχόνδριο στο κυτταρόπλασμα και μεταβαίνει στον πυρήνα όπου και προκαλεί τεμαχισμό του DNA. Η endoG είναι απαραίτητη για αυτή τη διαδικασία, ειδικά στην ανεξάρτητη απο κασπάσες απόπτωση (Li et al. 2001).

Η σωστή λειτουργία τόσο της αναπνευστικής αλυσίδας όσο και της απόπτωσης, είναι μείζονος σημασίας για την φυσιολογική ανάπτυξη ενός οργανισμού. Η πρώτη μέσω της παραγωγής ATP καλύπτει τις ενεργειακές απαιτήσεις, ενώ η δεύτερη ρυθμίζει την απομάκρυνση κυττάρων που έχουν υποστεί ή μπορούν να προκαλέσουν βλάβες. Διαταραχή του μηχανισμού της απόπτωσης οδηγεί σε σοβαρές νευροεκφυλιστικές ασθένειες και σε καρκίνο, ενώ εμπλέκεται και στο άσθμα. Επίσης, δυσλειτουργία οποιουδήποτε εκ των τεσσάρων συμπλόκων της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων (ETC) συνδέεται με διάφορες ασθένειες, με χαρακτηριστικό φαινότυπο την μειωμένη παραγωγή ATP και την αυξημένη παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS). Η οξειδάση του κυτοχρώματος c, το σύμπλοκο το οποίο καταναλώνει το περισσότερο μοριακό οξυγόνο που εισέρχεται στο μιτοχόνδριο, είναι υπεύθυνο για αρκετές ασθένειες, ενώ έχει δειχθεί ότι είναι ευπαθές σε οξειδωτικούς παράγοντες. Ενδεχόμενη απώλεια της λειτουργίας της οδηγεί σε οξειδωτικό στρες και σε απόπτωση (Hong et al. 2002).

1.4.2 Οξειδάση του κυτοχρώματος c

Η οξειδάση του κυτοχρώματος c, το τελευταίο σύμπλοκο της αναπνευστικής αλυσίδας που αντλεί πρωτόνια, είναι αυτό που καταλύει τη μεταφορά των ηλεκτρονίων από το ανηγμένο κυτόχρωμα c προς το μοριακό O_2 , τον τελικό δέκτη. Τέσσερα ηλεκτρόνια διοχετεύονται στο O_2 για να το ανάγουν πλήρως σε H_2O και συγχρόνως αντλούν πρωτόνια από τη μήτρα προς την εξωτερική πλευρά της εσωτερικής μεμβράνης.

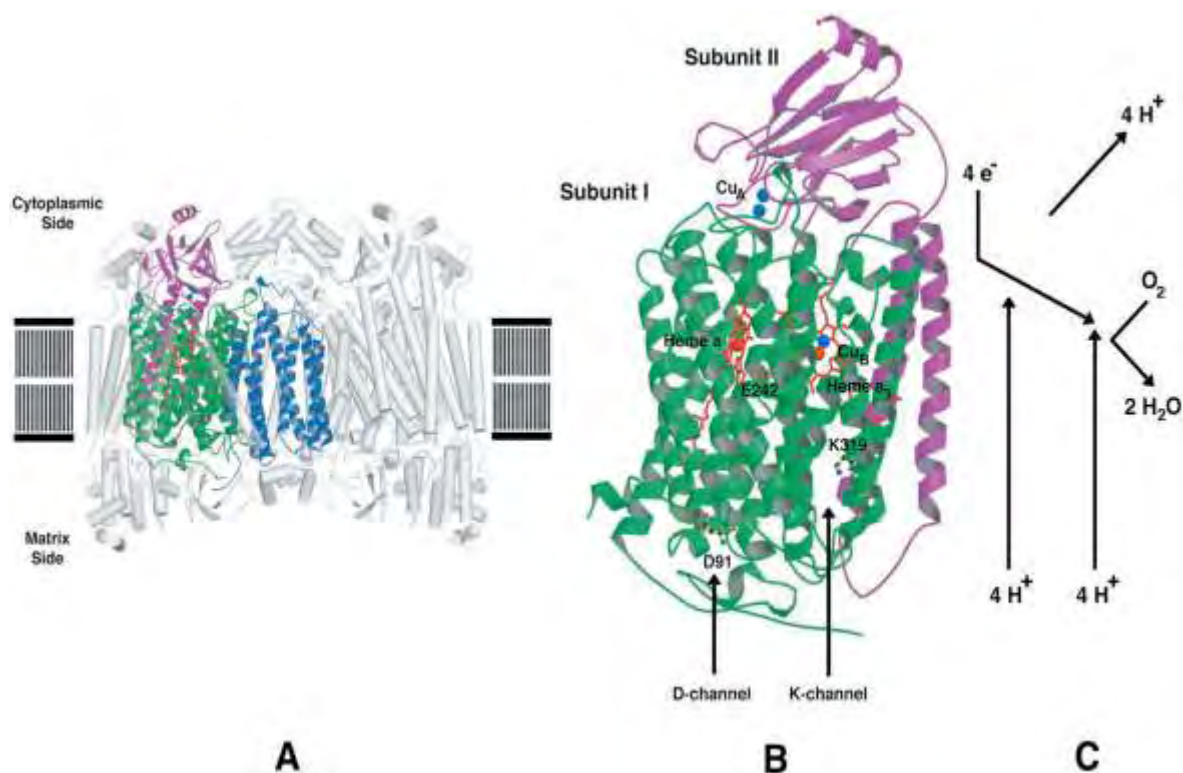
Από τις 13 υπομονάδες αυτού του συμπλόκου (200kDa), οι τρεις κωδικοποιούνται από το μιτοχονδριακό γονιδίωμα (COI, COII, COIII) και είναι αυτές που σχηματίζουν το

λειτουργικό πυρήνα του, ενώ οι υπόλοιπες 10 από το πυρηνικό γονιδίωμα (CO4, CO5a, CO5b, CO6a, CO6b, CO6c, CO7a, CO7b, CO7c και CO8) (Diaz 2010). Η οξειδάση του κυτοχρώματος περιέχει δύο ομάδες αίμης Α και δύο ιόντα χαλκού (Cu). Η αίμη Α διαφέρει από την αίμη του κυτοχρώματος c και c1, στο ότι μια φορμυλομάδα αντικαθιστά μια από τις μεθυλικές ομάδες, και μια υδρογονανθρακική αλυσίδα αντικαθιστά μια από τις βινυλομάδες. Οι αίμες αν και χημικά είναι ισοδύναμες, έχουν διαφορετικές ιδιότητες. Η μια ονομάζεται αίμη α, ενώ η άλλη αίμη α₃ και βρίσκονται στην υπομονάδα Ι. Τα ιόντα χαλκού επίσης διακρίνονται σε δύο είδη, βάσει του τρόπου με τον οποίον συνδέονται με την πρωτεΐνη. Ο Cu_A βρίσκεται στην υπομονάδα ΙΙ, κοντά στην αίμη α, ενώ ο Cu_B βρίσκεται στην υπομονάδα Ι, κοντά στην αίμη α₃. Επίσης, ένα κατιόν ψευδαργύρου (Zn⁺²) εντοπίζεται στην υπομονάδα CO5b, στην πλευρά της μήτρας, ενώ ένα κατιόν μαγνησίου (Mg⁺²) κοντά στο κέντρο Cu_B-α₃, ανάμεσα στις υπομονάδες COI και COII (Tsukihara et al. 1995; Tsukihara et al. 1996).

Η λειτουργία του συμπλόκου ελέγχεται από διάφορους παράγοντες όπως ορμόνες, μεμβρανικά λιπίδια και δευτέρους αγγελιοφόρους, ανάλογα με τις ενεργειακές απαιτήσεις του κυττάρου. Για παράδειγμα, ορμόνες του θυροειδούς προσδένονται στην υπομονάδα CO5a και ρυθμίζουν τη λειτουργία της οξειδάσης του κυτοχρώματος c (Arnold et al. 1998), ενώ η οξειδωμένη καρδιολιπίνη και το οξείδιο του αζώτου (NO) παρεμποδίζουν τη λειτουργία της (Paradies et al. 1997; Brunori et al. 2004). Ακόμα, μπορεί να ελεγχθεί με φωσφορυλίωση διαφόρων υπομονάδων από κινάσες όπως η c-SRC, η cAMP-εξαρτώμενη πρωτεϊνική κινάση, PKCε και PKCδ (Miyazaki et al. 2003; Churchill et al. 2005; Ogbi and Johnson 2006; Acin-Perez et al. 2009), αλλά και με έκφραση ιστοειδικών ισομορφών ορισμένων υπομονάδων πυρηνικής προέλευσης όπως για παράδειγμα, μια πνευμονοειδική μορφή της υπομονάδας CO4 (Huttemann et al. 2001). Για το σχηματισμό του συμπλόκου απαιτείται ένας μεγάλος αριθμός πρωτεϊνών που τελικά δε θα συμμετέχει στην ολοκληρωμένη μορφή της οξειδάσης (30 πυρηνικές πρωτεΐνες στο μύκητα) (Winge and Tzagoloff 2009). Μεταξύ αυτών των πρωτεϊνών, αυτές που έχουν κλινικό ενδιαφέρον λόγω της εμπλοκής τους σε ασθένειες είναι οι CO10, CO15, Surf1, SCO1 και SCO2.

Σε αντίθεση με το κυτόχρωμα bc₁, το οποίο παρουσιάζει μια δυναμική συμπεριφορά, η οξειδάση του κυτοχρώματος κατά τις φάσεις της οξείδωσης, της αναγωγής και της δέσμευσης κάποιου προσδέτη φαίνεται να είναι στατική. Αν και το αναμενόμενο θα ήταν ότι κατά τη φάση της αναγωγής, το ολοένζυμο θα άλλαζε τη διαμόρφωση του ώστε να προκαλέσει την άντληση πρωτονίων, κάτι τέτοιο δε συμβαίνει. Σε μιτοχόνδρια βοοειδούς, παρατηρήθηκε ότι κατά τη φάση αυτή (της αναγωγής), μόνο σε ένα τμήμα της υπομονάδας Ι, στην πλευρά του διαμεμβρανικού χώρου, συνέβαινε μία ελάχιστη μεταβολή στη διαμόρφωση (Saraste 1999). Το τμήμα αυτό δεν είναι αρκετά συντηρημένο ανάμεσα στα μιτοχόνδρια

αλλά και στα βακτήρια, οπότε είναι δύσκολο να κατέχει ουσιαστικό ρόλο στη διαδικασία αυτή. Η άντληση των πρωτονίων τόσο προς το διαμεμβρανικό χώρο όσο και προς την ενεργό περιοχή του συμπλόκου, όπου λαμβάνει χώρα η αναγωγή του οξυγόνου, γίνεται μέσω δύο υδρόφιλων καναλιών. Τα κανάλια καλούνται D και K λόγω ενός συντηρημένου αμινοξέος ασπαρτικού οξέος και λυσίνης, αντίστοιχα. Ένα συντηρημένο επίσης γλουταμικό οξύ (E242), στη μέση περίπου της μεμβράνης στο τέλος του καναλιού D, είναι απαραίτητο για την άντληση πρωτονίων (Saraste 1999). Μελέτες έχουν δείξει ότι και τα δύο κανάλια είναι αναγκαία για την καταλυτική λειτουργία της οξειδάσης του κυτοχρώματος (άντληση πρωτονίων, αναγωγή οξυγόνου) (Saraste 1999).



Εικόνα 6. Οξειδάση του κυτοχρώματος *c*. (A) Δομή της οξειδάσης του κυτοχρώματος *c* βοοειδούς από κρυσταλλογραφία με ακτίνες X. Το σύμπλοκο αποτελείται από 13 υπομονάδες (συνολικό μοριακό βάρος 204 kD). Οι υπομονάδες I (πράσινο), II (μωβ) και III (μπλε) κωδικοποιούνται από το μιτοχονδριακό DNA και σχηματίζουν το λειτουργικό πυρήνα του συμπλόκου. (B) Οι υπομονάδες I και II περιέχουν τα μεταλλικά κέντρα. Η ενεργός περιοχή (α_3/Cu_B) βρίσκεται στην υπομονάδα I. Το κυτόχρωμα *c* προσδένεται στην κυταροπλασματική πλευρά (προς το διαμεμβρανικό χώρο) του συμπλόκου και τα ηλεκτρόνια μεταφέρονται στην ενεργό περιοχή μέσω του α/Cu_A . (C) Η τοπολογία των ηλεκτρονίων και των πρωτονίων που μεταφέρονται στην κυτοχρωμική οξειδάση. Τα πρωτόνια που χρησιμοποιούνται για την αναγωγή του O_2 σε νερό ή αντλούνται στον διαμεμβρανικό χώρο, μεταφέρονται διαμέσου δύο καναλιών (D και K) από τη μήτρα του μιτοχονδρίου (Oxidative Phosphorylation at the fin de siecle, Matti Saraste, *Science* 283, 1488 (1999); DOI: 10.1126/science.283.5407.1488).

Η οξειδάση του κυτοχρώματος c συνδέεται με αρκετές μιτοχονδριακές ασθένειες όπως εγκεφαλοπάθειες, μυοπάθειες, νευρομυϊκές και άλλες ασθένειες, για πολλές από τις οποίες υπεύθυνες είναι μεταλλάξεις και στα τρία γονίδια του mtDNA (COI, COII, COIII). Το αποτέλεσμα αυτών των μεταλλάξεων είναι μείωση της απόδοσης του συμπλόκου και κατ' επέκταση μειωμένη παραγωγή ATP από το μιτοχόνδριο. Σε μελέτη που έγινε σε ποντίκια με πειραματικό αλλεργικό άσθμα, η μείωση στη λειτουργία της οξειδάσης του κυτοχρώματος c, στην παραγωγή ATP και στην έκφραση της υπομονάδας III που παρατηρήθηκε στην περιοχή των πνευμόνων, υποδεικνύει δυσλειτουργία του συμπλόκου κατά τη φάση της ασθένειας (Mabalirajan et al. 2008).

1.4.3 Μιτοχονδριακό γενετικό υλικό (mtDNA)

Το μιτοχονδριακό γενετικό υλικό είναι ένα μικρό, κυκλικό, γυμνό από ιστόνες δίκλωνο μόριο DNA σε μορφή υπερέλικας, το οποίο αποτελείται από 16.569 ζεύγη βάσεων. Το mtDNA δεν περιέχει νουκλεοτιδικές αλληλουχίες μεταξύ των γονιδίων ενώ επίσης χαρακτηριστική είναι η έλλειψη ιντρονίων και ψευδογονιδίων. Κάθε ανθρώπινο κύτταρο περικλείει εκατοντάδες μιτοχόνδρια, καθένα από τα οποία περιέχει από 2 έως 10 αντίγραφα κυκλικού mtDNA. Το μιτοχονδριακό γονιδίωμα περιέχει μόλις 37 γονίδια.

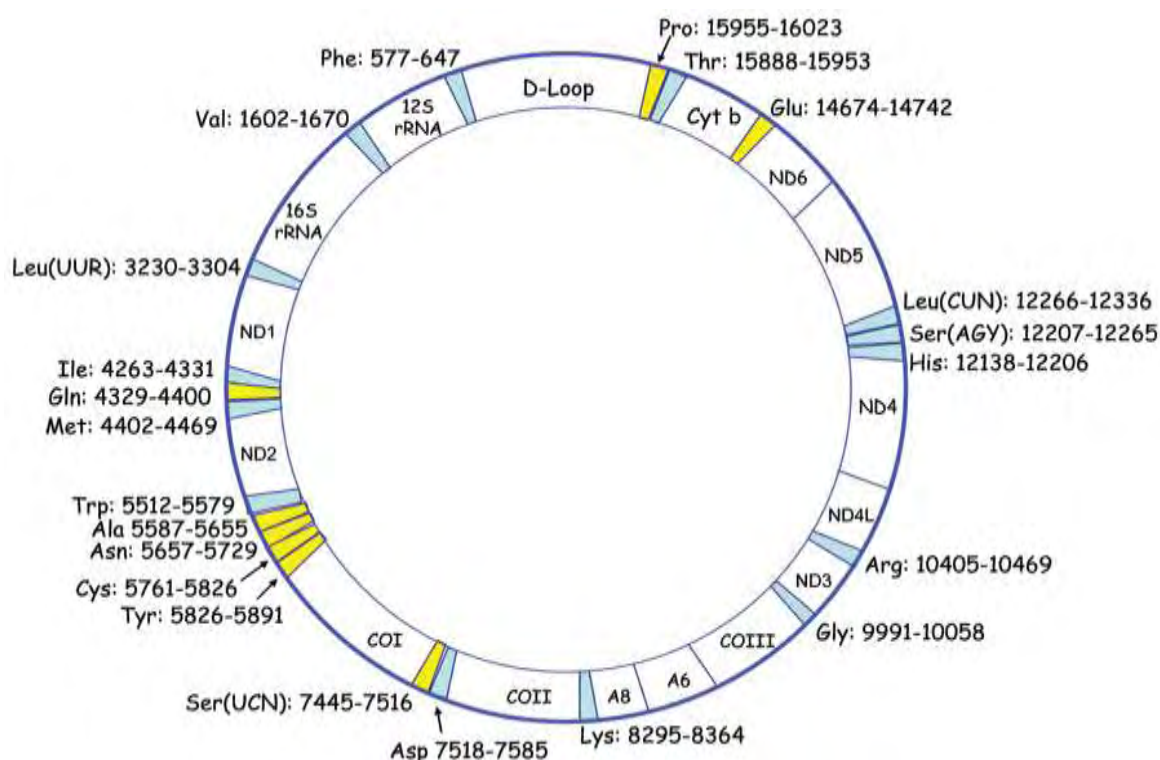
Δεκατρία γονίδια κωδικοποιούν πρωτεΐνες, όλες υπομονάδες της αναπνευστικής αλυσίδας. Αναλυτικά, επτά υπομονάδες του συμπλόκου αφυδρογονάση του NADH (ND1, ND2, ND3, ND4, ND4LN, ND5, ND6), το κυτόχρωμα b, τρεις υπομονάδες του συμπλόκου οξειδάση του κυτοχρώματος c (COI, COII, COIII) και δύο υπομονάδες του τελευταίου συμπλόκου, της ATP-συνθετάσης (ATPse 6, ATPse 8). Οι υπόλοιπες 70 περίπου υπομονάδες αυτών των ολοενζύμων συμπληρώνονται από πρωτεΐνες πυρηνικής προέλευσης (Schon 2000).

Τα υπόλοιπα 24 γονίδια κωδικοποιούν τη μεταφραστική μηχανή του μιτοχονδρίου (12S rRNA, 16S rRNA, 22 tRNAs). Το 12S rRNA μαζί με 29 πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από γονίδια του πυρήνα, σχηματίζουν τη μικρή υπομονάδα του ριβοσώματος (28S), ενώ το 16S rRNA μαζί με 48 πρωτεΐνες πυρηνικής προέλευσης, σχηματίζουν τη μεγάλη υπομονάδα του ριβοσώματος (39S).

Τα 22 tRNAs, τα οποία μεταφέρουν με υψηλή πιστότητα τα διάφορα αμινοξέα στη σχηματιζόμενη πολυπεπτιδική αλυσίδα κατά την πρωτεϊνοσύνθεση από τα μιτοχονδριακά ριβοσώματα, εμφανίζουν αποκλίσεις από τον γνωστό γενετικό κώδικα. Από τα 22 tRNAs, 18 αναγνωρίζουν από ένα αμινοξύ, δύο αναγνωρίζουν σερίνη (tRNA^{Ser(AGY)}, tRNA^{Ser(UCN)}) και

δύο λευκίνη ($\text{tRNA}^{\text{Leu(UUR)}}$, $\text{tRNA}^{\text{Leu(CUN)}}$). Με αυτό τον τρόπο τα tRNA γονίδια σχηματίζουν την ελάχιστη ομάδα μετάφρασης όλων των απαραίτητων κωδικονίων που απαιτούνται στη βιοσύνθεση των 13 πρωτεϊνών.

Οι δύο αλυσίδες του μιτοχondριακού DNA, η βαριά αλυσίδα (Heavy strand) και η ελαφριά αλυσίδα (Light strand), έχουν το δικό τους σημείο έναρξης της αντιγραφής. Το σημείο έναρξης της αντιγραφής για την Η-αλυσίδα (O_H) βρίσκεται εντός της D-loop περιοχής, η οποία είναι μια μη κωδικοποιούσα ρυθμιστική περιοχή, ενώ της L-αλυσίδας (O_L) βρίσκεται σε μια περιοχή πέντε tRNA γονιδίων (ομάδα WANCY), μεταξύ του tRNA γονιδίου για την ασπαράγινη και αυτού για την κυστεΐνη. Η κύρια κωδικοποιούσα αλυσίδα είναι η Η-αλυσίδα και μόνο το ND6 και τα tRNA γονίδια για το γλουταμινικό οξύ, την αλανίνη, την κυστεΐνη, τη σερίνη, το ασπαρτικό οξύ, τη γλουταμίνη και την προλίνη μεταγράφονται από την L-αλυσίδα.



Εικόνα 7. Μιτοχondριακό γονιδίωμα (mtDNA). Κάθε μιτοχόνδριο περιέχει 2-10 αντίγραφα του μικρού, κυκλικού, δίκλωνου DNA των 16.569 bp. Το mtDNA περιέχει 37 γονίδια που κωδικοποιούν 13 πρωτεΐνες, όλες υπομονάδες των συμπλόκων της αναπνευστικής αλυσίδας (το κυτόχρωμα *b* της αναγωγής του κυτοχρώματος *c*, τις ND1, ND2, ND3, ND4, ND4LN, ND5, ND6 της δεϋδρογονάσης του NADH, τις COI, COII, COIII της οξειδάσης του κυτοχρώματος *c*, τις A6 και A8 της ATP-συνθετάσης), 2 rRNAs (12S και 16S) και 22 tRNAs. Τα tRNA που δηλώνονται με κίτρινο μαζί με το γονίδιο ND6, κωδικοποιούνται από την ελαφριά αλυσίδα (Light chain), ενώ όλα τα υπόλοιπα από την βαριά αλυσίδα (Heavy chain) (Mitochondrial tRNA mutations, Emily Zifa, Stamatina Giannouli, Paschalis Theotokis, Costas Stamatis, Zissis Mamuris, Constantinos Stathopoulos, RNA Biology 4:1, 38-66, January/February/March 2007).

Το μιτοχονδριακό DNA παρουσιάζει ένα μητρικό πρότυπο κληρονομής. Κληρονομείται, δηλαδή, από τη μητέρα προς όλους τους απογόνους, αλλά μόνο οι κόρες θα το μεταβιβάσουν στους απογόνους τους. Σε πολύ σπάνιες περιπτώσεις, μπορεί ένας πληθυσμός mtDNA να κληρονομηθεί από τον πατέρα (Reddy and Beal 2005). Ως αναφορά το φαινόμενο του ανασυνδυασμού, θεωρείται από εξαιρετικά σπάνιο έως και απίθανο να συμβαίνει (Inann & Nordborg 2002), αν και ο Thyagarajan (Thyagarajan et al. 1996) βρήκε ότι εκχυλίσματα μιτοχονδρίων από ανθρώπινα κύτταρα περιέχουν ένζυμα που καταλύουν τον ομόλογο ανασυνδυασμό σε πλασμίδια.

Ένα ακόμα χαρακτηριστικό του μιτοχονδριακού γονιδιώματος είναι η υψηλή ευαισθησία του στη δημιουργία αλλαγών και μεταλλάξεων. Ο ρυθμός μεταλλαξιγένεσης του mtDNA είναι 10 με 17 φορές υψηλότερος συγκριτικά με αυτόν του πυρηνικού DNA (Allen et al. 1996; Pesole et al. 1999). Το γεγονός αυτό είναι πιθανό να οφείλεται στο ότι το mtDNA βρίσκεται κοντά στην εσωτερική μεμβράνη κι έτσι εκτίθεται στις δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) που παράγονται κατά την οξειδωτική φωσφορυλίωση (Allen et al. 1996). Η απουσία ιστονών, οι οποίες παρέχουν προστασία στο μόριο μέσω της αναδίπλωσης του, καθιστώντας εξαιρετικά δύσκολη την πρόσβαση σε μεταλλαξιγόνα είναι επίσης ένας λόγος, όπως και η έλλειψη επαρκών μηχανισμών επιδιόρθωσης. Η δημιουργία και η συσσώρευση μεταλλάξεων προκαλεί ελαττωματική λειτουργία της αναπνευστικής αλυσίδας αλλά και του μηχανισμού της απόπτωσης.

1.4.4 Μιτοχόνδριο και Ασθένειες

Ένα ευρύ φάσμα ασθενειών που προσβάλουν το Κεντρικό Νευρικό Σύστημα, την καρδιά, τους μύες, το ενδοκρινικό, τους νεφρούς και το ήπαρ συνδέεται με μεταλλάξεις στο μιτοχονδριακό DNA. Οι μεταλλάξεις αυτές μπορεί να είναι είτε απλές αντικαταστάσεις βάσεων είτε, σπανιότερα, προσθήκες ή αφαιρέσεις ολόκληρων τμημάτων DNA. Ορισμένες εκ των μεταλλάξεων οδηγούν σε ασθένεια ενώ άλλες όχι. Οι παθογόνες μεταλλάξεις επηρεάζουν συντηρημένα κατά την εξέλιξη νουκλεοτίδια, ενώ οι λεγόμενες πολυμορφικές είναι ουδέτερες μεταλλάξεις, δεν εμφανίζουν δηλαδή κάποιο φαινότυπο (Ingman et al. 2000).

Από το 1988, όταν για πρώτη φορά βρέθηκαν και συσχετίστηκαν μιτοχονδριακές μεταλλάξεις με ανθρώπινες ασθένειες, έχουν βρεθεί και ταυτοποιηθεί 214 παθογόνες μεταλλάξεις και στα 13 γονίδια (mitomap). Οι μεταλλάξεις αυτές προκαλούν βλάβες στο μιτοχόνδριο και συγκεκριμένα στη λειτουργία της αναπνευστικής αλυσίδας και στο μηχανισμό της απόπτωσης. Δυσλειτουργία της αναπνευστικής αλυσίδας έχει σαν αποτέλεσμα είτε αυξημένη παραγωγή ROS είτε μειωμένη παραγωγή ATP, για αυτό και οι ιστοί που

προσβάλλονται είναι κυρίως ιστοί με υψηλές απαιτήσεις ενέργειας (εγκέφαλος, μύες, καρδιά). Βλάβες στο μηχανισμό της απόπτωσης συνδέονται με εκφυλιστικές ασθένειες, γήρανση και καρκίνο.

Αυτό που πρέπει να αναφέρουμε για τις μιτοχονδριακές ασθένειες είναι ότι η σχέση μεταξύ γονότυπου και κλινικού φαινότυπου είναι περίπλοκη. Οι φαινότυποι που σχετίζονται με παθογόνες μεταλλάξεις είναι πολυάριθμοι. Η ίδια μετάλλαξη μπορεί να οδηγήσει σε διαφορετικούς φαινότυπους, ενώ ο ίδιος φαινότυπος μπορεί να συνδέεται με διαφορετικές μεταλλάξεις. Για παράδειγμα, η A3243G μετάλλαξη στο tRNA^{Leu(UUR)} γονίδιο που σχετίζεται κυρίως με μιτοχονδριακή εγκεφαλοπάθεια, γαλακτική οξείδωση κι εγκεφαλικά επεισόδια (σύνδρομο MELAS), μπορεί επίσης να προκαλέσει μυοκλωνική επιληψία με ανώμαλες ερυθρές ίνες (σύνδρομο MERRF), σύνδρομο Leigh, καρδιομυοπάθεια, διαβήτη, κώφωση ή εξωτερική οφθαλμοπληγία. Ακόμα, ο φαινότυπος του συνδρόμου MELAS έχει συσχετισθεί με αρκετές σημειακές μεταλλάξεις σε tRNA γονίδια όπως την A3243G, την G3244A, την A3252G, την G3256T, την A3258C, την T3271C και την T3291C στο γονίδιο tRNA^{Leu(UUR)}, την G1642A και την G1644A στο γονίδιο tRNA^{Val}, την G4332A στο γονίδιο tRNA^{Gln} και την T8316C στο γονίδιο tRNA^{Lys}. Επίσης, η ίδια tRNA μετάλλαξη μπορεί να προκαλέσει ασθένεια στα μέλη μιας οικογένειας, ενώ σε κάποια άλλη οικογένεια να μην εμφανίζει καμία κλινική εικόνα. Γενικότερα, μία μετάλλαξη από μόνη της δεν οδηγεί απαραίτητα σε ασθένεια κι αυτό μπορεί να αιτιολογηθεί εν μέρει από μερικά χαρακτηριστικά των μιτοχονδρίων (Schon 2000).

Το μιτοχονδριακό γονιδίωμα, όπως έχουμε προαναφέρει, είναι πολυπλοειδές με αρκετά αντίγραφα mtDNA σε κάθε μιτοχόνδριο και εκατοντάδες μιτοχόνδρια σε κάθε κύτταρο. Στους φυσιολογικούς ιστούς όλα τα mtDNAs του κυττάρου είναι πανομοιότυπα, μια κατάσταση που ονομάζεται **ομοπλασμία**. Στην περίπτωση παθογόνων μεταλλάξεων, αυτές προσβάλλουν μερικά αλλά όχι όλα τα mtDNAs σε ένα κύτταρο, σε έναν ιστό ή σε ένα άτομο. Η συνύπαρξη mtDNAs άγριου τύπου και μεταλλαγμένου στο ίδιο μιτοχόνδριο, κύτταρο, όργανο ή άτομο σε διάφορες αναλογίες, καλείται **ετεροπλασμία**. Το επίπεδο της ετεροπλασμίας παίζει σημαντικό ρόλο στον καθορισμό του κλινικού φαινοτύπου. Αν η μετάλλαξη είναι παθογόνος, το ποσοστό των μεταλλαγμένων μορίων σε έναν ετεροπλασμικό πληθυσμό επηρεάζει τη σοβαρότητα της βιοχημικής βλάβης. Ο φαινότυπος της ασθένειας εκφράζεται μόνο όταν το ποσοστό των μεταλλαγμένων mtDNA ξεπεράσει κάποιο σχετικό όριο. Για παράδειγμα, όταν το ποσοστό των mtDNA που φέρουν τη μετάλλαξη A3243G στο γονίδιο tRNA^{Leu(UUR)} είναι μικρότερο από 60% στους μύες, τότε εμφανίζεται μια μητρικώς κληρονομούμενη μορφή της ασθένειας PEO (progressive external ophthalmoplegia), ενώ αν το ποσοστό αυτό είναι πάνω από 80%, εμφανίζεται το σύνδρομο MELAS.

Επιπλέον, το ποσοστό μιας μετάλλαξης μπορεί να διαφέρει μέσα στο ίδιο το κύτταρο, επηρεάζοντας το φαινότυπο του. Όταν μια μυϊκή ίνα περιέχει μεταλλαγμένα μιτοχόνδρια σε ποσοστό 50% εμφανίζεται μορφολογικά και βιοχημικά φυσιολογική, κάτι που συμβαίνει στις μυϊκές ίνες των περισσότερων ασθενών με σύνδρομο MELAS και ασθενών με PEO. Όταν όμως το ποσοστό των μεταλλαγμένων μιτοχονδρίων στις μυϊκές ίνες ξεπερνάει το 90%, αποκτούν την εμφάνιση ανώμαλων ερυθρών ινών (RRFs). Η ενεργότητα επίσης της οξειδάσης του κυτοχρώματος c φαίνεται να επηρεάζεται. Όλες οι RRFs στο σύνδρομο MELAS που περιέχουν μεταλλαγμένα μιτοχόνδρια σε ποσοστό 90-95% έχουν ενεργή οξειδάση, ενώ σε ασθενείς με PEO, οι RRFs που περιέχουν 95-98% μεταλλαγμένα μιτοχόνδρια έχουν ανενεργή οξειδάση.

Αν και οι περισσότερες παθογόνες μεταλλάξεις είναι συνήθως ετεροπλασμικές, υπάρχουν αρκετοί φαινότυποι που οφείλονται σε ομοπλασμία. Για παράδειγμα, οι περισσότερες μορφές κώφωσης οφείλονται σε ομόπλασμες μεταλλάξεις (A7445G και T7511C στο tRNA^{Ser(UCN)})(Sue et al. 1999), όπως επίσης και η κληρονομούμενη από τη μητέρα υπερτροφική καρδιομυοπάθεια που έχει συσχετισθεί με ομοπλασμία της μετάλλαξης A4300G του γονιδίου tRNA^{Ile}. Η φαινοτυπική έκφραση ομοπλασμικών μεταλλάξεων μπορεί να ποικίλει μεταξύ διαφορετικών οικογενειών ή ακόμα και μεταξύ μελών της ίδιας οικογένειας. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι ο φαινότυπος επηρεάζεται τόσο από περιβαλλοντικούς όσο κι από γενετικούς παράγοντες. Περιβαλλοντικοί παράγοντες όπως η έκθεση σε αμινογλυκοσίδια έχει δείχθει ότι μπορεί να επιταχύνει την κώφωση (Estivill et al. 1998). Επίσης, άλλοι γενετικοί παράγοντες όπως κάποιες συμπληρωματικές μεταλλάξεις του mtDNA ή του πυρηνικού DNA (nDNA) επηρεάζουν το φαινότυπο. Για παράδειγμα, μία οικογένεια στη Νέα Ζηλανδία παρουσίαζε υψηλότερη συχνότητα κώφωσης από μία οικογένεια στη Σκωτία, λόγω τριών πολυμορφισμών στα ND μιτοχονδριακά γονίδια, οι οποίοι δεν υπήρχαν στη σκωτσέζικη οικογένεια (Fischel-Ghodsian 1998).

Ένα ακόμη χαρακτηριστικό του μιτοχονδριακού DNA είναι ότι κατά τη διάρκεια της διαίρεσης του κυττάρου, αντιγράφεται και κληρονομείται τυχαία στα γενετικά και σωματικά κύτταρα, οδηγώντας σε αλλαγές στην αναλογία μεταξύ άγριου τύπου mtDNA και μεταλλαγμένου. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται **μιτωτικός διαχωρισμός** κι εξηγεί πως ένας ασθενής μπορεί να μεταβεί από ένα φαινότυπο σε έναν άλλο καθώς αυξάνεται η ηλικία του.

Μεγάλο ενδιαφέρον στρέφεται στα tRNAs καθώς συγκεντρώνουν περισσότερες από τις μισές παθογόνες μεταλλάξεις ενώ αποτελούν μόλις το 10% του μιτοχονδριακού γονιδιώματος. Οι περισσότερες μεταλλάξεις των tRNA γονιδίων είναι μεταπτώσεις (πουρίνη σε πουρίνη ή πυριμιδίνη σε πυριμιδίνη) κι έχουν ομοιόμορφη κατανομή στη δομή ενός tRNA (τόσο στους βραχίονες όσο και στις θηλίες). Αυτές οι μεταλλάξεις μπορούν να προκαλέσουν

λάθη οδηγώντας σε ζεύγη του τύπου C-A ή G-U. Πλήρης σχεδόν απουσία μεταλλάξεων υπάρχει στην περιοχή του αντικωδικονίου, με τρεις μόνο εξαιρέσεις. Την T12298C στο γονίδιο tRNA^{Leu(CUN)}, την G15990A παθογόνο μετάλλαξη στο tRNA^{Pro} γονίδιο και την G611A παθογόνο μετάλλαξη στο tRNA^{Phe} γονίδιο. Γνωρίζοντας τον θεμελιώδη ρόλο του αντικωδικονίου, κατανοούμε γιατί προστατεύεται τόσο πολύ, αφού οι περισσότερες αλλαγές θα ήταν θανατηφόρες.

Μέχρι σήμερα, 139 μεταλλάξεις σε 21 από τα 22 tRNAs έχουν συσχετισθεί με ασθένεια, με μόνη εξαίρεση το tRNA^{Arg}. Αξίζει να σημειωθεί ότι μόνο τρία tRNA γονίδια (tRNA^{Leu(UUR)}, tRNA^{Lys}, tRNA^{Ile}) φέρουν το 50% όλων των γνωστών παθογόνων μεταλλάξεων στον άνθρωπο. Οι περισσότερες παθογόνες μεταλλάξεις έχουν βρεθεί στο γονίδιο tRNA^{Leu(UUR)}. Η λευκίνη είναι το πιο συχνά χρησιμοποιούμενο αμινοξύ (16%) κι εκ των δύο tRNAs που υπάρχουν για τη λευκίνη αυτό που χρησιμοποιείτε λιγότερο είναι το tRNA^{Leu} για το κωδικόνιο UUR (12%) σε σχέση με το tRNA για το κωδικόνιο CUN (88%). Αυτό ίσως εξηγεί το λόγο για τον οποίο οι μεταλλάξεις στο γονίδιο tRNA^{Leu(UUR)} είναι λιγότερο θανατηφόρες και περισσότερο κοινές. (Nakamura et al. 2000).

Συμπεραίνουμε λοιπόν πως ένας συγκεκριμένος κλινικός φαινότυπος είναι προϊόν αλληλεπίδρασης ανάμεσα στο επίπεδο της ετεροπλασμίας και στη διανομή του μεταλλαγμένου γονιδιώματος στο χώρο (σε μιτοχόνδρια, κύτταρα, ιστούς και όργανα) και στο χρόνο. Αυτή είναι πιθανώς η αιτία που αυτές οι ασθένειες μπορούν να εμφανιστούν σε κάθε ιστό ανά πάσα στιγμή. Ορισμένοι ιστοί, λόγω υψηλότερων απαιτήσεων ενέργειας, όπως οι μύες, η καρδιά και ο εγκέφαλος είναι περισσότερο ευαίσθητοι και προσβάλλονται ακόμη κι αν το ποσοστό της μετάλλαξης είναι σχετικά μικρό. Παρόλα αυτά, ο κλινικός φαινότυπος των περισσότερων ασθενειών δεν είναι απλά το αποτέλεσμα της περίσσειας του μεταλλαγμένου mtDNA. Άλλοι παράγοντες, όπως μεταλλάξεις σε γονίδια του nDNA, η ηλικία, το φύλο, το περιβάλλον, συμβάλλουν στην εξέλιξη της ασθένειας και σε μια ποικιλία φαινοτύπων που προκύπτουν από την ίδια μετάλλαξη (Zifa et al. 2007).

1.4.5 Άσθμα και μιτοχόνδριο

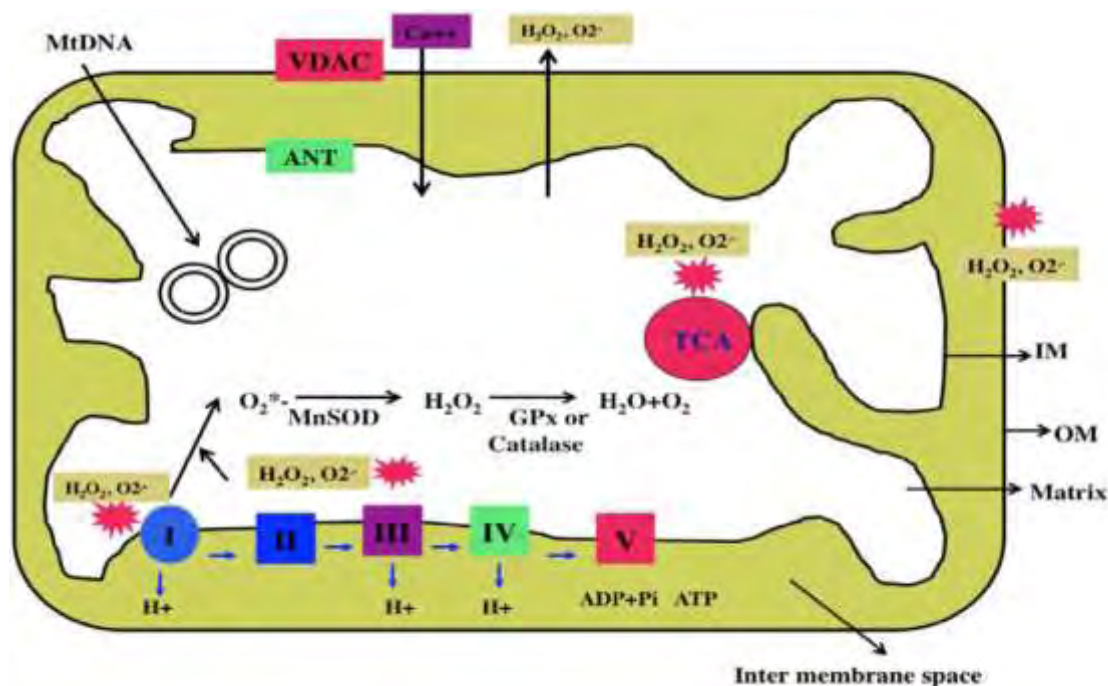
Η παθογένεια του άσθματος χαρακτηρίζεται από την επικράτηση των Th2 λεμφοκυττάρων κατά την ανοσοαπόκριση, από αύξηση των οξειδωτικών παραγόντων, από δυσλειτουργία του μηχανισμού της απόπτωσης καθώς παρατηρείται μειωμένος ρυθμός απόπτωσης στα φλεγμονώδη κύτταρα κι αυξημένος στα επιθηλιακά (Spinozzi et al. 2008, Bucchieri et al. 2002), κι από δομικές μεταβολές στους ιστούς των πνευμόνων. Από αρκετές μελέτες προκύπτουν στοιχεία τα οποία υποστηρίζουν την εμπλοκή του μιτοχονδρίου στην ανάπτυξη και την εξέλιξη της ασθένειας.

Ο Konga μετά την έκθεση ποντικών με άσθμα σε εκπομπές φωτοτυπικών μηχανημάτων και σε καπνό, παρατήρησε σημαντικά αυξημένη παραγωγή ROS από το μιτοχόνδριο, αύξηση των λιπιδικών υπεροξειδίων και μείωση των επιπέδων των μιτοχονδριακών ενζύμων (Konga et al. 2009). Σε άλλη έρευνα, ο Aguilera-Aguirre διαπίστωσε ότι μετά την έκθεση κυττάρων σε οξειδωτικούς παράγοντες, παρατηρείται βλάβη ορισμένων πρωτεϊνών της αναπνευστικής αλυσίδας που οδηγεί σε αυξημένη παραγωγή μιτοχονδριακών ROS (Aguilera-Aguirre et al. 2009). Η αύξηση των επιπέδων των δραστικών μορφών οξυγόνου μπορεί να επηρεάσει τόσο την απόπτωση όσο και την ανοσολογική απάντηση. Σε μελέτη που έγινε σχετικά με τις επιπτώσεις της αύξησης των οξειδωτικών παραγόντων σε αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα, παρατηρήθηκε μια συσχέτιση μεταξύ Th2 ανοσολογικής απάντησης και οξειδωτικού στρες (Murata et al. 2002; Del Prete et al. 2007; Kim et al. 2007). Τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα συμμετέχουν στη διαφοροποίηση των T λεμφοκυττάρων, προωθώντας είτε τον Th1 είτε τον Th2 υπότυπο. Παρόλο που οι οξειδωτικοί παράγοντες δεν είναι αποκλειστικά μιτοχονδριακής προέλευσης (περιβάλλον, κύτταρα φλεγμονής), τα μιτοχόνδρια θα μπορούσαν να συμβάλλουν σε αυτή τη διαδικασία. Οι ROS που προέρχονται από το μιτοχόνδριο, και κυρίως το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2), συμμετέχουν επίσης σε μονοπάτια μετάδοσης σήματος. Κάποια από αυτά συνδέονται με την απόπτωση, ενώ άλλα με την επιβίωση του κυττάρου (Hansen 2006; Lee & Shin 2009). Διαταραχή αυτής της διαδικασίας είναι πιθανό να συνδέεται με ανωμαλίες που παρατηρούνται στην απόπτωση ορισμένων σημαντικών παραγόντων για την εξέλιξη του άσθματος, όπως τα επιθηλιακά κύτταρα και τα κύτταρα της φλεγμονής. Σε πρωτεωμική μελέτη T λεμφοκυττάρων από ασθενείς με άσθμα βρέθηκε να υπερεκφράζεται η μιτοχονδριακή πρωτεΐνη Trx2 (Jeong et al. 2007). Σε άλλο πείραμα ο Hansen δοκίμασε να υπερεκφράσει την πρωτεΐνη αυτή και παρατήρησε ελάττωση στην απόπτωση, αφού η Trx2 ως αντιοξειδωτική πρωτεΐνη παρεμπόδιζε τη μετάδοση αποπτωτικού σήματος μέσω των ROS του μιτοχονδρίου.

Επίσης, σε μελέτη του Trian παρατηρήθηκε αυξημένη βιογένεση μιτοχονδρίων σε λείους μύες ασθματικών σε συνδυασμό με αύξηση του μεγέθους των κυττάρων των λείων μυών και έντονο πολλαπλασιασμό (Trian et al. 2007). Η αύξηση της μάζας των λείων μυών είναι χαρακτηριστικό της παθογένειας της ασθένειας κι οφείλεται είτε σε υπερπλασία (αύξηση αριθμού) είτε σε υπερτροφία (αύξηση μεγέθους) των λείων μυϊκών κυττάρων, ενώ θεωρείται κυρίως υπεύθυνη για τη στένωση των αεραγωγών (Munakata 2006). Το γεγονός αυτό εμπλέκει το οργανίδιο στη διαδικασία των δομικών μεταβολών που παρατηρούνται στο άσθμα, και κυρίως της επαναδιαμόρφωσης. Επιπλέον, τα κύτταρα των λείων μυών χαρακτηρίζονται από μειωμένη απόπτωση, κάτι που ίσως οφείλεται σε ένα μιτοχονδριακό κανάλι καλίου ((MitoK(ATP)) και στη σηματοδότηση με ROS, σύμφωνα με τον Zhao JP (Zhao et al. 2009). Ακόμα, ενδιαφέρον παρουσιάζει μελέτη που έγινε σε παιδιά με άσθμα, όπου βρέθηκε ότι οι φορείς μιας συγκεκριμένης μιτοχονδριακής απλοομάδας (haplogroup U) είχαν αυξημένη κατά 78% ολική IgE ορού, σε σχέση με φορείς άλλων απλοομάδων (Raby et al. 2007). Τα παραπάνω στοιχεία σε συνδυασμό με το αυξημένο ρίσκο για ανάπτυξη άσθματος όταν υπάρχει προσβεβλημένη μητέρα, γεγονός που συμφωνεί με το μητρικό πρότυπο κληρονόμησης των μιτοχονδρίων, αυξάνουν τις πιθανότητες εμπλοκής του μιτοχονδρίου στο άσθμα.

Το **οξειδωτικό στρες** αποτελεί έναν σημαντικό παράγοντα για την εμφάνιση ασθμενιών όπως ο καρκίνος, οι καρδιαγγειακές αλλά και οι ανοσολογικές παθήσεις. Αν και δεν είναι ξεκάθαρο εάν το οξειδωτικό στρες είναι η αιτία για την έναρξη της φλεγμονώδους αντίδρασης ή προκαλείται από αυτή, στην περίπτωση του άσθματος το οξειδωτικό στρες συμβάλλει στην επιδείνωση της φλεγμονής των αεραγωγών αφού επάγει διάφορους προφλεγμονώδης διαμεσολαβητές, ενισχύει τη βρογχική υπεραντιδραστικότητα, προκαλεί βρογχοσπασμό και αυξάνει την έκκριση βλέννης (Grievink et al. 1998; Omenaas et al. 2003; Terada 2006; Li & Nel 2006; Brown & Griendling 2009). Το κύτταρο φτάνει σε κατάσταση οξειδωτικού στρες όταν υπάρχει περίσσεια οξειδωτικών παραγόντων τους οποίους δεν μπορούν να αντιμετωπίσουν οι αμυντικοί του μηχανισμοί. Οι δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) που σχηματίζονται μπορούν να προκαλέσουν εκτεταμένες βλάβες σε πρωτεΐνες, λιπίδια και νουκλεϊκά οξέα. Τα μιτοχόνδρια αποτελούν την κύρια πηγή των ROS που σχηματίζονται ως παραπροϊόντα κατά τη διαδικασία της αναπνοής μέσω της αναπνευστικής αλυσίδας (ETC), κυρίως από τα σύμπλοκα I και III, αλλά και από συστατικά που συμμετέχουν στον κύκλο του κιτρικού οξέος – ή κύκλο του τρικαρβοξυλικού οξέος (TCA) – όπως η αφυδρογονάση του α-κετυλογουταρικού (Reddy 2006) (Εικόνα 8). Επίσης, η φλαβινοπρωτεΐνη μονοαμινοοξειδάση η οποία βρίσκεται στην εξωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου, καταλύει την οξειδωτική απαμίνωση πρωτοταγών αρωματικών αμινών, μιας

διαδικασίας που συμβάλλει σημαντικά στην αύξηση των επιπέδων των ROS τόσο στα μιτοχόνδρια όσο και στο κυτταρόπλασμα (Orrenius et al. 2007).



Εικόνα 8. Μιτοχόνδριο. Η εσωτερική (IM) και η εξωτερική μεμβράνη (OM) του μιτοχονδρίου δημιουργούν δύο διαμερίσματα. Το διαμεμβρανικό χώρο (Intermembrane space) και τη μήτρα (Matrix). Η αναπνευστική αλυσίδα βρίσκεται στην εσωτερική μεμβράνη, η οποία αποτελεί φραγμό για την ροή ιόντων προς το εσωτερικό της μήτρας. Στην αναπνευστική αλυσίδα, τα σύμπλοκα I και III, συνήθως, μεταφέρουν ηλεκτρόνια στο οξυγόνο, δημιουργώντας ρίζες υπεροξειδίου. Οι ρίζες αυτές μετατρέπονται σε H_2O_2 από τη δισμουτάση του υπεροξειδίου του μαγγανίου (MnSOD). Στη συνέχεια, η καταλάση ή η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx) ανάγει το H_2O_2 σε H_2O και O_2 , από ηλεκτρόνια που προσλαμβάνει από το NADH και το FADH₂. Δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) επίσης παράγονται και

κατά τον κύκλο του κιτρικού οξέος (TCA) (Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Stress in Asthma: Implications for Mitochondria-Targeted Antioxidant Therapeutics, P. Hemachandra Reddy, *Pharmaceuticals* **2011**, 4, 429-456; doi:10.3390/ph4030429).

Οι οξειδωτικοί παράγοντες που σχηματίζονται στο εσωτερικό του μιτοχονδρίου, και είναι κυρίως ρίζες υπεροξειδίου ($O_2^{\bullet-}$) και υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2), μεταφέρονται στο κυτταρόπλασμα μέσω τασεοελεγχόμενων καναλιών μεταφοράς ανιόντων. Η χρόνια έκθεση σε ROS προκαλεί σημαντικές βλάβες σε κυτταροπλασματικά και μιτοχονδριακά συστατικά του κυττάρου (πρωτεΐνες, λιπίδια, νουκλεϊκά οξέα). Η προσβολή της ακονιτάσης του κύκλου του κιτρικού οξέος, των κέντρων Fe-S των συμπλόκων I, II και III και του κέντρου Cu του συμπλόκου IV της αναπνευστικής αλυσίδας έχουν σαν αποτέλεσμα σημαντική μείωση στην παραγωγή ενέργειας από το μιτοχόνδριο (Reddy 2006), ενώ η προσβολή του mtDNA οδηγεί στη δημιουργία και τη συσσώρευση μεταλλάξεων στο

μιτοχονδριακό γενετικό υλικό.

Ο Leopoldo Aguilera-Aguirre σε μελέτη του, προσπάθησε να προσδιορίσει τις πρωτεΐνες του μιτοχονδρίου που οξειδώνονται, μετά την έκθεση του κυττάρου σε γύρη φυτού του γένους *Ambrosia* (RWE), συστατικά της οποίας έχουν ενεργότητα οξειδάσης του NADPH κι έτσι ενεργοποιούν το σχηματισμό ROS (Boldogh et al. 2005). Ανάμεσα στις πρωτεΐνες αυτές ήταν και η UQCRC2 (Ubiquinol-cytochrome reductase core 2), δομικό συστατικό της αναγωγάσης του κυτοχρώματος c, του τρίτου συμπλόκου της αναπνευστικής αλυσίδας. Βλάβη της συγκεκριμένης πρωτεΐνης προκαλούσε αυξημένη παραγωγή ROS από το μιτοχόνδριο. Επίσης, διερεύνησε τις συνέπειες της μειωμένης έκφρασης αυτής της πρωτεΐνης σε ποντίκια μετά την πρόκληση τους με RWE και παρατήρησε ότι εκτός από την αύξηση των ROS, αυξήθηκε ο αριθμός των ηωσινόφιλων στην περιοχή των αεραγωγών (4,4 φορές), ο αριθμός των βλεννοπαραγωγών κυττάρων και τα επίπεδα βλέννης (2,4 φορές η MUC5AC), ενώ αυξήθηκε και η υπερευαισθησία.

Όπως έχει προαναφερθεί, η κύρια αιτία για την έναρξη της φλεγμονής θεωρείται η διαφοροποίηση των T λεμφοκυττάρων προς τον Th2 υπότυπο. Αύξηση των επιπέδων των οξειδωτικών παραγόντων στα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (APC), τα οποία συμβάλλουν σημαντικά στη διαφοροποίηση, φαίνεται να επηρεάζει τη διαδικασία αυτή. Ο Hyon-Jeen Kim χρησιμοποίησε διαίθυλο-μηλικό (diethyl-maleate, DEM) για να ελαττώσει την ποσότητα γλουταθειόνης στα δένδριτικά κύτταρα (DCs) ποντικών (Kim et al. 2007). Αυτό που παρατήρησε ήταν ότι κατά την ανοσοαπόκριση που προκαλούνταν από λιποπολυσακχαρίτη (LPS), τα δένδριτικά κύτταρα φθάναν σε κατάσταση οξειδωτικού στρες, με αποτέλεσμα την μειωμένη παραγωγή IL-12 που είναι απαραίτητη για την ενεργοποίηση του Th1 υπότυπου. Στην ίδια διαπίστωση έφτασε κι ο Yukie Murata, ο οποίος δημιούργησε δύο υποπληθυσμούς μακροφάγων, έναν με υψηλή συγκέντρωση γλουταθειόνης (RMP) κι έναν με χαμηλή (OMP). Αυτό που παρατήρησε ήταν αυξημένη παραγωγή IL-6 και IL-10, και μειωμένη παραγωγή NO και IL-12 από τα OMP μακροφάγα, ενώ το αντίθετο συνέβαινε με τα RMP μακροφάγα. Βάσει των αποτελεσμάτων, θεώρησε πιθανή τη συσχέτιση RMP/Th1 ανοσολογικής απάντησης και OMP/Th2 ανοσολογικής απάντησης (Murata et al. 2002).

Ακόμα, υπάρχουν ενδείξεις για το ότι οι δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) που παράγονται από τα μιτοχόνδρια, όπως το υπεροξείδιο του υδρογόνου, σχετίζονται με σηματοδοτικά μονοπάτια (Chen et al. 2004; Dumont et al. 1999). Ο Ya Lee βρήκε ότι το H₂O₂ μπορεί να ενεργοποιήσει την κασπάση-3 και την ERK 1/2 σε ηωσινόφιλα, οδηγώντας τα σε απόπτωση. Αν και η ERK 1/2 συμμετέχει στο μονοπάτι των MAPK, παρατεταμένη ενεργοποίηση της με H₂O₂ φαίνεται να είναι στενά συνδεδεμένη με προαποπτωτικά σήματα (Lee & Shin 2009). Έχει δειχθεί ότι η απόπτωση των ηωσινόφιλων σε ιστό αεραγωγών που

προκλήθηκε με Fas αντιγόνο, δεν ήταν επιτυχείς σε αρκετές περιπτώσεις, οδηγώντας το κύτταρο σε δευτερογενή νέκρωση (Uller et al. 2005). Η δευτερογενής νέκρωση είναι αποτέλεσμα απόπτωσης που δεν ακολουθείται από φαγοκυττάρωση κι αυτό έχει ως συνέπεια την έκλυση ορισμένων συστατικών του κυττάρου, όπως οι heat shock πρωτεΐνες (HSP), οι οποίες αλληλεπιδρούν με τους υποδοχείς Toll (TLRs) των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων προκαλώντας παραγωγή φλεγμονωδών κυτταροκινών (Fadok et al. 1998). Επίσης, βρέθηκε ότι σε μεγάλες συγκεντρώσεις H_2O_2 (1mM), παρατηρείται παροδική ενεργοποίηση της ERK 1/2 στα ηωσινόφιλα, κάτι που σύμφωνα με άλλες μελέτες συνδέεται με την διαδικασία της αποκοκκίωσης, της μετανάστευσης και της προσκόλλησης (Adachi et al. 2000; Sano et al. 2001; Terakawa et al. 2005).

Σύμφωνα με τον Jason M. Hansen (Hansen et al. 2006), ο *παράγοντας νέκρωσης όγκων α* (tumor necrosis factor- α , TNF- α), ο οποίος εμπλέκεται τόσο σε φυσιολογικές λειτουργίες (αιμοποίηση, καταστολή όγκων) (Carswel et al. 1975) όσο και σε παθολογικές καταστάσεις (πνευμονική ίνωση, ρευματοειδής αρθρίτιδα, άσθμα, διαβήτης) (Miyazaki et al. 1995; Smith & Haynes 2002; Cembrzynska-Nowak et al. 1993; Hotamisligil et al. 1996), κατά τη σηματοδότηση προκαλεί την παραγωγή ROS από το μιτοχόνδριο (Goossens et al. 1995; Higuchi et al. 1998). Για να επιβεβαιώσει την μιτοχονδριακή προέλευση των ROS, ο Hansen χρησιμοποίησε δύο αντιοξειδωτικούς παράγοντες, τις πρωτεΐνες θειορεδοξίνη-1 (Trx1), που βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα, και θειορεδοξίνη-2 (Trx2), που βρίσκεται στο μιτοχόνδριο, και συνέκρινε το βαθμό οξειδωσης τους μετά από επώαση των κυττάρων με TNF- α . Αυτό που διαπίστωσε ήταν οξειδωση της Trx2 σε πολύ μεγαλύτερη έκταση σε σχέση με την Trx1. Οι ROS που παράγονται φαίνεται να έχουν αρκετά σημαντικό ρόλο στην περαιτέρω μετάδοση του σήματος, οδηγώντας είτε στην ενεργοποίηση του *πυρηνικού παράγοντα-κΒ* (nuclear factor- κ B, NF- κ B), ο οποίος ως μεταγραφικός παράγοντας ρυθμίζει την έκφραση γονιδίων σχετικών με την επιβίωση του κυττάρου, είτε στην απόπτωση. Υπερεκφράζοντας την πρωτεΐνη Trx2, ο Jason M. Hansen διαπίστωσε μείωση της απόπτωσης των κυττάρων και παρεμπόδιση της ενεργοποίησης του μεταγραφικού παράγοντα NF- κ B. Τα κύτταρα του ανοσοποιητικού, τα οποία χαρακτηρίζονται από μειωμένη απόπτωση στην περίπτωση του άσθματος, θα μπορούσαν να επηρεάζονται από μια τέτοια παρέκκλιση. Σε πρωτεωμική ανάλυση $CD3^+$ T-λεμφοκυττάρων από ασθενείς με άσθμα, μεταξύ των 13 πρωτεϊνών με αυξημένα επίπεδα έκφρασης (HSP-70, PTP, β -Arrestin-1b, etc.) ήταν και η Trx2 (Jeong et al. 2007).

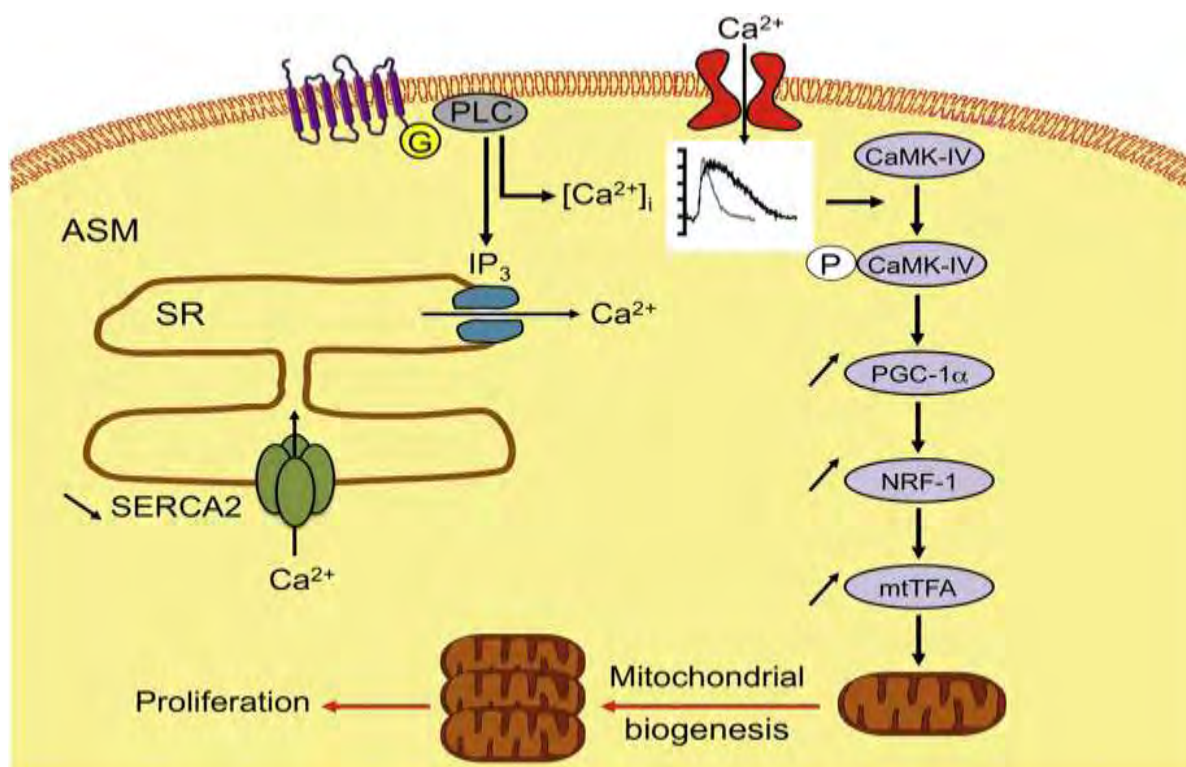
Ο Ulaganathan Madhiraajan επίσης, σε μελέτη του σε ευαισθητοποιημένα με οβαλβουμίνη (OVA) BALB/c ποντίκια, βρήκε ότι η πρόκληση πειραματικού αλλεργικού άσθματος στα ποντίκια σχετιζόταν με δυσλειτουργία του μιτοχονδρίου, όπως μείωση της

ενεργότητας της οξειδάσης του κυτοχρώματος c στα μιτοχόνδρια των πνευμόνων, μείωση της έκφρασης της υπομονάδας III της οξειδάσης του κυτοχρώματος c στο βρογχικό επιθήλιο, εμφάνιση του κυτοχρώματος c στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων στην περιοχή των πνευμόνων, μειωμένα επίπεδα ATP στους πνεύμονες και μείωση της έκφρασης της υπομονάδας των 17kDa της δευδρογονάσης του NADH (Complex I) στο βρογχικό επιθήλιο (Mabalirajan et al. 2008). Παρόλα αυτά, δεν παρατηρήθηκε καμία μεταβολή στα επίπεδα έκφρασης των υπομονάδων I και II της οξειδάσης του κυτοχρώματος c. Ακόμα, παρατηρήθηκαν και δομικές αλλαγές στα μιτοχόνδρια όπως απώλεια των ακρολοφιών της εσωτερικής μεμβράνης και διόγκωση. Όταν χορηγήθηκε αντίσωμα για την ιντερλευκίνη – 4 (IL-4 mAb), όλα τα παραπάνω αντιστράφηκαν και το μιτοχόνδριο επανήλθε σε κανονική λειτουργία, κάτι που δηλώνει σύνδεση του μιτοχονδρίου με την αλλεργία και το άσθμα.

Η χρόνια φλεγμονή προκαλεί δομικές μεταβολές στους αεραγωγούς, διαδικασία γνωστή και ως επαναδιαμόρφωση (**remodeling**), οι οποίες έχουν σαν αποτέλεσμα τη στένωση των αεραγωγών, δημιουργώντας δυσκολίες στην αναπνοή και σταδιακή μείωση της λειτουργίας των πνευμόνων. Οι δομικές μεταβολές των αεραγωγών που παρατηρούνται στο άσθμα είναι υπερτροφία και υπερπλασία των λείων μυών των αεραγωγών, απόθεση κολλαγόνου στην υποεπιθηλιακή μεμβράνη, υπερπλασία των καλυκοειδών κυττάρων (goblet cells), πάχυνση της βλεννογόνου των αεραγωγών και αύξηση του μεγέθους των αγγείων.

Η επαναδιαμόρφωση (remodeling) του επιθηλίου των αεραγωγών είναι ένα από τα κύρια χαρακτηριστικά του άσθματος και συμβάλλει στην εξέλιξη και στη νοσηρότητα της ασθένειας. Ο Trian και οι συνεργάτες του (Trian et al. 2007), θέλοντας να προσδιορίσουν αυτόν το μηχανισμό επικεντρώθηκαν στη μελέτη των μιτοχονδρίων σε ασθενείς με άσθμα και σε ασθενείς με χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια (ΧΑΠ), καθώς κι εδώ παρατηρείται αύξηση της μάζας των βρογχικών λείων μυών. Χρησιμοποιήθηκαν επίσης φυσιολογικά άτομα σαν control. Ο ρόλος των μιτοχονδρίων τόσο στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό όσο και στην απόπτωση, είναι πολύ σημαντικός. Αυτό που βρέθηκε ήταν, αυξημένη μιτοχονδριακή μάζα και αυξημένη κατανάλωση οξυγόνου σε δείγματα από βρογχικούς λείους μύες ασθενικών σε σχέση με ασθενείς με ΧΑΠ και controls. Το γεγονός αυτό συνδέθηκε με ένα μονοπάτι βιογένεσης των μιτοχονδρίων, το οποίο πυροδοτείται από αύξηση της συγκέντρωσης του ασβεστίου και αυξάνει τα επίπεδα έκφρασης ορισμένων παραγόντων (peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator, PGC-1 α , nuclear respiratory factor – 1, NRF – 1 και mitochondrial transcription factor A, mtTFA). Η αύξηση της συγκέντρωσης του Ca^{+2} οδηγεί στην ενεργοποίηση μιας ασβέστιο/καλμοδουλίνη – εξαρτώμενης πρωτεϊνικής κινάσης (CaMK – IV), η οποία στη συνέχεια ενεργοποιεί τους παράγοντες που προαναφέραμε, με σημαντικότερο τον mtTFA που εμπλέκεται άμεσα στη

διαδικασία της βιογένεσης (Εικόνα 9). Όταν η εισροή ασβεστίου παρεμποδίστηκε, δεν παρατηρήθηκε αυξημένος ρυθμός βιογένεσης των μιτοχονδρίων. Με άλλα λόγια, οι λείοι βρογχικοί μύες χαρακτηρίζονται από μια μεταβολή στην ομοιόσταση του ασβεστίου που αυξάνει την μιτοχονδριακή βιογένεση, η οποία με τη σειρά της ενισχύει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, οδηγώντας στην επαναδιαμόρφωση (συνήθως ανώμαλη) των αεραγωγών.



Εικόνα 9. Μηχανισμός αυξημένης μιτοχονδριακής βιογένεσης, ο οποίος πυροδοτείται από μια αλλαγή στην ομοιόσταση του Ca^{+2} . (Girodet, P.-O., et al., Airway remodeling in asthma: New mechanisms and potential for pharmacological intervention, *Pharmacology & Therapeutics* (2011), doi:10.1016/j.pharmthera.2011.02.001)

Σε άλλο πείραμα (Xu et al. 2010), ερευνητές προσπάθησαν να προσδιορίσουν τις μεταβολές στα επίπεδα έκφρασης πρωτεϊνών, σε ιστό πνεύμονα ποντικών ευαισθητοποιημένων με οβαλβουμίνη (OVA-sensitized), με πρωτεωμική ανάλυση κι ενώ βρίσκονταν στην αρχική φάση της ασθματικής αντίδρασης (early asthmatic response, EAR). Η φάση αυτή ξεκινάει λίγα λεπτά (2-5 λεπτά στη συγκεκριμένη μελέτη) μετά την εισπνοή του αλλεργιογόνου, προκαλώντας αντίδραση των αεραγωγών και διαρκεί 1 – 2 ώρες, ενώ ακολουθείται από την επόμενη φάση της ασθματικής αντίδρασης (late asthmatic response, LAR). Από τις 44 πρωτεΐνες που ανιχνεύθηκαν με 2-DE (two-dimensional gel

electrophoresis) να υπερεκφράζονται ή να υποεκφράζονται, οι 42 ταυτοποιήθηκαν με φασματοσκοπία μάζας (LC-ESI-MS/MS). Οι πρωτεΐνες αυτές ήταν κυρίως πρωτεΐνες που συμμετέχουν στη γλυκόλυση, πρωτεΐνες που προσδένουν ασβέστιο (CaBPs) και *μιτοχονδριακές πρωτεΐνες*. Ως αναφορά τις CaBPs, μεταβολές παρατηρήθηκαν στα επίπεδα έκφρασης πρωτεϊνών που εμπλέκονται στη συστολή των λείων μυών (Ca^{+2} /καλμοδοουλίνη ενεργοποιεί την κινάση της ελαφριάς αλυσίδας της μυοσίνης προκαλώντας συστολή), πρωτεϊνών που ελέγχουν την ομοιόσταση του ασβεστίου όπως και CaBPs που συνδέονται με τη φλεγμονώδη αντίδραση (Lorenz et al. 2008). Μεταξύ των επτά μιτοχονδριακών πρωτεϊνών που βρέθηκαν ήταν η Atp5a1, η οποία αποτελεί ενεργό τμήμα του τελευταίου ενζύμου της αναπνευστικής αλυσίδας, της ATP-συνθετάσης. Η υπερέκφραση αυτής της πρωτεΐνης συνδέεται με αυξημένη παραγωγή ATP που παρέχει την απαραίτητη ενέργεια για την συστολή των λείων μυών των αεραγωγών (airway smooth muscle, ASM). Επιπλέον, για τον προσδιορισμό της ποσότητας των μιτοχονδρίων εξετάστηκαν τα επίπεδα έκφρασης του mRNA της πρωτεΐνης VDAC1 (Voltage dependant anion channel 1) της εξωτερικής μεμβράνης του μιτοχονδρίου (Trian et al. 2007). Η σημαντικά αυξημένη έκφραση αυτής της πρωτεΐνης δηλώνει αύξηση του αριθμού και της δραστηριότητας των μιτοχονδρίων κατά την ασθματική αντίδραση.

Επιπλέον, σε έρευνα που έγινε από τον Raby et al. για την ανίχνευση απλών μιτοχονδριακών πολυμορφισμών (mtSNPs) σε 654 παιδιά με ήπιο έως και μέτριας έντασης άσθμα, βρέθηκε μια απλοομάδα που σχετίζεται με αυξημένα επίπεδα ολικής IgE ορού, σημαντικού παράγοντα για την ανάπτυξη αλλεργίας και άσθματος. Η κάθε μιτοχονδριακή απλοομάδα αποτελείται από ένα συγκεκριμένο συνδυασμό mtSNPs και κληρονομείται από τη μητέρα στους απογόνους, ενώ υποστηρίζεται ότι συμβάλλουν σε πολύπλοκες ασθένειες όπως το άσθμα. Κατά τη μελέτη αυτή προσδιορίστηκαν 11 απλοομάδες εκ των οποίων μια, η απλοομάδα U, βρέθηκε να σχετίζεται με υψηλότερα επίπεδα ολικής IgE κατά 78% σε σχέση με τους φορείς των υπόλοιπων απλοομάδων, ενώ επίσης παρατηρήθηκε αυξημένη αντιδραστικότητα στα δερματικά τεστ κι ένα ιστορικό ατοπικής δερματίτιδας για τα άτομα αυτά (απλοομάδα U).

1.5 Σκοπός του πειράματος

Σκοπός αυτής της εργασίας είναι η ανίχνευση και ο προσδιορισμός μεταλλάξεων στα δύο από τα τρία γονίδια του μιτοχondριακού DNA που κωδικοποιούν υπομονάδες της οξειδάσης του κυτοχρώματος c, η οποία φαίνεται να δυσλειτουργεί κατά την ασθματική αντίδραση (Mabalirajan et al. 2008). Τα γονίδια αυτά είναι το COI και το COII. Για το λόγο αυτό εξετάσαμε δείγματα 25 ασθενών με άσθμα και 23 φυσιολογικών με την μέθοδο της PCR και της αλληλούχισης. Ακολούθησε επεξεργασία και σύγκριση των αποτελεσμάτων με τη βοήθεια υπολογιστικών προγραμμάτων (BioEdit, BLAST) και κάποιων βάσεων δεδομένων, ώστε να εκτιμηθεί ο βαθμός στον οποίο επηρεάζεται η λειτουργικότητα του συμπλόκου από τις μεταλλάξεις που ανιχνεύθηκαν και στα δύο γονίδια. Ενδεχόμενη δυσλειτουργία της οξειδάσης του κυτοχρώματος c ίσως σχετίζεται με την εμφάνιση και την εξέλιξη του άσθματος.

2.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Τα δείγματα ολικού αίματος των 25 ασθενών με άσθμα και των 23 φυσιολογικών ατόμων προσφέρθηκαν από την Πνευμονική Κλινική του Περιφερειακού Πανεπιστημιακού νοσοκομείου Λάρισας και αποθηκεύτηκαν στους -20 °C. Η επεξεργασία των δειγμάτων ακολούθησε την εξής διαδικασία: απομόνωση DNA, PCR, καθαρισμός των προϊόντων της PCR, αλληλούχιση (sequencing).

2.1 Απομόνωση DNA

Η απομόνωση του DNA από ολικό αίμα είναι το πρώτο βήμα της διαδικασίας που θα ακολουθηθεί και μπορεί να διαιρεθεί στα εξής στάδια

- Διάσπαση και λύση των κυττάρων
- Απομάκρυνση των πρωτεϊνών
- Ανάκτηση του DNA

Υλικά

SSC 20X (Standard Saline Citrate)	87,6 gr NaCl 44,1 gr $C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$ (κιτρικό νάτριο) ddH ₂ O (δισ απεσταγμένο νερό) συμπλήρωση μέχρι τα 500ml Ρύθμιση του pH στο 7,4 χρησιμοποιώντας συμπυκνωμένο HCl Ανάδευση και αποστείρωση Αποθήκευση στους 4
SSC 1X	Για 500ml SSC 1X θα προσθέσουμε 25ml SSC 20X σε 475ml ddH ₂ O
NaOAc 0,2M	Ρυθμιστικό διάλυμα 0,2M οξικού νατρίου
SDS 5% (Sodium Dodecyl Sulphate)	Το θειϊκό δωδεκυλικό νάτριο είναι ένα ανιοντικό απορρυπαντικό, το οποίο καταστρέφει όλες σχεδόν τις μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις, προκαλεί ρήξη των πυρηνικών και των κυτταρικών μεμβρανών και διαλυτοποιεί τις πρωτεΐνες.
Proteinase K	Με την ενζυμικά πρωτεϊνάση K πραγματοποιείται πέψη των πρωτεϊνών για το διαχωρισμό του DNA από τις πρωτεΐνες.
Φαινόλη/Χλωροφόρμιο	Οργανικοί διαλύτες για την εκχύλιση του μείγματος και την απομάκρυνση των πρωτεϊνών και του RNA.
Ισοπροπανόλη	Χρησιμοποιείται για την κατακρήμνιση του DNA.
Αιθανόλη 70%	Με διάλυμα 70% απόλυτης αιθανόλης σε ddH ₂ O γίνεται η έκπλυση του ιζήματος.

Μέθοδος

1. Ανάμιξη 0,5ml αίματος με 1ml SSC 1X (Standard Saline Citrate) σε eppendorf των 2ml, έντονη ανάδευση και φυγοκέντρωση στις 13.000 στροφές για 3 λεπτά.
2. Απομάκρυνση του υπερκείμενου και προσθήκη 1ml SSC 1X, έντονη ανάδευση και φυγοκέντρωση για 2 λεπτά στις 13.000 στροφές.
3. Απομάκρυνση του υπερκείμενου και προσθήκη 0,5ml NaOAc 0,2M, 50μl SDS 5% και 10μl πρωτεϊνάσης K 10mg/ml, επώαση για μια ώρα στους 55 °C .
4. Προσθήκη 0,5ml φαινόλης και 0,5ml χλωροφορμίου, έντονη ανάδευση και φυγοκέντρωση για 7 λεπτά στις 13.000 στροφές.

5. Μεταφορά του υπερκείμενου σε νέο eppendorf των 2ml και προσθήκη 1ml χλωροφορμίου, ήπια ανακίνηση και φυγοκέντρωση στις 13.000 στροφές για 10 λεπτά.
6. Μεταφορά του υπερκείμενου σε νέο eppendorf των 2ml και προσθήκη 1ml ισοπροπανόλης, επώαση στους -20°C για 15 λεπτά και φυγοκέντρωση για 20 λεπτά στους 4°C στις 13.000 στροφές.
7. Αφαίρεση του υπερκείμενου, προσθήκη 1ml παγωμένης αιθανόλης 70% και φυγοκέντρωση στους 4°C για 15 λεπτά στις 13.000 στροφές.
8. Αφαίρεση του υπερκείμενου και επώαση στους 37°C για μια ώρα.
9. Προσθήκη 100μl ddH₂O και αποθήκευση στους 4°C .
10. Ποιοτικός προσδιορισμός του DNA με ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πηκτή αγαρόζης 1%.

2.2 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης είναι η μέθοδος που χρησιμοποιείται συνήθως για τον διαχωρισμό, τον χαρακτηρισμό και την απομόνωση τμημάτων DNA. Η συγκέντρωση της αγαρόζης εξαρτάται από το μέγεθος του τμήματος DNA που θα ηλεκτροφορηθεί. Στην πηκτή αγαρόζης προστίθεται βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr), το οποίο έχει την ιδιότητα να παρεμβάλλεται μεταξύ των δύο κλώνων του DNA και να εκπέμπει φθορισμό όταν διεγείρεται από υπεριώδη ακτινοβολία. Συγκρίνοντας το φθορισμό του άγνωστου δείγματος με το φθορισμό μιας σειράς DNA γνωστών συγκεντρώσεων, είναι δυνατό να προσδιοριστεί η συγκέντρωση του άγνωστου DNA. Τα δείγματα DNA τοποθετούνται σε ειδικές εσοχές που δημιουργούνται στο πήκτωμα. Κατά τη διάρκεια της ηλεκτροφόρησης το DNA, το οποίο φέρει αρνητικό φορτίο λόγω των φωσφορικών ομάδων, κινείται από τον αρνητικό προς το θετικό πόλο με ταχύτητα αντιστρόφως ανάλογη του μεγέθους του. Με τη χρήση ladder (μείγμα τμημάτων DNA γνωστού μεγέθους) μπορούμε να προσδιορίσουμε το μέγεθος ενός τμήματος DNA που μας ενδιαφέρει.

Υλικά

Αγαρόζη	Παράγοντας ζελατινοποίησης της πηκτής
TAE 1X	Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης με 40mM Tris-acetate, 1mM EDTA και pH 8,3
Βρωμιούχο αιθίδιο	Διεγείρεται από την υπεριώδη ακτινοβολία και φθορίζει, δίνοντας τα πρότυπα ζωνώσεων
Loading Buffer 6X 10ml	1ml χρωστική μπλε της βρωμοφαινόλης 5ml γλυκερόλη για την καθίζηση των δειγμάτων στις θέσεις φόρτωσης 0,5ml ρυθμιστικού διαλύματος TBE 20X 3,5ml ddH ₂ O

Μέθοδος

Αρχικά 0,4gr αγαρόζης αναμιγνύονται με 40ml TAE 1X και στη συνέχεια το μίγμα θερμαίνεται για 1-2 λεπτά σε φούρνο μικροκυμάτων. Αφού προστεθούν 4μl βρωμιούχου αιθιδίου, στερεοποιείται σε κατάλληλη μήτρα όπου σχηματίζονται και οι θέσεις φόρτωσης του DNA και μεταφέρεται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης. Στις θέσεις αυτές τοποθετούνται 5μl από το δείγμα DNA αφού πρώτα αναμιχθούν με 3μl loading buffer. Το loading buffer εκτός των άλλων περιέχει χρωστική, η οποία επιτρέπει την παρακολούθηση του μετώπου της ηλεκτροφόρησης και γλυκερόλη η κάποια άλλη ουσία που αυξάνει την πυκνότητα έτσι ώστε το δείγμα να συγκρατείται στις ειδικές θέσεις στο πήκτωμα. Η ηλεκτροφόρηση γίνεται σε οριζόντια συσκευή. Η τάση που εφαρμόζεται είναι συνήθως 100V και η διακοπή της ηλεκτροφόρησης γίνεται όταν η χρωστική έχει διανύσει τα 2/3 του μήκους της πηκτής της αγαρόζης. Το πήκτωμα στη συνέχεια μεταφέρεται σε συσκευή ακτινοβολίας UV για την εμφάνιση των ζωνών. Όσα δείγματα DNA εμφανίσουν θετικό αποτέλεσμα, χρησιμοποιούνται στις αντιδράσεις PCR.

2.3 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης

Η τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR, Polymerase Chain

Reaction) επινοήθηκε από τον Kary Mullis στα μέσα της δεκαετίας του 1980 κι έφερε επανάσταση στη μοριακή γενετική. Η PCR είναι μια ενζυμική μέθοδος που επιτρέπει την *in vitro* ενίσχυση συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA, εκμεταλλευόμενη ορισμένα χαρακτηριστικά του *in vivo* μηχανισμού αντιγραφής του DNA. Μέσω της PCR παράγεται ένας τεράστιος αριθμός πιστών αντιγράφων μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας του DNA, χρησιμοποιώντας μικρές ποσότητες DNA

Στην PCR χρησιμοποιείται μια DNA πολυμεράση για τη σύνθεση (τον πολλαπλασιασμό) μεγάλου αριθμού αντιγράφων μιας αλληλουχίας DNA. Η πολυμεράση αυτή χρησιμοποιεί μονόκλωνο DNA ως μήτρα για τη σύνθεση ενός συμπληρωματικού νέου κλώνου. Το μονόκλωνο DNA προκύπτει κατά τη θέρμανση του δίκλωνου σε θερμοκρασία που πλησιάζει το σημείο βρασμού. Καθώς η πολυμεράση χρειάζεται ένα τμήμα δίκλωνου DNA ώστε να ξεκινήσει τη σύνθεση, προσθέτουμε στην αντίδραση δυο ειδικούς ολιγονουκλεοτιδικούς εκκινητές (primers). Καθένας από αυτούς είναι συμπληρωματικός με μια περιοχή του ενός από τους κλώνους του DNA στόχου, ώστε να υβριδοποιείται (να προσδένεται) σε αυτή. Οι εκκινητές επιλέγονται ούτως ώστε να υβριδοποιούνται εκατέρωθεν του τμήματος DNA που θέλουμε να πολλαπλασιάσουμε. Κάθε νέος κλώνος DNA που συντίθεται από τον ένα εκκινητή περιλαμβάνει τη θέση στην οποία υβριδοποιείται ο άλλος εκκινητής. Το μείγμα της αντίδρασης θερμαίνεται ξανά, ώστε να διαχωριστούν οι κλώνοι, να υβριδοποιηθούν οι εκκινητές στις θέσεις πρόσδεσης που έγιναν προσβάσιμες λόγω της αποδιάταξης και συντίθενται νέοι κλώνοι. Οι κύκλοι θέρμανσης, προσκόλλησης των εκκινητών στη μήτρα και επέκτασης τους με αποτέλεσμα τη σύνθεση νέων μορίων DNA επαναλαμβάνονται, έτσι ώστε μετά από n κύκλους το μείγμα της αντίδρασης να περιέχει θεωρητικά έως 2^n δίκλινα μόρια DNA τα οποία φέρουν αντίγραφα της αλληλουχίας που βρίσκεται ανάμεσα στους εκκινητές. Στην πράξη, η τυπική απόδοση ανέρχεται στο 10-30% της θεωρητικά μέγιστης. Παράγοντες που επηρεάζουν σημαντικά την απόδοση είναι το μήκος και η αλληλουχία του τμήματος που πρόκειται να πολλαπλασιαστεί. Η DNA πολυμεράση συχνά δυσκολεύεται να αντιγράψει αλληλουχίες μεγάλου μήκους ή υψηλής περιεκτικότητας σε GC. Με την τεχνική PCR παράγονται τόσα πολλά αντίγραφα, που είναι εύκολο στη συνέχεια να εμφανιστούν σε πήκτωμα αγαρόζης βαμμένο με βρωμιούχο αιθίδιο.

Για τη βελτιστοποίηση της PCR είναι απαραίτητη η ρύθμιση πολλών παραμέτρων, όπως η θερμοκρασία υβριδοποίησης των εκκινητών στην αλληλουχία στόχο, οι συγκεντρώσεις των αλάτων και η χρονική διάρκεια κάθε επιμέρους βήματος. Ιδιαίτερη προσοχή χρειάζεται και στην επιλογή των εκκινητών, καθώς αυτοί καθορίζουν από πού θα ξεκινήσει η σύνθεση των νέων κλώνων.

Η εξειδίκευση της πρόσδεσης ενός εκκινητή εξαρτάται από τη νουκλεοτιδική

αλληλουχία και από το μήκος του. Ολιγονουκλεοτίδια μήκους 18-24bp παρουσιάζουν συνήθως μεγάλη εξειδίκευση (όσο αυξάνεται το μήκος του εκκινητή, τόσο αυξάνεται η πιθανότητα η συμπληρωματική του αλληλουχία να συναντάται μια μόνο φορά στο DNA-στόχο), εφόσον η υβριδοποίηση πραγματοποιείται στη θερμοκρασία τήξης τους (T_m). Είναι επίσης σημαντικό οι εκκινητές που θα χρησιμοποιηθούν να έχουν παραπλήσιες T_m ώστε στην ίδια θερμοκρασία να υβριδοποιούνται αποτελεσματικά και οι δύο.

Για τη διεξαγωγή του πειράματος χρησιμοποιήθηκαν τρία ζεύγη εκκινητών για τα δύο γονίδια του μιτοχονδριακού DNA. Ένα ζεύγος για το γονίδιο COII και δύο ζεύγη για το γονίδιο COI (1542bp), το οποίο ενισχύθηκε σε δύο τμήματα (COIa, COIb).

A/A	Γονίδιο	FW εκκινητής 5'-3' (T_m) RV εκκινητής 5'-3' (T_m)	Νουκλεοτιδική θέση	Μήκος (bp)
1	COIa	CATTTTACCTCACCCCACTG (61) ATGGGAGATTATTCGAAGC (56)	5883 6672	789
2	COIb	CTGATTTTTCGGTCACCCTGA (59) GGGTTCTTCGAATGTGTGGT (58)	6608 7427	819
3	COII	CAAGTAGGTCTACAAGAC (60) TATAGGGTAAATACGGGCCCT (60)	7601 8268	684

Πίνακας 1. Τα ζεύγη εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για κάθε γονίδιο.

Υλικά

Αρχικά παρασκευάζουμε ένα Mastert Mix των 50μl για κάθε δείγμα. Οι ποσότητες κάθε αντιδραστηρίου που θα χρησιμοποιήσουμε είναι οι εξής:

Αντιδραστήρια	Αρχικές Συγκεντρώσεις	Ποσότητα ανα δείγμα	Τελικές Συγκεντρώσεις
PCR Buffer	10X	5μl	1X
MgCl ₂	25mM	1μl	0,5mM
Primers	50pmol/μl	1μl από κάθε εκκινητή	1pmol/μl κάθε εκκινητή
dNTPs	10mM (για κάθε βάση)	1μl	0,8mM
DNA polymerase	5U/μl	0,2μl	0,02U/μl

KapaTaq			
ddH ₂ O		Μέχρι τελικού όγκου 50 μl	

Η ποσότητα του DNA που χρησιμοποιούμε είναι 3-5 μl.

Μέθοδος

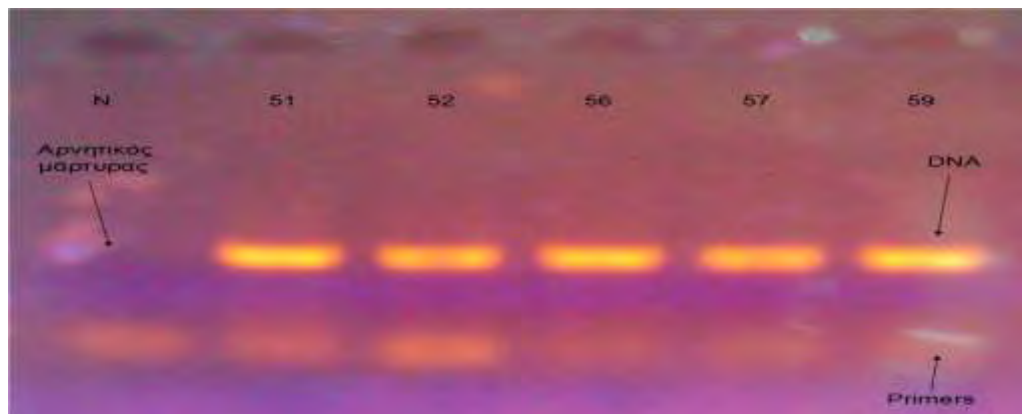
Αφού ολοκληρωθεί η παρασκευή του Master Mix, το δείγμα τοποθετείται σε θερμοκυκλοποιητή όπου θα λάβει χώρα η αντίδραση και θα ολοκληρωθεί σε 35 κύκλους. Αναλυτικά, ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία.

- Αρχική αποδιάταξη για 4 λεπτά στους 95 °C: Είναι το στάδιο όπου το δίκλωνο DNA αποδιατάσσεται ώστε να προκύψουν μονόκλωνα μόρια που θα χρησιμοποιηθούν ως εκμαγεία για τη σύνθεση νέου DNA από τους εκκινητές και την πολυμεράση.
- Ακολουθεί η φάση των 35 κύκλων όπου η παρακάτω διαδικασία θα επαναληφθεί 35 φορές
 1. **Αποδιάταξη** (denaturation): Για 40 δευτερόλεπτα στους 95 °C.
 2. **Υβριδισμός** (annealing): Πτώση της θερμοκρασίας στους 58 °C για 50 δευτερόλεπτα έτσι ώστε να υβριδοποιηθούν οι εκκινητές στις συμπληρωματικές τους αλληλουχίες, στο ήδη αποδιαταγμένο DNA.
 3. **Επέκταση** (extension): Αύξηση της θερμοκρασίας στους 72 °C για ένα λεπτό. Η θερμοκρασία αυτή είναι η κατάλληλη για την θερμοανθεκτική Taq DNA πολυμεράση κι έτσι μπορεί να εκτελέσει με μεγάλη ακρίβεια τη σύνθεση των νέων συμπληρωματικών κλώνων DNA.
- Τελική επέκταση για 10 λεπτά σε θερμοκρασία 72 °C ώστε να ολοκληρωθεί η επιμήκυνση τμημάτων που δεν έχουν επιμηκυνθεί πλήρως.

Το τελικό προϊόν μπορεί να αποθηκευτεί σε θερμοκρασία μικρότερη των 4 °C μέχρι την επόμενη χρήση. Επίσης, χρησιμοποιείται κατά την αντίδραση PCR αρνητικός μάρτυρας για τον έλεγχο επιμολύνσεων.

Το προϊόν της αντίδρασης ελέγχεται σε πήκτωμα αγαρόζης 1,5% (0,6gr αγαρόζης σε 40ml TAE 1X και 4μl βρωμιούχο αιθίδιο). Στο πήκτωμα φορτώνονται 5μl προϊόντος αναμεμιγμένα με 3μl loading buffer και ηλεκτροφορούνται στα 100V. Αφού ολοκληρωθεί η ηλεκτροφόρηση, γίνεται εμφάνιση των ζωνών των προϊόντων PCR σε συσκευή ακτινοβολίας

UV. Για τον έλεγχο του μεγέθους του τμήματος που ενισχύθηκε, χρησιμοποιείται μίγμα τμημάτων DNA γνωστού μεγέθους (ladder), το οποίο ηλεκτροφορείται παράλληλα με τα δείγματα που θέλουμε να ελέγξουμε.



Εικόνα 10. *PCR προϊόντα μετά την ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης*

2.4 Καθαρισμός PCR προϊόντων

Ο καθαρισμός των PCR προϊόντων των δειγμάτων που επιλέχθηκαν έγινε με QIAquick Spin[®] PCR Purification Kit, κατάλληλο για την απομάκρυνση εκκινητών, νουκλεοτιδίων, πολυμερασών, αλάτων και άλλων προσμίξεων που απέμειναν στα PCR προϊόντα μετά την αντίδραση PCR. Το DNA ανακτάται σε ποσοστό 90 – 95%.

Υλικά

PB Buffer Διάλυμα συλλογής (capture buffer)	Επιτρέπει την αποτελεσματική δέσμευση προϊόντος PCR ακόμα κι αν είναι πολύ μικρό (100bp) και την ποσοτική απομάκρυνση των
--	---

	εκκινητών (99,5%) μήκους έως και 40 νουκλεοτιδίων.
Buffer PE Διάλυμα πλύσης (wash buffer)	Περιέχει αιθανόλη και χρησιμοποιείται για πλύση, όπως και για απομάκρυνση των αλάτων.
Buffer EB (10mM Tris-Cl, pH 8,5) Διάλυμα έκλουσης (elution buffer)	Εξάγει το DNA.

Μέθοδος

1. Αναμειγνύουμε 50μl προϊόντος PCR με 250μl Buffer PB σε eppendorfs των 750μl.
2. Τοποθετούμε μια QIAquick spin στήλη σε ένα σωληνάριο eppendorf των 2ml.
3. Για τη δέσμευση του DNA, μεταφέρουμε το προηγούμενο δείγμα στην QIAquick spin στήλη και φυγοκεντρούμε για ένα λεπτό.
4. Απομακρύνουμε το υγρό και επανατοποθετούμε τη στήλη στο ίδιο σωληνάριο συλλογής.
5. Για το ξέπλυμα της στήλης προσθέτουμε 650μl Buffer PE και φυγοκεντρούμε για ένα λεπτό.
6. Απομακρύνουμε το υγρό, τοποθετούμε τη στήλη στο ίδιο σωληνάριο και φυγοκεντρούμε για ένα λεπτό στις 13.000 στροφές.
7. Για την ανάκτηση του DNA, προσθέτουμε 50μl Buffer EB και μετά από αναμονή ενός λεπτού φυγοκεντρούμε για ένα λεπτό τη στήλη.

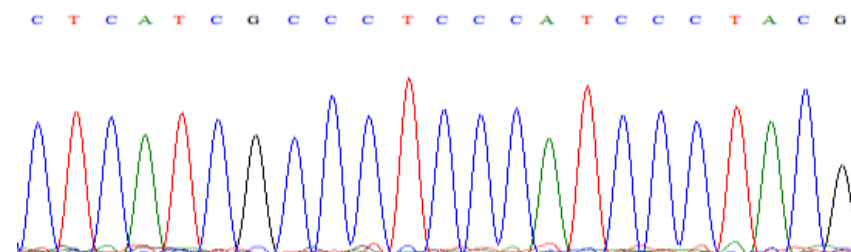
Μετά τη διαδικασία του καθαρισμού, ακολουθεί ποσοτικός προσδιορισμός του προϊόντος με φωτομέτρηση 1μl κάθε δείγματος DNA αραιωμένου σε 49μl ddH₂O. Από τις τιμές του φωτομέτρου υπολογίζουμε εάν η συγκέντρωση του DNA είναι επαρκής ώστε το δείγμα να σταλεί για αλληλούχιση (sequencing).

Τα δείγματα πλέον είναι έτοιμα να σταλούν για αλληλούχιση μαζί με τους κατάλληλους εκκινητές, αφού είναι απαραίτητοι για την εφαρμογή της διαδικασίας. Οι ποσότητα εκκινητή που απαιτείται ανά δείγμα είναι 5μl των 5pmol/μl.

2.5 Προσδιορισμός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας μορίων DNA (Sequencing)

Η αλληλούχιση των προϊόντων της PCR έγινε βάσει της ενζυματικής μεθόδου Sanger. Η αρχή της μεθόδου αυτής βασίζεται στη χρήση διδεοξυνουκλεοτιδίων (ddNTPs) για κάθε

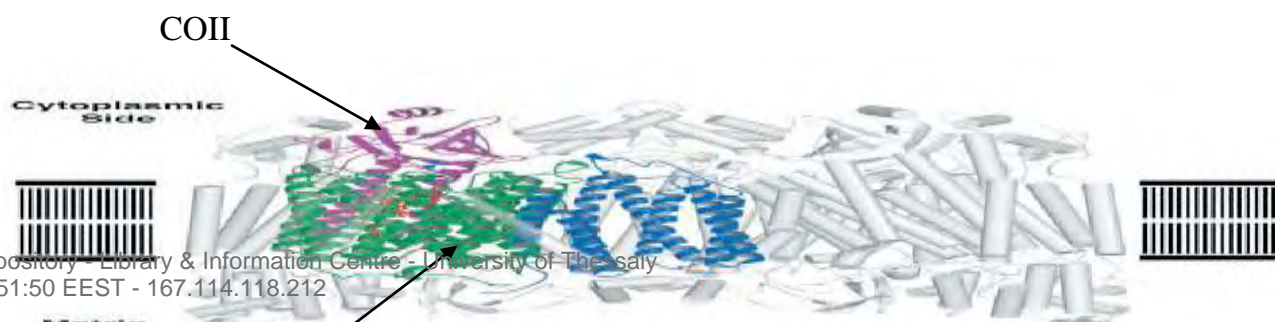
μία από τις τέσσερις βάσεις (A, T, C, G). Τα ddNTPs μπορούν να ενσωματωθούν σε ένα νεοσυντιθέμενο κλώνο DNA από τη DNA πολυμεράση, αφού φέρουν την 5' φωσφορική ομάδα, αλλά δεν μπορούν να σχηματίσουν φωσφοδιεστερικό δεσμό με το επόμενο dNTP που θα έρθει να προστεθεί, επειδή δε διαθέτουν την 3'-OH ομάδα. Έτσι η αντιγραφή της συγκεκριμένης αλυσίδας σταματά. Στην αντίδραση αλληλούχισης συμμετέχει ο κλώνος DNA που πρόκειται να αλληλουχιθεί, ο κατάλληλος εκκινητής, ενώ τα dNTPs και τα ddNTPs προστίθενται σε μια αυστηρά προσδιορισμένη αναλογία. Τα ddNTPs είναι σημασμένα με φθορίζουσα χρωστική για να μπορούν να ανιχνευθούν. Στη συνέχεια προστίθεται η DNA πολυμεράση και ξεκινάει η αντίδραση της σύνθεσης. Όταν σε μια αλυσίδα προστεθεί τυχαία ένα ddNTP, αυτή παύει να επεκτείνεται. Έτσι σχηματίζονται τμήματα DNA διαφορετικού μήκους ανάλογα με τη θέση στην οποία ενσωματώθηκε το ddNTP και το κάθε τμήμα θα πρέπει να έχει διαφορά μιας βάσης από το επόμενο μεγαλύτερο. Όταν ολοκληρωθεί η αντίδραση, το προϊόν ηλεκτροφορείται σε τριχοειδή όπου τα διάφορα τμήματα DNA κινούνται βάσει του μεγέθους τους και χάρη στη σήμανση των ddNTPs ανιχνεύονται από ανιχνευτή laser. Τα δεδομένα αυτά επεξεργάζονται από το κατάλληλο πρόγραμμα βιοπληροφορικής και τελικά παρουσιάζονται με έγχρωμες κορυφές που αντιστοιχούν σε συγκεκριμένες βάσεις.



Εικόνα 11. Χρωματογράφημα αλληλούχισης

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

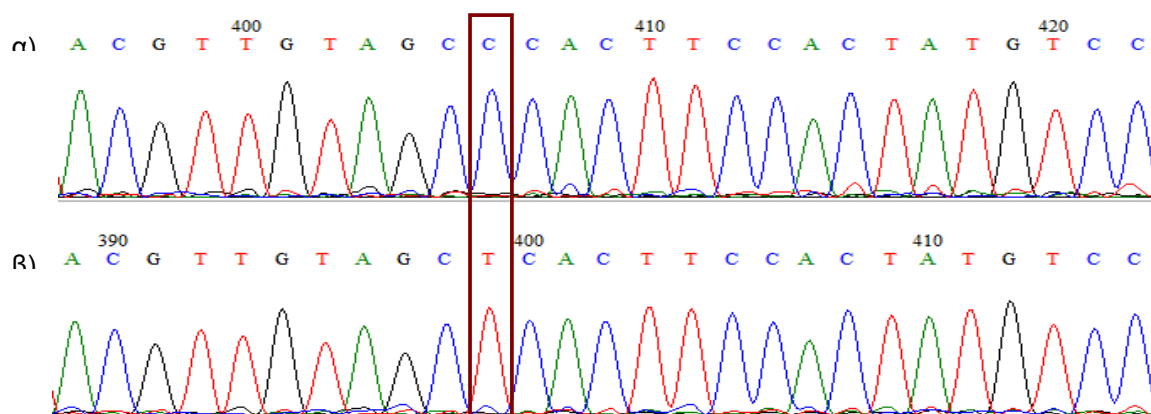
Στην παρούσα εργασία μελετήσαμε 25 ασθενείς με άσθμα και 23 φυσιολογικά άτομα για την ανίχνευση και την ταυτοποίηση μεταλλάξεων στα γονίδια COI και COII του μιτοχondριακού DNA, τα οποία κωδικοποιούν την υπομονάδα 1 και την υπομονάδα 2 αντίστοιχα, της οξειδάσης του κυτοχρώματος c. Μεταξύ των ασθενών εντοπίστηκαν συνολικά 14 μεταλλάξεις. Έντεκα από αυτές βρέθηκαν στο COI γονίδιο και μόλις τρεις στο COII.



Εικόνα 12. Οξειδάση του κυτοχρώματος c. Η υπομονάδα I (COI) με πράσινο χρώμα και η υπομονάδα II (COII) με μωβ, ενώ φαίνεται και η υπομονάδα III (μπλε) που επίσης κωδικοποιείται από το mtDNA.

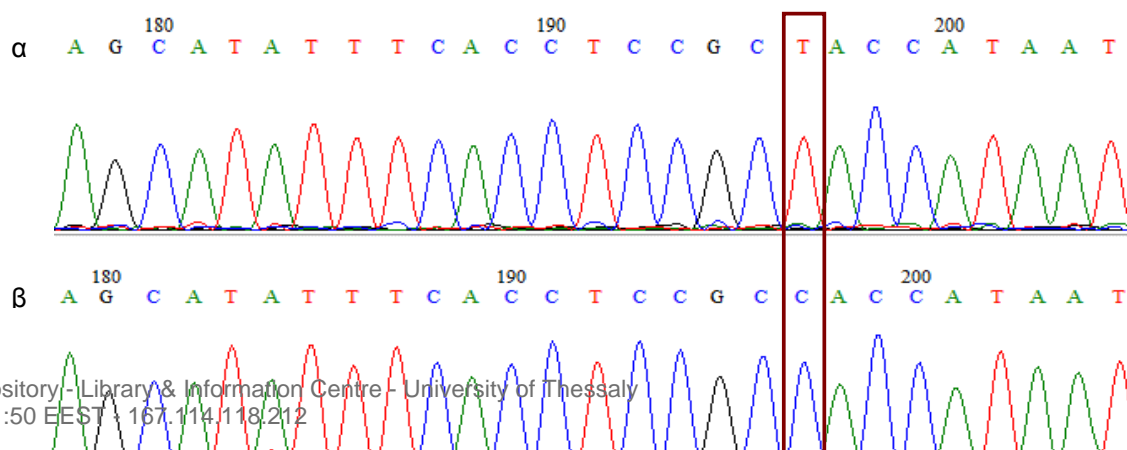
3.1 Μεταλλάξεις στο γονίδιο COI

Η πλειοψηφία των μεταλλάξεων ανιχνεύθηκε στο COI γονίδιο. Αναλυτικά, η μετάλλαξη T7028C βρέθηκε σε 12 από τους 25 ασθενείς (48%) και σε 11 από τους 23 φυσιολογικούς (47,8%). Η μετάλλαξη αυτή είναι σιωπηλή αφού δεν επηρεάζει την αμινοξική αλληλουχία της πρωτεΐνης. Το κωδικόνιο GCC που κωδικοποιεί αλανίνη (A) μετατρέπεται σε GCT που επίσης κωδικοποιεί αλανίνη.



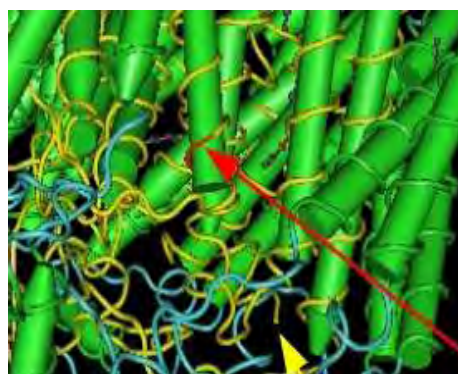
Εικόνα 13. Τμήμα χρωματογραφήματος αλληλούχισης. Στην εικόνα φαίνεται τμήμα της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του γονιδίου COI (α) ενός φυσιολογικού ατόμου (β) κι ενός ατόμου που φέρει τη μετάλλαξη T7028C.

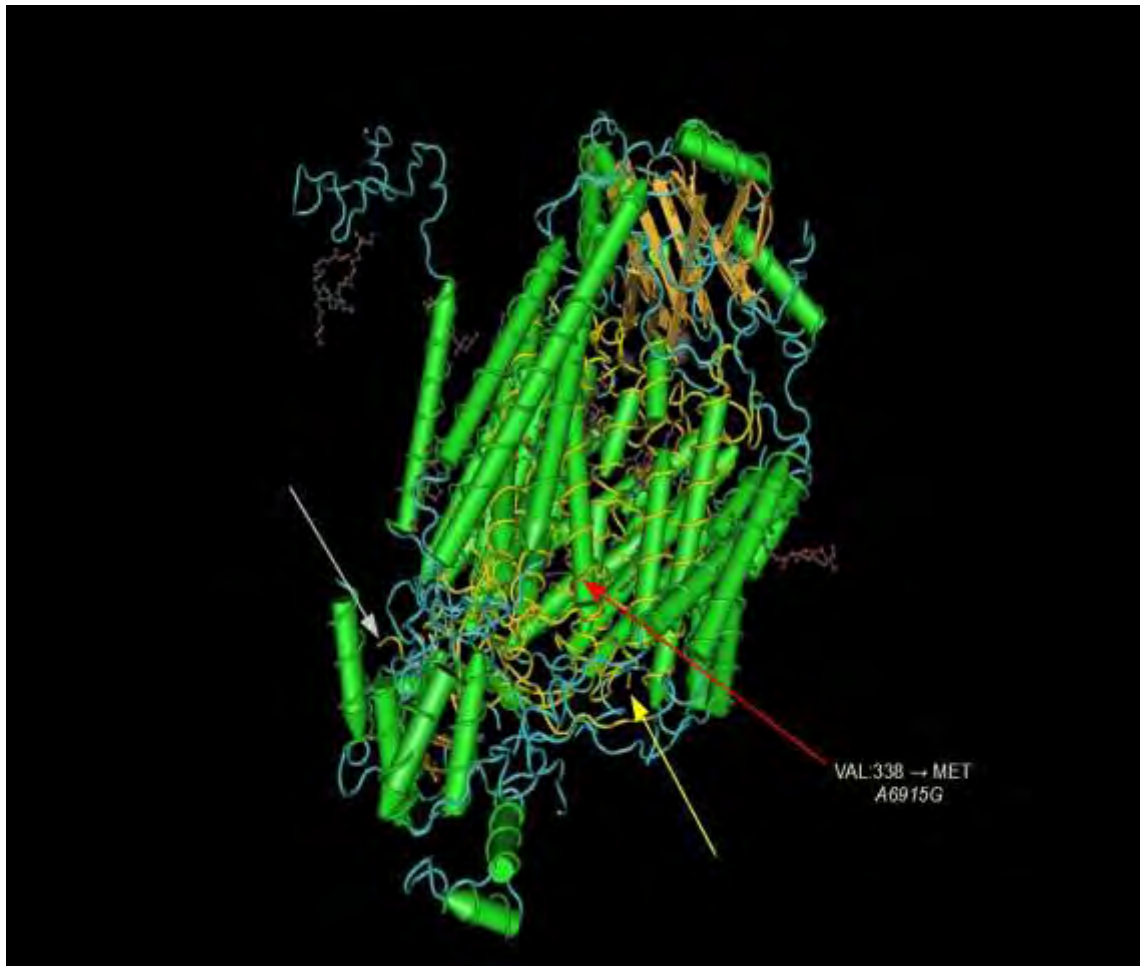
Η μετάλλαξη **C6827T** ανιχνεύθηκε σε 2 από τους 25 ασθενείς (8%) και σε κανέναν από τους φυσιολογικούς. Είναι μία σιωπηλή μετάλλαξη, με το κωδικόνιο να αλλάζει από GCT, που κωδικοποιεί την αλανίνη στη θέση 308, στην όγδοη διαμεμβρανική έλικα της υπομονάδας 1, σε GCC.



Εικόνα 14. Στην παραπάνω εικόνα διακρίνεται τμήμα της αλληλουχίας του COI γονιδίου (α) φυσιολογικού ατόμου (β) κι ασθενούς που φέρει τη μετάλλαξη C6827T.

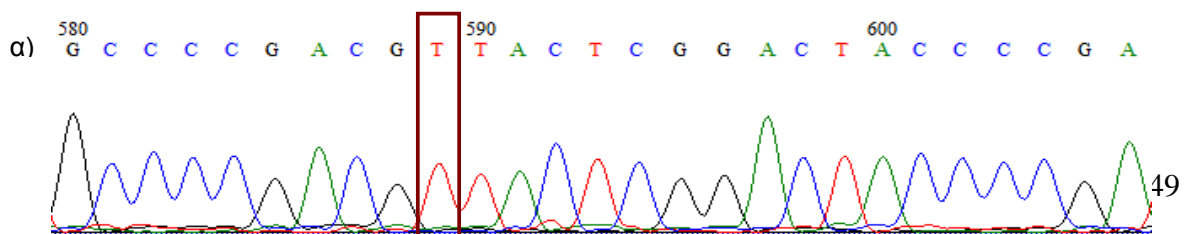
Βρέθηκε επίσης η μετάλλαξη **A6915G** σε 1 από τους 25 ασθματικούς (4%), ενώ δε βρέθηκε σε κανένα φυσιολογικό άτομο. Το αποτέλεσμα αυτής της μετάλλαξης είναι η αλλαγή του κωδικονίου GTG σε ATG, που οδηγεί στην μεταβολή της αλληλουχίας της πρωτεΐνης καθώς η μη πολική βαλίνη (V) αντικαθίσταται από την πολική μεθειονίνη (M), στη θέση 338, στην ένατη διαμεμβρανική έλικα της υπομονάδας 1.





Εικόνα 15. Οξειδάση του κυτοχρώματος *c*. Η υπομονάδα I (κίτρινο) αποτελείται από 12 διαμεμβρανικές α -έλικες. Το κόκκινο βέλος δείχνει την αντικατάσταση του αμινοξέος βαλίνη (VAL) από μεθειονίνη (MET), στην ένατη διαμεμβρανική έλικα της υπομονάδας I. Επίσης, φαίνεται το αμινοτελικό (κίτρινο βέλος) και καρβοξυτελικό (γκρι βέλος) άκρο της υπομονάδας αυτής.

Στο γονίδιο COI ανιχνεύθηκαν ακόμα οι μεταλλάξεις **C6671T**, **C6776T**, **A7196C** και **C7220T** σε ποσοστό 4% στους ασθενείς (1 από τους 25), ενώ δε βρέθηκαν σε κανένα φυσιολογικό. Οι μεταλλάξεις αυτές είναι σιωπηλές κι εκτός από την C7220T, η οποία μεταβάλλει το κωδικόνιο που κωδικοποιεί το αμινοξύ αργινίνη (R), στη θέση 439, στο διαμεμβρανικό χώρο, οι υπόλοιπες μεταλλάξεις μεταβάλλουν κωδικόνια που κωδικοποιούν αμινοξέα για τις διαμεμβρανικές έλικες της υπομονάδας 1.



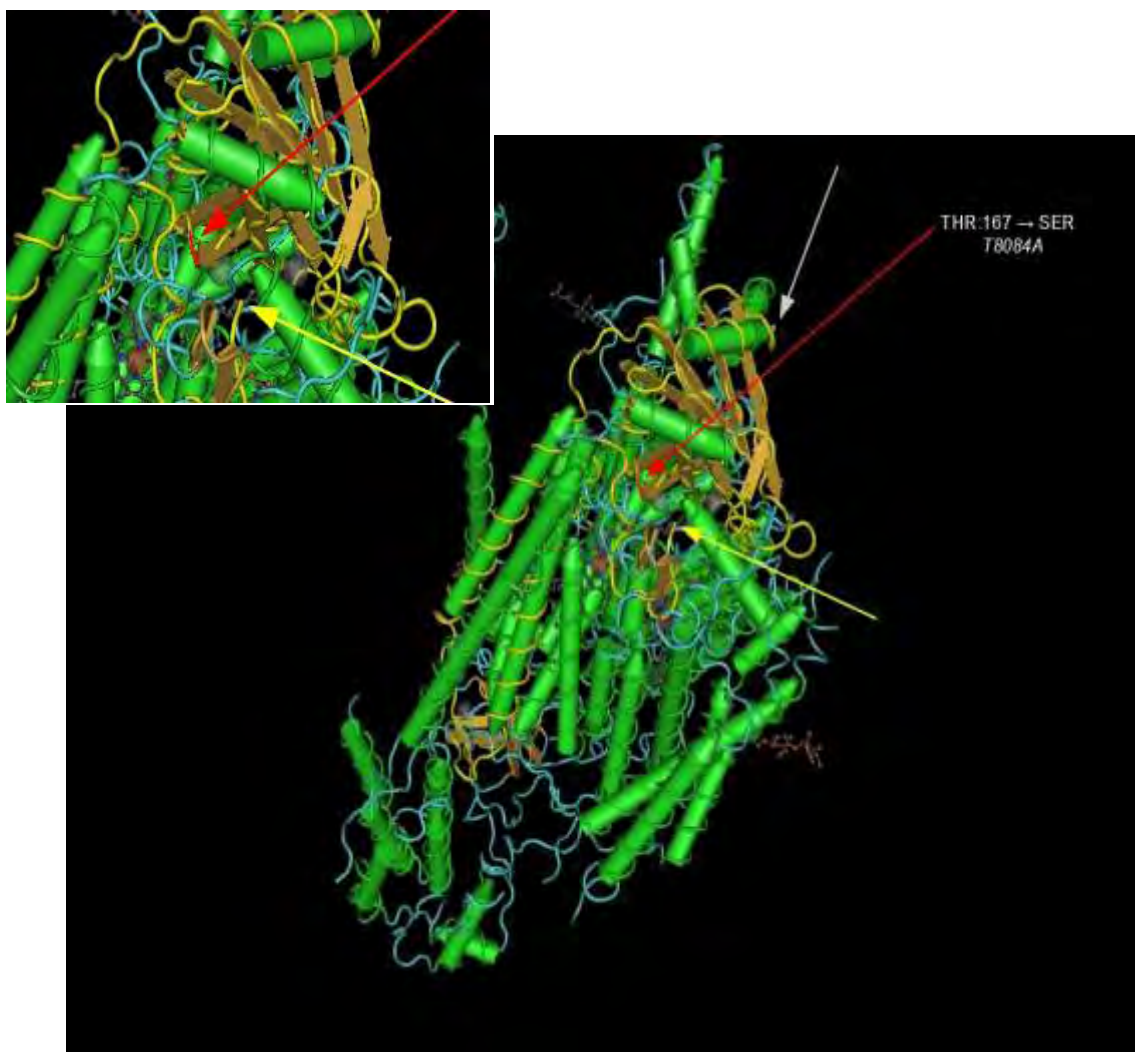
Εικόνα 16. Χρωματογράφημα αλληλούχισης τμήματος του γονιδίου *COI*. (α) Τμήμα του γονιδίου φυσιολογικού ατόμου. (β) Τμήμα του γονιδίου ασθενή με άσθμα όπου διακρίνεται η μετάλλαξη C7220T.

Επιπλέον, εντοπίστηκαν οι μεταλλάξεις **C5999T** και **G6047A** σε ποσοστό 4% σε ασθενείς με άσθμα (1 από τους 25) και σε ποσοστό 4,35% στους φυσιολογικούς (1 από τους 23), ενώ οι μεταλλάξεις **C6221T** και **T6371C** ανιχνεύθηκαν σε ποσοστό επίσης 4% στους ασθενείς (1 από τους 25), μικρότερο από αυτό των φυσιολογικών που έφτασε το 8,7% (2 από τους 23). Όλες οι παραπάνω μεταλλάξεις είναι σιωπηλές και μεταβάλλουν κωδικόνια υπεύθυνα για την κωδικοποίηση αμινοξέων για τις διαμεμβρανικές έλικες της υπομονάδας 1, εκτός από την G6047A (διαμεμβρανικός χώρος).

3.2 Μεταλλάξεις στο γονίδιο *COII*

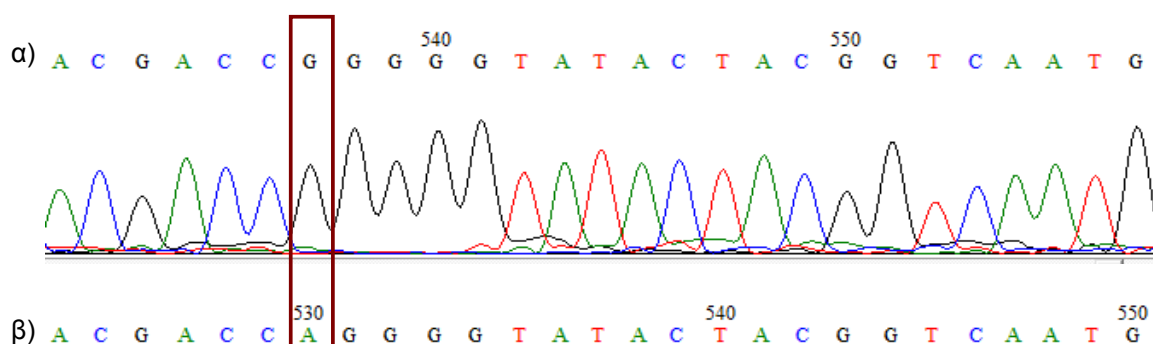
Για μεταλλάξεις στο γονίδιο αυτό εξετάστηκαν 25 ασθενείς με άσθμα και 22 φυσιολογικά άτομα. Οι τρεις μεταλλάξεις που ανιχνεύθηκαν είναι οι **G7768A**, **T8084A** και **A8152G**.

Η μετάλλαξη **T8084A** εντοπίστηκε σε 1 από τους 25 ασθενείς με άσθμα (4%), ενώ δεν βρέθηκε σε κανέναν φυσιολογικό. Το αποτέλεσμα αυτής της A → T μεταστροφής (ACA→TCA) είναι αλλαγή της αμινοξικής αλληλουχίας της πρωτεΐνης, με την πολική σερίνη (S) να αντικαθιστά την πολική θρεονίνη (T) στη θέση 167 της υπομονάδας 2, στο διαμεμβρανικό χώρο.



Εικόνα 17. Οξειδάση του κυτοχρώματος *c*. Η υπομονάδα II (κίτρινο) αποτελείται από δύο διαμεμβρανικές α-έλικες και μία δομή β-βαρελίου. Το κόκκινο βέλος δείχνει τη θέση στην οποία γίνεται η αντικατάσταση της θρεονίνης (THR) από σερίνη (SER), στο διαμεμβρανικό χώρο, στην υπομονάδα 2 (κίτρινο χρώμα). Το κίτρινο και το γκρι βέλος υποδεικνύουν το αμινοτελικό και καρβοξυτελικό άκρο της υπομονάδας 2, αντίστοιχα.

Η μετάλλαξη **A8152G** ανιχνεύθηκε σε 1 από τους 25 ασθενείς (4%) και σε κανένα φυσιολογικό άτομο. Είναι μία σιωπηλή μετάλλαξη καθώς η μετατροπή του κωδικονίου από **CCG** σε **CCA** δεν επηρεάζει την κωδικοποίηση της προλίνης (P) της θέσης 189, στο τμήμα της υπομονάδας 2 που βρίσκεται στο διαμεμβρανικό χώρο.



Εικόνα 18. Στο παραπάνω χρωματογράφημα φαίνεται η αλληλουχία τμήματος του γονιδίου *COII* (α) ενός φυσιολογικού ατόμου (β) κι ενός ασθματικού που φέρει τη μετάλλαξη A8152G

Επίσης, βρέθηκε η μετάλλαξη **G7768A** σε ποσοστό 4% στους ασθενείς (1 από τους 25) και 4,55% στους φυσιολογικούς (1 από τους 22). Κι αυτή η μετάλλαξη είναι σιωπηλή οπότε και συνεχίζει να κωδικοποιείται μεθειονίνη για το τμήμα της υπομονάδας 2 που βρίσκεται στην μιτοχονδριακή μήτρα.

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται συνολικά οι μεταλλάξεις που βρέθηκαν στα δύο γονίδια

A/A	Γονίδιο	Μετάλλαξη	Είδος μετάλλαξης	Θέση αμινοξέος στην πρωτεΐνη, που επηρεάζεται από την μετάλλαξη	% Ποσοστό στους ασθενείς με Άσθμα	% Ποσοστό στους φυσιολογικούς
1	COI	C5999T	GCT→GCC (A) σιωπηλή Παραμένει Αλανίνη	32 (1 ^η Διαμεμβρανική έλικα)	4%	4,35%
2	COI	G6047A	CTA→CTG (L) σιωπηλή	48 (Διαμεμβρανικός)	4%	4,35%

			Παραμένει Λευκίνη	χώρος)		
3	COI	C6221T	CCT→CCC (P) σιωπηλή Παραμένει Προλίνη	106 (3 ^η Διαμεμβρανική έλικα)	4%	8,7%
4	COI	T6371C	TCC→TCT (S) σιωπηλή Παραμένει Σερίνη	156 (4 ^η Διαμεμβρανική έλικα)	4%	8,7%
5	COI	C6671T	CAT→CAC (H) σιωπηλή Παραμένει Ιστιδίνη	256 (6 ^η Διαμεμβρανική έλικα)	4%	0,00%
6	COI	C6776T	CAT→CAC (H) σιωπηλή Παραμένει Ιστιδίνη	291 (7 ^η Διαμεμβρανική έλικα)	4%	0,00%
7	COI	C6827T	GCT→GCC (A) σιωπηλή Παραμένει Αλανίνη	308 (8 ^η Διαμεμβρανική έλικα)	8%	0,00%
8	COI	A6915G	GTG→ATG V→M Μεταλλάσσεται από Βαλίνη σε Μεθειονίνη	338 (9 ^η Διαμεμβρανική έλικα)	4%	0,00%
9	COI	T7028C	GCC→GCT (A) σιωπηλή Παραμένει Αλανίνη	375 (10 ^η Διαμεμβρανική έλικα)	48,00%	47,8%
10	COI	A7196C	CTC→CTA (L) σιωπηλή Παραμένει Λευκίνη	431 (11 ^η Διαμεμβρανική έλικα)	4%	0,00%
11	COI	C7220T	CGT→CGC (R) σιωπηλή Παραμένει Αργινίνη	439 (Διαμεμβρανικός χώρος)	4%	0,00%
12	COII	G7768A	ATA→ATG (M) σιωπηλή Παραμένει Μεθειονίνη	61 (Μιτοχονδριακή μήτρα)	4%	4,55%
13	COII	T8084A	ACA→TCA T→S Μεταλλάσσεται από Θρεονίνη σε Σερίνη	167 (Διαμεμβρανικός χώρος)	4%	0,00%
14	COII	A8152G	CCG→CCA (P) σιωπηλή Παραμένει Προλίνη	189 (Διαμεμβρανικός χώρος)	4%	0,00%

Πίνακας 2. Συνολικός πίνακας αποτελεσμάτων των μεταλλάξεων που εντοπίστηκαν στα COI και COII

3.3 Συνδυασμοί μεταλλάξεων

Οι περισσότερες μεταλλάξεις που αναφέρθηκαν εντοπίστηκαν σαν συνδυασμοί μεταλλάξεων σε ορισμένους ασθενείς με άσθμα. Ένας συνδυασμός τεσσάρων μεταλλάξεων ανιχνεύθηκε σε 1 από τους 25 ασθενείς (4%), ενώ απουσίαζε από τα δείγμα φυσιολογικών που εξετάστηκαν. Ο συνδυασμός αυτός αποτελείται από τις μεταλλάξεις **C5999T**, **G6047A**, **A6915G** και **T7028C**, και όλες βρίσκονται στο COI γονίδιο.

Οι μεταλλάξεις **C6776T** στο COI γονίδιο και **T8084A** στο COII, βρέθηκαν σε συνδυασμό σε έναν από τους 25 ασθματικούς (4%). Στο ίδιο ποσοστό εντοπίστηκαν κι άλλοι συνδυασμοί μεταλλάξεων όπως η **T7028C** και η **A7196C** στο γονίδιο COI, η **T7028C** (COI) και η **G7768A** που βρίσκεται στο γονίδιο COII. Η **T7028C** (COI) επίσης ανιχνεύθηκε σε συνδυασμό και με την **A8152G** που βρέθηκε στο COII γονίδιο. Από τους παραπάνω συνδυασμούς μεταλλάξεων, κανένας δεν ανιχνεύθηκε σε φυσιολογικά άτομα.

Ο μοναδικός συνδυασμός που εντοπίστηκε σε φυσιολογικούς και μάλιστα σε μεγαλύτερο ποσοστό από αυτό των ασθενών ήταν ο συνδυασμός των μεταλλάξεων **C6221T**, **T6371C** και **T7028C** στο γονίδιο COI. Δύο από τους 23 φυσιολογικούς έφεραν τον παραπάνω συνδυασμό (9,1%) και μόλις ένας εκ των 25 ασθενών (4%).

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Το μιτοχόνδριο αποτελεί το σημαντικότερο οργανίδιο για την παραγωγή ενέργειας του κυττάρου, ενώ παράλληλα έχει σημαντικό ρόλο στα ενδογενή αποπτωτικά μονοπάτια. Δυσλειτουργία της αναπνευστικής αλυσίδας συνδέεται με μειωμένη παραγωγή ATP και αυξημένα επίπεδα δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS). Η αύξηση των ROS έχειδειχθεί ότι μπορεί να προκαλέσει τη μεταστροφή των ανώριμων T λεμφοκυττάρων προς τον Th2 υπότυπο (Murata et al. 2002; Kim et al. 2007), βασικού παράγοντα για την έναρξη της φλεγμονής, ενώ κάποιες μελέτες δείχνουν ότι επηρεάζει και τη συμπεριφορά ορισμένων κυττάρων που συμμετέχουν στη φλεγμονώδη αντίδραση όπως την αποκκοκίωση των ηωσινόφιλων και τη μετανάστευση τους στους αεραγωγούς (Adachi et al. 2000; Sano et al. 2001; Terakawa et al. 2005). Σημαντικός επίσης φαίνεται να είναι ο ρόλος των ROS σε

σηματοδοτικά μονοπάτια σχετικά με την απόπτωση και την επιβίωση (Hansen et al. 2006). Η απογύμνωση του επιθηλίου των αεραγωγών λόγω της αυξημένης απόπτωσης που παρουσιάζουν τα επιθηλιακά κύτταρα (Bucchieri et al. 2002), οδηγεί στην παραγωγή ορισμένων αυξητικών παραγόντων, οι οποίοι σε συνδυασμό με κυτταροκίνες που παράγονται από τα κύτταρα που συμμετέχουν στη φλεγμονή (IL-13), προωθούν την επαναδόμηση των ιστών των αεραγωγών (Taagaya & Tamaoki 2007). Στην περίπτωση του άσθματος, η επαναδόμηση αυτή (remodeling) γίνεται με λανθασμένο τρόπο και προκαλεί στένωση των αεραγωγών. Κύριο χαρακτηριστικό αυτής της διαδικασίας είναι η αύξηση της μάζας των λείων μυών των αεραγωγών, που οφείλεται είτε σε υπερπλασία είτε σε υπερτροφία των λείων μυϊκών κυττάρων και συνδέεται με τον αυξημένο αριθμό μιτοχονδρίων που παρατηρούνται στα κύτταρα αυτά (Trian et al. 2007). Τα μιτοχόνδρια επίσης μπορεί να ευθύνονται για τη μειωμένη απόπτωση που χαρακτηρίζει τα κύτταρα των λείων μυών (Zhao et al. 2009). Επιπλέον, γενετικές μελέτες έχουν δείξει ότι η μητρική κληρονομικότητα αποτελεί σοβαρό παράγοντα κινδύνου για την ανάπτυξη άσθματος, κάτι που ίσως εξηγείται με τον τρόπο κληρονόμησης του μιτοχονδρίου, ενώ ακόμη έχει βρεθεί ότι μια μιτοχονδριακή απλοομάδα (απλοομάδα U) σχετίζεται με αυξημένα επίπεδα ολικής IgE ορού σε ασθενείς με άσθμα (Raby et al. 2007). Τα παραπάνω γεγονότα καθιστούν αρκετά πιθανή την εμπλοκή του μιτοχονδρίου στη παθογένεια του άσθματος.

Επίσης, κατά τη διάρκεια της ασθματικής αντίδρασης παρατηρούνται μεταβολές στη δομή και στη λειτουργία μιτοχονδρίων σε πνευμονικά κύτταρα (Mabalirajan et al. 2008; Konga et al. 2009), όπως αύξηση των ROS, μείωση της παραγωγής ATP, μειωμένη λειτουργία της οξειδάσης του κυτοχρώματος c και μείωση της έκφρασης της υπομονάδας III του συμπλόκου αυτού. Η δυσλειτουργία της οξειδάσης του κυτοχρώματος μπορεί να οφείλεται σε οξείδωση του ενεργού κέντρου του ενζύμου, το οποίο είναι ευπαθές σε οξειδωτικούς παράγοντες, σε οξείδωση της καρδιολιπίνης (λινολεϊκό οξύ πλούσιο σε φωσφολιπίδια) που είναι απαραίτητη για τη βέλτιστη απόδοση της οξειδάσης, αλλά επίσης μπορεί να οφείλεται και σε κάποια μετάλλαξη, η οποία μεταβάλλει την αμινοξική αλληλουχία και προκαλεί μείωση της λειτουργικότητας του ενζύμου.

Για το λόγο αυτό στην παρούσα εργασία μελετήσαμε τα δύο από τα τρία γονίδια του μιτοχονδριακού DNA που κωδικοποιούν υπομονάδες της οξειδάσης του κυτοχρώματος c. Τα γονίδια αυτά είναι το COI (υπομονάδα I) και το COII (υπομονάδα II). Τριάντα τρεις μεταλλάξεις στο γονίδιο COI και 14 στο COII έχουν συσχετιστεί με κάποια ασθένεια, ενώ αναφέρονται 263 και 156 πολυμορφισμοί αντίστοιχα (mitomap). Η απομόνωση του DNA έγινε από ολικό αίμα, στη συνέχεια ακολούθησε ενίσχυση των γονιδίων με PCR και τα προϊόντα στάλθηκαν για αλληλούχηση. Συνολικά ανιχνεύθηκαν 14 μεταλλάξεις, 11 στο

γονίδιο COI και 3 στο γονίδιο COII.

Από τις μεταλλάξεις αυτές, μόνο δύο προκαλούν αντικατάσταση αμινοξέος στην πρωτεΐνη, η *A6915G* και η *T8084A*, ενώ όλες οι υπόλοιπες είναι σιωπηλές. Η μετάλλαξη *A6915G* στο γονίδιο COI, ανιχνεύθηκε σε ποσοστό 4% σε ασθματικούς ενώ δε βρέθηκε σε κανέναν φυσιολογικό και προκαλεί αντικατάσταση της βαλίνης (V) από μεθειονίνη (M) στη θέση 338, στην ένατη από τις 12 διαμεμβρανικές α-έλικες της υπομονάδας I, της οξειδάσης του κυτοχρώματος c. Η μετάλλαξη *T8084*, η οποία βρίσκεται στο COII γονίδιο, εντοπίστηκε σε ποσοστό επίσης 4% σε ασθενείς και σε κανένα φυσιολογικό άτομο. Η μετάλλαξη αυτή οδηγεί στην αντικατάσταση της θρεονίνης (T) από σερίνη (S) στη θέση 167, στο πολικό τμήμα της υπομονάδας II, το οποίο σχηματίζει μια δομή β-βαρελίου, στο χώρο ανάμεσα στην εσωτερική και εξωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου (Intermembrane space). Και στις δύο παραπάνω περιπτώσεις, τα αμινοξέα που προκύπτουν ως αποτέλεσμα μετάλλαξης (μεθειονίνη και σερίνη αντίστοιχα), μετά από έλεγχο σε βάση δεδομένων βρέθηκε να υπάρχουν φυσιολογικά, απόλυτα συντηρημένα σε όλους σχεδόν τους προκαρυωτικούς και ευκαρυωτικούς οργανισμούς, εκτός από τον άνθρωπο και τον χιμπατζή. Η μετάλλαξη *T8084A* είναι γνωστός πολυμορφισμός (mitomap), ενώ δεν υπάρχει καμία αναφορά για την *A6915G*. Μάλλον πρόκειται για μια καινούργια μετάλλαξη, η οποία θα πρέπει να μελετηθεί περαιτέρω για το εάν προκαλεί πρόβλημα στην υπομονάδα I ή είναι απλά ένας πολυμορφισμός. Ακόμα κι ως πολυμορφισμός όμως, είναι πιθανό να προσδίδει στον άνθρωπο και στον χιμπατζή, σε συνδυασμό με άλλους παράγοντες φυσικά, κάποιο εξελικτικό πλεονέκτημα. Η μεθειονίνη, η οποία βρίσκεται απόλυτα συντηρημένη στη θέση αυτή σε όλους τους οργανισμούς, είναι ένα πολικό αμινοξύ τοποθετημένο σε μια διαμεμβρανική α-έλικα (προφανώς δε δημιουργεί πρόβλημα αν κρίνουμε από το πόσο συντηρημένο είναι). Η αντικατάσταση της από βαλίνη, ένα μη πολικό αμινοξύ, στον άνθρωπο και στον χιμπατζή ίσως αυξάνει τη σταθεροποίηση και την απόδοση του συμπλόκου.

Βρέθηκε επίσης η μετάλλαξη *T7028C* στο COI γονίδιο σε ποσοστό 48% (12/25) σε ασθενείς με άσθμα, ενώ στους φυσιολογικούς το ποσοστό ήταν 47,8% (11/23). Εφτά από τους 25 ασθματικούς (25%) φέρουν αυτή τη μετάλλαξη σε συνδυασμό με την μετάλλαξη *A12308G* στο γονίδιο του tRNA^{Leu(CUN)} (από προηγούμενη μελέτη), γεγονός που τους κατατάσσει στην απλοομάδα U. Όπως έχουμε ήδη προαναφέρει, φορείς αυτής της απλοομάδας εμφανίζουν αυξημένα επίπεδα ολικής IgE κι έντονη προδιάθεση στην αλλεργία και στα ατοπικά χαρακτηριστικά (Raby et al. 2007). Στους φυσιολογικούς το ποσοστό αυτού του συνδυασμού μεταλλάξεων ήταν 17,3% (4/23).

Στην απλοομάδα αυτή και συγκεκριμένα, στον U5 υποκλάδο της, ανήκει και η μετάλλαξη *G7768A* στο COII γονίδιο, η οποία βρέθηκε σε έναν ασθενή με άσθμα (4%) και

σε έναν φυσιολογικό (4,55%). Η μετάλλαξη *C6221T* στο γονίδιο COI ανήκει σε μια άλλη απλοομάδα, την απλοομάδα X, η οποία συναντάται σε όλους σχεδόν τους πληθυσμούς αλλά σε μικρό ποσοστό. Στη δική μας μελέτη ένας μόλις ασθενής (4%) και δύο φυσιολογικά άτομα (8,7%) έφεραν τη μετάλλαξη αυτή. Ανιχνεύθηκε επίσης στο γονίδιο COI η μετάλλαξη *A7196G*, η οποία ανήκει στην απλοομάδα C, σε έναν ασθματικό (4%), ενώ δε βρέθηκε σε κανένα φυσιολογικό άτομο.

Επιπλέον, εντοπίστηκαν μεταλλάξεις οι οποίες έχουν αναφερθεί ως πολυμορφισμοί και δεν φαίνεται να επηρεάζουν με κάποιο τρόπο τη λειτουργία του μιτοχονδριακού DNA. Οι μεταλλάξεις αυτές είναι η *T6371C*, η οποία βρέθηκε στο COI γονίδιο σε δύο φυσιολογικά άτομα (8,7%) και μόνο σε έναν ασθενή (4%), η *C6827T* επίσης στο γονίδιο COI σε δύο ασθματικούς (8%) και σε κανέναν φυσιολογικό, ενώ οι μεταλλάξεις *C6776T* και *A8152G* στα γονίδια COI και COII αντίστοιχα, βρέθηκαν σε ποσοστό 4% σε ασθενείς αλλά απουσίαζαν από τους φυσιολογικούς. Ανιχνεύθηκαν τέσσερις ακόμα μεταλλάξεις στο COI γονίδιο, οι οποίες αναφέρονται επίσης στη βιβλιογραφία ως πολυμορφισμοί. Οι *C5999T* και *G6047A* εμφανίζονται σε ποσοστό 4% (1/25) σε ασθενείς και 4,35% (1/23) σε φυσιολογικά άτομα, ενώ οι μεταλλάξεις *C6671T* και *C7220T* εντοπίζονται μόνο σε ασθματικούς, σε ποσοστό επίσης 4%.

Από τα παραπάνω αποτελέσματα, αυτό που παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον είναι ο συνδυασμός *T7028C* + *A12308G*, αφού κατατάσσει του φορείς στην απλοομάδα U που φαίνεται να συνδέεται με το άσθμα. Παρόλα αυτά, τόσο στους ασθενείς όσο και στους φυσιολογικούς η μετάλλαξη *A12308G* συγκληρονομείτε με την *T7028C*, ενώ και το ποσοστό των φυσιολογικών (17,3%) δεν διαφέρει και πολύ με αυτό των ασθματικών (25%). Σίγουρα πάντως δε μπορούμε να βγάλουμε σαφή συμπεράσματα και ίσως μια μελέτη σε μεγαλύτερο αριθμό ασθενών και φυσιολογικών θα μπορούσε να είναι περισσότερο κατατοπιστική.

Ως αναφορά την οξειδάση του κυτοχρώματος c, καμία από τις παραπάνω μεταλλάξεις δε φαίνεται να προκαλεί δυσλειτουργία στο σύμπλοκο. Από τις 14 μεταλλάξεις, οι 12 είναι σιωπηλές οπότε δεν προκαλούν αλλαγή του αμινοξέος στην πρωτεΐνη (υπομονάδα I, υπομονάδα II), ενώ οι υπόλοιπες δύο μεταλλάξεις αν και μεταβάλλουν την αμινοξική αλληλουχία, μάλλον δε μεταβάλλουν τη λειτουργικότητα του ενζύμου, αν κρίνουμε από το πόσο συντηρημένα είναι τα αμινοξέα, που στη μελέτη μας εμφανίζονται ως μεταλλάξεις, σε όλους τους οργανισμούς. Βέβαια, σε καμία περίπτωση δεν μπορούμε να αποφανθούμε βάσει των παραπάνω αποτελεσμάτων, αν τελικά η οξειδάση του κυτοχρώματος c σχετίζεται με το άσθμα. Κι αυτό γιατί υπάρχει ένας μεγάλος αριθμός γονιδίων τα οποία συμβάλλουν στη λειτουργία και στην οργάνωση του συμπλόκου, πέραν του COI και COII. Μια ακόμα

υπομονάδα, η COIII, κωδικοποιείται από το μιτοχονδριακό DNA και μαζί με τις COI και COII σχηματίζει το λειτουργικό πυρήνα του συμπλόκου. Ο ρόλος της είναι κυρίως στηρικτικός αν και υπάρχει περίπτωση να συμμετέχει στην άντληση πρωτονίων (Ostermeier et al. 1996). Οι υπόλοιπες δέκα υπομονάδες κωδικοποιούνται από γονίδια του πυρηνικού DNA, ενώ στην οργάνωση του συμπλόκου συμμετέχουν πρωτεΐνες, οι οποίες επίσης κωδικοποιούνται από το DNA του πυρήνα, όπως οι CO10, CO15, Surf1, SCO1 και SCO2.

Ασθένειες που οφείλονται σε δυσλειτουργία της οξειδάσης του κυτοχρώματος c, προκαλούνται κυρίως από μεταλλάξεις σε γονίδια του πυρηνικού DNA που κωδικοποιούν πρωτεΐνες υπεύθυνες για την οργάνωση του συμπλόκου (Horvath et al. 2005; Diaz 2010), μεταλλάξεις σε διάφορα mt-tRNA γονίδια (Bruno et al. 1999), όπου προσβάλλεται γενικότερα ο μηχανισμός της πρωτεϊνοσύνθεσης και παρατηρείται δυσλειτουργία κι άλλων συμπλόκων της αναπνευστικής αλυσίδας, και πιο σπάνια από μεταλλάξεις σε γονίδια του μιτοχονδριακού DNA που κωδικοποιούν τις τρεις υπομονάδες (COI, COII, COIII) της οξειδάσης του κυτοχρώματος c (Pecina et al. 2004; Diaz 2010). Μόλις πρόσφατα βρέθηκαν και κάποιες παθογόνες μεταλλάξεις σε γονίδια του πυρηνικού DNA που κωδικοποιούν τις υπόλοιπες 10 υπομονάδες του συμπλόκου. Μεταλλάξεις στο γονίδιο COI συνδέονται κυρίως με εγκεφαλοπάθειες, νευρομυϊκές ασθένειες, σύνδρομο MELAS (MELAS-like syndrome), μυογλοβινουρία και σιδηροβλαστική αναιμία, ενώ μεταλλάξεις στο γονίδιο COII συνδέονται με μυοπάθειες, εγκεφαλοπάθειες, πολυσυστημικές ασθένειες (αμφοτερόπλευρος καταρράκτης, νευροαισθητικές ακουστικές απώλειες, μυοπάθεια, αταξία) και μεταβολική οξέωση (Diaz 2010). Οι μεταλλάξεις στα δύο αυτά γονίδια, που σχετίζονται με παθολογικές καταστάσεις, είναι κυρίως σημειακές μεταλλάξεις, οι οποίες είτε προκαλούν αλλαγή στην αμινοξική αλληλουχία (Valmaron et al. 2002) είτε μεταβάλλουν κάποιο κωδικόνιο έναρξης ή λήξης, οδηγώντας σε μείωση της έκφρασης της πρωτεΐνης (Clark et al. 1999; Horvath et al. 2005), ενώ μπορεί να συμβαίνουν και αφαιρέσεις ολόκληρων τμημάτων των γονιδίων (Mita et al. 1989;). Επιπλέον, σε όλες σχεδόν τις περιπτώσεις βρίσκονται σε ετεροπλασμία. Σε περιπτώσεις μυοπάθειας για παράδειγμα, το mtDNA που φέρει τη μετάλλαξη βρίσκεται σε μεγάλο ποσοστό στους σκελετικούς μύες και σε πολύ μικρότερο, ως και μη ανιχνεύσιμο, στους υπόλοιπους ιστούς (Horvath et al. 2005;). Μεταλλάξεις επίσης στο γονίδιο COI σχετίζονται και με τον καρκίνο του προστάτη, αφού εντοπίζονται στο 11-12% των ασθενών (Petros et al. 2005). Οι μεταλλάξεις αυτές προκαλούν δυσλειτουργία της οξειδάσης του κυτοχρώματος c, με αποτέλεσμα την αυξημένη παραγωγή ROS που ενισχύει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (Xu et al. 1999; McCord 2000; Wallace & Lot 2002;). Ανάλογες μεταλλάξεις θα μπορούσαν να συμβάλλουν στη δυσλειτουργία της οξειδάσης του κυτοχρώματος c που παρατηρείται στο άσθμα. Ένας έλεγχος της λειτουργικότητας του

συμπλόκου θα μας έδινε μια πρώτη εικόνα και σίγουρα θα μας βοηθούσε να προχωρήσουμε παρακάτω.

Το μιτοχονδριακό DNA τα τελευταία χρόνια προσελκύει το ενδιαφέρον διαφόρων επιστημόνων εξαιτίας ορισμένων ιδιαίτερων χαρακτηριστικών που παρουσιάζει, όπως η μεγάλη συγκέντρωση μεταλλάξεων σε σχέση με το πυρηνικό DNA, η κληρονόμηση του χωρίς να υποστεί ανασυνδυασμό και η αφθονία του στα διάφορα κύτταρα. Η μελέτη των διαφόρων παραλλαγών του mtDNA σε καλά καθορισμένες ασθένειες, θα βοηθήσει στην κατανόηση των μηχανισμών βάσει των οποίων ορισμένες μεταλλάξεις ή και απλοομάδες του μιτοχονδριακού DNA συμβάλλουν στην προδιάθεση ή και στην εξέλιξη ασθενειών όπως οι μολυσματικές, οι φλεγμονώδης διαταραχές, οι διάφορες μορφές καρκίνου και κάποιες νευροεκφυλιστικές ασθένειες.

Οι γενετικές μελέτες που έχουν γίνει σχετικά με το μιτοχονδριακό DNA και το άσθμα είναι ελάχιστες. Για να αποκτήσουμε μια ολοκληρωμένη εικόνα θα πρέπει να γίνουν αρκετές μελέτες όπως αυτή, ώστε να βρεθεί τελικά ο τρόπος με τον οποίον σχετίζεται το μιτοχόνδριο με το άσθμα. Μια τέτοια εξέλιξη θα έχει σίγουρα σημαντικά οφέλη, τόσο στην πρόγνωση όσο και στην αντιμετώπιση της ασθένειας.

Βιβλιογραφία

Åberg N. Familial occurrence of atopic disease: genetic versus environmental factors. *Clin Exp Allergy* 1993;23:829–34.

Acin-Perez R, Salazar E, Kamenetsky M, Buck J, Levin L.R, Manfredi G. Cyclic AMP produced inside mitochondria regulates oxidative phosphorylation. *Cell Metab.* 9 (2009) 265–276.

Adachi T, Choudhury BK, Stafford S, Sur S, Alam R. The differential role of extracellular signal-regulated kinases and p38 mitogen-activated protein kinase in eosinophil functions. *J Immunol.* 2000;165:2198-204.

Aguilera-Aguirre L, Bacsı A, Saavedra-Molina A, Kurosky A, Sur S and Boldogh I.

Mitochondrial Dysfunction Increases Allergic Airway Inflammation. *J Immunol* 2009;183:5379-5387

Allen JF, Raven JA. Free-radical-induced mutation vs redox regulation: Costs and benefits of genes in organelles. *J Mol Evol* 1996; 42:482-92.

Arnold S, Goglia F, Kadenbach B, 3, 5-Diiodothyronine binds to subunit Va of cytochrome-c oxidase and abolishes the allosteric inhibition of respiration by ATP. *Eur. J. Biochem.* 252 (1998) 325–330.

Barnes PJ (2008b) Role of GATA-3 in allergic diseases. *Curr Mol Med* 8:330–334

Beasley R. The burden of asthma with specific reference to the United States. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 109 (5 Suppl): S482-S489.

Beghe B, Barton S, Rorke S, et al. Polymorphisms in the interleukin-4 and interleukin-4 receptor alpha chain genes confer susceptibility to asthma and atopy in a Caucasian population. *Clin Exp Allergy* 2003; 33:1111–1117.

Bleck B, Tse DB, Jaspers I et al (2006) Diesel exhaust particle-exposed human bronchial epithelial cells induce dendritic cell maturation. *J Immunol* 176:7431–7437

Blumenthal JB, Blumenthal MN. Genetics of asthma. *Med Clin North Am* 2002; 86:937–950.

Boldogh, I., A. Bacsı, B. K. Choudhury, N. Dharajiya, R. Alam, T. K. Hazra, S. Mitra, R. M. Goldblum, and S. Sur. 2005. ROS generated by pollen NADPH oxidase provide a signal that augments antigen-induced allergic airway inflammation. *J. Clin. Invest.* 115: 2169–2179.

Bousquet J et al. Management of chronic respiratory and allergic diseases in developing countries. Focus on sub-Saharan Africa. *Allergy*, 2003, 58:265–283.

Bousquet J, Khaltaev N. Global surveillance, prevention and control of chronic respiratory diseases : a comprehensive approach. World Health Organization 2007.

Brown DI, Griendling KK. Nox proteins in signal transduction. *Free Radic Biol Med* 2009;47:1239-53.

Bruno C, Martinuzzi A, Tang Y, Andreu AL, Pallotti F, et al. A Stop-Codon Mutation in the Human mtDNA Cytochrome c Oxidase I Gene Disrupts the Functional Structure of Complex IV. *Am. J. Hum. Genet.* 1999; 65:611–620.

Brunori M, Giuffrè A, Forte E, Mastronicola D, Barone M.C, Sarti P. Control of cytochrome c oxidase activity by nitric oxide, *Biochim. Biophys. Acta* 1655 (2004) 365–371.

Buc M, Dzurilla M, Vrlık M, Bucova M. Immunopathogenesis of bronchial asthma. *Arch Immunol Ther Exp*, 2009, 57, 331–344

Bucchieri F, Puddicombe SM, Lordan JL, Richter A, Buchanan D, Wilson SJ, Ward J, Zummo G, Howarth PH, Djukanovi R, Holgate ST, and Davies DE. Asthmatic Bronchial Epithelium Is More Susceptible to Oxidant-Induced Apoptosis. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* Vol. 27, 2002; pp. 179–185

Campbell H, et al. Molecular cloning, nucleotide sequence, and expression of the gene encoding human eosinophil differentiation factor (interleukin 5). *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987;84:6629–6633.

Carrol NG, Cooke C, James AL. Bronchial blood vessel dimensions in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 155: 689–695.

Carroll N, Elliott J, Morton A, James A. The structure of large and small airways in nonfatal and fatal asthma. *Am Rev Respir Dis* 1993; 147: 405–410.

Carroll N, Carello S, Cooke C, James A. Airway structure and inflammatory cells in fatal attacks of asthma. *Eur Respir J* 1996; 9: 709–715.

Carswell, E. A., Old, L. J., Kassel, R. L., Green, S., Fiore, N., and Williamson, B. (1975). An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 72, 3666–3670.

Clark JM, Abraham WM, Fishman CE, et al. Trypsin inhibitors block allergen-induced airway and inflammatory responses in allergic sheep. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;152:2076-83.

Cembrzynska-Nowak, M., Szklarz, E., Inglot, A. D., and Teodorczyk-Injeyan, J. A. (1993). Elevated release of tumor necrosis factor- α and interferon- γ by bronchoalveolar leukocytes from patients with bronchial asthma. *Am. Rev. Respir. Dis.* 147, 291–295.

Chen K, Thomas SR, Albano A, Murphy MP, Keaney JF. Mitochondrial function is required for hydrogen peroxide-induced growth factor receptor transactivation and downstream signaling. *J Biol Chem.* 2004;279:35079-86.

Churchill E.N, Murriel C.L, Chen C.H, Mochly-Rosen D, Szweda L.I. Reperfusion-induced translocation of deltaPKC to cardiac mitochondria prevents pyruvate dehydrogenase reactivation. *Circ. Res.* 97 (2005) 78–85.

Del Prete A, Zaccagnino P, Di Paola M, Saltarella M, Celis CO, Nico B, Santoro G, Lorusso M. Role of mitochondria and reactive oxygen species in dendritic cell differentiation and functions. 2007; doi:10.1016/j.freeradbiomed.2007.12.037

DiMauro S, Schon E.A. Mitochondrial disorders in the nervous system. *Annu. Rev. Neurosci.* 31 (2008) 91–123.

Di Somma C, Charron D, Deichmann K, et al. Atopic asthma and TNF-308 alleles: linkage disequilibrium and association analyses. *Hum Immunol* 2003; 64:359–365.

Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* 2000;102:33-42.

Dumont A, Hehner SP, Hoffmann TG, Ueffing M, Droge W, Schmitz ML. Hydrogen peroxide-induced apoptosis is CD95-independent, requires the release of mitochondria-derived reactive oxygen species and the activation of NF- κ B. *Oncogens.* 1999;18:747-57.

Dunnill M, Massarella G, Anderson J. Comparison of the quantitative anatomy of the bronchi

in normal subjects, in status asthmaticus, in chronic bronchitis and in emphysema. *Thorax* 1969; 24: 176–179.

Ehrlich RI, Du TD, Jordaan E et al. Risk factors for childhood asthma and wheezing. Importance of maternal and household smoking. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 154(3 Pt 1): 681-688.

ERS 2004. The European Lung White Book. The First Comprehensive Survey on Respiratory Health in Europe.

Estivill X, Govea N, Barcelo A. Familial progressive sensorineural deafness is mainly due to the mtDNA A1555G mutation and is enhanced by treatment with aminoglycosides. *Am J Hum Genet* 1998; 62:27-35.

Fadok VA, Bratton DL, Konowal A, Freed PW, Westcott JY, Henson PM: Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF- β 1, PGE2, and PAF. *J Clin Invest* 1998, 101:890-898.

Fischel-Ghodsian N. Mitochondrial mutations and hearing loss: Paradigm for mitochondrial genetics. *Am J Hum Genet* 1998; 62:15-9.

Francisca Diaz. Cytochrome c oxidase deficiency: Patients and animal models. *Biochimica et Biophysica Acta* 1802 (2010) 100–110

Gao PS, Kawada H, Kasamatsu T, Mao XQ, Roberts MH, Miyamoto Y, Yoshimura M, Saitoh Y, Yasue H, Nakao K, Adra CN, Kun JF, Moro-oka S, Inoko H, Ho LP, Shirakawa T, and Hopkin JM. Variants of NOS1, NOS2, and NOS3 genes in asthmatics. *Biochem Biophys Res Commun* 267: 761–763, 2000.

Gao PS, Mao XQ, Roberts MH, et al. Variants of STAT6 (signal transducer and activator of transcription 6) in atopic asthma. *J Med Genet* 2000; 37:380–382.

Goossens, V., Grooten, J., De Vos, K., and Fiers, W. (1995). Direct evidence for tumor necrosis factor-induced mitochondrial reactive oxygen intermediates and their involvement in cytotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 8115–8119.

Grasemann H, Yandava CN, and Drazen JM. Neuronal NO synthase (NOS1) is a major candidate gene for asthma. *Clin Exp Allergy* 29, Suppl 4: 39–41, 1999.

Grievink L, Smit HA, Ocke MC, van 't Veer P, Kromhout D. Dietary intake of antioxidant (pro)-vitamins, respiratory symptoms and pulmonary function: the MORGEN study. *Thorax* 1998;53:166-71.

Han Kyeom Kim et al. Proteomic Analysis of Peripheral T-Lymphocytes in Patients With Asthma. *Chest* 2007;132;489-496.

Hansen JM, Zhang H, and Jones DP. Mitochondrial Thioredoxin-2 Has a Key Role in Determining Tumor Necrosis Factor- α -Induced Reactive Oxygen Species Generation, NF- κ B Activation, and Apoptosis. *TOXICOLOGICAL SCIENCES* 91(2), 643–650 (2006)

Hammad H, Lambrecht BN (2008) Dendritic cells and epithelial cells: linking innate and adaptive immunity in asthma. *Nat Rev Immunol* 8:193–204

Hauck RW, Schulz C, Schomig A, Hoffman RK, Panettieri RA Jr. Alpha-thrombin stimulates contraction of human bronchial rings by activation of protease-activated receptors. *Am J Physiol* 1999;277:L22-L29.

Hegde R, Srinivasula SM, Datta P, Madesh M, Wassell R, Zhang Z, Cheong N, Nejme J, Fernandes-Alnemri T, Hoshino S, Alnemri ES. The polypeptide chain-releasing factor GSPT1/eRF3 is proteolytically processed into an IAP-binding protein. *J Biol Chem* 2003; 278:38699-706.

Higuchi, M., Proske, R. J., and Yeh, E. T. (1998). Inhibition of mitochondrial respiratory chain complex I by TNF results in cytochrome c release, membrane permeability transition, and apoptosis. *Oncogene* 17, 2515–2524.

Holgate TS. The sentinel role of the airway epithelium in asthma pathogenesis. *Immunological Reviews* 2011;Vol. 242: 205–219

Holla LI, Schuller M, Buckova D, and Vacha J. Neuronal nitric oxide synthase gene polymorphism and IgE-mediated allergy in the Central European population. *Allergy* 59: 548–552, 2004.

Hong, M. Y., R. S. Chapkin, R. Barhoumi, R. C. Burghardt, N. D. Turner, C. E. Henderson, L. M. Sanders, Y. Y. Fan, L. A. Davidson, M. E. Murphy, et al. 2002. Fish oil increases mitochondrial phospholipid unsaturation, up-regulating reactive oxygen species and apoptosis in rat colonocytes. *Carcinogenesis* 23: 1919–1925.

Horie S, et al. Interleukin-13 but not interleukin-4 prolongs eosinophil survival and induces eosinophil chemotaxis. *Internal Medicine* 1997;36 (3):179.

Horvath R, Schoser B.G.H, Muller-Hocker J, Volpel M, Jaksch M, Lochmuller H. Mutations in mtDNA-encoded cytochrome c oxidase subunit genes causing isolated myopathy or severe encephalomyopathy. *Neuromuscular Disorders* 15, 2005; 851–857

Hotamisligil, G. S., Peraldi, P., Budavari, A., Ellis, R., White, M. F., and Spiegelman, B. M. (1996). IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF- α - and obesity-induced insulin resistance. *Science* 271, 665–668.

Howard DT, Meyers AD, Bleecker RE. Mapping Susceptibility Genes for Allergic Diseases. *Chest* 2003;123;363S-368S

Huttemann M, Kadenbach B, Grossman L.I. Mammalian subunit IV isoforms of cytochrome c oxidase. *Gene* 267 (2001) 111–123

Ingman M, Kaessmann H, Pääbo S, Gyllenstein U. Mitochondrial genome variation and the origin of modern humans. *Nature* 2000; 408:708-13.

Innan H, Nordborg M. Recombination or mutational hot spots in human mtDNA? *Molecular Biology and Evolution* 2002; 19:1122-1127

Ito T, Wang YH, Duramad O et al TSLP-activated dendritic cells induce an inflammatory T helper type 2 cell response through OX40 ligand. *J Exp Med.* 2005; 202:1213–1223

Jaakkola JJ, Gissler M. Maternal smoking in pregnancy, fetal development and childhood

asthma. *Am J Public Health* 2004; 94(1):136-140

Jeong HC, Lee SY, Lee EJ, Jung KH et al. Proteomic Analysis of Peripheral T-Lymphocytes in Patients With Asthma. *Chest* 2007;132:489-496

Jin Z, El-Deiry W.S. Overview of cell death signaling pathways. *Cancer Biology & Therapy* 4:2, 139-163, 2005

Joza N, Susin SA, Daugas E, Stanford WL, Cho SK, Li CY, Sasaki T, Elia AJ, Cheng HY, Ravagnan L, Ferri KF, Zamzami N, Wakeham A, Hakem R, Yoshida H, Kong YY, Mak TW, Zuniga-Pflucker JC, Kroemer G, Penninger JM. Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature* 2001; 410:549-54.

Kim HJ, Barajas B, Chan RCF and Nel AE. Glutathione depletion inhibits dendritic cell maturation and delayed-type hypersensitivity: Implications for systemic disease and immunosenescence. *J Allergy Clin Immunol* 2007;119:1225-33

Kim M, Clark K.M, Robert W. Taylor R.W, Margaret A. Johnson M.A, Patrick F. Chinnery P.F, et al. An mtDNA Mutation in the Initiation Codon of the Cytochrome C Oxidase Subunit II Gene Results in Lower Levels of the Protein and a Mitochondrial Encephalomyopathy.

Konga DB, Kim Y, Hong SC, Roh YM, Lee CM, Kim KY, Lee SM. Oxidative stress and antioxidant defenses in asthmatic murine model exposed to printer emissions and environmental tobacco smoke. *J Environ Pathol Toxicol Oncol.* 2009;28(4):325-40.

Kuehr J, Karmaus W, Forster J, *et al.* Sensitisation to four common inhalant allergens within 302 nuclear families. *Clin Exp Allergy* 1993;23:600–5.

Kumar A, Ghosh B. Genetics of asthma: a molecular biologist perspective. *Clinical and Molecular Allergy* 2009, 7:7

Kuwano K, Bosken CH, Pare` PD, Bay TR, Wiggs BR, Hogg JC. Small airways dimensions in asthma and in chronic obstructive pulmonary disease. *Am Rev Respir Dis* 1993; 148: 1220–1225.

Law M et al. Changes in atopy over a quarter of a century, based on cross sectional data at three time periods. *British Medical Journal*, 2005, 330:1187–1188.

Lee JY, Park SW, Chang HK *et al.* A disintegrin and metalloproteinase 33 protein in patients with asthma: relevance to airflow limitation. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2006;173:729-735.

Lee YA, Shin MH (2009) Mitochondrial respiration is required for activation of ERK1/2 and caspase-3 in human eosinophils stimulated with hydrogen peroxide. *J Investig Allergol Clin Immunol* 19:188-94

Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, Wang X. Cytochrome C And dATP-dependent formation of Apaf-1/Caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 1997; 91:479-89.

Li LY, Luo X, Wang X. Endonuclease G is an apoptotic dnase when released from

mitochondria. *Nature* 2001; 412:95-9.

Li N, Nel AE. Role of the Nrf2-mediated signaling pathway as a negative regulator of inflammation: implications for the impact of particulate pollutants on asthma. *Antioxid Redox Signal* 2006;8:88-98.

Lorenz E, Muhlebach MS, Tessier PA, Alexis NE, Duncan Hite R, Seeds MC, Peden DB, Meredith W. Different expression ratio of S100A8/A9 and S100A12 in acute and chronic lung diseases. *Respir Med* 2008, 102:567-573.

Mabalirajan, U.; Dinda, A.K.; Kumar, S.; Roshan, R.; Gupta, P.; Sharma, S.K.; Ghosh, B. Mitochondrial structural changes and dysfunction are associated with experimental allergic asthma. *J. Immunol.* **2008**, *181*, 3540-3548.

Magnusson CG. Cord serum IgE in relation to family history and as a predictor of atopic disease in early infancy. *Allergy* 1988;43:241-51.

Malavia KN, Raub BC, Mahon BS, Brenner M, Panettieri AR, Jr., and George CS. Airway Epithelium Stimulates Smooth Muscle Proliferation. *Am J Respir Cell Mol Biol* Vol 41. pp 297-304, 2009.

Marion Rj, Creer TL, Reynolds RV. Direct and indirect costs associated with the management of childhood asthma. *Ann Allergy* 1985; 54(1):31-34

Martinez FD, Solomon S, Holberg CJ, Graves PE, Baldini M, Erickson RP. Linkage of circulating eosinophils to markers on chromosome 5q. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 158: 1739-1744.

Masoli M et al. The global burden of asthma: executive summary of the GINA Dissemination Committee Report. *Allergy*, 2004, 59:469-478.

McCord J. M. The Evolution of Free Radicals and Oxidative Stress. *Am. J. Med.* 2000; 108: 652-659.

Min B (2008) Basophils: what they 'can do' versus what they 'actually do'. *Nat Immunol* 9:1333-1339

Min B, Paul WE (2008). Basophils: in the spotlight at last. *Nat Immunol* 9:223-225

Mita S, Schmidt B, Schon E.A, Dimauro S, Bonilla E. Detection of "deleted" mitochondrial genomes in cytochrome-c oxidase-deficient muscle fibers of a patient with Kearns-Sayre syndrome. Vol. 86, 1989; pp. 9509-9513.

Mitsuru Munakata. Airway Remodeling and Airway Smooth Muscle in Asthma. *Allergology International*. 2006;55:235-243.

Miyazaki, Y., Araki, K., Vesin, C., Garcia, I., Kapanci, Y., Whitsett, J. A., Piguet, P. F., and Vassalli, P. (1995). Expression of a tumor necrosis factor alpha transgene in murine lung causes lymphocytic and fibrosing alveolitis. A mouse model of progressive pulmonary fibrosis. *J. Clin. Investig.* 96, 250-259.

Miyazaki T, Neff L, Tanaka S, Horne W.C, Baron R. Regulation of cytochrome c oxidase activity by c-Src in osteoclasts, J. Cell Biol. 160, 2003; 709–718.

Moffatt MF, Faux JA, Lester S, et al. Atopy, respiratory function and HLA-DR in Aboriginal Australians. Hum Mol Genet 2003; 12:625–630.

Moffatt MF, Kabesch M, Liang L, Dixon AL, Strachan D, Heath S, et al. Genetic variants regulating *ORMDL3* expression contribute to the risk of childhood asthma. Nature 2007; 448: 470-473.

Muller M, Grunewald J, Olgart Hoglund C, Dahlen B, Eklund A, Stridh H. Altered apoptosis in bronchoalveolar lymphocytes after allergen exposure of atopic asthmatic subjects. Eur Respir J 2006; 28: 513–22.

Murata Y, Shimamura T, Hamuro J. The polarization of Th1/Th2 balance is dependent on the intracellular thiol redox status of macrophages due to the distinctive cytokine production. International Immunology, Vol. 14, No 2, 2002; pp. 201-212.

Nakagome Kazuyuki, Nagata Makoto. Pathogenesis of airway inflammation in bronchial asthma. 2011; doi:10.1016/j.anl.2011.01.011

Nakamura Y, Gojobori T, Ikemura T. Codon usage tabulated from international DNA sequence databases. Nucleic Acids Res 2000; 28:292

Noguchi E, Shibasaki M, Arinami T, Takeda K, Maki T, Miyamoto T, et al. Evidence for linkage between asthma/atopy in childhood and chromosome 5q31-q33 in a Japanese population. Am J Respir Crit Care Med 1997; 156: 1390-1393.

Ogbi M, Johnson J.A. Protein kinase C epsilon interacts with cytochrome c oxidase subunit IV and enhances cytochrome c oxidase activity in neonatal cardiac myocyte preconditioning, Biochem. J. 393 (2006) 191–199.

Omenaas E, Fluge O, Buist AS, Vollmer WM, Gulsvik A. Dietary vitamin C intake is inversely related to cough and wheeze in young smokers. Respir Med 2003;97:134-42.

Orrenius S, Gogvadze V, Zhivotovsky B. Mitochondrial oxidative stress: Implications for cell death. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 2007;47:143-83.

Ostermeier C, Iwata S, Michel H. Cytochrome c oxidase. Current Opinion in Structural Biology 1996; 6:460-466

Page S, Ammit AJ, Black JL, Armour CL. Human mast cell and airway smooth muscle cell interactions: implications for asthma. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2001;281:L1313-L1323.

Paradies G, Petrosillo G, Ruggiero F.M. Cardiolipin-dependent decrease of cytochrome c oxidase activity in heart mitochondria from hypothyroid rats. Biochim. Biophys. Acta 1319 (1997) 5–8.

Pecina P, Houstkova H, Hansikova H, Zeman J, Houstek J. Genetic Defects of Cytochrome c Oxidase Assembly. Physiol. Res, 2004; 53 (Suppl. 1): S213-S223

Peng TI, and Jou MJ. Oxidative stress caused by mitochondrial calcium overload. 2010; doi: 10.1111/j.1749-6632.2010.05634.x

Pesole G, Gissi C, De Chirico A, Saccone C. Nucleotide substitution rate of mammalian mitochondrial genomes. *J Mol Evolution* 1999; 48:427-34.

Petros J.A, Baumann A.K, Ruiz-Pesini E, Amin M.B, et al. mtDNA mutations increase tumorigenicity in prostate cancer. *PNAS*, 2005; vol. 102 no. 3: 719–724

Rabe KF, Vermeire PA, Soriano JB *et al*, Clinical management of asthma in 1999: The Asthma Insights and Reality in Europe (AIRE) study. *Eur Respir J* 2000; 16(5): 802-807

Raby, B. A., B. Klanderman, A. Murphy, S. Mazza, C. A. Camargo, Jr., E. K. Silverman, and S. T. Weiss. 2007. A common mitochondrial haplogroup is associated with elevated total serum IgE levels. *J. Allergy Clin. Immunol.* 120:351–358.

Rådinger M, et al. Regulation of allergen-induced bone marrow eosinophilopoiesis: role of CD4+ and CD8+ T cells. *Allergy* 2007;62:1410–1418.

Rådinger M, et al. Regulatory role of CD8+ T lymphocytes in bone marrow eosinophilopoiesis. *Respir Res* 2006;7:83.

Reddy, P.H.; Beal, M.F. Are mitochondria critical in the pathogenesis of Alzheimer's disease? *Brain Res. Brain Res. Rev.* 2005, 49, 618-632.

Reddy, P.H. Amyloid precursor protein-mediated free radicals and oxidative damage: implications for the development and progression of Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* 2006, 96, 1-13.

Reddy, P.H. Mitochondrial oxidative damage in aging and Alzheimer's disease: implications for mitochondrially targeted antioxidant therapeutics. *J. Biomed. Biotechnol.* 2006, 2006, 1-13.

Roche WR, Beasley R, Williams JH, Holgate ST. Subepithelial fibrosis in the bronchi of asthmatics. *Lancet* 1989; i: 520–524.

Rosado-Pinto J, Morais-Almeida M. Asthma in the developing world. *Pediatric Pulmonology*, 2004, 26 (suppl.):66–68.

Saetta M, Di Stefano A, Rosina C, Thiene G, Fabbri LM. Quantitative structural analysis of peripheral airways and arteries in sudden fatal asthma. *Am Rev Respir Dis* 1991; 143: 138–143.

Saetta M, Turato G. Airway pathology in asthma. *Eur Respir J* 2001; 18: Suppl. 34: 18s–23s

Sandford A, Weir T, Paré P. The genetics of asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;153:1749–65.

Sano H, Zhu X, Sano A, Boetticher EE, Shioya T, Jacobs B, Munoz NM, Leff AR. Extracellular signal-regulated kinase 1/2-mediated phosphorylation of cytosolic phospholipase A2 is essential for human eosinophil adhesion to fibronectin. *J Immunol.* 2001;166:3515-21.

Saraste Matti. Oxidative Phosphorylation at the fin de siecle. *Science* 283, 1488, 1999; DOI: 10.1126/science.283.5407.1488

Schaefer A.M., McFarland R., Blakely E.L., He L., Whittaker R.G., Taylor R.W., Chinnery P.F., Turnbull D.M. Prevalence of mitochondrial DNA disease in adults. *Ann. Neurol.* 63, 2008; 35–39.

Schon EA. Mitochondrial genetics and disease. 2000; PII: S0968-0004(00)01688-1

Sears MR, Holdaway MD, Flannery EM, Herbison GP, Silva PA. Parental and neonatal risk factors for atopy, airway hyper-responsiveness, and asthma. *Arch Dis Child* 1996;75:392–8.

Shapiro, S. D., Owen, C. A. ADAM-33 surfaces as an asthma gene. *N Engl J Med*, 2002; 347(12), 936–938.

Shek LP, Tay AH, Chew FT, Goh DL, Lee BW. Genetic susceptibility to asthma and atopy among Chinese in Singapore-linkage to markers on chromosome 5q31-33. *Allergy* 2001; 56: 749-753.

Shimura S, Andoh Y, Haraguchi M, Shirato K. Continuity of airway goblet cells and intraluminal mucus in the airways of patients with bronchial asthma. *Eur Respir J* 1996; 9: 1395–1401.

Shin HD, Park BL, Kim LH, et al. Association of tumor necrosis factor polymorphisms with asthma and serum total IgE. *Hum Mol Genet* 2004; 13:397–403.

Smith, J. B., and Haynes, M. K. Rheumatoid arthritis—A molecular understanding. *Ann. Intern. Med.* 2002; 136, 908–922.

Spinozzi F, de Benedictis D, de Benedictis FM. Apoptosis, airway inflammation and anti-asthma therapy: From immunobiology to clinical application. *Pediatr Allergy Immunol* 2008; 19: 287–295.

Suzuki Y, Imai Y, Nakayama H, Takahashi K, Takio K, Takahashi R. A serine protease, Htra2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death. *Mol Cell* 2001; 8:613-21.

Sue CM, Tanji K, Hadjigeorgiou G, Reu AL, Nishino I, Krishna S, Bruno C, Hirano M, Shanske S, Bonilla E, Fischel-Ghodsian N, DiMauro S, Friedman R. Maternally inherited hearing loss in a large kindred with a novel *T7511C* mutation in the mitochondrial DNA tRNA(*Ser(UCN)*) gene. *Neurology* 1999; 52:1905-8.

Tam EK, Caughey GH. Degradation of airway neuropeptides by human lung tryptase. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1990;3:27-32.

Tamura K, Suzuki M, Arakawa H, et al. Linkage and association studies of STAT6 gene polymorphisms and allergic diseases. *Int Arch Allergy Immunol* 2003; 131:33–38.

Terada LS. Specificity in reactive oxidant signaling: think globally, act locally. *J Cell Biol* 2006;174:615-23.

- Terakawa M, Tomimori Y, Goto M, Hayashi Y, Oikawa S, Fukuda Y. Eosinophil migration induced by mast cell chymase is mediated by extracellular signal-regulated kinase pathway. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;332:969-75.
- Thyagarajan B, Pauda R.A, Campbell C. Mammalian mitochondria possess homologous DNA recombination activity. *Journal of Biological Chemistry* 1996; 271: 27536-27543.
- Trian, T., Benard, G., Begueret, H., Rossignol, R., Girodet, P. O., Ghosh, D., et al. . Bronchial smooth muscle remodeling involves calcium-dependent enhanced mitochondrial biogenesis in asthma. *J Exp Med*, 2007; 204(13), 3173–3181.
- Trompette A, Divanovic S, Visintin A et al Allergenicity resulting from functional mimicry of a Toll-like receptor complex protein. *Nature*, 2009; 457:585–588.
- Tsukihara T, Aoyama H, Yamashita E, Tomizaki T, Yamaguchi H, Shinzawa-Itoh K, Nakashima R, Yaono R, Yoshikawa S. Structures of metal sites of oxidized bovine heart cytochrome c oxidase at 2.8 Å, *Science* 269, 1995; 1069–1074.
- Tsukihara T, Aoyama H, Yamashita E, Tomizaki T, Yamaguchi H, Shinzawa-Itoh K, Nakashima R, Yaono R, Yoshikawa S. The whole structure of the 13-subunit oxidized cytochrome c oxidase at 2.8 Å, *Science* 272. 1996; 1136–1144.
- Uller L, Rydell-Tormanen K, Persson CG, Erjefalt JS. Anti-Fas mAb-induced apoptosis and cytolysis of airway tissue eosinophils aggravates rather than resolves established inflammation. *Respir Res*. 2005;6:90.
- Van Eerdewegh P, Little RD, Dupuis J *et al*. Association of the ADAM33 gene with asthma and bronchial hyperresponsiveness. *Nature* 2002;418:426-430
- Varlamov D.A, Kudin A.P, Vielhaber S, Schroder R, Sassen R. Metabolic consequences of a novel missense mutation of the mtDNA COI gene. *Human Molecular Genetics*, 2002; Vol. 11, No. 16 1797–1805
- Wan H, et al. Der p 1 facilitates transepithelial allergen delivery by disruption of tight junctions. *J Clin Invest* 1999;104:123–133.
- Wang YH, Angkasekwinai P, Lu N et al IL-25 augments type 2 immune responses by enhancing the expansion and functions of TSLP-DC-activated Th2 memory cells. *J Exp Med*, 2007; 204:1837–1847
- Wechsler ME, Grasemann H, Deykin A, Silverman EK, Yandava CN, Israel E, Wand M, and Drazen JM. Exhaled nitric oxide in patients with asthma: association with NOS1 genotype. *Am J Respir Crit Care Med*, 2000; 162: 2043–2047.
- Wenzel SE. Asthma: defining of the persistent adult phenotypes. *Lancet*. 2006;368:804–813.
- WHO/NHLBI Workshop Report. 1995. Global strategy for asthma management and prevention. National Institutes of Health, National Heart, Lung, and Blood Institute, Bethesda, MD. Publication No. 95-3659.

Winge D.R, Tzagoloff A. Assembly of the Mitochondrial Respiratory Chain. Preface, Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular Cell Research Assembly of the Mitochondrial Respiratory Chain, vol. 1793, 2009, p. 1.

Xu Y, Krishnan A, Wan XS, Majima H, Yeh CC, Ludewig G, Kasarskis EJ, St Clair DK. Mutations in the promoter reveal a cause for the reduced expression of the human manganese superoxide dismutase gene in cancer cells. 1999; Oncogene 18: 1, 93-102.

Xu YD, Cui JM, Wang Y, Yin LM, Gao CK, Liu YY, Yang YQ. The early asthmatic response is associated with glycolysis, calcium binding and mitochondria activity as revealed by proteomic analysis in rats. Respiratory Research 2010, 11:107

Yang D, Chen Q, Su SB et al. Eosinophil-derived neurotoxin acts as an alarmin to activate the TLR2-MyD88 signal pathway in dendritic cells and enhances Th2 immune responses. J Exp Med, 2008; 205:79–90

Yokouchi Y, Nukaga Y, Shibasaki M, Noguchi E, Kimura K, Ito S, et al. Significant evidence for linkage of mite-sensitive childhood asthma to chromosome 5q31-q33 near the interleukin 12 B locus by a genome-wide search in Japanese families. Genomics 2000; 66: 152-160.

Zhao JP, Gao M, Ye YJ, Hu WH, Zhou ZG, Hu HL. Regulation of rat airway smooth muscle cell proliferation by mitochondrial ATP-sensitive K(+) channel in asthmatic rats. *Acta Physiologica Sinica* . 2009;61(1):65-71.

Ziegler SF, Artis D. Sensing the outside world: TSLP regulates barrier immunity. Nat Immunol 2010;1:289–293.

Zifa E, Giannouli S, Theotokis P, Stamatis C, Mamuris Z, Stathopoulos C. Mitochondrial tRNA mutations. RNA Biology, 2007; 4:1, 38-66

Zimmermann N, et al. Chemokines in asthma: Cooperative interaction between chemokines and IL-13. Journal of Allergy and Clinical Immunology 2003;111 (2):227–242.

Zou H, Henzel WJ, Liu X, Lutschg A, Wang X. Apaf-1, a human protein homologous to C. elegans CED-4, participates in cytochrome C-dependent activation of caspase-3. Cell 1997; 90:405-13.