



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

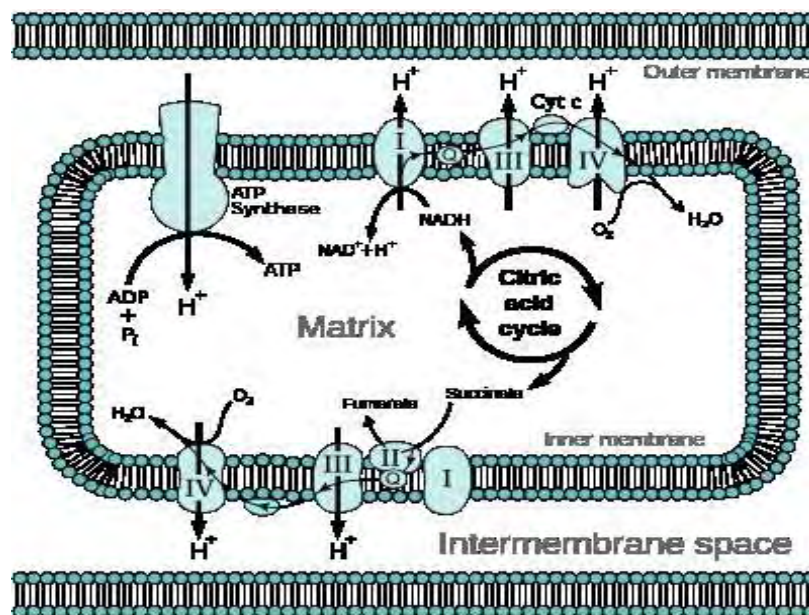


ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Τίτλος Διπλωματικής Εργασίας:

Γενετικός και βιοχημικός έλεγχος σε λεμφοκύτταρα ασθενών με
σαρκοείδωση



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

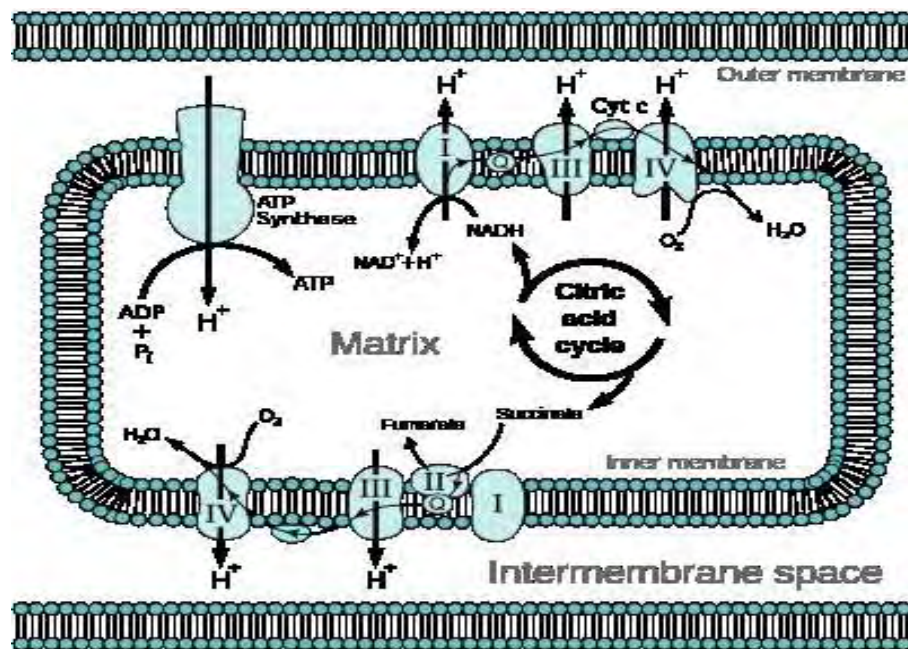
ΦΟΥΚΑ ΜΑΡΙΑ

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια: Ζίφα Αιμιλία

ΛΑΡΙΣΑ 2015



Genetic and biochemical evaluation of lymphocytes from sarcoidosis patients



DIPLOMA PROJECT

FOUKA MARIA

Supervisor: Emily Zifa

Larissa 2016

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:

Ζίφα Αιμιλία, Επίκουρος Καθηγήτρια Βιολογίας (Νευροβιολογίας), Τμήμα ΒΒ, ΠΘ.

Ψαρρά Γ. Άννα-Μαρία, Επίκουρος Καθηγήτρια Βιολογίας, Τμήμα ΒΒ, ΠΘ.

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

Ευχαριστίες,

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την τριμελή μου επιτροπή, και πρωτίστως την επιβλέποντα καθηγήτριά μου, κ. Ζίφα, για την ευκαιρία που μου έδωσε να εκπονήσω αυτή τη διπλωματική εργασία. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω από καρδιάς την κ. Ψαρρά για την πολύτιμη βοήθεια και την καθοδήγηση που μου παρείχε όλο το διάστημα που διήρκησε η διπλωματική μου εργασία, καθώς και την κυρία Δανιήλ Ζωή και τον κύριο Γουργουλιάνη Κωνσταντίνο που μου έδωσαν την ευκαιρία να συνεργαστώ μαζί τους συμμετέχοντας στις ερευνητικές τους δραστηριότητες. Τέλος, θα ήταν μεγάλη παράλειψη εκ μέρους μου να μην ευχαριστήσω όλα τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας αλλά και Δομικής και λειτουργικής Βιοχημείας για την όμορφη συνεργασία μας όλο αυτό το χρονικό διάστημα. Τέλος θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στους γονείς μου, Σταύρο και Φωτεινή, και στον αδερφό μου, Δημήτρη, για την αέναη υποστήριξη τους σε κάθε προσπάθεια της ζωής μου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	7
ABSTRACT.....	8
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	9
1.1 Τα μιτοχόνδρια.....	9
1.1.1 Δομή των μιτοχονδρίων.....	9
1.1.2 Προέλευση μιτοχονδρίων	10
1.1.3 Λειτουργίες των μιτοχονδρίων	13
1.1.4. Οξειδωτική φωσφορυλίωση- παραγωγή ATP.....	16
1.1.5. Ρόλος των μιτοχονδρίων στην απόπτωση.....	21
1.1.6 Ρόλος των μιτοχονδρίων στο οξειδωτικό στρες.....	27
1.1.7 Οξειδωτικό στρες και βλάβες στο DNA.....	31
1.2 Γενετική των μιτοχονδρίων.....	32
1.3 Χαρακτηριστικά γνωρίσματα μιτοχονδριακού DNA.....	33
1.4 Μιτοχονδριακά tRNAs.....	36
1.5 Μεταλλάξεις μιτοχονδριακού γονιδιώματος.....	38
1.5.1. Ελλείψεις mtDNA.....	38
1.5.2. Σημειακές μεταλλάξεις mtDNA.....	39
1.6 Μιτοχονδριακά νοσήματα.....	42
1.7 Συσχέτιση μιτοχονδρίων με πνευμονικές ασθένειες.....	45
1.8 Σαρκοείδωση.....	47
1.6.1. Επιδημιολογία.....	47
1.6.2. Παθοφυσιολογία.....	48
1.6.3 Αιτιολογία.....	49
1.6.5. Οξειδωτικό στρες και σαρκοείδωση	50
2. Σ Κ Ο Π Ο Σ.....	51
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	
3.1. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης.....	52
3.1.1 Αρχή της μεθόδου.....	55
3.1.2 Πειραματική Διαδικασία.....	57
3.1.3 Δείγματα.....	58
3.2. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 2%.....	58
3.2.1. Αντιδραστήρια – Διαλύματα	58
3.2.2 Διαδικασία ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης.....	58
3.2.3 Πειραματική διαδικασία.....	60
3.2.3. SSCP-Μέθοδος Ανάλυσης Πολυμορφισμού μονοκλωνικής διαμόρφωσης	
3.3.1 Αρχή της μεθόδου.....	62
3.3.2 Παρασκευή πηκτής πολυακρυλαμίδιου.....	65
3.3.3. Χρώση των gel.....	66
3.4. Καθαρισμός των προϊόντων της PCR.....	67

3.5 Εκτίμηση της ενζυμικής δραστηριότητας του συμπλόκου I της αναπνευστικής αλυσίδας με φαρματοφωτομετρικές μεθόδους σε απομονωμένα λεμφοκύτταρα	
3.5.1 Αρχή της Μεθόδου.....	69
3.5.2 Παρασκευή αντιδραστηρίων.....	71
3.5.3 Πειραματική Διαδικασία.....	72
3.6 Απομόνωση λεμφοκυττάρων.....	72
3.6.1 Αρχή της μεθόδου.....	73
3.6.2 Πειραματική διαδικασία	74
3.7 Επεξεργασία των λεμφοκυττάρων	
3.7.1 Κατάψυξη απόψυξη (freeze/thaw)	75
3.7.2 Πειραματική διαδικασία	76
3.8 Ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford	76
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	
4.1 Αποτελέσματα γενετικής ανάλυσης	77
4.2 Αποτελέσματα βιοχημικής ανάλυσης	80
4.2.1 Κατασκευή πρότυπης καμπύλης	80
4.2.2 Φωτομετρικός προσδιορισμό της ενζυμικής δραστηριότητας της οξειδοαναγωγής του ζεύγους NADH-Q (complex I) σε λεμφοκύτταρα από φυσιολογικούς και ασθενείς δότες.....	81
4.2.3 Εκτίμηση της ειδικής δραστηριότητας του complex I	83
4.2.4 Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων.....	85
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	89
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	92

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα μιτοχόνδρια είναι τα κυτταρικά οργανίδια που ευθύνονται για την παραγωγή ενέργειας στο κύτταρο. Παραπροϊόν της λειτουργίας τους, αποτελούν οι ελεύθερες ρίζες οι οποίες όταν υπερπαράγονται αυξάνουν κατά πολύ το ήδη μεγάλο ποσοστό μεταλλαγών στο μιτοχονδριακό DNA εξαιτίας της απουσίας επιδιορθωτικών μηχανισμών. Οι περισσότερες από αυτές τις μεταλλάξεις δημιουργούν μιτοχονδριακά νοσήματα, μία ετερογενή ομάδα παθήσεων που όλες χαρακτηρίζονται από δυσλειτουργία στην αναπνευστική αλυσίδα. Η εν λόγω μελέτη είναι τμήμα μιας ευρύτερης η οποία ξεκίνησε με την προοπτική συσχέτισης της σαρκοείδωσης με μεταλλαγές στα mt-tRNAs. Οι μεταλλάξεις δημιουργούνται στο mt-DNA πολύ συχνότερα από το πυρηνικό και μπορεί να είναι απόρροια ακόμη και της ίδιας της μιτοχονδριακής λειτουργίας. Η σαρκοείδωση είναι μια αγνώστου αιτιολογίας ασθένεια που παρουσιάζει πολλά κοινά με μιτοχονδριακά νοσήματα. Το πρώτο κομμάτι της παρούσας μελέτης περιλαμβάνει την ανάλυση δειγμάτων αίματος από 23 ασθενείς με σαρκοείδωση. Τα δείγματα αναλύθηκαν για 2 mt-tRNA γονίδια: t-RNA Val και t-RNA Glu. Ωστόσο σε κανένα από αυτά τα δείγματα δεν βρέθηκαν μεταλλάξεις. Στο δεύτερο κομμάτι της παρούσας πτυχιακής έγινε μια προσπάθεια συσχέτισης των μεταλλαγών στα mt-tRNAs που ανιχνεύτηκαν σε προηγούμενες μελέτες με τη λειτουργία της αναπνευστικής αλυσίδας. Δυσλειτουργία στην δραστηριότητα του συμπλόκου I είναι πιθανόν η συχνότερη διαταραχή που εμφανίζεται μεταξύ των διαταραχών της αναπνευστικής αλυσίδας. Για την αξιολόγηση της ενζυμικής δραστηριότητας της οξειδοαναγωγής του ζεύγους NADH-Q (σύμπλοκο I) ακολουθήθηκε φωτομετρικός προσδιορισμός της κινητικής της οξείδωσης του NADH σύμφωνα με τον De wit, 2006. Από τα 5 δείγματα ασθενών που αξιολογήθηκαν ως προς την δραστηριότητα του συμπλόκου I στα 2 παρατηρήθηκε στατιστικά μειωμένη ενζυμική δραστηριότητα, 29,5 mU/mg έναντι 50,4 mU/mg των φυσιολογικών (Η τιμή p value ήταν 0,0046 [(p < 0.05, στατιστικώς σημαντικό)]. Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης δεν είναι πλήρως επαρκή για να στηρίξουν τον συσχετισμό που επιδιώκουμε. Η έρευνα συνεχίζεται με στόχο την βελτίωση του πρωτοκόλλου και τη μελέτη περισσότερων ασθενών.

ABSTRACT

Mitochondria are these subcellular organelles which are in charge of producing energy. This function's byproduct are the free radicals. When free radicals are over produced they elevate DNA mutation ratio which is already high due to the absence of mitochondrial DNA-repair mechanisms. Most of such mutations lead to mitochondrial diseases, an heterogeneous group of diseases which are characterized by mitochondrial respiration chain dysfunction. The present study is a part of a bigger investigation, which takes place in order to correlate Sarcoidosis with mt-tRNA mutations. Sarcoidosis is a disease of yet unidentified cause that seem to have a lot in common with mitochondrial diseases. The first part of this study includes the analysis of blood samples from 23 patients with sarcoidosis. Those samples were analyzed for 2 mt-tRNA genes: t-RNA Val and t-RNA Glu. However in these samples no mutations were found. In the second part of the study there was an attempt to find an association between the mutations in mt-tRNAs that were detected in previous studies with the function of the respiratory chain. Complex I deficiency is probably the most common enzyme defect among the group of OXPHOS disorders. To evaluate NADH: ubiquinone oxidoreductase, or complex I, activity spectrophotometrically in blood lymphocytes we relied on the protocol that was developed by L. Elly. A.de Wit. Of the 5 patients tested, two of them were detected with statistically significant lower enzyme activity. The results of this study are not fully adequate to support this hypothesis. For this reason future studies must focus on the improvement of the protocol and on testing more samples of patients, helping us to understand the causes of sarcoidosis.

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Τα μιτοχόνδρια

Τα μιτοχόνδρια είναι κυτταρικά οργανίδια, τα οποία συμβάλλουν στην καλή λειτουργία των κυττάρων και στη ρύθμιση του κυτταρικού θανάτου (Kuznetsov & Margreiter, 2009). Ο κύριος ρόλος τους είναι η παραγωγή τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP), μέσω μεταβολικών διαδικασιών στις οποίες συμπεριλαμβάνονται ο κύκλος του τρικαρβοξυλικού ή κιτρικού οξέος (TCA) και η αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων. Η τριφωσφορική αδενοσίνη (ATP) παράγεται, κυρίως, μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης (OXPHOS) (van der Giezen and Tovar, 2005).

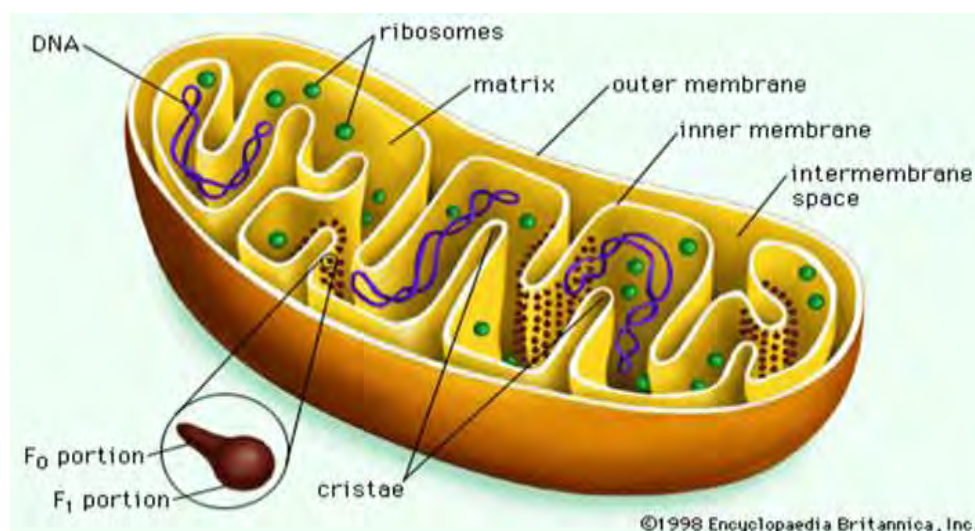
Τα μιτοχόνδρια συμμετέχουν στη ρύθμιση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης και της ομοιόστασης του ασβεστίου στο κύτταρο. Συμμετέχουν, επίσης, στη βιοσύνθεση αμινοξέων, λιπαρών οξέων, συμπαραγόντων βιταμινών και νευροδιαβιβαστών (Waldbaum & Patel, 2009). Η σύνθεση της ομάδας αίμης, μερικά στάδια της σύνθεσης στεροειδών και του κύκλου της ουρίας σχετίζονται με τη λειτουργία αυτών των δομών (Pinti *et al.*, 2010). Αποτελούν, επίσης, σημαντικούς ρυθμιστές της απόπτωσης (Newmeyer and Ferguson-Miller, 2003; Pozzan *et al.*, 2000).

Η παραγωγή δραστικών ριζών οξυγόνου (ROS) πραγματοποιείται στα μιτοχόνδρια (Duchen, 2004). Οι ROS συμμετέχουν σε πολλά σηματοδοτικά μονοπάτια. Οι περισσότερες λειτουργούν ως δευτερογενείς αγγελιοφόροι που προκαλούν διαφορετικά κυτταρικά γεγονότα, όπως έκκριση κυτταροκινών ή ενεργοποίηση μεταγραφικών παραγόντων αλλά στον αντίποδα προκαλούν βλάβες στα μιτοχόνδρια και κατ' επέκταση σε όλο το κύτταρο (Edeas *et al.*, 2010a). Η δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων ευθύνεται για πολλές μεταβολικές και εκφυλιστικές ασθένειες, για τη γήρανση και ενοχοποιείται για την εμφάνιση καρκίνου.

1.1.1 Δομή των μιτοχονδρίων

Τα μιτοχόνδρια παρουσιάζουν μια μεγάλη ποικιλία σε σχήματα. Σε πολλές περιπτώσεις έχουν σχήμα σφαιρικό, όπως εκείνα που βρίσκονται στο ήπαρ με διάμετρο από 0.5 –5 μm . Άλλα, απλά κυλινδρικά έχουν διάμετρο τουλάχιστον 0.2 μm και μήκος μέχρι και 20 μm (Perkins and Frey, 2000), άλλες φορές μπορεί να είναι νηματοειδή ή διακλαδιζόμενα ενώ έχουν καταγραφεί και άλλα με εξειδικευμένο σχήμα δακτυλίων, δίσκων (Munn, 1974; Reichert and Neupert, 2002). Η περίπλοκη εμφάνισή τους εξαρτάται τόσο από τον οργανισμό και τον κυτταρικό τύπο όσο και από την μεταβολική κατάσταση (Reichert and Neupert, 2002).

Τα μιτοχόνδρια διαθέτουν δύο συστήματα μεμβρανών, μία εξωτερική και μία μεγάλων διαστάσεων πτυχωτή εσωτερική μεμβράνη. Δημιουργούνται δύο διαμερίσματα στο μιτοχόνδριο: ο διαμεμβρανικός χώρος μεταξύ της εσωτερικής και εξωτερικής μεμβράνης και η μήτρα, η οποία περιβάλλεται από την εσωτερική μεμβράνη (Εικόνα 1.1).



Εικόνα 1.1: Στην εικόνα φαίνεται η δομή του μιτοχονδρίου και οι θέσεις των κυριότερων συστατικών του. Τα ριβοσώματα και το mt-DNA εδράζονται στη μιτοχονδριακή μήτρα, η $f_1\text{-}f_0$ ATPase βρίσκεται στην εσωτερική μεμβράνη με προσανατολισμό πάντα με την υπομονάδα f_0 προς τον διαμεμβρανικό.

Η εξωτερική μεμβράνη περιέχει πορίνες, οι οποίες την καθιστούν διαπερατή σε μόρια μεγέθους μικρότερο από 5-6 kDa (Waldbaum & Patel, 2009). Ενώσεις, όπως το νερό, O₂, CO₂, και NH₃ εύκολα διαπερνούν τη μεμβράνη. Ωστόσο, απαιτείται η συμμετοχή ειδικών καναλιών και πρωτεϊνών-μεταφορέων, ώστε υδρόφιλοι μεταβολίτες και όλα τα ανόργανα ιόντα να διαπεράσουν τη μεμβράνη (Szewczyk & Wojtczak, 2002).

Η εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων περιέχει ένζυμα της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Αυτό το σύμπλεγμα ενζύμων περιέχει τέσσερις οξειδοαναγωγάσες που εμπλέκονται στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων (Complexes I - IV) και στο σύμπλεγμα σύνθεσης της ATP (Complex V). Οι περισσότερες αντιδράσεις του κύκλου του κιτρικού οξέος και της οξείδωσης των λιπαρών οξέων λαμβάνουν χώρα στη μήτρα (Berg *et al.*, 2001).

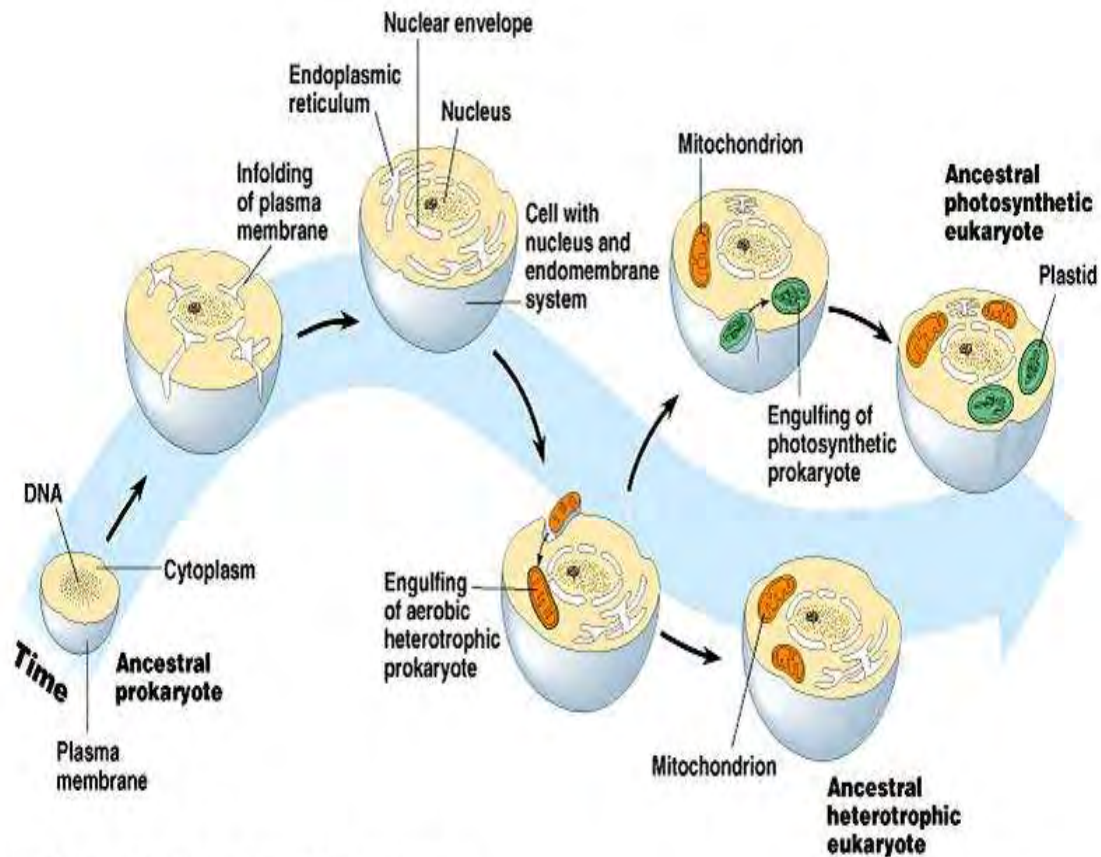
1.1.2 Προέλευση μιτοχονδρίων

Σχετικά με την προέλευση του μιτοχονδρίου έχουν διατυπωθεί δύο θεωρίες. Η πρώτη θεωρία που καλείται «θεωρία ενδοσυμβίωσης» υποστηρίζει ότι το γονιδίωμα των οργανιδίων αυτών έχει εξωγενή προέλευση, και συγκεκριμένα προέρχονται από βακτηριακούς προγόνους οι οποίοι εισέβαλαν (ή εγκοιλώθηκαν) σε πρώτοευκαρυωτικά κύτταρα (Margulis, 1981). Σήμερα είναι γενικά αποδεκτό ότι τα μιτοχόνδρια όπως και οι χλωροπλάστες προήλθαν από βακτήρια που ενσωματώθηκαν από αρχέγονα ευκαρυωτικά κύτταρα πριν από ένα και πλέον δισεκατομμύρια χρόνια (Εικόνα 1.2). Κατά τη συμβιωτική σχέση του προκαρυωτικού αερόβιου οργανισμού με το κύτταρο ξενιστή, που ήταν αρχικά αναερόβιο, ο ξενιστής απέκτησε πολλές λειτουργίες από τον προκαρυωτικό οργανισμό. Αποτέλεσμα αυτής της μεταφοράς λειτουργιών υπήρξε η μετακίνηση και η ενσωμάτωση πολλών γονιδίων του προκαρυωτικού οργανισμού στον πυρήνα του ξενιστή. Η βαθμιαία αυτή προσαρμογή στις νέες λειτουργικές συνθήκες συνέβαλε στη “μεταμόρφωση” των προκαρυωτικών οργανισμών σε μιτοχόνδρια. Φαίνεται ότι η εσωτερική μεμβράνη προήλθε από την πλασματική μεμβράνη του αρχέγονου βακτηριακού ενδοσυμβιώτη, ενώ η εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη πιθανόν προέρχεται από

τη μεμβράνη του φαγοσώματος του κυττάρου ξενιστή (stryer, 1997; Alberts et al, 1998). Ενδείξεις για αυτήν την εξελικτική προέλευση των μιτοχονδρίων προέρχονται από το γεγονός ότι τα μιτοχόνδρια περιέχουν το δικό τους γονιδίωμα, όπως και ένα πλήρες σύστημα μεταγραφής και μετάφρασης, το οποίο είναι απαραίτητο για την παραγωγή πρωτεϊνών από τα γονίδια αυτά. Επιπρόσθετη ένδειξη για τη βακτηριακή προέλευση των μιτοχονδρίων αποτελεί ο τρόπος αναπαραγωγής τους, μέσω αύξησης και διαίρεσης προϋπαρχόντων οργανιδίων. Επίσης, ο μηχανισμός της πρωτεϊνικής σύνθεσης παρεμποδίζεται από το αντιβιοτικό χλωραμφαινικόλη που αναστέλλει ειδικά την πρωτεϊνική σύνθεση προκαρυωτικών οργανισμών και όχι από το αντιβιοτικό κυκλοεξιμίδιο που είναι ένας ειδικός αναστολέας της κυτταροπλασματικής πρωτεϊνικής σύνθεσης σε ευκαρυωτικά κύτταρα.

Μια άλλη προσέγγιση στην προέλευση των μιτοχονδρίων δίνεται από την θεωρία της θυγατροποίησης (Raff & Mahler 1972,1976). Σύμφωνα με τη θεωρία αυτή τα αρχέγονα πρωτοευκαρυωτικά κύτταρα είχαν αναπτύξει ήδη ένα δικό τους αναπνευστικό σύστημα το οποίο βρισκόταν στις επιφανειακές μεμβράνες. Με την πάροδο του χρόνου δημιουργήθηκαν εγκολπώσεις των μεμβρανών οι οποίες σχημάτισαν κλειστές περιοχές εντός των οποίων περιορίστηκαν οι μηχανισμοί της αναπνοής στο εσωτερικό της μεμβράνης. Η εξέλιξη αυτών των περιοχών οδήγησε στο σχηματισμό των μιτοχονδρίων και των χλωροπλαστών. Η ύπαρξη του mtDNA και του ctDNA θεωρείται ότι προκύπτει από την παγίδευση γενετικού υλικού κατά τη διαδικασία εγκόλπωσης των μεμβρανών το οποίο αποτέλεσε πλέον μόνιμο συστατικό των οργάνων αυτών.

Η ενδοσυμβιωτική προέλευση των μιτοχονδρίων και των πλαστιδίων είναι σήμερα περισσότερο αποδεκτή, ιδιαίτερα με βάση τις φυλογενετικές αναλύσεις οι οποίες δείχνουν ότι τα μιτοχόνδρια και τα πλαστίδια προέρχονται από γενεαλογικές γραμμές, οι οποίες σχετίζονται με τα α-πρωτεοβακτήρια και τα κυανοβακτήρια αντίστοιχα (Gray & Doolittle 1982 Loiseaux 1994). Τα ευκαρυωτικά κύτταρα θα πρέπει έτσι να εξετάζονται ως γενετικές χίμαιρες οι οποίες προκύπτουν από τη συσσωμάτωση διαφορετικών οργανισμών (Sitte 1993).



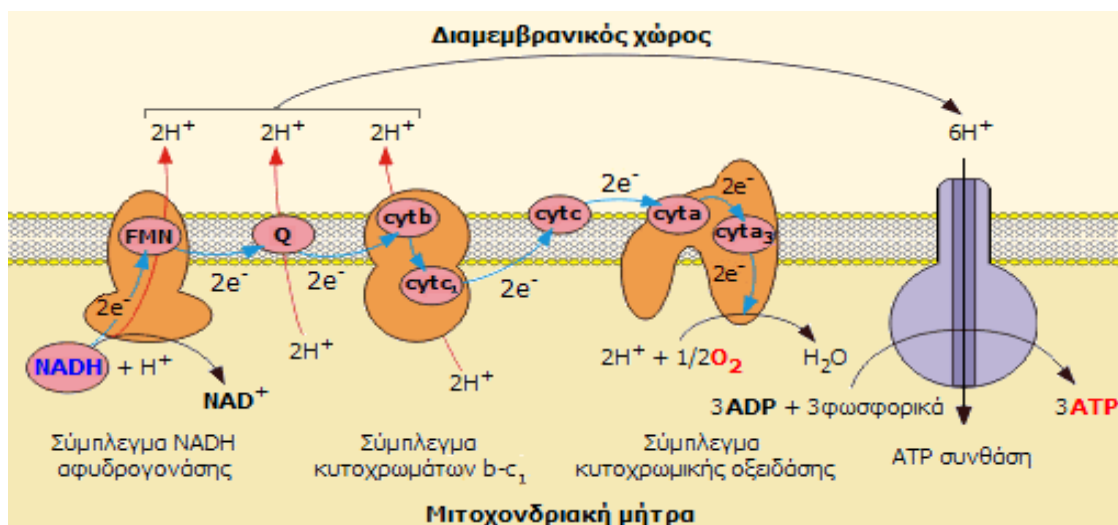
Copyright © Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

Εικόνα 1.2: Τα μιτοχόνδρια ήταν αρχικά ανεξάρτητοι αερόβιοι ετερότροφοι προκαρυώτες. Την γνωστή σημερινή μορφή και ιδιότητες τα απέκτησαν λόγω της εισόδου τους στους προγονικούς προκαρυώτες. Με τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των δύο κυττάρων τα μιτοχόνδρια έγιναν τα ιδιαίτερα κυτταρικά οργανίδια που υπάρχουν σήμερα ενώ ο ξενιστής εξελίχθηκε σε ετερότροφο

1.1.3 Λειτουργίες των μιτοχονδρίων

Οι λειτουργίες των μιτοχονδρίων είναι πολλαπλές και θεμελιώδεις για την επιβίωση και σωστή λειτουργία των κυττάρων. Η πρωταρχική λειτουργία που αποδόθηκε στο μιτοχόνδριο και μελετήθηκε εκτενώς εξαιτίας της τεράστιας σημασίας της ήταν εκείνη της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης (Oxidative Phosphorylation, OXPHOS) και όχι άδικα αφού αποτελεί την κύρια πηγή ενέργειας για το κύτταρο. Ως επί το πλείστον η OXPHOS πραγματοποιείται στην εσωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου καθώς τα ένζυμα που απαιτούνται είναι ιδιαίτερα εμπλουτισμένα στις μεμβράνες αυτές (Gilkerson et al., 2003; Vogel et al., 2006). Το τελικό προϊόν της OXPHOS είναι η τριφωσφορική αδενοσίνη (ATP) η οποία συντίθεται από διφωσφορική αδενοσίνη

(ADP) και ορθοφωσφορικά ιόντα με ταυτόχρονη οξείδωση του οξυγόνου και σύνθεση H_2O . Η αντίδραση καταλύεται από το ένζυμο της συνθάσης του ATP και είναι το τελευταίο στάδιο διαδοχικών οξειδοαναγωγικών αντιδράσεων κατά μήκος της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων η οποία αποτελείται από τέσσερα ενζυμικά-πολυπρωτεϊνικά σύμπλοκα (I, II, III, και IV) τα οποία σχηματίζουν και υπερ-σύμπλοκα (super-complexes) (Acin-Perez et al., 2008). Ο δότης ηλεκτρονίων στην αρχή της αλυσίδας είναι το ανηγμένο $NADH^+$ το οποίο ανάγεται κατά την οξείδωση των υδρογονανθράκων μέσω του κύκλου του καρβοξυλικού οξέος και των λιπιδίων μέσω της β -οξείδωσης. Η ενέργεια που ελευθερώνεται κατά τις οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων χρησιμοποιείται στην άντληση πρωτονίων (H^+) έξω από τη μήτρα του μιτοχονδρίου σχηματίζοντας έτσι το ηλεκτροχημικό δυναμικό της εσωτερικής μεμβράνης ($\Delta\Psi$) το οποίο χρησιμοποιείται από τη συνθάση του ATP κατά την τελική φωσφορυλίωση (Wallace, 2001) (εικόνα 1.3 και 1.4).



Εικόνα 1.3: Διαδικασία οξειδωτικής φωσφορυλίωσης: με μπλε βέλη στο σχήμα δείχνεται η διακίνηση των ηλεκτρονίων του $NADH$, που έχει ως αποτέλεσμα 1 μόριο του να "αντλεί" 6 πρωτόνια από τη μιτοχονδριακή μήτρα. Ίδια διαδρομή ακολουθεί και η διακίνηση των ηλεκτρονίων του $FADH_2$ με μόνη διαφορά ότι ξεκινά από το 2ο στάδιο γιατί και 1 μόριο του "αντλεί" 4 πρωτόνια από τη μιτοχονδριακή μήτρα (κόκκινα βέλη).

Κατά τη μεταφορά ηλεκτρονίων μεταξύ των ενδιάμεσων αντιδρώντων τα ηλεκτρόνια είναι δυνατόν να αντιδράσουν με το μοριακό οξυγόνο και άλλους δέκτες ηλεκτρονίων παράγοντας ελεύθερες ρίζες με την υπεροξειδική ρίζα ($O_2^{\cdot -}$) να είναι η στενότερα συνδεδεμένη με το μιτοχόνδριο (Murphy, 2009). Οι σημαντικότερες ελεύθερες ρίζες είναι εκείνες του οξυγόνου και ονομάζονται αντιδρώσες ρίζες οξυγόνου (Reactive oxygen species, ROS). Αν και ROS παράγονται σε διάφορα σημεία του κυττάρου, τα μιτοχόνδρια καλύπτουν τη συντριπτικά μεγάλη πλειονότητα ελεύθερων ριζών (που εκτιμάται στο 90 %) (Balaban et al., 2005). Οι ROS θεωρείται παραδοσιακά ότι έχουν επιβλαβή δράση για το κύτταρο αλλά πρόσφατα προέκυψε ότι μπορούν να αποτελούν και τμήμα σηματοδοτικών μηχανισμών (Nemoto et al., 2000). Επιπλέον υπάρχουν πολλά δεδομένα που συνηγορούν υπέρ της συμμετοχής ROS στην απόπτωση. Πρώτον, η προσθήκη ROS ή η στέρηση αντιοξειδωτικών προκαλεί απόπτωση. Δεύτερον, ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος αναστέλλεται από τα ενδογενή ή εξωγενή αντιοξειδωτικά. Τρίτον, η απόπτωση, σε μερικές περιπτώσεις συνδυάζεται με αύξηση των ενδοκυττάρων επιπέδων ROS (Jacobson MD et al., 1996).

Πέραν όμως της OXPHOS τα μιτοχόνδρια πραγματοποιούν ή ρυθμίζουν ένα πλήθος βιοχημικών μονοπατιών και κυτταρικών λειτουργιών όπως ο κύκλος του καρβοξυλικού οξέος, η β-οξείδωση, μέρος του κύκλου της ουρίας, η βιοσύνθεση της αίμης, η ρύθμιση του ασβεστίου (Ca^{2+}) και η απόπτωση (Chinopoulos and Adam-Vizi, 2010; Newmeyer and Ferguson-Miller, 2003; Nicholls, 2009; Reichert and Neupert, 2002; Scorrano, 2013; Spierings et al., 2005). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η συμμετοχή του μιτοχονδρίου στη διαδικασία της απόπτωσης. Ένα από τα δύο μονοπάτια της απόπτωσης, το εσωτερικό (intrinsic) μονοπάτι καθορίζεται από γεγονότα που συμβαίνουν στο μιτοχόνδριο. Η απελευθέρωση του κυτοχρώματος C, dATP και άλλων προ-αποπτωτικών μορίων από το εσωτερικό του μιτοχονδρίου μέσω της διαδικασίας της διαπερατοποίησης της εξωτερικής μεμβράνης (Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization, MOMP) του μιτοχονδρίου αποτελεί το έναυσμα για έναν καταρράκτη πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων που οδηγεί τελικά στην ενεργοποίηση των κασπασών τελεστών οι οποίες διασπούν υποστρώματα κλειδιά μέσα στο κύτταρο και οδηγούν στην αποικοδόμηση και το πακετάρισμα του

κυττάρου κατά ελεγχόμενο τρόπο προκειμένου να αποφευχθεί η ανεξέλεγκτη διαφυγή κυτταρικού υλικού που θα προκαλούσε φλεγμονή. Το εύρος των αποπτωτικών ερεθισμάτων που μπορούν να πυροδοτήσουν το εσωτερικό μονοπάτι της απόπτωσης είναι μεγάλο και περιλαμβάνουν τη μεγάλη παραγωγή ROS (οξειδωτικό στρες), την αύξηση του ενδομιτοχονδριακού Ca^{2+} , την έλλειψη θρεπτικών συστατικών, βλάβες στο DNA κ.α. Η διενέργεια ή όχι της MOMP εξαρτάται από ένα ρυθμιστικό δίκτυο πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των αντι-αποπτωτικών και των προ-αποπτωτικών (π.χ. Bax, Bak, tBid) Bcl₂ πρωτεϊνών. Στην περίπτωση που η ισορροπία μετακινηθεί προς όφελος της απόπτωσης, οι προ-αποπτωτικές Bcl₂ πρωτεΐνες μεσολαβούν το άνοιγμα πόρων στη μεμβράνη του μιτοχονδρίου και την απελευθέρωση κυτοχρώματος C. Το τελευταίο αλληλοεπιδρώντας με την πρωτεΐνη APAF-1 προωθεί τον διμερισμό και την ενεργοποίηση της κασπάσης-9 η οποία με τη σειρά της ενεργοποιεί τις κασπάσες τελεστές 3 και 7 (Spierings et al., 2005)

1.1.4. Οξειδωτική φωσφορυλίωση- παραγωγή ATP

Η διαδικασία της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης αποτελείται από τρία αλληλένδετα στάδια, τα οποία είναι κοινά για όλους τους οργανισμούς που παράγουν ενέργεια (Stryer, 1997; Alberts et al., 1998). Τα στάδια αυτά είναι:

- α. Παραγωγή ηλεκτρονίων υψηλού επιπέδου ενέργειας
- β. Σύστημα μεταφοράς ηλεκτρονίων- αναπνευστική αλυσίδα
- γ. Ενζυμικό σύστημα παραγωγής ATP

α. Παραγωγή ηλεκτρονίων υψηλού επιπέδου ενέργειας

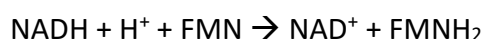
Προκειμένου οι τροφές ν' αξιοποιηθούν ως πηγές ενέργειας πρέπει πρώτα να μετατραπούν σε οξικές ομάδες. Ο μεταβολισμός των τροφών ολοκληρώνεται στα μιτοχόνδρια. Το πυροσταφυλικό οξύ που προέρχεται από τη γλυκόζη και άλλα σάκχαρα, όπως και τα λιπαρά οξέα, που προέρχονται από τα λίπη, μεταφέρονται διαμέσου της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης και κατόπιν μετατρέπονται στο

μεταβολικό ενδιάμεσο, το *ακέτυλο-συνένζυμοΑ*, με τη δράση των ενζύμων που εντοπίζονται στη μιτοχονδριακή μήτρα. Στη συνέχεια, οι ακετυλομάδες του *ακέτυλο-CoA*, οξειδώνονται στην μήτρα μέσω του κύκλου του Krebs. Μέσω του κύκλου παράγεται CO_2 , το οποίο αποβάλλεται από το κύτταρο, καθώς και ηλεκτρόνια υψηλής ενέργειας που μεταφέρονται είτε στο μόριο NAD^+ ή στο FAD . Τα ενεργοποιημένα μόρια φορείς $NADH$ και το $FADH_2$ στην συνέχεια μεταφέρουν τα ηλεκτρόνια στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη, όπου εισέρχονται στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων. Η απώλεια των ηλεκτρονίων από τα $NADH$ και $FADH_2$ οδηγεί σε αναγέννηση των NAD^+ και $FADH$, που είναι απαραίτητα για να συνεχιστεί ο οξειδωτικός μεταβολισμός. Η όλη διαδικασία αποτελεί το μηχανισμό παραγωγής των $NADH$ και $FADH_2$ που χρησιμοποιούνται ως υποστρώματα από το σύμπλοκο I και σύμπλοκο II της αναπνευστικής αλυσίδας (Stryer, 1997; Alberts et al., 1998).

β. Σύμπλοκα της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων

Σύμπλοκο I : οξειδοαναγωγή $NADH$ -ουβικινόνης

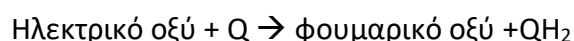
Το σύμπλοκο I, το πιο σύνθετο στα θηλαστικά, αποτελείται από τουλάχιστον 40 διαφορετικά πολυπεπτίδια με συνολική μάζα περίπου 900 kDa, είναι το μεγαλύτερο από τα πέντε ενζυμικά σύμπλοκα και αποτελείται από 7 υπομονάδες που κωδικοποιούνται από μιτοχονδριακό DNA (mtDNA) και 38 πυρηνικά κωδικοποιημένες υπομονάδες (Carroll et al., 2006). Έχει σχήμα L και περιέχει έναν υδατοδιαλυτό περιφερικό βραχίονα που προεξέχει μέσα στη μιτοχονδριακή μήτρα και ένα αδιάλυτο στο νερό υδρόφοβο βραχίονα ενσωματωμένο στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη (Brandt, 2006. Carroll et al, 2003). Ο περιφερικός βραχίονας περιέχει τον συμπάραγοντα FMN και διάφορα συμπλέγματα σιδήρου-θείου που παρέχουν ένα διχαλωτό μονοπάτι μεταφοράς ηλεκτρονίων από το $NADH$ στην ουβικινόνη (Verkhovskaya et al., 2008) Η οξείδωση του $NADH$ ξεκινά με τη μεταφορά δύο ηλεκτρονίων και δύο πρωτονίων από το $NADH$ και το H^+ στο FMN (φλαβινο-μονονουκλεοτίδιο) το οποίο περιέχει ριβοφλαβίνη (Βιταμίνη B_2) ομοιοπολικά συνδεδεμένη σε μία υπομονάδα του.



Τα ηλεκτρόνια κατόπιν μεταφέρονται ένα κάθε φορά στην ουβικινόνη, μέσω μιας ακολουθίας κέντρων FeS, 2Fe2S και 4Fe4S. Κατά αυτόν τον τρόπο το FMN είναι ο αποδέκτης δύο ηλεκτρονίων από το NADH και δότης ενός ηλεκτρονίου, κάθε φορά, στα κέντρα FeS. Αυτή η ικανότητα οφείλεται στη σταθερότητα της ημικινοειδούς μορφής του FMN. Η ουβικινόνη είναι επίσης ένας αποδέκτης ενός ή δύο ηλεκτρονίων γιατί σχηματίζει μια σταθερή ημικινόνη. Πέραν του υδρόφιλου δακτυλίου της, η ουβικινόνη έχει μια μεγάλη υδρόφοβη πλευρική αλυσίδα που αποτελείται από 10 μονάδες ισοπρενίου, που είναι βυθισμένη στη λιπιδική διπλοστιβάδα της μεμβράνης. Η ουβικινόνη και η ουβικινόλη διαχέονται ελεύθερα στη μεμβράνη και μπορούν να διακινούν ηλεκτρόνια από τα συμπλέγματα I και II στο σύμπλεγμα III. Κατά τη μεταφορά δύο ηλεκτρονίων από το σύμπλεγμα I στην ουβικινόνη, 4 πρωτόνια αντλούνται επίσης από τη πλευρά της θεμέλιας ουσίας και μεταφέρονται στη πλευρά της διαμεμβρανικής περιοχής. Η ενέργεια που απελευθερώνεται κατά τη διάρκεια των οξειδωτικών αντιδράσεων συντηρείται από αυτήν την μεταφορά πρωτονίων διαμέσου της μεμβράνης. (Thomas M. Devlin, 2006)

Σύμπλοκο II: αφυδρογονάση του ηλεκτρικού οξέος

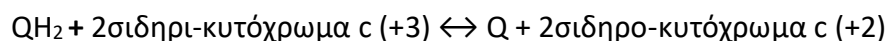
Το σύμπλοκο II αποτελείται από 4 υπομονάδες, οι οποίες κωδικοποιούνται από το πυρηνικό γονιδίωμα. Δύο από τις υπομονάδες αυτές έχουν δράση ηλεκτρικής αφυδρογονάσης. Περιέχει FAD ως συνένζυμο, καθώς και μη αιμηνικό σίδηρο, δηλαδή τρία κέντρα Fe-S. Πιστεύεται ότι τα ηλεκτρόνια περνούν από το FAD στα τρία κέντρα Fe-S, που υπάρχουν στο σύμπλοκο αυτό και κατόπιν μετακινούνται στην ουβικινόνη. Το σύμπλοκο II δεν έχει την ικανότητα να μετακινήσει πρωτόνια μέσω της μιτοχονδριακής μεμβράνης, γιατί η μεταβολή της ελεύθερης ενέργειας είναι μικρή. Η αντίδραση που καταλύεται είναι η εξής:



Σύμπλοκο III: κυτοχρωμική αναγωγή

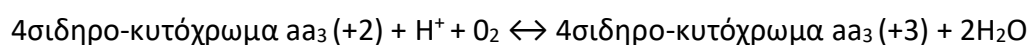
Το σύμπλοκο III αποτελείται από 11 υπομονάδες από τις οποίες μόνο η μία κωδικοποιείται από το mtDNA. Μια υπομονάδα, η αναγωγή του κυτοχρώματος c, περιέχει κυτοχρώματα τύπου b και c₁ καθώς και μια φερεδοξίνη. Το σύμπλοκο III

οξειδώνει την ουβικινόλη εις βάρος του κυτοχρώματος c, το οποίο είναι το δεύτερο κινητό συστατικό της αναπνευστικής αλυσίδας. Η αντίδραση που καταλύεται είναι η εξής:



Σύμπλοκο IV ή οξειδάση του κυτοχρώματος c

Η οξειδάση του κυτοχρώματος c (COX) κατευθύνει τα ηλεκτρόνια από το κυτόχρωμα c στο O₂. Το σύμπλοκο αυτό στα θηλαστικά αποτελείται από 13 υπομονάδες, από τις οποίες μόνο οι τρεις κωδικοποιούνται από το mtDNA. Στο σύμπλοκο περιέχονται προσθετικές ομάδες (ένα ιόν μαγνησίου (Mg), ψευδαργύρου (Zn) και νατρίου (Na), η αίμη α, η αίμη α₃ και τρία ιόντα χαλκού (Cu)) οι οποίες συνδέονται ισχυρά με το σύμπλοκο κατά ειδικό τρόπο και προσδίδουν μεγάλο οξειδοαναγωγικό δυναμικό. Το σύμπλοκο IV είναι υπεύθυνο για την αναγωγή του 90% του οξυγόνου που καταναλώνεται από τους ζωντανούς οργανισμούς. Η αντίδραση που καταλύεται είναι η εξής :



γ.Ενζυμικό σύστημα παραγωγής ATP

Η μεταφορά ηλεκτρονίων από τα ανηγμένα συνένζυμα προς το O₂ (αναπνευστική αλυσίδα) και η φωσφορυλίωση του ADP για τη δημιουργία του ATP είναι πορείες συζευγμένες άρρηκτα η μια με την άλλη. Η μεγαλύτερη συγκέντρωση των πρωτονίων στον διαμεμβρανικό χώρο σε σχέση με τη συγκέντρωσή τους στη μιτοχονδριακή μήτρα, προκαλεί μια αυθόρμητη συνεχή ροή των πρωτονίων από τον πρώτο χώρο στον δεύτερο, μέσω ενός διαύλου που παρέχει η **ATP-συνθάση**.

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

ΑΤΡ-συνθάση

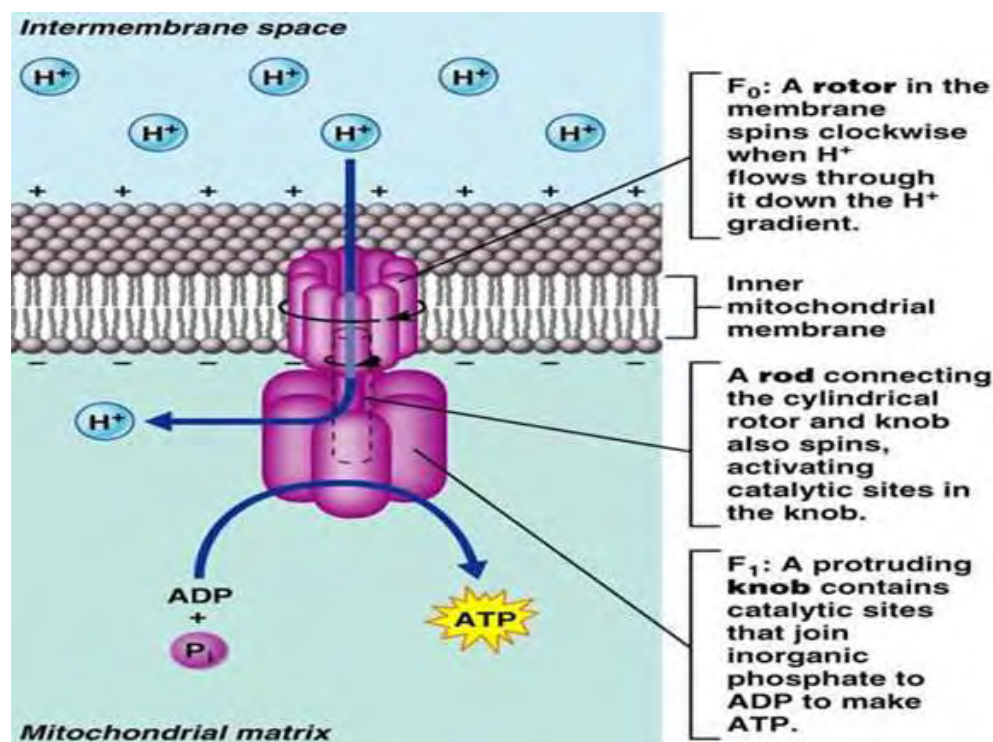
Διακρίνονται δύο χαρακτηριστικά τμήματα στην ΑΤΡ-συνθάση: Το λιπόφιλο τμήμα F_0 που περιβάλλεται από την εσωτερική μεμβράνη και το υδρόφιλο τμήμα F_1 το οποίο προεξέχει και βρίσκεται στη μιτοχονδριακή μήτρα. Αποτελείται από 6 υπομονάδες: Τρεις όμοιες υπομονάδες με καταλυτικές θέσεις, εναλλάξ με τρεις όμοιες υπομονάδες χωρίς (εικόνα 1.4).

Σε τρεις φάσεις πραγματοποιούνται:

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

(β) η σύνδεσή τους με σχηματισμό ΑΤΡ και

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



Εικόνα 1.4 Η δομή και η λειτουργία των τμημάτων της ΑΤΡ συνθάσης

1.1.5 Ρόλος των μιτοχονδρίων στην απόπτωση

Η απόπτωση είναι μιας ζωτικής σημασίας κυτταρική διαδικασία στην οποία τα μιτοχόνδρια παίζουν σημαντικό ρόλο. Ως απόπτωση ορίζεται ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος ο οποίος περιλαμβάνει την γενετικά καθορισμένη εξάλειψη των κυττάρων. Το φαινόμενο αυτό παρατηρείται κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης και της γήρανσης ενός πολυκύτταρου ευκαρυωτικού οργανισμού και αποτελεί μηχανισμό ομοιόστασης απέναντι σε οποιαδήποτε αλλαγή του πληθυσμού των κυττάρων στους ιστούς. Επιπλέον, αποτελεί μηχανισμό άμυνας του οργανισμού σε περιπτώσεις ανοσολογικών αντιδράσεων ή καταστροφής των κυττάρων από επιβλαβείς ή παθογόνους παράγοντες, ενώ αποτελεί σημαντική άμυνα ενάντια στον καρκίνο, καθώς μέσω της απόπτωσης απομακρύνονται τα καρκινικά κύτταρα [(Elmore S., 2007); (Debnath J, 2005); (Herr and Debatin, 2001)].

Η απόπτωση, επομένως, είναι σημαντική, όχι μόνο στην ανάπτυξη των ιστών, αλλά και στην ανοσοποιητική άμυνα, καθώς και στην εξάλειψη των καρκινικών κυττάρων, ενώ η λανθασμένη ενεργοποίησή της ενέχεται σε νευρομυϊκές εκφυλιστικές ασθένειες [(Wallace, 1999); (Lin and Beal, 2006)], όπως το Alzheimer, το Parkinson και η αμυοτροφική σκλήρωση, και με τον καρκίνο [(Kroemer, 2006); (Chen *et al.*, in press); (Chen *et al.*, 2007)].

Η απόπτωση περιλαμβάνει την ενεργοποίηση δύο μονοπατιών που οδηγούν στην αυτοκτονία του κυττάρου με μια χαρακτηριστική διαδικασία: το κύτταρο γίνεται πιο συμπαγές, δημιουργούνται αποπτωτικά κυστίδια, η χρωματίνη συμπυκνώνεται και το DNA κατακρεμνίζεται. Τα νεκρά κύτταρα διασπώνται σε οριοθετημένα από μεμβράνη θραύσματα και μπορεί να εγκολληθούν από γειτονικά κύτταρα με τη διαδικασία της φαγοκυττάρωσης [(Robertson and Orrenius, 2000); (Μαρκουλάτος Π.)].

Επιπρόσθετα, η απόπτωση αποτελεί μια πολύ καλά συντονισμένη διαδικασία, η οποία λαμβάνει χώρα με την ενεργοποίηση μιας ομάδας πρωτεασών κυστεΐνης, ασπαρτικού οξέος, γνωστές ως κασπάσες. Στα περισσότερα κύτταρα, οι κασπάσες απαντώνται ως ανενεργά προένζυμα, γνωστά ως προσκασπάσες οι οποίες περιλαμβάνουν ένα πεπτίδιο στο αμινοτελικό τους άκρο. Η αντίδραση

ενεργοποίησης περιλαμβάνει πρωτεόλυση του πεπτιδίου στο αμινοτελικό τους άκρο, γεγονός που συντελείται είτε από άλλες κασπάσες είτε από τις ίδιες, και επακόλουθη διάσπαση της υπόλοιπης πρωτεΐνης σε μια μικρή και μία μεγάλη υπομονάδα. Με τη σειρά τους, οι ενεργές πλέον κασπάσες μπορούν να ενεργοποιήσουν άλλες ανενεργές προκασπάσες, ενισχύοντας έτσι το αρχικό αποπτωτικό σήμα και οδηγώντας το κύτταρο ταχύ και μη αναστρέψιμο πλέον κυτταρικό θάνατο. Στα θηλαστικά υπάρχουν περίπου 14 μέλη της οικογένειας των κασπασών ενώ στη απόπτωση συμμετέχουν οι κασπάσες 3 και 6 έως 10 [(Cohen GM, 1997); (Rai NK, 2005)].

Υπάρχουν δύο μονοπάτια που μπορούν να προκαλέσουν απόπτωση σε ένα κύτταρο τα οποία αποδεδειγμένα πλέον συνδέονται σε βαθμό που η δράση του ενός επηρεάζει το άλλο. Το πρώτο είναι το εξωγενές μονοπάτι ή μονοπάτι του υποδοχέα θανάτου και το δεύτερο είναι το ενδογενές μονοπάτι ή μιτοχονδριακό μονοπάτι [(Igney FH, 2002); (Thornberry and Lazebnik, 1998)].

Άμεση σηματοδοτική οδός

Δύο θεωρίες σχετικά με την άμεση εκκίνηση των αποπτωτικών μηχανισμών στα θηλαστικά έχουν προταθεί: το μοντέλο που θεωρεί ότι η απόπτωση προκαλείται από τον παράγοντα TNF (παράγοντας νέκρωσης όγκων) και το μοντέλο σύνδεσης Fas-συνδέτη Fas. Και τα δύο μοντέλα περιλαμβάνουν τους υποδοχείς TNF (TNFR) να συνδέονται με εξωγενή σήματα (Wajant H, 2002).

Μονοπάτι του TNF: Ο TNF είναι μια κυτοκίνη που παράγεται κυρίως από ενεργοποιημένα μακροφάγα και είναι το κύριο εξωκυττάριο ενδιαμέσο της απόπτωσης. Τα περισσότερα ανθρώπινα σωματικά κύτταρα έχουν δύο υποδοχείς TNF: TNF-R1 και TNF-R2. Η πρόσδεση του TNF στον TNF-R1 έχει αποδειχθεί ότι εκκινεί ένα μονοπάτι που οδηγεί στην ενεργοποίηση των κασπασών μέσω των πρωτεϊνών περιοχή θανάτου που σχετίζεται με τον υποδοχέα TNF (TNF receptor-associated death domain ή TRADD) και της πρωτεΐνης περιοχής θανάτου που σχετίζεται με το FAS (Fas-associated death domain protein ή FADD) (Chen G, Goeddel DV, 2002). Η πρόσδεση αυτού στον υποδοχέα μπορεί επίσης να οδηγήσει έμμεσα

στην ενεργοποίηση μεταγραφικών παραγόντων που σχετίζονται με την κυτταρική επιβίωση και την αντίδραση σε φλεγμονές (Goeddel, DV, 2002)

Μονοπάτι του Fas: Ο υποδοχέας Fas (γνωστός ως Apo-1 ή CD95) προσδένει τον συνδέτη Fas (FasL), μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη που ανήκει στην οικογένεια TNF (Wajant H 2002). Η αλληλεπίδραση Fas και FasL έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό του συμπλόκου DISC, το οποίο περιλαμβάνει το FADD, την κασπάση-8 και την κασπάση-10. Σε κάποιους τύπους κυττάρων (τύπου I), η κασπάση-8 ενεργοποιεί άμεσα άλλες κασπάσες και πυροδοτεί την εκτέλεση της απόπτωσης. Σε άλλους τύπους κυττάρων (τύπου II), το Fas-DISC ξεκινά μια διαδικασία που έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση προαποπτωτικών παραγόντων από τα μιτοχόνδρια και την ενεργοποίηση της κασπάσης 8. Αμέσως μόλις ενεργοποιηθεί η κασπάση 8 ενεργοποιεί με την σειρά της την κασπάση 3 και την κασπάση 7, μέσω ενός μιτοχονδριακά εξαρτώμενου η μη μηχανισμού και ξεκινά η απόπτωση. Στο μιτοχονδριακά εξαρτώμενο μηχανισμό το μονοπάτι μετατοπίζεται από την κυτταρική μεμβράνη στο μιτοχόνδριο όταν η κασπάση 8 τέμνει μία πρωτεΐνη μέλος της Bcl-2 οικογένειας, την Bid. η τομή αυτή απελευθερώνει την καρβοξυτελική επικράτεια της Bid, η οποία στη συνέχεια μετατοπίζεται στην μιτοχονδριακή μεμβράνη, όπου ευθύνεται για την έκλυση του κυτοχρώματος c και τελικά την επαγωγή της απόπτωσης, με τον ίδιο τρόπο που περιγράφεται αναλυτικά παρακάτω [(Hsu H, 1995); (Herr *et al.*, 2007); (Hyer *et al.*, 2008); (Konopleva *et al.*, 2004); (Μαρκουλάτος Π.); (Madash *et al.*, 2002)].

Ενδογενές μονοπάτι ή μιτοχονδριακό μονοπάτι

Το ενδογενές μονοπάτι πυροδοτεί την απόπτωση μέσω των μιτοχονδρίων και λαμβάνει χώρα σε απόκριση ενός μεγάλου αριθμού ερεθισμάτων, τα οποία μπορούν να δρουν απευθείας στα κύτταρα στόχους, χωρίς να είναι αναγκαία η πρόσδεσή τους σε κάποιον υποδοχέα. Τα ερεθίσματα που πυροδοτούν τον κυτταρικό θάνατο πηγάζουν από το μιτοχόνδριο και είναι ικανά να έχουν είτε θετικές είτε αρνητικές επιπτώσεις. Μεταξύ των σημάτων με θετική επίδραση συναντώνται η ακτινοβολία, οι τοξίνες, η υποξία, η υπερθερμία, οι ιογενείς λοιμώξεις και οι ελεύθερες ρίζες [Elmore S, 2007]. Όλα αυτά τα ερεθίσματα προκαλούν αλλαγές στην εσωτερική

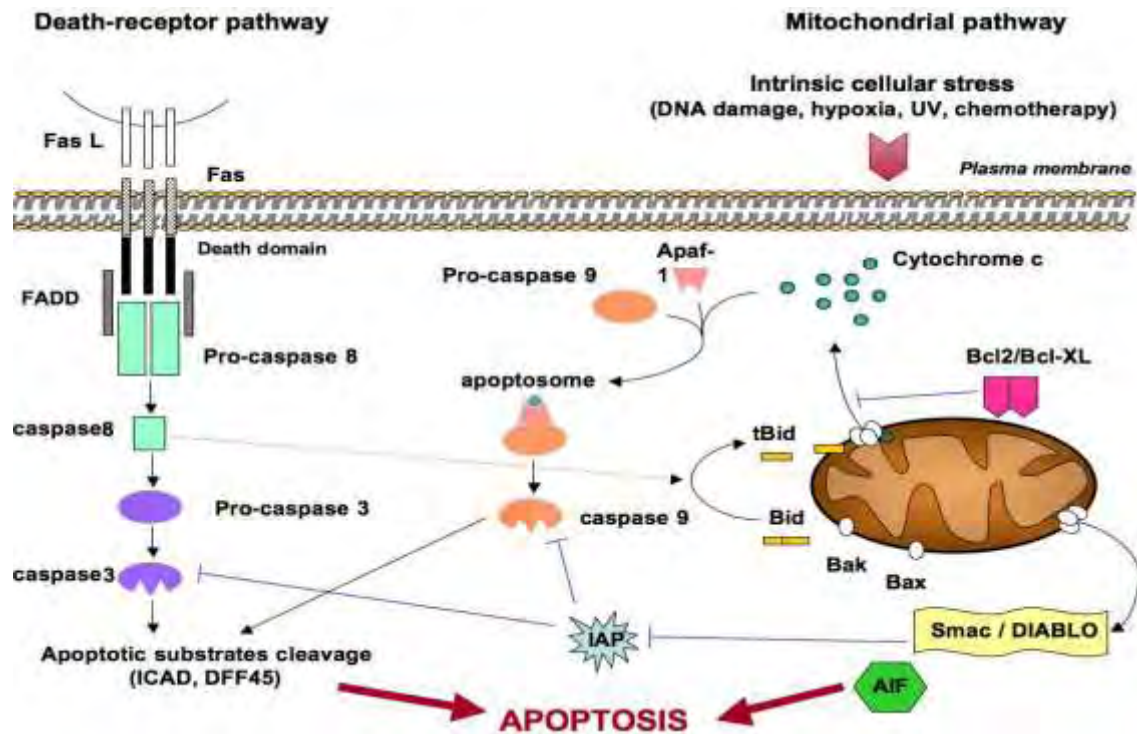
μιτοχονδριακή μεμβράνη που οδηγούν τελικά στον σχηματισμό πόρων στην μιτοχονδριακή μεμβράνη. Αυτή η αλλαγή στην διαπερατότητα της μεμβράνης, έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια του μιτοχονδριακού διαμεμβρανικού δυναμικού και την απελευθέρωση δύο κύριων προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών από το διαμεμβρανικό χώρο στο κυττόςόλιο [Saelens X, 2004].

Η πρώτη ομάδα πρωτεϊνών απαρτίζεται από το κυτόχρωμα c, τη Smac/DIABLO και την πρόσδεση της σερίνης HtrA2/Omi. Οι πρωτεΐνες αυτές ενεργοποιούν το εξαρτώμενο από τις κασπάσες μιτοχονδριακό μονοπάτι της απόπτωσης. Ειδικότερα οι πρωτεΐνες Smac/DIABLO και HtrA2/Omi προωθούν την απόπτωση μέσω καταστολής της δράσης των αναστολέων της απόπτωσης (inhibitor of apoptosis, IAP). Φυσιολογικά οι IAP μπορούν να προσδεθούν σε προσκασπάσες και ενεργοποιημένες κασπάσες και να αναστείλουν την ενεργότητά τους, άρα και την απόπτωση. Ωστόσο οι παραπάνω πρωτεΐνες, όπως η Smac, η οποία απελευθερώνεται από τα μιτοχόνδρια παράλληλα με το κυτόχρωμα c, δουν προσδένοντας τις IAP και επάγοντας, κατ' αυτόν τον τρόπο, την απόπτωση [Μαρκουλάτος Π.]. Το κυτόχρωμα c απελευθερώνεται από τα μιτοχόνδρια εξαιτίας του σχηματισμού ενός διαύλου, γνωστού ως MAC (mitochondrial apoptosis-induced channel), στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη (M. Dejean, 2006) και έχει ρυθμιστική δράση καθώς προάγει δράσεις σχετικές με την απόπτωση. Οι πόροι MAC ρυθμίζονται από διάφορες πρωτεΐνες, όπως αυτές που κωδικοποιούνται από την οικογένεια αντιαποπτωτικών γονιδίων Bcl-2, που είναι ομόλογα με το γονίδιο ced-9 που αναγνωρίστηκε στο *Caenorhabditis elegans*.^{[4][5]} Οι πρωτεΐνες Bcl-2 είναι ικανές να προάγουν ή να καταστείλουν την απόπτωση δρώντας άμεσα πάνω στο MAC. Οι πρωτεΐνες Bax ή/και Bak σχηματίζουν το δίαυλο, ενώ οι πρωτεΐνες Bcl-2, Bcl-xL ή Mcl-1 εμποδίζουν το σχηματισμό του.

Μόλις το κυτόχρωμα c απελευθερωθεί, προσδέεται στην πρωτεΐνη ενεργοποίησης της απόπτωσης 1 (APAF-1) και σε ATP, και στη συνέχεια προσδέεται στην προκασπάση-9 με αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός πρωτεϊνικού συμπλόκου γνωστού ως αποπτώσωμα (M. Dejean, 2006; Lodish, 2004). Στο αποπτώσωμα η προκασπάση μεταπίπτει στην ενεργή μορφή της, την κασπάση-9, η οποία με τη σειρά της

ενεργοποιεί την πρωτεΐνη καθοριστή κασπάση-3. Η κασπάση 3 μέσω άγνωστων μηχανισμών, εισέρχεται στον πυρήνα του κυττάρου, διασπά την πρωτεΐνη PARP (polyADP ribose polymerase) και οδηγεί σε κατάτμηση του DNA [(Garrido C, 2006); (Du C, 2000); (Μαρκουλάτος Π.)].

Η δεύτερη ομάδα προαποπτωτικών πρωτεϊνών αποτελείται από τις AIF, ενδονουκλεάση, G και CAD, οι οποίες απελευθερώνονται κατά τη διάρκεια της απόπτωσης, αφού δηλαδή έχει προγραμματιστεί ο κυτταρικός θάνατος. Ειδικότερα η πρωτεΐνη AIF μεταναστεύει στον πυρήνα όπου προκαλεί τον κατακερματισμό του DNA τη συμπύκνωση της περιφερική πυρηνικής χρωματίνης. Η ενδονουκλεάση G φυσιολογικά βρίσκεται μέσα στο μιτοχόνδριο και εμπλέκεται στην αντιγραφή του DNA. Σε κύτταρα που διενεργούν απόπτωση, το ένζυμο αυτό απελευθερώνεται από τα μιτοχόνδρια και μεταναστεύει στον πυρήνα, όπου διασπά την πυρηνική χρωματίνη βοηθώντας, έτσι, τον σχηματισμό θραυσμάτων ολιγονουκλεοσωματικού DNA. Και οι δύο αυτές πρωτεΐνες δρουν ανεξάρτητα από την παρουσία κασπασών. Τέλος παρατηρείται απελευθέρωση της πρωτεΐνης CAD από τα μιτοχόνδρια και μετατόπιση της στον πυρήνα, όπου και μετά από διάσπαση της από την κασπάση 3, προκαλεί κατακερματισμό των DNA ολιγονουκλεοσωμάτων περαιτέρω συμπύκνωση της χρωματίνης [(Susin SA, 2000); (Enari M, 1998)].



Εικόνα 1.5 Σχηματική απεικόνιση των εξωγενών και ενδογενών επαγόμενων αποπτωτικών μηχανισμών. Αριστερά ο μηχανισμός ο οποίος ενεργοποιείται με την πρόσδεση του συνδέτη Fas (FasL) στον υποδοχέα του Fas (γνωστός ως Apo-1 ή CD95). Δεξιά ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος ο οποίος ενεργοποιείται από καταστάσεις στρες και στηρίζεται σε μεγάλο βαθμό από το μιτοχόνδριο

Ολοκληρώνοντας την ενότητα της απόπτωσης, πρέπει να γίνει διάκριση μεταξύ των εννοιών της απόπτωσης και της νέκρωσης. Πρόκειται για δύο διαφορετικές διαδικασίες, ικανές να συμβούν σε ένα κύτταρο ανεξάρτητα, διαδοχικά αλλά και ταυτόχρονα. Η νέκρωση χαρακτηρίζεται από ρήξη της κυτταρικής μεμβράνης, οίδημα του κυτταροπλάσματος και των μιτοχονδρίων, διαρροή κυτταροπλασματικού περιεχομένου και πλήρη λύση του κυττάρου. Η νέκρωση, σε αντίθεση με την απόπτωση, οδηγεί συχνά σε οξεία φλεγμονώδη αντίδραση (Ameisen Jc, 1996 science). Συνήθως, το είδος αλλά και η ισχύς του ερεθίσματος καθορίζουν αν τα κύτταρα θα ακολουθήσουν την οδό της απόπτωσης ή της νέκρωσης. Σε χαμηλές δόσεις ένας μεγάλος αριθμός ζημιογόνων παραγόντων μπορούν να οδηγήσουν ένα κύτταρο σε απόπτωση, αλλά τα ίδια ερεθίσματα σε υψηλότερες δόσεις μπορούν να οδηγήσουν σε νέκρωση [(Debnath J, 2005); (Formigli L, 2000)]. Η μορφή του κυτταρικού θανάτου εξαρτάται επίσης από τα ενεργειακά αποθέματα του κυττάρου.

Σε αντίθεση με την απόπτωση, η νέκρωση δεν απαιτεί ενέργεια. Έτσι κύτταρα που έχουν εισέλθει στην διαδικασία της απόπτωσης μπορούν στην συνέχεια να υποστούν νέκρωση λόγω ελάττωσης των ενεργειακών επιπέδων (Saikumar.P et.,al 1998)

1.1.6 Ρόλος των μιτοχονδρίων στο οξειδωτικό στρες

Ελεύθερη ρίζα είναι οποιοδήποτε άτομο (όπως οξυγόνο, άζωτο),μόριο ή ιόν, που διαθέτει τουλάχιστον ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο στην εξωτερική στοιβάδα, και είναι ικανό για ανεξάρτητη ύπαρξη. Για παράδειγμα ελεύθερες ρίζες σχηματίζονται όταν διασπάται ένας ομοιοπολικός δεσμός και ένα ηλεκτρόνιο παραμένει με κάθε νεοσχηματισμένη χημική οντότητα (Karlsson J, 1997). Οι ελεύθερες ρίζες είναι πολύ δραστικές, λόγω της παρουσίας των ασύζευκτων ηλεκτρονίων και τείνουν να "αποσπασούν" ηλεκτρόνια από γειτονικά μόρια. Όταν συμβεί αυτό, το μόριο που έχασε το ηλεκτρόνιο του μετατρέπεται σε νέα ρίζα η οποία με τη σειρά της "αποσπά" ηλεκτρόνιο με αντιπαράλληλη στροφορμή (spin) από άλλο μόριο κ.ο.κ. Το υπόβαθρο για τη διεργασία αυτή αποτελεί η εγγενής τάση ατόμων, ιόντων, μορίων και γενικά ενεργειακών συστημάτων, φυσικά και των ριζών, να διατηρούνται στην κατάσταση ελάχιστης ενέργειας (ground state or atomic unexcited state). Σήμερα έχει διαπιστωθεί ότι οι ζώντες οργανισμοί, όχι μόνο έχουν αναπτύξει μηχανισμούς "συμβίωσης" με τις ελεύθερες ρίζες, η παραγωγή των οποίων είναι αναπόφευκτη κατά τις μεταβολικές διεργασίες, αλλά και μηχανισμούς χρησιμοποίησής τους προς όφελος της φυσιολογικής λειτουργίας του οργανισμού. Σε περιπτώσεις στις οποίες η παραγωγή ελευθέρων ριζών υπερβαίνει την ικανότητα του οργανισμού να τις εξουδετερώσει ή στις οποίες η παραγωγή είναι μεν στα φυσιολογικά επίπεδα αλλά τα αντιοξειδωτικά συστήματα του οργανισμού ανεπαρκούν, τότε ο τελευταίος βρίσκεται σε κατάσταση "οξειδωτικού στρες".

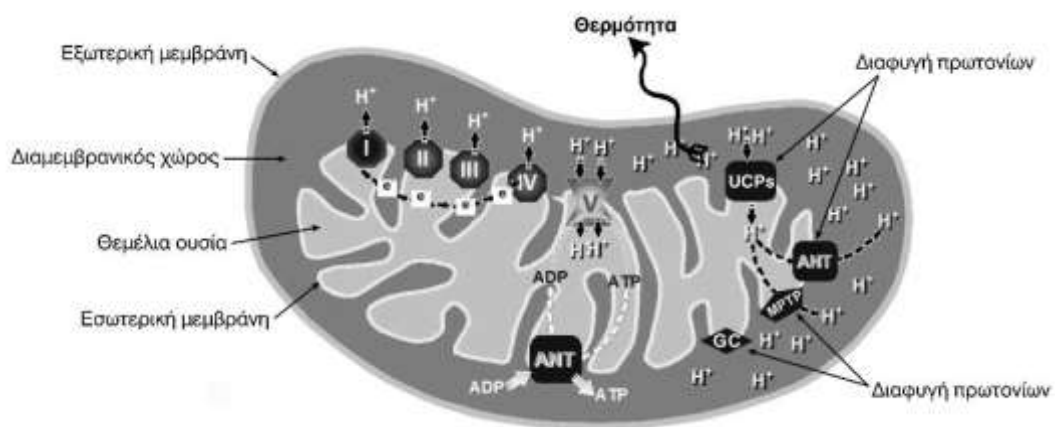
Το 95% του οξυγόνου που καταναλώνει ο οργανισμός χρησιμεύει για την παραγωγή ενέργειας στα μιτοχόνδρια η οποία αποθηκεύεται υπό μορφή δεσμών υψηλής ενέργειας, στο μόριο της τριφωσφορικής αδενοσίνης (adenosine triphosphate, ATP), με τη διεργασία της "οξειδωτικής φωσφορυλίωσης". Η ενέργεια αυτή απελευθερώνεται κατά τη διάσπαση της ATP σε διφωσφορική αδενοσίνη, ή

αδενοσινοδιφωσφορικό οξύ, (adenosine diphosphate, ADP) και δαπανάται για την κάλυψη ζωτικών και "ενεργοβόρων" λειτουργιών του κυττάρου, όπως είναι η διατήρηση της διαφοράς συγκέντρωσης ιόντων μεταξύ έξω- και ενδοκυττάρου χώρου, και γενικά εκατέρωθεν μεμβρανών στα ενδοπλασματικά οργανίδια, το "άνοιγμα" των διαύλων που εξασφαλίζουν τη νευροδιαβίβαση, η συστολή των λείων μυϊκών ινών και ο κυτταρικός κύκλος (Rolfé DS, Brown GC, 1997). Η διάσπαση των υδατανθράκων, των πρωτεϊνών και των λιπών της τροφής, όπως φαίνεται στην καταλήγει στη δημιουργία του ακετυλο-συνενζύμου Α το οποίο εισέρχεται στον κύκλο του κιτρικού οξέος. Ο τελευταίος λαμβάνει χώρα στη θεμέλια ουσία (matrix) των μιτοχονδρίων και κατά τις αντιδράσεις του σε τέσσερα σημεία (1. κατά τη μετατροπή του πυροσταφυλικού οξέος το οποίο σχηματίστηκε στο κυτταρόπλασμα κατά την αερόβιο γλυκόλυση, και εισήρθε στα μιτοχόνδρια, 2. κατά τη μετατροπή του ισοκιτρικού οξέος σε κετογλουταρικό, 3. κατά τη μετατροπή του τελευταίου σε σουκινικό οξύ (ηλεκτρολύ-CoA) και 4. κατά τη μετατροπή του μηλικού οξέος σε οξαλοξικό) αφαιρούνται δύο ηλεκτρόνια από το πρώτο μόριο και μεταφέρονται στο δινουκλεοτίδιο νικοτιναμίδης αδενίνης, NAD⁺ ανάγοντάς το σε NADH + H. Στα τρία πρώτα σημεία αφαιρείται από το πρώτο μόριο και ένα μόριο διοξειδίου του άνθρακα (CO₂). Ακόμη, κατά τη μετατροπή του σουκινικού σε φουμαρικό οξύ αφαιρούνται επίσης δύο ηλεκτρόνια και μεταφέρονται στο δινουκλεοτίδιο φλαβίνης αδενίνης (FAD) ανάγοντάς το σε FADH₂. Τα ηλεκτρόνια του NADH και FADH₂ μεταφέρονται στην "αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων". Τελικός σταθμός των μεταφερομένων ηλεκτρονίων είναι το μοριακό οξυγόνο το οποίο ανάγεται και παρουσία και πρωτονίων (ιόντων υδρογόνου) σχηματίζεται νερό. Η διαδικασία μεταφοράς των ηλεκτρονίων στο μοριακό (O₂) οξυγόνο για το σχηματισμό H₂O στα μιτοχόνδρια γίνεται άμεσα, δηλαδή τα 4 ηλεκτρόνια που "συλλέγει" το σύμπλεγμα IV (κυταροχρωμική C οξειδάση) αποδίδονται στο μοριακό οξυγόνο (το ανάγουν πλήρως) και με την προσθήκη 4 H⁺ σχηματίζουν, σε μια συντονισμένη αντίδραση, δύο μόρια H₂O χωρίς το σχηματισμό ενδιάμεσων μορίων. Αυτό αφορά το 95-99% του οξυγόνου. Εντούτοις, ιδίως από τα συμπλέγματα I και III, διαφεύγουν μικρές ποσότητες μονήρους οξυγόνου (¹O₂, singlet oxygen) και υπεροξειδίου (O₂⁻), τα οποία όμως εξουδετερώνονται από τοπικά αντιοξειδωτικά συστήματα που υπάρχουν στη θεμέλια ουσία: την υπεροξειδική δισμουτάση που περιέχει μαγνήσιο

(MnSOD), η οποία μετατρέπει το υπεροξείδιο σε H_2O_2 , το σύστημα θεωροδοξίνης-περοξυρεδοξίνης (theoredoxin-peroxyredoxin) και την υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, τα οποία μετατρέπουν το υπεροξείδιο σε H_2O . Ένα μικρό ποσοστό του H_2O_2 , όπως και το παραγόμενο σε άλλους ιστούς, διαφεύγει στο κυτταρόπλασμα και κινητοποιεί συγκεκριμένες σηματοδοτικές οδούς. Εντούτοις παρά την ικανότητα των μιτοχονδρίων να ανάγουν το μοριακό οξυγόνο πλήρως, τα οργανίδια αυτά αποτελούν την μεγαλύτερη πηγή ελεύθερων ριζών του οργανισμού γιατί σε αυτά χρησιμοποιείται το 95-99% του οξυγόνου κατά την οξειδωτική φωσφορυλίωση (Aon MA, Cortassa S, O'Rourke B, 2010).

Η παραγωγή ελεύθερων ριζών από τα μιτοχόνδρια εξαρτάται από την μερική τάση του οξυγόνου αλλά αυξάνεται σημαντικά σε βλάβη των μιτοχονδρίων, και ιδιαίτερα στην κατάσταση που περιέγραψαν για πρώτη φορά το 1979 οι Haworth και Hander ως "μιτοχονδριακή μεταβολή της διαπερατότητας" (mitochondrial transition permeability). Η κατάσταση αυτή χαρακτηρίζεται από αύξηση της διαπερατότητας της έσω μιτοχονδριακής μεμβράνης σε μόρια με $MB < 1500$ Da, που οδηγεί σε οξείδωση των μιτοχονδρίων. Στην ουσία πρόκειται για μεταβολή του συμπλέγματος πρωτεϊνών της έσω μεμβράνης γνωστού ως "μεταβολή της διαπερατότητας των μιτοχονδριακών πόρων" (MPTP). Το αποτέλεσμα της διαταραχής αυτής είναι η μη-χρησιμοποίηση (uncoupling) της παραγόμενης ενέργειας, από την μεταφορά των ηλεκτρονίων, για την σύνθεση ATP και η μεγάλη παραγωγή υπεροξειδίου, με συνέπεια την απόπτωση του κυττάρου. Το φαινόμενο της αποσύνδεσης της παραγόμενης ενέργειας από τη σύνθεση ATP στα μιτοχόνδρια, αναφέρεται ως "μιτοχονδριακή αποσύνδεση" (mitochondrial uncoupling). Ο όρος "αποσύνδεση", από βιοενεργητική άποψη, περιγράφει το φαινόμενο της μη αποθήκευσης και μη χρησιμοποίησής καθ' οιονδήποτε τρόπο της ενέργειας η οποία παράγεται κατά την κυτταρική αναπνοή. Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, η παραγόμενη ενέργεια κατά την μεταφορά των ηλεκτρονίων στην αναπνευστική αλυσίδα χρησιμοποιείται από τα συμπλέγματα I έως IV για την άντληση των πρωτονίων στο διαμεμβρανικό διάστημα ενάντια στη διαφορά συγκέντρωσης. Η ενέργεια δε που παράγεται κατά την επανείσοδο των πρωτονίων από το διαμεμβρανικό διάστημα στη θεμέλια ουσία χρησιμοποιείται από το σύμπλεγμα V

(συνθετάση της ATP) για τη σύνθεση της ATP. Εάν τα πρωτόνια επανεισέρθουν στη θεμέλια ουσία με οιοδήποτε άλλο τρόπο εκτός από τη συνθετάση της ATP (διαφυγή ηλεκτρονίων, proton leak), η παραγόμενη ενέργεια απελευθερώνεται ως θερμότητα. Η κατάσταση αυτή αναφέρεται στη βιολογία ως "αποσύνδεση μιτοχονδρίων" (uncoupling mitochondria). Στην έσω μεμβράνη των μιτοχονδρίων υπάρχουν διάφορες πρωτεΐνες μέσω των οποίων επιτελείται η διαφυγή (leak) των πρωτονίων (**Εικόνα 3**), όπως η πρωτεΐνη μετατόπισης των νουκλεοτιδίων αδενίνης (adenine nucleotide translocase, ANT) (Brand MD et al., 2005), ο φορέας γλουταμικού (glutamate carrier) (Samartsev VN et al., 1997) και το σύμπλεγμα μεταβολής της διαπερατότητας των μιτοχονδριακών πόρων (Hunter DR et al., 1976)



Εικόνα 1.6. Το φαινόμενο "αποσύνδεσης" της παραγόμενης ενέργειας με τη σύνθεση ATP στα μιτοχόνδρια.

1.1.7 Οξειδωτικό στρες και βλάβες στο DNA

Οι βλάβες στο από ελεύθερες ρίζες είναι κυρίως τριών ειδών:

α. Πρόκληση δομικών αλλαγών στο DNA: μεταλλάξεις σε ζεύγος βάσεων, μεταθέσεις, απάλειψη, εισαγωγές και επέκταση της σειράς-διαδοχής (αλληλουχία) των νουκλεοβάσεων, νίτρωση, απαμίνωση κ.λπ. Τέτοια είδη βλαβών μπορούν να προκληθούν από τη ρίζα υδροξυλίου, το μονήρες Οξυγόνο, αλκοξυ- και υπεροξυλο-ρίζες ($RO\bullet$, $ROO\bullet$), το όζον (O_3), το υπεροξυνιτρώδες ανιόν ($O=NOO^-$), και τα οξειδία του αζώτου (Storz G et al., 1990; Schreck R, Bauerle PA, 1991). Τα δραστικά οξυγονούχα είδη ενώσεων (που δεν είναι ελεύθερες ρίζες, αλλά έχουν ισχυρή οξειδωτική δράση) μπορούν να προκαλέσουν σημειακές μεταλλάξεις και μαζικές αλλαγές στα χρωμοσώματα.

β. Η δεύτερη σημαντική επίδραση των οξυγονούχων ελευθέρων ριζών στην κυτταρική λειτουργία είναι στους μηχανισμούς-οδούς μεταγωγής σημάτων (signal transduction pathways) σε κυτταροπλασματικό και πυρηνικό επίπεδο.¹¹ Για παράδειγμα, το H_2O_2 που διαπερνά εύκολα τις μεμβράνες των κυττάρων και οργανιδίων, μπορεί να οδηγήσει σε μετατόπιση της ανασταλτικής υπομονάδας από τον κυτταροπλασματικό μεταγραφικό παράγοντα στον πυρηνικό παράγοντα κΒ, επιτρέποντας στον παράγοντα ενεργοποίησης να μεταναστεύει στον πυρήνα (Aon MA et al., 2010).

γ. Οι ελεύθερες ρίζες (οξυγονούχες και αζωτούχες) μπορούν να διαμορφώσουν την ενεργότητα των πρωτεϊνών και γονιδίων που ανταποκρίνονται στο οξειδωτικό στρες και τα οποία ρυθμίζουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, διαφοροποίηση και κυτταρική απόπτωση. Πολυάριθμες έρευνες δείχνουν ότι οι οξυγονούχες ελεύθερες ρίζες ενεργοποιούν ογκογονίδια με τα οποία θεωρείται ότι συμβάλλουν σε μηχανισμούς καρκινογένεσης (Brand MD et al., 2005).

1.2 Γενετική των μιτοχονδρίων

Μετά την ανακάλυψη ότι τα μιτοχόνδρια περιέχουν το δικό τους αυτόνομο μιτοχονδριακό DNA (mtDNA) το 1963 (Nass and Nass, 1963a; Nass and Nass, 1963b), ακολούθησε η δημοσίευση της αλληλούχισης του ανθρώπινου μιτοχονδριακού γονιδιώματος από τους Anderson και συνεργάτες το 1981 (Anderson *et al.*, 1981) Κάθε ανθρώπινο κύτταρο περιέχει εκατοντάδες μιτοχόνδρια, το κάθε ένα από τα οποία περιέχει 2 - 10 μόρια μιτοχονδριακού DNA. Κάθε τέτοιο μόριο έχει μήκος 16.569 ζεύγη βάσεων, αποτελείται από δύο αλυσίδες, είναι δηλαδή δίκλωνο και μεταγράφονται και οι δύο του αλυσίδες. Η μία από αυτές είναι πλούσια σε γουανίνη και ονομάζεται βαριά (heavy, H), ενώ η άλλη είναι πλούσια σε κυτοσίνη και ονομάζεται ελαφριά (light, L) (Wallace, 1999). Τα μιτοχόνδρια είναι ικανά να συντήκονται, να χωρίζονται και να μετακινούνται μέσα στο κύτταρο (Bereiter Hann & Voth, 1994) . Συνολικά, μπορούν να αντιστοιχούν στο 25% του όγκου του κυτταροπλάσματος.

Το μιτοχονδριακό DNA του ανθρώπου περιέχει 37 γονίδια τα οποία κωδικοποιούν 2 ριβοσωμικά RNAs (rRNAs), 22 tRNAs και 13 πολυπεπτίδια. Τα πολυπεπτίδια είναι συστατικά της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων και της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης: Οι πρωτεΐνες αυτές είναι το κυτόχρωμα b, επτά υπομονάδες της αφυδρογονάσης του NADH (ND1, 2, 3, 4, 4L, 5 και 6), τρεις υπομονάδες της οξειδάσης του κυτοχρώματος c (CO I, II και III) και δύο υπομονάδες (6η και 8η) της μιτοχονδριακής συνθετάσης του ATP. (Wallace, 1999).

Το mtDNA αντιγράφεται με ημισυντηρητικό τρόπο και δεν περιορίζεται μόνο στη φάση S της μεσόφασης. Αντιγράφεται συνεχώς και ανεξάρτητα από το πυρηνικό, τόσο σε διαιρούμενα όσο και σε μη διαιρούμενα κύτταρα (Taanman *et al.*, 2003). Η πολυμεράση γ, η κινάση 2 της θυμιδίνης και η κινάση της δεοξυγουανοσίνης είναι ένζυμα υπεύθυνα για την αντιγραφή του mtDNA και κωδικοποιούνται από γονίδια του πυρήνα. Μεταγράφεται και μεταφράζεται μέσα στα μιτοχόνδρια. Το πυρηνικό γονιδίωμα κωδικοποιεί την πλειοψηφία των μιτοχονδριακών πρωτεϊνών, οι οποίες συντίθενται στο κυτταρόπλασμα και στη συνέχεια μεταφέρονται στα μιτοχόνδρια. Ο πυρήνας, επίσης, ελέγχει τη μεταγραφική ικανότητα του mtDNA μέσω ρυθμιστικών

πρωτεϊνών, όπως ο μιτοχονδριακός μεταγραφικός παράγοντας A (TFAM-mitochondrial transcription factor A) που κωδικοποιείται από γονίδιο του πυρήνα (Larsson *et al.*, 1998). Οι 13 μιτοχονδριακές πρωτεΐνες μαζί με τις πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από το πυρηνικό DNA σχηματίζουν τα 5 ενζυμικά συμπλέγματα που είναι απαραίτητα για την οξειδωτική φωσφορυλίωση και την παραγωγή ενέργειας με τη μορφή ATP.

Τα μιτοχόνδρια έχουν εξελίξει ένα περίπλοκο σύστημα για την εισαγωγή των πρωτεϊνών οι οποίες κωδικοποιούνται από τα γονίδια του πυρήνα. Οι πρωτεΐνες μπορεί να διαθέτουν μία N-τελική αλληλουχία αμινοξέων η οποία στοχεύει στους υποδοχείς της εξωτερικής μεμβράνης των μιτοχονδρίων. Ακολουθεί αναδίπλωση και εισαγωγή των πρωτεϊνών στο κατάλληλο διαμέρισμα του μιτοχονδρίου, πριν την αποκοπή της αλληλουχίας. Η ταυτοποίηση της συγκεκριμένης αλληλουχίας είναι σημαντικός δείκτης του μιτοχονδριακού εντοπισμού και χρήσιμη στον καθορισμό της συνεισφοράς και λειτουργίας των πρωτεϊνών (Ezqueriva *et al.*, 2005).

Η δομή του mtDNA είναι πολύ συμπαγής καθώς περιοχές, όπως ιντρόνια, ψευδογονίδια καθώς και επαναλαμβανόμενο DNA συνήθως απουσιάζουν. Ωστόσο, υπάρχει μια μη κωδικοποιούσα περιοχή, ο βρόχος D (D-loop), που περιέχει ακολουθίες απαραίτητες για την έναρξη της αντιγραφής και της μεταγραφής. Η περιοχή του βρόχου D είναι μία περιοχή 1.1 kb, η οποία σχηματίζεται με εκτόπιση των δύο αλυσίδων από μία τρίτη αλυσίδα DNA (Shadel and Clayton, 1997).

1.3 Χαρακτηριστικά γνωρίσματα του μιτοχονδριακού DNA

Το μιτοχονδριακό DNA έχει μοναδικά χαρακτηριστικά που το διακρίνουν από το πυρηνικό γονιδίωμα:

- Μεταβιβάζεται μόνο μέσω της μητρικής γενεαλογικής σειράς. Οι περισσότεροι ερευνητές θεωρούν ότι το πατρικό mtDNA δεν εισέρχεται με το σπέρμα στο γονιμοποιημένο ωάριο κατά τη σύλληψη, γι' αυτό το έμβρυο αποκτά μόνο μητρικό. Ωστόσο, μια έρευνα πατρικής κληρονόμησης που μελετούσε μια μετάλλαξη ενός μιτοχονδριακού γονιδίου η οποία οφείλεται σε έλλειψη, έδειξε

ότι υπάρχουν σπάνιες εξαιρέσεις (Schwartz *et al.*, 2002). Πιθανόν, η αντιγραφή του πατρικού mtDNA να καταστέλλεται. Υπάρχουν ενδείξεις για επιλεκτική στόχευση των μιτοχονδρίων του σπέρματος με σκοπό την αποικοδόμηση από τα ωάρια (Sutovsky *et al.*, 1999; 2004). Η αποτυχία ενός ωαρίου να εξαλείψει το πατρικό mtDNA θα μπορούσε να οδηγήσει στην απώλεια του εμβρύου στο στάδιο της βλαστοκύστης (St John *et al.*, 2000). Οι ερευνητές, επίσης, δεν κατάφεραν να ανιχνεύσουν πατρικό mtDNA σε ασθενείς με σποραδικές μιτοχονδριακές μυοπάθειες (Filosta *et al.*, 2003; Taylor *et al.*, 2003). Συνεπώς, εάν συμβαίνει η μεταβίβαση μέσω του πατέρα είναι σπάνια και, πιθανόν, εξαρτάται από την παρουσία ειδικών μεταλλάξεων που επιτρέπουν στο μιτοχονδριακό DNA του σπέρματος να αποφεύγει την αποικοδόμηση και να αντιγράφεται. Σε κάθε περίπτωση, το δόγμα ότι το ανθρώπινο mtDNA κληρονομείται αποκλειστικά από τη μητέρα παραμένει μία λογική βάση για γενετική συμβουλευτική.

- Ενώ τουλάχιστον 32 διαφορετικά μόρια tRNA μεταφέρουν αμινοξέα στα ριβοσώματα ο αριθμός των μορίων tRNA έχει περιοριστεί στο ελάχιστο και μόνον 22 μόρια απαιτούνται για την πρωτεϊνοσύνθεση των μιτοχονδρίων (Taylor and Turnbull, 2005).
- Κάθε άτομο περιλαμβάνει στα κύτταρά του εκατοντάδες ή και χιλιάδες αντίγραφα του ίδιου μορίου μιτοχονδριακού DNA. Ο αριθμός των αντιγράφων ποικίλλει μεταξύ των κυττάρων, ανάλογα με τις ανάγκες για ενέργεια των ιστών. Η πολυπλοειδική φύση του μιτοχονδριακού γονιδιώματος δημιουργεί ένα μοναδικό γενετικό χαρακτηριστικό στα μιτοχόνδρια, την ομοπλασμία και ετεροπλασμία. Ομοπλασμία είναι η κατάσταση κατά την οποία όλα τα αντίγραφα του μιτοχονδριακού γονιδιώματος είναι πανομοιότυπα. Στην περίπτωση της ετεροπλασμίας κύτταρα, ιστοί, ακόμα και ολόκληροι οργανισμοί, μπορεί να έχουν δύο πληθυσμούς mtDNA: φυσιολογικά (αγρίου τύπου) και μεταλλαγμένα. Η αξία αυτών των όρων είναι εμφανής όταν λάβουμε υπόψη τις μιτοχονδριακές μεταλλάξεις που οδηγούν σε ασθένειες. Μεταλλάξεις του mtDNA χωρίς βλαβερή επίδραση συνήθως είναι ομοπλασμικές, ενώ παθογόνες μεταλλάξεις συνήθως, αλλά όχι πάντα, είναι ετεροπλασμικές. Σε περίπτωση ετεροπλασμίας, είναι λογικό ότι πρέπει να υπάρχει ένας κρίσιμος ελάχιστος αριθμός μεταλλαγμένων

mtDNA πριν η δυσλειτουργία στον ιστό και τα κλινικά συμπτώματα γίνουν εμφανή (Sciaccio *et al.*, 1994).

Ο γενετικός κώδικας του mtDNA του ανθρώπου διαφέρει από τον παγκόσμιο κώδικα σε αρκετά σημεία (πίνακας 1). Τα σπουδαιότερα από αυτά είναι:

Τα κωδικόνια AUA και AUU καθώς και το κωδικόνιο AUG χρησιμοποιούνται και ως κωδικόνια έναρξης. Το AUA κωδικοποιεί τη μεθειονίνη αντί της ισολευκίνης, το AUG τη μεθειονίνη, ενώ το AUU την ισολευκίνη όπως στον παγκόσμιο γενετικό κώδικα. Το κωδικόνιο UGA κωδικοποιεί το αμινοξύ τρυπτοφάνη και δεν αποτελεί κωδικόνιο τερματισμού. Τα κωδικόνια AGA και AGG, θεωρούνταν τα τελευταία τριάντα χρόνια, κωδικόνια τερματισμού, ωστόσο αποδείχτηκε ότι στο ανθρώπινο μιτοχόνδριο τα κωδικόνια τερματισμού είναι τα UAA και UAG (Temperley *et al.*, 2010)(πίνακας 2).

Πίνακας 1.1: Ο μιτοχονδριακός γενετικός κώδικας του ανθρώπου (Πηγή: MITOMAP WEB)

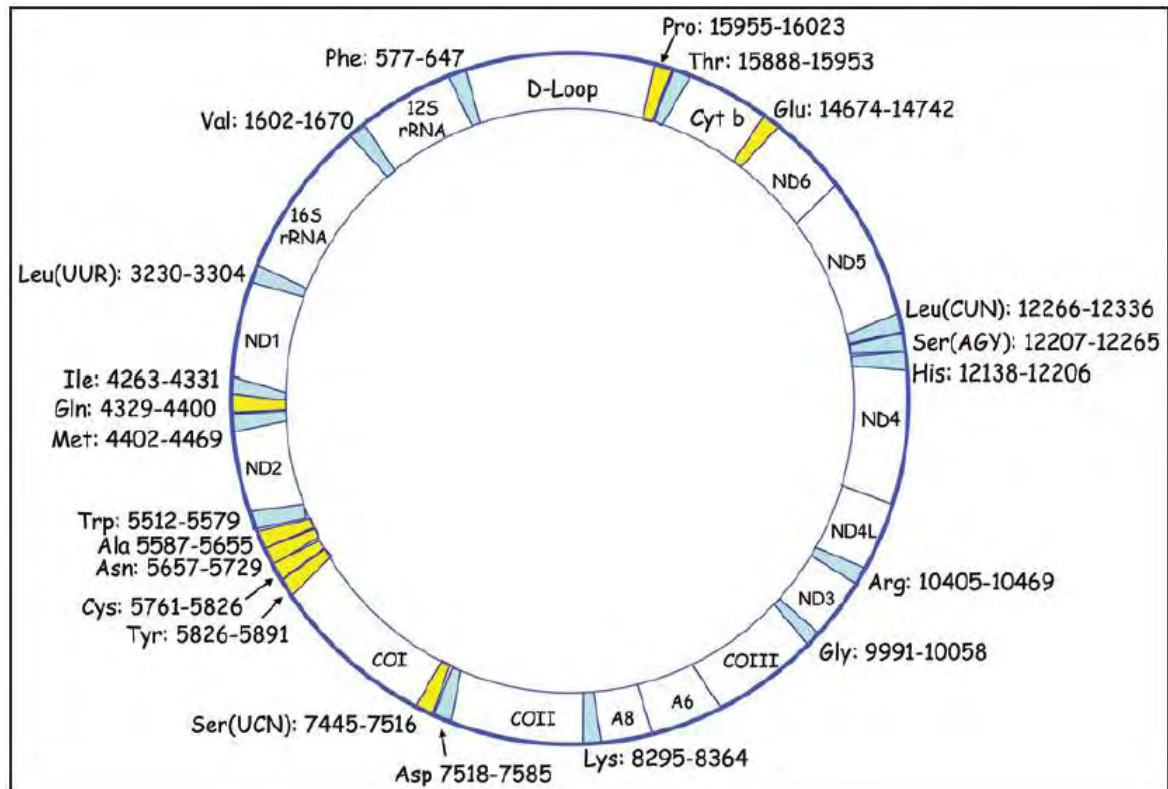
Phe F	UUU UUC	Thr T	ACU ACC ACA ACG	Asp D	GAU GAC
Leu (1) L (UUA/G)	UUA UUG	Ala A	GCU GCC GCA GCG	Glu E	GAA GAG
Leu (2) L (CUN)	CUU CUC CUA CUG	Tyr Y	UAU UAC	Cys C	UGU UGC
Ile I	AUU AUC	Ter	UAA UAG	Trp W	UGA UGG
Met M	AUA AUG	His H	CAU CAC	Arg R	CGU CGC CGA CGG
Val V	GUU GUC GUA GUG	Gln Q	CAA CAG	Ser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

Πίνακας 1.2: Βασικές αποκλίσεις μιτοχονδριακού κώδικα από τον παγκόσμιο γενετικό κώδικα στα θηλαστικά

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

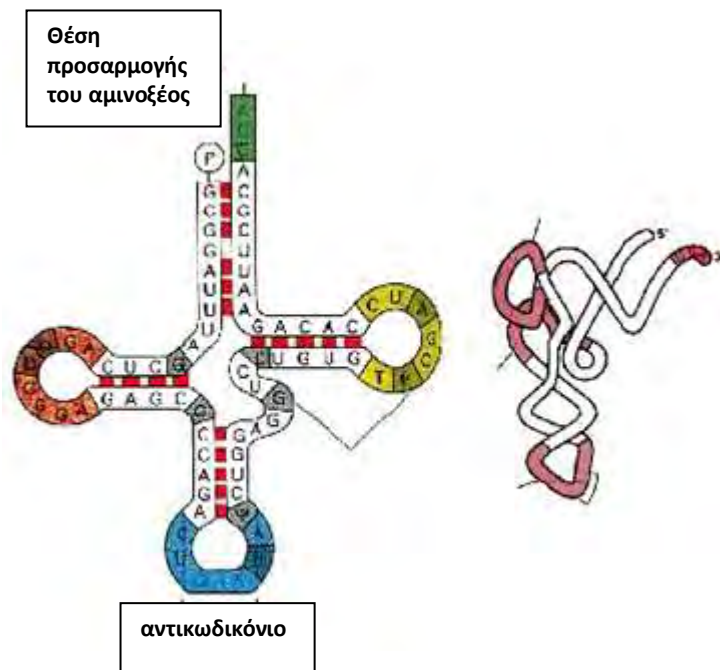
1.4 Μιτοχονδριακά tRNAs

Τα tRNAs αποτελούν βασικά συστατικά της πρωτεϊνοσύνθεσης καθώς μεταφέρουν τα αμινοξέα στο ριβόσωμα, βοηθούν την πρόσδεσή τους στα κωδικόνια των mRNA και διευκολύνουν την ενσωμάτωσή τους στα πολυπεπίδια με υψηλή πιστότητα. Το ανθρώπινο μιτοχονδριακό γονιδίωμα περιέχει μία μικρή ομάδα tRNAs. Τα tRNAs που κωδικοποιούνται στα μιτοχόνδρια είναι τα μόνα που χρησιμοποιούνται για τη βιοσύνθεση των πρωτεϊνών στα μιτοχόνδρια. Ενώ η είσοδος των tRNAs συμβαίνει σε μερικά ευκαρυωτικά μιτοχόνδρια, δεν έχει παρατηρηθεί σε ανθρώπινα κύτταρα *in vivo*. Για αυτόν το λόγο τα διαθέσιμα tRNAs στα ανθρώπινα μιτοχόνδρια υποδεικνύουν ότι τα αμινοξέα μεταφέρονται από ένα μόνο tRNA. Εξαιρέση αποτελούν η σερίνη (tRNA^{Ser(AGY)} και tRNA^{Ser(UCN)}) και η λευκίνη (tRNA^{Leu(UUR)} και tRNA^{Leu(CUN)}) που διαθέτουν δύο ισοϋποδοχείς. Για να εκτελεστεί η πρωτεϊνοσύνθεση στα μιτοχόνδρια χρειάζονται, δηλαδή, 22 tRNAs (Εικόνα 2) (Martin, 1995; Zifa *et al.*, 2007).



Εικόνα 1.7: Χάρτης ανθρώπινου μιτοχονδριακού γονιδιώματος. Με μπλε και κίτρινο συμβολίζονται τα 22 tRNAs (Zifa et al., 2007).

Η γενική δομή των tRNAs είναι καλά συντηρημένη στους περισσότερους οργανισμούς. Ωστόσο, οι δομές των tRNAs των μιτοχονδρίων των ανώτερων ευκαρυωτών αποκλίνει σημαντικά από αυτές των υπόλοιπων οργανισμών. Η δευτεροταγής δομή τους έχει σχήμα τριφυλλιού με 4 επικράτειες: το βραχίονα-υποδοχέα, το βραχίονα D, το βραχίονα ΤψC και το βραχίονα αντικωδικονίου (Εικόνα 3). Η δευτεροταγής δομή αναδιπλώνεται σε μία συμπαγή τριτοταγή δομή σχήματος L, όπως συμβαίνει σε όλες τις κλάσεις tRNAs (Dirheimer et al., 1995). Ωστόσο, τα μιτοχονδριακά tRNAs έχουν μικρούς βραχίονες ή έλλειψη και ολόκληρων επικρατειών (Helm et al., 2000).



Εικόνα 1.8: Αριστερά, δευτεροταγής δομή του μορίου tRNA όπου παρουσιάζονται με πράσινο η αλληλουχία CCA του βραχίονα υποδοχής όπου προσαρμόζεται το αμινοξύ, με κίτρινο η θηλιά TψC, με μπλε η θηλιά του αντικωδικονίου και με κόκκινο η θηλιά DHU. Το βέλος δείχνει την περιοχή όπου εντοπίζεται ο επιπλέον βραχίονας (μεταβλητός). Δεξιά, τριτοταγής διαμόρφωση του μορίου tRNA με σχήμα παρόμοιο με το ελληνικό Γ.

1.5 Μεταλλάξεις μιτοχονδριακού γονιδιώματος

Το mtDNA παρουσιάζει μεγάλη ευαισθησία στις μεταλλάξεις, σε αντίθεση με το πυρηνικό γονιδίωμα, καθώς αποτελείται μόνο από κωδικές αλληλουχίες και οι μηχανισμοί επιδιόρθωσης είναι περιορισμένοι. Οι περισσότερες μεταλλάξεις του μιτοχονδριακού DNA είναι σημειακές. Παρατηρούνται, επίσης, μικρές ή μεγάλες ελλείψεις. Οι μεταλλάξεις είναι είτε κληρονομούμενες, είτε επίκτητες. Είναι αξιοσημείωτο ότι οι κληρονομούμενες μεταλλάξεις είναι σχεδόν πάντα σημειακές και όχι μεγάλες ανακατατάξεις όπως ελλείψεις ή διπλασιασμοί. Είναι πιθανό πως η γενεαλογική γραμμή δεν επιτρέπει μεγάλες ανακατατάξεις του μιτοχονδριακού DNA, γι' αυτό οι ελλείψεις είναι πάντα επίκτητες και ετεροπλασμικές. Οι σημειακές μεταλλάξεις μπορεί να είναι κληρονομούμενες ή επίκτητες και να παρουσιάζουν ομοπλασμία ή ετεροπλασμία (Gellerich *et al.*, 2002).

1.5.1.Ελλείψεις mtDNA

Οι ελλείψεις του mtDNA ήταν οι πρώτες μεταλλάξεις οι οποίες περιγράφηκαν και σχετίστηκαν με ανθρώπινη ασθένεια (Holt *et al.*, 1988). Το μέγεθος της έλλειψης μπορεί να ποικίλλει από μία μόνο βάση έως αρκετές Kb και εντοίζονται σε οποιοδήποτε τμήμα του μορίου. Η πιο κοινή έλλειψη έχει μήκος 5 Kb και εκτείνεται μεταξύ των γονιδίων που κωδικοποιούν για το κυτόχρωμα b και για την υπομονάδα II της κυτοχρωμικής οξειδάσης, δηλαδή σε περιοχή όπου απαντώνται tRNAs και γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες. Μεγάλης κλίμακας ελλείψεις, όπως η προαναφερθείσα, έχουν συσχετιστεί με ειδικούς φαινότυπους που αντιστοιχούν σε σύνδρομα όπως το Kearns-Sayre, το Pearson και η χρόνια προοδευτική εξωτερική οφθαλμοπληγία (CPEO). Ωστόσο, η παθολογική έκφραση των ελλείψεων δεν περιορίζεται σε αυτούς τους φαινότυπους αλλά έχει συνδεθεί με όλες σχεδόν τις μιτοχονδριακές εγκεφαλοπάθειες.

Ελλείψεις εντοίζονται σε καταστάσεις ετεροπλασμίας, το ποσοστό των μορίων με έλλειμμα ποικίλλει ανάμεσα στους ιστούς και ο βαθμός ετεροπλασμίας μπορεί να αλλάξει με την πάροδο του χρόνου. Οι ελλείψεις προκύπτουν ως mtDNA προ-μετάλλαξη, πιθανόν, μέσα στο ωοκύτταρο και μεταφέρονται στο νεογνό το οποίο μπορεί να εμφανίσει κλινικά χαρακτηριστικά. Είναι εξαιρετικά ασυνήθιστο να προσβληθούν περισσότερα από ένα νεογνά και ο κίνδυνος της μετέπειτα μετάδοσης από μία προσβεβλημένη γυναίκα έχει εκτιμηθεί στο 4% (Chinnery *et al.*, 2004). Ορισμένοι ασθενείς έχουν διπλασιασμούς στο mtDNA, οι οποίοι θα μπορούσαν να αποτελέσουν ενδιάμεσο βήμα στο σχηματισμό ελλείψεων. Μικρές ελλείψεις έχουν περιγραφεί σε γονίδια όπως αυτά που κωδικοποιούν ένζυμα της αναπνευστικής αλυσίδας (Scharira, 2006).

1.5.2.Σημειακές μεταλλάξεις mtDNA

Περισσότερες από 100 μεταλλάξεις που έχουν συνδεθεί με ανθρώπινες ασθένειες έχουν περιγραφεί σε γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες, tRNAs, rRNAs (Servidei, 2004). Από τις μεταλλάξεις που έχουν εντοπιστεί και συσχετιστεί με ασθένειες, περισσότερες από τις μισές εντοπίζονται στα γονίδια των tRNAs, γεγονός αξιοσημείωτο δεδομένου ότι οι αλληλουχίες των tRNAs αποτελούν μόνο το 10% του μιτοχονδριακού γονιδιώματος. Αυτό μπορεί να εξηγηθεί λόγω του ουσιαστικού ρόλου των tRNAs στη σύνθεση πρωτεϊνών οι οποίες συμμετέχουν στην παραγωγή ενέργειας. Από τα 22 tRNAs τα 21 σχετίζονται με μεταλλάξεις που προκαλούν ασθένειες. Η μόνη γνωστή εξαίρεση είναι το γονίδιο για το tRNA της αργινίνης (tRNA^{Arg}). Αξίζει να σημειωθεί ότι το 50% των παθολογικών μεταλλάξεων παρατηρείται σε 3 μόνο tRNAs : tRNA^{Leu(UUR)}, tRNA^{Lys} και tRNA^{Ile}.

Η κλινική τους έκφραση ποικίλλει και περιλαμβάνει ποικίλους φαινότυπους (Πίνακας 2) όπως τα σύνδρομα: MELAS (μιτοχονδριακή εγκεφαλομυοπάθεια, γαλακτική οξέωση και αγγειακά εγκεφαλικά επεισόδια), MERRF (μυοκλονική επιληψία με ερυθρές ρακώδεις ίνες), NARP (νευροπάθεια, αταξία, μελαγχρωστική αμφιβληστροειδοπάθεια), LHON (κληρονομική οπτική νευροπάθεια του Leber). Επίσης, ολιγοσυμπτωματικά σύνδρομα που προκύπτουν από σημειακές μεταλλάξεις του mtDNA περιλαμβάνουν το σακχαρώδη διαβήτη, καρδιομυοπάθειες, νευροαισθητήρια κώφωση. Ωστόσο, ασθενείς με ολιγοσυμπτωματικές μορφές μπορούν διαδοχικά να αναπτύξουν επιπλέον κλινικά χαρακτηριστικά, π.χ η μητρική κληρονομικότητα υπέρτασης, υπερχοληστερολαιμίας και υπερμαγνησισαιμίας που προκαλείται από μετάλλαξη στο μιτοχονδριακό tRNA της ισολευκίνης (Wilson *et al.*, 2004). Στον πίνακα 1.3 παρουσιάζεται η συσχέτιση των κυριότερων μιτοχονδριακών μεταλλάξεων και ασθενειών (Scharira, 2006).

Πίνακας 1.3: Τα δεδομένα του πίνακα έχουν ληφθεί από διαδικτυακές βάσεις δεδομένων (www.mitomap.org και www.genpat.uu.se/mtDB)

Παθогόνες και πολυμορφικές μεταλλάξεις στα μιτοχονδριακά tRNA γονίδια

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

1.6 Μιτοχονδριακά νοσήματα

Τα μιτοχονδριακά νοσήματα περιεγράφηκαν για πρώτη φορά από τον Luft πριν από 43 χρόνια (1962). Υπολογίζεται ότι η συχνότητά τους είναι από 1:5.000-1:10.000 γεννήσεις. Εμπλέκονται περίπου 800 διαφορετικές πρωτεΐνες. Τα μιτοχόνδρια περιέχουν πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται τόσο από το πυρηνικό, όσο και από το μιτοχονδριακό DNA. Έχουν περιγραφεί ανωμαλίες στα σύμπλοκα I, II, III και IV, στο κυτόχρωμα c, στη συνθάση της ATP και στη βιοσύνθεση της ουβικινόνης. Οι περισσότερες ελλείψεις, διπλασιασμοί, εισαγωγές, αναστροφές ή άλλες σύνθετες ανακατατάξεις, περιλαμβάνουν αρκετά γονίδια, αφού τα μιτοχονδριακά γονίδια βρίσκονται πολύ κοντά το ένα με το άλλο (37 γονίδια σε 16,5 kb). Οι νουκλεοτιδικές αντικαταστάσεις του μιτοχονδριακού DNA κληρονομούνται μόνο από την μητέρα. (H. Kokotas et al., 2009). Οι σημειακές μεταλλαγές του μιτοχονδριακού DNA μπορούν να εμφανίζονται σε όλα τα γονίδια και οι συνέπειες τους μπορεί να εξαρτώνται από τις αλλαγές που επιφέρουν στα προϊόντα των γονιδίων αυτών, από το εύρος των ιστών που φέρουν τις μεταλλαγές, τη μεταβολή της παραγωγής ATP στους ιστούς αυτούς, άλλους πολυμορφισμούς του μιτοχονδριακού DNA (Lamminen T et al., 1997), παράγοντες που κωδικοποιούνται από τον πυρήνα και αλληλεπιδρούν με τα προϊόντα των γονιδίων του μιτοχονδριακού DNA (Bykhovskaya Y et al., 2000), Sasarman F. et al., Hum Mol Genet 2002; 11: 1669-1681), καθώς επίσης και από περιβαλλοντικούς παράγοντες (Estivill X. et al., 1998). Το ενδομιτοχονδριακό και ενδοκυτταρικό περιβάλλον αποτελούν τόπους σύνθετων αλληλεπιδράσεων και συνεπώς οι παθογενείς μηχανισμοί των σημειακών μεταλλαγών δεν είναι ακόμα αρκετά κατανοητοί. Οι περισσότερες μεταλλαγές του μιτοχονδριακού DNA είναι σημειακές. Οι ελλείψεις μικρών ή μεγάλων κομματιών είναι σπάνιες. Οι μεγάλες ελλείψεις γενικά περιλαμβάνουν τουλάχιστον ένα tRNA, κάτι που σημαίνει ότι μπορούν να προκαλέσουν προβλήματα στη μεταγραφή και δυσλειτουργία της αναπνευστικής αλυσίδας. Gellerich F. et al Biochim Biophys Acta 2002; 1556: 41-52). Διπλασιασμοί στο μιτοχονδριακό DNA έχουν περιγραφεί, όμως δε θεωρούνται ότι είναι παθογενείς και μπορούν να προκαλέσουν παθολογικό φαινότυπο μόνο έμμεσα. Manfredi G. et al 1997; 61: 953-960). Παλαιότερα είχε προταθεί πως το

μιτοχονδριακό DNA δεν έχει μηχανισμούς επιδιόρθωσης, όμως πρόσφατες μελέτες έδειξαν πως υπάρχει κάποια επιδιορθωτική δραστηριότητα, μικρότερου όμως εύρους συγκρινόμενη με το πυρηνικό DNA (Croteau D. et al, Mutat Res 1999; 434: 137-148)

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

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

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

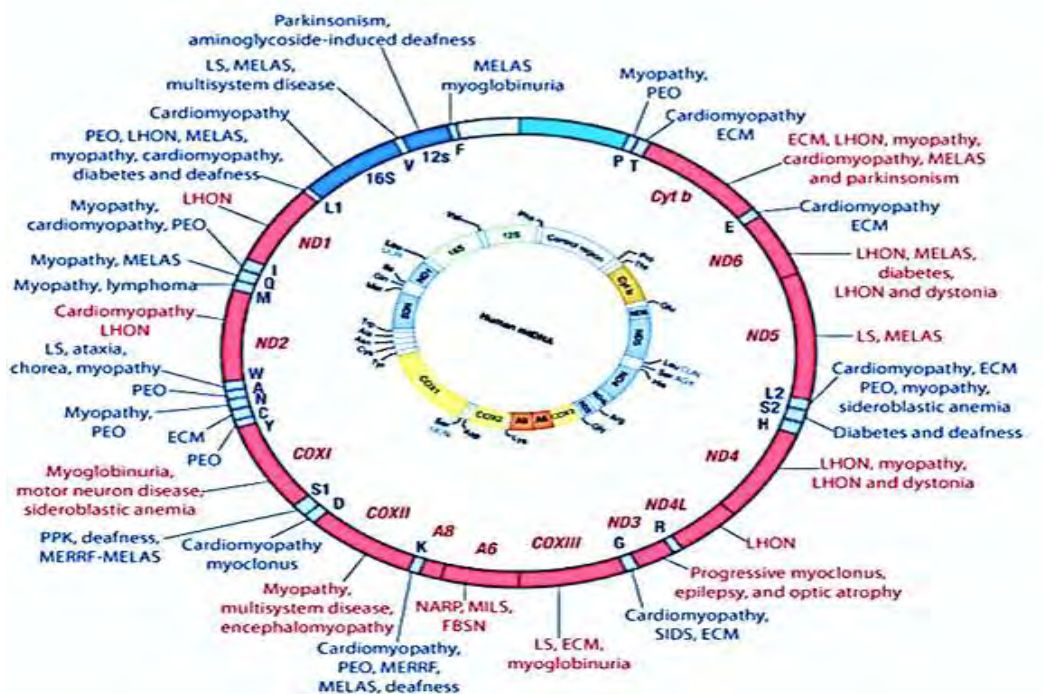
Η μεγάλη ετερογένεια τους οφείλεται εν μέρει στη βιοχημική πολυπλοκότητα του μηχανισμού της μιτοχονδριακής αναπνοής, αλλά και στο γεγονός ότι δύο γονιδιώματα, το μιτοχονδριακό και το πυρηνικό, κωδικοποιούν τις υπομονάδες των πρωτεϊνών των αναπνευστικών συμπλόκων. Γενικά, όργανα και ιστοί με την υψηλότερη ενεργειακή απαίτηση, όπως ο εγκέφαλος και οι μύες, είναι πιο πιθανό να επηρεαστούν και γι'αυτό τα νοσήματα αυτά αναφέρονται κι ως "μιτοχονδριακές εγκεφαλομυοπάθειες".

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

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

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

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



Εικόνα 1.9 : ΕΞΩΤΕΡΙΚΟ ΣΧΗΜΑ: με ανοιχτό μπλε χρώμα φαίνονται οι ασθένειες που οφείλονται σε μεταλλάξεις των αντίστοιχων mt-tRNAs στο εσωτερικό σχήμα.

1.7 Συσχέτιση μιτοχονδρίων με πνευμονικές ασθένειες

Η σημαντικότερη ίσως λειτουργία των μιτοχονδρίων αναγνωρίζεται στη συνεισφορά τους σε ό,τι αφορά τον ενεργειακό μεταβολισμό, καθώς αποτελούν τους βασικούς προμηθευτές ενέργειας των κυττάρων. Μέσω του μηχανισμού της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης (OXPHOS) της αναπνευστικής αλυσίδας, είναι δυνατό να καλύψουν περισσότερο από 90% των ενεργειακών αναγκών των κυττάρων σε ATP. Παραπροϊόν της λειτουργίας του μηχανισμού αυτού, αποτελούν οι ελεύθερες ρίζες οι οποίες όταν υπερπαράγονται αυξάνουν κατά πολύ το ήδη μεγάλο ποσοστό μεταλλαγών στο μιτοχονδριακό DNA εξαιτίας της απουσίας επιδιορθωτικών μηχανισμών. Το μιτοχονδριακό DNA αποτελείται από 37 γονίδια ενώ τα 22 από αυτά κωδικοποιούν τα μιτοχονδριακά μεταφορικά RNAs (mt-tRNA). Αυτά τα γονίδια είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα να υποστούν μεταλλάξεις, οι οποίες γίνονται η αιτία δυσλειτουργίας των μιτοχονδρίων και συνδέονται με αρκετές παθολογικές καταστάσεις. Οι μεταλλάξεις στο tRNA έχουν διαπιστωθεί μόνο σε μιτοχονδριακό tRNA, αποδεικνύοντας ότι η αιτιολογία του tRNA με ασθένειες συνδέεται στενά με τη βιολογία των μιτοχονδρίων. Η πρώτη έκθεση που συνδέει μια μετάλλαξη σε tRNA με μία ανθρώπινη ασθένεια αφορά το σύνδρομο MELAS (μιτοχονδριακή εγκεφαλομυοπάθεια, γαλακτική οξέωση και αγγειακά εγκεφαλικά επεισόδια). Από τότε, πολλές μεταλλάξεις σε γονίδια tRNA έχουν περιγραφεί και έχει επίσης βρεθεί ότι πολλές διαφορετικές μεταλλάξεις tRNA μπορεί να είναι η αιτία μιας ποικιλίας ανθρώπινων ασθενειών.

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

Το Οξειδωτικό στρες έχει επίσης ενοχοποιηθεί στην παθογένεση της σαρκοείδωσης. Η σαρκοείδωση είναι μια κοκκιωματώδης νόσος άγνωστης αιτιολογίας που προκαλεί μη τυροειδοποιημένα κοκκιώματα σε ένα ή περισσότερα όργανα. Μπορεί να προσβάλλει σχεδόν κάθε όργανο του σώματος, αλλά οι συνηθέστερες βλάβες απαντούν στους πνεύμονες.

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

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

1.8 Σαρκοείδωση

Η σαρκοείδωση είναι μια συστηματική κοκκιωματώδης νόσος άγνωστης αιτιολογίας, η οποία παρατηρείται συνήθως σε νέους ενήλικες και εκδηλώνεται με πυλαία πνευμονική λεμφαδενοπάθεια, πνευμονικές διηθήσεις και οφθαλμικές και δερματικές αλλοιώσεις.

1.8.1.Επιδημιολογία

Η σαρκοείδωση επηρεάζει ανθρώπους όλων των φυλετικών και εθνικών ομάδων. Εμφανίζεται σε όλες τις ηλικίες συνήθως όμως πριν από την ηλικία των 50 ετών. Η συχνότητα εμφάνισης κορυφώνεται στις ηλικίες 20-39 χρονών, ενώ είναι 2πλάσια σχεδόν στις γυναίκες, συγκριτικά με τους άνδρες (Bresnitz EA and Strom BL, 1983; Fanburg BL and Pitt EA, 1988) Η συχνότητα της σαρκοείδωσης διαφέρει ευρέως σε όλο τον κόσμο, πιθανώς λόγω των διαφορών στις περιβαλλοντικές εκθέσεις, της προδιάθεσης των αλληλομόρφων HLA και άλλων γενετικών παραγόντων. Η υψηλότερη ετήσια συχνότητα εμφάνισης της σαρκοείδωση έχει παρατηρηθεί σε χώρες της Βόρειας Ευρώπης (5-40 περιπτώσεις ανά 100.000 άτομα). Στην Ιαπωνία, η ετήσια συχνότητα εμφάνισης κυμαίνεται σε 1-2 περιπτώσεις ανά 100.000 άτομα. Είναι συχνότερη στους Αφρο-Αμερικανούς, συγκριτικά με τους Λευκούς (35,5 κρούσματα ανά 100.000, σε σύγκριση με 10,9 ανά 100.000), αν και η φυλετική κατανομή της νόσου ποικίλλει ανάλογα με την γεωγραφική περιοχή (Rybicki BA et al., 2001)

Η υπόθεση ότι οι γενετικοί παράγοντες παίζουν σημαντικό ρόλο στην παθογένεση της σαρκοείδωσης βασίζεται στις φυλετικές /εθνικές διαφορές που παρουσιάζουν οι πάσχοντες από σαρκοείδωση και στο γεγονός ότι η σαρκοείδωση έχει οικογενή επίπτωση (Rybicki BA et al., 2001, Newman LS et al., 1997)

1.8.2. Παθοφυσιολογία

Η σαρκοειδική φλεγμονή χαρακτηρίζεται από μη νεκρωτικά κοκκιώματα. Το σαρκοειδικό κοκκίωμα αποτελεί συμπαγή μάζα κυττάρων τα οποία το απομονώνουν αλλότρια αντιγόνα, τυπικά μικρόβια. Ο πυρήνας του κοκκιώματος αποτελείται από επιθηλιοειδή κύτταρα και μερικά πολυπύρρηνα γιγαντοκύτταρα, περιβαλλόμενα από μία εξωτερική στεφάνη από ολιγοκλωνικά T-λεμφοκύτταρα.

Η κοκκιωματώδης εξεργασία φαίνεται ότι αρχίζει με την παρουσίαση ενός άγνωστου αντιγόνου στα T-λεμφοκύτταρα, μέσω των γονιδίων MHC τάξης II. Οι μηχανισμοί που συμβάλλουν στη δημιουργία των κυτταρικών αυτών αθροίσεων περιλαμβάνουν :

Ενεργό μετανάστευση των CD4+ T-λεμφοκυττάρων και των μονοκυττάρων του αίματος κάτω από την επίδραση δυνητικών χημειοτακτικών παραγόντων (χημειοκίνες και αντίστοιχοι υποδοχείς, MIP-1, MCP-1, RANTES, IL-2, IL18) (Standiford TJ et al, 1993) και επαγόμενο από την IL-2 πολλαπλασιασμό των λεμφοκυττάρων (Pinkston P et al, 1983) και πιθανώς των μακροφάγων (Agostini C et al, 1985), in situ.

Άλλοι μεσολαβητές οι οποίοι μπορεί να παίζουν ρόλο στην παθογένεση της σαρκοείδωσης είναι η IL-15 (Muro S et al, 2001), ο GM-CSF (Itoh A et al, 1998) και η οστεοποντίνη (O' Regan AW et al, 1999).

Η χρόνια σαρκοείδωση συνδέεται με τον TNF- α , την IL-8 και το ACE, ενώ οι ιντερλευκίνες 10, 12, και 18 φαίνεται ότι παίζουν ρόλο στην ύφεση της νόσου. Πάντως, οι μηχανισμοί που οδηγούν στην επίμονη άθροιση των φλεγμονωδών κυττάρων δεν έχει πλήρως κατανοηθεί. Ακόμα, δεν έχει προσδιορισθεί κατά πόσον η μειωμένη κυτταρική απόπτωση εμπλέκεται στην παθογένεση της σαρκοείδωσης (Rutherford RM et al, 2001).

1.8.3 Αιτιολογία

Η σαρκοείδωση είναι νόσημα άγνωστης αιτιολογίας. Γενικά, θεωρείται αποτέλεσμα έκθεσης σε ένα αντιγόνο (λοιμώδεις/περιβαλλοντικοί παράγοντες, χημικές ουσίες, φάρμακα, κλπ.) σε γενετικά προδιατεθειμένους επιρρεπείς ξενιστές (Thomas KW and Hunninghake GW, 2003; Baughman RP et al, 2003).

Οι απόψεις που εμπλέκουν τους λοιμώδεις και άλλους εξωγενείς παράγοντες στην αιτιοπαθογένεση της σαρκοείδωσης βασίζονται στην παρατήρηση ότι η σαρκοείδωση απαντάται συχνότερα ορισμένες εποχές του έτους και περιοχές της Γης και σε ειδικές κατηγορίες εργαζομένων.

Η σαρκοείδωση συνδέεται με ορισμένες λοιμώξεις, αν και η συσχέτιση αυτή δεν έχει αποδειχθεί. Το σαρκοειδικό κοκκίωμα είναι πιθανώς αποτέλεσμα μιας στερεότυπης, χρόνιας απορρυθμισμένης ανοσιακής απάντησης σε έναν ή περισσότερους περιβαλλοντικούς (πιθανώς λοιμώδεις) παράγοντες σε επιρρεπείς ξενιστές. Οι συχνότεροι αιτιολογικά συνδεόμενοι με την σαρκοείδωση λοιμογόνοι παράγοντες θεωρούνται τα μυκοβακτηρίδια, ακόμα και οι ατελείς τύποι οι στερούμενοι κυτταρικού τοιχώματος (Mangiaran G and Hance AJ, 1995; Almenoff P et al, 1996; Alavi HA and Moscovic EA, 1996; Brown ST et al, 2003), και λιγότερο συχνά άλλοι μικρο-οργανισμοί.

1.8.4. Οξειδωτικό στρες και σαρκοείδωση

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

Μολονότι σε καμία μελέτη δεν έχει περιγραφεί ακόμα μια συστηματική οξειδοαναγωγική ανισορροπία στο πλαίσιο αυτό , αρκετοί ερευνητές έχουν αποδείξει ότι τα κυψελιδικά μακροφάγα που απομονώνονται από το βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα (BAL) των ασθενών με σαρκοείδωση ενεργοποιούνται τοπικά και **παράγουν ρίζες οξυγόνου in vitro**. (Angela Koutsokera et al, Larisa, Greece)

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

2. ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν να ελέγξουμε αν οι μεταλλάξεις που έχουν βρεθεί στα mt-tRNA ασθενών με σαρκοείδωση έχουν κάποιο φυσιολογικό αντίκτυπο. Η μείωση της δραστηριότητας του Complex I είναι πιθανόν η συχνότερη αιτία μιτοχονδριακών ασθενειών (Janssen RJ et al.2006). Για το λόγο αυτό η εύρεση ενός αξιόπιστου πρωτοκόλλου για την εκτίμηση της ενζυμικής δραστηριότητας της οξειδοαναγωγής του ζεύγους NADH-Q (Complex I), ικανού να εφαρμόζεται σε λεμφοκύτταρα, θα ήταν ένα σημαντικό εργαλείο για την εκτίμηση της λειτουργίας της αναπνευστικής αλυσίδας με μη επεμβατικό τρόπο.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης

3.1.1. Αρχή της μεθόδου

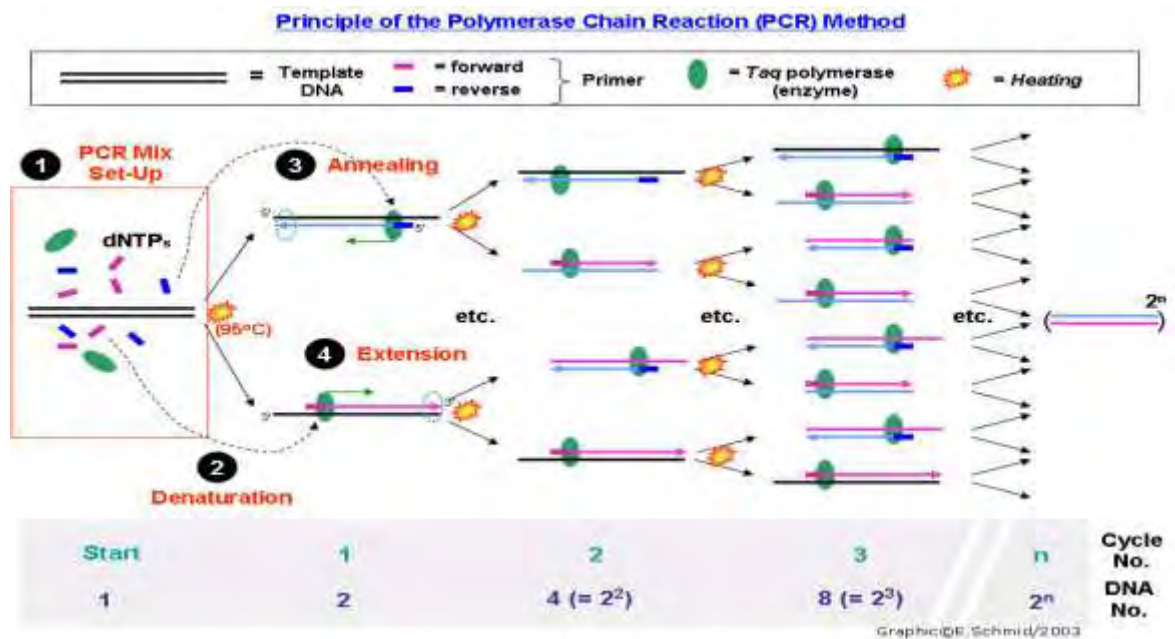
Η τεχνική της Αλυσιδωτής Αντίδρασης της Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) ανακοινώθηκε στην επιστημονική κοινότητα για πρώτη φορά στα μέσα της δεκαετίας του '80 από την ομάδα των ερευνητών Mullis, Fallona και Saiki και αποτελεί αναμφίβολα επανάσταση στη βιοϊατρική έρευνα με ευρύτατο φάσμα εφαρμογών. Αποτελεί μία γρήγορη, εύκολη και οικονομική τεχνική, ενώ, παράλληλα, πρόκειται για μία εξαιρετικά επιλεκτική και ευαίσθητη μέθοδο, καθώς έχει δυνατότητα ανίχνευσης μιας αλληλουχίας από ένα μόριο DNA (*Li et al., 1990*).

Η PCR είναι μία τεχνική που βασίζεται στον εκθετικό πολλαπλασιασμό *in vitro* (χωρίς τη χρήση ζωντανών οργανισμών, όπως η *E. coli* ή ζύμες) μεγάλου αριθμού αντιγράφων ενός συγκεκριμένου τμήματος DNA (γνωστού ή άγνωστου). Η γρήγορη βελτιστοποίηση της μεθόδου επιτεύχθηκε με τη βοήθεια μιας ειδικής DNA πολυμεράσης, της **Taq DNA πολυμεράσης**, η οποία έχει απομονωθεί από το θερμοανθεκτικό βακτήριο *Thermus aquaticus* (*Saiki et al., 1988*) και επιτρέπει τη χρησιμοποίηση υψηλών θερμοκρασιών στα βήματα υβριδισμού και επιμήκυνσης. Επίσης απαραίτητο συστατικό της PCR αποτελεί η χρήση **δύο ολιγονουκλεοτιδικών εκκινήτων** (*primers*) μήκους 18-22 βάσεις, που έχουν δομή συμπληρωματική προς τις πλευρικές αλληλουχίες του DNA στόχου, το καθένα αντίστοιχα προς τον ένα κλώνο του στόχου και με αντίθετη κατεύθυνση.

Η διαδικασία της PCR πραγματοποιείται σε κύκλους. Συνήθως, απαιτούνται 20-40 θερμοκρασιακές αλλαγές, οι οποίες μπορούν να ταξινομηθούν σε τρία στάδια (*Εικόνα 3.1*) :

1. Ένα στάδιο θερμικής αποδιάταξης του DNA – στόχου στους 94-96 °C.
2. Υβριδοποίηση των εκκινήτων στα μονόκλιωνα μόρια DNA σε μια θερμοκρασία, που εξαρτάται από το μήκος των εκκινήτων και την αλληλουχία τους.
3. Πολυμερισμός στους 72 °C.

Τα βήματα αυτά αναλύονται ακολούθως.



Εικόνα 3.1: Διαδικασία της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης.

1. Κατά το στάδιο της αποδιάταξης, πραγματοποιείται η μετουσίωση του DNA στόχου κατά την οποία το δίκλωνο DNA μετατρέπεται σε μονόκλωνο. Για την αποδιάταξη του DNA η θερμοκρασία συνήθως αυξάνεται στους 94 °-96 °C, μία θερμοκρασία, η οποία ευνοεί τη διάσπαση των δεσμών υδρογόνου που συγκρατούν τις δύο αλυσίδες της διπλής έλικας. Η θερμοκρασία στην οποία το δίκλωνο DNA γίνεται μονόκλωνο, καλείται θερμοκρασία τήξης, T_m (melting temperature). Πολλοί παράγοντες μπορούν να επηρεάσουν τη θερμοκρασία τήξεως όπως η περιεκτικότητα του DNA σε G/C και A/T, η συγκέντρωση των ιόντων στο διάλυμα (κυρίως των ιόντων Mg^{+} και K^{+}) και το μήκος της αλληλουχίας που χρησιμοποιείται ως εκμαγείο.

2. Στο δεύτερο στάδιο, η θερμοκρασία μειώνεται στους 50-60 °C, με αποτέλεσμα μερική επανασύνδεση των μονόκλωνων μορίων του DNA-στόχου, όπως επίσης και πρόσδεση των εκκινητικών μορίων στις συμπληρωματικές αλληλουχίες. Η θερμοκρασία αυτή είναι γνωστή ως θερμοκρασία επαναδιάταξης, T_a (annealing temperature) και είναι κατά κανόνα 5-10 °C χαμηλότερη της θερμοκρασίας τήξεως, T_m . Αξίζει να αναφερθεί ότι ο σχεδιασμός και η επιλογή ενός ειδικού εκκινητή

αποτελεί σημαντικό παράγοντα για την επιτυχία της αντίδρασης PCR. Γι' αυτό το λόγο, οι εκκινητές πρέπει να έχουν παρόμοια περιεκτικότητα σε G/C, να μην εμφανίζουν συμπληρωματικότητα στο 3' ή στο 5' άκρο, να απέχουν μεταξύ τους κατά 50 ζεύγη βάσεων και να έχουν παραπλήσια θερμοκρασία τήξεως, T_m .

3. Στο τρίτο στάδιο η θερμοκρασία ανέρχεται στους 72 °C και μπορεί να αρχίσει η σύνθεση του DNA, με τη δράση της Taq πολυμεράσης, παρουσία ειδικού ρυθμιστικού διαλύματος και ιόντων Mg^{+} . Σε αυτή τη θερμοκρασία, η Taq πολυμεράση προσθέτει 35-100 δεοξυριβοζονουκλεοτίδια (dNTPs), ανά δευτερόλεπτο, με προσανατολισμό 5' -> 3', τα οποία είναι συμπληρωματικά στο υπόστρωμα. Αφού οι εκκινητές επεκταθούν μερικές βάσεις, τότε κατέχουν μια ισχυρότερη ιονική έλξη προς την ακολουθία-στόχο, με αποτέλεσμα να μειώνεται η πιθανότητα αποδέσμευσης των εκκινητών από την ακολουθία-στόχο. Μετά από κάθε κύκλο, οι πρόσφατα συντιθέμενοι κλώνοι του DNA μπορεί να χρησιμεύσουν ως εκμαγείο στον επόμενο κύκλο. Το κύριο προϊόν αυτής της εκθετικής αντίδρασης είναι ένα τμήμα του δίκλωνου DNA, του οποίου τα άκρα ορίζονται από τους εκκινητές και το μήκος του από την απόσταση μεταξύ των εκκινητών (Πλαγεράς *et al.*, 2012).

Αξίζει να σημειωθεί, ότι ο άριστος αριθμός κύκλων εξαρτάται από τη συγκέντρωση του DNA-στόχου και την απόδοση της PCR σε κάθε κύκλο. Μεγαλύτερος αριθμός κύκλων από τον ιδανικό, συνεπάγεται αύξηση των μη ειδικών προϊόντων της γονιδιακής επέκτασης, ενώ μικρότερος αριθμός αποδίδει χαμηλότερο αριθμό αντιγράφων με αποτέλεσμα τη δυσχερή έως αδύνατη την ανίχνευση του DNA-στόχου. Σε κάθε νέο κύκλο οι κλώνοι αυξάνονται με εκθετική πορεία κατά 2^n όπου n είναι ο αριθμός των κύκλων αντίδρασης. Στους τελευταίους κύκλους, η αντίδραση φτάνει σε «πλάτο», κυρίως, λόγω της εξάντλησης των αντιδραστηρίων (Watson *et al.*, 2007).

Οι εναλλαγές της θερμοκρασίας επιτυγχάνονται με τη χρήση ειδικών αυτοματοποιημένων συσκευών, των θερμικών ανακυκλωτών ή θερμοκυκλοποιητών και είναι ταχύτερες, ώστε αυξομειώσεις της τάξεως των 40 °C να λαμβάνουν χώρα σε λιγότερο από ένα λεπτό.

Τα πλεονεκτήματα της PCR είναι ότι παρέχει τη δυνατότητα παραγωγής μεγάλου αριθμού αντιγράφων συγκεκριμένου τμήματος DNA σε μικρό χρονικό διάστημα.

Επιπλέον, η αντίδραση μπορεί να πραγματοποιηθεί με τη χρήση ελάχιστης ποσότητας γενωμικού DNA, καθώς και όταν το DNA δεν είναι εξαιρετικής ποιότητας ή καθαρότητας.

3.1.2 Πειραματική Διαδικασία

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

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

Πίνακας 3.1 : Τα συστατικά της αντίδρασης PCR.

Αντιδραστήρια	Αρχικές συγκεντρώσεις	Τελικές συγκεντρώσεις	Σε τελικό όγκο V=50μL.
DNA			1*
Ρυθμιστικό διάλυμα	10x	1x	5
MgCl ₂	50mM	1mM	1
dNTPs	40mM	0.8 mM	1
Fw primer	50μM	1 μM	1
Rv primer	50μM	1 μM	1
KAPA Taq pol	5units/μl	1 unit	0,2
ddH ₂ O			39

*από το κάθε δείγμα χρησιμοποιούσαμε αρχικά 1μl και αν αυτό δεν επαρκούσε για την δημιουργία προϊόντος επαναλαμβάναμε την PCR για όσα δείγματα δεν

εμφάνισαν ζώνη στην ηλεκτροφορηση αγαρόζης με κατά 1μl μεγαλύτερη ποσότητα μέχρι την απόκτηση του PCR product.

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

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

Σε όλες τις διαδικασίες ενίσχυσης περιοχής με PCR χρησιμοποιείται “Negative control” δηλαδή χωρίς το DNA-μήτρα για να επιβεβαιωθεί η ύπαρξη ή όχι επιμολύνσεων.

Για την ενίσχυση των συγκεκριμένων τμημάτων χρησιμοποιήθηκαν ειδικά ζεύγη εκκινητικών μορίων για το κάθε γονίδιο της **VBC Biotech**.

Εκκινητές

Forward		Tm	Reverse	Tm
VAL	5'-GTA CTGGAAAGTGCACTTGG-3'	57,3	5'-GGTTGTCTGGTAGTAAGG-3'	53,7
GLU	5'-CCCACACTCAACAGAAACA-3'	54,5	5'-TTGCGTATTGGGGTCATTG-3'	54,5

Τα στάδια της PCR που ακολουθήθηκαν είναι τα ακόλουθα (πίνακας 7):

Πίνακας 3.2: Τα στάδια της PCR.

Στάδια	Θερμοκρασία	Διάρκεια	Αριθμός κύκλων
Initial Denaturation	95°C	4 min	
Denaturation	95°C	40 sec	35 κύκλοι
Annealing	50°C	40 sec	
Extension	72°C	40sec	
Final Extension	72°C	10min	

3.1.3 Δείγματα

Ελέγχθηκαν 23 δείγματα από ασθενείς με σαρκοείδωση για πολυμορφισμούς στα γονίδια tRNA της βαλίνης και του γλουταμινικού οξέος.

Προυπόθεση συμμετοχής στην έρευνα ήταν:

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

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

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

3.2. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΗ ΑΓΑΡΟΖΗΣ 2%

3.2.1. Αντιδραστήρια - Διαλύματα

Για την ηλεκτροφόρηση των νουκλεϊνικών οξέων σε πήκτωμα αγαρόζης χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα αντιδραστήρια:

- ΤΑΕ 50X (stock): Tris-base (242 gr), οξικό οξύ (57.1 ml), EDTA (18.6 gr), ddH₂O μέχρι 1 L. pH: 8.
- Βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr): Υδατικό διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου 10 mg/ml, αριθμός καταλόγου A1152.
- Χρωστική φόρτωσης διαλύματος (Loading Buffer, 6X): 0.25% Μπλε της βρωμοφαινόλης (Bromofenol blue) (25 mg), 30% w/v Γλυκερόλη (3 ml), ddH₂O (7 ml). Συνολικός όγκος: 10 ml.
- Αγαρόζη

3.2.2 Αρχή της μεθόδου

Η ηλεκτροφόρηση αποτελεί τη βάση μιας πολύ χρήσιμης μεθοδολογίας για τον καθαρισμό, τον διαχωρισμό και τη ταυτοποίηση πολλών βιολογικών μεγαλομορίων όπως πρωτεϊνών, νουκλεϊκών οξέων (DNA, RNA) καθώς και νουκλεο-πρωτεϊνικών συμπλόκων, τα οποία διαφέρουν ως προς το ηλεκτρικό τους φορτίο, το μέγεθος και το σχήμα. Σύμφωνα, λοιπόν, με τα παραπάνω χαρακτηριστικά, καθίσταται δυνατή η μετακίνησή τους μέσα σε υδάτινα διαλύματα και υπό την επίδραση ενός ηλεκτρικού πεδίου, με διαφορετικές ταχύτητες, και έτσι, είναι εφικτό να διαχωριστούν σε κατάλληλες συνθήκες, διατηρώντας ταυτόχρονα και τις βιολογικές τους ιδιότητες (Watson *et al.*, 2007).

Όλα αυτά τα βιομόρια φέρουν ομάδες που έχουν τη δυνατότητα ιονισμού και κατ' επέκταση όταν εφαρμοστεί μια διαφορά δυναμικού, διαθέτουν καθαρό θετικό ή αρνητικό φορτίο με αποτέλεσμα να κινούνται μέσα σε ένα ηλεκτρικό πεδίο προς τον

αρνητικό ή το θετικό πόλο αντίστοιχα, με μία ταχύτητα, η οποία εξαρτάται από το μήκος, το φορτίο, το σχήμα τους καθώς και την ένταση του ηλεκτρικού πεδίου και τη θερμοκρασία (*Lee et al., 2012*).

Η αγαρόζη εξάγεται με τη μορφή άγαρ, ένα προϊόν που λαμβάνεται από ορισμένα θαλάσσια φύκη και διατίθενται με μορφή σκόνης. Το κύριο συστατικό του άγαρ είναι ένας πολυσακχαρίτης που παράγεται από διάφορα είδη του είδους *Rhodophyceae* (*Geldium amansii*, *G. Cartilagineum*), αποτελείται από επαναλαμβανόμενες υπομονάδες D-γαλακτοπυρανόζης και μπορεί να προστεθεί σε οποιοδήποτε θρεπτικό μέσο, σε συγκέντρωση 1 - 2%. Η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης αποτελεί μια πολύ συχνή μέθοδος ποιοτικής (αλλά και ποσοτικής) ανάλυσης του DNA, όπου γραμμικά μόρια DNA κινούνται προς την άνοδο (λόγω των αρνητικών φορτίων των φωσφορικών ομάδων του μορίου) με ταχύτητα αντιστρόφως ανάλογη προς το βάρος τους (*Watson et al., 2007*).

Τέλος, αξίζει να σημειωθεί, ότι η συγκέντρωση του πηκτώματος της αγαρόζης καθώς και η στερεοδιάταξη του DNA επηρεάζουν σημαντικά την κινητικότητα των νουκλεϊκών οξέων. Συγκεκριμένα η ποσοστιαία συγκέντρωση του πηκτώματος και η ταχύτητα κίνησης είναι μεγέθη που σχετίζονται αντιστρόφως ανάλογα. Έτσι, αυξάνοντας τη συγκέντρωση της αγαρόζης, μειώνεται η ταχύτητα μετανάστευσης των τμημάτων αλλά επιτυγχάνεται καλύτερος διαχωρισμός των μικρότερων τμημάτων. Αντίθετα, μειώνοντας τη συγκέντρωση της αγαρόζης επιτυγχάνεται καλύτερος διαχωρισμός μεγαλύτερων τμημάτων. Χαρακτηριστικά, ένα πήκτωμα αγαρόζης είναι αποτελεσματικό για το διαχωρισμό τμημάτων DNA με μεγέθη από 100 bp έως 25 kb (*Lee et al., 2012*). Επιπλέον, το DNA μπορεί να λάβει τρεις διαμορφώσεις την υπερελικωμένη διαμόρφωση, στην οποία το πλασμίδιο είναι άθικτο (χωρίς σπασίματα) και αποτελεί την πιο συμπαγή του μορφή, την ανοιχτή κυκλική, στην οποία μεταβαίνει όταν προκαλούνται μονόκλινα σπασίματα και την γραμμική διαμόρφωση, στην οποία μεταβαίνει όταν φέρει δίκλινα σπασίματα. Κάτω από τυπικές συνθήκες (πλασμίδιο 3.000-10.000 bp – αγαρόζη 1%), η υπερελικωμένη μορφή κινείται ταχύτερα από τη χαλαρή, γιατί είναι πιο συμπιεσμένη και περνά πιο εύκολα μέσα από τα κενά του πολυμερούς (*Lee et al., 2012*).

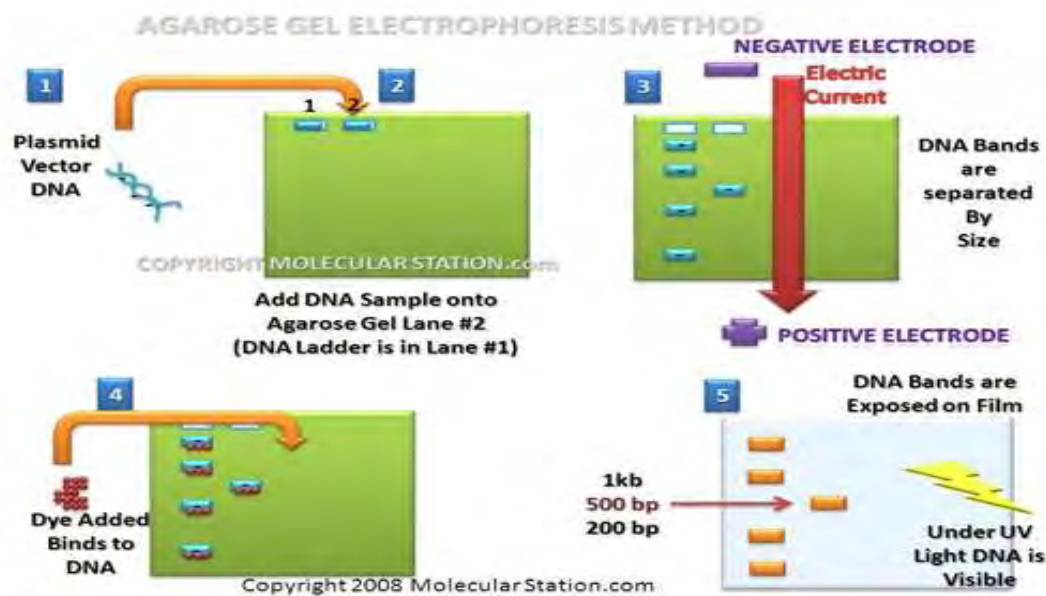
3.2.3 Πειραματική διαδικασία:

Η διαδικασία δημιουργίας ενός πηκτώματος αγαρόζης με ποσοστιαία περιεκτικότητα 2% σε αγαρόζη ήταν η ακόλουθη: αρχικά, ζυγίστηκαν 0,6gr αγαρόζης, με τη βοήθεια ειδικού ζυγού ακρίβειας και μεταφέρθηκαν σε μία κωνική φιάλη, στην οποία προστέθηκαν 40 ml ρυθμιστικού διαλύματος TAE (Tris/Acetate/EDTA) 1X.. Προκειμένου να διαλυθεί η αγαρόζη, η κωνική φιάλη τοποθετείται σε φούρνο μικροκυμάτων, για χρονικό διάστημα περίπου 2 λεπτών και παραμένει υγρή σε θερμοκρασία έως 40 °C. Αφού το μείγμα κρυώσει υπό τρεχούμενο νερό βρύσης, ακολουθεί η προσθήκη 4-8 ml διαλύματος βρωμιούχου αιθιδίου 10 mg/ml (ώστε η τελική συγκέντρωση του EtBr να είναι 0,5 µg/ml). Έπειτα από καλή ανάδευση, το δείγμα μεταφέρθηκε σε ειδικό καλούπι, έτσι ώστε να αποκτήσει το κατάλληλο σχήμα, μέχρι η αγαρόζη να πολυμεριστεί και να πήξει. Στο σημείο αυτό, αξίζει να σημειωθεί, πως πριν πολυμεριστεί η αγαρόζη, στο καλούπι τοποθετούνται ειδικά χτενάκια, τα οποία βοηθούν στο σχηματισμό των ονομαζόμενων “wells” ή αλλιώς “πηγαδάκια”, στα οποία φορτώνονται, στη συνέχεια, τα υπό εξέταση δείγματα. Μετά την πήξη του πηκτώματος, αφαιρέθηκαν τα χτενάκια και το πήκτωμα τοποθετήθηκε στην ειδική συσκευή οριζόντιας ηλεκτροφόρησης, η οποία ήταν γεμάτη με TAE 1X (παρέχει τα απαραίτητα ιόντα για να πραγματοποιείται η μεταφορά ρεύματος και να διατηρείται το pH σε μια σχετικά σταθερή τιμή).

Η διαδικασία παρασκευής της πηκτής αγαρόζης λαμβάνει χώρα σε απαγωγό λόγω της επικίνδυνης φύσης του βρωμιούχου αιθιδίου.

Πριν την τοποθέτηση των δειγμάτων στο πήκτωμα αγαρόζης, απαιτείται η ανάμειξη του δείγματος με ένα διάλυμα φόρτωσης – χρωστική ή Loading Buffer (3 ml χρωστικής (loading buffer) και 5 ml από κάθε δείγμα). Το διάλυμα φόρτωσης περιέχει μπλε της βρωμοφαινόλης και γλυκερόλη. Το μπλε της βρωμοφαινόλης είναι μία χρωστική ιχνηλασιμότητας χαμηλού μοριακού βάρους με αρνητικό φορτίο, η οποία είναι ορατή με φυσικό φως, καθιστώντας τα δείγματα ορατά, γεγονός που διευκολύνει τη τοποθέτησή τους (φόρτωσή τους) στο πήκτωμα ενώ παράλληλα επιτρέπει τον έλεγχο της προόδου της ηλεκτροφόρησης. Η γλυκερόλη με τη σειρά

της, αυξάνει τη πυκνότητα του δείγματος ώστε να διευκολυνθεί η εισαγωγή του στο “πηγαδάκι” και να μη διαχυθεί στο διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Watson et al., 2007). Η συσκευή ηλεκτροφόρησης αποτελείται από μια πηγή ηλεκτρικού ρεύματος (τροφοδοτικό), που παρέχει συνεχές ρεύμα, με ρυθμιζόμενη τάση (volts) ή ένταση (mA), και από μια λεκάνη χωρισμένη σε δυο δεξαμενές (λουτρό), που περιέχει το ρυθμιστικό διάλυμα TAE 1X. Η εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου προκαλεί τη ροή ηλεκτρικού ρεύματος, ώστε τα μόρια DNA (που είναι αρνητικά φορτισμένα) να μετακινούνται προς το θετικό πόλο. Καθώς τα διαφορετικά μόρια DNA μετακινούνται, σχηματίζονται χαρακτηριστικές ζώνες (ανάλογα με το μέγεθός τους) περιοχές του πηκτώματος (Watson et al., 2007). Μετά το πέρας της διαδικασίας, η οποία διήρκησε περίπου 20 λεπτά και με ρυθμιζόμενη τάση στα 150 έως 200 volt, το πήκτωμα αγαρόζης εκτέθηκε σε υπεριώδες φως (UV), ώστε να απεικονιστεί το αποτέλεσμα.



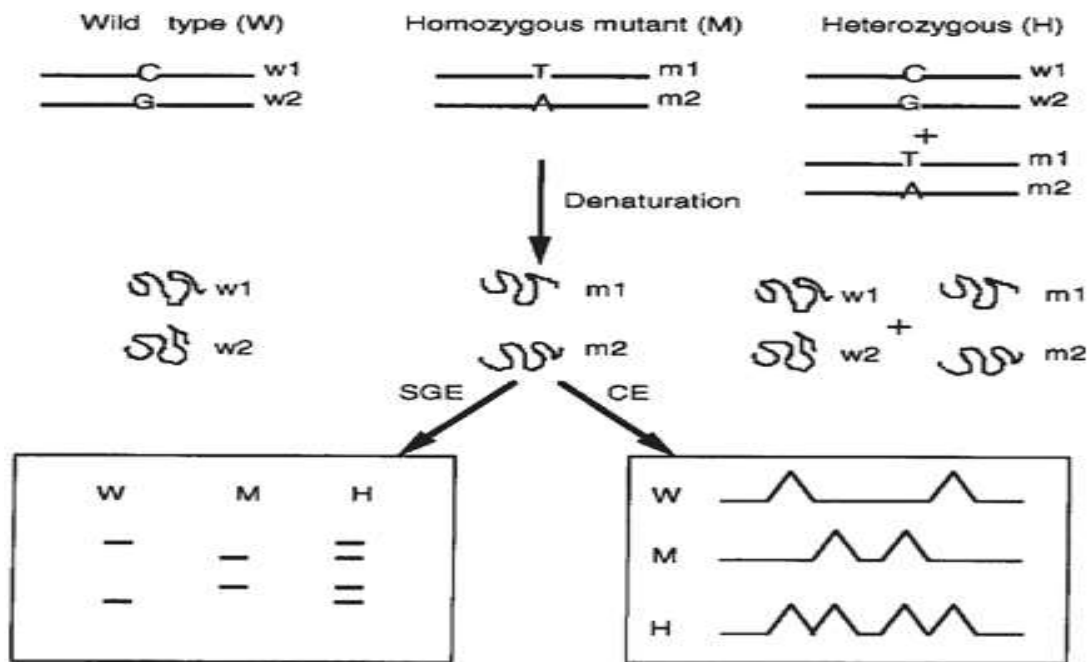
Εικόνα 3.2 : Η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης (Gel Electrophoresis).

3.3. SSCP-Μέθοδος Ανάλυσης Πολυμορφισμού μονοκλωνικής διαμόρφωσης

3.3.1 Αρχή της μεθόδου

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

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



Εικόνα 3.3: Τα διαφορετικά πρότυπα μεταξύ άγριου τύπου, ομόζυγου και ετερόζυγου.

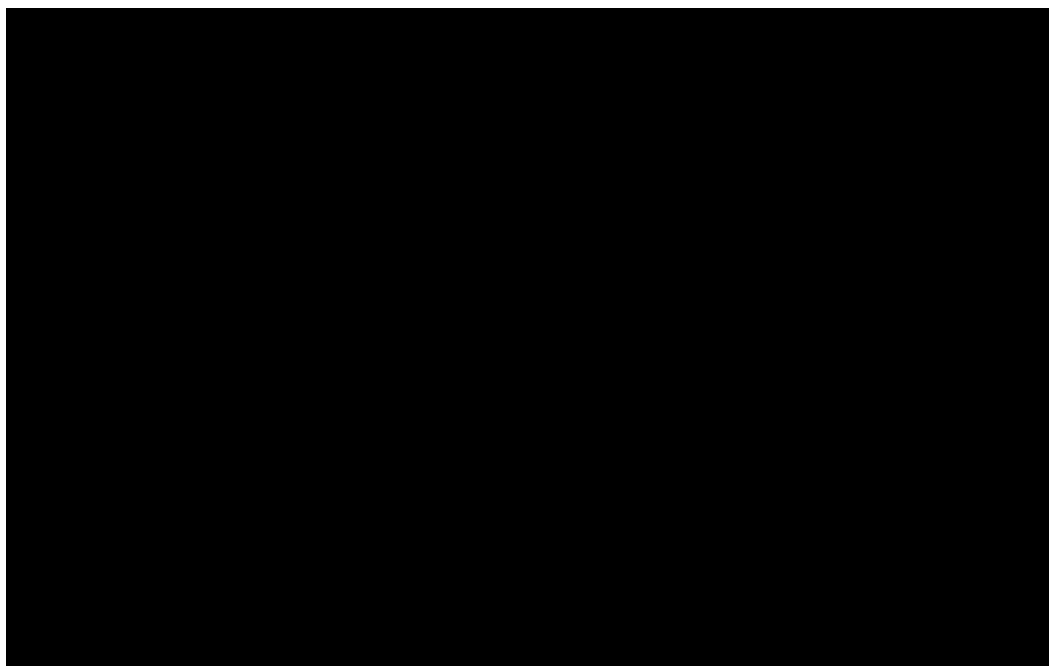
Παρόλο που η μέθοδος αυτή είναι πολύ ευαίσθητη, απαιτεί χρόνο και προσεκτικούς χειρισμούς. Τα πηκτώματα πρέπει να ηλεκτροφορούνται σε χαμηλή τάση (ολονύκτια) για να αποφευχθούν αλλαγές στη δομή λόγω της θερμοκρασίας. Η θερμοκρασία πρέπει να ελέγχεται με ακρίβεια, κάτι που συνήθως είναι δύσκολο.

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

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

Η συγκέντρωση του ακρυλαμιδίου είναι ένας άλλος παράγοντας που παίζει ρόλο στον αποτελεσματικό διαχωρισμό των μορίων, καθώς καθορίζει το μέγεθος των πόρων στο πήκτωμα. Τα gel ακρυλαμιδίου που δημιουργήθηκαν για την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων PCR ήταν τα περισσότερα συγκέντρωσης 10%

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



Εικόνα 3.4: Πολυμερισμός ακρυλαμιδίου και δισακρυλαμιδίου προς τη δημιουργία γεφυρών.

3.3.2 Παρασκευή πηκτής πολυακρυλαμιδίου

- Για δύο gel πολυακρυλαμιδίου διαστάσεων 20 x 18 cm, πάχους 2mm, τελικού όγκου 125ml και πυκνότητας 10%, οι ποσότητες των αντιδραστηρίων αναφέρονται στον παρακάτω πίνακα (πίνακας 8):

Πίνακας 3.3: Ποσότητες των αντιδραστηρίων για την παρασκευή πηκτής πολυακρυλαμιδίου 10%.

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	ΠΟΣΟΤΗΤΕΣ
Ακρυλαμίδη	12,375 gr
Bis-Ακρυλαμίδη	0,33 gr
TBE 10X	10 ml
Γλυκερόλη 50%	12,5 ml
TEMED	125 μl
APS 20%	650 μl

- Προστίθεται ddH₂O μέχρι ο τελικός όγκος να γίνει 125 ml.
- Οι πηκτές πήζουν σε περίπου 30 min
- Στην συσκευή ηλεκτροφόρησης τοποθετούνται οι πηκτές και TBE 0,5X.

Αποδιάταξη και φόρτωση των δειγμάτων

- Σε eppendorfs των 0,5 ml προστίθενται 5 μl προϊόντος PCR και 10 μl ρυθμιστικό διάλυμα αποδιάταξης (Denaturation Buffer)
- Σε Θερμικό Κυκλοποιητή με εφαρμογή ειδικού προγράμματος αποδιάταξης, αποδιατάσσονται πλήρως τα δίκλινα μόρια DNA. Πριν ολοκληρωθεί το τελευταίο στάδιο τα δείγματα εξέρχονται από τη συσκευή και τοποθετούνται αμέσως σε πάγο, για την αποφυγή της επαναδιάταξης των μονόκλωνων μορίων DNA.
- Έπειτα τα δείγματα φορτώνονται στις πηκτές, οι οποίες βρίσκονται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης. Η συσκευή ηλεκτροφόρησης τοποθετείται στο ψυγείο. Τα δείγματα ηλεκτροφορούνται για 16 – 22 h στα 220 Volts.

3.3.3. Χρώση των gel

Με το πέρας της ηλεκτροφόρησης, ακολουθεί η χρώση των πηκτών, η οποία περιλαμβάνει πλύσεις με τρία διαφορετικά διαλύματα (οι ποσότητες αναλογούν σε δύο πηκτές):

1^ο διάλυμα:

- Σε ογκομετρικό κύλινδρο προστίθενται 780 ml ddH₂O, 20 ml αιθανόλη 100% και 1ml οξικό οξύ.
- Ακολουθεί ανακίνηση και γίνεται η πρώτη πλύση προσθέτοντας 200 ml του διαλύματος σε κάθε gel για 3 min.
- Τα gel τοποθετούνται στον αναδευτήρα
- Μετά τα 3 min το διάλυμα απομακρύνεται.
- Προστίθενται ξανά 200 ml διαλύματος σε κάθε gel για 3 min για να γίνει μια δεύτερη πλύση και έπειτα το διάλυμα απομακρύνεται.
- Γίνονται 2 φορές πλύσεις με ddH₂O για 1 min.

2^ο διάλυμα:

- Σε ογκομετρικό κύλινδρο προστίθενται 400 ml διαλύματος νιτρικού αργύρου.
- Τα gel τοποθετούνται στον αναδευτήρα
- Σε κάθε gel προστίθενται από 200 ml διαλύματος για 15-20 min.
- Τα gel ξεπλένονται έπειτα 2 φορές με ddH₂O.

3^ο διάλυμα:

- Σε ποτήρι ζέσεως προστίθενται 6 gr NaOH, 0,02 gr NaBH₄, 2 ml φορμαλδεΐδη και συμπληρώνεται ddH₂O μέχρι ο τελικός όγκος του διαλύματος να γίνει 400ml.
- Προστίθενται 200 ml διαλύματος σε κάθε gel.
- Τα gel τοποθετούνται στον αναδευτήρα
- Τα gel παραμένουν στο διάλυμα μέχρι να εμφανιστούν οι ζώνες.
- Στη συνέχεια, το διάλυμα απομακρύνεται και ακολουθεί μια πλύση με ddH₂O.

Στο τέλος της διαδικασίας τα gel πολυακρυλαμιδίου συσκευάζονται σε διαφανείς μεμβράνες και συγκρίνονται τα αποτελέσματα. Επιλέγονται τα δείγματα που εμφάνισαν διαφορετικά πρότυπα ηλεκτροφόρησης σε σχέση με τα φυσιολογικά υπό εξέταση άτομα και ακολουθεί η διαδικασία του καθαρισμού των PCR προϊόντων των επιλεγμένων δειγμάτων, ώστε να σταλούν για αλληλούχιση.

3.4 Καθαρισμός των προϊόντων της PCR

Πρωτόκολλο

Προκειμένου να πραγματοποιηθεί η αλληλούχιση των προϊόντων της PCR, είναι σημαντικό, εκ των προτέρων, να επιτευχθεί ο καθαρισμός τους, έτσι ώστε να αφαιρεθούν όλα τα υπολείμματα αλάτων, ενζύμων, διμερή εκκινητών που έχουν παραμείνει από τις ενζυματικές αντιδράσεις. Ο καθαρισμός του ενισχυμένου προϊόντος της PCR έγινε σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή, όπως αυτές αναφέρονται στο πρωτόκολλο του NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up kit (for DNA, RNA and protein purification) της εταιρίας MACHEREY – NAGEL).

Η διαδικασία περιλαμβάνει τα ακόλουθα στάδια: αρχικά, προσαρμόστηκε ο όγκος των μειγμάτων της αντίδρασης σε 50 μl, με προσθήκη απεσταγμένου νερού. Στη συνέχεια, ακολούθησε προσθήκη κατάλληλης ποσότητας ρυθμιστικού διαλύματος NTI (Buffer NTI). Σύμφωνα με τις οδηγίες του πρωτοκόλλου, η ανάμειξη αναφέρεται σε 2 όγκους ρυθμιστικού διαλύματος NTI για κάθε 1 όγκο του δείγματος και, έτσι, στα 50 μl του PCR προϊόντος προστέθηκαν 100 μl διαλύματος NTI. Έπειτα, ακολούθησε η δέσμευση του DNA στη μεμβράνη της ειδικής στήλης. Για το σκοπό αυτό, τοποθετήθηκε μία στήλη έκλυσης σε κάθε σωλήνα συλλογής των 2 ml (collection tube) και όλη η ποσότητα μείγματος φορτώθηκε προσεκτικά στο κέντρο της μεμβράνης. Μετά από φυγοκέντρηση της στήλης σε ταχύτητα 11,000 x g για 30 δευτερόλεπτα, αφαιρέθηκε το απορρέων υγρό και η στήλη επανατοποθετήθηκε στον ίδιο, αλλά καθαρισμένο σωλήνα συλλογής. Επόμενο βήμα του καθαρισμού ήταν η έκλυση της μεμβράνης πυριτίου (silica membrane). Έτσι, προστέθηκαν στη στήλη 700 μl ρυθμιστικού διαλύματος NT3 (Buffer NT3) και ακολούθησε φυγοκέντρηση σε

ταχύτητα 11,000 x g για 30 δευτερόλεπτα. Μετά το τέλος της φυγοκέντρησης αφαιρέθηκε το απορρέων υγρό από το σωλήνα συλλογής. Η διαδικασία έκλουσης της μεμβράνης, πραγματοποιήθηκε και δεύτερη φορά (όπως προαναφέρθηκε), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Τελικά η στήλη φυγοκεντρήθηκε σε ταχύτητα 11,000 x g για ένα λεπτό, με απώτερο σκοπό την πλήρη απομάκρυνση της αιθανόλης, που περιλαμβάνεται στο ρυθμιστικό διάλυμα NT3, η οποία μπορεί να οδηγήσει σε παρεμπόδιση ενζυματικών αντιδράσεων. Για την έκλουση των προϊόντων της PCR η ειδική στήλη τοποθετήθηκε σε νέο erpendorf σωλήνα (χωρητικότητας 1.5 ml) και ακολούθησε προσθήκη κατάλληλης ποσότητας ρυθμιστικού διαλύματος έκλουσης NE (Buffer NE). Οι όγκοι έκλουσης που χρησιμοποιήθηκαν κυμαίνονταν μεταξύ 15 και 25 μl, ανάλογα με την ποσότητα του προϊόντος PCR της κάθε αντίδρασης, οι οποίοι αποφασίστηκαν ανάλογα με την ένταση της ζώνης του κάθε προϊόντος PCR, όπως αυτή παρουσιάζοταν στην εικόνα που προέκυψε μετά από την ηλεκτροφόρηση σε 2% πήκτωμα αγαρόζης. Πραγματοποιήθηκε επώαση του διαλύματος έκλουσης στις στήλες, για ένα λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου (18°-25 °C) και ακολούθησε φυγοκέντρηση σε ταχύτητα 11,000 x g για ένα λεπτό. Τέλος, τα προϊόντα της PCR αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης περιεκτικότητας 2% και διατηρήθηκαν σε καταψύκτη θερμοκρασίας -20 °C μέχρι την αλληλούχισή τους.

Σε αυτό το σημείο είναι απαραίτητο να αναφερθεί ότι για την αποφυγή ανεπιθύμητων παραπροϊόντων της αντίδρασης PCR που μπορεί να επηρεάσουν την μετέπειτα αλληλούχιση, κάποια προϊόντα της PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε 2% πήκτωμα αγαρόζης και μετά την αποκοπή της ζώνης του επιθυμητού μεγέθους καθαρίστηκαν σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή, όπως αυτές αναφέρονται στο πρωτόκολλο του **NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up kit**.

3.5 Εκτίμηση της ενζυμικής δραστηριότητας του συμπλόκου I της αναπνευστικής αλυσίδας με φαρματοφωτομετρικές μεθόδους σε απομονωμένα λεμφοκύτταρα

3.5.1 Αρχή της μεθόδου

Το σύστημα της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης (OXPHOS) βρίσκεται στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη και αποτελείται από πέντε επιμέρους λειτουργικά ενζυμικά σύμπλοκα. Τα σύμπλοκα I, III, και IV είναι τοποθετημένα ως υπερόςμπλοκα (Schagger και Pfeiffer, 2000) που περιέχουν δύο επιπλέον φορείς ηλεκτρονίων, το συνένζυμο Q (ουβικινόνη) και το κυτόχρωμα c. Η ροή των ηλεκτρονίων δια μέσου αυτών των των διαμεμβρανικών συμπλόκων οδηγεί στην άντληση πρωτονίων διαμέσου της μιτοχονδριακής εσωτερικής μεμβράνης. Τα ηλεκτρόνια εισέρχονται στην αλυσίδα από την οξειδοαναγωγή του ζεύγους NADH-Q (σύμπλοκο I) και μεταφέρονται στην οξειδοαναγωγή του ζεύγους Q-κυτόχρωμα c (σύμπλοκο III), από την ανηγμένη μορφή του συνενζύμου Q, επίσης γνωστού ως ουβικινόνης.

Το σύμπλοκο I έχει σχήμα L και περιέχει ένα υδατοδιαλυτό περιφερικό βραχίονα που προεξέχει προς τη μιτοχονδριακή μήτρα και έναν αδιάλυτο στο νερό υδρόφοβο βραχίονα ενσωματωμένο στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη (Brandt, 2006?. Carroll et al, 2003). Ο περιφερικός βραχίονας περιέχει τον συμπαράγοντα FMN και διάφορα συμπλέγματα σιδήρου-θείου και παρέχει ένα μονοπάτι μεταφοράς ηλεκτρονίων (Verkhovskaya et al., 2008) από το NADH στην ουβικινόνη (συνένζυμο Q). Η ουβικινόνη είναι ένας αποδέκτης ενός ή δύο ηλεκτρονίων γιατί σχηματίζει μια σταθερή ημικινόνη. Πέραν του υδρόφιλου δακτυλίου της, η ουβικινόνη έχει μια μεγάλη υδρόφοβη πλευρική αλυσίδα που αποτελείται από 10 μονάδες ισοπρενίου(Q₁₀), που είναι βυθισμένη στη λιπιδική διπλοστιβάδα της μεμβράνης.

Η θέση δέσμευσης του NADH βρίσκεται στον περιφερικό βραχίονα του συμπλόκου I . Η θέση δέσμευσης της ουβικινόνης έγκειται στο υδρόφοβο μεμβρανικό βραχίονα (Brandt, 2006? Carroll et al, 2003?. Degli Esposti και Ghelli, 1994? Friedrich et al., 1993? Walker, 1992). Εκεί βρίσκεται και η θέση δέσμευσης ενός αναστολέα του ενζύμου, της ροτενόνης. Έτσι η πορεία οξείδωσης του NADH από το σύμπλοκο I μπορεί να ανασταλεί με την προσθήκη ροτενόνης.

Η αντιμυκίνη, ένα αντιβιοτικό, αναστέλλει τη μεταφορά ηλεκτρονίων διαμέσου του συμπλέγματος III, δεσμευόμενη στη θέση Q_i , και παρεμποδίζει τη μεταφορά ηλεκτρονίων από το κυτόχρωμα bH στην ουβικινόνη. Το σύμπλεγμα IV αναστέλλεται από τα κυανιούχα ιόντα τα οποία δευσεύονται ισχυρά με την οξειδωμένη μορφή της αίμης α_3 και εμποδίζουν την μεταφορά ηλεκτρονίων από την αίμη α στο διπύρρηνο κέντρο. Με την αναστολή των συμπλόκων αυτών μπορεί να προσδιοριστεί "μεμονωμένα" η δραστικότητα του συμπλόκου I.

Ο προσδιορισμός της δραστικότητας του συμπλόκου I απαιτεί τη χρήση τεχνητών δεκτών ηλεκτρονίων, όπως τα ανάλογα του συνένζυμο Q επειδή οι φυσιολογικές κινόνες, όπως συνένζυμο Q_{10} , είναι πάρα πολύ αδιάλυτες στο νερό για να προστεθούν ως υποστρώματα στο μέσο προσδιορισμού. Σε αυτήν την δοκιμασία χρησιμοποιείται το συνένζυμο Q_1 το οποίο δρα ως ανάλογο του συνένζυμο Q_{10} . Το σύμπλοκο I οξειδώνει το NADH το οποίο απορροφά σε λ_{max} 340 nm, ενώ η οξειδωμένη μορφή NAD^+ δεν απορροφά σε αυτό το μήκος κύματος. Με αυτόν τον τρόπο μπορεί κανείς να παρακολουθήσει την πορεία της ενζυμικής αντίδρασης, μετρώντας τη μείωση της απορρόφησης στα 340 nm, όπου το NADH οξειδώνεται. Η μείωση της απορρόφησης που παρατηρείται είναι άμεσα σχετιζόμενη με το μέγεθος της ενζυμικής δραστικότητας της οξειδοαναγωγής του ζεύγους NADH-συνένζυμο Q. Τόσο η ανωτέρω αντίδραση, όσο και η αντίδραση οποιασδήποτε άλλης αφυδρογονάσης που μετέχουν τα ανωτέρω συνένζυμα, είναι δυνατόν να προσδιοριστεί καθώς καταγράφεται η μείωση ($NADH \rightarrow NAD^+$) ή αύξηση ($NAD^+ \rightarrow NADH$) της οπτικής απορρόφησης της αντιδράσεως στα 340 nm.

Στην πειραματική διαδικασία που πραγματοποιήθηκε η μέτρηση της δραστηριότητας του συμπλόκου I γίνεται φασματοφωτομετρικά μετρώντας την μείωση της απορρόφησης του NADH στα 340 nm, σε συνολικό όγκο αντίδρασης 1,0 mL που περιέχει: ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού καλίου pH 7.8 20mM, $MgCl_2$ 25mM, BSA 0,2 %, NADH 90μM, KCN 1,7mM, αντιμυκίνη 3mM, συνένζυμο Q_1 65mM, ροτενόνη 15μM, σε δείγμα που προέρχεται από απομονωμένα λεμφοκύτταρα.

3.5.2 Παρασκευή αντιδραστηρίων

- Το συνένζυμο Q₁ και η αντιμυκίνη-A διαλύθηκαν σε διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO) και δημιουργήθηκαν stock 2,8 mmol/L και 1,0 mmol/L, αντίστοιχα τα οποία αποθηκεύτηκαν στους -80 °C. Ένα από αυτά φυλάσσεται προς χρήση στους -20 °C
- Η ροτενόνη διαλύθηκε επίσης σε DMSO. Δημιουργήθηκαν stock 10mM και αποθηκεύτηκαν στους -20°C.
- Προετοιμάστηκε ένα απόθεμα διαλύματος BSA 80 g/ L διαλυμένο σε 5 mmol/L ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικού καλίου, pH 7.8. Επειδή το BSA είναι ένα κρίσιμο συστατικό στους δοκιμασίες του συμπλόκου I, μετράται φασματοφωτομετρικά τη συγκέντρωση στα 280nm (A_{280} 1 g/L BSA 0,667). Το απόθεμα διαλύματος αραιώθηκε σε 70 g / L και φυλάχθηκε σε δείγματα 1 mL στους -20 ° C.
- Για τη δημιουργία του ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικού καλίου, pH 7.8 δημιουργήθηκαν αρχικά δύο διαλύματα τα οποία αναμείχθηκαν σε αναλογία όγκου 9:1

Διάλυμα stock A: $K_2HPO_4 \times 2H_2O$ με συγκέντρωση 174 g/l

Διάλυμα stock B: $KH_2PO_4 \times H_2O$ με συγκέντρωση 136 g/l

Διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου.

- Για την δημιουργία διαλύματος κυανιούχου καλίου (KNC) συγκέντρωσης 1M ζυγίζονται 0,651g τα οποία διαλύονται σε 1mL H₂O. Πρέπει να φτιάχνεται πριν από κάθε δοκιμασία. Δεν διατηρείται.
- Το NADH διαλύθηκε σε νερό. Δημιουργήθηκαν stock 100mM και αποθηκεύτηκαν στους -80°C. Για την δοκιμασία το αρχικό stock αραιώθηκε σε 10mM και αποθηκεύτηκε στους -20°C

*όλα τα αντιδραστήρια προέρχονται από τη Sigma-Aldrich.

3.5.3 Πειραματική Διαδικασία

- Για τη δημιουργία του διαλύματος φωτομέτρησης αναμυγνούνται ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού καλίου pH 7.8 20mM, MgCl₂ 25mM, BSA 0,2 %, KCN 1,7mM, αντιμυκίνη 3mM σε ένα tube με όγκο 856 μl.
- Στο διάλυμα φωτομέτρησης προστίθενται 90μM NADH και 70μg από ομογενοποίημα λεμφοκυττάρων
- Το διάλυμα επωάζεται για 1 λεπτό στους 37 °C
- Η αντίδραση ξεκινά με την προσθήκη 60μM συνένζυμου Q₁ στο διάλυμα
- Καταγράφεται η καμπύλη ταχύτητας αντιδράσεως φωτομετρικά για 2-3 min (μέτρηση ανά 15 sec) και υπολογίζεται η κλίση σε ΔA/min.
- Επειδή η συσσώρευση της ροτενόνης στη θέση δέσμευσης της δεν είναι στιγμιαία (Burgos και Fedfearn, 1965 De Vries et al., 1996 De Wit et al., 2007) εκτελείται η ίδια διαδικασία για δεύτερη φορά αφού γίνει προσθήκη ροτενόνης 15μM κατά τη δημιουργία του διαλύματος φωτομέτρησης και ακολουθεί η ίδια διαδικασία. Έτσι μπορεί να διαχωριστεί η δράση του συμπλόκου I από άλλες NADH αφυδρογονάσες.

3.6 Απομόνωση λεμφοκυττάρων

Η ακριβής μέτρηση της δραστηριότητας του συμπλόκου I της αναπνευστικής αλυσίδας εξαρτάται από την πρόσβαση του NADH στον διαμεμβρανικό χώρο. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί με αύξηση της διαπερατότητας της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης στο ομογενοποίηση των λεμφοκυττάρων μετά από κατάλληλη επεξεργασία.

Ως πηγή λεμφοκυττάρων χρησιμοποιήθηκε φλεβικό αίμα που συλλέχθηκε από υγιείς και ασθενείς δότες. Η αιμοληψία γίνεται με αποστειρωμένη σύριγγα μίας χρήσης. Το αίμα συλλέγεται σε ηπαρινισμένα φιαλίδια. Το δείγμα αναδεύεται ήπια και παραμένει σε θερμοκρασία δωματίου για μικρό χρονικό διάστημα μέχρι να χρησιμοποιηθεί. Εώς την επεξεργασία η ανώτερη ώρα παραμονής ήταν 1-2 ώρες μετά τη λήψη του αίματος.

3.6.1 Αρχή της μεθόδου

Η απομόνωση των λεμφοκυττάρων από το περιφερικό αίμα μπορεί να καταστεί δυνατή με την εφαρμογή φυγοκεντρήσεως πυκνότητας με τη χρήση Ficoll και metrizimide (Hyaque). Η Ficoll έχει υψηλότερη πυκνότητα από αυτή των λεμφοκυττάρων (1.077 g/dl) αλλά χαμηλότερη από αυτή των ερυθροκυττάρων και των κοκκιοκυττάρων. Έτσι η Ficoll λειτουργεί ως διαχωριστικό μέσο μεταξύ των μονοπύρηνων και των υπολοίπων κυττάρων μετά από την φυγοκέντρηση.

3.5.2 Προετοιμασία διαλυμάτων

Το Solution A περιέχει:

✚ Anhydrous D-glucose 0,1% w/v

✚ CaCl_2 5×10^{-3} M

✚ MgCl_2 $9,8 \times 10^{-4}$ M

✚ KCl $5,4 \times 10^{-3}$ M

✚ Tris HCl pH 7.5, 0,145 M

Διαλύεται σε περίπου 950ml απιονισμένου νερού. Έπειτα προστίθενται 10 N HCl έως ότου το pH του διαλύματος να φτάσει 7,6 και συμπληρώνεται νερό μέχρι ο όγκος του διαλύματος να είναι 1 λίτρο

Το Solution B περιέχει:

NaCl 0,14M

Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS) 10x που αποτελείται από:

Na₂HPO₄ 1M

KH₂PO₄ 20mM

NaCl 1,37 M

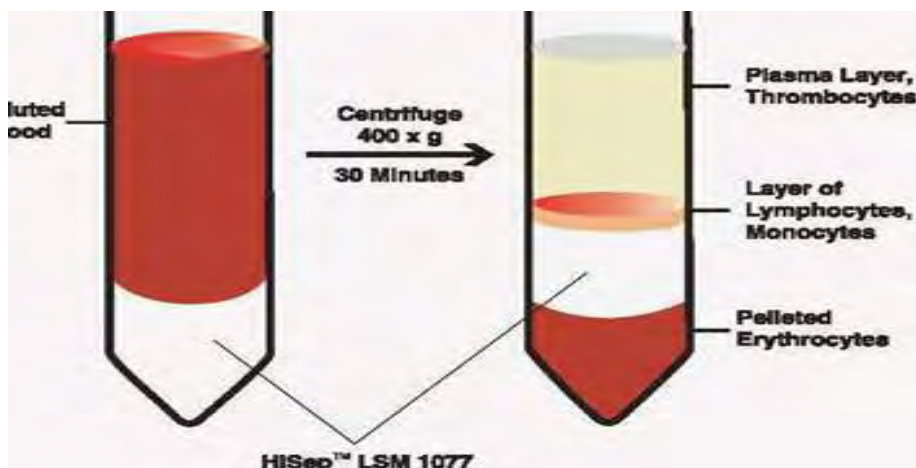
KCl 20mM.

Αποθηκεύεται σε θερμοκρασία δωματίου.

3.6.2 Πειραματική διαδικασία

1. Για την προετοιμασία του ισότονου διαλύματος αλάτων αναμειγνύεται το solution A με το solution B σε αναλογία όγκων 1:9
2. Το περιφερικό αίμα αραιώνεται με ίση ποσότητα ισότονου διαλύματος αλάτων.
3. Σε ένα falcon των 15ml προσθέτουμε 3ml ficoll-raque plus και επιστιβάζονται 4ml από το αραιωμένο αίμα με πιπέτα Pasteur . Η επιστίβαξη γίνεται προσεκτικά ώστε να μη γίνει ανάμειξη δείγματος και διαχωριστικού μέσου
4. Στην συνέχεια το δείγμα φυγοκεντρείται για 25-30 λεπτά στα 400g σε θερμοκρασία δωματίου 18-20 ° C
5. Μετά την φυγοκέντρηση δημιουργείται μια λεπτή στοιβάδα πάνω από την Ficoll, η οποία περιέχει τα λεμφοκύτταρα ενώ ακριβώς από πάνω βρίσκεται στρώμα, το οποίο περιέχει το αραιωμένο πλάσμα και τα αιμοπετάλια. Τα ερυθρά αιμοσφαίρια και τα πολυμορφοπύρρηνα διέρχονται μέσω της Ficoll και σχηματίζουν ίζημα στον πυθμένα του falcon (εικόνα 3.5). Κατόπιν γίνεται προσεκτική αναρρόφηση του υπερκείμενου στρώματος, το οποίο περιέχει το

- αραιωμένο πλάσμα και τα αιμοπετάλια και στην συνέχεια της στιβάδας των λεμφοκυττάρων, η οποία τοποθετείται σε ένα καινούργιο αποστειρωμένο falcon. Η διαδικασία πρέπει να γίνεται γρήγορα γιατί η Ficoll είναι τοξική για τα κύτταρα.
6. Γίνεται προσθήκη 10 ml PBS 1x, ήπια ανάδευση με μια Pasteur και φυγοκέντρηση στα 250g για 10 λεπτά στους 18-20° C.
 7. Αναρροφάται το υπερκείμενο και στο ίζημα που έχει δημιουργηθεί γίνεται προσθήκη 2-5 ml PBS 1x, (ανάλογα με το ίζημα των κυττάρων) ήπια ανάδευση και φυγοκέντρηση όπως προηγουμένως.
 8. Αφού αφαιρεθεί και πάλι το υπερκείμενο γίνεται προσθήκη 1 ml PBS στο ίζημα, μεταφορά σε ένα tube των 1,5 ml και φυγοκέντρηση όπως προηγουμένως.
 9. Μετά την φυγοκέντρηση γίνεται αφαίρεση υπερκειμένου και αποθήκευση του ιζήματος στους -80° C.



Εικόνα 3.5. Σχηματική αναπαράσταση του διαχωρισμού των λεμφοκυττάρων από τα υπόλοιπα κυτταρικά στοιχεία του αίματος με βάση τη πυκνότητά τους.





3.7 Επεξεργασία των λεμφοκυττάρων

3.7.1 Κατάψυξη απόψυξη (freeze/thaw)

Η μέθοδος ψύξης/απόψυξης χρησιμοποιείται κυρίως για τη λύση βακτηρίων και κυττάρων θηλαστικών. Η τεχνική περιλαμβάνει την κατάψυξη ενός εναιωρήματος κυττάρων μέσα σε καταψύκτη (-80^o C) και στη συνέχεια την τήξη του δείγματος στους 37°C. Αυτή η μέθοδος προκαλεί διόγκωση και πλήρη διάσπαση των κυττάρων, σαν κρύσταλλοι πάγου που σχηματίζονται κατά την κατάψυξη και συστέλλονται κατά την απόψυξη. Για την αποτελεσματική κυτταρόλυση απαιτούνται πολλαπλοί κύκλοι αυτής της διαδικασίας. Η μέθοδος αυτή εάν και θεωρείται λιγότερο αποτελεσματική από πιο δραστικές μεθόδους είναι δύσκολο να προκαλέσει μετουσίωση και αποδιάταξη των πρωτεϊνών στο εξεταζόμενο δείγμα.

3.7.2 Πειραματική διαδικασία

Τα απομονωμένα λεμφοκύτταρα επαναιωροποιούνται σε ισότονο διάλυμα λύσης τριπλάσιου όγκου μαζί με αναστολείς πρωτεασών και ακολουθούν 3 κύκλοι freeze/thawing. Το διάλυμα λύσης (SHE-PIM buffer) περιέχει:

-  10mM HEPES pH 7.4,
-  250 mM sucrose
-  1mM EDTA
-  Αναστολείς πρωτεασών

Μετά από τρεις κύκλους κατάψυξης απόψυξης, τα διαπερατά κύτταρα μπορούν να χρησιμοποιηθούν άμεσα στη δοκιμασία δραστηριότητας του συγκροτήματος I αφού γίνει η ποσοτικοποίηση τους.

3.8 Ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των πρωτεϊνών που προέκυψαν από τα παραπάνω στάδια πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της Bradford (1976) χρησιμοποιώντας το αντιδραστήριο Bradford protein assay της Bio-Rad. Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στην αντίδραση της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250. Υπό όξινες συνθήκες, η εν λόγω χρωστική αντιδρά με αμινοξέα πρωτεϊνών, οπότε και δημιουργείται ένα σταθερό χρωμοφόρο σύμπλοκο πρωτεΐνης-χρωστικής. Η δέσμευση της χρωστικής στην πρωτεΐνη σταθεροποιεί την μπλε ανιονική μορφή της χρωστικής Coomassie, με το σύμπλοκο που δημιουργείται να εμφανίζει μέγιστη απορρόφηση στα $\lambda = 595\text{nm}$. Τυχόν αύξηση της απορρόφησης στα 595nm , είναι ενδεικτική του ποσού της συνδεδεμένης πρωτεΐνης και ως εκ τούτου υποδεικνύει αύξηση στην περιεκτικότητα του δείγματος σε πρωτεΐνη.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

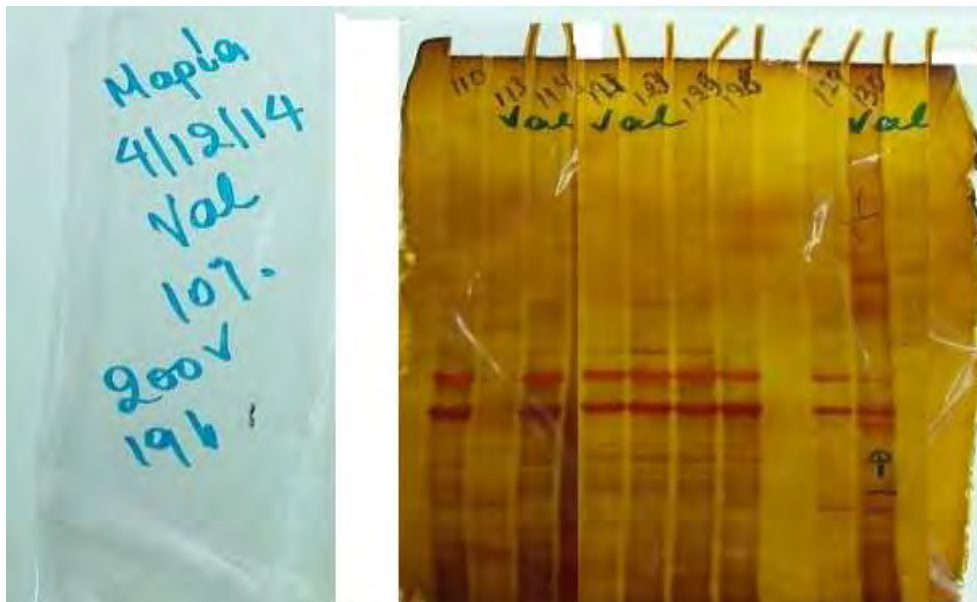
4.1 Αποτελέσματα γενετικής ανάλυσης

Παρακάτω παρατίθενται τα αποτελέσματα των αναλύσεων SSCP, και των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών (που έφτασαν στα χέρια μας μετά την αλληλούχιση τους)

VAL: Η ανάλυση SSCP στα 23 δείγματα που προέρχονται από ενίσχυση του γονιδίου tRNA της βαλίνης έδειξε το σχηματισμό δύο διαφορετικών προτύπων (1:130, 2:123) (εικόνα 4.1 και 4.2). Τα δείγματα που εμφάνιζαν τα πρότυπα αυτά επιλέχθηκαν για αλληλούχιση αφού πρώτα έγινε ο καθαρισμός τους. Ο καθαρισμός των προϊόντων της PCR είναι απαραίτητος για τον διαχωρισμό της ενισχυμένης γονιδιακής περιοχής από τα υπόλοιπα συστατικά της αντίδρασης PCR, και ειδικότερα εκκινητές ή διμερή εκκινητών, ώστε να επιτευχθεί η βέλτιστη αλληλούχιση για την ανάλυση των μεταλλάξεων του γονιδίου. Ο καθαρισμός των προϊόντων έγινε σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή, όπως αυτές αναφέρονται στο πρωτόκολλο του **NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up kit** (for DNA, RNA and protein purification) της εταιρίας **MACHEREY – NAGEL**).

Τα αποτελέσματα των αλληλουχίσεων στάλθηκαν υπό τη μορφή χρωματογραφημάτων, τα οποία αναλύθηκαν στο εργαστήριο με τη βοήθεια του εξειδικευμένου λογισμικού προγράμματος **BioEdit v7.2.5** (developer Tom Hall, Ibis Biosciences, Carlsbad CA 92008, Last update 12/11/2013, <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>).

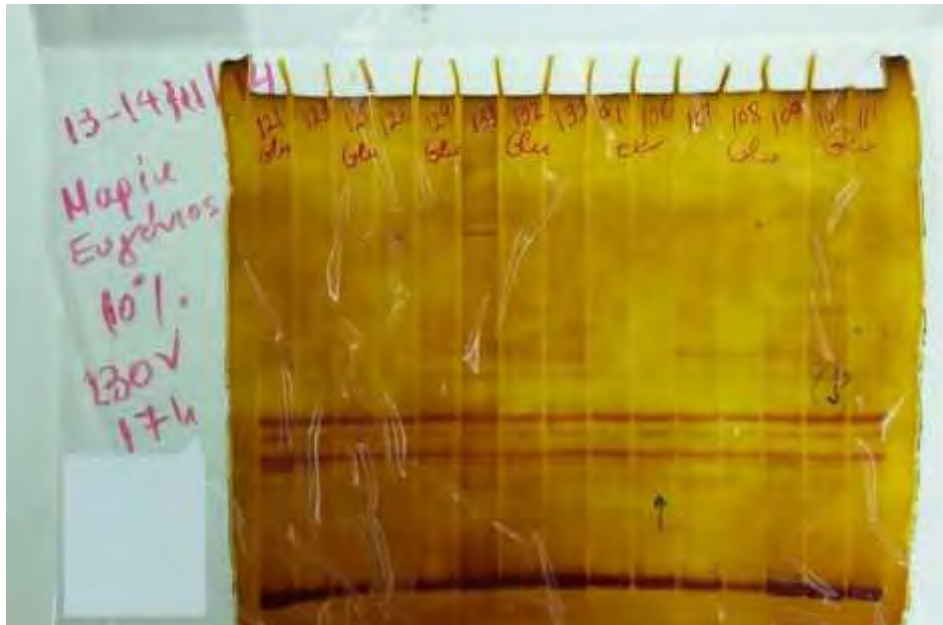
Μετά από επεξεργασία των αλληλουχιών δεν φάνηκε σε κανένα γονίδιο να υπάρχει κάποια μεταλλαγή που να το διαφοροποιεί από το γενικό πρότυπο. Όλα τα δείγματα συνεπώς εντάχθηκαν στο γενικό πρότυπο



Εικόνες 4.1-4.2: Πήκτωμα ακρυλαμίδης των PCR προϊόντων του εκκινητή VAL. Με βέλη, στην θέση 123 και 130, φαίνονται τα δείγματα που επιλέχθηκαν προς αλληλούχιση

GLU: Η ανάλυση SSCP στα 23 δείγματα που προέρχονται από ενίσχυση του γονιδίου tRNA του γλουταμινικού οξέος έδειξε το σχηματισμό πέντε διαφορετικών προτύπων (1:106, 2:115, 3:117, 4:118, 5:132) (εικόνα 4.3 και 4.4).

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



Εικόνες 4.3-4.4: πηκτώματα ακρυλαμίδης PCR προϊόντων του εκκινητή *Glu*. Με βέλη και κουκίδες, στις θέσεις 106,110,115,117,118,132 φαίνονται τα δείγματα που επιλέχθηκαν προς αλληλούχιση

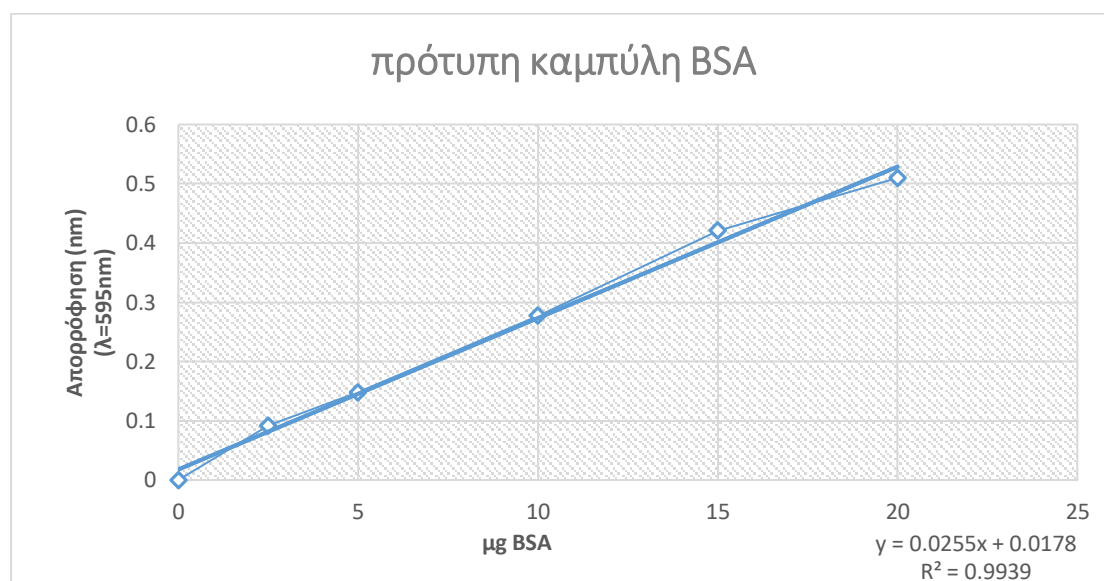
4.2 Αποτελέσματα βιοχημικής ανάλυσης

4.2.1 Κατασκευή πρότυπης καμπύλης

Αρχικά κατασκευάστηκε μια πρότυπη καμπύλη, βάση της οποίας θα γίνει η ποσοτικοποίηση των δειγμάτων. Για τη δημιουργία αυτής της πρότυπης καμπύλης χρησιμοποιείται μια σειρά πρότυπων διαλυμάτων πρωτεΐνης αλβουμίνης βόειου ορού (Bovine Serum Albumin,BSA) γνωστής συγκέντρωσης . Σε όγκο 20μl από το εκάστοτε πρότυπο δείγμα, συγκέντρωσης 0-20mg/ml προστίθενται 980μl αντιδραστήριου Bradford 1x. Τα διαλύματα (όγκου 1ml) αναδεύονται και αφήνονται για επώαση για 30min σε θερμοκρασία δωματίου, στο σκοτάδι. Μετά το πέρας των 30 λεπτών τα διαλύματα αναδεύονται καλά και φασματοφωτομετρούνται σε λ= 595nm. Οι τιμές της απορρόφησης των πρότυπων διαλυμάτων χρησιμοποιήθηκαν για το σχεδιασμό της πρότυπης καμπύλης αναφοράς (διάγραμμα 4.1).

ΠΙΝΑΚΑ 4.1 ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΠΡΟΤΥΠΗΣ ΚΑΜΠΥΛΗΣ BSA				
BSA 1mg/ml (μl)	Tris 10mM pH 7.4 (μl)	Αντιδραστήριο Bradford 1x (μl)	BSA (μg)	BSA(μg/ml)
0	20	980	0	0
1	19	980	2,5	2,5
5	15	980	5	5
10	10	980	10	10
15	5	980	15	15
20	0	980	20	20

Διάγραμμα 4.1 Παρουσιάζεται η πρότυπη καμπύλη αναφοράς της BSA



μg BSA	0	2,5	5	10	15	20
A595nm	0	0,092	0,148	0,277	0,421	0,51

4.2.2 Φωτομετρικός προσδιορισμός της ενζυμικής δραστηριότητας της οξειδοαναγωγής του ζεύγους NADH-Q (complex I) σε λεμφοκύτταρα από φυσιολογικούς και ασθενείς δότες.

Για τον φωτομετρικό προσδιορισμό της ενζυμικής δραστηριότητας του complex I της αναπνευστικής αλυσίδας με το πρωτόκολλο που βασίζεται στη χρήση του αναλόγου συνένζυμο Q₁ πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις σε ομογενοποίημα λεμφοκυττάρων από 13 φυσιολογικούς δότες (Δ1-Δ13) που αποτέλεσαν τα controls και 4 ασθενείς με σαρκοείδωση (Π1-Π4). Πιο αναλυτικά η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η εξής:

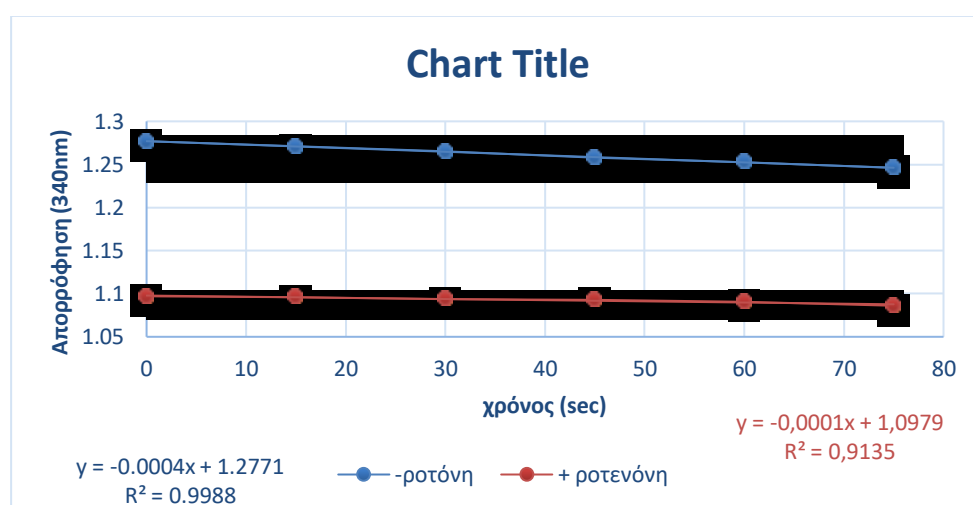
Ως πηγή λεμφοκυττάρων χρησιμοποιήθηκε φλεβικό αίμα. Η αιμοληψία έγινε με αποστειρωμένη σύριγγα μίας χρήσης και το αίμα συλλέχθηκε σε ηπαρινισμένα φιαλίδια. Ακολούθως έγινε η απομόνωση των λεμφοκυττάρων με εφαρμογή φυγοκεντρήσεως πυκνότητας με τη χρήση Ficoll και metrizimide (Hyraque) όπως περιγράφηκε. Το ίζημα των λεμφοκυττάρων που συλλέχθηκε από τη φυγοκέντρηση

διαλυτοποιήθηκε σε SHE-PIM buffer και η μεμβράνη κατέστη διαπερατή μετά απο 3 διαδοχικούς κύκλους ψύξης/απόψυξης. Έπειτα πραγματοποιήθηκε ο ποσοτικός προσδιορισμός των πρωτεϊνών στο ομογενοποίημα με τη μέθοδο Bradford βάση της πρότυπης καμπύλης που κατασκευάσαμε.

Ο φωτομετρικός προσδιορισμός της ενζυμικής δραστηρότητας του complex I πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τον De wit, 2006. Η αντίδραση παρακολουθείται φωτομετρικά και προσδιορίζεται η ταχύτητα μετατροπής του NADH σε NAD⁺, σε μήκος κύματος 340 nm και συντελεστή απόσβεσης $\epsilon = 6,22 \text{ L/mmole}\cdot\text{cm}$. Με σκοπό να διαχωριστεί η δράση του συμπλόκου I από άλλες NADH αφυδρογονάσες επαναλαμβάνεται η μέτρηση με προσθήκη στο διάλυμα φωτομέτρησης ενός αναστολέα του συμπλόκου I, την ροτενόνη. Και στις δύο μετρήσεις (με και χωρίς ροτενόνη) καταγράφεται η καμπύλη κινητικής οξειδωσης του NADH φωτομετρικά για 2-3 min (μέτρηση ανά 15 sec) και υπολογίζεται η κλίση σε $\Delta A/\text{min}$. Η κλίση της καμπύλης αντιπροσωπεύει την ταχύτητα αντίδρασης.

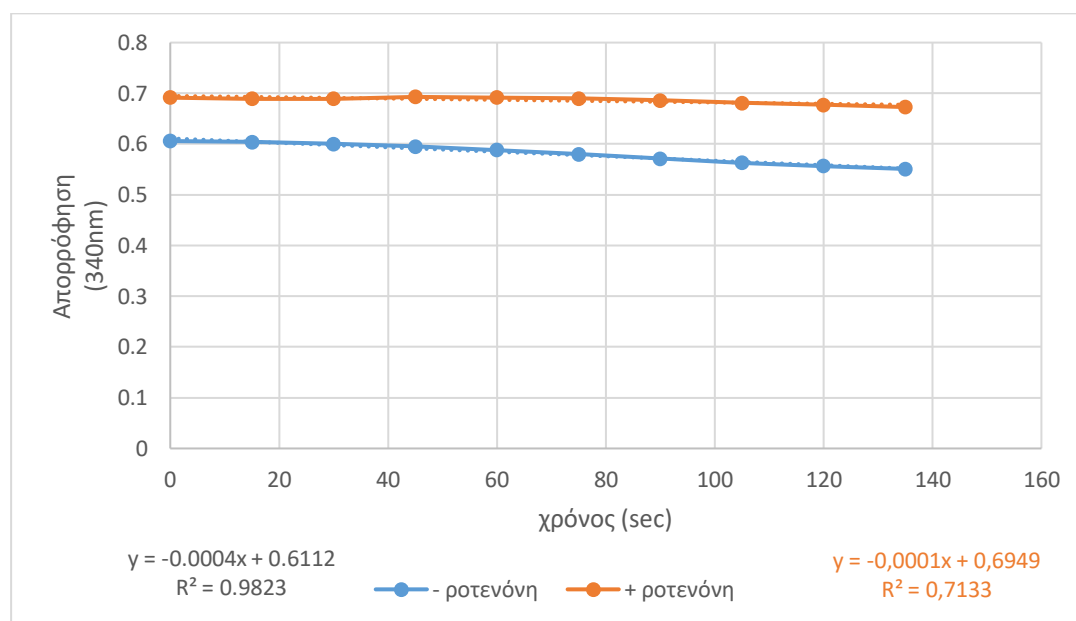
Για όλα τα δείγματα κατασκευάστηκε το διάγραμμα της απορρόφησης συναρτήση του χρόνου με και χωρίς ροτενόνη (διάγραμμα 4.1,4.2).

Διάγραμμα 4.2 Παρουσιάζεται η κινητική της αντίδρασης οξειδωσης του NADH του $\Delta 7 \mu\text{e}$ και χωρίς προσθήκη ροτενόνης. Η δραστηριότητα του complex I αντικατοπτρίζεται από τη μείωση της απορρόφησης στα 340 nm που προκαλείται από την οξειδωση του NADH.



Σε μερικά δείγματα η ενζυμική αντίδραση φαίνεται να ξεκινάει μετά τα πρώτο λεπτό, όπου και παρατηρήθηκε μείωση της απορρόφησης του NADH. Για το λόγο αυτό στην εκτίμηση της ενζυμικής δραστηριότητας χρησιμοποιήθηκαν οι τιμές της απορρόφησης μετά το πέρας του πρώτου λεπτού. Στο διάγραμμα 4.3 φαίνεται η καμπύλη της κινητικής ταχύτητας της αντίδρασης που αντιστοιχεί στο δείγμα 13 [Δ13] που παρουσίασε αυτό το χαρακτηριστικό. Στην περίπτωση αυτή ανήκουν τα δείγματα **Δ1, Δ7, Δ8, Δ9 και Δ13**.

Διάγραμμα 4.3 Παρουσιάζεται η κινητική της αντίδρασης οξείδωσης του NADH στο Δ13. Όπως φαίνεται και στη γραφική παράσταση η κινητική της αντίδρασης ξεκινάει μετά το πέρας του πρώτου λεπτού



4.2.3 Εκτίμηση της ειδικής δραστηριότητας του complex I

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

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

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

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

b : το μήκος οπτικής διαδρομής

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

Η ειδική δραστηριότητα του ενζύμου (specific activity) προκύπτει από το λόγο της ενζυμικής ενεργότητας με τα mg πρωτεΐνης που υπήρχαν στο παρασκεύασμα (δηλαδή U/mg).

Βάση των τύπων αυτών έγινε ο υπολογισμός της ειδικής δραστηριότητας του complex I με και χωρίς ροτενόνη για τις τιμές της απορρόφησης όπου η καμπύλη της αντίδρασης ήταν γραμμική. Η ροτενόνη παρεμποδίζει την μεταφορά ηλεκτρονίων στην ουβικινόνη και επιτρέπει το διαχωρισμό της δράσης του συμπλόκου I από άλλες NADH αφυδρογονάσες. Έτσι η ειδική δραστηριότητα του ενζύμου προκύπτει από την αφαίρεση των δύο τιμών. Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται οι τιμές της ενζυμικής δραστηριότητας για κάθε ένα από τα δείγματα που μελετήθηκε (πίνακας 4.2).

Πίνακας 4.2 Ειδική δραστηριότητα της οξειδοαναγωγής του ζεύγους NADH-Q σε λεμφοκύτταρα (nmol/min/mg protein)						
ΔΕΙΓΜΑ	ΦΥΛΟ	ΗΛΙΚΙΑ	SPECIFIC ACTIVITY ΧΩΡΙΣ POTENONH	SPECIFIC ACTIVITY ΜΕ POTENONH	TOTAL SPECIFIC ACTIVITY COMPLEX I	% rotenone sensitivity
Δ1	άνδρας	78	70	52	18	25%
Δ2	άνδρας	82	124	68	56	46%
Δ3	άνδρας	21	148	48	76	69%
Δ4	άνδρας	80	29	10	19	65%
Δ5	γυναίκα	25	98	34	64	66%
Δ6	γυναίκα	21	62	37	25	40%
Δ7	άνδρας	29	80	34	46	58%
Δ8	γυναίκα	25	114	84	30	26%
Δ9	άνδρας	72	112	60	52	47%
Δ10	άνδρας	29	96	30	66	69%
Δ11	Γυναίκα	21	64	4	60	99%
Δ12	γυναίκα	25	117	73	44	38%
Δ13	Γυναίκα	52	73	27	46	64%
Π1	γυναίκα	άνω των 60	151	158	-	
Π2	γυναίκα	άνω των 60	70	72	-	
Π3	γυναίκα	άνω των 60	45	18	27	60%
Π4	Ανδρας	άνω των 60	80	48	32	40%

4.2.4 Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων

Πραγματοποιήθηκε περιγραφική στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων για την συνόψιση, περιγραφή και παρουσίαση των δεδομένων. Υπολογίστηκαν η μέση τιμή και η τυπική απόκλιση με τη χρήση του προγράμματος Excel. Επίσης τα δείγματα ομαδοποιήθηκαν με βάση την ηλικία το φύλο και την κατάσταση υγείας και για καθ' ένα από αυτά τα σύνολα εκτελέσθηκε ο στατιστικός έλεγχος Student's t-test με σκοπό να διαπιστωθεί αν οι διαφορές που παρατηρούνται είναι στατιστικά σημαντικές. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στους πίνακες 4.3, 4.4 και 4.5. Το t-test χρησιμοποιείται για την σύγκριση των μέσων όρων δυο συνόλων τιμών που διαφέρουν όσον αφορά ένα χαρακτηριστικό. Στατιστική σημαντικότητα ενός αποτελέσματος είναι η πιθανότητα ότι η παρατηρηθείσα σχέση (π.χ., μεταξύ των μεταβλητών) ή της διαφοράς (π.χ., μεταξύ των μέσων) σε ένα δείγμα να εμφανίστηκε κατά καθαρή τύχη και ότι στον πληθυσμό από τον οποίο το δείγμα προήλθε, καμία τέτοια σχέση ή διαφορά δεν υπάρχει. Η τιμή p-value είναι το μικρότερο επίπεδο σημαντικότητας, α , στο οποίο η αρχική υπόθεση μπορεί να απορριφθεί.

Από τα δείγματα που ανήκουν σε φυσιολογικούς δότες τα δείγματα Δ1 και Δ8 δεν συμπεριλήφθηκαν στην στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων. Δεδομένου ότι η μείωση της ροτενόνη ήταν <30 % το αποτέλεσμα δεν μπορεί να θεωρηθεί αξιόπιστο και γιαυτό απορρίπτεται.

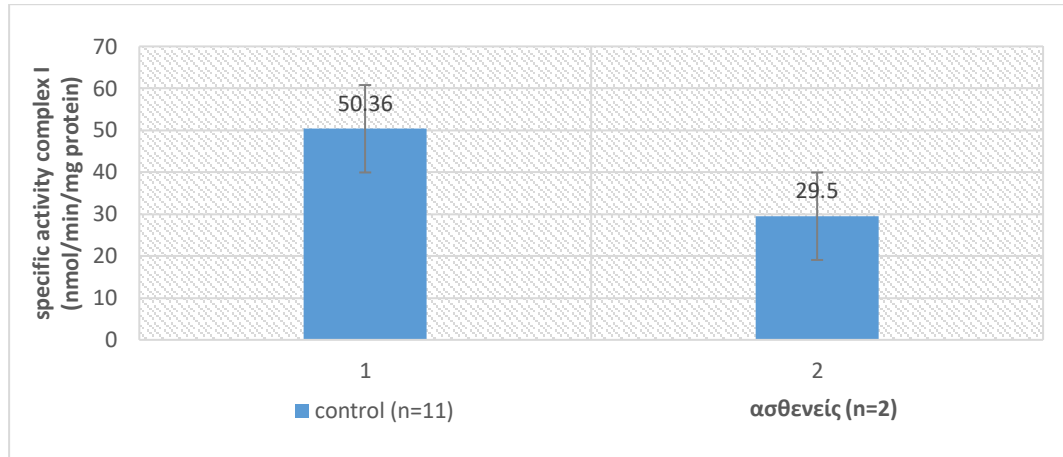
Από τα παθολογικά δείγματα μόνο τα Π3 και Π4 συμπεριλήφθηκαν στην ανάλυση. Τα αποτελέσματα της ενζυμικής αντίδρασης για τα δείγματα Π1 και Π2 δεν είναι αξιοποιήσιμα διότι δεν εμφάνισαν ευαισθησία στην ροτενόνη.

Πίνακας 4.3 Σύγκριση των μέσων τιμών της ειδική δραστηριότητα της οξειδοαναγωγής του ζεύγους NADH-Q (nmol/min/mg protein) σε λεμφοκύτταρα ανδρών και γυναικών		
	Άνδρες (v=6)	Γυναίκες (=5)
Μέσος όρος	52,5	44,75
Τυπική απόκλιση (SD)	17,8	13,8
P value	0,8 [(p > 0,05) μη στατιστικώς σημαντικό]	

Πίνακας 4.4 Σύγκριση των μέσων τιμών της ειδική δραστηριότητα της οξειδοαναγωγής του ζεύγους NADH-Q (nmol/min/mg protein) σε λεμφοκύτταρα από νέους (ηλικία<30 ετών) και ηλικιωμένους (ηλικία>70 ετών)		
	Ηλικιωμένοι (v=4)	Νέοι (v=7)
Μέσος όρος	43,25	54,4
Τυπική απόκλιση (SD)	14,4	15,9
P value	0,3 [(p > 0,05) μη στατιστικώς σημαντικό]	
*Το Δ13 συμπεριλήφθηκε στους ηλικιωμένους		

Πίνακας 4.5 Σύγκριση των μέσων τιμών της ειδική δραστηριότητα της οξειδοαναγωγής του ζεύγους NADH-Q (nmol/min/mg protein) σε λεμφοκύτταρα που προέρχονται απο υγιείς δότες και ασθενείς με σαρκοείδωση		
	Υγιείς (v=9)	Ασθενείς(v=2)
Μέσος όρος	50,4	29,5
Τυπική απόκλιση (SD)	16,3	2,5
P value	0,0046 [(p < 0,05) στατιστικώς σημαντικό]	

Διάγραμμα 4.4 Συγκριτικό διάγραμμα της ειδικής δραστηριότητας της οξειδοαναγωγής του ζεύγους NADH-Q (nmol/min/mg protein) σε λεμφοκύτταρα ασθενών με σαρκοείδωση σε σχέση με φυσιολογικά δείγματα



ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα μιτοχόνδρια είναι ημιαυτόνομα κυτταρικά οργανίδια τα οποία συνυπάρχουν σε μία συμβιωτική σχέση με το κύτταρο. Τα μιτοχόνδρια διαθέτουν το δικό τους γονιδίωμα, το οποίο κωδικοποιεί μία ποικιλία πρωτεϊνών και μορίων RNA. Το ανθρώπινο μιτοχονδριακό γονιδίωμα περιέχει 37 γονίδια (13 ενζυμικές υπομονάδες της αναπνευστικής αλυσίδας, 2 rRNA γονίδια και 22 tRNA). Η σημαντικότερη ίσως λειτουργία των μιτοχονδρίων αναγνωρίζεται στη συνεισφορά τους σε ό,τι αφορά τον ενεργειακό μεταβολισμό, καθώς αποτελούν τους βασικούς προμηθευτές ενέργειας των κυττάρων. Παραπροϊόν της λειτουργίας της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης αυτού, αποτελούν οι ελεύθερες ρίζες οι οποίες όταν υπερπαράγονται αυξάνουν κατά πολύ το ήδη μεγάλο ποσοστό μεταλλαγών στο μιτοχονδριακό DNA εξαιτίας της απουσίας επιδιορθωτικών μηχανισμών.

Στη διάρκεια των τελευταίων δεκαετιών πολυάριθμες μελέτες συσχετίζουν την ανίχνευση συγκεκριμένων μεταλλαγών του μιτοχονδριακού DNA (mtDNA) με ένα πλήθος σοβαρών παθολογικών καταστάσεων του ανθρώπου (DiMauro,2004; Mancuso et.al.,2007). Τέτοιου είδους μεταλλάξεις μπορούν να διακριθούν σε δύο κατηγορίες, α) τις μεταλλάξεις που επηρεάζουν την πρωτεϊνική σύνθεση των μιτοχονδρίων και β) τις μεταλλάξεις γονιδίων που κωδικοποιούν για 13 ενζυμικές υπομονάδες του αναπνευστικού συμπλόκου των μιτοχονδρίων (Zeviani and Di Donato,2004; Wong,2007). Οι περισσότερες μεταλλάξεις στα tRNA και rRNA γονίδια προκαλούν βλάβες στην πρωτεϊνική σύνθεση, επιφέροντας αρνητικές συνέπειες για τα σύμπλοκα της αναπνευστικής αλυσίδας. Ένα σημαντικό ποσοστό (>50%) αυτών των μεταλλάξεων εντοπίζεται στα tRNA γονίδια, γεγονός αξιοσημείωτο δεδομένου ότι η αλληλουχία των t-RNA καταλαμβάνει μόλις το 10% του μιτοχονδριακού γονιδιώματος (Zifa et al. 2007).

Οξειδωτικό στρες έχει επίσης ενοχοποιηθεί στην παθογένεση της σαρκοείδωσης. Η παραγωγή ελεύθερων ριζών όπως έχει ήδη περιγραφεί λαμβάνει χώρα στη μήτρα των μιτοχονδρίων, κατά την διαδικασία της μεταφοράς των ηλεκτρονίων, από τα ένζυμα της αναπνευστικής αλυσίδας. Σε φυσιολογικές καταστάσεις για να υπάρξει ισορροπία και να αποφευχθεί η παθολογική αύξηση του οξειδωτικού stress η

περίσσεια αυτή των ενδιάμεσων ελευθέρων ριζών εξουδετερώνεται τοπικά από τα ένζυμα (GSH, SOD, καταλάση) των ενδογενών μηχανισμών εξουδετέρωσης.

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

Σε προηγούμενη έρευνα του εργαστηρίου πραγματοποιήθηκε μελέτη για την ανίχνευση μεταλλάξεων στα t-RNA ασθενών με σαρκοείδωση, πρόκειται για μια αυτοάνοση διαταραχή του ανοσοποιητικού συστήματος που προκαλεί μη τυροειδοποιημένα κοκκιώματα σε ένα ή περισσότερα όργανα, ενώ έρευνες έχουν συσχετίσει τη νόσο με μιτοχονδριακές δυσλειτουργίες (Ichiro Mochizuki et.al 2011).

Έπειτα από την εύρεση μεταλλάξεων σε t-RNA σε ασθενείς με σαρκοείδωση, συνεχίσαμε την μελέτη με σκοπό την ανίχνευση μεταλλάξεων στα γονίδια των tRNA της βαλίνης και του γλουταμινικού οξέος. Από τις αναλύσεις SCCP για τα PCR products για τα γονίδια αυτά προέκυψαν κάποια διαφοροποιημένα πρότυπα όμως η στοίχιση των αλληλουχιών μέσω του αλγορίθμου Blast δεν εμφάνισε κάποιο πολυμορφισμό. Ακολούθως η εύρενά μας στράφηκε στη μελέτη της λειτουργικότητας της αναπνευστικής αλυσίδας των μιτοχονδρίων σε άτομα που φέρουν τη νόσο.

Συγκεκριμένα έγινε μία προσπάθεια εκτίμησης της ενζυμικής δραστηριότητας της οξειδοαναγωγής του ζεύγους NADH-Q (Complex I) της αναπνευστικής αλυσίδας των μιτοχονδρίων. Δυσλειτουργία στην δραστηριότητα του Complex I είναι πιθανόν η συχνότερη διαταραχή που εμφανίζεται ανάμεσα σε ένα πλήθος διαταραχών της αναπνευστικής αλυσίδας (Janssen RJ et al.2006). Για το λόγο αυτό είναι σημαντική η

εύρεση ενός πρωτοκόλλου που θα παρέχει έναν εύκολο και αξιόπιστο τρόπο αξιολόγησης της λειτουργικότητας του συμπλόκου I της αναπνευστικής αλυσίδας σε λεμφοκύτταρα ατόμων που πάσχουν από μιτοχονδριακή νόσο.

Στην συγκεκριμένη μελέτη έγινε φωτομετρικός προσδιορισμός της ενζυμικής δραστηριότητας του συμπλόκου I σε ομογενοποίηση λεμφοκυττάρων από 13 φυσιολογικούς δότες (Δ1-Δ13) που αποτέλεσαν τα controls και 4 ασθενείς με σαρκοείδωση (Π1-Π4). Το πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε βασίστηκε σε αυτό που κατασκεύασε ο L. Elly. A. de wit, 2009. Από το μικρό αριθμό δειγμάτων που αξιολογήθηκαν μπορούν μέχρι στιγμής να εξαχθούν λίγα συμπεράσματα.

Μετά την ομαδοποίηση των δειγμάτων με βάση το φύλο την ηλικία και την κατάσταση υγείας εκτελέστηκε ο στατιστικός έλεγχος Student's t-test με σκοπό να διαπιστωθεί αν οι διαφορές που παρατηρήθηκαν στη μέση τιμή της ενζυμικής δραστηριότητας του συμπλόκου I είναι στατιστικά σημαντικές. Η παρατηρηθείσα διαφορά μεταξύ των ανδρών και γυναικών (52,5 mU/mg και 44,75 mU/mg) δεν είναι στατιστικά σημαντική (P value 0,8>0,05). Μη στατιστικά σημαντική ήταν και η διαφορά μεταξύ νέων (<30 χρονών) και ηλικιωμένων (>70χρονών) (P value 0,3 >0,005). Από τα δύο παθολογικά δείγματα που εμφάνισαν ευαισθησία στη ροτενόνη παρατηρήθηκε μια οριακά στατιστικά σημαντική διαφορά στη μέση τιμή της ενζυμικής δραστηριότητας του συμπλόκου I σε σχέση με τη φυσιολογική (29,5 mU/mg έναντι 50,4 mU/mg). Η τιμή p value ήταν 0,0046 [(p < 0.05, στατιστικώς σημαντικό)]. Λόγω του μικρού αριθμού δειγμάτων δεν μπορούμε να οδηγηθούμε σε κάποιο συμπέρασμα ωστόσο η διαφορά αυτή μας προϊδεάζει για μία πιθανή οξειδοαναγωγική ανισορροπία. Ωστόσο πρέπει να εξεταστούν περισσότερα δείγματα ώστε να διεξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα και να διασαφηνιστεί ο ρόλος των μιτοχονδρίων στην παθογένεια της σαρκοείδωσης.

5.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Acin-Perez R, Fernandez-Silva P, Peleato ML, Perez-Martos A, Enriquez JA. 2008. Respiratory active mitochondrial supercomplexes. *Mol. Cell* 32:529–539
- Angela Koutsokera, Andriana I. Papaioannou, FoteiniMalli, Theodoros S. Kiropoulos, Alexandra Katsabeki, Theodora Kerenidi, Konstantinos I. Gourgoulianis, Zoe D. Daniil Systemic oxidative stress in patients with pulmonary sarcoidosis * Respiratory Medicine Department, University of Thessaly Medical School Address, University Hospital of Larissa, Larissa 41110, Greece.
- Aon MA, Cortassa S, O'Rourke B: Redox-optimized ROS balance: a unifying hypothesis. *Biochim Biophys Acta* 2010; 1797: 865-877.
- Balaban R. S., Nemoto S., Finkel T. Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell*. 2005;120:483–495.
- Bradford MM. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*.72:248-54.
- Brand MD, Pakay JL, Ocloo A, et al. The basal proton conductance of mitochondria depends on adenine nucleotide translocase content. *Biochem J* 2005; 392: 353-362.
- Brandt U. (2006). Energy converting NADH:quinone oxidoreductase (complex I). *Annu. Rev. Biochem.* 75: 69–92
- Bresnitz EA, Strom BL. Epidemiology of sarcoidosis. *Epidemiol Rev.* 1983;5:124-56.
- Carroll J., Fearnley I.M., Skehel J.M., Shannon R.J., Hirst J., Walker J.E. (2006). Bovine complex I is a complex of 45 different subunits. *J. Biol. Chem.* 281: 32724–32727
- Chen G, Goeddel DV (2002). TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. *Science* 296 (5573): 1634–5
- Chen J.Q., Brown T., Yager J.D., Mechanism of hormone carcinogenesis: revolution of views and role of mitochondria, (In, *Innovative Endocrinology of Cancer*, LevMBerstein and Ricard J Santen (edited) *Eurekah Bioscience Database*) (In press).
- Cohen GM. (1997). Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J*.326 (Pt 1):1-16.
- Dejean LM, Martinez-Caballero S, Manon S, Kinnally KW (February 2006). Regulation of the mitochondrial apoptosis-induced channel, MAC, by BCL-2 family proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1762 (2): 191–201
- Dennis R. Winge Sealing the Mitochondrial Respirasome *Mol Cell Biol.* 2012 Jul; 32(14): 2647–2652.
- DiMauro S, Shanske S, et al.(2004). Risk of developing a Mitochondrial DNA deletion disorder. *Lancet* 364, pp 592–96.
- Dirheimer, G. et al, (1995). Primary, secondary, and tertiary structures of tRNAs. In *tRNA: Structure, Biosynthesis, and Function* , American Society for Microbiology Press, pp. 93–126
- Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X. (2000). Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell*102(1):33-42.
- Duchen, M.R. (2004). Mitochondria in health and disease: perspectives on a new mitochondrial biology. *Mol Aspects Med*, pp. 365-451

- Edeas, M. Attaf, D. Mailfert, A.S. Nasu, M. & Joubet.R. (2010a). Maillard Reaction, mitochondria and oxidative stress: Potential role of antioxidants. *Pathologie Biologie*, pp. 220–225
- Elmore S, Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.* 2007 Jun;35(4):495-516
- Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A, Nagata S. (1998). A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature.* 391(6662):43-50.
- Ezquerro M, Campdelacreu J, Munoz E, Tolosa E, Marti MJ (2005). A novel intronic mutation in the DDP1 gene in a family with X-linked dystonia-deafness syndrome. *Arch Neurol*, 62, pp 306–08.
- Fesik SW, Shi Y. (2001). «Controlling the caspases». *Science* 294 (5546): 1477–8
- Filosto M, Mancuso M, Vives-Bauza C, et al. (2003). Lack of paternal inheritance of muscle mitochondrial DNA in sporadic mitochondrial myopathies. *Ann Neurol*, 54, pp 524–26.
- Formigli L, Pappuci L, Tani A, Schiavone N, Tempestini A, Orlandini GE, Capaccioli S, Orlandini SZ Aponecrosis: morphological and biochemical exploration of a syncretic process of cell death sharing apoptosis and necrosis. *J Cell Physiol* (2000) 182: 41-49
- G.A. Perkins, T.G. Frey (2000) Recent structural insight into mitochondria gained by microscopy. *Micron* 31, 97–111
- Garrido C, Galluzzi L, Brunet M, Puig PE, Didelot C, Kroemer G. (2006). Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria. *Cell Death Differ.* 13(9):1423-33.
- Gel Electrophoresis. Η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης (Available from: <http://wec4life.wikispaces.com/Gel+Electrophoresis>)
- Gellerich FN, Deschauer M, Chen Y, Muller T, Neudecker S, Zierz S. Functional impairment of mitochondria in skinned fibers of CPEO patients with single and multiple deletions of mt-DNA correlate with heteroplasmy. *Biochim Biophys Acta* 2002, 1556, pp. 41–52
- Helm.M, et al. (2000). Search for characteristic structural features of mammalian mitochondrial tRNAs. *RNA* 6, pp 1356–1379
- Henry R. Mahler, Rudolf A. The Evolutionary Origin of the Mitochondrion: A Nonsymbiotic Model *Raff International Review of Cytology Volume 43, 1976*
- Herr I., Gassler N., Friess H., Buchler M.W., Regulation of differential pro- and anti-apoptotic signaling by glucocorticoids, *Apoptosis* 12 (2007) 271–291.
- Holt IJ, Harding AE, Morgan-Hughes JA. (1988). Deletions of muscle mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathies. *Nature* 331, pp 717–19.
- Hsu H, Xiong J, Goeddel DV. (1995). The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation. *Cell* 81(4):495-504.
- Hunter DR, Haworth RA, Southard JH. Relationship between configuration, function, and permeability in calcium-treated mitochondria. *J Biol Chem* 1976; 251: 5069-5077.
- Hyer ML, Shi R, Krajewska M, Meyer C, Lebedeva IV, Fisher PB, Reed JC. Apoptotic activity and mechanism of 2-cyano-3,12-dioxoolean-1,9-dien-28-oic-acid and related synthetic triterpenoids in prostate cancer. *Cancer Res* 2008; 68:2927–2933
- Igney FH, Krammer PH. (2002). Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat. Rev. Cancer* 2(4):277-88.
- Jacobson MD. Reactive oxygen species and programmed cell death. *TIBS* 1996, 21:83–86

- Karlsson J. Introduction to Nutraology and Radical Formation. Illinois: Human Kinetics Press, 1997: p. 1-143.
- Kuznetsov, A. V. & Margreiter, R. (2009). Heterogeneity of mitochondria and mitochondrial function within cells as another level of mitochondrial complexity. *Int J Mol Sci*, pp. 1911-1929
- L. Elly. A. de Wit and Wim Sluiter Reliable Assay for Measuring Complex I Activity in Human Blood Lymphocytes and Skin Fibroblasts, (2009) *Methods in Enzymology*, Volume 456
- Larsson NG et al (1998). Mitochondrial transcription factor A is necessary for mtDNA maintenance and embryogenesis in mice. *Nature Genet* 18, pp. 231–236.
- Laurent M. Dejean, Sonia Martinez-Caballero, Kathleen W. Kinnally. Is MAC the knife that cuts cytochrome c from mitochondria during apoptosis?. (2006) *Cell Death and Differentiation* 13 (8): 1387–5.
- Lee, P. Y., Costumbrado, J., Hsu, C. Y., Kim, Y. H. (2012). Agarose Gel Electrophoresis for the separation of DNA fragments. *J Vis Exp*, 62(e3923): 1-5
- Lodish, Harvey; et al. (2004). *Molecular Cell Biology*. New York: W.H. Freeman and Company
- M W Gray and W F Doolittle, Has the endosymbiont hypothesis been proven? *Microbiol Rev*. 1982
- Mangiapan G, Hance AJ. Mycobacteria and sarcoidosis: an overview and summary of recent molecular biological data. *Sarcoidosis*. 1995 Mar;12(1):20-37.
- Margulis L. *Symbiosis in cell evolution*. New York: W.H. Freeman, (1981) 1993. 452 p.
- Martin-Hernandez E, Garcia-Silva MT, Vara J, Campos Y, Cabello A, Muley R, Del Hoyo P, Martin MA, Arenas J (2005). Renal pathology in children with mitochondrial diseases. *Pediatr Nephrol* 20, pp.1299-305.
- Murphy, 2009 How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J*. 2009 Jan 1;417(1):1-13.
- Nemoto S, Takeda K, Yu ZX, Ferrans VJ, Finkel T Role for mitochondrial oxidants as regulators of cellular metabolism *Mol Cell Biol*. 2000 Oct;20(19):7311-8.
- Newmeyer D.D and Ferguson-Miller, S (2003). Mitochondria: Releasing power for life and unleashing the machineries of death. *Cell* 112, pp. 481-490.
- O'Regan AW¹, Chupp GL, Lowry JA, Goetschkes M, Mulligan N, Berman JS. Osteopontin is associated with T cells in sarcoid granulomas and has T cell adhesive and cytokine-like properties in vitro. *J Immunol*. 1999 Jan 15;162(2):1024-31
- Pietinalho A, Hiraga Y, Hosoda Y, Lofroos AB, Yamaguchi M, Selroos O. The frequency of sarcoidosis in Finland and Hokkaido, Japan: a comparative epidemiological study. *Sarcoidosis* 1995;12:61-67
- Pinti M, Nasi M, Gibellini L, Roat E, De Biasi, S, Bertocelli, L. & Cossarizza A. (2010). The role of mitochondria in HIV infection and its treatment. *J Exp Clin Med*, pp. 145–155
- Pozzan, T, P. Magalhaes and R. Rizzuto. (2000). The comeback of mitochondria to calcium signaling. *Cell Calcium*. 28, pp.279–283
- Psathakis K, Papatheodorou G, Plataki M, Panagou P, Loukides S, Siafakas NM, et al. 8-Isoprostane, a marker of oxidative stress, is increased in the expired breath condensate of patients with pulmonary sarcoidosis. *Chest* 2004;125:1005–11.

- Rai NK, Tripathi K, Sharma D, Shukla VK. (2005). Apoptosis: a basic physiologic process in wound healing. *Int J Low Extrem Wounds*.4(3):138-44.
- Reichert AS, Neupert W (2002) Contact sites between the outer and inner membrane of mitochondria-role in protein transport. *Biochim Biophys Acta*. 2002 Sep 2;1592(1):41-9.`
- Robertson J.D., Orrenius S., Molecular mechanisms of apoptosis induced by cytotoxic chemicals, *Crit. Rev. Toxicol*. 30 (2000) 609–627
- Rolfe DS, Brown GC. Cellular energy utilization and molecular origin of standard metabolic rate in mammals.*Physiol Reviews* 1997; 77: 731-758.
- Rybicki BA, Major M, Popovich J Jr, Maliarik MJ, Iannuzzi MC. Racial differences in sarcoidosis incidence: a 5-year study in a health maintenance organization. *Am J Epidemiol* 1997;145:234-241
- Saelens X, Festjens N, Vande Walle L, van Gurp M, van Loo G, Vandenabeele P. (2004). Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene*23(16):2861-74.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K. B., Erlich, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239(4839): 487-491.
- Samartsev VN, Smirnov AV, Zeldi IP, Markova OV, Mok hova EN, Skulachev VP. Involvement of aspar tate/glutamate antiporter in fatty acid-induced uncou pling of liver mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1997; 1319: 251-257.
- Schapira AH (2006). Mitochondrial disease. *Lancet* 368, pp.70-82.
- Schreck R, Bauerle PA. Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of NF-kB transcription factor and HIV-1. *Trends Cell*
- Schurmann M, Reichel P, Muller-Myhsok B etal. Results from a genome-wide search for predisposing genes in sarcoiodosis. 2000; 162:755-8. 31.
- Schwartz M, Vissing J (2002). Paternal inheritance of mitochondrial DNA. *N Engl J Med* 347, pp 576–80
- Sciacco M, Bonilla E, Schon EA, DiMauro S, Moraes CT (1994). Distribution of wild-type and common deletion forms of mtDNA in normal and respiration-deficient muscle fibers from patients withvmitochondrial myopathy. *Hum Mol Genet* 3, pp.13–19.
- Servidei S (2004). Mitochondrial encephalomyopathies: gene mutation. *Neuromuscul Disord* 14, pp.107–16.
- Shadel gs, Clayton da (1997). Mitochondrial DNA maintenance in vertebrates. *Ann Rev Biochem* 66, pp.409-435
- Siltzbach LE, Greenberg GM: Childhood sarcoidosis: A study of 18 patients. *N Engl J Med* 1968; 279: 1239-1245
- Spierings D¹, McStay G, Saleh M, Bender C, Chipuk J, Maurer U, Green DR. Connected to death: the (unexpurgated) mitochondrial pathway of apoptosis. *Science*. 2005 Oct 7;310(5745):66-7.
- St John J, Sakkas D, Dimitriadi K, et al (2000). Failure of elimination of paternal mitochondrial DNA in abnormal embryos. *Lancet* 355, pp. 200.
- Storz G, Tartaglia LA, Ames BN. Transcriptional regulator of oxidative stress inducible genes: direct activation by oxidation. *Science* 1990; 248: 189-194

- Susin SA, Daugas E, Ravagnan L, Samejima K, Zamzami N, Loeffler M, Costantini P, Ferri KF, Irinopoulou T, Prévost MC, Brothers G, Mak TW, Penninger J, Earnshaw WC, Kroemer G.. (2000). Two distinct pathways leading to nuclear apoptosis. *J Exp Med.* 192(4):571-80.
- Sutovsky P, Moreno RD, Ramalho-Santos J, Dominko T, Simerly C, Schatten G. (1999). Ubiquitin tag for sperm mitochondria. *Nature* 402, pp.371–72.
- Szewczyk, A & Wojtczak L. (2002). Mitochondria as a pharmacological target. *Pharmacol Rev*, pp. 101–127
- Taanman JW, Muddle JR, Muntau AC (2003). Mitochondrial DNA depletion can be prevented by dGMP and dAMP supplementation in a resting culture of deoxyguanosine kinase-deficient fibroblasts. *Hum Mol Genet* 12, pp.1839–45
- Taylor, R. W and Turnbull, D. M. (2005). Mitochondrial DNA mutations in human disease. *Nat. Rev. Genet* 6, pp. 389 – 402.
- Temperley R., Richter, R, Dennerlein, S, Lightowlers, R. N. and Chrzanowska-Lightowlers, Z. M. (2010). "Hungry codons promote frameshifting in human mitochondrial ribosomes." *Science* 327, pp.301
- Thornberry N.A., Lazebnik Y., Caspases: enemies within, *Science* 281 (1998) 1312–1316.
- Van der Giezen, M and T. M. Lenton (2012). The rise of oxygen and complex life. *J. Euk. Microbiol* 59, pp.111-113.
- Verkhovskaya ML, Belevich N, Euro L, Wikström M & Verkhovsky MI (2008) Real-time electron transfer in respiratory complex I. *Proc Natl Acad Sci USA* 105(10): 3763–3767.
- Wajant H (2002). The Fas signaling pathway: more than a paradigm. *Science* 296 (5573): 1635–6.
- Waldbaum, S. & Patel, M. (2009). Mitochondria, oxidative stress, and temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res*, pp. 23-45
- Waldbaum, S. & Patel, M. (2009). Mitochondria, oxidative stress, and temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res*, pp. 23-45
- Wallace DC, Brown MD, Lott MT. (1999). Mitochondrial DNA variation in human evolution and disease. *Gene* 238, pp. 211–30.
- Watson, J. D., Caudy, A. A., Myers, R. M., Witkowski, J. A. (2007). *Recombinant DNA (Genes and Genomes – a short course)*. W. H. Freeman and Company, New York and Basingstoke, 3rd edition, pp. 103, 126-135.
- Wilson FH, Hariri A, Farhi A, et al (2004). A cluster of metabolic defects caused by mutation in a mitochondrial tRNA. *Science* 306, pp.1190–94.
- Zifa E, Giannouli S, Theotokis P, Stamatis C, Mamuris Z, Stathopoulos C (2007). Mitochondrial tRNA Mutations: clinical and functional perturbations. *RNA Biology* 4, pp.1,38-66. Department of Biochemistry and Biotechnology, University of Thessaly
- Zitvogel L, Tesniere A, Kroemer G. Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. *Nat Rev Immunol.* 2006 Oct;6(10):715-27. Epub 2006 Sep 15.
- Zoe D. Daniil, Evangelia Papageorgiou, Agela Koutsokera, Konstantinos Kostikas, Theodoros Kiroopoulos, Andriana I. Papaioannou, Konstantinos I. Gourgoulis. Department of Respiratory Medicine, University Hospital of Larissa, University of Thessaly, Larissa, Greece . Received 15 March 2006; received in revised form 27 June 2006; accepted 10 October 2006
- Μαρκουλάτος Π., Σημειώσεις Μοριακής Ογκογένεσης

- Πλαγεράς, Π., Γεροβασίλη, Α., Παπαϊωάννου, Α. (2012). Εφαρμογές Μοριακής Διαγνωστικής. Εκδόσεις Π. Χ. Πασχαλίδης , Broken Hill Publishers Ltd, pp. 185-194, 247-252, 254-256.