

# ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

## ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Εργαστήριο Γενετικής, Εξελικτικής και Συγκριτικής Βιολογίας

Εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας

*Μεταλλάξεις στα tRNA γονίδια του mtDNA και λειτουργία της  
αναπνευστικής αλυσίδας στη σαρκοείδωση*

*Mitochondrial tRNA mutations and activity of the respiratory chain in  
sarcoidosis*

*Πτυχιακή Εργασία*



Ευγένιος Μπουζέτος

Επιβλέπων Καθηγητής:

Αιμιλία Ζίφα

Λάρισα 2016

### **Η τριμελής επιτροπή:**

Αιμιλία Ζίφα, Επίκουρος Καθηγήτρια Βιολογίας και Νευροβιολογίας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Άννα Μαρία Ψαρρά, Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοχημείας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Δανιήλ Ζωή, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Πνευμονολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

### **Ευχαριστίες:**

Η συγκεκριμένη εργασία, πέρα των άλλων, αποτελεί προϊόν συνεργασίας και καλής θέλησης μεταξύ πολλών ατόμων μέσα και και έξω από το χώρο του εργαστηρίου.Γι' αυτό το λόγο θα ήθελα αρχικά να ευχαριστήσω τη κυρία Αιμιλία Ζίφα που μου προσέφερε την ευκαιρία να συμμετέχω και να εκπονήσω τη πτυχιακή μου εργασία σε ένα τόσο ενδιαφέρον και διδακτικό θέμα.Την κυρία Άννα Μαρία Ψαρρά για την καθοδήγηση και την επιστημονική της άποψη.Την κυρία Δανιήλ Ζωή για την συνεργασία της και την παροχή δειγμάτων.Ακόμη άξιοι ευχαριστιών είναι οι υποψήφιοι διδάκτορες Θέμης Γιαννούλης, Κωνσταντίνα Σαρρή, Ελένη Γαλιοπούλου, Βύρων Γοργογιέτας, Γεώργιος Στραβοδήμος που βοήθησαν στην εξοικίωση με το εργαστηριακό περιβάλλον. Ακόμη τον κύριο Κωνσταντίνο Σταμάτη για την επιστημονική του άποψη και την συνεργασία στην διάθεση αναλώσιμων.Τέλος ιδιαίτερες ευχαριστίες στη συνεργάτη και φίλη Μαρία Φούκα και στην Έλενα Παναγιωτίδου.

## **ABSTRACT:**

During the last decade a progressive accumulation of reports have occurred, which connects the detection of mt-tRNA mutations with human diseases. A similar research has taken place in the lab of Genetics, Evolutionary and Comparative Biology of the Department of the Biochemistry and Biotechnology and connected the disease of sarcoidosis with the existence of mt-tRNA mutations. Sarcoidosis is a polysystemic, inflammatory granulomatous disease and maybe the positive role of mitochondria in inflammation contributes to its manifestation and progression. In that current effort were searched the mt-tRNA genes of valine and glutamate ( MT-TV and MT-TE respectively ) for mutations. Moreover we looked for a possible association of the oxidoreductase of NADH-Q ( Complex I ) of the respiratory chain in the patients' blood lymphocytes. To achieve that goal we collected from the bibliography a quantitative spectrophotometric method for the activity of the NADH-Q oxidoreductase. The detection of a mutation in the MT-TE gene and the indication of a decreased activity of Complex I in the pathologic samples are optimistic signs for more research concerning the clarification of the mitochondrial role in the pathogenesis of sarcoidosis.

## Περίληψη:

Κατά την τελευταία δεκαετία έχει προκύψει μία προοδευτική συγκέντρωση αναφορών που συνδέουν τον εντοπισμό mt-tRNA μεταλλάξεων με ανθρώπινες παθήσεις. Μία παρόμοια έρευνα πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Γενετικής, Εξελικτικής και Συγκριτικής Βιολογίας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας στην οποία συσχετίστηκαν μεταλλάξεις στα mt-tRNA γονίδια με τη νόσο της σαρκοείδωσης. Η σαρκοείδωση είναι πολυσυστηματική κοκκιωματώδης, φλεγμονώδης νόσος και ο επαγωγικός χαρακτήρας των μιτοχondρίων στη φλεγμονή ίσως να συμβάλλει στην εκδήλωση και στην εξέλιξη της. Στην παρούσα έρευνα αναζητήθηκαν μεταλλάξεις στα mt-tRNA γονίδια της βαλίνης και του γλουταμικού οξέος ( MT-TV και MT-TE, αντίστοιχα). Ακόμη διερευνήθηκε η πιθανή συσχέτιση της δραστηριότητας της οξειδοαναγωγής του ζεύγους NADH-Q ( Σύμπλοκο I) της αναπνευστικής αλυσίδας με την νόσο της σαρκοείδωσης σε λεμφοκύτταρα του αίματος ασθενών. Για την επίτευξη του στόχου αναπτύχθηκε φασματοφωτομετρική μέθοδος ποσοτικοποίησης της δραστηριότητας του Συμπλόκου I σε λεμφοκύτταρα του αίματος. Ο εντοπισμός μετάλλαξης στο MT-TE γονίδιο και η ένδειξη μειωμένης δραστηριότητας του Συμπλόκου I στα παθολογικά δείγματα είναι ενθαρρυντικά σημάδια για την συνέχιση της ερευνητικής προσπάθειας για την διελεύκανση του μιτοχondριακού ρόλου στην παθολογία της σαρκοείδωσης.

# Περιεχόμενα

|   |    |
|---|----|
| Κεφάλαιο 1: Εισαγωγή.....   | 1  |
| 1.1 Σαρκοείδωση.....  | 1  |
| 1.2 Μιτοχόνδρια.....  | 13 |
| 1.3 Σκοπός.....   | 27 |
| <br>  |    |
| Κεφάλαιο 2: Υλικά και Μέθοδοι.....  | 31 |
| 2.1 Υλικά.....  | 31 |
| 2.1.1 Υλικά για τον εντοπισμό και την ταυτοποίηση<br>μεταλλάξεων.....   | 31 |
| 2.1.2 Υλικά για το σχεδιασμό αξιόπιστου πρωτοκόλλου μέτρησης της<br>οξειδοαναγωγής του ζεύγους NADH-Q.....  | 34 |
| 2.2 Μέθοδοι.....  | 38 |
| 2.2.1 Μέθοδος εντοπισμού και ταυτοποίησης μεταλλάξεων.....  | 38 |
| 2.2.2 Μέθοδοι σχεδιασμού αξιόπιστου πρωτοκόλλου μέτρησης<br>δραστικότητας της οξειδοαναγωγής του ζεύγους NADH-Q.....  | 41 |
| <br>  |    |
| Κεφάλαιο 3: Αποτελέσματα.....   | 51 |
| 3.1 Αποτελέσματα αναζήτησης και ταυτοποίησης μεταλλάξεων.....   | 51 |
| 3.2 Αποτελέσματα σχεδιασμού αξιόπιστου πρωτοκόλλου μέτρησης της<br>οξειδοαναγωγής του ζεύγους NADH-Q. Σύγκριση αποτελεσμάτων<br>φυσιολογικών και παθολογικών δειγμάτων..... | 54 |
| <br>  |    |
| Κεφάλαιο 4: Συμπεράσματα Συζήτηση.....  | 63 |

# 1.Εισαγωγή

## 1.1 Σαρκοείδωση

Η σαρκοείδωση είναι μία συστηματική φλεγμονώδης νόσος που μπορεί να προσβάλλει οποιοδήποτε όργανο, με συχνότερη εμφάνιση στους πνεύμονες σε ποσοστό ενενήντα τοις εκατό. Ετυμολογικά η λέξη σαρκοείδωση προέρχεται από τις λέξεις σάρκο- που σημαίνει σάρκα, είδος και το πρόθεμα -ώση που δείχνει σε μία κατάσταση. Ολόκληρη η λέξη αναφέρεται σε μία κατάσταση που μοιάζει με σάρκα αναφερόμενη στα σαρκοειδή εξανθήματα που συχνά παρατηρούνται.

### 1.1.1. Συμπτώματα

Τα συμπτώματα της νόσου είναι αντίστοιχα των προσβαλλόμενων οργάνων ενώ συχνά η νόσος είναι ασυμπτωματική. Γενικά συμπτώματα είναι η κόπωση, ο πυρετός, οι πρησμένοι λεμφαδένες και η απώλεια βάρους. Εάν έχουν προσβληθεί οι πνεύμονες ο ασθενής βιώνει επίμονο ξηρό βήχα, πόνο στο στήθος και μειωμένη αναπνοή. Μερικές φορές εμφανίζονται δερματικά συμπτώματα όπως κόκκινα εξανθήματα στη περιοχή της κνήμης και του αστραγγάλου, υποδερματικοί όζοι γύρω από σημεία τραυματισμού και τέλος σημεία δερματικού ερεθισμού στο πρόσωπο. Άλλες φορές η σαρκοείδωση προσβάλλει τους οφθαλμούς προκαλώντας ευαισθησία στο φως, θολή όραση και πόνο <sup>[1]</sup> <sup>[2]</sup>.

### 1.1.2. Επιδημιολογία

Η σαρκοείδωση εμφανίζεται με συχνότητα 16,5/100.000 και 19/100.000 σε άνδρες και γυναίκες αντίστοιχα στο γενικό πληθυσμό. Όμως επειδή πολλοί ασθενείς είναι ασυμπτωματικοί οι παρατηρούμενες συχνότητες μπορεί να είναι διαφορετικές από τις πραγματικές. Επιπλέον οι παρατηρούμενες συχνότητες εμφάνισης της σαρκοείδωσης διαφέρουν ανά εθνικότητα. Για

παράδειγμα στη Σουηδία παρατηρείται μία συχνότητα εμφάνισης 60/100.000,στην Ιρλανδία 40/100.000,στο Ηνωμένο Βασίλειο 20/100.000 και στη Πορτογαλία μόλις 0,2/100.000. Ακόμη στη Βόρειο Αμερική η σαρκοείδωση εμφανίζεται συχνότερα σε πληθυσμούς αφρικανικής καταγωγής σε σχέση με τους καυκάσιους πληθυσμούς (35,5/100.000 και 10,9/100.00 αντίστοιχα). Οι διαφορές στην εκδήλωση της νόσου σχετικά με το προσβαλλόμενο όργανο και την σοβαρότητα των συμπτωμάτων ανάμεσα σε φυλές και εθνικότητες υποδεικνύει κάποια γενετική συνιστώσα. Επίσης η νόσος εμφανίζει μία εποχιακή έξαρση κατά τους μήνες της άνοιξης. Για παράδειγμα το 70% των διαγνώσεων στην Ελλάδα γίνεται μεταξύ μήνα Μάρτιο και μήνα Μάιο και στην Ισπανία το 50% των διαγνώσεων μεταξύ μήνα Απρίλιο και μήνα Ιούνιο. Τέλος η νόσος εμφανίζει θνησιμότητα σε ποσοστό 5% [3].

### **1.1.3. Γενετικοί Παράγοντες**

Διαφορές στην εκδήλωση της νόσου σχετικά με το προσβαλλόμενο όργανο και την σοβαρότητα των συμπτωμάτων ανάμεσα σε φυλές και εθνικότητες υποδεικνύει κάποια γενετική συνιστώσα. Ακόμη μελέτη 61.662 ζευγών διδύμων του δανικού και φιλανδικού πληθυσμού έδειξε συμπτωτικότητα 0,148 και 0,012 σε μονοζυγωτικούς και διζυγωτικούς διδύμους αντίστοιχα [4]. Διαφορετικά αλληλόμορφα του γονιδίου HLA-DRB1 που εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 6 και κωδικοποιεί για την β-αλυσίδα του MHCII έχουν συσχετιστεί με τη ασθένεια. Το αλληλόμορφο DRB1 έχει τη πεντάπλασια έκφραση από τα DRB3, DRB4 και DRB5 που επίσης κωδικοποιούν για την β-αλυσίδα του MHCII γεγονός που υποδεικνύει τη σημαντικότητά του. Τα σαρκοείδο-σχετιζόμενα αλληλόμορφα είναι τα HLA-DRB1 1101,-0402,-1201 και -1501. Ακόμη συγκεκριμένα HLA-DRB1 αλληλόμορφα έχουν συσχετιστεί με την φαινοτυπική έκφραση της σαρκοείδωσης. Για παράδειγμα το DRB1-0401 σχετίζεται με την προσβολή των ματιών. Δίπλα από τα γονίδια του μείζονος συμπλόκου ιστοσυμβατότητας (MHC) υπάρχουν γονίδια που κωδικοποιούν για συν-διεγερτικά μόρια της ενεργοποίησης των T-λεμφοκυττάρων. Για παράδειγμα το γονίδιο της butyrophilin-like 2 (BTNL2) κωδικοποιεί για μία ανοσοσφαιρίνη που σχετίζεται με την προδιάθεση για σαρκοείδωση. Η φυσιολογική BTNL2 προσδέεται μέσω του καρβοξυτελικού της ακρού στις κυτταρικές μεμβράνες και συμβάλλει στην παρουσίαση του αντιγόνου και στην ενεργοποίηση των T-λεμφοκυττάρων. Η μετάλλαξη G-rs2076530-A εισάγει



μία θέση εναλλακτικού ματίσματος στο πρώιμο mRNA με αποτέλεσμα ύστερα από την ωρίμανση να προκύπτει ένα πρώιμο κωδικόνιο λήξης. Έτσι η μεταλλαγμένη πρωτεΐνη λείπει στο απαραίτητο καρβοξυτελικό ακρό που καθοδηγεί για την πρόσδεση στην κυτταρική μεμβράνη [3].

#### **1.1.4 Παθοφυσιολογία**

Κύριο χαρακτηριστικό της σαρκοείδωσης είναι τα μη νεκρωτικά κοκκιώματα. Ένας οργανισμός δημιουργεί κοκκιώματα όταν δεν μπορεί να εξουδετερώσει ένα αντιγόνο. Έτσι γύρω από το αντιγόνο συσσωρεύονται κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος. Το κοκκίωμα μοιάζει με όγκο και στο κέντρο του υπάρχουν ενεργοποιημένα μακροφάγα κύτταρα τα οποία συντήκονται σχηματίζοντας γιγαντιαία πολυπύρρηνα κύτταρα. Αυτά περιβάλλονται από μεγάλα τροποποιημένα μακροφάγα τα οποία μοιάζουν με επιθηλιακά κύτταρα και γι' αυτό ονομαζονται επιθηλιοειδή κύτταρα. Γύρω από το κοκκίωμα εμφανίζονται ενεργοποιημένα Τ-λεμφοκύτταρα. Τα ενεργοποιημένα μακροφάγα τελικά απελευθερώνουν διάφορα υδρολυτικά ένζυμα και ενεργές ρίζες οξυγόνου με σκοπό την εξουδετέρωση του αντιγόνου αλλά στη περίπτωση χρόνιας φλεγμονής προκαλείται βλάβη στους περιβάλλοντες ιστούς [5].

#### **1.1.5. Αιτιολογία**

Η σαρκοείδωση θεωρείται νόσος άγνωστης αιτιολογίας. Όμως επιδημιολογικές μελέτες και ομοιότητες με κάποιες μολυσματικές νόσους υποδεικνύουν ότι η σαρκοείδωση μπορεί να πυροδοτείται από περιβαλλοντικούς παράγοντες ή/και από μολυσματικούς οργανισμούς. Περιβαλλοντικοί παράγοντες μπορεί να είναι η σκόνη, το ταλκ, η γύρη κ.α. Για παράδειγμα υπήρξε μία αύξηση στα περιστατικά σαρκοείδωσης στο πυροσβεστικό σώμα της Νέας Υόρκης μετά το τρομοκρατικό χτύπημα το 2001 (14/100.000 πριν, 86/100.000 μετά). Σαν πιθανό αντιγόνο μολυσματικού παράγοντα έχει ταυτοποιηθεί η πρωτεΐνη καταλάση-περοξειδάση του βακτηρίου *Mycobacterium tuberculosis* [5].

### 1.1.6 Μηχανισμός Παθογένεσης

Στις περιπτώσεις οξείας σαρκοείδωσης τα κυψελιδικά μακροφάγα του πνεύμονα ενδοκυτταρώνουν το αντιγόνο και το παρουσιάζουν μέσω του συμπλόκου μείζονος ιστοσυμβατότητας II (MHC II). Παρακείμενα Th1-CD4 βοηθητικά T-λεμφοκύτταρα αλληλεπιδρούν με το σύμπλεγμα αντιγόνου-MHC II, ενεργοποιούνται και εκκρίνουν κυτταροκίνες. Οι εκκρινόμενες κυτταροκίνες παίζουν ενεργό ρόλο στην επαγωγή της ανοσολογικής απόκρισης ενεργοποιώντας επιπλέον μακροφάγα, Tc-λεμφοκύτταρα και B-λεμφοκύτταρα. Τα ενεργοποιημένα μακροφάγα απελευθερώνουν χημειοκίνες όπως CXCL10, IL-12, IL-18 με αποτέλεσμα να προσελκύουν επιπλέον Th1-λεμφοκύτταρα. Έτσι επιτυγχάνεται τελικά μία οξεία ανοσοποιητική αντίδραση με συνέπεια το αντιγόνο γύρω από το οποίο έχει σχηματιστεί το κοκκίωμα να εξουδετερώνεται. Τελικά απελευθερώνεται από τα μακροφάγα, τα επιθηλιοειδή κύτταρα ή/και από τα ίδια τα κύτταρα του κοκκιώματος ο αυξητικός παράγοντας TGF-β που επάγει την απενεργοποίηση των T-λεμφοκυττάρων. Έτσι στις περισσότερες περιπτώσεις το κοκκίωμα αποσυντίθεται τελείως ή αφήνει μία μικρή ουλή. Στη χρόνια σαρκοείδωση ο μηχανισμός είναι ίδιος με τη διαφορά πως τα μεταγωγικά σήματα CXCL10, IL-12, IL-18 που παράγονται από τα ενεργοποιημένα μακροφάγα είναι ασθενέστερα με αποτέλεσμα να επάγεται μία ασθενέστερη ανοσολογική απόκριση που δεν επαρκεί για την εξουδετέρωση του αντιγόνου και επομένως το κοκκίωμα να παραμένει [3].

### 1.1.7. Διάγνωση

Τα συμπτώματα της σαρκοείδωσης μπορεί να είναι περίεργα και άτυπα, γι' αυτό και συχνά η διάγνωση καθυστερεί σημαντικά [6]. Η διάγνωση καθυστερεί περισσότερο όταν η σαρκοείδωση παρουσιάζεται με πνευμονικές εκδηλώσεις και λιγότερο, με δερματικές αλλοιώσεις [6]. Παράγοντες απαραίτητοι για την διάγνωση είναι οι συμβατές με την νόσο κλινικο-ακτινολογικές εκδηλώσεις, η ιστολογική απόδειξη μη ρευστοποιιών επιθηλιοειδών κοκκιωμάτων και ο αποκλεισμός παρόμοιων νοσημάτων υποδυόμενων σαρκοείδωση [7]. Οι προσθοπίσθιες απλές ακτινογραφίες του θώρακα είναι απαραίτητες για την σταδιοποίηση της νόσου. Στις περισσότερες περιπτώσεις συνιστάται διαβρογχική βιοψία του πνεύμονα, αν και η βιοψία μπορεί να γίνει και σε εύκολα προσπελάσιμες δερματικές αλλοιώσεις ή περιφερικούς

ψηλαφητούς λεμφαδένες. Εάν η βιοψία είναι αρνητική ή αδύνατη, η διάγνωση μπορεί να γίνει με βάση ορισμένα ευρήματα, τα οποία όμως στερούνται ειδικότητας <sup>[7]</sup>:

- αύξηση της σχέσης cd4/cd8 τ-λεμφοκυττάρων >3.5 στο BAL
- εικόνα τύπου «panda» και «λάμδα» στο σπινθηρογράφημα με γάλλιο.
- αύξηση των επιπέδων του ACE >2πλάσιο των φυσιολογικών τιμών, αν και η μέτρηση των επιπέδων του ACE χρησιμεύει περισσότερο σαν δείκτης δραστηριότητας της νόσου, παρά για διαγνωστικούς λόγους.

### **1.1.8. Θεραπεία**

Σκοπός της θεραπείας είναι η πρόληψη ή ελαχιστοποίηση της δραστηριότητας της νόσου (δηλ. της φλεγμονής και της δημιουργίας κοκκιωμάτων), η οποία οδηγεί σε δυσλειτουργία και τελικώς μη αναστρέψιμη καταστροφή των οργάνων - στόχων μέσω ανάπτυξης υάλινης ίνωσης. Επειδή η νόσος υφίσταται αυτόματα στο 50% περίπου των ασθενών και οι μόνιμες διαταραχές της λειτουργίας των οργάνων συνήθως δεν ανταποκρίνονται στα κορτικοειδή, θεραπευτικά κριτήρια της σαρκοείδωσης δεν έχουν καθιερωθεί, γι' αυτό και η θεραπεία είναι μόνο συμπτωματική και υποστηρικτική.

**Κορτικοειδή:** Τα συστηματικά χορηγούμενα κορτικοειδή είναι η βάση της θεραπείας των συμπτωματικών παιδιών με σοβαρή πολυσυστηματική νόσο <sup>[8]</sup>. Η οφθαλμική προσβολή ανταποκρίνεται συνήθως στα τοπικά ή συστηματικά κορτικοειδή. Στην πνευμονική σαρκοείδωση, τα εισπνεόμενα κορτικοειδή μπορεί να επαρκούν για θεραπεία συντήρησης <sup>[9]</sup>.

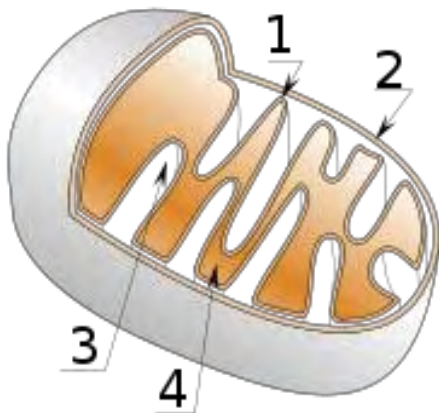
**Μεθοτρεξάτη:** Στους ενήλικες και τα παιδιά με σαρκοείδωση μη ανταποκρινόμενη ή επιπλεκόμενη με σοβαρές ανεπιθύμητες ενέργειες στα κορτικοειδή, είναι αποτελεσματική, ασφαλής, μειώνει τα επίπεδα της ΤΚΕ και της ACE και βοηθά στη μείωση της δόσης των κορτικοειδών <sup>[10]</sup>.

## 1.2. Μιτοχόνδρια

Ο όρος μιτοχόνδριο προέρχεται από τις λέξεις μίτος που σημαίνει νήμα και τη λέξη χονδρίον που σημαίνει κόκκος. Είναι διπλομεμβρανικά ημιαυτόνομα οργανίδια που εντοπίζονται σε όλους του ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Έχουν διάμετρο μεταξύ 0,75μm και 3,5μm. Παίζουν σημαντικό ρόλο στην ενεργειακή παροχή του κυττάρου, στα ενδοκυτταρικά επίπεδα ασβεστίου και στην ρύθμιση της απόπτωσης.

### 1.2.1. Δομή

Τα μιτοχόνδρια περιβάλλονται από δύο μεμβράνες, ενδιάμεσα της εξωτερικής και της εσωτερικής μεμβράνης βρίσκεται ο διαμεμβρανικός χώρος. Η εσωτερική μεμβράνη δημιουργεί αναδιπλώσεις που λέγονται cristae και ο χώρος εσωτερικά της μεμβράνης λέγεται μήτρα. Η μορφολογία των μιτοχονδρίων εξαρτάται από τον οργανισμό, το κυτταρικό τύπο και την μεταβολική κατάσταση.



Εικόνα 1. Τα μεμβρανικά διαμερίσματα του μιτοχονδρίου. 1: Εσωτερική μεμβράνη, 2: Εξωτερική μεμβράνη, 3: Αναδιπλώσεις, 4: Μήτρα

### 1.2.2. 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 εγκολλώθηκαν) σε πρώτο-ευκαρυωτικά κύτταρα <sup>[11]</sup>. 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. 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. 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 βακτηρική προέλευση των μιτοχονδρίων αποτελεί ο τρόπος αναπαραγωγής τους, μέσω αύξησης και διαίρεσης προυπαρχόντων 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 <sup>[12]</sup>. 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 εγκολλώσεις 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 φυλλογενετικές 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 <sup>[13]</sup>. Τα ευκαρυωτικά κύτταρα θα πρέπει έτσι να εξετάζονται ως γενετικές χίμαιρες οι οποίες προέκυψαν από τη συσσωμάτωση διαφορετικών οργανισμών .

### **1.2.3. Μιτοχονδριακό Γονιδίωμα**

Τα μιτοχόνδρια είναι ημιαυτόνομα οργανίδια που περιέχουν το δικό τους γενετικό υλικό το οποίο έχει τη μορφή κυκλικού, δίκλωνου DNA και βρίσκεται στη μήτρα. Το ανθρώπινο μιτοχονδριακό DNA έχει μήκος 16.569 bp και κωδικοποιεί για 37 γονίδια. Οι συμπληρωματικοί κλώνοι διαφοροποιούνται ανάλογα με το νουκλεοτιδικό τους περιεχόμενο, δηλαδή ο γουανίνη-πλούσιος κλώνος αναφέρεται ως βαρύς (H-κλώνος) και ο κυτοσίνη-πλούσιος κλώνος ως ελαφρύς (L-κλώνος). Ο L-κλώνος κωδικοποιεί για 28 γονίδια και ο H-κλώνος για 9 γονίδια, για το σύνολο των 37 γονιδίων <sup>[14]</sup>. Δεκατρία από τα γονίδια του μιτοχονδριακού γονιδιώματος κωδικοποιούν για υπομονάδες των ενζύμων της αναπνευστικής αλυσίδας, εικοσι-δύο γονίδια κωδικοποιούν για μόρια μεταφορικού RNA (tRNA) και δύο γονίδια για μόρια ριβοσωμικού RNA (12S rRNA και 16S rRNA). Οι πρωτεΐνες της μεταγραφής, της αντιγραφής και οι υπόλοιπες ριβοσωμικές πρωτεΐνες κωδικοποιούνται από το γενετικό υλικό του πυρήνα.

Το μιτοχονδριακό DNA (mtDNA) αντιγράφεται με ημισυντηρητικό τρόπο καθ' όλη τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου. Ένα μιτοχόνδριο μπορεί να φέρει 2-10 αντίγραφα του γενετικού του υλικού και δεν υπάρχει αυστηρά ελεγχόμενος τρόπος διαχωρισμού τους κατά τη σύνθεση νέων μιτοχονδρίων. Επιπλέον τα μιτοχόνδρια κατανέμονται με τυχαίο τρόπο στα

θυγατρικά κύτταρα μετά το πέρας της μίτωσης. Έτσι σε περίπτωση μιτοχονδριακής μεταλλαξιγένεσης μπορεί να προκύψουν είτε κύτταρα που φέρουν ομογενή πληθυσμό μιτοχονδρίων οπότε βρίσκονται σε κατάσταση ομοπλασμίας είτε κύτταρα με ετερογενή πληθυσμό μιτοχονδρίων και άρα βρίσκονται σε κατάσταση ετεροπλασμίας.

#### **1.2.4. Μεταφορά Πρωτεϊνών**

Όπως ήδη αναφέρθηκε πολλές πρωτεΐνες που είναι απαραίτητες για την εύρυθμη λειτουργία του μιτοχονδρίου κωδικοποιούνται από το πυρήνα, επομένως χρειάζεται ένα σύστημα καθόδηγησης και μεταφοράς αυτών των πρωτεϊνικών μορίων στα μιτοχόνδρια. Εξαιτίας της διπλομεμβρανικής φύσης των μιτοχονδρίων η εισαγωγή πρωτεϊνών στα μιτοχόνδρια είναι πολύπλοκη διότι μπορεί να προορίζονται για διαφορετικά μεμβρανικά διαμερίσματα.

Οι περισσότερες πρωτεΐνες της μητράς στοχοποιούνται για ενδομητρική μεταφορά μέσω ενδομοριακών αλληλουχιών-οδηγών στο αμινοτελικό άκρο οι οποίες αφαιρούνται με πρωτεόλυση ύστερα από την ολοκλήρωση της μεταφοράς. Οι αλληλουχίες-οδηγοί προσδέονται σε έναν υποδοχέα στην επιφάνεια της εξωτερικής μεμβράνης του μιτοχονδρίου που ονομάζεται σύμπλοκο Tom ( σύμπλοκο τρανσλοκάσης της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης ). Το σύμπλοκο Tom σχηματίζει πόρο και οι προσδεδωμένες πρωτεΐνες εισέρχονται στο διαμεμβρανικό χώρο. Ύστερα προσδέονται στο σύμπλοκο Tim ( σύμπλοκο τρανσλοκάσης της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης και εισέρχονται στη μήτρα. Η είσοδος της πρωτεΐνης στη μήτρα προωθείται από το ηλεκτροχημικό δυναμικό που δημιουργείται από την αναπνευστική αλυσίδα. Τα ένζυμα της αναπνευστικής αλυσίδας προωθούν πρωτόνια από τη μήτρα προς το διαμεμβρανικό χώρο. Έτσι λόγω των θετικά φορτισμένων αμινοξέων της αλληλουχίας-οδηγού το ηλεκτροχημικό δυναμικό συμβάλλει στη μεταφορά των πρωτεϊνών.

Για τη μετατόπιση των πρωτεϊνών διαμέσω των μιτοχονδριακών μεμβρανών απαιτείται η μερική ξεδίπλωσή τους. Στο κυτοδ/μα οι πρωτεΐνες διατηρούνται σε μερικώς ξεδιπλωμένη μορφή από μοριακούς συνοδούς Hsp70. Αφού βρεθούν στο διαμεμβρανικό χώρο και

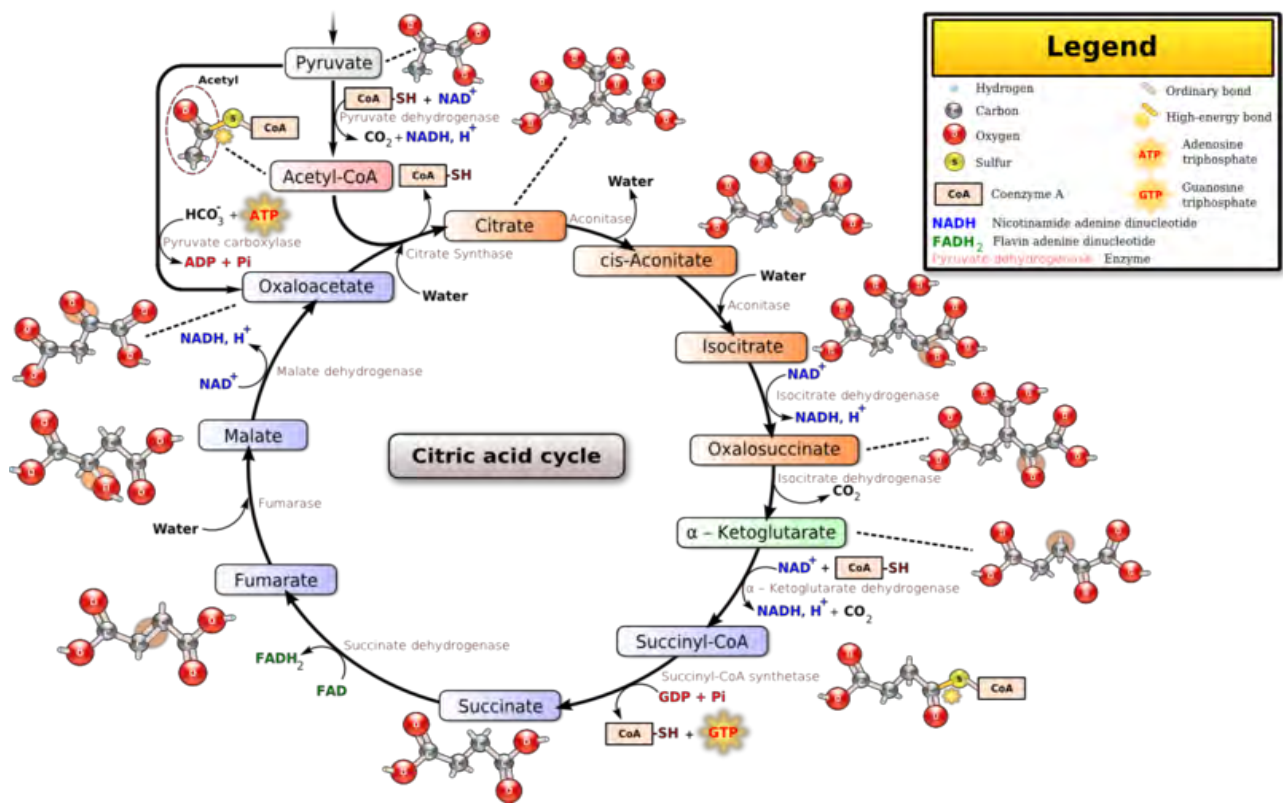
προσδεθούν στο σύμπλοκο Tim μία άλλη μοριακός συνοδός Hsp70, που είναι επίσης προσδεμένη σύμπλοκο Tim, από τη πλευρά της μήτρας, προωθεί την εισαγωγή των πρωτεϊνών υδρολύοντας ATP. Ύστερα η αλληλουχία-οδηγός πέπτει συνήθως από μία πεπτιδάση του σήματος του μιτοχονδρίου (MPP) και η πρωτεΐνη αποκτά την σωστή αναδίπλωση με τη συμβολή των μοριακών συνοδών Hsp70 και Hsp60.

Οι μιτοχονδριακές πρωτεΐνες που προορίζονται για την εξωτερική μεμβράνη, την εσωτερική μεμβράνη ή τον διαμεμβρανικό χώρο διαθέτουν και άλλες εσωτερικές αλληλουχίες σήματος πέρα από την αλληλουχία-οδηγό. Στις πρωτεΐνες που προορίζονται για την εξωτερική μεμβράνη διακόπτεται η μεταφορά τους μέσω του συμπλόκου Tom και εξέρχονται από αυτό πλευρικά για να ενσωματωθούν στη μεμβράνη. Κάποιες από τις πρωτεΐνες που προορίζονται για ο διαμεμβρανικό χώρο αφού διασχίσουν την εξωτερική μεμβράνη αναγνωρίζονται από κυστεϊνο-ειδικούς μοριακούς συνοδούς που εμποδίζουν την αλληλεπίδρασή τους με το σύμπλοκο Tim. Οι πρωτεΐνες της εσωτερικής μεμβράνης εισέρχονται πρώτα στη μήτρα όπου γίνεται η πέψη της αλληλουχίας-οδηγού. Έτσι δημιουργείται ένα δεύτερο σήμα διαλογής στο αμινοτελικό άκρο το οποίο αναγνωρίζεται από το τρανσλοκόνιο Oxa1 μέσω του οποίου οι πρωτεΐνες μεταφέρονται είτε στην εσωτερική μεμβράνη είτε στον διαμεμβρανικό χώρο <sup>[15]</sup>.

#### **1.2.5. Παροχή Ενέργειας: Κύκλος του Τρικαρβωλικού Οξέος και Οξειδωτική Φωσφορυλίωση <sup>[16]</sup>.**

Η οξείδωση της γλυκόζης μέσω της διαδικασίας της γλυκόλυσης αποδίδει δύο μόρια πυροσταφυλικού οξέος τα οποία εισέρχονται στη μήτρα των μιτοχονδρίων. Το πυροσταφυλικό καταβολίζεται, με τη ταυτόχρονη αναγωγή του NAD<sup>+</sup> σε NADH, σε ακετυλο-CoA το οποίο εισέρχεται στο κύκλο του κιτρικού οξέος (Εικόνα 2). Έτσι από μία ακετυλική ομάδα παράγονται τρία μόρια NADH και ένα μόριο FADH<sub>2</sub>. Επιπλέον αποβάλλονται δύο άτομα άνθρακα σε μορφή CO<sub>2</sub>.





Εικόνα 2. Ο κύκλος του τρικαρβολικού οξέος.

Η ενέργεια που βρίσκεται πλέον δεσμευμένη στα μόρια NADH και FADH<sub>2</sub> γίνεται εκμεταλέυσιμη από τα τέσσερα ένζυμα της αναπνευστικής αλυσίδας που βρίσκονται στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη και την μετατρέπουν σε ηλεκτροχημικό δυναμικό εκατέρωθεν της εσωτερικής μεμβράνης των μιτοχονδρίων και τελικά αποθηκεύεται σε μόρια τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP) μέσω της δράσης της F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> ATP συνθάσης (Εικόνα 3).

1) Οξειδοαναγωγή του ζεύγους NADH-Q (Σύμπλοκο I):

Έχει σχήμα L και περιέχει μία υδρόφοβη περιοχή εμβαπτισμένη στην εσωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου και μία υδρόφιλη περιοχή που προβάλλει προς τη μήτρα. Είναι ένα πελώριο ένζυμο μεγέθους σχεδόν 1MDA και αποτελείται από 45

υπομονάδες. Περιέχει μία προσθετική ομάδα φλαβινο-μονονουκλεοτιδίου (FMN) και δύο είδη συμπλόκων σιδήρου-θείου (Fe-S): 2Fe-2S,4Fe-4S. Τα σύμπλοκα σιδήρου θείου αποτελούνται από ένα ιόν σιδήρου  $Fe^{2+}$  ή  $Fe^{3+}$  συνδεδεμένο με άτομα θείου κυστεϊνικών καταλοίπων. Επιπλέον διαθέτει μία θέση πρόσδεση ουβικουινόνης (Q).

2) Σύμπλοκο της αναγωγής του ζεύγους ηλεκτρικού οξέος-Q (Σύμπλοκο II):

Αποτελείται από τέσσερις υπομονάδες: δύο υδρόφιλες και δύο υδρόφοβες. Οι υδρόφοβες υπομονάδες είναι εμβαπτισμένες στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη και οι υδρόφιλες προβάλλουν προς τη μήτρα. Η SdhA υδρόφιλη υπομονάδα περιέχει μία προσθετική ομάδα φλαβινο-αδενινο-δινουκλεοτιδίου(FAD) και μία θέση πρόσδεσης ηλεκτρικού οξέος. Η SdhB υδρόφιλη υπομονάδα περιέχει τρία σύμπλοκα Fe-S (2Fe-2S,4Fe-2S,3Fe-4S). Οι υδρόφοβες υπομονάδες SdhC και SdhD έχουν λειτουργία αγκυροβόλησης στην μεμβράνη. Τέλος οι υπομονάδες SdhB,SdhC,SdhD σχηματίζουν μαζί θέση πρόσδεσης για την ουβικουινόνη.

3) Οξειδοαναγωγή του ζεύγους Q-κυτοχρώματος C (Σύμπλοκο III):

Είναι ένα διμερές ένζυμο με το κάθε μονομερές να αποτελείται από έντεκα υπομονάδες. Περιέχει τρεις προσθετικές ομάδες αίμης και ένα σύμπλοκο 2Fe-2S που διεκπεραιώνουν τις αντιδράσεις μεταφοράς ηλεκτρονίων.

4) Οξειδάση του Κυτοχρώματος c (Σύμπλοκο IV):

Αποτελείται από δεκατρείς υπομονάδες από τις οποίες οι τρεις (I,II,III) κωδικοποιούνται από το mtDNA. Περιέχει δύο ομάδες αίμης και τρία ιόντα χαλκού. Δύο από τα μόρια αίμης λέγονται αίμη α και αίμη α3 και δύο από τα ιόντα χαλκού σχηματίζουν το σύμπλοκο CuA/CuA συνδεδεμένα με δύο κατάλοιπα κυστεΐνης. Το ιόν CuB σχηματίζει σύμπλοκο με τρία κατάλοιπα ιστιδίνης. Τέλος το ιόν CuB και η αίμη α3 αποτελούν ενεργό κέντρο για την αναγωγή του μοριακού οξυγόνου σε δύο μόρια νερού.

5)  $F_0F_1$  ATP συνθάση (Σύμπλοκο V):

Αποτελείται από δύο επικράτειες:

α)  $F_0$ : Είναι εμβαπτισμένη στην μεμβράνη

β)  $F_1$ : Προβάλλει στη μήτρα και έχει τη δραστικότητα της ATP-συνθάσης.

Η  $F_1$  αποτελείται από πέντε τύπους πολυπεπτιδικών αλυσίδων σε στοιχειομετρία  $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$ . Οι υπομονάδες  $\alpha$  και  $\beta$  είναι εναλλάξ, κυκλικά τοποθετημένες σχηματίζοντας έναν εξαμερή δακτύλιο. Η  $F_0$  είναι υδρόφοβη και διαμεμβρανική. Αποτελεί το διαύλο εισόδου των πρωτονίων από το διαμεμβρανικό χώρο πίσω στη μήτρα και σχηματίζεται από δέκα με δεκατέσσερις πολυπεπτιδικές αλυσίδες  $c$ . Μια αλυσίδα  $a$  βρίσκεται συνδεδεμένη εξωτερικά του διαύλου. Οι  $F_0$  και  $F_1$  επικράτειες συνδέονται μέσω του κεντρικού μίσχου που σχηματίζεται από  $\gamma$  και  $\epsilon$  πολυπεπτιδικές αλυσίδες και μέσω της εξωτερικής στήλης που σχηματίζεται από  $a$ ,  $2\beta$  και  $\gamma$  αλυσίδες.

Το πρώτο βήμα στην αναπνευστική αλυσίδα είναι η πρόσδεση  $NADH$  στην προσθετική ομάδα  $FMN$  του Συμπλόκου I. Δύο ηλεκτρόνια μεταφέρονται από το  $NADH$  στην ομάδα  $FMN$  η οποία ανάγεται σε  $FMNH_2$ . Ύστερα τα ηλεκτρόνια μεταφέρονται εσωτερικά του ενζύμου διαμέσω των συμπλόκων  $Fe-S$ . Τελικά τα ηλεκτρόνια μεταφέρονται στο συνένζυμο  $Q$ , ένα μόριο ουβικουινόνης. Η ροή των ηλεκτρονίων μέσα στο Σύμπλοκο I προκαλεί στερεοδιαμορφωτικές αλλαγές με αποτέλεσμα την άντληση τεσσάρων πρωτονίων από τη μήτρα στο διαμεμβρανικό χώρο. Το Σύμπλοκο II παίζει ρόλο και στο κύκλο του κιτρικού οξέος. Οξειδώνει το ηλεκτρικό οξύ σε φουμαρικό οξύ με τη ταυτόχρονη αναγωγή του  $FAD$  σε  $FADH_2$ . Στη συνέχεια τα ηλεκτρόνια μεταφέρονται από το  $FADH_2$  στο συνένζυμο  $Q$  το οποίο ανάγεται σε  $QH_2$ .

Το συνένζυμο  $Q$  είναι μία ουβικουινόνη, ένα λιποδιαλυτό μόριο που διαχέεται ελεύθερα στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων. Η πλήρης ανηγμένη μορφή ( $QH_2$ ) λέγεται ουβικουινόλη. Η ουβικουινόλη προσδένεται στο Σύμπλοκο III στη θέση  $Q_o$ . Από εκεί το ένα ηλεκτρόνιο μεταφέρεται στο κυτόχρωμα  $c$  και το άλλο σε ένα άλλο μόριο

οξειδωμένης ουβικουινόνης, ταυτόχρονα τα δύο πρωτόνια που φέρει το μόριο της ουβικουινόλης απελευθερώνονται στο διαμεμβρανικό χώρο. Έτσι προκύπτει μία ρίζα ημικινόνης, δηλαδή μία μερικώς ανηγμένη ουβικουινόνη. Μόλις ακολουθήσει το επόμενο μόριο ουβικουινόλης την ίδια διαδικασία η ρίζα ημικινόνης ανάγεται πλήρως και αντλεί δύο πρωτόνια από τη μήτρα. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται κύκλος Q και συμβάλλει σημαντικά στη δημιουργία του ηλεκτροχημικού δυναμικού βάσει της βαθμίδωσης της συγκέντρωσης πρωτονίων εκατέρωθεν της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης. Στη συνέχεια το Σύμπλοκο IV οξειδώνει το κυτόχρωμα c και μεταφέρει το ζεύγος ηλεκτρονίων σε μοριακό οξυγόνο με αποτέλεσμα το σχηματισμό δύο μορίων νερού. Η μεταφορά γίνεται μέσω των ομάδων αίμης και των ιόντων χαλκού. Τα πρωτόνια που χρησιμοποιούνται για το σχηματισμό του νερού προέρχονται από τη μήτρα και επιπλέον το Σύμπλοκο IV αντλεί τέσσερα πρωτόνια από τη μήτρα στο διαμεμβρανικό χώρο. Έτσι και το Σύμπλοκο IV συνεισφέρει στην ηλεκτροχημική βαθμίδωση. Τέλος υπάρχουν περιπτώσεις που το οξυγόνο ανάγεται μερικώς με μονάχα ένα ηλεκτρόνιο με αποτέλεσμα το σχηματισμό ενεργών ριζών οξυγόνου. Τελικά για κάθε μόριο NADH μεταφέρονται δέκα πρωτόνια στο διαμεμβρανικό χώρο.

Η  $F_0F_1$  ATP συνθάση εκμεταλλεύεται την ηλεκτροχημική βαθμίδωση των πρωτονίων για την σύνθεση ATP. Η ATP συνθάση καταλύει την αντίδραση  $ADP + P_i = ATP + H_2O$ . Στην ουσία όμως πειράματα έδειξαν ότι η ATP συντίθεται και απουσία ηλεκτροχημικού δυναμικού και πως τελικά ο ρόλος της βαθμίδωσης στη συγκέντρωση των πρωτονίων είναι η απελευθέρωση της ATP από το ένζυμο.

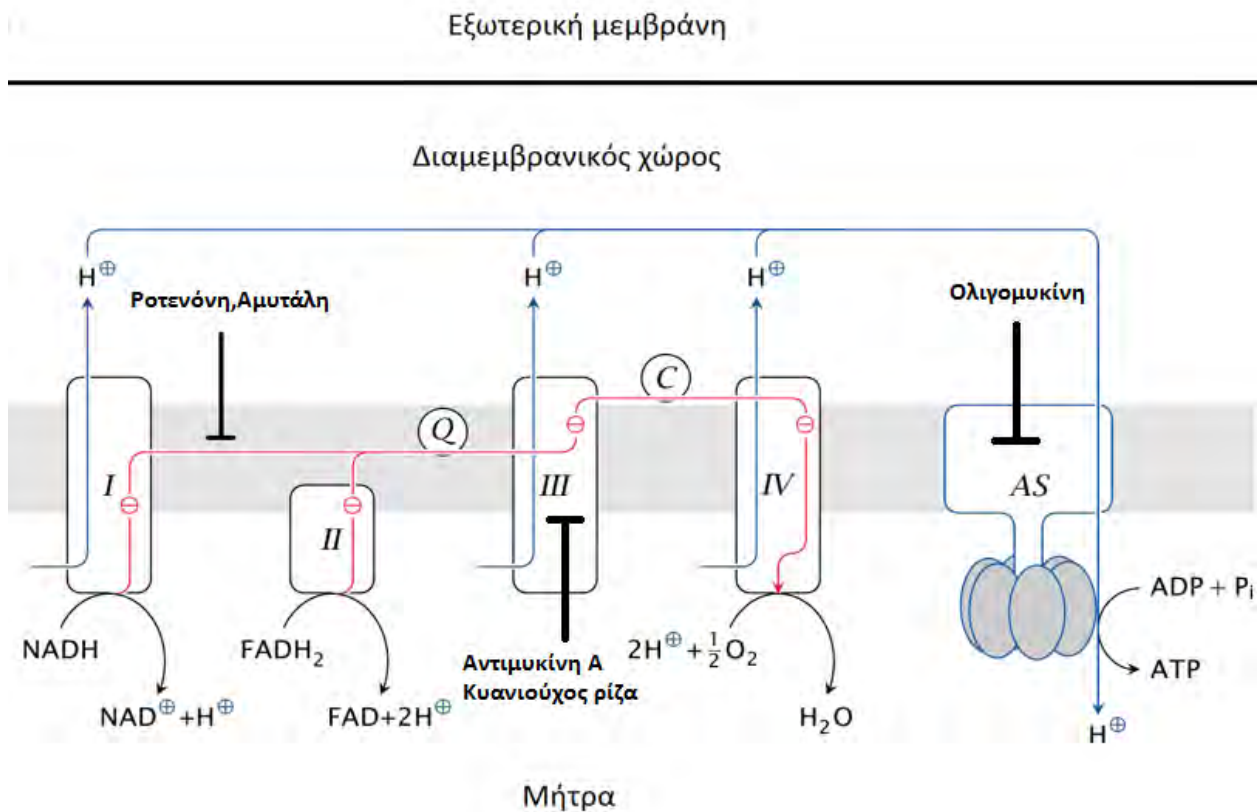
#### **1.2.6. Αναστολείς της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης**

Η οξειδωτική φωσφορυλίωση είναι επιδεκτικής αναστολής σε όλα τα στάδια. Η ροτενόνη και η αμυτάλη παρεμποδίζουν τη μεταφορά ηλεκτρονίων στο Σύμπλοκο I. Η αντιμυκίνη A και η κυανουούχα ρίζα ( $CN^-$ ) εμποδίζουν την ροή ηλεκτρονίων στο Σύμπλοκο III. Η αναστολή της αναπνευστικής αλυσίδας παρεμποδίζει την σύνθεση ATP διότι δεν

παράγεται πλέον πρωτονιοκινητική δύναμη. Τέλος η ATP συνθάση αναστέλλεται από την ολιγομυκίνη [16].

### 1.2.7. Παραγωγή Θερμότητας

Η εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων διαθέτει πρωτεΐνες αποσύζευξης (UCP) ή θερμογενίνες. Οι θερμογενίνες επιτρέπουν την ροή πρωτονίων από το διαμεμβρανικό χώρο πίσω στη μήτρα χωρίς την απελευθέρωση ATP με αποτέλεσμα η διαθέσιμη ενέργεια να μετατρέπεται σε θερμότητα [16].



Εικόνα 3. Αναπνευστική αλυσίδα και σημεία αναστολής.

### 1.2.8. Μιτοχόνδρια και Ενδοκυτταρική Συγκέντρωση Ασβεστίου

Τα μιτοχόνδρια βρίσκονται σε συνεχή επικοινωνία με το κυτταρόπλασμα ώστε να συγχρονίζονται η ζήτηση με τη προσφορά της ενέργειας. Το κύριο ρυθμιστικό σήμα είναι το ασβέστιο. Η κυτταροπλασματική αύξηση της συγκέντρωσης του ασβεστίου διαχέεται στη μήτρα μέσω ειδικού μιτοχονδριακού καναλιού ασβεστίου. Η αύξηση της ενδομητρικής συγκέντρωσης ασβεστίου ενεργοποιεί τα καθοριστικά ένζυμα του κύκλου του τρικαρβωλικού οξέος: αφυδρογονάση του πυροσταφυλικού οξέος, αφυδρογονάση του ισοκιτρικού οξέος και αφυδρογονάση του α-κετογλουταρικού οξέος. Επιπλέον η αυξημένη ενδομιτοχονδριακή συγκέντρωση ασβεστίου ρυθμίζει θετικά την δραστικότητα της ATP συνθάσης. Έτσι δημιουργείται αυξημένη διαθεσιμότητα NADH και FADH<sub>2</sub>, αυξάνεται η δραστηριότητα της αναπνευστικής αλυσίδας και επομένως οι ρυθμοί σχηματισμού της ATP. Η εκροή του ασβεστίου από τα μιτοχόνδρια γίνεται τελικά μέσω ενός ανταλλάκτη Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> [17].

### 1.2.9. Μιτοχόνδριο και Απόπτωση

Στα κύτταρα των θηλαστικών τα σήματα κυτταρικού θανάτου που επάγουν την απόπτωση εμπλέκουν τα μιτοχόνδρια. Το κυτόχρωμα c επάγει την απόπτωση όταν απελευθερώνεται από τα μιτοχόνδρια. Αφού απελευθερωθεί προσδένεται στη πρωτεΐνη Araf-1. Το σύμπλοκο Araf-1/κυτόχρωμα c σταθεροποιείται περαιτέρω με την πρόσδεση ATP και τελικά ολιγομερόζεται σχηματίζοντας το αποπτώσωμα. Το αποπτώσωμα στρατολογεί την εναρκτήρια προκασπάση-1 η οποία ενεργοποιείται και πέπτει την εκτελεστική κασπάση 3 που τελικά επάγει τον κυτταρικό θάνατο.

Σημαντικό ρόλο στη σηματοδότηση της απόπτωσης παίζουν οι πρωτεΐνες της οικογένειας Bcl-2. Χαρακτηρίζονται από την παρουσία τεσσάρων ομόλογων περιοχών (BH1, BH2, BH3, BH4). Τα μέλη που έχουν και τους τέσσερις τύπους των ομόλογων περιοχών έχουν αντιαποπτωτικό χαρακτήρα ενώ εκείνα τα μέλη που λείπουν έστω και σε ένα τύπο ομόλογης περιοχής έχουν προαποπτωτική δράση. Οι προαποπτωτικές πρωτεΐνες BAX/BAK σχηματίζουν ολιγομερή στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη δημιουργώντας ένα κανάλι

μέσω του οποίου εξέρχεται στο κυτόχρωμα c. Η ενεργοποίηση των BAX/BAK γίνεται από BH3-μόνο πρωτεΐνες των οποίων η δράση διεγείρεται από επαγωγικά σήματα του κυτταρικού θανάτου όπως οι βλάβες στο DNA. Οι BH3-μόνο πρωτεΐνες μπορούν να ενεργοποιούν άμεσα τις BAX/BAK ή/και έμμεσα ανταγωνιζόμενες αντιαποπτωτικές πρωτεΐνες όπως οι Bcl-2 και Bcl-xL [17] [18].

### **1.2.10. Μιτοχόνδρια και Φλεγμονή [19]**

Όπως προηγουμένως αποσαφηνίστηκε η σαρκοείδωση είναι μια φλεγμονώδης νόσος. Διαχρονικά οξείες αλλά και χρόνιες φλεγμονώδεις παθήσεις έχουν συσχετιστεί με υπερβολική παραγωγή ενεργών ριζών οξυγόνου (ROS). Τα μιτοχόνδρια αποτελούν την κύρια πηγή παραγωγής ενεργών ριζών οξυγόνου. Υπό φυσιολογικές συνθήκες 1-3% του μοριακού οξυγόνου ανάγεται μερικώς σε σουπεροξειδίο ( $O_2^-$ ) μέσω της αναπνευστικής αλυσίδας ενώ υπό παθολογικές συνθήκες παρατηρείται αύξηση στα επίπεδα των ενεργών ριζών οξυγόνου. Η περίσσεια ενεργών ριζών οξυγόνου προκαλεί οξειδωτική ζημιά σε λιπίδια, πρωτεΐνες και γενετικό υλικό. Μάλιστα τα μιτοχόνδρια είναι πολύ πιο δεκτικά στην ROS-εξαρτώμενη βλάβη λόγω της εγκύτητας στο σημείο παραγωγής των ενεργών ριζών οξυγόνου και της απουσίας προστατευτικών ιστονών στο mtDNA. Όταν τα μιτοχόνδρια εκτίθενται σε οξειδωτικές βλάβες επηρεάζεται η λειτουργικότητα της αναπνευστικής αλυσίδας με αποτέλεσμα την περαιτέρω παραγωγή σουπεροξειδίου.

Ένα θεωρητικό μοντέλο προτείνει το ρόλο των μιτοχονδρίων στην φλεγμονή μέσω της υπερβολικής παραγωγής ενεργών ριζών οξυγόνου με δύο μηχανισμούς:

A) Οξειδοαναγωγικά ευαίσθητο φλεγμονικό μονοπάτι:

Οι ενεργές ρίζες οξυγόνου ενεργοποιούν τον μεταγραφικό παράγοντα Nk-Fβ που επάγει την έκφραση προφλεγμονικών κυτταροκινών. Πειραματικά έχει δειχθεί ότι η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία αυξάνει τη δεκτικότητα κυττάρων ποικίλων τύπων στην κυτταροκινο-επαγόμενη φλεγμονή προκαλώντας φλεγμονική απόκριση μέσω της παραγωγής ενεργών ριζών οξυγόνου και ενεργοποίηση του Nk-Fβ. Ακόμη σε ινοβλάστες που προκλήθηκε μιτοχονδριακή

δυσλειτουργία με εφαρμογή ολιγομυκίνης παρατηρήθηκε δεκαπλάσια συγκέντρωση IL-1β κυτταροκίνης. Τέλος έχει αναφερθεί αυξημένη ευαισθησία στον Nk-Fβ σε περιβάλλον μιτοχονδριακής δυσλειτουργίας.

#### B) Ενεργοποίηση Φλεγμονοσώματος:

Το φλεγμονόσωμα είναι ένα ετεροολιγομερές σύμπλοκο και ανήκει στους μηχανισμούς της επίκτητης ανοσίας. Το ενεργοποιημένο φλεγμονόσωμα ρυθμίζει θετικά την κασπάση-1 που πέπτει και ενεργοποιεί τις κυτοκίνες IL-1β και IL-18. Το φλεγμονόσωμα έχει ιδιότητες υποδοχέα αναγνώρισης μοτίβων (PRR), δηλαδή αναγνωρίζει παθογόνο-σχετιζόμενα μοριακά μοτίβα (RAMPs) ή μοριακά μοτίβα που σχετίζονται με βλάβη (DAMPs).

Αυξημένα επίπεδα ενεργών ριζών οξυγόνου συμβάλλουν στην ενεργοποίηση του φλεγμονοσώματος και επομένως η χημική εξουδετέρωσή τους παρεμποδίζει την ενεργοποίησή του (Tschopp, 2011). Αρχικά υπήρχε η υπόθεση ότι τα ROS-ενεργοποιητικά προέρχονται από την NADPH-οξειδάση των φαγοκυττάρων. Όμως σε παθολογικά δείγματα χρόνιας κοκκιωματικής νόσου στα οποία είναι ελαττωματική η δραστηριότητα της NADPH οξειδάσης υπήρχαν φυσιολογικά επίπεδα κασπάσης-1 και IL-1β (Meissner et al., 2010 ; van Bruggen et al., 2010 ; van de Veerdonk et al., 2010). Έτσι προκύπτει η υπόθεση μία εναλλακτικής πηγής ενεργών ριζών οξυγόνου, ρόλο που κάλλιστα τα μιτοχόνδρια θα μπορούσαν να αναλάβουν.

#### 1.2.11. Μεταλλάξεις στα Μιτοχονδριακά tRNA

Το μιτοχονδριακό γονιδίωμα είναι 10 με 17 φορές επιδεκτικότερο στη μεταλλαξιγένεση σε σχέση με το πυρηνικό γονιδίωμα, εξαιτίας της εγκύτητας στο σημείο παραγωγής ενεργών ριζών οξυγόνου, την έλλειψη προστατευτικών ιστονών και επιδιορθωτικών μηχανισμών. Επιπλέον η ανισοροπία στην μιτοχονδριακή νουκλεοτιδική δεξαμενή αυξάνει τη πιθανότητα λάθους ζευγαρώματος κατά την αντιγραφή, σε καρδιακούς και σκελετικούς μύες το dGTP αποτελούσε το 85%-91% στη συνολική νουκλεοτιδική δεξαμενή <sup>[20]</sup>. Περισσότερες από τις μισές μεταλλάξεις στο mt-DNA εντοπίζονται σε γονίδια μεταφορικού RNA. Ακόμη τρία tRNA γονίδια (tRNA<sup>Leu(UUR)</sup>, tRNA<sup>(Lys)</sup>, tRNA<sup>(k)</sup>) συγκεντρώνουν τις μισές από τις γνωστές παθογόνες μεταλλάξεις.



Παρ' όλα αυτά μόνο σε ένα ποσοστό του 20% των ταυτοποιημένων μεταλλάξεων που έχουν συσχετιστεί με παθογένειες, έχει αποδείχθει η παθογόνος δράση τους. Τέλος υπάρχει σχεδόν πλήρης απουσία μεταλλάξεων στις τριπλέτες του αντικωδικονίου με εξαίρεση τρεις περιπτώσεις (T12298C,G15990A.G611A). Είναι μία εξηγήσιμη παρατήρηση αναλογιζόμενοι το θεμελιώδες ρόλο που κατέχουν τα συγκεκριμένα νουκλεοτίδια <sup>[21]</sup>.

Τα βιοχημικά μονοπάτια που σχετίζονται με τις tRNA-παθογένειες αφορούν ενεργειακές δυσλειτουργίες όπως χαμηλή κυτταρική αναπνοή, χαμηλότερη δραστικότητα της αναπνευστικής αλυσίδας και χαμηλότερα επίπεδα σύνθεσης ATP. Αυτές οι ανωμαλίες συνδέονται με απορύθμιση της μιτοχονδριακής μετάφρασης των συμπλόκων της αναπνευστικής αλυσίδας. Μάλιστα έντονη μείωση στο ρυθμό της σύνθεσης πρωτεϊνών στα μιτοχόνδρια έχει παρατηρηθεί σε διάφορα κυτταρικά μοντέλα παρουσία διάφορων μεταλλάξεων <sup>[21]</sup>. Όμως η μείωση στην μιτοχονδριακή πρωτεϊνοσύνθεση δεν εξηγεί την μειωμένη αναπνευστική δραστηριότητα διότι η πρωτεϊνοσύνθεση δεν φαίνεται να παραλληλίζεται με την ενζυμική δραστικότητα. Βέβαια υπάρχουν και εξαιρέσεις mt-tRNA μεταλλάξεων που δεν επηρεάζουν την μιτοχονδριακή μετάφραση υποδεικνύοντας εναλλακτικούς ή πρόσθετους μηχανισμούς που συσχετίζουν μία tRNA-μετάλλαξη με ένα φαινότυπο.

Μελέτες σε κυτταρικό και μοριακό επίπεδο έχουν δείξει ότι οι πολλαπλές και περίπλοκες συνέπειες των tRNA-μεταλλάξεων μπορεί να οφείλονται σε αποσταθεροποίηση της δομής του μεταφορικού μορίου RNA. Μία σημειακή μετάλλαξη είτε επηρεάζει τοπικά τη δομή του μορίου είτε έχει γενικότερες συνέπειες διαταράσσοντας συνδέσεις που σταθεροποιούν την δευτεροταγή και τη τεταρτοταγή δομή. Για παράδειγμα οι μεταλλάξεις T4285C, G4298A, A4317G (tRNA<sup>Ile</sup>) προκαλούν γενικευμένη δομική ευαισθησία ενώ οι μετάλλαξη G7497A (tRNA<sup>Ser(UCN)</sup>) μόνο ήπιες δομικές διαταραχές. Αναλόγως τα δομικά τους χαρακτηριστικά τα tRNA μόρια αναγνωρίζονται από πρωτεϊνικούς συνεργάτες του μεταφραστικού μηχανισμού και εισέρχονται στις ενεργές θέσεις στα ριβοσώματα. Όταν οι μεταλλάξεις επηρεάζουν σημαντικά στοιχεία της αρχιτεκτονικής του μορίου προκύπτουν βλαβερές συνέπειες στην αλληλεπίδραση με άλλα βιομόρια. Ακόμη τα πρώιμα tRNA υφίστανται ενδονουκλεοτιδική πέψη στο 5'- και 3'- άκρο και προσθήκη τριπλέτας CCA στο νέο 3'-άκρο. Η CCA τριπλέτα είναι απαραίτητη για την ωρίμανση του tRNA και για την αμινοακυλίωση. Αρκετές σημειακές μεταλλάξεις επηρεάζουν τα

δύο στάδια ωρίμανσης προκαλώντας μειωμένα επίπεδα έκφρασης ώριμου tRNA. Για παράδειγμα η μετάλλαξη A4317G επηρεάζει τη τρισδιάστατη δομή του tRNA<sup>Ile</sup> με αποτέλεσμα την δυσκολία αναγνώρισης από τα CCA-προσθετικά ένζυμα. Ύστερα από τη σύνθεση ενός tRNA άλλες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις είναι υπεύθυνες για τον εξοπλισμό των μορίων σε τελικά προϊόντα. Αυτές οι τροποποιήσεις σταθεροποιούν τη δομή ή/και παρέχουν αναγνωριστικά σήματα για πρωτεϊνικούς συνεργάτες όπως οι αμινοάκυλο-συνθετάσες. Για παράδειγμα μειωμένη μεθυλίωση στο tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> προκαλείται από τη μετάλλαξη A3243G. Η μειωμένη σταθερότητα ενός tRNA μορίου, όπως της προηγούμενης περίπτωσης, μπορεί να οδηγήσει στη ταχύτερη αποικοδόμηση ή μειωμένη χωριτικότητα αμινοακυλίωσης [21]. Συμπερασματικά οι mt-tRNA μεταλλάξεις

Για την εκδήλωση ενός κλινικού φαινοτύπου σημαντικό ρόλο παίζει το επίπεδο ετεροπλασμίας ανάμεσα στα κύτταρα. Δηλαδή στη περίπτωση παρουσίας μίας παθόγονου μετάλλαξης η αναλογία στα μεταλλαγμένα μόρια επηρεάζει αντίστοιχα και τη σοβαρότητα του βιοχημικού ελαττώματος. Ένας κλινικός φαινότυπος θα εκδηλωθεί όταν η αναλογία μεταλλαγμένου/φυσιολογικού DNA ξεπεράσει ένα συγκεκριμένο κατώφλι. Για παράδειγμα εάν το φορτίο μετάλλαξης του tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> A3243G είναι μικρότερο του 60% θα εκδηλωθεί μητρικά κληνομήσιμη μορφή προοδευτικής εξωτερικής οφθαλμοπληγίας. Εάν το φορτίο μετάλλαξης είναι μεγαλύτερο του 80% θα εκδηλωθεί σύνδρομο MELAS [21].

Οι παθογένειες που παίρνουν μιτοχονδριακό πρόσημο διαχωρίζονται ανάλογα με τη σχέση αιτίου-αποτελέσματος που έχει η μιτοχονδριακή δισλειτουργία στην παθογένεση της νόσου:

A)Κλασσικά μιτοχονδριακά νοσήματα:

Για παράδειγμα η μιτοχονδριακή οπτική νευροπάθεια του Leber προκαλείται από τις μεταλλάξεις: G11778A, G3460A, T14484C. Οι θέσεις αυτές βρίσκονται σε γονίδια που κωδικοποιούν για υπομονάδες του Συμπλόκου I.

B)Κλινικά σύνδρομα με υψηλή πιθανότητα μιτοχονδριακής ανάμειξης:

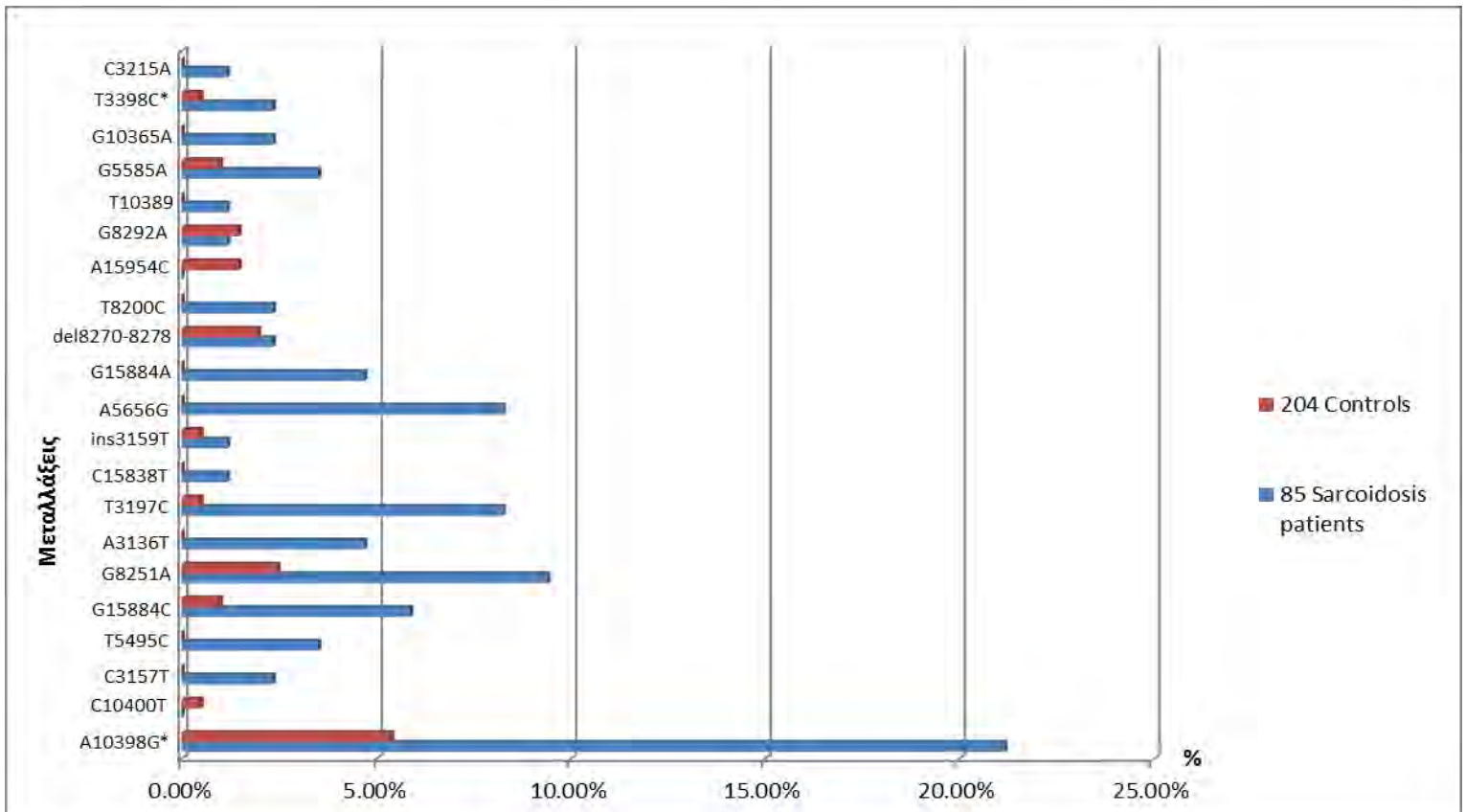
Π.χ. ραβδομύωση

Γ) Παθογόνοι φαινότυποι στους οποίους συνεισφέρουν μιτοχονδριακές μεταλλάξεις:

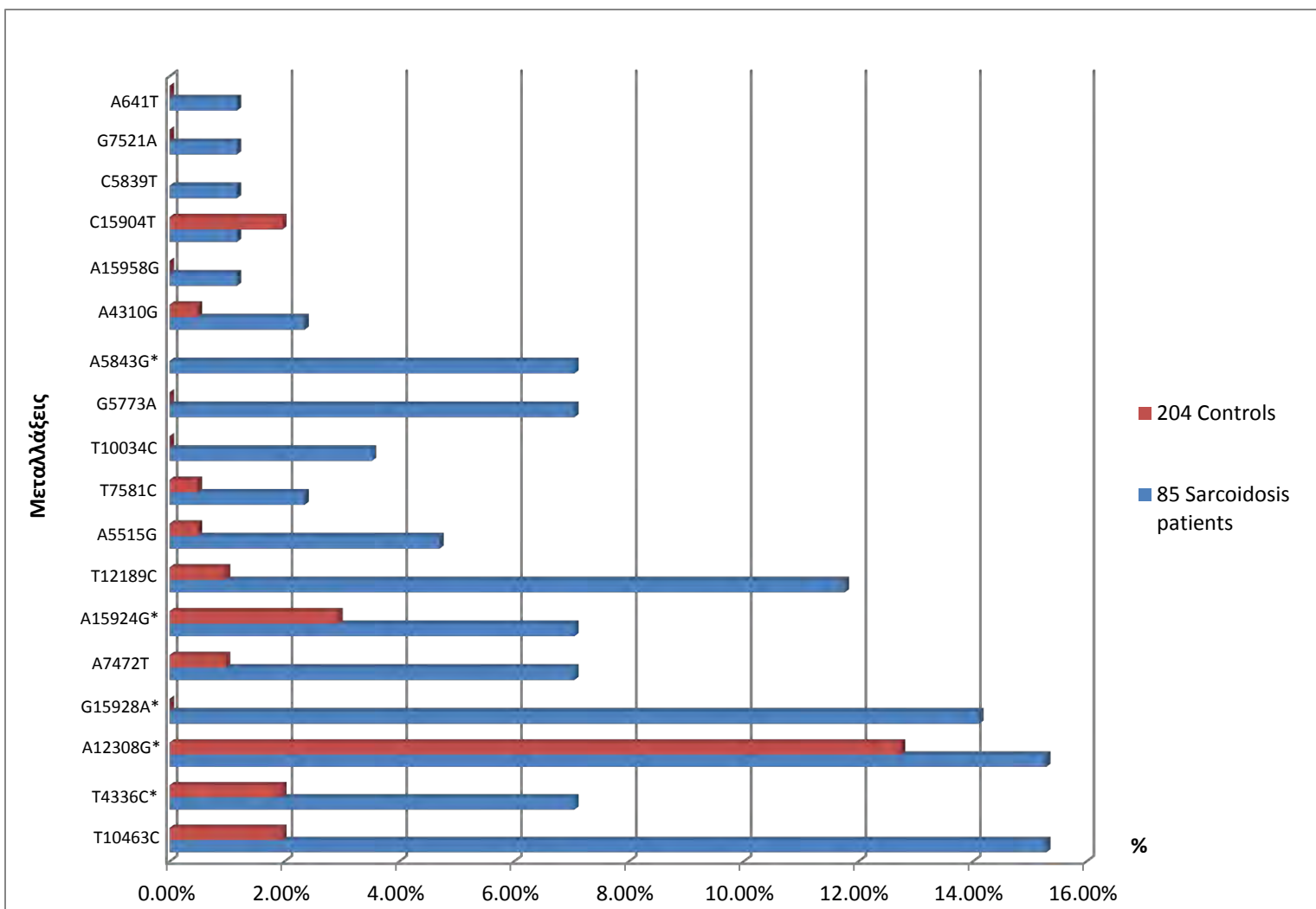
Π.χ Νόσος του Alzheimer και νόσος του Parkinson.

### 1.3. Σκοπός

Ένας από τους σκοπούς της σύγχρονης ερευνητικής δραστηριότητας του εργαστηρίου μας είναι η συσχέτιση της μιτοχονδριακής λειτουργικότητας με την παθοφυσιολογία και την παθογένεση της σαρκοείδωσης. Γι' αυτό πραγματοποιήθηκε ανάλυση για τον εντοπισμό και την ταυτοποίηση μεταλλάξεων στα μιτοχονδριακά tRNA-γονίδια (tRNA-Gln, tRNA-Leu<sup>(CUN)</sup>, tRNA-Thr, tRNA-Arg, tRNA-His, tRNA-Thr, tRNA-Ser<sup>(CUN)</sup>, tRNA-Ile, tRNA-Trp, tRNA-Gly, tRNA-Cys, tRNA-Tyr, tRNA-Phe, tRNA-Asp) και στις παρακείμενες περιοχές τους. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στα διαγράμματα 1,2 αντίστοιχα και στο πίνακα 1 αναφέρονται ποιες από τις μεταλλάξεις σχετίζονται με ποιες παθογόνες καταστάσεις.



Διάγραμμα 1. Συχνότητες μεταλλάξεων στα mt-tRNA γονίδια σε φυσιολογικά και παθολογικά δείγματα.

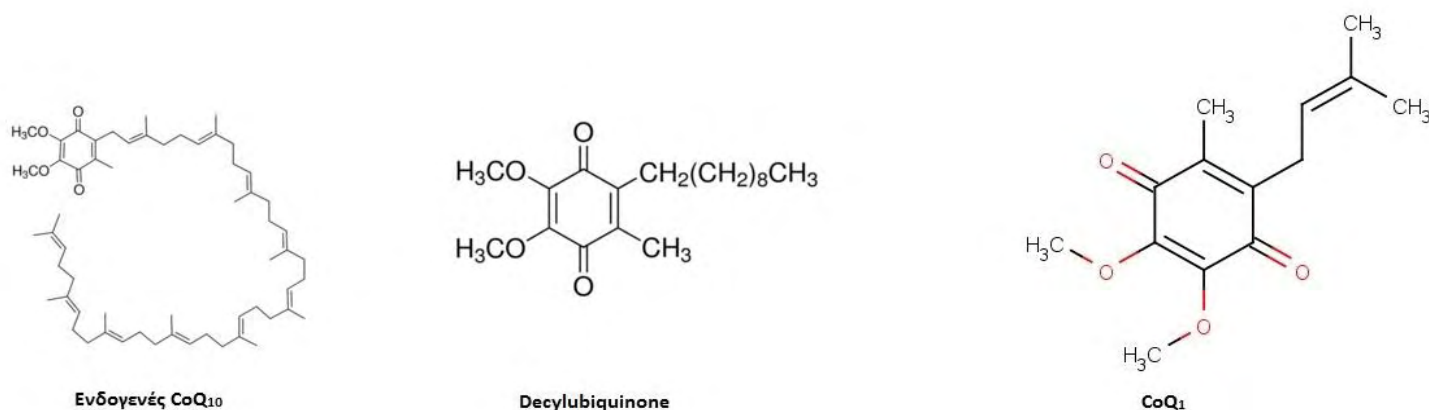


Διάγραμμα 2. Συχνότητες μεταλλάξεων στις παρακείμενες περιοχές των mt-tRNA γονιδίων σε φυσιολογικά και παθολογικά δείγματα.

| Μεταλλάξεις                       | Συσχετιζόμενες Παθολογένειες                      |
|-----------------------------------|---|
| tRNA-Gln T4336C                   | ADPD, απώλεια μαλλιών, ημικρανία                  |
| tRNA-Leu <sup>(CUN)</sup> A12308G | Καρκίνος μαστού, προστάτη, νεφρών                 |
| tRNA-Thr G15928A                  | Πολλαπλή σκλήρωση                                 |
| tRNA-Thr A15924G                  | Θανατηφόρα βρεφική μιτοχονδριακή μυοπάθεια (LIMM) |
| tRNA-Tyr A5843G                   | Μιτοχονδριακή κυτοπάθεια                          |
| MT-ND1 T3398C                     | Καρδιομυοπάθεια                                   |
| MT-ND3 A10398G                    | Καρκίνος Μαστού, Μεταβολικό Σύνδρομο              |

Πίνακας 1. mt-DNA μεταλλάξεις και συσχετιζόμενες παθολογένειες. Πηγή: [mitomap.org](http://mitomap.org)

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν ο εντοπισμός και η ταυτοποίηση μεταλλάξεων στα γονίδια του μεταφορικού RNA των αμινοξέων της βαλίνης και του γλουταμικού οξέος ( MT-TV και MT-TE αντίστοιχα ). Ακόμη στόχος ήταν η σύγκριση της δραστικότητας του ενζύμου οξειδοαναγωγή του ζεύγους NADH-Q ( Σύμπλοκο I ) σε λεμφοκύτταρα αίματος μεταξύ φυσιολογικών και παθολογικών δειγμάτων. Η μέτρηση της δραστικότητας του Συμπλόκου I με φασματοφωτομετρικές μεθόδους ήταν μία απαιτητική δοκιμασία διότι δεν υπήρχε προηγούμενο τέτοιας έρευνας στο εργαστήριο και λόγω της απουσίας μίας ευρέως αναγνωρισμένης μεθόδου. Γι'αυτό δοκιμάστηκαν δύο διαφορετικά πρωτόκολλα που συλλέχθηκαν από τη βιβλιογραφία. Η ουσιαστική διαφορά ανάμεσα στις δύο μεθόδους ήταν η χρήση διαφορετικών αναλόγων του ενδογενούς CoQ<sub>10</sub>. Το ενδογενές CoQ<sub>10</sub> δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως εξωγενής δέκτης ηλεκτρονίων λόγω της υψηλής υδροφοβικότητας. Η μειωμένη υδροφοβικότητα των αναλόγων του CoQ<sub>10</sub> βασίζεται στο μικρότερο μήκος της πλευρικής αλυσίδας. Έτσι η μία μέθοδος προτείνει ως κατάλληλο ανάλογο την decylubiquinone και η άλλη το ανάλογο CoQ<sub>1</sub> ( Εικόνα 4 ). Τελικά επιλέχθηκε ως καταλληλότερη μέθοδος η χρήση του αναλόγου CoQ<sub>1</sub>. Επιπλέον δοκιμάστηκαν διαφορετικοί τρόποι επεξεργασίας του δείγματος για την επίτευξη της καταλληλότερης διαπερατότητας των κυττάρων/μιτοχονδρίων στα υποστρώματα της μέτρησης. Ως ιδανικότερος τρόπος κρίθηκε η αύξηση της διαπερατότητας με διαδοχικούς κύκλους ψύξης/απόψυξης σε περιβάλλον ισότονου διαλύματος.



Εικόνα 4. Το ενδογενές CoQ<sub>10</sub> και τα ανάλογα decylubiquinone και CoQ<sub>1</sub>. Πηγή: sigmaaldrich.com

## 2.Υλικά και Μέθοδοι

Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν και οι μέθοδοι που εφαρμόστηκαν στη παρούσα εργασία είναι ανάλογα των σκοπών της, δηλαδή του εντοπισμού και της ταυτοποίησης μεταλλάξεων στα μιτοχονδριακά γονίδια του μεταφορικού RNA των αμινοξέων της βαλίνης, του γλουταμικού οξέος και του σχεδιασμού ενός αξιόπιστου πρωτοκόλλου για την μέτρηση της δραστηριότητας της οξειοαναγωγάσης του ζεύγους NADH-Q (Σύμπλοκο I) σε λεμφοκύτταρα του περιφερικού αίματος.

### 2.1. Υλικά

#### 2.1.1. Εντοπισμός και ταυτοποίηση μεταλλάξεων:

Η διαδικασία χωρίζεται σε τέσσερα μέρη: 1)ενίσχυση γονιδίου με PCR, 2)επιβεβαίωση της ενίσχυσης του γονιδίου με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης, 3)ανίχνευση μονοκλωνικών πολυμορφισμών διαμόρφωσης (SSCP) με ηλεκτροφόρηση πηκτής ακρυλαμίδης, 4)αλληλούχιση PCR-product και ανάλυση αποτελεσμάτων με υπολογιστικές μεθόδους.

#### 1)Υλικά για την PCR:

α) Εκκινητές για τον γονίδο mt-tRNA βαλίνης

FW:5'-GTACTGGAAAGTGCACTTGG-3'

REV:5'GGTTGTCTGGTAGTAAGG-3'

β) Εκκινητές για το γονίδιο mt-tRNA γλουταμικού οξέος

FW:5'-CCCACACTCAACAGAAACA-3'

REV:5'-TTGCGTATTGGGGTCATTG-3'

γ) MgCl<sub>2</sub>

δ) Taq-kapa-polymerase (Kapa Biosystems)

ε) Buffer 10x

στ) Τριφωσφορικά δεόξυριβονουκλετίδια (dNTPs)

ζ) Διπλά απεσταγμένο και αποστειρωμένο νερό.

Η αντίδραση πραγματοποιείται σε συσκευή θερμοκυκλοποίησης.

## 2) Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης:

Για την παρασκευή της πηκτής χρειάζεται:

- Αγαρόζη
- Διάλυμα TAE
- Βρωμιούχο αιθίδιο
- Φούρνος μικροκυμάτων

Για την παρασκευή 1L διαλύματος TAE 50x (stock) σε PH=8:

- 2M Tris-base
- 1M οξικό οξύ
- 50mM EDTA

Για το loading buffer:

- Μπλε της βρωμοφαινόλης 0,25% w/v
- Γλυκερόλη 30% w/v

Η παρασκευή της πηκτής γίνεται σε περιβάλλον απαγωγού και η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε ειδική συσκευή ηλεκτροφόρησης για πηκτές αγαρόζης. Τέλος η πηκτή εκτίθεται σε υπεριώδες φως.

## 3) Ανίχνευση μονοκλωνικών πολυμορφισμών διαμόρφωσης (SSCP):

Για τη παρασκευή πηκτής ακρυλαμίδης:

- Ακρυλαμίδη
- Bis-ακρυλαμίδη
- TBE-10x
- Γλυκερόλη 50%
- TEMED
- APS 20%
- Νερό

Για τη παρασκευή 1L διαλύματος TBE:

- 10mM EDTA
- 0.8M Βορικό οξύ
- 0.8 Tris-Base
- Νερό

Διάλυμα αποδιάταξης.

Ηλεκτροφόρηση σε ειδική συσκευή ηλεκτροφόρησης πηκτών ακρυλαμίδης.

Για τη χρώση των πηκτών ακρυλαμίδης:

- Αιθανόλη 100%
- Οξικό οξύ
- Νιτρικός άργυρος
- Υδροξείδιο του νατρίου
- Sodium borohydride ( $\text{NaBH}_4$ )
- Φορμαλδεύδη

#### 4) Αλληλούχηση και ανάλυση αποτελεσμάτων:



- NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up kit (for DNA, RNA and protein purification) της εταιρίας MACHEREY – NAGEL).
- Εκκινητές για το αντίστοιχο γονίδιο που ενισχύθηκε
- Λογισμικό Bioedit
- Αλγόριθμος Blast

**2.1.2. Σχεδιασμός αξιόπιστου πρωτοκόλλου για τη μέτρηση της δραστικότητας της οξειδοαναγωγάσης του ζεύγους NADH-Q (Σύμπλοκο I) σε λεμφοκύτταρα:**

2.1.2.1. Απομόνωση λεμφοκυττάρων από το περιφερικό αίμα:

- Φιαλίδια συλλογής αίματος με αντιπηκτικό παράγοντα (EDTA ή ηπαρίνη)
- Αντιδραστήριο Ficoll Paque plus
- Άνυδρη D-γλυκόζη
- $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$
- $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$
- Tris-Base
- NaCl
- Φυγόκεντρος

2.1.2.2. Επεξεργασία ιστού ποντικού:

- Ομογενοποιητή ιστών (Εικόνα 5)
- Διάλυμα ομογενοποίησης:  
10mM Tris-HCL  
250mM σουκρόζη

1mM EDTA

1/25 v/v μείγμα αναστολέων πρωτεασών (PIM, protease inhibitors mix)



Εικόνα 5. Ομογενοποιητής

### 2.1.2.3. Απομόνωση ιζημάτων εμπλουτισμένων σε μιτοχόνδρια:

#### 1. Μέθοδος:

- Διάλυμα ομογενοποίησης
- Ομογενοποιητής Teflon Glass (Εικόνα 6)
- Φυγόκεντρος

#### 2. Μέθοδος:

- Mito buffer, PH=7.8 (0.2 mM EDTA, 0.25mM σουκρόζη, 10mM Tris-HCL, 1/25 v/v PIM)
- Διγτιονίνη
- Τριαιθανολαμίνη
- Υγρό άζωτο
- Ομογενοποιητής Teflon Glass (Εικόνα 6)
- Φυγόκεντρος



Εικόνα 6. Ομογενοποιητής Teflon Glass

### 2.1.3 Αύξηση της διαπερατότητας των κυτταρικών και μιτοχονδριακών μεμβρανών στα υποστρώματα της μέτρησης:

Σε αυτή τη περίπτωση χρησιμοποιήθηκαν τρεις διαφορετικές μέθοδοι με τα αντίστοιχα υλικά και όργανα:

1) Μέθοδος:

Συσκευή sonication (Εικόνα 7)

Φυγόκεντρος

Lysis Buffer( 20mM Tris-HCl PH=7,5, 0.5% Triton X-100,250 mM NaCl,3mM EDTA)

2) Μέθοδος:

Καταψύκτης -80 °C

Υπότονο διάλυμα (Tris-HCl PH=7,7 1/25 v/vPIM)

3) Μέθοδος:

Καταψύκτης -80 °C

Ισότονο διάλυμα SHE-PIM (10mM HEPES PH=7.4, 250mM σουκρόζη, 1mM EDTA, 1/25 v/v PIM)

### 2.1.4. Ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών:

Αντιδραστήριο Bradford (BioRad)

Φασματοφωτόμετρο



Εικόνα 7. Συσκευή sonication.

**2.1.5. Για την μέτρηση της δραστηρότητας της οξειδοαναγωγής του ζεύγους NADH-Q (Σύμπλοκο I) χρησιμοποιήθηκαν δύο μέθοδοι με τα αντίστοιχα υλικά που συλλέχθηκαν από τη βιβλιογραφία:**

**1.Μέθοδος ( Richard J.T Rodenburg et.all 2007)**

Φασματοφωτόμετρο

Υδατόλουτρο

Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών PH=7.8 ( $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-K}_2\text{HPO}_4$ )

Αλβουμίνη του ορού των βοειδών (BSA)

Αντιμυκίνη-A

Decylubiquinone

DCIP

NADH

Ροτενόνη

DMSO

**2.Μέθοδος (L.E.A de Wilt et.all 2007)**

Φασματοφωτόμετρο υπεριώδους ακτινοβολίας

Κυψελίδα χαλαζία

Υδατόλουτρο

Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών PH=7.4 ( $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-K}_2\text{HPO}_4$ )

Αλβουμίνη του ορού των βοειδών (BSA)

NADH

KCN

$\text{MgCl}_2$

$\text{CoQ}_1$

Ροτενόνη

Αντιμυκίνη-A

DMSO

## 2.2. Μέθοδοι:

### 2.2.1. Εντοπισμός και ταυτοποίηση μεταλλάξεων:

Η διαδικασία χωρίζεται σε τέσσερα μέρη: 1)ενίσχυση γονιδίου με PCR, 2)επιβεβαίωση της ενίσχυσης του γονιδίου με ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αγαρόζη, 3)ανίχνευση μονοκλωνικών πολυμορφισμών διαμόρφωσης (SSCP) με ηλεκτροφόρηση σε πηκτική ακρυλαμίδης, 4)αλληλούχιση PCR-product και ανάλυση αποτελεσμάτων με υπολογιστικές μεθόδους.

#### 2.2.1.1 Ενίσχυση γονιδίου με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase chain reaction,PCR):

Η μέθοδος της PCR αναπτύχθηκε από τον Kary Mullis το 1983. Είναι μία μοριακή τεχνική εκθετικής ενίσχυσης ενός ή/και μερικών αντιγράφων DNA σε χιλιάδες ή ακόμα και εκατομύρια αντίγραφα. Βάση της μεθόδου αποτελεί η δράση της DNA-πολυμεράσης και το φαινόμενο της αντιγραφής του DNA πριν τη κυτταρική διαίρεση. Μία DNA-πολυμεράση δρα με την προϋπόθεση της πρόσδεσης αρχικών μορίων RNA ή DNA-εκκινητών βάση συμπληρωματικότητας στο DNA-εκμαγείο. Έτσι σχεδιάζονται μόρια εκκινητών που προσδένουν εκατέρωθεν τη περιοχής στόχου. Μετά από διαδοχικούς κύκλους αντιγραφής ενισχύεται μόνο το σημείο ανάμεσα στα σημεία πρόσδεσης των εκκινητών (Εικόνα 8). Έαν η απόδοση της PCR είναι 100% τότε ο αριθμός των αντιγράφων είναι  $2^n$  (  $n$ =πλήθος κύκλων αντιγραφής ). Μετά το πέρας μεγάλου αριθμού κύκλων αντιγραφής η αντίδραση φτάνει σε plateau λόγω της εξάντλησης των συστατικών. Ένας PCR-κύκλος μπορεί να αναλυθεί σε τρία στάδια σύμφωνα με τις θερμοκρασιακές διαφορές ( Εικόνα 8 ):

Στάδιο 1.Αποδιάταξη (94-98 °C):

Το DNA-εκμαγείο αποδιατάσσεται σε μονόκλωνη διαμόρφωση με θέρμανση στους 94-98 °C για τη ρήξη των δεσμών υδρογόνου. Η αποδιάταξη είναι απαραίτητη για την πραγματοποίηση της PCR διότι οι DNA-πολυμεράσες δρουν σε υποστρώματα DNA μονόκλωνης μορφής. In vivo το DNA αποκτά τοπικά μονόκλωνη διαμόρφωση μέσω της δράσης DNA-ελικασών.

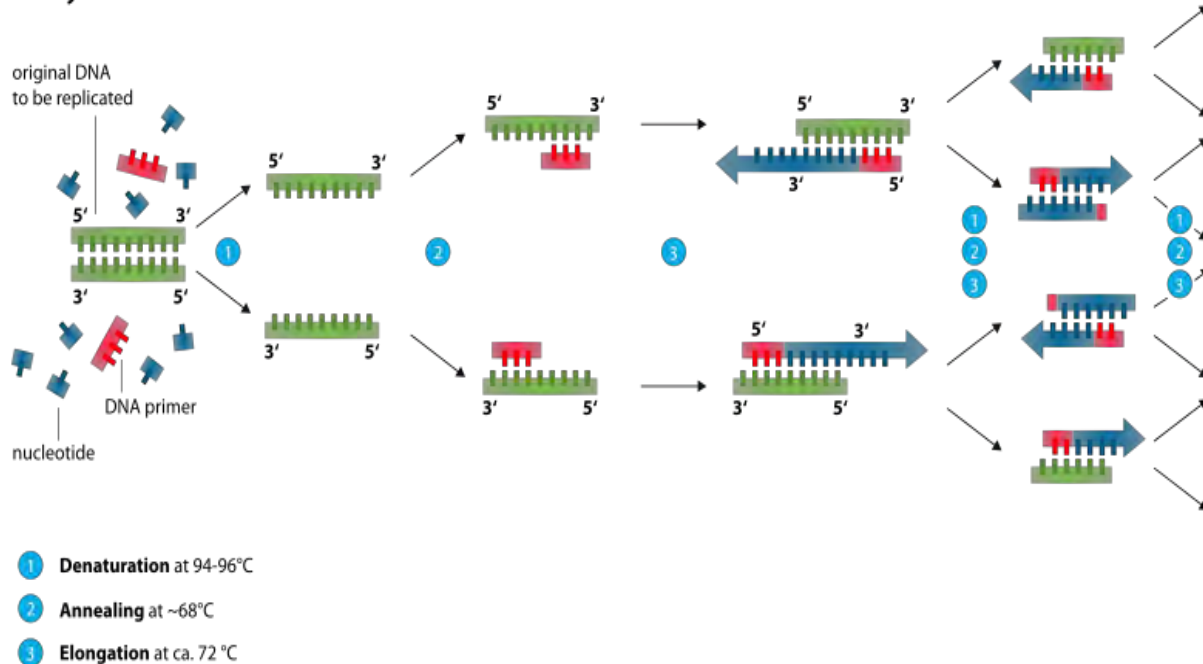
#### Στάδιο 2.Υβριδοποίηση (50-60 °C):

Για την δράση μίας DNA-πολυμεράση απαιτείται η πρόσδεση, βάση συμπληρωματικότητας, ζεύγους μορίων DNA-εκκινητών στο DNA-εκμαγείο. Οι εκκινητές σχεδιάζονται και παράγονται στο εργαστήριο βάση του DNA-στόχου ώστε να προσδένονται εκατέρωθεν του, να μην εμφανίζουν μεταξύ τους συμπληρωματικότητα και να έχουν παραπλήσιο σημείο τήξης ώστε να προσδένονται στην ίδια θερμοκρασία στο DNA-εκμαγείο. Γι' αυτό οι δύο εκκινητές έχουν παραπλήσια περιεκτικότητα σε G/C. Η υβριδοποίηση των εκκινητών συμβαίνει σε θερμοκρασία 50-60 °C η οποία πρέπει να καθορίζεται προσεκτικά. Υψηλότερη θερμοκρασία από την κατάλληλη συνεπάγεται αύξηση της πιθανότητας να μην προσδεθούν οι εκκινητές και χαμηλότερη θερμοκρασία συνεπάγεται αύξηση της πιθανότητας μη ειδικής πρόσδεσης των εκκινητών με αποτέλεσμα την παραγωγή μη επιθυμητών PCR-προϊόντων.

#### Στάδιο 3.Επιμύκωση (72°C):

Είναι το στάδιο που λαμβάνει δράση η DNA-πολυμεράση. Φυσιολογικά οι DNA-πολυμεράσες χάνουν τη δραστηριότητά τους στις υψηλές θερμοκρασίες της αποδιάταξης. Γι' αυτό χρησιμοποιούνται θερμοσταθερά ένζυμα που διατηρούν τη δραστηριότητά τους σε υψηλές θερμοκρασίες. Το πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο ένζυμο είναι Taq-πολυμεράση που ανακαλύφθηκε στο θερμόφιλο βακτήριο *Thermus aquaticus* το οποίο απαντάται σε θερμές πηγές. Η Taq-πολυμεράση προσδένεται στα άκρα των εκκινητών και επιμυκνεί προσθέτοντας dNTPs σε κατεύθυνση 5'-3' βάση συμπληρωματικότητας. Για την δράση της Taq-πολυμεράσης απαιτείται κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα και ιόντα μαγνησίου ως συμπαραγόντα τα οποία παρέχονται με την προσθήκη διαλύματος MgCl<sub>2</sub>.

## Polymerase chain reaction - PCR



Εικόνα 8. Δύο κύκλοι PCR. Εμφανίζονται τα τρία στάδια κάθε κύκλου. Πράσινο: DNA-μήτρα. Κόκκινο: DNA-εκκινητές. Μπλε: νεοσυντιθέμενοι DNA- κλώνοι.

Για την ενίσχυση των mt-tRNA γονιδίων της βαλίνης και του γλουταμικού οξέος μέσω PCR ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία:

Αρχικά σε tube 1,5 ml προετοιμάζεται το περιβάλλον της PCR σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα ( Πίνακας 2 ) για όλα τα δείγματα + ένα τυφλό δείγμα για τον εντοπισμό τυχόν επιμολύνσεων. Αφού παρασκευασθεί το διάλυμα μοιράζεται κατά 49 μl σε tube των 100μl και προστίθεται 1μl DNA-εκμαγείου. Έτσι ο τελικός όγκος της αντίδρασης είναι 50μl. Έαν παρατηρηθεί ασθενής ενίσχυση, η PCR επαναλαμβάνεται με μεγαλύτερη ποσότητα DNA-εκμαγείου με τον όγκο να διατηρείται στα 50μl καθώς αφαιρείται η διαφορά από τη ποσότητα του ddH<sub>2</sub>O. Στη συνέχεια τα διαλύματα επωάζονται στο θερμοκυκλοποιητή για 35 κύκλους των οποίων τα στάδια παρουσιάζονται στο πίνακα 3. Ακόμη η αλληλουχίες των εκκινητών για τα δύο γονίδια παρουσιάζονται στο πίνακα 4.

| Αντιδραστήρια      | Αρχικές συγκεντρώσεις | Τελικές συγκεντρώσεις | Σε τελικό όγκο V=50μL. |
|--------------------|-----------------------|-----------------------|------------------------|
| DNA                |                       |                       | 1*                     |
| Ρυθμιστικό διάλυμα | 10x                   | 1x                    | 5                      |
| MgCl <sub>2</sub>  | 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 <sub>2</sub> O |                       |                       | 39                     |

Πίνακας 2. Ποσότητες και αναλογίες PCR-συσταστικών για την ενίσχυση των mt-tRNA γονιδίων της βαλίνης και του γλουταμικού οξέος.

| Στάδια               | Θερμοκρασία | Διάρκεια | Αριθμός κύκλων |
|----------------------|-------------|----------|----------------|
| Initial Denaturation | 95°C        | 4 min    |                |
| Denaturation         | 95°C        | 40 sec   | x35            |
| Annealing            | 56°C        | 40 sec   |                |
| Extension            | 72°C        | 40sec    |                |
| Final Extension      | 72°C        | 10min    |                |

Πίνακας 3. Οι θερμοκρασίες και οι χρόνοι των σταδίων κάθε κύκλου.



### 2.2.1.2. Επιβεβαίωση της ενίσχυσης του γονιδίου με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζη:

Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης είναι πρότυπη μέθοδος για το διαχωρισμό μορίων DNA βάσει μήκους. Ηλεκτροφόρηση είναι η κίνηση φορτισμένων μορίων μέσα σε ένα ηλεκτρικό πεδίο. Τα αρνητικά φορτισμένα μόρια DNA μεταναστεύουν προς το θετικό ηλεκτρόδιο. Η πηκτή αγαρόζης σχηματίζει δίκτυο από πόρους διαμέσου των οποίων μετακινούνται τα μόρια DNA. Όσο βραχύτερα σε μήκος είναι τα μόρια DNA τόσο μεγαλύτερη και η ταχύτητα μετανάστευσης. Έτσι τα μόρια διαχωρίζονται βάσει μεγέθους. Η αγαρόζη είναι ένας πολυσακχαρίτης ο οποίος σχηματίζει πόρους με διάμετρο 100nm έως 300nm. Το μέγεθός τους εξαρτάται από την συγκέντρωση της αγαρόζης στη πηκτή. Σε υψηλές συγκεντρώσεις αγαρόζης η ταχύτητα των μορίων είναι βραδύτερη και χρησιμοποιούνται για το διαχωρισμό μικρότερων μορίων DNA όπου απαιτείται μεγαλύτερη ευαισθησία ενώ μικρότερες συγκεντρώσεις αγαρόζης χρησιμοποιούνται για το διαχωρισμό μεγαλύτερων μορίων. Για παράδειγμα μόρια μεγέθους 30kb ηλεκτροφορούνται σε πηκτή 3% ενώ μόρια μεγέθους 100bp σε πηκτή 5%. Τα μόρια DNA γίνονται ορατά στη πηκτή λόγω του βρωμιούχου αιθιδίου, ουσία που προσδένεται στο DNA και φθορίζει εκτεθειμένο σε υπεριώδη ακτινοβολία. Επιπλέον για την παρακολούθηση της πορείας της ηλεκτροφόρησης προστίθενται στη πηκτή χρωστικές ουσίες με γνωστή ταχύτητα μετανάστευσης [28].

Στη παρούσα εργασία για την ηλεκτροφόρηση των PCR-προϊόντων για τα mt-tRNA γονίδια της βαλίνης και του γλουταμικού οξέος ( ≈120bp και 140bp, αντίστοιχα ) χρησιμοποιήθηκε πηκτή αγαρόζης συγκέντρωσης 2%. Αρχικά αναμειγνύονται 0,6 gr αγαρόζης με 40ml διαλύματος TAE 1X. Το μείγμα θερμαίνεται σε φούρνο μικροκυμάτων έως ότου διαλυθεί πλήρως η αγαρόζη. Ύστερα προστίθεται βρωμιούχο αιθίδιο σε τελική συγκέντρωση 0,5μg/ml και το μείγμα αποχύνεται σε σφραγισμένο με χαρτοταινία καλούπι Persex. Εφάρμονται τα κατάλληλα για το καλούπι “χτενάκια” για το σχηματισμό των “πηγαδιών” και το μείγμα αφήνεται για στερεοποίηση σε θερμοκρασία δωματίου. Λόγω της καρκινογόνου φύσης του, η προσθήκη του βρωμιούχου αιθιδίου και η απόχυση του μείγματος στο καλούπι γίνεται σε περιβάλλον απαγωγού. Αφού η πηκτή σταθεροποιηθεί τοποθετείται σε οριζόντια συσκευή ηλεκτροφόρησης που περιέχει

διάλυμα TAE 1X. Είναι σημαντικό η πηκτή να καλύπτεται πλήρως από το διάλυμα ώστε να μην αφυδατωθεί λόγω των υψηλών θερμοκρασιών που αναπτύσσονται κατά την ηλεκτροφόρηση. Τα δείγματα προς ηλεκτροφόρηση αναμειγνύονται με loading buffer (5μl και 3μl αντίστοιχα). Το loading buffer περιέχει μπλε της βρωμοφαινόλης που εξυπηρετεί ως χρωστική για τη παρακολούθηση της πορείας της ηλεκτροφόρησης και γλυκερόλη για την καταβύθιση του DNA στο πάτο κάθε “πηγαδιού”. Ακολουθεί η ηλεκτροφόρηση σε συνθήκες 150-200 V για περίπου 20 λεπτά. Τέλος η πηκτή εκτίθεται σε λάμπα υπεριώδους ακτινοβολίας για τη επιβεβαίωση της παρουσίας PCR-προϊόντων και τη απουσία τυχόν επιμολύνσεων.

### 2.2.1.3. Ανίχνευση μονοκλωνικών πολυμορφισμών διαμόρφωσης (SSCP) με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή ακρυλαμίδης:

Η ανάλυση SSCP είναι μια από τις πιο απλές μεθόδους ανίχνευσης άγνωστων μεταλλάξεων, χρησιμεύει στην ανίχνευση μικρών ελλειμμάτων ή ενθέσεων και μονονουκλεοτιδικών μεταλλάξεων και πολυμορφισμών σε τμήματα εκατοντάδων βάσεων, ενώ για τμήματα κιλοβάσεων δεν ενδείκνυται. Μάλιστα, για τμήματα μικρότερα των 300bp η μέθοδος είναι πάνω από 85% αποτελεσματική με ένα και μόνο πείραμα, ενώ η αποτελεσματικότητα της 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, (ακόμα και σε μία μόνο θέση) προσθήκης ή ελλείψεως 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. Τα συστατικά που χρησιμοποιούνται για να συνθέσουν την

πηκτή είναι μονομερή ακρυλαμίδιου, N, N-μεθυλενο δισακρυλαμίδιο, 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 ακρυλαμίδιου επάγοντας τα να αντιδρούν με άλλα μόρια ακρυλαμίδιου και έτσι σχηματίζουν μακρές αλυσίδες. Αυτές οι αλυσίδες διασυνδέονται με το Bis. Το TEMED δρα ως καταλύτης για τον σχηματισμό της πηκτής, λόγω της ικανότητάς του να υπάρχει σε μορφή ελεύθερης ρίζας.

Στη παρούσα εργασία παρασκευάστηκαν πηκτές ακρυλαμίδης διαστάσεων 20 x 18 cm, πάχους 2mm, τελικού όγκου 125ml και πυκνότητας 10%. Οι ποσότητες των συστατικών για δύο πηκτές αναγράφονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 5) και ο όγκος συμπληρώνεται μέχρι τα 125ml με H<sub>2</sub>O. Τα μείγματα αποχύνονται στα κατάλληλα καλούπια, τοποθετούνται τα κατάλληλα χτενάκια και αφήνονται για στερεοποίηση σε θερμοκρασία δωματίου. Τέλος οι πηκτές τοποθετούνται στις αντίστοιχες συσκευές κάθετης ηλεκτροφόρησης που περιέχουν διάλυμα TBE 1X σε όγκο που να επικαλύπτει πλήρως τη πηκτή.

| 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    |

Πίνακας 5. Ποσότητες και συστατικά για τη παρασκευή δύο πηκτών πολυακρυλαμίδης διαστάσεων 20 x 18 cm, πάχους 2mm, τελικού όγκου 125ml και πυκνότητας 10%.

Πριν τη “φόρτωση” των δειγμάτων στις πηκτές προηγείται η αποδιάταξη του DNA σε μονόκλωνη διαμόρφωση. Αρχικά 5μl PCR-προϊόντος αναμειγνύονται με 10μl διαλύματος αποδιάταξης (Denaturation

buffer). Το διάλυμα αποδιάταξης περιέχει χρωστική για την παρακολούθηση της ηλεκτροφόρησης και γλυκερόλη για την καταβύθιση του μείγματος κατά την “φόρτωση” της πηκτής. Το μείγμα επωάζεται μέσα σε θερμοκυκλοποιητή για 10 λεπτά στους 95 °C και ύστερα τοποθετείται σε πάγο ώστε να διατηρηθεί η μονόκλωνη διαμόρφωση έως ότου “φορτωθούν” όλα τα δείγματα στη πηκτή. Η ηλεκτροφόρηση γίνεται σε περιβάλλον ψυγείου (4 °C) και σε τάση 220 V για 16-22 ώρες.

Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης οι πηκτές αφαιρούνται από τα καλούπια και χρωματίζονται για την εμφάνιση των ζωνών που έχει σχηματίσει το ηλεκτροφορημένο DNA. Αρχικά οι πηκτές πλένονται με υδατικό διάλυμα 0,5% αιθανόλης και 1mM οξικού οξέος όγκου αρκετού για την επικάλυψη της πηκτής για 3 λεπτά δύο φορές σε ανακίνηση. Αφού ολοκληρωθούν οι δύο πλύσεις ξεπλένουμε δύο φορές με νερό για ένα λεπτό. Ύστερα πλένουμε με διάλυμα νιτρικού αργύρου σε ανακίνηση για περίπου 20 λεπτά και ξεπλένουμε πάλι δύο φορές με νερό για 1 λεπτό. Τέλος ακολουθεί πλύση με διάλυμα όγκου 400ml με 6gr NaOH, 0.02gr NaBH<sub>4</sub> και 20ml φορμαλδεύδης (C<sub>fin.</sub>=37%) έως ότου γίνου ορατές με γυμνό μάτι οι ζώνες του DNA και ξέπλυμα με νερό. Πλέον οι πηκτές ακρυλαμιδής είναι έτοιμες για την εξαγωγή συμπεράσματος σχετικά με την ύπαρξη διαφορετικών προτύπων ηλεκτροφόρησης ανάμεσα στα PCR-προϊόντα.

#### 2.2.1.4. Αλληλούχιση PCR-product και ανάλυση αποτελεσμάτων με υπολογιστικές μεθόδους:

Τα δείγματα που δείχνουν διαφορετικό πρότυπο ζώνης στην ηλεκτροφόρηση σε πηκτή ακρυλαμιδής επιλέγονται για αλληλούχιση. Της αλληλούχισης προηγείται ο καθαρισμός του PCR-προϊόντος ώστε να αφαιρεθούν υπολείμματα αλάτων, διμερή εκκινητών κ.α. Ο καθαρισμός γίνεται σύμφωνα με τις οδηγίες του kit: NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up kit (for DNA, RNA and protein purification) της εταιρίας MACHERY – NAGEL. 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 έκλουσης 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

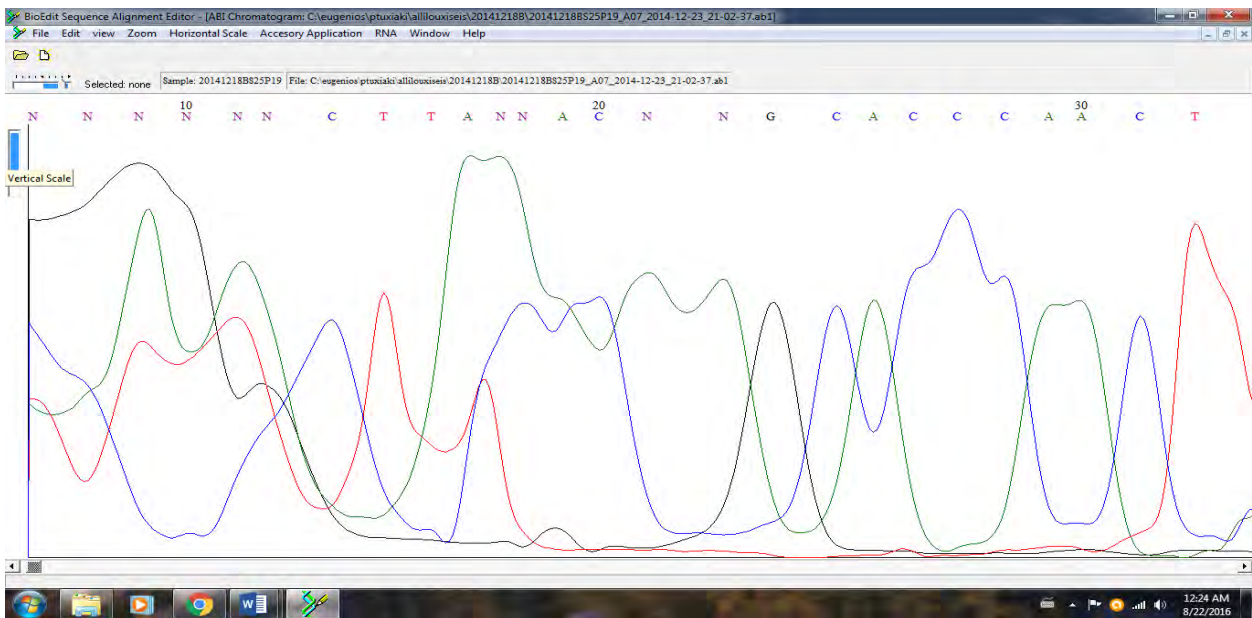
καθαρισμένο σωλήνα συλλογής. Επόμενο βήμα του καθαρισμού ήταν η έκλουση της μεμβράνης πυριτίου (silica membrane). Έτσι, προστέθηκαν στη στήλη 700 μl ρυθμιστικού διαλύματος NT3 (Buffer NT3) και ακολούθησε φυγοκέντρηση σε ταχύτητα 11,000 x g για 30 δευτερόλεπτα. Μετά το τέλος της φυγοκέντρησης αφαιρέθηκε 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.

Τα αποτελέσματα της αλληλούχισης είναι για κάθε κλώνο στέλνονται σε ηλεκτρονική μορφή Επεξεργάζονται με το λογισμικό Bioedit. Μέσω του γραφήματος (Εικόνα 9) κρίνεται η πιστότητα της αναφερθείσας αλληλουχίας. Έξαιτίας της ασάφειας του γραφήματος στο σημείο πρόσδεσης κάθε εκκινητή (Εικόνα 10) η αποσαφήνιση της αλληλουχίας του συγκεκριμένου σημείου γίνεται βάση του συμπληρωματικού κλώνου μέσω του εργαλείου στοίχισης ClustalW. Αφού αποσαφηνιστεί εξ'ολοκλήρου η αλληλουχία ενός PCR-προϊόντος ακολουθεί στοίχιση μέσω του αλγόριθμου BLAST και τελικά εξακριβώνονται τυχόν μεταλλάξεις ή πολυμορφισμοί. (Εικόνα11).



Εικόνα 9.Γράφημα αλληλούχισης όπως αυτό παρουσιάζεται στο λογισμικό bioedit.



Εικόνα 10.Σημείο πρόσδεσης των εκκινήτων.Γίνεται εμφανής η ασάφεια στον καθορισμό της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας στο συγκεκριμένο σημείο.

Download ▾ GenBank Graphics

▼ Next ▲ Previous ▲ Descriptions

Homo sapiens mitochondrion, complete genome

Sequence ID: [ref|NC\\_012920.1](#) Length: 16569 Number of Matches: 1Range 1: 1575 to 1714 [GenBank](#) [Graphics](#)

▼ Next Match ▲ Previous Match

| Score         | Expect | Identities    | Gaps      | Strand    |
|---------------|--------|---------------|-----------|-----------|
| 259 bits(140) | 5e-67  | 140/140(100%) | 0/140(0%) | Plus/Plus |

|       |      |  |      |
|-------|------|--|------|
| Query | 2    | TG TACTGGAAAGTGCACCTTGGACGAAACCAGAGTGTAGCTTAACACAAAGCACCCCAACTTA | 61   |
| Sbjct | 1575 | TG TACTGGAAAGTGCACCTTGGACGAAACCAGAGTGTAGCTTAACACAAAGCACCCCAACTTA | 1634 |
| Query | 62   | CAC TTAGGAGATTTCAACTTAACTTGACCGCTCTGAGCTAAACCTAGCCCCAAACCCACT    | 121  |
| Sbjct | 1635 | CAC TTAGGAGATTTCAACTTAACTTGACCGCTCTGAGCTAAACCTAGCCCCAAACCCACT    | 1694 |
| Query | 122  | CCACCTTACTACCAGACAAC   | 141  |
| Sbjct | 1695 | CCACCTTACTACCAGACAAC   | 1714 |

**Related Information**[PubChem BioAssay](#) - bioactivity screening[Map Viewer](#) - aligned genomic context

Εικόνα 11. Αποτέλεσμα στοίχισης με τον αλγόριθμο BLAST αλληλουχίας PCR-προϊόντος για το mt-tRNA γονίδιο της βαλίνης (1602-1670 bp). Στη άνω σειρά είναι η αλληλουχία που δόθηκε και στη κάτω εκείνη με την οποία στοιχήθηκε από τη βάση δεδομένων. Παρατηρείται ότι η ομοιότητα είναι 100%, επομένως το υπό εξέταση γονίδιο λείπει σε μεταλλάξεις ή/και πολυμορφισμούς.

## 2.2.2. Σχεδιασμός αξιόπιστου πρωτοκόλλου για τη μέτρηση της δραστηριότητας της οξειδοαναγωγής του ζεύγους NADH-Q (Σύμπλοκο I) σε λεμφοκύτταρα:

1) Απομόνωση δείγματος

2) Επεξεργασία δείγματος

3) Ποσοτικοποίηση

4) Πρωτόκολλο μέτρησης δραστηριότητας οξειδοαναγωγής του ζεύγους NADH-Q

### 2.2.2.1. Απομόνωση δείγματος (Ολικό κυτταρικό ομογενοποιήμα ή εμπλουτισμένο σε μιτοχόνδρια ίζημα):

Μετρήσεις της οξειδοαναγωγής του ζεύγους NADH-Q πραγματοποιήθηκαν σε ολικά ομογενοποιήματα κυττάρων και σε εμπλουτισμένα σε μιτοχόνδρια ιζήματα.

Η μέτρηση της ενζυμικής δραστηριότητας της οξειδοαναγωγής του ζεύγους NADH-Q έγινε σε λεμφοκύτταρα του περιφερικού αίματος λόγω του εύκολου και σχετικά ανώδυνου τρόπου συλλογής. Το αίμα συλλέχθηκε με σύριγγα (20ml) παρουσία αντιπηκτικού παράγοντα από πιστοποιημένο ιατρικό ή/και νοσηλευτικό προσωπικό. Τα λεμφοκύτταρα απομονώθηκαν με το αντιδραστήριο Ficoll-Paque Plus. Η μέθοδος βασίζεται στην πυκνότητα της φικόλης που επιτρέπει τη διόδο στα ερυθροκύτταρα του αίματος αλλά όχι στα μονοκύτταρα κύτταρα. Έτσι μετά από την κατάλληλη φυγοκέντρηση δημιουργείται μια στρώση μονοκύτταρων κυττάρων που δύναται να συλλεχθεί (Εικόνες 12 και 13).



Εικόνα 12. Αίμα (πάνω) και φικόλη (κάτω) πριν τη φυγοκέντρηση. Τα ερυθροκύτταρα καθιζάνουν ήδη αυθόρμητα.



Εικόνα 13. Οι στρώσεις από πάνω προς τα κάτω μετά τη φυγοκέντρηση: πλάσμα, λεμφοκύτταρα, φικόλη, ερυθροκύτταρα.



Για τη διαδικασία της απομόνωσης αρχικά ακολουθήθηκαν οι οδηγίες της εταιρείας και ύστερα από δοκιμές καταλήξαμε σε μία ελαφρώς διαφορετική μέθοδο η οποία παρουσιάζεται αναλυτικά στα παρακάτω βήματα:

- Παρασκευή διαλύματων stock  $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$  0,5M,  $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$  0.5M, KCl 0.5M, NaCl 0.5M, Tris-HCl PH=7.6 1M.
- Παρασκευή διαλυμάτων A και B:

| Διάλυμα A                                  | Συγκέντρωση mol/l             |
|--|-------------------------------|
| Άνυδρη D-γλυκόζη                           | 0.1 %                         |
| $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ | $5 \cdot 10^{-5} \text{ M}$   |
| $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ | $9.8 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ |
| KCl  | $5.4 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ |
| Tris-HCl PH=7.6                            | 0.145 M                       |

| Διάλυμα B | Συγκέντρωση mol/l |
|-----------|-------------------|
| NaCl      | 0.14 M            |

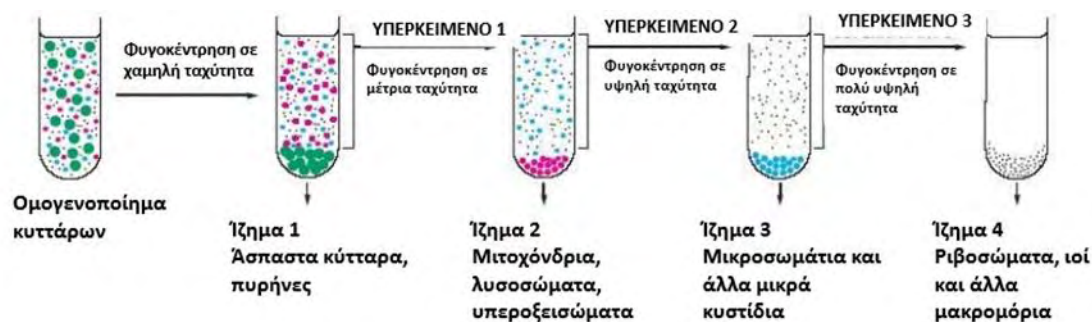
- Ανάμιξη διαλυμάτων A και B σε όγκο 1:9 αντίστοιχα για παρασκευή ισοροπημένου διαλύματος αλάτων.
- Ανάμιξη αίματος και διαλύματος αλάτων σε όγκο 1:1
- Απόχυση 3ml Ficoll-Paque Plus σε falcon 15ml με σύριγγα και σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.
- Απαλή απόχυση 4ml του μείγματος αίμα και διάλυμα αλάτων με πιπέτα Pasteur πάνω στο Ficoll-Paque Plus ώστε να δημιουργηθούν δύο στρώσεις.
- Φυγοκέντρηση 400 x g, 30 λεπτά, 19 °C.
- Συλλογή στρώση λεμφοκυττάρων με πιπέτα Pasteur σε νέο falcon 15ml. Ακολουθούν πλύσεις με ισότονο διάλυμα για την απομάκρυνση της φικόλης λόγω της τοξικότητάς της.
- Προσθήκη τριπλάσιου όγκου PBS 1X.
- Φυγοκέντρηση 250 x g, 10 λεπτά, 19 °C.
- Απόρριψη υπερκείμενου και επαναδιαλυτοποίηση ιζήματος με 5ml PBS 1X.

- Φυγοκέντρηση 250 x g, 10 λεπτά, 19 °C.
- Απόρριψη υπερκείμενου και επαναδιαλυτοποίηση ιζήματος με 1ml PBS 1X και μεταφορά σε Eppendorf 1,5 ml
- Φυγοκέντρηση 250 x g, 10 λεπτά, 19 °C.
- Απόρριψη υπερκείμενου.

Κατά τις προσπάθειές μας να καταλήξουμε σε ένα κατάλληλο πρωτόκολλο για την μέτρηση της δραστηριότητας της οξειδοαναγωγής του ζεύγους NADH-Q δοκιμάσαμε τη μέτρηση σε μυικό ιστό ποντικού. Το πειραματόζωο προσφέρθηκε από το Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Καταστάλλει με εισπνοή αιθέρα και θανατώθηκε με καρατόμηση. Ύστερα με χειρουργικό νυστέρι συλλέχθηκαν 1,5gr μυικού ιστού και 0,65gr ηπατικού ιστού. Ο μυικός ιστός ομογενοποιήθηκε με ομογενοποιητή σε 4,5ml διαλύματος ομογενοποίησης παρουσία PIM (1/25 v/v). Αντίστοιχα ομογενοποιήθηκε και ο ηπατικός ιστός σε 1.95 ml διαλύματος ομογενοποίησης.

Για να επιτευχθεί μεγαλύτερη ευαισθησία μέτρηση, χωρίς τη παρεμβολή μη ευαίσθητων στη ροτενονή NADH-οξειδασών, απομονώθηκαν με δύο διαφορετικούς τρόπους ιζήματα εμπλουτισμένα σε μιτοχόνδρια (mitochondria enriched fraction,MEF). Αρχικά λεμφοκύτταρα ή ιστοί ποντικού αναμειγνύονταν με διάλυμα ομογενοποίησης παρουσία PIM (1/25 v/v). Ύστερα ακολουθεί επεξεργασία σε ομογενοποιητή Teflon Glass (Εικόνα 6) :3x10 up n' down με 1 λεπτό παύση ανάμεσα σε πάγο. Η ομογενοποίηση Teflon glass βασίζεται στις πιέσεις που αναπτύσσονται μεταξύ του γυάλινου δοχείου και του περιστρεφόμενου εμβόλου με αποτέλεσμα τη θραύση των κυτταρικών μεμβρανών. Ακολουθούν διαφορικές φυγοκέντρες για το διαχωρισμό των κυτταρικών συστατικών βάση βάρους ( Εικόνα 14 ). Αρχικά στα 1,000xg, 4 °C για 5 λεπτά για την κατακρήμνιση των βαρύτερων κυτταρικών συστατικών ( π.χ. πυρήνας ). Το υπερκείμενο συλλέγεται και επαναφυγοκεντρείται στα 12,000 rpm, 4 °C, για 20 λεπτά. Το ίζημα επαναδιαλυτοποιείται για μια πλύση με 1ml διαλύματος ομογενοποίησης για φυγοκεντρείται 12,000 rpm, 4 °C, για 20 λεπτά. Το ίζημα που προκύπτει είναι εμπλουτισμένο σε μιτοχόνδρια. Αυτός ο τρόπος αποδείχθηκε αναποτελεσματικός για την απομόνωση μιτοχονδρίων από λεμφοκύτταρα διότι το ίζημα που προέκυπτε ήταν εξαιρετικά μικρό και δεν αρκούσε για μέτρηση. Έτσι δοκιμάστηκε η μέθοδος που προτείνεται από την βιβλιογραφία<sup>[22]</sup> για την απομόνωση μιτοχονδρίων από λεμφοκύτταρα του αίματος

[22]. Αρχικά τα λεμφοκύτταρα διαλύονται σε mito buffer (0.2mM EDTA,0.25mM σουκρόζη,10mM Tris-HCl PH=7,8) σε συγκέντρωση 5mg/ml. Το μείγμα ψύχεται και αποψύχεται σε υγρό άζωτο. Ύστερα προστίθεται 10mM τριαιθανολαμίνη και 0,1mg/ml διγτονίνη και το δείγμα επώαζεται για 10 λεπτά στο πάγο. Ακολουθεί επεξεργασία σε Teflon glass ομογενοποιητή 15 up n down στα 500 rpm και φυγοκέντρηση στα 1000xg, στους 4 °C για 10 λεπτά. Το υπερκείμενο συλλέγεται και επαναφυγοκεντρείται στα 12,000xg, στους 4 °C για 15 λεπτά. Το ίζημα διαλύεται στην επιθυμητή συγκέντρωση με mito buffer και αποθηκεύεται στους -80 °C.



[http://stevegalik.org/sites/all/images/centrifugation\\_2.jpg](http://stevegalik.org/sites/all/images/centrifugation_2.jpg)

Εικόνα 14. Διαφορικές φυγοκεντρήσεις και κατακρήμνιση κυτταρικών συστατικών.

### 2.2.2.2. Επεξεργασία δείγματος:

Για την αύξηση της διαπερατότητας του δείγματος, είτε μιτοχονδρίων είτε κυτταρικού ομογενοποιημένου στα υποστρώματα της μέτρησης, χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικές μέθοδοι. Η πρώτη μέθοδος χρησιμοποιεί υπέρηχους για τη θραύση της κυτταρικής μεμβράνης και την απελευθέρωση των κυτταρικών συστατικών (sonication). Σε αυτή τη μέθοδο το δείγμα επώαζεται πρωτίστως σε lysis buffer για 15 λεπτά στους 4 °C. Το lysis buffer επιτελεί ρόλο ρυθμιστικού διαλύματος, διαταρράσει τις κυτταρικές μεμβράνες λόγω του απορρυπαντικού Triton X-100, διατηρεί την ιοντική ισχύ μέσω του NaCl και έχει προστατευτικό ρόλο για τις πρωτεΐνες εξαιτίας του χηλικού χαρακτήρα του EDTA που αναστέλλει τις μεταλλοπρωτεΐνες. Μετά το sonication (3x10" με 30" παύση σε 40% amplitude) το μείγμα φυγοκεντρείται σε 12,000 rpm, στους 4 °C για 12 λεπτά ώστε να κατακρημνιστούν τα βαρύτερα συστατικά (οργανίδια) ενώ οι πρωτεΐνες να παραμείνουν στο υπερκείμενο διάλυμα. Η θραύση με

υπερήχους είναι μία ιδιαίτερα επεμβατική μέθοδος που μπορεί να διαταράξει την στερεοδιαμόρφωση πρωτεϊνών και να συμβάλλει στην ανάπτυξη υψηλών θερμοκρασιών. Η δεύτερη μέθοδος βασίζεται στη απότομη ψύξη/απόψυξη του δείγματος από τους  $-80^{\circ}\text{C}$  στους  $37^{\circ}\text{C}$ . Οι κρύσταλλοι πάγου σχηματίζονται και υγροποιούνται πολύ γρήγορα με αποτέλεσμα την διατάραξη στη συνοχή της κυτταρικής μεμβράνης. Η μέθοδος είναι ήπια και δεν επηρεάζει τη διαμόρφωση των πρωτεϊνών αλλά για να γίνει αποτελεσματική μπορεί να χρειαστούν περισσότεροι από ένας κύκλοι. Στη παρούσα έρευνα πραγματοποιήθηκαν κύκλοι ψύξης/απόψυξης σε υπότονο διάλυμα Tris-HCl PH=7,7 ύστερα από επώαση στους  $4^{\circ}\text{C}$  για 30 λεπτά, ώστε η αρνητική ωσμωτική πίεση να συμβάλλει στην κυτταρόλυση και με ισότονο διάλυμα SHE-PIM για την κυτταρόλυση λεμφοκυττάρων όπως προτείνεται από τον L.E.A de Wit <sup>[22]</sup>.

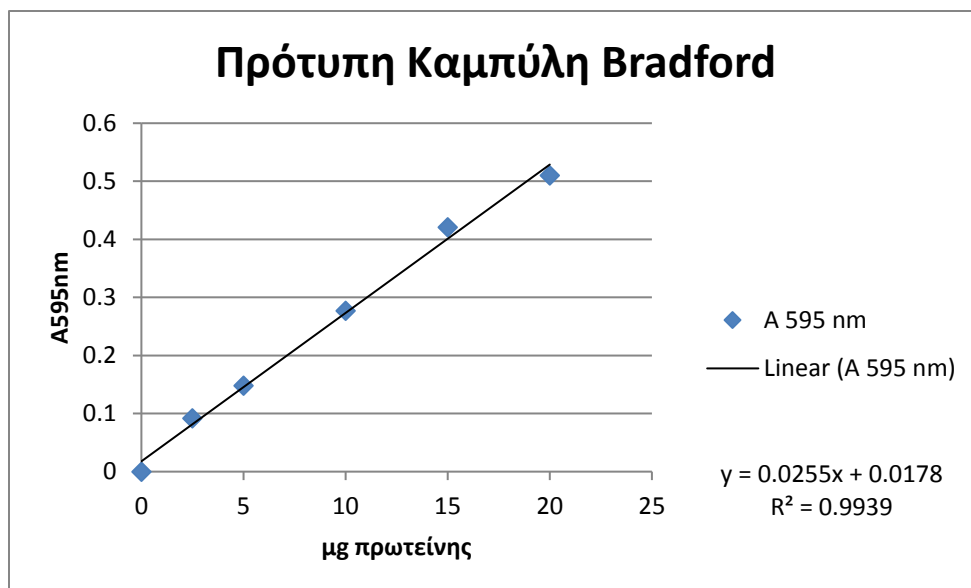
### 2.2.2.3. Ποσοτικοποίηση πρωτεϊνών:

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των πρωτεϊνών σε κάθε δείγμα έγινε με αντιδραστήριο Bradford protein assay της Bio-Rad. Η μέθοδος βασίζεται στην αντίδραση της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250 με τα αμινοξέα των πρωτεϊνών με αποτέλεσμα να δημιουργείται ένα σταθερό χρωμοφόρο σύμπλοκο που εμφανίζει μέγιστη απορροφητικότητα στα 595nm. Η αύξηση της απορρόφησης στα 595nm είναι εύθεως ανάλογη με την περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη. Για την ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών κάθε δείγματος δημιουργήθηκε αρχικά μία πρότυπη καμπύλη με γνωστές συγκεντρώσεις αλβουμίνης του βόειου ορού (BSA) σε διάλυμα Tris-HCl PH=7,4.

|  |     |       |       |       |       |      |
|--|-----|-------|-------|-------|-------|------|
| $m_{\text{BSA}}$ ( $\mu\text{g}$ )                 | 0   | 1     | 5     | 10    | 15    | 20   |
| $V_{\text{Tris } 10\text{mM}}$ ( $\mu\text{l}$ )   | 20  | 19    | 15    | 10    | 5     | 0    |
| $V_{\text{Bradford } 1\text{x}}$ ( $\mu\text{l}$ ) | 980 | 980   | 980   | 980   | 980   | 980  |
| $A_{595\text{nm}}$                                 | 0   | 0.092 | 0.148 | 0.277 | 0.421 | 0.51 |

Πίνακας 6. Μάζα BSA, όγκος αντιδραστηρίου Bradford και οι αντίστοιχες απορροφήσεις για την κατασκευή πρότυπη καμπύλης ποσοτικοποίησης πρωτεϊνών.

Έτσι κατασκευάστηκε η παρακάτω πρότυπη καμπύλη (Διάγραμμα 3) με βάση την οποία υπολογίστηκε το περιεχόμενο σε πρωτεΐνη κάθε δείγματος που μετρήθηκε.



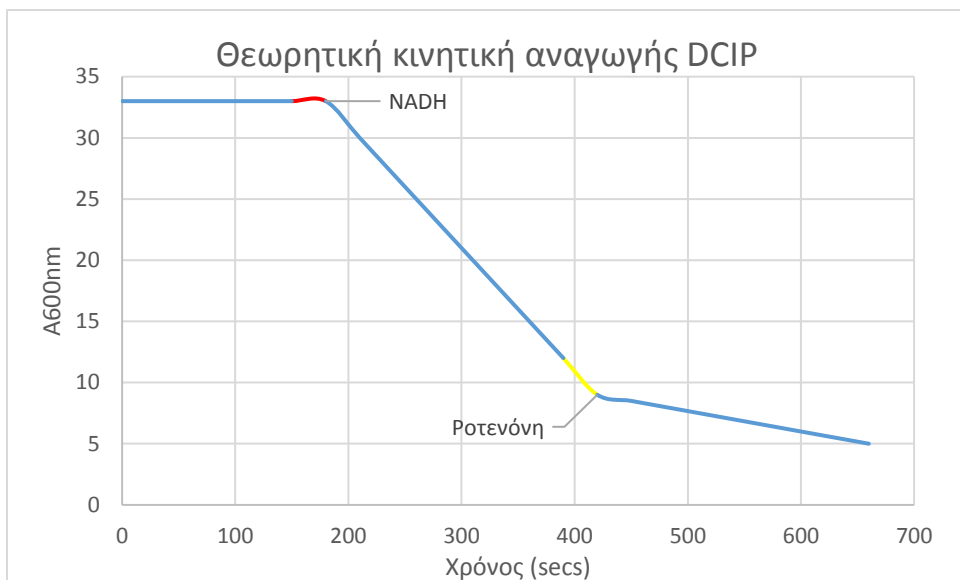
Διάγραμμα 3. Πρότυπη καμπύλη Bradford.

#### 2.2.2.4. Πρωτόκολλα μέτρησης της δραστηριότητας της οξειδοαναγωγής του ζεύγους NADH-Q:

Για τη μέτρηση της δραστηριότητας του Συμπλόκου I σε λεμφοκύτταρα του αίματος δοκιμάστηκαν δυο διαφορετικά πρωτόκολλα τα οποία συλλέχθηκαν από τη βιβλιογραφία. Κοινός τρόπος διαχωρισμού του ζεύγους NADH-Q από άλλες NADH-οξειδάσες είναι η χρήση ροτενόνης. Η ροτενόνη είναι ουσία με εντομοκτόνο δράση που αναστέλλει εξειδικευμένα το Σύμπλοκο I. Έτσι η διαφορά στη δραστηριότητα NADH-οξειδάσης, πριν και μετά τη προσθήκη ροτενόνης, αντιστοιχεί στη δραστηριότητα της οξειδοαναγωγής του ζεύγους NADH-Q.

*A) Spectrophotometric Assay for Complex I of the Respiratory Chain in Tissue Samples and Cultured Fibroblasts* <sup>[23]</sup>: Η μέθοδος βασίζεται στην αναγωγή της 2,6-διχλωροφαινόλης (DCIP) από ηλεκτρόνια που παρέχονται από το ανηγμένο ανάλογο του ενδογενούς CoQ<sub>10</sub> decylubiquinone. Η αναγωγή του DCIP παρακολουθείται φασματοφωτομετρικά στα 600nm. Η μέτρηση γίνεται σε διάλυμα όγκου 1ml το οποίο περιέχει 25mM ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών, 70μM decylubiquinone διαλυμένη σε DMSO, 1μM αντιμυκίνη-α επίσης διαλυμένη σε DMSO, 3.5 g/l BSA διαλυμένη σε 5mM ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών και 0,2mM NADH. Αρχικά το δείγμα επωάζεται στο διάλυμα μέτρησης, απουσία NADH, για 3 λεπτά. Μετά προστίθεται 0,2mM NADH, καλή αναδεύση, και παρακολουθείται του αποχρωματισμού του DCIP στα 600nm για 3 λεπτά καθώς αυτό ανάγεται μέσω της δράσης του Συμπλόκου I. Ύστερα προστίθεται ροτενόνη διαλυμένη σε DMSO και η αναγωγή του DCIP παρακολουθείται για ακόμα

4 λεπτά. Έτσι σύμφωνα με τα παραπάνω μία καμπύλη κινητικής της αναγωγής του DCIP μέσω του Συμπλόκου I θα έχει τη παρακάτω μορφή (Διάγραμμα 4).



Διάγραμμα 4. Θεωρητικό διάγραμμα κινητικής της αναγωγής του DCIP από το Σύμπλοκο I.

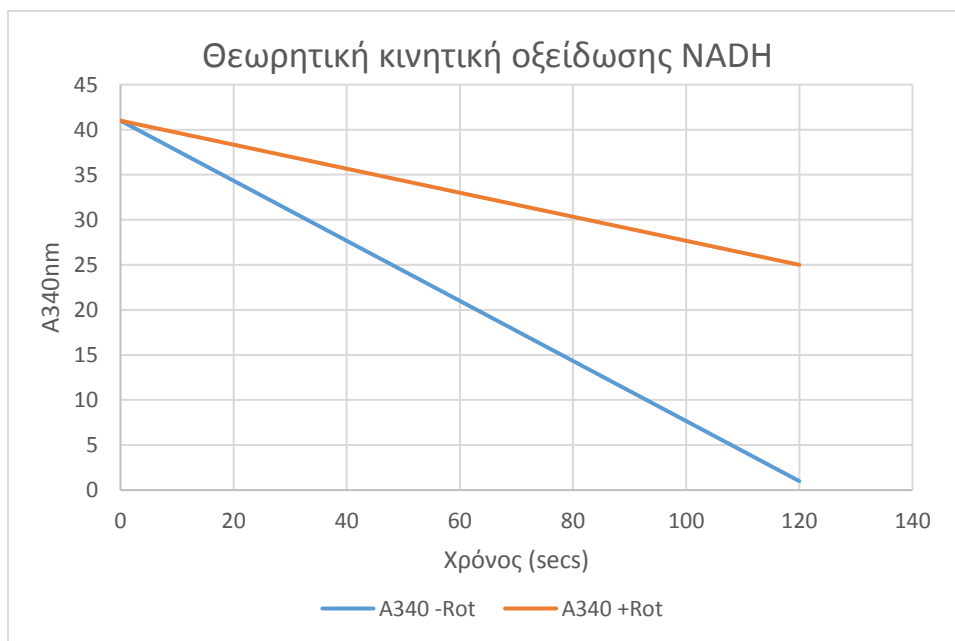
Στα πρώτα 3 λεπτά δεν πρέπει να παρατηρείται κάποια αντίδραση διότι δεν υπάρχει NADH που δρα ως παροχέας ηλεκτρονίων για την αναγωγή του DCIP από το Σύμπλοκο I. Μετά την προσθήκη NADH η αντίδραση ξεκινάει και το DCIP ανάγεται με αποτέλεσμα μείωση της απορρόφητικότητας. Τέλος με την προσθήκη ροτενόνης η δράση του Συμπλόκου I παρεμποδίζεται και έτσι ο ρυθμός αναγωγής του DCIP μειώνεται αισθητά, όμως υπάρχει η πιθανότητα δράσης μη ευαίσθητων στη ροτενόνη NADH-οξειδασών με αποτέλεσμα να παραμείνει ένας μικρός ρυθμός αναγωγής του. Αφαιρώντας την ενζυμική ενεργότητα παρουσίας και την ενζυμική ενεργότητα απουσίας ροτενόνη προσδιορίζεται η δραστηριότητα της οξειδοαναγωγής του ζεύγους NADH-Q.

*B) A simplified and reliable assay for complex I in human blood lymphocytes [22]:*

Η συγκεκριμένη μέθοδος βασίζεται στην παρακολούθηση της οξείδωσης του NADH από το Σύμπλοκο I στα 340nm. Η οξειδωμένη μορφή NAD<sup>+</sup> δεν εμφανίζει απορροφητικότητα στα 340nm. Σημαντικές διαφορές με την προηγούμενη μέθοδο είναι η χρήση του αναλόγου CoQ<sub>1</sub> αντί της decyubiquinone και η πραγματοποίηση δύο μετρήσεων μία απουσία και μία παρουσία

ροτενόνης. Η μέτρησις έγιναν σε κυψελίδα χαλαζία λόγω της χρήσης υπεριώδης ακρινοβολίας και σε όγκο 1ml. Το διάλυμα φωτομέτρησης περιείχε 20mM ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών σε PH=7.4, 25mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2% BSA w/v, 90μM NADH, 1.7mM KCN, 3μM αντιμυκίνη-α διαλυμένη σε DMSO και 65μM CoQ<sub>1</sub> επίσης διαλυμένο σε DMSO.

Αρχικά, απουσία CoQ<sub>1</sub> και ροτενόνης, προστίθεται στο διάλυμα φωτομέτρησης NADH και το δείγμα και το μείγμα επωάζεται για 1 λεπτό στους 37 °C. Η αντίδραση ξεκινά με τη προσθήκη CoQ<sub>1</sub> και ο ρυθμός οξείδωσης του NADH παρακολουθείται στα 340nm μέχρι η αντίδραση να χάσει την δυναμική της. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται με διαφορά τη προσθήκη ροτενόνης στο αρχικό διάλυμα φωτομέτρησης. Οι ενζυμικές ενεργότητες των δύο αντιδράσεων προσδιορίζονται από το ευθύγραμμο τμήμα της κινητικής, αφαιρούνται μεταξύ τους και έτσι προσδιορίζεται η δραστικότητα του Συμπλόκου I. Οι αναμενόμενες κινητικές της μέτρησης θα είναι της μορφής του Διαγράμματος 5. Παρουσία ροτενόνης διατηρείται μία δυναμική οξείδωσης του NADH λόγω της ύπαρξης μη ευαίσθητων στη ροτενόνη NADH-οξειδασών.



Διάγραμμα 5 Μορφή καμπυλών της κινητική οξείδωσης του NADH απουσία και παρουσία ροτενόνης.

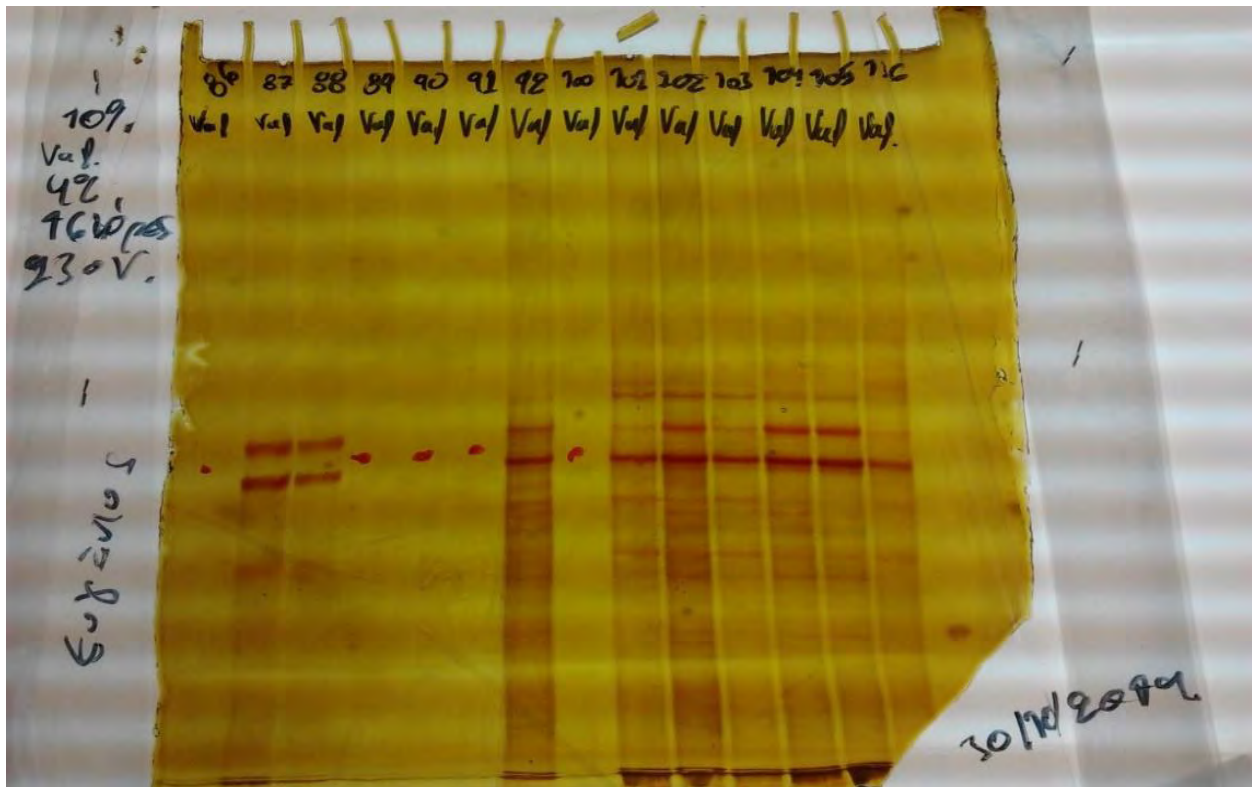
Σύμφωνα με το νόμο του Beer-Lambert ισχύει  $A = \epsilon \cdot b \cdot C$ . Όπου A: απορροφητικότητα,  $\epsilon$ : συντελεστής μοριακής απορροφητικότητας, C: συγκέντρωση του απορροφητικού συστατικού, b: η απόσταση που διανύει η ακτινοβολία διαμέσω του μετρούμενου διαλύματος, άρα το πλάτος της κυψελίδας που χρησιμοποιείται. Έτσι μπορεί να υπολογιστεί η συγκέντρωση του DCIP σε διαφορετικά χρονικά σημεία και επομένως ο ρυθμός αναγωγής του. Ακόμη ισχύει  $1U = 1\mu\text{mol}/\text{min}$ . Τέλος η ειδική δραστηριότητα ενός ενζύμου ορίζεται ως  $U/\text{gr}$ . Υπολογίζοντας λοιπόν τις ειδικές δραστηριότητες απουσία και παρουσία ροτενόνης και βρίσκοντας τη διαφορά τους προσδιορίζεται η ειδική δραστηριότητα του Συμπλόκου I.



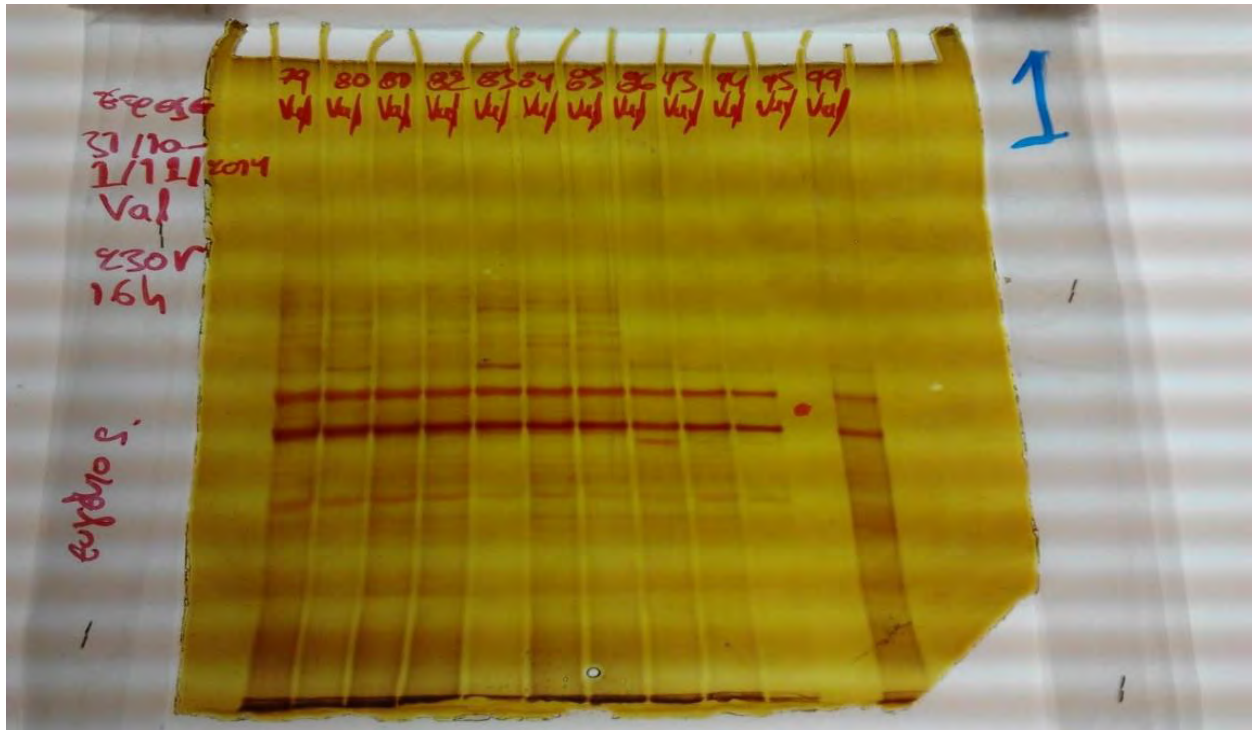
### 3.Αποτελέσματα

#### 3.1. Εντοπισμός και ταυτοποίηση μεταλλάξεων:

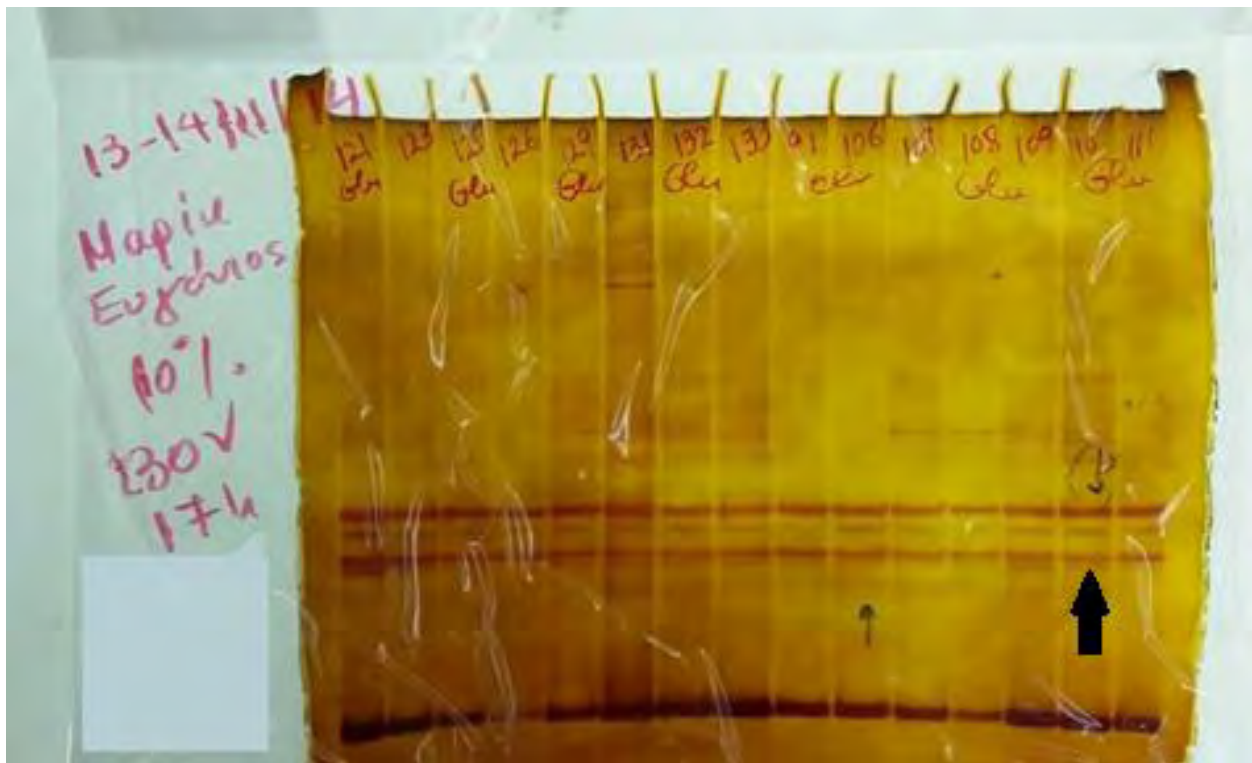
Συνολικά ενισχύθηκαν με PCR 25 δείγματα για το mt-tRNA γονίδιο της βαλίνης και 27 δείγματα για το mt-tRNA γονίδιο του γλουταμικού οξέος τα οποία και ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή πολυακρυλαμίδης για τον εντοπισμό μονοκλωνικών πολυμορφισμών.



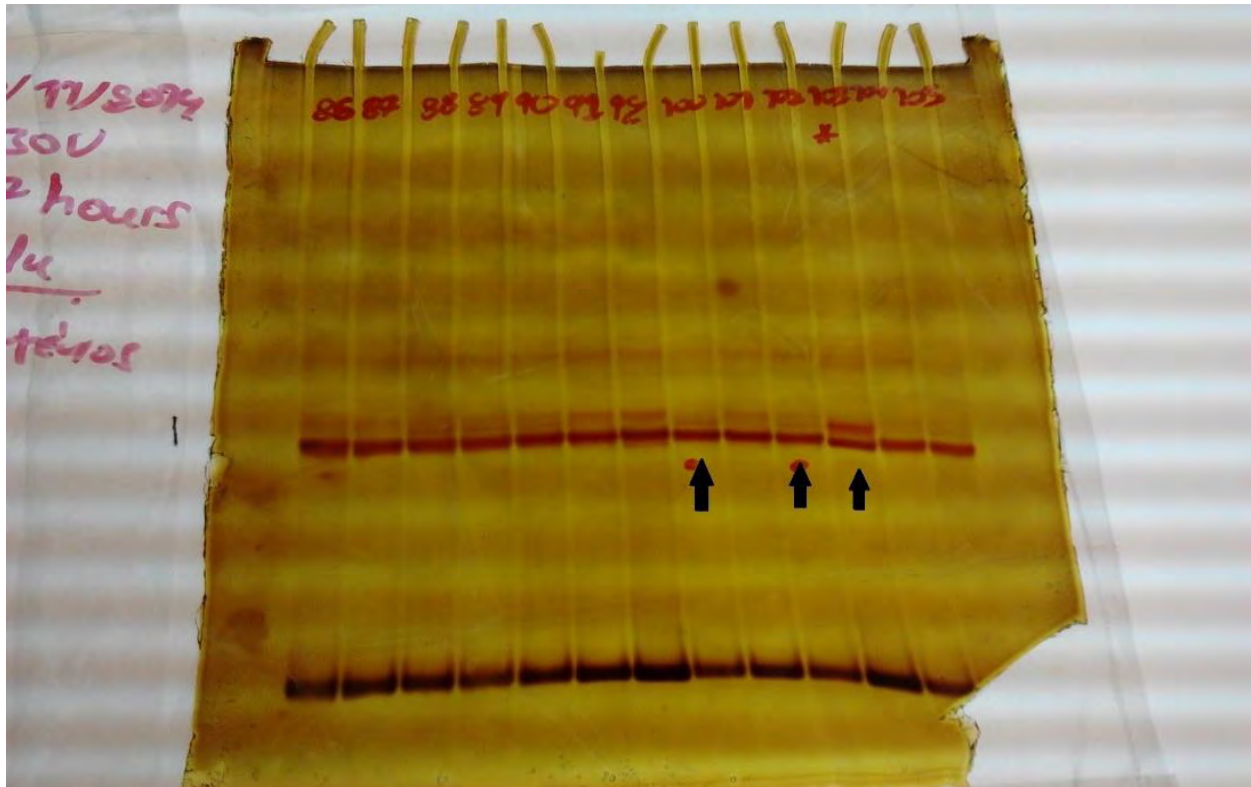
Εικόνα 15α, Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή ακρυλαμίδης PCR-προϊόντων για το mt-tRNA γονίδιο της βαλίνης.



Εικόνα 15β, Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή ακρυλαμίδης PCR-προϊόντων για το mt-tRNA γονίδιο της βαλίνης

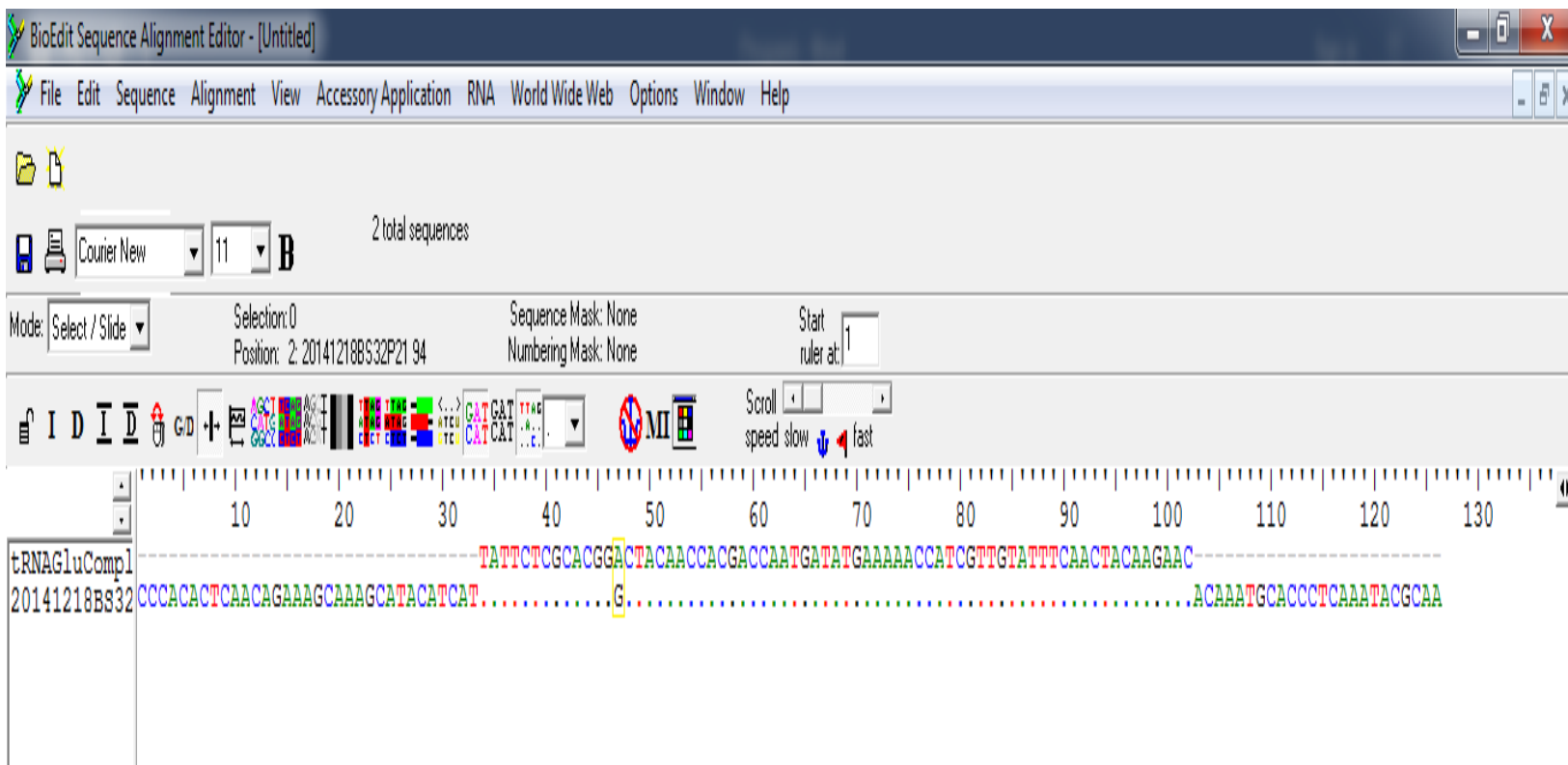


Εικόνα 16α. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή ακρυλαμίδης PCR-προϊόντων για το mt-tRNA γονίδιο του γλουταμικού οξέος.



Εικόνα 16β. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή ακρυλαμίδης PCR-προϊόντων για το mt-tRNA γονίδιο του γλουταμικού οξέος.

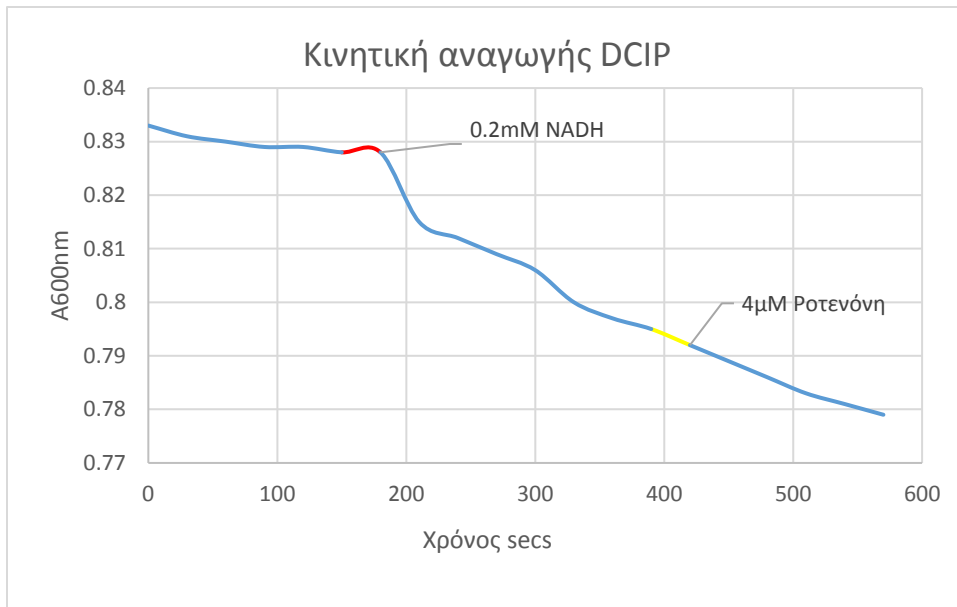
Κατά τη φόρτωση των δειγμάτων 89, 90, 91 ( Εικόνα 15α ) και 100 ( Εικόνα 15β ) έγινε λάθος με αποτέλεσμα να χυθεί το PCR-προϊόν εκτός της πηκτής και να υπάρχει αυτό το αποτέλεσμα. Τα υπόλοιπα δείγματα έδειξαν φυσιολογικό πρότυπο ηλεκτροφόρησης και επόμενως θεωρήθηκε πως δεν υπάρχει η πιθανότητα ύπαρξης κάποιας μετάλλαξης η πολυμορφισμού για το MT-TV γονίδιο. Τα δείγματα 102, 103, 104 ( Εικόνα 16α ) έδειξαν διαφοροποιημένο πρότυπο ηλεκτροφόρησης με τον πάνω κλώνο να μετακινείται ελαφρώς ταχύτερα από τους υπόλοιπους. Ακόμη το δείγμα 110 ( Εικόνα 16β ) επίσης εμφάνισε διαφοροποιημένο πρότυπο ηλεκτροφόρησης. Έτσι ακολούθησε η αλληλούχιση των συγκεκριμένων PCR-προϊόντων. Τα δείγματα 102, 104, 110 δεν εμφάνισαν καμία διαφοροποίηση όμως το δείγμα 103 ήταν φορέας της μετάλλαξης: A14687G η οποία βρίσκεται εσωτερικά του mt-tRNA γονιδίου του γλουταμικού οξέος (Εικόνα 17 ).



Εικόνα 17. Αντιστοίχιση της αλληλουχίας του 103 PCR-προϊόντος (κάτω σειρά) με την αλληλουχία του mt-tRNA γονιδίου του γλουταμικού οξέος (πάνω σειρά, Πηγή: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), μέσω του εργαλείου ClustalW στο λογισμικό Bioedit. Με κίτρινο πλαίσιο τονίζεται η υπάρχουσα μετάλλαξη A14687G.

### 3.2. Σχεδιασμός αξιόπιστου πρωτοκόλλου για μέτρηση της δραστηρότητας της οξειδοαναγωγής του ζεύγους NADH-Q:

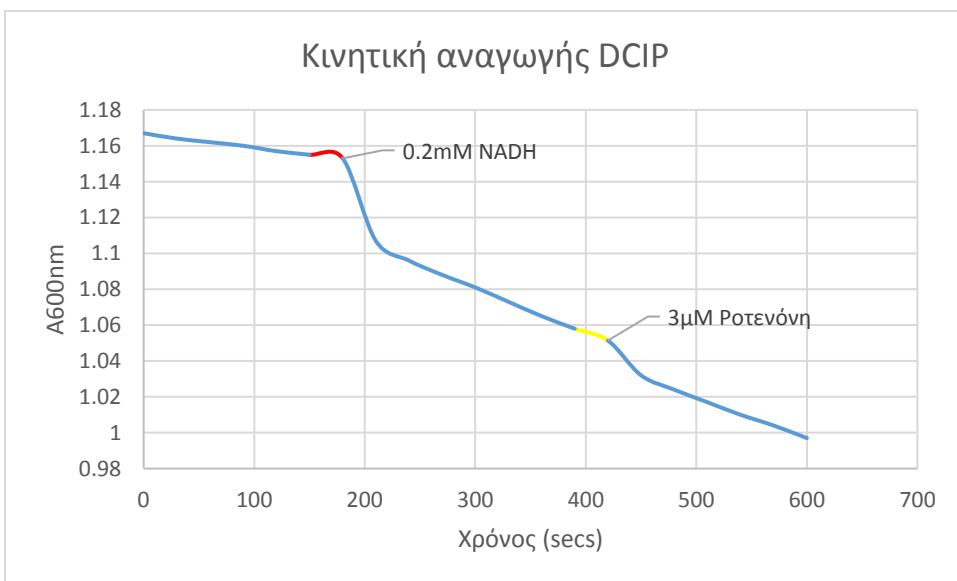
Στη πρώτη φάση για τη μέτρηση της δραστηρότητας του Συμπλόκου I δοκιμάστηκε το πρωτόκολλο της δημοσίευσης Spectrophotometric Assay for Complex I of the Respiratory Chain in Tissue Samples and Cultured Fibroblasts <sup>[23]</sup>. Στα παρακάτω διαγράμματα παρουσιάζονται οι κινητικές αναγωγής του DCIP μέσω της δράσης του Συμπλόκου I και δίπλα αναφέρονται οι συνθήκες μέτρησης του ρυθμού αναγωγής αλλά και ο τύπος και ο τρόπος επεξεργασίας του δείγματος πριν τη μέτρηση.



Διάγραμμα 6.Κινητική αναγωγής DCIP σε δείγμα λεμφοκυττάρων επεξεργασμένο με υπέρηχους.

|                 |
|-----------------|
| <b>Συνθήκες</b> |
| Λεμφοκύτταρα    |
| Υπέρηχους       |

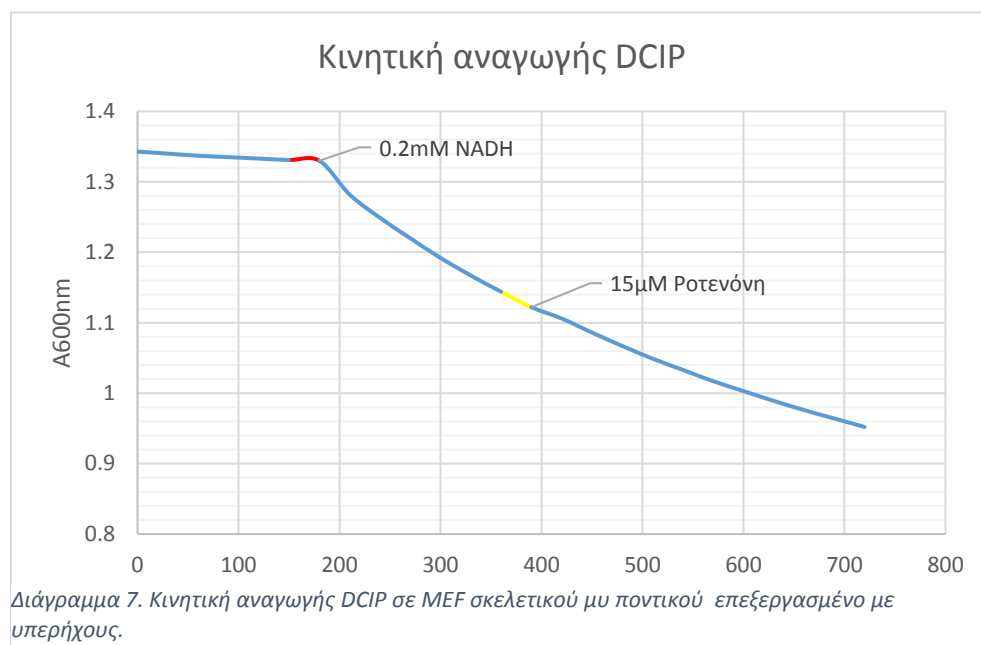
Πριν τη προσθήκη ροτενόνης και μετά τη προσθήκη NADH έχουμε ταχύτητα αναγωγής του DCIP 1.25  $\mu\text{mol}/\text{min}$  και μετά τη προσθήκη ροτενόνης 1 $\mu\text{mol}/\text{min}$ . Έτσι θεωρούμε πως η προσθήκη ροτενόνης δεν είχε κάποιο αποτέλεσμα και επομένως είναι αδύνατος ο προσδιορισμός της δραστηριότητας του Συμπλόκου I. Θέλοντας να αυξήσουμε την ευαισθησία της μέτρησης για το Σύμπλοκο I απομονώσαμε ιζήματα πλούσια σε μιτοχόνδρια ( MEF ) και πραγματοποιήσαμε νέες μετρήσεις ( Διάγραμμα 7 ).



Διάγραμμα 7.Κινητική αναγωγής DCIP σε MEF λεμφοκυττάρων επεξεργασμένο με υπέρηχους.

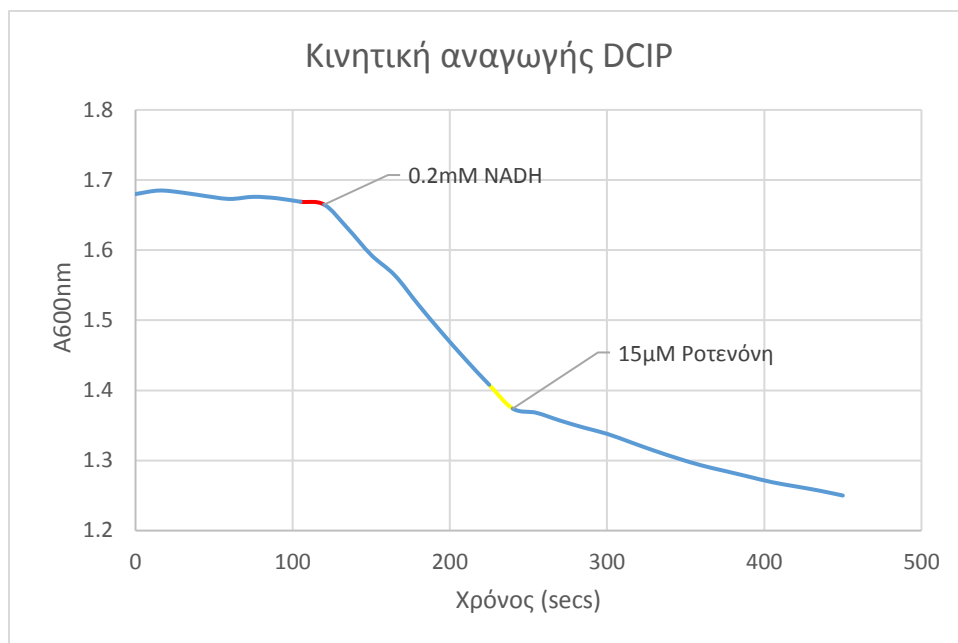
|                            |
|----------------------------|
| <b>Συνθήκες</b>            |
| 27 $\mu\text{g}$ πρωτεΐνης |
| MEF λεμφοκυττάρων          |
| Υπέρηχους                  |

Πριν την προσθήκη ροτενόνης και μετά τη προσθήκη NADH υπάρχει ταχύτητα αναγωγής του DCIP 12 nmol/min/μg ενώ μετά τη προσθήκη ροτενόνης 10 nmol/min/μg. Η ασθενής αντίδραση ίσως οφείλεται στη χαμηλή ποσότητα δείγματος, μόλις 27μg πρωτεΐνης. Το άρθρο από το οποίο εκμαιεύτηκε το πρωτόκολλο μιλάει για εφαρμογή σε ομογενοποίημα μυικών κυττάρων και ινοβλαστών. Έτσι αποφασίσαμε να δοκιμάσουμε το πρωτόκολλο σε μυικούς ιστούς ποντικού.



|                   |
|-------------------|
| <b>Συνθήκες:</b>  |
| 210μg πρωτεΐνης   |
| MEF μύος ποντικού |
| Υπέρηχοι          |

Στη μέτρηση του Διαγράμματος 7 προέκυψε ταχύτητα αναγωγής του DCIP 13,5 nmol/min/μg πριν τη προσθήκη της ροτενόνης και 7nmol/min/μg μετά τη προσθήκη της ροτενόνης. Αυτή η αλλαγή όμως οφείλεται στο χρόνο που έχει περάσει από την έναρξη της αντίδρασης πάρα στη δράση της ροτενόνης. Γίνεται εμφανές από την απαλή μείωση της κλίσης της καμπύλης στο διάγραμμα κατά την πάροδο του χρόνου.

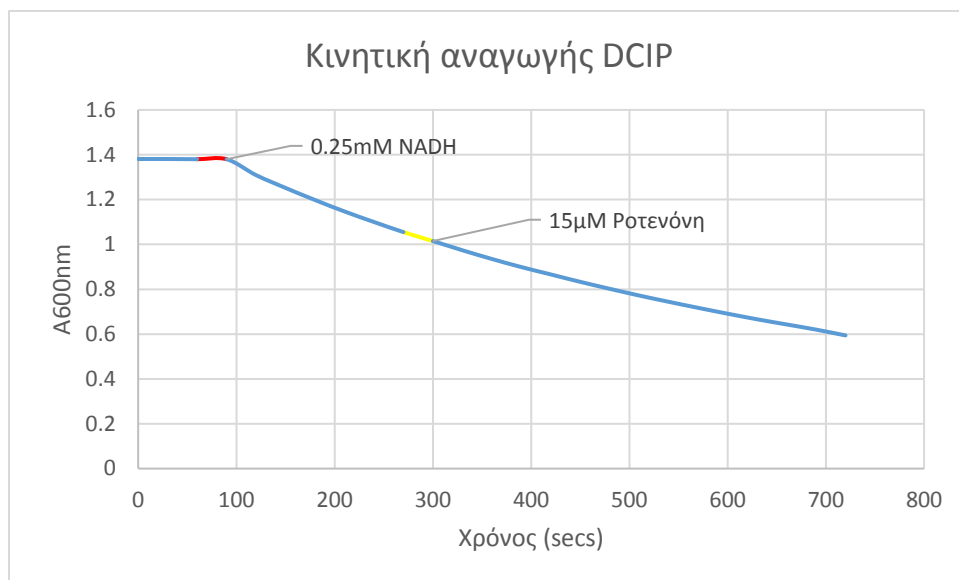


| Συνθήκες  |
|---|
| 348μg πρωτεΐνης                                 |
| MEF μυός ποντικού                               |
| 2 κύκλοι ψύξης/απόψυξης<br>Σε υποτότονο διάλυμα |

Διάγραμμα 8. Κινητική αναγωγής DCIP σε MEF σκελετικού μυ ποντικού επεξεργασμένο με διαδοχικούς κύκλους ψύξης/απόψυξης.

Στη μέτρηση του Διαγράμματος 8 η ταχύτητα αναγωγής του DCIP πριν την προσθήκη ροτενόνης ήταν 20nmol/min/μg και μετά την προσθήκη 5nmol/min/μg. Αυτή η αλλαγή οφείλεται στη δράση της ροτενόνης γιατί όπως παρατηρείται και στο Διάγραμμα 8 αμέσως μετά τη προσθήκη ροτενόνης η κλίση της ευθείας μικραίνει απότομα. Σε αυτή τη περίπτωση είναι δυνατός ο προσδιορισμός της ειδικής δραστηριότητας του Συμπλόκου I η οποία και ισούται με 15nmol/min/μg.

Έτσι εφαρμόσαμε την ίδια μεθοδολογία επεξεργασίας MEF από λεμφοκύτταρα. Τα εμπλουτισμένα ιζήματα σε μιτοχόνδρια λεμφοκυττάρων απομονώθηκαν παρουσία διγλιτονίνης ώστε να αυξηθεί η λύση της κυτταρικής μεμβράνης με σκοπό να αυξηθεί η απόδοση σε ποσότητα πρωτεΐνης.



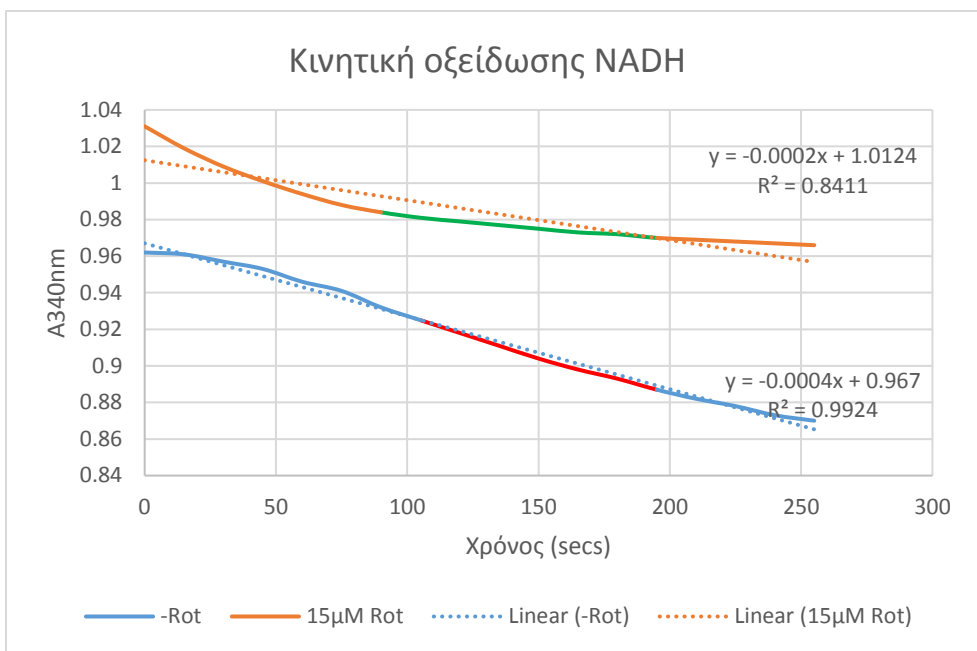
Διάγραμμα 9.Κινητική αναγωγής DCIP σε MEF λεμφοκυττάρων απομονωμένα με διγιτονίνη και επεξεργασμένα με διαδοχικούς κύκλους ψύξης/απόψυξης.

| Συνθήκες                                   |
|--|
| 50μg Πρωτεΐνης                             |
| MEF λεμφοκυττάρων με διγιτονίνη            |
| 2 κύκλοι ψύξης/απόψυξης Σε υπότονο διάλυμα |

Στη μέτρηση του διαγράμματος 9 η ταχύτητα αναγωγής του NADH πριν την προσθήκη ροτενόνης ήταν 97nmol/min/μg ενώ μετά την προσθήκη ροτενόνης 68nmol/min/μg.Και σε αυτή τη περίπτωση η αλλαγή δεν οφείλεται στη δράση της ροτενόνης αλλά στην εξασθένηση της αντίδρασης κατά την πάροδο του χρόνου.

Έτσι θεωρήθηκε πως η συγκεκριμένη μέθοδος ίσως εμφανίζει κάποιο ιστοειδικό χαρακτήρα και γι'αυτό δεν λειτουργεί υπό παρόμοιες συνθήκες σε MEF από λεμφοκύτταρα του αίματος όπως λειτουργεί σε MEF από σκελετικό μυ. Επομένως ανατρέξαμε στην βιβλιογραφία για την εύρεση μίας νέας μεθόδου που λειτουργεί σε λεμφοκύτταρα του περιφερικού αίματος και καταλήξαμε στη δημοσίευση: A simplified and reliable assay for complex I in human blood lymphocytes [22].

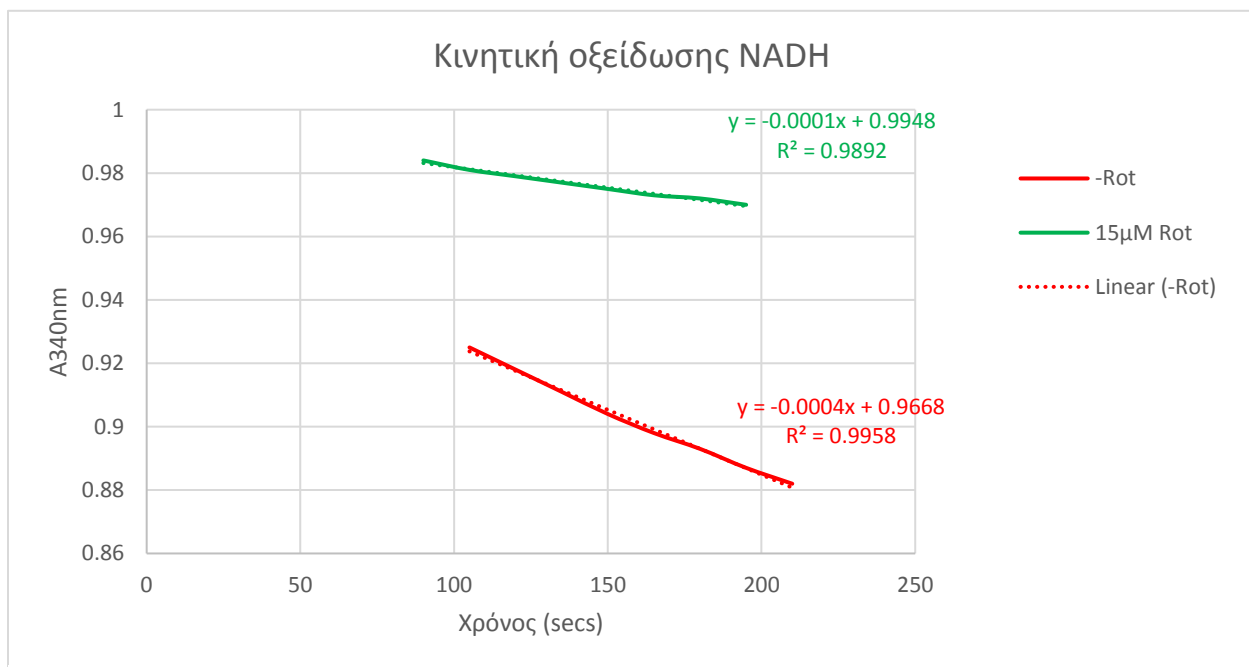




| Συνθήκες                                   |
|--|
| 70µg Πρωτεΐνης                             |
| Λεμφοκύτταρα                               |
| 3 κύκλοι ψύξης απόψυξης σε ισότονο διάλυμα |

Διάγραμμα 10. Κινητική οξείδωσης NADH παρουσία και απουσία ροτενόνης

Οι δύο κινητικές εμφανίζουν αισθητή διαφορά με την κινητική απουσία ροτενόνης να παρουσιάζει εντονότερη κλίση. Για τον προσδιορισμό της ειδικής δραστηριότητας του Συμπλόκου I χρησιμοποιούνται οι διαφορές στην απορροφητικότητα σημείων των ευθύγραμμων τμημάτων της συνολικής κινητικής ( Διάγραμμα 11 ).

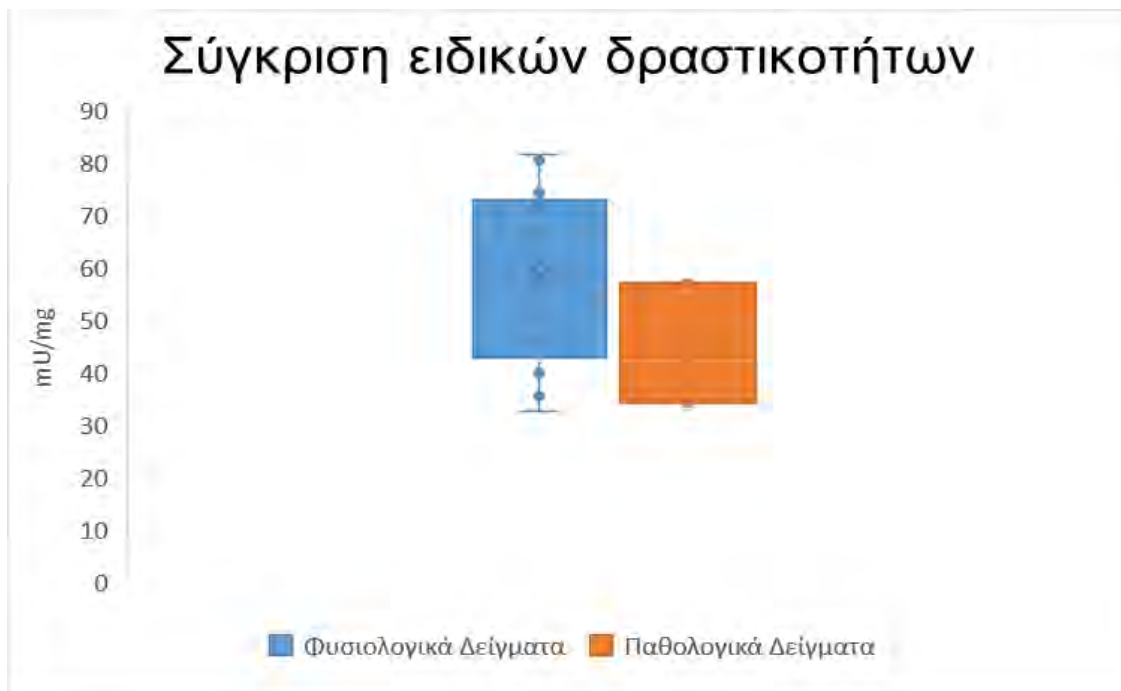


Διάγραμμα 11. Τα ευθύγραμμα τμήματα της συνολικής κινητικής του διαγράμματος 10.

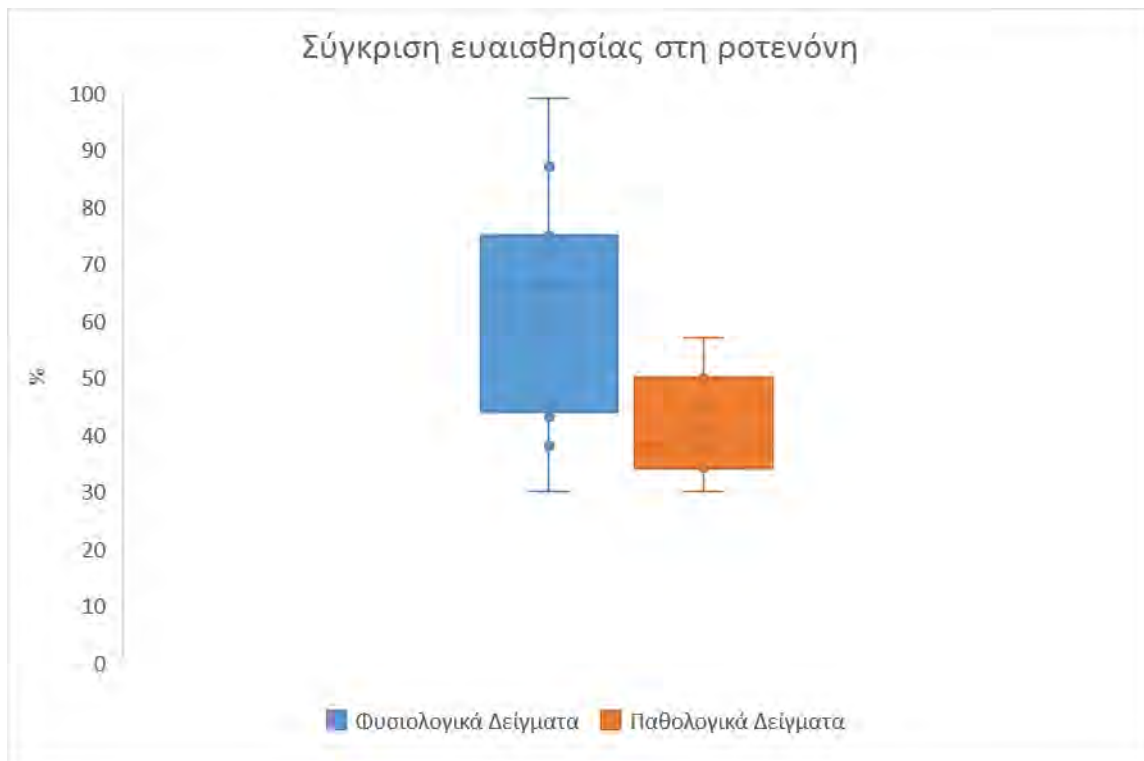
Έτσι βρέθηκε η ειδική δραστικότητα του Συμπλόκου Ι δεκατριών υγείων ατόμων και επτά ατόμων που νοσούν από σαρκοείδωση. Ακόμη προστέθηκε η ευαισθησία στη ροτενόνη για κάθε δείγμα ( % ) διαιρώντας τους συντελεστές της κλίσης κάθε ευθείας για κάθε κινητική. Τα αναλυτικά αποτελέσματα παρουσιάζονται στο Πίνακα 7.

| Φυσιολογικά Δείγματα (N <sub>1</sub> =13) | Ειδική δραστικότητα (mU/mg) | Ειδική δραστικότητα -Rot (mU/mg) | Ειδική δραστικότητα +Rot (mU/mg) | Ευαισθησία στη ροτενόνη (%) |
|---|-----------------------------|----------------------------------|----------------------------------|-----------------------------|
| Δ1  | 32.8                        | 57.1                             | 24.3                             | 75                          |
| Δ2  | 71.4                        | 142.8                            | 71.4                             | 45                          |
| Δ3  | 80.7                        | 157.1                            | 76.4                             | 66                          |
| Δ4  | 81.7                        | 176                              | 94.3                             | 43                          |
| Δ5  | 35.56                       | 43.84                            | 7.14                             | 87                          |
| Δ6  | 45.7                        | 91.4                             | 45.7                             | 72                          |
| Δ7  | 66.7                        | 160                              | 38                               | 75                          |
| Δ8  | 74.3                        | 104.7                            | 85.7                             | 30                          |
| Δ9  | 60                          | 60                               | 0                                | 99                          |
| Δ10                                       | 40                          | 67.57                            | 28.2                             | 60                          |
| Δ11                                       | 64                          | 98                               | 34                               | 57                          |
| Δ12                                       | 52                          | 112                              | 60                               | 38                          |
| Δ13                                       | 58                          | 80                               | 22                               | 72                          |
| Μέσος όρος(μ <sub>1</sub> )               | 58,681                      |                                  |                                  | 63                          |
| Τυπική απόκλιση (SD <sub>1</sub> )        | 16,537                      |                                  |                                  | 20,029                      |
| Παθολογικά δείγματα (N <sub>2</sub> =7)   | Ειδική δραστικότητα (mU/mg) | Ειδική δραστικότητα -Rot (mU/mg) | Ειδική δραστικότητα +Rot (mU/mg) | Ευαισθησία στη ροτενόνη (%) |
| Π1  | 57.1                        | 114.1                            | 57.1                             | 45                          |
| Π2  | 57.1                        | 95.2                             | 38.1                             | 57                          |
| Π3  | 42.8                        | 114.2                            | 71.4                             | 38                          |
| Π4  | 34.3                        | 114.3                            | 80                               | 34                          |
| Π5  | 57.1                        | 132.8                            | 75.7                             | 34                          |
| Π6  | 42.9                        | 85.7                             | 42.8                             | 30                          |
| Π7  | 34.3                        | 80                               | 45.7                             | 50                          |
| Μέσος όρος(μ <sub>2</sub> )               | 46,514                      |                                  |                                  | 41,143                      |
| Τυπική απόκλιση (SD <sub>2</sub> )        | 10,499                      |                                  |                                  | 9,839                       |

Πίνακας 7.Ειδικές δραστικότητες του Συμπλόκου Ι σε φυσιολογικά και παθολογικά δείγματα.



Διάγραμμα 12. Σύγκριση ειδικών δραστηριοτήτων ανάμεσα σε φυσιολογικά ( $\mu_1=58.681, SD_1=16.537$ ) και παθολογικά δείγματα ( $\mu_2=46,514, SD_2=10.499$ ).



Διάγραμμα 13. Σύγκριση ευαισθησίας στη ροτενόνη φυσιολογικών ( $\mu_1=63, SD_1=20.029$ ) και παθολογικών δειγμάτων ( $\mu_2=41,143, SD_2=9,839$ ).

Για τις τιμές που συλλέχθηκαν πραγματοποιήθηκε t-test για δύο ομάδες δειγμάτων (φυσιολογικά και παθολογικά) για τον έλεγχο της στατιστικής σημαντικότητας των διαφόρων στην ειδική δραστικότητα και στην ευαισθησία στη ροτενόνη, ανάμεσα στις δύο ομάδες. Οι παράμετροι του t-test ήταν two tailed και για τους δύο ελέγχους ενώ equal variances και unequal variances για τον έλεγχο της στατιστικής σημαντικότητας και για τον έλεγχο της ευαισθησίας στη ροτενόνη αντίστοιχα. Ο τύπος καθορίστηκε με προηγούμενο F-test όπου και προέκυψε  $F_{stat} < F_{crit}$  για τις τιμές της ειδικής δραστικότητας και  $F_{stat} > F_{crit}$  για τις τιμές στην ευαισθησία στη ροτενόνη. Έτσι για τις διαφορές στην ειδική δραστικότητα προέκυψε  $P=0.096$  και για τις διαφορές στην ευαισθησία στη ροτενόνη  $P=0.004$ .

## 4. Συμπεράσματα/Συζήτηση

Η δειγματοληψία για τον εντοπισμό και την ταυτοποίηση μεταλλάξεων στα γονίδια MT-TV και MT-TE έγινε από **συγκεκριμένη περιοχή**. Έτσι από γονιδιωματικής άποψης και από το συγκεκριμένο πλήθος δειγμάτων δεν φαίνεται συσχέτιση της σαρκοείδωσης με το MT-TV γονίδιο. Από τα 27 δείγματα που αναλύθηκαν για μεταλλάξεις ή πολυμορφισμούς στο MT-TE γονίδιο ένα έφερε τη μετάλλαξη A146876G. Είναι μία ήδη γνωστή μετάλλαξη που έχει συσχετιστεί με μιτοχονδριακή μυοπάθεια και αναπνευστική ανεπάρκεια <sup>[24]</sup> αν και έχει χαρακτηριστεί ως πολυμορφική <sup>[21]</sup>. Ακόμη έλειπε από το αίμα του ασθενούς και από τη μητέρα του και επομένως να είναι απλώς μία τυχαία σωματική μετάλλαξη <sup>[21]</sup>. Όμως εντοπισμός της στη παρούσα έρευνα πιθανώς αποτελεί ένα ακόμα κομμάτι στο παζλ του ρόλου των μιτοχονδρίων στην νόσο της σαρκοείδωσης.

Η μέθοδος για τον φασματοφωτομετρικό προσδιορισμό της δρατικότητας του Συμπλόκου I της αναπνευστικής αλυσίδας σε δείγματα ιστών και καλλιέργειών ινοβλαστών <sup>[23]</sup> έδειξε ιστοειδικό χαρακτήρα. Σε ίδιες συνθήκες μέτρησης και επεξεργασίας του δείγματος η μέθοδος λειτούργησε ικανοποιητικά σε MEF μυϊκού ιστού αλλά σε MEF λεμφοκυττάρων η ροτενόνη δεν εμφάνισε κάποια επίδραση με αποτέλεσμα να μην είναι δυνατός ο προσδιορισμός της δρατικότητας του Συμπλόκου I. Ήταν απαραίτητη η διεξαγωγή της έρευνας σε λεμφοκύτταρα του περιφερικού αίματος λόγω του εύκολου, γρήγορου και ανώδυνου τρόπου συλλογής του δείγματος. Η απλοποιημένη και αξιόπιστη μέθοδος μέτρησης της δρατικότητας του Συμπλόκου I σε ανθρώπινα λεμφοκύτταρα του αίματος <sup>[22]</sup> εμφάνισε ικανοποιητική λειτουργικότητα. Ο συντελεστής μεταβλητότητας (CV%) στο Intra-Assay (N=3)=11.16% και στο Inter-Assay (N=15)=28%. Είναι ελαφρώς καλύτερα αποτελέσματα του L.E.A de Wit et. al που παρουσίασε  $CV_{\text{Intra Assay}}=12\%$  και  $CV_{\text{Inter Assay}}=41\%$ . Ακόμη έχουν αναφερθεί συντελεστές μεταβλητότητας Inter-Assay σε καλλιέργειες 143B κυττάρων και ινοβλαστών 7,3% και 7,6% αντίστοιχα <sup>[25]</sup>. Στη περίπτωση μας επειδή το δείγμα προέρχεται από οργανισμούς με διαφορετικό γενετικό και περιβαλλοντικό υπόβαθρο οι διαφορές ανάμεσα σε Intra-Assay και Inter-Assay να οφείλονται σε αντίστοιχους παράγοντες (ηλικία, διατροφή, άσκηση κ.α) αν και το κάπνισμα δεν εμφάνισε

κάποια συσχέτιση ( $P=0.384>0,1$ ). Έτσι είναι άξιο έρευνας η βελτίωση της ακρίβειας της μεθόδου σε δείγμα λεμφοκυττάρων. Τέλος άξιο συζήτησης είναι ο υποκειμενικός τρόπος απομόνωσης ενός ευθύγραμμου τμήματος από τη συνολική κινητική οξειδωσης του NADH για τον προσδιορισμό της δραστικότητας του Συμπλόκου I <sup>[26]</sup>. Κάποιο διαφορετικό άτομο θα μπορούσε να υπακούσει στον ίδιο κανόνα, χωρίς λάθος, και να υπολογίσει με διαφορετικές διαφορές στην απορροφητικότητα διαφορετική ειδική δραστικότητα.

Στη σύγκριση της ειδικής δραστικότητας σε φυσιολογικά και παθολογικά δείγματα προέκυψε  $0,1<P=0.96<0.05$ . Επομένως οι τιμές αποτελούν ένδειξη ότι οι δύο ομάδες ανήκουν σε διαφορετικό πλυθησμό <sup>[29]</sup>. Ακόμη από τη διενέργεια t-test για την επί τοις εκατό ευαισθησία στη ροτενόνη προέκυψε  $P=0,004<0,05$ , σχέση που δείχνει μία στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στις δύο ομάδες δειγμάτων.

Τελικά οι μεταλλάξεις στα μιτοχονδριακά tRNA μπορούν να εκθέσουν την αποτελεσματικότητα της μιτοχονδριακής μεταφραστικής μηχανής με αποτέλεσμα την ζημίωση της λειτουργικότητας των ενζύμων της αναπνευστικής αλυσίδας συμπεριλαμβανομένης της οξειδοαναγωγής του ζεύγους NADH-Q. Για παράδειγμα το σύνδρομο MELAS είναι μία νευροεκφυλιστική νόσος που χαρακτηρίζεται από μιτοχονδριακή μυοπάθεια, εγκεφαλοπάθεια, οξέωση λόγω γαλακτικού και εγκεφαλικά επεισόδια. Είναι μία από τις πιο συνηθισμένες μιτοχονδριακές παθήσεις και στο 80% των περιπτώσεων εντοπίζονται σημειακές μεταλλάξεις στο mt-tRNA<sup>Leu(UUR)</sup>. Μετρήσεις στη δραστικότητα των ενζύμων της αναπνευστικής αλυσίδας αποκάλυψαν ανεπάρκεια του Συμπλόκου I ή του Συμπλόκου I και του Συμπλόκου IV. Ακόμη στο σπάνιο σύνδρομο της μυοκλονικής επιληψίας με αγγειόμορφες κόκκινες ίνες (MERRF) εντοπίζεται η μετάλλαξη A8344G στο mt-tRNA<sup>Lys</sup> και εξέχων χαρακτηριστικό είναι η ανεπάρκεια του Συμπλόκου IV <sup>[30]</sup>. Τέλος συγκρίθηκε η παραγωγή σουπεροξειδίου και η δραστικότητα του Συμπλόκου I σε καλλιέργειες ινοβλαστών μεταξύ φυσιολογικών δειγμάτων και 21 δειγμάτων από παιδιά με κληνομούμενη δυσλειτουργία του Συμπλόκου I. Η παραγωγή σουπεροξειδίου βρέθηκε σημαντικά αυξημένη σε όλες εκτός από δύο καλλιέργειες της δυσλειτουργικής σειράς <sup>[27]</sup>.

Τα σύνδρομα MELAS και MERRF έχουν ξεκάθαρη μιτοχονδριακή αιτιολογία. Όμως η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία συμβάλλει και στις πολυπαραγοντικές ασθένειες του Parkinson's και του Alzheimer's. Μη αναστρέψιμος παρκινσονισμός εκδηλώνεται εάν χορηγηθεί MPTP, ένα παραπροϊόν της σύνθεσης του οποιοειδούς MPPP. Το MPTP διαπερνά τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό, οξειδώνεται σε MPP<sup>+</sup> και προσλαμβάνεται από τους ντοπαμινεργικούς νευρώνες. Εκεί συσσωρεύεται στα μιτοχόνδρια και αναστέλλει το Σύμπλοκο I. Σαν αποτέλεσμα η παραγωγή ATP μειώνεται και αυξάνεται η παραγωγή ενεργών ριζών οξυγόνου και αζώτου. Τα παρακάτω σηματοδοτικά γεγονότα που οδηγούν στο κυτταρικό θάνατο είναι περίπλοκα αλλά εμπλέκουν την ενεργοποίηση προ-αποπτωτικών μελών της Bcl2-οικογένειας, κασπασών και επάγουν την φλεγμονή [31]. Στο σύνδρομο του Alzheimer κύριος παράγοντας κινδύνου είναι η ηλικία. Όπως ήδη αναφέρθηκε το μιτοχονδριακό γενεϊκό υλικό είναι επιδεκτικό σε μεταλλάξεις και τα μιτοχόνδρια αποτελούν σημείο παραγωγής ενεργών ριζών οξυγόνου. Με το πέρασμα του χρόνου μπορεί να συσσωρευθούν μεταλλάξεις μειώνοντας την απόδοση της αναπνευστικής αλυσίδας με αποτέλεσμα την αύξηση της παραγωγής ενεργών ριζών οξυγόνου. Ακόμη η β-αμυλοειδής πρωτεΐνη εισέρχεται στα μιτοχόνδρια και παρεμποδίζει την σωστή μεταφορά των πυρινικά κωδικοποιημένων υπομονάδων των ενζύμων της αναπνευστικής αλυσίδας μέσω εμποδισμού των συμπλόκων TIM23 και TIM40. Έτσι διαταράσσεται η λειτουργία της αναπνευστικής αλυσίδας, αυξάνεται ο ρυθμός σχηματισμού ενεργών ριζών οξυγόνου και επάγεται η απόπτωση [31].

Η σαρκοείδωση αν και άγνωστης αιτιολογίας είναι μία πολυπαραγοντική νόσος που τόσο γενετικοί όσο και περιβαλλοντικοί παράγοντες συμβάλλουν στην εκδήλωσή της. Η παρουσία μεταλλάξεων στη πλειοψηφία των mt-tRNA γονιδίων αλλά και οι ένδειξη ανεπάρκεια του Συμπλόκου I είναι στοιχεία που υποδεικνύουν στον μιτοχονδριακό παράγοντα. Όμως για μία καλύτερη πειραματικά αποδεδειγμένη βάση θα χρειαστούν μετρήσεις της δραστηριότητας του Συμπλόκου I σε περισσότερα δείγματα που να κατανέμονται ομοιόμορφα στο πληθυσμό ή φέρουν μεταλλάξεις στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα. Επόμενο βήμα θα μπορούσε να είναι η σύγκριση των επιπέδων παραγωγής ATP και ενεργών ριζών οξυγόνου σε φυσιολογικά και κλινικά δείγματα ώστε να ελεγχθεί η συνολική λειτουργικότητα της αναπνευστικής αλυσίδας. Τέλος στις πολυπαραγοντικές ασθένειες του Parkinson και Alzheimer τα μιτοχόνδρια έχουν

ενεργοποιητικό ρόλο στο προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο επομένως είναι ενδιαφέρον η σύγκριση των επιπέδων προαποπτωτικών και αντιαποπτωτικών μορίων ανάμεσα σε κλινικά και φυσιολογικά δείγματα.



## Βιβλιογραφία:

- [1] King, TE, Jr. Sarcoidosis: Interstitial Lung Diseases: Merck Manual Home Edition 2008
- [2] Sweiss NJ, Patterson K, Sawaqed R, Jabbar U, Korsten P, Hogarth K, Wollman R, Garcia JG, Niewold TB, Baughman RP; Patterson; Sawaqed; Jabbar; Korsten; Hogarth; Wollman; Garcia; Niewold; Baughman (August 2010). "Rheumatologic manifestations of sarcoidosis". *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*. 31 (4): 463–73.
- [3] Muller-Quernheim J., Prasse A., Zissel G.,: Pathogenesis of sarcoidosis. *Sarcoidosis Quarterly Medical Review*. 2012.
- [4] Srrerild A., Backer V., Kyvik KO., Kapri J., Milman N., Srensen CB., Thomsen SF.,: Heredity Sarcoidosis: a registry base twin study. *Thorax* 2008
- [5] Kindt J.T., Goldsby A.R., Osborne A.B.: *Immunology, Sixth Edition*, W.H. Freeman and Company, New York 2007, 410-417.
- [6] Judson MA., Thompson MW, Rabin DL., Steimel J., Knattereud GL., Lackland DT., Rose C., Rand CS., Baughman RP., Teirstein AS., ACCESS Research Group: The diagnostiv pathway to sarcoidosis. *Chest* 2003
- [7] Costabel U.: Sarcoidosis: Clinical update. *Eur Respir J. Suppl*. 2001
- [8] Jasper PL. and Penny FW.Q Sarcoidosis in Children. *J. PEDIATR*. 1968
- [9] Kiper N, Anadol D., Ozceli KU., Gochmen A.,: Inhaled corticosteroids for maintainance treatment in childhood pulmonary sarcoidosis. *Acta paediatr* 2001
- [10] Lower ET., Baughman RP.,: The use of low dose methotrexate in refractory sarcoidosis
- [11] Margulis L.: *Symbiosis in cell evolution*, W.H. Freeman, New York 1981
- [12] Raff R.A., Muhler H.R.: The non symbiotic origin of mitochondria. *Science* 1972
- [13] Gray MW., and Doolittle WF.,: Has the endosymbiotic theory been proved? *Microbiol. Rev*. 1982

[14] Anderson, S.; Bankier, A. T.; Barrell, B. G.; de Bruijn, M. H. L.; Coulson, A. R.; Drouin, J.; Eperon, I. C.; Nierlich, D. P.; Roe, B. A.; Sanger, F.; Schreier, P. H.; Smith, A. J. H.; Staden, R.; Young, I. G. (1981). "Sequence and organization of the human mitochondrial genome". *Nature*.

[15] Cooper M.G., Hausman E.R.: *The Cell: A Molecular Approach*, Fifth Edition, 2009, Second Tome, 646-655.

[16] Berg M.J., Tymoczko L.J, Stryer L.,: *Biochemistry*, Fifth Edition, W.H. Freeman and Company 2002. 536, 557-581.

[17] Osellame D.O., B.Sc (Hons), Ph.D, Research Associate<sup>a,b,d</sup>, Thomas S. Blacker, MPhys, MRes, Research Student<sup>a,c,d</sup>, Michael R. Duchon, BA (Oxon), MBBS, MRCP, PhD, MAE, FSB, Professor of Physiology<sup>a,b,\*</sup>. a: of Cell and Developmental Biology, University College London, London WC1E 6BT, United Kingdom

b:UK Parkinson's Disease Consortium, Institute of Neurology, University College London, London WC1N 3BG, United Kingdom c: Department of Physics and Astronomy, University College London, London WC1E 6BT, United Kingdom. \*:Corresponding author. Department of Cell and Developmental Biology, University College London, London WC1E 6BT. d:Tel.: þ44 20 7679 7127.:Cellular and molecular mechanisms of mitochondrial function. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2012. 711-723.

[18] Cooper M.G., Hausman E.R.: *The Cell: A Molecular Approach*, Fifth Edition, 2009, Second Tome, 1029-1035.

[19] Lopez Armada J.M., Riveiro-Naveira R.R., Vaamonde-Garcia C., Valcarcel-Ares N.M.: Mitochondrial dysfunction and the inflammatory response. *Mitochondrion* 2013.

[20] Song S., et al. DNA precursor asymmetries in mammalian tissue mitochondria and possible contribution of mutagenesis through reduced replication fidelity. *Proceedings of the National Academy Of sciences* 2005. 4990-4995.

[21] Zifa E., Giannouli S., Theotokis P., Stamatis C., Mamuris Z., Stathopoulos C.,: Mitochondrial tRNA Mutations, Clinical and Functional Perturbations. *RNA Biology* 38-66. 2007

- [22] de Wit L.E.A., Spruijt L., Schoondewoerd G.C., de Coo I.F.M, Smeets H.J.M., Scholte H.R., Sluiter W.: A simplified and reliable assay for complex I in human blood lymphocytes. *Journal of Immunological Methods* 2007.
- [23] Janssen J.M.A., Trijbels J.M.F., Sengers C.A.R., smeytink A.M.J., Heuvel van den P.L., Wintjes T.M.L., Stoltenborg-Hogenkamp J.M.B., and Rodenburg J.T.R.: Spectrophotometric Assay For Complex I of the Respiratory Chain in Tissue Samples and Cultured Fibroblasts. *Clinical Chemistry* 729-734. 2007.
- [24] Bruno, C., Sacco, O., Santorelli, F. M., Assereto, S., Tonoli, E., Bado, M., Rossi, G. A., Minetti, C. (2003) Mitochondrial myopathy and respiratory failure associated with a new mutation in the mitochondrial transfer ribonucleic acid glutamic acid gene *Journal of Child Neurology* . 18 (4): 300-303 .
- [25] Oliveira K.K., Kiyamoto Hitomi B., Rodriguez DeSanti A., Tengan Harumi C.,: Complex I spectrophotometric assay in cultured cells: detailed analysis of key factors. *Analytical Biochemistry* 2012.
- [26] Diwakar L., Ray A., Ravindranath V.: Complex I Assay in Mitochondrial Preparations from CNS. *Current Protocols in Toxicology* 2008.
- [27] Hirst J., King S.M., Pryde R.K.: The production of reactive oxygen species by Complex I. *Biochemical Society Transactions* 2008.
- [28] Brown T.A.: *GENOMES 3* , Garland Science Publishing, 2007, 53.
- [29] Τριχόπουλος Δ., Τζώνου Α., Κατσουγιάννη Κ.: Βιοστατιστική. Επιστημονικές Εκδόσεις Παριζιάνου 2002. 34.\
- [30] Zeviani M. and Di Donato S.: Review Article Mitochondrial disorders. *Brain* 2004
- [31] Winklhofer F. K., Hass C.,: Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Biochimica et Biophysica* 2010.
- [32] Renato X Santos X. R., Correia C.S., Wang X., Perry G., Smith A.M., Moreira I.P., Zhu X.: Alzheimer's disease: diverse aspects of mitochondrial malfunctioning, *Int J Clin Exp Pathol*. 2010

