

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**“ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥ G11778A  
ΤΟΥ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟΥ DNA ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ  
ΜΕ ΣΚΛΗΡΥΝΣΗ ΚΑΤΑ ΠΛΑΚΑΣ”**



ΔΗΜΗΤΡΗΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΥ

ΛΑΡΙΣΑ ΙΟΥΛΙΟΣ 2008



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ  
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»**

Αριθ. Εισ.: 7044/1

Ημερ. Εισ.: 27-03-2009

Δωρεά: Π.Θ.

Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ

2008

ΔΗΜ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ  
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087324

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Μοριακής & Κυτταρικής Βιολογίας και Γενετικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας υπό την επίβλεψη του Αναπληρωτή Καθηγητή Νευρολογίας κ. Γεώργιου Χατζηγεωργίου.

Τριμελής Επιτροπή:

1. Γεώργιος Χατζηγεωργίου, Αναπληρωτής Καθηγητής Νευρολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
2. Ζήσης Μαμούρης, Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
3. Κων/νος Σταθόπουλος, Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα μου κ. Χατζηγεωργίου για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε με την ανάθεση της παρούσας μελέτης. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τα μέλη της τριμελούς επιτροπής για τη συνεισφορά τους και το χρόνο που αφιέρωσαν στην εργασία αυτή. Τέλος θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον Ειδικευόμενο Ιατρό Νευρολογίας, κ. Ευθύμιο Δαρδιώτη για τη συνεργασία και τη στήριξη καθ' όλη τη διάρκεια διεξαγωγής των πειραμάτων.

## Περιεχόμενα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ .....	4
ABSTRACT .....	5
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	6
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	6
1.1 Το μιτοχόνδριο και το γονιδίωμά του.....	6
1.2 Μεταλλάξεις του μιτοχονδριακού DNA .....	9
1.2.1 Η μετάλλαξη G11778A του mtDNA .....	14
1.2 Σκλήρυνση κατά πλάκας.....	17
1.2.1 Μυελίνη και εξέλιξη της πλάκας.....	21
1.2.2 Αιτιοπαθογένεια.....	26
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ .....	32
2.1 Ασθενείς .....	32
2.2 Υλικά .....	32
2.3 Μέθοδοι.....	33
2.3.1 Απομόνωση του mtDNA .....	33
2.3.2 Προσδιορισμός ποιότητας και συγκέντρωσης του DNA .....	36
2.3.3 Αλυσιδωτή Αντίδραση της Πολυμεράσης (PCR: Polymerase Chain Reaction).....	37
2.3.4 Πέψη με ένζυμο περιορισμού – Πολυμορφισμός μήκους τμημάτων περιορισμών (RFLP) .....	42
2.3.5 Ηλεκτροφόρηση .....	44
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	47
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....	52
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	57

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το μιτοχονδριακό DNA κωδικοποιεί μόρια σημαντικά για την αναπνευστική αλυσίδα της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Μεταλλάξεις, απαλοιφές και ανακατατάξεις του μιτοχονδριακού DNA έχουν συσχετιστεί με ασθένειες, κυρίως μυοπάθειες και νευροπάθειες. Η μετάλλαξη G11778A στο γονίδιο που κωδικοποιεί την τέταρτη υπομονάδα της NADH αφυδρογονάσης έχει συσχετιστεί με την ασθένεια LHON. Ωστόσο, κάποιες έρευνες συσχετίζουν τη συγκεκριμένη μετάλλαξη και με την οπτική νευρίτιδα που εμφανίζουν ασθενείς με σκλήρυνση κατά πλάκας. Στα πλαίσια της παρούσας μελέτης ελέγχθηκε το μιτοχονδριακό DNA 92 ατόμων με σκλήρυνση κατά πλάκας, 20% των οποίων παρουσίαζαν οπτική νευρίτιδα. Η μετάλλαξη G11778A δεν εντοπίστηκε σε κανένα από τα υπό μελέτη δείγματα, ενισχύοντας τα αποτελέσματα άλλων ερευνητικών ομάδων για έλλειψη συσχέτισής της με την συγκεκριμένη ασθένεια σε ορισμένες ομάδες πληθυσμών.

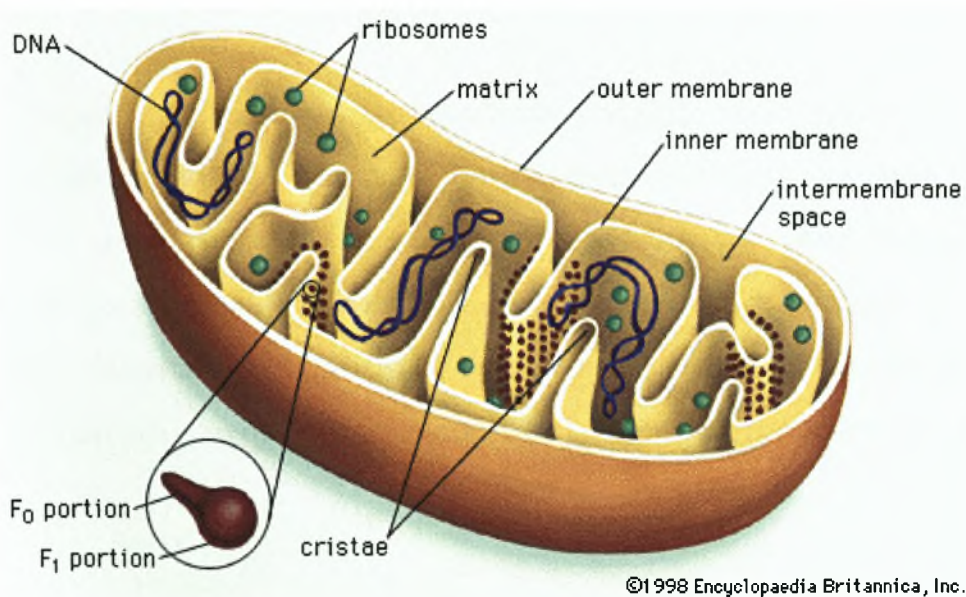
## ABSTRACT

Mitochondrial DNA codes for specific and important factors that participate in oxidative phosphorylation. MtDNA mutations, deletions and rearrangements have been associated with various human diseases, especially neuropathies and myopathies. The mutation G11778A, located in the gene that codes for the fourth subunit of NADH dehydrogenase, is present in patients that suffer from LHON. Meanwhile, this mutation has been linked to optic neuritis, a dysfunction of Multiple Sclerosis patients. This study focused on the survey of 92 mtDNA samples of MS patients, 20% of whom suffer from optic neuritis. The mutation G11778A was not found in any of the analyzed samples. These results support previous surveys in this field, which found no correlation of this specific mutation and MS in various populations.

# 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

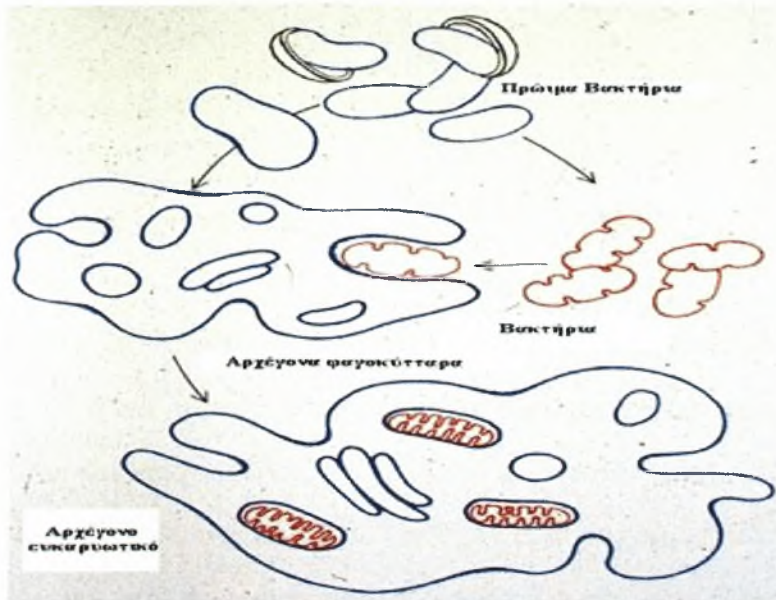
## 1.1 Το μιτοχόνδριο και το γονιδίωμά του

Τα μιτοχόνδρια είναι βασικά οργανίδια, τα οποία είναι παρόντα σε όλα σχεδόν τα κύτταρα των θηλαστικών. Αποτελούνται από δύο συστήματα μεμβρανών, μία εξωτερική μεμβράνη που περιβάλλει το μιτοχόνδριο και μία εσωτερική η οποία αναδιπλώνεται δημιουργώντας πτυχώσεις, τις ακρολοφίες. Έτσι το μιτοχόνδριο διαμερισματοποιείται στο διαμεμβρανικό χώρο, που είναι ο χώρος ανάμεσα στην εξωτερική και την εσωτερική μεμβράνη και στη μήτρα ή στρώμα, που είναι ο χώρος που περιβάλλεται από την εσωτερική μεμβράνη **(Εικόνα 1)**. Μέσα στη μήτρα του μιτοχονδρίου βρίσκεται το δικό του DNA, ριβοσώματα, πολυάριθμες πρωτεΐνες, για να επιτελούν τις λειτουργίες του, και άλλα μόρια.



Εικόνα 1: Η δομή του μιτοχονδρίου

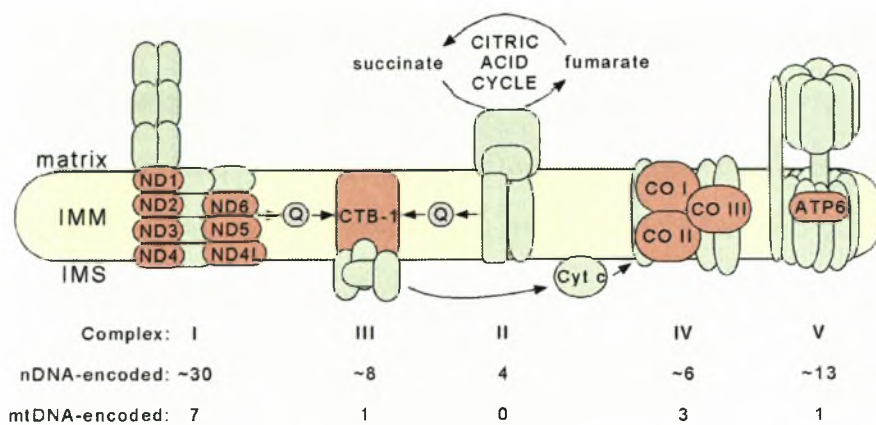
Τα οργανίδια αυτά προήλθαν από βακτήρια που εγκοιλώθηκαν σε ένα αρχέγονο ευκαρυωτικό κύτταρο και επέζησαν στο εσωτερικό του, διαβιώντας συμβιωτικά με τον ξενιστή τους (Εικόνα 2).



Εικόνα 2: Προέλευση των μιτοχονδρίων

Η κύρια λειτουργία των μιτοχονδρίων είναι να υποστηρίξουν την αερόβια αναπνοή και να εξασφαλίζουν ενεργειακό υπόστρωμα, υπό τη μορφή ATP, μέσω την αναπνευστικής αλυσίδας για τα ενδοκυτταρικά μεταβολικά μονοπάτια (Εικόνα 3). Εκτός από αυτή τη βασική τους λειτουργία, φαίνεται ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στην κυτταρική σηματοδότηση και ειδικότερα στη σηματοδότηση για την απόπτωση.<sup>1</sup>





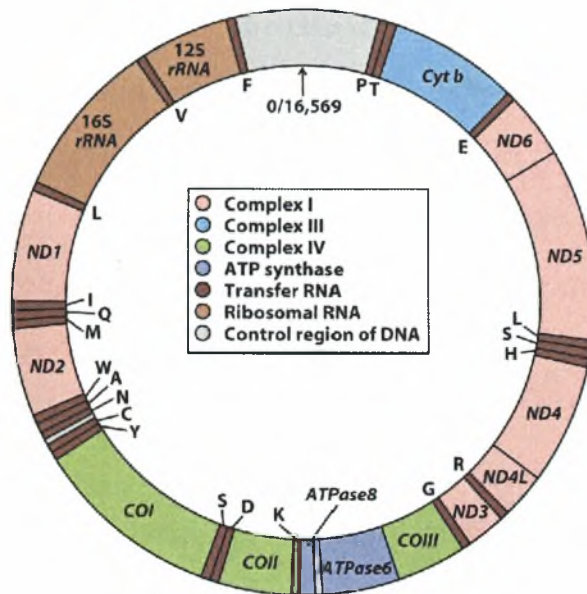
Εικόνα 3: Η αναπνευστική αλυσίδα

Κάθε ανθρώπινο κύτταρο περικλείει εκατοντάδες μιτοχόνδρια, καθένα από τα οποία περιέχει από δύο μέχρι δέκα αντίγραφα ενός μικρού, δίκλωνου, κυκλικού DNA που αποτελείται από 16569 ζεύγη νουκλεοτιδίων<sup>2</sup>. Το mtDNA διπλασιάζεται αυτόνομα και ανεξάρτητα από το πυρηνικό, ενώ τα μιτοχόνδρια διαχωρίζονται στα θυγατρικά κύτταρα ανεξάρτητα από τα πυρηνικά χρωμοσώματα. Αυτό το εξωπυρηνικό γονιδίωμα κληρονομείται μητρικά. Το μιτοχονδριακό γονιδίωμα περιλαμβάνει 37 γονίδια (Εικόνα 4). Αυτά τα γονίδια κωδικοποιούν:

➤ Δεκατρείς πρωτεΐνες, οι οποίες είναι όλες υπομονάδες των συμπλόκων της αναπνευστικής αλυσίδας που παίρνουν μέρος στη μεταφορά ηλεκτρονίων και τη σύνθεση ATP (σύμπλοκα I, III και IV). Αυτά τα ολοένζυμα συμπληρώνονται από περίπου εβδομήντα επιπρόσθετες υπομονάδες που προέρχονται από τον πυρήνα και εισάγονται στα μιτοχόνδρια από το κυτταρόπλασμα για να δημιουργήσουν τα ενεργά σύμπλοκα για τη σύνθεση του ATP.

➤ Δύο rRNAs, ένα 12S και ένα 16S. Τα μιτοχονδριακά ριβοσώματα σχηματίζονται από μία μικρή 28S υπομονάδα και μία μεγάλη 39S υπομονάδα. Η μικρή υπομονάδα αποτελείται από το 12S RNA και 29 πρωτεΐνες που προέρχονται από τον πυρήνα και η μεγάλη υπομονάδα αποτελείται το 16S RNA και 48 πυρηνικές πρωτεΐνες.

➤ Είκοσι δύο tRNAs, τα μόρια που μεταφέρουν αμινοξέα στο ριβόσωμα και μεσολαβούν στην ενσωμάτωσή τους σε πολυπεπτίδια με μεγάλη ακρίβεια. Το μιτοχονδριακό γένωμα περιέχει δύο tRNAs ειδικά για τη σερίνη, δύο tRNAs για τη λευκίνη και από ένα tRNA ειδικό για το κάθε ένα από τα υπόλοιπα 18 αμινοξέα.



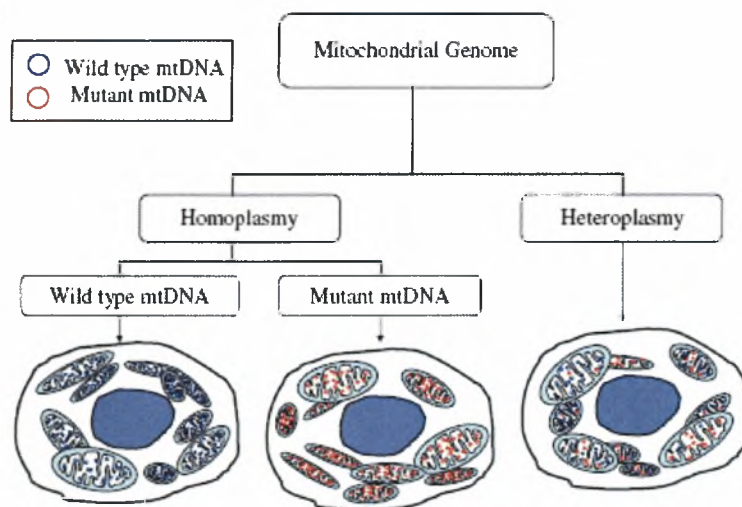
Εικόνα 4: Το γονιδίωμα του mtDNA

## 1.2 Μεταλλάξεις του μιτοχονδριακού DNA

Το μιτοχονδριακό γονιδίωμα υφίσταται μεταλλάξεις 10 με 17 φορές με υψηλότερο ρυθμό από το πυρηνικό γονιδίωμα.<sup>3,4</sup> Αυτό συμβαίνει γιατί μέσα στα μιτοχόνδρια απουσιάζουν τα ένζυμα επιδιόρθωσης που απαντώνται στον πυρήνα με αποτέλεσμα η αντιγραφή να γίνεται με μικρότερη πιστότητα. Επίσης, απουσιάζει η προστατευτική αλληλεπίδραση του DNA με τις ιστόνες. Μία άλλη πιθανή αιτία που παρατηρούνται υψηλότεροι ρυθμοί μεταλλάξεων στο mtDNA είναι ότι αυτό εντοπίζεται κοντά στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη και έτσι εκτίθεται σε μεγάλες δόσεις μεταλλαξιογόνων ενεργών ριζών οξυγόνου

(ROS), οι οποίες παράγονται από την αναπνευστική αλυσίδα. Το γεγονός επίσης ότι το ανθρώπινο mtDNA είναι ιδιαίτερα συμπαγές, στερείται ιντρονίων, τα γονίδια που κωδικοποιεί βρίσκονται το ένα δίπλα στο άλλο και πολλές φορές επικαλύπτονται (μόνο το 5% του μορίου δεν κωδικοποιείται) ίσως να παίζει ένα κύριο ρόλο στον παρατηρούμενο υψηλό ρυθμό μεταλλαξιγένεσης.

Στους φυσιολογικούς ιστούς όλα τα mtDNAs είναι πανομοιότυπα, μία κατάσταση που ονομάζεται ομοπλασμία. Η συνύπαρξη φυσιολογικού mtDNA και μεταλλαγμένου στο ίδιο μιτοχόνδριο, κύτταρο, όργανο σε ξεχωριστές αναλογίες καλείται ετεροπλασμία (Εικόνα 5). Το επίπεδο της ετεροπλασμίας παίζει ένα καίριο ρόλο στον προσδιορισμό του κλινικού φαινοτύπου, καθώς στις περισσότερες περιπτώσεις για να έχουμε κάποια παθολογεία το ποσοστό του μεταλλαγμένου mtDNA πρέπει να ξεπερνά ένα συγκεκριμένο όριο. Οι ιστοί που εξαρτώνται περισσότερο από την οξειδωτική φωσφορυλίωση είναι οι μυς και το κεντρικό νευρικό σύστημα. Έτσι τα μιτοχονδριακά νοσήματα χαρακτηρίζονται συνήθως από μυοπάθειες και νευροπάθειες.



Εικόνα 4: Ομοπλασμία και Ετεροπλασμία του mtDNA.

Το 1988 χαρακτηρίστηκαν οι πρώτες μεταλλάξεις στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα που σχετίζονται με κάποια παθολογία.<sup>5</sup> Από τότε πάνω από 200 μεταλλάξεις που έχουν συσχετιστεί με παθολογίες έχουν ταυτοποιηθεί. Ενδεικτικά στον Πίνακα 1 φαίνονται κάποιες ασθένειες που έχουν συσχετιστεί με μεταλλάξεις στο mtDNA<sup>6</sup>.

**Πίνακας 1:** Παραδείγματα μιτοχονδριακών μεταλλάξεων που έχουν συσχετιστεί με ασθένειες

Ασθένεια	Γονίδιο	Μετάλλαξη
MELAS	tRNA <sup>Leu(UR)</sup>	A3243G
MERF	tRNA <sup>Lys</sup>	A8344G
LHON	ND4	G11778A

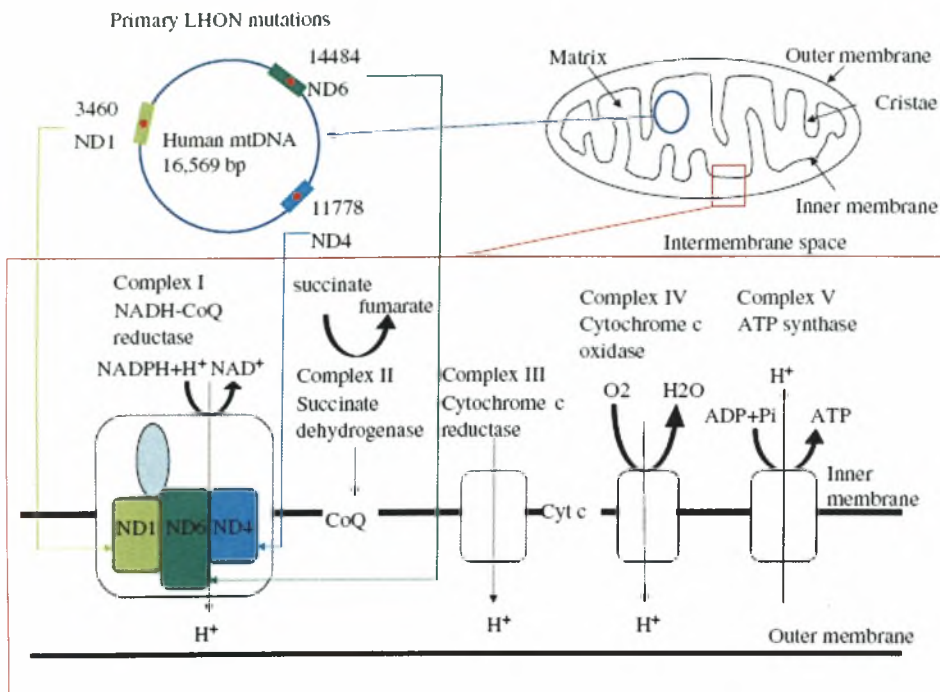
Η μετάλλαξη του mtDNA στη θέση 11778 όπου η γουανίνη αντικαθίσταται από αδενίνη έχει συσχετιστεί άμεσα με την Κληρονομική Οπτική Νευροπάθεια του Leber (Leber's Hereditary Optic Neuropathy, LHON). Η ασθένεια αυτή έχει χαρακτηριστεί κλινικά από το Theodore Leber το 1871 και διακρίνεται από γρήγορη και ανώδυνη απώλεια της όρασης στο ένα ή και στα δύο μάτια (**Εικόνα 5**). Στα άτομα που πάσχουν από LHON και φέρουν μεταλλάξεις στο mtDNA (βλέπε παρακάτω) παρατηρείται μια δραματική μείωση των αμφιβληστροειδικών γαγγλίων και των αποφυάδων των νευρικών αξόνων σε σχέση με άτομα που έχουν φυσιολογικό αμφιβληστροειδή.<sup>7</sup> Να σημειωθεί ότι η νόσος αυτή προσβάλλει πολύ συχνότερα τους άντρες παρά τις γυναίκες, για αδιευκρίνιστους λόγους, ενώ η ηλικία που προσβάλλει η νόσος είναι συνήθως η δεύτερη με τρίτη δεκαετία ζωής του ασθενούς.



**Εικόνα 5:** Πώς βλέπει ένας ασθενής που πάσχει από οπτική νευρίτιδα και ένα υγιές άτομο

Ο πρώτος που πιθανολόγησε ότι η LHON σχετίζεται με κάποια μετάλλαξη στο mtDNA είναι ο Erickson το 1972.<sup>8</sup> Αργότερα αποδείχθηκε ότι η LHON οφείλεται κυρίως σε τρεις μεταλλάξεις του mtDNA. Και οι τρεις μεταλλάξεις απαντώνται σε υπομονάδες του συμπλόκου I της αναπνευστικής αλυσίδας. Η πρώτη μετάλλαξη που συσχετίστηκε με τη νόσο είναι η μετάπτωση της γουανίνης (G) σε αδερίνη (A) στη θέση 11778 και έχει ως αποτέλεσμα να αντικατασταθεί η αργινίνη (Arg, R) στο κωδικόνιο 340 της τέταρτης υπομονάδας της NADH-αφυδρογονάσης (ND4) από ιστιδίνη (His, H).<sup>9</sup> Αργότερα βρέθηκε η συσχέτιση της νόσου με τη μετάλλαξη στη θέση 3460 του mtDNA όπου και πάλι η G μεταλλάσσεται σε A με αποτέλεσμα την αλλαγή της αλανίνης (Ala, A) σε θρεονίνη (Thr, T) στη θέση 52 της ND1.<sup>10,11</sup> Η τρίτη μετάλλαξη που βρέθηκε να είναι πρωταρχικής σημασίας για την πρόκληση της LHON είναι η μετάλλαξη στη θέση 14484 όπου μία θυμίνη (T) αντικαθίσταται από κυτοσίνη (C). Σε αυτήν την περίπτωση μία βαλίνη (Val, V) παίρνει τη θέση της μεθειονίνης (Met, M) στη θέση 64 της ND6<sup>12, 13</sup> (**Εικόνα 6**).





Εικόνα 6: Οι τρεις κύριες μεταλλάξεις στις θέσεις 3460, 11778 και 14484 επηρεάζουν τις υπομονάδες ND1, ND4 και ND6 του συμπλόκου I της αναπνευστικής αλυσίδας

Οι πιο πάνω μεταλλάξεις είναι υπεύθυνες για το 95% περίπου των ασθενών που πάσχουν από LHON στην Ευρώπη.<sup>14</sup> Επίσης η μετάλλαξη στη θέση 11778 είναι η πιο συχνή στους ασθενείς καθώς υπερβαίνει το 50% των περιπτώσεων, ενώ η παρουσία της είναι υψηλότερη στους Ασιάτες παρά στην Καυκάσια φυλή.<sup>15, 16</sup> Εν τούτοις η διείδυση της νόσου δεν είναι ίδια σε όλους τους ασθενείς και έχει προταθεί ότι η μία εκ των τριών τουλάχιστον μεταλλάξεων πρέπει να είναι μεν παρούσα για να παρουσιάσει ο ασθενής κλινικά συμπτώματα αλλά η σοβαρότητα της ασθένειας κρίνεται και από άλλους γενετικούς παράγοντες (πυρηνικούς και μιτοχονδριακούς), όπως είναι κάποιες περιοχές στο X χρωμόσωμα, καθώς επίσης και από περιβαλλοντικούς παράγοντες, όπως το αλκοόλ και το κάπνισμα, με αντικρουόμενα όμως αποτελέσματα.

### 1.2.1 Η μετάλλαξη G11778A του mtDNA

Η μετάλλαξη G11778A του μιτοχονδριακού DNA εντοπίζεται στο γονίδιο που κωδικοποιεί την υπομονάδα 4 της NADH αφυδρογονάσης. Η υπομονάδα αυτή συμμετέχει στο σύμπλοκο I της αναπνευστικής αλυσίδας. Το σύμπλοκο I είναι ένα από τα πολλά ενζυμικά σύμπλοκα που είναι απαραίτητα για την οξειδωτική φωσφορύλιση. Κατά τη διαδικασία αυτή τα μιτοχονδριακά πρωτεϊνικά σύμπλοκα φέρουν εις πέρας χημικές αντιδράσεις που οδηγούν στη σύνθεση ATP. Συγκεκριμένα, δημιουργούν μια διαβάθμιση ηλεκτρικών φορτίων στις δύο πλευρές της εσωτερικής μεμβράνης μέσω σταδιακής μεταφοράς ηλεκτρονίων. Αυτή η διαφορά στο φορτίο παρέχει την ενέργεια για τη σύνθεση του ATP. Το σύμπλοκο I είναι υπεύθυνο για το πρώτο βήμα της διαδικασίας μεταφοράς ηλεκτρονίων, τη μεταφορά δηλαδή των ηλεκτρονίων από το NADH στην ουβικινόνη.

Το σύμπλοκο I της αναπνευστικής αλυσίδας (NADH-αφυδρογονάση) αποτελείται από 39 υπομονάδες που προέρχονται από το πυρηνικό γονιδίωμα και 7 υπομονάδες που τις κωδικοποιεί το mtDNA.<sup>17</sup> Οι μιτοχονδριακές υπομονάδες σχηματίζουν τον κοντό υδρόφοβο βραχίονα του συμπλόκου στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη. Σύμφωνα με βιοχημικές μελέτες<sup>18, 19, 20, 21</sup> η μετάλλαξη G11778A και η επακόλουθη αντικατάσταση της ιδιαίτερα συντηρημένης Arg στο κωδικόνιο 340 με His (Εικόνα 7), προκαλεί μείωση της ενεργότητας του συμπλόκου κατά 20% (Εικόνα 6). Η βλάβη αυτή στην ενεργότητα του συμπλόκου έχει ως αποτέλεσμα την εξασθένιση της αναπνευστικής λειτουργίας. Έχει δειχθεί ότι η G11778A προκαλεί μία μείωση της τάξης του 30-36% της αναπνευστικής λειτουργίας.<sup>18</sup>

Q92258   NU4M_CANFA	VLIQTPWSYMGATALMIAHGLTSSMLFCLANSNYERIHSR	MILARGLQTLPLMAAWWL
P48655   NU4M_HORSE	VLIQTPWSYMGATALMIAHGLTSSMLFCLANSNYERTHSR	MILARGLQTLPLMAAWWL
P48916   NU4M_FELCA	VLIQTPWSYMGATALMIAHGLTSSMLFCLANSNYERVHSR	MILARGLQTLPLMAAWWL
O79881   NU4M_PIG	IMIQTWPWSFMGATALMIAHGLTSSMLFCLANTNYERVHSR	MILARGLQTLPLMATWWL
P03910   NU4M_BOVIN	ILIQTPWSYMGATALMIAHGLTSSMLFCLANSNYERIHSR	MILARGLQTLPLMATWWL
O79436   NU4M_RABIT	ILIQTPWSFMGATALMIAHGLTSSLLFCLANSNYERIHSR	MILARGLQTLPLMAAWWL
P03907   NU4M_GORGO	ILIQTPWSFTGAVVLMIAHGLTSSLLFCLANSNYERTHSR	MILSQGLQTLPLMALWWL
P03905   NU4M_HUMAN	ILIQTPWSFTGAVILMIAHGLTSSLLFCLANSNYERTHSR	MILSQGLQTLPLMAFWWL
P03906   NU4M_PANTR	ILIQTPWSFTGAILMIAHGLTSSLLSCLANSNYERTHSR	MILSQGLQTLPLMAFWWL
P03908   NU4M_PONPY	ILIQTPWSFTGATLMIAHGLTSSLLFCLANSNYERTHSR	MILSQGLQTLPLMALWWL
P03911   NU4M_MOUSE	IMIQTWPWSFMGATMLMIAHGLTSSLLFCLANSNYERIHSR	MIMARGLQMVFLMATWWL
P05508   NU4M_RAT	IMIQTWPWSFMGATMLMIAHGLTSSLLFCLANTNYERIHSR	MIMARGLQMI FPLMATWWL
P18939   NU4M_CHICK	SMIQTPQWSFSGAMILMISHGLTSSLLFCLANTNYERTHSR	LLILTRGLQPLPLMSVWWL

**Εικόνα 7:** Πολλαπλή ομοπαράθεση τμήματος των αλληλουχιών των υπομονάδων ND4 από ανώτερα θηλαστικά. Με κόκκινο φαίνεται η ιδιαίτερα συντηρημένη ανάμεσα στα είδη αργινίνη (R) που αλλάζει σε ιστιδίνη (H) παρουσία της μετάλλαξης του mtDNA G11778A.

Παρά τη μείωση της ενζυμικής ενεργότητας του συμπλόκου I και του αναπνευστικού ρυθμού, σε μελέτες που έγιναν σε λεμφοκύτταρα φαίνεται το ενεργειακό φορτίο να μην επηρεάζεται σε ασθενείς οι οποίοι φέρουν την μετάλλαξη G11778A.<sup>22</sup> Αυτό συμβαίνει γιατί στους ασθενείς που φέρουν τη συγκεκριμένη μετάλλαξη παρατηρούνται κάποια αντισταθμιστικά φαινόμενα όπως είναι η αύξηση της ενεργότητας του συμπλόκου II της αναπνευστικής αλυσίδας (κυτοχρωμική αναγωγή) και η αύξηση του mtDNA στα λευκοκύτταρα.<sup>23, 24</sup> Τα κύτταρα έχουν τη δυνατότητα να αντισταθμίσουν τη μείωση παραγωγής ενέργειας που παρατηρείται παρουσία της G11778A μέσω της γλυκόλυσης και την αύξηση της ενεργότητας του συμπλόκου II. Αυτά τα αποτελέσματα επιβεβαιώνουν και μελέτες που έγιναν σε *cybrids*, κυτταρικές σειρές δηλαδή από τις οποίες αφαιρέθηκε το δικό τους mtDNA και τοποθετήθηκε εξωγενές.<sup>25, 26</sup> Σύμφωνα με τα πιο πάνω δηλαδή παρά το βιοχημικό μειονέκτημα που αποκτούν οι φορείς της G11778A, αυτό δεν είναι ικανό να εξηγήσει την παθογένεση καθώς το ενεργειακό φορτίο αναπληρώνεται σχεδόν πλήρως.



Στην αναπνευστική αλυσίδα υπάρχουν τέσσερα σύμπλοκα (I – IV) μεταφορείς ηλεκτρονίων και ένα σύμπλοκο (V) σύνθεσης ATP με μεταφορά πρωτονίων. Τα σύμπλοκα I και III είναι υπεύθυνα για την παραγωγή των περισσότερων ανιόντων των υπεροξειδίων.<sup>27, 28</sup> Οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου (ROS) παράγονται ως προϊόν του φυσιολογικού οξειδωτικού μεταβολισμού. Ωστόσο οι παθογόνες μεταλλάξεις του mtDNA που επάγουν τη δυσλειτουργία του συμπλόκου I προκαλούν υπερπαραγωγή ROS.<sup>29, 30, 31</sup> Έτσι μετά από βιοχημικές μελέτες οδηγούμαστε στο συμπέρασμα ότι η κυτταροτοξικότητα που προξενείται από την απώλεια της ενεργότητας του συμπλόκου I δεν οφείλεται στη μείωση της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης αλλά στην ιδιαίτερα αυξημένη παραγωγή ROS.<sup>32</sup> Ίδια αποτελέσματα είχαν και μελέτες που έγιναν σε *cybrids*<sup>33, 34, 35</sup> τα οποία έφεραν τη μετάλλαξη στη θέση 11778, ενώ παράλληλα οι μεταλλάξεις στο mtDNA οδηγούν και σε ένα τροποποιημένο μηχανισμό αντιοξειδωτικής άμυνας,<sup>33</sup> όπου τα *cybrids* που φέρουν τη μετάλλαξη G11778A παρουσιάζουν μειωμένες ενεργότητες για την αναγωγή της γλουταθειόνης (GR), την περοξειδάση της γλουταθειόνης (GPx) και για τη δισμουτάση των υπεροξειδίων του μαγγανίου (MnSOD). Τέλος άτομα που φέρουν τη μετάλλαξη G11778A βρέθηκε να έχουν αυξημένα επίπεδα 8-υδροξυ-2-δεοξυγουανοσίνης,<sup>36</sup> στο DNA λευκοκυττάρων, που είναι δείκτης οξειδωτικής βλάβης που προκαλείται από τις ROS. Από τα πιο πάνω συμπεραίνουμε ότι οι ROS είναι ένας παράγοντας κλειδί στην παθογένεια που προκαλείται από την G11778A.

Η σύνδεση της Σκλήρυνσης κατά Πλάκας και της G11778A έγινε γιατί ένα μεγάλο ποσοστό των ασθενών (~25%) που πάσχουν από ΣΚΠ παρουσιάζουν ανάμεσα σε άλλα συμπτώματα έναρξης της νόσου και οπτική νευρίτιδα με κλινική εικόνα παρόμοια με τους ασθενείς που πάσχουν από LHON. Ένα άλλο στοιχείο που συνδέει τις δύο ασθένειες

είναι ότι μεγάλο ποσοστό ασθενών που πάσχουν από LHON<sup>37</sup> αλλά και ασθενείς που πάσχουν από ΣΚΠ<sup>38</sup> ανήκουν στο απλότυπο J του mtDNA.

## 1.2 Σκλήρυνση κατά πλάκας

Η Σκλήρυνση κατά Πλάκας (ΣΚΠ) κάνει την παρουσία της ιδιαίτερα αισθητή στον ανεπτυγμένο κόσμο. Ειδικότερα σε κεντρική και βόρεια Ευρώπη, Ηνωμένες Πολιτείες, νότιο Καναδά, Αυστραλία και Νέα Ζηλανδία εμφανίζεται σε 100 ή και περισσότερα άτομα ανά 100 000 πληθυσμού.<sup>39</sup> Μάλιστα σε ορισμένες περιπτώσεις έχει θεωρηθεί ότι ενσκήπτει επιδημικά,<sup>40</sup> όπως συνέβη στην κοινότητα Macomer της Σαρδηνίας. Τα συμπτώματά της δε, που οφείλονται σε «διάσπαρτες στο χρόνο και στο χώρο» βλάβες της λευκής ουσίας του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος (ΚΝΣ), είναι σχετικά εμφανή και διαγιγνώσκονται σχετικά εύκολα. Παρ' όλα αυτά η ΣΚΠ, όπως την ονόμασε ο Charcot το 1868, εμφανίζεται στα ιατρικά αρχεία<sup>41</sup> να έχει ηλικία μόλις 150 χρόνων. Αναφορές που μας παραπέμπουν στη νόσο εξαιτίας της συμπτωματολογίας έχουμε από το 14<sup>ο</sup> αιώνα όπου μία Ολλανδή, μετά από ατύχημα, άρχισε να παρουσιάζει σταδιακά προσωπικά άλγη, δυσκολία βάδισης, παραπάρεση και διαταραχές όρασης με φθίνουσα πορεία της υγείας της έως το θάνατό της. Η επόμενη αναφορά που παραπέμπει σε ΣΚΠ είναι του 19<sup>ου</sup> αιώνα, όπου μέσα από το ημερολόγιο του Augustus d' Este, φαίνεται ότι ο ίδιος εμφάνιζε μετά από ιλαρά, διαταραχές της όρασης (πιθανόν οπτική νευρίτιδα), διπλωπία, αδυναμία στα κάτω άκρα, ακράτεια και άλλα χαρακτηριστικά συμπτώματα της νόσου μέχρι την παράλυση και το θάνατό του ύστερα από 26 χρόνια συνεχώς επιδεινούμενης πορείας της άγνωστης τότε ασθένειάς του.

Οι παθολογοανατόμοι, πρώτη φορά το 19<sup>ο</sup> αιώνα, περιλαμβάνουν περιγραφές ή και εικόνες από παθολογικό υλικό που παραπέμπει σε ΣΚΠ, σε γαλλικά και αγγλικά έργα, (Cruveilhier J. και Carswell R. αντίστοιχα).

Όσον αφορά την ονοματολογία, προτού αναγνωρισθεί και καθιερωθεί ως ξεχωριστή κλινική οντότητα η ΣΚΠ, αναφέρεται στα πρώτα παθολογοανατομικά έργα ως “the French disease” (η νόσος των Γάλλων).

Πραγματοποιήθηκαν πολλές μελέτες με αντικείμενο τη ΣΚΠ, που είχαν σκοπό την κατανόηση της ασθένειας και την αντιμετώπισή της. Μερικά ορόσημα αυτής της πορείας αναφέρονται στη συνέχεια. Το 1878 ο Ranvier ανακαλύπτει τη μυελίνη, ενώ το 1916 ο Dawson ανακάλυψε την απομυελίνωση που προκαλείται από λεμφοκύτταρα, μακροφάγα και πλασματοκύτταρα σε εγκεφαλικά κύτταρα. Το 1935 ο Thomas Rivers αναπτύσσει ένα ζωικό πειραματικό μοντέλο της νόσου παρόμοιο με τη ΣΚΠ, το ονόμασε «πειραματική αλλεργική εγκεφαλομυελίτιδα» (Experimental Allergic Encephalomyelitis, EAE) το οποίο χρησιμοποιείται από τότε στη μελέτη της αιτιοπαθογένειας και της θεραπείας της νόσου. Το μοντέλο προτείνει την αυτοάνοση βάση της ασθένειας όπου η μυελίνη του ΚΝΣ γίνεται στόχος της ανοσολογικής απόκρισης. Ο Kabat το 1948 ανακάλυψε μετά από ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών του εγκεφαλονωτιαίου υγρού (ΕΝΥ) ασθενών με ΣΚΠ αυξημένη τη γ-σφαιρίνη. Το 1955 ο John Kurtzke ανέπτυξε την Κλίμακα Κατάστασης Αναπηρίας (Disability Status Scale, DSS). Η κλίμακα αυτή χρησιμοποιείται μέχρι σήμερα, σε βελτιωμένη μορφή, για την εκτίμηση της αναπηρίας. Το 1970 αναπτύσσεται η θεωρία σύμφωνα με την οποία η ΣΚΠ είναι μία αυτοάνοση ασθένεια που πιθανόν να προκλήθηκε από κάποια ιική λοίμωξη. Τέλος, το 1978 ο Lawrence Jacobs μαζί με τους συνεργάτες του ξεκίνησαν πιλοτική θεραπεία ασθενών με ΣΚΠ χρησιμοποιώντας

ιντερφερόνη-β. Μέχρι σήμερα η ιντερφερόνη-β είναι το βασικό φάρμακο που χρησιμοποιείται ενάντια στη νόσο. Η χορήγησή της έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της συχνότητας των εξάρσεων της νόσου και την επιβράδυνση της εγκατάστασης αναπηρίας. Παράλληλα έχουν χρησιμοποιηθεί και διάφορες άλλες ουσίες για τη θεραπεία της νόσου, εν τούτοις η ιντερφερόνη-β είναι το κύριο φάρμακο.

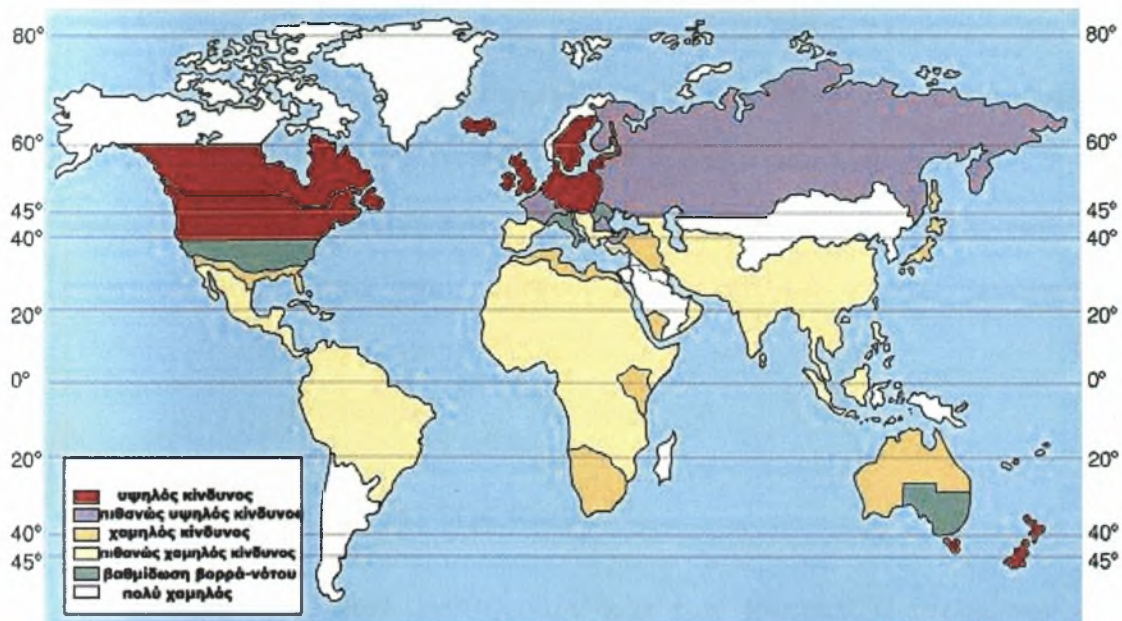
Η Σκλήρυνση κατά Πλάκας (ΣΚΠ), ή διαφορετικά Πολλαπλή Σκλήρυνση (Multiple Sclerosis, MS) είναι μία ασθένεια με άγνωστη μέχρι σήμερα αιτιοπαθογένεια. Συνήθως προσβάλλει νεαρούς ενήλικες. Παθολογικά χαρακτηρίζεται από πολλαπλές περιοχές φλεγμονής, απομυελίνωση που ρυθμίζεται ανοσολογικά και χαρακτηριστικών γλοιακών «ουλών» (σκλήρυνση), οι οποίες ονομάζονται απομυελινωτικές πλάκες. Οι βλάβες είναι λοιπόν διάσπαρτες στο χώρο.

Η κλινική πορεία της νόσου ποικίλει. Μπορεί να είναι σε μία μορφή ήπια χωρίς συμπτώματα αλλά μπορεί και να έχει και μία μορφή που εξελίσσεται ταχέως (προϊούσα) και οδηγεί σε καταλείπουσα αναπηρία. Συνήθως στους περισσότερους ασθενείς εισβάλλει υπό μορφή εξάρσεων και υφέσεων, όπου στην αρχή η ανάρρωση από τις εξάρσεις είναι σχεδόν πλήρης, αλλά με την πάροδο του χρόνου οι νευρολογικές διαταραχές αθροίζονται σταδιακά. Οι βλάβες είναι δηλαδή διάσπαρτες τόσο στο χώρο όσο και στο χρόνο.

Από τα δεδομένα που διαθέτουμε φαίνεται ότι η ασθένεια οφείλεται σε ένα συνδυασμό γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων, αφενός μέσω γονιδίων επιρρέπειας στη νόσο και αφετέρου μέσω έκθεσης του οργανισμού, κατά τα πρώτα στάδια της ζωής του ασθενούς, σε κάποιο άγνωστο λοιμώδη παράγοντα του περιβάλλοντος, πιθανότατα σε κάποιο ιό.

Παρά τη διακύμανση που παρουσιάζουν οι τιμές επιπολασμού της νόσου (οι τιμές κυμαίνονται από 0.88 έως 224 ανά 100.000), υπάρχουν δύο

γενικές παραδοχές που στηρίζονται σε παρατηρήσεις.<sup>42, 43</sup> Η μία είναι ότι η επίπτωση της ΣΚΠ αυξάνει με το γεωγραφικό πλάτος (**Εικόνα 8**) και η άλλη ότι η συχνότητα της νόσου αυξάνει με το χρόνο.



Εικόνα 8: Η σχέση ανάμεσα στη ΣΚΠ και το γεωγραφικό πλάτος. Προς μεγαλύτερα γεωγραφικά πλάτη ο επιπολασμός της νόσου αυξάνει.

Η επίπτωση είναι υψηλότερη στην βόρεια Ευρώπη, στη νότια Αυστραλία και στο μεσαίο τμήμα της βόρειας Αμερικής.<sup>44</sup> Πολλές μελέτες δείχνουν ότι άτομα που μεταναστεύουν από ζώνη «υψηλού κινδύνου» σε ζώνη χαμηλού κινδύνου φέρουν μαζί τους μέρος του κινδύνου της περιοχής προέλευσής τους.<sup>45</sup> Επιπλέον δεδομένα από μελέτη των Dean and Kurtzke στην Νότια Αφρική δείχνουν ότι άτομα που μεταναστεύουν πριν την ηλικία των 15 ετών διατρέχουν κίνδυνο εμφάνισης της νόσου παρόμοιο με τους γηγενείς Νοτιοαφρικανούς. Αντίθετα αυτοί που μεταναστεύουν μετά την ηλικία αυτή, διατρέχουν τον κίνδυνο της περιοχής από την οποία προέρχονται.<sup>46</sup> Οι αιτίες για την παρατηρούμενη διακύμανση στην επίπτωση και στον επιπολασμό παγκοσμίως δεν είναι κατανοητές. Έχουν προταθεί θεωρίες για εμπλοκή στη παθογένεια της

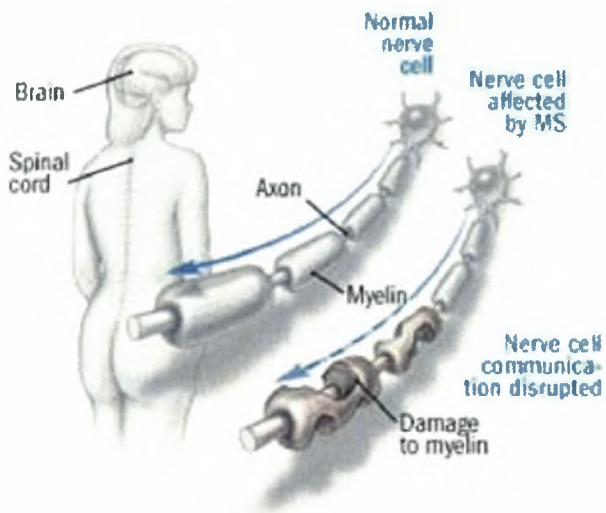


νόσου διαφόρων παραγόντων, τόσο περιβαλλοντικών όσο και γενετικών. Η μεταβολή στη συχνότητα της νόσου μεταξύ γονέων και απογόνων, όταν οι τελευταίοι μεταναστεύουν προς και από περιοχές με υψηλό επιπολασμό, ενισχύει τη θεωρία ότι υπάρχει κάποιος εμπλεκόμενος περιβαλλοντικός παράγοντας.<sup>47, 48</sup> Ορισμένες μελέτες δείχνουν ότι η επίπτωση της ΣΚΠ, στα υιοθετημένα παιδιά ασθενών με πολλαπλή σκλήρυνση, δεν είναι υψηλότερη από την αναμενόμενη, γεγονός που αποδυναμώνει την πιθανότητα ύπαρξης κάποιου ενδοοικογενειακού μεταδοτικού παράγοντα, ενώ ενισχύει τη θεωρία του κοινού γενετικού παράγοντα μεταξύ συγγενών.<sup>49</sup>

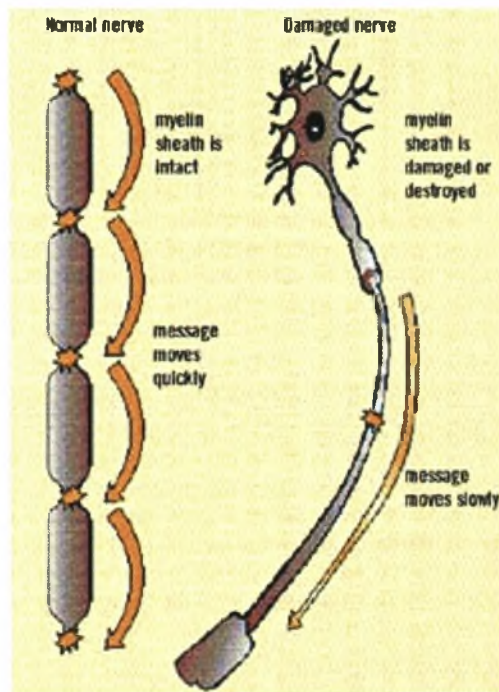
### 1.2.1 Μυελίνη και εξέλιξη της πλάκας

Οι αποφυάδες των αισθητικών και των κινητικών νευρώνων οι οποίες μεταφέρουν σήματα περιβάλλονται, κατά τη μεγαλύτερή τους έκταση, από έλυτρο μυελίνης, το οποίο διατάσσεται σε ομόκεντρες στιβάδες αποτελούμενες από επαναλαμβανόμενες διμοριακές στιβάδες λιπιδίων, που παρεμβάλλονται μεταξύ των πρωτεϊνικών στιβάδων. Χάρη στη μυελίνη το δυναμικό δράσης δεν κινείται σε συνεχή γραμμή κατά μήκος του άξονα από κόμβο σε κόμβο, αλλά η μεταγωγή γίνεται με «άλματα», επάγοντας έτσι την ταχύτητα της μεταγωγής κατά μήκος των αξόνων. Η βιοχημική ανάλυση αποδεικνύει ότι η μυελίνη έχει παρόμοια σύσταση με την κυτταρική μεμβράνη, αποτελούμενη κατά 70% από λιπίδια και κατά 30% από πρωτεΐνες, με υψηλή συγκέντρωση χοληστερόλης και φωσφολιπιδίων. Το μονωτικό μυελώδες έλυτρο του νευράξονα εμφανίζει κατά κανονικά διαστήματα διάκενα που ονομάζονται κόμβοι Ranvier. Ο κεντρικός κλάδος του νευράξονα των κυττάρων των νωτιαίων γαγγλίων είναι επίσης εμμύελος, όπως και ο νευράξονας των κινητικών νευρώνων. Η μυελίνη στο ΚΝΣ όμως, διαφέρει

κάπως από την αντίστοιχη περιφερική, διότι το νευρογλοιακό κύτταρο στο οποίο οφείλεται η δημιουργία της κεντρικής μυελίνης είναι το ολιγοδενδροκύτταρο, ενώ στο περιφερικό νευρικό σύστημα η μυελίνη παράγεται από τα κύτταρα Schwann. Στα τελευταία, τα γονίδια που κωδικοποιούν τη μυελίνη ενεργοποιούνται από την παρουσία νευραξόνων, ενώ στα ολιγοδενδροκύτταρα ενεργοποιούνται, κατά τα φαινόμενα, με την παρουσία αστροκυττάρων. Η μυελίνη τόσο στο ΚΝΣ όσο και στο περιφερικό, περιέχει την ίδια ομάδα πρωτεϊνών, τις βασικές πρωτεΐνες μυελίνης. Η ομάδα αυτή πρωτεϊνών αποτελείται από επτά τουλάχιστον συγγενείς πρωτεΐνες, οι οποίες παράγονται από ένα μόνο γονίδιο με εναλλακτικό μάτισμα του RNA. Οι βασικές πρωτεΐνες μυελίνης είναι ικανές να προκαλέσουν ισχυρή ανοσοαπόκριση. Όταν ενεθούν σε ζώα προκαλούν πειραματική αλλεργική εγκεφαλομυελίτιδα (Experimental Allergic Encephalomyelitis, EAE), η οποία χαρακτηρίζεται από τοπική φλεγμονή και απομυελίνωση στο ΚΝΣ, και αποτελεί το ζωικό πειραματικό μοντέλο της ΣΚΠ. Στους ασθενείς με ΣΚΠ, η απομυελίνωση των νευραξόνων καθυστερεί τη μετάδοση των νευρικών σημάτων (του δυναμικού ενέργειας) και προκαλεί προβλήματα με την αισθητική αντίληψη και το σωστό κινητικό συντονισμό (Εικόνες 9 & 10).



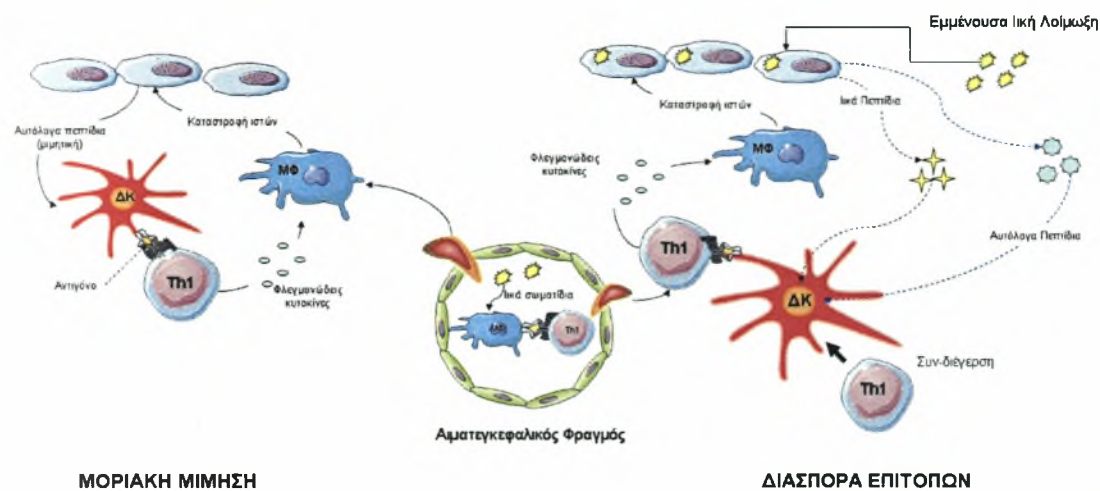
**Εικόνα 9:** Η δομή της μυελίνης σε φυσιολογικό νευρικό κύτταρο και σε νευρικό κύτταρο του οποίου η μυελίνη έχει καταστραφεί γιατί έχει προσβληθεί από ΣΚΠ



**Εικόνα 10:** Στα φυσιολογικά νευρικά κύτταρα η μετάδοση του δυναμικού δράσης πραγματοποιείται γρήγορα μέσω αλμάτων. Στον αντίποδα φαίνεται η αργή μετάδοση του μηνύματος κατά μήκος του άξονα του νευρικού κυττάρου του οποίου η μυελίνη έχει υποστεί βλάβη.



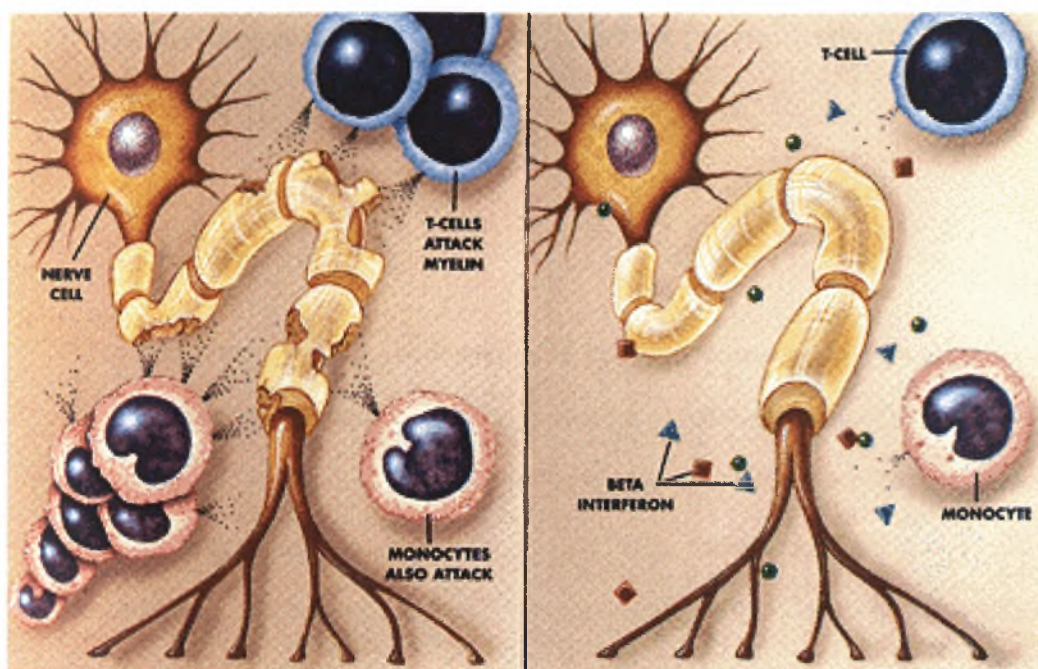
Τα υγιή άτομα διατηρούν τα αυτό-αντιδρώντα προς τη μυελίνη T-κύτταρα υπό τον έλεγχο των T-κατασταλτικών κυττάρων. Μία υπόθεση που προσπαθεί να εξηγήσει την κατάρρευση της ανοσορύθμισης στις αυτοάνοσες νόσους, είναι η μοριακή μίμηση,<sup>50, 51</sup> (Εικόνα 11) η οποία προτείνει ότι οι επίτοποι διαφόρων μικροβιακών πεπτιδίων που αναγνωρίζονται από ειδικά τάξης II μόρια (MHC II), είναι ανοσολογικώς μη-διακριτά από τα αυτό-αντιγόνα και έτσι μία σωστή απόκριση στη λοίμωξη πυροδοτεί μία λανθασμένη φλεγμονή και επίθεση εναντίον συστατικών της μυελίνης.



Εικόνα 11: Οι μηχανισμοί της μοριακής μίμησης και της διασποράς επιτόπων κατά την έναρξη αυτοάνοσης απάντησης στο κεντρικό νευρικό σύστημα

Η αποτυχία ρύθμισης οδηγεί σε πολλαπλασιασμό, ενεργοποίηση και είσοδο στην κυκλοφορία αυτό-αντιδρώντων T-κυττάρων, τα οποία εκφράζουν συγκολλητικά μόρια και προκαλούν αλλαγές στο ενδοθήλιο των αγγείων, επιτρέποντας την πρόσβαση, μέσω του αίματοεγκεφαλικού φραγμού, στο ΚΝΣ. Εκεί, ενεργοποιημένα T-κύτταρα επανααναγνωρίζουν το αντιγόνο και ενεργοποιούν τα κύτταρα της μικρογλοίας (τα μακροφάγα του ΚΝΣ) τα οποία με τη σειρά τους εκφράζουν μόρια τάξης II, επαναπαρουσιάζουν το αντιγόνο σε άλλα T-κύτταρα και έτσι

οργανώνεται ένας προφλεγμονώδης φαύλος κύκλος, που δημιουργεί ένα διήθημα πλούσιο σε ενεργοποιημένα Τ-κύτταρα, μικρογλοία και μερικά ουδετερόφιλα, που προκαλούν την καταστροφή της μυελίνης (Εικόνα 12).



Εικόνα 12: Αριστερά – η καταστροφή της μυελίνης από τα ενεργοποιημένα Τ λεμφοκύτταρα και τα μονοκύτταρα. Δεξιά – η αναστολή της δράσης των κυττάρων παρουσία ιντερφερόνης-β.

Κατά την πορεία της νόσου μπορεί να εμφανισθεί πληθώρα συμπτωμάτων, που μπορεί να είναι τυπικά ή άτυπα. Οι διάφορες διαταραχές που προκύπτουν από τη νόσο εξαρτώνται από τα σημεία που εντοπίζονται οι βλάβες στο ΚΝΣ που προκαλούνται από την απομυελίνωση του ΚΝΣ (διάσπαρτες στο χώρο). Πιο αναλυτικά παρατηρούνται κινητικές διαταραχές που οφείλονται στην προσβολή του κεντρικού κινητικού νευρώνα, του περιφερειακού κινητικού νευρώνα και της παρεγκεφαλίδας. Παρατηρούνται επίσης αισθητικές διαταραχές όπως παραισθήσεις και δυσαισθησίες. Από τα κρανιακά νεύρα συνήθως προσβάλλεται το οπτικό προκαλώντας οπτική νευρίτιδα. Από την

προσβολή του αυτόνομου νευρικού συστήματος προκαλούνται κυστικές, σφικκτηριακές και μη σφικκτηριακές διαταραχές. Αυτές έχουν ως αποτέλεσμα ακράτεια ούρων και κοπράνων ή των αντίθετα ακριβώς αποτελεσμάτων, διαταραχές στην αρτηριακή πίεση, σεξουαλικές διαταραχές και γνωσιακές, με πρόβλημα στη μνήμη και τη μάθηση, και ψυχικές διαταραχές.

### **1.2.2 Αιτιοπαθογένεια**

Τα αίτια που προκαλούν τη ΣΚΠ παραμένουν άγνωστα έως σήμερα. Η επικρατέστερη άποψη, όπως προκύπτει μέσα από την επιδημιολογική προσέγγιση της προσπάθειας διερεύνησης της αιτιοπαθογένειας, είναι ότι ένας εξωγενής παράγοντας, πιθανώς ιός, προκαλεί σε γενετικά και ανοσολογικά προδιατεθειμένα άτομα μια παθολογική ανοσολογική αντίδραση που κατευθύνεται εναντίον των πρωτεϊνών της μυελίνης, χωρίς πάντως να έχει επιβεβαιωθεί η ύπαρξη αυτού του εξωγενούς παράγοντα. Έτσι, τόσο περιβαλλοντικοί παράγοντες, όπως ιικές λοιμώξεις, όσο και αυτοάνοσοι μηχανισμοί και γενετικοί παράγοντες δύνανται να επηρεάζουν την εμφάνιση της νόσου.

#### **1.2.2.1 Περιβαλλοντικοί παράγοντες**

Δημογραφικά δεδομένα που αφορούν στην επίπτωση στα δύο φύλα καταδεικνύουν σταθερά συχνότερη εμφάνιση της νόσου στις γυναίκες σε σχέση με την εμφάνιση στους άνδρες. Οι ισχυρότερες όμως ενδείξεις ότι κάποιοι περιβαλλοντικοί παράγοντες υπεισέρχονται στην

αιτιοπαθογένεια της ΣΚΠ προέρχονται από μελέτες που στηρίχθηκαν στη μετανάστευση.<sup>41</sup> Βασίζονται στη λογική ότι η εμφάνιση μιας καθαρά γενετικής νόσου δεν θα επηρεασθεί από τη μετανάστευση, πράγμα που θα συμβεί όταν ένας περιβαλλοντικός παράγοντας διαμορφώνει συνθήκες νόσησης στη χώρα υποδοχής. Παράλληλα βρέθηκε ότι άτομα που μετανάστευσαν σε μικρή ηλικία από χώρες με υψηλή συχνότητα, της νόσου σε χώρες με χαμηλή συχνότητα, εμφάνιζαν τη συχνότητα της χώρας προορισμού τους, ενώ αν μετανάστευαν σε ηλικία μεγαλύτερη των 15 ετών εμφάνιζαν συχνότητα ανάλογη με της χώρας από όπου ξεκινούσαν. Αυτό επιβεβαιώθηκε με μελέτες<sup>48</sup> μεταναστών από τη Β. Ευρώπη, περιοχή υψηλού κινδύνου, στη Ν. Αφρική, περιοχή χαμηλού κινδύνου. Αλλά και η χαμηλή συχνότητα των Αφρικανών αυξήθηκε στην δεύτερη γενιά μεταναστών που μεγάλωσε στη Μεγάλη Βρετανία<sup>52</sup>. Το γεγονός αυτό είναι ενδεικτικό της δράσης κάποιου περιβαλλοντικού παράγοντα στα πρώτα χρόνια της ζωής του πάσχοντα.

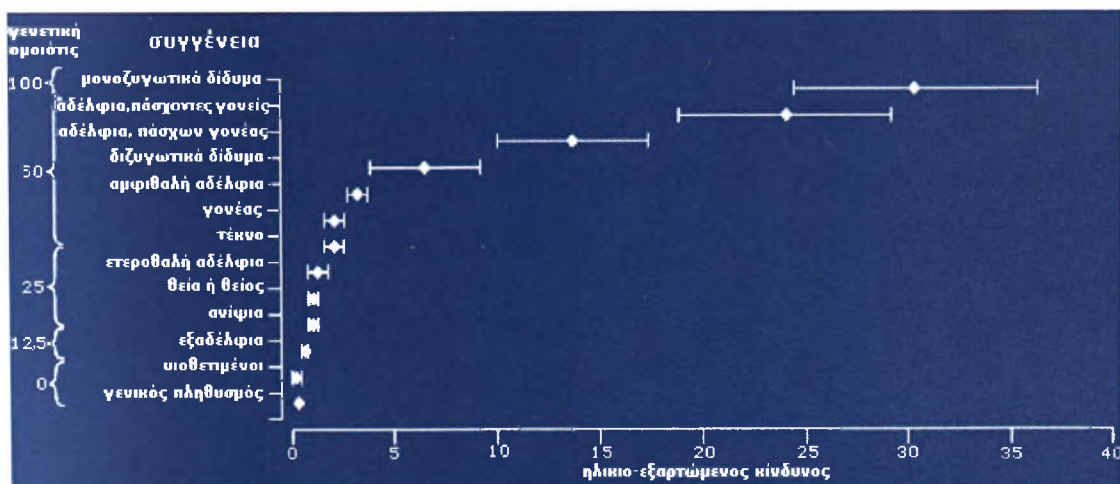
Ο πιο πιθανός περιβαλλοντικός παράγοντας είναι κάποιος λοιμογόνος παράγοντας, όπως κάποιος ιός. Αυτό προκύπτει από το γεγονός βρέθηκαν πολλοί ιοί σε ασθενείς με ΣΚΠ. Τέτοιοι ιοί είναι αυτοί της ιλαράς, ερυθράς, παρωτίτιδας, κορωνοϊοί, παραϊνφλουένζας, απλού έρπητα, Epstein – Barr και τύπου Ι λεμφοτροπικού ιού των Τ – κυττάρων του ανθρώπου.<sup>53</sup> Πέρα από τους ιούς πιθανόν ρόλο στην εμφάνιση της νόσου να έχουν και κάποιοι μικροοργανισμοί,<sup>54</sup> όπως είναι τα βακτήρια της οικογένειας *Acinetobacter*.<sup>55</sup> Τελικά, είναι πιθανόν να μην υφίσταται ένας μοναδικός ιός που να πυροδοτεί την απομυελίνωση σε όλους τους ασθενείς, αλλά να εμπλέκονται πολλοί διαφορετικοί ιοί και βακτήρια.



### 1.2.2.2 Γενετικοί παράγοντες

Για την εύρεση της συσχέτισης των γενετικών παραγόντων και της ΣΚΠ μελετούνται συνήθως οικογένειες ασθενών και δίδυμοι. Από τα αποτελέσματα των μελετών αυτών προκύπτει ότι υπάρχει μια ισχυρή κληρονομικότητα στην προδιάθεση για τη νόσο που δεν ακολουθεί τους κλασικούς νόμους του Mendel. Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 13**, ο κίνδυνος εμφάνισης της νόσου στους μονοζυγωτικούς (MZ) διδύμους είναι περίπου 25 - 35%. Στα διζυγωτικά δίδυμα ο κίνδυνος μειώνεται στα επίπεδα των κανονικών αδελφών.<sup>56, 57</sup>

Ο κίνδυνος σε ετεροθαλή αδέρφια είναι μικρότερος από ότι σε κανονικά αδέρφια. Ο κίνδυνος είναι υψηλότερος σε αδέρφια (3%), γονείς (2%) και τέκνα (2%) ασθενών από ότι σε συγγενείς δευτέρου και τρίτου βαθμού. Η εμφάνιση της νόσου είναι συχνότερη σε τέκνα δύο προσβεβλημένων γονέων (20%) από ότι σε απογόνους ενός προσβεβλημένου γονέα (2%). Ο κίνδυνος δεν αυξάνεται ούτε για άτομα υιοθετημένα από οικογένεια με προσβεβλημένο μέλος, ούτε για μη-βιολογικούς συγγενείς υιοθετημένων που αναπτύσσουν ΣΚΠ.<sup>39, 58</sup>



Εικόνα 13: Συσχέτιση του κινδύνου εμφάνισης της ΣΚΠ με βάση τη συγγένεια

Επειδή η ΣΚΠ είναι ένα αυτοάνοσο νόσημα που χαρακτηρίζεται από απομυελίνωση στο Κ.Ν.Σ έχουν ελεγχθεί όλα τα υποψήφια γονίδια που κωδικοποιούν ανοσοσφαιρίνες, κυτταροκίνες, T-κυτταρικούς υποδοχείς (T-cell Receptor, TCR), ιντερλευκίνες, αντιγόνα ιστοσυμβατότητας (Human Leucocyte Antigen, HLA) και αντιγόνα μυελίνης. Το μόνο βέβαιο γενετικό χαρακτηριστικό, που προκύπτει από τις μελέτες, είναι ότι η νόσος συσχετίζεται με αλληλόμορφα και απλότυπους του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (Major Histocompatibility Complex, MHC), που εδράζεται στο χρωμόσωμα 6p21.<sup>59, 60</sup> Το MHC είναι μία περιοχή του γονιδίου, μεγέθους τεσσάρων μεγαβάσεων, που περιέχει τα κλασικά HLA γονίδια καθώς και τουλάχιστον άλλα 128 γονίδια, το 40% των οποίων είναι ανοσολογικώς σχετικά.<sup>61</sup> Οι περισσότερες μελέτες ωστόσο έχουν εστιάσει το ενδιαφέρον τους σε μια μικρή υποομάδα των γονιδίων αυτών στα HLA-DRB1, -DQA1, -DQB1 και στον TNF-α. Έτσι, έχει βρεθεί σε ποικίλους πληθυσμούς βορειο-ευρωπαϊκής καταγωγής, ότι ο φαινότυπος MHC τάξης II DR15-DQ6 και τα αντίστοιχα αλληλία DRB1\*1501 και DQB1\*0602 παρατηρούνται πιο συχνά σε άτομα με ΣΚΠ, σε σύγκριση με τον γενικό πληθυσμό με ένα σχετικό κίνδυνο 2.6 και 8.3 για ετεροζυγώτες και ομοζυγώτες φορείς, αντίστοιχα.<sup>62</sup> Επιπρόσθετα, φαίνεται ότι υφίσταται μια πιο ασθενής συσχέτιση με τον απλότυπο DR3 (DR17)-DQ2 καθώς και με τον απλότυπο (DRB1\*0301-DRB5\*0101-DQA1\*0501-DQB1\*0201).<sup>63</sup> Σε μεσογειακούς πληθυσμούς έχουν διαπιστωθεί συσχετίσεις με το αλληλίο DR4 και με τον γονότυπο (DRB1\*0405-DQA1\*0301-DQB1\*0302).<sup>58</sup>

Παρά το γεγονός ότι η περιοχή του MHC συμβάλλει σημαντικά στην εμφάνιση της ΣΚΠ, η γενετική της νόσου δεν έχει αποκαλυφθεί. Η ολική γενετική προδιάθεση που αποδίδεται στην HLA θέση, στη ΣΚΠ, υπολογίζεται μεταξύ 15 και 50%. Η βαρύτητα και η πορεία της νόσου φαίνεται επίσης να επηρεάζονται από γενετικούς παράγοντες, χωρίς να

εμπλέκονται οι πολυμορφισμοί των HLA-DR και DQ. Πρόσφατα έχουν συσχετισθεί οι γονιδιακοί πολυμορφισμοί του υποδοχέα της ιντερλευκίνης-1β, του ανταγωνιστή του υποδοχέα της ιντερλευκίνης-1, του Fc τμήματος του υποδοχέα της ανοσοσφαιρίνης-γ και της απολιποπρωτεΐνης-E, με την πορεία της νόσου.<sup>44</sup>

## ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη της συσχέτισης μεταξύ της μετάλλαξης G11778A του μιτοχονδριακού DNA και της Σκλήρυνσης κατά Πλάκας. Η μετάλλαξη αυτή έχει συσχετισθεί με την ασθένεια LHON και σε κάποιους πληθυσμούς έχει βρεθεί και σε ασθενείς με ΣΚΠ. Κυρίως εμφανίζεται όταν παρουσιάζεται σε αυτούς οπτική νευρίτιδα. Η μετάλλαξη αυτή εντοπίζεται στο γονίδιο της τέταρτης υπομονάδας της NADH αφυδρογονάσης, μιας πρωτεΐνης που συμμετέχει στο σύμπλοκο I της αναπνευστικής αλυσίδας. Μείωση της ενεργότητας του συμπλόκου αυτού θα μπορούσε να προκαλέσει ελάττωση της σύνθεσης ATP, με συνέπεια δυσλειτουργία των κυττάρων που έχουν μεγάλες απαιτήσεις σε ενέργεια. Για τη συγκεκριμένη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν δείγματα αίματος ασθενών με ΣΚΠ, από τα οποία απομονώθηκε και αναλύθηκε το mtDNA.



## 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.1 Ασθενείς

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν 92 ασθενείς, οι οποίοι διαγνώστηκαν ότι πάσχουν από Σκλήρυνση κατά Πλάκας. Η διάγνωση των ασθενών έγινε στη Νευρολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας. Ο ιστός που χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση του mtDNA των ασθενών ήταν το ολικό αίμα. Το αίμα αφού συλλέχθηκε αποθηκεύτηκε στους  $-20^{\circ}\text{C}$  μέχρι τη διαδικασία της απομόνωσης του DNA.

### 2.2 Υλικά

- ⊙ Bromophenol blue
- ⊙  $\text{CH}_3\text{COONa}$
- ⊙ ddH<sub>2</sub>O
- ⊙ dNTPs
- ⊙ EDTA
- ⊙ EDTA
- ⊙ Ficoll
- ⊙  $\text{KHCO}_3$
- ⊙ Low molecular weight DNA ladder (BioLabs, New England)
- ⊙  $\text{MgCl}_2$
- ⊙ NaCl
- ⊙  $\text{NH}_4\text{Cl}$
- ⊙ Proteinase K 10mg/ml
- ⊙ SDS
- ⊙ Taq DNA Polymerase (5 U/ $\mu\text{L}$ ) (Invitrogen)
- ⊙ Tris
- ⊙ Αγαρόζη
- ⊙ Αιθανόλη 100%
- ⊙ Βορικό οξύ
- ⊙ Βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr)
- ⊙ Εκκινητές (primers)
- ⊙ Ενδονουκλεάση περιορισμού SfaNI

- Ρυθμιστικό διάλυμα κατάλληλο για την *Taq* DNA Polymerase
- Ρυθμιστικό διάλυμα κατάλληλο για το περιοριστικό ένζυμο SfaNI

## 2.3 Μέθοδοι

### 2.3.1 Απομόνωση του mtDNA

Για να μελετήσουμε τη μετάλλαξη G11778A που εντοπίζεται στο μιτοχονδριακό DNA χρειάστηκε σαν πρώτο βήμα να γίνει απομόνωση του γενετικού υλικού. Η απομόνωση του DNA έγινε από τα λευκοκύτταρα του ολικού αίματος με την τεχνική της εξαλάτωσης. Τα στάδια της τεχνικής που ακολουθήθηκαν είναι τα εξής:

#### 1<sup>η</sup> ημέρα

- 1) Μετά την αιμοληψία, προσθέτουμε EDTA στο αίμα, ως αντιπηκτικό, τόσο ώστε η συγκέντρωσή του στο αίμα να είναι 5 mM.
- 2) Τοποθετούμε τα 2 mL αίματος από κάθε δείγμα σε σωληνάριο των 15mL και αραιώνουμε ως 12mL περίπου με ddH<sub>2</sub>O (δισ-απεσταγμένο) και ανακατεύουμε με σιφώνιο pasteur (τα ερυθροκύτταρα λύνονται σε υπότονο περιβάλλον).
- 3) Φυγοκεντρούμε για 15 min στις 3000 rpm, στους 4°C (καθιζάνουν τα εμπύρηννα κύτταρα).
- 4) Αφαιρούμε το υπερκείμενο. Το ίζημα αραιώνεται σε ddH<sub>2</sub>O ως 12mL περίπου. Διαλύουμε με μηχανική ανάδευση.
- 5) Φυγοκεντρούμε για 15 min στις 3000 rpm στους 4°C.
- 6) Αφαιρούμε το υπερκείμενο. Το ίζημα αραιώνεται σε ddH<sub>2</sub>O ως 12mL περίπου. Διαλύουμε με μηχανική ανάδευση.
- 7) Φυγοκεντρούμε για 15 min στις 3000 rpm στους 4°C.

8) Απορρίπτουμε το υπερκείμενο. Προσθέτουμε διάλυμα λύσης λευκοκυττάρων (lysis I) μέχρι τα 12mL (το lysis I λύει την κυτταρική μεμβράνη των λευκοκυττάρων).

9) Φυγοκεντρούμε για 15 min στις 3000 rpm στους 4°C.

10) Επαναλαμβάνουμε τα στάδια 8, 9 με lysis I.

11) Απορρίπτουμε το υπερκείμενο. Προσθέτουμε διάλυμα λύσης των πυρήνων των λευκοκυττάρων (lysis II) μέχρι τα 6 mL. Ανακινούμε καλά και επωάζουμε για 30 min στους 20-22°C (το lysis II σπάει τους πυρήνες και τα μιτοχόνδρια των λευκοκυττάρων και παίρνουμε DNA).

12) Προσθέτουμε 750μl SDS 10% και 100μL proteinase K συγκέντρωσης 10 mg/mL (το SDS ανοίγει την πυρηνική μεμβράνη, η πρωτεϊνάση K συμβάλλει στη πεπτιδική υδρόλυση και αποικοδόμηση των πρωτεϊνών).

13) Επώαση στους 37°C για 14-16 ώρες.

## 2<sup>η</sup> ημέρα

14) Προσθέτουμε 2ml 6M NaCl. Αναδεύουμε ισχυρά για 15 sec (το NaCl σε μεγάλη συγκέντρωση προκαλεί κατακρήμνιση των πρωτεϊνών).

15) Φυγοκεντρούμε για 15 min στις 3500 rpm στους 4°C (με τη φυγοκέντρωση παίρνουμε το DNA στο υπερκείμενο).

16) Στο υπερκείμενο υπάρχει το DNA. Μεταγγίζουμε το υπερκείμενο σε καθαρό σωλήνα (falcon των 50 mL)

17) Φυγοκεντρούμε για 15 min στις 3.500 rpm στους 4°C.

18) Μεταγγίζουμε το υπερκείμενο σε άλλο σωλήνα (falcon των 50 mL)

19) Ακολουθεί κατακρήμνιση με 2 όγκους αιθανόλης 100%. Προσθέτουμε CH<sub>3</sub>COONa, όγκου ίσου με 1/10 του όγκου που είχαμε πριν την κατακρήμνιση (το DNA κατακρημνίζεται με ανάμειξη με αιθανόλη

100%, το άλας CH<sub>3</sub>COONa οδηγεί σε συσσωμάτωση των μορίων του DNA μέσω εξουδετέρωσης των αρνητικών φορτίων τους).

20) Επωάζουμε στην κατάψυξη (-20 °C) για 14-16 ώρες.

### 3<sup>η</sup> ημέρα

21) Φυγοκεντρούμε για 50min στις 3500rpm στους 4°C (ή για 30min στις 8000rpm).

22) Αφαιρούμε το υπερκείμενο και το ίζημα το βάζουμε σε σωλήνα erpendorf των 2mL.

23) Ξεπλένουμε το ίζημα με 2mL 70% αιθανόλης και φυγοκεντρούμε για 30min στις 12000rpm στους 4°C.

24) Επαναλαμβάνουμε δύο φορές το στάδιο 23, με τη διαφορά ότι η διάρκεια της φυγοκέντρωσης είναι 20min.

25) Απορρίπτεται το υπερκείμενο και το ίζημα διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου έως ότου απομακρυνθούν τα υπολείμματα αιθανόλης.

26) Επαναδιαλύουμε το ίζημα σε ddH<sub>2</sub>O όγκου αναλόγως της συγκέντρωσης που επιθυμούμε να έχει το διάλυμα (δοθέντος ότι ποσοτικοποιήσαμε, όπως ακολουθεί παρακάτω, το DNA που απομονώσαμε και γνωρίζουμε τη μάζα του).

<u>Διάλυμα λύσης λευκοκυττάρων Lysis I</u>	NH <sub>4</sub> Cl 155mM, KHCO <sub>3</sub> 10mM, EDTA 1mM pH 7,4
<u>Διάλυμα λύσης πυρήνων λευκοκυττάρων Lysis II</u>	Tris 10mM, NaCl 400mM, EDTA 2mM pH 8,2

### 2.3.2 Προσδιορισμός ποιότητας και συγκέντρωσης του DNA

#### A. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης – ποιοτικός έλεγχος

Μια μικρή ποσότητα από το απομονωμένο DNA ηλεκτροφορείται σε πηκτή αγαρόζης (1%) παρουσία βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr) και το DNA γίνεται ορατό με υπεριώδη ακτινοβολία σε συσκευή UV. Η τεχνική αυτή θα αναλυθεί εκτενέστερα παρακάτω. Με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται ο έλεγχος της ποιότητας του DNA.

#### B. Μέτρηση συγκέντρωσης - ποσοτικός έλεγχος

Μετά το πέρας της διαδικασίας απομόνωσης του DNA ακολουθεί ο προσδιορισμός της συγκέντρωσής του. Το DNA ανιχνεύεται και προσδιορίζεται ποσοτικά με πολλούς τρόπους. Η απλούστερη μέθοδος περιλαμβάνει τον υπολογισμό της συγκέντρωσής του με φωτομέτρηση σε φασματοφωτόμετρο. Η τεχνική αυτή βασίζεται στην ιδιότητα του DNA να απορροφά εκλεκτικά ακτινοβολία μήκους κύματος 260nm.

Συγκεκριμένα, μετράται η οπτική πυκνότητα (OD) υδατικού διαλύματος DNA (αραιωμένο διάλυμα DNA 1:100) σε μήκος κύματος 260nm και 280 nm σε κυψελίδα χαλαζία με διαδρομή φωτός 1cm. Η απορρόφηση στα 260nm αντιστοιχεί στο νουκλεϊκό οξύ που περιέχεται στο διάλυμα, ενώ η απορρόφηση στα 280 nm αντιστοιχεί στις πρωτεΐνες και άλλες προσμίξεις που έχουν παραμείνει στο διάλυμα.

Η καθαρότητα του DNA εκτιμάται με βάση το λόγο  $OD_{260}/OD_{280}$ . Τιμές του λόγου μεταξύ 1,7 και 1,9 υποδηλώνουν παρουσία επαρκώς καθαρού DNA, τιμές μικρότερες του 1,7 φανερώνουν ότι το διάλυμα του DNA περιέχει πρωτεΐνες, ενώ τιμές μεγαλύτερες του 1,9 υποδηλώνουν πρόσμιξη με RNA.

Έχει αποδειχθεί ότι σε μήκος κύματος 260nm τιμή OD ίση με 1 αντιστοιχεί σε συγκέντρωση 50μg/ml δίκλωνου DNA. Βάσει αυτού του δεδομένου μπορεί να υπολογιστεί η συγκέντρωση του DNA μετά τη φωτομέτρηση ως εξής:

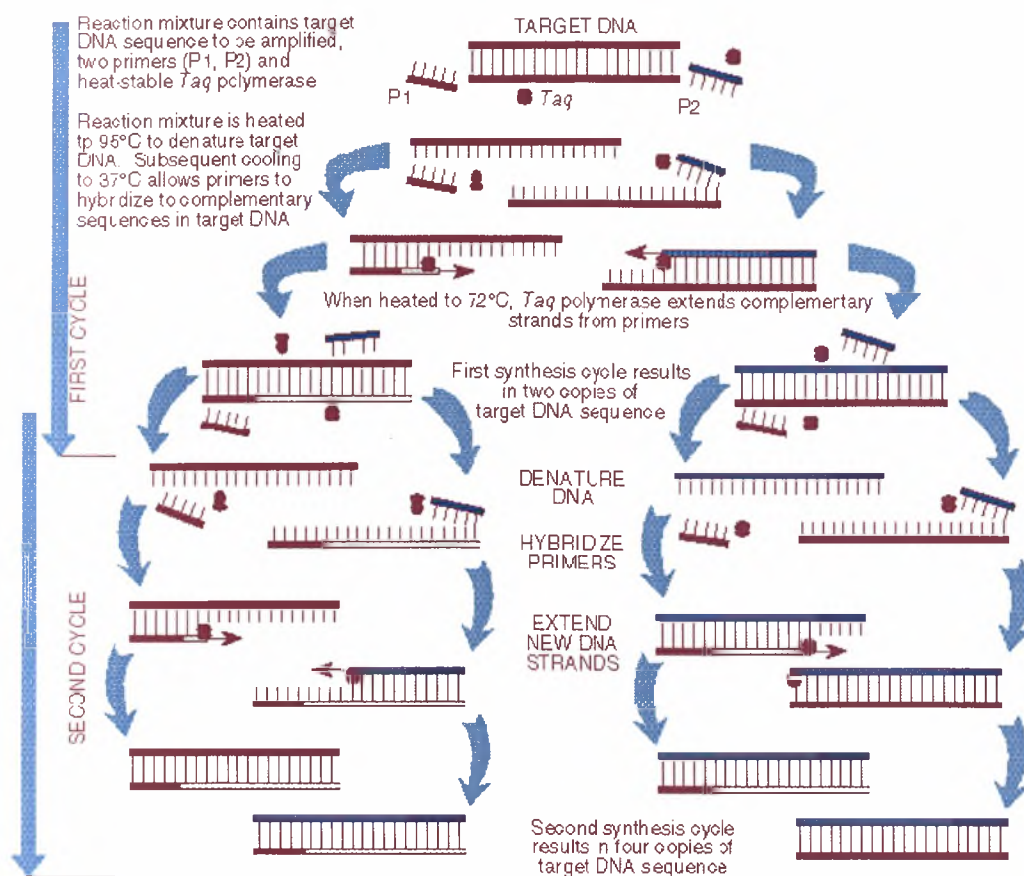
$$\text{Συγκέντρωση DNA (}\mu\text{g/ml)} = \text{αραιώση} \times 50 \times \text{τιμή OD}_{260}$$

Η μέθοδος αυτή είναι αρκετά ευαίσθητη και μπορεί να ανιχνεύσει ποσότητες DNA μέχρι και 0,2μg DNA/ml διαλύματος.

### 2.3.3 Αλυσιδωτή Αντίδραση της Πολυμεράσης (PCR: Polymerase Chain Reaction)

Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμέρασης είναι μία τεχνική η οποία αναπτύχθηκε το 1984 από το βιοχημικό Kary Mullis. Με την τεχνική αυτή έχουμε τη δυνατότητα να κλωνοποιήσουμε συγκεκριμένες αλληλουχίες DNA *in vitro*, χρησιμοποιώντας ορισμένα χαρακτηριστικά του μηχανισμού αντιγραφής του DNA *in vivo*. Αυτά τα στοιχεία είναι ότι η DNA πολυμεράση χρησιμοποιεί μονόκλωνο μόριο DNA ως εκμαγείο για τη σύνθεση ενός νέου συμπληρωματικού κλώνου, ενώ απαιτεί επίσης την παρουσία ενός μικρού τμήματος δίκλωνου DNA για την έναρξη της σύνθεσης (**Εικόνα 14**). Το σημείο έναρξης της σύνθεσης μπορεί να καθοριστεί με τη χρήση ενός ολιγονουκλεοτιδικού εναρκτήριου μορίου (εκκινητής, primer) που συνδέεται με τη μήτρα σε αυτό ακριβώς το σημείο. Επομένως έχουμε τη δυνατότητα να ενισχύσουμε οποιοδήποτε τμήμα δίκλωνου DNA επιλέγοντας δύο εκκινητές που υβριδίζονται εκατέρωθεν της αλληλουχίας στόχου.

## DNA Amplification Using Polymerase Chain Reaction



Εικόνα 14: Ενίσχυση τμημάτων DNA με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης

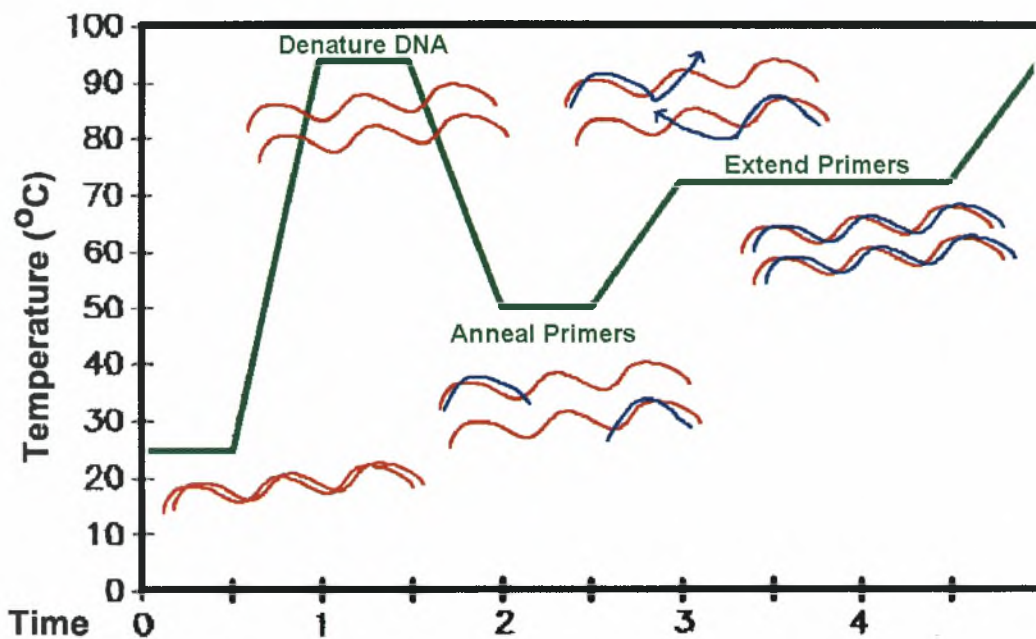
Η τεχνική της PCR αποτελείται από επαναλαμβανόμενους κύκλους. Μετά από κάθε κύκλο η συγκέντρωση του τμήματος του DNA που θέλουμε να ενισχύσουμε διπλασιάζεται. Κάθε κύκλος της PCR περιλαμβάνει τρία στάδια και η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται εξολοκλήρου *in vitro* σε ένα σωληνάριο τύπου erpendorf με τη χρήση θερμικού κυκλοποιητή, ο οποίος παρέχει τη δυνατότητα της αλλαγής της θερμοκρασίας ανάλογα με το στάδιο στο οποίο βρίσκεται κάθε στιγμή η διαδικασία. Τα στάδια αυτά είναι τα ακόλουθα:

1. αποδιάταξη (στο στάδιο αυτό διαχωρίζονται τα δίκλινα μόρια του DNA σε μονόκλωνες αλυσίδες)
2. υβριδοποίηση (σύζευξη των εκκινητών με τις συμπληρωματικές τους αλληλουχίες στα μόρια του μονόκλωνου DNA)



3. προέκταση (σύνθεση της συμπληρωματικής αλυσίδας του DNA

Όπως παραστατικά φαίνεται στο παρακάτω διάγραμμα, η τεχνική της PCR περιλαμβάνει μια επαναλαμβανόμενη εναλλαγή ανάμεσα σε μια υψηλή θερμοκρασία για το διαχωρισμό των αλυσίδων του DNA, μια σχετικά χαμηλή θερμοκρασία για τον υβριδισμό των εκκινητών με συμπληρωματικές περιοχές του DNA-στόχου και μια ενδιάμεση θερμοκρασία για την επέκταση των εκκινητών (Εικόνα 15).



Εικόνα 15: Γραφική αναπαράσταση των σταδίων της PCR σε σχέση με τη θερμοκρασία και το χρόνο

Εκτός από το αρχικό εκμαγείο-DNA και τους εκκινητές η τεχνική της PCR χρειάζεται:

- την DNA πολυμεράση, χρησιμοποιείται η *Taq* DNA πολυμεράση η οποία προέρχεται από τον οργανισμό *Thermus aquaticus* και μπορεί να καταλύει την αντίδραση σε ιδιαίτερα υψηλές θερμοκρασίες.



- διάλυμα που να περιέχει ελεύθερα 5' τριφωσφορικά δεοξυριβοζονουκλεοτίδια (dNTPs), τα οποία χρησιμοποιεί η πολυμεράση για την προέκταση του κλώνου που συνθέτει.
- διάλυμα MgCl<sub>2</sub>, καθώς η πολυμεράση χρησιμοποιεί τα ιόντα Mg<sup>2+</sup> ως συμπαραγόντα για να μπορέσει να δράσει.
- ειδικό ρυθμιστικό διάλυμα, που παρέχει στην πολυμεράση τις κατάλληλες συνθήκες για να μπορέσει να δράσει.

### 2.3.3.1 Ενίσχυση τμήματος του γονιδίου MT ND4

Στην παρούσα εργασία μελετούμε την παρουσία της μετάλλαξης G11778A στο γονίδιο της τέταρτης υπομονάδας της NADH-αφυδρογονάσης (MT ND4) και βρίσκεται στο μιτοχονδριακό DNA. Με βάση την αλληλουχία της υπό μελέτη περιοχής του γονιδίου σχεδιάζονται οι εκκινητές (primers) έτσι ώστε να είναι συμπληρωματικοί ο ένας προς το 3' άκρο της μη κωδικοποιούσας αλυσίδας (forward ή νοηματικός <sense> εκκινητής) και ο δεύτερος προς το 5' άκρο της κωδικοποιούσας αλυσίδας (reverse ή αντινοηματικός <antisense> εκκινητής). Η αλληλουχία των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι εξής:

Primer FW: 5'-CCAAACCCCCTGAAGCTTCACCGGCGCCGCAG-3'

Primer RV: 5'-GGGTTAACGAGGGTGGTAAGG-3'

Οι συγκεντρώσεις και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν για την PCR ούτως ώστε να ενισχύσουμε το τμήμα αυτό φαίνονται στον **Πίνακα 2**.

**Πίνακας 2:** Σύσταση των αντιδράσεων PCR

	<b>Όγκος</b>	<b>Συγκέντρωση</b>
DNA (200ng/μl)	5 μl	0.02 μg
10x Taq DNA polymerase buffer	5 μl	1x
dNTPs (40mM)	0,5 μl	0,4 mM
Primer FW (10mM)	1 μl	0,2 μM
Primer RV (10mM)	1 μl	0,2 μM
MgCl <sub>2</sub> (50mM)	2 μl	2 mM
Taq DNA polymerase (5u/μl)	0,5 μl	2,5 u
ddH <sub>2</sub> O	35 μl	
<b>Τελικός όγκος (V<sub>τελ</sub>)</b>	<b>50 μl</b>	

Οι συνθήκες της PCR περιγράφονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 3).

**Πίνακας 3:** Συνθήκες της αντίδρασης PCR.

<b>ΣΤΑΔΙΟ</b>	<b>ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ (°C)</b>	<b>ΧΡΟΝΟΣ</b>	
Αρχική αποδιάταξη	94	3 min	
Αποδιάταξη	94	30 sec	} 30 κύκλοι
Υβριδισμός	60	30 sec	
Επιμήκυνση	72	1 min	
Τελική επιμήκυνση	72	5 min	

Τα προϊόντα της PCR ηλεκτροφορούνται σε πηκτή αγαρόζης 2,5% παρουσία βρωμιούχου αιθιδίου. Παράλληλα ηλεκτροφορείται δείκτης μοριακού βάρους τμημάτων DNA για να ελεγχθεί το αποτέλεσμα της PCR. Το μέγεθος του τμήματος που αναμένεται να ενισχυθεί είναι 215 ζεύγη βάσεων.

10x Taq DNA polymerase buffer	200 mM Tris-HCl (pH 8.4), 500 mM KCl
-------------------------------	--------------------------------------

#### 2.3.4 Πέψη με ένζυμο περιορισμού – Πολυμορφισμός μήκους τμημάτων περιορισμών (RFLP)

Τα ένζυμα περιορισμού είναι ενδονουκλεάσες που προέρχονται από βακτήρια. Ο φυσιολογικός τους ρόλος είναι να προστατεύουν τα βακτήρια από ξένα προς αυτά μόρια DNA. Τα ένζυμα περιορισμού αναγνωρίζουν αλληλουχίες DNA 4 – 8 νουκλεοτιδίων, ενώ κάθε ένζυμο αναγνωρίζει και ξεχωριστή αλληλουχία. Το γονιδίωμα του βακτηρίου προστατεύεται από τις νουκλεάσες αυτές καθώς στο δικό τους γενετικό υλικό μία τριφωσφορική αδενοσίνη ή κυτοσίνη είναι μεθυλιωμένες. Τυχόν αλληλουχίες κάποιου ξενιστή που βρίσκονται μέσα στο βακτήριο και δεν είναι μεθυλιωμένες αναγνωρίζονται και αποκόπτονται από τα ένζυμα περιορισμού.

Οι ενδονουκλεάσες περιορισμού κατατάσσονται σε τρεις κατηγορίες ανάλογα με τη θέση που τέμνουν την αλληλουχία – στόχο μετά την αναγνώρισή της. Συγκεκριμένα οι ενδονουκλεάσες τύπου I τέμνουν το DNA σε μία απόσταση 1000 με 5000 bp από την αλληλουχία αναγνώρισης. Η κατηγορία τύπου II περιλαμβάνει ενδονουκλεάσες οι οποίες τέμνουν το γενετικό υλικό μέσα στην αλληλουχία που αναγνωρίζουν. Η ομάδα αυτή περιλαμβάνει και τις περισσότερες γνωστές

ενδονουκλεάσες. Τέλος τα ένζυμα τύπου III δρουν όπως αυτά του τύπου I, μόνο που τέμνουν το γενετικό υλικό 20 περίπου βάσεις μακριά από την αλληλουχία που αναγνωρίζουν.

Έτσι χάρη στα ένζυμα αυτά έχουμε ένα πολύτιμο εργαλείο με το οποίο μπορούμε να μελετήσουμε απομονωμένα γονίδια ή τμήματα γονιδίων ξεχωριστά παρά να έχουμε διασκορπισμένες πληροφορίες σε ένα τεράστιο μοριακό σύνολο.

#### 2.3.4.1 Πέψη με το ένζυμο περιορισμού *Sfa*NI

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήσαμε ως ένζυμο περιορισμού την ενδονουκλεάση *Sfa*NI. Το ένζυμο αυτό αναγνωρίζει μία αλληλουχία 5 βάσεων και κόβει το DNA 10 θέσεις μετά την αλληλουχία αναγνώρισης σχηματίζοντας συμπληρωματικά άκρα όπως φαίνεται στο πιο κάτω σχήμα.



Στον πίνακα 4 φαίνονται οι ποσότητες και οι συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν για την πέψη του προϊόντος της PCR του τμήματος του γονιδίου MT ND4 που περιέχει τη θέση 11778.

Πίνακας 4: Ποσότητα και συγκέντρωση αντιδραστηρίων για την πέψη με το *Sfa*NI

	Όγκος	Τελική συγκέντρωση
Προϊόν PCR	25 $\mu$ l	
<i>Sfa</i> NI (10u/ $\mu$ l)	0,5 $\mu$ l	5 u
10x buffer για το <i>Sfa</i> NI	3 $\mu$ l	1x
ddH <sub>2</sub> O	1,5 $\mu$ l	
Τελικός όγκος ( $V_{\text{τελ}}$ )	30 $\mu$ l	

Μετά την προετοιμασία των δειγμάτων ακολούθησε επώαση στους 37 °C για 14-16 ώρες (O/N) για να πραγματοποιηθεί η πέψη.

10x buffer για το <i>Sfa</i> NI	50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl <sub>2</sub> , 1 mM Dithiothreitol, pH 7.9,
---------------------------------	--

### 2.3.5 Ηλεκτροφόρηση

Ηλεκτροφόρηση είναι η μετακίνηση ενός φορτισμένου μορίου υπό την επίδραση κάποιου ηλεκτρικού πεδίου. Με τη μετακίνηση έχουμε τη δυνατότητα να διαχωρίσουμε μόρια που έχουν διαφορετικό μέγεθος και φορτίο. Στην περίπτωση του DNA ο διαχωρισμός γίνεται με βάση το μέγεθος των τμημάτων που μελετάμε καθώς είναι φορτισμένο αρνητικά εξ αιτίας των φωσφορικών ομάδων.

Στον παρόν πείραμα η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε πηκτική αγαρόζη. Όσο πιο πυκνή είναι η πηκτική (μεγαλύτερο ποσοστό αγαρόζης) τόσο πιο μικρά τμήματα DNA μπορούμε να διαχωρίσουμε. Επειδή είχαμε να διαχωρίσουμε τμήματα έως και 95bp φτιάξαμε πηκτική 3%. Οι ποσότητες και τα αντιδραστήρια φαίνονται στον Πίνακα 5.

Πίνακας 5: Αντιδραστήρια για την παρασκευή πηκτής αγαρόζης 3%

Αντιδραστήριο	Ποσότητα
Αγαρόζη	4,2 g
TBE 1x	140 ml
Βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr, 1%)	7 $\mu$ l

Η αγαρόζη επιτρέπει το διαχωρισμό των μορίων μεταξύ τους χάρη στους μικρούς πόρους που υπάρχουν ανάμεσα στα μόριά της. Το TBE αποτελεί το ρυθμιστικό μέσο στο οποίο διαλύουμε την αγαρόζη. Για να παρασκευάσουμε το διάλυμα βάζουμε την αγαρόζη μέσα στο TBE και θερμαίνουμε μέχρι το διάλυμα να γίνει εντελώς διαυγές. Το TBE εκτός του ότι είναι πολύ καλό ρυθμιστικό επιτυγχάνει και καλό διαχωρισμό. Επίσης με το TBE καλύπτουμε μετά την πηκτή μέσα στη συσκευή κατά τη διαδικασία της ηλεκτροφόρησης. Τέλος, μέσα στο διάλυμα του TBE και της αγαρόζης προσθέτουμε βρωμιούχο αιθίδιο καθώς η ουσία αυτή παρεμβάλλεται ανάμεσα στις βάσεις του DNA και με τον τρόπο αυτό μπορούν να γίνουν εμφανή τα τμήματα του DNA που ηλεκτροφορήσαμε μετά την έκθεση της πηκτής σε υπεριώδη ακτινοβολία (UV). Αφού προσθέσουμε και το EtBr τοποθετούμε το διάλυμα σε κατάλληλη συσκευή όπου και πήζει και δημιουργούνται και τα πηγαδάκια για να φορτώσουμε το DNA. Στο δείγμα του DNA προσθέτουμε και διάλυμα πλήρωσης το οποίο περιέχει:

1. Μπλε της βρωμοφαινόλης, ένα δείκτη για την παρακολούθηση του μετώπου της ηλεκτροφόρησης,
2. Γλυκερόλη, για την καθίζηση των δειγμάτων στα πηγαδάκια, και



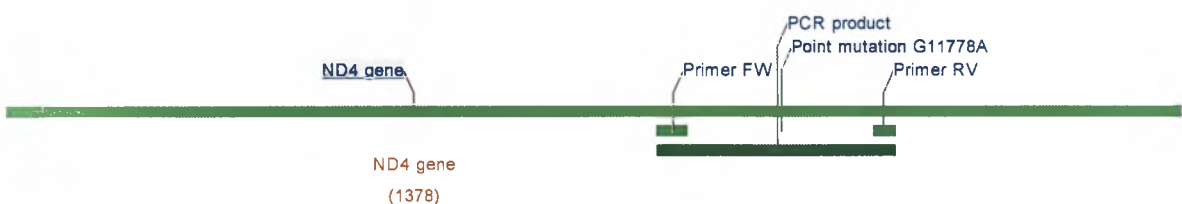
3. EDTA, για τη δέσμευση των κατιόντων και την παύση οποιασδήποτε ενζυμικής αντίδρασης.

Αφού φορτώσουμε τα δείγματα εφαρμόζουμε σταθερή τάση και η ηλεκτροφόρηση τελειώνει όταν το μέτωπο της ηλεκτροφόρησης φτάσει τα 2/3 περίπου της πηκτής. Αφού τελειώσει η ηλεκτροφόρηση τοποθετούμε την πηκτή σε συσκευή UV για να δούμε τα αποτελέσματα και φωτογραφίζουμε την πηκτή.

Τα δείγματα που βάλαμε για ηλεκτροφόρηση είναι το προϊόν της πέψης που υπέστη το τμήμα του γονιδίου της MT ND4 και περιλαμβάνει τη νουκλεοτιδική θέση 11778 και που ενισχύσαμε με PCR. Σα μάρτυρα χρησιμοποιήσαμε το Low molecular weight DNA ladder της BioLabs σύμφωνα με τα τμήματα που αναμένουμε να πάρουμε στην ηλεκτροφόρηση (215bp, 120bp και 95bp). Ο μάρτυρας μας επιτρέπει να υπολογίσουμε το μέγεθος του τμήματος που θέλουμε να μελετήσουμε. Οι συνθήκες που εφαρμόσαμε κατά την ηλεκτροφόρηση ήταν 115 Volts για 1 ώρα.

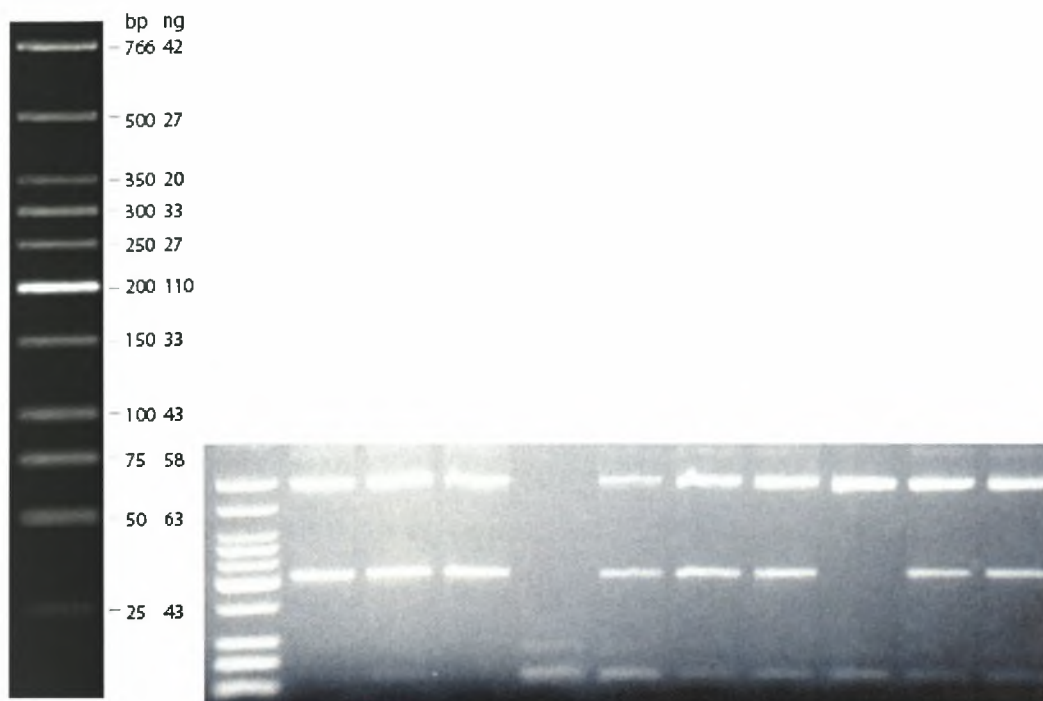
### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Για την παρούσα μελέτη απομονώθηκε DNA από 92 ασθενείς που πάσχουν από Σκλήρυνση κατά Πλάκας. Και για τα 92 δείγματα πραγματοποιήθηκε PCR αντίδραση με στόχο τον πολλαπλασιασμό τμήματος του γονιδίου της MT ND4 του mtDNA. Το τμήμα αυτό περιείχε τη θέση 11778 για να μελετήσουμε τον πολυμορφισμό G11778A (**Εικόνα 16**).



**Εικόνα 16:** Το γονίδιο της ND4 και η περιοχή του γονιδίου που ενισχύεται με την PCR. Στην εικόνα φαίνονται επίσης οι θέσεις δέσμησης των εκκινήτων και η θέση της σημειακής μετάλλαξης.

Τα προϊόντα της αντίδρασης PCR όλων των δειγμάτων αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης για να ελεγχθεί το αποτέλεσμα της αντίδρασης (**Εικόνα 17**).



**Εικόνα 17:** Ηλεκτροφόρηση προϊόντων της αντίδρασης PCR. Αριστερά φαίνεται ο Low Molecular Weight DNA Ladder ο οποίος χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας.

Στις περισσότερες των περιπτώσεων ενισχύθηκε ένα τμήμα DNA μεγέθους 215 ζευγών βάσεων που αντιστοιχεί στο μέγεθος της υπό μελέτη περιοχής. Ωστόσο, παρατηρήθηκε ότι σε όλα τα δείγματα ενισχυόταν και ένα τμήμα DNA περί τα 770 ζεύγη βάσεων. Το τμήμα αυτό πιθανολογείται ότι προκύπτει από την ενίσχυση κάποιου ψευδογονιδίου του πυρηνικού DNA. Σύμφωνα με την ανάλυση που πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια των εργαλείων της βιοπληροφορικής, το τμήμα αυτό ανήκει στο χρωμόσωμα 5. Οι εκκινητές παρουσιάζουν συμπληρωματικότητα βάσεων με τα άκρα μιας περιοχής του βραχίονα p του χρωμοσώματος 5. Γενικά, πολλά είναι τα ψευδογονίδια που υπάρχουν στο χρωμοσωμικό πυρηνικό DNA και παρουσιάζουν ομοιότητα με μιτοχονδριακά γονίδια, όπως αναφέρεται και στη βάση δεδομένων MITOMAP ([www.mitomap.org](http://www.mitomap.org)).

Για να μελετηθεί η παρουσία ή όχι της μετάλλαξης G11778A στο μιτοχονδριακό DNA των ασθενών με ΣΚΠ επιλέχτηκε η ανάλυση RFLP (πολυμορφισμοί μήκος τμημάτων περιορισμού). Σύμφωνα με το χάρτη των θέσεων των περιοριστικών ενζύμων στο τμήμα που εντοπίζεται η μετάλλαξη, το καταλληλότερο ένζυμο για τη συγκεκριμένη μελέτη είναι το *Sfa*NI.

Η θέση 11778 του mtDNA αποτελεί την αρχή της αλληλουχίας αναγνώρισης του *Sfa*NI. Έτσι σε φυσιολογικά άτομα (G) θα τέμνει το τμήμα του DNA που ενισχύσαμε ενώ σε άτομα που φέρουν την μετάλλαξη (A) το τμήμα αυτό θα μένει ενιαίο. Πιο ειδικά άτομα τα οποία φέρουν μόνο γουανίνη στη θέση 11778, παρουσιάζουν δηλαδή ομοπλασμία για τη φυσιολογική άγριου τύπου MT ND4, μετά την πέψη το τμήμα των 215bp που ενισχύεται με την PCR θα διασπαστεί πλήρως σε ένα τμήμα 120bp και ένα τμήμα 95bp. Άτομα που φέρουν μόνο αδενίνη στη θέση 11778 του mtDNA, παρουσιάζουν ομοπλασμία δηλαδή για τη μετάλλαξη μετά την πέψη θα φέρουν μόνο το τμήμα των 215bp καθώς η *Sfa*NI δεν μπορεί κόψει το ενισχυμένο τμήμα αφού δεν αναγνωρίζει πια την αλληλουχία στόχο. Τέλος στα άτομα που παρουσιάζουν ετεροπλασμία, φέρουν δηλαδή στο γονιδίωμα του mtDNA τόσο γουανίνη όσο και αδενίνη στη θέση 11778, στο ίδιο μιτοχόνδριο, κύτταρο ή ιστό, θα παρουσιάζουν και τις τρεις ζώνες (215bp, 120bp και 95bp) μετά την πέψη. (Εικόνα 18).

ΠΡΟΪΟΝ PCR (- ΜΕΤΑΛΛΑΞΗ)

ΠΡΟΪΟΝ PCR (+ ΜΕΤΑΛΛΑΞΗ)

215bp

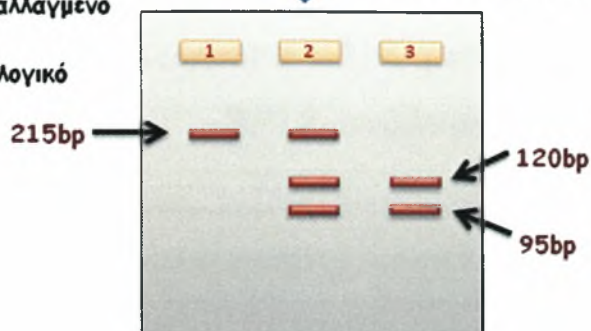


Πέψη με το ένζυμο  
περιορισμού *Sfa*NI



Ηλεκτροφόρηση σε  
πηκτή αγαρόζης

1. Ομοπλασμία - Μεταλλαγμένο
2. Ετεροπλασμία
3. Ομοπλασμία - Φυσιολογικό



**Εικόνα 18:** Ανάλυση RFLP των προϊόντων της αντίδρασης PCR. Σε περιπτώσεις ομοπλασμίας και ετεροπλασμίας το προφίλ των προϊόντων της πέψης με την περιοριστική ενδονουκλεάση διαφέρει ανάλογα με την παρουσία ή όχι της μετάλλαξης G11778A.

Ο διαχωρισμός των τμημάτων DNA μετά την πέψη με την περιοριστική ενδονουκλεάση πραγματοποιείται με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 3%. Ο μάρτυρας μεγέθους που ηλεκτροφορείται παράλληλα βοηθάει στην εκτίμηση του μεγέθους των τμημάτων που προκύπτουν. Η παρακάτω εικόνα (**Εικόνα 19**) αποτελεί ένα αντιπροσωπευτικό δείγμα ηλεκτροφορημένων τμημάτων DNA μετά από ανάλυση RFLP.



Εικόνα 19: Ηλεκτροφόρηση προϊόντων RFLP ανάλυσης.

Η συνολική εκτίμηση που προέκυψε από την ανάλυση των δειγμάτων των ασθενών με ΣΚΠ είναι ότι η μετάλλαξη δεν παρουσιάζεται σε κανέναν ασθενή. Σύμφωνα με το ιστορικό των ασθενών και τις ιατρικές εξετάσεις που πραγματοποιήθηκαν πριν τη συγκεκριμένη μελέτη, ένα ποσοστό της τάξεως του 20% περίπου των ασθενών εμφάνισε οπτική νευρίτιδα. Ωστόσο, η μετάλλαξη G11778A, που κυρίως έχει συσχετιστεί με την ασθένεια LHON, δεν εντοπίστηκε στο μιτοχονδριακό DNA της συγκεκριμένης ομάδας ασθενών. Όπως θα συζητηθεί και παρακάτω, το αποτέλεσμα αυτό συνάδει με αποτελέσματα παρόμοιων ερευνών σε ομάδες ασθενών διαφορετικής εθνικότητας.



## 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Το μιτοχονδριακό DNA κωδικοποιεί πολλές πρωτεΐνες και μόρια ιδιαίτερα σημαντικά για την ενεργειακή κατάσταση των κυττάρων. Από το 1981 είναι γνωστή η αλληλουχία και η οργάνωση του ανθρώπινου μιτοχονδριακού γενώματος. Το μιτοχονδριακό DNA κωδικοποιεί 13 πρωτεΐνες, 22 μόρια tRNA και 2 μόρια rRNA. Οι 13 πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται συμμετέχουν στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων που εντοπίζεται στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη. Η πρώτη μετάλλαξη του μιτοχονδριακού DNA περιγράφηκε το 1988. Σε ασθενείς με σύνδρομο Kearns–Sayre ανιχνεύθηκαν απαλοιφές στο μιτοχονδριακό DNA. Επίσης, επισημάνθηκε η παρουσία μιας σημειακής μετάλλαξης στο γονίδιο που κωδικοποιεί την ND4 (G11778A), η οποία συσχετίστηκε με την ασθένεια LHON, την κύρια αιτία της μητρικά κληρονομούμενης τύφλωσης. Σε σύντομο χρονικό διάστημα δύο ακόμα μητρικά κληρονομούμενες ασθένειες, η MERRF και η MELAS συνδέθηκαν με σημειακές μεταλλάξεις σε μιτοχονδριακά γονίδια που κωδικοποιούν μόρια tRNA.

Σε μελέτες που ακολούθησαν, μεταλλάξεις στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα συσχετίστηκαν με ποικίλες ασθένειες, κυρίως νευροπάθειες και μυοπάθειες. Τα νευρικά και μυϊκά κύτταρα εξαρτώνται άμεσα από την παρουσία «άφθονου» ATP ώστε να επιτελέσουν τις λειτουργίες τους. Αυτό μπορεί να εξηγήσει γιατί οποιαδήποτε ανωμαλία στη σύνθεση αυτού του μορίου προκαλεί εμφανείς εκδηλώσεις ασθενών φαινοτύπων.

Η μετάλλαξη G11778A έχει συσχετισθεί κυρίως με την ασθένεια LHON. Η μετάλλαξη αυτή εντοπίζεται στην υπομονάδα 4 της NADH αφυδρογονάσης, που συμμετέχει στο σύμπλοκο I της αναπνευστικής αλυσίδας. Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, δεν έχει διευκρινιστεί αν η

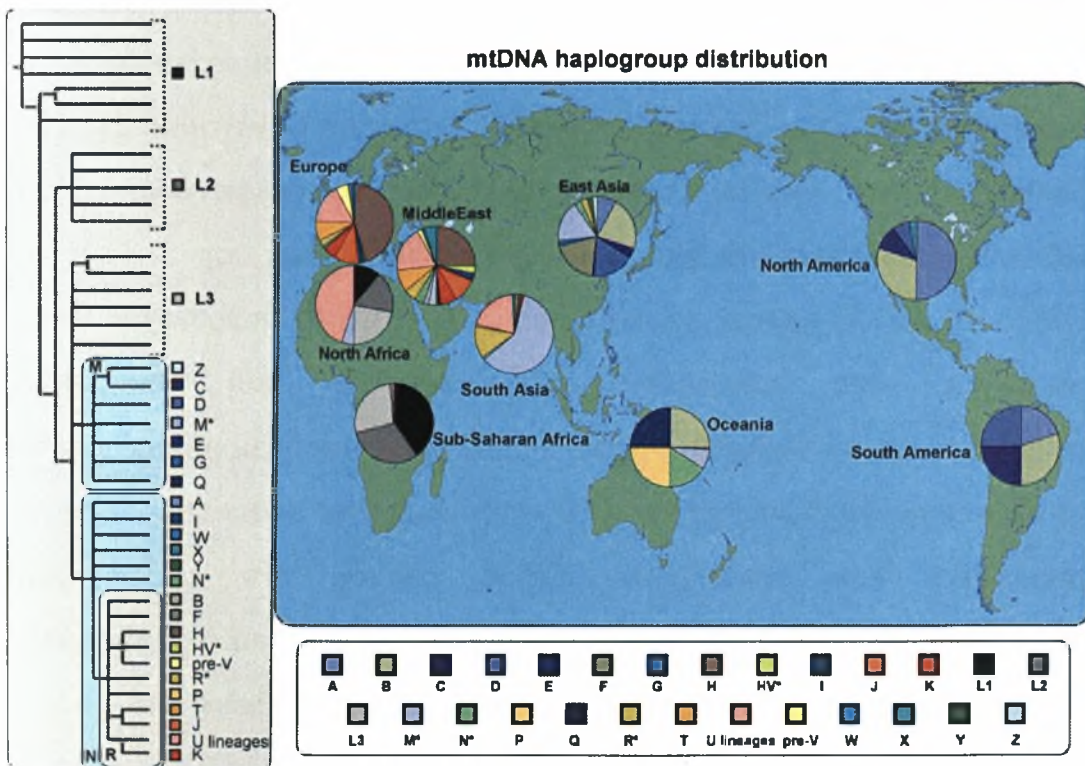
μειωμένη δραστικότητα του συμπλόκου ή η υπερ-παραγωγή ελευθέρων ριζών ευθύνονται για την παθογένεια της μετάλλαξης αυτής. Τις τελευταίες δεκαετίες κάποιες μελέτες υποστηρίζουν ότι η συγκεκριμένη μετάλλαξη μπορεί να σχετίζεται και με την οπτική νευρίτιδα που παρουσιάζουν οι ασθενείς με ΣΚΠ.

Η υπόθεση ότι τα γονίδια του μιτοχονδριακού DNA μπορεί να σχετίζονται με τη σκλήρυνση κατά πλάκας ενισχύεται από το ότι οι μιτοχονδριακές μεταλλάξεις που σχετίζονται με την ασθένεια LHON έχουν βρεθεί και σε ασθενείς με ΣΚΠ. Η οπτική νευρίτιδα σε ασθενείς με ΣΚΠ που φέρουν μια από τις παθολογικά σημαντικές μεταλλάξεις που σχετίζονται με τη LHON υποδεικνύει την εμπλοκή των μιτοχονδριακών γονιδίων στην αιτιολογία της ΣΚΠ. Σε ορισμένες μελέτες δεν εντοπίστηκαν συγκεκριμένες παθολογικές μεταλλάξεις στα μιτοχονδριακά γονίδια ασθενών με ΣΚΠ. Ωστόσο, ο ρόλος των μιτοχονδρίων στην ασθένεια αυτή είναι ιδιαίτερα σημαντικός. Και αυτό γιατί συγκεκριμένοι μιτοχονδριακοί απλότυποι που εμφανίζονται στην ΣΚΠ έχουν περιγραφεί σε πολλές μελέτες. Οι μιτοχονδριακοί απλότυποι J (προσδιορίζεται ως - 13.704 BstI / 16.065 HinfI) και K (προσδιορίζεται ως - 9.052 HaeII / 9.053 HhaI) έχει δειχθεί ότι αυξάνουν την επιρρέπεια στην ΣΚΠ. Οι μιτοχονδριακοί απλότυποι J και X (προσδιορίζεται ως - 1.715 DdeI) σχετίζονται με την οπτική νευρίτιδα που παρουσιάζεται τόσο σε ασθενείς που πάσχουν από LHON όσο και σε ασθενείς που πάσχουν από σκλήρυνση κατά πλάκας<sup>37, 38</sup> (Εικόνα 20).

		Polymorphic nucleotide position													
		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
		6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
		0	0	1	1	1	2	2	2	2	2	2	3	3	3
		5	6	2	4	9	2	4	6	9	9	9	0	1	1
H <sup>a</sup>		1	9	6	5	3	4	9	1	0	2	4	4	1	9
rCam <sup>b</sup>	A	C	T	G	C	T	T	C	C	C	C	T	T	G	T
H	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	C	...	...
D	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	C
L	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	T	...	...	...
J	...	T	C	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
T	...	...	C	...	...	...	...	...	...	...	...	T	...	...	...
U	G	...	...	...	...	...	C	...	...	...	...	...	...	...	...
K	...	...	...	...	...	C	...	...	...	...	...	...	C	...	...
W	...	...	...	...	...	...	...	...	...	T	...	...	...	...	...
A	...	...	...	...	...	...	...	...	T	...	...	...	...	...	A

Εικόνα 20: Απλότυποι του μιτοχονδριακού DNA

Οι απλότυποι του mtDNA που φαίνεται να επηρεάζουν την εκδήλωση της ΣΚΠ και της LHON εντοπίζονται κυρίως σε πληθυσμούς της Ευρώπης και της Μέσης Ανατολής, όπως φαίνεται από την κατανομή των απλοτύπων στην Εικόνα 21.



Εικόνα 21: Γεωγραφική κατανομή μιτοχονδριακών απλοτύπων ανά την υφήλιο.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης δεν υπάρχει συσχέτιση της μετάλλαξης G11778A του μιτοχονδριακού γενώματος με τη ΣΚΠ σε πληθυσμό από τη Θεσσαλία. Ελέγχθηκαν δείγματα 92 ασθενών, 20% από τους οποίους παρουσίαζε οπτική νευρίτιδα. Τα αποτελέσματα των ερευνών στο συγκεκριμένο θέμα δίστανται. Σε πολλούς πληθυσμούς έχει ανιχνευθεί η μετάλλαξη σε ασθενείς με ΣΚΠ σε διάφορα ποσοστά που τους επιτρέπουν να συσχετίσουν τη μετάλλαξη G11778A του mtDNA με τη νόσο.<sup>65, 66, 67</sup> Αντιθέτως, άλλες μελέτες αναφέρουν ότι δεν υπάρχει συσχέτιση. Συγκεκριμένα, ο Houshmand και οι συνεργάτες του<sup>68</sup> αναφέρουν ότι μελέτησαν δείγματα 31 ασθενών με ΣΚΠ και οπτική νευρίτιδα και 25 ασθενών με ΣΚΠ οι οποίοι δεν παρουσίαζαν ως σύμπτωμα οπτική νευρίτιδα και δεν ανίχνευσαν καμία από τις μεταλλάξεις που έχουν συσχετιστεί με τη LHON. Αυτή η αναφορά αποτελεί ένα παράδειγμα, καθώς υπάρχουν και άλλες αντίστοιχες μελέτες<sup>69, 70, 71</sup> που διαχωρίζουν πλήρως την ΣΚΠ από τις συγκεκριμένες μιτοχονδριακές μεταλλάξεις.

Η παθογένεια όμως της ΣΚΠ φαίνεται να είναι πολυπαραγοντική, όπως προαναφέρθηκε. Υπάρχουν πολλά γονίδια του πυρηνικού γενώματος, που κωδικοποιούν σύμπλοκα της αναπνευστικής αλυσίδας των μιτοχονδρίων, ένα από τα οποία είναι το γονίδιο SURF1. Το SURF1 κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη, που εντοπίζεται στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη, σημαντική για τη διατήρηση της δραστηριότητας της οξειδάσης του κυτοχρώματος c (COX) και την αναπνοή του κυττάρου. Μεταλλάξεις στο γονίδιο SURF1 επηρεάζουν τον ενεργειακό μιτοχονδριακό μεταβολισμό. Το γεγονός αυτό μπορεί να συμβάλλει στη μείωση της σύνθεσης ATP, οδηγώντας σε δυσλειτουργία κυρίως τα κύτταρα με μεγαλύτερες απαιτήσεις σε ATP, όπως είναι τα νευρικά κύτταρα, τα οποία είναι άμεσα εξαρτώμενα από τη συνεχή παροχή ενέργειας. Βιοχημικές μελέτες σχετικά με την αναπνευστική αλυσίδα

μπορεί να οδηγήσουν στον προσδιορισμό του ρόλου πυρηνικών γονιδίων, συμπεριλαμβανομένου και του SURF1, και των μιτοχονδρίων στην αιτιολογία της ΣΚΠ.

Η συσχέτιση της ΣΚΠ με συγκεκριμένες μιτοχονδριακές μεταλλάξεις παραμένει ένα αναπάντητο ερώτημα, γύρω από το οποίο τα αποτελέσματα των ερευνών δίστανται. Οι μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί μέχρι σήμερα έχουν κυρίως συγκεντρωθεί στην ανίχνευση των μεταλλάξεων που συνδέονται με την LHON σε ασθενείς με ΣΚΠ. Μια ευρύτερη διερεύνηση της αλληλουχίας του μιτοχονδριακού γενώματος των ασθενών με ΣΚΠ μπορεί να δώσει πληροφορίες για νέους πολυμορφισμούς που σχετίζονται με την ασθένεια. Επίσης, η διερεύνηση θα πρέπει να επεκταθεί σε μεγαλύτερο εύρος πληθυσμών, αν και φαίνεται ότι οι απλότυποι που ευνοούν την εμφάνιση της ασθένειας εντοπίζονται σε συγκεκριμένες γεωγραφικές περιοχές. Οπότε, σε καθαρά εθνικό επίπεδο, η μελέτη αυτή θα έπρεπε να επεκταθεί με ανάλυση δειγμάτων από όλα τα γεωγραφικά διαμερίσματα της χώρας, καθώς η Ελλάδα και γενικότερα η Ευρώπη είναι από τις περιοχές που εμφανίζονται οι απλότυποι αυτοί (X, K & J).

## 5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Scheffler, IE. (2001) Mitochondria make a come back. **Adv Drug Deliv Rev.** 49:3-26
2. Anderson, S., Bankier, A.T., Barrell, B.G., de Bruijn, M.H., Coulson, A.R., Drouin, J., Epenon, I.C., Nierlich, D.P., Roe, B.A., Sanger, F., Schreier, PH., Smith, A.J., Standen, R., Young, IG. (1981) Sequence and organization of the human mitochondrial genome. **Nature** 290:457-65
3. Pesole, G., Gissi, C., De Chirico, A., Saccone, C. (1999) Nucleotide substitution rate of mammalian mitochondrial genomes. **J Mol Evolution** 48:427-34
4. Allen, J.F., Raven, J.A. (1996) Free radical – induced mutation vs redox regulation: Costs and benefits of genes in organelles. **J Mol Evol** 42:482-92
5. Holt, I.J., Harding, A.E., Morgan-Hughes, J.A. (1988) Deletions of muscle mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathies. **Nature** 31:717-9
6. Johns, D.R. (1995) Review. Mitochondrial DNA and disease **N Eng J Med** 333:638-44
7. Carelli V., Ross-Cisneros FN., Sadun, A.A. (2004a) Mitochondrial dysfunction as a cause of optic neuropathies. **Prog Retin. Eye Res.** 23:53-89
8. Erickson, R.P. (1972) Leber's optic atrophy, a possible example of mitochondrial inheritance. **Am. J. Hum. Genet.** 24:348-349.
9. Wallace, D.C., Singh, G., Lott, M.T., Hodge, J.A., Schurr, T.G., Lezza, A.M., Elsas, L.J., Nikoskelainen, E.K. (1998) Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy. **Science** 242:1427-1430
10. Huoponen, K., Villki, J., Aula, P., Nikoskelainen, E.K., Savontaus, M.L. (1991) A new mtDNA mutation associated with Leber hereditary opticneuroretinopathy. **Am. J. Hum. Genet.** 48:1147-1153.
11. Howell, N., Bindoff, A., McCullough, D.A., Kubacka, I., Poulton, J., Mackey, D., Taylor, L., Turnbull, D.M. (1991) Leber hereditary opticneuropathy: identification of the same mitochondrial ND1 mutation in six pedigrees. **Am. J. Hum. Genet.** 49:939-950.
12. Johns, D.R., Neufeld, M.J., Park, R.D. (1992) An ND6 mitochondrial DNA mutation associated with Leber hereditary optic neuropathy. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 187:1551-1557.
13. Mackey, D., Howell, N. (1992) A variant of Leber hereditary optic neuropathy characterized by recovery of vision and by an unusual mitochondrial genetic etiology. **Am. J. Hum. Genet.** 51:1218-1228.
14. Mackey, D.A., Oostra, R.J., Rosenberg, T., Nikoskelainen, E., Bronte-Stewart, J., Poulton, J., Harding, A.E., Govan, G., Bolhuis, P.A., Norby, S. (1996) Primary pathologic mtDNA mutations in multigeneration pedigrees with Leber hereditary optic neuropathy. **Am. J. Hum. Genet.** 59:481-485.
15. Mashima, Y., Yamada, K., Wakakura, M., et al. (1998) Spectrum of pathogenic mitochondrial DNA mutations and clinical features in Japanese families with Leber's hereditary optic neuropathy. **Curr. Eye Res.** 17:403-408.



16. Yen, M.Y., Wang, A.G., Chang, W.L., Hsu, W.M., Liu, J.H., Wei, Y.H. (2002a) Leber's hereditary optic neuropathy—the spectrum of mitochondrial DNA mutations in Chinese patients. **Jpn. J. Ophthalmol.** 46:45–51.
17. Carroll, J., Fearnley, I.M., Shannon, R.J., Hirst, J., Walker, J.E. (2003) Analysis of the subunit composition of complex I from bovine heart mitochondria. **Mol. Cell. Proteomics** 2:117–126.
18. Brown, M.D., Trounce, I.A., Jun, A.S., Allen, J.C., Wallace, D.C. (2000) Functional analysis of lymphoblast and cybrid mitochondria containing the 3460, 11778, or 14484 Leber hereditary optic neuropathy mitochondrial DNA mutation. **J. Biol. Chem.** 275:39831–39836.
19. Carelli, V., Ghelli, A., Bucchi, L., Montagna, P., De Negri, A., Leuzzi, V., Carducci, C., Lenaz, G., Lugaresi, E., Degri Esposti, M. (1999) Biochemical features of mtDNA 14484 (ND6/M64 V) point mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy. **Ann. Neurol.** 45:320–328.
20. Carelli, V., Rugolo, M., Sgarbi, G., Ghelli, A., Zanna, C., Baracca, A., Lenaz, G., Napoli, E., Martinuzzi, A., Solaini, G. (2004b) Bioenergetics shapes cellular death pathways in Leber's hereditary optic neuropathy: a model of mitochondrial neurodegeneration. **Biochim. Biophys. Acta** 1628:172–179.
21. Cock, H.R., Cooper, J.M., Schapira, A.H.V. (1999) Functional consequences of the 3460-bp mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy. **J. Neurol. Sci.** 165:10–17.
22. Yen, M.Y., Lee, J.F., Liu, J.H., Wei, Y.H. (1998) Energy charge is not decreased in lymphocytes of patients with Leber's hereditary optic neuropathy with the 11778 mutation. **J. Neuro-Ophthalmol.** 18:84–85.
23. Yen, M.Y., Lee, H.C., Liu, J.H., Wei, Y.H. (1996) Compensatory elevation of complex II activity in Leber's hereditary optic neuropathy. **Br. J. Ophthalmol.** 80:78–81.
24. Yen, M.Y., Chen, C.S., Wang, A.G., Wei, Y.H. (2002b) Increase of mitochondrial DNA in blood cells of patients with Leber's hereditary optic neuropathy with 11778 mutation. **Br. J. Ophthalmol.** 86:1027–1030.
25. Gajewski, C.D., Yang, L., Schon, E.A., Manfredi, G. (2003) New insights into the bioenergetics of mitochondrial disorders using intracellular ATP reporters. **Mol. Biol. Cell** 14:3628–3635.
26. Zanna, C., Ghelli, A., Forcelli, A.M., Carelli, V., Martinuzzi, A., Rugolo, M. (2003) Apoptotic cell death of cybrids bearing LHON mutations is caspase-independent. **Ann. N.Y. Acad. Sci.** 1010:213–217.
27. Raha, S., Robinson, B.H. (2001) Mitochondria, oxygen free radicals, and apoptosis. **Am. J. Med. Genet.** 106:62–70.
28. Kudin, A.P., Bimpong-Buta, N.Y., Vielhaber, S., Elger, C.E., Kunz, W.S. (2004) Characterization of superoxide-producing sites in isolated brain mitochondria. **J. Biol. Chem.** 279:4127–4135.
29. Degli Esposti, M., Carelli, V., Ghelli, A., Ratta, M., Crimi, M., Sangiorgi, S., Montagna, P., Lenaz, G., Lugaresi, E., Cortelli, P. (1994) Functional alterations of the mitochondrially encoded ND4 subunit associated with Leber's hereditary optic neuropathy. **FEBS Lett.** 352:375–379.

30. Pitkanen, S., Robinson, B.H. (1996) Mitochondrial complex I deficiency leads to increased production of superoxide radicals and induction of superoxide dismutase. **J. Clin. Invest.** 98:345–351.
31. Robinson, B.H. (1998) Human complex I deficiency: clinical spectrum and involvement of oxygen free radicals in the pathogenicity of the defect. **Biochim. Biophys. Acta** 1364:271–286.
32. Barrientos, A., Moraes, C.T. (1999) Titrating the effects of mitochondrial complex I impairment in the cell physiology. **J. Biol. Chem.** 274:16188–16197.
33. Carelli, V., Napoli, E., Valentino, L., Martinuzzi, A. (2002a) ROS production in cybrids carrying the three primary mutations associated with Leber's hereditary optic neuropathy. **Neurology** 58 (Suppl. 3), A507.
34. Wong, A., Cavelier, L., Collins-Schramm, H.E., Seldin, M.F., McGrogan, M., Savontaus, M.L., Cortopassi, G.A. (2002) Differentiation-specific effects of LHON mutations introduced into neuronal NT2 cells. **Hum. Mol. Genet.** 11, 431–438.
35. Beretta, S., Mattavelli, L., Sala, G., Tremolizzo, L., Schapira, A.H.V., Martinuzzi, A., Carelli, V., Ferrarese, C. (2004) Leber hereditary optic neuropathy mtDNA mutations disrupt glutamate transport in cybrid cell lines. **Brain** 127:2183–2192.
36. Yen, M.Y., Kao, S.H., Wang, A.G., Wei, Y.H. (2004) Increased 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in leukocyte DNA in Leber's hereditary optic neuropathy. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.** 45 :1688–1691.
37. Panahi, M.S.S., Houshmand ., and Tabassi, A.R. (2006) Mitochondrial D-Loop Variation in Leber Hereditary Neuropathy Patients Harboring Primary G11778A, G3460A, T14484C Mutations: J and W Haplogroups as High-Risk Factors. **Archives of Medical Research** 37:1028-1033
38. Kumleh H, Houshmand M, Shafa Shariat Panahi M, Riazi GH, Sanati MH, Garagozli K, et al. (2006) Mitochondrial D-loop variation in Persian multiple sclerosis Patients: K and A haplogroups as a risk factors!. **Cell Mol Neurobiol**
39. Compston, A. (1999) The genetic epidemiology of multiple sclerosis. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.** 354(1390):1623-34.
40. Pugliatti M, Solinas G, Sotgiu S, Castiglia P, Rosati G. (2002) Multiple sclerosis distribution in northern Sardinia: spatial cluster analysis of prevalence. **Neurology.** Jan 22;58(2):277-82.
41. Sfagos C, Makis AC, Chaidos A, Hatzimichael EC, Dalamaga A, Kosma K, Bourantas KL. (2005) Serum ferritin, transferrin and soluble transferrin receptor levels in multiple sclerosis patients. **Mult Scler.** Jun;11(3):272-5.
42. Yu, Y.L., Woo, E., Hawkins, B.R. et al. (1989) Multiple sclerosis amongst Chinese in Hong Kong. **Brain** 112:1445-1467
43. Cook, S.D., Cromatry, J.I., Tapp, W., et al. (1998) Declining incidence of multiple sclerosis in the Shetland Islands: an update. **Acta Neurol. Scand.** 77:148-151
44. Noseworthy, J.H., Luccinetti, C., Rodrigues, M., Weishenker, B.G. (2000) Multiple Sclerosis. **N. Engl. J. Med.** 343:938-952
45. Adams and Victor's principles of neurology / Victor M, Ropper AH–7th ed. McGraw-Hill 2001: 957-958
46. Dean, G., Kurtzke, J.F. (1971) On the risk of multiple sclerosis according to age at immigration to south Africa. **Br. Med. J.** 3:725

47. Alter, M., Leibowitz, U., Speer, J. (1966) Risk of multiple sclerosis related to age at immigration to Israel. **Arch. Neurol.** 15:234-237
48. Dean, G. (1967) Annual incidence, prevalence and mortality of multiple sclerosis in white South-African-born and in white immigrants to South Africa. **Br. Med. J.** 2:724-730
49. Ebers, G.C., Sadovnick, A.D., Risch, N.J., and the Canadian Collaborative study Group. (1995) A genetic basis for familial aggregation in multiple sclerosis, **Nature** 377:150-151
50. Wucherpfenning, K.W., Strominger, J.L. (1995) Molecular mimicry in T cell-mediated autoimmunity: viral peptides activate human T cell clones specific for myelin basic protein. **Cell** 80:695-705
51. Benoist, C., Mathis, D. (2001) Autoimmunity provoked by infection: how good is the case for T cell epitope mimicry? **Nat. Immunol.** 2:797-801
52. Elian, M., Dean, G. (1987) Multiple sclerosis among the United Kingdom-born children of immigrants from the West Indies. **J Neurol Neurosurg Psychiatry.** Mar 50(3):327-32.
53. Warren, K.G., Catz, I., Steinman, L. 1995 Fine specificity of the antibody response to myelin basic protein in the central nervous system in multiple sclerosis: the minimal B cell epitope and a model of its unique features. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 92:11061-11065
54. Wucherpfenning, K.W., Strominger, J.L. (1995) Molecular mimicry in T cell-mediated autoimmunity: viral peptides activate human T cell clones specific for myelin basic protein **Cell** 80:695-705
55. Ebringer, A., Rashid, T., Wilson C. (2005) Bovine Spongiform Encephalopathy, Multiple Sclerosis, and Creutzfeldt-Jakob Disease Are Probably Autoimmune Diseases Evoked by *Acinetobacter* Bacteria. **Ann. N.Y. Acad. Sci.** 1050: 417-428
56. Sadovnick, A.D., Armstrong, H., Rice, G.P. et al. (1993) A population based study of multiple sclerosis in twins: update **Ann. Neurol** 33:281-285
57. Mumford, C.J., Wood, N.W., Kellar-Wood, H., et al. (1944) The British Isles survey of multiple sclerosis in twins. **Neurology** 44:11-15
58. Compston, A., Coles, A. (2002) Multiple sclerosis. **Lancet.** Apr 6;59(9313):1221-31.
59. Allen, M., Sandberg-Wollheim, M., Sjogren, K., et al (1994) Association of susceptibility to multiple sclerosis in Sweden with HLA class II DRB1 and DQB1 alleles. **Hum. Immunol.** 39:41-48
60. Corradu, F., Reyes-Yanez, M.P., Parra, A., et al. (1998) HLA associations with multiple sclerosis in the Canary Islands **J. Neuroimmunol.** 87:130-135
61. Beck, S., Trowsdale, J. (2000) The human major histocompatibility complex: lessons from the DNA sequence. **Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.** 1:117-137
62. Hensiek, A.E., Sawcer, S.J., Compston, D.A.S. (2003) Searching for needles in haystacks- the genetics of multiple sclerosis and other common neurological diseases. **Brain Res. Bulletin** 61:229-234
63. Masterman, T., Ligers, A., Olsson, T., et al. (2000) HLA-DR15 is associated with lower age at onset in multiple sclerosis. **Ann. Neurol.** 48: 211-219

64. Vanopdenbosch, L., Dubois, B., D'Hooghe, M-B., Meire, F., Carton H. (2000) Mitochondrial mutations of Leber's hereditary optic neuropathy: a risk factor for multiple sclerosis **J Neurol** 247 : 535–543
65. Kellar-Wood, H., Robertson, N., Govan, G.G., Compston, D.A.S., Harding, A.E. (1994) Leber's hereditary optic neuropathy mitochondrial DNA mutations in multiple sclerosis. **Ann Neurol** 36:109–112
66. Carrara, F., Eoli, M., La Mantia, L., Zeviani, M. (1995) The contribution of LHON mitochondrial DNA mutations to multiple sclerosis. **Am J Hum Genet** 57:A336
67. Leuzzi, V., Carducci, C., Lanza, M., Salvetti, M., Ristori, G., Di Giovanni, S., Torroni, A. (1997) LHON mutations in Italian patients affected by multiple sclerosis. **Acta Neurol Scand** 96:145–148
68. Houshmand, M., Sanati, M.-H., Rashedi, I., Sharifpanah, F., Asghari, E., Lotfi, J. (2004) Lack of Association between Leber's Hereditary Optic Neuropathy Primary Point Mutations and Multiple Sclerosis in Iran. **Eur Neurol.** 51:68–71
69. Nishimura, M., Obayashi, H., Ohta, M., Uchiyama, T., Hao, Q., Saida, T. (1995) No association of the 11 778 mitochondrial DNA mutation and multiple sclerosis in Japan. **Neurology** 45:1333–1334
70. Meire, F.M., Van Coster, R., Cochaux, P., Obermaier-Kusser, B., Candaele, C., Martin, J.-J. (1995) Neurological disorders in members of families with Leber's hereditary optic neuropathy (LHON) caused by different mitochondrial mutations. **Ophthalmic Genet** 16:119–126
71. Mayr-Wohlfart, U., Paulus, C., Henneberg, A., Rödel, G. (1996) Mitochondrial DNA mutations in multiple sclerosis patients with severe optic involvement. **Acta Neurol Scand** 94:167–171

