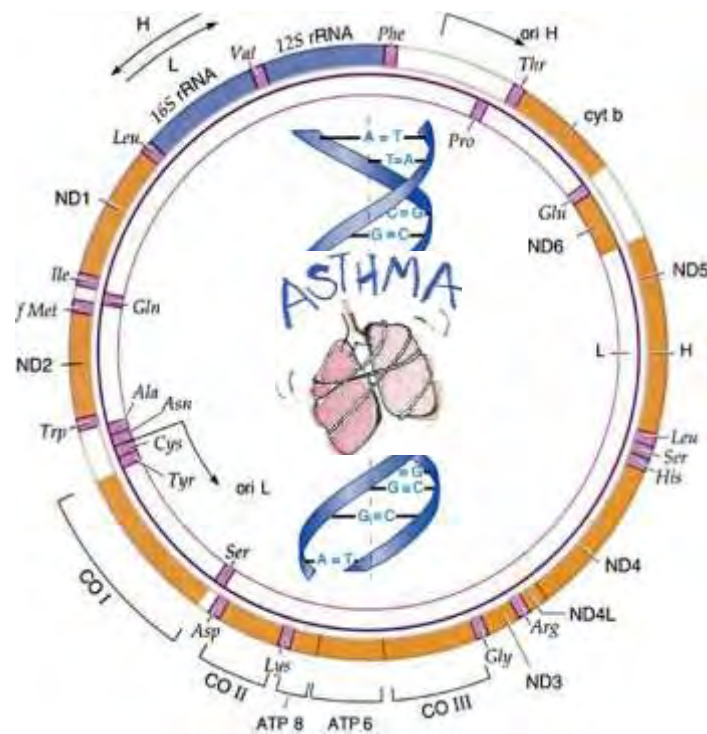


# ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

## Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας



Ελευθερία Σκουμή

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

“ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ ΣΕ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΑ tRNA  
ΓΟΝΙΔΙΑ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΆΣΘΜΑ”

Λάρισα 2009

**Ανίχνευση μεταλλάξεων σε μιτοχονδριακά tRNA γονίδια σε  
ασθενείς με άσθμα**

**Τριμελής Επιτροπή**

**Ζίφα Αιμιλία, Επίκουρη Καθηγήτρια Βιολογίας /  
Νευροβιολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας**

**Μαμούρης Ζήσης, Καθηγητής Γενετικής Ζωικών  
Πληθυσμών Πανεπιστημίου Θεσσαλίας**

**Γουργουλιάνης Κωνσταντίνος, Καθηγητής Πνευμονολογίας  
Πανεπιστημίου Θεσσαλίας**

## Ευχαριστίες...

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Γενετικής του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας στη Λάρισα, στα πλαίσια του μεταπτυχιακού προγράμματος «Βιοτεχνολογία: Ποιότητα Διατροφής και Περιβάλλοντος», υπό την επίβλεψη της Επίκουρης Καθηγήτριας Βιολογίας/Νευροβιολογίας Αιμιλίας Ζίφα, κατά τα έτη 2007 – 2009 και αποτελεί ένα τμήμα της έρευνας που πραγματοποιείται στο χώρο αυτό.

Σε αυτό το σημείο θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες στην επιβλέπουσα καθηγήτριά μου, κ.Αιμιλία Ζίφα, για την υπομονή, την καθοδήγηση και τη στήριξη σε όλες τις προσπάθειές μου. Όλο αυτό το χρονικό διάστημα ήταν πάντα διαθέσιμη, να ακούσει, να λύσει, αλλά κυρίως να συζητήσει όλα τα εμπόδια και τα προβλήματα που συνάντησα, κατά τη διεξαγωγή του πειράματος και την εκπόνηση αυτής της εργασίας.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη ΔΕΠ του εργαστηρίου, τους διδακτορικούς αλλά και μεταπτυχιακούς φοιτητές, γιατί από την πρώτη στιγμή με έκαναν να αισθανθώ καλοδεχούμενη στο χώρο και διευκόλυναν με κάθε τρόπο την ενσωμάτωσή μου στο έμπυχο δυναμικό του εργαστηρίου.

Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ στον σύζυγό μου Γιώργο και στον γιο μου Δημήτρη για την κατανόηση, την αγάπη και την αμέριστη συμπαράστασή τους.

# Περιεχόμενα

|   |     |
|---|-----|
| Περίληψη / Abstract.....  | 6-7 |
| 1. Εισαγωγή.....  | 8   |
| 1.2 Κύρια αιτία του άσθματος η στένωση των αεραγωγών: νευρικός έλεγχος από το ANS ..... | 11  |
| Αντανακλαστικές μεταβολές στην παρασυμπαθητική και συμπαθητική δραστηριότητα.....       | 15  |
| 1.3 Η φλεγμονή είναι από τις κύριες αιτίες της στένωσης των αεραγωγών.....              | 16  |
| Σχέση φλεγμονής και νευρικής ρύθμισης των αεραγωγών στο άσθμα.....                      | 19  |
| 1.4 Παράγοντες πρόκλησης άσθματος .....   | 20  |
| Περιβαλλοντικοί Παράγοντες .....  | 20  |
| Παράγοντες Προδιάθεσης.....   | 21  |
| Εξωγενείς παράγοντες προδιάθεσης.....   | 21  |
| Γενετική βάση άσθματος και Ενδογενείς παράγοντες προδιάθεσης .....                      | 22  |
| 1.5 Ο Ρόλος των Μιτοχονδρίων στο Άσθμα.....   | 25  |
| Μιτοχόνδρια – Δομή και Λειτουργία .....   | 25  |
| Μιτοχονδριακό Γενετικό Υλικό .....  | 29  |
| Μεταλλάξεις mtDNA και μιτοχονδριακές ασθένειες.....                                     | 32  |
| Συσχέτιση μεταξύ γονότυπου και κλινικού φαινοτύπου .....                                | 36  |
| Κλινικοί φαινότυποι των μιτοχονδριακών tRNA μεταλλάξεων .....                           | 39  |
| Μιτοχονδριακές αλλαγές και Άσθμα.....   | 39  |
| Αλλαγές στο μιτοχονδριακό γενετικό υλικό σε περιπτώσεις άσθματος.....                   | 43  |
| 1.6 Σκοπός του πειράματος.....  | 47  |
| 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....   | 48  |
| 2.1 Απομόνωση DNA.....  | 49  |
| 2.2 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης.....  | 51  |
| 2.3 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης.....  | 53  |
| 2.4 Μέθοδος Ανάλυσης Πολυμορφισμού μονοκλωνικής διαμόρφωσης .....                       | 58  |
| 2.5 Καθαρισμός PCR προϊόντων .....  | 65  |
| 2.6 Προσδιορισμός της Νουκλεοτιδικής Αλληλουχίας Μορίων DNA / Sequencing                | 68  |
| 3. Αποτελέσματα.....  | 71  |
| 3.1 Μεταλλάξεις σε γονίδια tRNAs.....   | 72  |
| 3.2 Μεταλλάξεις που ανιχνεύθηκαν σε περιοχές παρακείμενες των tRNA γονιδίων .....       | 80  |
| 3.3 Συνδυασμοί μεταλλάξεων που ανιχνεύθηκαν σε ασθενείς με άσθμα.....                   | 87  |
| 5. Συζήτηση.....  | 89  |

## Περίληψη

Η γενετική βάση του άσθματος είναι ιδιαίτερα περίπλοκη και πολλές διαφορετικές χρωμοσωμικές περιοχές και γονίδια έχουν σχετισθεί με την ασθένεια. Η πιθανή ανάμειξη του μιτοχονδριακού γονιδιώματος στη γενετική του άσθματος παρουσιάζει ενδιαφέρον γιατί θα μπορούσε να αποτελεί μια εξήγηση του μητρικού τρόπου κληρονομιάς της ασθένειας. Στην παρούσα εργασία μελετήσαμε 22 tRNA γονίδια του μιτοχονδριακού γενετικού υλικού και τις παρακείμενες περιοχές των γονιδίων αυτών, σε 26 ασθενείς με άσθμα και 60 φυσιολογικούς, για την ανίχνευση μεταλλάξεων που πιθανώς σχετίζονται με την ασθένεια. Με τη χρησιμοποίηση των μεθόδων PCR και SSCP ανιχνεύτηκαν στους ασθενείς με άσθμα 5 διαφορετικές μεταλλάξεις σε 5 tRNA γονίδια : A12308G στο γονίδιο tRNA<sup>Leu(CUN)</sup>, A8343G στο γονίδιο tRNA<sup>Lys</sup>, G15928A στο γονίδιο tRNA<sup>Thr</sup>, T10448C στο γονίδιο tRNA<sup>Arg</sup> και 596insC στο γονίδιο tRNA<sup>Phe</sup>. Επίσης, ανιχνεύτηκαν 5 διαφορετικές μεταλλάξεις σε περιοχές παρακείμενες των γονιδίων αυτών: G709A στο γονίδιο 12S rRNA, A750G στο γονίδιο 12S rRNA, T3197C στο γονίδιο 16S rRNA, A10398G στο γονίδιο ND3 και A15954C στη μη-κωδική νουκλεοτιδική περιοχή μεταξύ των γονιδίων tRNA<sup>Pto</sup> και tRNA<sup>Thr</sup>. Η ταυτοποίηση των μεταλλάξεων πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της αλληλούχησης. Οι μεταλλάξεις που ανιχνεύτηκαν στα tRNA γονίδια βρέθηκαν σε πολύ μεγαλύτερο ποσοστό στους ασθματικούς ασθενείς σε σχέση με τον φυσιολογικό πληθυσμό που μελετήθηκε, παρά τον διπλάσιο αριθμό των δειγμάτων των φυσιολογικών. Η ίδια αναλογία παρατηρήθηκε και στις μεταλλάξεις των παρακείμενων περιοχών των tRNA γονιδίων, εκτός από τη μετάλλαξη A10398G του γονιδίου ND3. Παράλληλα, παρατηρήθηκαν συνδυασμοί δύο ή τριών διαφορετικών μεταλλάξεων στους ασθενείς με άσθμα, οι οποίοι δεν εντοπίστηκαν στους φυσιολογικούς. Επιπλέον, η μετάλλαξη A12308G ανήκει στη μιτοχονδριακή απλοομάδα U. Επίσης, οι μεταλλάξεις G709A και T3197C ανήκουν σε υποκλάδους της απλοομάδας U. Τα άτομα που ανήκουν σε αυτή την απλοομάδα εμφανίζουν προδιάθεση στην ανάπτυξη των ατοπικών χαρακτηριστικών του άσθματος. Οι μεταλλάξεις A12308G, A8343G, G15928A, A10398G και T3197C έχουν χαρακτηριστεί ως παθογόνες και έχουν σχετισθεί με ασθένειες. Με βάση αυτά τα δεδομένα οι μεταλλάξεις A12308G, G709A, A750G και T3197C πιθανότατα σχετίζονται με το άσθμα, καθώς και οι συνδυασμοί A12308G+T3197C+A750G και A12308G+G709A+A750G. Το επόμενο βήμα της έρευνας είναι η περαιτέρω μελέτη της μιτοχονδριακής λειτουργίας με παράλληλο προσδιορισμό της απλοομάδας των ασθενών για την εξαγωγή πιο συγκεκριμένων συμπερασμάτων.

## Abstract

The genetic basis of asthma is highly complex, and many different chromosomal regions and candidate genes have been described to be linkage or association with asthma. The potential involvement of the mitochondrial genome in the genetics of bronchial asthma would be interesting, because it could be one explanation of the predominantly maternal transmission of asthma. The aim of this study is to detect and identify mutations in 22 tRNA genes of the mitochondrial genome in 26 patients with asthma and 60 normal people, and to find out if these mutations are related to the disease. By using PCR and SSCP method, five different mutations were detected in 5 tRNA genes of the patients: A12308G mutation in tRNA<sup>Leu(CUN)</sup> gene, A8343G in tRNA<sup>Lys</sup> gene, G15928A in tRNA<sup>Thr</sup> gene, T10448C in tRNA<sup>Arg</sup> gene and 596insC in tRNA<sup>Phe</sup> gene. There were, also, detected five different mutations in the nucleotide sequences near tRNA genes: G709A mutation in 12S rRNA gene, A750G in 12S rRNA gene, T3197C in 16S rRNA gene, A10398G in ND3 gene, and A15954C in non-coding nucleotides between tRNA<sup>Pro</sup> gene and tRNA<sup>Thr</sup> gene. All the mutations were identified by sequencing. tRNA genes mutations were more frequent in asthmatic patients than normal people, although, greater number of the normal specimens. The same analogue was, also, found in the mutations of the nucleotide sequences near tRNA genes, except from the A10398G of the ND3 gene. At the same time, there were noticed combinations of the two or three different mutations in the asthmatic patients, which were not detected in the normal people. Furthermore, the A12308G mutation belongs to the mitochondrial haplogroup U. Besides, the G709A and T3197C mutations belong to subclades of the haplogroup U. People who belong to this particular haplogroup show predisposition in developing of the atopic characteristics of asthma. The A12308G, A8343G, G15928A, A10398G and T3197C mutations have been characterized as pathogenic and are related to diseases. It's possible that, according to these facts, the A12308G, G709A, A750G and T3197C mutations are related to asthma, as well as the A12308G+T3197C+A750G and A12308G+G709A+A750G combinations. The next step of this research is the farther study of the mitochondrial function and the definition of the patient's haplogroup, in order to extract more specific conclusions.

# 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ



## 1.1 ΑΣΘΜΑ – Η ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΟΥ ΣΤΗ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ

Υπάρχουν δύο βασικές φυσιολογικές λειτουργίες αναγκαίες για τη ζωή: η αναπνοή και η κυκλοφορία του αίματος. Μπορεί κανείς να ζήσει αρκετές ημέρες χωρίς ηπατική, νεφρική ή εγκεφαλική λειτουργία, αλλά πέντε λεπτά είναι συνήθως μοιραία χωρίς αναπνοή ή κυκλοφορία για τη διανομή του οξυγονωμένου αίματος σε όλα τα κύτταρα του σώματος. Γι' αυτό και οι παθήσεις του αναπνευστικού κατατάσσονται στις κύριες αιτίες θανάτου παγκοσμίως. Επιπλέον, προκαλούν σημαντική οικονομική επιβάρυνση στην παγκόσμια κοινότητα, αλλά και ουσιαστικούς περιορισμούς στην ευημερία και την ποιότητα ζωής των ασθενών.

Οι βασικές παθήσεις των πνευμόνων είναι η χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια (ΧΑΠ), το άσθμα, η πνευμονία, ο καρκίνος του πνεύμονα και η φυματίωση. Η λέξη «άσθμα» και το ρήμα «ασθμαίνω» αναφέρονται για πρώτη φορά τον 8<sup>ο</sup> αιώνα π.Χ. στην Ιλιάδα του Ομήρου. Αργότερα, ο Ιπποκράτης αναφέρεται στο άσθμα με την έννοια της δυσκολίας στην αναπνοή. Η πρώτη, όμως, κλινική περιγραφή του άσθματος δόθηκε από τον Έλληνα ιατρό Αρεταίο τον 2<sup>ο</sup> αιώνα μ.Χ. και μέχρι σήμερα ελάχιστα έχει αλλάξει. Ο ορισμός του άσθματος που αντιστοιχεί στα τελευταία δεδομένα και αναφέρεται στις τελευταίες Διεθνείς Οδηγίες για την Αντιμετώπιση του Άσθματος είναι ο ακόλουθος: *«Το άσθμα είναι **μία χρόνια φλεγμονώδης νόσος των αεραγωγών**, στην οποία συμμετέχουν διάφορα είδη κυττάρων και κυτταρικών στοιχείων. Η χρόνια φλεγμονή προκαλεί αυξημένη βρογχική υπεραντιδραστικότητα, η οποία οδηγεί σε επανειλημμένα επεισόδια συρίττους αναπνοής, δύσπνοιας, συσφιγκτικού αισθήματος στο στήθος και βήχα ιδιαίτερα τις νυκτερινές και τις πρώτες πρωινές ώρες. Τα συμπτώματα αυτά συνδυάζονται με μεταβαλλόμενο περιορισμό της ροής του αέρα που είναι συχνά αναστρέψιμος είτε αυτόματα είτε με την κατάλληλη αγωγή»* (National Heart, Lung and Blood Institute, 2003).

Το άσθμα αφορά εκατομμύρια ανθρώπους σε ολόκληρο τον κόσμο επηρεάζοντας την ποιότητα της καθημερινότητάς τους και θέτοντας σε κίνδυνο ακόμα και τη ζωή τους. Σύμφωνα με τα τελευταία δεδομένα, περίπου 300.000.000 άνθρωποι του γενικού πληθυσμού της Γης πάσχουν από άσθμα (C. Fanta, 2009) και η ανακοίνωση του Διεθνούς Οργανισμού Υγείας (WHO) τονίζει ότι «το άσθμα είναι μια χρόνια πάθηση που εμφανίζεται ιδιαίτερα στα παιδιά και στους νέους, και παρά το γεγονός ότι είναι μια καλοήθης πάθηση προκαλεί σημαντική νοσηρότητα και η

θνησιμότητά του δεν παρουσιάζει μείωση παρά την ύπαρξη πολύ αποτελεσματικών φαρμάκων».

Μεγάλες κλινικές έρευνες έδειξαν ότι το άσθμα είναι η 1<sup>η</sup> αιτία απουσίας από το σχολείο και η 4<sup>η</sup> αιτία απουσίας από την εργασία (Rabe et al., 2000; ERS 2004). Επιπλέον, το 23% των ασθενών, εκ των οποίων η πλειονότητα είναι παιδιά, αναφέρουν ότι εισάγονται στο νοσοκομείο τουλάχιστον μια φορά το χρόνο λόγω ασθματικού παροξυσμού. Οι χαμένες ημέρες εργασίας καθώς και η ενδονοσοκομειακή περίθαλψη, η οποία οφείλεται κυρίως στους σοβαρούς παροξυσμούς λόγω κακής θεραπείας, αποτελούν τις πιο δαπανηρές συνιστώσες της ασθένειας. Το κόστος της θεραπείας του στις περισσότερες χώρες αντιστοιχεί στο 1% του γενικού προϋπολογισμού για την υγεία, ανεξάρτητα από το είδος της οικονομίας κάθε χώρας (Weiss et al., 1993; Weiss et al., 2001). Αλλά και η οικογένεια των ασθενών επιβαρύνεται με περίπου 5,5-15% του συνολικού ετήσιου εισοδήματός της (Vance et al., 1971; Marion et al., 1985; Matsaganis et al., 1997).

Όσον αφορά την αύξηση των περιστατικών της ασθένειας αλλά και τις διακυμάνσεις που παρατηρούνται μεταξύ γεωγραφικών περιοχών και εθνικών ομάδων η μελέτη των παραγόντων κινδύνου εμφάνισης του άσθματος μπορεί να δώσει κάποιες εξηγήσεις. Σύμφωνα με δύο μεγάλες διεθνείς επιδημιολογικές μελέτες, της ISAAC (International Study for Asthma and Atopy in Children) και της ECRHS (European Community Respiratory Health Survey) που πραγματοποιήθηκαν σε ενήλικες, οι χώρες με το υψηλότερο ποσοστό συμπτωμάτων άσθματος ήταν οι Αγγλόφωνες καθώς και οι αγγλικές αποικίες, ενώ άλλες περιοχές, όπως οι μεσογειακές, μεταξύ των οποίων και η Ελλάδα, έδειξαν χαμηλό ποσοστό εξάπλωσης του άσθματος (Burney et al., 1994; ECRHS, 1996; Papageorgiou et al., 1997; ISAAC, 1998).

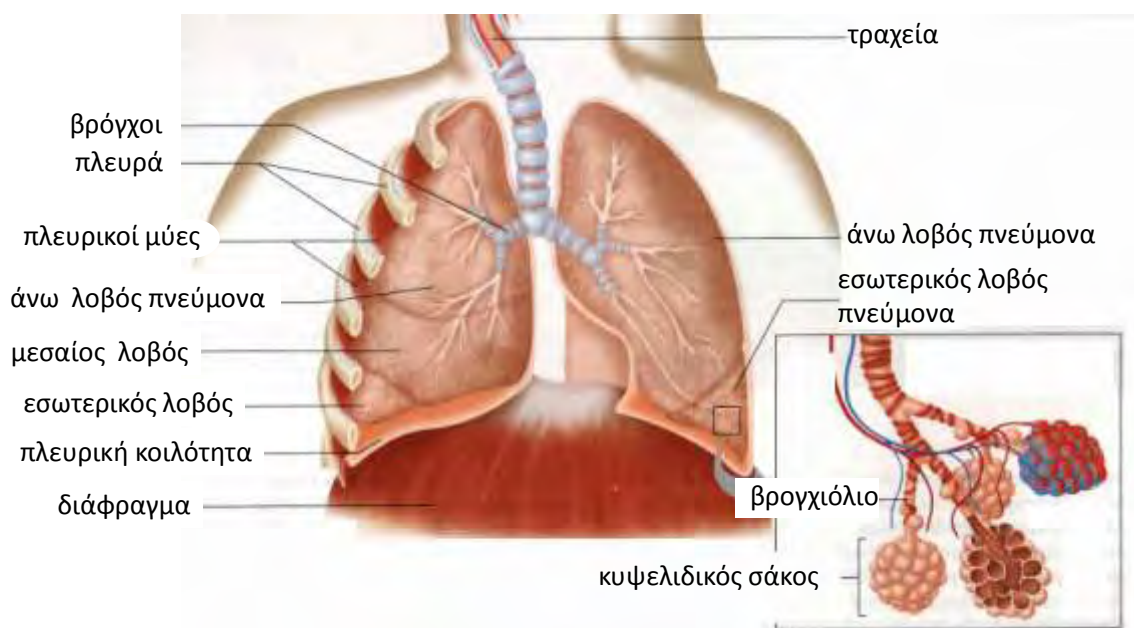
Τα αποτελέσματα αυτών των ερευνών δείχνουν την ανάγκη διερεύνησης περιβαλλοντικών παραγόντων αλλά και παραγόντων προδιάθεσης, ως πιθανά αίτια εμφάνισης και ανάπτυξης άσθματος. Επιτακτική, όμως, είναι και η ανάγκη εύρεσης της μοριακής βάσης της ασθένειας η οποία θα οδηγήσει σε νέες, πιο αποτελεσματικές θεραπείες.

## 1.2 ΚΥΡΙΑ ΑΙΤΙΑ ΤΟΥ ΑΣΘΜΑΤΟΣ Η ΣΤΕΝΩΣΗ ΤΩΝ ΑΕΡΑΓΩΓΩΝ: ΝΕΥΡΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΠΟ ΤΟ ΑΝΣ

Η κυριότερη λειτουργία των πνευμόνων είναι η κατανομή του εισπνεόμενου αέρα μέσω των αεραγωγών. Οι αεραγωγοί των πνευμόνων είναι δύο τύπων, οι χόνδρινοι βρόγχοι και τα μεμβρανώδη βρογχιόλια.

Οι χόνδρινοι **βρόγχοι** έχουν διάμετρο μεγαλύτερη από 1mm, περιβάλλονται από μια στιβάδα λείων μυϊκών κυττάρων και καλύπτονται από επιθηλιακά κύτταρα, μεταξύ των οποίων ένας μεγάλος αριθμός κροσσωτών κυττάρων, η ρυθμική κίνηση των οποίων απομακρύνει αποτελεσματικά την εκκρινόμενη βλέννα και τα εισπνεόμενα σωματίδια από τους πνεύμονες.

Τα μεμβρανώδη **βρογχιόλια** αποτελούν συνέχεια των βρόγχων. Έχουν διάμετρο μικρότερη από 1mm περιβάλλονται και αυτά από μια στιβάδα λείων μυϊκών κυττάρων ενώ καλύπτονται από ένα απλό κυβοειδές επιθήλιο.



**Εικόνα 1.** Αριστερά διακρίνονται οι χόνδρινοι βρόγχοι που καταλήγουν στα μικρότερα βρογχιόλια. Δεξιά απεικονίζονται τα βρογχιόλια που καταλήγουν στις κυψελίδες, οι οποίες συναθροίζονται δημιουργώντας τους κυψελιδικούς σάκους. (LIFE, Lewis, Hoefnagels, Gaffin, Parker, 7<sup>th</sup> edition, Sinauer, 2004).

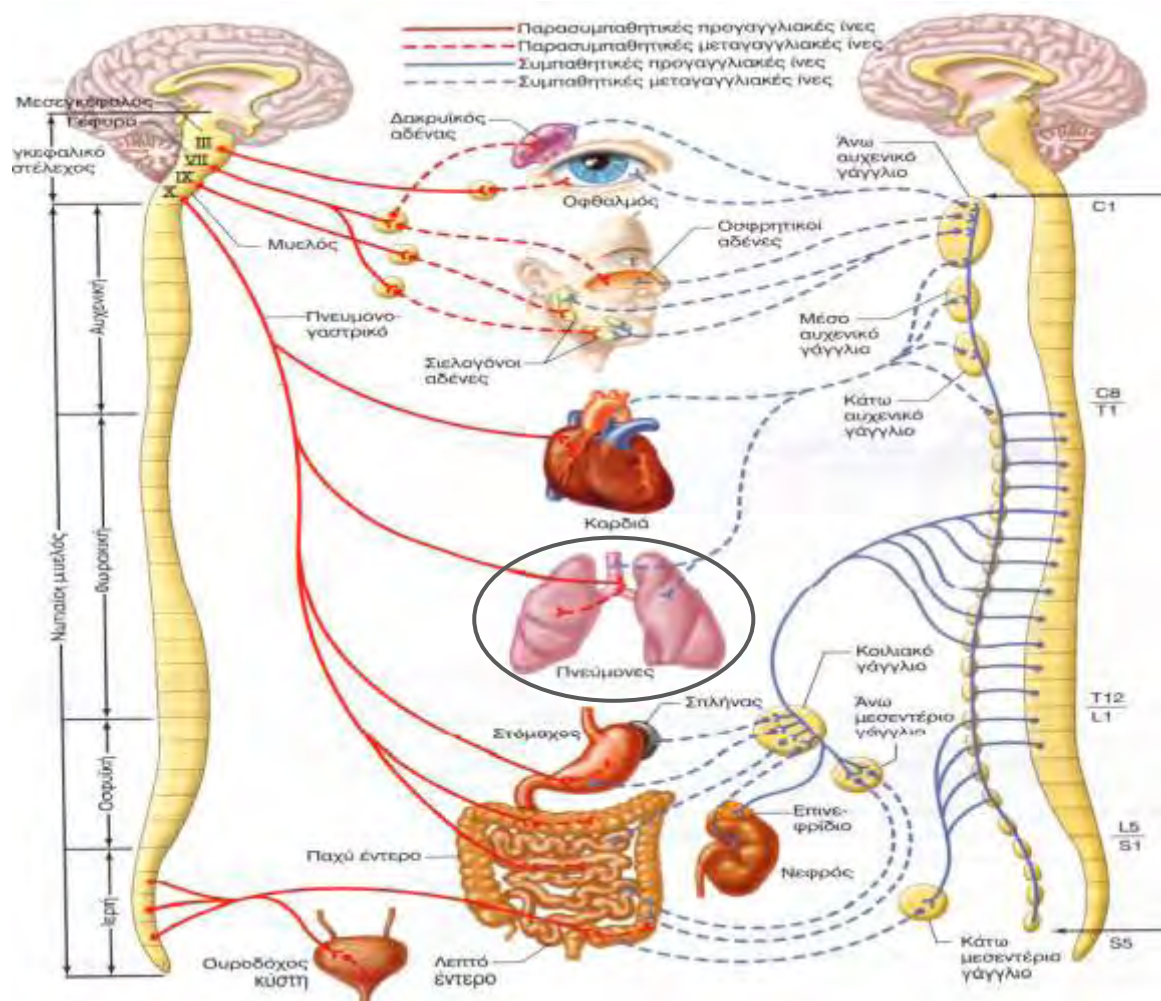
Στις απολήξεις τους, τα βρογχιόλια αναπτύσσουν προβολές – τις **κυψελίδες**, οι οποίες συμμετέχουν στην ανταλλαγή αερίων. Με περαιτέρω διακλαδώσεις ο αριθμός και το μέγεθος των κυψελίδων αυξάνεται σχηματίζοντας τους κυψελιδικούς σάκους. Οι αεραγωγοί αιματώνονται μέσω των βρογχικών αρτηριών, οι οποίες είναι μικροί κλάδοι της αορτής. Ομάδες κυψελιδικών σάκων και οι κυψελίδες τους, μαζί με τις αρτηρίες τους, συγκροτούν μικρές λειτουργικές πνευμονικές μονάδες (Εικ.1).

Οι αεραγωγοί δρουν σαν διάυλοι που συνδέουν την ατμόσφαιρα με τις κυψελίδες. Η ροή των αερίων εξαρτάται από τη διαφορά πίεσης ανάμεσα στις κυψελίδες και στην ατμόσφαιρα καθώς και από την αντίσταση των αεραγωγών. Φυσιολογικά η αντίσταση στη ροή είναι ελάχιστη καθώς μικρή μόνο διαφορά πίεσης είναι αναγκαία για να μετακινηθεί ο αέρας μέσα και έξω από τους πνεύμονες κατά τη διάρκεια της εισπνοής. Η χάλαση και η σύσπαση των λείων μυών των αεραγωγών οδηγούν σε βρογχοδιαστολή ή βρογχοσύσπαση, ελαττώνοντας ή αυξάνοντας αντίστοιχα, την αντίσταση. Βρογχοσύσπαση (βρογχόσπασμος) και αυξημένη αντίσταση των αεραγωγών είναι το κύριο χαρακτηριστικό του άσθματος.



**Εικόνα 2.** Στένωση των αεραγωγών εξαιτίας της σύσπασης των λείων μυών (βρογχόσπασμος).

Η βρογχοσύσπαση και η βρογχοσυστολή ρυθμίζεται συνεχώς, αυτόματα και αντανεκλαστικά από το αυτόνομο νευρικό σύστημα (ΑΝΣ), το οποίο αποτελείται από το συμπαθητικό (αδρενεργικό), το παρασυμπαθητικό (χολινεργικό) και το μη-αδρενεργικό μη-χολινεργικό (NANC: non-adrenergic non-cholinergic) νευρικό σύστημα (Εικ. 3).



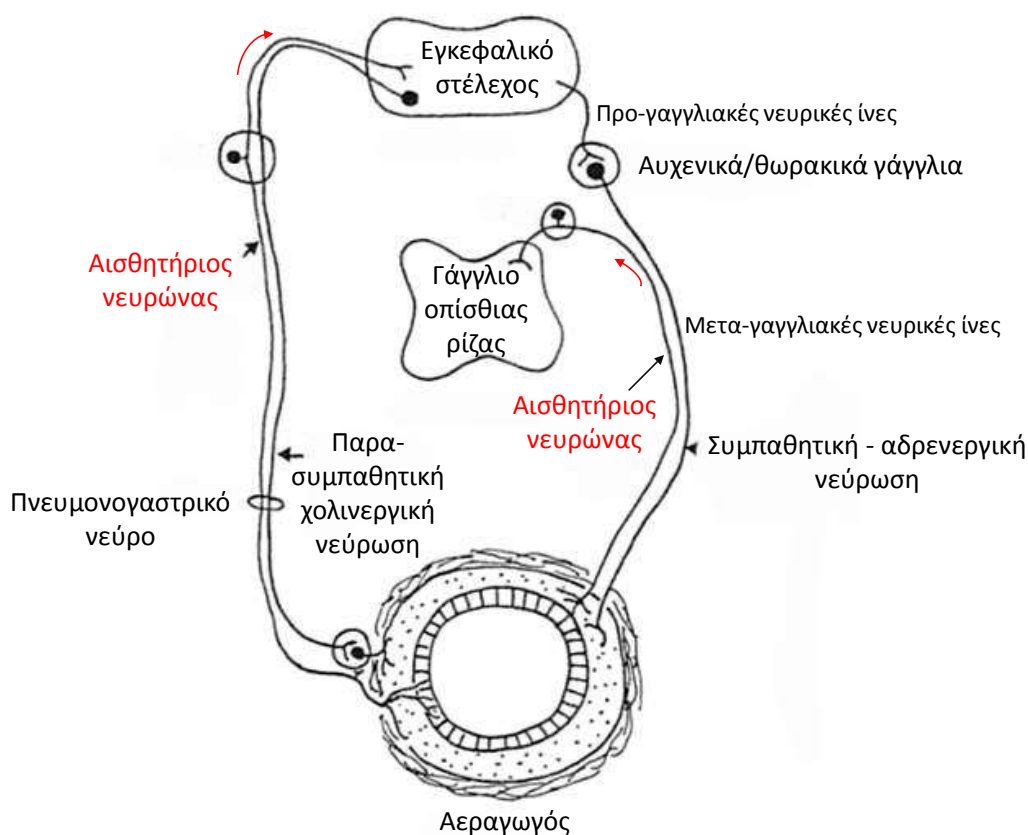
**Εικόνα 3.** Τα συμπαθητικά και παρασυμπαθητικά νεύρα του Αυτόνομου Νευρικού Συστήματος, το οποίο είναι υπεύθυνο για όλες εκείνες τις λειτουργίες του οργανισμού που δεν υπόκεινται στον έλεγχο της βούλησής μας (λείοι μύες, καρδιά, ενδοκρινικό σύστημα κ.τ.λ). Οι παρασυμπαθητικές νευρικές ίνες, ξεκινούν από το εγκεφαλικό στέλεχος και μέσω του πνευμονογαστρικού νεύρου καταλήγουν στους λείους μύες των αεραγωγών. Οι συμπαθητικές νευρικές ίνες που καταλήγουν στους αεραγωγούς είναι μεταγαγγλιακές και ξεκινούν από τα αυχενικά και θωρακικά γάγγλια. Το συμπαθητικό και παρασυμπαθητικό σύστημα έχουν ανταγωνιστική και αλληλοαναιρούμενη δράση.

Οι νευρώνες του ANΣ ελέγχουν τη σύσπαση/χάλαση των λείων μυϊκών κυττάρων των αεραγωγών μέσω των νευροδιαβιβαστών που απελευθερώνουν στη νευρομυϊκή σύναψη.

Η διέγερση των αδρενεργικών συμπαθητικών νευρικών ινών, οι οποίες ξεκινούν από τα θωρακικά/αυχενικά γάγγλια, απελευθερώνει αδρεναλίνη, η οποία συνδέεται στους β-αδρενεργικούς υποδοχείς των λείων μυϊκών κυττάρων των αεραγωγών προκαλώντας βρογχοδιαστολή. Ωστόσο, υπάρχει και μια μικρή ποσότητα α-αδρενεργικών υποδοχέων, οι οποίοι όταν ενεργοποιηθούν οδηγούν σε αντίθετο αποτέλεσμα (βρογχόσπασμο). Η επίδρασή τους όμως είναι ελάχιστη και δρουν μόνο

όταν οι β-αδρενεργικοί υποδοχείς είναι μπλοκαρισμένοι. Επιπλέον, οι αδρενεργικές συμπαθητικές νευρικές ίνες απελευθερώνουν και νευροπεπτίδιο Υ (NPY), το οποίο δεν έχει άμεση δράση στους λείους μύες των αεραγωγών, αλλά έμμεσα μπορεί να αναστείλει την απελευθέρωση της αδρεναλίνης.

Αντίθετα η διέγερση των χολινεργικών παρασυμπαθητικών νευρικών ινών, μέσω του πνευμονογαστρικού νεύρου, απελευθερώνει ακετυλοχολίνη, η οποία ενεργοποιεί τους μουσκαρινικούς χολινεργικούς υποδοχείς των λείων μυϊκών κυττάρων προκαλώντας βρογχοσπασμό.



**Εικόνα 4.** Οι παρασυμπαθητικές χολινεργικές νευρικές ίνες, ξεκινούν από το εγκεφαλικό στέλεχος, όπου βρίσκεται το κέντρο αναπνοής, και μέσω του πνευμονογαστρικού νεύρου καταλήγουν στους λείους μύες των αεραγωγών. Οι συμπαθητικές-αδρενεργικές νευρικές ίνες που καταλήγουν στους αεραγωγούς είναι μεταγαγγλιακές και ξεκινούν από τα αυχενικά και θωρακικά γάγγλια. Παράλληλα υπάρχουν και αισθητήριοι νευρικοί οδοί που ξεκινούν από τη στιβάδα των λείων μυϊκών ινών των αεραγωγών και καταλήγουν στο εγκεφαλικό στέλεχος ή στο νοτιαίο μυελό (στο γάγγλιο της οπίσθιας ρίζας) (Asthma, Barnes, Rodger, Thomson, Third Edition, Academic Press, 1998).

Το άσθμα θα μπορούσε συνεπώς να θεωρηθεί ότι οφείλεται σε έλλειψη ισορροπίας της συμπαθητικής και παρασυμπαθητικής ρύθμισης των αεραγωγών, η οποία οδηγεί σε βρογχόσπασμο και υπεραντιδραστικότητα των αεραγωγών. Ωστόσο, η άποψη αυτή

επανεξετάζεται μετά την ανακάλυψη του μη-αδρενεργικού μη-χολινεργικού (NANC) αυτόνομου νευρικού συστήματος, το οποίο ανάλογα με το νευροδιαβιβαστή που απελευθερώνεται προκαλεί βρογχοδιαστολή ή βρογχοσυστολή. Για παράδειγμα, η ανασταλτική μοίρα του NANC, iNANC απελευθερώνει VIP και NO, τα οποία προκαλούν βρογχοδιαστολή, ενώ η διεγερτική μοίρα eNANC απελευθερώνει SP και νευροκινίνη που προκαλούν βρογχοσυσπασση.

## **Αντανακλαστικές μεταβολές στην παρασυμπαθητική και συμπαθητική δραστηριότητα**

Η αυτόνομη νεύρωση που δέχονται οι αεραγωγοί από το εγκεφαλικό στέλεχος είναι τονικά ενεργή, παράγοντας ένα σταθερό ρυθμό αναπνοής. Ωστόσο η λειτουργία των νευρών αυτών ελέγχεται/ρυθμίζεται από **αισθητήριους νευρώνες**, οι οποίοι ξεκινούν από τους αεραγωγούς ή από άλλα σημεία περιφερειακά (καρδιά, καρωτίδα, αορτή κτλ) ή κεντρικά (κινητικός φλοιός, μεταχιακό σύστημα, κτλ) και καταλήγουν στο στέλεχος, όπου αναστέλλουν ή διεγείρουν το κέντρο αναπνοής. Οι αισθητήριοι νευρώνες είναι διαφόρων ειδών:

**Μηχανοϋποδοχείς ή τασεϋποδοχείς** (stretch receptors) που απαντούν σε **μηχανικές δυνάμεις** που ενεργοποιούνται από μεγάλη διάταση των αεραγωγών (υπεραερισμός των πνευμόνων) ή των αγγείων (αύξηση στην πίεση του αίματος). Ανήκουν σε «**A ίνες**» καθώς τα δυναμικά δράσης μεταφέρονται προς το εγκεφαλικό στέλεχος με γρήγορο ρυθμό κατά μήκος του άξονα (10-50m/sec). Οι μηχανοϋποδοχείς διαίρουνται με βάση την ικανότητα προσαρμογής στην παρατεταμένη διάταση: όταν απαντούν με δδ (δυναμικό δράσης) στη διάταση αεραγωγών ή αγγείων και στη συνέχεια προσαρμόζονται γρήγορα **RARs** (rapidly adapting receptors) ή αργά - **SARs** (slowly adapting receptors). Η δράση τους είναι αντικρουόμενη: οι RARs ενεργοποιούν επιπλέον τους παρασυμπαθητικούς νευρώνες προκαλώντας αντανακλαστικό βρογχόσπασμο, ενώ οι SARs αναστέλλουν τους παρασυμπαθητικούς νευρώνες ελαττώνοντας μακροπρόθεσμα το βρογχόσπασμο (Canning and Fischer, 2001).

**Αλγο-υποδοχείς που απαντούν στην καταστροφή του ιστού** (nociceptors). Διεγείρονται από την παραμόρφωση της δομής του συνδετικού ιστού των πνευμόνων, όπως και από τη συσσώρευση υγρού (οίδημα) ή από διάφορες χημικές ενώσεις, όπως είναι η βραδυκινίνη, το όζον, το διοξείδιο του θείου, η αμμωνία ο καπνός του τσιγάρου,

η ισταμίνη και η καψαϊσίνη (ενεργός ερεθιστική ουσία στο πιπέρι). Ανήκουν σε «C ίνες» καθώς η μετάδοση των δδ κατά μήκος του άξονα είναι αργή (0,3-2m/sec). Η διέγερση των βρογχικών αμύελων ιών C αυξάνει την παρασυμπαθητική δραστηριότητα οδηγώντας σε βρογχόσπασμο.

Η συνεχής έκθεση ενός οργανισμού σε «βλαπτικές ουσίες», μπορεί να υπερευαισθητοποιήσει τους υποδοχείς ερεθιστικών ουσιών ώστε να αντιδρούν πολύ πιο εύκολα και γρήγορα και να οδηγούν σε βρογχόσπασμο. Στο άσθμα, για παράδειγμα, οι υποδοχείς αυτοί διεγείρονται από την εισπνοή καπνού, σκόνης, ψυχρού αέρα και άλλων ουσιών, στις οποίες έχουν αποκτήσει υπερευαισθησία και οδηγούν σε αυτή την ανώμαλη απάντηση του αναπνευστικού.

Με λίγα λόγια οι λείοι μύες των αεραγωγών νευρώνονται από συμπαθητικά και παρασυμπαθητικά νεύρα. Όταν ενεργοποιούνται, τα νεύρα των αεραγωγών μπορούν να προκαλέσουν σύσπαση των βρόγχων (βρογχόσπασμο). Συνεπώς, το νευρικό σύστημα παίζει πρωταρχικό ρόλο στη ρύθμιση της διαμέτρου των αεραγωγών και κατ' επέκταση στη δυσλειτουργία τους και για τον λόγο αυτό συμβάλλει στην παθογένεση ασθενειών του πνεύμονα, όπως το άσθμα. Η κύρια συσταλτική νεύρωση των λείων μυών των αεραγωγών είναι παρασυμπαθητική (χολινεργική), ενώ η νεύρωση χάλασης αποτελείται από συμπαθητικά (αδρενεργικά) νεύρα. Τα συμπαθητικά-αδρενεργικά νεύρα παίζουν λίγο ή και καθόλου ρόλο στην απευθείας ρύθμιση του τόνου των λείων μυών των αεραγωγών. Η ενεργοποίηση των αισθητήριων νευρών διεγείρει τα παρασυμπαθητικά νεύρα προκαλώντας την υπερδιέγερσή τους που οδηγεί σε βρογχόσπασμο ή ελαττώνοντας τη δράση τους οδηγώντας σε αναστολή του βρογχόσπασμου (Canning B et al., 2001).

### **1.3 Η ΦΛΕΓΜΟΝΗ ΕΙΝΑΙ ΑΠΟ ΤΙΣ ΚΥΡΙΕΣ ΑΙΤΙΕΣ ΤΗΣ ΣΤΕΝΩΣΗΣ ΤΩΝ ΑΕΡΑΓΩΓΩΝ**

Η φλεγμονή αποτελεί ένα βασικό αμυντικό μηχανισμό που προστατεύει το σώμα από την είσοδο παθογόνων μικροοργανισμών, τις δράσεις διαφόρων τοξινών, συμμετέχει στις διαδικασίες επούλωσης και επαναφέρει τελικά τη φυσιολογική λειτουργία του ιστού. Το ανοσολογικό σύστημα του ασθενή με άσθμα αντιλαμβάνεται



ως βλαπτικούς διάφορους παράγοντες, που δεν είναι απαραίτητα παθογόνοι και έτσι αντιδρά με μια αλλεργικού τύπου ηωσινοφιλική φλεγμονώδη απάντηση.

Στην ηωσινοφιλική φλεγμονώδη απάντηση συμμετέχουν όλα τα είδη των κυττάρων που υπάρχουν στους αεραγωγούς. (T-λεμφοκύτταρα, ηωσινόφιλα, σιτευτικά, μακροφάγα, επιθηλιακά κύτταρα, δενδριτικά κύτταρα, ινοβλάστες και λεία μυϊκά κύτταρα). Παρόλα αυτά τα ηωσινόφιλα φαίνεται να είναι τα κυρίαρχα κύτταρα σε αυτή τη διαδικασία καθώς απελευθερώνουν **μεσολαβητές φλεγμονής** (Schwartz LB, 1992; Barnes PJ, 1996), **κυτταροτοξικές ουσίες** και **κυτταροκίνες** (π.χ. ιντερλευκίνες, TNF-α κ.ά.).

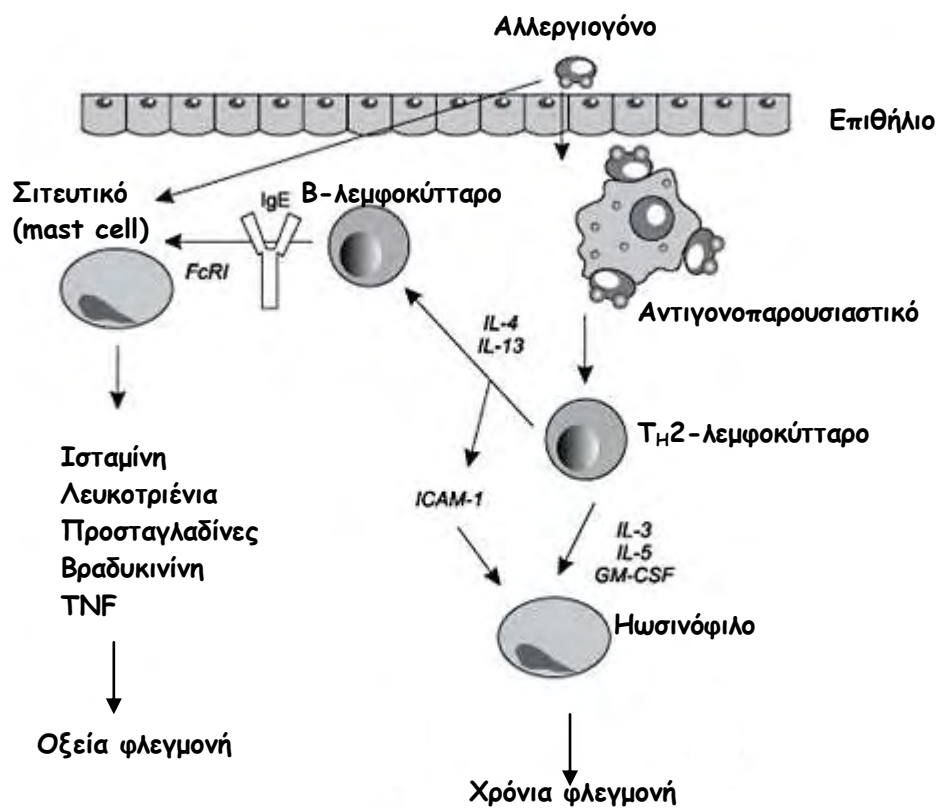
Ένα δίκτυο δενδριτικών κυττάρων βρίσκεται κάτω από το επιθήλιο των αεραγωγών, ‘επιθεωρώντας’ για εισβάλοντα παθογόνα ή εισπνεόμενα αντιγόνα. Ορισμένα αλλεργιογόνα έχουν ενζυμικές ιδιότητες ικανές να διασπάσουν τους σταθερούς συνδέσμους ανάμεσα στα επιθηλιακά κύτταρα και να ενεργοποιήσουν τους PARs (μεμβρανικοί υποδοχείς, που ενεργοποιούνται από την πρωτεολυτική αποκοπή του εξωκυττάριου τμήματός τους (protease activated receptors). Το ενεργοποιημένο επιθήλιο απελευθερώνει κυτταροκίνες, που προσελκύουν δενδριτικά. Επιπλέον, η είσοδος του αλλεργιογόνου οδηγεί στη μετανάστευση και ωρίμανση δενδριτικών αλλά και T-κυττάρων, που θα μεσολαβήσουν στη διαδικασία της φλεγμονής. Συγκεκριμένα:

- 1) Όταν το **αντιγόνο** εισέλθει στον οργανισμό και δεσμευτεί στο δενδριτικό κύτταρο, το ενεργοποιεί και αυτό μετατρέπεται σε **αντιγόνοπαρουσιαστικό** και μεταναστεύει στους λεμφαδένες, όπου θα παρουσιάσει το αντιγόνο στα T<sub>H</sub>0-λεμφοκύτταρα (CD4<sup>+</sup>) (Holt et al., 2000).
- 2) Τα ενεργοποιημένα T-κύτταρα απελευθερώνουν κυτταροκίνες και συγκεκριμένα IL-4.
- 3) Η IL-4 οδηγεί στη διαφοροποίηση των T<sub>H</sub>0 σε T<sub>H</sub>2 (Holt et al., 1999). Αυτά τα ενεργοποιημένα **T<sub>H</sub>2-λεμφοκύτταρα** κατευθύνονται στους αεραγωγούς, όπου εκκρίνουν ιντερλευκίνη IL-4, IL-5 και IL-13 (Mosmann et al., 1996).
- 4) Η IL-4 ενεργοποιεί τα **B-λεμφοκύτταρα** για την παραγωγή αντισωμάτων IgE. Η IgE στη συνέχεια προσδένεται στους υποδοχείς (FcεRI) των **σιτευτικών** κυττάρων (mast cells) με αποτέλεσμα την ενεργοποίησή τους και την έκκριση φλεγμονωδών μεσολαβητών, όπως **His (ισταμίνη)**, **TNF** υπεύθυνων για την **οξεία αλλεργική**

**αντίδραση** (οξεία φλεγμονή). Παράλληλα, η IL-4 προσδένεται σε ειδικούς υποδοχείς της κυτταρικής μεμβράνης ενεργοποιώντας την υπερέκκριση βλέννης.

Η IL-5 επάγει την ενεργοποίηση των **ηωσινόφιλων** κυττάρων, που απελευθερώνουν κυτταροτοξικούς μεσολαβητές με κυτταρο-καταστροφικές δράσεις. Ανάμεσα στους εκλυόμενους από τα ηωσινόφιλα μεσολαβητές ανήκουν και οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου (υπεροξειδίου ανιόν, ρίζες υδροξυλίου, υπεροξειδίου του υδρογόνου, NO). Αυτές οι ελεύθερες ρίζες 'λιμνάζουν' γύρω από τα γειτονικά κύτταρα δημιουργώντας ένα τοπικό οξειδωτικό μικροπεριβάλλον. Αυτό το οξειδωτικό μικροπεριβάλλον προκαλεί βλάβη στα επιθηλιακά κύτταρα των αεραγωγών, οδηγώντας σε απώλεια του επιθηλίου από τη βασική μεμβράνη και τη μη φυσιολογική επαναδόμηση αυτού (remodeling).

Η IL-13 συμμετέχει στη διατήρηση της φλεγμονής, καθώς η φλεγμονή στο άσθμα δεν περιορίζεται αλλά διατηρείται για μεγάλο χρονικό διάστημα και μεταπίπτει σε **χρόνια φλεγμονή** (Wills-Karp, 2001). Ο μηχανισμός της φλεγμονής απεικονίζεται στην Εικόνα 2.



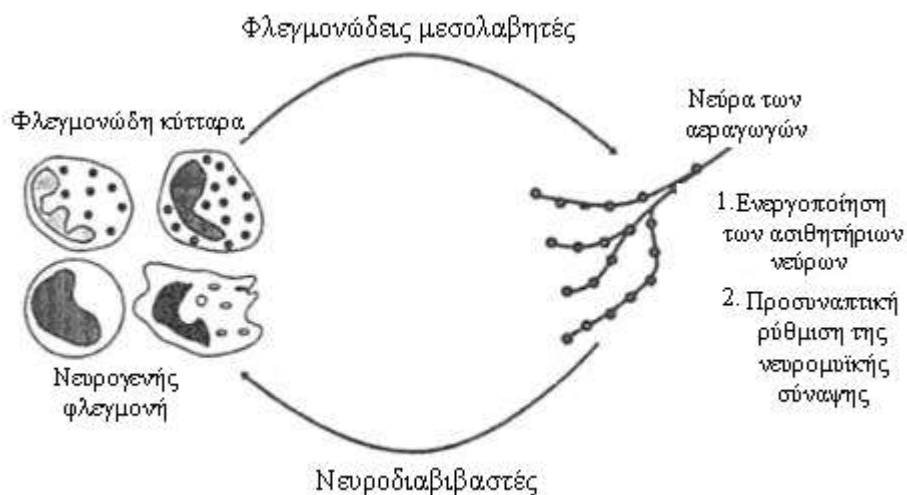
**Εικόνα 2.** Απεικόνιση του περίπλοκου μηχανισμού της φλεγμονώδους διαδικασίας του άσθματος.

Συνοπτικά οι εκκρινόμενοι μεσολαβητές και κυτταροκίνες προκαλούν τα παρακάτω συμπτώματα του άσθματος:

- 1. Υπερπαραγωγή και υπερέκκριση βλέννης** από τους υποβλεννογόνιους αδένες
- 2. Σύσπαση των λείων μυϊκών ινών των βρόγχων (βρογχόσπασμος)**
- 3. Αγγειοδιαστολή και εξοίδηση πλάσματος από τα αγγεία** με δημιουργία οιδήματος
- 4. Καταστροφή του επιθηλίου**, δηλαδή απόπτωση επιθηλιακών κυττάρων και απογύμνωση του βρογχικού επιθηλίου και
- 5. Επαναδιαμόρφωση (remodeling) του βρογχικού επιθηλίου** εξαιτίας του αυξημένου όγκου των λείων μυών, του πολλαπλασιασμού των αγγείων, της κακής εναπόθεσης κολλαγόνου και πάχυνση της μεμβράνης και της αύξησης των βρογχικών αδένων.

### **Σχέση φλεγμονής και νευρικής ρύθμισης των αεραγωγών στο άσθμα**

Μελέτες σε ασθενείς με άσθμα έδειξαν σχέση αλληλεπίδρασης μεταξύ της φλεγμονής που αναπτύσσεται στους αεραγωγούς και των νευρικών μηχανισμών ρύθμισης αυτών. Οι φλεγμονώδεις μεσολαβητές που απελευθερώνονται από τα φλεγμονώδη κύτταρα κατά την ανάπτυξη της φλεγμονής μπορεί να διεγείρουν τα παρασυμπαθητικά νεύρα των αεραγωγών, είτε μέσω της ενεργοποίησης των αισθητήριων νεύρων, είτε δρώντας πάνω στους προ-συναπτικούς υποδοχείς μιας νευρομυϊκής σύναψης ώστε να τους διεγείρουν, προκαλώντας την απελευθέρωση χολινεργικών νευροδιαβιβαστών. Η απελευθέρωση των χολινεργικών διαβιβαστών οδηγεί σε βρογχόσπασμο. Από την άλλη νευρικοί μηχανισμοί μπορεί να επηρεάσουν τη φλεγμονώδη αντίδραση του άσθματος (νευρογενής φλεγμονή) (Εικ.3).



**Εικόνα 3.** Αλληλεπίδραση μεταξύ φλεγμονής και μηχανισμών νευρικού ελέγχου. Οι φλεγμονώδεις μεσολαβητές, οι οποίοι απελευθερώνονται από τα φλεγμονώδη κύτταρα μπορούν να διεγείρουν τα νεύρα των αεραγωγών, είτε μέσω της ενεργοποίησης των αισθητήριων νεύρων, είτε μέσω μιας προσυναπτικής ρύθμισης της νευρομυϊκής σύναψης, προκαλώντας την απελευθέρωση χολινεργικών νευροδιαβιβαστών, η οποία οδηγεί σε βρογχόσπασμο (Asthma, Barnes, Rodger, Thomson, Third Edition, Academic Press, 1998).

## 1.4 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΡΟΚΛΗΣΗΣ ΑΣΘΜΑΤΟΣ

Οι παράγοντες που προκαλούν άσθμα χωρίζονται σε δύο κατηγορίες: στους **περιβαλλοντικούς παράγοντες** και στους **παράγοντες προδιάθεσης**.

### ➤ Περιβαλλοντικοί Παράγοντες

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

Τα πιο κοινά αλλεργιογόνα είναι:

- τα ακάρεα της οικιακής σκόνης, οι κατσαρίδες, οι γάτες και άλλα κατοικίδια, η γύρη και διάφοροι μύκητες
- τα τροφικά αλλεργιογόνα (αβγό, γάλα, ξηροί καρποί κ.τ.λ.)

- τα επαγγελματικά αλλεργιογόνα στα οποία εκτίθενται εργαζόμενοι, κυρίως φυτικής και ζωικής προέλευσης (τρίχες, κύτταρα της επιδερμίδας, εκκρίματα)

Στους μη-ειδικούς ερεθιστικούς ή εκλυτικούς παράγοντες περιλαμβάνονται:

- εισπνεόμενες χημικές ουσίες όπως τα οξείδια του αζώτου, το διοξείδιο του θείου, το όζον και η έκθεση σε αυξημένη ατμοσφαιρική ρύπανση

- ο καπνός του τσιγάρου (ενεργητικό και παθητικό κάπνισμα)

- οι αναπνευστικές λοιμώξεις, κυρίως από ιούς, π.χ. ρινοϊό (Rhinovirus) (Johnston et al., 1995) και όχι από βακτήρια

- η άσκηση

- οι ακραίες καιρικές συνθήκες (π.χ. παγετός, έντονη υγρασία) και οι απότομες αλλαγές της θερμοκρασίας (π.χ. από κλιματιζόμενο χώρο σε ζεστό και ξηρό αέρα)

- οι τροφές (προσθετικά, συντηρητικά, χρωστικές)

- τα φάρμακα (π.χ. ασπιρίνη, μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη, β-αδρενεργικοί ανταγωνιστές)

- επαγγελματικές ερεθιστικές ουσίες (ανόργανες και οργανικές χημικές ουσίες)

- η συναισθηματική φόρτιση (ο υπεραερισμός λόγω έντονου γέλιου, κλάματος, θυμού, φόβου, άγχους μπορεί να προκαλέσει επιδείνωση του άσθματος. Ο ακριβής τρόπος με τον οποίο μια ψυχολογική κατάσταση μπορεί να επιδράσει και να προκαλέσει άσθμα δεν έχει αποσαφηνισθεί.).

## ➤ **Παράγοντες Προδιάθεσης**

Παράγοντες προδιάθεσης είναι αυτοί οι οποίοι προδιαθέτουν στην ανάπτυξη άσθματος, δηλαδή ενέχουν τον κίνδυνο ανάπτυξης της ασθένειας. Οι παράγοντες προδιάθεσης χωρίζονται σε **περιβαλλοντικούς προδιαθεσικούς παράγοντες (εξωγενείς)** και σε **ενδογενείς παράγοντες προδιάθεσης**.

### • **Εξωγενείς παράγοντες προδιάθεσης**

Οι περιβαλλοντικοί προδιαθεσικοί παράγοντες επηρεάζουν την ανάπτυξη άσθματος σε άτομα με προδιάθεση. Για παράδειγμα, η γενετική προδιάθεση και η ευαισθητοποίηση σε κάποιον εξωγενή προδιαθεσικό παράγοντα κατά τη διάρκεια της

εγκυμοσύνης μπορεί να οδηγήσουν στη γέννηση ενός παιδιού με αλλεργίες και άσθμα. Παραδείγματα εξωγενών προδιαθεσικών παραγόντων είναι τα ενδοοικιακά αλλεργιογόνα, το κάπνισμα της μητέρας, το οποίο φαίνεται ότι αυξάνει τον κίνδυνο εκδήλωσης άσθματος στο παιδί (Weitzman et al., 1990; Ehrlich et al., 1996; Jaakkola et al., 2001), η διατροφή και η λήψη φαρμάκων από τις εγκύους, οι ορμονικές διαταραχές (ιδιαίτερα στις γυναίκες). Πολλές φορές οι περιβαλλοντικοί προδιαθεσικοί παράγοντες δρουν αμφίδρομα και ως εκλυτικοί.

- **Γενετική βάση άσθματος και Ενδογενείς παράγοντες προδιάθεσης**

Κάποιοι άνθρωποι γεννιούνται με μια τάση εμφάνισης άσθματος. Η τάση αυτή οφείλεται σε γενετικούς παράγοντες.

Το άσθμα είναι ένα σύνδρομο που χαρακτηρίζεται από γενετική ετερογένεια και παρουσιάζεται με πολλούς φαινοτύπους. Είναι μια σύνθετη γενετικά πάθηση, όπως ο σακχαρώδης διαβήτης, η υπέρταση, η αθηροσκλήρωση και η αρθρίτιδα. Το είδος του εμφανιζόμενου φαινοτύπου εξαρτάται από την αλληλεπίδραση διαφόρων γονιδίων με το περιβάλλον, δηλαδή γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων. Η κληρονομικότητα του άσθματος δεν ακολουθεί τον τύπο κληρονομικότητας σύμφωνα με τους νόμους του Mendel, όπου ένα κυρίαρχο, υπολειπόμενο ή φυλοσύνδετο γονίδιο είναι υπεύθυνο για την εμφάνιση της πάθησης. Αντίθετα το άσθμα χαρακτηρίζεται από ένα πολυγονιδιακό πρότυπο κληρονομικότητας, που ονομάζεται πολυπαραγοντική κληρονόμηση. Κατά την πολυπαραγοντική κληρονόμηση δεν υπάρχει ένα και μοναδικό σφάλμα στη γενετική πληροφορία, αλλά ένας συνδυασμός μικρών αποκλίσεων που συνολικά μπορούν να προκαλέσουν ή να προδιαθέσουν ένα άτομο για την ανάπτυξη της ασθένειας. Σε αυτή τη διαδικασία εμπλέκονται και περιβαλλοντικοί παράγοντες. Οι πολυπαραγοντικές ασθένειες τείνουν να επανεμφανίζονται στις οικογένειες, αλλά δεν παρουσιάζουν τα χαρακτηριστικά γενεαλογικά πρότυπα των μονογονιδιακών χαρακτήρων.

Η κληρονομικότητα του άσθματος και άλλων πολύπλοκων γενετικά ασθενειών μπορεί να υπολογισθεί συγκρίνοντας το ποσοστό ανάπτυξης άσθματος σε συγγενείς πρώτου βαθμού με το ποσοστό ανάπτυξης άσθματος στον γενικό πληθυσμό. Τέτοιες μελέτες έδειξαν ότι το οικογενειακό ιστορικό είναι βασικός κληρονομικός παράγοντας ανάπτυξης άσθματος (Sibbald et al., 1979; Panhuysen et al., 1998). Για παράδειγμα μια μεγάλη και εκτεταμένη επιδημιολογική μελέτη σε οικογένειες, η ECRHS, μελετώντας

13.963 άτομα ηλικίας 20-44 χρόνων έδειξε ότι το αλλεργικό άσθμα του γονέα και ιδιαίτερα τη μητέρας είναι ισχυρός παράγοντας κινδύνου για την ανάπτυξη αλλεργικού άσθματος στο παιδί (ECRHS, 1997). Επιπλέον, μελέτες σε διδύμους έδειξαν ότι η γενετική προδιάθεση είναι πολύ ισχυρή και εξαιρετικά υψηλότερη σε μονοζυγωτικούς από ότι σε διζυγωτικούς διδύμους (Weisch DG et al., 1999).

Οι επιστήμονες έχουν εντοπίσει διάφορα γονίδια που σχετίζονται με την ανάπτυξη της ασθένειας. Τα γονίδια αυτά αφορούν την ανάπτυξη των βασικών χαρακτηριστικών του άσθματος που είναι:

- Η **αλλεργία (ατοπία)**, δηλαδή η παραγωγή παθολογικά μεγάλων ποσοτήτων ανοσοσφαιρίνης E (IgE) ως απάντηση του οργανισμού στην επαφή με ένα αλλεργιογόνο. Το μεγάλο ποσοστό (πάνω από το 70%) των ατοπικών ασθματικών ασθενών δείχνει ότι η αλλεργία αποτελεί ισχυρό παράγοντα κινδύνου για την ανάπτυξη άσθματος (Weiss et al., 1993; Holt et al., 1999; Holgate ST, 1999; Kay AB, 2001).

- Η **βρογχική υπεραντιδραστικότητα (BY)**, δηλαδή η αυξημένη απάντηση των βρόγχων σε μη ειδικά εξωγενή βρογχοσυσπαστικά ερεθίσματα (όπως αυτά που αναφέρθηκαν παραπάνω), τα οποία, αν χορηγηθούν σε υγιείς, προκαλούν ελάχιστα έως καθόλου αποτελέσματα. Υπάρχουν ενδείξεις ότι η βρογχική υπεραντιδραστικότητα προηγείται της ανάπτυξης άσθματος. Αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η BY στην παιδική ηλικία αποτελεί ισχυρό προδιαθεσικό παράγοντα για την ανάπτυξη άσθματος αργότερα στη ζωή τους (Laprice et al., 1999; Rasmussen et al., 1999; Rasmussen et al., 2002). Σε μακροχρόνιες μελέτες φαίνεται ότι ο συνδυασμός ευαισθητοποίησης σε ακάρεα της οικιακής σκόνης (house dust mites, HDM) και βρογχικής υπεραντιδραστικότητας είναι παράγοντας κινδύνου για ανάπτυξη άσθματος (Ulrik et al., 1996).

- Η **επαναδιαμόρφωση (remodeling)**, η οποία είναι μια διαδικασία ανώμαλης επιδιόρθωσης του βρογχικού επιθήλιου, που συμβάλλει στο σχεδόν μη αντιστρεπτό στένεμα των αεραγωγών. Μπορεί να εμφανιστεί πολύ νωρίς στην εξέλιξη της ασθένειας και χαρακτηρίζεται από μια αυξημένη μάζα λείων βρογχικών μυών (BSM-Bronchial Smooth Muscle).

Η χαρτογράφηση ολόκληρου του ανθρώπινου γονιδιώματος έδειξε σύνδεση των παραπάνω χαρακτηριστικών του άσθματος με όλα σχεδόν τα χρωμοσώματα και ιδιαίτερα του 4q, 5q, 6, 7, 11q, 12q, 13q, 16, 19q και 21q (Barnes KC, 2000).

Ο ρόλος των γονιδίων στην προδιάθεση του άσθματος δεν είναι ακόμα απόλυτα σαφής, αλλά το χρωμόσωμα 5 έχει ερευνηθεί περισσότερο, αφού είναι πλούσιο σε γονίδια, τα οποία κωδικοποιούν μόρια-κλειδιά της φλεγμονώδους αντίδρασης του άσθματος (κυτταροκίνες, αυξητικούς παράγοντες κτλ.).

Συγκεκριμένα η 5q31 χρωμοσωμική περιοχή κωδικοποιεί την παραγωγή ιντερλευκινών (IL-3, IL-4, IL-5, IL-9, IL-13), οι οποίες είναι κυτταροκίνες υπεύθυνες για τη ρύθμιση της ανοσοσφαιρίνης E (IgE) σε αλλεργικές αντιδράσεις, αλλά και για τη ρύθμιση της λειτουργίας των σιτευτικών κυττάρων, βασεόφιλων και ηωσινόφιλων (κυττάρων που συμμετέχουν στη διαδικασία της φλεγμονής του άσθματος). Μια ένθεση (-589T) στον προαγωγέα (promoter) της ιντερλευκίνης-4 (IL-4) σχετίστηκε με αυξημένη γονιδιακή μεταγραφή και αυξημένη ολική IgE (Rosenwasser et al., 1995). Η μετάλλαξη αυτή βρέθηκε σε πολλούς φαινοτύπους της ασθένειας (Noguchi et al., 1998; Burchard et al., 1999; Zhu et al., 2000; Sandford et al., 2000). Δύο μεταλλάξεις στην IL-13 (C1112T και G2044A) βρέθηκαν σε διάφορους ασθματικούς φαινοτύπους.

Επίσης, η χρωμοσωμική θέση 5q32, κωδικοποιεί την έκφραση των  $\beta_2$ -αδρενεργικών υποδοχέων, υπεύθυνων για τη βρογχοδιαστολή. Υπάρχουν δύο κοινές μεταλλάξεις των  $\beta_2$ -αδρενεργικών υποδοχέων οι οποίες έχουν σχετισθεί με βρογχική υπεραντιδραστικότητα στους ασθματικούς ασθενείς (Hall et al., 1995) και με αυξημένο ποσοστό ανάπτυξης άσθματος στα παιδιά (Hopes et al., 1998).

Το χρωμόσωμα 6 και το χρωμόσωμα 11 φέρουν γονίδια που ελέγχουν την παρουσίαση του αντιγόνου κατά την έναρξη της φλεγμονώδους αντίδρασης του άσθματος.

Τελευταία, το γονίδιο ADAM33 (Van Eerdewegh et al., 2002; Howard TD et al., 2003) εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 20 και κωδικοποιεί την πρωτεΐνη ADAM33 (A Disintegrinase and Metalloproteinase 33) ένα νέο μέλος της οικογένειας των συνδεδεμένων με ψευδάργυρο μεταλλοπρωτεϊνών. Βλάβες στο γονίδιο αυτό έχουν συνδεθεί με τη βρογχική υπεραντιδραστικότητα και την επαναδιαμόρφωση (remodeling) των αεραγωγών στο άσθμα. Συγκεκριμένα η οικογένεια αυτών των πρωτεϊνών συμμετέχει στην διακυτταρική επικοινωνία. Στις φλεγμονώδεις νόσους οι ADAM πρωτεΐνες φαίνεται να έχουν μια συμμετοχή στην έκκριση κυτταροκινών και η ADAM33 βρέθηκε ότι εκφράζεται κυρίως στον εγκέφαλο, την καρδιά και τους



πνεύμονες, γεγονός που ενισχύει την υποψία συμμετοχής της στην παθοφυσιολογία του άσθματος.

Η ανάπτυξη του άσθματος επηρεάζεται επίσης από:

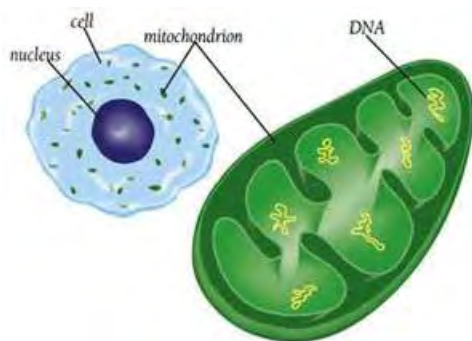
- Τη **φυλή** και την **εθνικότητα**. Οι διαφορές που παρατηρούνται στο ποσοστό ανάπτυξης άσθματος μεταξύ διαφορετικών φυλών και εθνικών ομάδων εξαρτώνται από τον συνδυασμό του γενετικού υπόβαθρου με διάφορους περιβαλλοντικούς και κοινωνικοοικονομικούς παράγοντες (Litonjua AA et al., 1999). Έχει βρεθεί ότι οι Αφρικανοί-Αμερικανοί εμφανίζουν σοβαρότερο άσθμα από αντίστοιχα άτομα λευκής φυλής.

- Το **φύλο** και την **ηλικία**. Στην παιδική ηλικία το άσθμα είναι συχνότερο στα αγόρια παρά στα κορίτσια (Gissler M et al., 1999) λόγω στενότερων αεραγωγών (Palmer et al., 2001) και αυξημένης IgE (Sears et al., 1993), ενώ μετά την εφηβεία αναπτύσσουν άσθμα περισσότερες γυναίκες από άνδρες (Szczeklik et al., 2000).

## 1.5 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΩΝ ΣΤΟ ΆΣΘΜΑ

Τα παιδιά κληρονομούν την αλλεργία και το άσθμα περισσότερο από τη **μητέρα** παρά από τον πατέρα και οι παράγοντες που επηρεάζουν τη μητέρα αυξάνουν και την προδιάθεση του παιδιού. Αυτό το γεγονός συνδέεται με το μητρικό πρότυπο κληρονόμησης του μιτοχονδριακού γενετικού υλικού.

### Μιτοχόνδρια – Δομή και Λειτουργία

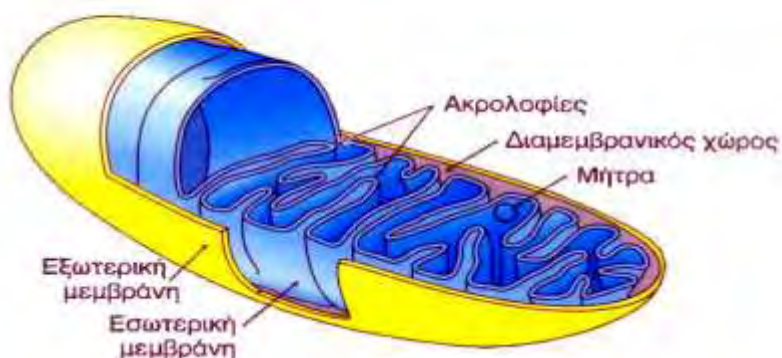


Ο βιολογικός προορισμός του οξυγόνου που εισέρχεται στον οργανισμό μέσω της αναπνοής είναι τα **μιτοχόνδρια**, τα κυτταρικά θεμελιώδη οργανίδια που βρίσκονται σε όλα σχεδόν τα κύτταρα των θηλαστικών.

Τα μιτοχόνδρια σύμφωνα με την

‘ενδοσυμβιωτική θεωρία’ προήλθαν πριν από ενάμιση δισεκατομμύριο χρόνια, από ενδοκυττάρωση ενός αερόβιου πρωτοβακτηρίου μέσα σε ένα αναερόβιο ευκαρυωτικό κύτταρο. Αυτή η θεωρία εξηγεί την ύπαρξη του δικού τους γενετικού υλικού.

Ένα τυπικό μιτοχόνδριο, όπως φαίνεται στην Εικόνα 4, έχει σωληνόμορφο σχήμα και διάμετρο περίπου 1μm. Διαθέτει μια λεία και χωρίς αναδιπλώσεις εξωτερική μεμβράνη και μια εσωτερική μεμβράνη με πολυάριθμες πτυχωσεις ή ακρολοφίες (cristae). Οι δύο μεμβράνες διαχωρίζουν το μιτοχόνδριο σε δύο διακριτά διαμερίσματα, τον διαμεμβρανικό χώρο, που ορίζεται ως ο χώρος μεταξύ της εξωτερικής και της εσωτερικής μεμβράνης και τον εσωτερικό χώρο που περικλείεται από την εσωτερική μεμβράνη και ονομάζεται μήτρα. Η μήτρα του μιτοχονδρίου περιέχει ένα ή περισσότερα μικρά κυκλικά δίκλιωνα μόρια DNA, RNA και ριβοσώματα προκαρυωτικού τύπου.

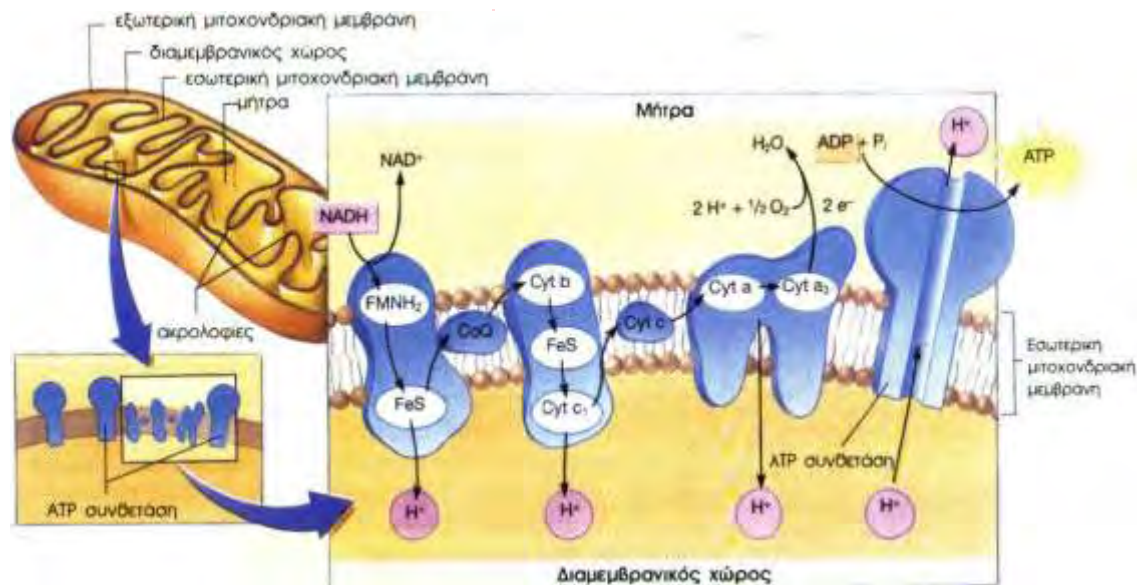


**Εικόνα 4.** Δομή μιτοχονδρίου

Η βασική λειτουργία των μιτοχονδρίων είναι να υποστηρίξουν την αερόβια αναπνοή και να εφοδιάζουν με ενεργειακά υποστρώματα, παράγοντας ATP (τριφωσφορική αδενοσίνη), τα ενδοκυτταρικά μεταβολικά μονοπάτια. Με άλλα λόγια τα μιτοχόνδρια τροφοδοτούν τον ανθρώπινο οργανισμό με την απαραίτητη για τις λειτουργίες του ενέργεια, γι' αυτό και χαρακτηρίζονται ως τα εργοστάσια παραγωγής ενέργειας.

Η διαδικασία που ακολουθείται στα μιτοχόνδρια για την παραγωγή του ATP ονομάζεται οξειδωτική φωσφορυλίωση. Η οξειδωτική φωσφορυλίωση περιλαμβάνει τον κύκλο του Krebs, ο οποίος λαμβάνει χώρα στη μήτρα του μιτοχονδρίου και την

αναπνευστική αλυσίδα ή αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων, τα ενζυμικά σύμπλοκα της οποίας (complex I,II,III και IV) αποτελούν συστατικά της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης (Εικ.5).



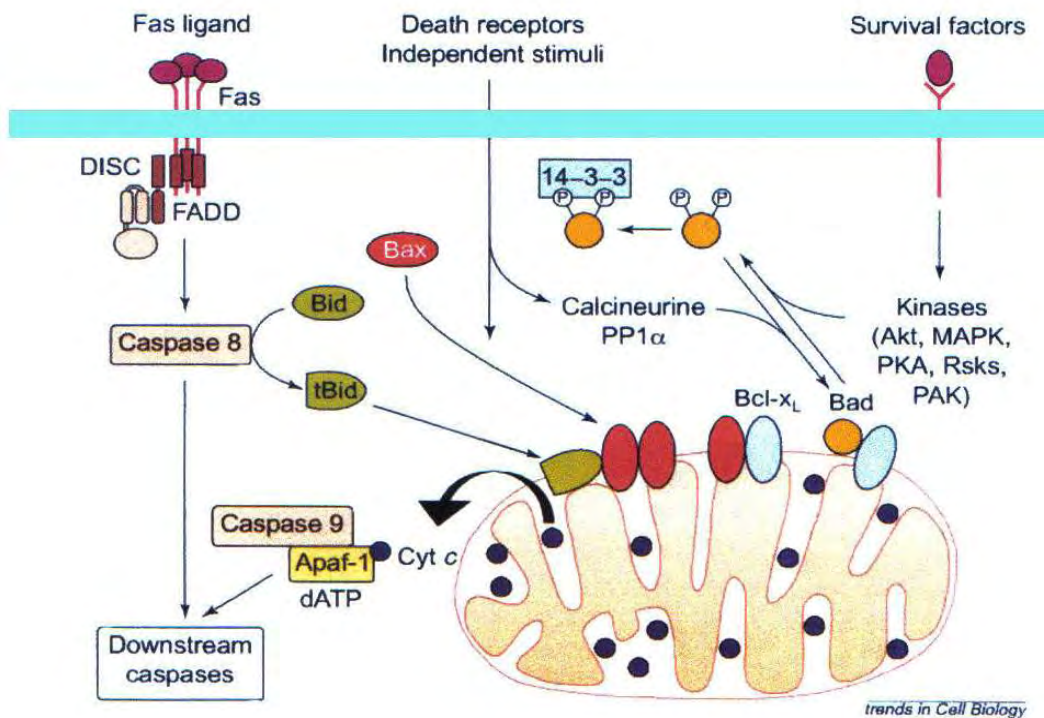
**Εικόνα 5.** Η μεταφορά ηλεκτρονίων μέσω των τριών συμπλόκων των αναπνευστικών ενζύμων (NADH-αφυδρογονάση, κυτοχρωμική αναγωγάση, κυτοχρωμική οξειδάση) της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης. Κατά τη μεταφορά ηλεκτρονίων από το NADH προς το O<sub>2</sub>, πρωτόνια που προέρχονται από το H<sub>2</sub>O αντλούνται μέσω της μεμβράνης με τη βοήθεια των τριών συμπλόκων. Η ουβικινόνη (CoQ) και το κυτόχρωμα c λειτουργούν ως κινητοί φορείς για τη μεταφορά ηλεκτρονίων από το ένα σύμπλοκο στο επόμενο.

Τα οκτώ ηλεκτρόνια που απελευθερώνονται σε κάθε κύκλο του Krebs, δεσμεύονται από τα συνένζυμα NADH και FADH<sub>2</sub>. Από τα ανηγμένα αυτά συνένζυμα, τα ηλεκτρόνια, με τη βοήθεια μιας αλυσίδας εξειδικευμένων φορέων, των συμπλόκων της αναπνευστικής αλυσίδας, μεταφέρονται σταδιακά προς έναν τελικό δέκτη, ο οποίος είναι το μοριακό οξυγόνο (O<sub>2</sub>). Αυτό το πέρασμα των ηλεκτρονίων από τον ένα μεταφορέα στον άλλο (NADH-αφυδρογονάση - συνένζυμο Q - κυτόχρωμα b και c<sub>1</sub> - κυτόχρωμα c - κυτοχρωμική οξειδάση) απελευθερώνει ενέργεια σε κάθε στάδιο. Η ενέργεια αυτή εξασφαλίζει τη μεταφορά των πρωτονίων H<sup>+</sup> από τη μήτρα στον διαμεμβρανικό χώρο. Το pH της μήτρας ελαττώνεται, ενώ η εσωτερική μεμβράνη γίνεται ηλεκτραρνητική στην πλευρά που βρίσκεται προς τον διαμεμβρανικό χώρο. Η διαφορά αυτή του δυναμικού προκαλεί την είσοδο πρωτονίων στη μήτρα και η ροή αυτή των πρωτονίων ενεργοποιεί την ATP-συνθετάση, με τη βοήθεια της οποίας, προκαλείται η φωσφορυλίωση του ADP σε ATP (οξειδωτική φωσφορυλίωση).

Τα μιτοχόνδρια όμως έχουν ένα διττό ρόλο. Παράλληλα με τη λειτουργία τους στην κυτταρική αναπνοή παίζουν σημαντικό ρόλο και στο σηματοδοτικό μονοπάτι της απόπτωσης. Η απόπτωση ή προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος είναι ένα πρόγραμμα κυτταρικής «αυτοκτονίας», με τη βοήθεια του οποίου οι πολυκύτταροι οργανισμοί εξαλείφουν τα γερασμένα, κατεστραμμένα ή μολυσμένα κύτταρα. Οποιαδήποτε διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της απόπτωσης μπορεί να οδηγήσει σε καρκίνο, σε αυτοάνοσα και σε εκφυλιστικά νοσήματα.

Τα κεντρικά στοιχεία της απόπτωσης είναι οι πρωτεΐνες Bcl-2, Araf-1 και οι κασπάσες. Πρόσφατα βρέθηκε ότι στην απόπτωση κύριο ρόλο παίζουν τα μιτοχόνδρια και το απελευθερούμενο από αυτά κυτόχρωμα c. Η απόπτωση μπορεί να ενεργοποιηθεί από μια ποικιλία ερεθισμάτων, είτε λόγω έλλειψης σημάτων επιβίωσης (αυξητικοί παράγοντες, ορμόνες), είτε λόγω ύπαρξης σημάτων θανάτου (ακτινοβολία, χημειοθεραπευτικά φάρμακα, συνδέτες όπως Fas-L και υποδοχέας Fas, TNF και TNF-R). Πολλά σήματα θανάτου συγκλίνουν στα μιτοχόνδρια και σε όλα συμμετέχουν οι πρωτεΐνες της οικογένειας Bcl-2. Το σήμα θανάτου ενεργοποιεί την παραγωγή της προ-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bax, μέλος της οικογένειας Bcl-2, η οποία προκαλεί την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c από τον διαμεμβρανικό χώρο του μιτοχονδρίου στο κυτταρόπλασμα. Το κυτόχρωμα c προσδέεται στον συμπαράγοντα Araf-1, οποίος συνδέεται στη συνέχεια στην προκασπάση 9, δημιουργώντας ένα σύμπλοκο, το **αποπτώσωμα** (cyto-c/Araf-1/procaspase 9). Στο αποπτώσωμα η προκασπάση 9 εξελίσσεται σε ώριμη κασπάση, η οποία μετά ενεργοποιεί άλλες κασπάσες τελεστές (ανενεργές πρωτεάσες), όπου μετά την ενεργοποίησή τους αποικοδομούν ορισμένες πρωτεΐνες-κλειδιά με αποτέλεσμα τη δημιουργία μιας αλυσιδωτής αντίδρασης θανάτου (Εικόνα 6). Οι μορφολογικές αλλαγές που παρατηρούνται κατά την απόπτωση είναι ότι το κύτταρο συρρικνώνεται και συμπυκνώνεται, ο κυτταροσκελετός καταρρέει, το πυρηνικό περιβλήμα αποσυναρμολογείται, το DNA του πυρήνα θρυμματίζεται σε μικρά κλάσματα και η επιφάνεια του κυττάρου εκδηλώνει ιδιότητες που προκαλούν την άμεση φαγοκυττάρωσή του.

Στο μιτοχόνδριο κατά την απόπτωση παρατηρείται κατάρρευση του μηχανισμού μεταφοράς  $e^-$  (πτώση των επιπέδων ATP), απελευθέρωση ενεργοποιητών πρωτεϊνικής φύσεως (Cyto-C/AIF (apoptosis initiator factor) και απελευθέρωση ελεύθερων ριζών οξυγόνου ROS (reactive oxygen species).



**Εικόνα 6.** Σηματοδοτικό μονοπάτι απόπτωσης. Διάφορα ερεθίσματα μεσολαβούν στην απελευθέρωση του κυτοχρώματος c από το μιτοχόνδριο. Η προ-αποπτωτική πρωτεΐνη Bax και Bid επάγουν την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c, το οποίο προσδένεται στον παράγοντα Araf-1. Στη συνέχεια προσδένεται και η προκασπάση 9, δημιουργώντας το αποπτώσωμα (cyto-c/Araf-1/caspase 9), το οποίο ενεργοποιεί τον καταρράκτη κασπασών και υποχρεώνει το κύτταρο σε θάνατο. (Πηγή: Desagher S. and Martinou J-C., Mitochondria as central control point of apoptosis. Trends in Cell Biology, 2000, 10, 369-377)

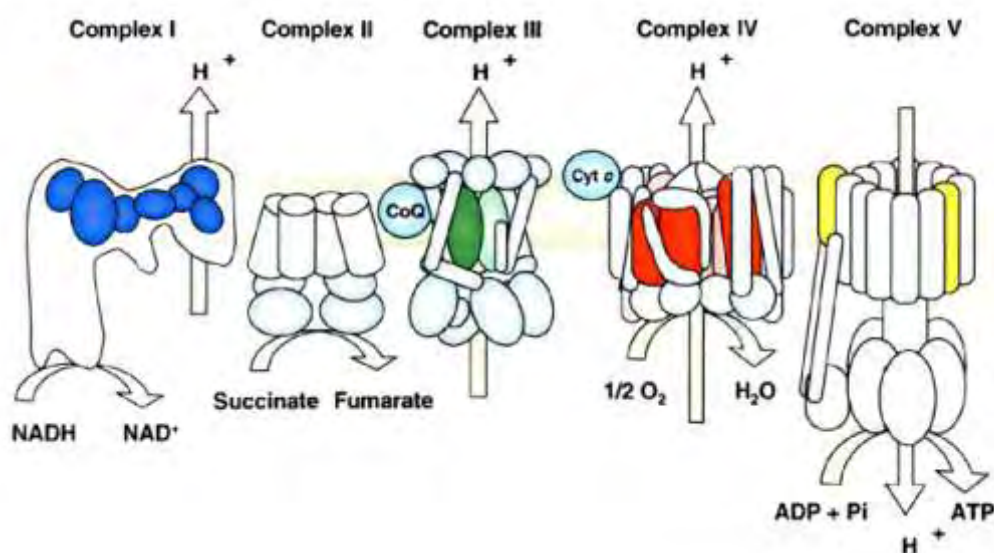
## Μιτοχονδριακό Γενετικό Υλικό

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω το εξωπυρηνικό μιτοχονδριακό DNA (mtDNA), βρίσκεται στη μήτρα του μιτοχονδρίου και είναι ένα μικρό, κυκλικό, ‘γυμνό’ από ιστόνες, δίκλωνο μόριο DNA με μορφή υπερέλικας. Περιέχει κωδικές αλληλουχίες οι οποίες απαντούν μία μόνο φορά στο γονιδίωμα του. Χαρακτηριστική επίσης είναι η έλλειψη νουκλεοτιδικών αλληλουχιών μεταξύ των γονιδίων καθώς και η απουσία ιντρονίων, ψευδογονιδίων και ανασυνδυασμού σε σχέση με το πυρηνικό DNA.

Κάθε ανθρώπινο κύτταρο περικλείει εκατοντάδες μιτοχόνδρια, καθένα από τα οποία περιέχει από 2 έως 10 αντίγραφα του δίκλωνου, κυκλικού DNA των 16,569

ζευγών νουκλεοτιδίων. Αυτό το εξωπυρηνικό γενετικό υλικό κληρονομείται από τη μητέρα προς όλους τους απογόνους (αρσενικούς και θηλυκούς), αλλά μόνο η κόρη θα το μεταβιβάσει στους απογόνους της. Το μιτοχονδριακό γονιδίωμα περιέχει 37 γονίδια (Εικ.8). Αυτά τα γονίδια κωδικοποιούν:

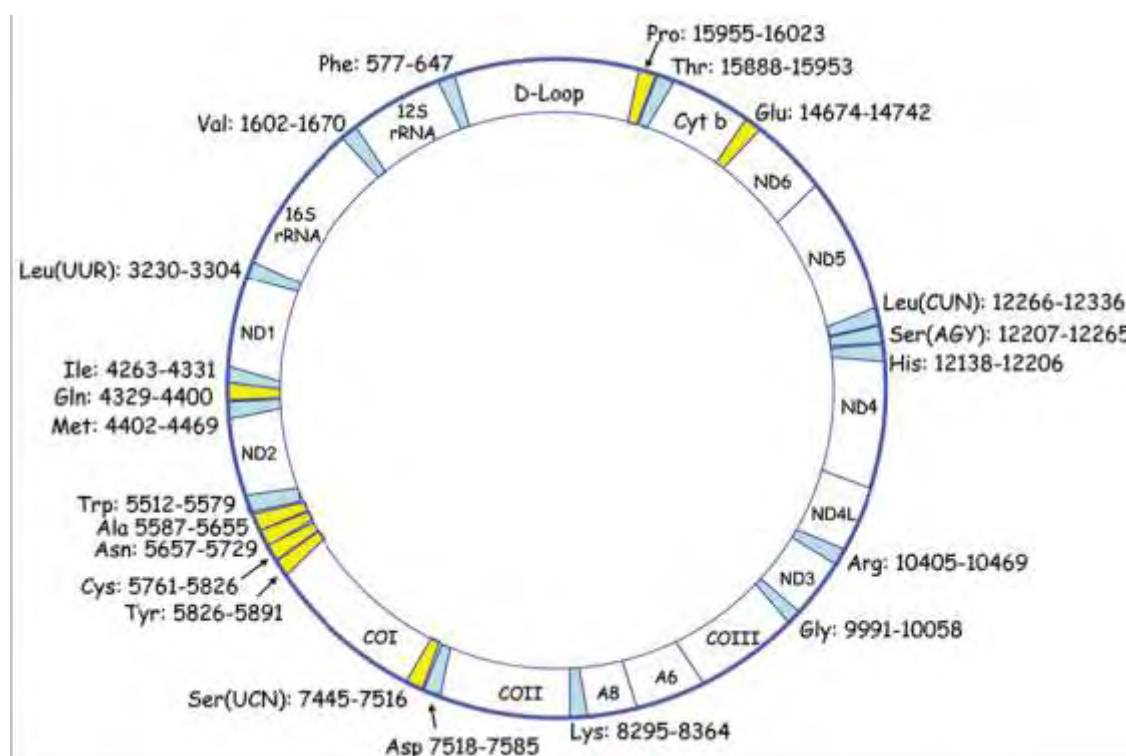
- Δεκατρείς πρωτεΐνες που είναι όλες υπομονάδες των συμπλόκων της αναπνευστικής αλυσίδας και εμπλέκονται στη μεταφορά ηλεκτρονίων και στη σύνθεση του ATP (complex I, III και IV). Αυτά τα ολοένζυμα συμπληρώνονται με 70 περίπου υπομονάδες πυρηνικής προέλευσης, οι οποίες εισάγονται στα μιτοχόνδρια από το κυτταρόπλασμα για τη δημιουργία ενεργών συμπλόκων και τη σύνθεση του ATP. Οι υπομονάδες των συμπλοκών της αναπνευστικής αλυσίδας που κωδικοποιούνται από το μιτοχονδριακό DNA φαίνονται στην Εικόνα 7.



**Εικόνα 7.** Οι χρωματιστές υπομονάδες των συμπλόκων κωδικοποιούνται από γονίδια του μιτοχονδριακού DNA. Οι υπόλοιπες κωδικοποιούνται από το πυρηνικό.

- Δύο rRNAs, ένα 12S και ένα 16S. Τα μιτοχονδριακά ριβοσώματα σχηματίζονται από μια μικρή 28S υπομονάδα και μια μεγάλη 39S υπομονάδα. Η μικρή υπομονάδα αποτελείται από 12S RNA και 29 πρωτεΐνες πυρηνικής προέλευσης, ενώ η μεγάλη υπομονάδα αποτελείται από 16S RNA και 48 πρωτεΐνες πυρηνικής προέλευσης.
- Είκοσι δύο μεταφορικά RNAs. Τα tRNAs είναι τα μόρια που μεταφέρουν αμινοξέα στο ριβόσωμα και μεσολαβούν για την ενσωμάτωση αυτών των αμινοξέων σε

πολυπεπίδια με μεγάλη πιστότητα. Το μιτοχονδριακό γονιδίωμα περιέχει ένα tRNA ειδικό για κάθε ένα από 18 αμινοξέα, δύο tRNAs ειδικά για τη σερίνη tRNA<sup>Ser(AGY)</sup> και tRNA<sup>Ser(UCN)</sup> και 2 tRNAs ειδικά για την λευκίνη (tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> και tRNA<sup>Leu(CUN)</sup>). Τα 22 tRNAs γονίδια σχηματίζουν την ελάχιστη ομάδα μετάφρασης όλων των απαραίτητων κωδικονίων που απαιτούνται στη βιοσύνθεση των δεκατριών πρωτεϊνών.



**Εικόνα 8.** Το μιτοχονδριακό γονιδίωμα: ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5 και ND6 υπομονάδες της αφυδρογονάσης του NADH (complex I), COI, COII, COIII, υπομονάδες της οξειδάσης του κυτοχρώματος c (complex IV), Cyt b (complex III), A8-A6 (ATP συνθετάση), D-loop (ρυθμιστική περιοχή του DNA), 12S, 16S rRNA (ριβοσωμικό RNA) (Πηγή: Zifa E, Giannouli S, Theotokis P, Stamatis C, Mamuris Z, Stathopoulos C, Mitochondrial tRNA mutations: clinical and functional perturbations, RNA Biol. 2007 Jan-Mar;4(1):38-66.)

Άλλο ένα χαρακτηριστικό των μιτοχονδρίων είναι η υπερβολική ευαισθησία τους στη δημιουργία μεταλλάξεων και αλλαγών. Αυτό συμβαίνει εξαιτίας της υψηλής συχνότητας αντιγραφής του mtDNA και των λίγων μηχανισμών επιδιόρθωσης που διαθέτει σε σχέση με το πυρηνικό DNA. Το mtDNA υφίσταται 10-17 φορές υψηλότερο ρυθμό μετάλλαξης συγκριτικά με το πυρηνικό. Ταυτόχρονα είναι ευαίσθητο και σε βλάβες από εξωγενείς αιτίες. Όλα αυτά οδηγούν σε ανωμαλίες στη μιτοχονδριακή αναπνευστική αλυσίδα, οι οποίες αποτελούν ένα από τα πιο κοινά λάθη του μεταβολισμού και ανωμαλίες στα μονοπάτια της απόπτωσης.

## Μεταλλάξεις mtDNA και μιτοχονδριακές ασθένειες

Οι μεταλλάξεις διακρίνονται σε **παθογόνες μεταλλάξεις** και **πολυμορφισμούς**. Οι πολυμορφικές ουδέτερες μεταλλάξεις είναι απλές νουκλεοτιδικές υποκαταστάσεις και δεν επηρεάζουν τη δομή και τη λειτουργία του μιτοχονδριακού γονιδιώματος και χρησιμοποιούνται στην ανίχνευση της φυλογενετικής κατανομής μεγάλων πληθυσμιακών ομάδων. Οι παθογόνες μεταλλάξεις επηρεάζουν ιδιαίτερα συντηρημένα στην εξέλιξη νουκλεοτίδια, σε αντίθεση με τις πολυμορφικές ουδέτερες μεταλλάξεις, οι οποίες επηρεάζουν μη συντηρημένα νουκλεοτίδια (Ingman et al., 2000).

Από το 1988 όπου και χαρακτηρίστηκε η πρώτη παθογόνος μετάλλαξη του μιτοχονδριακού γονιδιώματος, πολλές παθογόνες μιτοχονδριακές μεταλλάξεις (υποκαταστάσεις, ελλείψεις, προσθήκες) έχουν ταυτοποιηθεί. Οι μεταλλάξεις αυτές προκαλούν μιτοχονδριακές βλάβες και συγκεκριμένα επηρεάζουν τρεις θεμελιώδεις μηχανισμούς του μιτοχονδρίου: την οξειδωτική φωσφορυλίωση, την παραγωγή ελεύθερων ριζών και τη ρύθμιση της απόπτωσης και έχουν σχετισθεί με την εκδήλωση εκφυλιστικών ασθενειών, τη γήρανση και τον καρκίνο. Οι μιτοχονδριακές ασθένειες χαρακτηρίζονται από έναν ασυνήθιστο συνδυασμό κλινικών προβλημάτων σε όργανα και ιστούς με υψηλές απαιτήσεις ενέργειας όπως η καρδιά, ο εγκέφαλος, οι μύες τα νεφρά και το ενδοκρινικό σύστημα. Έρευνες που έχουν γίνει σε άτομα με μιτοχονδριακές ασθένειες δείχνουν την πολυπλοκότητα αυτών των ασθενειών. Σε ορισμένες μιτοχονδριακές ασθένειες παρατηρήθηκε μια συνεργασία μεταλλάξεων σε μιτοχονδριακά και πυρηνικά γονίδια, η αδρανοποίηση των οποίων είτε αναστέλλει την δράση των συμπλόκων της αναπνευστικής αλυσίδας και κατ' επέκταση την παραγωγή ενέργειας, ή διακόπτει τη βιογένεση των μιτοχονδρίων και του μιτοχονδριακού DNA (Douglas C.Wallace, 1999)

Μεταλλάξεις έχουν βρεθεί σε όλο το μήκος του μιτοχονδριακού γενετικού υλικού, σε κωδικές και μη κωδικές περιοχές. Στις κωδικές περιοχές του mtDNA που κωδικοποιούν πρωτεΐνες της αναπνευστικής αλυσίδας, έχουν βρεθεί συνολικά 214 παθογόνες μεταλλάξεις και στα 13 γονίδια (mitomap).

Στα μιτοχονδριακά rRNA γονίδια έχουν βρεθεί συνολικά δεκαέξι παθογόνες μεταλλάξεις. Οι δεκατρείς από αυτές αφορούν ασθένειες που σχετίζονται με κώφωση και απώλεια ακοής και βρέθηκαν στο 12S rRNA. Τρεις μεταλλάξεις έχουν βρεθεί στο 16S rRNA, η C2835T, η οποία έχει σχετισθεί με σύνδρομο Rett, η C3039G η οποία



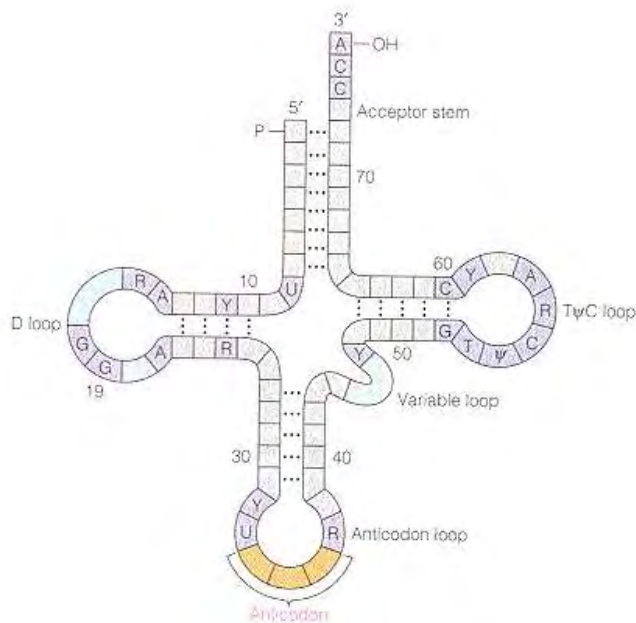
αναφέρθηκε σε μια μελέτη για την ασθένεια MELAS και η G3196A, που σχετίζεται με τη νόσο Alzheimer και Parkinson.

Σήμερα το μεγαλύτερο ενδιαφέρον των επιστημόνων συγκεντρώνουν τα mt-tRNAs εξαιτίας της ανακάλυψης μεγάλου αριθμού σημειακών μεταλλάξεων στα γονίδια που τα κωδικοποιούν και της συσχέτισης αυτών των μεταλλάξεων με νευρομυϊκές και νευροεκφυλιστικές διαταραχές. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι στα tRNA γονίδια του μιτοχονδρίου, αν και αποτελούν μόλις το 10% του μιτοχονδριακού γονιδιώματος, συγκεντρώνουν πάνω από τις μισές μεταλλάξεις του mtDNA που έχουν χαρακτηριστεί ως παθογόνες και σχετίζονται με ασθένεια. Μέχρι σήμερα, έχουν εντοπιστεί και χαρακτηριστεί 139 παθογόνες μεταλλάξεις στα 21 από τα 22 tRNA γονίδια (Πίνακας 1). Η μόνη εξαίρεση μέχρι στιγμής είναι το γονίδιο tRNA<sup>Arg</sup>. Αξίζει επίσης να αναφερθεί ότι μόνο τρία tRNA γονίδια (tRNA<sup>Leu(UUR)</sup>, tRNA<sup>Lys</sup>, tRNA<sup>Ile</sup>) φέρουν το 50% όλων των γνωστών παθογόνων μεταλλάξεων στον άνθρωπο. Οι περισσότερες παθογόνες μεταλλάξεις έχουν βρεθεί στο γονίδιο tRNA<sup>Leu(UUR)</sup>. Αν και η λευκίνη είναι το πιο συχνά χρησιμοποιούμενο αμινοξύ στα ανθρώπινα μιτοχόνδρια (16%), το κωδικόνιο UUR χρησιμοποιείται λιγότερο συχνά (12%) από το κωδικόνιο CUN (88%). Αυτό ίσως εξηγεί το γεγονός ότι οι μεταλλάξεις στο γονίδιο tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> φαίνεται να είναι λιγότερο θανατηφόρες και πιο κοινές (Nakamura et al., 2000).

Οι περισσότερες μεταλλάξεις των tRNA γονιδίων είναι μεταπτώσεις (αλλαγές βάσεων από πουρίνες σε πουρίνες ή από πυριμιδίνες σε πυριμιδίνες) και έχουν ομοιόμορφη κατανομή στη δομή ενός tRNA (τόσο στους βραχίονες όσο και στις θηλιές) (Εικ.9). Οι μεταλλάξεις μπορεί να προκαλέσουν λάθος στο ενδομοριακό ζευγάρι των βάσεων που συμβαίνει στους βραχίονες, κυρίως εμφανίζονται με τη μορφή C-A ή G-U. Υπάρχει σχεδόν πλήρης απουσία μεταλλάξεων στην περιοχή του αντικωδικονίου, με μόνο τρεις εξαιρέσεις, την T12298C πολυμορφική μετάλλαξη στο γονίδιο tRNA<sup>Leu(CUN)</sup>, την G15990A παθογόνο μετάλλαξη στο tRNA<sup>Pro</sup> γονίδιο και την G611A παθογόνο μετάλλαξη στο tRNA<sup>Phe</sup> γονίδιο. Γνωρίζοντας τον θεμελιώδη ρόλο του αντικωδικονίου είναι κατανοητό γιατί προστατεύεται τόσο πολύ, αφού οι περισσότερες αλλαγές του θα ήταν θανατηφόρες.

**Πίνακας 1.** Παθогόνες και πολυμορφικές σημειακές μεταλλάξεις στα ανθρώπινα μιτοχονδριακά tRNAs γονίδια.

|               | tRNA                     | Παθогόνες Μεταλλάξεις | Πολυμορφικές μεταλλάξεις |
|---------------|--------------------------|-----------------------|--------------------------|
| 1             | tRNA <sup>Leu(UUR)</sup> | 28                    | 7                        |
| 2             | tRNA <sup>Lys</sup>      | 14                    | 9                        |
| 3             | tRNA <sup>Ile</sup>      | 14                    | 7                        |
| 4             | tRNA <sup>Leu(CUN)</sup> | 10                    | 11                       |
| 5             | tRNA <sup>Thr</sup>      | 8                     | 29                       |
| 6             | tRNA <sup>Ser(UCN)</sup> | 7                     | 10                       |
| 7             | tRNA <sup>Phe</sup>      | 7                     | 10                       |
| 8             | tRNA <sup>Val</sup>      | 6                     | 10                       |
| 9             | tRNA <sup>Trp</sup>      | 6                     | 13                       |
| 10            | tRNA <sup>Gly</sup>      | 5                     | 12                       |
| 11            | tRNA <sup>Tyr</sup>      | 4                     | 7                        |
| 12            | tRNA <sup>Pro</sup>      | 4                     | 9                        |
| 13            | tRNA <sup>Asn</sup>      | 4                     | 7                        |
| 14            | tRNA <sup>Gln</sup>      | 3                     | 15                       |
| 15            | tRNA <sup>His</sup>      | 3                     | 11                       |
| 16            | tRNA <sup>Met</sup>      | 3                     | 6                        |
| 17            | tRNA <sup>Ala</sup>      | 3                     | 11                       |
| 18            | tRNA <sup>Ser(AGY)</sup> | 3                     | 13                       |
| 19            | tRNA <sup>Glu</sup>      | 3                     | 9                        |
| 20            | tRNA <sup>Cys</sup>      | 2                     | 16                       |
| 21            | tRNA <sup>Asp</sup>      | 2                     | 11                       |
| 22            | tRNA <sup>Arg</sup>      | 0                     | 9                        |
| <b>Σύνολο</b> |                          | <b>139</b>            | <b>243</b>               |



**Εικόνα 9.** Η δομή του tRNA. Διακρίνεται καθαρά, ο βραχίονας υποδοχής (Acceptor stem) η περιοχή της D θηλιάς (D loop), η περιοχή της TψC θηλιάς (TψC loop), η μεταβλητή θηλιά (Variable loop) καθώς και η περιοχή του αντικωδικόνιου (Anticodon loop). Οι περιοχές μεταξύ των θηλιών ονομάζονται βραχίονες. Έτσι διακρίνεται ο D βραχίονας, ο TψC βραχίονας και ο βραχίονας του αντικωδικόνιου.

Παρά τον μεγάλο αριθμό των μεταλλάξεων στα tRNA γονίδια που έχουν σχετισθεί με ασθένειες, μόνο το 20% έχει αποδειχθεί χωρίς αμφιβολία ότι προκαλεί νόσο. Το 77% των μεταλλάξεων αναφέρονται στο *mitomap* ως πιθανά παθογόνες, ενώ το 4% αυτών, δεν είναι ξεκάθαρο αν ανήκουν στις παθογόνες μεταλλάξεις ή στους πολυμορφισμούς. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι οι μεταλλάξεις του μιτοχονδριακού DNA μπορούν να δημιουργούνται αυθόρμητα σε μεγάλη συχνότητα και οι περισσότερες αλλαγές του γονιδιώματος είναι ουδέτεροι πολυμορφισμοί χωρίς κλινική σημασία. Γι' αυτό έχουν δημιουργηθεί ορισμένοι κανόνες σύμφωνα με τους οποίους αποδεικνύεται η παθογένεια μίας νέας μετάλλαξης του μιτοχονδριακού DNA. Πρώτον, η μετάλλαξη δεν θα πρέπει να είναι παρούσα σε υγιή άτομα του ίδιου εθνικού υπόβαθρου. Δεύτερον, η μετάλλαξη θα πρέπει να δημιουργεί αλλαγές σε ένα τμήμα του μιτοχονδριακού DNA το οποίο είναι συντηρητικό στην εξέλιξη και κατά συνέπεια σημαντικό λειτουργικά. Τρίτον, θα πρέπει να δημιουργεί μία ή περισσότερες βλάβες στην ενζυμική αλυσίδα της αναπνοής ή βλάβες στη σύνθεση των μιτοχονδριακών πρωτεϊνών. Τέταρτον, θα πρέπει να υπάρχει συσχέτιση μεταξύ του βαθμού της

ετεροπλασμίας και της βαρύτητας της κλινικής εικόνας, καθώς και συσχέτιση μεταξύ του βαθμού της ετεροπλασμίας και της κυτταρικής παθολογίας (DiMauro et al., 2005). Το τελευταίο κριτήριο πάντως, δεν είναι τόσο ισχυρό, αφού ο συσχετισμός δεν είναι πάντα τόσο αντιπροσωπευτικός. Επίσης, παρατηρούνται αλληλεπιδράσεις των πυρηνικών γονιδίων με περιβαλλοντικούς παράγοντες οι οποίοι επηρεάζουν τη βαρύτητα της νόσου.

## Συσχέτιση μεταξύ γονότυπου και κλινικού φαινοτύπου

Στις μιτοχονδριακές ασθένειες η σχέση μεταξύ γονότυπου και κλινικού φαινοτύπου είναι περίπλοκη. Οι φαινότυποι που σχετίζονται με παθογόνες μεταλλάξεις είναι πολυάριθμοι και η ίδια μετάλλαξη μπορεί να οδηγήσει σε διαφορετικούς φαινοτύπους, ενώ ο ίδιος φαινότυπος μπορεί να σχετίζεται με διαφορετικές μεταλλάξεις. Για παράδειγμα, η μετάλλαξη A3243G στο γονίδιο tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> σχετίζεται κυρίως με το σύνδρομο MELAS (μιτοχονδριακή εγκεφαλοπάθεια, γαλακτική οξείδωση και εγκεφαλικά επεισόδια), μπορεί όμως να προκαλέσει και το σύνδρομο MERRF (μυοκλωνική επιληψία με ανώμαλες ερυθρές μυϊκές ίνες), το σύνδρομο Leigh, καρδιομυοπάθεια, διαβήτη, κώφωση ή εξωτερική οφθαλμοπληγία. Παράλληλα, ο φαινότυπος του συνδρόμου MELAS εκτός της A3243G έχει σχετισθεί με πολλές άλλες tRNA σημειακές μεταλλάξεις, όπως η G3244A, A3252G, G3256T, A3258C, T3271C και η T3291C στο γονίδιο tRNA<sup>Leu(UUR)</sup>, η G1642A και η G1644A στο γονίδιο tRNA<sup>Val</sup>, η G4332A στο γονίδιο tRNA<sup>Gln</sup> και η T8316C στο γονίδιο tRNA<sup>Lys</sup>. Επίσης η ίδια tRNA μετάλλαξη μπορεί να προκαλέσει ασθένεια στα μέλη μιας οικογένειας, ενώ να μην έχει καμία κλινική εικόνα σε μια άλλη οικογένεια. Συνεπώς η ίδια η μετάλλαξη μπορεί να μην καθορίζει από μόνη της τον φαινότυπο, αλλά αυτός να εξαρτάται και από τα ειδικά χαρακτηριστικά των μιτοχονδρίων, δηλαδή το επίπεδο της ετεροπλασμίας και τον μιτωτικό διαχωρισμό (Schon et al., 2000).

Το μιτοχονδριακό γονιδίωμα, όπως έχει ήδη αναφερθεί, είναι πολυποειδές με πολλαπλά αντίγραφα του mtDNA μέσα σε κάθε μιτοχόνδριο και εκατοντάδες μιτοχόνδρια μέσα σε κάθε κύτταρο. Στους φυσιολογικούς ιστούς όλα τα mtDNAs μέσα στα κύτταρα είναι πανομοιότυπα, μια κατάσταση που ονομάζεται **ομοπλασμία**. Οι παθογόνες μεταλλάξεις συνήθως προσβάλουν μερικά, αλλά όχι όλα τα mtDNAs μέσα σε ένα κύτταρο, έναν ιστό ή ένα άτομο. Η συνύπαρξη φυσιολογικού (αγρίου τύπου) και μεταλλαγμένου mtDNA μέσα στο ίδιο μιτοχόνδριο, κύτταρο, όργανο ή άτομο σε

διάφορες αναλογίες ονομάζεται **ετεροπλασμία**. Το επίπεδο της ετεροπλασμίας παίζει έναν σημαντικό ρόλο στον καθορισμό του κλινικού φαινοτύπου μιας ασθένειας. Αν η μετάλλαξη είναι παθογόνος η αναλογία μεταλλαγμένων μορίων σε έναν ετεροπλασμικό πληθυσμό επηρεάζει την εξέλιξη και τη σοβαρότητα της βιοχημικής βλάβης. Ο φαινότυπος της ασθένειας εκφράζεται μόνο όταν το ποσοστό μεταλλαγμένου mtDNA ξεπεράσει κάποιο σχετικό όριο. Για παράδειγμα, αν το ποσοστό της μετάλλαξης A3243G του tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> είναι λιγότερο από 60% στους μύες τότε εμφανίζονται ήπια συμπτώματα της ασθένειας PEO (progressive external ophthalmoplegia), ενώ αν το επίπεδο της μετάλλαξης είναι πάνω από 80%, τότε εμφανίζεται το σύνδρομο MELAS.

Επιπλέον, το επίπεδο μιας μετάλλαξης μπορεί να διαφέρει και μέσα στο ίδιο το κύτταρο, επηρεάζοντας τον φαινότυπό του. Όταν μια μυϊκή ίνα περιέχει 50% μεταλλαγμένα μιτοχόνδρια, φαίνεται να είναι μορφολογικά και βιοχημικά φυσιολογική, αυτό συμβαίνει στις μυϊκές ίνες ενός ασθενή με σύνδρομο MELAS αλλά και στην ηπιότερης μορφής ασθένειας PEO. Όταν οι μυϊκές ίνες περιέχουν πάνω από 90% μεταλλαγμένα μιτοχόνδρια έχουν την εμφάνιση ανώμαλων ερυθρών ινών (RRF: ragged red fibers).

Τα ακριβή όρια της βιοχημικής έκφρασης διαφέρουν από μετάλλαξη σε μετάλλαξη και από ιστό σε ιστό (Chinnery et al., 1997; White et al., 1999).

Συνήθως οι παθογόνες μεταλλάξεις είναι ετεροπλασμικές, παρόλα αυτά πολλοί κλινικοί φαινότυποι οφείλονται σε ομοπλασμία. Οι περισσότερες μορφές κώφωσης οφείλονται σε ομόπλασμες μεταλλάξεις, συμπεριλαμβανομένης της A7445G και της T7511C του γονιδίου tRNA<sup>Ser(UCN)</sup> (Sue et al., 1999). Επίσης, η κληρονομούμενη από τη μητέρα υπερτροφική καρδιομυοπάθεια έχει σχετισθεί με ομοπλασμία της μετάλλαξης A4300G του γονιδίου tRNA<sup>Ile</sup> (Taylor et al., 2003), το μητρικά κληρονομούμενο μεταβολικό σύνδρομο (δυσλιπιδαιμία, υπέρταση, υπομαγνησαιμία, αντίσταση στην ινσουλίνη) αποδίδεται στην ομόπλασμη T4291C μετάλλαξη του γονιδίου tRNA<sup>Ile</sup> (Wilson et al., 2004) και εξαιτίας της ομόπλασμη μετάλλαξης C1624T στο γονίδιο tRNA<sup>Val</sup> έχουν προκληθεί πολυάριθμοι νεογνικοί θάνατοι καθώς και το σύνδρομο LS (McFarland et al., 2002).

Η φαινοτυπική έκφραση των ομοπλασμικών μεταλλάξεων ποικίλει μεταξύ διαφορετικών οικογενειών ή και διαφορετικών μελών της ίδιας οικογένειας. Αυτό εξηγείται από το γεγονός ότι ο φαινότυπος επηρεάζεται και από περιβαλλοντικούς

αλλά και από άλλους γενετικούς παράγοντες. Για παράδειγμα, περιβαλλοντικοί παράγοντες, όπως η έκθεση σε αμινογλυκοσίδια (amisoglycosides) μπορεί να επιταχύνει την κώφωση (Estivill et al., 1998). Επίσης άλλοι γενετικοί παράγοντες, π.χ. συμπληρωματικές mtDNA μεταλλάξεις ή μεταλλάξεις του πυρηνικού γενετικού υλικού επηρεάζουν την φαινοτυπική έκφραση. Για παράδειγμα, μια οικογένεια στη Νέα Ζηλανδία παρουσίαζε μεγαλύτερη συχνότητα κώφωσης από μια οικογένεια στη Σκωτία καθώς είχε τρεις πολυμορφισμούς παραπάνω στα ND μιτοχονδριακά γονίδια (Fischel-Ghodsian et al., 1998).

Επίσης, ο φαινότυπος ενός ασθενή μπορεί να επηρεαστεί κατά τη διάρκεια της ζωής του και από τον μιτωτικό διαχωρισμό. Κατά την κυτταρική διαίρεση, η αντιγραφή του mtDNA και η κληρονομικότητά του σε γενετικά και σωματικά κύτταρα είναι τυχαία, οδηγώντας τις περισσότερες φορές κατά τη διάρκεια της ζωής ενός ασθενή σε αλλαγή της αναλογίας των μεταλλαγμένων μορίων, σε διαφορετικά κύτταρα και ιστούς. Αυτό το φαινόμενο καλείται **μιτωτικός διαχωρισμός** και εξηγεί πώς ορισμένοι ασθενείς μπορούν να μεταβούν από έναν κλινικό φαινότυπο σε έναν άλλο καθώς μεγαλώνουν. Ο μιτωτικός διαχωρισμός μπορεί να συμβεί κατά τη διάρκεια της γαμετογένεσης, της διαίρεσης των σωματικών κυττάρων και επίσης κατά την ογκογένεση.

Συμπερασματικά, ένας συγκεκριμένος κλινικός φαινότυπος είναι προϊόν αλληλεπίδρασης του επιπέδου της ετεροπλασμίας και της κατανομής των μεταλλαγμένων γονιδιωμάτων μέσα σε ένα κύτταρο, ιστό, όργανο ή άτομο. Ωστόσο, οι μύες, η καρδιά και ο εγκέφαλος είναι προφανώς πλήρως εξαρτημένοι από τη διαδικασία της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης και την παραγωγή ενέργειας, γι' αυτό και είναι περισσότερο εκτεθειμένοι σε σχέση με άλλους ιστούς, ακόμα και αν το επίπεδο της μετάλλαξης είναι σχετικά χαμηλό. Επιπλέον, ο κλινικός φαινότυπος των περισσότερων ασθενειών δεν είναι απλά μια συνέπεια της σχετικής απουσίας μεταλλαγμένου mtDNA. Υπάρχουν και άλλοι παράγοντες, όπως μεταλλάξεις του πυρηνικού γενετικού υλικού, η ηλικία, το φύλο και το περιβάλλον, που συμβάλλουν στην εξέλιξη της ασθένειας, οδηγώντας σε μια ευρεία ποικιλία φαινοτύπων, οι οποίοι προκαλούνται από την ίδια μετάλλαξη.

## Κλινικοί φαινότυποι των μιτοχονδριακών tRNA μεταλλάξεων

Μεταλλάξεις στα mt-tRNAs σχετίζονται με ποικίλες ανθρώπινες ασθένειες, οι οποίες προκαλούνται από μιτοχονδριακή δυσλειτουργία. Οι tRNA μεταλλάξεις είναι υπεύθυνες για την εμφάνιση ορισμένων συνδρόμων, όπως το σύνδρομο MELAS (μιτοχονδριακή εγκεφαλομυοπάθεια, γαλακτική οξέωση, εγκεφαλικά επεισόδια) εντοπίζεται σε μεγαλύτερο ποσοστό η ετεροπλασμική (85% στους μύες και 61% στο αίμα) μετάλλαξη A3243G στο γονίδιο tRNA<sup>Leu(UUR)</sup>. Το σύνδρομο Kearns Sayre (KSS) (οφθαλμοπληγία), το οποίο προκαλείται από μεγάλες ελλείψεις ζευγών βάσεων στο mtDNA, αλλά και από τη σημειακή μετάλλαξη G3249A στο γονίδιο tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> (Seneca et al., 2001). Η χρόνια προοδευτική εξωτερική οφθαλμοπληγία (CPEO) έχει σχετισθεί με τη μετάλλαξη A3243G του γονιδίου tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> (Koga et al., 2000; Hansrote et al., 2002). Το σύνδρομο MERRF (μυοκλονική επιληψία με ανώμαλες ερυθρές μυϊκές ίνες), στο οποίο η πιο συχνή μετάλλαξη είναι η A8344G που εντοπίζεται στο γονίδιο tRNA<sup>Lys</sup> και βρίσκεται συνήθως σε ετεροπλασμία.

Πρόσφατα, αρκετές σημειακές μεταλλάξεις σε mt-tRNA γονίδια έχουν βρεθεί και σε διάφορες κοινές ασθένειες όπως ο διαβήτης, σε νευροεκφυλιστικές ασθένειες (Alzheimer, Parkinson, σκλήρυνση κατά πλάκας), σε μη συνδρομική κώφωση, καρδιομυοπάθειες, σε μυοσφαιριναιμία και αυτισμό (Hutchin et al., 1995; Tysoe et al., 1996; Egensperger et al., 1997; Cavelier et al., 2001; Zhang et al., 2009).

## Μιτοχονδριακές αλλαγές και Άσθμα

Η αναποτελεσματικότητα των συμπλόκων της αναπνευστικής αλυσίδας του μιτοχονδρίου οδηγεί σε διαταραχές που οφείλονται σε ενεργειακά προβλήματα. Οι μιτοχονδριακές διαταραχές εξαιτίας μιας ελαττωματικής αναπνευστικής αλυσίδας συχνά φανερώνουν πολυπαραγοντικές ασθένειες, όπως το άσθμα. Πολλές μελέτες έχουν συσχετίσει ελαττωματικά σύμπλοκα της αναπνευστικής αλυσίδας με το άσθμα.

Επίσης, η αναπνευστική μεταφορά των ηλεκτρονίων είναι αποτελεσματική μόνο κατά 95-98 % και η απώλεια ενός μονήρους ηλεκτρονίου από το μόριο του οξυγόνου σχηματίζει την ελεύθερη ρίζα με αποτέλεσμα τη βλάβη των κυττάρων. Συνεπώς, τα μιτοχόνδρια είναι η κύρια πηγή ελεύθερων ριζών του κυττάρου. Οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου όταν διατηρούνται σε χαμηλά επίπεδα, δεν μπορούν να

προκαλέσουν βλάβη στο μιτοχονδριακό γενετικό υλικό, εξαιτίας των ενδομιτοχονδριακών αντιοξειδωτικών μηχανισμών άμυνας (πχ, UCPs, thiol switching) (Jessica Gutierrez et al., 2006). Επίσης, ένας άλλος μηχανισμός άμυνας από τη συσσώρευση ελευθέρων ριζών οξυγόνου όταν παρατηρούνται σε χαμηλές συγκεντρώσεις είναι και η απόπτωση του κυττάρου, διαδικασία στην οποία κύριο ρόλο παίζουν τα μιτοχόνδρια. Έτσι, το μιτοχόνδριο αν και αποτελεί την κύρια πηγή ROS αποτελεί, παράλληλα, και τον βασικό προστάτη του κυττάρου και ολόκληρου του οργανισμού από τις ελεύθερες ρίζες.

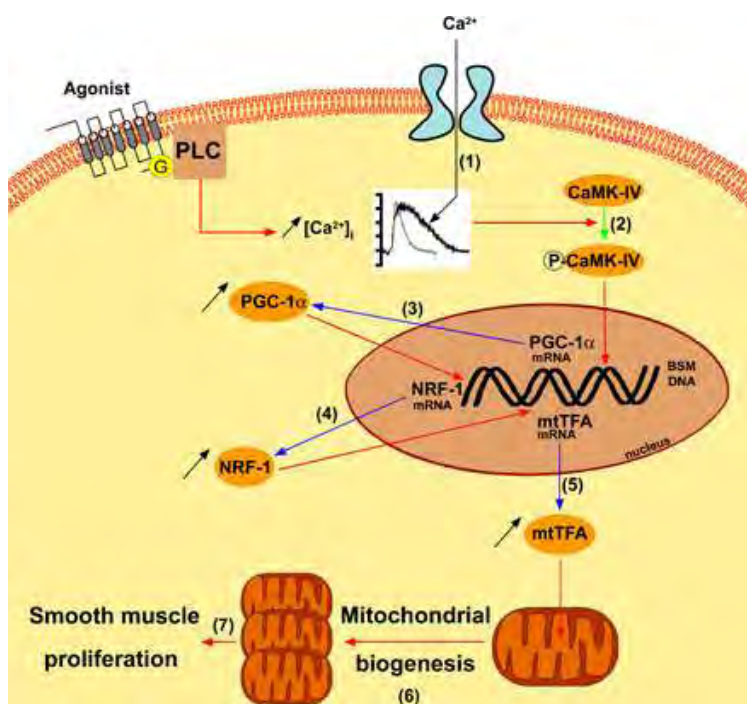
Μια ανώμαλη, όμως, λειτουργία των μιτοχονδρίων μπορεί να προκαλέσει την υπερέκκριση των ελευθέρων ριζών οξυγόνου η οποία διαδοχικά μπορεί να οδηγήσει σε φλεγμονή, σε στρατολόγηση των ενεργών ανοσοποιητικών κυττάρων από χημειοτακτικούς παράγοντες και σε μια αυξημένη παραγωγή προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών (Barnes PJ, 1990; Martinez et al., 1996). Αυτά τα χαρακτηριστικά είναι και τα κύρια χαρακτηριστικά της φλεγμονώδους αντίδρασης του βρογχικού άσθματος. Η διαδικασία αυτή θα οδηγήσει στην απόπτωση των κυττάρων του βρογχικού επιθηλίου των αεραγωγών των πνευμόνων και στην ανώμαλη επαναδόμησή του (remodeling).

Κατά την ανώμαλη επαναδόμηση του βρογχικού επιθηλίου στους ασθματικούς ασθενείς, τα κύτταρα των λείων μυών των αεραγωγών χαρακτηρίζονται από υπερβολικό πολλαπλασιασμό, με αποτέλεσμα την αύξηση του όγκου των λείων μυών των βρόγχων. (Trian et al., 2007). Η συσχέτιση της αυξημένης μάζας των λείων βρογχικών μυών και της μειωμένης λειτουργίας του πνεύμονα έχει αποδειχθεί και σε άλλες μελέτες (Pepe et al., 2005; Hogg et al., 2004), οι οποίες επίσης θέτουν αυτή την αύξηση ως την πιο σημαντική ανωμαλία, υπεύθυνη για τη στένωση των αεραγωγών (Lambert et al., 1993). Στο άσθμα τα κύτταρα των λείων βρογχικών μυών εκτός από τον υπερβολικό πολλαπλασιασμό (Johnson et al., 2001; Roth et al., 2004; Ramos-Barbon et al., 2005) χαρακτηρίζονται και από μειωμένη απόπτωση, κάτι που έχει επίσης αποδειχθεί σε πειράματα με ποντίκια (Ramos-Barbon et al., 2005).

Τα μιτοχόνδρια έχοντας ένα σημαντικό ρόλο στην απόπτωση, είναι πιθανή η συμβολή τους στην επαναδιαμόρφωση του βρογχικού επιθηλίου σε ασθενείς με άσθμα. Για την απόδειξη αυτής της υπόθεσης ο Trian και οι συνεργάτες του (Trian et al., 2007) συγκρίνανε τον αριθμό των μιτοχονδρίων, τη λειτουργία τους και τη βιογένεσή τους σε ασθενείς με άσθμα, σε ασθενείς με χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια (ΧΑΠ) και σε



φυσιολογικούς. Η έρευνα αυτή αποκάλυψε μια αυξημένη μιτοχονδριακή μάζα και κατανάλωση οξυγόνου στα λεία βρογχικά κύτταρα των ασθενών με άσθμα, κάτι που δεν παρατηρήθηκε στους ασθενείς με ΧΑΠ και στους φυσιολογικούς. Επίσης η μιτοχονδριακή βιογένεση εμφανίστηκε αυξημένη στους ασθενείς με άσθμα μέσω ενός ασβεστίο-εξαρτώμενου μονοπατιού. Δηλαδή μια αυξημένη εξωκυτταρική εισροή ασβεστίου, που είναι ιδιαίτερο χαρακτηριστικό των λείων βρογχικών κυττάρων των ασθματικών ασθενών, οδηγεί, μέσω διαδοχικών βημάτων όπως φαίνονται στην Εικόνα 10, σε μια αύξηση της βιογένεσης και της μάζας των μιτοχονδρίων. Επίσης, οι επιστήμονες έδειξαν ότι αν μπλοκάρουν αυτή την εισροή ασβεστίου, τότε μειώνεται η μιτοχονδριακή βιογένεση και ο πολλαπλασιασμός των λείων μυϊκών κυττάρων. Με άλλα λόγια οι λείοι βρογχικοί μύες στους ασθενείς με άσθμα χαρακτηρίζονται από μια μεταβολή στην ομοιόσταση του ασβεστίου που οδηγεί στην αύξηση της μιτοχονδριακής βιογένεσης, η οποία με τη σειρά της αυξάνει τον πολλαπλασιασμό των λείων μυϊκών κυττάρων, οδηγώντας στην επαναδιαμόρφωση (remodeling) των αεραγωγών (Εικ.10).



**Εικόνα 10.** Ο μηχανισμός του πολλαπλασιασμού των λείων βρογχικών μυών στο άσθμα. (1) Εισροή εξωκυτταρικού ασβεστίου, ενεργοποιεί την φωσφορυλίωση της κινάσης CaMK-IV(2), η οποία επάγει τη μεταγραφή των μεταγραφικών παραγόντων PGC-1α(3), NRF-1(4), mtTFA (mitochondrial transcriptional factor A – μιτοχονδριακός μεταγραφικός παράγοντας A) (5). Ο παράγοντας mtTFA, ενεργοποιεί τη βιογένεση των μιτοχονδρίων (6), η οποία αυξάνει τον πολλαπλασιασμό των λείων βρογχικών μυών (7). Τα κόκκινα βέλη δηλώνουν ενεργοποίηση, τα πράσινα φωσφορυλίωση και τα μπλε μετάφραση. (Πηγή: Trian et al., 2007)

Παράλληλα, ο Mabalirajan και οι συνεργάτες του (Ulaganathan Mabalirajan et al., 2008) σε πειράματα που έκαναν σε αλφικά BALB/c ποντίκια με αλλεργικό άσθμα παρατήρησαν στα κύτταρα του βρογχικού επιθηλίου, εκτός από τον αυξημένο αριθμό μιτοχονδρίων και δομικές αλλαγές των μιτοχονδρίων καθώς και δυσλειτουργία. Κατά τη διεξαγωγή του πειράματος ανακάλυψαν ότι οι ελεύθερες οξειδωτικές ρίζες, οι οποίες είναι χαρακτηριστικές της παθογένειας του άσθματος, επηρεάζουν πρωτίστως την οξειδάση του κυτοχρώματος c καταστρέφοντας το κέντρο της αίμης και το κέντρο του χαλκού του ενζύμου. Η οξειδάση του κυτοχρώματος c είναι ένα πολύ σημαντικό ένζυμο των μιτοχονδρίων, αφού καταλύει τη μεταφορά ηλεκτρονίων στη σύνθεση του ATP μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης και καταναλώνει το περισσότερο κυτταρικό οξυγόνο (Capaldi, R.A. 1992). Από τις 13 υπομονάδες του ενζύμου, η καταλυτική του δραστηριότητα καθορίζεται από τρεις υπομονάδες, οι οποίες όλες κωδικοποιούνται από τα μιτοχόνδρια (Capaldi, R.A. 1992). Με βάση τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν στην έρευνα αυτή βρέθηκε ότι το οξειδωτικό στρες επηρεάζει κυρίως την τρίτη υπομονάδα, η οποία είναι υπεύθυνη για τη σταθεροποίηση ολόκληρου του συμπλόκου (You et al., 2002). Αν και το κυτόχρωμα c συμμετέχει στη διαδικασία της απόπτωσης, μιας βασικής λειτουργίας του μιτοχονδρίου και το μιτοχόνδριο είναι η κύρια πηγή ελευθέρων ριζών, δεν είναι εντελώς ξεκάθαρος ο ρόλος του μιτοχονδρίου στη διαδικασία αυτή. Στην έρευνα αυτή, φάνηκε επίσης ότι η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία στο πειραματικό αλλεργικό άσθμα είναι IL-4 εξαρτώμενη.

Γενικά οι μιτοχονδριακές βλάβες και αλλαγές στη λειτουργία που παρατηρήθηκαν είναι:

- μείωση της ενεργότητας της οξειδάσης του κυτοχρώματος c στα μιτοχόνδρια των πνευμόνων
- μείωση της έκφρασης της υπομονάδας III της οξειδάσης του κυτοχρώματος c στο βρογχικό επιθήλιο
- εμφάνιση του κυτοχρώματος c στο κυτταρικό κυτταρόπλασμα των πνευμόνων
- μείωση των επιπέδων ATP στον πνεύμονα
- μείωση της έκφρασης της υπομονάδας των 17 kDa του complex I της αναπνευστικής αλυσίδας στο βρογχικό επιθήλιο, όπου σε συνδυασμό με τη μείωση του ATP, δείχνει

την πιθανή βλάβη σε λειτουργίες που σχετίζονται με την ενέργεια στο βρογχικό επιθήλιο.

Οι μιτοχονδριακές υπερδομικές (ultrastructural) αλλαγές που παρατηρήθηκαν είναι:

- απώλεια των ακρολοφιών (cristae) της εσωτερικής μεμβράνης
- απώλεια της ικανότητας διόγκωσης του μιτοχονδρίου (η οποία συμβαίνει κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες).

Σε μια άλλη έρευνα, ο Roth και οι συνεργάτες του (Roth et al., 2009) υποθέτουν ότι η αιτία της επαναδιαμόρφωσης, μπορεί να προέρχεται από ένα λάθος στη μεταγραφή του μιτοχονδριακού DNA. Η μεταγραφή ξεκινά με τη δέσμευση της RNA-πολυμεράσης στη θέση έναρξης της μεταγραφής, στον υποκινητή (promoter) του γονιδίου. Στους υποκινητές δεσμεύονται και διάφοροι μεταγραφικοί παράγοντες, οι οποίοι είναι ειδικές πρωτεΐνες απαραίτητες για την έναρξη της μεταγραφής. Συγκεκριμένα, σύμφωνα με την έρευνα αυτή, η ανεπαρκής έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα C/EBP- $\alpha$  (CAAT-box/Enhancer Binding Protein) (Roth et al., 2004; Borger et al., 2007) οδηγεί σε αυξημένο πολλαπλασιασμό των λείων βρογχικών μυϊκών κυττάρων και σε συνδυασμό με τα υπεράριθμα ελαττωματικά μιτοχόνδρια (Trian et al., 2007), αποτελεί μια εξήγηση των τροποποιημένων λείων μυών των αεραγωγών που παρατηρούνται σε ασθενείς με άσθμα. Ο υποκινητής των μιτοχονδριακών γονιδίων πιθανόν είναι η αλληλουχία CCAAT. Η αλληλουχία αυτή αποτελεί μια περιοχική δέσμευσης, όπου δεσμεύονται διάφοροι γενικοί μεταγραφικοί παράγοντες, όπως ο C/EBP. Μια πιθανή συμμετοχή των μιτοχονδρίων με έναν απορυθμισμένο C/EBP στην παθοφυσιολογία του άσθματος και η αποδεδειγμένη ύπαρξη υπεράριθμων μιτοχονδρίων στα κύτταρα των λείων μυών των αεραγωγών σε ασθενείς με άσθμα σύμφωνα με την έρευνα αυτή ίσως έχουν κοινή αιτία (Roth et al., 2009).

### **Αλλαγές στο μιτοχονδριακό γενετικό υλικό σε περιπτώσεις άσθματος**

Σε μια έρευνα (Alan Shanske et al., 1993) ένα εννιάχρονο αγόρι με σοβαρό χρόνιο άσθμα και κατάθλιψη βρέθηκε να έχει μη φυσιολογικά μιτοχόνδρια, ελαττωματικά ένζυμα της αναπνευστικής αλυσίδας και τη σημειακή μετάλλαξη του συνδρόμου MELAS (A3243G) στο tRNA<sup>Leu(UUR)</sup>, χωρίς όμως τα κλινικά συμπτώματα της ασθένειας. Η μυϊκή βιοψία έδειξε την ύπαρξη ανώμαλων ερυθρών μυϊκών ινών (RRF), αυξημένη ενζυματική δραστηριότητα και αυξημένο αριθμό μιτοχονδρίων με

ελαττωματική δομή. Βιοχημικές αναλύσεις έδειξαν στοιχεία που υποδηλώνουν τον πολλαπλασιασμό των μιτοχονδρίων και οι μοριακές αναλύσεις έδειξαν ότι ο ασθενής είχε 83% μεταλλαγμένα μιτοχόνδρια στους μύες. Αυτή η μετάλλαξη, μπορεί να είναι κοινή σε ασθενείς με τυπικό φαινότυπο MELAS, αλλά η έρευνα προτείνει ότι θα πρέπει να εξετάζεται γενικότερα σε ασθενείς με μυοπάθειες και εγκαφαλοπάθειες, μιας και έχει βρεθεί σε πολλές ασθένειες που σχετίζονται με μιτοχονδριακή δυσλειτουργία σε ιστούς που έχουν ανάγκη μεγάλα ποσά ενέργειας.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει μια έρευνα, η οποία συσχετίζει την κληρονομικότητα του άσθματος με τα μιτοχονδριακά γονίδια και το επίπεδο της IgE (Raby et al., 2007). Σύμφωνα με την έρευνα αυτή μια κοινή μιτοχονδριακή απλοομάδα (haplogroup) σχετίζεται με αυξημένα επίπεδα ολικής IgE στον ορό του αίματος, ένα από τα βασικά χαρακτηριστικά του άσθματος. Κοινοί μιτοχονδριακοί του ενός νουκλεοτιδίου πολυμορφισμοί (mtSNPs) μπορούν ευρέως να οργανωθούν σε μιτοχονδριακές απλοομάδες, που μοιράζονται έναν κοινό πρόγονο και κληρονομούνται από τη μητέρα. Σε πληθυσμούς της Ευρώπης έχουν βρεθεί και χαρακτηριστεί γενεαλογικά 9 τέτοιες απλοομάδες και έχουν σχετισθεί με ασθένειες. Αυτά τα πολύ πρόσφατα δεδομένα προτείνουν ότι κοινές παραλλαγές (variations) της μιτοχονδριακής αλληλουχίας μπορεί να επηρεάζουν κοινές αλλά πολύπλοκες ασθένειες, όπως το άσθμα. Με βάση ισχυρές επιδημιολογικές παρατηρήσεις της επικρατούς μητρικής προέλευσης του άσθματος και της ευαισθησίας στην αλλεργία, υπάρχουν ενδείξεις ότι τέτοιοι κοινοί πολυμορφισμοί στην αλληλουχία του mtDNA επηρεάζουν την ανάπτυξη ατοπικών φαινοτύπων. Ο έλεγχος για το αν κοινές μιτοχονδριακές γενετικές αποκλίσεις επηρεάζουν την ανάπτυξη άσθματος έγινε σε μια καλά χαρακτηρισμένη ομάδα 654 λευκών παιδιών από 5 έως 12 ετών με ήπιο έως και μέτριας έντασης άσθμα, υπό τη διεξαγωγή του Προγράμματος Διαχείρισης του Παιδικού Άσθματος στη Ευρώπη (CAMP-Childhood Asthma Management Program). Κατά τον ποιοτικό έλεγχο του γονότυπου των παιδιών βρέθηκαν 8 μιτοχονδριακοί του ενός νουκλεοτιδίου πολυμορφισμοί (mtSNPs) (Πίνακας 2).

**TABLE I.** Results of genotype quality control analysis for mitochondrial SNP

| MtSNP       | MAF   | Genotype completion rate | Genotype discordances (n = 276) | Mother-child discordances (n = 687) |
|-------------|-------|--------------------------|---------------------------------|-------------------------------------|
| mt1719 G>A  | 0.064 | 0.98                     | 0                               | 0                                   |
| mt4580 G>A  | 0.044 | 0.99                     | 0                               | 0                                   |
| mt7028 T>C  | 0.400 | 0.99                     | 0                               | 5 (0.72%)                           |
| mt8251 G>A  | 0.056 | 0.98                     | 0                               | 0                                   |
| mt9055 G>A  | 0.089 | 0.95                     | 0                               | 1 (0.15%)                           |
| mt10398 A>G | 0.206 | 0.97                     | 0                               | 2 (0.30%)                           |
| mt12308 A>G | 0.219 | 0.99                     | 0                               | 1 (0.43%)                           |
| mt13368 G>A | 0.102 | 0.98                     | 0                               | 0                                   |
| Overall     | N/A   | 0.98                     | 0                               | 11 (0.18%)                          |

**Πίνακας 2.** Αποτελέσματα της γονοτυπικής ανάλυσης για μιτοχονδριακούς του ενός νουκλεοτιδίου πολυμορφισμούς (mtSNPs).

Στην έρευνα αυτή βρέθηκαν 11 απλοομάδες σε συχνότητα μεγαλύτερη από 0,01%. Οι μιτοχονδριακές απλοομάδες παρατίθενται στον Πίνακα 3.

**TABLE II.** Mitochondrial haplogroup frequencies in CAMP\*

| Haplogroup | MtSNP      |            |            |            |            |             |             |             | CAMP            |                            |                            |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|-------------|-------------|-------------|-----------------|----------------------------|----------------------------|
|            | mt1719 G>A | mt4580 G>A | mt7028 T>C | mt8251 G>A | mt9055 G>A | mt10398 A>G | mt12308 A>G | mt13368 G>A | White (n = 950) | African American (n = 128) | Hispanic American (n = 94) |
| H          | G          | G          | C          | G          | G          | A           | A           | G           | 0.396           | 0.031                      | 0.043                      |
| I          | A          | •          | T          | A          | •          | G           | •           | •           | 0.026           | 0.016                      | —                          |
| J          | •          | •          | T          | •          | •          | G           | •           | •           | 0.117           | 0.873                      | 0.183                      |
| K          | •          | •          | T          | •          | A          | G           | G           | •           | 0.063           | —                          | —                          |
| K2         | •          | •          | T          | •          | A          | •           | G           | •           | 0.021           | —                          | —                          |
| T          | •          | •          | T          | •          | •          | •           | •           | A           | 0.100           | —                          | —                          |
| U          | •          | •          | T          | •          | •          | •           | G           | •           | 0.130           | 0.016                      | 0.085                      |
| V          | •          | A          | T          | •          | •          | •           | •           | •           | 0.043           | —                          | —                          |
| W          | •          | •          | T          | A          | •          | •           | •           | •           | 0.015           | —                          | —                          |
| X          | A          | •          | T          | •          | •          | •           | •           | •           | 0.025           | —                          | 0.011                      |
| Z          | •          | •          | T          | •          | •          | •           | •           | •           | 0.039           | 0.024                      | 0.667                      |

**Πίνακας 3.** Οι μιτοχονδριακές απλοομάδες και οι συχνότητές τους στο Πρόγραμμα Διαχείρισης του Παιδικού Άσθματος στην Ευρώπη.

Κατά τη διεξαγωγή της πειραματικής διαδικασίας μετρήθηκαν τα επίπεδα της ολικής IgE ορού, η αντιδραστικότητα σε δερματικά τεστ, το επίπεδο των ηωσινόφιλων στον ορό του αίματος, η βρογχική υπεραντιδραστικότητα και η λειτουργία του πνεύμονα στις έντεκα αυτές απλοομάδες (H, I, J, K, K2, T, U, V, W, X, Z). Η έρευνα παρουσίασε ισχυρές αποδείξεις ότι μια μιτοχονδριακή απλοομάδα (haplogroup) σχετίζεται με υψηλά επίπεδα ολικής IgE ορού. Συγκεκριμένα, τα άτομα που ανήκαν στην κοινή απλοομάδα U είχαν 78% υψηλότερα επίπεδα της ολικής IgE ορού σε σχέση με τα άτομα που ανήκαν στις άλλες απλοομάδες. Επίσης παρατηρήθηκε αυξημένη αντιδραστικότητα στα δερματικά τεστ και ένα ιστορικό ατοπικής δερματίτιδας. Όλα αυτά τα ευρήματα δείχνουν ότι η μιτοχονδριακή γενετική ποικιλότητα επηρεάζει τα

ατοπικά χαρακτηριστικά του άσθματος, υποστηρίζοντας έτσι έναν ρόλο της αλλαγής στην αλληλουχία του μιτοχονδριακού DNA στην παθογένεια του άσθματος και της ατοπικής διάθεσης γενικότερα.

## 1.6 ΣΚΟΠΟΣ ΤΟΥ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ

Σκοπός της πειραματικής αυτής εργασίας είναι η ανίχνευση και ταυτοποίηση μεταλλάξεων σε tRNA γονίδια του μιτοχονδριακού γενετικού υλικού σε ασθενείς με άσθμα και σε φυσιολογικό πληθυσμό για τη σύγκριση των αποτελεσμάτων. Για τον λόγο αυτό μελετήσαμε σε 26 ασθενείς με άσθμα και σε 60 φυσιολογικά άτομα 22 μιτοχονδριακά tRNA γονίδια: tRNA<sup>Glu</sup>, tRNA<sup>Leu(CUN)</sup>, tRNA<sup>Ser</sup>, tRNA<sup>His</sup>, tRNA<sup>Arg</sup>, tRNA<sup>Gly</sup>, tRNA<sup>Lys</sup>, tRNA<sup>Asp</sup>, tRNA<sup>Ser(UCN)</sup>, tRNA<sup>Tyr</sup>, tRNA<sup>Cys</sup>, tRNA<sup>Asn</sup>, tRNA<sup>Ala</sup>, tRNA<sup>Trp</sup>, tRNA<sup>Met</sup>, tRNA<sup>Gln</sup>, tRNA<sup>Ile</sup>, tRNA<sup>Leu(UUR)</sup>, tRNA<sup>Val</sup>, tRNA<sup>Phe</sup>, tRNA<sup>Pro</sup> και tRNA<sup>Thr</sup>, καθώς και τις παρακείμενες περιοχές των γονιδίων αυτών. Παράλληλα ελέγξαμε για την ύπαρξη συνδυασμού μεταλλάξεων στους ασθενείς και το ποσοστό αυτών στους φυσιολογικούς. Η ανίχνευση των μεταλλάξεων στα tRNA γονίδια των ασθματικών ασθενών και του φυσιολογικού πληθυσμού επιτεύχθηκε με τη βοήθεια των μεθόδων PCR και SSCP. Στη συνέχεια, τα δείγματά μας στάλθηκαν για αλληλούχιση με σκοπό την ταυτοποίηση των μεταλλάξεων. Με την επεξεργασία και τη σύγκριση των αποτελεσμάτων προσπαθήσαμε να εξηγήσουμε αν τελικά οι μεταλλάξεις που ανιχνεύσαμε στα μιτοχονδριακά tRNA γονίδια των ασθενών με άσθμα και στις παρακείμενες περιοχές των γονιδίων αυτών, σχετίζονται με την εμφάνιση της ασθένειας και τι ρόλο παίζουν στην παθογένεση του άσθματος.

## **2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**



## Υλικά και Μέθοδοι

### Άτομα υπό μελέτη

Τα δείγματα ολικού αίματος των 26 ασθενών με άσθμα και των 60 φυσιολογικών ατόμων προσφέρθηκαν από την Πνευμονική Κλινική του Περιφερειακού Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας και αποθηκεύτηκαν στους  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Η επεξεργασία των δειγμάτων ακολούθησε την εξής διαδικασία: απομόνωση DNA, PCR, SSCP, καθαρισμός των προϊόντων της PCR, αλληλούχιση (sequencing).

### 2.1 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA

Η απομόνωση του DNA από ολικό αίμα είναι το πρώτο βήμα της διαδικασίας που πρέπει να ακολουθηθεί.

Γενικά ο διαχωρισμός του DNA από τα κύτταρα μπορεί να διαιρεθεί στα εξής στάδια:

- α. Διάσπαση και λύση των κυττάρων
- β. Απομάκρυνση των πρωτεϊνών
- γ. Αποκατάσταση του DNA

### ΥΛΙΚΑ

|  |   |
|--|---|
| • <b>SSC 20X:</b><br>(Standard Saline Citrate) | 87.6g NaCl<br>+44.1g $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Κιτρικό Νάτριο) μέχρι τα 500ml δις απεσταγμένο νερό (ddH <sub>2</sub> O)<br>Ρύθμιση του pH στο 7,4 χρησιμοποιώντας συμπυκνωμένο HCl (πριν τον τελικό όγκο νερού).<br>Ανάδευση και αποστείρωση. Αποθήκευση στους 4 °C. |
| • <b>SSC 1X:</b>                               | 475ml ddH <sub>2</sub> O<br>+25ml SSC 20X<br>500ml SSC 1X   |
| • <b>NaOAc 0,2M:</b>                           | Ρυθμιστικό διάλυμα 0,2M οξικού νατρίου.   |

|  |   |
|--|---|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>● <b>SDS 5%:</b></li> </ul>                   | (Sodium dodecyl sulphate/Θειικό δωδεκυλικό νάτριο): ανιοντικό απορρυπαντικό που καταστρέφει όλες σχεδόν τις μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις, προκαλεί ρήξη των πυρηνικών και των κυτταρικών μεμβρανών και διαλυματοποιεί τις πρωτεΐνες. |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>● <b>Proteinase K:</b></li> </ul>             | Με την ενζυμική πρωτεΐνάση K πραγματοποιείται πέψη των πρωτεϊνών και το DNA απομονώνεται από τις πρωτεΐνες.   |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>● <b>Φαινόλη/<br/>Χλωροφόρμιο:</b></li> </ul> | Οργανικοί διαλύτες για την εκχύλιση του μείγματος και την απομάκρυνση των πρωτεϊνών και του RNA.  |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>● <b>Ισοπροπανόλη:</b></li> </ul>             | Για την κατακρήμιση του DNA   |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>● <b>Αιθανόλη 70%:</b></li> </ul>             | Μίγμα 70% κ.ο. απόλυτης αιθανόλης σε ddH <sub>2</sub> O για έκπλυση του ιζήματος  |

## ΜΕΘΟΔΟΣ

1. Αναμιγνύουμε 0,5 ml αίματος με 1 ml SSC 1X (Standard saline citrate) σε eppendorf των 2 ml, έντονη ανάδευση και φυγοκέντρηση στις 13000 στροφές για 2 λεπτά.
2. Απομάκρυνση του υπερκείμενου και προσθήκη 1 ml SSC 1X, έντονη ανάδευση και φυγοκέντρηση για 2 λεπτά στις 13000 στροφές.
3. Απομάκρυνση του υπερκείμενου και προσθήκη 0,5 ml NaOAc 0.2M, 50μl SDS 5% και 10mg/ml proteinase K, επώαση για μια ώρα στους 55 °C.
4. Προσθήκη 0,5 ml φαινόλης και 0,5 ml χλωροφόρμιου, έντονη ανάδευση και φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 13000 στροφές.

5. Μεταφορά του υπερκείμενου σε νέο eppendorf των 2 ml και προσθήκη 1 ml χλωροφόρμιου, ήπια ανακίνηση και φυγοκέντρηση στις 13000 στροφές για 5 λεπτά.
6. Μεταφορά του υπερκείμενου σε νέο eppendorf των 2 ml και προσθήκη 1 ml ισοπροπανόλης, επώαση στους  $-20^{\circ}\text{C}$  για 15 λεπτά και φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στους  $4^{\circ}\text{C}$  στις 13000 στροφές.
7. Αφαίρεση του υπερκείμενου, προσθήκη 1 ml παγωμένης αιθανόλης 70% και φυγοκέντρηση στους  $4^{\circ}\text{C}$  για 10 λεπτά στις 13000 στροφές.
8. Αφαίρεση του υπερκείμενου και επώαση στους  $37^{\circ}\text{C}$  για μια ώρα.
9. Προσθήκη 100  $\mu\text{l}$  ddH<sub>2</sub>O και αποθήκευση στους  $4^{\circ}\text{C}$ .
11. Ποιοτικός προσδιορισμός του DNA με ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πηκτή αγαρόζης 1%.

## 2.2 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΗ ΑΓΑΡΟΖΗΣ

Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης είναι η μέθοδος που χρησιμοποιείται συνήθως για τον διαχωρισμό, τον χαρακτηρισμό και την απομόνωση τμημάτων DNA.

Η συγκεκριμένη μέθοδος εφαρμόζεται για πολύ μικρές ποσότητες DNA και γίνεται με προσθήκη βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr) στην πηκτή αγαρόζης. Το βρωμιούχο αιθίδιο με μια πλευρική ομάδα που περιέχει παρεμβάλλεται μεταξύ γειτονικών βάσεων του DNA και φθορίζει όταν ακτινοβολείται με υπεριώδη ακτινοβολία. Συγκεκριμένα η υπεριώδης ακτινοβολία που απορροφάται από το DNA στα 260 nm μεταφέρεται στη χρωστική, η οποία επανεκπέμπεται στα 590 nm στην κίτρινο-πορτοκαλί περιοχή του ορατού φάσματος (Εικ.11). Συγκρίνοντας το φθορισμό του άγνωστου δείγματος με τον φθορισμό μιας σειράς DNA γνωστών συγκεντρώσεων είναι δυνατό να προσδιοριστεί η συγκέντρωση του άγνωστου DNA. Με αυτή τη μέθοδο προσδιορίζονται μέχρι και 5 ng DNA.



Εικόνα 11. Ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή αγαρόζης.

## Παρασκευή πηκτώματος

### ΥΛΙΚΑ

|   |   |
|---|---|
| • <b>Αγαρόζη:</b>                                       | παράγοντας ζελατινοποίησης της πηκτής   |
| • <b>TAE 1X:</b>  | ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης με:<br>40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA, pH 8.3  |
| • <b>Βρωμιούχο αιθίδιο:</b>                             | φθορίζει στο υπεριώδες και δίνει τα πρότυπα ζωνώσεων  |
| • <b>Loading Buffer 6X 10ml:</b><br>(Διάλυμα χρωστικής) | 1 ml χρωστική μπλε της βρωμοφαινόλης<br>5 ml γλυκερόλη (για την καθίζηση των δειγμάτων στις υποδοχές)<br>0.5 ml TBE 20X (ρυθμιστικό διάλυμα)<br>3.5 ml ddH <sub>2</sub> O |

### ΜΕΘΟΔΟΣ

Αρχικά αναμειγνύουμε 0,3 gr αγαρόζης σε 40 ml TAE 1X. Θερμαίνουμε το μίγμα για 1-2 λεπτά σε φούρνο μικροκυμάτων. Μετά προστίθενται 0,3μl βρωμιούχο αιθίδιο και στερεοποιείται σε κατάλληλη μήτρα, η οποία περιέχει και τις απαραίτητες θέσεις υποδοχής του DNA. Στα προς ανάλυση δείγματα DNA προστίθεται διάλυμα χρωστικής το οποίο, επιτρέπει την παρακολούθηση του μετώπου της ηλεκτροφόρησης και παράλληλα αυξάνει την πυκνότητα των δειγμάτων DNA, ώστε να παραμείνουν στις θέσεις υποδοχής τους στο πήκτωμα. Οι ποσότητες που αναμειγνύονται είναι 3 μl διαλύματος χρωστικής με 5 μl δείγματος.

## Συνθήκες ηλεκτροφόρησης

Η ηλεκτροφόρηση γίνεται σε οριζόντια συσκευή. Η τάση που εφαρμόζεται είναι συνήθως 100V και η διακοπή της ηλεκτροφόρησης γίνεται όταν η χρωστική έχει διανύσει τα 2/3 του μήκους της πηκτής της αγαρόζης. Η πηκτή αγαρόζης παρατηρείται σε ειδική συσκευή ακτινοβολίας UV, για την εμφάνιση των ζωνών. Όσα δείγματα DNA εμφανίσουν θετικό αποτέλεσμα, χρησιμοποιούνται στις αντιδράσεις PCR.

## 2.3 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ

Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction - PCR) είναι μια ενζυμική μέθοδος που επιτρέπει την *in vitro* ενίσχυση συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA, εκμεταλλευόμενη ορισμένα χαρακτηριστικά του *in vivo* μηχανισμού αντιγραφής του DNA. Μέσω της PCR παράγεται ένας τεράστιος αριθμός πιστών αντιγράφων μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας του DNA χρησιμοποιώντας μικρές ποσότητες (0.1-1μg) DNA.

### Αρχή της Μεθόδου

Η PCR βασίζεται στη δράση του ενζύμου DNA πολυμεράση. Η αντίδραση μιμείται τον τρόπο με τον οποίο το ένζυμο αντιγράφει το DNA. Η DNA πολυμεράση χρησιμοποιεί μονόκλιωνα μόρια DNA ως εκμαγεία για τη σύνθεση νέων συμπληρωματικών κλώνων με κατεύθυνση 5'-3'. Τα μονόκλιωνα μόρια μπορούν να παραχθούν με απλό τρόπο από δίκλιωνα μόρια DNA, όταν αυτά θερμαίνονται σε υψηλές θερμοκρασίες οπότε και αποχωρίζονται (μετουσιώνονται). Η DNA πολυμεράση απαιτεί επίσης ως αφετηρίες για την έναρξη της σύνθεσης 2 συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια (18-22 βάσεων), τους εκκινήτες ή primers, που έχουν δομή συμπληρωματική προς τις πλευρικές αλληλουχίες του DNA στόχου, το καθένα αντίστοιχα προς τον ένα κλώνο του στόχου και με αντίθετη κατεύθυνση.

Επομένως, το σημείο έναρξης της σύνθεσης του DNA μπορεί να καθοριστεί, και με τη χρήση του κατάλληλου ζεύγους εκκινήτων κατευθύνουμε την DNA πολυμεράση να συνθέσει συγκεκριμένη περιοχή του DNA. Και οι δύο κλώνοι του DNA χρησιμοποιούνται ως εκμαγεία για τη σύνθεση του DNA.

Το 1<sup>ο</sup> στάδιο της PCR είναι η μετατροπή του δίκλωνου DNA σε μονόκλιωνα. Στη συνέχεια συνδέονται - υβριδίζονται τα δύο συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια

(εκκινητές ή “primers”) στις δύο πλευρές του DNA-στόχου, στους αντίστοιχους κλώνους DNA (2<sup>ο</sup> στάδιο). Με τη δράση του ενζύμου *Taq DNA* πολυμεράσης προστίθενται συμπληρωματικές βάσεις δεοξυριβονουκλεοτιδίων στο 3΄ άκρο κάθε εκκινητού και η αλυσίδα του DNA επεκτείνεται (3<sup>ο</sup> στάδιο). Έτσι σχηματίζονται δύο καινούργιες αλυσίδες ή κλώνοι DNA συμπληρωματικές προς αυτές των δύο κλώνων του προτύπου DNA με αποτέλεσμα το διπλασιασμό του DNA-στόχου.

Η σειρά των τριών σταδίων, μετουσίωσης (denaturation), υβριδισμού των εκκινητών (primers annealing) και επέκτασης των εκκινητών με τη σύνθεση καινούργιου κλώνου (extension), αποτελούν 1 κύκλο της αντίδρασης PCR.

Όλη η αντίδραση PCR ολοκληρώνεται στο ίδιο μείγμα αντιδραστηρίων, για το οποίο απαιτούνται: DNA-στόχος, εκκινητές, τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια, ένζυμο *Taq DNA* πολυμεράση, ιόντα  $Mg^{2+}$  απαραίτητα για την ενζυμική δράση και κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα pH  $\approx 8.2$  για τη δράση του ενζύμου.

Το ένζυμο *Taq DNA* είναι μια θερμοάαντοχη DNA πολυμεράση η οποία απομονώθηκε από το βακτήριο *Thermus aquaticus* (*Taq*) και έχει την ιδιότητα να είναι ενεργό ακόμη και στους +95<sup>ο</sup> C, θερμοκρασία η οποία απαιτείται για τη μετουσίωση του DNA στόχου επί 30 τουλάχιστον λεπτά.

Στο τέλος του πρώτου κύκλου της αντίδρασης οι κλώνοι του DNA στόχου είναι πλέον 4 και αποτελούν τα πρότυπα για τη σύνθεση νέων κλώνων DNA στο 2ο κύκλο. Στο τέλος του 2ου κύκλου οι κλώνοι θα είναι 8 και αυξάνοντας τον αριθμό των κύκλων, αυξάνει εκθετικά και ο αριθμός των αντίγραφων του στόχου DNA, διότι οι κλώνοι που σχηματίζονται χρησιμοποιούνται ως πρότυπο στον επόμενο κύκλο. Με αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται αύξηση του DNA στόχου 2<sup>n</sup> φορές, όπου n ο αριθμός των κύκλων.

### **Σχεδιασμός και επιλογή του εκκινητή (Primer Selection)**

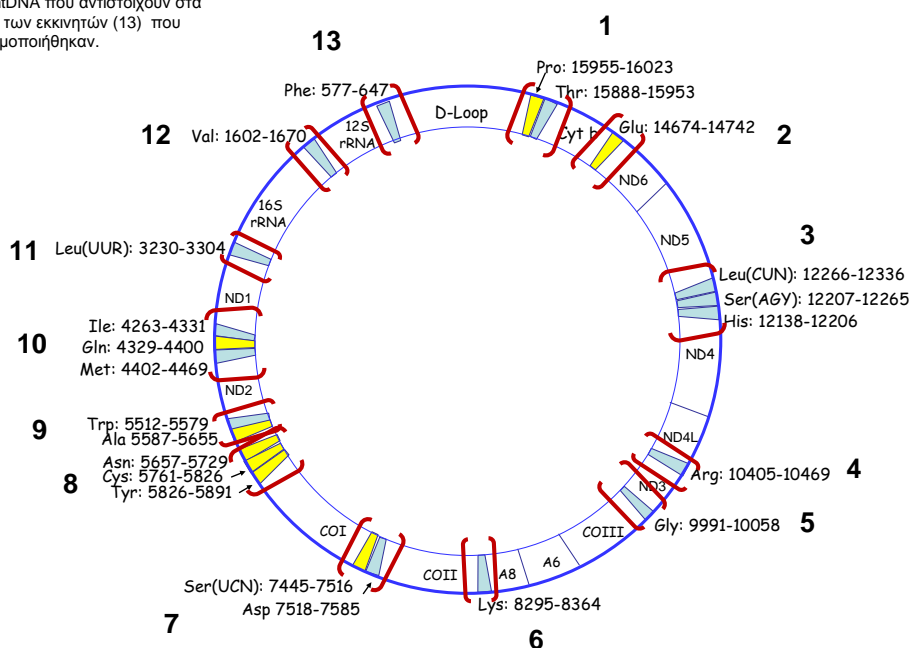
Για τη διεξαγωγή του πειράματος χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές για τα έξι γονίδια tRNA του mtDNA των 27 ασθενών με άσθμα και των 60 φυσιολογικών ατόμων.

Τα ζεύγη εκκινητών τα οποία χρησιμοποιήθηκαν φαίνονται στον παρακάτω Πίνακα 4 και στην Εικόνα 12.

**Πίνακας 4.** Ζεύγη εκκινητών.

| A/A | tRNA                            | FW Primer 5'-3'<br>RV Primer 5'-3'                | νουκλεοτιδική<br>θέση      | μήκος<br>(bp) |
|-----|---------------------------------|---|----------------------------|---------------|
| 1   | Pro/Thr (TP)                    | CTAATACCAACTATCTCCCT<br>ACCCAAATCTGCTTCCCCAT      | 15839-15858<br>16050-16031 | 212           |
| 2   | Glu                             | CCCACACTCAACAGAAACA<br>TTGCGTATTGGGGTCATTG        | 14642-14660<br>14763-14745 | 122           |
| 3   | Leu(CUN)/Ser(AGY)/<br>His (HSL) | CATCATTACCGGGTTTTCCT<br>ACCCAAATCTGCTTCCCCAT      | 12115-12134<br>12361-12342 | 247           |
| 4   | Arg                             | GCCCTACAAACAACCTAACCT<br>AGTGAGATGGTAAATGCTAG     | 10290-10309<br>10516-10497 | 227           |
| 5   | Gly                             | CCATCTATTGATGAGGGTCT<br>GGATATAGGGTCCAAGCCGC<br>A | 9970-9989<br>10193-10173   | 224           |
| 6   | Lys                             | GCTCTGAAATCTGTGGAGCA<br>ACGGTAGTATTAGTTGGGG       | 8172-8191<br>8388-8369     | 217           |
| 7   | Asp/Ser(UCN) (SA)               | ATTCGAAGAACCCGTATACA<br>GCTCTTCTATGATAGGGGAA      | 7415-7434<br>7643-7624     | 229           |
| 8   | Tyr/Cys/Asn (ACT)               | CAATGGGACTTAAACCCACA<br>A<br>GCGAACATCAGTGGGGGTGA | 5663-5683<br>5911-5892     | 249           |
| 9   | Ala/Trp (TA)                    | CGTACTCCTACCTATCTCC<br>TTAGGGTGCTTAGCTGTTAAC      | 5470-5489<br>5711-5691     | 242           |
| 10  | Met/Gln/Ile (IGM)               | CCAGCATTCCCCCTCAAACC<br>TGGGCCAGGGGATTAATTA       | 4241-4260<br>4486-4468     | 246           |
| 11  | Leu(UUR)                        | AGGACAAGAGAAATAAGGCC<br>CACGTTGGGGCCTTTGCCTA      | 3130-3149<br>3423-3404     | 294           |
| 12  | Val                             | GTACTGGAAGTGCACCTTGG<br>GGTGTCTGGTAGTAAGG         | 1576-1595<br>1712-1698     | 140           |
| 13  | Phe                             | CAACCAAACCCCAAAGACA<br>GGATGCTTGCATGTGTAATC       | 549-567<br>706-687         | 158           |

Στην εικόνα φαίνονται οι περιοχές του mtDNA που αντιστοιχούν στα ζεύγη των εκκινητών (13) που χρησιμοποιήθηκαν.



**Εικόνα 12.** Μέσα στα κόκκινα πλαίσια φαίνονται τα όρια των αλληλουχιών των ζευγών των primers που χρησιμοποιήθηκαν.

## Περιγραφή της αντίδρασης PCR

Το αρχικό υλικό στην αντίδραση PCR είναι DNA, το οποίο περιέχει την αλληλουχία-στόχο. Η αλληλουχία του DNA που πρόκειται να ενισχυθεί δεν χρειάζεται να απομονωθεί, καθώς καθορίζεται από το ζεύγος των εκκινητών που χρησιμοποιούνται στην αντίδραση. Η αντίδραση της PCR επαναλαμβάνεται για 35 κύκλους, καθένας από τους οποίους περιλαμβάνει τα ακόλουθα βήματα:

**Βήμα 1<sup>ο</sup>** Αρχική Αποδιάταξη (denaturation) στους 95 °C για 4 λεπτά: Σε αυτή τη θερμοκρασία τα δίκλιωνα μόρια DNA αποχωρίζονται πλήρως, με αποτέλεσμα να παράγονται μονόκλωνες αλυσίδες που στη συνέχεια θα χρησιμοποιηθούν ως μήτρες για τους εκκινητές και την Taq DNA πολυμεράση.

**Βήμα 2<sup>ο</sup>** 35 κύκλοι από

α. Αποδιάταξη: στους 95 °C για 30 δευτερόλεπτα

β. Υβριδισμός (annealing) στους 50 °C για 40 δευτερόλεπτα: Η θερμοκρασία μειώνεται έτσι ώστε οι εκκινητές να προσδεθούν με τις συμπληρωματικές τους αλληλουχίες στα μονόκλιωνα μόρια του DNA.

γ. Επέκταση (extension) στους 72 °C για 40 δευτερόλεπτα: Στο βήμα αυτό η θερμοκρασία αυξάνεται στους 72°C, που είναι η βέλτιστη θερμοκρασία δράσης της θερμοανθεκτικής Taq (Thermus aquaticus) DNA πολυμεράσης, ώστε να εκτελέσει τη σύνθεση των συμπληρωματικών αλυσίδων.

**Βήμα 3<sup>ο</sup>** Τελική Επέκταση για 10 λεπτά στους 72 °C: Το βήμα αυτό επιτρέπει ατελώς επιμηκυμένα προϊόντα στο μείγμα της αντίδρασης να επιμηκυνθούν πλήρως.

**Βήμα 4<sup>ο</sup>** Αποθήκευση του ενισχυμένου PCR προϊόντος στους 4 °C ή χρησιμοποίησή του για περαιτέρω ανάλυση.



**ΥΛΙΚΑ** : Για μια αντίδραση PCR χρειάζονται 50 µl Master Mix

**Master Mix**

| <b>Υλικά</b>   | <b>Αρχικές συγκεντρώσεις</b> | <b>Τελικές Συγκεντρώσεις</b> |
|--|------------------------------|------------------------------|
| • <b>DNA:</b>  |                              | 200 ngr                      |
| • <b>Primers:</b>  | 50pmol/µl                    | 1pmol/µl                     |
| • <b>MgCl<sub>2</sub>:</b>   | 50mM                         | 2mM                          |
| • <b>PCR Buffer:</b>   | 10X                          | 1X                           |
| • <b>dNTP's</b> (Διάλυμα δεοξυνουκλεοτιδίων):<br>Παρασκευάζεται από dATP,dCTP,dGTP και dTTP με μίξη ίσων ποσών από ξεχωριστά διαλύματα stock από 0,2mM έκαστο dNTP | 10mM x 4                     | 0,8mM                        |
| • <b>Taq DNA Πολυμεράση:</b>   | 5u                           | 1u/µl DNA                    |
| • <b>ddH<sub>2</sub>O:</b>   |                              | Μέχρι τα 50µl                |

**ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ**

Για την PCR χρησιμοποιήθηκε ο θερμικός κυκλοποιητής και eppendorf (500µl).

Για κάθε αντίδραση αναμιγνύονται με τη σειρά που αναφέρονται:

- 2 ή 3 µl DNA
- 1 µl από κάθε εκκινητή (Forward και Reverse)

- 5μl 10X PCR Buffer
- 1 μl μείγματος dNTP's
- 2μl MgCl<sub>2</sub>
- 0.2μl Taq DNA πολυμεράση
- αποστειρωμένο dd H<sub>2</sub>O μέχρι τελικού όγκου 50μl

Το προϊόν της αντίδρασης φυλάσσεται επ'αόριστον στους -20°C.

## **Έλεγχος των προϊόντων της αντίδρασης PCR**

Το προϊόν της αντίδρασης ελέγχεται σε πήκτωμα αγαρόζης 2% (0.6 gr αγαρόζης + 40 ml TAE1X + 3μl Βρωμιούχο Αιθίδιο) στα 100 Volts. Ηλεκτροφορούνται 5 μl προϊόντος αναμειγμένα με 3 μl Loading Buffer. Στη συνέχεια γίνεται εμφάνιση των ζωνών των προϊόντων της PCR με τη χρήση συσκευής UV ακτινοβολίας. Η παρουσία DNA μάρτυρα τις περισσότερες φορές καθίσταται αναγκαία για τον έλεγχο του μεγέθους του τμήματος που ενισχύθηκε. Τα δείγματα με θετικό αποτέλεσμα χρησιμοποιούνται για την ανάλυση των μεταλλάξεων με τη μέθοδο SSCP.

## **2.4 ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥ ΜΟΝΟΚΛΩΝΙΚΗΣ ΔΙΑΜΟΡΦΩΣΗΣ**

### **SSCP (Single-Strand Conformation Polymorphism)**

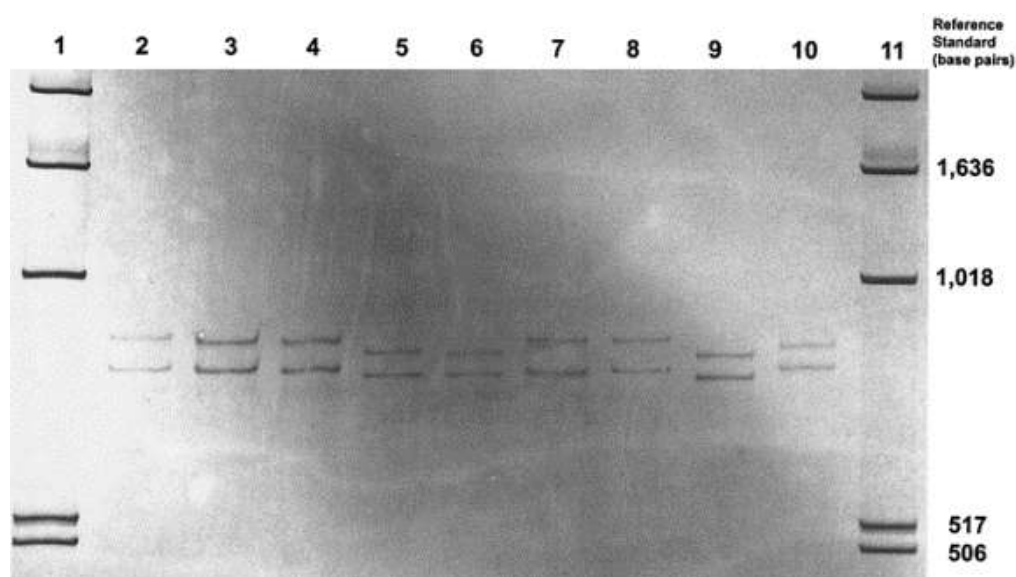
Το 1989 η μέθοδος SSCP ανακοινώθηκε ως ένας νέος, φθηνός, εύκολος και αξιόπιστος τρόπος ανίχνευσης DNA πολυμορφισμών και μεταλλάξεων (Orita et al., 1989).

Η μέθοδος SSCP είναι ο ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός μονόκλωνων αλυσίδων νουκλεϊκών οξέων, ο οποίος βασίζεται σε πολύ λεπτές διαφορές στην αλληλουχία (συντά ένα μόνο ζεύγος βάσεων), από τις οποίες προκύπτουν διαφορετικές δευτερογενείς δομές και μια ορατή διαφορά στην κινητικότητά τους κατά μήκος ενός πηκτώματος ηλεκτροφόρησης.

Η κινητικότητα δίκλωνων μορίων DNA σε πηκτή ηλεκτροφόρησης εξαρτάται από το μέγεθος του κλώνου και το μήκος, αλλά είναι ανεξάρτητη από τη νουκλεοτιδική αλληλουχία. Η κινητικότητα μονόκλωνων μορίων DNA όμως επηρεάζεται από πολύ μικρές αλλαγές στην αλληλουχία, ακόμη και από αλλαγή μιας βάσης από τις εκατοντάδες της αλληλουχίας. Οι μικρές αυτές αλλαγές είναι ορατές εξαιτίας της σχετικά ασταθούς φύσης των μονόκλωνων μορίων DNA. Εξαιτίας της απουσίας της συμπληρωματικής αλυσίδας ο μονός κλώνος υφίσταται ενδοκλωνικό ζευγάρωμα βάσεων σχηματίζοντας θηλιές και πτυχώσεις, που δίνουν στη μονή αλυσίδα μια μοναδική τριτοταγή δομή ανεξάρτητα από το μήκος της. Μια μόνο νουκλεοτιδική αλλαγή θα μπορούσε να επηρεάσει ουσιαστικά την κινητικότητα του κλώνου κατά μήκος ενός πηκτώματος αλλάζοντας το ενδοκλωνικό ζευγάρωμα των βάσεων και της τριτοταγούς διαμόρφωσης που αυτό δημιουργεί.



**Εικόνα 13.** Δίπλα από τα τρία ισομήκη δίκλιωνα μόρια DNA φαίνονται οι μονόκλωνες δομές τους. . (Πηγή: <http://www.bio.davidson.edu>)



**Εικόνα 14.** Δείγμα SSCP πηκτώματος. Παρουσίαση των αποτελεσμάτων. (πηγή: <http://www.bio.davidson.edu>)

Οι πολυμορφισμοί διαμόρφωσης μονόκλωνης αλυσίδας (SSCPs) είναι αλληλομορφικές παραλλαγές κληρονομούμενων γενετικών χαρακτηριστικών που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως γενετικοί δείκτες. Σαν τεχνική ανίχνευσης μεταλλάξεων, το SSCP χρησιμοποιείται κυρίως στην ανάλυση πολυμορφισμών γονιδιακών τόπων, ειδικά όταν χρησιμοποιείται για διαγνωστικούς σκοπούς στην ιατρική.

Τα περισσότερα πειράματα που χρησιμοποιούν τη μέθοδο SSCP, έχουν σχεδιαστεί για να ανιχνεύσουν πολυμορφισμούς σε μια γονιδιακή περιοχή και να συγκρίνουν τα αποτελέσματα μεταξύ διαφορετικών ατόμων.

Κάτω από κατάλληλες συνθήκες, περίπου το 80 με 90% της πιθανής αλλαγής βάσης είναι ανιχνεύσιμη με το SSCP. Η κινητικότητα των μονόκλωνων μορίων εξαρτάται από τη θερμοκρασία και η ευαισθησία της μεθόδου εξαρτάται από το pH, από τη σύσταση του πηκτώματος ηλεκτροφόρησης αλλά και από το ηλεκτροφορητικό buffer (Kukita Y et al., 1997). Τροποποιώντας, λοιπόν, τις συνθήκες που ηλεκτροφορούνται τα δείγματα, δηλαδή τη θερμοκρασία, τη σύσταση του ρυθμιστικού διαλύματος, τη σύσταση της πηκτής, την τάση του ρεύματος καθώς και τον χρόνο, μπορούμε να επιτύχουμε τον επιθυμητό διαχωρισμό που προκύπτει από υπάρχουσες διαφορές μεταξύ των δειγμάτων μας.

## **Αποδιάταξη**

Τα προϊόντα PCR που ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης και εμφάνισαν θετικό αποτέλεσμα, προετοιμάζονται κατάλληλα για αποδιάταξη.

Σε eppendorf των 0.5μl προσθέτουμε 5 μl από το PCR προϊόν και 10 μl ρυθμιστικό διάλυμα αποδιάταξης (Denaturation Buffer).

## **ΥΛΙΚΑ**

|                              |  |
|------------------------------|--|
| <b>•Denaturation Buffer:</b> | 95% φορμαμίδιο<br>20 mM EDTA<br>10 mM NaOH<br>0.05% κυανούν του Ξυλενίου<br>0.05% μπλε της βρωμοφαινόλης |
|------------------------------|--|

## ΜΕΘΟΔΟΣ

Σε Θερμικό Κυκλοποιητή με εφαρμογή ειδικού προγράμματος αποδιάταξης:

- 2 λεπτά στους 92 °C
- 2 λεπτά στους 95 °C
- 7 λεπτά στους 97 °C

πραγματοποιείται πλήρης αποδιάταξη των δίκλωνων μορίων DNA. Πριν ολοκληρωθεί το τελευταίο στάδιο τα δείγματα εξέρχονται από τη συσκευή και τοποθετούνται αμέσως σε πάγο, για την αποφυγή της επαναδιάταξης των μονόκλωνων μορίων DNA. Στη συνέχεια τα δείγματα φορτώνονται σε πηκτή πολυακρυλαμίδης σε ειδική συσκευή.

### **Παρασκευή πηκτώματος πολυακρυλαμίδιου**

Η σύσταση του πηκτώματος εξαρτάται από το μήκος των υπό μελέτη μονόκλωνων τμημάτων DNA. Όσο μικρότερο είναι το μήκος, τόσο πιο πυκνό πρέπει να είναι και το πήκτωμα πολυακρυλαμίδιου. Οι συγκεντρώσεις πολυακρυλαμίδης που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή της πηκτής κυμαίνονται από 8% έως 12%. Εμείς για την ανάλυση των περισσότερων προϊόντων PCR όπου το μέγεθός τους ήταν πάνω από 100 βάσεις χρησιμοποιήσαμε πηκτή πολυακρυλαμίδης 10%, ενώ για τα τμήματα PCR που κυμαίνονταν περίπου στις 70 βάσεις, χρησιμοποιήσαμε πήκτωμα πολυακρυλαμίδιου 12%.

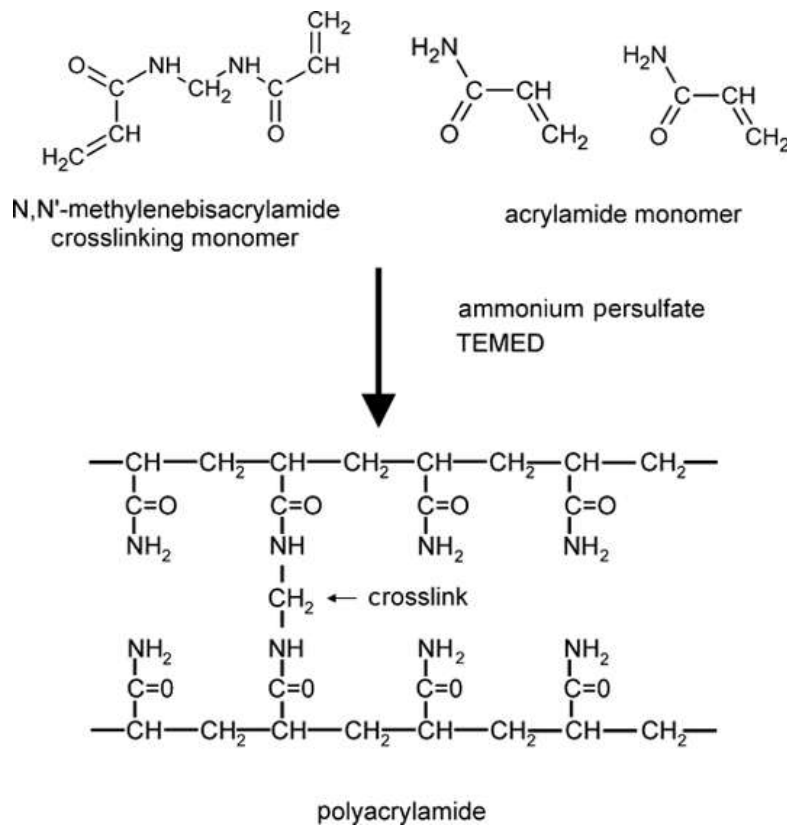
**Ποσότητες αντιδραστηρίων για δύο gel τελικού όγκου 125 ml και πυκνότητας 10%:**

|  |  |
|--|--|
| <ul style="list-style-type: none"><li>• <b><u>12,375 gr Ακρυλαμίδιο</u></b> (Acrylamide)</li><li>• <b><u>0,33 gr Δις-ακρυλαμίδιο</u></b> (N,N'-methylenebisacrylamide)</li></ul> | Τα πηκτώματα πολυακρυλαμίδιου δημιουργούνται με τον πολυμερισμό του ακρυλαμίδιου και του N,N'-μεθυλενο-δις-ακρυλαμίδιου. |
| <ul style="list-style-type: none"><li>• <b><u>10 ml TBE10X</u></b></li></ul>   | Ρυθμιστικό διάλυμα   |

|   |   |
|---|---|
| <p>● <b>12,5 ml Γλυκερόλη 50%</b> (Glycerol 50%)</p>  | <p>Ελαττώνει την τιμή του pH του διαλύματος ηλεκτροφόρησης, η οποία καθορίζεται από την παρουσία του ρυθμιστικού διαλύματος TBE και αυξάνει την ευαισθησία της μεθόδου.<sup>105</sup></p> |
| <p>● <b>650 μl APS 20%</b> (ammonium persulfate: υπερθειικό αμμώνιο)</p>  | <p>Ξεκινά την αντίδραση πολυμερισμού με το να δημιουργεί και να ελευθερώνει ελεύθερες ρίζες</p>   |
| <p>● <b>125 μl TEMED</b> (φωτοχημικός καταλύτης <math>N,N,N',N'</math>-τετραμεθυλοαιθυλοδιαμίνη: <math>N,N,N',N'</math>-tetramethylethylenediamine)</p> | <p>Καταλύει την αντίδραση</p>   |

Η διαδικασία του πολυμερισμού φαίνεται στο σχήμα της Εικόνας 15.

Μετά τη δημιουργία του πηκτώματος, τοποθετείται σε μια ειδική συσκευή κάθετης ηλεκτροφόρησης και εμβαπτίζεται σε ρυθμιστικό διάλυμα TBE 0,5X (100 ml TBE10X + 1900 ml H<sub>2</sub>O). Στη συνέχεια «φορτώνονται» τα δείγματα στις υποδοχές/πηγαδάκια της πηκτής και εφαρμόζεται τάση 220V στους 4 °C. Ο χρόνος ηλεκτροφόρησης κυμαίνεται από 18-22 ώρες, ανάλογα με το μέγεθος των μονόκλωνων τμημάτων DNA. Τη διαδικασία της ηλεκτροφόρησης ακολουθεί η διαδικασία χρώσης του πηκτώματος.



**Εικόνα 15.** Ο πολυμερισμός μέσω ελευθέρων ριζών του ακρυλαμίδιου και του  $\text{N,N'}$ -μεθυλενο-δισ-ακρυλαμίδιου. Ο πολυμερισμός ξεκινά μέσω ελευθέρων ριζών που γεννώνται από ένα οξειδοαναγωγικό ζευγάρι, το υπερθειικό αμμώνιο (APS: ammonium persulfate) και τη  $\text{N,N,N',N'}$ -τετραμεθυλαιθυλδιαμίνη (TEMED). Πολυμερίζοντας το μονομερές ακρυλαμίδιο με τον εαυτό του δημιουργεί μακριές ευθείες αλυσίδες πολυμερούς με τη μορφή ενός παχύρευστου υγρού. Προσθέτοντας το δισ-ακρυλαμίδιο δημιουργείται μια ένωση με ελεύθερους 4 βραχίονες που συμπολυμερίζεται με ακρυλαμίδιο σχηματίζοντας πήκτωμα. Η αντίδραση είναι εξώθερμη. Το πήκτωμα δημιουργεί πόρους, που το μέγεθός τους εξαρτάται από τη συγκέντρωση ακρυλαμίδιου και δισ-ακρυλαμίδιου. Το πορώδες πήκτωμα χρησιμοποιείται στον διαχωρισμό των μονόκλωνων τμημάτων DNA. (Πηγή: <http://www.media.wiley.com/.../et0703-fig-0003-1-full.gif> )

## Χρώση πηκτώματος πολυακρυλαμίδιου με διάλυμα νιτρικού αργύρου (Silver Staining)

### ΥΛΙΚΑ

#### 1<sup>ο</sup> Διάλυμα για 2 gel:

- 20 ml Et100%
- +1ml  $\text{CH}_3\text{COOH}$
- +dd $\text{H}_2\text{O}$  ώστε ο τελικός όγκος να είναι 800ml

### **2<sup>ο</sup> Διάλυμα για 2 gel:**

400 ml AgNO<sub>3</sub> (1 gr AgNO<sub>3</sub> + 1 L ddH<sub>2</sub>O)

### **3<sup>ο</sup> Διάλυμα για 2 gel:**

6 gr NaOH

0,02 gr NaBH<sub>4</sub>

2 ml HCHO

ddH<sub>2</sub>O ως τα 400 ml

### **ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ**

Όλα τα στάδια της συγκεκριμένης μεθόδου πραγματοποιούνται υπό ανακίνηση, στη συσκευή πλύσης και με την εξής σειρά:

1. πλύση του πηκτώματος με 200 ml του 1<sup>ου</sup> Διαλύματος για 3 λεπτά
2. απομάκρυνση του διαλύματος και ξέπλυμα με ddH<sub>2</sub>O
3. δεύτερη πλύση του πηκτώματος με 200 ml του 1<sup>ου</sup> Διαλύματος για 3 λεπτά
4. απομάκρυνση του διαλύματος και ξέπλυμα με ddH<sub>2</sub>O δύο φορές
5. εφαρμογή του 2<sup>ου</sup> Διαλύματος για 20 λεπτά
6. απομάκρυνση του διαλύματος και ξέπλυμα με ddH<sub>2</sub>O δύο φορές
7. εφαρμογή του 3<sup>ου</sup> Διαλύματος έως την εμφάνιση χρώματος και ζωνών
8. απομάκρυνση του διαλύματος και ξέπλυμα με ddH<sub>2</sub>O

Στο τέλος της διαδικασίας συσκευάζουμε τα πηκτώματα πολυακρυλαμιδίου σε διαφανείς μεμβράνες και συγκρίνουμε τα αποτελέσματα. Επιλέγουμε τα δείγματα που εμφάνισαν διαφορετικά πρότυπα ηλεκτροφόρησης σε σχέση με τα φυσιολογικά υπό εξέταση άτομα και ακολουθεί η διαδικασία του καθαρισμού των PCR προϊόντων των επιλεγμένων δειγμάτων, ώστε να σταλούν για αλληλούχιση (sequencing).



## 2.5 ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ PCR ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ



Ο καθαρισμός των PCR προϊόντων των δειγμάτων που επελέγησαν έγινε με QIAquick Spin<sup>®</sup> PCR Purification Kit, κατάλληλο για την απομάκρυνση εκκινητών, νουκλεοτιδίων, πολυμερασών, αλάτων και άλλα που έχουν απομείνει μαζί με τα PCR προϊόντα μετά την αντίδραση PCR. Η ανάκτηση του DNA είναι 90 – 95%.

### ΥΛΙΚΑ

|  |  |
|--|--|
| <ul style="list-style-type: none"><li>● PB Buffer</li></ul> Διάλυμα συλλογής (capture buffer)                        | Επιτρέπει την αποτελεσματική δέσμευση προϊόντος PCR ακόμα κι αν είναι πολύ μικρό (100 bp) και την ποσοτική (99,5%) απομάκρυνση των εκκινητών έως και 40 νουκλεοτιδίων. |
| <ul style="list-style-type: none"><li>● Buffer PE</li></ul> Διάλυμα πλύσης (wash buffer)                             | Περιέχει αιθανόλη και χρησιμοποιείται για ξέπλυμα και την απομάκρυνση των αλάτων   |
| <ul style="list-style-type: none"><li>● Buffer EB(10 mM Tris-Cl, pH 8,5)</li></ul> Διάλυμα έκλουσης (elution buffer) | Εξάγει το DNA.   |

### ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ:

1. Αναμειγνύουμε 50 μl προϊόντος PCR με 250 μl Buffer PB σε eppendorfs των 750 μl.
2. Τοποθετούμε μια QIAquick spin στήλη σε ένα σωληνάκι eppendorf των 2 ml.
3. Για τη δέσμευση του DNA, μεταφέρουμε το προηγούμενο δείγμα στην QIAquick στήλη και φυγοκεντρούμε για ένα λεπτό.
4. Απομακρύνουμε το υγρό. Τοποθετούμε την QIAquick στήλη στο ίδιο σωληνάκι συλλογής.
5. Για το ξέπλυμα της στήλης, προσθέτουμε 0,75 ml Buffer PE στη στήλη και φυγοκεντρούμε για ένα λεπτό

6. Απομακρύνουμε το υγρό και τοποθετούμε τη στήλη στο ίδιο σωληνάκι. Φυγοκέντρωση της στήλης στις 13000 στροφές για ένα λεπτό.
7. Μεταφέρουμε τη στήλη σε καθαρά σωληνάρια μικροφυγοκέντρωσης των 1,5 ml.
8. Για την εξαγωγή του DNA, προσθέτουμε 50 μl Buffer EB (10 mM Tris-Cl, pH 8.5) ή νερό στο κέντρο της QIAquick μεμβράνης, περιμένουμε ένα λεπτό και στη συνέχεια φυγοκεντρούμε τη στήλη για ένα λεπτό.



Μετά τη διαδικασία του καθαρισμού, ακολουθεί ποσοτικός προσδιορισμός του PCR προϊόντος με φωτομέτρηση 1 μl κάθε δείγματος DNA αραιωμένο με 49 μl ddH<sub>2</sub>O. Ανάλογα με τις τιμές της φωτομέτρησης υπολογίζουμε τη συγκέντρωση του δείγματος και αν υπάρχει επαρκής ποσότητα DNA, τότε τα δείγματα μπορούν να αποσταλούν για αλληλούχιση (sequencing).

Τα δείγματα τα στέλνουμε σε στερεά μορφή, γι' αυτό, σταλούν ιζηματοποιούμε το DNA.

### **Κατακρήμνιση νουκλεϊκών οξέων με αιθανόλη**

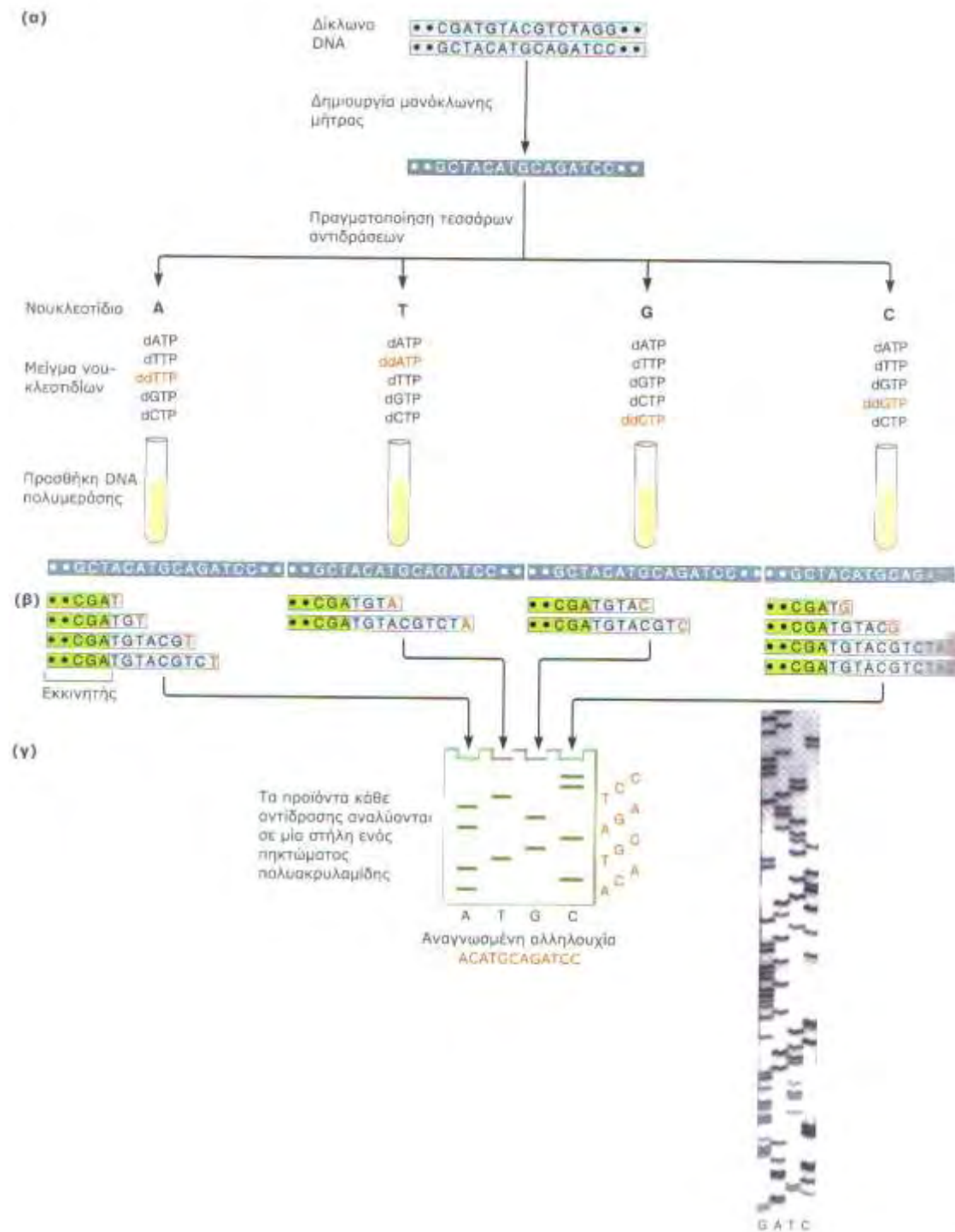
Η μέθοδος αυτή είναι ευρέως διαδεδομένη, διότι είναι γρήγορη και αποτελεσματική ακόμη και για πολύ μικρές ποσότητες DNA και ακολουθεί την εξής διαδικασία:

- σε 50 μl δείγματος προσθέτουμε 500 μl Et100% παγωμένη και 5 μl CH<sub>3</sub>COONa (Sodium Acetate) για την κατακρήμνιση του DNA
- αφήνουμε τα δείγματα στους -20 °C όλη τη νύχτα
- στη συνέχεια φυγοκεντρούμε τα δείγματα για 20 λεπτά, στις 13000 στροφές σε θερμοκρασία 4 °C
- Αφαίρεση του υπερκείμενου και τοποθέτηση των δειγμάτων στους 37 °C για περίπου μία ώρα

Παράλληλα με τα δείγματά μας στέλνουμε και τους κατάλληλους εκκινητές, για τη χρησιμοποίησή τους στη διαδικασία της αλληλούχισης. Η ποσότητα που στέλνουμε από κάθε εκκινητή είναι 4 μl εκκινητή αραιωμένα σε 16 μl νερό. Κατά την αποστολή των δειγμάτων απαιτείται και η συμπλήρωση του έντυπου παραγγελίας. Οι απαντήσεις αποστέλλονται ηλεκτρονικά.

## 2.6 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ ΜΟΡΙΩΝ DNA / Sequencing

### Ενζυματική μεθοδος Sanger



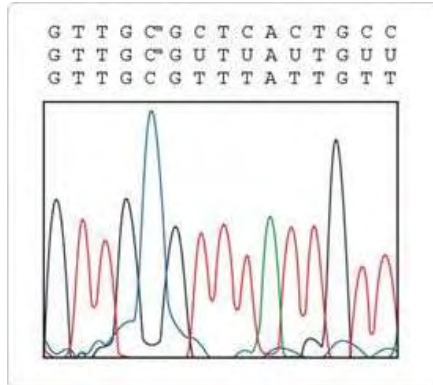
**Εικόνα 16.** Η διαδικασία αλληλούχισης DNA με τη μεθοδο Sanger, που βασίζεται στη χρήση διδεοξυνουκλεοτιδίων (Πηγή: Ανασυνδυασμένο DNA, γονίδια και γονιδιώματα James D. Watson, Richard M. Myers, Amy A. Caudy, Jan A. Witkowski, 2007)

## Αρχή της μεθόδου

Κατά την ενζυματική μέθοδο Sanger, παρασκευάζονται 2',3'-διδεοξυνουκλεοτίδια (ddNTPs) για κάθε μία από τις τέσσερις βάσεις (A, T, G, C). Τα μόρια αυτά μπορούν να ενσωματωθούν από την DNA πολυμεράση σε έναν νεοσυντιθέμενο κλώνο DNA, διότι φέρουν την 5'τριφωσφορική ομάδα. Παρόλα αυτά, μετά την ενσωμάτωσή τους τα ddNTPs δεν μπορούν να σχηματίσουν φωσφοδιεστερικό δεσμό με το επόμενο dNTP που θα έρθει να προστεθεί, επειδή δεν διαθέτουν την 3'-OH ομάδα, η οποία είναι απαραίτητη για τη δημιουργία του δεσμού. Έτσι η αντιγραφή της συγκεκριμένης αλυσίδας σταματά. Όπως φαίνεται στο (α) μέρος της εικόνας, στην αντίδραση αλληλούχισης με τη μέθοδο Sanger συμμετέχει ο κλώνος DNA που πρόκειται να αλληλουχηθεί, ένα τμήμα DNA μικρού μήκους (ο εκκινητής), το οποίο είναι συμπληρωματικό προς την 3'περιοχή αυτού του κλώνου, τα τέσσερα φυσιολογικά dNTP και ένα συγκεκριμένο ddNTP (σε μια προσεκτικά προσδιορισμένη αναλογία σε σχέση με τα φυσιολογικά dNTP). Περιλαμβάνεται επίσης μια μικρή ποσότητα ενός ή περισσότερων ραδιοσημασμένων dNTP, για να είναι δυνατή η ανίχνευση των νεοσυντιθέμενων μορίων DNA με αυτοραδιογραφία. Στο (β) βήμα προστίθεται DNA πολυμεράση και ξεκινά ο πολυμερισμός από τον εκκινητή. Όταν σε μια αλυσίδα προστεθεί τυχαία ένα ddNTP, η αλυσίδα αυτή παύει να αυξάνεται. Αν έχει επιλεγθεί η σωστή αναλογία ddNTP:dNTP, θα προκύψουν πολλοί διαφορετικοί σημασμένοι κλώνοι, τα μήκη των οποίων θα εξαρτώνται από τη θέση στην οποία ενσωματώθηκε το ddNTP. Στο (γ) βήμα, τα σημασμένα τμήματα που προκύπτουν ως προϊόντα της αντίδρασης, διαχωρίζονται με βάση το μήκος της αλληλουχίας τους σε ένα πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου και ακολουθεί αυτοραδιογραφία. Το ηλεκτροφορητικό πρότυπο των τμημάτων φανερώνει την αλληλουχία του DNA.

Στις σύγχρονες μεθόδους αλληλούχισης είναι όλα αυτοματοποιημένα και τα προϊόντα εντοπίζονται συνήθως με ανίχνευση του φθορισμού που εκπέμπουν χρωστικές, οι οποίες είναι συζευγμένες με τα ddNTPs. Οι συσκευές που χρησιμοποιούνται ονομάζονται “ **DNA sequencer**”, τα τμήματα του DNA μεταναστεύουν βάσει του μήκους και τα σημασμένα ddNTPs ανιχνεύονται καθώς διέρχονται προς το κάτω μέρος του πηκτώματος (gel). Κάθε ddNTP εκπέμπει χρώμα στο χαρακτηριστικό του μήκος κύματος και καταγράφεται με το αντίστοιχο χρώμα στον υπολογιστή. Τα δεδομένα αυτά επεξεργάζονται από το κατάλληλο

πρόγραμμα βιοπληροφορικής και τελικά παρουσιάζονται υπό μορφή χρωματογραφήματος με έγχρωμα “peaks” και τα αντίστοιχα γράμματα της αλληλουχίας, όπως φαίνεται στην Εικόνα 17.



**Εικόνα 17.** Χρωματογράφημα αλληλούχισης.

# **3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**

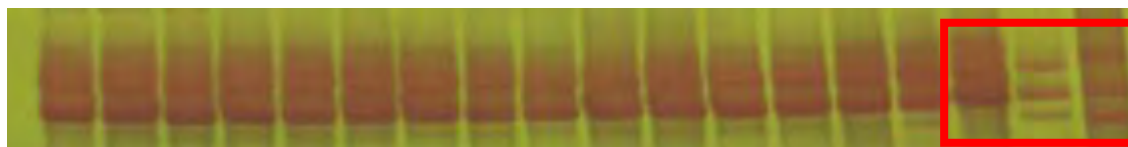
## Αποτελέσματα

Στην παρούσα εργασία μελετήσαμε 26 ασθενείς με άσθμα και 60 φυσιολογικά άτομα για την ανίχνευση και ταυτοποίηση μεταλλάξεων στα tRNA γονίδια του μιτοχονδριακού γενετικού υλικού καθώς και στις παρακείμενες περιοχές των γονιδίων αυτών. Στο σύνολο των πειραμάτων που πραγματοποιηθήκαν στο χώρο του εργαστηρίου μελετήθηκαν συνολικά και τα 22 tRNA γονίδια: tRNA<sup>Glu</sup>, tRNA<sup>Leu(CUN)</sup>, tRNA<sup>Ser</sup>, tRNA<sup>His</sup>, tRNA<sup>Arg</sup>, tRNA<sup>Gly</sup>, tRNA<sup>Lys</sup>, tRNA<sup>Asp</sup>, tRNA<sup>Ser(UCN)</sup>, tRNA<sup>Tyr</sup>, tRNA<sup>Cys</sup>, tRNA<sup>Asn</sup>, tRNA<sup>Ala</sup>, tRNA<sup>Trp</sup>, tRNA<sup>Met</sup>, tRNA<sup>Gln</sup>, tRNA<sup>Ile</sup>, tRNA<sup>Leu(UUR)</sup>, tRNA<sup>Val</sup>, tRNA<sup>Phe</sup>, tRNA<sup>Pro</sup> και tRNA<sup>Thr</sup> στους ασθματικούς ασθενείς και στους φυσιολογικούς. Από τα 22 tRNA γονίδια των 26 ασθματικών ασθενών που μελετήθηκαν, εντοπίστηκαν μεταλλάξεις σε πέντε από αυτά.

### 3.1 Μεταλλάξεις σε γονίδια tRNAs

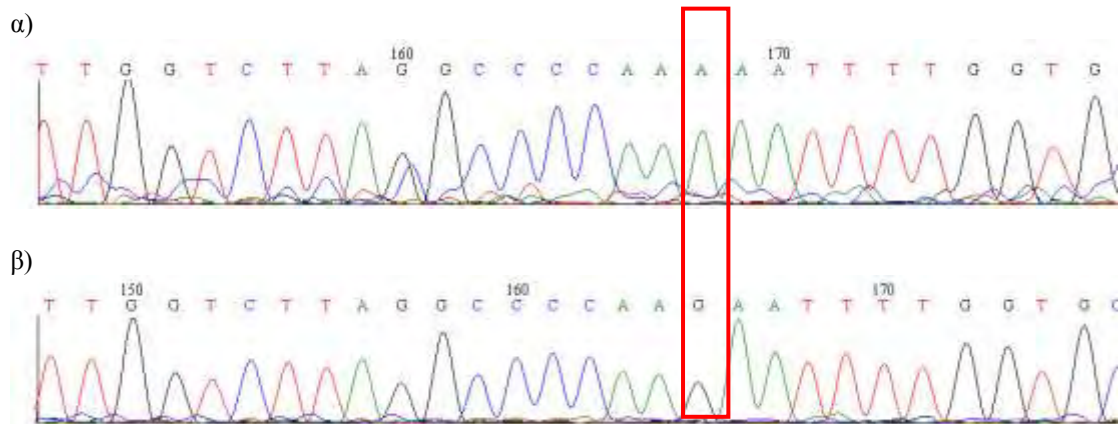
Όλες οι μεταλλάξεις ανιχνεύτηκαν με τη μέθοδο SSCP και ταυτοποιήθηκαν με τη μέθοδο της αλληλούχισης.

Συγκεκριμένα στο γονίδιο tRNA<sup>Leu(CUN)</sup> ανιχνεύτηκε η μετάλλαξη **A12308G** σε 7 από τους 26 ασθματικούς ασθενείς, δηλαδή σε ποσοστό 27%, ενώ η ίδια μετάλλαξη ανιχνεύτηκε και σε 2 από τους 60 φυσιολογικούς, δηλαδή σε ποσοστό 3,33%. Η μετάλλαξη αυτή, όπως αναφέρθηκε, ανιχνεύτηκε με τη μέθοδο SSCP (Εικ.18) και ταυτοποιήθηκε με τη μέθοδο της αλληλούχισης (Εικ.19), βρίσκεται στη νουκλεοτιδική θέση 12308 του μιτοχονδριακού γονιδιώματος, η οποία αντιστοιχεί στην αρχή του βραχίονα του αντικωδικονίου μετά τη μεταβλητή θηλιά του tRNA (Εικ.9) και η νουκλεοτιδική αλλαγή είναι μια μετάπτωση βάσης από A σε G (Εικ.20).

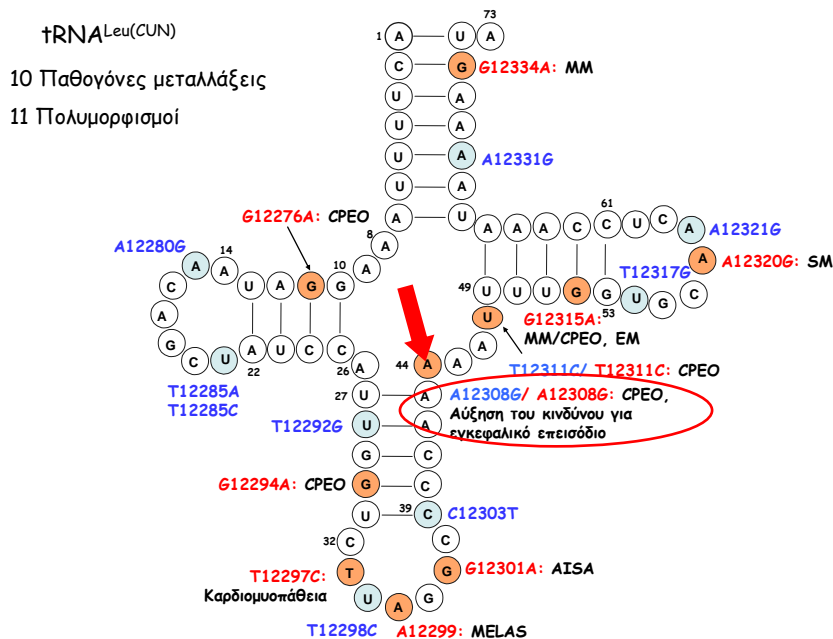


**Εικόνα 18.** Μετά από την ενίσχυση του γονιδίου tRNA<sup>Leu(CUN)</sup> με τη μέθοδο PCR τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν με τη μέθοδο SSCP σε πηκτή πολυακρυλαμίδης 10%, για 22 ώρες στα 220V. Στην εικόνα σε κόκκινο πλαίσιο φαίνεται η διαφορά των ζωνώσεων των δειγμάτων στο πρότυπο ηλεκτροφόρησης SSCP.



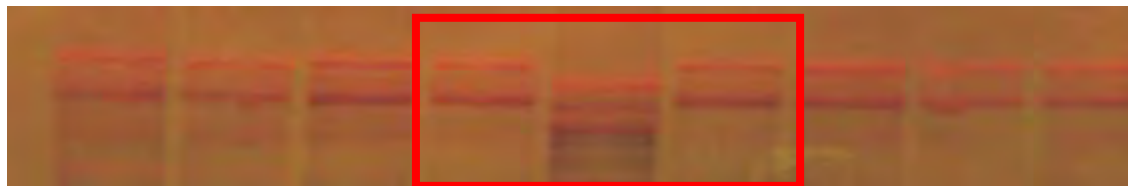


**Εικόνα 19.** Τμήμα χρωματογραφήματος αλληλούχισης. Το επάνω μέρος της εικόνας (α) απεικονίζει τμήμα της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του γονιδίου  $tRNA^{Leu(CUN)}$  ενός φυσιολογικού ατόμου, το κάτω μέρος (β) τμήμα ενός ατόμου που φέρει τη μετάλλαξη A12308G.

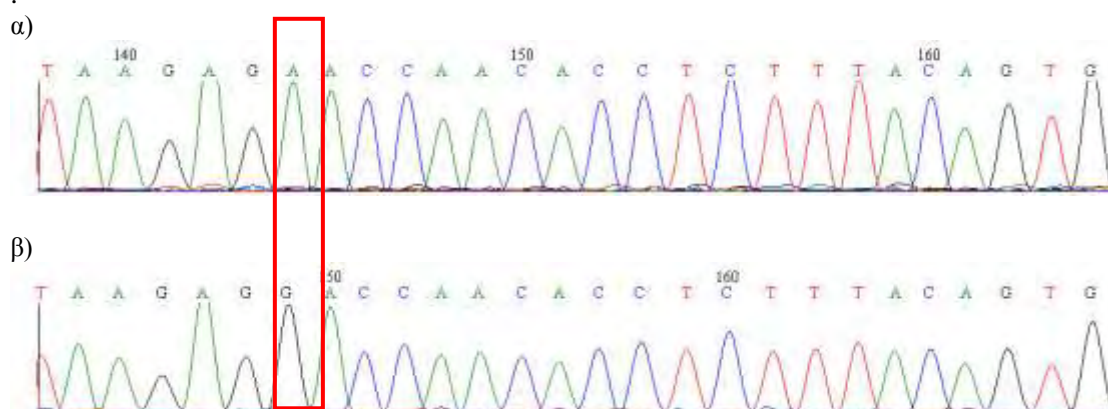


**Εικόνα 20.** Μεταλλάξεις στο γονίδιο  $tRNA^{Leu(CUN)}$  όπως συγκεντρώθηκαν από τη διεθνή βιβλιογραφία και καταγράφηκαν στις βάσεις δεδομένων του mitomap. Οι παθογόνες μεταλλάξεις απεικονίζονται με κόκκινο και οι πολυμορφισμοί με μπλε. Το βελάκι δείχνει τη θέση της μετάλλαξης A12308G μεταξύ της μεταβλητής θηλιάς και το βραχίονα του αντικωδικόνιου.

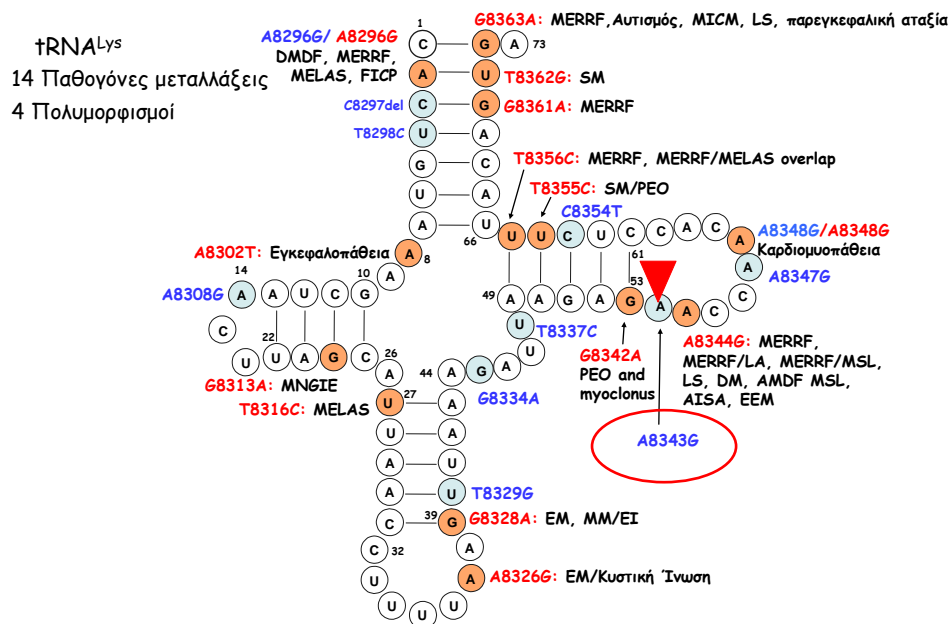
Στο γονίδιο tRNA<sup>Lys</sup> εντοπίσαμε τη μετάλλαξη **A8343G** σε έναν ασθενή με άσθμα, που αντιστοιχεί στο 3,85% των ασθενών, ενώ δεν ανιχνεύτηκε στον φυσιολογικό πληθυσμό. Η νουκλεοτιδική αλλαγή είναι μια μετάπτωση βάσης από A σε G στη θέση 8343, η οποία βρίσκεται στη θηλιά TψC του tRNA (Εικ.23).



**Εικόνα 21.** Μετά από την ενίσχυση του γονιδίου tRNA<sup>Lys</sup> με τη μέθοδο PCR τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν με τη μέθοδο SSCP σε πηκτή πολυακρυλαμίδης 10%, για 22 ώρες στα 220V. Στην εικόνα σε κόκκινο πλαίσιο φαίνεται η διαφορά των ζωνώσεων των δειγμάτων στο πρότυπο ηλεκτροφόρησης SSCP.

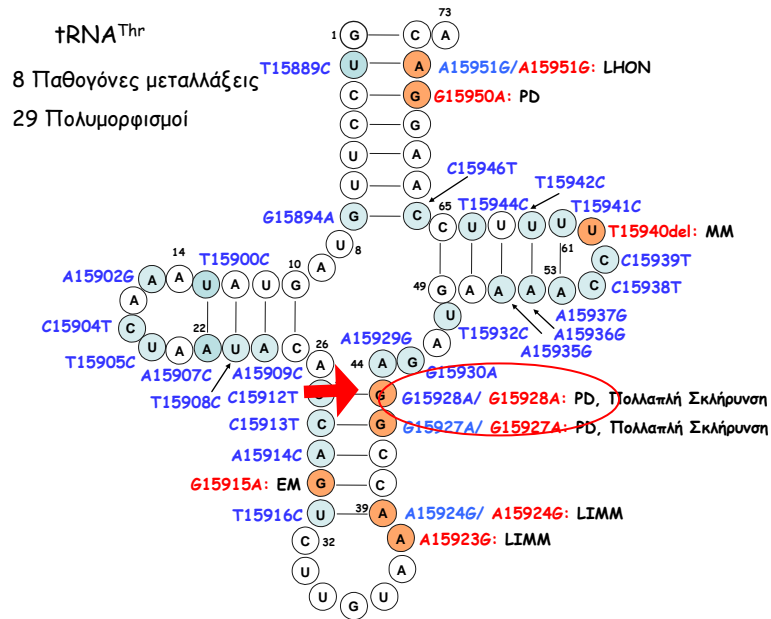


**Εικόνα 22.** α) Χρωματογράφημα αλληλούχισης φυσιολογικού ατόμου β) χρωματογράφημα αλληλούχισης που φέρει τη μετάλλαξη A8343G του γονιδίου tRNA<sup>Lys</sup>.



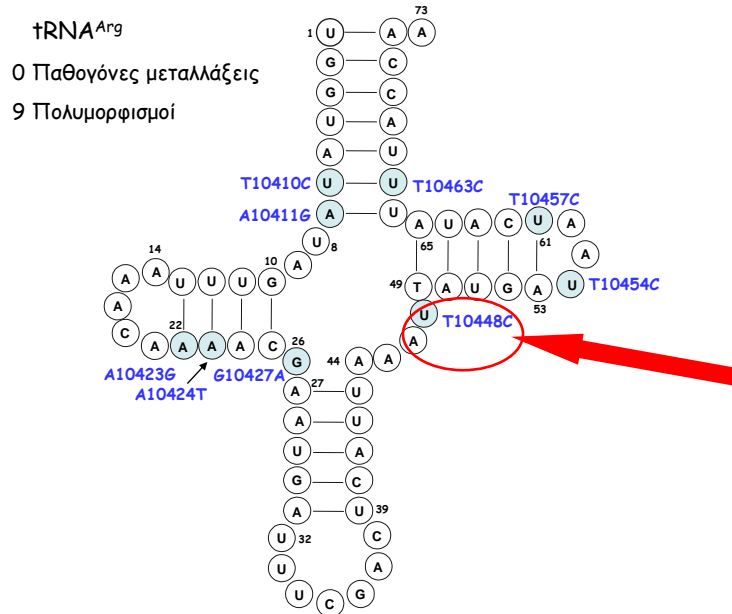
**Εικόνα 23.** Μεταλλάξεις στο γονίδιο  $tRNA^{Lys}$  όπως συγκεντρώθηκαν από τη διεθνή βιβλιογραφία και καταγράφηκαν στις βάσεις δεδομένων του mitomap. Οι παθολογικές μεταλλάξεις απεικονίζονται με κόκκινο και οι πολυμορφισμοί με μπλε. Το βελάκι δείχνει τη θέση της μετάλλαξης A8343G στην ΤψC θηλιά.

Στο γονίδιο  $tRNA^{Thr}$  βρέθηκε η μετάλλαξη **G15928A** σε 2 από τους 26 ασθενείς με άσθμα, που αντιστοιχεί στο 7,7% των ασθενών. Η μετάλλαξη αυτή ανιχνεύτηκε και σε 3 από τους 60 φυσιολογικούς, δηλαδή στο 5% των φυσιολογικών. Η μετάλλαξη G15928A είναι μια μετάπτωση βάσης από G σε A και ανιχνεύθηκε στη θέση 15928 του γονιδίου  $tRNA^{Thr}$  στην αρχή του βραχίονα του αντικωδικονίου μετά τη μεταβλητή θηλιά (Εικ.24).



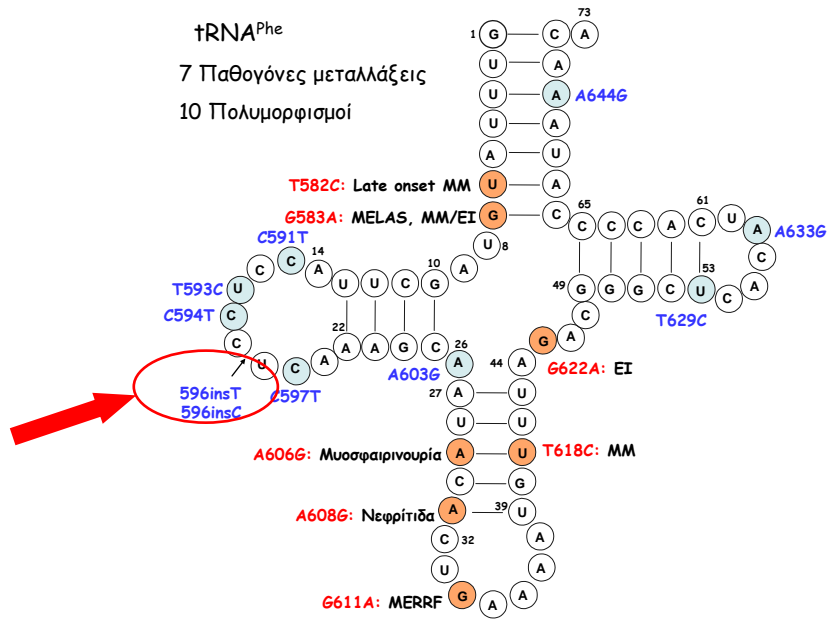
**Εικόνα 24.** Μεταλλάξεις στο γονίδιο tRNA<sup>Thr</sup> όπως συγκεντρώθηκαν από τη διεθνή βιβλιογραφία και καταγράφηκαν στις βάσεις δεδομένων του mitomap. Οι παθολόγες μεταλλάξεις απεικονίζονται με κόκκινο και οι πολυμορφισμοί με μπλε. Το κόκκινο βελάκι δείχνει τη θέση της μετάλλαξης G15928A μεταξύ της μεταβλητής θηλιάς και του βραχίονα του αντικωδικόνιου, στην αρχή του βραχίονα.

Στο γονίδιο tRNA<sup>Arg</sup> βρέθηκε η μετάλλαξη **T10448C** σε έναν ασθματικό ασθενή (3,85%), ενώ δεν εντοπίστηκε στους φυσιολογικούς (0%). Πρόκειται για μια αλλαγή βάσης από T σε C στη θέση 10448, η οποία εντοπίζεται στην αρχή της μεταβλητής θηλιάς (Εικ.25).



**Εικόνα 25.** Μεταλλάξεις στο γονίδιο tRNA<sup>Arg</sup> όπως συγκεντρώθηκαν από τη διεθνή βιβλιογραφία και καταγράφηκαν στις βάσεις δεδομένων του miTomap. Οι παθολόγες μεταλλάξεις απεικονίζονται με κόκκινο και οι πολυμορφισμοί με μπλε. Το βελάκι δείχνει τη θέση της μετάλλαξης T10448C στην αρχή της μεταβλητής θηλιάς.

Τέλος στο γονίδιο tRNA<sup>Phe</sup> ανιχνεύτηκε η ένθεση **596insC**. Η μετάλλαξη αυτή είναι μια ένθεση βάσης C στη θέση 596 του γονιδίου tRNA<sup>Phe</sup> και βρέθηκε σε 2 από τους 26 ασθενείς (7,7%), ενώ δεν εντοπίστηκε σε κανέναν φυσιολογικό. Η μετάλλαξη εντοπίζεται στην περιοχή τη D θηλιάς του tRNA (Εικ.26).



**Εικόνα 26.** Μεταλλάξεις στο γονίδιο tRNA<sup>Phe</sup> όπως συγκεντρώθηκαν από τη διεθνή βιβλιογραφία και καταγράφηκαν στις βάσεις δεδομένων του mitomap. Οι παθολογικές μεταλλάξεις απεικονίζονται με κόκκινο και οι πολυμορφισμοί με μπλε. Το βελάκι δείχνει τη θέση της ένθεσης 596insC στην περιοχή της D θηλιάς.

Τα συνολικά αποτελέσματα των μεταλλάξεων που εντοπίστηκαν σε tRNA γονίδια παρατίθενται στον Πίνακα 5.

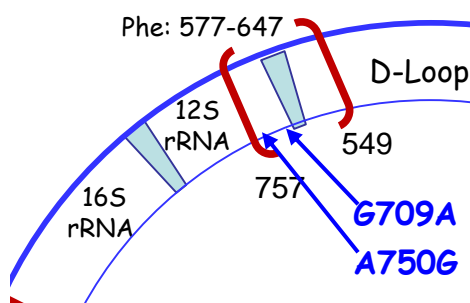
**Πίνακας 5.** Συνολικός πίνακας αποτελεσμάτων των μεταλλάξεων που εντοπίστηκαν στα tRNA γονίδια των ασθενών με άσθμα.

| A/A | tRNA                     | Σύνολο Παθολογικών Μεταλλάξεων που έχουν αναφερθεί (από mitomap) | Σύνολο Πολυμορφικών Μεταλλάξεων που έχουν αναφερθεί (από mitomap) | Μετάλλαξη | %Ποσοστό στους 26 Ασθενείς με άσθμα | %Ποσοστό στους 60 Φυσιολογικούς |
|-----|--------------------------|--|---|-----------|-------------------------------------|---------------------------------|
| 1   | tRNA <sup>Leu(UUR)</sup> | 28   | 7   | -         | -                                   | -                               |
| 2   | tRNA <sup>Lys</sup>      | 14   | 9   | A8343G    | 3,85%                               | 0%                              |
| 3   | tRNA <sup>Ile</sup>      | 14   | 7   | -         | -                                   | -                               |
| 4   | tRNA <sup>Leu(CUN)</sup> | 10   | 11  | A12308G   | 27%                                 | 3,33%                           |
| 5   | tRNA <sup>Thr</sup>      | 8  | 29  | G15928A   | 7,7%                                | 5%                              |
| 6   | tRNA <sup>Ser(UCN)</sup> | 7  | 10  | -         | -                                   | -                               |
| 7   | tRNA <sup>Phe</sup>      | 7  | 10  | 596insC   | 7,7%                                | 0%                              |
| 8   | tRNA <sup>Val</sup>      | 6  | 10  | -         | -                                   | -                               |
| 9   | tRNA <sup>Trp</sup>      | 6  | 13  | -         | -                                   | -                               |
| 10  | tRNA <sup>Gly</sup>      | 5  | 12  | -         | -                                   | -                               |
| 11  | tRNA <sup>Tyr</sup>      | 4  | 7   | -         | -                                   | -                               |
| 12  | tRNA <sup>Pro</sup>      | 4  | 9   | -         | -                                   | -                               |
| 13  | tRNA <sup>Asn</sup>      | 4  | 7   | -         | -                                   | -                               |
| 14  | tRNA <sup>Gln</sup>      | 3  | 15  | -         | -                                   | -                               |
| 15  | tRNA <sup>His</sup>      | 3  | 11  | -         | -                                   | -                               |
| 16  | tRNA <sup>Met</sup>      | 3  | 6   | -         | -                                   | -                               |
| 17  | tRNA <sup>Ala</sup>      | 3  | 11  | -         | -                                   | -                               |
| 18  | tRNA <sup>Ser(AGY)</sup> | 3  | 13  | -         | -                                   | -                               |
| 19  | tRNA <sup>Glu</sup>      | 3  | 9   | -         | -                                   | -                               |
| 20  | tRNA <sup>Cys</sup>      | 2  | 16  | -         | -                                   | -                               |
| 21  | tRNA <sup>Asp</sup>      | 2  | 11  | -         | -                                   | -                               |
| 22  | tRNA <sup>Arg</sup>      | 0  | 9   | T10448C   | 3,85%                               | 0%                              |

### 3.2 Μεταλλάξεις που ανιχνεύθηκαν σε περιοχές παρακείμενες των tRNA γονιδίων

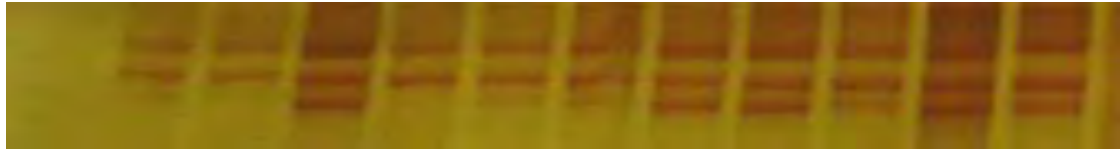
Εντοπίστηκαν μεταλλάξεις και στις παρακείμενες περιοχές των tRNA γονιδίων στους ασθενείς με άσθμα και στους φυσιολογικούς. Συγκεκριμένα:

Το γονίδιο tRNA<sup>Phe</sup> μέσα στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα ξεκινά από τη νουκλεοτιδική θέση 577 και τελειώνει στη νουκλεοτιδική θέση 647. Το ζεύγος των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκε για την ενίσχυση του γονιδίου ξεκινά την αντιγραφή του γονιδίου tRNA<sup>Phe</sup> από τη νουκλεοτιδική 549, η οποία εντοπίζεται μέσα στην περιοχή D-Loop και τελειώνει στη νουκλεοτιδική θέση 757, η οποία εντοπίζεται μέσα στο γονίδιο 12S rRNA (Εικ.27). Μέσα σ' αυτό το γονίδιο ανιχνεύτηκε η μετάλλαξη **G709A** σε 6 από τους 26 ασθενείς (23%), ενώ δεν εντοπίστηκε στους φυσιολογικούς. Στο ίδιο γονίδιο ανιχνεύτηκε και μια δεύτερη μετάλλαξη, η **A750G**, η οποία βρέθηκε σε 15 από τους 26 ασθενείς με άσθμα, δηλαδή στο 57,7% των ασθενών και μόλις στο 10% των φυσιολογικών (6/60). Η μετάλλαξη G709A εντοπίζεται στη νουκλεοτιδική θέση 709 του γονιδίου 12S rRNA. Η μετάλλαξη A750G εντοπίζεται στη θέση 750 του γονιδίου 12S rRNA και είναι μια αλλαγή βάσης από A σε G. Και οι δύο μεταλλάξεις εντοπίζονται στην αρχή του γονιδίου (Εικ.30).

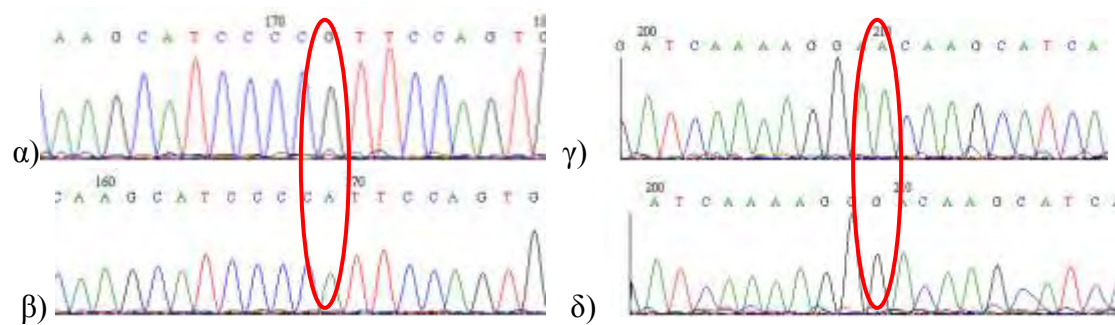


**Εικόνα 27.** Τα μπλε βέλη δείχνουν την περιοχή, στην οποία βρέθηκαν οι μεταλλάξεις G709A και A750G. Το κόκκινο πλαίσιο δείχνει τα άκρα των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση του γονιδίου tRNA<sup>Phe</sup>.

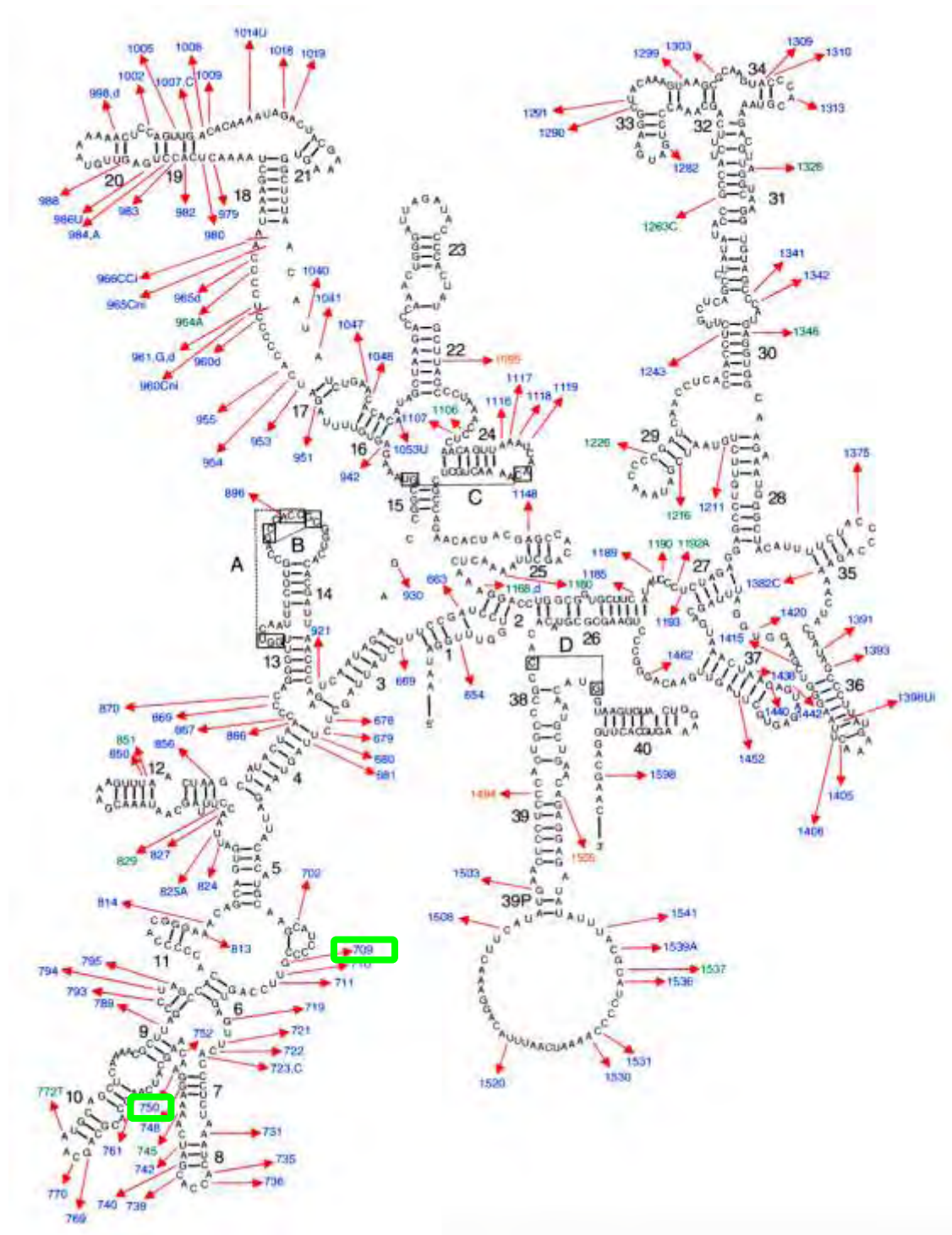




**Εικόνα 28.** Μετά από την ενίσχυση του γονιδίου  $tRNA^{Phe}$  με τη μέθοδο PCR (ζεύγος εκκινητών: 549-567/706-687) τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν με τη μέθοδο SSCP σε πηκτή πολυακρυλαμίδης 10%, για 22 ώρες στα 220V. Στην εικόνα διακρίνεται το διαφορετικό πρότυπο ζωνώσεων των δειγμάτων.



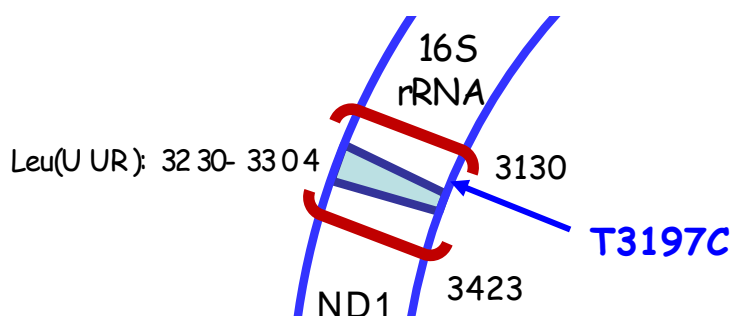
**Εικόνα 29.** Στα δεξιά της εικόνας φαίνεται η μετάλλαξη G709A, ενώ στα αριστερά φαίνεται η μετάλλαξη A750G. (α και γ: χρωματογραφήματα αλληλούχισης φυσιολογικών, β και δ: χρωματογραφήματα αλληλούχισης ατόμων που φέρουν τις μεταλλάξεις)



**Εικόνα 30.** Μέσα σε πράσινο πλαίσιο διακρίνονται οι μεταλλάξεις A709G και G750A στην αρχή του γονιδίου 12S rRNA.

Το γονίδιο tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> ξεκινά από τη νουκλεοτιδική θέση 3230 και τελειώνει στη νουκλεοτιδική θέση 3304. Το ζεύγος εκκινητών που χρησιμοποιήθηκε για την ενίσχυση του γονιδίου, ξεκινά την αντιγραφή από τη θέση 3130, η οποία εντοπίζεται

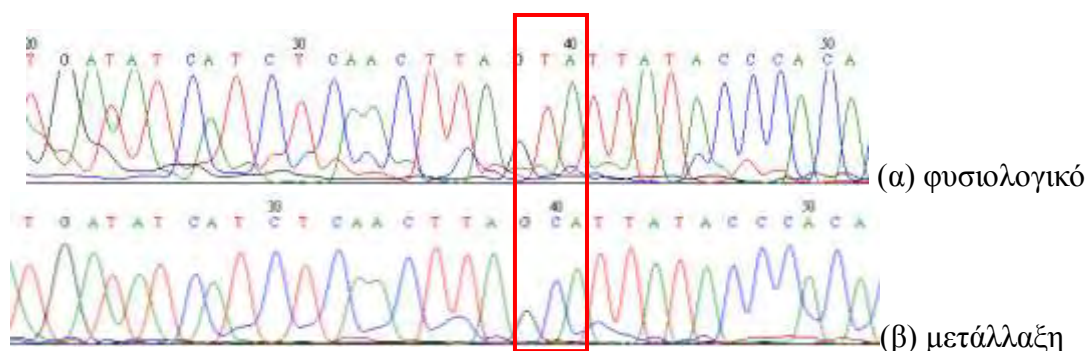
μέσα στην περιοχή του γονιδίου 16S rRNA και τελειώνει στη θέση 3423, η οποία εντοπίζεται στην περιοχή του γονιδίου ND1 (Εικ.31). Στο γονίδιο 16S rRNA ανιχνεύτηκε η μετάλλαξη **T3197C** σε έναν ασθματικό ασθενή (3,85%) καθώς και σε έναν φυσιολογικό (1,67%). Η νουκλεοτιδική αλλαγή είναι αντικατάσταση της βάσης T με τη βάση C στη θέση 3197 και βρίσκεται στο τέλος του 16S rRNA (Εικ.34).



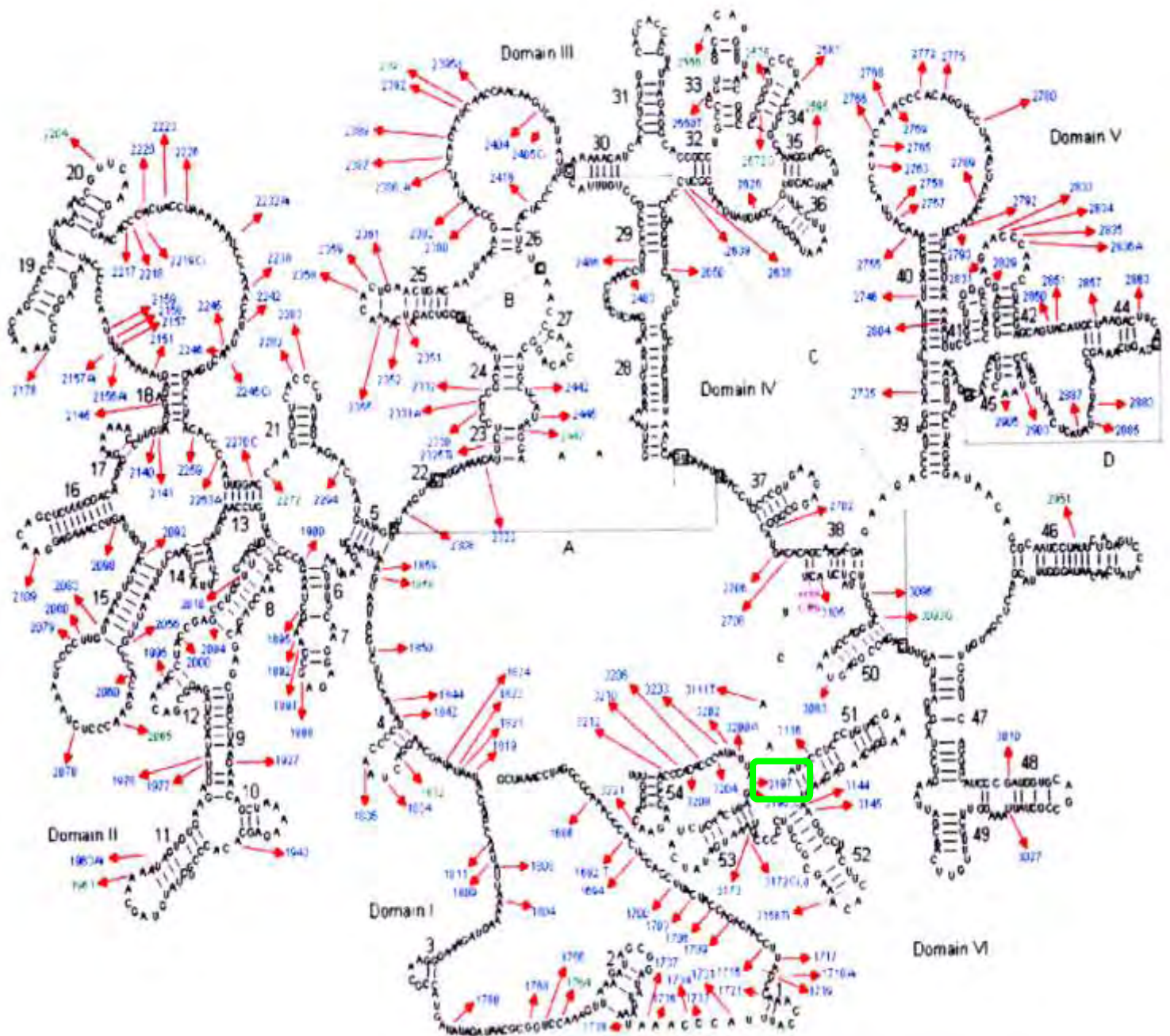
**Εικόνα 31.** Το μπλε βέλος δείχνει την περιοχή, στην οποία βρέθηκε η μετάλλαξη T3197C. Το κόκκινο πλαίσιο δείχνει τα άκρα των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση του γονιδίου tRNA<sup>Leu(UUR)</sup>.



**Εικόνα 32.** Μετά από την ενίσχυση του γονιδίου tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> με τη μέθοδο PCR (ζεύγος εκκινητών: 3130-3149/3423-3404) τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν με τη μέθοδο SSCP σε πηκτή πολυακρυλαμίδης 10%, για 22 ώρες στα 220V. Στην εικόνα διακρίνεται το διαφορετικό πρότυπο ζωνώσεων των δειγμάτων.



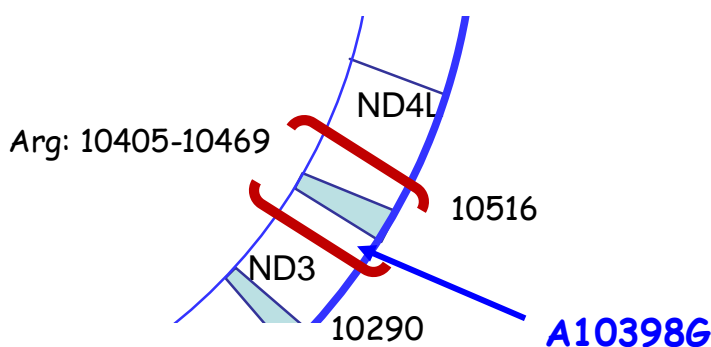
**Εικόνα 33.** Τα αποτελέσματα της αλληλούχισης έδειξαν τη νουκλεοτιδική αλλαγή T → C.



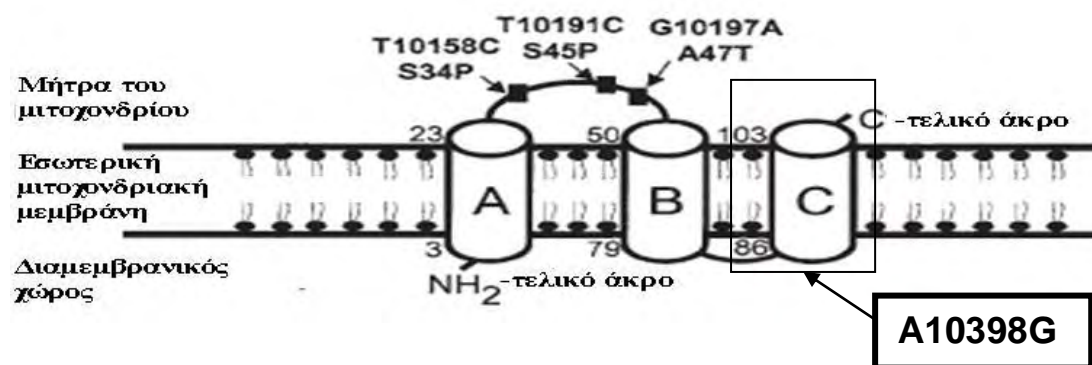
**Εικόνα 34.** Μέσα σε πράσινο πλαίσιο διακρίνεται η μετάλλαξη T3197C, η οποία βρίσκεται στο τέλος του 16S rRNA γονιδίου στην Περιοχή VI (Domain VI).

Το γονίδιο tRNA<sup>Arg</sup> εντοπίζεται στη νουκλεοτιδική περιοχή 10405-10469, το ζεύγος εκκινήτων που χρησιμοποιήθηκε για την ενίσχυση του γονιδίου ξεκινά την αντιγραφή από τη νουκλεοτιδική θέση 10290, η οποία εντοπίζεται μέσα στο γονίδιο ND3 και τελειώνει στη θέση 10516, η οποία βρίσκεται μέσα στο γονίδιο ND4L (Εικ.35). Το γονίδιο ND3 του μιτοχονδριακού γενετικού υλικού κωδικοποιεί την

υπομονάδα III του ενζύμου NADH δεϋδρογενάση (Σύμπλοκο I) της αναπνευστικής αλυσίδας. Στο γονίδιο ND3 βρέθηκε η μετάλλαξη **A10398G** σε 2 από τους 26 ασθενείς (7,7%), ενώ ανιχνεύτηκε σε μεγαλύτερο ποσοστό, της τάξης του 10% (6/60) και στους φυσιολογικούς. Η μετάλλαξη A10398G εντοπίζεται στη θέση 10398 του γονιδίου ND3 (Εικ.36) και η νουκλεοτιδική αλλαγή είναι από A σε G. Η μετάλλαξη αυτή αλλάζει το αμινοξύ Θρεονίνη (T) σε Αλανίνη (A).



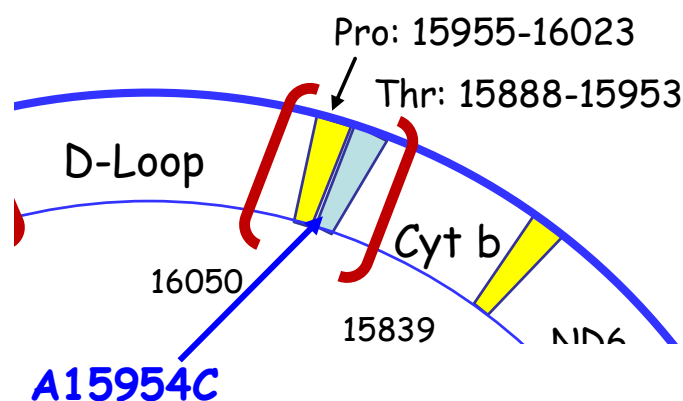
**Εικόνα 35.** Στη θέση που δείχνει το κόκκινο βελάκι βρίσκεται η μετάλλαξη A10398G. Το κόκκινο πλαίσιο δείχνει τα όρια των εκκινήτων που χρησιμοποιήθηκαν κατά την επεξεργασία του γονιδίου tRNA<sup>Arg</sup>.



**Εικόνα 36.** Στην εικόνα διακρίνεται η δομή της υπομονάδας III (ND3) του συμπλόκου I (NADH δεϋδρογενάση) της αναπνευστικής αλυσίδας των μιτοχονδρίων. Τα γράμματα A,B,C συμβολίζουν τις τρεις διαμεμβρανικές έλικες της υπομονάδας. Έχουν βρεθεί και άλλες μεταλλάξεις στην ND3 υπομονάδα της NADH δεϋδρογενάσης (T10158C, T10191C, G10197A). Η μετάλλαξη A10398G εντοπίζεται στην περιοχή του πλαισίου.

Τέλος, ανιχνεύτηκε η μετάλλαξη **A15954C**, η οποία βρίσκεται πάνω σε μη κωδικά νουκλεοτίδια και συγκεκριμένα στη νουκλεοτιδική θέση 15954. Η νουκλεοτιδική αυτή θέση βρίσκεται μεταξύ του γονιδίου tRNA<sup>Pro</sup> και tRNA<sup>Thr</sup>. Το γονίδιο tRNA<sup>Thr</sup> ξεκινά από τη νουκλεοτιδική θέση 15888 και τελειώνει στη νουκλεοτιδική θέση 15953, ενώ το γονίδιο tRNA<sup>Pro</sup> ξεκινά από τη νουκλεοτιδική

θέση 15955. Χρησιμοποιήθηκε ένα κοινό ζεύγος εκκινητών για την ενίσχυση των δύο γονιδίων, το οποίο ξεκινά την αντιγραφή από τη θέση 15839 (cyt b) και τελειώνει στη θέση 16050 (D-Loop) όπως φαίνεται στη Εικόνα 37. Στη θέση 15954, μεταξύ των δύο γονιδίων, ανιχνεύτηκε η μετάλλαξη A15954C, μια νουκλεοτιδική αλλαγή από A σε C, στο 3,85% (1/26) των ασθενών με άσθμα και στο 1,67% (1/60) των φυσιολογικών (Εικ.37).



**Εικόνα 37.** Το γονίδιο tRNA<sup>Thr</sup> αρχίζει από τη νουκλεοτιδική θέση 15953 και από τη νουκλεοτιδική θέση 15955 αρχίζει το γονίδιο tRNA<sup>Pro</sup>. Στη θέση 15954, μεταξύ των δύο γονιδίων, βρέθηκε η μετάλλαξη A15954C.

Στον παρακάτω πίνακα παρατίθενται τα συνολικά αποτελέσματα των μεταλλάξεων που βρέθηκαν σε περιοχές παρακείμενες των γονιδίων.

**Πίνακας 6.** Μεταλλάξεις που εντοπίστηκαν στις παρακείμενες περιοχές των tRNA γονιδίων και το ποσοστό στο οποίο βρέθηκαν στους ασθενείς με άσθμα και στους φυσιολογικούς.

| A/A | Χρωμοσωμική περιοχή – Γονίδιο               | Μετάλλαξη | % Ποσοστό στους ασθενείς με άσθμα | % Ποσοστό στον φυσιολογικό πληθυσμό |
|-----|---|-----------|-----------------------------------|-------------------------------------|
| 1   | 12S rRNA                                    | G709A     | 23% (6/26)                        | -                                   |
| 2   | 12S rRNA                                    | A750G     | 57,7% (15/26)                     | 10% (6/60)                          |
| 3   | 16S rRNA                                    | T3197C    | 3,85% (1/26)                      | 1,67% (1/60)                        |
| 4   | MT-ND3 (NADH dehydrogenase subunit 3)       | A10398G   | 7,7% (2/26)                       | 10% (6/60)                          |
| 5   | MT-NC10 (Thr/Pro)<br>Non coding nucleotides | A15954C   | 3,85% (1/26)                      | 1,67% (1/60)                        |

### 3.3 Συνδυασμοί μεταλλάξεων που ανιχνεύτηκαν σε ασθενείς με άσθμα

Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι σε ορισμένους ασθενείς με άσθμα ανιχνεύτηκαν πάνω από μία μεταλλάξεις.

Ένας συνδυασμός τριών μεταλλάξεων βρέθηκε σε 3 από τους 26 ασθενείς με άσθμα. Ο συνδυασμός αυτός αποτελείται από τις παρακάτω μεταλλάξεις: **A12308G** του γονιδίου tRNA<sup>Leu(CUN)</sup>, **G709A** του γονιδίου 12S rRNA και **A750G** του γονιδίου 12S rRNA. Αυτός είναι ένας μοναδικός συνδυασμός μεταλλάξεων που εντοπίζεται στο 11,5% των ασθματικών ασθενών, ενώ δεν εντοπίζεται στους φυσιολογικούς.

Η μετάλλαξη **A750G** του γονιδίου 12S rRNA συν-κληρονομείται με τη μετάλλαξη **T10448C** του γονιδίου tRNA<sup>Arg</sup>. Ο συνδυασμός αυτός βρέθηκε στο 3,85% (1/26) των ασθενών και όχι στους φυσιολογικούς.

Η μετάλλαξη **A750G** του γονιδίου 12S rRNA συν-κληρονομείται με τη μετάλλαξη **G15928A** του γονιδίου tRNA<sup>Thr</sup>. Αυτός ο συνδυασμός βρέθηκε στο 7,7% (2/26) των ασθενών, ενώ δεν εντοπίστηκε στους φυσιολογικούς.

Σε ένα 3,85% (1/26) των ασθενών με άσθμα παρατηρήθηκε ο παρακάτω συνδυασμός μεταλλάξεων: η **A12308G** του γονιδίου tRNA<sup>Leu(CUN)</sup> μαζί με την **A10398G** του γονιδίου ND3. Ο συνδυασμός αυτός δε βρέθηκε στους φυσιολογικούς.

Ο συνδυασμός της μετάλλαξης **A12308G** του γονιδίου tRNA<sup>Leu(CUN)</sup> και της μετάλλαξης **A15954C** του μη κωδικού νουκλεοτιδίου 15954 μεταξύ των δύο γονιδίων tRNA<sup>Thr</sup> και tRNA<sup>Pro</sup> βρέθηκε σε ένα ποσοστό της τάξης του 3,85% (1/26) των ασθενών και σε κανέναν φυσιολογικό (0%).

Ο μοναδικός συνδυασμός διπλής μετάλλαξης, οποίος εντοπίζεται και στο 3,85% των ασθενών με άσθμα (1/26), αλλά και στο 1,67% των φυσιολογικών (1/60) είναι: η μετάλλαξη **A750G** του γονιδίου 12S rRNA μαζί με τη μετάλλαξη **A10398G** του γονιδίου ND3.

Στον πίνακα 7 παρατίθενται τα συνολικά αποτελέσματα των συνδυασμών μεταλλάξεων που βρέθηκαν στους ασθενείς με άσθμα.

**Πίνακας 7.** Συνδυασμοί μεταλλάξεων που παρατηρήθηκαν στους ασθενείς με άσθμα.

| Αριθμός ασθενών | Αριθμός μεταλλάξεων | Συνδυασμοί Μεταλλάξεων  | %Ποσοστό σε ασθενείς με άσθμα | %Ποσοστό στον φυσιολογικό πληθυσμό |
|-----------------|---------------------|---|-------------------------------|------------------------------------|
| 4               | 3                   | tRNA <sup>Leu(CUN)</sup> A12308G<br>16S rRNA T3197C<br>12S rRNA A750G | 3,85%<br>(1/26)               | -                                  |
|                 |                     | tRNA <sup>Leu(CUN)</sup> A12308G<br>12S rRNA G709A<br>12S rRNA A750G  | 11,5%<br>(3/26)               | -                                  |
| 6               | 2                   | 12S rRNA A750G<br>tRNA <sup>Arg</sup> T10448C                         | 3,85%<br>(1/26)               | -                                  |
|                 |                     | tRNA <sup>Thr</sup> G15928A<br>12S rRNA A750G                         | 7,7%<br>(2/26)                | -                                  |
|                 |                     | tRNA <sup>Leu(CUN)</sup> A12308G<br>ND3 A10398G                       | 3,85%<br>1/(26)               | -                                  |
|                 |                     | tRNA <sup>Leu(CUN)</sup> A12308G<br>Thr/Pro A15954C                   | 3,85%<br>(1/26)               | -                                  |
|                 |                     | 12S rRNA A750G<br>ND3 A10398G   | 3,85%<br>(1/26)               | 1,67%<br>(1/60)                    |



# 5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

## Συζήτηση

Οι βασικές λειτουργίες των μιτοχονδρίων είναι η παραγωγή ενέργειας με τη μορφή ATP, και η συμμετοχή τους στη διαδικασία της απόπτωσης. Επίσης, τα μιτοχόνδρια αποτελούν την κύρια πηγή παραγωγής ελευθέρων ριζών οξυγόνου. Η υπερπαραγωγή ελευθέρων ριζών οξυγόνου είναι χαρακτηριστικό της παθογένειας του άσθματος (Barnes PJ., 1990). Επομένως, το μιτοχόνδριο είναι σαφές ότι εμπλέκεται με κάποιον τρόπο στην παθογένεση του άσθματος, αν και ο ακριβής ρόλος του δεν έχει πλήρως αποσαφηνιστεί.

Η μητρική κληρονομικότητα είναι ένας ουσιαστικός παράγοντας κινδύνου ανάπτυξης άσθματος (Raby et al., 2007), και ίσως η συμμετοχή του μιτοχονδριακού γενετικού υλικού να αποτελεί μια εξήγηση του μητρικού τρόπου κληρονόμησης της ασθένειας. Οι μιτοχονδριακές απλοομάδες, και συγκεκριμένα η U, φάνηκε να σχετίζεται με τα αυξημένα επίπεδα ολικής IgE ορού στους ασθματικούς ασθενείς (Raby et al., 2007). Οι ενδογενείς δραστικές μορφές οξυγόνου και ο μιτοχονδριακός μεταβολισμός βρέθηκαν να σχετίζονται με ανοσολογικές απαντήσεις σημαντικές στην παθογένεια του άσθματος (Del Prete et al., 2008).

Παράλληλα, τα λεία βρογχικά μυϊκά κύτταρα των αεραγωγών σε ασθενείς με άσθμα χαρακτηρίζονται από υπερβολικό πολλαπλασιασμό (Johnson et al., 2001; Roth et al., 2004; Ramos-Barbon et al., 2005, Trian et al., 2007) που οδηγεί σε μειωμένη λειτουργία του πνεύμονα (Pepe et al., 2005; Hogg et al., 2004). Επίσης, χαρακτηρίζονται και από μειωμένη απόπτωση, κάτι που έχει επίσης αποδειχθεί σε πειράματα με ποντίκια (Ramos-Barbon et al., 2005). Ιδιαίτερο, χαρακτηριστικό αυτών των κυττάρων είναι η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία και η μειωμένη ικανότητα παραγωγής ATP (Ulaganathan Mabalirajan et al., 2008).

Αν και πολλές διαφορετικές χρωμοσωμικές περιοχές και γονίδια του πυρηνικού γενετικού υλικού έχουν σχετισθεί με το άσθμα, ελάχιστες μελέτες έχουν ερευνήσει την πιθανή συμμετοχή του μιτοχονδριακού γονιδιώματος στη γενετική του άσθματος.

Για τον λόγο αυτό, στην παρούσα εργασία προσπαθήσαμε να ανιχνεύσουμε μεταλλάξεις σε 22 tRNA γονίδια του μιτοχονδριακού γονιδιώματος (tRNA<sup>Glu</sup>, tRNA<sup>Leu(CUN)</sup>, tRNA<sup>Ser</sup>, tRNA<sup>His</sup>, tRNA<sup>Arg</sup>, tRNA<sup>Gly</sup>, tRNA<sup>Lys</sup>, tRNA<sup>Asp</sup>, tRNA<sup>Ser(UCN)</sup>,

tRNA<sup>Tyr</sup>, tRNA<sup>Cys</sup>, tRNA<sup>Asn</sup>, tRNA<sup>Ala</sup>, tRNA<sup>Trp</sup>, tRNA<sup>Met</sup>, tRNA<sup>Gln</sup>, tRNA<sup>Ile</sup>, tRNA<sup>Leu(UUR)</sup>, tRNA<sup>Val</sup>, tRNA<sup>Phe</sup>, tRNA<sup>Pro</sup> και tRNA<sup>Thr</sup>) και σε περιοχές παρακείμενες των tRNA γονιδίων, σε ασθενείς με άσθμα και σε φυσιολογικούς για τη σύγκριση των αποτελεσμάτων. Η πειραματική διαδικασία ανίχνευσης και ταυτοποίησης μεταλλάξεων στα 12 από τα 22 tRNA γονίδια (tRNA<sup>Arg</sup>, tRNA<sup>Gly</sup>, tRNA<sup>Asp</sup>, tRNA<sup>Ser(UCN)</sup>, tRNA<sup>Tyr</sup>, tRNA<sup>Cys</sup>, tRNA<sup>Asn</sup>, tRNA<sup>Ala</sup>, tRNA<sup>Trp</sup>, tRNA<sup>Val</sup>, tRNA<sup>Pro</sup> και tRNA<sup>Thr</sup>) διεξήχθησε στο εργαστήριο σε προηγούμενη μελέτη.

Η επιλογή των mt-tRNA γονιδίων έγινε εξαιτίας του σημαντικού ρόλου των μορίων αυτών στη μιτοχονδριακή πρωτεϊνοσύνθεση και κυρίως γιατί παρόλο που αποτελούν μόλις το 10% του μιτοχονδριακού γενετικού υλικού, συγκεντρώνουν πάνω από τις μισές μεταλλάξεις που έχουν βρεθεί και χαρακτηρίζεται ως παθογόνες και σχετίζονται με ασθένεια.

Η εξαγωγή του DNA έγινε από ολικό αίμα και χρησιμοποιήθηκε για την ενίσχυση των mt-tRNA γονιδίων με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης, ακολούθησε η μέθοδος SSCP για την ανίχνευση μεταλλάξεων και η αυτοματοποιημένη αλληλούχιση για την ταυτοποίηση των μεταλλάξεων.

Συνολικά βρέθηκαν πέντε μεταλλάξεις σε πέντε tRNA γονίδια και τέσσερις μεταλλάξεις στις παρακείμενες περιοχές των tRNA γονιδίων. Συγκεκριμένα στο γονίδιο tRNA<sup>Leu(CUN)</sup> ανιχνεύτηκε η **μετάλλαξη A12308G** σε 7 από τους 26 ασθενείς με άσθμα, δηλαδή σε ένα αρκετά μεγάλο ποσοστό της τάξης του 27%, ενώ εντοπίστηκε μόλις στο 3,3% (2/60) των φυσιολογικών. Άλλοι κυτταρικοί τύποι ή ιστοί, στους οποίους έχει βρεθεί αυτή η μετάλλαξη είναι το ενδομήτριο, ο προστάτης και οι **πνεύμονες**. Έχει σχετισθεί με ασθένειες όπως η χρόνια προοδευτική εξωτερική οφθαλμοπληγία (CPEO), εγκεφαλικά επεισόδια (Pulkes et al., 2000), καρδιομυοπάθεια, κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου των νεφρών, του προστάτη και του πνεύμονα και με το σύνδρομο του αιφνίδιου βρεφικού θανάτου (mitomap). Η μετάλλαξη A12308G έχει προταθεί και ως πολυμορφισμός σε φυσιολογικό πληθυσμό και συγκεκριμένα τη φέρουν άτομα που ανήκουν στη μιτοχονδριακή απλοομάδα U. Σε μια έρευνα που έγινε υπό τη διεξαγωγή του Προγράμματος Διαχείρισης του Παιδικού Άσθματος στη Ευρώπη βρέθηκε ότι στην απλοομάδα U ανήκουν άτομα τα οποία εμφανίζουν προδιάθεση στην αλλεργία και στα ατοπικά χαρακτηριστικά του άσθματος (Raby et al., 2007).

Στο γονίδιο tRNA<sup>Lys</sup> ανιχνεύτηκε η **μετάλλαξη A8343G** στο 3,85% (1/26) των ασθενών, ενώ δεν εντοπίστηκε σε κανένα φυσιολογικό άτομο. Η μετάλλαξη αυτή έχει χαρακτηριστεί ως πολυμορφισμός, τη φέρουν άτομα που ανήκουν στη μιτοχονδριακή απλοομάδα Η. Πρόσφατα αναφέρθηκε ότι η μιτοχονδριακή απλοομάδα Η σχετίζεται με την ανάπτυξη νευροεκφυλιστικών ασθενειών και συγκεκριμένα άτομα που ανήκουν σε αυτή την απλοομάδα έχουν αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης Πάρκινσον (Khusnutdinova E. et al., 2008).

Στο γονίδιο tRNA<sup>Phe</sup> ανιχνεύτηκε η **μετάλλαξη 596insC** στο 7,7% (2/26) των ασθενών με άσθμα, ενώ δεν εντοπίστηκε στους φυσιολογικούς. Η μετάλλαξη αυτή έχει χαρακτηριστεί ως πολυμορφισμός και δεν σχετίζεται με καμία ασθένεια.

Στο γονίδιο tRNA<sup>Thr</sup> εντοπίστηκε η **μετάλλαξη G15928A** στο 7,7% (2/26) των ασθενών. Σημαντικό όμως είναι το γεγονός ότι το ποσοστό των φυσιολογικών στο οποίο ανιχνεύτηκε αυτή η μετάλλαξη, το οποίο αντιστοιχεί στο 5% (3/60), είναι πολύ κοντά στο ποσοστό των ασθματικών ασθενών. Η μετάλλαξη G15928A έχει χαρακτηριστεί ως πολυμορφισμός αφού εντοπίζεται σε φυσιολογικό πληθυσμό. Επίσης, τα άτομα που ανήκουν στη μιτοχονδριακή απλοομάδα Τ φέρουν τη συγκεκριμένη μετάλλαξη. Η μιτοχονδριακή απλοομάδα Τ έχει σχετισθεί με στεφανιαία νόσο, με διαβήτη τύπου ΙΙ και με διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια (Barbara Kofler et al., 2009). Η μετάλλαξη G15928A έχει χαρακτηριστεί και ως παθογόνος καθώς έχει σχετισθεί με την ασθένεια πολλαπλή σκλήρυνση (mitomap). Επίσης, έχει βρεθεί και σε ασθενείς με Πάρκινσον (Grabson-Frodl EM et al., 1999).

Η **μετάλλαξη T10448C** βρέθηκε στο γονίδιο tRNA<sup>Arg</sup> στο 3,85% (1/26) των ασθενών με άσθμα και χαρακτηρίζεται ως πολυμορφισμός. Στο γονίδιο tRNA<sup>Arg</sup> έχουν ανιχνευτεί και χαρακτηριστεί 9 συνολικά πολυμορφισμοί, ενώ δεν έχει βρεθεί ούτε μία παθογόνος μετάλλαξη. Ο πολυμορφισμός αυτός δε βρέθηκε στους φυσιολογικούς.

Το μεγαλύτερο ποσοστό των ασθενών με άσθμα, περίπου το 58% (15/26), φέρει τη **μετάλλαξη A750G**, η οποία ανιχνεύτηκε στο γονίδιο 12S rRNA. Η μετάλλαξη αυτή ανιχνεύθηκε και στους φυσιολογικούς, αλλά σε πολύ μικρότερο ποσοστό, στο 10% (6/60). Στο ίδιο γονίδιο βρίσκεται και η **μετάλλαξη G709A** σε ποσοστό 23% (5/26) των ασθενών με άσθμα ενώ δεν τη φέρει κανείς φυσιολογικός. Και οι δύο αυτές μεταλλάξεις έχουν χαρακτηριστεί ως πολυμορφισμοί. Ενδιαφέρον

παρουσιάζει το γεγονός ότι σε ποσοστό 23% (5/26) των ασθενών με άσθμα οι δύο αυτοί πολυμορφισμοί συν-κληρονομούνται, ενώ αυτός ο συνδυασμός μεταλλάξεων δεν παρατηρείται στους φυσιολογικούς. Ο συνδυασμός αυτών των μεταλλάξεων περιέχεται σε υποκλάδους (T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub>) της απλοομάδας T, δηλαδή στο σύνολο των μεταλλάξεων της απλοομάδας T παρατηρούνται επιπλέον αυτές οι μεταλλάξεις. Ενώ η 709 περιέχεται σε υποκλάδο της απλοομάδας U, η οποία σχετίζεται με προδιάθεση στα ατοπικά χαρακτηριστικά του άσθματος όπως έχει ήδη αναφερθεί.

Η **μετάλλαξη T3197C**, η οποία ανιχνεύτηκε στο γονίδιο 16S rRNA βρέθηκε στο 3,85% (1/26) των ασθενών με άσθμα και στο 1,67% (1/60) των φυσιολογικών. Η μετάλλαξη αυτή έχει χαρακτηριστεί ως πολυμορφισμός, αλλά έχει αναφερθεί και σε ασθενείς με εγκεφαλοπάθεια, καρδιομυοπάθεια και σε ασθενείς με στοματικό καρκίνο (mitomap). Η μετάλλαξη αυτή περιλαμβάνεται στον υποκλάδο U5 της απλοομάδας U, η οποία σχετίζεται με αυξημένα επίπεδα IgE (κύριο χαρακτηριστικό του άσθματος), και έχει βρεθεί ότι ο συνδυασμός μεταλλάξεων T3197C + A12308G του υποκλάδου U5 σχετίζεται με τον γεροντικό δερματικό κηλιδώδη εκφυλισμό (AMD-age-related macular degeneration) (Udar N. Et al., 2009). Ο συνδυασμός αυτός βρέθηκε και σε έναν ασθματικό ασθενή.

Η ομοπλασμική **μετάλλαξη A10398G**, ανιχνεύτηκε στο γονίδιο ND3, το οποίο κωδικοποιεί την υπομονάδα 3 του ενζύμου NADH δεϋδρογενάση (Σύμπλοκο I) της αναπνευστικής αλυσίδας των μιτοχονδρίων (Εικ.36). Εντοπίζεται στο 7,7% (2/26) των ασθενών, ενώ εμφανίζεται σε μεγαλύτερο ποσοστό στους φυσιολογικούς, στο 10% (6/60). Η μετάλλαξη αυτή εμφανίζεται στον φυσιολογικό πληθυσμό και χαρακτηρίζεται ως πολυμορφισμός. Αναφέρεται στις απλοομάδες I,J,K. Ενώ έχει βρεθεί και σε άλλους τύπος ιστών όπως ο θυρεοειδής αδένας, σε ασθενείς με όγκο του θυρεοειδούς. Πρόσφατα βρέθηκε ότι η μετάλλαξη A10398G, αποτελεί έναν κληρονομικό παράγοντα προδιάθεσης για την ανάπτυξη καρκίνου του στήθους (Czarnecka AM et al., 2009).

Τέλος, η **μετάλλαξη A15954C**, η οποία ανιχνεύεται στο μη κωδικό νουκλεοτίδιο 15954 μεταξύ των γονιδίων tRNA<sup>Pro</sup> και tRNA<sup>Thr</sup>, αναφέρεται ως κοινός πολυμορφισμός μιας και δεν έχει σχετισθεί με ασθένεια και εντοπίζεται στο 3,85% (1/26) των ασθενών με άσθμα και στο 1,67% (1/60) των φυσιολογικών.

Το άσθμα είναι μια πολυπαραγοντική ασθένεια και ο κλινικός φαινότυπος της ασθένειας αυτής δεν επηρεάζεται από την ύπαρξη μιας μόνο μετάλλαξης, αλλά από το συνδυασμό διαφορετικών μεταλλάξεων. Γι' αυτό θα πρέπει να εξετάσουμε στους ασθενείς με άσθμα την ύπαρξη συν-κληρονομίησης συνδυασμού μεταλλάξεων και να συγκρίνουμε με τους φυσιολογικούς. Ο συνδυασμός μεταλλάξεων που εντοπίζεται στο μεγαλύτερο ποσοστό των ασθενών με άσθμα, το οποίο αντιστοιχεί στο **11,5%** (3/26), είναι η A12308G του γονιδίου tRNA<sup>Leu(CUN)</sup>, η G709A και η A750G του γονιδίου 12S rRNA. Ο συνδυασμός A12308G και G709A περιέχονται στον υποκλάδο U6a7b της απλοομάδας U, η οποία σύμφωνα με τον Raby και τους συνεργάτες του σχετίζεται με την αλλεργία του άσθματος. Ο συνδυασμός αυτός δεν εντοπίζεται στους φυσιολογικούς.

Ενδιαφέρον παρουσιάζει και ο συνδυασμός μεταλλάξεων: A12038G + T3197C + A750G. Αν και εμφανίζεται μόλις στο 3,85% (1/26) των ασθματικών ασθενών, ο συνδυασμός A12308G + T3197C περικλείεται σε υποκλάδο της απλοομάδας U, ενώ δεν εντοπίζεται στους φυσιολογικούς. Επίσης, ο συνδυασμός A12308G + T3197C, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω έχει σχετισθεί με τον γεροντικό δερματικό κηλιδώδη εκφυλισμό.

Ο συνδυασμός G15928A + A750G βρέθηκε στο 7,7% (2/26) των ασθματικών ασθενών και δεν εντοπίστηκε στους φυσιολογικούς. Σε ποσοστό 3,85% (1/26) εντοπίστηκε ο συνδυασμός των μεταλλάξεων A750G + T10448C, ο οποίος δεν ανιχνεύτηκε στους φυσιολογικούς. Η μετάλλαξη A12308G συν-κληρονομείται με τη μετάλλαξη A10398G σε ποσοστό 3,85% (1/26), αλλά και με τη μετάλλαξη A15954G σε ποσοστό επίσης 3,85% (1/26). Και οι δύο αυτοί συνδυασμοί μεταλλάξεων δεν παρατηρήθηκαν στους φυσιολογικούς. Τέλος ο συνδυασμός των μεταλλάξεων A750G + A10398G ανιχνεύτηκε στο 3,85% (1/26) των ασθενών και αποτελεί τον μοναδικό συνδυασμό που ανιχνεύεται και στον φυσιολογικό πληθυσμό σε ποσοστό 1,67% (1/60). Συσσώρευση μεταλλάξεων παρατηρήθηκε και σε άτομα του φυσιολογικού πληθυσμού, αλλά σε μικρότερο ποσοστό και με διαφορετικούς συνδυασμούς μεταλλάξεων.

**Πίνακας 8.** Μεταλλάξεις και πολυμορφισμοί που εντοπίστηκαν στο μιτοχondριακό DNA των ασθενών με άσθμα και οι ασθένειες με τις οποίες έχουν σχετισθεί.

| Αριθμός Ασθενών | Μετάλλαξη/ Πολυμορφισμός | Νουκλεοτιδική Θέση | Γονίδιο  | Νουκλεοτιδική αλλαγή | Αμινοξική αλλαγή         | Ομάδα ασθενών/ φαινότυπος/ Άλλες ασθένειες  |
|-----------------|--------------------------|--------------------|--|----------------------|--------------------------|---|
| 7               | A12308G                  | 12308              | tRNA <sup>Leu(CUN)</sup>   | A-G                  | μη-κωδική                | CPEO/εγκεφαλικά επεισόδια /CM/κίνδυνος ανάπτυξης καρκίνου του προστάτη και των νεφρών   |
| 1               | A8343G                   | 8343               | tRNA <sup>Lys</sup>  | A-G                  | μη-κωδική                | Πιθανός παράγοντας κινδύνου ανάπτυξης Πάρκινσον   |
| 2               | G15928A                  | 15928              | tRNA <sup>Thr</sup>  | G-A                  | μη-κωδική                | Πολλαπλή σκλήρυνση  |
| 1               | T10448C                  | 10448              | tRNA <sup>Arg</sup>  | T-C                  | μη-κωδική                | (Πολυμορφισμός)   |
| 2               | 596insC                  | 596                | tRNA <sup>Phe</sup>  | Ένθεση C             | μη-κωδική                | (Πολυμορφισμός)   |
| 6               | G709A                    | 709                | 12S ριβοσωμικόRNA  | G-A                  | μη-κωδική                | (Πολυμορφισμός)   |
| 15              | A750G                    | 750                | 12S ριβοσωμικόRNA  | A-G                  | συναινετική (consensus)  | (Πολυμορφισμός)   |
| 1               | T3197C                   | 3197               | 16S ριβοσωμικόRNA  | T-C                  | μη-κωδική                | Εγκεφαλοπάθεια Καρδιομυοπάθεια Στοματικός καρκίνος  |
| 2               | A10398G                  | 10398              | ND3  | A-G                  | T-A (Θρεονίνη – Αλανίνη) | Παράγοντας προστασίας Πάρκινσον/μακροβιοτητα/αλλαγή κυτταρικού pH/απόκριση σε λίθιο στη διπολική διαταραχή/όγκος στον θυρεοειδή |
| 1               | A15954C                  | 15954              | Μη κωδική περιοχή μεταξύ των γονιδίων tRNA <sup>Thr</sup> /tRNA <sup>Pro</sup> | A-C                  | μη-κωδική                | (Πολυμορφισμός)   |

Κατά τη διεξαγωγή της παρούσας εργασίας, βρέθηκαν μεταλλάξεις σε tRNA γονίδια αλλά και στις παρακείμενες περιοχές των γονιδίων αυτών. Σε ορισμένους ασθενείς παρατηρήθηκε και συνδυασμός μεταλλάξεων. Από τις μεταλλάξεις, που βρέθηκαν σε tRNA γονίδια προκύπτει μια υποψία συμμετοχής της μετάλλαξης A12308G του γονιδίου tRNA<sup>Leu(CUN)</sup> στην παθογένεση του άσθματος, τόσο γιατί εντοπίστηκε στο 27% των ασθενών και μόλις στο 3% των φυσιολογικών, αλλά και γιατί αποτελεί μια μετάλλαξη, η οποία περικλείεται στη μιτοχονδριακή απλοομάδα U. Άτομα που ανήκουν σε αυτή την απλοομάδα χαρακτηρίζονται από αυξημένη προδιάθεση ανάπτυξης των ατοπικών χαρακτηριστικών του άσθματος, όπως τα υψηλά επίπεδα ολικής IgE ορού. Επίσης η μετάλλαξη αυτή έχει ανιχνευθεί και σε κύτταρα των πνευμόνων. Επιπλέον, σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία και τις καταγραφές στις βάσεις δεδομένων του mitomap έχει χαρακτηριστεί ως παθογόνος και σχετισθεί με ασθένειες, όπως ο καρκίνος του πνεύμονα.

Επίσης, η μετάλλαξη G709A, θα μπορούσε να σχετισθεί με την ασθένεια, μιας και ανιχνεύτηκε στο 23% των ασθενών με άσθμα και σε κανέναν φυσιολογικό. Επιπλέον, αποτελεί και αυτή μετάλλαξη υποκλάδου της μιτοχονδριακής απλοομάδας U και έχει σχετισθεί και με άλλες ασθένειες. Ενδεχομένως, και η μετάλλαξη A750G θα μπορούσε να σχετισθεί με την ασθένεια εξαιτίας του αυξημένου ποσοστού των ασθενών, στο οποίο βρέθηκε (58%), αλλά και του μεγάλου ποσοστού συν-κληρονόμησης με την A12308G και την G709A (11,5%).

Ένας από τους συνδυασμούς μεταλλάξεων που θα μπορούσαμε να υποθέσουμε ότι ίσως συμμετέχει στην ανάπτυξη του άσθματος είναι ο συνδυασμός T3197C + A12308G. Αυτός ο συνδυασμός μεταλλάξεων περικλείεται στον υποκλάδο U5 της απλοομάδας U και έχει σχετισθεί με τον γεροντικό δερματικό κηλιδώδη εκφυλισμό και παρόλο που εμφανίζεται μόλις στο 3,85% των ασθενών, δεν εντοπίζεται στους φυσιολογικούς. Επίσης, ο συνδυασμός A12308G + G709A + A750G είναι πιθανόν να εμπλέκεται με την ασθένεια μιας και βρίσκεται σε σχετικά μεγάλο ποσοστό (11,5%) των ασθματικών ασθενών και οι A12308G + G709A αποτελούν τμήμα της απλοομάδας U.

Ωστόσο δεν μπορούμε να βγάλουμε σαφή συμπεράσματα. Το επόμενο βήμα της έρευνας είναι να προσδιοριστεί η μιτοχονδριακή απλοομάδα στην οποία ανήκουν οι ασθενείς και ποιοι από αυτούς ανήκουν στην απλοομάδα U, η οποία προσδίδει μια γενετική προδιάθεση στην ανάπτυξη των ατοπικών χαρακτηριστικών του άσθματος



στα άτομα που ανήκουν σε αυτή. Στη συνέχεια πρέπει να μελετηθεί και να υπολογιστεί η ενεργειακή απόδοση των μιτοχονδρίων που φέρουν αυτές τις μεταλλάξεις ώστε να επιβεβαιωθεί ή όχι η ύπαρξη ελαττωματικών μιτοχονδρίων με μειωμένη ικανότητα παραγωγής ενέργειας.

Η σημασία ύπαρξης παραλλαγών του mtDNA στις καλά καθορισμένες μεταβολικές και εκφυλιστικές ασθένειες αποδεικνύεται μεγάλη, μιας και οι μεταλλάξεις που τις προκαλούν συμβάλλουν στην έρευνα του ρόλου των μιτοχονδρίων και την εμπλοκή του μιτοχονδριακού γενετικού υλικού (mtDNA) στην προδιάθεση σε μολυσματικές ασθένειες, φλεγμονώδεις διαταραχές, καρκίνους, δυσμορφίες και μια σειρά άλλων προβληματικών φαινοτύπων.

Καθώς γίνεται διαθέσιμη μια μεγάλη ποικιλία μητρικά κληρονομούμενων mtDNA μεταλλάξεων, διάφορες mtDNA μεταλλάξεις μπορούν να συνδυαστούν μεταξύ τους αλλά και με nDNA μεταλλάξεις, που σχετίζονται με μιτοχονδριακή δυσλειτουργία, και να χρησιμοποιηθούν στην έρευνα για τον καθορισμό της σημασίας των αλλαγών του mtDNA. Η εισαγωγή μεγαλύτερης ποικιλίας mtDNA απλοτύπων και απλοομάδων μπορεί επίσης να επιτρέψει την κατανόηση της σημασίας των φυσικά προερχόμενων mtDNA παραλλαγών στη φυσιολογία των θηλαστικών και την επίδρασή τους στην προσαρμογή σε διαφορετικά περιβάλλοντα και στην προδιάθεση σε ασθένειες.

Παρόμοιες μελέτες θα επιτρέψουν τον προσδιορισμό του πόσο σημαντικά είναι τα μιτοχόνδρια και το μιτοχονδριακό γενετικό υλικό στην ανίχνευση της πολυπλοκότητας καθώς και του τρόπου κληρονόμησης τέτοιων ασθενειών που απαιτούν ιδιαίτερη κρατική ιατρική μέριμνα και εύρεση νέων θεραπειών στις αναπτυσσόμενες καθώς και στις ανεπτυγμένες χώρες (Douglas C. Wallace, 2009).

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- 1 A. Heinzmann, C. Thoma, H. Dietrich, K.A. Deichmann, Identification of common polymorphisms in the mitochondrial genome, *Allergy* 2003; 58: 830-831.
- 2 Alan L. Shanske, Sara Shanske, Gabriella Silvestri, Kurenai Tanji, David Wetheim, Stanley Lipper, MELAS point mutation with unusual clinical presentation, *Neuromusc. Disord.*, Vol. 3. No. 3, pp. 191-193, 1993.
- 3 Barbara Kofler, Edith E Mueller, Waltrand Eder, Olaf Stanger, Richard Maier, Martin Weger, Anton Haas, Robert Winker, Otto Schmut, Bernhard Paulweber, Bernhard Iglseider, Wilfried Renner, Martina Wiesbaner, Irene Aigner, Danijela Santic, Franz A Zimmermann, Johannes A Mayr, Wolfgang Sperl. Mitochondrial DNA haplogroup T is associated with coronary artery disease: a case control study. *BCM Medical Genetics* 2009; 10:35.
- 4 Barnes KC. Evidence for common genetic elements in allergic disease. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 106(5 Suppl):S192-S200.
- 5 Barnes P.J. Pathophysiology of asthma. *Eur Respir Mon* 2003; 84-113.
- 6 Barnes PJ, Modulation of neurotransmission in airways. *Physiol Rev* 1992; 72: 699-729.
- 7 Barnes PJ. Neural control of human airways in health and disease. *Am Rev Respir Dis.* 1986; 134(6):1289-1314.
- 8 Barnes PJ. NO or no NO in asthma? *Thorax* 1996; 51(2):218-220.
- 9 Barnes PJ. Reactive oxygen species and airway inflammation. *Free Rad Biol Med* 1990; 9:235-543.
- 10 Barnes J Peter, Ian W Rodger, Neil C Thomson, *Asthma, Basic mechanisms and clinical management*, third edition, Academic Press 1998; 389-403.
- 11 Borger P, Matsumoto H, Boustany S, Gencay MM, Burgess JK, King GG et al. (2007). Disease-specific expression and regulation of CCAAT/ enhancer-binding proteins in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *J Allergy Clin Immunol* 119: 98–105.

- 12 Burchard EG, Silverman EK, Rosenwasser LJ, et al. Association between a sequence variant in the Il-4 gene promoter and FEV<sub>1</sub> in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160:919-22.
- 13 Burney PG, Luczynska C., Chinn S et al. The European Community Respiratory Health Survey. *Eur Respir J* 1994; 7(5):954-960.
- 14 C. Fanta. Asthma. *N Engl J Med*. 2009 Mar 5;360(10):1002-14.
- 15 Canning BJ, Fisher A. Neural regulation of airway smooth muscle tone. *Respir Physiol*. 2001 Mar; 125(1-2):113-27.
- 16 Capaldi, R. A. 1992. Structure and function of cytochrome oxidase. *Annu. Rev. Biochem.* 59:569-596.
- 17 Cavelier L, Erikson I, Tammi M, Jalonen P, Lindholm E, Jazin E, Smith P, Luthman H, Gyllensten U. MtDNA mutations in maternally inherited diabetes: presence of the 3397 ND1 mutation previously associated with Alzheimer's and Parkinson's disease, *Hereditas*. 2001; 135(1):65-70.
- 18 Chinnery PF, Howell N, Lightowlers RN, Turnbull DM. Molecular pathology of MELAS and MERRF. The relationship between mutation load and clinical phenotypes. *Brain* 1997; 120: 1713-21.
- 19 Christopher H. Fanta, Asthma, *N Engl J Med*, 360:1002-1014, March 5, 2009.
- 20 Czarnecka AM, Krawczyk T, Zdrożny M, Lubiński J, Arnold RS, Kukwa W, Scińska A, Golik P, Bartnik E, Petros JA. Mitochondrial NADH-dehydrogenase subunit 3 (ND3) polymorphism (A10398G) and sporadic breast cancer in Poland. *Breast Cancer Res Treat*. 2009 Mar 6.
- 21 Del Prete A, Zaccaguino P, Di Paola M, Saltarella M, Oliveros Celis C, Nico B, Santoro G, Lorusso M. Role of mitochondria and reactive oxygen species in dendritic cell differentiation and functions. *Free Radic Biol Med*. 2008 Apr 1; 44(7):1443-51.
- 22 Desagher S. and Martinou J-C., Mitochondria as central control point of apoptosis. *Trends in Cell Biology*, 2000, 10, 369-377.
- 23 DiMauro S, Davidzon G. Mitochondrial DNA and disease. *Ann Med* 2005; 37:222-232.

- 24 Douglas C. Wallace et al. Mitochondrial Diseases in Man and Mouse. *Science* 1999 ; 283 : 1482.
- 25 Douglas C. Wallace. The pathophysiology of mitochondrial disease as modeled in the mouse. *Genes Dev.* 2009; 23:1714-1736.
- 26 Egensperger R, Kosel S, Schnopp NM, Mehraein P, Graeber MB. Association of the mitochondrial tRNA(A4336G) mutation with Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1997; 23:315-321.
- 27 Ehrlich RI, Du TD, Jordaan E et al. Risk factors for childhood asthma and wheezing. Importance of maternal and household smoking. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 154(3 Pt 1):681-688.
- 28 Zifa Emily, Stamatina Giannouli, Paschalis Theotokis, Costas Stamatis, Zisis Mamuris, Constantinos Stathopoulos, Mitochondrial tRNA Mutations Clinical and Functional Perturbations, *RNA Biology* 2007; 4:1, 38-66.
- 29 ERS 2004. The European Lung White Book The First Comprehensive Survey on Respiratory Health in Europe.
- 30 Estivill X, Govea N, Barcelo A. Familial progressive sensorineural deafness is mainly due to the mtDNA A1555G mutation and is enhanced by treatment with aminoglycosides. *Am J Hum Genet* 1998; 62:27-35.
- 31 Fischel-Ghodsian N. Mitochondrial mutations and hearing loss: Paradigm for mitochondrial genetics. *Am J Hum Genet* 1998; 62:15-9.
- 32 Genes for Asthma? An analysis of the European Community Respiratory Health Survey (ECRHS). *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 156(6):1773-1780.
- 33 Gissler M, Jarvelin MR, Louhiala P et al. Boys have more health problems in childhood than girls: follow-up of the 1987 Finnish birth cohort. *Acta Paediatr* 1999; 88(3):310-314.
- 34 Global strategy for asthma management and prevention. National Institutes of Health. National Heart, Lung and Blood Institute, 2003.
- 35 Grabson-Frodl EM, Kösel S, Sprinzl M, von Eitzen U, Mehraein P, Graeber MB. Two novel point mutations of mitochondrial tRNA genes in histologically confirmed Parkinson disease. *Neurogenetics.* 1999 Apr; 2(2):121-7.

- 36 Hall IP, Wheatley A, Wilding P, et al. Association of Glu 27  $\beta_2$ -adrenoceptor polymorphism with lower airway reactivity in asthmatic subjects. *Lancet* 1995; 345:1213-4.
- 37 Hansrote S, Croul S, Selak M, Kalman B, Schwartzman RJ. External ophthalmoplegia with severe progressive multiorgan involvement associated with the mtDNA A3243G mutation. *J Neurol Sci* 2002; 197:63-7.
- 38 Hogg, J.C., F. Chu, S. Utokaparch, R. Woods, W.M. Elliott, L. Buzatu, R.M. Cherniack, R.M. Rogers, F.C. Scirba, H.O. Coxson, and P.D. Pare. 2004. The nature of small-airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease. *N. Engl. J. Med.* 350:2645–2653.
- 39 Holgate ST. The epidemic of allergy and asthma. *Nature* 1999; 402(6760 Suppl):B2-B4.
- 40 Holt PG, Macaubas C, Stumbles PA et al. The role of allergy in the development of asthma. *Nature* 1999; 402(6760 Suppl):B12-B17.
- 41 Holt PG, Stumbles PA, McWilliam AS. Functional studies on dendritic cells in the respiratory tract and related mucosal tissues. *J Leukoc Biol* 1999; 66(2):272-275.
- 42 Holt PG, Stumbles PA, Regulation of immunologic homeostasis in peripheral tissues by dendritic cells: the respiratory tract as a paradigm. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 1(3):199-205.
- 43 Hopes E, McDougall C, Christie G, et al. Association of glutamine 27 polymorphism of  $\beta_2$  adrenoceptor with reported childhood asthma: population based study. *BMJ* 1998; 316:664.
- 44 Howard TD, Postma DS, Jongepier H et al. Association of a didintegrin and metalloprotease 33 (ADAM33) gene with asthma in ethnically diverse populations. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 112(4):717-722.
- 45 <http://www.mitomap.org>
- 46 Hutchin T, Cortopassi G, A mitochondrial DNA clone is associated with increased risk for Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci (U.S.A.)* 1995; 92:6892-6895.

- 47 Ingman M, Kaessmann H, Pääbo S, Gyllenstein U. Mitochondrial genome variation and origin of modern humans. *Nature* 2000; 28:292.
- 48 Jaakkola JJ, Gissler M. Maternal smoking in pregnancy, fetal development and childhood asthma. *Am J Public Health* 2004; 94(1):136-140.
- 49 James D. Watson, Richard M. Myers, Amy A. Caudy, Jan A. Witkowski, Ανασυνδυνασμένο DNA, γονίδια και γονιδιώματα – μια συνοπτική παρουσίαση, ακαδημαϊκές εκδόσεις, τρίτη αγγλική έκδοση – πρώτη ελληνική έκδοση, 2007, κεφάλαιο 4, 124-125.
- 50 Jessica Gutierrez, Ballinger SW, Darley-Usmar VM, Landar A. Free radicals, mitochondria, and oxidized lipids: the emerging role in signal transduction in vascular cells. *Circ Res.* 2006 Oct 27; 99(9):924-32.
- 51 Johnson, P.R., M. Roth, M. Tamm, M. Hughes, Q. Ge, G. King, J.K. Burgess, and J.L. Black. 2001. Airway smooth muscle cell proliferation is increased in asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 164:474–477.
- 52 Johnston SL, Pattermore PK, Sanderson G et al. Community study of role of viral infections in exacerbations of asthma in 9-11 year old children. *BMJ* 1995; 310(6989):1225-1229.
- 53 Kay AB. Allergy and allergic diseases. First of two parts. *N Engl J Med* 2001; 344(1):30-37.
- 54 Kay AB. Allergy and allergic diseases. Second of two parts. *N Engl J Med* 2001; 344(2):109-113.
- 55 Kedda MA, Duffy DL, Bradley B, O’Hehir RE, Thompson PJ (2006). ADAM33 haplotypes are associated with asthma in a large Australian population. *Eur J Hum Genet* 14: 1027–1036.
- 56 Khusnutdinova, E., Gilyazova, I., Ruiz-Pesini, E., Derbeneva, O., Khusainova, R., Khidiyatova, I., Magzhanov, R., Wallace, D. C.. A mitochondrial etiology of neurodegenerative diseases: evidence from Parkinson's disease. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 2008; 1147:1-20.
- 57 Koga Y, Akita Y, Takane N, Sato Y, Kato H. Heterogeneous presentation in A3243G mutation in the mitochondrial tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> gene. *Arch Dis Child* 2000; 82:407-11.

- 58 Kukita, Y., et al. SSCP Analysis of Long DNA Fragments in Low pH Gel. *Human Mutation*; 1997, (10): 400-7.
- 59 Kuwano K, Yoshimi M, Maeyama T, Hamada N, Yamada M, Nakanishi Y., Apoptosis signaling pathways in lung diseases, *Med Chem*. 2005 Jan;1(1):49-56, Research Institute for Diseases of the Chest, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University, 3-1-1 Maidashi, Fukuoka 812-8582, Japan.
- 60 Lambert, R.K., B.R. Wiggs, K. Kuwano, J.C. Hogg, and P.D. Pare. 1993. Functional significance of increased airway smooth muscle in asthma and COPD. *J. Appl. Physiol*. 74:2771–2781.
- 61 Laprice C, Laviolette M, Boutet M et al. Asymptomatic airway hyperresponsiveness: relationships with airway inflammation and remodeling. *Eur Respir J* 1999;14(1):63-73
- 62 Litonjua AA, Carey VJ, Weiss ST et al. Race, socioeconomic factors, and area of residence are associated with asthma prevalence. *Pediatr Pulmonol* 1999; 28(6):394-401.
- 63 Marion Rj, Creer TL, Reynolds RV. Direct and indirect costs associated with the management of childhood asthma. *Ann Allergy* 1985; 54(1):31-34.
- 64 Martinez J, Moreno JJ. Influence of superoxide on arachidonic acid mobilization. *Arch Biochem Biophys* 1996; 336:191-198.
- 65 McFarland R, Clark KM, Morris AA, Taylor RW, Macphail S, Lightowers RN, Thurnbull DM. Multiple neonatal deaths due to a homoplasmic mitochondrial DNA mutation. *Nat Genet* 2002; 30:145-6.
- 66 Mishra NC, Kumar S., Apoptosis: a mitochondrial perspective on cell death, *Indian J Exp Biol*. 2005 Jan; 43(1):25-34, Respiratory Immunology and Asthma Program, Lovelace Respiratory Research Institute, Albuquerque, NM 87108, USA.
- 67 Mosmann TR, Sad S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol Today* 1996; 17(3):138-146.
- 68 Noguchi E, Shibasaki M, Arinami T, et al. Association of asthma and the interleukin-4 promoter gene in Japanese. *Clin Exp Allergy* 1998;28:449-53.

- 69 Orita, M., et al. Detection of Polymorphisms of Human DNA by Gel Electrophoresis as SSCPS. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America; 1989, (86): 2766-70.
- 70 Oryszczyn MP, Bouzigon E, Maccario J, Siroux V, Nadif R, Wright A (2007). Kauffmann Interrelationships of quantitative asthma related phenotypes in the Epidemiological Study on the Genetics and Environment of Asthma, Bronchial Hyperresponsiveness, and Atopy. *J Allergy Clin Immunol* 119: 57–63.
- 71 Palmer LJ, Rye PJ, Gibson NA et al. Airway responsiveness in early infancy predicts asthma, lung function, and respiratory symptoms by school age. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163(1):37-42.
- 72 Panhuysen CI, Bleeker ER, Koeter GH et al. Characterization of obstructive airway disease in family members of probands with asthma. An algorithm for the diagnosis of asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 156(6 Pt 1):1734-1742.
- 73 Papageorgiou N, Gaga M, Marossis C et al., Prevalence of asthma and asthma-like symptoms in Athens, Greece. *Respir Med* 1997; 91(2):83-88.
- 74 Pepe, C., S. Foley, J. Shannon, C. Lemiere, R. Olivenstein, P. Ernst, M.S. Ludwig, J.G. Martin, and Q. Hamid. 2005. Differences in airway remodeling between subjects with severe and moderate asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 116:544–549.
- 75 Pulkes, T., Sweeney, M. G., Hanna, M. G. (2000) "Increased risk of stroke in patients with the A12308G polymorphism in mitochondria". *Lancet.* 356 (9247): 2068-2069.
- 76 Rabe KF, Vermeire PA, Soriano JB et al., Clinical management of asthma in 1999: the Asthma Insights and Reality in Europe (AIRE) study. *Eur Respir J* 2000; 16(5):802-807
- 77 Raby Benjamin A., MD, MPH, Barbara Klanderma, PhD, Amy Murphy, PhD, Salvatore Mazza, BSc, Carlos A. Camargo, Jr, MD, DrPH, Edwin K. Silverman, MD, PhD and Scott T. Weiss, MD, MSc, A common mitochondrial haplogroup is associated with elevated total serum IgE levels, *J Allergy Clin Immunol*, 351-358, August 2007.



- 78 Ramos-Barbon, D., J.F. Presley, Q.A. Hamid, E.D. Fixman, and J.G. Martin. 2005. Antigen-specific CD4+ T cells drive airway smooth muscle remodeling in experimental asthma. *J. Clin. Invest.* 115:1580–1589.
- 79 Rasmussen F, Lambrechtsen J, Siersted HC et al. Asymptomatic bronchial hyperresponsiveness to exercise in childhood and the development of asthma related symptoms in young adulthood: The Odense Schoolchild Study. *Thorax* 1999; 54(7):587-589.
- 80 Rasmussen F, Taylor DR, Flannery EM et al. Outcome in adulthood of asymptomatic airway hyperresponsiveness in childhood: a longitudinal population study. *Pediatr Pulmonol* 2002; 34(3):164-171.
- 81 Ricki Lewis, Mariëlle Hoefnagels, Douglas Gaffin, Bruce Parker, LIFE, fourth edition, chapter 36; 721.
- 82 Robert M. Berne, Matthew N. Levy, Αρχές Φυσιολογίας (Principles of Physiology), δεύτερη έκδοση, τόμος I, μέρος IV, Αναπνευστικό σύστημα (Respiratory System), Ηράκλειο 2002, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης.
- 83 Rosenwasser LJ, Klemm DI, Dresback JK et al. Promoter polymorphisms in the chromosome 5 gene cluster in asthma and atopy. *Clin Exp Allergy* 1995; 25:74-8.
- 84 Roth M, Black JL, An imbalance in C/EBPs and increased mitochondrial activity in asthmatic airway smooth muscle cells: novel targets in asthma therapy?, *Br J Pharmacol* 2009 Apr 3; Volume 157 Issue 3 , Pages 331 – 490.
- 85 Roth, M., P.R. Johnson, P. Borger, M.P. Bihl, J.J. Rudiger, G.G. King, Q. Ge, K. Hostettler, J.K. Burgess, J.L. Black, and M. Tamm. 2004. Dysfunctional interaction of C/EBPalpha and the glucocorticoid receptor in asthmatic bronchial smooth-muscle cells. *N. Engl. J. Med.* 351:560–574.
- 86 Sandford AJ, Chagani T, Zhu S, et al. Polymorphisms in the IL-4, IL4RA, and FCER1B genes and asthma severity. *J Allergy Clin Immunol* 2000;106:135-40.
- 87 Schon EA. Mitochondrial genetics and disease. *Trends Biochem Sci* 2000; 25:555-60.
- 88 Schwarz LB. Cellular inflammation in asthma: neutral proteases of mast cells. *Am Rev Respir Dis* 1992;145(2 Pt 2):S18-S21.

- 89 Seneca S, Verhelst H, De Meirleir L, Meire F, Ceyterick-De Groote C, Lissens W, Van Coster R. A new mitochondrial point mutation in the transfer RNA(Leu) gene in a patient with clinical phenotype resembling Kearns-Sayre syndrome. *Arch Neurol* 2001; 58:1113-8.
- 90 Sibblad B, Turner-Warwick M. Factors influencing the prevalence of asthma among first degree relatives of extrinsic and intrinsic asthmatics. *Thorax* 1979; 34(3):332-337.
- 91 Sue CM, Tanji K, Hadjigeorgiou G, Reu AL, Nishino I, Krishna S, Bruno C, Hirano M, Shanske S, Bonilla E, Fishel-Ghodsian N, DiMauro S, Friedman R. Maternally inherited hearing loss in a large kindred with a novel T7511C mutation in the mitochondrial DNA tRNA(Ser(UCN)) gene. *Neurology* 1999; 52:1905-8.
- 92 Szczeklik A, Nizankowska E, Duplaga M. Natural history of aspirin-induced asthma. AIANE Investigations. European Network on Aspirin-Induced Asthma. *Eur Respir J* 2000;16(3):432-436
- 93 Taylor RW, Giordano C, Davidson MM, d'Amari G, Bain H, Hayes CM, Leonard H, Barron MJ, Casali C, Santorelli FM, Hirano M, Lightowers RN, DiMauro S, Turnbull DM. A homoplasmic mitochondrial transfer ribonucleic acid mutation as a cause of maternally inherited hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Col Cardiol* 2003; 41:1786-96.
- 94 Taylor RW, Turnbull DM. Mitochondrial DNA mutations in human disease. *Nat Rev Genet* 2005; 6:389-402.
- 95 Trian T, Benard G, Begueret H, Rossignol R, Girodet PO, Ghosh D, Ousova O, Vernejoux JM, Marthan R, Tunon-de-Lara JM, Berger P. Bronchial smooth muscle remodeling involves calcium-dependent enhanced mitochondrial biogenesis in asthma. *J Exp Med*. 2007 Dec 24; 204(13):3173-81.
- 96 Tysoe C, Robinson D, Brayne C, Denning T, Paykel ES, Huppert FA, Rubinsztein DC. The tRNA(Gln)4336 mitochondrial DNA variant is not a high penetrance mutation which predisposes to dementia before the age of 75 years. *J Med Genet* 1996; 33:1002-1006.
- 97 Udar N, Atilano SR, Memarzadeh M, Boyer DS, Chwa M, Lu S, Maguen B, Langberg J, Coskun P, Wallace DC, Nesburn AB, Khatibi N, Hertzog D, Le K,

- Hwang D, Kenney MC. Mitochondrial DNA haplogroups associated with age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2009 Jun; 50(6):2966-74.
- 98 Ulaganathan Mabalirajan, Amit Kumar Dinda, Sarvesh Kumar, Reema Roshan, Pooja Gupta, Surendra Kumar Sharma, Balaram Ghosh, Mitochondrial Structural Changes and Dysfunction Are Associated with Experimental Allergic Asthma, *The Journal of Immunology*, 2008, 181: 3540-3548.
- 99 Ulrik CS, Backer V, Hesse B et al. Risk factors for development of asthma in children and adolescents: findings from a longitudinal population study. *Respir Med* 1996; 90(10):623-630
- 100 Van Eerdewegh P, Little RD, Dupius J et al. Association of the ADAM33 gene with asthma and bronchial hyperresponsiveness. *Nature* 2002; 418(6896):426-430.
- 101 Vance VJ, Taylor WF. The financial cost of chronic childhood asthma. *Ann Allergy* 1971; 29(9):455-460.
- 102 Variations in the prevalence of respiratory symptoms, self-reported asthma attacks, and use of asthma medication in the European Community Respiratory Health Survey (ECRHS). *Eur Respir J* 1996; 9(4):687-695.
- 103 Weiss KB, Sullivan SD. The economic costs of asthma: a review and conceptual model. *Pharmacoeconomics* 1993; 4(1):14-30.
- 104 Weiss KB, Sullivan SD. The health economics of asthma and rhinitis. I. Assessing the economic impact. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 107(1):3-8.
- 105 Weiss ST, Sparrow D, O'Connor GT. The interrelationship among allergy, airways responsiveness, and asthma. *J Asthma* 1993; 30(5):329-349.
- 106 Weitzman M, Gortmaker S, Walker DK et al. Maternal smoking and childhood asthma. *Pediatrics* 1990;85(4):505-511.
- 107 White SL, Collins VR, Wolfe R, Cleary MA, Shanske S, DiMauro S, Dahl HH, Thorburn DR. Genetic counseling and prenatal diagnosis for the mitochondrial DNA mutations at nucleotide 8993. *Am J Hum Genet* 1999; 65 (2): 474-82.
- 108 Wiesch DG, Meyers DA, Bleecker ER, Genetics of asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 104(5):895-901.

- 109 Wills-Karp M. IL-12/IL-13 axis in allergic asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 107(1):9-18.
- 110 Wilson FH, Hriri A, Farthi A, Zhao H, Petersen KF, Toka HR, Nelson-William C, Raja KM, Shulman GI, Scheinman SJ, Lifton RP, A cause of metabolic defects caused by mutation in a mitochondrial tRNA. *Science* 2004; 306:1190-4.
- 111 Worldwide variations in the prevalence of asthma symptoms: the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC). *Eur Respir J* 1988; 12(2):315-335.
- 112 You, K. R., Wen. S. T. Lee and D. G. Kim. 2002. Cytochrome c oxidase subunit III: a molecular marker for N-(-4-hydroxyphenyl) retinamisse-induced oxidative stress in hepatoma cells. *J. Biol. Chem.* 277:3870-3877.
- 113 Zhang S, Tong AL. Zhang Y, Nie M, Li YX, Wang H, Heteroplasmy level of the mitochondrial tRNA Leu (UUR) A3243G mutation in a Chinese family is positively associated with earlier age-of-onset and increasing severity of diabetes, *Chin Med Sci J*, 2009 Mar; 24(1):20-25.
- 114 Zhu S, Chan-Yeung, Becker AB, et al. Polymorphisms of the IL-4, TNF- $\alpha$ , and FceR1 $\beta$  genes and the risk of allergic disorders in at-risk infants. *Am j Respir Crit Care Med* 2000; 161:1655-9.
- 115 Αιμιλία Ζίφα, Ζήσης Μαμούρης, Κατερίνα Μούτου, Βιολογία, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Θεσσαλίας, 2008.
- 116 Δ.Πολυζωγόπουλος Δ/ντής 4<sup>ης</sup> Πνευμονολογικής Κλινικής ΝΝΘΑ, Β. Πολυχρονόπουλος Δ/ντής Γ' Πνευμονολογικής Κλινικής Σισμανόγλειου ΓΝΑ, Κλινική Πνευμονολογία, Β' Έκδοση, Τόμος Γ, Κεφάλαιο 22, Βρογχικό Άσθμα, Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης
- 117 Α.Χ. Μαργαρίτης, Β.Κ. Γαλανόπουλος, Κ.Ε. Κεραμάρης, Ε. Σ. Μαρίνος, Ι.Σ. Παπασιδέρη, Δ.Ι. Στραβοπόδης, Ι.Π. Τρουγκάκος, Βιολογία Κυττάρου, Τέταρτη έκδοση, ιατρικές εκδόσεις Λίτσας.
- 118 Ματσαγγάνης Μ., Γεωργάτου Ν., Μελισσηνός Χρ., Το κόστος του άσθματος στην Ελλάδα, *Πνεύμων* 10(1): 40-52, 1997.