

*Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών  
Τμήμα Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας*

***Λεπτομερής γενετική ανάλυση στο  
χρωμόσωμα 18 του ποντικού για τον  
εντοπισμό ενός νέου παθογενετικού  
στόχου που προκαλεί θνησιγόνο  
νευρολογικό φαινότυπο***

Ερευνητική εργασία στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού  
Διπλώματος Ειδίκευσης σε συνεργασία με το  
Ερευνητικό Κέντρο Βιοϊατρικών Επιστημών «Αλέξανδρος  
Φλέμιγκ»

***ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ ΚΑΡΑΚΩΣΤΑΣ***

**ΑΘΗΝΑ 2010**

**Τριμελής συμβουλευτική και εξεταστική επιτροπή:**

1. Καθηγητής Παναγιώτης Κατινάκης (Επιβλέπων)
2. Καθηγητής Πολυδεύκης Χατζόπουλος (Μέλος)
3. Ερευνήτρια Γ' Ινστιτούτο Ανοσολογίας Ελένη Ντούνη (Μέλος)

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Π. Κατινάκη, την Ε. Ντούνη και τον Π. Χατζόπουλο ως μέλη της τριμελούς επιτροπής που επέβλεψαν την μεταπτυχιακή μου εργασία.

Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω την Δρ. Ελένη Ντούνη για την ευκαιρία που μου έδωσε να πραγματοποιήσω την μεταπτυχιακή μου εργασία στο εργαστήριό της, στο Ερευνητικό Κέντρο Βιοϊατρικών Επιστημών «Αλέξανδρος Φλέμιγκ». Τόσο για την συνεχή επίβλεψη, την καθοριστική βοήθεια, τις πολύτιμες γνώσεις πάνω στο αντικείμενο της έρευνας αλλά και την υπομονή που επέδειξε καθ' όλη την διάρκεια της παρουσίας μου στο εργαστήριο. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Βαγγέλη Ρηνώτα, τον Φώτη Ιωακειμίδα και την Αλεξάνδρα Νίτη για την πολύτιμη βοήθειά τους στον χειρισμό και εξοικείωση των μηχανημάτων, τις συμβουλές τους, και τις μεθόδους τους που με βοήθησαν ιδιαίτερα κατά την εκτέλεση των πειραμάτων.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b> .....	6
<b>ABSTRACT</b> .....	7

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1<sup>ο</sup>

### ΕΙΣΑΓΩΓΗ

<b>1.1 ΠΡΟΣΘΙΑ ΓΕΝΕΤΙΚΗ</b> .....	8
1.1.1 Χημική Μεταλλαξογένεση με ENU .....	8
<b>1.2 ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ</b> .....	11
1.2.1 Πολυμορφικοί γενετικοί δείκτες .....	11
1.2.2 Γενετική χαρτογράφηση και αναγνώριση ENU επαγόμενων μεταλλάξεων .....	12
<b>1.3 ΕΥΡΕΣΗ ΕΝΟΣ ΜΟΝΤΕΛΟΥ ΑΤΑΞΙΑΣ ΣΤΟ ΠΟΝΤΙΚΙ ΜΕ ΤΥΧΑΙΑ ΜΕΤΑΛΛΑΞΟΓΕΝΕΣΗ</b> .....	15
1.3.1 Η επιληψία/ αταξία στο ποντίκι (Mus musculus).....	15
1.3.2 Εύρεση του φαινοτύπου της αταξίας.....	15
1.3.3 Στατιστική ανάλυση.....	16

<b>1.4</b>	<b>Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΩΝ ΣΤΙΣ ΝΕΥΡΟΕΚΦΥΛΙΣΤΙΚΕΣ</b>	
	<b>ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ.....</b>	<b>17</b>
1.4.1	Μιτοχόνδρια-Δομή και λειτουργία.....	17
1.4.2	Μιτοχονδριακές πρωτεΐνες-μεταφορείς.....	19
1.4.3	Η SLC οικογένεια μιτοχονδριακών μεταφορέων.....	21
1.4.4	Ασθένειες που προκαλούνται από μιτοχονδριακούς μεταφορείς.....	21
1.4.5	Ασθένειες που προκαλούνται από μιτοχονδριακούς μεταφορείς που εμπλέκονται άμεσα με οξειδωτική φωσφορυλίωση.....	22
1.4.5.1	ACC1 ανεπάρκεια.....	23
1.4.5.2	Σύνδρομο Senger's.....	23
1.4.5.3	PiC ανεπάρκεια.....	24
1.4.5.4	Αυτοσωμική επικρατής προοδευτική εξωτερική οφθαλμοπληγία.....	24
1.4.6	Ασθένειες που προκαλούνται από μιτοχονδριακούς μεταφορείς που εμπλέκονται στον ενδιάμεσο μεταβολισμό.....	25
1.4.6.1	CaC ανεπάρκεια.....	25
1.4.6.2	HHH ανεπάρκεια.....	26
1.4.6.3	Εμβρυική μυοκλονική επιληψία (neonatal myoclonic epilepsy).....	27
<b>1.5</b>	<b>ΣΤΟΧΟΙ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΜΕΛΕΤΗΣ.....</b>	<b>28</b>

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2<sup>ο</sup>

### ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

<b>2.1</b>	<b>ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....</b>	<b>29</b>
2.1.1	Στελέχη ποντικών που χρησιμοποιήθηκαν.....	29
2.1.2	Παραλαβή ιστών από ποντίκια για την απομόνωση γενωμικού DNA.....	30

2.1.3	Απομόνωση γενωμικού DNA από ουρές ποντικών.....	30
2.1.4	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) .....	31
2.1.5	Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης .....	32
2.1.6	Πολυμορφικοί δείκτες .....	35
2.1.7	Μέθοδος αλληλούχισης Pyrosequencing .....	37
2.1.8	Στατιστική ανάλυση με το πρόγραμμα R-QTL .....	38
2.1.9	Απομόνωση DNA από πήκτωμα αγαρόζης.....	39
2.1.10	Μέτρηση δύναμης (Grip Strength).....	39
2.1.11	Μέτρηση βάρους (Body Weigth).....	39

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3<sup>ο</sup>

<b>3</b>	<b>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....</b>	<b>41</b>
3.1	Χαρακτηρισμός του φαινοτύπου.....	41
3.2	Αποτέλεσμα λεπτομερούς χαρτογράφησης.....	44
3.3	Η εύρεση του μεταλλαγμένου γονιδίου.....	46

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4<sup>ο</sup>

<b>4</b>	<b>ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....</b>	<b>48</b>
4.1	Υποψήφια γονίδια.....	48
4.2	Εύρεση της μετάλλαξης σε γονίδιο της οικογένειας SLC.....	49
4.3	Μελλοντικοί στόχοι.....	51

	<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....</b>	<b>53</b>
--	--------------------------	-----------

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η Αταξία ανήκει στα εκφυλιστικά νοσήματα του κεντρικού νευρικού συστήματος (ΚΝΣ) όπου η εκφύλιση επικρατεί στην παρεγκεφαλίδα και στα νωτιαίο-παρεγκεφαλιδικά δεμάτια και χαρακτηρίζεται από πολύ μεγάλη ετερογένεια στην αιτιολογία και στα κλινικά φαινοτυπικά χαρακτηριστικά. Η εύρεση νέων γονιδίων που επάγουν αταξία σε οργανισμούς μοντέλα συμβάλει στην κατανόηση των παθογενετικών μηχανισμών και στην αντιμετώπισή της .

Μέσω διαδικασιών τυχαίας μεταλλαξογένεσης στο ποντίκι έχουμε δημιουργήσει ένα νέο μοντέλο αυτοσωμικής υπολειπόμενης αταξίας. Ο φαινότυπος περιλαμβάνει πλάγιασμα κατά το περπάτημα με απροσδιόριστα συνεχή αλλαγή κατεύθυνσης, επιληπτικές κρίσεις, μειωμένο βάρος και πρόωρη θνησιμότητα.

Στα πλαίσια της παρούσας μελέτης κατέστη δυνατή μία λεπτομερής χαρτογράφηση του γονιδιώματος με γενετικούς πολυμορφικούς δείκτες (SSLPs, SNPs) και η αλληλούχιση γονιδίων που ήταν πιθανά να φέρουν την μετάλλαξη. Η πειραματική αυτή διαδικασία οδήγησε στην εύρεση του γονιδίου που φέρει την μετάλλαξη, το οποίο ανήκει στην οικογένεια των μιτοχονδριακών μεταφορέων SLC (Solute Carriers). Πρόκειται για ένα νέο και αχαρακτήριστο μέλος της οικογένειας αυτής όπου ανήκει ένας μεγάλος αριθμός γονιδίων, οι πρωτεΐνες των οποίων βρίσκονται στις εσωτερικές μιτοχονδριακές μεμβράνες και εξειδικεύονται ανάλογα με τα είδη των υποστρωμάτων που μεταφέρουν προς και από την μήτρα του μιτοχονδρίου.

Σκοπός της έρευνας αυτής είναι ο φαινοτυπικός, γενετικός, και μοριακός χαρακτηρισμός του νέου αυτού μοντέλου αταξίας. Η περαιτέρω έρευνα θα οδηγήσει στην κατανόηση των παθογενετικών μηχανισμών στο νέο αυτό μοντέλο μέσα από την ιστοπαθολογική ανάλυση του μοντέλου και την σύγκριση με γνωστές ασθένειες στον άνθρωπο αλλά και τον κυτταρικό και μοριακό χαρακτηρισμό με στόχο την ανάλυση της λειτουργίας της φυσιολογικής και της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης.

## **ABSTRACT**

Ataxia belongs to the neurodegenerative diseases of the central nervous system, where it primarily affects the cerebellar cortex of the brain and it is characterized by a great heterogeneity in the rationale and in the clinical phenotypic characteristics. The discovery of new genes that induce ataxia to model organisms contract to the realization of the pathogenetic mechanisms and how to face it.

Via procedures of random mutagenesis in the mouse we have created a new model of autosomal recessive ataxia. The phenotype includes leaning while walking with unspecified continuous change of direction, episodic crises of consciousness, loss of body weight and premature lethality.

Within this specific study, a detailed linkage genetic analysis using genome-wide polymorphic markers (SSLPs, SNPs) and the sequencing of genes that were possible to provoke the mutation were achieved. This experimental process led to the identification of a gene that carries the mutation, a gene that belongs to the family of the mitochondrial carriers SLC (Solute Carriers). It is about a new unspeakable member of this family in which a large number of genes belongs, their proteins are positioned in the internal mitochondrial membranes and are specialized depending on the types of substrate they carry to and from the mitochondrial matrix.

The aim of this study is the phenotypic, genetic and molecular specific characterization of this new model of ataxia. Further research will lead to the thorough understanding of the pathogenetic mechanisms in this new model through the histopathological analysis of this specific model and its comparison with well known diseases in humans and furthermore the cellular and molecular characterization aiming to the analysis of both the normal and the mutant protein.



# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1<sup>ο</sup>

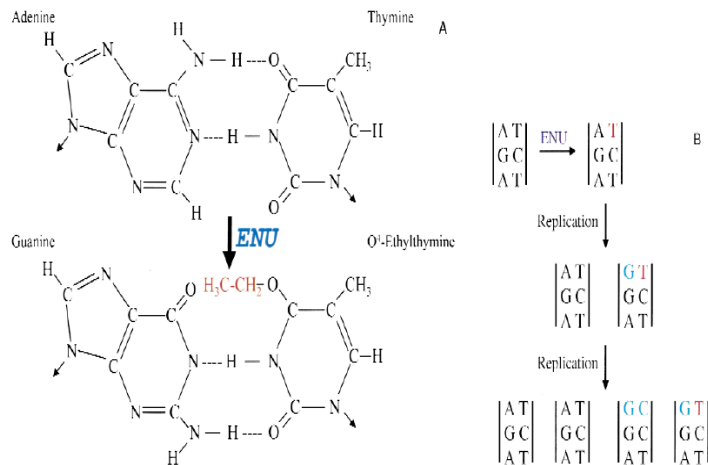
## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 1.1 Πρόσθια Γενετική

Η Πρόσθια Γενετική (Forward Genetics) στηρίζεται κυρίως στην κλασική γενετική όπου έχοντας γνωστό τον φαινότυπο ακολουθεί η εύρεση του μεταλλαγμένου γονιδίου. Η επαγωγή νέων φαινοτύπων πραγματοποιείται με τυχαία μεταλλαξογένεση από ουσίες όπως η αιθυλνιτροσουρία (N-ethyl-N-nitrosourea, ENU) ενώ η ανάλυση και εύρεση των μεταλλαγμένων γονιδίων επιτυγχάνεται με κατάλληλες διασταυρώσεις και γενετική ανάλυση (Ντούνη, 2009).

#### 1.1.1 Χημική Μεταλλαξογένεση με ENU

Η τυχαία χημική μεταλλαξογένεση στο ποντίκι έχει καθιερωθεί ως εργαλείο σε πολλά πεδία της βιολογίας, όπως στην αναγνώριση των γονιδίων που εμπλέκονται σε φυσιολογικές διαδικασίες και ασθένειες αλλά και στην βοήθεια του προσδιορισμού της λειτουργίας των γονιδίων αυτών (Keats, *et. al.*, 2001). Η χημική ένωση η οποία χρησιμοποιείται ευρέως για την επαγωγή σημειακών μεταλλάξεων είναι η αιθυλνιτροζούρια (ENU) (εικόνα 1). Πρόκειται για ένα αλκυλιωτικό παράγοντα που προσθέτει μια αλκυλομάδα στις βάσεις του DNA, κυρίως σε αδερίνη και θυμίνη (Cook, *et. al.*, 2006), προκαλώντας με τον τρόπο αυτό λάθη κατά το ζευγάρωμα των βάσεων, δηλ. η αλκυλιωμένη θυμίνη ζευγαρώνει με γουανίνη αντί αδερίνη.



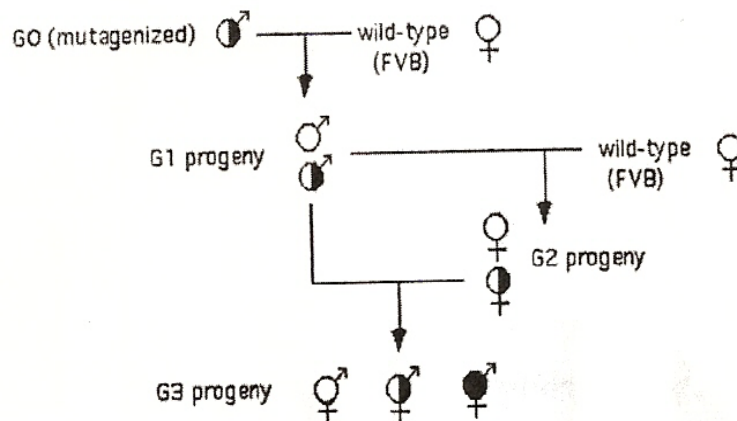
**Εικόνα 1.** Α) Ο χημικός τύπος της αιθυλνιτροζουρίας (ENU). Το μεταλλαξογόνο ENU προσθέτει μια αλκυλομάδα στις βάσεις του DNA δημιουργώντας ζεύγη μη συμπληρωματικών βάσεων κατά την αντιγραφή του DNA με αποτέλεσμα την επαγωγή σημειακών μεταλλάξεων.

Συνέπεια αυτών των μεταλλάξεων είναι η εισαγωγή σημειακών μεταλλάξεων τυχαία στο γονιδίωμα. Στο επίπεδο της πρωτεΐνης προκαλούνται αλλαγές στα αμινοξέα μέσω λαθών στο μάτισμα και δημιουργία πρόωρων κωδικονίων λήξης. Η ουσία ENU δρα σε όλους τους κυτταρικούς τύπους αλλά κυρίως στα προμειωτικά σπερματογόνια βλαστικά κύτταρα. Επίσης αυξάνει τον αριθμό των μεταλλάξεων έως και 12 φορές σε σχέση με την δράση των ακτίνων X (Cook, et. al., 2006).

Η μεταλλαξογένεση επιτυγχάνεται με ενδοπεριτονιακή χορήγηση ENU σε αρσενικό ποντίκι (Γενιά 0: G0), πραγματοποιώντας με αυτό τον τρόπο ένα μεγάλο αριθμό σημειακών μεταλλάξεων στα σπερματογόνια βλαστικά κύτταρα (Keats, et al., 2001). Η χημική ουσία ENU προκαλεί παροδική στειρότητα στο ποντίκι, διότι καταστρέφονται τα υπάρχοντα σπερματοζωάρια και χρειάζονται πάνω από 8 εβδομάδες για να παραχθούν σπερματοζωάρια με ENU-επαγόμενες σημειακές μεταλλάξεις. Στην συνέχεια ο G0 αρσενικός ζευγαρώνει με φυσικού τύπου θηλυκά ποντίκια έτσι ώστε να προκύψουν απόγονοι ετερόζυγοι για κάποια μετάλλαξη (G1). Φαινοτυπική ανάλυση μπορεί να γίνει άμεσα στους G1 απογόνους για εντοπισμό επικρατών κληρονομικών μεταλλαγών (Keats, et al., 2001). Ο χαρακτηρισμός των G1 απογόνων έχει χρησιμοποιηθεί πρόσφατα σε

προγράμματα μεγάλης κλίμακας μεταλλαξογένεσης σε ποντίκια. Τα προγράμματα αυτά διεξήχθησαν στο Harwell της Αγγλίας (Nolan et. al. 2000) και στο Μόναχο της Γερμανίας (Hrabe de Angelis et. al. 2000). Στα προγράμματα αυτά εξετάστηκαν δεκάδες χιλιάδες G1 ποντίκια για ανωμαλίες στο αίμα αλλά και στη συμπεριφορά, και αναγνωρίστηκαν πάνω από 300 επιβεβαιωμένες μεταλλαξογόνες σειρές ποντικών (Keats, *et al.*, 2001).

Η πλειονότητα βέβαια των φαινοτύπων οφείλεται σε υπολειπόμενες μεταλλάξεις οπότε για την αποκάλυψη τους απαιτούνται διασταυρώσεις τριών γενεών (εικόνα 2). Σ' αυτό το πλάνο διασταυρώσεων οι G1 αρσενικοί ζευγαρώνουν με φυσικού τύπου θηλυκές και στην συνέχεια με τις κόρες τους G2. Στην G3 γενιά υπάρχει 12,5% (1/8) πιθανότητα να βρίσκεται σε ομοζυγωτία κάθε ξεχωριστή μετάλλαξη που μεταφέρει ο G1 αρσενικός (Keats, *et al.*, 2001).



**Εικόνα 2.** Πλάνο διασταυρώσεων για την δημιουργία απογόνων πρώτης (G1) και τρίτης γενιάς (G3) με σκοπό τον εντοπισμό επικρατών και υπολειπόμενων μεταλλάξεων αντίστοιχα.

Έχει δειχθεί ότι σε κατάλληλες δόσεις η ENU δημιουργεί μία νέα μετάλλαξη για οποιαδήποτε γονίδιο, σε αναλογία 1 προς 700 γαμέτες (Keats, *et al.*, 2001), δηλαδή πρέπει να ελεγχθούν 700 γαμέτες για να εντοπιστεί μια σημειακή μετάλλαξη σ' ένα γονίδιο. Σε όλο το γονιδίωμα περιμένουμε περίπου 2600 σημειακές μεταλλάξεις, αφού η συχνότητα των μεταλλαγών είναι 1 μετάλλαξη ανά Mbp. Γνωρίζοντας ότι ολόκληρο το γονιδίωμα του ποντικού είναι 2,6 Gb από το οποίο το 1,5 % ανήκει σε κωδικές περιοχές (42Mb), αναμένονται περίπου μεταλλάξεις σε 42 γονίδια για κάθε G1 ποντίκι, από τις οποίες λόγω εκφυλισμού του γενετικού κώδικα μόνο οι 32 μεταλλάξεις οδηγούν σε αλλαγή της

αμινοξικής αλληλουχίας. Αντίστοιχα, κάθε G3 απόγονος φέρει 4 μεταλλάξεις σε ομοζυγία (Cook, et. al., 2006). Ο αριθμός των απογόνων που είναι αναγκαίοι για την γενετική ανάλυση ενός φαινοτύπου, είναι διαφορετικός για επικρατείς (10 απόγονοι) και υπολειπόμενες μεταλλάξεις (30 απόγονοι). Στις επικρατείς μεταλλάξεις απαιτούνται λιγότεροι απόγονοι αφού εμφανίζουν μεγαλύτερη φαινοτυπική αναλογία (50% φέρουν την μετάλλαξη) σε σχέση με τις υπολειπόμενες μεταλλάξεις (12,25% είναι ομοζυγώτες για την μετάλλαξη).

## 1.2 ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

### 1.2.1 Πολυμορφικοί γενετικοί δείκτες

Οι πολυμορφικοί γενετικοί δείκτες άρχισαν να χρησιμοποιούνται ευρύτατα με την αποκωδικοποίηση του γονιδιώματος του ποντικού, λόγω της διαφοράς που επιδεικνύουν μεταξύ των στελεχών των ποντικών που επιλέγονται. Είναι δυνατόν, γνωρίζοντας τις αρχικές ποικιλίες των γονίων, ο προσδιορισμός της κατανομής των δεικτών στις διάφορες χρωμοσωμικές θέσεις των απογόνων. Σήμερα οι πιο ευρέως διαδεδομένοι γενετικοί δείκτες είναι οι πολυμορφικοί δείκτες μήκους απλής αλληλουχίας (simple sequence length polymorphisms, SSLPs) και οι πολυμορφικοί δείκτες ενός νουκλεοτιδίου (single nucleotide polymorphisms, SNPs) (Ντούνη, 2009).

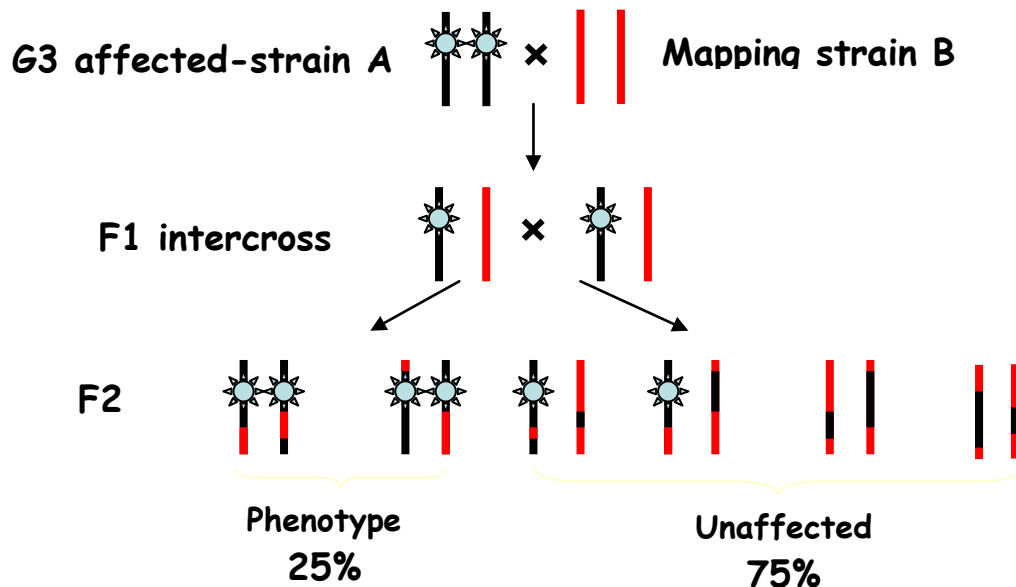
**Πολυμορφισμός μήκους απλής αλληλουχίας (SSLPs):** Αποτελείται από επαναλήψεις μιας αλληλουχίας μήκους 2-4 νουκλεοτιδίων. Στο γονιδίωμα του ποντικού υπάρχουν περίπου 100.000 σε αριθμό. Οι δείκτες αυτοί χρησιμοποιούνται ευρύτατα για την σάρωση του γονιδιώματος μέχρι όμως ενός σημείου, περίπου στις 10-20Mb. Δεν επαρκούν όμως για την χαρτογράφηση μικρότερων περιοχών.

**Πολυμορφισμός ενός νουκλεοτιδίου (SNPs):** Για την σάρωση των χρωμοσωμικών περιοχών μικρότερων των 10-20Mb χρησιμοποιούνται οι γενετικοί δείκτες SNPs όπου πρόκειται για πολυμορφισμό μόνο ενός νουκλεοτιδίου και στο γονιδίωμα του ποντικού υπάρχουν περίπου 5.000.000. Οι δείκτες αυτοί επιτρέπουν πιο λεπτομερή χαρτογράφηση

του μεταλλαγμένου γονιδίου διότι βρίσκονται συχνότερα στο γονιδίωμα λόγω του μεγάλου αριθμού τους (Ντούνη, 2009).

### 1.2.2 Γενετική χαρτογράφηση και αναγνώριση ENU-επαγόμενων μεταλλάξεων

Η γενετική χαρτογράφηση αναφέρεται στον γρήγορο εντοπισμό της κάθε μετάλλαξης σε μια συγκεκριμένη χρωμοσωμική περιοχή. Η μέθοδος αυτή ξεκινά πρώτα με τις κατάλληλες διασταυρώσεις ώστε να παραχθούν ομόζυγα άτομα για συγκεκριμένες επικρατείς ή υπολειπόμενες μεταλλάξεις. Τα άτομα αυτά παράγονται με την διασταύρωση G3 απογόνων που φέρουν την μετάλλαξη σε ομόζυγία με μια καθαρή φυσικού τύπου (wt) σειρά χαρτογράφησης έτσι ώστε οι ετερόζυγοι απόγονοι (F1) να φέρουν ένα χρωμόσωμα από τον κάθε γονέα. Στην συνέχεια οι ετερόζυγοι F1 απόγονοι διασταυρώνονται μεταξύ τους με συνέπεια να λαμβάνουμε στην F2 γενιά ομόζυγα άτομα που εμφανίζουν τον φαινότυπο σε ποσοστό 25% (εικόνα 3). Από τα άτομα αυτά απομονώνεται γενωμικό DNA οπότε μπορεί να ξεκινήσει η χαρτογράφηση.



**Εικόνα 3.** Στρατηγική διασταυρώσεων για την χαρτογράφηση των F2 απογόνων αφού διαχωριστούν σε δύο ομάδες, α) F2 με φαινότυπο (ομόζυγων για την μετάλλαξη) και β) F2 χωρίς φαινότυπο (ετερόζυγων και ομόζυγων).

Οι διασταυρώσεις που προαναφέρθηκαν διαφέρουν για τον εντοπισμό των επικρατών μεταλλάξεων όπου χρησιμοποιείται στρατηγική της αναδιασταύρωσης (backcrossing), δηλ. της διασταύρωσης απογόνων της F1 γενιάς με την σειρά χαρτογράφησης. Και για τις δύο πιο πάνω στρατηγικές διασταυρώσεων απαιτούνται δύο γενιές και αρκετοί μήνες, ανάλογα με την ηλικία που καθίσταται δυνατή η ανίχνευση του φαινοτύπου (Keats, *et al.*, 2001). Η φιλοσοφία της χαρτογράφησης στηρίζεται στο φαινόμενο του ανασυνδυασμού που συμβαίνει κατά την διάρκεια της μειωτικής διαίρεσης. Όταν ζεύγη ομόλογων χρωμοσωμάτων έρχονται κοντά κατά την μείωση στο στάδιο της πρόφασης I, ανταλλάσσουν τμήματα με την διαδικασία του ανασυνδυασμού. Είναι επίσης γνωστό ότι όσο απομακρυνόμαστε από ένα σημείο του χρωμοσώματος τόσο αυξάνεται η πιθανότητα να συμβεί ανασυνδυασμός δηλ. η συχνότητα ανασυνδυασμού μεταξύ δύο χρωμοσωμικών σημείων, που ορίζεται και ως γενετική απόσταση, είναι αυτή που χρησιμεύει στην χαρτογράφηση μιας μετάλλαξης με την βοήθεια γενετικών δεικτών. Ο μειωτικός ανασυνδυασμός που συμβαίνει στους γαμέτες των F1 απογόνων λειτουργεί ως γενετικό «ανακάτεμα» το οποίο ανιχνεύεται με την βοήθεια πολυμορφικών δεικτών. Ολόκληρο το γονιδίωμα ελέγχεται με γενετικούς δείκτες ώστε να προσδιοριστούν οι χρωμοσωμικές περιοχές που προέρχονται από την σειρά μεταλλαξογένεσης ή από την σειρά χαρτογράφησης. Οι δείκτες αυτοί αποτελούν πολύ χρήσιμα εργαλεία για την γενετική ανάλυση διότι διαφέρουν μεταξύ των διαφόρων ποικιλιών ποντικών οπότε με την χρήση τους εύκολα, γνωρίζοντας τις αρχικές ποικιλίες των γονιών, προσδιορίζεται η κατανομή τους στις διάφορες χρωμοσωμικές θέσεις μετά από ανασυνδυασμό. Οι γενετικοί δείκτες λειτουργούν ως σημαίες στο γονιδίωμα υποδεικνύοντας τη χρωμοσωμική θέση της μετάλλαξης λόγω σύνδεσης τους με το γονίδιο. Όσο πιο μακριά βρίσκεται ένας γενετικός δείκτης από ένα γονίδιο τόσο περισσότερες πιθανότητες υπάρχουν να γίνει ανασυνδυασμός μεταξύ τους (Cook, *et. al.*, 2006). Κατά συνέπεια με αυτόν τον τρόπο εκτιμάται η γενετική απόσταση του δείκτη από το γονίδιο αυτό.

Στους F2 απογόνους η χρωμοσωμική περιοχή που φέρει την υπολειπόμενη μετάλλαξη είναι ομόζυγη προς τους γενετικούς δείκτες της μεταλλαγμένης σειράς (G1). Αντίθετα στις άλλες χρωμοσωμικές περιοχές που είναι απομακρυσμένες από την μετάλλαξη π.χ. σε άλλο χρωμόσωμα η πιθανότητα ανασυνδυασμού μεταξύ τους είναι τυχαία (50%).

Για την χαρτογράφηση της υποψήφιας μετάλλαξης χρησιμοποιούνται περίπου 20 F2 ποντίκια, όπου αρχικά επιτυγχάνεται εντοπισμός της μετάλλαξης σε περιοχή 10-20Mb με αρκετά μεγάλη σιγουριά (95%) (Cook, et. al., 2006). Για τον περιορισμό της μετάλλαξης σε μικρότερη χρωμοσωμική περιοχή από τα 10 Mb, αφενός είναι απαραίτητη η εύρεση περισσότερων γενετικών δεικτών μέσα στην περιοχή αυτή, και αφετέρου είναι απαραίτητος ο έλεγχος μεγαλύτερου αριθμού F2 απογόνων, ώστε να αυξηθούν οι πιθανότητες εύρεσης ανασυνδυασμού στα δείγματα αυτά. Θεωρητικά έχει αποδειχθεί ότι δεν πραγματοποιούνται ανασυνδυασμοί μεταξύ μιας περιοχής μικρότερης του 1Mb οπότε η γενετική ανάλυση μπορεί να φτάσει μέχρι το σημείο αυτό. Στην περιοχή των 10Mb υπάρχουν αρκετά γονίδια που μπορεί να εμφανίζονται ως υποψήφια για την δημιουργία του φαινοτύπου και η επιλογή τους πραγματοποιείται αποκλείοντας άλλα γονίδια που προκαλούν διαφορετικό φαινότυπο από αυτόν που υπάρχει. Διαφορετικά όταν δεν είναι δυνατή αυτή η πληροφορία του φαινοτύπου, η επιλογή στηρίζεται στην γνωστή γενικά δράση των γονιδίων αυτών σε βιολογικό και βιοχημικό επίπεδο, για την εύρεση κοινών βιοχημικών μονοπατιών ή πιθανών ομοιοτήτων στην δράση και έκφρασή τους. Τα υποψήφια γονίδια που θα παραμείνουν μετά τη συγκεκριμένη διαδικασία θα πρέπει άμεσα να αλληλουχηθούν για την εύρεση της σημειακής μετάλλαξης. Γνωρίζοντας όμως ότι υπάρχουν περίπου 4 ομόζυγες λειτουργικές μεταλλάξεις σε κάθε G3 απόγονο είναι σχεδόν αδύνατο να συνυπάρχουν περισσότερες από μια μεταλλάξεις σε μια χρωμοσωμική περιοχή 10Mb που να ευθύνονται για τον φαινότυπο που μελετάται. Όταν βρεθεί η μετάλλαξη και κατ' επέκταση το μεταλλαγμένο γονίδιο το οποίο προκαλεί τον φαινότυπο αυτό, θα πρέπει να επιβεβαιωθεί για το αν είναι υπεύθυνο για τον συγκεκριμένο φαινότυπο. Η γενετική επιβεβαίωση αυτή γίνεται με την χρήση knockout και διαγονιδιακών ποντικών για το γονίδιο αυτό. Η σύγκριση του φαινοτύπου των αντίστοιχων knockout ποντικών, όπου έχει αδρανοποιηθεί το συγκεκριμένο γονίδιο, με τον ENU-επαγόμενο φαινότυπο θα καθορίσει κατά πόσο η μετάλλαξη στο συγκεκριμένο γονίδιο δημιουργεί τον φαινότυπο αυτό. Επίσης εάν η διασταύρωση με το διαγονιδιακό ποντίκι που υπερεκφράζει το γονίδιο αυτό, αναστείλει τον φαινότυπο τότε το εν λόγω γονίδιο θα καθορίζει τον φαινότυπο (Cook, et. al., 2006).

### **1.3 Εύρεση ενός μοντέλου αταξίας στο ποντίκι με τυχαία μεταλλαξογένεση**

#### **1.3.1 Η επιληψία/ αταξία στο ποντίκι (*Mus musculus*)**

Το ποντίκι χρησιμοποιείται ευρέως ως μοντέλο ασθενειών του ανθρώπου, λόγω του μεγάλου αριθμού απογόνων, του σύντομου χρόνου αναπαραγωγής αλλά και της εύκολης γενετικής τροποποίησης του γονιδιώματός του. Πριν από το 1994 μόνο μια μετάλλαξη σε ένα γονίδιο είχε βρεθεί που προκαλεί φλοιώδη επιληψία στο ποντίκι (James O. et. al., 1998). Από τότε 24 μονογονιδιακές μεταλλάξεις ανακαλύφθηκαν που προκαλούν τον επιληπτικό φαινότυπο (James, et. al., 1998). Τα περισσότερα από αυτά τα γονίδια (20 από τα 25 γονίδια) αναγνωρίστηκαν στα ποντίκια, με μεθόδους απαλοιφής γονιδίων (Knockout), τροποποίησης ή λιγότερο συχνά υπερέκφρασης. Στις περισσότερες περιπτώσεις ο επιληπτικός φαινότυπος εμφανίστηκε τυχαία προς ευχάριστη έκπληξη των ερευνητών, αφού η επιληψία είναι αναμφισβήτητα η πιο συχνή νευρολογική ασθένεια στα ποντίκια από επαγόμενες μεταλλάξεις. Υπάρχουν επίσης πάνω από 100 ανθρώπινες αταξικές και επιληπτικές ασθένειες κάποιες από τις οποίες σχετίζονται με αντίστοιχα μοντέλα στο ποντίκι, όπως Stargazer, Tottering, Lethargic, Slow-wave epilepsy, Mocha, Ducky, Woozy ποντίκια κ.α. (Sarkisian, 2001). Η χρήση του ποντικού ως μοντέλο ασθενειών δίνει την δυνατότητα στην κατανόηση των μηχανισμών των κληρονομούμενων επιληψιών και στην αναζήτηση νέων θεραπευτικών προσεγγίσεων (Palau et. al., 2006).

#### **1.3.2 Εύρεση του φαινοτύπου της αταξίας**

Με την μέθοδο της ENU μεταλλαξογένεσης στο εργαστήριο της Δρ. Ντούνη στο Ινστιτούτο Ανοσολογίας του Ερευνητικού Κέντρου Βιοϊατρικών Επιστημών «Αλέξανδρος Φλέμιγκ» δημιουργήθηκαν και εντοπίστηκαν G3 ποντίκια με έντονη αταξία κατά την βάδιση και επιληπτικές κρίσεις που χαρακτηρίζονταν από αυτοσωμικά υπολειπόμενο τρόπο κληρονομικότητας. Ο φαινότυπος εμφανίζεται μεταξύ της 2<sup>ης</sup>-3<sup>ης</sup> εβδομάδας της ζωής τους και τα ποντίκια πεθαίνουν μεταξύ της 5<sup>ης</sup> και της 8<sup>ης</sup> εβδομάδας. Τα χαρακτηριστικά της αταξίας είναι πλάγιασμα κατά το περπάτημα με απροσδιόριστα

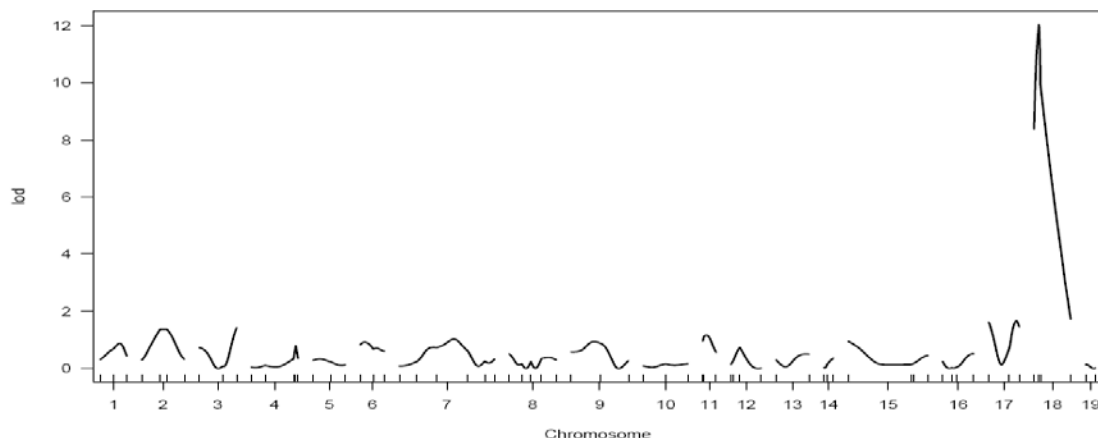


συνεχή αλλαγή κατεύθυνσης, επιληπτικές κρίσεις, μειωμένο βάρος και μειωμένη δραστηριότητα. Επίσης ο φαινότυπος αυτός εμφανίζεται ταυτόχρονα σε αρσενικά και θηλυκά ποντίκια.

### 1.3.3 Στατιστική ανάλυση

Στα πλαίσια προηγούμενης έρευνάς μας (Καρακώστας 2008) εντοπίσαμε την υπεύθυνη μετάλλαξη για τον φαινότυπο της αταξίας στο χρωμόσωμα 18 μέσω της γενετικής ανάλυσης σύνδεσης. Η εικόνα 4 προέρχεται από την ανάλυση των δεδομένων της γενετικής ανάλυσης χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα R-QTL στη γλώσσα R (Karl W. Broman). Πρόκειται για μια μέθοδο στατιστικής ανάλυσης η οποία χρησιμοποιεί τα γονοτυπικά δεδομένα από την χαρτογράφηση μέσω των πολυμορφικών δεικτών για την εύρεση της υποψήφιας περιοχής για την μετάλλαξη. Εάν το όριο των τιμών Lodscore που λαμβάνουμε είναι μεγαλύτερο του 3,6 (threshold) τότε ο συγκεκριμένος πολυμορφικός δείκτης είναι κοντά στην υποψήφια μετάλλαξη και υπάρχει σύνδεση μεταξύ τους .

Στην εικόνα 4 φαίνεται ξεκάθαρα ότι οι πολυμορφικοί δείκτες του χρωμοσώματος 18 δίνουν υψηλές τιμές Lodscore υποδεικνύοντας την πολύ μεγάλη πιθανότητα να βρίσκεται εκεί η μετάλλαξη. Η τιμή του Lodscore (στον κάθετο άξονα Y) είναι 12 για το χρωμόσωμα 18 είναι πολύ μεγαλύτερη του 3,6 ενώ για τα υπόλοιπα χρωμοσώματα είναι κάτω του 2, που σημαίνει ότι σίγουρα η μετάλλαξη βρίσκεται στο χρωμόσωμα 18.



**Εικόνα 4.** Στατιστική ανάλυση και προσδιορισμός του Lodscore για όλα τα χρωμοσώματα με δεδομένα απ' όλους τους πολυμορφικούς δείκτες που χρησιμοποιήθηκαν για την χαρτογράφηση.

Είναι εμφανές ότι οι δείκτες του χρωμοσώματος 18 δίνουν την μεγαλύτερη κορυφή. Στον άξονα X εμφανίζονται σε αριθμό τα χρωμοσώματα 1 έως 19. Στον άξονα Y εμφανίζονται οι τιμές του Lodscore.

Στην προαναφερθείσα εργασία (Καρακώστας 2008) η μετάλλαξη είχε βρεθεί στο χρωμόσωμα 18 και συγκεκριμένα σε μια περιοχή μεταξύ των 23,7Mb και 72,1Mb. Η περιοχή αυτή των 48,4 Mb περιέχει περίπου 300 γονίδια υποψήφια να φέρουν την μετάλλαξη. Ο περαιτέρω προσδιορισμός μέσω της χαρτογράφησης θα μας δώσει πιο ακριβή στοιχεία για την εύρεση της μετάλλαξης. Ο ερευνητικός σκοπός της μελέτης αυτής είναι η λεπτομερής χαρτογράφηση του χρωμοσώματος 18, η εύρεση του μεταλλαγμένου γονιδίου και η φαινοτυπική ανάλυση σε αρχικό επίπεδο του μοντέλου αυτού. Η εύρεση του μεταλλαγμένου γονιδίου και ο μετέπειτα χαρακτηρισμός του θα διαλευκάνει τους μοριακούς και κυτταρικούς μηχανισμούς παθογένεσης και θα προωθήσει την εφαρμογή θεραπευτικών προσεγγίσεων.

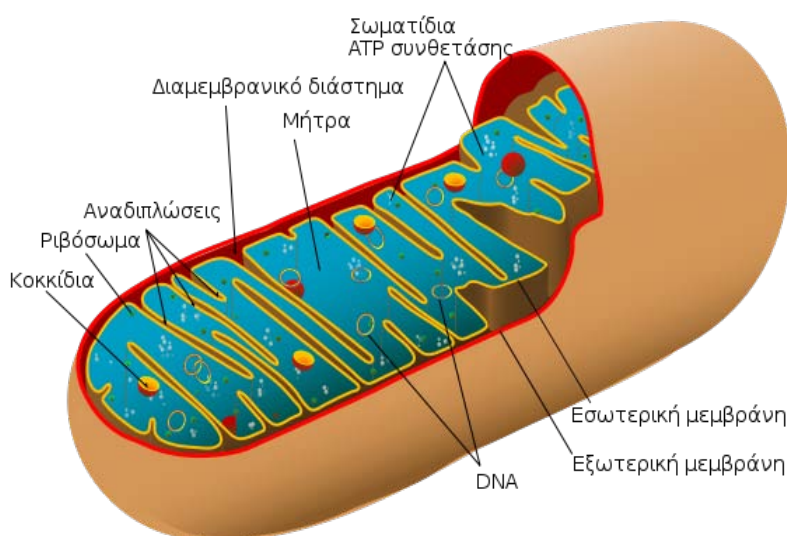
## **1.4 Ο ρόλος των μιτοχονδρίων στις αταξικές νευροεκφυλιστικές ασθένειες**

### **1.4.1 Μιτοχόνδρια – Δομή και λειτουργία**

Τα μιτοχόνδρια είναι κυτταρικά οργανίδια των ευκαρυωτικών οργανισμών. Αναφέρονται και ως εργοστάσια των κυττάρων, λόγω των μεταβολικών διεργασιών που επιτελούν αποδίδοντας μεγάλα ποσά ενέργεια. Ο αριθμός τους ποικίλει ανάλογα με το είδος των οργανισμών και των κυτταρικών τύπων. Τα μιτοχόνδρια εμφανίζονται σε διάφορα μεγέθη και σχήματα. Αποτελούνται από δύο μεμβράνες και διακρίνονται από δύο διακριτά τμήματα όπου η εξωτερική είναι λεία, ενώ η εσωτερική είναι αναδιπλωμένη και σχηματίζει πολυάριθμες δισκοειδείς ή δακτυλοειδείς πτυχώσεις (εικόνα 5).

Παρόλο που η κύρια λειτουργία των μιτοχονδρίων είναι η σύνθεση του ATP μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης αυτά τα οργανίδια επιτελούν και πολλές άλλες λειτουργίες. Λειτουργούν σ' αυτό αρκετά μεταβολικά μονοπάτια, όπως ο κύκλος του

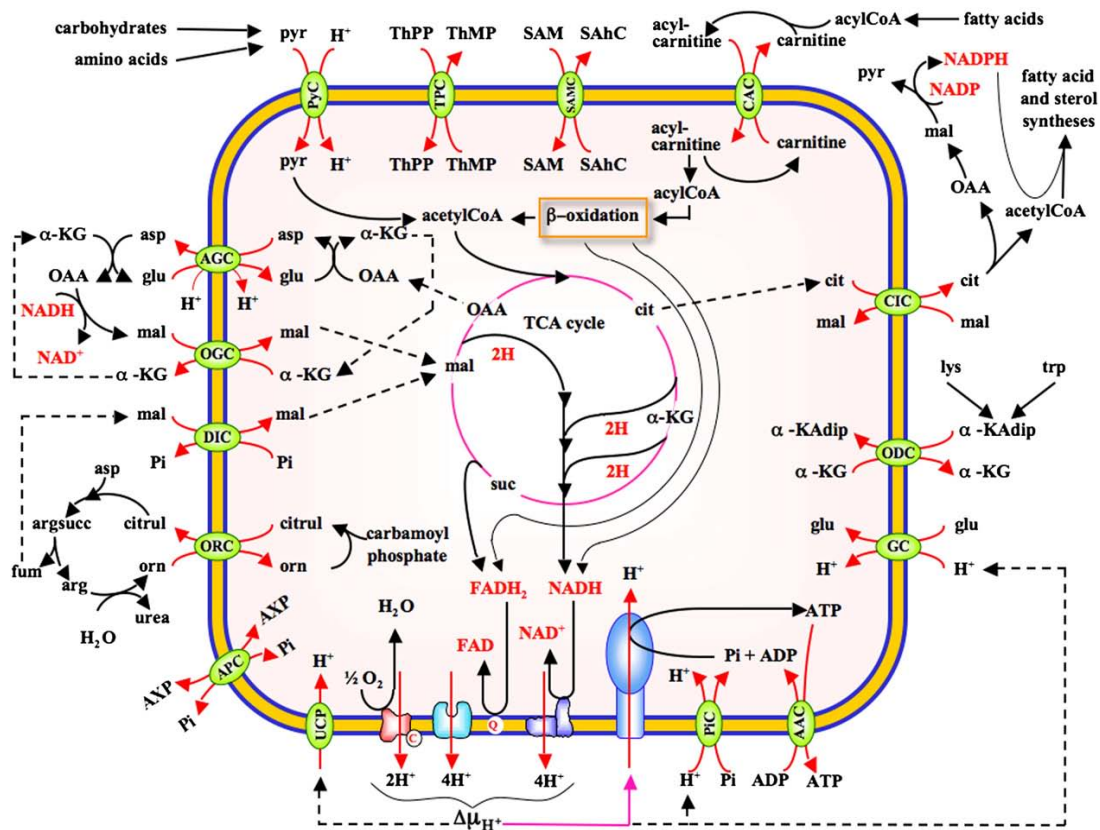
κιτρικού οξέος όπου δημιουργούνται και οι ελεύθερες ρίζες (ROS) που παράγονται από την οξειδωτική φωσφορυλίωση, αλλά και άλλες θεμελιώδης βιολογικές λειτουργίες όπως η  $Ca^{+}$  κυτταρική σηματοδότηση, ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, ο κυτταρικός θάνατος και η κυτταρική απόπτωση. Επίσης αρκετά ένζυμα που εμπλέκονται στην διαχείριση των ελεύθερων ριζών (ROS), στον καταβολισμό των αμινοξέων και στην βιοσύνθεση των λιπαρών οξέων, της χοληστερόλης, των στεροειδών ορμονών, των ουβικουιτινών κ.α. βρίσκονται στο εσωτερικό των μιτοχονδρίων. Η επικοινωνία των μιτοχονδρίων με άλλα τμήματα του κυττάρου πραγματοποιείται κυρίως από πρωτεΐνες μεταφορείς που βρίσκονται στην μιτοχονδριακή μεμβράνη και επιτρέπουν επιλεκτικά την μεταφορά στοιχείων μέσα και έξω από την μιτοχονδριακή μήτρα. Όλες αυτές οι λειτουργίες εκτελούνται από έναν μεγάλο αριθμό πρωτεϊνών-μεταφορέων που μεταγράφονται από γονίδια του πυρήνα του κυττάρου, μεταφράζονται στο κυτταρόπλασμα και μεταφέρονται στα μιτοχόνδρια.



**Εικόνα 5.** Δομή του μιτοχονδρίου σε εγκάρσια τομή και εμφάνιση των δομικών του στοιχείων και χαρακτηριστικών.

#### 1.4.2 Μιτοχονδριακές πρωτεΐνες-μεταφορείς

Τα μιτοχόνδρια ως παραγωγοί ενέργειας είναι πολύ σημαντικά οργανίδια των κυττάρων και μιτοχονδριακές ασθένειες προκαλούν εκατοντάδες κλινικούς φαινοτύπους αρκετοί από τους οποίους αφορούν το νευρικό σύστημα. Η οξειδωτική φωσφορυλίωση και η αναπνευστική αλυσίδα ηλεκτρονίων είναι λειτουργίες που απαιτούν αρκετά υποστρώματα και μεταβολίτες. Καθίσταται έτσι πολύ σημαντική η ομαλή εισαγωγή και μεταφορά στην σωστή θέση και σε επαρκείς ποσότητες των εμπλεκόμενων αυτών στοιχείων. Λόγω του ότι τα μιτοχόνδρια και το κυτταρόπλασμα συνεργάζονται σε ένα μεγάλο αριθμό μεταβολικών κυτταρικών διεργασιών, απαιτείται η ανάγκη από υψηλές συγκεντρώσεις ποικίλων μεταβολιτών, νουκλεοτιδίων και συμπαραγόντων μέσα και έξω από αυτά. Η μεταφορά των στοιχείων αυτών κατά μήκος της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης πραγματοποιείται από μία οικογένεια πρωτεϊνών που κωδικοποιείται από το πυρηνικό DNA των κυττάρων και ονομάζονται μιτοχονδριακοί μεταφορείς. Οι μεταφορείς αυτοί εμπλέκονται στον κύκλο του Krebs, στην οξειδωτική φωσφορυλίωση, στην διαμόρφωση της νουκλεοτιδικής και δεοξυριβονουκλεοτιδικής συγκέντρωσης στην μήτρα του μιτοχονδρίου, στην σύνθεση και αποσύνθεση του μιτοχονδριακού DNA, RNA και πρωτεϊνών, στην οξείδωση των λιπαρών οξέων, στην γλυκονογένεση, στην λιπογένεση κ.α. (εικόνα 6) (F. Palmiery 2008).



**Εικόνα 6.** Ο μεταβολικός ρόλος των μιτοχονδριακών μεταφορέων. Η παραπάνω εικόνα εμφανίζει 15 μεταφορείς που πραγματοποιούν μεταφορές μεταβολιτών μεταξύ της εσωτερικής πλευράς της μιτοχονδριακής μεμβράνης. Αυτοί οι μεταφορείς εμπλέκονται στην οξειδωτική φωσφορυλίωση (AAC, PiC, UCP), στο μονοπάτι της οξειδοαναγωγής (AGC, OGC, DIC, CIC, CAC, PyC), στην ομοίωση της ενδομιτοχονδριακής συγκέντρωσης της νουκλεοτιδικής αδενίνης (APC), στην μεθυλίωση του DNA, mtRNA και μερικών ενδομιτοχονδριακών πρωτεϊνών (SAMC), στην εισαγωγή του απαραίτητου συνενζύμου της πυροφωσφατιδικής θυαμίνης (ThPP) που απαιτείται για την δραστηριότητα των συμπλόκων του πυροσταφυλικού και οξογλουταρικής – δευδρογενάσης (TPC), στον μεταβολισμό των αμινοξέων (AGC, ORC, GC, ODC). Η παραπάνω εικόνα δεν εμφανίζει όλα τα μεταβολικά μονοπάτια στα οποία οι ήδη αναγνωρισμένοι μεταφορείς εμπλέκονται. (F. Palmieri 2008)

Η διάκριση των μιτοχονδριακών μεταφορέων γίνεται ανάλογα με το είδος των ουσιών που μεταφέρονται από αυτά. Μερικά μέλη αυτής της μεγάλης οικογένεια αποτελούν μεταφορείς του φωσφόρου (PiC), ADP/ATP, ATP/Mg/Pi, γλουταμίνης, ορνιθίνης, καρνιτίνης, ακυλκαρνιτίνης.

### 1.4.3 Η SLC οικογένεια μιτοχονδριακών μεταφορέων

Οι μιτοχονδριακοί μεταφορείς, που κωδικοποιούνται από τα γονίδια της οικογένειας SLC25 (Solute Carrier Family 25), εντοπίζονται στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων, όπου καταλύουν την μεταφορά των μεταβολιτών από και προς την μεμβράνη και ανήκουν στην οικογένεια των SLC25 μιτοχονδριακών μεταφορέων. Ο κοινός ρόλος της οικογένειας αυτής είναι η εξασφάλιση της επικοινωνίας μεταξύ του κυτταροπλάσματος και των μιτοχονδρίων του κυττάρου, διευκολύνοντας την διέλευση μεγάλης ποικιλίας υδατοδιαλυτών ουσιών στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων. Εκτός της βασικής τους λειτουργίας, αρκετοί μιτοχονδριακοί μεταφορείς επιτελούν σπουδαίο ρόλο στην ρύθμιση της ισορροπίας των παραγώγων της φωσφορυλίωσης και της οξειδοαναγωγής μεταξύ του κυτοπλάσματος και του μιτοχονδρίου. Τα υποστρώματα που μεταφέρονται από τους μεταφορείς διαφέρουν και στο είδος αλλά και στο μέγεθος, από το μικρότερο που είναι το  $H^+$  στο μεγαλύτερο και το πιο υψηλά φορτισμένο, το ATP. Στον άνθρωπο και στο ποντίκι έχουν ανιχνευτεί 50 περίπου μέλη (M. Zeviani 2001).

### 1.4.4 Ασθένειες που προκαλούνται από μιτοχονδριακούς μεταφορείς

Υπάρχουν αρκετές ασθένειες που προκαλούνται από μεταλλάξεις στους μιτοχονδριακούς μεταφορείς. Μερικά παραδείγματα παρατίθενται στον πίνακα 1. Όλες αυτές οι ασθένειες μεταφέρονται με τους νόμους την μεντελιανής κληρονομικότητας και συγκεκριμένα κληρονομούνται με αυτοσωμικά υπολειπόμενο τρόπο, με εξαίρεση την αυτοσωμική επικρατή προοδευτικά εξωτερική οφθαλμοπληγία (adPEO).

Οι μιτοχονδριακές ασθένειες που οφείλονται σε μεταλλάξεις των μιτοχονδριακών μεταφορέων χωρίζονται σε δύο κατηγορίες. Η πρώτη αφορά μεταλλάξεις σε μιτοχονδριακούς μεταφορείς που εμπλέκονται άμεσα στην οξειδωτική φωσφορυλίωση και η δεύτερη σε μεταφορείς που εμπλέκονται στον ενδιάμεσο μεταβολισμό.

**Πίνακας 1.** Ασθένειες που σχετίζονται με μιτοχονδριακούς μεταφορείς (F. Palmieri 2008)

Disorder	Gene	Carrier	Substrates
----------	------	---------	------------

AAC1 deficiency	SLC25A4	AAC1	ADP/ATP
Sengers' syndrome	?	AAC1	ADP/ATP
PiC deficiency	SLC25A3	PiC	Phosphate
adPEO	SLC25A4	AAC1	ADP/ATP
CAC deficiency	SLC25A20	CAC	Carnitine/acylcarnitines
HHH syndrome	SLC25A15	ORC1	Ornithine/citrulline
NICCD/CTLN2	SLC25A13	AGC2	Aspartate/glutamate
Amish microcephaly	SLC25A19	TPC	Thiamine pyrophosphate
Neonatal myoclonic epilepsy	SLC25A22	GC1	Glutamate

#### 1.4.5 Ασθένειες που προκαλούνται από μιτοχονδριακούς μεταφορείς που εμπλέκονται άμεσα με οξειδωτική φωσφορυλίωση

Η συμπτωματολογία αυτών των ασθενειών χαρακτηρίζεται από ανεπαρκή παραγωγή ενέργειας στους ιστούς όπου οι μεταφορείς αυτοί παράγονται και επιτελούν σπουδαίο ρόλο στην οξειδωτική φωσφορυλίωση. Γνωρίζοντας ότι το καταλυτικό κέντρο της ενζυμικής ATP συνθάσης είναι άμεσα εκτεθειμένο προς την μήτρα του μιτοχονδρίου, η εισαγωγή του ανόργανου φωσφόρου (Pi) και του ADP προς τα μιτοχόνδρια είναι απαραίτητη για την οξειδωτική φωσφορυλίωση του ADP σε ATP. Αυτή η εισαγωγή καταλύεται από δύο διαφορετικούς μεταφορείς τους PiC και ADP/ATP μεταφορείς αντίστοιχα. Μεταλλάξεις στους μεταφορείς αυτούς προκαλούν ασθένειες παραδείγματα όπως AAC1 ανεπάρκεια, Senger's σύνδρομο, PiC ανεπάρκεια και adPEO (αυτοσωμική επικρατής προοδευτικά εξωτερική οφθαλμοπληγία) (πίνακας 1) (F. Palmiery 2008).

##### 1.4.5.1 ACC1 ανεπάρκεια

Το SLC25A4 γονίδιο κωδικοποιεί ένα ADP/ATP μεταφορέα του καρδιακού μυ (ACC1, ή αλλιώς ANT1). Βρέθηκε σε ασθενή μια μετάλλαξη σε ένα πολύ υψηλά συντηρημένο αμινοξύ της αλανίνης στην θέση 123 η οποία αντικαταστάθηκε από

ασπαρτικό οξύ (A123D). Η υποκατάσταση του A123D έχει ως αποτέλεσμα την ολοκληρωτική απώλεια της ενεργότητας της πρωτεΐνης και την ικανότητα της να μεταφέρει το ADP και ATP στα ανασυσταθέντα λιποσωμάτια. Ο ασθενής με την ACC1 ανεπάρκεια εμφανίζει αδυναμία, γαλακτική οξέωση, υπερτροφική καρδιομυοπάθεια και ήπια μυοπάθεια χωρίς προοδευτική εξωτερική οφθαλμοπληγία (PEO). Οι ενεργότητες των τριών ανεξάρτητων συμπλόκων της αναπνευστικής αλυσίδας (complexes I, III, IV) είναι αρκετά χαμηλότερες από το φυσιολογικό και η ενεργότητα της συνθάσης του κιτρικού οξέος πολύ υψηλότερη από το φυσιολογικό, πιθανόν λόγω του μιτοχονδριακού πολλαπλασιασμού. Η έλλειψη της ACC1 ενεργότητας είναι βιώσιμη για ένα ενήλικο άτομο, πιθανόν λόγω της αντιστάθμισης της γλυκόλυσης και/ ή της μεταφοράς της ενεργότητας από άλλο ACC ισόμορφο ή άλλους νουκλεοτιδικούς μιτοχονδριακούς μεταφορείς, όπως τους ATP-Mg/Pi μεταφορείς. (B.H. Graham et. al., 1997)

#### **1.4.5.2 Σύνδρομο Senger's**

Το Senger's σύνδρομο είναι μια κληρονομούμενη αυτοσωμική υπολειπόμενη ασθένεια που χαρακτηρίζεται από εκ' γενετής καταρράκτη, υπερτροφική καρδιομυοπάθεια, μιτοχονδριακή μυοπάθεια και γαλακτική οξέωση αλλά χωρίς PEO. Στους μυϊκούς ιστούς η συγκέντρωση της πρωτεΐνης ACC1 είναι δραματικά μειωμένη. Ακόμα η μεταφορά του νουκλεοτιδίου αδενίνη μειώνεται σημαντικά κατά την ανασύσταση των λιποσωμάτων. Δεν έχει βρεθεί μετάλλαξη στο γονίδιο SLC25A4 όπως και η εμπλοκή του ACC1 τμήματος έχει αποκλειστεί. Η γενετική ταυτότητα του Senger's συνδρόμου δεν είναι ακόμα γνωστή. Παρόλα αυτά η ACC1 ανεπάρκεια φαίνεται ότι σχετίζεται με τα κλινικά συμπτώματα της ασθένειας. Πιθανός μια ατελής μεταγραφή ή μετάφραση ή στόχευση της ACC1 πρωτεΐνης είναι υπεύθυνη για την διαταραχή αυτή. (E.Z. Jordens et. al., 2002)

#### **1.4.5.3 PiC ανεπάρκεια**

Η PiC ανεπάρκεια χαρακτηρίζεται από υποτονική μυϊκή δύναμη, προοδευτική υπερτροφική καρδιομυοπάθεια, υψηλά επίπεδα πλάσματος του άλατος γαλακτικού οξέος,



και γαλακτική οξέωση. Ακόμα έχει παρατηρηθεί σε ορισμένες περιπτώσεις κυάνωση και χαμηλή αύξηση βάρους. Οι ασθενείς πεθαίνουν από καρδιακή ανεπάρκεια σε 4 με 9 μήνες. Σύμφωνα με την ιδιαιτερότητα των ιστών και της συμπτωματολογίας της ασθένειας, η σύνθεση του ATP από την οξειδωτική φωσφορυλίωση παρατηρείται ελαττωματική μόνο στους μυς. Πράγματι, έχει βρεθεί ότι στα μιτοχόνδρια της καρδιάς η αναπνοή που διεγείρεται από το ADP έχει δραστικά μειωθεί, ενώ η μη συζευγμένη αναπνοή είναι φυσιολογική. Ακόμα, η δραστικότητα των ενζύμων της αναπνευστικής αλυσίδας, πυροσταφυλικής δευδρογονάσης και ολιγομυκινική ATP-άσης είναι φυσιολογική. Δεν έχει βρεθεί καμία μετάλλαξη σε γονίδια του μιτοχονδριακού DNA που εκφράζουν υπομονάδες της ATP συνθάσης ή σε ισόμορφο SLC25A4 γονίδιο εκφραζόμενο ειδικά στους μυς της καρδιάς και την μεταγραφή του ATP/ADP μεταφορέα. Η ασθένεια αυτή σύμφωνα με όλα τα παραπάνω οφείλεται σε μετάλλαξη του γονιδίου SLC25A3 το οποίο εκφράζει έναν PiC μεταφορέα και καταλύει φυσιολογικά την μεταφορά φωσφόρου (P) είτε μαζί με πρωτόνια H<sup>+</sup>, είτε ανταλλάσσοντας ιόντα OH<sup>-</sup> στα μιτοχόνδρια. Η ανταλλαγή του φωσφόρου είναι πολύ σημαντική για την διαδικασία της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης και πιθανή διαταραχή οδηγεί στο σύνδρομο της PiC ανεπάρκειας εμποδίζοντας την σύνθεση του ATP από την διαδικασία της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. (J.A. Mayer et. al., 2997)

#### **1.4.5.4 Αυτοσωμική επικρατής προοδευτική εξωτερική οφθαλμοπληγία**

Η αυτοσωμική επικρατής προοδευτική εξωτερική οφθαλμοπληγία (adPEO) είναι κλινικά και γενετικά μια ετερογενής διαταραχή η οποία συνήθως κληρονομείται ως επικρατής. Προκαλείται από ανωμαλίες σε συγκεκριμένα πυρηνικά γονίδια και χαρακτηρίζεται από πολλαπλές ελλείψεις του μιτοχονδριακού DNA σε μετά-μιτωτικούς ιστούς. Συνεπώς η adPEO συνιστά ένα παράδειγμα διαταραχής πυρηνικών γονιδίων που επηρεάζουν αρνητικά το μιτοχονδριακό DNA. Οι ελλείψεις του μιτοχονδριακού DNA προκαλούν μείωση των πρωτεϊνών της αναπνευστικής αλυσίδας όπου οδηγούν σε ελλιπή παραγωγή ενέργειας. Τα τυπικά συμπτώματα της διαταραχής αυτής είναι η προοδευτική εξωτερική οφθαλμοπληγία λόγω της αδυναμίας των εξωτερικών μυών των ματιών, αστάθεια και ήπια πτωτική μυοπάθεια. Επιπλέον συμπτώματα περιλαμβάνουν αμφίπλευρο καταρράκτη, βαρηκοΐα, ρίγη, αταξία, κινητική περιφερική νευροπάθεια, γενική μυική

αδυναμία, μη ανεκτική αντοχή στην άσκηση, κατάθλιψη, Παρκινσονισμό και ενδοκρινική δυσλειτουργία. Η βιοψία των μυών των ασθενών έδειξε τραχείς μυικές ίνες και μειωμένη ενεργότητα της αναπνευστικής αλυσίδας στις κύτταρα των ινών αυτών. Η PEO αποτελεί μία από τις πιο κοινές ασθένειες που προκαλείται από ελλείψεις του μιτοχονδριακού DNA. Παρόλα αυτά πρόσφατα ανακαλύφθηκαν μεταλλάξεις σε τρία πυρηνικά γονίδια τα οποία έχουν δείξει ότι συσχετίζονται και είναι υπεύθυνα για την adPEO προκαλώντας δευτερεύουσες ελλείψεις στο μιτοχονδριακό DNA. Ένα από αυτά τα γονίδια είναι το SLC25A4 το οποίο κωδικοποιεί έναν μυο-καρδιακό μιτοχονδριακό ACC1 μεταφορέα. Τα υπόλοιπα δύο γονίδια είναι το Twinkle που κωδικοποιεί μια μιτοχονδριακή DNA ελικάση, και το POLG1 που κωδικοποιεί μια καταλυτική υπομονάδα της μιτοχονδριακής πολυμεράσης γ. (J. Kaukonen et.al., 2000)

#### **1.4.6 Ασθένειες που προκαλούνται από μιτοχονδριακούς μεταφορείς που εμπλέκονται στον ενδιάμεσο μεταβολισμό**

Στην δεύτερη κατηγορία ανήκουν οι ασθένειες που οφείλονται σε αλλαγές γονιδίων που εκφράζουν μιτοχονδριακούς μεταφορείς οι οποίοι απαιτούνται για μιτοχονδριακές λειτουργίες εκτός της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης και συγκεκριμένα του ενδιάμεσου μεταβολισμού. Στις ασθένειες αυτής της κατηγορίας είναι γνωστές μέχρι στιγμής η CAC ανεπάρκεια, το HHH σύνδρομο, η AGC2 ανεπάρκεια, η μικροκεφαλία και η νεογνική μυοκλονική επιληψία.

##### **1.4.6.1 CAC ανεπάρκεια**

Η καρνιτινική-ακυλκαρνιτινική (CAC) ανεπάρκεια είναι η πρώτη διαταραχή που συσχετίστηκε με την οικογένεια των SLC25 γονιδίων. Το SLC25A20 γονίδιο κωδικοποιεί την CAC, μια πρωτεΐνη η οποία καταλύει την ανταλλαγή σε αναλογία ένα προς ένα μεταξύ μορίου ακυλκαρνιτίνης το οποίο εισέρχεται στα μιτοχόνδρια με το μόριο της ελεύθερης καρνιτίνης που υπάρχει στην μήτρα. Η CAC πρωτεΐνη είναι πολύ συντηρημένη σε όλους τους οργανισμούς, κυρίως λόγω της θέσης κλειδιού που κατέχει στον κύκλο της καρνιτίνης. Η CAC ανεπάρκεια είναι μια πολύ σοβαρή αυτοσωμική υπολειπόμενη

ασθένεια, επηρεάζοντας περισσότερο τα όργανα της καρδιάς, ήπατος, εγκεφάλου και των σκελετικών μυών. Η ασθένεια αυτή είναι απειλητική για την ζωή με πιθανό επεισόδιο κώματος μετά από νηστεία (λόγω της υπογλυκαιμίας, αφού το ήπαρ είναι ανίκανο να παράγει κετόνη από το λίπος και οι μυς χρησιμοποιούν την γλυκόζη), επίσης προκαλεί καρδιομυοπάθεια, καρδιακή αρρυθμία, μυϊκή ατονία, και δυσλειτουργία του ήπατος. Άλλα συμπτώματα περιλαμβάνουν εμετούς, υποτονία, υπνηλία, ηπατομεγαλία, καρδιακή ανεπάρκεια, αναπνευστική δυσλειτουργία και επιληπτικά επεισόδια.

Η CAC ανεπάρκεια παρουσιάζεται με δύο διαφορετικούς φαινοτύπους. Ο πρώτος και πιο συχνός εμφανίζεται σε ένα πρώιμο εμβρυικό στάδιο και το δεύτερο και πιο σπάνιο εμφανίζεται στην νηπιακή ηλικία ή πιο σπάνια στην εφηβεία. Στα νεογέννητα στα οποία η CAC διατηρείται συνήθως δεν παρατηρούνται καρδιακά προβλήματα και μπορούν να ανταπεξέλθουν στην θεραπεία με διάλυμα τριγλυκεριδίων όπου δεν απαιτείται η καρνιτίνη για να εισέλθουν στα μιτοχόνδρια. Γενικά και οι δύο φαινότυποι δεν είναι ιάσιμοι, και ασθενείς με CAC ανεπάρκεια παθαίνουν υπογλυκαιμικές κρίσεις ο οποίες μπορούν να οδηγήσουν σε εγκεφαλικό, κώμα και θάνατο, ή ο θάνατος επέρχεται μετά από καρδιακό επεισόδιο. (M. Huizing et. al., 1997)

#### **1.4.6.2 ΗΗΗ ανεπάρκεια**

Μια ακόμα διαταραχή του μεταβολισμού είναι η ΗΗΗ (hyperammonemia, hyperornithinemia, homocitrullinuria) ανεπάρκεια που προκαλείται από μια μετάλλαξη στο SLC25A15 γονίδιο. Το γονίδιο αυτό κωδικοποιεί έναν μεταφορέα ορνιθίνης (ORC1), ο μεταφορέας αυτός εξυπηρετεί την μεταφορά της ορνιθίνης-κιτροουλίνης στα μιτοχόνδρια και καταλύει την ανταλλαγή της στον πολύ σημαντικό κύκλο της ουρίας. Οι μεταφορείς ορνιθίνης επιτελούν σημαντικό ρόλο στον κυτταρικό μεταβολισμό. Κάτω από συνθήκες χαμηλής συγκέντρωσης αργινίνης στους ιστούς όπου η δράση της αργινάσης είναι αμελητέα, παράγεται η ορνιθίνη ενδομιτοχονδριακά από την γλουταμίνη και εξέρχεται στο κυτταρόπλασμα για την εκτέλεση της πολυαμινικής βιοσύνθεσης. Αντίστροφα, όταν η συγκέντρωση της αργινίνης είναι πολύ υψηλή, η ορνιθίνη που παράγεται από την υδρόλυση της αργινίνης στο κυτταρόπλασμα θα πρέπει να εισαχθεί στο μιτοχόνδριο όπου εκεί θα μετασχηματιστεί σε γλουταμίνη και προλίνη από την ορνιθινική

αμινοτρανσφεράση, ένα ένζυμο που βρίσκεται στην μήτρα των μιτοχονδριών σε πολύ μεγάλη συγκέντρωση στο ήπαρ και στα νεφρά.

Το HHH σύνδρομο χαρακτηρίζεται από υπεραμμωναιμία, υπερορνυθιναιμία και ομοκυτρουλιναιμία. Τα πιο συχνά συμπτώματα αυτής της διαταραχής είναι επεισόδια που φέρνουν σύγχυση στον ασθενή, λήθαργο και κώμα λόγω της υπεραμμωναιμίας, και νευρολογικά χαρακτηριστικά όπως διανοητική καθυστέρηση, σπαστική παραπληγία και επιληψία. Επίσης συχνά παρουσιάζεται ανωμαλία στην λειτουργία του ήπατος που οδηγεί σε μορφές ηπατίτιδας και θρομβώσεις. Κάποια από τα συμπτώματα εμφανίζονται σε πολύ οξεία μορφή όπως συνεχή επεισόδια εμετού, αταξία, λήθαργο, κώμα, μυοκλονικές συσπάσεις και ηπατίτιδα. Ενώ άλλα συμπτώματα ακολουθούν μία πιο ήπια αλλά χρονικά προσδιορισμένη μορφή εμφάνισης όπως αδυναμία λήψης τροφών πλούσιων σε πρωτεΐνες, θρομβωτικές ανωμαλίες, καθυστέρηση στην ανάπτυξη, προοδευτική εγκεφαλοπάθεια με διανοητική καθυστέρηση, κ.α. (J. Camacho et. al., 2006)

#### **1.4.6.3 Εμβρυική μυοκλονική επιληψία (neonatal myclonic epilepsy)**

Μεταλλάξεις στο SLC25A22 γονίδιο που κωδικοποιεί ένα ισόμορφο γλουταμινικό μεταφορέα (GC1), προκαλούν μια μορφή πρώιμης μυοκλονικής επιληψίας (early myoclonic epilepsy, EME), που ονομάζεται εμβρυική μυοκλονική επιληψία. Η πρωτεΐνη GC1 μαζί με την GC2, ένα άλλο ισόμορφο που κωδικοποιείται από το SLC25A18 γονίδιο εντοπίζονται στην μιτοχονδριακή μεμβράνη και καταλύουν την συνμεταφορά γλουταμινικού/H<sup>+</sup> με πολύ μεγάλη εξειδίκευση. Επειδή η γλουταμίνη μεταφέρεται μαζί με ένα πρωτόνιο (H<sup>+</sup>) από την GC προκύπτει μια διαδρομή κατά την διάρκεια εισόδου στην μιτοχονδριακή μεμβράνη που εξαρτάται από το ΔpH, με συνέπεια αυτού η γλουταμίνη να ευνοείται για την παραγωγή της ενέργειας των μιτοχονδριών. Παρόλα αυτά όταν η γλουταμίνη παράγεται ενδομιτοχονδριακά (από την οξειδωση της προλίνης), η GC μπορεί να λειτουργεί και με αντίθετη διαδρομή για τον περιορισμό της ενδομιτοχονδριακής συγκέντρωσης της γλουταμίνης. Τα συμπτώματα αυτού του συνδρόμου σε ασθενείς είναι πρώιμη μυοκλονική επιληψία, υποτονία, προοδευτική μικροκεφαλία, ασυνήθιστη δυσλειτουργία του οπτικού νεύρου, ταχεία εξέλιξη εγκεφαλοπάθειας και σπαστικότητα. Παρόλο που η παθογένεια της εμβρυονικής μυοκλονικής επιληψίας είναι ακόμα άγνωστη,

υπάρχουν πληροφορίες σημαντικές για την κατανόησή της. Κατά την διάρκεια ανάπτυξης του εμβρύου, η GC1 εκφράζεται πρώτα στο εγκέφαλο και συγκεκριμένα μεταξύ περιοχών που σχετίζονται με την δημιουργία και τον έλεγχο των μυοκλονικών επιληψιών. Η έκφραση της GC1 είναι πολύ μεγαλύτερη στα αστροκύτταρα από τα νευρικά κύτταρα. Τα μιτοχόνδρια των αστροκυττάρων δεν περιέχουν ασπαρτικούς/ γλουταμινικούς μεταφορείς και γι' αυτό η εισαγωγή πραγματοποιείται μόνο μέσω των γλουταμινικών μεταφορέων. Η γλουταμίνη είναι σημαντικός διεγερτικός νευροδιαβιβαστής και μετά την απελευθέρωσή του στις συνάψεις συνεχίζει να λαμβάνεται από τα αστροκύτταρα. Πιθανά λοιπόν η επιληψία που προκαλείται λόγω της μετάλλαξης της GC1 είναι αποτέλεσμα της ανεπάρκειας των γλουταμινικών μιτοχονδριακών μεταφορέων στα αστροκύτταρα, κάτι που οδηγεί στην αύξηση της συγκέντρωσης της ενδοσυναπτικής γλουταμίνης. (F. Molinari et.al., 2005)

## **1.5 Στόχοι της παρούσας μελέτης**

Οι στόχοι της παρούσας μελέτης είναι η λεπτομερής χαρτογράφηση του χρωμοσώματος 18, η εύρεση του γονιδίου που φέρει την σημειακή μετάλλαξη και ο χαρακτηρισμός της μετάλλαξης αυτής σε νουκλεοτιδικό και αμινοξικό επίπεδο. Ακόμη στόχος της μελέτης αυτής αποτελεί ο φαινοτυπικός, χαρακτηρισμός του νέου αυτού μοντέλου αταξίας σε ένα αρχικό επίπεδο τόσο στην ανάλυση των κλινικών χαρακτηριστικών του φαινοτύπου όσο και στην ιστολογική ανάλυση για την εύρεση πιθανών ιστολογικών αλλοιώσεων.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2<sup>ο</sup>

### ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

#### 2.1 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Για τις ανάγκες της χαρτογράφησης χρησιμοποιήθηκαν αρκετά δείγματα γενωμικού DNA F2 ποντικών. Αρχικά χρησιμοποιήθηκαν 20 δείγματα από αταξικά ποντίκια και 8 δείγματα ποντικών με φυσιολογικό φαινότυπο που προήλθαν από τους ίδιους γονείς. Στην συνέχεια και όταν εντοπίστηκε το χρωμόσωμα στο οποίο βρίσκεται η μετάλλαξη χρησιμοποιήθηκαν περισσότερα δείγματα που προέρχονται από ποντίκια F3 και F4 γενιάς, είτε με φαινότυπο αταξίας είτε φυσικού τύπου.

##### 2.1.1 Στελέχη ποντικών που χρησιμοποιήθηκαν

Έχει ειδη αναφερθεί ότι ένα μεγάλο πλεονέκτημα της χρήσης του ποντικού (*Mus musculus*) είναι η ύπαρξη πολλών στελεχών. Συγκεκριμένα το γενετικό υπόβαθρο (background) για τα πειράματα της ENU μεταλλαξογένεσης χρησιμοποιήθηκαν τρία στελέχη, τα μικτά στελέχη C57BL/6J και 129 στα οποία έγινε η μεταλλαξογένεση και το στέλεχος DBA/2J που χρησιμοποιήθηκε για την χαρτογράφηση..

##### 2.1.2 Παραλαβή ιστών από ποντίκια για την απομόνωση γενωμικού DNA

Η ποσότητα του DNA που απαιτείται για την χαρτογράφηση και την εύρεση της γονιδιακής μετάλλαξης απομονώνεται από τις ουρές των ποντικών. Πρώτα γίνεται σήμανση του ζώου και καταχωρείται με έναν αύξοντα αριθμό. Η κοπή της ουράς γίνεται περίπου στις 10 μέρες της ηλικίας των ποντικών.

### 2.1.3 Απομόνωση γενωμικού DNA από ουρές ποντικών

Η διαδικασία απομόνωσης του DNA πραγματοποιείται ακολουθώντας το κάτωθι πρωτόκολλο.

1. Η σήμανση του ποντικού γίνεται κόβοντας ένα από τα δάχτυλα του ποδιού του με συγκεκριμένη φορά και μέθοδο, αφήνοντας πάντα το πρώτο χωρίς να κόψουμε τίποτα (άκοπο), και συνεχίζοντας πάντα από το πρώτο πάνω δεξιά δάκτυλο, από τα τέσσερα που έχει σε κάθε πόδι, και πηγαίνοντας πάντα ανάποδα από την φορά του ρολογιού.
2. Κόβουμε 1 cm από την ουρά του ζώου και την τοποθετούμε σε ένα άδειο 1,5ml eppendorf.
3. Προσθέτουμε σ' αυτό 400μl από tail buffer «διάλυμα για ουρές».
4. Προσθέτουμε 2 μl πρωτεΐνάσης K.
5. Επωάζουμε όλη τη νύχτα σε υδατόλουτρο 55°C.
6. Την επόμενη μέρα: Αναδεύουμε μέχρι να διαλυθεί η ουρά.
7. Προσθέτουμε ίσο όγκο φαινόλης (400μl) και αναμιγνύουμε έντονα για περίπου 5 λεπτά.
8. Φυγοκεντρούμε σε 12000 rpm για 10 λεπτά.
9. Μεταφέρουμε (300-350μl) της υδάτινης φάσης προσεκτικά σε καθαρό eppendorf.
10. Προσθέτουμε 70% του όγκου του διαλύματος που έχουμε στο eppendorf, ισοπροπανόλη (~250μl) για την κατακρήμιση του DNA.
11. Αναμιγνύουμε ελαφρώς και «ψαρεύουμε» το DNA με κλειστή στην άκρη γυάλινη πιπέτα Pasteur.
12. Εμβαπτίζουμε την πιπέτα σε 70% αιθανόλη (4-8 φορές).
13. Εμβαπτίζουμε σε 100% αιθανόλη (4-8 φορές).
14. Αφήνουμε την πιπέτα να στεγνώσει στον αέρα για 10 λεπτά.
15. Διαλύουμε το DNA σε 200μl dd H<sub>2</sub>O, αφήνοντας την πιπέτα μέσα σε ένα eppendorf (με νερό) για περίπου 30 λεπτά.
16. Τέλος βάζουμε τους αναγνωριστικούς αριθμούς των ποντικών σε κάθε ένα eppendorf και τα αποθηκεύουμε στους -20° C.

### Διαλύματα

Διάλυμα για ουρές (tail buffer) σε τελικό όγκο 500ml: 0.05M (25ml Tris 1M pH 8.0)  
0.1M (100ml EDTA 0,5M)  
0.1M (10ml NaCl 5M)  
1% (50ml SDS 10%)

Στην αντίδραση χρησιμοποιούμε 400μl από το παραπάνω διάλυμα.

Πρωτεΐνάση K: Διάλυμα stock 10mg/ml σε 50mM Tris pH 8.0

Αιθανόλη: 70% και 100%

Ισοπροπανόλη

Φαινόλη

### **Πλαστικά – Γυαλικά**

Πιπέτες Pasteur

Eppendorf 1,5ml

#### **2.1.4 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)**

Η αντίδραση PCR αποτελεί μια *in vitro* μέθοδο για την ενζυμική σύνθεση εξειδικευμένων αλληλουχιών DNA με την χρήση δυο ολιγονουκλεοτιδίων που χρησιμοποιούνται ως εκκινητές για την αντιγραφή της μήτρας του DNA μέσω της δράσης του ενζύμου Taq DNA πολυμεράσης. Τα ζεύγη των εκκινητών σχεδιάζονται με τέτοιο τρόπο ώστε να είναι συμπληρωματικά ως προς τις αλυσίδες του δίκλωνου DNA που πρόκειται να αντιγραφεί.

Η μέθοδος PCR βασίζεται σε μια σειρά επαναλαμβανόμενων κύκλων κάθε ένας από τους οποίους περιλαμβάνει τρία διακριτά στάδια:

- 1 Κατά το πρώτο στάδιο η δίκλωνη μήτρα DNA αποδιατάσσεται με θέρμανση στους 92-95° C.



- 2 Ακολούθως η θερμοκρασία μειώνεται σε επίπεδα που επιτρέπουν τον υβριδισμό των ολιγονουκλεοτιδίων – εκκινητών στις συμπληρωματικές θέσεις των μονόκλωνων αλυσίδων της μήτρας DNA (50-60<sup>0</sup> C).
- 3 Τέλος πραγματοποιείται η σύνθεση της συμπληρωματικής αλυσίδας μέσω της δράσης του ενζύμου Taq DNA πολυμεράσης, η οποία χρησιμοποιεί ως εκκινητές τα ολιγονουκλεοτίδια που έχουν υβριδίσει στις μονόκλωνες αλυσίδες της μήτρας DNA κατά το προηγούμενο στάδιο (72<sup>0</sup> C). Για τη σύνθεση χρησιμοποιούνται τα τέσσερα τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), τα οποία περιλαμβάνονται στο μίγμα της αντίδρασης PCR.

Η επαναλαμβανόμενη εκτέλεση του παραπάνω κύκλου αντιγραφής έχει ως αποτέλεσμα τη συσσώρευση αντιγράφων της περιοχής στόχου της μήτρας DNA κατά εκθετικό ρυθμό, καθώς τα προϊόντα του προηγούμενου κύκλου μπορεί να χρησιμοποιηθούν ως μήτρα στον επόμενο κύκλο. Ως τελικό προϊόν της αντίδρασης PCR λαμβάνονται δίκλινα τμήματα DNA τα οποία περιλαμβάνουν την αλληλουχία της αρχικής μήτρας DNA η οποία περικλείεται από τους δύο εκκινητές.

*Η αντίδραση γίνεται ως εξής:*

1. Αριθμούμε τα PCR σωληνάκια με τον ίδιο αριθμό του DNA και προσθέτουμε 1μl γενωμικού DNA.
2. Φτιάχνουμε το Master mix για τους εκκινητές σε σωληνάκια 1,5ml. Τα διαλύματα χρήσης αναφέρονται στον πιο κάτω πίνακα (πίνακας 2). Οι ποσότητες που χρησιμοποιούνται από το κάθε διάλυμα είναι οι εξής:

Master mix:

- 12μl H<sub>2</sub>O
- 2μl 10x Buffer
- 2μl dNTPs
- 1,2 μl MgCl<sub>2</sub>
- 0,2 μl Taq
- 2 μl primers (εκκινητές)

Ανάλογα με τον αριθμό των δειγμάτων που χρησιμοποιούμε πολλαπλασιάζουμε τις παραπάνω ποσότητες με τον αριθμό αυτό αυξημένο κατά 2 δείγματα, για την αντιμετώπιση πιθανής απώλειας μερικής ποσότητας.

3. Προσθέτουμε 19μl από το Master mix σε κάθε PCR tubes των δειγμάτων (για να έχουμε συνολική ποσότητα 20 μl). Και τοποθετούνται στον θερμοκυκλοποιητή.
4. Επιλέγεται το κατάλληλο πρόγραμμα από το μηχάνημα με την ειδική θερμοκρασία υβριδισμού και τους κατάλληλους χρόνους.

### **Διαλύματα**

Taq Buffer 10x: 500mM KCl

100mM Tris-HCl pH:9

1% Triton-X

### **Πίνακας 2.** Συστατικά αντίδρασης PCR

Stock εργαστηρίου - aliquots	Συγκεντρώσεις στην αντίδραση
dd H <sub>2</sub> O	dd H <sub>2</sub> O
10x Buffer	1x Buffer
dNTPs 2,5 mM	dNTPs 0,25 mM
MgCl <sub>2</sub> 25 mM	MgCl <sub>2</sub> 1,5mM
Taq 10U/μl	Taq 1 U
Primers (R and F) 10 pmol/μl	Primers (R and F) 10 pmol

### **Πλαστικά – Γυαλικά**

Αποστειρωμένα eppendorfs 0,2 και 1,5 ml

Αποστειρωμένα yellow και Blue tips

### **Συσκευές**

Biorad thermal cycler

### **2.1.5 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης**

Η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης είναι μια μέθοδος διαχωρισμού των προϊόντων της αντίδρασης PCR και βασίζεται στην διαφορά του μοριακού βάρους των τμημάτων αυτών. Ο διαχωρισμός πραγματοποιείται με την βοήθεια της ιδιότητας που έχει το DNA να αντιδρά στο ηλεκτρικό πεδίο. Το DNA περιέχει αρνητικές φωσφορικές ομάδες δίνοντας έτσι στο μόριο αυτό αρνητικό φορτίο. Τα δείγματα λοιπόν που τοποθετούνται στο πήκτωμα αγαρόζης δέχονται την επίδραση του ηλεκτρικού πεδίου και κινούνται προς το θετικό πόλο. Κατά την κίνησή τους αυτή διαχωρίζονται, αφού τα τμήματα που έχουν μεγαλύτερο μοριακό βάρος καθυστερούν σε σχέση με τα τμήματα μικρότερου μοριακού βάρους που κινούνται πιο γρήγορα μέσα στο πήκτωμα. Η κατασκευή του πηκτώματος αγαρόζης βασίζεται στο κάτωθι πρωτόκολλο. Για τον διαχωρισμό των SSLPs δεικτών η ηλεκτροφόρηση γίνεται σε πήκτωμα 4% αγαρόζης.

#### ***Παρασκευή του πηκτώματος αγαρόζης 4% (w/v)***

1. Αραιώνουμε 100ml 10xTBE διαλύματος σε τελικό όγκο 1000ml (1x TBE) και προσθέτουμε 33ml βρωμιούχο αιθίδιο.
2. Ζυγίζουμε 4 gr αγαρόζης υψηλής ανάλυσης (High resolution Agarose, Sigma) και 4 gr απλής αγαρόζης και τα προσθέτουμε σε κωνική φιάλη που περιέχει 200ml από το διάλυμα ηλεκτροφόρησης (1x TBE).
3. Βάζουμε τη φιάλη στο φούρνο μικροκυμάτων μέχρι να διαλυθεί η αγαρόζη και να γίνει διαφανής (περίπου 5 λεπτά).
4. Τοποθετούμε το διάλυμα στην ειδική συσκευή με τις χτένες (tray) για περίπου 15 λεπτά έως να στερεοποιηθεί το πήκτωμα.
5. Τοποθετούμε το πήκτωμα στη συσκευή ηλεκτροφόρησης, στην οποία έχουμε ήδη τοποθετήσει το διάλυμα ηλεκτροφόρησης (1x TBE).
6. Τοποθετούμε 10μl από τα δείγματα του DNA στα «πηγαδάκια», αφού πρώτα έχουν ήδη προστεθεί 6μl απ' το διάλυμα καταβύθισης (orange G) στο προϊόν της PCR αντίδρασης σε τελικό όγκο 26μl.

7. Εφαρμόζεται τάση 100-120 V για χρονική διάρκεια ανάλογα του είδους των δειγμάτων (μεγάλο μοριακό βάρος και μικρή διαφορά χρειάζεται περισσότερη ώρα από δείγματα μικρότερου μοριακού βάρους και μεγάλης διαφοράς βάσεων)
8. Η εμφάνιση και η καταγραφή του διαχωρισμού γίνεται σε ειδική συσκευή με λάμπα UV και ειδικό πρόγραμμα ηλεκτρονικού υπολογιστή.

### **Διαλύματα**

*TBE 10x*: 323,4g Tris

165g Βορικό οξύ

27,9g EDTA

Σε τελικό όγκο 3l με ddH<sub>2</sub>O και το διάλυμα έχει αυτόματα pH=8.0. Για το διάλυμα ηλεκτροφόρησης (buffer) χρησιμοποιούμε 1,5l 1x TBE, αραιώνοντας 150ml 10x TBE με 1350ml ddH<sub>2</sub>O.

*Βρωμιούχο αιθίδιο*: 1g/100ml ddH<sub>2</sub>O.

*Αγαρόζη*: High resolution Agarose (Sigma)

*OrangeG* (Διάλυμα καταβύθισης): 15g Ficoll 400 σε 30ml ddH<sub>2</sub>O (υδατόλουτρο 55°C), προσθήκη 250 mg orangeG. Τελικός όγκος 100ml.

### **Πλαστικά – Γυαλικά**

Κωνική φιάλη 500ml για το πήκτωμα.

Ογκομετρικοί κύλινδροι 500 και 1000ml.

Δοχείο 3l για την παρασκευή του 10x TBE

### **Συσκευές**

Τροφοδοτικό BIO-RAD

Συσκευή ηλεκτροφόρησης OWL

Φούρνος μικροκυμάτων

Ζυγαριά ακριβείας

Gel doc

### 2.1.6 Πολυμορφικοί δείκτες

Η επιλογή των πολυμορφικών δεικτών SSLPs για το χρωμόσωμα 18 έγινε από κατάλληλες βάσεις δεδομένων με κριτήρια το μοριακό βάρος που έχουν ως PCR προϊόν, και επίσης την όσο δυνατόν μεγαλύτερη διαφορά σε βάσεις μεταξύ των στελεχών (strains) που χρησιμοποιήθηκαν. Οι δείκτες αυτοί αντιστοιχούν σε μια μικρού μήκους χρωμοσωμική περιοχή, που ενισχύεται με την μέθοδο της PCR για το κάθε δείγμα DNA που χρησιμοποιείται και το αποτέλεσμα αναλύεται σε πήκτωμα αγαρόζης όπου και ηλεκτροφορείται. Οι πολυμορφικοί δείκτες SNPs επιλέχθηκαν λόγω της μη εύρεσης περισσότερων SSLPs στην συγκεκριμένη χρωμοσωμική περιοχή αφού είναι περισσότεροι στα χρωμοσώματα και σε πολύ μικρή απόσταση μεταξύ τους. Έτσι μας βοηθούν στην λεπτομερή χαρτογράφηση (πίνακας 3).

**Πίνακας 3.** Οι πολυμορφικοί δείκτες που επιλέχθηκαν για την λεπτομερή χαρτογράφηση στο χρωμόσωμα 18 και η χρωμοσωμική απόσταση στην οποία ανήκουν αντίστοιχα (Mb). Οι SSLPs συμβολίζονται ως D18Mit, ενώ τα SNPs που χρησιμοποιήθηκαν για την καλύτερη σάρωση του χρωμοσώματος είναι τα SNP54 και 52.

Πολυμορφικός δείκτης	Αλληλουχία	Προϊόν PCR	Χρωμοσωμική απόσταση (Mb)
D18Mit186	F: 5' GCAGTATAGTTGGGCCCTTG 3' R: 5' CTTCCTCGTTACAGACTATG 3'	292 bp	72,1
D18Mit120	F: 5' ACTGCACTGGTCCCATTTTC 3' R: 5' CAATAGTTGGAAATCAGACAGGC 3'	174 bp	36,1
D18Mit22	F: 5' TGATGGGATGTTTCTTGGGT 3' R: 5' CACTGGATGACACAGCCTGT 3'	143 bp	25,1
D18Mit225	F: 5' AGGACAAATAAATAAAAAGAGTGTGTG 3' R: 5' CTTCATATTTGCTGTAACCTAAATGG 3'	117 bp	30,75
D18Mit60	F: 5' ACCTGACACCATTTTCAGGC 3' R: 5' ATCCTTGAGCCTGTAAAAGACA 3'	205 bp	32,6
D18Mit172	F: 5' TGGGGTCCTATCCTTCTGTC 3' R: 5' AGTGATACTTACTTTATCACACATGCG 3'	106 bp	23,7
D18Mit132	F: 5' AAGGAAGACACCCAGTGCC 3' R: 5' TTTGCTTCCAGTGGAAAACC 3'	109 bp	21,4
D18Mit158	F: 5' TCTGACACTGGCTTCTGTGG 3' R: 5' GGCTTGCCATGACAATATG 3'		33,6

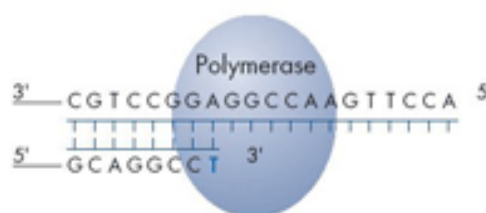
SNP52	F→GTTCTGGTGGCTCCATACTTG R→GAGAGGCTAGACTTCGAGGAATC S→CAAAGGGCTCCATGA	169 bp	34,76
SNP54	F→CCCAACCTCCGTCTCTAGAAAGTC R→GGAGGGTGGTGCTGAGAACTT S→ACACACCTACGTCATTTT	95 bp	34,03

### 2.1.7 Μέθοδος αλληλούχισης Pyrosequencing

Το Pyrosequencing είναι μια μέθοδος αλληλούχισης DNA που βασίζεται στην σύνθεση DNA. Για το Pyrosequencing χρειάζονται 3 εκκινητέ, 2 για να πολλαπλασιάσουν την περιοχή και ένας για την αλληλούχιση 10 περίπου βάσεων που εμπεριέχουν τον SNP πολυμορφισμό. Η διαδικασία αυτή χρησιμοποιεί μια μονή αλυσίδα του DNA ως μήτρα για την σύνθεση της συμπληρωματικής της αλυσίδα παρουσία του εκκινητή αλληλούχισης. Κάθε φορά που ενσωματώνεται ένα γνωστό νουκλεοτίδιο απελευθερώνεται πυροφωσφορικό που χρησιμοποιείται για την ακριβή ανάγνωση του DNA τμήματος. Η διαδικασία της μεθόδου αυτής περιλαμβάνει τα εξής βήματα. ([www.pyrosequencing.com/DynPage.aspx?id=7454](http://www.pyrosequencing.com/DynPage.aspx?id=7454)).

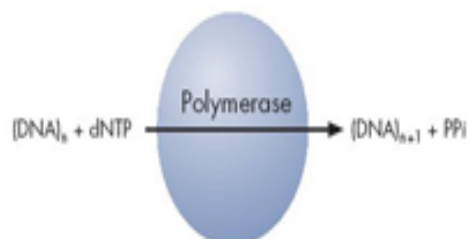
#### Βήμα 1.

Ο εκκινητής αλληλούχισης (sequencing primer) υβριδίζει τμήμα μονής αλυσίδας DNA (DNA product), όπου μαζί με ένζυμα, όπως DNA πολυμεράση, λουσιφεράση (Luciferase) και sulfurylase, αλλά και τα υποστρώματα λουσιφερίνη και APS ξεκινάει η αντίδραση.



#### Βήμα 2.

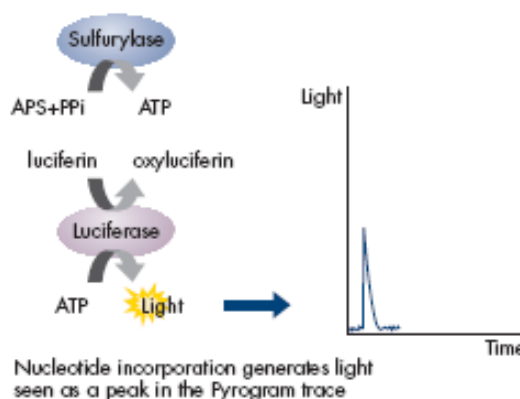
Το πρώτο γνωστό τριφωσφορικό δεοξυριβονουκλεοτίδιο (dNTP) προστίθεται στην αντίδραση. Η DNA πολυμεράση καταλύει την



ενσωμάτωση του dNTP στην μονή αλυσίδα του DNA, σύμφωνα με την αρχή της συμπληρωματικότητας των βάσεων. Με κάθε ενσωμάτωση ακολουθεί απελευθέρωση ενός πυροφωσφορικού (pp<sub>i</sub>).

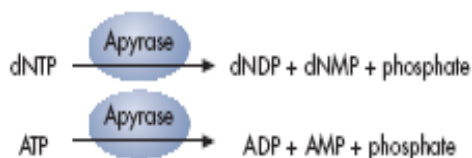
### Βήμα 3.

Η ATP sulfurylase μετατρέπει το πυροφωσφορικό σε ATP με την βοήθεια της παρουσίας της APS. Η APS οδηγεί την μετατροπή της λουσιφερίνης από την λουσιφεράση σε όξυλουσιφερίνη η οποία παράγει φως σε ποσότητες ανάλογες των ποσοτήτων του ATP. Το φως που παράγεται ανιχνεύεται από κατάλληλη συσκευή και αποτυπώνεται ως μια κορυφή σε κατάλληλο λογισμικό. Το ύψος της κορυφής είναι εξαρτώμενο από τον αριθμό των ενσωματωμένων νουκλεοτιδίων.



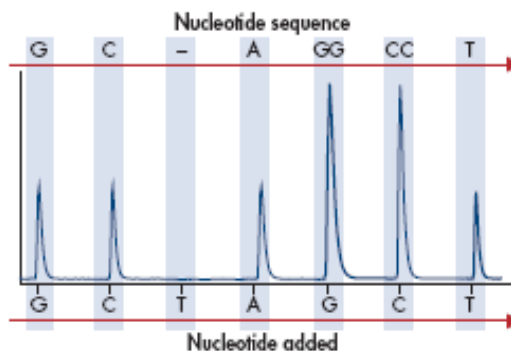
### Βήμα 4.

Η απυράση (apyrase), ένα νουκλεοτιδικό αποδιατακτικό ένζυμο, συνεχίζει να απομακρύνει μη ενσωματωμένα νουκλεοτιδία και ATP. Όταν η απομάκρυνση ολοκληρωθεί τότε ένα νέο νουκλεοτίδιο ενσωματώνεται.



### Βήμα 5.

Καθώς η διαδικασία προχωρεί, η συμπληρωματική αλυσίδα DNA κατασκευάζεται και η νουκλεοτιδική αλληλουχία εμφανίζεται ως κορυφές φωτεινών σιγμάτων στο λογισμικό πρόγραμμα.



### **2.1.8 Στατιστική ανάλυση με το πρόγραμμα R-QTL**

Το R-QTL είναι ένα πρόγραμμα για την ανάλυση των πειραμάτων της QTL (quantitative trait locus) χαρτογράφησης, με την βοήθεια της γλώσσας προγραμματισμού R. Το πρόγραμμα R-QTL δημιουργήθηκε από τον Karl W. Broman (Department of Biostatistics, Johns Hopkins University Baltimore, MD 21205, USA). Η ανάπτυξη του προγράμματος αυτού στην γλώσσα R έγινε λόγω των πλεονεκτημάτων που έχει στα βασικά μαθηματικά, στην στατιστική ανάλυση και στα ενισχυμένα γραφικά που διαθέτει. Το κλειδί για την υπολογιστική μέθοδο που χρησιμοποιεί το πρόγραμμα για την QTL χαρτογράφηση είναι το μοντέλο Markov (HMM). Η τεχνολογία αυτή αξιοποιεί την έλλειψη των γονοτυπικών δεδομένων αναγνωρίζοντας έτσι τα γονοτυπικά λάθη των αναδιασταυρώσεων (backcross) και των ομόμικτων διασταυρώσεων (intercross). Η συγκεκριμένη έκδοση του προγράμματος R-QTL (qtl\_1.09-43.zip) περιλαμβάνει ενέργειες όπως ο υπολογισμός των γενετικών χαρτών, αναγνωρίζει γονοτυπικά λάθη, εκτελεί απλές και διπλές QTL γονοτυπικές σαρώσεις, δυσδιάστατες QTL γονοτυπικές σαρώσεις κ.α. τα γονοτυπικά δεδομένα από την χαρτογράφηση μέσω των πολυμορφικών δεικτών που χρησιμοποιήθηκαν εισήχθησαν στο πρόγραμμα για την ανάλυσή τους.

### **2.1.9 Απομόνωση DNA από πήκτωμα αγαρόζης**

Για την αλληλούχιση των υποψήφιων γονιδίων να απομονωθεί το προϊόν PCR από πήκτωμα αγαρόζης με την μέθοδο του Gel extraction με το πρωτόκολλο της QIAquick Gel Extraction Kit (250). Στην συνέχεια το DNA στάλθηκε στην εταιρία MWG Eurofin.

### **2.1.10 Μέτρηση δύναμης (Grip Strength)**

Η δύναμη των ποντικών μετρήθηκε από ειδικό δυναμόμετρο. Κάθε ποντίκι τοποθετούνταν, κρατώντας το από την ουρά, σε ειδικό τετράγωνο μεταλλικό πλέγμα τραβώντας το ελαφρά ώστε να μπορέσει να κρατήσει αντίσταση στην κίνηση αυτή μέχρι το τέλος του πλέγματος. Η τιμή της δύναμης που κάθε φορά πετύχαινε καταχωρούνταν στο



μηχάνημα και εμφανιζόταν σε οθόνη. Ο μέσος όρος τριών προσπαθειών κάθε ποντικού καταχωρούνταν και στην συνέχεια αναλύονταν σε πρόγραμμα για την εξαγωγή διαγραμμάτων. Η χρονική απόσταση κάθε προσπάθειας ήταν 1 λεπτό για την ξεκούραση κάθε φορά του ποντικού.

#### **2.1.11 Μέτρηση βάρους (Body weight)**

Για την μέτρηση του βάρους των ποντικών χρησιμοποιήθηκε ζυγαριά ακριβείας και ένα μεγάλο πλαστικό διάφανο δοχείο για την τοποθέτησή τους και μετέπειτα ζύγισή τους. Η μετρήσεις γίνονταν ανά βδομάδα ξεκινώντας από την δεύτερη βδομάδα γέννησης τους. Καθώς ο φαινότυπος εμφανίζεται από την δεύτερη βδομάδα και επιδεινώνεται προοδευτικά έως ότου τα αταξικά ποντίκια αποβιώσουν, οι μετρήσεις ξεκινούν σε όλα τα ποντίκια της γέννας και στην συνέχεια συνεχίζουν μόνο τα αταξικά και τα αντίστοιχα φυσιολογικά (ίδιου φύλλου, ίσα σε αριθμό). Ο μέσος όρος των μετρήσεων όλων των αταξικών ποντικών και αντίστοιχα των φυσιολογικών στην κάθε βδομάδας μέτρηση καταχωρούνται και στην συνέχεια αναλύονται σε πρόγραμμα για την εξαγωγή διαγραμμάτων.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3<sup>ο</sup>

### ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

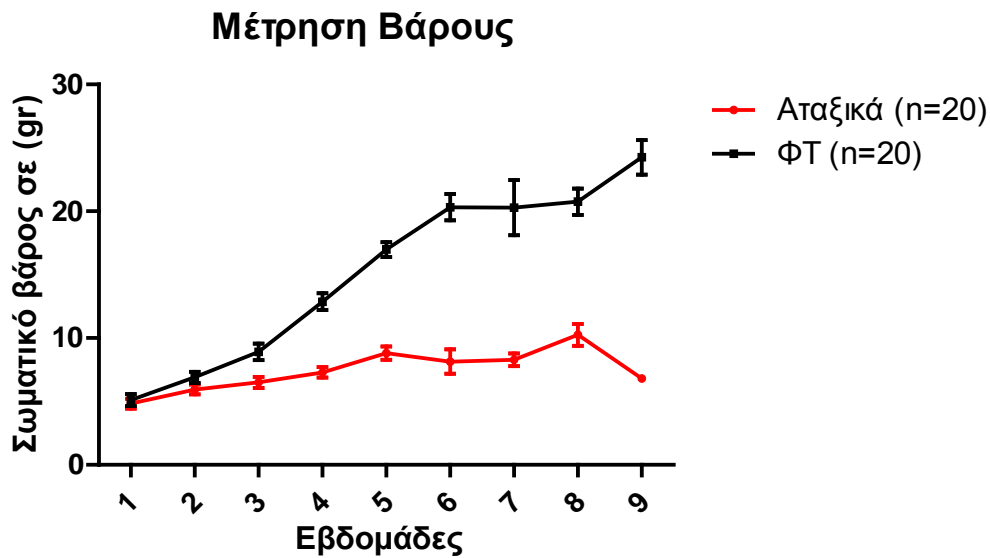
#### 3.1 Χαρακτηρισμός του φαινοτύπου

Τα χαρακτηριστικά της αταξίας περιλαμβάνουν πλάγιασμα κατά το περπάτημα με απροσδιόριστη συνεχή αλλαγή κατεύθυνσης, επιληπτικές κρίσεις, μείωση βάρους και μειωμένη δραστηριότητα. Μια σημαντική παρατήρηση είναι η μη εύρεση ατροφίας της παρεγκεφαλίδας, αλλά η μεγάλη ατροφία του θύμου στο αταξικό ποντίκι που υποδηλώνει μη φυσιολογική ανάπτυξη του ανοσοποιητικού συστήματος.

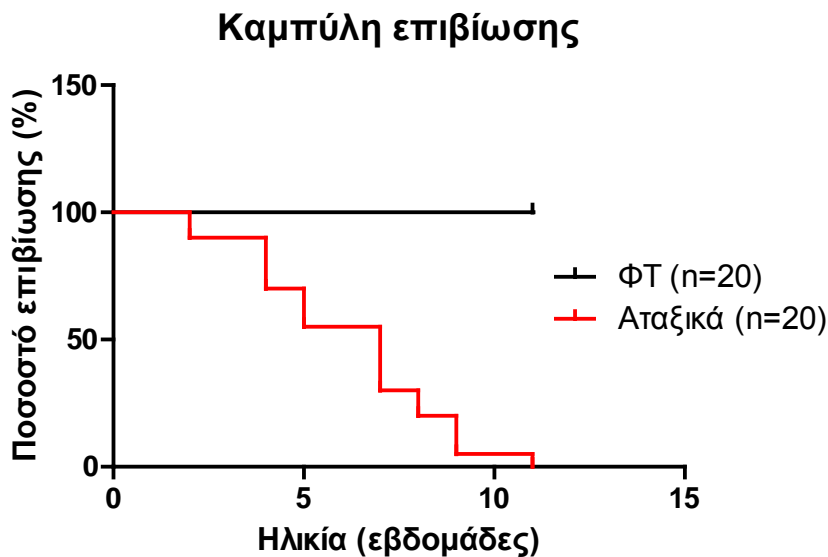


*Εικόνα 7.* Τα αταξικά ποντίκια εμφανίζουν επιληπτικές κρίσεις με απώλεια συνείδησης (λιγότερο από ένα λεπτό) και έχουν μειωμένο βάρος σε σχέση με τα φυσιολογικά ποντίκια.

Ο χρόνος εμφάνισης της αταξίας και της θνησιμότητας των αταξικών ποντικών είναι πολύ σημαντικός αφού μπορεί να προσδιορίσει την μορφή της αταξίας αλλά και να δώσει ιδέες για το πού και πώς επηρεάζει η μετάλλαξη αυτή τις μεταβολικές διεργασίες του ποντικού. Όπως έχει ήδη αναφερθεί ο φαινότυπος εμφανίζεται μεταξύ της 2ης-3ης εβδομάδας της ζωής τους ενώ τα αταξικά ποντίκια δεν ζουν κατά μέσο όρο περισσότερο από 2 μήνες. Τα διαγράμματα που παρατίθενται δείχνουν την διαφορά βάρους που εμφανίζουν σε σχέση με τα φυσικού τύπου ποντίκια (*Εικόνα 8*) και την καμπύλη επιβίωσης των αταξικών ποντικών (*Εικόνα 9*).



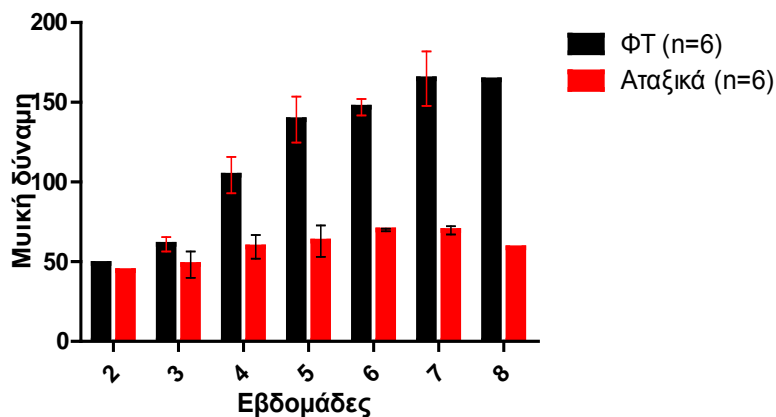
*Εικόνα 8.* Διάγραμμα καταγραφής σωματικού βάρους αταξικών και φυσικού τύπου (ΦΤ) ποντικών (n=20). Είναι εμφανής η μεγάλη διαφορά στο σωματικό βάρος μεταξύ των ΦΤ και των αταξικών ποντικών από την 2<sup>η</sup> εβδομάδα.



*Εικόνα 9.* Διάγραμμα επιβίωσης των αταξικών ποντικών (n=20) σε σύγκριση με τα φυσικού τύπου (n=20). Ο άξονας του Y αναφέρεται στο ποσοστό επιβίωσης, ενώ ο X σε εβδομάδες ζωής.

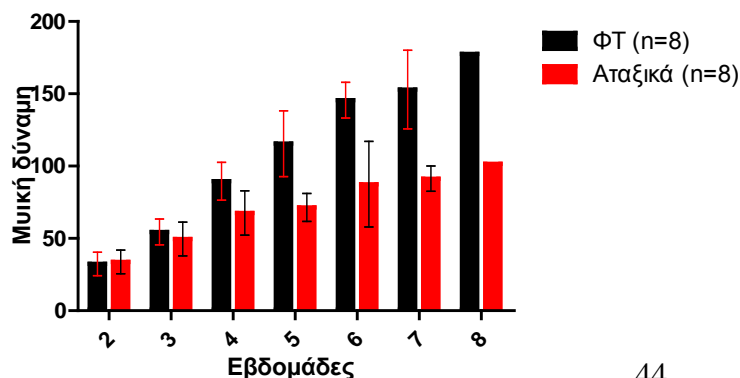
Ένα ακόμα χαρακτηριστικό των αταξικών ποντικών είναι η μειωμένη δύναμη των άκρων που εμφανίζουν σε σχέση με τα φυσικού τύπου ποντίκια. Για την επιβεβαίωση του φαινοτύπου αυτού μετρήθηκε η δύναμη (Grip strength) 6 αρσενικών και 8 θηλυκών αταξικών και φυσικού τύπου ποντικών αντίστοιχα, ώστε να αποτυπωθεί ο χρόνος εμφάνισης του φαινοτύπου αλλά και η πορεία εκδήλωσης του φαινομένου αυτού. Τα κάτωθι διαγράμματα (εικόνα 10,11) δείχνουν ακριβώς την μειωμένη δύναμη των αταξικών αρσενικών (εικόνα 10) και θηλυκών (εικόνα 11) ποντικών σε σχέση με τα φυσικού τύπου ποντίκια από την 3<sup>η</sup> εβδομάδα με όλο και μεγαλύτερη απόκλιση κατά την διάρκεια του χρόνου. Η τόσο μεγάλη διαφορά δεν εξηγείται μόνο στην μειωμένη δύναμη λόγω της νευροεκφυλιστικής αταξικής ασθένειας και στην δυσλειτουργία των μυών που αυτή επιφέρει, αλλά κυρίως στην μεγάλη διαφορά βάρους που εμφανίζουν σε σχέση με τα φυσικού τύπου ποντίκια με αποτέλεσμα την μείωση της μυικής τους μάζας και κατ' επέκταση της μυικής τους δύναμης.

### Μυική δύναμη αρσενικών ποντικών



**Εικόνα 10.** Δοκιμή μυικής δύναμης (Grip strength Test) σε αρσενικά ποντίκια. Ο μέσος όρος της μέγιστης αντίστασης των άκρων των αταξικών ποντικών (κόκκινες μπάρες) είναι κατά πολύ μικρότερος σε σχέση με των φυσικού τύπου ποντικών (μαύρες μπάρες).

### Μυική δύναμη θηλυκών ποντικών



**Εικόνα 11.** Δοκιμή μυικής δύναμης σε θηλυκά αταξικά και φυσικού τύπου ποντίκια

### 3.2 Αποτελέσματα λεπτομερούς χαρτογράφησης

Σε προηγούμενη μελέτη μας (Καρακώστας 2007), εντοπίστηκε η υπεύθυνη μετάλλαξη σε μια χρωμοσωμική περιοχή 48,4Mb του χρωμοσώματος 18 χρησιμοποιώντας περίπου 80 πολυμορφικούς δείκτες SSLPs (με μέσο όρο 3 έως 4 για κάθε χρωμόσωμα). Στην μελέτη αυτή (Καρακώστας 2007) χρησιμοποιήθηκε το DNA F2 ποντικών, ενώ στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν 20 επιπλέον δείγματα F2 φυσικού τύπου και αταξικών ποντικών. Λόγω του περιορισμένου αριθμού των SSLPs δεικτών στην περιοχή αυτή, χρησιμοποιήθηκαν και πολυμορφικοί γενετικοί δείκτες ενός νουκλεοτιδίου (SNPs) (πίνακας 4). Έτσι εκτός των πολυμορφικών δεικτών που χρησιμοποιήθηκαν αρχικά για την εύρεση του υποψήφιου χρωμοσώματος και αναφέρονται στον κάτωθι πίνακα (πίνακας 4), παραγγέλθηκαν επιπλέον 4 SSLPs και 2 SNPs (με κόκκινο χρώμα).

Πολυμορφικοί δείκτες	Mb
D18Mit132	21,4Mb
D18Mit172	23,7 Mb
D18Mit22	25,1Mb
D18Mit225	30,75Mb
D18Mit60	32,6 Mb
D18Mit158	33,6 Mb
SNP54	34,03Mb
SNP52	34,76Mb
D18Mit120	36,1Mb
D18Mit186	72,1 Mb

*Πίνακας 4.* Χρωμοσωμική απόσταση των αρχικών 4 πολυμορφικών δεικτών SSLPs (μαύρο χρώμα) που χρησιμοποιήθηκαν και των 4 υπολοίπων SSLPs + 2 SNPs (κόκκινο χρώμα) που παραγγέλθηκαν στην συνέχεια για το χρωμόσωμα 18.

Τα αποτελέσματα της χαρτογράφησης όλων των πολυμορφικών δεικτών που χρησιμοποιήθηκαν για το χρωμοσώμα 18 παρατίθενται στον κάτωθι πίνακα (πίνακας 5) για 6 συνολικά δείγματα γενωμικού DNA από τρία αταξικά και τρία φυσικού τύπου ποντίκια.

MARKERS	RECOMBINATION						Mb
D18Mit132	B	B	H	D	D	B	21,4
D18Mit172	B	B	H	D	D	B	23,7
D18Mit22	B	B	H	D	D	H	25,1
<b>D18Mit225</b>	B	B	B	D	H	H	<b>30,75</b>
D18Mit60	B	B	B	D	H	H	32,6
<b>D18Mit158</b>	B	B	B	D	H	H	<b>33,6</b>
SNP 54		H					34,03
SNP 52F		H	B				34,76
D18Mit120	B	H	H	D	H	H	36,1
D18Mit186	H	H	H	D	B	B	72,1
<b>DNA No</b>	<b>181</b>	<b>188</b>	<b>190</b>	<b>443</b>	<b>444</b>	<b>445</b>	

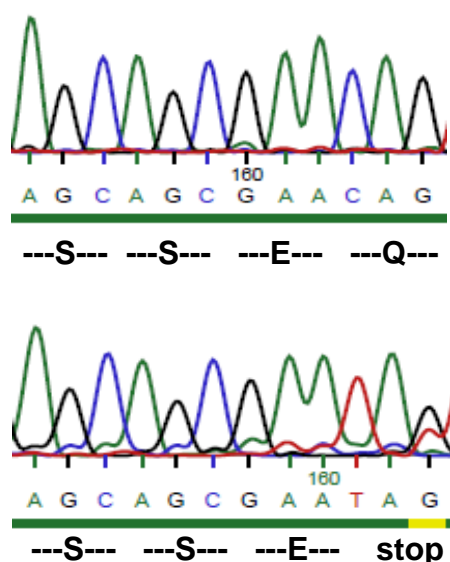
**Πίνακας 5.** Αποτελέσματα της γενετικής ανάλυσης στο χρωμόσωμα 18. Τα κελιά με B, H και D αντιστοιχούν στον γονότυπο C57 ομόζυγων (στέλεχος μεταλλαξογένεσης), C57/DBA ετερόζυγων και DBA ομόζυγων (στέλεχος χαρτογράφησης) ποντικών για το καθένα πολυμορφικό δείκτη. Τα δείγματα DNA των αταξικών ποντικών εμφανίζονται με κόκκινο ενώ του φυσικού τύπου με μαύρο.

Είναι εμφανές από τον παραπάνω πίνακα ότι τα DNA δείγματα των αταξικών ποντικών εμφανίζουν μόνο τον ομόζυγο γονότυπο C57 για τους δείκτες D18Mit225, D18Mit60 και D18Mit158. Αυτό δηλώνει ότι η μετάλλαξη βρίσκεται ανάμεσα στην περιοχή που ορίζουν οι συγκεκριμένοι πολυμορφικοί δείκτες δηλ. από 30,75 έως 33,6Mb. Οι δείκτες SNPs βοήθησαν ώστε να περιοριστεί η απόσταση από την μία μεριά (πέραν του 33,6 Mb) αφού σε τόσες μικρές αποστάσεις δεν υπήρχαν άλλοι SSLPs. Με αυτό τον τρόπο επιτεύχθηκε ο περιορισμός της μετάλλαξης σε μια περιοχή των 2,85Mb. Η περιοχή αυτή περιέχει 24 γονίδια, όπου και θα πρέπει να αλληλουχηθούν ώστε να βρεθεί η σημειακή μετάλλαξη. Τα πιο πιθανά γονίδια μέσω βιβλιογραφίας που μπορούν να δημιουργήσουν έναν τέτοιο φαινότυπο στα ποντίκια επιλέχθηκαν ως πρώτα για αλληλούχιση.

### 3.3 Η εύρεση του μεταλλαγμένου γονιδίου

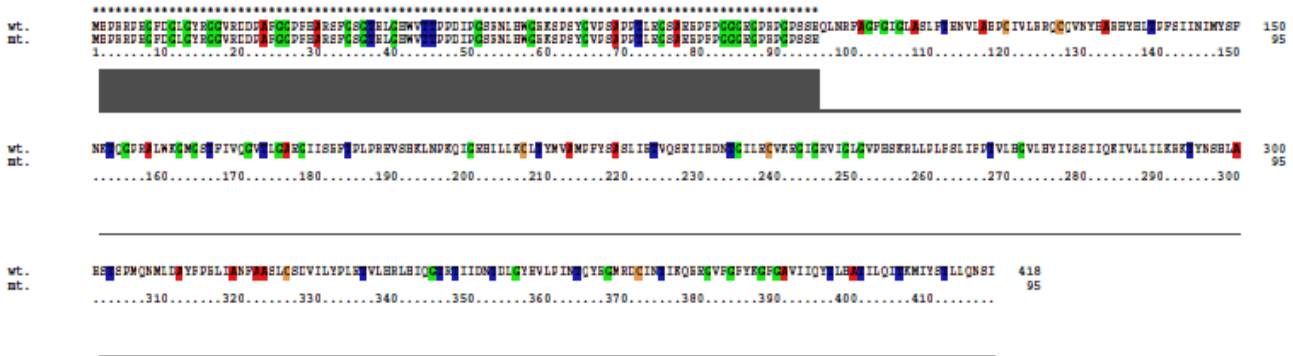
Το πρώτο γονίδιο που αλληλουχήθηκε είναι το Camk4. Το γονίδιο αυτό εκφράζει μια  $Ca^{2+}$ /καλμοντουλίνη – εξαρτώμενη πρωτεϊνική κινάση και βρίσκεται στην περιοχή μεταξύ 33-33,3Mb. Παρόλα αυτά η αλληλούχιση του γονιδίου Camk4 δεν έδειξε κάποια μετάλλαξη. Στην συνέχεια αλληλουχήθηκαν άλλα 4 γονίδια (Polr2d, Rit2, Syt4, Gpr17) πάντα με βάση την λειτουργία που επιτελούνε και τις πιθανές διαταραχές που θα μπορούσε να προκαλέσει μία ενδεχόμενη μετάλλαξή τους, χωρίς να βρεθεί κάποια μετάλλαξη.

Η συνέχιση της αλληλούχισης στα υπόλοιπα γονίδια οδήγησαν στην εύρεση της μετάλλαξης σε ένα νέο γονίδιο της SLC25 (solute carrier family 25) οικογένειας μιτοχondριακών μεταφορέων αποκαλύπτοντας μια αλλαγή από C (κυτοσίνη) σε T (θυμίνη) στην κωδική περιοχή οδηγώντας έτσι σε ένα πρόωρο κωδικόνιο λήξης (stop codon). Ως αποτέλεσμα παράγεται μια πρωτεΐνη 95 αμινοξέων αντί της φυσικού τύπου SLC25 πρωτεΐνης που έχει 418 αμινοξέα (εικόνα 12). Η μετάλλαξη αυτή χρησιμοποιείται πλέον για την γονοτυπική ανάλυση όλων των αταξικών απογόνων και την αναγνώριση των ετερόζυγων ατόμων που δεν έχουν τον αταξικό φαινότυπο.

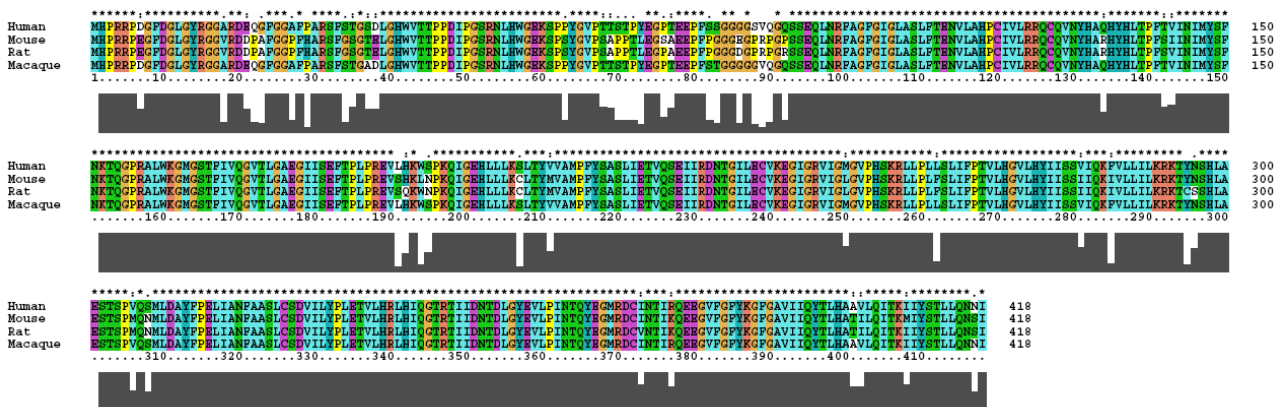


*Εικόνα 12.* Τα αποτελέσματα της αλληλούχισης του γονιδίου της SLC οικογένειας (σε cDNA) όπου είναι εμφανής η αντικατάσταση της κυτοσίνης (C) από την θυμίνη (T) (με κόκκινο χρώμα) με αποτέλεσμα την εισαγωγή ενός κωδικονίου λήξης (stop codon) στο 96<sup>ο</sup> αμινοξύ.

Αντίστοιχα, η ανάλυση σε αμινοξικό επίπεδο παρατίθεται στην εικόνα 13 όπου είναι εμφανής η αλλαγή σε πρωτεϊνικό επίπεδο. Αξίζει να σημειωθεί ότι η SLC25 πρωτεΐνη (418 αμινοξέα) εμφανίζει μεγάλη συντηρητικότητα μεταξύ διαφόρων ειδών, κάτι που υποδεικνύει την συμμετοχή της σε σημαντικές κυτταρικές λειτουργίες που έχουν διατηρηθεί κατά την πορεία της εξέλιξης (εικόνα 14).



**Εικόνα 13.** Αμινοξική ευθυγράμμιση μέσω του προγράμματος Clustal X μεταξύ της μεταλλαγμένης και της φυσικού τύπου SLC25 πρωτεΐνης. Η νουκλεοτιδική αλλαγή οδηγεί σε αμινοξικό επίπεδο στο σταμάτημα της μετάφρασης με την εισαγωγή ενός πρόωρου κωδικονίου λήξης με αποτέλεσμα να μην υπάρχει ολόκληρη πρωτεΐνη (418 αμινοξέα), αλλά ένα μικρό τμήμα αυτής (95 αμινοξέα).



**Εικόνα 14.** Ευθυγράμμιση της SLC25 πρωτεΐνης μεταξύ διαφόρων ειδών μέσω του προγράμματος Clustal X. Είναι εμφανής η μεγάλη συντήρηση μεταξύ των διαφόρων ειδών (μαύρη σκίαση).



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4<sup>ο</sup>

### ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Μέσω διαδικασιών τυχαίας μεταλλαξογένεσης στο ποντίκι έχουμε δημιουργήσει ένα νέο μοντέλο αυτοσωμικής υπολειπόμενης αταξίας. Ο φαινότυπος περιλαμβάνει πλάγιασμα κατά το περπάτημα με απροσδιόριστα συνεχή αλλαγή κατεύθυνσης, επιληπτικές κρίσεις, μειωμένο βάρος και πρόωρη θνησιμότητα. Στα πλαίσια της παρούσας μελέτης πραγματοποιήθηκε μία λεπτομερής χαρτογράφηση του γονιδιώματος με γενετικούς πολυμορφικούς δείκτες (SSLPs, SNPs) στο χρωμόσωμα 18 όπου είχε εντοπιστεί στο παρελθόν η υπεύθυνη μετάλλαξη. Ακολούθησε αλληλούχιση των γονιδίων της περιοχής για τον εντοπισμό της μετάλλαξης.

#### 4.1 Υποψήφια γονίδια

Είναι πολύ σημαντικό το γεγονός ότι στην περιοχή αυτή του χρωμοσώματος 18 δεν υπάρχουν γονίδια που κατά την μετάλλαξη τους να σχετίζονται με εκδήλωση παρόμοιου αταξικού επιληπτικού φαινοτύπου με αυτόν της παρούσης εργασίας. Αυτό αποδεικνύει ότι πιθανόν έχουμε εντοπίσει μια νέα μορφή αταξίας στο ποντίκι, που μπορεί να οφείλεται σ'ένα νέο εμπλεκόμενο μεταβολικό μονοπάτι ή σ'ένα νέου γονιδίου που παίζει καθοριστικό ρόλο στην εκδήλωση της αταξίας.

Με γενετική ανάλυση και την βοήθεια των πολυμορφικών γενετικών δεικτών εντοπίστηκε η μετάλλαξη που ευθύνεται για τον φαινότυπο της αταξίας στο χρωμόσωμα 18 μεταξύ των περιοχών 30,75 και 33,6Mb. Η περιοχή αυτή των 2,9Mb περίπου περιέχει 26 γονίδια υποψήφια να φέρουν την μετάλλαξη. Η εύρεση του γονιδίου επιτεύχθηκε με την αλληλούχιση των πιο πιθανών γονιδίων που σχετίζονται με νευρολογικούς φαινοτύπους και στην συνέχεια με αλληλούχιση των υπολοίπων έως ότου βρεθεί η μετάλλαξη. Όπως αναφέρθηκε το πρώτο γονίδιο που αλληλουχίστηκε ήταν το Camk4. Στην συνέχεια ακολούθησαν τα Rit2, Syt4, Gpr17 γονίδια.

Το γονίδιο Camk4 θεωρήθηκε ως πιθανό γονίδιο για να φέρει την μετάλλαξη όχι επειδή υπάρχει βιβλιογραφική αναφορά που να προκαλεί τον αταξικό φαινότυπο, αλλά στο ότι τα μόρια του  $Ca^{2+}$  και τα κανάλια  $Ca^{2+}$  είναι πολύ σημαντικά για τους νευρομεταβιβαστές, τις νευρικές συνάψεις και γενικά τις νευρικές απολήξεις των νευρικών κυττάρων των παρεγκεφαλιδικών οδών. Αλλαγές στο ενδοκυτταρικό επίπεδο του  $Ca^{2+}$  προωθεί σήματα που επιτρέπουν στα νευρικά κύτταρα να ανταποκρίνονται στις εξωτερικές διεγέρσεις. Ένας σημαντικός μηχανισμός για την αύξηση του  $Ca^{2+}$  είναι η εισροή του εξωκυτταρικού  $Ca^{2+}$  μέσω των πόρων των καναλιών του  $Ca^{2+}$  στην πλασματική μεμβράνη. Για τον λόγο αυτό μια μετάλλαξη σε γονίδιο που εκφράζει ή επηρεάζει τα κανάλια  $Ca^{2+}$  προκαλεί συνήθως νευρολογικές ασθένειες, όπως παρεγκεφαλιδικές αταξίες, επιληψία δυσκινησία και προβλήματα μνήμης (Sikela, et. al., 1990).

Το γονίδιο Syt4 εκφράζει μια εξαρτώμενη  $Ca^{2+}$  πρωτεΐνη που απελευθερώνεται στους νευροδιαβιβαστές από τα προσυναπτικά νευρικά άκρα και εμπλέκεται στον κεντρικό ρόλο της νευροσυναπτικής μεταφοράς. Η Syt4 πρωτεΐνη (synaptotagmins) είναι μια σταθερή μεμβρανική πρωτεΐνη των συναπτικών δεσμών που παίζει ρόλο στην εξωκύτωση και μεταφορά διαμεμβρανικών μορίων.

Το γονίδιο Gpr17 είναι μέλος της υπεροικογένειας των G πρωτεϊνικών υποδοχέων (GPCR) όπου αποτελείται από 7 διαμεμβρανικά τμήματα και μεταφέρει εξωκυτταρικά σήματα μέσω των ετεροτριμερών G πρωτεϊνών.

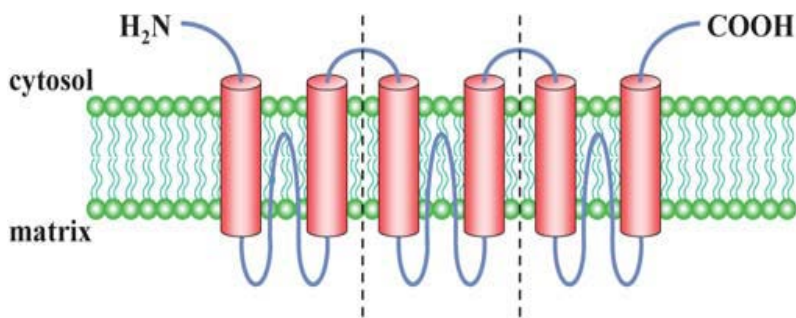
Τέλος το γονίδιο Rit2 ανήκει στην RAS υπεροικογένεια των μικρών GTPασών. Η πρωτεΐνη του γονιδίου Rit2 δεσμεύεται με την καλμοντουλίνη μια πρωτεΐνη πολύ σημαντική στις νευρικές συνάψεις του κεντρικού νευρικού συστήματος.

#### **4.2 Εύρεση της μετάλλαξης σε γονίδιο της οικογένειας SLC**

Η ακριβής γενετική χαρτογράφηση της παθογόνου μετάλλαξης μέσω γενετικών δεικτών (SSLPs, SNPs) και η αλληλούχιση συγκεκριμένων γονιδίων έχει οδηγήσει στην εύρεση του γονιδίου που φέρει την μετάλλαξη το οποίο ανήκει στην οικογένεια των μιτοχονδριακών μεταφορέων SLC25 (Solute Carrier Family 25). Στην υπεροικογένεια αυτή ανήκει ένας μεγάλος αριθμός γονιδίων, οι πρωτεΐνες των οποίων βρίσκονται στη εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη και χαρακτηρίζονται ανάλογα με τα είδη των μορίων

που μεταφέρουν προς την μήτρα ή την εξωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου. Η οξειδωτική φωσφορυλίωση και η αναπνευστική αλυσίδα ηλεκτρονίων είναι λειτουργίες που απαιτούν πολλές και αρκετές πρωτεΐνες και μεταβολίτες. Καθίσταται έτσι πολύ σημαντική η ομαλή εισαγωγή και μεταφορά στην σωστή θέση και σε επαρκείς ποσότητες των εμπλεκόμενων αυτών στοιχείων. Οι μιτοχονδριακοί μεταφορείς (SLCs) παίζουν ακριβώς αυτό τον ρόλο της εισαγωγής και μεταφοράς συστατικών από το κυτταρόπλασμα προς την μήτρα του μιτοχονδρίου ή αντίστροφα.

Όλοι οι γνωστοί μιτοχονδριακοί μεταφορείς έχουν παρόμοια στερεοδομή που αποτελείται από τρεις ομόλογες περιοχές μήκους 100 αμινοξέων στην σειρά. Κάθε περιοχή έχει 2 υδρόφοβες «ράβδους» οι οποίες εισχωρούν στην μεμβράνη με την δομή της α-έλικας και διαχωρίζονται από ένα υδρόφιλο τμήμα (εικόνα 15). Οι τρεις περιοχές τοποθετούνται στην μεμβράνη με την σειρά και την διαπερνούν εξολοκλήρου 6 φορές, ενώ το αμινοτελικό και καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα. (F. Palmiery 2008)



**Εικόνα 15.** Δομικό μοντέλο της SLC25 οικογένειας των μιτοχονδριακών μεταφορέων. Έξι α-έλικες διαπερνούν την εσωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου με τα αμινοτελικά και καρβοξυτελικά άκρα της πρωτεΐνης να βρίσκονται προς την μεριά του κυτταροπλάσματος. Όλη η αλληλουχία διακρίνεται σε τρία όμοια τμήματα με δύο διαμεμβρανικές α-έλικες. Μεταξύ των τμημάτων αυτών οι δύο αυτές α-έλικες ενώνονται με μία μεγάλη υδρόφιλη ενδομιτοχονδριακή δομή (loop) που εισχωρεί μέσα στην μεμβράνη (F. Palmiery 2004)

Η μετάλλαξη όπως έχει αναφερθεί αλλάζει το νουκλεοτίδιο της κυτοκίνης σε θυμίνη, ενώ σε αμινοξικό επίπεδο η γλουταμίνη (96ο αμινοξύ) αλλάζει σε κωδικόνιο λήξης (stop codon) που βρίσκεται, ακριβώς στο αμινοξύ από το οποίο ξεκινά η πρώτη από τις έξι α-έλικες που εισχωρούν στην εσωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου. Ως αποτέλεσμα η μεταλλαγμένη πρωτεΐνη αποτελείται από 95 αμινοξέα δηλ. περιέχει μόνο το αμινοτελικό άκρο που βρίσκεται στην μεριά του κυτταροπλάσματος (εικόνα 15). Αυτό σημαίνει ότι η εν λόγω πρωτεΐνη έχει χάσει την λειτουργικότητα και την φυσιολογική της δομή και δεν ενσωματώνεται στην μιτοχονδριακή μεμβράνη.

Για το νέο αυτό SLC25 γονίδιο δεν υπάρχουν βιβλιογραφικές πληροφορίες για την λειτουργία του, το υπόστρωμα που μεταφέρει και τον παθογενετικό του ρόλο σε ασθένειες. Η περαιτέρω ανάλυση σε κυτταρικό και μοριακό επίπεδο θα βοηθήσει στην καλύτερη κατανόηση της δομής και λειτουργίας της εν λόγω πρωτεΐνης στα φυσικού τύπου ποντίκια αλλά και στην καλύτερη περιγραφή του καινούργιου και μοναδικού αυτού μοντέλου αυτοσωμικής υπολειπόμενης νευροεκφυλιστικής/αταξικής νόσου, με σκοπό να αποκτηθεί η γνώση γύρω από τους παθογενετικούς μηχανισμούς που οδηγούν σε αυτόν τον εντυπωσιακό φαινότυπο.

### **4.3 Μελλοντικοί στόχοι**

Καταρχήν θα πρέπει να επιβεβαιωθεί και γενετικά αν η μετάλλαξη στο SLC25 γονίδιο προκαλεί τον φαινότυπο της αταξίας. Για την οριστική επιβεβαίωση της ταυτοποιημένης μετάλλαξης χρησιμοποιούνται διάφορες προσεγγίσεις. Όπως η μελέτη γενετικής αναπλήρωσης κατά την οποία διασταυρώνονται ετερόζυγα μεταλλαγμένα ποντίκια με τα αντίστοιχα knockout (αν είναι διαθέσιμα) προκειμένου να δειχθεί αν οι απόγονοι εμφανίζουν παρόμοιο φαινότυπο. Επίσης μια μέθοδος ακόμη είναι η διάσωση του φαινοτύπου με υπερέκφραση της φυσιολογικής πρωτεΐνης, ιστοειδικά, χρησιμοποιώντας διαγονιδιακά ποντίκια.

Παράλληλα η λειτουργική ανάλυση της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης θα προκύψει μέσα από την μελέτη του προτύπου έκφρασης του φυσικού τύπου γονιδίου σε διάφορους ιστούς (εγκέφαλος, παρεγκεφαλίδα, νωτιαίος μυελός, περιφερικά νεύρα), με την ετερόλογη

υπερέκφραση ανασυνδυασμένης φυσικού τύπου και μεταλλαγμένης πρωτεΐνης στην E.coli, επίσης στην υπερέκφραση της φυσικού τύπου και της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης σε κυτταρικές σειρές, αλλά και με την μελέτη της επίδρασης που έχουν ορισμένοι φαρμακευτικοί παράγοντες για την βελτίωση των συμπτωμάτων των μεταλλαγμένων ποντικών. Ακόμη θα μελετηθεί αν όντως το νέο αυτό SLC25 μέλος εντοπίζεται στα μιτοχόνδρια. Τα πειράματα αυτά θα μας βοηθήσουν στην ανάλυση του βιοχημικού μηχανισμού στον οποίο εμπλέκεται η μεταλλαγμένη πρωτεΐνη.

Μελλοντικά θα προσπαθήσουμε να ανακαλύψουμε τα υποστρώματα που δένονται και μεταφέρονται από το νέο SLC25 μέλος εκατέρωθεν της εσωτερικής μεμβράνης των μιτοχονδρίων, με σκοπό την κατανόηση του βιολογικού ρόλου της SLC25 πρωτεΐνης. Επίσης, είναι απαραίτητη η πλήρης μελέτη της λειτουργίας και της μορφολογίας των μιτοχονδρίων στον αταξικό φαινότυπο μέσω της μελέτης της μιτοχονδριακής λειτουργίας, αλλά και η εύρεση της πρωταρχικής ιστολογικής βλάβης που προκαλεί τον φαινότυπο αυτό. Τέλος, θα μελετηθεί εάν υπάρχουν αντίστοιχες μεταλλάξεις στο νέο αυτό SLC25 γονίδιο στον άνθρωπο σε ασθένειες του νευρικού συστήματος.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Ντούνη Ελένη (2006-2007). Βιοτεχνολογία ζώων. Πανεπιστημιακό σύγγραμμα.
- Φλεμετάκης Ε., Π. Κατινάκης (2005) Σημειώσεις στην τεχνολογία ανασυνδυασμένου DNA. Πανεπιστημιακό σύγγραμμα.
- Adams and Victor's (2003). PRINCIPLES OF NEUROLOGY. Μεταφρασμένο, Πανεπιστημιακό σύγγραμμα.
- Beier DR, Herron BJ, (2004). Genetic mapping and ENU mutagenesis. *Genetica*. 122. 65-69.
- Berkich D.A., M.S. Ola, J. Cole, A.J. Sweatt, S.M. Hutson and K.F. LaNoue (2007). Mitochondrial Transport Proteins. 85:3367-3377
- Brill Julia, Rainer Klockes, Dieter Paul, Detlev Boison, Nicolette Gouder, Norbet Klugbauer, Franz Hofmann, Cord-Michael Becker, and Kristina Becker (2004). Entla, a Novel Epileptic and Ataxic Cacna2d2 Mutant of the Mouse. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*. 279, No8, pp. 7322-7330.
- Camacho J., R. Mardach, N. Rioseco-Camacho, E. Ruiz-Pesini, O. Derbeneva, D. Andrade, F. Zaldivar, Y. Qu, S.D. Cederbaum. Clinical and functional characterization of a human ORNT1 mutation (T32R) in the hyperornithinemia-hyperammonemia-homocitrullinuria (HHH) syndrome. *Pediatr, Res*. 60 (2006) 423-429.
- Cook C Matthew, Carola G Vinuesa and Christopher C Goodnow (2006). ENU-mutagenesis: insight into immune function and pathology. *Current opinion in Immunology*. 18, 627-633.

- Criscuolo C, Chessa L, Di Giandomenico S, et. al., (2006). Ataxia with oculomotor apraxia type 2: a clinical, pathologic, and genetic study. *Neurology*. 66:1207-10.
- Dusart I, Guenet JL, Sotelo C, (2006). Purkinje cell death: Differences between developmental cell death and neurodegenerative death in mutant mice. *The Cerebellum*. 5. 163-176.
- Ferdinando Palmieri (2004). The mitochondrial transporter family (SLC25): physiological and pathological implications. 447: 689-709.
- Ferdinando Palmieri (2008). Diseases caused by defects of mitochondrial carriers: A review. 564-578.
- Fogel BL, Perlman S, (2007). Clinical features and molecular genetics of autosomal recessive cerebellar ataxias. *Lancet Neurol*. 6, 245-257.
- Graham B.H., K.G. Waymire, B. Cottrell, I.A. Trounce, G.R. MacGregor, D.C. Wallace. A mouse model for mitochondrial myopathy and cardiomyopathy resulting from a deficiency in the heart/muscle isoform of the adenine nucleotide translocator. *Nat. Genet*. 16 (1997) 226-234.
- Grieco GS, Malandrini A, Comanducci G, et al. Novel SACS mutations in autosomal recessive spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay type. (2004). *Neurology*. 62:103-06.
- Huizing M., V. Lacobazzi, L. Ijlist, P. Savelkoul, W. Ruitenbeek, L.P. van den Heuvel, C. Indiveri, J. Smeitink, F.J.M. Trijbels, R.J.A. Wanders, F. Palmieri. Cloning of the human carnitine-acylcarnitine carrier cDNA, and identification of the molecular defect in a patient. *Am. J. Hum. Genet* 61. (1997) 1239-1245.

- Illario M. et. al., (2008). Calmodulin-dependent kinase IV links Toll-like receptor 4 signaling with survival pathway of activated dendritic cells. *Blood Jan.* 15;111(2):723-31.
- Jaap J. Plomp, Simon Kaja (2009). The Ataxic Cacna1a-Mutant Mouse Rolling Nagoya: An Overview of Neuromorphological and Electrophysiological Findings. 009-0117-5.
- Jansen GA, Waterham HR, Wanders RJA. (2004). Molecular basis of Refsum disease: sequence variations in phytanoyl- CoA hydroxylase (PHYH) and the PTS2 receptor (PEX7). *Hum Mutat.* 23:209-18.
- Jordens E.Z., L.Palmieri, M. Huizing, L.P. van den Heuvel, RC.A. Sengers, A Doerner, W. Ruitenbeek, J.M.F. Trijbels, J.Valsson, G. Sigfusson, F Palmieri, J.A.M. Smeitink. Adenine nucleotide translocator 1 deficiency associated with Sengers syndrome. *Ann. Neurol.* 52 (2002). 95-99.
- Kaukonen J., J.K. Juselius, V. Tiranti, A. Kyttala, M. Zeviani, G.P. Comi, S. Keranen, L. Peltonen, A. Suomalainen. Role of adenine nucleotide translocator 1 in mtDNA maintenance. *Science* 289 (2000). 782-785.
- Kuniyasu Niizuma, Hidenori Endo and Pak H. Chan (2009). Oxidative stress and mitochondrial dysfunction as determinants of ischemic neuronal death and survival. 109. 133-138.
- Longley MJ, Graziewica MA, Bienstock RJ, Copeland WC. (2005). Consequences of mutations in human DNA polymerase  $\gamma$ . *Gene.* 354:125-31.
- Lorincz MT, Rainier S, Thomas D, Fink JK. (2005). Cerebrotendinous xanthomatosis. Possible higher prevalence than previously recognized. *Arch Neurol.* 62:1459-63.



- Mayr J.A., O. Merkel, S.D. Kohlwein, B.R. Gebhardt, H. Bohles, U. Fotschl, J. Koch, M. Jaksch, H. Lochmuller, R. Horvath, P. Freisinger, W. Sperl. Mitochondrial phosphate-carrier deficiency: a novel disorder of oxidative phosphorylation. *Am J Hum. Genet.* 80 (2007) 478-484.
- Massimo Zeviani and Thomas Klopstock (2001). Mitochondrial disorders. 14:553-560.
- McNamara JO, Puranam RS. (1998). An abundance of riches for biologists *Epilepsy genetics.* 8:R168-R170.
- Molinari F., A. Raas-Rothschild, M. Rio, G. Fiermonte, F. Encha-Razavi, L. Palmieri, F. Palmieri, Z. Ben-Neriah, N. Khadom, M. Vekemans, T. Attie-Bitach, A. Munnich, P. Rustin, L. Colleaux. Impaired mitochondrial glutamate transport in autosomal recessive neonatal myoclonic epilepsy. *Am. J. Hum. Genet.* 76 (2005) 334-339.
- Montalvo ALE, Filocamo M, Vlahovicek K, et. al., (2005). Molecular analysis of the HEPA gene in Italian patients with infantile and late onset Tay-Sachs disease: detection of fourteen novel alleles. *Hum Mutat.* 26:2-8
- Moreira MC, Barbot C, Tachi N, et. al., (2001). The gene mutated in ataxia-ocular apraxia 1 encodes the HIT/Zn-finger protein aprataxin. *Nat Genet.* 29:189-93.
- Nakamura T, Lipton SA, (2007). Molecular mechanisms of nitrosative stress-mediated protein misfolding in neurodegenerative diseases. *Cellular and Molecular Life Sciences.* 1-9.
- Narcisi TM, Shoulders CC, Chester SA, et. al., (1995). Mutations of the microsomal triglyceride- transfer- protein in abetalipoproteinemia. *Am J Hum Genet.* 57:1298-310.

- Nelms KA, Goodnow CC, (2001). Genome-wide ENU mutagenesis to reveal immune regulators. *Immunity*. 15, 409-418.
- Nikali K, Suomalainen A, Saharinen J, et. al., (2005). Infantile onset spinocerebellar ataxia is caused by recessive mutations in mitochondrial proteins *twinkle* and *twinky*. *Hum Mol Genet*. 14:2981-90.
- Noebels JL. (2001). Modeling human epilepsies in mice. *Epilepsia*. 42 Suppl5:11-5.
- Nystuen A, Benke PJ, Merren J, Stone EM, Sheffield VC. (1996). A cerebellar ataxia locus identified by DNA pooling to search for linkage disequilibrium in an isolated population from the Cayman Islands. *Hum Mol Genet*. 5:525-31.
- Palau F, Espinos C, (2006). Autosomal recessive cerebellar ataxia. *Orphanet journal of Rare Diseases*. 1:47.
- Peter L. Oliver, David A. Keays, Kay E. Davies (2007). Behavioural characterization of the robotic mouse mutant. 239-247.
- Principle of Pyrosequencing Technology  
([www.pyrosequencing.com/DynPage.aspx?id=7454](http://www.pyrosequencing.com/DynPage.aspx?id=7454))
- Sarkisian MR, (2001). Overview of the Current Animal model for Human Seizure and epileptic disorders. *Epilepsy & Behavior*. 2, 201-216.
- Sikela JM et al., (1990). Genetic mapping of the gene for Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase IV (Camk-4) to mouse chromosome 18. *Genomics* Nov;8(3):579-82.
- Taylor AMR, Groom A, Byrd PJ. (2005). Ataxia-telangiectasia-like disorder (ATLD) – its clinical presentation and molecular basis. *Nat Med*. 3:1219-25.

- Tokuda S, Kuramoto T, Tanaka K, Kaneko S, Takeuchi IK, Sasa M, Serikawa T, (2007). The ataxic groggy rat has a missense mutation in the P/Q-type voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channel alpha 1A subunit gene and exhibits absence seizures. *BRAIN RESEARCH* pp.168-177.
- Waterston RH, et. al., (2002). Mouse Genome Sequencing Consortium. Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature*. 420, 520-561.
- Zimmermann R, Muller L, Wullich B, (2006). Protein transport into the endoplasmic reticulum: mechanisms and pathologies. *Molecular Medicine*. 12. 567-573.
- Geneinfo – Genetics of Epilepsy – Advanced. ([www.geocities.com/geneinfo/conditions/epilepsya.html?200831](http://www.geocities.com/geneinfo/conditions/epilepsya.html?200831)).