

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΤΡΟΦΙΜΩΝ, ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ ΤΜΗΜΑΤΟΣ

ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

"ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ"

ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ ΣΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ

DNAJC11 ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΑΜΥΟΤΡΟΦΙΚΗ

ΠΛΕΥΡΙΚΗ ΣΚΛΗΡΥΝΣΗ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ



ΕΙΡΗΝΗ Ν. ΓΙΑΛΙΤΑΚΗ

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ: ΕΛΕΝΗ ΝΤΟΥΝΗ

ΕΠΙΚΟΥΡΗ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ Γ.Π.Α

ΑΘΗΝΑ 2015

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΤΡΟΦΙΜΩΝ, ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ ΤΜΗΜΑΤΟΣ

ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

"ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ"

ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ ΣΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ

DNAJC11 ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΑΜΥΟΤΡΟΦΙΚΗ

ΠΛΕΥΡΙΚΗ ΣΚΛΗΡΥΝΣΗ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΕΙΡΗΝΗ Ν. ΓΙΑΛΙΤΑΚΗ

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ: ΕΛΕΝΗ ΝΤΟΥΝΗ

ΕΠΙΚΟΥΡΗ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ Γ.Π.Α

Τριμελής Συμβουλευτική και Εξεταστική Επιτροπή:

Επίκουρη Καθηγήτρια Ελένη Ντούνη (Επιβλέπουσα)

Καθηγητής Ηλίας Ηλιόπουλος (Μέλος)

Λέκτορας Βασιλική Κουμάντου (Μέλος)

ΑΘΗΝΑ 2015

Ευχαριστίες

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή εκπονήθηκε στο εργαστήριο της κ. Ντούνη στο Ε.ΚΕ.Β.Ε. «Αλέξανδρος Φλέμιγκ» σε συνεργασία με το Εργαστήριο Γενετικής του Τμήματος Βιοτεχνολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών του Τμήματος Βιοτεχνολογίας κατά το ακαδημαϊκό έτος 2014-15.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της Τριμελούς Συμβουλευτικής και Εξεταστικής Επιτροπής για τη συμμετοχή τους στην αξιολόγηση της διατριβής μου καθώς και τη συνεργασία τους προκειμένου να πραγματοποιηθούν οι απαραίτητες διαδικασίες για την ολοκλήρωση της διατριβής μου.

Ιδιαίτερα θα ήθελα την εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στην Επίκουρη Καθηγήτρια του Γ.Π.Α. Ελένη Ντούνη, εισηγήτρια του θέματος και επιβλέπουσα της μεταπτυχιακής διατριβής μου. Θα ήθελα να την ευχαριστήσω για την ευκαιρία που μου παρείχε να εκπονήσω τη διατριβή μου στο εργαστήριό της καθώς και για την πολύτιμη καθοδήγησή της και την υπομονή της για την ολοκλήρωση της παρούσας διατριβής.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη της ερευνητικής ομάδας της κ. Ντούνη και κυρίως τον διδάκτορα Βαγγέλη Ρηνώτα και την υποψήφια διδάκτορα Φωτεινή Βιολιτζή για τις γνώσεις τους και την πολύτιμη βοήθεια που μου παρείχαν. Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον διδάκτορα Φώτη Ιωακειμίδα για τις γνώσεις, την πολύτιμη βοήθειά του αλλά και καθοδήγησή μου κατά την παραμονή μου στο εργαστήριο, χωρίς τον οποίο δεν θα ήταν δυνατή η ολοκλήρωση της μεταπτυχιακής διατριβής.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της Μονάδας Γενετικής του Νευρικού Συστήματος της Α' Νευρολογικής Κλινικής Πανεπιστημίου Αθηνών στο Αιγινήτειο Νοσοκομείο και κυρίως τον κ. Πάνα και την κ. Καραδήμα για την παροχή των δειγμάτων DNA.

Ευχαριστώ όλους τους καθηγητές του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών για τις γνώσεις και τη βοήθεια που μου παρείχαν καθώς και τον διδάκτορα Γεράσιμο Δάρα για την πολύτιμη συμβολή του στο Π.Μ.Σ. Ευχαριστώ ιδιαίτερα τον Καθηγητή του Γ.Π.Α. και υπεύθυνο του Π.Μ.Σ. Πολυδεύκη Χατζόπουλο για τις γνώσεις που μου παρείχε, την καθοδήγηση και την υποστήριξή του καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου. Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Επίκουρο Καθηγητή Σπυρίδων Κίντζιο για τη δυνατότητα που μου παρείχε να πραγματοποιήσω την εξάσκησή μου στο εργαστήριο Ενζυμικής Τεχνολογίας του

Γ.Π.Α. καθώς και τον υποψήφιο διδάκτορα Θεοφύλακτο Αποστόλου για τις γνώσεις, την υπομονή αλλά και την ενθάρρυνσή τους κατά την παραμονή μου στο εργαστήριο.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στους γονείς μου που με στηρίζουν όλα αυτά τα χρόνια ώστε να μπορώ να φτάνω τους στόχους μου και με ενθαρρύνουν σε κάθε μου βήμα. Τέλος, ευχαριστώ τους φίλους μου και όσους στάθηκαν δίπλα μου στηρίζοντάς με ηθικά καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή εκπονήθηκε στα πλαίσια του έργου ΑΡΙΣΤΕΙΑ ΙΙ με τίτλο " Ο ρόλος του DNAJC11 στην μιτοχονδριακή δομή και σε μοντέλο νευρομυκικής ασθένειας στο ποντίκι" με κωδικό 4676 το οποίο συγχρηματοδοτήθηκε από την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο - ΕΚΤ) και από εθνικούς πόρους μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση» του Εθνικού Στρατηγικού Πλαισίου Αναφοράς (ΕΣΠΑ).



Ευρωπαϊκή Ένωση
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο



ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ ΚΑΙ ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



Περίληψη

Ο νευροεκφυλισμός είναι ένας γενικός όρος που χρησιμοποιείται για να περιγράψει τη προοδευτική απώλεια της δομής ή της λειτουργίας των νευρώνων με τελικό στάδιο την απώλειά τους και την εκδήλωση νόσων όπως Alzheimer, Parkinson, Huntington και Αμυοτροφική Πλευρική Σκλήρυνση (ALS). Τα τελευταία χρόνια όλο ένα και περισσότερες μελέτες συγκλίνουν στην διαπίστωση ότι ένας κοινός παράγοντας στις νευροεκφυλιστικές ασθένειες είναι η δυσλειτουργία ή η ανώμαλη δομή των μιτοχονδρίων, χωρίς ωστόσο να είναι γνωστοί οι παθογενετικοί μηχανισμοί που οδηγούν στον νευροεκφυλισμό. Για το σκοπό αυτό, υπάρχει ανάγκη ανακάλυψης των γονιδίων που είναι υπεύθυνα για την εμφάνιση των νευροεκφυλιστικών ασθενειών ώστε να κατανοηθεί η γενετική τους βάση και να βρεθούν νέες θεραπείες.

Η ερευνητική ομάδα της κ. Ντούνη δημιούργησε πρόσφατα ένα νέο νευρομυϊκό φαινότυπο στα ποντίκια με τυχαία μεταλλαξογένεση ακολουθώντας την προσέγγιση της Πρόσθιας Γενετικής για την ανίχνευση νέων παθογενετικών στόχων. Χαρακτηριστικά του συγκεκριμένου φαινοτύπου είναι η ανώμαλη βάδιση, μυϊκή αδυναμία, σπαστικότητα, τρόμος των άκρων, καχεξία και πρόωρος θάνατος. Με γενετική ανάλυση σύνδεσης, η υπεύθυνη μετάλλαξη εντοπίστηκε στο γονίδιο *DnaJC11*, η λειτουργία του οποίου παραμένει άγνωστη. Χαρακτηριστικό νευροϊστοπαθολογικό εύρημα αποτελεί η παρουσία κενοτοπίων στους κινητικούς νευρώνες οι οποίοι φαίνεται ότι προέρχονται από μιτοχόνδρια που έχουν χάσει τη φυσιολογική δομή της εσωτερικής τους μεμβράνης.

Σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής είναι η ανίχνευση πολυμορφισμών για το γονίδιο *DNAJC11* σε ασθενείς με ALS δεδομένου ότι στο ποντίκι η μετάλλαξη στο γονίδιο αυτό προκάλεσε βλάβη στους κινητικούς νευρώνες όπως συμβαίνει στην περίπτωση της νόσου στον άνθρωπο. Για το λόγο αυτό, αλληλουχήθηκαν τα εξώνια οι περιοχές ματίσματος (splicing junctions) σε DNA που απομονώθηκε από υγιή άτομα και από ασθενείς με ALS. Τα αποτελέσματα αποκάλυψαν την ύπαρξη πέντε πολυμορφισμών, που είναι καταγεγραμμένοι και ενός νέου σε σύνολο 4 εξωνικών και 2 εσωνικών σημειακών μεταλλάξεων σε ετερόζυγη κατάσταση αποκλειστικά σε ALS ασθενείς. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον αποτελεί μια παρανοηματική μετάλλαξη που οδηγεί σε αντικατάσταση της βαλίνης από ασπαρτικό οξύ στη θέση του 48^{ου} αμινοξέος στην συντηρημένη περιοχή J της πρωτεΐνης και του νέου πολυμορφισμού που εντοπίζεται στην περιοχή DUF3395 και αποτελεί επίσης μια παρανοηματική μετάλλαξη που προκαλεί αντικατάσταση της βαλίνης στη θέση 496 από αλανίνη.

Η περαιτέρω ανάλυση των πολυμορφισμών που ανιχνεύθηκαν στο γονίδιο *DNAJC11* με εργαλεία γενετικής, βιοπληροφορικής, βιοχημείας και κυτταρικής βιολογίας πρόκειται να προσφέρουν πληροφορίες για τη λειτουργία του *DNAJC11* γονιδίου αλλά και να διαλευκάνουν εάν σχετίζονται με την παθογένεση της Αμυοτροφικής Πλευρικής Σκλήρυνσης.

Abstract

Neurodegeneration is a generic term used to describe progressive loss of structure or function of neurons with a final step to their loss and the onset of diseases such as Alzheimer's disease, Parkinson, Huntington and Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS). In recent years more studies converge on the realization that a common factor in neurodegenerative diseases is the malfunction or aberrant mitochondrial structure, but it is not known the pathogenetic mechanisms that lead to the neurodegeneration. For this purpose, there is a need to discover the responsible genes for the onset of neurodegenerative diseases in order to understand the genetic basis and to find new treatments.

The research group of Dr Eleni Douni created a novel neuromuscular phenotype in mice by random mutagenesis following the approach of Forward Genetics for detecting new pathogenic targets. Features of this phenotype are abnormal locomotion, muscle weakness, spasticity, tremor, cachexia and early death. With genetic linkage analysis, the responsible mutation was identified in a novel gene of unknown function, *DnaJC11*. Typical neurohistopathological finding is the presence of vacuoles in motor neurons which seem to originate from mitochondria that had lost their normal structure of the internal membrane.

The aim of the present Masters dissertation is the detection of polymorphisms in the gene *DNAJC11* in patients with ALS as mouse mutant in this gene cause damage to motor neurons as in the case of human patients. Therefore, we sequenced the exons and the splicing junctions of DNA derived from healthy individuals and patients with ALS. The results revealed the existence of five polymorphisms, which were already registered and a novel one of total 4 exonic and 2 intronic point mutations in heterozygous state exclusively on ALS patients. Particular interest has a missense mutation leading to a substitution of valine from aspartic acid at position of the 48th amino acid in the conserved region J of the protein and the new polymorphism that is identified in the domain DUF3395 and is also a missense mutation causing substitution of valine from alanine at amino acid position 496.

Further analysis of the identified polymorphisms in *DNAJC11* by genetic tools, bioinformatics, biochemistry and cell biology will provide information about the function of the *DNAJC11* gene and will also unravel if they are related to the pathogenesis of Amyotrophic Lateral Sclerosis.

Περιεχόμενα

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	12
1.1 Η νευροεκφυλιστική νόσος ALS.....	12
1.1.1 Γενική Επισκόπηση.....	13
1.1.2 Γενετική ανάλυση της ALS-Μετάλλαξη του γονιδίου SOD1.....	13
1.2 Δομή και λειτουργία των μιτοχονδρίων.....	15
1.2.1 Γενική Επισκόπηση.....	15
1.2.2 Το σύμπλοκο MICOS.....	18
1.2.3 Ο ρόλος των μιτοχονδρίων στις νευρομυϊκές ασθένειες.....	20
1.3 Χαρακτηρισμός του νευρομυϊκού φαινότυπου στα spastic ποντίκια.....	22
1.4 Χαρτογράφηση και ταυτοποίηση της υπεύθυνης μετάλλαξης στο γονίδιο DNAJC11.....	26
1.5 Οι πρωτεΐνες J-Χαρακτηρισμός της DNAJC11.....	27
1.6 Σκοπός της Μεταπτυχιακής Μελέτης.....	30
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	31
2.1 Γενετικό Υλικό.....	31
2.2 Επιλογή Εκκινητών.....	32
2.3 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR).....	34
2.4 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.....	37
2.5 Καθαρισμός της PCR.....	38
2.6 Προσδιορισμός συγκέντρωσης και καθαρότητας προϊόντος PCR.....	39
2.7 Καθαρισμός DNA από πήκτωμα αγαρόζης.....	40
2.8 Αλληλούχιση προϊόντων PCR.....	41
2.9 Πολλαπλή ευθυγράμμιση αλληλουχιών.....	41
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	42
3.1 Επιλογή γενετικού υλικού από ασθενείς με ALS.....	42
3.2 Θέσεις εκκινητών για κάθε εξόνιο του DNAJC11.....	42
3.3 Πολλαπλή ευθυγράμμιση αλληλουχιών.....	46
3.4 Πολυμορφισμοί των ασθενών με ALS.....	47
3.4.1 Εντοπισμός του πολυμορφισμού rs41310361 στο εσόνιο 1.....	47
3.4.2 Εντοπισμός του πολυμορφισμού rs138392773 στο εξόνιο 2.....	48
3.4.3 Εντοπισμός του πολυμορφισμού rs200454 στο εξόνιο 8.....	50
3.4.4 Εντοπισμός του πολυμορφισμού rs200458 στο εξόνιο 10.....	51
3.4.5 Εντοπισμός του πολυμορφισμού rs6577583 στο εσόνιο 15.....	52
3.4.6 Εντοπισμός νέου πολυμορφισμού στο εξόνιο 14.....	54
3.4.7 Ανασκόπηση πολυμορφισμών.....	55

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	57
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	62

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Η νευροεκφυλιστική νόσος ALS

1.1.1 Γενική Επισκόπηση

Η Αμυοτροφική Πλευρική Σκλήρυνση (Amyotrophic Lateral Sclerosis, ALS) περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1869 από τον Γάλλο νευρολόγο Jean-Martin Charcot (Boillee et al., 2006). Πρόκειται για μια θνησιγόνο νευροεκφυλιστική νόσο που χαρακτηρίζεται από τον πρόωρο εκφυλισμό και θάνατο των άνω και κάτω κινητικών νευρώνων. Παρόλο που τα αρχικά συμπτώματα μπορεί να διαφέρουν καθώς και ο βαθμός εξέλιξης μπορεί να ποικίλει μεταξύ των ασθενών, ο μέσος χρόνος επιβίωσής τους είναι 2-5 χρόνια από τη διάγνωση της νόσου. Μεταξύ των συμπτωμάτων είναι η σύσπαση των μυών, μυϊκή αδυναμία και ατροφία, δυσφαγία και αδυναμία των μυών του διαφράγματος που οδηγεί σε αναπνευστική ανεπάρκεια ή πνευμονία λόγω παράλυσης των αναπνευστικών μυών με αποτέλεσμα το θάνατο των ασθενών. Οι άνθρωποι με ALS δεν εκδηλώνουν τα ίδια συμπτώματα ή την ίδια σειρά συμπτωμάτων. Ωστόσο, η προοδευτική αδυναμία και παράλυση των μυών είναι γενικό χαρακτηριστικό των ασθενών. Συνήθως η νόσος εμφανίζεται σε άτομα ηλικίας μεταξύ 45-60 ετών αν και υπάρχουν περιπτώσεις ατόμων που εμφάνισαν τη νόσο σε πολύ μικρότερη ηλικία. Η ALS είναι 20% πιο κοινή σε άντρες παρά σε γυναίκες. Ωστόσο, καθώς η ηλικία αυξάνεται, αποκτούν τις ίδιες πιθανότητες εμφάνισης της νόσου.

Στους μηχανισμούς που εμπλέκονται στην καταστροφή των κινητικών νευρώνων είναι: η συσσώρευση των πρωτεϊνών, η υπερδιέγερση καναλιών νατρίου, επιγενετικοί και γενετικοί παράγοντες, η δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων, ελεύθερες ρίζες που αυξάνουν το οξειδωτικό στρες και η συσσώρευση τοξικών ουσιών. Πολλοί περισσότεροι παράγοντες θεωρείται ότι έχουν σημαντικό ρόλο για την έναρξη και εξέλιξη της νόσου.

Η ALS ανάλογα με την αιτία εμφάνισής της χωρίζεται σε 2 κύριες κατηγορίες, την σποραδική (sALS) και τη συγγενή μορφή της ALS (fALS) που είναι όμοιες κλινικά και παθολογικά (Horton et al., 1976).

- **Σποραδική ALS (sporadic ALS, sALS) :** Πρόκειται για μεμονωμένα περιστατικά που η νόσος εμφανίζεται σε άτομα χωρίς οικογενειακό ιστορικό. Σχεδόν το 90% των περιπτώσεων αφορούν τη "σποραδική ALS". Η αιτία εμφάνισής της δεν είναι πλήρως γνωστή

αλλά θεωρείται ότι ο συνδυασμός περιβαλλοντικών και γενετικών παραγόντων ευθύνεται για την εκδήλωση της σποραδικής ALS.

- **Συγγενής ALS (familial ALS, fALS)** : Πρόκειται για περιπτώσεις που το μεταλλαγμένο γονίδιο κληρονομείται στους απογόνους. Συνήθως περισσότερα από ένα άτομα σε μια οικογένεια έχουν ALS οι οποίοι εμφανίζουν και μετωποκροταφική άνοια. Αποτελεί το 10% των περιπτώσεων και τα άτομα με fALS συνήθως εμφανίζουν συμπτώματα σε μικρότερη ηλικία από αυτά με σποραδική ALS. Σχεδόν σε όλες τις περιπτώσεις, η fALS κληρονομείται με αυτοσωμικό υπολειπόμενο τρόπο (Horton et al., 1976; Mulder et al., 1986; Siddique et al., 1989).

Η sALS και fALS είναι κλινικά δυσδιάκριτες και επηρεάζουν τους ίδιους νευρώνες. Ακόμα και εντός των fALS περιπτώσεων, ο χρόνος και η διάρκεια της νόσου ποικίλουν. Η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία θεωρείται ότι παίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεια της νόσου. Ανωμαλίες στη δομή των μιτοχονδρίων σε μύες έχουν παρατηρηθεί με ιστοπαθολογικές αναλύσεις σε ασθενείς με sALS και fALS (Hirano et al., 1984a; Hirano et al., 1984b; Sasaki and Iwata, 1996, 2007) καθώς και σε ποντίκια με μετάλλαξη του SOD1 που εξέφραζαν ενεργή δισμουτάση (Dal Canto and Gurney, 1994; Higgins et al., 2003; Kong and Xu, 1998; Wong et al., 1995) και ανενεργή μετάλλαξη (Bruijn et al., 1997). Επιπλέον, έχει αναφερθεί ότι η λειτουργικότητα των μιτοχονδρίων επηρεάζεται στο νοτιαίο μυελό και τους σκελετικούς μύες των ατόμων με fALS και sALS (Dupuis et al., 2003; Echaniz-Laguna et al., 2002; Vielhaber et al., 1999; Wiedemann et al., 2002) καθώς και κάποιων ποντικών με ALS (Damiano et al., 2006; Mattiazzi et al., 2002; Nguyen et al., 2009).

1.1.2 Γενετική ανάλυση της ALS - Μετάλλαξη του γονιδίου SOD1

Παρόλο που η νόσος ALS περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1869, χρειάστηκε πάνω από ένας αιώνας για να προσδιοριστεί ότι η μετάλλαξη του γονιδίου Cu/Zn υπεροξειδική δισμουτάση 1 (Superoxide dismutase 1, SOD1) στο χρωμόσωμα 21 συνδέεται με την ALS (Rosen et al., 1993). Οι μεταλλάξεις του SOD1 γονιδίου είναι οι πιο κοινές καθώς ευθύνονται περίπου για το 20% των περιπτώσεων fALS. Από το 1993 που περιγράφηκε η πρώτη μετάλλαξη του SOD1 (Rosen et al., 1993), ο αριθμός των γνωστών μεταλλάξεων έχει αυξηθεί πάνω από 114. Η πιο προφανής κυτταρική ανωμαλία είναι η παρουσία κενοδοπίων σε άξονες και δενδρίτες, τα οποία φαίνεται ότι προέρχονται από εκφυλισμένα μιτοχόνδρια (Wong et al., 1995). Η δράση

του SOD1 είναι η οξειδοαναγωγή ή μετατροπή του υπεροξειδίου, ενός φυσικού υποπροϊόντος της αναπνοής, σε νερό ή υπεροξειδίο του υδρογόνου. Έτσι ο πρώτος πιθανός παθογόνος μηχανισμός είναι η απώλεια ή η μείωση της αποτοξινωτικής δράσης. Η πιο συχνή μετάλλαξη του SOD1 είναι η αντικατάσταση από αλανίνη σε βαλίνη στη θέση 4 (SOD1^{A4V}) στη Νότια Αμερική, υπεύθυνη για το 50% όλων των περιπτώσεων. Οι ασθενείς με SOD1^{A4V} εμφανίζουν ομοιόμορφα ταχύτατη πορεία της νόσου με μέσο χρόνο επιβίωσης 1 έτος από την εμφάνισή της. Στην Ιαπωνία, το 40% των περιπτώσεων εμφανίζουν τη μετάλλαξη από ιστιδίνη σε αργινίνη στη θέση 46 του SOD1 (SOD^{H46R}). Η μετάλλαξη SOD^{H46R} προκαλεί απώλεια του χαλκού που προσδένεται στο ενεργό κέντρο του SOD1. Σε αυτή τη μετάλλαξη, η πορεία εξέλιξης της νόσου είναι εξαιρετικά μεγάλη και οι ασθενείς συνήθως ζουν περίπου 15 χρόνια από την εμφάνιση της νόσου. Τέλος, η μετάλλαξη από γλυκίνη σε αλανίνη στη θέση 93 του SOD1 (SOD1^{G93A}) είναι πιο σπάνια συγκριτικά με τις άλλες μεταλλάξεις αλλά έχει μελετηθεί εκτενώς και είναι η πρώτη μετάλλαξη που μοντελοποιήθηκε στα ποντίκια. Ζώα που εκφράζουν ενεργή δεσμουτάση (hSOD1^{G93A} [Gurney et al., 1994; Howland et al., 2002]) καθώς και ανενεργή (hSOD1^{H46R} [Nagai et al., 2001]) μορφή του ενζύμου, αναπτύσσουν όμοιες παθολογίες σε σχέση με τους ασθενείς, συμπεριλαμβανομένου τη σύμπτυξη των συνάψεων των κινητικών νευρώνων (Fischer et al., 2004; Frey et al., 2000; Pun et al., 2006), μιτοχονδριακή αλλοίωση (Higgins et al., 2003; Kong and Xu, 1998; Liu et al., 2004; Wong et al., 1995) και μικρογλιακή ενεργοποίηση (Boillee et al., 2006; Engelhardt and Appel, 1990; Hall et al., 1998; Henkel et al., 2006).

Εκτός από μεταλλάξεις του γονιδίου SOD1, σχετικά πρόσφατα ανακαλύφθηκε ότι μεταλλάξεις του γονιδίου C9ORF72 (Chromosome 9 open reading frame 72) οφείλονται για το 25-40% των fALS περιπτώσεων, ανάλογα με τον πληθυσμό, και περίπου 4-6% περιπτώσεων sALS. Συγκεκριμένα μετά από μελέτη στον ελληνικό πληθυσμό, βρέθηκε ότι επέκταση του εξωνίου με επανάληψη της ακολουθίας "GGGGCC" του C9ORF72 είναι η πιο συχνή αιτία εμφάνισης ALS στην Ελλάδα (Kin et al., 2012). Επίσης, μεταλλάξεις στα γονίδια TDP-43 (Transactive response DNA-binding protein) (Kabashi et al., 2008; Sreedharan et al., 2008), FUS (Fused in Sarcoma) (Mackenzie et al., 2010), NEFH (Neurofilament, heavy polypeptide) (Claire et al., 2006), OPTN (Optineurin) (Maruyama et al., 2010), UBQLN2 (Ubiquilin 2) (Gilpin et al., 2015) έχει βρεθεί ότι σχετίζονται με την fALS.

Τα συσσωματώματα είναι ένα παθολογικό γνώρισμα πολλών νευροεκφυλιστικών διαταραχών συμπεριλαμβανομένου και της νόσου ALS. Συσσωματώματα κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών παρατηρήθηκαν σε sALS και fALS περιπτώσεις καθώς και σε διαγονιδιακά ποντίκια με μετάλλαξη του SOD1 (Bruijn et al., 1997, 1998; Gurney et al., 1994; Watanabe et al., 2001;

Wong et al., 1995). Η συνεισφορά των συσσωματωμάτων στην τοξικότητα των κινητικών νευρώνων δεν έχει διευκρινιστεί ακόμα και παραμένει άγνωστο πότε αυτά τα συσσωματώματα είναι πραγματικά τοξικά. Ένα άλλο κοινό χαρακτηριστικό των νευροεκφυλιστικών νόσων είναι η βλάβη των μιτοχονδρίων που συμβάλλει σε έναν εκφυλιστικό φαινότυπο. Τα μιτοχόνδρια θεωρούνται πιθανοί στόχοι τοξικότητας της ALS από ιστοπαθολογικές παρατηρήσεις των κενотоπίων και διαστολή των μιτοχονδρίων με αποδιοργανωμένες ακρολοφίες και μεμβράνες στους κινητικούς νευρώνες και μυς σε ασθενείς με sALS και fALS (Afifi et al., 1966; Hirano et al., 1984a, 1984b).

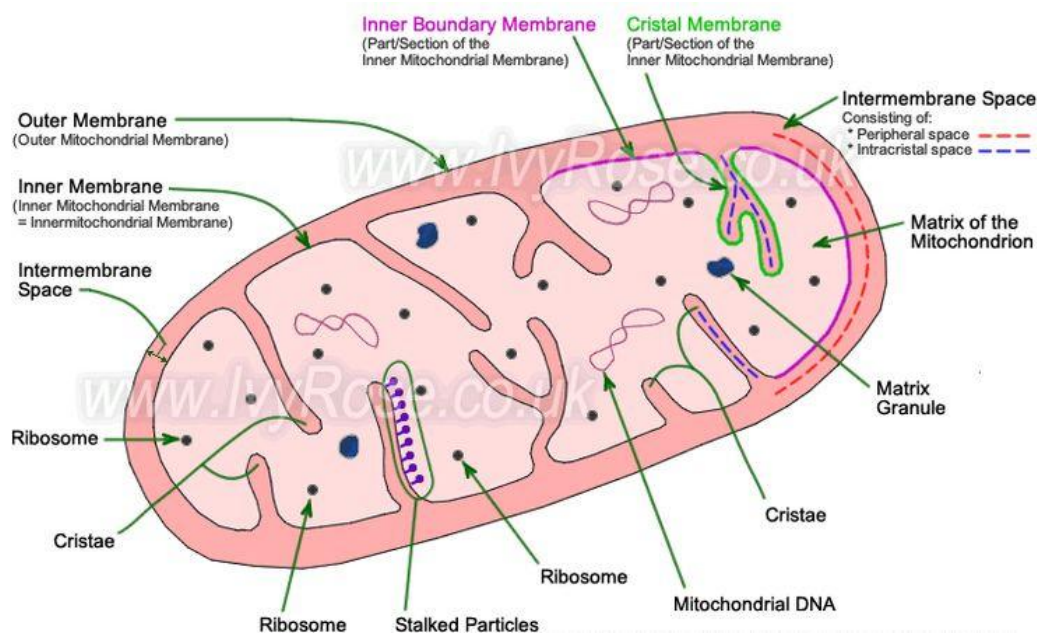
1.2 Δομή και λειτουργία των μιτοχονδρίων

1.2.1 Γενική Επισκόπηση

Τα μιτοχόνδρια είναι οργανίδια των ευκαρυωτικών κυττάρων τα οποία θεωρείται ότι προέρχονται από τη συμβίωση πρωτόγονων βακτηρίων με ευκαρυωτικά κύτταρα πριν εκατοντάδες εκατομμύρια χρόνια. Πρόκειται για ιδιαίτερα δυναμικά οργανίδια τα οποία βρίσκονται συνεχώς σε κατάσταση σχάσης (fission) και σύντηξης (fusion) (Hoppins et al., 2007; Zick et al., 2009). Αναφέρονται και ως εργοστάσια παραγωγής ενέργειας, λόγω των μεταβολικών διεργασιών που επιτελούν αποδίδοντας μεγάλα ποσά ενέργειας. Τα μιτοχόνδρια διαθέτουν το δικό τους DNA (mtDNA) το οποίο είναι κυκλικό μήκους 16.569 bp και το οποίο κωδικοποιεί μόλις ελάχιστες από τις 1.500 μιτοχονδριακές πρωτεΐνες. Συγκεκριμένα από το mtDNA κωδικοποιούνται 13 πρωτεϊνικά μόρια, μέλη της αναπνευστικής αλυσίδας, 22 tRNA, τα δυο 12S και 23S rRNA (Wallace et al., 2001; Wallace et al., 2009). Οι υπόλοιπες μιτοχονδριακές πρωτεΐνες κωδικοποιούνται από πυρηνικά γονίδια και μεταφέρονται στη συνέχεια στα μιτοχόνδρια από μηχανισμούς μεταφοράς και διαλογής (Chacinska et al., 2009). Ο αριθμός των μιτοχονδρίων ποικίλει ανάλογα με το είδος των οργανισμών και των κυτταρικών τύπων. Τα ανθρώπινα κύτταρα περιέχουν από 5-2.000 μιτοχόνδρια το σχήμα και το μέγεθος των οποίων ποικίλει. Υπάρχουν σφαιρικά μιτοχόνδρια σε κύτταρα όπως αυτά του ήπαρ με διάμετρο 0.5-5μm, ενώ υπάρχουν μακρόστενα κυλινδρικά σε μυϊκά κύτταρα με διάμετρο τουλάχιστον 0.2μm και μήκος μέχρι και 20μm (Perkins and Frey, 2000). Άλλες φορές μπορεί να είναι νηματοειδή ή διακλαδιζόμενα ενώ έχουν καταγραφεί και άλλα με εξειδικευμένο σχήμα δακτυλίων, δίσκων ή φλιτζανιού (Munn, 1974; Reichert and Neupert, 2002).

Η δομή των μιτοχονδρίων φαίνεται να είναι αρκετά πολύπλοκη (Εικόνα 1.1). Το σύστημα των διπλών μεμβρανών των μιτοχονδρίων παρατηρήθηκε για πρώτη φορά με τη βοήθεια του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου διέλευσης στη δεκαετία του 1950 από τους Sjostrand και Palade. Η εξωτερική μεμβράνη (Outer Membrane, OM) των μιτοχονδρίων είναι λεία, ενώ η εσωτερική μεμβράνη (Inner Membrane, IM) είναι αναδιπλώμενη και εμφανίζει πολυάριθμες δισκοειδείς ή δακτυλιοειδείς πτυχώσεις (cristae) προς το εσωτερικό του οργανιδίου (μήτρα). Τα cristae διαχωρίζουν την IM στο τμήμα που βρίσκεται σε κοντινή απόσταση με την OM, δηλαδή την εσωτερική οριακή μεμβράνη (Inner Boundary Membrane, IBM) και την μεμβράνη των cristae (Cristae Membrane, CM). Ο χώρος μεταξύ της IBM και της OM καλείται διαμεμβρανικός χώρος (Inter Membrane Space, IMS) ενώ τα cristae συνδέονται με την IBM μέσω σωληνοειδών ανοιγμάτων που ονομάζονται κόμβοι cristae (Cristae Junctions, CJs) (Mannella, 2006b; Zick et al., 2009).

Μετά από αναλύσεις, προκύπτει ότι οι δυο μεμβράνες έχουν διαφορετική σύσταση σε λιπίδια και πρωτεΐνες. Η OM αποτελείται από 52% λιπίδια και 48% πρωτεΐνες ενώ η IM αποτελείται από 24% λιπίδια και 76% πρωτεΐνες.

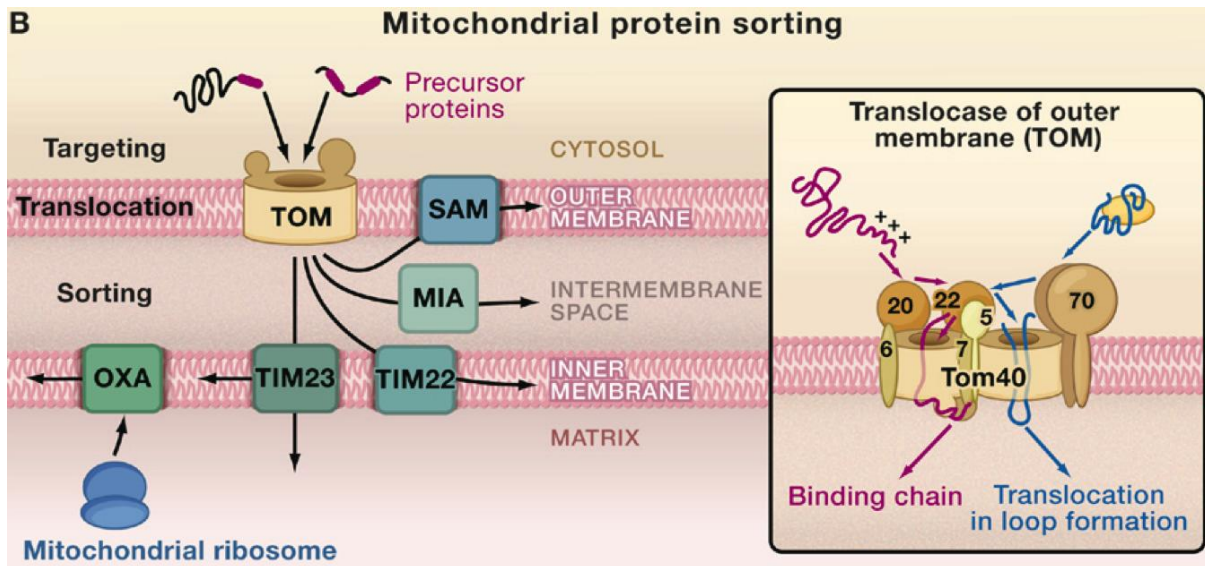


Εικόνα 1.1: Αναπαράσταση της δομής του μιτοχονδρίου σε εγκάρσια τομή και εμφάνιση των δομικών του στοιχείων και χαρακτηριστικών. (<http://www.ivyroses.com/Biology/Organelles/Structure-of-Mitochondria.php>)

Τα μιτοχόνδρια επιτελούν πολλές λειτουργίες που είναι σημαντικές για την επιβίωση και τη σωστή λειτουργία των κυττάρων. Η πρώτη λειτουργία που μελετήθηκε είναι εκείνη της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης (Oxidative Phosphorylation, OXPHOS) και είναι υψίστης σημασίας για τα κύτταρα. Κατά την διαδικασία της OXPHOS τα καύσιμα υλικά της αναπνευστικής αλυσίδας οξειδώνονται με τελικό προϊόν την παραγωγή τριφωσφορικής αδενοσίνης (Adenosine Triphosphate, ATP). Πρόκειται για μια διαδικασία που επιτελείται στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων στο σύστημα μεταφοράς ηλεκτρονίων κατά την αερόβια αναπνοή όπου μόρια ATP συντίθεται από τη διφωσφορική αδενοσίνη (Adenosine Diphosphate, ADP) και ορθοφωσφορικά ιόντα με ταυτόχρονη οξείδωση του οξυγόνου και σύνθεση H₂O. Στη διαδικασία της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης συμμετέχουν 4 μεγάλα πρωτεϊνικά σύμπλοκα (I, II, III και IV) (Acin-Perez et al., 2008). Για την έναρξη της OXPHOS, δότης ηλεκτρονίων είναι το NADH⁺.

Εκτός από την οξειδωτική φωσφορυλίωση, πολλά μεταβολικά μονοπάτια λαμβάνουν χώρα στα μιτοχόνδρια όπως ο κύκλος του κιτρικού οξέος όπου δημιουργούνται ελεύθερες ρίζες (Reactive Oxygen Species, ROS) που παράγονται από την οξειδωτική φωσφορυλίωση, αλλά και άλλες βασικές λειτουργίες όπως η κυτταρική σηματοδότηση με ασβέστιο, ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός και η κυτταρική απόπτωση που οδηγεί στην αυτοκαταστροφή του κυττάρου (Scorrano et al., 2002).

Η εξωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων (OM) έχει βρεθεί ότι διαθέτει το σύμπλοκο TOM (Translocase Outer Membrane), που είναι το κεντρικό σημείο εισόδου σχεδόν όλων των μιτοχονδριακών πρωτεϊνών (Εικόνα 1.2). Ανάλογα με το στόχο, οι προ-πρωτεΐνες κατευθύνονται είτε στην εσωτερική μεμβράνη (IM) που διαθέτει το σύμπλοκο TIM (Translocase Inner Membrane) είτε εισέρχονται στο διαμεμβρανικό χώρο (IMS) μέσω του συμπλόκου MIA (Mitochondrial Intermembrane space Assembly machinery).

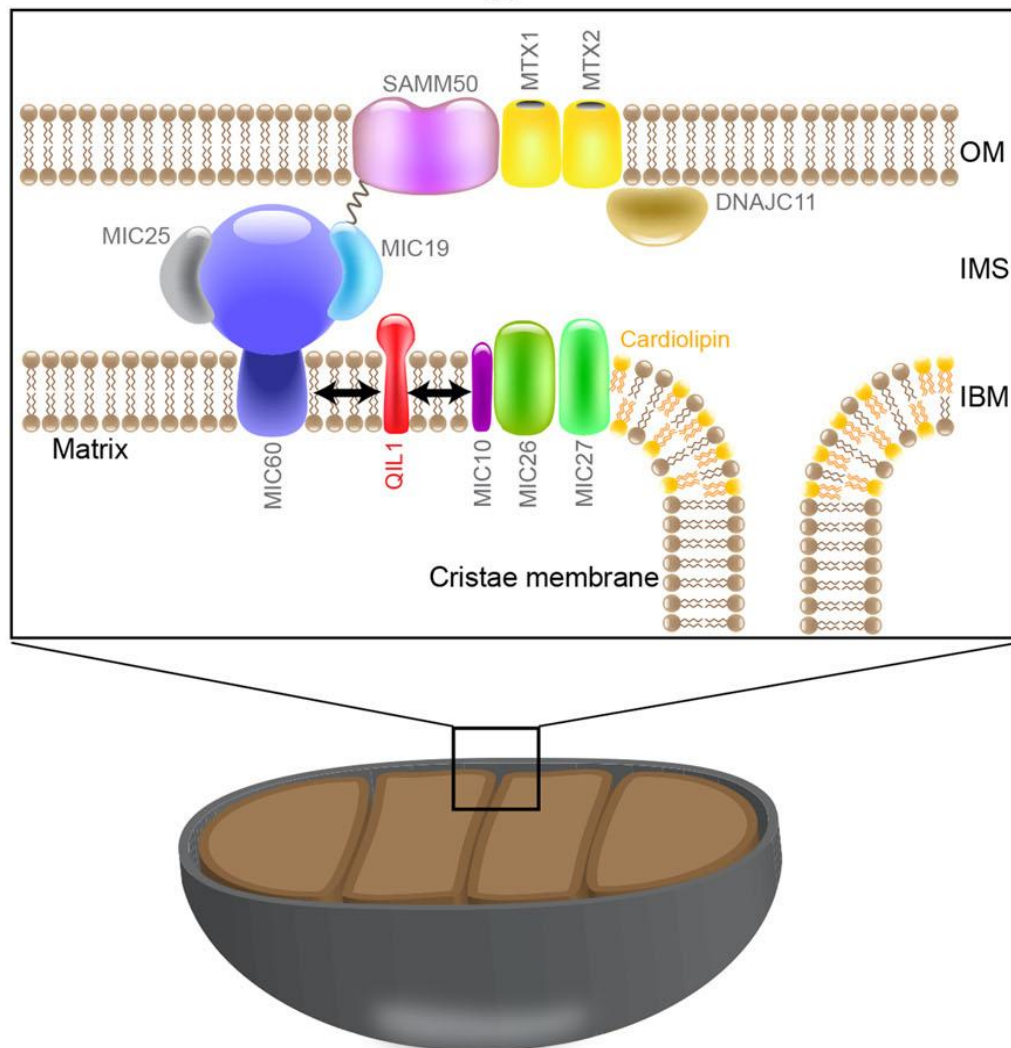


Εικόνα 1.2. Η είσοδος των πρωτεϊνών από το κυτταρόπλασμα στο μιτοχόνδριο και η διανομή τους στα μιτοχονδριακά διαμερίσματα (Chacinska et al., 2009).

1.2.2 Το σύμπλοκο MICOS

Έρευνες στα μιτοχόνδρια της ζύμης και του ανθρώπου έχουν αποκαλύψει την ύπαρξη του πρωτεϊνικού συμπλόκου MINOS (Mitochondrial INner membrane Organization System) (von der Malsburg et al., 2011) ή αλλιώς MITOS (MITochondrial Organizing System) (Hoppins et al., 2011) ή MICOS (MItochondrial COntact Site) (Harner et al., 2011), το οποίο είναι σημαντικό για τη διατήρηση της φυσιολογικής μορφολογίας των cristae του μιτοχονδρίου. Η γενική ονομασία που έχει επικρατήσει για το πρωτεϊνικό σύμπλοκο είναι MICOS, τα στοιχεία του οποίου έχουν ονόματα από Mic10 έως Mic60 (Pfanner et al., 2014). Τα στοιχεία του MICOS συμπλόκου φαίνεται ότι σχετίζονται με τις OM πρωτεΐνες στα μιτοχόνδρια της ζύμης - το σύμπλοκο TOM (von der Malsburg et al., 2011), UGO1, VDAC (Hoppins et al., 2011; Harner et al., 2011) και το σύμπλοκο SAM (Harner et al., 2011). Στα μιτοχόνδρια του ανθρώπου, η Mic60/Mitofilin συνδέεται με ποικίλες πρωτεΐνες όπως Mic19/CHCHD3 και Mic25/CHCHD6 (Coiled-coil helix coiled-coil helix domain-containing protein 3 and 6), SAM50, Metaxin1 και 2 και DNAJC11 (Darshi et al., 2011; Xie et al., 2007; Ott et al., 2012). Η αλληλεπίδραση της Mic19/CHCHD3 με τη Mic60/Mitofilin και την OPA1 πιστεύεται ότι είναι σημαντικές για τη μορφολογία των cristae (Darshi et al., 2011). Από την άλλη, η αλληλεπίδραση της SAM με το σύμπλοκο MICOS φαίνεται ότι είναι απαραίτητο για τα μιτοχονδριακά cristae στους ανθρώπους. Η SAM50 έχει βρεθεί μαζί με τη Mic60/Mitofilin και τη Min19/CHCHD3 στο σύμπλοκο MIB (Mitochondrial Intermembrane space Bridging) (Ott

et al., 2012). Πρόσφατα έχουν ταυτοποιηθεί και άλλα στοιχεία του συμπλόκου MICOS (Εικόνα 1.3), όπως η Mic25/CHCHD6, η Mic10/MINOS1 και η QIL1 (Alkhaja et al., 2012; An et al., 2012; Guarani et al., 2015).



Εικόνα 1.3. Σχηματική αναπαράσταση των σημαντικότερων πρωτεϊνών που συμμετέχουν ή αλληλεπιδρούν με το σύμπλοκο MICOS (Guarani et al., 2015).

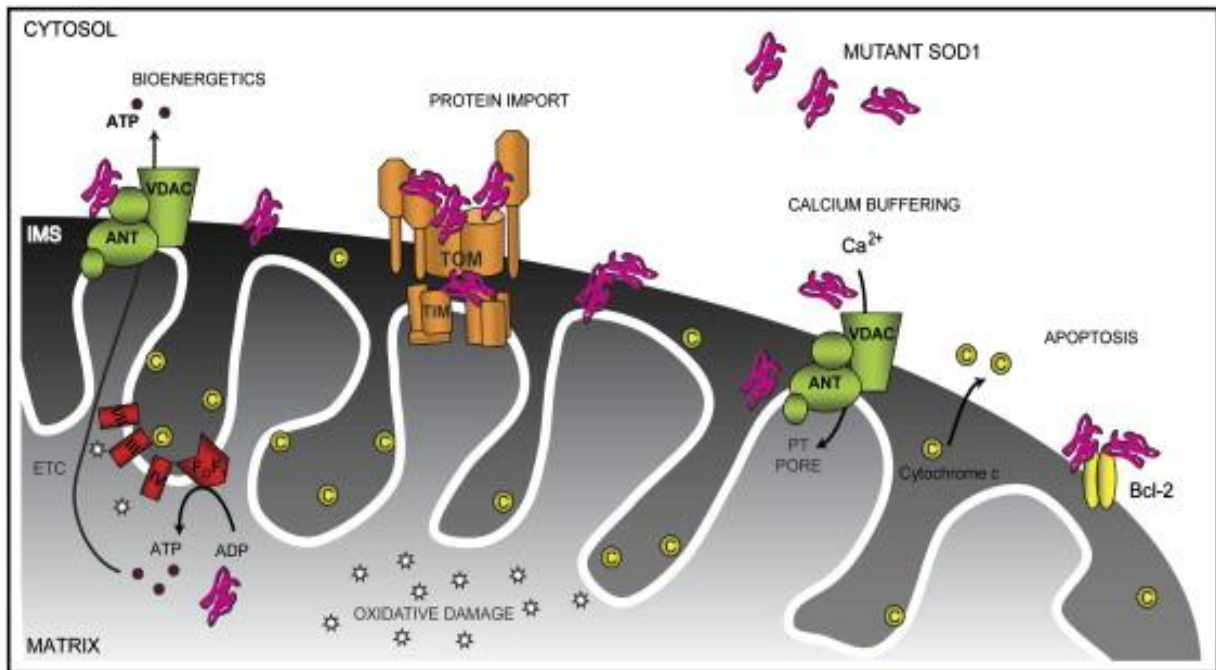
1.2.3 Ο ρόλος των μιτοχονδρίων στις νευρομυϊκές ασθένειες

Πέρα από το πλήθος των κυτταρικών λειτουργιών, τα μιτοχόνδρια ευθύνονται για την εμφάνιση πολλών ασθενειών είτε άμεσα λόγω των δυσλειτουργιών τους είτε έμμεσα λόγω του ότι η παθοφυσιολογία των ασθενειών περιλαμβάνει μιτοχονδριακές δυσλειτουργίες. Οι μιτοχονδριακές ασθένειες είναι μια μεγάλη ομάδα γενετικών νοσημάτων, τα οποία οδηγούν σε ανωμαλίες της μιτοχονδριακής αναπνευστικής αλυσίδας. Μια μιτοχονδριακή ασθένεια μπορεί να είναι αποτέλεσμα μεταλλάξεων γονιδίων του πυρηνικού DNA ή μεταλλάξεων γονιδίων του μιτοχονδριακού DNA (mtDNA). Η μεγάλη ετερογένειά τους οφείλεται εν μέρει στη βιοχημική πολυπλοκότητα του μηχανισμού της μιτοχονδριακής αναπνοής, αλλά και στο γεγονός ότι το μιτοχονδριακό και πυρηνικό γονιδίωμα κωδικοποιούν τις πρωτεϊνικές υπομονάδες των αναπνευστικών συμπλόκων. Γενικά, τα όργανα και οι ιστοί με την υψηλότερη ενεργειακή απαίτηση, όπως ο εγκέφαλος και οι μύες, είναι πιθανότερο να εμφανίσουν μιτοχονδριακές ασθένειες, γι' αυτό αναφέρονται ως "μιτοχονδριακές εγκεφαλομυοπάθειες". Παραδείγματα τέτοιων μιτοχονδριακών ασθενειών είναι: η Κυρίαρχη Οπτική Ατροφία (LHON) που προκαλείται από μετάλλαξη μιτοχονδριακού γονιδίου (DiMauro and Schon, 2008; Nardin and Johns, 2001) και το σύνδρομο του Leigh που προκαλείται από μεταλλάξεις των μιτοχονδριακών γονιδίων Cox και SURF1 (Yon et al., 1993). Η ετερογένεια στην κατανομή του mtDNA και η ιστο-ειδική έκφραση πολλών γονιδίων του πυρηνικού DNA αποτελούν τις κύριες αιτίες για τη μεγάλη ποικιλία των φαινοτυπικών χαρακτηριστικών που εκδηλώνουν οι μιτοχονδριακές ασθένειες. Λόγω της σπανιότητας των ασθενειών αυτών και της έλλειψης ζωικών μοντέλων, οι μιτοχονδριακές ασθένειες παραμένουν ανίατες (Zeviani and Di Donato, 2004).

Εκτός της άμεσης εμπλοκής της μιτοχονδριακής δυσλειτουργίας στην εκδήλωση μιτοχονδριακών ασθενειών, ο κεντρικός ρόλος της μιτοχονδριακής λειτουργίας ανακύπτει ως ένα σημείο σύγκλισης σε πολλές νευρομυϊκές / νευροεκφυλιστικές ασθένειες (Karbowski and Neutzner, 2012) που παρουσιάζουν βλάβη στη μιτοχονδριακή λειτουργία, δυναμική και δομή. (Karbowski and Neutzner, 2012; Kwong et al., 2006; Mattson et al., 2008). Σε πολλές νευρομυϊκές ασθένειες έχει βρεθεί ότι κύρια αιτία δεν είναι κάποια μετάλλαξη του mtDNA, αλλά ανωμαλίες στη δομή και τη λειτουργία των μιτοχονδρίων. Παραδείγματα τέτοιων ασθενειών είναι: το Parkinson, το Alzheimer και η Πλάγια Αμυοτροφική Σκλήρυνση (Amyotrophic Lateral Sclerosis, ALS) (Chung and Suh, 2002; Zick et al., 2009).

Συγκεκριμένα στην ALS, τα μιτοχόνδρια θεωρούνται πιθανοί στόχοι τοξικότητας της νόσου όπως φάνηκε από ιστοπαθολογικές παρατηρήσεις ύπαρξης κενοδοπιών και διαστολής των μιτοχονδρίων με αποδιοργανωμένες μεμβράνες στους κινητικούς νευρώνες και μύες σε ασθενείς με sALS και fALS (Afifi et al., 1966; Hirano et al., 1984a, 1984b). Αν και το γονίδιο που κωδικοποιεί την SOD1 είναι πυρηνικό, εντούτοις η πρωτεΐνη κατευθύνεται στο μιτοχόνδριο όπου δρα καταστρέφοντας τις ελεύθερες ρίζες υπεροξειδίου. Υπάρχουν διάφοροι μηχανισμοί με τους οποίους οι μεταλλαγμένες πρωτεΐνες προσβάλλουν τη λειτουργία των μιτοχονδρίων. Μια μετάλλαξη του SOD1 μπορεί να παρέμβει στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων με αποτέλεσμα να διακόπτεται η παραγωγή ATP. Επίσης, μια μετάλλαξη του SOD1 μπορεί να διαταράξουν τους ρυθμούς με τους οποίους τα μιτοχόνδρια ρυθμίζουν τα επίπεδα κυτοσολικού ασβεστίου. Συσσωματώματα από μετάλλαξη του SOD1 μπορεί να αλληλεπιδράσουν με τα συστατικά των μιτοχονδρίων που εξαρτώνται από το μηχανισμό απόπτωσης, όπως το γονίδιο Bcl-2, ως εκ τούτου προκαλείται πρόωρη ενεργοποίηση της απόπτωσης με απελευθέρωση του κυτοχρώματος c στο κυτταρόπλασμα. Επιπλέον, μια μετάλλαξη του SOD1 μπορεί έμμεσα να επηρεάσει όμοια μονοπάτια που συνδέονται με τα μιτοχόνδρια μπλοκάροντας φυσικά τις μηχανές εισόδου πρωτεϊνών, TOM (Translocators of the Outer Membrane) και TIM (Translocators of the Inner Membrane). Η οξειδωτική βλάβη που προκύπτει από διάφορες μιτοχονδριακές πρωτεΐνες μπορεί να συνεισφέρει στη συνολική δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων. Οι παραπάνω μηχανισμοί ή συνδυασμοί αυτών θεωρείται ότι μπορεί να διαταράξουν την κυτταρική ομοιόσταση (εντός της γλοίας ή/και των κινητικών νευρώνων) προκαλώντας έτσι το θάνατο των κινητικών νευρώνων (Εικόνα 1.4).

Ο εντοπισμός νέων ζωικών μοντέλων για την ALS μέσω Πρόσθιας Γενετικής αποτελεί μια ιδιαίτερα αποτελεσματική προσέγγιση για την ανίχνευση νέων γονιδίων που εμπλέκονται στην παθογένεση της νόσου και την κατανόηση των παθογενετικών μηχανισμών (Douni et al., 2012, Ioakeimidis et al., 2014).



Εικόνα 1.4: Πιθανοί μηχανισμοί με τους οποίους η μετάλλαξη του SOD1 μπορεί να προκαλέσει βλάβη στη λειτουργία των μιτοχονδρίων (Boillee et al., 2006).

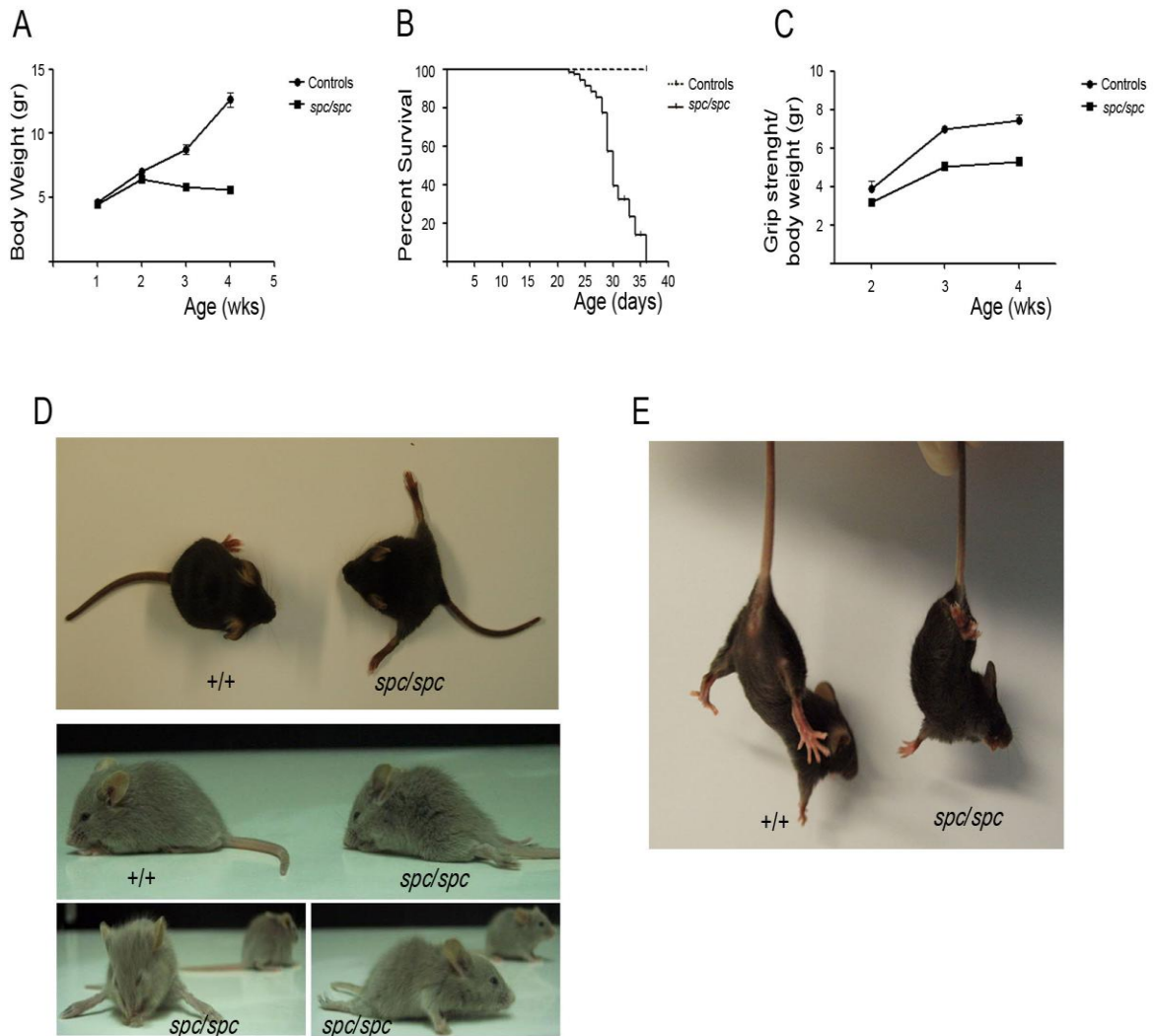
1.3 Χαρακτηρισμός του νευρομυϊκού φαινοτύπου στα *spastic* ποντίκια

Η ερευνητική ομάδα της κ. Ελένης Ντούνη εντόπισε πρόσφατα ένα νέο νευρομυϊκό φαινότυπο στα ποντίκια χρησιμοποιώντας την προσέγγιση της Πρόσθιας Γενετικής με τυχαία χημική μεταλλαξογένεση χρησιμοποιώντας το μεταλλαξογόνο N-αιθυλ-N-νιτροζουρία (N-ethyl-N-nitrosourea, ENU) που επάγει σημειακές μεταλλάξεις. Ο χαρακτήρας αυτός κληρονομείται με αυτοσωμικό υπολειπόμενο τρόπο, παρουσιάζει πλήρη διεισδυτικότητα και επιδρά εξίσου και στα δυο φύλα. Τα ποντίκια με το συγκεκριμένο φαινότυπο εμφανίζουν μια πληθώρα κλινικών χαρακτηριστικών όπως ανώμαλη στάση των πίσω άκρων, δυσκολία στη μετακίνηση, μυϊκή αδυναμία, μάζεμα των πίσω άκρων όταν τα ποντίκια αιωρούνται από την ουρά, σπαστικότητα, τρόμο άκρων, καθυστερημένη ανάπτυξη, προϊούσα καχεξία και πρόωρο θάνατο (Εικόνα 1.5) (Ioakeimidis et al., 2014). Λόγω των έντονων νευρολογικών συμπτωμάτων, ο φαινότυπος ονομάστηκε *spastic* (*spc*).

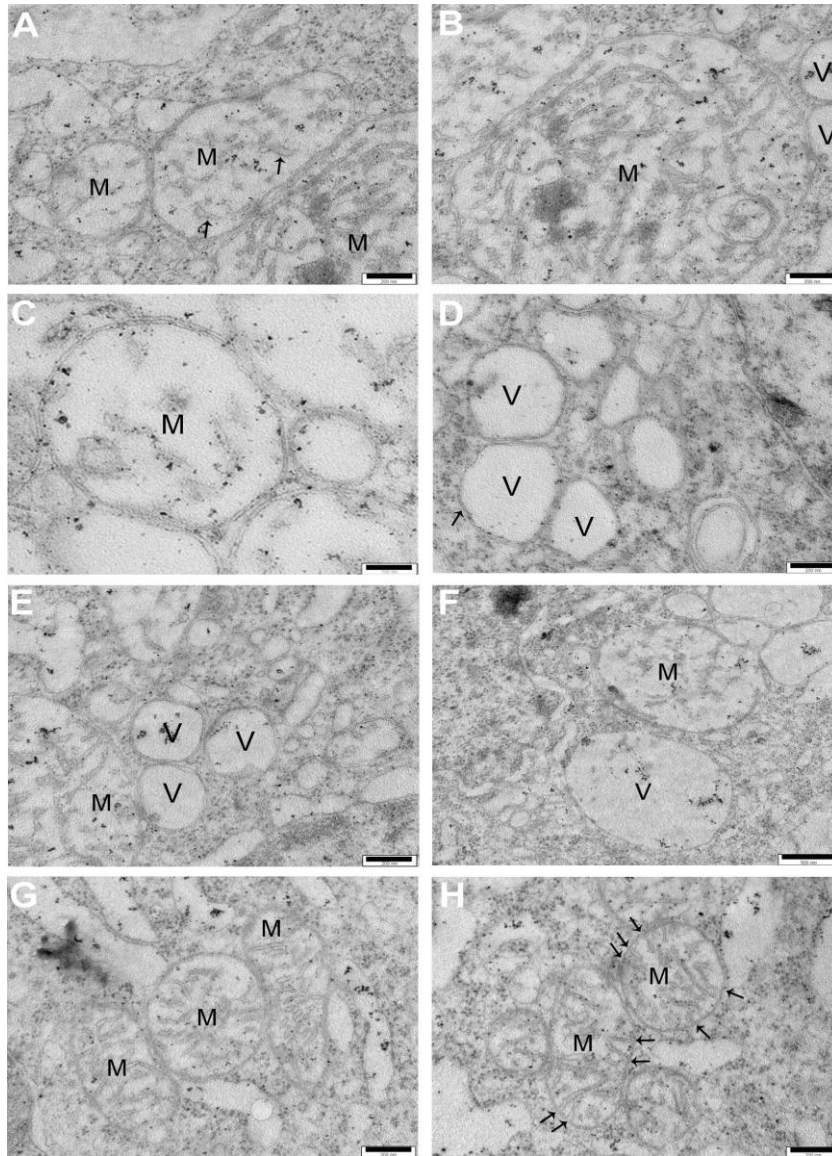
Τα ετερόζυγα ποντίκια (*spc/+*) δεν διαφέρουν από αυτά του αγρίου τύπου (WT) αδέρφια τους. Παρ' όλο που τα νεογέννητα *spc/spc* ποντίκια είναι πανομοιότυπα με τα WT αδέρφια τους, τα

πρώτα συμπτώματα εμφανίζονται περίπου τη δέκατη μέρα μετά τη γέννησή τους παρουσιάζοντας ανώμαλη στάση των πίσω άκρων και προβλήματα στη μετακίνηση. Από τη δεύτερη εβδομάδα, τα *src/src* ποντίκια σταματούν να παίρνουν βάρος (Εικόνα 1.5) ενώ μέχρι την πέμπτη εβδομάδα έχουν πεθάνει (Εικόνα 1.5). Ο θάνατος πιθανότατα προέρχεται από δυσκολίες στην αναπνοή και τη μετακίνηση. Η μυϊκή αδυναμία είναι προϊούσα ξεκινώντας από τα πίσω άκρα και συνεχίζοντας στα πρόσθια, κρίνοντας από τον τρόπο στάσης και βάδισης αλλά και από την απώλεια του αντανακλαστικού έκτασης των πίσω άκρων (Εικόνα 1.5).

Με ιστοπαθολογική ανάλυση του νωτιαίου μυελού παρατηρήθηκε έντονη κενотоποίηση στους κινητικούς νευρώνες των *spastic* ποντικών. Λεπτομερής ανάλυση με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης έδειξε ότι τα μιτοχόνδρια αυτών των κυττάρων εμφανίζουν απώλεια των εγκοιλώσεων της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης (Εικόνα 1.6).



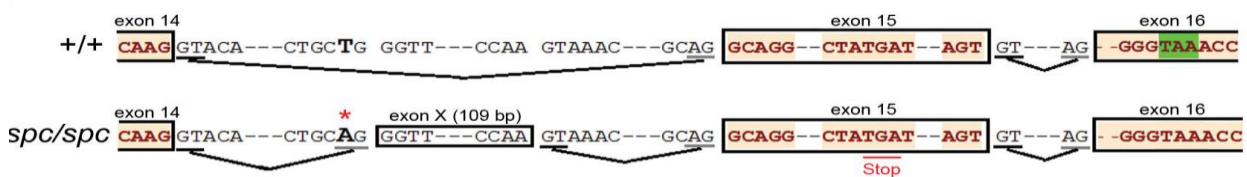
Εικόνα 1.5: Κλινικός χαρακτηρισμός του spastic φαινοτύπου. (A) Καμπύλη σωματικού βάρους *spc/spc* ποντικών και υγιών αδερφών τους. **(B)** Διάγραμμα καμπύλης επιβίωσης Kaplan-Meier *spc/spc* ποντικών και υγιών αδερφών τους. **(C)** Μετρήσεις δύναμης άκρων *spc/spc* ποντικών και υγιών, ίδιου φύλου, αδερφών τους. **(D)** Ανώμαλη στάση των άκρων των *spc/spc* ποντικών. **(E)** Απώλεια του αντανακλαστικού της έκτασης των οπίσθιων άκρων όταν τα *spc/spc* ποντίκια αιωρούνται από την ουρά (Ioakeimidis et al., 2014).



Εικόνα 1.6: Αποδιοργάνωση των μιτοχονδριακών cristae στα *sprc/sprc* ποντίκια. Κενοτόπια (V) και μιτοχόνδρια (M) στο σώμα των κινητικών νευρώνων στο πρόσθιο κέρασ του νωτιαίου μυελού από *sprc/sprc* (A-F) και από υγιείς μάρτυρες (G-H). Ο διαχωρισμός κενοτοπίων και μιτοχονδρίων στα *sprc/sprc* δείγματα βασίζεται στην ύπαρξη ή μη υπολειμμάτων εσωτερικής μεμβράνης (π.χ. A, βέλη σε σύγκριση με D). Τα μιτοχόνδρια στα ποντίκια μάρτυρες (G-H) ήταν καλά συντηρημένα με πλήθος cristae και κόμβους cristae (H, βέλη). (Διδακτορική διατριβή Ιωακειμίδης, 2014).

1.4 Χαρτογράφηση και ταυτοποίηση της υπεύθυνης μετάλλαξης στο γονίδιο *DNAJC11*

Για τη χαρτογράφηση της υπεύθυνης μετάλλαξης, πραγματοποιήθηκε ανάλυση γενετικής σύνδεσης σε 64 F2 ποντίκια (37 με φαινότυπο και 27 μάρτυρες) χρησιμοποιώντας ένα σετ από 87 μοριακούς πολυμορφικούς δείκτες (SSLPs και SNPs) οι οποίοι κάλυπταν ολόκληρο το γονιδίωμα εκτός από τα φυλετικά χρωμοσώματα, λαμβάνοντας υπόψη ότι ο χαρακτήρας κληρονομείται με αυτοσωμικό υπολειπόμενο τρόπο. Η αλληλούχιση του γονιδίου αποκάλυψε μια σημειακή μετάλλαξη θυμίνης προς αδενίνη (T>A) στο εσώνιο μεταξύ των εξωνίων 14 και 15 (Εικόνα 1.7). Η μετάλλαξη αυτή δημιούργησε μια νέα αλληλουχία δέκτη ματίσματος οδηγώντας στην ενσωμάτωση εσωνικής αλληλουχίας μήκους 109 bp στο ώριμο μετάγραφο (Εικόνα 1.7). Η ένθεση άλλαξε το αναγνωστικό πλαίσιο και προβλέπεται να οδηγήσει στην αντικατάσταση των τελευταίων 51 αμινοξέων της πρωτεΐνης με 43 διαφορετικά αμινοξέα. Η νέα μεταλλαγμένη *DNAJC11* πρωτεΐνη προβλέπεται να έχει μοριακή μάζα 62 kDa δηλαδή είναι ελάχιστα μικρότερη από την 63kDa άγριου τύπου (WT) πρωτεΐνη αποτελούμενη από 551 αμινοξέα αντί 559 της WT πρωτεΐνης. Αυτή η μετατόπιση του αναγνωστικού πλαισίου προβλέπεται να δημιουργεί επίσης ένα νέο κωδικόνιο λήξης το οποίο εντοπίζεται 107 bp πριν από τον επόμενο κόμβο εξωνίου-εξωνίου (Εικόνα 1.7). Σύμφωνα με τον «κανόνα των 50 νουκλεοτιδίων» αυτό το πρώιμο κωδικόνιο λήξης προβλέπεται να καθιστά αυτό το μεταλλαγμένο μετάγραφο ευαίσθητο στη μη-νοηματική μεσολαβούμενη αποικοδόμηση (Non-sense Mediated Decay, NMD) (Neu-Yilik and Kulozik, 2008).



Εικόνα 1.7: Απεικόνιση της υπεύθυνης μετάλλαξης στο *DNAJC11* γονίδιο. Γενωματική οργάνωση του γονιδίου *DNAJC11* μεταξύ των εξωνίων 14-16 και υποδεικνυόμενες θέσεις ματίσματος για το WT και το *spc* mRNA. Η μετάλλαξη T>A δηλώνεται με κόκκινο αστερίσκο και δημιουργεί μια αλληλουχία δέκτη ματίσματος AG η οποία έχει ως αποτέλεσμα την ένθεση μιας εσωνικής αλληλουχίας μήκους 109 bp (exon X) στο ώριμο mRNA. Η ένθεση εισάγει ένα πρόωρο κωδικόνιο λήξης (κόκκινη υπογράμμιση). Με πράσινη απόχρωση δηλώνεται το WT κωδικόνιο λήξης. Οι μικρές μαύρες και γκρι

γραμμές δηλώνουν αλληλουχίες δότες και δέκτες ματίσματος αντίστοιχα. (Διδακτορική διατριβή Ιωακειμίδης, 2014).

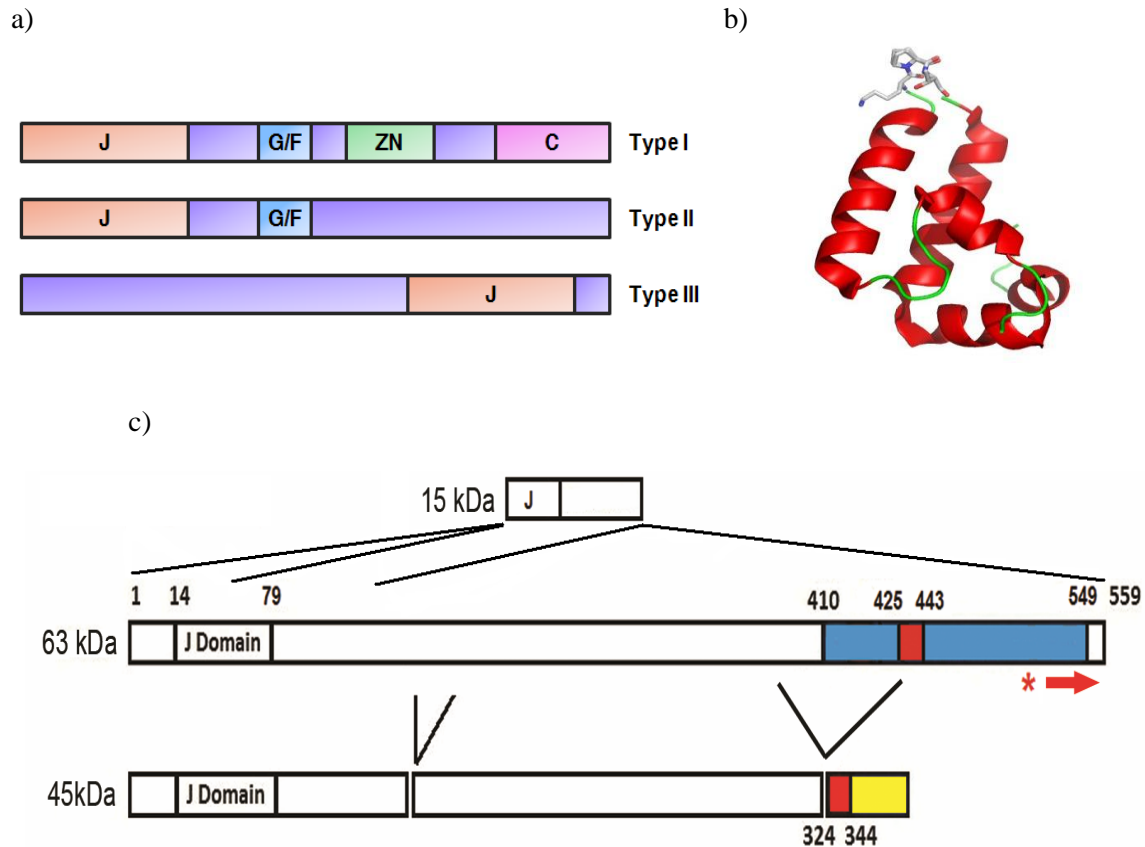
1.5 Οι πρωτεΐνες J - Χαρακτηρισμός της *DNAJC11*

Η πρωτεΐνη DNAJC11 είναι μέλος της οικογένειας των J πρωτεϊνών, γνωστές και ως Πρωτεΐνες Θερμικού Σοκ (Heat Shock Protein 40, Hsp40s). Η οικογένεια αυτή ορίζεται από την παρουσία μιας υψηλά συντηρημένης J περιοχής και βασίζεται από την παρουσία ή την απουσία άλλων γνωστών πρωτεϊνικών μοτίβων, βάση των οποίων περαιτέρω υποκατηγοριοποιείται σε 3 κλάσεις (I,II και III ή A,B και C) (Kampinga and Craig, 2010) (Εικόνα 1.8). Οι DnaJ πρωτεΐνες αποτελούνται από 4 δομικές περιοχές: 1) τη N-άκρο J περιοχή, 2) μια περιοχή πλούσια σε γλυκίνη και φαινυλαλανίνη, η οποία θεωρείται ότι συνδέει τη περιοχή J με την υπόλοιπη πρωτεΐνη και μπορεί να επηρεάσει την αλληλεπίδραση με τις Hsp70, 3) μια περιοχή που περιέχει τις 4 επαναλήψεις της μορφής "κυστεΐνη-XX-κυστεΐνη-X-γλυκίνη-X-γλυκίνη", (CXXCXGXGX), που αποτελεί το δάκτυλο ψευδαργύρου για αλληλεπίδραση με άλλες πρωτεΐνες και 4) τη περιοχή του C-τελικού άκρου. Γενικώς, οι Hsp40s είναι γνωστό ότι ρυθμίζουν τη μεσολαβούμενη από τις Hsp70 υδρόλυση του ATP, μέσω των J περιοχών τους, δρώντας ως συν-συνοδευτικές πρωτεΐνες (co-chaperones), αλλά ο λειτουργικός τους ρόλος είναι εξαιρετικά ετερογενής (Kampinga and Craig, 2010). Κάποιες από τις λειτουργίες που επιτελούν στο εσωτερικό των κυττάρων είναι η αναδίπλωση πεπτιδίων που δεν έχουν τη σωστή διαμόρφωση, η αναδίπλωση πεπτιδίων που συντίθεται στο ριβόσωμα, η μεταφορά πρωτεϊνών στο πρωτεολυτικό σύστημα αποικοδόμησης και η μετακίνηση πρωτεϊνών δια μέσου οργανοδιακών μεμβρανών. Καθώς οι άνθρωποι διαθέτουν μόλις 11 Hsp70s θεωρείται ότι το πλήθος των λειτουργιών τους οφείλεται στην αλληλεπίδρασή τους με τις πρωτεΐνες J.

Σύμφωνα με τη βάση δεδομένων Ensembl για το γονίδιο DnaJC11 του ποντικού υπάρχει πρόβλεψη ότι κωδικοποιεί τρεις πρωτεϊνικές ισομορφές 63, 45 και 15 kDa. Ωστόσο, μόνο η ισομορφή 63kDa προβλέπεται ότι επηρεάζεται σε επίπεδο πρωτεΐνης από την ταυτοποιημένη μετάλλαξη (Εικόνα 1.8). Μετά από βιοπληροφορική ανάλυση βρέθηκε ότι η J περιοχή εντοπίζεται στο N-τελικό άκρο της πρωτεΐνης μεταξύ των αμινοξέων 14 και 79 καθώς και ότι υπάρχει μια περιοχή με άγνωστη λειτουργία (Domain of Unknown Function, DUF3395) στο C-τελικό άκρο της πρωτεΐνης μεταξύ των αμινοξέων 410 και 549. Μελέτες του εργαστηρίου μας έδειξαν ότι τα επίπεδα της DnaJC11 πρωτεΐνης στα spastic ποντίκια είναι δραματικά

μειωμένα ή και μη ανιχνεύσιμα κάτι που προτείνει ότι πρόκειται για μια υπομορφική μετάλλαξη (Ioakeimidis et al., 2014).

Πρόσφατα δεδομένα δείχνουν ότι η DNAJC11 πρωτεΐνη αλληλεπιδρά με μέλη του συμπλόκου MICOS και συγκεκριμένα με Mic60/Mitofilin, Mic19/CHCHD3, Mic25/CHCHD6 (Coiled-coil helix coiled-coil helix domain-containing protein 3 and 6), SAM50, Metaxin1 και 2 (Darshi et al., 2011; Xie et al., 2007; Ott et al., 2012). Σε συνδυασμό λοιπόν με τον έντονο φαινότυπο στην μιτοχονδριακή δομή που εμφανίζουν τα *spastic* ποντίκια είναι πιθανόν ο παρατηρούμενος νευρολογικός φαινότυπος να οφείλεται σε ανωμαλίες της μιτοχονδριακής δομής μέσω μη σωστής παραγωγής της DNAJC11 πρωτεΐνης.



Εικόνα 1.8: Απεικόνιση των πρωτεϊνών που περιέχουν την J περιοχή. **α)** Στην οικογένεια DNAJ, ο Τύπος I αποτελείται από την περιοχή J, την περιοχή πλούσια σε γλυκίνη και φαινυλαλανίνη, το μοτίβο CXXCXGXGX και το C-τελικό άκρο, ο Τύπος II αποτελείται από τη J περιοχή και την περιοχή πλούσια σε γλυκίνη και φαινυλαλανίνη ενώ ο Τύπος III αποτελείται μόνο από τη περιοχή J. **β)** Απεικόνιση της J περιοχής. Η συντηρημένη J περιοχή αποτελείται από 4 α-έλικες, με έναν βρόγχο ο οποίος περιέχει το συντηρημένο τριπεπτιδίο ιστιδίνη, προλίνη και ασπαρτικό οξύ (Histidine - Proline - Aspartic acid, HPD) μεταξύ της έλικας 2 και 3 οι οποίες είναι αντιπαράλληλες, **γ)** Σχηματική απεικόνιση των τριών προβλεφθέντων ισομορφών της DnaJC11 του ποντικού. Υποδεικνύονται οι αριθμοί αμινοξέων όλων των δομικών περιοχών που αναγνωρίστηκαν. Η περιοχή με μπλε αντιπροσωπεύει την DUF3395 και με κόκκινο φαίνεται η περιοχή coiled coil. Ο κόκκινος αστερίσκος και το κόκκινο βέλος αντιπροσωπεύει τη θέση της μετάλλαξης και το τμήμα της προβλεπόμενης μεταλλαγμένης αλληλουχίας αντίστοιχα. Η κίτρινη περιοχή στην ισομορφή των 45 kDa αντιπροσωπεύει μια αλληλουχία απύσα από τις άλλες ισομορφές. Οι μαύρες γραμμές δηλώνουν τις πρωτεϊνικές περιοχές της 63 kDa ισομορφής που λείπουν από της άλλες ισομορφές (Διδακτορική διατριβή Ιωακειμίδης, 2014).

1.6 Σκοπός της Μεταπτυχιακής Μελέτης

Καθώς τα *DnaJC11^{spc/spc}* ποντίκια εμφανίζουν κενοτόπια στους κινητικούς νευρώνες όπως τα ποντίκια με μετάλλαξη του *SOD1* (Wong et al., 1995), μπορεί να θεωρεί ότι ακολουθούν ένα κοινό μηχανισμό για την παθολογία των κινητικών νευρώνων. Σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής μελέτης είναι ο εντοπισμός πολυμορφισμών στο γονίδιο *DNAJC11* σε ασθενείς με νευροεκφυλιστική νόσο ALS ώστε να βρεθεί πιθανή μεταξύ τους συσχέτιση. Η ύπαρξη κάποιου πολυμορφισμού ίσως ανοίξει νέους δρόμους για την μελέτη των νευροεκφυλιστικών ασθενειών και κυρίως στις περιπτώσεις που εμπλέκονται κινητικοί νευρώνες όπως στην νόσο ALS.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Γενετικό Υλικό

Τα δείγματα DNA για την αλληλούχιση του γονιδίου *DNAJC11* προήλθαν από το Μονάδα Γενετικής του Νευρικού Συστήματος της Α' Νευρολογικής Κλινικής Πανεπιστημίου Αθηνών στο Αιγινήτειο Νοσοκομείο. Συνολικά είχαμε στη διάθεσή μας 30 υγιείς μάρτυρες και 20 ασθενείς ALS. Η απομόνωση του DNA έγινε από τα λευκοκύτταρα του αίματος αφού το αίμα είχε ληφθεί με αντιπηκτικό Na₂EDTA 10% w/v. Η μέθοδος που ακολούθησε βασίζεται στη μέθοδο του NaCl (Miller et al., 1988). Σε υψηλές συγκεντρώσεις NaCl, το DNA παραμένει διαλυτό ενώ οι πρωτεΐνες κατακρημνίζονται και απομακρύνονται. Η τελική απομόνωση του DNA πραγματοποιήθηκε με προσθήκη αιθανόλης στην οποία το DNA είναι αδιάλυτο και έτσι προκύπτει ένα DNA καθαρό από πρωτεϊνικές προσμίξεις. Στους πίνακες 2.1 και 2.2 παρουσιάζονται τα στοιχεία για το κάθε δείγμα. Ως πρώτο στάδιο της μελέτης αλληλουχήθηκαν 10 ασθενείς ALS για όλα τα εξώνια. Επιλέχθηκαν οι 5 ασθενείς fALS και οι 5 νεότεροι ασθενείς με sALS.

Πίνακας 2.1 Στοιχεία ασθενών με ALS. Με γκρι σκίαση επισημαίνονται οι δέκα ασθενείς που αλληλουχήθηκαν για όλα τα εξώνια.

Κωδικός	Μορφή ALS	Φύλο	Ηλικία
ALS 61	fALS	Θήλυ	42
ALS 72	fALS	Άρρεν	45
ALS 77	fALS	Άρρεν	55
K 130	fALS	Άρρεν	54
K 140	sALS	Θήλυ	56
K 176	sALS	Άρρεν	39
K 166	sALS	Άρρεν	48
K 180	sALS	Άρρεν	52
K 189	sALS	Άρρεν	53
ALS 194	fALS	Θήλυ	56
K 155	sALS	Άρρεν	64
K 158	sALS	Άρρεν	71
K 161	sALS	Άρρεν	59
K 169	sALS	Άρρεν	64
K 174	sALS	Άρρεν	72
K 183	sALS	Άρρεν	75
K 185	sALS	Άρρεν	71
K 194	sALS	Άρρεν	74
K 197	sALS	Άρρεν	57
K 198	sALS	Άρρεν	67

Πίνακας 2.2 Στοιχεία των υγιών μαρτύρων.

Κωδικός	Φύλο	Ηλικία
C4	Θήλυ	33
C8	Άρρεν	32
C9	Θήλυ	33
C13	Άρρεν	35
C14	Θήλυ	47
C18	Άρρεν	24
C19	Άρρεν	39
C20	Θήλυ	53
C21	Θήλυ	35
C22	Άρρεν	37
C23	Άρρεν	40
C25	Θήλυ	42
C26	Άρρεν	62
C28	Θήλυ	30
C29	Θήλυ	24
C30	Άρρεν	32
C31	Θήλυ	24
C32	Άρρεν	35
C33	Θήλυ	23
C34	Άρρεν	51
C35	Άρρεν	31
C39	Θήλυ	50
C40	Άρρεν	51
C41	Θήλυ	63
C44	Άρρεν	35
C45	Θήλυ	33
C50	Άρρεν	45
C52	Θήλυ	49
C53	Άρρεν	42
C56	Θήλυ	43

2.2 Επιλογή Εκκινητών

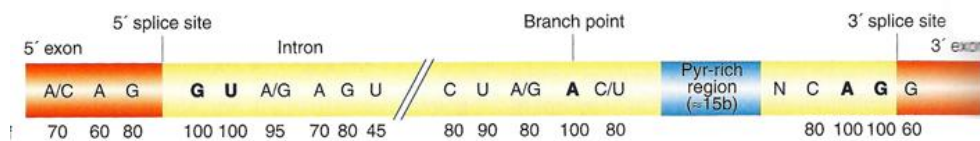
Η επιλογή των εκκινητών για την αλληλούχιση των δειγμάτων έγινε με βάση το πρόγραμμα Primer 3 Plus.

Χαρακτηριστικά κατάλληλων εκκινητών:

- 1) Το μήκος τους είναι συνήθως 18-25 bp.
- 2) Η T_m ιδανικά θα πρέπει είναι μεταξύ 55-65°C. Η διαφορά των T_m των δυο εκκινητών δεν θα πρέπει να είναι πάνω από 5°C.

- 3) Το ποσοστό GC να είναι περίπου 50%.
- 4) Για την αύξηση της ειδικότητας θα πρέπει η περιεκτικότητα σε G/C να είναι στην αρχή ή στη μέση της περιοχής του εκκινητή.
- 5) Μια ομάδα G ή C είναι επιθυμητό να υπάρχει στο 3' άκρο καθώς αυτό αυξάνει την απόδοση του εκκινητή.
- 6) Αποφυγή συμπληρωματικότητας μεταξύ του ζεύγους των εκκινητών αλλά και εντός του εκκινητή. Για το λόγο αυτό είναι καλύτερο να μην υπάρχει ομολογία για πάνω από 3bp εντός του εκκινητή.

Σε συνδυασμό με τα παραπάνω χαρακτηριστικά, οι εκκινητές σχεδιάστηκαν ώστε οι περιοχές που θα αλληλουχηθούν να περιλαμβάνουν τις θέσεις διακλάδωσης (Branch Points), που είναι σημαντικές για τη διαδικασία του ματίσματος (Εικόνα 2.1). Για το λόγο αυτό, οι περιοχές για αλληλούχηση επιλέχθηκαν να περιέχουν 15-45 bp πριν την έναρξη κάθε εξωνίου.



Εικόνα 2.1: Περιοχή ενός πρόριμου mRNA: Για τη διαδικασία του ματίσματος είναι απαραίτητο να συμπεριλαμβάνονται: η θέση δότη (στο 5' άκρο του εσωνίου), η θέση διακλάδωσης (Branch Point) και η θέση δέκτη (στο 3' άκρο του εσωνίου). Η θέση δότη περιλαμβάνει μια σχεδόν αμετάβλητη αλληλουχία GU στο 5' άκρο του εσωνίου ενώ η θέση δέκτη περιλαμβάνει μια σχεδόν αμετάβλητη αλληλουχία AG στο 3' άκρο του εσωνίου. Πριν τη θέση δέκτη, υπάρχει μια περιοχή πλούσια σε πυριμιδίνες, C και U (περιοχή με μπλε χρώμα). Πριν την πολυπυριμιδινική περιοχή βρίσκεται το πεντανουκλεοτίδιο της περιοχής διακλάδωσης που περιλαμβάνει την αδενίνη με την οποία σχηματίζεται ο βρόγχος ματίσματος. Οι αριθμοί κάτω από το σχήμα δηλώνουν % ποσοστό εμφάνισης σε κάθε θέση. (Εικόνα από ιστότοπο: <http://www.discoveryandinnovation.com/>).

Η ανάλυσή μας περιορίστηκε στα εξώνια εκείνα που κωδικοποιούν την ισομορφή των 63 kDa (559 αμινοξέα). Η ισομορφή αυτή αποτελείται από 16 εξώνια. Όπως φαίνεται στον Πίνακα 2.3, τα εξώνια 9-10, 13-14 και 15-16 αλληλουχίστηκαν με το ίδιο ζεύγος εκκινητών λόγω της μικρής μεταξύ τους απόστασης ενώ για τα υπόλοιπα εξώνια χρησιμοποιήθηκε ένα ζευγάρι εκκινητών ανά εξώνιο.

Πίνακας 2.3 Ακολουθία και μήκος ζευγών εκκινητών για κάθε εξώνιο.

Εξώνιο	Εκκινητής	Ακολουθία	Μήκος
1	DnaJC11 F1 (#583) DnaJC11 R1 (#570)	5' - GGCGACAGAGTATGACTCCG - 3' 5' - GTGGGGACGCCTCCATCG - 3'	F: 20 bp R: 18 bp
2	DnaJC11 F2 (#571) DnaJC11 R2 (#572)	5' - CAGCACTTCCCAGCAAAACC - 3' 5' - CGCCCGGTCTCTCATTTTCT - 3'	F: 20 bp R: 20 bp
3	DnaJC11 F3 (#573) DnaJC11 R3 (#574)	5' - ATTCAAGGCTGCAGTGAGCT - 3' 5' - AAGTCAGATGAGTGGCTGGC - 3'	F: 20 bp R: 20 bp
4	DnaJC11 F4 (#585) DnaJC11 R4 (#586)	5' - TGTAATCCCAGCACTTCCGG - 3' 5' - AACAAATCCACCAGCACCTCA - 3'	F: 20 bp R: 20 bp
5	DnaJC11 F5 (#599) DnaJC11 R5 (#600)	5' - GGGTCCTGTTTGGTCTCTGA - 3' 5' - TGGCTAATTGCATCCTTTCA - 3'	F: 20 bp R: 20 bp
6	DnaJC11 F6 (# 589) DnaJC11 R6 (#590)	5' - AAAAGTGAAGCTGTTGCGGC - 3' 5' - CTCTGCCTCCTGGGTTTCATG - 3'	F: 20 bp R: 20 bp
7	DnaJC11 F7 (#591) DnaJC11 R7 (#592)	5' - TTTAGAGCCCTGGCAAGACC - 3' 5' - TGTGCTCCATTCTAGGACTCC - 3'	F: 20 bp R: 20 bp
8	DnaJC11 F8 (#593) DnaJC11 R8 (#594)	5' - CCTCCCCCTCTGTGTGGATA - 3' 5' - CTCGAAGGTTCCACCAGGTC - 3'	F: 20 bp R: 20 bp
9-10	DnaJC11 F9-10 (#595) DnaJC11 R9-10 (#596)	5' - CGTGACCCCTGCCTTAAAGG - 3' 5' - ATAAGCCACTGCACCTAGCC - 3'	F: 20 bp R: 20 bp
11	DnaJC11 F11 (#575) DnaJC11 R11 (#576)	5' - AGGTGGTGGACTGTGAAAGG - 3' 5' - TACCAATCGTGACCCAGACA - 3'	F: 20 bp R: 20 bp
12	DnaJC11 F12 (#577) DnaJC11 R12 (#578)	5' - CCAGTAAGATCACAGACTGTTTGC - 3' 5' - AAAACAATGCGTTGTCAGC - 3'	F: 24 bp R: 20 bp
13-14	DnaJC11 F13-14 (#579) DnaJC11 R13-14 (#580)	5' - ACTCGGGTAGCAGAGCTGTC - 3' 5' - CTTGGCCTTCCAAAGTGCTA - 3'	F: 20 bp R: 20 bp
15-16	DnaJC11 F15-16 (#581) DnaJC11 R15-16 (#582)	5' - CCCCAAAGTTTGCATCTCC - 3' 5' - TGCATGTCCCTTCACATAATTG - 3'	F: 19 bp R: 22 bp

2.3 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης είναι μια επιλεκτική και ευαίσθητη μέθοδος που χρησιμοποιείται για να πολλαπλασιάσει *in vitro* ένα τμήμα του DNA, κατά εκατομμύρια φορές με τη βοήθεια του ενζύμου DNA πολυμεράση και κάτω από κατάλληλες συνθήκες. Πρόκειται δηλαδή για μια ενζυμική μέθοδο σύνθεσης DNA. Η επιλεκτικότητά της οφείλεται στη χρήση ειδικών ολιγονουκλεοτιδίων-εκκινητών οι οποίοι υβριδίζουν εκατέρωθεν της περιοχής που πρόκειται να πολλαπλασιαστεί και παρέχουν τα ελεύθερα 3'-άκρα στα οποία η DNA πολυμεράση προσθέτει δεόξυ-ριβονουκλεοτίδια (dNTPs) με βάση τον κανόνα της


συμπληρωματικότητας, χρησιμοποιώντας ως εκμαγείο/μήτρα το αρχόμενο δείγμα DNA. Καθώς πρόκειται για μια ευαίσθητη τεχνική είναι σημαντικό να δίνεται προσοχή καθ' όλη τη διάρκεια της διαδικασίας προκειμένου να αποφευχθεί η επιμόλυνση με ανεπιθύμητο DNA. Η θερμοκρασία πρόσδεσης (T_a , Temperature annealing) των εκκινητών στη μήτρα θα πρέπει να είναι περίπου 5°C κάτω από τη θερμοκρασία τήξης (T_m , Temperature melting). Για την αύξηση της απόδοσης και τη βελτίωση της εξειδίκευσης του κάθε ζεύγους εκκινητών ακολουθήσαμε μια βαθμιδωτή PCR (PCR gradient) (Εικόνα 2.2). Κατά την αντίδραση αυτή, οι εκκινητές δοκιμάζονται σε διαφορετικές θερμοκρασίες πρόσδεσης έτσι ώστε να βρεθεί εκείνη στην οποία η απόδοση της αντίδρασης και η εξειδίκευσή της μεγιστοποιούνται.

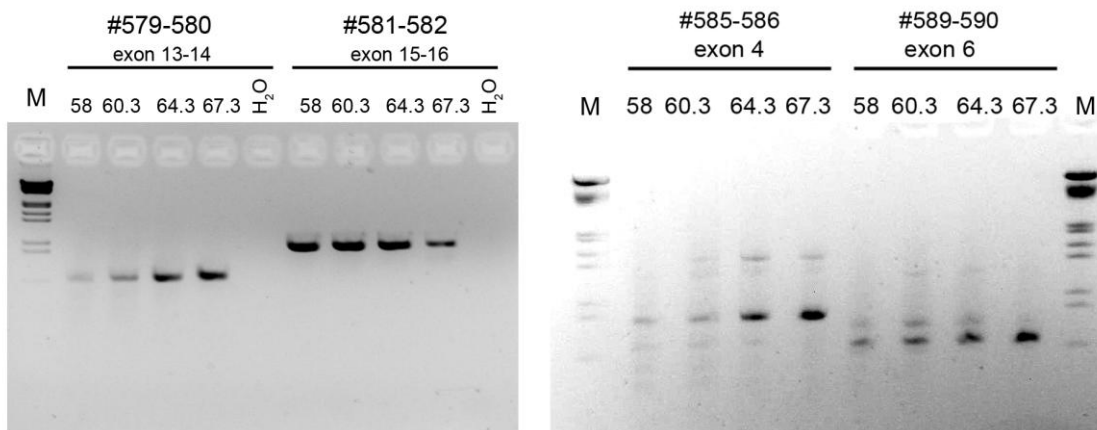
Για τη βελτιστοποίηση των συνθηκών πραγματοποιήθηκε η παρακάτω αντίδραση PCR.

Συστατικά	Όγκος (λ)
Δείγμα DNA	1
Εκκινητής πρόσθιας κατεύθυνσης (Forward) (VBC-Biotech)	0,75
Εκκινητής ανάστροφης κατεύθυνσης (Reverse) (VBC-Biotech)	0,75
Μίγμα dNTPs (10mM stock)	0,75
5xHiFi ρυθμιστικό διάλυμα	5
ddH ₂ O	14,85
KAPA HiFi πολυμεράση (KAPABIOSYSTEMS)	0,4
Τελικός όγκος	25

Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε ειδικό θερμικό κυκλοποιητή (C1000, Thermal Cycler BioRad).

Συνθήκες PCR:

- Αρχική Αποδιάταξη 3' στους 95°C
 - Αποδιάταξη 30" στους 98°C
 - Πρόσδεση εκκινητών 15" στους 65°C
 - Επιμήκυνση 15" στους 72°C
 - Τελική επιμήκυνση 2' στους 72°C
 - Τέλος αντίδρασης 30" στους 24°C
- x 35 κύκλοι
- 



Εικόνα 2.2: Αντιδράσεις βαθμιδωτής PCR (PCR gradient). Πρόκειται για μια ενδεικτική απεικόνιση 4 αντιδράσεων για τους εκκινητές των εξωνίων 4, 6, 13-14 και 15-16. Η διαδικασία της PCR πραγματοποιήθηκε σε διαφορετικές θερμοκρασίες πρόσδεσης (58-67.3°C) προκειμένου να βρεθεί εκείνη στην οποία κάθε ζεύγος εκκινητών έχει τη μεγαλύτερη απόδοση και εξειδίκευση. Όπως φαίνεται στην εικόνα η απόδοση και η εξειδίκευση των εκκινητών για τα εξώνια 4, 6 και 13-14 είναι μεγαλύτερη καθώς η Τα αυξάνεται αφού ταυτόχρονα εξαφανίζονται τα παραπροϊόντα ενώ για τους εκκινητές των εξωνίων 15-16 η Τα με τη μεγαλύτερη απόδοση είναι στους 58°C.

2.4 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης είναι μια μέθοδος διαχωρισμού των νουκλεϊκών οξέων. Λόγω του διαφορετικού μεγέθους των νουκλεϊκών οξέων, τα μόρια κινούνται με διαφορετική ταχύτητα στο πήκτωμα αγαρόζης με την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου. Η κατεύθυνση με την οποία κινούνται τα νουκλεϊκά οξέα είναι προς την κάθοδο καθώς εξ αιτίας της φωσφορικής ομάδας που διαθέτουν είναι αρνητικά φορτισμένα.

Διαδικασία παρασκευής του πηκτώματος αγαρόζης 2% (w/v):

Αραίωση 100ml διαλύματος 10 x TBE σε 900ml dH₂O. Προσθήκη 5g αγαρόζης (Agarose Basic) σε κωνική φιάλη που περιέχει 250ml του διαλύματος 1x TBE και θέρμανση στο φούρνο μικροκυμάτων ώστε το διάλυμα να γίνει διαυγές. Ακολουθεί προσθήκη 20 μl διαλύματος βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr) και ελαφριά ανάμιξη. Το διάλυμα τοποθετείται σε ειδικό καλούπι με χτένες για το σχηματισμό των πηγαδιών. Αφού στερεοποιηθεί το διάλυμα αφαιρούνται οι χτένες και η βάση μαζί με το διάλυμα πηκτώματος τοποθετούνται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης, στην οποία έχει ήδη τοποθετηθεί το διάλυμα ηλεκτροφόρησης (1x TBE).

Για τη φόρτωση των δειγμάτων στα πηγάδια του πηκτώματος, προστίθεται έγχρωμο διάλυμα καταβύθισης orange G στο διάλυμα των νουκλεϊκών οξέων και γίνεται καλή ανάδευση με πιπετάρισμα. Φορτώνεται η μισή αντίδραση PCR στην οποία εφαρμόζεται τάση 120V μέχρι οι μπάντες να φαίνονται καθαρά για ανάλυση. Στο τέλος, το πήκτωμα αγαρόζης τοποθετείται στο σκοτεινό θάλαμο ενός συστήματος οπτικοποίησης με υπεριώδες (UV) φως. Το σύστημα οπτικοποίησης είναι συνδεδεμένο με έναν H/Y και με μία κάμερα CCD γίνεται λήψη της εικόνας.

Διαλύματα:

- TBE 10x: 323.4g Tris, 165 g Boric acid, 27.9g EDTA
- Βρωμιούχο αιθίδιο: 1%
- Αγαρόζη (Sigma)
- Orange G: 15g Ficoll 400 σε 30ml ddH₂O (σε υδατόλουτρο 55°C), προσθήκη 250mg OrangeG. Τελικός όγκος 100ml.

Συσκευές:

- Τροφοδοτικό BIO-RAD
- Συσκευή ηλεκτροφόρησης OWL
- Σύστημα Gel Doc (Alpha Innotech, Alpha Imager-Mini)

2.5 Καθαρισμός του προϊόντος PCR

Μετά τη διαδικασία της PCR ακολούθησε ο καθαρισμός του προϊόντος ώστε να είναι δυνατή η αλληλούχιση των δειγμάτων. Για τις αντιδράσεις εκείνες χρησιμοποιήθηκε το kit Macherey-Nagel.

Διαδικασία καθαρισμού PCR:

- Στα 20 μL δείγματος προσθήκη H_2O ώστε ο τελικός όγκος να φτάσει τα 100 μL .
- Ανάμιξη των 100 μL δείγματος με 200 μL Binding Buffer NT1.
- Φόρτωση του δείγματος στην ειδική κολώνα του kit (NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Column) η οποία έχει τοποθετηθεί σε tube συλλογής (Collection tube).
- Φυγοκέντρηση για 1' στα 11,000 x g και καθαρισμός του tube.
- Πλύσιμο με 700 μL Washing Buffer NT3.
- Φυγοκέντρηση για 30" στα 11,000 x g και καθαρισμός του tube.
- Πλύσιμο με 700 μL Washing Buffer NT3.
- Φυγοκέντρηση για 30" στα 11,000 x g και καθαρισμός του tube.
- Πλύσιμο με 250 μL Washing Buffer NT3.
- Φυγοκέντρηση για 30" στα 11,000 x g και καθαρισμός του tube.
- Φυγοκέντρηση για 1' στα 11,000 x g και καθαρισμός του tube.
- Αλλαγή του Collection tube με ένα σωλήνα eppendorf.
- Παραμονή για 10' στους 70°C για απομάκρυνση της αιθανόλης.
- Προσθήκη 20 μL milliQ H_2O και επώαση για 1' σε θερμοκρασία δωματίου.
- Φυγοκέντρηση για 1' στα 11,000 x g.
- Φυγοκέντρηση για 5' στα 21,000 x g για απαλλαγή ινών σιλικόνης που τυχόν έχουν περάσει στο δείγμα.
- Μεταφορά υπερκειμένου σε νέο eppendorf για προσδιορισμό συγκέντρωσης και ποιότητας.

2.6 Προσδιορισμός συγκέντρωσης και καθαρότητας προϊόντος PCR

Ο έλεγχος καθαρότητας των δειγμάτων DNA πραγματοποιήθηκε φωτομετρικά με τη χρήση του NanoDrop 1000 Spectrophotometer συνδεδεμένο με H/Y.

Διαδικασία φωτομέτρησης:

- Καθαρισμός της άνω και κάτω βάσης μέτρησης της συσκευής.
- Εκκίνηση της συσκευής για μέτρηση. Φόρτωση 1λ ddH₂O.
- Μηδενισμός μέτρησης για προσδιορισμό βάσεων μέτρησης. Φόρτωση 1λ Elution Buffer (Blank sample).
- Φόρτωση 1λ DNA.
- Τα δείγματα φωτομετρούνται διαδοχικά σε μήκη κύματος: 230 nm, 260 nm και 280nm.
- Αποθήκευση μετρήσεων στον H/Y.

Ερμηνεία αποτελεσμάτων:

- 260/280: Η αναλογία απορρόφησης στα 260 και 280 nm χρησιμοποιείται για τον έλεγχο καθαρότητας των δειγμάτων DNA. Μια αποδεκτή αναλογία για να θεωρηθεί το DNA καθαρό είναι περίπου στο 1,8. Μικρότερη αναλογία πιθανώς να φανερώνει την παρουσία πρωτεϊνών, φαινόλης ή άλλων μολυσματικών ουσιών που απορροφούν στα 280 nm ή σε μικρότερα μήκη κύματος.
- 260/230: Η αναλογία απορρόφησης στα 230 και 260 nm είναι μια δεύτερη ένδειξη καθαρότητας του DNA. Ένα καθαρό δείγμα έχει μεγαλύτερη αναλογία 260/230 από την αντίστοιχη 260/280. Οι τιμές για το λόγο 260/230 είναι συνήθως 1,8-2,2. Αισθητά χαμηλότερη αναλογία μπορεί να υποδεικνύει την παρουσία άλατος θειοκυανικού γουανιδίνιου (GuSCN) που απορροφά στα 240 nm ή σε μικρότερα μήκη κύματος.

Μετά τη διαδικασία της φωτομέτρησης, 10 ng προϊόντος αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης για επιβεβαίωση του επιτυχούς καθαρισμού του επιθυμητού προϊόντος και τα δείγματα αφού αραιώθηκαν στα 10 ng/μL στάλθηκαν για αλληλούχιση.

2.7 Καθαρισμός DNA από πήκτωμα αγαρόζης

Για τα εξώνια 8 και 11 πραγματοποιήθηκε ο καθαρισμός του επιθυμητού προϊόντος PCR από πήκτωμα αγαρόζης καθώς η αντίδραση με τους συγκεκριμένους εκκινητές ενίσχυε και μη ειδικά προϊόντα.

Διαδικασία καθαρισμού DNA από πήκτωμα αγαρόζης:

- Με ένα καθαρό νυστέρι αφαιρούνται τα θραύσματα του DNA από το πήκτωμα της αγαρόζης και τοποθετούνται σε καθαρό tube.
- Τα κομμάτια του DNA ζυγίζονται.
- Για κάθε 100 mg πηκτώματος αγαρόζης, προστίθενται 200 μ L NT1.
- Επώαση των δειγμάτων για 5-10 min στους 50°C.
- Σύντομη φυγοκέντρηση κάθε 2-3 min μέχρι να τα κομμάτια του πηκτώματος να διαλυθούν πλήρως.
- Φόρτωση του δείγματος στην ειδική κολώνα του kit (NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Column) η οποία έχει τοποθετηθεί σε tube συλλογής (Collection tube).
- Φυγοκέντρηση για 1' στα 11,000 x g και καθαρισμός του tube.
- Πλύσιμο με 700 μ L Washing Buffer NT3.
- Φυγοκέντρηση για 30" στα 11,000 x g και καθαρισμός του tube.
- Πλύσιμο με 700 μ L Washing Buffer NT3.
- Φυγοκέντρηση για 30" στα 11,000 x g και καθαρισμός του tube.
- Πλύσιμο με 250 μ L Washing Buffer NT3.
- Φυγοκέντρηση για 30" στα 11,000 x g και καθαρισμός του tube.
- Φυγοκέντρηση για 1' στα 11,000 x g και καθαρισμός του tube.
- Αλλαγή του Collection tube με ένα σωλήνα eppendorf.
- Παραμονή για 10' στους 70°C για απομάκρυνση της αιθανόλης.
- Προσθήκη 20 μ L H₂O και επώαση για 1' σε θερμοκρασία δωματίου.
- Φυγοκέντρηση για 1' στα 11,000 x g.
- Φυγοκέντρηση για 5' στα 21,000 x g ώστε να απομακρυνθούν ίνες σιλικόνης που τυχόν έχουν περάσει στο δείγμα.
- Μεταφορά υπερκειμένου σε νέο eppendorf για έλεγχο καθαρότητας.
- Φωτομέτρηση και αντίδραση PCR για αξιολόγηση των δειγμάτων.

2.8 Αλληλούχιση προϊόντων PCR

Μετά τον καθαρισμό, τα δείγματα DNA στάλθηκαν για την αλληλούχιση του γονιδίου *DNAJC11*.

Προϋποθέσεις για την αλληλούχιση καθαρού προϊόντος PCR:

- Το μήκος να μην είναι πάνω από 800 bp.
- Η συγκέντρωση να είναι 5 ng/μL.
(Τα δείγματα είχαν συγκέντρωση 10 ng/μL)
- Ο όγκος να είναι τουλάχιστον 15μL.
(Τα δείγματα είχαν όγκο 24 μL)

Εφόσον τα δείγματα ικανοποιούσαν τις προϋποθέσεις, στάλθηκαν για αλληλούχιση στην εταιρεία VBC-Biotech.

2.9 Πολλαπλή ευθυγράμμιση αλληλουχιών

Για να είναι δυνατός ο εντοπισμός πολυμορφισμών στους ασθενείς με ALS ακολούθησε η πολλαπλή ευθυγράμμιση αλληλουχιών κάθε εξωνίου με το πρόγραμμα Clustal Omega (Multiple Sequence Alignment) και έγινε σύγκριση με DNA αναφοράς από τη βάση δεδομένων Ensembl.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Επιλογή γενετικού υλικού από ασθενείς με ALS

Τα δείγματα DNA για την αλληλούχιση του γονιδίου *DNAJC11* προήλθαν από την Μονάδα Γενετικής του Νευρικού Συστήματος της Α' Νευρολογικής Κλινικής Πανεπιστημίου Αθηνών στο Αιγινήτειο Νοσοκομείο. Συνολικά είχαμε στη διάθεσή μας 30 υγιείς μάρτυρες και 20 ασθενείς με ALS και η απομόνωση του DNA έγινε από τα λευκοκύτταρα του αίματος. Στον Πίνακα 3.1 παρουσιάζονται συγκεντρωτικά τα στοιχεία για το κάθε δείγμα. Ως πρώτο στάδιο της μελέτης αλληλουχήθηκαν 10 ασθενείς με ALS για όλα τα εξόνια και τις περιοχές διακλάδωσης ματίσματος (splicing junctions). Επιλέχθηκαν 5 ασθενείς με fALS (familial ALS), δηλαδή ασθενείς που προέρχονται από οικογένειες με ιστορικό ALS και οι 5 νεότεροι ασθενείς με sALS (sporadic ALS) οι οποίοι εκδήλωσαν την νόσο χωρίς να υπάρχει οικογενειακό ιστορικό. Σε όλες τις περιπτώσεις δεν έχουν πιστοποιηθεί οι υπεύθυνες μεταλλάξεις για την νόσο.

Πίνακας 3.1 Συγκεντρωτικός πίνακας για τα στοιχεία των ατόμων ALS και υγιών μαρτύρων που αλληλουχήθηκαν. Η ηλικία αναφέρεται στον χρόνο δειγματοληψίας.

Άτομα με ALS	sALS	fALS	Ηλικία (έτη)
♀	1	2	51,33 ± 6,60
♂	14	3	60 ± 10,52
Υγιείς μάρτυρες			
♀	15		38,80 ± 11,53
♂	15		39,40 ± 9,31

3.2 Θέσεις εκκινητών για κάθε εξόνιο του *DNAJC11*

Από τη βάση δεδομένων Ensembl χρησιμοποιήθηκε το ανθρώπινο γονιδίωμα αναφοράς (Έκδοση GRCh38:CM000663.2) όπου αντλήσαμε πληροφορίες για την αλληλουχία ολόκληρου του *DNAJC11* γονιδίου καθώς και οι θέσεις των 16 εξονίων. Κάθε ζευγάρι εκκινητών σχεδιάστηκε με σκοπό τον πολλαπλασιασμό τμημάτων DNA προς αλληλούχιση

που περιέχουν τα εξώνια που αντιστοιχούν στην 63kDa ισομορφή και τις αλληλουχίες που καθορίζουν το μάτισμα. Όλα τα εξώνια αλληλουχήθηκαν με τους εκκινητές πρόσθιας κατεύθυνσης με εξαίρεση τα εξώνια 1, 4, 8 και 11 στα οποία το διάβασμα επιτεύχθηκε με τους εκκινητές ανάστροφης κατεύθυνσης. Επιπλέον, τα εξώνια 9-10, 13-14 και 15-16 αλληλουχήθηκαν με τους ίδιους εκκινητές λόγω της μεταξύ τους κοντινής απόστασης. Τα εξώνια 9-10 αλληλουχήθηκαν με εκκινητή πρόσθιας και ανάστροφης κατεύθυνσης. Η αλληλούχιση των εξωνίων 13-14 πραγματοποιήθηκε μόνο με τον εκκινητή πρόσθιας κατεύθυνσης. Τέλος, η αλληλούχιση των εξωνίων 15-16 επιτεύχθηκε με τον εκκινητή πρόσθιας και ανάστροφης κατεύθυνσης.

Για την επιλογή των εκκινητών, πρόσθιας και ανάστροφης κατεύθυνσης, χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα Primer 3 Plus. Μετά την επιλογή των εκκινητών ακολούθησε η δοκιμασία τους με την αντίδραση της PCR σε διαφορετικές θερμοκρασίες. Σκοπός ήταν να προσδιοριστεί η θερμοκρασία στην οποία κάθε ζεύγος εκκινητών δίνει την πιο ευκρινή ζώνη μετά από φόρτωση των δειγμάτων σε πήκτωμα αγαρόζης. Για αυτή τη διαδικασία χρησιμοποιήθηκαν τα δείγματα υγείων ατόμων. Μετά τη βελτιστοποίηση των συνθηκών ακολούθησε η αντίδραση της PCR σε δείγματα ασθενών για όλα τα εξώνια του γονιδίου. Λόγω του ότι η αντίδραση PCR δεν δίνει ένα προϊόν κατάλληλο για άμεση αλληλούχιση, πραγματοποιήθηκε ο καθαρισμός όλων των προϊόντων PCR με τη χρήση του kit Macherey-Nagel. Ο έλεγχος της καθαρότητας ελέγχθηκε με φωτομέτρηση και ξανά PCR για επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων. Στο τέλος της διαδικασίας, τα δείγματα στάλθηκαν στην εταιρεία VBC-Biotech για αλληλούχιση. Τα αποτελέσματα των αλληλουχιών στάλθηκαν σε μορφή FASTA μαζί με φερογράμματα.

Στην Εικόνα 3.1 παρουσιάζονται οι θέσεις των εκκινητών σε σχέση με τα εξώνια. Με γαλάζια σκίαση απεικονίζονται οι εκκινητές πρόσθιας κατεύθυνσης ενώ με κόκκινη οι εκκινητές ανάστροφης κατεύθυνσης. Με κίτρινη σκίαση επισημαίνονται τα υπό εξέταση εξώνια, δηλαδή αυτά που κωδικοποιούν την 63kDa ισομορφή. Οι ροζ σκιασμένες περιοχές είναι και αυτές εξωνικές αλλά για κάποια άλλη ισομορφή. Τα κωδικόνια "ATG" και "TAA" με μωβ σκίαση επισημαίνουν την έναρξη και το τέλος αντίστοιχα της πρωτεΐνης. Τέλος, με γκρι σκίαση απεικονίζονται τα πιθανότερα σημεία διακλάδωσης (Branch Points, BP) όπως βρέθηκαν με χρήση του προγράμματος Human Splicing Finder 3.0 (HSF 3.0) ώστε να ελεγχθεί αν οι πολυμορφισμοί που εντοπίστηκαν επηρεάζουν τη διαδικασία του ματίσματος. Στις παρενθέσεις αναφέρεται το μήκος του PCR προϊόντος.

Εξώνιο 1:
(614 bp)

```
.....GGCGACAGAG
TATGACTCCGTCTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAGCAAAGTTTCCCTTCTAGTACAGGAAAA
GCCCTAGGGAGTCTCGGCTGGATCTCAGGCCCCCGAGGACGCAGCCACGCCGCGTCCAC
CCGCTCCATTTGGGAGCACGAAGAGACACCCGCGTGGTCAACCCGCGAGGGCTGCCTAGGCC
CCGCGTCCCGCCCTAGGCCGCGCGGGGGCCGCAAAGCGCAGGCCCACTCCCGCCGGGCGCG
GACGGCTCCGGGCCCGCAGGGGCCGCTGTGGCGCAGCCGGGCTGGCCCGCGCTGTCCCTG
ACGCGGATCACTGGCCCTCTTGAGCAGGCCTTGCCGGTTTGCGGGGTGAAAGGTTGC
GAACATGCGCAGCGCTTGAGCGAGGAGCTGGACAATGAAGACTATTACTCGTTGCT
GAACGTGCCAGGGAGGTGAGGCCAGCGGCTGGACGCTCTGGGGGCTGAGGCCGAGCCCG
GTCGTTCCGGAGGGCCGGGCTGGCGGTGGCCGCCACCCCGCCACGGGAGGCTCGGGT
CCGTCGGGGAGGCCGCGTACCCCGCGACGTGCACGCCAGCCGCCATGGAGGCGCTCC
CCAG.....
```

Εξώνιο 2:
(574 bp)

```
.....CAGCACTTCCAGCAAACCAGTCCCTATTGATGTATGTAA
TTGATCACTTTATTAAGTGGCAAAAAGAAGCCTTGTGAGGTGATAAACCGAATTCATT
ACATCCTGTATGTCGAGAGCAAACACATTTGGGACGTGGCTGATGGGTTCCCATTTCAAGG
CTGATCTGATGATAAATGTTAAGTAGCATTGATTGTTCTCTAATTGAATTTTCTTT
TCTTTAGGCCTCTTCTGAAGAGCTGAAAGCTGCCTACCGGAGGCTCTGTATGCTCTACCA
TCCAGACAAGCACAGAGACCCAGAGCTCAAGTCACAGGGCGAAGACTGTTTAACTTGT
TCACCAGGCTTATGAAGTTCAGTGGAGGGCCGGACTTTGTAGAAACATCCTGGTAAACAGA
TATTCGATTTTAGGAGGTGCGATTTGTAGAGATAGAAAAAGAGAGTCCCTAGAGGTAT
ATAAAACAGGTGGTTAGTTTAGTACTTTTCACTGACAGGGTCCCTTGAAAGAATAGTATT
TTGCTTTGAAATCAATACGTGTCCAGTAAGTAGAAAATGAGAGACCGGGCG.....
```

Εξώνιο 3:
(563 bp)

```
.....AATCAAGGCTGCAGTGCAGTATGATCTTACCATTGCA
CTCCAGCCAGGACAACAGAGAAGGACCCTGTCACTCAATAAGTCAATAACAAATCCTAG
GTGAATCGAAAAAGCAGTTGGGAGGAAAGATGTGTAGAAAATGAAAGGGTCTCTAGGA
AGATTGTGATCAGACAGGAGAAACAGGAGATGGGCTTACCTAATGATGTCAATTTCTCA
GGAAGGACTGAAGGTGAATTTGTATTTTATAAACATGTTAATTTTAAATTTGCAGTGC
TTAGTGACCCCAAACCAGGGCCATCTATGATATATATGGGAAGAGAGGACTGGAATGG
AAGGATGGGAGGTAAGAGAACTGTGCGTCTGGTGTCCAGAAAAGTCATTAACAGTTA
CAGAACATCTCCCAAAACCCTGCAATCTGTAATATTGTCTTTGGGAATATTTGAAACCA
TTAGAGCCCTTCTTGCCTGTATTTTGTTTTGTAGGTTGAGTTTGGACTTGGCTT
TGCCACTTTGTAACCTGAACTTGGCCAGCCACTCATCTGACT.....
```

Εξώνιο 4:
(800 bp)

```
.....TGTAATCCAGCACTTCCGGAGGCCGAGGTG
GGTGGATCACGAGGTCAGGAGATTGAGACCATCCGGGTAACATGGTGAACCCCTGTCTC
TACTAAAAATACAAAAAAATTAGCCAGGGGTGGTGGCGGGCGCTGTAGTCCAGCTA
CTCAGGAGGCTGAGGCAGGAGAATGGTGTAAACCAGGAGGCGGAGCTTGCAGTGCAGCTG
AGATAATGCACGGCACTTCAGCTTGGGCGACAGAGCGAGACTCCGCTCTCAAAAAGAAAA
AAAAGAAAGAAATTCATAAGGTGACATTTTCCCTGTAAGATTTCTGCAGCTCAGAGATA
AGTTGCTAAAAATAAGAAATGTTTAAAGTCACTCTGGAGAGCTGAGTGAAAACTCATTTCAA
CCTTGGGAAGGGCCAGGAGGGCAGTGAGCTCTCCCTCACCAGGCTGAGCCATCGGATG
GTGGAACCTCATGGTTTGGGTCCTTCCCTGAGGAAAGGCTGTGGCCGGACCCAGGCAGCA
TGCAACACCAAAAATCAATGGCTGCAGCTCTTTGTGTACGTTTCCCTTACCTCCTGGGTC
CTCAACTGTCTTCCCATCTTGATTCTGTGCATAGTTGTGGAAAGGAGGAGAACCCTGC
TGAAATTCGAGAGGAGTTTGAGCGGCTGCAGAGAGAGAGAAGAGAGGAGATTGCAGCA
CGGAACCAATCCCAAGGTAAGCCAGGGGCCACGTTTCATGAGGACACTTCATGAAAAGGC
CTCATAACTAGAAGCCAGGCTGAAATAATGAGGTGCTGGTGGATTGT.....
```

Εξώνιο 5:
(596 bp)

```
.....GGTCCTGTTGGTCTCTGAAAACTCAAACTG
TCTAGCTCTTACTCCTTTGACTAACACTTTGTCTTTGGCGTGTATTGCTCTGCAGACA
TGCGGACCGGCTCTCCTGGTCAAATGATGTTTCTAGCTCTGGACGCTGTGGTGTCTG
CAGTTTGGTTCGGACTGTGACATTATGCTTTGTGGGCTTCTGGTGGAGTGTCTTACCT
AAACCCAGTGAACCTGAAGTCAAATGACTTGTTCAAATTAAGCCGAGCTGGCTGTTGAAG
GTAGCATTGTCTTTCATTTCCACAAATACCACCGGTTCTGCTGACGGCTTGTTTTCTGC
CCCAGGGAACGATCAGCGTTGGAGTAGATGCCACCGACTTTTTGATCGCTATGATGAGG
AGTATGAAGATGTGTCCGGCAGTAGCTTTCCGCAGATTGAAATTAATAAATGCACATAT
CCCAGTCCATTGAGGTAAGCACACAACCACCTTCCGAGTACAGCAAGGGCTCGAGTTA
ATGAGGCACAGCACACCAAGCAGCTGGAATGAGAGTCTGCCAGGGTTTTTCTCATCTTT
ATTTATGAAAGGATGCAATTAGCCA.....
```

Εξώνιο 6:
(599 bp)

.....AAAAGTGAAGCTGTGCGGCAGTTCTG
CATCCATGTGTGCTTCTGAACAGAGGAATCGTCTGCACCTTTGGCCTTGGGCTCACAGTG
CGTTCTTTAGGCTGCTGCCATTGGCACTTCTGTGTTTTGATTCAATTCATTACACGCAA
ATACCATTTTTAGGCACCTTTGACAGCGACAGACACAGCCATCCTCTCTGGAAGCCTCTC
AACCAGAAATGGAAATGGAGGAGGTTCCATTAACCTTTGCGCTCAGACGAGTAACTTCGGC
AAGGGATGGGAGAGGTAAGAATGTCTATTGGCTGAGTTGTGTGTCTGTGCAAGCCT
TATTTCTGAACATTACACTCTCAAAGCTCACCTCAAACCTCACCTGGGGGCCCGTTG
TTGTGTAAGAACGGTACCAAGTGTCAAGCTTCCATAAGTTGACTGGTCTAAAAGAAAA
TAGGTCTCATGAGCCTGGCAACATGGTGAACCCCGTCTCTACTAAAAATACAAAATT
AGCTGGGCATGGTGGCACCTGCCTGTAATCCAGCTACTTTGGGAGGCTGAGGCAGAGAA
TCACGAGAATCACATGACCAGGAGGCAGAG.....

Εξώνιο 7:
(822 bp)

.....TTTAGAGCCCTGGCAAGACCAGT
GAATGAATGAAGGAATTATACCTAGAGGTACATACCTGAGCCTGGGTGTGCTATGAG
ATAAAACACCATTAAATGCCTTCTCTTTTTCTTTTCAAACAGTTGGAATTTGGAGCTGGA
GACCTACAGGGCCCTTTGTTCCGCTCAAGCTGTTCCGTAATCTCACACCAAGATGTA
ATATGAGAGACAGCAGCTCCTCTTTGGTGGTCTTTGTTGGCTTAGGAGACTAGAAGTGTG
TGTTCTTTTATCACAGTGGTGGCACTATCTTGTCTGTCTACAAGGTCAGTGCCTACA
TCAAGGGCAGGTATAGCACTGGCGTGAAGCCAGGCAGTGTGCAGGTGGGAAGAGGCAGG
ATTGAGGGGGCCGACCTTTGCCAGCCCTGGCCAGGCTGCACCATCCAGGCTCAGC
CTCCCTTACCTATGCCACAAGGCCACGGAGAAAGAGTGCCTTCAGGGAGAGTTGGTCAGT
GGACCGAAACACTTACAGACTTATGGATCGTTCCATTGTCCAGAGAATGACAGACTGCC
TCATCATCGGGTTGATTGACATATGCCAGAGATGTAGTCCCGAGCCAGCCTCTGCTTCCT
GTCGCTCTGTCTGCCATGTCACACTCCTAGAAGTGTATATCCCTGTCCCTTCTAGAA
CGACAGCAGTGTCTTCATTTCCCTATATGTTGGGTGCAGTGTGCTGTGTGAGCTCAGAT
AAAAGAAATGGTGGAGGTAATAATACCTTTTCTTCCAGAGGAAGATATAGCTGAAG
AGTCTAGAATGGAGCACA.....

Εξώνιο 8:
(541 bp)

.....CCTCCCCCTCTGTGTGGATAAGGCCTG
ACCTCCTGCTTTTTTTTTACTGGGAGCTGGCCAGGGATGCATAGACCTGACAGTAAAGT
GAGGTCTTAGCCAGGCAGAGAGGAAGTAACAGAACAGCTGAGAGCAGGTGCTATCCAGGA
CCTATTCTGTCTGTGTCTCTCCAGCTTTGTGACAACAAACTGTGCTCTGCAGTTTTCA
TCCCGTGGAAATCCGACCCGGCCTGACCCTGTCTTAGCTCGGAACCTAGACAAGAACC
GTGGGCTACCTGCAGTGGCGATGGGGTATCCAGTCAGCCATGAACACTAGCATCTCCGA
GACACTAAAACCAGCCACTTCACTGTGGCCCTGCAGGTGAGCCGAGCAGCCATCATCTCC
TGCAGACAGAGCTCTGGGAGGACCCCTCCTCCCAAGCACTCAGTGTCTCCCTTAAATCCT
GCGTCTGTATCACCCTAAGTCTAAGCCCATACAGGGCCCTGAGGGGCAGGCTCTCGGTG
CTCACACTCGAGTGACCTGGTGGAACTTCGAG.....

Εξώνιο 9-10:
(836 bp)

.....CGTGACCCTGCCTTAAAGCCTGT
GTGCAGCAGATGCCAGAGCTAGTGGGAGGCAGATACCCATCTCCACAGAGTACAC
GCCCTAGCCACGCATCCTTGCACCCCTCTGTCTCCCGAGCTGGGAATCCCTCACTCCTTTG
CACTGATCAGCTATCAGCACAATTCGAAGATGACGATCAGACTCGTGTGAAAGGATCCC
TCAAAGTAAGTCTGGCCTGGCTAAATGGAAGCACACTGGTACTGCATGCGGGTCTTCAC
AGTGAACACAGTTGGTGTAAAGACACCTTGTCTGTGAATATCTACGTGTGTGTGACATT
TTTGAGAGCTTCCATTTTGGAGCTGTGGGGGATTTAACTACAGTCCAGCCCTTGA
GGAGCTTAGAGAGTGTGTGGAAGAACTAGACCATGGGTGTCCCACTTTCTTCTGTCTCAT
GAATCTGTCTCCCTGGGGTTCGAGGAGGCTGGAGGGAGGGGAGGGTACCTGGCCTCT
TCTCAAATGACAGCTGCCCTGAAGTGTGAATGAGGGGCACAGGCACAGACCGCGTCT
CTCCCTGCAGAGCAGGCTTCTTTGGGACGGTGGTGGAGTACGGAGCTGAGAGGAAGATCT
CCAGGCACAGCGTTTTGGGTGCAGCTGTGACGCTTGGAGTCCACAGGGTGTTCCTCTCA
AAGTCAAAGTAAGTTGAACCTTAGGCCTTTTCGGGTCAAGGAATGCCTGTACCTTCACTCAA
CCAGGCTTTACCAAGTTAAGGCTGAAATAGCCTTTGCATTGTAATTTTGTCTTAAAGA
CACAGTTGCTTGGCTAGTGCAGTGGCTTAT.....

Εξώνιο 11:
(476 bp)

.....AGGTGGTGGACTGTGAAAGGAGCAGACTG
CAGGCTCCTTAACTCGCAGCTGCACGCAGCACAAGTTCTTCTTCTGTGCTGACACCC
ATTGCCCTTCCCTGGAAAACCTGATTCATCTTGGCTTTTTTTTTTTTTTTTGTATTTT
TCCCAGGCTCAACAGGGCCAGTCAGACATACTTCTTCCCTATTCACTTGACGGACGAG
TTCTGCCAGCGCCATGTTCTATGCCACCGTGGGGCCTCTAGTGGTCTACTTTGCCATGC
ACCGTCTGATCATCAAACCATACCTCAGGGCTCAGAAAGAGAAAGTGAGTTGACACGTCAT
GGGCATGTCACTAGCCAGCCCTGTGCCTCAGTTTCTCACCCCTTAAAATGGAGAGGATAA
CAGACCTCTGCTCGGGTGTATGAGGAACCTGAATTAAGTAATGCATGTAAGCACTT
AGGCTGATGTCTGGTCAAGATTGGTA.....

Εξώνιο 12:
(667 bp)

```
.....CCAGTAAGATCACAGACTGTTTGC TGGGCTCGG  
GTCCAGCACGGGAGGGGCTGTGTTGGCTGGAAGCTGGGCAGCGCCGCGTAACTGGGGG  
TTGTGTTCCCTCTCGCGTAAAGGGAATTGGAGAAGCAGAGGGAAAGCGCCGCCACCGATGTG  
CTGCAGAAGAAGCAAGAGGCGGAGTCCCGTGTGAGTGTGCCACCCTTCCCAAGCGAG  
GGCTGTAGGGGACACACTCCACACCCACATGTTGGTCTCAGGGCCTTAGAGGTACAGACT  
TCTCTTCTCCAACAACCTTGGCTCTCCACTTAGTCTTTATTGTGGGATGCGACACTGGGCT  
CTGCAGTCCCTGCCCTGAAGATAATTACCCTCCAAGGCCTAACAGGGCTTTTTTAAAG  
TGGTGAGTATTGGCCTCTTTTCTTCCCTCTGAGTGTCTGCCTTTTACTGAGCAGGAGG  
GAGCAGGCTTCCCTGGGTATGTGGCGAGCACTGCCAGGTGGCCATGGGGCGTGTGCGCG  
GCCTGGCGAGCACATGCCTGTCTGAGGGGGCGGCACAGCTATGCCAGCAGAATGGCACC  
ACAGGAGAACACAGGTCTTTCTCAAGAGGAGCTGGGATTCAGCTTCTCTGTGAAATC  
TCTTTATTTTAAACCTGACAACGCATTGTTTTTTATTGGGTCAACAAATCCCACCCAC
```

Εξώνιο 13-14:
(562 bp)

```
AGCCACTCGGGTAGCAGACTGTGAGGGTGCCCACTCCCTTCTTTCCAGGCCCTGAGCA  
AGTATGTTGACGTGGACAAGACTGCCTGCCTGTGGCCCTCTCACAGAGGTGGAACAGGC  
CTGGCAGGGCCCTGACTGTGTCACTCTTGTCTCTGGCAGGTCCGGCTGATGCAGGAATC  
TGTCCGAAGGATAATTGAGGCAGAGAGTCCAGAATGGGTGAGAACATGTGTCCCTCTT  
GGTCCAGGGTGGGCGCTGGGGGTCTTAAGCCACACAAGGAGGTGCCTGGAGGAGGCCCT  
CCTTACTCGGAGTCTGTCCCTTAGGCCTCATCATCGTCAATGCCCTGGTACGGGAAGTTTG  
TCAATGACAAGAGCAGGAAGAGCGAGAAGGTGAAGGTGATTGACGTGACTGTGCCCTGC  
AGTGCCTGGTGAAGGACTCGAAGCTCATCTCACGGAGGCCCTCCAAGGTACAGCAGCACC  
AGCCACCACATGCTATGTGCTCACAGATTTGAACAGGCTGGGCGCGGTGACTCAGGCCATA  
TAAATCC TAGCACTTTGGAAGGCCAAG.....
```

Εξώνιο 15-16:
(850 bp)

```
.....CCCCAAAGTTTGCATCTCC CAGGGGAA  
TGTGAGAGCCTGTGCACACTGCCCTCCGGTGGTAGTGAGGAGGAGTGTGTTCTTAGAC  
CGTCTGGAGTATTGAGAGTAGCAATTTGTTTGTACAGGCTGGGCTGCCTGGCTTTTATG  
ACCCGTGTGTGGGGGAAGAGAAGAACCTGAAAGTGTCTATCAGTTCGGGGCGTCTCTGC  
ATCAGGTGATGGTGTGGACAGTGGGCCCTCCGGATACCAAAGCAGTGTGAGTAGCCGT  
CCCTTCGCAGTACCAGCTAACGGGGCGGGACCTCGAAGCGGCTGCTCAGTGTGTGGG  
CTGCCAGCCACCTTCCACCTTCTCAGCTGCCACCTGGGAGCAGAGACGCCAACTAGCC  
CTTGACCCATGATTCACTCAGAGCCATGATTTGTGCCCTAAAAGGGGGCTGGGGCCCT  
TTACAGGTAGAATTAGAGTGAGCGCTTGGAACTGCGGCTTGTGAGTGGCGGGGGATGAA  
AGCAGACCTTACGTCCAGCAGCAGTTGATTTTCAGCAGCGGGTGTCTGCCTCGCCTG  
GGCCAGCCAGCTGCTGGTCCGGGTGACTGCTGAGCCCCATCAGTAGAAAGGTGCATGGG  
AATGGCCACCTTCTGATCAGCTGCGTCTGTCTTTTCTTTACAGCCACAGGATCGATAC  
AGATGGATAACTGCCAAGAACCAGATTTTTTAAAGGCCGCAAAAATCTTTTCTGGGA  
GTCTACAAAATTGGAAATGAAAAAACCAGACATCAGATGTTTTTATTTATATTATTTAT  
TATAGAAGGTGGTACCATTATCAATTATGTGAAGGGACATGCGAGACCCAGCTTTTGA
```

Εικόνα 3.1: Οι αλληλουχίες του γονιδίου *DNAJC11* του ανθρώπου που αναλύθηκαν. Σημειώνονται με διαφορετικό χρωματισμό τα εξώνια (κίτρινο), οι εκκινητές πρόσθιας και ανάστροφης κατεύθυνσης (γαλάζιο και κόκκινο αντίστοιχα) και τα σημεία διακλάδωσης (γκρι). Ως αναφορά χρησιμοποιήθηκαν οι αντίστοιχες περιοχές του γονιδίου από τη βάση δεδομένων Ensembl Genome Browser.

3.3 Πολλαπλή ευθυγράμμιση αλληλουχιών

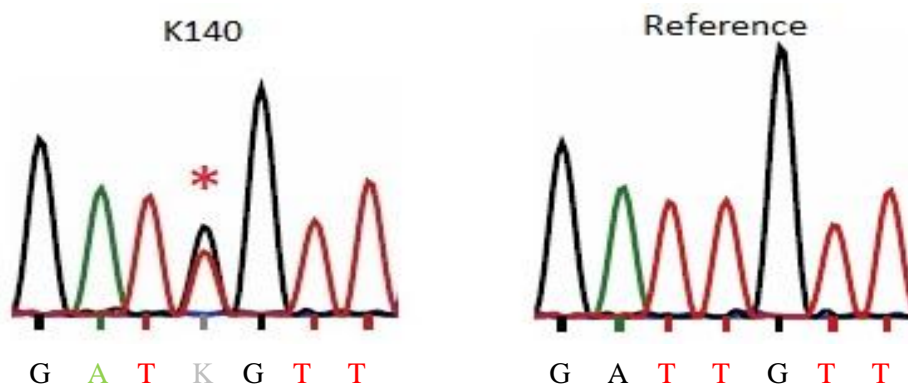
Για να είναι δυνατός ο εντοπισμός πολυμορφισμών στους ασθενείς με ALS ακολούθησε η πολλαπλή ευθυγράμμιση αλληλουχιών κάθε εξωνίου με το πρόγραμμα Clustal Omega (Multiple Sequence Alignment) και έγινε σύγκριση με DNA αναφοράς από τη βάση δεδομένων Ensembl.

3.4 Ανίχνευση πολυμορφισμών για το *DNAJC11* γονίδιο σε ασθενείς με ALS

Με την πολλαπλή ευθυγράμμιση αλληλουχιών ήταν δυνατή η εύρεση πολυμορφισμών στα δείγματα ασθενών με ALS. Αρχικά, αλληλουχήθηκαν 10 ασθενείς (5 με sALS και 5 με fALS) όπου ανιχνεύθηκαν 6 σημειακοί πολυμορφισμοί 4 σε εξώνια και 2 σε εσώνια που επιβεβαιώθηκαν με συμπληρωματική αλληλούχιση. Από τους πολυμορφισμούς επιλέξαμε 2 παρανοηματικούς που οδηγούν δηλαδή σε αντικατάσταση ενός αμινοξέος για να ελεγχθούν με αλληλούχιση τόσο στους υπόλοιπους ALS ασθενείς που είχαμε στη διάθεσή μας όσο και στους υγιείς μάρτυρες ώστε να διερευνηθεί εάν πρόκειται για φυσικούς πολυμορφισμούς στον πληθυσμό.

3.4.1 Εντοπισμός πολυμορφισμού rs41310361 στο εσώνιο 1

Ο πολυμορφισμός rs41310361 εντοπίστηκε σε έναν ασθενή (K140) με sALS από τους συνολικά 20 ασθενείς και 30 υγιείς μάρτυρες (Εικόνες 3.2 και 3.3). Από τη βάση δεδομένων Ensembl προκύπτει ότι ο συγκεκριμένος πολυμορφισμός είναι εσωνικός και εντοπίζεται 30 βάσεις πριν το εξώνιο 2. Πρόκειται για μια σημειακή μετάλλαξη μεταστροφής από T σε G που βρίσκεται σε ετερόζυγη κατάσταση και έχει καταγραφεί στο παρελθόν. Πολύ πιθανόν δεν έχει κάποια κλινική σημασία καθώς δεν βρίσκεται σε περιοχές που καθορίζουν το μάτισμα.



Εικόνα 3.2: Εντοπισμός του πολυμορφισμού rs41310361 στο δείγμα K140. Αλληλούχιση της περιοχής του πρώτου εσωνίου του γονιδίου *DNAJC11* αποκάλυψε σημειακή αλλαγή από T σε G (K) στο δείγμα K140 (αστερίσκος). Ως σημείο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε DNA από υγιές άτομο (reference). Η διπλή κορυφή προκύπτει από την ετεροζυγωτία του ατόμου για τη συγκεκριμένη βάση.

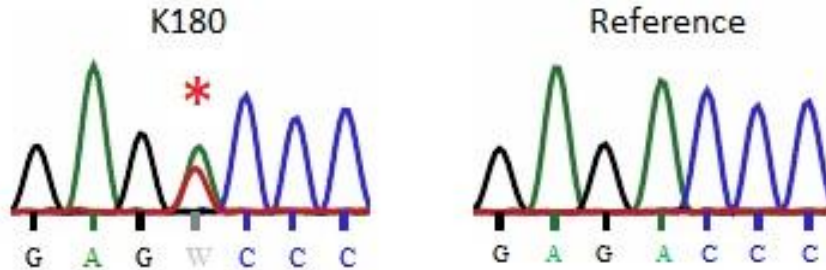
reference	CTGATTCTGATGATGATAAATGTTTAAAGTAGCATTGATTGTTCTCTAATTGAATTTTTCTT
ALS 72	CTGATTCTGATGATGATAAATGTTTAAAGTAGCATTGATTGTTCTCTAATTGAATTTTTCTT
K 183	CTGATTCTGATGATGATAAATGTTTAAAGTAGCATTGATTGTTCTCTAATTGAATTTTTCTT
K 194	CTGATTCTGATGATGATAAATGTTTAAAGTAGCATTGATTGTTCTCTAATTGAATTTTTCTT
K 166	CTGATTCTGATGATGATAAATGTTTAAAGTAGCATTGATTGTTCTCTAATTGAATTTTTCTT
K 174	CTGATTCTGATGATGATAAATGTTTAAAGTAGCATTGATTGTTCTCTAATTGAATTTTTCTT
K 169	CTGATTCTGATGATGATAAATGTTTAAAGTAGCATTGATTGTTCTCTAATTGAATTTTTCTT
K 161	CTGATTCTGATGATGATAAATGTTTAAAGTAGCATTGATTGTTCTCTAATTGAATTTTTCTT
K 130	CTGATTCTGATGATGATAAATGTTTAAAGTAGCATTGATTGTTCTCTAATTGAATTTTTCTT
K 140	CTGATTCTGATGATGATAAATGTTTAAAGTAGCATTGATTGTTCTCTAATTGAATTTTTCTT
ALS 61	CTGATTCTGATGATGATAAATGTTTAAAGTAGCATTGATTGTTCTCTAATTGAATTTTTCTT
K 158	CTGATTCTGATGATGATAAATGTTTAAAGTAGCATTGATTGTTCTCTAATTGAATTTTTCTT
K 198	CTGATTCTGATGATGATAAATGTTTAAAGTAGCATTGATTGTTCTCTAATTGAATTTTTCTT
K 197	CTGATTCTGATGATGATAAATGTTTAAAGTAGCATTGATTGTTCTCTAATTGAATTTTTCTT
K 185	CTGATTCTGATGATGATAAATGTTTAAAGTAGCATTGATTGTTCTCTAATTGAATTTTTCTT
ALS 77	CTGATTCTGATGATGATAAATGTTTAAAGTAGCATTGATTGTTCTCTAATTGAATTTTTCTT
K 176	CTGATTCTGATGATGATAAATGTTTAAAGTAGCATTGATTGTTCTCTAATTGAATTTTTCTT
K 155	CTGATTCTGATGATGATAAATGTTTAAAGTAGCATTGATTGTTCTCTAATTGAATTTTTCTT
K 180	CTGATTCTGATGATGATAAATGTTTAAAGTAGCATTGATTGTTCTCTAATTGAATTTTTCTT
K 189	CTGATTCTGATGATGATAAATGTTTAAAGTAGCATTGATTGTTCTCTAATTGAATTTTTCTT
ALS 194	CTGATTCTGATGATGATAAATGTTTAAAGTAGCATTGATTGTTCTCTAATTGAATTTTTCTT
	*****.*****

Εικόνα 3.3: Πολλαπλή ευθυγράμμιση αλληλουχιών για την περιοχή που εντοπίστηκε ο πολυμορφισμός rs41310361. Απεικονίζονται οι αλληλουχίες των ασθενών οι οποίες συγκρίθηκαν με την αλληλουχία αναφοράς (reference). Με μωβ σκίαση εμφανίζεται ο πολυμορφισμός K (T/G) για το δείγμα K140.

3.4.2 Εντοπισμός του πολυμορφισμού rs138392773 στο εξόνιο 2

Ο πολυμορφισμός rs138392773 εντοπίστηκε σε έναν ασθενή (K180) με sALS από τους συνολικά 20 ασθενείς και 30 υγιείς μάρτυρες (Εικόνα 3.4 και 3.5). Από τη βάση δεδομένων Ensembl προκύπτει ότι πρόκειται για σημειακή μετάλλαξη μεταστροφής από A σε T στο κωδικόνιο που κωδικοποιεί το 48^ο αμινοξύ της πρωτεΐνης, προκαλώντας αμινοξική αντικατάσταση από ασπαρτικό οξύ σε βαλίνη. Πρόκειται για αμινοξέα με εντελώς διαφορετικές ιδιότητες πλευρικής αλυσίδας αφού το ασπαρτικό είναι αρνητικά φορτισμένο ενώ η βαλίνη είναι μη φορτισμένη αλειφατική. Επίσης, το 48^ο αμινοξύ εντοπίζεται εντός της περιοχής J (Εικόνα 3.14), που έχει ιδιαίτερη σημασία για τη λειτουργία των πρωτεϊνών DNAJ. Εξαιτίας αυτών των δεδομένων, θεωρήθηκε πως ο πολυμορφισμός rs138392773 πιθανόν εμπλέκεται στην παθογένεια του ALS ασθενή και για αυτό προχωρήσαμε στην αλληλούχηση όλων των δειγμάτων ασθενών που είχαμε στη διάθεσή μας καθώς επίσης και των τριάντα υγιών μαρτύρων, δίχως να εντοπίσουμε τον πολυμορφισμό σε κάποιο από αυτά τα δείγματα.

Τέλος, δεν υπάρχουν πληροφορίες για την κλινική σημασία του πολυμορφισμού παρότι έχει καταγραφεί στο παρελθόν.



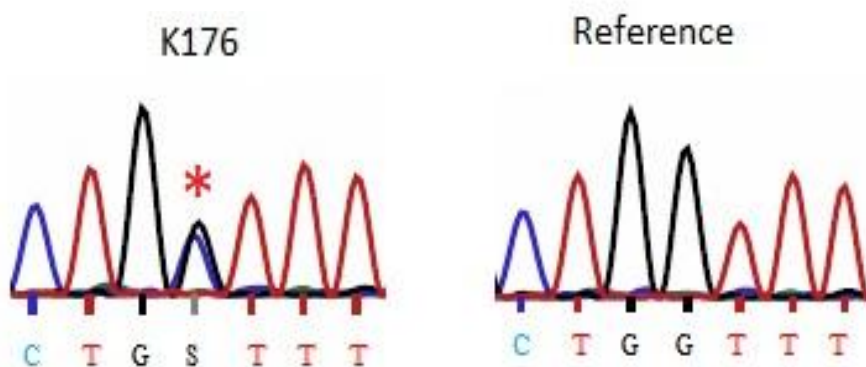
Εικόνα 3.4: Εντοπισμός του πολυμορφισμού rs138392773 στο δείγμα K180. Αλληλούχιση της περιοχής του πολυμορφισμού rs138392773 στο εξόνιο 2 του γονιδίου *DNAJC11* όπως φαίνεται σε υγιές άτομο (reference) και στο δείγμα K180 με πολυμορφισμό W (αλλαγή από A σε T) (αστερίσκος).

reference	TCCAGACAAGCACAGAGACCCAGAGCTCAAGTCACAGGCGGAACGACTGTTTAAACCTTGT
ALS 72	TCCAGACAAGCACAGAGACCCAGAGCTCAAGTCACAGGCGGAACGACTGTTTAAACCTTGT
K 183	TCCAGACAAGCACAGAGACCCAGAGCTCAAGTCACAGGCGGAACGACTGTTTAAACCTTGT
K 194	TCCAGACAAGCACAGAGACCCAGAGCTCAAGTCACAGGCGGAACGACTGTTTAAACCTTGT
K 166	TCCAGACAAGCACAGAGACCCAGAGCTCAAGTCACAGGCGGAACGACTGTTTAAACCTTGT
K 174	TCCAGACAAGCACAGAGACCCAGAGCTCAAGTCACAGGCGGAACGACTGTTTAAACCTTGT
K 169	TCCAGACAAGCACAGAGACCCAGAGCTCAAGTCACAGGCGGAACGACTGTTTAAACCTTGT
K 161	TCCAGACAAGCACAGAGACCCAGAGCTCAAGTCACAGGCGGAACGACTGTTTAAACCTTGT
K 130	TCCAGACAAGCACAGAGACCCAGAGCTCAAGTCACAGGCGGAACGACTGTTTAAACCTTGT
K 140	TCCAGACAAGCACAGAGACCCAGAGCTCAAGTCACAGGCGGAACGACTGTTTAAACCTTGT
ALS 61	TCCAGACAAGCACAGAGACCCAGAGCTCAAGTCACAGGCGGAACGACTGTTTAAACCTTGT
K 158	TCCAGACAAGCACAGAGACCCAGAGCTCAAGTCACAGGCGGAACGACTGTTTAAACCTTGT
K 198	TCCAGACAAGCACAGAGACCCAGAGCTCAAGTCACAGGCGGAACGACTGTTTAAACCTTGT
K 197	TCCAGACAAGCACAGAGACCCAGAGCTCAAGTCACAGGCGGAACGACTGTTTAAACCTTGT
K 185	TCCAGACAAGCACAGAGACCCAGAGCTCAAGTCACAGGCGGAACGACTGTTTAAACCTTGT
ALS 77	TCCAGACAAGCACAGAGACCCAGAGCTCAAGTCACAGGCGGAACGACTGTTTAAACCTTGT
K 176	TCCAGACAAGCACAGAGACCCAGAGCTCAAGTCACAGGCGGAACGACTGTTTAAACCTTGT
K 155	TCCAGACAAGCACAGAGACCCAGAGCTCAAGTCACAGGCGGAACGACTGTTTAAACCTTGT
K 180	TCCAGACAAGCACAGAGACCCAGAGCTCAAGTCACAGGCGGAACGACTGTTTAAACCTTGT
K 189	TCCAGACAAGCACAGAGACCCAGAGCTCAAGTCACAGGCGGAACGACTGTTTAAACCTTGT
ALS 194	TCCAGACAAGCACAGAGACCCAGAGCTCAAGTCACAGGCGGAACGACTGTTTAAACCTTGT

Εικόνα 3.5: Πολλαπλή ευθυγράμμιση αλληλουχιών για την περιοχή του εξονίου 2 που εντοπίστηκε ο πολυμορφισμός rs138392773. Απεικονίζονται οι αλληλουχίες 20 ALS ασθενών οι οποίες συγκρίθηκαν με την αλληλουχία αναφοράς (reference). Με μωβ εμφανίζεται ο πολυμορφισμός W (A/T) που εντοπίστηκε στο δείγμα K180.

3.4.3 Εντοπισμός του πολυμορφισμού rs200454 στο εξόνιο 8

Ο πολυμορφισμός rs200454 εντοπίστηκε στον ασθενή K176 με sALS από τους συνολικά 10 ασθενείς που αλληλουχίστηκαν (Εικόνα 3.6 και 3.7). Από τη βάση δεδομένων Ensembl πρόκειται για σημειακή μεταλλαγή μεταστροφής από G σε C στο κωδικόνιο που κωδικοποιεί το υπ' αριθμόν 290 αμινοξύ της πρωτεΐνης προκαλώντας την αντικατάσταση της θρεονίνης από σερίνη. Το αμινοξύ 290 εντοπίζεται περίπου στο μέσο της πρωτεΐνης, σε μια περιοχή με μη καθορισμένη δομή (Εικόνα 3.14). Τα αμινοξέα σερίνη και θρεονίνη ανήκουν στην ίδια κατηγορία των αμινοξέων με πολικές μη φορτισμένες πλευρικές αλυσίδες και έτσι διαθέτουν παρόμοιες ιδιότητες. Επίσης, ο πολυμορφισμός αυτός περιγράφεται στη βιβλιογραφία (Henrich et al., 2007) όπου γονοτυπήθηκαν δείγματα ρετινοβλαστώματος και δείγματα μη προσβεβλημένων μαρτύρων για τον πολυμορφισμό rs200454. Σε δείγματα 97 μαρτύρων, το 4% βρέθηκε G/G ομόζυγο και το 33% C/G ετερόζυγο για αυτό το πολυμορφισμό. Λόγω της ευρείας διάδοσης του πολυμορφισμού αυτού στον πληθυσμό δεν θεωρήθηκε ότι μπορεί να εμπλέκεται στην παθογένεια της νόσου και γι' αυτό δεν αλληλουχίστηκε το DNA των υπόλοιπων ασθενών για το συγκεκριμένο εξόνιο. Παρόλα αυτά, η πλειοψηφία των ALS ασθενών είναι σε ομόζυγη κατάσταση για G/G σε αντίθεση με την υπάρχουσα βιβλιογραφία (Henrich et al., 2007) κάτι που αξίζει να διερευνηθεί περαιτέρω.



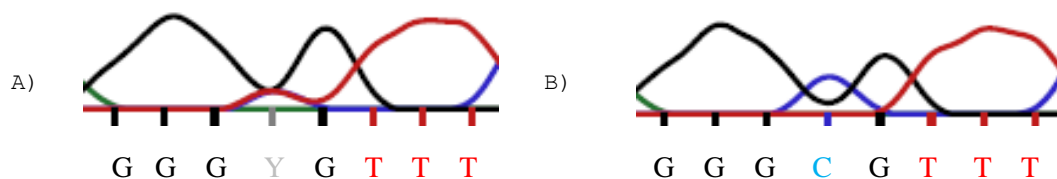
Εικόνα 3.6: Εντοπισμός του πολυμορφισμού rs200454 στο δείγμα K176. Αλληλούχιση της περιοχής του πολυμορφισμού rs200454 στο εξόνιο 8 του *DNAJC11* γονιδίου όπως φαίνεται σε υγιές άτομο (reference) και στο δείγμα K176 με πολυμορφισμό S δηλαδή από G σε C (αστερίσκος) σε ετερόζυγη κατάσταση.

reference	CAGGGCCACAGTGAAGTGGCTGGTTTTAGTGTCTCGGACGATGCTAGTGTTCATGGCTGA
K 180	CAGGGCCACAGTGAAGTGGCTGGTTTTAGTGTCTCGGACGATGCTAGTGTTCATGGCTGA
K 176	CAGGGCCACAGTGAAGTGGCTG S TTTTAGTGTCTCGGACGATGCTAGTGTTCATGGCTGA
K 189	CAGGGCCACAGTGAAGTGGCTGGTTTTAGTGTCTCGGACGATGCTAGTGTTCATGGCTGA
K 140	CAGGGCCACAGTGAAGTGGCTGGTTTTAGTGTCTCGGACGATGCTAGTGTTCATGGCTGA
ALS 72	CAGGGCCACAGTGAAGTGGCTGGTTTTAGTGTCTCGGACGATGCTAGTGTTCATGGCTGA
K 166	CAGGGCCACAGTGAAGTGGCTGGTTTTAGTGTCTCGGACGATGCTAGTGTTCATGGCTGA
ALS 77	CAGGGCCACAGTGAAGTGGCTGGTTTTAGTGTCTCGGACGATGCTAGTGTTCATGGCTGA
ALS 61	CAGGGCCACAGTGAAGTGGCTGGTTTTAGTGTCTCGGACGATGCTAGTGTTCATGGCTGA
ALS 194	CAGGGCCACAGTGAAGTGGCTGGTTTTAGTGTCTCGGACGATGCTAGTGTTCATGGCTGA
K 130	CAGGGCCACAGTGAAGTGGCTGGTTTTAGTGTCTCGGACGATGCTAGTGTTCATGGCTGA
	*****.*****

Εικόνα 3.7: Πολλαπλή ευθυγράμμιση αλληλουχιών για την περιοχή του εξωνίου 8 που εντοπίστηκε ο πολυμορφισμός rs200454. Απεικονίζονται οι αλληλουχίες 10 ALS ασθενών οι οποίες συγκρίθηκαν με την αλληλουχία αναφοράς (reference). Με μωβ εμφανίζεται ο πολυμορφισμός S (G/C) που εντοπίστηκε στο δείγμα K176.

3.4.4 Εντοπισμός του πολυμορφισμού rs200458 στο εξόνιο 10

Σύμφωνα με τη βάση δεδομένων Ensembl ο πολυμορφισμός rs200458 αφορά σημειακή αλλαγή μετάπτωσης από T σε C. Σε όλους τους ALS ασθενείς που αλληλουχήθηκαν εντοπίστηκε ο πολυμορφισμός. Συγκεκριμένα, 8 στους 10 ήταν σε ομόζυγη κατάσταση (C/C) ενώ 2/10 σε ετερόζυγη κατάσταση (T/C) (Εικόνα 3.8 και 3.9). Ο πολυμορφισμός αυτός εντοπίζεται στο κωδικόνιο που κωδικοποιεί το 360^ο αμινοξύ της πρωτεΐνης, προκαλώντας μια συνώνυμη μετάλλαξη καθώς κατά τη διαδικασία της μετάφρασης κωδικοποιείται το ίδιο αμινοξύ (γλυκίνη). Στην εναλλακτική αλληλουχία του ανθρώπινου γονιδιώματος (Celera, CHM1 1.1) η συγκεκριμένη βάση είναι C, δηλαδή 8/10 ασθενείς έχουν τον αλληλόμορφο του εναλλακτικού γονιδιώματος αναφοράς. Το 360^ο αμινοξύ εντοπίζεται στο μέσο περίπου της πρωτεΐνης, σε μια περιοχή με μη καθορισμένη δομή (Εικόνα 3.14). Λόγω της συνώνυμης μετάλλαξης αλλά και της θέσης του πολυμορφισμού δεν αλληλουχήθηκαν και οι υπόλοιποι ασθενείς καθώς ο πολυμορφισμός δεν θεωρήθηκε ότι μπορεί να εμπλέκεται στην παθογένεια της νόσου. Όσον αφορά την κλινική σπουδαιότητα για τον συγκεκριμένο πολυμορφισμό δεν υπάρχουν πληροφορίες.



Εικόνα 3.8: Εντοπισμός του πολυμορφισμού rs200458 στα δείγματα των ALS ασθενών. **A)** Αλληλουχία της περιοχής του πολυμορφισμού rs200458 (T/C) στο εξόνιο 10 του *DNAJC11* όπως φαίνεται στα δείγματα ALS72 και K130 και **B)** όπως φαίνεται στα δείγματα ALS71, ALS77, K176, K189, K140, K166, K180 και ALS194 (C/C).

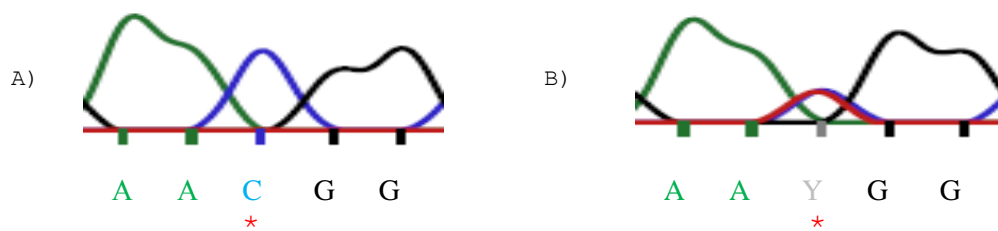
reference	CCAGGCACAGCGTTTTGGGTGCAGCTGTCAGCGTTGGAGTTCACAGGGTGTTCCTCTCA
ALS 77	CCAGGCACAGCGTTTTGGGTGCAGCTGTCAGCGTTGGAGTTCACAGGGCGTTTCCTCTCA
K 176	CCAGGCACAGCGTTTTGGGTGCAGCTGTCAGCGTTGGAGTTCACAGGGCGTTTCCTCTCA
K 180	CCAGGCACAGCGTTTTGGGTGCAGCTGTCAGCGTTGGAGTTCACAGGGCGTTTCCTCTCA
K 130	CCAGGCACAGCGTTTTGGGTGCAGCTGTCAGCGTTGGAGTTCACAGGGYGTTCCTCTCA
ALS 72	CCAGGCACAGCGTTTTGGGTGCAGCTGTCAGCGTTGGAGTTCACAGGGYGTTCCTCTCA
K 189	CCAGGCACAGCGTTTTGGGTGCAGCTGTCAGCGTTGGAGTTCACAGGGCGTTTCCTCTCA
ALS 194	CCAGGCACAGCGTTTTGGGTGCAGCTGTCAGCGTTGGAGTTCACAGGGCGTTTCCTCTCA
ALS 61	CCAGGCACAGCGTTTTGGGTGCAGCTGTCAGCGTTGGAGTTCACAGGGCGTTTCCTCTCA
K 140	CCAGGCACAGCGTTTTGGGTGCAGCTGTCAGCGTTGGAGTTCACAGGGCGTTTCCTCTCA
K 166	CCAGGCACAGCGTTTTGGGTGCAGCTGTCAGCGTTGGAGTTCACAGGGCGTTTCCTCTCA

Εικόνα 3.9: Πολλαπλή ευθυγράμμιση αλληλουχιών για την περιοχή του εξωνίου 10 που εντοπίστηκε ο πολυμορφισμός rs200458. Απεικονίζονται οι αλληλουχίες των 10 ασθενών οι οποίοι συγκρίθηκαν με την αλληλουχία αναφοράς (reference). Με μωβ απεικονίζεται ο πολυμορφισμός που εντοπίστηκε στα δείγματα.

3.4.5 Εντοπισμός του πολυμορφισμού rs6577583 στο εσόνιο 15

Ο πολυμορφισμός rs6577583 εντοπίστηκε σε όλους τους ασθενείς που αλληλουχήθηκαν (Εικόνα 3.10 και 3.11). Από τη βάση δεδομένων Ensembl προκύπτει ότι είναι ένας εσωνικός πολυμορφισμός μετάπτωσης από T σε C και ο οποίος εντοπίζεται 42 βάσεις πριν το εξόνιο 16. Η μεγάλη συχνότητα του πολυμορφισμού (100% των ασθενών), μας έκανε να εξετάσουμε τη συγκεκριμένη βάση στην εναλλακτική αλληλουχία του ανθρώπινου γονιδιώματος (Celera, CHM1 1:1). Στην αλληλουχία αυτή, η συγκεκριμένη βάση είναι C και άρα 6/10 ασθενείς είναι

ομόζυγοι για τη βάση αναφοράς (C/C) και οι 4/10 ετερόζυγοι (T/C). Η εξέταση του πολυμορφισμού σε σχέση με την εναλλακτική αλληλουχία του ανθρώπινου γονιδιώματος της Celera έδειξε ότι πιθανότατα πρόκειται για κάποιον φυσικό πολυμορφισμό. Επίσης, καθώς βρίσκεται σε περιοχή του εσωνίου και δεν εντοπίζεται εντός σημείων διακλάδωσης (Branch Points), θεωρήθηκε ότι ο πολυμορφισμός δεν εμπλέκεται στην παθογένεια της νόσου και γι' αυτό δεν αλληλουχήθηκαν οι υπόλοιποι ασθενείς.



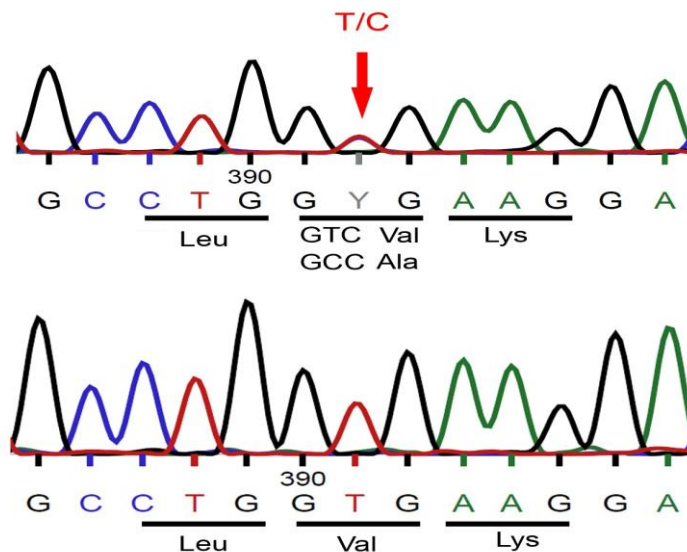
Εικόνα 3.10: Εντοπισμός του πολυμορφισμού rs6577583 στα δείγματα. Α) Αλληλούχιση της περιοχής του πολυμορφισμού rs6577583 στο εσώνιο 15 του *DNAJC11* όπως φαίνεται στα δείγματα K189, K166, ALS61, K140, ALS77 και ALS194 (C/C, αστερίσκος) σε ομόζυγη κατάσταση και Β) όπως φαίνεται στα δείγματα ALS72, K176, K130 και K180 σε ετερόζυγη κατάσταση Y (T/C, αστερίσκος).

reference	AATGGCCACSTTCTGATCACCTGCGTCTGTCTTTTCSTTTACAGCCACAGGATCGATAC
K 189	AA C GGCCACSTTCTGATCACCTGCGTCTGTCTTTTCSTTTACAGCCACAGGATCGATAC
K 166	AA C GGCCACSTTCTGATCACCTGCGTCTGTCTTTTCSTTTACAGCCACAGGATCGATAC
ALS 72	AA Y GGCCACSTTCTGATCACCTGCGTCTGTCTTTTCSTTTACAGCCACAGGATCGATAC
ALS 61	AA C GGCCACSTTCTGATCACCTGCGTCTGTCTTTTCSTTTACAGCCACAGGATCGATAC
K 176	AA Y GGCCACSTTCTGATCACCTGCGTCTGTCTTTTCSTTTACAGCCACAGGATCGATAC
K 130	AA Y GGCCACSTTCTGATCACCTGCGTCTGTCTTTTCSTTTACAGCCACAGGATCGATAC
K 140	AA C GGCCACSTTCTGATCACCTGCGTCTGTCTTTTCSTTTACAGCCACAGGATCGATAC
ALS 77	AA C GGCCACSTTCTGATCACCTGCGTCTGTCTTTTCSTTTACAGCCACAGGATCGATAC
ALS 194	AA C GGCCACSTTCTGATCACCTGCGTCTGTCTTTTCSTTTACAGCCACAGGATCGATAC
K 180	AA Y GGCCACSTTCTGATCACCTGCGTCTGTCTTTTCSTTTACAGCCACAGGATCGATAC
	** *****

Εικόνα 3.11: Πολλαπλή ευθυγράμμιση αλληλουχιών για την περιοχή του εσωνίου 15 που εντοπίστηκε ο πολυμορφισμός rs6577583. Απεικονίζονται οι αλληλουχίες των 10 ασθενών που συγκρίθηκαν με την αλληλουχία αναφοράς (reference). Με κόκκινο εμφανίζεται ο πολυμορφισμός που εντοπίστηκε στα δείγματα.

3.4.6 Εντοπισμός νέου πολυμορφισμού στο εξόνιο 14

Μόνο ένας ασθενής (ALS77) με fALS από τους συνολικά 20 ασθενείς παρουσίασε τον πολυμορφισμό σε ετερόζυγη κατάσταση (T/C) που οφείλεται σε μια σημειακή μετάλλαξη μετάπτωσης (Εικόνες 3.12 και 3.13). Ο πολυμορφισμός αυτός εντοπίζεται στο κωδικόνιο που κωδικοποιεί το αμινοξύ υπ' αριθμόν 496 του εξωνίου 14 προκαλώντας την αντικατάσταση της βαλίνης από αλανίνη. Πρόκειται για αμινοξέα με παρόμοιες ιδιότητες πλευρικής αλυσίδας (μη φορτισμένη, αλειφατική). Η παρανοηματική αυτή μετάλλαξη βρίσκεται στην περιοχή DUF3395 του C-τελικού άκρου της πρωτεΐνης που φαίνεται ότι παίζει σημαντικό ρόλο στην αλληλεπίδραση της DNAJC11 πρωτεΐνης με άλλες πρωτεΐνες. Καθώς δεν υπάρχουν πληροφορίες για το συγκεκριμένο πολυμορφισμό από τη βιβλιογραφία, θεωρήθηκε σημαντικό να προχωρήσουμε στην αλληλούχιση όλων των δειγμάτων ασθενών που είχαμε στη διάθεσή μας καθώς επίσης και των 30 υγιών μαρτύρων, δίχως να εντοπίσουμε τον πολυμορφισμό σε κάποιο από αυτά τα δείγματα. Ωστόσο, η περαιτέρω μελέτη του πολυμορφισμού σε περισσότερα δείγματα ασθενών με ALS και κυρίως ατόμων που ανήκουν στην ίδια οικογένεια κρίνεται απαραίτητη για τη διαλεύκανση της σημασίας του στην νόσο.



Εικόνα 3.12: Εντοπισμός του νέου πολυμορφισμού στο δείγμα ALS77. Αλληλουχία της περιοχής του πολυμορφισμού στο εξόνιο 14 του *DNAJC11* γονιδίου όπως φαίνεται στο δείγμα ALS 77 (T/C, πάνω) σε ετερόζυγη κατάσταση σε σχέση με το υγιές άτομο (T/T, κάτω).

reference	AGTGCCTGGTGAAGGACTCGAAGCTCATCCTCACGGAGGCCTCCAAGGTACAGCAGCACC
K 185	AGTGCCTGGTGAAGGACTCGAAGCTCATCCTCACGGAGGCCTCCAAGGTACAGCAGCACC
K 140	AGTGCCTGGTGAAGGACTCGAAGCTCATCCTCACGGAGGCCTCCAAGGTACAGCAGCACC
K 176	AGTGCCTGGTGAAGGACTCGAAGCTCATCCTCACGGAGGCCTCCAAGGTACAGCAGCACC
ALS 77	AGTGCCTGGYGAAGGACTCGAAGCTCATCCTCACGGAGGCCTCCAAGGTACAGCAGCACC
ALS 61	AGTGCCTGGTGAAGGACTCGAAGCTCATCCTCACGGAGGCCTCCAAGGTACAGCAGCACC
K 130	AGTGCCTGGTGAAGGACTCGAAGCTCATCCTCACGGAGGCCTCCAAGGTACAGCAGCACC
K 183	AGTGCCTGGTGAAGGACTCGAAGCTCATCCTCACGGAGGCCTCCAAGGTACAGCAGCACC
K 180	AGTGCCTGGTGAAGGACTCGAAGCTCATCCTCACGGAGGCCTCCAAGGTACAGCAGCACC
K 174	AGTGCCTGGTGAAGGACTCGAAGCTCATCCTCACGGAGGCCTCCAAGGTACAGCAGCACC
K 158	AGTGCCTGGTGAAGGACTCGAAGCTCATCCTCACGGAGGCCTCCAAGGTACAGCAGCACC
K 166	AGTGCCTGGTGAAGGACTCGAAGCTCATCCTCACGGAGGCCTCCAAGGTACAGCAGCACC
ALS 194	AGTGCCTGGTGAAGGACTCGAAGCTCATCCTCACGGAGGCCTCCAAGGTACAGCAGCACC
K 161	AGTGCCTGGTGAAGGACTCGAAGCTCATCCTCACGGAGGCCTCCAAGGTACAGCAGCACC
K 155	AGTGCCTGGTGAAGGACTCGAAGCTCATCCTCACGGAGGCCTCCAAGGTACAGCAGCACC
K 189	AGTGCCTGGTGAAGGACTCGAAGCTCATCCTCACGGAGGCCTCCAAGGTACAGCAGCACC
K 197	AGTGCCTGGTGAAGGACTCGAAGCTCATCCTCACGGAGGCCTCCAAGGTACAGCAGCACC
K 194	AGTGCCTGGTGAAGGACTCGAAGCTCATCCTCACGGAGGCCTCCAAGGTACAGCAGCACC
K 198	AGTGCCTGGTGAAGGACTCGAAGCTCATCCTCACGGAGGCCTCCAAGGTACAGCAGCACC
K 169	AGTGCCTGGTGAAGGACTCGAAGCTCATCCTCACGGAGGCCTCCAAGGTACAGCAGCACC
ALS 72	AGTGCCTGGTGAAGGACTCGAAGCTCATCCTCACGGAGGCCTCCAAGGTACAGCAGCACC

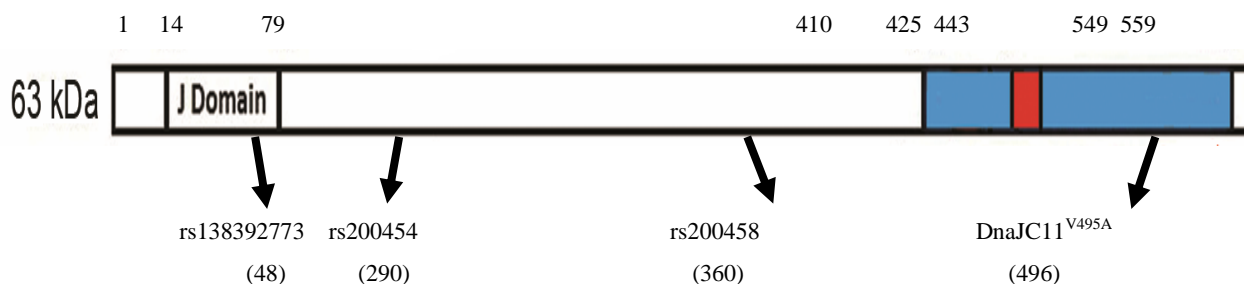
Εικόνα 3.13: Πολλαπλή ευθυγράμμιση αλληλουχιών για την περιοχή του εξωνίου 14 που εντοπίστηκε ο νέος πολυμορφισμός. Απεικονίζονται οι αλληλουχίες των 20 ασθενών που συγκρίθηκαν με την αλληλουχία αναφοράς (reference). Με μωβ εμφανίζεται ο πολυμορφισμός Y (από T σε C) που εντοπίστηκε στο δείγμα ALS77.

3.4.7 Ανασκόπηση πολυμορφισμών

Συγκεντρωτικά όλοι οι πολυμορφισμοί που ανιχνεύθηκαν, μαζί με διάφορα στοιχεία, παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.2. Οι πέντε από τους έξι είναι γνωστοί πολυμορφισμοί οι οποίοι έχουν ήδη καταχωρηθεί στη βάση δεδομένων. Μόνο μία σημειακή μετάλλαξη δεν έχει περιγραφεί προηγουμένως και αφορά στην περιοχή του εξωνίου 14 στον ασθενή ALS77. Τέσσερις από τους έξι πολυμορφισμούς είναι εξωνικοί και οι δύο είναι εσωνικοί. Όλοι οι πολυμορφισμοί εξετάστηκαν προσεκτικά στα αντίστοιχα φερογράμματα και επιβεβαιώθηκαν με δεύτερη αλληλούχιση. Αρχικά, η μελέτη ξεκίνησε με την αλληλούχιση 10 ασθενών (5 με σποραδική ALS και 5 με συγγενή ALS). Για τον πολυμορφισμό rs138392773 που εντοπίστηκε στο εξώνιο 2 καθώς και για τον νέο πολυμορφισμό που εντοπίστηκε στο εξώνιο 14 αλληλουχήθηκαν και οι υπόλοιποι διαθέσιμοι ασθενείς αλλά και υγιείς μάρτυρες καθώς θεωρήθηκε ότι πιθανόν να σχετίζονται με την παθογένεια της νόσου.

Πίνακας 3.2 Συγκεντρωτικά οι πολυμορφισμοί του *DNAJC11* που εντοπίστηκαν στα δείγματα των 20 ασθενών ALS. Με γκρι σκίαση απεικονίζεται ο πολυμορφισμός που δεν έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία. * Στην εναλλακτική αλληλουχία του ανθρώπινου γονιδιώματος (Celera, CHM1_1.1) η συγκεκριμένη βάση είναι C.

Κωδικός	Εξώνιο	Εσώνιο	Αλλαγή βάσης	Τύπος	Αμινοξική αλλαγή	Αριθμός ασθενών	Ζυγωτία	Ασθενής
rs41310361	-	1	T>G	άγνωστο	-	1/20	ετερόζυγος	K140
rs138392773	2	-	A>T	παρα-νοηματική	D48>V	1/20	ετερόζυγος	K189
rs200454	8	-	C>G	παρα-νοηματική	T290>S	1/10	ετερόζυγος	K176
rs200458*	10	-	T>C	συνώνυμη	-	10/10	8/10: C/C ομόζυγοι 2/10: T/C ετερόζυγοι	Όλοι
DNAJC11^{V496A}	14	-	T>C	παρα-νοηματική	V496>A	1/20	ετερόζυγος	ALS77
rs6577583*	-	15	T>C	άγνωστο	-	10/10	6/10: C/C ομόζυγοι 4/10: T/C ετερόζυγοι	Όλοι



Εικόνα 3.14: Σχηματική απεικόνιση των πολυμορφισμών στην κωδική περιοχή ανάλογα με την θέση τους στην ισομορφή 63 kDa του γονιδίου *DNAJC11*. Όπως φαίνεται στο σχήμα, ο πολυμορφισμός rs138392773 που εντοπίστηκε στο εξώνιο 2 βρίσκεται στη J περιοχή ενώ ο πολυμορφισμός *DNAJC11^{V296A}* στο εξώνιο 14 βρίσκεται στην DUF3395 περιοχή του C-τελικού άκρου της πρωτεΐνης. Στις παρενθέσεις αναφέρεται ο αριθμός του αμινοξέος που εντοπίστηκε ο πολυμορφισμός.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η ερευνητική ομάδα της κ. Ντούνη έχει δημιουργήσει πρόσφατα ένα νέο μοντέλο νευρομυϊκής νόσου στο ποντίκι (spastic) με την προσέγγιση της Πρόσθιας Γενετικής μέσω της τυχαίας μεταλλαξογένεσης με ENU (Ioakeimidis et al., 2014). Ο φαινότυπος αυτός, κληρονομείται με αυτοσωμικό υπολειπόμενο τρόπο και περιλαμβάνει αρκετά νευρολογικά χαρακτηριστικά, όπως ανώμαλη στάση των άκρων, μυϊκή αδυναμία, σπαστικότητα, τρόμος των άκρων, καχεξία και πρόωρο θάνατο. Νευροϊστοπαθολογική ανάλυση αποκάλυψε την ύπαρξη κενотоπιών στους κινητικούς νευρώνες του νωτιαίου μυελού και με ηλεκτρονική μικροσκοπίαδείχθηκε ότι πρόκειται για μιτοχόνδρια που είχαν χάσει τη φυσιολογική δομή τους. Με γενετική ανάλυση σύνδεσης διαπιστώθηκε ότι για το φαινόμενο ευθύνεται μια σημειακή μετάλλαξη σε εσώνιο του γονιδίου *DnaJC11* που επηρεάζει τη διαδικασία του ματίσματος στο 3' άκρο του μεταγραφήματος (Ioakeimidis et al., 2014). Η μετάλλαξη αυτή δημιούργησε μια νέα θέση ματίσματος με αποτέλεσμα την ένθεση μιας εσωνικής αλληλουχίας μήκους 109 bp στο μεταγράφημα. Αποτέλεσμα της μετάλλαξης ήταν η αλλαγή του αναγνωστικού πλαισίου και η αντικατάσταση των τελευταίων 51 αμινοξέων της 63kDa ισομορφής του *DNAJC11* από 43 διαφορετικά. Σε επίπεδο πρωτεΐνης, η μετάλλαξη μείωσε δραματικά τα επίπεδα της 63kDa ισομορφής στους περισσότερους ιστούς λειτουργώντας ως υπομορφική μετάλλαξη.

Η *DNAJC11* πρωτεΐνη είναι μέλος της οικογένειας των πρωτεϊνών J ή αλλιώς Hsp40. Οι DNAJ πρωτεΐνες είναι γνωστό ότι ρυθμίζουν τη μεσολαβούμενη από τις Hsp70 υδρόλυση του ATP, μέσω των J περιοχών τους, δρώντας ως συν-συνοδευτικές πρωτεΐνες (co-chaperones), αλλά ο λειτουργικός τους ρόλος είναι εξαιρετικά ετερογενής (Kampinga and Craig, 2010). Κάποιες από τις λειτουργίες που επιτελούν στο εσωτερικό των κυττάρων είναι η αναδίπλωση πεπτιδίων που δεν έχουν τη σωστή διαμόρφωση, η αναδίπλωση πρωτεϊνών κατά την πρωτεϊνοσύνθεση, η μεταφορά πρωτεϊνών στο πρωτεολυτικό σύστημα αποικοδόμησης και η μετακίνηση πρωτεϊνών δια μέσου μεμβρανών οργανιδίων. Καθώς ο άνθρωπος διαθέτει μόλις 11 Hsp70s θεωρείται ότι το πλήθος των λειτουργιών τους οφείλεται στην αλληλεπίδρασή τους με τις πρωτεΐνες DNAJ.

Η Αμυοτροφική Πλευρική Σκλήρυνση (Amyotrophic Lateral Sclerosis, ALS) είναι μια θνησιγόνος νευροεκφυλιστική νόσος που χαρακτηρίζεται από τον πρόωρο εκφυλισμό και θάνατο των άνω και κάτω κινητικών νευρώνων. Οι ασθενείς εμφανίζουν ποικίλα συμπτώματα

αλλά τελικό στάδιο της νόσου είναι η αναπνευστική ανεπάρκεια ή πνευμονία λόγω παράλυσης των αναπνευστικών μυών με αποτέλεσμα το θάνατο των ασθενών. Συνήθως η νόσος εμφανίζεται σε άτομα ηλικίας μεταξύ 45-60 ετών και είναι κατά 20% πιο κοινή σε άντρες παρά σε γυναίκες. Ωστόσο, καθώς η ηλικία αυξάνεται, αποκτούν τις ίδιες πιθανότητες εμφάνισης της νόσου. Ανάλογα με την αιτία εμφάνισής της, η ALS χωρίζεται σε σποραδική (sALS) και συγγενή (fALS). Η sALS εμφανίζεται σε άτομα χωρίς οικογενειακό ιστορικό και αποτελεί το 90% όλων των περιπτώσεων ALS. Πιστεύεται ότι αιτία εμφάνισης της sALS είναι ένας συνδυασμός περιβαλλοντικών και γενετικών παραγόντων. Η fALS εμφανίζεται όταν τα άτομα κληρονομούν το μεταλλαγμένο γονίδιο και αποτελούν το 10% των περιπτώσεων ALS.

Έχει βρεθεί ότι για την εμφάνιση της ALS ευθύνονται κυρίως μεταλλάξεις του γονιδίου SOD1 (Rosen et al., 1993). Συγκεκριμένα, μεταλλάξεις του SOD1 ευθύνονται περίπου για το 20% των περιπτώσεων fALS και για το 1-2% όλων των περιπτώσεων ALS. Αν και το γονίδιο SOD1 είναι πυρηνικό οι μεταλλάξεις του έχουν επίπτωση στα μιτοχόνδρια προσβεβλημένων ιστών. Υπάρχουν διάφοροι μηχανισμοί με τους οποίους οι μεταλλαγμένες πρωτεΐνες προσβάλλουν τη λειτουργία των μιτοχονδρίων. Τα συσσωματώματα είναι ένα παθολογικό γνώρισμα πολλών νευροεκφυλιστικών διαταραχών που έχουν παρατηρηθεί και στο κυτταρόπλασμα πρωτεϊνών ατόμων με sALS και fALS καθώς και σε διαγονιδιακά ποντίκια με μετάλλαξη του SOD1. Η βλάβη των μιτοχονδρίων αποτελεί ένα ακόμα χαρακτηριστικό των νευροεκφυλιστικών νόσων. Τα μιτοχόνδρια θεωρούνται πιθανοί στόχοι τοξικότητας της ALS από ιστοπαθολογικές παρατηρήσεις των κενотоπίων και διαστολή των μιτοχονδρίων με αποδιοργανωμένες ακρολοφίες και μεμβράνες στους κινητικούς νευρώνες και μυς σε ασθενείς με sALS και fALS (Afifi et al., 1966; Hirano et al., 1984a, 1984b). Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι μεταλλάξεις στα γονίδια TDP-43 (Kabashi et al., 2008; Sreedharan et al., 2008), FUS (Mackenzie et al., 2010), C9ORF72 (Kin et al., 2012), NEFH (Claire et al., 2006), OPTN (Maruyama et al., 2010), και UBQLN2 (Gilpin et al., 2015) σχετίζονται με την εμφάνιση ALS.

Στα πλαίσια της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής επιχειρήσαμε να μελετήσουμε την παρουσία πολυμορφισμών στο γονίδιο *DNAJC11* σε ασθενείς με νευροεκφυλιστική νόσο ALS. Για το σκοπό αυτό, λήφθηκαν δείγματα υγείων ατόμων και ασθενών με ALS από την Μονάδα Γενετικής του Νευρικού Συστήματος της Α' Νευρολογικής Κλινικής Πανεπιστημίου Αθηνών στο Αιγινήτειο Νοσοκομείο. Για κάθε δείγμα υπήρχαν πληροφορίες για τη μορφή της ALS, το φύλο και την ηλικία των ατόμων. Αρχικά αλληλουχήθηκαν 10 ασθενείς με fALS και

sALS και σε κάποιες περιπτώσεις όταν εντοπίστηκαν πολυμορφισμοί που προκαλούν αλλαγή στην αμινοξική αλληλουχία, ακολούθησε η αλληλούχιση άλλων 10 δειγμάτων ασθενών με ALS και 30 υγείων μαρτύρων. Αρχικά, το πρόγραμμα Clustal Omega χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση της αλληλούχισης κάθε εξωνίου έχοντας ως αναφορά την αντίστοιχη αλληλουχία του γονιδίου από τη βάση δεδομένων Ensembl. Με την πολλαπλή ευθυγράμμιση των αλληλουχιών, ήταν εύκολος ο εντοπισμός πολυμορφισμών οι οποίοι επιβεβαιώθηκαν με δεύτερη αλληλούχιση. Ταυτόχρονα με την πολλαπλή ευθυγράμμιση των αλληλουχιών, οι πολυμορφισμοί αναλύθηκαν με τα φερογράμματα. Με αυτόν τον τρόπο αξιολογήθηκαν τα αποτελέσματα της αλληλούχισης και κυρίως στις περιοχές που παρουσίασαν πολυμορφισμούς.

Πολυμορφισμοί εντοπίστηκαν στα εσώνια 1 και 15 καθώς και στα εξώνια 2, 8, 10 και 14. Από τους έξι πολυμορφισμούς τέσσερις δεν φαίνεται να έχουν κλινική σημασία είτε επειδή είναι σε εσώνια είτε επειδή πρόκειται για συνώνυμες μεταλλάξεις είτε επειδή βρίσκονται σε μεγάλη συχνότητα στον πληθυσμό. Συγκεκριμένα, στο δείγμα K140 εντοπίστηκε ο πολυμορφισμός *rs41310361* στην περιοχή του πρώτου εσωνίου, δηλαδή σε μη κωδική περιοχή. Πρόκειται για μια σημειακή μετάλλαξη μεταστροφής από T σε G σε ετερόζυγη κατάσταση που έχει καταγραφεί στο παρελθόν και πιθανόν δεν έχει κάποια κλινική σημασία καθώς δεν βρίσκεται σε περιοχές που καθορίζουν το μάτισμα. Επίσης, όλα τα δείγματα εμφάνισαν πολυμορφισμό μετάπτωσης από T σε C στην αλληλούχιση του εσωνίου 15 (*rs6577583*). Ο πολυμορφισμός αυτός φαίνεται ότι βρίσκεται σε μεγάλη συχνότητα στον πληθυσμό μιας και η βάση T εμφανίζεται στην βάση δεδομένων Ensembl ενώ η βάση C εντοπίζεται στην βάση δεδομένων Celera. Στην ανάλυσή μας έδειξε ότι 6 στους 10 ασθενείς είναι ομόζυγοι (C/C) και 4 στους 10 ετερόζυγοι (T/C). Ο πολυμορφισμός *rs6577583* πολύ πιθανόν δεν εμπλέκεται στην παθογένεια της νόσου αφού έχει μεγάλη συχνότητα στον πληθυσμό, βρίσκεται σε εσωνική περιοχή και δεν εντοπίζεται εντός σημείων διακλάδωσης (Branch Points) ή θέσεων ματίσματος.

Οι μεταλλάξεις στα εξώνια 8 και 10 επίσης δεν παρουσιάζουν κάποιο ιδιαίτερο ενδιαφέρον. Συγκεκριμένα, ο πολυμορφισμός *rs200454* σύμφωνα με τη βάση δεδομένων Ensembl πρόκειται για σημειακή μεταλλαγή μεταστροφής από G σε C στο κωδικόνιο που κωδικοποιεί το υπ' αριθμόν 290 αμινοξύ της πρωτεΐνης προκαλώντας την αντικατάσταση της θρεονίνης από σερίνη. Τα αμινοξέα σερίνη και θρεονίνη ανήκουν στην ίδια κατηγορία των αμινοξέων με πολικές μη φορτισμένες πλευρικές αλυσίδες και έτσι διαθέτουν παρόμοιες ιδιότητες. Επίσης, το 290 αμινοξύ εντοπίζεται περίπου στο μέσο της πρωτεΐνης, σε μια περιοχή με μη

καθορισμένη δομή. Λόγω της ευρείας διάδοσης του πολυμορφισμού αυτού στον πληθυσμό (Henrich et al., 2007) δεν θεωρήθηκε ότι μπορεί να εμπλέκεται στην παθογένεια της νόσου. Όσον αφορά το εξώνιο 10, όλα τα δείγματα παρουσίασαν μια συνώνυμη μετάλλαξη (*rs200458*), στην οποία η βάση T αντικαταστάθηκε από τη βάση C και έτσι αντί της τριπλέτας [GGT] εμφανίστηκε η τριπλέτα [GGC] χωρίς αμινοξική αλλαγή λόγω της συνώνυμης μετάλλαξης. Συνεπώς, ο πολυμορφισμός αυτός επίσης δεν πρέπει να επηρεάζει την εμφάνιση της νόσου.

Από τους πολυμορφισμούς που έχουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον είναι ο πολυμορφισμός *rs138392773* στο εξώνιο 2 και ο νέος πολυμορφισμός που εντοπίστηκε στο εξώνιο 14, όπου και στις δύο περιπτώσεις γίνεται αλλαγή ενός αμινοξέος από άλλο. Ο πολυμορφισμός *rs138392773* στο εξώνιο 2 εντοπίστηκε στο δείγμα K180 και πρόκειται για μετάλλαξη μεταστροφής από A σε T με αποτέλεσμα την αντικατάσταση του 48^{ου} αμινοξέος από ασπαρτικό οξύ [GAC] σε βαλίνη [GTC]. Τα δυο αυτά αμινοξέα έχουν εντελώς διαφορετικές ιδιότητες μεταξύ τους. Ο πολυμορφισμός αυτός βρίσκεται στη J περιοχή, πολύ κοντά στην συντηρημένη τριπλέτα αμινοξέων HPD η οποία υπάρχει σε όλες τις πρωτεΐνες J και έχει μεγάλη σημασία στη λειτουργία των πρωτεϊνών DNAJ. Για τους λόγους αυτούς, υποθέσαμε ότι πιθανώς εμπλέκεται στην παθογένεια της νόσου και γι' αυτό αλληλουχήθηκαν όλα τα δείγματα των ασθενών αλλά και των 30 υγιών μαρτύρων στους οποίους δεν βρέθηκε κάποιος πολυμορφισμός. Συνεπώς, ο πολυμορφισμός αυτός χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση τόσο σε περισσότερα δείγματα ασθενών με ALS όσο και σε υγιείς μάρτυρες ώστε να διαπιστωθεί εάν πρόκειται για έναν κοινό πολυμορφισμό στον πληθυσμό και εάν ισχύει αυτό να υπολογιστεί η συχνότητά του. Σε κάθε περίπτωση βέβαια πρέπει να διερευνηθεί εάν σχετίζεται με την εκδήλωση της νόσου.

Εκτός του πολυμορφισμού *rs138392773* στο εξώνιο 2, σημαντικός για την παθογένεια της νόσου θεωρήθηκε και ο πολυμορφισμός μετάπτωσης από T σε C που εντοπίστηκε για πρώτη φορά στο εξώνιο 14 στη περιοχή DUF3395. Ο πολυμορφισμός εμφανίστηκε σε έναν ασθενή με fALS (ALS77) σε ετερόζυγη κατάσταση (T/C) ενώ δεν εντοπίστηκε σε δείγματα 30 υγιών μαρτύρων. Αποτέλεσμα αυτού είναι η αλλαγή του υπ' αριθμόν 496 αμινοξέος από βαλίνη σε αλανίνη (GTG → GCG), τα οποία ανήκουν στην κατηγορία των αμινοξέων με αλειφατική πλευρική αλυσίδα. Πρόκειται για έναν πολυμορφισμό ο οποίος επιβεβαιώθηκε με δεύτερη αλληλούχιση της περιοχής αλλά για τον οποίον δεν υπάρχουν πληροφορίες. Δεδομένου, όμως, ότι εντοπίζεται σε κωδική περιοχή και μάλιστα στην περιοχή DUF3395 που πιθανόν παίζει

ρόλο στην αλληλεπίδραση της DNAJC11 πρωτεΐνης με άλλες πρωτεΐνες (Ioakeimidis et al., 2014), θα μπορούσε να σχετίζεται με την εκδήλωση της νόσου και για το λόγο αυτό χρήζει περαιτέρω μελέτης.

Συμπερασματικά, στην παρούσα μελέτη για πρώτη φορά ελέχθησαν ασθενείς με ALS για πολυμορφισμούς στο γονίδιο *DNAJC11*. Περαιτέρω μελέτες θα μπορούσαν να επιβεβαιώσουν αν ο πολυμορφισμός *rs138392773* στο εξόνιο 2 και ο νέος πολυμορφισμός στο εξόνιο 14 συσχετίζεται με την εκδήλωση ALS. Αυτό θα μπορούσε να γίνει σε πρώτη φάση με τον έλεγχο των πολυμορφισμών αυτών σε περισσότερους ασθενείς και ειδικά σε μέλη των οικογενειών τους, ειδικά για τον νέο πολυμορφισμό που προέρχεται από fALS, αλλά και σε υγιείς μάρτυρες. Παράλληλα, θα μπορούσε να ελεγχθεί εάν οι μεταλλάξεις που ανιχνεύθηκαν επηρεάζουν την λειτουργικότητα της DNAJC11 πρωτεΐνης. Καθώς τα spastic ποντίκια εμφάνισαν παρόμοια συμπτώματα με αυτά των ασθενών, είναι επίσης σημαντική η στροφή των ερευνών στην κατανόηση της φυσιολογικής λειτουργίας του *DNAJC11* και την πιθανή συσχέτιση του γονιδίου με την νόσο. Αυτό ίσως να είχε ως αποτέλεσμα την κατανόηση της παθοφυσιολογίας της ALS καθιστώντας έτσι πιο εφικτό την εύρεση μιας αποτελεσματικής θεραπείας.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Acin-Perez, R., Fernandez-Silva, P., Peleato, M.L., Perez-Martos, A., and Enriquez, J.A. (2008). Respiratory active mitochondrial supercomplexes. *Mol Cell* 32, 529-539.

Alkhaja, A.K., Jans, D.C., Nikolov, M., Vukotic, M., Lytovchenko, O., Ludewig, F., Schliebs, W., Riedel, D., Urlaub, H., Jakobs, S., *et al.* (2012). MINOS1 is a conserved component of mitofilin complexes and required for mitochondrial function and cristae organization. *Molecular biology of the cell* 23, 247-257.

An, J., Shi, J., He, Q., Lui, K., Liu, Y., Huang, Y., and Sheikh, M.S. (2012). CHCM1/CHCHD6, novel mitochondrial protein linked to regulation of mitofilin and mitochondrial cristae morphology. *J Biol Chem* 287, 7411-7426.

Boillee, S., Velde, V.C., Cleveland, W.D. (2006). ALS: A disease of motor neurons and their Nonneuronal Neighbors. *Neuron* 52, 39-59.

Chacinska, A., Koehler, C.M., Milenkovic, D., Lithgow, T., and Pfanner, N. (2009). Importing mitochondrial proteins: machineries and mechanisms. *Cell* 138, 628-644.

Chung, M.J., and Suh, Y.L. (2002). Ultrastructural changes of mitochondria in the skeletal muscle of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Ultrastruct Pathol* 26, 3-7.

Claire, L., Simpson, Ammar, Al-Ch. (2006). Amyotrophic lateral sclerosis as a complex genetic disease. *BBA-Molecular Basis of Amyotrophic lateral sclerosis* 1762, 973-985.

Cook, C.M., Vinuesa, G.C., Goodnow, C.C. (2006). ENU-mutagenesis: insight into immune function and pathology. *Elsevier Current Opinion In Immunology* 18, 627-633.

Dal Canto, M.C., and Gurney, M.E. (1994). Development of central nervous system pathology in a murine transgenic model of human amyotrophic lateral sclerosis. *Am. J. Pathol.* 145, 1271-1279.

Darshi, M., Mendiola, V.L., Mackey, M.R., Murphy, A.N., Koller, A., Perkins, G.A., Ellisman, M.H., and Taylor, S.S. (2011). ChChd3, an inner mitochondrial membrane protein, is essential for maintaining crista integrity and mitochondrial function. *J Biol Chem* 286, 2918-2932.

DiMauro, S., and Schon, E.A. (2008). Mitochondrial disorders in the nervous system. *Annu Rev Neurosci* 31, 91-123.

Douni E, Rinotas V, Makrinou E, Zwerina J, Penninger JM, Eliopoulos E, Schett G, Kollias G. (2012). A RANKL G278R mutation causing osteopetrosis identifies a functional amino acid essential for trimer assembly in RANKL and TNF. *Hum Mol Genet.*; 21(4):784-98.

Ferraiuolo, L., Meyer, K., and Kaspar, B. (2013). The Use of Human Samples to Study Familial and Sporadic Amyotrophic Lateral Sclerosis: New Frontiers and Challenges. *InTech* DOI: 10.5772/56487.

Gilpin, K. M., Chang, L., Monteinero, M. J. (2015). ALS-linked mutations in ubiquilin-2 or hnRNPA1 reduce interaction between ubiquilin-2 and hnRNPA1. *Hum. Mol. Genet.* 24, 2565-2577.

Guarani V, McNeill EM, Paulo JA, Huttlin EL, Fröhlich F, Gygi SP, Van Vactor D, Harper JW. (2015). QIL1 is a novel mitochondrial protein required for MICOS complex stability and cristae morphology. *Elife*, 4. doi: 10.7554/eLife.06265.

Harner, M., Korner, C., Walther, D., Mokranjac, D., Kaesmacher, J., Welsch, U., Griffith, J., Mann, M., Reggiori, F., and Neupert, W. (2011). The mitochondrial contact site complex, a determinant of mitochondrial architecture. *The EMBO journal* 30, 4356-4370.

Higgins, C.M., Jung, C., and Xu, Z (2003). ALS-associated mutant SOD1G93A causes mitochondrial vacuolation by expansion of the intermembrane space and by involvement of SOD1 aggregation and peroxisomes. *BMC Neurosci.* 22, RC215.

Hirano, A., Donnenfeld, H., Sasaki, S., and Nakano, I. (1984). Fine structural observations of neurofilamentous changes in amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 43, 461-470.

Hoppins, S., Collins, S.R., Cassidy-Stone, A., Hummel, E., Devay, R.M., Lackner, L.L., Westermann, B., Schuldiner, M., Weissman, J.S., and Nunnari, J. (2011). A mitochondrial-focused genetic interaction map reveals a scaffold-like complex required for inner membrane organization in mitochondria. *J Cell Biol* 195, 323-340.

Hoppins, S., Lackner, L., and Nunnari, J. (2007). The machines that divide and fuse mitochondria. *Annu Rev Biochem* 76, 751-780.

Horton, W. A., Eldredge, R., and Brody, J. A. (1976). Familial motor neuron disease: evidence for at least three different types. *Neurology* 26, 460-665.

Ioakeimidis, F., Ott, C., Kozjak-Pavlovic, V., Violitzi, F., Rinotas, V., Makrinou, E., Eliopoulos, E., Fasseas, C., Kollias, G., Douni, E. (2014). A Splicing Mutation in the Novel Mitochondrial Protein DNAJC11 Causes Motor Neuron Pathology Associated with Cristae Disorganization, and Lymphoid Abnormalities in Mice. *PLoS ONE* 9, e104237. DOI: 10.1371/journal.pone.0104237.

Kampinga, H.H., and Craig, E.A. (2010). The HSP70 chaperone machinery: J proteins as drivers of functional specificity. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11, 579-592.

Karbowski, M., and Neutzner, A. (2012). Neurodegeneration as a consequence of failed mitochondrial maintenance. *Acta Neuropathol* 123, 157-171.

Kong, J., and Xu, Z (1998). Massive mitochondrial degeneration in motor neurons triggers the onset of amyotrophic lateral sclerosis in mice expressing a mutant SOD1. *J Neurosci.* 18, 3241-3250.

Kwong, J.Q., Beal, M.F., and Manfredi, G. (2006). The role of mitochondria in inherited neurodegenerative diseases. *J Neurochem* 97, 1659-1675.

Mannella, C.A. (2006b). Structure and dynamics of the mitochondrial inner membrane cristae. *Biochim Biophys Acta* 1763, 542-548.

Maruyama, H., Morino, H., Ito, H., Izumi, Y., Kato, H., Watanabe, Y., Kinoshita, Y., Kamada, M., Nodera, H., Suzuki, H., Komure, O., Matsuura, S., Kobatake, K., Morimoto, N., Abe, K., Suzuki, N., Aoki, M., Kawata, A., Hirai, T., Kato, T., Ogasawara, K., Hirano, A., Takumi, T.,

- Kusaka, H., Haqiwara, K., Kaji, R., Kawakami, H. (2010). Mutations of optineurin in amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 465, 223-226.
- Mattson, M.P., Gleichmann, M., and Cheng, A. (2008). Mitochondria in neuroplasticity and neurological disorders. *Neuron* 60, 748-766.
- Miller S. A., Dykes D. D. and Polesky H. F. (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids* 16, 1215.
- Mulder, D. W., Kurland, L. T., Offord, K. P., and Beard, C. M. (1986). Familial adult motor neuron disease: amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* 36, 511-517.
- Munn, E.A. (1974). *The structure of mitochondria* (London ; New York, Academic Press).
- Nardin, R.A., and Johns, D.R. (2001). Mitochondrial dysfunction and neuromuscular disease. *Muscle Nerve* 24, 170-191.
- Neu-Yilik, G., and Kulozik, A.E. (2008). NMD: multitasking between mRNA surveillance and modulation of gene expression. *Adv Genet* 62, 185-243.
- Ott, C., Ross, K., Straub, S., Thiede, B., Gotz, M., Goosmann, C., Krischke, M., Mueller, M.J., Krohne, G., Rudel, T., *et al.* (2012). Sam50 functions in mitochondrial intermembrane space bridging and biogenesis of respiratory complexes. *Mol Cell Biol* 32, 1173-1188.
- Perkins, G.A., and Frey, T.G. (2000). Recent structural insight into mitochondria gained by microscopy. *Micron* 31, 97-111.
- Reichert, A.S., and Neupert, W. (2002). Contact sites between the outer and inner membrane of mitochondria-role in protein transport. *Biochim Biophys Acta* 1592, 41-49.
- Rosen, D. R., Siddique, T., Patterson, D., Figlewicz, D. A., Sapp, P., Hentati, A., Donaldson, D., Goto, J., O'Regan, J. P., Deng, H.-X., Rahmani, Z., Krizus, A., McKenna-Yasek, D., Cayabyab, A., Gaston, S. M., Berger, R., Tanzi, R. E., Halperin, J. J., Herzfeldt, B., Van den Bergh, R., Hung, W.-Y., Bird, T., Deng, G., Mulder, D. W., Smyth, C., Laing, N. G., Soriano, E., Pericak-Vance, M. A., Haines, J., Rouleau, G. A., Gusella, J. S., Horvitz, H. R., and Brown, R. H., Jr. (1993). Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 362, 59-62.

Scorrano, L., Ashiya, M., Buttle, K., Weiler, S., Oakes, S.A., Mannella, C.A., and Korsmeyer, S.J. (2002). A distinct pathway remodels mitochondrial cristae and mobilizes cytochrome c during apoptosis. *Dev Cell* 2, 55-67.

Siddique, T., Pericak-Vance, M. A., Brooks, B. R., Roos, R. P., Hung, W.-Y., Antel, J. P., Munsat, T. L., Phillips, K., Warner, K., Speer, M., Bias, W. B., Siddique, N. A., and Roses, A. D. (1989). Linkage analysis in familial amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* 39, 919-925.

von der Malsburg, K., Muller, J.M., Bohnert, M., Oeljeklaus, S., Kwiatkowska, P., Becker, T., Loniewska-Lwowska, A., Wiese, S., Rao, S., Milenkovic, D., *et al.* (2011). Dual role of mitofilin in mitochondrial membrane organization and protein biogenesis. *Dev Cell* 21, 694-707.

Wallace, D.C. (2001). Mouse models for mitochondrial disease. *Am J Med Genet* 106, 71-93.

Wallace D. C. and WeiWei Fan (2009). The pathophysiology of mitochondrial disease as modeled in the mouse. *Genes* 23, 1714–1736.

Wong, C.P., Pardo, A.C., Borchelt, R.D., Lee, K.M., Copeland, G.N., Jenkins, A.N., Sisodia, S.S., Cleveland, W.D., Prince L.D. (1995). An adverse property of a familial ALS-linked SOD1 mutation causes motor neuron disease characterized by vacuolar degeneration of mitochondria. *Neuron* 14, 1105-1116.

Xie, J., Marusich, M.F., Souda, P., Whitelegge, J., and Capaldi, R.A. (2007). The mitochondrial inner membrane protein mitofilin exists as a complex with SAM50, metaxins 1 and 2, coiled-coil-helix coiled-coil-helix domain-containing protein 3 and 6 and DnaJC11. *FEBS letters* 581, 3545-3549.

Zeviani, M., and Di Donato, S. (2004). Mitochondrial disorders. *Brain* 127, 2153-2172.

Zick, M., Rabl, R., and Reichert, A.S. (2009). Cristae formation-linking ultrastructure and function of mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1793, 5-19.