



ΤΜΗΜΑ
**Βιοχημείας &
Βιοτεχνολογίας**
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

**Ανίχνευση μεταλλάξεων στα μιτοχονδριακά γονίδια
tRNA^{Arg} και tRNA^{Glu} σε ασθενείς με Χρόνια
Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια (ΧΑΠ)**

**Detection of mutations in mitochondrial tRNA^{Arg} and
tRNA^{Glu} genes in patients with Chronic Obstructive
Pulmonary Disease (COPD)**

Πτυχιακή Εργασία

Καρέλα Μαρία του Νικολάου

Λάρισα 2023

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

Ζίφα Αιμιλία (Επιβλέπουσα Καθηγήτρια)

Επίκουρος Καθηγήτρια Βιολογίας / Νευροβιολογίας, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Σταμάτης Κωνσταντίνος

Μέλος Εργαστηριακού Διδακτικού Προσωπικού (Ε.ΔΙ.Π.), Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Δανιήλ Ζωή

Καθηγήτρια Πνευμονολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Ευχαριστίες

Για την παρούσα πτυχιακή εργασία θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στην επιβλέπουσά μου κυρία Ζίφα Αιμιλία για όλη την υποστήριξη, την εμπιστοσύνη και τις συμβουλές της, τον κύριο Σταμάτη Κωνσταντίνο ο οποίος ήταν πάντα εκεί για όλα τα ερωτήματα και προβλήματα που προέκυψαν κατά την πραγματοποίηση των πειραμάτων, την κυρία Ζωή Δανιήλ και την κυρία Ουρανία Κώτσιου για τη σημαντική συμβολή τους στην επιστημονική μου κατάρτιση επάνω στο ιατρικό κομμάτι της πτυχιακής μου και στη διαχείριση των δεδομένων των ασθενών, τους υποψήφιους διδάκτορες του εργαστηρίου για τις συμβουλές τους και την προθυμία τους να βοηθήσουν όποτε προέκυπτε κάποιο πρόβλημα και φυσικά τη συμφοιτήτριά μου Καφίδα Μιχαέλα με την οποία πραγματοποιήσαμε παράλληλα τα πειράματά μας και υποστηρίξαμε η μία την άλλη σε όλες τις δυσκολίες που αντιμετωπίσαμε, και στην οποία εύχομαι καλό πτυχίο και καλή σταδιοδρομία!

Κλείνοντας, θα ήταν μεγάλη παράληψη να μην συμπεριλάβω στις ευχαριστίες της πτυχιακής μου την οικογένειά μου και τους φίλους μου, οι οποίοι όπως πάντα με στήριξαν πάρα πολύ καθ'όλη τη διάρκεια της φοίτησής μου στο τμήμα.

Περιεχόμενα

Περίληψη.....	6
Abstract	7
1. Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια (ΧΑΠ).....	8
1.1 Ορισμός	8
1.2 Παθογένεια	8
1.3 Κλινική εικόνα	9
1.4 Διάγνωση.....	10
1.5 Απουσία αποτελεσματικής θεραπείας	10
1.6 Ιστολογικά ευρήματα	10
1.7 Ευρήματα και παρατηρήσεις σε κυτταρικό επίπεδο	13
2. Μιτοχόνδρια και ΧΑΠ	14
2.1 Τα μιτοχόνδρια ως ενδοκυτταρικά οργανίδια	16
2.2 Το μιτοχονδριακό DNA (mtDNA).....	16
2.3 Παραγωγή ROS στα μιτοχόνδρια	18
2.4 Μιτοχόνδρια και ασθένειες	19
3. Μοριακή βάση της νόσου	21
3.1 Κυτταρική γήρανση	21
3.2 Έλλειψη αποτελεσματικής αντιοξειδωτικής άμυνας.....	22
3.3 Ίνωση	22
3.4 Επίδραση των ROS στα τελομερή.....	23
3.5 Απορρύθμιση της βιογένεσης των μιτοχονδρίων.....	24
3.6 Αυξημένη μιτοχονδριακή σχάση και μειωμένη μιτοφαγία	24
3.7 Βλάβες στο mtDNA.....	26
3.8 Σύνοψη επίδρασης οξειδωτικού stress στη λειτουργία των μιτοχονδρίων σε ασθενείς με ΧΑΠ	26
4 Μιτοχονδριακά tRNAs και συσχέτιση με ασθένειες.....	27
5 Σκοπός της εργασίας	29
6 Υλικά και μέθοδοι.....	30
6.1 Απομόνωση ολικού DNA από δείγμα ολικού αίματος ασθενών με ΧΑΠ	30
6.2 Ηλεκτροφόρηση απομονωμένων δειγμάτων DNA με χρήση πηκτής αγαρόζης	34
6.3 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)	39
6.4 Ποιοτικός προσδιορισμός των PCR προϊόντων.....	44
6.5 Πολυμορφισμός μονόκλωνης διαμόρφωσης – SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism)	45
6.5.1 Παρασκευή πηκτωμάτων πολυακρυλαμιδίου.....	46

6.5.2 Χρώση πηκτωμάτων πολυακρυλαμιδίου με διάλυμα νιτρικού αργύρου	49
6.6 Καθαρισμός προϊόντων PCR	51
6.7 Αλληλούχιση DNA	52
7 Αποτελέσματα	54
7.1 Απομόνωση DNA	54
7.2 Έλεγχος επιτυχούς ενίσχυσης των mt tRNA ^{Arg} και mt tRNA ^{Glu} μέσω ηλεκτροφόρησης των PCR προϊόντων	55
7.3 Αποτελέσματα SSCP και εύρεση κοινών προτύπων ηλεκτροφόρησης	57
7.4 Αποτελέσματα αλληλούχισης κατά Sanger	59
8 Συμπεράσματα/Συζήτηση	62
Βιβλιογραφία	74

Περίληψη

Η παρούσα πτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, με στόχο την ανίχνευση μεταλλάξεων στα μιτοχονδριακά γονίδια που κωδικοποιούν για τα tRNA^{Arg} και tRNA^{Glu} σε ασθενείς με Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια (ΧΑΠ). Η ΧΑΠ είναι μία φλεγμονώδης νόσος των πνευμόνων που χαρακτηρίζεται από μείωση της ροής του αέρα στους αεραγωγούς και οφείλεται περισσότερο συχνά σε περιβαλλοντικούς παρά σε γενετικούς παράγοντες. Η πιο σύνηθης αιτία εμφάνισής της είναι το κάπνισμα. Το κάπνισμα προκαλεί οξειδωτικό stress στον οργανισμό, με συνέπεια να επηρεάζεται η λειτουργία των μιτοχονδρίων. Είναι επομένως σημαντικό να διερευνηθεί η ύπαρξη μεταλλάξεων στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα ασθενών με ΧΑΠ, ώστε να εξεταστεί η πιθανή συσχέτισή τους με την προδιάθεση για την εμφάνιση της νόσου ή με την παθογένειά της. Στην παρούσα εργασία λοιπόν διερευνήθηκε η ύπαρξη μεταλλάξεων στα γονίδια mt-tRNA^{Arg} και mt-tRNA^{Glu} σε 38 ασθενείς με ΧΑΠ. Τα δείγματα προήλθαν από το Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο της Λάρισας και ήταν δείγματα αίματος. Από το αίμα έγινε πρώτα απομόνωση του μιτοχονδριακού DNA. Στη συνέχεια, ακολούθησε ενίσχυση μόνο των συγκεκριμένων γονιδίων, με τη βοήθεια της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) και αφού επιβεβαιώθηκε η επιτυχής ενίσχυση μόνο των γονιδίων και όχι παραπροϊόντων, ακολούθησε η ανάλυση του πολυμορφισμού διαμόρφωσης μονόκλωνων αλυσίδων (SSCP). Τα δείγματα DNA από τους 38 ασθενείς ομαδοποιήθηκαν ανάλογα με το πρότυπο ηλεκτροφορητικής κινητικότητας που παρουσίασαν μετά τη διαδικασία της SSCP και από κάθε ομάδα αλληλουχήθηκε αντιπροσωπευτικά ένα δείγμα. Τα αποτελέσματα της αλληλούχισης υπέδειξαν την ύπαρξη της μετάλλαξης T10463C στο mt-tRNA^{Arg} σε 4/38 ασθενείς, της μετάλλαξης A10398G στο MT-ND3 σε 14/38 ασθενείς και της μετάλλαξης A14696G στο mt-tRNA^{Glu} σε 1/38 ασθενείς. Από αυτές τις μεταλλάξεις, οι T10463C και A10398G έχουν ανιχνευτεί και σε άλλες πνευμονικές νόσους, ενώ η A14696G όχι. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώνουν την ανάγκη συνέχισης της έρευνας για συσχέτιση των μεταλλάξεων στο mtDNA με την παθογένεια της ΧΑΠ.

Λέξεις κλειδιά: Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια (ΧΑΠ), παθογένεια, μιτοχονδριακή δυσλειτουργία, μιτοχονδριακό DNA (mtDNA), μεταλλάξεις, μιτοχονδριακό tRNA (mt-tRNA).

Abstract

This thesis was carried out at the Genetic, Comparative and Evolutionary Laboratory of the department of Biochemistry and Biotechnology at the University of Thessaly. The aim of the project was the detection of mutations in mitochondrially encoded tRNA arginine (mt-tRNA^{Arg}) and tRNA glutamic acid (mt-tRNA^{Glu}) in patients suffering from Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD). COPD is an inflammatory disease affecting the lungs, that is most often caused by environmental rather than genetic factors. The most common such factor is smoking. Smoking leads to the generation of oxidative stress in the body and as a result, the natural functions that take place in mitochondria are disrupted. So, it is worth investigating the presence of mutations in the mitochondrial DNA of COPD patients, in order to study the possible correlation between the mutations and the predisposition to COPD or the pathogenesis of the disease. In this study, the presence of mutations in mt-tRNA^{Arg} and mt-tRNA^{Glu} was investigated on 38 COPD patients. The necessary blood samples were obtained by the University Hospital of Larisa. The first step was the extraction of pure mtDNA by the blood samples. Following this, the specific genes were amplified by the polymerase chain reaction (PCR) and after the successful amplification was confirmed, the single strand conformation polymorphism (SSCP) protocol was applied. The 38 DNA samples were grouped based on their electrophoretic mobility model (SSCP model), and a representative sample from each group was sent for sequencing. The results showed the presence of the T10463C mutation in the mt-tRNA^{Arg} gene of 4/38 patients, the A10398G mutation in the MT-ND3 gene of 14/38 patients and the A14696G mutation in the mt-tRNA^{Glu} gene of 1/38 patients. The T10463C and A10398G mutations have already been detected in other pulmonary diseases contrary to A14696G mutation. These results finally indicate the need for further research to reach a conclusion on whether there is indeed a correlation between mtDNA mutations and COPD pathogenesis.

Key words: Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD), pathogenesis, mitochondrial dysfunction, mitochondrial DNA (mtDNA), mutations, mitochondrial tRNA (mt-tRNA).

1. Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια (ΧΑΠ)

Η χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια είναι μία νόσος με υψηλή θνητότητα, η οποία προκαλείται περισσότερο από περιβαλλοντικούς και λιγότερο από γενετικούς παράγοντες. Συνιστά την τέταρτη αιτία θανάτου παγκοσμίως και χαρακτηρίζεται από υψηλή νοσηρότητα καθώς οι ασθενείς παρουσιάζουν σοβαρά αναπνευστικά προβλήματα που δυσχεραίνουν την καθημερινότητά τους. Συνεπώς, η διερεύνηση των μηχανισμών παθογένειας που οδηγούν στην εμφάνιση και εξέλιξη της νόσου, αποτελεί προτεραιότητα για την επιστημονική κοινότητα. Σε αυτή την ενότητα θα παρουσιαστεί πρώτα η ΧΑΠ από την μακροσκοπική σκοπιά, ώστε να γίνουν αντιληπτές οι κλινικές εκδηλώσεις της, πριν παρατεθούν οι μοριακοί μηχανισμοί που ευθύνονται για την παθογένειά της.

1.1 Ορισμός

Η χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια (ΧΑΠ) ορίζεται ως η εμμένουσα απόφραξη των αεραγωγών, η οποία είναι συνήθως προοδευτική και σχετίζεται με υπερβολική φλεγμονώδη απόκριση των αεραγωγών και των πνευμόνων σε βλαπτικά σωματίδια ή αέρια. Πρόκειται δηλαδή για τον επίμονο, αναπαραγωγικό περιορισμό της ροής του εκπνεόμενου αέρα που συνοδεύεται από την παρουσία μη φυσιολογικής φλεγμονής στους πνεύμονες και τους αεραγωγούς (*Benjamin et al, 2016*). Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας, η ΧΑΠ αποτελεί την τέταρτη αιτία θανάτου παγκοσμίως και χαρακτηρίζεται ως μία μη αναστρέψιμη ή μερικώς αναστρέψιμη κατάσταση.

1.2 Παθογένεια

Ένα μικρό ποσοστό της παθογένειας έχει αποδειχθεί ότι οφείλεται σε γενετικούς παράγοντες και πιο συγκεκριμένα στην ανεπάρκεια της α₁-αντιθρυψίνης. Η α₁-αντιθρυψίνη είναι μία αντιπροτεάση που παράγεται στο ήπαρ και έχει ως στόχο να εξισορροπεί τη δράση της ουδετερόφιλης ελαστάσης. Η ουδετερόφιλη ελαστάση είναι μία πρωτεάση που απελευθερώνεται από τα ουδετερόφιλα όταν επικρατούν φλεγμονώδεις συνθήκες, και καταστρέφει την ελαστίνη στον πνεύμονα. Η διαταραχή

της ισορροπίας μεταξύ πρωτεασών-αντιπρωτεασών, λόγω γενετικής ανεπάρκειας της αντιπρωτεάσης, είναι δυνατό να πυροδοτήσει την εμφάνιση της νόσου (*Benjamin et al, 2016*).

Παρά ταύτα, η γενετική ανεπάρκεια της αι-αντιθρυψίνης συναντάται μόλις στο 1% των ασθενών με ΧΑΠ (*Benjamin et al, 2016*). Περιβαλλοντικοί παράγοντες, με επικρατέστερο το κάπνισμα, συνιστούν τους μεγαλύτερους παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση της νόσου. Μάλιστα η ΧΑΠ είναι γνωστή στο ευρύ κοινό ως «η νόσος των καπνιστών», αφού έχει βρεθεί πως το 15-20% των καπνιστών εμφανίζουν τη νόσο (*Zhou et al, 2021*). Ο καπνός του τσιγάρου περιλαμβάνει 10^{14} - 10^{17} οξειδωτικά σωματίδια ανά ρουφηξιά (*Birch et al, 2018*) και αποτελείται από δύο φάσεις, την σωματιδιακή και την αέρια. Η σωματιδιακή φάση περιλαμβάνει πολυκυκλικούς αρωματικούς υδρογονάνθρακες (PAHs) και σχετιζόμενες με τον καπνό νιτροσαμίνες (TSNAs), ενώ η αέρια φάση περιλαμβάνει φορμαλδεΰδη, ακρολεΐνη και HCN και είναι αυτή που έχει συσχετιστεί περισσότερο με την εμφάνιση της ΧΑΠ (*Adamson et al, 2011*).

1.3 Κλινική εικόνα

Υπάρχουν δύο ταξινομήσεις της ΧΑΠ, η χρόνια βρογχίτιδα, που αφορά την απόφραξη των μεγάλων αεραγωγών (διάμετρος > 2mm) και το εμφύσημα που αφορά την απόφραξη των μικρών αεραγωγών (διάμετρος < 2mm). Ένας ασθενής θεωρείται ότι πάσχει από χρόνια βρογχίτιδα όταν παρουσιάζει χρόνια, παραγωγικό βήχα και πτύελα για τρεις μήνες ανά έτος για δύο συνεχόμενα έτη (*Kim et al, 2013*). Οι ασθενείς παρουσιάζουν επίσης κυάνωση, περιφερικό οίδημα, ακροαστικά ευρήματα όπως ρόγχους και τρίζοντες, ενώ συχνά είναι παχύσαρκοι. Οι ασθενείς με εμφύσημα από την άλλη παρουσιάζουν ξηρό βήχα, ταχύπνοια και αυξημένο κατά λεπτό πνευμονικό αερισμό. Επιπλέον, εμφανίζουν ροζ απόχρωση στο δέρμα, αναπνέουν με σφιγμένα χείλη, χρησιμοποιούν τους επικουρικούς αναπνευστικούς μύες, παρουσιάζουν μεταβολές στο σχήμα του θώρακα (βαρελοειδής θώρακας), συχνά είναι καχεκτικοί, ενώ κατά την ακρόαση διαπιστώνεται μειωμένο αναπνευστικό ψιθύρισμα.

1.4 Διάγνωση

Για τη διάγνωση της ΧΑΠ είναι απαραίτητη η λήψη ιστορικού, η κλινική εξέταση (επισκόπηση θώρακα, ψηλάφηση, επίκρουση και ακρόαση) και η αξιολόγηση των συμπτωμάτων από τον κλινικό γιατρό, η διενέργεια απεικονιστικών εξετάσεων όπως η ακτινογραφία θώρακος και τέλος η σπιρομέτρηση. Κατά τη σπιρομέτρηση, εάν ο λόγος του βίαια εκπνεόμενου αέρα από το πρώτο δευτερόλεπτο (Forced Expiratory Volume in the 1st second, FEV₁) προς τη βίαια ζωτική χωρητικότητα (Forced Vital Capacity, FVC), μετά τη χορήγηση βρογχοδιασταλτικών στον ασθενή, βρεθεί μικρότερος από 0,70, τότε το αποτέλεσμα αυτό επιβεβαιώνει την απόφραξη των αεραγωγών και είναι διαγνωστικό της νόσου (*Benjamin et al, 2016*).

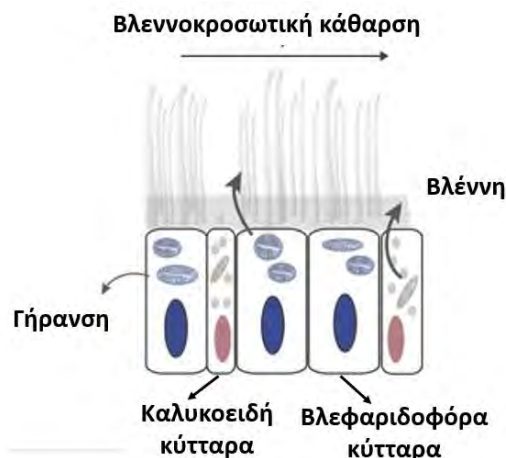
1.5 Απουσία αποτελεσματικής θεραπείας

Το γεγονός ότι η ΧΑΠ θεωρείται μία μη αναστρέψιμη ή μερικώς αναστρέψιμη κατάσταση οφείλεται στο ότι οι ασθενείς παρουσιάζουν αντίσταση στα κορτικοστεροειδή. Πιο συγκεκριμένα, το αυξημένο οξειδωτικό stress που παρατηρείται μειώνει, μέσω της ενεργοποίησης της PI3Kδ, την έκφραση και τη λειτουργικότητα της αποακετυλάσης των ιστονών HDAC2, η οποία φυσιολογικά αναστέλλει τα προφλεγμονώδη γονίδια. Η ανεπάρκεια ωστόσο της εν λόγω αποακετυλάσης στη ΧΑΠ έχει ως αποτέλεσμα όχι μόνο τη μη αναστολή των προφλεγμονωδών γονιδίων αλλά και τη μη αποακετυλίωση του υποδοχέα των γλυκοκορτικοστεροειδών και κατ'επέκταση τη μη αναστολή του μεταγραφικού παράγοντα NF-κΒ. Ο NF-κΒ λοιπόν παραμένει ενεργός και ελέγχει την έκφραση πολλών προφλεγμονωδών γονιδίων. Με αυτό τον τρόπο εδραιώνεται η φλεγμονή στους πνεύμονες των ασθενών με ΧΑΠ και δεν μπορεί να ανατραπεί από τα κορτικοστεροειδή (*Kume et al, 2023*).

1.6 Ιστολογικά ευρήματα

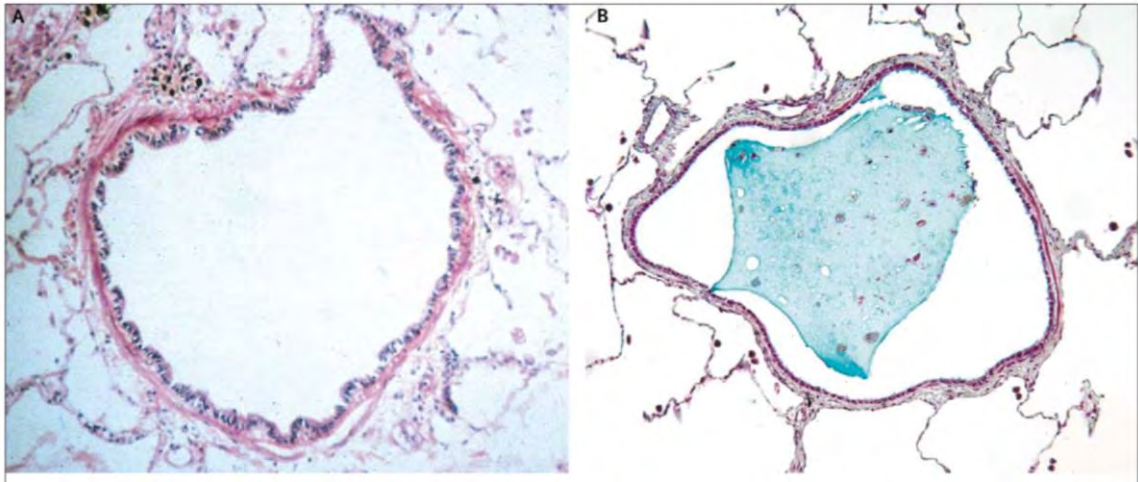
Το βρογχικό επιθήλιο αποτελείται από τρεις βασικούς κυτταρικούς τύπους: τα καλυκοειδή κύτταρα (goblet cells) που εκκρίνουν βλέννη, τα βλεφαριδοφόρα κύτταρα που εξωθούν τη βλέννη προς το φάρυγγα και τα πλακοειδή κύτταρα. Η βλέννη είναι ένας προστατευτικός φραγμός και περιλαμβάνει το εξωτερικό στρώμα, το οποίο παγιδεύει εισπνεόμενα μόρια και εισβολείς, και το εσωτερικό στρώμα το οποίο έχει

χαμηλό ιξώδες ώστε να διευκολύνεται η εξώθηση από τις βλεφαρίδες, μία διαδικασία που είναι γνωστή ως βλεννοκροσωτική κάθαρση (Adamson, 2011).



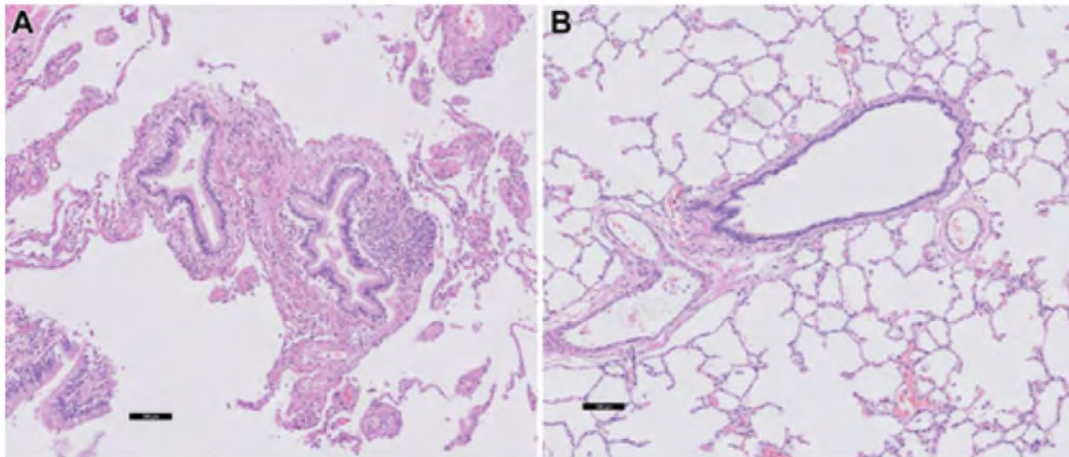
Εικόνα 1: Σχηματική απεικόνιση καλυκοειδών και βλεφαριδοφόρων κυττάρων στο βρογχικό επιθήλιο (Cloonan et al, 2020).

Στη χρόνια βρογχίτιδα παρατηρείται υπερπλασία των βλεννοεκκριτικών καλυκοειδών κυττάρων και κατά συνέπεια υπερπαραγωγή βλέννης. Επίσης, υπάρχει δυσκολία στην απομάκρυνση της επιπλέον βλέννης που παράγεται, λόγω μειωμένης βλεννοκροσωτικής κάθαρσης, απόφραξης των περιφερικών αεραγωγών και αναποτελεσματικού βήχα, ο οποίος οφείλεται στην αδυναμία των αναπνευστικών μυών και τη μειωμένη μέγιστη αναπνευστική ροή (Kin et al, 2013). Τα τοιχώματα των αεραγωγών τελικά υφίστανται πάχυνση που οφείλεται στην υπερπαραγωγή βλέννης και στην εναπόθεση κολλαγόνου (Barnes, 2019). Στην εικόνα 2A φαίνεται η διατομή ενός φυσιολογικού μικρού αεραγωγού υγιούς ατόμου ενώ στην εικόνα 2B φαίνεται η προσκόλληση ενός βύσματος βλέννης στο μικρό αεραγωγό. Το βύσμα αυτό έχει παραχθεί στους μεγάλους αεραγωγούς και ταξιδεύει στους μικρούς όπου οδηγεί σε μερική απόφραξη, παρεμποδίζοντας τη ροή του αέρα (Hogg et al, 2004).



Εικόνα 2: A) Διατομή μικρού αεραγωγού σε υγιές άτομο. Στο κέντρο της εικόνας, ο λευκός χώρος αντιστοιχεί στον αυλό του αεραγωγού ο οποίος περιβάλλεται από τη στιβάδα του βρογχικού επιθηλίου και από τον υποκείμενο συνδετικό ιστό. Ο αυλός είναι ανοιχτός και επιτρέπει τη ροή του αέρα. B) Διατομή μικρού αεραγωγού σε ασθενή με χρόνια βρογχίτιδα. Σε αντίθεση με την περίπτωση του υγιούς ατόμου, εδώ ο αεραγωγός φράσσεται από ένα βύσμα βλέννης (απεικονίζεται με γαλάζιο χρώμα), το οποίο παρεμποδίζει τη φυσιολογική ροή του αέρα (Hogg et al, 2004).

Το εμφύσημα είναι νόσος των μικρών αεραγωγών και προκαλείται από τη μόνιμη διάταση των αεροχώρων περιφερικά των τελικών βρογχιολίων, με συνέπεια την κατατροφή του πνευμονικού παρεγχύματος. Το τελικό αποτέλεσμα είναι η καταστροφή των κυψελίδων και η διαταραχή στην ανταλλαγή των αερίων. Ο καπνός του τσιγάρου είναι γνωστό ότι ενεργοποιεί τα μακροφάγα, τα οποία με τη σειρά τους στρατολογούν άλλα φλεγμονώδη κύτταρα στον πνεύμονα, όπως είναι για παράδειγμα τα ουδετερόφιλα. Τα φλεγμονώδη αυτά κύτταρα οδηγούν σε αύξηση της συγκέντρωσης των μεταλλοπρωτεασών (MMPs). Οι MMPs αυξάνονται τόσο ώστε δεν μπορούν πλέον να εξισορροπηθούν από τους TIMs (Tissue Inhibitors of MMPs). Το αποτέλεσμα είναι η καταστροφή του πνευμονικού παρεγχύματος από τις πρωτεάσες και η απώλεια της ελαστικής τάσης επαναφοράς του πνεύμονα (Benjamin et al, 2016). Τα ιστολογικά ευρήματα (Εικόνα 3) αποτελούν κύριο μέσο για τη διάγνωση του εμφυσήματος και υποδεικνύουν απώλεια της συνοχής των κυψελιδικών τοιχωμάτων και καταστροφή του πνευμονικού παρεγχύματος.

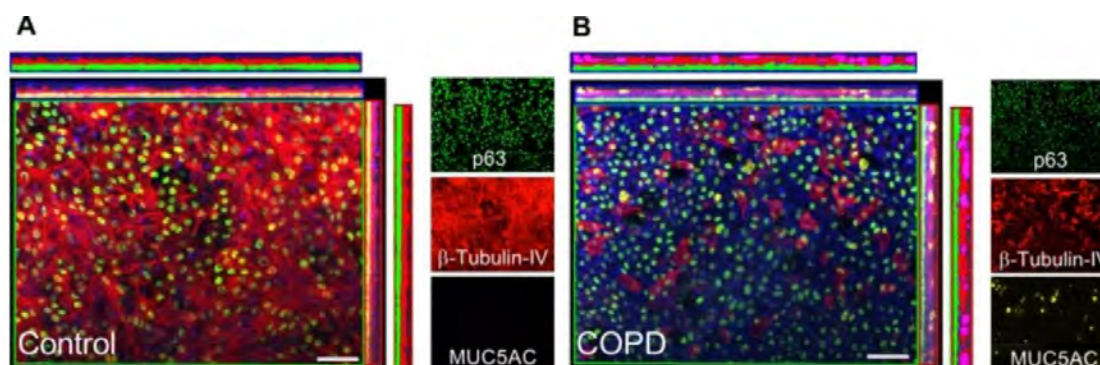


Εικόνα 3: Α) Τελικά βρογχιόλια, κυψελίδες και πνευμονικό παρέγχυμα σε ασθενή με εμφύσημα. Τα δύο τελικά βρογχιόλια εμφανίζουν στένωση λόγω εναπόθεσης κολλαγόνου, ενώ πολλές κυψελίδες έχουν καταστραφεί και κατ'επέκταση έχει χαθεί η συνοχή και επικοινωνία μεταξύ τους. Β) Δύο τελικά βρογχιόλια, κυψελίδες και πνευμονικό παρέγχυμα σε υγιές άτομο. Στην εικόνα φαίνονται οι αυλοί των βρογχιολίων οι οποίοι είναι ανοιχτοί και επιτρέπουν τη ροή του αέρα, και επίσης φαίνονται περιμετρικά των τελικών βρογχιολίων οι κυψελίδες, η μία δίπλα στην άλλη (Brandsma et al, 2020).

1.7 Ευρήματα και παρατηρήσεις σε κυτταρικό επίπεδο

Τα ιστολογικά ευρήματα που συζητήθηκαν παραπάνω γίνονται καλύτερα αντιληπτά από τη μελέτη κυτταρικών σειρών βρογχικού επιθηλίου σε υγιείς και πάσχοντες. Έχουν πραγματοποιηθεί πολλές μελέτες για τον εντοπισμό διαφορών μεταξύ των κυττάρων υγιών ατόμων και ασθενών με ΧΑΠ. Στην εικόνα 4 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από ένα πείραμα ανοσοφθορισμού όπου χρησιμοποιήθηκαν κυτταροκαλλιέργειες ALI (Air-Liquid Interface) – HBECs (Human Bronchial Epithelial Cells) από υγιές άτομο και από ασθενή με ΧΑΠ. Ο δείκτης p63, που εκφράζεται στα πλακοειδή κύτταρα, δεν παρουσιάζει στατιστικά σημαντική διαφορά στην έκφρασή του μεταξύ του υγιούς ατόμου και του πάσχοντος από ΧΑΠ. Ο δείκτης β-τουμπουλίνη κωδικοποιείται από ένα ιδιοσύστατο γονίδιο και εκφράζεται σε όλους τους κυτταρικούς τύπους. Η έκφρασή του παρουσιάζεται μειωμένη στην κυτταρική σειρά που έχει προέλθει από ασθενή με ΧΑΠ, γεγονός που μπορεί να αποδοθεί στην καταστροφή βλεφαριδοφόρων κυττάρων στη ΧΑΠ. Τέλος, η έκφραση της γλυκοπρωτεΐνης της βλέννης MUC5AC εμφανίζεται

εμφανώς αυξημένη σε ασθενείς με ΧΑΠ, παρατήρηση που συμφωνεί και με τα ιστολογικά ευρήματα που παρουσιάστηκαν παραπάνω και υποδηλώνει υπερπλασία των καλυκοειδών κυττάρων και υπερέκκριση βλέννης στη ΧΑΠ (Gohy et al, 2019). Επομένως, από το πείραμα αυτό συνάγεται το συμπέρασμα πως στη ΧΑΠ τα καλυκοειδή κύτταρα παρουσιάζουν υπερπλασία, τα βλεφαριδοφόρα καταστρέφονται, ενώ τα πλακοειδή δεν παρουσιάζουν κάποια στατιστικά σημαντική μεταβολή.

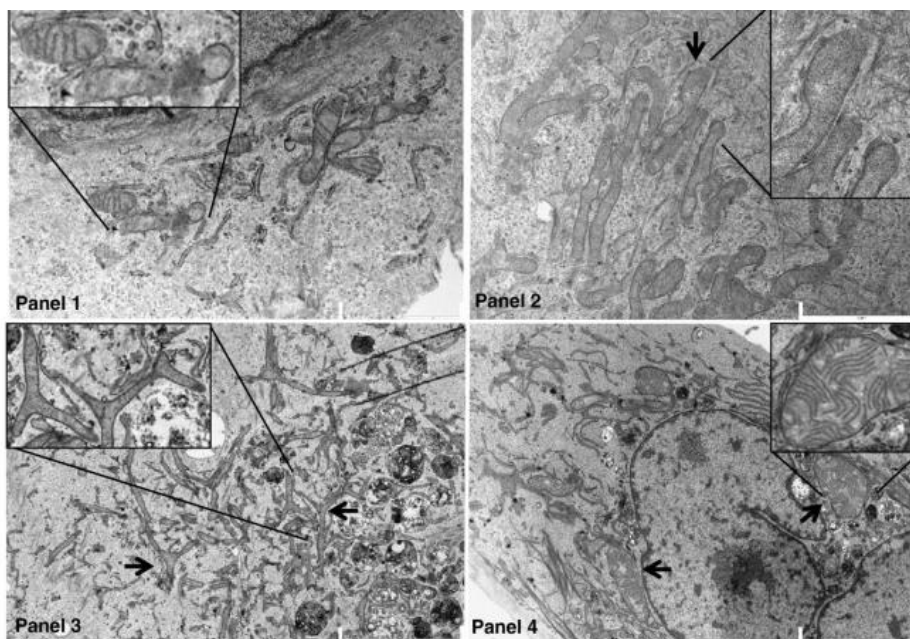


Εικόνα 4: Πείραμα ανοσοχημικού εντοπισμού των δεικτών p63, β-τουμπουλίνη και MUC5AC σε κυτταρικές σειρές ALI- HBECs A) από υγιές άτομο και B) από ασθενή με ΧΑΠ. Οι τρεις μικρές εικόνες στα δεξιά τόσο της A όσο και της B εικόνας αντιστοιχούν σε ανοσοχημικό εντοπισμό των δεικτών p63 (με πράσινη φθορίζουσα), β-τουμπουλίνη (με κόκκινη φθορίζουσα) και MUC5AC (με κίτρινη φθορίζουσα), ενώ οι μεγάλες εικόνες συνιστούν αντιπαραβολή/συγχώνευση και των τριών δεικτών μαζί. Οι πυρήνες χρωματίστηκαν μπλε με τη χρώση DAPI (Gohy et al, 2019).

2. Μιτοχόνδρια και ΧΑΠ

Όπως έγινε σαφές από τα παραπάνω, η ΧΑΠ είναι μία νόσος που πυροδοτείται κατά κύριο λόγο από περιβαλλοντικούς παράγοντες, οι οποίοι επάγουν οξειδωτικό stress. Το οξειδωτικό stress δημιουργείται στα μιτοχόνδρια λόγω υπερπαραγωγής ROS από τις αντιδράσεις της αναπνευστικής αλυσίδας και έχει άμεσες συνέπειες στη λειτουργία των μιτοχονδρίων. Δεν είναι παράδοξο λοιπόν το γεγονός ότι η μορφολογία των μιτοχονδρίων σε ασθενείς με ΧΑΠ έχει βρεθεί αλλοιωμένη. Στην εικόνα 5 παρουσιάζονται εικόνες μιτοχονδρίων από κύτταρα βρογχικού επιθηλίου από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Στο panel 1 φαίνεται η φυσιολογική μορφολογία των μιτοχονδρίων από άτομα-control που δεν πάσχουν από ΧΑΠ. Στα υπόλοιπα τρία panels

φαίνονται μιτοχόνδρια από ασθενείς με ΧΑΠ, τα οποία παρουσιάζουν σαφείς διαφοροποιήσεις από το φυσιολογικό πρότυπο καθώς εμφανίζονται επιμηκυσμένα, διακλαδισμένα ή διογκωμένα, ενώ παράλληλα στερούνται των χαρακτηριστικών ακρολοφιών (*Hoffmann et al, 2013*).



Εικόνα 5: Μορφολογία μιτοχονδρίων από πρωτογενή βρογχικά επιθηλιακά κύτταρα υγιών ατόμων-control και ασθενών με ΧΑΠ. Στο panel 1 φαίνεται η φυσιολογική μορφολογία των μιτοχονδρίων από άτομα-control που δεν πάσχουν από ΧΑΠ. Στο panel 2 απεικονίζονται επιμηκυσμένα μιτοχόνδρια χωρίς τις χαρακτηριστικές ακρολοφίες. Στο panel 3 παρουσιάζονται μιτοχόνδρια που διακλαδίζονται έντονα, ενώ στο panel 4 τα μιτοχόνδρια εμφανίζονται διογκωμένα (*Hoffmann et al, 2013*).

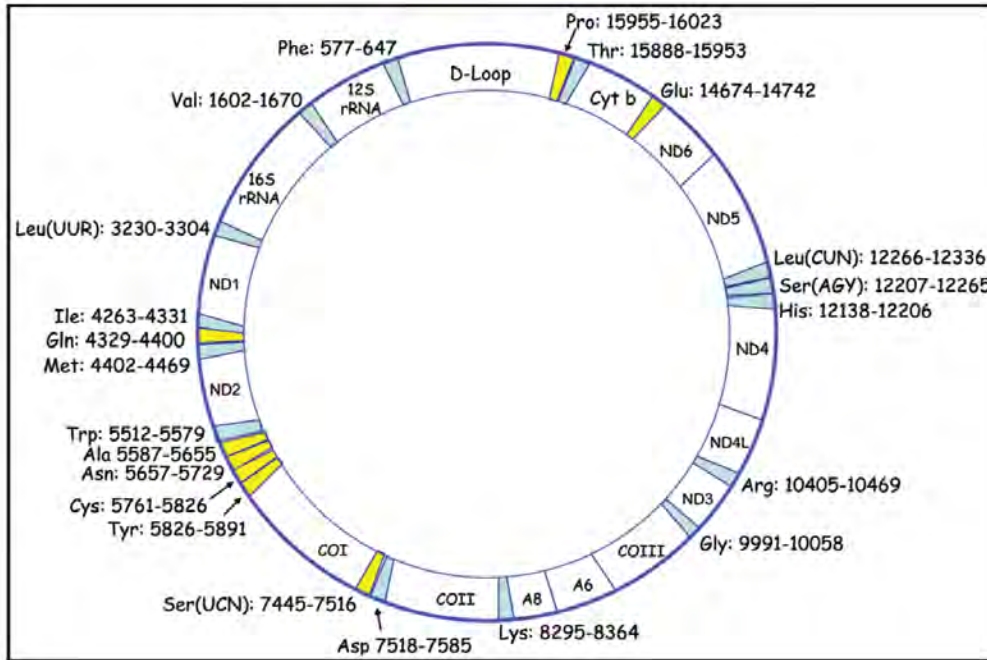
Τέτοιου είδους ευρήματα έχουν παρατηρηθεί στα μιτοχόνδρια τόσο των επιθηλιακών κυττάρων των βρόγχων, όσο και αρκετών κυττάρων του ανοσοποιητικού (π.χ. μακροφάγα) (*Hoffmann et al, 2013*). Είναι λοιπόν σαφές ότι τα μιτοχόνδρια διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην παθογένεια της ΧΑΠ και συνεπώς η έρευνα έχει στραφεί στη μελέτη των μηχανισμών μέσω των οποίων τα μιτοχόνδρια εμπλέκονται στην εμφάνιση της νόσου.

2.1 Τα μιτοχόνδρια ως ενδοκυτταρικά οργανίδια

Τα μιτοχόνδρια είναι ενδοκυτταρικά οργανίδια με πολύ σημαντικό ρόλο για την παραγωγή ενέργειας και την εκκίνηση της απόπτωσης του κυττάρου. Ένα κύτταρο περιλαμβάνει εκατοντάδες έως και χιλιάδες τέτοια οργανίδια. Κάθε μιτοχόνδριο αποτελείται από δύο μεμβράνες, μία εξωτερική και μία εσωτερική. Η εξωτερική μεμβράνη είναι περισσότερο διαπερατή σε σύγκριση με την εσωτερική. Η εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων σχηματίζει αναδιπλώσεις και ακρολοφίες και έχει επιφορτιστεί με την επιτέλεση της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, η οποία έχει ως στόχο την παραγωγή ATP, δηλαδή ενέργειας. Ο χώρος ανάμεσα στην εξωτερική και την εσωτερική μεμβράνη είναι γνωστός ως διαμεμβρανικός χώρος, ενώ εντός της εσωτερικής μεμβράνης περικλείεται η μήτρα του μιτοχονδρίου, στην οποία διαδραματίζονται οι αντιδράσεις του κύκλου του κιτρικού οξέος και η οξείδωση των λιπαρών οξέων.

2.2 Το μιτοχονδριακό DNA (mtDNA)

Κάθε μιτοχόνδριο περικλείει εντός της μήτρας δύο έως δέκα αντίγραφα του μιτοχονδριακού γονιδιώματος (mtDNA). Το mtDNA είναι ένα δίκλωνο, κυκλικό μόριο DNA με μήκος 16.569 bp. Περιλαμβάνει συνολικά 37 γονίδια εκ των οποίων 13 κωδικοποιούν υπομονάδες πρωτεϊνών της αναπνευστικής αλυσίδας, 2 κωδικοποιούν τα μιτοχονδριακά rRNA 12s και 16s και τα υπόλοιπα 22 κωδικοποιούν τα μιτοχονδριακά tRNAs. Τα tRNAs είναι 22 στο σύνολο (αντί για 20) γιατί υπάρχουν δύο tRNA για τη μεταφορά της Leu και επίσης δύο tRNA για τη μεταφορά της Ser. Ο χάρτης του mtDNA του ανθρώπου όπου απεικονίζονται οι θέσεις των γονιδίων που κωδικοποιούν τα tRNAs, τα rRNAs και τις πρωτεΐνες της αναπνευστικής αλυσίδας παρουσιάζεται στην εικόνα 6 (Zifa et al, 2007).

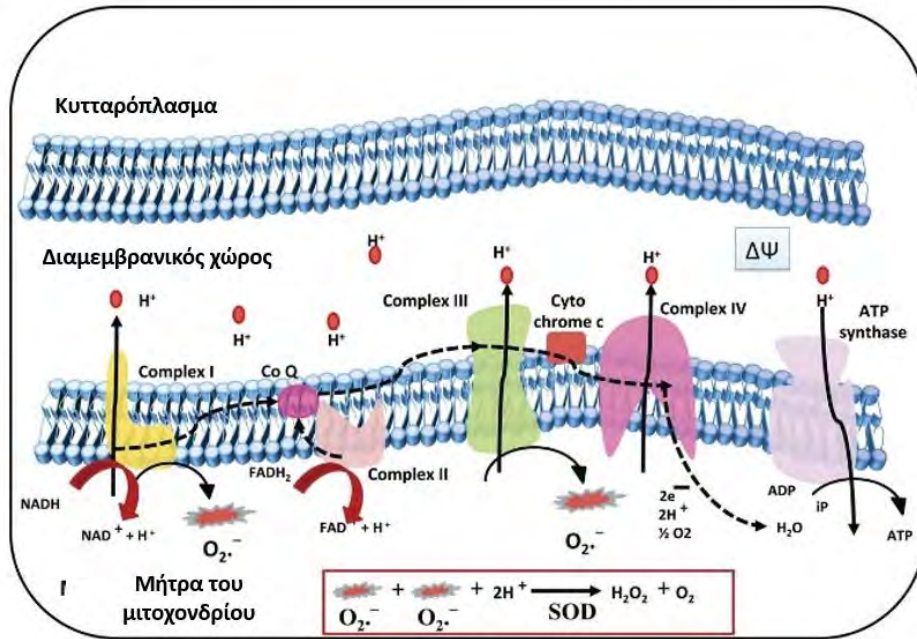


Εικόνα 6: Χάρτης του μιτοχονδριακού γονιδιώματος του ανθρώπου. Στην εικόνα παρουσιάζεται το δίκλωνο, κυκλικό mtDNA και χαρτογραφούνται τα 37 γονίδια που αυτό κωδικοποιεί. Πιο συγκεκριμένα, φαίνονται τα 13 γονίδια που κωδικοποιούν υπομονάδες πρωτεϊνών της αναπνευστικής αλυσίδας (Nd1-6, COI-III, Cyt b, A6/A8), τα 2 γονίδια που κωδικοποιούν τις μιτοχονδριακές ριβοσωμικές υπομονάδες 12s και 16s, και τα 22 γονίδια που κωδικοποιούν τα μιτοχονδριακά tRNAs (δηλαδή για τα tRNAs που μεταφέρουν τα αμινοξέα Phe, Val, Leu, Ile, Gln, Met, Trp, Ala, Asn, Cys, Tyr, Ser, Asp, Lys, Gly, Arg, His, Glu, Thr, Pro). Με κίτρινο χρώμα σημειώνονται τα tRNAs που κωδικοποιούνται από τον πλούσιο σε γουανίνη «βαρύ» κλώνο ενώ με γαλάζιο σημειώνονται τα tRNAs που κωδικοποιούνται από τον πλούσιο σε κυτοσίνη «ελαφρύ» κλώνο. Συντομογραφίες: A6/A8: υπομονάδες της F_1F_0 ATP συνθάσης, Ala: αλανίνη, Arg: αργινίνη, Asn: ασπαραγίνη, Asp: ασπαραγινικό, COI-III: υπομονάδες της κυτοχρωμικής οξειδάσης, Cys: κυστεΐνη, Cyt b: κυτόχρωμα b, Gln: γλουταμίνη, Glu: γλουταμινικό, Gly: γλυκίνη, His: ιστιδίνη, Ile: ισολευκίνη, Leu: λευκίνη, Lys: λυσίνη, Met: μεθειονίνη, Nd1-6: υπομονάδες της αφυδρογονάσης του NADH, Phe: φαινολαλανίνη, Pro: προλίνη, Ser: σερίνη, Thr: θρεονίνη, Trp: τρυπτοφάνη, Tyr: τυροσίνη, Val: βαλίνη (Zifa et al, 2007).

2.3 Παραγωγή ROS στα μιτοχόνδρια

Η οξειδωτική φωσφορυλίωση είναι μία πολύ σημαντική διαδικασία που επιτελείται από τα μιτοχόνδρια χάρη στις αντιδράσεις της αναπνευστικής αλυσίδας. Κατά τις αντιδράσεις αυτές παρατηρείται μεταφορά e^- μεταξύ των συμπλόκων I, III και IV, με στόχο την εγκαθίδρυση μίας διαβάθμισης στη συγκέντρωση των πρωτονίων μεταξύ της μήτρας και του διαμεμβρανικού χώρου. Η διαβάθμιση αυτή θα χρησιμοποιηθεί από το σύμπλοκο V (F_1F_0 ATP συνθάση) για την παραγωγή ATP. Παράλληλα, παρατηρείται αναγωγή του μοριακού O_2 σε H_2O . Εντούτοις, κατά τη διάρκεια αυτής της αναγωγής προκύπτουν και παραπροϊόντα, με τελικό αποτέλεσμα την παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) στα μιτοχόνδρια. Ένα παράδειγμα μίας τέτοιας δραστικής μορφής οξυγόνου είναι η ρίζα σουπεροξειδίου (O_2^-) που προκύπτει από τη μεταφορά ενός μόνο e^- στο O_2 . Η παραγωγή ROS σε χαμηλά επίπεδα στα μιτοχόνδρια είναι απαραίτητη για τη σωστή λειτουργία της αναπνευστικής αλυσίδας, καθώς επιφέρει αλλαγή στη διαπερατότητα του μιτοχονδρίου μέσω της εξασθένησης των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων (Zhou *et al*, 2021). Κατά τη λειτουργία της αναπνευστικής αλυσίδας, το 1-2% του συνολικού αριθμού των e^- «διαρρέει» οδηγώντας στην παραγωγή των ROS (Tymoczko *et al*, 2015). Άρα, η παραγωγή ROS σε χαμηλά επίπεδα εντός των μιτοχονδρίων συνιστά ένα φυσιολογικό κυτταρικό μηχανισμό.

Ωστόσο, η αύξηση της παραγωγής των ROS μπορεί να οδηγήσει σε μία κατάσταση που ονομάζεται οξειδωτικό stress και η οποία είναι αποτέλεσμα της ανισορροπίας μεταξύ οξειδωτικών μορίων (π.χ. ελεύθερων ριζών) και αντιοξειδωτικών μορίων στο κύτταρο. Το οξειδωτικό stress προκαλεί οξείδωση πρωτεϊνών και λιπιδίων, ενώ είναι ιδιαίτερα επιβλαβές για το mtDNA, το οποίο εμφανίζει 10 με 17 φορές υψηλότερο ρυθμό μεταλλαξιγένεσης συγκριτικά με το πυρηνικό. Το γεγονός αυτό οφείλεται στην απουσία ιστονών, την ανεπάρκεια κατάλληλων μηχανισμών επιδιόρθωσης των βλαβών καθώς επίσης και στη θέση του στη μήτρα του μιτοχονδρίου, δεδομένου ότι το mtDNA εντοπίζεται κοντά στη θέση παραγωγής των ROS. Επιπλέον, το mtDNA του ανθρώπου είναι συμπαγές, τα γονίδια στερούνται ιντρονίων και βρίσκονται πολύ κοντά το ένα στο άλλο, ενώ το 95% της συνολικής του αλληλουχίας έχει κωδικοποιητικό ρόλο. Συνεπώς, αυξάνονται κατά πολύ οι πιθανότητες μία μετάλλαξη στο mtDNA να επιφέρει δυσμενή για την λειτουργία του μιτοχονδρίου αποτελέσματα (Zifa *et al*, 2007).



Εικόνα 7: Παραγωγή ROS κατά τη μεταφορά e^- στην αναπνευστική αλυσίδα. Στην εικόνα φαίνεται το κυτταρόπλασμα, ο διαμεμβρανικός χώρος και η μήτρα του μιτοχονδρίου, διαμερίσματα που οριοθετούνται από την εξωτερική και εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη. Στην εσωτερική μεμβράνη εντοπίζονται τα σύμπλοκα I, II, III, IV, η ουβικινόνη (Co Q), το κυτόχρωμα c (Cyt c) και η ATP συνθάση που απαρτίζουν την αναπνευστική αλυσίδα. Τα αναγωγικά μόρια NADH και $FADH_2$ τροφοδοτούν την αναπνευστική αλυσίδα με e^- . Κατά τη μεταφορά e^- , από τα σύμπλοκα I και III παράγονται ROS, οι οποίες μπορούν να μετατραπούν σε H_2O_2 μέσω της δράσης της δισμουτάσης του σουπεροξειδίου (SOD), ενός ενζύμου που υπάρχει φυσιολογικά στα μιτοχόνδρια (Agrawal et al, 2016).

2.4 Μιτοχόνδρια και ασθένειες

Οι ασθένειες που σχετίζονται με τα μιτοχόνδρια παρουσιάζουν στη συντριπτική τους πλειοψηφία μητρικό πρότυπο κληρονομησης, δηλαδή το mtDNA προέρχεται από τα μιτοχόνδρια του ωαρίου και όχι του σπερματοζωαρίου. Ωστόσο, η κλινική εκδήλωση μίας νόσου που σχετίζεται με μεταλλάξεις στο mtDNA εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό και από τα επίπεδα της ετεροπλασμίας. Ως ετεροπλασμία ορίζεται το φαινόμενο κατά το οποίο ένα μιτοχόνδριο μπορεί να περιλαμβάνει αντίγραφα του mtDNA που δεν φέρουν όλα ακριβώς την ίδια αλληλουχία. Επομένως, η κατανομή των mtDNA στα μιτοχόνδρια κατά τις ανεξάρτητες από τον κυτταρικό κύκλο διαιρέσεις των

μιτοχονδρίων, μπορεί να επηρεάσει το φαινότυπο. Συνήθως για να εκδηλωθεί μία νόσος θα πρέπει τα κύτταρα του ιστού ή του οργάνου να περιέχουν μιτοχόνδρια που στο σύνολό τους να φέρουν την εκάστοτε μετάλλαξη στο mtDNA σε ένα ποσοστό που να υπερβαίνει ένα συγκεκριμένο κατώφλι.

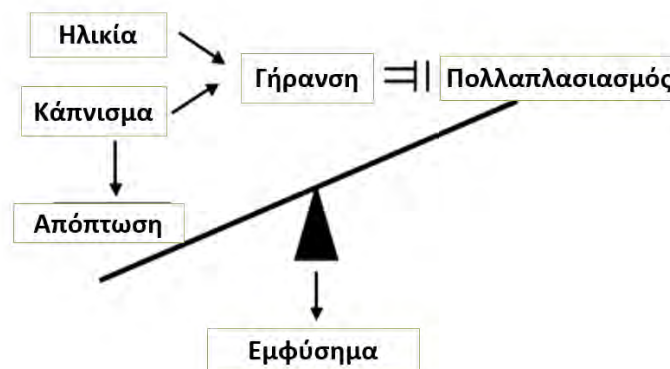
Είναι γνωστό πως τόσο οι μεταλλάξεις στο mtDNA (ή στο πυρηνικό DNA που κωδικοποιεί για πρωτεΐνες του μιτοχονδρίου), όσο και η επακόλουθη υπερπαραγωγή ROS, συνιστούν κοινούς αιτιολογικούς παράγοντες για πολλές νόσους που σχετίζονται με δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων. Τέτοιες νόσοι αφορούν κατά κύριο λόγο ιστούς με έντονη μεταβολική δραστηριότητα, δηλαδή ιστούς των οποίων τα κύτταρα περιέχουν πολλά μιτοχόνδρια, όπως είναι για παράδειγμα ο εγκέφαλος, οι μύες, η καρδιά, ο αμφιβληστροειδής χιτώνας και ο κοχλίας. Ένα πολύ γνωστό παράδειγμα νόσου που σχετίζεται με τα μιτοχόνδρια είναι η οπτική νευροπάθεια Leber. Η εν λόγω νόσος οφείλεται κατά κύριο λόγο σε μεταλλάξεις που επηρεάζουν κάποιες υπομονάδες της αφυδρογονάσης του NADH, δηλαδή του συμπλόκου I, ενώ έχει βρεθεί πως η παραγωγή των ROS αυξάνεται, και της ATP μειώνεται σε ασθενείς που πάσχουν από τη συγκεκριμένη νόσο (*Cooper et al, 2016*).

Πέραν από το νευρικό και μυϊκό ιστό, που είναι γνωστοί για την υψηλή μεταβολική τους δραστηριότητα, οι πνεύμονες επιτελούν επίσης σημαντικές ενεργοβόρες διαδικασίες χάρη στα μιτοχόνδρια. Δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων έχει παρατηρηθεί λοιπόν σε πολλές πνευμονικές νόσους όπως είναι η ιδιοπαθής πνευμονική ίνωση (IPF), η σαρκοείδωση και η χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια (ΧΑΠ). Στην IPF η παραγωγή των ROS στα μιτοχόνδρια επηρεάζει τη σηματοδότηση από τον TGF- β και συμβάλλει στην εμφάνιση ίνωσης στους πνεύμονες (*Bueno et al, 2020*), ενώ στη σαρκοείδωση έχει βρεθεί διαταραχή στην ισορροπία μεταξύ οξειδωτικών και αντιοξειδωτικών παραγόντων στα μιτοχόνδρια (*Malli et al, 2013*). Επίσης, στη σαρκοείδωση έχει βρεθεί συσχέτιση ανάμεσα στα μιτοχόνδρια και στην εναπόθεση σταγονιδίων λιπιδίων στα ενδοθηλιακά κύτταρα των τριχοειδών αγγείων της αναπνευστικής οδού (*Daniil et al, 2018*). Όσον αφορά τη χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια, η παρούσα πτυχιακή εργασία έχει εστιάσει το ενδιαφέρον της σε αυτήν τη νόσο, συνεπώς ευθύς αμέσως προσεγγίζεται η συσχέτιση της ΧΑΠ με τα μιτοχόνδρια, με βάση δεδομένα που έχουν αντληθεί από τη διεθνή βιβλιογραφία.

3. Μοριακή βάση της νόσου

3.1 Κυτταρική γήρανση

Η ΧΑΠ χαρακτηρίζεται από τη συσσώρευση γηρασμένων κυττάρων στον πνεύμονα όπως επιθηλιακών, ενδοθηλιακών, κυψελιδικών τύπου II κυττάρων και ινοβλαστών (Cloonan et al, 2020). Η πρόωγη γήρανση συμβαίνει είτε λόγω αυξημένου κυτταρικού πολλαπλασιασμού, είτε λόγω οξειδωτικού stress. Η αύξηση του οξειδωτικού stress οφείλεται αρχικά σε εξωγενείς παράγοντες, όπως είναι ο καπνός του τσιγάρου, οι οποίοι στη συνέχεια επάγουν και την παραγωγή ενδογενούς οξειδωτικού stress από τα φλεγμονώδη κύτταρα (Kume et al, 2023). Προκύπτει δηλαδή ένας φαύλος κύκλος. Η συσσώρευση γηρασμένων κυττάρων μπορεί να εξηγήσει την αύξηση της απόπτωσης των κυψελιδικών κυττάρων στο εμφύσημα, αφού η γήρανση παρεμποδίζει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό που θα δρούσε εξισορροπιστικά ενάντια στην αυξημένη απόπτωση. Με άλλα λόγια, η γήρανση προκαλεί μία ανισορροπία ανάμεσα στην απόπτωση και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό όπως φαίνεται στο σχεδιάγραμμα της εικόνας 8 (Aoshiba et al, 2009).



Εικόνα 8: Επαγόμενη από την κυτταρική γήρανση ανισορροπία ανάμεσα στην απόπτωση και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό σε ασθενείς με ΧΑΠ (Aoshiba et al, 2009).

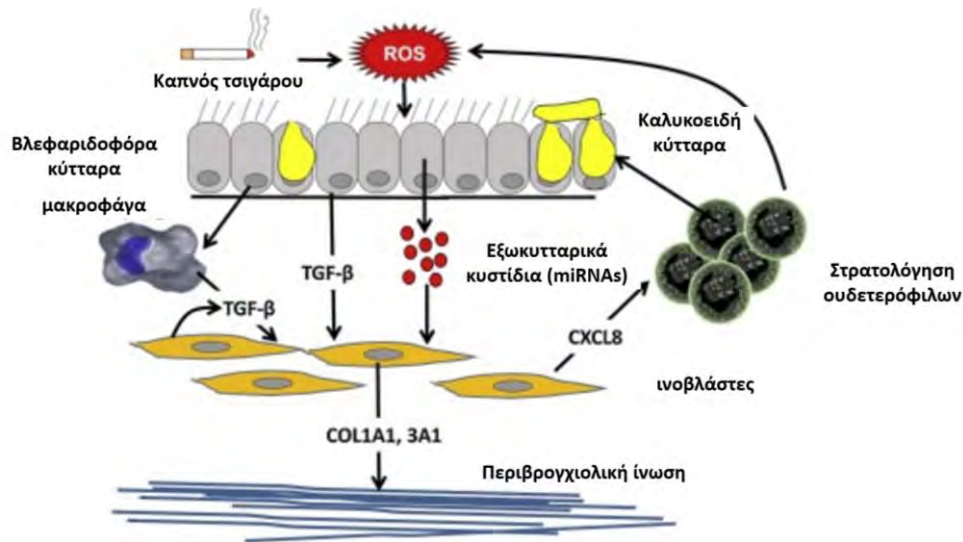
Τα γηρασμένα κύτταρα στους ασθενείς με ΧΑΠ παραμένουν μεταβολικά ενεργά, αυξάνονται σε μέγεθος και έχουν συσχετιστεί με το φαινότυπο SASP (Senescence-associated Secretory Phenotype), δηλαδή εκκρίνουν φλεγμονώδεις πρωτεΐνες όπως χημειοκίνες (CXCL1, CXCL8, CCL2), προφλεγμονώδεις κυτοκίνες (TNF- α , IL-1, IL-6), πρωτεάσες (MMP2, MMP9) και αυξητικούς παράγοντες (TGF- β , VEGF).

3.2 Έλλειψη αποτελεσματικής αντιοξειδωτικής άμυνας

Το οξειδωτικό stress φυσιολογικά αντισταθμίζεται και εξουδετερώνεται από τους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς των κυττάρων. Παρ'όλα αυτά, στη ΧΑΠ τα ενδογενή αντιοξειδωτικά εμφανίζονται μειωμένα. Για παράδειγμα, η γλουταθειόνη έχει βρεθεί σημαντικά μειωμένη στο βρογχοκυψελιδικό υγρό ασθενών με ΧΑΠ. Αντίθετα, στους καπνιστές που δεν πάσχουν από ΧΑΠ παρατηρείται αύξηση των επιπέδων της γλουταθειόνης ως μία προσπάθεια του οργανισμού να αντιμετωπίσει το οξειδωτικό stress που επάγεται από τον καπνό του τσιγάρου. Εκτός από τη γλουταθειόνη, και άλλα σημαντικά αντιοξειδωτικά όπως η θειορεδοξίνη και η δισμουτάση του σουπεροξειδίου (SOD) ελαττώνονται στη ΧΑΠ. Επιπλέον, μελέτες έχουν δείξει πως οι μεταγραφικοί παράγοντες Nrf2 και FOXO3a (που είναι υπεύθυνοι για την έκφραση πολλών γονιδίων που κωδικοποιούν αντιοξειδωτικά πεπτιδία ή πρωτεΐνες) δεν υπάρχουν σε επαρκή επίπεδα στα κύτταρα του βρογχικού επιθηλίου ασθενών με ΧΑΠ (Kume *et al*, 2023). Έτσι, το οξειδωτικό stress δεν αντισταθμίζεται και επικρατεί, απειλώντας την κυτταρική υγεία.

3.3 Ίνωση

Χάρη στον καπνό του τσιγάρου και τις παραγόμενες ROS, τα επιθηλιακά κύτταρα των αεραγωγών απελευθερώνουν TGF- β και άλλους παράγοντες, με αποτέλεσμα να επάγεται η εναπόθεση κολλαγόνου από τους ινοβλάστες. Οι ινοβλάστες με τη σειρά τους εκκρίνουν τη χημειοκίνη CXCL8, η οποία προσελκύει με χημειοτακτισμό τα ουδετερόφιλα. Τα ουδετερόφιλα θα επάγουν την υπερέκκριση βλέννης από τα καλυκοειδή κύτταρα του βρογχικού επιθηλίου. Το μονοπάτι αυτό εξηγεί τα ιστολογικά ευρήματα ίνωσης στη ΧΑΠ και απεικονίζεται στην εικόνα 9 (Barnes, 2019).



Εικόνα 9: Μηχανισμός πρόκλησης ίνωσης και υπερέκκρισης βλέννης στους μικρούς αεραγωγούς σε ασθενείς με ΧΑΠ. Στην εικόνα παρουσιάζονται τα βλεφαριδοφόρα και τα καλυκοειδή κύτταρα του επιθηλίου, τα οποία απελευθερώνουν (λόγω επαγωγής από τις ROS) TGF-β και εξωκυτταρικά κυστίδια και ενεργοποιούν τους υποκείμενους ινοβλάστες για την εναπόθεση κολλαγόνου (οι ίνες κολλαγόνου απεικονίζονται με μπλε γραμμές). Οι ινοβλάστες ακολούθως παράγουν τη χημειοκίνη CXCL8 και προσελκύουν τα ουδετερόφιλα. Τα ουδετερόφιλα επάγουν την παραγωγή βλέννης (απεικονίζεται με έντονο κίτρινο χρώμα) από τα καλυκοειδή κύτταρα (Barnes, 2019).

3.4 Επίδραση των ROS στα τελομερή

Η υπερπαραγωγή ROS στα μιτοχόνδρια επηρεάζει πολλές ζωτικής σημασίας λειτουργίες των μιτοχονδρίων και των κυττάρων. Ένας από τους στόχους των ROS είναι τα τελομερή. Τα τελομερή με την πάροδο του χρόνου και την πρόοδο των κυτταρικών διαιρέσεων συρρικνώνονται. Η συρρίκνωση αυτή επάγει την ενεργοποίηση ενός μηχανισμού απόκρισης σε βλάβες, μέσω της ενεργοποίησης του μεταγραφικού παράγοντα p53. Ο p53 ενεργοποιεί αρχικά τον παράγοντα p21, ο οποίος ανταγωνίζεται τις CDKs (κυκλινοεξαρτώμενες κινάσες) και οδηγεί σε στάση του κυτταρικού κύκλου και γήρανση (Cloonan et al, 2020). Η αύξηση του οξειδωτικού stress επιταχύνει τη διαδικασία της γήρανσης καθώς οι ROS που παράγονται στα μιτοχόνδρια επιδρούν απ'ευθείας στα τελομερή του πυρήνα, τα οποία είναι πιο επιρρεπή σε βλάβες σε σχέση με το υπόλοιπο πυρηνικό γονιδίωμα, γιατί παρουσιάζουν υψηλή περιεκτικότητα σε G και γιατί αλληλεπιδρούν με τις σελετερίνες. Επομένως, οι

ROS επιδρούν στα τελομερή και οδηγούν σε συρρίκνωσή τους, επιταχύνοντας έτσι τη γήρανση. Τέτοιου είδους επιτάχυνση της γήρανσης λόγω μείωσης του μήκους των τελομερών έχει παρατηρηθεί σε κυψελιδικά κύτταρα τύπου II, λευκοκύτταρα και ενδοθηλιακά κύτταρα ασθενών με ΧΑΠ (*Birch et al, 2018*).

3.5 Απορρύθμιση της βιογένεσης των μιτοχονδρίων

Μία άλλη δράση του οξειδωτικού stress είναι η ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού PI3K του οποίου βασικός τελεστής είναι ο mTOR (mammalian target of rapamycin). Ο mTOR αναστέλλει ένα βασικό ρυθμιστή της βιογένεσης και της λειτουργίας των μιτοχονδρίων, τον PGC-1α (peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1-a). Επιπλέον, σε ασθενείς με ΧΑΠ έχει βρεθεί μείωση της αποακετυλάσης sirtuin-1 (SIRT1) η οποία φυσιολογικά ρυθμίζει θετικά το μεταγραφικό παράγοντα PGC-1α. Η μείωση των επιπέδων των PGC-1α και SIRT1 έχει ως αποτέλεσμα τη διαταραχή της βιογένεσης των μιτοχονδρίων (*Cloonan et al, 2020*).

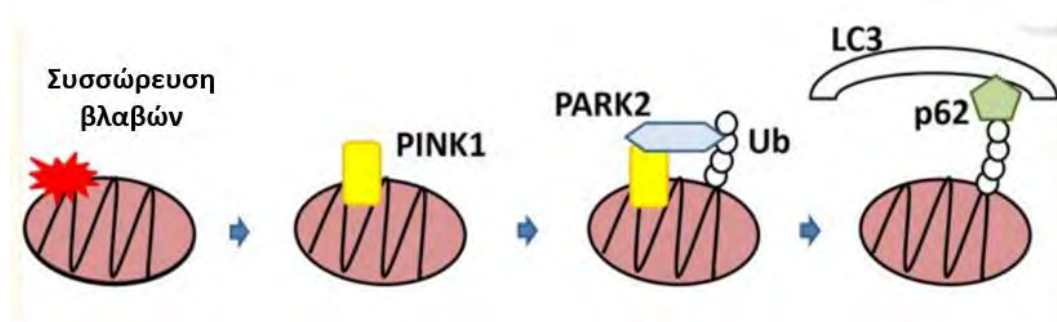
3.6 Αυξημένη μιτοχονδριακή σχάση και μειωμένη μιτοφαγία

Το οξειδωτικό stress που επάγεται από τον καπνό του τσιγάρου επιδρά επίσης στη σύντηξη/σχάση των μιτοχονδρίων και στη μιτοφαγία. Η σύντηξη των μιτοχονδρίων ελέγχεται από τις πρωτεΐνες Mfn1 και Mfn2 (mitofucins) που εδράζουν στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη και από την Opa1 (optic atrophy 1) που εντοπίζεται στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη. Η σύντηξη βοηθά τα μιτοχόνδρια να αλληλοϋποστηρίζονται και να διατηρούν την ακεραιότητά τους. Η σχάση των μιτοχονδρίων από την άλλη επιλέγεται όταν τα μιτοχόνδρια έχουν συσσωρεύσει βλάβες και πρέπει να οδηγηθούν σε μιτοφαγία, δηλαδή σε καταστροφή. Η σχάση ελέγχεται από την Ddp1 (dynamin-related protein 1) και τη FIS1 (fission 1 protein) (*Prakash et al, 2017*).

Ο καπνός του τσιγάρου και το οξειδωτικό stress που αυτός επάγει αρχικά προωθεί τη σύντηξη των μιτοχονδρίων ως μέσο επιβίωσής τους έναντι των αντίξοων συνθηκών. Ωστόσο, παρατεταμένη έκθεση στον καπνό οδηγεί τελικά σε αύξηση των Ddp1 και FIS1 και μείωση των Mfn, δηλαδή οδηγεί σε σχάση των μιτοχονδρίων ώστε αυτά να

οδηγηθούν σε μιτοφαγία (Tsubouchi et al, 2018). Εντούτοις, ο καπνός του τσιγάρου επιδρά και στη διαδικασία της μιτοφαγίας καθιστώντας τη δυσλειτουργική.

Φυσιολογικά, όταν αποπολώνεται η μιτοχονδριακή μεμβράνη ή συσσωρεύονται πολλές μη σωστά αναδιπλωμένες πρωτεΐνες εντός του μιτοχονδρίου, η κινάση PINK1 (PTEN-induced putative protein kinase 1) σταθεροποιείται στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη και προσελκύει την PARK2 (E3- λιγάση της ουβικουιτίνης) η οποία θα ουβικουιτινώσει πρωτεΐνες όπως αυτές που προωθούν τη σύντηξη και επιπλέον θα αλληλεπιδράσει με συστατικά του αυτοφαγосώματος. Ο μηχανισμός της μιτοφαγίας παρουσιάζεται στην εικόνα 10 (Tsubouchi et al, 2018).



Εικόνα 10: Μηχανισμός της διαμεσολαβούμενης από τις PINK1/PARK2 μιτοφαγίας. Η συσσώρευση βλαβών στα μιτοχόνδρια οδηγεί στη σταθεροποίηση της κινάσης PINK1 στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη. Η PINK1 ακολούθως φωσφορυλιώνει και στρατολογεί την PARK2 (E3 λιγάση της ουβικουιτίνης), η οποία ουβικουιτινώνει πρωτεΐνες-στόχους. Οι ουβικουιτινιλωμένες πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν τελικά, μέσω του p62, με την περιοχή LC3 (light chain 3) του αυτοφαγосώματος και έτσι προωθείται η μιτοφαγία (Tsubouchi et al, 2018).

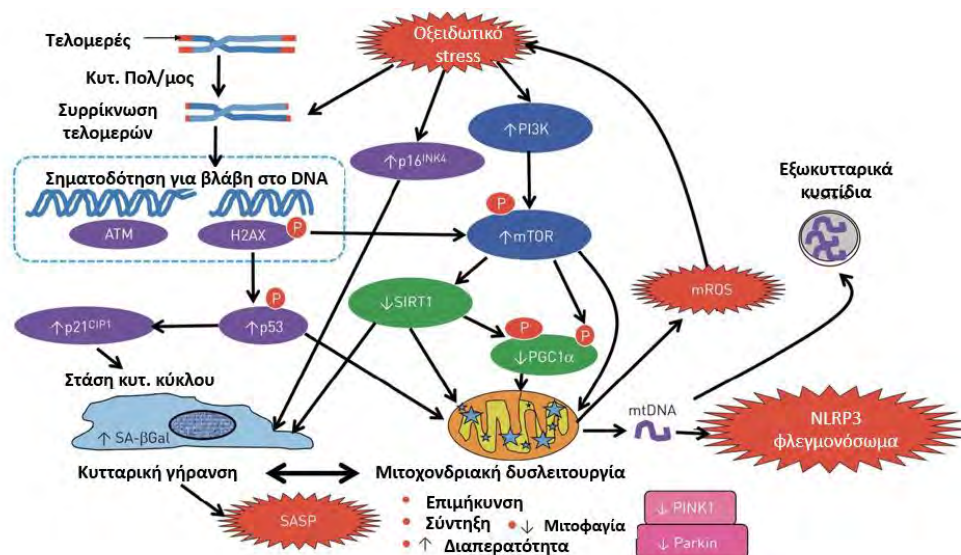
Στους ασθενείς με ΧΑΠ έχει βρεθεί μειωμένη έκφραση της PINK1 και της PARK2 που οφείλεται σε στόχευση από τον mTOR (Cloonanet al, 2020). Το αποτέλεσμα είναι να συσσωρεύονται πολλά γηρασμένα μιτοχόνδρια τα οποία δεν καταστρέφονται, γεγονός που εγκυμονεί κινδύνους για την επιβίωση των κυττάρων.

3.7 Βλάβες στο mtDNA

Όλες οι προαναφερθείσες βλάβες που επάγονται στα μιτοχόνδρια από τις ROS έχουν σαν αποτέλεσμα τη μείωση του δυναμικού και την αύξηση της διαπερατότητας των μιτοχονδριακών μεμβρανών. Αυτό έχει ως συνέπεια την εκροή mtDNA και ATP στο κυτταρόπλασμα. Το mtDNA, λόγω της ομοιότητάς του με τα προκαρυωτικά γονιδιώματα, αναγνωρίζεται ως DAMP (damage associated molecular pattern) από τα κύτταρα του ανοσοποιητικού (Tsoubouchi et al, 2018). Επιπλέον, το mtDNA κατά την έξοδό του από το μιτοχόνδριο είναι δυνατό να αλληλεπιδράσει με το NLRP3 φλεγμονόσωμα. Η αλληλεπίδραση αυτή θα οδηγήσει σε απελευθέρωση IL-1β και σε ενεργοποίηση της έμφυτης ανοσίας (Cloonan et al, 2020). Όλα αυτά τα γεγονότα τελικά θα οδηγήσουν σε νεκρόπτωση, δηλαδή σε έναν τύπο νέκρωσης που προσομοιάζει τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο.

3.8 Σύνοψη επίδρασης οξειδωτικού stress στη λειτουργία των μιτοχονδρίων σε ασθενείς με ΧΑΠ

Το σύνολο των μηχανισμών που επηρεάζονται από την επαγωγή οξειδωτικού stress από τον καπνό του τσιγάρου σε ασθενείς που πάσχουν από ΧΑΠ συνοψίζεται στην εικόνα 11.



Εικόνα 11: Σύνοψη αιτιολογικών παραγόντων που οδηγούν σε δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων στη ΧΑΠ. Το οξειδωτικό stress: 1) επάγει την συρρίκνωση των τελομερών,

γεγονός που πυροδοτεί την ενεργοποίηση μηχανισμών απόκρισης στη βλάβη. Πιο συγκεκριμένα, στρατολογείται στο σημείο της βλάβης η H2AX (ανάλογο της ιστόνης 2) και η κινάση ATM (*Ataxia-Telangiectasia Mutated*). Στη συνέχεια, ενεργοποιείται ο μεταγραφικός παράγοντας p53, ο οποίος αρχικά αυξορρυθμίζει τα γονίδια με τα οποία έχει μεγαλύτερη συγγένεια, δηλαδή τα γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες όπως η p21, που οδηγούν σε στάση του κυτταρικού κύκλου και γήρανση, 2) επάγει την έκφραση του p16, ο οποίος ανταγωνίζεται τις κυκλινοεξαρτώμενες κινάσες και προωθεί την περαιτέρω στάση του κυτταρικού κύκλου, 3) ρυθμίζει θετικά το μονοπάτι PI3K/mTOR. Η κινάση mTOR μειωρρυθμίζει την αποακετυλάση SIRT1 και το μεταγραφικό παράγοντα PGC1- α οδηγώντας σε κυτταρική γήρανση και μιτοχονδριακή δυσλειτουργία. Η κυτταρική γήρανση συσχετίζεται με την εμφάνιση του φαινοτύπου SASP (*Senescence-associated Secretory Phenotype*), ενώ η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία αφορά μείωση της μιτοφαγίας (μέσω μείωσης των βασικών ρυθμιστών της μιτοφαγίας PINK1 και PARK2), διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ σύντηξης/σχάσης και αύξηση στη διαπερατότητα των μιτοχονδριακών μεμβρανών πέραν του φυσιολογικού. Επιπλέον, παρατηρείται έξοδος του mtDNA στο κυτταρόπλασμα και αλληλεπίδρασή του με το NLRP3 φλεγμονόσωμα (Cloonan et al, 2020).

4 Μιτοχονδριακά tRNAs και συσχέτιση με ασθένειες

Πέρα από τους παραπάνω μηχανισμούς με τους οποίους το οξειδωτικό stress επηρεάζει τη λειτουργία των μιτοχονδρίων, η έρευνα εστιάζει πλέον το ενδιαφέρον της στις προϋπάρχουσες ή επαγόμενες από το οξειδωτικό stress μεταλλάξεις στο mtDNA, οι οποίες είναι δυνατό να συνεισφέρουν στην παθογένεια της ΧΑΠ. Όπως ήδη συζητήθηκε, το mtDNA μεταξύ άλλων κωδικοποιεί 22 tRNA τα οποία είναι απαραίτητα για την πρωτεϊνοσύνθεση εντός των μιτοχονδρίων. Τα tRNA των μιτοχονδρίων διαφέρουν ως προς τη μορφολογία τους και ως προς τις μετα-μεταγραφικές τροποποιήσεις που υφίστανται από τα tRNA του κυτταροπλάσματος (Zifa et al, 2007). Όπως όμως και τα κυτταροπλασματικά tRNA, έτσι και τα μιτοχονδριακά υπόκεινται σε ωρίμαση και σε μετα-μεταγραφικές τροποποιήσεις που διευκολύνουν την αλληλεπίδρασή τους με τις αμινοακυλ-tRNA συνθετάσες, οι οποίες θα φορτίσουν το tRNA με το κατάλληλο αμινοξύ. Στη συνέχεια, τα αμινοακυλιωμένα tRNAs αλληλεπιδρούν αντιστρεπτά με παράγοντες της μετάφρασης όπως ο

παράγοντας επιμήκυνσης EF-Tu, ώστε να μεταφερθούν στα ριβοσώματα. Εύκολα λοιπόν συνάγεται το συμπέρασμα ότι μεταλλάξεις στα μιτοχονδριακά tRNAs μπορεί να οδηγήσουν σε αύξηση της αποικοδόμησής τους, μείωση της ικανότητας αμινοακυλίωσης ή μείωση της ικανότητας αλληλεπίδρασης με τους παράγοντες μετάφρασης, με επακόλουθο αποτέλεσμα τη μείωση του ρυθμού της πρωτεϊνοσύνθεσης στα μιτοχόνδρια και πιθανές συνέπειες στη λειτουργικότητα της αναπνευστικής αλυσίδας.

Είναι ενδιαφέρον πως παρ'ότι τα γονίδια που κωδικοποιούν τα μιτοχονδριακά tRNAs καταλαμβάνουν μόλις το 10% της συνολικής κωδικοποιητικής ικανότητας των μιτοχονδρίων, εντούτοις περισσότερες από τις μισές μεταλλάξεις στο mtDNA που έχουν συσχετιστεί με ασθένειες, εντοπίζονται στα γονίδια αυτά (*Stowe and Camara, 2009*). Η παρατήρηση αυτή δεν είναι παράδοξη εάν αναλογιστεί κανείς πως τα μιτοχονδριακά tRNAs είναι υπεύθυνα για την πραγματοποίηση της πρωτεϊνοσύνθεσης εντός των μιτοχονδρίων. Συνεπώς, μία μετάλλαξη που επηρεάζει τη λειτουργία ενός mt-tRNA, μπορεί να προκαλέσει προβλήματα κατά τη σύνθεση των μιτοχονδριακών πρωτεϊνών και να αποτελέσει αιτιολογικό παράγοντα για την εμφάνιση κάποιας σχετιζόμενης με τα μιτοχόνδρια νόσου. Επισημαίνεται βέβαια ότι κάθε tRNA στα μιτοχόνδρια δεν έχει την ίδια σημαντικότητα, δεδομένου ότι οι πρωτεΐνες της αναπνευστικής αλυσίδας είναι διαμεμβρανικές, που σημαίνει πως κατά ένα μεγάλο ποσοστό αποτελούνται από υδρόφοβα αμινοξέα (*Zifa et al, 2007*).

Μεταλλάξεις σε γονίδια που κωδικοποιούν mt-tRNAs έχουν ήδη εντοπιστεί σε διάφορες πνευμονικές νόσους όπως είναι η ιδιοπαθής πνευμονική ίνωση (IPF), η σαρκοείδωση και το άσθμα. Σε μία έρευνα που διενεργήθηκε στο Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, εξετάστηκε η παρουσία μεταλλάξεων στα mt-tRNA γονίδια σε 40 ασθενείς με IPF και 85 ασθενείς με σαρκοείδωση σε σύγκριση με 204 υγιείς-control. Στους πάσχοντες από IPF εντοπίστηκαν 32 συνολικά μεταλλάξεις σε 38 από τους 40 ασθενείς, ενώ στους πάσχοντες από σαρκοείδωση, ανιχνεύτηκαν 45 μεταλλάξεις στους 69 από τους 85 ασθενείς. Τα αποτελέσματα της έρευνας για την IPF αποκάλυψαν εν τέλει την ύπαρξη 12 μεταλλάξεων που εμφανίζονται με μεγαλύτερη συχνότητα στους ασθενείς σε σχέση με τους υγιείς, ενώ 5 εντοπίζονται αποκλειστικά σε ασθενείς με IPF. Τα αντίστοιχα αποτελέσματα για τη σαρκοείδωση ανέδειξαν την ύπαρξη 17 μεταλλάξεων που εμφανίζονται με μεγαλύτερη συχνότητα στους ασθενείς καθώς και 8 μεταλλάξεων που εντοπίζονται μόνο στους ασθενείς και καθόλου στους υγιείς (*Daniil et al, 2018*).

Ανάλογη έρευνα πραγματοποιήθηκε και για το άσθμα. Στους 56 από τους 76 ασθενείς που εξετάστηκαν, εντοπίστηκαν 10 μεταλλάξεις στα mt-tRNA γονίδια, εκ των οποίων οι 5 παρουσιάζουν σημαντικά μεγαλύτερη συχνότητα στους ασθενείς σε σύγκριση με τους 100 υγιείς-controls (Zifa *et al*, 2012). Τα αποτελέσματα και των τριών αυτών ερευνών συνοψίζονται στον πίνακα 1.

Ασθένεια	IPF	Σαρκοείδωση	Άσθμα
Υγιείς-controls (n)	204	204	100
Ασθενείς (n)	40	85	76
Μεταλλάξεις που ανιχνεύτηκαν στους ασθενείς (n)	32	45	10
Ποσοστό ασθενών που φέρουν κάποια μετάλλαξη (%)	38/40 (95%)	59/85 (81%)	56/76 (74%)
Μεταλλάξεις με μεγαλύτερη συχνότητα στους ασθενείς (n)	12	17	5
Μεταλλάξεις που ανιχνεύτηκαν μόνο σε ασθενείς (n)	5	8	4

Πίνακας 1: Σύνοψη αποτελεσμάτων ερευνητικών μελετών για ανίχνευση μεταλλάξεων στα mt-tRNA γονίδια σε ασθενείς με IPF, σαρκοείδωση και άσθμα.

5 Σκοπός της εργασίας

Προσπάθειες ανίχνευσης μεταλλάξεων σε mt -RNA γονίδια έχουν ξεκινήσει και για τη χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια (ΧΑΠ). Όπως περιγράφηκε παραπάνω, οι ασθενείς με ΧΑΠ είναι πιο επιρρεπείς στην εμφάνιση μεταλλάξεων στο mtDNA τους, ενώ μεταλλάξεις συγκεκριμένα σε γονίδια που κωδικοποιούν για mt-tRNAs μπορεί να έχουν πολλές και διαφορετικές επιδράσεις στη συνολική μιτοχονδριακή λειτουργία. Η παρούσα πτυχιακή εργασία αποτελεί συνέχεια μίας προσπάθειας εντοπισμού μεταλλάξεων στα mt-tRNAs, οι οποίες μπορεί να συσχετίζονται με την εμφάνιση και εξέλιξη της ΧΑΠ. Προηγούμενες μελέτες έχουν ήδη διερευνήσει την ύπαρξη μεταλλάξεων στα tRNA των αμινοξέων Met, Gln, Ile, Asn, Cys, Tyr, Leu^(UR), Leu^(CUN), Phe, Val, Ser^(AGY), His Gly σε ασθενείς με ΧΑΠ, ενώ στη συνέχεια της παρούσας εργασίας διερευνάται η ανίχνευση μεταλλάξεων στα γονίδια που κωδικοποιούν τα mt-tRNAs για την Arg (αργινίνη) και το Glu (γλουταμινικό οξύ).

6 Υλικά και μέθοδοι

Στο παρόν πείραμα εξετάζονται δείγματα ολικού αίματος από 38 ασθενείς με ΧΑΠ, τα οποία προήλθαν από την πνευμονολογική κλινική του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας. Η μελέτη έγινε σε δείγματα αίματος, δεδομένου ότι η ΧΑΠ είναι μία συστηματική νόσος και σε προχωρημένα επίπεδα επηρεάζει το καρδιαγγειακό, το μυϊκό, το ανοσοποιητικό σύστημα κ.ά. Οι περισσότεροι από τους ασθενείς είναι καπνιστές (33/38 ασθενείς, 87%), η ηλικία τους κυμαίνεται από 51 έως και 83 έτη (Μ.Ο. = 68 έτη), ενώ οι άντρες υπερτερούν αριθμητικά από τις γυναίκες (33/38 ασθενείς είναι άντρες, 87%). Τα χαρακτηριστικά της ομάδας των ασθενών που εξετάζονται συνοψίζονται στον πίνακα 2.

Αριθμός ασθενών (n)	Φύλο	Ποσοστό καπνιστών (%)	Ηλικία (έτη)
38	33 άνδρες 5 γυναίκες	87% (33/38 ασθενείς)	51-83 (Μ.Ο. = 68)

Πίνακας 2: Χαρακτηριστικά της ομάδας ασθενών με ΧΑΠ που εξετάζονται. Στον πίνακα φαίνεται ο αριθμός των ασθενών, το φύλο, η ηλικία και συνήθειες όπως είναι το κάπνισμα.

Από το δείγμα ολικού αίματος, το πρώτο βήμα είναι η απομόνωση του ολικού DNA από τα λευκοκύτταρα. Μετά την απομόνωση, ακολουθεί ηλεκτροφόρηση για το διαχωρισμό του πυρηνικού από το μιτοχονδριακό γονιδίωμα, και στη συνέχεια πραγματοποιείται ενίσχυση των περιοχών στο mtDNA που περιέχουν τα γονίδια mt-tRNA^{Arg} και mt-tRNA^{Glu} μέσω της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR). Μετά την PCR εφαρμόζεται η μέθοδος του πολυμορφισμού μονόκλωνης διαμόρφωσης (SSCP - Single Strand Conformation Polymorphism) για τον έλεγχο της ύπαρξης διαφορών στην τρισδιάστατη δομή των γονιδίων που κωδικοποιούν για τα συγκεκριμένα mt-tRNAs, ενώ τελικά οι πολυμορφισμοί ταυτοποιούνται μέσω αλληλούχησης.

6.1 Απομόνωση ολικού DNA από δείγμα ολικού αίματος ασθενών με ΧΑΠ

Το πρώτο βήμα της παρούσας ερευνητικής μελέτης είναι η απομόνωση του ολικού DNA (πυρηνικού και εξωπυρηνικού/μιτοχονδριακού) από τα λευκοκύτταρα αίματος

ασθενών με ΧΑΠ. Τα δείγματα αίματος αποθηκεύτηκαν στους -20 °C σε ειδικούς σωλήνες που περιείχαν το αντιπηκτικό EDTA, του οποίου ο ρόλος είναι να παρεμποδίζει τη δημιουργία θρόμβων. Για την απομόνωση του ολικού DNA ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο ‘Genomic DNA purification with Nucleospin® Blood’, της εταιρίας MACHEREY-NAGEL και συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκε το kit που περιλαμβάνει υλικά για 50 δείγματα (ώστε να είναι επαρκές για τα 38 δείγματα που εξετάζονται στο εν λόγω πείραμα).

Υλικά/Όργανα

- Πιπέτες (1.000 μl, 200 μl, 100 μl, 20 μl, 10 μl)
- Ρύγχι
- Σωλήνες μικροφυγοκέντρισης των 1,5 mL
- Επωαστήρας (55 °C)
- Φυγόκεντρος
- Στατό
- Στήλες δέσμησης νουκλεϊκών οξέων Nucleospin® Blood
- Σωλήνες συλλογής των 2 mL
- Vortex

Αντιδραστήρια (που δεν περιλαμβάνονται στο kit)

- Αιθανόλη 100%

Αντιδραστήρια στο kit

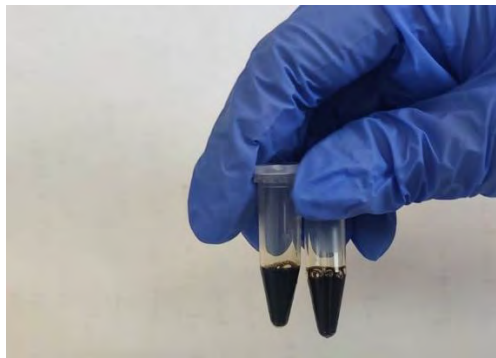
- Proteinase Buffer BP
- Buffer B3
- Wash Buffer BW
- Wash Buffer B5
- Elution Buffer BE
- Λυοφιλωμένη πρωτεΐνωση K

Πειραματική Διαδικασία

Για την απομόνωση ολικού DNA από δείγματα αίματος ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία:

1. Αρχικά, τα δείγματα αίματος αφέθηκαν να ξεπαγώσουν, καθώς προηγουμένως βρίσκονταν αποθηκευμένα στους $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.
2. Ενώ ξεπάγωναν τα δείγματα, παρασκευάστηκαν τα διαλύματα Proteinase K και Wash Buffer B5.
 - Proteinase K: 30 mg λυοφιλιωμένης πρωτεΐνάσης K διαλύθηκαν σε 1,35 mL του ρυθμιστικού διαλύματος Proteinase Buffer BP. Το διάλυμα αυτό διατηρείται στους $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ για 6 μήνες.
 - Wash Buffer B5: Σε 12 mL του Wash Buffer B5, που παρέχεται από το kit, προστέθηκαν 48 mL αιθανόλης 100%. Το διάλυμα αυτό είναι δυνατό να διατηρηθεί για 1 χρόνο σε θερμοκρασία δωματίου ($18-25\text{ }^{\circ}\text{C}$).
3. Σε σωλήνες μικροφυγοκέντρισης των 1,5 mL προστέθηκαν 200 μl από κάθε δείγμα αίματος, 20 μl του διαλύματος Proteinase K και 200 μl του ρυθμιστικού διαλύματος Buffer B3 (Genomic Lysis Buffer). Οι σωλήνες αναδεύτηκαν με τη βοήθεια Vortex για 10-20 δευτερόλεπτα σε μεγάλη ταχύτητα. Η μεγάλη ταχύτητα στην ανάδευση είναι απαραίτητη για την απόκτηση DNA υψηλής καθαρότητας.

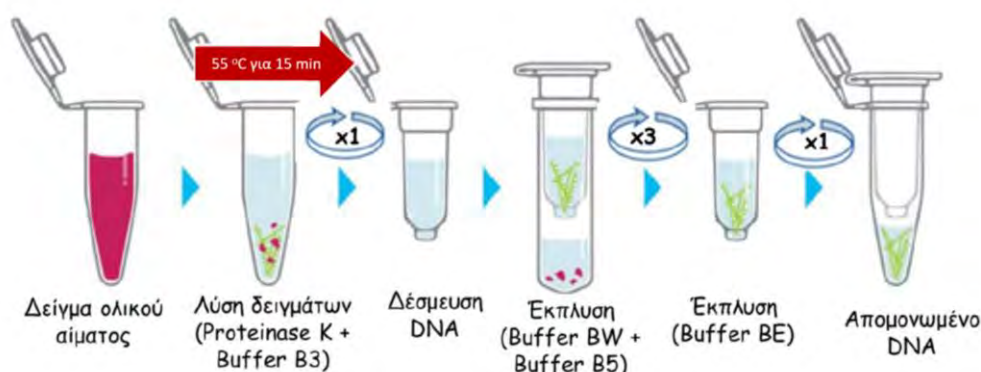
Το διάλυμα Proteinase K έχει ως ρόλο την αποικοδόμηση των πρωτεϊνών (συμπεριλαμβανομένων και των νουκλεασών), ενώ το διάλυμα Buffer B3 περιέχει υποχλωριώδη γουανιδίνη (GuHCl), δηλαδή έναν ισχυρό χηλικό παράγοντα που μπορεί να παρεμβαίνει στα δίκτυα δεσμών υδρογόνου σε υδατικά διαλύματα και να αποσταθεροποιεί τα βιολογικά μακρομόρια.
4. Οι σωλήνες μικροφυγοκέντρισης επώαστηκαν στους $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ για 10-15 λεπτά. Κατά τη διάρκεια της επώασης πραγματοποιήθηκε η λύση των κυττάρων και μάλιστα το προϊόν της λύσης απέκτησε ένα καφετί χρώμα (εικόνα 12).



Εικόνα 12: Δείγματα αίματος ασθενών με ΧΑΠ τα οποία έχουν υποστεί λύση και έχουν αποκτήσει καφετί χρώμα.

5. Μετά την επώαση, σε κάθε σωλήνα προστέθηκαν 200 µl αιθανόλης 100% και ακολούθησε έντονη ανάδευση με Vortex για λίγα δευτερόλεπτα.
6. Για τη δέσμευση του DNA και το διαχωρισμό του από τα υπόλοιπα προϊόντα της λύσης, χρησιμοποιήθηκαν οι στήλες δέσμευσης νουκλεϊκών οξέων Nucleospin® Blood, οι οποίες τοποθετήθηκαν σε σωλήνες συλλογής. Σε κάθε στήλη φορτώθηκε το περιεχόμενο των σωλήνων μικροφυγοκέντρισης και ακολούθησε φυγοκέντριση στις 10.000g για 1 λεπτό. Το DNA παρέμεινε δεσμευμένο στη στήλη μετά το τέλος της φυγοκέντρισης γι' αυτό απορρίφθηκε το υγρό στο σωλήνα συλλογής και κρατήθηκε η στήλη.
7. Ακολούθως, ξεκίνησαν οι διαδικασίες έκπλυσης. Αρχικά, οι στήλες τοποθετήθηκαν σε νέο σωλήνα συλλογής και προστέθηκαν επιπλέον 500 µl του διαλύματος Wash Buffer BW. Το διάλυμα αυτό χρησιμοποιείται για την έκπλυση. Αφαιρεί αποτελεσματικά το προηγούμενο διάλυμα και προετοιμάζει τον ιστό για το επόμενο στάδιο έκπλυσης. Επιπλέον, το διάλυμα αυτό απομακρύνει νουκλεϊκά οξέα χαμηλού μοριακού βάρους. Κατόπιν, πραγματοποιήθηκε φυγοκέντριση στις 10.000g για 1 λεπτό και τελικά απορρίφθηκε ο σωλήνας συλλογής και κρατήθηκε η στήλη.
8. Οι στήλες τοποθετήθηκαν σε νέο σωλήνα συλλογής μαζί με 500 µl ενός νέου διαλύματος έκπλυσης, του Wash Buffer B5, το οποίο συμβάλλει στην απομάκρυνση του προηγούμενου διαλύματος έκπλυσης, και το οποίο αντί για υποχλωριώδη γουανιδίνη περιέχει αιθανόλη. Η αιθανόλη πρέπει να απομακρυνθεί με την επόμενη πλύση γιατί εάν παραμείνει, θα παρεμποδίσει την τελική έκλυση του DNA, ενώ είναι δυνατό να παρεμποδίσει τη διεξαγωγή μετέπειτα πειραματικών μεθοδολογιών όπως είναι για παράδειγμα η PCR. Το μίγμα φυγοκεντρήθηκε στις 14.000g για 3 λεπτά και στο τέλος απορρίφθηκε ο σωλήνας συλλογής.
9. Τέλος, οι στήλες τοποθετήθηκαν σε σωλήνες τύπου eppendorf των 1,5mL και προστέθηκαν σε αυτούς 80 µl του διαλύματος Wash Buffer BE, το οποίο σε χαμηλές συγκεντρώσεις προωθεί την έκπλυση των πρωτεϊνών, ενώ σε υψηλές οδηγεί στην αποδέσμευση του επιθυμητού μακρομορίου από τη στήλη, δηλαδή του DNA. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε φυγοκέντριση στις 14.000g για 1,5 λεπτό και τελικά απορρίφθηκαν οι στήλες και κρατήθηκαν οι σωλήνες συλλογής, οι οποίοι περιείχαν πλέον το απομονωμένο ολικό DNA από κάθε

αρχικό δείγμα αίματος. Το ολικό DNA αποθηκεύτηκε στους $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ μέχρι την επόμενη χρήση.



Εικόνα 13 Σχηματική αναπαράσταση των 9 βημάτων του πειραματικού πρωτοκόλλου που ακολουθήθηκε για την απομόνωση ολικού DNA από αίμα ασθενών με ΧΑΠ.

6.2 Ηλεκτροφόρηση απομονωμένων δειγμάτων DNA με χρήση πηκτής αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση του DNA σε πήκτωμα αγαρόζης χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό δίκλωνων μορίων DNA σε ουδέτερο pH. Σε ουδέτερο pH, το DNA, λόγω των αρνητικά φορτισμένων φωσφορικών ομάδων που φέρει, έχει αρνητικό (-) φορτίο. Η μέθοδος βασίζεται στην αρχή μετανάστευσης φορτισμένων μορίων κάτω από την επίδραση εξωτερικά εφαρμοζόμενου ηλεκτρικού πεδίου. Η ηλεκτροστατική δύναμη που αναπτύσσεται κατευθύνει τα φορτισμένα μόρια προς το ηλεκτρόδιο του αντίθετου φορτίου. Συνεπώς, αν τοποθετηθούν τμήματα DNA στην κάθοδο (-) θα μετακινηθούν προς την άνοδο (+).

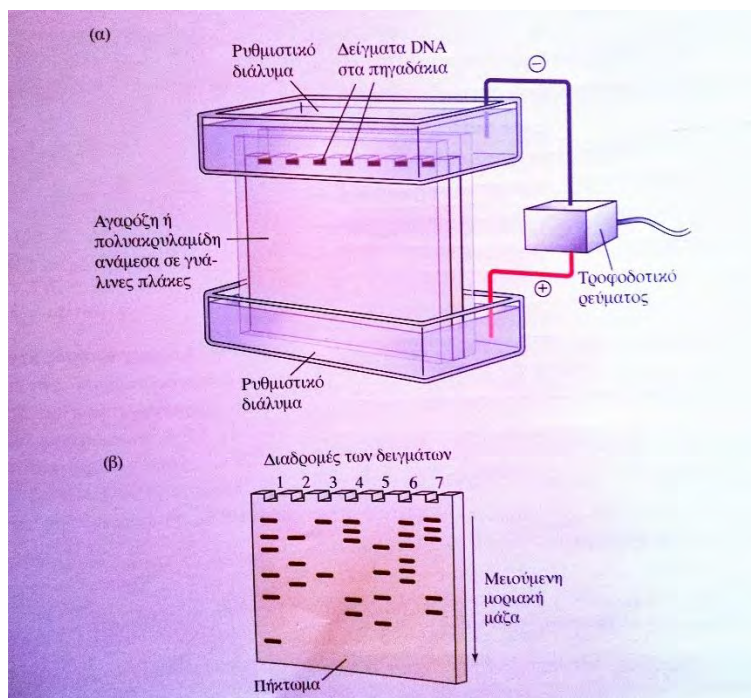
Η κινητικότητα του DNA κατά τη διάρκεια της ηλεκτροφόρησης καθορίζεται από τις εξής παραμέτρους:

- Το μέγεθος του δίκλωνου DNA. Όσο πιο μεγάλο είναι ένα μόριο DNA, τόσο πιο δύσκολα διέρχεται μέσα από τους πόρους του πηκτώματος αγαρόζης και άρα τόσο πιο αργά μετακινείται προς την άνοδο (+).
- Τη συγκέντρωση της αγαρόζης.
- Τη στερεοδιάταξη του DNA. Η κλειστή (υπερελικωμένη) μορφή (μορφή I), η ανοιχτή κυκλική μορφή (μορφή II) και το γραμμικό DNA (μορφή III) του ίδιου

μοριακού βάρους παρουσιάζουν διαφορετική κινητικότητα σε πήκτωμα αγαρόζης. Οι σχετικές κινητικότητες των τριών αυτών μορφών διαφέρουν ανάλογα με τις συνθήκες της ηλεκτροφόρησης και εξαρτώνται από τη συγκέντρωση της αγαρόζης, το βαθμό υπερελίκωσης της μορφής I, την ένταση του ρεύματος και την ιονική ισχύ του ρυθμιστικού διαλύματος.

- Την τάση του ηλεκτρικού πεδίου που εφαρμόζεται.
- Τη χρήση χρωστικών όπως το βρωμιούχο αιθίδιο.
- Την ιονική ισχύ του ρυθμιστικού διαλύματος που εφαρμόζεται.

Η αγαρόζη είναι ένας φυσικός πολυσακχαρίτης που παράγεται από φύκη του είδους Rhodophyceae. Το πήκτωμα σχηματίζει πόρους, το μέγεθος των οποίων είναι αντιστρόφως ανάλογο της συγκέντρωσης της αγαρόζης. Τα πήκτωμα αγαρόζης έχουν τη μορφή πλάκας πάχους λίγων χιλιοστών, παρασκευάζονται σε γυάλινο ή πλαστικό υπόστρωμα και τοποθετούνται σε ειδικές συσκευές ηλεκτροφόρησης που περιέχουν ένα κατάλληλο διάλυμα. Οι συσκευές αυτές στο επάνω μέρος φέρουν εσοχές, γνωστές ως πηγαδάκια, μέσα στις οποίες φορτώνονται τα δείγματα προς ηλεκτροφόρηση. Λόγω της μικρής μηχανικής αντοχής της αγαρόζης, τα πήκτωματά της ηλεκτροφορούνται σε οριζόντιες συσκευές.



Εικόνα 14: (α) Σχηματική απεικόνιση συσκευής ηλεκτροφόρησης όπου φαίνονται οι δύο αντίθετα φορτισμένοι πόλοι (καθοδος και άνοδος), το πήκτωμα τοποθετημένο εντός

γυάλινων πλακών με ρυθμιστικό διάλυμα και τα πηγαδάκια μέσα στα οποία φορτώνονται τα δείγματα DNA. (β) Τα δείγματα κινούνται ανάλογα με τη μοριακή τους μάζα κατά μήκος του πηκτώματος αγαρόζης (Tropp, 2014).

Με την ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης είναι δυνατός ο διαχωρισμός τμημάτων DNA μήκους από 100 bp έως και 25 kbp. Άρα, επειδή στο συγκεκριμένο σημείο του πειράματος ο στόχος είναι ο διαχωρισμός του πυρηνικού DNA από το κυκλικό mtDNA, η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης προσφέρει την απαιτούμενη διακριτική ικανότητα και δεν υπάρχει ανάγκη μεγαλύτερης ακρίβειας, όπως η ακρίβεια που θα προσέφερε η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης, η οποία διαχωρίζει τμήματα DNA με διαφορά ακόμη και μίας βάσης στο μήκος τους. Έτσι λοιπόν, η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης πραγματοποιήθηκε ώστε να ελεγχθεί ποιοτικά ότι απομονώθηκε επαρκής ποσότητα mtDNA. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε παρουσιάζεται παρακάτω.

Υλικά/Όργανα

- Κωνική φιάλη των 100 mL
- Σωλήνες falcon
- Φούρνος μικροκυμάτων
- Πυρίμαχο γάντι
- Πιπέτες
- Ρύγχοι
- Αναδευτήρας
- Ειδική πλάκα με χτενάκια για την παρασκευή του πηκτώματος
- Συσκευή ηλεκτροφόρησης
- Parafilm
- Λάμπα UV

Αντιδραστήρια

- Αγαρόζη
- Ρυθμιστικό διάλυμα TAE 1x
- Χρωστική φόρτωσης Xpert Green
- Χρωστική Bromophenol Blue

Πειραματική Διαδικασία

Για την παρασκευή του πηκτώματος αγαρόζης ακολουθήθηκε η εξής πειραματική διαδικασία:

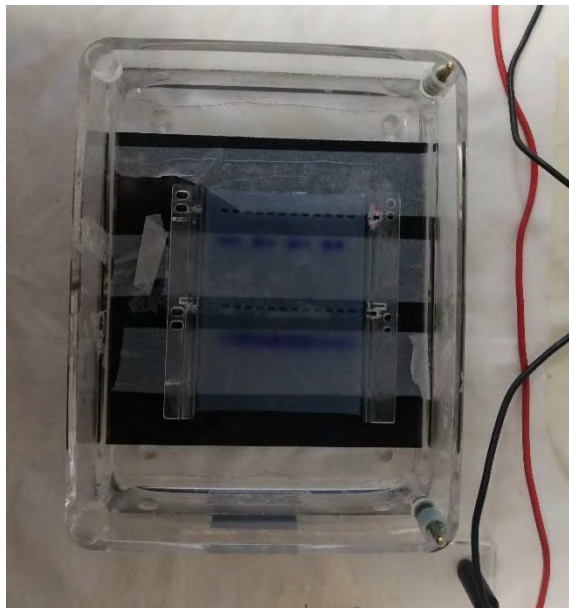
1. Σε κωνική φιάλη των 100 mL τοποθετήθηκαν 0,9 g αγαρόζης (σε σκόνη) και 50 mL του ρυθμιστικού διαλύματος TAE 1x (Tris- acetic acid- EDTA), το οποίο συνιστά ένα ρυθμιστικό διάλυμα που αποτελείται από Tris-οξικό οξύ και EDTA. Το EDTA είναι απαραίτητο γιατί δεσμεύει δισθενή ιόντα και κατά συνέπεια παρεμποδίζει τη δράση νουκλεασών. Το μίγμα αγαρόζης-TAE αναδεύτηκε ελαφρά.
2. Στη συνέχεια, η κωνική φιάλη τοποθετήθηκε σε φούρνο μικροκυμάτων για λίγα λεπτά ώστε να επιτευχθεί η διαλυτοποίηση της αγαρόζης στο ρυθμιστικό διάλυμα.
3. Έπειτα, το διάλυμα αναδεύτηκε και παρατηρήθηκε στο φως για την επιβεβαίωση της επιτυχούς διαλυτοποίησης της αγαρόζης.
4. Η κωνική φιάλη τοποθετήθηκε κάτω από τρεχούμενο νερό βρύσης και υπό ανάδευση, προκειμένου να επανέλθει ομοιόμορφα η θερμοκρασία της.
5. Μόλις η θερμοκρασία της κωνικής φιάλης ήταν ανεκτή με γυμνό χέρι, προστέθηκαν σε αυτή 5 μ L της χρωστικής Xpert Green. Η χρωστική αυτή αλληλεπιδρά με το DNA και δίνει σήμα φθορισμού όταν διεγερθεί από UV ακτινοβολία. Μετά την προσθήκη της χρωστικής αυτής, η φιάλη αναδεύτηκε ξανά.
6. Τέλος, το διάλυμα τοποθετήθηκε στην ειδική πλάκα με τα χτενάκια ώστε να δημιουργηθούν τα πηγαδάκια. Μετά από 15-20 λεπτά τα χτενάκια αφαιρέθηκαν και η πηκτή ήταν πλέον έτοιμη για χρήση.

Αφού ετοιμάστηκε το πήκτωμα αγαρόζης, ακολούθησε η διαδικασία διαχωρισμού του DNA ως εξής:

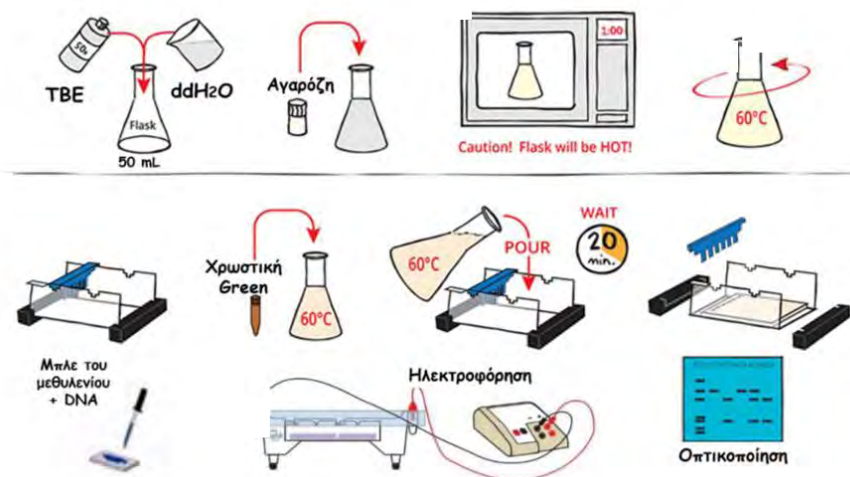
7. Σε κάθε πηγαδάκι του πηκτώματος αγαρόζης τοποθετήθηκε ένα μίγμα που αποτελούνταν από 4 μ l DNA και 6 μ l του loading buffer. Το loading buffer περιέχει γλυκερόλη, η οποία βοηθά στην καθίζηση του δείγματος στο πηγαδάκι και επίσης περιέχει τη χρωστική Bromophenol Blue η οποία βάφει το δείγμα με μπλε χρώμα και βοηθάει στο χειρισμό και στη φόρτωση στο πηγαδάκι. Η

χρωστική αυτή «τρέχει» όπως θα «ετρεχε» ένα τμήμα DNA μήκους 200-300 bp.

8. Έπειτα, το πήκτωμα τοποθετήθηκε σε ειδική συσκευή ηλεκτροφόρησης η οποία συνδέεται με τροφοδότη ρεύματος και στην οποία προστέθηκε ρυθμιστικό διάλυμα TAE 1x. Γενικά, ο λόγος για τον οποίο προστέθηκε το ρυθμιστικό διάλυμα ήταν για να διατηρήσει, κατά τη διάρκεια της ηλεκτροφόρησης, σταθερή την κατανομή του ηλεκτρικού πεδίου, η οποία μετριέται σε volts/cm. Στη συνέχεια, εφαρμόστηκε μία διαφορά δυναμικού στα δύο άκρα της συσκευής (100V), με τον αρνητικό πόλο να εντοπίζεται πιο κοντά στα πηγαδάκια σε σχέση με το θετικό πόλο. Συνεπώς, το αρνητικά φορτισμένο DNA μετακινείται από τον αρνητικό πόλο προς το θετικό λόγω των απωστικών δυνάμεων που του ασκούνται. Τέλος, η οπτικοποίηση των ζωνών πραγματοποιήθηκε μετά από 20 λεπτά με τη βοήθεια της UV ακτινοβολίας.



Εικόνα 15: Πηκτή αгарόζης με δείγματα DNA φορτωμένα στα πηγαδάκια, σε συσκευή ηλεκτροφόρησης.



Εικόνα 16: Σύνοψη των βημάτων που ακολουθήθηκαν για την παρασκευή του πηκτώματος αгарόζης και για τον επακόλουθο διαχωρισμό του πυρηνικού από το μιτοχονδριακό DNA.

6.3 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)

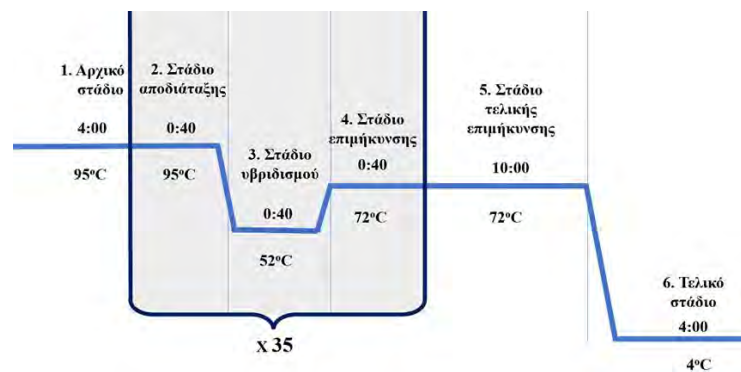
Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) είναι μία εύκολη, γρήγορη και οικονομική τεχνική, μέσω της οποίας καθίσταται δυνατός ο ενζυμικός πολλαπλασιασμός συγκεκριμένων τμημάτων DNA in vitro. Για τον πολλαπλασιασμό αυτό απαραίτητη είναι η παρουσία της θερμοανθεκτικής Taq DNA πολυμεράσης, των τεσσάρων δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs) και δύο ολιγονουκλεοτιδικών εκκινήτων, ενός πρόσθιου και ενός ανάστροφου. Απαραίτητη είναι επίσης η προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος και ιόντων Mg^{2+} , τα οποία δρουν ως συμπαραγόντες της πολυμεράσης.

Η ενίσχυση ενός τμήματος DNA μέσω PCR πραγματοποιείται σε ένα ειδικό μηχάνημα που ονομάζεται θερμοκυκλοποιητής. Κατά την εκκίνηση του θερμοκυκλοποιητή, αρχικά η θερμοκρασία ανέρχεται τους 95 °C και διατηρείται για 4 λεπτά. Στη συνέχεια, πραγματοποιούνται 35 επαναλήψεις των εξής τριών διακριτών σταδίων:

1. Στάδιο αποδιάταξης: Άνοδος της θερμοκρασίας στους 95 °C για 40 δευτερόλεπτα με στόχο την αποδιάταξη των δίκλωνων αλυσιάδων του DNA.

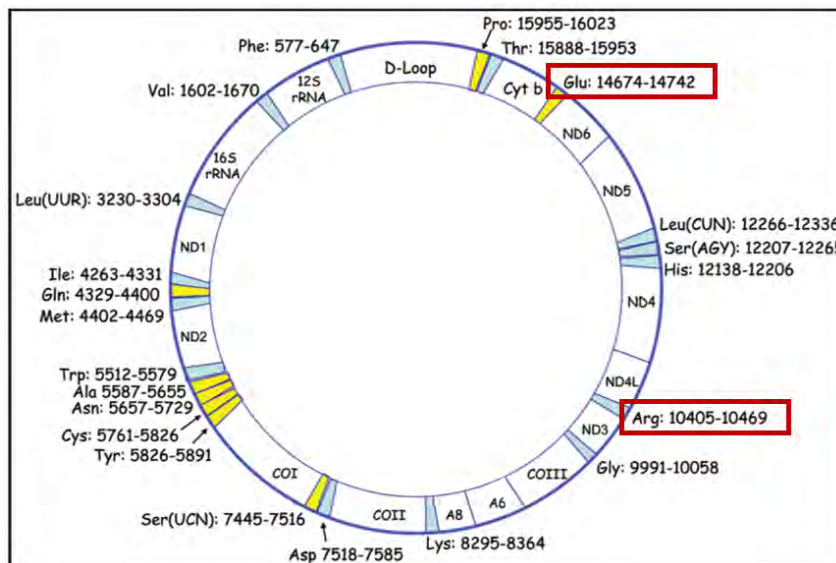
2. Στάδιο υβριδισμού: Κάθοδος της θερμοκρασίας στους 52 °C για 40 δευτερόλεπτα, ώστε να μπορέσουν να υβριδοποιηθούν οι εκκινητές σε κάθε μία από τις δύο αλυσίδες του DNA. Οι εκκινητές είναι απαραίτητοι διότι η Taq πολυμεράση μπορεί να προσθέτει νουκλεοτίδια στο 3' άκρο μίας ήδη υπάρχουσας αλληλουχίας, με βάση τον κανόνα της συμπληρωματικότητας των βάσεων, αλλά δεν μπορεί να συνθέσει μία αλληλουχία από την αρχή (de novo).
3. Στάδιο επιμήκυνσης: Άνοδος της θερμοκρασίας στους 72 °C για 40 δευτερόλεπτα. Η θερμοκρασία αυτή είναι η βέλτιστη για τη δράση της Taq πολυμεράσης, η οποία προσθέτει 150 νουκλεοτίδια ανά δευτερόλεπτο.

Ακολουθεί το στάδιο τελικής επίμηκυνσης, όπου η θερμοκρασία διατηρείται στους 72 °C για 10 λεπτά και το τελικό στάδιο, όπου η θερμοκρασία κατέρχεται στους 4 °C πριν ο θερμοκυκλοποιητής απενεργοποιηθεί πλήρως.



Διάγραμμα 1: Σχηματική αναπαράσταση των θερμοκρασιών και των χρόνων επώασης που εφαρμόζονται σε κάθε στάδιο μίας αντίδρασης PCR.

Στην παρούσα εργασία μελετώνται τα μιτοχονδριακά γονίδια tRNA^{Arg} και tRNA^{Glu}. Το γονίδιο tRNA^{Arg} βρίσκεται στη θέση 10.405-10.469, έχει μήκος 65 bp και κωδικοποιείται από τον πλούσιο σε κυτοσίνη «ελαφρύ» κλώνο, ενώ το γονίδιο tRNA^{Glu} βρίσκεται στη θέση 14.674-14.742, έχει μήκος 69 bp και κωδικοποιείται από τον πλούσιο σε γουανίνη «βαρύ» κλώνο. Η ακριβής θέση των δύο αυτών γονιδίων επισημαίνεται στην εικόνα 17.



Εικόνα 17: Χάρτης του ανθρώπινου μιτοχονδριακού γονιδιώματος όπου επισημαίνονται με κόκκινο πλαίσιο οι ακριβείς θέσεις των γονιδίων $tRNA^{Arg}$ και $tRNA^{Glu}$.

Για την πραγματοποίηση της PCR απαραίτητος ήταν ο σχεδιασμός κατάλληλων εκκινητών για καθένα από τα δύο γονίδια-στόχους. Οι εκκινητές είναι ολιγονουκλεοτίδια με μήκος 18-24 nt και παίζουν το ρόλο του εκμαγείου για την Ταq πολυμεράση. Η ακριβής νουκλεοτιδική αλληλουχία των γονιδίων αντλήθηκε από τη βάση δεδομένων UCSC ως εξής:

- Για το γονίδιο $tRNA^{Arg}$, το οποίο είναι επίσης γνωστό με το όνομα TRNR:

>hg38_ncbiRefSeqOther range=chrM:10405-10469 5'pad=0 3'pad=0 strand=+
repeatMasking=none

5'TGGTATATAGTTTAAACAAAACGAATGATTTTCGACTCATTA AATTATGA
TAATCATATTTACCAA 3'

Με βάση αυτή την αλληλουχία και τις παρακείμενες σε αυτήν αλληλουχίες αντλήθηκαν από τη βιβλιογραφία οι ακόλουθοι εκκινητές, μήκους 20 nt, οι οποίοι ενισχύουν μία αλληλουχία μήκους 227 bp:

Forward Primer 1: 5' GCCCTACAAACA ACTAACCT 3'

$T_m = 52,4$ °C, GC = 45 %

Reverse Primer 1: 5' AGTGAGATGGTAAATGCTAG 3'

$T_m = 49,1$ °C, GC = 40 %

- Για το γονίδιο tRNA^{Glu}, το οποίο είναι επίσης γνωστό με το όνομα TNRE:
- >hg38_ncbiRefSeqOther range=chrM:14674-14742 5'pad=0 3'pad=0 strand=+ repeatMasking=none

5'TATTCTCGCACGGACTACAACCACGACCAATGATATGAAAAACCATCGT
TGTATTTCAACTACAAGAAC3'

Με βάση αυτή την αλληλουχία και τις παρακείμενες σε αυτή αλληλουχίες, αντλήθηκαν από τη βιβλιογραφία οι ακόλουθοι εκκινητές, μήκους 19 nt, οι οποίοι ενισχύουν μία αλληλουχία μήκους 122 bp:

Forward Primer 2: 5' CCCACACTCAACAGAAACA 3'

$T_m = 52,6$ °C, GC = 47,4 %

Reverse Primer 2: 5' TTGCGTATTGGGGTCATTG 3'

$T_m = 53,1$ °C, GC = 47,4 %

Όλοι οι εκκινητές ελέγχθηκαν μέσω του βιοπληροφορικού εργαλείου OligoanalyzerTM Tool για το εάν σχηματίζουν φουρκέτες, εάν ομοδιμερίζονται και εάν ετεροδιμερίζονται. Για τον έλεγχο του σχηματισμού φουρκέτας, έπρεπε όλες οι πιθανές διαμορφώσεις να ικανοποιούν τον κανόνα $T_{m+10} < T_{m \text{ εκκινητή}}$. Την προϋπόθεση αυτή βρέθηκε ότι την πληρούν και οι τέσσερις εκκινητές. Για τον έλεγχο της πιθανότητας ομοδιμερισμού, έπρεπε όλοι οι πιθανοί συνδυασμοί ομοδιμερών να παρουσιάζουν $\Delta G > -9$ kcal/mol. Το κριτήριο αυτό το πληρούν επίσης όλοι οι εκκινητές. Τέλος, για να αποκλειστεί η πιθανότητα ετεροδιμερισμού των δύο εκκινητών κάθε γονιδίου, έπρεπε το ζεύγος πρόσθιου και ανάστροφου εκκινητή να παρουσιάζει για όλους τους πιθανούς συνδυασμούς ετεροδιμερών $\Delta G > -9$ kcal/mol, κριτήριο που και πάλι πληρούν και τα δύο ζεύγη εκκινητών που σχεδιάστηκαν. Επιπλέον, πρέπει να σημειωθεί πως και οι τέσσερις εκκινητές έχουν τιμές T_m (θερμοκρασία τήξης) πολύ κοντά στη θερμοκρασία υβριδισμού που εφαρμόζεται στο θερμοκυκλοποιητή. Αυτό είναι θεμιτό γιατί έτσι αποφεύγεται ο κίνδυνος μη υβριδισμού του εκκινητή (όταν η T_m του εκκινητή είναι πολύ χαμηλότερη από τη θερμοκρασία υβριδισμού) αλλά και ο κίνδυνος υβριδισμού του εκκινητή σε μη ειδικές θέσεις (όταν η T_m του εκκινητή είναι σημαντικά υψηλότερη από τη θερμοκρασία υβριδισμού).

Για την ενίσχυση των δύο μιτοχondριακών γονιδίων πραγματοποιήθηκε PCR με τη χρήση των εκκινητών που σχεδιάστηκαν. Η αντίδραση είχε τελικό όγκο 50 μ l και τα συστατικά που προστέθηκαν στο θερμοκυκλοποιητή παρουσιάζονται στον πίνακα 3.

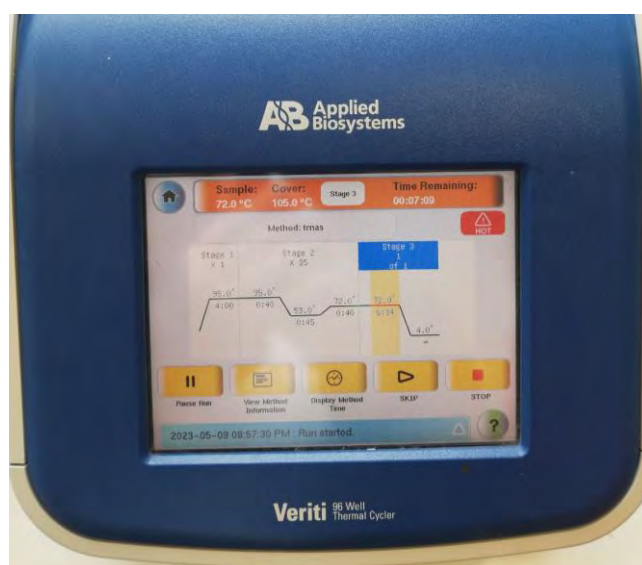
Δείγμα DNA	1 μ l
50 pmol από κάθε εκκινητή	1 + 1 μ l
Ρυθμιστικό διάλυμα PCR, 10x	5 μ l
dNTPs, 40mM	1 μ l
MgCl ₂ , 25mM	1 μ l
1U Taq πολυμεράσης (5U/ μ l)	0,25 μ l
ddH ₂ O έως τα 50 μ l	39,75 μ l

Πίνακας 3: *Συστατικά απαραίτητα για την πραγματοποίηση της αντίδρασης PCR με τελικό όγκο 50 μ l και οι αντίστοιχες ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν.*

Πειραματική διαδικασία

1. Αρχικά, σε σωλήνες τύπου eppendorf τοποθετήθηκε 1 μ l από κάθε δείγμα DNA.
2. Στη συνέχεια, παρασκευάστηκε ένα διάλυμα το οποίο περιείχε όλα τα συστατικά που αναφέρονται στον πίνακα 3 εκτός από το DNA, και το οποίο είναι γνωστό ως Mastermix. Το mastermix περιέχει όλα τα απαραίτητα για την διεξαγωγή της PCR αντιδραστήρια σε ποσότητες που αντιστοιχούν στον αριθμό των δειγμάτων προς ενίσχυση, ενός αρνητικού μάρτυρα και ενός επιπλέον δείγματος ώστε να περισέψει μία ποσότητα σε περίπτωση που υπάρξουν μικροαπώλειες κατά τους χειρισμούς. Η δημιουργία εξαρχής ενός mastermix, αντί του να προσθέταμε κάθε αντιδραστήριο ξεχωριστά σε κάθε eppendorf, μειώνει σημαντικά το πειραματικό σφάλμα και επιταχύνει τη διαδικασία.
3. Για την παρασκευή του mastermix προστέθηκαν τα αντιδραστήρια ξεκινώντας από το αντιδραστήριο με τη μεγαλύτερη ποσότητα (ddH₂O) και τελειώνοντας με το αντιδραστήριο με τη μικρότερη ποσότητα (Taq πολυμεράση). Το ένζυμο της πολυμεράσης είναι θερμοευαίσθητο και δεν πρέπει να παραμείνει για πολλή ώρα σε θερμοκρασία δωματίου ώστε να μη χάσει τη δραστητικότητά του.

4. Μετά τη δημιουργία του, το mastermix τοποθετήθηκε στη φυγόκεντρο για μία σύντομη ανάδευση (spin) για 10 δευτερόλεπτα.
5. Με τη βοήθεια κατάλληλης πιπέτας μεταφέρθηκαν 49 μl από το mastermix σε κάθε έναν από τους σωλήνες erpendorf που περιέχουν τα δείγματα DNA ή το νερό στην περίπτωση του αρνητικού μάρτυρα.
6. Όλα τα erpendorf τοποθετήθηκαν σε φυγόκεντρο για σύντομη ανάδευση (spin) και έπειτα μεταφέρθηκαν στο θερμοκυκλοποιητή ώστε να ξεκινήσει η διαδικασία ενίσχυσης (εικόνα 18).



Εικόνα 18: Διαγραμματική αναπαράσταση των θερμοκρασιών που εφαρμόστηκαν για την ενίσχυση μιτοχονδριακών γονιδίων σε θερμοκυκλοποιητή.

Μετά τις αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα στο θερμοκυκλοποιητή, το αποτέλεσμα είναι η ενίσχυση των δύο μιτοχονδριακών γονιδίων και η απόκτηση δισεκατομμυρίων πιστών αντιγράφων αυτών.

6.4 Ποιοτικός προσδιορισμός των PCR προϊόντων

Μετά την ολοκλήρωση της PCR θα πρέπει να έχουν ενισχυθεί μόνο τα δύο γονίδια mt-tRNA^{Arg} και mt-tRNA^{Glu}. Για να επιβεβαιωθεί πως η PCR οδήγησε σε ενίσχυση μόνο των δύο γονιδίων-στόχων και όχι παραπροϊόντων, πραγματοποιήθηκε και πάλι ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 2,5%. Η συγκέντρωση της αγαρόζης που

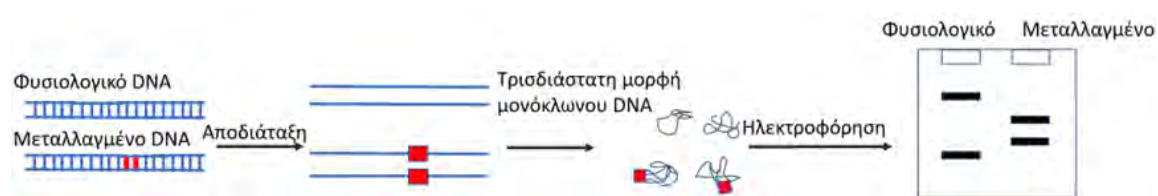
χρησιμοποιήθηκε είναι υψηλότερη από τη συγκέντρωση που είχε εφαρμοστεί στην προηγούμενη ηλεκτροφόρηση (2%) ώστε να επιτευχθεί μεγαλύτερη διακριτική ικανότητα. Για την ηλεκτροφόρηση, χρησιμοποιήθηκε ένας μάρτυρας μοριακού βάρους (DNA ladder), προκειμένου να διαπιστωθεί πως δεν υπήρξε ενίσχυση μη ειδικών (off-target) προϊόντων, και ένας αρνητικός μάρτυρας. Ο αρνητικός μάρτυρας περιείχε όλα τα συστατικά που είναι απαραίτητα για την PCR εκτός από το δείγμα DNA. Αυτό σημαίνει πως εάν δεν υπήρξε κάποια επιμόλυνση με μη επιθυμητό γενετικό υλικό, δεν προέκυψε προϊόν ενίσχυσης κατά την PCR και επομένως κατά την ηλεκτροφόρηση δεν είναι δυνατό να εμφανιστεί κάποια ζώνη. Στη συνέχεια, τα δείγματα που έδωσαν θετικό αποτέλεσμα χρησιμοποιήθηκαν για τον ποιοτικό προσδιορισμό πολυμορφισμών με τη μέθοδο SSCP.

6.5 Πολυμορφισμός μονόκλωνης διαμόρφωσης – SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism)

Χαρη στην PCR, είναι πλέον εφικτή η ενίσχυση οποιασδήποτε γνωστής αλληλουχίας σε ένα γονιδίωμα, ενώ με τη βοήθειά της έχουν αναπτυχθεί πολλές τεχνικές για τον εντοπισμό μεταλλάξεων σε μία νουκλεοτιδική αλληλουχία. Από τις τεχνικές αυτές, η πιο εύκολη, ευαίσθητη και οικονομικά συμφέρουσα είναι η SSCP ή αλλιώς η τεχνική εντοπισμού πολυμορφισμών σε μονόκλωνες διαμορφώσεις. Πρόκειται για μία τεχνική η οποία προσφέρει τη δυνατότητα ανίχνευσης πολυμορφισμών μεταξύ νουκλεοτιδικών αλληλουχιών που είναι σχεδόν ταυτόσημες. Η μέθοδος αυτή επιλέγεται να εφαρμοστεί στην παρούσα εργασία διότι ο στόχος είναι η ανίχνευση διαφορών στα γονίδια mt-tRNA^{Arg} και mt-tRNA^{Glu}, σε 38 ασθενείς με ΧΑΠ. Άρα, σε περίπτωση που κάποιοι από τους 38 ασθενείς φέρουν ακριβώς τον ίδιο πολυμορφισμό, τα δείγματά τους θα ομαδοποιηθούν και από αυτά θα σταλεί για αλληλούχιση μόνο ένα ενδεικτικά. Αυτό σημαίνει πως το κόστος του πειράματος μειώνεται σημαντικά.

Για την εκτέλεση της τεχνικής SSCP απαιτείται ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου. Το πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου προσφέρει σημαντικά μεγαλύτερη διακριτική ικανότητα σε σύγκριση με το πήκτωμα αγαρόζης, δεδομένου ότι καθιστά δυνατό το διαχωρισμό νουκλεοτιδικών αλληλουχιών που διαφέρουν ακόμη και ως προς μία βάση. Τα δίκλιωνα μόρια DNA αρχικά αποδιατάσσονται και οι μονόκλωνες πλέον νουκλεοτιδικές αλληλουχίες ηλεκτροφορούνται. Οι μονόκλωνες αλληλουχίες,

ανάλογα με τη σύστασή τους σε νουκλεοτίδια, υιοθετούν διαφορετικές τρισδιάστατες διαμορφώσεις, γεγονός που σημαίνει πως εμφανίζουν διαφορετική και μοναδική ηλεκτροφορητική κινητικότητα. Με άλλα λόγια, εάν δύο νουκλεοτιδικές αλληλουχίες προέρχονται η μία από υγιές άτομο και η άλλη από ασθενή που φέρει μία συγκεκριμένη μετάλλαξη σε μία θέση του γονιδίου που ενισχύθηκε, τότε οι δύο αλληλουχίες θα αποκτήσουν διαφορετική τρισδιάστατη διαμόρφωση και άρα θα κινηθούν με διαφορετική ταχύτητα κατά την ηλεκτροφόρηση. Το κατά πόσο λοιπόν είναι διακριτή η ύπαρξη πολυμορφισμού ή μετάλλαξης σε μία αλληλουχία εξαρτάται από το πόσο ο πολυμορφισμός ή η μετάλλαξη αυτή επηρεάζει την τρισδιάστατη διαμόρφωση της μονόκλωνης αλυσίδας (Kakavas, 2021).



Εικόνα 19: Σχηματική απεικόνιση της αρχής της μεθόδου SSCP.

6.5.1 Παρασκευή πηκτωμάτων πολυακρυλαμιδίου

Υλικά/Όργανα

- Κάθετη συσκευή ηλεκτροφόρησης
- Βαζελίνη
- Πιπέτα Pasteur
- Οριζόντιος αναδευτήρας
- Δοχεία
- Ογκομετρικοί κύλινδροι
- Πιπέτες
- Ρύγχοι
- Ποτήρι ζέσεως
- Κωνική φιάλη
- Μαγνητικός αναδευτήρας και μαγνητάκι
- Δηθητικό χαρτί
- Ζυγός

- Φωτεινή οθόνη για την παρατήρηση των πηκτωμάτων
- Μικροσωλήνες erpendorf του 0,5 mL
- Θερμοκυκλοποιητής
- Πάγος

Αντιδραστήρια

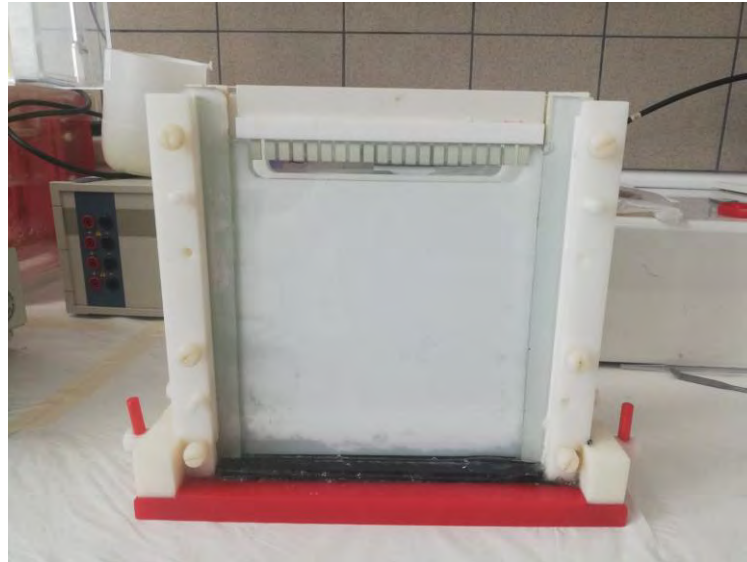
- Πολυακρυλαμίδη
- Δις-πολυακρυλαμίδη
- Γλυκερόλη 50%
- Ρυθμιστικό διάλυμα TBE 10x
- Διάλυμα TEMED
- Διάλυμα APS
- ddH₂O
- Αποδιατακτικό διάλυμα

Για την παρασκευή δύο πηκτών πολυακρυλαμιδίου (12%) ακολουθήθηκε η κάτωθι πειραματική διαδικασία (Εικόνα 20):

1. Αρχικά, με τη βοήθεια του ζυγού, μετρήθηκαν 15 g ακρυλαμιδίου και 0,38 g δις-ακρυλαμιδίου.
2. Σε ογκομετρικό κύλινδρο μετρήθηκαν 6,4 mL ρυθμιστικού διαλύματος TBE 10x και 12,5 mL γλυκερόλης 50%.
3. Τα στερεά και υγρά υλικά τοποθετήθηκαν μαζί σε ποτήρι ζέσεως και ομογενοποιήθηκαν με τη βοήθεια μαγνητικού αναδευτήρα.
4. Ακολούθησε διήθηση του ομογενοποιημένου διαλύματος σε ογκομετρικό κύλινδρο, με τη χρήση διηθητικού χαρτιού, και ογκομέτρηση του διηθήματος. Στη συνέχεια, προστέθηκε ddH₂O μέχρι ο όγκος να φτάσει τα 125 mL.
5. Το επόμενο βήμα ήταν η προσθήκη 125 μl του διαλύματος TEMED (Τετραμεθυλαιθυλενοδιαμίνη) και 750 μl APS (υπερθειϊκό αμμώνιο) 20%. Η προσθήκη της TEMED είναι απαραίτητη για τον πολυμερισμό του πηκτώματος πολυακρυλαμιδίου. Πιο συγκεκριμένα, η τριτοταγής αμίνη TEMED καταλύει το σχηματισμό ελεύθερων ριζών από το APS και τη ριβοφλαβίνη, προκαλώντας έτσι τον πολυμερισμό του ακρυλαμιδίου και του δις-ακρυλαμιδίου προς μία πηκτή κατάλληλη για ηλεκτροφόρηση. Μετά την προσθήκη των TEMED και APS ακολούθησε έντονη ανάδευση, το ρευστό ακόμη πήκτωμα τοποθετήθηκε

στην ειδική συσκευή κάθετης ηλεκτροφόρησης και τέλος εφαρμόστηκαν τα χτενάκια για τη δημιουργία των πηγαδιών. Κάθε πηκτή απέκτησε συνολικά 20 πηγαδάκια.

6. Τα πηκτώματα αφήθηκαν να πήξουν για 30 λεπτά.



Εικόνα 20: Πηκτή πολυακρυλαμίδης με πηγαδάκια σε κάθετη συσκευή ηλεκτροφόρησης.

7. Προτού φορτωθούν τα δείγματα DNA στα πηγαδάκια, πραγματοποιήθηκε αποδιάταξη των δίκλωνων μορίων DNA ως εξής: 7 μl DNA αναμείχθηκαν με 10 μl αποδιατακτικού διαλύματος και τοποθετήθηκαν σε θερμοκυκλοποιητή για 13 λεπτά. Στο θερμοκυκλοποιητή, η θερμοκρασία αρχικά ρυθμίστηκε στους 95 °C για 2 λεπτά, στη συνέχεια στους 97 °C για άλλα 2 λεπτά και τέλος στους 99 °C για 9 λεπτά.

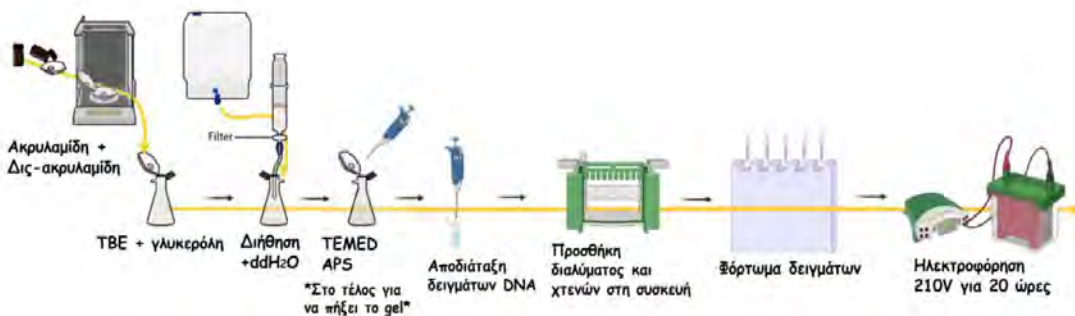
Το αποδιατακτικό διάλυμα περιείχε:

- 95% φορμαμίδιο, το οποίο σε καθαρή μορφή διαλύει πολλές αδιάλυτες στο νερό ιονικές ενώσεις και έχει την ικανότητα να αυτοδιασπάται όταν θερμανθεί.
- 20 mM EDTA. Το EDTA είναι ένας χηλικός παράγοντας που προσδένει δυσθενή ιόντα όπως τα ιόντα ασβεστίου και μαγνησίου. Τα ιόντα αυτά δρουν ως συμπαράγοντες νουκλεασών, επομένως η δέσμευση των ιόντων από το EDTA απενεργοποιεί τις νουκλεάσες παίζοντας έτσι έναν προστατευτικό ρόλο κατά την αποδιάταξη του DNA.

- 10 mM NaOH ως ρυθμιστικό διάλυμα εκχύλισης.
- 0,05% κυανό του ξυλενίου και 0,05% κυανό της βρωμοφαινόλης οι οποίοι δρουν ως δείκτες, δεδομένου ότι εμφανίζουν την ίδια ηλεκτροφορητική κινητικότητα με το DNA.

Μετά την ολοκλήρωση του προγράμματος από το θερμοκυκλοποιητή, τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε πάγο ώστε να αποκλειστεί το ενδεχόμενο επαναδιάταξης των μονόκλωνων πλέον μορίων DNA.

8. Πριν φορτωθούν τα δείγματα DNA, προστέθηκε πρώτα το ρυθμιστικό διάλυμα TBE 0,5x στη συσκευή και έπειτα πραγματοποιήθηκε η φόρτωση των δειγμάτων DNA στα πηγαδάκια με τη βοήθεια πιπέτας.
9. Τέλος, ξεκίνησε η ηλεκτροφόρηση για 20 ώρες στα 200V.



Εικόνα 21: Σύνοψη πρωτοκόλλου παρασκευής πηκτώματος πολυακρυλαμιδίου.

6.5.2 Χρώση πηκτωμάτων πολυακρυλαμιδίου με διάλυμα νιτρικού αργύρου

Για την οπτικοποίηση και παρατήρηση των αποτελεσμάτων της ηλεκτροφόρησης πραγματοποιήθηκε χρώση των δύο πηκτωμάτων πολυακρυλαμιδίου και πλύσεις με τρία διαφορετικά διαλύματα, με βάση το ακόλουθο πειραματικό πρωτόκολλο (Εικόνα 22):

1^ο Διάλυμα: Μονιμοποίηση DNA στο πηκτώμα

1. Αρχικά, σε ογκομετρικό κύλινδρο προστέθηκαν 1 mL οξικού οξέος και 800 mL ddH₂O και το διάλυμα ανακινήθηκε.

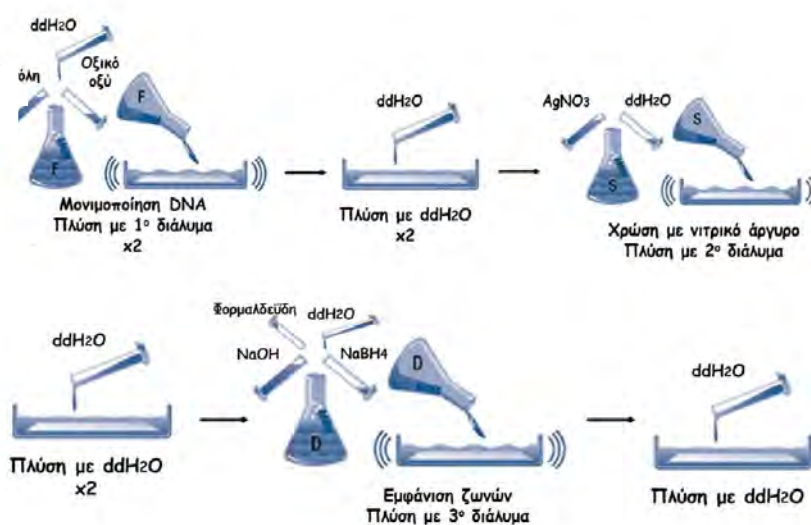
- 200 mL του διαλύματος προστέθηκαν σε κάθε πήκτωμα για 2 λεπτά. Τα πήκτωμα βρίσκονταν υπό ανάδευση κατά τη διάρκεια της πλύσης. Μετά το πέρας των 2 λεπτών το διάλυμα απομακρύνθηκε.
- Η διαδικασία της πλύσης επαναλήφθηκε για ακόμη μία φορά.
- Ακολούθησε άλλη μία πλύη με ddH₂O για 2 λεπτό έκαστη.

2° Διάλυμα: Χρώση των πηκτωμάτων πολυακρυλαμιδίου

- Σε ογκομετρικό κύλινδρο προστέθηκαν 400 mL διαλύματος νιτρικού αργύρου (0,4 g νιτρικού αργύρου διαλύθηκαν σε 400 mL H₂O).
- 200 mL του διαλύματος προστέθηκαν σε κάθε πήκτωμα για 15 λεπτά. Τα πήκτωμα είχαν τοποθετηθεί στον αναδευτήρα κατά τη διάρκεια της πλύσης.
- Τα πήκτωμα ξεπλύθηκαν δύο φορές με ddH₂O.

3° Διάλυμα: Εμφάνιση ζωνών που προέκυψαν από την ηλεκτροφόρηση

- Σε ποτήρι ζέσεως προστέθηκαν 6 g NaOH, 0,02 g NaBH₄, 2 mL φορμαλδεΰδης και ddH₂O, έως ότου ο όγκος φτάσει τα 400 mL.
- 200 mL του διαλύματος προστέθηκαν σε κάθε πήκτωμα. Τα πήκτωμα είχαν τοποθετηθεί στον αναδευτήρα κατά τη διάρκεια της πλύσης.
- Τα πήκτωμα παρέμειναν εμβαπτισμένα στο διάλυμα μέχρι την εμφάνιση των ζωνών.
- Τέλος, απομακρύνθηκε το διάλυμα και ακολούθησε πλύση με ddH₂O.



Εικόνα 22: Σύνοψη πρωτοκόλλου χρώσης των πηκτωμάτων πολυακρυλαμιδίου για την οπτικοποίηση των ζωνών της ηλεκτροφόρησης.

6.6 Καθαρισμός προϊόντων PCR

Μετά την οπτικοποίηση των ζωνών στα πηκτώματα πολυακρυλαμιδίου, παρατηρήθηκε το πρότυπο της ηλεκτροφορητικής κινητικότητας των μονόκλωνων μορίων DNA από τους 38 ασθενείς με ΧΑΠ και τα δείγματα που εμφάνιζαν το ίδιο πρότυπο, δηλαδή τα δείγματα που έφεραν την ίδια μετάλλαξη, ομαδοποιήθηκαν. Τα δείγματα με μοναδικό πρότυπο καθώς και ένα από τα ομαδοποιημένα δείγματα αντιπροσωπευτικά, αποστάλθηκαν σε εταιρεία για αλληλούχιση. Πριν την αποστολή, τα δείγματα υποβλήθηκαν σε καθαρισμό μέσω του kit 'SureClean' της εταιρείας Bioline με στόχο την απομάκρυνση εκκινητών ή παραπροϊόντων που προέκυψαν κατά την ενίσχυση με PCR. Μετά την ολοκλήρωση της αλληλούχισης, τα αποτελέσματα παραδόθηκαν με τη μορφή χρωματογραφήματος από την εταιρεία και με τη χρήση κατάλληλων βιοπληροφορικών εργαλείων όπως είναι το Bioedit, πραγματοποιήθηκε η εξαγωγή της επιθυμητής νουκλεοτιδικής αλληλουχίας.

Για τον καθαρισμό των επιτυχημένων PCR προϊόντων ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία:

1. Αρχικά, σε σωλήνα τύπου erpendorf, αναμειγνύονται 40 μl PCR προϊόντος με 80 μl του διαλύματος NT1. Εάν ο όγκος του PCR προϊόντος είναι μικρότερος από 40 μl, τότε ο εκάστοτε όγκος πρέπει να συμπληρωθεί με ddH₂O μέχρι τα 40 μl. Το διάλυμα NT1 προστίθεται γιατί θα βοηθήσει στη μετέπειτα δέσμευση του DNA στη στήλη καθαρισμού.
2. Σε σωλήνες συλλογής των 2 mL τοποθετούνται οι στήλες καθαρισμού των PCR προϊόντων, και στη συνέχεια φορτώνεται σε κάθε στήλη το περιεχόμενο των σωλήνων τύπου erpendorf του προηγούμενου βήματος. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 11.000 g για 30 s. Το DNA παραμένει δεσμευμένο στη στήλη και γι' αυτό απορρίπτεται το περιεχόμενο του σωλήνα συλλογής.
3. Η στήλη επανατοποθετείται στο σωλήνα συλλογής και προστίθενται σε αυτή 700 μl του διαλύματος NT3. Η πλύση με αυτό το διάλυμα βοηθά στην απομάκρυνση ανεπιθύμητων τμημάτων DNA όπως τα διμερή εκκινητών και παράλληλα προστατεύει από την κατακράτηση αλάτων. Ακολούθως, πραγματοποιείται φυγοκέντρηση στις 11.000 g για 30 s.
4. Η διαδικασία του βήματος 3 επαναλαμβάνεται για ακόμη μία φορά ώστε να επιτευχθεί η απομόνωση DNA υψηλότερης καθαρότητας.

5. Έπειτα, πραγματοποιείται φυγοκέντρηση στις 11.000 g για 1 λεπτό ώστε να απομακρυνθεί πλήρως το διάλυμα NT3, το οποίο μεταξύ άλλων περιέχει αιθανόλη. Η αιθανόλη μπορεί να δράσει ως αναστολέας σε ενζυμικές αντιδράσεις και γι'αυτό πρέπει να απομακρυνθεί πλήρως. Μετά τη φυγοκέντρηση, απορρίπτεται το υγρό στο σωλήνα συλλογής και η στήλη τοποθετείται σε σωλήνα μικροφυγοκέντρησης των 1,5 mL.
6. Τέλος, για την έκλυση του DNA από τη στήλη, προστίθενται 22 μl ddH₂O και η στήλη παραμένει σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (18-25°C) για 2 λεπτά. Κατόπιν, οι στήλες φυγοκεντρώνται στις 11.000 g για 1 λεπτό και τελικά απορρίπτεται η στήλη. Το καθαρό DNA βρίσκεται πλέον στο σωλήνα μικροφυγοκέντρησης και είναι έτοιμο να σταλεί για αλληλούχιση.
7. Για την επιβεβαίωση της επιτυχούς απομόνωσης καθαρού DNA πραγματοποιείται ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης (2%). Σε κάθε πηγάδι φορτώνονται 2 μl DNA και 2 μl της χρωστικής μπλε της βρωμοφαινόλης. Η οπτικοποίηση πραγματοποιείται με τη βοήθεια UV ακτινοβολίας.

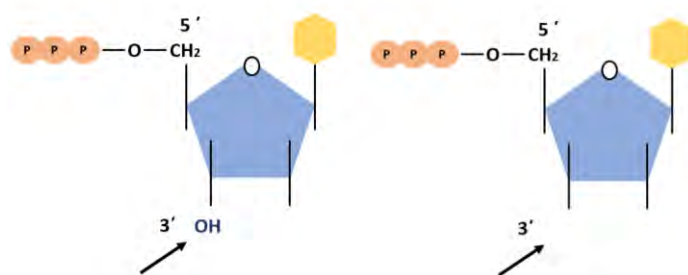


Εικόνα 23: Σύνοψη πειραματικής διαδικασίας για την απομόνωση καθαρού DNA από επιτυχημένα PCR προϊόντα.

6.6 Αλληλούχιση DNA

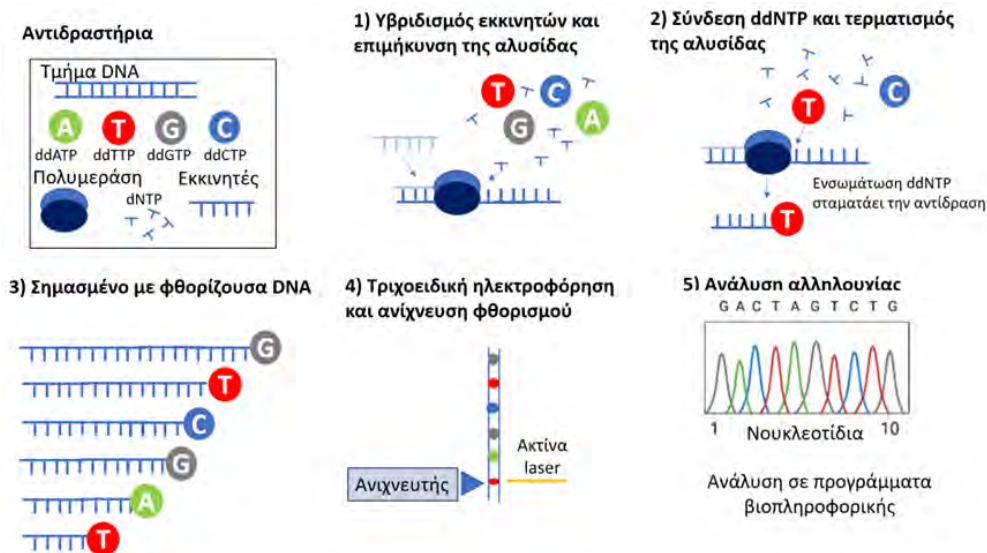
Η αλληλούχιση είναι η διαδικασία εύρεσης της ακολουθίας των νουκλεϊκών βάσεων σε ένα τμήμα DNA. Η τεχνολογία της αλληλούχισης αναπτύχθηκε κατά τις δεκαετίες του '70 και του '80, και η πιο γνωστή και ευρέως χρησιμοποιούμενη μέχρι σήμερα είναι η αλληλούχιση κατά Sanger. Η αλληλούχιση κατά Sanger στηρίζεται στην αντιγραφή του DNA με τη χρήση δεοξυνουκλεοτιδίων και διδεοξυνουκλεοτιδίων. Τα διδεοξυνουκλεοτίδια μοιάζουν με τα δεοξυνουκλεοτίδια, με τη διαφορά πως στον 3'

άνθρακα της ριβόζης φέρουν ένα άτομο υδρογόνου αντί για μία υδροξυλομάδα (εικόνα 24).



Εικόνα 24: Σύγκριση της δομής ενός δεοξυνουκλεοτιδίου (αριστερά) και ενός διδεοξυνουκλεοτιδίου (δεξιά). Η διαφορά εντοπίζεται στον 3' άνθρακα της ριβόζης και υποδεικνύεται από τα μαύρα βέλη.

Η αντιγραφή του DNA λαμβάνει χώρα παρουσία δεοξυνουκλεοτιδίων και διδεοξυνουκλεοτιδίων. Τα διδεοξυνουκλεοτίδια, λόγω της απουσίας της 3' υδροξυλομάδας, δεν είναι δυνατό να σχηματίσουν φωσφοδιεστερικό δεσμό με άλλα νουκλεοτίδια. Αυτό σημαίνει πως όταν, κατά τυχαίο τρόπο, η πολυμεράση χρησιμοποιεί ένα διδεοξυνουκλεοτίδιο για την επιμήκυνση του νεοσυντιθέμενου κλώνου, η αντιγραφή τερματίζεται. Με βάση το νόμο της τυχαιότητας, για κάθε νουκλεοτίδιο που προστίθεται, κάποια στιγμή θα προστεθεί διδεοξυνουκλεοτίδιο και η αντιγραφή θα τερματιστεί. Αυτό σημαίνει πως θα προκύψουν τμήματα DNA με διαφορετικά μήκη. Αν μάλιστα κάθε ένα από τα τέσσερα διδεοξυνουκλεοτίδια σημανθεί με μία διαφορετική φθορίζουσα, καθίσταται δυνατή η ανάγνωση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας, ύστερα από τριχοειδή ηλεκτροφόρηση και ανίχνευση του φθορισμού από αυτόματους αναλυτές. Τα αποτελέσματα της αλληλούχισης κατά Sanger αποδίδονται με τη μορφή χρωματογραφήματος και είναι ακριβή για την αλληλούχιση τμημάτων μήκους μέχρι και 800 bp. Η διαδικασία της αλληλούχισης παρουσιάζεται στην εικόνα 25.



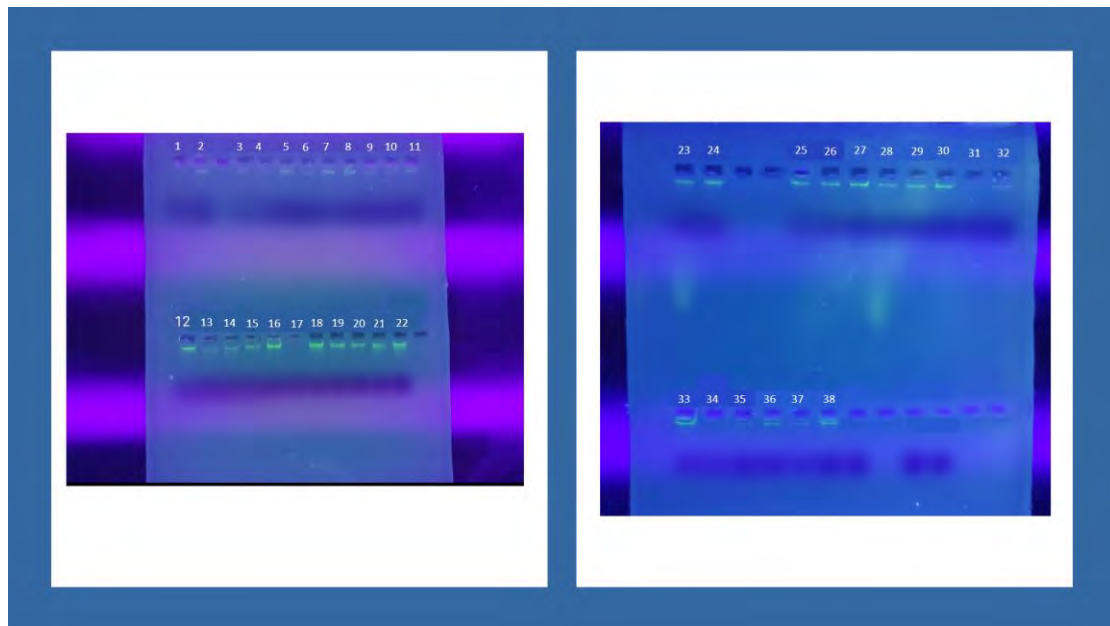
Εικόνα 25: Σύνοψη των βημάτων που απαιτούνται για την αλληλούχιση κατά Sanger.

7 Αποτελέσματα

Οι πειραματικές διαδικασίες που παρουσιάστηκαν στην προηγούμενη ενότητα πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, ενώ τα δείγματα ολικού αίματος ασθενών με ΧΑΠ προήλθαν από την πνευμονολογική κλινική του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας. Τα αποτελέσματα κάθε σταδίου των πειραμάτων παρουσιάζονται στις ακόλουθες υποενότητες.

7.1 Απομόνωση DNA

Η απομόνωση ολικού DNA από δείγμα ολικού αίματος από 38 ασθενείς που πάσχουν από ΧΑΠ πραγματοποιήθηκε με βάση το πρωτόκολλο ‘Genomic DNA purification with Nucleospin® Blood’, της εταιρίας MACHEREY-NAGEL, όπως περιγράφηκε αναλυτικά στην υποενότητα 6.1. Επειδή ο στόχος της παρούσας πτυχιακής είναι η ανίχνευση μεταλλάξεων σε tRNA γονίδια στο mtDNA, έπρεπε να πραγματοποιηθεί ηλεκτροφόρηση για την επιβεβαίωση της απομόνωσης mtDNA από τα δείγματα ολικού αίματος. Η ηλεκτροφόρηση έγινε με τη βοήθεια πηκτώματος αγαρόης 2% και τα αποτελέσματα της για τα 38 δείγματα παρουσιάζονται στην εικόνα 26.

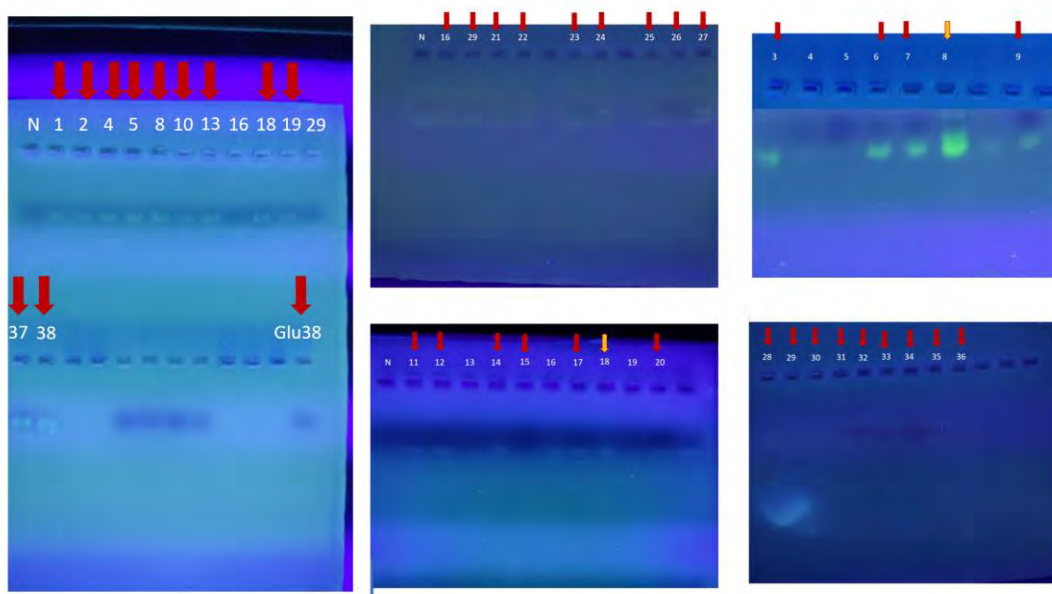


Εικόνα 26: Στην εικόνα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης των 38 δειγμάτων DNA που απομονώθηκαν από ασθενείς με ΧΑΠ. Με αριθμούς υποδεικνύονται τα πηγαδάκια στα οποία έχει προστεθεί δείγμα DNA, ενώ τα υπόλοιπα πηγαδάκια είναι κενά. Με πράσινη φθορίζουσα παρατηρείται το mtDNA, το οποίο λόγω του μικρότερου μεγέθους του είναι πιο ευκινητό από το γονιδιωματικό DNA το οποίο έχει παραμείνει βυθισμένο στο πηγαδάκι. Τα αποτελέσματα δείχνουν πως όλα τα δείγματα DNA απομονώθηκαν σωστά, με εξαίρεση το δείγμα 17. Το δείγμα 17 δεν έδωσε πράσινο σήμα φθορισμού. Αυτό σημαίνει πως η απομόνωση του DNA δεν έγινε σωστά. Γι' αυτό το λόγο η διαδικασία απομόνωσης DNA από το δείγμα 17 επαναλήφθηκε και ύστερα από μία νέα ηλεκτροφόρηση επιβεβαιώθηκε η επιτυχής απομόνωση.

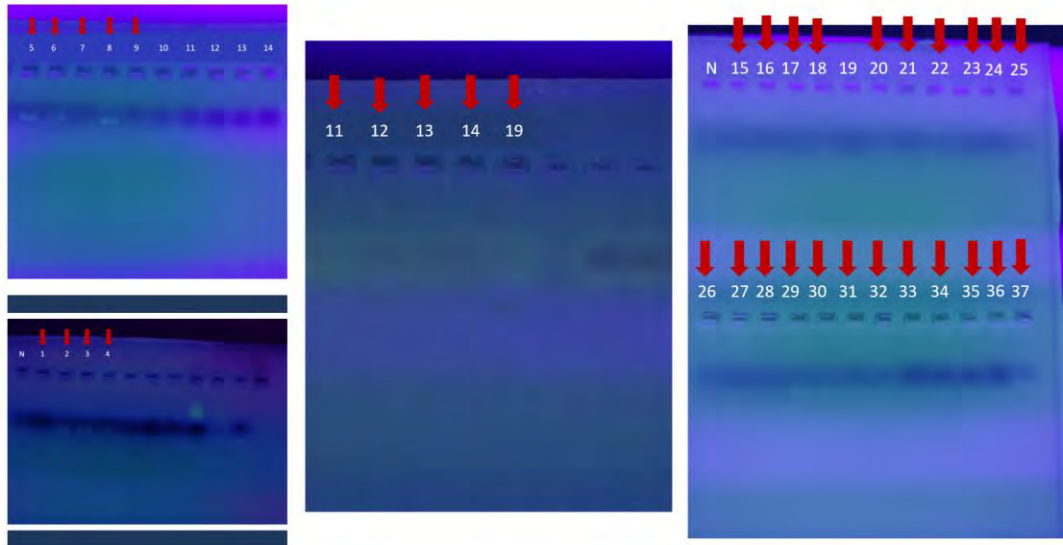
7.2 Έλεγχος επιτυχούς ενίσχυσης των mt-tRNA^{Arg} και mt-tRNA^{Glu} μέσω ηλεκτροφόρησης των PCR προϊόντων

Μετά την ενίσχυση των επιθυμητών γονιδίων με PCR, πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης (2%) ώστε να επιβεβαιωθεί η επιτυχής ενίσχυση μόνο των γονιδίων-στόχων και όχι παραπροϊόντων. Σε κάθε αντίδραση PCR εκτός από τα δείγματα παρασκευάστηκε και αρνητικός μάρτυρας. Ο αρνητικός μάρτυρας περιείχε όλα τα απαραίτητα για την αντίδραση PCR συστατικά εκτός από DNA. Αυτό σημαίνει πως εάν βλέπαμε μετά την ηλεκτροφόρηση ζώνη στο μάρτυρα αυτό θα σήμαινε πως υπήρξε επιμόλυνση και το πείραμα θα έπρεπε να επαναληφθεί.

Η διαδικασία ενίσχυσης για αρκετά δείγματα πραγματοποιήθηκε περισσότερες από μία φορές, διότι τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης πολλές φορές δεν επιβεβαίωναν την επιτυχή ενίσχυση. Τα αποτελέσματα του συνόλου των ηλεκτροφορήσεων που έλαβαν χώρα έως την επιβεβαίωση της επιτυχούς ενίσχυσης και των 38 δειγμάτων για καθένα από τα δύο γονίδια ($mt-tRNA^{Arg}$ και $mt-tRNA^{Glu}$) παρουσιάζονται στις εικόνες 27 και 28 αντίστοιχα.



Εικόνα 27: Στην εικόνα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης των ενισχυμένων προϊόντων PCR για το γονίδιο $mt-tRNA^{Arg}$ και για τα 38 δείγματα. Με κόκκινα βέλη υποδεικνύεται η επιτυχής ενίσχυση, ενώ με κίτρινα παρουσιάζονται τα δείγματα στα οποία ενισχύθηκε και κάποιο παραπροϊόν. Τα πηγάδια που δεν επισημαίνονται με βέλος είτε είναι κενά, είτε η ενίσχυση δεν ήταν επιτυχής. Προς διευκόλυνση της διαδικασίας των πειραμάτων στο πήκτωμα της μεγάλης εικόνας που φαίνεται στα αριστερά, φορτώθηκε και το δείγμα 38 για το γονίδιο του Glu (τα υπόλοιπα προϊόντα PCR για το $mt-tRNA^{Glu}$ παρουσιάζονται στην εικόνα 28). Σημειώνεται επίσης πως το προϊόν PCR έχει μήκος 227 bp οπότε η εμφάνισή του εντός της μπλε χρωστικής είναι αναμενόμενη (δεδομένου ότι η μπλε χρωστική «τρέχει» όπως ένα τμήμα DNA μήκους 200 -300 bp). Με N συμβολίζεται ο αρνητικός (Negative) μάρτυρας.



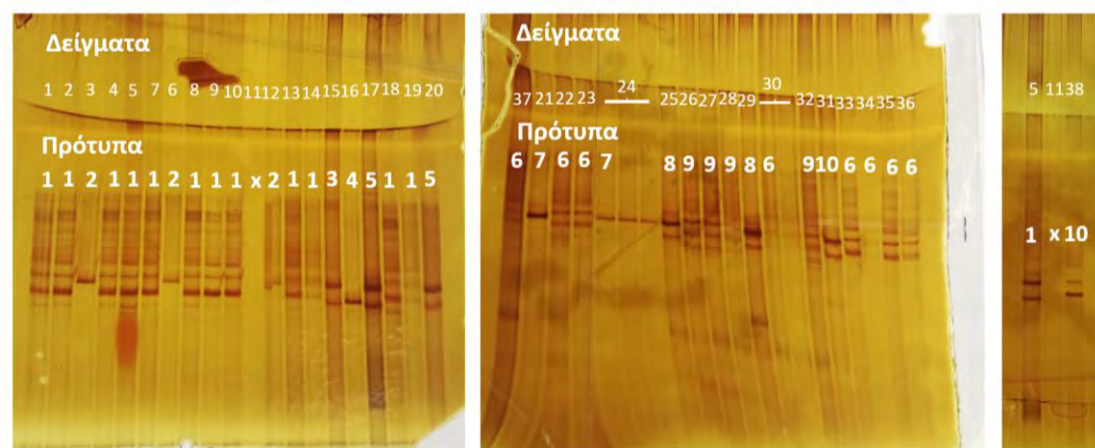
Εικόνα 28: Στην εικόνα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης των ενισχυμένων προϊόντων PCR για το γονίδιο *mt-tRNA^{Glu}* και για τα 38 δείγματα. Με κόκκινα βέλη υποδεικνύεται η επιτυχής ενίσχυση. Τα πηγάδια που δεν επισημαίνονται με βέλος είτε είναι κενά, είτε η ενίσχυση δεν ήταν επιτυχής. Σημειώνεται επίσης πως το προϊόν PCR έχει μήκος 122 bp οπότε η εμφάνισή του λίγο πιο κάτω από τη μπλε χρωστική είναι αναμενόμενη (δεδομένου ότι η μπλε χρωστική «τρέχει» όπως ένα τμήμα DNA μήκους 200 -300 bp. Το δείγμα 38 για πρακτικούς λόγους έχει φορτωθεί σε πήκτωμα με δείγματα για το *mt-tRNA^{Arg}* και παρουσιάζεται στην εικόνα 27. Με N συμβολίζεται ο αρνητικός (Negative) μάρτυρας.

7.3 Αποτελέσματα SSCP και εύρεση κοινών προτύπων ηλεκτροφόρησης

Μετά την επιβεβαίωση της επιτυχούς ενίσχυσης των γονιδίων *mt-tRNA^{Arg}* και *mt-tRNA^{Glu}* ακολούθησε κάθετη ηλεκτροφόρηση όλων των PCR προϊόντων σε πηκτώματα πολυακρυλαμιδίου. Τα δείγματα είχαν προηγουμένως αποδιαταχθεί ώστε να διαχωριστούν οι δύο κλώνοι του DNA. Κάθε κλώνος υιοθετεί μία μοναδική και διαφορετική διαμόρφωση στο χώρο και διασχίζει το πήκτωμα με διαφορετική ηλεκτροφορητική κινητικότητα. Αναλόγως λοιπόν με το εάν δύο ασθενείς με ΧΑΠ φέρουν την ίδια αλληλουχία ή κάποια μετάλλαξη, περιμένουμε να δούμε το ίδιο ή διαφορετικό ηλεκτροφορητικό πρότυπο αντίστοιχα. Βάσει των προτύπων που παρατηρήθηκαν, οι ασθενείς κατατάχθηκαν σε ομάδες ασθενών που φέρουν το

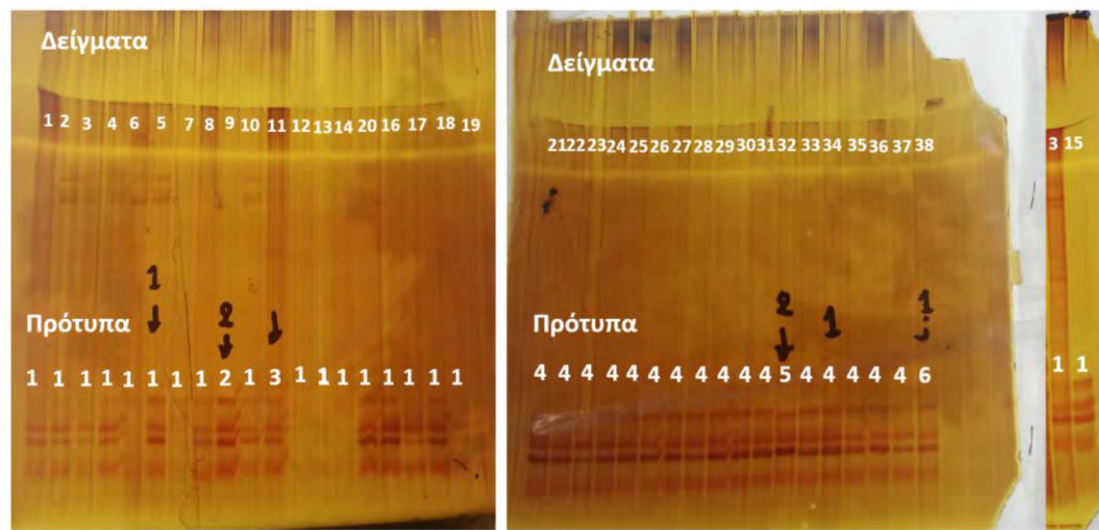
πρότυπο 1, το πρότυπο 2 κ.λ.π. Στη συνέχεια, ένα προϊόν PCR αντιπροσωπευτικά από κάθε ομάδα προτύπων υποβλήθηκε σε καθαρισμό και στάλθηκε για αλληλούχιση.

Για το γονίδιο $mt-tRNA^{Arg}$, το οποίο ηλεκτροφορήθηκε σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου 12% για 20 ώρες, εντοπίστηκαν 10 διαφορετικά πρότυπα τα οποία παρουσιάζονται στην εικόνα 29.



Εικόνα 29: Στην εικόνα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της SSCP για το γονίδιο $mt-tRNA^{Arg}$. Οι πάνω αριθμοί αντιστοιχούν στον αριθμό του δείγματος που έχει φορτωθεί σε κάθε πηγάδι. Λόγω αστοχίας στον πειραματικό χειρισμό το δείγμα 24 φορτώθηκε σε τρία πηγάδια και το δείγμα 30 φορτώθηκε σε δύο πηγάδια, χωρίς όμως να επηρεάσει αυτό τα αποτελέσματα. Οι αριθμοί στην κάτω σειρά αντιστοιχούν στα διαφορετικά πρότυπα της ηλεκτροφορητικής κινητικότητας των δειγμάτων. Βρέθηκαν 10 συνολικά διαφορετικά πρότυπα. Το δείγμα 11 δεν έδωσε κάποιο πρότυπο ηλεκτροφορητικής κινητικότητας. Αυτό είναι πιθανό να οφείλεται σε πολύ χαμηλά επίπεδα ενίσχυσης του γονιδίου $mt-tRNA^{Arg}$ σε αυτό το δείγμα λόγω μη σωστού υβριδισμού των primers στο $mtDNA$ του συγκεκριμένου ασθενούς. Σημειώνεται πως τα τρία πηκτώματα που παρουσιάζονται δεν είναι συγκρίσιμα και είναι δύσκολο να βρεθούν κοινά πρότυπα μεταξύ τους. Ωστόσο, δεν αποκλείεται το ενδεχόμενο κάποιο πρότυπο από το πήκτωμα 1 για παράδειγμα, να είναι ίδιο με κάποιο πρότυπο από το πήκτωμα 2. Αν συμβαίνει πράγματι κάτι τέτοιο, θα φανεί από τα αποτελέσματα της αλληλούχισης.

Για το γονίδιο mt-tRNA^{Glu}, το οποίο ηλεκτροφορήθηκε σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου 13% για 17 ώρες, εντοπίστηκαν 6 διαφορετικά πρότυπα τα οποία παρουσιάζονται στην εικόνα 30.

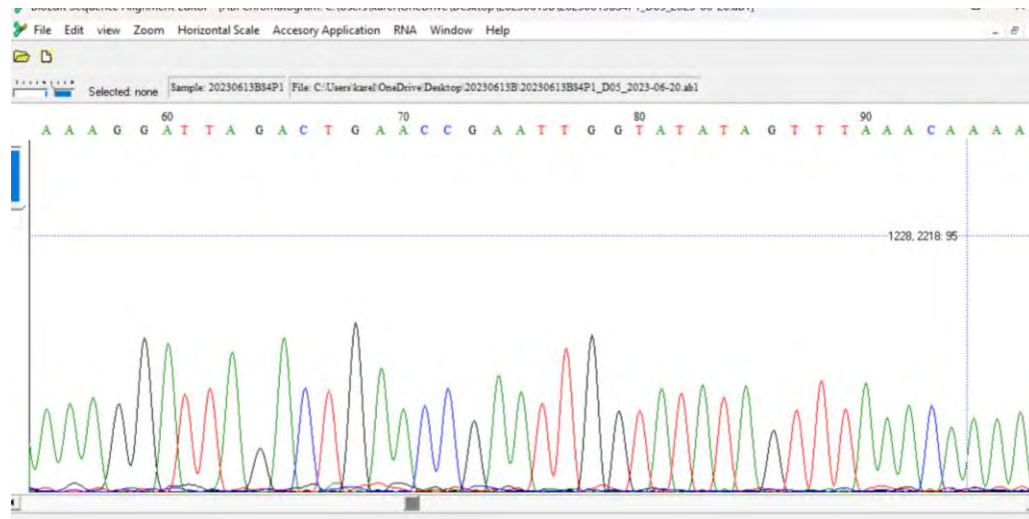


Εικόνα 30: Στην εικόνα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της SSCP για το γονίδιο mt-tRNA^{Glu}. Οι πάνω αριθμοί αντιστοιχούν στον αριθμό του δείγματος που έχει φορτωθεί σε κάθε πηγάδι. Οι αριθμοί στην κάτω σειρά αντιστοιχούν στα διαφορετικά πρότυπα της ηλεκτροφορητικής κινητικότητας των δειγμάτων. Βρέθηκαν 6 συνολικά διαφορετικά πρότυπα.. Σημειώνεται πως τα τρία πηκτώματα που παρουσιάζονται δεν είναι συγκρίσιμα και είναι δύσκολο να βρεθούν κοινά πρότυπα μεταξύ τους. Ωστόσο, δεν αποκλείεται το ενδεχόμενο κάποιο πρότυπο από το πήκτωμα 1 για παράδειγμα, να είναι ίδιο με κάποιο πρότυπο από το πήκτωμα 2 .Αν συμβαίνει πράγματι κάτι τέτοιο, θα φανεί από τα αποτελέσματα της αλληλούχισης.

7.4 Αποτελέσματα αλληλούχισης κατά Sanger

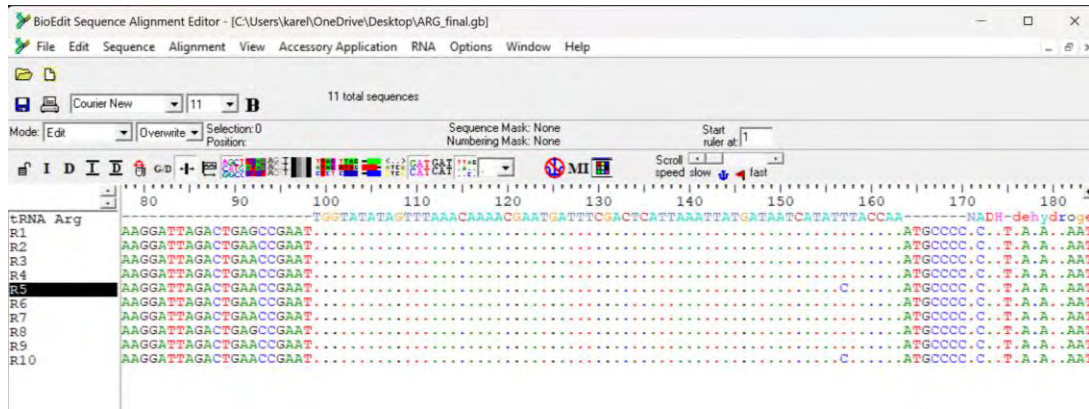
Μετά την ολοκλήρωση της αλληλούχισης, τα αποτελέσματα στάλθηκαν με τη μορφή πρόσθιων και ανάστροφων αλληλουχιών νουκλεϊκών οξέων (με προσανατολισμό 5' → 3'), ενώ κάθε αλληλουχία συνοδεύεται από το αντίστοιχο χρωματογράφημα. Τα χρωματογραφήματα ελέγχθηκαν ώστε να διαπιστωθεί η εγκυρότητα κάθε αλληλουχίας. Εάν σε κάποιο χρωματογράφημα υπήρχε τμήμα της αλληλουχίας όπου το σήμα από την αλληλούχιση ήταν αμφίβολο, τότε η αλληλουχία αυτή δεν

χρησιμοποιήθηκε στα τελικά αποτελέσματα. Ένα παράδειγμα χρωματογραφήματος υψηλής ποιότητας παρουσιάζεται στην εικόνα 31.

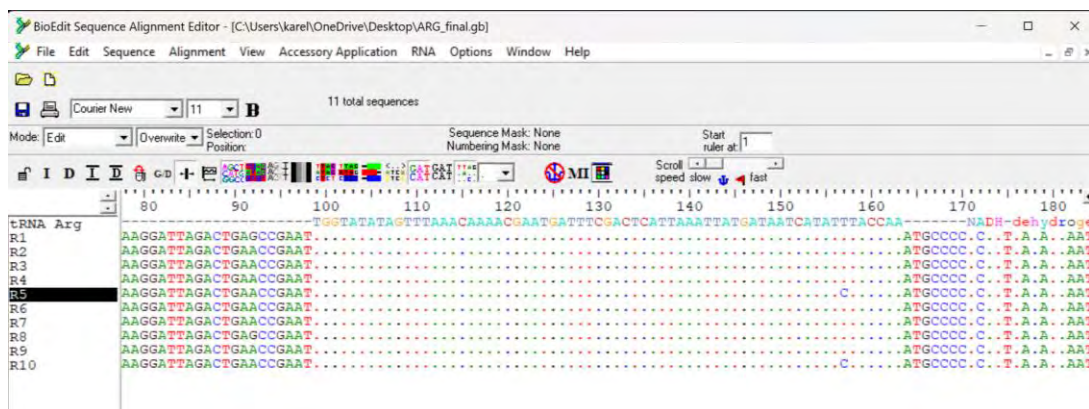


Εικόνα 31: Τμήμα χρωματογραφήματος της πρόσθιας αλληλουχίας του $mt-tRNA^{Arg}$ από το δείγμα 16.

Μετά την ανάλυση των χρωματογραφημάτων και την επιλογή των πιο αξιόπιστων αλληλουχιών, οι αλληλουχίες στοιχίστηκαν με τη βοήθεια του προγράμματος βιοπληροφορικής ανάλυσης Bioedit (7.7.1). Η στοιχίση έγινε με βάση τη wild type αλληλουχία των γονιδίων $mt-tRNA^{Arg}$ και $mt-tRNA^{Glu}$ αντίστοιχα. Για κάθε ένα από τα δύο γονίδια που μελετώνται βρέθηκε μία μετάλλαξη. Πιο συγκεκριμένα, στο γονίδιο $mt-tRNA^{Arg}$ εντοπίστηκε η μετάπτωση **T10463C** στα 2 από τα 10 πρότυπα που είχαν σταλεί για αλληλούχιση και συνεπώς στους 4 από τους 38 ασθενείς που εξετάστηκαν, ενώ στο γονίδιο $mt-tRNA^{Glu}$ ανιχνεύτηκε η μετάπτωση **A14696G** σε 1 από τα 6 πρότυπα που αλληλουχίστηκαν, δηλαδή σε 1 από τους 38 ασθενείς. Αναλυτικά τα αποτελέσματα αυτά παρουσιάζονται στις εικόνες 32 και 33.

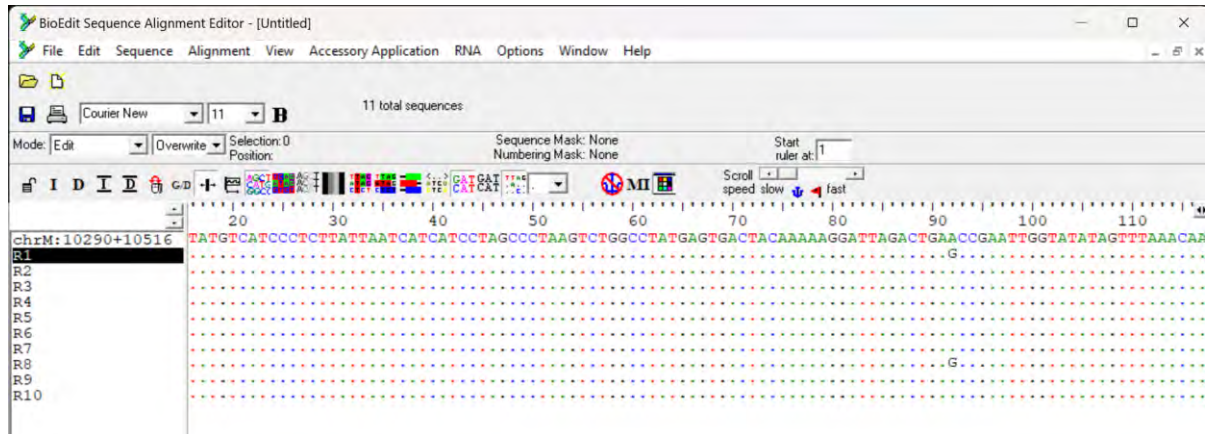


Εικόνα 32: Στοίχιση των αλληλουχιών που προέκυψαν από την αλληλούχιση (R1-R10) με την WT αλληλουχία του *mt-tRNA^{Arg}* (*tRNA Arg*). Με τελείες απεικονίζονται τα νουκλεοτίδια που είναι ίδια με εκείνα της αλληλουχίας *tRNA Arg*. Παρατηρούμε πως τα δείγματα R5 και R10 παρουσιάζουν τη σημειακή μετάλλαξη T10463C.



Εικόνα 33: Στοίχιση των αλληλουχιών που προέκυψαν από την αλληλούχιση (E1-E6) με την WT αλληλουχία του *mt-tRNA^{Glu}* (*tRNA Glu*). Με τελείες απεικονίζονται τα νουκλεοτίδια που είναι ίδια με εκείνα της αλληλουχίας *tRNA Glu*. Παρατηρούμε πως το δείγμα E4 παρουσιάζει τη σημειακή μετάλλαξη A14696G.

Εκτός από τις μεταλλάξεις που αναφέρθηκαν προηγουμένως, ανιχνεύτηκε ακόμη μία σημειακή μετάλλαξη στην παρακαείμενη αλληλουχία του γονιδίου *mt-tRNA^{Arg}* (εικόνα 34). Συγκεκριμένα, βρέθηκε μία μετάπτωση A→G στη θέση 10.398. Η θέση αυτή εντοπίζεται εντός του γονιδίου MT-ND3, το οποίο κωδικοποιεί για την υπομονάδα 3 της NADH αφυδρογονάσης. Η μετάλλαξη **A10398G** ανιχνεύτηκε σε 2 από τα 10 πρότυπα που είχαν σταλεί για αλληλούχιση, δηλαδή σε 14 από τους 38 ασθενείς που εξετάστηκαν.

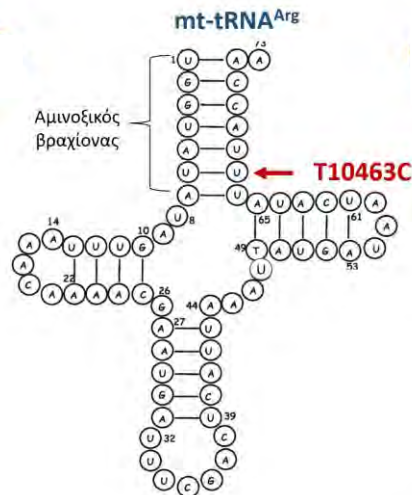


Εικόνα 34: Στοίχιση των αλληλουχιών που προέκυψαν από την αλληλούχιση (R1-R10) με την αναμενόμενη αλληλουχία του προϊόντος PCR (chrM: 10.250 +10.516). Με τελείες απεικονίζονται τα νουκλεοτίδια που είναι ίδια με εκείνα της αλληλουχίας του PCR προϊόντος. Παρατηρούμε πως τα δείγματα R1 και R8 παρουσιάζουν τη σημειακή μετάλλαξη A10398G. Η μετάλλαξη αυτή βρίσκεται εντός του MT-ND3 γονιδίου.

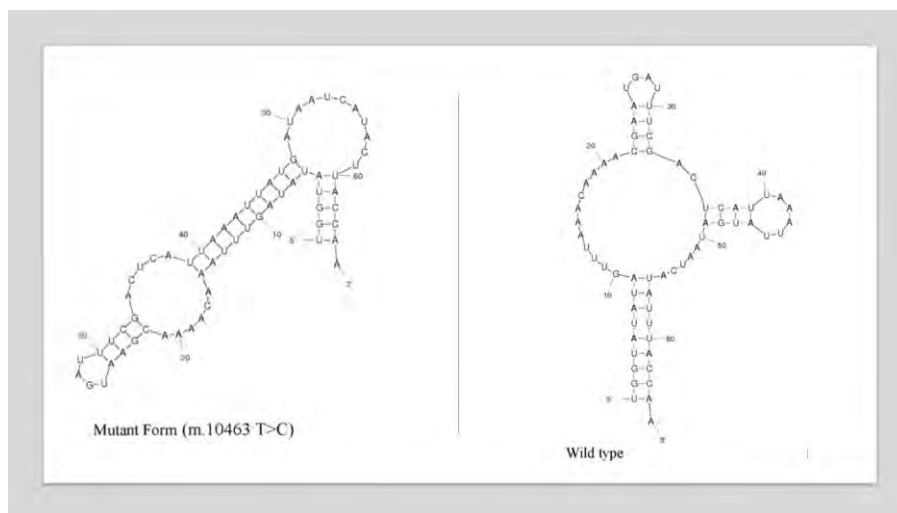
8 Συμπεράσματα/Συζήτηση

Σημειακή μετάλλαξη T10463C

Η μετάπτωση $T \rightarrow C$ εντοπίστηκε στη θέση 10463 στο γονίδιο mt-tRNA^{Arg}. Η μετάλλαξη στο mt-tRNA^{Arg} έχει ως αποτέλεσμα την αντικατάσταση μίας T από μία C στον αμινοξικό βραχίονα (Εικόνα 35). Η αντικατάσταση αυτή ενδέχεται να επηρεάζει την αμινοακυλίωση του tRNA και τη διαδικασία ωρίμασης των πρόδρομων άκρων του. Μάλιστα, έχει βρεθεί με βιοπληροφορική ανάλυση πως η μετάλλαξη αυτή προκαλεί σημαντική αλλαγή στην τιμή της ελεύθερης ενέργειας G, με συνέπεια να μεταβάλλεται η δευτεροταγής δομή του μορίου, όπως φαίνεται στην εικόνα 36 (Heidari et al, 2020).



Εικόνα 35: Μετάλλαξη T10463C στο *mt-tRNA^{Arg}* (Zifa et al, 2012).



Εικόνα 36: Πρόβλεψη της δευτεροταγούς δομής του *mt-tRNA^{Arg}* με και χωρίς τη μετάλλαξη T10463C (Heidari et al, 2020).

Υπάρχουν πολλές αναφορές και συσχετίσεις της μετάλλαξης T10463C με νόσους στη διεθνή βιβλιογραφία. Κάποιες από τις σημαντικότερες νόσους που σχετίζονται με τη μετάλλαξη παρουσιάζονται στον πίνακα 4.

Ασθένεια	Ασθενείς με τη μετάλλαξη T10463C	Παραπομπή
Σύνδρομο DIDMOAD (κώφωση, άπειος διαβήτης και διαβήτης τύπου II, και οπτική ατροφία)	5/8 ασθενείς 12/67 υγιείς-control. p=0,023	Hofmann et al, 1997
Parkinson	3/28 ασθενείς, p=0,041	Simon et al, 1999
Καρκίνος θυροειδούς	4 ασθενείς	Yeh et al, 2000
Υπογονιμότητα	8/136 ασθενείς, p=0,768	Dahadhah et al, 2021
Μιτοχονδριακή εγκεφαλοπάθεια	1 ασθενής	Da Pozzo et al, 2004
Διπολική διαταραχή και σχιζοφρένεια προστατευτικός ρόλος	Περισσότεροι υγιείς φέρουν τη μετάλλαξη συγκριτικά με τους ασθενείς (p= 0,04)	Rollins et al, 2009
LQTS	11 ασθενείς- μέλη της ίδιας οικογένειας	Khatami et al, 2014
Σύνδρομο LVNC	1/20 ασθενείς	Tang et al, 2010
Μη δυστροφική μυοτονία	4/45 ασθενείς (p = 0,022)	Heidari et al, 2020
Καρκίνος του ενδομητρίου	Σε ένα δείγμα βιοψίας	Lorenc et al, 2003

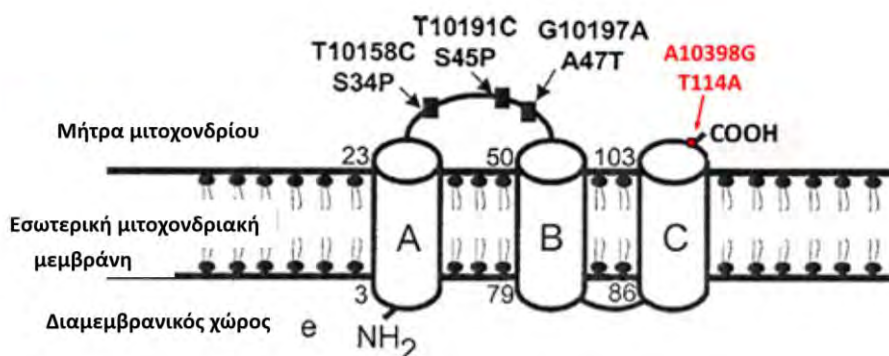
Πίνακας 4: Κατάλογος ασθενειών στις οποίες έχει βρεθεί η μετάλλαξη T10463C σε ασθενείς. Στον πίνακα αναφέρονται και μη στατιστικά σημαντικές περιπτώσεις ασθενών με τη μετάλλαξη. Τα δεδομένα προήλθαν από τη βάση δεδομένων MITOMAP.

Η συγκεκριμένη μετάλλαξη είναι χαρακτηριστική της απλοομάδας T και πολλές μελέτες υποστηρίζουν πως πρόκειται για ένα φυσιολογικό πολυμορφισμό παρά για μία παθογόνο μετάλλαξη. Πράγματι, αρκετοί από τους ασθενείς που εξετάστηκαν στις μελέτες με μη στατιστική σημαντικότητα του πίνακα 4, έφεραν τον απλότυπο T, συνεπώς ενδέχεται να μη σχετίζεσαι η παρουσία της μετάλλαξης με την παθογένεια των συγκεκριμένων νόσων, αλλά αυτή να είναι αποτέλεσμα κάποιας άλλης μετάλλαξης. Από την άλλη πλευρά, μία ενδιαφέρουσα πληροφορία που προέκυψε από τη μελέτη της βιβλιογραφίας, είναι η σύνδεση της εν λόγω μετάλλαξης με τη

μετάλλαξη G15928A στο mt-tRNA^{Thr} γονίδιο. Οι μεταλλάξεις αυτές όταν συνυπάρχουν φαίνεται πως αυξάνουν τις πιθανότητες εμφάνισης κάποιων νόσων (Stemberg et al, 1998). Επομένως, θα ήταν ενδιαφέρον, μετά τη μελέτη του γονιδίου mt-tRNA^{Thr} σε επόμενη φάση αυτού του project, να διερευνηθεί ενδεχόμενη συσχέτιση μεταξύ των μεταλλάξεων T10463C και G15928A.

Σημειακή μετάλλαξη A10398G

Η μετάπτωση A → G βρέθηκε στη θέση 10398, στην παρακαείμενη αλληλουχία του γονιδίου mt-tRNA^{Arg}, δηλαδή εντός του γονιδίου MT-ND3, το οποίο κωδικοποιεί την υπομονάδα 3 της NADH αφυδρογονάσης. Η υπομονάδα αυτή είναι μία από τις 7 υπομονάδες που στελεχώνουν το σύμπλοκο I της αλυσίδας μεταφοράς e⁻. Η μετάλλαξη οδηγεί σε αντικατάσταση της υδρόφιλης Thr 114 από την υδρόφοβη Ala. Η θέση 114 εντοπίζεται στο καρβοξυτελικό άκρο της υπομονάδας και μάλιστα στο υδρόφοβο τμήμα αυτής το οποίο συμμετέχει στη μεταφορά e⁻ στην ουβικινόνη. Η αντικατάσταση Thr114Ala οδηγεί σε αποσταθεροποίηση της ND3 και κατ'επέκταση και του συμπλόκου I, οδηγώντας σε δυσλειτουργία του και υπερπαραγωγή ROS (Zifa et al, 2012; Li et al, 2014).



Εικόνα 37: Δομή της υπομονάδας 3 της NADH αφυδρογονάσης όπου φαίνεται η αντικατάσταση της Thr στη θέση 114 από μία Ala λόγω της A10398G μετάπτωσης (Zifa et al, 2012).

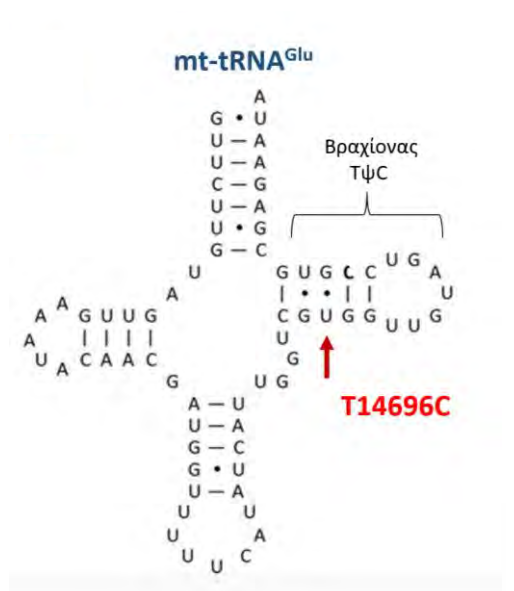
Δεδομένα από τη διεθνή βιβλιογραφία αποκαλύπτουν πως η μετάλλαξη A10398G έχει συσχετιστεί με πολλές νόσους καθώς έχει ανιχνευτεί σε ομάδες ασθενών σε στατιστικά σημαντικά επίπεδα συγκριτικά με τους υγιείς-control. Οι νόσοι αυτές συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα:

Ασθένεια	Ασθενείς με τη μετάλλαξη A10398G	Παραπομπή
Νωτιαία παρεγκεφαλιδική αταξία τύπου 2 (SAT2)	11/27 Κουβανούς ασθενείς, $p < 0,05$	Simon et al, 2007
Καρκίνος παγκρέατος	97/374 ασθενείς, $p=0,91$	Wang et al, 2007
Σύνδρομο ελλειμματικής προσοχής	85/150, $p=0,024$	Hwang et al, 2017
Σακχαρώδης διαβήτης τύπου II προστατευτικός ρόλος της μετάλλαξης	18/72 ασθενείς 27/50 υγιείς-control $p < 0,01$	Liao et al, 2008
Καρκίνος μαστού	50/156, $p=0,011$	Covarrubias et al, 2008
Μεταβολικό σύνδρομο	93/141 Κινέζοι ασθενείς, $p=0,004$	Juo et al, 2010
Σύνδρομο Leigh	20/171 ασθενείς, $p=0,013$	Hao et al, 2013
HAPE (Πνευμονικό οίδημα λόγω υψομέτρου)	73,3% των ασθενών $p=0,0024$	Sharma et al, 2019
Δημιουργία ινώδους ιστού μετά την ακτινοθεραπεία	Σε 10 ασθενείς $p=0,01$	Alsbeih et al, 2009
Μετάσταση καρκίνου προστάτη στα οστά	7/10 ασθενείς	Arnold et al, 2015
Οπτική ατροφία Δευτερογενής ρόλος μετάλλαξης	7/10 ασθενείς με LHON $P < 0,05$	Shu et al, 2012
Υπέρταση	Σε Αφροαμερικάνους	Watson et al, 2001
Parkinson προστατευτικός ρόλος της μετάλλαξης	Ασθενείς με απλοομάδα J ή K	Van der walt et al, 2003
Fuch's endothelial corneal dystrophy προστατευτικός ρόλος της μετάλλαξης	Ασθενείς με απλοομάδα I	Hao et al, 2014

Πίνακας 5: Ανίχνευση της μετάλλαξης A10398G σε ασθενείς με διάφορες νόσους. Στον πίνακα αναφέρονται και μη στατιστικά σημαντικές περιπτώσεις. Τα δεδομένα προήλθαν από τη βάση δεδομένων MITOMAP.

Σημειακή μετάλλαξη A14696G

Η μετάπτωση A → G εντοπίστηκε στη θέση 14696, εντός του γονιδίου mt-tRNA^{Glu}. Τη μετάλλαξη αυτή τη βλέπουμε στο tRNA ως μετάπτωση T→C, διότι το συγκεκριμένο γονίδιο μεταγράφεται από τον πλούσιο σε γουανίνη «βαρύ» κλώνο του mtDNA. Η αντικατάσταση της U από C στο tRNA^{Glu} στο βραχίονα ριβοθυμίνης-ψευδοουριδίνης οδηγεί στη δημιουργία ενός G-C δεσμού κατά Watson και Crick, όπως φαίνεται στην εικόνα 38.



Εικόνα 38: Μετάλλαξη A14696G στο mt-tRNA^{Glu} (Uusmaa et al, 2004).

Η δημιουργία του δεσμού G-C έχει σαν αποτέλεσμα τη μείωση της ταλάντωσης του mt-tRNA^{Glu} και την αλλαγή στην τιμή της ελεύθερης ενέργειάς του, όπως φαίνεται στην εικόνα 39. Η αλλαγή αυτή θα μπορούσε να επιφέρει αλλαγές στις αλληλεπιδράσεις του μορίου με άλλα μόρια, όπως με τα ριβοσώματα, χωρίς ωστόσο να υπάρχει κάποια σχετική μελέτη που να το αποδεικνύει.

WT-*mttRNA^{Glu}* $G = -20,35 \text{ kcal.mol}$



A14696G *mttRNA^{Glu}* $G = -17,74 \text{ kcal/mol}$



Εικόνα 39: Αλλαγή δευτεροταγούς δομής και ελεύθερης ενέργειας (G) στο *mt-tRNA^{Glu}* λόγω της μετάλλαξης A14696G..

Για τη σημειακή μετάλλαξη A14696G δεν υπάρχουν πολλές αναφορές στη διεθνή βιβλιογραφία. Η μετάλλαξη έχει χαρακτηριστεί ως παθογόνος μόνο για τη μιτοχονδριακή εγκεφαλομυοπάθεια (MELAS). Πιο συγκεκριμένα, σε έρευνα που δημοσιεύτηκε το 2004 αναφέρεται η ανίχνευση της μετάλλαξης σε ένα μόνο από τα 100 παιδιά με MELAS που εξετάστηκαν. Ωστόσο, η μετάλλαξη ήταν ετεροπλασμική και βρέθηκε και στη μητέρα και στη γιαγιά του παιδιού. Δηλαδή είχε διατηρηθεί σε ετεροπλασμική κατάσταση για τρεις γενιές. Συνεπώς χαρακτηρίστηκε ως μία σπάνια, αλλά παθογόνος μετάλλαξη για τη MELAS (*Usimaa et al, 2004*).

Η μελέτη που διεξάγεται στο Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας έχει ως στόχο τον έλεγχο της ύπαρξης μεταλλάξεων στα 22 *mt-tRNAs* σε ασθενείς με ΧΑΠ. Έως σήμερα έχει γίνει έλεγχος για τα γονίδια *mt-tRNA^{Gly}*, *mt-tRNA^{Leu(UUR)}*, *mt-tRNA^{Met}*, *mt-tRNA^{Ile}*, *mt-tRNA^{Gln}*, *mt-tRNA^{Asn}*, *mt-tRNA^{Tyr}*, *mt-tRNA^{Cys}*, *mt-tRNA^{Glu}*, *mt-tRNA^{Arg}*, *mt-tRNA^{Val}*, *mt-tRNA^{Phe}*, *mt-tRNA^{His}*, *mt-tRNA^{Leu(CUN)}* και *mt-tRNA^{Ser(AGY)}* (15/22 *mt-tRNAs*) σε μία ομάδα 38 ασθενών με ΧΑΠ. Εκτός από τις τρεις μεταλλάξεις που βρέθηκαν στην παρούσα εργασία στα *mt-tRNA^{Arg}*, *mt-tRNA^{Glu}* και *MT-ND3* γονίδια, έχει βρεθεί επίσης μία μετάλλαξη στο *mt-tRNA^{Phe}* σε 1/38 ασθενείς (596insC), μία στο *mt-tRNA^{Gln}* σε 2/38 ασθενείς (T4336C), ακόμη μία στο *mt-tRNA^{Leu(CUN)}* σε 9/38 ασθενείς (A12308G) και τέλος δύο στην παρακείμενη αλληλουχία του *mt-*

tRNA^{Leu(UUR)}, δηλαδή στο γονίδιο 16srRNA σε 5/38 ασθενείς (T3197C, C3212T). Στα υπόλοιπα γονίδια δεν έχει βρεθεί κάποια μετάλλαξη.

Στη συνέχεια, παρουσιάζονται αναλυτικά κάποια στατιστικά στοιχεία των ασθενών με ΧΑΠ στους οποίους εντοπίστηκε κάποια από τις προαναφερθείσες μεταλλάξεις. Τα στοιχεία αυτά αφορούν το φύλο, την ηλικία, το κάπνισμα και τη σοβαρότητα της νόσου για κάθε ασθενή (στάδιο ΧΑΠ).

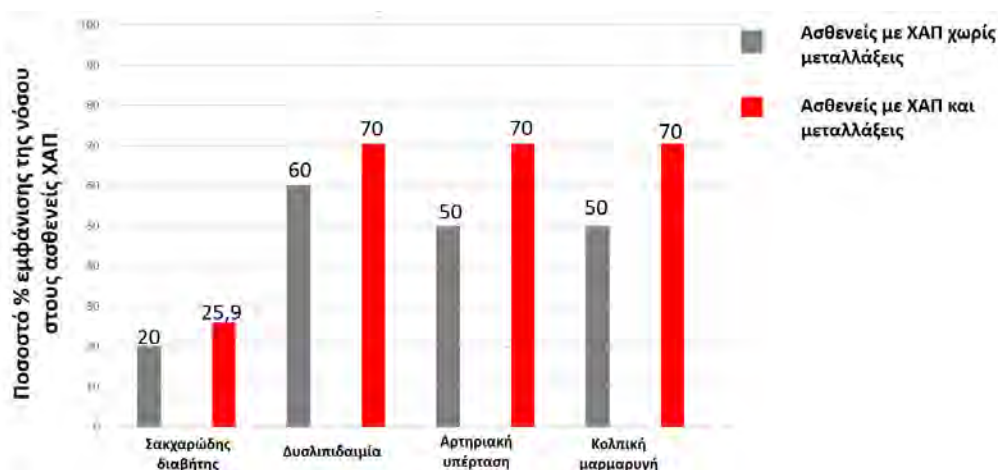
Χαρακτηριστικά ασθενών με ΧΑΠ στους οποίους ανιχνεύτηκαν μεταλλάξεις												
Δείγμα	Φύλο	Ηλικία	Στάδιο ΧΑΠ	Καπνιστές	Μεταλλάξεις							
1	A	83	3	ΝΑΙ	A10398G							
2	A	79	2	ΝΑΙ	A10398G							
4	A	82	2	ΝΑΙ	A10398G	A12308G						
5	Θ	69	2	ΝΑΙ	A10398G	A12308G				T3197C	C3112T	
6	A	51	2	ΝΑΙ		A12308G				T3197C	C3112T	
7	A	66	2	ΝΑΙ	A10398G							
8	A	76	2	ΝΑΙ	A10398G							
9	A	69	1	ΝΑΙ	A10398G							
10	Θ	55		ΟΧΙ	A10398G	A12308G						
11	A	66	2	ΝΑΙ						T3197C	C3112T	
13	Θ	64	2	ΝΑΙ	A10398G	A12308G				T3197C	C3112T	
14	Θ	74		ΟΧΙ	A10398G							
15	A	69	3	ΝΑΙ		A12308G						
16	A	69	4	ΝΑΙ						T3197C	C3112T	
17	Θ			ΟΧΙ				T10463C				
18	A	67	2	ΝΑΙ	A10398G				596insC			
19	A	56	2	ΝΑΙ	A10398G							
20	A	79		ΟΧΙ				T10463C				
21	A	60		ΟΧΙ		A12308G						
23	A	69	2	ΝΑΙ								T4336C
25	A	65	4	ΝΑΙ	A10398G							
28	A	70	4	ΝΑΙ		A12308G						
29	A	62	4	ΝΑΙ	A10398G							
31	A	69	1	ΝΑΙ				T10463C				
32	Θ	73	1	ΝΑΙ			A14696G					
34	A	59	2	ΝΑΙ								T4336C
35	A	81	2	ΝΑΙ		A12308G						
38	A	66	3	ΝΑΙ				T10463C				

Πίνακας 6: Στοιχεία ασθενών με ΧΑΠ στους οποίους ανιχνεύτηκαν μεταλλάξεις στο mtDNA. Στον πίνακα παρουσιάζονται δεδομένα που αφορούν το φύλο, την ηλικία, τη σοβαρότητα των συμπτωμάτων και συνήθειες των ασθενών (κάπνισμα).

Όπως φαίνεται και στον πίνακα 6, οι περισσότεροι ασθενείς με ΧΑΠ στους οποίους βρέθηκαν μεταλλάξεις στο mtDNA είναι άντρες. Ωστόσο, και στο αρχικό δείγμα των 38 ασθενών οι άντρες ήταν πολυπληθέστεροι. Επίσης, βλέπουμε ότι ο μέσος όρος ηλικίας είναι τα 68 έτη όπως ακριβώς και στο αρχικό δείγμα. Όσον αφορά το στάδιο της ΧΑΠ στο οποίο βρίσκονται οι ασθενείς, αυτό φαίνεται να αντιστοιχεί κατά μέσο όρο στο στάδιο 2, ωστόσο τα δεδομένα εδώ δεν είναι επαρκή ώστε να εξαχθεί ένα ασφαλές συμπέρασμα, γιατί δεν είναι διαθέσιμα όλα τα δεδομένα που αφορούν το στάδιο της ΧΑΠ στο οποίο βρίσκονται όλοι οι ασθενείς. Τέλος, οι περισσότεροι ασθενείς είναι καπνιστές όπως και στο αρχικό δείγμα.

Παρατηρούμε επίσης πως κάποιοι ασθενείς φέρουν συνδυασμό μεταλλάξεων. Οι συνδυασμοί αυτοί είναι 5 και ελέγχθηκε η παρουσία τους στους 204 υγιείς-control. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως μόνο ο ένας από τους 5 συνδυασμούς έχει βρεθεί σε 1/204 υγιείς, ενώ οι υπόλοιποι 4 έχουν εντοπιστεί μόνο στους ασθενείς. Αξιοσημείωτο είναι πως μεταξύ άλλων βρέθηκε σε 4 ασθενείς ο συνδυασμός των μεταλλάξεων A10398G και A12308G. Οι μεταλλάξεις αυτές έχει βρεθεί πως συνδυαστικά αυξάνουν τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του μαστού (*Covarrubias et al, 2008*). Δεδομένου λοιπόν ότι οι 3/4 ασθενείς με το συγκεκριμένο αυτό συνδυασμό μεταλλάξεων είναι γυναίκες και δεδομένου επίσης πως εξαρχής οι γυναίκες στο αρχικό δείγμα ήταν λιγότερες (5/38) συμπεραίνουμε πως θα ήταν καλό να ελεγχθούν και ενδεχομένως να ενημερωθούν οι γυναίκες αυτές για την πιθανότητα εμφάνισης καρκίνου του μαστού στο μέλλον.

Σημαντικό είναι επίσης να αναφέρουμε πως οι περισσότεροι ασθενείς με ΧΑΠ από το αρχικό δείγμα πάσχουν και από άλλες νόσους. Οι πιο σημαντικές από αυτές είναι ο σακχαρώδης διαβήτης, η δυσλιπιδαιμία, η αρτηριακή υπέρταση και η κοιλιακή μαρμαρυγή. Θα μπορούσαμε δηλαδή να πούμε πως φαίνεται να υπάρχει καρδιαγγειακή συννοσηρότητα. Βέβαια, ύστερα από στατιστική επεξεργασία, δεν προκύπτει κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά στο ποσοστό εμφάνισης κάθε μίας από αυτές τις νόσους στους ασθενείς με ΧΑΠ στους οποίους ανιχνεύτηκαν μεταλλάξεις συγκριτικά με το ποσοστό εμφάνισης των συννοσηροτήτων σε αυτούς στους οποίους δεν έχει βρεθεί ακόμη κάποια μετάλλαξη (Διάγραμμα 2). Ωστόσο, δεδομένου ότι το δείγμα αναφοράς είναι μικρό, μπορούμε να παρατηρήσουμε πως υπάρχει μία τάση οι ασθενείς με μεταλλάξεις να εμφανίζουν πιο συχνά καρδιαγγειακή συννοσηρότητα συγκριτικά με εκείνους στους οποίους δεν ανιχνεύτηκαν ακόμη μεταλλάξεις.



Διάγραμμα 2: Εμφάνιση συννοσηρότητας (σακχαρώδης διαβήτης, δυσλιπιδαιμία, αρτηριακή υπέρταση και κολπική μαρμαρυγή) για τη ΧΑΠ. Οι κόκκινες μπάρες αντιστοιχούν στο ποσοστό εμφάνισης της κάθε νόσου στους ασθενείς στους οποίους έχουν ανιχνευτεί μεταλλάξεις, ενώ οι γκρι στο ποσοστό εμφάνισης της νόσου στους ασθενείς χωρίς μεταλλάξεις.

Αξίζει να σημειωθεί πως η μετάλλαξη A10398G έχει συσχετιστεί με την αρτηριακή υπέρταση. Επομένως, θα περιμέναμε οι ασθενείς με ΧΑΠ που φέρουν αυτή τη μετάλλαξη να πάσχουν παράλληλα από υπέρταση. Πράγματι, οι 11 από τους 14 ασθενείς με τη μετάλλαξη A10398G παρουσιάζουν συγχρόνως και αρτηριακή υπέρταση. Παρ'όλα αυτά δεν υπάρχει στατιστική σημαντικότητα για να αποδείξει την συσχέτιση αυτή και συνεπώς θα πρέπει να πραγματοποιηθούν περαιτέρω μελέτες με μεγαλύτερο αριθμό ασθενών προκειμένου να διαπιστωθεί εάν υπάρχει τελικά κάποια συσχέτιση.

Κάποιες από τις μεταλλάξεις που αναφέρονται στην παρούσα εργασία, καθώς και αρκετές από τις υπόλοιπες μεταλλάξεις που έχουν βρεθεί στο mtDNA ασθενών με ΧΑΠ κατά τη διάρκεια αυτού του project, έχουν ανιχνευτεί επίσης σε ασθενείς που πάσχουν από άλλες πνευμονικές νόσους όπως είναι η ιδιοπαθής πνευμονική ίνωση (IPF), η σαρκοείδωση και το άσθμα. Η συσχέτιση αυτή είναι σημαντική, καθώς και οι τέσσερις αυτές πνευμονικές νόσοι (ΧΑΠ, IPF, σαρκοείδωση και άσθμα) έχουν ως κοινή συνιστώσα τη μιτοχονδριακή δυσλειτουργία. Στον ακόλουθο πίνακα παρουσιάζονται τα 15 από τα 22 mt-tRNAs που έχουν μελετηθεί μέχρι σήμερα, και οι τυχόν μεταλλάξεις που έχουν βρεθεί στα γονίδια που τα κωδικοποιούν σε ασθενείς με

ΧΑΠ. Για κάθε μετάλλαξη, αναφέρονται επίσης τα ποσοστά των ασθενών με IPF, σαρκοείδωση και άσθμα στους οποίους έχουν ανιχνευτεί οι εκάστοτε μεταλλάξεις σε σύγκριση με τους υγιείς-control κάθε πειράματος (Daniil et al, 2018; Zida et al, 2012).

Μεταλλάξεις στο mtDNA ασθενών με ΧΑΠ, IPF, σαρκοείδωση και άσθμα							
Γονίδια	Μετάλλαξη	Υγιείς – control για τις νόσους ΧΑΠ, IPF και σαρκοείδωση	Ασθενείς με ΧΑΠ και με μετάλλαξη	Ασθενείς με IPF και με μετάλλαξη	Ασθενείς με σαρκοείδωση και με μετάλλαξη	Υγιείς – control για το άσθμα	Ασθενείς με άσθμα και με μετάλλαξη
tRNA ^{Asp}	-						
tRNA ^{Cys}	-						
tRNA ^{Tyr}	-						
tRNA ^{Ile}	-						
tRNA ^{Gln}	T4336C	4/204 (2%)	2/38 (5%)	9/40 (22,5%)*	6/85 (7,1%) *		-
tRNA ^{Met}	-						
tRNA ^{Gly}	-						
tRNA ^{Leu(UUR)}	-						
tRNA ^{Phe}	596insC	0/204	1/38 (2,6%)	-	-	0/100 (0%)	6/76 (7,9%) **
tRNA ^{Val}	-						
tRNA ^{Glu}	A14696G	0/204	1/38 (2,6%)	-	-		-
tRNA ^{Arg}	A10463G	6/204 (2%)	4/38 (11%)	11/40 (27,5%)*	13/85 (15%)*		-
tRNA ^{His}	-						
tRNA ^{Ser(AGY)}	-						
tRNA ^{Leu(CUN)}	A12308G	27/204 (13,2%)	9/38 (21,1%)	8/40 (20%)	13/85 (15,3%)	4/100 (4%)	21/76 (27,6%)*
16SrRNA	T3197C	1/204 (0,5%)	5/38 (13%)*	2/40 (5%)	7/85 (8,3%)*	2/100 (2%)	3/76 (3,9%)
16SrRNA	C3212T	0/204 (0%)	5/38 (13%)*	-	-		-
ND3	A10398G	12/204 (5,4%)	14/38 (36,8%)*	11/40 (27,5%)*	18/85 (21,2%)*	11/100 (11%)	6/76 (7,9%)

Πίνακας 7: Συχνότητα εμφάνισης των μεταλλάξεων στο mtDNA που ανιχνεύτηκαν σε ασθενείς με ΧΑΠ, στις πνευμονικές νόσους IPF, σαρκοείδωση και άσθμα σε σύγκριση με τη συχνότητα εμφάνισης των ίδιων μεταλλάξεων στους υγιείς-control. Με διαφορετικό χρώμα φαίνονται οι μεταλλάξεις A10398G, T10463C και A14696G που ανιχνεύτηκαν στην παρούσα εργασία. Η στατιστική σημαντικότητα υποδεικνύεται από την παρουσία αστερίσκων (*). Στον πίνακα με αστερίσκο δηλώνεται η στατιστική σημαντικότητα όπου * $p_{value} < 0,05$, ** $p_{value} < 0,01$ και *** $p_{value} < 0,001$.

Από τον πίνακα 7 φαίνεται πως η μετάλλαξη A14696G στο mt-tRNA^{Glu} ανιχνεύτηκε μόνο στη ΧΑΠ και όχι σε κάποια άλλη πνευμονική νόσο, ενώ δεν παρουσιάζει στατιστική σημαντικότητα, καθώς βρέθηκε μόλις σε 1 από τους 38 ασθενείς. Η μετάλλαξη T10463C, από την άλλη, στο γονίδιο mt-tRNA^{Arg}, παρ'ότι δεν βρέθηκε σε στατιστικά σημαντικότερα επίπεδα στους ασθενείς με ΧΑΠ, εντούτοις ανιχνεύτηκε σε στατιστικά σημαντικότερα επίπεδα στους ασθενείς με IPF και σαρκοείδωση, σε σύγκριση με τους control. Σε ασθενείς με άσθμα από την άλλη, δεν έχει ανιχνευτεί η συγκεκριμένη μετάλλαξη. Τέλος, η μετάλλαξη A10398G στο MT-ND3 γονίδιο βρέθηκε σε στατιστικά σημαντικά επίπεδα στους ασθενείς με ΧΑΠ, IPF και

σαρκοείδωση συγκριτικά με τους υγιείς- control, ενώ έχει ανιχνευτεί και σε ασθενείς με άσθμα αλλά χωρίς στατιστική σημαντικότητα (Daniil et al, 2018; Zida et al, 2012).

Τόσο η IPF όσο και η σαρκοείδωση χαρακτηρίζονται από χαμηλότερο προσδόκιμο ζωής συγκριτικά με τη ΧΑΠ που είναι λίγο πιο ήπια νόσος, και με το άσθμα που είναι αρκετά ηπιότερο νόσημα (Πίνακας 8). Άρα, η ανίχνευση μεγαλύτερου αριθμού μεταλλάξεων στην IPF και στη σαρκοείδωση σε σύγκριση με τη ΧΑΠ και το άσθμα συνάδει με τη φύση των νοσημάτων αυτών. Αναμένουμε λοιπόν μετά την ολοκλήρωση της έρευνας για τη ΧΑΠ, ο αριθμός των μεταλλάξεων στο mtDNA των ασθενών, να είναι μικρότερος από εκείνους της IPF και της σαρκοείδωσης, και μεγαλύτερος ενδεχομένως από τον αριθμό μεταλλάξεων στους ασθενείς με άσθμα. Επίσης, αναμένουμε τα τελικά αποτελέσματα για να αποφανθούμε για το ρόλο που διαδραματίζουν οι συνδυασμοί μεταλλάξεων στο φαινότυπο της νόσου.

Συσχέτιση μεταλλάξεων στο mtDNA με τη βαρύτητα πνευμονικών νόσων				
Ασθένειες	IPF	Σαρκοείδωση	Άσθμα	ΧΑΠ (15/22 mt-tRNA)
Προσδόκιμο ζωής (χρόνια)	2-5	6	18	4-10
Αριθμός μεταλλάξεων mtDNA	32	45	10	8 (δεν έχει ολοκληρωθεί)
Ασθενείς με μεταλλάξεις	38/40 (95%)	69/85 (81%)	56/76 (73,6%)	28/38 (73,7%) (δεν έχει ολοκληρωθεί)
Συνδυασμοί μόνο στους ασθενείς	15	15	9	4 (δεν έχει ολοκληρωθεί)

Πίνακας 8: Σύνοψη όλων των μέχρι σήμερα γνωστών στοιχείων σχετικά με τις μεταλλάξεις στο mtDNA σε ασθενείς με ΧΑΠ, IPF, σαρκοείδωση και άσθμα.

Κλείνοντας, πρέπει να τονιστεί πως μετά την ολοκλήρωση της μελέτης των 22 mt-RNAs, είναι απαραίτητη η διεξαγωγή περαιτέρω πειραμάτων τα οποία θα εστιάζουν το ενδιαφέρον τους στο αντίκτυπο που έχουν αυτές οι μεταλλάξεις στη λειτουργικότητα των συμπλόκων της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης και θα αξιολογούν τη σοβαρότητα κάθε μετάλλαξης και το ρόλο τους στην παθογένεια της νόσου.

Βιβλιογραφία

- Adamson, J., E. L., Phillips, G., & D. M. (2011). In Vitro Models of Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD). *Bronchitis*. doi: 10.5772/18247
- Agrawal, A., & Mabalirajan, U. (2016). Rejuvenating cellular respiration for optimizing respiratory function: targeting mitochondria. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*, 310(2), L103–L113.
- Alsbeih, G.A., Al-Harbi, N.M., El-Sebaie, M.M., Al-Rajhi, N.M., Al-Hadyan, K.S., Abu- Amero, K.K., 2009. Involvement of mitochondrial DNA sequence variations and respiratory activity in late complications following radiotherapy. *Clin. Cancer Res.* 15, 7352-7360.
- Aoshiha, K., & Nagai, A. (2009). Senescence hypothesis for the pathogenetic mechanism of chronic obstructive pulmonary disease. *Proceedings of the American Thoracic Society*, 6(7), 596–601.
- Arnold, R.S., Fedewa, S.A., Goodman, M., Osunkoya, A.O., Kissick, H.T., Morrissey, C., True, L.D., Petros, J.A., 2015. Bone metastasis in prostate cancer: Recurring mitochondrial DNA mutation reveals selective pressure exerted by the bone microenvironment. *Bone* 78, 81–86.
- Barnes, P. J. (2019). Small airway fibrosis in COPD. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 116, 105598.
- Birch, J., Barnes, P. J., & Passos, J. F. (2018). Mitochondria, telomeres and cell senescence: Implications for lung ageing and disease. *Pharmacology & Therapeutics*, 183, 34–49.
- Bueno, M., Calyeca, J., Rojas, M., & Mora, A. L. (2020). Mitochondria dysfunction and metabolic reprogramming as drivers of idiopathic pulmonary fibrosis. *Redox biology*, 33, 101509.

Cloonan, S. M., Kim, K., Esteves, P., Trian, T., & Barnes, P. J. (2020). Mitochondrial dysfunction in lung ageing and disease. *European Respiratory Review*, 29(157), 200165.

Cooper, G., Hausman, R. (2016). *The cell: a molecular approach*. Oxford University Press

Covarrubias, D., Bai, R. K., Wong, L. J., Leal, S. M. (2008) Mitochondrial DNA variant interactions modify breast cancer risk *Journal of Human Genetics* . 53 (10): 924-928.

Da Pozzo, P., Cardaioli, E., Radi, E., Federico, A. (2004) Sequence analysis of the complete mitochondrial genome in patients with mitochondrial encephalomyopathies lacking the common pathogenic DNA mutations *Biochemical and Biophysical Research Communications* . 324 (1): 360-364 .

Dahadhah, F. W., Saleh Jaweesh, M., Al Zoubi, M. S., Issam Abu Alarjah, M., Hammadeh, M. E., Amor, H. (2021) Lack of association between single polymorphic variants of the mitochondrial nicotinamide adenine dinucleotide dehydrogenase 3, and 4L (MT-ND3 and MT-ND4L) and male infertility *Andrologia* . 53 (8): e14139 .

Daniil, Z., Kotsiou, O. S., Grammatikopoulos, A., Peletidou, S., Gkika, H., Malli, F., Antoniou, K., Vasarmidi, E., Mamuris, Z., Gourgoulisanis, K., & Zifa, E. (2018). Detection of mitochondrial transfer RNA (mt-tRNA) gene mutations in patients with idiopathic pulmonary fibrosis and sarcoidosis. *Mitochondrion*, 43, 43–52.

Gohy, S., Carlier, F. M., Fregimilicka, C., Detry, B., Lecocq, M., Ladjemi, M. Z., Verleden, S., Hoton, D., Weynand, B., Bouzin, C., & Pilette, C. (2019). Altered generation of ciliated cells in chronic obstructive pulmonary disease. *Scientific Reports*, 9(1).

Hao, X. D., Yang, Y. L., Tang, N. L., Kong, Q. P., Wu, S. F., Zhang, Y. P. (2013) Mitochondrial DNA haplogroup Y is associated to Leigh syndrome in Chinese population *Gene* . 512 (2): 460-463 .

Heidari, M. M., Keshmirshekan, A., Bidakhavidi, M., Khosravi, A., Bandari, Z., Khatami, M., & Nafissi, S. (2020). A novel heteroplasmic mutation in mitochondrial

tRNA^{Arg} gene associated with non-dystrophic myotonias. *Acta neurologica Belgica*, 120(3), 573–580.

Hoffmann, R. F., Zarrintan, S., Brandenburg, S. M., Kol, A., de Bruin, H. G., Jafari, S., Dijk, F., Kalicharan, D., Kelders, M., Gosker, H. R., ten Hacken, N. H. T., van der Want, J. J., van Oosterhout, A. J. M., & Heijink, I. H. (2013). Prolonged cigarette smoke exposure alters mitochondrial structure and function in airway epithelial cells. *Respiratory Research*, 14(1), 97.

Husain, A.N. 2018. 'Lung'. V. Kumar, A. Abbas, J. Aster. *ROBBINS BASIC PATHOLOGY 10th edition*. ELSEVIER

Hwang, I. W., Hong, J. H., Kwon, B. N., Kim, H. J., Lee, N. R., Lim, M. H., Kwon, H. J., Jin, H. J. (2017) Association of mitochondrial DNA 10398 A/G polymorphism with attention deficit and hyperactivity disorder in Korean children *Gene* . 630 (): 8-12 .

Jankowich, M. 2016. 'Obstructive Pulmonary Diseases'. I. Benjamin, R. Criggs, E. Wing, G. Fitz. *Andreoli and Capenter's CECIL ESSENTIALS OF MEDICINE 9th edition*. ELSEVIER

Juo, S. H., Lu, M. Y., Bai, R. K., Liao, Y. C., Trieu, R. B., Yu, M. L., Wong, L. J. (2010) A common mitochondrial polymorphism 10398A>G is associated metabolic syndrome in a Chinese population *Mitochondrion* . 10 (3): 294-299.

Kakavas K. V. (2021). Sensitivity and applications of the PCR Single-Strand Conformation Polymorphism method. *Molecular biology reports*, 48(4), 3629–3635.

Khatami, F., Mehdi Heidari, M., & Houshmand, M. (2014). The mitochondrial DNA mutations associated with cardiac arrhythmia investigated in an LQTS family. *Iranian journal of basic medical sciences*, 17(9), 656–661.

Kim, V., & Criner, G. J. (2013). Chronic bronchitis and chronic obstructive pulmonary disease. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 187(3), 228–237.

Kume, H., Yamada, R., Sato, Y., & Togawa, R. (2023). Airway smooth muscle regulated by oxidative stress in COPD. *Antioxidants*, 12(1), 142.

Liao, W. Q., Pang, Y., Yu, C. A., Wen, J. Y., Zhang, Y. G., Li, X. H. (2008) Novel mutations of mitochondrial DNA associated with type 2 diabetes in Chinese Han population *The Tohoku Journal of Experimental Medicine* . 215 (4): 377-384 .

Lorenc, A., Bryk, J., Golik, P., Kupryjanczyk, J., Ostrowski, J., Pronicki, M., Semczuk, A., Szolkowska, M., Bartnik, E. (2003) Homoplasmic MELAS A3243G mtDNA mutation in a colon cancer sample *Mitochondrion* . 3 (2): 119-124

Malli, F., Bardaka, F., Tsilioni, I., Karetsi, E., Gourgoulianis, K.I., Daniil, Z., 2013. 8-Isoprostane levels in serum and bronchoalveolar lavage in idiopathic pulmonary fibrosis and sarcoidosis. *Food Chem. Tox.* 61, 160–163.
Med. Sci. 17, 656–661.

Prakash, Y. S., Pabelick, C. M., & Sieck, G. C. (2017). Mitochondrial Dysfunction in Airway Disease. *Chest*, 152(3), 618–626.

Rollins, B., Martin, M. V., Sequeira, P. A., Moon, E. A., Morgan, L. Z., Watson, S. J., Schatzberg, A., Akil, H., Myers, R. M., Jones, E. G., Wallace, D. C., Bunney, W. E., Vawter, M. P. (2009) Mitochondrial variants in schizophrenia, bipolar disorder, and major depressive disorder *PLoS One* . 4 (3)

Salas, A., Garcia-Magarinos, M., Logan, I., Bandelt, H. J. (2014) The saga of the many studies wrongly associating mitochondrial DNA with breast cancer *BMC Cancer* . 14 (0): 659 .

Sharma, S., Singh, S., Gupta, R. K., Ganju, L., Singh, S. B., Kumar, B., Singh, Y. (2019) Mitochondrial DNA sequencing reveals association of variants and haplogroup M33a2'3 with high altitude pulmonary edema susceptibility in Indian male lowlanders *Scientific Reports* . 9 (1): 10975.

Shu, L., Zhang, Y.M., Huang, X.X., Chen, C.Y., Zhang, X.N., 2012. Complete mitochondrial DNA sequence analysis in two southern Chinese pedigrees with Leber hereditary optic neuropathy revealed secondary mutations along with the primary mutation. *Int. J. Ophthalmol.* 5, 28–31.
Signal. 11, 1373–1414.

Simon, D. K., Zheng, K., Velazquez, L., Santos, N., Almaguer, L., Figueroa, K. P., Pulst, S. M. (2007) Mitochondrial complex I gene variant associated with early age at onset in spinocerebellar ataxia type 2 *Archives of Neurology* . 64 (7): 1042-1044 .

Simon, D.K., Mayeux, R., Marder, K., Kowall, N.W., Beal, M.F., Johns, D.R. (1999) Mitochondrial DNA mutations in complex I and tRNA genes in Parkinson's disease *Neurology* . 54 (3): 703-709 .

Sternberg, D., Danan, C., Lombes, A., Laforet, P., Girodon, E., Goossens, M., Amselem, S. (1998) Exhaustive scanning approach to screen all the mitochondrial tRNA genes for mutations and its application to the investigation of 35 independent patients with mitochondrial disorders *Human Molecular Genetics* . 7 (1): 33-42 .

Stowe, D.F., Camara, A.K., 2009. Mitochondrial reactive oxygen species production in Tropp, B. (2014). *Principles of Molecular Biology, First Edition*. JONES & BARTLETT LEARNING, LCC

Tang, S., Batra, A., Zhang, Y., Ebenroth, E. S., Huang, T. (2010) Left ventricular noncompaction is associated with mutations in the mitochondrial genome *Mitochondrion* . 10 (4): 350-357 .

Tsubouchi, K., Araya, J., & Kuwano, K. (2018). PINK1-PARK2-mediated mitophagy in COPD and IPF pathogenesises. *Inflammation and regeneration*, 38, 18.

Tymoczko, J., Berg, J., Stryer, L. (2015). *Biochemistry, A Short Course*. W. H Freeman and Company

Uusimaa, J., Finnila, S., Remes, A. M., Rantala, H., Vainionpaa, L., Hassinen, I. E., Majamaa, K. (2004) Molecular epidemiology of childhood mitochondrial encephalomyopathies in a Finnish population: sequence analysis of entire mtDNA of 17 children reveals heteroplasmic mutations in tRNA^{Arg}, tRNA^{Glu}, and tRNA^{Leu(UUR)} genes *Pediatrics* . 114 (2): 443-450.

Wang, L., Bamlet, W. R., de Andrade, M., Boardman, L. A., Cunningham, J. M., Thibodeau, S. N., Petersen, G. M. (2007) Mitochondrial genetic polymorphisms and

pancreatic cancer risk *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention* . 16 (7): 1455-1459 .

Watson, B.Jr., Khan, M.A., Desmond, R.A., Bergman, S., 2001. Mitochondrial DNA mutations in black Americans with hypertension-associated end-stage renal disease. *Am. J. Kidney Dis.* 38, 529–536.

Yeh, J. J., Lunetta, K. L., van Orsouw, N. J., Moore, F. D., Jr., Mutter, G. L., Vijg, J., Dahia, P. L., Eng, C. (2000) Somatic mitochondrial DNA (mtDNA) mutations in papillary thyroid carcinomas and differential mtDNA sequence variants in cases with thyroid tumours *Oncogene* . 19 (16): 2060-2066 .

Zhou, W.-cheng, Qu, J., Xie, S.-yang, Sun, Y., & Yao, H.-wei. (2021). Mitochondrial dysfunction in chronic respiratory diseases: Implications for the pathogenesis and potential therapeutics. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2021, 1–20.

Zifa, E., Giannouli, S., Theotokis, P., Stamatis, C., Mamuris, Z., Stathopoulos, C., 2007. Mitochondrial tRNA mutations: clinical and functional perturbations. *RNA Biol.* 4, 38–66.

Κακάνη, Ε., Αυγουστίνος, Α., Ματθιόπουλος, Κ. *Φυλλάδιο Εργαστηριακών Ασκήσεων του Μαθήματος Μοριακή Βιολογία Ι*