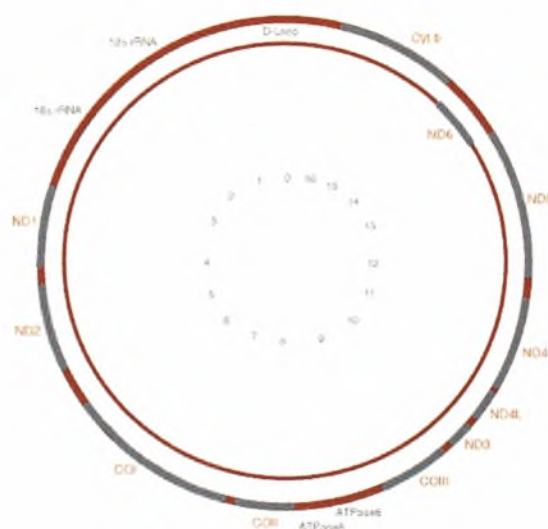


Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του  
Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

Βιοτεχνολογία – Ποιότητα Διατροφής & Περιβάλλοντος



**ΒΑΪΟΣ ΣΑΛΓΚΑΜΗΣ**

**“ΜΕΛΕΤΗ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟΥ  
DNA ΣΤΟ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΟ ΠΛΗΘΥΣΜΟ”**

Λάρισα 2010



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

Αριθ. Εισ.: 8109/1  
Ημερ. Εισ.: 08-03-2010  
Δωρεά: \_\_\_\_\_  
Ταξιθετικός Κωδικός: Δ  
571.657  
ΣΑΛ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ  
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087137

Μελέτη πολυμορφισμών μιτοχονδριακού  
DNA στο φυσιολογικό πληθυσμό

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

Ζίφα Αιμιλία, Επίκουρος Καθηγήτρια Βιολογίας / Νευροβιολογίας,  
Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Μαμούρης Ζήσης, Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών, Τμήμα  
Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Μπαλατσός Νικόλαος, Λέκτορας Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας &  
Βιοτεχνολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

## Πρόλογος

Η παρούσα Διπλωματική Εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Γενετικής, Συγκριτικής & Εξελικτικής Βιολογίας του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας στα πλαίσια του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών "Βιοτεχνολογία – Ποιότητα Διατροφής & Περιβάλλοντος".

Σε αυτό το σημείο θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες σε όλους όσους συνέβαλαν στην ολοκλήρωσή της.

Ιδιαίτερα ευχαριστώ την κα Αιμιλία Ζίφα για την ανάθεση του θέματος και για την επιστημονική της καθοδήγηση καθ' όλη τη διάρκεια της προσπάθειάς μου.

Ευχαριστώ τον κ. Ζήση Μαμούρη και τον κ. Νικόλαο Μπαλατσό, για την τιμή που μου έκαναν να συμμετέχουν στην Τριμελή Συμβουλευτική Επιτροπή.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τη Λέκτορα του Τμήματος κα Θεολογία Σαραφίδου, την υποψήφια διδάκτορα Ευαγγελία Κουτσογιαννούλη και τον υποψήφιο διδάκτορα Κώστα Σταμάτη, για την προθυμία να βοηθήσουν όποτε αυτό τους ζητήθηκε.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στους μεταπτυχιακούς φοιτητές Κωνσταντίνο Παπαδημητρίου και Θέμη Γιαννούλη, για την βοήθεια που μου παρείχαν κατά την εκτέλεση του πειραματικού μέρους.

Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου σε όλους τους μεταπτυχιακούς και προπτυχιακούς φοιτητές του Εργαστηρίου Γενετικής για την άψογη συνεργασία που είχαμε στο διάστημα που συνυπάρξαμε στο εργαστήριο.

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>1.1 ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b> .....	6
<b>1.2 ABSTRACT</b> .....	8
<b>2. ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b> .....	9
2.1 ΤΑ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑ.....	9
2.1.1 ΔΟΜΗ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΟΥ .....	10
2.1.2 ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΟΥ .....	12
2.1.3 ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ ΤΟΥ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΟΥ.....	13
2.2 ΤΟ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑ (mtDNA) .....	16
2.2.1 ΑΝΤΙΓΡΑΦΗ, ΜΕΤΑΓΡΑΦΗ ΚΑΙ ΜΕΤΑΦΡΑΣΗ ΤΟΥ mtDNA .....	18
2.2.2 Ο ΓΕΝΕΤΙΚΟΣ ΚΩΔΙΚΑΣ ΣΤΟ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΟ .....	21
2.3 ΤΑ ΜΟΡΙΑ tRNAs .....	22
2.3.1 ΔΟΜΗ ΤΟΥ tRNA.....	23
2.3.2 ΥΠΟΘΕΣΗ ΤΑΛΑΝΤΕΥΣΗΣ.....	26
2.3.3 ΠΑΘΟΓΟΝΕΣ ΚΑΙ ΟΥΔΕΤΕΡΕΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ ΣΕ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΑ ΓΟΝΙΔΙΑ tRNA.....	28
2.4 ΑΝΘΡΩΠΙΝΕΣ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΕΣ ΑΠΛΟΟΜΑΔΕΣ .....	36
2.5 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ .....	40
<b>3. ΥΛΙΚΑ &amp; ΜΕΘΟΔΟΙ</b> .....	41
3.1 ΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΥΛΙΚΟ.....	41
3.2 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA .....	41
3.3 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR).....	44
3.3.1. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ.....	45
3.3.2 ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣ ΤΩΝ tRNA ΓΟΝΙΔΙΩΝ.....	48
3.3.3 ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ PCR ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ.....	52
3.4 ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥ ΜΟΝΟΚΛΩΝΗΣ ΑΛΥΣΙΔΑΣ (Single Stranded Conformation Polymorphism –SSCP) .....	53
3.4.1 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΠΗΚΤΗΣ ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΙΟΥ .....	54
3.4.2 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΤΩΝ PCR ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ .....	55
3.4.3 ΧΡΩΣΗ ΝΙΤΡΙΚΟΥ ΑΡΓΥΡΟΥ (SILVER STAINING) .....	56
3.5 ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ DNA (DNA SEQUENCING) .....	57
3.5.1 ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ PCR ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ .....	57

3.5.2 ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗ (SEQUENCING).....	58
3.5.3 ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗΣ.....	59
<b>4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....</b>	<b>60</b>
4.1 ΓΟΝΙΔΙΑ tRNA <sup>Thr</sup> ΚΑΙ tRNA <sup>Pro</sup> & ΤΜΗΜΑΤΑ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΤΟΥ ΚΥΤΟΧΡΩΜΑΤΟΣ b ΚΑΙ ΤΟΥ ΒΡΟΧΟΥ D .....	60
4.2 ΓΟΝΙΔΙΑ tRNA <sup>Ile</sup> , tRNA <sup>Gln</sup> και tRNA <sup>Met</sup> ΚΑΙ ΤΜΗΜΑΤΑ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΤΩΝ ND1 ΚΑΙ ND2 ΥΠΟΜΟΝΑΔΩΝ ΤΟΥ ΣΥΜΠΛΟΚΟΥ Ι ΤΗΣ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΗΣ ΑΛΥΣΙΔΑΣ .....	63
4.3 ΓΟΝΙΔΙΑ tRNA <sup>Ser(UCN)</sup> και tRNA <sup>Asp</sup> ΚΑΙ ΤΜΗΜΑΤΑ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΤΩΝ ΥΠΟΜΟΝΑΔΩΝ Ι ΚΑΙ ΙΙ ΤΗΣ ΟΞΕΙΔΑΣΗΣ ΤΟΥ ΚΥΤΟΧΡΩΜΑΤΟΣ C .....	64
4.4 ΓΟΝΙΔΙΑ tRNA <sup>Asn</sup> , tRNA <sup>Cys</sup> ΚΑΙ tRNA <sup>Tyr</sup> ΚΑΙ ΤΜΗΜΑ ΤΗΣ ΥΠΟΜΟΝΑΔΑΣ Ι ΤΗΣ ΟΞΕΙΔΑΣΗΣ ΤΟΥ ΚΥΤΟΧΡΩΜΑΤΟΣ C.....	66
4.5 ΓΟΝΙΔΙΑ tRNA <sup>Trp</sup> , tRNA <sup>Ala</sup> , tRNA <sup>Glu</sup> & ΠΑΡΑΚΕΙΜΕΝΕΣ ΠΕΡΙΟΧΕΣ .....	67
4.6 ΣΥΝΟΨΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ.....	68
<b>5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....</b>	<b>74</b>
<b>6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....</b>	<b>79</b>

## 1.1 ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Πρόσφατα, ένας μεγάλος αριθμός μεταλλάξεων που ανιχνεύθηκαν σε μιτοχονδριακά γονίδια tRNA έχει συνδεθεί με την εμφάνιση εξαιρετικά ετερογενών ασθενειών με ποικίλα κλινικά συμπτώματα στον άνθρωπο. Ο λόγος για τον οποίο συμβαίνει αυτό έγκειται στον κεντρικό ρόλο των μορίων tRNA στη μιτοχονδριακή πρωτεϊνοσύνθεση, όπου εμπλέκονται στη σύνθεση ενζύμων, απαραίτητων για τον ενεργειακό μεταβολισμό. Στην πλειοψηφία των μιτοχονδριακών μορίων tRNA έχουν παρατηρηθεί τόσο πολυμορφικές μεταλλάξεις, όσο και μεταλλάξεις οι οποίες έχουν χαρακτηριστεί ως παθογόνες. Οι πρώτες δεν επηρεάζουν τη δομική ακεραιότητα ή τη λειτουργικότητα των μιτοχονδριακών tRNAs και εμπλουτίζουν τον πληθυσμό με νέα γενετική ποικιλότητα, πάνω στην οποία θα δράσουν συστηματικές ή τυχαίες διεργασίες. Οι δεύτερες προκαλούν δυσλειτουργία στο μιτοχόνδριο με αποτέλεσμα την εμφάνιση κάποιας ασθένειας.

Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκε η ύπαρξη μεταλλάξεων σε 13 μιτοχονδριακά γονίδια σε πληθυσμό φυσιολογικών ατόμων από την περιοχή της Θεσσαλίας. Ειδικότερα τα γονίδια που μελετήθηκαν ήταν τα: tRNA<sup>Thr</sup>, tRNA<sup>Pro</sup>, tRNA<sup>Ser(UCN)</sup>, tRNA<sup>Asp</sup>, tRNA<sup>Glu</sup>, tRNA<sup>Trp</sup>, tRNA<sup>Ala</sup>, tRNA<sup>Ile</sup>, tRNA<sup>Gln</sup>, tRNA<sup>Met</sup>, tRNA<sup>Asn</sup>, tRNA<sup>Cys</sup> και tRNA<sup>Tyr</sup>. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η συλλογή δειγμάτων ολικού αίματος 40 ατόμων, η απομόνωση DNA και η ενίσχυση με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) των παραπάνω γονιδίων καθώς και τμημάτων των παρακείμενων γονιδίων. Ακολούθως, η ανίχνευση των μεταλλάξεων στα προϊόντα PCR πραγματοποιήθηκε με την τεχνική του πολυμορφισμού διάταξης μονής αλυσίδας (SSCP) και η περαιτέρω ταυτοποίηση τους επετεύχθη ύστερα από ταυτοποίηση της αλληλουχίας του DNA τους (sequencing). Συνολικά, ανιχνεύθηκαν έξι ήδη ταυτοποιημένοι πολυμορφισμοί από τους οποίους οι πέντε εντοπίζονται σε γονίδια tRNA, ενώ ο ένας εντοπίζεται στο γονίδιο της υπομονάδας II της οξειδάσης του κυτοχρώματος c (MT-CO2). Αξίζει να σημειωθεί ότι ανιχνεύθηκε και μια μετάλλαξη στο γονίδιο tRNA<sup>Tyr</sup> για την οποία δεν υπάρχει καμιά αναφορά στην βιβλιογραφία και παρατηρείται για πρώτη φορά.

Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας συμβάλλουν στην δημιουργία μιας βάσης δεδομένων των μιτοχονδριακών μεταλλάξεων στο φυσιολογικό πληθυσμό, ώστε να είναι δυνατή η σύγκριση των μεταλλάξεων που εμφανίζονται στις



παθολογικές καταστάσεις με τις μεταλλάξεις του φυσιολογικού πληθυσμού. Κάτι που δεν υπάρχει ως τώρα στην Ελλάδα.

## 1.2 ABSTRACT

Recently, a large number of mutations detected in mitochondrial tRNA genes have been associated with the emergence of highly heterogeneous diseases with diverse clinical symptoms in humans. The reason why this happens is the central role of tRNA molecules in mitochondrial protein synthesis involving the enzymes necessary for energy metabolism. It has been observed that in the majority of mitochondrial tRNA molecules there are not only polymorphic mutations, but also mutations that are classified as pathogenic. The former do not affect the structural integrity or functionality of mitochondrial tRNAs and enrich the population with new genetic diversity upon which are to act systematic or random processes. The pathogenic mutations cause disease as a result of mitochondrial dysfunction.

This study examined the existence of such polymorphisms in 10 mitochondrial genes in a population of normal from the region of Thessaly. Particularly, the genes in this study were: tRNA<sup>Thr</sup>, tRNA<sup>Pro</sup>, tRNA<sup>Ser(UCN)</sup>, tRNA<sup>Asp</sup>, tRNA<sup>Glu</sup>, tRNA<sup>Trp</sup>, tRNA<sup>Ala</sup>, tRNA<sup>Ile</sup>, tRNA<sup>Gln</sup>, tRNA<sup>Met</sup>, tRNA<sup>Asn</sup>, tRNA<sup>Cys</sup> and tRNA<sup>Tyr</sup>. The procedure followed was to collect whole blood samples of 40 people, the isolation of DNA and the strengthening of polymerase chain reaction (PCR) of these genes and part of their adjacent regions. Next, the detection of polymorphisms in PCR products made with the technique of single stranded chain polymorphism (SSCP) and further identification was achieved after the identification of the DNA sequence (sequencing). Overall, there were detected six polymorphisms already identified five of which are located in genes tRNA, while the one is located in gene of subunit II of cytochrome oxidase c (MT-CO2). It is worth mentioning that a mutation was also detected in gene tRNA<sup>Tyr</sup> for which there is no reference in the literature and it is observed for the first time.

The results of this study are part of wider research carried out in order to correlate mutations of the mitochondrial genome with specific diseases. Thus contribute to enrich the database of mitochondrial mutations to allow comparisons of mutations that occur in pathological conditions with those in the normal population.

## 2. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 2.1 ΤΑ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑ

Τα **μιτοχόνδρια** (μίτος + χόνδρος, κόκκος) ανακαλύφθηκαν ως συστατικά του κυττάρου το 1886 από τον Altmann. Το 1898 ο Benda εισάγει τον όρο «μιτοχόνδριο», το 1904 ο Meves περιγράφει τα μιτοχόνδρια στα φυτικά κύτταρα και το 1934 οι Bensley και Hoerr απομονώνουν τα οργανίδια με υπερφυγοκέντρωση. Η λεπτομερειακή λεπτή δομή, όμως, έγινε γνωστή αρκετά χρόνια αργότερα, μετά την κατασκευή του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου και χάρη στις πρωτοποριακές έρευνες των G. Palade, K.R. Porter, F. Sjöstrand και άλλων, το 1952, επέτρεψε την κατανόηση των βιοχημικών μηχανισμών και τη συσχέτιση δομής και λειτουργίας των σημαντικών αυτών κυτταρικών οργανιδίων.

Τα μιτοχόνδρια απαντώνται σε όλους σχεδόν τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς (εξαιρέση αποτελούν κάποιοι μονοκύτταροι ευκαρυώτες). Είναι ωσειδή οργανίδια, με μήκος 1-10 μm και διάμετρο 0,3-1 μm. Αποτελούν συνήθως το 18-20% του συνολικού κυτταροπλασματικού όγκου και ο αριθμός τους στο κύτταρο ποικίλει ανάλογα με τον ιστό και τον οργανισμό. Έχει δειχτεί, με τη βοήθεια σύγχρονων τεχνικών, ότι τα μιτοχόνδρια μπορούν να διαιρούνται ή να συντήκονται μέσα στο κύτταρο, καθώς και ότι η θέση τους στο κυτταρόπλασμα μπορεί να μην είναι σταθερή. Η πλαστικότητα του σχήματός τους και η ικανότητά τους να αλλάζουν θέση οφείλονται πιθανότατα στις αλληλεπιδράσεις τους με τον κυτταροσκελετό, με τον οποίο φαίνεται ότι βρίσκονται σε επαφή (Bereiter-Hann and Voth, 1994).

Τα κύτταρα, με την εξελικτική διαδικασία εκατομμυρίων ετών, για τη διατήρηση της ζωής, προσαρμόστηκαν στο να παράγουν ενέργεια (κυτταρική αναπνοή) και να τη χρησιμοποιούν με τη μορφή τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP), μεγάλα ποσά αυτής της ενέργειας παράγονται στα μιτοχόνδρια γι' αυτό συχνά περιγράφονται ως «εργοστάσια παραγωγής ενέργειας». Εμπλέκονται έτσι σε ένα εύρος διαδικασιών, όπως είναι η μεταγωγή σήματος, η κυτταρική διαφοροποίηση, ο κυτταρικός θάνατος (Desagher and Martinou, 2000), η ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και της κυτταρικής αύξησης, καθώς και η διατήρηση της ομοιόστασης του ενδοκυτταρικού ασβεστίου και η παραγωγή θερμότητας (Ballard and Whitlock,

2004). Επίσης παρουσιάζουν μια γενετική ημιαυτονομία καθώς φέρουν το δικό τους ανεξάρτητο γονιδίωμα, το μιτοχονδριακό DNA. Τέλος, σύμφωνα με την ενδοσυμβιωτική θεωρία, τα μιτοχόνδρια προέρχονται από αρχαία βακτήρια που εγκολλώθηκαν σε προγόνους ευκαρυωτικών κυττάρων, πριν από ένα εκατομμύριο χρόνια.

### 2.1.1 ΔΟΜΗ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΟΥ

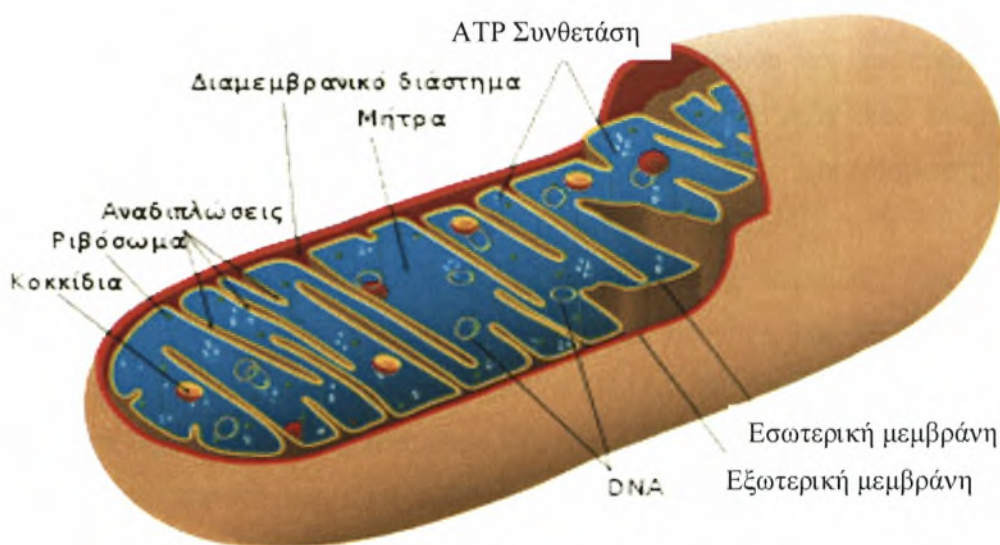
Η δομή των μιτοχονδρίων είναι χαρακτηριστική, όπως φαίνεται με ηλεκτρονική μικροσκοπία λεπτών τομών: τα μιτοχόνδρια περιβάλλονται από ένα σύστημα δύο μεμβρανών, μιας εξωτερικής και μιας εσωτερικής μεμβράνης, οι οποίες διαχωρίζουν το εσωτερικό των μιτοχονδρίων, που ονομάζεται μήτρα, από το κυτταρόπλασμα. Το διάστημα που δημιουργείται ανάμεσα στις δύο μεμβράνες ονομάζεται διαμεμβρανικός χώρος. Η εσωτερική μεμβράνη δημιουργεί αναδιπλώσεις, που ονομάζονται ακρολοφίες (Εικόνα 1).

Πιο αναλυτικά:

- **Η εξωτερική μεμβράνη** περιβάλλει ολόκληρο το μιτοχόνδριο όπου οι πρωτεΐνες διατάσσονται με τέτοιο τρόπο ώστε να δημιουργούν πόρους, οι οποίοι διευκολύνουν το πέρασμα των προϊόντων του μεταβολισμού με μοριακό βάρος μικρότερο των 10 kDa. Μια τέτοια διαπερατότητα επιβεβαιώνεται από τη βιοχημική σύνθεση του διαμεμβρανικού χώρου, η οποία συγγενεύει με εκείνη του κυτταροπλάσματος.
- **Ο διαμεμβρανικός χώρος**, είναι ο χώρος μεταξύ της εσωτερικής και εξωτερικής μεμβράνης, ο οποίος λόγω της διαπερατότητας της εξωτερικής μεμβράνης περιέχει ιόντα σε ισοδύναμες συγκεντρώσεις με το κυτταρόπλασμα. Περιέχει επίσης ένζυμα που χρησιμοποιούν το εξερχόμενο ATP για φωσφορυλίωση νουκλεοτιδίων.
- **Η εσωτερική μεμβράνη** σε αντίθεση με την εξωτερική μεμβράνη είναι αδιαπέραστη σε όλα τα μόρια και η επιλεκτική μεταφορά τόσο των ιόντων

όσο και των πολικών μορίων μέσα και έξω από τη μήτρα γίνεται μόνο μέσω ειδικών υποδοχέων. Περιέχει μεγάλο αριθμό πρωτεϊνών που εκτελούν διαφορετικές λειτουργίες, συμμετέχουν στις αντιδράσεις της κυτταρικής αναπνοής, στη σύνθεση του ATP καθώς και στη μεταφορά μορίων προς και από τη μήτρα.

- **Οι ακρολοφίες** είναι συνήθως κάθετες προς τον επιμήκη άξονα του μιτοχονδρίου και σχηματίζουν ατελή διαφράγματα, τα οποία δε διακόπτουν τη συνέχεια της μήτρας. Επηρεάζουν τη χημειοσμωτική λειτουργία της εσωτερικής μεμβράνης και ενισχύουν την ικανότητά της να παράγει ATP.
- **Η μήτρα.** Η πυκνότητά της ποικίλλει ανάλογα με τη λειτουργική κατάσταση του οργανιδίου. Τη σταθερή χημική σύνθεσή της αποτελούν:
  - μόρια του μιτοχονδριακού DNA,
  - μιτοχονδριακά ριβοσώματα,
  - ακανόνιστα, πυκνά συσσωματώματα, διαμέτρου 50nm, κοκκίδια, τα οποία δημιουργούνται από τη συσσώρευση των κατιόντων,
  - τα ένζυμα που παίρνουν στον κύκλο του κιτρικού οξέος και στη βιοσύνθεση των λιπαρών οξέων.



**Εικόνα 1:** Σχηματική απεικόνιση της δομής του μιτοχονδρίου.

## 2.1.2 ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΟΥ

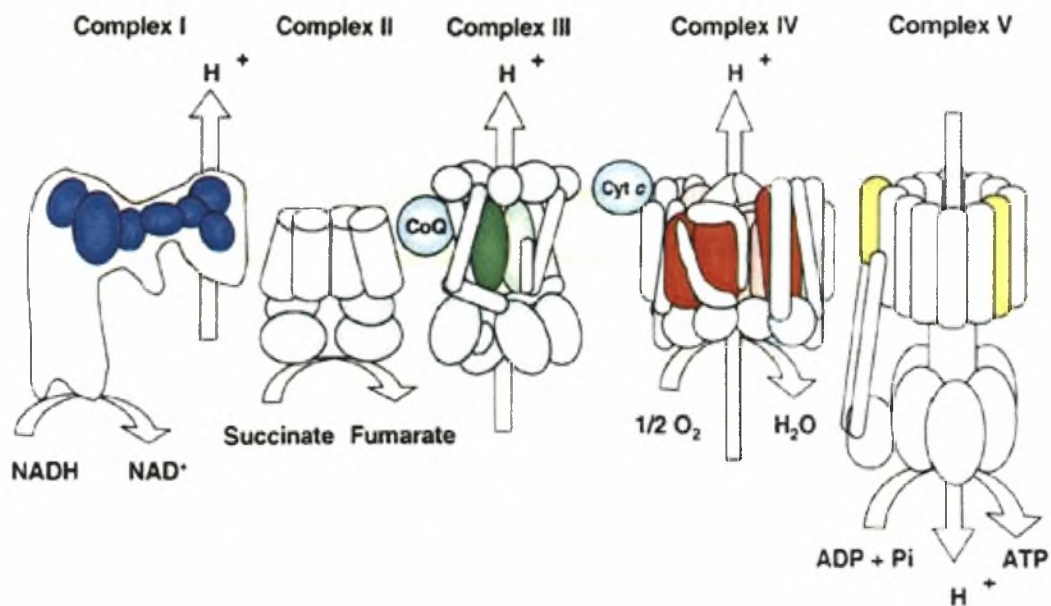
Τα μιτοχόνδρια αποτελούν τα εξειδικευμένα οργανίδια όπου επιτελείται η κυτταρική αναπνοή και παράγεται ATP, γι' αυτό καλούνται ενεργειακά κέντρα των κυττάρων. Μέσα σ' αυτά, τα λιπαρά οξέα και το πυροσταφυλικό οξύ διασπώνται σε ακέτυλο συνένζυμο A, το οποίο μέσω του κύκλου του κιτρικού οξέος παρέχει NADH και FADH<sub>2</sub>.

Ο κύκλος του κιτρικού οξέος, γνωστός και ως κύκλος του Krebs, αποτελεί το πρώτο στάδιο στην κυτταρική αναπνοή, πραγματοποιείται αφαίρεση ηλεκτρονίων υψηλής ενέργειας από τις πηγές καύσιμων οργανικών μορίων – αμινοξέων, λιπαρών οξέων και υδατανθράκων. Αυτά τα ηλεκτρόνια ανάγουν το οξυγόνο για να δημιουργηθεί μια βαθμίδωση συγκέντρωσης πρωτονίων, που χρησιμοποιείται για την παραγωγή ATP. Η αναγωγή του οξυγόνου και η σύνθεση του ATP απαρτίζουν την οξειδωτική φωσφορυλίωση. Η αναγωγική ενέργεια από τα NADH και FADH<sub>2</sub> μεταφέρεται στο μόριο του οξυγόνου (O<sub>2</sub>) με διαδοχικά βήματα μέσω της αναπνευστικής αλυσίδας ή αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων.

Τα πρωτεϊνικά σύμπλοκα της εσωτερικής μεμβράνης (NADH αφυδρογονάση, κυτοχρωμική αναγωγάση και κυτοχρωμική οξειδάση) καταλύουν τη μεταφορά και την απελευθέρωση της αναγωγικής ενέργειας, που χρησιμοποιείται για να αντλήσει πρωτόνια στο διαμεμβρανικό χώρο. Καθώς η πρωτονιακή συγκέντρωση αυξάνεται, παράγεται ένα ισχυρό ηλεκτροχημικό δυναμικό κατά μήκος της εσωτερικής μεμβράνης. Λόγω του ηλεκτροχημικού δυναμικού, τα πρωτόνια επιστρέφουν στη μήτρα μέσω του ενζυμικού συμπλόκου της ATP συνθάσης και το ενεργειακό δυναμικό τους χρησιμοποιείται για τη σύνθεση ATP από ADP και ανόργανο φωσφορικό άλας (Pi). Η διαδικασία αυτή ονομάζεται χημειόσμωση και παρατηρήθηκε πρώτα από τον Peter Mitchell (Mitchell, 1967).

Παρά την αποτελεσματικότητα της αναπνευστικής αλυσίδας, ένα μικρό ποσοστό των ηλεκτρονίων δύναται να ανάγει το οξυγόνο και να σχηματίσει οξειδωτικές ρίζες, όπως αυτή του υπεροξειδίου (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Το γεγονός αυτό μπορεί να οδηγήσει σε οξειδωτικό stress στα μιτοχόνδρια και κατ' επέκταση στη μείωση της μιτοχονδριακής λειτουργίας, κάτι που σχετίζεται με τη διαδικασία της γήρανσης (Cortopassi, 1999, Huang et al., 2004).





**Εικόνα 2:** Σχηματική απεικόνιση της αναπνευστικής αλυσίδας. Το σύμπλοκο I (NADH αφυδρογονάση) ανάγει το NADH, αντλεί  $H^+$  και προσδίδει  $e^-$  στην αλυσίδα. Το σύμπλοκο II (αφυδρογονάση του ηλεκτρικού) δέχεται  $e^-$  από το FADH<sub>2</sub> και τα μεταφέρει στο σύμπλοκο III (κυτοχρωμική αναγωγία), μέσω του συνενζύμου Q. Τα  $e^-$  μεταφέρονται στη συνέχεια στο σύμπλοκο IV (κυτοχρωμική οξειδάση), μέσω του κυτοχρώματος c. Τέλος, το σύμπλοκο V (ATP συνθάση) καταλύει τη μετατροπή του ADP σε ATP, το οποίο μεταφέρεται έξω από τη μήτρα μέσω αντλιών για να αξιοποιηθεί όπου χρειάζεται.

### 2.1.3 ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ ΤΟΥ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΟΥ

Το γεγονός ότι τα μιτοχόνδρια παρουσιάζουν πολλές ομοιότητες με τους προκαρυωτικούς οργανισμούς οδήγησε στην ανάπτυξη της **ενδοσυμβιωτικής θεωρίας** για την προέλευση των μιτοχονδρίων (Margulis, 1970). Οι πρώτες μορφές ζωής στον πλανήτη μας ήταν αναερόβιοι προκαρυωτικοί οργανισμοί, δεδομένου ότι η ατμόσφαιρα της Γης περιείχε κυρίως άζωτο. Με την ανάπτυξη του συστήματος της φωτοσύνθεσης, η οποία θεωρείται ότι έλαβε χώρα από οργανισμούς παρόμοιους με τα κυανοφύκη και τα φωτοσυνθετικά βακτήρια, άρχισαν να απελευθερώνονται στην ατμόσφαιρα διαρκώς αυξανόμενες ποσότητες οξυγόνου. Το αποτέλεσμα αυτής της διαδικασίας αποτέλεσε και το υπόστρωμα ανάπτυξης οργανισμών οι οποίοι δημιούργησαν μηχανισμούς αερόβιας αναπνοής.

Κεντρικό σημείο της ενδοσυμβιωτικής θεωρίας είναι ότι τα μιτοχόνδρια προήλθαν συμβιωτικά από ένα προγονικό τύπο βακτηρίου που διαβίωνε ελεύθερο και απέκτησε την ικανότητα της αποδοτικής κυτταρικής αναπνοής.

Σήμερα, είναι αποδεκτή η **τμηματική ενδοσυμβιωτική θεωρία** που ανέπτυξε η Lynn Margulis το 1982, σύμφωνα με την οποία η εξέλιξη των ευκαρυωτών από τους προκαρυώτες περιελάμβανε τη συμβιωτική ένωση πολλών προγενέστερων ανεξάρτητων προγόνων. Τις προγονικές αυτές μορφές αποτελούσαν το κύτταρο-ξενιστής, ο πρόγονος των μιτοχονδρίων, ο πρόγονος των χλωροπλαστών και ένας προκαρυωτικός οργανισμός, που διέθετε τις δομές που σήμερα εξασφαλίζουν την κυτταρική κίνηση. Σύμφωνα με τη θεωρία, το αρχικό προκαρυωτικό κύτταρο-ξενιστής ήταν ένα αρχαιοβακτήριο όμοιο με το σημερινό *Thermoplasma*, που είναι ανθεκτικό σε υψηλές θερμοκρασίες και όξινες συνθήκες. Το κύτταρο-ξενιστής δεν είχε φωτοσυνθετική ικανότητα ούτε ήταν ικανό να χρησιμοποιεί αποτελεσματικά το οξυγόνο. Σύμφωνα με αυτούς τους μηχανισμούς εξηγείται τόσο η προέλευση των ευκαρυωτικών κυττάρων όσο και η ύπαρξη DNA στα μιτοχόνδρια και στους χλωροπλάστες.

Μια άλλη προσέγγιση στην προέλευση των μιτοχονδρίων δίνεται από την **θεωρία της θυγατροποίησης** (Raff and Mahler, 1972). Σύμφωνα με τη θεωρία αυτή τα αρχέγονα προκαρυωτικά κύτταρα είχαν αναπτύξει ήδη ένα δικό τους αναπνευστικό σύστημα το οποίο βρισκόταν στις επιφανειακές μεμβράνες. Με την πάροδο του χρόνου δημιουργήθηκαν εγκολπώσεις των μεμβρανών οι οποίες σχημάτισαν κλειστές περιοχές εντός των οποίων περιορίστηκαν οι μηχανισμοί της αναπνοής στο εσωτερικό της μεμβράνης. Η εξέλιξη αυτών των περιοχών οδήγησε στο σχηματισμό των μιτοχονδρίων και των χλωροπλαστών. Η ύπαρξη του mtDNA και του ctDNA θεωρείται ότι προκύπτει από την παγίδευση γενετικού υλικού κατά τη διαδικασία εγκόλπωσης των μεμβρανών το οποίο αποτέλεσε πλέον μόνιμο συστατικό των οργάνων αυτών.

Τα τελευταία χρόνια αναπτύχθηκε από τους Martin και Muller (1998) μία νέα θεωρία για την προέλευση των μιτοχονδρίων που ονομάστηκε **«υπόθεση υδρογόνου»**. Σύμφωνα με αυτή τη θεωρία το πρώτο ευκαρυωτικό κύτταρο δεν σχηματίστηκε απλά από "ατύχημα", αλλά ήταν αποτέλεσμα σκόπιμης ένωσης μεταξύ του αρχαιοβακτηριακού κυττάρου-ξενιστή, ενός μεθανιογόνου που κατανάλωνε υδρογόνο και διοξείδιο του άνθρακα για την παραγωγή μεθανίου και του μελλοντικού μιτοχονδριακού συμβιώτη, ο οποίος απέβαλε υδρογόνο και διοξείδιο του άνθρακα ως



προϊόντα του αναερόβιου μεταβολισμού. Έτσι, ενώ ο συμβιώτης είχε πιθανόν ικανότητα στην αερόβια αναπνοή, η συμβίωση άρχισε ως αποτέλεσμα των προϊόντων του αναερόβιου μεταβολισμού. Η εξάρτηση του ξενιστή από το υδρογόνο που παρήγαγε ο συμβιώτης αναγνωρίστηκε ως η αρχή επιλογής που σταθεροποίησε τον κοινό πρόγονο των ευκαρυωτικών κυττάρων.

Μια τέταρτη θεωρία αναπτύχθηκε από τους Lopez-Garcia και Moreira (Lopez-Garcia and Moreira, 1999), η οποία ονομάστηκε **«υπόθεση συντροφικότητας»**, όπου θεωρείται ότι η αρχική συμβίωση πραγματοποιήθηκε μεταξύ ενός μεθανιογόνου αρχαιοβακτηρίου και ενός προγονικού δέλτα-πρωτοβακτηρίου, που χρησιμοποιούσε θείο για την αναπνοή του.

Η ενδοσυμβιωτική προέλευση των μιτοχονδρίων είναι σήμερα περισσότερο αποδεκτή, ιδιαίτερα με βάση τις φυλογενετικές αναλύσεις οι οποίες δείχνουν ότι τα μιτοχόνδρια προέρχονται από γενεολογικές γραμμές, οι οποίες σχετίζονται με τα α-πρωτεοβακτήρια (Emelyanov, 2001).



**Εικόνα 3:** Σχηματική απεικόνιση της ενδοσυμβιωτικής θεωρίας.

## 2.2 ΤΟ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑ (mtDNA)

Τα μιτοχονδριακά DNA (mtDNA) των ζωικών οργανισμών εμφανίζουν ομοιότητες ως προς τη δομή και τη λειτουργία τους. Πρόκειται για κυκλικά δίκλιωνα μόρια, με εξαίρεση κάποιους κατώτερους οργανισμούς, στους οποίους το mtDNA είναι ευθύγραμμο και μικρού μεγέθους.

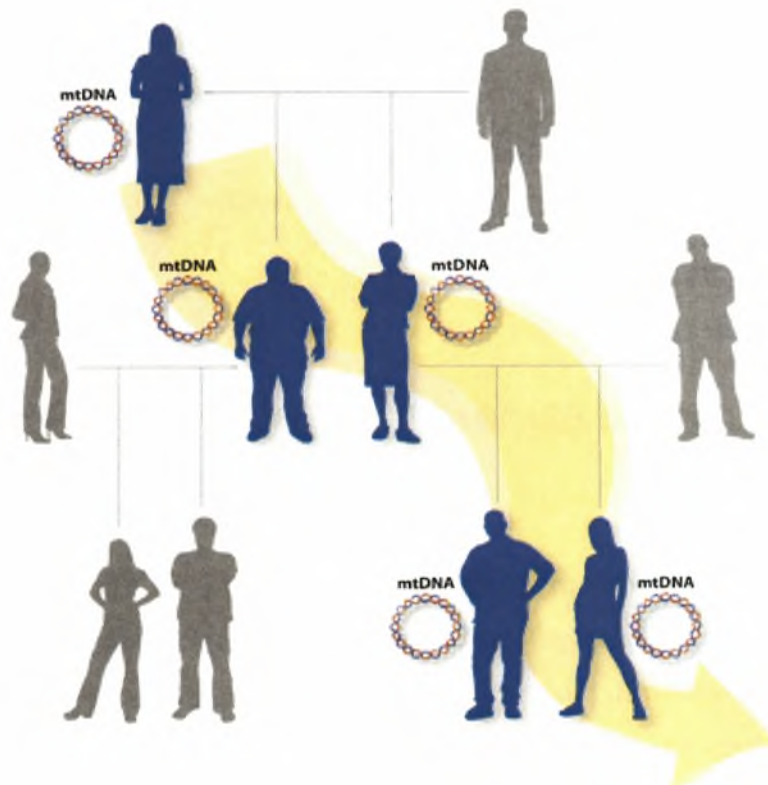
Το 1981 δημοσιεύτηκε η πρωτοταγής δομή του ανθρώπινου μιτοχονδριακού DNA (mtDNA). Είναι ένα κυκλικό δίκλινο μόριο του οποίου οι δύο κλώνοι έχουν διαφορετικό περιεχόμενο σε G-C, με αποτέλεσμα ο ένας να είναι βαρύτερος του άλλου. Ο ένας κλώνος ονομάζεται H (heavy) και ο άλλος L (light). Το mtDNA έχει μέγεθος 16.569 kb και κωδικοποιεί 37 γονίδια (Anderson et al., 1981): 13 γονίδια των πρωτεϊνών που ανήκουν στα σύμπλοκα I, III, IV και V της αναπνευστικής αλυσίδας, 22 μιτοχονδριακά tRNAs και 2 rRNAs (12S και 16S). Ειδικότερα, ο κλώνος H κωδικοποιεί 28 γονίδια και ο κλώνος L κωδικοποιεί 9 γονίδια, εκ των οποίων τα 8 κωδικοποιούν μιτοχονδριακά μόρια tRNAs. Στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα έχει βρεθεί μια περιοχή πλούσια σε A-T, η οποία αποτελεί το σημείο έναρξης της αντιγραφής και ονομάζεται replication origin ή D-loop.

Κάθε μιτοχόνδριο περιλαμβάνει περίπου 2 έως 10 αντίγραφα του γονιδιώματός του. Λόγω της κυτταροπλασματικής του εντόπισης, το μιτοχονδριακό γονιδίωμα κληρονομείται αποκλειστικά μητρικά (τα ώριμα σπερματοζώαρια περιέχουν πολύ λίγο κυτταρόπλασμα με λίγα μιτοχόνδρια) (Hutchison et al., 1974). Ως εκ τούτου, μόνο τα θηλυκά άτομα μπορούν να μεταβιβάσουν τις μεταλλάξεις σε όλους τους απογόνους ανεξαρτήτως φύλου.

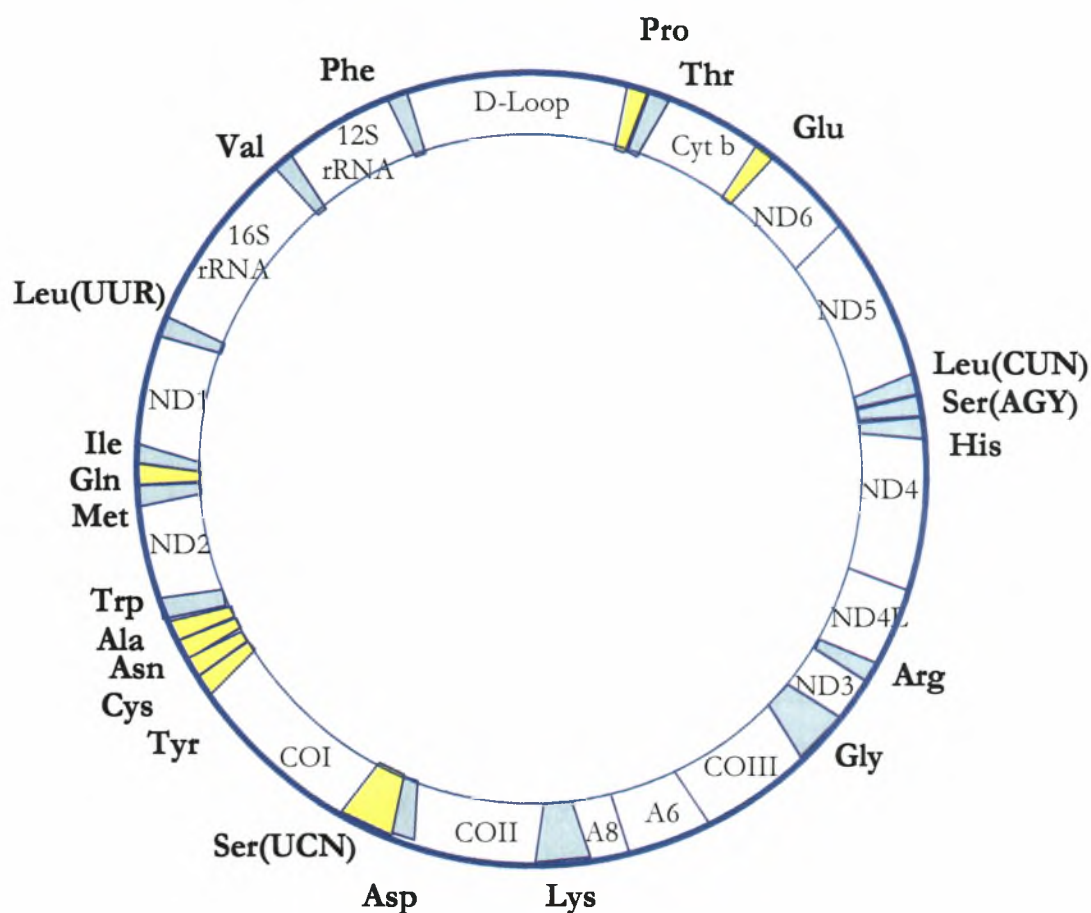
Το mtDNA διαφέρει από το πυρηνικό DNA εξαιτίας των ιδιαίτερων χαρακτηριστικών του: είναι απλοειδές, μη-ανασυνδυαζόμενο και μητρικά μεταβιβαζόμενο. Θεωρείται παράδειγμα γενετικής οικονομίας στη φύση (Attardi, 1985), καθώς δεν υπάρχουν ιντρόνια, ψευδογονίδια, επαναλαμβανόμενο DNA και μεγάλες ακολουθίες που να παρεμβάλλονται μεταξύ των γονιδίων. Τα μιτοχονδριακά DNA μεταγράφονται ως πολυγονιδιακά μετάγραφα, τα οποία στη συνέχεια ματίζονται και πολυαδενυλιώνονται για να δώσουν ώριμα mRNAs. Εξάλλου οι περισσότερες από τις γενετικές αλλαγές που παρατηρούνται είναι απλές αντικαταστάσεις βάσεων, ορισμένες είναι μικρές προσθέσεις ή ελλείμματα, ενώ λιγότερες περιλαμβάνουν μεγάλες αλλαγές στο μήκος του μορίου.

Ο ρυθμός μετάλλαξης του μιτοχονδριακού γονιδιώματος είναι περίπου είκοσι φορές μεγαλύτερος από αυτόν του πυρηνικού γονιδιώματος. Πιθανόν δευτερογενώς λόγω της παραγωγής ελεύθερων ριζών οξυγόνου στα μιτοχόνδρια, αλλά και λόγω της ελαττωμένης ικανότητας των μιτοχονδρίων για επιδιόρθωση λαθών κατά την αντιγραφή του mtDNA από την πολυμεράση. Είναι επίσης πιθανό η ταχεία εξέλιξη του mtDNA να οφείλεται στη «χαλαρότητα» αναγνώρισης της τρίτης θέσης του κωδικονίου έτσι όπως εκφράζεται με την υπόθεση ταλάντευσης που περιγράφεται παρακάτω.

Αποτέλεσμα αυτών των αλλαγών είναι η αυξημένη συσσώρευση πολυμορφισμών και η δημιουργία μεγάλης ποικιλομορφίας μεταξύ των μιτοχονδρίων, όχι μόνο μεταξύ διαφορετικών ειδών, αλλά και ανάμεσα στο ίδιο είδος. Τέλος πρέπει να σημειωθεί ότι η πλειοψηφία των πρωτεϊνών που είναι απαραίτητες για τη μιτοχονδριακή λειτουργία κωδικοποιείται από το πυρηνικό και όχι από το μιτοχονδριακό γονιδίωμα.



**Εικόνα 4:** Σχηματική απεικόνιση της μητρικής κληρονομιάς. Το μιτοχονδριακό γονιδίωμα μεταβιβάζεται αποκλειστικά μητρικά σε όλους τους απογόνους ανεξαρτήτως φύλου.



**Εικόνα 5:** Το μιτοχονδριακό γονιδίωμα. Με κίτρινο απεικονίζονται τα tRNAs που προκύπτουν από τη μεταγραφή του κλώνου L, ενώ με μπλε αυτά που προκύπτουν από τη μεταγραφή του κλώνου H.

## 2.2.1 ΑΝΤΙΓΡΑΦΗ, ΜΕΤΑΓΡΑΦΗ ΚΑΙ ΜΕΤΑΦΡΑΣΗ ΤΟΥ mtDNA

### **Αντιγραφή**

Η αντιγραφή του mtDNA γίνεται με ημισυντηρητικό τρόπο και δεν περιορίζεται μόνο στη φάση S της μεσόφασης, αλλά αντιγράφεται ανεξάρτητα από τον κυτταρικό κύκλο. Στα ευκαρυωτικά κύτταρα υπάρχει ένας μηχανισμός ρύθμισης της μιτοχονδριακής αντιγραφής ως απάντηση στις ενεργειακές ανάγκες του κυττάρου. Όταν οι ενεργειακές ανάγκες του κυττάρου είναι υψηλές τότε τα μιτοχόνδρια αυξάνονται και διαιρούνται, ενώ το αντίθετο συμβαίνει όταν οι ενεργειακές απαιτήσεις του κυττάρου είναι χαμηλές.

Η μιτοχονδριακή πολυμεράση αρχίζει την αντιγραφή από καθορισμένο σημείο έναρξης του δίκλωνου κυκλικού μορίου. Μετά την αποδιάταξη γίνεται αντιγραφή του ενός μόνον από τους δύο γονικούς κλώνους, του κλώνου H, για τη βιοσύνθεση θυγατρικού κλώνου L. Η αντιγραφή προχωράει σε σχετικά λίγα νουκλεοτίδια και με αυτόν τον τρόπο εκτοπίζεται ο γονικός κλώνος L, που παραμένει μονόκλωνος. Η όλη διαμόρφωση της περιοχής ονομάζεται βρόγχος D (D loop). Η μιτοχονδριακή DNA πολυμεράση χρησιμοποιώντας ως μήτρα τον κλώνο H προσθέτει νουκλεοτίδια στο 3'-άκρο του μικρού κλώνου του βρόγχου D. Ο γονικός κλώνος L συνεχίζει να παραμένει μονόκλωνος, μέχρι η αντιγραφή του κλώνου H να φθάσει στα 2/3 του μεγέθους του κυκλικού μορίου και αποκαλυφθεί το σημείο έναρξης της αντιγραφής του κλώνου L. Από το σημείο αυτό και έπειτα μια μιτοχονδριακή DNA πολυμεράση χρησιμοποιώντας ως μήτρα τον κλώνο L και με αντίθετη κατεύθυνση αντιγραφής συνθέτει θυγατρικό κλώνο H. Επειδή καθυστερεί η έναρξη της αντιγραφής του κλώνου L, γι' αυτό όταν ολοκληρώνεται η αντιγραφή του κλώνου H, η σύνθεση του θυγατρικού κλώνου H έχει προχωρήσει μόνο 30-40%. Σ' αυτό το στάδιο, από τη μια μεριά υπάρχει ένα πλήρες κυκλικό δίκλωνο θυγατρικό μόριο και από την άλλη ένα που είναι μερικά μονόκλωνο και μερικά δίκλωνο. Τελικά ολοκληρώνεται και η αντιγραφή του κλώνου L και προκύπτουν δύο όμοια θυγατρικά κυκλικά μιτοχονδριακά γονιδιώματα.

Σημειώνεται ότι η αντιγραφή του mtDNA βρίσκεται κάτω από τον έλεγχο του πυρηνικού DNA καθώς η μιτοχονδριακή DNA πολυμεράση και άλλες απαραίτητες πρωτεΐνες για την αντιγραφή του mtDNA κωδικοποιούνται από το πυρηνικό DNA.

Η όλη διαδικασία της αντιγραφής διαρκεί μία περίπου ώρα, γεγονός που δείχνει πως η ταχύτητα αντιγραφής του mtDNA είναι εκατό φορές βραδύτερη από εκείνη του πυρηνικού DNA. Μια ακόμη διαφορά μεταξύ της μιτοχονδριακής και πυρηνικής αντιγραφής είναι ότι στην πρώτη απουσιάζει η επιδιόρθωση λαθών χάρη στη δράση εξωνουκλεάσης της μιτοχονδριακής DNA πολυμεράσης. Αυτό οδηγεί σε υψηλότερο ρυθμό μεταλλαξιγένεσης στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα σε σχέση με το πυρηνικό.



## **Μεταγραφή**

Στο mtDNA η μεταγραφή αρχίζει μόνο από δύο προαγωγείς, έναν για κάθε συμπληρωτική αλυσίδα. Η μεταγραφή είναι σχεδόν συμμετρική, και κάθε κλώνος μεταγράφεται σε ένα μεγάλο μόριο RNA. Αυτά τα δύο μεγάλα πρωταρχικά μόρια RNA διασπώνται με τη δράση ενδονουκλεάσης και δημιουργούνται τα ώριμα μόρια RNA. Η μεταγραφή του κλώνου H δίνει πρόδρομο μόριο RNA που μετά τη διάσπασή του από νουκλεάσες προκύπτουν: 2 μόρια rRNA, 14 μόρια tRNA και 12 μόρια mRNA. Αντίθετα, η μεταγραφή του κλώνου L και η διάσπασή του δίνει 8 μόρια tRNA και ένα μόριο mRNA.

Οι αλληλουχίες που καθορίζουν μόρια tRNAs βρίσκονται ανάμεσα στις αλληλουχίες που καθορίζουν μόρια mRNAs και rRNAs, χωρίς να υπάρχει DNA ανάμεσά τους, αλλά ούτε και αλληλουχίες-σήματα τερματισμού και έναρξης μεταξύ τους. Τα πρόδρομα μόρια mRNA δεν έχουν κολλώδες άκρο, ούτε κωδικόνια τερματισμού. Τα τελευταία δημιουργούνται με την προσθήκη των αλληλουχιών poly-A. Τα mRNA έχουν κωδικόνια έναρξης (AUG, AUA, AUU) ακριβώς στο 5' άκρο τους ή μερικές βάσεις μετά από αυτό. Αντίθετα, δεν αποκτούν ποτέ τη δομή του 5' καλύμματος.

## **Μετάφραση**

Τα μιτοχόνδρια έχουν το δικό τους μηχανισμό πρωτεϊνικής σύνθεσης. Έτσι δεν είναι παράδοξο που έχουν ριβοσώματα. Τα μιτοχονδριακά ριβοσώματα διαφέρουν από τα κυτταροπλασματικά στο μέγεθος, στο συντελεστή καθίζησης, στα είδη rRNAs και στους αναστολείς της πρωτεϊνοσύνθεσης. Έχουν διαφορετικό μέγεθος ανάλογα με το είδος. Στις περισσότερες περιπτώσεις απουσιάζει το 5S και 5,8S rRNA. Έτσι συνήθως τα mt ριβοσώματα αποτελούνται από δύο άνισες υπομονάδες με ένα μόριο rRNA. Το ανθρώπινο rRNA των ριβοσωμάτων έχει συντελεστή καθίζησης 16S και 12S. Οι μιτοχονδριακές ριβοσωμικές πρωτεΐνες είναι διαφορετικές από τις πρωτεΐνες των κυτταροπλασματικών ριβοσωμάτων και καθορίζονται από πυρηνικά γονίδια.

Η έναρξη της μετάφρασης στα μιτοχονδριακά ριβοσώματα μοιάζει με εκείνη των ευκαρυωτών. Παρόλο αυτά η πρωτεϊνοσύνθεση αρχίζει με fmet. Τα

μιτοχονδριακά ριβοσώματα βρίσκονται στη μιτοχονδριακή μήτρα είτε ελεύθερα είτε συνδεδεμένα στις μιτοχονδριακές ακρολοφίες. Η πρωτεϊνοσύνθεση στα μιτοχονδριακά ριβοσώματα αναστέλλεται από τη χλωραμφαινικόλη, ενώ στα κυτταροπλασματικά ριβοσώματα από το κυκλοεξαμίδιο. Τέτοιες διαφορές στην ευαισθησία επιτρέπουν να προσδιοριστεί αν και κατά πόσο πρωτεΐνες που βρίσκονται στα μιτοχόνδρια κωδικοποιούνται από πυρηνικά ή μιτοχονδριακά γονίδια. Από τα προηγούμενα, αλλά και με άλλα στοιχεία, προκύπτει ότι η μιτοχονδριακή πρωτεϊνοσύνθεση έχει αρκετά κοινά σημεία με τη βακτηριακή. Τέλος, τα πολυπεπίδια που καθορίζονται από το μιτοχονδριακό γονιδίωμα αποτελούν το 5-10% του συνόλου των μιτοχονδριακών πρωτεϊνών. Οι υπόλοιπες πρωτεΐνες κωδικοποιούνται από το πυρηνικό γονιδίωμα, μεταφράζονται στα κυτταροπλασματικά ριβοσώματα και μεταφέρονται στα μιτοχόνδρια.

### 2.2.2 Ο ΓΕΝΕΤΙΚΟΣ ΚΩΔΙΚΑΣ ΣΤΟ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΟ

Πρόσφατα και κατά τη διάρκεια της μελέτης των ανθρώπινων μιτοχονδριακών γονιδίων διαπιστώθηκε ότι η πρωτεϊνοσύνθεση στο μιτοχόνδριο διαφέρει από την αντίστοιχη διαδικασία στο κυτταρόπλασμα. Συγκεκριμένα, ο μιτοχονδριακός γενετικός κώδικας σύμφωνα με τον οποίο γίνεται η κωδικοποίηση των διαφορετικών αμινοξέων διαφέρει από τον παγκόσμιο (Jukes and Osawa, 1990). Ο λόγος για τον οποίο συμβαίνει αυτό δεν έχει αποσαφηνιστεί, αλλά υπάρχουν διάφορες απόψεις που προσπαθούν να εξηγήσουν αυτή την διαφοροποίηση.

Μια θεωρία που διατυπώθηκε είναι ότι αντιπροσωπεύει ένα πιο πρωτόγονο πρότυπο και οι αλλαγές οφείλονται σε μεταλλακτικές πύσεις ή σε οικονομικότερη χρήση των κωδικονίων του γονιδιώματος. Κατά μια άλλη εκδοχή, ο απλούστερος μιτοχονδριακός γενετικός κώδικας μπορεί να έχει εξελιχθεί ως ανταπόκριση στις ειδικές ανάγκες πρωτεϊνοσύνθεσης του μιτοχονδρίου. Σύμφωνα με μια τρίτη άποψη, τα τροποποιημένα κωδικόνια αντιπροσωπεύουν εξελικτικά ατυχήματα, τα οποία όμως διατηρήθηκαν γιατί συμμετέχουν στη βιοσύνθεση ελάχιστων πρωτεϊνών και είναι κατά συνέπεια αβλαβή για τα οργανίδια και τα κύτταρα.

Έτσι, τα μιτοχονδριακά γονίδια χρησιμοποιούν έναν εναλλακτικό κώδικα κατά την μιτοχονδριακή πρωτεϊνοσύνθεση. Οι παραλλαγές στο γενετικό κώδικα των

μιτοχονδρίων σε σχέση με τον παγκόσμιο γενετικό κώδικα συνοψίζονται στον Πίνακα 1.

**ΠΙΝΑΚΑΣ 1:** Παραλλαγές στο γενετικό κώδικα των μιτοχονδρίων στα θηλαστικά.

Οργανισμός	Κωδικόνιο	Παγκόσμιος γενετικός κώδικας	Μιτοχόνδρια
Θηλαστικά	UGA	Κωδικόνιο Λήξης	Τρυπτοφάνη
	AUA	Ισολευκίνη	Μεθειονίνη
	AGA, AGG	Αργινίνη	Κωδικόνιο Λήξης

### 2.3 ΤΑ ΜΟΡΙΑ tRNAs

Τα **μεταφορικά RNAs** (transfer RNA ή tRNA) είναι μικρά μόρια RNA 73-93 νουκλεοτιδίων, τα οποία φέρουν αμινοξέα από το κυτταρόπλασμα στα ριβοσώματα για να ενωθούν με πεπτιδικούς δεσμούς και να σχηματίσουν τις πολυπεπτιδικές αλυσίδες κατά το στάδιο της μετάφρασης. Το tRNA με το προσδεδωμένο του αμινοξύ επιλέγεται σε κάθε βήμα, καθώς κάθε ειδικό tRNA περιέχει μια αλληλουχία τριών βάσεων που ονομάζεται **αντικωδικόνιο**, το οποίο σχηματίζει δεσμούς με τη συμπληρωματική του αλληλουχία στο mRNA (**κωδικόνιο**).

Εξαιτίας του εκφυλισμού του γενετικού κώδικα, υπάρχουν περισσότερα από 20 διαφορετικά είδη μορίων tRNAs, ενώ αρκετά tRNAs χρησιμοποιούν για την αναγνώριση του αντίστοιχου κωδικονίου mRNA μόνο τις δύο από τις τρεις βάσεις. Η δράση αποκωδικοποιητή των tRNAs βασίζεται στην τρισδιάστατη δομή τους και απαιτεί επίσης τη συμμετοχή των αμινοάκυλο-tRNA συνθετασών, που μεταφέρουν το ειδικό αμινοξύ στο κατάλληλο tRNA, καθώς αναγνωρίζουν τις θηλιές του αντικωδικονίου και τους βραχίονες υποδοχής των tRNAs (Normanly and Abelson,



1989). Κάθε ένα tRNA αναγνωρίζεται από μία μόνο από τις 20 αμινοάκυλο-tRNA συνθετάσες. Κάθε ένα από αυτά τα ένζυμα προσδένει ένα από τα 20 αμινοξέα σε ένα δεδομένο tRNA δημιουργώντας έτσι ένα αμινοάκυλο-tRNA.

### 2.3.1 ΔΟΜΗ ΤΟΥ tRNA

Η βασική αλληλουχία ενός μορίου μεταφορικού RNA προσδιορίστηκε αρχικά σε ζυμομύκητα και ακολούθως προσδιορίστηκαν οι αλληλουχίες και άλλων μορίων tRNAs. Είναι γνωστές περίπου 2000 αλληλουχίες μορίων tRNAs, οι οποίες συναντώνται σε περισσότερα από 200 είδη οργανισμών. Όλες οι αλληλουχίες είναι δυνατόν να παρασταθούν σχηματικά με τριφύλλι (δευτεροταγής δομή), στο οποίο περίπου τα μισά κατάλοιπα βάσεων είναι ζευγαρωμένα, ενδεικτικό των πολλών κοινών δομικών χαρακτηριστικών των μορίων tRNAs, τα οποία τους επιτρέπουν να αλληλεπιδρούν σχεδόν με τον ίδιο τρόπο με τα ριβοσώματα, τα μόρια mRNA και πρωτεϊνικούς παράγοντες που συμμετέχουν στη μετάφραση.

Όλα τα γνωστά μόρια μεταφορικού RNAs στη δευτεροταγή δομή έχουν τα παρακάτω χαρακτηριστικά:

1. Το κάθε ένα είναι μία μονόκλωνη αλυσίδα που περιέχει από 73 έως 93 ριβονουκλεοτίδια (~ 25kD).
2. Περιέχουν πολλές ασυνήθιστες βάσεις, συνήθως από 7 έως 15 ανά μόριο. Μερικές από αυτές είναι μεθυλιωμένα ή διμεθυλιωμένα παράγωγα των A, U, C και G και σχηματίζονται με ενζυμική τροποποίηση ενός πρόδρομου μορίου tRNA. Η μεθυλίωση εμποδίζει τον σχηματισμό ορισμένων ζευγών βάσεων και έτσι καθιστά μερικές από τις βάσεις αυτές προσιτές σε άλλες αλληλεπιδράσεις. Επιπλέον, η μεθυλίωση προσδίδει έναν υδρόφοβο χαρακτήρα σε ορισμένες περιοχές των tRNA, οι οποίες μπορεί να είναι σημαντικές για την αλληλεπίδρασή τους με συνθετάσες και ριβοσωματικές πρωτεΐνες.
3. Περίπου τα μισά από τα νουκλεοτίδια των μορίων tRNAs συνδέονται με ζεύγη βάσεων σχηματίζοντας διπλές έλικες. Πέντε ομάδες βάσεων δεν είναι ζευγαρωμένες με τον τρόπο αυτό:
  - ί. Η θηλιά TψC, η οποία πήρε το όνομά της από την αλληλουχία ριβοθυμίνης-ψευδοουρακίλης-κυτοσίνης.

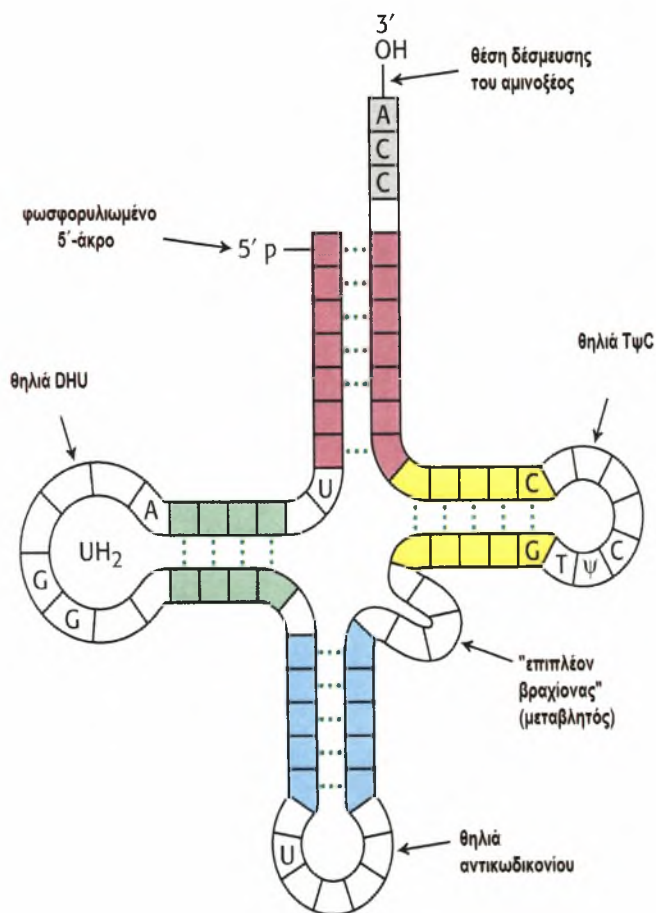
- ii. Ο «επιπλέον βραχίονας», ο οποίος περιέχει διαφορετικό αριθμό καταλοίπων, σε κάθε tRNA.
- iii. Η θηλιά διυδροουρακίλης (θηλιά DHU), η οποία περιέχει μερικά κατάλοιπα διυδροουρακίλης.
- iv. Η θηλιά η οποία περιέχει το αντικωδικόνιο.

Η δομική ποικιλομορφία που δημιουργείται με αυτόν το συνδυασμό των ελίκων και θηλιών και που περιέχει τροποποιημένες βάσεις διασφαλίζει την αποτελεσματική διάκριση του κάθε μορίου tRNA μέσα από ένα σύνολο δομικά παρόμοιων μορίων.

4. Το 5'-άκρο ενός μορίου tRNA είναι φωσφορυλιωμένο και το 5'-τελικό κατάλοιπο είναι συνήθως pG.

5. Το ενεργοποιημένο αμινοξύ είναι συνδεδεμένο με μια υδροξυλική ομάδα του καταλοίπου αδενοσίνης, το οποίο βρίσκεται στο 3'-άκρο της αλληλουχίας CCA του βραχίονα υποδοχής. Η περιοχή αυτή στο 3'-άκρο ώριμων μορίων tRNA είναι μονόκλωνη.

6. Το αντικωδικόνιο βρίσκεται σε μια θηλιά κοντά στο κέντρο της αλληλουχίας.



**Εικόνα 6:** Η δευτεροταγής δομή του tRNA. Φαίνονται η θέση δέσμευσης του αμινοξέος στο 3'-άκρο, η θηλιά TψC, ο επιπλέον «βραχίονας», η θηλιά αντικωδικονίου και η θηλιά DHU.

Η τριτοταγής δομή των tRNAs λαμβάνεται κατά την αναδίπλωση των μορίων και το σχηματισμό ζευγών βάσεων ανάμεσα σε διαφορετικές περιοχές του, με αποτέλεσμα να δημιουργούνται δίκλωνες περιοχές, και θηλιές που του αποδίδουν χαρακτηριστική δομή σχήματος Γ. Στα άκρα της δομής Γ εντοπίζονται δύο περιοχές αζευγάρωτων νουκλεοτιδίων. Η μία περιοχή αζευγάρωτων νουκλεοτιδίων σχηματίζει το αντικωδικόνιο, την ομάδα δηλαδή των τριών νουκλεοτιδίων που θα ζευγαρώσουν με τα νουκλεοτίδια του συμπληρωματικού κωδικονίου του mRNA. Η άλλη περιοχή αζευγάρωτων νουκλεοτιδίων, βρίσκεται στο 3' άκρο του μορίου με αλληλουχία βάσεων CCA, όπου δεσμεύεται το αμινοξύ ή η πεπτιδύλο-αλυσίδα. Το άκρο αυτό προεξέχει από το ένα άκρο του Γ και μπορεί να αλλάζει στερεοδιάταξη κατά την ενεργοποίηση του αμινοξέος και τη σύνθεση πρωτεϊνών (Brian, 2006).

Επομένως, η αρχιτεκτονική των tRNAs ανταποκρίνεται καλά στο ρόλο της ως προσαρμοστική. Με άλλα λόγια, το αντικωδικόνιο είναι διαθέσιμο να αλληλεπιδρά με ένα κατάλληλο κωδικόνιο στο mRNA, ενώ το άκρο που συνδέεται με ένα ενεργοποιημένο αμινοξύ είναι τοποθετημένο κατάλληλα ώστε να μπορεί να συμμετέχει στον σχηματισμό πεπτιδικών δεσμών.



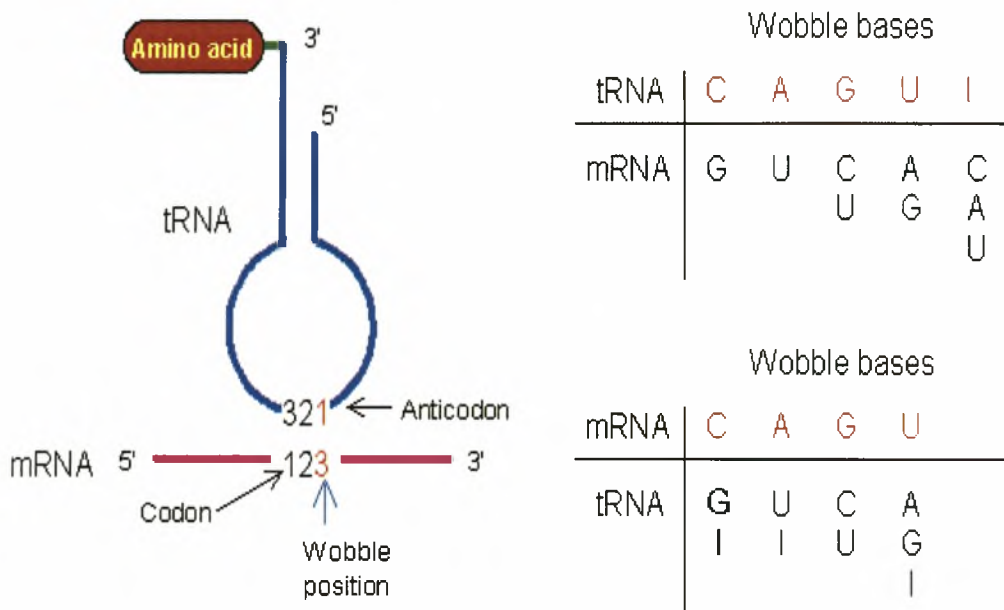
**Εικόνα 7:** Η τριτοταγής δομή του tRNA με το χαρακτηριστικό σχήμα Γ. Με μωβ χρώμα απεικονίζεται ο βραχίονας υποδοχής, με πράσινο η θηλιά TψC, με μπλε η θηλιά του αντικωδικονίου, με κίτρινο το αντικωδικόνιο και με κόκκινο ο μεταβλητός βραχίονας.

### 2.3.2 ΥΠΟΘΕΣΗ ΤΑΛΑΝΤΕΥΣΗΣ

Κατά τη μετάφραση του γενετικού κώδικα κατά τη διαδικασία της πρωτεϊνοσύνθεσης διαπιστώθηκε ότι η αναγνώριση της τρίτης βάσης του κωδικονίου των tRNAs μπορεί να είναι μερικές φορές λιγότερο ειδική από ότι η αναγνώριση των άλλων δύο βάσεων. Κωδικόνια του τύπου XYU και XYZ πάντοτε κωδικοποιούν το ίδιο αμινοξύ, ενώ του τύπου XYA και XYG συνήθως κωδικοποιούν κάποιο άλλο αμινοξύ. Ο Francis Crick υπέθεσε από τα δεδομένα αυτά ότι τα στερεοχημικά κριτήρια θα μπορούσαν να είναι λιγότερο αυστηρά για το ζευγάρωμα στην τρίτη βάση από ότι στις άλλες δύο. Μοντέλα διαφόρων ζευγών βάσεων κατασκευάστηκαν για να προσδιορίσουν ποια από αυτά ήταν όμοια με τα κανονικά A-U και G-C σε σχέση με την απόσταση και τη γωνία μεταξύ των γλυκοζιτικών δεσμών. Η ινোসίνη (I) συμπεριλήφθηκε στις μελέτες αυτές διότι εμφανιζόταν σε μερικά αντικωδικόνια. Υποθέτοντας ότι υπάρχει κάποια στερεοχημική ελευθερία (ταλάντευση – «wobble») στο ζευγάρωμα με την τρίτη βάση του αντικωδικονίου, οι συνδυασμοί που παρουσιάζονται στην Εικόνα 8 φαίνεται ότι είναι εφικτοί. Η παραπάνω θεωρία για την μη ειδική αναγνώριση στην τρίτη θέση του αντικωδικονίου των tRNAs ονομάστηκε **υπόθεση ταλάντευσης (wobble hypothesis)** και έχει γίνει σήμερα πλήρως αποδεκτή.

Μπορούν να γίνουν δύο γενικεύσεις για τις αλληλεπιδράσεις κωδικονίου-αντικωδικονίου:

1. Οι δύο πρώτες βάσεις ενός κωδικονίου ζευγαρώνουν κατά το συνηθισμένο τρόπο. Η αναγνώριση είναι ακριβής. Επομένως, κωδικόνια που διαφέρουν σε οποιαδήποτε από τις δύο πρώτες βάσεις θα πρέπει να αναγνωρίζονται από διαφορετικά tRNA. Παραδείγματος χάριν, το UUA και το CUA κωδικοποιούν λευκίνη αλλά διαβάζονται από διαφορετικά tRNA.
2. Η πρώτη βάση του αντικωδικονίου προσδιορίζει το εάν ένα ιδιαίτερο μόριο tRNA διαβάζει ένα, δύο ή τρία είδη κωδικονίων: C ή A (ένα κωδικόνιο), U ή G (δύο κωδικόνια), I (τρία κωδικόνια). Άρα, μέρος από τον εκφυλισμό του γενετικού κώδικα προκύπτει από την ανακρίβεια (ταλάντευση) στο ζευγάρωμα της τρίτης βάσης του κωδικονίου με την πρώτη βάση του αντικωδικονίου.



**Εικόνα 8:** Παρουσίαση της υπόθεσης ταλάντευσης. Το ζευγάρι κωδικονίου-αντικωδικονίου περιλαμβάνει ταλάντευση στην τρίτη θέση. Η πρώτη βάση του αντικωδικονίου προσδιορίζει τη βάση που αναγνωρίζεται στην τρίτη θέση του κωδικονίου. Συγκεκριμένα:

Αν η βάση στην πρώτη θέση του αντικωδικονίου είναι C, τότε η βάση στην τρίτη θέση του κωδικονίου μπορεί να είναι μόνο G.

Αν η βάση στην πρώτη θέση του αντικωδικονίου είναι A, τότε η βάση στην τρίτη θέση του κωδικονίου μπορεί να είναι μόνο U.

Αν η βάση στην πρώτη θέση του αντικωδικονίου είναι G, τότε η βάση στην τρίτη θέση του κωδικονίου μπορεί να είναι είτε C είτε U.

Αν η βάση στην πρώτη θέση του αντικωδικονίου είναι U, τότε η βάση στην τρίτη θέση του κωδικονίου μπορεί να είναι είτε A είτε G.

Αν η βάση στην πρώτη θέση του αντικωδικονίου είναι I, τότε η βάση στην τρίτη θέση του κωδικονίου μπορεί να είναι είτε C είτε A είτε U.

Επομένως, και τα 22 tRNAs που κωδικοποιούνται στα μιτοχόνδρια επαρκούν για την αντίστοιχη μιτοχονδριακή μετάφραση:

- ένα tRNA ειδικό για καθένα από τα δεκαοκτώ αμινοξέα,
- δύο tRNAs για τη σερίνη (tRNA<sup>Ser(AGY)</sup> και tRNA<sup>Ser(UCN)</sup>),
- και δύο tRNAs για τη λευκίνη (tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> και tRNA<sup>Leu(CUN)</sup>).



### 2.3.3 ΠΑΘΟΓΟΝΕΣ ΚΑΙ ΟΥΔΕΤΕΡΕΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ ΣΕ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΑ ΓΟΝΙΔΙΑ tRNA

Οι μεταλλάξεις διακρίνονται σε **παθογόνες** μεταλλάξεις και σε **ουδέτερες** μεταλλάξεις. Οι πρώτες επηρεάζουν τη δομή και τη λειτουργία του μιτοχονδριακού DNA με αποτέλεσμα την εμφάνιση ασθενειών στον οργανισμό. Οι δεύτερες δεν επηρεάζουν τη δομική ακεραιότητα και τη λειτουργικότητα του μιτοχονδρίου και συμβάλλουν στη δημιουργία γενετικής ποικιλότητας ενώ μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την φυλογενετική κατανομή των πληθυσμών.

Ο αριθμός των «μιτοχονδριακών» ασθενειών, όπως καλούνται οι ασθένειες που οφείλονται σε δυσλειτουργία των γονιδίων του μιτοχονδρίου συνεχώς αυξάνεται. Οι ασθένειες αυτές περιλαμβάνουν κυρίως βλάβες σε όργανα και ιστούς με υψηλές απαιτήσεις σε ενέργεια όπως η καρδιά, ο εγκέφαλος, οι μύες και το ενδοκρινικό σύστημα (Di Mauro and Schon, 2003). Σε πολλές από αυτές τις ασθένειες διαπιστώθηκε η ύπαρξη συνδυασμών μεταλλάξεων σε μιτοχονδριακά και πυρηνικά γονίδια με αποτέλεσμα την αναστολή της δράσης των συμπλόκων της αναπνευστικής αλυσίδας και κατ' επέκταση τη διακοπή της παραγωγής ενέργειας.

Μεταλλάξεις έχουν βρεθεί σε όλο το μιτοχονδριακό γονιδίωμα, στα tRNAs, στα rRNAs και στις πρωτεΐνες της αναπνευστικής αλυσίδας. Ωστόσο, οι περισσότερες αφορούν mt-tRNAs.

Η πλειοψηφία των mt-tRNA γονιδίων συγκεντρώνει τόσο **παθογόνες** όσο και **ουδέτερες** μεταλλάξεις. Περισσότερες από τις μισές μεταλλάξεις του mtDNA που έχουν συνδεθεί με ασθένειες εντοπίζονται στα tRNA γονίδια, γεγονός αξιοσημείωτο καθώς οι tRNA αλληλουχίες συνιστούν μόνο το 10% του συνολικού μιτοχονδριακού γονιδιώματος. Μέχρι σήμερα έχουν εντοπισθεί και χαρακτηριστεί 139 παθογόνες μεταλλάξεις οι οποίες εντοπίζονται σε όλα τα tRNA γονίδια, εκτός εκείνου της αργινίνης (Πίνακας 2). Σχεδόν το 50% όλων των γνωστών παθογόνων μεταλλάξεων εντοπίζεται σε τρία γονίδια tRNA ( $tRNA^{Leu(UUR)}$ ,  $tRNA^{Lys}$  και  $tRNA^{Ile}$ ). Οι περισσότερες μεταλλάξεις έχουν βρεθεί στο γονίδιο  $tRNA^{Leu(UUR)}$  και αυτό εξηγείται από το γεγονός ότι η λευκίνη είναι το πιο συχνά χρησιμοποιούμενο αμινοξύ στο μιτοχόνδριο. Ουδέτερες μεταλλάξεις ή πολυμορφισμοί βρίσκονται σε όλα τα tRNA γονίδια και είναι κυρίως σημειακές αντικαταστάσεις. Οι περισσότερες μεταλλάξεις είναι μεταπτώσεις (πυριμιδίνη σε πυριμιδίνη/ πουρίνη σε πουρίνη) παρά μετατροπές (πυριμιδίνη σε πουρίνη και αντίστροφα) και κατανέμονται ομοιόμορφα σε ολόκληρο

το μόριο των tRNA, τόσο στους βραχίονες όσο και στις θηλιές. Αυτές που εντοπίζονται στους βραχίονες διαταράσσουν το φυσιολογικό ζευγάρωμα των βάσεων που έχει διατυπωθεί από τους Watson και Crick, και συνήθως εμφανίζονται ως C-A ή G-U. Όσον αφορά τη τριπλέτα του αντικωδικονίου, όπου τα κατάλοιπα είναι εξελικτικά συντηρημένα και οποιαδήποτε αλλαγή βάσεως θα μπορούσε να αποβεί μοιραία για τη διαδικασία της πρωτεϊνοσύνθεσης, εκλείπουν σχεδόν πλήρως οι μεταλλάξεις. Πρέπει να σημειωθεί ότι οι περισσότερες παθογόνες μεταλλάξεις επηρεάζουν νουκλεοτίδια που έχουν δείξει υψηλό βαθμό συντήρησης με το χρόνο, ενώ οι περισσότεροι πολυμορφισμοί στοχεύουν όχι σε τόσο συντηρημένα κατάλοιπα, χωρίς όμως αυτό να είναι απόλυτο.

Με δεδομένο ότι το μιτοχονδριακό γονιδίωμα διπλασιάζεται αυτόνομα και ανεξάρτητα από το πυρηνικό γονιδίωμα, και ότι τα μιτοχόνδρια διαχωρίζονται στα θυγατρικά κύτταρα ανεξάρτητα από τα πυρηνικά χρωμοσώματα, το ποσοστό των μιτοχονδρίων που φέρουν στο γενετικό τους υλικό τη μετάλλαξη μπορεί να διαφέρει σημαντικά μεταξύ διαφορετικών σωματικών κυττάρων και ιστών. Αυτή η ετερογένεια ονομάζεται **ετεροπλασμία** και από το βαθμό αυτής της ετερογένειας εξαρτάται το αν μια παθογόνος μετάλλαξη μπορεί να οδηγήσει στο κλινικό φαινότυπο μιας ασθένειας.

**Ετεροπλασμία** λοιπόν, είναι η συνύπαρξη φυσιολογικού και μεταλλαγμένου DNA στο κύτταρο, που δημιουργείται ύστερα από τη κυτταρική διαίρεση όπου τα μιτοχόνδρια και τα γονιδιώματα τους κατανέμονται τυχαία στα θυγατρικά κύτταρα. Η αναλογία των μεταλλαγμένων έναντι των φυσιολογικών mtDNA καθορίζει την έκφραση και σοβαρότητα του νοσήματος.

Οι παθογόνες μεταλλάξεις των tRNA γονιδίων είναι συνήθως ετεροπλασμικές, ενώ οι πολυμορφισμοί είναι ομοπλασμικοί. Επιπρόσθετα, οι ιστοί διαφέρουν ως προς την εξάρτησή τους από την οξειδωτική φωσφορυλίωση, με την καρδιά, τους σκελετικούς μύες και το κεντρικό νευρικό σύστημα να είναι τα πιο εξαρτημένα. Έτσι, τα μιτοχονδριακά νοσήματα χαρακτηρίζονται συχνά από μυοπάθειες και εγκεφαλοπάθειες.

Επιπλέον, η φαινοτυπική έκφραση μιας μετάλλαξης επηρεάζεται από τον μιτωτικό διαχωρισμό. Κατά την κυτταρική διαίρεση, η αντιγραφή του mtDNA και η κληρονομικότητά του σε γενετικά και σωματικά κύτταρα είναι τυχαία, οδηγώντας σε αλλαγή της αναλογίας των μεταλλαγμένων μορίων σε διαφορετικά κύτταρα και ιστούς. Αυτό το φαινόμενο καλείται **μιτωτικός διαχωρισμός** και εξηγεί πως σε

ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να αλλάξει ο φαινότυπος ενός ατόμου κατά τη διάρκεια της ζωής του.

○ Normal mitochondria      ○ Normal phenotype  
● Mutant mitochondria      ● Disease phenotype

### mtDNA proliferation



**Εικόνα 9:** Ο πολλαπλασιασμός των mtDNA και ο τυχαίος διαχωρισμός τους.

- Ένα κύτταρο μπορεί να έχει μερικά μιτοχόνδρια που να έχουν μία μετάλλαξη στο mtDNA και μερικά που να μην έχουν. Αυτό ορίζεται ως **ετεροπλασμία**. Η αναλογία των μεταλλαγμένων μορίων mtDNA καθορίζει και την διεισδυτικότητα και την σοβαρότητα της έκφρασης κάποιων ασθενειών.
- Η **ομοπλασμία** αποδίδεται σε ένα κύτταρο το οποίο έχει μία ενιαία συλλογή mtDNA μορίων, είτε όλα του τα mtDNA είναι φυσιολογικά είτε όλα του τα mtDNA είναι μεταλλαγμένα.
- Σε κύτταρα με ετεροπλασμία, κάθε θυγατρικό κύτταρο δύναται να προσλάβει διαφορετική αναλογία μιτοχονδρίων φέροντας και φυσιολογικά και μεταλλαγμένα μόρια mtDNA.

Συνοψίζοντας, η φαινοτυπική έκφραση μιας μετάλλαξης είναι το προϊόν της αλληλεπίδρασης μια σειράς παραγόντων. Στους παράγοντες αυτούς περιλαμβάνονται το ποσοστό της ετεροπλασμίας, η κατανομή των μεταλλαγμένων γονιδιωμάτων στα διαφορετικά κύτταρα και ιστούς, ο μιτωτικός διαχωρισμός καθώς και η εξάρτηση που παρουσιάζουν οι διάφοροι ιστοί και όργανα από τη διαδικασία της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης και την παραγωγή ενέργειας. Επιπλέον, η παρουσία και άλλων μεταλλάξεων στο μιτοχονδριακό αλλά και στο πυρηνικό γονιδίωμα και η επίδραση



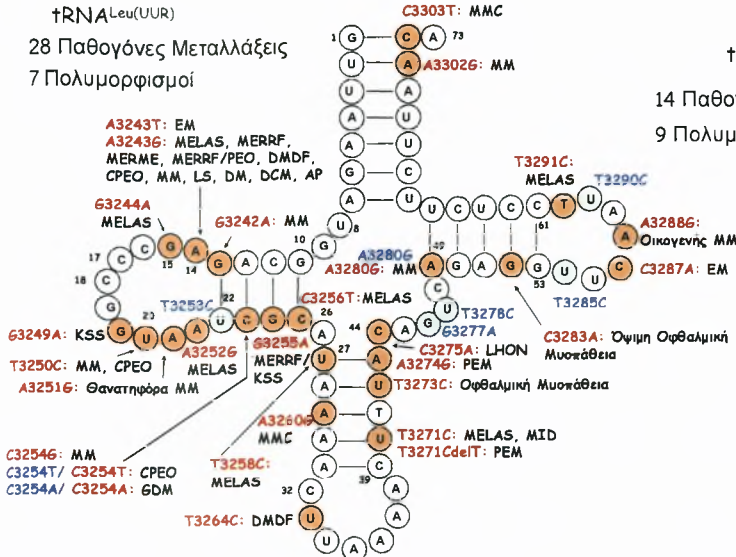
περιβαλλοντικών παραγόντων είναι πιθανό να εξηγούν τη διαφορετική έκφραση των μιτοχονδριακών μεταλλάξεων.

**ΠΙΝΑΚΑΣ 2:** Παθογόνες και ουδέτερες μεταλλάξεις στα ανθρώπινα μιτοχονδριακά tRNA γονίδια.

Πηγές: (www.mitomap.org και www.genpat.uu.se/mtDB)

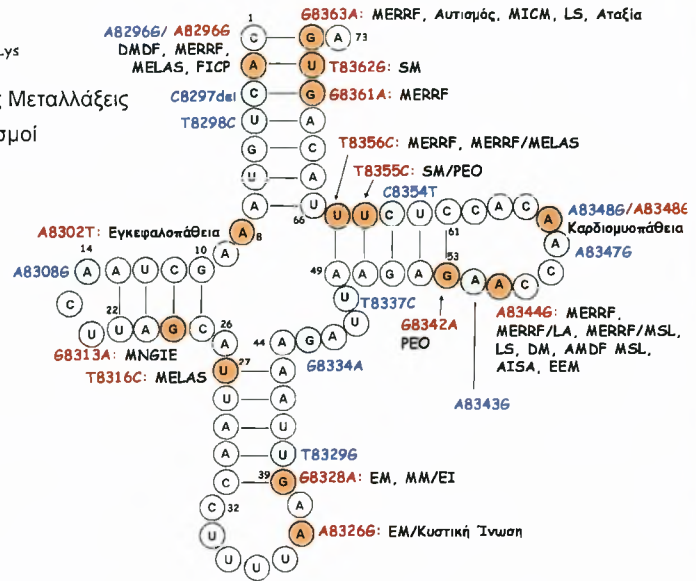
tRNA	Αριθμός παθογόνων μεταλλάξεων	Αριθμός πολυμορφισμών
tRNA <sup>Leu(UUR)</sup>	28	7
tRNA <sup>Lys</sup>	14	9
tRNA <sup>Ile</sup>	14	7
tRNA <sup>Leu(CUN)</sup>	10	11
tRNA <sup>Thr</sup>	8	29
tRNA <sup>Ser(UCN)</sup>	7	10
tRNA <sup>Phe</sup>	7	10
tRNA <sup>Val</sup>	6	10
tRNA <sup>Trp</sup>	6	13
tRNA <sup>Gly</sup>	5	12
tRNA <sup>Tyr</sup>	4	7
tRNA <sup>Pro</sup>	4	9
tRNA <sup>Asn</sup>	4	7
tRNA <sup>Gln</sup>	3	15
tRNA <sup>His</sup>	3	11
tRNA <sup>Met</sup>	3	6
tRNA <sup>Ala</sup>	3	11
tRNA <sup>Ser(AGY)</sup>	3	13
tRNA <sup>Glu</sup>	3	9
tRNA <sup>Cys</sup>	2	16
tRNA <sup>Asp</sup>	2	11
tRNA <sup>Arg</sup>	0	9
<b>Σύνολο</b>	<b>139</b>	<b>243</b>

†RNA<sup>Leu(UUR)</sup>  
28 Παθόνες Μεταλλάξεις  
7 Πολυμορφισμοί



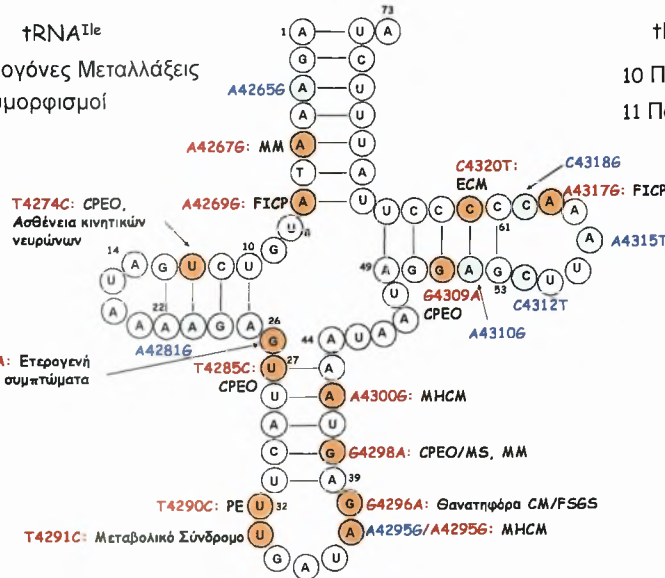
†RNA<sup>Lys</sup>

14 Παθόνες Μεταλλάξεις  
9 Πολυμορφισμοί



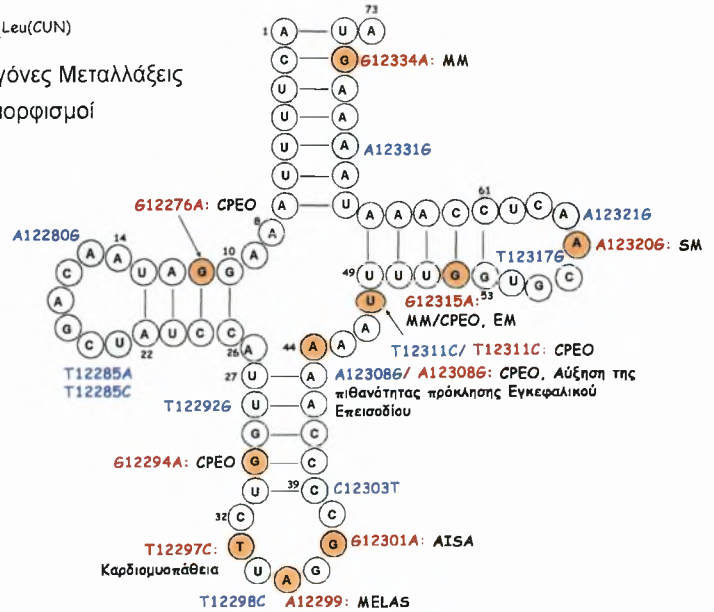
†RNA<sup>Ile</sup>

14 Παθόνες Μεταλλάξεις  
7 Πολυμορφισμοί



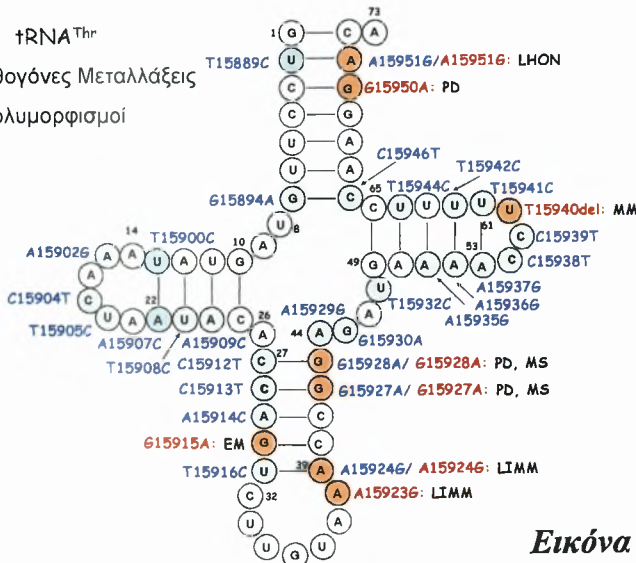
†RNA<sup>Leu(CUN)</sup>

10 Παθόνες Μεταλλάξεις  
11 Πολυμορφισμοί



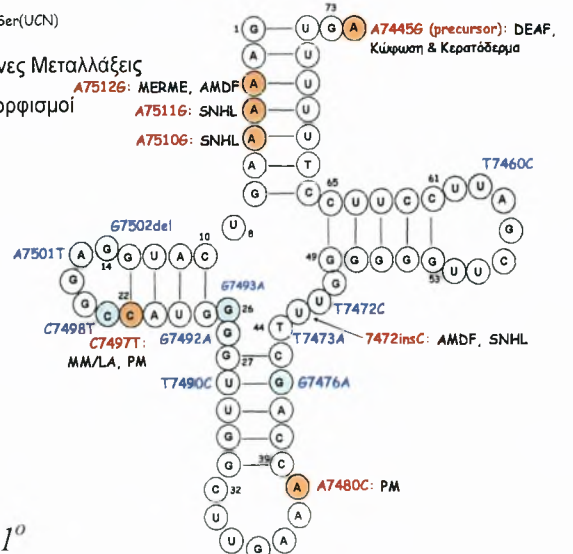
†RNA<sup>Thr</sup>

8 Παθόνες Μεταλλάξεις  
29 Πολυμορφισμοί

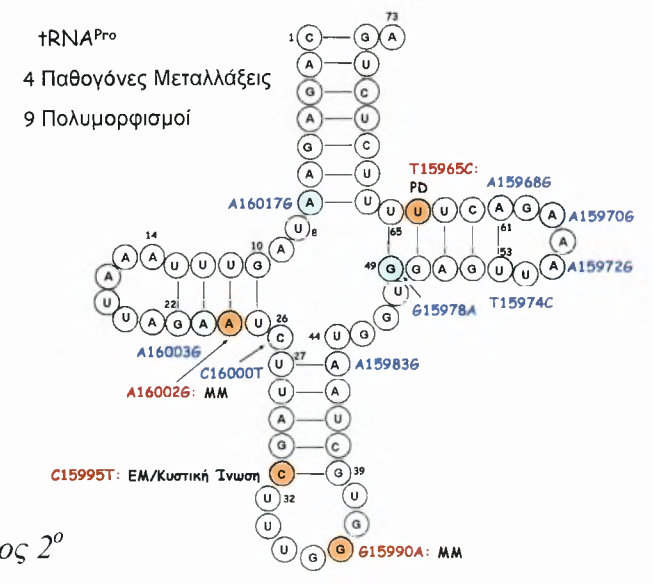
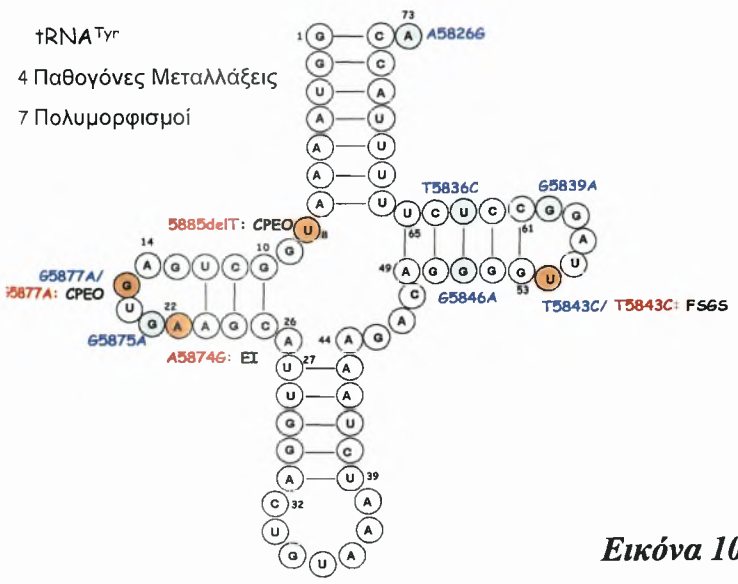
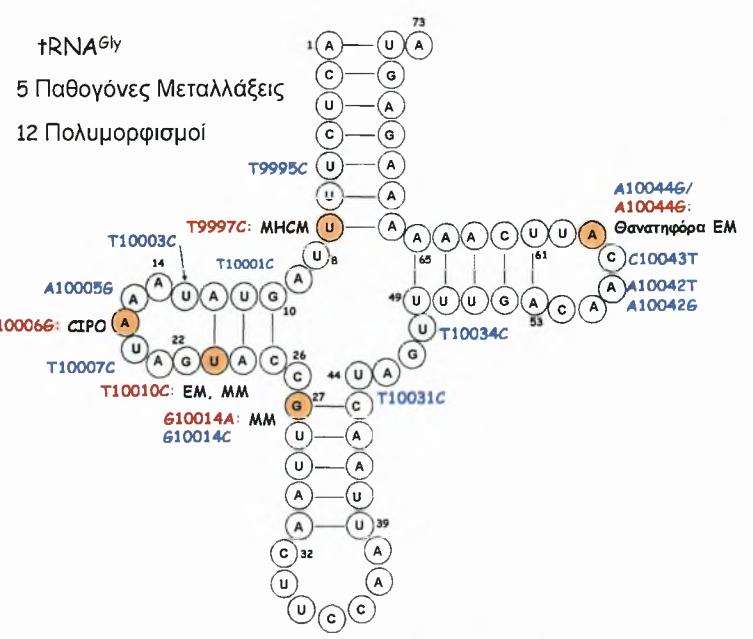
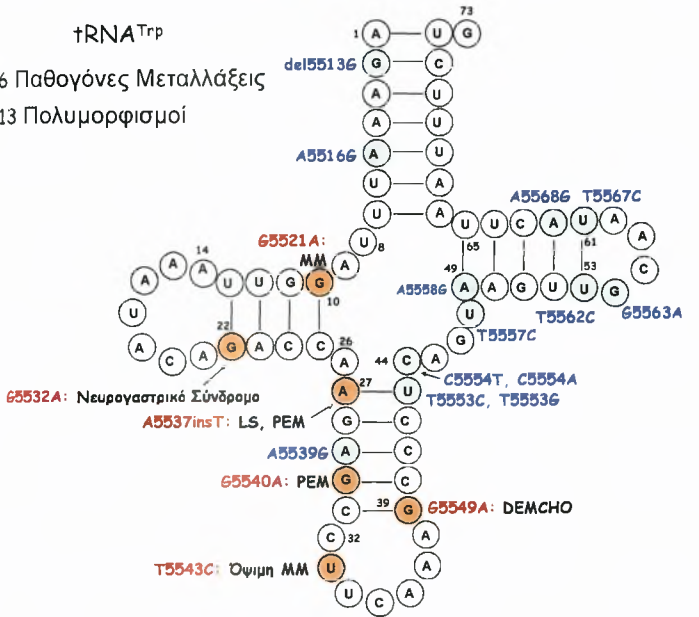
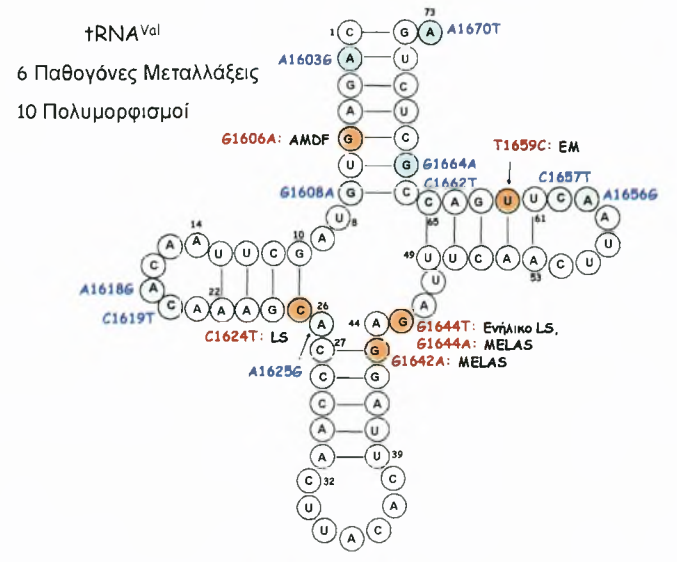
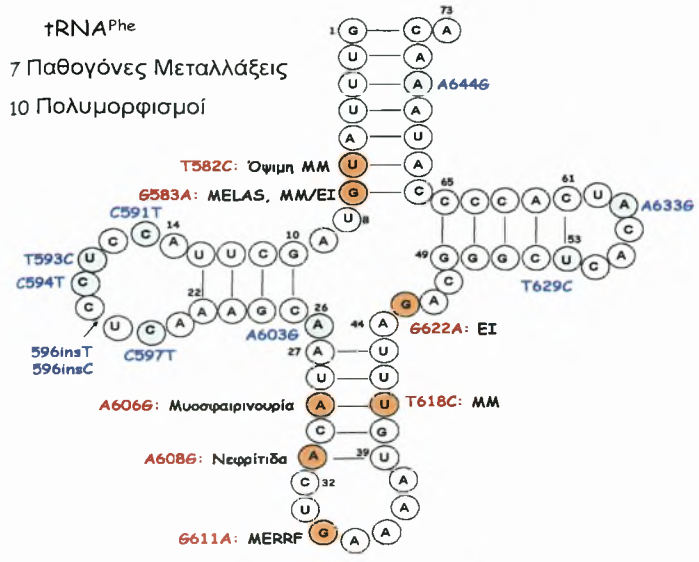


†RNA<sup>Ser(UCN)</sup>

7 Παθόνες Μεταλλάξεις  
10 Πολυμορφισμοί



Εικόνα 10. Μέρος 1<sup>ο</sup>

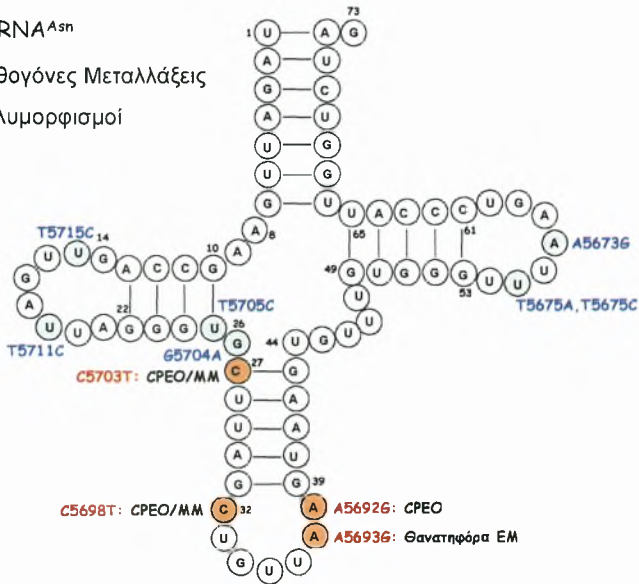


**Εικόνα 10. Μέρος 2<sup>ο</sup>**



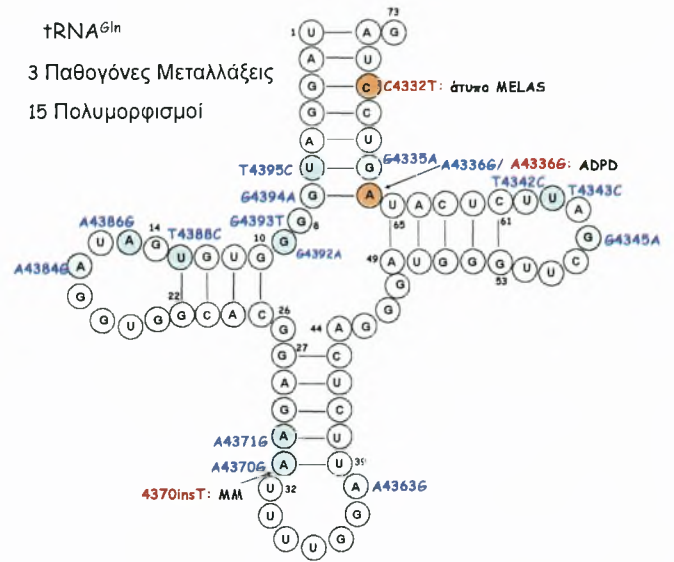
†RNA<sup>Asn</sup>

4 Παθογόνες Μεταλλάξεις  
7 Πολυμορφισμοί



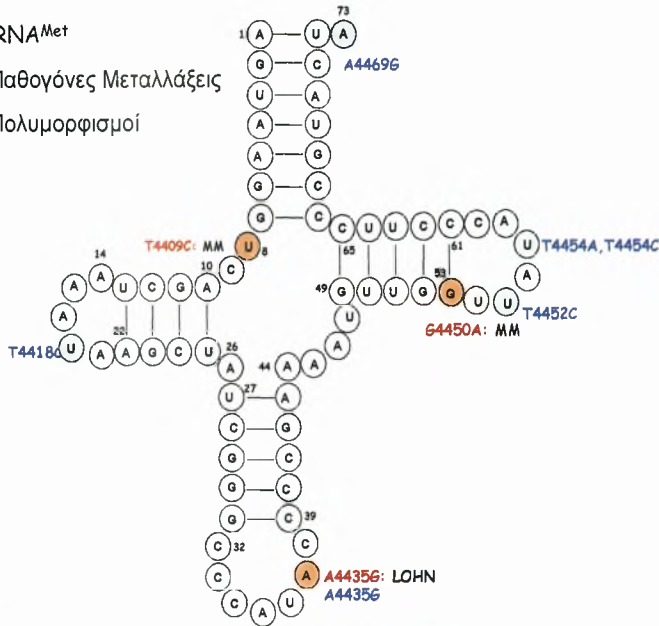
†RNA<sup>Gln</sup>

3 Παθογόνες Μεταλλάξεις  
15 Πολυμορφισμοί



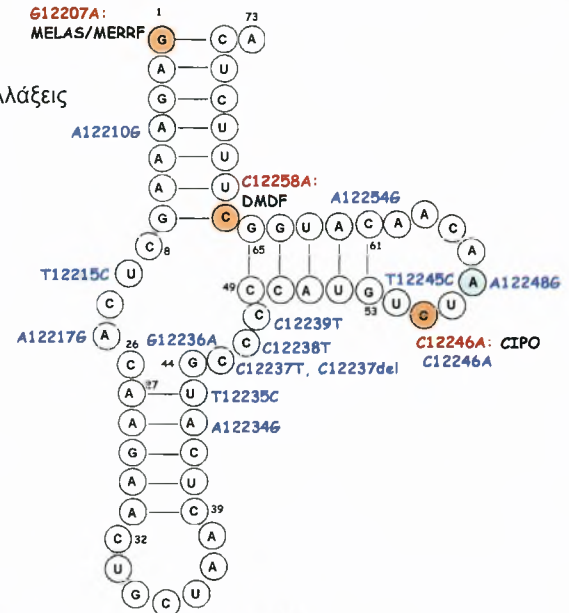
†RNA<sup>Met</sup>

3 Παθογόνες Μεταλλάξεις  
6 Πολυμορφισμοί



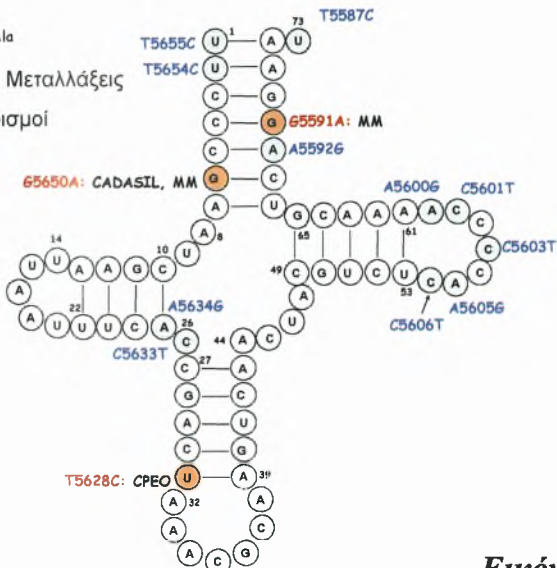
†RNA<sup>Ser(AGY)</sup>

3 Παθογόνες Μεταλλάξεις  
13 Πολυμορφισμοί



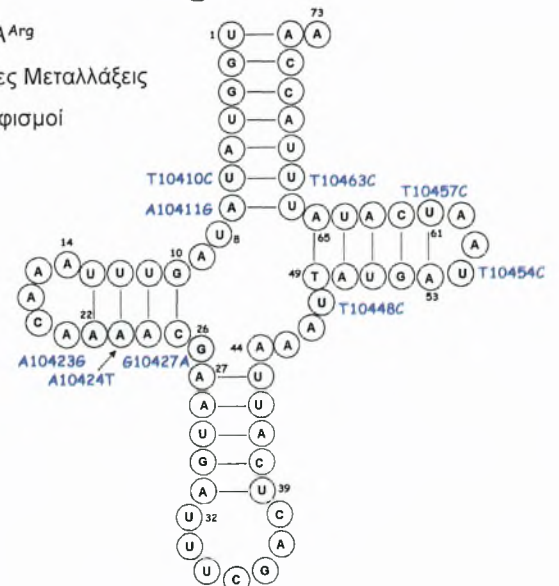
†RNA<sup>Ala</sup>

3 Παθογόνες Μεταλλάξεις  
11 Πολυμορφισμοί

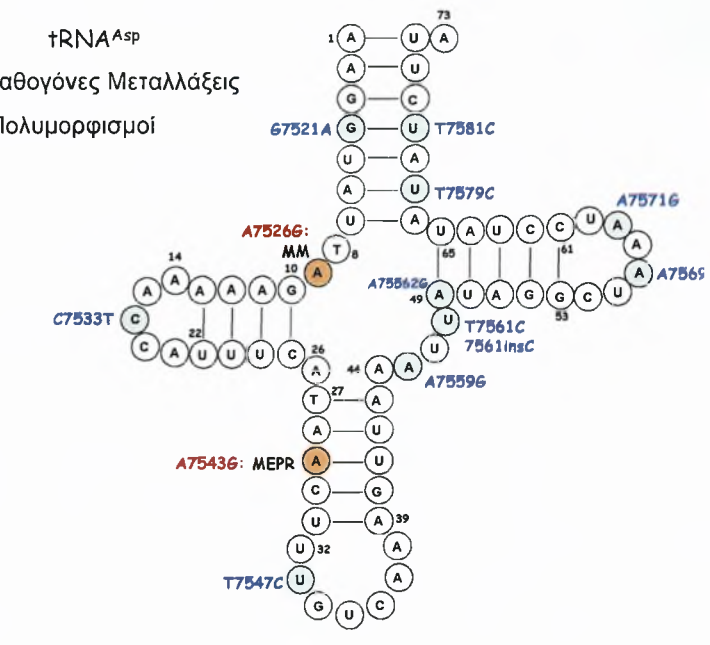
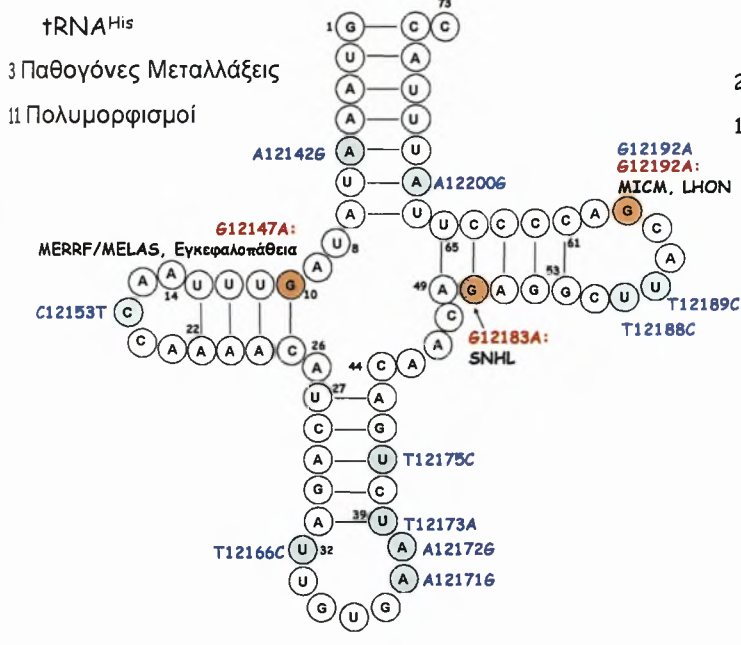
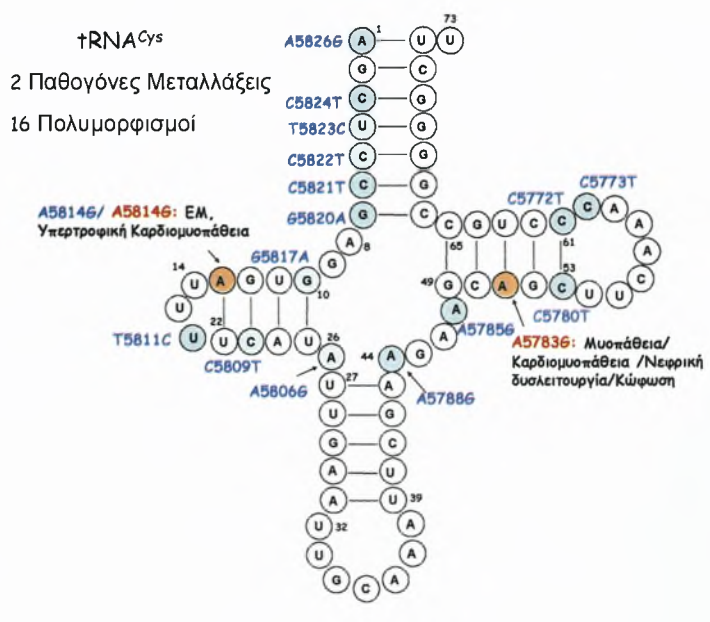
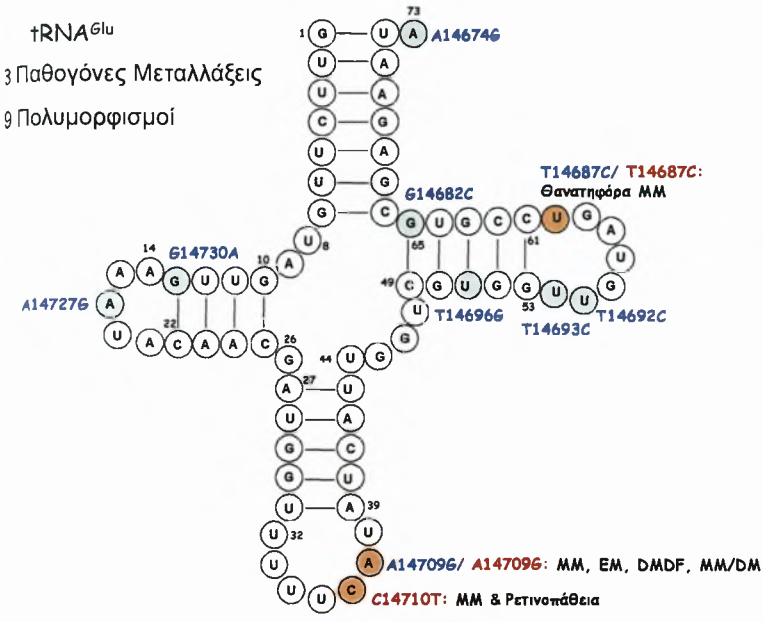


†RNA<sup>Arg</sup>

0 Παθογόνες Μεταλλάξεις  
9 Πολυμορφισμοί



Εικόνα 10. Μέρος 3<sup>ο</sup>



**Εικόνα 10.Μέρος 4<sup>ο</sup>**

**Εικόνα 10:** Παθογόνες και πολυμορφικές μεταλλάξεις στα ανθρώπινα μιτοχονδριακά tRNA. Οι παθογόνες μεταλλάξεις απεικονίζονται με κόκκινο ενώ οι πολυμορφισμοί με μπλε. Οι αλληλουχίες των tRNA πάρθηκαν από την βάση δεδομένων αναφοράς [www.tRNA.uniba-grueuth.de](http://www.tRNA.uniba-grueuth.de) και οι παθογόνες και πολυμορφικές μεταλλάξεις από τις [www.mitomap.org](http://www.mitomap.org) και [www.genpat.uu.se/mtDB](http://www.genpat.uu.se/mtDB) βάσεις δεδομένων. Στο σχήμα αναφέρονται επίσης οι ασθένειες που οφείλονται σε αυτές τις μεταλλάξεις. ADPD: Νόσος Alzheimer και Parkinson, AISA: Επίκτητη ιδιοπαθής σιδηροβλαστική αναιμία, AP: Ασυμπτωματική πρωτεϊνουρία, BD: Διπολική διαταραχή, CIPO: Χρόνια εντερική ψευδοαπόφραξη, CPEO: Χρόνια προοδευτική έξω οφθαλμοπληγία, DCM: Διατακτική καρδιομυοπάθεια, DEAF: Μητρικά

κληρονομούμενη κώφωση, DM: Σακχαρώδης διαβήτης, DMDF: Κληρονομούμενος σακχαρώδης διαβήτης με κώφωση, ECM: εγκεφαλοκαρδιομυοπάθεια, EEM: Εγκεφαλοεντερομυοπάθεια, EI: Μη ανοχή στην άσκηση, EM: Εγκεφαλομυοπάθεια, FSGS: Είδος νεφρίτιδας με πρόβλημα 'εστιασμένο' σε τμήμα των νεφρικών σπειραμάτων, GDM: Σακχαρώδης διαβήτης σε περίοδο εγκυμοσύνης, KSS: Σύνδρομο Kearns-Sayre, LA: Γαλακτική οξέωση, LHON: Κληρονομική οπτική νευροπάθεια του Leber, L1MM: Θανατηφόρος βρεφική μυοπάθεια, LS: Σύνδρομο Leigh, MELAS: Μιτοχονδριακή εγκεφαλομυοπάθεια, γαλακτική οξέωση και εγκεφαλικά επεισόδια, MEPR: Μυοκλονική επιληψία με ψυχοκινητική καθυστέρηση, MERRF: Μυοκλονική επιληψία με ανώμαλες ερυθρές μυϊκές ίνες, MERME: επικάλυψη των συνδρόμων MERRF/MELAS, MHCM: Μητρικά κληρονομούμενη υπερτροφική καρδιομυοπάθεια, MICM: Μητρικά κληρονομούμενη καρδιομυοπάθεια, MID: Μητρικά κληρονομούμενος διαβήτης, MM: Μιτοχονδριακή μυοπάθεια, MNGIE: μιτοχονδριακή νευρογαστροεντερική εγκεφαλοπάθεια, MS: Σκλήρυνση κατά πλάκας, MSL: Πολλαπλή λιπομάτωση, PEM: Προοδευτική εγκεφαλομυοπάθεια, PEO: προοδευτική έξω οφθαλμοπληγία, SNHL: Νευροαισθητήρια κώφωση.

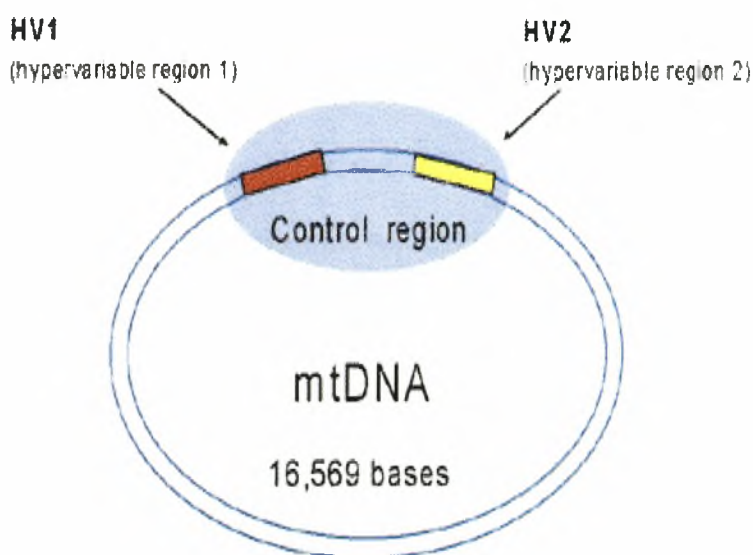
## 2.4 ΑΝΘΡΩΠΙΝΕΣ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΕΣ ΑΠΛΟΟΜΑΔΕΣ

Τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά που εμφανίζει το μιτοχονδριακό DNA σε σχέση με το πυρηνικό και κυρίως η απουσία γενετικού ανασυνδυασμού και ο υψηλός ρυθμός μεταλλαξιγένεσης το καθιστούν ένα χρήσιμο «εργαλείο» για τις πληθυσμιακές μελέτες. Καθώς η εξελικτική ιστορία είναι αποτυπωμένη στις νουκλεοτιδικές αλληλουχίες του DNA, διαφορές μεταξύ πληθυσμών μπορεί να αντανakλούν την εξελικτική τους ιστορία.

Με τον όρο «απλότυπος» αναφερόμαστε σε μια ομάδα γονιδίων διαφορετικών γενετικών τύπων στενά συνδεδεμένων που συγκληρονομούνται από ένα άτομο στους απογόνους του· χρησιμοποιείται για το mtDNA καθώς είναι απλοειδές, όλα τα γονιδια του είναι συνδεδεμένα και κληρονομείται σαν αδιάσπαστη μονάδα. Οι απλότυποι έχουν ευρεία χρήση στην κατασκευή μητρικών φυλογενετικών δέντρων, αφού το mtDNA προέρχεται από τη μητέρα. Γενικά, γενεολογικά, ή εξελικτικά, δέντρα είναι σχεδιαγράμματα τα οποία απεικονίζουν τις εξελικτικές σχέσεις μεταξύ διάφορων βιολογικών ειδών που προέρχονται από κοινό πρόγονο. Στα «δέντρα» αυτά κάθε «κλαδί», ή κόμβος, αντιπροσωπεύει έναν κοινό πρόγονο και καταλήγει σε «παρακλάδια» που αντιπροσωπεύουν τους απογόνους του. Κάθε κόμβος ονομάζεται ταξινομική μονάδα και το μήκος του αντιστοιχεί στο χρονικό διάστημα που διανύθη. Τα πρότυπα που απεικονίζονται με τα γενεολογικά δέντρα χρησιμοποιούνται για την εξαγωγή συμπερασμάτων για την εξελικτική πορεία των



διάφορων πληθυσμών (Ingman et al., 2000). Παράδειγμα αξιοποίησης του mtDNA αποτελεί ο προσδιορισμός της προέλευσης της ανθρωπότητας, όπου ακολουθώντας το μονοπάτι της εξέλιξης του μιτοχονδριακού DNA και μόνο τη γραμμή της μητρικής γενεάς, αποδεικνύεται ότι η «μιτοχονδριακή Εύα» είναι ο πιο πρόσφατος κοινός πρόγονος όλων των σύγχρονων ανθρώπων και προέρχεται από την Αφρική (Torroni et al., 2006). Για τον προσδιορισμό αυτό απαιτείται αλληλούχιση μίας ή περισσότερων εκ των **υπερμεταβλητών ρυθμιστικών περιοχών (hypervariable control regions)** του ανθρώπινου μιτοχονδριακού γονιδιώματος (**HV1 ή HV2**). Η HV1 περιοχή αποτελείται από περισσότερα από 440 ζεύγη βάσεων, των οποίων οι πολυμορφισμοί μπορούν να συγκριθούν με ρυθμιστικές περιοχές άλλων ατόμων (είτε πραγματικών ατόμων είτε από βάσεις δεδομένων), για να καθοριστεί η γραμμή της μητρικής γενεάς.

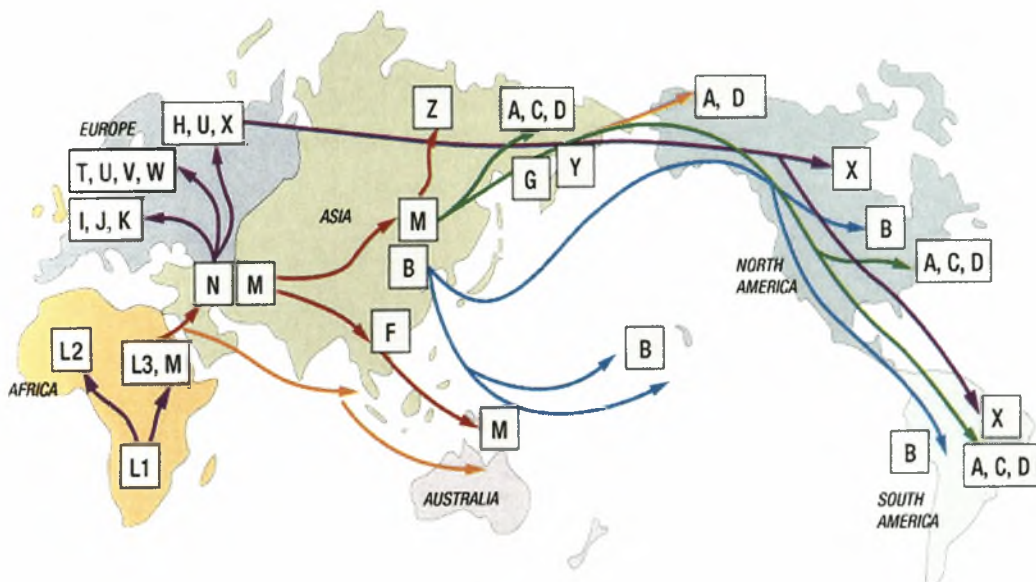


**Εικόνα 11:** Οι υπερμεταβλητές ρυθμιστικές περιοχές του ανθρώπινου μιτοχονδριακού γονιδιώματος HV1 και HV2.

Εν τούτοις, το μιτοχονδριακό DNA αντιπροσωπεύει την ιστορία μόνο των θηλυκών ατόμων του πληθυσμού. Συνεπώς δεν μπορεί να αντιπροσωπεύσει την ιστορία του πληθυσμού ως σύνολο. Γενικά, για να εξαχθούν αντιπροσωπευτικά συμπεράσματα για την ιστορική εξέλιξη ενός πληθυσμού θα πρέπει να μελετηθεί τόσο το μιτοχονδριακό όσο και το πυρηνικό γονιδίωμα.

Στις εξελικτικές μελέτες γίνεται χρήση των **απλοομάδων** ή **haplogroups**, οι οποίες είναι ομάδες που αποτελούνται από παρεμφερείς απλότυπους που προέρχονται από έναν κοινό πρόγονο και με τον οποίο μοιράζονται κοινούς πολυμορφισμούς ενός νουκλεοτιδίου (SNP's). Τα ονόματα των haplogroups αντιστοιχούν σε συνδυασμούς καθορισμένων γραμμάτων της αλφαβήτου και αριθμών. Τα **ανθρώπινα μιτοχονδριακά DNA haplogroups** είναι απλοομάδες που καθορίζονται από διαφορές στο ανθρώπινο mtDNA. Τα τελευταία οδήγησαν τους ερευνητές στο να εντοπίσουν τη μητρική γενεά των σύγχρονων ανθρώπων στην Αφρική (Cann et al., 1987, Castro et al., 1998). Το σύνολο των ομάδων αυτών περιγράφεται με τα ακόλουθα κωδικά γράμματα: A, B, C, CZ, D, E, F, G, H, pre-HV, HV, I, J, pre-JT, JT, K, L0, L1, L2, L3, L4, L5, L6, L7, M, N, P, Q, R, S, T, U, UK, V, W, X, Y και Z. Τα mtDNA haplogroups είναι επίσης καθορισμένα βάσει γεωγραφίας. Για παράδειγμα:

- Αφρικανοί: L, L1, L2, L3, M
- Νοτιοευρωπαίοι: I, J, K
- Κεντροευρωπαίοι: T, U, V, W
- Βορειοευρωπαίοι: H, U, X
- Ασιάτες: A,B,C,D,F,G, Z και M (όπου M: C,D,G)
- Λατινοαμερικάνοι: A,B,C,D και μερικές φορές X



**Εικόνα 12:** Υποθετικός χάρτης των ανθρώπινων mtDNA haplogroups που απεικονίζει τη προέλευση των ανθρώπων από την Αφρική καθώς και την μετέπειτα εξάπλωσή τους σε ολόκληρη την υδρόγειο.



**Πίνακας 3:** Η εξάπλωση του ανθρώπων στις διάφορες περιοχές ξεκινώντας από την «Μιτοχονδριακή Εύα» στην Αφρική πριν από περίπου 150.000 χρόνια.

<b>Περιοχή</b>	<b>Έτη</b>
Αφρική	120.000-150.000
Έξω από την Αφρική	55.000-75.000
Ασία	40.000-70.000
Αυστραλία	40.000-60.000
Ευρώπη	35.000-50.000
Αμερική	15.000-35.000
Αλάσκα	8.000-10.000

## 2.5 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η ανίχνευση και η ταυτοποίηση μεταλλάξεων σε μιτοχονδριακά γονίδια tRNA σε μια ομάδα φυσιολογικών ατόμων (χωρίς κλινικά συμπτώματα), πληθυσμού που προέρχεται από την περιοχή της Θεσσαλίας. Τα μιτοχονδριακά γονίδια είναι εξαιρετικά πολυμορφικά μόρια και αυτός είναι ένας από τους λόγους που χρησιμοποιούνται ευρύτατα σε φυλογενετικές μελέτες. Επιπλέον, τα τελευταία χρόνια η ανίχνευση μεγάλου αριθμού μεταλλάξεων σε μιτοχονδριακά tRNAs και η πιθανή συσχέτιση αυτών των μεταλλάξεων με διαταραχές στον ανθρώπινο οργανισμό έχει προκαλέσει το έντονο ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας.

Οι φαινοτυπικές εκφράσεις των μιτοχονδριακών μεταλλάξεων περιλαμβάνουν κυρίως δυσλειτουργίες σε όργανα και ιστούς που εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από την μιτοχονδριακή λειτουργία όπως είναι η καρδιά, ο εγκέφαλος και οι μύες. Ωστόσο, δεν έχει απαντηθεί ακόμη το ερώτημα πότε μια μετάλλαξη προκαλεί παθολογία και ποιος είναι ο μηχανισμός με τον οποίο γίνεται αυτό.

Η παρούσα μελέτη έχει ως στόχο να αποτελέσει σημείο αναφοράς και σύγκρισης για μελέτες παθολογίας όσον αφορά τα «μιτοχονδριακά νοσήματα» και πραγματοποιήθηκε παράλληλα με αντίστοιχες μελέτες, σκοπός των οποίων είναι η ανίχνευση παθογόνων μεταλλάξεων σε ασθενείς με νευρικές και μυϊκές δυσλειτουργίες, σε ασθενείς με άσθμα, σε ασθενείς με Alzheimer καθώς και σε ασθενείς στους οποίους έχει διαγνωστεί διαβήτης ώστε να είναι δυνατή η σύγκριση των αποτελεσμάτων που προέρχονται από το φυσιολογικό πληθυσμό με τα αποτελέσματα των ατόμων που εμφανίζουν κάποια ασθένεια.

## 3. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

### 3.1 ΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΥΛΙΚΟ

Στη παρούσα πειραματική μελέτη χρησιμοποιήθηκε ως βιολογικό υλικό ολικό αίμα (στο οποίο προηγουμένως έχει προστεθεί αντιπηκτικό) από ένα σύνολο 40 υγιών ατόμων από την ευρύτερη περιοχή της Θεσσαλίας. Τα άτομα επιλέχθηκαν τυχαία και δεν είναι συγγενή μεταξύ τους. Τα δείγματα αίματος διατηρήθηκαν σε θερμοκρασία  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  μέχρι την εφαρμογή της διαδικασίας απομόνωσης DNA.

### 3.2 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA

Το πρώτο βήμα για τη μελέτη ανίχνευσης μεταλλάξεων και πολυμορφισμών σε γονιδιακό επίπεδο, αποτελεί η απομόνωση του DNA από το ολικό αίμα.

Η απομόνωση του DNA από τα κύτταρα μπορεί να διαιρεθεί στα εξής στάδια:

- A. Διάσπαση και λύση των κυττάρων.
- B. Απομάκρυνση των πρωτεϊνών.
- Γ. Αποκατάσταση του DNA.

Για την απομόνωση του DNA χρησιμοποιούνται τα παρακάτω διαλύματα:

- **SSC 20x (Standard Saline Citrate)**. 87,6g NaCl + 44,1g  $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  μέχρι τα 500 ml με ddH<sub>2</sub>O. Ρύθμιση του pH στο 7,4 με συμπυκνωμένο HCl (πριν τον τελικό όγκο νερού). Ανάδευση και αποστείρωση. Αποθήκευση στους 4 °C.
- **SSC 1x (Standard Saline Citrate)**. Παρασκευάζεται από SSC 20x με αραιώση (475 ml ddH<sub>2</sub>O + 25 ml SSC 20x = 500 ml SSC 1x).
- **NaOAc 0,2M**. Παρασκευάζεται από NaOAc 3M με αραιώση (140 ml ddH<sub>2</sub>O + 10 ml NaOAc 3M = 150 ml NaOAc 0,2M).
- **SDS 5% (Sodium Dodecyl Sulphate)**. Ανιονικό απορρυπαντικό που καταστρέφει όλες σχεδόν τις μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις,

προκαλεί ρήξη των πυρηνικών και των κυτταρικών μεμβρανών και διαλυματοποιεί τις πρωτεΐνες.

- **Proteinase K.** Με την ενζυμική πρωτεϊνάση K πραγματοποιείται πέψη των πρωτεϊνών και το DNA απομονώνεται από τις πρωτεΐνες.
- **Χλωροφόρμιο.** Οργανικός διαλύτης για την εκχύλιση του μίγματος και την απομάκρυνση των πρωτεϊνών και του RNA.
- **Ισοπροπανόλη.** Για την κατακρήμνιση του DNA.
- **Αιθανόλη 70%.** Μίγμα 70% κ.ο απόλυτης αλκοόλης σε ddH<sub>2</sub>O για έκπλυση του ιζήματος.

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η εξής :

1. Ανάμιξη 0,5 ml ολικού αίματος με 1 ml SSC 1x (Standard Saline Citrate) σε eppendorf του 1,5 ml.
2. Ανάδευση στο vortex και φυγοκέντρηση για 3 λεπτά στις 13.000 rpm.
3. Απομάκρυνση 1 ml του υπερκείμενου και διάλυση του ιζήματος σε 1 ml SSC 1x.
4. Ανάδευση στο vortex και φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στις 13.000 rpm.
5. Απομάκρυνση το υπερκείμενου και διάλυση του ιζήματος ξανά σε 0,5 ml NaOAc 0,2M και 50 μl SDS 5%, προσθέτοντας 10 μl πρωτεϊνάσης K (10mg/ml). Η πρωτεϊνάση K συντελεί στην αποδιάταξη των πρωτεϊνών.
6. Επώαση των δειγμάτων στους 55 °C για 1 ώρα.
7. Προσθήκη 0,5 ml φαινόλης και 0,5 ml χλωροφορμίου/ισοαμυλικής αλκοόλης.
8. Ανάδευση στο vortex και φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 13.000 rpm.
9. Μεταφορά του υπερκείμενου σε νέα eppendorf και προσθήκη 1 ml χλωροφορμίου/ισοαμυλικής αλκοόλης.
10. Ήπια ανακίνηση και φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 13.000 rpm.
11. Μεταφορά του υπερκείμενου σε νέα eppendorf και προσθήκη 1 ml ισοπροπανόλης.
12. Επώαση των δειγμάτων στους -20 °C για 15 λεπτά.
13. Φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 13.000 rpm.
14. Απομάκρυνση του υπερκείμενου και προσθήκη 1 ml παγωμένης αιθανόλης 70%.
15. Φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 13.000 rpm.
16. Απομάκρυνση του υπερκείμενου.
17. Επώαση-ξήρανση του ιζήματος για 1 ώρα στους 37 °C.

18. Προσθήκη 100 µl ddH<sub>2</sub>O και παραμονή overnight στους 4 °C για διάλυση.

19. Την επόμενη μέρα, τα δείγματα ηλεκτροφορούνται σε πηκτή αγαρόζης 1% με σκοπό την ποιοτική ανίχνευση του mtDNA.

Για την παρασκευή **πηκτής αγαρόζης** 1% χρησιμοποιούνται :

- 30 ml TAE 1x (παρασκευάζεται από stock διάλυμα TAE 50x)
- 0,3 gr αγαρόζης
- 3 µl βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr)

Το stock διάλυμα TAE 50x παρασκευάζεται ως εξής:

- Tris 121 gr
- Οξικό οξύ 28,5 ml
- EDTA 0,5M 50 ml
- ddH<sub>2</sub>O μέχρι τα 500 ml

Τοποθετούνται 0,3 gr αγαρόζης σε κωνική φιάλη των 100 ml και προστίθενται σε αυτά 30 ml TAE 1x. Το μίγμα θερμαίνεται (σε φούρνο μικροκυμάτων) για περίπου 1-2 λεπτά μέχρι η αγαρόζη να διαλυθεί πλήρως και στη συνέχεια προστίθενται προσεκτικά 3 µl βρωμιούχου αιθιδίου. Το βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr) έχει την χαρακτηριστική ιδιότητα να φθορίζει στο υπεριώδες φως καθώς παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων του DNA. Έτσι δίνει πρότυπα ζωνώσεων που αντιστοιχούν στην ποσότητα του DNA που δέσμευσε το EtBr. Το μίγμα μεταφέρεται σε κατάλληλη μήτρα, η οποία περιέχει τις απαραίτητες θέσεις υποδοχής του DNA όπου και στερεοποιείται.

Η φόρτωση του δείγματος στη πηκτή αγαρόζης γίνεται αφού συμπληρωθεί η συσκευή με το ίδιο διάλυμα TAE 1x μέχρι η πηκτή να είναι πλήρως βυθισμένη στο διάλυμα αυτό. Ακολουθεί ανάμιξη 3µl loading buffer με 5 µl δείγματος και τοποθέτηση τους προσεκτικά σε κάθε πηγαδάκι της πηκτής.

Το **loading buffer** (6x) 10 ml παρασκευάζεται ως εξής:

- 1 ml χρωστική μπλε της βρωμοφαινόλης
- 5 ml γλυκερόλη
- 0,5 ml TBE 20x



- 3,5 ml ddH<sub>2</sub>O

Η τάση που εφαρμόζεται είναι 100V και τα δείγματα ηλεκτροφορούνται στο πήκτωμα μέχρι να διανύσουν τα 2/3 της διαδρομής (για περίπου 20-30 λεπτά). Τέλος, το πήκτωμα παρατηρείται σε συσκευή UV (Εικόνα 13). Όσα δείγματα δίνουν θετικό αποτέλεσμα (ανίχνευση ζωνών) χρησιμοποιούνται στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).



***Εικόνα 13:** Ηλεκτροφόρηση DNA μετά από απομόνωση από ολιγό αίμα σε πηκτή αγαρόζης 1%.*

### 3.3 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)

Η **αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction)** πρωτοεμφανίστηκε το 1987 από την ομάδα των ερευνητών Mullis, Fallona και Saiki της εταιρίας Cetus και αποτελεί αναμφίβολα μία σημαντική εξέλιξη στην τεχνολογία του DNA. Έχει τεράστιες επιπτώσεις στη βασική έρευνα και τη γενετική διαγνωστική, καθώς παρέχει την ικανότητα να ενισχύει μια μικρή αλληλουχία DNA από το σύνολο του γενώματος. Αυτό επιτρέπει την ανάλυση ενός ειδικού τμήματος DNA χωρίς να κλωνοποιηθεί πρώτα, πράγμα το οποίο αυξάνει σημαντικά την ταχύτητα της ανάλυσης. Το βραβείο Νόμπελ Χημείας απενεμήθη στον Δρ. K. Mullis τον Οκτώβριο του 1993, για την καθοριστική του συμβολή στην ανακάλυψη και ανάπτυξη της τεχνικής PCR.

### 3.3.1. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Με την PCR επιτυγχάνεται η ενίσχυση ενός τμήματος DNA, ανεξαρτήτου προελεύσεως, *in vitro*. Σε χρονικό διάστημα λίγων ωρών, η συγκεκριμένη περιοχή του DNA (DNA στόχος), ενισχύεται σε ένα μεγάλο αριθμό αντιγράφων. Επειδή κατά την τεχνική της PCR γίνεται ενίσχυση του DNA, η αρχική ποσότητα που απαιτείται είναι πολύ μικρή. Ο αριθμός των αντιγράφων εξαρτάται από τον αριθμό των κύκλων της αντίδρασης. Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στην κινητική επανασύνδεσης των αποδιαταγμένων συμπληρωτικών αλυσίδων δίκλωνου νουκλεϊκού οξέος, που ανέπτυξαν οι Britten και Kohne στα τέλη του 1960.

Το τμήμα του DNA που πρόκειται να ενισχυθεί μπορεί να είναι ένα μοναδικό γονίδιο, ένα μέρος ενός γονιδίου ή μια μη κωδική αλληλουχία. Για την αντίδραση απαιτούνται:

- Ένα τμήμα DNA ως εκμαγείο.
- Ένας ή περισσότεροι εκκινητές (primers), συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια 18-22 βάσεων, που έχουν δομή συμπληρωματική προς τις πλευρικές αλληλουχίες του DNA στόχου, το καθένα αντίστοιχα προς τον ένα κλώνο του στόχου και με αντίθετη κατεύθυνση.
  - ! Προσέχουμε οι εκκινητές να μην έχουν συμπληρωματικές αλληλουχίες μεταξύ τους ώστε να αποφεύγεται ο σχηματισμός διμερών, η περιεκτικότητα σε GC να μην ξεπερνάει το 50% των επιλεγόμενων βάσεων, να έχουν παραπλήσια θερμοκρασία τήξεως ( $T_m$ , melting temperature) -η θερμοκρασία τήξεως είναι αυτή στην οποία, στατιστικά, τα μισά μόρια του εκκινητή ζευγαρώνουν με την αλληλουχία-στόχο, ενώ τα άλλα μισά σταθεροποιούνται πάνω σε αυτή και παραμένουν ελεύθερα- και η απόστασή τους να είναι μεγαλύτερη των 100 βάσεων ώστε να επιτρέπεται ο σχηματισμός του νέου κλώνου DNA.
- Μία DNA πολυμεράση, όπως η Taq πολυμεράση, που είναι θερμοσταθερή DNA πολυμεράση η οποία απομονώθηκε από το βακτήριο *Thermus aquaticus* (Taq) που ζει στο νερό σε θερμοκρασία 75 °C. Έχει την ιδιότητα να μην αποδιατάσσεται σε υψηλές θερμοκρασίες, έχει βέλπστη θερμοκρασία 72 °C, ενώ είναι αρκετά σταθερή ακόμη και στους 95 °C, παραμένοντας έτσι ενεργή σε όλη τη διάρκεια των κύκλων του πολλαπλασιασμού.

- Τριφωσφορικά δεοξυνουκλεοζίδια (dNTPs), τα οποία αποτελούν τα δομικά συστατικά από τα οποία η DNA πολυμεράση συνθέτει τους νέους κλώνους DNA.
- Ρυθμιστικό διάλυμα (buffer solution), το οποίο δημιουργεί ένα κατάλληλο χημικό περιβάλλον για τη βέλτιστη δραστηριότητα και σταθερότητα της DNA πολυμεράσης.
- Δισθενή κατιόντα  $Mg^{2+}$ , απαραίτητα για την ενζυμική δράση της Taq πολυμεράσης.

Η αντίδραση εκτελείται κυρίως σε όγκο 15-100 μl σε eppendorf των 0.2-0.5 ml σε θερμικό κυκλοποιητή, ο οποίος ρυθμίζει τη διαδοχική θέρμανση και ψύξη των δειγμάτων σε κάθε στάδιο. Τα στάδια ενίσχυσης για την PCR στον θερμικό κυκλοποιητή είναι τα ακόλουθα (τα στάδια 2-4 επαναλαμβάνονται για 35 κύκλους):

**1. Αρχικό στάδιο:** Στο στάδιο αυτό η θερμοκρασία ανέρχεται στους  $95^{\circ}C$  και διατηρείται για 4 λεπτά ώστε να γίνει αποδιάταξη των δίκλωνων μορίων DNA.

**2. Στάδιο αποδιάταξης (denaturation):** Στο στάδιο αυτό η θερμοκρασία ανέρχεται στους  $95^{\circ}C$  για 30 δευτερόλεπτα. Το γεγονός αυτό προκαλεί τήξη του τμήματος DNA καθώς διασπώνται οι δεσμοί υδρογόνου μεταξύ των συμπληρωματικών βάσεων των δύο κλώνων, δημιουργώντας μονούς κλώνους DNA.

**3. Στάδιο υβριδισμού (annealing):** Στο στάδιο αυτό η θερμοκρασία κατέρχεται στους  $55^{\circ}C$  για 40 δευτερόλεπτα, επιτρέποντας την υβριδοποίηση των εκκινητών, οι οποίοι βρίσκονται σε περίσσεια, με το μονόκλωνο DNA-εκμαγείο. Όσο περισσότερο συμπληρωματική είναι η αλληλουχία των εκκινητών με την αλληλουχία του εκμαγείου, τόσο σταθερότεροι δεσμοί υδρογόνου σχηματίζονται μεταξύ τους. Η DNA πολυμεράση προσδένεται στο υβρίδιο εκμαγείο-εκκινητής και ξεκινά τη σύνθεση του νέου τμήματος DNA.

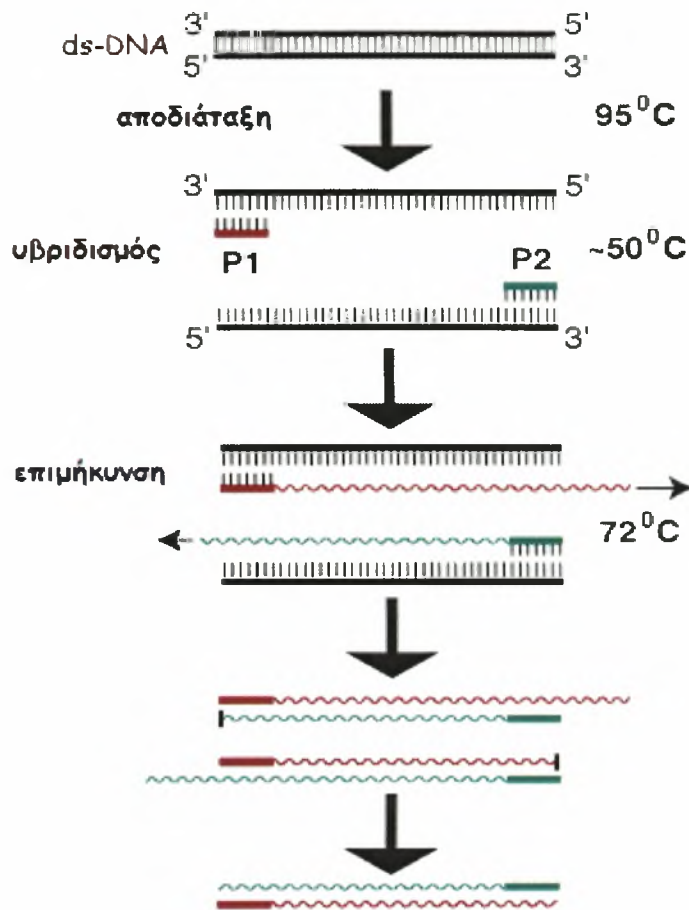
**4. Στάδιο επιμήκυνσης (extention):** Στο στάδιο αυτό η θερμοκρασία ανέρχεται ξανά στους  $72^{\circ}C$  για 40 δευτερόλεπτα, όπου η Taq πολυμεράση λειτουργεί βέλπιστα. Η DNA πολυμεράση συνθέτει το νέο κλώνο DNA, παρουσία  $MgCl_2$ , προσθέτοντας dNTPs συμπληρωματικά με τον κλώνο-εκμαγείο, με κατεύθυνση  $5'-3'$

συμπυκνώνοντας τη 5'-φωσφορική ομάδα των dNTPs με την 3'-υδροξυλομάδα με το τέλος του νεοσυντιθέμενου κλώνου. Η DNA πολυμεράση συνθέτει το νέο κλώνο προσθέτοντας περίπου 1.000 βάσεις ανά λεπτό.

**5. Στάδιο τελικής επιμήκυνσης:** Στο στάδιο αυτό η θερμοκρασία παραμένει στους 72 °C για 10 λεπτά, ύστερα από τον τελευταίο κύκλο PCR. Αυτό γίνεται για να εξασφαλισθεί ότι το απομένον μονόκλωνο DNA έχει πλήρως πολυμεριστεί.

Κατόπιν η θερμοκρασία κατέρχεται στους 4 °C. Έτσι το PCR δείγμα μπορεί να παραμείνει βραχυπρόθεσμα «αποθηκευμένο» στον θερμικό κυκλοποιητή για όσο χρόνο επιθυμούμε, μέχρι την εφαρμογή της επόμενης τεχνικής.

Διάρκεια: κατά μέσο όρο περίπου δύο ώρες για 35 κύκλους (εξαρτάται από την ταχύτητα εναλλαγής των θερμοκρασιών για την πραγματοποίηση των διαφόρων σταδίων στον κυκλοποιητή).



**Εικόνα 14:** Σχηματική απεικόνιση του κύκλου της τεχνικής PCR. Αποδιάταξη στους  $95^{\circ}\text{C}$ , υβριδισμός στους  $\sim 50^{\circ}\text{C}$  και επιμήκυνση στους  $72^{\circ}\text{C}$ .

### 3.3.2 ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣ ΤΩΝ tRNA ΓΟΝΙΔΙΩΝ

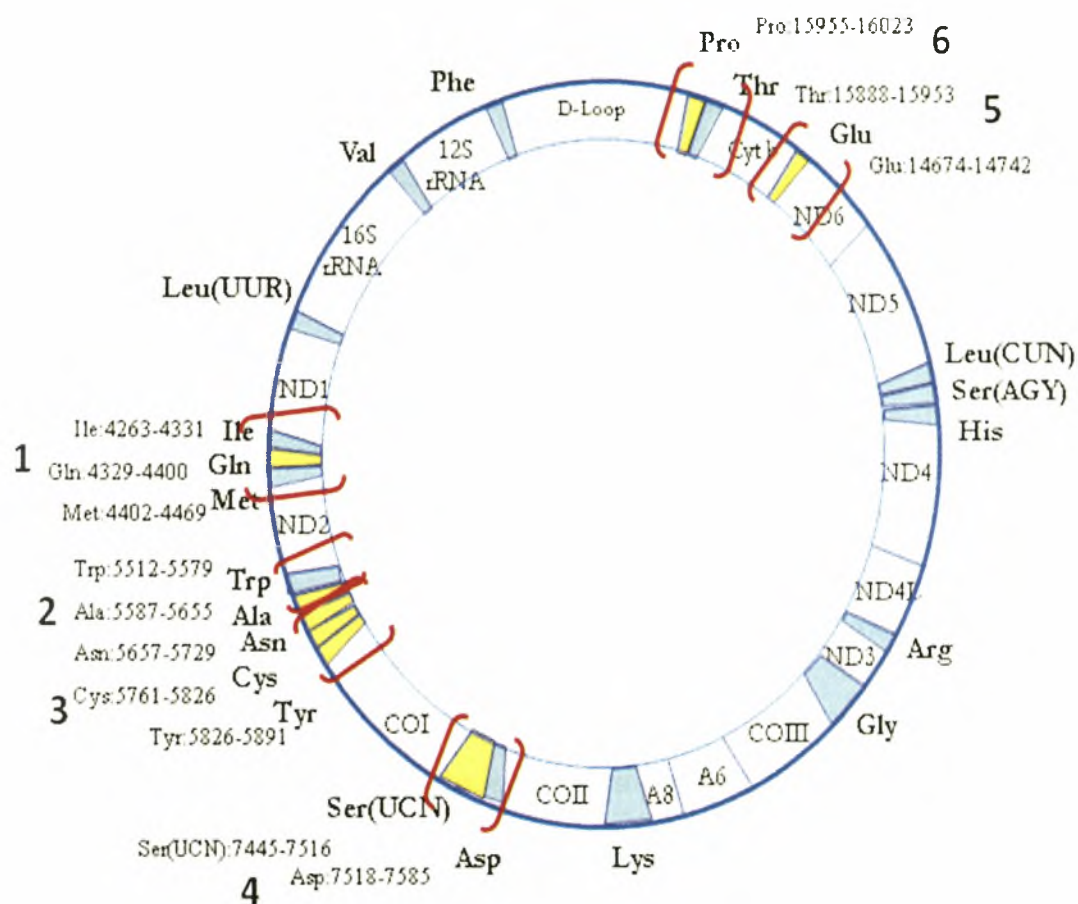
Ενισχύθηκαν 6 τμήματα DNA που περιέκλειαν 13 από τα 22 γονίδια tRNA του mtDNA. Στον πίνακα 3 παρουσιάζονται τα ζεύγη των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν, η νουκλεοτιδική τους θέση καθώς και το μήκος τους.



**ΠΙΝΑΚΑΣ 4:** Ζεύγη των primers που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση των mt tRNA's, η νουκλεοτιδική τους θέση καθώς και το μήκος τους.

A/A	tRNA	Primers	νουκλεοτιδική θέση	μήκος(bp)
1	Ile-Gln-Met	<b>FW Primer 5' - 3'</b> CCAGCATTCCCCCTCAAACC	<b>νουκλεοτιδική θέση</b>  (FW 4241-4260) (RV 4486-4468)	<b>μήκος(bp)</b>  246
		<b>RV Primer 5' - 3'</b> TGGGCCAGGGGATTAATTA		
2	Trp-Ala	<b>FW Primer 5' - 3'</b> CGCTACTCCTACCTATCTCC	<b>νουκλεοτιδική θέση</b>  (FW 5470-5489) (RV 5711-5691)	<b>μήκος(bp)</b>  242
		<b>RV Primer 5' - 3'</b> TTAGGGTGCTTAGCTGTTAC		
3	Asn-Cys-Tyr	<b>FW Primer 5' - 3'</b> CAATGGGACTTAAACCCACAA	<b>νουκλεοτιδική θέση</b>  (FW 5663-5683) (RV 5911-5892)	<b>μήκος(bp)</b>  294
		<b>RV Primer 5' - 3'</b> GCGAACATCAGTGGGGTGA		
4	Ser(UCN)-Asp	<b>FW Primer 5' - 3'</b> ATTCGAAGAACCCGTATACA	<b>νουκλεοτιδική θέση</b>  (FW 7415-7434) (RV 7643-7624)	<b>μήκος(bp)</b>  229
		<b>RV Primer 5' - 3'</b> GCTCTTCTATGATAGGGGAA		
5	Glu	<b>FW Primer 5' - 3'</b> CCCACACTCAACAGAAACA	<b>νουκλεοτιδική θέση</b>  (FW 14642-14660) (RV 14763-14745)	<b>μήκος(bp)</b>  122
		<b>RV Primer 5' - 3'</b> TTGCGTATTGGGGTCATTG		

6	<b>tRNA</b> Thr-Pro	<b>FW Primer 5' - 3'</b> CTAATACCAACTATCTCCCT	<b>νουκλεοτιδική θέση</b> (FW 15839-15858)	<b>μήκος(bp)</b> 212
		<b>RV Primer 5' - 3'</b> ACCCAAATCTGCTTCCCCAT	(RV 16050-16031)	



**Εικόνα 15:** Οι περιοχές του mtDNA που αντιστοιχούν στα ζεύγη των εκκινητών (6) που χρησιμοποιήθηκαν φαίνονται μέσα στα κόκκινα πλαίσια.

**ΠΙΝΑΚΑΣ 6:** Υλικά που χρησιμοποιήθηκαν σε μια αντίδραση PCR, αρχικές συγκεντρώσεις, ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν για  $V_{\text{τελ}}=50\mu\text{l}$  και οι τελικές τους συγκεντρώσεις.

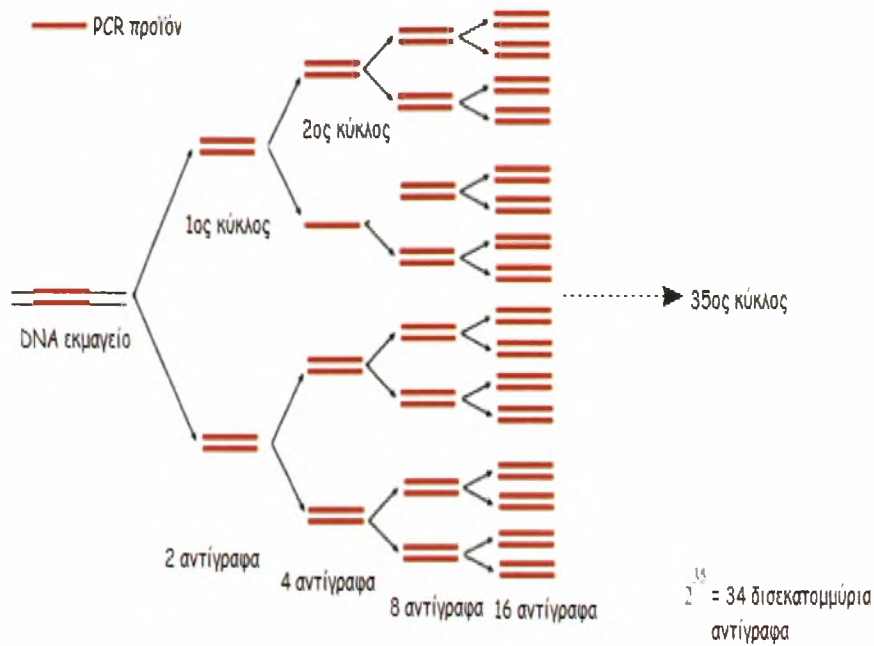
Υλικά	Αρχικές συγκεντρώσεις	Ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν σε μία αντίδραση PCR των 50 $\mu\text{L}$	Τελικές συγκεντρώσεις
DNA		2 $\mu\text{l}$	200ng
Primers (FW + RV)	50pmol/ $\mu\text{L}$	1 $\mu\text{l}$ + 1 $\mu\text{l}$	1pmol/ $\mu\text{l}$
Mg <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	50mM	2 $\mu\text{l}$	2mM
PCR Buffer	10x	5 $\mu\text{l}$	1x
dNTP's*	10mM x 4	1 $\mu\text{l}$	0,8mM
Taq DNA Πολυμεράση	5u/ $\mu\text{L}$	0,2 $\mu\text{l}$	1 unit
ddH <sub>2</sub> O		39 $\mu\text{l}$	

\*dNTP's (Διάλυμα δεοξυνουκλεοτιδίων): Παρασκευάζεται από dATP, dCTP, dGTP και dTTP με μίξη ίσων ποσοτήτων από ξεχωριστά διαλύματα stock από 0,2mM έкаστο dNTP.

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



**Εικόνα 16:** Θερμοκυκλοποιητής που χρησιμοποιείται για την πραγματοποίηση των αντιδράσεων PCR.



**Εικόνα 17:** Σχηματική παράσταση του εκθετικού πολλαπλασιασμού του DNA μέσω της τεχνικής της PCR. Έπειτα από  $n$  κύκλους προκύπτουν  $2^n$  αντίγραφα.

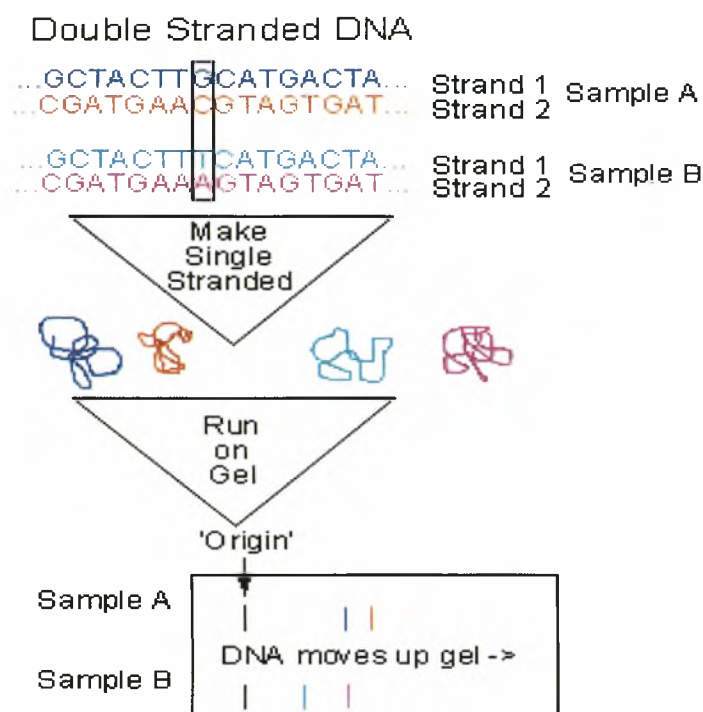
### 3.3.3 ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ PCR ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ

Μετά το πέρας της αντίδρασης PCR γίνεται ηλεκτροφόρηση των PCR προϊόντων σε πήκτωμα αγαρόζης 2%, για τη διαπίστωση της επιτυχούς ενίσχυσης. Η ηλεκτροφόρηση γίνεται κατά ανάλογο τρόπο με εκείνη που πραγματοποιούμε για τα προϊόντα απομόνωσης, παρουσία μάρτυρα γνωστού μοριακού βάρους και δείγματος αρνητικού ελέγχου. Η παρουσία του μάρτυρα είναι αναγκαία καθώς είναι ο μόνος τρόπος για να είμαστε σίγουροι ότι δεν ενισχύθηκαν μη ειδικά προϊόντα ενώ το αρνητικό δείγμα επιβεβαιώνει την απουσία επιμόλυνσης κατά τον πολλαπλασιασμό του επιθυμητού τμήματος DNA. Όσα δείγματα δίνουν θετικό αποτέλεσμα (ανίχνευση ζωνών) χρησιμοποιούνται στην ποιοτική ανάλυση πολυμορφισμών με τη μέθοδο SSCP.

### **3.4 ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥ ΜΟΝΟΚΛΩΝΗΣ ΑΛΥΣΙΔΑΣ (Single Stranded Conformation Polymorphism –SSCP)**

Η **ανάλυση πολυμορφισμού μονόκλωνης αλυσίδας (Single Stranded Conformation Polymorphism)** χρησιμοποιήθηκε πρώτη φορά το 1989 και αποτελεί μια φθηνή, ευαίσθητη και αξιόπιστη μέθοδο για τον προσδιορισμό της γενετικής ποικιλομορφίας. Στηρίζεται στον ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό μονόκλωνων τμημάτων DNA βάσει μικρών διαφορών στην αλληλουχία τους, οι οποίες έχουν ως αποτέλεσμα το σχηματισμό μιας διαφορετικής δευτεροταγούς δομής, η οποία προκαλεί διαφορά στη κινητικότητα των μορίων αυτών μέσα σε πήκτωμα. Η κινητικότητα των δίκλωνων μορίων DNA μέσα σε ένα ηλεκτροφορητικό πήκτωμα εξαρτάται από το μέγεθος και το μήκος του μορίου και είναι σχετικά ανεξάρτητη από την αλληλουχία των νουκλεοτιδίων του. Εν τούτοις, στα μονόκλιωνα μόρια DNA η κινητικότητα επηρεάζεται αισθητά όταν συμβαίνουν μικρές αλλαγές στην νουκλεοτιδική αλληλουχία, όπως είναι οι πολυμορφισμοί SNP. Αυτό συμβαίνει λόγω της ασταθούς φύσης του μονόκλωνου DNA: απουσία συμπληρωματικού κλώνου, ο μονός κλώνος δύναται να σχηματίσει ενδομοριακούς δεσμούς, οι οποίοι έχουν ως αποτέλεσμα τη δημιουργία αναδιπλώσεων και θηλειών, προσδίδοντάς του μία χαρακτηριστική τρισδιάστατη δομή. Η μέθοδος SSCP εκμεταλλεύεται ακριβώς αυτή την ιδιότητα του μονόκλωνου DNA (Orita et al., 1989). Τμήματα DNA έως 300-600 bp αναλύονται επιτυχώς. Τροποποιώντας συνθήκες όπως η θερμοκρασία, η σύνθεση του ρυθμιστικού διαλύματος (buffer) και του πηκτώματος μπορούμε να πάρουμε πληροφορίες για όλες τις διαφορές που προκύπτουν μεταξύ των δειγμάτων.





**Εικόνα 18:** Σχηματική αναπαράσταση της ανάλυσης SSCP. Τα δείγματα DNA A και B πρέπει να υποστούν αποδιάταξη πριν την ηλεκτροφόρησή τους στο πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου. Μία σημειακή μετάλλαξη είναι ικανή να προσδώσει στη μονόκλωνη αλυσίδα τέτοια μοναδική διαμόρφωση ώστε μετά την ηλεκτροφόρηση, το πρότυπο της αντίστοιχης ζώνης να διαφέρει στα δύο διαφορετικά δείγματα.

### 3.4.1 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΠΗΚΤΗΣ ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΙΟΥ

Συνήθως επιλέγονται συγκεντρώσεις από 8% έως 12%. Όσο πιο μικρό σε μήκος είναι το τμήμα του εξεταζόμενου μονόκλωνου μορίου, τόσο πιο πυκνό θα πρέπει να είναι το πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου. Στη παρούσα μελέτη η συγκέντρωση του πολυακρυλαμιδίου που επιλέχθηκε να χρησιμοποιηθεί ήταν 10%, καθώς κρίθηκε η καταλληλότερη, ύστερα από δοκιμές, που επέτρεπε την καλύτερη εμφάνιση των αποτελεσμάτων.

Για **2 πηκτώματα** πυκνότητας 10% και 125mL χρησιμοποιήθηκαν:

- 12,5 gr Ακρυλαμίδιο
- 0,33 gr Δις-ακρυλαμίδιο

*Τα πηκτώματα δημιουργούνται ύστερα από πολυμερισμό των δύο αντιδραστηρίων. Το μέγεθος των πόρων του πολυμερούς που προκύπτει είναι συνάρτηση του βαθμού του πολυμερισμού, ο οποίος ποικίλει ανάλογα με τις συγκεντρώσεις των μονομερών.*

- 10 ml TBE 10x
- 12,5 ml Γλυκερόλη 50%

*Η προσθήκη γλυκερόλης στο πήκτωμα ελαττώνει την τιμή του pH του διαλύματος ηλεκτροφόρησης που καθορίζεται από την παρουσία του ρυθμιστικού διαλύματος TBE, με αποτέλεσμα να αυξάνεται η ευαισθησία της SSCP ανάλυσης και να λαμβάνονται πιο ευδιάκριτα αποτελέσματα.*

Στο σημείο αυτό ακολουθεί διήθηση και συμπλήρωση με H<sub>2</sub>O έως τα 125 ml και έπειτα προσθήκη των:

- 125 μl TEMED
- 650 μl APS 20%

*Η αντίδραση πολυμερισμού αρχίζει με την προσθήκη του υπερθειικού αμμωνίου (APS: ammonium persulfate) που δημιουργεί ελεύθερες ρίζες :  $S_2O_8^{2-} \rightarrow 2 SO_4^{\bullet-}$  που μαζί με το φωτοχημικό καταλύτη N,N' τετραμεθυλοαιθυλενοδιαμίνη (TEMED) διαδίδονται στο σύστημα πολυμερισμού.*

Αφού προστεθούν οι κατάλληλες χτένες (2mm) για το σχηματισμό πηγαδιών, το ρευστό πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου απαιτεί περίπου 30 λεπτά για να πήξει πλήρως. Έπειτα το τοποθετούμε στην κατάλληλη συσκευή κάθετης ηλεκτροφόρησης.

### 3.4.2 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΤΩΝ PCR ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ

Καθώς αναμένεται να πήξει το πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου προετοιμάζονται τα PCR προϊόντα που έδωσαν θετικό αποτέλεσμα. Σε eppendorf των 0,5 ml προσθέτονται:

- 5 μl δείγματος
- 10μl αποδιατακτικού διαλύματος (denaturation buffer).

Το **Αποδιατακτικό Διάλυμα (Denaturation Buffer)** περιέχει:

- 95% φορμαμίδιο
- 20 mM EDTA
- 10 mM NaOH
- 0.05% κυανό του ξυλενίου
- 0.05% κυανό της βρωμοφαινόλης

Ακολουθώντας, τα δείγματα τοποθετούνται στη συσκευή του θερμοκυκλοποιητή, ώστε να πραγματοποιηθεί η πλήρης αποδιάταξη των δίκλωνων μορίων DNA επiléγοντας το ακόλουθο πρόγραμμα:

1. 97 °C για 7 λεπτά. (Τα δείγματα πριν το τέλος του 7<sup>ου</sup> λεπτού εξέρχονται της συσκευής και τοποθετούνται αμέσως σε πάγο προκειμένου να αποφευχθεί η επανασύνδεση των μονόκλωνων μορίων DNA).

Τέλος, τα αποδιαταγμένα δείγματα φορτώνονται στο πήκτωμα πολυακρυλαμίδιου αφού πρώτα στη συσκευή προστεθεί ρυθμιστικό διάλυμα TBE 0,5x. Εφαρμόζεται τάση 220V και τα δείγματα ηλεκτροφορούνται στο πήκτωμα για 22 ώρες (overnight) σε θερμοκρασία 4°C. Ακολουθεί χρώση του πηκτώματος με νιτρικό άργυρο.

### 3.4.3 ΧΡΩΣΗ ΝΙΤΡΙΚΟΥ ΑΡΓΥΡΟΥ (SILVER STAINING)

Για **2 πηκτώματα** χρησιμοποιούνται:

- Δ/μα 1 : 800 ml dd-H<sub>2</sub>O + 20 ml Et100% + 1 ml CH<sub>3</sub>COOH 90%
- Δ/μα 2 : 400 ml AgNO<sub>3</sub> 1 gr /l
- Δ/μα 3 : 6 gr NaOH + 0,02 gr NaBH<sub>4</sub> + 2 ml HCHO και ddH<sub>2</sub>O έως 400 ml

Τα διαλύματα εμποτίζονται στα πηκτώματα και ξεπλένονται με ddH<sub>2</sub>O το κάθε ένα με την ακόλουθη σειρά:

1. Α' εμποτισμός με 200 ml του διαλύματος 1 για 3 min.
2. Β' εμποτισμός με 200 ml του διαλύματος 1 για 3 min & πλύση με ddH<sub>2</sub>O.
3. Εμποτισμός με 200 ml του διαλύματος 2 για 20 min & διπλή πλύση με ddH<sub>2</sub>O.
4. Εμποτισμός με 200 ml του διαλύματος 3 έως την εμφάνιση χρώματος & πλύση με ddH<sub>2</sub>O.

### 3.5 ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ DNA (DNA SEQUENCING)

Τα δείγματα εκείνα που εμφάνισαν διαφορετικά πρότυπα συγκριτικά με τα δείγματα με φυσιολογικό πρότυπο, αποστέλλονται για **ταυτοποίηση της DNA αλληλουχίας τους (DNA sequencing)**, αφού προηγουμένως υποστούν κατάλληλο καθαρισμό.

#### 3.5.1 ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ PCR ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ

Για τον καθαρισμό των PCR προϊόντων χρησιμοποιήθηκαν στήλες QIAquick Spin<sup>R</sup>. Ο λόγος που πραγματοποιείται είναι για να απομακρυνθούν οι ελεύθεροι ή/και διμερισμένοι primers, τα νουκλεοτίδια, η DNA πολυμεράση και άλατα που τυχόν υπάρχουν στο διάλυμα μαζί με τα PCR προϊόντα, ούτως ώστε να μη προκαλέσουν προβλήματα ανάγνωσης κατά τη διαδικασία του sequencing. Ακολουθήθηκε το παρακάτω πρωτόκολλο καθαρισμού:

1. Τοποθέτηση των στηλών QIAquick Spin σε eppendorf των 1,5 ml.
2. Προσθήκη 250 μl από το διάλυμα συλλογής (capture buffer) και 50 μl PCR προϊόντος στις στήλες QIAquick Spin.
3. Φυγοκέντρηση του περιεχόμενου των στηλών για 1 λεπτό στις 13.000 rpm. Σε αυτό το βήμα πραγματοποιείται η πρόσδεση των επιθυμητών αλληλουχιών πάνω στη στήλη.
4. Απομάκρυνση του εκλούσματος και επανατοποθέτηση των στηλών στα eppendorf.
5. Προσθήκη 750 μl από το διάλυμα πλύσης (wash buffer) στις στήλες και φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στις 13.000 rpm.
6. Απομάκρυνση του εκλούσματος, επανατοποθέτηση των στηλών στα eppendorf και ξανά φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στις 13.000 rpm. Το βήμα αυτό είναι σημαντικό, καθώς είναι αναγκαίο να απομακρυνθεί πλήρως η αιθανόλη από το διάλυμα πλύσης μέσα στη στήλη.
7. Εκ νέου τοποθέτηση των στηλών QIAquick Spin σε αποστειρωμένα eppendorf των 1,5 ml.
8. Προσθήκη 50 μl από το διάλυμα έκλυσης (elution buffer) και επώαση των δειγμάτων για περίπου 1 λεπτό.

9. Τέλος, φυγοκέντρωση για 1,5 λεπτό στις 13.000 rpm για ανάκτηση του καθαρισμένου DNA από τα eppendorf.

Στη συνέχεια, ακολουθεί υπολογισμός της ποσότητας του PCR προϊόντος ποσοτικά με φωτόμετρο (1μl και 49μl ddH<sub>2</sub>O) ή ποιοτικά με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 2%. Ενδείξεις φωτόμετρου γύρω στα 100 ng/μl είναι ικανοποιητικές.

Το DNA που στέλνεται για αλληλούχιση πρέπει να είναι σε στερεά μορφή (ίζημα) και όχι σε διάλυμα. Αυτό επιτυγχάνεται με κατακρήμνιση του DNA με αιθανόλη και CH<sub>3</sub>COONa (οξικό νάτριο). Για 50μl δείγμα απαιτούνται 500 μl αιθανόλη και 5μl CH<sub>3</sub>COONa. Τα δείγματα μένουν overnight στους -20 °C και την επόμενη μέρα φυγοκεντρώνται στις 13.000 rpm, για 20 λεπτά, στους 4 °C. Το υπερκείμενο απομακρύνεται προσεκτικά και το ίζημα τοποθετείται στους 37 °C για 1 ώρα. Τέλος, παράλληλα με τα δείγματα, αποστέλλονται επίσης για αλληλούχιση και οι primers που χρησιμοποιήθηκαν κατά την αντίδραση PCR. Οι primers αραιώνονται 1/10 σε τελικό όγκο 40 μl (4μl primer + 36μl H<sub>2</sub>O).

### 3.5.2 ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗ (SEQUENCING)

Η τεχνολογική επανάσταση στις μεθόδους ανάλυσης του γενετικού υλικού ξεκίνησε το 1977, όταν οι Maxam & Gilbert περιέγραψαν μία μέθοδο ανάλυσης της αλληλουχίας με ειδική χημική αποικοδόμηση των βάσεων. Τον ίδιο χρόνο ο Sanger με τους συνεργάτες του πρότειναν μία ενζυμική μέθοδο για ανάγνωση της αλληλουχίας του DNA χρησιμοποιώντας διδεοξυνουκλεοτίδια (ddNTP's), τα οποία οδηγούν στον πρόωρο τερματισμό της νουκλεϊκής σύνθεσης. Οι δύο αυτές μέθοδοι παράγουν πληθυσμούς σημασμένων πολυνουκλεοτιδίων τα οποία αρχίζουν από ένα συγκεκριμένο σημείο και τελειώνουν σε σημεία εξαρτώμενα από τη θέση μιας συγκεκριμένης βάσης του αρχικού κλώνου.

Τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί αυτόματοι αναλυτές που μειώνουν εξαιρετικά το χρόνο αλληλούχισης. Τα σημασμένα τμήματα του DNA ανιχνεύονται από μία πηγή laser και τα δεδομένα αποθηκεύονται για να αναλυθούν. Όλοι οι αυτόματοι αναλυτές περιέχουν προγράμματα περαιτέρω επεξεργασίας ή επιτρέπουν

την εξαγωγή των δεδομένων για ανάλυση σε άλλα προγράμματα επεξεργασίας νουκλεϊνικών αλληλουχιών.

### 3.5.3 ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗΣ

Για την στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων των δεδομένων της αλληλούχισης χρησιμοποιήθηκαν τα προγράμματα βιοπληροφορικής: BIOEDIT 7.0 και CLUSTALX 1.81. Το πρώτο χρησιμεύει στην «ανάγνωση» της αλληλουχίας του κάθε γονιδίου που απεικονίζεται σε μορφή χρωματογραφήματος, με κάθε κορυφή του να αντιστοιχεί και σε μια συγκεκριμένη βάση. Με τον τρόπο αυτό συγκρίνοντας τη ζητούμενη αλληλουχία με μια πρότυπη, εντοπίζουμε τη σημειακή μετάλλαξη, την προσθήκη ή την έλλειψη βάσει των διαφορών στις κορυφές τους. Το δεύτερο χρησιμεύει για την εκτέλεση πολλαπλής ομοπαράθεσης της ζητούμενης αλληλουχίας με μια πρότυπη, ως επιβεβαίωση της ορθής «ανάγνωσης» της αλληλουχίας με το BIOEDIT. Επιπλέον, με το CLUSTALX μπορούμε να προσδιορίσουμε και αν η σημειακή μετάλλαξη οδηγεί σε αλλαγή ή όχι του αρχικού νοήματος της αλληλουχίας.

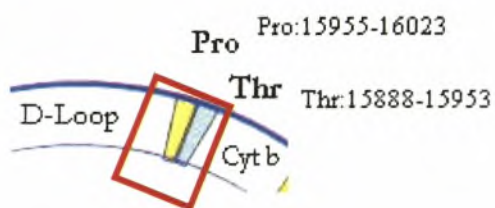


## 4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στα 40 φυσιολογικά άτομα που μελετήθηκαν εντοπίστηκαν 6 ήδη ταυτοποιημένοι πολυμορφισμοί όπως αναφέρονται στη δικτυακή βάση δεδομένων για το μιτοχόνδριο [www.mitomap.org](http://www.mitomap.org). Πέντε εκ των οποίων εντοπίζονται σε γονίδια tRNA (στο tRNA<sup>Thr</sup>, στο tRNA<sup>Gln</sup> και στο tRNA<sup>Asp</sup>) ενώ ο ένας εντοπίζεται στην περιοχή της υπομονάδας II της οξειδάσης του κυτοχρώματος c, MT-CO2. Επίσης εντοπίστηκε ένας πολυμορφισμός στο γονίδιο tRNA<sup>Tyr</sup> για τον οποίο δεν υπάρχει καμία αναφορά.

### 4.1 ΓΟΝΙΔΙΑ tRNA<sup>Thr</sup> ΚΑΙ tRNA<sup>Pro</sup> & ΤΜΗΜΑΤΑ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΤΟΥ ΚΥΤΟΧΡΩΜΑΤΟΣ b ΚΑΙ ΤΟΥ ΒΡΟΧΟΥ D

Για το τμήμα των 212 bp που κωδικοποιεί τα γονίδια tRNA<sup>Thr</sup> και tRNA<sup>Pro</sup> καθώς και τμήματα των παρακαείμενων γονιδίων του κυτοχρώματος b και του βρόχου D, εντοπίστηκαν 3 διαφορετικά πρότυπα με τη μέθοδο του SSCP.



**Εικόνα 19:** Τμήμα του mtDNA. Με το πλαίσιο κόκκινου χρώματος φαίνονται τα άκρα των εκκνητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση των γονιδίων tRNA<sup>Thr</sup> και tRNA<sup>Pro</sup>.

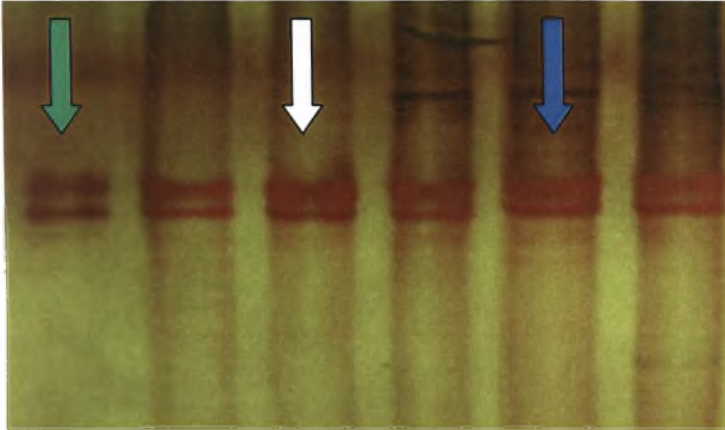
**ΠΙΝΑΚΑΣ 7:** Μεταλλάξεις που βρέθηκαν στο γονίδιο tRNA<sup>Thr</sup> σε σύνολο 40 ατόμων.

#### Άτομα (6)      Μεταλλάξεις

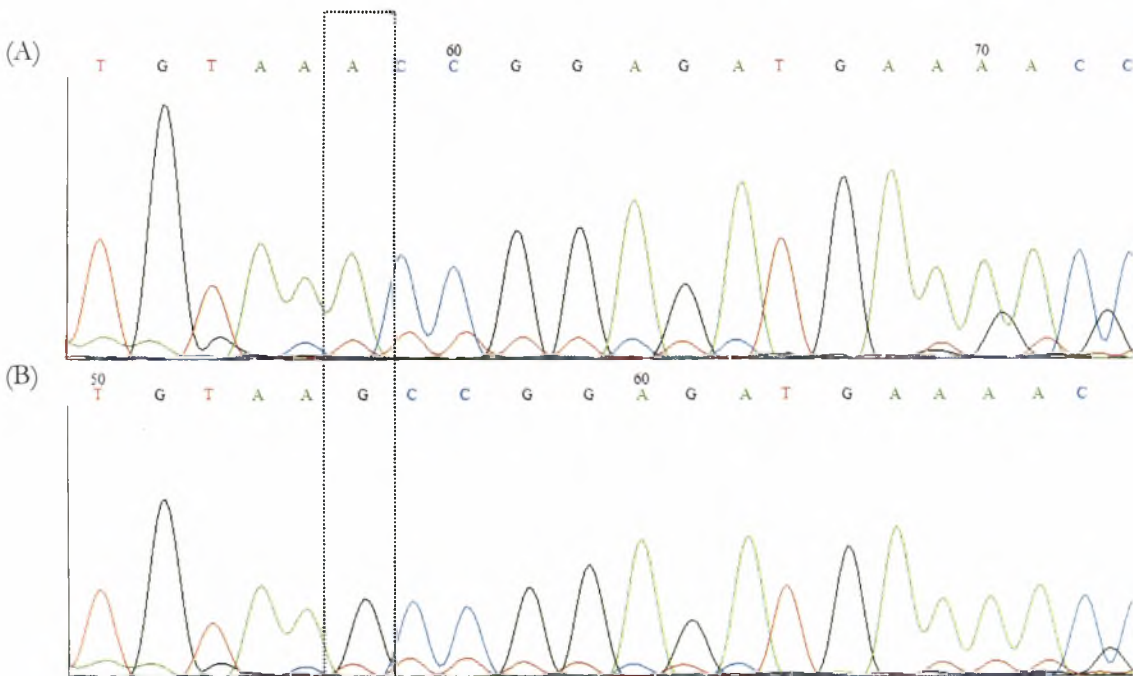
No 2.9      tRNA<sup>Thr</sup>  
5.9      T15889A  
9.6  
9.11

No 9.9      tRNA<sup>Thr</sup>  
9.12      A15924G

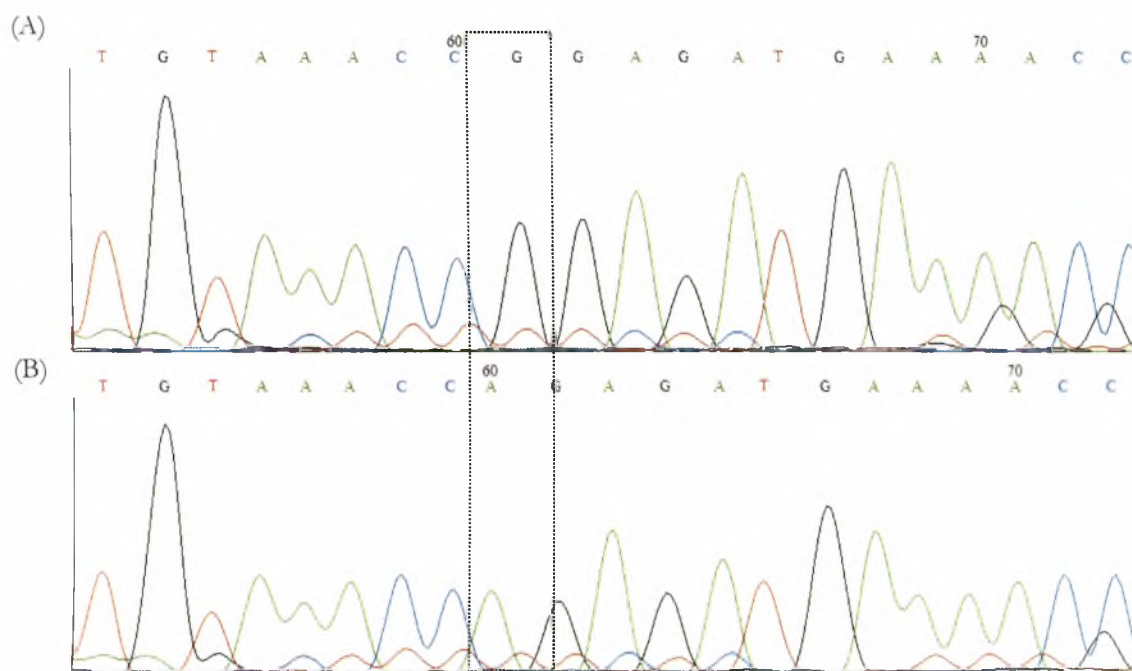
No 13.15      tRNA<sup>Thr</sup>  
G15927A



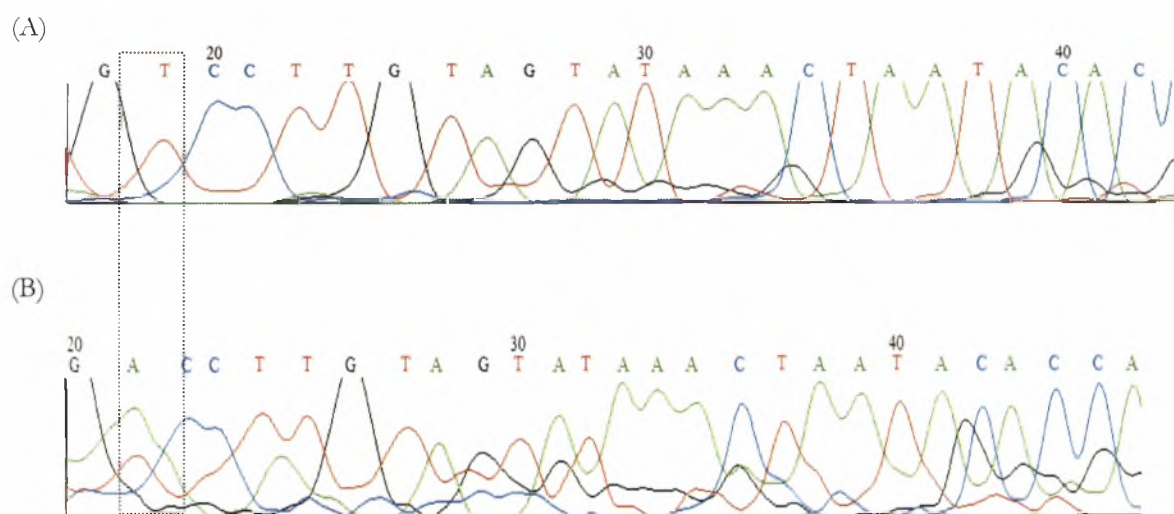
**Εικόνα 20:** Στο πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου 10% (22 ώρες, 220Volt, 4°C) απεικονίζονται με το πράσινο βελάκι το πρότυπο της μετάλλαξης *tRNA<sup>Thr</sup> G15889A*, με το λευκό βελάκι το πρότυπο της μετάλλαξης *tRNA<sup>Thr</sup> A15924G* και με το μπλε βελάκι το πρότυπο του πολυμορφισμού *tRNA<sup>Thr</sup> G15927A*. Τα υπόλοιπα δείγματα εμφανίζουν το φυσιολογικό γενότυπο.



**Εικόνα 21:** Χρωματογράφημα sequencing τμήματος του γονιδίου *tRNA<sup>Thr</sup>* σε άτομο control (A) και στο άτομο 9.9 (B). Είναι εμφανής η μετάπτωση *A*→*G* στη θέση 15924.



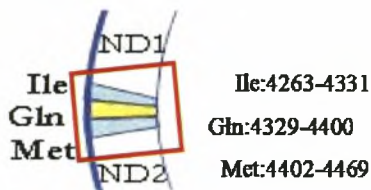
**Εικόνα 22:** Χρωματογράφημα sequencing τμήματος του γονιδίου *tRNA<sup>Thr</sup>* σε άτομο control (A) και στο άτομο 13.15 (B). Είναι εμφανής η μετάπτωση  $G \rightarrow A$  στη θέση 15927.



**Εικόνα 23:** Χρωματογράφημα sequencing τμήματος του γονιδίου *tRNA<sup>Thr</sup>* σε άτομο control (A) και στο άτομο 2.9 (B). Είναι εμφανής η μετατροπή  $T \rightarrow A$  στη θέση 15889.

## 4.2 ΓΟΝΙΔΙΑ $tRNA^{Ile}$ , $tRNA^{Gln}$ και $tRNA^{Met}$ ΚΑΙ ΤΜΗΜΑΤΑ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΤΩΝ ND1 ΚΑΙ ND2 ΥΠΟΜΟΝΑΔΩΝ ΤΟΥ ΣΥΜΠΛΟΚΟΥ Ι ΤΗΣ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΗΣ ΑΛΥΣΙΔΑΣ

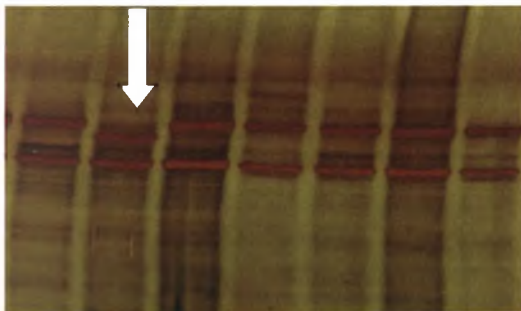
Για το τμήμα των 246 bp που κωδικοποιεί τα γονίδια  $tRNA^{Ile}$ ,  $tRNA^{Gln}$  και  $tRNA^{Met}$  καθώς και τμήματα των παρακείμενων γονιδίων των ND1 και ND2 υπομονάδων του συμπλόκου I της αναπνευστικής αλυσίδας εντοπίστηκε 1 διαφορετικό πρότυπο με τη μέθοδο του SSCP.



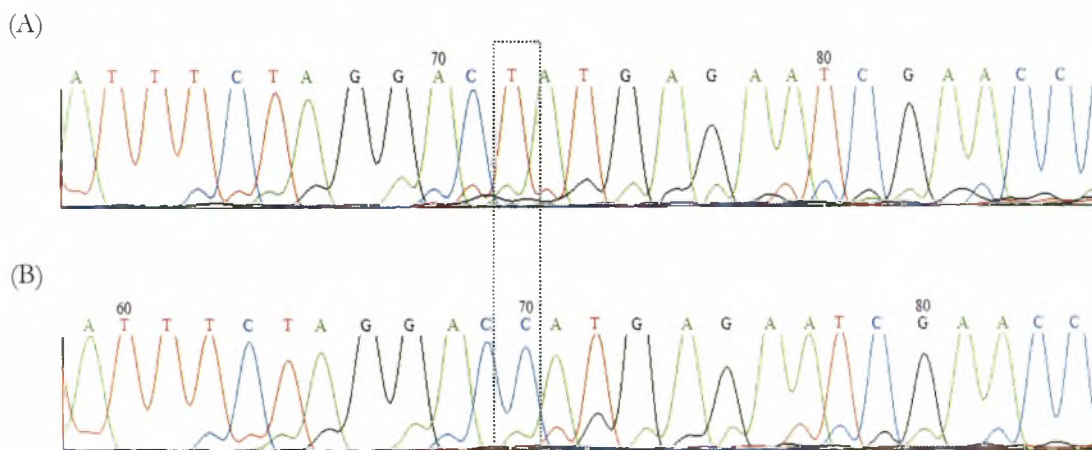
**Εικόνα 24:** Τμήμα του mtDNA. Με το πλαίσιο κόκκινου χρώματος φαίνονται τα άκρα των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση των γονιδίων  $tRNA^{Ile}$ ,  $tRNA^{Gln}$  και  $tRNA^{Met}$ .

**ΠΙΝΑΚΑΣ 8:** Μεταλλάξεις που βρέθηκαν στο γονίδιο  $tRNA^{Gln}$  σε σύνολο 40 ατόμων.

<u>Άτομο (1)</u>	<u>Μεταλλάξεις</u>
No 12.4	$tRNA^{Gln}$ T4336C



**Εικόνα 25:** Στο πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου 10% (22 ώρες, 220Volt, 4°C) απεικονίζεται με το λευκό βελάκι το πρότυπο της μετάλλαξης  $tRNA^{Gln}$  T4336C. Τα υπόλοιπα δείγματα εμφανίζουν το φυσιολογικό γενότυπο.

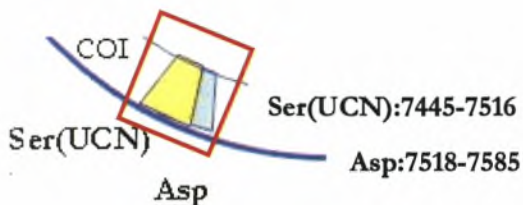


**Εικόνα 26:** Χρωματογράφημα sequencing τμήματος του γονιδίου  $tRNA^{Gln}$  σε άτομο control (A) και στο άτομο 12.4 (B). Είναι εμφανής η μετάπτωση  $T \rightarrow C$  στη θέση 4336.



### 4.3 ΓΟΝΙΔΙΑ $tRNA^{Ser(UCN)}$ και $tRNA^{Asp}$ ΚΑΙ ΤΜΗΜΑΤΑ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΤΩΝ ΥΠΟΜΟΝΑΔΩΝ I ΚΑΙ II ΤΗΣ ΟΞΕΙΔΑΣΗΣ ΤΟΥ ΚΥΤΟΧΡΩΜΑΤΟΣ C

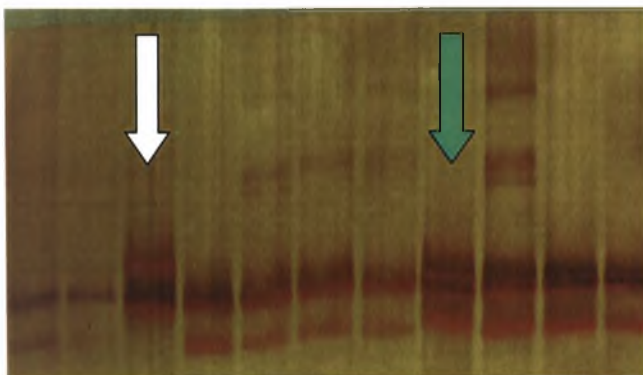
Για το τμήμα των 229 bp που κωδικοποιεί τα γονίδια  $tRNA^{Ser(UCN)}$  και  $tRNA^{Asp}$  καθώς και τμήματα των γονιδίων των υπομονάδων I και II της οξειδάσης του κυτοχρώματος c εντοπίστηκαν 2 διαφορετικά πρότυπα με τη μέθοδο του SSCP.



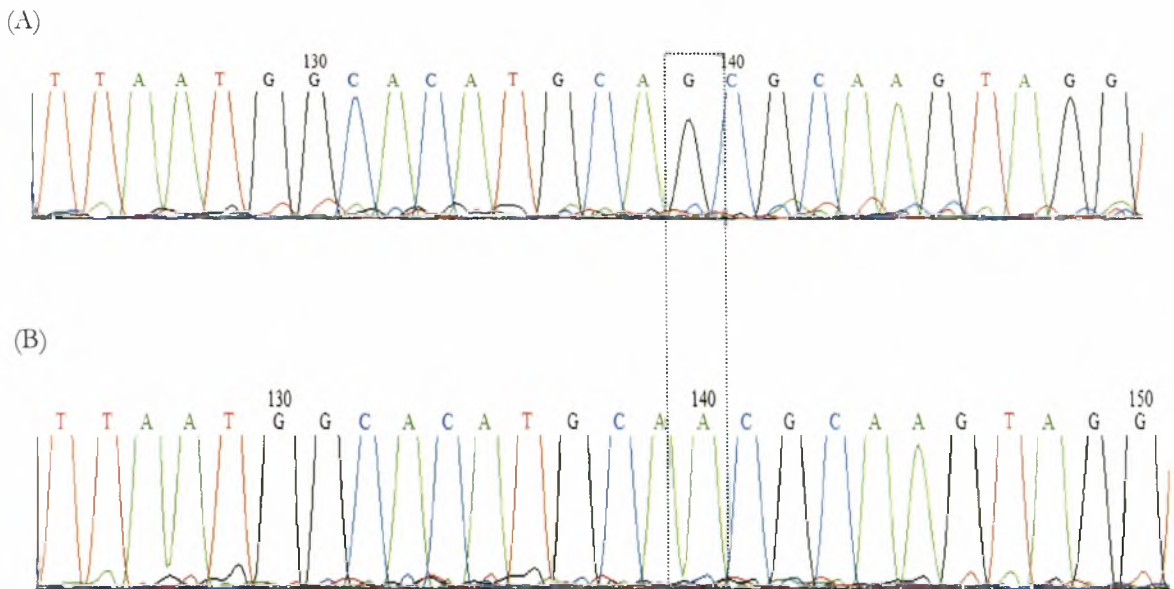
**Εικόνα 27:** Τμήμα του *mtDNA*. Με το πλαίσιο κόκκινου χρώματος φαίνονται τα άκρα των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση των γονιδίων  $tRNA^{Ser(UCN)}$  και  $tRNA^{Asp}$ .

**ΠΙΝΑΚΑΣ 9:** Μεταλλάξεις που βρέθηκαν στο γονίδιο MT-CO2 και στο γονίδιο  $tRNA^{Asp}$  σε σύνολο 40 ατόμων.

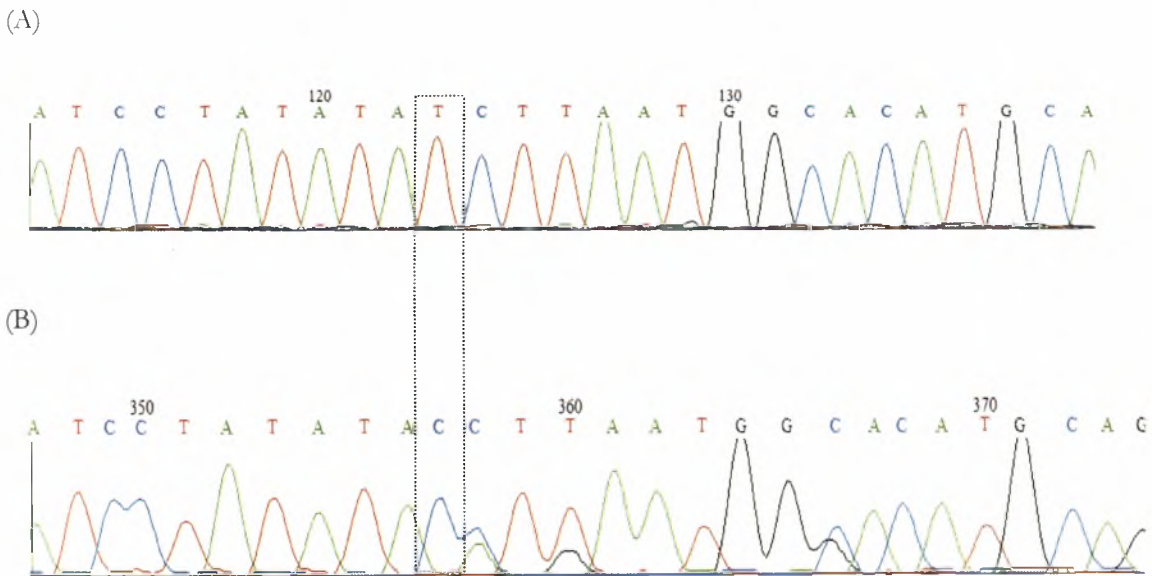
<u>Άτομα (2)</u>	<u>Μεταλλάξεις</u>
No 9.9	MT-CO2 G7598A
No 5.9	$tRNA^{Asp}$ 7581 C



**Εικόνα 28:** Στο πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου 10% (22 ώρες, 220Volt, 4°C) απεικονίζονται με το πράσινο βελάκι το πρότυπο της μετάλλαξης **MT-CO2 G7598A** και με το λευκό βελάκι το πρότυπο της μετάλλαξης  $tRNA^{Asp}$  **T7581C**. Τα υπόλοιπα δείγματα εμφανίζουν το φυσιολογικό γενότυπο.



**Εικόνα 29:** Χρωματογράφημα sequencing τμήματος του γονιδίου MT-CO2 σε άτομο control (A) και στο άτομο 9.9 (B). Είναι εμφανής η μετάπτωση  $G \rightarrow A$  στη θέση 7598.

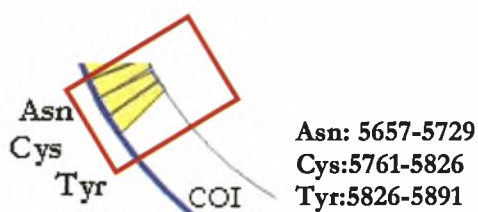


**Εικόνα 30:** Χρωματογράφημα sequencing τμήματος του γονιδίου *tRNA<sup>Asp</sup>* σε άτομο control (A) και στο άτομο 5.9 (B). Είναι εμφανής η μετάπτωση  $T \rightarrow C$  στη θέση 7581.



#### 4.4 ΓΟΝΙΔΙΑ $tRNA^{Asn}$ , $tRNA^{Cys}$ ΚΑΙ $tRNA^{Tyr}$ ΚΑΙ ΤΜΗΜΑ ΤΗΣ ΥΠΟΜΟΝΑΔΑΣ I ΤΗΣ ΟΞΕΙΔΑΣΗΣ ΤΟΥ ΚΥΤΟΧΡΩΜΑΤΟΣ C

Για το τμήμα των 294 bp που κωδικοποιεί τα γονίδια  $tRNA^{Asn}$ ,  $tRNA^{Cys}$  και  $tRNA^{Tyr}$  καθώς και τμήμα του γονιδίου της υπομονάδας I της οξειδάσης του κυτοχρώματος c εντοπίστηκε 1 διαφορετικό πρότυπο με τη μέθοδο του SSCP. Το συγκεκριμένο πρότυπο το οποίο εμφανίστηκε σε ένα μόνο δείγμα μετά την επεξεργασία των αποτελεσμάτων του sequencing αποδείχτηκε ότι παρουσιάζει ένα νέο πολυμορφισμό.



**Εικόνα 31:** Τμήμα του mtDNA. Με το πλαίσιο κόκκινου χρώματος φαίνονται τα άκρα των εκκνητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση των γονιδίων  $tRNA^{Asn}$ ,  $tRNA^{Cys}$  και  $tRNA^{Tyr}$ .

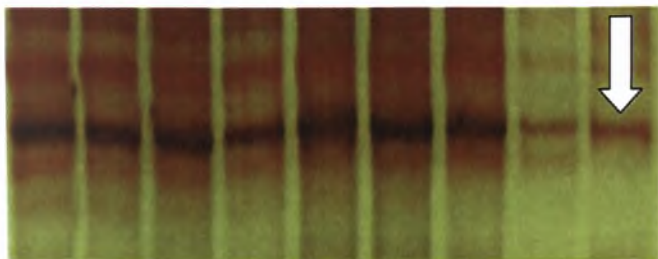
**ΠΙΝΑΚΑΣ 10:** Μεταλλάξεις που βρέθηκαν στο  $tRNA^{Tyr}$  σε σύνολο 40 ατόμων.

Άτομο (1)

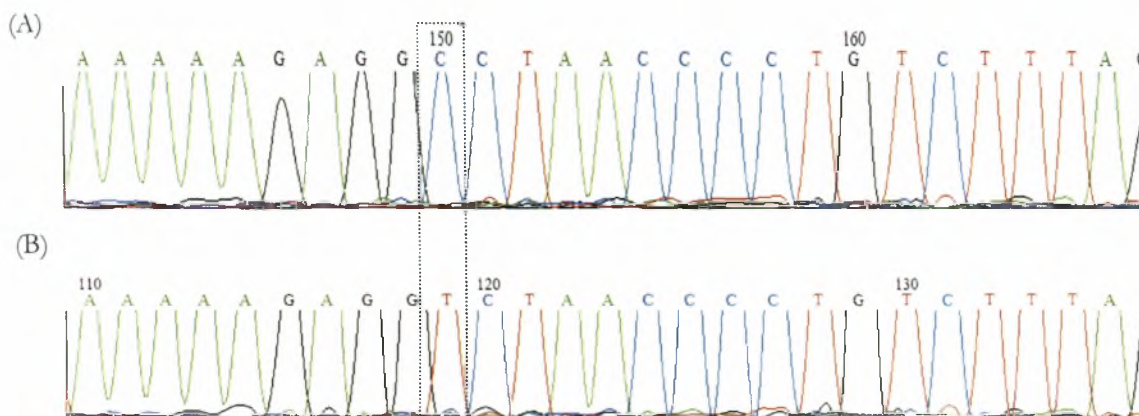
Μεταλλάξεις

No 12.4

$tRNA^{Tyr}$   
**C5839T**



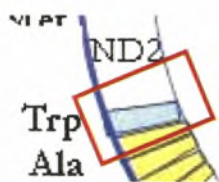
**Εικόνα 32:** Στο πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου 10% (22ώρες, 220Volt, 4°C ) απεικονίζονται με το λευκό βελάκι το πρότυπο της μετάλλαξης  $tRNA^{Tyr}$  **C5839T**. Τα υπόλοιπα δείγματα εμφανίζουν τον ίδιο γενότυπο.



**Εικόνα 33:** Χρωματογράφημα sequencing τμήματος του γονιδίου MT-CO2 σε άτομο control (A) και στο άτομο 9.9 (B). Είναι εμφανής η μετάπτωση C→T στη θέση 5839.

#### 4.5 ΓΟΝΙΔΙΑ tRNA<sup>Trp</sup>, tRNA<sup>Ala</sup>, tRNA<sup>Glu</sup> & ΠΑΡΑΚΕΙΜΕΝΕΣ ΠΕΡΙΟΧΕΣ

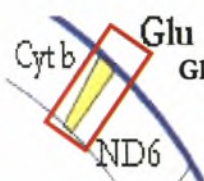
Όσον αφορά τα γονίδια tRNA<sup>Trp</sup> και tRNA<sup>Ala</sup> καθώς και το τμήμα του γονιδίου της ND2 υπομονάδας του συμπλόκου I της αναπνευστικής αλυσίδας στην παρούσα εργασία δεν ανιχνεύτηκε κανένας πολυμορφισμός. Επιπλέον εξετάστηκε το γονίδιο tRNA<sup>Glu</sup> και τμήματα των παρακείμενων γονιδίων της ND6 υπομονάδας του συμπλόκου I της αναπνευστικής αλυσίδας και του κυτοχρώματος b όπου επίσης δεν εντοπίστηκε κάποιος πολυμορφισμός.



**Trp:5512-5579**

**Ala:5587-5655**

**Εικόνα 34:** Τμήμα του mtDNA. Με το πλαίσιο κόκκινου χρώματος φαίνονται τα άκρα των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση των γονιδίων tRNA<sup>Trp</sup> και tRNA<sup>Ala</sup>. Στα συγκεκριμένα γονίδια δεν βρέθηκε καμία μετάλλαξη στην παρούσα εργασία.



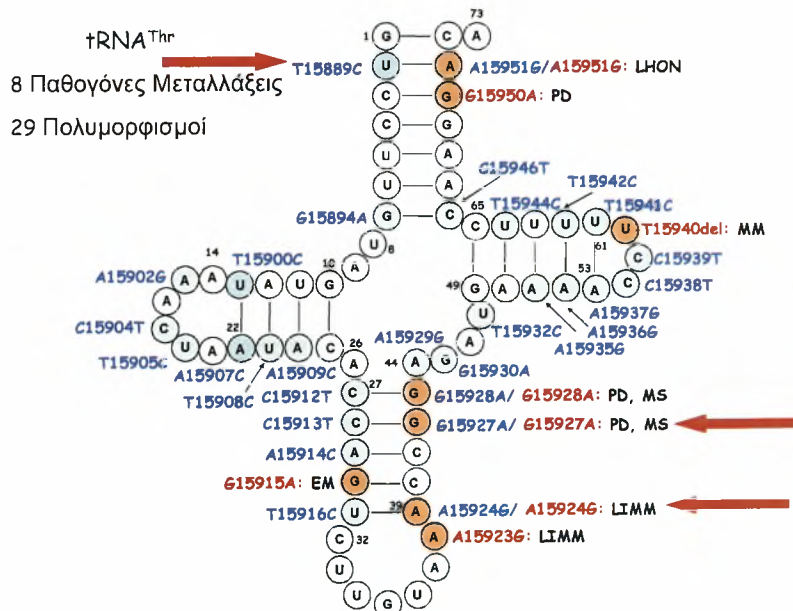
**Glu:14674-14742**

**Εικόνα 35:** Με το πλαίσιο κόκκινου χρώματος φαίνονται τα άκρα των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση του γονιδίου tRNA<sup>Glu</sup>. Στα συγκεκριμένο γονίδιο δεν βρέθηκε καμία μετάλλαξη στην παρούσα εργασία.

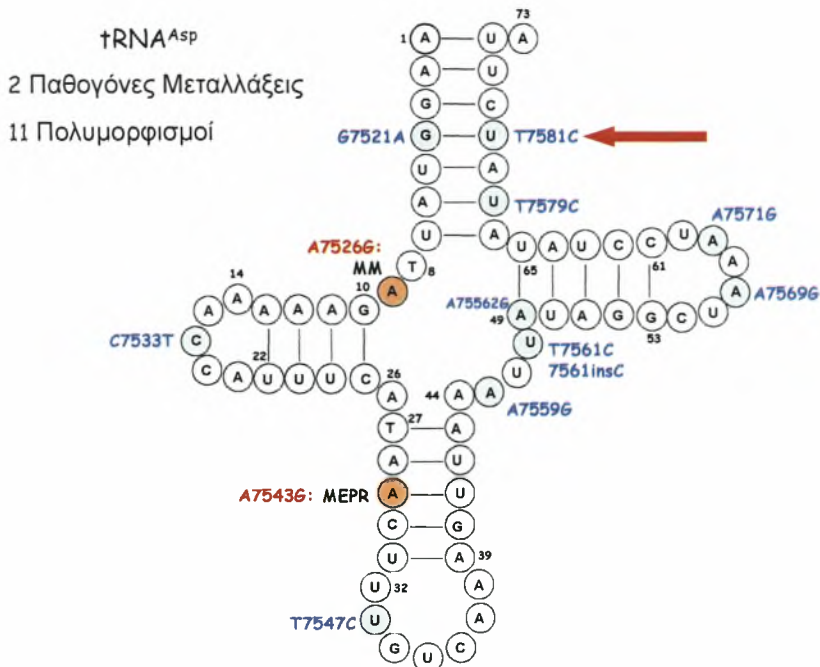
## 4.6 ΣΥΝΟΨΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

**ΠΙΝΑΚΑΣ 11:** Συγκεντρωτικός πίνακας με τις 7 μεταλλάξεις που εντοπίστηκαν στα 40 φυσιολογικά άτομα που μελετήθηκαν. Αναφέρεται οι αριθμός των ατόμων που εμφάνισαν τη μετάλλαξη, οι θέσεις των μεταλλάξεων στο tRNA καθώς και οι απλοομάδες (haplogroups) στις οποίες έχουν βρεθεί οι συγκεκριμένες μεταλλάξεις.

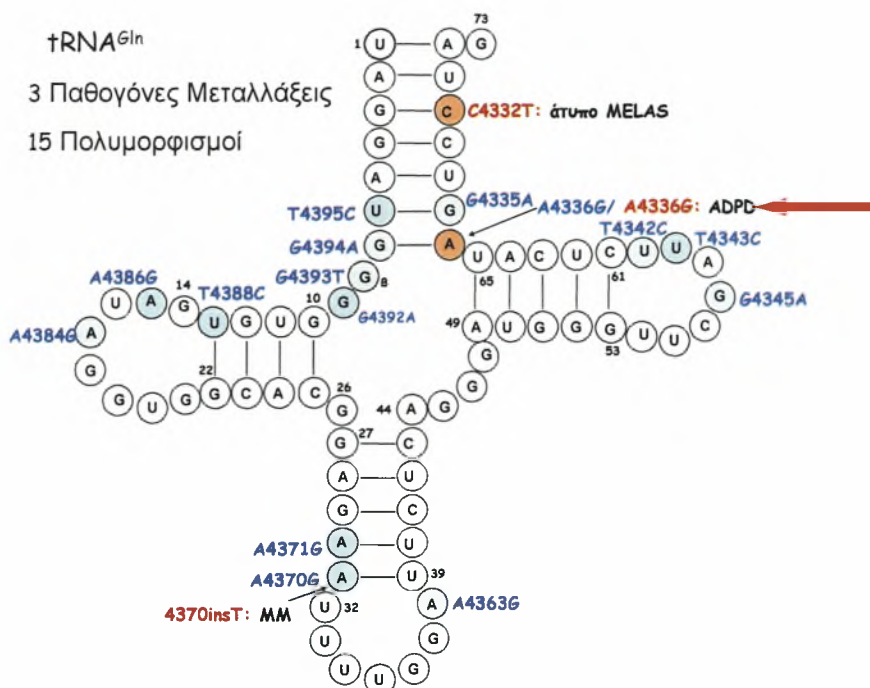
Γονίδιο	Νουκλεοτιδική αλλαγή	Αποτέλεσμα αλλαγής	Αριθμός ατόμων	Θέση στο tRNA	Αριθμός νουκλεοτιδ στο tRNA	Haplogroup
tRNA <sup>Thr</sup>	A15924G	μη κωδικοποιούσα	2	Βραχίονας Αντικωδικονίου	39	T
tRNA <sup>Thr</sup>	G15927A	μη κωδικοποιούσα	1	Βραχίονας Αντικωδικονίου	42	T
tRNA <sup>Thr</sup>	T15889A	μη κωδικοποιούσα	4	Βραχίονα υποδοχής	2	-
tRNA <sup>Asp</sup>	T7581C	μη κωδικοποιούσα	1	Βραχίονα υποδοχής	63	-
tRNA <sup>Gln</sup>	T4336C	μη κωδικοποιούσα	1	Βραχίονα υποδοχής	8	-
tRNA <sup>Tyr</sup>	C5839T	μη κωδικοποιούσα	1	Θηλιά ΤψC	14	-
MT-CO2	G7598A	A-T	1	-	12	E



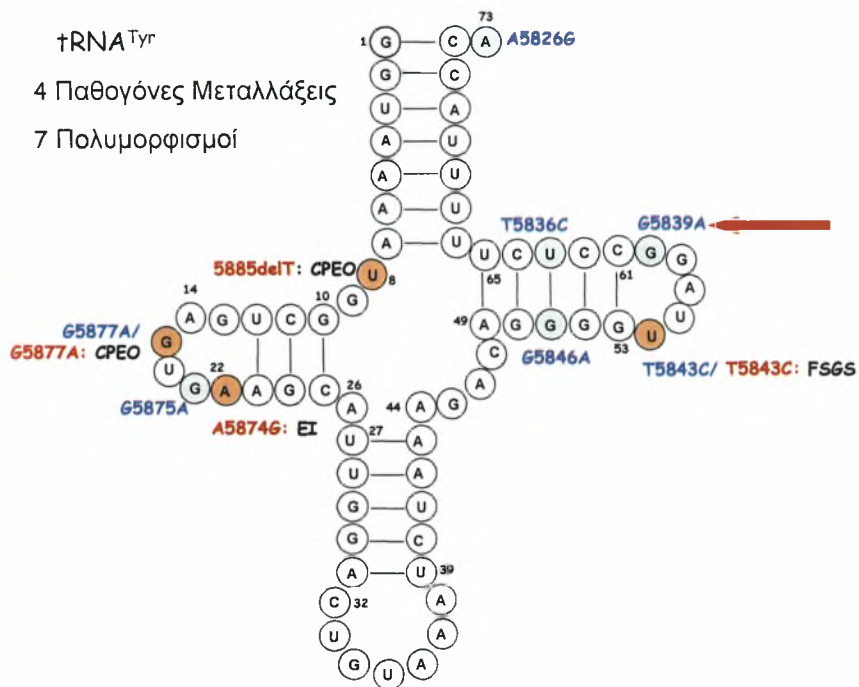
**Εικόνα 36:** Μεταλλάξεις στο γονίδιο tRNA<sup>Thr</sup> όπως συγκεντρώθηκαν από τη διεθνή βιβλιογραφία και καταγράφηκαν στις βάσεις δεδομένων του *mitomap*. Οι παθογόνες μεταλλάξεις απεικονίζονται με κόκκινο και οι πολυμορφισμοί με μπλε. Τα κόκκινα βέλη δείχνουν τη θέση των μεταλλάξεων που εντοπίστηκαν στην παρούσα εργασία.



**Εικόνα 37:** Μεταλλάξεις στο γονίδιο  $tRNA^{Asp}$  όπως συγκεντρώθηκαν από τη διεθνή βιβλιογραφία και καταγράφηκαν στις βάσεις δεδομένων του *mitomap*. Οι παθογόνες μεταλλάξεις απεικονίζονται με κόκκινο και οι πολυμορφισμοί με μπλε. Το κόκκινο βέλος δείχνει τη θέση της μετάλλαξης που εντοπίστηκε στην παρούσα εργασία.

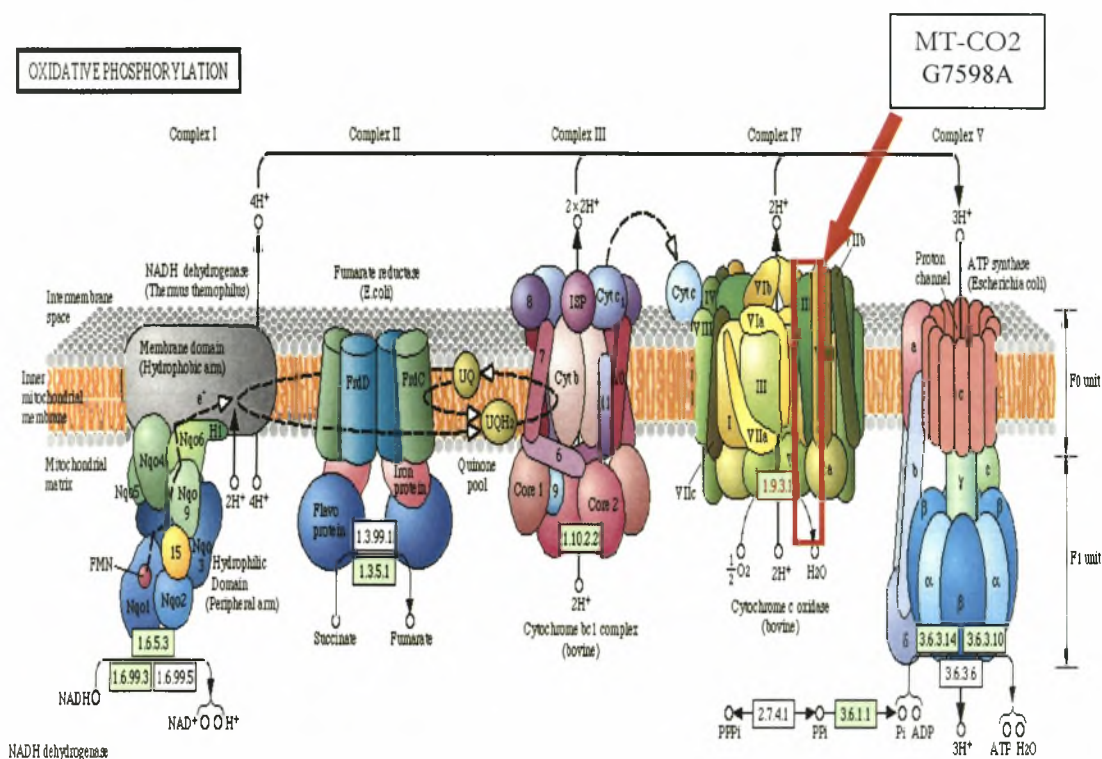


**Εικόνα 38:** Μεταλλάξεις στο γονίδιο  $tRNA^{Gln}$  όπως συγκεντρώθηκαν από τη διεθνή βιβλιογραφία και καταγράφηκαν στις βάσεις δεδομένων του *mitomap*. Οι παθογόνες μεταλλάξεις απεικονίζονται με κόκκινο και οι πολυμορφισμοί με μπλε. Το κόκκινο βέλος δείχνει τη θέση της μετάλλαξης που εντοπίστηκε στην παρούσα εργασία.



**Εικόνα 39:** Μεταλλάξεις στο γονίδιο *tRNA<sup>Tyr</sup>* όπως συγκεντρώθηκαν από τη διεθνή βιβλιογραφία και καταγράφηκαν στις βάσεις δεδομένων του *mitomap*. Οι παθογόνες μεταλλάξεις απεικονίζονται με κόκκινο και οι πολυμορφισμοί με μπλε. Το κόκκινο βέλος δείχνει τη θέση της μετάλλαξης που εντοπίστηκε στην παρούσα εργασία.





**Εικόνα 40:** Στην εικόνα που φαίνεται η οξειδωτική φωσφορυλίωση και τα σύμπλοκα που συμμετέχουν σ' αυτή. Με κόκκινο πλαίσιο η υπομονάδα II της οξειδάσης του κυτοχρώματος c στο σύμπλοκο IV όπου εντοπίστηκε η μετάλλαξη G7598A.

**ΠΙΝΑΚΑΣ 12:** Φυσιολογικά άτομα στα οποία εντοπιστήκαν πάνω από 1 μεταλλάξεις στην παρούσα εργασία.

A/A	ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ						
	tRNA <sup>Thr</sup> A15924G	tRNA <sup>Thr</sup> G15927A	tRNA <sup>Thr</sup> T15889A	tRNA <sup>Gln</sup> T4336C	tRNA <sup>Tyr</sup> C5839T	MT-CO2 G7598A	tRNA <sup>Asp</sup> T7581C
5.9			✓				✓
9.9	✓					✓	
12.4				✓	✓		



**ΠΙΝΑΚΑΣ 13:** Συγκεντρωτικός πίνακας μεταλλάξεων σε φυσιολογικά άτομα από την περιοχή της Θεσσαλίας.

A/A	ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΣ	ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΣΕ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΑ ΑΤΟΜΑ	ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ ΠΟΥ ΜΕΛΕΤΗΘΗΚΑΝ ΣΤΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ	ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ ΠΟΥ ΑΝΑΦΕΡΕΤΑΙ ΣΤΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ
1	tRNA <sup>Leu(UUR)</sup> T3290C	1/143 (0,7%)	-	-
2	tRNA <sup>Gln</sup> T4336C	1/40 (2,5%)	ALZHEIMER 1/50 (2,0%)	-ALZHEIMER <sup>1</sup> -PARKINSON <sup>1</sup> -ΑΠΩΛΕΙΑ ΑΚΟΗΣ <sup>2</sup> -ΗΜΙΚΡΑΝΙΑ <sup>2</sup>
3*	tRNA <sup>Tyr</sup> C5839T	1/67 (1,5%)		
4	tRNA <sup>Asp</sup> G7521A	1/63 (1,6%)	-	-
5	tRNA <sup>Asp</sup> T7581C	1/63 (1,6%)	-	-
6*	tRNA <sup>Lys</sup> A8308G	2/143 (1,4%)		
7*	tRNA <sup>Gly</sup> A10032G	1/30 (3,3%)		
8	tRNA <sup>His</sup> G12164A	1/143 (0,7%)	-	-
9	tRNA <sup>His</sup> T12189C	1/143 (0,7%)	-	-
10	tRNA <sup>Ser(AGY)</sup> A12234G	1/143 (0,7%)	-	-
11	tRNA <sup>Leu(CUN)</sup> T12285C	1/143 (0,7%)	-	-
12	tRNA <sup>Leu(CUN)</sup> A12308G	24/143 (16,8%)	1.ΑΣΘΜΑ 7/24 (29%) 2. ΔΙΑΒΗΤΗΣ 10/62 (16,1%)	-ΧΡΟΝΙΑ ΠΡΟΟΔΕΥΤΙΚΗ ΕΞΩ ΟΦΘΑΛΜΟΠΛΗΓΙΑ <sup>3</sup> -ΕΓΚΕΦΑΛΙΚΟ ΕΠΕΙΣΟΔΙΟ <sup>4</sup>
13	tRNA <sup>Thr</sup> 15889A	4/67 (6,0%)	-	-
14	tRNA <sup>Thr</sup> A15924G	2/67 (3,0%)	1.ALZHEIMER 2/50 (4%) 2. ΣΤΡΑΒΙΣΜΟΣ 1/30 (3,3%)	-ΘΑΝΑΤΗΦΟΡΟΣ ΒΡΕΦΙΚΗ ΜΥΟΠΑΘΕΙΑ <sup>5</sup>
15	tRNA <sup>Thr</sup> G15927A	3/67 (4,5%)	-	-PARKINSON <sup>6</sup> -ΣΚΛΗΡΥΝΣΗ ΚΑΤΑ ΠΛΑΚΑΣ <sup>7</sup>
16	tRNA <sup>Thr</sup> G15928A	4/67 (6,0%)	1.ΑΣΘΜΑ 2/30 (6,7%) 2. ALZHEIMER 2/50 (4%)	-PARKINSON <sup>8</sup> -ΣΚΛΗΡΥΝΣΗ ΚΑΤΑ ΠΛΑΚΑΣ <sup>9</sup>
17	D-loop ins574CCC	1/30 (3,3%)	-	-
18	12S rRNA G709A	2/30 (6,7%)	ΑΣΘΜΑ 6/30 (20%)	-
19	12S rRNA ins715G	1/30 (3,3%)	-	-
20	12S rRNA T721C	1/30 (3,3%)	-	-
21	12S rRNA A750G	1/30 (3,3%)	ΑΣΘΜΑ 15/30 (50%)	-
22	16S rRNA 3158insT	1/143 (0,7%)	-	-
23	16S rRNA A3213G	2/143 (1,4%)	-	-
24	ND1 T3394G	2/143 (1,4%)	-	-
25	NC7 G8251A	3/143 (2,1%)	1.ALZHEIMER 3/50 (6%) 2. ΔΙΑΒΗΤΗΣ 1/62 (16%)	-
26	NC7 8270-8278del	1/143 (0,7%)	-	-
27	NC7 8277-8285del	3/143 (2,1%)	-	-
28	NC7 G8292A	2/143 (1,4%)	-	-
29	NC7 8290-8307 ins	1/143 (0,7%)	-	-
30	CO2 G7598A	1/63 (1,6%)	-	-
31	ND3 A10097G	2/30 (6,7%)	-	-

Με αστερίσκο (\*) οι μεταλλάξεις που αναφέρονται για πρώτη φορά.

Με κόκκινο χρώμα στον πίνακα 13 εμφανίζονται οι πολυμορφισμοί που ανιχνεύθηκαν στην παρούσα εργασία (δείγμα 40 φυσιολογικών ατόμων από την περιοχή της Θεσσαλίας).

### **Βιβλιογραφία Πίνακα 13**

- <sup>1</sup>Wallace, D.C., Shoffner, J.M., Brown, M.D., Torroni, A., Lott, M.T., Cabell, M., Mitochondrial DNA mutations associated with Alzheimer's and Parkinson's disease, *American Journal of Human Genetics*, 1992, 51:A30.
- <sup>2</sup>Finnila, S., Autere, J., Lehtovirta, M., Hartikainen, P., Mannermaa, A., Soininen, H., Majamaa, K., Increased risk of sensorineural hearing loss and migraine in patients with a rare mitochondrial DNA variant 4336A>G in tRNAGln, *Journal of Medical Genetics*, 2001, 38:400-405.
- <sup>3</sup>van den Ouweland, J.M., Bruining, G.J., Lindhout, D., Wit, J.M., Veldhuyzen, B.F., Maassen, J.A., Mutations in mitochondrial tRNA genes: non-linkage with syndromes of Wolfram and chronic progressive external ophthalmopelgia, *Nucleic Acids Research*, 1992, 20:679-682.
- <sup>4</sup>Pulkes, T., Sweeney, M.G., Hanna, M.G., Increased risk of stroke in patients with the A12308G polymorphism in mitochondria, *Lancet*, 2000, 356:2068-2069.
- <sup>5</sup>Brown, M.D., Torroni, A., Shoffner, J.M., Wallace, D.C., Mitochondrial tRNAThr mutations and lethal infantile mitochondrial myopathy, *American Journal of Human Genetics*, 1992, 51:446-447.
- <sup>6</sup>Mayr-Wohlfart, U., Rodel, G., Henneberg, A., Mitochondrial tRNA(Gln) and tRNA(Thr) gene variants in Parkinson's disease, *European Journal of Medical Research*, 1997, 2:111-113.
- <sup>7</sup>Wang, X., Lu, J., Zhu, Y., Yang, A., Yang, L., Li, R., Chen, B., Qian, Y., Tang, X., Wang, J., Zhang, X., Guan, M.X., Mitochondrial tRNAThr G15927A mutation may modulate the phenotypic manifestation of ototoxic 12S rRNA A1555G mutation in four Chinese families, *Pharmacogenetics and Genomics*, 2008, 18:1059-1070.
- <sup>8</sup>Mayr-Wohlfart, U., Rodel, G., Henneberg, A., Mitochondrial tRNA(Gln) and tRNA(Thr) gene variants in Parkinson's disease, *European Journal of Medical Research*, 1997, 2:111-113.
- <sup>9</sup>Mayr-Wohlfart, U., Paulus, C., Henneberg, A., Rodel, G., Mitochondrial DNA mutations in multiple sclerosis patients with severe optic involvement, *Acta Neurologica Scandinavica*, 1996, 94:167-171.

## 5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα εργασία, όπου μελετήθηκαν τα 13 από τα 22 tRNA γονίδια 40 φυσιολογικών ατόμων (χωρίς κλινικά συμπτώματα), εντοπίστηκε με τη χρήση μοριακών τεχνικών ένας αξιοσημείωτος αριθμός μεταλλάξεων. Καθώς οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν δεν ενίσχυαν επακριβώς τα γονίδια των tRNA, αλλά ενίσχυαν και τμήματα των παρακείμενων γονιδίων τους, ανιχνεύθηκαν αλλαγές και στα παρακείμενα γονίδια. Συγκεκριμένα, εντοπίστηκαν 7 σημειακές μεταλλάξεις από τις οποίες οι 6 αφορούν γονίδια tRNA, ενώ μια το γονίδιο της υπομονάδας II της οξειδάσης του κυτοχρώματος c (MT-CO2).

Αναλυτικότερα, στο γονίδιο **tRNA<sup>Thr</sup>** ανιχνεύτηκαν 3 ήδη ταυτοποιημένοι πολυμορφισμοί. Οι δύο εντοπίζονται στο βραχίονα του αντικωδικονίου και ο ένας στη θηλιά της διυδροουρακίλης (DHU). Είναι οι μεταλλάξεις **A15924G** (σε 2 άτομα), **G15927A** (σε 1 άτομο) και **T15889A** (σε 3 άτομα).

Η μετάλλαξη **tRNA<sup>Thr</sup> A15924G** εμφανίζεται στο 3% (2/67) του πληθυσμού της Θεσσαλίας. Εντοπίζεται στο τελευταίο ζεύγος βάσεων του στελέχους του αντικωδικονίου που βρίσκεται παρακείμενα με τη θηλιά του αντικωδικονίου (Εικόνα 36). Αναφέρεται ως παθογόνος μετάλλαξη και έχει συνδεθεί με τη θανατηφόρο βρεφική μυοπάθεια (LIMM). Ωστόσο, η συγκεκριμένη μετάλλαξη δεν προκαλεί απαραίτητα τη νόσο αφού σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε φυσιολογικούς Καυκάσιους βρέθηκε στο 11% (11/103) του πληθυσμού (Brown et al., 1992). Έχει επίσης ταυτοποιηθεί σε ένα περιστατικό εγκεφαλομυοπάθειας σε ένα βρέφος 10 μηνών σε συνδυασμό με την μετάλλαξη **tRNA<sup>Asn</sup> T5693C**.

Η αλλαγή στο **tRNA<sup>Thr</sup> G15927A** εντοπίστηκε σε ποσοστό 4,5% (3/67) του δείγματος, η θέση όπου εντοπίζεται στο tRNA είναι στον βραχίονα του αντικωδικονίου. Πρόκειται για έναν πολυμορφισμό που αναφέρεται και ως παθογόνος μετάλλαξη με πιθανή συσχέτιση με την ασθένεια της πολλαπλής σκλήρυνσης και τη νόσο Parkinson (Mayr-Wohlfart et al., 1996, 1997). Επιπλέον, όταν συγκληρονομείται με την μετάλλαξη στο **12S rRNA A1555G** αποτελεί παράγοντα κινδύνου για εμφάνιση κώφωσης σύμφωνα με έρευνα που έγινε σε άτομα στην Κίνα που έφεραν το συγκεκριμένο συνδυασμό μεταλλάξεων (Wang et al., 2008). Αξίζει επίσης να σημειωθεί ότι η συγκεκριμένη μετάλλαξη έχει ανιχνευθεί και

σε ένα πλήθος διαφορετικών ασθενειών όπως διαβήτη (Thomas et al.,1996), χρόνια προοδευτική έξω οφθαλμοπληγία (CPEO) (Hattori et al.,1994) και υπερτροφική καρδιομυοπάθεια (Obayashi et al.,1992).

Η μετάλλαξη **tRNA<sup>Thr</sup> T15889A** είναι αυτή που απαντάται πιο συχνά στον πληθυσμό της Θεσσαλίας, σε ποσοστό 6% (4/67) του πληθυσμού (**Πίνακας 13**). Βρίσκεται στον βραχίονα υποδοχής του μορίου tRNA. Η συγκεκριμένη αλλαγή έχει ανιχνευθεί και σε ασθενείς με καρκίνο των ωοθηκών (Liu et al., 2001). Ωστόσο, λόγω του υψηλού ποσοστού με το οποίο συναντάται στο φυσιολογικό πληθυσμό και του γεγονότος ότι δεν αποδεικνύεται καμία αιτιολογική συσχέτιση με την συγκεκριμένη ασθένεια αναφέρεται ως πολυμορφισμός και όχι ως παθογόνος μετάλλαξη στη βάση δεδομένων του mitomap.

Στο γονίδιο **tRNA<sup>Gln</sup>** εντοπίστηκε η μετάλλαξη **T4336C** σε συχνότητα 2,5% (1/40) στο φυσιολογικό πληθυσμό. Η θέση της εντοπίζεται στο βραχίονα υποδοχής του tRNA. Αναφέρεται και ως παθογόνος μετάλλαξη με πιθανή συσχέτιση με τις νόσους Alzheimer και Parkinson (Wallace et al.,1992) Έχει βρεθεί στο 5% των ασθενών με Alzheimer σύμφωνα με κάποιες μελέτες (Hutchin et al., 1995, Brown et al.,1996). Σε κάποιες άλλες μελέτες το ποσοστό της συγκεκριμένης μετάλλαξης σε άτομα που πάσχουν από τις δύο αυτές νευροεκφυλιστικές ασθένειες είναι ανάλογο με το ποσοστό που απαντάται και στο γενικό πληθυσμό και δεν αποδεικνύεται κάποια συσχέτιση ( Leroy and Norby, 1994, Mayr-Wohlfart et al., 2004). Σε κάθε περίπτωση είναι δύσκολο να εκτιμηθεί ο ρόλος των μιτοχονδριακών μεταλλάξεων στις ασθένειες αυτές για τις οποίες η παθοφυσιολογία δεν είναι πλήρως γνωστή. Η ίδια μετάλλαξη έχει ανιχνευθεί σε άτομα που παρουσίασαν ημικρανίες αλλά και απώλεια ακοής (Finnila et al., 2001).

Στο γονίδιο **tRNA<sup>Asp</sup>** εντοπίστηκε η μετάλλαξη **T7581C** στο 1,6% (1/63) του δείγματος που εξετάστηκε. Η θέση της συγκεκριμένης αλλαγής στο tRNA εντοπίζεται στον βραχίονα υποδοχής και συγκεκριμένα δίπλα στη θηλιά TψC. Αναφέρεται στις βάσεις δεδομένων για το μιτοχόνδριο (mitomap) ως κοινός πολυμορφισμός και δεν έχει σχετισθεί με κάποιο κλινικό φαινόμενο.

Στο γονίδιο **tRNA<sup>Tyr</sup>** ταυτοποιήθηκε η μετάλλαξη **C5839T** σε ποσοστό 1,5% (1/67) του πληθυσμού. Η συγκεκριμένη αλλαγή η οποία εντοπίζεται στη θηλιά TψC αναφέρεται για πρώτη φορά (δεν υπάρχει καμία καταχώρηση στις σχετικές βάσεις δεδομένων πολυμορφισμών - μεταλλάξεων για το μιτοχονδριακό DNA). Στην ίδια περιοχή του γονιδίου **tRNA<sup>Tyr</sup>** έχουν ανιχνευθεί 3 ακόμη μεταλλάξεις από τις οποίες

μόνο η μία έχει χαρακτηριστεί παθογόνος και έχει συσχετιστεί με δυσλειτουργία στη νεφρική λειτουργία ( ασθένεια FSGS: Είδος νεφρίτιδας με πρόβλημα εστιασμένο σε τμήμα των νεφρικών σπειραμάτων) (Εικόνα 39).

Επιπλέον, σε παρακείμενη περιοχή του γονιδίου tRNA<sup>Asp</sup> και συγκεκριμένα στο **MT-CO2**, στο γονίδιο που κωδικοποιεί την υπομονάδα II του κυτοχρώματος c (σύμπλοκο IV της αναπνευστικής αλυσίδας) ταυτοποιήθηκε στο 1,6% (1/63) του πληθυσμού ο πολυμορφισμός **G7598A**. Η συγκεκριμένη αλλαγή κωδικοποιεί την αλλαγή ενός αμινοξέος από Αλανίνη (A) σε Θρεονίνη (T). Η αλλαγή αυτή του πέμπτου αμινοξέος της πρωτεΐνης δεν επηρεάζει τη δομή της και τη λειτουργικότητά της. Δεν επιδρά επομένως στη δομή του συμπλόκου (IV) και κατ' επέκταση στη λειτουργία της αναπνευστικής αλυσίδας αφού η συγκεκριμένη αλλαγή θεωρείται κοινός πολυμορφισμός και δεν έχει αποδειχθεί οποιαδήποτε συσχέτισή της με παθολογικές καταστάσεις.

Επιπλέον, κρίνεται σκόπιμο να εξετασθεί εκτός από την παρουσία των μεμονωμένων μεταλλάξεων, η συγκληρονόμηση δύο ή περισσότερων μεταλλάξεων στο ίδιο άτομο. Η πληροφορία αυτή παρέχει πληροφορίες χρήσιμες για τις φυλογενετικές και εξελικτικές μελέτες, τη δημιουργία απλότυπων και απλοομάδων. Εκτός όμως από αυτές τις πληροφορίες είναι πιθανό να αποτελεί και την απάντηση στο ερώτημα πότε μια μετάλλαξη είναι παθογόνος, αφού όπως αναφέρθηκε και παραπάνω έχουν βρεθεί συνδυασμοί μεταλλάξεων που συμβάλλουν στην εκδήλωση ενός κλινικού φαινότυπου (Wang et al., 2008).

Με βάση τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας (**Πίνακας 12**) παρατηρούμε ότι μόνο το 7,5% (3/40) του δείγματος παρουσιάζει το φαινόμενο συγκληρονόμησης δύο ή περισσότερων μεταλλάξεων. Συγκεκριμένα, σε ένα άτομο συγκληρονομούνται οι μεταλλάξεις **tRNA<sup>Thr</sup> T15889A** και **tRNA<sup>Asp</sup> T7581C**, σε ένα άτομο οι μεταλλάξεις **tRNA<sup>Thr</sup> A15924G** και **MT-CO2 G7598A** και σε ένα άτομο οι μεταλλάξεις **tRNA<sup>Tyr</sup> C5839T** και **tRNA<sup>Gln</sup> T4336C**.

Χρήσιμο είναι επίσης να διερευνηθεί η συχνότητα εμφάνισης συγκεκριμένων μεταλλάξεων στο φυσιολογικό πληθυσμό σε σχέση με τη συχνότητα των ίδιων μεταλλάξεων σε παθολογικές καταστάσεις του ίδιου πληθυσμού. Αυτό θα βοηθούσε ώστε να εντοπισθούν μεταλλάξεις που εμφανίζονται σε σημαντικά υψηλότερο ποσοστό σε ασθένειες, και να μελετηθεί ο μηχανισμός με τον οποίο εκφράζεται η παθογένεια σε κάθε περίπτωση.



Στον **Πίνακα 13** αναφέρονται όλοι οι πολυμορφισμοί που εντοπίστηκαν σε φυσιολογικά άτομα της περιοχής της Θεσσαλίας καθώς και η παρουσία των ίδιων πολυμορφισμών σε διάφορες ασθένειες που μελετήθηκαν από το εργαστήριο Γενετικής, Εξελικτικής & Συγκριτικής Βιολογίας του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και σε ασθένειες που αναφέρονται στη βιβλιογραφία ([www.mitomap.org](http://www.mitomap.org)). Με βάση τα δεδομένα αυτά, παρατηρούμε κάποιες μεταλλάξεις να είναι πιο πολύ πιο συχνές στα δείγματα των ασθενών σε σχέση με τα φυσιολογικά δείγματα.

Συγκεκριμένα, η μετάλλαξη στο **tRNA<sup>Leu</sup> A12308G** βρέθηκε στα φυσιολογικά άτομα σε ένα ποσοστό περίπου 16,8% ενώ στους ασθενείς με άσθμα ανέρχεται σε 29% του πληθυσμού που εξετάστηκε.

Η μετάλλαξη στο **12S ριβοσωμικό RNA G709A** ανιχνεύθηκε στο 6,66% των φυσιολογικών ατόμων ενώ η ίδια μετάλλαξη εμφανίζεται σε ένα ποσοστό 20% των ατόμων που έχουν άσθμα.

Επιπλέον, ο πολυμορφισμός στο **12S rRNA A750G** εμφανίζεται σε ποσοστό 3,33% των φυσιολογικών ατόμων και στο 50% των ατόμων με άσθμα.

Είναι σαφές ότι τα ποσοστά στις παραπάνω περιπτώσεις είναι σημαντικά υψηλότερα στην περίπτωση των ασθενών σε σύγκριση με το δείγμα του φυσιολογικού πληθυσμού που εξετάστηκε και γι' αυτό οι συγκεκριμένες μεταλλάξεις χρήζουν περαιτέρω διερεύνησης ώστε να επιβεβαιωθεί συσχέτισή τους με το άσθμα αλλά και ο μηχανισμός πρόκλησης δυσλειτουργίας στην αναπνευστική λειτουργία.

Με βάση τα παραπάνω μπορούν να εξαχθούν κάποια χρήσιμα **συμπεράσματα** για την ύπαρξη πολυμορφισμών στο μιτοχονδριακό DNA του φυσιολογικού πληθυσμού.

**I)** το ποσοστό συγκληρονόμησης πολυμορφισμών βρίσκεται σε χαμηλά επίπεδα, 7,5% στην παρούσα εργασία. Επομένως, στο φυσιολογικό πληθυσμό έχουμε συνήθως μεμονωμένες αλλαγές σε συγκεκριμένα γονίδια.

**II)** σε κάποιες ασθένειες συγκεκριμένοι πολυμορφισμοί εμφανίζονται σε σημαντικά υψηλότερο ποσοστό σε σχέση με τον φυσιολογικό πληθυσμό.

Συνοψίζοντας, και με βάση τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας, η παρουσία μιας μετάλλαξης στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα δεν αποτελεί τις περισσότερες φορές το αποκλειστικό αίτιο της μιτοχονδριακής δυσλειτουργίας. Η εκδήλωση ενός συγκεκριμένου κλινικού φαινότυπου εξαρτάται από το ποσοστό της ετεροπλασμίας, την εξάρτηση του ιστού ή οργάνου από τη διαδικασία της



οξειδωτικής φωσφορυλίωσης αλλά και από την ταυτόχρονη παρουσία συνδυασμών μεταλλάξεων μιτοχονδριακού αλλά και πυρηνικού DNA.

Σε κάποιες περιπτώσεις για να εκδηλωθεί δυσλειτουργία απαιτείται όλα τα μόρια να είναι μεταλλαγμένα (ομοπλασμία) ενώ σε άλλες, και ένα μικρό ποσοστό μεταλλαγμένων μορίων μπορεί να προκαλέσει νόσο. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η κληρονομική οπτική νευροπάθεια (LHON -Leber's Hereditary Optic Neuropathy) στην οποία συμβάλλουν τρεις μεταλλάξεις και εκδηλώνεται όταν υπάρχει ομοπλασμία (Brown et al., 1992).

Εντούτοις, φαίνεται ότι η επιλογή που ασκείται στη μιτοχονδριακή DNA αλληλουχία όσον αφορά δομικά γονίδια, όπως αυτά των tRNA, του 12S και του 16S rRNA, δεν είναι ουδέτερη. Καθίσταται πιο δύσκολο να εκτιμηθεί η βάση για την αρνητική επιλογή στη περίπτωση των μορίων tRNA από ότι στη περίπτωση των γονιδίων που κωδικοποιούν σύμπλοκα της αναπνευστικής αλυσίδας. Η αρνητική επιλογή μπορεί να βασίζεται σε αλλαγές στη συνολική σταθερότητα της δομής των tRNA, στο εύρος ή την ποιότητα των μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων της αλληλουχίας τους ή στην αλληλεπίδραση τους με αμινοάκυλο-tRNA συνθετάσες, μεταγραφικούς παράγοντες και ριβοσωμικές υπομονάδες. Παρόλα αυτά κάποιιοι πολυμορφισμοί στα γονίδια των tRNA φαίνεται να μην είναι ουδέτεροι και μπορεί να είναι δυνητικά ήπια επιβλαβείς.

Η συνέχεια της έρευνας τόσο στο φυσιολογικό πληθυσμό όσο και σε άτομα με διάφορους κλινικούς φαινότυπους κρίνεται επιβεβλημένη ώστε να υπάρξουν περισσότερα δεδομένα που θα αποσαφηνίσουν το ρόλο του μιτοχονδριακού γενετικού υλικού και των μεταλλάξεων αυτού σε διάφορες πολυπαραγοντικές ασθένειες.

## 6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Anderson, S., Bankie, A.T., Barrell, B.G., Bruijn, M.H., Coulson, A.R., Drouin, J., Eperon, I.C., Nierlich, D.P., Roe, B.A., Sanger, F., Schreier, P.H., Smith, A.J., Staden, R., Young, I.G., Sequence and organization of the human mitochondrial genome, *Nature*, 1981, 290:457-65.
- Andrews, R.M, Kubacha, I., Chinnery, P.F., Lightowlers R.N., Turnbull, D.M., Howell N., Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA, *Nat Genet*, 1999, 23:147.
- Attardi G., Animal mitochondrial DNA: an extreme example of genetic economy, *Int. Rev. Cytol.*, 1985, 93:93-145.
- Ballard J.W., Whitlock M.C., The incomplete natural history of mitochondria, *Mol*, 2004, 13:729-744.
- Bereiter-Hann J., Voth M., Dynamics of mitochondria in living cells: shape changes, dislocations, fusion, and fission of mitochondria, *Microsc. Res. Tech.*, 1994, 15; 27:198-219.
- Booker, L.M., Habermacher, G.M., Jessie, B.C., Sun, Q.C., Baumann, A.K., Amin, M., Lim, S.D., Fernandez-Golarz, C., Lyles, R. H., Brown, M.D., Marshall, F.F., Petros, J.A., North American white mitochondrial haplogroups in prostate and renal cancer, *Journal of Urology*, 2006, 175:468-472.
- Brandon, M., Baldi, P., Wallace, D.C., Mitochondrial mutations in cancer , *Oncogene*, 2006, 25:4647-4662.
- Brian F.C., Clark, The crystal structure of tRNA, *J. Biosci*, 2006, 31:453-457.
- Brown W.M., Polymorphism in mitochondrial DNA of humans as revealed by restriction endonuclease analysis, *Proc Natl Acad Sci USA*, 1980, 77:3605-3609.
- Brown, M.D., Torroni, A., Shoffner, J.M., Wallace, D.C., Mitochondrial tRNA<sup>Thr</sup> mutations and lethal infantile mitochondrial myopathy, *American Journal of Human Genetics*, 1992, 5:446-447.
- Brown, M.D., Shoffner, J.M., Kim, Y.L., Jun, A.S., Graham, B.H., Cabell, M.F., Gurley, D.S., Wallace, D.C. , Mitochondrial DNA sequence analysis of four Alzheimer's and Parkinson's disease patients, *American Journal of Human Genetics*, 1996, 61:283-289.
- Brown, M.D., Voljavec, A.S., Lott, M.T., MacDonald, I. and Wallace, D.C., Leber's hereditary optic neuropathy: a model for mitochondrial neurodegenerative diseases, *FASEB Journal*, 1992, 6:2791-2799.
- Cann, R.L., Stoneking, M., Wilson, A.C., Mitochondrial DNA and human evolution, *Nature*, 1987, 325:31-36.
- Castro, J.A., Picornell, A., Ramon, M., Mitochondrial DNA: a tool for populational genetics studies, *Int Microbiol*, 1998, 1:327-332.
- Chen, B., Sun, D., Yang, L., Zhang, C., Yang, A., Zhu, Y., Zhao, J., Chen, Y., Guan, M., Wang, X., Li, R., Tang, X., Wang, J., Tao, Z., Lu, J., Guan, M.X., Mitochondrial ND5 T12338C, tRNA(Cys) T5802C, and tRNA(Thr) G15927A variants may have a modifying role in the phenotypic manifestation of deafness-associated 12S rRNA A1555G mutation in three Han Chinese pedigrees, *American Journal of Medical Genetics.*, 2008, 146A: 1248-1258.
- Cortopassi, G.A. and Wong, A., Mitochondria in organismal aging and degeneration, *Biochim. Biophys. Acta*, 1999, 1410:183-193.

- Coskun, P.E., Beal, M.F., Wallace, D.C., Somatic mitochondrial DNA control region mutations are prevalent in Alzheimer Disease brains, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004, 101:10726-10731.
- Crimi, M., Del Bo, R., Galbiati, S., Sciacco, M., Bordoni, A., Bresolin, N., Comi, G.P., Mitochondrial A12308G polymorphism affects clinical features in patients with single mtDNA macrodeletion, *European Journal of Human Genetics*, 2003, 11:896-898.
- Coulbault, L., Herlicoviez D., Chapon, F., Read, M.H, Penniello, M.J, Reynier P., Fayet G., Lombes A., Jauzac P., Allouch, S., A novel mutation in the mitochondrial tRNA<sup>Asn</sup> gene associated with a lethal disease, *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 329:1152-4.
- Desagher S. and Martinou J-C., Mitochondria as central control point of apoptosis, *Trends in Cell Biology*, 2000, 369-377.
- DiMauro S, Schon E.A., Mitochondrial respiratory-chain diseases, *N. Engl. J. Med.*, 2003, 348:2656-68.
- Emelyanov V.V, Rickettsiaceae, rickettsia-like endosymbionts, and the origin of mitochondria, *Biosci. Rep*, 2001, 21:1–17.
- Finnila, S., Autere, J., Lehtovirta, M., Hartikainen, P., Mannermaa, A., Soinen, H., Majamaa, K., Increased risk of sensorineural hearing loss and migraine in patients with a rare mitochondrial DNA variant 4336A>G in tRNAGln, *Journal of Medical Genetics*, 2001, 38:400-405.
- Finnila, S., Hassinen, I.E., Majamaa, K., Phylogenetic analysis of mitochondrial DNA in patients with an occipital stroke. Evaluation of mutations by using sequence data on the entire coding region, *Mutation Research*, 2001, 458:31-39.
- Fischer S.G., Lerman L.S., DNA fragments differing by single base-pair substitutions are separated in denaturing gradient gels, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1983, 80:1579-1583.
- Florentz C., Sissler M., Disease- related versus polymorphic mutations in human mitochondrial tRNAs. Where is the difference?, *EMBO Rep*, 2001, 2:481-486.
- Ford E.B., Genetic polymorphism. MIT Press 1965, p17-25.
- Gonzalez et al., Mitochondrial lineage M1 traces an early human backflow to Africa., *BMC Genomics*, 2007, 8:223.
- Grasso, M., Diegoli, M., Brega, A., Campana, C., Tavazzi, L., Arbustini, E., The mitochondrial DNA mutation T12297C affects a highly conserved nucleotide of tRNA(Leu(CUN)) and is associated with dilated cardiomyopath, *European Journal of Human Genetics*, 2001, 9:311-315.
- Hattori, Y., Goto, Y., Sakuta, R., Nonaka, I., Mizuna, Y., Horai, S., Point mutations in mitochondrial tRNA genes: sequence analysis of chronic progressive external ophthalmoplegia (CPEO), *Journal of the Neurological Sciences*, 1994, 125:50-55.
- Henze, K., Martin, W., Evolutionary biology: essence of mitochondria, *Nature*, 2003, 426:127–128.
- Herrnstadt, C., Elson, J. L., Fahy, E., Preston, G., Turnbull, D. M., Anderson, C., Ghosh, S. S., Olefsky, J. M., Beal, M. F., Davis, R. E., Howell, N., Reduced-median-network analysis of complete mitochondrial DNA coding-region sequences for the major African, Asian, and European haplogroups, *American Journal of Human Genetics*, 2002, 70: 1152-1171.
- Hofmann, S., Jaksch, M., Bezold, R., Mertens, S., Aholt, S., Paprotta, A., Gerbitz, K.D., Population genetics and disease susceptibility: characterization of central European haplogroups by mtDNA gene mutations, correlation with D loop variants and association with disease, *Human Molecular Genetics*, 1997, 6:1835-1846.

- Houshmand, M., Larsson, N.G., Holme, E., Oldfors, A., Tulinius, M., Hersen, O., Automatic sequencing of mitochondrial tRNA genes in patients with mitochondrial encephalomyopathy, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1994, 1226: 49-55.
- Howell, N., Elson, J.L., Chinnery, P.F., Turnbull, D.M., mtDNA mutations and common neurodegenerative disorders, *Trends in Genetics*, 2005, 21:583-586.
- Huang, K., Manton K.G., The role of oxidative damage in mitochondria during aging: A review, *Frontiers in Bioscience*, 2004, 9:1100-1117.
- Hutchin, T., Cortopassi, G., A mitochondrial DNA clone is associated with increased risk for Alzheimer disease, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1995, 92:6892-6895.
- Hutchison, A.C., Newbold, E.J., Potter, S.S., Edgell, H.M., Maternal inheritance of mammalian mitochondrial DNA, *Nature*, 251:536-538.
- Ingman, M., Kaessmann, H., Pääbo, S., Gyllenstein, U., Mitochondrial genome variation and the origin of modern humans. *Nature*, 2000, 408:708-713.
- Jacobs, H.T., Hutchin, T.P., Kappi, T., Gillies, G., Minkkinen, K., Walker, J., Thompson, K., Rovio, A. T., Carella, M., Melchionda, S., Zelante, L., Gasparini, P., Pyykko, I., Shah, Z.H., Zeviani, M., Mueller, R.F., Mitochondrial DNA mutations in patients with postlingual, nonsyndromic hearing impairment, *European Journal of Human Genetics*, 2005, 13:26.
- Jeronimo, C., Nomoto, S., Caballero, O. L., Usadel, H., Henrique, R., Varzim, G., Oliveira, J., Lopes, C., Fliss, M. S., Sidransky, D., Mitochondrial mutations in early stage prostate cancer and bodily fluids , *Oncogene*, 2001, 20:5195-5198.
- Jukes T. H. and Osawa S., The genetic code in mitochondria and chloroplasts, *Experientia*, 1990, 46:1117-1126.
- Khusnutdinova, E., Gilyazova, I., Ruiz-Pesini, E., Derbeneva, O., Khusainova, R., Khidiyatova, I., Magzhanov, R., Wallace, D.C., A mitochondrial etiology of neurodegenerative diseases: evidence from Parkinson's disease *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2008, 1147:1-20.
- Konings, A., Van Camp, G., Goethals, A., Van Eyken, E., Vandeveld, A., Ben Azza, J., Peeters, N., Wuyts, W., Smeets, H., Van Laer, L., "Mutation analysis of mitochondrial DNA 12SrRNA and tRNASer(UCN) genes in non-syndromic hearing loss patients, *Mitochondrion*, 2008, 8:377-382.
- Kosel, S., Lucking, C.B., Egensperger, R., Mehraein, P., Graeber, M.B., Mitochondrial NADH dehydrogenase and CYP2D6 genotypes in Lewy-body parkinsonism, *Journal of Neuroscience Research*, 1996, 44:174-183.
- Lauber, J., Marsac, C., Kadenbach, B., Seibel, P., Mutations in mitochondrial tRNA genes: a frequent cause of neuromuscular diseases, *Nucleic Acids Research*, 1991, 19:1393-1397.
- Leroy Am., D., Norby, S., A new human mtDNA polymorphism: tRNAGln/4336(T-C), *Clinical Genetics*, 1994, 45:109-110.
- Lopez-Garcia P., Moreira D., Metabolic symbiosis at the origin of eukaryotes, *Trends Biochem Sci.*, 1999, 24:88-93.
- Lorenc, A., Bryk, J., Golik, P., Kupryjanczyk, J., Ostrowski, J., Pronicki, M., Semczuk, A., Szolkowska, M., Bartnik, E., "Homoplasmic MELAS A3243G mtDNA mutation in a colon cancer sample ", *Mitochondrion*, 2003, 3:119-124.
- Liu, V.W., Shi, H.H., Cheung, A.N., Chiu, P.M., Leung, T.W., Nagley, P., Wong, L.C., Ngan, H.Y., High incidence of somatic mitochondrial DNA mutations in human ovarian carcinomas, *Cancer Research*, 2001, 61:5998-6001.
- Margulis L., *Origin of Eukaryotic Cells*, 1970, Yale University Press.



- Margulis L., *Early Life*, 1982, Science Books International.
- Markoulatos P., Samara V., Marinakis J., Kaparos C., Fountoukidou P., Krikelis V., Spirou N., Vamvakopoulos N., *Polymerase Chain Reaction in Iology Diagnose*, *Hellenic Virology* 1996, 1:83-85.
- Martin W., Muller M., *The hydrogen hypothesis for the first eukaryote*, *Nature*, 1998, 392:37-41.
- Marzuki, S., Noer, A. S., Letrit, P., Thyagarajan, D., Kapsa, R., Utthanaphol, P., Byrne, E., *Normal variants of human mitochondrial DNA and translation products: the building of a reference data base*, *Human Genetics*, 1991, 88:139-145.
- Mayr-Wohlfart, U., Paulus, C., Henneberg, A., Rodel, G., *Mitochondrial DNA mutations in multiple sclerosis patients with severe optic involvement*, *Acta Neurologica Scandinavica*, 1996, 94:167-171.
- Mayr-Wohlfart, U., Rodel, G., Henneberg, A., *Mitochondrial tRNA(Gln) and tRNA(Thr) gene variants in Parkinson's disease*, *European Journal of Medical Research*, 1997, 2:111-113.
- Merante, F., Tein, I., Benson, L., Robinson, B.H., *Maternally inherited hypertrophic cardiomyopathy due to a novel T-to-C transition at nucleotide 9997 in the mitochondrial tRNA(glycine) gene*, *American Journal of Human Genetics*, 1994, 55:437-446.
- Mitchell P, Moyle J., *Chemiosmotic hypothesis of oxidative phosphorylation*, *Nature*, 1967, 213:137-9.
- Mitchell P., *Proton current flow in mitochondrial systems*, *Nature*, 1967, 25: 1327-1328.
- Moraes, C. T., Ciacci, F., Bonilla, E., Jansen, C., Hirano, M., Rao, N., Lovelace, R. E., Rowland, L. P., Schon, E. A., DiMauro, S., *Two novel pathogenic mitochondrial DNA mutations affecting organelle number and protein synthesis. Is the tRNA<sup>Leu</sup>(UUR) gene an etiologic hot spot?*, *Journal of Clinical Investigation*, 1993, 92:2906-2915.
- Mullis K.B, Faloona F.A., *Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction*, *Methods Enzymol*, 1987, 155:335-350.
- Noer, A.S., Sudoya, H., Lertrit, P., Thyagarajan, D., Utthanaphol, P., Kapsa, R., Byrne, E., Marzuki, S., *A tRNA<sup>Lys</sup> mutation in the mtDNA is the causal genetic lesion underlying myoclonic epilepsy and ragged-red fiber (MERRF) syndrome*, *American Journal of Human Genetics*, 1991, 49:715-722.
- Normanly, J., and Abelson, J., *Transfer RNA identity*, *Annu. Rev. Biochem.* 1989, 58:1029-1049.
- Obayashi, T., Hattori, K., Sugiyama, S., Tanaka, M., Tanaka, T., Itoyama, S., Deguchi, H., Kawamura, K., Koga, Y., Toshima, H., Takeda, N., Nagano, M., Ito, T., Ozawa, T., *Point mutations in mitochondrial DNA in patients with hypertrophic cardiomyopathy*, *American Heart Journal*, 1992, 124:1263-1269.
- Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T., *Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms*, *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, 86:2766-2770.
- Ozawa, T., Tanaka, M., Sugiyama, S., Ino, H., Ohno, K., Hattori, K., Ohbayashi, T., Ito, T., Deguchi, H., Kawamura, K., Nakane, Y., Hashiba, K., *Patients with idiopathic cardiomyopathy belong to the same mitochondrial DNA gene family of Parkinson's disease and mitochondrial encephalomyopathy*, *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1991, 177:518-525.



- Pulkes, T., Sweeney, M.G., Hanna, M.G., Increased risk of stroke in patients with the A12308G polymorphism in mitochondria, *Lancet*, 2000, 356:2068-2069.
- Pyle, A., Foltynie, T., Tiangyou, W., Lambert, C., Keers, S. M., Allcock, L. M., Davison, J., Lewis, S. J., Perry, R. H., Barker, R., Burn, D. J., Chinnery, P.F., Mitochondrial DNA haplogroup cluster UKJT reduces the risk of PD, *Annals of Neurology*, 2005, 57:564-567.
- Raff R.A., Mahler H.R., The non symbiotic origin of mitochondria, *Science*, 1972, 177:575-82.
- 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., Mitochondrial variants in schizophrenia, bipolar disorder, and major depressive disorder, *PLoS One*, 2009, 4:4913.
- Ruppert, V., Nolte, D., Aschenbrenner, T., Pankuweit, S., Funck, R., Maisch, B., Novel point mutations in the mitochondrial DNA detected in patients with dilated cardiomyopathy by screening the whole mitochondrial genome, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2004, 318:535-543.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T.; Hrsg. *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*, 1989, 2nd Edition. Cold Spring Harbour Laboratory Press, NY.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR, DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1977, 74:5463-5467.
- Schaefer AM, Taylor RW, Turnbull DM, Chinnery PF, The epidemiology of mitochondrial disorders – past, present and future, *Biochim Biophys Acta*, 2004, 1659:115-120.
- Shoffner, J.M., Brown, M.D., Torroni, A., Lott, M.T., Cabell, M.R., Mirra, S.S., Beal, M.F., Yang, C., Gearing, M., Salvo, R., Watts, R.L., Juncos, J.L., Hansen, L.A., Crain, B.J., Fayad, M., Reckord, C.L., Wallace, D.C., Mitochondrial DNA variants observed in Alzheimer disease and Parkinson disease patients, *Genomics*, 1993, 17:171-184.
- Simon, D.K., Mayeux, R., Marder, K., Kowall, N.W., Beal, M.F., Johns, D.R., Mitochondrial DNA mutations in complex I and tRNA genes in Parkinson's disease, *Neurology*, 1999, 54:703-709.
- Sternberg, D., Chatzoglou, E., Laforet, P., Fayet, G., Jardel, C., Blondy, P., Fardeau, M., Amselem, S., Eymard, B., Lombes, A., Mitochondrial DNA transfer RNA gene sequence variations in patients with mitochondrial disorders, *Brain*, 2001, 124:984-994.
- Sternberg, D., Danan, C., Lombes, A., Laforet, P., Girodon, E., Goossens, M., Amselem, S., 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*, 1998, 7:33-42.
- Tan, E. K., Khajavi, M., Thornby, J. I., Nagamitsu, S., Jankovic, J., Ashizawa, T., Variability and validity of polymorphism association studies in Parkinson's disease, *Neurology*, 2000, 55:533-538.
- Thomas, A.W., Edwards, A., Sherratt, E.J., Majid, A., Gagg, J., Alcolado, J.C. Molecular scanning of candidate mitochondrial tRNA genes in type 2 (non-insulin dependent) diabetes mellitus, *Journal of Medical Genetics*, 1996, 33: 253-256.
- Torroni A, Achilli A, Macaulay V, Richards M, Bandelt HJ, Harvesting the fruit of the human mtDNA tree, *Trends Genet*, 2006, 22:339-45.

- van den Ouweland, J. M., Bruining, G. J., Lindhout, D., Wit, J. M., Veldhuyzen, B. F., Maassen, J. A., Mutations in mitochondrial tRNA genes: non-linkage with syndromes of Wolfram and chronic progressive external ophthalmoplegia, *Nucleic Acids Research*, 1992, 20: 679-682.
- Varani, G., McClain W., The G x U wobble base pair. A fundamental building block of RNA structure crucial to RNA function in diverse biological systems, *EMBO Rep*, 2000, 1:18-23.
- Wallace, D.C., Shoffner, J.M., Brown, M.D., Torroni, A., Lott, M.T., Cabell, M., Mitochondrial DNA mutations associated with Alzheimer's and Parkinson's disease, *American Journal of Human Genetics*, 1992, 51: A30.
- Wang, X., Lu, J., Zhu, Y., Yang, A., Yang, L., Li, R., Chen, B., Qian, Y., Tang, X., Wang, J., Zhang, X., Guan, M. X., Mitochondrial tRNAThr G15927A mutation may modulate the phenotypic manifestation of ototoxic 12S rRNA A1555G mutation in four Chinese families, *Pharmacogenetics and Genomics*, 2008, 18:1059-1070.
- Weisblum, B., Back to Camelot: Defining the specific role of tRNA in protein synthesis, *Trends Biochem. Sci.*, 1999, 24:247-250.
- Yam, J. J., Lunetta, K. L., van Orsouw, N. J., Moore, F. D., Jr., Mutter, G. L., Vijg, J., Dahia, P. L., Eng, C., Somatic mitochondrial DNA (mtDNA) mutations in papillary thyroid carcinomas and differential mtDNA sequence variants in cases with thyroid tumors, *Oncogene*, 2000, 19:2060-2066.
- Yoon, K. L., Aprille, J. R., Ernst, S. G., Mitochondrial tRNAThr mutation in fatal infantile respiratory enzyme deficiency, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1991, 176:1112-1115.
- Zifa E., Giannouli S., Theotokis P., Stamatis C., Mamuris Z., Stathopoulos C., Mitochondrial tRNA mutations: Clinical and functional perturbations, *RNA Biology*, 2007, 4:1-30.