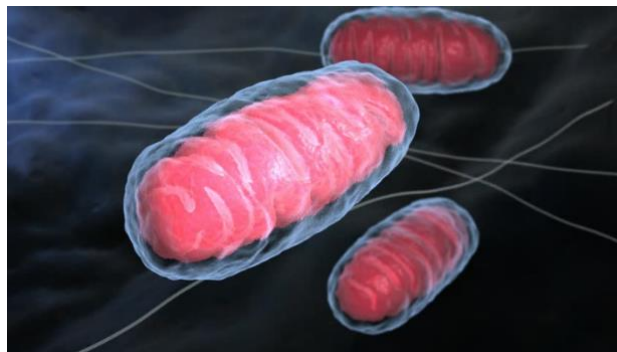




ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

*Μελέτη του μιτοχονδριακού γονιδιώματος σε ασθενείς με Χρόνια
Αναπνευστική Πνευμονοπάθεια*

*Study of the mitochondrial genome in patients with Chronic Obstructive
Pulmonary Disease*



Γεώργιος Κακλίδης

Λάρισα 2021

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ

Ζίφα Αιμιλία, Επίκουρος Καθηγήτρια Βιολογίας-
Νευροβιολογίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Ζίφα Αιμιλία, Επίκουρος Καθηγήτρια Βιολογίας-
Νευροβιολογίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Κωνσταντίνος Σταμάτης, Ε.ΔΙ.Π, Τμήμα Βιοχημείας και
Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Δανιήλ Ζωή, Καθηγήτρια Πνευμονολογίας, Τμήμα Ιατρικής,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα πτυχιακή εργασία πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια του Προπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Οι επιβλέποντες καθηγητές ήταν οι κ. Αιμιλία Ζίφα (Επίκουρος Καθηγήτρια του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας) και ο κ. Κωνσταντίνος Σταμάτης στους οποίους και θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου για την ανάθεση του θέματος, την βοήθειά τους, το ενδιαφέρον του αλλά και το χρόνο που διέθεσαν για τη διεκπεραίωσή της. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κ. Ζωή Δανιήλ (Αναπληρώτρια Καθηγήτρια του τμήματος Ιατρικής Π.Θ.) για τη συνεργασία και τη βοήθειά της στην διεκπεραίωση της εργασίας αυτής.

Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω θερμά την οικογένειά μου και τους φίλους μου για τη στήριξη και τη βοήθειά τους όλα αυτά τα χρόνια των σπουδών.

Περιεχόμενα

1. ΠΕΡΙΛΗΨΗ	5
1.2 ABSTRACT	6
2. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	7
2.1 ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΚΑΙ ΘΕΡΑΠΕΙΑ	11
2.2 ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑ - ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΗ ΑΛΥΣΙΔΑ	12
2.3 ΔΡΑΣΤΙΚΕΣ ΜΟΡΦΕΣ ΟΞΥΓΟΝΟΥ (ROS)	13
2.4 ΧΑΠ ΚΑΙ ΔΡΑΣΤΙΚΕΣ ΜΟΡΦΕΣ ΟΞΥΓΟΝΟΥ	18
2.5 ΔΡΑΣΤΙΚΕΣ ΜΟΡΦΕΣ ΟΞΥΓΟΝΟΥ ΚΑΙ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΕΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ tRNA	19
3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ	22
3.1 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΟΛΙΚΟΥ DNA ΑΠΟ ΟΛΙΚΟ ΑΙΜΑ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΧΡΟΝΙΑ ΑΠΟΦΡΑΚΤΙΚΗ ΠΝΕΥΜΟΝΟΠΑΘΕΙΑ (ΧΑΠ)	22
3.2 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΑΠΟΜΟΝΩΜΕΝΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ DNA ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΠΗΚΤΗΣ ΑΓΑΡΟΖΗΣ (1%)	24
3.3 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ - PCR (Polymerase Chain Reaction)	26
3.3.1 Η ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ	26
3.4 ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΣ ΜΟΝΟΚΛΩΝΗΣ ΔΙΑΜΟΡΦΩΣΗΣ - Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP)	29
3.5 ΧΡΩΣΗ ΠΗΚΤΩΜΑΤΟΣ ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΙΟΥ ΜΕ ΔΙΑΛΥΜΑ ΝΙΤΡΙΚΟΥ ΑΡΓΥΡΟΥ	32
3.6 ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ PCR	33
3.7 ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗ DNA	33
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	35
4.1 ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΤΟΥ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΤΗΣ ΛΕΥΚΙΝΗΣ ΜΕ ΤΗΝ ΜΕΘΟΔΟ ΤΗΣ ΑΛΥΣΙΔΩΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)	35
4.2 ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΜΕ ΤΗΝ ΜΕΘΟΔΟ SSCP	36
4.3 ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ	38
5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ	41
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	46

1. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια (ΧΑΠ) είναι μία ασθένεια η οποία χαρακτηρίζεται από φλεγμονώδεις μεταβολές στο παρέγχυμα των πνευμόνων και στους αεραγωγούς ως απόκριση σε αέρια ή επιβλαβή σωματίδια. Η φλεγμονή οφείλεται στην παραμονή ηωσινόφιλων κυττάρων στους ιστούς των πνευμόνων αλλά και σε άλλους παράγοντες όπως είναι οι περιβαλλοντικοί και ο καπνός του τσιγάρου. Τα μέσα που χρησιμοποιούνται για την αντιμετώπιση της νόσου είναι η συμβουλή διακοπής του καπνίσματος, η διατροφή πλούσια σε βιταμίνες C,E και A, ενώ σε τελικά στάδια καθίσταται απαραίτητη η χορήγηση βρογχοδιασταλτικών φαρμάκων για την ανακούφιση από την δύσπνοια. Μελέτες οι οποίες σχετίζονται με διάφορα νοσήματα των πνευμόνων έχουν δείξει ότι μεταλλάξεις στο μιτοχονδριακό DNA (mt-DNA), παίζουν κάποιο ρόλο στην εμφάνισή τους. Μία εξ' αυτών είναι η ΧΑΠ και το κύριο όργανο προσβολής είναι ο πνεύμονας. Οι αντιδραστικές μορφές οξυγόνου (ROS), οι οποίες παράγονται από την αναπνευστική αλυσίδα είναι ικανές να προκαλέσουν μεταλλάξεις στο μιτοχονδριακό DNA και να συμβάλλουν στην πρόκληση ή επιδείνωση της ΧΑΠ. Στην παρούσα έρευνα διερευνήθηκε η ύπαρξη μεταλλάξεων σε ένα μιτοχονδριακό γονίδιο tRNA από δείγματα αίματος ασθενών με Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια. Εν συνεχεία, αφού ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο απομόνωσης του DNA, ενισχύθηκαν τα επιθυμητά τμήματα με χρήση της PCR και τα αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν με ηλεκτροφόρηση, την μέθοδο SSCP και τέλος με αλληλούχιση. Βρέθηκαν 2 σημειακές μεταλλάξεις, οι T3197C και C3212T, σε τμήμα του 16s rRNA ως αποτέλεσμα της έρευνας. Γίνεται κατανοητό ότι οι μεταλλάξεις σε μιτοχονδριακά γονίδια tRNA μπορούν να επηρεάσουν την πρόκληση ή μη εμφάνισης ΧΑΠ. Με την περαιτέρω μελέτη των μιτοχονδριακών γονιδίων τα επόμενα χρόνια, θα είναι ικανή η επιστημονική κοινότητα να βγάλει περισσότερα και πιο ακριβή συμπεράσματα σχετικά με την παθογένεια ασθενειών όπως η ΧΑΠ.

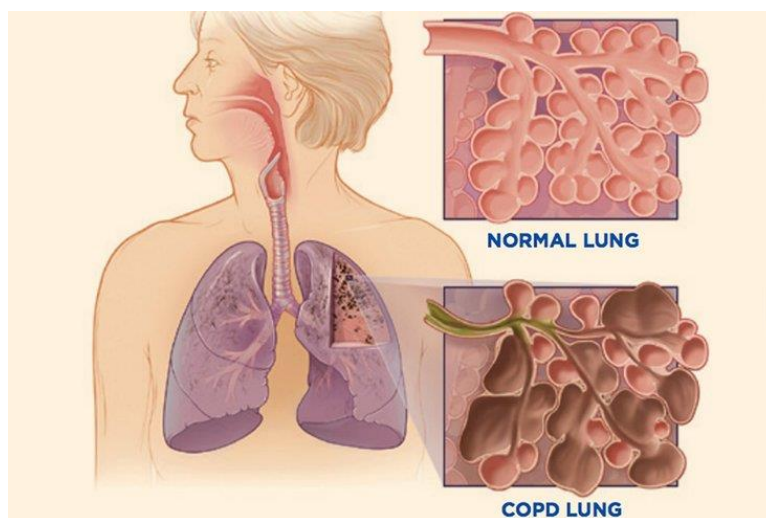
1.2 ABSTRACT

Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) is a disease characterized by inflammatory changes in the parenchyma of the lungs and airways in response to gas or harmful particles. Inflammation is due to the presence of eosinophilic cells in the tissues of the lungs but also to other factors such as environmental and cigarette smoke. The means used to treat the disease are smoking cessation advice, a diet rich in vitamins C, E and A, while in the final stages it becomes necessary to administer bronchodilators to relieve shortness of breath. Studies related to various lung diseases have shown that mutations in mitochondrial DNA (mt-DNA) play a role in their occurrence. One of them is COPD and the main organ of infection is the lung. Reactive oxygen species (ROS) produced by the respiratory chain are capable of causing mutations in mitochondrial DNA and contributing to the induction or worsening of COPD. In the present study, the presence of mutations in a mitochondrial tRNA gene from blood samples of patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease was investigated. Then, after the DNA isolation protocol was followed, the desired sections were amplified using PCR and the results were confirmed by electrophoresis, the SSCP method and finally by sequencing. Two point mutations, T3197C and C3212T, were found in part of the 16s rRNA as a result of the investigation. It is understood that mutations in mitochondrial tRNA genes may or may not cause COPD. By further studying mitochondrial genes in the coming years, the scientific community will be able to draw more and more accurate conclusions about the pathogenesis of diseases such as COPD.

2. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια γνωστή και ως ΧΑΠ αποτελεί την τέταρτη πιο συχνή αιτία θανάτου παγκοσμίως, ενώ η παθοφυσιολογία της δεν είναι ακόμη πλήρως κατανοητή από τους επιστήμονες. Η ασθένεια σχετίζεται σε μεγάλο βαθμό και συνήθως προκαλείται από τον καπνό του τσιγάρου, κάτι το οποίο όμως δεν τον καθιστά την κύρια αιτία. Η ασθένεια αυτή αποτελείται από τέσσερα στάδια με αυξανόμενο βαθμό επικινδυνότητας ανά στάδιο. Στο αρχικό στάδιο (0), η πνευμονική λειτουργία χαρακτηρίζεται ως φυσιολογική με την ύπαρξη κινδύνου εμφάνισης ΧΑΠ. Αυτός ο κίνδυνος συνήθως αποδίδεται στο ιστορικό καπνίσματος που μπορεί να έχει ένας υποψήφιος ασθενής, ενώ δεν αποκλείεται να αποδοθεί σε άλλους παράγοντες συμπεριλαμβανομένης και της γενετικής προδιάθεσης εμφάνισης ΧΑΠ λόγω έλλειψης α-1-αντιθρυσίνης [10]. Ο καπνός του τσιγάρου περιέχει πολλές οξειδωτικές ουσίες με αποτέλεσμα να δημιουργεί μια ανισορροπία στη σχέση οξειδωτικών/αντιοξειδωτικών, προκαλώντας βλάβες στην πνευμονική μήτρα [17]. Τα σημάδια εξέλιξης της νόσου (βήχας, πτύελα) κατά κανόνα θεωρούνται αμελητέα από τον υποψήφιο ασθενή και για αυτό το λόγο δεν υπάρχει έγκαιρη διάγνωση. Στο επόμενο στάδιο (I), παρατηρείται περιορισμός της ροής του αέρα στους ασθενείς, συνήθως όμως δεν εκφράζεται κάποια ανησυχία στον γιατρό. Αυτή η μορφή ΧΑΠ χαρακτηρίζεται ως ήπια. Στο στάδιο II, ο ασθενής πάσχει από ήπια ΧΑΠ, δηλαδή αυξημένο περιορισμό της ροής του αέρα και δύσπνοια κυρίως κατά την άσκησή του. Σε αυτό το στάδιο της νόσου οι ασθενείς συνηθίζεται να αναφέρουν τα σημάδια στον γιατρό τους. Στο τελικό στάδιο της ΧΑΠ (III), ο ασθενής εμφανίζει προοδευτική μυϊκή αδυναμία καχεξία και η απώλεια των αναπνευστικών μυών μπορεί να επιδεινώσει περαιτέρω την ανταλλαγή αερίων του πνεύμονα συμβάλλοντας στην εξέλιξη της δύσπνοιας εμφανίζοντας σημάδια πνευμονικής ανεπάρκειας και δυσκολία σε δραστηριότητες της καθημερινής του ζωής. Σε αυτό το στάδιο, η θνησιμότητα μετά από ένα χρόνο από οξείες παροξύνσεις υπολογίζεται κατά μέσο όρο στο 50%.

Τα δύο κυριότερα συμπτώματα της ΧΑΠ είναι η υπερέκκριση βλέννας και ο περιορισμός του αέρα [2]. Ασθενείς με ΧΑΠ εμφανίζουν συμπτώματα τα οποία συμπεριλαμβάνονται στην παθολογία τριών ξεχωριστών ασθενειών. Η χρόνια βρογχίτιδα, το εμφύσημα και η αποφρακτική βρογχολίτιδα είναι οι ασθένειες αυτές, τα συμπτώματα των οποίων μπορεί να εμφανιστούν σε μικτή μορφή σε ασθενείς με Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια. Κάποια από αυτά τα συμπτώματα είναι η διεύρυνση του υποβλεννογόνου βρογχικού αδένου, η φλεγμονή, οι παροξύνσεις, η υπερτροφία των κυττάρων λείου μυός, η υπερπαραγωγή βλέννας, η καταστροφή του παρεγχύματος και η ίνωση [18].

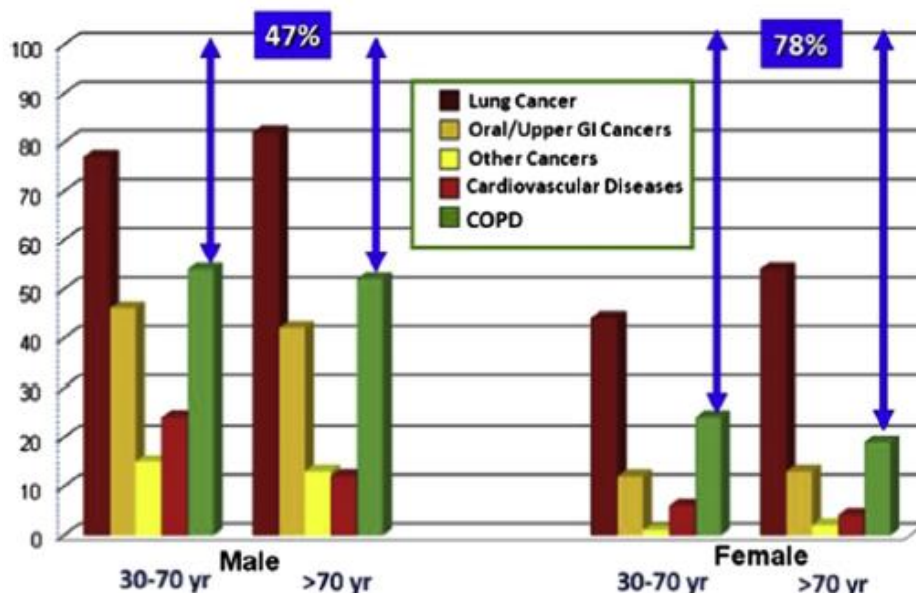


Εικόνα 1: Απεικόνιση του πνεύμονα ενός υγιούς ατόμου και ενός ασθενή με Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια [20]

Η υπερέκκριση βλέννας και η καταστροφή του πνευμονικού παρεγχύματος είναι αποτέλεσμα έκκρισης λευκοτριενίων και πρωτεϊνών από ουδετερόφιλα κατά την διάρκεια οξείων παροξύνσεων. Ο περιορισμός του αέρα οφείλεται στην ανισορροπία που παρατηρείται μεταξύ πρωτεϊνών και αντιπρωτεϊνών, το οποίο είναι αποτέλεσμα της κληρονομικής ανεπάρκειας της α -1-αντιθρυψίνης που αναστέλλει τις πρωτεϊνάσες. Παρατηρείται καταστροφή των κυψελιδικών τοιχωμάτων και σε συνδυασμό με το οξειδωτικό στρες προάγεται φλεγμονή. Η μειωμένη ελαστική επαναφορά του πνεύμονα είναι αναπόφευκτο γεγονός το οποίο συμβάλλει στην περαιτέρω δυσλειτουργία των πνευμόνων και των αεραγωγών. Οι παροξύνσεις, ένα ακόμη πολύ συχνό σύμπτωμα, είναι πλέον γνωστό πως προκαλούνται από ιογενείς λοιμώξεις ή/και από μη μολυσματικές αιτίες [18]. Ακόμη, οι παροξύνσεις μπορεί να είναι αποτέλεσμα της δράσης καθαρισμού αποπτωτικών ουδετερόφιλων κυττάρων από μακροφάγα κύτταρα αλλά και της έκκρισης προ-φλεγμονωδών κυτοκινών [14]. Κάποιοι από τους πιο διαδεδομένους ιούς που προκαλούν παροξύνσεις είναι ο ιός της γρίπης, οι ρινοϊοί και οι κορωνοϊοί. Όσον αφορά τις μη μολυσματικές αιτίες, σε αυτές περιλαμβάνονται τα αλλεργιογόνα, η εισπνοή τοξικών ουσιών, η πάχυνση της βρογχικής έκκρισης και η πνευμονική εμβολή [18].

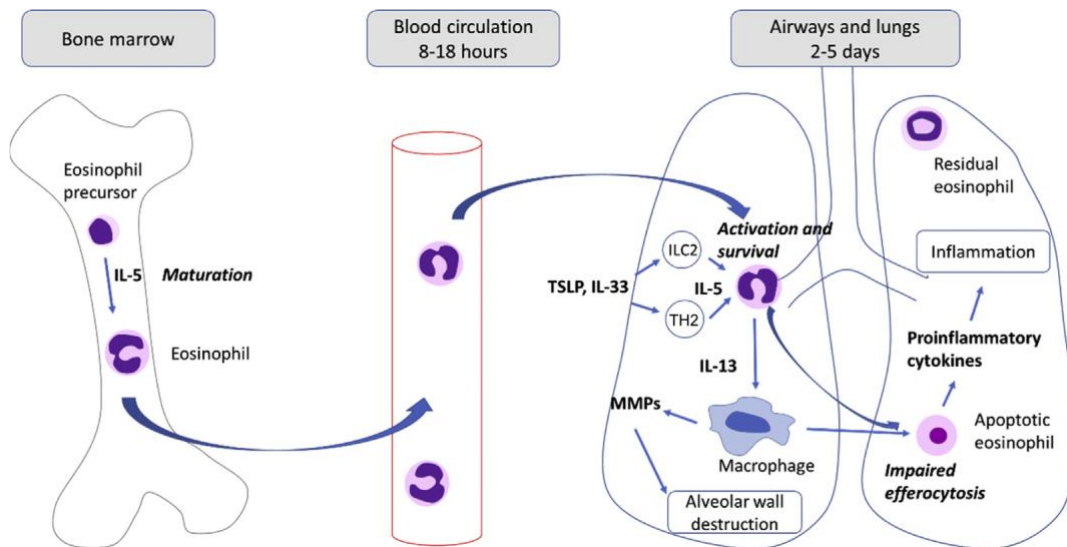
Ένας ακόμη παράγοντας που ευθύνεται για την επιδείνωση της κατάστασης των ασθενών που αναπτύσσουν τελικά φλεγμονή στο επιθήλιο των αεραγωγών είναι ο καπνός του τσιγάρου. Βάσει ερευνών, χρόνια καπνιστές που εμφάνισαν ΧΑΠ, εμφανίζουν μεγαλύτερη ανισορροπία του λόγου Οξειδωτικά /Αντιοξειδωτικά και αυτό πιστεύεται πως οφείλεται στον μεγάλο αριθμό ελεύθερων ριζών (κυρίως $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2) που περιέχει ο καπνός του τσιγάρου. Επίσης, όπως είναι αναμενόμενο, τα συμπτώματα

περιορισμού του αέρα στους ασθενείς με ΧΑΠ και μεγάλο ιστορικό καπνίσματος είναι πιο έντονα και εμφανίζονται πρόωρα σε σχέση με αυτά ασθενών δίχως αυτό το ιστορικό [6,9,16]. Μόνο ένα ποσοστό της τάξης του 15% των καπνιστών εμφανίζουν την ασθένεια, κάτι που υπογραμμίζει την ισχυρή γενετική βάση πίσω από την εκδήλωσή της, καθώς μεγάλος αριθμός καπνιστών δεν την εμφανίζουν [21].



Εικόνα 2: Ραβδόγραμμα Παγκόσμιας Θνησιμότητας που αποδίδεται στο κάπνισμα. Για ένα ποσοστό 47% νεκρών ανδρών με ΧΑΠ και ένα ποσοστό 78% νεκρών γυναικών με ΧΑΠ δεν ευθύνεται ο καπνός του τσιγάρου [21].

Η φλεγμονή που αναπτύσσεται κατά την πρόοδο της ασθένειας θεωρείται συστατικό 'κλειδί', καθώς παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην επιβάρυνση της υγείας του ασθενούς. Πολλά κύτταρα όπως είναι τα μακροφάγα, τα ουδετερόφιλα, τα ηωσινόφιλα και προφλεγμονώδεις ρυθμιστές όπως οι κυτοκίνες και οι ιντερλευκίνες (IL-13, IL-4, IL-5, IL-33) εμπλέκονται στην ανάπτυξη φλεγμονής. Σε αρκετούς ασθενείς με Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια έχει παρατηρηθεί ανάπτυξη φλεγμονής εξαιτίας ηωσινόφιλων κυττάρων, κάτι που συμβαίνει πιο συχνά σε ασθενείς με άσθμα.



Εικόνα 3: Κύκλος ζωής των ηωσινόφιλων στο μυελό των οστών, στο αίμα, στους αεραγωγούς και στους πνεύμονες [14].

Στην παραπάνω εικόνα φαίνεται η πορεία ωρίμανσης, μεταφοράς και παραμονής των ηωσινόφιλων στους ιστούς των πνευμόνων. Αρχικά, παρατηρείται ωρίμανση των πρόδρομων ηωσινόφιλων σε ώριμα ηωσινόφιλα και στη συνέχεια τα κύτταρα αυτά εισέρχονται στην κυκλοφορία του αίματος. Εκεί παραμένουν για μερικές ώρες και έπειτα μεταφέρονται στους ιστούς των πνευμόνων. Η παραμονή στους ιστούς των πνευμόνων διαρκεί μερικές μέρες και κατά την διάρκεια των ημερών αυτών ενεργοποιούνται οι μεταλλοπρωτεϊνάσες της μήτρας οι οποίες καταστρέφουν τα κυψελιδικά τοιχώματα προκαλώντας εμφύσημα. Παράλληλα, παρατηρείται αύξηση των προφλεγμονωδών κυτοκινών κατά την μετατροπή των ηωσινόφιλων σε αποπτωτικά και τελικά η φλεγμονή στους ιστούς των πνευμόνων [14].

Μία αιτία μετατροπής των ηωσινόφιλων και των βρογχικών επιθηλιακών κυττάρων σε αποπτωτικά είναι η επίδραση των ελεύθερων ριζών σε αυτά. Αυτές οι ελεύθερες ρίζες παράγονται κατά κύριο λόγο κατά την οξειδωτική φωσφορυλίωση που λαμβάνει χώρα στα μιτοχόνδρια. Συνεπώς, η περίσσεια ελεύθερων ριζών οδηγεί στην δημιουργία όλο και περισσότερων αποπτωτικών κυττάρων και τελικά στην φλεγμονή στους ιστούς των αεραγωγών [3].

2.1 ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΚΑΙ ΘΕΡΑΠΕΙΑ

Όσον αφορά τη διάγνωση των αποφρακτικών πνευμονικών διαταραχών, η αναλογία αναγκαστικού εκπνεόμενου όγκου σε 1 δευτερόλεπτο προς την αναγκαστική ζωτική ικανότητα (FEV_1 / FVC) αποτελεί έναν πολύ σημαντικό δείκτη. Ο βαθμός μείωσης της συγκεκριμένης αναλογίας είναι άμεσα συνδεδεμένος με τον βαθμό σοβαρότητας της νόσου. Κάθε ασθενής με βήχα, παραγωγή πτυέλων, δύσπνοια ή / και ιστορικό έκθεσης σε άλλους παράγοντες πρόκλησης της νόσου συνίσταται να εξετάζεται για την Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια. Τιμές μικρότερες κατά 70% από τις προβλεπόμενες στην αναλογία ' FEV_1 / FVC ' καθώς και τιμές μικρότερες κατά 80% από τις προβλεπόμενες στον FEV_1 υποδεικνύουν την ύπαρξη κινδύνου περιορισμού της ροής του αέρα και κατ' επέκταση είναι αποφρακτικής φύσης [2].

Σχετικά με την θεραπεία του ασθενή με ΧΑΠ, το πρώτο βήμα περιλαμβάνει την παροχή συμβουλών για διακοπή του καπνίσματος σε περίπτωση που ο ασθενής έχει ιστορικό καπνίσματος αλλά και την βελτίωση της διατροφής του [7]. Αυτή θα πρέπει να περιλαμβάνει αντιοξειδωτικά όπως είναι η βιταμίνη C, E και η προ-βιταμίνη A [48]. Κάποια επίσης χρήσιμα αντιοξειδωτικά θεωρούνται τα φλαβονοειδή και το λυκοπένιο, τα οποία είναι ικανά να προστατεύσουν από τα υπεροξειδία των λιπιδίων και από τη φλεγμονώδη αντίδραση που προκαλείται από τα οξειδωτικά στοιχεία του καπνού, αντίστοιχα. Επί πρόσθετα, η αναγωγή της γλουταθειόνης, καταλύει την μετατροπή του δισουλφιδίου της γλουταθειόνης (GSSG) σε γλουταθειόνη (GSH), σταθεροποιώντας με αυτό τον τρόπο το πιο σημαντικό μη ενζυματικό αντιοξειδωτικό του σώματος, δρώντας ως υδρόφιλο μόριο που προστίθεται σε άλλες λιπόφιλες τοξίνες ή απόβλητα πριν εισέλθει στη χολική απέκκριση. Σε υγιή άτομα, οι πνεύμονες προστατεύονται και από ενζυματικούς μηχανισμούς όπως είναι η δισμουτάση του υπεροξειδίου (SOD), η υπεροξειδάση (GPx) και η καταλάση (Cat) που αντιδρούν με το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) [49].

Στη συνέχεια της θεραπείας εμπλέκονται φαρμακευτικές ουσίες, κυριότερες εκ των οποίων είναι οι βρογχοδιασταλτικές. Τα βρογχοδιασταλτικά είναι ένα είδος φαρμάκου, το οποίο χαλαρώνει τους μυς των πνευμόνων και διευρύνει τους αεραγωγούς διευκολύνοντας την αναπνοή. Συνήθως η χρήση τους γίνεται με σκοπό την θεραπεία μακροχρόνιων καταστάσεων κατά τις οποίες οι αεραγωγοί γίνονται επικίνδυνα στενοί και χαρακτηρίζονται από φλεγμονή. Στην κατηγορία των βρογχοδιασταλτικών φαρμάκων συμπεριλαμβάνονται οι β_2 -αγωνιστές, τα αντιχολινεργικά φάρμακα και η θεοφυλλίνη [11].

2.2 ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑ - ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΗ ΑΛΥΣΙΔΑ

Τα μιτοχόνδρια είναι ίσως το πιο σημαντικό οργανίδιο του κυττάρου, κρίσιμο για την παραγωγή του βασικού ενεργειακού νομίσματος, του ATP. Τα μιτοχόνδρια χρησιμοποιούν την ενέργεια που παράγεται από άλλες βιολογικές διεργασίες όπως η οξείδωση διάφορων σακχάρων συμπεριλαμβανομένης και της γλυκόζης. Η παραγωγή των μορίων ATP που απαιτείται για την τροφοδοσία του οργανισμού πραγματοποιείται μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, δηλαδή τις οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις που επιτρέπουν την ροή των ηλεκτρονίων από τα NADH και FADH₂ προς το μοριακό οξυγόνο [15,23].

Η αναπνευστική αλυσίδα των μιτοχονδρίων είναι υπεύθυνη για την παραγωγή ATP και αποτελείται συνολικά από πέντε σύμπλοκα. Το **σύμπλοκο I** ή **αλλιώς σύμπλοκο NADH**, ρυθμίζει τον κυτταρικό μεταβολισμό και τροφοδοτεί με NAD⁺ την β-οξείδωση των λιπιδίων και τον κύκλο του Krebs, ανάγοντας το NADH στην μιτοχονδριακή μήτρα. Αποτελείται από 2 επιμήκεις περιοχές, αποκαλούμενες και ως 'χέρια'. Το υδρόφοβο 'χέρι' εκτείνεται μέσα στην κυτταροπλασματική μεμβράνη, ενώ το υδρόφιλο 'χέρι' εισχωρεί στην μιτοχονδριακή μήτρα. Κάθε 'χέρι' αποτελείται από 7 υπομονάδες [19,37].

Το δεύτερο κατά σειρά **σύμπλοκο II** ή **αλλιώς ηλεκτρική αφυδρογονάση** αποτελεί μέρος του κύκλου του κιτρικού οξέος καταλύοντας την οξείδωση του ηλεκτρικού οξέος σε φουμαρικό. Όσον αφορά τον ρόλο του συμπλόκου στη μιτοχονδριακή αλυσίδα, είναι το μοναδικό το οποίο δεν αντλεί πρωτόνια αλλά μετατρέπει την ουβικινόνη σε ουβικινόλη. Αποτελείται από δύο υδρόφιλες πρωτεΐνες. Μια φλαβοπρωτεΐνη (Fp) που περιέχει έναν συμπαράγοντα FAD και μια πρωτεΐνη θείου-σιδήρου (ISP) και μια περιοχή αγκύρωσης μεμβράνης στα μιτοχόνδρια που αποτελούνται από τις δύο διαμεμβρανικές πρωτεΐνες, CybL και CybS [38].

Το **σύμπλοκο III** **γνωστό και ως κυτόχρωμα bc₁**, συμβάλλει τόσο στην μεταφορά ηλεκτρονίων από την ουβικινόλη στο κυτόχρωμα c όσο και στην κατά μήκος της μιτοχονδριακής αναπνευστικής αλυσίδας μετατόπιση πρωτονίων. Το σύμπλοκο III είναι ένα συμμετρικό διμερές με 3 κύριες υπομονάδες και ακόμη 8 δευτερεύουσες. Τρεις από αυτές τις υπομονάδες είναι ενεργές καταλυτικά, με το κυτόχρωμα b να αποτελεί την μία, το κυτόχρωμα c₁ την δεύτερη και την πρωτεΐνη Rieske θείου-σιδήρου την τρίτη [35,36].

Το **σύμπλοκο IV ή αλλιώς κυτοχρωμική οξειδάση** αντλεί πρωτόνια κατά μήκος της αναπνευστικής αλυσίδας και μετατρέπει το O₂ σε H₂O. Το τελευταίο και καθοριστικό για την παραγωγή ATP σύμπλοκο είναι η συνθάση του ATP, η οποία εκμεταλλευόμενη την ροή των πρωτονίων από τον διαμεμβρανικό χώρο στη μιτοχονδριακή μήτρα, προσθέτει μια φωσφορική ομάδα (P) σε μόρια ADP παράγοντας ATP [1].

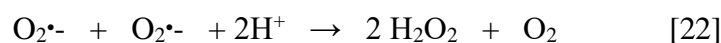
2.3 ΔΡΑΣΤΙΚΕΣ ΜΟΡΦΕΣ ΟΞΥΓΟΝΟΥ (ROS)

Μέσω της αναπνευστικής αλυσίδας παράγονται οι δραστικές μορφές οξυγόνου ή αλλιώς ROS που αποτελούν σηματοδοτικά μόρια, ενώ σε μεγαλύτερες ή σε μικρότερες συγκεντρώσεις από τις φυσιολογικές, προκαλούν βλάβες στο ίδιο το κύτταρο. Ο όρος ROS αναφέρεται σε ελεύθερες ρίζες οξυγόνου, όπως είναι οι ρίζες ανιόντων υπεροξειδίου και η ρίζα υδροξυλίου ($\cdot\text{OH}$), και σε μη ριζικά οξειδωτικά όπως είναι το O₂ και το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H₂O₂) [12]. Η πιο άφθονη μορφή ROS είναι η ρίζα ανιόντος υπεροξειδίου με υψηλή οξειδωτική ικανότητα. Ωστόσο, η πιο επιθετική οξειδωτική μορφή των ROS είναι η ρίζα του υδροξυλίου, η οποία είναι ικανή για την πρόκληση βλαβών στο DNA και έχει μικρό χρόνο ημιζωής. Η παραγωγή των ελεύθερων ριζών οξυγόνου εξυπηρετεί δύο βασικούς σκοπούς. Την βακτηριοκτόνο δράση και την ενδοκυτταρική σηματοδότηση. Η παραγωγή των ROS με βακτηριοκτόνο δράση στα φαγοκύτταρα γίνεται με τη βοήθεια του ενζύμου οξειδάση του NADPH ή αλλιώς NOX₂. Η ενεργοποίηση των φαγοκυττάρων πραγματοποιείται μέσω υποδοχέων αναγνώρισης μοτίβου (PRRs), ενώ ο ρόλος της ενεργοποιημένης οξειδάσης του NADPH είναι να μεταφέρει ηλεκτρόνια από το NADPH στο O₂ σχηματίζοντας την ρίζα του ανιόντος υπεροξειδίου του O₂ (O₂ \cdot^-). Η ρίζα αυτή μπορεί να οδηγήσει σε περίσσεια θετικού φορτίου στην μιτοχονδριακή μεμβράνη διευκολύνοντας την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c [51].

Αναλυτικά η αντίδραση μετατροπής του O₂ σε O₂ \cdot^- φαίνεται παρακάτω:

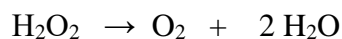
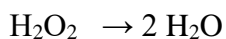


Το ανιόν υπεροξειδίου όντας ένα ασταθές μόριο, προτιμάται ενεργειακά από το κύτταρο σε μορφή υπεροξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂). Παρακάτω αναγράφεται η αντίδραση σχηματισμού του H₂O₂, η οποία καταλύεται με την βοήθεια του ενζύμου δισμουτάση του υπεροξειδίου (SOD):



Το υπεροξείδιο του υδρογόνου χρησιμοποιείται ως υπόστρωμα από πρωταρχικούς ενζυμικούς μηχανισμούς αποτοξικοποίησης από ROS, όπως είναι η μετατροπή του υπεροξειδίου του υδρογόνου σε H₂O από υπεροξειδάσες των τοξινών (Prx) και από υπεροξειδάσες της γλουταθειόνης (Gpx), αλλά και η μετατροπή της ίδιας ένωσης σε O₂ και H₂O με την βοήθεια της καταλάσης (Cat) [17].

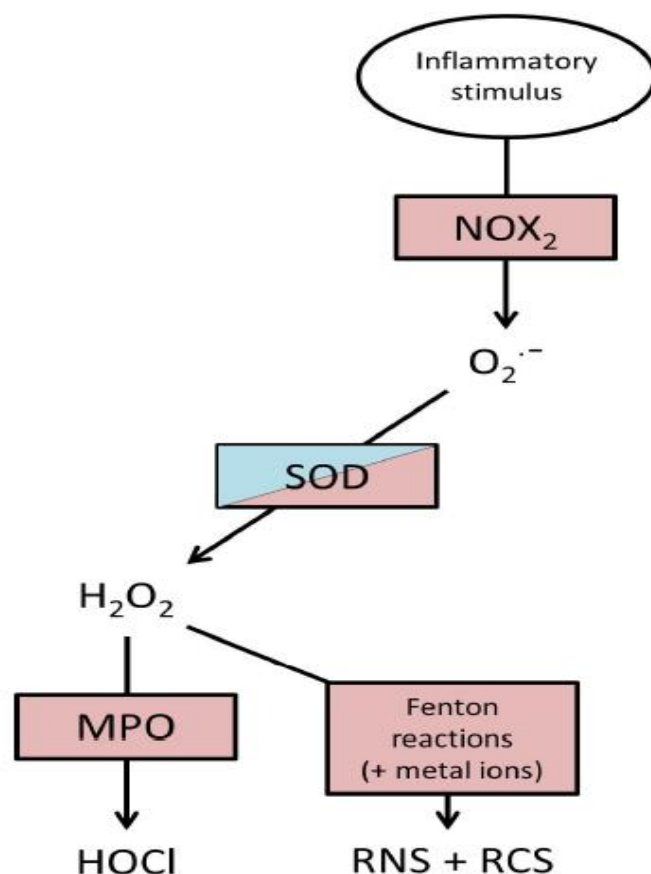
Οι αντιδράσεις είναι οι εξής:



Ακόμη, παρουσία υπεροξειδίου του υδρογόνου καταλύεται η αντίδραση μετατροπής του σε υποχλωριούχο οξύ (HOCl) με την βοήθεια του ενζύμου μυελοπεροξειδάση (MPO), κάτι το οποίο οδηγεί σε παραγωγή πιο τοξικών ελεύθερων ριζών όπως την ρίζα υδροξυλίου ($\bullet\text{OH}$) [52].

Αναλυτικά η αντίδραση είναι η εξής:





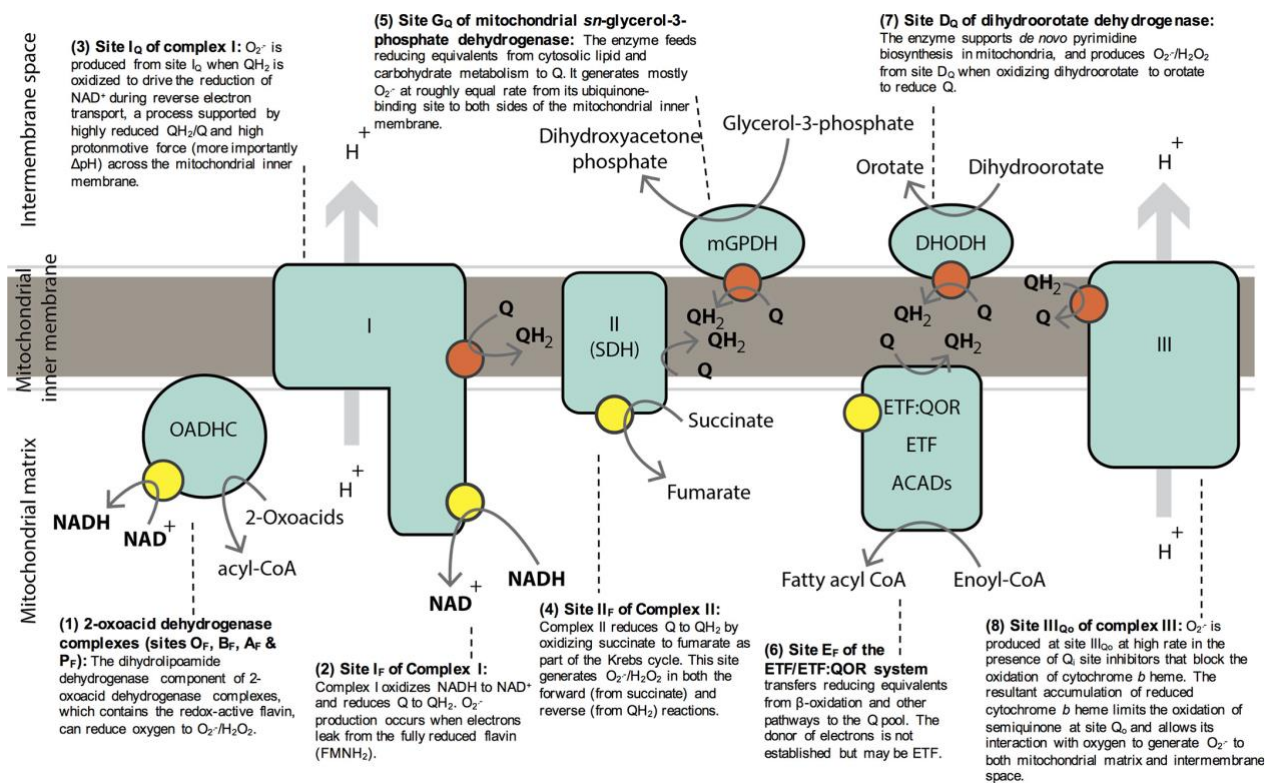
Εικόνα 5: Μοριακή παραγωγή των αντιδραστικών μορφών. Τα κόκκινα κουτιά αντιπροσωπεύουν προ-φλεγμονώδη ένζυμα, ενώ τα μπλε αντιφλεγμονώδη. Η SOD μπορεί να χαρακτηριστεί και από τα δύο χρώματα καθώς τόσο το υπόστρωμά της, όσο και το προϊόν της, μπορούν να προκαλέσουν βλάβη. NOX₂ Οξειδάση του NADPH; SOD δισμουτάση υπεροξειδίου, MPO μυελοπεροξειδάση, η οποία καταλύει την μετατροπή του H₂O₂ σε HOCl [22,24].

Η παραγωγή των ROS δεν περιορίζεται στη βακτηριοκτόνο δράση, αλλά παίζει σημαντικό ρόλο και στην ενδοκυτταρική σηματοδότηση. Η ενδοκυτταρική απελευθέρωση των ROS μπορεί να επηρεάσει την μεταγραφή και την κυτταρική ομοιόσταση [25]. Ενδοκυτταρικά, η απελευθέρωση ROS και ειδικότερα του H₂O₂, είναι ικανή να απενεργοποιήσει την πρωτεϊνική φωσφατάση τυροσίνης (PTP), ρυθμίζοντας με αυτό τον τρόπο την φωσφορυλίωση της τυροσίνης και κατ' επέκταση την σηματοδότηση με μεσολάβηση κινάσης [26]. Αυτό είναι πιθανό να σχετίζεται με την ΧΑΠ καθώς ο τομέας PTP που έχει δράση φωσφατάσης συμβάλλει στην ενεργοποίηση και μετανάστευση των ουδετερόφιλων [27].

Οι ROS είναι ικανές να προκαλέσουν βλάβες τόσο στο RNA, όσο στο πυρηνικό αλλά και μιτοχονδριακό DNA (mtDNA). Τα μόρια RNA είναι πιο επιρρεπή σε βλάβη, καθώς αποτελούνται από μία μόνο αλυσίδα (μονόκλωνα), δεν προστατεύονται από ιστόνες, σε αντίθεση με το DNA, και απουσιάζουν επιδιορθωτικοί μηχανισμοί [17]. Το

ίδιο ισχύει και για το μιτοχονδριακό DNA, όπου η ένταση της εκάστοτε βλάβης από ROS σχετίζεται με την προέλευση των δραστικών μορφών οξυγόνου [28].

Κάποιοι από τους τρόπους παραγωγής των δραστικών μορφών οξυγόνου είναι η οξείδωση του NADH και του φουμαρικού οξέος. Στην παρακάτω εικόνα φαίνονται και τα έντεκα σημεία παραγωγής ριζών υπεροξειδίου του υδρογόνου και υπεροξειδίου του οξυγόνου στην αναπνευστική αλυσίδα:



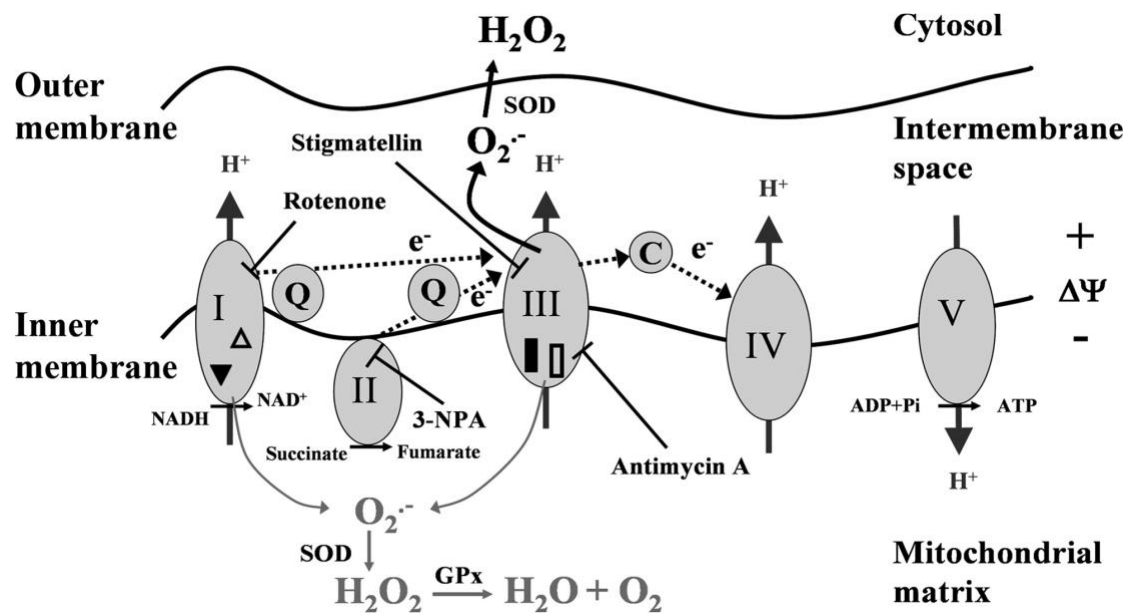
Εικόνα 6: Μιτοχονδριακές θέσεις παραγωγής ριζών υπεροξειδίου και υπεροξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂) [13].

Η οξειδωτική καταστροφή πρωτεϊνών των συμπλόκων της αναπνευστικής αλυσίδας παρατηρήθηκε μετά από έκθεση σε εκχυλίσματα γύρης αμβροσίας. Πιο συγκεκριμένα, βρέθηκαν δύο πρωτεΐνες που αποτελούν μέρος του αναπνευστικού συμπλόκου III, οι UQCRC1 και UQCRC2 [32], αλλά και δύο που αποτελούν μέρος του αναπνευστικού συμπλόκου I, οι NDUFS1 και NDUFS2 [5]. Το σύμπλοκο I θεωρείται ως την κύρια πηγή ROS στα μιτοχόνδρια σε παθολογικές συνθήκες και όχι σε συνθήκες υγείας. Έχει παρατηρηθεί ότι η αλληλεπίδραση του συμπλόκου I με την ροτενόνη, έναν αναστολέα του, έχει ως αποτέλεσμα την έντονη παραγωγή ROS και ειδικότερα του O₂^{•-} [29,30]. Όσον αφορά το σύμπλοκο III, η παραγωγή της ασταθούς ημικινόνης (Q₂^{•-}) που συμβαίνει κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, είναι μικρής πιθανότητας, εξαιτίας της γρήγορης οξείδωσής της. Η αντιμυκίνη A, ως αναστολέας του συμπλόκου III, προκαλεί την παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου, όπως η ροτενόνη στην περίπτωση του συμπλόκου I [31]. Η υπερπαραγωγή ROS από το

σύμπλοκο III μπορεί να είναι αποτέλεσμα ελλείψεων της αναπνευστικής αλυσίδας δίπλα σε ένα σημείο πρόσδεσης της αντιμυκίνης A.

Υπάρχουν μορφές ROS που δεν παράγονται από την αναπνευστική αλυσίδα και προέρχονται από εξωγενείς παράγοντες όπως είναι οι περιβαλλοντικοί και ειδικότερα το όζον, τα σωματίδια που εξατμίζονται από την χρήση ντίζελ και ο καπνός των τσιγάρων. Αυτοί οι παράγοντες προκαλούν την παραγωγή ROS στο επιθήλιο των αεραγωγών [16]. Οι κόκκοι γύρης αμβροσίας περιέχουν οξειδάσες NADH που μόλις ενυδατωθούν παράγουν ROS και αυτά τα προϊόντα των ενζύμων γύρης προκαλούν οξειδωτικό στρες στο επιθήλιο των αεραγωγών επιδεινώνοντας την φλεγμονή μέσω της παραγωγής χημειοκινών και κυτοκινών [33,34].

Στην παρακάτω εικόνα φαίνεται ο εντοπισμός με σύμβολα των πρωτεϊνών που αναφέρθηκαν στα αντίστοιχα σύμπλοκα (I, III) σε κατάσταση οξειδωτικού στρες που προκαλείται από την έκθεση σε εκχύλισμα γύρης αμβροσίας:



Εικόνα 7: Σχηματική απεικόνιση των συμπλεγμάτων εσωτερικής μεμβράνης και εντοπισμός των οξειδωτικά τροποποιημένων πρωτεϊνών στα μιτοχόνδρια των κυττάρων που έχουν υποστεί αγωγή με εκχύλισμα γύρης αμβροσίας [5].

Πιο ειδικά, η δραστική μορφή οξυγόνου που παράγεται από το σύμπλεγμα III, η ρίζα του ανιόντος του υπεροξειδίου, μετατρέπεται σε υπεροξείδιο του υδρογόνου (H₂O₂) με την βοήθεια του ενζύμου δισμουτάση του υπεροξειδίου (SOD) και μεταφέρεται στο κυττοσόλιο. Η ρίζα αυτή, παραγόμενη και από το σύμπλοκο I, μετατρέπεται ομοίως σε υπεροξείδιο του υδρογόνου στην μιτοχονδριακή μήτρα και με

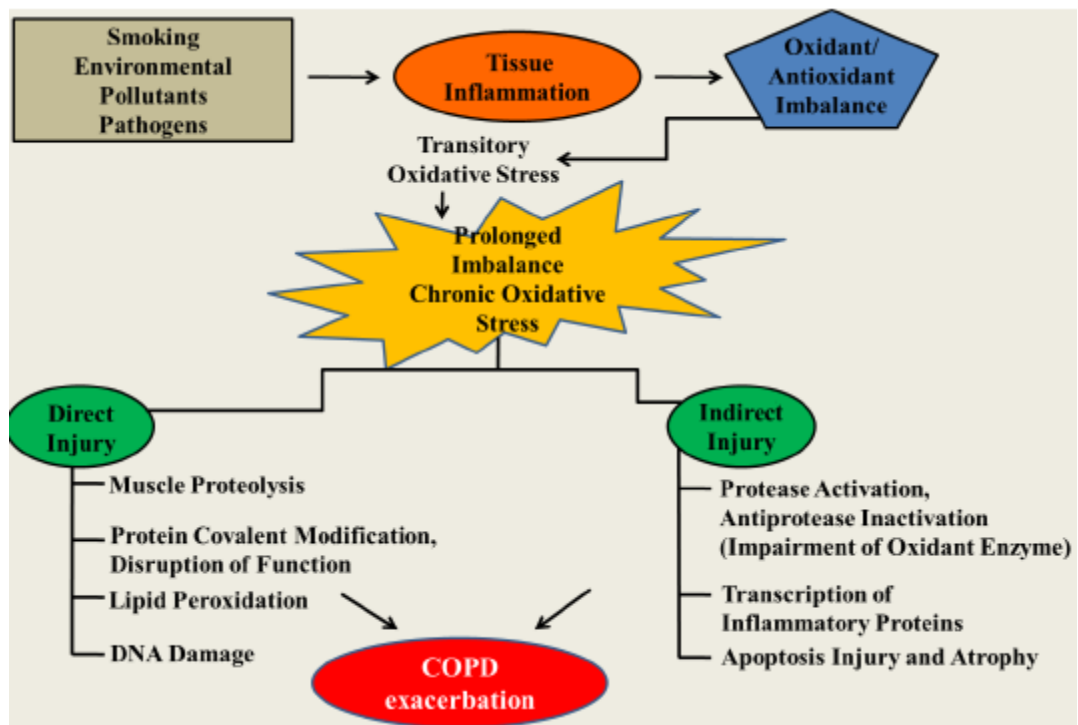
τη βοήθεια του ενζύμου υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, μετατρέπεται σε H₂O και O₂.

Κατά την διάρκεια λειτουργίας της αναπνευστικής αλυσίδας πολλές βοηθητικές πρωτεΐνες επιτελούν σημαντικό έργο για την ομαλή διεκπεραίωση της διαδικασίας, επηρεάζονται παρ' όλα αυτά όταν οι πρωτεΐνες της αναπνευστικής αλυσίδας υποστούν ζημιά. Κάποιες από αυτές είναι η, σχετιζόμενη με το σύμπλοκο III, GRP75, η HSP70 και η HSP60 (πρωτεΐνες θερμικού σοκ 70 και 60) που σχετίζονται με τα σύμπλοκα I, II, III, IV και II, IV αντίστοιχα. Μία επιπλέον βοηθητική πρωτεΐνη που επηρεάζεται αρνητικά είναι η κιτρική συνθάση, ο φυσιολογικός ρόλος της οποίας είναι η μετατροπή του ακετυλο-CoA σε κιτρικό οξύ [5].

2.4 ΧΑΠ ΚΑΙ ΔΡΑΣΤΙΚΕΣ ΜΟΡΦΕΣ ΟΞΥΓΟΝΟΥ

Ο καπνός των τσιγάρων φέρεται να είναι υπεύθυνος για βλάβες στα μιτοχόνδρια οδηγώντας παράλληλα σε ασθένειες που προέρχονται από την μη φυσιολογική λειτουργία των μιτοχονδρίων. Προκαλεί βλάβες στο DNA μέσω παραγωγής δραστικών μορφών οξυγόνου, όπως ρίζες υδροξυλίου οι οποίες 'επιτίθενται' στο DNA προκαλώντας διαγραφές στην μία εκ των δύο αλυσίδων του ή και μέσω ενεργοποίησης ενδονουκλεασών, οι οποίες τεμαχίζουν το DNA σε ειδικές θέσεις. Οι ρίζες ημικίνονης έχουν μεγάλο χρόνο ημιζωής και αλληλοεπιδρούν με το DNA δημιουργώντας ανιόντα υπεροξειδίου με τελικό προϊόν το υπεροξειδίο του υδρογόνου. Οι ελεύθερες ρίζες στον καπνό του τσιγάρου έχουν κάποιες ιδιότητες που τις καθιστούν επικίνδυνες για τους ιστούς των πνευμόνων. Τα οξειδωτικά στοιχεία που περιέχονται στον καπνό των τσιγάρων είναι ικανά για την διέγερση των κυψελιδικών μακροφάγων, τα οποία απελευθερώνοντας μεσολαβητές, προσελκύουν ουδετερόφιλα προκαλώντας μια φλεγμονώδη αντίδραση στους πνεύμονες. Με αυτό τον τρόπο επιδεινώνεται η κατάσταση των χρόνια καπνιστών και ασθενών με ΧΑΠ [46,47].

Η γενετική βλάβη σε μιτοχονδριακό και πυρηνικό γονιδίωμα στα μακροφάγα κύτταρα των πνευμόνων καπνιστών παρατηρείται μεγαλύτερη σε σύγκριση με αυτή στους μη καπνιστές. Δείκτες της πνευμονικής λειτουργίας αποτελούν η μείωση του λόγου 'FEV₁ / FVC' , αυτή του FEV₁ αλλά και η αυξημένη περιεκτικότητα υπεροξειδίων λιπιδίων στους πνεύμονες καπνιστών [7].



Εικόνα 8: Σχηματική απεικόνιση της βλάβης που προκαλείται στους ιστούς των πνευμόνων λόγω οξειδωτικού στρες και η κατάληξη σε παροξύνσεις στην ΧΑΠ [50].

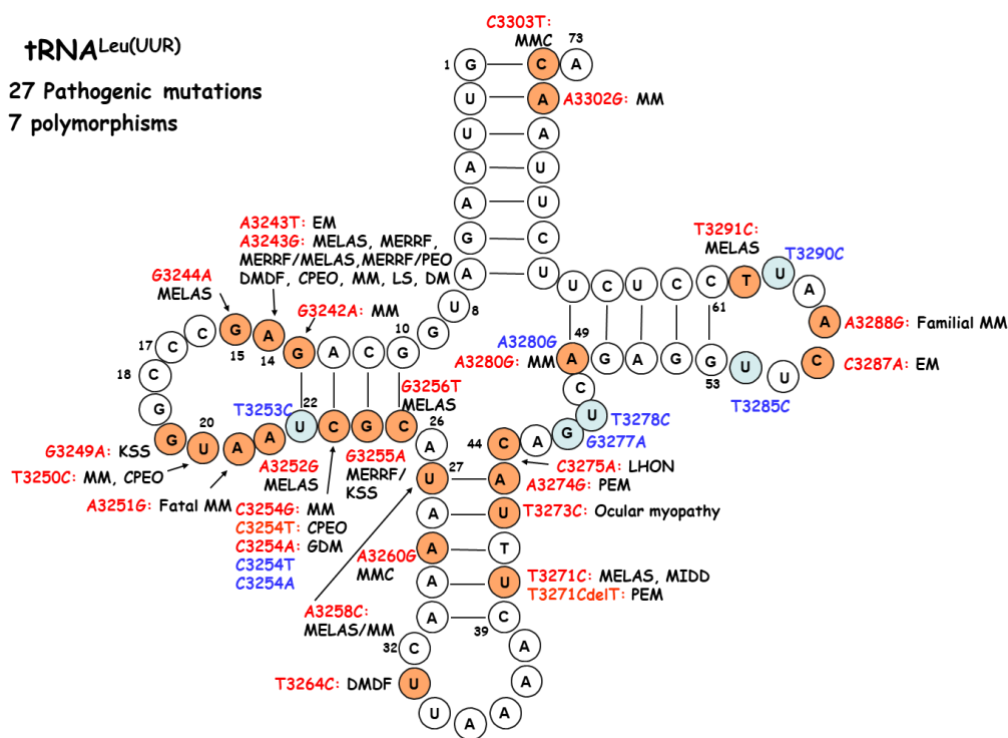
2.5 ΔΡΑΣΤΙΚΕΣ ΜΟΡΦΕΣ ΟΞΥΓΟΝΟΥ ΚΑΙ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΕΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ tRNA

Η υπερπαραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου που μπορεί να προκαλέσει βλάβη στα κύτταρα είναι πιθανό να προέρχεται από μεταλλάξεις στα μιτοχόνδρια και ειδικότερα στα γονίδια μιτοχονδριακών tRNA. Το μιτοχονδριακό γονιδίωμα είναι πολυπλοειδές, έχει δηλαδή πολλά αντίγραφα του γενετικού υλικού. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, όλα τα αντίγραφα του μιτοχονδριακού DNA είναι πανομοιότυπα, όμως σε περίπτωση μεταλλάξεων δημιουργείται το φαινόμενο της ετεροπλασμίας. Ετεροπλασμία καλείται η συνύπαρξη αντιγράφων αγρίου τύπου και μεταλλαγμένων, στο ίδιο μιτοχόνδριο, στο ίδιο κύτταρο σε ποικίλες ποσότητες. Το επίπεδο της ετεροπλασμίας είναι καθοριστικό του κλινικού φαινοτύπου που εμφανίζει ο ασθενής [40].

Το μιτοχονδριακό γονιδίωμα παρουσιάζει ένα πολύ μεγαλύτερο ρυθμό μεταλλάξεων σε σύγκριση με το πυρηνικό και γι' αυτό είναι πιθανό να ευθύνεται το γεγονός πως το μιτοχονδριακό γονιδίωμα βρίσκεται πολύ κοντά στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη και είναι εκτεθειμένο σε αντιδραστικά είδη οξυγόνου (ROS) που προέρχονται από την αναπνευστική αλυσίδα. Ακόμη, απουσιάζουν οι μηχανισμοί επιδιόρθωσης του μιτοχονδριακού DNA που λειτουργούν στην περίπτωση του

πυρηνικού και αυτό αποτελεί ακόμη έναν λόγο του μεγάλου ρυθμού μεταλλάξεων. Πολλές από τις μεταλλάξεις αυτές λαμβάνουν χώρα στα γονίδια μιτοχονδριακών tRNA. Τα γονίδια των tRNA^{Leu} και tRNA^{Thr} είναι αυτά με τις περισσότερες ανιχνεύσιμες μεταλλάξεις ως τώρα, με αυτές του tRNA^{Leu} να είναι περισσότερο παθογόνες συγκριτικά με τις υπόλοιπες [4,6].

Έχει βρεθεί πως πολλές ανεπάρκειες συμπλόκων της αναπνευστικής αλυσίδας οφείλονται σε σημειακές μεταλλάξεις γονιδίων μιτοχονδριακών tRNA, ενώ μέχρι στιγμής έχουν αναφερθεί περίπου 60 διαφορετικά παθογόνα μεταλλάγματα που στοχεύουν στην λειτουργία της αναπνευστικής αλυσίδας. Οι πιο γνωστές μεταλλάξεις που σχετίζονται με την αναπνευστική αλυσίδα αφορούν την κληρονόμηση μητρικών μεταλλάξεων γονιδίων tRNA αλλά και οι σποραδικές ελλείψεις [41,42]. Οι περισσότερες παθογόνες μεταλλάξεις γονιδίων μιτοχονδριακών tRNA που σχετίζονται με την ανεπάρκεια συμπλόκων της αναπνευστικής αλυσίδας αφορούν γονίδια των tRNA^{Leu}, tRNA^{Ser} και tRNA^{Lys}, με αυτό της Leu να επικρατεί έναντι των άλλων δύο. Η μετάλλαξη που βρέθηκε περισσότερες φορές στο γονίδιο αυτού του μιτοχονδριακού tRNA είναι η A3243G, σχετίζεται με την ανεπάρκεια του συμπλόκου I (σύμπλοκο NADH) και φαίνεται στην παρακάτω εικόνα [6].



Εικόνα 9: Παθογόνες και πολυμορφικές μεταλλάξεις στο ανθρώπινο μιτοχονδριακό tRNA^{Leu} γονίδιο [6].

Η μετάλλαξη tRNA^{Leu (UUR)} A3243G προκαλεί μια σημαντική δομική αλλαγή, το σχηματισμό ενός διμερούς συμπλέγματος, μέσω ζεύξης διαμοριακών βάσεων μεταξύ των βρόχων D. Η υψηλή σταθερότητα του διμερούς συμπλέγματος υποδηλώνει ότι μπορεί να παρατηρηθεί και *in vivo*, ενώ πρόσθετες μελέτες [4,39] έδειξαν ότι ο διμερισμός είναι εν μέρει υπεύθυνος για την απώλεια λειτουργίας του μεταλλαγμένου tRNA. Συνήθως οι παθογόνες μεταλλάξεις που αφορούν την αναπνευστική αλυσίδα, βρίσκονται σπάνια σε μεταβλητούς βρόγχους των γονιδίων tRNA [43] και κατανέμονται τυχαία με εξαίρεση τα αντικωδικόνια και τους μεταβλητούς βρόγχους που αναφέρθηκαν. Άποψη των ερευνητών είναι ακόμη πως για την σωστή αναδίπλωση και αμινοακυλίωση των tRNA απαιτούνται μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις σε ζεύγη με μία βάση [44].

Η μετάλλαξη tRNA^{Lys} A8344G είναι αποτέλεσμα απουσίας μιας τροποποίησης που περιέχει ταυρίνη, την 5- ταυρινομεθυλουριδίνη [8]. Η τροποποίηση αυτή στη θέση C5 της ουριδίνης συμβάλλει σημαντικά στην αποκωδικοποίηση του κωδικονίου UGG με αποτέλεσμα την σταθεροποίηση του ζεύγους βάσεων U:G. Αυτό εξηγεί το μεταφραστικό ελάττωμα των γονιδίων πλούσιων σε UUG, το οποίο οδηγεί σε ανεπάρκεια του συμπλόκου I της αναπνευστικής αλυσίδας [9].

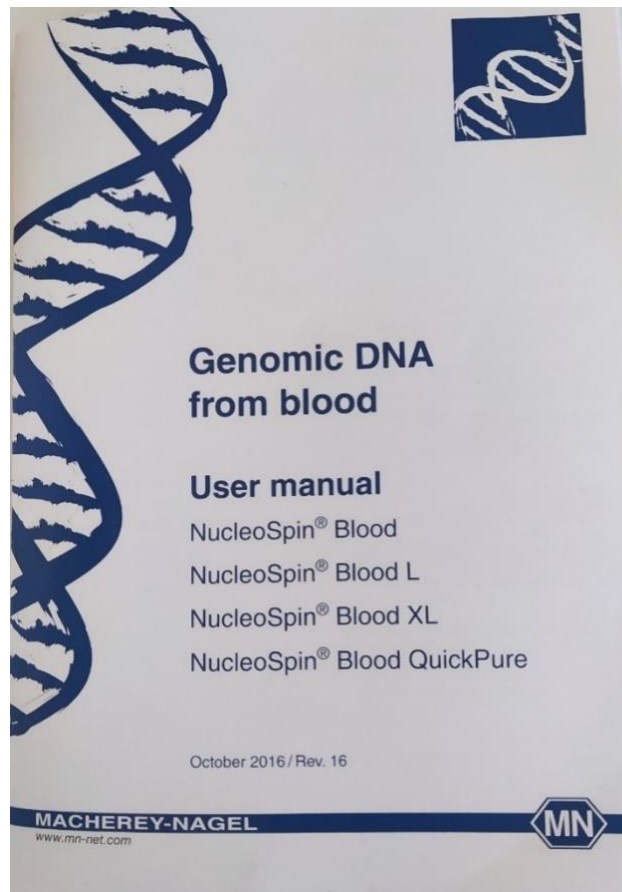
Τέλος, δύο από τις σημειακές μεταλλάξεις που αφορούν το tRNA^{Ser}, οι T7512C και G7497A, οδηγούν σε εξαιρετικά μειωμένα επίπεδα του tRNA^{Ser (UCN)}, ακόμη και κάτω του 10% σε σχέση με αυτά των controls, οδηγώντας με αυτό τον τρόπο σε ανεπάρκεια των συμπλόκων I και IV της αναπνευστικής αλυσίδας. Αυτό συμβαίνει πιθανότατα λόγω βλάβης σε κάποιες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις οδηγώντας σε αυξημένη δράση των νουκλεασών κατά των tRNA [45].

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι αρχικά η ανίχνευση και έπειτα η ταυτοποίηση μεταλλάξεων σε μιτοχόνδρια γονίδια tRNA σε 35 δείγματα ασθενών που έχουν διαγνωσθεί με Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια (ΧΑΠ). Το γονίδιο που μελετήθηκε είναι το tRNA^{Leu}.

3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

3.1 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΟΛΙΚΟΥ DNA ΑΠΟ ΟΛΙΚΟ ΑΙΜΑ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΧΡΟΝΙΑ ΑΠΟΦΡΑΚΤΙΚΗ ΠΝΕΥΜΟΝΟΠΑΘΕΙΑ (ΧΑΠ)

Για την απομόνωση του ολικού DNA από τα δείγματα, ακολουθήθηκαν τα βήματα ενός πρωτοκόλλου της εταιρείας MACHEREY-NAGEL (Protocol for DNA purification from whole blood) και ειδικότερα το ‘Genomic DNA purification with Nucleospin® Blood L’, το οποίο περιλαμβάνει υλικά για έως και 50 δείγματα. Το αίμα των ασθενών με ΧΑΠ που χρησιμοποιήθηκε, είχε αποθηκευτεί σε ειδικούς σωλήνες (με μωβ καπάκι) που περιέχουν EDTA με σκοπό την αποφυγή δημιουργίας θρόμβων.



Εικόνα 10: Πρωτόκολλο απομόνωσης γενωμικού DNA από ολικό αίμα, MACHEREY-NAGEL

ΥΛΙΚΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΜΕΘΟΔΟ:

1. Πιπέτες (1000μL, 200μL, 100μL, 20μL, 10μL)
2. Tips
3. Tubes 1,5ml
4. Αιθανόλη 99,8%
5. Επωαστήρα (70°C)
6. Φυγόκεντρος
7. Στατό

Στο συγκεκριμένο πείραμα η απομόνωση του DNA από τα δείγματα αίματος πραγματοποιήθηκε με βάση τα παρακάτω βήματα:

- Αρχικά, ξεπάγωσαν τα δείγματα ολικού αίματος που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα.
- Κατά την διάρκεια αυτής της αναμονής, δημιουργήθηκαν τα διαλύματα της Proteinase K και του Wash Buffer B5, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν στην συνέχεια. Για τη δημιουργία του διαλύματος της Proteinase K, (ρόλος της οποίας είναι η αποδιάταξη των πρωτεϊνών), προστέθηκαν 1,35 mL από το Proteinase Buffer σε 30mg Proteinase K, ενώ για την δημιουργία του Wash Buffer B5, σε 12mL αυτού, προστέθηκαν 48mL αιθανόλης 100%.
- Αφού ξεπάγωσαν τα δείγματα, προστέθηκαν 200μL από κάθε δείγμα αίματος σε σωλήνες μικροφυγοκέντρωσης των 1,5ml καθώς και 25μL από το διάλυμα της Proteinase K.
- Στην συνέχεια, προστέθηκαν στον ίδιο σωλήνα 200μL από το Buffer B3. Ακολούθησε έντονη ανάδευση του μείγματος με χρήση VORTEX για 20 δευτερόλεπτα.
- Μετά την ανάδευση, τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε επωαστήρα των 70°C για 10-15 λεπτά.
- Με το πέρας της επώασης, προστέθηκαν 210μL αιθανόλης 99,8% σε κάθε δείγμα και ακολούθησε έντονη ανάδευση με χρήση VORTEX για λίγα δευτερόλεπτα.
- Έπειτα, κάθε δείγμα φορτώθηκε σε στήλη και ακολούθησε φυγοκέντρωση στα 11.000 rpm με διάρκεια 1min. Με το τέλος της φυγοκέντρωσης, πετάχθηκε ο σωλήνας συλλογής και κρατήθηκε η στήλη.
- Περνώντας στην φάση της έκπλυσης, οι στήλες τοποθετήθηκαν σε νέο σωλήνα συλλογής και προστέθηκαν 500μL από το Buffer BW σε αυτές. Ακολούθησε φυγοκέντρωση στα 11.000 rpm για 1 min και στο τέλος αφαιρέθηκε ο σωλήνας συλλογής.
- Στο επόμενο βήμα, οι στήλες τοποθετήθηκαν σε νέο σωλήνα συλλογής και προστέθηκαν 600μL από το Buffer B5 σε αυτές. Ακολούθησε φυγοκέντρωση

στα 11.000 rpm για 1 min και στο τέλος αφαιρέθηκε μόνο το υγρό που έμεινε στον πάτο του σωλήνα συλλογής.

- Οι στήλες τοποθετήθηκαν δίχως την προσθήκη κάποιου διαλύματος, φυγοκεντρήθηκαν ξανά στα 11.000 rpm για 1 min. Μετά το τέλος της φυγοκέντρωσης, αφαιρέθηκαν οι σωλήνες συλλογής.
- Στο τελευταίο βήμα της απομόνωσης του DNA, οι στήλες τοποθετήθηκαν σε νέους σωλήνες συλλογής και προστέθηκαν 100μL από το Buffer BE, το οποίο είχε προθερμανθεί στους 70°C για λίγα λεπτά πριν από την χρήση του. Πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρωση στα 11.000 rpm για 1 min και στο τέλος αφαιρέθηκαν οι στήλες και όχι οι σωλήνες, οι οποίοι περιείχαν πλέον το απομονωμένο DNA κάθε δείγματος.

Το **ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης BE** χρησιμοποιείται αρχικά για την απομάκρυνση των μη δεσμευμένων πρωτεϊνών και σε μεγαλύτερη συγκέντρωση απελευθερώνει την επιθυμητή πρωτεΐνη από τον συνδέτη.

Το **ρυθμιστικό διάλυμα B3** περιέχει υποχλωριώδη γουανιδίνη (GuHCl), η οποία είναι ένας ισχυρός χαοτροπικός παράγοντας. Παρεμβαίνει στο δίκτυο δεσμών υδρογόνου σε υδατικά διαλύματα και έχει αποσταθεροποιητική επίδραση στα μακρομόρια όπως είναι οι πρωτεΐνες και τα νουκλεϊκά οξέα.

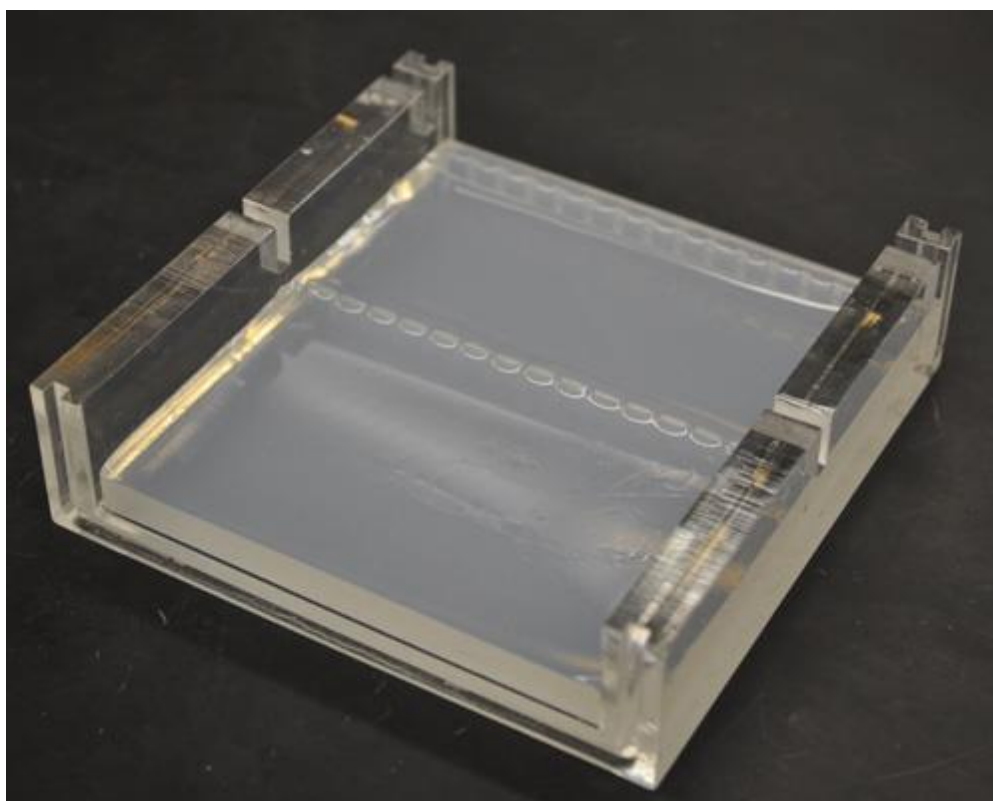
Το **ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης BW** χρησιμοποιείται στη συνέχεια για την έκπλυση τμημάτων ιστού μετά από κάθε στάδιο επώασης, αφαιρώντας αποτελεσματικά το προηγούμενο αντιδραστήριο και προετοιμάζοντας τον ιστό για την εφαρμογή του επόμενου αντιδραστηρίου. Πιο συγκεκριμένα αφαιρεί νουκλεϊκά οξέα χαμηλού μοριακού βάρους

Το **ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης B5** χρησιμοποιείται και αυτό για την έκπλυση με την ιδιαιτερότητα πως υπάρχει αιθανόλη σε αυτό και όχι GuHCl όπως στην περίπτωση του BW. Το B5 χρησιμοποιείται για την έκπλυση του προηγούμενου Buffer, του BW, και όχι νουκλεϊκών οξέων.

3.2 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΑΠΟΜΟΝΩΜΕΝΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ DNA ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΠΗΚΤΗΣ ΑΓΑΡΟΖΗΣ (1%)

Η ηλεκτροφόρηση πηκτής αγαρόζης είναι μία αποτελεσματική διαδικασία διαχωρισμού θραυσμάτων DNA από 100bp έως και 25kbp. Κατά τη διάρκεια της

δημιουργίας μιας πηκτής αγαρόζης, τα πολυμερή αγαρόζης συνδέονται μη ομοιοπολικά και σχηματίζουν ένα δίκτυο δεσμών των οποίων τα μεγέθη πόρων καθορίζουν τις ιδιότητες του μοριακού ‘φίλτρου’ μιας πηκτής. Για τη δημιουργία μιας πηκτής, αρχικά ζυγίστηκαν και μετρήθηκαν 0,300g σκόνης αγαρόζης και τοποθετήθηκαν σε κωνική φιάλη των 100mL. Στην κωνική φιάλη προστέθηκαν 45mL Tris/Βορικό οξύ/Αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ(EDTA) (TBE) 0,5X, ένα ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει μείγμα βάσης Tris, βορικού οξέος και αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ και πραγματοποιήθηκε ελαφρά ανάδευση. Στην συνέχεια, για την διαλυτοποίηση της αγαρόζης στο διάλυμα του TBE, τοποθετήθηκε η κωνική φιάλη σε φούρνο μικροκυμάτων για λίγα λεπτά. Αμέσως μετά το βράσιμο, το διάλυμα αναδεύθηκε και παρατηρήθηκε στο φως για την επιβεβαίωση της διαλυτοποίησης της αγαρόζης. Για την ελάττωση της θερμοκρασίας της φιάλης, εφαρμόστηκε νερό στο εξωτερικό τοίχωμά της με ταυτόχρονη ανάδευση για ομοιόμορφο αποτέλεσμα στο διάλυμα. Μόλις η θερμοκρασία ήταν ανεκτή σε γυμνό χέρι, προστέθηκαν 4μL της χρωστικής Green και ξανά εφαρμόστηκε ανάδευση. Η χρωστική αυτή χρησιμοποιείται για την οπτικοποίηση αλλά και την ποσοτικοποίηση δίκλωνου DNA σε γέλες ηλεκτροφόρησης. Τέλος, το διάλυμα τοποθετήθηκε στην ειδική πλάκα με τα χτενάκια, ρόλος των οποίων είναι η δημιουργία των πηγαδιών αφότου δημιουργηθεί η πηκτή. Μετά από 15-20min αφαιρέθηκαν τα χτενάκια έχοντας δημιουργήσει τα πηγάδια, και η πηκτή ήταν έτοιμη για χρήση.



Εικόνα 11: Πηκτή αγαρόζης μετά την αφαίρεση της χτένας σχηματισμού των πηγαδιών [55].

Για τον διαχωρισμό του DNA σε μία πηκτή αγαρόζης, τοποθετήθηκε μια μικρή ποσότητα απομονωμένου DNA (2μL) αναμειγμένη με μία μικρή ποσότητα της χρωστικής Methylene Blue (3μL) στα πηγάδια της πηκτής, με σκοπό την οπτικοποίηση. Όταν η χρωστική αυτή αναμειχθεί με νερό, προκαλεί ένα μπλε χρώμα. Η πηκτή τοποθετείται σε μία συσκευή που εφαρμόζει τάση στα δύο άκρα της, δημιουργώντας ηλεκτρικό πεδίο και με τρόπο έτσι ώστε τα πηγάδια να βρίσκονται πιο κοντά στον αρνητικό πόλο. Αυτό συμβαίνει γιατί το DNA είναι αρνητικά φορτισμένο και με την εφαρμογή τάσης, αυτό θα 'τρέξει' προς τον θετικό πόλο, δηλαδή στην άλλη άκρη της συσκευής.

3.3 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ - PCR (Polymerase Chain Reaction)

Η PCR είναι μια τεχνική που χρησιμοποιείται για την γρήγορη, επιλεκτική και ακριβή ενίσχυση μικρών τμημάτων DNA με σκοπό την ανάλυση πιθανών μεταλλάξεων και πολυμορφισμών σε μοριακό επίπεδο. Αποτελεί μία από τις σημαντικότερες ανακαλύψεις της επιστημονικής κοινότητας, η οποία από το 1985, έχει χρησιμοποιηθεί σε χιλιάδες επιστημονικές εργασίες και έχει αναβαθμίσει τον τρόπο μελέτης του DNA. Ο εφευρέτης αυτής της τεχνικής είναι ο βραβευμένος με Νόμπελ το 1993, Karry Mullis.

3.3.1 Η ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Κατά τον πολλαπλασιασμό ενός τμήματος DNA με την μέθοδο της PCR, τα δείγματα DNA θερμαίνονται με σκοπό να αποδιαταχθεί το δίκλωνο DNA και να προκύψουν 2 μονόκλωνα. Τα δύο αυτά μονόκλωνα τμήματα DNA που προκύπτουν, χρησιμοποιούνται ως εκμαγεία από το ένζυμο Taq πολυμεράση με σκοπό την δημιουργία δύο συμπληρωματικών τμημάτων DNA. Με αυτό τον τρόπο προκύπτουν δυο δίκλωνα μόρια DNA, καθένα από τα οποία περιέχει έναν παλιό και έναν καινούργιο κλώνο. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται για 30-40 φορές δημιουργώντας τελικά πάνω από 1 δισεκατομμύριο πιστά αντίγραφα του αρχικού τμήματος DNA που αποδιατάχθηκε.

Η ραγδαία ανάπτυξη της τεχνολογίας τα τελευταία χρόνια έχει επιτρέψει σε μεγάλο βαθμό την αυτοματοποίηση της μεθόδου και την ολοκλήρωση της διαδικασίας μέσα

σε λίγες ώρες. Η συνεχής εναλλαγή της θερμοκρασίας στα διάφορα στάδια κάθε κύκλου επιτυγχάνεται από τον θερμικό κυκλοποιητή (PCR thermal cycler), ο οποίος είναι ικανός για την αυξομείωση της θερμοκρασίας μέσα σε λίγα μόλις λεπτά ή και δευτερόλεπτα.

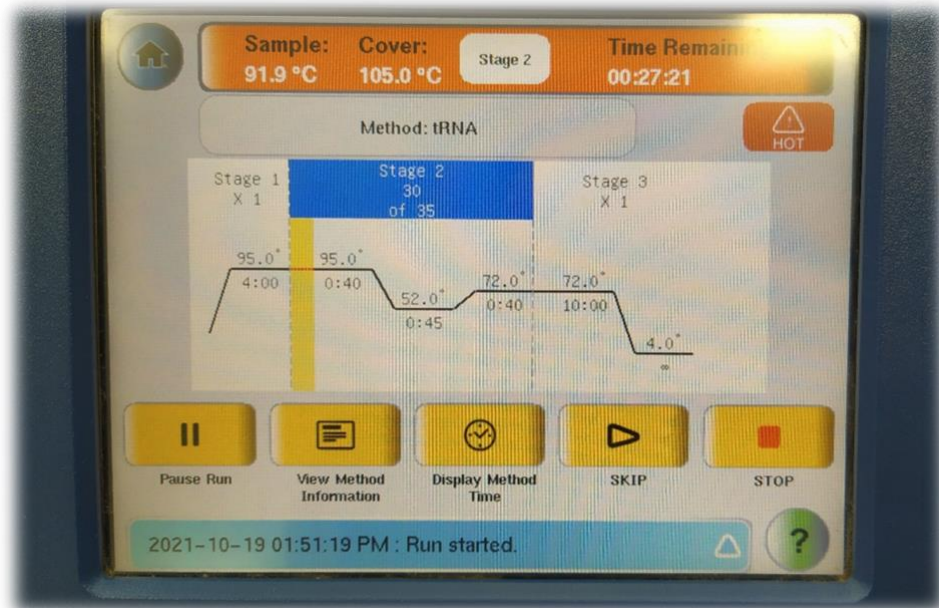
Για μια αντίδραση PCR των 50μl χρησιμοποιήθηκαν:

- | | |
|--------------------------------------|----------|
| ▪ DNA δείγμα | 1 μl |
| ▪ 50 pmol από τον κάθε primer | 1 + 1 μl |
| ▪ 10 x PCR Buffer | 5 μl |
| ▪ 40 Mm dNTP's | 1 μl |
| ▪ 25 mM MgCl ₂ | 4 μl |
| ▪ 1U Taq πολυμεράση (5U/μl) | 0,25 μl |
| ▪ dd H ₂ O μέχρι τα 50 μl | 36,75 μl |

Στο συγκεκριμένο πείραμα, η PCR εκτελέστηκε για δείγματα όγκου 50 μl και τα στάδια αναλυτικά ήταν τα εξής:

1. **Αρχικό στάδιο:** Η θερμοκρασία ανέρχεται στους 95°C και διατηρείται για 4 λεπτά.
2. **Στάδιο αποδιάταξης:** Η θερμοκρασία ανέρχεται στους 95°C για 40 δευτερόλεπτα.
3. **Στάδιο υβριδισμού:** Η θερμοκρασία μειώνεται στους 52°C για 45 δευτερόλεπτα, έτσι ώστε να καταστεί δυνατή η υβριδοποίηση των εκκινητών με τα μονόκλιωνα τμήματα DNA που θα υποστούν την ενίσχυση.
4. **Στάδιο επιμήκυνσης:** Η θερμοκρασία ανέρχεται στους 72°C για 40 δευτερόλεπτα και η Taq πολυμεράση που λειτουργεί βέλτιστα σε αυτή την θερμοκρασία, επιμηκώνει τα τμήματα των εκκινητών ακολουθώντας τον κανόνα της συμπληρωματικότητας. Ο ρόλος των εκκινητών έγκειται στην χρησιμοποίησή τους από την Taq πολυμεράση με σκοπό την πρόσδεση στην αλληλουχία. Η Taq πολυμεράση μπορεί μόνο να προσθέτει νουκλεοτίδια στο 3'- άκρο ήδη υπάρχοντων νουκλεϊκών οξέων και όχι να δημιουργήσει μια αλληλουχία από την αρχή. Με αυτό τον τρόπο, η συμπληρωματική, ως προς στα μονόκλιωνα τμήματα DNA που έχουν προκύψει, αλληλουχία των εκκινητών διευκολύνει την διαδικασία.
5. **Στάδιο τελικής επιμήκυνσης:** Η θερμοκρασία παραμένει στους 72°C για 10 λεπτά αμέσως μετά τον τελευταίο κύκλο της PCR.
6. **Τελικό στάδιο:** Η θερμοκρασία κατέρχεται στους 4°C και διατηρείται έως ότου σταματήσει κάποιος PCR.

- Τα στάδια 2-4 επαναλαμβάνονται για 35 κύκλους.



Εικόνα 12: Μια αντίδραση PCR από την οθόνη του ειδικού μηχανήματος.

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) χρησιμοποιεί ένα ζεύγος προσαρμοσμένων εκκινητών για να κατευθύνει την επιμήκυνση του DNA προς το ένα και προς το άλλο άκρο της αλληλουχίας που ενισχύεται. Αυτοί οι εκκινητές έχουν τυπικά μήκος μεταξύ 18 και 24 βάσεων και πρέπει να κωδικοποιούν μόνο τις συγκεκριμένες θέσεις ανοδικά και καθοδικά της αλληλουχίας που ενισχύεται. Ένας εκκινητής που μπορεί να συνδεθεί σε πολλαπλές περιοχές κατά μήκος του DNA θα τις ενισχύσει όλες, κάτι το οποίο δεν συνάδει με τον σκοπό της PCR. Γι'αυτό τον λόγο πραγματοποιείται στοχευμένη σχεδίαση των εκάστοτε εκκινητών για την εξυπηρέτηση συγκεκριμένων σκοπών.

Υπάρχουν μερικά κριτήρια που πρέπει να λαμβάνονται υπόψη κατά το σχεδιασμό ενός ζεύγους εκκινητών PCR. Τα ζεύγη εκκινητών θα πρέπει να έχουν παρόμοιες θερμοκρασίες τήξης αφού ο υβριδισμός κατά τη διάρκεια της PCR λαμβάνει χώρα και για τους δύο κλώνους ταυτόχρονα, και αυτή η κοινή θερμοκρασία τήξης δεν πρέπει να είναι ούτε υψηλότερη ούτε χαμηλότερη από τη θερμοκρασία νόπτωσης υβριδισμού της αντίδρασης. Ένας εκκινητής με T_m (θερμοκρασία τήξης) πολύ υψηλότερη από τη θερμοκρασία υβριδισμού της αντίδρασης μπορεί να μη υβριδοποιηθεί και να επεκταθεί σε εσφαλμένη θέση κατά μήκος της αλληλουχίας DNA. Μια θερμοκρασία τήξης σημαντικά χαμηλότερη από τη θερμοκρασία υβριδισμού μπορεί να εμποδίσει τον υβριδισμό και την αδυναμία επέκτασης της αλληλουχίας.

Επιπροσθέτως, οι αλληλουχίες εκκινητών πρέπει να επιλέγονται μοναδικά για μια περιοχή του DNA, αποφεύγοντας την πιθανότητα υβριδισμού σε παρόμοια κοντινή αλληλουχία. Μια ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος για την επιλογή μιας θέσης εκκινητή είναι η αναζήτηση BLAST, όπου μπορούν να φανούν όλες οι πιθανές περιοχές στις οποίες μπορεί να συνδεθεί ένας εκκινητής. Τόσο η αλληλουχία νουκλεοτιδίων όσο και ο ίδιος ο εκκινητής μπορούν να αναζητηθούν με BLAST. Το δωρεάν εργαλείο NCBI Primer-BLAST ενσωματώνει τη σχεδίαση primer και την αναζήτηση BLAST σε μία εφαρμογή. Προσομοιώσεις υπολογιστών θεωρητικών αποτελεσμάτων PCR (Electronic PCR) μπορούν να πραγματοποιηθούν για να βοηθήσουν στο σχεδιασμό του εκκινητή δίνοντας θερμοκρασίες τήξης και υβριδισμού.

Η ενίσχυση που πραγματοποιήθηκε με την βοήθεια της PCR σε τμήματα DNA δειγμάτων από ασθενείς με Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια είχε ένα ζεύγος εκκινητών. Το ζεύγος FwLeu – RevLeu. Στον παρακάτω πίνακα αναφέρονται τα χαρακτηριστικά του ζεύγους εκκινητών που χρησιμοποιήθηκε στην PCR.

Table 1 Χαρακτηριστικά εκκινητών Leu

tRNA ^{Leu}	Όνομα Primer	Αλληλουχία	Μήκος (bp)
Forward Primer	FwLeu 5' - 3'	AGGACAAGAGAAATAAGGCC	282
Reverse Primer	RevLeu 3' - 5'	CACGTTGGGGCCTTTGCGTA	

3.4 ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΣ ΜΟΝΟΚΛΩΝΗΣ ΔΙΑΜΟΡΦΩΣΗΣ - Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP)

Η μέθοδος SSCP αποτελεί μία γρήγορη και εύκολη διαδικασία με την οποία ανιχνεύονται εισαγωγές, διαγραφές ή ανακατατάξεις σε δείγματα DNA τα οποία έχουν ενισχυθεί με την μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) και έχουν ηλεκτροφορηθεί σε πηκτή πολυακρυλαμίδης. Η ηλεκτροφόρηση που πραγματοποιείται είναι κάθετη, ενώ η πηκτή πολυακρυλαμίδιου προσδίδει στη διαδικασία μεγαλύτερη διαχωριστική ικανότητα απ' ότι αυτή της αγαρόζης.

Κατά τη διάρκεια της ηλεκτροφόρησης, τα θραύσματα μονόκλωνου DNA αναδιπλώνονται σε τρισδιάστατο σχήμα ανάλογα με την κύρια αλληλουχία τους. Η

ηλεκτροφορητική κινητικότητα του διαχωρισμού επηρεάζει το σχήμα των διπλωμένων, μονόκλωνων μορίων. Ακόμα κι αν η διαφορά στην αλληλουχία μεταξύ του φυσιολογικού δείγματος και του εξεταζόμενου πιθανώς μεταλλαγμένου θραύσματος είναι μόνο ένα νουκλεοτίδιο, θα υιοθετηθεί μια μοναδική ηλεκτροφορητική κινητικότητα. Η μέθοδος SSCP βασίζεται στην παρατήρηση ότι κάτω από μη μετουσιωτικές συνθήκες, θραύσματα μονόκλωνου DNA υιοθέτησαν μοναδικές διαμορφώσεις που καθορίστηκαν από την πρωταρχική τους ακολουθία της οποίας οι δομές σταθεροποιούνται από ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις. Συνεπώς, ακόμη και η αλλαγή μιας βάσης μπορεί να οδηγήσει σε διαμορφωτική αλλαγή, η οποία μπορεί να ανιχνευθεί από την αλλοιωμένη κινητικότητα του το μονόκλωνο μόριο DNA στο SSCP [54].

Στο συγκεκριμένο πείραμα, η διαδικασία ακολουθήθηκε 2 φορές, ενώ κάθε φορά τοποθετούνταν στην συσκευή 2 πηκτές.

Για την παρασκευή δύο πηκτών πολυακρυλαμιδίου:

1. Ζυγίστηκαν, σε ζυγαριά ακριβείας, **15gr ακρυλαμιδίου** και **0,375gr δις-ακρυλαμιδίου**.
2. Μετρήθηκαν σε falcon των 50ml, **20ml TBE 5X** και **12,5ml γλυκερόλης 50%**.
3. Τα παραπάνω υλικά αναμείχθηκαν και ανακατεύθηκαν σε ποτήρι ζέσεως με χρήση μαγνήτη έως ότου προέκυψε ένα διάλυμα.
4. Στην συνέχεια, το προκύπτον διάλυμα διηθήθηκε με την βοήθεια διηθητικού χαρτιού και μια κωνικής φιάλης.
5. Ο όγκος του διαλύματος αυτού ογκομετρήθηκε με χρήση ογκομετρικού σωλήνα και συμπληρώθηκε με ddH₂O μέχρι τα 130mL.
6. Στο επόμενο βήμα, προστέθηκαν στο διάλυμα **125μL Τετραμεθυλαιθυλενοδιαμίνη (TEMED ή TMEDA)** και **650μL Υπερθειϊκό αμμώνιο (APS) 20%** με σκοπό την πήξη του διαλύματος και τον πολυμερισμό της πολυακρυλαμίδης. Το TMEDA χρησιμοποιείται ευρέως ως πρόσδεμα για μεταλλικά ιόντα. Σχηματίζει σταθερά σύμπλοκα με πολλά αλογονίδια μετάλλων, π.χ. χλωριούχος ψευδάργυρος και ιωδιούχος χαλκός(I), δίνοντας σύμπλοκα που είναι διαλυτά σε οργανικούς διαλύτες. Σε τέτοια σύμπλοκα, το TMEDA χρησιμεύει ως δισθενής συνδέτης. Το TEMED καταλύει τον σχηματισμό ελεύθερων ριζών και κατ' επέκταση την πήξη της γέλης, ενώ το APS προωθεί τον πολυμερισμό.
7. Πριν από την προσθήκη του διαλύματος στην συσκευή, πραγματοποιήθηκε έντονη ανάδευση.

Πριν από το φόρτωμα των δειγμάτων στα πηγάδια της πηκτής, πραγματοποιήθηκε αποδιάταξη των προϊόντων της PCR για 14 λεπτά. Πιο συγκεκριμένα η αποδιάταξη πραγματοποιήθηκε με ανάμειξη 5μL DNA και 10μL αποδιατακτικού διαλύματος σε θερμικό κυκλοποιητή με βάση τα παρακάτω βήματα:

- Στους 92°C για 2 λεπτά
- Στους 92°C για 2 λεπτά
- Στους 97°C για 9 λεπτά

Το αποδιατακτικό διάλυμα περιείχε:

- 95% **φορμαμίδιο**, το οποίο σε καθαρή μορφή διαλύει πολλές ιονικές ενώσεις που είναι αδιάλυτες στο νερό και εάν θερμομανθεί έντονα αυτοδιασπάται.
- 20 mM **EDTA**, το οποίο παρέχει ένα κατάλληλο χημικό περιβάλλον για τη δράση της DNA πολυμεράσης. Το ρυθμιστικό pH είναι συνήθως μεταξύ 8,0 και 9,5 και συχνά σταθεροποιείται με Tris-HCl. Για την Taq πολυμεράση, ένα κοινό συστατικό στο ρυθμιστικό διάλυμα είναι το ιόν καλίου (K⁺) από το KCl, το οποίο προάγει τον υβριδισμό του εκκινητή.
- 10 mM **NaOH**, ως ρυθμιστικό διάλυμα εκχύλισης.
- 0,05 % **κυανό του ξυλενίου**, ως δείκτης καθώς έχει την ίδια ταχύτητα μετακίνησης με το DNA.
- 0,05 % **κυανό της βρωμοφαινόλης**, ως δείκτης καθώς έχει την ίδια ταχύτητα μετακίνησης με το DNA.

8. Αμέσως μετά έγινε η προσθήκη των χτενών δημιουργίας πηγαδιών.
9. Μόλις δημιουργήθηκε η πηκτή, αφαιρέθηκαν τα χτενάκια και τα νέο-σχηματιζόμενα πηγάδια καθαρίστηκαν με μία βελόνα.
10. Πραγματοποιήθηκε προσθήκη του Buffer TBE 0,5X στην συσκευή.
11. Τέλος, τοποθετήθηκαν τα δείγματα στα πηγάδια και ξεκίνησε η ηλεκτροφόρηση στα 220V για 18-20 ώρες.



Εικόνα 13: Πηκτή ακρυλαμιδίου σε συσκευή κάθετης ηλεκτροφόρησης με τα δείγματα φορτωμένα στα πηγάδια.

3.5 ΧΡΩΣΗ ΠΗΚΤΩΜΑΤΟΣ ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΙΟΥ ΜΕ ΔΙΑΛΥΜΑ ΝΙΤΡΙΚΟΥ ΑΡΓΥΡΟΥ

Για την εμφάνιση των αποτελεσμάτων ηλεκτροφόρησης της πηκτής πολυακρυλαμιδίου, ακολούθησε χρώση και πλύσεις με 3 διαφορετικά διαλύματα με σκοπό την χρώση των πηκτωμάτων. Οι ποσότητες των ουσιών που περιέχονται στα διαλύματα αναφέρονται παρακάτω και αντιστοιχούν στην χρώση 2 πηκτωμάτων:

1^ο Διάλυμα:

- Προσθήκη 800ml ddH₂O, 20ml αιθανόλης 100% και 1ml οξικού οξέος σε ογκομετρικό κύλινδρο.
- Τοποθέτηση των πηκτωμάτων στον αναδευτήρα.
- Ανακίνηση του διαλύματος και η πρώτη πλύση με προσθήκη 200ml του διαλύματος σε κάθε πηκτωμα για 3 λεπτά.
- Απομάκρυνση του διαλύματος μετά τα 3 λεπτά.
- Προσθήκη 200ml διαλύματος σε κάθε πηκτωμα για 3 λεπτά για μια δεύτερη πλύση και έπειτα απομάκρυνση του διαλύματος.
- Ακολούθησαν 2 φορές πλύσεις με ddH₂O για 1 λεπτό.

2^ο Διάλυμα:

- Προσθήκη 400ml διαλύματος νιτρικού αργύρου σε ογκομετρικό κύλινδρο.
- Τοποθέτηση των πηκτωμάτων στον αναδευτήρα.
- Προσθήκη σε κάθε πήκτωμα από 200ml διαλύματος για 20 λεπτά.
- Ξέπλυμα των πηκτωμάτων 2 φορές με ddH₂O

3^ο Διάλυμα:

- Προσθήκη σε ποτήρι ζέσεως 6gr NaOH, 0,02gr NaBH₄, 2ml φορμαλδεΐδης και συμπλήρωση με ddH₂O μέχρι ο τελικός όγκος του διαλύματος να φθάσει τα 400ml.
- Προσθήκη 200ml διαλύματος σε κάθε πήκτωμα.
- Τοποθέτηση των πηκτωμάτων στον αναδευτήρα.
- Παραμονή των πηκτωμάτων στο διάλυμα μέχρι την εμφάνιση των ζωνών.
- Απομάκρυνση του διαλύματος και πλύση με ddH₂O

3.6 ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ PCR

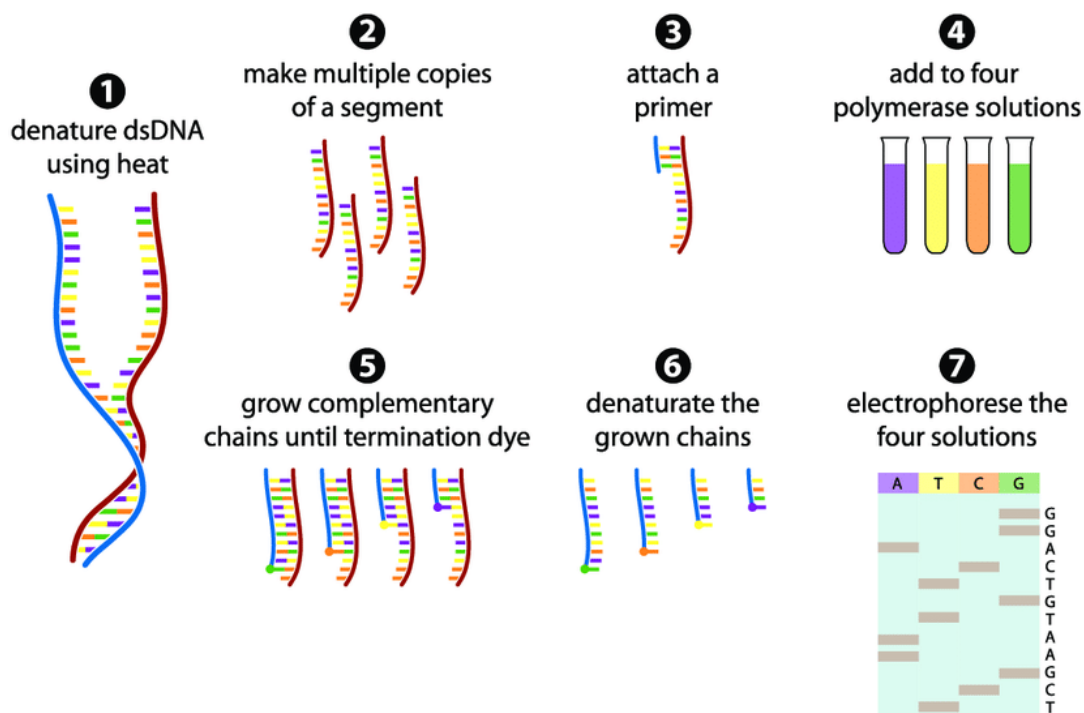
Μετά από παρατήρηση των πηκτών της SSCP και την απαρίθμηση των πιθανών προτύπων, τα προϊόντα PCR των επιλεγμένων δειγμάτων, υφίστανται καθαρισμό πριν αποσταλούν για αλληλούχιση. Ο καθαρισμός γίνεται με τη χρήση του Kit 'SureClean' της εταιρείας Bioline και με τον τρόπο αυτό απομακρύνονται εκκινητές και συστατικά της αντίδρασης PCR, καθώς και παραπροϊόντα. Στη συνέχεια αποστέλλονται σε εταιρεία για να ολοκληρωθεί η διαδικασία της αλληλούχισης. Η εταιρεία αποστέλλει τα αποτελέσματα υπό την μορφή χρωματογραφήματος και με τη χρήση κατάλληλων προγραμμάτων βιοπληροφορικής, όπως είναι το Bioedit, καθίσταται δυνατή η εξαγωγή της επιθυμητής αλληλουχίας.

3.7 ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗ DNA

Η αλληλούχιση των νουκλεϊκών οξέων είναι ένα πολύ σημαντικό εργαλείο στην βιολογική έρευνα. Υπάρχουν αρκετές γενιές τεχνολογιών αλληλούχισης DNA οι οποίες μπορούν να χαρακτηριστούν βάσει του έργου παραγωγής τους. Η αλληλούχιση κατά Sanger κυριάρχησε για 30 χρόνια και αποτέλεσε τον θεμέλιο λίθο του Human Genome Project, ενός διεθνούς επιστημονικού ερευνητικού προγράμματος με στόχο τον προσδιορισμό των ζευγών βάσεων που συνθέτουν το ανθρώπινο DNA και τον

εντοπισμό και τη χαρτογράφηση όλων των γονιδίων του ανθρώπινου γονιδιώματος τόσο από φυσική όσο και από λειτουργική άποψη.

Η αρχή της μεθόδου κατά Sanger βασίζεται στην εισαγωγή τροποποιημένων δεοξυνουκλεοτιδίων που ονομάζονται διδεοξυνουκλεοτίδια (ddNTP). Το υδρογόνο αντί του υδροξυλίου στη θέση 3' της δεοξυριβόζης και η ενσωμάτωσή τους στη νεοσυντιθέμενη αλυσίδα εμποδίζει την περαιτέρω επιμήκυνσή της καθώς δεν είναι εφικτός ο σχηματισμός φωσφοδιεστερικού δεσμού. Το τμήμα DNA που βρίσκεται υπό ανάλυση, χρησιμοποιείται ως εκμαγείο με σκοπό τη σύνθεση αντιγράφων, τα οποία έχουν ίδιο σημείο έναρξης αλλά η σύνθεσή τους διακόπτεται σε διαφορετικό σημείο. Επειδή το ενσωματωμένο διδεοξυνουκλεοτίδιο δεν έχει 3'-OH ομάδα, ο φωσφοδιεστερικός δεσμός μεταξύ του 3'-OH του τελευταίου τμήματος του σακχάρου και του 5' του επόμενου dNTP δεν θα σχηματιστεί, με αποτέλεσμα τον τερματισμό της αλυσίδας σε αυτό το σημείο [56].



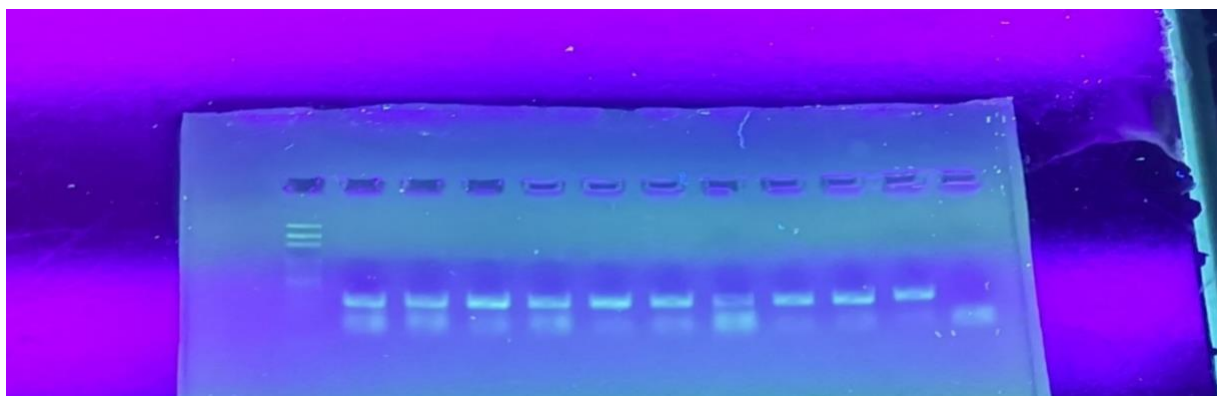
Εικόνα 14: Η μέθοδος αλληλούχησης κατά Sanger σε 7 βήματα [57].

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα πτυχιακή εργασία, τέθηκαν υπό ανάλυση 38 δείγματα αίματος από άτομα που πάσχουν από Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια. Τα δείγματα ελήφθησαν στο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας. Σκοπός της εργασίας ήταν η ανίχνευση και η ταυτοποίηση πιθανών μεταλλάξεων στο μιτοχονδριακό γονίδιο tRNA^{Leu} στους ασθενείς αυτούς. Για την ανίχνευση και ταυτοποίηση των μεταλλάξεων ακολουθήθηκε μία πειραματική διαδικασία η οποία περιλάμβανε αρχικά την απομόνωση του ολικού DNA από τα κύτταρα του αίματος, ακολούθησε η ενίσχυση των επιλεγμένων γονιδίων στα δείγματα με τη μέθοδο της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (PCR) χρησιμοποιώντας τους κατάλληλους εκκινητές και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ανάλυση με τη μέθοδο της SSCP για την κατάταξη των δειγμάτων σε πρότυπα, ανάλογα με την ηλεκτροφορητική τους ικανότητα. Στη συνέχεια, τα δείγματα στα οποία ανιχνεύθηκαν πολυμορφισμοί, στάλθηκαν για αλληλούχιση με σκοπό τη μελέτη των αλληλουχιών τους. Τα αποτελέσματα της μεθόδου αυτής μελετήθηκαν στην συνέχεια για την αναζήτηση των πιθανών μεταλλάξεων στις αλληλουχίες.

4.1 ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΤΟΥ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΤΗΣ ΛΕΥΚΙΝΗΣ ΜΕ ΤΗΝ ΜΕΘΟΔΟ ΤΗΣ ΑΛΥΣΙΔΩΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)

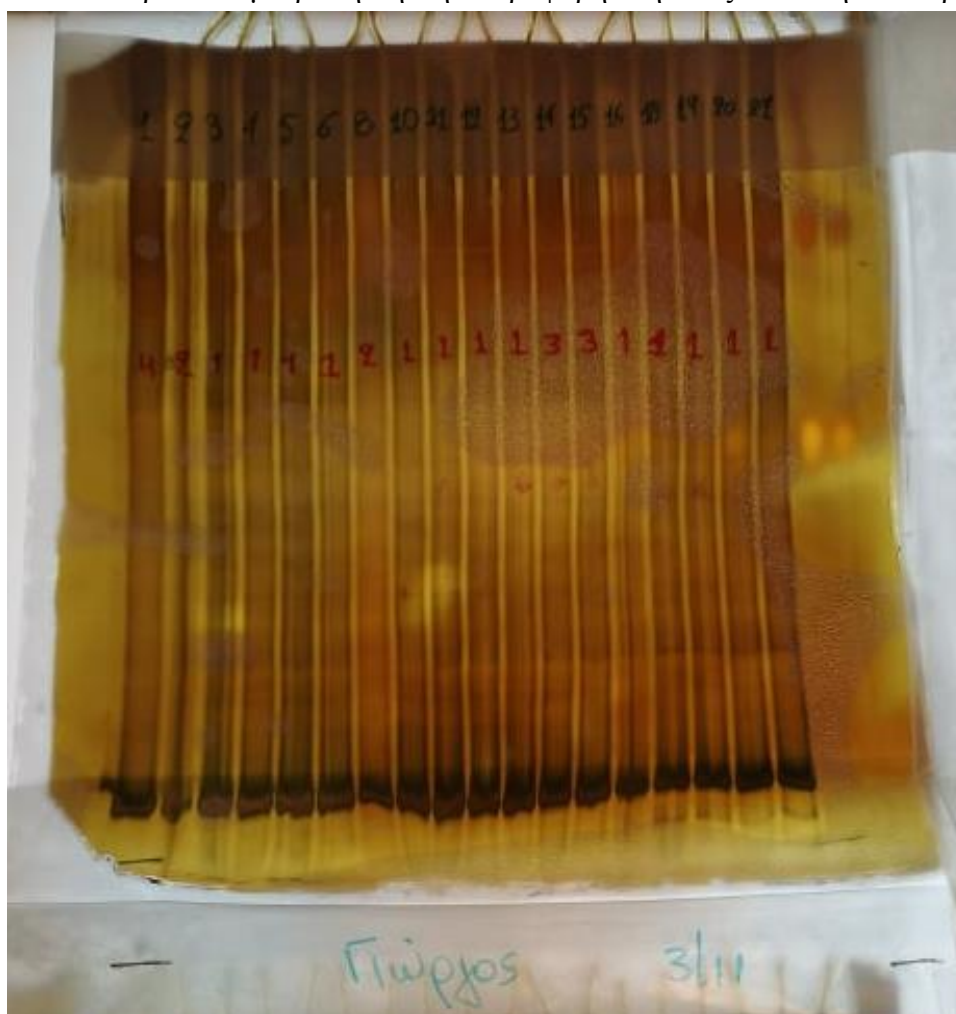
Για να ενισχυθεί το τμήμα που κωδικοποιεί το γονίδιο tRNA^{Leu}, χρησιμοποιήθηκε ένα ζεύγος εκκινητών. Το ζεύγος αυτό ήταν το FwLeu - RevLeu. Πραγματοποιήθηκε έλεγχος στα αποτελέσματα της PCR με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης (2%) ώστε να επιβεβαιωθεί ότι το τμήμα που ενισχύθηκε είναι το επιθυμητό.



Εικόνα 15: Πηκτή αγαρόζης (2%) όπου απεικονίζονται τα προϊόντα της PCR για κάποια από τα δείγματα, όσον αφορά το μιτοχονδριακό γονίδιο tRNA^{Leu}.

4.2 ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΜΕ ΤΗΝ ΜΕΘΟΔΟ SSCP

Στην συνέχεια ακολούθησε η μέθοδος SSCP με σκοπό τον διαχωρισμό των δειγμάτων σε πρότυπα με βάση την ηλεκτροφορητική τους ικανότητα. Παρακάτω



απεικονίζεται ένα από τα πηκτώματα πολυακρυλαμίδης που κατασκευάστηκε, για το γονίδιο ενδιαφέροντος ($tRNA^{Leu}$).

Εικόνα 16: Πήκτωμα πολυακρυλαμίδης για το γονίδιο $tRNA^{Leu}$ όπου απεικονίζονται τα πρότυπα, βάσει των οποίων επιλέχθηκαν ποια δείγματα θα σταλούν για αλληλούχιση.

Στην παραπάνω εικόνα απεικονίζονται 4 διαφορετικά πρότυπα βάσει ηλεκτροφορητικής ικανότητας σε 18 δείγματα. Παρατηρείται ότι το πρότυπο 1 είναι κυρίαρχο μεταξύ των δειγμάτων. Το κοινό πρότυπο ανάμεσα στα δείγματα επιβεβαιώνει την ύπαρξη κοινής αλληλουχίας μεταξύ των δειγμάτων αυτών.

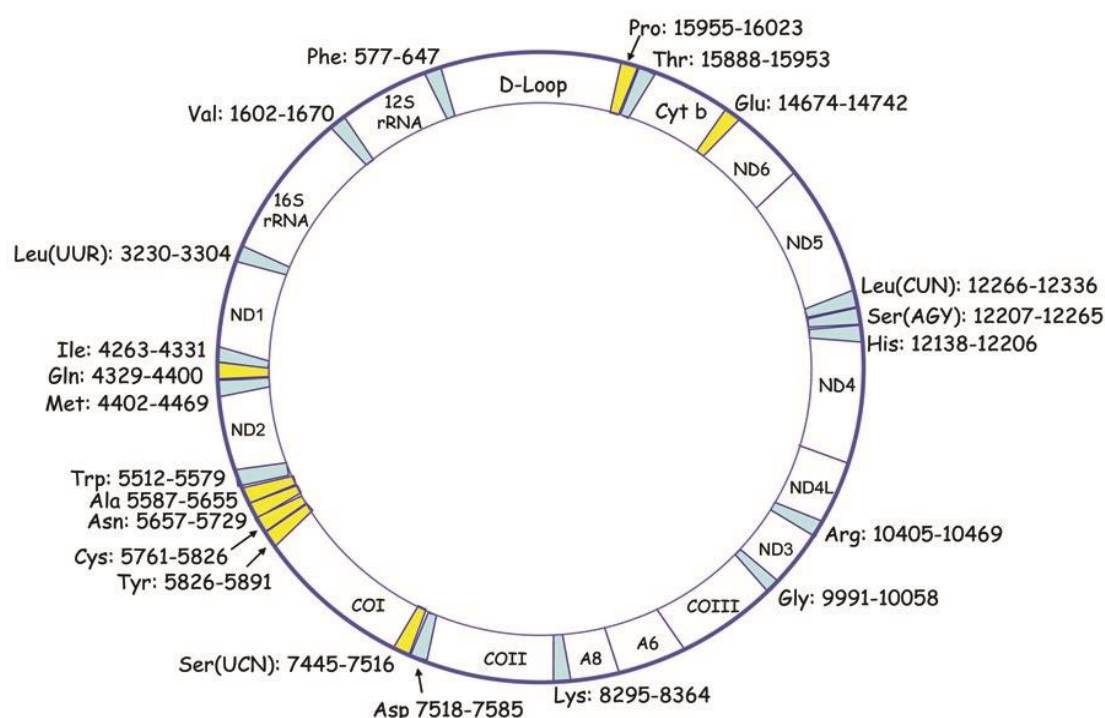


Εικόνα 17: Πήκτωμα πολυακρυλαμίδης για το γονίδιο $tRNA^{Leu}$ όπου απεικονίζονται τα πρότυπα, βάσει των οποίων επιλέχθηκαν ποια δείγματα θα σταλούν για αλληλούχιση.

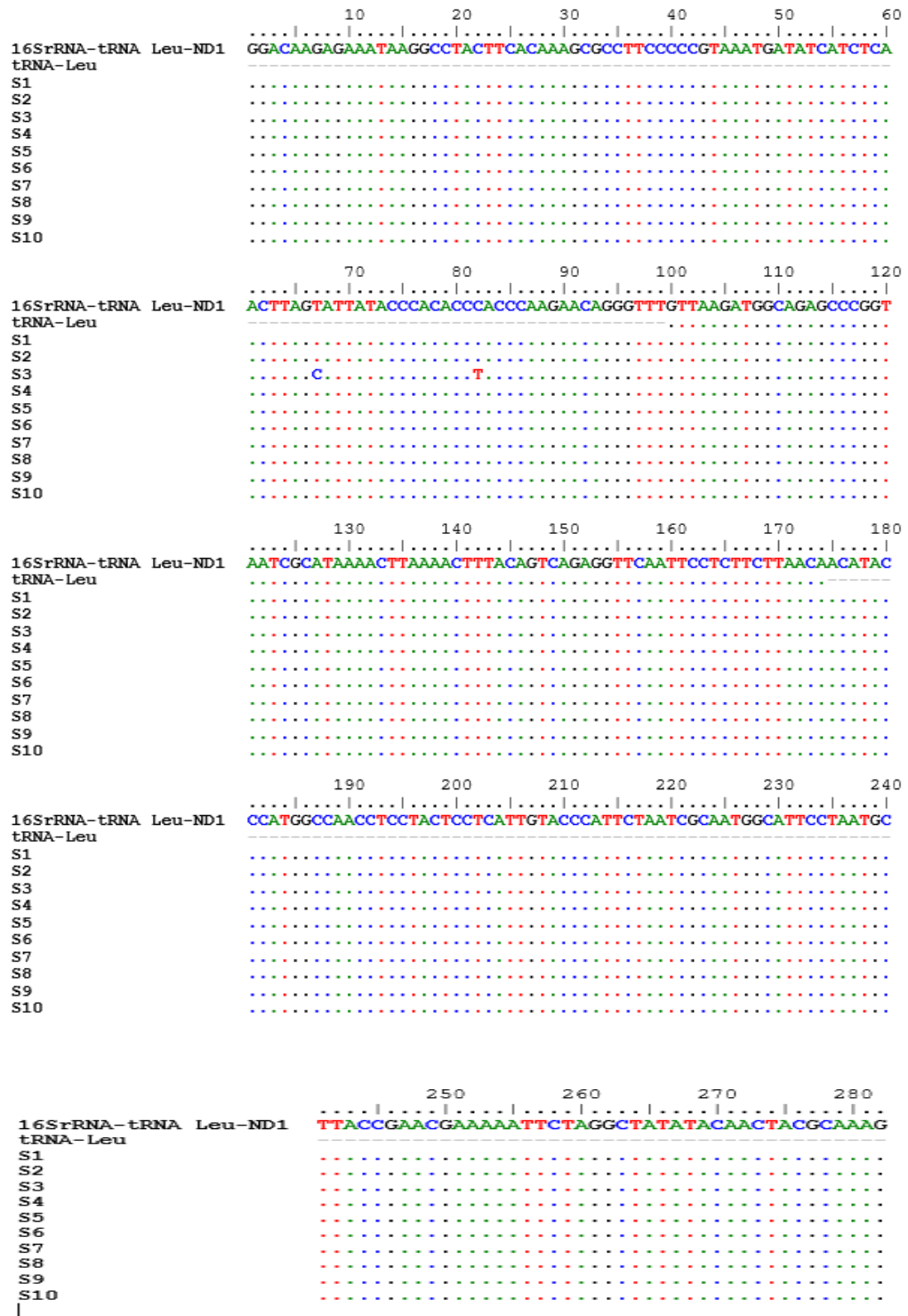
Στην παραπάνω εικόνα παρατηρείται η ύπαρξη 6 διαφορετικών προτύπων στα επόμενα 17 δείγματα του πειράματος. Σε σύγκριση και με τα πρότυπα των προηγούμενων δειγμάτων εμφανίζονται 2 νέα, τα 5 και 6, τα οποία όμως δεν εμφανίζονται σε ζεύγη, όπως συμβαίνει με τα άλλα πρότυπα.

4.3 ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ

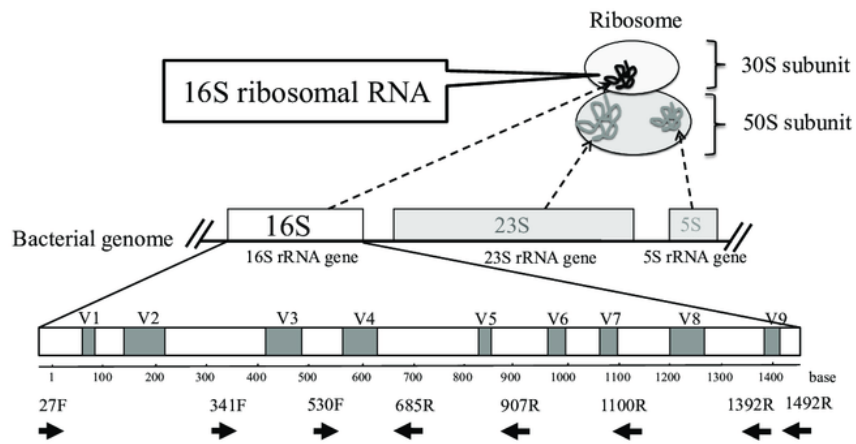
Μόνο τα δείγματα που εμφάνισαν διαφορετικά πρότυπα στην ανάλυση SSCP στάλθηκαν για αλληλούχιση. Η ταυτοποίηση των μεταλλάξεων πραγματοποιήθηκε με την βοήθεια της πρότυπης αλληλουχίας που λήφθηκε από την βάση δεδομένων NCBI και άλλων γραφημάτων. Πιο ειδικά, στα 38 δείγματα που αναλύθηκαν, βρέθηκαν 2 σημειακές μεταλλάξεις σε τμήμα του 16S rRNA στο γονίδιο tRNA^{Leu}. Αυτές ήταν οι T3197C και C3212T στην προβλεπόμενη απλοομάδα U5b (U5b2a2).



Εικόνα 18: Χάρτης του ανθρώπινου μιτοχονδριακού γονιδιώματος. Κάθε μιτοχόνδριο περιέχει 2–10 αντίγραφα ενός μικρού, δίκλωνου, κυκλικού DNA 16,569 kb. Το mtDNA περιέχει 37 γονίδια που κωδικοποιούν για δεκατρείς πρωτεΐνες, υπομονάδες της αναπνευστικής αλυσίδας (Cyt b, ND1-6, COI-III, A6/8), 2 rRNA (12S και 16S) και 22 RNA μεταφοράς. Τα tRNA είναι διάσπαρτα, μεμονωμένα ή σε μικρές ομάδες μεταξύ των άλλων λειτουργικών RNA. Τα «ελαφριά» tRNA υποδεικνύονται με μπλε χρώμα και τα «βαριά» tRNA υποδεικνύονται με κίτρινο χρώμα. [6].



Εικόνες 19, 20: Αποτελέσματα της αλληλούχισης όπου φαίνονται οι 2 σημειακές μεταλλάξεις T3197C (T → C) και C3212T (C → T) στο δείγμα 3 (S3) του γονιδίου tRNA^{Leu} και πιο ειδικά στις βάσεις 67 και 82 αντίστοιχα.



Εικόνες 21: Σχήμα του γονιδίου 16S rRNA όπου φαίνονται οι μεταβλητές περιοχές (V for Variable) 1-9. [67]

Με βάση την κλίμακα των βάσεων στην **Εικόνα 20** και λαμβάνοντας υπόψη την **Εικόνα 19** καταλαβαίνουμε πως οι σημειακές μεταλλάξεις έλαβαν χώρα στην περιοχή V1 είτε εκατέρωθεν αυτής.

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η παρούσα πτυχιακή εργασία πραγματοποιήθηκε για την ανίχνευση και ταυτοποίηση μεταλλάξεων σε μιτοχονδριακά γονίδια tRNA ασθενών που πάσχουν από Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια με σκοπό να διαπιστωθεί ο ρόλος αυτών στην δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων και στο πως αυτές μπορεί να ευθύνονται για την εμφάνιση της συγκεκριμένης νόσου.

Τα υψηλά επίπεδα οξειδωτικών είναι γνωστό ότι είναι επιζήμια για τους αεραγωγούς, πυροδοτώντας την έκφραση και απελευθέρωση προφλεγμονωδών κυτοκινών, ενεργοποιώντας καταρράκτες σηματοδότησης που σχετίζονται με φλεγμονή και προάγοντας τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και τη λανθασμένη ρύθμιση της συγκέντρωσης του Ca^{2+} στο άσθμα και τη ΧΑΠ (Thannickal, V.J. 2000, Mak, J.C. 2006, Kirkham, P.A. 2013, Villegas, L. 2014). Παρομοίως, η φλεγμονή και οι ROS μπορούν με τη σειρά τους να ρυθμίσουν τη μορφολογία και τη λειτουργία των μιτοχονδρίων, δημιουργώντας έναν φαύλο κύκλο δυσλειτουργίας σε νόσους των αεραγωγών (Yao, H. and Rahman, I. 2012, Cloonan, S.M. and Choi, A.M.K. 2016).

Από τα 38 δείγματα που αναλύθηκαν, προέκυψαν 2 σημειακές μεταλλάξεις σε τμήμα του 16s RNA. Η μετάλλαξη T3197C βρίσκεται σε κωδική περιοχή του γονιδίου του 16s rRNA και φαίνεται να εμπλέκεται και να επηρεάζει την σταθερότητα του 16s ριβοσωμικού RNA (Bai, και συν. 2007). Η μετάλλαξη ανιχνεύθηκε επίσης στο 10,6% των ασθενών με μητρικό κληρονομικό σακχαρώδη διαβήτη σε έρευνα που πραγματοποιήθηκε σε Γερμανούς διαβητικούς ασθενείς και προτάθηκε η τροποποίηση του κινδύνου καρκίνου του μαστού στις Ευρωπαϊκές Αμερικανίδες (Klemm T. 2001).

Επί πρόσθετα, σε έρευνα που έλαβε χώρα το 2012 σε ασθενείς με άσθμα, η συγκεκριμένη μετάλλαξη ανιχνεύθηκε σε ένα ποσοστό της τάξης του 3,9% του συνόλου των δειγμάτων (Zifa et al, 2012).

Η μετάλλαξη C3212T αποτελεί μια εκ των ευρεθέντων αλλά μη δημοσιευμένων μεταλλάξεων, όσον αφορά την επιρροή της στην Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια αλλά και γενικότερα σε κάποια παθολογική κατάσταση.

Σε μία διαφορετική έρευνα, οι περισσότεροι ασθενείς με Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια είχαν αρχική εμφάνιση νευρολογικών συμπτωμάτων. Μεταλλάξεις του mtDNA όπως η C3212T έχουν εντοπιστεί σε ασθενείς που παρουσιάζουν οφθαλμολογικά, ενδοκρινικά, γαστρεντερολογικά και καρδιακά προβλήματα (Harrison et al, 1997; Santorelli et al., 1996).

Στην παρούσα έρευνα, το φύλο των ασθενών δεν φαίνεται να σχετίζεται άμεσα με την ύπαρξη σημειακών μεταλλάξεων στα μιτοχονδριακά γονίδια tRNA που εντοπίστηκαν καθώς βρέθηκαν τόσο σε άνδρες όσο και σε γυναίκες με το ίδιο ποσοστό (2 άνδρες, 2 γυναίκες). Ακόμη, παρατηρείται πως η ύπαρξη της μετάλλαξης βρέθηκε σε ασθενείς με ηλικία άνω των 50 ετών, το 75% των οποίων (3 στους 4) είναι άνω των 60. Είναι πιθανό η εμφάνιση μεταλλάξεων σε μιτοχονδριακά γονίδια tRNA που σχετίζονται με την ΧΑΠ να είναι συχνότερη σε ασθενείς μεγαλύτερης ηλικίας.

Οι μεταλλάξεις στο tRNA βρίσκονται στην περιοχή του γονιδίου ND1, το οποίο κωδικοποιεί για την υπομονάδα 1 της αναπνευστικής αλυσίδας των μιτοχονδρίων. Αυτή εντοπίζεται λίγο πριν την κωδική περιοχή του γονιδίου tRNA^{Leu}. Αυτό σημαίνει ότι οι μεταλλάξεις αυτές είναι πιθανό να επηρεάσουν την έκφραση του γονιδίου εμποδίζοντάς την.

Αν η σημειακή μετάλλαξη έχει ως αποτέλεσμα την αλλαγή του κωδικονίου και την δημιουργία ενός νέου που κωδικοποιεί για το ίδιο αμινοξύ, τότε η μετάλλαξη θεωρείται σιωπηλή και δεν επηρεάζει λειτουργικά την παραγόμενη πρωτεΐνη. Σε περίπτωση που η σημειακή μετάλλαξη οδηγήσει στην δημιουργία κωδικονίου που κωδικοποιεί για διαφορετικό αμινοξύ αλλά όχι κωδικονίου λήξης, τότε υπάρχει περίπτωση να επηρεαστεί η λειτουργικότητα της παραγόμενης πρωτεΐνης. Αυτή η μετάλλαξη ονομάζεται παρανοηματική. Αν από την μετάλλαξη προκύψει κωδικόνιο λήξης, τότε η παραγωγή της πρωτεΐνης θα σταματήσει πρόωρα και η πρωτεΐνη (Υπομονάδα 1 της αναπνευστικής αλυσίδας) θα είναι δυσλειτουργική επηρεάζοντας την αναπνευστική αλυσίδα, την παραγωγή ROS και τελικά τα μιτοχόνδρια [Shanthirabalan et al., 2018].

Τα αντιδραστικά είδη οξυγόνου (ROS) που υπάρχουν στον καπνό του τσιγάρου θεωρείται ότι συμβάλλουν στην ανάπτυξη και την πρόοδο της ΧΑΠ μέσω της επαγωγής συστηματικού οξειδωτικού στρες, το οποίο μπορεί να οδηγήσει σε τραυματισμό ιστού, μυϊκή δυσλειτουργία, ανεπάρκεια οργάνων και παρατεταμένη συστηματική φλεγμονή. Στην αέρια-φάση τα ROS στον καπνό του τσιγάρου δεν είναι ικανά να διαχέονται μέσω της πλασματικής

μεμβράνης των επιθηλιακών κυττάρων των αεραγωγών και επομένως είναι απίθανο να περάσουν μέσα από τον φραγμό των επιθηλιακών κυττάρων του αεραγωγού. Συστατικά του καπνού του τσιγάρου, συμπεριλαμβανομένων των φαινολικών ενώσεων, αλδεΐδες, και πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες, μπορούν εύκολα να διεισδύουν στα επιθηλιακά κύτταρα των αεραγωγών και να εισέρχονται στη συστηματική κυκλοφορία. Μόλις μπουν στην κυκλοφορία, τα λιπόφιλα συστατικά μπορούν να διαταράξουν τη λειτουργία των μιτοχονδρίων, οδηγώντας στην αυξημένη ενδοκυτταρική παραγωγή μιτοχονδριακών ROS [Prokopczyk et al., 2002 ,van der Toorn et al., 2007].

Η σημασία του μεταβολισμού των μιτοχονδριακών ROS στη ΧΑΠ αποδεικνύεται καλύτερα από το γεγονός ότι πολλά αντιοξειδωτικά συμπεριλαμβανομένης της γλουταθειόνης, της θειορεδοξίνης, της δισμουτάσης του υπεροξειδίου και της οξυγενάσης της αίμης-1, είναι σημαντικά στη ΧΑΠ [Slebos et al., 2007]. Η παθοφυσιολογία συνδέεται με τα μιτοχόνδρια. Τα μιτοχόνδρια υπάρχουν σε όλα τα ευκαρυωτικά κύτταρα και χρησιμοποιούνται στην οξειδωτική φωσφορυλίωση (OXPHOS) για τη μετατροπή της ενέργειας χημικών ουσιών, υδατανθράκων και λιπών, σε χρησιμοποιήσιμες μορφές ενέργειας. Τα μιτοχόνδρια δημιουργούν επίσης περίπου το 85% των ενδοκυτταρικών ROS, το οποίο μπορεί να προάγει την κυτταρική διαφοροποίηση ή να προκαλέσει απόπτωση [Wallace, 1999 , Wallace, 2006].

Το mtDNA είναι ιδιαίτερα ευαίσθητο σε οξειδωτική βλάβη και μεταλλάξεων λόγω του υψηλού ποσοστού παραγωγής ROS και της περιορισμένης ικανότητας επιδιόρθωσης του DNA στα μιτοχόνδρια [Croteau and Bohr, 1997]. Ο καπνός του τσιγάρου είναι ένας περιβαλλοντικός παράγοντας που προκαλεί οξειδωτικό στρες δημιουργώντας υψηλά επίπεδα ROS εντός του σώματος [Church and Pryor, 1985 , Pryor and Stone, 1993 , Vallyathan and Shi, 1997]. Το χρόνιο οξειδωτικό στρες μπορεί να προκαλέσει βλάβες στο mtDNA, με αποτέλεσμα να υπάρξουν σημειακές μεταλλάξεις, εισαγωγές και διαγραφές [Lee et al., 2005]. Η συσσώρευση των οξειδωτικών βλαβών και οι προκύπτουσες διακυμάνσεις της αλληλουχίας του mtDNA μπορεί τελικά να οδηγήσει σε μη φυσιολογικό OXPHOS στα προσβεβλημένα κύτταρα [Wallace, 2010]. Ως εκ τούτου, το οξειδωτικό στρες που προκαλείται από το κάπνισμα μπορεί να διαδραματίσει σημαντικό ρόλο στην παθογένεση ασθενειών που σχετίζονται με το κάπνισμα.

Προηγούμενες μελέτες (Shizhen Zheng et al, 2012] έχουν δείξει ότι οι κοινές και οι «μη παθολογικές» παραλλαγές του mtDNA που καθορίζουν τις

διάφορες απλοομάδες mtDNA σχετίζονται με την ευαισθησία σε μεταβολικές και εκφυλιστικές ασθένειες στον άνθρωπο. Επηρεάζουν επίσης τη μακροζωία και την καρκινογένεση υπό συνθήκες όπου η παραγωγή μιτοχονδριακών ROS θεωρείται ότι παίζει ρόλο [Wallace, D.C. 2006 , Tanaka et al., 1998 , Cai et al., 2009 , Takagi, 2004].

Επιπλέον, οι παραλλαγές mtDNA που ορίζουν τις διάφορες απλοομάδες mtDNA καθορίζουν επίσης διαφορές στην απόδοση του OXPHOS και την παραγωγή ROS τόσο σε ποντίκια όσο και σε ανθρώπους [Moreno-Loshuertos et al., 2006 , Marcuello et al., 2009 , Marcuello et al., 2009 , Martínez-Redondo et al., 2010].

Ακόμη, ο αυξημένος αριθμός αντιγράφων mtDNA που προκαλούνται σε αντιστάθμιση της βλάβης έχει βρεθεί ότι σχετίζεται θετικά με αυξημένο κίνδυνο για καρκίνο του πνεύμονα μεταξύ των βαρέων καπνιστών [Hosgood et al., 2010]. Σε προηγούμενη μελέτη, αρκετές απλοομάδες του mtDNA συσχετίστηκαν με αυξημένο κίνδυνο καρκίνου του πνεύμονα σε κινεζικό πληθυσμό από τη νοτιοδυτική Κίνα [Zheng et al., 2012].

Επειδή το κάπνισμα είναι ένας από τους κοινούς περιβαλλοντικούς παράγοντες κινδύνου που συμβάλλουν στην ανάπτυξη του καρκίνου των πνευμόνων στην ΧΑΠ και επειδή ο καρκίνος του πνεύμονα και η ΧΑΠ συνδέονται σε μοριακό και γενετικό επίπεδο, υποθέτουμε ότι οι απλοομάδες του mtDNA μπορεί επίσης να παίζουν ρόλο στην ευαισθησία στη ΧΑΠ [Rhee et al., 2020 , Pillai et al., 2009 , Young et al., 2009 , Young et al., 2008].

Οι πολυπαραγοντικές αναλύσεις λογιστικής παλινδρόμησης με κριτήρια την ηλικία, το φύλο και τις συνήθειες καπνίσματος αποκάλυψαν ότι ο κίνδυνος για τη διαγραφή μέρους του mtDNA ήταν 4,2 φορές υψηλότερος σε ασθενείς με ΧΑΠ σε σύγκριση με τα controls. Είναι ενδιαφέρον ότι η εμφάνιση περιπτώσεων διαγραφής του mtDNA ήταν σημαντικά υψηλότερη σε γυναίκες μη καπνιστές σε σύγκριση με μη καπνιστές άνδρες ασθενείς με ΧΑΠ και με τα controls. Αναλύσεις λογιστικής παλινδρόμησης προσαρμοσμένες για την ηλικία αποκάλυψαν ότι ο κίνδυνος για τη διαγραφή του mtDNA ήταν 2 φορές υψηλότερος στις γυναίκες που δεν καπνίζουν σε σύγκριση με τους άνδρες. [Shizhen Zheng et al, 2012].

Με την συνεχή προσπάθεια των επιστημόνων στην έρευνα καθίσταται καθημερινά όλο και πιο εφικτή η εύρεση γενετικά και μη υπεύθυνων παραγόντων που οδηγούν στην εμφάνιση της Χρόνια Αποφρακτικής Πνευμονοπάθειας, όπως είναι οι σημειακές μεταλλάξεις σε μιτοχονδριακά

γονίδια tRNA. Ακόμη, η περαιτέρω μελέτη των μιτοχονδρίων θα συμβάλλουν στην καλύτερη και πολύπλευρη κατανόηση αυτών, όσον αφορά την λειτουργία και την σχέση τους με άλλες παθολογικές καταστάσεις. Η γνώση θα οδηγήσει σε πιο στοχευμένη, γρήγορη και αποτελεσματική αντιμετώπιση μιας παθολογικής κατάστασης, το οποίο είναι ζωτικής σημασίας για κάθε ασθενή. Τέλος, η συνεχής ανάπτυξη της τεχνολογίας σε επίπεδο μηχανημάτων και μοριακών τεχνικών (τεχνικές ενίσχυσης, αλληλούχισης κ.α.) θα μπορούσε να βελτιώσει σημαντικά τις συνθήκες εργασίας των επιστημόνων και να διευκολύνει την έρευνα.

6.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] Silverman, E.K. (2020) Genetics of COPD. *Annual Review of Physiology*, 82(1) 413–431.
- [2] Mintz, M.L. (ed.) (2006) *Disorders of the respiratory tract: common challenges in primary care*. Current clinical practice. Totowa, N.J: Humana Press.
- [3] Zifa, E., Daniil, Z., Skoumi, E., Stavrou, M., Papadimitriou, K., Terzenidou, M., Kostikas, K., Bagiatis, V., Gourgoulianis, K.I. and Mamuris, Z. (2012) Mitochondrial genetic background plays a role in increasing risk to asthma. *Molecular Biology Reports*, 39(4) 4697–4708.
- [4] Jaksch, M. (2001) Frequency of mitochondrial transfer RNA mutations and deletions in 225 patients presenting with respiratory chain deficiencies. *Journal of Medical Genetics*, 38(10) 665–673.
- [5] Aguilera-Aguirre, L., Bacsı, A., Saavedra-Molina, A., Kurosky, A., Sur, S. and Boldogh, I. (2009) Mitochondrial Dysfunction Increases Allergic Airway Inflammation. *The Journal of Immunology*, 183(8) 5379–5387.
- [6] Zifa, E., Giannouli, S., Theotokis, P., Stamatis, C., Mamuris, Z. and Stathopoulos, C. (2007) Mitochondrial tRNA Mutations: Clinical and Functional Perturbations. *RNA Biology*, 4(1) 38–66.
- [7] Fahn, H.-J., Wang, L.-S., Kao, S.-H., Chang, S.-C., Huang, M.-H. and Wei, Y.-H. (1998) Smoking-Associated Mitochondrial DNA Mutations and Lipid Peroxidation in Human Lung Tissues. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 19(6) 901–909.
- [8] Yasukawa, T., Suzuki, T., Ishii, N., Ueda, T., Ohta, S. and Watanabe, K. (2000) Defect in modification at the anticodon wobble nucleotide of mitochondrial tRNA^{Lys} with the MERRF encephalomyopathy pathogenic mutation. *FEBS Letters*, 467(2–3) 175–178.
- [9] Kirino, Y. and Suzuki, T. (2005) Human Mitochondrial Diseases Associated with tRNA Wobble Modification Deficiency. *RNA Biology*, 2(2) 41–44.
- [10] Ragland, M.F., Benway, C.J., Lutz, S.M., Bowler, R.P., Hecker, J., Hokanson, J.E., Crapo, J.D., Castaldi, P.J., DeMeo, D.L., Hersh, C.P., Hobbs, B.D., Lange, C., Beaty, T.H., Cho, M.H. and Silverman, E.K. (2019) Genetic Advances in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. Insights from COPD Gene. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 200(6) 677–690.
- [11] Albertson, T.E., Chenoweth, J.A., Pearson, S.J. and Murin, S. (2020) The pharmacological management of asthma-chronic obstructive pulmonary disease overlap syndrome (ACOS). *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 21(2) 213–231.

- [12] Zorov, D.B., Juhaszova, M. and Sollott, S.J. (2014) Mitochondrial Reactive Oxygen Species (ROS) and ROS-Induced ROS Release. *Physiological Reviews*, 94(3) 909–950.
- [13] Wong, H.-S., Dighe, P.A., Mezera, V., Monternier, P.-A. and Brand, M.D. (2017) Production of superoxide and hydrogen peroxide from specific mitochondrial sites under different bioenergetic conditions. *Journal of Biological Chemistry*, 292(41) 16804–16809.
- [14] Mycroft, K., Krenke, R. and Górska, K. (2020) Eosinophils in COPD—Current Concepts and Clinical Implications. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice*, 8(8) 2565–2574.
- [15] Mazat, J.-P., Devin, A. and Ransac, S. (2020) Modelling mitochondrial ROS production by the respiratory chain. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 77(3) 455–465.
- [16] Langen, R.C.J., Korn, S.H. and Wouters, E.F.M. (2003) ROS in the local and systemic pathogenesis of COPD. *Free Radical Biology and Medicine*, 35(3) 226–235.
- [17] Boukhenouna, S., Wilson, M.A., Bahmed, K. and Kosmider, B. (2018) Reactive Oxygen Species in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018 1–9.
- [18] Szilasi, M., Dolinay, T., Nemes, Z. and Strausz, J. (2006) Pathology of chronic obstructive pulmonary disease. *Pathology & Oncology Research*, 12(1) 52–60.
- [19] Sousa, J.S., D’Imprima, E. and Vonck, J. (2018) Mitochondrial Respiratory 1Chain Complexes. In: J.R. Harris and E.J. Boekema (eds.) *Membrane Protein Complexes: Structure and Function*. Singapore: Springer Singapore, 167–227.
- [20] Centers for Disease Control and Prevention <https://www.cdc.gov/copd/basics-about.html>
- [21] Salvi, S. (2014) Tobacco Smoking and Environmental Risk Factors for Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Clinics in Chest Medicine*, 35(1) 17–27.
- [22] McGuinness, A. and Sapey, E. (2017) Oxidative Stress in COPD: Sources, Markers, and Potential Mechanisms. *Journal of Clinical Medicine*, 6(2) 21.
- [23] Berg J.M, J.L. Tymoczko, G.J. Gatto, L. Stryer, (2012), BIOXHMEIA. Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης.
- [24] Kinkade, J.M., Pember, S.O., Barnes, K.C., Shapira, R., Spitznagel, J.K. and Martin, L.E. (1983) Differential distribution of distinct forms of myeloperoxidase in different azurophilic granule subpopulations from human neutrophils. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 114(1) 296–303.
- [25] Murphy, M.P. (2009) How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochemical Journal*, 417(1) 1–13.

- [26] Denu, J.M. and Tanner, K.G. (1998) Specific and Reversible Inactivation of Protein Tyrosine Phosphatases by Hydrogen Peroxide: Evidence for a Sulfenic Acid Intermediate and Implications for Redox Regulation. *Biochemistry*, 37(16) 5633–5642.
- [27] Kuiper, J.W.P., Sun, C., Magalhães, M.A.O. and Glogauer, M. (2011) Rac regulates PtdInsP3 signaling and the chemotactic compass through a redox-mediated feedback loop. *Blood*, 118(23) 6164–6171.
- [28] Alexeyev, M.F. (2009) Is there more to aging than mitochondrial DNA and reactive oxygen species?: mtDNA + ROS = Aging? *FEBS Journal*, 276(20) 5768–5787.
- [29] Ramsay, R.R. and Singer, T.P. (1992) Relation of superoxide generation and lipid peroxidation to the inhibition of NADH-Q oxidoreductase by rotenone, piericidin A, and MPP+. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 189(1) 47–52.
- [30] Votyakova, T.V. and Reynolds, I.J. (2008) $\Delta\Psi_m$ -Dependent and -independent production of reactive oxygen species by rat brain mitochondria: ROS and rat brain mitochondria. *Journal of Neurochemistry*, 79(2) 266–277.
- [31] Starkov, A.A. and Fiskum, G. (2001) Myxothiazol Induces H₂O₂ Production from Mitochondrial Respiratory Chain. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 281(3) 645–650.
- [32] Deng, K., Shenoy, S.K., Tso, S.-C., Yu, L. and Yu, C.-A. (2001) Reconstitution of Mitochondrial Processing Peptidase from the Core Proteins (Subunits I and II) of Bovine Heart Mitochondrial Cytochrome bc₁ Complex. *Journal of Biological Chemistry*, 276(9) 6499–6505.
- [33] Boldogh, I. (2005) ROS generated by pollen NADPH oxidase provide a signal that augments antigen-induced allergic airway inflammation. *Journal of Clinical Investigation*, 115(8) 2169–2179.
- [34] Bacsı, A., Choudhury, B., Dharajiyā, N., Sur, S. and Boldogh, I. (2006) Subpollen particles: Carriers of allergenic proteins and oxidases. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 118(4) 844–850.
- [35] von Jagow, G., Schägger, H., Riccio, P., Klingenberg, M. and Kolb, H.J. (1977) b · c₁ complex from beef heart: Hydrodynamic properties of the complex prepared by a refined hydroxyapatite chromatography in Triton X-100. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 462(3) 549–558.
- [36] Yang, X.H. and Trumpower, B.L. (1986) Purification of a three-subunit ubiquinol-cytochrome c oxidoreductase complex from *Paracoccus denitrificans*. *Journal of Biological Chemistry*, 261(26) 12282–12289.
- [37] Clason, T., Ruiz, T., Schägger, H., Peng, G., Zickermann, V., Brandt, U., Michel, H. and Radermacher, M. (2010) The structure of eukaryotic and prokaryotic complex I. *Journal of Structural Biology*, 169(1) 81–88.

- [38] Hägerhäll, C. (1997) Succinate: quinone oxidoreductases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1320(2) 107–141.
- [39] Wittenhagen, L.M. and Kelley, S.O. (2002) Dimerization of a pathogenic human mitochondrial tRNA. *Nature Structural Biology*, Available from <http://www.nature.com/doi/10.1038/nsb820> [accessed 2 September 2021].
- [40] Florentz, C. (2002) Molecular Investigations on tRNAs Involved in Human Mitochondrial Disorders. *Bioscience Reports*, 22(1) 81–98.
- [41] IS092 Mitochondrial medicine: Diagnostic approaches and current treatments (2005) 238 S16.
- [42] Munnich, A., Rötig, A., Chretien, D., Saudubray, J., Cormier, V. and Rustin, P. (1996) Clinical presentations and laboratory investigations in respiratory chain deficiency. *European Journal of Pediatrics*, 155(4) 262–274.
- [43] Chalmers, R.M., Lamont, P.J., Nelson, I., Ellison, D.W., Thomas, N.H., Harding, A.E. and Hammans, S.R. (1997) A mitochondrial DNA tRNA^{Val} point mutation associated with adult-onset Leigh syndrome. *Neurology*, 49(2) 589–592.
- [44] Helm, M., Florentz, C., Chomyn, A. and Attardi, G. (1999) Search for differences in post-transcriptional modification patterns of mitochondrial DNA-encoded wild-type and mutant human tRNA^{Lys} and tRNA^{Leu}(UUR). *Nucleic Acids Research*, 27(3) 756–763.
- [45] Mollers, M. (2005) A new mechanism for mtDNA pathogenesis: impairment of post-transcriptional maturation leads to severe depletion of mitochondrial tRNA^{Ser}(UCN) caused by T7512C and G7497A point mutations. *Nucleic Acids Research*, 33(17) 5647–5658.
- [46] Petruzzelli, S., Puntoni, R., Mimotti, P., Pulerá, N., Baliva, F., Fornai, E. and Giuntini, C. (1997) Plasma 3-Nitrotyrosine in Cigarette Smokers. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 156(6) 1902–1907.
- [47] Saux, N. Aaron, S.D., Angel, J.B., Lunau, M., Wright, K., Fex, C., Le and Dales, R.E. (2001) Granulocyte Inflammatory Markers and Airway Infection during Acute Exacerbation of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 163(2) 349–355.
- [48] Rahman, I., Morrison, D., Donaldson, K. and MacNee, W. (1996) Systemic oxidative stress in asthma, COPD, and smokers. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 154(4) 1055–1060.
- [49] Domej, W., Oetll, K. and Renner, W. (2014) Oxidative stress and free radicals in COPD – implications and relevance for treatment. *International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease*, 1207.
- [50] Bathri, R., Bose, P., Gujar, V. and Kumar, L. (2017) The Role of ROS in COPD Progression and Therapeutic Strategies. *Reactive Oxygen Species*, Available from <https://www.rosj.org/index.php/ros/article/view/89> [accessed 15 September 2021].

- [51] Wiegman, C.H., Michaeloudes, C., Haji, G., Narang, P., Clarke, C.J., Russell, K.E., Bao, W., Pavlidis, S., Barnes, P.J., Kanerva, J., Bittner, A., Rao, N., Murphy, M.P., Kirkham, P.A., Chung, K.F., Adcock, I.M., Brightling, C.E., Davies, D.E., Finch, D.K., Fisher, A.J., Gaw, A., Knox, A.J., Mayer, R.J., Polkey, M., Salmon, M. and Singh, D. (2015) Oxidative stress–induced mitochondrial dysfunction drives inflammation and airway smooth muscle remodeling in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 136(3) 769–780.
- [52] Hawkins, C.L., Pattison, D.I. and Davies, M.J. (2003) Hypochlorite-induced oxidation of amino acids, peptides and proteins. *Amino Acids*, 25(3–4) 259–274.
- [53] Lee, P.Y., Costumbrado, J., Hsu, C.-Y. and Kim, Y.H. (2012) Agarose Gel Electrophoresis for the Separation of DNA Fragments. *Journal of Visualized Experiments*, (62) 3923.
- [54] Konstantinos, K.V., Panagiotis, P., Antonios, V.T., Agelos, P. and Argiris, N.V. (2008) PCR–SSCP: A Method for the Molecular Analysis of Genetic Diseases. *Molecular Biotechnology*, 38(2) 155–163.
- [55] Lee, P.Y., Costumbrado, J., Hsu, C.-Y. and Kim, Y.H. (2012) Agarose Gel Electrophoresis for the Separation of DNA Fragments. *Journal of Visualized Experiments*, (62) 3923.
- [56] Verma, M., Kulshrestha, S. and Puri, A. (2017) Genome Sequencing. In: J.M. Keith (ed.) *Bioinformatics*. New York, NY: Springer New York, 3–33.
- [57] Muthukumar, M. and Kong, C.Y. (2006) Simulation of polymer translocation through protein channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(14) 5273–5278. Available from <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0510725103> [accessed 22 December 2021].
- [58] Klemm, T., Neumann, S., Trülzsch, B., Pistrosch, F., Hanefeld, M. and Paschke, R. (2001) Search for mitochondrial DNA mutation at position 3243 in German patients with a positive family history of maternal diabetes mellitus. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes*, 109(05) 283–287. Available from <http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-2001-16348> [accessed 17 January 2022].
- [59] Santorelli, F.M., Shanske, S., Jain, K.D., Tick, D., Schon, E.A. and DiMauro, S. (1994) A T → C mutation at nt 8993 of mitochondrial DNA in a child with Leigh syndrome. *Neurology*, 44(5) 972–972. Available from <http://www.neurology.org/cgi/doi/10.1212/WNL.44.5.972> [accessed 17 January 2022].
- [60] Thannickal, V.J. and Fanburg, B.L. (2000) Reactive oxygen species in cell signaling. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 279(6) L1005–L1028. Available from <https://www.physiology.org/doi/10.1152/ajplung.2000.279.6.L1005> [accessed 27 January 2022].

- [61] Mak, J.C. and Chan-Yeung, M.M. (2006) Reactive oxidant species in asthma: *Current Opinion in Pulmonary Medicine*, 12(1) 7–11. Available from <http://journals.lww.com/00063198-200601000-00003> [accessed 27 January 2022].
- [62] Kirkham, P.A. and Barnes, P.J. (2013) Oxidative Stress in COPD. *Chest*, 144(1) 266–273. Available from <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0012369213604766> [accessed 27 January 2022].
- [63] Villegas, L. (2014) Oxidative Stress and Therapeutic Development in Lung Diseases. *Journal of Pulmonary & Respiratory Medicine*, 04(04). Available from <https://www.omicsonline.org/open-access/oxidative-stress-and-therapeutic-development-in-lung-diseases-2161-105X.1000194.php?aid=28308> [accessed 27 January 2022].
- [64] Yao, H. and Rahman, I. (2012) Role of histone deacetylase 2 in epigenetics and cellular senescence: implications in lung inflammation and COPD. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 303(7) L557–L566. Available from <https://www.physiology.org/doi/10.1152/ajplung.00175.2012> [accessed 27 January 2022].
- [65] Cloonan, S.M. and Choi, A.M.K. (2016) Mitochondria in lung disease. *Journal of Clinical Investigation*, 126(3) 809–820. Available from <https://www.jci.org/articles/view/81113> [accessed 27 January 2022].
- [66] Jedynak-Slyvka, M., Jabczynska, A. and Szczesny, R.J. (2021) Human Mitochondrial RNA Processing and Modifications: Overview. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(15) 7999. Available from <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/15/7999> [accessed 27 January 2022].
- [67] Fukuda, K., Ogawa, M., Taniguchi, H. and Saito, M. (2016) Molecular Approaches to Studying Microbial Communities: Targeting the 16S Ribosomal RNA Gene. *Journal of UOEH*, 38(3) 223–232. Available from https://www.jstage.jst.go.jp/article/juoeh/38/3/38_223/_article [accessed 4 February 2022].
- [68] Shanthirabalan, S., Chomilier, J. and Carpentier, M. (2018) Structural effects of point mutations in proteins. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 86(8) 853–867. Available from <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/prot.25499> [accessed 14 February 2022].
- [69] Zheng, S., Wang, C., Qian, G., Wu, G., Guo, R., Li, Q., Chen, Y., Li, J., Li, H., He, B., Chen, H. and Ji, F. (2012) Role of mtDNA haplogroups in COPD susceptibility in a southwestern Han Chinese population. *Free Radical Biology and Medicine*, 53(3) 473–481.
- [70] Prokopczyk, B., Hoffmann, D., Bologna, M., Cunningham, A.J., Trushin, N., Akerkar, S., Boyiri, T., Amin, S., Desai, D., Colosimo, S., Pittman, B., Leder, G., Ramadani, M., Henne-Bruns, D., Beger, H.G. and El-Bayoumy, K. (2002) Identification of Tobacco-Derived Compounds in Human Pancreatic Juice.

Chemical Research in Toxicology, 15(5) 677–685. Available from <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/tx0101088> [accessed 10 February 2022].

[71] van der Toorn, M., Slebos, D.-J., de Bruin, H.G., Leuvenink, H.G., Bakker, S.J.L., Gans, R.O.B., Koëter, G.H., van Oosterhout, A.J.M. and Kauffman, H.F. (2007) Cigarette smoke-induced blockade of the mitochondrial respiratory chain switches lung epithelial cell apoptosis into necrosis. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 292(5) L1211–L1218. Available from <https://www.physiology.org/doi/10.1152/ajplung.00291.2006> [accessed 10 February 2022].

[72] Slebos, D.-J., Ryter, S.W., van der Toorn, M., Liu, F., Guo, F., Baty, C.J., Karlsson, J.M., Watkins, S.C., Kim, H.P., Wang, X., Lee, J.S., Postma, D.S., Kauffman, H.F. and Choi, A.M.K. (2007) Mitochondrial Localization and Function of Heme Oxygenase-1 in Cigarette Smoke-Induced Cell Death. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 36(4) 409–417. Available from <http://www.atsjournals.org/doi/abs/10.1165/rcmb.2006-0214OC> [accessed 10 February 2022].

[73] Wallace, D.C. (1999) Mitochondrial Diseases in Man and Mouse. *Science*, 283(5407) 1482–1488. Available from <https://www.science.org/doi/10.1126/science.283.5407.1482> [accessed 10 February 2022].

[74] Wallace, D.C. (2006) A Mitochondrial Paradigm of Metabolic and Degenerative Diseases, Aging, and Cancer: A Dawn for Evolutionary Medicine. *The FASEB Journal*, 20(5). Available from <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1096/fasebj.20.5.A1474-c> [accessed 10 February 2022].

[75] Croteau, D.L. and Bohr, V.A. (1997) Repair of Oxidative Damage to Nuclear and Mitochondrial DNA in Mammalian Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 272(41) 25409–25412. Available from <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021925818601164> [accessed 10 February 2022].

[76] Church, D.F. and Pryor, W.A. (1985) Free-radical chemistry of cigarette smoke and its toxicological implications. *Environmental Health Perspectives*, 64 111–126. Available from <https://ehp.niehs.nih.gov/doi/10.1289/ehp.8564111> [accessed 10 February 2022].

[77] Pryor, W.A. and Stone, K. (1993) Oxidants in Cigarette Smoke Radicals, Hydrogen Peroxide, Peroxynitrate, and Peroxynitrite. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 686(1 Tobacco Smoki) 12–27. Available from <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1749-6632.1993.tb39148.x> [accessed 10 February 2022].

[78] Vallyathan, V. and Shi, X. (1997) The role of oxygen free radicals in occupational and environmental lung diseases. *Environmental Health Perspectives*, 105(suppl 1) 165–177. Available from <https://ehp.niehs.nih.gov/doi/10.1289/ehp.97105s1165> [accessed 10 February 2022].

- [79] Lee, H.-C., Yin, P.-H., Lin, J.-C., Wu, C.-C., Chen, C.-Y., Wu, C.-W., Chi, C.-W., Tam, T.-N. and Wei, Y.-H. (2005) Mitochondrial Genome Instability and mtDNA Depletion in Human Cancers. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1042(1) 109–122. Available from <http://doi.wiley.com/10.1196/annals.1338.011> [accessed 10 February 2022].
- [80] Wallace, D.C. (2010) Mitochondrial DNA mutations in disease and aging. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, n/a-n/a. Available from <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/em.20586> [accessed 10 February 2022].
- [81] Cai, X., Wang, X., Li, S., Qian, J., Qian, D., Chen, F., Yang, Y., Yuan, Z., Xu, J., Bai, Y., Yu, S. and Jin, L. (2009b) Association of Mitochondrial DNA Haplogroups with Exceptional Longevity in a Chinese Population F. Kronenberg (ed.). *PLoS ONE*, 4(7) e6423. Available from <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0006423> [accessed 12 February 2022].
- [82] Takagi, K. (2004) Association of a 5178C → A (Leu237Met) polymorphism in the mitochondrial DNA with a low prevalence of myocardial infarction in Japanese individuals. *Atherosclerosis*, 175(2) 281–286. Available from <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021915004001510> [accessed 12 February 2022].
- [83] Moreno-Loshuertos, R., Acín-Pérez, R., Fernández-Silva, P., Movilla, N., Pérez-Martos, A., de Cordoba, S.R., Gallardo, M.E. and Enríquez, J.A. (2006) Differences in reactive oxygen species production explain the phenotypes associated with common mouse mitochondrial DNA variants. *Nature Genetics*, 38(11) 1261–1268. Available from <http://www.nature.com/articles/ng1897> [accessed 12 February 2022].
- [84] Marcuello, A., Martínez-Redondo, D., Dahmani, Y., Terreros, J.L., Aragonés, T., Casajús, J.A., Echavarrri, J.M., Quílez, J., Montoya, J., López-Pérez, M.J. and Díez-Sánchez, C. (2009) Steady exercise removes VO₂max difference between mitochondrial genomic variants. *Mitochondrion*, 9(5) 326–330. Available from <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1567724909000853> [accessed 12 February 2022].
- [85] Marcuello, A., Martínez-Redondo, D., Dahmani, Y., Casajús, J.A., Ruiz-Pesini, E., Montoya, J., López-Pérez, M.J. and Díez-Sánchez, C. (2009) Human mitochondrial variants influence on oxygen consumption. *Mitochondrion*, 9(1) 27–30. Available from <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1567724908000871> [accessed 12 February 2022].
- [86] Martínez-Redondo, D., Marcuello, A., Casajús, J.A., Ara, I., Dahmani, Y., Montoya, J., Ruiz-Pesini, E., López-Pérez, M.J. and Díez-Sánchez, C. (2010) Human mitochondrial haplogroup H: The highest VO₂max consumer – Is it a paradox? *Mitochondrion*, 10(2) 102–107. Available from <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1567724909001743> [accessed 12 February 2022].

- [87] Hosgood, H.D., Liu, C.S., Rothman, N., Weinstein, S.J., Bonner, M.R., Shen, M., Lim, U., Virtamo, J., Cheng, W. I., Albanes, D. and Lan, Q. (2010) Mitochondrial DNA copy number and lung cancer risk in a prospective cohort study. *Carcinogenesis*, 31(5) 847–849. Available from <https://academic.oup.com/carcin/article-lookup/doi/10.1093/carcin/bgq045> [accessed 12 February 2022].
- [88] Zheng, S., Qian, P., Li, F., Qian, G., Wang, C., Wu, G., Li, Q., Chen, Y., Li, J., Li, H., He, B. and Ji, F. (2012) Association of Mitochondrial DNA Variations with Lung Cancer Risk in a Han Chinese Population from Southwestern China P.-C. Yang (ed.). *PLoS ONE*, 7(2) e31322. Available from <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0031322> [accessed 12 February 2022].
- [89] Rhee, C.K., Min, K.H., Yoo, K.H.Y. and Jung, K.-S. (2020) High interleukin-33 is associated with acute exacerbation in patients with chronic obstructive pulmonary disease. In: *Monitoring airway disease*. 7 September 2020 European Respiratory Society, 960.
- [90] Pillai, S.G., Ge, D., Zhu, G., Kong, X., Shianna, K.V., Need, A.C., Feng, S., Hersh, C.P., Bakke, P., Gulsvik, A., Ruppert, A., Lødrup Carlsen, K.C., Roses, A., Anderson, W., ICGN Investigators, Rennard, S.I., Lomas, D.A., Silverman, E.K. and Goldstein, D.B. (2009) A Genome-Wide Association Study in Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD): Identification of Two Major Susceptibility Loci M.I. McCarthy (ed.). *PLoS Genetics*, 5(3) e1000421. Available from <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pgen.1000421> [accessed 12 February 2022].
- [91] Young, R.P., Hopkins, R.J., Christmas, T., Black, P.N., Metcalf, P. and Gamble, G.D. (2009) COPD prevalence is increased in lung cancer, independent of age, sex and smoking history. *European Respiratory Journal*, 34(2) 380–386. Available from <http://erj.ersjournals.com/cgi/doi/10.1183/09031936.00144208> [accessed 12 February 2022].
- [92] Young, R.P., Hopkins, R.J., Hay, B.A., Epton, M.J., Black, P.N. and Gamble, G.D. (2008) Lung cancer gene associated with COPD: triple whammy or possible confounding effect? *European Respiratory Journal*, 32(5) 1158–1164. Available from <http://erj.ersjournals.com/cgi/doi/10.1183/09031936.00093908> [accessed 12 February 2022].