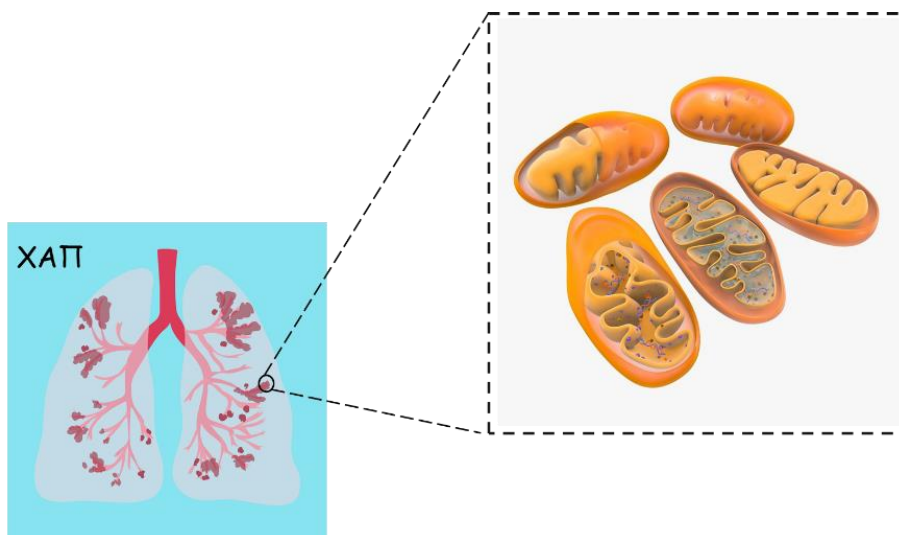


## ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

### ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Ανίχνευση μεταλλάξεων στα μιτοχονδριακά tRNA γονίδια Ile, Gln, Met  
σε ασθενείς με Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια (ΧΑΠ)

Detection of mutations in mitochondrial tRNA genes of Ile, Gln, Met in  
patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD)



### ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Χρονόπουλος Βασίλειος του Δημητρίου

Λάρισα 2022

## **Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή**

**Ζίφα Αιμιλία** (Επιβλέπουσα Καθηγήτρια)

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

**Σταμάτης Κωνσταντίνος**

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

**Δανιήλ Ζωή**

Καθηγήτρια Πνευμονολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

## ***Ευχαριστίες***

Ευχαριστώ θερμά την επιβλέπουσα καθηγήτριά μου, κ. Ζίφα Αιμιλία, που με στήριξε και με ενθάρρυνε, με διακριτικότητα και υπομονή, στην προσπάθειά μου να εκπονήσω την παρούσα πτυχιακή εργασία. Ευχαριστώ επίσης τον κ. Σταμάτη Κωνσταντίνο, ο οποίος συνέβαλε καταλυτικά σε όλη τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας με τις πολύτιμες συμβουλές του.

## Περιεχόμενα

Περίληψη.....	4
Abstract .....	5
1.Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια (ΧΑΠ) .....	6
1.1 Ορισμός .....	6
1.2 Συμπτώματα της ΧΑΠ.....	6
1.3 Παρόξυνση της ΧΑΠ .....	6
1.4 Διάγνωση της ΧΑΠ.....	7
1.5 Παθολογικά ευρήματα σε πνευμονικούς ιστούς με ΧΑΠ.....	7
1.6 Παράγοντες κινδύνου εμφάνισης ΧΑΠ.....	8
1.7 Μηχανισμοί παθογένεσης της ΧΑΠ.....	9
Διαταραχή του ισοζυγίου πρωτεολυτικών/ αντιπρωτεολυτικών ενζύμων στον πνευμονικό ιστό .....	9
Ανεπαρκής αντιοξειδωτική άμυνα.....	10
Μιτοχονδριακή δυσλειτουργία.....	11
1.8 Μεταλλάξεις στα mt- tRNA και συσχετισμός τους με ασθένειες .....	18
2. Σκοπός της εργασίας .....	21
3. Πειραματική διαδικασία.....	21
3.1 Απομόνωση ολικού DNA από ολικό αίμα ασθενών με Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια (ΧΑΠ).....	21
3.2 Ηλεκτροφόρηση απομονωμένων δειγμάτων DNA με χρήση πηκτής αγαρόζης .....	24
3.3 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης – Polymerase Chain Reaction (PCR).....	26
3.4 Πολυμορφισμός μονόκλωνης διαμόρφωσης – Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP).....	30
3.5 Χρώση πηκτώματος πολυακρυλαμιδίου με διάλυμα νιτρικού αργύρου .....	33
3.6 Καθαρισμός προϊόντων της PCR.....	35
3.7. Αλληλούχιση DNA .....	36
4. Αποτελέσματα .....	37
4.1 Απομόνωση DNA.....	37
4.2 Ενίσχυση των γονιδίων tRNA <sup>Ile</sup> , tRNA <sup>Gln</sup> , tRNA <sup>Met</sup> με PCR .....	37
4.3 Ανίχνευση πολυμορφισμών στα γονίδια tRNA <sup>Ile</sup> , tRNA <sup>Gln</sup> , tRNA <sup>Met</sup> με τη μέθοδο SSCP.....	38
4.4 Αλληλούχιση των γονιδίων tRNA <sup>Ile</sup> , tRNA <sup>Gln</sup> , tRNA <sup>Met</sup> και ανίχνευση πιθανών μεταλλάξεων .....	39
5. Συμπεράσματα/ Συζήτηση.....	40
Βιβλιογραφία .....	45

## Περίληψη

Η Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια (ΧΑΠ) είναι μια σοβαρή ασθένεια που επηρεάζει αρνητικά την καθημερινότητα εκατομμυρίων ανθρώπων παγκοσμίως. Αν και υπάρχουν αρκετοί παράγοντες που έχουν συνδεθεί με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης ΧΑΠ, η γενεσιουργός αιτία της παθολογίας της νόσου παραμένει άγνωστη. Τα τελευταία χρόνια, ένας μεγάλος αριθμός ερευνών καταλήγει στο συμπέρασμα πως η διαταραχή της φυσιολογικής μιτοχονδριακής λειτουργίας και το οξειδωτικό στρες αποτελούν πολύ σημαντικούς -αν όχι τους κυριότερους- παράγοντες του προβλήματος. Η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία συνοδεύεται από αυξημένη συχνότητα μεταλλάξεων στα mt- tRNA έχει παρατηρηθεί σε αρκετές πνευμονικές νόσους παρόμοιας αιτιολογίας με τη ΧΑΠ. Σε αυτό το πλαίσιο, σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η ανίχνευση μεταλλάξεων στα μιτοχονδριακά γονίδια tRNA<sup>Ile</sup>, tRNA<sup>Gln</sup>, και tRNA<sup>Met</sup>. Η ανίχνευση σημειακής μετάλλαξης στο mt- tRNA<sup>Gln</sup> είναι ενθαρρυντική για τη συνέχιση της έρευνας που στοχεύει στο προσδιορισμό της σχέσης που έχει η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία με την παθολογία της ΧΑΠ.

**Λέξεις κλειδιά:** Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια (ΧΑΠ), παθολογία, μιτοχονδριακή δυσλειτουργία, μιτοχονδριακό DNA (mt- DNA), μεταλλάξεις, μιτοχονδριακά tRNA (mt- RNA).

## Abstract

Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) is a major disease that adversely affects the daily lives of millions of people worldwide. While there are several factors that have been associated with an increased risk of COPD, the generative cause of the disease's pathogenicity remains unknown. In recent years, many studies have concluded the disorder of normal mitochondrial function and oxidative stress are very significant - if not the most crucial - factors of the problem. Mitochondrial dysfunction accompanied by an increased frequency of mt-tRNA mutations has been observed in several lung diseases of similar aetiology to COPD. In this context, the aim of the present study was the detection of mutations in the mitochondrial genes tRNA<sup>Ile</sup>, tRNA<sup>Gln</sup> and tRNA<sup>Met</sup>. The detection of a point mutation in mt-tRNA<sup>Gln</sup> is encouraging for the continuation of research aimed at determining the relationship between mitochondrial dysfunction and COPD pathogenicity.

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

## 1.Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια (ΧΑΠ)

### 1.1 Ορισμός

Η Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια (Chronic Obstructive Pulmonary Disease, COPD) είναι μια συχνή, αποτρέψιμη και θεραπεύσιμη νόσος που χαρακτηρίζεται από επίμονα αναπνευστικά συμπτώματα και περιορισμό της ροής του αέρα στους πνεύμονες η οποία είναι αποτέλεσμα ανωμαλιών στους αεραγωγούς ή/και στις κυψελιδικές οδούς. Οι ανωμαλίες αυτές προκαλούνται συνήθως μετά από σημαντική έκθεση σε επιβλαβή αέρια ή σωματίδια (GOLD, 2022).

### 1.2 Συμπτώματα της ΧΑΠ

Τα κύρια συμπτώματα των ασθενών με ΧΑΠ είναι ο ξηρός ή παραγωγικός βήχας και η δύσπνοια (GOLD, 2022). Στα αρχικά στάδια της νόσου ο βήχας είναι παροδικός αλλά με τη πρόοδο της ΧΑΠ εμφανίζεται καθημερινά και με μεγάλη διάρκεια. Η δύσπνοια είναι αρχικά ήπια και εκδηλώνεται μόνο σε συνθήκες έντονης σωματικής άσκησης αλλά βαθμιαία επιδεινώνεται και εν τέλει εμφανίζεται ακόμα και στις πιο απλές καθημερινές δραστηριότητες (πχ. περπάτημα, ντύσιμο). Σπανιότερα συμπτώματα είναι ο συριγμός κατά την αναπνοή και το αίσθημα βάρους στο στήθος. Ένα κοινό σύμπτωμα των ανθρώπων με προχωρημένο ΧΑΠ είναι η καθημερινή, έντονη κόπωση η οποία επηρεάζει σημαντικά τις δραστηριότητες και τη ποιότητα της ζωής των ασθενών (GOLD, 2022).

### 1.3 Παρόξυνση της ΧΑΠ

Ως παρόξυνση της ΧΑΠ ορίζεται η προσωρινή σημαντική επιδείνωση των συμπτωμάτων ενός ασθενούς πέρα τη φυσιολογικής καθημερινής διακύμανσης (GOLD, 2022). Οι παροξύνσεις επηρεάζουν αρνητικά τη καθημερινότητα των ασθενών και πολλές φορές είναι αναγκαία η νοσοκομειακή περίθαλψη. Η συχνότητα εμφάνισης αυτών των επεισοδίων ποικίλλει από άνθρωπο σε άνθρωπο. Ο συχνότερος αιτιολογικός παράγοντας των παροξύνσεων είναι βακτηριακές και ιογενείς λοιμώξεις που προσβάλλουν το αναπνευστικό σύστημα. Εκτός από τις λοιμώξεις, το κάπνισμα και η έκθεση σε αλλεργιογόνα έχουν επίσης συνδεθεί με την εμφάνιση

παροξύνσεων. Τέλος, περίπου στο ένα τρίτο των παροξύνσεων δεν μπορεί να προσδιοριστεί με σαφήνεια το αίτιο (GOLD, 2022).

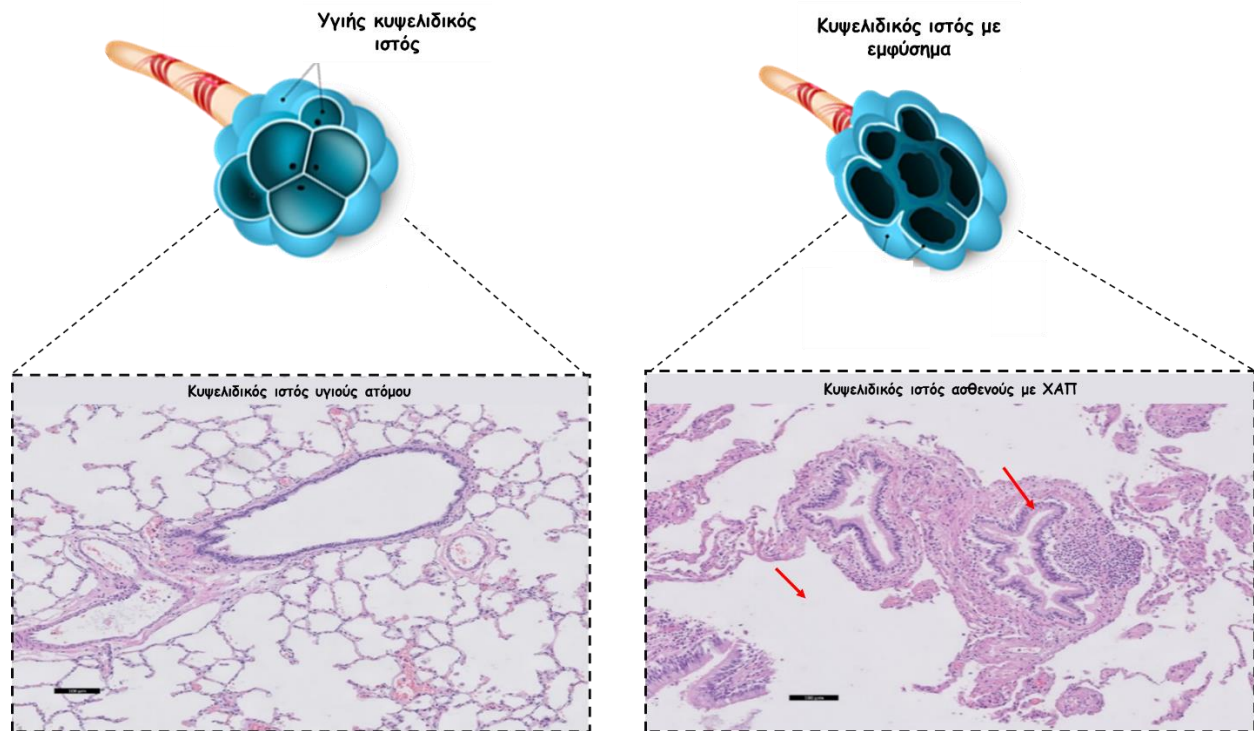
#### *1.4 Διάγνωση της ΧΑΠ*

Η διάγνωση της ΧΑΠ γίνεται με σπιρομέτρηση (GOLD, 2022). Αρχικά χορηγείται στον ασθενή βρογχοδιασταλτικό φάρμακο και στη συνέχεια υπολογίζεται ο λόγος του βίαια εκπνεόμενου όγκου αέρα σε ένα δευτερόλεπτο (Forced Expiratory Volume in the 1st second, FEV1) προς τον βίαια εκπνεόμενο συνολικό όγκο αέρα μετά από τη μέγιστη δυνατή εισπνοή (Forced Vital Capacity, FVC). Οι μετρούμενες τιμές συγκρίνονται με τιμές αναφοράς οι οποίες λαμβάνουν υπόψη την ηλικία, το ύψος, το φύλο και τη φυλή του ατόμου. Στη ΧΑΠ παρατηρείται μείωση των τιμών και των δύο παραμέτρων με μεγαλύτερη όμως μείωση της τιμής του FEV1. Σε γενικές γραμμές, τιμές του λόγου FEV1/FVC < 0.70 υποδεικνύουν αποφρακτικό πρότυπο (GOLD, 2022).

#### *1.5 Παθολογικά ευρήματα σε πνευμονικούς ιστούς με ΧΑΠ*

Το πιο χαρακτηριστικό εύρημα στον πνευμονικό ιστό ασθενών με ΧΑΠ είναι το εμφύσημα (GOLD, 2022). Ως εμφύσημα ορίζεται η μόνιμη μη φυσιολογική διόγκωση των αεραγωγών ή/και των κυψελίδων που συνοδεύεται από καταστροφή των κυψελιδικών τοιχωμάτων (Leap et al., 2021). Το εμφύσημα προκύπτει από την καταστροφή της πνευμονικής εξωκυτταρικής μήτρας και ιδιαίτερα του κυψελιδικού ενδιάμεσου ιστού ο οποίος συνδέει τις κυψελίδες με τα αιμοφόρα αγγεία. Επίσης, στη ΧΑΠ παρατηρείται αυξημένη εναπόθεση κολλαγόνου στα τοιχώματα των αεραγωγών με αποτέλεσμα την πάχυνση του τοιχώματος και τη μείωση της διαμέτρου τους. Επιπλέον, υπάρχει μεγάλος αριθμός αποδιοργανωμένων ινιδίων κολλαγόνου στην εξωκυτταρική μήτρα. Συνολικά, οι αλλαγές στη δομή του κολλαγόνου και η απώλεια του κυψελιδικού ενδιάμεσου ιστού οδηγεί σε «χαλαρά» τοιχώματα των αεραγωγών χωρίς κυψελιδική υποστήριξη και τελικά σε αυξημένη καταστροφή των αεραγωγών, περιορισμό της ροής του αέρα και μειωμένη ικανότητα ανταλλαγής αερίων στις κυψελίδες (εικ. 1) (GOLD, 2022).





**Εικόνα 1:** Πνευμονικός ιστός από ασθενή με προχωρημένο στάδιο εμφυσημάτος: Απεικονίζονται δύο μικροί αεραγωγοί με εκτεταμένη απώλεια του κυψελιδικού ενδιάμεσου ιστού και αυξημένη εναπόθεση κολλαγόνου στα τοιχώματα των αεραγωγών. Κυψελιδικός ιστός υγιούς ανθρώπου: Απεικονίζονται δύο μικροί αεραγωγοί που περιβάλλονται από φυσιολογικό παρεγχυματικό ιστό (Brandtsma et al., 2019).

### 1.6 Παράγοντες κινδύνου εμφάνισης ΧΑΠ

Η ΧΑΠ είναι αποτέλεσμα συνδυασμού περιβαλλοντικών και γενετικών παραγόντων καθώς και συννοσηροτήτων. Η σημαντικότερη ασθένεια που σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης ΧΑΠ είναι το άσθμα. Οι έρευνες δείχνουν ότι οι άνθρωποι που πάσχουν από άσθμα έχουν 12 φορές μεγαλύτερη πιθανότητα να εμφανίσουν ΧΑΠ κάποια στιγμή στη ζωή τους σε σύγκριση με υγιή άτομα (GOLD, 2022). Αναφορικά με τους περιβαλλοντικούς παράγοντες, η πιθανότητα εμφάνισης ΧΑΠ αυξάνεται μετά από χρόνια έκθεση σε συγκεκριμένα οργανικά και ανόργανα σωματίδια (πχ. σκόνη σιδήρου, σκόνη κατά την επεξεργασία του χαρτιού) και στο καπνό του τσιγάρου (Grahn et al, 2021). Το χρόνιο κάπνισμα, ιδιαίτερα, αναφέρεται ως ο κυριότερος περιβαλλοντικός παράγοντας κινδύνου εμφάνισης ΧΑΠ. Πιο συγκεκριμένα, έχει βρεθεί ότι σε

όσο πιο νεαρή ηλικία ξεκινάει ένας άνθρωπος το κάπνισμα και για όσο περισσότερα συνεχόμενα χρόνια καπνίζει τόσο αυξάνεται η πιθανότητα να διαγνωστεί με ΧΑΠ κάποια στιγμή στη ζωή του. Η πιθανότητα αυτή αρχίζει να μειώνεται σταδιακά από τη στιγμή που ο άνθρωπος σταματήσει το κάπνισμα (Chang et al., 2021). Ωστόσο, υπολογίζεται ότι λιγότερο από το 50% ακόμα και των χρόνιων βαριά καπνιστών προσβάλλεται από ΧΑΠ (GOLD, 2022). Εκτός από τους περιβαλλοντικούς παράγοντες, υπάρχει γενετική προδιάθεση η οποία παίζει σημαντικό ρόλο στην εμφάνιση της ασθένειας. Η γενετική ασθένεια που τεκμηριωμένα συνδέεται με αυξημένο κίνδυνο ΧΑΠ είναι η ανεπάρκεια της α1 αντιθρυψίνης (GOLD, 2022). Η ανεπάρκεια του ενζύμου αυτού είναι μια σπάνια (προσβάλλει το 1% του πληθυσμού), αυτοσωμική υπολειπόμενη γενετική ασθένεια που οφείλεται σε μετάλλαξη του γονιδίου SERPINA1. Υπολογίζεται ότι 1-2% του συνόλου των ασθενών με ΧΑΠ είναι ομόζυγα ως προς τη μετάλλαξη αυτή. Μάλιστα, οι έρευνες δείχνουν ότι ακόμα και τα ετερόζυγα ως προς τη μετάλλαξη άτομα έχουν μεγαλύτερη πιθανότητα προσβολής από ΧΑΠ σε σχέση με εκείνους που φέρουν δύο φυσιολογικά αλληλόμορφα γονίδια (Brandtsma et al., 2019).

### *1.7 Μηχανισμοί παθογένεσης της ΧΑΠ*

#### *Διαταραχή του ισοζυγίου πρωτεολυτικών/ αντιπρωτεολυτικών ενζύμων στον πνευμονικό ιστό*

Στον πνευμονικό ιστό ασθενών με ΧΑΠ παρατηρείται διαταραχή της ισορροπίας πρωτεασών/ αντιπρωτεασών και ιδιαίτερα του ισοζυγίου ελαστάση των ουδετερόφιλων/ α1 αντιθρυψίνη. Η ελαστάση των ουδετερόφιλων καταστρέφει την ελαστίνη, το σημαντικότερο συστατικό του συνδετικού ιστού στο πνευμονικό παρέγχυμα, και ενοχοποιείται για την πρόκληση του εμφυσήματος που συνοδεύει τη ΧΑΠ (Voynow et. al., 2021). Αναλυτικότερα, η έκθεση σε ερεθιστικούς παράγοντες που αναφέρονται παραπάνω διεγείρει την απελευθέρωση κυτοκινών από πνευμονικά κύτταρα με αποτέλεσμα τη στρατολόγηση ουδετερόφιλων στη περιοχή. Η ελαστάση των ουδετερόφιλων απελευθερώνεται κατά την αποκοκκίωσή τους και φυσιολογικά αποδομείται κατά τον τερματισμό της ανοσοαπόκρισης από την αντιελαστάση α1 αντιθρυψίνη. Η α1 αντιθρυψίνη συντίθεται στο ήπαρ και απελευθερώνεται στην κυκλοφορία του αίματος έχοντας ως βασικό στόχο τη προστασία των ιστών από τα ένζυμα που απελευθερώνονται κατά

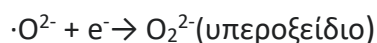
τη φλεγμονή και ιδιαίτερα από την ελαστάση των ουδετερόφιλων. Επομένως, η κληρονομική ανεπάρκεια α1 αντιθρυψίνης οδηγεί σε μειωμένη ικανότητα αποδόμησης της ελαστάσης των ουδετερόφιλων με αποτέλεσμα το ένζυμο να υπερσυσσωρεύεται στον πνευμονικό ιστό (Voynow et al., 2021). Ωστόσο, η μετάλλαξη του γονιδίου SERPINA1 δεν είναι η μοναδική αιτία έλλειψης α1 αντιθρυψίνης. Ειδικότερα, έχει αποδειχτεί ότι η περίσσεια ROS προκαλεί οξείδωση της μεθειονίνης που βρίσκεται στη θέση 358 της πολυπεπτιδικής αλυσίδας της α1 αντιθρυψίνης με αποτέλεσμα αδρανοποίηση του ενζύμου (Antunes et al., 2021).

### Ανεπαρκής αντιοξειδωτική άμυνα

Οι ασθενείς με ΧΑΠ έχουν μειωμένα επίπεδα αντιοξειδωτικών στους πνεύμονές τους (GOLD, 2022). Πιο συγκεκριμένα, τα βρογχικά επιθηλιακά κύτταρα και τα κυψελιδικά μακροφάγα ασθενών με ΧΑΠ εμφανίζουν μειωμένα επίπεδα γλουταθειόνης (GSH) και άλλων GSH-εξαρτώμενων ενζύμων (πχ. περοξειδάση της GSH, S- τρανσφεράση της GSH) (GOLD, 2022). Επιπλέον, ως προστατευτικό μηχανισμό έναντι των εξωγενών οξειδωτικών, το υγρό του επιθηλίου του πνεύμονα περιέχει αντιοξειδωτικά όπως είναι το ασκορβικό οξύ (βιταμίνη C), η α-τοκοφερόλη (βιταμίνη E) και το ουρικό οξύ. Τα τρία αυτά αντιοξειδωτικά εμφανίζουν σαφή μείωση στη ΧΑΠ. Ακόμα, τα λεία μυϊκά κύτταρα των αεραγωγών ασθενών με ΧΑΠ εμφανίζουν συχνά υπερέκφραση του παράγοντα TGF-β οποίος έχει βρεθεί ότι αναστέλλει την έκφραση αρκετών αντιοξειδωτικών γονιδίων όπως για παράδειγμα της καταλάσης και της δισμουτάσης 2 του σουπεροξειδίου (SOD2) (Antunes et al., 2021). Εκτός από τον πνευμονικό ιστό, οι ασθενείς με ΧΑΠ εμφανίζουν αδυναμία ρύθμισης της συγκέντρωσης των αντιοξειδωτικών στον ορό του αίματός τους. Πιο συγκεκριμένα, πειραματικά δεδομένα δείχνουν μια ουσιαστική διαφορά στην απόκριση του οργανισμού στην οξειδωτική καταπόνηση μεταξύ των καπνιστών χωρίς ΧΑΠ και των καπνιστών που πάσχουν από ΧΑΠ: Τα επίπεδα των αντιοξειδωτικών στον ορό των καπνιστών χωρίς ΧΑΠ αυξάνονται σημαντικά σε σύγκριση με τους υγιείς μη καπνιστές. Το φαινόμενο αυτό είναι μια αντισταθμιστική απάντηση του οργανισμού στην οξειδωτική καταπόνηση που υφίσταται από το κάπνισμα. Αντίθετα, δεν παρατηρείται αύξηση των αντιοξειδωτικών στον ορό καπνιστών που πάσχουν από ΧΑΠ (Aragay et al., 2019). Επομένως, η ελλιπής αντιοξειδωτική άμυνα συμβάλλει στην εξέλιξη και πιθανόν στην έναρξη της νόσου.

## Μιτοχονδριακή δυσλειτουργία

Τα μιτοχόνδρια είναι μικρά υποκυτταρικά οργανίδια διαμέτρου περίπου 1μm και περιβάλλονται από δύο μεμβράνες, την εσωτερική και την εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη. Το εσωτερικό των μιτοχονδρίων ονομάζεται μήτρα. Η περιοχή μεταξύ της εσωτερικής και της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης ονομάζεται διαμεμβρανικός χώρος. Μια από τις πιο σημαντικές λειτουργίες των μιτοχονδρίων είναι η οξειδωτική φωσφορυλίωση. Η διαδικασία της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης μετατρέπει την ενέργεια που βρίσκεται αποθηκευμένη στα NADH και FADH<sub>2</sub> σε ηλεκτροχημική βαθμίδωση H<sup>+</sup> εκατέρωθεν της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης. Η ηλεκτροχημική αυτή βαθμίδωση τελικά υποκινεί τη σύνθεση ATP. Τα ηλεκτρόνια των NADH και FADH<sub>2</sub> ρέουν μέσα από μια σειρά συμπλόκων (αναπνευστική αλυσίδα) τα οποία αντλούν πρωτόνια από τη μήτρα του μιτοχονδρίου προς τον διαμεμβρανικό χώρο. Η μεταφορά των ηλεκτρονίων από το ένα σύμπλοκο στο επόμενο γίνεται με τη βοήθεια δύο εξειδικευμένων φορέων ηλεκτρονίων: την ουβικινόλη και το κυτόχρωμα c. Κατά το τελικό βήμα της αναπνευστικής αλυσίδας, η οξειδάση του κυτοχρώματος c (σύμπλοκο IV) χρησιμοποιεί το μοριακό οξυγόνο ως αποδέκτη των ηλεκτρονίων που μεταφέρονται από την ουβικινόλη. Η αντίδραση αυτή οδηγεί κατά κανόνα στην παραγωγή νερού και είναι θερμοδυναμικά ευνοϊκή καθώς το οξυγόνο έχει μεγάλη χημική συγγένεια για τα ηλεκτρόνια. Ωστόσο, ενώ η μεταφορά τεσσάρων ηλεκτρονίων από το σύμπλοκο IV σε δύο μόρια οξυγόνου έχει ως αποτέλεσμα την πλήρη αναγωγή τους προς δύο μόρια νερού, η μερική αναγωγή του οξυγόνου που προκύπτει σε κάποιες περιπτώσεις οδηγεί στη παραγωγή χημικών ενώσεων ιδιαίτερα επιβλαβών για την κυτταρική υγεία. Πιο συγκεκριμένα, η μεταφορά ενός ηλεκτρονίου στο οξυγόνο οδηγεί στη παραγωγή ανιόντος σουπεροξειδίου και η μεταφορά δύο ηλεκτρονίων σχηματίζει το υπεροξείδιο:



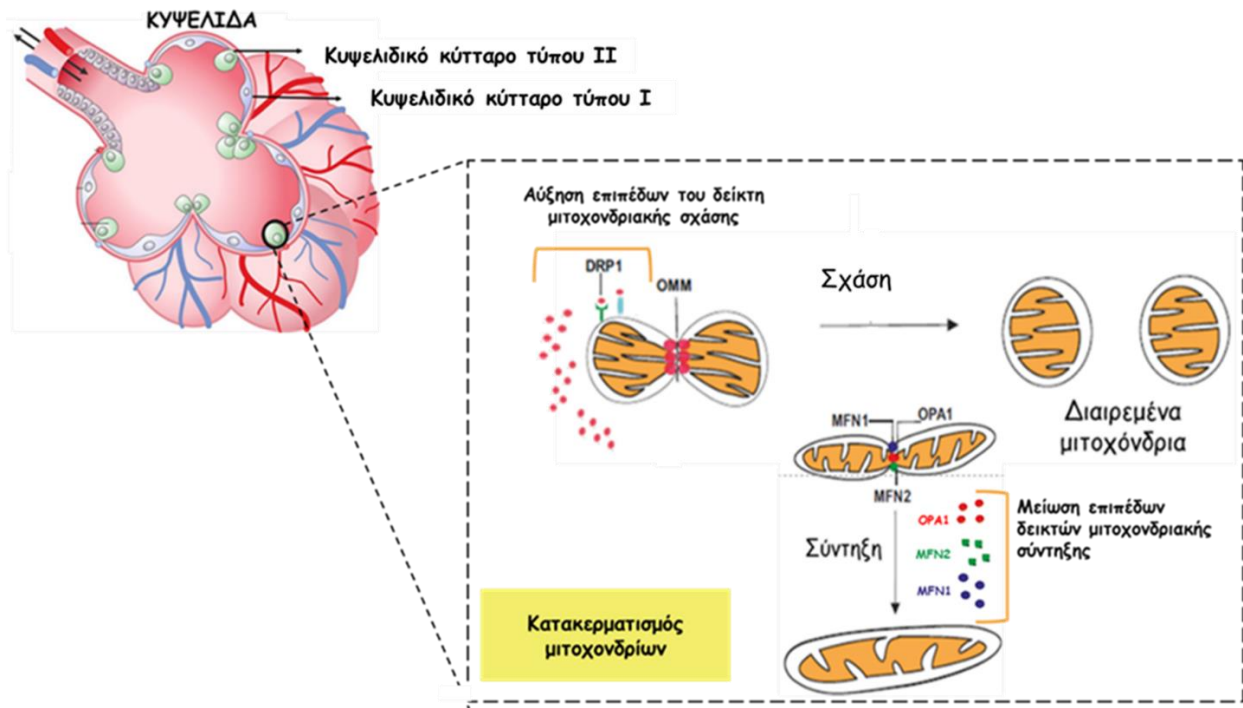
Ακόμα και όταν η αναπνευστική αλυσίδα λειτουργεί φυσιολογικά, το 1-2% των συνολικών ηλεκτρονίων «διαρρέει» με τη μορφή των ROS (Berg et al., 2015).

Αν και η γενεσιουργός αιτία της παθογένειας της ΧΑΠ δεν έχει προσδιορισθεί επακριβώς μέχρι σήμερα, ένας μεγάλος αριθμός ερευνών καταλήγει στο συμπέρασμα πως τα μιτοχόνδρια αποτελούν έναν από τους βασικούς -αν όχι τον βασικότερο- παράγοντα του προβλήματος. Πειραματικά δεδομένα δείχνουν σοβαρή δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων στη ΧΑΠ η οποία βαίνει επιδεινούμενη με τη πρόοδο της νόσου. Επιπλέον, οι βιοδείκτες οξειδωτικού στρες είναι αυξημένοι στο συμπύκνωμα εκπνεόμενου αέρα, στα πτύελα και στη συστηματική κυκλοφορία σε όλους τους ασθενείς με ΧΑΠ, μια κατάσταση που υποδεικνύει οξειδωτική καταπόνηση στους πνευμονικούς -και όχι μόνο- ιστούς των ασθενών (GOLD, 2022). Επομένως, η περαιτέρω έρευνα σχετικά με τη λειτουργία των μιτοχονδρίων στην ΧΑΠ είναι πολύ σημαντική.

### **Κατακερματισμός των μιτοχονδρίων**

Στα υγιή ευκαρυωτικά κύτταρα η μιτοχονδριακή μορφολογία διατηρείται σε μια λεπτή ισορροπία μεταξύ δύο αντίθετων διεργασιών: τη σύντηξη και τη σχάση. Ο κύριος ρυθμιστής της μιτοχονδριακής σχάσης είναι η σχετιζόμενη με τη δυναμίνη πρωτεΐνη 1 (Drp1). Αντίθετα, η μιτοχονδριακή σύντηξη ρυθμίζεται από τρεις μεγάλες GTPάσες: Τις MFN1 και MFN2 οι οποίες βρίσκονται στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη και την OPA1 που βρίσκεται στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη (Antunes et al., 2021).

Στα κυψελιδικά κύτταρα τύπου II που απομονώθηκαν από πνευμονικό ιστό με εμφύσημα ασθενών με ΧΑΠ υπάρχει πολύ μεγαλύτερος αριθμός κατακερματισμένων μιτοχονδρίων σε σύγκριση με υγιή άτομα (Kosmider et al., 2019). Το φαινόμενο αυτό σχετίζεται με τις μεταβολές στη συγκέντρωση των βασικών ρυθμιστικών πρωτεϊνών της μιτοχονδριακής μορφολογίας: Στα κύτταρα των ασθενών αυξάνεται η Drp1 και μειώνονται οι MFN1, MFN2 και OPA1 (εικ.2). Μάλιστα, η διαταραχή της μιτοχονδριακής μορφολογίας είναι ανάλογη με την πορεία της ασθένειας καθώς στα κυψελιδικά κύτταρα τύπου II που απομονώθηκαν από πνευμονικό ιστό με σοβαρό εμφύσημα παρατηρούνται περισσότερα κατακερματισμένα μιτοχόνδρια συγκριτικά με εκείνα που απομονώθηκαν από ιστό με ήπιο εμφύσημα (Kosmider et al., 2019). Έχει βρεθεί ότι τα κατακερματισμένα μιτοχόνδρια εμφανίζουν δυσλειτουργίες στην αναπνευστική αλυσίδα και υπερπαράγουν ROS (Antunes et al., 2021). Επομένως, υπάρχει σταδιακή επιδείνωση της μιτοχονδριακής λειτουργίας με την πρόοδο της ΧΑΠ.

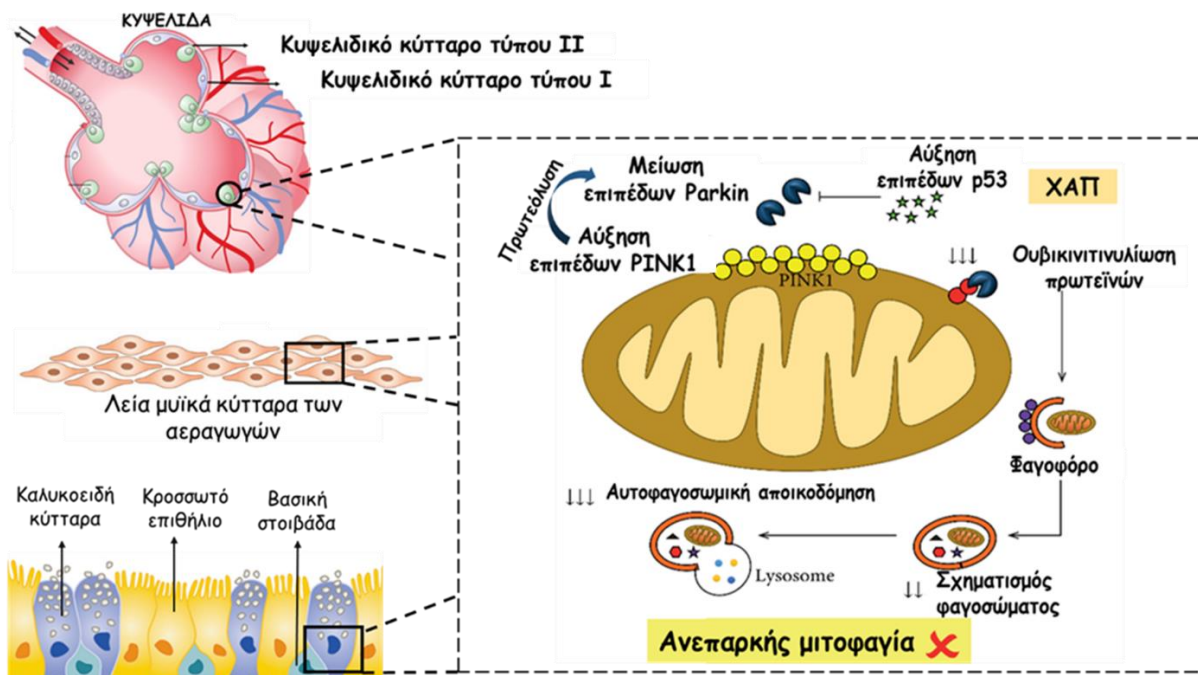


**Εικόνα 2:** Μεταβολές των βασικών ρυθμιστών της μιτοχονδριακής μορφολογίας στα κυψελιδικά κύτταρα τύπου ΙΙ των ασθενών με ΧΑΠ. Η αύξηση των επιπέδων *Drrp1* και η μείωση των *MFN1*, *MFN2* και *OPA1* έχει ως αποτέλεσμα την ανισορροπία σχάσης/σύντηξης με αποτέλεσμα να προκύπτει μεγάλος αριθμός κατακερματισμένων μιτοχονδρίων.

### Ελάττωση της μιτοφαγίας

Στα επιθηλιακά κύτταρα των αεραγωγών, στα λεία μυϊκά κύτταρα των αεραγωγών και ιδιαίτερα στα κυψελιδικά κύτταρα τύπου ΙΙ που έχουν απομονωθεί από ασθενείς με ΧΑΠ παρατηρείται εκτενέστερη κυτταρική γήρανση, σε σύγκριση με τους υγιείς ανθρώπους, συνοδευόμενη από συσσώρευση πολλών και κατεστραμμένων μιτοχονδρίων (Araya et al., 2019). Ο συνδυασμός των παραπάνω ευρημάτων υποδεικνύει διαταραχή του μηχανισμού της μιτοφαγίας. Από πειράματα που έγιναν *in vitro* σε κυτταρικές σειρές από πνευμονικό ιστό ποντικών γνωρίζουμε ότι ο περιορισμός της μιτοφαγίας οφείλεται στη μείωση τόσο της συγκέντρωσης (Araya et al., 2019 και Ito et al., 2015) όσο και της διαθεσιμότητας (Hoshino et al., 2015) της πρωτεΐνης Parkin (εικ. 3). Η μείωση της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης Parkin αποδίδεται στην αύξηση της συγκέντρωσης της κινάσης PINK1 η οποία εμπλέκεται στην διαδικασία αποικοδόμησης της Parkin στο πρωτεάσωμα (Araya et al., 2019). Εκτός από την PINK-1 επαγόμενη πρωτεόλυση της

Parkin, υπάρχει και ένας δεύτερος μηχανισμός που ελαττώνει περαιτέρω τον αριθμό των διαθέσιμων Parkin: Στα κυψελιδικά κύτταρα τύπου II, στα επιθηλιακά κύτταρα των αεραγωγών και στα λεία μυϊκά κύτταρα των αεραγωγών των ασθενών με ΧΑΠ έχουν βρεθεί αυξημένα επίπεδα του παράγοντα p53 ο οποίος έχει αποδειχθεί ότι συνδέεται στην Parkin αναστέλλοντας τη μετανάστευσή της στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη κατά τη μιτοφαγία (Hoshino et al., 2014). Επίσης, σε αυτούς τους κυτταρικούς τύπους παρατηρούνται πολύ αυξημένα επίπεδα 8-υδροξυ-2'-δεοξυγουανοσίνης (προϊόν οξείδωσης της δεοξυγουανοσίνης) και της 4-HNE (προϊόν της οξείδωσης των λιπιδίων) (Araga et al., 2019). Η πιθανότερη εξήγηση είναι ότι η αύξηση αυτών των δύο παραγώγων οφείλεται στο οξειδωτικό στρες εξαιτίας της υπερπαραγωγής ROS από τα κατεστραμμένα μιτοχόνδρια τα οποία είναι αδύνατο να απομακρυνθούν λόγω δυσλειτουργίας του μηχανισμού της μιτοφαγίας (Araga et al., 2019).

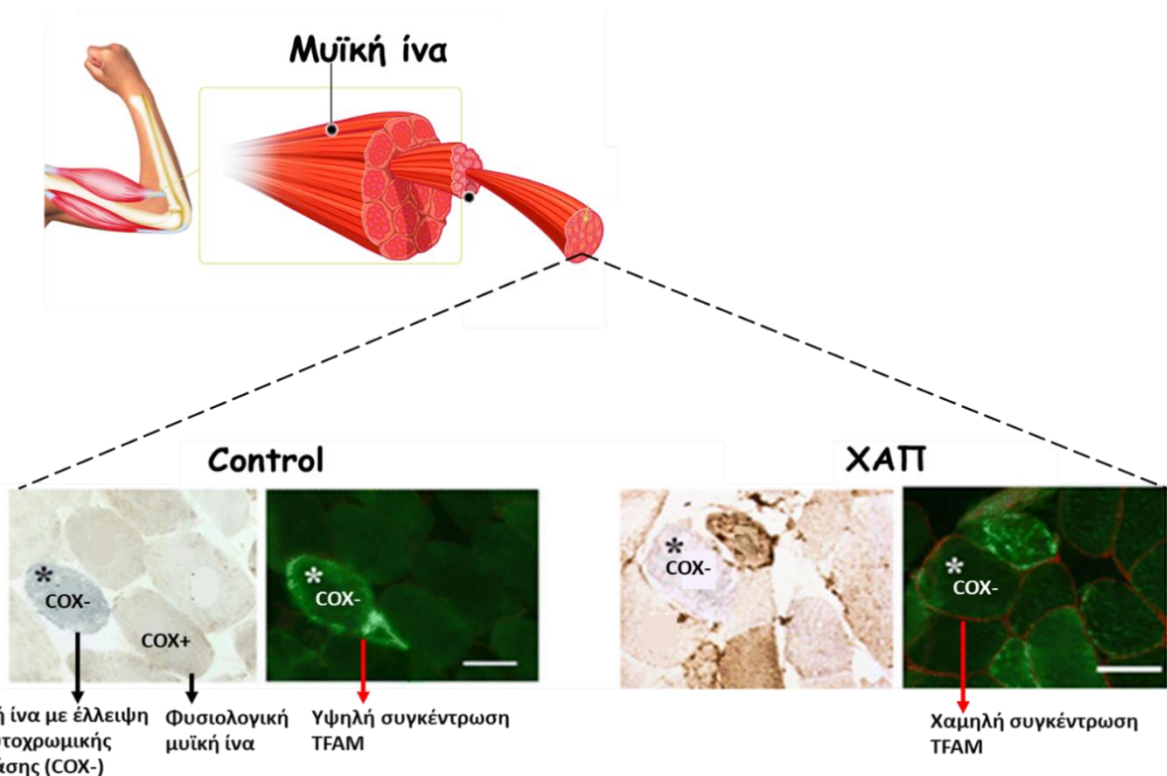


**Εικόνα 2:** Μεταβολές των ρυθμιστών της μιτοφαγίας στον πνευμονικό ιστό ασθενών με ΧΑΠ: Η PINK1-επαγόμενη πρωτεόλυση της Parkin και η αύξηση των επιπέδων p53 οδηγεί σε μείωση του αριθμού των Parkin που είναι διαθέσιμες για τη στόχευση των κατεστραμμένων μιτοχονδρίων. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη μειωμένη ικανότητα σχηματισμού αυτοφαγωσμάτων και τελικά περιορισμό της αποδόμησης των κατεστραμμένων μιτοχονδρίων (Antunes et al., 2021).

### **Απορρύθμιση της μιτοχονδριακής βιογένεσης**

Εκτός από τον πνευμονικό ιστό, μιτοχονδριακή δυσλειτουργία παρατηρείται και σε εξωπνευμονικούς ιστούς και ιδιαίτερα στο σκελετικό μυϊκό ιστό των ασθενών με ΧΑΠ όπου η βιογένεση των μιτοχονδρίων δεν ακολουθεί το φυσιολογικό πρότυπο (Konokhova et al., 2016). Η μιτοχονδριακή βιογένεση είναι μια προσαρμοστική απάντηση των κυττάρων στην αυξημένη ενεργειακή ζήτηση. Κύριος ρυθμιστής της διαδικασίας αυτής είναι η πρωτεΐνη PGC-1α η οποία μεταξύ άλλων δρα ενεργοποιώντας τον μιτοχονδριακό μεταγραφικό παράγοντα A (TFAM) με αποτέλεσμα να διασφαλίζεται ο διπλασιασμός του mtDNA κατά τη μιτοχονδριακή βιογένεση. Μελέτες που έγιναν σε σκελετικά μυϊκά κύτταρα που απομονώθηκαν με βιοψίες δείχνουν σημαντική διαφορά στην απόκριση των μυϊκών ινών που έχουν ανεπάρκεια του ενζύμου οξειδάση του κυτοχρώματος c (COX-) μεταξύ των υγείων ανθρώπων και των ασθενών με ΧΑΠ (Konokhova et al., 2016). Οι μυϊκές ίνες COX- υπάρχουν φυσιολογικά σε μικρούς αριθμούς στους νέους και υγιείς ανθρώπους ενώ αυξάνονται σημαντικά σε ασθενείς με μιτοχονδριακές ασθένειες. Στα υγιή άτομα στις COX- μυϊκές ίνες παρατηρείται αύξηση του παράγοντα TFAM και των μορίων mtDNA το οποίο υποδηλώνει αντισταθμιστική προσπάθεια των κυττάρων για αύξηση της ενεργειακής παραγωγής. Αντίθετα, τα άτομα με ΧΑΠ παρουσιάζουν παρόμοια επίπεδα TFAM και μορίων mtDNA τόσο στις COX- όσο και στις φυσιολογικές μυϊκές ίνες (εικ.4) (Konokhova et al., 2016).





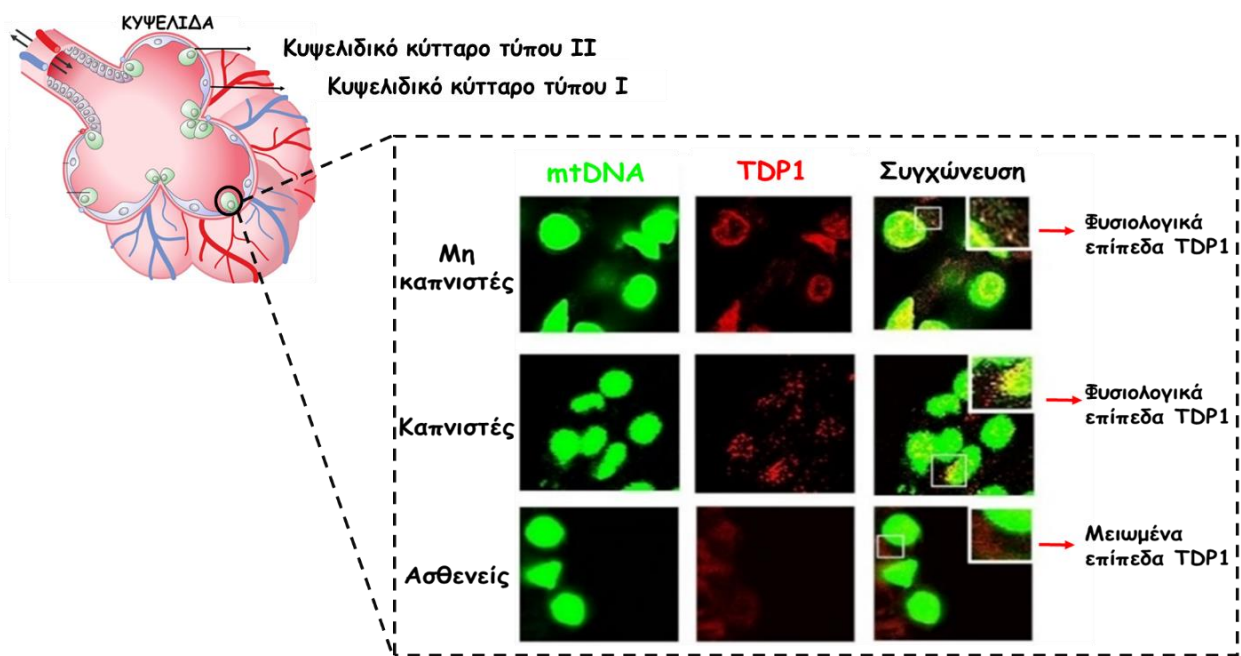
**Εικόνα 4:** Προσδιορισμός της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης TFAM με τη χρήση ανοσοφθορισμού. Στους control τα επίπεδα της πρωτεΐνης TFAM είναι αυξημένα στις COX- μυϊκές ίνες ενώ στους ασθενείς με ΧΑΠ τα επίπεδα της πρωτεΐνης TFAM δε διαφέρουν μεταξύ των COX- και COX+ μυϊκών ινών (Kopokhona et al., 2016).

### **Βλάβες στο μιτοχondριακό DNA**

Το mtDNA είναι εκ φύσεως πιο ευάλωτο σε βλάβες σε σχέση με το πυρηνικό DNA καθώς χαρακτηρίζεται από έλλειψη προστατευτικών ιστονών και αποτελεσματικών μηχανισμών επιδιόρθωσης. Τα χαρακτηριστικά αυτά σε συνδυασμό με την παρουσία σχετικά υψηλών συγκεντρώσεων ROS – παραπροϊόντων της αναπνευστικής αλυσίδας- στα μιτοχόνδρια καθιστούν το μιτοχondριακό γονιδίωμα 10 έως 17 φορές πιο ευαίσθητο στη μεταλλαξιγένεση σε σχέση με το πυρηνικό DNA.

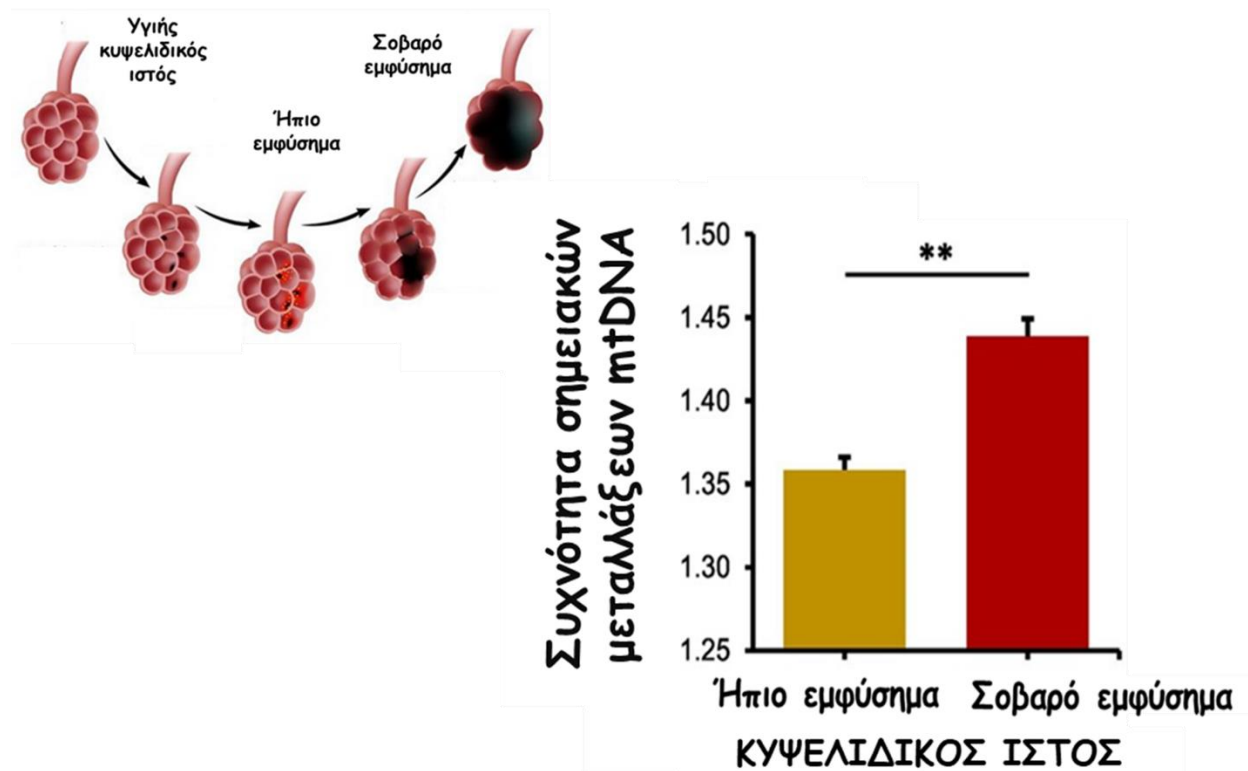
Στα κυψελιδικά κύτταρα τύπου II που απομονώθηκαν από πνευμονικό ιστό με εμφύσημα ασθενών με ΧΑΠ οι βλάβες στο mtDNA και ιδιαίτερα οι δίκλωνες ρήξεις και οι οξειδώσεις των νουκλεοτιδίων είναι πολύ εκτενέστερες σε σχέση με τους υγιείς ανθρώπους (Kosmider et al., 2019). Η αύξηση των βλαβών αποδίδεται στην υπερπαραγωγή ROS από τα κατεστραμμένα

μιτοχόνδρια που δεν απομακρύνονται λόγω διαταραχής της μιτοφαγίας αλλά και στη μείωση της ικανότητας αποκατάστασης των βλαβών του mtDNA. Ειδικότερα, στα μιτοχονδριακά νουκλεοειδή των ασθενών παρατηρείται μείωση του TDP1, ενός ενζύμου που είναι υπεύθυνο για την επιδιόρθωση των συμπλεγμάτων τοποϊσομεράσης 1-mtDNA (Kosmider et al., 2019). Ο ρόλος του TDP1 είναι πολύ σημαντικός στην αποκατάσταση των βλαβών του mtDNA που προκαλούνται από το οξειδωτικό στρες. Για παράδειγμα, έχει βρεθεί ότι στους καπνιστές αυξάνονται τα επίπεδα TDP1 στα μιτοχονδριακά νουκλεοειδή, μια κατάσταση που υποδηλώνει αντισταθμιστική απάντηση των κυττάρων στις βλάβες που προκαλεί το εξωγενές οξειδωτικό στρες (κάπνισμα) στο mtDNA. Αντιθέτως, στους ασθενείς παρά την οξειδωτική καταπόνηση που υφίστανται τα κύτταρά τους, δεν αυξάνεται η ποσότητα των TDP1 με αποτέλεσμα τη μειωμένη ικανότητα αποκατάστασης των βλαβών του mtDNA (εικ. 5) (Kosmider et al., 2019).



**Εικόνα 5:** Ανοσοϊστοφθορισμός για τον προσδιορισμό της θέσης και της συγκέντρωσης του TDP1 (κόκκινο χρώμα) στα μιτοχόνδρια των κυψελιδικών κυττάρων τύπου II ασθενών με ΧΑΠ, καπνιστών και υγιών ανθρώπων. Στους καπνιστές παρατηρείται αύξηση του TDP1 στα μιτοχονδριακά νουκλεοειδή σε σχέση με τους μη-καπνιστές λόγω οξειδωτικής καταπόνησης. Στους ασθενείς παρά την οξειδωτική καταπόνηση δεν παρατηρείται σημαντική αύξηση των επιπέδων TDP1 (Kosmider et al., 2019).

Μάλιστα, η ελάττωση της ικανότητας αποκατάστασης των βλαβών του mtDNA είναι ανάλογη με τη πρόοδο της ΧΑΠ. Πιο συγκεκριμένα, ο έλεγχος του mtDNA για σημειακές μεταλλάξεις συγκριτικά σε κυψελιδικά κύτταρα τύπου II που απομονώθηκαν από πνευμονικό ιστό με ήπιο και σοβαρό εμφύσημα δείχνει ότι η συχνότητα των μεταλλάξεων αυξάνεται στο σοβαρό εμφύσημα (εικ. 6) (Kosmider et al, 2019). Συνολικά, τα αποτελέσματα αντικατοπτρίζουν βαθμιαία μείωση της ικανότητας αποκατάστασης των βλαβών του mtDNA με τη πρόοδο της ΧΑΠ.

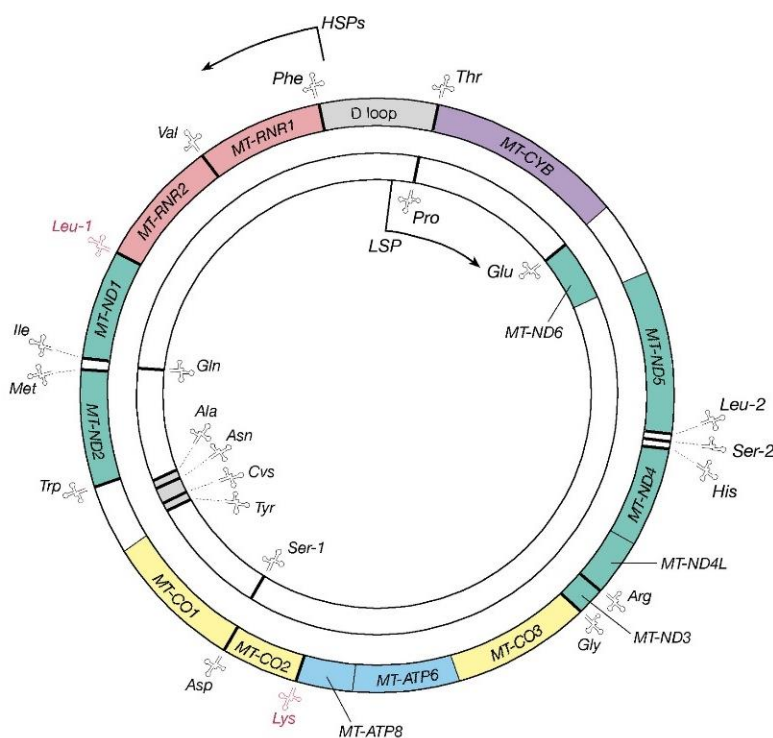


**Εικόνα 6:** Η συχνότητα των σημειακών μεταλλάξεων σε κυψελιδικά κύτταρα τύπου II που προέρχονται από πνευμονικό ιστό με ήπιο (πορτοκαλί χρώμα) και σοβαρό (κόκκινο χρώμα) εμφύσημα. Η συχνότητα των μεταλλάξεων αυξάνεται στο σοβαρό εμφύσημα υποδεικνύοντας ότι η ελάττωση της ικανότητας αποκατάστασης των βλαβών του mtDNA είναι ανάλογη με τη πρόοδο της ΧΑΠ (Kosmider et al., 2019).

### 1.8 Μεταλλάξεις στα mt-tRNA και συσχετισμός τους με ασθένειες

Πάνω από τις μισές παθογόνες μεταλλάξεις που έχουν εντοπιστεί στο mt-DNA βρίσκονται σε γονίδια που κωδικοποιούν για mt-tRNA παρότι αυτές οι αλληλουχίες αποτελούν μόνο το 10%

του συνολικού mtDNA (εικ. 7). Η απάντηση σε αυτό το παράδοξο φαινόμενο είναι πιθανότατα ο ζωτικός ρόλος αυτών των mt-tRNA στη σύνθεση πρωτεϊνών απαραίτητων για τη παραγωγή ενέργειας από τα κύτταρα. Αξίζει να σημειωθεί ότι τα γονίδια t-RNA<sup>Leu(UUR)</sup> και t-RNA<sup>Lys</sup> φέρουν το 85% των παθογόνων mt-RNA μεταλλάξεων (Richter et al., 2021). Αντιθέτως, παρατηρείται σχεδόν πλήρης έλλειψη μεταλλάξεων στη περιοχή του mtDNA που κωδικοποιεί για τις τριπλέτες των αντικωδικονίων (Zhou et al., 2021). Προφανώς, η θεμελιώδης λειτουργία των αντικωδικονίων δεν αφήνει περιθώριο για μεταλλάξεις στις αντίστοιχες αλληλουχίες του mtDNA καθώς οι περισσότερες από αυτές θα ήταν ασύμβατες με τη ζωή του οργανισμού.



**Εικόνα 7:** Χάρτης του ανθρώπινου μιτοχondριακού γονιδιώματος. Το mtDNA είναι ένα δίκλωνο κυκλικό μόριο μήκους 16.6 kb. Ο εξωτερικός κύκλος αντιπροσωπεύει τον πλούσιο σε γουανίνη «βαρύ» κλώνο και ο εσωτερικός κύκλος τον πλούσιο σε κυτοσίνη «ελαφρύ» κλώνο. Το mtDNA περιλαμβάνει 37 γονίδια που κωδικοποιούν 13 πρωτεΐνες, 2 rRNAs και 22 tRNAs (Richter et al., 2021)

Η συσχέτιση μεταξύ των παθογόνων mt-tRNA μεταλλάξεων και της κλινικής εικόνας είναι αρκετά ασαφής. Η ίδια μετάλλαξη μπορεί να οδηγήσει σε διαφορετικούς φαινοτύπους και ο ίδιος φαινότυπος μπορεί να είναι αποτέλεσμα διαφορετικών μεταλλάξεων. Καθοριστικό ρόλο για τη διαμόρφωση του φαινοτύπου μιας mt-tRNA μετάλλαξης έχει το επίπεδο της ετεροπλασμίας μέσα σε ένα κύτταρο, ιστό ή οργανισμό (Pereira et al., 2021). Ως ετεροπλασμία ορίζεται η συνύπαρξη μέσα στο ίδιο μιτοχόνδριο του μεταλλαγμένου και του φυσιολογικού mtDNA. Οι έρευνες αποκαλύπτουν πως ο λόγος του αριθμού των μεταλλαγμένων μορίων mtDNA μέσα σε ένα κύτταρο προς τα φυσιολογικά μόρια mtDNA είναι αυτός που σε πολλές

περιπτώσεις καθορίζει την έκφραση του φαινοτύπου (Pereira et al., 2021). Επιπλέον, υπάρχουν περιπτώσεις ασθενών που κατά τη διάρκεια της ζωής τους μεταπίπτουν από τον αρχικό τους φαινότυπο σε κάποιο διαφορετικό. Η εξήγηση για αυτό το παράδοξο φαινόμενο είναι ο μιτωτικός διαχωρισμός: Το mtDNA διπλασιάζεται ανεξάρτητα από το πυρηνικό DNA και τα μιτοχόνδρια μεταβιβάζονται τυχαία στα θυγατρικά κύτταρα που προκύπτουν κατά τη μίτωση. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα κατά τη διάρκεια της ζωής του ασθενούς να μεταβάλλεται ο λόγος των μεταλλαγμένων mtDNA προς τα φυσιολογικά στους διάφορους ιστούς αλλά και στο σύνολο του σώματος (Wilton et al., 2018). Επομένως, μια mt-tRNA μετάλλαξη ως μοναδικό γεγονός δεν μπορεί να συνδεθεί άμεσα με ένα συγκεκριμένο κλινικό φαινότυπο. Ο φαινότυπος είναι αποτέλεσμα συνδυασμού των επιπέδων της ετεροπλασμίας και του μιτωτικού διαχωρισμού τόσο ως προς το χώρο (κύτταρα, ιστοί) όσο και ως προς το χρόνο.

Η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία και η αυξημένη συχνότητα μεταλλάξεων σε γονίδια που κωδικοποιούν για mt-tRNA έχουν παρατηρηθεί σε αρκετές πνευμονικές νόσους που έχουν παρόμοια αιτιολογία με τη ΧΑΠ. Σύμφωνα με την έρευνα που διεξάγεται στο Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, σε μια ομάδα 40 ασθενών με ιδιοπαθή πνευμονική ίνωση, το 95% έφεραν μεταλλάξεις στα mt-tRNA ή στις παρακείμενες περιοχές τους. Από το σύνολο 32 μεταλλάξεων, 12 από αυτές είχαν σημαντικά μεγαλύτερη συχνότητα στους ασθενείς σε σχέση με τους υγιείς (controls) (Daniil et al. 2018). Επιπλέον, σε μια ομάδα 85 ασθενών με σαρκοείδωση, το 81% έφεραν μεταλλάξεις στα mt-tRNA ή στις παρακείμενες περιοχές τους. Από το σύνολο των 85 μεταλλάξεων, 18 από αυτές είχαν μεγαλύτερη συχνότητα σε ασθενείς σε σχέση με τους control (Daniil et al. 2018). Επιπλέον, σε μια ομάδα 76 ασθενών με άσθμα, το 73% έφεραν μεταλλάξεις στα mt-tRNA ή στις παρακείμενες περιοχές τους. Από το σύνολο των 10 μεταλλάξεων, οι 5 από αυτές είχαν σημαντικά μεγαλύτερη συχνότητα σε ασθενείς σε σχέση με τους control (Zifa et al. 2012). Τέλος, στις τρεις αυτές ασθένειες και ιδιαίτερα στην ιδιοπαθή πνευμονική ίνωση και στη σαρκοείδωση παρατηρήθηκε ένας μεγάλος αριθμός συνδυασμών σημειακών μεταλλάξεων στο mtDNA που δεν εντοπίστηκαν σε κανέναν από τους control (Daniil et al. 2018, Zifa et al. 2012). Είναι πιθανό αυτές οι σημειακές μεταλλάξεις να δρουν συνεργατικά και με αυτό τον τρόπο να οδηγούν στο κοινό φαινοτυπικό χαρακτηριστικό αυτών των τριών ασθενειών, τη μιτοχονδριακή δυσλειτουργία (Daniil et al., 2018).

Αποτελέσματα ερευνών συσχέτισης μεταλλάξεων στα mt-tRNAs με πνευμονικές νόσους						
Ασθένεια	Controls (n)	Ασθενείς (n)	Σύνολο μεταλλάξεων στους ασθενείς (n)	Ασθενείς με μεταλλάξεις (%)	Μεταλλάξεις με μεγαλύτερη συχνότητα σε ασθενείς συγκριτικά με controls	Συνδυασμοί μεταλλάξεων μόνο στους ασθενείς
IPF	204	40	32	38 ασθενείς/40 (95%)	12	15
Σαρκοείδωση	204	85	45	69 ασθενείς /85 (81%)	18	15
Άσθμα	100	76	10	56 ασθενείς /76 (73%)	5	9

**Πίνακας 1:** Ο αριθμός, η συχνότητα και οι συνδυασμοί των μεταλλάξεων των mt-tRNA γονιδίων και των παρακείμενων περιοχών τους σε ασθενείς με ιδιοπαθή πνευμονική ίνωση, σαρκοείδωση και άσθμα.

## 2. Σκοπός της εργασίας

Η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία και η αυξημένη συχνότητα μεταλλάξεων σε γονίδια που κωδικοποιούν για mt-tRNA έχει παρατηρηθεί σε αρκετές χρόνιες πνευμονικές νόσους παρόμοιας αιτιολογίας με τη ΧΑΠ. Όπως αναφέρεται παραπάνω, μια σειρά παραγόντων καθιστούν το mtDNA των ασθενών με ΧΑΠ πιο ευαίσθητο στη μεταλλαξιγένεση σε σχέση με το mtDNA των υγιών ανθρώπων. Επομένως, μεταλλάξεις στα mt-tRNA γονίδια των ασθενών με ΧΑΠ ενδεχομένως να οδηγούν στην παραγωγή δυσλειτουργικών mt-tRNA τα οποία επηρεάζουν τη σύνθεση πρωτεϊνών απαραίτητων για τη φυσιολογική κυτταρική λειτουργία. Στο πλαίσιο αυτό, σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η ανίχνευση μεταλλάξεων στα μιτοχονδριακά γονίδια tRNA<sup>Ile</sup>, tRNA<sup>Gln</sup> και tRNA<sup>Met</sup> σε μια ομάδα ασθενών που πάσχουν από ΧΑΠ.

## 3. Πειραματική διαδικασία

### 3.1 Απομόνωση ολικού DNA από ολικό αίμα ασθενών με Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια (ΧΑΠ)

Για την απομόνωση του ολικού DNA χρησιμοποιήθηκαν 38 δείγματα ολικού αίματος ασθενών με ΧΑΠ από την Πνευμονολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας. Η πλειοψηφία των ασθενών ήταν άνδρες, καπνιστές και ανήκαν στο στάδιο δύο της νόσου. Η διάμεση ηλικία των πασχόντων ήταν τα 68 έτη. Τα χαρακτηριστικά των ασθενών συνοψίζονται στον Πίνακα 2.

Χαρακτηριστικά ασθενών							
Αριθμός ασθενών	Φύλο	Ηλικία	Ποσοστό καπνιστών	Αριθμός ασθενών με βάση τη βαρύτητα της ΧΑΠ			
				Στάδιο 1	Στάδιο 2	Στάδιο 3	Στάδιο 4
38	33 ♂ 5 ♀	51-83 (Μ.Ο=68)	33/38 (86%)	8	15	5	4

**Πίνακας 2:** Τα χαρακτηριστικά των ασθενών που έδωσαν τα δείγματα αίματος για τις ανάγκες του πειράματος.

Η απομόνωση του ολικού DNA από τα δείγματα έγινε με βάση το πρωτόκολλο “Genomic DNA purification with Nucleospin Blood L” της εταιρείας MACHERY – NAGEL. Το αίμα από ασθενείς με ΧΑΠ που χρησιμοποιήθηκε είχε αποθηκευτεί σε ειδικούς σωλήνες που περιέχουν το αντιπηκτικό EDTA έτσι ώστε να αποφευχθεί η δημιουργία θρόμβων.

### Υλικά για τη μέθοδο

1. Πιπέτες (100μL, 200μL, 100μL, 20 μL, 10μL)
2. Tips
3. Tubes 1.5ml
4. Αιθανόλη 99,8%
5. Επωαστήρα (70 °C)
6. Φυγόκεντρος
7. Στατό

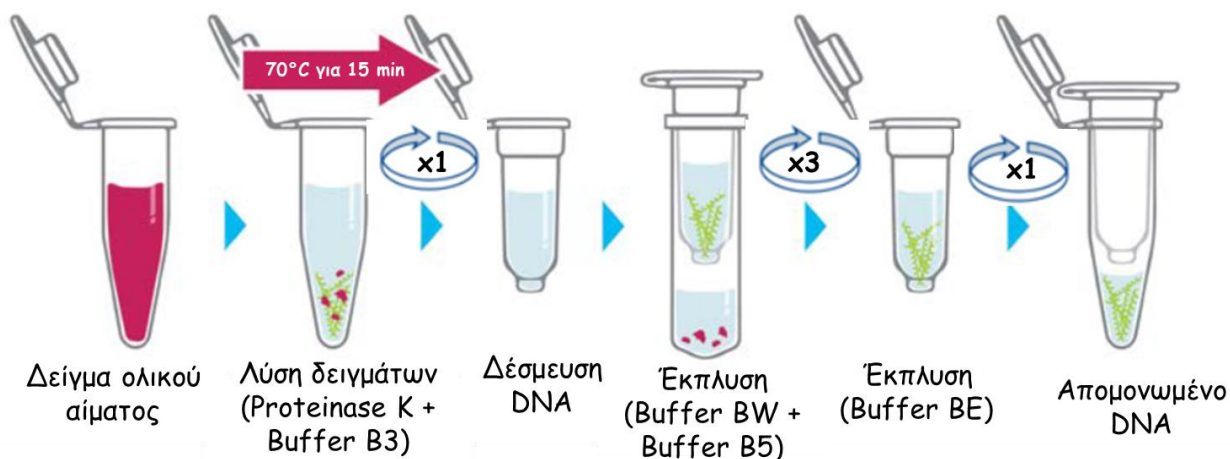
Στο συγκεκριμένο πείραμα η απομόνωση του DNA από τα δείγματα αίματος πραγματοποιήθηκε με βάση τα παρακάτω βήματα:

- Αρχικά, ξεπάγωσαν τα δείγματα ολικού αίματος που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα.
- Κατά τη διάρκεια της αναμονής δημιουργήθηκαν τα διαλύματα της Proteinase K και του Wash Buffer B5, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν στην συνέχεια. Για τη δημιουργία του διαλύματος Proteinase K, ρόλος της οποίας είναι η αποδιάταξη των πρωτεϊνών,

προστέθηκαν 1,35ml από το Proteinase Buffer σε 300mg Proteinase K, ενώ για τη δημιουργία του Wash Buffer B5, σε 12ml αυτού, προστέθηκαν 48ml αιθανόλης 100%.

- Αφού ξεπάγωσαν τα δείγματα προστέθηκαν 200μL από κάθε δείγμα αίματος σε σωλήνες μικροφυγοκέντρισης των 1,5ml μαζί με 25μL από το διάλυμα της Proteinase K.
- Στη 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 στον επωαστήρα στους 70 °C για 15 λεπτά.
- Ακολούθησε προσθήκη 20μL αιθανόλης 99,8% σε κάθε δείγμα και έντονη ανάδευση με χρήση VORTEX για 10 δευτερόλεπτα.
- Έπειτα κάθε δείγμα φορτώθηκε σε στήλη και ακολούθησε φυγοκέντρωση στα 11.000 rpm με διάρκεια 1 min. Με το τέλος της φυγοκέντρωσης αφαιρέθηκε ο σωλήνας συλλογής και κρατήθηκε η στήλη.
- Περνώντας στην φάση της έκπλυσης, οι στήλες τοποθετήθηκαν σε νέο σωλήνα συλλογής και προστέθηκαν 500 μL 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 στο νέο σωλήνα συλλογής και προστέθηκαν 600 μL 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 σωλήνα συλλογής.
- Οι στήλες τοποθετήθηκαν δίχως την προσθήκη κάποιου διαλύματος, φυγοκεντρίθηκαν 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 και προστέθηκαν 100μL στο Buffer BE, το οποίο είχε προθερμανθεί στους 70 °C για 5 λεπτά. 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.





**Εικόνα 8:** Σχηματική αναπαράσταση των βημάτων που απαιτούνται για την απομόνωση του ολικού DNA από δείγμα ολικού αίματος.

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

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

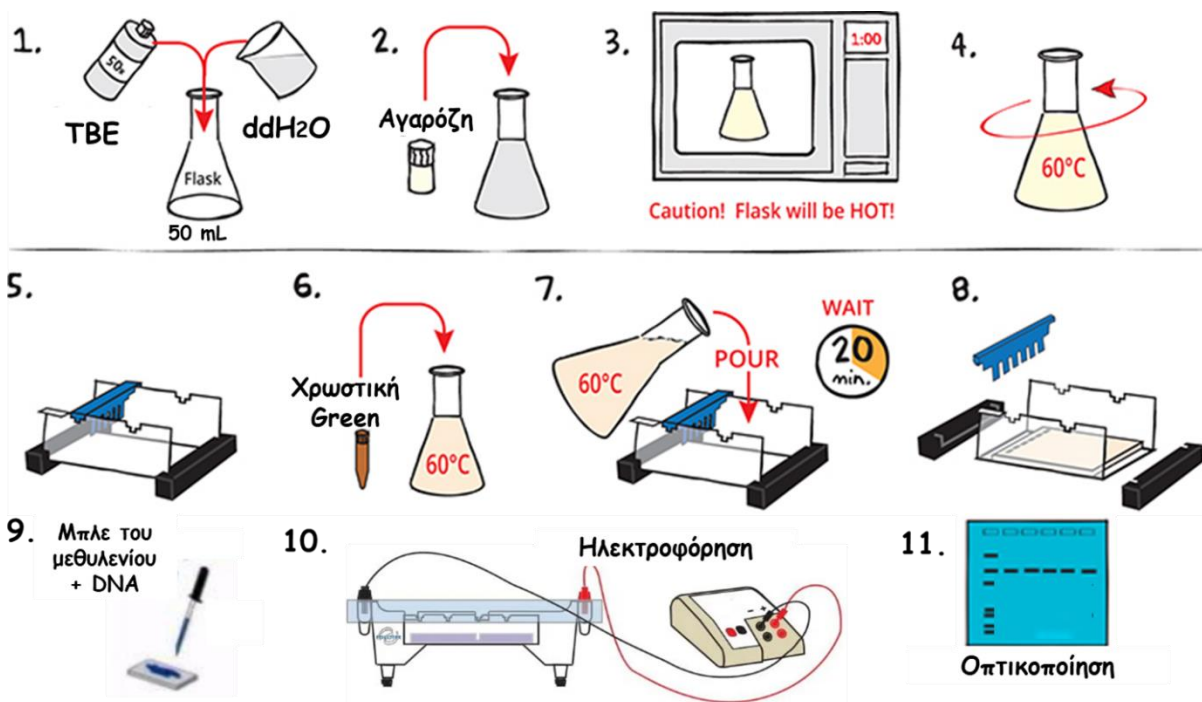
Το ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης BW αφαιρεί νουκλεϊκά οξέα χαμηλού μοριακού βάρους από τους ιστούς και χρησιμοποιείται για την έκπλυση τμημάτων ιστού μετά από κάθε στάδιο επώασης προετοιμάζοντας έτσι τον ιστό για την εφαρμογή του επόμενου αντιδραστηρίου.

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 BW και όχι νουκλεϊκών οξέων.

### 3.2 Ηλεκτροφόρηση απομονωμένων δειγμάτων DNA με χρήση πηκτής αγαρόζης

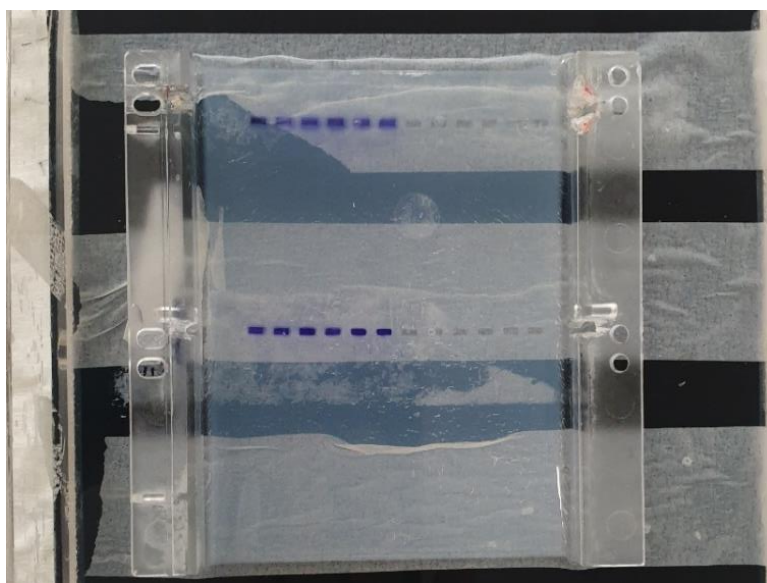
Η ηλεκτροφόρηση πηκτής αγαρόζης είναι μία αποτελεσματική διαδικασία διαχωρισμού DNA από 100bp έως και 25kbp. Κατά τη δημιουργία της πηκτής, τα πολυμερή αγαρόζης συνδέονται μη ομοιοπολικά και σχηματίζουν ένα δίκτυο δεσμών. Για τις ανάγκες του πειράματος

κατασκευάστηκε μια πηκτή αгарόζης περιεκτικότητας 2%. Αρχικά, ζυγίστηκε 1g σκόνης αгарόζης και τοποθετήθηκαν σε κωνική φιάλη των 100ml. Στην κωνική φιάλη προστέθηκαν 50ml TBE 0.5X και πραγματοποιήθηκε ελαφρά ανάδευση. Στη συνέχεια, τοποθετήθηκε η κωνική φιάλη στον φούρνο μικροκυμάτων για περίπου 3 λεπτά ώστε να τη διαλυτοποιηθεί η αгарόζη στο διάλυμα του TBE. Αμέσως μετά το βράσιμο, το διάλυμα αναδεύτηκε και παρατηρήθηκε στο φως για την επιβεβαίωση της διαλυτοποίησης της αгарόζης. 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 ακολούθησε ανάδευση. Η χρωστική αυτή χρησιμοποιείται για την οπτικοποίηση 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 στην πηκτή. Μετά από 20 λεπτά αφαιρέθηκαν τα χτενάκια και η πηκτή ήταν έτοιμη για χρήση.



**Εικόνα 9:** Σχηματική αναπαράσταση των βημάτων που απαιτούνται για την παρασκευή του πηκτώματος της αгарόζης και για τη προετοιμασία των δειγμάτων DNA πριν την ηλεκτροφόρηση.

Για τον διαχωρισμό του DNA σε μία πηκτή αγαρόζης, τοποθετήθηκαν 5μL απομονωμένου DNA αναμειγμένα με 3μL της χρωστικής μπλε του μεθυλενίου στα πηγαδάκια της πηκτής. Το μπλε του μεθυλενίου έχει την ικανότητα να συνδέεται στο DNA και έτσι είναι δυνατή η οπτικοποίηση του DNA μέσα στην πηκτή. Η πηκτή τοποθετείται σε μία συσκευή που εφαρμόζει τάση στα δύο άκρα της (250V), κοντά στον αρνητικό πόλο. Αυτό συμβαίνει γιατί το DNA είναι αρνητικά φορτισμένο και με την εφαρμογή τάσης αυτό θα «τρέξει» προς το θετικό πόλο, δηλαδή στην άλλη άκρη της συσκευής. Η παρατήρηση των αποτελεσμάτων γίνεται έπειτα από 20 λεπτά ηλεκτροφόρησης.



**Εικόνα 10:** Πηκτή αγαρόζης μέσα στη συσκευή της ηλεκτροφόρησης, βυθισμένη σε ρυθμιστικό διάλυμα TBE 0.5X. Στα πηγαδάκια της πηκτής έχει φορτωθεί η ποσότητα DNA αναμειγμένη με τη χρωστική μπλε του μεθυλενίου.

### **3.3 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης – Polymerase Chain Reaction (PCR)**

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) είναι μια τεχνική που χρησιμοποιείται για την γρήγορη, επιλεκτική και ακριβή ενίσχυση των 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.

Η PCR βασίζεται στον ενζυμικό πολλαπλασιασμό in vitro στοχευμένων αλληλουχιών DNA από μικρή αρχική ποσότητα δείγματος. Η τεχνική αφορά την επανασύνδεση θερμικά

αποδιαταγμένου δίκλωνου DNA. Ειδικότερα, 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 μονόκλινα. Τα δύο αυτά μονόκλινα μήματα DNA που προκύπτουν, χρησιμοποιούνται ως εκμαγεία από το ένζυμο Taq πολυμεράση με σκοπό τη δημιουργία δύο συμπληρωματικών τμημάτων DNA. Με αυτό τον τρόπο προκύπτουν δύο δίκλινα μόρια DNA. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται για 30-40 φορές δημιουργώντας τελικά πάνω από 1 δισεκατομμύριο πιστά αντίγραφα του αρχικού τμήματος DNA.

Η 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 δευτερόλεπτα.

Η αντίδραση PCR έγινε σε όγκο 50μl. Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν και οι αντίστοιχες ποσότητες αναγράφονται στον Πίνακα 3:

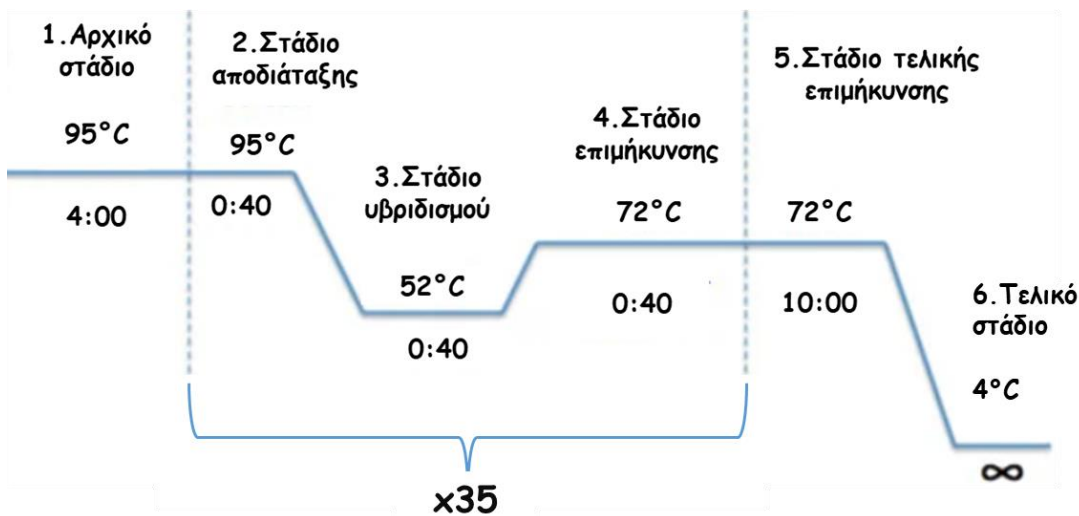


<b>DNA δείγμα</b>	1μl
<b>50 pmol από τον κάθε primer</b>	1 + 1 μl
<b>10 X PCR Buffer</b>	5μl
<b>40 mM dNTP's</b>	1 μl
<b>25 mM MgCl2</b>	1 μl
<b>1 U Taq πολυμεράση (5U/μl)</b>	0.25 μl
<b>dd H2O μέχρι τα 50μl</b>	36.75 μl

**Πίνακας 3:** Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στη PCR και οι αντίστοιχες ποσότητές τους.

Τα βήματα που ακολουθήθηκαν είναι 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 ώστε να καταστεί δυνατή η υβριδοποίηση των εκκινητών με τα μονόκλιωνα τμήματα DNA που θα ενισχυθούν.
  4. **Στάδιο επιμήκυνσης:** Η θερμοκρασία ανέρχεται στους 72 °C για 40 δευτερόλεπτα ώστε η Ταq πολυμεράση -που λειτουργεί βέλτιστα σε αυτή την θερμοκρασία- να επιμηκύνει τα τμήματα των εκκινητών. Ο ρόλος των εκκινητών έγκειται στην χρησιμοποίησή τους από την Ταq πολυμεράση με σκοπό την πρόσδεση στην αλληλουχία καθώς το ένζυμο αυτό μπορεί μόνο να προσθέτει νουκλεοτίδια στο 3' άκρο ήδη υπαρχόντων νουκλεϊκών οξέων και όχι να δημιουργήσει μια αλληλουχία από την αρχή.
  5. **Στάδιο τελικής επιμήκυνσης:** Η θερμοκρασία παραμένει στους 72 °C για 10 λεπτά μετά τον τελευταίο κύκλο της PCR.
  6. **Τελικό στάδιο:** Η θερμοκρασία κατέρχεται στους 4°C.
- Τα στάδια 2-4 επαναλαμβάνονται για 35 κύκλους.



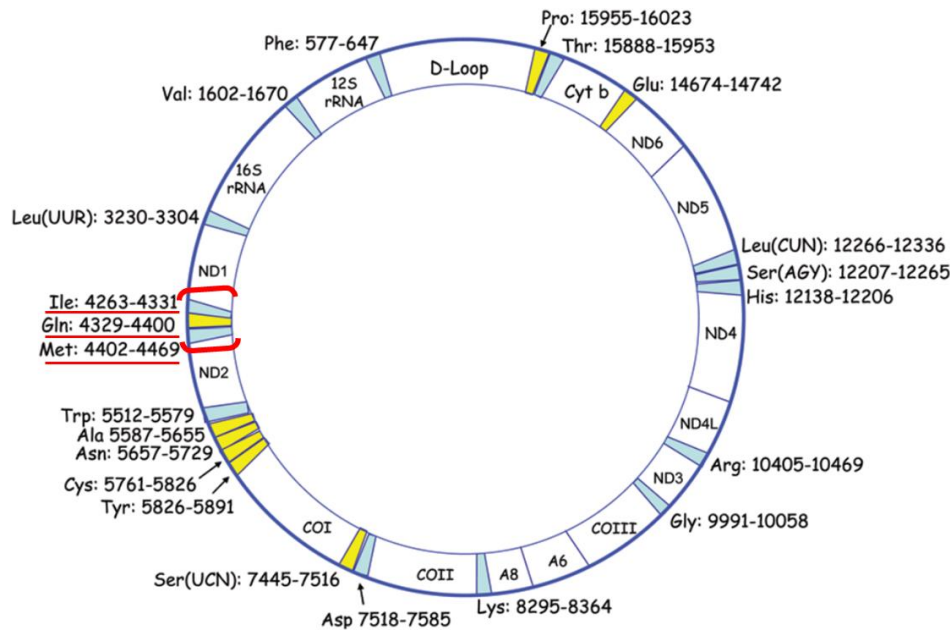
**Εικόνα 11:** Σχηματική αναπαράσταση των θερμοκρασιών και των χρόνων επώασης των διαφόρων σταδίων της PCR.

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. Κατά το σχεδιασμό ενός ζεύγους εκκινητών PCR λαμβάνονται υπόψη ορισμένα κριτήρια. Αρχικά, οι εκκινητές πρέπει να συνδέονται μόνο στις επιθυμητές 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 δε συνάδει με το σκοπό της PCR. 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. Επιπλέον, τα ζεύγη των εκκινητών θα πρέπει να έχουν παρόμοιες θερμοκρασίες τήξης αφού ο υβριδισμός κατά τη διάρκεια της PCR λαμβάνει χώρα και για τους δύο κλώνους ταυτόχρονα. Αυτή η παρόμοια θερμοκρασία τήξης δεν πρέπει να είναι ούτε υψηλότερη ούτε χαμηλότερη από τη θερμοκρασία υβριδισμού της αντίδρασης. Ένας εκκινητής με  $T_m$  (θερμοκρασία τήξης) υψηλότερη από τη θερμοκρασία υβριδισμού της αντίδρασης είναι πολύ πιθανό να μην καταφέρει να υβριδοποιηθεί στο DNA. Μια θερμοκρασία τήξης σημαντικά χαμηλότερη από τη θερμοκρασία υβριδισμού μπορεί επίσης να εμποδίσει τον υβριδισμό και άρα την επέκταση της αλληλουχίας.

Στο συγκεκριμένο πείραμα ενισχύθηκαν τα γονίδια που κωδικοποιούν για τα  $tRNA^{Ile}$ ,  $tRNA^{Gln}$  και  $tRNA^{Met}$  (IGM) με ένα ζεύγος εκκινητών, FwIGM– RevIGM. Οι αλληλουχίες των εκκινητών και οι θερμοκρασίες τήξης τους αναγράφονται στον ακόλουθο πίνακα.

Primer	Αλληλουχία	$T_m$
<b>FwIGM</b>	5'-CCA GCA TCC CCC CTC AAA CC-3'	54.5 °C
<b>RevIGM</b>	5'-TGG GCC AGG GGA TTA AAA CC-3'	61.5 °C

**Πίνακας 4:** Οι αλληλουχίες και η θερμοκρασίες τήξης των εκκινητών FwIGM-RevIGM.



**Εικόνα 12:** Χάρτης του ανθρώπινου μιτοχondριακού γονιδιώματος. Με κόκκινο χρώμα σημαίνονται τα γονίδια που ενισχύθηκαν στο συγκεκριμένο πείραμα.

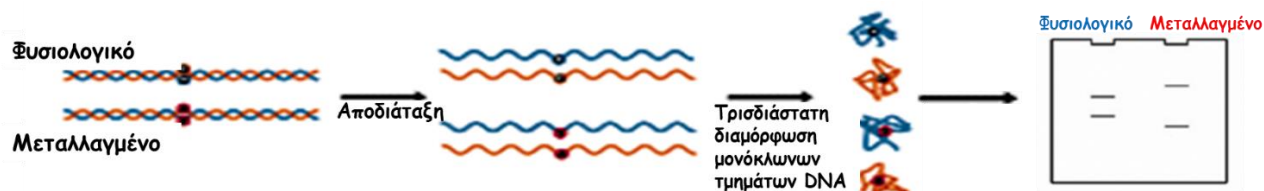
### 3.4 Πολυμορφισμός μονόκλωνης διαμόρφωσης – *Single Strand Conformation*

#### *Polymorphism (SSCP)*

Το SSCP (Single Strand Conformational Polymorphism) είναι μία απλή, γρήγορη, οικονομική και ιδιαίτερα αποτελεσματική μέθοδος σάρωσης τμημάτων DNA. Έχει μεγάλη διακριτική ικανότητα και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον διαχωρισμό μονόκλωνων μορίων DNA που διαφέρουν μεταξύ τους έστω και κατά μία μόνο βάση. Στο SSCP, η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε πήκτωμα ακρυλαμίδης, ένα μονομερές που πολυμερίζεται σε μακριές αλυσίδες με την παρουσία ελεύθερων ριζών οι οποίες με τη σειρά τους διασυνδέονται παρουσία του N,N - μεθυλεν - δις- ακρυλαμίδης, ενός μορίου διασυνδέτη. Η μέθοδος στηρίζεται στη διαφορετική τρισδιάστατη διαμόρφωση και κατά συνέπεια στη διαφορετική κινητικότητα που έχουν τα μονόκλιωνα μόρια DNA κατά το μήκος της πορώδους πηκτής.

Ειδικότερα, κατά τη διάρκεια της ηλεκτροφόρησης τα θραύσματα DNA αναδιπλώνονται σε τρισδιάστατο σχήμα ανάλογα με την αλληλουχία τους. Η ηλεκτροφορητική κινητικότητα του διαχωρισμού επηρεάζεται από το σχήμα των αναδιπλωμένων μορίων. Ακόμα και αν η διαφορά στην αλληλουχία μεταξύ του φυσιολογικού και του μεταλλαγμένου θραύσματος είναι μόνο ένα νουκλεοτίδιο, θα προκύψει μια διαφορετική ηλεκτροφορητική κινητικότητα. Η βάση της

μεθόδου SSCP είναι η παρατήρηση ότι, υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες, τα θραύσματα μονόκλωνου DNA υιοθετούν μοναδικές διαμορφώσεις που καθορίζονται από τη νουκλεοτιδική αλληλουχία τους, η δομή της οποίας διαμορφώνεται από ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις. Συνεπώς, η αλλαγή μιας βάσης οδηγεί κατά κανόνα σε διαμορφωτική αλλαγή η οποία ανιχνεύεται από την αλλοιωμένη κινητικότητα του μεταλλαγμένου μονόκλωνου μορίου DNA στο πήκτωμα πολυακρυλαμίδης.



**Εικόνα 13:** Σχηματική αναπαράσταση της αρχής της μεθόδου SSCP.

Τα βήματα που ακολουθήθηκαν για την παρασκευή δύο πήκτων πολυακρυλαμιδίου είναι τα εξής:

1. Ζυγίστηκαν σε ζυγαριά ακριβείας 15gr ακρυλαμιδίου και 0,38 gr δις-ακρυλαμιδίου.
2. Μετρήθηκαν σε ογκομετρικό κύλινδρο των 500ml, 6.4ml TBE 10X και 6.25ml γλυκερόλης 100%.
3. Τα παραπάνω υλικά αναμείχθηκαν και ανακατεύθηκαν σε ποτήρι ζέσεως με χρήση μαγνήτη έως ότου προέκυψε ένα διάλυμα.
4. Το διάλυμα διηθήθηκε με τη βοήθεια διηθητικού χαρτιού και μιας κωνικής φιάλης.
5. Ο όγκος του διαλύματος αυτού ογκομετρήθηκε με χρήση ογκομετρικού σωλήνα και συμπληρώθηκε με ddH<sub>2</sub>O μέχρι τα 130mL.
6. Στο επόμενο βήμα, προστέθηκαν στο διάλυμα 125μL Τετραμεθυλαιθυλενοδιαμίνη (TEMED) και 750 μL Υπερθειικό αμμώνιο (APS) 20% με σκοπό την πήξη του διαλύματος και τον πολυμερισμό της ακρυλαμίδης. Το TEMED χρησιμοποιείται ευρέως ως πρόσδεμα για μεταλλικά ιόντα. Σχηματίζει σταθερά σύμπλοκα με πολλά αλογονίδια μετάλλων 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.
8. Αμέσως μετά έγινε η προσθήκη των χτενών δημιουργίας πηγαδιών.
9. Μόλις δημιουργήθηκε η πηκτή αφαιρέθηκαν τα χτενάκια και τα νεοσχηματιζόμενα πηγάδια καθαρίστηκαν με μία βελόνα.

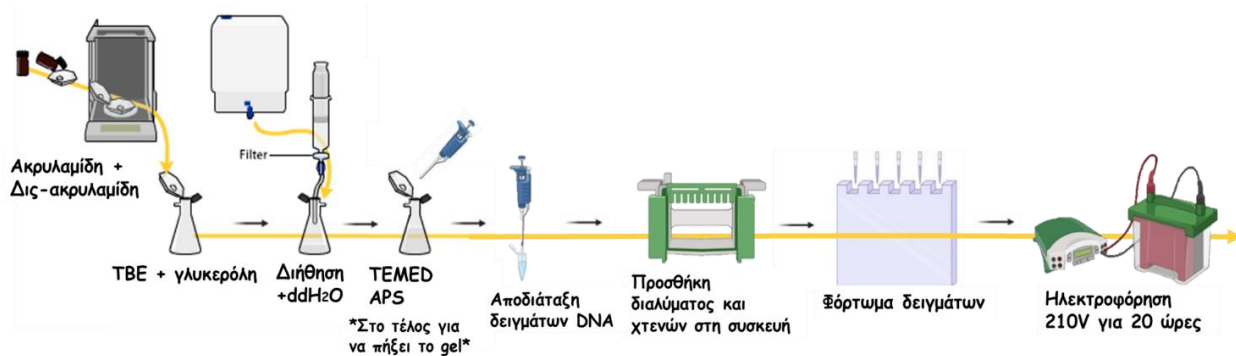
Πριν από το φόρτωμα των δειγμάτων στα πηγάδια της πηκτής, έγινε αποδιάταξη των προϊόντων της PCR για 14 λεπτά. Πιο συγκεκριμένα, η αποδιάταξη πραγματοποιήθηκε με ανάμειξη 5μL DNA και 10μL αποδιατακτικού διαλύματος σε θερμικό κυκλοποιητή με βάση τα παρακάτω βήματα:

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

Το αποδιατακτικό διάλυμα περιέχει:

- 95% φορμαμίδιο, το οποίο σε καθαρή μορφή διαλύει πολλές ιονικές ενώσεις που είναι αδιάλυτες στο νερό και αν θερμανθεί έντονα αυτοδιασπάται.
- 20mM EDTA, το οποίο δημιουργεί 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.
- 10mM 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.

Μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας της αποδιάταξης, ακολούθησε φόρτωση των δειγμάτων στα πηγαδάκια της πηκτής και ηλεκτροφόρηση στα 210V για 20 ώρες.



**Εικόνα 14:** Σχηματική αναπαράσταση των βημάτων που απαιτούνται για την παρασκευή του πηκτώματος πολυακρυλαμίδης και για την προετοιμασία των δειγμάτων DNA για την ηλεκτροφόρηση.

### 3.5 Χρώση πηκτώματος πολυακρυλαμίδιου με διάλυμα νιτρικού αργύρου

Για την εμφάνιση των αποτελεσμάτων ηλεκτροφόρησης της πηκτής πολυακρυλαμίδιου, ακολούθησαν 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<sup>ο</sup> Διάλυμα: Μονιμοποίηση του DNA στο πήκτωμα**

1. Προσθήκη 800ml ddH<sub>2</sub>O, 20ml αιθανόλης 100% και 1ml οξικού οξέος σε ογκομετρικό κύλινδρο.
2. Τοποθέτηση των πηκτωμάτων στον αναδευτήρα.
3. Ανακίνηση του διαλύματος και προσθήκη 200ml του διαλύματος σε κάθε πήκτωμα για 3 λεπτά.
4. Απομάκρυνση του διαλύματος μετά τα 3 λεπτά.
5. Προσθήκη 200ml διαλύματος σε κάθε πήκτωμα για 3 λεπτά για μια δεύτερη πλύση και έπειτα απομάκρυνση του διαλύματος.
6. Ακολούθησαν 2 φορές πλύσεις με ddH<sub>2</sub>O για 1 λεπτό.

## **2° Διάλυμα: Χρώση του πηκτώματος**

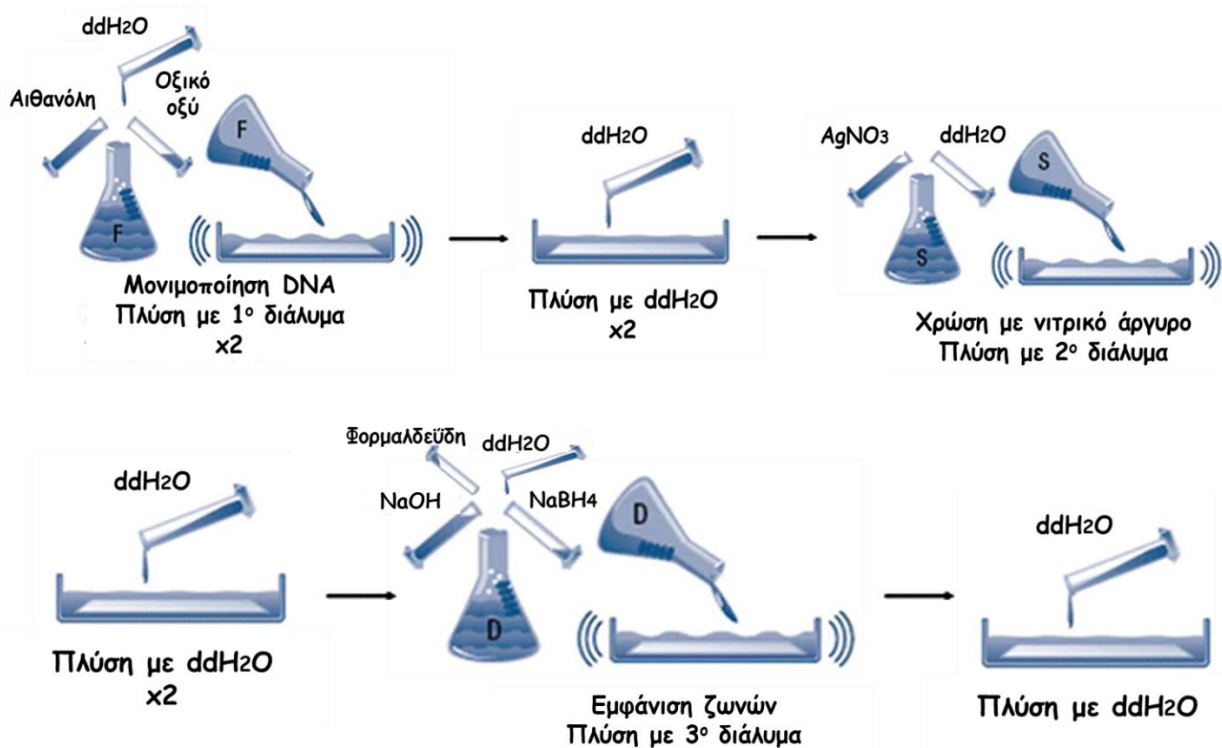
1. Προσθήκη 400ml διαλύματος νιτρικού αργύρου σε ογκομετρικό κύλινδρο.
2. Τοποθέτηση των πηκτωμάτων στον αναδευτήρα.
3. Προσθήκη σε κάθε πήκτωμα από 200ml διαλύματος για 20 λεπτά.
4. Ξέπλυμα των πηκτωμάτων 2 φορές με ddH<sub>2</sub>O.

## **3° Διάλυμα: Εμφάνιση ηλεκτροφορητικών ζωνών**

1. Προσθήκη σε ποτήρι ζέσεως 6gr NaOH, 0,02gr NaBH<sub>4</sub>, 2ml φορμαλδεΐδης και συμπλήρωση με ddH<sub>2</sub>O μέχρι ο όγκος του διαλύματος να φθάσει τα 400ml.
2. Προσθήκη 200ml διαλύματος σε κάθε πήκτωμα.
3. Τοποθέτηση των πηκτωμάτων στον αναδευτήρα.
4. Παραμονή των πηκτωμάτων στο διάλυμα μέχρι την εμφάνιση των ζωνών.
5. Απομάκρυνση του διαλύματος και πλύση με ddH<sub>2</sub>O.



***Εικόνα 15:*** Πηκτή πολυακρυλαμιδίου τοποθετημένη στον αναδευτήρα μαζί με το κατάλληλο διάλυμα.



**Εικόνα 16:** Σχηματική αναπαράσταση των βημάτων που απαιτούνται για την εμφάνιση των αποτελεσμάτων της ηλεκτροφόρησης.

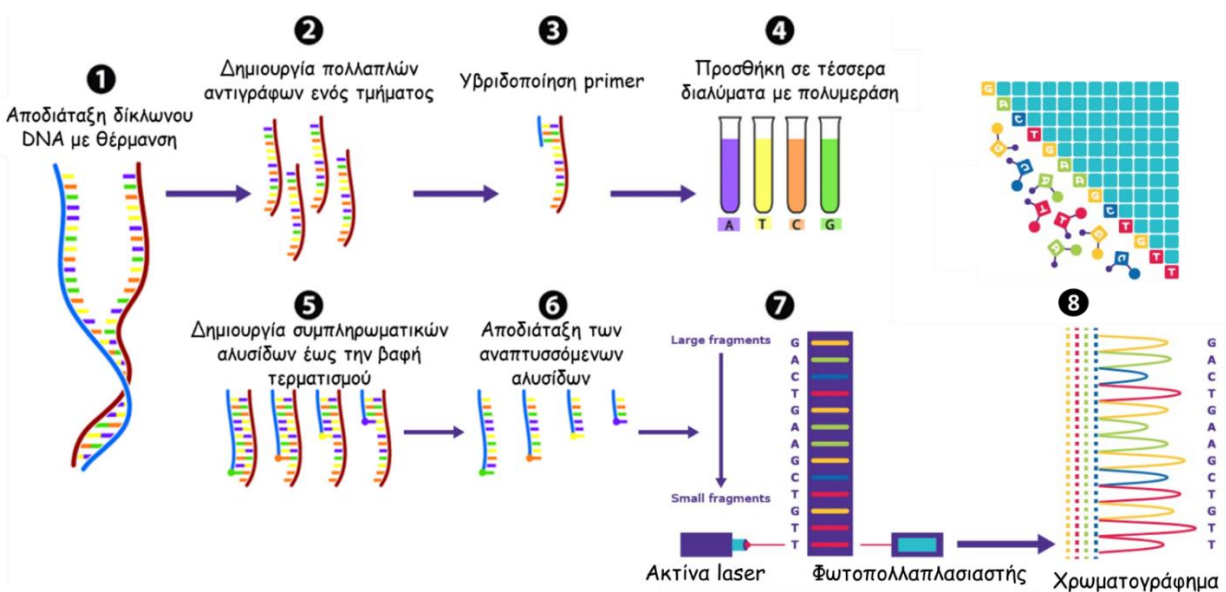
### 3.6 Καθαρισμός προϊόντων της PCR

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. Αλληλούχιση DNA

Η αλληλούχιση των νουκλεϊκών οξέων είναι ένα πολύ σημαντικό εργαλείο στην βιολογική έρευνα. 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 του ανθρώπινου 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 Sanger βασίζεται στην εισαγωγή τροποποιημένων δεοξυνουκλεοτιδίων που ονομάζονται διδεοξυνουκλεοτίδια (ddNTP). Το υδρογόνο αντί του υδροξυλίου στη θέση 3' της δεοξυριβόζης αναστέλλει την επιμήκυνση της αλυσίδας εμποδίζοντας τον σχηματισμό 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. Ακολουθεί αποδιάταξη των αναπτυσσόμενων αλυσίδων και έπειτα με τη χρήση ακτίνας λέιζερ και φωτοπολλαπλασιαστή προκύπτει το χρωματογράφημα. Τέλος, με κατάλληλη βιοπληροφορική επεξεργασία του χρωματογραφήματος παίρνουμε την επιθυμητή αλληλουχία.

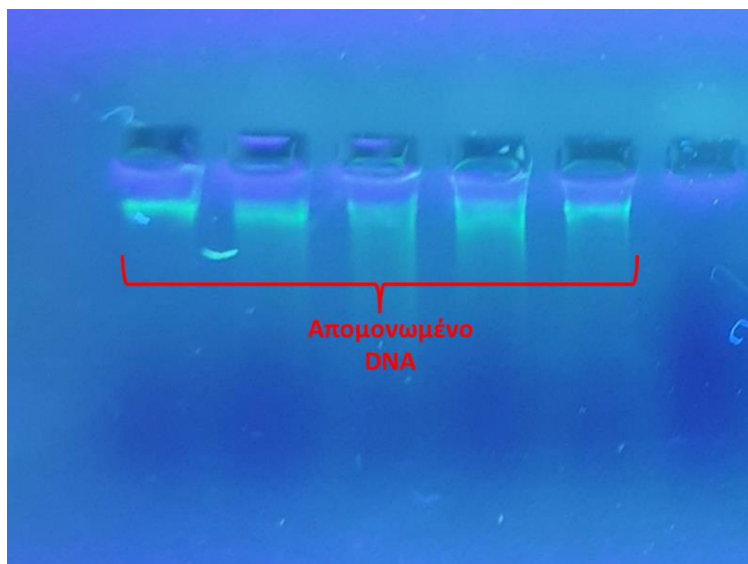


**Εικόνα 17:** Σχηματική αναπαράσταση των βημάτων της αλληλούχισης Sanger.

## 4. Αποτελέσματα

### 4.1 Απομόνωση DNA

Η επιτυχία της απομόνωσης ολικού DNA από αίμα ασθενών με ΧΑΠ ελέγχθηκε με ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πήκτωμα αγαρόζης περιεκτικότητας 2%. Ειδικότερα, στα πηγαδάκια της πηκτής προστέθηκε μικρή ποσότητα απομονωμένου DNA μαζί με τη χρωστική μπλε του μεθυλενίου. Το μπλε του μεθυλενίου έχει την ικανότητα να συνδέεται στο DNA και να παράγει φθορισμό που είναι ορατός στο UV. Επομένως, η τοποθέτηση της πηκτής αγαρόζης σε μια συσκευή που παράγει UV καθιστά ικανή την οπτικοποίηση του DNA μέσα στην πηκτή (εικ. 18). Η απομόνωση του ολικού DNA πέτυχε στο σύνολο των διαθέσιμων δειγμάτων αίματος (38).

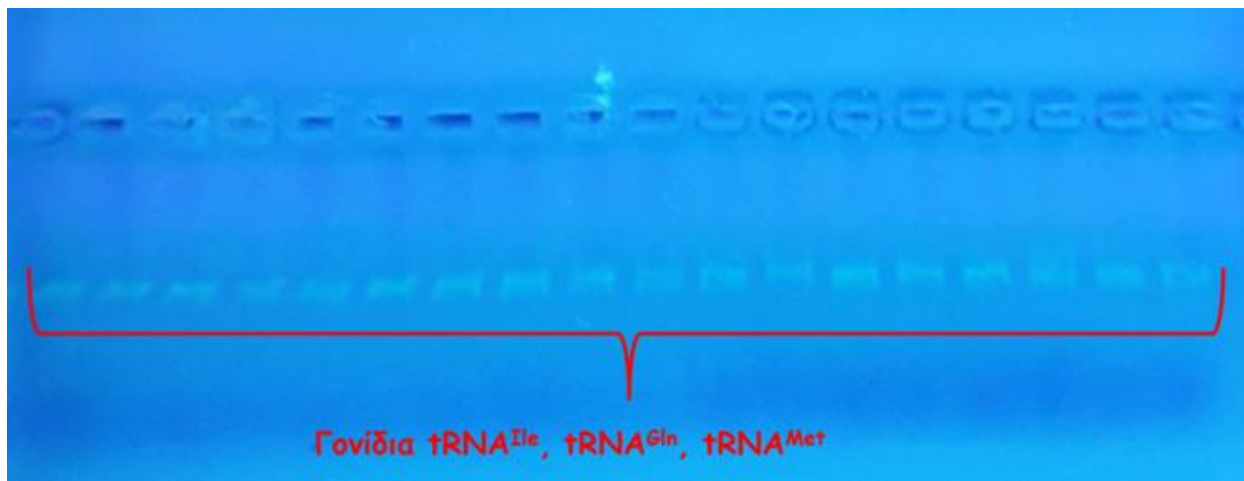


**Εικόνα 18:** Πηκτή αγαρόζης τοποθετημένη στη συσκευή UV. Απεικονίζονται τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης των απομονωμένων δειγμάτων DNA. Ο φθορισμός αντιστοιχεί στο απομονωμένο DNA.

### 4.2 Ενίσχυση των γονιδίων $tRNA^{Ile}$ , $tRNA^{Gln}$ , $tRNA^{Met}$ με PCR

Η επιτυχία της απομόνωσης του ολικού DNA από αίμα ασθενών με ΧΑΠ ελέγχθηκε με ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πήκτωμα αγαρόζης περιεκτικότητας 3%. Η αύξηση στη συγκέντρωση της αγαρόζης έγινε για την αποτελεσματικότερη κατακράτηση των προϊόντων της PCR στην πηκτή καθώς το ενισχυόμενο προϊόν έχει αρκετά μικρό μήκος. Στα πηγαδάκια της πηκτής προστέθηκε DNA μαζί με τη χρωστική μπλε του μεθυλενίου, πραγματοποιήθηκε

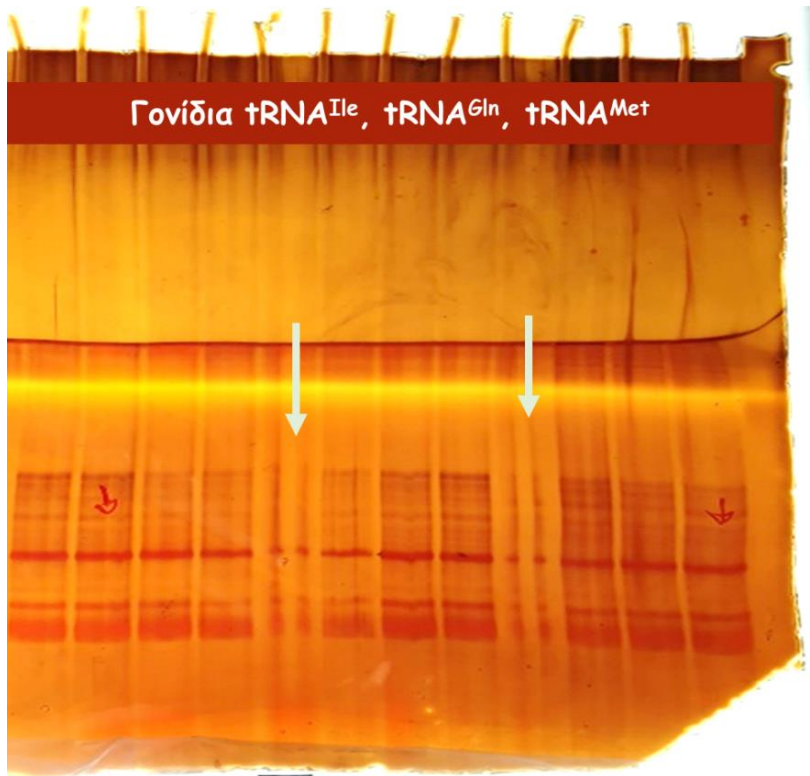
ηλεκτροφόρηση και έπειτα παρατηρήθηκε η πηκτή στο UV (εικ. 19). Η ενίσχυση των γονιδίων  $tRNA^{Ile}$ ,  $tRNA^{Gln}$ ,  $tRNA^{Met}$  πέτυχε στο σύνολο των διαθέσιμων δειγμάτων DNA (38).



**Εικόνα 19:** Πηκτή αγαρόζης τοποθετημένη στη συσκευή UV. Απεικονίζονται τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης των γονιδίων  $tRNA^{Ile}$ ,  $tRNA^{Gln}$ ,  $tRNA^{Met}$  μετά την ενίσχυσή τους με PCR. Ο φθορισμός αντιστοιχεί στα προϊόντα της PCR.

#### 4.3 Ανίχνευση πολυμορφισμών στα γονίδια $tRNA^{Ile}$ , $tRNA^{Gln}$ , $tRNA^{Met}$ με τη μέθοδο SSCP

Τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης των αποδιαταγμένων προϊόντων PCR στη πηκτή πολυακρυλαμιδίου οπτικοποιήθηκαν μετά από κατάλληλη επεξεργασία του πηκτώματος. Ο εντοπισμός των πιθανών μεταλλάξεων γίνεται με βάση τις διαφορές στα πρότυπα ηλεκτροφόρησης μεταξύ των δειγμάτων, οι οποίες προκύπτουν από τη διαφορετική τρισδιάστατη διαμόρφωση των μορίων DNA (εικ. 20).



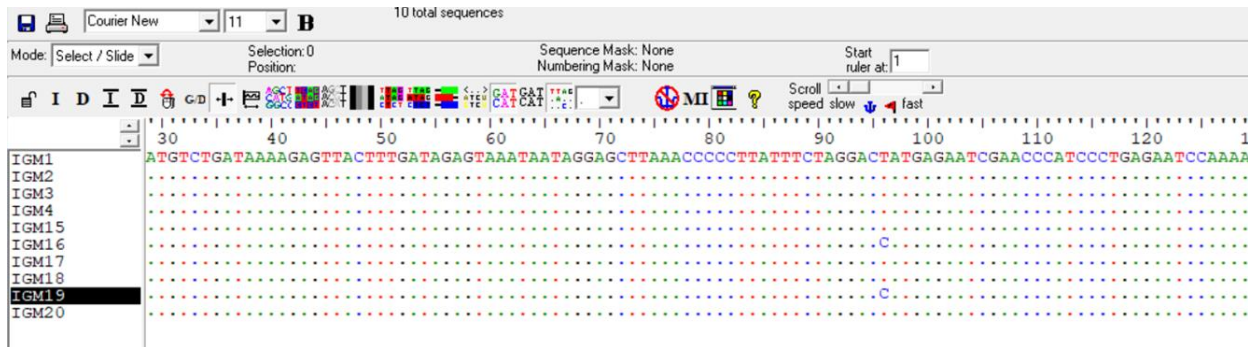
**Εικόνα 20:** Πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου μετά από κατάλληλη επεξεργασία για την οπτικοποίηση ηλεκτροφορητικών ζωνών. Διακρίνονται τα πρότυπα ηλεκτροφόρησης των δειγμάτων και με το άσπρο βέλος σημαίνονται τα δείγματα με διαφορετική ηλεκτροφορητική κινητικότητα σε σχέση με τα υπόλοιπα.

#### 4.4 Αλληλούχιση των γονιδίων $tRNA^{Ile}$ , $tRNA^{Gln}$ , $tRNA^{Met}$ και ανίχνευση πιθανών μεταλλάξεων

Μετά την ολοκλήρωση της χρώσης των πηκτωμάτων πολυακρυλαμιδίου και τη παρατήρηση των ηλεκτοφορητικών προτύπων, επιλέχθηκαν 10 δείγματα DNA που είχαν διαφορετική ηλεκτροφορητική κινητικότητα σε σχέση με τα υπόλοιπα. Στη συνέχεια, τα δείγματα αυτά αλληλουχήθηκαν με τη μέθοδο Sanger και τα χρωματογραφήματα που προέκυψαν επεξεργάστηκαν το πρόγραμμα BioEdit (εικ. 20). Τέλος, οι αλληλουχίες των δειγμάτων συγκρίθηκαν με το φυσιολογικό mtDNA με τη βοήθεια της βάσης δεδομένων MITOMAP. Έτσι, είναι δυνατή η ταυτοποίηση πιθανών μεταλλάξεων.



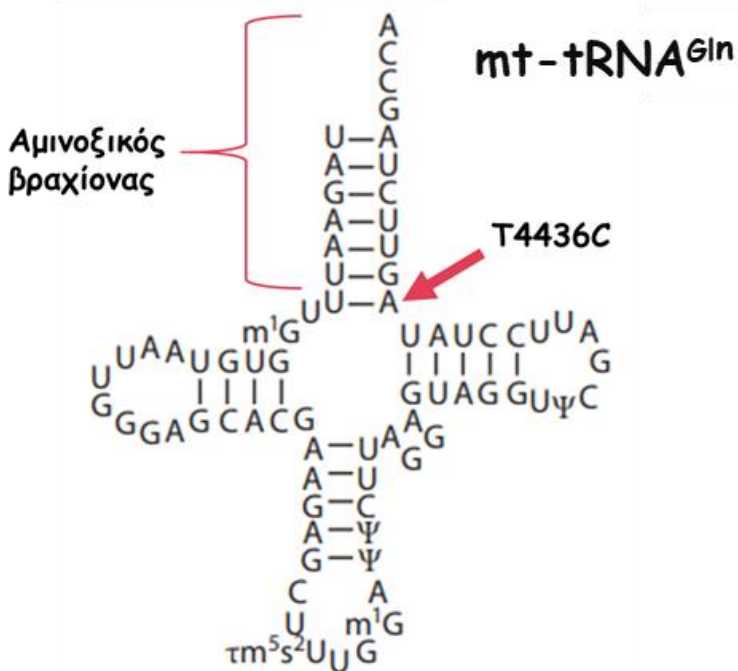
Με βάση την παραπάνω διαδικασία, σε 2 από τα 10 δείγματα που αλληλουχήθηκαν ανιχνεύθηκε μια μετάπτωση T→C στη θέση 4336 του mtDNA. Ο γενετικός τόπος που εντοπίστηκε αυτή η σημειακή μετάλλαξη κωδικοποιεί για το mt-tRNA της γλουταμίνης.



**Εικόνα 21:** Οι αλληλουχίες των 10 δειγμάτων mt-DNA αλληλουχήθηκαν με τη μέθοδο Sanger. Η μετάπτωση T→C που ανιχνεύθηκε φαίνεται στη θέση 96 στα δείγματα 16 και 19.

## 5. Συμπεράσματα/ Συζήτηση

Στη συγκεκριμένη έρευνα, σε 2 από τα 38 δείγματα ανιχνεύθηκε μια μετάπτωση T→C στη θέση 4336 του mtDNA, δηλαδή στον αμινοξικό βραχίονα του mt-tRNA της γλουταμίνης (εικ. 22). Σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία, η μετάλλαξη αυτή πιθανόν να σχετίζεται με τη νόσο Alzheimer (Shoffner et al.1993, Hutchin et al.1995, Brown et al., 1996, Mayr-Wohlfart et al., 1997, Coskun et al. 2004, Tanaka et al. 2010), τη νόσο του Parkinson (Shoffner et al.1993, Wallace et al. 1992, Brown et al., 1996, Mayr-Wohlfart et al. 1997, Simon, D.K et al. 1999, Khusnutdinova et al. 2008, Garcia et al., 2019), με διαταραχές της ακοής (Lehtonen et al. 2003, Finnila et al. 2001, Jacobs et al. 2005), με συχνές ημικρανίες (Finnila et al. 2005, Zaki et al. 2009), με το φάσμα του αυτισμού και τη νοητική αναπηρία (Valiente-Palleja et al. 2018). Ωστόσο, υπάρχουν μελέτες που υποστηρίζουν πως η μετάλλαξη T4336C δεν σχετίζεται με κάποια διαταραχή και ότι πρόκειται για μια φυσιολογική πολυμορφική μετάλλαξη (Huerta et al. 2007, Wragg et al. 1995). Επομένως, η συσχέτιση αυτής της σημειακής μετάλλαξης με την κλινική εικόνα παραμένει ασαφής.



**Εικόνα 22:** Η δομή του mt- tRNA<sup>Gln</sup>. Με κόκκινο βέλος σημαίνεται το σημείο του αμινοξικού βραχίονα που βρέθηκε η σημειακή μετάλλαξη T4436C.

Μέχρι σήμερα, στα πλαίσια της έρευνας που διεξάγεται στο Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας έχει γίνει έλεγχος του mt-DNA για μεταλλάξεις στα γονίδια mt- tRNA<sup>Ile</sup>, mt- tRNA<sup>Gln</sup>, mt- tRNA<sup>Met</sup>, mt- tRNA<sup>Asn</sup>, mt- tRNA<sup>Cys</sup>, mt- tRNA<sup>Tyr</sup>, mt- tRNA<sup>Gly</sup> και mt- tRNA<sup>Leu</sup> σε μια ομάδα 38 ασθενών που πάσχουν από ΧΑΠ. Εκτός από τη μετάλλαξη που ανιχνεύθηκε με στη παρούσα έρευνα στο mt- tRNA<sup>Gln</sup>, σε 5 από τους 38 ασθενείς (13%) εντοπίστηκαν 2 σημειακές μεταλλάξεις στην παρακείμενη περιοχή (16S rRNA) του γονιδίου mt- tRNA<sup>Leu</sup>. Στα υπόλοιπα mt- tRNA γονίδια δεν εντοπίστηκαν μεταλλάξεις (Πίνακας 6).

Η πλειοψηφία των ασθενών που εμφάνισαν τις μεταλλάξεις ήταν άνδρες. Ωστόσο, και στο αρχικό δείγμα των ασθενών που έδωσαν αίμα, οι 33 από τους 38 ασθενείς ήταν άνδρες. Η διάμεση ηλικία των ασθενών με τις μεταλλάξεις ήταν τα 64 έτη ενώ ο μέσος όρος όλων των ασθενών που συμμετείχαν στην έρευνα ήταν τα 68 έτη. Επομένως, παρατηρούμε πως, σε γενικές γραμμές, η μεταλλαξιγένεση του mtDNA δεν αυξάνεται με την ηλικία των ασθενών. Τέλος, σχεδόν όλοι οι ασθενείς που έφεραν μεταλλάξεις ήταν στο δεύτερο στάδιο της ΧΑΠ (Πίνακας 5).

## Χαρακτηριστικά ασθενών με μεταλλάξεις στο mtDNA

Ασθενείς	Φύλο	Ηλικία	Στάδιο ΧΑΠ	Μεταλλάξεις		
Δείγμα 5	♀	69	2	T3197C	C3212T	
Δείγμα 6	♂	51	2	T3197C	C3212T	
Δείγμα 11	♂	66	2	T3197C	C3212T	
Δείγμα 13	♀	64	2	T3197C	C3212T	
Δείγμα 16	♂	69	4	T3197C	C3212T	
Δείγμα 23	♂	69	2			T4336C
Δείγμα 34	♂	59	2			T4336C

**Πίνακας 5:** Το φύλο, η ηλικία και το στάδιο της ΧΑΠ των ασθενών που έφεραν μεταλλάξεις στο mtDNA τους.

Ορισμένες από τις μεταλλάξεις που έχουν εντοπιστεί στο mtDNA των ασθενών με ΧΑΠ εμφανίζονται και σε άλλες πνευμονικές νόσους με κοινό χαρακτηριστικό τη μιτοχονδριακή δυσλειτουργία. Η σημειακή μετάλλαξη T4336C στο mt- tRNA<sup>Gln</sup> έχει ανιχνευθεί σε ασθενείς με ιδιοπαθή πνευμονική ίνωση και σαρκοείδωση με μάλιστα με στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερη συχνότητα στους ασθενείς συγκριτικά με τους control (Πίνακας 6). Επιπλέον, η σημειακή μετάλλαξη T3197C στο 16S rRNA έχει εντοπιστεί σε ασθενείς με ιδιοπαθή πνευμονική ίνωση, σαρκοείδωση και άσθμα αλλά με στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερη συχνότητα μόνο στους ασθενείς με σαρκοείδωση (Πίνακας 6) (Daniil et al., 2018, Zifa et al. 2012).

Μεταλλάξεις στο mtDNA ασθενών με ΧΑΠ, IPF, σαρκοείδωση και άσθμα						
Θέση mtDNA	Μετάλλαξη mtDNA στη ΧΑΠ	Control (%)	Ασθενείς ΧΑΠ με μετάλλαξη (%)	Ασθενείς IPF με μετάλλαξη (%)	Ασθενείς σαρκοείδωση με μετάλλαξη (%)	Ασθενείς άσθμα με μετάλλαξη (%)
tRNA <sup>Asn</sup>	-					
tRNA <sup>Cys</sup>	-					
tRNA <sup>Tyr</sup>	-					
tRNA <sup>Ile</sup>	-					
tRNA <sup>Gln</sup>	T4336C	4/204 (2%)	2/38 (5%)	9/40 (22.5%) *	6/85 (7.1%) *	-
tRNA <sup>Met</sup>	-					
tRNA <sup>Gly</sup>	-					
tRNA <sup>Leu</sup>	-					
16S rRNA	T3197C	1/204 (0.5%)	5/38 (13%) *	2/40 (5%)	7/85 (8.3%) *	3/76 (3.9%)
16S rRNA	C3212T	-	5/38 (13%) *	-	-	-

\*: p- value < 0.05

**Πίνακας 6:** Συχνότητα των mtDNA μεταλλάξεων που έχουν εντοπιστεί στη ΧΑΠ στις πνευμονικές νόσους ιδιοπαθή πνευμονική ίνωση, σαρκοείδωση, άσθμα καθώς και στους υγιείς (control).

Το πλήθος των μεταλλάξεων που εντοπίζεται στα γονίδια που κωδικοποιούν για mt- tRNA και στις παρακείμενες περιοχές τους έχει άμεσο φαινοτυπικό αντίκρισμα. Το mtDNA των ασθενών με ιδιοπαθή πνευμονική ίνωση και σαρκοείδωση φέρει σε αυτές τις αλληλουχίες τα μεγαλύτερα ποσοστά μεταλλαξιγένεσης. Οι δύο αυτές ασθένειες είναι πολύ σοβαρές με προσδόκιμο ζωής περίπου πέντε χρόνια από τη στιγμή της διάγνωσης (Πίνακας 7). Αντίθετα, οι ασθενείς με άσθμα, η οποία είναι σαφώς ηπιότερη ασθένεια, έχουν αρκετά μικρότερο αριθμό μεταλλάξεων στο mtDNA τους (Πίνακας 7). Αναφορικά με τη ΧΑΠ, αν και η έρευνα δεν έχει ολοκληρωθεί, τα πρώτα δεδομένα υποδεικνύουν χαμηλότερο ποσοστό μεταλλαξιγένεσης των mt- tRNA γονιδίων και των παρακείμενων περιοχών τους σε σχέση με την ιδιοπαθή πνευμονική ίνωση και τη σαρκοείδωση το οποίο συνάδει με τον ηπιότερο φαινότυπο της νόσου. Τέλος, η παρουσία στο mtDNA συγκεκριμένων συνδυασμών μεταλλάξεων με συνεργατική δράση ενδεχομένως να είναι καθοριστικός παράγοντας του φαινοτυπικού αποτελέσματος (Πίνακας 7).

Συσχέτιση μεταλλάξεων mtDNA με τη βαρύτητα πνευμονικών νόσων				
Ασθένεια	Αριθμός μεταλλάξεων mtDNA	Ασθενείς με μεταλλάξεις	Συνδυασμοί μεταλλάξεων μόνο στους ασθενείς	Προσδόκιμο ζωής (χρόνια)
IPF	32	38/40 (95%)	15	2-5
Σαρκοείδωση	45	69/85 (81%)	15	~6
ΧΑΠ (δεν ολοκληρώθηκε, μελετήθηκαν 8/22 tRNAs)	3	7/38 (18%)		4-10
Άσθμα	10	56/76 (73%)	9	~18

**Πίνακας 7:** Η συχνότητα και το πλήθος των συνδυασμών μεταλλάξεων στα mt- tRNA γονίδια και στις παρακείμενες περιοχές τους σε σχέση με τη βαρύτητα των πνευμονικών ασθενειών ιδιοπαθής πνευμονική ίνωση, σαρκοείδωση, άσθμα και ΧΑΠ.

## **Βιβλιογραφία**

1. Antunes M., Lopes-Pacheco M. and Patricia R. M. Rocco. Oxidative Stress-Derived Mitochondrial Dysfunction in Chronic Obstructive Pulmonary Disease: A Concise Review. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2021; 2: 1-11
2. Aravamudan B., Kiel A., Freeman M. et al., "Cigarette smoke-induced mitochondrial fragmentation and dysfunction in human airway smooth muscle," *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*. 2014; 306: 840–854.
3. Araya J., Tsubouchi K., Sato N. et al., "PRKN-regulated mitophagy and cellular senescence during COPD pathogenesis," *Autophagy*. 2019; 15: 510–526.
4. Berg M.J., Tymoczko L.J, Gatto G. J. and Stryer L. *Biochemistry*. W.H. Freeman and Company. 2015. p. 540-581.
5. Brandsma C-A., Van den Berge M., Hackett T-L., Brusselle G, Timens W. Recent advances in chronic obstructive pulmonary disease pathogenesis: from disease mechanisms to precision medicine. *The Journal of Pathology*. 2019; 250: 624-635
6. Brown, M.D., Shoffner, J.M., Kim, Y.L., Jun, A.S., Graham, B.H., Cabell, M.F., Gurley, D.S., Wallace, D.C. (1996) Mitochondrial DNA sequence analysis of four Alzheimer's and Parkinson's disease patients. *American Journal of Human Genetics*; 61: 283-289 .
7. Chang J.T., Meza R., Levy D.T., Arenberg D., Jihyoun J. Prediction of COPD risk accounting for time-varying smoking exposures. *Plos One*. 2021; 16: 1-16
8. Coskun, P. E., Beal, M. F., Wallace, D. C. Somatic mitochondrial DNA control region mutations are prevalent in Alzheimer Disease brains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004: 101: 10726-10731.
9. Daniil Z, Kotsiou OS, Grammatikopoulos A, Peletidou S, Gkika H, Malli F, Antoniou K, Vasarmidi E, Mamuris Z, Gourgoulis K, Zifa E. Detection of mitochondrial transfer RNA (mt-tRNA) gene mutations in patients with idiopathic pulmonary fibrosis and sarcoidosis. *Mitochondrion*. 2018; 43: 43-52.
10. Finnila, S., Autere, J., Lehtovirta, M., Hartikainen, P., Mannermaa, A., Soininen, H., Majamaa, K. Increased risk of sensorineural hearing loss and migraine in patients with a

rare mitochondrial DNA variant 4336A>G in tRNAGln. *Journal of Medical Genetics* . 2001; 38: 400-405 .

11. Garcia, S., Lopez-Hernandez, L., Davila-Maldonado, L., Cuevas-Garcia, C., Gallegos-Arreola, M., Alcaraz-Estrada, S., Cortes-Espinosa, L., Flores, C., Canto, P., Vazquez, R. Association of mitochondrial variants A4336G of the tRNAGln gene and 8701G/A of the MT-ATP6 gene in Mexicans Mestizos with Parkinson disease. *Folia Neuropathologica* . 2019; 57: 335-339.
12. Gold Reports for Personal Use - Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease - GOLD. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease - GOLD. 2022. Available from: <https://goldcopd.org/gold-reports/>.
13. Grahn K., Gustavsson P., Andersson T., Lindén A. et al. Occupational exposure to particles and increased risk of developing chronic obstructive pulmonary disease (COPD): A population-based cohort study in Stockholm, Sweden. *Environmental Research*. 2021; 200: 1-9
14. Hoshino A., Mita, Y., Okawa et al. Cytosolic p53 inhibits Parkin-mediated mitophagy and pro-motes mitochondrial dysfunction in the mouse heart. 2014. *Nature Communication*; 111: 3116-3121
15. Huerta, C., Castro, M. G., Coto, E., Blazquez, M., Ribacoba, R., Guisasola, L. M., Salvador, C., Martinez, C., Lahoz, C. H., Alvarez, V. Mitochondrial DNA polymorphisms and risk of Parkinson's disease in Spanish population. *Journal of the Neurological Sciences*. 2005; 236: 49-54
16. Huerta, C., Sanchez-Ferrero, E., Coto, E., Blazquez, M., Ribacoba, R., Guisasola, L. M., Salvador, C., Alvarez, V. No association between Parkinson's disease and three polymorphisms in the eNOS, nNOS, and iNOS genes. *Neuroscience Letters* . 2007; 413: 202-205 .
17. Hutchin, T, and G Cortopassi. "A mitochondrial DNA clone is associated with increased risk for Alzheimer disease." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1995: 6892-6895.

18. Ito S., Araya J., Kurita Y. et al. "PARK2-mediated mitophagy is involved in regulation of HBEC senescence in COPD pathogenesis" *Autophagy*. 2015; 11: 547–559
19. Jacobs, H. T., Hutchin, T. P., Kappi, T., Gillies, G., Minkinen, K., Walker, J., Thompson, K., Rovio, A. T., Carella, M., Melchionda, S., Zelante, L., Gasparini, P., Pyykko, I., Shah, Z. H., Zeviani, M., Mueller, R. F. Mitochondrial DNA mutations in patients with postlingual, nonsyndromic hearing impairment. *European Journal of Human Genetics* . 2005; 13: 26-33 .
20. Konokhova Y., Spendiff S., Jagoe R.T. et al., "Failed upregulation of TFAM protein and mitochondrial DNA in oxidatively deficient fibers of chronic obstructive pulmonary disease locomotor muscle," *Skeletal Muscle*. 2016; 6: 1-16.
21. Kosmider B., Lin C-R., Loukmane et al. Mitochondrial dysfunction in human primary alveolar type II cells in emphysema. *eBioMedicine*. 2019; 46: 305-316.
22. Leap J., Obaid A., Tariq C., Marvin B. Pathophysiology of COPD. *Critical Care Nursing Quarterly*. 2021; 44: 2-8.
23. Mayr-Wohlfart, U., Rodel, G., Henneberg, A. Mitochondrial tRNA(Gln) and tRNA(Thr) gene variants in Parkinson's disease. *European Journal of Medical Research* . 1997; 2: 111-113.
24. Pereira CV, Gitschlag BL, Patel MR. Cellular mechanisms of mtDNA heteroplasmy dynamics. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 2021; 5: 510-525.
25. Richter U., McFarland R., Taylor R. W., Pickett S. J. The molecular pathology of pathogenic mitochondrial tRNA variants. *Febs Letters*. 2021; 595: 1003-1024
26. Shoffner JM, Brown MD, Torroni A, Lott MT, Cabell MF, Mirra SS, Beal MF, Yang CC, Gearing M, Salvo R, et al. Mitochondrial DNA variants observed in Alzheimer disease and Parkinson disease patients. *Genomics*. 1993; 1: 171-84.
27. Simon, D.K., Mayeux, R., Marder, K., Kowall, N.W., Beal, M.F., Johns, D.R. (1999) Mitochondrial DNA mutations in complex I and tRNA genes in Parkinson's disease. *Neurology*. 54: 703-709 .
28. Tanaka, N., Goto, Y. I., Akanuma, J., Kato, M., Kinoshita, T., Yamashita, F., Tanaka, M., Asada, T. Mitochondrial DNA variants in a Japanese population of patients with Alzheimer's disease. *Mitochondrion*. 2010; 10: 32-37.



29. Valiente-Palleja, A., Torrell, H., Muntane, G., Cortes, M. J., Martinez-Leal, R., Abasolo, N., Alonso, Y., Vilella, E., Martorell, L. Genetic and clinical evidence of mitochondrial dysfunction in autism spectrum disorder and intellectual disability. *Human Molecular Genetics*. 2018; 27: 891-900.
30. Voynow J.A. and Shinbashi M. Neutrophil Elastase and Chronic Lung Disease. *Biomolecules*.2021; 11: 1-15
31. Wilton P. R., Zaidi A., Makova k. and Nielsen R. A Population Phylogenetic View of Mitochondrial Heteroplasmy. *Genetics*. 2018; 208: 1261-1274
32. Wragg, M. A., Talbot, C. J., Morris, J. C., Lendon, C. L., Goate, A. M. No association found between Alzheimer's disease and a mitochondrial tRNA glutamine gene variant. *Neuroscience Letters*. 1995; 201: 107-110 .
33. Zaki, E. A., Freilinger, T., Klopstock, T., Baldwin, E. E., Heisner, K. R., Adams, K., Dichgans, M., Wagler, S., Boles, R. G. Two common mitochondrial DNA polymorphisms are highly associated with migraine headache and cyclic vomiting syndrome. *Cephalalgia* . 2009; 29: 719-728 .
34. Zhou JB., Wang ED, Zhou XL. Modifications of the human tRNA anticodon loop and their associations with genetic diseases. *Cell Mol Life Sci*. 2021; 23: 7087-7105.
35. Zifa E., Daniil Z., Skoumi .E, Stavrou M., Papadimitriou K., Terzenidou M., Kostikas K., Bagiatis V., Gourgoulisanis K.I., Mamuris Z. Mitochondrial genetic background plays a role in increasing risk to asthma. *Mol Biol Rep*. 2012; 39: 4697-708.