



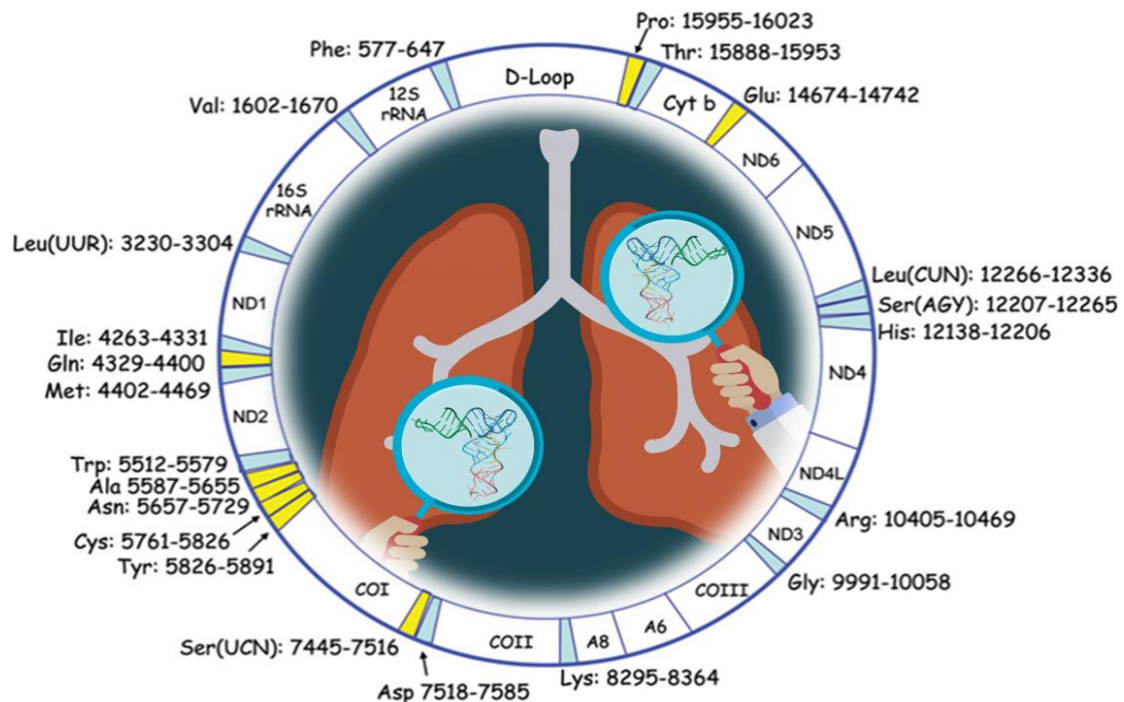
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
Σχολή Επιστημών Υγείας
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Ανίχνευση μεταλλάξεων σε μιτοχονδριακά tRNA
γονίδια Asn, Cys, Tyr σε ασθενείς με ΧΑΠ

Detection of mutations in the mitochondrial tRNA genes
of Asn, Cys, Tyr in patients with COPD

Τάσιου Μαρία του Γεωργίου



Λάρισα, 2022

«Ανίχνευση μεταλλάξεων σε μιτοχονδριακά tRNA γονίδια Asn,
Cys, Tyr σε ασθενείς με ΧΑΠ»

«Detection of mutations in the mitochondrial tRNA genes of
Asn, Cys, Tyr in patients with COPD»

Τριμελής συμβουλευτική επιτροπή

Ζίφα Αιμιλία (επιβλέπουσα): Επίκουρος καθηγήτρια Βιολογίας/Νευροβιολογίας,
Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Σταμάτης Κωνσταντίνος: Μέλος Εργαστηριακού Διδακτικού Προσωπικού
(Ε.ΔΙ.Π), Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Δανιήλ Ζωή: Καθηγήτρια Πνευμονολογίας της Ιατρικής Σχολής του
Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στην επιβλέπουσα καθηγήτριά μου, Αιμιλία Ζίφα, για την καθοδήγησή της σε όλη τη διάρκεια εκπόνησης της πτυχιακής εργασίας, όπως και για τις συμβουλές της σε γενικότερο πλαίσιο αλλά και σχετικά με την συγγραφή της εργασίας, δίνοντας την ευκαιρία να διευρύνω τις γνώσεις μου σε έναν ενδιαφέροντα τομέα. Σε αυτό το χρονικό διάστημα ήταν πρόθυμη να βοηθήσει με ό,τι πρόβλημα προέκυπτε κατά την πραγματοποίηση των πειραμάτων.

Επίσης, ευχαριστώ ιδιαίτερα τον κ. Σταμάτη Κωνσταντίνο για την πολύτιμη βοήθειά του κατά τη διεξαγωγή του εργαστηριακού σκέλους όπως και την κ. Δανιήλ Ζωή για τη συνεργασία της.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου Γενετικής, Συγκριτικής & Εξελικτικής Βιολογίας, μεταπτυχιακούς, διδακτορικούς φοιτητές και συμφοιτητές μου που συνέβαλαν στην εκμάθηση των διαφόρων πειραματικών μεθόδων και δημιούργησαν ένα ευχάριστο κλίμα.

Περίληψη.....	6
Abstract.....	7
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	8
1.1 ΧΡΟΝΙΑ ΑΠΟΦΡΑΚΤΙΚΗ ΠΝΕΥΜΟΝΟΠΑΘΕΙΑ.....	8
1.1.1 Παθοφυσιολογία.....	8
1.1.2 Μηχανισμοί παθογένεσης.....	10
1.1.3 Παράγοντες κινδύνου.....	10
1.2. ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ ΚΑΙ ΧΑΠ.....	12
1.3. ROS.....	15
1.3.1 Πηγές των ROS.....	15
1.3.2 Βιολογικές επιδράσεις.....	17
1.4. ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑ.....	19
1.4.1 Δομή.....	19
1.4.2 Λειτουργία.....	20
1.4.3 Οξειδωτική φωσφορυλίωση.....	21
1.4.4 Η δυναμική των μιτοχονδρίων.....	23
1.4.5 Σχάση και σύντηξη.....	24
1.4.6 Μιτοφαγία.....	24
1.4.7 Μιτοχονδριακή προέλευση και ημιαυτονομία.....	25
1.4.8 Ετεροπλασμία και κληρονομικότητα.....	26
1.5. ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΗ ΔΥΣΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΚΑΙ ΧΑΠ.....	27
1.5.1 Μορφολογικές αλλαγές.....	27
1.5.2 Λειτουργικές αλλαγές.....	28
1.5.3 Αλλαγές στη βιογένεση και τη μιτοφαγία.....	30
1.6. ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΩΝ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΩΝ.....	32
1.6.1 Μιτοχονδριακό γονιδίωμα.....	32
1.6.2 Μεταλλάξεις στο μιτοχονδριακό DNA.....	33
1.6.3 Μεταλλάξεις στα μιτοχονδριακά tRNA γονίδια.....	35
1.6.4 Συσχέτιση μιτοχονδριακών μεταλλάξεων με ασθένειες.....	36
1.7. ΣΚΟΠΟΣ.....	38
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	39

2.1 Απομόνωση ολικού DNA από ολικό αίμα ασθενών με χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια (ΧΑΠ)	39
2.2 Ηλεκτροφόρηση απομονωμένων δειγμάτων DNA με χρήση πηκτής αγαρόζης (2%).....	42
2.3 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης – PCR (Polymerase Chain Reaction).....	45
2.3.1 Η αρχή της μεθόδου.....	45
2.3.2 Ποιοτικός προσδιορισμός των PCR προϊόντων.....	49
2.4 Πολυμορφισμός μονόκλωνης διαμόρφωσης – SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism)	50
2.5 Χρώση πηκτώματος πολυακρυλαμιδίου με διάλυμα νιτρικού αργύρου.....	53
2.6 Καθαρισμός των προϊόντων PCR.....	54
2.7 Αλληλούχιση DNA.....	55
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	57
3.1 Απομόνωση DNA.....	57
3.2 Ενίσχυση με PCR.....	58
3.3 SSCP και πρότυπα ηλεκτροφόρησης.....	58
3.4 Ανάλυση αποτελεσμάτων αλληλούχισης.....	59
4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	60
Βιβλιογραφικές αναφορές.....	65

Περίληψη

Η Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια (ΧΑΠ), ως μία μη αντιστρεπτή φλεγμονώδης νόσος των πνευμόνων, αποτελεί την τρίτη κυριότερη αιτία θανάτου παγκοσμίως. Μία ποικιλία παραγόντων προδιαθέτουν για αυτή καθιστώντας σύνθετη τη διερεύνηση του υποβάθρου της ασθένειας για κάθε άτομο. Αναμφίβολα, η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία συνιστά ένα χαρακτηριστικό στοιχείο της ΧΑΠ με τον ρόλο της να παραμένει αδιευκρίνιστο για το εάν συμμετέχει στην έναρξη της ασθένειας ή είναι αποτέλεσμα των μηχανισμών παθογένεσής της. Γνωρίζοντας ότι το μιτοχονδριακό γονιδίωμα συγκεντρώνει με μεγαλύτερη συχνότητα μεταλλάξεις στις περιοχές που κωδικοποιούν για τα tRNA γονίδια, που εμπλέκονται στην πρωτεϊνοσύνθεση, η συνεισφορά τους στην ομαλή μιτοχονδριακή λειτουργία είναι βαρυσήμαντη. Μία μετάλλαξη σε αυτές τις περιοχές, ξεπερνώντας ένα συγκεκριμένο ουδό, θα μπορούσε να επιφέρει αλλαγές στη μιτοχονδριακή ομοιόσταση και να θέσει τα θεμέλια για την εμφάνιση και πρόοδο της ασθένειας. Προηγούμενες μελέτες σε ασθενείς που πάσχουν από πνευμονικές νόσους παρόμοιας αιτιολογίας με τη ΧΑΠ φανερώνουν αυξημένη μεταλλαξιγένεση στις περιοχές των mt-tRNA γονιδίων τους. Σε αυτά τα πλαίσια, διερευνήθηκε η ύπαρξη μεταλλάξεων στα μιτοχονδριακά γονίδια των tRNA^{Asn}, tRNA^{Cys} και tRNA^{Tyr} σε 38 ασθενείς με ΧΑΠ. Από δείγματα ολικού αίματος των ασθενών πραγματοποιήθηκε απομόνωση DNA και ενίσχυση των συγκεκριμένων τμημάτων με τη μέθοδο αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR). Έγινε ανάλυση των προϊόντων PCR με τη μέθοδο πολυμορφισμού μονόκλωνης διαμόρφωσης (SSCP) και τέλος επεξεργασία των αποτελεσμάτων αλληλούχισης. Η μετέπειτα ανάλυση των αποτελεσμάτων με κατάλληλα προγράμματα βιοπληροφορικής έδειξε πως δεν υπάρχει καμία μετάλλαξη στα τρία αυτά γονίδια. Είναι σημαντικό να διεξαχθούν περαιτέρω μελέτες για τη διαλεύκανση της σχέσης των μιτοχονδριακών tRNA γονιδίων με ασθένειες όπως η ΧΑΠ.

Abstract

Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD), as an irreversible inflammatory lung disease, is the third leading cause of death worldwide. A variety of factors predispose to it making it difficult to investigate the background of the disease for each individual. Undoubtedly, mitochondrial dysfunction is a characteristic feature of COPD with its role remaining unclear as to whether it is involved in the onset of the disease or is the result of its pathogenesis mechanisms. Knowing that the mitochondrial genome gathers mutations with higher frequency in the regions encoding the tRNA genes, involved in protein synthesis, their contribution to normal mitochondrial function is significant. A mutation in these areas, exceeding a certain threshold, could induce changes in mitochondrial homeostasis and lay the foundations for the onset and progression of the disease. Previous studies in patients with pulmonary diseases of similar etiology to COPD reveal increased mutagenesis in the regions of their mt-tRNA genes. In this context, mutations in the mitochondrial genes of tRNA^{Asn}, tRNA^{Cys} and tRNA^{Tyr} in 38 patients with COPD were investigated. In whole blood samples of the patients, DNA extraction was performed and the specific sections were amplified by the polymerase chain reaction (PCR) method. The PCR products were analyzed by the single-strand conformational polymorphism (SSCP) method and finally the sequencing results were processed. Subsequent analysis of the results with appropriate bioinformatics programs showed that there is no mutation in these three genes. It is important to conduct further studies to elucidate the association of mitochondrial tRNA genes with diseases such as COPD.

1.1 ΧΡΟΝΙΑ ΑΠΟΦΡΑΚΤΙΚΗ ΠΝΕΥΜΟΝΟΠΑΘΕΙΑ

Η Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια (ΧΑΠ), ως μία χρόνια πάθηση των πνευμόνων που δεν είναι πλήρως αντιστρεπτή, αποτελεί ένα παγκόσμιο πρόβλημα υγείας με την κατάταξή της ως μία από τις κυριότερες αιτίες νοσηρότητας και θνησιμότητας σε παγκόσμιο επίπεδο (Viegi et al., 2006). Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας αποτελεί την τρίτη κυριότερη αιτία θανάτου, με 65 εκατομμύρια ασθενείς και περισσότερους από 3 εκατομμύρια θανάτους κάθε χρόνο παγκοσμίως, ενώ η επικράτησή της και ο βαθμός θνησιμότητας προβλέπονται να αυξηθούν ακόμη περαιτέρω τις ερχόμενες δεκαετίες λόγω της συνεχόμενης έκθεσης σε παράγοντες κινδύνου και της γήρανσης του πληθυσμού (Alfahad et al., 2021).

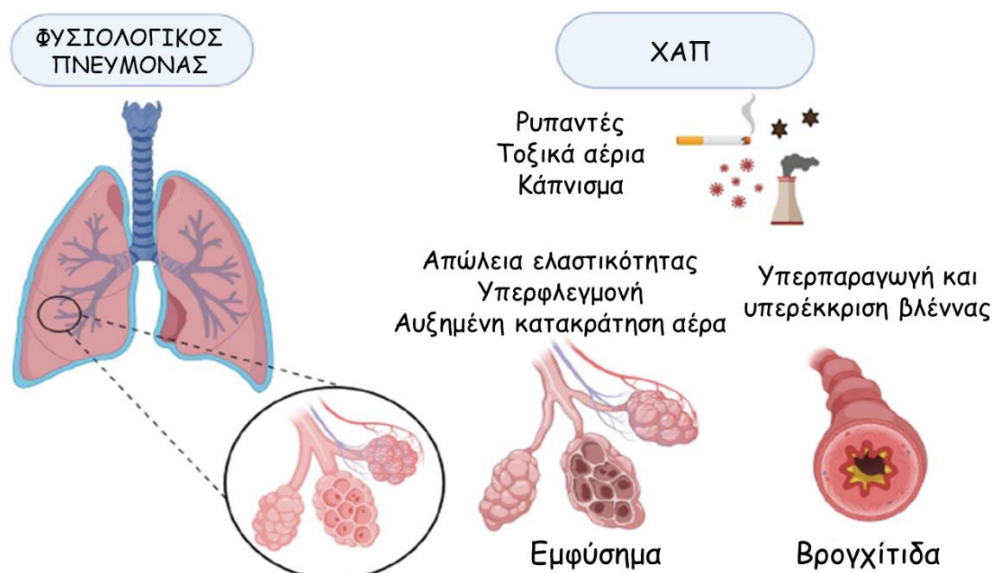
1.1.1 Παθοφυσιολογία

Η ΧΑΠ έχει περιγραφεί ως μία ασθένεια με κύριο χαρακτηριστικό τον περιορισμό τη ροής του αέρα που στις περισσότερες περιπτώσεις συμβαίνει προοδευτικά και συσχετίζεται με μία μη φυσιολογική χρόνια φλεγμονώδη απόκριση των πνευμόνων σε τοξικά σωματίδια ή αέρια. Η χρόνια αυτή φλεγμονή συνοδεύεται από παθολογικές αλλαγές που ποικίλλουν μεταξύ των ασθενών και περιλαμβάνουν την αναδιαμόρφωση των αεραγωγών και την καταστροφή ιστού, του παρεγχύματος των πνευμόνων, καταλήγοντας τελικά στις δύο κύριες διαταραχές - φαινοτυπικές εκδηλώσεις της νόσου: τη χρόνια βρογχίτιδα και το εμφύσημα (Rodrigues et al., 2021).

Η **χρόνια βρογχίτιδα** περιλαμβάνει τη μακρόχρονη φλεγμονή των βρόγχων με αποτέλεσμα την υπερπαραγωγή και υπερέκκριση βλέννας, μειώνοντας έτσι την ροή του αέρα (Εικόνα 1). Η δομή των πνευμόνων περιλαμβάνει τους βρόγχους με τον καθένα να διακλαδίζεται σε κάθε πνεύμονα σε μικρότερους πολυάριθμους κλάδους, τα βρογχιόλια στα άκρα των οποίων εντοπίζονται οι κυψελίδες (Sherwood, 2016). Οι πνεύμονες χαρακτηρίζονται από την παρουσία κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος που διαθέτουν ένα σύστημα έμφυτης άμυνας ικανό να αντιμετωπίζει εισβολές και να επιδιορθώνει βλάβες (Rodrigues et al., 2021). Τα περισσότερα επιβλαβή ανοσολογικά γεγονότα διαδραματίζονται στο τοίχωμα των βρόγχων που περιβάλλεται από βλεφαρίδες και βλέννα, η οποία εκκρίνεται από τα καλκοειδή κύτταρα. Η βλέννα συνεχώς καταφέρει να απομακρύνει τις εισπνεόμενες ουσίες μέσω της κίνησης των βλεφαρίδων. Η είσοδος ξένων μορίων θα μπορούσε να πυροδοτήσει, έτσι, μία μη φυσιολογική φλεγμονώδη απόκριση που να οδηγήσει στην σύσπαση των

λείων μυών των αεραγωγών, την υπερτροφία του βλεννογόνου αδένα και τη δημιουργία οιδήματος (Alfahad et al., 2021). Συνέπεια αυτών αποτελεί η εμφάνιση της χρόνιας βρογχίτιδας με την εκδήλωση συμπτωμάτων όπως η πάχυνση του τοιχώματος των αεραγωγών, η υπερέκκριση βλέννας, η δυσλειτουργία του κροσσωτού επιθηλίου και η στένωση των βρογχιολίων (Wang et al., 2018).

Το **εμφύσημα** αποτελεί μία κατάσταση που χαρακτηρίζεται από την καταστροφή των κυψελίδων (Εικόνα 1). Όταν οξειδωτικά μόρια οδηγηθούν στα κυψελιδικά επιθηλιακά κύτταρα εκκινούν αποκρίσεις της φυσικής και ειδικής ανοσίας. Με τη σειρά τους τα κύτταρα εκκρίνουν κυτταροκίνες, χημειοκίνες και διάφορους άλλους παράγοντες ως αμυντικό μηχανισμό. Επίσης, τα μακροφάγα των κυψελίδων απελευθερώνουν πρωτεάσες όπως ελαστάσες αλλά και μεταλλοπρωτεϊνάσες (MMPs) που αποικοδομούν την εξωκυττάρια μήτρα ως απόκριση στη φλεγμονή (Alfahad et al., 2021). Η ανισορροπία ανάμεσα στη δράση των πρωτεασών και τους μηχανισμούς απόπτωσης οδηγεί τελικά στην καταστροφή των κυψελίδων, των μικρών αεροφόρων σάκων εντός των πνευμόνων όπου λαμβάνει χώρα η ανταλλαγή αερίων μεταξύ του αίματος και του αέρα, με αποτέλεσμα την ελάττωση των επιπέδων οξυγόνου στο αίμα (υποξία) σε συνδυασμό με την αύξηση των επιπέδων του διοξειδίου του άνθρακα (υπερκαπνία) έχοντας ως επακόλουθο τη μείωση της πνευμονικής λειτουργίας (Devine et al., 2008).



Εικόνα 1: Οι φαινότυποι της ΧΑΠ. Παρατηρούνται μορφολογικές διαφορές ανάμεσα στους πνεύμονες των υγιών ατόμων και αυτούς των ασθενών με ΧΑΠ. Στη ΧΑΠ οι πνεύμονες παρουσιάζουν δύο διακριτά χαρακτηριστικά: το εμφύσημα, που προκαλεί την καταστροφή των κυψελίδων και την απώλεια της ελαστικότητάς τους, αδυνατώντας να αποβάλλουν τον παγιδευμένο αέρα με αποτέλεσμα την παθολογική διάταση των πνευμόνων και τη βρογχίτιδα,

με την αύξηση της παραγωγής βλέννας, τη στένωση των αεραγωγών και τη μείωση της ροής του αέρα (Rodrigues et al., 2021).

1.1.2 Μηχανισμοί παθογένεσης

Διάφοροι μηχανισμοί συμβάλλουν στην ανάπτυξη της νόσου. Αρχικά, η είσοδος τοξικών σωματιδίων στα βρογχόλια και τις κυψελίδες οδηγεί σε μία ανώμαλη φλεγμονώδη απόκριση προκαλώντας την ενεργοποίηση διάφορων φλεγμονωδών διαμεσολαβητών, όπως τα μακροφάγα, τα ουδετερόφιλα και τα CD8+ T λεμφοκύτταρα, που συμμετέχουν σε αυτή, στους αεραγωγούς των ασθενών με ΧΑΠ (Rodrigues et al., 2021). Κατά δεύτερον, διαταράσσεται η ισορροπία ανάμεσα στα πρωτεολυτικά και αντιπρωτεολυτικά μόρια στους πνεύμονες (Chillappagari et al., 2015). Μία αυξημένη πρωτεολυτική δράση οδηγεί στο εμφύσημα. Αυτή η απόκριση μπορεί να είναι συνέπεια της φλεγμονής ή να προκύπτει από γενετικούς παράγοντες (π.χ. έλλειψη α-1 αντιθρυψίνης) (Silverman et al., 2020). Ένας τρίτος μηχανισμός είναι το οξειδωτικό στρες που προκύπτει από την αυξημένη παρουσία των ROS και επιφέρει κυτταρικές δυσλειτουργίες, κυτταρικό θάνατο ή και βλάβες στην εξωκυττάρια μήτρα των πνευμόνων (Boukhenouna et al., 2018). Πρόσφατες έρευνες υποδεικνύουν και έναν τέταρτο μηχανισμό στην παθογένεση της ασθένειας που περιλαμβάνει την ανισορροπία ανάμεσα στην απόπτωση και την απομάκρυνση των αποπτωτικών κυττάρων στους πνεύμονες με την ανάγκη να χαρακτηριστεί καλύτερα η σχέση των αποπτωτικών μονοπατιών με την εμφάνιση της ΧΑΠ (Alfahad et al., 2021). Αυτές οι τέσσερις διαδικασίες που εμπλέκονται στην παθογένεση της νόσου δεν είναι ανεξάρτητες αλλά αλληλεπιδρούν κατά την πρόοδο της ασθένειας. Λόγω αυτών των μηχανισμών (παραγωγή ROS, απόπτωση) τα μιτοχόνδρια μπορεί να κατέχουν ένα ξεχωριστό ρόλο στην ανάπτυξη της ΧΑΠ.

1.1.3 Παράγοντες κινδύνου

Οι παράγοντες κινδύνου που εμπλέκονται στην ανάπτυξη της χρόνιας αυτής νόσου μπορούν να διακριθούν σε εξωγενείς ανάμεσα στους οποίους συγκαταλέγονται ο καπνός του τσιγάρου, περιβαλλοντικοί ρύποι, οι συνθήκες εργασίας (π.χ. ορυχεία) και ενδογενείς όπως η ηλικία, το φύλο, με τις γυναίκες να εμφανίζουν αυξημένο ρίσκο, καθώς και γενετικοί παράγοντες. Αυτοί, είτε μεμονωμένα είτε δρώντας συνεργιστικά καθορίζουν τον βαθμό επιρρέπειας του ατόμου για την ασθένεια (Viegi et al., 2006). Αν και το κάπνισμα θεωρείται ο κυριότερος παράγοντας κινδύνου, περίπου το 20%

των καπνιστών εμφανίζουν την ασθένεια υποδεικνύοντας την ύπαρξη και άλλων συνιστωσών (Terzikhan et al., 2016). Ρυπαντές του αέρα σε εσωτερικούς και εξωτερικούς χώρους, όπως η καύση ξύλου και άλλης βιομάζας, οργανικές και ανόργανες σκόρες (π.χ. άσβεστος), χημικά αντιδραστήρια, αναθυμιάσεις, εντομοκτόνα ακόμη και το παθητικό κάπνισμα σχετίζονται με την ανάπτυξη της ΧΑΠ (GLOBAL STRATEGY FOR PREVENTION, DIAGNOSIS AND MANAGEMENT OF COPD: 2022 Report).

Γενετικοί παράγοντες μπορούν επίσης να αυξήσουν τον κίνδυνο εμφάνισής της, με πολυάριθμους γονιδιακούς τόπους να προδιαθέτουν για αυτή. Όπως προκύπτει από μία μελέτη διδύμων, η κληρονομησιμότητα, δηλαδή το κλάσμα της φαινοτυπικής ποικιλότητας που οφείλεται σε γενετικούς καθοριστές, εκτιμάται περίπου στο 60% (Silverman et al., 2020). Η ομοζυγωτία για το Z αλληλόμορφο του γονιδίου SERPINA1 που κωδικοποιεί για την α1-αντιθρυψίνη, μία αντιπρωτεάση, οδηγεί σε μία κληρονομική διαταραχή που χαρακτηρίζεται από χαμηλά επίπεδα της πρωτεΐνης στο πλάσμα και αποτελεί τον κυριότερο, καλύτερα χαρακτηρισμένο, γενετικό παράγοντα που συνεισφέρει στον κίνδυνο εμφάνισης εμφυσήματος και της ΧΑΠ (Ferrarotti et al., 2014). Ένας άλλος γενετικός παράγοντας έγκειται σε μία μεταλλάξη του γονιδίου της ελαστίνης, συστατικό της εξωκυττάριας μήτρας, η οποία προκαλεί ασθενέστερη συναρμολόγηση των ινιδίων διαταράσσοντας την ευελιξία των πνευμόνων (Kelleher et al., 2005). Σε μία γενετικά σύνθετη ασθένεια όπως η ΧΑΠ, η γενετική επιρρέπεια, που μπορεί να εξαρτάται από την ύπαρξη ποικίλων πολυμορφισμών που δρουν ταυτόχρονα και η έκφραση διαφορετικών συνδυασμών γονιδίων πιθανώς ευθύνονται για την ετερογενή ιστοπαθολογία και το κλινικό προφίλ των ασθενών (Silverman et al., 2020).

Η γνώση για την γενετική βάση της ΧΑΠ περιοριζόταν σε μενδελικά σύνδρομα που προκαλούνταν από σπάνιες γενετικές μεταλλάξεις. Την τελευταία δεκαετία, οι μελέτες συσχέτισης σε ολόκληρο το γονιδίωμα (GWAS), η ελάττωση του κόστους αλληλούχισης σε επίπεδο ολόκληρου γονιδιώματος και εξονιώματος και οι ομικές τεχνολογίες καθιστούν ευκολότερες πλέον τις προσεγγίσεις αναζήτησης της γενετικής αρχιτεκτονικής της νόσου και αξιοποιούνται για την κατανόηση των γενετικών παραλλαγών που συσχετίζονται με την ευαισθησία των ατόμων στη ΧΑΠ και την ταυτοποίηση νέων γενετικών καθοριστικών παραγόντων (Ragland et al., 2019). Ο αριθμός αυτών των γενετικών συσχετισμών έχει αυξηθεί ραγδαία, και πρόσφατες μελέτες αναφέρουν γονίδια που συνδέονται με αλλαγές στη δομή και στους φλεγμονώδεις μηχανισμούς στο αναπνευστικό σύστημα (Alfahad et al., 2021).

Ωστόσο, χρειάζεται περισσότερη προσπάθεια για την ταυτοποίηση και αξιολόγηση νέων υποψήφιων γονιδίων ώστε να κατανοηθεί πλήρως η πρόοδος της ΧΑΠ.

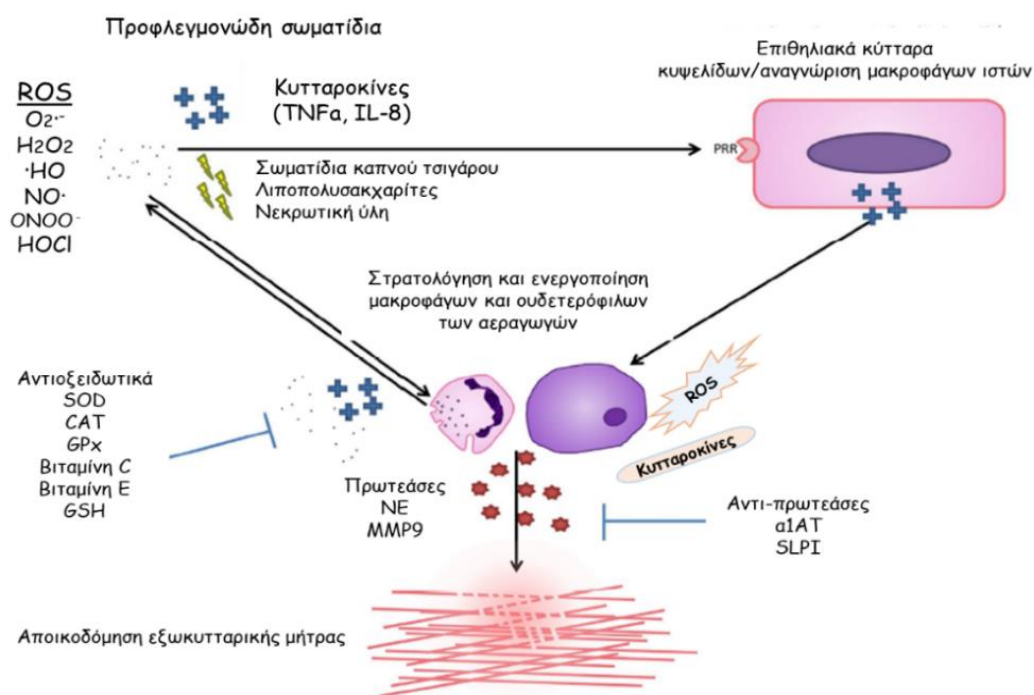
Μεταξύ όλων των παραγόντων κινδύνου, το κάπνισμα συνιστά τον σημαντικότερο για την εμφάνιση της ΧΑΠ, με την κυτταρική βλάβη και θάνατο που παρατηρείται στους αεραγωγούς των ασθενών να αποδίδεται στο οξειδωτικό στρες που προκαλεί. Ο καπνός του τσιγάρου και οι υπόλοιποι περιβαλλοντικοί παράγοντες περιέχουν ή είναι ικανοί να επάγουν την παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS), που εμπλέκονται στις φλεγμονώδεις αποκρίσεις και σε μεγάλες ποσότητες μπορούν να προκαλέσουν καταστροφή του ιστού των πνευμόνων και αναπνευστικά προβλήματα (Boukhenouna et al., 2018; Rahman and Adcock, 2006).

1.2. ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ ΚΑΙ ΧΑΠ

Οι πνεύμονες, ως ο χώρος που πραγματοποιείται η ανταλλαγή αερίων, είναι υπεύθυνοι για την παροχή κατάλληλων ποσοτήτων οξυγόνου στον οργανισμό ανταλλάσσοντας το με διοξείδιο του άνθρακα, μία διαδικασία που πραγματοποιείται εντός των κυψελίδων. Το οξυγόνο μπορεί μέσω ενζυμικών ή μη ενζυμικών διεργασιών να μετατραπεί σε δραστικές μορφές οξυγόνου ή αζώτου (ROS και RNS αντίστοιχα) με επιβλαβή δράση. Υπό φυσιολογικές συνθήκες οι συγκεντρώσεις των ROS/RNS ελαχιστοποιούνται μέσω ενός σύνθετου αντιοξειδωτικού συστήματος εντοπισμένο τόσο ενδοκυτταρικά όσο και στο υγρό που επαλείφει τους αεραγωγούς (Rogers and Cismowski, 2018). Η εμφάνιση και η πρόοδος της ΧΑΠ σχετίζεται στενά με την οξείδωση πρωτεϊνών και λιπιδίων στο πνευμονικό επιθήλιο, παρεμποδίζοντας φυσιολογικές λειτουργίες (Kirkham et al., 2013), με τους πνεύμονες να είναι ιδιαίτερα επιρρεπείς στο οξειδωτικό στρες λόγω της ύπαρξης υψηλών ποσοτήτων οξυγόνου στο περιβάλλον τους, της υψηλής αιματικής παροχής και της έκθεσης σε περιβαλλοντικά παθογόνα και τοξίνες (Vliet et al., 2018).

Το οξειδωτικό στρες συμβαίνει όταν η έκθεση σε ελεύθερες ρίζες είναι επαρκής ώστε να καταστήσει τους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς του οργανισμού ελλιπείς (Pizzino et al., 2017). Η έκθεση σε εξωγενείς πηγές δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) όπως ο καπνός ή ενδογενείς πηγές όπως η απελευθέρωση αυτών από τα μακροφάγα και τα λευκοκύτταρα, που εμπλέκονται στις φλεγμονώδεις διαδικασίες είτε ως παραπροϊόντα της κυτταρικής αναπνοής, μπορεί να επάγει το οξειδωτικό στρες συνεισφέροντας στην πρόοδο της ασθένειας. Ανάμεσα στις επιδράσεις του

οξειδωτικού στρες στους πνεύμονες ανήκουν: η οξειδωτική απενεργοποίηση αντιπρωτεασών και επιφανειοδραστικών ουσιών, η υπερέκκριση βλέννας, η υπεροξείδωση των μεμβρανικών λιπιδίων, η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία, η βλάβη του κυψελιδικού επιθηλίου, η αναδιαμόρφωση της εξωκυττάριας μήτρας, η διαταραχή στους αποπτωτικούς μηχανισμούς και βλάβες στο DNA (Zinellu et al., 2016; Boukhenouna et al., 2018). Σε μοριακό επίπεδο, με εκκίνηση ένα φλεγμονώδες ερέθισμα, ένας καταρράκτης αντιδράσεων ξεκινά με τελικό αποτέλεσμα τη δημιουργία μιας ποικιλίας οξειδωτικών αντιδραστηρίων (Εικόνα 2).



Εικόνα 2: Το οξειδωτικό στρες επάγει την καταστροφή του ιστού των πνευμόνων στη ΧΑΠ. Τα προφλεγμονώδη σωματίδια εισέρχονται στους πνεύμονες και συνδέονται στους υποδοχείς PRR στην επιφάνεια των επιθηλιακών κυττάρων των πνευμόνων ή των μακροφάγων του ιστού, εκκινώντας ένα σηματοδοτικό καταρράκτη που καταλήγει στην απελευθέρωση προφλεγμονωδών κυτταροκινών. Οι κυτταροκίνες προωθούν την στρατολόγηση, τη μετανάστευση και την ενεργοποίηση των περιφερικών ουδετερόφιλων και μονοκυττάρων, τα οποία ωριμάζουν σε κυψελιδικά μακροφάγα όταν ενεργοποιηθούν. Η ενεργοποίηση αυτών των κυττάρων έχει ως αποτέλεσμα την περαιτέρω απελευθέρωση κυτταροκινών, πρωτεασών και ROS, που αυξάνουν το οξειδωτικό φορτίο και με τη σειρά τους τροφοδοτούν αυτόν τον κύκλο με επιπλέον στρατολόγηση και ενεργοποίηση. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, αντι-πρωτεάσες και αντιοξειδωτικά βρίσκονται σε υψηλά επίπεδα εμποδίζοντας την καταστροφή του ιστού και περιορίζοντας αυτόν τον θετικό βρόχο ανατροφοδότησης. Στη ΧΑΠ, τα ανεπαρκή επίπεδα των αντιοξειδωτικών μορίων, οδηγούν σε ανεπαρκή αναστολή των πρωτεασών και καταστροφή του ιστού με τελική συνέπεια την εμφάνιση των παθολογικών χαρακτηριστικών της ΧΑΠ (McGuinness and Sapey, 2017).

Αν και το οξειδωτικό στρες υπό φυσιολογικές συνθήκες αντιμετωπίζεται από πολλαπλά αντιοξειδωτικά και επιδιορθωτικά συστήματα (όπως η δισμουτάση του

σουπεροξειδίου, η καταλάση, η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, οι βιταμίνες C και E), που δρουν ως άμυνα έναντι των ROS, παρατηρείται μία ανισορροπία ανάμεσα στα οξειδωτικά και αντιοξειδωτικά μόρια στους πνεύμονες των ασθενών με ΧΑΠ, υποδεικνύοντας μία πιθανή αιτία παθογένεσης της νόσου. Συγκεκριμένα, σε ασθενείς με ΧΑΠ έχει παρατηρηθεί: μείωση στους αντιφλεγμονώδεις αμυντικούς μηχανισμούς, αύξηση της έκφρασης προ-φλεγμονωδών ενζύμων, καθώς και αύξηση του οξειδωτικού φορτίου συγκριτικά με υγιή άτομα (McGuinness and Sapey, 2017). Στον Πίνακα 1 συνοψίζονται τα πιο σημαντικά ευρήματα διαφόρων ερευνών που φανερώνουν μία συσχέτιση ανάμεσα στην ανισορροπία της οξειδοαναγωγικής κατάστασης των κυττάρων με τη ΧΑΠ:

Πίνακας 1 : Στοιχεία για τη συσχέτιση του οξειδωτικού στρες με τη ΧΑΠ.

ΔΕΙΚΤΕΣ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΥ ΣΤΡΕΣ	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ
Γλουταθειόνη (GSH)	↓ επίπεδα σε δείγματα αίματος (πλάσμα και ολικό αίμα) και πτυέλου σε ασθενείς με ΧΑΠ σε σύγκριση με υγιείς καπνιστές και μη-καπνιστές (Zeng et al., 2013; Ahmad et al., 2013).
Υπεροξειδική δισμουτάση (SOD)	↓ δραστηριότητα του ενζύμου σε δείγματα αίματος και πτυέλου ασθενών με ΧΑΠ σε σύγκριση με υγιείς καπνιστές και μη-καπνιστές (Zeng et al., 2013).
Καταλάση	↓ δραστηριότητα του ενζύμου σε ερυθροκύτταρα και ↓ έκφραση σε βρογχικά επιθηλιακά κύτταρα ασθενών με ΧΑΠ σε σύγκριση με υγιείς καπνιστές και μη-καπνιστές (Ahmad et al., 2013; Betsuyaku et al., 2013).
Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης	↓ επίπεδα στο πλάσμα ασθενών με ΧΑΠ (McGuinness and Sapey, 2017).
iNOS	↑ έκφραση σε πνευμονοκύτταρα τύπου II ασθενών με σοβαρή ΧΑΠ σε σύγκριση με υγιή άτομα (Maestrelli et al., 2003).
H ₂ O ₂	↑ συγκέντρωση σε συμπύκνωμα εκπνεόμενου αέρα (EBC) ασθενών με ΧΑΠ (Dekhuijzen et al., 1996)
Παράγωγα υπεροξειδωσής αραχιδονικού οξέος (ισοπροστάνια)	↑ επίπεδα στο EBC ασθενών με ΧΑΠ συγκριτικά με υγιείς μη-καπνιστές (Montuschi et al., 2000).
Μαλονδιαλδεΐδη (MDA)	↑ επίπεδα σε δείγματα αίματος, πτυέλου και EBC σε ασθενείς με ΧΑΠ και με παροξύνσεις συγκριτικά με υγιή control (Zeng et al., 2013; Ahmad et al., 2013; Bartoli et al., 2011).
Νιτροτυροσίνη	↑ επίπεδα στο πτύελο ασθενών με ΧΑΠ συγκριτικά με ασθενείς με άσθμα και υγιή άτομα (Ichinose et al., 2000).

1.3. ROS

Οι ελεύθερες ρίζες, που περιγράφονται με τον όρο δραστικές ή ενεργές μορφές οξυγόνου (ROS) μπορούν να προκύψουν κατά την μιτοχονδριακή αναπνοή, να λειτουργήσουν ως σηματοδοτικά μόρια αλλά και να συνεισφέρουν στην άμυνα έναντι παθογόνων (McGuinness and Sapey, 2017). Η υπερπαραγωγή τους είναι επιβλαβής για τον οργανισμό, καθώς η πλειοψηφία αυτών των ενώσεων κατέχει μεταλλαξιγόνες και καρκινογόνες ιδιότητες. Πιο κοινές αποτελούν οι υδροξυλικές ρίζες ($\cdot\text{OH}$) και το ανιόν του σουπεροξειδίου ($\text{O}_2\cdot^-$) που περιέχουν ασύζευκτα ηλεκτρόνια και λόγω της ασταθούς φύσης τους είναι ικανά να μεταφέρουν αυτά τα ηλεκτρόνια σε άλλα μόρια μέσω οξειδωσης οδηγώντας έτσι σε βλάβη, απενεργοποίηση ή δημιουργία νέων ριζών (Boukhenouna et al., 2018). Οι ROS μπορούν να αλληλεπιδράσουν με βιολογικά μακρομόρια όπως λιπίδια, πρωτεΐνες, DNA, RNA και μιτοχονδριακό DNA με αποτέλεσμα την κυτταρική βλάβη και απόπτωση, συνεισφέροντας στην ανάπτυξη της ΧΑΠ (Rahman and Adcock, 2006).

1.3.1 Πηγές των ROS

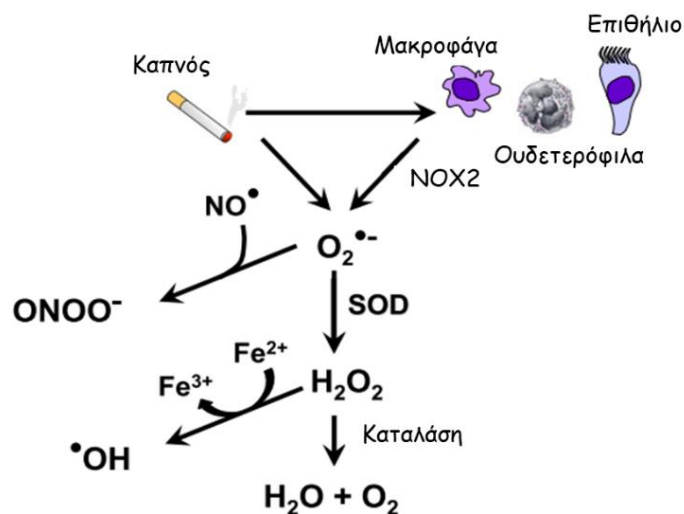
Μία σημαντική πηγή των ROS συνιστούν τα μιτοχόνδρια, καθώς μπορούν να παραχθούν ως παραπροϊόντα της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων, μία διαδικασία που διεξάγεται σε αυτά, κατά την οποία ηλεκτρόνια μεταφέρονται από δότες σε δέκτες και προωθείται η μεταφορά πρωτονίων δια μέσου της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης. Ο κίνδυνος παραμονεύει κατά την αναγωγή του O_2 , καθώς εάν γίνει μερικώς, παράγει επικίνδυνες ενώσεις, όπως το ανιόν του σουπεροξειδίου και το υπεροξείδιο. Το τελευταίο μέσω της SOD μετατρέπεται σε υπεροξείδιο του υδρογόνου που είναι σταθερότερο, διαχέεται κατά μήκος των μεμβρανών και οξειδώνει θειολικές ομάδες σε πλευρικές αλυσίδες αμινοξικών καταλοίπων (Berg, Tymoczko, Gatto & Stryer, 2017).

Επιπροσθέτως, οι ROS ενδογενώς μπορούν να παραχθούν τόσο από κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος που μεσολαβούν σε φλεγμονώδεις αποκρίσεις (ουδετερόφιλα, μονοκύτταρα/μακροφάγα) όσο και από επιθηλιακά και ενδοθηλιακά κύτταρα που δομούν τους πνεύμονες (Εικόνα 3) (Kirkham et al., 2013). Η NADPH οξειδάση (NOX), ένα ενζυμικό σύμπλοκο που εκφράζεται σε αυτά, αποτελεί μία από τις κυριότερες πηγές τους σε ενδοκυτταρικό επίπεδο. Η αρχική λειτουργία που τους αποδόθηκε περιλάμβανε την παραγωγή τους από τα φαγοκύτταρα για την εξάλειψη

μικροοργανισμών. Πλέον, είναι γνωστό ότι εξυπηρετούν πολλαπλούς ρόλους και δρουν ως σηματοδοτικά μόρια που εμπλέκονται σε διαδικασίες όπως ο κυτταρικός θάνατος, η χημειοταξία και η γονιδιακή έκφραση (Dupré-Crochet et al., 2013). Η ενεργοποίηση των φαγοκυττάρων ύστερα από κατάλληλο ερέθισμα, όπως η πρόσδεση μοριακών μοτίβων σχετιζόμενων με παθογόνα ή βλάβη (PAMPs και DAMPs) σε διαμεμβρανικούς υποδοχείς, έχει ως αποτέλεσμα την μετέπειτα ενεργοποίηση της σηματοδότησης του NF-κΒ, οδηγώντας στην συναρμολόγηση των υπομονάδων της NOX στη μεμβράνη και την ενεργοποίησή της. Το ένζυμο με τη σειρά του μεταφέρει ένα ηλεκτρόνιο από το NADPH στο O₂ καταλήγοντας στον σχηματισμό του ανιόντος του σουπεροξειδίου (O₂⁻) που απελευθερώνεται εντός του φαγοκυττάρου (Kirkham et al., 2013). Ωστόσο, η άμεση οξείδωση άλλων μορίων από αυτή τη ρίζα δεν συνεισφέρει σε σημαντικό βαθμό στο οξειδωτικό στρες λόγω της ταχείας μετατροπής της σε υπεροξείδιο του υδρογόνου (H₂O₂), μία αντίδραση που καταλύεται από το ένζυμο σουπεροξειδική δισμουτάση (SOD).

Μία άλλη κατηγορία των ROS αποτελεί το μονοξειδίο του αζώτου (·NO), που παράγεται μέσω της επαγόμενης συνθάσης του μονοξειδίου του αζώτου (iNOS) ύστερα από τη διέγερση των φαγοκυττάρων από PAMPs όπως οι λιποπολυσακχαρίτες και ο παράγοντας νέκρωσης όγκων TNF-α. Αυτό επίσης απομακρύνεται εύκολα μέσω διάχυσης στο αίμα και δέσμευσης από την οξυαιμοσφαιρίνη (McGuinness and Sapey, 2017). Η ταχεία απομάκρυνση των ·NO και O₂⁻ είναι απαραίτητη για την εξασφάλιση της υγείας του ατόμου καθώς όταν βρίσκονται σε αυξημένες συγκεντρώσεις, όπως παρατηρείται σε περιπτώσεις φλεγμονής, παράγουν ένα εξαιρετικά επικίνδυνο μόριο το υπεροξυνιτρώδες (ONOO⁻) με ικανότητα να οξειδώνει πολλαπλούς στόχους όπως πρωτεϊνικές θειόλες και τυροσίνες (Bernardo et al., 2015). Τα φαγοκύτταρα περιέχουν επίσης το ένζυμο μυελοπεροξειδάση, που συσχετίζεται με αυξημένα επίπεδα ROS και τη χρόνια φλεγμονή σε ασθενείς με ΧΑΠ, και καταλύει την μετατροπή του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂) σε υποχλωριώδες οξύ (HOCl) οδηγώντας στην παραγωγή ακόμη περισσότερων τοξικών μορίων (Zhu et al., 2014). Επιπλέον, ο σίδηρος και άλλα μεταλλικά ιόντα μπορούν να καταλύσουν την παραγωγή ριζών υδροξυλίου από H₂O₂ μέσω των αντιδράσεων Haber-Weiss και Fenton (Domej et al., 2014). Η αλυσίδα, λοιπόν, αυτών των οξειδωτικών γεγονότων καταλήγει στον σχηματισμό δραστικών ριζών αζώτου και καρβονυλίου (RNS και RCS αντίστοιχα) με παρόμοια επιβλαβή δράση. Οι ROS με περιβαλλοντική προέλευση που είναι κοινές στο

επιθήλιο των πνευμόνων, προέρχονται από αέρια, όπως το όζον και το διοξείδιο του αζώτου, συμβάλλοντας επίσης στην αύξηση του οξειδωτικού φορτίου.



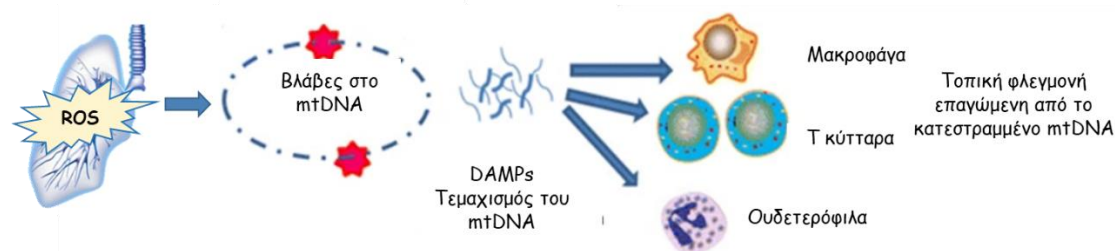
Εικόνα 3: Η κυτταρική παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου και αζώτου στη ΧΑΠ. Ο καπνός του τσιγάρου επιδρά στα φλεγμονώδη κύτταρα των πνευμόνων όπου η ενεργοποίηση της NADPH οξειδάσης (NOX2) παράγει ρίζες υπεροξειδίου ($O_2^{\bullet-}$). Αυτές μπορούν είτε να αντιδράσουν με μονοξείδιο του αζώτου $\cdot NO$ για την παραγωγή του πολύ δραστικού υπεροξυνιτρώδους ($ONOO^-$) είτε να μετατραπούν σε υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) με την ενζυματική δράση της σουπεροξειδικής δισμουτάσης (SOD). Παρουσία Fe^{2+} , το H_2O_2 μπορεί να μετατραπεί στο ακόμη πιο βλαβερό $\cdot OH$ μέσω της αντίδρασης Fenton. Ένζυμα όπως η καταλάση είναι ικανά να μειώσουν τα κυκλοφορούντα ROS μετατρέποντας τα σε αβλαβείς ενώσεις, μειώνοντας έτσι το οξειδωτικό φορτίο (Bernardo et al., 2015).

1.3.2 Βιολογικές επιδράσεις

Οι δραστικές ρίζες έχουν την ικανότητα να τροποποιήσουν τις θειόλες, τις αμίνες και αμινοξικά κατάλοιπα όπως η κυστεΐνη, η μεθειονίνη και η τυροσίνη. Αυτές οι αλλαγές αντανακλώνται ως μεταβολές στο προφίλ των φορτίων και τον σχηματισμό νέων δισουλφιδικών δεσμών, αλλάζοντας την τεταρτοταγή δομή και συνολικά την πρωτεϊνική λειτουργία και δράση. Η τροποποίηση αυτών των περιοχών μπορεί τελικά να αυξήσει ή να αναστείλλει την δραστηριότητα ενζύμων, να επηρεάσει τις αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης, την υποκυτταρική μεταφορά τους, όπως και τον ρυθμό ανακύκλωσης (van der Vliet et al., 2018).

Οι ROS θεωρούνται η κύρια πηγή βλάβης των νουκλεϊκών οξέων, ιδίως του μιτοχονδριακού DNA, το οποίο είναι περισσότερο ευαίσθητο συγκριτικά με το πυρηνικό, λόγω της εγγύτητας στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη και της υψηλής έκθεσης σε ROS προερχόμενες από την αναπνευστική αλυσίδα όπως και της απουσίας ιστονών και επιδιορθωτικών μηχανισμών. Τα κύρια προϊόντα της καταστροφής των βάσεων του μιτοχονδριακού DNA είναι η θυμινογλυκόλη μεταξύ

των πυριμιδινών και η δ-οξογουανίνη μεταξύ των πουρινών, με την τελευταία να έχει μεταλλαξιγόνες ιδιότητες και κατά την αντιγραφή του DNA να προκαλεί μεταστροφές G→T (Shokolenko et al., 2009). Τα κατεστραμμένα μόρια του μιτοχονδριακού DNA, σε περίπτωση που διαταράσσεται η ομοιόσταση του ιστού των πνευμόνων, όπως παρατηρείται σε ασθενείς με ΧΑΠ, μπορούν να απελευθερωθούν από τα μιτοχόνδρια και να δράσουν ως DAMPs (Damage Associated Molecular Patterns) (Εικόνα 4) (Pouwels et al., 2014). Η αλληλεπίδραση των mtDAMPs με τους υποδοχείς PRRs (Pattern Recognition Receptors) στην επιφάνεια γειτονικών κυττάρων (είτε επιθηλιακών είτε της φυσικής και ειδικής ανοσίας) στρατολογεί ακόμη περισσότερα κύτταρα του ανοσοποιητικού στην κατεστραμμένη περιοχή για την εκκίνηση φλεγμονωδών αποκρίσεων συνεισφέροντας στην εγκαθίδρυση μιας χρόνιας φλεγμονής (Liu et al., 2017).



Εικόνα 4: Η συνεισφορά των βλαβών του mtDNA που επάγονται από ROS στην παθογένεση πνευμονικών παθήσεων. Τα κατεστραμμένα τμήματα του μιτοχονδριακού DNA απελευθερώνονται από τα μιτοχόνδρια και παρουσιάζουν ανοσογονικότητα, στρατολογώντας μία ποικιλία κυττάρων του ανοσοποιητικού στην περιοχή που υπέστη βλάβη, για την έναρξη φλεγμονωδών και ανοσολογικών αντιδράσεων (Liu et al., 2017).

Ειδικότερα, οι ρίζες υδροξυλίου μπορούν να αλληλεπιδράσουν με οποιοδήποτε συστατικό του DNA, όπως οι βάσεις πουρινών, πυριμιδινών, ο σκελετός δεοξυριβόζης οδηγώντας σε βλαβερές αλλαγές όπως μονόκλωνες ή δίκλωνες ρήξεις στο DNA. Για παράδειγμα, τα τελομερή, ακολουθίες DNA εντοπισμένες στα άκρα των χρωμοσωμάτων είναι υπεύθυνα για την προστασία αυτών από αποικοδόμηση ή τη σύντηξη με άλλα χρωμοσώματα. Οι βλάβες που επάγονται από ROS στα τελομερή επιδιορθώνονται λιγότερο αποτελεσματικά, με την μειωμένη αυτή ικανότητα να αποδίδεται στην διαδικασία της αντιγραφής και την ανικανότητα της DNA πολυμεράσης να αντιγράψει πλήρως τα χρωμοσώματα, και έτσι οι διαταραγμένες αυτές περιοχές μπορούν να επιταχύνουν διαδικασίες όπως η γήρανση που έχει βρεθεί να συσχετίζεται με την ΧΑΠ (Neofytou et al., 2012).

Το RNA είναι πιο επιρρεπές στις βλάβες που προκαλούνται από ROS λόγω του ότι είναι μονόκλωνο, δεν επιδιορθώνεται μόνο του και τα κυτταροπλασματικά RNAs βρίσκονται κοντά στα μιτοχόνδρια (Kong et al., 2010). Τα μιτοχόνδρια αποτελούν την πρωτογενή πηγή ROS κατά την αναπνοή, με την αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων, από την κατανάλωση οξυγόνου καθημερινά, να μπορεί να προκαλέσει διαρροή 1-2% του συνόλου των ηλεκτρονίων ακόμη και υπό φυσιολογικές συνθήκες και άρα είναι λογική η υπόθεση ότι η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία μπορεί να συνεισφέρει στην παθογένεση της ΧΑΠ.

Ανάγοντας τις τροποποιήσεις που προκαλούν οι ROS στα διάφορα βιομόρια σε ένα γενικότερο πλαίσιο, η ενδοκυτταρική απελευθέρωση τους επηρεάζει συνολικά την κυτταρική ομοιόσταση και μεταγραφή καθώς θεωρείται ότι εμπλέκονται στον έλεγχο της κυτταρικής διαφοροποίησης, στην ανοσοαπόκριση, στην αυτοφαγία και σε άλλες μεταβολικές δραστηριότητες (McGuinness and Sapey, 2017). Έτσι, η διαμεσολάβησή τους σε πορείες μεταγωγής σήματος που ενεργοποιούνται κατά τη φλεγμονή τονίζει επίσης τον ρόλο τους στην εμφάνιση και την πρόοδο της ασθένειας.

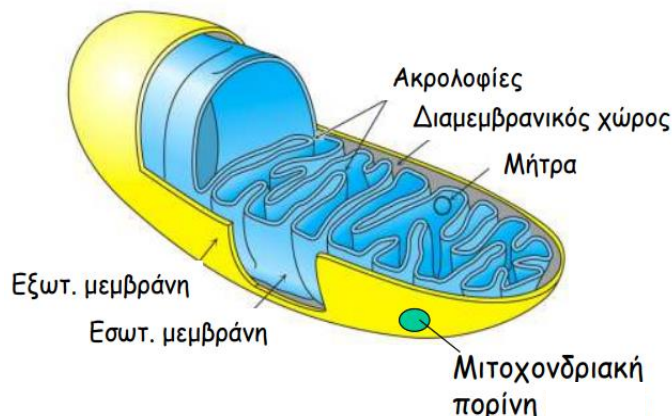
1.4. ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑ

Τα μιτοχόνδρια ως μικρά υποκυτταρικά οργανίδια είναι απαραίτητα για όλα τα εμπύρνηνα κύτταρα των θηλαστικών. Περιβάλλονται από μία διπλή μεμβράνη, που ελέγχει την κίνηση των πρωτεϊνών ρυθμίζοντας έτσι το περιεχόμενο του κάθε διαμερίσματος, συνεισφέροντας στον πολυδιάστατο ρόλο των μιτοχονδρίων.

1.4.1 Δομή

Το σχήμα και η μορφή των μιτοχονδρίων ποικίλλει ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο. Όλα, όμως, περιβάλλονται από ένα σύστημα δύο μεμβρανών, που παίζουν τον ρόλο του σκελετού. Οι δύο αυτές μεμβράνες, εξωτερική και εσωτερική, διαχωρίζουν το εσωτερικό των μιτοχονδρίων, που ονομάζεται μήτρα, από το κυτταρόπλασμα, με το διάστημα που δημιουργείται μεταξύ τους να αποτελεί τον διαμεμβρανικό χώρο (Εικόνα 5). Η εξωτερική μεμβράνη είναι διαπερατή από μόρια, το οποίο εξασφαλίζεται μέσω της ύπαρξης των πορινών, που σχηματίζουν υδρόφιλους διαύλους. Η εσωτερική μεμβράνη αναδιπλώνεται σε πολυάριθμες ακρολοφίες και περιλαμβάνει πρωτεΐνες με τρεις διακριτούς ρόλους: πρωτεΐνες που πραγματοποιούν τις οξειδωτικές αντιδράσεις της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων, τη συνθάση του ATP, που παράγει ATP και

περμεάσες, μεταφορικές πρωτεΐνες. Ο εσωτερικός χώρος, η μήτρα, περιέχει αντίγραφα του μιτοχονδριακού DNA, ειδικά μιτοχονδριακά ριβοσώματα, μόρια tRNA και ένζυμα τόσο για την έκφραση των μιτοχονδριακών γονιδίων όσο και για την πραγματοποίηση μεταβολικών αντιδράσεων (Ζίφα, Μαμούρης & Μούτου, 2011).



Εικόνα 5: Η δομή των μιτοχονδρίων.

Είναι ο χώρος που συντελούνται οι περισσότερες αντιδράσεις του κύκλου του κιτρικού οξέος και της οξειδωσης των λιπαρών οξέων (Nam et al., 2017). Αντιθέτως, η οξειδωτική φωσφορυλίωση λαμβάνει χώρα μέσα στην εσωτερική μεμβράνη, που διαθέτει περισσότερες θέσεις για την διεκπεραίωσή της λόγω της αύξησης της επιφάνειάς της από τις ακρολοφίες (Agharour et al., 2020).

1.4.2 Λειτουργία

Τα μιτοχόνδρια χαρακτηρίζονται από την συμβατική λειτουργία τους ως «εργοστάσια» παραγωγής ενέργειας των κυττάρων, καθώς αποτελούν τον χώρο όπου διεξάγονται οι οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις, που είναι συνδυασμένες με τη φωσφορυλίωση του ADP σε ATP, παρέχοντας τα κατάλληλα ενζυμικά σύμπλοκα (Nam et al., 2017). Είναι υπεύθυνα, όμως, και για άλλες λειτουργίες όπως η ρύθμιση των αποπτωτικών διαδικασιών, η παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου, η βιοσύνθεση αίμης, και η ομοιόσταση του ασβεστίου (Białas et al., 2016). Οι διεργασίες που επιτελούνται στα μιτοχόνδρια για την παραγωγή της ATP στο σύνολό τους καλούνται οξειδωτική φωσφορυλίωση και περιλαμβάνουν τον κύκλο του Krebs και την αναπνευστική αλυσίδα. Η ικανότητα των μιτοχονδρίων να παράγουν ATP, το ενεργειακό νόμισμα των κυττάρων, είναι ζωτικής σημασίας για τη φυσιολογική λειτουργία τους και η απορρύθμιση αυτής οδηγεί σε ένα ευρύ φάσμα κλινικών

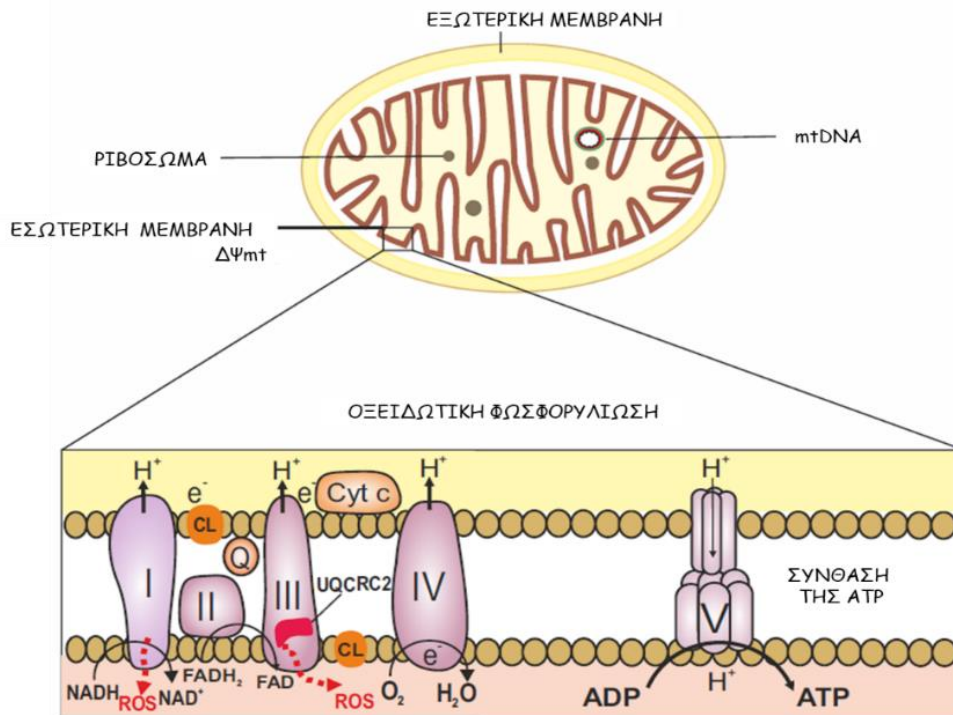
διαταραχών από νευρομυϊκές και νευροεκφυλιστικές ασθένειες έως και συχνές επιπλοκές όπως του διαβήτη.

Ο κύκλος του Krebs, το καταβολικό μονοπάτι οξειδωτικής αποικοδόμησης λιπιδίων, υδατανθράκων και πρωτεϊνών πραγματοποιείται στη μιτοχονδριακή μήτρα και παρέχει τεράστια ποσά ενέργειας σε αερόβιες συνθήκες συνεισφέροντας στη σύνθεση της ATP. Περιλαμβάνει μια σειρά ενορχηστρωμένων γεγονότων με αρχικό και τελικό υπόστρωμα το οξαλοξικό οξύ. Κάθε κύκλος ξεκινά με την παραχώρηση μιας ακετυλομάδας από το ακέτυλο-συνένζυμο Α (CoA), το προϊόν καταβολισμού είτε των πρωτεϊνών και υδατανθράκων είτε των λιπιδίων, στο οξαλοξικό, που μετατρέπεται σε 2 μόρια CO₂, 8 άτομα υδρογόνου και 8 ηλεκτρόνια. Αυτά τα 8 ηλεκτρόνια που απελευθερώνονται δεσμεύονται από τα συνένζυμα NADH και FADH₂ και μέσω ενζυμικών συμπλόκων μεταφέρονται σε ένα τελικό δέκτη, το μοριακό οξυγόνο. Η αναγωγή του μοριακού οξυγόνου από το NADH και FADH₂ πραγματοποιείται μέσω ενός αριθμού αντιδράσεων μεταφοράς ηλεκτρονίων που εκτυλίσσονται σε ένα σύνολο μεμβρανικών πρωτεϊνών, γνωστών ως αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων ή αναπνευστική αλυσίδα (Ζίφα, Μαμούρης & Μούτου, 2011). Η κινητήρια δύναμη της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, της διαδικασίας παραγωγής ATP από ADP και P_i, είναι το δυναμικό μεταφοράς ηλεκτρονίων του NADH ή του FADH₂ σε σχέση με εκείνο του O₂. Η ενέργεια που απελευθερώνεται από την αναγωγή του O₂ χρησιμοποιείται αρχικά για τη δημιουργία βαθμίδωσης συγκέντρωσης πρωτονίων και η τελευταία με τη σειρά της για τη σύνθεση ATP και τη μεταφορά μεταβολιτών δια μέσου της μιτοχονδριακής μεμβράνης (Berg, Tymoczko, Gatto & Stryer, 2017).

1.4.3 Οξειδωτική φωσφορυλίωση

Η αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων βρίσκεται στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων και περιλαμβάνει τρία μεγάλα πρωτεϊνικά σύμπλοκα τα οποία ονομάζονται οξειδοαναγωγή του ζεύγους NADH-Q, οξειδοαναγωγή του ζεύγους Q-κυτοχρώματος C και οξειδάση του κυτοχρώματος C ή σύμπλοκα I, III, IV αντίστοιχα (Εικόνα 6). Ένα ακόμη σύμπλοκο (σύμπλοκο II), που ονομάζεται αναγωγή του ζεύγους ηλεκτρικού-Q περιέχει την ηλεκτρική αφυδρογονάση, η οποία παράγει FADH₂ στον κύκλο του κιτρικού οξέος και δεν αντλεί πρωτόνια (Mukherjee and Ghosh, 2020). Δύο εξειδικευμένοι φορείς ηλεκτρονίων, το συνένζυμο Q ή ουβικινίνη και το κυτόχρωμα c, μεταφέρουν τα ηλεκτρόνια από το ένα σύμπλοκο στο

επόμενο με τελικό δέκτη το μοριακό οξυγόνο. Η ροή ηλεκτρονίων δια μέσου αυτών των διαμεμβρανικών συμπλόκων είναι ιδιαίτερα εξώεργη και προωθεί τη μεταφορά πρωτονίων δια μέσου της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης (Berg, Tymoczko, Gatto & Stryer, 2017). Πώς, όμως, η διεργασία αυτή είναι συζευγμένη με τη σύνθεση της ATP, μια ενδόεργη αντίδραση;



Εικόνα 6: Η αναπνευστική αλυσίδα και η παραγωγή ROS ως παραπροϊόντα αυτής από τα μιτοχόνδρια. Εντός των μιτοχονδρίων, η διπλή μεμβράνη τους, με την εσωτερική να παρουσιάζει αναδιπλώσεις, σχηματίζει ακρολοφίες (cristae). Η μιτοχονδριακή μήτρα περιέχει κυκλικά μόρια μιτοχονδριακού DNA (mtDNA) και ριβοσώματα. Η οξειδωτική φωσφορυλίωση (OXPHOS), που παρέχει ATP, απαραίτητο για τις κυτταρικές λειτουργίες, πραγματοποιείται στην υπερ-αναδιπλωμένη εσωτερική μεμβράνη. Κατά την οξειδωτική φωσφορυλίωση, δημιουργείται μία βαθμίδωση πρωτονίων μέσω της ροής ηλεκτρονίων δια μέσου της αλυσίδας των ενζυμικών συμπλόκων (I έως V), που οδηγεί στην παραγωγή ROS, H₂O και ATP. Το κυτόχρωμα c (Cyt c) και το συνένζυμο Q μεσολαβούν τη μεταφορά των ηλεκτρονίων δια μέσου των συμπλόκων. Τα σύμπλοκα I και III αποτελούν τις κύριες πηγές παραγωγής των ROS στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων (ETC). Ειδικότερα, ο πυρήνας της αναγωγάσης της ουβικινόλης-κυτοχρώματος c II (UQCRC2) αποτελεί μία πρωτεΐνη ευαίσθητη στη βλάβη που συνεισφέρει στην παραγωγή των ROS από το σύμπλοκο III. Η οξείδωση της καρδιολιπίνης (CL), ενός λιπιδίου της εσωτερικής μεμβράνης, ειδικό για τα μιτοχόνδρια, μπορεί να επάγει την οξειδωτική βλάβη (Agharour et al., 2020).

Η σύνθεση της ATP πραγματοποιείται από ένα μοριακό συγκρότημα που ονομάζεται συνθάση της ATP και εντοπίζεται επίσης στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη. Σύμφωνα με το μοντέλο της χημειοσμωτικής υπόθεσης, η μεταφορά ηλεκτρονίων δια μέσου της αναπνευστικής αλυσίδας οδηγεί σε άντληση πρωτονίων

από τη μήτρα στο διαμεμβρανικό χώρο. Η χαμηλότερη συγκέντρωση πρωτονίων στη μήτρα που προκύπτει, οδηγεί σε μια διαφορά ηλεκτρικού δυναμικού εκατέρωθεν της εσωτερικής μεμβράνης, με την πλευρά της μήτρας να είναι αρνητικά φορτισμένη, με αποτέλεσμα τα πρωτόνια να ρέουν πίσω προς τη μήτρα ώστε να εξισωθούν οι συγκεντρώσεις τους. Η πρωτονιοκίνητη αυτή δύναμη ωθεί τη σύνθεση της ATP από το σύμπλοκο της συνθάσης του ATP μέσω ενός μηχανισμού περιστροφικής κατάλυσης. Υπό φυσιολογικές συνθήκες οι ROS απελευθερώνονται από τα μιτοχόνδρια ως παραπροϊόντα της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Διάφορες μιτοχονδριακές πρωτεΐνες, και συγκεκριμένα αυτές που συμμετέχουν στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων συνεισφέρουν στον σχηματισμό των ROS, με κυριότερες τα σύμπλοκα I και III και τον πυρήνα της αναγωγάσης της ουβικινόλης-κυτοχρώματος c II (UQCRC2) (Agharour et al., 2020) . Όταν παράγονται σε υπερβολικές ποσότητες, οδηγούν σε κυτταρική βλάβη, κυτταρικό στρες ή και προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο (Bolisetty and Jaimes, 2013). Πέρα από το ότι παράγουν ROS, τα μιτοχόνδρια αποτελούν και στόχο αυτών, με συνέπεια την οξειδωτική βλάβη στις μιτοχονδριακές πρωτεΐνες και το μιτοχονδριακό γονιδίωμα και την δημιουργία μεταλλάξεων, με περαιτέρω πρόκληση οξειδωτικού στρες οδηγώντας σε ένα φαύλο κύκλο.

1.4.4 Η δυναμική των μιτοχονδρίων

Τα μιτοχόνδρια σχηματίζουν ένα δυναμικό δίκτυο, επιτρέποντας την προσαρμογή σε αλλαγές στις ομοιοστατικές συνθήκες και τις κυτταρικές αποκρίσεις στη βλάβη. Οι διαδικασίες που εμπλέκονται στην αναδιαμόρφωση αυτού του δικτύου περιλαμβάνουν γεγονότα σχάσης (fission) και σύντηξης (fusion), εξασφαλίζοντας την ανταλλαγή μιτοχονδριακού DNA κατά τις διαδικασίες επιδιόρθωσης, τη δημιουργία νέων μιτοχονδρίων (βιογένεση) ή την απομάκρυνση των κατεστραμμένων μέσω ενός μηχανισμού αυτοφαγίας εξειδικευμένο για τα μιτοχόνδρια, που ονομάζεται μιτοφαγία (Hara et al., 2013). Κύριος ρυθμιστής της βιογένεσης των μιτοχονδρίων αποτελεί ο υποδοχέας γ -συνενεργοποιητής 1 α που ενεργοποιείται από τον πολλαπλασιαστή των υπεροξειδωσωμάτων (PGC-1 α), με τον μιτοχονδριακό μεταγραφικό παράγοντα A (TFAM) και τους πυρηνικούς αναπνευστικούς παράγοντες 1 και 2 (NRF1/2) να συμμετέχουν καθοδικά ως ρυθμιστές (Poron, 2020). Η ενεργοποίηση διαφόρων κινασών συνεισφέρει στη βιογένεση των μιτοχονδρίων μέσω της ρύθμισης του PGC-1 α . Μεταξύ αυτών η πρωτεϊνική κινάση C, η κινάση ενεργοποιούμενη από μιτογόνα (MAPK) και η κινάση που ενεργοποιείται από το AMP (AMPK) εμπλέκονται στη

δυσλειτουργία των επιθηλιακών κυττάρων των πνευμόνων που επάγεται από τον καπνό του τσιγάρου (Arciuch et al., 2012). Αν και η αυξημένη μιτοχονδριακή βιογένεση θα αναμενόταν να είναι επωφελής για τις κυτταρικές λειτουργίες, η αυξημένη παραγωγή των ROS ως αποτέλεσμα του αυξημένου αριθμού των μιτοχονδρίων καθιστά τα κύτταρα πιο ευαίσθητα σε διαδικασίες όπως η μη αναστρέψιμη αναστολή του κυτταρικού κύκλου ή η γήρανση που φαίνεται να εμπλέκεται στην παθογένεση της ασθένειας, ιδιαίτερα όταν συνοδεύεται από μία ανισορροπία οξειδωτικών μορίων και αντιοξειδωτικής ικανότητας των κυττάρων, που παρατηρείται στη ΧΑΠ (Agharour et al., 2020).

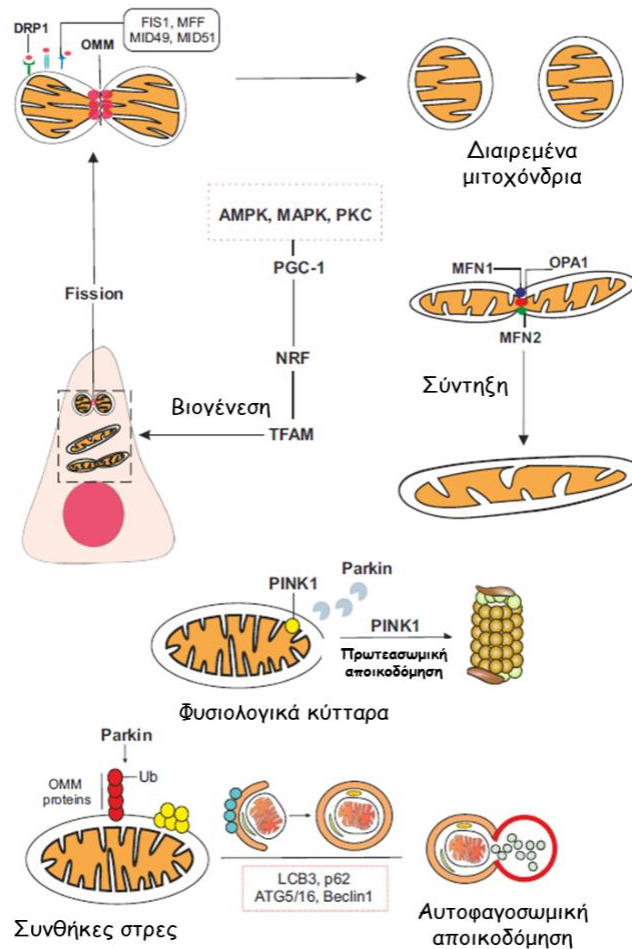
1.4.5 Σχάση και σύντηξη

Τα γεγονότα σχάσης και σύντηξης των μιτοχονδρίων βρίσκονται υπό τον έλεγχο εξειδικευμένων πρωτεϊνών, GTPασών, που εντοπίζονται στην εξωτερική και εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη (Εικόνα 7). Κατά τη σχάση, η εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη διαχωρίζεται από την σχετιζόμενη με την δυναμίνη πρωτεΐνη 1 (DRP1), ύστερα από την αναγνώρισή της από τον υποδοχέα της στην εξωτερική μεμβράνη (FIS1), τον μιτοχονδριακό παράγοντα σχάσης (MFF), τη μιτοχονδριακή δυναμική πρωτεΐνη 49 (MID49) και την MID51, οδηγώντας σε ένα κατακερματισμένο μιτοχονδριακό δίκτυο. Από την άλλη, κατά την σύντηξη, οι πρωτεΐνες της εξωτερικής μεμβράνης MFN1 (mitofusin 1) και MFN2, όπως και η πρωτεΐνη οπτικής ατροφίας 1 (OPA1) της εσωτερικής μεμβράνης συνδέουν τις μιτοχονδριακές μεμβράνες επιτρέποντας τα γειτονικά μιτοχόνδρια να ανταλλάσσουν γενετικό υλικό (Jiang et al., 2017).

1.4.6 Μιτοφαγία

Υπό συνθήκες μιτοχονδριακής βλάβης, καταστροφής ή δυσλειτουργίας, τα μιτοχόνδρια απομακρύνονται μέσω μιτοφαγίας. Η κινάση PINK1, κύριος ρυθμιστής αυτής της διαδικασίας, υφίσταται πρωτεασωμική αποικοδόμηση στα υγιή κύτταρα μέσω στρατολόγησης της E3 λιγάσης Parkin, αφού μετατοπισθεί στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη (Youle and Narendra, 2011). Υπό συνθήκες στρες (π.χ. υποξία, οξειδωτικό στρες) διαταράσσεται η πρωτεασωμική αποικοδόμηση οδηγώντας στη συσσώρευση της PINK1 στην εξωτερική μεμβράνη και την επακόλουθη στρατολόγηση της Parkin, η οποία ουβικιτινυλιώνει διάφορες πρωτεΐνες της

εξωτερικής μεμβράνης που δρουν ως σήμα-ετικέτα για την εγκόλπωση των μιτοχονδρίων στο αυτοφαγόσωμα.



Εικόνα 7: Τα μιτοχόνδρια ως δυναμικές δομές υφίστανται διάφορες διαδικασίες που συνεισφέρουν στην παραγωγή και αποικοδόμηση τους εντός των κυττάρων. Αυτές περιλαμβάνουν την σχάση, τη σύντηξη, την εξειδικευμένη για τα μιτοχόνδρια αυτοφαγία (μιτοφαγία) καθώς και τη μιτοχονδριακή βιογένεση με τη ρύθμιση τους από μία ποικιλία πρωτεϊνών τόσο υπό φυσιολογικές συνθήκες όσο και υπό συνθήκες στρες (Agharour et al., 2020).

1.4.7 Μιτοχονδριακή προέλευση και ημιавтоνομία

Τα μιτοχόνδρια περιέχουν πολλαπλά αντίγραφα του δικού τους κυκλικού γενετικού υλικού (mtDNA) που κωδικοποιεί για 13 πρωτεϊνικά συστατικά της αναπνευστικής αλυσίδας (υπομονάδες των συμπλόκων) όπως και για τον μεταφραστικό μηχανισμό με τη μορφή των mt-rRNAs και mt-tRNAs που απαιτούνται για την πρωτεϊνοσύνθεση. Διαθέτοντας τον απαραίτητο μηχανισμό για την αξιοποίηση της γενετικής τους πληροφορίας, ο οποίος περιλαμβάνει μιτοχονδριακές DNA πολυμεράσες και RNA πολυμεράσες, ριβοσώματα και μεταφορικά RNA, τα

μιτοχόνδρια χαρακτηρίζονται ως ημιαυτόνομα οργανίδια. Αυτή η αυτοδυναμία σε συνδυασμό με τις ομοιότητες των μιτοχονδριακών ριβοσωμάτων και μορίων tRNA με εκείνα των βακτηρίων, οδήγησε στην διατύπωση της υπόθεσης της ενδοσυμβιωτικής προέλευσης. Σύμφωνα με αυτή, τα μιτοχόνδρια προήλθαν από βακτήρια, που εισήλθαν σε ευκαρυωτικά κύτταρα σε κάποιο σημείο της εξελικτικής τους πορείας. Η είσοδος του βακτηρίου οδήγησε στη δημιουργία μιας συμβιωτικής σχέσης, κατά την οποία το ευκαρυωτικό κύτταρο χρησιμοποιούσε το μηχανισμό οξειδωτικής φωσφορυλίωσης του βακτηρίου (Berg, Tymoczko, Gatto & Stryer, 2017).

1.4.8 Ετεροπλασμία και κληρονομικότητα

Οι μιτοχονδριακές δυσλειτουργίες μπορούν να προκύψουν από μεταλλάξεις είτε στο πυρηνικό είτε στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα, από τις οποίες το 5-10% ανήκει στο mtDNA. Παρά το μικρό αυτό ποσοστό, οι παθογενείς σημειακές μεταλλάξεις σε μιτοχονδριακά tRNA γονίδια ευθύνονται για την πλειοψηφία των μιτοχονδριακών νοσημάτων (Zifa et al., 2007). Η σχέση μεταξύ γονότυπου-φαινότυπου στις ασθένειες που προκαλούνται από τέτοιου είδους μεταλλάξεις είναι αρκετά σύνθετη και όχι πλήρως κατανοητή, αν και η γενετική ετερογένεια μεταξύ κυττάρων και ιστών φαίνεται να διαδραματίζει κάποιο ρόλο. Αυτό οφείλεται τόσο στο φαινόμενο της ετεροπλασμίας όσο και στον τρόπο κληρονόμησης του μιτοχονδριακού DNA (Lightowers et al., 2015). Όταν συμβαίνουν μεταλλάξεις μπορούν να επηρεάσουν ένα ποσοστό μορίων mtDNA, που ποικίλλει σε κάθε κύτταρο (ετεροπλασμία), με αποτέλεσμα τη δημιουργία δύο διαφορετικών τύπων mtDNA εντός των κυττάρων, τα φυσιολογικά και τα μεταλλαγμένα. Η παρουσία τόσο των μεταλλαγμένων όσο και των φυσιολογικών (αγρίου τύπου) αλληλομόρφων στο ίδιο άτομο καθώς και οι ταχείες αλλαγές στην αλληλομορφική συχνότητα μπορούν να οδηγήσουν σε ένα απόγονο με ποικίλα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά για μία ασθένεια.

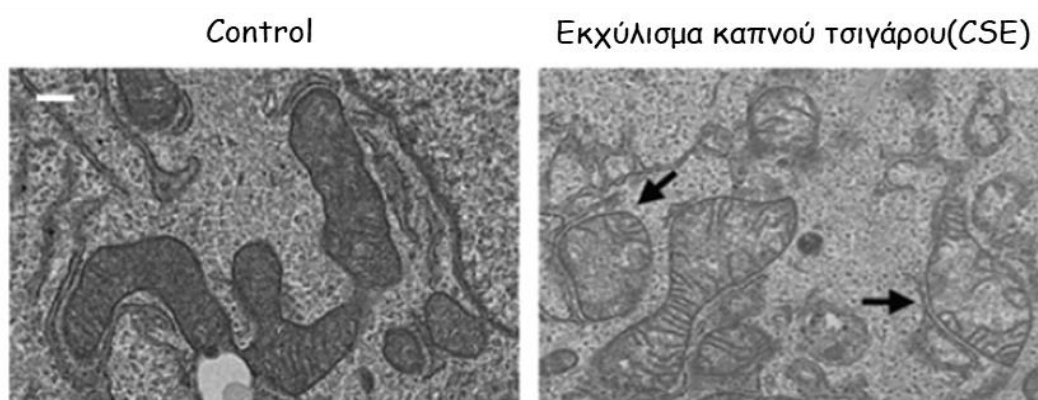
Επιπλέον, είναι γνωστό ότι το μιτοχονδριακό γονιδίωμα προέρχεται από τη μητέρα στους περισσότερους οργανισμούς. Στα θηλαστικά, τα μιτοχόνδρια πατρικής προέλευσης εισέρχονται στο κυτταρόπλασμα του ωοκυττάρου κατά τη γονιμοποίηση και εξαφανίζονται στα στάδια της πρώιμης εμβρυογένεσης (Yan et al., 2019). Οι μηχανισμοί με τους οποίους γίνεται η εξάλειψη του πατρικού mtDNA ποικίλλουν και εμφανίζουν εξειδίκευση για κάθε είδος, παραμένοντας αδιευκρίνιστοι όσον αφορά τον άνθρωπο (Sato M. and Sato K., 2013). Αν και το mtDNA κληρονομείται μητρικά, η

μετάδοση των μιτοχονδριακών νοσημάτων και η σοβαρότητα αυτών είναι δύσκολο να προβλεφθούν, κι αυτό λόγω της επίδρασης των εξελικτικών μηχανισμών σε κυτταρικό επίπεδο όσο και του σύνθετου μιτοχονδριακού γενετικού υπόβαθρου (Zhang et al., 2018).

1.5. ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΗ ΔΥΣΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΚΑΙ ΧΑΠ

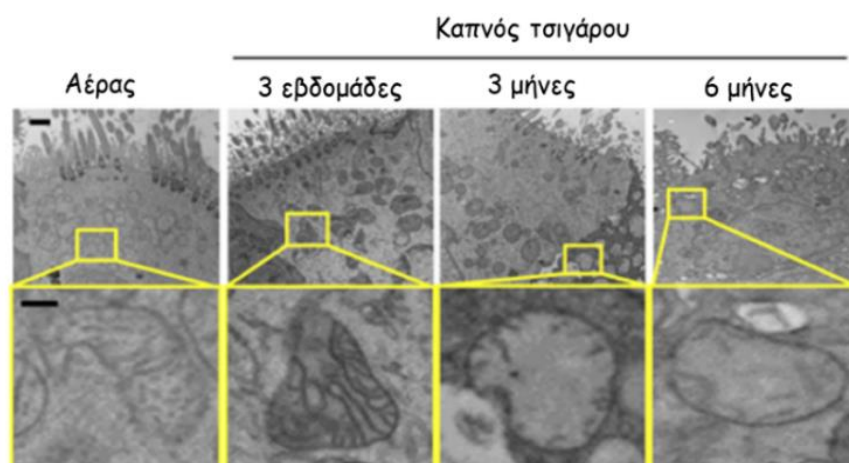
1.5.1 Μορφολογικές αλλαγές

Διάφορες έρευνες επιβεβαιώνουν την ύπαρξη μιτοχονδριακών ανωμαλιών στα επιθηλιακά κύτταρα των πνευμόνων σε ασθενείς με ΧΑΠ ή εμφύσημα. Μεταξύ άλλων αναφέρονται διαταραχές στη μορφολογία των μιτοχονδρίων όπως απώλεια των ακρολοφίων, μη φυσιολογικές αναδιπλώσεις των μεμβρανών και τεμαχισμός των οργανιδίων (Εικόνα 8) (Hara et al., 2013). Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και σε πειράματα σε καλλιέργειες βρογχιακών επιθηλιακών κυττάρων που προήλθαν από πρώην καπνιστές που βρίσκονταν σε προηγμένο στάδιο της ΧΑΠ με τα μιτοχόνδρια να παρουσιάζουν σημαντικές αλλαγές στην πυκνότητα της μήτρας και τον σχηματισμό αναδιπλώσεων (Hoffmann et al., 2013). Ωστόσο, χρειάζονται να γίνουν περισσότερες μελέτες *in vitro* σε διαφοροποιημένα κύτταρα ώστε να διερευνηθούν οι επιδράσεις του καπνού του τσιγάρου στην μορφολογία των μιτοχονδρίων καθώς οι συγκεκριμένες εστιάζουν μόνο σε ένα συγκεκριμένο κυτταρικό τύπο του πνεύμονα (αδιαφοροποίητα βασικά κύτταρα).



Εικόνα 8: Παρατήρηση των αλλαγών στη μιτοχονδριακή δομή σε επιθηλιακά κύτταρα πνευμόνων (BEAS-2B) μέσω ηλεκτρονικής μικροσκοπίας μετάδοσης (TEM). Στην δεξιά εικόνα με μαύρα βέλη διακρίνονται η διόγκωση των μιτοχονδρίων και οι διαταραγμένες ακρολοφίες μετά από τη χορήγηση 20% CSE στα κύτταρα για 4 ώρες συγκριτικά με το control (αριστερή εικόνα), στο οποίο δεν χορηγήθηκε το εκχύλισμα (Mizumura et al., 2014).

Παράλληλα με τις *in vitro* μελέτες σε ανθρώπινα κύτταρα, η παρατεταμένη *in vivo* έκθεση ποντικών σε καπνό τσιγάρου επέφερε επίσης μιτοχονδριακή βλάβη τόσο στους αεραγωγούς όσο και στις κυψελίδες (Εικόνα 9).



Εικόνα 9: Παρατήρηση των αλλαγών (όπως οι απώλειες ακρολοφιών) στη μιτοχονδριακή δομή από τομές πνευμόνων ποντικών που εκτέθηκαν σε αέρα δωματίου ή καπνό τσιγάρου για 3 εβδομάδες, 3 μήνες και 6 μήνες μέσω ηλεκτρονικής μικροσκοπίας μετάδοσης (TEM) (Mizumura et al., 2014). Στις περιοχές που διαγράφονται με κίτρινο χρώμα βρίσκονται τα μιτοχόνδρια, τα οποία παρουσιάζονται σε μεγέθυνση στα χαμηλότερα κίτρινα πλαίσια. Υπάρχουν ενδείξεις διαταραχής των μιτοχονδριακών ακρολοφιών με τις σημαντικότερες αλλοιώσεις να φαίνονται ύστερα από τη μακρόχρονη έκθεση των ποντικών στον καπνό του τσιγάρου (6 μήνες).

1.5.2 Λειτουργικές αλλαγές

Ταυτόχρονα με τις επιδράσεις στα μορφολογικά χαρακτηριστικά, έχουν παρατηρηθεί και διαταραχές στη λειτουργία των μιτοχονδρίων, μεταξύ των οποίων συγκαταλέγονται οι εξής :

- Μία ελάττωση του ποσοστού του μιτοχονδριακού DNA και αύξηση των βλαβών σε πρωτογενή κυψελιδικά κύτταρα τύπου II απομονωμένα από ασθενείς με εμφύσημα (Kosmider et al., 2019).

- Μειωμένα επίπεδα κατανάλωσης οξυγόνου
- Μειωμένα επίπεδα ATP
- Απώλεια του μεμβρανικού δυναμικού ($\Delta\Psi_m$)
- Μειωμένη δραστικότητα και επίπεδα έκφρασης των συμπλόκων της αναπνευστικής αλυσίδας

Σε πειράματα με χορήγηση εκχύλισματος καπνού τσιγάρου σε επιθηλιακές κυτταρικές σειρές Beas-2b, με παρόμοια αποτελέσματα αναφορικά με ορισμένα συστατικά των συμπλόκων (π.χ. VF_1) να παρατηρούνται και σε καλλιέργειες πρωτογενών βρογχικών επιθηλιακών κυττάρων (PBECs) (Van der Toorn et al., 2009; Aghapour et al., 2020; Hoffmann et al., 2013).

- Αυξημένα επίπεδα των μιτοχονδριακών ROS -σε επιθηλιακές κυτταρικές σειρές απομονωμένες από πνευμονικό ιστό (A549 και Calu-3) ύστερα από την έκθεσή τους σε εκχύλιμα καπνού τσιγάρου (Cigarette Smoke Extract ή CSE), τη χρήση κατάλληλων ανιχνευτών για τις μιτοχονδριακές ROS και την μετέπειτα παρατήρηση σε συνεστιακό μικροσκόπιο (Van der Toorn et al., 2009; Valdivieso et al., 2018).

Μεταξύ των αλλαγών που σημειώθηκαν σε επιθηλιακά κύτταρα ανήκουν οι :

- Μεταβολικές τροποποιήσεις σε κυψελιδικά κύτταρα τύπου II απομονωμένα από ποντίκια που εκτέθηκαν βραχυπρόθεσμα σε καπνό τσιγάρου, με τη στροφή των μιτοχονδρίων προς τον μεταβολισμό του παλμιτικού οξέος (β -οξειδωση), αντί της γλυκόζης, που προτιμάται ως υπόστρωμα για την παραγωγή ενέργειας υπό συνθήκες στρες, αποτελώντας έτσι μια πιθανή εξήγηση για τον υποσιτισμό που εμφανίζουν ορισμένοι ασθενείς με ΧΑΠ. Οι αλλαγές αυτές συνοδεύτηκαν και με ελάττωση της βιοσύνθεσης επιφανειοδραστικών παραγόντων (surfactant), ειδικότερα της φωσφατιδυλοχολίνης, που υπό φυσιολογικές συνθήκες συνιστούν ένα προστατευτικό φραγμό για το πνευμονικό επιθήλιο (Agarwal et al., 2014).

Τα αποτελέσματα αυτά φανερώνουν μία σύνδεση ανάμεσα στις μορφολογικές αλλαγές, τις βλάβες στη μιτοχονδριακή λειτουργία όπως και στις αλλαγμένες κυτταρικές λειτουργίες ως απόκριση σε τοξικές ουσίες όπως αυτές του τσιγάρου. Η μείωση στην παραγωγή κυτταρικής ενέργειας που παρατηρήθηκε σε αυτές τις μελέτες, πιθανολογείται ότι προέρχεται από επιπλοκές στην αναπνευστική αλυσίδα, καθώς η έκθεση του επιθηλίου σε εκχύλιμα καπνού φάνηκε να έχει ως αποτέλεσμα μειωμένα επίπεδα δραστικότητας των συμπλόκων της αναπνευστικής αλυσίδας I-III, όπως και

αυξημένη επεξεργασία των συμπλόκων III και V από τον αυτοφαγικό μηχανισμό (Agharour et al., 2020).

Σε αντιπαράθεση με αυτά, σε άλλες έρευνες αναφέρεται αυξημένη μεταβολική δραστηριότητα των μιτοχονδρίων (αυξορρυθμιση γονιδίων που εμπλέκονται σε μεταβολικά μονοπάτια), αύξηση της έκφρασης των γονιδίων που κωδικοποιούν για τα σύμπλοκα II, III, IV, V και της δραστηριότητας αυτών σε καλλιέργειες πρωτογενών επιθηλιακών κυττάρων τύπου II ποντικών στις οποίες χορηγήθηκε εκχύλισμα καπνού τσιγάρου (Ballweg et al., 2014). Τα αντικρουόμενα αυτά αποτελέσματα πιθανώς οφείλονται σε μία αρχική προσαρμοστική απόκριση των μιτοχονδρίων (μιτοόρμηση) σε χαμηλές συγκεντρώσεις CSE. Πέρα από τις αλλοιώσεις στη μιτοχονδριακή μορφολογία και λειτουργία σε επιθηλιακά κύτταρα πνευμόνων, μελέτες αναφέρουν επιβλαβή αποτελέσματα από τον καπνό του τσιγάρου και σε άλλους τύπους κυττάρων των αεραγωγών, συμπεριλαμβανομένου των λείων μυϊκών κυττάρων και των ινοβλαστών (Wiegman et al., 2015). Συμπερασματικά, η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία εκτείνεται σε ένα ευρύ φάσμα κυττάρων του τοιχώματος των αεραγωγών και του πνευμονικού παρεγχύματος.

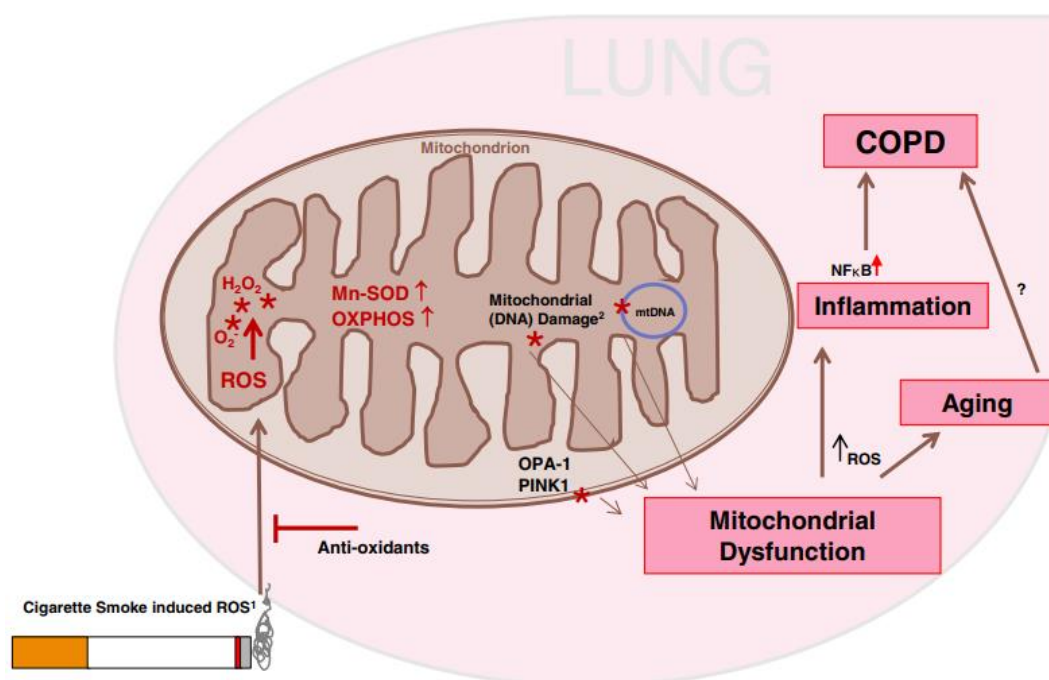
1.5.3 Αλλαγές στη βιογένεση και τη μιτοφαγία

Δεδομένου ότι η μιτοχονδριακή λειτουργία και η σύσταση (αριθμός αντιγράφων mtDNA) επηρεάζονται σημαντικά στα επιθηλιακά κύτταρα των αεραγωγών από την έκθεση σε παράγοντες κινδύνου της νόσου, είναι λογικό και τα μονοπάτια που ελέγχουν τη μιτοχονδριακή βιογένεση και μιτοφαγία να επηρεάζονται σε αυτούς τους κυτταρικούς τύπους σε ασθενείς με ΧΑΠ. Σε κυτταρικές σειρές επιθηλιακών κυττάρων του πνεύμονα ποντικών (MLE12 και pmA11) που χορηγήθηκε CSE, παρατηρήθηκε υπεрсύντηξη των μιτοχονδρίων και υπερέκφραση των Opa1 και Mfn2, με τη δράση της τελευταίας να οφείλεται στην αύξηση της έκφρασης της PGC-1α (Ballweg et al., 2014). Η μιτοχονδριακή σύντηξη είναι ένα συχνό φαινόμενο στα μιτοχόνδρια όταν εκτίθενται σε συνθήκες ήπιου στρες, ως μία αρχική απόκριση για την προσαρμογή των οργανιδίων, ενώ η σχάση επιταχύνει την κυτταρική νεκρόπτωση και σχετίζεται με την απόπτωση και τη μιτοφαγία (Jiang et al., 2017). Μία χρόνια έκθεση των ασθενών με ΧΑΠ στον καπνό του τσιγάρου επάγει την έκφραση των πρωτεϊνών που σχετίζονται με την σχάση (Fis1, Ddp1) μειώνοντας τα επίπεδα των πρωτεϊνών που συμμετέχουν

στη σύντηξη, όπως παρατηρήθηκε σε επιθηλιακά και λεία μυϊκά κύτταρα των αεραγωγών, υποδεικνύοντας ότι οι ROS συνεισφέρουν στη μιτοχονδριακή σχάση.

Όταν τα κατακερματισμένα μιτοχόνδρια καθίστανται ανίκανα να επιστρέψουν στη λειτουργική δεξαμενή των μιτοχονδρίων, λαμβάνει χώρα η μιτοφαγία ως ένας προστατευτικός μηχανισμός με την κινάση PINK1 να εκκινεί τη διαδικασία. Σε περιπτώσεις που η ασθένεια προκαλείται από το κάπνισμα, υπάρχει μία ανισορροπία της πρωτεϊνικής ομοιόστασης στα μιτοχόνδρια (επίδραση στη λειτουργία του πρωτεασώματος), με αποτέλεσμα τη συσσώρευση ουβικιτινυλιωμένων πρωτεϊνών, που με τη σειρά του προωθεί τη συσσώρευση της PINK (παρουσιάζει αυξημένη έκφραση όταν χορηγείται CSE σε καλλιέργειες επιθηλιακών κυττάρων) και τη μιτοφαγία (Mizumura et al., 2014).

Έτσι, μέσα σε αυτό το σύνθετο πλαίσιο παθογένεσης της ασθένειας, γίνεται σαφές ότι η αλλαγμένη μιτοχονδριακή δομή και λειτουργία μπορεί να συμβεί ως απόκριση στην πρόοδο της νόσου και αντιστρόφως να επηρεάσει κυτταρικές διαδικασίες που εμπλέκονται σε αυτή (Εικόνα 10).

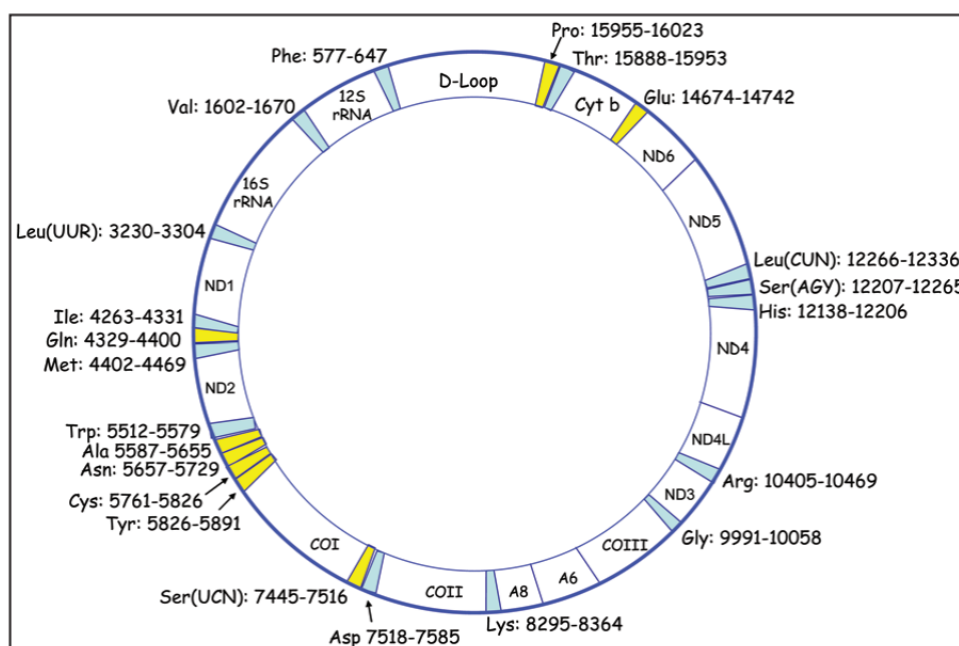


Εικόνα 10: Προτεινόμενο μοντέλο της επίδρασης των **μιτοχονδριακών αλλαγών** που επάγονται από οξειδωτικά μόρια στην παθογένεση της ΧΑΠ. Ο καπνός του τσιγάρου έχει την ικανότητα να επάγει την παραγωγή των ROS ενδοκυτταρικά από τα μιτοχόνδρια. Οι ROS επιδρούν στο μιτοχονδριακό DNA, τα μεμβρανικά λιπίδια και πρωτεΐνες, συμπεριλαμβανομένου των πρωτεϊνών σχάσης/σύντηξης (π.χ. OPA-1) και της PINK1, ρυθμιστή της μιτοφαγίας, και προκαλούν την οξειδωτική τροποποίηση ή παρεμπόδιση του συστήματος της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Υπό συνθήκες συνεχούς μιτοχονδριακής βλάβης ή οξειδωτικού στρες που υπερβαίνει την αντιοξειδωτική απόκριση, προκύπτει η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία. Τελικά, αυτή μπορεί να επάγει την φλεγμονή, την πρόωρη γήρανση, και μέσω αυτών την εμφάνιση της ασθένειας (Hoffmann et al., 2013).

1.6. ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΩΝ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΩΝ

1.6.1 Μιτοχονδριακό γονιδίωμα

Το μιτοχονδριακό γονιδίωμα είναι ένα συμπαγές, κλειστό κυκλικό, δίκλωνο μόριο, που αποτελείται από 16.569 ζεύγη βάσεων σε μήκος και εντοπίζεται στη μιτοχονδριακή μήτρα σε πολλαπλά αντίγραφα (Εικόνα 11). Κωδικοποιεί για 37 γονίδια, εκ των οποίων τα 13 κωδικοποιούν για συστατικά των συμπλόκων I, III, IV και V της αναπνευστικής αλυσίδας με τα ολοένζυμα να δημιουργούνται με την είσοδο στα μιτοχόνδρια των υπόλοιπων ~70 υπομονάδων πυρηνικής προέλευσης, τα 2 για μιτοχονδριακά RNAs (mt-rRNAs, 12S και 16S) και τα εναπομείναντα 22 για τα μιτοχονδριακά tRNA γονίδια (mt-tRNAs) (Lightowers et al., 2015). Έτσι, το σύστημα της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης βρίσκεται υπό τον διπλό γενετικό έλεγχο του πυρηνικού αλλά και του μιτοχονδριακού γονιδιώματος. Η πλειοψηφία των μιτοχονδριακών πρωτεϊνών κωδικοποιείται από στοιχεία του πυρήνα και κατόπιν εισάγεται στα μιτοχόνδρια (Zifa et al., 2007). Το γονιδίωμα διαθέτει δύο κλώνους. Ο ένας είναι πλούσιος σε γουανίνη (Heavy Strand) και ο άλλος πλούσιος σε κυτοσίνη (Light Strand) (Yarham et al., 2010). Το μιτοχονδριακό DNA παρουσιάζει υψηλή οργάνωση με δύο μόνο μη κωδικές περιοχές, τη περιοχή του βρόγχου D (D-Loop), που περιέχει τους υποκινητές για τη μεταγραφή των δύο κλώνων, και τη περιοχή έναρξης αντιγραφής της ελαφριάς αλυσίδας. Χαρακτηριστικό, επίσης, αποτελεί η απουσία ιντρονίων.



Εικόνα 11: Ο χάρτης του μιτοχονδριακού γονιδιώματος. Τα tRNAs διατάσσονται είτε μεμονωμένα είτε σε μικρές συστάδες κατά μήκος του κυκλικού μορίου DNA. Τα mt-tRNAs

που προκύπτουν από την μεταγραφή της βαριάς αλυσίδας (H κλώνος) απεικονίζονται με μπλε χρώμα, ενώ αυτά που προκύπτουν από τη μεταγραφή της ελαφριάς (L κλώνος) απεικονίζονται με κίτρινο (Zifa et al., 2007).

Κατά τη μεταγραφή, γίνεται η επεξεργασία του κάθε κλώνου σαν ένα ενιαίο μετάγραφο με τα μιτοχονδριακά tRNA γονίδια να «υπογραμμίζουν» την αρχή και το τέλος των γονιδίων που εκφράζονται. Η μοναδική δευτεροταγής δομή αυτών των γονιδίων σχηματίζει περιοχές που προορίζονται για ενδονουκλεολυτική διάσπαση, απελευθερώνοντας έτσι μεμονωμένα τα μετάγραφα κάθε γονιδίου. Μόλις συμβεί η μεταγραφή, τα 14 mt-tRNAs της ελαφριάς αλυσίδας και τα 8 της βαριάς απελευθερώνονται στη μήτρα (Yarham et al., 2010).

Χρειάζονται 22 tRNA για την μετάφραση των μιτοχονδριακών mRNA. Αυτό εξηγείται από το ότι τα στερεοχημικά κριτήρια για το ζευγάρισμα μεταξύ των βάσεων στη τρίτη θέση του κωδικονίου του mRNA και του αντικωδικονίου του tRNA δεν είναι τόσο περιοριστικά όσο για τις δύο πρώτες θέσεις, δεδομένου ότι η U μπορεί να ζευγαρώσει με οποιαδήποτε βάση στην τρίτη θέση επιτρέποντας ένα μόριο mt-tRNA να αναγνωρίσει τέσσερα διαφορετικά κωδικόνια, γνωστό ως υπόθεση της ταλάντευσης ή αστάθειας, όπως και από το ότι ορισμένα κωδικόνια καθορίζουν διαφορετικά αμινοξέα στον γενετικό κώδικα των μιτοχονδρίων.

1.6.2 Μεταλλάξεις στο μιτοχονδριακό DNA

Ο βαθμός μεταλλάξεων του μιτοχονδριακού DNA είναι υψηλότερος (10-17 φορές) σε σύγκριση με το πυρηνικό, πιθανώς λόγω της εγγύτητας του πρώτου στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων, της παραγωγής μεταλλαξιγόνων ελεύθερων ριζών και της έλλειψης μη κωδικοποιούντων μορίων mtDNA. Επιπλέον, το ένζυμο αντιγραφής του μιτοχονδριακού DNA η πολυμεράση γ παρουσιάζει πολύ υψηλότερο βαθμό σφάλματος (~1 στις 6.000) σε σύγκριση με την DNA πολυμεράση α (~1 στις 30.000 βάσεις). Αν και το mtDNA επιδιορθώνεται μέσω ενός μηχανισμού επιδιόρθωσης με εκτομή βάσης (base excision repair), η αποτελεσματικότητά του ποικίλλει ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο (Yarham et al., 2010). Το πυρηνικό DNA επιδιορθώνεται καλύτερα συγκριτικά με το μιτοχονδριακό λόγω μιας ευρύτερης ποικιλίας επιδιορθωτικών μηχανισμών. Αυτές οι μεταλλάξεις μπορούν έτσι να συσσωρευθούν μέσω κλωνικής επέκτασης, που πιθανώς οφείλεται σε κάποιο γεγονός τυχαίας γενετικής παρέκκλισης (Zhang et al., 2018). Η ετεροπλάσμια, με την παρουσία περισσότερων του ενός γονοτύπου σε ένα κύτταρο λόγω των πολλαπλών

μιτοχονδριακών γενετικών αντιγράφων συσχετίζεται με μιτοχονδριακές ασθένειες (Yarham et al., 2010). Αν και υπάρχει πιθανότητα εμφάνισής της σε φυσιολογικά, υγιή κύτταρα (<1%), εξαιτίας του υψηλού βαθμού μεταλλαξιγένεσης, θεωρείται κλινικά ασήμαντη, και τα κύτταρα αναφέρονται ως ομοπλασμικά. Αν και έχουν ταυτοποιηθεί κάποιες παθογενείς, ομοπλασμικές μεταλλάξεις σε μιτοχονδριακά tRNA γονίδια, οι μεταλλάξεις του mtDNA είναι κυρίως ετεροπλασμικές, προκαλώντας την εμφάνιση ασθένειας μόνο όταν ξεπεραστεί ένας ουδός (threshold) των μεταλλαγμένων αντιγράφων μέσα στο κύτταρο. Τα επίπεδα του ουδού διαφέρουν ανάμεσα στους ιστούς και στα άτομα, αλλά συχνά κυμαίνονται από 70 έως 90% των μορίων mtDNA (Abbott et al., 2014). Εάν ένας επαρκής αριθμός κυττάρων σε ένα δεδομένο ιστό επηρεάζεται, τότε εκδηλώνεται ο παθολογικός φαινότυπος.

Έχουν βρεθεί περισσότερες από 200 μεταλλάξεις στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα που σχετίζονται με ασθένειες με τις περισσότερες από αυτές να εντοπίζονται σε μιτοχονδριακά tRNA γονίδια παρά του ότι συνιστούν το 10% το μιτοχονδριακού γονιδιώματος. Το γεγονός αυτό επισημαίνει τον κύριο ρόλο των tRNAs στην σύνθεση πρωτεϊνών που εμπλέκονται στον ενεργειακό μεταβολισμό των κυττάρων (Zifa et al., 2007). Οι μεταλλάξεις αυτές μπορούν να προκαλέσουν τη δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων επιφέροντας αλλαγές στον μηχανισμό της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Οι περισσότερες μεταλλάξεις του μιτοχονδριακού DNA περιλαμβάνουν μεγάλης κλίμακας ανακατατάξεις (συνήθως ελλείψεις) ή σημειακές μεταλλάξεις (κυρίως μεταπτώσεις), με τον τύπο της μετάλλαξης που συμβαίνει να παρουσιάζει εξειδίκευση για κάθε ιστό. Οι ομοπλασμικές μιτοχονδριακές μεταλλάξεις κληρονομούνται σε όλους τους απογόνους, αλλά δεν εμφανίζουν όλοι παθολογικό φαινότυπο. Αυτό υποδεικνύει την επίδραση τόσο περιβαλλοντικών όσο και γενετικών πυρηνικών παραγόντων στην εμφάνιση της ασθένειας, φανερώνοντας την πολύπλοκη φύση της αλληλεπίδρασης πυρηνικού-μιτοχονδριακού γονιδιώματος. Η κληρονόμηση των ετεροπλασμικών μεταλλάξεων είναι ακόμη πιο περίπλοκη, με την αναλογία μεταλλαγμένων:αγρίου τύπου μορίων mtDNA και την δράση των προαναφερθέντων παραγόντων να καθορίζουν το τελικό φαινοτυπικό αποτέλεσμα (Zifa et al., 2007).

1.6.3 Μεταλλάξεις στα μιτοχονδριακά tRNA γονίδια

Οι μεταλλάξεις των μιτοχονδριακών tRNA γονιδίων παρουσιάζουν τεράστιο ενδιαφέρον λόγω της συσχέτισης διαφόρων σημειακών μεταλλάξεων σε αυτά με ποικίλες ασθένειες. Σε μοριακό επίπεδο μπορούν να επηρεάσουν διαδικασίες όπως η μιτοχονδριακή πρωτεϊνοσύνθεση, η ενεργοποίηση της αμινοακυλίωσης, της σύνδεσης δηλαδή ενός αμινοξέος με ένα μόριο tRNA, η αναγνώριση κωδικονίων καθώς και η τρισδιάστατη δομή και αναδίπλωση των μορίων tRNA εντός των μιτοχονδρίων (Abbott et al., 2014). Η δομή των μιτοχονδριακών tRNAs διαφέρει από τα κυτταροπλασματικά, όσον αφορά κάποιες παρεκκλίσεις στο μέγεθος των βραχιόνων και των βρόγχων, αλλά σε γενικές γραμμές διατηρεί το σχήμα τριφυλλίου (Yarham et al., 2010). Προκειμένου να αναδιπλωθεί σωστά το μόριο και να είναι πλήρως λειτουργικό απαιτούνται μετα-μεταγραφικές τροποποιήσεις. Πολλές φορές σε αυτή τη διαδικασία το mt-tRNA μπορεί να αποκτήσει λάθος φορτίο ως συνέπεια συγκεκριμένων μεταλλάξεων με αποτέλεσμα την απώλεια ή το κέρδος λειτουργίας του (loss or gain of function). Επίσης, το αντικωδικόνιο είναι απαραίτητο για την αναγνώριση του κωδικονίου του mRNA και επακολούθως τη σωστή ενσωμάτωση αμινοξέος κατά τη μετάφραση. Λάθη σε αυτές τις τρεις βάσεις οδηγούν σε λανθασμένη ενσωμάτωση αμινοξέων και άρα στην παραγωγή μη λειτουργικών πρωτεϊνών. Αξιοσημείωτο χαρακτηριστικό αποτελεί η σχεδόν πλήρης απουσία μεταλλάξεων στην περιοχή του αντικωδικονίου, κάτι το οποίο φανερώνει τον θεμελιώδη ρόλο τους στην σύνθεση πρωτεϊνών και τις καταστρεπτικές επιπτώσεις που θα είχε η ύπαρξη μεταλλαγών, καθώς θα ήταν μη συμβατές με τη ζωή.

Διάφορα γονίδια που κωδικοποιούν για tRNA αποτελούν «hot spots» για πολυμορφικές μεταλλάξεις, ενώ άλλα για παθογενείς (Εικόνα 12) (Zifa et al., 2007). Έχουν βρεθεί 243 μεταλλάξεις σε tRNA γονίδια που πρόκειται για πολυμορφισμούς, δηλαδή ουδέτερες μεταλλάξεις που βρίσκονται σε όλα τα tRNA γονίδια, δεν έχουν κάποια επίδραση στην δομική και λειτουργική ακεραιότητα των mt-tRNAs και αποτελούν αντικαταστάσεις ενός μόνο νουκλεοτιδίου συνεισφέροντας στην ποικιλομορφία των πληθυσμών. Οι παθογενείς μεταλλάξεις ανέρχονται στις 139 και εντοπίζονται στο σύνολο των tRNA γονιδίων με εξαίρεση το tRNA^{Arg}. Οι περισσότερες παθογενείς μεταλλάξεις συμβαίνουν σε υψηλά συντηρημένες περιοχές, ενώ οι πλειοψηφία των πολυμορφικών επηρεάζουν μη συντηρημένα νουκλεοτίδια. Ωστόσο, η θέση που υπάρχει μία μετάλλαξη δεν αποτελεί κριτήριο για το εάν σχετίζεται με παθολογικό φαινόμενο καθώς ορισμένες παθογενείς μεταλλάξεις εντοπίζονται σε όχι

τόσο συντηρημένες θέσεις (Zifa et al., 2007). Τέλος, οι μεταλλάξεις σε tRNA μόρια έχουν παρατηρηθεί μόνο στα μιτοχondριακά tRNA υποδεικνύοντας ότι οι ασθένειες που σχετίζονται με tRNAs είναι στενά συνδεδεμένες με τη βιολογία των μιτοχondρίων (Abbott et al., 2014).

Παθογενείς και πολυμορφικές σημειακές μεταλλάξεις στα μιτοχondριακά tRNA γονίδια του ανθρώπου			
	tRNA	Παθογενείς μεταλλάξεις	Πολυμορφικές μεταλλάξεις
1	tRNA ^{Leu} (UUR)	28	7
2	tRNA ^{Lys}	14	9
3	tRNA ^{Ile}	14	7
4	tRNA ^{Leu} (CUN)	10	11
5	tRNA ^{Thr}	8	29
6	tRNA ^{Ser} (UCN)	7	10
7	tRNA ^{Phe}	7	10
8	tRNA ^{Val}	6	10
9	tRNA ^{Trp}	6	13
10	tRNA ^{Gly}	5	12
11	tRNA ^{Tyr}	4	7
12	tRNA ^{Pro}	4	9
13	tRNA ^{Asn}	4	7
14	tRNA ^{Gln}	3	15
15	tRNA ^{His}	3	11
16	tRNA ^{Met}	3	6
17	tRNA ^{Ala}	3	11
18	tRNA ^{Ser} (AGY)	3	13
19	tRNA ^{Glu}	3	9
20	tRNA ^{Cys}	2	16
21	tRNA ^{Asp}	2	11
22	tRNA ^{Arg}	0	9
	Total	139	243

Εικόνα 12 : Λίστα των μεταλλάξεων των μιτοχondριακών tRNA γονιδίων (Zifa et al., 2007).

1.6.4 Συσχέτιση μιτοχondριακών μεταλλάξεων με ασθένειες

Όταν για πρώτη φορά, το 1990, μια μιτοχondριακή νόσος, το σύνδρομο MELAS (Μιτοχondριακή εγκεφαλομυοπάθεια, Γαλακτική οξέωση με επεισόδια τύπου εγκεφαλικού επεισοδίου) συσχετίστηκε με μία σημειακή μετάλλαξη στο γονίδιο της λευκίνης (mt-tRNA^{Leu}) τέθηκαν οι βάσεις για τη διερεύνηση της συσχέτισης της βιολογίας των μιτοχondρίων με διάφορες ασθένειες. Ιστοί που καταναλώνουν υψηλά επίπεδα ενέργειας, όπως οι πνεύμονες, μπορούν να επηρεαστούν από μιτοχondριακά ελαττώματα μιας και τα μιτοχόνδρια αποτελούν τις βασικές περιοχές κατανάλωσης οξυγόνου στον πνεύμονα (Daniil et al., 2018). Ωστόσο, τα δεδομένα που αφορούν το νουκλεοτιδικό μοτίβο των μιτοχondριακών tRNAs στις πνευμονικές νόσους είναι περιορισμένα.

Μία πληθώρα στοιχείων συνδέει τη μιτοχονδριακή δυσλειτουργία με πνευμονικές νόσους. Διάφορες έρευνες (μελέτες ασθενών – μαρτύρων) σε ομάδες ασθενών που πάσχουν από άσθμα, ιδιοπαθή πνευμονική ίνωση (IPF) και σαρκοείδωση επιβεβαιώνουν τη ύπαρξη αρκετών μιτοχονδριακών μεταλλάξεων στο γονιδιώμά τους. Οι ασθένειες αυτές μοιράζονται ένα κοινό στοιχείο- την παρουσία οξειδωτικού στρες που οδηγεί σε μια απορρύθμιση φλεγμονωδών μηχανισμών και συσχετίζεται με τη μιτοχονδριακή δυσλειτουργία (Daniil et al., 2018; Zifa et al., 2012). Συγκεκριμένα, ύστερα από ανάλυση των αλληλουχιών των 22 mt-tRNA γονιδίων και ενδιάμεσων περιοχών τους, σε ένα πολύ μεγάλο ποσοστό ασθενών (38/40 ή 95% με ιδιοπαθή πνευμονική ίνωση και 69/85 ή 89% με σαρκοείδωση) βρέθηκε αρκετά μεγάλος αριθμός μεταλλάξεων (32 και 45 αντίστοιχα), με την συχνότητα ορισμένων εκ των οποίων να παρουσιάζεται αρκετά αυξημένη στους πάσχοντες συγκριτικά με τους υγιείς. Μάλιστα, για την ανίχνευση παθογενών μεταλλάξεων, διερευνήθηκε εάν ορισμένοι συνδυασμοί μεταλλάξεων στους ασθενείς εκφράζονταν σε στατιστικώς σημαντικά επίπεδα και παρατηρήθηκαν 5 και 8 μεταλλάξεις εκφραζόμενες αποκλειστικά στους ασθενείς με IPF και σαρκοείδωση, αντιστοίχως (Daniil et al., 2018). Όσον αφορά τους ασθματικούς ασθενείς, ένα σχετικά μεγάλο ποσοστό αυτών (56/76 ή 73%) παρουσίασαν μεταλλάξεις (10), με 4 εκ των οποίων να εμφανίζονται μόνο στους πάσχοντες (Zifa et al., 2012). Η ανίχνευση μεγάλου ποσοστού μεταλλάξεων στις συγκεκριμένες περιοχές του μιτοχονδριακού γονιδιώματος με αυξημένη συχνότητα και στις τρεις ομάδες ασθενών που πάσχουν από πνευμονικές νόσους, πιθανότητα υποδηλώνει την ύπαρξη ενός μηχανισμού παθογένειας των ασθενειών που διαμεσολαβείται από τα μιτοχόνδρια.

Οι μεταλλάξεις του mtDNA, με την αναλογία φυσιολογικών:μεταλλαγμένων μορίων να ξεπερνά ένα συγκεκριμένο κατώφλι, μπορούν να δρουν ως παράγοντες που τροποποιούν την κλινική εκδήλωση μιας ασθένειας. Είναι, λοιπόν, δύσκολη η δημιουργία μιας άμεσης σύνδεσης μεταξύ των μεταλλαγμάτων του μιτοχονδριακού γονιδιώματος με τα παθοφυσιολογικά χαρακτηριστικά μιας ασθένειας λόγω της γενετικής ετερογένειας των μιτοχονδρίων, της πλειοτροπικής φύσης της μιτοχονδριακής δυσλειτουργίας στο σύνολο της παθολογίας, και της έλλειψης γνώσεων σχετικά με παραλλαγές του μιτοχονδριακού γονιδιώματος, αν και η λίστα των διαφορετικών μεταλλάξεων του mtDNA που συσχετίζονται με ασθένειες συνεχώς μεγαλώνει. Ωστόσο, τα μιτοχόνδρια θα μπορούσαν να αποτελέσουν ένα πιθανό θεραπευτικό στόχο για την αντιμετώπιση ασθενειών που περιλαμβάνουν χρόνιες

φλεγμονώδεις καταστάσεις, με διάφορες μιτοχονδριακές μεταλλάξεις να διερευνώνται ως πιθανοί διαγνωστικοί δείκτες (Orekhov et al., 2020). Χρειάζεται να διεξαχθούν μελλοντικές έρευνες για την περαιτέρω κατανόηση των μηχανισμών με τους οποίους τα μιτοχόνδρια εμπλέκονται στις παθολογικές αυτές διαδικασίες.

1.7 ΣΚΟΠΟΣ

Η Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια (ΧΑΠ) αντιπροσωπεύει ένα παγκόσμιο πρόβλημα υγείας πλήττοντας την καθημερινότητα πολλών ανθρώπων. Η διατήρηση της φυσιολογικής πνευμονικής λειτουργίας επιτυγχάνεται μέσω της διασφάλισης μιας λεπτής ισορροπίας ανάμεσα στην τοξικότητα των οξειδωτικών μορίων και την προστατευτική δράση των ενδοκυτταρικών και εξωκυτταρικών συστημάτων άμυνας. Μία απορρύθμιση αυτής της οξειδοαναγωγικής ομοιόστασης οδηγεί στο οξειδωτικό στρες, ένα από τα βασικότερα χαρακτηριστικά παθογένειας της ΧΑΠ. Σε ασθενείς με ΧΑΠ παρατηρείται μία υπερσυσσώρευση των ROS σε μία ποικιλία κυτταρικών τύπων που απαρτίζουν τους πνεύμονες. Τα μιτοχόνδρια συνιστούν μία κύρια πηγή παραγωγής τους, ενώ ταυτόχρονα οι ROS μπορούν να επιδράσουν στα συστατικά αυτών των οργανιδίων. Πνευμονικές παθήσεις, όπως η IPF και η σαρκοείδωση, χαρακτηρίζονται από μιτοχονδριακή δυσλειτουργία με τους ασθενείς να εμφανίζουν αυξημένη συχνότητα μεταλλάξεων στις περιοχές των mt-tRNA γονιδίων. Αδιαμφισβήτητα, η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία είναι εμφανής και στη ΧΑΠ με τα στοιχεία που το επιβεβαιώνουν να βασίζονται σε μελέτες σε ανθρώπους, σε ζωικά πρότυπα της νόσου όπως και σε *in vitro* μοντέλα. Ο χαρακτηρισμός περισσότερων από 200 μεταλλάξεων με αυξημένη συχνότητα στις περιοχές του μιτοχονδριακού γονιδιώματος που εδράζονται τα γονίδια που κωδικοποιούν για τα mt-tRNAs, επισημαίνει τη σημασία αυτών για τη μιτοχονδριακή λειτουργία. Έτσι, διεξάγονται έρευνες για τη συσχέτιση των διαφορών αυτών μεταλλαγμάτων με τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά ποικίλων ασθενειών. Κι αυτό γιατί μία συνδυασμένη ανίχνευση φαινοτύπου και γονοτύπου αυξάνει την ακρίβεια και αποτελεσματικότητα της διάγνωσης και παρακολούθησης σύνθετων διαταραχών, όπως η ΧΑΠ.

Στο πλαίσιο αυτό, σκοπός της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας είναι η ανίχνευση και ταυτοποίηση μεταλλάξεων στα μιτοχονδριακά tRNA γονίδια της ασπαραγίνης (tRNA^{Asn}), της κυστεΐνης (tRNA^{Cys}) και της τυροσίνης (tRNA^{Tyr}) σε 38

ασθενείς με χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια, λαμβάνοντας υπόψιν τον ρόλο των μιτοχονδρίων στην εμφάνιση και πρόοδο της ασθένειας καθώς και το πώς οι μεταλλάξεις στο mtDNA μπορούν να επηρεάσουν τη μιτοχονδριακή λειτουργία φανερώνοντας μία πιθανή συσχέτιση αυτών με τη ΧΑΠ.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

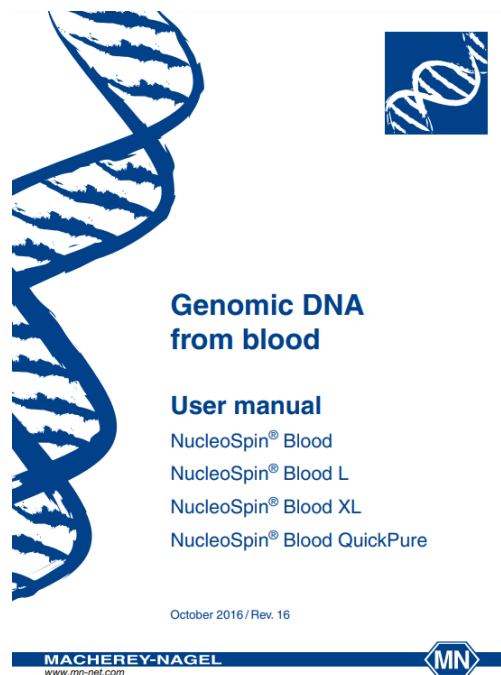
Στη συγκεκριμένη εργασία έγινε χρήση βιολογικού υλικού από δείγματα αίματος 38 ασθενών με ΧΑΠ, που προήλθαν από την Πνευμονολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας και αποθηκεύτηκαν στους -20°C έως την περαιτέρω επεξεργασία τους (Πίνακας 2). Εφαρμόστηκαν οι εξής πειραματικές τεχνικές: Απομόνωση DNA, Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR), η μέθοδος του Πολυμορφισμού Μονόκλωνης Διαμόρφωσης (SSCP), καθαρισμός των προϊόντων PCR, αλληλούχιση.

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 (M.O=68)	33/38 (86%)	8	15	5	4

Πίνακας 2: Χαρακτηριστικά των ασθενών.

2.1 Απομόνωση ολικού DNA από ολικό αίμα ασθενών με χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια (ΧΑΠ)

Το αρχικό βήμα της πειραματικής διαδικασίας περιλαμβάνει την απομόνωση του DNA από ολικό αίμα. Ακολουθήθηκαν οι οδηγίες ενός πρωτοκόλλου της εταιρίας 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 (Εικόνα 13). Το αίμα των ασθενών με ΧΑΠ που χρησιμοποιήθηκε, ήταν αποθηκευμένο σε ειδικούς σωλήνες που περιέχουν EDTA (αντιπηκτικό) ώστε να αποφευχθεί η δημιουργία θρόμβων.



Εικόνα 13 : Πρωτόκολλο απομόνωσης γενωμικού DNA από ολικό αίμα, MACHERY-NAGEL.

ΥΛΙΚΑ ΓΙΑ ΤΗ 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

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

- Proteinase K: Χρησιμοποιείται για την αποδιάταξη των πρωτεϊνών.
- Buffer B3: Περιέχει υποχλωριώδη γουανιδίνη (GuHCl) που δρα ως ισχυρός χαοτροπικός παράγοντας. Παρεμβαίνει στο δίκτυο δεσμών υδρογόνου σε υδατικά διαλύματα και έχει αποσταθεροποιητική επίδραση σε βιολογικά μακρομόρια.
- Buffer BW: Χρησιμοποιείται για την έκπλυση τμημάτων ιστού μετά από κάθε στάδιο επώασης, αφαιρεί αποτελεσματικά το προηγούμενο διάλυμα και προετοιμάζει τον ιστό για την εφαρμογή του επόμενου. Ειδικότερα, απομακρύνει νουκλεϊκά οξέα χαμηλού μοριακού βάρους.

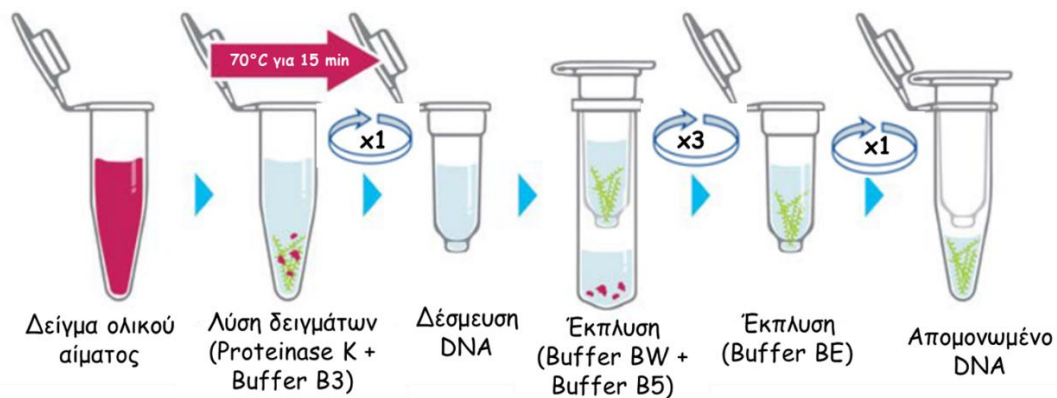
- Wash Buffer B5: Χρησιμοποιείται για την έκπλυση του προηγούμενου Buffer του BW, περιέχει αιθανόλη και όχι GuHCl όπως στην περίπτωση του BW.
- Buffer BE: Χρησιμοποιείται αρχικά για την απομάκρυνση των μη δεσμευμένων πρωτεϊνών και σε μεγαλύτερη συγκέντρωση για την αποδέσμευση του επιθυμητού μακρομορίου από τον συνδέτη.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Στο συγκεκριμένο πείραμα ακολουθήθηκαν τα παρακάτω βήματα για την απομόνωση του DNA από τα δείγματα αίματος (Εικόνα 14):

- Σε αρχικό στάδιο ξεπάγωσαν τα δείγματα ολικού αίματος που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα.
- Κατά της διάρκεια αυτής της αναμονής, δημιουργήθηκαν τα διαλύματα της Proteinase K και του Wash Buffer B5, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν στη συνέχεια. Για τη δημιουργία του διαλύματος της Proteinase K, προστέθηκαν 1,35 mL από το Proteinase Buffer σε 30mg Proteinase K, ενώ για τη δημιουργία του Wash Buffer B5 σε 12 mL αυτού, προστέθηκαν 48 mL 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.
- Έπειτα, προστέθηκαν στον ίδιο σωλήνα 200μL από το Buffer B3 και 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.
- Στη συνέχεια, 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 στη 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 με διάρκεια 1min 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 φυγοκέντρηση στα 11.000 rpm για 1 min και στο τέλος αφαιρέθηκε μόνο το υγρό που έμεινε στον πάτο του σωλήνα συλλογής.
- Οι στήλες τοποθετήθηκαν χωρίς την προσθήκη κάποιου διαλύματος, φυγοκεντρήθηκαν ξανά στα 11.000 rpm για 1min. Μετά το τέλος της φυγοκέντρησης, 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 τη χρήση του. Πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση 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.



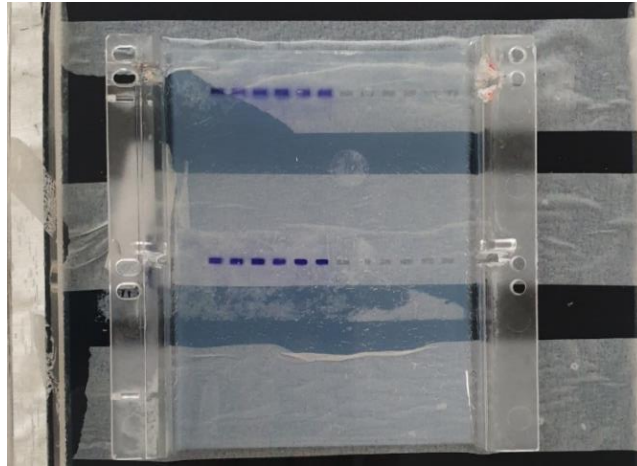
Εικόνα 14: Σχηματική αναπαράσταση των βημάτων που ακολουθήθηκαν για την απομόνωση DNA από δείγματα αίματος.

2.2 Ηλεκτροφόρηση απομονωμένων δειγμάτων DNA με χρήση πηκτής αγαρόζης (2%)

Η ηλεκτροφόρηση αποτελεί μία μέθοδο ανάλυσης και διαχωρισμού νουκλεϊκών οξέων και πρωτεϊνών βάσει μεγέθους και στηρίζεται στο ότι ένα μόριο με καθαρό φορτίο θα μετακινηθεί σε ηλεκτρικό πεδίο. Οι ηλεκτροφορητικοί διαχωρισμοί γίνονται σε πήγμα το οποίο λειτουργεί ως μοριακό κόσκινο βελτιώνοντας το διαχωρισμό. Όταν εφαρμοσθεί ηλεκτρική τάση στα άκρα του πορώδους υποστρώματος, τα μόρια που είναι μικρά συγκριτικά με τους πόρους του πηγματος κινούνται εύκολα μέσω αυτού, τα ενδιάμεσου μεγέθους κινούνται με ποικίλους βαθμούς ευκολίας, ενώ αυτά που είναι πολύ μεγαλύτερα είναι σχεδόν αμετακίνητα.

Η ηλεκτροφόρηση πηκτής αγαρόζης είναι μία αποτελεσματική διαδικασία διαχωρισμού θραυσμάτων DNA από 100bp έως και 25 kbp. Κατά τη δημιουργία 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 εφαρμόστηκαν τα ακόλουθα βήματα (Εικόνα 16) :

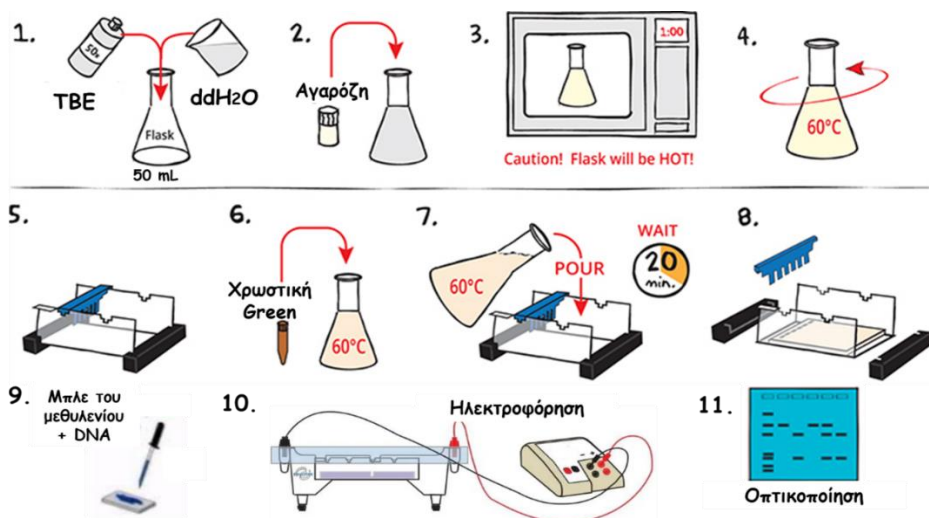
- Αρχικά, ζυγίστηκαν και μετρήθηκαν 1g σκόνης αγαρόζης και τοποθετήθηκαν σε κωνική φιάλη των 100mL.
- Στην κωνική φιάλη προστέθηκαν 50mL Tris/Βορικό οξύ/Αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ(EDTA) (TBE) 0,5X, το οποίο αποτελεί ένα ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει μείγμα βάσης Tris, βορικού οξέος και αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ και πραγματοποιήθηκε ελαφρά ανάδευση.
- Στη συνέχεια, για τη διαλυτοποίηση της αγαρόζης στο διάλυμα του TBE, η κωνική φιάλη τοποθετήθηκε σε φούρνο μικροκυμάτων για λίγα λεπτά.
- Αμέσως μετά το βράσιμο το διάλυμα αναδεύτηκε και παρατηρήθηκε στο φως για την επιβεβαίωση της διαλυτοποίησης της αγαρόζης.
- Προκειμένου να ελαττωθεί η θερμοκρασία της φιάλης, εφαρμόστηκε νερό στο εξωτερικό τοίχωμα της με ταυτόχρονη ανάδευση για ομοιόμορφο αποτέλεσμα στο διάλυμα.
- Μόλις η θερμοκρασία ήταν ανεκτή σε γυμνό χέρι, προστέθηκαν 4 mL της χρωστικής Green (χρησιμοποιείται για την οπτικοποίηση και την ποσοτικοποίηση δίκλωνου DNA σε γέλες ηλεκτροφόρησης) και ξανά εφαρμόστηκε ανάδευση.
- 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 15).



Εικόνα 15: Πηκτή αγαρόζης μέσα στη συσκευή της ηλεκτροφόρησης, βυθισμένη σε ρυθμιστικό διάλυμα TBE 0.5X.

Τα βήματα που ακολουθήθηκαν για τη διαδικασία του διαχωρισμού του DNA σε μία πηκτή αγαρόζης ήταν τα εξής:

- Τοποθετήθηκαν 5 μL απομονωμένου DNA αναμειγμένο με 3 μL της χρωστικής Methylene Blue στα πηγαδάκια της πηκτής, με στόχο την οπτικοποίηση. Όταν η χρωστική αυτή αναμειχθεί με νερό προκαλεί ένα μπλε χρώμα.
- Η πηκτή τοποθετήθηκε σε μία συσκευή που εφαρμόζει τάση στα δύο άκρα της, δημιουργώντας ηλεκτρικό πεδίο, με τέτοιο τρόπο ώστε τα πηγάδια να βρίσκονται πιο κοντά στον αρνητικό πόλο. Το DNA ως αρνητικά φορτισμένο μόριο με την εφαρμογή τάσης θα κινηθεί προς τον θετικό πόλο, δηλαδή στην άλλη άκρη της συσκευής.
- Τέλος, έγινε παρατήρηση των ζωνών σε ειδική συσκευή ακτινοβολίας UV.



Εικόνα 16: Η διαδικασία παρασκευής του πηκτώματος αγαρόζης και διαχωρισμού του DNA.

2.3 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης – PCR (Polymerase Chain Reaction)

Η PCR αποτελεί μία γρήγορη, επιλεκτική και ακριβή μέθοδο ενίσχυσης μικρών τμημάτων DNA με στόχο την ανάλυση πιθανών μεταλλάξεων και πολυμορφισμών σε μοριακό επίπεδο. Ως μία από τις σημαντικότερες ανακαλύψεις της επιστημονικής κοινότητας, από το 1985 βρίσκει εφαρμογές σε πολυάριθμα επιστημονικά πειράματα, αναβαθμίζοντας τον τρόπο μελέτης των νουκλεϊκών οξέων. Ο εφευρέτης αυτής της τεχνικής της είναι ο Karry Mullis, που βραβεύθηκε με Νόμπελ το 1993.

2.3.1 Η αρχή της μεθόδου

Το αρχικό βήμα για τον πολλαπλασιασμό μιας αλληλουχίας DNA με την τεχνική της PCR απαιτεί τη θέρμανση των δειγμάτων DNA ώστε να επιτευχθεί η αποδιάταξη των δίκλωνων τμημάτων και να προκύψουν δύο μονόκλωνα. Τα μονόκλωνα τμήματα DNA που προκύπτουν, λειτουργούν ως εκμαγεία για το θερμοανθεκτικό ένζυμο Taq πολυμεράση, που τα χρησιμοποιεί με σκοπό τη δημιουργία δύο συμπληρωματικών τμημάτων DNA. Έτσι, σχηματίζονται δύο δίκλινα μόρια DNA, αποτελούμενα το θα καθένα από έναν παλιό και έναν νεοσυντιθέμενο κλώνο. Η επανάληψη αυτής της διαδικασίας για 30-40 φορές οδηγεί στη δημιουργία πάνω από 1 δισεκατομμυρίων πιστών αντιγράφων του αρχικού αποδιαταγμένου τμήματος DNA.

Η ταχεία τεχνολογική εξέλιξη τις τελευταίες δεκαετίες έχει καταστήσει εφικτή την αυτοματοποίηση αυτής της μεθόδου και την ολοκλήρωση των σταδίων που εμπεριέχει μέσα σε διάστημα λίγων ωρών. Η συνεχής εναλλαγή της θερμοκρασίας στα διάφορα βήματα του κάθε κύκλου επιτυγχάνεται από τον θερμικό κυκλοποιητή (PCR Thermal Cycler), που επιτρέπει την αυξομείωση της θερμοκρασίας σε λίγα μόλις λεπτά ή και δευτερόλεπτα.

Στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) γίνεται χρήση ενός ζεύγους κατάλληλα σχεδιασμένων εκκινητών (primers) για να κατευθύνουν την επιμήκυνση του DNA προς το ένα και προς το άλλο άκρο της αλληλουχίας-στόχου. Το μήκος κυμαίνεται τυπικά μεταξύ 18 και 24 βάσεων και πρέπει να οριοθετούν την περιοχή που ενισχύεται, φέροντας συμπληρωματικές αλληλουχίες μόνο για τις συγκεκριμένες θέσεις ανοδικά και καθοδικά της αλληλουχίας. Για να αποφευχθεί μία μη επιλεκτική ενίσχυση τμημάτων DNA πάνω στο γονιδίωμα, πραγματοποιείται στοχευμένη

σχεδίαση των εκάστοτε εκκινήτων για την εξυπηρέτηση συγκεκριμένων σκοπών κάθε φορά.

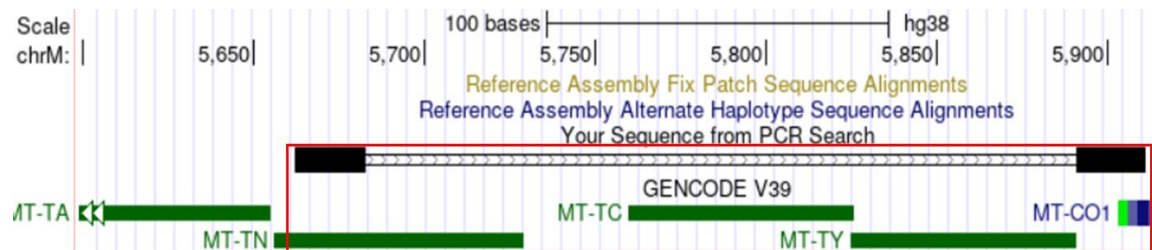
Χρειάζονται να λαμβάνονται υπόψιν ορισμένα κριτήρια κατά τον σχεδιασμό ενός ζεύγους εκκινήτων PCR (όπως οι T_a – annealing temperature και T_m – melting temperature). Τα ζευγάρια εκκινήτων θα πρέπει να έχουν παρόμοιες θερμοκρασίες τήξης αφού ο υβριδισμός κατά τη διάρκεια της PCR συμβαίνει και για τους δύο κλώνους ταυτόχρονα, και αυτή η κοινή θερμοκρασία τήξης δεν πρέπει να είναι ούτε ψηλότερη ούτε χαμηλότερη από τη θερμοκρασία υβριδισμού της αντίδρασης. Ένας εκκινήτης με T_m (θερμοκρασία τήξης) πολύ υψηλότερη από τη θερμοκρασία υβριδισμού της αντίδρασης μπορεί να μην υβριδοποιηθεί και να επεκταθεί σε εσφαλμένη θέση κατά μήκος της αλληλουχίας DNA. Μία θερμοκρασία τήξης σημαντικά χαμηλότερα από τη θερμοκρασία υβριδισμού μπορεί να εμποδίσει τον υβριδισμό και την επέκταση της αλληλουχίας.

Επιπλέον, η επιλογή των αλληλουχιών των εκκινήτων χρειάζεται να είναι μοναδική για μία περιοχή του γονιδιώματος, ώστε να αποφευχθεί η πιθανότητα υβριδισμού σε παρόμοιες γειτονικές θέσεις. Η αναζήτηση BLAST αποτελεί μία μέθοδο που χρησιμοποιείται ευρέως για την επιλογή μιας θέσης εκκινήτη, υποδεικνύοντας όλες τις πιθανές περιοχές στις οποίες υβριδίζει. Τόσο η αλληλουχία νουκλεοτιδίων όσο και ο ίδιος ο εκκινήτης μπορούν να αναζητηθούν με BLAST. Το δωρεάν εργαλείο NCBI Primer-BLAST συνδυάζει τον σχεδιασμό εκκινήτων και την αναζήτηση BLAST σε μία εφαρμογή. Βιοπληροφορικά εργαλεία όπως, προσομοιώσεις υπολογιστών θεωρητικών αποτελεσμάτων PCR (Electronic – In silico PCR) παρέχουν πληροφορίες για τις θερμοκρασίες τήξης και υβριδισμού των εκκινήτων, βοηθώντας τον σχεδιασμό τους.

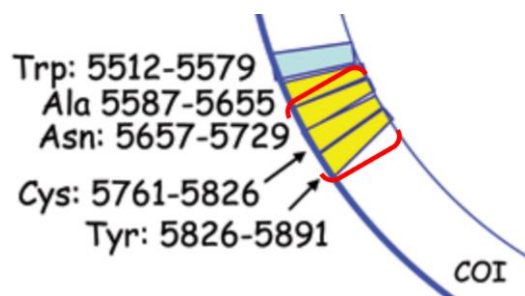
Η ενίσχυση που πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια της PCR σε τμήματα DNA δειγμάτων από ασθενείς με Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια (ΧΑΠ) είχε ένα ζεύγος εκκινήτων. Το ζεύγος FwACT-RevACT ενισχύει το τμήμα που κωδικοποιεί για τα γονίδια των $tRNA^{Asn}$, $tRNA^{Cys}$, $tRNA^{Tyr}$ (Εικόνα 18). Στον Πίνακα 3 αναφέρονται τα χαρακτηριστικά του ζεύγους εκκινήτων που χρησιμοποιήθηκε στην PCR, όπως και η αλληλουχία-στόχος που ενισχύθηκε και περιλαμβάνει τη συστάδα των γονιδίων των $tRNA^{Asn}$, $tRNA^{Cys}$, $tRNA^{Tyr}$ μαζί με τις ενδιάμεσες περιοχές τους (Εικόνα 17).

tRNAs	FW Primer 5'-3'	RV Primer 5'-3'	Νουκλεοτιδική θέση	Μήκος (bp)
Asn/Cys/Tyr	CAATGGGACTT AAACCCACAA (T _m 57°C)	GCGAACATCAG TGGGGGTGA (T _m 63°C)	(FW 5663–5683) & (RV 5911–5892)	249

Πίνακας 3 : Χαρακτηριστικά των εκκινήτων που χρησιμοποιήθηκαν.



Εικόνα 17 : Απεικόνιση του τμήματος του mtDNA που ενισχύθηκε από τους συγκεκριμένους primers στα κόκκινα πλαίσια μέσω του εργαλείου της UCSC In-Silico PCR (<http://genome.ucsc.edu>).



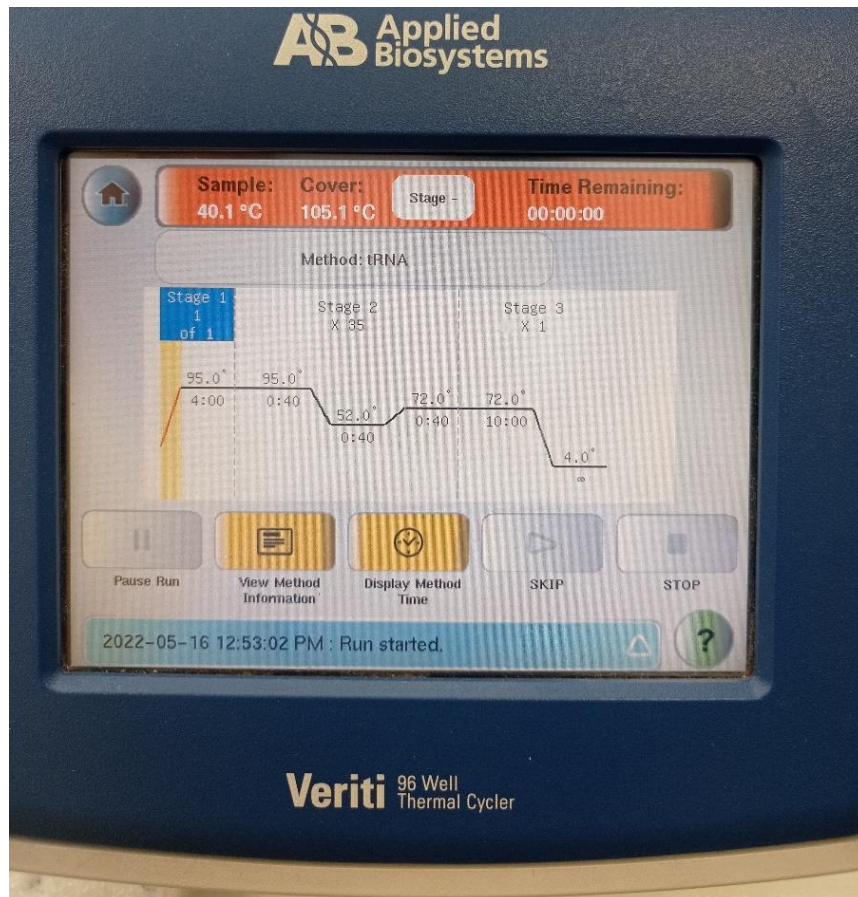
Εικόνα 18 : Απεικόνιση του τμήματος του mtDNA που ενισχύθηκε από τους συγκεκριμένους primers στις κόκκινες αγκύλες πάνω στο χάρτη του μιτοχονδριακού γονιδιώματος.

Για μία αντίδραση PCR σε τελικό όγκο 50μl χρησιμοποιήθηκαν τα εξής συστατικά:

DNA δείγμα	1μl
50pmol από τον κάθε primer	1 + 1 μl
10X PCR Buffer	5 μl
40 mM dNTPs	1 μl
25 mM MgCl ₂	1 μl
1U Taq πολυμεράση (5U/μl)	0,25 μl
ddH ₂ O έως τα 50 μl	39,75 μl

Στη συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία, η PCR πραγματοποιήθηκε για δείγματα όγκου 50 μl και περιλάμβανε τα ακόλουθα στάδια:

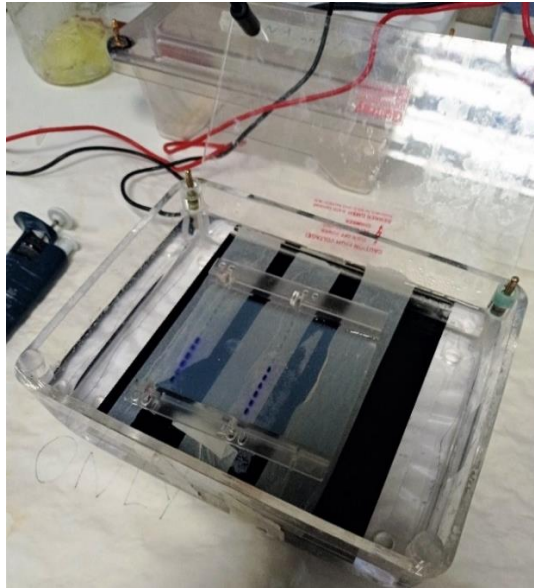
1. **Αρχικό στάδιο:** Η θερμοκρασία ανέρχεται στους 95°C και διατηρείται για 4 λεπτά.
 2. **Στάδιο αποδιάταξης:** Η θερμοκρασία ανέρχεται στους 95°C για 40 δευτερόλεπτα.
 3. **Στάδιο υβριδισμού:** Η θερμοκρασία μειώνεται στους 52°C για 40 δευτερόλεπτα με σκοπό να καταστεί δυνατή η υβριδοποίηση των εκκινητών 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 τη θερμοκρασία, επιμηκώνει τα τμήματα των εκκινητών σύμφωνα με την αρχή της συμπληρωματικότητας των βάσεων. Ο ρόλος των εκκινητών έγκειται στην χρησιμοποίησή τους από το συγκεκριμένο ένζυμο με σκοπό την πρόσδεση στην επιθυμητή αλληλουχία. Η Taq πολυμεράση έχει την ικανότητα να προσθέτει νουκλεοτίδια μόνο στο 3' άκρο ήδη υπάρχοντων νουκλεοτιδίων και όχι να δημιουργήσει μία αλληλουχία από την αρχή. Με αυτόν τον τρόπο η συμπληρωματική, ως προς τα μονόκλιωνα τμήματα DNA που προέκυψαν, αλληλουχία των εκκινητών διευκολύνει τη 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 το μηχάνημα.
- Τα στάδια 2-4 επαναλαμβάνονται για 35 κύκλους (Εικόνα 19).



Εικόνα 19: Αντίδραση PCR από την οθόνη του ειδικού μηχανήματος.

2.3.2 Ποιοτικός προσδιορισμός των PCR προϊόντων

Αφού ολοκληρώθηκε η αντίδραση της PCR πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση των προϊόντων σε πήκτωμα αγαρόζης 3% που βασίστηκε στο διαχωρισμό τμημάτων DNA ανάλογα με το μέγεθός τους (Εικόνα 20). Η μεγαλύτερη περιεκτικότητα της αγαρόζης στο διάλυμα χρησιμοποιείται για να επιτευχθεί καλύτερη διακριτική ικανότητα λόγω του μικρού μεγέθους των προϊόντων της PCR. Η παρασκευή του πηκτώματος καθώς και τα βήματα που εφαρμόστηκαν είναι ίδια με αυτά που προαναφέρθηκαν για την απομόνωση του DNA. Η διαδικασία έγινε παρουσία ενός μάρτυρα μοριακών μεγεθών τμημάτων DNA (DNA Ladder), καθώς είναι ο μόνος τρόπος για την απόδειξη ότι δεν ενισχύθηκαν μη ειδικά προϊόντα και ενός αρνητικού μάρτυρα (Negative control) για τον αποκλεισμό της πιθανότητας ύπαρξης επιμολύνσεων. Έπειτα, όσα δείγματα έδωσαν θετικό αποτέλεσμα χρησιμοποιήθηκαν στην εφαρμογή της μεθόδου SSCP για την ποιοτική ανάλυση πολυμορφισμών.



Εικόνα 20: Πηκτική αγαρόζης τοποθετημένη στην ειδική συσκευή πριν εφαρμοσθεί ηλεκτρική τάση.

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

Η ανακάλυψη της PCR έδωσε μεγάλη ώθηση στις μεθοδολογίες ανίχνευσης μεταλλαγών θέτοντας ως μοναδική προϋπόθεση για την μελέτη τυχόν μεταλλαγών τη γνώση της αλληλουχίας του τμήματος γονιδίου, προκειμένου να σχεδιαστούν κατάλληλοι primers και να πραγματοποιηθεί ο *in vitro* πολλαπλασιασμός. Σε περιπτώσεις που ένα γονίδιο έχει συσχετιστεί με κάποιο παθολογικό φαινόμενο χωρίς να είναι γνωστή η υπεύθυνη μεταλλαγή, σε ένα καινούριο γονίδιο που εξετάζεται ως πιθανό υποψήφιο για ένα νόσημα, σε μελέτες διερεύνησης της ποικιλομορφίας ενός πληθυσμού χρειάζεται να σαρωθεί όλο το γονίδιο ή το εξεταζόμενο τμήμα DNA για την ταυτοποίηση όλων των πιθανών μεταλλαγών.

Η μέθοδος SSCP αποτελεί μία απλή, γρήγορη και οικονομική διαδικασία με μεγάλη διακριτική ικανότητα με την οποία ανιχνεύονται εισαγωγές, διαγραφές ή ανακατατάξεις σε δείγματα DNA τα οποία έχουν ενισχυθεί με την τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) και έχουν ηλεκτροφορηθεί σε πηκτική πολυακρυλαμίδης. Η ηλεκτροφόρηση που πραγματοποιείται είναι κάθετη, ενώ η πηκτική πολυακρυλαμίδης προσδίδει στη διαδικασία μεγαλύτερη διαχωριστική ικανότητα συγκριτικά με αυτή της αγαρόζης.

Κατά τη διάρκεια της ηλεκτροφόρησης τα θραύσματα μονόκλωνου DNA αποκτούν μία τρισδιάστατη διαμόρφωση ανάλογα με την 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 πρόκειται για μόνο ένα νουκλεοτίδιο, θα υιοθετηθεί μία μοναδική ηλεκτροφορητική κινητικότητα. Η μέθοδος SSCP βασίζεται στην παρατήρηση ότι απουσία αποδιατακτικού μέσου, θραύσματα μονόκλωνου DNA υιοθετούν μοναδικές διαμορφώσεις που καθορίζονται από την πρωταρχική τους ακολουθία, της οποίας οι δομές σταθεροποιούνται από ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις. Επομένως, τμήματα DNA του ίδιου γονιδίου που έχουν παραχθεί με PCR, με υπόστρωμα mtDNA από διαφορετικά άτομα και που φέρουν μεταλλαγές σε διαφορετικές θέσεις, θα έχουν και διαφορετική κινητικότητα κατά την ηλεκτροφόρηση καθιστώντας δυνατή τη διάκρισή τους. Επίσης, τα δείγματα που εμφανίζουν ταυτόσημο πρότυπο μπορούν να ομαδοποιηθούν ώστε να πραγματοποιηθεί αλληλούχιση σε ένα μόνο από αυτά, μειώνοντας σημαντικά το κόστος της διαδικασίας.

Στο συγκεκριμένο πείραμα η διαδικασία ακολουθήθηκε τρεις φορές, ενώ κάθε φορά τοποθετούνταν στη συσκευή δύο πηκτές.

2.5 Χρώση πηκτώματος πολυακρυλαμιδίου με διάλυμα νιτρικού αργύρου

ΥΛΙΚΑ - ΟΡΓΑΝΑ ΓΙΑ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ

Κάθετη συσκευή

Αναδευτήρας οριζόντιος για τη χρώση των πηκτωμάτων

Δοχεία για την τοποθέτηση των πηκτωμάτων κατά τη χρώση

Ογκομετρικοί σωλήνες

Πιπέτες

Ποτήρια ζέσεως

Μαγνητικός αναδευτήρας και μαγνητάκια

Χαρτί διήθησης και χωνί για την διήθηση διαλυμάτων

Ζυγός

Φωτεινή οθόνη για την παρατήρηση των πηκτωμάτων

Μικροσωλήνες eppendorfs 0,5ml

Για την παρασκευή 2 πηκτών πολυακρυλαμιδίου 12% (Εικόνα 21) :

1. Ζυγίστηκαν σε ζυγαριά ακριβείας, 15 gr ακρυλαμιδίου και 0,38 δις – ακρυλαμιδίου.
2. Μετρήθηκαν σε Falcon των 50ml 6,4ml TBE 10X και 12,5 ml γλυκερόλης 50%
3. Τα παραπάνω υλικά αναμείχθηκαν και ανακατεύτηκαν σε ποτήρι ζέσεως με χρήση μαγνήτη έως ότου προέκυψε ένα διάλυμα.

4. Στην συνέχεια, το προκύπτον 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 ddH₂O μέχρι τα 130 mL.
6. Στο επόμενο βήμα προστέθηκαν στο διάλυμα 125ml Τετραμεθυλαιθυλενοδιαμίνη (TEMED ή TMEDA) και 750ml Υπερθειικό 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 TMEDA καταλύει τον σχηματισμό ελευθέρων 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.

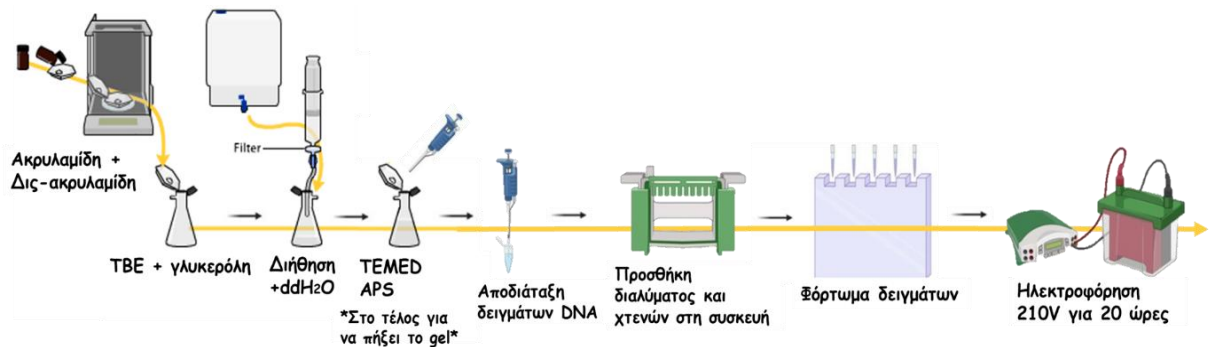
Πριν από το φόρτωμα των δειγμάτων στα πηγάδια της πηκτής πραγματοποιήθηκε αποδιάταξη των προϊόντων της PCR για 14 λεπτά. Πιο συγκεκριμένα, η αποδιάταξη πραγματοποιήθηκε με ανάμειξη 5 μl DNA και 10 μl αποδιατακτικού διαλύματος σε θερμικό κυκλοποιητή βάσει των παρακάτω βημάτων:

- 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 αν θερμανθεί έντονα αυτοδιασπάται.
- 20mM **EDTA**, το οποίο παρέχει ένα κατάλληλο χημικό περιβάλλον για τη δράση της DNA πολυμεράσης. Το ρυθμιστικό pH κυμαίνεται 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.
- Μόλις ολοκληρωθεί το πρόγραμμα, τα δείγματα τοποθετούνται σε πάγο, για να αποφευχθεί η επαναδιάταξη των μονόκλωνων μορίων DNA.
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 210V για 20 ώρες.



Εικόνα 21: Η διαδικασία παρασκευής πηκτωμάτων πολυακρυλαμιδίου.

2.5 Χρώση πηκτώματος πολυακρυλαμιδίου με διάλυμα νιτρικού αργύρου

Για την εμφάνιση των αποτελεσμάτων ηλεκτροφόρησης της πηκτής πολυακρυλαμιδίου, ακολούθησε χρώση και πλύσεις με τρία διαφορετικά διαλύματα με σκοπό την χρώση των πηκτωμάτων (Εικόνα 23). Οι ποσότητες των ουσιών που περιέχονται στα διαλύματα αναφέρονται παρακάτω και αντιστοιχούν στην χρώση δύο πηκτωμάτων.

1^ο Διάλυμα

- Προσθήκη 800ml ddH₂O, 20ml αιθανόλης 100% και 1ml οξικού οξέος σε ογκομετρικό κύλινδρο.
- Τοποθέτηση των πτωμάτων στον αναδευτήρα.
- Ανακίνηση του διαλύματος και η πρώτη πλύση με προσθήκη 200 ml του διαλύματος σε κάθε πήκτωμα.

- Απομάκρυνση του διαλείμματος μετά τα 3 λεπτά.
- Προσθήκη 200ml διαλύματος σε κάθε πήκτωμα για 3 λεπτά για μία δεύτερη πλύση και έπειτα απομάκρυνση του διαλύματος.
- Ακολούθησαν πλύσεις με ddH₂O για 1 λεπτό.

2^ο Διάλυμα

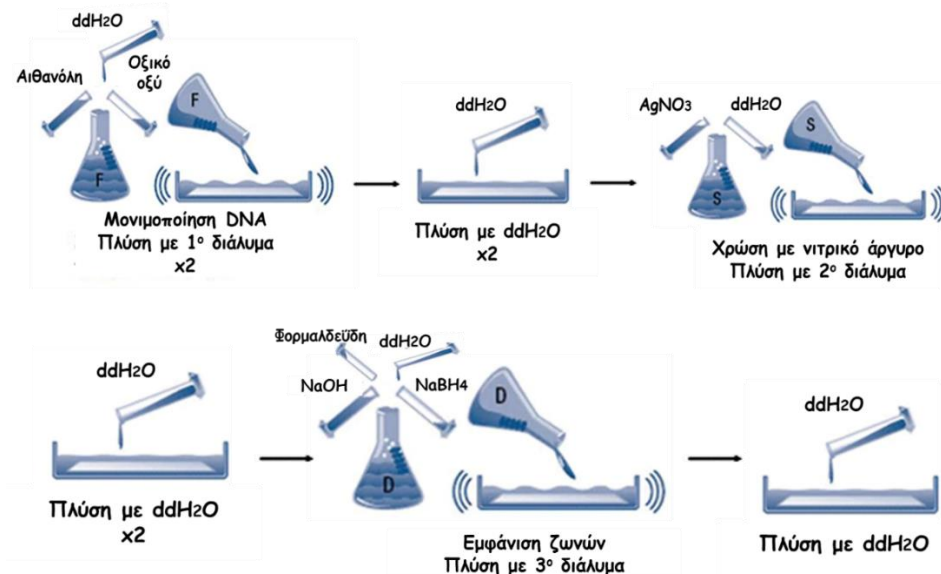
- Προσθήκη 400ml διαλύματος νιτρικού αργύρου σε ογκομετρικό κύλινδρο (0,4 g AgNO₃ σε 400 mL ddH₂O).
- Τοποθέτηση των πηκτωμάτων στον αναδευτήρα.
- Προσθήκη σε κάθε πήκτωμα από 200ml διαλύματος για 20 λεπτά.
- Ξέπλυμα των πηκτωμάτων δύο φορές με ddH₂O.

3^ο Διάλυμα

- Προσθήκη σε ποτήρι ζέσεως 6gr NaOH, 0, 02 gr NaBH₄, και συμπλήρωση με ddH₂O μέχρι ο τελικός όγκος του διαλύματος να φτάσει τα 400ml.
- Προσθήκη 200 ml διαλύματος σε κάθε πήκτωμα.
- Τοποθέτηση των πηκτωμάτων στον αναδευτήρα.
- Παραμονή των πηκτωμάτων στο διάλυμα μέχρι την εμφάνιση των ζωνών (Εικόνα 22).
- Απομάκρυνση του διαλύματος και πλύση με ddH₂O.



Εικόνα 22: Τοποθέτηση του πηκτώματος στον αναδευτήρα ύστερα από την προσθήκη του τρίτου διαλύματος έως την εμφάνιση των ζωνών.



Εικόνα 23: Σχηματική αναπαράσταση των βημάτων της χρώσης της πηκτής με διάλυμα νιτρικού αργύρου.

2.6 Καθαρισμός των προϊόντων PCR

Ύστερα από την παρατήρηση των πηκτωμάτων και την ομαδοποίηση των πιθανών προτύπων, είναι απαραίτητος ο καθαρισμός των προϊόντων PCR για την απομάκρυνση εκκινητών, συστατικών της αντίδρασης και παραπροϊόντων. Αφού επιλέχθηκαν και προετοιμάστηκαν τα επιθυμητά δείγματα στάλθηκαν μαζί με τα διαλύματα των primers σε εταιρεία για την ολοκλήρωση της διαδικασίας της αλληλούχισης.

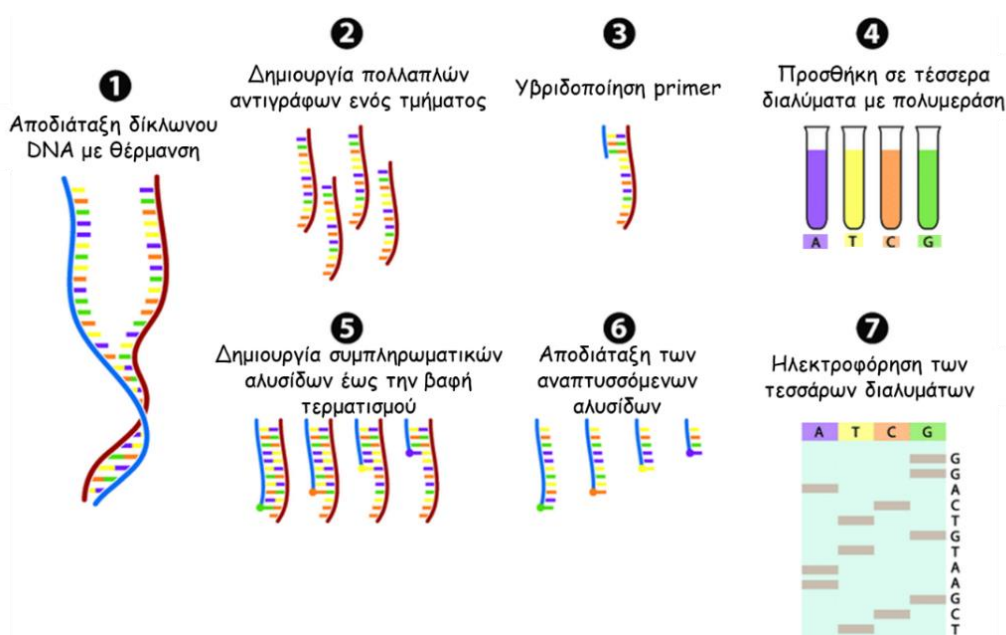
Τα αποτελέσματα αποστάλθηκαν υπό την μορφή χρωματογραφήματος και με τη χρήση κατάλληλων λογισμικών βιοπληροφορικής, όπως είναι το Bioedit που επιτρέπει την επεξεργασία και ανάλυση βιολογικών αλληλουχιών, πραγματοποιήθηκε η εξαγωγή της επιθυμητής νουκλεοτιδικής ακολουθίας.

2.7 Αλληλούχιση DNA

Η αλληλούχιση των νουκλεϊκών οξέων αποτελεί ένα σημαντικό εργαλείο στη βιολογική έρευνα. Υπάρχουν αρκετές γενιές τεχνολογιών αλληλούχισης DNA οι οποίες μπορούν να χαρακτηριστούν βάσει του έργου παραγωγής στους. Η αλληλούχιση κατά Sanger κυριάρχησε για 30 χρόνια και έθεσε τα θεμέλια για το Human Genome Project, ένα διεθνές επιστημονικό ερευνητικό πρόγραμμα με σκοπό τον προσδιορισμό των ζευγών βάσεων που συνθέτουν το ανθρώπινο DNA και τον εντοπισμό και τη

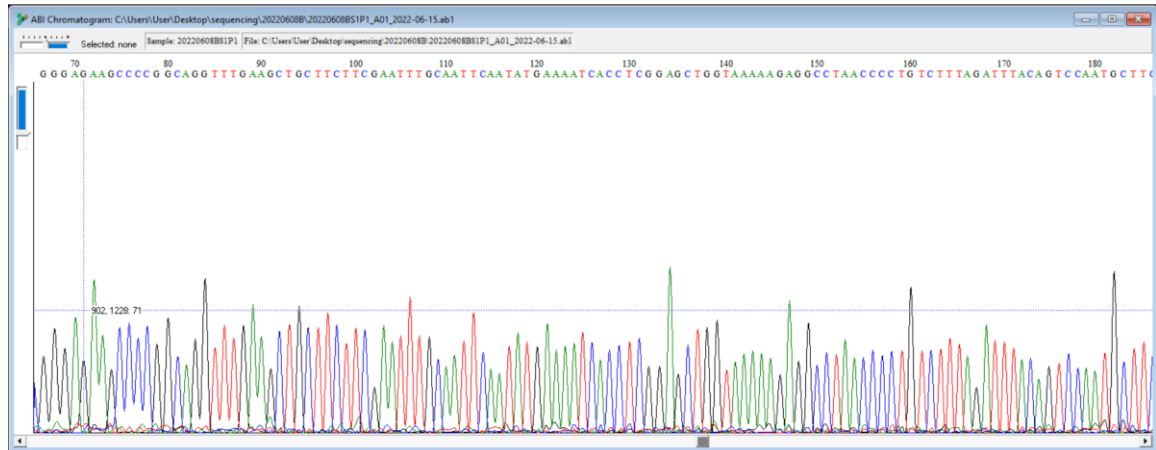
χαρτογράφηση όλων των γονιδίων του ανθρώπινου γονιδιώματος τόσο από φυσική όσο και από λειτουργική άποψη (Εικόνα 24).

Η αρχή της μεθόδου κατά Sanger βασίζεται στην εισαγωγή δεοξυνουκλεοτιδίων που ονομάζονται διδεοξυνουκλεοτίδια (ddNTPs) και διαφέρουν στο ότι αντί για την υδροξυλομάδα (-OH) στη θέση 3' της δεοξυριβόζης φέρουν υδρογόνο. Η ενσωμάτωσή τους νεοσυντιθέμενη αλυσίδα εμποδίζει την περαιτέρω επιμήκυνση της, καθώς δεν μπορεί να δημιουργηθεί φωσφοδιεστερικός δεσμός. Το τμήμα DNA που αναλύεται, 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 φέρει 3-OH ομάδα, ο φωσφοδιεστερικός δεσμός μεταξύ του C3'-OH του τελευταίου τμήματος του σακχάρου και του C5' του επόμενου dNTP δεν σχηματίζεται, με συνέπεια τον τερματισμό της αλυσίδας στο συγκεκριμένο σημείο.



Εικόνα 24: Η μέθοδος της αλληλούχισης κατά Sanger σε 7 βήματα (Gauthier, 2008).

Τα προϊόντα που προκύπτουν υφίστανται τριχοειδική ηλεκτροφόρηση σε αυτόματους αναλυτές. Με το πέρας αυτής, τα σημασμένα με φθοροομάδες μόρια DNA διατρέχουν ένα σύστημα ανίχνευσης, που αναγνωρίζει τη χρωστική και άρα την ενσωματωμένη βάση του 3' άκρου κάθε προϊόντος. Τα δεδομένα συλλέγονται σε μορφή χρωματογραφήματος (Εικόνα 25).



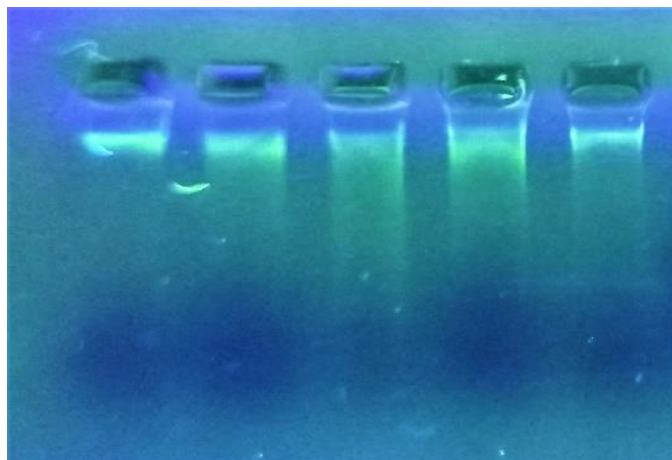
Εικόνα 25: Επεξεργασία της επιθυμητής αλληλουχίας υπό την μορφή χρωματογραφήματος μέσω του προγράμματος Bioedit 7.0.5.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στη συγκεκριμένη εργασία μελετήθηκαν 38 ασθενείς που πάσχουν από ΧΑΠ με σκοπό τον προσδιορισμό μεταλλάξεων σε 3 μιτοχονδριακά tRNA γονίδια και στις παρακείμενες περιοχές αυτών.

3.1 Απομόνωση DNA

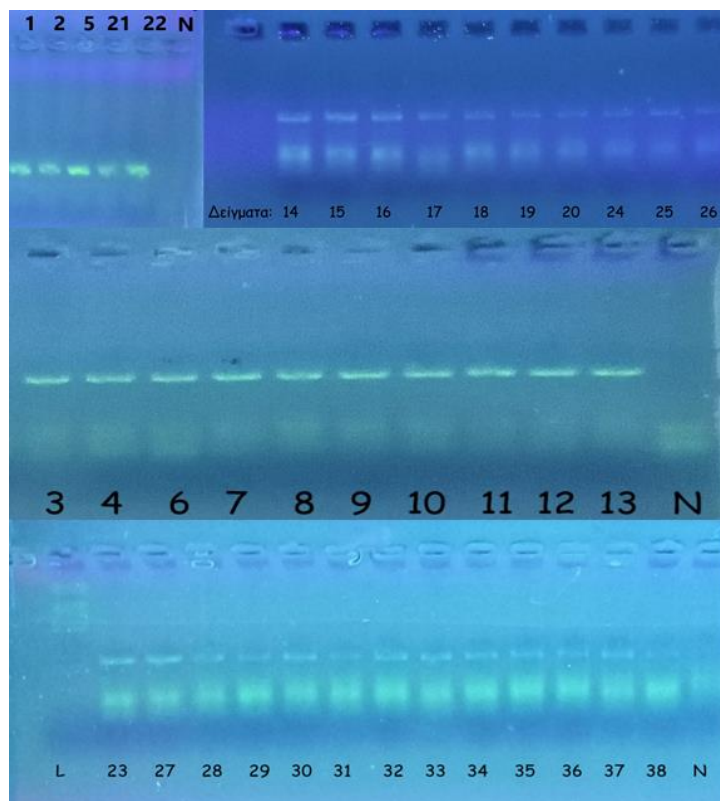
Πραγματοποιήθηκε απομόνωση DNA από δείγματα ολικού αίματος ασθενών, που προήλθαν από το Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Λάρισας. Το αποτέλεσμα της απομόνωσης εκτιμήθηκε ύστερα από ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αгарόζης συγκέντρωσης 2% στα 150 V και παρατήρηση σε τράπεζα υπεριώδους φωτός (Εικόνα 26).



Εικόνα 26: Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης 5 δειγμάτων απομονωμένου DNA ασθενών σε συσκευή UV.

3.2 Ενίσχυση με PCR

Για να επιβεβαιωθεί ότι οι αντιδράσεις PCR ήταν επιτυχείς, τα προϊόντα υποβλήθηκαν σε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης (3%). Παρατίθενται τα αποτελέσματα για το σύνολο των δειγμάτων. Οι ζώνες του επιθυμητού προϊόντος, που αντιστοιχεί σε μέγεθος 249 bp, είναι διακριτές (Εικόνα 27). Σε ορισμένα πηγαδάκια υπάρχουν και δεύτερες αχνές ζώνες (καθοδικά των επιθυμητών), οι οποίες αντιστοιχούν σε διμερή των primers.



Εικόνα 27: Οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων της PCR.

3.3 SSCP και πρότυπα ηλεκτροφόρησης

Από τα πηκτώματα πολυακρυλαμιδίου μπορεί να γίνει παρατήρηση των ζωνών και διάκριση των δειγμάτων που εμφανίζουν κάποια διαφορετικά πρότυπα, υποδεικνύοντας πιθανώς την ύπαρξη μεταλλάξεων σε αυτά (Εικόνα 28). Αφού έγινε η ταυτοποίησή τους τα κατηγοριοποιήσαμε βάσει της ομοιότητάς τους. Κατόπιν τα επιλεγμένα δείγματα στάλθηκαν για αλληλούχιση.

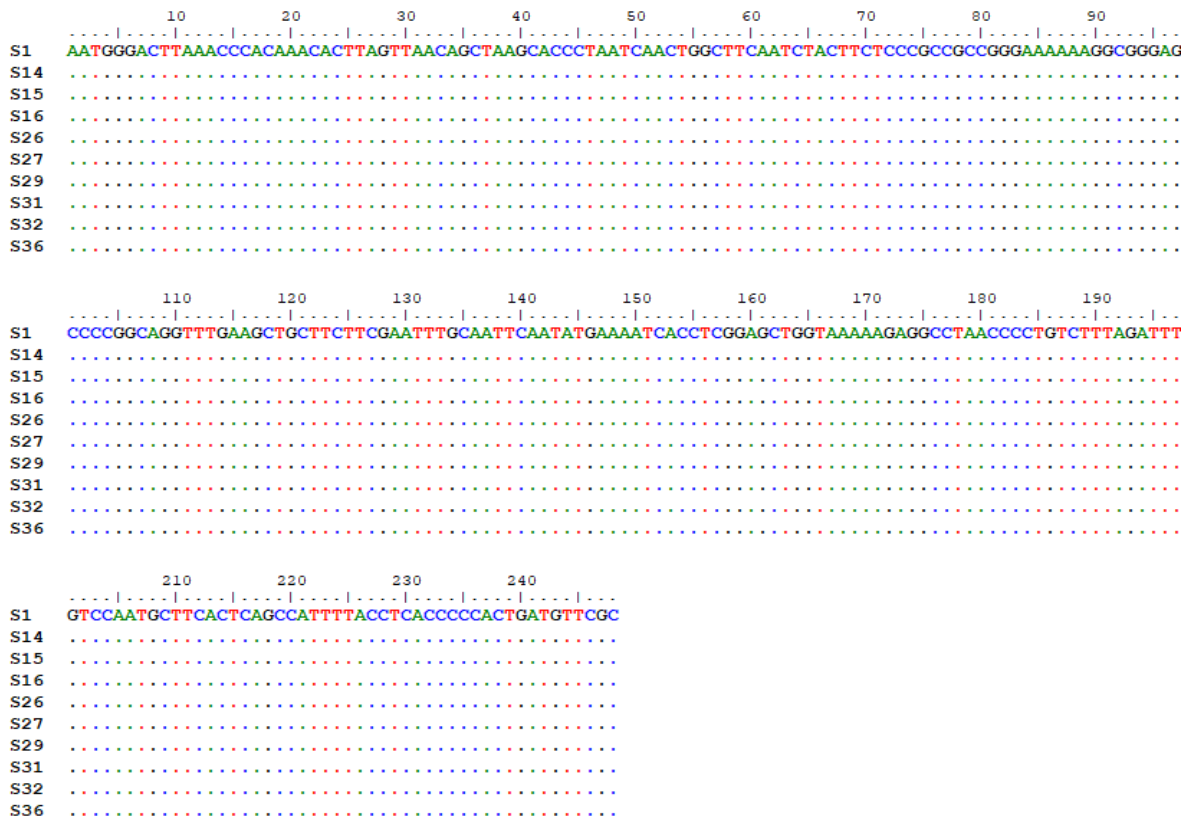


Εικόνα 28: Πηκτή πολυακρυλαμίδης των προϊόντων PCR με τη χρήση των primers ACT. Διακρίνονται με βέλη τα διαφορετικά πρότυπα των ζωνώσεων.

3.4 Ανάλυση αποτελεσμάτων αλληλούχισης

Επιλέχθηκαν 10 δείγματα (1, 14, 15, 16, 26, 27, 29, 31, 32, 36) για τον προσδιορισμό της αλληλουχίας τους. Για την επεξεργασία των αποτελεσμάτων και τη πολλαπλή στοίχιση τους χρησιμοποιήθηκαν τα προγράμματα Bioedit 7.0.5.3 και ClustalW αντίστοιχα. Ακολούθως, διακρίνεται η νουκλεοτιδική σύσταση του κάθε δείγματος χωρίς να παρατηρείται κάποια διαφοροποίηση ανάμεσα στις αλληλουχίες (Εικόνα 29). Τελικά, δεν ανιχνεύθηκε κάποια μετάλλαξη στα γονίδια των tRNA^{Asn}, tRNA^{Cys} και tRNA^{Tyr}.

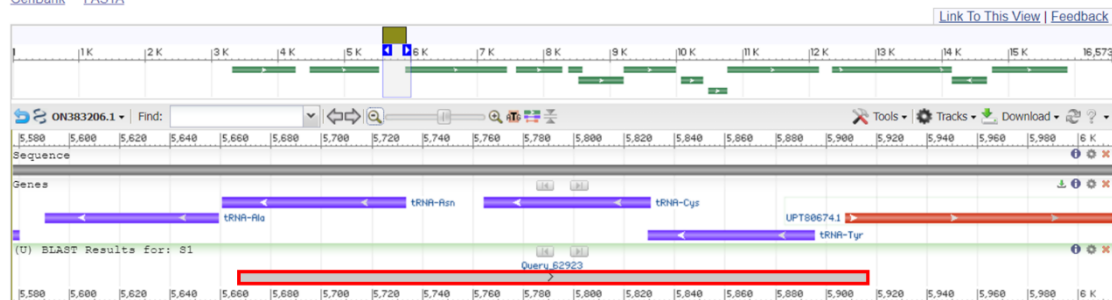
Αξιοποιώντας το εργαλείο Blast μπορεί να γίνει αναζήτηση των αλληλουχιών που εξήχθησαν, μήκους 248 βάσεων (Εικόνα 30). Η πρότυπη αλληλουχία (Sequence ID: ON383206.1) περιλαμβάνει τις νουκλεοτιδικές θέσεις 5668-5915 του μιτοχονδριακού γονιδιώματος. Στα δείγματά μας οι περιοχές που αντιστοιχούν στις νουκλεοτιδικές θέσεις είναι: 5668-5733: tRNA^{Asn}, 5734-5764: non-coding, 5765-5830: tRNA^{Cys}, 5830-5895: tRNA^{Tyr} και 5896-5907: non-coding και 5908-5915: COX1.



Εικόνα 29: Η στοίχιση των επιλεγμένων αλληλουχιών και σύγκριση της ομοιότητάς τους. Οι ταυτόσημες βάσεις μεταξύ των δειγμάτων αντικατοπτρίζονται με τις έγχρωμες τελείες.

Homo sapiens haplogroup K1b2a3 mitochondrion, complete genome

GenBank: ON383206.1
[GenBank](#) [FASTA](#)



Εικόνα 30: Η αλληλουχία επερώτησης πάνω στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα (με κόκκινο περίγραμμα).

4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα μιτοχόνδρια εμπλέκονται σε ένα ευρύ φάσμα κυτταρικών διαδικασιών και μία διαταραχή της ομαλής λειτουργίας τους μπορεί να έχει καταστρεπτικές συνέπειες τόσο σε επίπεδο κυττάρου όσο και σε οργανισμού με συνέπεια την εμφάνιση ασθενειών. Από το 1988, αφού αναγνωρίστηκαν οι πρώτες μεταλλάξεις στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα που σχετίζονταν με παθολογικό φαινότυπο, έχουν χαρακτηριστεί περισσότερες από 200 μεταλλάξεις με τις περισσότερες να εντοπίζονται εντός των

tRNA γονιδίων, τονίζοντας την σημασία τους για την μιτοχονδριακή λειτουργία. Οι μεταλλάξεις αυτές μπορούν να επηρεάσουν την πρωτεϊνοσύνθεση καθώς και την έκφραση, την αναδίπλωση και τη λειτουργία των ενζύμων της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης επηρεάζοντας συνολικά τη λειτουργία της αναπνευστικής αλυσίδας και οδηγώντας στην μιτοχονδριακή δυσλειτουργία.

Τα τελευταία χρόνια διεξάγονται μελέτες στον χώρο του Πανεπιστημίου μας σε ασθενείς που πάσχουν από χρόνιες πνευμονικές νόσους, όπως η IPF, η σαρκοείδωση και το άσθμα, οι οποίες εμφανίζουν ως κοινό γνώρισμα τη μιτοχονδριακή δυσλειτουργία. Αυτές οι ομάδες ασθενών παρουσίασαν αυξημένη μεταλλαξιγένεση στις περιοχές των μιτοχονδριακών tRNA γονιδίων τους. Όπως αναφέρθηκε, πειραματικά αποτελέσματα επιβεβαιώνουν ότι η ΧΑΠ είναι συνυφασμένη με τη μιτοχονδριακή δυσλειτουργία και είναι λογικό να εγείρονται σκέψεις σχετικά με τη συμμετοχή μιτοχονδριακών μορίων DNA που φέρουν μεταλλάξεις σε αυτόν τον μηχανισμό παθογένειας.

Ο αριθμός των μεταλλάξεων στα γονίδια των tRNA^{Asn}, tRNA^{Cys}, tRNA^{Tyr}, που έχουν χαρακτηριστεί έως τώρα, είναι μικρός (5, 2 και 4 παθογενείς μεταλλάξεις αντίστοιχα), κάτι το οποίο καθιστά την συσχέτιση γονοτύπου-φαινοτύπου μία δύσκολη διαδικασία. Αξίζει να σημειωθεί ότι έχουν εντοπιστεί δύο σημειακές μεταλλάξεις των γονιδίων tRNA^{Cys} και tRNA^{Tyr} (G5773A και A5843G αντίστοιχα) αποκλειστικά σε ασθενείς με σαρκοείδωση συγκριτικά με υγιή άτομα με σχετικά μικρή συχνότητα 7.1% (6/85) (Daniil et al., 2018). Οι μεταλλάξεις αυτές εντοπίζονται σε μία περιοχή του βραχίονα TψC των tRNAs, υπεύθυνο για την αλληλεπίδραση με το ριβοσωμικό RNA. Όμως, δεν τους έχει αποδοθεί κάποιος παθογενής ρόλος και σύμφωνα με τη Mitomap πρόκειται για μη επιβλαβείς πολυμορφισμούς. Μία mt-tRNA μετάλλαξη ως μοναδικό γεγονός δεν μπορεί να συνδεθεί άμεσα με ένα συγκεκριμένο κλινικό φαινότυπο, κι αυτό γιατί η επίδραση των μεταλλάξεων εξαρτάται από το επίπεδο της ετεροπλασμίας μέσα σε ένα κύτταρο, ιστό και οργανισμό, το φαινόμενο του μιτωτικού διαχωρισμού με τον ανεξάρτητο διπλασιασμό των μιτοχονδρίων και την τυχαία κατανομή τους στα θυγατρικά κύτταρα κατά τη μίτωση όπως και την εξελικτική επιλογή που υφίστανται τα μιτοχόνδρια με αδιευκρίνιστους ακόμη μηχανισμούς. Παράλληλα, τα κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενειών που συνοδεύονται από μιτοχονδριακές ανωμαλίες εξαρτώνται από το είδος των mt-tRNAs, τον αριθμό, τη θέση των μεταλλάξεων όπως και τους συνδυασμούς αυτών, που μπορεί να δράσουν συνεργιστικά (Zifa et al., 2007). Ωστόσο, σε μοριακό επίπεδο δεν έχει αποσαφηνιστεί ο τρόπος με τον οποίο

μεταλλαγμένα tRNAs προκαλούν μιτοχονδριακή δυσλειτουργία και εξειδικεύουν αυτή τη κλινική εικόνα.

Η συγκεκριμένη πειραματική εργασία πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο, Γενετικής, Συγκριτικής & Εξελικτικής Βιολογίας του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Κατά τη διεξαγωγή της διπλωματικής, εξετάστηκαν τα διαδοχικά μιτοχονδριακά tRNA γονίδια των tRNA^{Asn}, tRNA^{Cys}, tRNA^{Tyr} προκειμένου να διερευνηθεί η ύπαρξη μεταλλάξεων σε αυτές τις περιοχές σε ασθενείς με ΧΑΠ. Παράλληλα, αξιοποιήθηκαν δεδομένα από μελέτες σε ασθενείς με ΧΑΠ που πραγματοποιήθηκαν στον συγκεκριμένο χώρο και αφορούσαν την ανίχνευση μεταλλάξεων στα γονίδια tRNA^{Gly}, tRNA^{Leu}, tRNA^{Gln}, tRNA^{Ile} και tRNA^{Met}. Χρησιμοποιήθηκαν δείγματα ολικού αίματος 38 ασθενών από τα οποία απομονώθηκε DNA και αφού ενισχύθηκαν τα επιθυμητά τμήματα, υποβλήθηκαν σε ανάλυση SSCP και επιλεκτικά στάλθηκαν για αλληλούχιση βάσει του προτύπου ηλεκτροφορητικής κινητικότητας. Μετά από την παραλαβή και επεξεργασία των αποτελεσμάτων αλληλούχισης, δεν εντοπίστηκαν μεταλλάξεις στα γονίδια των tRNA^{Asn}, tRNA^{Cys} tRNA^{Tyr} στα συγκεκριμένα δείγματα (Πίνακας 4).

Θέση mtDNA	Μετάλλαξη mtDNA στη ΧΑΠ	Control (%)	Ασθενείς ΧΑΠ με μετάλλαξη (%)	Ασθενείς IPF με μετάλλαξη (%)	Ασθενείς σαρκοείδωση με μετάλλαξη (%)	Ασθενείς άσθμα με μετάλλαξη (%)
tRNA ^{Asn}	-					
tRNA ^{Cys}	-					
tRNA ^{Tyr}	-					
tRNA ^{Ile}	-					
tRNA ^{Gln}	T4336C	4/204 (2%)	2/38 (5%)	9/40 (22.5%) *	6/85 (7.1%) *	-
tRNA ^{Met}	-					
tRNA ^{Gly}	-					
tRNA ^{Leu}	-					
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 4: Οι μεταλλάξεις στο mtDNA ασθενών με ΧΑΠ, IPF, σαρκοείδωση και άσθμα. Διακρίνονται τα αποτελέσματα ανίχνευσης μεταλλάξεων σε 8 tRNA γονίδια και παρακείμενες περιοχές τους σε ασθενείς με ΧΑΠ. Τα γονίδια tRNA^{Asn}, tRNA^{Cys} tRNA^{Tyr} που μελετήθηκαν δεν εμφάνισαν μεταλλάξεις.

Δεν αποκλείεται η πιθανότητα ύπαρξης μεταλλάξεων είτε στο συγκεκριμένο γονιδιακό τόπο είτε σε παρακείμενες περιοχές, λαμβάνοντας υπόψιν την ύπαρξη

περιορισμένου αριθμού δειγμάτων που ανήκουν σε μία συγκεκριμένη πληθυσμιακή ομάδα.

Όσον αφορά τις σημειακές μεταλλάξεις που βρέθηκαν σε ασθενείς με ΧΑΠ, αξίζει να αναφερθεί ότι η μετάλλαξη T4336C που εντοπίζεται στον αμινοξικό βραχίονα του mt-tRNA^{Gln} εμφανίζεται σε ασθενείς με IPF, σε ασθενείς με σαρκοείδωση και σε υγιείς, αλλά εκφράζεται σε στατιστικώς σημαντικά μεγαλύτερα επίπεδα στις δύο ομάδες ασθενών σε σχέση με τα υγιή άτομα (Πίνακας 4). Οι μεταλλάξεις T3197C και C3212T αντιστοιχούν σε περιοχές του 16S rRNA που ενισχύθηκε μαζί με το γονίδιο tRNA^{Leu}. Η πρώτη εμφανίζεται σε ασθενείς με IPF, σε ασθενείς με σαρκοείδωση, σε ασθματικούς και σε υγιή controls, αλλά επικρατεί κυρίως στους ασθενείς με σαρκοείδωση και σε αυτούς με άσθμα. Η δεύτερη δεν έχει εντοπιστεί σε καμία από τις υπόλοιπες πνευμονικές νόσους.

Η πλειοψηφία των ασθενών που πάσχουν από IPF και σαρκοείδωση (38/40 και 69/85 αντίστοιχα), σπάνιες πνευμονικές παθήσεις που χαρακτηρίζονται από έντονη συμπτωματολογία, εμφάνισαν αυξημένη μεταλλαξιγένεση στις περιοχές των mt-tRNA γονιδίων τους (Πίνακας 5). Είναι, επίσης, αξιοσημείωτο ότι ένας μεγάλος αριθμός συνδυασμών μεταλλάξεων εμφανίζεται αποκλειστικά στην ομάδα ασθενών, κάτι το οποίο υποδεικνύει τη συνεργιστική δράση αυτών, με την αλληλεπίδρασή τους να «πολλαπλασιάζει» το αντίκτυπο τους. Ένα μικρότερο ποσοστό ασθενών με άσθμα (56/76), μία αναστρέψιμη και επαρκώς ελεγχόμενη νόσο, παρουσίασαν επίσης μεταλλάξεις στις συγκεκριμένες περιοχές, σε λιγότερο βαθμό, αλλά και ένα μικρότερο αριθμό συνδυασμών μεταλλάξεων μόνο στην ομάδα τους. Στους 38 ασθενείς με ΧΑΠ μελετήθηκαν έως τώρα 8 mt-tRNA γονίδια και βρέθηκαν συνολικά 3 μεταλλάξεις στο 18% των ασθενών (7/38). Τα αποτελέσματα αυτά υπολείπονται των προηγούμενων μελετών. Λαμβάνοντας υπόψιν τις συχνότητες των μεταλλάξεων και τον συνδυασμό τους σε σχέση με την βαρύτητα της κάθε πάθησης, γίνεται αντιληπτό ότι ενδεχομένως οι μεταλλάξεις στις συγκεκριμένες περιοχές αυξάνονται με τη σοβαρότητα της νόσου.

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 5: Συσχέτιση μεταλλάξεων mtDNA με τη βαρύτητα πνευμονικών νόσων.

Τα ευρήματα αυτά εμπλουτίζουν το κομμάτι της έρευνας που στοχεύει στον προσδιορισμό της σχέσης της μιτοχονδριακής δυσλειτουργίας με τη ΧΑΠ. Χρειάζεται, ωστόσο, να συνεχιστούν οι μελέτες για τον εντοπισμό και χαρακτηρισμό μεταλλάξεων σε mt-tRNA γονίδια καθώς και τον προσδιορισμό του αντίκτυπου τους στη μιτοχονδριακή λειτουργία με συνέπεια την εμφάνιση τέτοιων ασθενειών.

Βιβλιογραφικές αναφορές

Ελληνική βιβλιογραφία

1. Ζίφα Αιμιλία, Μαμούρης Ζήσης & Μούτου Κατερίνα. (2011). «Βιολογία». Βόλος: Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Θεσσαλίας.
2. Berg, M. J., Tymoczko, L. J. & Stryer L. (Επιμ.). (2017). «BIOΧΗΜΕΙΑ». Ηράκλειο: Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης.
3. Sherwood, L. (2016). «Εισαγωγή στη Φυσιολογία του Ανθρώπου». Αλεξανδρούπολη: Ακαδημαϊκές εκδόσεις.

Ξένη βιβλιογραφία

4. Abbott JA, Francklyn CS, Robey-Bond SM. Transfer RNA and human disease. *Front Genet.* 2014 Jun 3;5:158.
5. Agarwal AR, Yin F, Cadenas E. Short-term cigarette smoke exposure leads to metabolic alterations in lung alveolar cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2014 Aug;51(2):284-93.
6. Aghapour M, Remels AHV, Pouwels SD, Bruder D, Hiemstra PS, Cloonan SM, Heijink IH. Mitochondria: at the crossroads of regulating lung epithelial cell function in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2020 Jan 1;318(1):L149-L164.
7. Ahmad A, Shameem M, Husain Q. Altered oxidant-antioxidant levels in the disease prognosis of chronic obstructive pulmonary disease. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2013 Aug;17(8):1104-9.
8. Alfahad AJ, Alzaydi MM, Aldossary AM, Alshehri AA, Almughem FA, Zaidan NM, Tawfik EA. Current views in chronic obstructive pulmonary disease pathogenesis and management. *Saudi Pharm J.* 2021 Dec;29(12):1361-1373.
9. Ballweg K, Mutze K, Königshoff M, Eickelberg O, Meiners S. Cigarette smoke extract affects mitochondrial function in alveolar epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2014 Dec 1;307(11):L895-907.
10. Bartoli ML, Novelli F, Costa F, Malagrino L, Melosini L, Bacci E, Cianchetti S, Dente FL, Di Franco A, Vagaggini B, Paggiaro PL. Malondialdehyde in exhaled breath condensate as a marker of oxidative stress in different pulmonary diseases. *Mediators Inflamm.* 2011;2011:891752.

11. Betsuyaku T, Fuke S, Inomata T, Kaga K, Morikawa T, Odajima N, Adair-Kirk T, Nishimura M. Bronchiolar epithelial catalase is diminished in smokers with mild COPD. *Eur Respir J*. 2013 Jul;42(1):42-53.
12. Bernardo I, Bozinovski S, Vlahos R. Targeting oxidant-dependent mechanisms for the treatment of COPD and its comorbidities. *Pharmacol Ther*. 2015 Nov;155:60-79.
13. Białas AJ, Sitarek P, Miłkowska-Dymanowska J, Piotrowski WJ, Górski P. The Role of Mitochondria and Oxidative/Antioxidative Imbalance in Pathobiology of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Oxid Med Cell Longev*. 2016;2016:7808576.
14. Bolisetty S, Jaimes EA. Mitochondria and reactive oxygen species: physiology and pathophysiology. *Int J Mol Sci*. 2013 Mar 19;14(3):6306-44.
15. Boukhenouna S, Wilson MA, Bahmed K, Kosmider B. Reactive Oxygen Species in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Oxid Med Cell Longev*. 2018 Feb 11;2018:5730395.
16. Chillappagari S, Preuss J, Licht S, Müller C, Mahavadi P, Sarode G, Vogelmeier C, Guenther A, Nahrlich L, Rubin BK, Henke MO. Altered protease and antiprotease balance during a COPD exacerbation contributes to mucus obstruction. *Respir Res*. 2015 Jul 15;16(1):85.
17. Daniil Z, Kotsiou OS, Grammatikopoulos A, Peletidou S, Gkika H, Malli F, Antoniou K, Vasarmidi E, Mamuris Z, Gourgoulialis K, Zifa E. Detection of mitochondrial transfer RNA (mt-tRNA) gene mutations in patients with idiopathic pulmonary fibrosis and sarcoidosis. *Mitochondrion*. 2018 Nov;43:43-52.
18. Dekhuijzen PN, Aben KK, Dekker I, Aarts LP, Wielders PL, van Herwaarden CL, Bast A. Increased exhalation of hydrogen peroxide in patients with stable and unstable chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 1996 Sep;154(3 Pt 1):813-6.
19. Devine JF. Chronic obstructive pulmonary disease: an overview. *Am Health Drug Benefits*. 2008 Sep;1(7):34-42.
20. Domej W, Oettl K, Renner W. Oxidative stress and free radicals in COPD--implications and relevance for treatment. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2014 Oct 17;9:1207-24.
21. Dupré-Crochet S, Erard M, Nüße O. ROS production in phagocytes: why, when, and where? *J Leukoc Biol*. 2013 Oct;94(4):657-70.

22. Ferrarotti I, Carroll TP, Ottaviani S, Fra AM, O'Brien G, Molloy K, Corda L, Medicina D, Curran DR, McElvaney NG, Luisetti M. Identification and characterisation of eight novel SERPINA1 Null mutations. *Orphanet J Rare Dis.* 2014 Nov 26;9:172.
23. Gauthier, M. Simulation of Polymer Translocation Through Small Channels: A Molecular Dynamics Study and a New Monte Carlo Approach. *Dissertation Abstracts International.* 2008 Jan 1;70-08;4913.
24. Hara H, Araya J, Ito S, Kobayashi K, Takasaka N, Yoshii Y, Wakui H, Kojima J, Shimizu K, Numata T, Kawaishi M, Kamiya N, Odaka M, Morikawa T, Kaneko Y, Nakayama K, Kuwano K. Mitochondrial fragmentation in cigarette smoke-induced bronchial epithelial cell senescence. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2013 Nov 15;305(10):L737-46.
25. Hoffmann RF, Zarrintan S, Brandenburg SM, Kol A, de Bruin HG, Jafari S, Dijk F, Kalicharan D, Kelders M, Gosker HR, Ten Hacken NH, van der Want JJ, van Oosterhout AJ, Heijink IH. Prolonged cigarette smoke exposure alters mitochondrial structure and function in airway epithelial cells. *Respir Res.* 2013 Oct 2;14(1):97.
26. Ichinose M, Sugiura H, Yamagata S, Koarai A, Shirato K. Increase in reactive nitrogen species production in chronic obstructive pulmonary disease airways. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000 Aug;162(2 Pt 1):701-6.
27. Jiang Y, Wang X, Hu D. Mitochondrial alterations during oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis.* 2017 Apr 13;12:1153-1162.
28. Kelleher CM, Silverman EK, Broekelmann T, Litonjua AA, Hernandez M, Sylvia JS, Stoler J, Reilly JJ, Chapman HA, Speizer FE, Weiss ST, Mecham RP, Raby BA. A functional mutation in the terminal exon of elastin in severe, early-onset chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2005 Oct;33(4):355-62.
29. Kim SJ, Cheres P, Williams D, Cheng Y, Ridge K, Schumacker PT, Weitzman S, Bohr VA, Kamp DW. Mitochondria-targeted Ogg1 and aconitase-2 prevent oxidant-induced mitochondrial DNA damage in alveolar epithelial cells. *J Biol Chem.* 2014 Feb 28;289(9):6165-76.
30. Kirkham PA, Barnes PJ. Oxidative stress in COPD. *Chest.* 2013 Jul;144(1):266-273.

31. Kong Q, Lin CL. Oxidative damage to RNA: mechanisms, consequences, and diseases. *Cell Mol Life Sci.* 2010 Jun;67(11):1817-29.
32. Kosmider B, Lin CR, Karim L, Tomar D, Vlasenko L, Marchetti N, Bolla S, Madesh M, Criner GJ, Bahmed K. Mitochondrial dysfunction in human primary alveolar type II cells in emphysema. *EBioMedicine.* 2019 Aug;46:305-316.
33. Kuwano K, Araya J, Hara H, Minagawa S, Takasaka N, Ito S, Kobayashi K, Nakayama K. Cellular senescence and autophagy in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and idiopathic pulmonary fibrosis (IPF). *Respir Investig.* 2016 Nov;54(6):397-406. Lightowers, R. N., Taylor, R. W., & Turnbull, D. M. (2015). Mutations causing mitochondrial disease: What is new and what challenges remain?. *Science*, 349(6255), 1494–1499.
34. Lam HC, Cloonan SM, Bhashyam AR, Haspel JA, Singh A, Sathirapongsasuti JF, Cervo M, Yao H, Chung AL, Mizumura K, An CH, Shan B, Franks JM, Haley KJ, Owen CA, Tesfaigzi Y, Washko GR, Quackenbush J, Silverman EK, Rahman I, Kim HP, Mahmood A, Biswal SS, Ryter SW, Choi AM. Histone deacetylase 6-mediated selective autophagy regulates COPD-associated cilia dysfunction. *J Clin Invest.* 2013 Dec;123(12):5212-30.
35. Liu X, Chen Z. The pathophysiological role of mitochondrial oxidative stress in lung diseases. *J Transl Med.* 2017 Oct 13;15(1):207.
36. Maestrelli P, Páska C, Saetta M, Turato G, Nowicki Y, Monti S, Formichi B, Miniati M, Fabbri LM. Decreased haem oxygenase-1 and increased inducible nitric oxide synthase in the lung of severe COPD patients. *Eur Respir J.* 2003 Jun;21(6):971-6.
37. McGuinness AJ, Sapey E. Oxidative Stress in COPD: Sources, Markers, and Potential Mechanisms. *J Clin Med.* 2017 Feb 15;6(2):21.
38. Mizumura K, Cloonan SM, Nakahira K, Bhashyam AR, Cervo M, Kitada T, Glass K, Owen CA, Mahmood A, Washko GR, Hashimoto S, Ryter SW, Choi AM. Mitophagy-dependent necroptosis contributes to the pathogenesis of COPD. *J Clin Invest.* 2014 Sep;124(9):3987-4003.
39. Montuschi P, Collins JV, Ciabattini G, Lazzeri N, Corradi M, Kharitonov SA, Barnes PJ. Exhaled 8-isoprostane as an in vivo biomarker of lung oxidative stress in patients with COPD and healthy smokers. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000 Sep;162(3 Pt 1):1175-7.

40. Mukherjee S, Ghosh A. Molecular mechanism of mitochondrial respiratory chain assembly and its relation to mitochondrial diseases. *Mitochondrion*. 2020 Jul;53:1-20.
41. Nam HS, Izumchenko E, Dasgupta S, Hoque MO. Mitochondria in chronic obstructive pulmonary disease and lung cancer: where are we now? *Biomark Med*. 2017 May;11(6):475-489.
42. Neofytou E, Tzortzaki EG, Chatziantoniou A, Siafakas NM. DNA damage due to oxidative stress in Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD). *Int J Mol Sci*. 2012 Dec 10;13(12):16853-64.
43. Orekhov AN, Nikiforov NN, Ivanova EA, Sobenin IA. Possible Role of Mitochondrial DNA Mutations in Chronification of Inflammation: Focus on Atherosclerosis. *J Clin Med*. 2020 Apr 1;9(4):978.
44. Pizzino G, Irrera N, Cucinotta M, Pallio G, Mannino F, Arcoraci V, Squadrito F, Altavilla D, Bitto A. Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. *Oxid Med Cell Longev*. 2017;2017:8416763.
45. Popov LD. Mitochondrial biogenesis: An update. *J Cell Mol Med*. 2020 May;24(9):4892-4899.
46. Pouwels SD, Heijink IH, ten Hacken NH, Vandenabeele P, Krysko DV, Nawijn MC, van Oosterhout AJ. DAMPs activating innate and adaptive immune responses in COPD. *Mucosal Immunol*. 2014 Mar;7(2):215-26.
47. Prakash YS, Pabelick CM, Sieck GC. Mitochondrial Dysfunction in Airway Disease. *Chest*. 2017 Sep;152(3):618-626.
48. Ragland MF, Benway CJ, Lutz SM, Bowler RP, Hecker J, Hokanson JE, Crapo JD, Castaldi PJ, DeMeo DL, Hersh CP, Hobbs BD, Lange C, Beaty TH, Cho MH, Silverman EK. Genetic Advances in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. Insights from COPDGene. *Am J Respir Crit Care Med*. 2019 Sep 15;200(6):677-690.
49. Rahman I, Adcock IM. Oxidative stress and redox regulation of lung inflammation in COPD. *Eur Respir J*. 2006 Jul;28(1):219-42.
50. Rodrigues SO, Cunha CMCD, Soares GMV, Silva PL, Silva AR, Gonçalves-de-Albuquerque CF. Mechanisms, Pathophysiology and Currently Proposed Treatments of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2021 Sep 26;14(10):979.

51. Rogers LK, Cismowski MJ. Oxidative Stress in the Lung - The Essential Paradox. *Curr Opin Toxicol.* 2018 Feb;7:37-43.
52. Sato M, Sato K. Maternal inheritance of mitochondrial DNA by diverse mechanisms to eliminate paternal mitochondrial DNA. *Biochim Biophys Acta.* 2013 Aug;1833(8):1979-84.
53. Shokolenko I, Venediktova N, Bochkareva A, Wilson GL, Alexeyev MF. Oxidative stress induces degradation of mitochondrial DNA. *Nucleic Acids Res.* 2009 May;37(8):2539-48.
54. Silverman EK. Genetics of COPD. *Annu Rev Physiol.* 2020 Feb 10;82:413-431.
55. Taanman JW. The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication. *Biochim Biophys Acta.* 1999 Feb 9;1410(2):103-23.
56. Terzikhan N, Verhamme KM, Hofman A, Stricker BH, Brusselle GG, Lahousse L. Prevalence and incidence of COPD in smokers and non-smokers: the Rotterdam Study. *Eur J Epidemiol.* 2016 Aug;31(8):785-92.
57. Valdivieso ÁG, Dugour AV, Sotomayor V, Clauzure M, Figueroa JM, Santa-Coloma TA. N-acetyl cysteine reverts the proinflammatory state induced by cigarette smoke extract in lung Calu-3 cells. *Redox Biol.* 2018 Jun;16:294-302.
58. van der Toorn M, Rezayat D, Kauffman HF, Bakker SJ, Gans RO, Koëter GH, Choi AM, van Oosterhout AJ, Slebos DJ. Lipid-soluble components in cigarette smoke induce mitochondrial production of reactive oxygen species in lung epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2009 Jul;297(1):L109-14.
59. van der Vliet A, Janssen-Heininger YMW, Anathy V. Oxidative stress in chronic lung disease: From mitochondrial dysfunction to dysregulated redox signaling. *Mol Aspects Med.* 2018 Oct;63:59-69.
60. Viegi G, Maio S, Pistelli F, Baldacci S, Carrozzi L. Epidemiology of chronic obstructive pulmonary disease: health effects of air pollution. *Respirology.* 2006 Sep;11(5):523-32.
61. Wang Y, Xu J, Meng Y, Adcock IM, Yao X. Role of inflammatory cells in airway remodeling in COPD. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis.* 2018 Oct 12;13:3341-3348.
62. WHO, WHO highlights huge scale of tobacco-related lung disease deaths. World Health Organization, 2019.
63. Wiegman CH, Michaeloudes C, Haji G, Narang P, Clarke CJ, Russell KE, Bao W, Pavlidis S, Barnes PJ, Kanerva J, Bittner A, Rao N, Murphy MP, Kirkham PA, Chung KF, Adcock IM; COPDMAP. Oxidative stress-induced mitochondrial

- dysfunction drives inflammation and airway smooth muscle remodeling in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *J Allergy Clin Immunol*. 2015 Sep;136(3):769-80.
64. Yarham JW, Elson JL, Blakely EL, McFarland R, Taylor RW. Mitochondrial tRNA mutations and disease. *Wiley Interdiscip Rev RNA*. 2010 Sep-Oct;1(2):304-24.
65. Yan C, Duanmu X, Zeng L, Liu B, Song Z. Mitochondrial DNA: Distribution, Mutations, and Elimination. *Cells*. 2019 Apr 25;8(4):379.
66. Zeng M, Li Y, Jiang Y, Lu G, Huang X, Guan K. Local and systemic oxidative stress status in chronic obstructive pulmonary disease patients. *Can Respir J*. 2013 Jan-Feb;20(1):35-41.
67. Zifa E, Daniil Z, Skoumi E, Stavrou M, Papadimitriou K, Terzenidou M, Kostikas K, Bagiatis V, Gourgoulianis KI, Mamuris Z. Mitochondrial genetic background plays a role in increasing risk to asthma. *Mol Biol Rep*. 2012 Apr;39(4):4697-708.
68. Zifa E, Giannouli S, Theotokis P, Stamatis C, Mamuris Z, Stathopoulos C. Mitochondrial tRNA mutations: clinical and functional perturbations. *RNA Biol*. 2007 Jan-Mar;4(1):38-66.
69. Zinellu E, Zinellu A, Fois AG, Carru C, Pirina P. Circulating biomarkers of oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease: a systematic review. *Respir Res*. 2016 Nov 14;17(1):150.
70. Zhu A, Ge D, Zhang J, Teng Y, Yuan C, Huang M, Adcock IM, Barnes PJ, Yao X. Sputum myeloperoxidase in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur J Med Res*. 2014 Mar 3;19(1):12.
71. Zhang H, Burr SP, Chinnery PF. The mitochondrial DNA genetic bottleneck: inheritance and beyond. *Essays Biochem*. 2018 Jul 20;62(3):225-234.

Sites

<http://genome.ucsc.edu>

<https://goldcopd.org/2022-gold-reports-2/>