ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

ΒΟΥΤΙΔΟΥ ΣΤΑΥΡΟΥΛΑ

ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΜΟΡΙΑΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ

ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ

ΛΑΡΙΣΑ 2022

ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ ΤΟΥ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ tRNA ΤΗΣ ΛΕΥΚΙΝΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΓΛΥΚΙΝΗΣ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΧΡΟΝΙΑ ΑΠΟΦΡΑΚΤΙΚΗ ΠΝΕΥΜΟΝΟΠΑΘΕΙΑ

DETECTION OF MUTATIONS IN THE MITOCHONDRIAL tRNA GENE OF LEUCINE AND GLYCINE IN PATIENTS WITH CHRONIC OBSTRUCTIVE PULMONARY DISEASE

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Ζίφα Αιμιλία (επιβλέπουσα καθηγήτρια), Επίκουρος Καθηγήτρια Βιολογίας-Νευροβιολογίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Δανιήλ Ζωή, Καθηγήτρια Πνευμονολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

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

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών με τίτλο: «Εφαρμογές Μοριακής Βιολογίας, Μοριακή Γενετική-Διαγνωστικοί Δείκτες» του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και εκπονήθηκε στο εργαστήριο Γενετικής, Εξελικτικής και Συγκριτικής Βιολογίας, υπό την επίβλεψη και την καθοδήγηση της κα Ζίφα Αιμιλίας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της τριμελούς επιτροπής και ιδιαίτερα την κα Ζίφα Αιμιλία για την ανάθεση του θέματος και για την βοήθεια που μου παρείχε καθ’ όλη τη διάρκεια της διπλωματικής μου εργασίας.

Θα ήθελα ακόμη να ευχαριστήσω τον κ. Κωνσταντίνο Σταμάτη καθώς και όλα τα μέλη του εργαστηρίου, τους διδακτορικούς αλλά και μεταπτυχιακούς φοιτητές για την συνεισφορά τους στη διεκπεραίωση του πειραματικού μέρους της εργασίας αυτής.

Τέλος, θέλω να πω ένα μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένειά μου και στους φίλους μου για την κατανόηση, την στήριξη και την συμπαράστασή τους όλο το διάστημα των Μεταπτυχιακών Σπουδών μου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια (ΧΑΠ) είναι μία ασθένεια που χαρακτηρίζεται από επίμονο περιορισμό της ροής του αέρα που συνήθως είναι προοδευτικός και σχετίζεται με χρόνια φλεγμονώδη απόκριση στους αεραγωγούς και τον πνεύμονα σε επιβλαβή σωματίδια ή αέρια. Με βάση αποδεδειγμένες μελέτες, κύριος παράγοντας κινδύνου για ΧΑΠ αποτελεί η έκθεση στον καπνό του τσιγάρου. Μεταλλάξεις στο μιτοχονδριακό DNA (mt-DNA) έχουν συσχετιστεί με διάφορες πνευμονολογικές διαταραχές. Η ΧΑΠ είναι μία εξ' αυτών, καθώς ο πνεύμονας αποτελεί το κύριο όργανο προσβολής. Μεταλλάξεις στο mt-tRNA μπορούν να οδηγήσουν σε δυσλειτουργία των συμπλόκων της αναπνευστικής αλυσίδας με αποτέλεσμα την αύξηση των μιτοχονδριακών ROS. Οι δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) είναι πιθανόν να συμβάλλουν στην πρόκληση ή στην επιδείνωση της ΧΑΠ. Στη παρούσα εργασία εξετάστηκε η ύπαρξη μεταλλάξεων στα μιτοχονδριακά γονίδια tRNA της λευκίνης και της γλυκίνης από 38 δείγματα αίματος ασθενών με ΧΑΠ. Σε παρακείμενη περιοχή του γονιδίου $tRNA^{Leu}$ εντοπίστηκαν 2 σημειακές μεταλλάξεις, οι T3197C και C3212T που ανήκαν στο 16S rRNA, ενώ στο γονίδιο tRNA της γλυκίνης δεν βρέθηκαν καθόλου μεταλλάξεις.

<u>Λέξεις-Κλειδιά:</u> Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια, μεταλλάξεις, μιτοχονδριακό DNA, δραστικές μορφές οξυγόνου

ABSTRACT

Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) is a disease characterized by persistent airflow limitation that is usually progressive and associated with a chronic inflammatory response in the airways and lung to noxious particles or gases. Based on proven studies, a major risk factor for COPD is exposure to cigarette smoke. Mutations in mitochondrial DNA (mt-DNA) have been associated with various pulmonary disorders. COPD is one of them, as the lung is the main affected organ. Mutations in mt-tRNA can lead to dysfunction of respiratory chain complexes resulting in increased mitochondrial ROS. Reactive oxygen species (ROS) are likely to contribute to the induction or exacerbation of COPD. In the present work, the existence of mutations in the mitochondrial leucine and glycine tRNA genes from 38 blood samples of COPD patients was examined. In an adjacent region of the $tRNA^{Leu}$ gene, 2 point mutations, T3197C and C3212T belonging to the 16S rRNA, were identified, while no mutations were found in the glycine tRNA gene.

Keywords: Chronic Obstructive Pulmonary Disease, mutations, mitochondrial DNA, reactive oxygen species

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

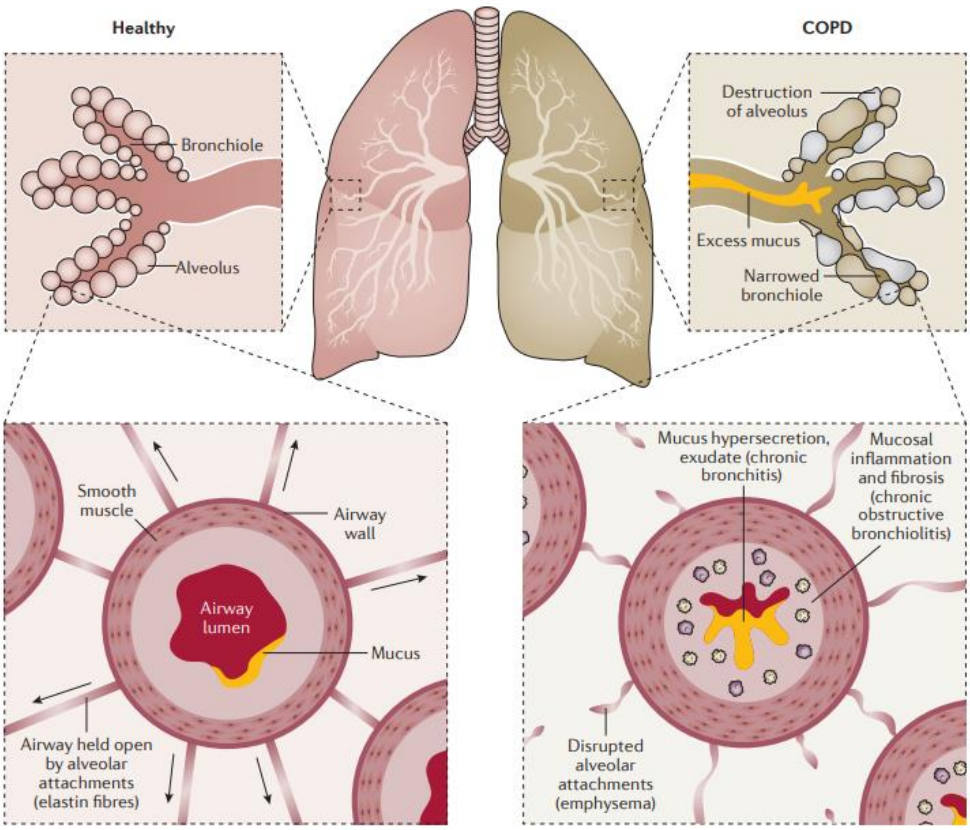
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΧΡΟΝΙΑ ΑΠΟΦΡΑΚΤΙΚΗ ΠΝΕΥΜΟΝΟΠΑΘΕΙΑ

Ορισμός

Η Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια (Chronic Obstructive Pulmonary Disease) αποτελεί ένα χρόνιο νόσημα που χαρακτηρίζεται από διάχυτη απόφραξη των αεραγωγών και εκδηλώνει συμπτώματα δύσπνοιας, βήχα και παραγωγή πτυέλων. Σχετίζεται με μια χρόνια φλεγμονώδη απάντηση των πνευμόνων και των αεραγωγών σε βλαπτικά σωματίδια ή αέρια, όπως ο καπνός του τσιγάρου (GOLD, 2022). Με βάση τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (ΠΟΥ), η Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια (ΧΑΠ) αποτελεί ένα σημαντικό πρόβλημα υγείας καθώς θεωρείται η τρίτη αιτία νοσηρότητας και θνησιμότητας σε όλο τον κόσμο. Περιλαμβάνει δύο παθήσεις των πνευμόνων, την **χρόνια βρογχίτιδα**, η οποία είναι η μακροχρόνια φλεγμονή των βρόγχων και το **εμφύσημα** μια κατάσταση που περιλαμβάνει βλάβες στις κυψελίδες του τοιχώματος του πνεύμονα. Με τον τρόπο αυτό, οι πνεύμονες μεταφέρουν όλο και λιγότερο οξυγόνο στην κυκλοφορία του αίματος (WHO, 2021), (Coxson *et al.*, 2013). Οι παραπάνω παθήσεις συνοψίζονται στην Εικόνα 1.



Εικόνα 1: Απόφραξη των αεραγωγών στην Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια. Στους υγιείς πνεύμονες, οι μικροί αεραγωγοί (βρογχιόλια) διατηρούνται ανοιχτοί από το κυψελιδικό τοίχωμα που περιέχουν ίνες ελαστίνης. Στη χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια (ΧΑΠ), οι μικροί αεραγωγοί στενεύουν μέσω πάχυνσης του βρογχιολικού περιφερικού τοιχώματος από φλεγμονή και σταθεροποιημένη στένωση ως αποτέλεσμα ίνωσης, διαταραχή των κυψελιδικών προσκολλήσεων ως αποτέλεσμα εμφυσήματος και απόφραξης του αυλού από βλέννα και φλεγμονώδες εξίδρωμα (Πηγή: Barnes *et al*., 2015).

Αιτιολογικοί Παράγοντες

Σύμφωνα με την πλειονότητα μελετών, υπάρχουν αρκετοί παράγοντες εμφάνισης της ΧΑΠ. Ο σημαντικότερος παράγοντας αποτελεί ο καπνός του τσιγάρου καθώς και διάφοροι εξωγενείς παράγοντες όπως η έκθεση σε ατμοσφαιρική ρύπανση, η εργασία σε σκόνη, οι αναθυμιάσεις και οι χημικές ουσίες. Στους ενδογενείς παράγοντες που συντελούν στην εμφάνιση της ΧΑΠ ανήκουν η γενετική προδιάθεση καθώς και η συγγενής έλλειψη της α1-αντιθρυψίνης. Επιπλέον, αιτιολογικοί παράγοντες αποτελούν η ηλικία, το φύλο και η λοίμωξη του αναπνευστικού (Mannino and Buist, 2007).

Το κάπνισμα κατέχει πρωτεύοντα ρόλο στην παθογένεια της ΧΑΠ, καθώς χαρακτηρίζεται και ως η νόσος των καπνιστών. Επιφέρει πολλές βλαπτικές συνέπειες τόσο στην πνευμονική όσο και στην καρδιακή λειτουργία. Το SO_2 που ανευρίσκεται στον καπνό του τσιγάρου προκαλεί αντανακλαστικό βρογχόσπασμο από τον ερεθισμό των βρογχικών υποδοχέων. Η παρατεταμένη έκθεση επιφέρει υπερτροφία των βλεννογόνων αδένων των βρόγχων και υπερπαραγωγή βλέννας.

Η έλλειψη της α1-αντιθρυψίνης επιτρέπει σε πρωτεολυτικά ένζυμα που απελευθερώνονται από τα πολυμορφοπύρηνα ουδετερόφιλα να καταστρέψουν το πνευμονικό παρέγχυμα και να δημιουργήσουν εμφύσημα. Ο καπνός του τσιγάρου αυξάνει τη συγκέντρωση πρωτεολυτικών ενζύμων στον πνεύμονα, καθώς προκαλεί την συγκέντρωση των μακροφάγων στην περιοχή των τελικών βρογχιολίων όπου και καταστρέφονται. Συνήθως η α1-αντιθρυψίνη που περιέχεται στο υγρό που διαβρέχει το τοίχωμα των αεροφόρων οδών εξουδετερώνει τα πρωτεολυτικά ένζυμα προστατεύοντας έτσι τον πνεύμονα.

Άλλη μια ιδιότητα του καπνού του τσιγάρου αποτελεί η έντονη οξειδωτική δράση που προκαλούν τα διάφορα οξείδια του αζώτου καθώς και οι υδροκινόνες και κινόνες που περιέχονται στην πίσσα του. Η οξειδωτική δράση του καπνού εξουδετερώνει την α1-αντιθρυψίνη και αυτό έχει ως αποτέλεσμα την καταστροφή του πνευμονικού παρεγχύματος γύρω από τα τελικά βρογχιόλια και την δημιουργία εμφυσήματος. Το γεγονός αυτό οφείλεται στη παρουσία ουδετερόφιλων σε όλο το αναπνευστικό λοβίδιο αλλά και στην αδυναμία εξουδετέρωσης της ελαστάσης (πρωτεολυτικό ένζυμο) που παράγουν (Πατάκας, 2006).

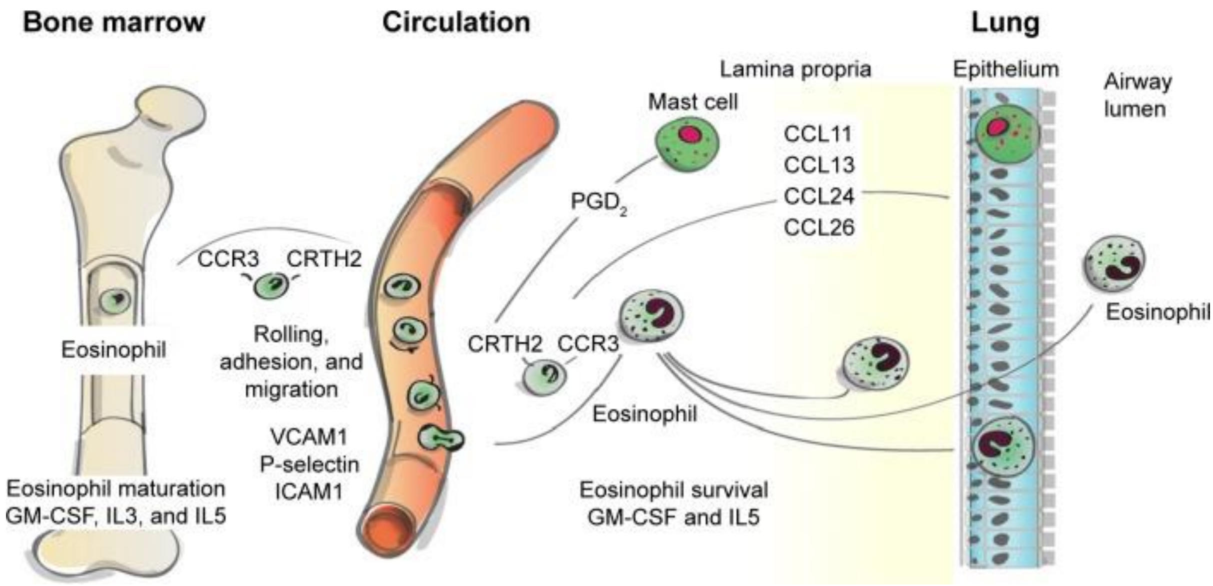
Παθογένεια

Η ΧΑΠ χαρακτηρίζεται από χρόνια φλεγμονή στους αεραγωγούς, παρέγχυμα και πνευμονική αγγείωση. Τα μακροφάγα, τα Τ-λεμφοκύτταρα (κυρίως $CD8^+$) και τα ουδετερόφιλα αυξάνονται σε διάφορα τμήματα του πνεύμονα. Τα ενεργοποιημένα φλεγμονώδη κύτταρα απελευθερώνουν μια ποικιλία μεσολαβητών συμπεριλαμβανομένων λευκοτριενίων B4 (LTB4), την ιντερλευκίνη-8 (IL-8), τον παράγοντα νέκρωσης όγκου-α (TNF-α) και άλλων, ικανών να βλάψουν τις δομές των πνευμόνων ή να διατηρήσουν την ουδετεροφιλική φλεγμονή. Εκτός από την φλεγμονή, σημαντικά στοιχεία στην παθογένεια της ΧΑΠ αποτελούν η ανισορροπία πρωτεασών- αντιπρωτεασών στον πνεύμονα, και το οξειδωτικό στρες. Ο καπνός του τσιγάρου μπορεί να προκαλέσει φλεγμονή και βλάβη απευθείας στους πνεύμονες.

Οι ελεύθερες ρίζες O_2 και αζώτου που παράγονται από τα φλεγμονώδη κύτταρα καθώς και τα οξειδωτικά που περιλαμβάνονται στον καπνό του τσιγάρου διαταράσσουν την ισορροπία μεταξύ οξειδωτικών- αντιοξειδωτικών προκαλώντας οξειδωτικό στρες. Το οξειδωτικό στρες ενισχύει την φλεγμονή, προκαλεί την απενεργοποίηση των αντιπρωτεασών και διεγείρει την παραγωγή βλέννας από τους βλεννογόνους (MacNee, 2006).

Επιπλέον, τα ηωσινόφιλα φαίνεται πως συμβάλλουν στην φλεγμονή που προάγει την απόφραξη των αεραγωγών (Saha and Brightling, 2006). Παρόλο που η ηωσινοφιλική φλεγμονή σχετίζεται συχνότερα με το άσθμα και έχει χρησιμοποιηθεί για την διαφοροποίηση του άσθματος από τη ΧΑΠ (Cukic *et al*., 2012), μελέτες δείχνουν ότι περίπου το 1/3 των ασθενών με ΧΑΠ έχουν ηωσινοφιλία πτυέλων (Eltboli *et al*., 2014), (Pizzichini *et al*., 1998), (Leigh *et al*., 2006).

Όπως φαίνεται στην εικόνα 2, υπό κανονικές συνθήκες τα ηωσινόφιλα παραμένουν σε ηρεμία στο αίμα. Κατά την έκθεση σε προφλεγμονώδεις μεσολαβητές (IL3, IL5) τα ηωσινόφιλα μπορούν να ενεργοποιηθούν μερικώς πριν μεταναστεύσουν σε σημεία φλεγμονής (George and Brightling, 2016), (Davoine and Lacy, 2014), (Luijk *et al*., 2005). Η μετανάστευσή τους στους πνεύμονες ελέγχεται από χημειοτακτικούς παράγοντες (CCL5, CCL7, CCL11 και άλλοι). Προφλεγμονώδεις μεσολαβητές, κυτοκίνες, χημειοκίνες και αυξητικοί παράγοντες που απελευθερώνονται από τα ηωσινόφιλα (George and Brightling, 2016), (Moqbel *et al*., 1994) συμμετέχουν στην παρατεταμένη φλεγμονή και βλάβη των ιστών των πνευμόνων (Davoine and Lacy, 2014), (Kita, 1996).



Εικόνα 2: Διακίνηση ηωσινόφιλων από το μυελό των οστών στους αεραγωγούς. Τα ώριμα ηωσινόφιλα αφήνουν τον μυελό των οστών, κυκλοφορούν στο αίμα και μεταναστεύουν στον ιστό υπό την επίδραση διαφόρων χημειοτακτικών παραγόντων. Η διήθηση στους αεραγωγούς γίνεται μέσω της προσκόλλησης και της μετανάστευσης κατά μήκος του βρογχικού αγγειακού επιθηλίου. Οι χημειοκίνες, όπως οι CCL5 και CCL11, και άλλοι παράγοντες παίζουν ρόλο σε αυτή τη διαδικασία (Πηγή: George and Brightling, 2016).

Η παραμονή των ηωσινόφιλων στους ιστούς των πνευμόνων διαρκεί λίγες μέρες και στο διάστημα αυτό ενεργοποιούνται οι μεταλλοπρωτεϊνάσες της μήτρας οι οποίες καταστρέφουν τα κυψελιδικά τοιχώματα προκαλώντας εμφύσημα. Επιπλέον, παρατηρείται αύξηση των προφλεγμονωδών κυτοκινών κατά την μετατροπή των ηωσινόφιλων σε αποπτωτικά (Mycroft *et al*., 2020). Στη μετατροπή των ηωσινόφιλων και των βρογχικών επιθηλιακών κυττάρων σε αποπτωτικά εμπλέκονται οι ελεύθερες ρίζες οι οποίες επιδρούν σε αυτά. Οι ελεύθερες ρίζες παράγονται κατά την οξειδωτική φωσφορυλίωση που πραγματοποιείται στα μιτοχόνδρια. Με αυτόν τον τρόπο, η πληθώρα ελευθέρων ριζών οδηγεί στη δημιουργία πολλών αποπτωτικών κυττάρων και κατ' επέκταση στην φλεγμονή στους ιστούς των αεραγωγών (Zifa *et al*., 2012).

Κλινική Εικόνα

Η κύρια συμπτωματολογία που εμφανίζουν οι ασθενείς με ΧΑΠ είναι ο βήχας, η αποβολή πτυέλων και η δύσπνοια η οποία εμφανίζεται ύστερα από μερικά χρόνια, συνήθως κατά την φυσική άσκηση, αλλά με την πάροδο του χρόνου επιβαρύνεται (Σιχλετίδης, 2009). Άλλα κλινικά σημεία αποτελούν το σφίξιμο στο στήθος, η κόπωση, η απώλεια βάρους (σε προχωρημένα στάδια) και η ανορεξία (Burgel *et al.*, 2014).

Ένα από τα πιο διαδεδομένα γνωρίσματα της ΧΑΠ αποτελούν οι παροξύνσεις ή τα επεισόδια οξείας επιδείνωσης των αναπνευστικών κλινικών σημείων. Τα αίτια των παροξύνσεων οφείλονται συνήθως σε ιογενείς ή βακτηριακές λοιμώξεις αλλά και στην ρύπανση της ατμόσφαιρας. Οι παροξύνσεις σε προχωρημένα στάδια πολλές φορές οδηγούν την είσοδο στο νοσοκομείο. Οι ασθενείς σε προχωρημένο στάδιο εκδηλώνουν και άλλες συννοσηρότητες, όπως καρδιακή και αναπνευστική ανεπάρκεια (Vogelmeier *et al*., 2017).

Διάγνωση

Η διάγνωση της ΧΑΠ βασίζεται σε ασθενείς που διαθέτουν ορισμένα από τα κλινικά συμπτώματα ή ακόμη που διαθέτουν ιστορικό καπνίσματος. Κύρια διαγνωστική εξέταση αποτελεί η σπιρομέτρηση η οποία μπορεί να επιβεβαιώσει τον βαθμό απόφραξης των αεραγωγών. Στη σπιρομέτρηση υπολογίζεται ο απότομος εκπνεόμενος όγκος αέρα σε ένα δευτερόλεπτο (FEV1=forced expiratory volume), καθώς και η ολική μέγιστη ποσότητα αέρα που μπορεί να εκπνεύσει ο ασθενής, η εκπνεόμενη ζωτική χωρητικότητα (FVC= forced vital capacity). Η απόφραξη των αεραγωγών ορίζεται από την τιμή του κλάσματος, το οποίο κλάσμα είναι ο σταθερός λόγος της FEV1/ FVC. Πέρα από τη σπιρομέτρηση, η διάγνωση προέρχεται και από το ιατρικό ιστορικό, το προηγούμενο ιστορικό άσθματος, αλλεργίας και αναπνευστικής λοίμωξης. Σημαντικό στοιχείο αποτελεί ο έλεγχος του ασθενή για τυχόν ανεπάρκεια της α1-αντιθρυψίνης ή γενετική διαφοροποίηση στο χρωμόσωμα 14 (Celli *et al.*, 2004). Επιπλέον βοηθητικές εξετάσεις οι οποίες περιλαμβάνονται στην εξαγωγή της διάγνωσης αποτελούν η ανάλυση αερίων αίματος, η μέτρηση των πνευμονικών όγκων (με την ολόσωμη πληθυσμογραφία), η ακτινογραφία θώρακος, το τεστ κοπώσεως και το ηλεκτροκαρδιογράφημα όπου αναδεικνύει το στάδιο της καρδιακής και αναπνευστικής λειτουργίας (Σιχλετίδης, 2009).

Θεραπεία

Η λογική της θεραπείας σε ασθενείς με ΧΑΠ στηρίζεται στην ανακούφιση από τα συμπτώματα της νόσου, στην μείωση των παροξύνσεων αλλά και στην βελτιστοποίηση της φυσικής κατάστασης του ασθενούς. Η θεραπεία της ΧΑΠ διακρίνεται σε φαρμακευτική και μη φαρμακευτική, ενώ το κάθε σχήμα της που θα ακολουθηθεί θα πρέπει να είναι εξατομικευμένο ανάλογα με τις ανάγκες του ασθενούς.

Η φαρμακευτική θεραπεία περιλαμβάνει τα εισπνεόμενα βρογχοδιασταλτικά (β2-αγωνιστές, αντιχολινεργικά), τα εισπνεόμενα κορτικοστεροειδή και τα αντιβιοτικά (GOLD, 2022), (Viniol and Vogelmeier, 2018). Τα βρογχοδιασταλτικά (μακράς δράσης) μειώνουν τον όγκο των πνευμόνων μειώνοντας την παγίδευση του αέρα. Προκαλούν χαλάρωση των μυών στα τοιχώματα των αεραγωγών και μειώνουν την υπάρχουσα στένωση. Τα εισπνεόμενα κορτικοστεροειδή βελτιώνουν τα συμπτώματα, αυξάνουν την πνευμονική λειτουργία και μειώνουν την συχνότητα των παροξύνσεων. Γενικά, προτιμάται η χορήγηση συνδυασμού κορτικοστεροειδών με βρογχοδιασταλτικά καθώς θεωρείται πιο αποτελεσματική στην αντιμετώπιση των συμπτωμάτων με ΧΑΠ (Ejiofor and Turner, 2013).

Η μη φαρμακευτική θεραπεία περιλαμβάνει την διακοπή του καπνίσματος, την οξυγονοθεραπεία, την πνευμονική αποκατάσταση και τον μη επεμβατικό μηχανικό αερισμό (GOLD, 2022), (Viniol and Vogelmeier, 2018).

Τέλος, σημαντικό στοιχείο αποτελεί η βελτίωση της διατροφής του ασθενούς, καθώς αυτή θα πρέπει να περιλαμβάνει αντιοξειδωτικά όπως βιταμίνη C, E και προ- βιταμίνη A (Rahman *et al.*, 1996). Ακόμη, τα φλαβονοειδή και το λυκοπένιο αποτελούν χρήσιμα αντιοξειδωτικά καθώς επιδρούν ενάντια στα οξειδωτικά στοιχεία του καπνού. Οι υγιείς πνεύμονες προστατεύονται από ενζυματικούς μηχανισμούς όπως είναι η καταλάση (CAT), η υπεροξειδική δισμουτάση (SOD) και η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx) καθώς αντιδρούν με το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) (Domej *et al.*, 2014).

1.2 ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑ-ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΗ ΑΛΥΣΙΔΑ

Τα μιτοχόνδρια είναι κυτταρικά οργανίδια, τα οποία συμβάλλουν στην ομαλή λειτουργία των κυττάρων και στη ρύθμιση του κυτταρικού θανάτου (Kuznetsov and Margreiter, 2009). Ο κυριότερος ρόλος τους είναι η παραγωγή τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP), μέσω μεταβολικών διαδικασιών στις οποίες συμπεριλαμβάνεται ο κύκλος του τρικαρβοξυλικού ή κιτρικού οξέος (TCA), καθώς και η αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων. Η παραγωγή των μορίων ATP που απαιτείται για την τροφοδοσία του οργανισμού επιτυγχάνεται μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, δηλαδή τις οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις που επιτρέπουν την ροή των ηλεκτρονίων από τα NADH και $FADH_2$ προς το μοριακό οξυγόνο (Mazat *et al.*, 2020), (Berg *et al.*, 2012).

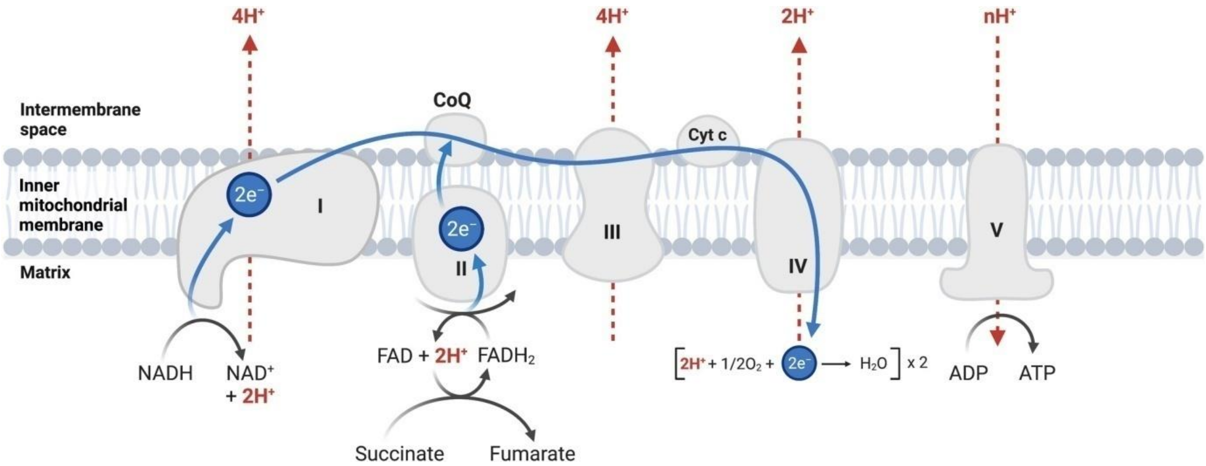
Η αναπνευστική αλυσίδα των μιτοχονδρίων είναι υπεύθυνη για την παραγωγή ATP και αποτελείται από πέντε σύμπλοκα. Τα ηλεκτρόνια περνάνε μέσα από μια αλυσίδα πρωτεϊνικών συμπλόκων με αποτέλεσμα να μειώνεται το επίπεδο ενέργειάς τους και να απελευθερώνεται ενέργεια. Η ενέργεια αυτή χρησιμοποιείται για την έξοδο H^+, που προκύπτουν από τις αντιδράσεις οξείδωσης του NADH, από την μιτοχονδριακή μήτρα στον διαμεμβρανικό χώρο. Έτσι, δημιουργείται διαβάθμιση πρωτονίων, δηλαδή ο διαμεμβρανικός χώρος είναι αρνητικά φορτισμένος και η μήτρα είναι αρνητικά φορτισμένη. Αυτή η διαβάθμιση χρησιμοποιείται από την ATP synthase, για να σχηματίσει ATP από ADP. Η ροή των ηλεκτρονίων καταλύεται από τα παρακάτω τέσσερα πρωτεϊνικά σύμπλοκα και ένα συνένζυμο, (Ahmad *et al.*, 2019):

1. **Σύμπλοκο I**, γνωστό και ως Οξειδοαναγωγάση του Ζεύγους NADH-Q. Είναι υπεύθυνο για την οξείδωση του NADH $\rightarrow$ NAD+ + H^+ + $2e^-$. Τα δύο ηλεκτρόνια που προκύπτουν μεταφέρονται στο συνένζυμο Q.
2. **Σύμπλοκο II**, γνωστό και ως Αναγωγάση του Ζεύγους ηλεκτρικού-Q. Αντίστοιχα με το σύμπλοκο I, το σύμπλοκο II είναι υπεύθυνο για την μεταφορά ηλεκτρονίων από το $FADH_2$ στο συνένζυμο Q.
3. Συνένζυμο Q, γνωστό και ως Ουβικινόνη. Είναι υπεύθυνο για τη μεταφορά των ηλεκτρονίων στο **σύμπλοκο III**.

4. **Σύμπλοκο ΙΙΙ**, γνωστό και ως Οξειδοαναγωγάση του Ζεύγους Q – Κυτόχρωμα c. Δέχεται ηλεκτρόνια από το συνένζυμο Q και τα προωθεί στο σύμπλοκο IV και παράλληλα μεταφέρει H^+ από τη μήτρα των μιτοχονδρίων στην διαμεμβρανική περιοχή.
5. **Σύμπλοκο IV**, γνωστό και ως Οξειδάση του Κυτοχρώματος c. Είναι ο τελευταίος μεταφορέας ηλεκτρονίων της αναπνευστικής αλυσίδας. Μεταφέρει τα ηλεκτρόνια στον τελικό τους δέκτη, το O_2. Το O_2, τελικά, ανάγεται σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση:

$$2e^- + H^+ + ½\ O_2 \rightarrow H_2O$$

Τα παραπάνω σύμπλοκα απεικονίζονται στην εικόνα 3.



Εικόνα 3: Σχηματική απεικόνιση της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων. Αυτή η εικόνα υποδεικνύει μονοπάτια μεταφοράς ηλεκτρονίων (μπλε) και μετατόπιση πρωτονίων (κόκκινο) στη μιτοχονδριακή αλυσίδα (Πηγή: Yin and O'Neill, 2021).

1.3 ΔΡΑΣΤΙΚΕΣ ΜΟΡΦΕΣ ΟΞΥΓΟΝΟΥ- ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ

Η σωστή λειτουργία της αναπνευστικής αλυσίδας αποτελεί σημαντικό παράγοντα για την φυσιολογική ανάπτυξη ενός οργανισμού καθώς καλύπτει τις ενεργειακές απαιτήσεις του μέσω της παραγωγής ATP. Δυσλειτουργία οποιουδήποτε εκ' των συμπλόκων της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων έχει ως αποτέλεσμα την ύπαρξη διαφόρων ασθενειών, με χαρακτηριστικό την μειωμένη παραγωγή ATP αλλά και την αυξημένη παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) (Zhao *et al.*, 2019). Στις δραστικές μορφές οξυγόνου περιλαμβάνονται οι ρίζες ανιόντων υπεροξειδίου και η ρίζα υδροξυλίου, αλλά και μη ριζικά οξειδωτικά όπως το O_2 και το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) (Zorov *et al.*, 2014).

Δύο σημαντικοί λόγοι παραγωγής δραστικών μορφών οξυγόνου αποτελούν η βακτηριοκτόνος δράση τους αλλά και η ενδοκυτταρική τους σηματοδότηση. Πιο συγκεκριμένα, το ένζυμο οξειδάση του NADPH ή NOX συμμετέχει στην παραγωγή ROS με βακτηριοκτόνο δράση στα φαγοκύτταρα. Η ενεργοποίηση των φαγοκυττάρων επιτυγχάνεται μέσω υποδοχέων αναγνώρισης μοτίβου (PRRs). Η οξειδάση του NADPH στοχεύει στην μεταφορά ηλεκτρονίων από το NADPH στο O_2 σχηματίζοντας την ρίζα του ανιόντος υπεροξειδίου του O_2 η οποία διευκολύνει την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c (Wiegman *et al.*, 2015).

Η ενδοκυτταρική απελευθέρωση των ROS μπορεί να επιφέρει αλλαγές στην μεταγραφή και την κυτταρική ομοιόσταση (Murphy, 2009). Πιο συγκεκριμένα, η απελευθέρωση του H_2O_2 έχει την ικανότητα απενεργοποίησης της πρωτεϊνικής φωσφατάσης τυροσίνης (PTP), ρυθμίζοντας έτσι την φωσφορυλίωση της τυροσίνης και κατ' επέκταση την σηματοδότηση με μεσολάβηση κινάσης (Denu and Tanner, 1998). Το γεγονός αυτό είναι πιθανό να σχετίζεται με την ΧΑΠ καθώς η PTP συμβάλλει στην ενεργοποίηση και μετανάστευση των ουδετερόφιλων (Kuiper *et al*., 2011).

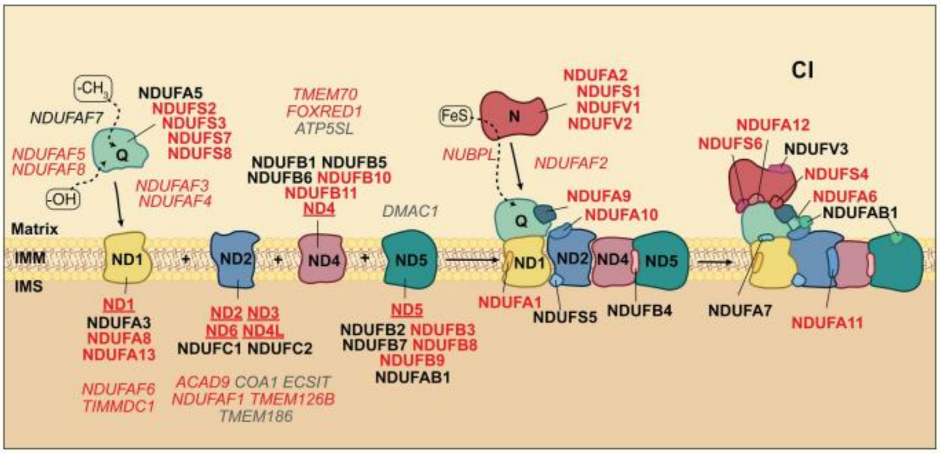
Οι δραστικές μορφές οξυγόνου μπορούν να δημιουργήσουν βλάβες στο RNA καθώς και στο πυρηνικό και μιτοχονδριακό DNA. Αυτό συμβαίνει διότι τα μόρια RNA είναι μονόκλωνα, δεν προστατεύονται από ιστόνες και υπάρχει ανεπάρκεια επιδιορθωτικών μηχανισμών σε αντίθεση με το DNA (Boukhenouna *et al*., 2018). Το ίδιο συμβαίνει και στο μιτοχονδριακό DNA (Alexeyev, 2009).

Η πλειονότητα της παραγωγής ROS προέρχεται από τα μιτοχόνδρια. Η «διαρροή» που εμφανίζει η αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων είναι δυνατόν να συμβεί στο σύμπλοκο I και III. Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, το σύμπλοκο III θεωρείται η βασική πηγή δημιουργίας ROS, με την παραγωγή ελευθέρων ριζών ανιόντων ημικινόνης ($\cdot O^-$) καθώς αποτελούν ενδιάμεσο προϊόν στην αναγέννηση του συνενζύμου Q. Οι ρίζες ανιόντων ημικινόνης μπορούν να μεταφέρουν ηλεκτρόνια με μη ενζυματικό τρόπο στο μοριακό οξυγόνο με αποτέλεσμα τη δημιουργία μιας ρίζας $\cdot O_2^-$. Επιπλέον, ένα μέρος της παραγωγής ROS αποτελεί ο φυσιολογικός ενδοκυτταρικός μεταβολισμός στα υπεροξεισώματα (Finkel and Holbrook, 2000), (Thannickal and Fanburg, 2000).

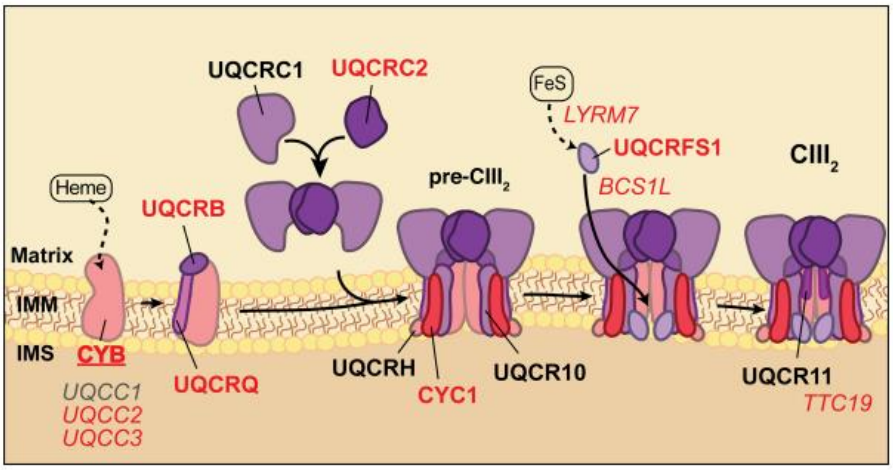
Από την άλλη, ένα αντιοξειδωτικό αμυντικό σύστημα που περιλαμβάνει την καταλάση (CAT), την υπεροξειδική δισμουτάση (superoxide dismutase, SOD), και την υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (glutathione peroxidase, GPx), διατηρεί την κυτταρική ομοιόσταση μέσω της ρύθμισης των συνολικών επιπέδων ROS με ενζυματικό και μη ενζυματικό τρόπο (Finkel and Holbrook, 2000).

Όταν η παραγωγή ROS υπερβαίνει την ενδογενή αντιοξειδωτική άμυνα, προκαλείται οξειδωτικό στρες το οποίο οδηγεί σε βλάβη των νουκλεϊκών οξέων, πρωτεϊνών και λιπιδίων προκαλώντας τον κυτταρικό θάνατο (Davies, 1995).

Ο Leopoldo Aguilera-Aguirre σε μελέτη του, προσπάθησε να προσδιορίσει τις πρωτεΐνες του μιτοχονδρίου που οξειδώνονται, μετά την έκθεση του κυττάρου σε γύρη φυτού του γένους Ambrosia (RWE), συστατικά της οποίας έχουν ενεργότητα οξειδάσης του NADPH κι έτσι ενεργοποιούν το σχηματισμό ROS. Ανάμεσα στις πρωτεΐνες αυτές ήταν και η UQCRC2 (Ubiquinol-cytochrome reductase core 2), δομικό συστατικό της αναγωγάσης του κυτοχρώματος c, του τρίτου συμπλόκου της αναπνευστικής αλυσίδας. Βλάβη της συγκεκριμένης πρωτεΐνης προκαλούσε αυξημένη παραγωγή ROS από το μιτοχόνδριο. Άλλες δύο πρωτεΐνες που βρέθηκαν ήταν η NDUFS1 και η NDUFS2 που αποτελούν μέρος του συμπλόκου I (Aguilera-Aguirre *et al*., 2009). Οι πρωτεΐνες αυτές απεικονίζονται στις εικόνες 4 και 5. Επίσης, έχει βρεθεί πως η ροτενόνη δρα ως ισχυρός αναστολέας του συμπλόκου I της αναπνευστικής αλυσίδας με αποτέλεσμα τον σχηματισμό ROS (Heinz *et al*., 2017). Την ίδια διαδικασία πραγματοποιεί και η αντιμυκίνη A, με την διαφορά ότι εκείνη δρα ως αναστολέας του συμπλόκου III (Ma *et al*., 2011).



Εικόνα 4: Σχηματική απεικόνιση του συμπλόκου I που παρουσιάζει γνωστά γονίδια μιτοχονδριακής νόσου με κόκκινο χρώμα (Πηγή: Hock *et al*., 2020).



Εικόνα 5: Σχηματική απεικόνιση του συμπλόκου III που παρουσιάζει γνωστά γονίδια μιτοχονδριακής νόσου με κόκκινο χρώμα (Πηγή: Hock *et al*., 2020).

Τέλος, πολλές βοηθητικές πρωτεΐνες παίζουν σημαντικό ρόλο στην ομαλή λειτουργία της αναπνευστικής αλυσίδας ενώ δεν αποκλείεται να υποστούν βλάβη. Τέτοιες πρωτεΐνες είναι η GRP75 που σχετίζεται με το σύμπλεγμα III, οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ HSP70 και HSP60 που σχετίζονται με τα σύμπλοκα I, II, III, IV και II, IV αντίστοιχα, καθώς και η κιτρική συνθάση (σύμπλοκο II) (Aguilera-Aguirre *et al*., 2009).

.

1.4 ΔΡΑΣΤΙΚΕΣ ΜΟΡΦΕΣ ΟΞΥΓΟΝΟΥ- ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΕΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ tRNA ΓΟΝΙΔΙΩΝ

Η ανεξέλεγκτη παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου είναι πιθανό να προέρχεται από μεταλλάξεις στα μιτοχόνδρια και ειδικότερα στα γονίδια μιτοχονδριακών tRNA. Ένα χαρακτηριστικό του μιτοχονδριακού γονιδιώματος είναι η ευαισθησία του στη δημιουργία αλλαγών και μεταλλάξεων. Ο ρυθμός μεταλλαξιγένεσης του mtDNA είναι περίπου 10-17 φορές υψηλότερος σε σχέση με το πυρηνικό DNA (Allen and Raven, 1996), (Pesole *et al*., 1999). Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι το mtDNA βρίσκεται κοντά στην εσωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου και έτσι είναι εκτεθειμένο στις δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) που προέρχονται από την αναπνευστική αλυσίδα (Allen and Raven, 1996). Το μιτοχονδριακό γονιδίωμα είναι πολυπλοειδές με αρκετά αντίγραφα γενετικού υλικού σε κάθε μιτοχόνδριο και εκατοντάδες μιτοχόνδρια σε κάθε κύτταρο. Στους φυσιολογικούς ιστούς όλα τα mtDNAs του κυττάρου είναι πανομοιότυπα, μια κατάσταση που ονομάζεται ομοπλασμία. Στην περίπτωση παθογόνων μεταλλάξεων, αυτές προσβάλλουν μερικά αλλά όχι όλα τα mtDNAs σε ένα κύτταρο, σε έναν ιστό ή σε ένα άτομο. Ως ετεροπλασμία χαρακτηρίζεται η συνύπαρξη mtDNAs άγριου τύπου και μεταλλαγμένου στο ίδιο μιτοχόνδριο, κύτταρο, όργανο ή άτομο σε διάφορες αναλογίες. Το επίπεδο της ετεροπλασμίας παίζει σημαντικό ρόλο στον καθορισμό του κλινικού φαινοτύπου (Sciacco *et al*., 1994).

Σήμερα, το μεγαλύτερο ενδιαφέρον των επιστημόνων επικεντρώνεται στα μιτοχονδριακά tRNA εξαιτίας της ανακάλυψης μεγάλου αριθμού σημειακών μεταλλάξεων στα γονίδια που τα κωδικοποιούν. Αξιοσημείωτο γεγονός αποτελεί ότι τα μιτοχονδριακά tRNA γονίδια παρόλο που αποτελούν μόλις το 10% του μιτοχονδριακού γονιδιώματος, συγκεντρώνουν πάνω από τις μισές μεταλλάξεις του mtDNA που έχουν χαρακτηριστεί ως παθογόνες και σχετίζονται με ασθένεια. Μέχρι σήμερα, έχουν βρεθεί και χαρακτηριστεί 139 παθογόνες μεταλλάξεις στα 21 από τα 22 tRNA γονίδια (Πίνακας 1). Η μοναδική εξαίρεση αποτελεί το γονίδιο $tRNA^{Arg}$. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι μόνο τρία tRNA γονίδια φέρουν το 50% των γνωστών παθογόνων μεταλλάξεων στον άνθρωπο και αυτά είναι: $tRNA^{Leu(UUR)}$, $tRNA^{Lys}$ και $tRNA^{Ile}$. Στο γονίδιο $tRNA^{Leu(UUR)}$ έχουν εντοπιστεί οι περισσότερες παθογόνες μεταλλάξεις. Αν και η λευκίνη αποτελεί το πιο συχνά χρησιμοποιούμενο αμινοξύ στα μιτοχόνδρια (16%), φαίνεται πως το κωδικόνιο UUR χρησιμοποιείται λιγότερο συχνά (12%) από το κωδικόνιο CUN (88%). Αυτό το γεγονός ίσως εξηγεί ότι οι μεταλλάξεις στο γονίδιο $tRNA^{Leu(UUR)}$ φαίνεται να είναι πιο κοινές και λιγότερο θανατηφόρες (Nakamura *et al*., 2000).

Πίνακας 1: Παθογόνες και πολυμορφικές μεταλλάξεις στα ανθρώπινα γονίδια μιτοχονδριακών tRNA (Πηγή: Zifa, *et al*., 2007).

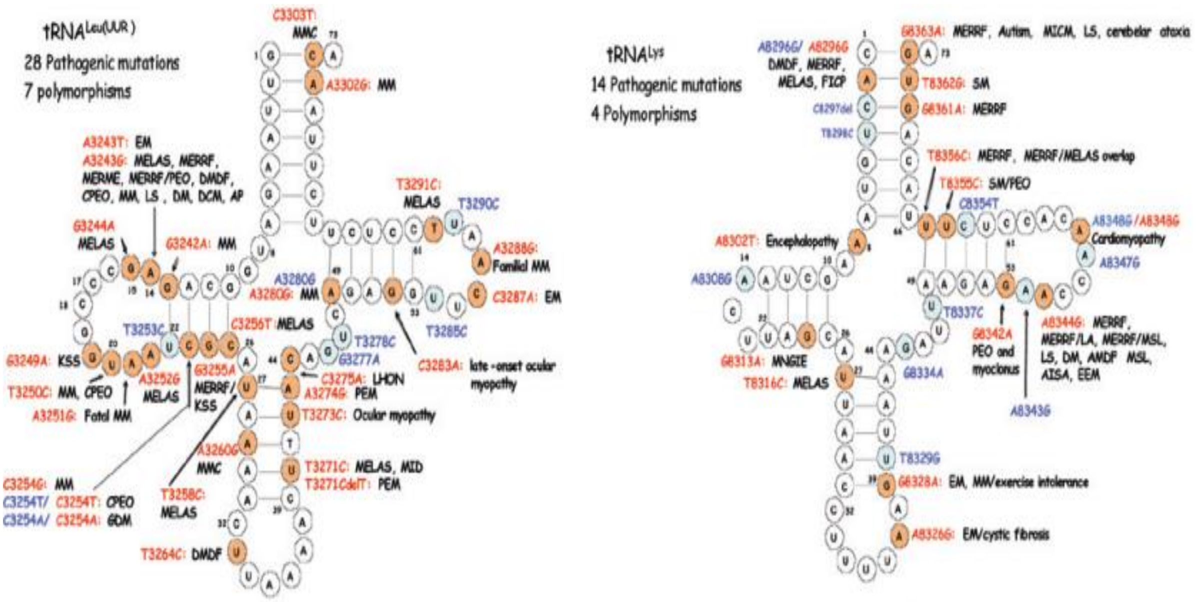
tRNA	Παθογόνες μεταλλάξεις	Πολυμορφικές μεταλλάξεις
$tRNA^{Leu(UUR)}$	28	7
$tRNA^{Lys}$	14	9
$tRNA^{Ile}$	14	7
$tRNA^{Leu(CUN)}$	10	11
$tRNA^{Thr}$	8	29
$tRNA^{Ser(UCN)}$	7	10
$tRNA^{Phe}$	7	10
$tRNA^{Val}$	6	10
$tRNA^{Trp}$	6	13
$tRNA^{Gly}$	5	12
$tRNA^{Tyr}$	4	7
$tRNA^{Pro}$	4	9
$tRNA^{Asn}$	4	7
$tRNA^{Gln}$	3	15
$tRNA^{His}$	3	11
$tRNA^{Met}$	3	6
$tRNA^{Ala}$	3	11
$tRNA^{Ser(AGY)}$	3	13
$tRNA^{Glu}$	3	9
$tRNA^{Cys}$	2	16
$tRNA^{Asp}$	2	11
$tRNA^{Arg}$	0	9
Συνολικά	**139**	**243**

Μελέτες έχουν δείξει πως σημειακές μεταλλάξεις γονιδίων μιτοχονδριακών tRNA σχετίζονται με ανεπάρκειες συμπλόκων της αναπνευστικής αλυσίδας, ενώ παράλληλα έχουν ανιχνευτεί περίπου 60 διαφορετικές παθογόνες μεταλλάξεις που στοχεύουν στην λειτουργία της αναπνευστικής αλυσίδας. Οι πιο γνωστές μεταλλάξεις αφορούν την κληρονόμηση μητρικών μεταλλάξεων γονιδίων tRNA καθώς και οι σποραδικές ελλείψεις (Munnich *et al*., 1996). Οι περισσότερες παθογόνες μεταλλάξεις γονιδίων μιτοχονδριακών tRNA που σχετίζονται με την ανεπάρκεια συμπλόκων της αναπνευστικής αλυσίδας αφορούν τα γονίδια $tRNA^{Leu}$, $tRNA^{Ser}$, $tRNA^{Lys}$. Το γονίδιο του μιτοχονδριακού $tRNA^{Leu}$ υπερτερεί σε σχέση με τα άλλα δύο, ενώ η μετάλλαξη που έχει εντοπιστεί τις περισσότερες φορές είναι η A3243G και σχετίζεται με την ανεπάρκεια του συμπλόκου I (σύμπλοκο NADH) (Zifa *et al*., 2007).

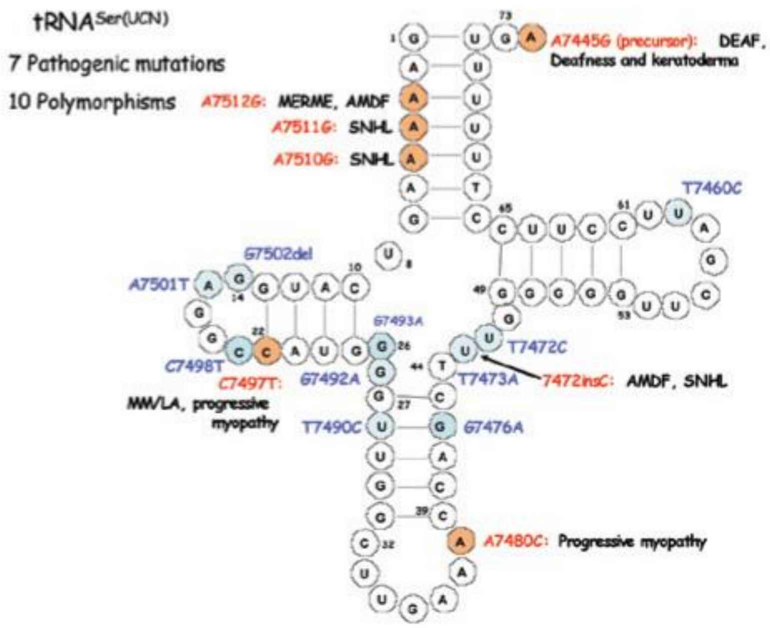
Η μετάλλαξη που αφορά το γονίδιο $tRNA^{Leu(UUR)}$ A3243G (Εικόνα 6) προκαλεί μια σημαντική δομική αλλαγή, το σχηματισμό ενός διμερούς συμπλέγματος, μέσω ζεύξης διαμοριακών βάσεων μεταξύ των βρόχων D. Η υψηλή σταθερότητα του διμερούς συμπλέγματος υποδηλώνει ότι μπορεί να παρατηρηθεί και in vivo, ενώ πρόσθετες μελέτες (Jaksch *et al*., 2001), (Wittenhagen and Kelley, 2002) έδειξαν ότι ο διμερισμός είναι εν μέρει υπεύθυνος για την απώλεια λειτουργίας του μεταλλαγμένου tRNA. Συνήθως οι παθογόνες μεταλλάξεις που σχετίζονται με την αναπνευστική αλυσίδα, βρίσκονται σπάνια σε μεταβλητούς βρόγχους των γονιδίων tRNA (Chalmers *et al*., 1997) και κατανέμονται τυχαία με εξαίρεση τα αντικωδικόνια και τους μεταβλητούς βρόγχους που αναφέρθηκαν. Άποψη των ερευνητών είναι ακόμη πως για την σωστή αναδίπλωση και αμινοακυλίωση των tRNA απαιτούνται μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις σε ζεύγη με μία βάση (Helm *et al*., 1999).

Η μετάλλαξη που αφορά το γονίδιο $tRNA^{Lys}$ A8344G (Εικόνα 6) είναι αποτέλεσμα απουσίας μιας τροποποίησης που περιέχει ταυρίνη, την 5- ταυρινομεθυλουριδίνη (Yasukawa *et al*., 2000). Η τροποποίηση αυτή στη θέση C5 της ουριδίνης συμβάλλει σημαντικά στην αποκωδικοποίηση του κωδικονίου UGG με αποτέλεσμα την σταθεροποίηση του ζεύγους βάσεων U:G. Αυτό εξηγεί το μεταφραστικό ελάττωμα των γονιδίων πλούσιων σε UUG, το οποίο οδηγεί σε ανεπάρκεια του συμπλόκου I της αναπνευστικής αλυσίδας (Kirino and Suzuki, 2005).

Δύο από τις σημειακές μεταλλάξεις που αφορούν το γονίδιο tRNA^{Ser}, οι T7512C και G7497A (Εικόνα 7), οδηγούν σε εξαιρετικά μειωμένα επίπεδα του tRNA$^{Ser(UCN)}$, ακόμη και κάτω του 10% σε σχέση με αυτά των controls, οδηγώντας με αυτό τον τρόπο σε ανεπάρκεια των συμπλόκων I και IV της αναπνευστικής αλυσίδας. Αυτό συμβαίνει πιθανότατα λόγω βλάβης σε κάποιες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις με αποτέλεσμα την αυξημένη δράση των νουκλεασών κατά των tRNA (Mollers *et al.*, 2005).

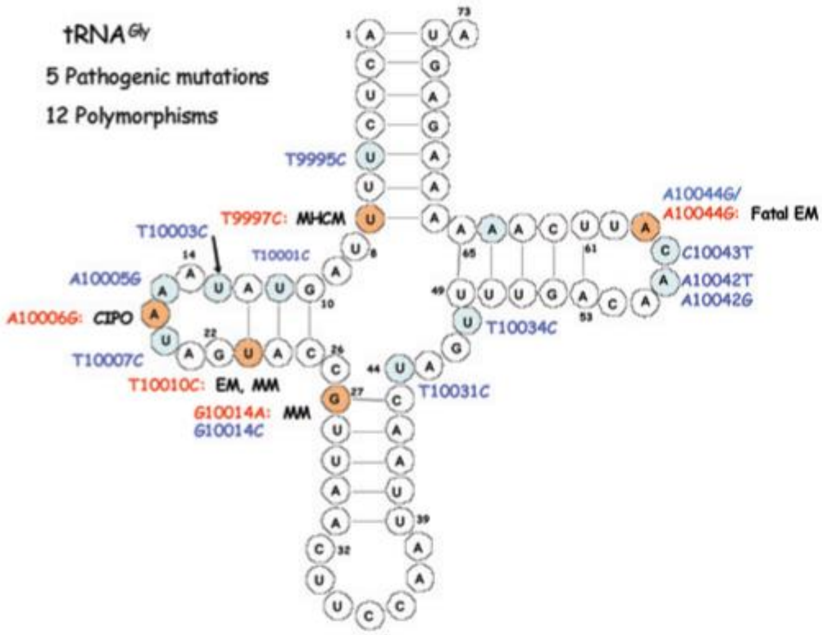


Εικόνα 6: Παθογόνες και πολυμορφικές μεταλλάξεις στα μιτοχονδριακά γονίδια tRNA^{Leu} και tRNA^{Lys} (Πηγή: Zifa *et al.*, 2007).



Εικόνα 7: Παθογόνες και πολυμορφικές μεταλλάξεις στο μιτοχονδριακό γονίδιο tRNA^{Ser} (Πηγή: Zifa *et al.*, 2007).

Με βάση μια ακόμη έρευνα που πραγματοποιήθηκε φαίνεται πως η μετάλλαξη στο μιτοχονδριακό γονίδιο tRNA^{Gly} T9997C φαίνεται να σχετίζεται με δυσλειτουργία της αναπνευστικής αλυσίδας. Η συγκεκριμένη μετάλλαξη προκαλεί σημαντική μείωση στο σύμπλοκο I και στο σύμπλοκο IV λόγω ετεροπλασμίας. Η σχετική μείωση στο σύμπλοκο IV είναι πολύ υψηλότερη σε σχέση με τη μετάλλαξη A3243G (Raha *et al.*, 1999). Άλλη μία μετάλλαξη που έχει βρεθεί είναι η T10010C και σχετίζεται με χαμηλή δραστηριότητα των συμπλόκων I, III, IV (Nishigaki *et al.*, 2002). Οι μεταλλάξεις αυτές απεικονίζονται στην εικόνα 8.



Εικόνα 8: Παθογόνες και πολυμορφικές μεταλλάξεις στο μιτοχονδριακό γονίδιο tRNA^{Gly} (Πηγή: Zifa *et al.*, 2007).

2. ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η ανίχνευση και η ταυτοποίηση μεταλλάξεων σε μιτοχονδριακά γονίδια tRNA σε ασθενείς με ΧΑΠ και αν αυτά ευθύνονται για δυσλειτουργικές πρωτεΐνες που εκφράζονται από το DNA των μιτοχονδρίων. Τα γονίδια που μελετήθηκαν είναι το $tRNA^{Leu}$ και το $tRNA^{Gly}$. Η ανίχνευση των μεταλλάξεων στα γονίδια tRNA πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια των μεθόδων PCR και SSCP. Στη συνέχεια τα δείγματα στάλθηκαν για αλληλούχιση με σκοπό την ταυτοποίηση των μεταλλάξεων. Ενδεχόμενη δυσλειτουργία των tRNA ίσως σχετίζεται με την εμφάνιση και την εξέλιξη της ΧΑΠ.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν 38 δείγματα αίματος από διαγνωσμένους ασθενείς με Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια. Τα δείγματα συλλέχθηκαν από την Πνευμονολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας και αποθηκεύτηκαν στους -20^{o}C μέχρι την έναρξη της διαδικασίας της απομόνωσης του DNA.

3.1 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΟΛΙΚΟΥ DNA

Για την απομόνωση του ολικού DNA χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο από το kit απομόνωσης NucleoSpin® Blood.
Το kit περιλαμβάνει:

- Buffer B3 (15mL)
- Wash Buffer BW (30mL)
- Wash Buffer B5 (12mL)
- Elution Buffer BE (13mL)
- Proteinase K (30mg)
- Proteinase Buffer PB (1.8mL)
- Στήλες NucleoSpin® Blood
- Σωλήνες συλλογής των 2mL

Πριν την έναρξη της διαδικασίας απομόνωσης απαιτείται η προετοιμασία των παρακάτω:

- Wash Buffer B5 (12mL) → προσθήκη 48mL αιθανόλης (96-100%)
- Proteinase K (30mg) → προσθήκη 1.35mL Proteinase Buffer

Πρωτόκολλο απομόνωσης DNA από ολικό αίμα:

- Αφού ξεπάγωσαν τα δείγματα, σε σωλήνες Eppendorf των 1.5mL έγινε ανάμειξη 25μL Proteinase K και 200μL δείγμα αίματος (για κάθε ασθενή χωριστά).
- Προσθήκη 200μL Buffer B3 σε κάθε δείγμα και έντονη ανάδευση στο vortex για περίπου 10-20 δευτερόλεπτα.
- Θέρμανση των δειγμάτων σε επωαστήρα στους 70^{o} C για 10-15 λεπτά.
- Προσθήκη 210μL αιθανόλης (96-100%) και ανάδευση ξανά στο vortex.
- Τοποθέτηση κάθε δείγματος στην αντίστοιχη στήλη που υπάρχει μαζί της και ένας σωλήνας συλλογής. Φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στις 11000 στροφές. (Αν τα δείγματα δεν τραβηχτούν εντελώς από τη μήτρα γίνεται επανάληψη της φυγοκέντρησης σε υψηλότερες στροφές). Απόρριψη του σωλήνα συλλογής με το υγρό.
- Τοποθέτηση της κάθε στήλης σε νέο σωλήνα συλλογής και προσθήκη 500μL Buffer BW. Φυγοκέντρηση ξανά για 1 λεπτό στις 11000 στροφές. Απόρριψη του σωλήνα συλλογής με το υγρό.
- Τοποθέτηση της κάθε στήλης σε νέο σωλήνα συλλογής και προσθήκη 600μL Buffer B5. Φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στις 11000 στροφές. Απόρριψη του υγρού και επαναχρησιμοποίηση του υπάρχοντος σωλήνα συλλογής.
- Φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στις 11000 στροφές και απόρριψη του σωλήνα συλλογής.

- Τοποθέτηση της κάθε στήλης σε σωλήνες Eppendorf των 1.5mL και προσθήκη 100μL προθερμασμένο (στους 70°C) Buffer BE. Διανομή του Buffer κατευθείαν στην μεμβράνη σιλικόνης και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 1 λεπτό. Φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στις 11000 στροφές.
- Τέλος, απόρριψη της στήλης και αποθήκευση του σωλήνα Eppendorf με το υγρό που περιέχει το απομονωμένο DNA για περαιτέρω επεξεργασία.

Μετά την ολοκλήρωση της απομόνωσης του DNA γίνεται ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πηκτή αγαρόζης 1% με σκοπό την ποιοτική ανίχνευση του mtDNA.

Εφόσον η ποσότητα και η ποιότητα του DNA είναι ικανοποιητικές ακολουθεί η ενίσχυση με τη μέθοδο της PCR (Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης).

3.2 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΗ ΑΓΑΡΟΖΗΣ (1%)

Η ηλεκτροφόρηση αποτελεί μια ευρέως χρησιμοποιούμενη τεχνική, η οποία είναι απλή και γρήγορη. Χρησιμοποιείται για την ανάλυση πολύπλοκων μειγμάτων, καθώς επίσης και για τον έλεγχο της καθαρότητας και της απομόνωσης διαφόρων βιομορίων όπως: πρωτεΐνες, νουκλεϊκά οξέα, πεπτίδια και άλλα. Η ηλεκτροφόρηση αποτελεί μια τεχνική διαχωρισμού κατά την οποία φορτισμένα μόρια μετακινούνται υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου στο εσωτερικό πηκτών. Διαφορετικά μόρια κινούνται με διαφορετικές ταχύτητες.

Πολλά βιομόρια περιέχουν ομάδες που μπορούν να ιονιστούν και έτσι σε υδατικά διαλύματα βρίσκονται σαν κατιόντα ή ανιόντα ανάλογα με το καθαρό φορτίο που φέρουν. Όταν τα μόρια αυτά βρεθούν σε ένα ηλεκτρικό πεδίο θα μετακινηθούν προς το θετικό ή αρνητικό πόλο με μια ταχύτητα η οποία εξαρτάται από το φορτίο, το μέγεθος και το σχήμα του μορίου, τις ιδιότητες του μέσου στήριξης κα τη θερμοκρασία. Όσον αφορά το φορτίο, αρνητικά φορτισμένα μόρια όπως το DNA μετακινούνται προς την άνοδο, ενώ θετικά φορτισμένα μόρια μετακινούνται προς την κάθοδο. Όσον αφορά το μέγεθος, τα μικρά μόρια μετακινούνται γρηγορότερα σε σχέση με τα μεγάλα. Όσον αφορά το σχήμα, η κινητικότητα διαφέρει ανάμεσα σε γραμμικό και κυκλικό DNA καθώς επίσης σε σφαιρικές και ινώδεις πρωτεΐνες. Τέλος όσον αφορά την ένταση του ηλεκτρικού πεδίου, όσο αυξάνεται η τάση του πεδίου, τόσο αυξάνεται και η κινητικότητα.

Ως υπόστρωμα για την μελέτη νουκλεϊκών οξέων μπορεί να χρησιμοποιηθεί η πηκτή αγαρόζης η οποία είναι διαυγής και επιτρέπει τη μέτρηση της οπτικής πυκνότητας των ζωνών. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί για το διαχωρισμό DNA και πρωτεϊνών. Η αγαρόζη εξάγεται με τη μορφή του άγαρ από διάφορα είδη κόκκινων θαλάσσιων φυκών. Η αγαρόζη είναι ένα γραμμικό πολυμερές που αποτελείται από την επανάληψη μονομερών μονάδων αγαροβιόζης. Η αγαροβιόζη είναι ένας δισακχαρίτης που αποτελείται από D-γαλακτόζη και 3,6-ανυδρο-L-γαλακτοπυρανόζης (Πλαγεράς κ.α., 2012).

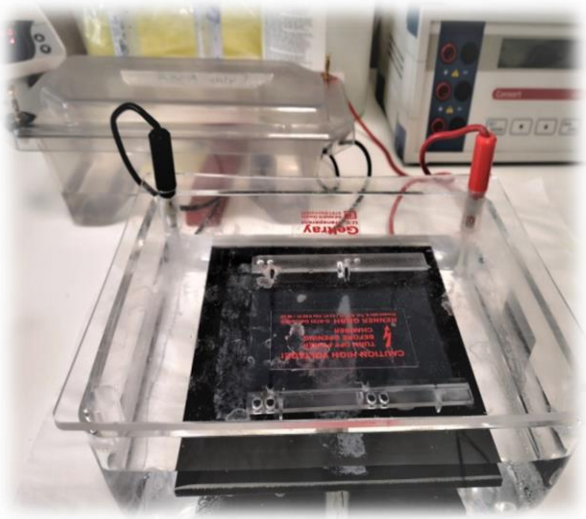
Τα υλικά που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή πηκτής αγαρόζης 1% είναι:

- 45mL ρυθμιστικό διάλυμα TBE(Tris-Borate-EDTA) 0.5X
- 0.3gr αγαρόζης
- 4μL χρωστική Xpert Green

Διαδικασία παρασκευής πηκτής

Σε κωνική φιάλη των 100mL προστίθενται 45mL ρυθμιστικό διάλυμα TBE 0.5X και 0.3gr αγαρόζης. Ακολουθεί θέρμανση σε φούρνο μικροκυμάτων για περίπου 2 λεπτά μέχρι την πλήρη διάλυση της αγαρόζης στο ρυθμιστικό διάλυμα. Στη συνέχεια γίνεται ελαφριά ψύξη του διαλύματος με τρεχούμενο νερό στα εξωτερικά τοιχώματα της φιάλης και προστίθεται 4μL χρωστικής Xpert Green. Ακολουθεί ήπια ανάδευση και περίχυση του διαλύματος στο ειδικό καλούπι στο οποίο έχουν τοποθετηθεί τα χτενάκια. Η σταθεροποίηση του πηκτώματος απαιτεί 20-30 λεπτά. Τέλος αφαιρούνται τα χτενάκια προσεκτικά και η πηκτή τοποθετείται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης που περιέχει ρυθμιστικό διάλυμα TBE 0.5X τόσο ώστε να καλύπτει το πήκτωμα.

Η φόρτωση των δειγμάτων στο πήκτωμα ηλεκτροφόρησης γίνεται ταυτόχρονα με τη χρωστική Methylene Blue (Loading Buffer). Πιο συγκεκριμένα, 3μL LB μαζί με 2μL από το κάθε δείγμα DNA που έχει απομονωθεί τοποθετείται σε κάθε πηγαδάκι του πηκτώματος. Η τάση του ηλεκτρικού πεδίου εφαρμόζεται στα 100 Volt και η διάρκεια ηλεκτροφόρησης είναι περίπου 20-30 λεπτά. Τέλος, ακολουθεί η παρατήρηση του πηκτώματος σε συσκευή UV. Όσα δείγματα DNA εμφανίσουν θετικό αποτέλεσμα, χρησιμοποιούνται στην αντίδραση PCR.



Εικόνα 9: Συσκευή ηλεκτροφόρησης.

3.3 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΑΡΑΣΗΣ (PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης αποτελεί μια μέθοδο που αναπτύχθηκε το 1985 από τον Mullis και άρχισε να χρησιμοποιείται ευρέως το 1987 με την χρήση θερμοανθεκτικών DNA πολυμερασών. Αυτή η ανακάλυψη του Mullis τιμήθηκε με βραβείο Νόμπελ το 1993 καθώς κατέστησε δυνατή την παραγωγή πολυάριθμων αντιγράφων ενός μορίου DNA σε σύντομο χρονικό διάστημα, ακόμα και αν υπάρχει στη διάθεσή μας ένα μόνο αρχικό μόριο DNA.

Η κινητική επανασύνδεση αποδιαταγμένου δίκλωνου DNA στην αρχή, όπου η διάρκεια επανασύνδεσης εξαρτάται από την συγκέντρωση και την πολυπλοκότητα των συμπληρωματικών αλυσίδων αποτελεί τη βάση της μεθόδου της PCR. Με τη μέθοδο αυτή πραγματοποιείται η δημιουργία ενός μεγάλου αριθμού αντιγράφων ενός συγκεκριμένου τμήματος DNA σε μια ενζυματική αντίδραση in vitro.

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης βασίζεται στον ενζυμικό πολλαπλασιασμό μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA που οριοθετείται από αριστερά και δεξιά από δύο εκκινητές- ολιγονουκλεοτίδια και η αλληλουχία του καθενός είναι συμπληρωματική προς τις δύο αλυσίδες του δίκλωνου DNA-εκμαγείου. Η αλληλουχία αυτή χρησιμοποιείται για το σχεδιασμό δυο συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων, ενός συμπληρωματικού προς το 3΄ άκρο της μιας αλυσίδας του DNA και ενός συμπληρωματικού προς το 5΄ άκρο της άλλης αλυσίδας. Αυτά τα ολιγονουκλεοτίδια μήκους 20-30 βάσεων χρησιμοποιούντα ως πρωταρχικά τμήματα για in vitro σύνθεση DNA και οριοθετούν τα άκρα του τελικού προϊόντος. Το κομμάτι αυτό θα επιλεγεί και θα πολλαπλασιαστεί αρκετές φορές με την βοήθεια άλλων μορίων όπως: η Taq DNA πολυμεράση, το κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα, ένα ζεύγος εκκινητών, τα τέσσερα τριφωσφορικά δεοξυνουκλεοτίδια και τα ιόντα μαγνησίου (Berg *et al*., 2002).

Απαραίτητοι παράγοντες για τη αντίδραση της PCR:

- **DNA-εκμαγείο:** Αποτελεί την απαραίτητη αλληλουχία-στόχο όπου θα υβριδιστούν οι εκκινητές. Λόγω της μεγάλης εξειδίκευσης και ευαισθησίας της μεθόδου, είναι σημαντικό το απομονωμένο DNA να είναι όσο το δυνατόν πιο καθαρό. Επίσης κατά την απομόνωση θα πρέπει να αποφεύγεται το σπάσιμο του DNA ώστε να μην δυσκολεύεται ο υβριδισμός των εκκινητών.
- **Εκκινητές:** Αποτελούν ολιγονουκλεοτιδικές ακολουθίες συμπληρωματικές ως προς τις αλληλουχίες οι οποίες περικλύουν το τμήμα που πρόκειται να ενισχυθεί.
- **Ρυθμιστικό διάλυμα (Buffer):** Ρυθμίζει το pH της αντίδρασης και πιο συγκεκριμένα το pH στο οποίο η δραστικότητα της πολυμεράσης είναι βέλτιστη.
- **Τριφωσφορικά δεοξυνουκλεοτίδια (dNTPs):** Αποτελούν το υπόστρωμα της πολυμεράσης η οποία τα προσθέτει με κατεύθυνση 5΄→3΄.
- **Ιόντα Mg^{2+}:** Προστίθενται στο μίγμα της αντίδρασης μέσω του διαλύματος $MgCl_2$ και χρησιμοποιούνται από την πολυμεράση ως μεταλλικός συμπαράγοντας. Πιο συγκεκριμένα, τα ιόντα αυξάνουν την ειδικότητα της αντίδρασης βοηθώντας τον υβριδισμό των εκκινητών.
- **DNA πολυμεράση:** Η θερμοανθεκτική Taq πολυμεράση προέρχεται από το θερμόφιλο βακτήριο Thermus aquaticus. Μέσω της πολυμεράσης αυτής αυτοματοποιήθηκε η διαδικασία ενίσχυσης με τη βοήθεια θερμικών κυκλοποιητών. Σημαντικό ρόλο στη δράση της αποτελεί το στέλεχος του βακτηρίου από το οποίο η ίδια απομονώνεται καθώς και ο τρόπος απομόνωσής της (Mullis and Faloona, 1987).

Για την ενίσχυση του DNA που απομονώθηκε από δείγματα αίματος ατόμων με ΧΑΠ πραγματοποιείται η μέθοδος της PCR. Τα ζεύγη εκκινητών που χρησιμοποιούνται είναι το LeuFWD-LeuREV καθώς και το FwGly-RevGly. Τα χαρακτηριστικά των εκκινητών παρουσιάζονται στους Πίνακες 2 και 3.

Πίνακας 2: Χαρακτηριστικά εκκινητών Leu.

$tRNA^{Leu}$	Όνομα primer	Αλληλουχία	Μήκος
Forward Primer	LeuFWD 5'→3'	AGGACAAGAGAAATAAGGCC	294
Reverse Primer	LeuREV 3'→5'	CACGTTGGGGCCTTTGCGTA	

Πίνακας 3: Χαρακτηριστικά εκκινητών Gly.

$tRNA^{Gly}$	Όνομα primer	Αλληλουχία	Μήκος
Forward Primer	FwGly 5'→3'	CCATCTATTGATGAGGGTCT	224
Reverse Primer	RevGly 3'→5'	GGATATAGGGTCCAAGCCGCA	

Για μια αντίδραση PCR των 50μL χρησιμοποιούνται:

- DNA →1μL
- 50pmol από τον κάθε primer →1μL+1μL
- 10x PCR Buffer →5μL
- 40μM dNTPs →1μL
- 25mM $MgCl_2$ →4μL
- 1U Taq πολυμεράση (5U/μL) →0.25μL
- ddH_2O μέχρι τα 50 μL →36.75μL

Αρχικά ετοιμάζεται σε σωλήνες Eppendorf των 1.5mL το μίγμα (Master Mix) το οποίο θα μοιραστεί σε κάθε PCR tube (200μL). Το μίγμα περιέχει τις παραπάνω ποσότητες των αντιδραστηρίων πολλαπλασιασμένες με τον αριθμό των δειγμάτων που υπόκεινται σε PCR συν ένα για τον αρνητικό μάρτυρα ο οποίος χρησιμοποιείται για να φανερώσει τις επιμολύνσεις. Το DNA προστίθεται σε κάθε ένα αριθμημένο PCR tube που αντιστοιχεί στο απομονωμένο δείγμα. Έτσι σε κάθε PCR tube ο τελικός όγκος είναι 50μL (1μL DNA+49μL μίγματος Master Mix). Στη συνέχεια πραγματοποιείται φυγοκέντρηση για μερικά δευτερόλεπτα στα PCR tubes και στο τέλος τοποθετούνται στον θερμικό κυκλοποιητή.

Η αντίδραση πραγματοποιείται σε όγκο 15-100μL σε σωλήνες Eppendorf των 0.2-0.5mL στον θερμικό κυκλοποιητή. Τα στάδια ενίσχυσης για την PCR είναι τα ακόλουθα (τα στάδια 2-4 επαναλαμβάνονται για 35 κύκλους):

1. **Αρχικό στάδιο:** Η θερμοκρασία ανέρχεται στους 95^oC και διατηρείται για 4 λεπτά.
2. **Στάδιο αποδιάταξης:** Η θερμοκρασία ανέρχεται στους 95^oC για 40 δευτερόλεπτα.
3. **Στάδιο υβριδισμού:** Η θερμοκρασία κατεβαίνει στους 52^oC για 45 δευτερόλεπτα, επιτρέποντας την υβριδοποίηση των εκκινητών (οι οποίοι βρίσκονται σε περίσσεια) με το μονόκλωνο DNA- εκμαγείο.

4. **Στάδιο επιμήκυνσης:** Η θερμοκρασία ανέρχεται και πάλι στους 72°C για 40 δευτερόλεπτα, όπου η Taq πολυμεράση λειτουργεί βέλτιστα.
5. **Στάδιο τελικής επιμήκυνσης:** Η θερμοκρασία παραμένει στους 72°C για 10 λεπτά ύστερα από τον τελευταίο κύκλο PCR.
6. **Τελικό στάδιο:** Η θερμοκρασία κατέρχεται στους 4°C.

Εικόνα 10: Θερμικός κυκλοποιητής.

Αφού ολοκληρωθεί η αντίδραση της PCR ακολουθεί η ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της σε πήκτωμα αγαρόζης 2% η οποία βασίζεται στο διαχωρισμό τμημάτων DNA ανάλογα με το μέγεθός τους. Η παρασκευή της αγαρόζης καθώς και η διαδικασία που έχει ακολουθηθεί είναι ακριβώς η ίδια που αναφέρθηκε παραπάνω για την απομόνωση του DNA με τη διαφορά ότι εδώ έγινε παρουσία μάρτυρα μοριακών μεγεθών τμημάτων DNA (ladder), καθώς είναι ο μόνος τρόπος για την απόδειξη ότι δεν ενισχύθηκαν μη ειδικά προϊόντα.

Πιο συγκεκριμένα, μετά το σχηματισμό πηκτής αγαρόζης 2% (διπλάσια ποσότητα αγαρόζης), 5μL από κάθε PCR προϊόν αναμιγνύονται με 3μL Loading Buffer και ακολουθεί η προσθήκη των δειγμάτων στα πηγαδάκια της πηκτής. Επίσης για τον προσδιορισμό του μήκους των PCR προϊόντων είναι απαραίτητη και η προσθήκη ενός μάρτυρα μοριακού βάρους (ladder). Ειδικότερα, 2μL ladder αναμιγνύεται με 2μL Loading Buffer και στη συνέχεια γίνεται προσθήκη στο πήκτωμα. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται και πάλι σε τάση 100 Volt για περίπου 30 λεπτά. Τέλος, ακολουθεί η παρατήρηση του πηκτώματος σε συσκευή UV.

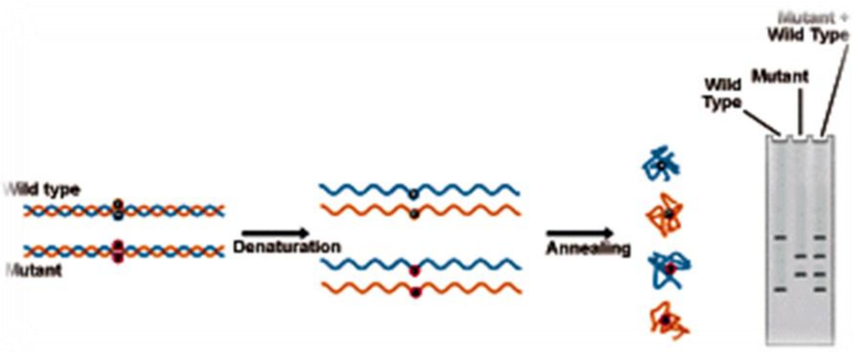
3.4 ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥ ΔΙΑΜΟΡΦΩΣΗΣ ΜΟΝΟΚΛΩΝΗΣ ΑΛΥΣΙΔΑΣ (SSCP)

Η SSCP θεωρείται σήμερα μία από τις πιο διαδεδομένες τεχνικές ανίχνευσης άγνωστων μεταλλάξεων. Η αρχή της μεθόδου στηρίζεται στο γεγονός ότι η διαμόρφωση του μονόκλωνου DNA που οφείλεται σε ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις είναι χαρακτηριστική για κάθε αλληλουχία DNA. Η ηλεκτροφορητική κινητικότητα των μονόκλωνων μορίων του DNA εξαρτάται από την διαμόρφωσή τους, η οποία σχετίζεται με το μέγεθος και τη σύστασή τους σε βάσεις. Έτσι λοιπόν, δύο μονόκλωνα μόρια DNA που διαφέρουν έστω και σε μία βάση εμφανίζουν διαφορετική διαμόρφωση και η μετακίνησή τους πραγματοποιείται με διαφορετική ταχύτητα κατά την ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης χωρίς αποδιατακτικούς παράγοντες (Orita *et al*., 1989).

Η περιοχή του DNA που πρόκειται να ελεγχθεί για την ύπαρξη κάποιας μετάλλαξης ή πολυμορφισμού ενισχύεται με την μέθοδο της PCR. Πιο συγκεκριμένα, το προϊόν της PCR αποδιατάσσεται σε υψηλές θερμοκρασίες και φορτώνεται σε πηκτή πολυακρυλαμίδης συγκεκριμένης συγκέντρωσης. Τα μονόκλωνα τμήματα του DNA κινούνται ανάλογα με το μέγεθος και τη διαμόρφωσή τους. Όταν το τμήμα DNA που ελέγχεται δεν παρουσιάζει κάποια μετάλλαξη τότε η κινητικότητα όλων των μορίων είναι ίδια και συνήθως μετά τη χρώση της πηκτής εμφανίζονται δύο ζώνες που αντιστοιχούν στις δύο συμπληρωματικές αλυσίδες του DNA.

Οι ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις που καθορίζουν τη διαμόρφωση του μορίου, αλλάζουν ανάλογα με τη θερμοκρασία και την ιοντική ισχύ. Έτσι, ο διαχωρισμός με την τεχνική SSCP διαφέρει ανάλογα με τις συνθήκες ηλεκτροφόρησης.

Σημαντικό πλεονέκτημα της SSCP αποτελεί η δυνατότητά της να ανιχνεύει ακόμα και ελάχιστες διαφορές στην αλληλουχία DNA ταυτόχρονα σε πολλά PCR προϊόντα. Με αυτόν τον τρόπο, ελαττώνεται στο ελάχιστο η ανάγκη προσδιορισμού της αλληλουχίας των βάσεων του DNA (Sequencing). Πρόκειται λοιπόν για μια απλή, γρήγορη και οικονομική τεχνική που παρουσιάζει και αρκετά μεγάλη ευαισθησία (Miterski *et al*., 2000).



Εικόνα 11: Αρχή λειτουργίας SSCP (Πηγή: https://www.nationaldiagnostics.com/2011/08/26/sscp-analysis/).

Παρασκευή πηκτής πολυακρυλαμιδίου

Για δύο πηκτώματα πηκτής πολυακρυλαμιδίου πυκνότητας 12% και όγκου 130mL χρησιμοποιούνται τα ακόλουθα:

- Ακρυλαμίδιο →15gr
- Δις- ακρυλαμίδιο → 0.375gr
- Γλυκερόλη 50% → 12.5mL
- TBE 10X → 10mL
- TEMED → 125mL
- APS 20% → 650mL

Διαδικασία:

~ Προετοιμασία συσκευής παρασκευής της πηκτής.

- Σε ποτήρι ζέσεως με μαγνητάκι γίνεται η προσθήκη των παραπάνω υλικών (εκτός από TEMED και APS) και ακολουθεί καλή ανάδευση.
- Φιλτράρισμα του περιεχομένου του ποτηριού ζέσεως με διηθητικό χαρτί σε κωνική φιάλη. Στη συνέχεια μεταφορά του σε ογκομετρικό σωλήνα και προσθήκη ddH_2O μέχρι ο όγκος να φτάσει 130mL και ξανά μεταφορά σε κωνική φιάλη.
- Προσθήκη TEMED και APS (το TEMED καταλύει το σχηματισμό ελευθέρων ριζών και το APS ξεκινάει τον πολυμερισμό).
- Περίχυση του διαλύματος στη συσκευή ηλεκτροφόρησης και τοποθέτηση των χτενών.
- Μόλις σταθεροποιηθεί η πηκτή (περίπου 30 λεπτά) αφαιρούνται τα χτενάκια.
- Προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος TBE 0.5X στη συσκευή και τοποθέτηση των δειγμάτων στα πηγάδια.

Προετοιμασία και αποδιάταξη pcr προϊόντων

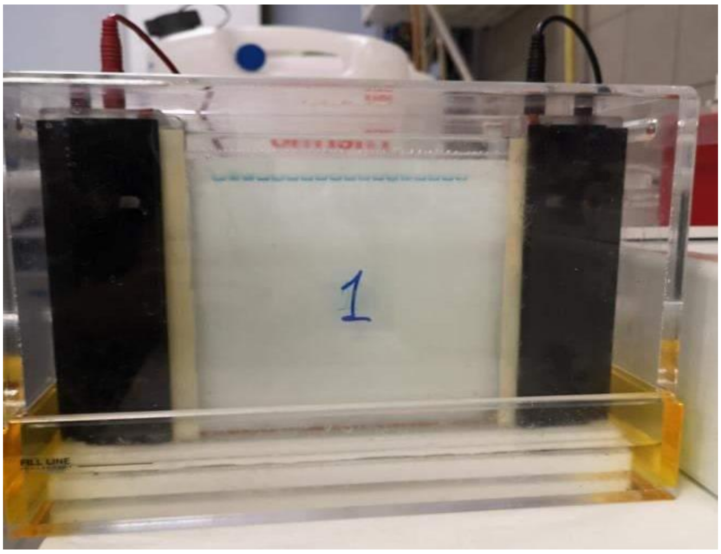
Σε PCR tube γίνεται προσθήκη 5μL PCR προϊόντος και 10μL αποδιατακτικού διαλύματος. Το αποδιατακτικό διάλυμα στα 3mL περιέχει τα ακόλουθα:

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

Ακολουθεί η αποδιάταξη των δειγμάτων σε θερμικό κυκλοποιητή με βάση το ακόλουθο πρόγραμμα:

- 92^oC για 2 λεπτά
- 95^oC για 2 λεπτά
- 97^oC για 9 λεπτά

Δύο λεπτά πριν την ολοκλήρωση του τελικού σταδίου αποδιάταξης τοποθετούνται τα δείγματα απ' ευθείας στο πάγο για την αποφυγή επαναδιάταξης των μονόκλωνων μορίων DNA. Στη συνέχεια γίνεται φόρτωση των δειγμάτων στη συσκευή και ηλεκτροφόρηση σε τάση 220 Volt για 18-22 ώρες.



Εικόνα 12: Πηκτή ακρυλαμιδίου σε συσκευή κάθετης ηλεκτροφόρησης με τα δείγματα φορτωμένα στα πηγαδάκια.

Χρώση πηκτώματος πολυακρυλαμίδης με διάλυμα νιτρικού αργύρου

Ακολουθεί η χρώση των πηκτωμάτων η οποία περιλαμβάνει πλύσεις με 3 διαφορετικά διαλύματα με σκοπό την εμφάνιση των ζωνών στο πήκτωμα. Για την χρώση 2 πηκτωμάτων χρησιμοποιούνται:

1ο Διάλυμα:

- Σε ογκομετρικό κύλινδρο προστίθενται 800mL ddH_2O και 1mL οξικού οξέος.
- Τοποθέτηση των πηκτωμάτων στον αναδευτήρα.
- Ανακίνηση του διαλύματος και πρώτη πλύση με προσθήκη 200mL σε κάθε πήκτωμα για 2 λεπτά.
- Απομάκρυνση του διαλύματος μετά το πέρας των 2 λεπτών.
- Προσθήκη ξανά 200mL διαλύματος σε κάθε πήκτωμα για 2 λεπτά ώστε να γίνει μια δεύτερη πλύση και έπειτα απομάκρυνση του διαλύματος.
- Ακολουθούν 2 φορές πλύσεις με ddH_2O για 1 λεπτό.

2ο Διάλυμα:

- Σε ογκομετρικό σωλήνα προστίθενται 400mL διαλύματος νιτρικού αργύρου.
- Τοποθέτηση των πηκτωμάτων στον αναδευτήρα.
- Προσθήκη 200mL διαλύματος σε κάθε πήκτωμα για 12 λεπτά.
- Ξέπλυμα των πηκτωμάτων 2 φορές με ddH_2O για 2 λεπτά.

3ο Διάλυμα:

- Προσθήκη σε ποτήρι ζέσεως 6gr NαOH, 0,02gr $NaBH_4$, 2mL φορμαλδεΰδης και συμπλήρωση με ddH_2O μέχρι ο τελικός όγκος του διαλύματος να φτάσει 400mL.
- Προσθήκη 200mL διαλύματος σε κάθε πήκτωμα.
- Τοποθέτηση των πηκτωμάτων στον αναδευτήρα.
- Παραμονή των πηκτωμάτων στο διάλυμα μέχρι την εμφάνιση των ζωνών.
- Απομάκρυνση του διαλύματος και μια καλή πλύση με ddH_2O.

Στο τέλος, τα πηκτώματα πολυακρυλαμιδίου συσκευάζονται σε διαφανείς μεμβράνες ώστε να γίνει η σύγκριση των αποτελεσμάτων. Στη συνέχεια επιλέγονται τα δείγματα που εμφάνισαν διαφορετικά πρότυπα ηλεκτροφόρησης ώστε να σταλούν για αλληλούχιση. Μαζί με τα δείγματα αποστέλλονται επίσης και ορισμένες ποσότητες από τους εκκινητές που έχουν χρησιμοποιηθεί (LeuFWD-LeuREV, FwGly-RevGly).

3.5 ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ PCR ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ

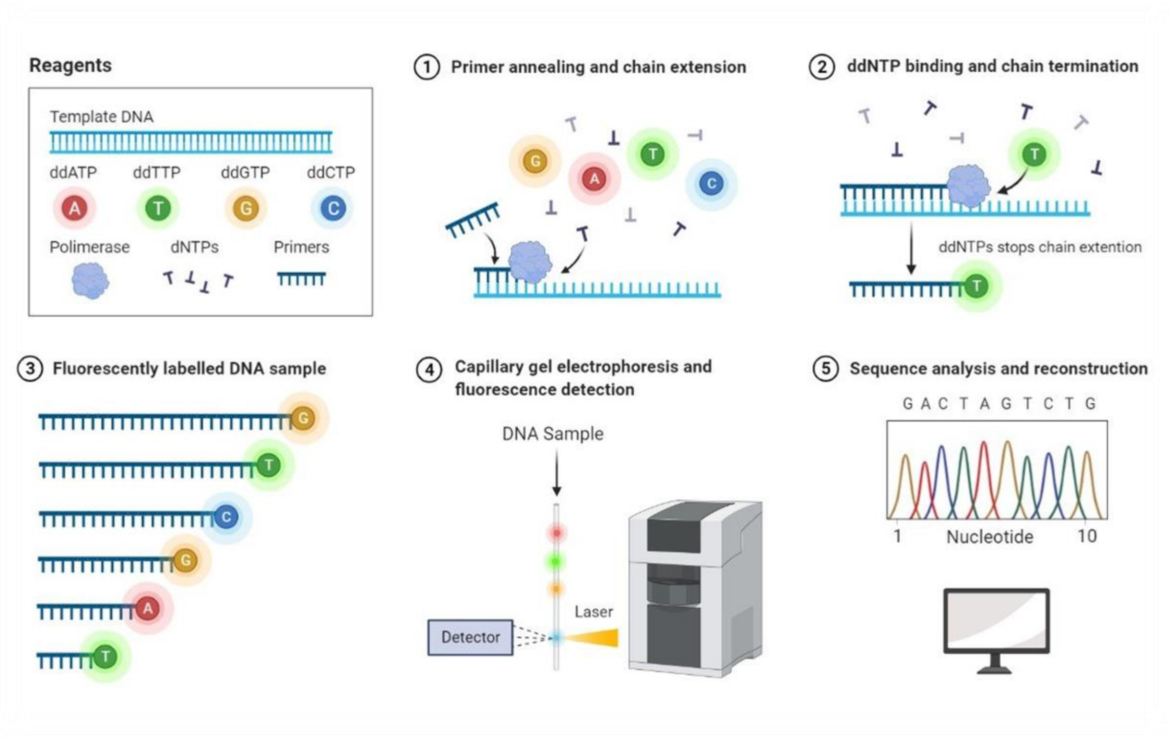
Μετά από την παρατήρηση των πηκτών της SSCP και την απαρίθμηση των πιθανών προτύπων, τα προϊόντα PCR των επιλεγόμενων δειγμάτων, υφίστανται καθαρισμό πριν αποσταλούν για αλληλούχιση. Ο καθαρισμός γίνεται με τη χρήση του kit ‘SureClean’ της εταιρείας Bioline και με τον τρόπο αυτό απομακρύνονται εκκινητές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

3.6 ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗ DNA

- Ενζυμική Μέθοδος ή Μέθοδος κατά Sanger

Αποτελεί την πιο διαδεδομένη μέθοδο για την ανάλυση της πρωτοταγούς δομής του DNA. Έχει τη δυνατότητα προσδιορισμού της πρωτοταγούς δομής μιας αλληλουχίας η οποία μπορεί να φτάνει τις 1000 βάσεις. Η μέθοδος βασίζεται στην ενζυμική ενσωμάτωση ενός νουκλεοτιδίου στην επιμηκυνόμενη αλυσίδα του DNA. Η αρχή της μεθόδου στηρίζεται στην ύπαρξη ενός συνθετικού σημασμένου εκκινητή (αρχικά ήταν ραδιενεργά σημασμένος), ο οποίος υβριδίζεται στο μονόκλωνο DNA. Επίσης για την πραγματοποίηση της αντίδρασης είναι απαραίτητη η πολυμεράση, τα 4 φυσιολογικά τριφωσφορικά ολιγονουκλεοτίδια (dNTPs) καθώς και σε μικρή αναλογία, 2’,3’ διδεοξυνουκλεοτίδια (dideoxynucleotides, ddNTPs). Το διδεοξυνουκλεοτίδιο έχει ένα άτομο υδρογόνου στον 3’ άνθρακα της δεοξυριβόζης αντί για ένα υδροξύλιο. Με τον τρόπο αυτό, όταν γίνεται η ενσωμάτωση του διδεοξυνουκλεοτιδίου στο νεοσυντιθέμενο κλώνο του DNA δεν είναι δυνατή η δημιουργία άλλου φωσφωδιεστερικού δεσμού και επομένως η πρόσδεση του επόμενου νουκλεοτιδίου (λόγω της έλλειψης του υδροξυλίου) και η αντίδραση σταματάει. Για το κάθε νουκλεοτίδιο πραγματοποιείται μια αντίδραση (επομένως πραγματοποιούνται 4 αντιδράσεις, μια για κάθε νουκλεοτίδιο). Σε κάθε αντίδραση υπάρχει, σε μικρή αναλογία, ένα διδεοξυνουκλεοτίδιο (για την αντίδραση της γουανίνης- το διδεόξυνουκλεοτίδιο της γουανίνης-ddGTPs κτλ). Κατά τη σύνθεση των νέων αλυσίδων, δημιουργούνται διαφορετικά, σε μήκος, τμήματα DNA λόγω της τυχαίας προσθήκης στην νεοσυντιθέμενη αλυσίδα των διδεόξυνουκλεοτιδίων. Το μήκος του κάθε τμήματος καθορίζεται από την απόσταση που υπάρχει από το 5΄ άκρο του εκκινητή έως τη θέση προσθήκης του διδεοξυνουκλεοτιδίου. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να έχουμε συγκεκριμένα μήκη μορίων στα οποία γνωρίζουμε το νουκλεοτίδιο που υπάρχει κάθε φορά. Ο διαχωρισμός των μορίων των παραπάνω αντιδράσεων επιτυγχάνεται με τη διαδικασία της ηλεκτροφόρησης (Watson *et al.*, 2007).

Από την πρώτη εφαρμογή της μεθόδου μέχρι σήμερα, έχουν πραγματοποιηθεί πολλές αλλαγές στην τεχνική οι οποίες είχαν ως σκοπό την αυτοματοποίηση της. Ο εκκινητής δε χρειάζεται πλέον να είναι σημασμένος με ραδιενεργό στοιχείο αλλά με ειδική χρωστική. Η χρωστική αποτελείται από μια χρωστική δότη (φλουορεσκεΐνη) συνδεδεμένη με μια χρωστική δέκτη (διχλωροροδαμίνη) μέσω ενός συνδέτη αμινοβενζοϊκού οξέος. Υπάρχουν 4 διαφορετικές χρωστικές δέκτη οι οποίες έχουν διαφορετικό φάσμα εκπομπής και η κάθε μια από αυτές ενσωματώνεται σε ένα συγκεκριμένο διδεοξυνουκλεοτίδιο. Η ανίχνευση του σήματος πραγματοποιείται από ειδικό laser και το σύστημα ηλεκτροφόρησης χρησιμοποιεί τριχοειδή σωληνάρια. Η δέσμη φωτός από το laser κατευθύνεται κατά μήκος των τριχοειδών. Ως αποτέλεσμα αυτού, τα σημασμένα ddNTPs απορροφούν μια μικρή ποσότητα από τη δέσμη φωτός και την αποδίδουν ως δέσμη φωτός με μμεγαλύτερο μήκος κύματος προς όλες τις κατευθύνσεις. Με το κατάλληλο λογισμικό γίνεται μετατροπή των δεδομένων στις 4 χρωστικές που έχουν καθοριστεί για την ανάλυση της πρωτοταγούς δομής. Τα αποτελέσματα παρέχονται σε χρωματογράφημα το οποίο απαιτεί συγκεκριμένο λογισμικό για την ανάλυση του (Watson *et al.*, 2007).



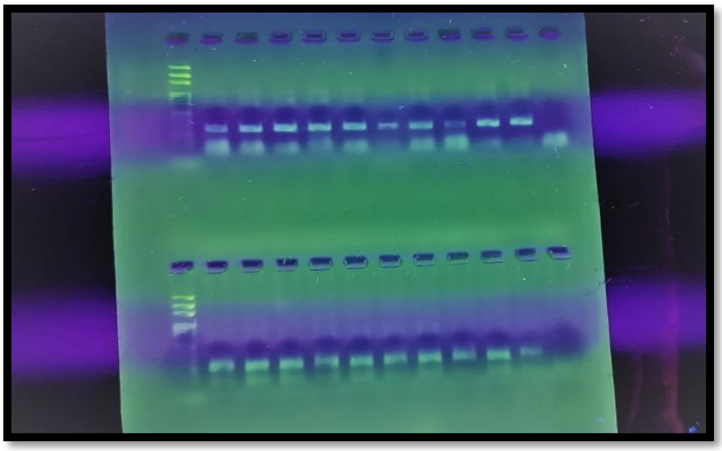
Εικόνα 13: Μέθοδος αλληλούχισης Sanger (Πηγή: https://app.biorender.com/biorender-templates).

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν 38 δείγματα αίματος από άτομα που πάσχουν από Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια. Τα δείγματα συλλέχθηκαν από την Πνευμονολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου της Λάρισας. Σκοπός της εργασίας ήταν η ανίχνευση και η ταυτοποίηση των μεταλλάξεων στα μιτοχονδριακά γονίδια $tRNA^{Leu}$ και $tRNA^{Gly}$ στους ασθενείς αυτούς. Η πειραματική διαδικασία περιλάμβανε αρχικά την απομόνωση του DNA από τα κύτταρα του αίματος, την ενίσχυση των επιλεγμένων γονιδίων στα δείγματα με την μέθοδο της PCR χρησιμοποιώντας τους κατάλληλους εκκινητές, καθώς και την ανάλυση με τη μέθοδο της SSCP για την κατάταξη των δειγμάτων σε πρότυπα ανάλογα με την ηλεκτροφορητική τους ικανότητα. Τέλος, τα δείγματα στα οποία ανιχνεύτηκαν μεταλλάξεις και πολυμορφισμοί στάλθηκαν για αλληλούχιση προκειμένου να μελετηθεί η αλληλουχία τους.

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

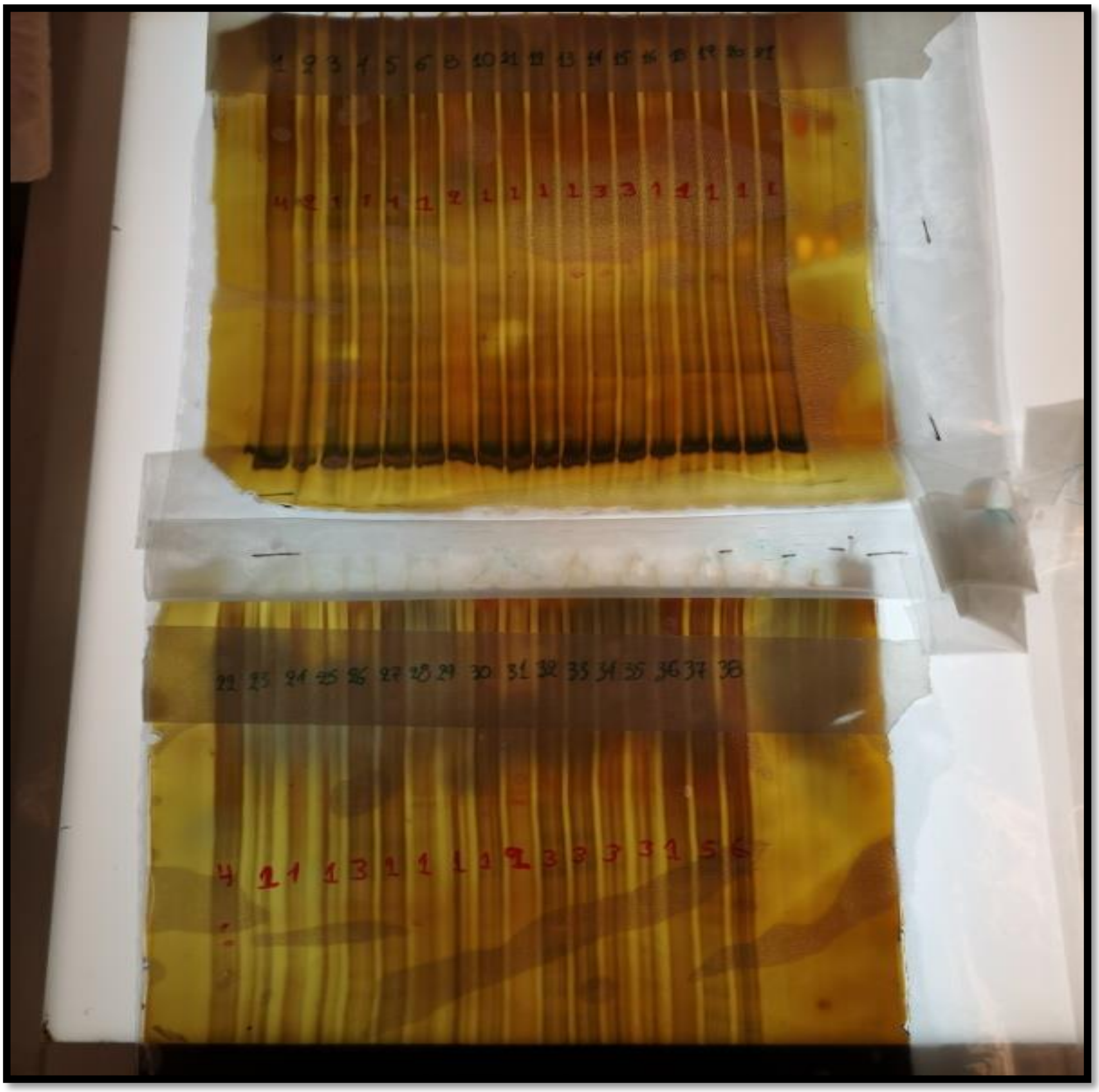
Για να ενισχυθούν τα τμήματα που κωδικοποιούν τα γονίδια $tRNA^{Leu}$ και $tRNA^{Gly}$ χρησιμοποιήθηκαν δύο ζεύγη εκκινητών. Το ένα ζεύγος ήταν το LeuFWD- LeuREV και το άλλο FwGly- RevGly. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε έλεγχος στα αποτελέσματα της PCR με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης (2%) ώστε να επιβεβαιωθεί ότι το τμήμα που ενισχύθηκε είναι το επιθυμητό.



Εικόνα 14 : Πηκτή αγαρόζης (2%) όπου απεικονίζονται τα προϊόντα της PCR μερικών εκ' των δειγμάτων . Το πάνω φόντο αφορά το μιτοχονδριακό γονίδιο $tRNA^{Leu}$ και το κάτω το μιτοχονδριακό γονίδιο $tRNA^{Gly}$.

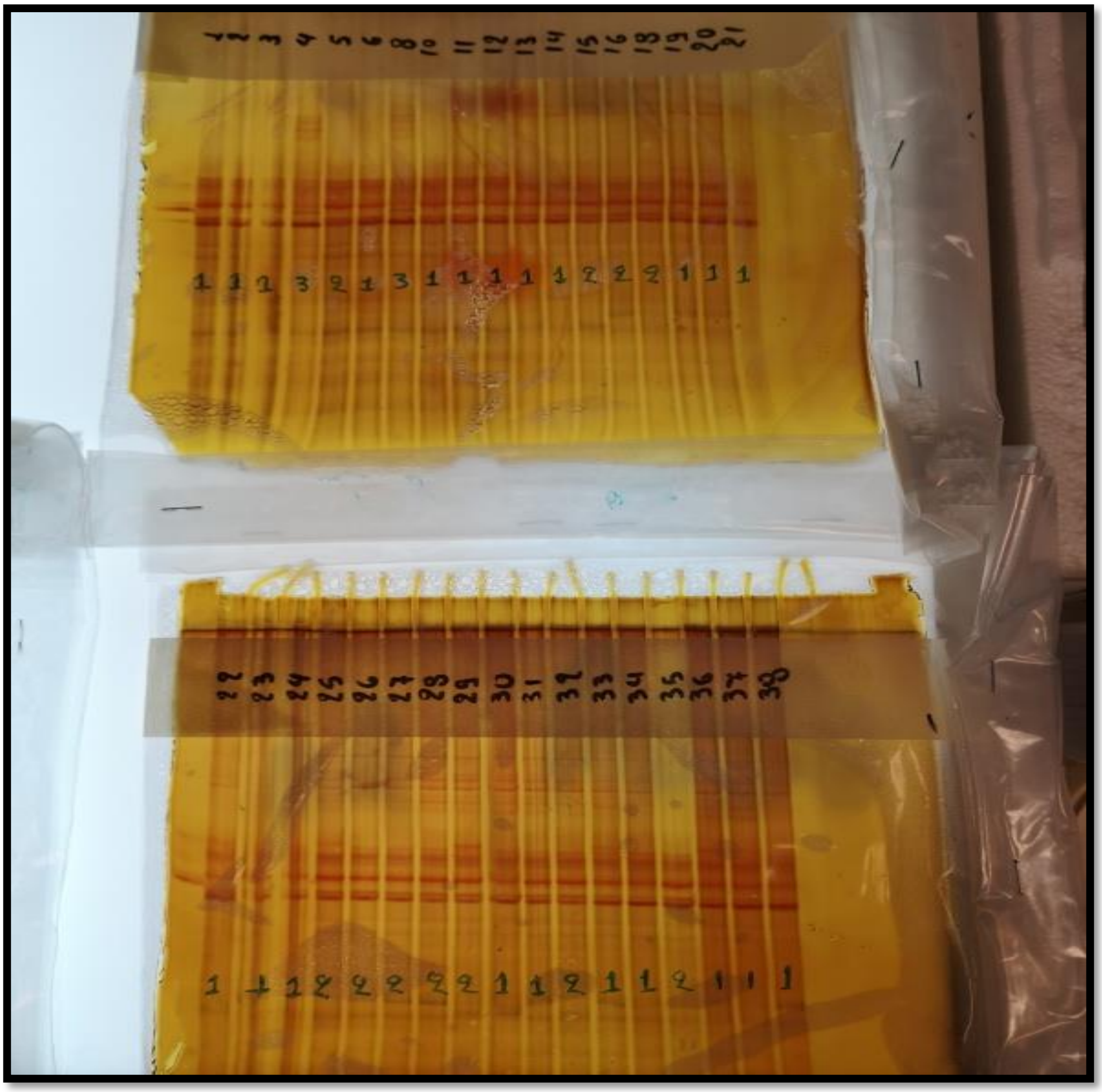
4.2 ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΜΕ ΤΗΝ ΜΕΘΟΔΟ SSCP

Πραγματοποιήθηκε ανάλυση των δειγμάτων με τη μέθοδο SSCP ώστε να διαχωριστούν σε πρότυπα ανάλογα με την ηλεκτροφορητική τους ικανότητα. Για το γονίδιο $tRNA^{Leu}$ εμφανίζονται 6 διαφορετικά πρότυπα. Όπως γίνεται αντιληπτό στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 15), το πρότυπο 1 κυριαρχεί μεταξύ των δειγμάτων και αυτό υποδηλώνει την ύπαρξη κοινής αλληλουχίας μεταξύ των δειγμάτων αυτών. Ωστόσο, τα πρότυπα 5 και 6 δεν εμφανίζονται σε ζεύγη όπως συμβαίνει με τα υπόλοιπα πρότυπα.



Εικόνα 15 : Πήκτωμα πολυακρυλαμίδης όπου απεικονίζονται τα πρότυπα βάση των οποίων επιλέχθηκαν ποια δείγματα θα σταλούν για αλληλούχιση. Αφορά το γονίδιο $tRNA^{Leu}$.

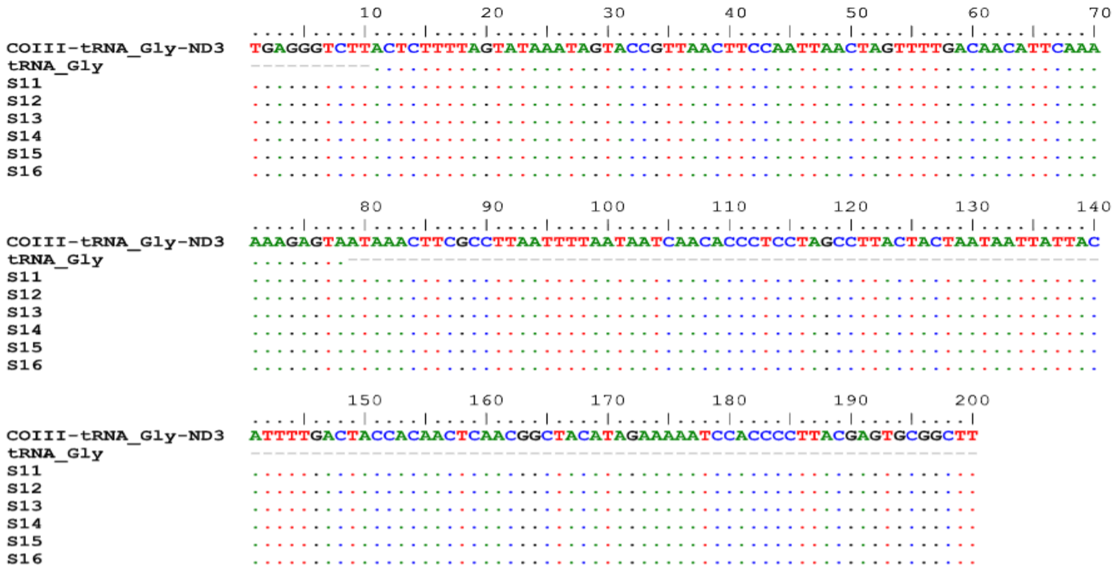
Για το γονίδιο $tRNA^{Gly}$ όπως φαίνεται στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 16) εμφανίζονται 3 διαφορετικά πρότυπα.



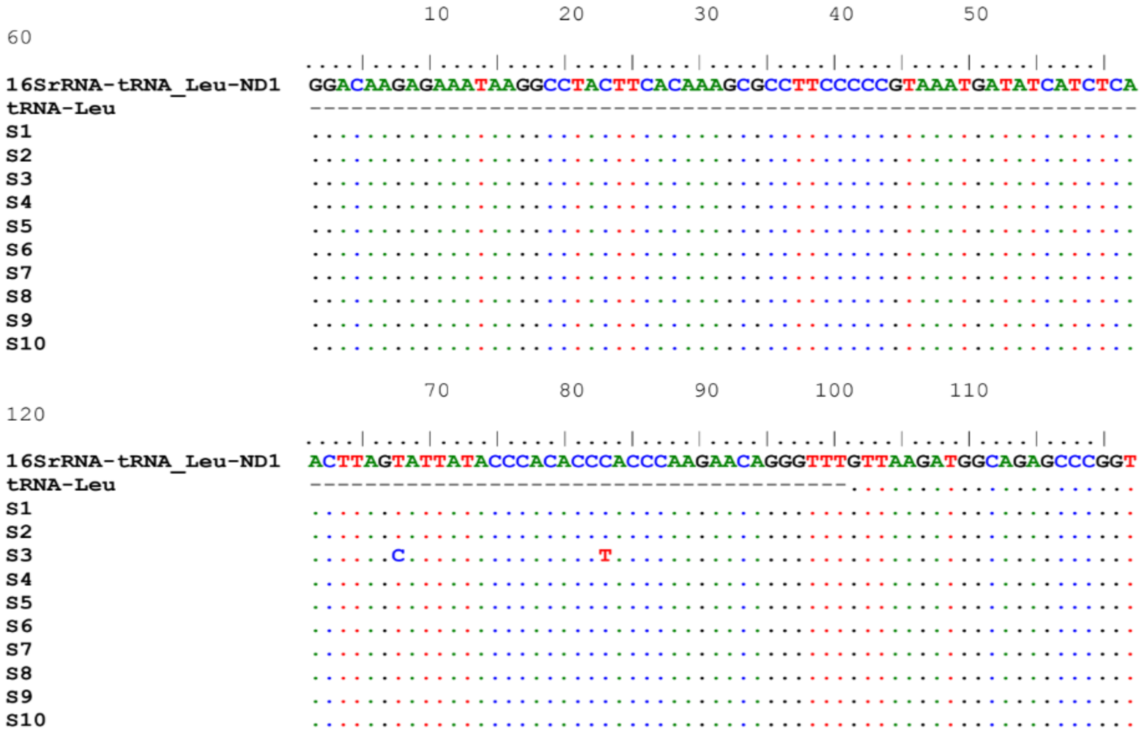
Εικόνα 16: Πήκτωμα πολυακρυλαμίδης όπου απεικονίζονται τα πρότυπα βάση των οποίων επιλέχθηκαν ποια δείγματα θα σταλούν για αλληλούχιση. Αφορά το γονίδιο $tRNA^{Gly}$.

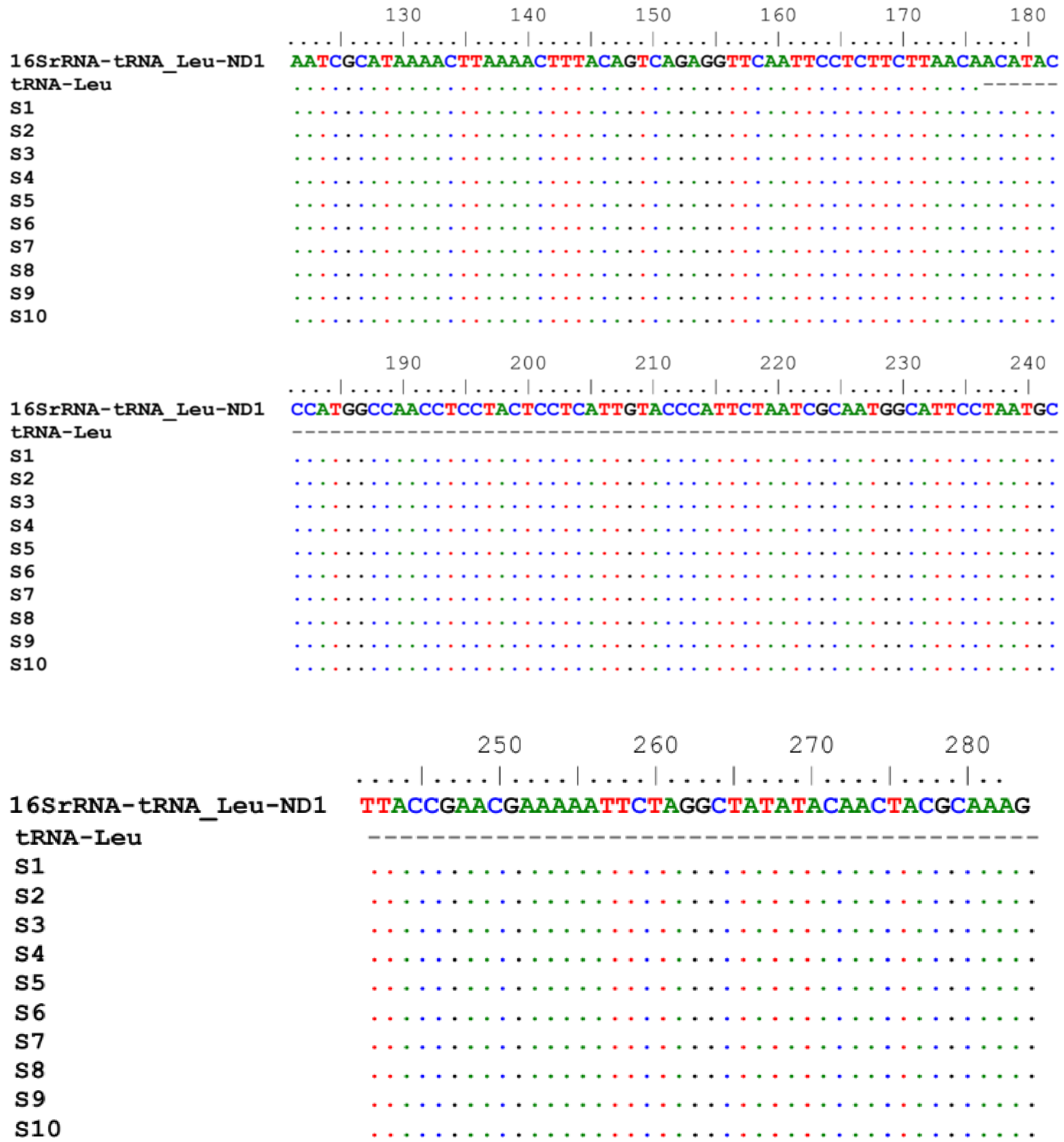
4.3 ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ

Τα δείγματα τα οποία παρουσίασαν διαφορετικό πρότυπο στην ανάλυση SSCP στάλθηκαν για αλληλούχιση. Με την βοήθεια της πρότυπης αλληλουχίας που λήφθηκε από τη βάση δεδομένων του NCBI και διαφόρων γραφημάτων ταυτοποιήθηκαν οι μεταλλάξεις. Στα δείγματα που στάλθηκαν για αλληλούχιση δεν βρέθηκαν μεταλλάξεις στο γονίδιο του $tRNA^{Gly}$. Από την άλλη, εντοπίστηκαν σημειακές μεταλλάξεις σε τμήμα του 16S rRNA στο γονίδιο $tRNA^{Leu}$. Αυτές ήταν οι T3197C και C3212T στην προβλεπόμενη απλοομάδα U5b (U5b2a2).

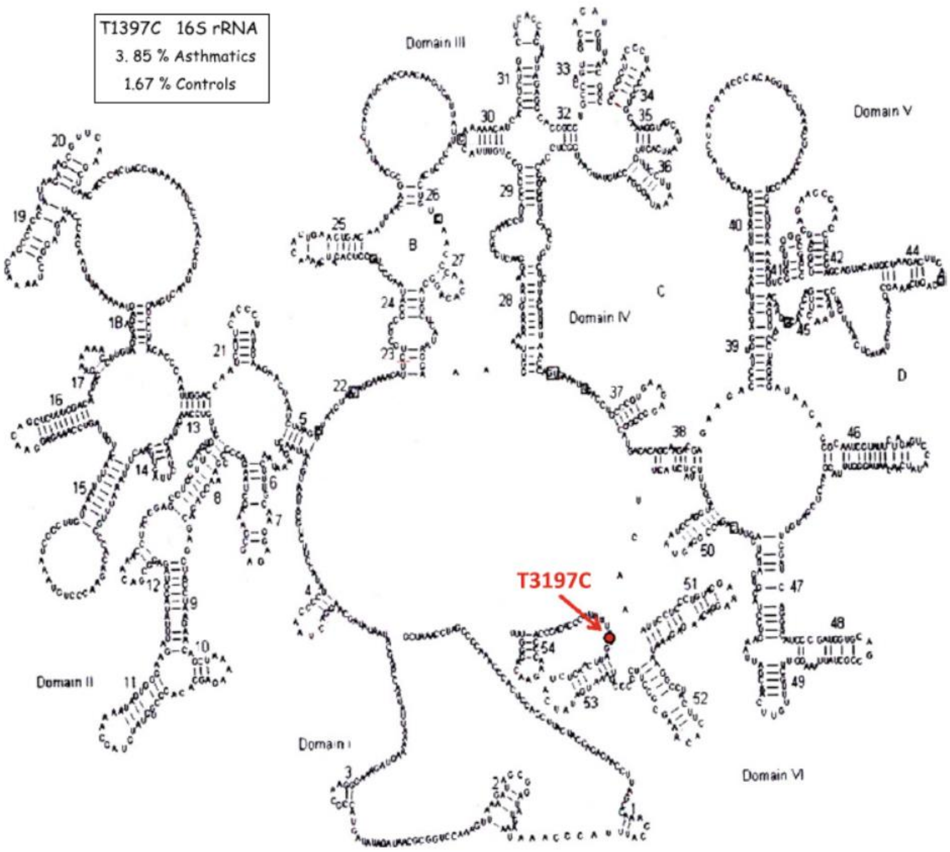


Εικόνα 17: Αποτελέσματα της αλληλούχισης του γονιδίου tRNA^{Gly}.

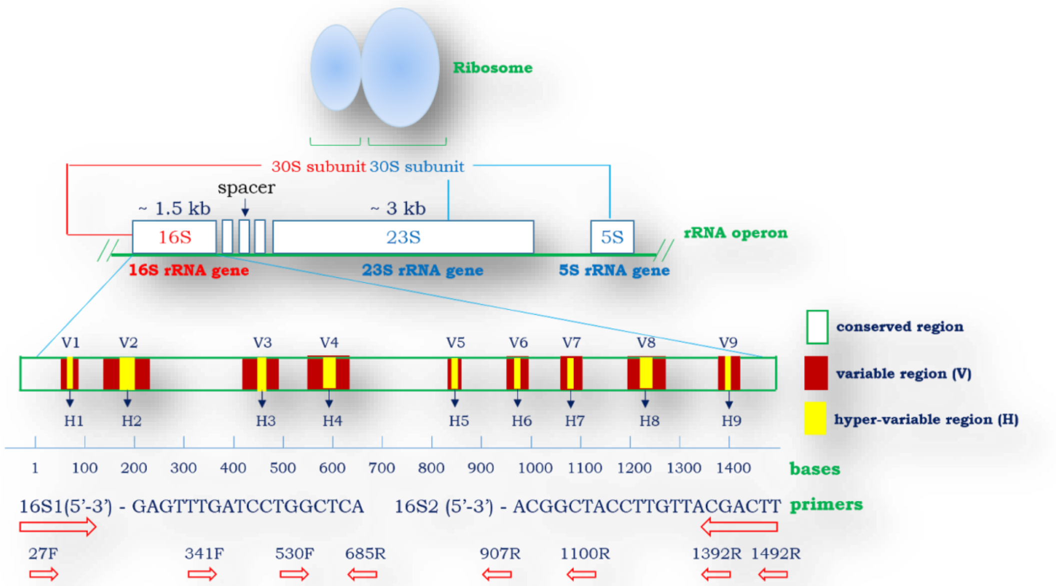




Εικόνα 18: Αποτελέσματα της αλληλούχισης του γονιδίου $tRNA^{Leu}$. Παρατηρούνται 2 σημειακές μεταλλάξεις T3197C (T→C) και C3212T (C→T) στο δείγμα 3 (S3) και πιο συγκεκριμένα στις βάσεις 67 και 82 αντίστοιχα.



Εικόνα 19: Δομή του μιτοχονδριακού DNA 16S rRNA όπου εντοπίζεται η μετάλλαξη T3197C. Αυτή η μετάλλαξη βρίσκεται κοντά στο 3' άκρο του 16S (Πηγή: Zifa *et al*., 2012).



Εικόνα 20: Σχηματική απεικόνιση του γονιδίου 16S rRNA όπου εμφανίζονται οι μεταβλητές περιοχές (V1-V9) (Πηγή: https://www.sharmilajoseph.com/2020/04/why-16s-rrna-gene_3.html).

Λαμβάνοντας υπόψη τις εικόνες 18,19 και 20 συμπεραίνουμε πως οι σημειακές μεταλλάξεις που εντοπίστηκαν στο γονίδιο $tRNA^{Leu}$ ανήκουν στην περιοχή V1 είτε εκατέρωθεν αυτής.

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε ώστε να ανιχνευτούν και να ταυτοποιηθούν μεταλλάξεις σε μιτοχονδριακά γονίδια tRNA ασθενών που πάσχουν από Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια με στόχο να κατανοηθεί ο ρόλος τους στην δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων καθώς και στην πιθανή συσχέτισή τους με την εμφάνιση της νόσου. Για τον σκοπό αυτό, αναλύθηκαν 38 δείγματα ασθενών με ΧΑΠ. Η εξαγωγή του DNA πραγματοποιήθηκε από ολικό αίμα ακολουθώντας ένα συγκεκριμένο πρωτόκολλο και χρησιμοποιήθηκε για την ενίσχυση των mt-tRNA γονιδίων με τη μέθοδο της PCR, ακολούθησε η μέθοδος SSCP για την ανίχνευση μεταλλάξεων καθώς και η μέθοδος της αλληλούχισης για την ταυτοποίηση των μεταλλάξεων. Χρησιμοποιήθηκαν τα γονίδια $tRNA^{Leu}$ και $tRNA^{Gly}$.

Στη συγκεκριμένη μελέτη σχετικά με το γονίδιο $tRNA^{Gly}$ δεν εντοπίστηκε κάποια μετάλλαξη. Αντιθέτως, εντοπίστηκαν 2 σημειακές μεταλλάξεις σε τμήμα του 16S rRNA.
Η μετάλλαξη T3197C εντοπίζεται στην κωδική περιοχή του γονιδίου 16S rRNA επηρεάζοντας τη σταθερότητά του (Bai *et al.*, 2007). Η συγκεκριμένη μετάλλαξη εντοπίστηκε σε ποσοστό 10,6% από σύνολο 122 Γερμανών διαβητικών ασθενών με οικογενειακό ιστορικό μητρικά κληρονομήσιμου διαβήτη σε έρευνα που διεξήχθη (Klemm *et al*., 2001). Επίσης, η μετάλλαξη αυτή εμφανίστηκε σε ποσοστό 3,85% (1/26) των ασθενών με άσθμα και στο 1,67% (1/60) των φυσιολογικών (Zifa *et al.*, 2012). Η μετάλλαξη αυτή έχει χαρακτηριστεί ως πολυμορφισμός, αλλά έχει αναφερθεί και σε ασθενείς με εγκεφαλοπάθεια, καρδιομυοπάθεια και σε ασθενείς με στοματικό καρκίνο (mitomap). Η μετάλλαξη αυτή περικλείεται στον υποκλάδο U5 της απλοομάδας U, η οποία σχετίζεται με αυξημένα επίπεδα IgE (κύριο χαρακτηριστικό του άσθματος), και έχει βρεθεί ότι ο συνδυασμός μεταλλάξεων T3197C + A12308G του υποκλάδου U5 σχετίζεται με τον γεροντικό δερματικό κηλιδώδη εκφυλισμό (AMD-age-related macular degeneration) (Udar *et al.*, 2009). Ο συνδυασμός αυτός βρέθηκε και σε έναν ασθματικό ασθενή. Ακόμη, η συνύπαρξη της μετάλλαξης T3197C με την σημειακή μετάλλαξη G13708A εμφανίζει προστατευτική δράση έναντι της εμφάνισης του καρκίνου του μαστού, με επιζήμια όμως έκβαση σε διάφορες νευροεκφυλιστικές ασθένειες (Bai *et al.*, 2007).

Σχετικά με την μετάλλαξη C3212T δεν έχει δημοσιευτεί προς το παρόν κάποια έρευνα που να την συσχετίζει με την ΧΑΠ αλλά και με άλλη παθολογική κατάσταση.

Οι μεταλλάξεις στο ριβοσωμικό RNA βρίσκονται στην περιοχή του γονιδίου ND1 που κωδικοποιεί την υπομονάδα 1 της αναπνευστικής αλυσίδας των μιτοχονδρίων. Εντοπίζονται πριν την κωδική περιοχή του γονιδίου $tRNA^{Leu}$ με πιθανή συνέπεια να εμποδίζουν την έκφραση του.

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

Ο κύριος παράγοντας κινδύνου για την ΧΑΠ, που έχει αποδειχθεί σε πολλές μελέτες, είναι η έκθεση στον καπνό του τσιγάρου. Η ανισορροπία οξειδωτικού-αντιοξειδωτικού αναγνωρίζεται ως ένας από τους σημαντικούς παράγοντες που συμβάλλουν στην ανάπτυξη και την πρόοδο της ΧΑΠ. Στην παθοβιολογία της ΧΑΠ υπάρχουν πολυάριθμες εξωγενείς και ενδογενείς πηγές ROS. Μία από τις ενδογενείς πηγές ROS είναι τα μιτοχόνδρια. Αν και η διαρροή ηλεκτρονίων από την αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων και ο σχηματισμός ROS είναι το αποτέλεσμα της φυσιολογικής λειτουργίας των μιτοχονδρίων, υπάρχουν διάφοροι ενδο- και εξωκυτταρικοί παράγοντες που μπορεί να αυξήσουν αυτή την ποσότητα και να συμβάλουν σημαντικά στην οξειδωτική-αντιοξειδωτική ανισορροπία. Ωστόσο, υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις ότι τα ROS αέριας φάσης δεν είναι σε θέση να διαχυθούν μέσω των πλασματικών μεμβρανών των επιθηλιακών κυττάρων των αεραγωγών και έτσι να εισέλθουν στην συστηματική κυκλοφορία. Αντίθετα, τα λιπόφιλα συστατικά στον καπνό του τσιγάρου συμπεριλαμβανομένων των πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων, αλδεΰδων, αμινών, βαρέων μετάλλων ή φαινολικών ενώσεων, περνούν εύκολα τις κυτταρικές μεμβράνες και εισέρχονται στην κυκλοφορία. Το λιπόφιλο κλάσμα που υπάρχει στο εκχύλισμα του καπνού του τσιγάρου είναι υπεύθυνο για τη μείωση του δυναμικού της μιτοχονδριακής μεμβράνης, την παραγωγή ATP και την ταυτόχρονη δημιουργία μιτοχονδριακών ROS (van der Toorn *et al*., 2009).

Το mtDNA παρουσιάζει σημαντική ευαισθησία τόσο στην οξειδωτική βλάβη όσο και στην παρουσία μεταλλάξεων εξαιτίας της ανεξέλεγκτης παραγωγής ROS αλλά και της αδυναμίας επιδιόρθωσης του DNA στα μιτοχόνδρια (Croteau and Bohr, 1997). Το χρόνιο οξειδωτικό στρες μπορεί να προκαλέσει βλάβες στο mtDNA με αποτέλεσμα την δημιουργία σημειακών μεταλλάξεων (Lee *et al*., 2005). Έτσι, η συσσώρευση οξειδωτικών βλαβών μπορεί να οδηγήσει στην ύπαρξη διακυμάνσεων της αλληλουχίας του mtDNA και κατά συνέπεια σε μη φυσιολογικό OXPHOS στα προσβεβλημένα κύτταρα (Wallace, 2010).

Όσο αφορά το φύλο των ασθενών, δεν φαίνεται να επηρεάζει άμεσα την ύπαρξη μεταλλάξεων στα μιτοχονδριακά γονίδια tRNA, καθώς εντοπίζεται τόσο σε άνδρες όσο και σε γυναίκες. Όσο αφορά την ηλικία των ασθενών, φαίνεται πως ο μέσος όρος της στην ύπαρξη μεταλλάξεων είναι τα 70 έτη.

Το μιτοχονδριακό DNA το τελευταίο διάστημα προσελκύει το ενδιαφέρον πολλών επιστημόνων εξαιτίας ορισμένων ιδιαίτερων χαρακτηριστικών που παρουσιάζει, όπως η μεγάλη συγκέντρωση μεταλλάξεων σε σχέση με το πυρηνικό DNA. Η μελέτη των διαφόρων παραλλαγών του mt-DNA σε καλά καθορισμένες ασθένειες, θα βοηθήσει στην κατανόηση των μηχανισμών βάσει των οποίων ορισμένες μεταλλάξεις του μιτοχονδριακού DNA συμβάλλουν στην προδιάθεση ή και στην εξέλιξη ασθενειών όπως η ΧΑΠ. Οι γενετικές μελέτες που έχουν γίνει σχετικά με τις μεταλλάξεις σε μιτοχονδριακά γονίδια tRNA και την ΧΑΠ είναι ελάχιστες. Προκειμένου να αποκτήσουμε μια ολοκληρωμένη εικόνα θα πρέπει να γίνουν αρκετές μελέτες ώστε να βρεθεί τελικά ο τρόπος με τον οποίον σχετίζεται το μιτοχόνδριο με την ασθένεια αυτή. Μια τέτοια εξέλιξη θα έχει σίγουρα σημαντικά οφέλη, τόσο στην πρόγνωση όσο και στην αντιμετώπιση της.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Aguilera-Aguirre, L., Bacsi, A., Saavedra-Molina, A., Kurosky, A., Sur, S. and Boldogh, I., (2009) Mitochondrial Dysfunction Increases Allergic Airway Inflammation. *The Journal of Immunology*, 183(8), 5379–5387.
- Ahmad, M., Wolberg, A., Kahwaji, CI., (2019) Biochemistry, Electron Transport Chain. In: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing.
- Alexeyev, M.F., (2009) Is there more to aging than mitochondrial DNA and reactive oxygen species?: mtDNA + ROS = Aging?. *FEBS Journal*, 276(20), 5768-5787.
- Allen, J.F., Raven, J.A., (1996) Free-radical-induced mutation vs redox regulation: Costs and benefits of genes in organelles. *Journal of Molecular Evolution,* 42, 482-92.
- Bai, R.K., Leal, S.M., Covarrubias, D., Liu, A., and Wong, L.J., (2007) Mitochondrial Genetic Background Modifies Breast Cancer Risk. *Cancer Reaserch*, 67(10), 4687-4694.
- Barnes, P.J., Burney, P.G., Silverman, E.K., Celli, B.R., Vestbo, J., Wedzicha, J.A., Wouters, E.F., (2015) Chronic obstructive pulmonary disease. *Nature Reviews Disease Primers*, 1, 15076.
- Berg, J., Tymoczko, J., and Stryer, L., (2002) *Biochemistry, 5th edition*, W.H. Freeman and Company, New York. Section 27.2 and 27.2.4.
- Berg, J.M., Tymoczko, J.L., Stryer, L., (2012) *ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ*, Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης.
- Boukhenouna, S., Wilson, M.A., Bahmed, K., and Kosmider, B., (2018) Reactive Oxygen Species in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 1-9.
- Burgel, P.R., Paillasseur, J.L., Roche, N., (2014) Identification of Clinical Phenotypes Using Cluster Analyses in COPD Patients with Multiple Comorbidities. *Biomed Research International*, 1-9.
- Celli, B.R., MacNee, W., Agusti, A., Anzueto, A., Berg, B., Buist, A.S., Calverley, P.M.A., Chavannes, N., Dillard, T., Fahy, B., Fein, A., Heffner, J., Lareau, S., Meek, P., Martinez, F., McNicholas, W., Muris, J., Austegard, E., Pauwels, R., Rennard, S., Rossi, A., Siafakas, N., Tiep, B., Vestbo, J., Wouters, E., ZuWallack, R., (2004) Standards for the diagnosis and treatment of patients with COPD: a summary of the ATS/ERS position paper. *European Respiratory Journal*, 23(6), 932-946.
- Chalmers, R.M., Lamont, P.J., Nelson, I., Ellison, D.W., Thomas, N.H., Harding, A.E., and Hammans, S.R., (1997) A mitochondrial DNA $tRNA^{Val}$ point mutation associated with adult-onset Leigh syndrome. *Neurology*, 49(2), 589–592.
- Coxson, H.O., Dirksen, A., Edwards, L.D., Yates, J.C., Agusti, A., Bakke, P., Ma Calverley, P., Celli, B., Crim, C., Duvoix, A., Fauerbach, P.N., Lomas, D.A., Macnee, W., Mayer, R.J., Miller, B.E., Müller, N.L., Rennard, S.I., Silverman, E.K., Tal-Singer, R., Wouters, E., Vestbo, J., (2013) The presence and progression of emphysema in COPD as determined by CT scanning and biomarker expression: a prospective analysis from the ECLIPSE study. *The Lancet*, 1(2), 129-136.

- Croteau, D.L., and Bohr, V.A., (1997) Repair of Oxidative Damage to Nuclear and Mitochondrial DNA in Mammalian Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 272(41), 25409–25412.
- Cukic, V., Lovre, V., Dragisic, D., Ustamujic, A., (2012) Asthma and chronic obstructive pulmonary disease (COPD): differences and similarities. *Mater Sociomed,* 24(2), 100-105.
- Davies, K.J., (1995) Oxidative stress: the paradox of aerobic life. *Biochemical Society Symposia*, 61, 1-31.
- Davoine, F., Lacy, P., (2014) Eosinophil cytokines, chemokines, and growth factors: emerging roles in immunity. *Frontiers in Immunology,* 5, 570.
- Denu, J.M., and Tanner, K.G., (1998) Specific and Reversible Inactivation of Protein Tyrosine Phosphatases by Hydrogen Peroxide: Evidence for a Sulfenic Acid Intermediate and Implications for Redox Regulation. *Biochemistry*, 37(16), 5633-5642.
- Domej, W., Oettl, K., Renner, W., (2014) Oxidative stress and free radicals in COPD-implications and relevance for treatment. *International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease*, 9, 1207-24.
- Ejiofor, S., and Turner, A.M., (2013) Pharmacotherapies for COPD. *Clinical Medicine Insights: Circulatory, Respiratory and Pulmonary Medicine*, 7, 17-34.
- Eltboli, O., Bafadhel, M., Hollins, F., Wright, A., Hargadon, B., Kulkarni, N., Brightling, C., (2014) COPD exacerbation severity and frequency is associated with impaired macrophage efferocytosis of eosinophils. *BMC Pulmonary Medicine*, 14, 112.
- Finkel, T., and Holbrook, N.J., (2000) Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature,* 408, 239-247.
- George, L., Brightling, C.E., (2016) Eosinophilic airway inflammation: role in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Therapeutic Advances in Chronic Disease,* 7(1), 34-51.
- Global Strategy for Prevention, Diagnosis and Management of COPD: 2022 Report. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) 2022. Available from: http://www.goldcopd.org/.
- Heinz, S., Freyberger, A., Lawrenz, B., Schladt, L., Schmuck, G., Ellinger-Ziegelbauer, H., (2017) Mechanistic Investigations of the Mitochondrial Complex I Inhibitor Rotenone in the Context of Pharmacological and Safety Evaluation. *Scientific Reports, 7, 45465.*
- Helm, M., Florentz, C., Chomyn, A., and Attardi, G., (1999) Search for differences in post-transcriptional modification patterns of mitochondrial DNA-encoded wild-type and mutant human tRNALys and tRNALeu(UUR). *Nucleic Acids Research*, 27(3), 756-763.
- Hock, D.H., Robinson, D.R.L., and Stroud, D.A., (2020) Blackout in the powerhouse: clinical phenotypes associated with defects in the assembly of OXPHOS complexes and the mitoribosome. *Biochemical Journal,* 477(21), 4085-4132.
- Jaksch, M., Kleinle, S., Scharfe, C., Klopstock, T., Pongratz, D., Müller-Höcker, J., Gerbitz, K.D., Liechti-Gallati, S., Lochmuller, H., Horvath, R., (2001) Frequency of

mitochondrial transfer RNA mutations and deletions in 225 patients presenting with respiratory chain deficiencies. *Journal of Medical Genetics*, 38(10), 665-673.

- Kirino, Y., and Suzuki, T., (2005) Human Mitochondrial Diseases associated with tRNA Wobble Modification Deficiency. *RNA Biology*, 2(2), 41-44.
- Kita, H., (1996) The eosinophil: a cytokine-producing cell?. *Journal of Allergy and Clinical Immunology,* 97(4), 889-892.
- Klemm, T., Neumann, S., Trülzsch, B., Pistrosch, F., Hanefeld, M., and Paschke, R., (2001) Search for mitochondrial DNA mutation at position 3243 in German patients with a positive family history of maternal diabetes mellitus. *Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes*, 109(5), 283-287.
- Kuiper, J.W.P., Sun, C., Magalhães, M.A.O., and Glogauer, M., (2011) Rac regulates PtdInsP3 signaling and the chemotactic compass through a redoxmediated feedback loop. *Blood*, 118(23), 6164-6171.
- Kuznetsov, A.V., and Margreiter, R., (2009) Heterogeneity of mitochondria and mitochondrial function within cells as another level of mitochondrial complexity. *International Journal of Molecular Sciences*, 10(4), 1911-1929.
- Lee, H.C., Yin, P.H., Lin, J.C., Wu, C.C., Chen, C.Y., Wu, C.W., Chi, C.W., Tam, T.N., and Wei, Y.H., (2005) Mitochondrial Genome Instability and mtDNA Depletion in Human Cancers. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1042(1), 109-122.
- Leigh, R., Pizzichini, M.M., Morris, M.M., Maltais, F., Hargreave, F.E., Pizzichini, E., (2006) Stable COPD: predicting benefit from high-dose inhaled corticosteroid treatment. *European Respiratory Journal,* 27(5), 964-971.
- Luijk, B., Lindemans, C.A., Kanters, D., van der Heijde, R., Bertics, P., Lammers, J.W., Bates, M.E., Koenderman, L., (2005) Gradual increase in priming of human eosinophils during extravasation from peripheral blood to the airways in response to allergen challenge. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 115(5), 997-1003.
- Ma, X., Jin, M., Cai, Y., Xia, H., Long, K., Liu, J., Yu, Q., Yuan, J., (2011) Mitochondrial Electron Transport Chain Complex III Is Required for Antimycin A to Inhibit Autophagy*. Chemistry and Biology, 18(11), 1474-1481.*

- MacNee, W., (2006) Pathology, pathogenesis, and pathophysiology. *British Medical Journal*, 332(7551), 1202-1204.
- Mannino, D.M., and Buist, A.S., (2007) Global burden of COPD: risk factors, prevalence, and future trends. *The Lancet*, 370(9589), 765-773.
- Mazat, J.P., Devin, A., and Ransac, S., (2020) Modelling mitochondrial ROS production by the respiratory chain. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 77(3), 455-465.
- Miterski, B., Krüger, R., Wintermeyer, P., Epplen, J.T., (2000) PCR/SSCP detects reliably and efficiently DNA sequence variations in large scale screening projects. *Combinatorial Chemistry and High Throughput Screening*, 3, 211-218.
- Mollers, M., Maniura-Weber, K., Kiseljakovic, E., Bust, M., Hayrapetyan, A., Jaksch, M., Helm, M., Wiesner, R.J, von Kleist-Retzow, J.C., (2005) A new mechanism for mtDNA pathogenesis: impairment of post-transcriptional maturation leads to severe

depletion of mitochondrial tRNASer(UCN) caused by T7512C and G7497A point mutations. *Nucleic Acids Research*, 33(17), 5647-5658.

- Moqbel, R., Levi-Schaffer, F., Kay, A.B., (1994) Cytokine generation by eosinophils. *Journal of Allergy and Clinical Immunology,* 94(6 Pt 2), 1183-1188.
- Mullis, K.B., Faloona, F.A., (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via polymerase chain reaction. *Methods in Enzymology*, 155, 335-350.
- Munnich, A., Rötig, A., Chretien, D., Saudubray, J.M., Cormier, V., and Rustin, P., (1996) Clinical presentations and laboratory investigations in respiratory chain deficiency. *European Journal of Pediatrics*, 155(4), 262-274.
- Murphy, M.P., (2009) How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochemical Journal*, 417(1), 1-13.
- Mycroft, K., Krenke, R., and Górska, K., (2020) Eosinophils in COPD- Current Concepts and Clinical Implications. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice*, 8(8), 2565-2574.
- Nakamura, Y., Gojobori, T., Ikemura, T., (2000) Codon usage tabulated from international DNA sequence databases: status for the year 2000. *Nucleic Acids Research*, 28(1), 292.
- Nishigaki, Y., Bonilla, E., Shanske, S., Gaskin, D.A., DiMauro, S., Hirano, M., (2002) Exercise-induced muscle "burning," fatigue, and hyper-CKemia: mtDNA T10010C mutation in tRNAGly*. Neurology, 58(8), 1282-1285.*
- Orita, M., Iwahana, H., Kanazawa, H., Hayashi, K., Sekiya, T., (1989) Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(8), 2766-2770.
- Pesole, G., Gissi, C., De Chirico, A., Saccone, C., (1999) Nucleotide substitution rate of mammalian mitochondrial genomes. *Journal of Molecular Evolution*, 48(4), 427-434.
- Pizzichini, E., Pizzichini, M.M., Gibson, P., Parameswaran, K., Gleich, G.J., Berman, L., Dolovich, J., Hargreave, F.E., (1998) Sputum eosinophilia predicts benefit from prednisone in smokers with chronic obstructive bronchitis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 158(5 Pt 1), 1511-1517.
- Raha, S., Merante, F., Shoubridge, E., Myint, A.T., Tein, I., Benson, L., Johns, T., Robinson, B.H., (1999) Repopulation of ρ^0 cells with mitochondria from a patient with a mitochondrial DNA point mutation in $tRNA^{Gly}$ results in respiratory chain dysfunction. *Human Mutation, 13(3), 245-254.*
- Rahman, I., Morrison, D., Donaldson, K., and MacNee, W., (1996) Systemic oxidative stress in asthma, COPD, and smokers. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 154(4), 1055-1060.
- Saha, S., Brightling, C.E., (2006) Eosinophilic airway inflammation in COPD. *International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease,* 1(1), 39-47.
- Sciacco, M., Bonilla, E., Schon, E.A., DiMauro, S., Moraes, C.T., (1994) Distribution of wild-type and common deletion forms of mtDNA in normal and respiration-deficient

muscle fibers from patients with mitochondrial myopathy. *Human Molecular Genetics*, 3(1), 13-19.

- Shanthirabalan, S., Chomilier, J., and Carpentier, M., (2018) Structural effects of point mutations in proteins. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 86(8), 853-867.
- Thannickal, V.J., and Fanburg, B.L., (2000) Reactive oxygen species in cell signaling. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*, 279(6), 1005-1028.
- Udar, N., Atilano, S.R., Memarzadeh, M., Boyer, D.S., Chwa, M., Lu, S., Maguen, B., Langberg, J., Coskun, P., Wallace, D.C., Nesburn, A.B., Khatibi, N., Hertzog, D., Le, K., Hwang, D., Kenney, M.C., (2009) Mitochondrial DNA haplogroups associated with age-related macular degeneration. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 50(6), 2966-2974.
- van der Toorn, M., Rezayat, D., Kauffman, H.F., Bakker, S.J., Gans, R.O., Koëter, G.H., Choi, A.M., van Oosterhout, A.J., Slebos, D.J., (2009) Lipid-soluble components in cigarette smoke induce mitochondrial production of reactive oxygen species in lung epithelial cells. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*, 297(1), 109-114.
- Viniol, C., Vogelmeier, C.F., (2018) Exacerbations of COPD. *European Respiratory Review*, 27(147), 170103.
- Vogelmeier, C.F., Criner, G.J., Martinez, F.J., Anzueto, A., Barnes, P.J., Bourbeau, J., Celli, B.R., Chen, R., Decramer, M., Fabbri, L.M., Frith, P., Halpin, D.M., López Varela, M.V., Nishimura, M., Roche, N., Rodriguez-Roisin, R., Sin, D.D., Singh, D., Stockley, R., Vestbo, J., Wedzicha, J.A., Agusti, A., (2017) Global Strategy for the Diagnosis, Management, and Prevention of Chronic Obstructive Lung Disease 2017 Report: GOLD Executive Summary. *European Respiratory Journal*, 49(3), 1700214.
- Wallace, D.C., (2010) Mitochondrial DNA mutations in disease and aging. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 51(5), 440-450.
- Watson, J.D., Meyers, R.M., Caudy, A.A., Witkowski, J.A., (2007) *Recombinant DNA: Genes and Genomes - A Short Course,* COLD SPRING HARBOR LABORATORY PRESS, New York.
- WHO, 2021 Chronic obstructive pulmonary disease (COPD). World Health Organization, 2021.
- Wiegman, C.H., Michaeloudes, C., Haji, G., Narang, P., Clarke, C.J., Russell, K.E., Bao, W., Pavlidis, S., Barnes, P.J., Kanerva, J., Bittner, A., Rao, N., Murphy, M.P., Kirkham, P.A., Chung, K.F., Adcock, I.M., Brightling, C.E., Davies, D.E., Finch, D.K., Fisher, A.J., Gaw, A., Knox, A.J., Mayer, R.J., Polkey, M., Salmon, M. and Singh, D., (2015) Oxidative stress–induced mitochondrial dysfunction drives inflammation and airway smooth muscle remodeling in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 136(3), 769-780.
- Wittenhagen, L.M., and Kelley, S.O., (2002) Dimerization of a pathogenic human mitochondrial tRNA. *Nature Structural Biology*, 9(8), 586-590.

- Yasukawa, T., Suzuki, T., Ishii, N., Ueda, T., Ohta, S., and Watanabe, K., (2000) Defect in modification at the anticodon wobble nucleotide of mitochondrial tRNA Lys with the MERRF encephalomyopathy pathogenic mutation. *FEBS Letters*, 467(2-3), 175-178.
- Yin, M., O'Neill, L.A.J., (2021) The role of the electron transport chain in immunity. *FASEB Journal*, 35(12), 21974.
- Zhao, R.Z., Jiang, S., Zhang, L., and Yu, Z.B., (2019) Mitochondrial electron transport chain, ROS generation and uncoupling (Review). *International Journal of Molecular Medicine,* 44(1), 3-15.
- Zifa, E., Daniil, Z., Skoumi, E., Stavrou, M., Papadimitriou, K., Terzenidou, M., Kostikas, K., Bagiatis, V., Gourgoulianis, K.I., and Mamuris, Z., (2012) Mitochondrial genetic background plays a role in increasing risk to asthma. *Molecular Biology Reports*, 39(4), 4697-4708.
- Zifa, E., Giannouli, S., Theotokis, P., Stamatis, C., Mamuris, Z., Stathopoulos, C., (2007) Mitochondrial tRNA Mutations: Clinical and Functional Perturbations. *RNA Biology, 4(1), 38-66.*
- Zorov, D.B., Juhaszova, M., and Sollott, S.J., (2014) Mitochondrial Reactive Oxygen Species (ROS) and ROS-Induced ROS Release. *Physiological Reviews*, 94(3) 909-950.
- Πατάκας Δ., (2006) *Επίτομη Πνευμονιολογία*. Β' Έκδοση, University Studio Press, 165-192, Θεσσαλονίκη.
- Πλαγεράς Π., Γεροβασίλη Β., Παπαϊωάννου Α., (2012) *Εφαρμογές Μοριακής Διαγνωστικής*. Εκδόσεις Π.Χ Πασχαλίδης, 247-251, Αθήνα.
- Σιχλετίδης Λ., (2009) *Πνευμονολογία*. 1Η Έκδοση, Τόμος 1, , Εκδόσεις University Studio Press, 19-22, Θεσσαλονίκη.