



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

**Ανίχνευση μεταλλάξεων σε μιτοχονδριακά γονίδια tRNA^{Phe} και
tRNA^{Val} σε ασθενείς με χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια
(ΧΑΠ)**

**Detection of mutations in mitochondrial tRNA^{Phe} and
tRNA^{Val} genes in patients with Chronic Obstructive
Pulmonary Disease (COPD)**

Καφίδα Μιχαέλα του Δημητρίου

Λάρισα 2023

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

Ζίφα Αιμιλία (Επιβλέπουσα Καθηγήτρια)

Επίκουρος Καθηγήτρια Βιολογίας / Νευροβιολογίας,

Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Σταμάτης Κωνσταντίνος

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

Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Δανιήλ Ζωή

Καθηγήτρια Πνευμονολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω πολύ όλους όσους με βοήθησαν να πραγματοποιήσω την παρούσα εργασία. Συγκεκριμένα την επιβλέπουσα καθηγήτριά μου κα. Ζίφα Αιμιλία η οποία πίστεψε στις δυνατότητές μου και ήταν αρωγός καθ' όλη τη διάρκεια της εργασίας. Οι συμβουλές της στη συγγραφή της εργασίας και στο εργαστηριακό κομμάτι ήταν πολύτιμες.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Σταμάτη Κωνσταντίνο, ο οποίος έδωσε λύσεις σε όλα τα προβλήματα που παρουσιάστηκαν στο εργαστήριο. Πολύ σημαντική ήταν και η βοήθεια που έλαβα από τους υποψήφιους διδάκτορες του εργαστηρίου Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας. Καθώς και την κα. Δανιήλ Ζωή για τη συνεργασία της.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω και την οικογένειά μου και τους φίλους μου, που ήταν δίπλα μου σε όλες τις στιγμές της φοιτητικής μου ζωής. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τη συμφοιτήτριά μου Καρέλα Μαρία για την συνεργασία μας. Καθώς είχαμε παρόμοια πειραματική εργασία περάσαμε πολλές ώρες μαζί και συνεργαστήκαμε άψογα και η βοήθεια της ήταν πολύτιμη.

Περιεχόμενα

Περίληψη	4
Abstract	5
1. Εισαγωγή	6
1.1 Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια (ΧΑΠ):	6
1.2 Ιστολογικές παρατηρήσεις και κυτταρικές σειρές στη ΧΑΠ	8
1.3 Μοριακοί μηχανισμοί παθογένειας της ΧΑΠ	12
1.4 Το μιτοχόνδριο	14
1.5 Τα μιτοχόνδρια στη ΧΑΠ: μοριακοί μηχανισμοί πίσω από τη νόσο	18
1.6 Μεταλλάξεις στα μιτοχονδριακά γονίδια mt-tRNA και ασθένειες	24
2. Σκοπός	26
3. Υλικά και Μέθοδοι	26
3.1 Απομόνωση ολικού DNA από δείγματα αίματος ασθενών ΧΑΠ	27
3.2 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή αγαρόζης 2%	30
3.3 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης – Polymerase Chain Reaction	34
3.4 Ποιοτικός προσδιορισμός προϊόντων PCR	39
3.5 Ανάλυση πολυμορφισμού μονόκλωνης διαμόρφωσης Single-Strand Conformational Polymorphism (SSCP)	40
3.6 Καθαρισμός προϊόντων PCR	46
3.7 Αλληλούχιση DNA	47
4. Αποτελέσματα	50
4.1 Αποτελέσματα απομόνωσης DNA μέσω ηλεκτροφόρησης	50
4.2 Αποτελέσματα PCR – οπτικοποίηση μέσω ηλεκτροφόρησης	51
4.3 Αποτελέσματα μεθόδου SSCP	53
4.4 Αποτελέσματα αλληλούχισης	54
5. Συζήτηση - Συμπεράσματα	56
6. Βιβλιογραφία	64

Περίληψη

Η παρούσα πτυχιακή εργασία διεξήχθη στα πλαίσια ενός ευρύτερου προγράμματος ανίχνευσης μεταλλάξεων στα μιτοχονδριακά γονίδια tRNA ασθενών με Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια (ΧΑΠ). Η ΧΑΠ αποτελεί μία σοβαρή φλεγμονώδη νόσο που πλήττει μεγάλο αριθμό συνανθρώπων μας και σήμερα αποτελεί την τέταρτη αιτία θανάτου. Η νόσος προκαλεί σοβαρά και μη αναστρέψιμα προβλήματα στους ασθενείς υποβαθμίζοντας την ποιότητα ζωής τους. Οι παράγοντες κινδύνου είναι περιβαλλοντικοί και γενετικοί. Ένας κύριος παράγοντας φαίνεται να είναι το κάπνισμα καθώς ο καπνός του τσιγάρου προκαλεί οξειδωτικό στρες στον οργανισμό και συγκεκριμένα στα μιτοχόνδρια. Το οξειδωτικό στρες προκαλεί συχνά μεταλλάξεις και επειδή το μιτοχονδριακό γονιδίωμα είναι πιο επιρρεπές στη μεταλλαξιγένεση, στη παρούσα πτυχιακή θα αναλυθεί η αλληλουχία δύο γονιδίων μιτοχονδριακών tRNA ($mt-tRNA^{Phe}$ και $mt-tRNA^{Val}$) με στόχο την διακρίβωση της ύπαρξης μεταλλάξεων σε ασθενείς. Για το σκοπό αυτό αρχικά απομονώθηκε το ολικό DNA από δείγματα αίματος 38 ασθενών και η επιτυχία της απομόνωσης επιβεβαιώθηκε μετά από ηλεκτροφόρηση. Στη συνέχεια, ενισχύθηκε μέσω της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) η αλληλουχία του κάθε γονιδίου και το μήκος της επιβεβαιώθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αγαρόζης. Η ύπαρξη πολυμορφισμών στα γονίδια αυτά ανιχνεύθηκε μέσω της ανάλυσης πολυμορφισμού διαμόρφωσης μονόκλωνης αλυσίδας (SSCP) και τελικά ένα αντιπροσωπευτικό δείγμα από κάθε πρότυπο, στάλθηκε για αλληλούχιση με τη μέθοδο Sanger. Τα αποτελέσματα της αλληλούχισης, μετά από επεξεργασία με κατάλληλα προγράμματα βιοπληροφορικής, επιβεβαίωσαν την ύπαρξη 1 μετάλλαξης στο γονίδιο του $mt-tRNA^{Phe}$ (596insC) και καμία μετάλλαξη στο γονίδιο $mt-tRNA^{Val}$. Η μετάλλαξη 596insC έχει βρεθεί ξανά σε ασθενείς με άσθμα ($p_{value}=0.006$). Είναι σημαντικό να διεξαχθούν περαιτέρω μελέτες για τη διαλεύκανση της σχέσης των μιτοχονδριακών tRNA γονιδίων με ασθένειες όπως η ΧΑΠ.

Λέξεις κλειδιά: Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια (ΧΑΠ), παθογένεια, μιτοχόνδριο, μιτοχονδριακή δυσλειτουργία, μιτοχονδριακό DNA (mtDNA), μεταλλάξεις, $mt-tRNA^{Phe}$, $mt-tRNA^{Val}$.

Abstract

This thesis was carried out in continuation of a wider program aiming to detect mutations in the mitochondrial tRNA genes of patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD). COPD is a serious inflammatory disease that affects a significant portion of humanity and ranks as the fourth leading cause of death worldwide. The progression of the disease is terrible as it could cause severe and irreversible damage to the lungs and degrades the patient's lifestyle. The risk factors could be environmental and genetic. A main factor seems to be smoking, because cigarette smoke causes oxidative stress in the body and especially in mitochondria. Oxidative stress often causes mutations. In addition to that the mitochondrial genome is prone to mutagenesis. Therefore, the sequence of two tRNA genes mt-tRNA^{Phe} and mt-tRNA^{Val}, in this thesis will be analyzed, with the aim of verifying the existence of mutations among COPD patients. The first step was to extract the DNA from the blood samples of 38 patients. The DNA quality was evaluated with electrophoresis in agarose gel and then it was multiplied using Polymerase Protein Reaction (PCR). The PCR product was confirmed with electrophoresis. After that, the PCR product was used to identify mutations with the method of Single Stranded Conformational Polymorphism (SSCP). The next step was the SSCP evaluation and the formation of mutation groups and then the samples were sequenced using Sanger's method. The sequences were processed with BioEdit and the result was one cytosine (C) insertion in the mt-tRNA^{Phe} gene (596insC) while no mutations were found in the mt-tRNA^{Val} gene or in the genes flanking sequences. The mutation 596insC has been found in patients with asthma ($p_{\text{value}}=0.006$). The conduction of further studies is crucial in order to elucidate the association of mitochondrial tRNA genes with diseases such as COPD.

Key words: Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD), pathogenesis, mitochondria, mitochondrial dysfunction, mitochondrial DNA (mtDNA), mutations, mt-tRNA^{Phe}, mt-tRNA^{Val}.

1. Εισαγωγή

1.1 Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια (ΧΑΠ):

Η ΧΑΠ είναι μία ασθένεια πολύ σοβαρή με πολύ μεγάλη θνητότητα σε όλο τον κόσμο. Οι ασθενείς αντιμετωπίζουν μεγάλες δυσκολίες στην καθημερινότητά τους καθώς δεν μπορούν να ανταπεξέλθουν σε βασικές τους ανάγκες ακόμα και στο ντύσιμο. Επιπλέον, η ΧΑΠ επιβαρύνει πολύ και την πολιτεία αφού το κόστος περίθαλψης είναι πολύ μεγάλο. Οι παράγοντες κινδύνου είναι περιβαλλοντικοί και γενετικοί (GOLD, 2023). Στη συνέχεια της εισαγωγής αναλύονται, η εικόνα του ασθενή, ιστολογικά και μοριακά ευρήματα της νόσου.

Ορισμός

Η ΧΑΠ είναι μία συχνή πάθηση, μπορεί να προληφθεί και να αντιμετωπιστεί. Χαρακτηρίζεται από εμμένουσα απόφραξη των αεραγωγών που είναι συνήθως προοδευτική και σχετίζεται με υπερβολική χρόνια φλεγμονώδη απάντηση των αεραγωγών και των πνευμόνων σε βλαπτικά σωματίδια ή αέρια (Benjamin et al, 2016). Η ΧΑΠ αποτελεί την τέταρτη αιτία θανάτου παγκοσμίως και εκτιμάται ότι μέχρι το 2030 θα είναι η τρίτη (Sharma et al, 2021).

Διάγνωση

Η διάγνωση της νόσου βασίζεται σε κλινική εξέταση του ασθενούς (επισκόπηση θώρακα, ψηλάφηση, επίκρουση και ακρόαση) και στα ευρήματα απεικονιστικών εξετάσεων όπως η ακτινογραφία θώρακος. Το κύριο πρόβλημα στη ΧΑΠ είναι ο περιορισμός της ροής του εκπνεόμενου αέρα. Η διάγνωση του περιορισμού του αέρα γίνεται με τη μέθοδο της σπιρομέτρησης, εάν ο λόγος του βίαια εκπνεόμενου αέρα από το πρώτο δευτερόλεπτο (FEV_1) προς τη βίαια ζωτική χωρητικότητα (FVC), μετά τη χορήγηση βρογχοδιασταλτικών στον ασθενή, βρεθεί μικρότερος από 0,70.

Μορφές της ΧΑΠ και κλινική εικόνα

Διακρίνονται δύο μορφές ΧΑΠ: το εμφύσημα και η χρόνια βρογχίτιδα. Η χρόνια βρογχίτιδα αφορά τους μεγάλους αεραγωγούς (διαμέτρου μεγαλύτερης των 2 mm) και η διάγνωση βασίζεται στο ιστορικό του ασθενούς, δηλαδή όταν ο ασθενής παρουσιάζει βήχα και πτύελα για τουλάχιστον τρεις μήνες το χρόνο για δύο συναπτά

έτη. Το εμφύσημα είναι η μόνιμη διάταση των αεροχώρων περιφερικά των τελικών βροχιολίων. Προκαλείται από καταστροφή του πνευμονικού παρεγχύματος χωρίς σημαντική ίνωση (Kumar et al, 2018).

Κλινική εικόνα (συμπτώματα και σημεία): Οι ασθενείς με ΧΑΠ παρουσιάζουν επιδεινούμενη δύσπνοια, η οποία εξελίσσεται με το πέρασμα του χρόνου σε δύσπνοια στην ελάχιστη κόπωση ή και σε κατάσταση ηρεμίας. Ο χρόνιος βήχας υπάρχει πάντα και είναι παραγωγικός ή ξηρός, ανάλογα με τον βαθμό υπερπλασίας των βλεννογόνων. Κατά τη διάρκεια των τελευταίων σταδίων της ΧΑΠ οι ασθενείς παρουσιάζουν αυξημένο έργο, αναπνέουν με σφιγμένα χείλη και εμφανίζουν απώλεια βάρους. Κάποιοι ασθενείς διατηρούν τις μερικές πιέσεις O₂ και CO₂ σχετικά φυσιολογικές, αν και εμφανίζουν δύσπνοια. Άλλοι κατακρατούν το CO₂, και έτσι δημιουργείται χρόνια αναπνευστική οξέωση και σε ακραίες περιπτώσεις εμφανίζεται κυάνωση. Οι περιοδικές οξείες παροξύνσεις είναι χαρακτηριστικό της νόσου και αυξάνονται σε συχνότητα, με την πρόοδο της ΧΑΠ, συνδυαστικά με την αύξηση της ηλικίας. Επιπλέον σε κάποιους ασθενείς παρατηρείται αναπνευστικός συριγμός, πιθοειδής θώρακας και μειωμένη διάχυση αέρα (Benjamin et al, 2016 και Kumar et al, 2018).

Παράγοντες κινδύνου

Στους παράγοντες κινδύνου για την ανάπτυξη της ΧΑΠ ανήκουν περιβαλλοντικοί και γενετικοί παράγοντες. Ο κύριος βλαπτικός παράγοντας είναι ο καπνός από τα τσιγάρα, καθώς η ΧΑΠ είναι γνωστή και ως «νόσος των καπνιστών». Ο καπνός αποτελείται από την αέρια φάση (φορμαλδεΰδη, ακρολεΐνη και υδροκυάνιο) η οποία σχετίζεται με τη νόσο και τη σωματιδιακή (πολυαρωματικοί υδρογονάνθρακες και νιτροζαμίνας του καπνού) (Adamson et al, 2011). Στους περιβαλλοντικούς παράγοντες ανήκει και η επιβαρυνόμενη ατμόσφαιρα τόσο εντός του σπιτιού όσο και η περιβαλλοντική ρύπανση. Στα σπίτια υπολείμματα ξύλου, σόμπες και εστίες θέρμανσης που δεν λειτουργούν σωστά, καθώς και υπολείμματα εντομοκτόνων που χρησιμοποιούνται, αυξάνουν την πιθανότητα εκδήλωσης ΧΑΠ (Orozco-Levi et al, 2006). Στα γενετικά αίτια της ασθένειας αναφέρεται η ανεπάρκεια της α1 αντιθρυψίνης, η οποία οφείλεται σε μεταλλάξεις του γονιδίου SERPINA1. Πρόκειται για μία πρωτεΐνη οξείας φάσης, η οποία παράγεται στο ήπαρ και καταλήγει στον πνεύμονα. Φυσιολογικά, η λειτουργία της α1 αντιθρυψίνης ως αντιπρωτεάση

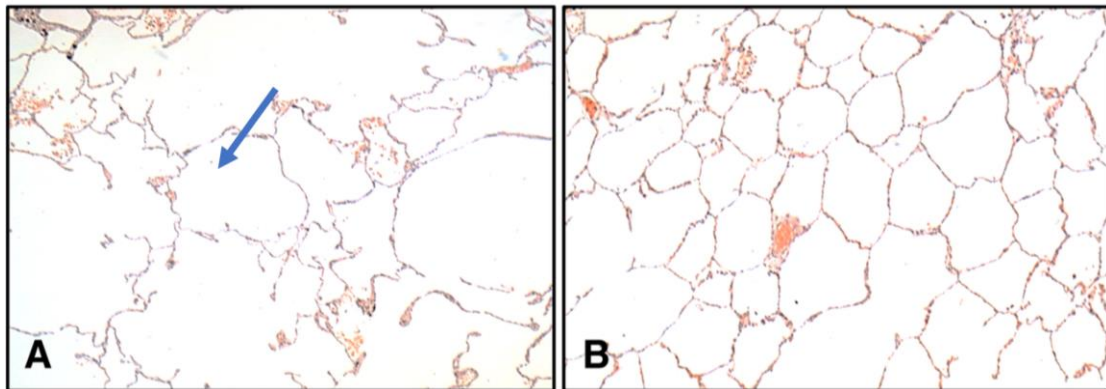
αντισταθμίζει τη δράση της ελαστάσης. Συγκεκριμένα, η ελαστάση συνδέεται στο ενεργό κέντρο της α1 αντιθρυψίνης και έτσι, μετά από μία αλλαγή στη στερεοδιαμόρφωση της α1 αντιθρυψίνης, οι δύο πρωτεΐνες είναι συνδεδεμένες και απενεργοποιημένες (Carrell & Lomas, 2002). Επομένως, η ελαστάση δεν μπορεί να αποικοδομήσει την ελαστίνη που βρίσκεται στα τοιχώματα των κυψελίδων και έτσι διατηρούν το φυσιολογικό πάχος τους (Stoller, 2016). Η έλλειψη της α1 αντιθρυψίνης, αποτελεί την κληρονομική πτυχή της ΧΑΠ και οδηγεί σε αδυναμία παρεμπόδισης της ελαστάσης και στην επακόλουθη λέπτυνση των κυψελιδικών τοιχωμάτων (Clark & Kumar, 2015). Πολλές μακροπρόθεσμες μελέτες έχουν εξετάσει τη σχέση της ηλικίας με τη μείωση της αναπνευστικής λειτουργίας και έχουν αποδείξει συσχέτιση (Benjamin et al, 2016).

1.2 Ιστολογικές παρατηρήσεις και κυτταρικές σειρές στη ΧΑΠ

Η κλινική εικόνα της νόσου που αναλύσαμε προηγουμένως αντικατοπτρίζεται στα ιστολογικά ευρήματα τόσο της χρόνιας βρογχίτιδας όσο και του εμφυσηματος. Στους φυσιολογικούς πνευμονικούς ιστούς, υπάρχει μία ισορροπία μεταξύ πολλών κυτταρικών τύπων. Μερικοί τύποι κυττάρων είναι τα επιθηλιακά κύτταρα των κυψελίδων τύπου I και II, τα καλυκοειδή κύτταρα (Goblet cells) που παράγουν βλέννα, τα μακροφάγα, τα ουδετερόφιλα, τα ενδοθηλιακά κύτταρα, τα κύτταρα Clara (προγονικά κύτταρα, με προστατευτικό χαρακτήρα καθώς μπορούν να αποτοξικοποιούν ξενοβιοτικές ουσίες που εντοπίζονται στους πνεύμονες). Ο αριθμός και η λειτουργικότητα των κυττάρων αυτών και κυρίως του ανοσοποιητικού παρουσιάζουν μεγάλες διαφορές στους ασθενείς της ΧΑΠ σε σύγκριση με τα υγιή άτομα (Barnes, 2017).

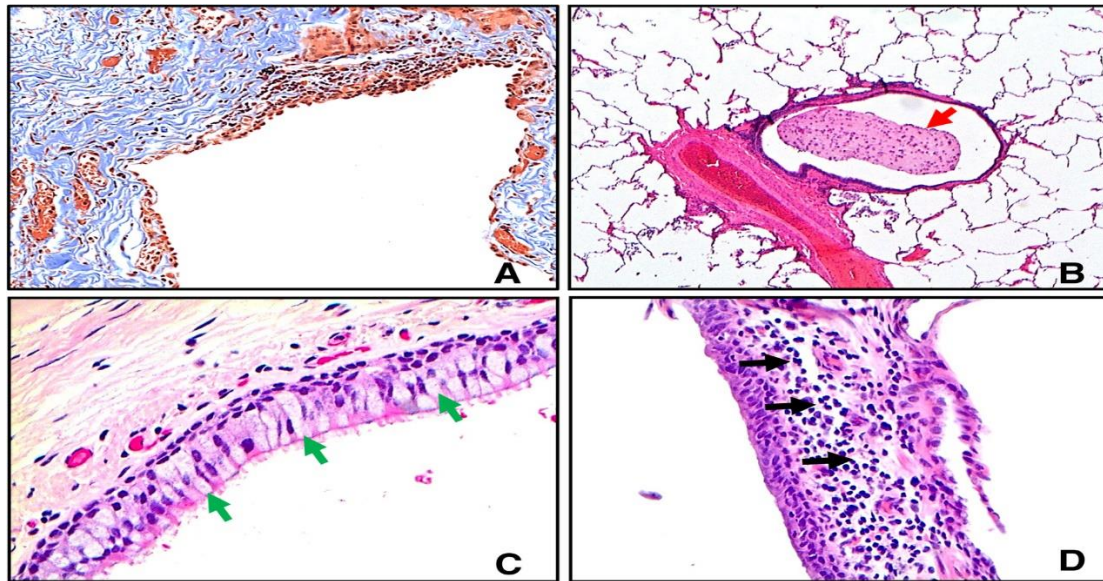
Σύμφωνα με τον GOLD (Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease) το εμφύσημα είναι το πιο χαρακτηριστικό εύρημα στον πνευμονικό ιστό ασθενών με ΧΑΠ. Στο εμφύσημα (Εικόνα 1) οι πληθυσμοί των κυττάρων διαφοροποιούνται και παρατηρείται καταστροφή των κυψελιδικών τοιχωμάτων χωρίς ίνωση, με αποτέλεσμα τη διεύρυνση των αεροφόρων χώρων. Παρατηρείται ακόμη ελάττωση του αριθμού των κυψελιδικών τριχοειδών και παραμορφωμένα αναπνευστικά βρογχιόλια. Παράλληλα, υπάρχει απώλεια ελαστικών ινών, ελαττώνοντας την ακτινωτή έλξη στους μικρούς αεραγωγούς. Επομένως, η συνένωση των τοιχωμάτων κατά την αναπνοή είναι αναπόφευκτη και έτσι παρατηρείται η

χρόνια απόφραξη της ροής του αέρα σε εμφύσημα βαριάς μορφής (Kumar et al, 2018).



Εικόνα 1: Κεντρολοβιακό εμφύσημα που σχετίζεται με κάπνισμα A) Περιοχή εμφυσηματικού πνευμονικού ιστού με σοβαρή εξάλειψη των κυψελιδικών τοιχωμάτων, που φαίνονται με το βέλος (4X μεγέθυνση). B) Φυσιολογικός πνευμονικός ιστός, με άθικτα κυψελιδικά τοιχώματα (4X μεγέθυνση). Η χρώση του A και του B έχει γίνει με αιματοξυλίνη – ηωσίνη (Higham et al, 2019).

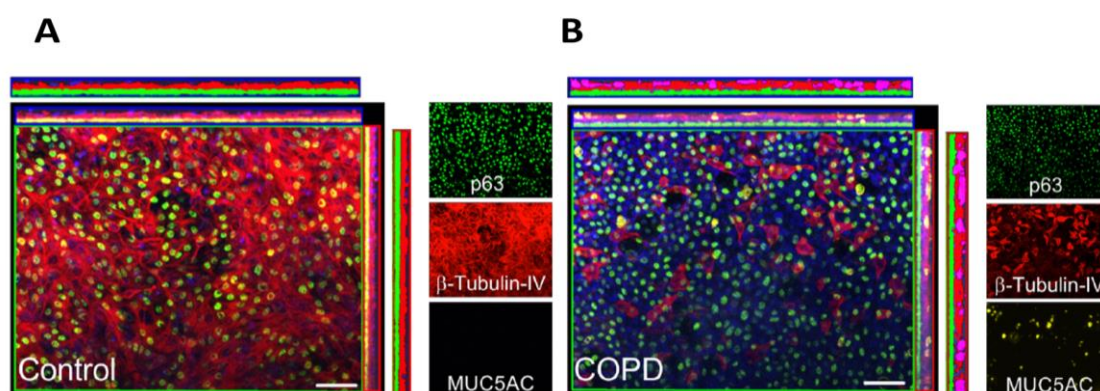
Η δεύτερη μορφή της ΧΑΠ, όπως προαναφέρθηκε, είναι η χρόνια βρογχίτιδα. Στην εικόνα 2 παρατηρείται η διόγκωση των βλεννοεκκριτικών αδένων και η υπερπαραγωγή βλέννας (4B). Στο βρογχικό βλεννογόνο εμφανίζονται φλεγμονώδη κύτταρα, κυρίως λεμφοκύτταρα, μακροφάγα και μερικές φορές ουδετερόφιλα (4D). Επιπλέον, στη χρόνια βρογχιολίτιδα, που χαρακτηρίζεται από μεταπλασία τύπου καλυκοειδών κυττάρων, παρατηρείται επίσης σχηματισμός βυσμάτων βλέννας (4B), φλεγμονή (4D) και ίνωση (4A) (Higham et al, 2019). Η υποβλεννογονία ίνωση οδηγεί σε στένωση του αυλού και απόφραξη των αεραγωγών (Kumar et al, 2018). Επιπλέον, οι ινοβλάστες, μέσω κυτοκινών ενεργοποιούν τα ουδετερόφιλα και τελικά ενεργοποιούνται τα καλυκοειδή κύτταρα που παράγουν βλέννα, ένα σημαντικό χαρακτηριστικό της ΧΑΠ. Οι ινοβλάστες έχουν επαχθεί από οξειδωτικό στρες και είναι υπεύθυνοι για την ίνωση της χρόνιας βρογχίτιδας (Barnes, 2019).



Εικόνα 2: Ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά της νόσου των μικρών αεραγωγών στη ΧΑΠ. Α) Ένα βροχιόλιο ΧΑΠ όπου φαίνεται ένα παχύ τοίχωμα αεραγωγού με ίνωση λόγω της εναπόθεσης πολλών ινών κολλαγόνου (με μπλε χρώμα- Masson's Trichrome) σε μεγέθυνση 10X. Β) Τομή ιστού ΧΑΠ όπου το βρογγιόλιο περιέχει ένα μεγάλο ενδοαυλικό βλεννογόνο βύσμα (κόκκινο βέλος) (μεγέθυνση 2X) Γ) Βροχιόλιο ΧΑΠ με αυξημένο αριθμό καλυκοειδών κυττάρων (πράσινα βέλη) στο επιθήλιο (μεγέθυνση 20X). Δ) Το τοίχωμα ενός βρογγιολίου ΧΑΠ με αυξημένο αριθμό φλεγμονωδών κυττάρων (μαύρα βέλη) (μεγέθυνση 20X), οι τομές Β, Γ και Δ χρωματίστηκαν με αιματοξυλίνη και ηωσίνη (Higham et al, 2019).

Η διαφορετική διαμόρφωση των πνευμονικών ιστών στη ΧΑΠ οφείλεται σε διαφοροποιήσεις στους πληθυσμούς των κυττάρων αυτών των ιστών. Η μελέτη σε κυτταρικό επίπεδο μπορεί να γίνει με δύο τρόπους. Ο ένας είναι να χρησιμοποιηθούν κυτταρικές σειρές, στις οποίες θα έχει δημιουργηθεί η συνθήκη που προσομοιάζει τη ΧΑΠ, μέσω επώασης με καπνό τσιγάρου. Ο δεύτερος τρόπος είναι να γίνει μελέτη σε κύτταρα ασθενών με ΧΑΠ (Adamson et al, 2011). Ένα πείραμα είναι το ακόλουθο. Κύτταρα από ασθενείς με τη νόσο καλλιεργήθηκαν σε κατάλληλες κυτταροκαλλιέργειες ALI (Air-Liquid Interface) – HBECs (Human Bronchial Epithelial Cells) και ακολούθησε χρώση ανοσοϊστοχημείας με φθορίζουσα. Όπως βλέπουμε στην εικόνα 3, έχουμε σχεδόν ίσο αριθμό πλακοειδών κυττάρων μεταξύ ασθενών και υγιών. Φανερώθηκε μειωμένος αριθμός βλεφαριδοφόρων κυττάρων στη ΧΑΠ, που μπορεί να δικαιολογείται από καταστροφή κυττάρων, όπως τα βλεφαριδοφόρα. Η αύξηση της MUC5AC είναι ενδεικτική της παραγωγής βλέννας

στη ΧΑΠ (Gohy et al, 2019). Αφού άρχισε να διαφαίνεται το τι συμβαίνει στους κυτταρικούς τύπους, το επόμενο βήμα ήταν η διερεύνηση των αλλαγών που υφίσταται το κύτταρο.



Εικόνα 3: Εικόνα από μικροσκόπιο φθορισμού σε κυτταρικές σειρές που έχουν αναπτυχθεί με τη μέθοδο ALI (Air-Liquid Interface) A) υγιούς ατόμου – κοντρόλ και B) ασθενή με βαριά μορφή ΧΑΠ. Με κίτρινο ανοσοφθορισμό για τη MUC5AC (γλυκοπρωτεΐνη που συμμετέχει στον σχηματισμό της βλέννας), με κόκκινο για τη β-τουμουλίνη (δείκτης βλεφαριδοφόρων κυττάρων) και πράσινο για την p63 (δείκτης για τα πλακοειδή κύτταρα). Οι πυρήνες χρωματίστηκαν μπλε με τη χρώση DAPI. Με τη σύγκριση του δείγματος κοντρόλ και της ΧΑΠ φαίνονται διαφορές στο αποτέλεσμα των χρώσεων μεταξύ των κυτταρικών σειρών (Gohy et al, 2019).

Κατά τη ΧΑΠ τα κύτταρα εμφανίζουν διαφορετική μορφολογία. Με ένα άλλο πείραμα, αυτή τη φορά σε κυτταρική σειρά όπου έχουν εγκαθιδρυθεί συνθήκες οξειδωτικού στρες, διαπιστώθηκε ότι τα επιθηλιακά πνευμονικά κύτταρα τα οποία είχαν επωαστεί με τον καπνό παρουσιάζουν αυξημένη γήρανση. Σχετικά με τη μορφολογία τους, είναι πεπλατυσμένα και λεπτά συγκριτικά με τα φυσιολογικά, ενώ παρουσιάζουν και αυξημένα λυσοσώματα (Tsuji et al, 2003). Συμπερασματικά, στους ιστούς ασθενών ΧΑΠ έχουν παρατηρηθεί πολλές διαφορές με τις κυριότερες να είναι η μείωση των βλεφαριδοφόρων κυττάρων, η υπερπαραγωγή βλέννας λόγω αύξησης των καλκοειδών κυττάρων και η ύπαρξη γερασμένων και παραμορφωμένων επιθηλιακών κυττάρων.

Οι αλλαγές στη μορφολογία και στον αριθμό των κυττάρων στους πνευμονικούς ιστούς εξαρτώνται από τη κατάσταση που επικρατεί μέσα στο κύτταρο και τους μοριακούς μηχανισμούς, που διέπουν τη λειτουργία του. Στη συνέχεια θα

εστιάσουμε στις τρεις διαταραχές που χαρακτηρίσουν τη παθογένεια της ΧΑΠ και κυρίως τη μιτοχονδριακή δυσλειτουργία.

1.3 Μοριακοί μηχανισμοί παθογένειας της ΧΑΠ

Διαταραχή της ισορροπίας πρωτεασών – αντιπρωτεασών

Όπως είδαμε προηγουμένως η έλλειψη της α1-αντιθρυψίνης διαταράσσει την ισορροπία πρωτεασών – αντιπρωτεασών και δημιουργεί σοβαρά προβλήματα στα κύτταρα. Εκτός της α1-αντιθρυψίνης, άλλες αιτίες ανισορροπίας πρωτεασών – αντιπρωτεασών είναι και η ύπαρξη δραστικών μορφών οξυγόνου, ROS (Reactive Oxygen Species). Οι ROS αλληλεπιδρούν με τις πρωτεάσες και απορυθμίζουν τη λειτουργία τους. Επιπλέον, ο καπνός του τσιγάρου, σε τοξικές συγκεντρώσεις και για παρατεταμένο χρονικό διάστημα, μπορεί να ενεργοποιήσει τα κύτταρα του ανοσοποιητικού. Χαρακτηριστικά, τα μακροφάγα και τα ουδετερόφιλα αυξάνονται και εκκρίνουν ποικιλία πρωτεασών, όπως οι μεταλλοπρωτεάσες, η ουδετερόφιλη ελαστάση και η πρωτεϊνάση 3 (Fischer et al, 2011). Επομένως, διαταραχή της ισορροπίας πρωτεασών – αντιπρωτεασών, οδηγεί σε ανεξέλεγκτη πρωτεόλυση και συνεπώς στη καταστροφή κυττάρων που είναι χαρακτηριστικό του εμφυσήματος.

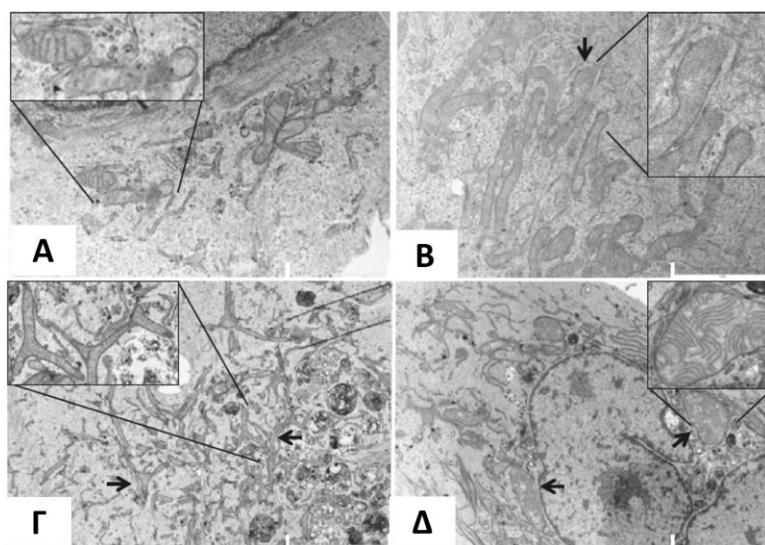
Έλλειψη αντιοξειδωτικών μηχανισμών

Το οξειδωτικό στρες είναι αυξημένο στους ασθενείς με ΧΑΠ και δεν μπορεί να αντισταθμιστεί από τους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς του οργανισμού. Οι πηγές του οξειδωτικού στρες μπορεί να είναι εξωγενείς ή ενδογενείς. Στις εξωγενείς ανήκει ο καπνός του τσιγάρου και η περιβαλλοντική ρύπανση, που αποτελούν και παράγοντες κινδύνου της ΧΑΠ (Adamson et al, 2011). Από την άλλη, στις ενδογενείς πηγές είναι η φλεγμονή, η υπερπαραγωγή ROS (ρίζα OH, το H₂O₂), οι ελεύθερες ρίζες αζώτου (RNS) καθώς και τα ένζυμα που παράγουν ROS και RNS (Barnes, 2022). Το πρόβλημα στη ΧΑΠ εκτός από το αυξημένο οξειδωτικό στρες είναι η μείωση των αντιοξειδωτικών μορίων. Τα αντιοξειδωτικά προέρχονται τόσο από τη διατροφή (βιταμίνη E, βιταμίνη C, φλαβονοειδή και πολυφαινόλες) όσο και ενδογενώς, από τα κύτταρα. Για παράδειγμα στο αίμα ασθενών με ΧΑΠ τα επίπεδα θειορεδοξίνης, η οποία είναι ένας σημαντικός αντιοξειδωτικός παράγοντας, εμφανίζονται πολύ μειωμένα (Liu et al, 2021). Επιπλέον, και ο πυρηνικός μεταγραφικός παράγοντας Nrf2 βρέθηκε σε μειωμένα επίπεδα. Ο ρόλος του Nrf2

είναι η ρύθμιση της μεταγραφής γονιδίων, των οποίων τα προϊόντα έχουν αντιοξειδωτική ικανότητα. Άρα, η έλλειψη του Nrf2 που παρατηρείται στη ΧΑΠ (Liu et al, 2019), έχει ως αποτέλεσμα την ελάττωση των αντιοξειδωτικών μηχανισμών και την αύξηση του οξειδωτικού στρες, δικαιολογώντας έτσι τις αλλαγές που συμβαίνουν στα μιτοχόνδρια, στα κύτταρα και στον οργανισμό των ασθενών.

Μιτοχονδριακή δυσλειτουργία

Στη ΧΑΠ το οξειδωτικό stress, όπως είδαμε είναι ένας πολύ σημαντικός παράγοντας εκδήλωσης και εξέλιξης της νόσου. Κύρια πηγή παραγωγής ROS στον οργανισμό είναι τα μιτοχόνδρια. Τα οργανίδια αυτά, παρουσιάζουν σημαντικές μορφολογικές αλλοιώσεις στους ασθενείς σε σχέση με τους υγιείς κάτι που συνεπάγεται και τη δυσλειτουργία τους. Όπως μπορούμε να παρατηρήσουμε στην εικόνα 4 τα μιτοχόνδρια των ασθενών φαίνεται να είναι διακλαδισμένα, επιμηκυμένα, με ασυνεχείς ακρολοφίες και διογκωμένα, με αυξημένη μάζα (παθολογική μορφολογία), σε αντίθεση με τα φυσιολογικά μιτοχόνδρια (Hoffman et al, 2013). Η μορφολογία αυτή αντικατοπτρίζει προβλήματα στην ομοιοστασία των μιτοχονδρίων και την απορρύθμιση των μηχανισμών της μιτοφαγίας, της βιογένεσης, της μιτοχονδριακής σχάσης και σύντηξης. Η μιτοχονδριακή ομοιοστασία στηρίζεται στη σταθεροποίηση της μεμβράνης του, στην ισορροπία του Ca^{+2} , στο mtDNA, στη παραγωγή ROS και στην μιτοφαγία (Zhou et al, 2021). Τους μηχανισμούς αυτούς θα τους δούμε αναλυτικά στη συνέχεια.



Εικόνα 4: Ηλεκτρονική μικροσκοπία βρογχικού επιθηλίου, στο A φαίνονται τα φυσιολογικά μιτοχόνδρια ανθρώπων που δεν έχουν καπνίσει ποτέ, στο B, Γ και Δ είναι

τα μιτοχόνδρια των πρώην καπνιστών – ασθενών με ΧΑΠ. Συγκεκριμένα στο Β τα μιτοχόνδρια φαίνονται επιμηκυμένα, με διαταραγμένες ακρολοφίες. Στο Γ παρουσιάζονται διακλαδισμένα μιτοχόνδρια. Στο Δ τα μιτοχόνδρια είναι διογκωμένα και παρουσιάζουν ασυνεχείς ακρολοφίες (Hoffman et al, 2013).

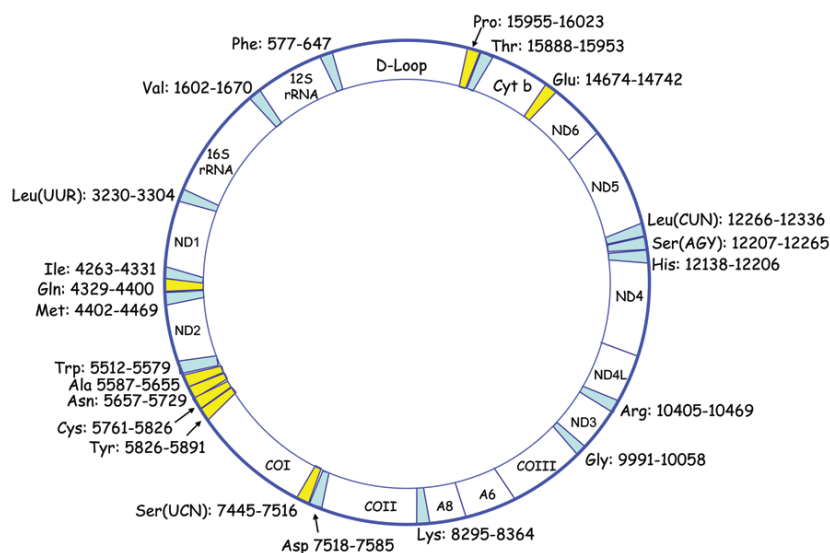
1.4 Το μιτοχόνδριο

Το μιτοχόνδριο είναι ένα ημιαυτόνομο οργανίδιο που εξελικτικά έχει προέλθει από τη συμβίωση βακτηριακών και ευκαρυωτικών κυττάρων, ένα φαινόμενο που ονομάζεται ενδοσυμβίωση. Αποτελείται από δύο μεμβράνες την εξωτερική, αρκετά διαπερατή, και την εσωτερική, πιο εκλεκτική, η οποία σχηματίζει ακρολοφίες. Ο χώρος ενδιάμεσα των μεμβρανών ονομάζεται διαμεμβρανικός και το εσωτερικό του μιτοχονδρίου μήτρα. Είναι απαραίτητο οργανίδιο καθώς είναι υπεύθυνο για το 90% της παραγόμενης ενέργειας του κυττάρου (ATP) μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων, που βρίσκεται στην εσωτερική μεμβράνη (Tymoczko et al, 2019). Επίσης συμμετέχει στον μεταβολισμό λιπαρών οξέων και αμινοξέων, σε τροποποιήσεις φωσφολιπιδίων, στη ρύθμιση του ασβεστίου (Ca^{2+}), στη παραγωγή ελεύθερων ριζών οξυγόνου που ανήκουν στις δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) και μέσω μονοπατιών μεταγωγής σήματος στην κυτταρική επιβίωση, γήρανση και θάνατο (Poron, 2020). Οι λειτουργίες αυτές ελέγχονται τόσο από τον πυρήνα όσο και από το μιτοχονδριακό DNA (mtDNA).

Το γενετικό υλικό του μιτοχονδρίου

Σημαντικό χαρακτηριστικό του οργανιδίου αυτού είναι η ύπαρξη δύο έως δέκα αντιγράφων mtDNA. Το mtDNA έχει μήκος 16.569 ζεύγη βάσεων και περιέχει 37 γονίδια (Taanman, 1999). Σε αυτά περιλαμβάνονται 13 γονίδια υπομονάδων των πρωτεϊνών της αναπνευστικής αλυσίδας, δύο γονίδια rRNA (12S και 16S), καθώς και 22 γονίδια μεταφορικού RNA (mt-tRNA) (Εικόνα 5). Ωστόσο τα γονίδια αυτά δεν επαρκούν για την λειτουργία του μιτοχονδρίου και έτσι μεταφέρονται σε αυτό 1000-2000 πρωτεΐνες, οι οποίες φέρουν ένα πεπτίδιο οδηγό 20-25 αμινοξέων και κωδικοποιούνται από το πυρηνικό DNA. Στο μιτοχόνδριο η μετάφραση γίνεται μέσω μόνο των 22 mt-tRNA επειδή κατά την σύνδεση κωδικονίου - αντικωδικονίου γίνεται ταλάντευση στη δεύτερη και όχι στην τρίτη θέση, όπως στο κυτταρόπλασμα (Cooper & Hausman, 2016). Εστιάζοντας στη κατανομή των γονιδίων του mtDNA, παρατηρούμε ότι τα γονίδια είναι πολύ πυκνά διατεταγμένα και ότι μόνο το 5% του

mtDNA δεν είναι κωδικοποιητικό (Zifa et al, 2007). Επομένως, λόγω της πυκνής διάταξης των μιτοχονδριακών γονιδίων μία μετάλλαξη είναι πιο πιθανό να δημιουργεί πρόβλημα στα προϊόντα της μεταγραφής και κατ' επέκταση στη λειτουργία του μιτοχονδρίου.



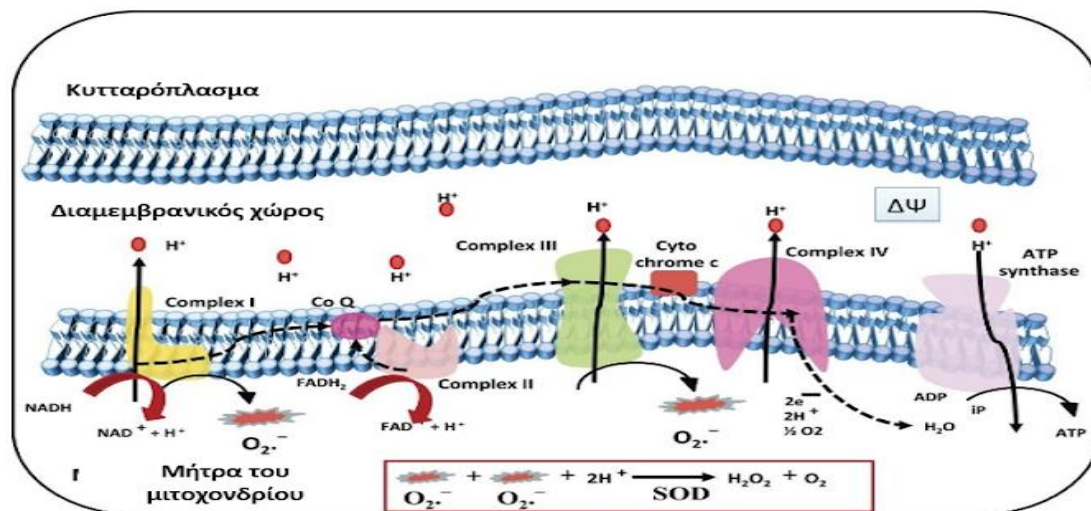
Εικόνα 5: Ο χάρτης του mtDNA στον άνθρωπο. Παρατηρούμε τις θέσεις γονιδίων 12S και 16S rRNA, γονίδια από 13 υπομονάδες των πρωτεϊνών της αναπνευστικής αλυσίδας (Cyt b, ND1-6, COI-III, A6/8) και 22 mt-tRNA (πχ το γονίδιο του mt-tRNA^{Phe} ξεκινάει από τη βάση 577 έως 647). Με κίτρινο και μπλε χρώμα φαίνονται αντίστοιχα τα γονίδια mt-tRNA που κωδικοποιούνται από τη βαριά και την ελαφριά αλυσίδα (Zifa et al, 2007). Συντομογραφίες: A6/A8: υπομονάδες της F₁F₀ ATP συνθάσης, Ala: αλανίνη, Arg: αργινίνη, Asn: ασπαραγίνη, Asp: ασπαραγινικό, COI-III: υπομονάδες της κυτοχρωμικής οξειδάσης, Cys: κυστεΐνη, Cyt b: κοτόχρωμα b, Gln: γλουταμίνη, Glu: γλουταμινικό, Gly: γλυκίνη, His: ιστιδίνη, Ile: ισολευκίνη, Leu: λευκίνη, Lys: λυσίνη, Met: μεθειονίνη, Nd1-6: υπομονάδες της αφυδρογονάσης του NADH, Phe: φαινυλαλανίνη, Pro: προλίνη, Ser: σερίνη, Thr: θρεονίνη, Trp: τρυπτοφάνη, Tyr: τυροσίνη, Val: βαλίνη

Μεταλλάξεις στο mtDNA και παραγωγή ROS

Οι μεταλλάξεις στα mtDNA γονίδια και στα μιτοχονδριακά γονίδια του πυρηνικού DNA, συσχετίζονται με πολλές ασθένειες. Αυτό είναι αναμενόμενο καθώς η διατάραξη της φυσιολογικής λειτουργίας του μιτοχονδρίου διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην απορρύθμιση της λειτουργίας του κυττάρου. Θα πρέπει να τονιστεί ότι το mtDNA δεν έχει ιστόνες ή μηχανισμούς επιδιόρθωσης και επιπλέον βρίσκεται στη μήτρα, δηλαδή στο σημείο παραγωγής ROS. Εξαιτίας αυτών, εμφανίζει αυξημένη κατά 10 με 17 φορές συχνότητα μεταλλάξεων σε σύγκριση με το πυρηνικό. Στη συνέχεια θα αναφερθούμε σε ορισμένα παραδείγματα μεταλλάξεων

που εντοπίζονται στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα και έχουν συσχετιστεί με διάφορες ασθένειες.

Ο φυσιολογικός ρόλος των ROS είναι η αύξηση της διαπερατότητας της μεμβράνης ώστε να λειτουργεί σωστά η αναπνευστική αλυσίδα, η συμμετοχή σε μονοπάτια μεταγωγής σήματος και η ρύθμιση της βιογένεσης των μιτοχονδρίων. Η υπερπαραγωγή ROS ωστόσο οδηγεί σε βλάβες στο mtDNA και σε οξείδωση πρωτεϊνών και λιπιδίων του μιτοχονδρίου. Οι ROS παράγονται κυρίως κατά την οξειδωτική φωσφορυλίωση, όπου τα ηλεκτρόνια από το NADH και το FADH₂ μεταφέρονται από τα σύμπλοκα I, II, III και IV. Παράλληλα, πρωτόνια διέρχονται από τη μήτρα στον διαμεμβρανικό χώρο, μέσω των συμπλόκων I, III και IV, για την εγκαθίδρυση διαφοράς δυναμικού, που αξιοποιείται από το σύμπλοκο V (F₀F₁ ATP συνθάση) (Agrawal et al, 2016). Η παραγωγή των ROS γίνεται κυρίως από το σύμπλοκο I, III και το συνένζυμο Q, όπου δημιουργούνται ρίζες O₂⁻ και μετά μετατρέπονται σε H₂O₂ (μέσω της δισμουτάσης του υπεροξειδίου του υδρογόνου SOD). Από το παραγόμενο H₂O₂ μπορεί να προκύψουν ρίζες υδροξυλίου που ανήκουν στις πιο δραστικές ROS (Brookes et al, 2004 και Zhou et al, 2021) (Εικόνα 6). Ακόμα και όταν η αναπνευστική αλυσίδα λειτουργεί φυσιολογικά, το 1-2% των συνολικών ηλεκτρονίων «διαρρέει» με τη μορφή των ROS (Tymoczko et al, 2015). Όταν τα μιτοχόνδρια υπερπαραγάγουν ROS, επηρεάζεται η αναπνευστική αλυσίδα. Το διαθέσιμο ATP μειώνεται, ενώ παράλληλα προκαλείται οξειδωτικό στρες στο μιτοχόνδριο και κατ' επέκταση στο κύτταρο, οδηγώντας το δεύτερο σε απόπτωση. Ο μηχανισμός αυτός συνδέεται με την παθογένεια πολλών ασθενειών.



***Εικόνα 6:** Η αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων και η παραγωγή ROS. Στην εικόνα βλέπουμε την αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων τα ηλεκτρόνια από το NADH και το FADH₂ περνάνε από τα σύμπλοκα I-IV, την ουβικινόνη (CoQ) και το κυτόχρωμα C (CytC) και καταλήγουν στο O₂. Τα πρωτόνια που διαπερνούν την εσωτερική μεμβράνη εγκαθιδρύουν τη διαφορά δυναμικού Δψ η οποία είναι απαραίτητη για τη σύνθεση του ATP, από την ATPσυνθάση. Κάποια ηλεκτρόνια βγαίνουν από τη πορεία, κυρίως όταν βρίσκονται στα σύμπλοκα I και III, και δημιουργούν ρίζες υπεροξειδίου O₂⁻. Από την δισμουτάση του υπεροξειδίου (SOD) το υπεροξείδιο μετατρέπεται σε υπεροξείδιο του υδρογόνου που αργότερα θα δώσει H₂O και O₂, εναλλακτικά μπορεί να οδηγήσει στο σχηματισμό της ελεύθερης ρίζας του υδροξυλίου (Agrawal et al, 2016).*

Μιτοχονδριακές ασθένειες

Η ύπαρξη μεταλλάξεων στο mtDNA έχει διαπιστωθεί σε πολλά νοσήματα χωρίς να γνωρίζουμε αν υπάρχει πάντα σχέση αιτίου-αιτιατού. Κάτω από την ομπρέλα του όρου μιτοχονδριακές ασθένειες βρίσκονται πολλές ετερογενείς νόσοι με πολύ διαφορετικά κλινικά συμπτώματα (Gorman et al, 2016). Η ετερογένεια του φαινοτύπου μπορεί να εξηγηθεί και από την ετεροπλασμία που διέπει τα μιτοχόνδρια. Ετεροπλασμία ορίζεται η ύπαρξη διαφορών στα αντίγραφα του μιτοχονδριακού DNA, μέσα σε ένα μιτοχόνδριο ή σε ένα κύτταρο. Για να θεωρηθεί ότι μία μιτοχονδριακή μετάλλαξη συμμετέχει στο φαινότυπο μίας νόσου, θα πρέπει το ποσοστό μεταλλαγμένων προς φυσιολογικών αντιγράφων, μέσα σε ένα κύτταρο, να υπερβαίνει ένα κατώφλι. Η ομοιοπλασμία σχετίζεται με την αυξημένη παθογένεια των νόσων (Zifa et al, 2007).

Κάποια από τα κοινά χαρακτηριστικά των μιτοχονδριακών νοσημάτων είναι η ανίχνευση μεταλλάξεων στο mtDNA, αλλά και στο πυρηνικό γονιδίωμα στις περιοχές που κωδικοποιούν μιτοχονδριακές πρωτεΐνες. Επίσης, παρουσιάζουν αυξημένα ποσοστά ROS και φαίνεται κατά κύριο λόγο να επηρεάζουν ιστούς με αυξημένες ενεργειακές απαιτήσεις (Daniil et al, 2018). Ο νευρικός, ο μυϊκός και ο καρδιακός ιστός διαθέτουν περισσότερα μιτοχόνδρια και άρα είναι πιο επιρρεπείς σε μιτοχονδριακές ασθένειες. Η πρώτη ασθένεια που συσχετίστηκε με το μιτοχόνδριο είναι η MELAS (Mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes), μία ασθένεια που προσβάλλει κυρίως το νευρικό και μυϊκό σύστημα. Οι

ασθενείς εμφανίζουν επιδεινούμενα συμπτώματα εγκεφαλοπάθειας, μυοπάθειας και πονοκεφάλους (Pia and Lui, 2022). Επιπλέον, μετά από μελέτες διαπιστώθηκε και ότι ο πνευμονικός ιστός έχει μεγάλη κατανάλωση ενέργειας και τα μιτοχόνδρια είναι το σημείο όπου καταναλώνεται το περισσότερο O_2 στους πνεύμονες. Επομένως, αναμένουμε ορισμένες ασθένειες των πνευμόνων να οφείλονται σε μεταλλάξεις στο mtDNA και συνεπώς στη μιτοχονδριακή δυσλειτουργία. Στις ασθένειες αυτές ανήκουν και η ιδιοπαθής πνευμονική ίνωση (IPF), το άσθμα και η σαρκοείδωση. Στην IPF η δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων οδηγεί σε ίνωση. Βρέθηκε ότι οι ROS τροποποιούν τον TGF- β , που επάγει την ίνωση στους ασθενείς (Daniil et al, 2018). Στη σαρκοείδωση το κύριο χαρακτηριστικό της νόσου είναι η φλεγμονή. Βλάβες και η έξοδος του mtDNA στο κυτταρόπλασμα, έχουν ως αποτέλεσμα την διατήρηση της φλεγμονής (Ryu et al, 2019). Με παρόμοια λογική καθώς η ΧΑΠ έχει παρόμοια παθογένεια με την IPF και τη σαρκοείδωση, στη παρούσα πτυχιακή εργασία θα εστιάσουμε στην ΧΑΠ και θα ερευνήσουμε αν υπάρχει σύνδεση μεταξύ μεταλλάξεων σε γονίδια mt-tRNA του mtDNA με τη νόσο.

1.5 Τα μιτοχόνδρια στη ΧΑΠ: μοριακοί μηχανισμοί πίσω από τη νόσο

[Παραγωγή ROS στη ΧΑΠ](#)

Εστιάζοντας στους παράγοντες που διέπουν τη μιτοχονδριακή δυσλειτουργία στη ΧΑΠ, θα ξεκινήσουμε από την αυξημένη παραγωγή ROS. Όπως αναλύθηκε προηγουμένως, οι ROS παράγονται ως παραπροϊόντα στη διαδικασία της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Στα κύτταρα των ασθενών που πάσχουν από ΧΑΠ, βρέθηκαν αυξημένα επίπεδα μιτοχονδριακών ROS, όπως το υπεροξειδίο του υδρογόνου. Αντίθετα, μειωμένα εντοπίστηκαν τα επίπεδα των πρωτεϊνών που συμμετέχουν στην οξειδωτική φωσφορυλίωση. Επομένως, η ικανότητα αναπνοής και η παραγωγή ATP ήταν πολύ μειωμένες. Η αύξηση των ROS οδηγεί σε μεταλλάξεις στο mtDNA, σε αυξημένη γήρανση, μειωμένη μιτοφαγία και σε μεγαλύτερη διαπερατότητα των μεμβρανών. Επιπλέον, οι ROS επιτρέπουν την απελευθέρωση του Cyt C και το κύτταρο λαμβάνει το μήνυμα για απόπτωση. Ένας ακόμα μηχανισμός που επηρεάζουν οι ROS είναι αυτός της φλεγμονής καθώς ενεργοποιούν το φλεγμονόσωμα NLRP3 για να παράγει τις ιντερλευκίνες IL-1 β και IL-18 οι οποίες

ενεργοποιούν τον πυρηνικό παράγοντα NF-κB. Έτσι, παράγονται κυτοκίνες και ξεκινάει φλεγμονώδης απόκριση (Zhou et al, 2021 και Ungvari et al, 2018). Συνεπώς, διαπιστώνουμε ότι υπάρχει μεγάλη συσχέτιση της υπερπαραγωγής ROS με τις αλλοιώσεις που παρατηρούνται στα κύτταρα και στον οργανισμό ασθενών με ΧΑΠ.

[Αλλαγή του δυναμικού της μιτοχονδριακής μεμβράνης στη ΧΑΠ](#)

Ένας ακόμη παράγοντας που επηρεάζεται στη ΧΑΠ είναι το δυναμικό της μιτοχονδριακής μεμβράνης. Το δυναμικό εξαρτάται από την αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων και την ATP-συνθάση. Όταν μειώνεται το δυναμικό της μεμβράνης, αντιστρέφεται η λειτουργία της ATP-συνθάσης, η οποία υδρολύει το ATP αντί να το συνθέτει, μειώνοντας έτσι τη διαθέσιμη ποσότητα ATP. Επιπλέον, μεταβάλλεται και το pH του μιτοχονδρίου. Μείωση στο δυναμικό οδηγεί στην έναρξη της φλεγμονής και στην απελευθέρωση των ROS (Peng et al, 2010), του Cyt C και του mtDNA στο κυτταρόπλασμα (Zhou et al, 2021).

[Βλάβες στο mtDNA στη ΧΑΠ](#)

Η αυξημένη διαπερατότητα των μιτοχονδριακών μεμβρανών που παρουσιάστηκε προηγουμένως, μπορεί να οδηγήσει στην απελευθέρωση του mtDNA. Η απελευθέρωση του mtDNA στο κυτταρόπλασμα (Εικόνα 7) είναι άμεσα σχετιζόμενη με τη μιτοχονδριακή δυσλειτουργία. Τα mtDNA μπορούν να δράσουν ως DAMPs (Damage Associated Molecular Patterns) αντιμετωπίζεται από τα κύτταρα ως απειλή καθώς ομοιάζει με το βακτηριακό και ενεργοποιεί την άμυνα του οργανισμού για να το διασπάσει (Riley et al, 2018). Έτσι, κατακερματίζεται και εξωκυτταρώνεται με τη μορφή κυστιδίου (Εικόνα 8). Επίσης, στρατολογούνται κύτταρα της άμυνας και έτσι επάγεται η φλεγμονή, η οποία χαρακτηρίζει τη νόσο. Σε ασθενείς με ΧΑΠ φαίνεται τα επίπεδα mtDNA, στο αίμα και στο σάλιο να είναι αυξημένα συγκριτικά με των υγιών. (Zhou et al, 2021).

[Αλλαγές στη μιτοφαγία](#)

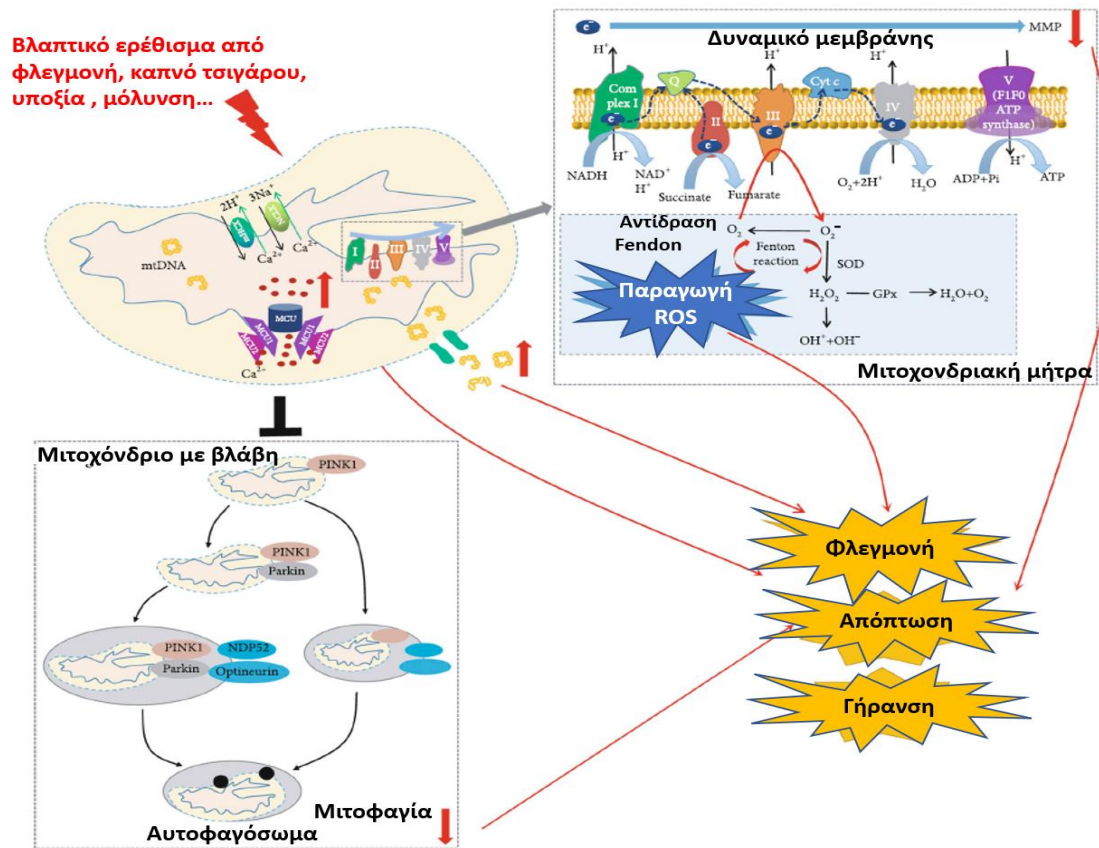
Περνώντας σε πιο σύνθετες λειτουργίες του μιτοχονδρίου που διαταράσσονται, η μιτοφαγία χαρακτηρίζεται ως ένας προστατευτικός αυτοφαγικός μηχανισμός του κυττάρου. Ο στόχος της είναι η απαλλαγή του κυττάρου από κατεστραμμένα μιτοχόνδρια, ώστε αυτό να ικανοποιεί τις ενεργειακές του απαιτήσεις (Onishi et al, 2021). Στα κύτταρα του πνεύμονα ασθενών με ΧΑΠ έχει παρατηρηθεί

μείωση της μιτοφαγίας (μείωση της PINK1) και η επακόλουθη αύξηση της κυτταρικής γήρανσης. Λόγω της μειωμένης μιτοφαγίας τα προβληματικά μιτοχόνδρια δεν απομακρύνονται και παρατηρείται επιδείνωση της νόσου. Ο μηχανισμός της εξαρτάται από τη κινάση σερίνης-θρεονίνης PINK1. Η PINK1 φυσιολογικά παράγεται από τον πυρήνα και μεταφέρεται στο μιτοχόνδριο, όπου και αποικοδομείται από πεπτιδάσες. Όμως όταν το δυναμικό της μεμβράνης μειώνεται και ο αριθμός των μη σωστά αναδιπλωμένων πρωτεϊνών είναι μεγαλύτερος του φυσιολογικού, τότε η πρωτεΐνη σταθεροποιείται στην εξωτερική μεμβράνη μέσω αυτοφωσφορύλιωσης και στη συνέχεια στρατολογεί με φωσφορύλιωση την Parkin (PARK2). Η PARK2 είναι μία E3 λιγάση της ουβικουιτίνης και παρουσιάζεται μειωμένη σε ασθενείς με ΧΑΠ. Στη συνέχεια, η PARK2 ουβικουιτινιλιώνει πρωτεΐνες της μεμβράνης και έτσι ενεργοποιείται ο υποδοχέας της αυτοφαγίας NDP52 και η οπτινευρίνη (Εικόνα 7). Τελικά, μέσω του LC3, που είναι η τρίτη ελαφριά αλυσίδα της σχετιζόμενης με τους μικροσωληνίσκους πρωτεΐνης, γίνεται σύνδεση με το αυτοφαγόσωμα. Αργότερα, το αυτοφαγόσωμα θα συντηχθεί με ένα λυσόσωμα και έτσι θα ολοκληρωθεί η μιτοφαγία (Zhou et al, 2021). Σε δείγματα ασθενών με ΧΑΠ οι παράγοντες που συμμετέχουν στη μιτοφαγία είναι σημαντικά μειωμένοι και η μιτοφαγία δεν είναι επαρκής για να απομακρύνει τα ελλατωματικά μιτοχόνδρια. Έτσι τα κύτταρα οδηγούνται σε γήρανση και είναι ανίκανα να επιδιορθώσουν τις βλάβες που έχουν προκύψει στη ΧΑΠ, οδηγώντας σε επιδείνωση της νόσου.

Μειωμένη μιτοχονδριακή βιογένεση

Πέρα από τις συνθήκες που αναλύθηκαν μέχρι στιγμής στη μιτοχονδριακή δυσλειτουργία συμμετέχει και η διαταραγμένη βιογένεση. Σε δείγματα ασθενών, παρατηρήθηκε ότι λόγω απορρύθμισης της μιτοφαγίας μειώνεται η SIRT1 (απακετυλάση) που ενεργοποιεί την PGC-1α (βασικός παράγοντας βιογένεσης μιτοχονδρίων που ρυθμίζει την αντιγραφή και μεταγραφή του mtDNA). Τόσο η SIRT1 όσο και η PGC-1α μειώνεται και μέσω της δράσης της κινάσης mTOR, όπου επάγεται από το οξειδωτικό στρες (παρουσία ROS), όπως φαίνεται και στην εικόνα 8. Επομένως, η βιογένεση των μιτοχονδρίων μειώνεται και έτσι η επιδιόρθωση των βλαβών που προκαλούνται κατά τη ΧΑΠ καθίσταται αδύνατη (Cloonan et al, 2020). Βέβαια, είναι σημαντικό να αναφερθεί και ότι ορισμένες φορές παρατηρείται

υπερβολική αύξηση της βιογένεσης, η οποία οδηγεί σε παραγωγή μη λειτουργικών μιτοχονδρίων και υπερπαραγωγή των ROS (Hara et al, 2018).



Εικόνα 7: Προβλήματα της ομοιόστασης των μιτοχονδρίων σε ασθενείς με ΧΑΠ, που επάγεται από τον καπνό του τσιγάρου, τη φλεγμονή και άλλα ερεθίσματα. Στην εικόνα φαίνεται η διαταραχή της μεμβράνης λόγω της αυξημένης διαπερατότητας Ca^{+2} . Κατά την αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων, ηλεκτρόνια ξεφεύγουν και οδηγούν στο σχηματισμό ελεύθερων ριζών. Το mtDNA υφίσταται βλάβες και βγαίνει στο κυτταρόπλασμα. Αυτές οι διαταραχές στο μιτοχόνδριο εμποδίζουν το μηχανισμό της μιτοφαγίας. Έτσι προωθείται η φλεγμονή, η απόπτωση και η γήρανση (Zhou et al, 2021).

Διαφοροποιήσεις στη μιτοχονδριακή σχάση και σύντηξη

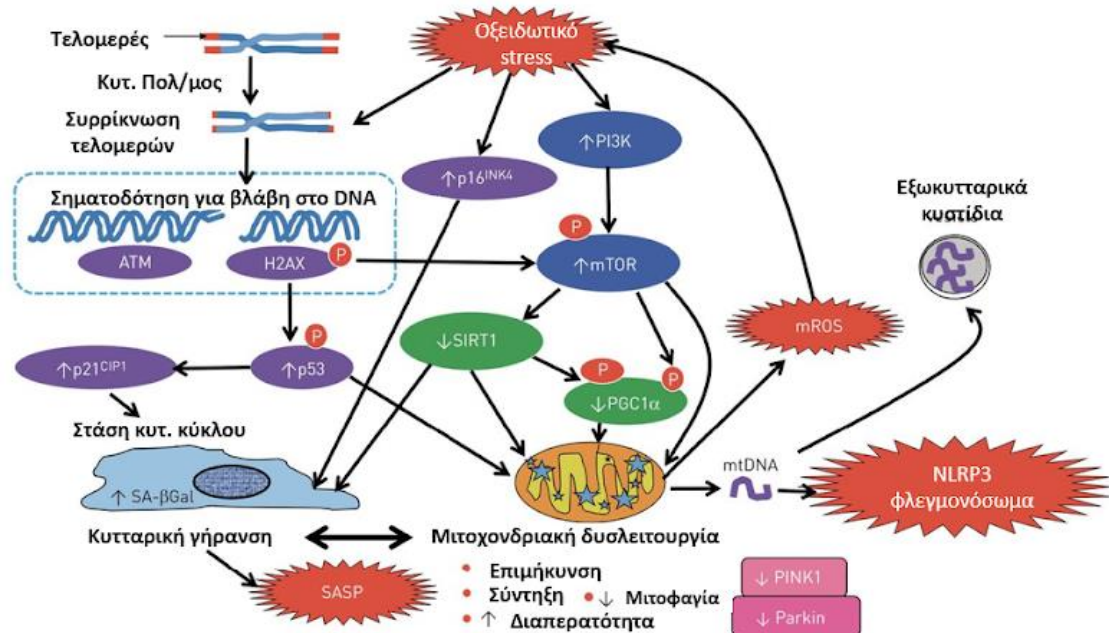
Περνώντας στη μιτοχονδριακή σχάση (fission) είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι πραγματοποιείται κυρίως στις φάσεις S, G2 και M του κυτταρικού κύκλου. Όταν αυξάνονται οι ROS, η σχάση βοηθάει στην απομάκρυνση των μη λειτουργικών οργανιδίων μέσω των εξής πρωτεϊνών: από την πρωτεΐνη εξαρτώμενη από δυναμίνη (Drr1), από τη μιτοχονδριακή πρωτεΐνη σχάσης 1 και τον παράγοντα μιτοχονδριακής

σχάσης (Mff). Σε ασθενείς με ΧΑΠ φαίνεται αυξημένη η Drp1 και άρα τα μιτοχόνδρια διαιρούνται και τελικά καταστρέφονται. Ο αντίθετος μηχανισμός της σχάσης είναι η σύντηξη (fusion). Φυσιολογικά γίνεται κυρίως στις φάσεις G1 και S του κυτταρικού κύκλου, λόγω ύπαρξης μεγάλων απαιτήσεων σε ATP. Είναι ένας επιδιορθωτικός μηχανισμός των μιτοχονδριακών βλαβών. Κατά τη σύντηξη γίνεται συνένωση των εξωτερικών και εσωτερικών μεμβρανών δύο μιτοχονδρίων δημιουργώντας ένα μεγαλύτερο μιτοχόνδριο. Οι πιο σημαντικές πρωτεΐνες που συμμετέχουν είναι: στην εξωτερική μεμβράνη οι GTPάσες Μιτοφουσίνη 1 και 2 (Mfn1 και Mfn2) και στην εσωτερική η εξαρτώμενη της δυναμίνης GTPάση Opa1 (optic atrophy 1). Η σύντηξη της εσωτερικής μεμβράνης επιτελείται μέσω της διάσπασης της Opa1 σε μικρή και μεγάλη, λόγω υδρόλυσης του GTP (Zhou et al, 2021 και Sharma et al, 2021).

[Απορρύθμιση των μιτοχονδρίων και βλάβες στα τελομερή](#)

Κατά τη ΧΑΠ παρατηρήθηκαν αλλοιώσεις και στο πυρηνικό γονιδίωμα, οι οποίες οφείλονται στη μιτοχονδριακή δυσλειτουργία. Η υπερπαραγωγή ROS από τα μιτοχόνδρια έχει ως απόρροια τη μείωση του μήκους των τελομερών του πυρηνικού DNA. Στους ασθενείς με ΧΑΠ τα τελομερή τόσο των λευκοκυττάρων όσο και των επιθηλιακών κυττάρων έχουν βρεθεί να είναι πολύ μικρότερα του φυσιολογικού και με πολλές μεταλλάξεις. Το DNA είναι οξειδωμένο και έτσι η αλληλουχία των τελομερών, που είναι πλούσια σε γουανίνη (5'TTAGGG3'), οξειδώνεται και δημιουργούνται μεταλλάξεις. Οι βλάβες στο DNA αναγνωρίζονται από ένα ανάλογο ιστόνης την H2AX, ενεργοποιούνται οι κινάσες ATM και ATR και μέσω των μονοπατιών μεταγωγής σήματος αυξάνεται η p53 (μεταγραφικός παράγοντας, αντικαρκινικός παράγοντας που αποτρέπει τη διαίρεση όταν υπάρχουν βλάβες στο DNA) και η p21, οδηγώντας σε στάση του κυτταρικού κύκλου και επακόλουθη κυτταρική γήρανση (Εικόνα 8). Σε δείγματα από ασθενείς με ΧΑΠ βρέθηκε αυξημένη η p21, μαζί με πολλές βλάβες στο DNA των επιθηλιακών κυψελιδικών κυττάρων τύπου I και II. Τα γερασμένα κύτταρα έχουν ένα συγκεκριμένο φαινότυπο που ονομάζεται SASP, δηλαδή εκκρίνουν ενώσεις όπως κυτοκίνες, χημικίνες, αυξητικούς παράγοντες και μεταλλοπρωτεάσες. Τα μόρια αυτά δρουν αυτοκρινώς και παρακρινώς, προκαλώντας τη γήρανση και των γειτονικών κυττάρων. Η γήρανση χαρακτηρίζεται από τη συσσώρευση κυττάρων που δεν αναπαράγονται (αδυναμία επιδιόρθωσης και συντήρησης πνευμονικού ιστού) και φαίνεται πως τα τελομερή

συμβάλλουν σημαντικά στη διαδικασία αυτή (Birch et al, 2018). Τα γερασμένα κύτταρα δεν μπορούν να ανταποκριθούν στη βλάβη που έχει προκληθεί κατά τη ΧΑΠ και δεν έχουν την ικανότητα πολλαπλασιασμού και επιδιόρθωσης.



Εικόνα 8: Μιτοχονδριακή δυσλειτουργία στη ΧΑΠ. Από τις πολλές κυτταρικές διαιρέσεις το μήκος των τελομερών μειώνεται και ενεργοποιείται η p53, η οποία ενεργοποιεί την κυκλινοεξαρτώμενη κινάση p21, που οδηγεί σε στάση του κυτταρικού κύκλου, γήρανση και απορρύθμιση των μιτοχονδρίων. Στη ΧΑΠ το οξειδωτικό στρες πυροδοτεί την σύμκρυνση των τελομερών, ενεργοποιεί την p16, η οποία ενισχύει τη στάση του κυτταρικού κύκλου. Επίσης, το οξειδωτικό στρες ενεργοποιεί την κινάση PI3K, η οποία ενεργοποιεί την mTOR (mammalian Target Of Rapamycin). Η mTOR μειώνει τη βιογένεση των μιτοχονδρίων μέσω μείωσης του PGC1α και της SIRT1. Η μιτοφαγία είναι διαταραγμένη στη ΧΑΠ, οπότε προβληματικά μιτοχόνδρια συσσωρεύονται στο κύτταρο λόγω μείωσης της PINK1 και της Parkin, εξαιτίας της mTOR. Τα διαταραγμένα μιτοχόνδρια απελευθερώνουν ROS, προκαλώντας το οξειδωτικό στρες στη ΧΑΠ. Επίσης, απελευθερώνουν mtDNA, το οποίο ενεργοποιεί το φλεγμονόσωμα NLRP3, ενώ εξωκυτταρώνονται με κυστίδια. Από τη γήρανση προκύπτει και ο εκκριτικός φαινότυπος SASP (Cloonan et al, 2020).

1.6 Μεταλλάξεις στα μιτοχονδριακά γονίδια mt-tRNA και ασθένειες

Μέχρι στιγμής έχει αναλυθεί το μιτοχονδριακό γονιδίωμα, η ΧΑΠ και οι μοριακοί μηχανισμοί που τη χαρακτηρίζουν. Το συμπέρασμα που εξάγεται είναι ότι τα μιτοχόνδρια υφίστανται σοβαρές αλλοιώσεις τόσο στη δομή όσο και στη λειτουργία τους. Η δυσλειτουργία των οργανιδίων αυτών οφείλεται και σε μεταλλάξεις του γονιδιώματός του, που προωθούνται και από τις ROS. Οι αλλαγές στη νουκλεοτιδική αλληλουχία γονιδίων, τα οποία κωδικοποιούν υπομονάδες των συμπλόκων της αναπνευστικής αλυσίδας των μιτοχονδρίων φαίνεται να δημιουργούν σοβαρά προβλήματα στην οξειδωτική φωσφορυλίωση και στη παραγωγή ενέργειας. Στις μεταλλάξεις του mtDNA συγκαταλέγονται και αυτές των γονιδίων των mt-tRNA, τα οποία ενώ καταλαμβάνουν μόνο το 10% της κωδικοποιητικής ικανότητας του μιτοχονδρίου, έχουν συσχετιστεί με πολλές ασθένειες. Διαταραχές στη φυσιολογική δομή του mt-tRNA μπορεί να δημιουργήσουν προβλήματα στην πρωτεϊνσύνθεση (Ding et al, 2022). Αρχικά μεταλλάξεις σε συγκεκριμένες περιοχές των mt-tRNA προκαλούν αστάθεια του μορίου και διαταράσσουν τη δευτεροταγή και τριτοταγή δομή του, οδηγώντας σε αυξημένη αποικοδόμησή τους. Επιπλέον, προβλήματα στην πέψη του 5' και του 3' άκρου, καθώς και στην προσθήκη του 5'-CCA-3' στο 3' άκρο δυσχεραίνουν τη πρόσδεση του σωστού αμινοξέος από την αμινοάκυλο συνθάση του mt-tRNA. Παράλληλα δυσχεραίνεται και η πρόσδεση στις θέσεις του ριβοσώματος και μειώνεται η συγγένεια με τον παράγοντα επιμήκυνσης EF-Tu (Zifa et al, 2007). Έτσι, οι μεταλλάξεις στα γονίδια mt-tRNA δημιουργούν σοβαρά προβλήματα στην πρωτεϊνσύνθεση του μιτοχονδρίου. Επομένως, διαταράσσεται η ομαλή λειτουργία της αναπνευστικής αλυσίδας και άρα παράγονται ROS, που οδηγούν το κύτταρο σε γήρανση, απόπτωση ή νεκρόπτωση (Bock et al, 2020).

Με βάση τα παραπάνω δεδομένα, το Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας έχει ξεκινήσει μία έρευνα για ορισμένες πνευμονικές ασθένειες που φαίνεται να συνδέονται με τη μιτοχονδριακή δυσλειτουργία. Στο πλαίσιο της έρευνας, διαπιστώθηκαν μεταλλάξεις σε γονίδια mt-tRNA στους ασθενείς, οι οποίες απουσιάζουν ή είναι πολύ πιο σπάνιες στους υγιείς. Οι έρευνες αυτές έγιναν με δείγματα αίματος ασθενών καθώς οι νόσοι

έχουν συστημικό χαρακτήρα και οι μεταλλάξεις του μιτοχονδριακού DNA μπορούν να εντοπιστούν στο αίμα. Μία ασθένεια που διερεύνησαν ήταν και το άσθμα. Στα πλαίσια της έρευνας συμμετείχαν 100 υγιείς και 76 ασθενείς. Στην ομάδα των 76 ασθενών με άσθμα βρέθηκαν 10 μεταλλάξεις στους 56 από τους 76 ασθενείς, δηλαδή περίπου στο 74% των ασθενών. Εξ αυτών τέσσερις μεταλλάξεις εντοπίστηκαν μόνο σε ασθενείς, ενώ πέντε βρέθηκαν σε πολύ μικρότερα ποσοστά στους υγιείς (Zifa et al, 2012). Επιπρόσθετα, στην IPF χρησιμοποιήθηκαν δείγματα αίματος από 204 υγιείς και 40 ασθενείς και βρέθηκε ότι το 95% (38/40) των ασθενών έφεραν μεταλλάξεις στα γονίδια mt-tRNA και στις περιοχές γύρω από αυτά. Κάποιες από αυτές τις μεταλλάξεις βρέθηκαν πολύ αυξημένες στους ασθενείς, ενώ μόλις 5 μεταλλάξεις εμφανίζονταν αποκλειστικά στους ασθενείς (Daniil et al, 2018). Στην ίδια έρευνα βρέθηκαν συνολικά 45 μεταλλάξεις σε 69 από τους 80 ασθενείς με σαρκοείδωση, δηλαδή το 81% των ασθενών έφερε μεταλλάξεις στα mt-tRNA γονίδια και παρελκόμενες περιοχές τους. Από τις μεταλλάξεις που ανιχνεύθηκαν, οι 17 βρέθηκαν σε μεγαλύτερη συχνότητα στους ασθενείς, ενώ οκτώ βρέθηκαν αποκλειστικά σε ασθενείς (Daniil et al, 2018). Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν την συσχέτιση των νοσημάτων αυτών με τη μιτοχονδριακή δυσλειτουργία.

Μεταλλάξεις στα mt tRNA γονίδια σε συσχέτιση με πνευμονικές νόσους.

Ασθένεια	IPF	Σαρκοείδωση	Άσθμα
Υγιείς – Κοντρόλ (n)	204	204	100
Ασθενείς (n)	40	85	76
Μεταλλάξεις που ανιχνεύθηκαν σε ασθενείς (n)	32	45	10
Ποσοστό ασθενών που φέρουν κάποια μετάλλαξη (%)	38/40 (95%)	59/85 (81%)	56/76 (74%)
Μετάλλαξη με μεγαλύτερη συχνότητα σε ασθενείς (n)	12	17	5
Μεταλλάξεις που ανιχνεύθηκαν μόνο σε ασθενείς (n)	5	8	4

Πίνακας 1: Ο αριθμός, η συχνότητα, οι μεταλλάξεις των mt-tRNA γονιδίων και των παρακείμενων περιοχών τους με μεγαλύτερη συχνότητα στους ασθενείς και οι που βρέθηκαν μόνο σε ασθενείς, για τα νοσήματα ιδιοπαθή πνευμονική ίνωση (IPF), σαρκοείδωση και άσθμα.

2. Σκοπός

Όπως αναλύθηκε στην εισαγωγή η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία και η αυξημένη συχνότητα παθολογικών μεταλλάξεων, έχουν διαπιστωθεί σε πνευμονικά νοσήματα. Η διαταραχή της μιτοχονδριακής λειτουργίας μπορεί να οφείλεται ή να οδηγήσει σε αύξηση των μεταλλάξεων του mtDNA. Κάποιες από τις μεταλλάξεις αυτές θα γίνουν στην αλληλουχία γονιδίων mt-tRNA και έτσι δυνητικά μπορούν να επηρεάζουν τη διαδικασία της πρωτεϊνοσύνθεσης του μιτοχονδρίου, οδηγώντας στο σχηματισμό προβληματικών πρωτεϊνών. Είναι φυσικό επόμενο μεταλλάξεις στα γονίδια mt-tRNA να σχετίζονται με την έναρξη ή την εξέλιξη μίας νόσου, όπως η Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια, η οποία έχει συσχετιστεί με τη μιτοχονδριακή δυσλειτουργία. Η παρούσα πτυχιακή εργασία εντάσσεται σε ένα σύνολο εργασιών διερεύνησης μιτοχονδριακών νοσημάτων. Ήδη έχει ξεκινήσει μελέτη για τη ΧΑΠ και τη συσχέτισή της με μεταλλάξεις σε γονίδια mt-tRNA. Έχουν εξεταστεί τα γονίδια mt-tRNA των αμινοξέων ισολευκίνη, γλουταμίνη, μεθειονίνη, ασπαραγίνη, κυστεΐνη, τυροσίνη, λευκίνη και γλυκίνη. Σε αυτή την πτυχιακή θα μελετηθεί η ύπαρξη μεταλλάξεων στα γονίδια των mt-tRNA της βαλίνης (mt-tRNA^{Val}) και της φαινυλαλανίνης (mt-tRNA^{Phe}).

3. Υλικά και Μέθοδοι

Για τις ανάγκες του πειράματος 38 ασθενείς με ΧΑΠ έδωσαν δείγμα αίματος στην πνευμονολογικής κλινικής του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας. Η ηλικία των ασθενών κυμαινόταν από τα 51 έτη έως τα 83 με τον μέσο όρο να ανέρχεται στα 68 έτη. Οι περισσότεροι ασθενείς που συμμετείχαν είναι άνδρες (33/38) ενώ οι γυναίκες ήταν μόλις πέντε. Ένας παράγοντας που λήφθηκε υπ' όψη ήταν το ποσοστό των καπνιστών καθώς το 87% των ασθενών ήταν καπνιστές. Οι πληροφορίες για τους ασθενείς συνοψίζονται στον πίνακα 2. Χρησιμοποιήθηκε δείγμα αίματος καθώς η ΧΑΠ είναι μία συστηματική νόσος και στα συστήματα που επηρεάζονται ανήκει και το ανοσοποιητικό. Τα λευκοκύτταρα μεταφέρονται μέσω του αίματος και δύναται να φέρουν μεταλλάξεις στο mtDNA τους, που σχετίζονται με τη ΧΑΠ. Επομένως καθώς το αίμα είναι ένας ιστός που απομονώνεται εύκολα,

συγκριτικά με τα επιθηλιακά πνευμονικά κύτταρα, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση των μεταλλάξεων σχετιζόμενες με τη ΧΑΠ.

Χαρακτηριστικά της ομάδας ασθενών με ΧΑΠ που θα εξεταστούν

Αριθμός ασθενών (n)	Φύλο	Ποσοστό καπνιστών (%)	Ηλικία (έτη)
38	33 άνδρες 5 γυναίκες	87% (33/38 ασθενείς)	51-83 (Μ.Ο. = 68)

Πίνακας 2: Στον πίνακα φαίνεται ο αριθμός των ασθενών, το φύλο, η ηλικία και συνήθειες όπως είναι το κάπνισμα.

Κατά τη διεξαγωγή του πειράματος εφαρμόστηκαν οι εξής πειραματικές τεχνικές. Αρχικά έγινε απομόνωση DNA, στη συνέχεια το DNA ηλεκτροφορήθηκε για τον διαχωρισμό του μιτοχονδριακού από το πυρηνικό και αφού έγινε ο ποιοτικός έλεγχος, το επιθυμητό τμήμα ενισχύθηκε μέσω της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR). Για τον προσδιορισμό ύπαρξης μεταλλάξεων αξιοποιήθηκε η μέθοδος πολυμορφισμού μονόκλωνης διαμόρφωσης (SSCP) και μετά από τον καθαρισμό των προϊόντων PCR έγινε αλληλούχιση των δειγμάτων που φάνηκε να φέρουν μεταλλάξεις.

3.1 Απομόνωση ολικού DNA από δείγματα αίματος ασθενών ΧΑΠ

Για να μπορέσει να γίνει ανίχνευση μεταλλάξεων το πρώτο βήμα είναι η απομόνωση όλου του γενετικού υλικού των λευκοκυττάρων του αίματος των ασθενών. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο της εταιρίας MACHEREY-NAGEL (Protocol for DNA purification from whole blood) και συγκεκριμένα το ‘Genomic DNA purification with Nucleospin® Blood’, το οποίο περιλαμβάνει υλικά για έως και 50 δείγματα καλύπτοντας έτσι την ανάγκη των 38 δειγμάτων που θα εξεταστούν. Τα δείγματα των ασθενών φυλάσσονται στους -20 °C, σε ειδικούς σωλήνες με EDTA (Ethylenediaminetetraacetic Acid). Το EDTA είναι αντιπηκτικό και αποτρέπει τον σχηματισμό θρόμβων και καθιστά τα δείγματα κατάλληλα χρήσης.

Υλικά και αντιδραστήρια

- Ρύγχη
- Σωλήνες τύπου eppendorff 1,5 ml
- Αιθανόλη 100%
- Πιπέτες (1000μL, 100 μL, 20 μL)
- Dry bath
- Φυγόκεντρος
- Στατό
- Vortex

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

- Genomic Lysis Buffer
- Wash Buffer WB2
- Proteinase K (30mg)
- Στήλες NucleoSpin® Blood
- Wash Buffer BW1
- Elution Buffer BE
- Proteinase Buffer PB (1.8mL)
- Σωλήνες συλλογής των 2mL

Ανάλυση Αντιδραστηρίων

Proteinase K: το ένζυμο αυτό χρησιμοποιείται για την διάσπαση πρωτεϊνών και την αποικοδόμηση των νουκλεασών, προστατεύοντας έτσι τα νουκλεϊκά οξέα κατά την απομόνωσή τους.

Genomic Lysis Buffer (B3): το ρυθμιστικό διάλυμα αυτό περιέχει ισχυρό χηλικό παράγοντα, την υποχλωριώδη γουανιδίνη (GuHCl). Η GuHCl οδηγεί στη μετουσίωση των πρωτεϊνών του δείγματος και στην απελευθέρωση του DNA.

Wash Buffer BW1: αυτό το ρυθμιστικό διάλυμα χρησιμοποιείται μετά από τα στάδια επώασης, κατά την έκπλυση. Αφαιρεί κυρίως νουκλεϊκά οξέα χαμηλού μοριακού βάρους, απομακρύνει τμήματα ιστού που είχαν παραμείνει και προετοιμάζει το δείγμα για την προσθήκη του επόμενου αντιδραστηρίου. Και αυτό το διάλυμα περιέχει GuHCl.

Wash Buffer WB2 (ή B5): το ρυθμιστικό διάλυμα περιέχει αιθανόλη με στόχο την απομάκρυνση των προηγούμενων διαλυμάτων. Μετά τη χρήση του είναι σημαντική η αφαίρεση όλης της ποσότητας του διαλύματος (σε ένα επόμενο βήμα), γιατί η αιθανόλη την παρεμποδίζει την έκλυση του DNA από τη στήλη.

Elution Buffer BE: το αλκαλικό ρυθμιστικό διάλυμα έκλυσης (pH: 8-9) σε μικρή συγκέντρωση χρησιμοποιείται για την απομάκρυνση των πρωτεϊνών από τη στήλη

και όταν η συγκέντρωση είναι αυξημένη τότε οδηγεί στην έκλυση του DNA από τη στήλη.

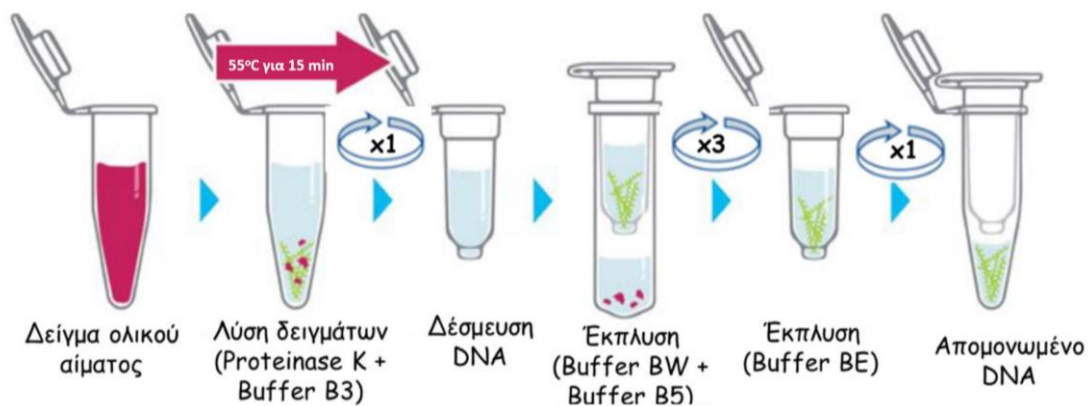
Πειραματική Διαδικασία

Για την απομόνωση του ολικού DNA από ολικό αίμα ακολουθήθηκαν τα παρακάτω βήματα, συνοπτικά περιγράφονται στην εικόνα 9:

- 1) Το πρώτο βήμα ήταν το ξεπάγωμα των δειγμάτων αίματος των ασθενών.
- 2) Στο χρόνο της αναμονής του πρώτου βήματος παρασκευάστηκαν τα διαλύματα Proteinase K και του Wash Buffer BW2. Για το διάλυμα της Proteinase K τοποθετήθηκαν 1,35 mL από το Proteinase Buffer σε 30mg λυοφιλιωμένης Proteinase K, ενώ για τη δημιουργία του Wash Buffer BW2 σε 12 mL αυτού, προστέθηκαν 48 mL αιθανόλης 100%.
- 3) Όταν τα δείγματα ξεπάγωσαν προστέθηκαν 200 μ L δείγματος σε σωλήνες erpendorf των 1,5 mL μαζί με 20 μ L διαλύματος Proteinase K. Στον ίδιο σωλήνα προστέθηκαν 200 μ L από το ρυθμιστικό διάλυμα Genomic Lysis Buffer (Buffer B3).
- 4) Έγινε έντονη ανάδευση με Vortex για 10-20 δευτερόλεπτα, για την επίτευξη της ομοιογένειας του διαλύματος.
- 5) Στη συνέχεια τα δείγματα τοποθετήθηκαν για 10-15 λεπτά στο Dry Bath στους 55°C και εκεί πραγματοποιήθηκε η λύση των κυττάρων από το Genomic Lysis Buffer. Το προϊόν της λύσης είχε ένα καφετί χρώμα.
- 6) Αφού έσπασαν τα κύτταρα και τελείωσε η επώαση, στον σωλήνα τοποθετήθηκαν 200 μ L αιθανόλης 100% και πραγματοποιήθηκε έντονη ανάδευση με Vortex για λίγα δευτερόλεπτα. Με στόχο τη δημιουργία κατάλληλων συνθηκών πρόσδεσης του DNA.
- 7) Η συνολική ποσότητα του κάθε erpendorf (260 μ l) φορτώθηκε σε ξεχωριστή στήλη που βρίσκεται μέσα σε σωλήνα συλλογής και έγινε φυγοκέντρηση για 1 λεπτό, στα 10000 g. Σε περίπτωση που τα δείγματα δεν περνούσαν σωστά από τη μήτρα, θα γινόταν επανάληψη της φυγοκέντρησης σε υψηλότερες στροφές. Τέλος, ο σωλήνας συλλογής απορρίφθηκε και διατηρήθηκε μόνο η στήλη καθώς εκεί ήταν το DNA.
- 8) Το επόμενο στάδιο είναι το στάδιο έκπλυσης της μεμβράνης της στήλης και περιλαμβάνει δύο εκπλύσεις. Αφού οι στήλες τοποθετήθηκαν σε νέο σωλήνα

συλλογής, η πρώτη έκπλυση ξεκίνησε με προσθήκη 500 μL του διαλύματος BW1. Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 1 λεπτό, στα 10000 g και απόρριψη του σωλήνα συλλογής. Παράλληλα με τη φυγοκέντρηση αυτή τοποθετήθηκε το Genomic Elution Buffer στον επωαστήρα στους 70°C για να το χρησιμοποιήσουμε αργότερα, αν και το βήμα αυτό είναι προαιρετικό.

- 9) Κατά τη δεύτερη έκπλυση κάθε στήλη τοποθετήθηκε σε καινούργιο σωλήνα συλλογής και μετά προστέθηκαν 500 μL του διαλύματος έκπλυσης BW2. Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν για 3 λεπτά, στα 14000 g και απορρίφθηκε ο σωλήνας συλλογής μαζί με το υγρό που περιείχε. Η φυγοκέντρηση σε μεγαλύτερες στροφές γίνεται για το «στέγνωμα» της στήλης. Έτσι απομακρύνθηκε η αιθανόλη που περιείχε η στήλη και θα εμπόδιζε τα επόμενα βήματα.
- 10) Για το τελικό βήμα η κάθε στήλη μεταφέρθηκε σε ένα σωλήνα τύπου Eppendorf 1,5 mL και προστέθηκαν 80 μl από το διάλυμα έκπλυσης BE. Πραγματοποιήθηκε ξανά φυγοκέντρηση για 1 λεπτό και 30 δευτερόλεπτα, στα 14000 g. Αυτή τη φορά το DNA του κάθε δείγματος ήταν στον σωλήνα eppendorf, ο οποίος και αποθηκεύτηκε στην κατάψυξη στους -20°C.



Εικόνα 9: Σχηματική αναπαράσταση της πειραματικής διαδικασίας απομόνωσης ολικού DNA από δείγματα αίματος. Το σύμβολο x δηλώνει τις φορές που επαναλαμβάνεται μία επιμέρους διαδικασία.

3.2 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή αгарόζης 2%

Μετά την απομόνωση του ολικού DNA έγινε ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πηκτή αгарόζης 2% για να προσδιοριστεί η ποιότητα του DNA που απομονώθηκε. Έτσι, διαχωρίζεται το μιτοχονδριακό από το πυρηνικό γενετικό υλικό και διακριβώνεται ότι έχουμε απομονώσει όντως ικανοποιητική ποσότητα

μιτοχονδριακού DNA. Αν τα ποιοτικά και ποσοτικά χαρακτηριστικά του είναι ικανοποιητικά, ακολουθεί ενίσχυση του δείγματος με PCR.

Αρχή της μεθόδου

Η ηλεκτροφόρηση είναι μία μέθοδος διαχωρισμού, οπτικοποίησης και απομόνωσης βιομορίων. Είναι μία απλή και γρήγορη τεχνική η οποία βασίζεται στη κινητική των μορίων που διαθέτουν φορτίο, υπό την επίδραση ενός εξωτερικά εφαρμοζόμενου ηλεκτρικού πεδίου. Τα φορτισμένα μόρια κινούνται προς τον πόλο με το αντίθετο φορτίο, ανάλογα με το μέγεθός τους. Χαρακτηριστικά το DNA λόγω του αρνητικού φορτίου (-) του θα κινηθεί προς την άνοδο (+). Στους κύριους παράγοντες που επηρεάζουν την κινητική των μορίων συγκαταλέγονται το μέγεθος του DNA, η συγκέντρωση της αγαρόζης, η τάση του ηλεκτρικού πεδίου που εφαρμόζεται, η παρουσία χρωστικών, η σύσταση και η ιοντική ισχύς του διαλύματος ηλεκτροφόρησης. Σημαντικός παράγοντας είναι και η στεροδιαμόρφωση του DNA, δηλαδή εάν έχει κλειστή (υπερελικωμένη) κυκλική μορφή ή ανοιχτή κυκλική μορφή ή εάν είναι γραμμικό. Όσον αφορά το μέγεθος, τα μικρά μόρια μετακινούνται γρηγορότερα σε σχέση με τα μεγάλα.

Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης είναι μία αποτελεσματική διαδικασία διαχωρισμού DNA μήκους από 100bp έως και 25kbp. Η αγαρόζη είναι ένας φυτικός πολυσακχαρίτης που παράγεται από φύκη του είδους Rhodophyceae, τήκεται σε θερμοκρασία βρασμού του νερού και στερεοποιείται στους 40-42 °C και για αυτό χρησιμοποιείται στη κατασκευή πηκτών, αφού σε θερμοκρασία δωματίου είναι στερεή. Κατά τη δημιουργία της πηκτής, τα πολυμερή αγαρόζης συνδέονται μη ομοιοπολικά και σχηματίζουν ένα δίκτυο δεσμών. Το πήκτωμα που σχηματίζεται δεν είναι συμπαγές αλλά έχει πόρους μεγέθους αντιστρόφως ανάλογου της συγκέντρωσης της αγαρόζης. Για τις ανάγκες του πειράματος παρασκευάστηκε πηκτή αγαρόζης συγκέντρωσης 2%.

Υλικά

- Κωνική Φιάλη 300 mL
- Φούρνος μικροκυμάτων
- Ρύγχη
- Ειδική πλάκα με χτενάκια
- Falcon 50 mL
- Διάλυμα φόρτωσης με μπλε της βρωμοφαινόλης
- Λάμπα UV
- Σκόνη Αγαρόζης 1g
- Ρυθμιστικό διάλυμα TAE (1 X)
- Χρωστική Green
- Πιπέτα 1-20 μ L
- Ζυγός
- 2 μ L DNA
- Parafilm

Πειραματική διαδικασία

Για τη δημιουργία πηκτής ακολουθήθηκαν τα επόμενα βήματα

- 1) Αρχικά ζυγίστηκαν 0,9 gr σκόνη αγαρόζης και μεταφέρθηκαν σε μία κωνική φιάλη των 250 mL. Αν και με βάση τον τύπο της συγκέντρωσης θα έπρεπε να ήταν 1 gr αγαρόζης βάλουμε λιγότερη ποσότητα για να αντισταθμίσουμε την εξάτμιση που θα προκύψει από τη θέρμανση.
- 2) Στην κωνική φιάλη προστέθηκαν 50 mL από το ρυθμιστικό διάλυμα TAE 1X (Tris / Acetic acid / Ethylenediaminetetraacetic Acid). Το EDTA που περιέχει είναι χηλικός παράγοντας που δεσμεύει δισθενή ιόντα και άρα αποτρέπει τη δράση των νουκλεασών. Το TAE είναι ένα ρυθμιστικό διάλυμα που χρησιμοποιείται για τη διατήρηση σταθερών συνθηκών pH 8-9 και η συγκέντρωση 1X σημαίνει ότι είναι έτοιμο προς χρήση. Στη κωνική έγινε ελαφριά ανάδευση.
- 3) Στη συνέχεια η κωνική αυτή τοποθετήθηκε στον φούρνο μικροκυμάτων και με το που έφτανε σε βρασμό γινόταν ανάδευση για να επιτευχθεί γρηγορότερη διάλυση της αγαρόζης, με τη μικρότερη εξάτμιση και διαρκεί περίπου 3 λεπτά.
- 4) Μετά τη θέρμανση το διάλυμα αναδεύτηκε και παρατηρήθηκε στο φως. Έτσι επιβεβαιώθηκε ότι η αγαρόζη είχε διαλυτοποιηθεί πλήρως.
- 5) Με στόχο τη μείωση της θερμοκρασίας του διαλύματος συνεχίστηκε ανάδευση της κωνικής. Αυτή τη φορά όμως παράλληλα με την ανάδευση εφαρμόστηκε ροή νερού πλευρικά της φιάλης για να επιτευχθεί γρηγορότερα ομοιόμορφα χαμηλή θερμοκρασία.
- 6) Όταν η θερμοκρασία έπεσε και μπορούσαμε να κρατάμε τη φιάλη με γυμνό χέρι, προστέθηκαν στο μείγμα 5 μ L χρωστικής Xpert Green. Χρησιμοποιείται για την

οπτικοποίηση της πηκτής καθώς συνδέεται με το DNA και τότε κάτω από μία λάμπα UV παίρνουμε σήμα μέσω πράσινου φθορισμού.

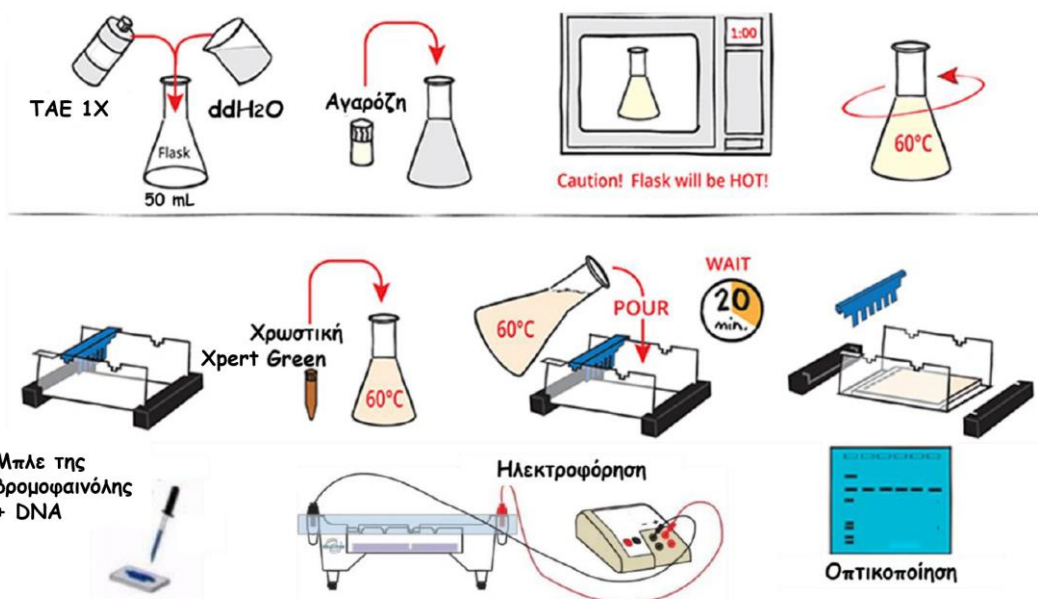
- 7) Ακολούθησε τοποθέτηση του μείγματος στην ειδική πλάκα με τα χτενάκια. Τα χτενάκια έχουν ως σκοπό την δημιουργία κενών χώρων στη πηκτή, πηγαδάκια.
- 8) Τέλος, μετά από 15-20 λεπτά, αφαιρέθηκαν τα χτενάκια, δημιουργήθηκαν τα πηγαδάκια και η πηκτή ήταν έτοιμη για χρήση.

Η διαδικασία επαναλήφθηκε 2 φορές γιατί κάθε πηκτή αγαρόζης είχε 24 πηγαδάκια και εμείς θέλαμε να εξετάσουμε 38 δείγματα.

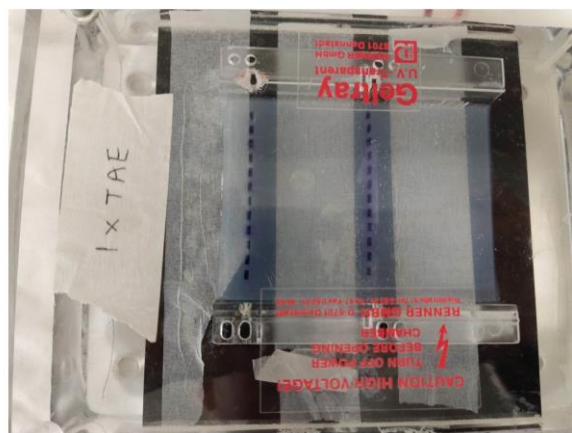
Μετά την παραγωγή της πηκτής ακολούθησε ο διαχωρισμός του DNA:

- 1) Αρχικά, αναμείχθηκαν 4 μL απομονωμένου DNA και 6 μL διαλύματος φόρτωσης (Loading Buffer) με μπλε της βρωμοφαινόλης και τοποθετήθηκαν στα πηγαδάκια. Είναι χρωστική με χαμηλό μοριακό βάρος και λόγω αρνητικού φορτίου κινείται προς την άνοδο. Το διάλυμα αυτό περιέχει και γλυκερόλη η οποία χρησιμεύει για τη καθίζηση του DNA στα πηγαδάκια. Η χρωστική μπλε της βρωμοφαινόλης συνδέεται αναστρέψιμα με την έλικα του DNA. Όταν διαλύεται στο νερό αποκτά χαρακτηριστικό μπλε χρώμα. Κατά την ηλεκτροφόρηση σταματάει στο ύψος των 150 - 300 ζευγών βάσεων.
- 2) Στη συνέχεια, η πηκτή τοποθετήθηκε στη συσκευή ηλεκτροφόρησης με τα πηγαδάκια να είναι κοντά στον αρνητικό πόλο, δηλαδή στην κάθοδο. Μετά τη φόρτωση των δειγμάτων DNA στα άκρα της πηκτής εφαρμόστηκε ηλεκτρικό πεδίο της τάξεως των 100 V και το DNA άρχισε να κινείται προς τον θετικό πόλο.
- 3) Τέλος, μετά από 20 περίπου λεπτά παρατηρήθηκαν τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης κάτω από λάμπα UV.

Στη συσκευή υπήρχε το ρυθμιστικό διάλυμα TAE 1X το οποίο χρησιμοποιείται για την σταθερή κατανομή του ηλεκτρικού πεδίου στη συσκευή το οποίο μετράται σε Volt/cm.



Εικόνα 10: Σχεδιάγραμμα πειραματικής διαδικασίας παρασκευής και φόρτωσης της πηκτής. Φαίνεται η προσθήκη της αγαρόζης και του TBE, η θέρμανση, η προσθήκη της χρωστικής Green και τοποθέτηση στην ειδική συσκευή. Παρατηρείται η χρώση του DNA και τελικά ο διαχωρισμός του στην πηκτή.



Εικόνα 11: Πηκτή αγαρόζης μέσα στη συσκευή ηλεκτροφόρησης. Με μπλε χρώμα στα πηγαδάκια βλέπουμε το διάλυμα με το DNA

3.3 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης – Polymerase Chain Reaction

Η τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction - PCR), είναι απλή, γρήγορη, οικονομική και επιτρέπει τον ενζυματικό πολλαπλασιασμό in vitro εξειδικευμένων αλληλουχιών DNA. Αποτελεί μία από τις

σημαντικότερες ανακαλύψεις της επιστημονικής κοινότητας, η οποία από το 1985, έχει χρησιμοποιηθεί σε πάνω από 7000 επιστημονικές εργασίες και έχει ενισχύσει την ικανότητα μελέτης του DNA. Ο εφευρέτης αυτής της τεχνικής είναι ο βραβευμένος με Νόμπελ το 1993, Kary Mullis.

Αρχή της μεθόδου

Η μέθοδος βασίζεται στην επαναλαμβανόμενη αντιγραφή ενός τμήματος DNA με τη βοήθεια μίας ειδικής θερμοανθεκτικής πολυμεράσης (Taq) και δύο ολιγονουκλεοτιδικών εκκινητών σχεδιασμένων σε γνωστές αλληλουχίες. Η Taq πολυμεράση απομονώθηκε για πρώτη φορά από το βακτήριο *Thermus aquaticus* το 1988 και η βέλτιστη θερμοκρασία λειτουργίας της είναι οι 72 °C, αυτό το ένζυμο επέτρεψε την ανάπτυξη της PCR. Ειδικότερα, κατά τον πολλαπλασιασμό ενός τμήματος DNA με την μέθοδο της PCR, ξεκινάει η αύξηση της θερμοκρασίας με σκοπό να αποδιαταχθεί το δίκλωνο DNA και να προκύψουν δύο μονόκλωνα. Τα δύο αυτά μονόκλωνα τμήματα DNA χρησιμοποιούνται ως εκμαγεία από το ένζυμο Taq πολυμεράση για να παραχθούν δύο συμπληρωματικά τμήματα DNA. Με αυτό τον τρόπο προκύπτουν δύο δίκλωνα μόρια DNA. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται 30 με 40 φορές δημιουργώντας τελικά πάνω από 1 δισεκατομμύριο πιστά αντίγραφα του αρχικού τμήματος DNA. Η ανάπτυξη της τεχνολογίας τα τελευταία χρόνια έχει επιτρέψει σε μεγάλο βαθμό την αυτοματοποίηση της μεθόδου και την ολοκλήρωση της διαδικασίας μέσα σε λίγες ώρες. Η ανάγκη για συνεχή αλλαγή της θερμοκρασίας κατά τη διάρκεια της PCR, καλύπτεται από τον θερμοκυκλοποιητή (PCR thermal cycler), καθώς έχει την ικανότητα αυξομείωσης της θερμοκρασίας εντός μερικών δευτερολέπτων.

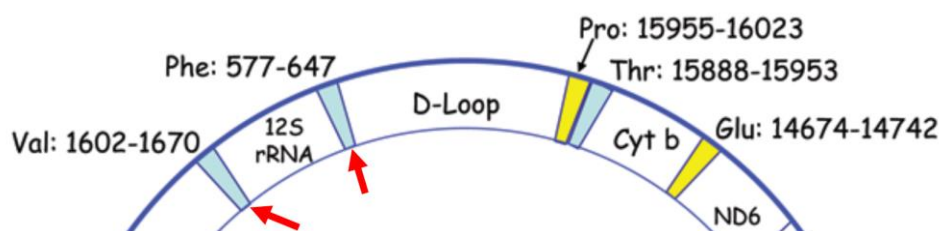
Ένα σημαντικό συστατικό της αντίδρασης είναι οι εκκινητές. Για τον σχηματισμό των εκκινητών, θα πάρουμε ξεχωριστά τις αλληλουχίες των γονιδίων tRNA^{Phe} το οποίο εκτείνεται από τη βάση 577 έως την 647 και το γονίδιο mt-tRNA^{Val} που εντοπίζεται στις θέσεις 1602 έως την 1670. Στη συνέχεια τις βάλλαμε σε κατάλληλο πρόγραμμα, μαζί με τις παρακείμενες περιοχές τους και πήραμε τους εκκινητές. Εξετάσαμε την καταλληλότητα των εκκινητών μέσω του προγράμματος Oligoanalyzer. Οι δύο εκκινητές για την ενίσχυση του κάθε γονιδίου βρέθηκαν από τη βιβλιογραφία και περιγράφονται στον πίνακα 2. Πληρούν και οι τέσσερις τις προϋποθέσεις της θερμοκρασίας τήξης καθώς είναι μέσα στο όριο των 50 °C – 70 °C

και ανά ζεύγος οι τιμές είναι κοντινές. Επιπλέον οι περισσότεροι δεν σχηματίζουν ομοδιμερή και ετεροδιμερή, η διαφορά ελεύθερης ενέργειας ΔG είναι μεγαλύτερη του -9 kcal/mol. Ένα ακόμα σημαντικό χαρακτηριστικό τους ως προς την ιδιότητα της αποδιάταξης και του υβριδισμού είναι το ποσοστό ανάμεσα στις βάσεις G/C, καθώς οι βάσεις αυτές συνδέονται με τρεις δεσμούς υδρογόνου είναι και αυτό εντός ορίων (40% - 60%). Ένας τελευταίος παράγοντας για την ποιότητα των εκκινητών είναι η πιθανότητα σχηματισμού φουρκέτας και σε αυτόν τον τομέα υπήρξε πρόβλημα στον R tRNA^{Phe} και στον F tRNA^{Val}. Το όριο είναι η θερμοκρασία σχηματισμού φουρκέτας είναι μικρότερη της θερμοκρασίας τήξης των εκκινητών αυξημένη κατά 10 °C. Αυτό μπορεί να οδηγήσει σε πειραματικό σφάλμα. Τα γονίδια δεν ενισχύθηκαν μαζί γιατί όπως μπορούμε να παρατηρήσουμε στον χάρτη του mtDNA (Εικόνα 12), ανάμεσά τους βρίσκεται το γονίδιο για το 12S rRNA του μιτοχονδρίου.

Στοιχεία των εκκινητών της PCR.

	Αλληλουχία Εκκινητή (5'→3')	Θερμοκρασία τήξης	Ομοδιμερή/ Ετεροδιμερή	Δημιουργία Φουρκέτας	Μήκος Προϊόντος
F tRNA ^{Phe}	CAACCAA ACCCCAA AGACA	53.3 °C	Όχι / όχι	Δεν σχηματίζονται	158 bp
R tRNA ^{Phe}	GGATGCTT GCATGTGT AATC	51.9 °C	Όχι / όχι	Σχηματίζονται	
F tRNA ^{Val}	GTACTGG AAAGTGC ACTTGG	53.7 °C	Ναι/ όχι	Σχηματίζονται	140 bp
R tRNA ^{Val}	GGTTGTCT GGTAGTA AGG	49.1 °C	Όχι / όχι	Δεν σχηματίζονται	

Πίνακας 3: Χαρακτηριστικά των εκκινητών και του προϊόντος της PCR.



Εικόνα 12: Με κόκκινο βέλος η θέση των γονιδίων *mt-tRNA^{Phe}* και *mt-tRNA^{Val}* και τα δύο κωδικοποιούνται από την ελαφριά αλυσίδα του *mtDNA*.

Υλικά

Για την εκτέλεση του πειράματος χρειάστηκαν τα παρακάτω υλικά:

- Πιπέτες 1-10 μ l και 10-100 μ l
- Θερμοκυκλοποιητής
- Ρύγχη
- Eppendorf των 1,5 ml
- Στατό

Ανάλυση αντιδραστηρίων

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν καθώς και οι ποσότητές τους παρατίθενται στη συνέχεια.

1U Taq πολυμεράση (5U/ μ l)	0,25 μ l
DNA δείγμα	1 μ l
50 pmol από τον κάθε εκκινητή	1 + 1 μ l
10X PCR Buffer	5 μ l
40 mM dNTPs	1 μ l
25 mM MgCl ₂	1 μ l
ddH ₂ O	39,75 μ l
Τελικός όγκος αντίδρασης	50 μ l

Αναλυτικότερα το ρυθμιστικό διάλυμα της PCR είναι απαραίτητο για τη σωστή λειτουργία της Taq πολυμεράσης. Ο ρόλος του είναι η διατήρηση του pH όπου στους 92 °C κυμαίνεται μεταξύ 6,8 και 7,8 καθώς περιέχει Tris - HCl και ένα άλας. Στο ρυθμιστικό διάλυμα περιέχονται και σταθεροποιητές του ενζύμου, για να διασφαλίζεται η βέλτιστη λειτουργία του. Το δείγμα του DNA είναι από το ολικό DNA που απομονώσαμε στο βήμα 3.1. Τα νουκλεοτίδια που προστέθηκαν έχουν την ίδια συγκέντρωση στο διάλυμα, για να μειωθεί η πιθανότητα λάθους. Τα ιόντα MgCl₂ είναι σημαντικά για τη λειτουργία της Taq πολυμεράσης. Το ένζυμο για να μπορέσει να προχωρήσει η αντίδραση έπρεπε να βρίσκεται σε ενεργότητα 1U. Οι εκκινητές προστέθηκαν στη συγκεκριμένη συγκέντρωση καθώς σε μικρότερη συγκέντρωση δεν θα επαρκούσαν και σε μεγαλύτερη θα αυξανόταν η πιθανότητα σχηματισμού ομοδιμερών.

Πειραματική Διαδικασία

Για τη πραγματοποίηση της αντίδρασης PCR ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία:

- 1) Αρχικά φορτώθηκε 1 μL DNA σε ένα eppendorf των 0,2 ml, από κάθε δειγμα και σε ένα eppendorf τοποθετήθηκε νερό, για τη δημιουργία του αρνητικού μάρτυρα. Ο μάρτυρας είναι απαραίτητος για την επιβεβαίωση των σωστών χειρισμών και για την εύρεση πιθανής επιμόλυνσης.
- 2) Παρασκευάστηκε ένα mastermix για τη μείωση του πειραματικού σφάλματος, το οποίο είχε πολλαπλάσιες ποσότητες των αντιδραστηρίων (αριθμός δειγμάτων + μάρτηρας +1). Κατά την παρασκευή του, πρώτα τοποθετήθηκε σε eppendorf των 1,5 mL το αντιδραστήριο με τον μεγαλύτερο όγκο, νερό και τελευταία η Taq πολυμεράση, καθώς είχε τον μικρότερο όγκο και δεν έπρεπε να μείνει πολύ ώρα εκτός κατάψυξης (διατήρηση της ενεργότητας του ενζύμου).
- 3) Έγινε μια μικρή φυγοκέντρωση στο mastermix (spin 10'') και μετά τοποθετήθηκαν 49 μL στα eppendorf που είχαμε το DNA. Τελικός όγκος αντίδρασης 50 μL .
- 4) Τέλος έγινε ένα spin 10'' στα eppendorf και μετά τοποθετήθηκαν στον θερμοκυκλοποιητή.

Πορεία της αντίδρασης

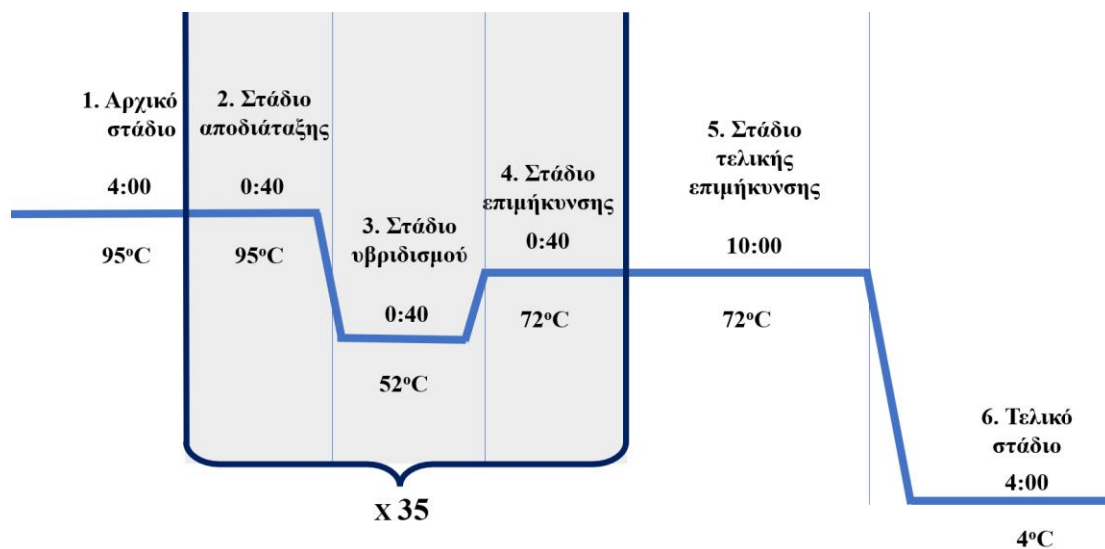
Αφού προστέθηκαν όλα τα διαλύματα που αναφέρθηκαν προηγουμένως, τα eppendorfs τοποθετήθηκαν στο θερμοκυκλοποιητή και ξεκίνησαν τα στάδια της αντίδρασης (Εικόνα 13).

- 1) Αρχικό στάδιο: η θερμοκρασία αυξάνεται και σταθεροποιείται στους 95 °C για 4 λεπτά.
- 2) Στάδιο αποδιάταξης: η θερμοκρασία παραμένει στους 95 °C για 40 δευτερόλεπτα, ώστε να προκύψει μονόκλωνο DNA.
- 3) Στάδιο υβριδισμού: η θερμοκρασία μειώνεται στους 52 °C για το γονίδιο mt-tRNA^{Val} και στους 55 °C για το γονίδιο mt-tRNA^{Phe} για 40 δευτερόλεπτα, εδώ πραγματοποιείται η σύνδεση των εκκινητών στο μονόκλωνο DNA εκατέρωθεν των τμημάτων που επιθυμούμε να ενισχύσουμε.
- 4) Στάδιο επιμήκυνσης: έγινε αύξηση της θερμοκρασίας στο 72 °C για 40 δευτερόλεπτα. Στη θερμοκρασία αυτή παρατηρείται η βέλτιστη δράση της Taq πολυμεράσης. Η πολυμεράση προσδένεται στο DNA και δημιουργεί δίκλινο

τμήματα. Βέβαια δεν έχει δράση εξωνουκλεάσης και άρα ότι λάθος νουκλεοτίδιο ενσωματωθεί, δεν επιδιορθώνεται.

- 5) Στάδιο τελικής επιμήκυνσης: η θερμοκρασία παραμένει σταθερή στους 72 °C για 10 λεπτά ώστε να γίνει η τελική επιμήκυνση του προϊόντος.
- 6) Τελικό στάδιο: η θερμοκρασία κατεβαίνει στους 4 °C.

Κατά την PCR τα βήματα δύο έως τέσσερα επαναλήφθηκαν 35 φορές, για να μπορέσει να ενισχυθεί σε ικανοποιητικό βαθμό το επιθυμητό DNA, ώστε να μπορέσουμε να συνεχίσουμε την ανάλυση για την εύρεση μεταλλάξεων. Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε και δεύτερη φορά για το γονίδιο mt-tRNA^{Val} με τα ίδια αντιδραστήρια, αλλά τους κατάλληλους εκκινητές.



Εικόνα 13: Τα στάδια της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης. Παρατηρούνται οι θερμοκρασίες, ο χρόνος και η χρησιμότητα του κάθε σταδίου.

3.4 Ποιοτικός προσδιορισμός προϊόντων PCR

Μετά τη λήξη της αντίδρασης PCR έγινε διαχωρισμός των τμημάτων DNA που ενισχύθηκαν. Για το σκοπό αυτό παρασκευάστηκε μία πηκτή αγαρόζης συγκέντρωσης 2% και 2,5%. Η μεγαλύτερη συγκέντρωση αγαρόζης χρησιμοποιήθηκε γιατί τα τμήματα DNA έχουν μικρότερο μέγεθος από ότι πριν και άρα για να γίνει ο διαχωρισμός τους έπρεπε οι πόροι να είναι μικρότεροι από εκείνους της πηκτής 2%. Έτσι το πήκτωμα αγαρόζης 2,5% έχει μεγαλύτερη

διακριτική ικανότητα. Για την παρασκευή της πηκτής και για τη διαδικασία της ηλεκτροφόρησης ακολουθήθηκαν τα ίδια βήματα με τη προηγούμενη ηλεκτροφόρηση (3.2). Μία διαφορά μεταξύ των ηλεκτροφορήσεων ήταν ότι εδώ χρησιμοποιήθηκε ένας μάρτυρας μοριακού βάρους (DNA ladder), ο οποίος περιείχε τμήματα DNA διαφορετικών (γνωστών) μεγεθών. Αυτό αποσκοπούσε στη διασαφήνιση της ειδικής ενίσχυσης μόνο του επιθυμητού τμήματος DNA. Επιπλέον ελέγχθηκε και ο αρνητικό μάρτυρας της PCR. Αφού φορτώθηκαν τα δείγματα στα πηγαδάκια πραγματοποιήθηκε η ηλεκτροφόρηση. Τέλος ακολούθησε η παρατήρηση του πηκτώματος σε λάμπα UV. Σε όσα δείγματα είχε ενισχυθεί σωστά το DNA, έγινε ο έλεγχος SSCP. Τη τεχνική αυτή θα τη δούμε στη συνέχεια.

3.5 Ανάλυση πολυμορφισμού μονόκλωνης διαμόρφωσης Single-Strand Conformational Polymorphism (SSCP)

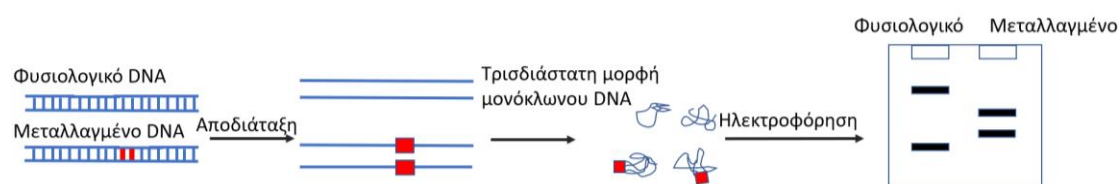
Μετά το πέρας της απομόνωσης του μιτοχονδριακού DNA και της αντίδρασης PCR για την ενίσχυση των προϊόντων, ακολούθησε η ανάλυση της αλληλουχίας των γονιδίων mt-tRNA^{Val} και mt-tRNA^{Phe}. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος SSCP και στη συνέχεια έγινε αλληλούχιση των δειγμάτων που φάνηκαν να έχουν αλλοιώσεις στη νουκλεοτιδική τους αλληλουχία.

Αρχή της μεθόδου

Η μέθοδος SSCP είναι μία απλή, πολύ ευαίσθητη και οικονομική τεχνική. Βασίζεται στο ότι τα μονόκλινα τμήματα DNA κάτω από μη αποδιατακτικές συνθήκες παρουσιάζουν συγκεκριμένη στερεοδιαμόρφωση. Η τρισδιάστατη τους διαμόρφωση οφείλεται στις διαμοριακές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των νουκλεοτιδίων τους. Έστω και μία αλλαγή σε ένα νουκλεοτίδιο μπορεί να οδηγήσει σε αλλαγή της στερεοδιάταξης των τμημάτων και συνεπώς σε διαφορετική κινητική μέσα στη πηκτή. Έτσι λοιπόν, δύο μονόκλινα 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. Στη μέθοδο χρησιμοποιείται μονόκλινο DNA γιατί το δίκλινο εμφανίζει διαφορές στη κινητικότητα σε σχέση μόνο με το μέγεθός του και όχι με τη νουκλεοτιδική αλληλουχία του. Επομένως, από μία ανάλυση SSCP μπορεί

να ανιχνεύσει έλλειψη, διπλασιασμό ή και αντικατάσταση μίας βάσης χωρίς όμως να μας δίνει πληροφορίες για το είδος της μετάλλαξης (Dong and Zhu, 2005).

Συνοπτικά το τμήμα του DNA που πρόκειται να ελεγχθεί για την ύπαρξη κάποιας μετάλλαξης ή πολυμορφισμού αρχικά ενισχύεται με την μέθοδο της PCR. Στη συνέχεια το προϊόν της PCR υφίσταται αποδιάταξη, χρησιμοποιώντας υψηλές θερμοκρασίες και φορτώνεται σε πηκτή πολυακρυλαμίδης 12%. Τα μονόκλιωνα 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. Αντίθετα παρουσία μετάλλαξης παρατηρείται διαφορετικό πρότυπο ζώνωσης. Η ζώνωση παρατηρείται μετά από χρώση νιτρικού αργύρου. Η διαδικασία περιγράφεται συνοπτικά στην εικόνα 14.



Εικόνα 14: Συνοπτική αναπαράσταση της διαδικασίας SSCP, όπου φαίνεται η διαφορετική ζώνωση μεταξύ φυσιολογικού και μεταλλαγμένου τμήματος DNA.

3.5.1 Παραγωγή πηκτής πολυακρυλαμίδιου

Στη μέθοδο SSCP χρησιμοποιήθηκε πηκτή πολυακρυλαμίδιου γιατί έχει μεγαλύτερη διακριτική ικανότητα σε σχέση με τη πηκτή αγαρόζης καθώς έχει διακριτική ικανότητα σε διαφορά μίας μόνο βάσης. Επιπλέον, η πολυακρυλαμίδη είναι λιγότερο εύθραυστη από τη πηκτή αγαρόζης και έτσι επιτρέπεται η χρήση κάθετης συσκευής ηλεκτροφόρησης.

Υλικά και αντιδραστήρια

Για τη παραγωγή δύο πηκτών πολυακρυλαμίδιου θα χρειαστούν τα παρακάτω:

Υλικά	Αντιδραστήρια
Ζυγός	Ακρυλαμίδιο (15 gr)
Μικροσωλήνες τύπου Eppendorf (0,5 mL)	Δις- ακρυλαμίδιο (0,375 gr)
Ποτήρια ζέσεως	Γλυκερόλη 50% (12,5 mL)
Μαγνητικός αναδευτήρας και μαγνητάκι	TBE 10X (6,4 mL)
Διηθητικό χαρτί	TEMED (125 mL)
Κωνική φιάλη	APS 20% (750 mL)
Ογκομετρικοί σωλήνες (250 mL, 1 L)	ddH ₂ O

Πειραματική διαδικασία

Για την παρασκευή δύο πηκτών πολυακρυλαμιδίου ακολουθήθηκε η παρακάτω πειραματική διαδικασία (Εικόνα 17):

- 1) Αρχικά, με τον ζυγό έγινε η μέτρηση 15 g ακρυλαμιδίου και 0,375 g δις-ακρυλαμιδίου.
- 2) Στη συνέχεια τοποθετήθηκαν 6,4 mL ρυθμιστικού διαλύματος TBE 10X και 12,5 mL γλυκερόλης 50% σε falcon των 50 mL.
- 3) Τα στερεά και υγρά υλικά, μαζί με 100 mL νερού τοποθετήθηκαν μαζί σε ποτήρι ζέσεως και ομογενοποιήθηκαν με τη βοήθεια του μαγνητικού αναδευτήρα.
- 4) Έγινε διήθηση του διαλύματος σε ογκομετρικό κύλινδρο, με τη χρήση διηθητικού χαρτιού, και ογκομέτρηση του διηθήματος. Στη συνέχεια, προστέθηκε ddH₂O μέχρι το διάλυμα να έχει όγκο 125 mL.
- 5) Το επόμενο βήμα ήταν η προσθήκη 125 μL του διαλύματος TEMED (Τετραμεθυλαιθυλενοδιαμίνη) και 750 μL APS (υπερθειικό αμμώνιο) 20%. Η προσθήκη της TEMED είναι απαραίτητη για τον πολυμερισμό του πηκτώματος πολυακρυλαμιδίου. Πιο συγκεκριμένα, το TEMED είναι μία τριτοταγής αμίνη η οποία καταλύει το σχηματισμό ελεύθερων ριζών από το APS και την ριβοφλαβίνη προκαλώντας έτσι τον πολυμερισμό του ακρυλαμιδίου και του δις-ακρυλαμιδίου ώστε να παραχθεί μία πηκτή κατάλληλη για ηλεκτροφόρηση.
- 6) Μετά την προσθήκη των TEMED και APS ακολούθησε έντονη ανάδευση και το διάλυμα τοποθετήθηκε ανάμεσα από 2 τζάμια με κενό 2mm μεταξύ τους. Τέλος εφαρμόστηκαν τα χτενάκια για τη δημιουργία των πηγαδιών και υπήρχε χρόνος αναμονής περίπου 30 λεπτά, για να πήξει η πηκτή.

3.5.2 Αποδιάταξη DNA και ηλεκτροφόρηση

Πριν φορτωθούν τα δείγματα DNA στα πηγαδάκια πραγματοποιήθηκε αποδιάταξη των δίκλωνων μορίων DNA σύμφωνα με την παρακάτω διαδικασία (Εικόνα 15):

- 1) Πραγματοποιήθηκε ανάμειξη 7 μl DNA με 10 μl αποδιατακτικού διαλύματος και τοποθετήθηκαν σε θερμοκυκλοποιητή.
- 2) Η θερμοκρασία αρχικά ρυθμίστηκε στους 95 °C για 2 λεπτά.
- 3) Στη συνέχεια στους 97 °C για 2 ακόμα λεπτά.
- 4) Τέλος στους 99 °C για 9 λεπτά. Τα δείγματα τα τοποθετήσαμε κατευθείαν σε πάγο στα 8 λεπτά για να αποτρέψουμε πιθανό υβριδισμό σε θερμοκρασία δωματίου.

Το αποδιατακτικό διάλυμα περιείχε:

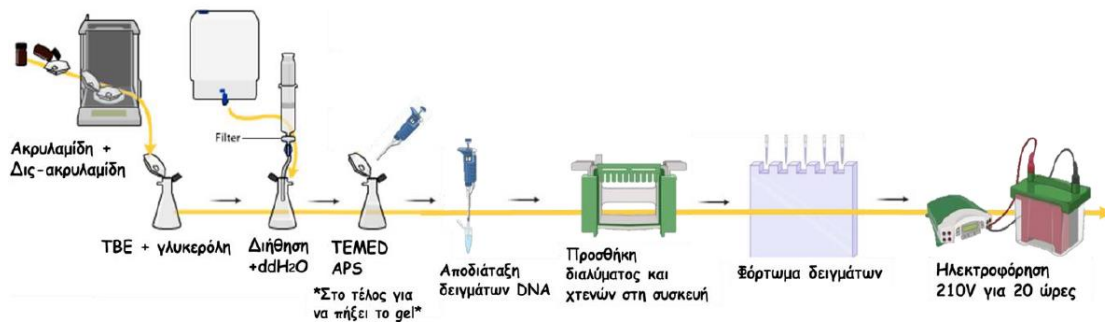
95% φορμαμίδιο, το οποίο σε καθαρή μορφή διαλύει πολλές αδιάλυτες στο νερό ιονικές ενώσεις και έχει την ικανότητα να αυτοδιασπάται όταν θερμανθεί.

20 mM EDTA: Το EDTA είναι ένας χηλικός παράγοντας που προσδένει δισθενή ιόντα όπως τα ιόντα ασβεστίου και μαγνησίου. Τα ιόντα αυτά δρουν ως συμπράγοντες νουκλεασών επομένως η δέσμευση των ιόντων από το EDTA απενεργοποιεί τις νουκλεάσες κατέχοντας έτσι έναν προστατευτικό ρόλο κατά την αποδιάταξη του DNA.

10 mM NaOH: είναι το ρυθμιστικό διάλυμα εκχύλισης.

0,05% κυανό του ξυλενίου και 0,05% κυανό της βρωμοφαινόλης: οι οποίοι δρουν ως δείκτες, δεδομένου ότι εμφανίζουν την ίδια ηλεκτροφορητική κινητικότητα με το DNA.

- 5) Πριν φορτωθούν τα δείγματα DNA, προστέθηκε πρώτα το ρυθμιστικό διάλυμα TBE 0,5X στη συσκευή και έπειτα πραγματοποιήθηκε η προσθήκη των δειγμάτων DNA στα πηγαδάκια.
- 6) Τέλος, πραγματοποιήθηκε κάθετη ηλεκτροφόρηση για 20 ώρες στα 200 V.



Εικόνα 15: Σύνοψη πρωτοκόλλου παρασκευής πηκτώματος πολυακρυλαμιδίου και της ηλεκτροφόρησης που ακολουθεί.

Επειδή, κατά τη διεξαγωγή του πειράματος το γονίδιο mt-tRNA^{Val} έδειξε μάντες πολύ χαμηλά στο πήκτωμα η διαδικασία επαναλήφθηκε σε 13% πηκτή για 18 ώρες στα 190 V.

3.5.3 Χρώση πηκτώματος πολυακρυλαμιδίου με διάλυμα νιτρικού αργύρου

Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης ήταν απαραίτητη η εμφάνιση των αποτελεσμάτων της, για τη διακρίβωση της ύπαρξης διαφορετικού προτύπου ζώνωσης από το αναμενόμενο. Υπάρχουν πολλές εναλλακτικές χρώσεις, αλλά για τις ανάγκες του πειράματος επιλέχθηκε η χρώση νιτρικού αργύρου. Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε για τη χρώση δύο πηκτών, ήταν το παρακάτω και περιγράφεται συνοπτικά στην εικόνα 16:

1^ο Διάλυμα: Μονιμοποίηση DNA στο πήκτωμα

- 1) Αρχικά, σε ογκομετρικό κύλινδρο προστέθηκαν 1 mL οξικού οξέος και 800 mL ddH₂O και το διάλυμα ανακινήθηκε μετά τη προσθήκη parafilm.
- 2) 200 mL του διαλύματος προστέθηκαν σε κάθε πήκτωμα για 2 λεπτά. Τα πηκτώματα βρίσκονταν υπό ανάδευση κατά τη διάρκεια της πλύσης. Μετά το πέρας των 2 λεπτών το διάλυμα απομακρύνθηκε.
- 3) Η διαδικασία της πλύσης επαναλήφθηκε για ακόμη μία φορά.
- 4) Ακολούθησε πλύση με ddH₂O, για 2 λεπτά.

2^ο Διάλυμα: Χρώση των πηκτωμάτων πολυακρυλαμιδίου

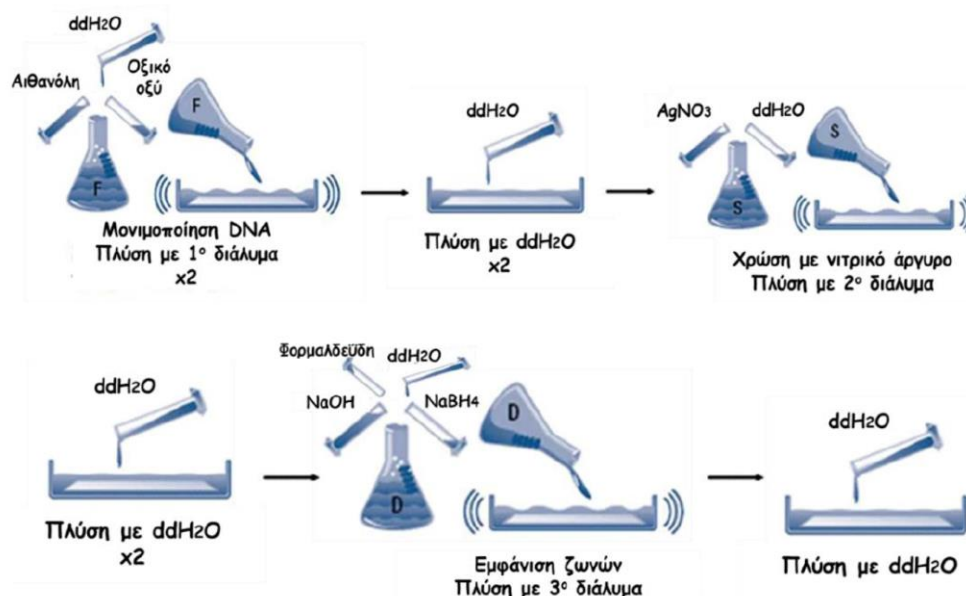
- 1) Σε ογκομετρικό κύλινδρο προστέθηκαν 400 mL ddH₂O και 0,4g νιτρικού αργύρου.
- 2) 200 mL του διαλύματος προστέθηκαν σε κάθε πήκτωμα για 15 λεπτά. Τα πηκτώματα είχαν τοποθετηθεί στον αναδευτήρα κατά τη διάρκεια της πλύσης.

3) Τα πηκτώματα ξεπλύθηκαν δύο φορές με ddH₂O .

3^ο Διάλυμα: Εμφάνιση ζωνών που προέκυψαν από την ηλεκτροφόρηση

- 1) Σε ποτήρι ζέσεως προστέθηκαν 400 mL H₂O και εκεί διαλύθηκαν 6 g NaOH, 0,02 g NaBH₄, 2 mL φορμαλδεΐδης.
- 2) 200 mL του διαλύματος προστέθηκαν σε κάθε πήκτωμα. Τα πηκτώματα είχαν τοποθετηθεί στον αναδευτήρα κατά τη διάρκεια της πλύσης.
- 3) Τα πηκτώματα παρέμειναν εμβαπτισμένα στο διάλυμα μέχρι την εμφάνιση των ζωνών.
- 4) Τέλος, απομακρύνθηκε το διάλυμα και ακολούθησε πλύση με ddH₂O.

Μετά την εμφάνιση των ζωνών, τα πηκτώματα πολυακρυλαμιδίου συσκευάζονται σε διαφανείς μεμβράνες ώστε να γίνει η σύγκριση των αποτελεσμάτων. Τέλος, 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.



Εικόνα 16: Συνοπτική σχηματική απεικόνιση του πρωτοκόλλου χρώσης των πηκτωμάτων πολυακρυλαμιδίου για την οπτικοποίηση των ζωνών της ηλεκτροφόρησης.

3.6 Καθαρισμός προϊόντων PCR

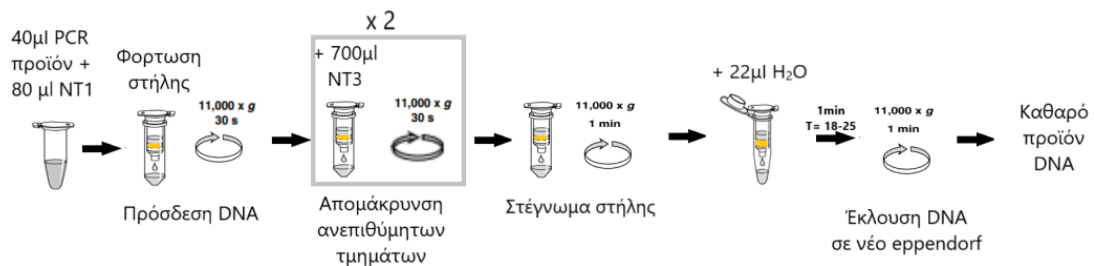
Αφού έγινε παρατήρηση των πηκτών της SSCP και απαρίθμηση των δειγμάτων που πιθανώς περιείχαν μεταλλάξεις, τα προϊόντα PCR των επιλεγόμενων δειγμάτων, καθαρίστηκαν και ομαδοποιήθηκαν πριν αποσταλούν για αλληλούχιση. Πριν την αλληλούχιση έγινε ομαδοποίηση των δειγμάτων που εμφάνισαν ίδια ζώνωση. Ο καθαρισμός έγινε με τη χρήση του kit της εταιρείας *MACHEREY-NAGEL*, και με τον τρόπο αυτό απομακρύνθηκαν εκκινητές και συστατικά της αντίδρασης PCR, καθώς και παραπροϊόντα της.

Για τον καθαρισμό των επιτυχημένων PCR προϊόντων ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία:

1. Σε σωλήνα τύπου *erppendorf*, αναμειγνύονται 40 μ l PCR προϊόντος με 80 μ l του διαλύματος NT1. Εάν ο όγκος του PCR προϊόντος είναι μικρότερος από 40 μ l (αλλά μεγαλύτερο από 30 μ l), τότε ο εκάστοτε όγκος πρέπει να συμπληρωθεί με ddH₂O μέχρι τα 40 μ l. Το διάλυμα NT1 προστίθεται γιατί θα βοηθήσει στη δέσμευση του DNA στη στήλη καθαρισμού.
2. Σε σωλήνες συλλογής των 2 mL τοποθετούνται οι στήλες καθαρισμού των PCR προϊόντων και το *Nucleospin Gel*, και στη συνέχεια φορτώνεται σε κάθε στήλη το προηγούμενο διάλυμα. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 11.000 g για 30 s. Το DNA δεσμεύεται στη στήλη και απορρίπτεται το περιεχόμενο του σωλήνα συλλογής.
3. Η στήλη επανατοποθετείται στο σωλήνα συλλογής και προστίθενται 700 μ l διαλύματος NT3. Η πλύση με αυτό το διάλυμα βοηθά στην απομάκρυνση ανεπιθύμητων τμημάτων DNA όπως τα διμερή εκκινητών και παράλληλα προστατεύει από την κατακράτηση αλάτων. Ακολούθως, πραγματοποιείται φυγοκέντρηση στις 11.000 g για 30 s. Το βήμα αυτό επαναλαμβάνεται.
4. Έπειτα, πραγματοποιείται φυγοκέντρηση στις 11.000 g για 1 λεπτό ώστε να απομακρυνθεί πλήρως το διάλυμα NT3 το οποίο μεταξύ άλλων περιέχει αιθανόλη. Η αιθανόλη μπορεί να δράσει ως αναστολέας ενζυμικών αντιδράσεων και έτσι πρέπει να απομακρυνθεί πλήρως. Μετά τη φυγοκέντρηση απορρίπτεται το υγρό στο σωλήνα συλλογής και η στήλη τοποθετείται σε σωλήνα *erppendorf* των 1,5 mL.
5. Τέλος, για την έκλυση του DNA από τη στήλη, προστίθενται 22 μ l ddH₂O και η στήλη παραμένει σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (18-25 °C) για 1 λεπτό. Κατόπιν,

οι στήλες φυγοκεντρώνται στις 11.000 g για 1 λεπτό και τελικά απορρίπτεται η στήλη. Το καθαρό DNA βρίσκεται πλέον στο Eppendorf.

6. Πριν το δείγμα σταλεί για αλληλούχιση πραγματοποιείται μία ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 2% για να βεβαιωθούμε για τη ποιότητά του, χρησιμοποιώντας 2μL DNA και 2μL της χρωστικής μπλε της βρωμοφαινόλης.



Εικόνα 17: Πρωτόκολλο καθαρισμού προϊόντων PCR της εταιρίας MACHEREY-NAGEL.

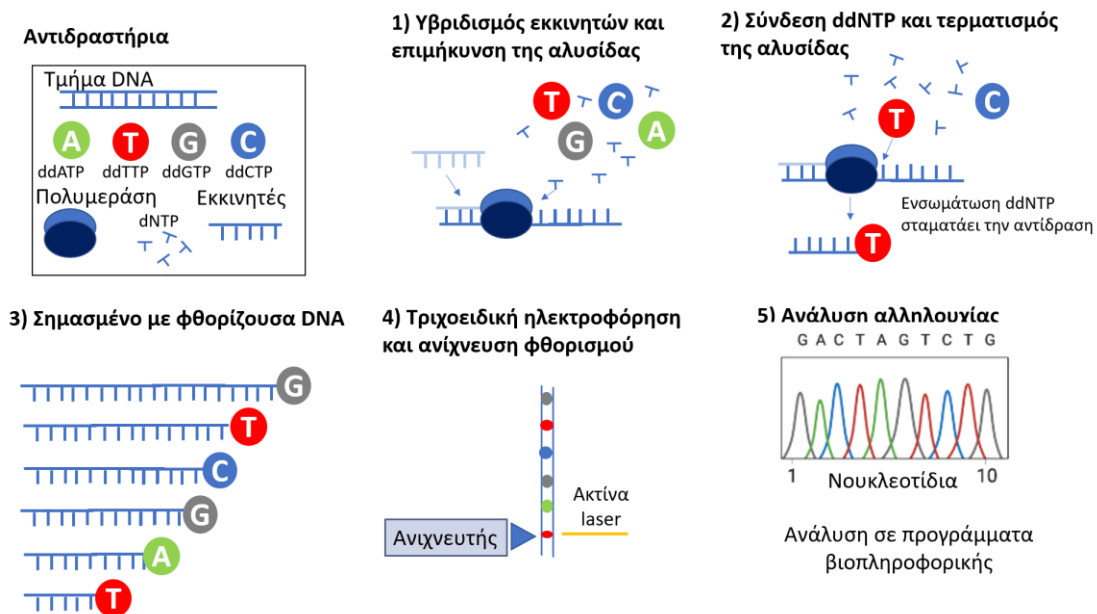
3.7 Αλληλούχιση DNA

Μέχρι στιγμής, έχει γίνει απομόνωση του DNA από τα δείγματα αίματος των ασθενών και μετά από ηλεκτροφόρηση. Στη συνέχεια ενισχύθηκαν τα επιθυμητά τμήματα και έγινε έλεγχος για μεταλλάξεις μέσω της μεθόδου SSCP. Όσα δείγματα είχαν θετικά αποτελέσματα αναλύθηκαν με αλληλούχιση.

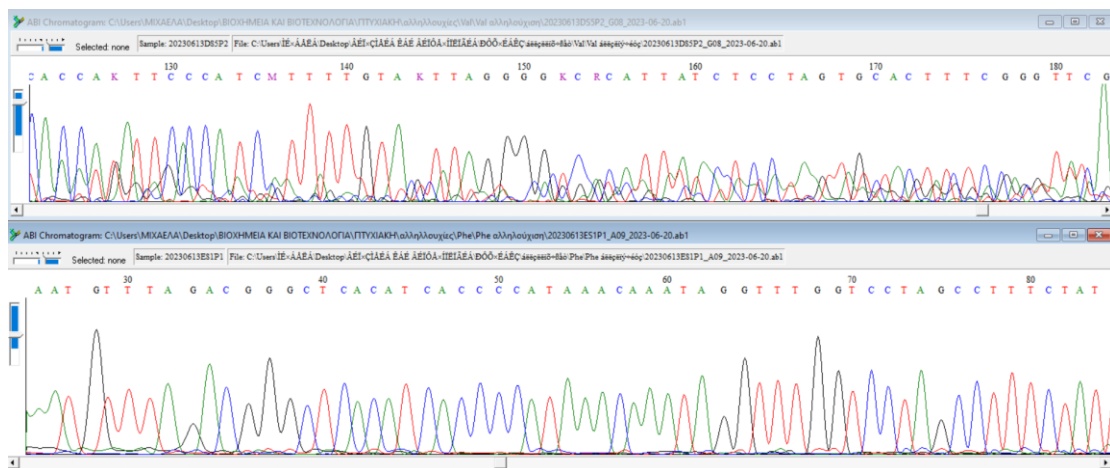
Μία από τις πρώτες μεθόδους αλληλούχισης είναι η μέθοδος κατά Sanger. Άρχισε να χρησιμοποιείται το 1977 και παραλλαγές της χρησιμοποιούνται μέχρι και σήμερα. Αποτελεί την πιο διαδεδομένη μέθοδο ανάλυσης της πρωτοταγούς δομής του DNA και μπορεί να αλληλουχίσει αξιόπιστα τμήματα μέχρι 800 βάσεις καλύπτοντας έτσι τις ανάγκες του συγκεκριμένου πειράματος. Το μικρό αυτό μέγεθος οφείλεται στην πεπερασμένη ικανότητα της πολυμεράσης που καταλύει την αντίδραση καθώς είναι μία ενζυμική μέθοδος. Η βάση της μεθόδου Sanger είναι ο υβριδισμός του μονόκλωνου DNA με έναν σημασμένο εκκινητή (αρχικά χρησιμοποιούταν ραδιενέργεια). Στην αντίδραση συμμετέχουν η πολυμεράση του DNA, τα τέσσερα φυσιολογικά νουκλεοτίδια (dNTPs), για την επιμήκυνση του DNA και σε μικρή αναλογία κάθε φορά ένα από 2',3' διδεδόξυ νουκλεοτίδια (ddNTPs). Τα ddNTPs δεν φέρουν υδροξύλιο στο 3' άκρο τους και επομένως μετά την ενσωμάτωσή τους δεν

γίνεται η επιμήκυνση της αλυσίδας καθώς το απαραίτητο OH για το σχηματισμό του φωσφοδιεστερικού δεσμού λείπει. Αφού τελειώσουν οι αντιδράσεις στους τέσσερις δοκιμαστικούς σωλήνες, γίνεται ηλεκτροφόρηση και τελικά η αλληλουχία του συμπληρωματικού DNA από αυτό που αντιγράφηκε δίνεται από την πηκτή διαβάζοντάς την από κάτω προς τα πάνω. Αυτό γίνεται γιατί τα μόρια με μικρό μοριακό βάρος κινούνται πιο εύκολα μέσα στη πηκτή.

Σήμερα η τεχνική έχει βελτιστοποιηθεί αρκετά και ενώ η λογική της παραμένει ίδια, η χρήση φθορίζουσών έχει κάνει την αλληλούχιση πιο γρήγορη και ασφαλή. Η σύγχρονη διαδικασία περιγράφεται συνοπτικά από την εικόνα 17. Ο εκκινητής δεν είναι σημασμένος με ραδιενεργό στοιχείο αλλά με ειδική χρωστική. Η χρωστική αποτελείται από μια χρωστική δότη (φλουορεσκεΐνη) και είναι συνδεδεμένη με μια χρωστική δέκτη (διχλωροροδαμίνη) μέσω ενός συνδέτη αμινοβενζοϊκού οξέος. Κάθε ddNTP είναι συνδεδεμένο με μία χρωστική. Συνολικά υπάρχουν τέσσερις χρωστικές που εμφανίζουν διαφορετικό φάσμα και άρα η κάθε χρωστική συσχετίζεται με το αντίστοιχο νουκλεοτίδιο. Μετά το πέρας της αντίδρασης τα τμήματα DNA που έχουν διαφορετικό μήκος ηλεκτροφορούνται μέσα σε τριχοειδή σωληνάρια και η ανίχνευση του σήματος της χρωστικής γίνεται μέσω ειδικού laser. Τα ddNTPs που είναι συνδεδεμένα με την εκάστοτε φθορίζουσα είναι ικανά να απορροφούν την ενέργεια που περιέχεται στην ακτίνα laser και να επανεκπέμπουν ακτινοβολία μεγαλύτερου μήκος κύματος. Με τη χρήση κατάλληλου λογισμικού γίνεται μετατροπή των δεδομένων στις 4 χρωστικές που έχουν καθοριστεί για την ανάλυση της πρωτοταγούς δομής και καταλήγουμε στο κάθε νουκλεοτίδιο. Τα αποτελέσματα παρέχονται σε χρωματογράφημα το οποίο απαιτεί συγκεκριμένο λογισμικό για την ανάλυση του (Εικόνα 18).



Εικόνα 18: Συνοπτική εικονική αναπαράσταση της σύγχρονης μορφής της τεχνικής Sanger.

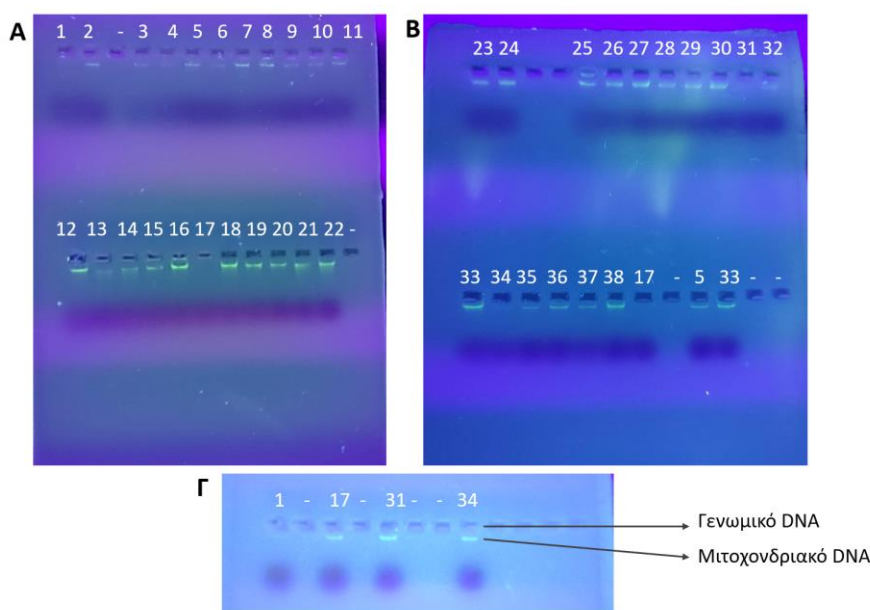


Εικόνα 19: Το αποτέλεσμα της αλληλούχισης σε μορφή χρωματογραφήματος και η αντιστοίχισή του σε νουκλεοτιδικές βάσεις μέσω του προγράμματος Bioedit 7.7.1. Στο πάνω χρωματογράφημα βλέπουμε την αλληλουχία, αλλά μπορούμε να παρατηρήσουμε ότι το χρωματογράφημα δεν είναι καλή ποιότητας και ότι δεν αντιστοιχεί μία μόνο κρυφή σε μία βάση. Για το λόγο αυτό στην αλληλουχία υπάρχουν τα γράμματα K, M, R τα οποία δείχνουν ότι το αποτέλεσμα της αλληλούχισης δεν είναι σίγουρο σε εκείνο το σημείο. Αντίθετα στην κάτω εικόνα, το χρωματογράφημα είναι καλής ποιότητας άρα η αλληλούχιση είναι αξιόπιστη. Παρατηρούμε ψηλές και μοναδικές κορυφές οι οποίες αντιστοιχούν σε μία μόνο νουκλεοτιδική βάση.

4. Αποτελέσματα

4.1 Αποτελέσματα απομόνωσης DNA μέσω ηλεκτροφόρησης

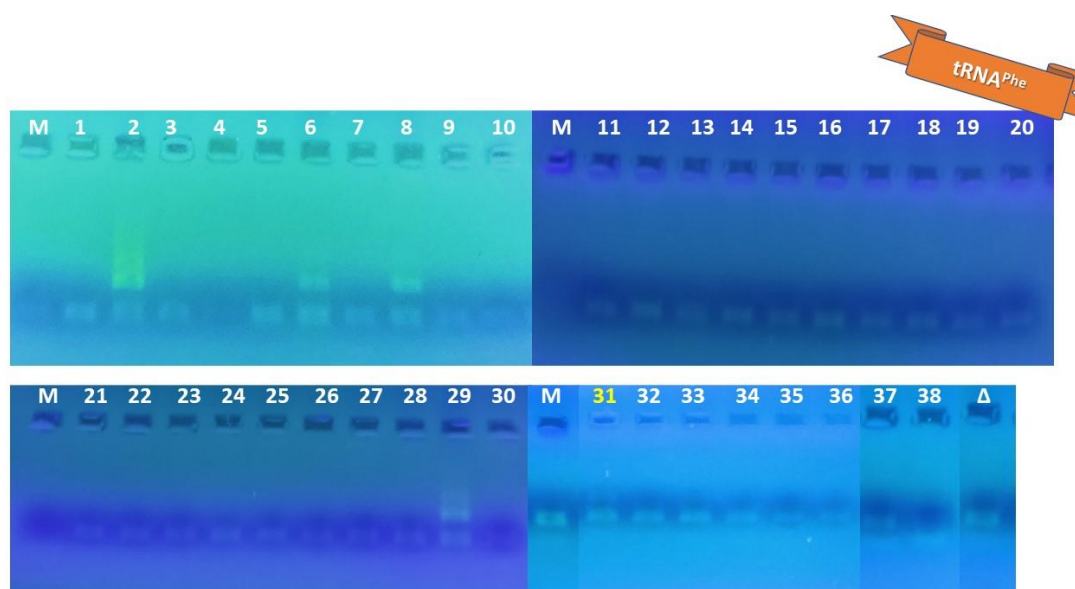
Μετά την απομόνωση του ολικού DNA με το kit, ακολούθησε η ηλεκτροφόρηση του απομονωμένου ολικού DNA για να εξετάσουμε αν η απομόνωση όλων των δειγμάτων ήταν επιτυχής. Στην πηκτή στα δείγματα που απομονώθηκαν σωστά φαίνεται μία πράσινη ζώνη (χρωστική Xpert Green) που αντιστοιχεί στο μιτοχονδριακό DNA. Το γενωμικό DNA έχει πολύ μεγάλο μέγεθος και δεν εξέρχεται από τα πηγαδάκια. Μετά την εμφάνιση της πηκτής κάτω από λάμπα UV, διαπιστώθηκε ότι όλα τα δείγματα είχαν απομονωθεί εκτός από το 17 ενώ τα δείγματα 1, 31 και 34 είχαν λίγη ποσότητα DNA (Εικόνα 19: Α, Β). Επομένως, επαναλήφθηκε η απομόνωση και η ηλεκτροφόρησή τους (Εικόνα 19: Γ). Το γενωμικό DNA έχει πολύ μεγάλο μήκος και δεν μπορεί να περάσει από τους πόρους της πηκτής και παραμένει στα πηγαδάκια.

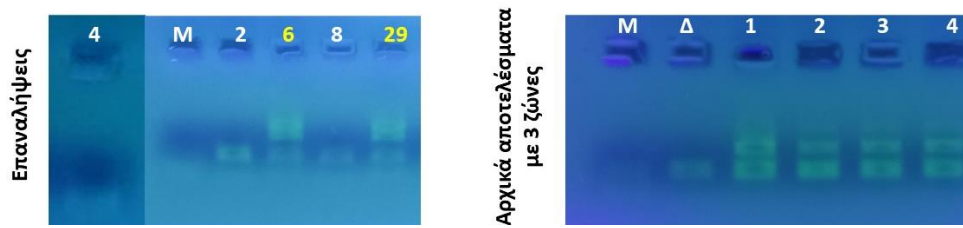


Εικόνα 20: Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αгарόζης 2%. Όλα τα δείγματα ελέγχθηκαν ως προς την επιτυχία της απομόνωσης του DNA. Η πράσινη ζώνη είναι το μιτοχονδριακό DNA που έχει μήκος 16569 ζεύγη βάσεων και δίνει σήμα μετά από σύνδεση στη χρωστική Xpert Green. Α) ηλεκτροφόρηση δειγμάτων 1-22. Β) Ηλεκτροφόρηση δειγμάτων 23-38 και επανάληψη της ηλεκτροφόρησης των δειγμάτων 17, 5 και 33. Γ) Ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων που επαναλήφθηκε η απομόνωσή τους. Το σύμβολο – σημαίνει ότι το πηγαδάκι ήταν κενό.

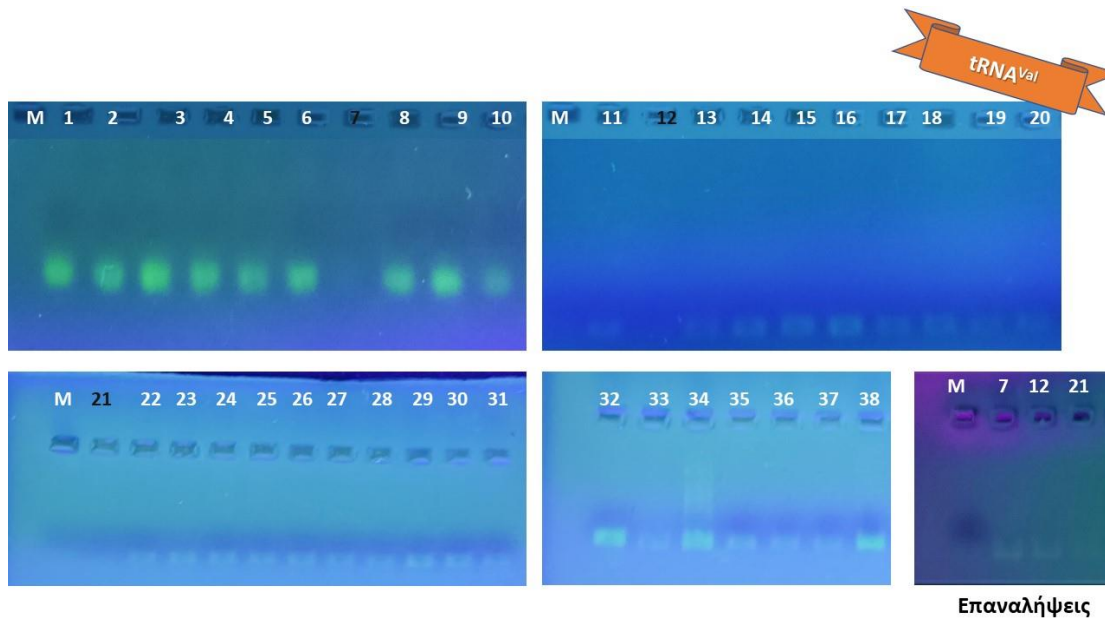
4.2 Αποτελέσματα PCR – οπτικοποίηση μέσω ηλεκτροφόρησης

Αφού πραγματοποιήθηκε η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης έπρεπε να εξετάσουμε αν υπήρχε προϊόν, αν ήταν το επιθυμητό και αν υπήρχε επιμόλυνση στην αντίδραση. Για τους λόγους αυτούς πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αгарόζης. Μετά την τοποθέτηση της πηκτής πάνω στη λάμπα UV, παρατηρούμε μία ζώνη. Ορισμένες φορές όταν οι εκκινητές κάνουν διμερή, μπορεί να εμφανιστεί και μία δεύτερη ζώνη κάτω από την επιθυμητή. Στο πηγάδι που έχει τοποθετηθεί ο μάρτυρας, δεν πρέπει να εμφανιστεί ζώνη καθώς εμφάνιση ζώνης σημαίνει επιμόλυνση στην αντίδραση και άρα πρέπει να επαναληφθεί. Σε όσα δείγματα δεν είχε πραγματοποιηθεί σωστά η αντίδραση επαναλήφθηκε. Η ενίσχυση του γονιδίου mt-tRNA^{Val} έγινε επιτυχώς σε όλα τα δείγματα (Εικόνα 21). Κατά την ενίσχυση του mt-tRNA^{Phe} ενισχύθηκαν όλα τα δείγματα, αλλά παρουσίασαν τρεις ζώνες (Εικόνα 22). Η διακρίβωση της επιθυμητής ζώνης έγινε με την ηλεκτροφόρηση ενός τμήματος DNA ίδιου μήκους με το επιθυμητό προϊόν. Η επιπλέον ζώνη, οφείλονταν στην ενίσχυση κάποιου παραπροϊόντος μεγαλύτερου μήκους. Για να δυσκολέψουμε την δημιουργία του παραπροϊόντος, δημιουργήσαμε πιο δύσκολες συνθήκες στην αντίδραση. Συγκεκριμένα η αντίδραση έγινε στους 55°C χωρίς προσθήκη επιπλέον μαγνησίου για να ενισχυθεί το επιθυμητό μόνο τμήμα DNA. Με εξαίρεση τα δείγματα 6, 29 και 31 τα υπόλοιπα 35 δείγματα ενισχύθηκαν όπως έπρεπε και πήραμε δύο ζώνες.





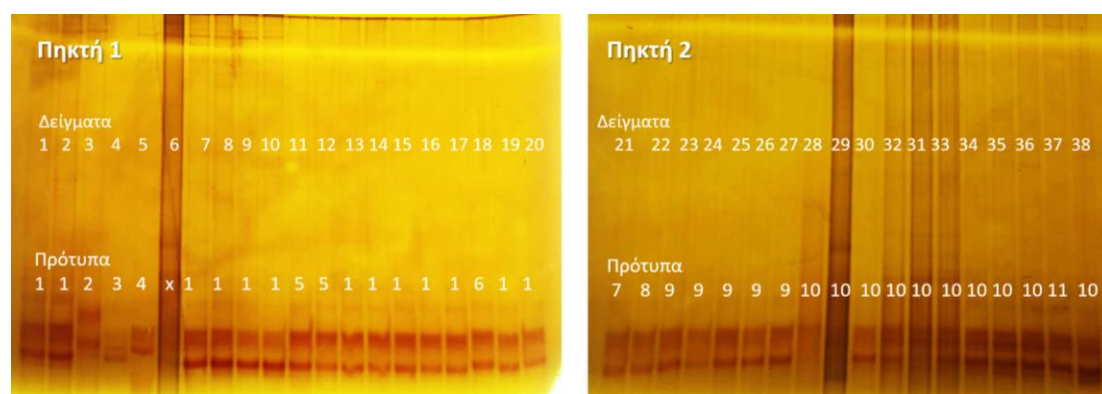
Εικόνα 21: Φωτογραφίες από την ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αραρόζης 2,5%. Τα προϊόντα PCR του γονιδίου *mt-tRNA^{Phe}* το οποίο έχει μήκος 158bp. Στην εικόνα φαίνονται τα δείγματα 1-38, οι επαναλήψεις τους και τα αρχικά προϊόντα PCR, που παρουσίαζαν παραπροϊόν (3 ζώνες). Οι αριθμοί με άσπρο χρώμα σηματοδοτούν την σωστή ενίσχυση του γονιδίου, ενώ τα δείγματα με κίτρινο αριθμό συνεχίζουν να εμφανίζουν 3 ζώνες. M είναι ο μάρτυρας και Δ είναι ο δείκτης που χρησιμοποιήθηκε για τη διακρίβωση της επιθυμητής ζώνης.



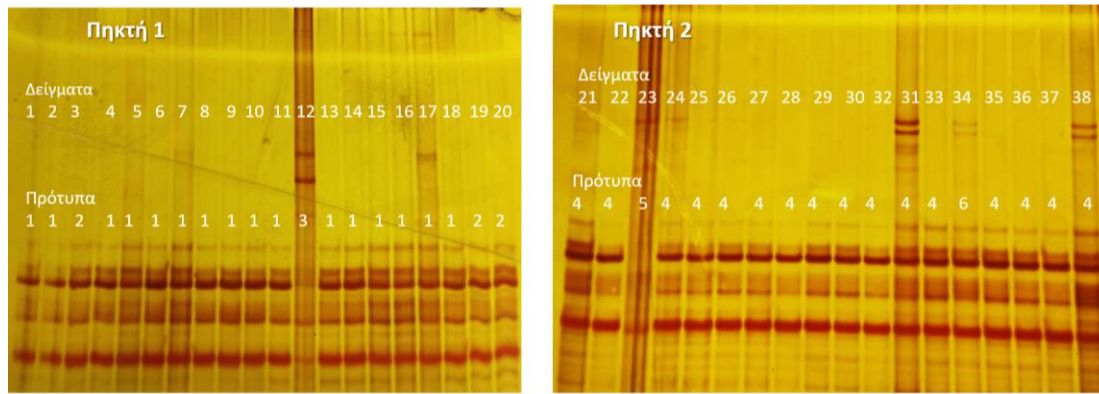
Εικόνα 22: Φωτογραφίες από την ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αραρόζης 2%. Τα προϊόντα PCR του γονιδίου *mt-tRNA^{Val}* έχουν μήκος 140 bp. Στην εικόνα φαίνονται τα δείγματα 1-38 και οι επαναλήψεις των αποτυχημένων προϊόντων. Οι αριθμοί με άσπρο χρώμα σηματοδοτούν την σωστή ενίσχυση του γονιδίου, ενώ τα δείγματα με μαύρο δεν ενισχύθηκαν σωστά και επαναλήφθηκε η ενίσχυσή τους (7,12,21). M είναι ο μάρτυρας.

4.3 Αποτελέσματα μεθόδου SSCP

Για τον έλεγχο της ύπαρξης διαφορών στην αλληλουχία των δύο γονιδίων, πραγματοποιήθηκε ξεχωριστά για το καθένα SSCP. Στη μέθοδο αυτή όπως αναλύθηκε στην ενότητα 3.5 τα μονόκλωνα τμήματα DNA αποκτούν μία μοναδική διαμόρφωση ανάλογη της αλληλουχίας τους. Η κάθε αλληλουχία – διαμόρφωση έχει διαφορετική ηλεκτροφορητική ικανότητα και εμφανίζει ένα συγκεκριμένο πρότυπο. Για το γονίδιο mt-tRNA^{Phe}, αναγνωρίστηκαν 11 πρότυπα (6 στη πρώτη πηκτή και 5 στη δεύτερη) καθώς δεν ήταν δυνατή η σύγκριση μεταξύ των δύο πηκτών. Για το γονίδιο του mt-tRNA^{Val} βρέθηκαν 6 διαφορετικά πρότυπα (3 σε κάθε πηκτή). Το γεγονός ότι τα πρότυπα των 2 πηκτών δεν είναι συγκρίσιμα, μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα τα δείγματα να έχουν ακριβώς την ίδια αλληλουχία κάτι που θα φανεί μετά την αλληλούχιση. Κάθε πρότυπο αντιπροσωπεύει μία μοναδική διαμόρφωση και κατ' επέκταση αλληλουχία η οποία μπορεί να βρίσκεται πάνω από μία φορά στο σύνολο των 38 ασθενών. Για το λόγο αυτό, ένα δείγμα από κάθε πρότυπο στάλθηκε για αλληλούχιση.



Εικόνα 23: Χρωματισμένο πήκτωμα πολυακρυλαμίδης 12% για το γονίδιο mt-tRNA^{Phe}. Στην εικόνα φαίνεται, μετά από χρώση νιτρικού αργύρου, η κάθετη ηλεκτροφόρηση των προϊόντων PCR των δειγμάτων 1-38 και χαρακτηρίστηκαν 11 διαφορετικά πρότυπα ηλεκτροφορητικής κινητικότητας. Με x συμβολίζεται το δείγμα 6 το οποίο δεν χαρακτηρίστηκε. Τα πρότυπα χαρακτηρίστηκαν λαμβάνοντας υπόψη την καμπυλότητα που εμφανίστηκε λόγω προβλήματος του τροφοδοτικού και ανισοκατανομής του ηλεκτρικού πεδίου.

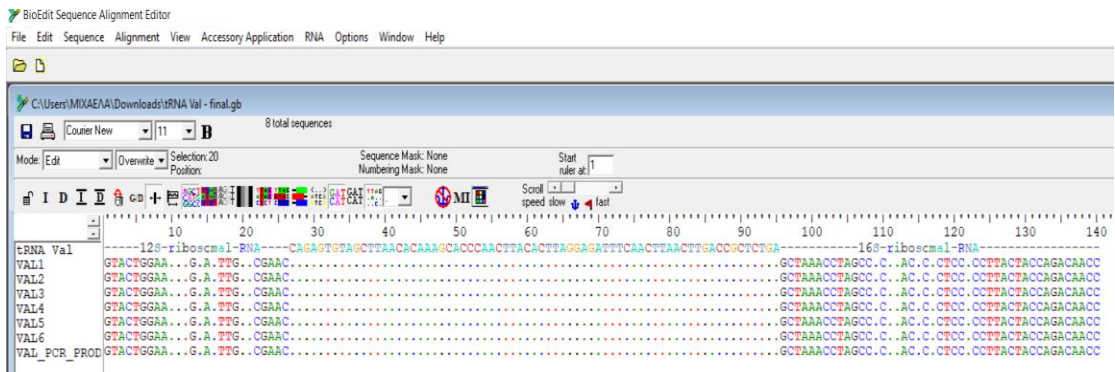


Εικόνα 24: Χρωματισμένο πήκτωμα πολυακρυλαμίδης 13% για το γονίδιο *mt-tRNA^{Val}*. Στην εικόνα φαίνεται, μετά από χρώση νιτρικού αργύρου, η κάθετη ηλεκτροφόρηση των προϊόντων PCR των δειγμάτων 1-38 και χαρακτηρίστηκαν συνολικά 6 διαφορετικά πρότυπα ηλεκτροφορητικής κινητικότητας. Παρατηρούμε ότι οι διαφορές μεταξύ των προτύπων είναι πολύ μικρές οπότε δεν μπόρεσε να γίνει σύγκριση μεταξύ των δύο πηκτωμάτων.

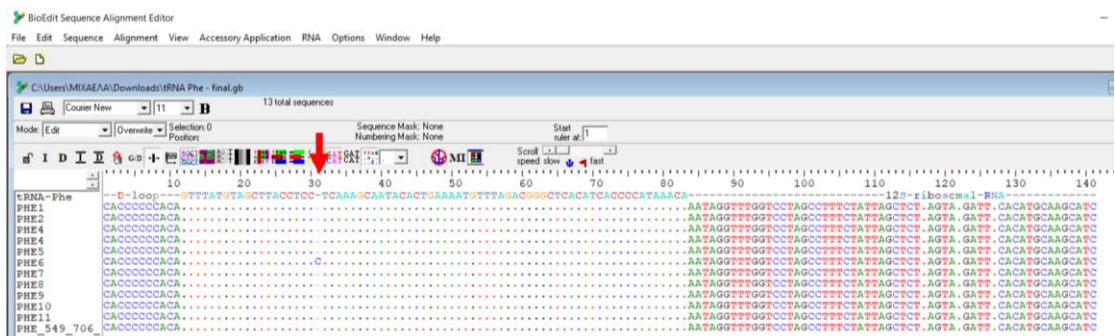
4.4 Αποτελέσματα αλληλούχισης

Αφού τα προϊόντα της PCR από τα ενδεικτικά δείγματα του κάθε προτύπου καθαρίστηκαν, ακολούθησε η αλληλούχισή τους και μία εβδομάδα μετά πήραμε τα αποτελέσματα της αλληλούχισης σε μορφή χρωματογραφήματος. Για την ανάλυση των αλληλουχιών χρησιμοποιήθηκε η τελευταία έκδοση του προγράμματος BioEdit (7.7.1). Αρχικά ελέγχθηκαν όλα τα χρωματογραφήματα ως προς την ποιότητά τους και στη συνέχεια έγινε ένωση των αξιόπιστων τμημάτων των αλληλουχιών κάθε γονιδίου.

Στο γονίδιο του *mt-tRNA^{Val}*, δεν ανιχνεύθηκε κάποια μετάλλαξη ούτε μέσα στο γονίδιο ούτε στις παρακείμενες περιοχές του (12S-*mt-rRNA* και 16S-*mt-rRNA*), όπως φαίνεται και στην εικόνα 25. Στο γονίδιο *tRNA^{Phe}* βρέθηκε μία μετάλλαξη και συγκεκριμένα ένθεση μίας κυτοσίνης (C) στη θέση 596 του *mtDNA* (596insC). Η μετάλλαξη αυτή βρέθηκε στο πρότυπο 6, το οποίο αντιστοιχεί μόνο στο δείγμα 18.



Εικόνα 25: Αποτέλεσμα στοίχισης αλληλουχιών του γονιδίου *mt-tRNA^{Val}*. Στην εικόνα φαίνεται αρχικά η αλληλουχία του γονιδίου με τα γονίδια που βρίσκονται ανοδικά και καθοδικά του. Στη συνέχεια, οι αλληλουχίες VAL1, VAL2, VAL3, VAL4, VAL5 και VAL6 είναι οι αλληλουχίες από τα αντίστοιχα πρότυπα και τέλος είναι η αλληλουχία του προϊόντος PCR. Με τελείες παρουσιάζονται τα νουκλεοτίδια που είναι ίδια με τη φυσιολογική αλληλουχία του γονιδίου. Οι αλληλουχίες έχουν στοιχηθεί και δεν παρατηρείται κάποια μετάλλαξη.



Εικόνα 26: Αποτέλεσμα στοίχισης αλληλουχιών του γονιδίου *mt-tRNA^{Phe}*. Στην εικόνα φαίνεται στη πρώτη σειρά η αλληλουχία του γονιδίου με τις περιοχές που βρίσκονται ανοδικά (*D loop*) και καθοδικά του (*12S-mt-rRNA*). Μετά είναι οι αλληλουχίες PHE1-11 από τα αντίστοιχα πρότυπα και τέλος είναι η αλληλουχία του αναμενόμενου προϊόντος PCR. Με τελείες παρουσιάζονται τα νουκλεοτίδια που είναι ίδια με τη φυσιολογική αλληλουχία του γονιδίου. Μετά τη στοίχιση των αλληλουχιών, βρέθηκε η 596insC μετάλλαξη στην αλληλουχία του γονιδίου, στο πρότυπο 6 και καμία μετάλλαξη στην αλληλουχία των πλευρικών αλληλουχιών. Το κόκκινο βέλος δείχνει το σημείο της ένθεσης.

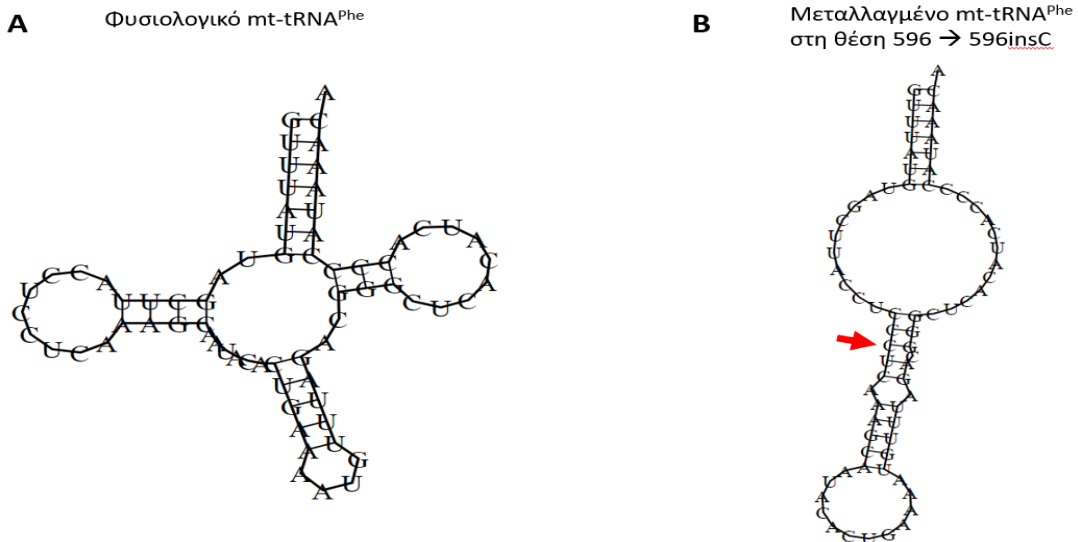
5. Συζήτηση - Συμπεράσματα

Η μετάλλαξη 596insC

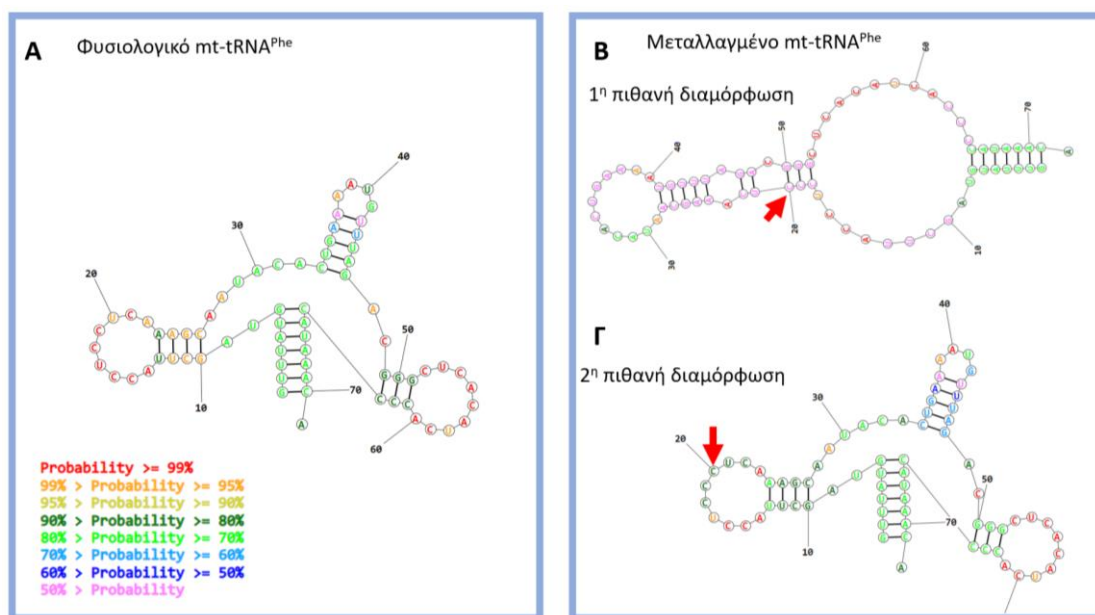
Το αποτέλεσμα αυτής της εργασίας ήταν η ανίχνευση της μετάλλαξης 596insC στην αλληλουχία του γονιδίου mt-tRNA^{Phe}. Αν και το ποσοστό εμφάνισής της στη ΧΑΠ δεν είναι στατιστικά σημαντικό ($p_{\text{value}} < 0.05$), πρέπει να διερευνηθεί, διότι μπορεί να παρουσιάζει βιολογικό ενδιαφέρον. Τη μετάλλαξη αυτή την συναντάμε με διαφορετικές ονομασίες στη βιβλιογραφία, γιατί η αλληλουχία πριν την ένθεση φέρει στις θέσεις 594 και 595 δύο κυτοσίνες (CC) και μετά προστίθεται μία τρίτη. Επομένως, δεν μπορούμε να γνωρίζουμε σε ποια ακριβώς θέση έχει γίνει η ένθεση. Έτσι, την ίδια μετάλλαξη την βλέπουμε στη βάση δεδομένων MITOMAP ως T593TC ή C595CC.

Για την εύρεση πιθανών διαφορών στη δευτεροταγή δομή του mt-tRNA^{Phe}, χρησιμοποιήθηκαν δύο προγράμματα βιοπληροφορικής, το «RNAfold webserver» και το «RNA structure». Τα αποτελέσματα του «RNAfold webserver», τα βλέπουμε στην εικόνα 27. Οι δομές του φυσιολογικού και του μεταλλαγμένου, διαφέρουν πολύ ως προς το σχήμα τους, αλλά η διαφορά στην ελεύθερη ενέργεια ήταν πολύ μικρή. Το φυσιολογικό μόριο είχε ελεύθερη ενέργεια $G = -11,00 \text{ kcal/mol}$ ενώ το tRNA με τη μεταλλαγμένη αλληλουχία είχε ελεύθερη ενέργεια $G = -11,40 \text{ kcal/mol}$. Επιπλέον, έγινε χρήση του προγράμματος «RNA structure», το οποίο παρέχει τη δυνατότητα σχηματισμού των 2 πιο πιθανών δομών από μία αρχική αλληλουχία. Έτσι, για τη φυσιολογική βρέθηκε μία μόνο δομή (Εικόνα 28Α) και για τη μεταλλαγμένη βρέθηκαν δύο πιθανές δομές. Η πιο πιθανή (Εικόνα 28Β) είχε παρόμοια δομή με εκείνη του προγράμματος «RNAfold webserver» ενώ η δεύτερη έχει μεγάλη ομοιότητα με τη δομή της φυσιολογικής (Εικόνα 28Γ).

Είναι σημαντικό να σχολιαστεί το αντίκτυπο της ένθεσης στο μόριο του mt-tRNA^{Phe}. Η 596insC έγινε στο βρόχο DHU του tRNA^{Phe}. Ο βρόχος αυτός αναγνωρίζεται από την αμινοάκυλο συνθετάση, της οποίας ο ρόλος είναι να φορτίσει το tRNA με το αμινοξύ Phe (Hendrickson, 2001). Η μετάλλαξη αυτή μπορεί να επηρεάζει την αμινοακυλίωση του μορίου και να δημιουργεί σοβαρά προβλήματα στην πρωτεϊνοσύνθεση μέσα στο μιτοχόνδριο.



Εικόνα 27: Προσομοίωση δευτεροταγούς δομής mt-tRNA^{Phe} μέσω του προγράμματος βιοπληροφορικής «RNAfold webserver». A) στην εικόνα φαίνεται η δομή του mt-tRNA^{Phe} με τη φυσιολογική αλληλουχία της όπου έχει την αναμενόμενη διαμόρφωση. B) στο σχήμα φαίνεται η διαμόρφωση του mt-tRNA^{Phe} με τη μετάλλαξη 596insC. Με κόκκινο βέλος επιδεικνύεται το σημείο της μετάλλαξης.



Εικόνα 28: Δευτεροταγείς δομές mt-tRNA^{Phe} A) πιθανή διαμόρφωση της φυσιολογικής αλληλουχίας ($G = -11$ kcal/mol). B) η πιο πιθανή διαμόρφωση της μεταλλαγμένης αλληλουχίας ($G = -11,40$ kcal/mol). Γ) η δεύτερη πιο πιθανή διαμόρφωση της μεταλλαγμένης αλληλουχίας ($\Delta G = -11,10$ kcal/mol). Παρατηρούμε ότι οι δομές Γ και Α είναι αρκετά παρόμοιες. Τα χρώματα των βάσεων εκφράζουν τη πιθανότητα οι *in silico* δεσμοί να αντιστοιχούν στους *in vivo*, σύμφωνα με το υπόμνημα της εικόνας.

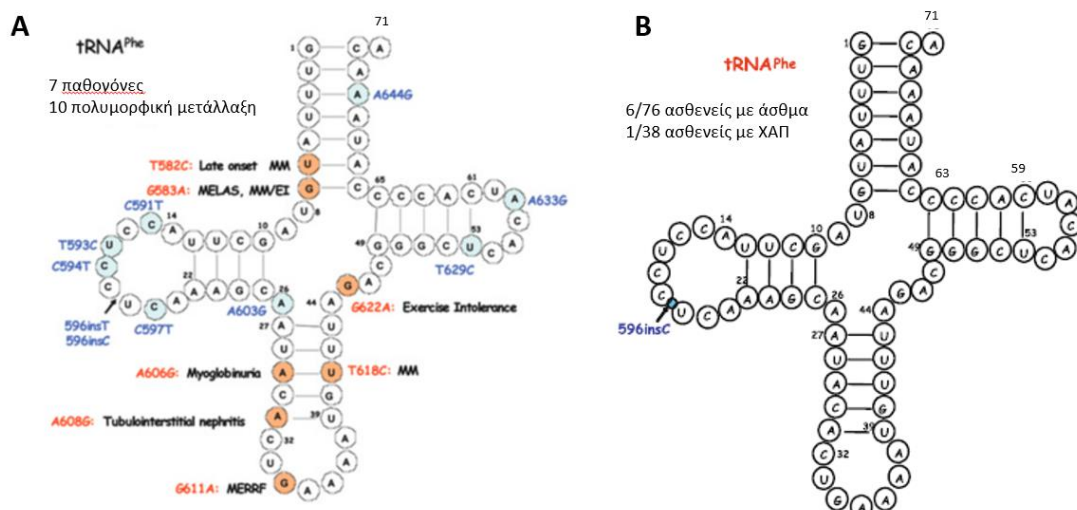
Για την περαιτέρω διερεύνηση του αντίκτυπου που μπορεί να έχει η μετάλλαξη στο μόριο mt-tRNA^{Phe}, πραγματοποιήθηκε ένας έλεγχος στο BLAST. Ως αλληλουχία επερώτησης ορίστηκε η αλληλουχία του γονιδίου με την μετάλλαξη και τελικά βρέθηκαν 114 αλληλουχίες με 100% ομοιότητα. Οι αλληλουχίες αυτές προέκυψαν κυρίως από την ανάλυση απλοομάδων. Οι απλοομάδες ορίζονται ως πολυμορφικές αλληλουχίες mtDNA, οι οποίες έχουν προκύψει τουλάχιστον 150.000 χρόνια πριν και συσχετίζονται με τη γεωγραφική προέλευση των πληθυσμών (Kenney et al, 2012). Επομένως, φαίνεται η αλληλουχία αυτή να συναντάται στο γονιδίωμα πολλών ανθρώπων. Παράλληλα, χρησιμοποιήθηκε και η βάση δεδομένων MITOMAP, όπου η μετάλλαξη 596insC φαίνεται ότι έχει βρεθεί σε απλοομάδες, σε ποσοστό μεγαλύτερο του 50% των ατόμων που αναλύθηκαν, όπως περιγράφεται στον πίνακα 4.

Ποσοστό εμφάνισης της ένθεσης 596insC σε απλοομάδες

Απλοομάδα	Ποσοστό συνάντησης της μετάλλαξης 596insC
C5a	63,40%
C5b	86,40%
C5c	61,10%
C5d	73,50%

Πίνακας 4: Συσχέτιση της μετάλλαξης 596insC με υποομάδες της απλοομάδας C5.

Η μετάλλαξη 596insC είχε χαρακτηριστεί αρχικά ως μία πολυμορφική θέση (Zifa et al, 2007). Το 2012, η μετάλλαξη αυτή βρέθηκε με μεγάλη στατιστική σημαντικότητα ($p_{\text{value}} < 0.01$) σε ασθενείς με άσθμα. Αναλυτικότερα, η 596insC ανιχνεύτηκε σε 6/76 ασθενείς αλλά σε κανένα υγιή (Zifa et al, 2012). Ωστόσο, δεν εντοπίστηκε σε ασθενείς με IPF και σαρκοείδωση (Daniil et al, 2018). Πρέπει να συνεχιστεί και να διευρυνθεί η έρευνα για να μπορέσει να υπάρξει ένα στατιστικά σημαντικό συμπέρασμα για την παθογένεια της μετάλλαξης, λαμβάνοντας υπόψη την ύπαρξη της ένθεσης αυτής και σε ορισμένες απλοομάδες. Υπάρχει μία σύνδεση μεταξύ της απλοομάδας C5 και της μετάλλαξης. Βέβαια χρειαζόμαστε περισσότερα στοιχεία για να γίνει η συσχέτιση της απλοομάδας C5 με τη ΧΑΠ.



Εικόνα 29: Στις εικόνες A και B φαίνεται η δευτεροταγής δομή του mt-tRNA^{Phe}. A) Με κόκκινο χρώμα φαίνονται οι θέσεις των μεταλλάξεων που το 2007 είχαν χαρακτηριστεί παθογόνες και με μπλε χρώμα οι μη παθογόνες ή πολυμορφικές θέσεις. Επίσης παρουσιάζονται και οι ασθένειες στις οποίες έχουν εντοπιστεί οι μεταλλάξεις (Zifa et al, 2007). B) Στο mt-tRNA^{Phe} φαίνεται μόνο η μετάλλαξη 596insC που ανιχνεύθηκε σε έναν ασθενή με ΧΑΠ και σε έξι ασθενείς με άσθμα.

Τελική εκτίμηση των αποτελεσμάτων όλης της έρευνας

Η μελέτη που διεξάγεται στο Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας έχει ως στόχο τον έλεγχο της ύπαρξης μεταλλάξεων στα 22 mt-tRNAs σε ασθενείς με ΧΑΠ. Έως σήμερα έχει γίνει έλεγχος στα γονίδια mt-tRNA^{Gly}, mt-tRNA^{Leu(UUR)}, mt-tRNA^{Met}, mt-tRNA^{Ile}, mt-tRNA^{Gln}, mt-tRNA^{Asn}, mt-tRNA^{Tyr}, mt-tRNA^{Cys}, mt-tRNA^{Glu}, mt-tRNA^{Arg}, mt-tRNA^{Val}, mt-tRNA^{Phe}, mt-tRNA^{His}, mt-tRNA^{Leu(CUN)} και mt-tRNA^{Ser(AGY)} (15/22 mt-tRNAs) σε μία ομάδα 38 ασθενών με ΧΑΠ. Εκτός από τη μετάλλαξη που βρέθηκε στην παρούσα εργασία, δηλαδή εκτός από την 596insC στο mt-tRNA^{Phe}, έχουν βρεθεί μεταλλάξεις στα γονίδια mt-tRNA^{Glu} (A14696G) σε 4/38 ασθενείς, mt-tRNA^{Arg} (T10463C) σε 1/38 ασθενείς, στο γονίδιο MT-ND3 (A10398G) σε 14/38 ασθενείς, μία στο mt-tRNA^{Gln} (T4336C) σε 2/38 ασθενείς, ακόμη μία στο mt-tRNA^{Leu(CUN)} (A12308G) σε 9/38 ασθενείς και τέλος δύο στην παρακείμενη αλληλουχία του mt-tRNA^{Leu(UUR)}, στο γονίδιο 16SrRNA (T3197C και C3212T) σε 5/38 ασθενείς (Πίνακας 5).

Χαρακτηριστικά ασθενών ΧΑΠ που φέρουν μεταλλάξεις.

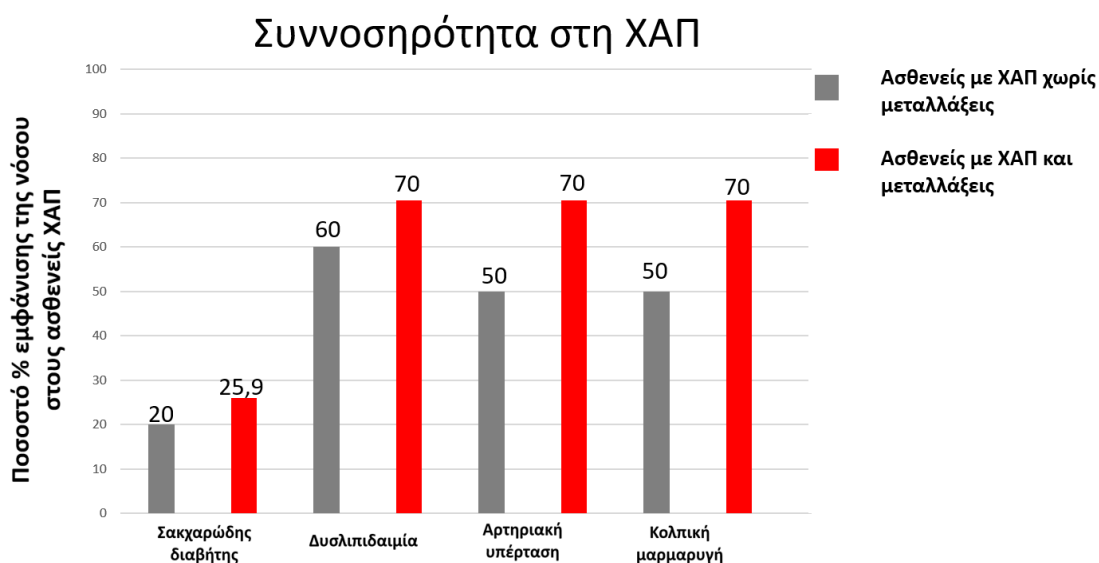
Δείγμα	Φύλο	Ηλικία	Στάδιο ΧΑΠ	Καπνιστές	Μεταλλάξεις								
1	A	83	3	ΝΑΙ	A10398G								
2	A	79	2	ΝΑΙ	A10398G								
4	A	82	2	ΝΑΙ	A10398G	A12308G							
5	Θ	69	2	ΝΑΙ	A10398G	A12308G				T3197C	C3112T		
6	A	51	2	ΝΑΙ		A12308G				T3197C	C3112T		
7	A	66	2	ΝΑΙ	A10398G								
8	A	76	2	ΝΑΙ	A10398G								
9	A	69	1	ΝΑΙ	A10398G								
10	Θ	55		ΟΧΙ	A10398G	A12308G							
11	A	66	2	ΝΑΙ						T3197C	C3112T		
13	Θ	64	2	ΝΑΙ	A10398G	A12308G				T3197C	C3112T		
14	Θ	74		ΟΧΙ	A10398G								
15	A	69	3	ΝΑΙ		A12308G							
16	A	69	4	ΝΑΙ						T3197C	C3112T		
17	Θ			ΟΧΙ				T10463C					
18	A	67	2	ΝΑΙ	A10398G				596insC				
19	A	56	2	ΝΑΙ	A10398G								
20	A	79		ΟΧΙ				T10463C					
21	A	60		ΟΧΙ		A12308G							
23	A	69	2	ΝΑΙ								T4336C	
25	A	65	4	ΝΑΙ	A10398G								
28	A	70	4	ΝΑΙ		A12308G							
29	A	62	4	ΝΑΙ	A10398G								
31	A	69	1	ΝΑΙ				T10463C					
32	Θ	73	1	ΝΑΙ			A14696G						
34	A	59	2	ΝΑΙ								T4336C	
35	A	81	2	ΝΑΙ		A12308G							
38	A	66	3	ΝΑΙ				T10463C					

Πίνακας 5: Χαρακτηριστικά ασθενών ΧΑΠ που φέρουν μεταλλάξεις. Αριθμός δείγματος, ηλικία, φύλο, Στάδιο της ΧΑΠ (δεν υπάρχουν όλα τα δεδομένα), το εάν καπνίζει ή όχι και οι μεταλλάξεις που εμφανίζονται σε κάθε ασθενή.

Είναι σημαντικό να πούμε ότι 23/28 ασθενείς που φέρουν μεταλλάξεις είναι καπνιστές. Βέβαια επειδή 33/38 ασθενείς ήταν καπνιστές δεν μπορεί να γίνει κάποια συσχέτιση του καπνίσματος με το αν ο ασθενής θα φέρει ή όχι κάποια μετάλλαξη. Ως προς την ηλικία, ο μέσος όρος ηλικίας των ασθενών με μετάλλαξη είναι τα 68,4 χρόνια ενώ ο γενικός μέσος όρος των ασθενών είναι τα 68,1 έτη. Επομένως, φαίνεται ότι η ηλικία δεν επηρεάζει σημαντικά την ύπαρξη μεταλλάξεων. Επιπλέον, οι περισσότεροι ασθενείς που εμφανίζουν μεταλλάξεις βρίσκονται στο στάδιο 2 αλλά

και πάλι δεν μπορεί να γίνει κάποια συσχέτιση του σταδίου της ΧΑΠ με την εμφάνιση μεταλλάξεων γιατί στο σύνολο των ασθενών υπερτερεί το στάδιο 2 είτε έχουν μετάλλαξη είτε όχι.

Ένα άλλο χαρακτηριστικό που μελετήθηκε ήταν και η συννοσηρότητα της ΧΑΠ. Οι ασθενείς με ΧΑΠ φαίνεται ότι πάσχουν σε μεγάλα ποσοστά και από άλλες νόσους κυρίως καρδιαγγειακές. Συγκεκριμένα στο διάγραμμα παρουσιάζονται τα ποσοστά εμφάνισης των ασθενειών του σακχαρώδη διαβήτη, της δυσλιπιδαιμίας, της αρτηριακής υπέρτασης και της κοιλιακής μαρμαρυγής, στους ασθενείς με ΧΑΠ. Οι νόσοι αυτές είναι οι πιο συχνές και σημαντικές. Βέβαια, δεν παρατηρείται κάποια στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ της συννοσηρότητας στους ασθενείς με και χωρίς μεταλλάξεις. Η στατιστική σημαντικότητα δεν είναι απόλυτη καθώς το δείγμα μελέτης μας είναι μικρό. Είναι εμφανής η τάση ότι ασθενείς στους οποίους δεν έχουν βρεθεί μεταλλάξεις, πάσχουν από λιγότερες καρδιαγγειακές ασθένειες συγκριτικά με τους ασθενείς ΧΑΠ με μεταλλάξεις.



Διάγραμμα 1: Παρουσιάζονται επί τοις εκατό τα ποσοστά εμφάνισης της κάθε νόσου στους ασθενείς της ΧΑΠ που έχουν μεταλλάξεις (κόκκινη) και στους ασθενείς ΧΑΠ που δεν έχει βρεθεί ακόμα κάποια μετάλλαξη (γκρι). Οι διαφορές μεταξύ των ασθενών με μετάλλαξη και χωρίς μετάλλαξη σε κάθε νόσο δεν είναι στατιστικώς σημαντική. Πάνω από την κάθε στήλη φαίνεται η τιμή του ποσοστού στα 100.

Επιπλέον, επιστημονικό ενδιαφέρον παρουσιάζει ο συνδυασμός των μεταλλάξεων ανάμεσα σε ασθενείς και υγιείς. Φαίνεται ότι από τα 38 δείγματα ΧΑΠ

προέκυψαν 4 συνδυασμοί μεταλλάξεων οι οποίοι δεν εμφανίζονται στους υγιείς. Στους 4 αυτούς μοναδικούς συνδυασμούς, φαίνεται ότι οι μεταλλάξεις A10398G και A12308G συνυπάρχουν. Η ταυτόχρονη ύπαρξη των δύο μεταλλάξεων έχει συσχετιστεί με αυξημένη πιθανότητα εμφάνισης καρκίνου του μαστού. Στους 38 ασθενείς οι 2 αυτές μεταλλάξεις βρέθηκαν μαζί σε 4 ασθενείς, 3 εκ των οποίων είναι γυναίκες. Πρέπει να λάβουμε υπόψη μας ότι μόνο 5/38 ασθενείς ήταν γυναίκες και οι 3 εμφανίζουν τον συνδυασμό των μεταλλάξεων. Επομένως, κρίνουμε καλό να ενημερωθούν οι συγκεκριμένοι ασθενείς έτσι ώστε να προληφθεί μία πιθανή πάθηση. Είναι ακόμα σημαντικό, να αναφέρουμε ότι όλες οι μεταλλάξεις που βρέθηκαν είχαν συσχετιστεί σε σημαντικό βαθμό με πολλές νόσους που σχετίζονταν κυρίως με την ακοή, νευρολογικές, ψυχιατρικές παθήσεις και άλλες.

Σύγκριση με άλλες πνευμονικές νόσους

Είναι απαραίτητο να συνεξετάσουμε τα αποτελέσματα που έχουμε έως τώρα για τη ΧΑΠ, με εκείνα που έχουμε στην IPF, στη σαρκοείδωση και στο άσθμα. Στον πίνακα 6, συνοψίζονται οι μεταλλάξεις στους υγιείς και στους ασθενείς της κάθε νόσου.

Μεταλλάξεις ασθενών της ΧΑΠ που εμφανίζονται και σε άλλες πνευμονικές νόσους.

Γονίδια	Μετάλλαξη	Υγιείς – control για τις νόσους ΧΑΠ, IPF και σαρκοείδωση	Ασθενείς με ΧΑΠ και με μετάλλαξη	Ασθενείς με IPF και με μετάλλαξη	Ασθενείς με σαρκοείδωση και με μετάλλαξη	Υγιείς – control για το άσθμα	Ασθενείς με άσθμα και 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(UUR)}	-						
tRNA ^{Phe}	596insC	0/204	1/38 (2,6%)	-	-	0/100 (0%)	6/76 (7,9%) **
tRNA ^{Val}	-						
tRNA ^{Glu}	A14696G	0/204	1/38 (2,6%)	-	-		-
tRNA ^{Arg}	T10463C	6/204 (2%)	4/38 (11%)	11/40 (27,5%)***	13/85 (15%)***		-
tRNA ^{His}	-						
tRNA ^{Ser(AGY)}	-						
tRNA ^{Leu(CUN)}	A12308G	27/204 (13,2%)	9/38 (21,1%)	8/40 (20%)	13/85 (15,3%)	4/100 (4%)	21/76 (27,6%)***
16SrRNA	T3197C	1/204 (0,5%)	5/38 (13%) *	2/40 (5%)	7/85 (8,3%) **	2/100 (2%)	3/76 (3,9%)
16SrRNA	C3212T	0/204 (0%)	5/38 (13%) *	-	-		-
ND3	A10398G	12/204 (5,4%)	14/38 (36,8%)***	11/40 (27,5%) ***	18/85 (21,2)***	11/100 (11%)	6/76 (7,9%)

Πίνακας 6: Τα 15 mt-tRNA γονίδια που έχουν μελετηθεί στη ΧΑΠ με τις μεταλλάξεις που εμφάνισαν και τα γονίδια 16SrRNA και ND3, τα οποία βρίσκονται στις παρακείμενες περιοχές των mt-tRNA γονιδίων. Γίνεται σύγκριση της ύπαρξης των

μεταλλάξεων που βρέθηκαν στη ΧΑΠ για την ύπαρξή της ή όχι στην ιδιοπαθή πνευμονική ίνωση (IPF), στη σαρκοείδωση και στο άσθμα. Στον πίνακα με αστερίσκο δηλώνεται η στατιστική σημαντικότητα όπου * $p_{value} < 0,05$, ** $p_{value} < 0,01$ και *** $p_{value} < 0,001$. Με διαφορετικό χρώμα σημαίνεται η μετάλλαξη που αναλύεται στην παρούσα εργασία.

Ένα ακόμα σημαντικό στοιχείο που ανέκυψε από τη μελέτη αυτή είναι η συσχέτιση της βαρύτητας των πνευμονικών νόσων που έχουν μιτοχονδριακή συνιστώσα με το ποσοστό μεταλλάξεων στους ασθενείς. Η IPF που εμφανίζει πιο βαριά συμπτώματα έχει και τις περισσότερες μεταλλάξεις ανά ασθενείς (95%) και πολλούς συνδυασμούς μεταλλάξεων μόνο σε ασθενείς (15). Ακολουθεί η σαρκοείδωση με προσδόκιμο ζωής τα 6 χρόνια και ποσοστό μεταλλάξεων στους ασθενείς 81% και ίδιο αριθμό ασθενών με συνδυασμό μεταλλάξεων μόνο σε ασθενείς (Daniil et al, 2018). Τέλος, το άσθμα που είναι πιο ήπια ασθένεια συγκριτικά με τις IPF και σαρκοείδωση, εμφανίζει το μικρότερο αριθμό ασθενών με μετάλλαξη (73,6%) και συνδυασμό μεταλλάξεων μόνο σε ασθενείς (9) (Zifa et al, 2012). Τα αποτελέσματα για τη ΧΑΠ αναμένουμε όταν ολοκληρωθεί η μελέτη όλων των mt-tRNA γονιδίων να είναι μεταξύ της σαρκοείδωσης και του άσθματος. Η σύνοψη των ασθενειών και των μεταλλάξεων που έχουν βρεθεί σε αυτές γίνεται στον πίνακα 7.

Συσχέτιση μεταλλάξεων στο mtDNA με τη βαρύτητα πνευμονικών νόσων				
Ασθένειες	IPF	Σαρκοείδωση	Άσθμα	ΧΑΠ (15/22 tRNA)
Προσδόκιμο ζωής (χρόνια)	2-5	6	18	4-10
Αριθμός μεταλλάξεων mtDNA	32	45	10	8 (δεν έχει ολοκληρωθεί)
Ασθενείς με μεταλλάξεις	38/40 (95%)	69/85 (81%)	56/76 (73,6%)	28/38 (73,7%) (δεν έχει ολοκληρωθεί)
Συνδυασμοί μόνο στους ασθενείς	15	15	9	4 (δεν έχει ολοκληρωθεί)

Πίνακας 7: Παρουσιάζονται οι ασθενείς IPF, σαρκοείδωση, άσθμα και ΧΑΠ, το προσδόκιμο ζωής τους, ο αριθμός μεταλλάξεων στο mtDNA τους (mt-tRNA γονίδια και παρακείμενες περιοχές).

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα αυτά είναι ενθαρρυντικά για την συνέχεια της έρευνας. Φαίνεται ήδη να υπάρχει συσχέτιση της ΧΑΠ με αρκετές μεταλλάξεις, οι οποίες έχουν βρεθεί να συμμετέχουν και σε άλλες νόσους. Αναμένεται η ολοκλήρωση της έρευνας για την εξαγωγή του τελικού συμπεράσματος, για το ρόλο των μεταλλάξεων στη Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια (ΧΑΠ). Τέλος, πρέπει να αναφερθεί ότι η ανίχνευση αυτών των μεταλλάξεων είναι το πρώτο βήμα καθώς μένει ακόμα να διερευνηθεί ο τρόπος με τον οποίο πιθανόν συμβάλουν οι μεταλλάξεις αυτές στη παθογένεια της κάθε νόσου, μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης.

6. Βιβλιογραφία

1. Adamson, J., Haswell, L. E., Phillips, G., & Gaça, M. D. (2011). In vitro models of chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Bronchitis, ed. I Martin-Loeches. InTech*, 41-66.
2. Agrawal, A., & Mabalirajan, U. (2016). Rejuvenating cellular respiration for optimizing respiratory function: targeting mitochondria. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*, 310(2), L103–L113.
3. Barnes PJ. Oxidative Stress in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Antioxidants*. 2022; 11(5):965. <https://doi.org/10.3390/antiox11050965>
4. Barnes, P. J. (2017). Cellular and molecular mechanisms of asthma and COPD. *Clinical Science*, 131(13), 1541-1558.
5. Barnes, P. J. (2019). Small airway fibrosis in COPD. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 116, 105598.
6. Birch, J., Barnes, P. J., & Passos, J. F. (2018). Mitochondria, telomeres and cell senescence: implications for lung ageing and disease. *Pharmacology & therapeutics*, 183, 34-49.
7. Bock, F. J., & Tait, S. W. (2020). Mitochondria as multifaceted regulators of cell death. *Nature reviews Molecular cell biology*, 21(2), 85-100.
8. Brookes, P. S., Yoon, Y., Robotham, J. L., Anders, M. W., & Sheu, S. S. (2004). Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*.

9. Carrell, R. W., & Lomas, D. A. (2002). Alpha1-antitrypsin deficiency—a model for conformational diseases. *New England Journal of Medicine*, 346(1), 45-53.
10. Cloonan, S. M., Kim, K., Esteves, P., Trian, T., & Barnes, P. J. (2020). Mitochondrial dysfunction in lung ageing and disease. *European Respiratory Review*, 29(157).
11. Cooper, G., Hausman, R. (2016). *The cell: a molecular approach*. Oxford University Press.
12. Daniil, Z., Kotsiou, O. S., Grammatikopoulos, A., Peletidou, S., Gkika, H., Malli, F., ... & Zifa, E. (2018). Detection of mitochondrial transfer RNA (mt-tRNA) gene mutations in patients with idiopathic pulmonary fibrosis and sarcoidosis. *Mitochondrion*, 43, 43-52.
13. Ding, Y., Gao, B., & Huang, J. (2022). Mitochondrial Cardiomyopathy: The Roles of mt-tRNA Mutations. *Journal of Clinical Medicine*, 11(21), 6431.
14. Dong, Y., & Zhu, H. (2005). Single-strand conformational polymorphism analysis: basic principles and routine practice. *Methods in molecular medicine*, 108, 149–157. <https://doi.org/10.1385/1-59259-850-1:149>
15. Fischer, B. M., Pavlisko, E., & Voynow, J. A. (2011). Pathogenic triad in COPD: oxidative stress, protease–antiprotease imbalance, and inflammation. *International journal of chronic obstructive pulmonary disease*, 413-421.
16. Gohy, S., Carlier, F. M., Fregimilicka, C., Detry, B., Lecocq, M., Ladjemi, M. Z., ... & Pilette, C. (2019). Altered generation of ciliated cells in chronic obstructive pulmonary disease. *Scientific reports*, 9(1), 1-12.
17. Gorman, G. S., Chinnery, P. F., DiMauro, S., Hirano, M., Koga, Y., McFarland, R., Suomalainen, A., Thorburn, D. R., Zeviani, M., & Turnbull, D. M. (2016). Mitochondrial diseases. *Nature reviews. Disease primers*, 2, 16080. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.80>
18. Hara, H., Kuwano, K., & Araya, J. (2018). Mitochondrial quality control in COPD and IPF. *Cells*, 7(8), 86.
19. Hendrickson, T. L. (2001). Recognizing the D-loop of transfer RNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(24), 13473-13475.
20. Higham, A., Quinn, A. M., Cançado, J. E. D., & Singh, D. (2019). The pathology of small airways disease in COPD: historical aspects and future directions. *Respiratory research*, 20(1), 1-11.

21. Hoffmann, R. F., Zarrintan, S., Brandenburg, S. M., Kol, A., de Bruin, H. G., Jafari, S., ... & Heijink, I. H. (2013). Prolonged cigarette smoke exposure alters mitochondrial structure and function in airway epithelial cells. *Respiratory research*, *14*(1), 1-13.
22. Hoigate, ST. & Frew, A. 2002, 'Respiratory disease'. Clark, M., Kumar, P., In *Clinical Medicine 5th Edition*. Elsevier.
23. Huisain, A. 2018. 'Lungs'. V., Kumar, A., Abbas, J., Aster. In *Robbins Basic Pathology 10th edition*. Elsevier Inc.
24. Jankowich, M. 2016. 'Obstructive Pulmonary Diseases'. I. Benjamin, R. Criggs, E. Wing, G. Fitz. *Andreoli and Capenter's CECIL ESSENTIALS OF MEDICINE 9th edition*. ELSEVIE.
25. Kenney, M. C., Ferrington, D. A., & Udar, N. (2012). Mitochondrial Genetics of Retinal Disease. In *Retina Fifth Edition* (pp. 635-641). Elsevier Inc..
26. Liu, J., Huang, J., Liu, H., Chen, C., Xu, J., & Zhong, L. (2021). Elevated serum 4HNE plus decreased serum thioredoxin: Unique feature and implications for acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease. *PloS one*, *16*(1), e0245810.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0245810>
27. Liu, Q., Gao, Y., & Ci, X. (2019). Role of Nrf2 and its activators in respiratory diseases. *Oxidative medicine and cellular longevity*, *2019*.Loer, S. A., Scheeren, T. W., & Tarnow, J. (1997). How much oxygen does the human lung consume?. *Anesthesiology*, *86*(3), 532–537. <https://doi.org/10.1097/00000542-199703000-00004>
28. Onishi, M., Yamano, K., Sato, M., Matsuda, N., & Okamoto, K. (2021). Molecular mechanisms and physiological functions of mitophagy. *The EMBO journal*, *40*(3), e104705.
29. Orozco-Levi, M., Garcia-Aymerich, J., Villar, J., Ramírez-Sarmiento, A., Antó, J. M., & Gea, J. (2006). Wood smoke exposure and risk of chronic obstructive pulmonary disease. *The European respiratory journal*, *27*(3), 542–546. <https://doi.org/10.1183/09031936.06.00052705>
30. Peng, T. I., & Jou, M. J. (2010). Oxidative stress caused by mitochondrial calcium overload. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1201*(1), 183-188.

31. Pia S, Lui F. Melas Syndrome. [Updated 2022 Dec 22]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK532959/>
32. Popov, L. D. (2020). Mitochondrial biogenesis: An update. *Journal of cellular and molecular medicine*, 24(9), 4892-4899.
33. Riley, J. S., Quarato, G., Cloix, C., Lopez, J., O'Prey, J., Pearson, M., ... & Tait, S. W. (2018). Mitochondrial inner membrane permeabilisation enables mt DNA release during apoptosis. *The EMBO journal*, 37(17), e99238.
34. Ryu, C., Brandsdorfer, C., Adams, T., Hu, B., Kelleher, D. W., Yaggi, M., ... & Herzog, E. L. (2019). Plasma mitochondrial DNA is associated with extrapulmonary sarcoidosis. *European Respiratory Journal*, 54(2).
35. Sharma, A., Ahmad, S., Ahmad, T., Ali, S., & Syed, M. A. (2021). Mitochondrial dynamics and mitophagy in lung disorders. *Life Sciences*, 284, 119876.
36. Stoller, J. K. (2016). Alpha-1 antitrypsin deficiency: An underrecognized, treatable cause of COPD. *Cleve Clin J Med*, 83(7), 507-14.
37. Taanman J. W. (1999). The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication. *Biochimica et biophysica acta*, 1410(2), 103–123. [https://doi.org/10.1016/s0005-2728\(98\)00161-3](https://doi.org/10.1016/s0005-2728(98)00161-3)
38. Tsuji, T., Aoshiba, K., & Nagai, A. (2004). Cigarette smoke induces senescence in alveolar epithelial cells. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 31(6), 643-649.
39. Tymoczko, J., Berg, J., Stryer, L. (2015). *Biochemistry, A Short Course*. W. H Freeman and Company.
40. Ungvari, Z., Tarantini, S., Donato, A. J., Galvan, V., & Csiszar, A. (2018). Mechanisms of Vascular Aging. *Circulation research*, 123(7), 849–867. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.118.311378>
41. Zhou, W. C., Qu, J., Xie, S. Y., Sun, Y., & Yao, H. W. (2021). Mitochondrial dysfunction in chronic respiratory diseases: implications for the pathogenesis and potential therapeutics. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2021.
42. Zifa, E., Daniil, Z., Skoumi, E., Stavrou, M., Papadimitriou, K., Terzenidou, M., ... & Mamuris, Z. (2012). Mitochondrial genetic background plays a role in increasing risk to asthma. *Molecular biology reports*, 39, 4697-4708.

43. 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.