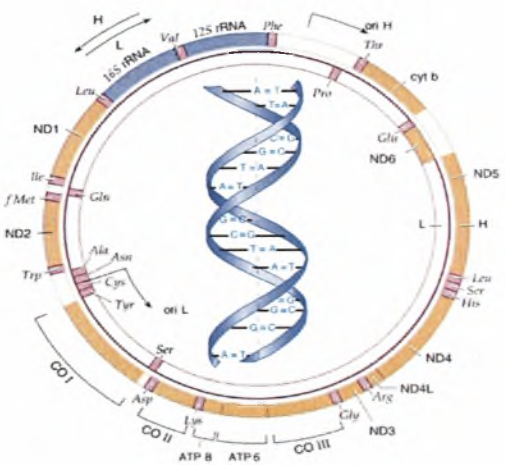
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΜΕΛΕΤΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ ΣΕ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΑ tRNA ΓΟΝΙΔΙΑ ΣΕ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΟ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟ ΕΛΛΗΝΙΚΟ ΠΛΗΘΥΣΜΟ



ΑΡΧΟΝΤΙΑ ΚΑΜΙΝΑΡΗ

ΛΑΡΙΣΑ 2008

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»

Αριθ. Εισ.:	6588/1
Ημερ. Εισ.:	11-03-2009
Δωρεά:	Π.Θ.
Ταξιθετικός Κωδικός:	ΠΤ - ΒΒ
	2008
	ΚΑΜ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
004000087352

ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Γενετικής, Συγκριτικής & Εξελικτικής Βιολογίας του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κατά το έτος 2007-2008, υπό την επίβλεψη της κας Αιμιλίας Ζίφα.

Η τριμελής εξεταστική επιτροπή αποτελείται από τους :

Αιμιλία Ζίφα, Επίκουρος Καθηγήτρια Βιολογίας / Νευροβιολογίας, Τμήμα Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας.

Κωνσταντίνος Σταθόπουλος, Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας.

Ζήσης Μαμούρης, Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών, Τμήμα Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ:

Τη καθηγήτρια μου Α. Ζίφα για την πολύτιμη καθοδήγηση, τις ιδιαίτερες συμβουλές και την υπομονή που μου παρείχε σε όλη τη διάρκεια εκπόνησης της παρούσας εργασίας. Επιπλέον, τους κ. Σταθόπουλο και κ. Μαμούρη για τις συμβουλές τους, όποτε τις χρειάστηκα.

Τους υποψήφιους διδάκτορες Κ. Σταμάτη και Λ. Κουτσογιαννούλη για την επιστημονική υποστήριξη τους κατά την εκτέλεση του πειραματικού μέρους.

Τον συνάδελφό μου Π. Θεοτόκη για την άψογη συνεργασία και τη βοήθεια του στην εκτέλεση του μεγαλύτερου μέρους της πειραματικής εργασίας.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΠΕΡΙΛΗΨΗ 4
1. ABSTRACT.....5
2. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....6
2.1 ΓΕΝΙΚΑ ΓΙΑ ΤΑ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑ.....6
2.2 ΔΟΜΗ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΟΥ.....7
2.3 ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΟΥ.....8
2.4 ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ.....10
2.5 ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑ.....11
2.5.1 ΑΝΤΙΓΡΑΦΗ, ΜΕΤΑΓΡΑΦΗ & ΜΕΤΑΦΡΑΣΗ ΤΟΥ mtDNA.....12
2.5.2 ΠΟΙΚΙΛΟΜΟΡΦΙΑ ΣΤΟ ΓΕΝΕΤΙΚΟ ΚΩΔΙΚΑ.....13
2.6 ΓΕΝΙΚΑ ΓΙΑ ΤΑ ΜΟΡΙΑ tRNA.....14
2.6.1 ΥΠΟΘΕΣΗ ΤΑΛΑΝΤΕΥΣΗΣ.....14
2.6.2 ΔΟΜΗ tRNA 15
2.6.3 ΠΑΘΟΓΟΝΕΣ & ΟΥΔΕΤΕΡΕΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ ΣΕ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΑ tRNA ΓΟΝΙΔΙΑ.....16
2.7. ΓΕΝΙΚΑ ΓΙΑ ΤΟΥΣ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥΣ.....23
2.7.1 ΓΕΝΕΤΙΚΟΙ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ.....23
2.7.2 ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ ΜΟΝΟΥ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΟΥ (SNPs).....23
2.8 ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟΙ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ & Η ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΟΥΣ.....25
2.8.1 ΕΞΕΛΙΚΤΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ.....25
2.8.2 ΑΝΘΡΩΠΙΝΕΣ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΕΣ ΑΠΛΟΟΜΑΔΕΣ.....26
2.9 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....28
3. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ.....29
3.1 ΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΥΛΙΚΟ.....29
3.2 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA.....29
3.3 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR).....31
3.3.1 ΓΕΝΙΚΑ ΓΙΑ ΤΗΝ PCR.....31
3.3.2. ΑΡΧΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ.....32
3.3.3 ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ tRNA.....33
3.3.4 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΕΝΙΣΧΥΣΗΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ PCR.....34
3.3.5 ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ PCR ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ.....35
3.4 ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥ ΜΟΝΟΚΛΩΝΗΣ ΑΛΥΣΙΔΑΣ (SSCP).....36
3.4.1 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΤΩΝ PCR ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ.....37
3.4.2 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΠΗΚΤΗΣ ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΙΟΥ.....37
3.4.3 ΧΡΩΣΗ ΝΙΤΡΙΚΟΥ ΑΡΓΥΡΟΥ (SILVER STAINING).....38
3.5 ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ DNA (DNA SEQUENCING).....39

3.5.1 ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ PCR ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ.....39
3.5.2 ΜΕΘΟΔΟΣ SANGER.....40
3.5.3 ΦΘΟΡΙΖΟΥΣΑ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ DNA (DYE TERMINATION SEQUENCING).....41
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....42
4.1 ΓΟΝΙΔΙΟ $tRNA^{Leu(UUR)}$.....42
4.2 ΓΟΝΙΔΙΑ $tRNA^{His}$, $tRNA^{Ser(AGY)}$, $tRNA^{Leu(CUN)}$.....45
4.3 ΓΟΝΙΔΙΟ $tRNA^{Lys}$.....46
4.4 ΣΥΝΟΨΗ.....48
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....49
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....52

1. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ένας μεγάλος αριθμός μεταλλάξεων που ανιχνεύθηκαν σε μιτοχονδριακά γονίδια tRNA έχει συνδεθεί τα τελευταία χρόνια με την εμφάνιση εξαιρετικά ετερογενών ασθενειών με ποικίλα κλινικά συμπτώματα στον άνθρωπο. Ο λόγος για τον οποίο συμβαίνει αυτό έγκειται στον κεντρικό ρόλο των μορίων tRNA στη μιτοχονδριακή πρωτεϊνοσύνθεση, όπου εμπλέκονται στη σύνθεση ενζύμων απαραίτητων για τον ενεργειακό μεταβολισμό. Στην πλειοψηφία των μιτοχονδριακών μορίων tRNA έχουν παρατηρηθεί τόσο πολυμορφικές μεταλλάξεις, όσο και μεταλλάξεις οι οποίες έχουν χαρακτηρισθεί ως παθογόνες. Οι πρώτες δεν επηρεάζουν τη δομική ακεραιότητα ή τη λειτουργικότητα των μιτοχονδριακών tRNAs και συνεισφέρουν στη ποικιλομορφία μεταξύ των ανθρώπινων πληθυσμών. Στη παρούσα μελέτη εξετάστηκε η ύπαρξη τέτοιων πολυμορφισμών στα γονίδια $tRNA^{Leu(UUR)}$, $tRNA^{Lys}$, $tRNA^{His}$, $tRNA^{Ser(AGY)}$ και $RNA^{Leu(CUN)}$ σε ελληνικό πληθυσμό φυσιολογικών ατόμων· μελέτη η οποία διεξάγεται για πρώτη φορά στον Ελλαδικό χώρο. Τα συγκεκριμένα γονίδια επιλέχθηκαν διότι συγκεντρώνουν, σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία, αρκετά υψηλό αριθμό ουδέτερων πολυμορφισμών: Τα δύο πρώτα γονίδια συγκεντρώνουν μικρότερο αριθμό ουδέτερων πολυμορφισμών (7 και 9 αντίστοιχα), ενώ τα τρία τελευταία μεγαλύτερο (11, 13 και 11 αντίστοιχα). Ειδικότερα, από δείγματα ολικού αίματος 150 ατόμων, απομονώθηκαν και ενισχύθηκαν με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) τα παραπάνω γονίδια καθώς και τμήματα των παρακείμενων γονιδίων τους. Ακολούθως, η ανίχνευση των πολυμορφισμών στα προϊόντα PCR πραγματοποιήθηκε με την τεχνική του πολυμορφισμού διάταξης μονήρους αλυσίδας (SSCP) και η περαιτέρω ταυτοποίηση τους επετεύχθη ύστερα από ταυτοποίηση της DNA αλληλουχίας τους (sequencing). Συνολικά, ανιχνεύθηκαν 16 πολυμορφισμοί στα 150 άτομα: 11 ήδη ταυτοποιημένοι και 5 που παρατηρούνται για πρώτη φορά.

1. ABSTRACT

Mitochondrial tRNA genes undergo a high rate of mutations, which in recent reports have been accused for resulting to extremely heterogeneous diseases of various clinical symptoms. This can be explained by the central role of tRNAs in mitochondrial protein synthesis of enzymes involved in energy metabolism. Both polymorphic and pathogenic mutations have been reported for the vast majority of tRNA genes. Polymorphic neutral mutations however, seem not to affect the structural integrity of the functional role of mtRNAs but rather to contribute to the diversity of human populations. In the present study we examined the sequence variation of five genes [$tRNA^{Leu(UUR)}$, $tRNA^{Lys}$, $tRNA^{His}$, $tRNA^{Ser(AGY)}$ και $RNA^{Leu(CUN)}$] in a Greek population of healthy individuals, something that has never been performed so far. The reason for choosing to investigate these particular genes is their relatively high number of polymorphic changes that they accumulate; the first two genes accumulate a lower number of polymorphisms (7 and 9, respectively), while the late three accumulate a higher number (11, 13 and 11, respectively). Specifically, we examined blood samples from 150 individuals using the method of polymerase chain reaction (PCR) in order to enhance the genes in question, as well as parts of their neighbouring genes. Furthermore, we used the method of single stranded conformation polymorphism (SSCP) in order to detect any possible changes in the patterns and performed direct sequencing in order to identify the exact location of these changes. We detected 16 mutations in total; 11 already known polymorphisms and 5 more that have never been reported before.

2. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

2.1 ΓΕΝΙΚΑ ΓΙΑ ΤΑ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑ

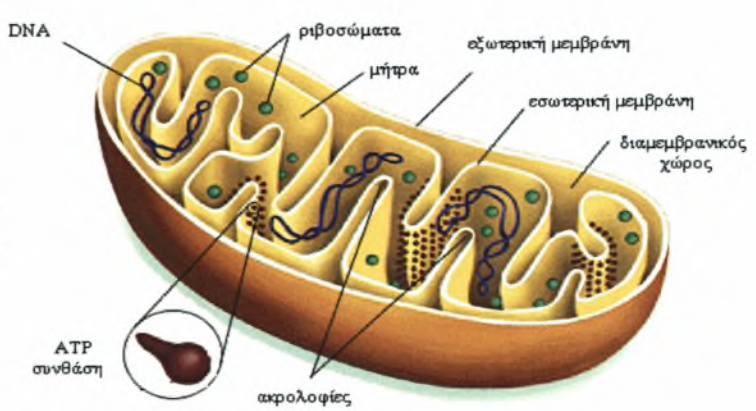
Τα μιτοχόνδρια (*μίτος + χόνδρος, κόκκος*) είναι θεμελιώδη οργανίδια που συναντώνται διεσπαρμένα στο κυτταρόπλασμα όλων σχεδόν των ευκαρυωτικών κυττάρων. Ανακαλύφθηκαν το 1949 από τον Albert Lehninger, ο οποίος αποκάλυψε το ρόλο τους στη κυτταρική αναπνοή, ενώ το 1952, μέσω πειραμάτων ηλεκτρονικής μικροσκοπίας από τον George Palade, έγινε γνωστή και η δομή τους. Συχνά περιγράφονται ως **«εργοστάσια παραγωγής κυτταρικής ενέργειας»**, διότι παράγουν μεγάλα ποσά τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP), που αποτελεί πηγή χημικής ενέργειας για το κύτταρο. Επιπρόσθετα με το ρόλο αυτό, εμπλέκονται σε ένα εύρος διαδικασιών, όπως είναι η μεταγωγή σήματος, η κυτταρική διαφοροποίηση, ο κυτταρικός θάνατος, καθώς και στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και της κυτταρικής αύξησης. Έχουν σχήμα ωοειδές, το μέγεθος τους κυμαίνεται από 1 έως 10 μm και ο αριθμός τους στο κύτταρο ποικίλει ανάλογα με τον ιστό και τον οργανισμό. Κάποια κύτταρα περιέχουν μόνο ένα μιτοχόνδριο, ενώ άλλα αρκετές χιλιάδες, όπως για παράδειγμα τα μυικά και τα καρδιακά κύτταρα που καταναλώνουν μεγάλα ποσά ενέργειας. Τα ανθρώπινα μιτοχόνδρια περιέχουν περίπου 615 διακριτούς τύπους πρωτεϊνών, ανάλογα με τον ιστό. Παρ' όλο που σχεδόν ολόκληρο το DNA του κυττάρου εντοπίζεται στο πυρήνα, το μιτοχόνδριο φέρει το δικό του ανεξάρτητο γονιδίωμα, το οποίο παρουσιάζει αρκετές ομοιότητες με εκείνο των βακτηρίων. Σύμφωνα δε με την ενδοσυμβιωτική θεωρία, τα μιτοχόνδρια προέρχονται από αρχαία βακτήρια που εγκολπώθηκαν σε προγόνους ευκαρυωτικών κυττάρων, πριν από ένα εκατομμύριο χρόνια.

***Εικόνα 1**: Μιτοχόνδριο όπως φαίνεται από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο.*

2.2 ΔΟΜΗ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΟΥ

Τα μιτοχόνδρια φέρουν μια διπλή μεμβρανική οργάνωση, καθώς περιέχουν τόσο εσωτερικές, όσο και εξωτερικές μεμβράνες, αποτελούμενες από φωσφολιπιδικές διπλοστιβάδες και πρωτεΐνες. Οι μιτοχονδριακές μεμβράνες δεν συντίθενται από ριβοσώματα του αδρού ενδοπλασματικού δικτύου, αλλά από ελεύθερα διεσπαρμένα ριβοσώματα του κυτταροπλάσματος, καθώς και ριβοσώματα του ίδιου του μιτοχονδρίου. Λόγω της διπλής αυτής μεμβρανικής οργάνωσης, το μιτοχόνδριο χωρίζεται περαιτέρω σε πέντε διακριτά μέρη. *Την εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη*, τον *διαμεμβρανικό χώρο*, την *εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη*, τις *ακρολοφίες* και τη *μήτρα*. Ειδικότερα:

- **Η εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη** περιβάλλει ολόκληρο το μιτοχόνδριο και περιλαμβάνει ένα μεγάλο αριθμό πρωτεϊνών, τις πορίνες. Οι πρωτεΐνες αυτές σχηματίζουν κανάλια τα οποία επιτρέπουν την ελεύθερη διέλευση μορίων μοριακού βάρους 5000Dalton ή και λιγότερο, από τη μία πλευρά της μεμβράνης στην άλλη.
- **Ο διαμεμβρανικός χώρος**, είναι ο χώρος μεταξύ της εσωτερικής και εξωτερικής μεμβράνης, ο οποίος λόγω της διαπερατότητας της εξωτερικής μεμβράνης περιέχει πολυάριθμα μικρά ιόντα σε ισοδύναμες συγκεντρώσεις με το κυτταρόπλασμα.
- **Η εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη** σε αντίθεση με την εξωτερική μεμβράνη είναι αδιαπέραστη σε όλα τα μόρια και η επιλεκτική μεταφορά τους μέσα και έξω από τη μήτρα γίνεται μόνο μέσω ειδικών υποδοχέων. Στη μεμβράνη αυτή λαμβάνει χώρα η κυτταρική αναπνοή, δηλαδή το μεταβολικό μονοπάτι που χρησιμοποιεί την ενέργεια που απελευθερώνεται από την οξείδωση των θρεπτικών ουσιών, για να παράγει ATP.
- **Οι ακρολοφίες** αποτελούν ειδικές αναδιπλώσεις της εσωτερικής μεμβράνης που επηρεάζουν τη χημειοσμωτική λειτουργία της, καθώς και ενισχύουν την ικανότητά της να παράγει ATP.
- **Η μήτρα** είναι ο χώρος που περιβάλλεται από την εσωτερική μεμβράνη και περιέχει εκατοντάδες ένζυμα, καθώς και ριβοσώματα, tRNAs και αρκετά αντίγραφα του μιτοχονδριακού γονιδιώματος. Οι σημαντικότερες λειτουργίες των ενζύμων της περιλαμβάνουν την οξείδωση του πυροσταφυλικού και των λιπαρών οξέων, καθώς και τον κύκλο του κιτρικού οξέος.

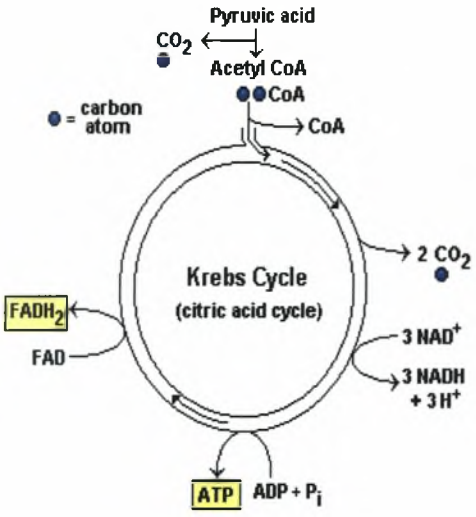


***Εικόνα 2**: Σχηματική απεικόνιση δομής μιτοχονδρίου.*

2.3 ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΟΥ

Ο βασικός ρόλος των μιτοχονδρίων είναι η παραγωγή ATP, κάτι που γίνεται φανερό και από το μεγάλο αριθμό πρωτεϊνών που βρίσκονται εντοπισμένες στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη και εξυπηρετούν το σκοπό αυτό. Η παραγωγή ATP επιτυγχάνεται με την οξείδωση των βασικών προϊόντων της γλυκολυτικής πορείας: *το πυροσταφυλικό οξύ* και το *NADH*. Η διαδικασία αυτή ονομάζεται κυτταρική αναπνοή και είναι εξαρτώμενη από τη παρουσία οξυγόνου. Απουσία οξυγόνου τα γλυκολυτικά προϊόντα μεταβολίζονται μέσω της αναερόβιας αναπνοής, μια διαδικασία ανεξάρτητη με τα μιτοχόνδρια. Η παραγωγή ATP από τη γλυκόζη έχει 17 φορές μεγαλύτερη απόδοση όταν γίνεται μέσω της αερόβιας παρά της αναερόβιας αναπνοής.

Α) Ο κύκλος του κιτρικού οξέος

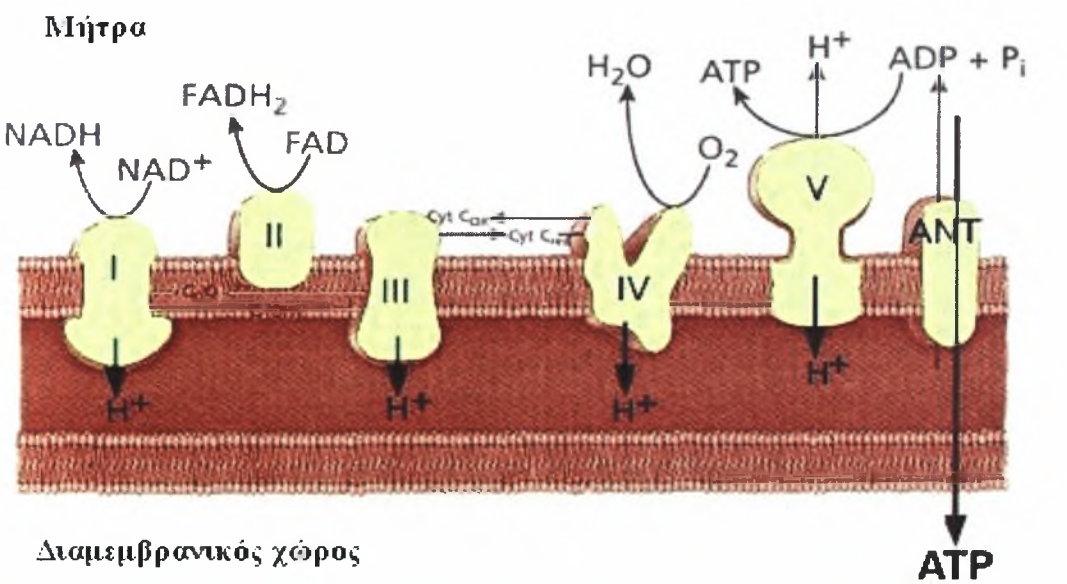


***Εικόνα 3**: Σχηματική απεικόνιση του κύκλου του κιτρικού οξέος.*

Ο κύκλος του κιτρικού οξέος, ανακαλύφθηκε το 1937 από τον Hans Krebs, και είναι μια σειρά ενζυμικών διεργασιών με κεντρικό ρόλο στο μεταβολικό καταβολισμό των θρεπτικών ουσιών των τροφών. Λαμβάνει χώρα στη μήτρα του μιτοχονδρίου και αποτελεί τη διαδικασία που ακολουθεί τη γλυκολυτική πορεία. Κάθε μόριο πυροσταφυλικού οξέος (pyruvic acid) που παράγεται από τη γλυκόλυση εισάγεται στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη μέσω ενεργητικής μεταφοράς, οξειδώνεται και αντιδρά με το συνένζυμο Α, σχηματίζοντας ακετυλοσυνένζυμο Α (acetyl CoA) και NADH. Το ακετυλοσυνένζυμο Α είναι το πρωτεύον υπόστρωμα του κύκλου του κιτρικού οξέος ή κύκλου του Krebs. Όλα τα ένζυμα του κύκλου του κιτρικού οξέος (οκτώ στο σύνολο) εντοπίζονται στη μήτρα του μιτοχονδρίου, εκτός από το ένζυμο ηλεκτρική αφυδρογονάση που εντοπίζεται στην εσωτερική μεμβράνη ως μέρος του συμπλόκου ΙΙ. Καθ' όλη την διεργασία, το ακετυλοσυνένζυμο Α μετατρέπεται σε διοξείδιο του άνθρακα (δύο μόρια CO_2), παράγονται αναγωγικοί παράγοντες (τρία μόρια NADH και ένα μόριο $FADH_2$), που αποτελούν πηγή ηλεκτρονίων για την αναπνευστική αλυσίδα και ένα μόριο GTP (το οποίο αμέσως μετατρέπεται σε ATP).

Β) Η αναπνευστική αλυσίδα

Η αναγωγική ενέργεια από τα NADH και $FADH_2$ μεταφέρεται στο μόριο του οξυγόνου (O_2) με διαδοχικά βήματα μέσω της αναπνευστικής αλυσίδας ή αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων. Τα πρωτεϊνικά σύμπλοκα της εσωτερικής μεμβράνης (*NADH αφυδρογονάση, κυτοχρωμική αναγωγάση και κυτοχρωμική οξειδάση*) καταλύουν τη μεταφορά και την απελευθέρωση της αναγωγικής ενέργειας, που χρησιμοποιείται για να αντλήσει πρωτόνια στο διαμεμβρανικό χώρο. Καθώς η πρωτονιακή συγκέντρωση αυξάνεται, παράγεται ένα ισχυρό ηλεκτροχημικό δυναμικό κατά μήκος της εσωτερικής μεμβράνης. Τα πρωτόνια επιστρέφουν στη μήτρα μέσω του ενζυμικού συμπλόκου της ATP συνθάσης και το ενεργειακό δυναμικό τους χρησιμοποιείται για τη σύνθεση ATP από ADP και ανόργανο φωσφορικό άλας (Pi). Η διαδικασία αυτή ονομάζεται χημειόσμωση και παρατηρήθηκε πρώτα από τον Peter Mitchell, που τιμήθηκε με το βραβείο Nobel το 1978 για την εργασία αυτή. Παρ' όλη την αποτελεσματικότητα της αναπνευστική αλυσίδας, ένα μικρό ποσοστό των ηλεκτρονίων δύναται να ανάγει το οξυγόνο και να σχηματίσει οξειδωτικές ρίζες, όπως αυτή του υπεροξειδίου (H_2O_2). Το γεγονός αυτό μπορεί να οδηγήσει σε οξεδωτικό stress στα μιτοχόνδρια και κατ' επέκταση στην μείωση της μιτοχονδριακής λειτουργίας, κάτι που σχετίζεται με τη διαδικασία της γήρανσης.

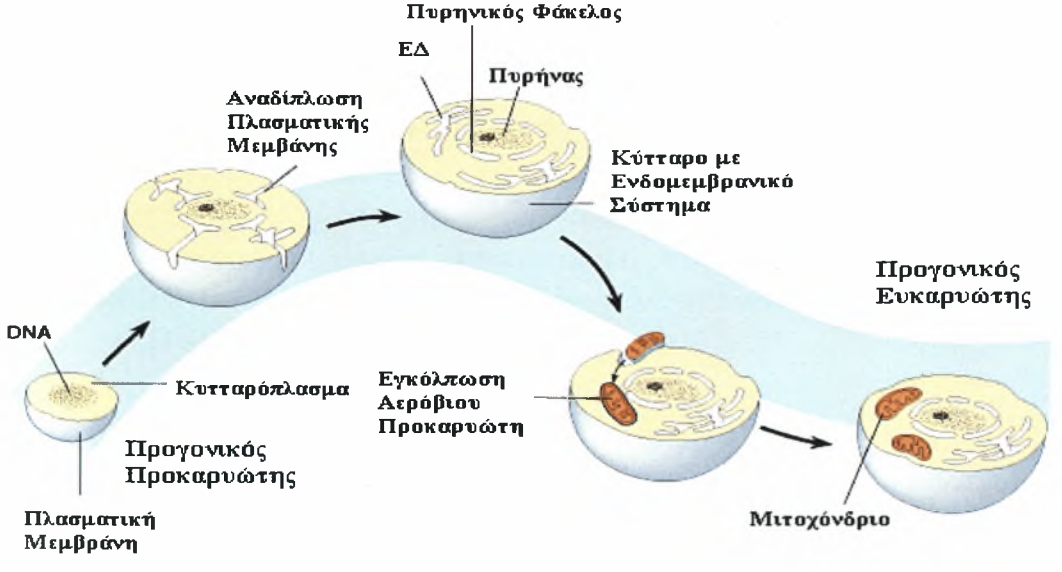


***Εικ.4**: Σχηματική απεικόνιση της αναπνευστικής αλυσίδας. Το σύμπλοκο I (NADH αφυδρογονάση) ανάγει το NADH, αντλεί H^+ και προσδίδει e^- στην αλυσίδα. Το σύμπλοκο II (αφυδρογονάση του ηλεκτρικού) δέχεται e^- από το $FADH_2$ και τα μεταφέρει στο σύμπλοκο III (κυτοχρωμική αναγωγάση), μέσω του συνενζύμου Q. Τα e^- μεταφέρονται στη συνέχεια στο σύμπλοκο IV (κυτοχρωμική οξειδάση), μέσω του κυτοχρώματος c. Τέλος, το σύμπλοκο V (ATP συνθάση) καταλύει τη μετατροπή του ADP σε ATP, το οποίο μεταφέρεται έξω από τη μήτρα μέσω αντλιών (ANT) για να αξιοποιηθεί όπου χρειάζεται.*

Επιπλέον, τα μιτοχόνδρια παίζουν σημαντικό ρόλο και σε άλλες διαδικασίες όπως στην ρύθμιση του μεμβρανικού δυναμικού, στη κυτταρική διαφοροποίηση και στον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο, στην σύνθεση της αίμης και των στεροειδών και άλλες. Ορισμένες λειτουργίες λαμβάνουν χώρα μόνο σε συγκεκριμένους τύπους κυττάρων. Για παράδειγμα, τα μιτοχόνδρια των ηπατοκυττάρων περιέχουν ένζυμα που τους επιτρέπουν να καταβολίζουν την αμμωνία, ένα τοξικό παράγωγο του πρωτεϊνικού μεταβολισμού.

2.4 ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ

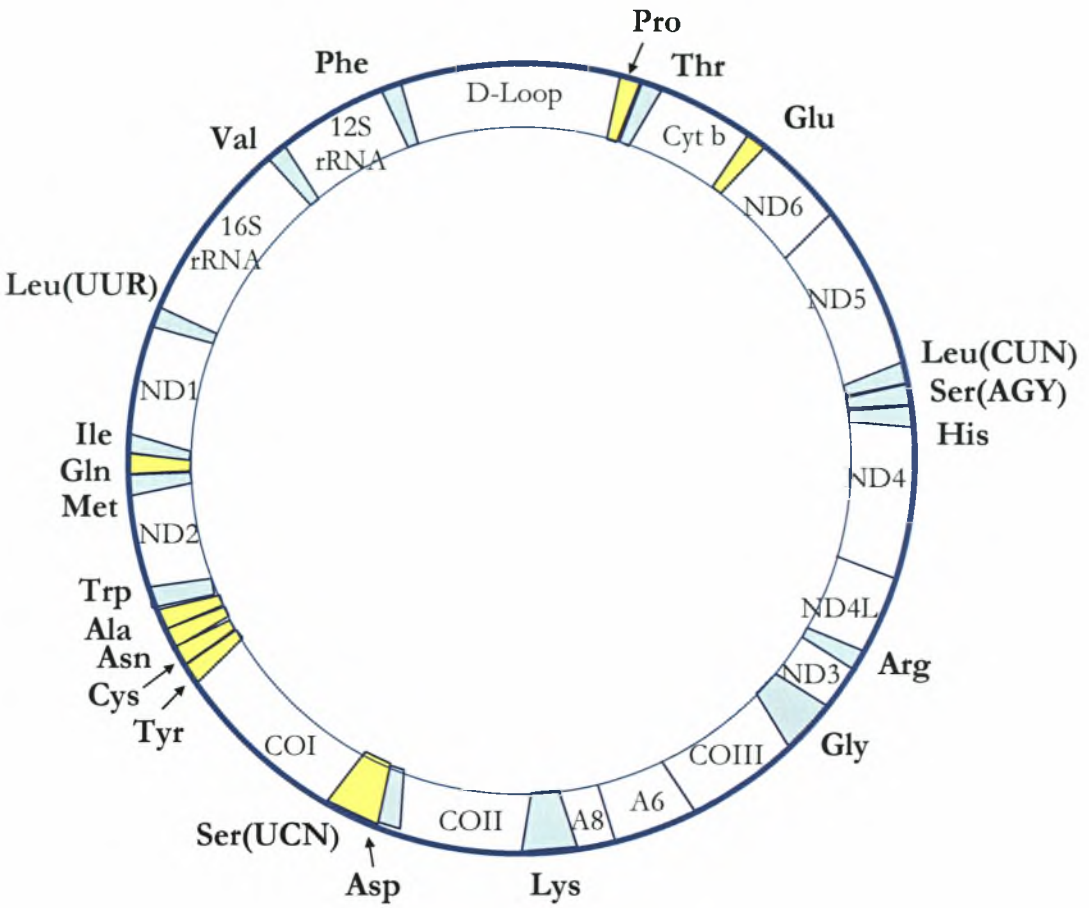
Το γεγονός ότι τα μιτοχόνδρια παρουσιάζουν πολλές ομοιότητες με τους προκαρυωτικούς οργανισμούς, όπως για παράδειγμα ότι περιέχουν μόνο ριβοσώματα και DNA και αναπαράγονται αγενώς, οδήγησε στην ανάπτυξη της **ενδοσυμβιωτικής θεωρίας** από την Lynn Margulis το 1981. Σύμφωνα με τη θεωρία αυτή τα μιτοχόνδρια προέρχονται από μια κατηγορία ειδικών βακτηρίων, τα Πρωτεοβακτήρια, τα οποία πριν από 1.7-2 εκατομμύρια χρόνια εγκολπώθηκαν, αλλά δεν αποσυντέθηκαν, στο κυτταρόπλασμα πρώιμων προγόνων των ευκαρυωτικών κυττάρων, λόγω της αντοχής τους απέναντι στα πεπτικά ένζυμα. Η ικανότητα των συμβιωτικών βακτηρίων να διεξάγουν κυτταρική αναπνοή στα κύτταρα των ξενιστών τους, που μέχρι τότε περιορίζετο στις βασικές μεταβολικές διεργασίες της γλυκόλυσης και της ζύμωσης, τους προσέδωσε ένα αξιοσημείωτο εξελικτικό πλεονέκτημα: τα κύτταρα μπορούσαν να επιβιώσουν σε σαφώς μεγαλύτερο αριθμό περιβαλλόντων. Στοιχείο που συνηγορεί υπέρ της θεωρίας αποτελεί το γεγονός ότι τα μιτοχονδριακά ριβοσώματα μοιάζουν περισσότερο με εκείνα των βακτηρίων (μεγέθους 70S) από όλα τα υπόλοιπα ριβοσώματα που εντοπίζονται στο ευκαρυωτικό κύτταρο (μεγέθους 80S).



Εικόνα 5: *Σχηματική απεικόνιση της ενδοσυμβιωτικής θεωρίας.*

2.5 ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑ

Το ανθρώπινο μιτοχονδριακό γονιδίωμα είναι ένα κυκλικό δίκλωνο (κλώνος Η και κλώνος L) μόριο DNA μεγέθους 16.569 kb, το οποίο κωδικοποιεί 37 γονίδια: 13 γονίδια των συμπλόκων I, III, IV και V της αναπνευστικής αλυσίδας, 22 μιτοχονδριακά tRNA και 2 rRNA. Ειδικότερα, ο κλώνος Η κωδικοποιεί 28 γονίδια και ο κλώνος L 9, εκ των οποίων τα 8 κωδικοποιούν μιτοχονδριακά μόρια tRNA. Ολόκληρο το μόριο συντονίζεται από μια ρυθμιστική περιοχή, η οποία περιέχει σημεία έναρξης (origins of replication) τόσο για τον κλώνο Η, όσο και L κλώνο. Κάθε μιτοχόνδριο περιλαμβάνει περίπου 2 έως 10 αντίγραφα του γονιδιώματός του. Το μιτοχονδριακό γονιδίωμα έχει διαφορετική προέλευση από το πυρηνικό και η κληρονόμησή του είναι αποκλειστικά μητρική (συνεπώς παραμένει απαράλλακτο από γονέα σε απόγονο), εν αντιθέσει με το δεύτερο όπου κληρονομείται και από τους δύο γονείς και υπόκειται στη διαδικασία του ανασυνδυασμού. Η **μητρική κληρονόμηση** οφείλεται στο ότι κατά τη γονιμοποίηση τα μιτοχόνδρια του σπερματοζωαρίου, που στη πλειοψηφία τους εντοπίζονται στην ουρά, δεν εισέρχονται στο ωάριο καθώς εκείνη αποκόπτεται κατά τη σύντηξη του σπερματοζωαρίου με το ωάριο, ενώ όσα εισέρχονται καταστρέφονται από το ίδιο το ωάριο. Συμπληρωματικά, το μιτοχονδριακό γονιδίωμα διαφέρει από το πυρηνικό και στο ρυθμό μεταλλαγής του, που είναι 10 με 17 φορές υψηλότερος από εκείνον του πυρηνικού, γεγονός που οφείλεται στην έλλειψη επιδιορθωτικών μηχανισμών. Αυτό έχει ως συνέπεια την αυξημένη συσσώρευση πολυμορφισμών και τη δημιουργία μεγάλης ποικιλομορφίας μεταξύ των μιτοχονδρίων, όχι μόνο μεταξύ διαφορετικών ειδών, αλλά και ανάμεσα στο ίδιο είδος. Έχει υπολογιστεί ότι αν αναλυθεί το mtDNA δυο τυχαία επιλεγμένων ατόμων, η διαφορά στην μιτοχονδριακή αλληλουχία τους θα κυμαίνεται από πενήντα με εβδομήντα νουκλεοτίδια· τα άτομα δηλαδή θα διαφέρουν περίπου στο 42% του mtDNA. Τα ανθρώπινα μιτοχονδριακά γονίδια δεν περιέχουν επαναλήψεις και ιντρόνια και μεταγράφονται ως πολυγονιδιακά μετάγραφα, τα οποία στη συνέχεια ματίζονται και πολυαδενυλιώνονται για να δώσουν ώριμα mRNAs. Σημειώνεται ότι η πλειοψηφία των πρωτεϊνών που είναι απαραίτητες για τη μιτοχονδριακή λειτουργία κωδικοποιείται από το πυρηνικό και όχι από το μιτοχονδριακό γονιδίωμα. Το ανθρώπινο μιτοχονδριακό γονιδίωμα χαρτογραφήθηκε πλήρως το 1981, δέκα χρόνια νωρίτερα από τη χαρτογράφηση ολόκληρου του ανθρώπινου γονιδιώματος (human genome project).



Εικόνα 6: *Το μιτοχονδριακό γονιδίωμα. Με κίτρινο απεικονίζονται τα tRNA που προκύπτουν από τη μεταγραφή του κλώνου L, ενώ με μπλε αυτά που προκύπτουν από τη μεταγραφή του κλώνου H.*

2.5.1 ΑΝΤΙΓΡΑΦΗ, ΜΕΤΑΓΡΑΦΗ & ΜΕΤΑΦΡΑΣΗ ΤΟΥ mtDNA

Τα μιτοχόνδρια αντιγράφουν το DNA τους και διαιρούνται κυρίως ως απάντηση στις ενεργειακές ανάγκες του κυττάρου, ανεξάρτητα με τον κυτταρικό κύκλο. Όταν οι ενεργειακές ανάγκες του κυττάρου είναι υψηλές τότε τα μιτοχόνδρια αυξάνονται και διαιρούνται, ενώ το αντίθετο συμβαίνει όταν το ενεργειακό φορτίο του κυττάρου είναι χαμηλό. Η μιτοχονδριακή αντιγραφή ελέγχεται από πυρηνικά γονίδια και είναι ειδικά «σχεδιασμένη» να παράγει όσα μιτοχόνδρια το κύτταρο χρειάζεται κάθε δεδομένη στιγμή. Διαρκεί περίπου μία ώρα (100 φορές βραδύτερη της πυρηνικής αντιγραφής), εκτελείται από τη μιτοχονδριακή DNA πολυμεράση (που κωδικοποιείται από το πυρηνικό DNA και στερείται επιδιορθωτικής λειτουργίας), και είναι ημισυντηρητική (τα θυγατρικά δίκλωνα αποτελούνται από μία πατρική και μία αρτιγενή αλυσίδα). Τα ανθρώπινο μιτοχονδριακό DNA έχει τρεις υποκινητές, τον H1, H2 και L (heavy strand 1, heavy strand 2 and light strand promoters). Ο H1 υποκινητής αντιγράφει ολόκληρο τον κλώνο H, ο υποκινητής L

ολόκληρο τον κλώνο L και ο υποκινητής H2 είναι υπεύθυνος για την αντιγραφή των δύο μιτοχονδριακών rRNA. Η αντιγραφή του κλώνου H παράγει ένα πολυκιστρονικό μετάγραφο, το οποίο κατ' επέκταση ματίζεται σε λειτουργικά tRNA, rRNA και mRNA, ενώ η αντιγραφή του κλώνου L παράγει είτε ένα πολυκιστρονικό μετάγραφο, είτε πολλά μικρά μετάγραφα. Τα τελευταία προκύπτουν από επεξεργασία της μιτοχονδριακής RNάσης και στη συνέχεια μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως εκκινητές για μετάφραση. Σημειώνεται ότι τα μιτοχονδριακά μετάγραφα, σε αντίθεση με τα πυρηνικά, στερούνται τη δομή καλύπτρας στο 5΄ άκρο τους, καθώς και τις αλληλουχίες-σήματα έναρξης, ενώ στο 3΄ άκρο τους προστίθεται κανονικά η poly-A ουρά. Ο μηχανισμός της μεταγραφής στα μιτοχόνδρια, αν και τα στάδια του οποίου δεν είναι απόλυτα κατανοητά, περιλαμβάνει δύο τύπους πρωτεϊνών: τη μιτοχονδριακή RNA πολυμεράση (polRMT) και τους μεταγραφικούς παράγοντες A, B1, B2 (TFAM, TFB1M, TFB2M), οι οποίοι προσδένονται στους αντίστοιχους μιτοχονδριακούς υποκινητές και ξεκινούν τη μεταγραφή. Η μιτοχονδριακή μετάφραση δεν είναι προς το παρόν κατανοητή λόγω της αδυναμίας μελέτη της in vitro. Αυτό συμβαίνει εξαιτίας της δυσκολίας απομόνωσης επαρκούς ποσότητας λειτουργικού mt mRNA και mt rRNA, καθώς και εξαιτίας των περίπλοκων τροποποιήσεων που υφίσταται το mRNA προτού μεταφραστεί.

2.5.2 ΠΟΙΚΙΛΟΜΟΡΦΙΑ ΣΤΟ ΓΕΝΕΤΙΚΟ ΚΩΔΙΚΑ

Ο γενετικός κώδικας είναι, ως επί το πλείστον, παγκόσμιος όμως το 1979 ερευνητές που μελετούσαν τα ανθρώπινα μιτοχονδριακά γονίδια ανακάλυψαν ότι αυτά χρησιμοποιούσαν έναν εναλλακτικό κώδικα. Οι παραλλαγές από τον παγκόσμιο γενετικό κώδικα συνοψίζονται στον πίνακα 1.

ΠΙΝΑΚΑΣ 1

Οργανισμός	**Κωδικόνιο**	**Παγκόσμιος Γενετικός Κώδικας**	**Μιτοχόνδρια**
Θηλαστικά	AGA, AGG	Αργινίνη	Κωδικόνιο Λήξης
	AUA*	Ισολευκίνη	Μεθειονίνη
	UGA	Κωδικόνιο Λήξης	Τρυπτοφάνη

** Τα κωδικόνια AUA, AUC και AUU είναι όλα επιτρεπτά κωδικόνια έναρξης*

***Πίνακας 1**: Εξαιρέσεις από τον παγκόσμιο γενετικό κώδικα στα μιτοχόνδρια.*

2.6 ΓΕΝΙΚΑ ΓΙΑ ΤΑ ΜΟΡΙΑ tRNA

Τα μεταφορικά RNA (transfer RNA), όπως ονομάστηκαν από τον Francis Crick, είναι μικρά μόρια RNA (73-93 νουκλεοτίδια), τα οποία μεταφέρουν συγκεκριμένα αμινοξέα στις αυξανόμενες πολυπεπτιδικές αλυσίδες που συνθέτουν τα ριβοσώματα, κατά τη διάρκεια της πρωτεϊνοσύνθεσης. Φέρουν ένα 3΄ τελικό άκρο υπεύθυνο για την αμινοξική σύνδεση και μια περιοχή τριών βάσεων, το αντικωδικόνιο, το οποίο συνδέεται με τη κωδική περιοχή στο mRNA (messenger RNA). Το ένζυμο αμινοάκυλο-tRNA-συνθετάση καταλύει την αντίδραση της σύνδεσης των αμινοξέων με ομοιοπολικό δεσμό με το 3΄άκρο των μορίων tRNA. Κάθε tRNA μπορεί να συνδεθεί με ένα τύπο αμινοξέος, όμως λόγω του ότι ο παγκόσμιος γενετικός κώδικας περιέχει πολλαπλά κωδικόνια που καθορίζουν το ίδιο αμινοξύ, διαφορετικά μόρια tRNA μπορούν να μεταφέρουν το ίδιο αμινοξύ.

2.6.1 ΥΠΟΘΕΣΗ ΤΑΛΑΝΤΕΥΣΗΣ

Το γεγονός ότι υπάρχουν 61 κωδικόνια στο πυρηνικό DNA που κωδικοποιούν 20 αμινοξέα και περίπου 40 tRNA μόρια υπεύθυνα για τη μετάφραση τους δημιούργησε ένα εμφανές πρόβλημα ανεπάρκειας μορίων tRNA ικανά για να «διαβάσουν» επαρκώς όλα τα κωδικόνια. Την απάντηση στο πρόβλημα αυτό έδωσε το 1966 Francis Crick με την **υπόθεση ταλάντευσης (wobble hypothesis)**, σύμφωνα με την οποία η 5΄ βάση της τριπλέτας του αντικωδικονίου δεν είναι χωροταξικά περιορισμένη όπως οι άλλες δύο βάσεις και συνεπώς δεν περιορίζεται στο τυπικό ζευγάρωμα βάσεων κατά Watson και Crick. Οι τροποποιημένοι δεσμοί που δημιουργούνται σύμφωνα με την υπόθεση ταλάντευσης παίζουν κρίσιμο ρόλο στη μετάφραση καθώς αντισταθμίζουν την ανισότητα στον αριθμό των αμινοξέων (20) συγκριτικά με τον αριθμό των κωδικονίων (61). Επίσης, έχουν θεμελιώδη ρόλο στο σχηματισμό της δευτεροταγής δομής του tRNA. Μια σημαντική τροποποιημένη βάση είναι βάση της ινοσίνης (I), η οποία ζευγαρώνει με τις βάσεις ουρακίλη (U), αδενίνη (A) και κυτοσίνη (C). Ένας άλλος κρίσιμος τροποποιημένος δεσμός είναι το ζευγάρωμα G-U που επιτρέπει το ζευγάρωμα της ουρακίλης (U) με τις βάσεις γουανίνη (G) και αδενίνη (A). Με ανάλογο τρόπο και τα 22 tRNA που κωδικοποιούνται στα μιτοχόνδρια επαρκούν για την αντίστοιχη μιτοχονδριακή μετάφραση [ένα tRNA ειδικό για καθένα από τα δεκαοκτώ αμινοξέα, δύο tRNA ειδικά για τη σερίνη ($tRNA^{Ser(AGY)}$ και $tRNA^{Ser(UCN)}$), και δύο tRNA ειδικά για τη λευκίνη ($tRNA^{Leu(UUR)}$ και $tRNA^{Leu(CUN)}$)] .

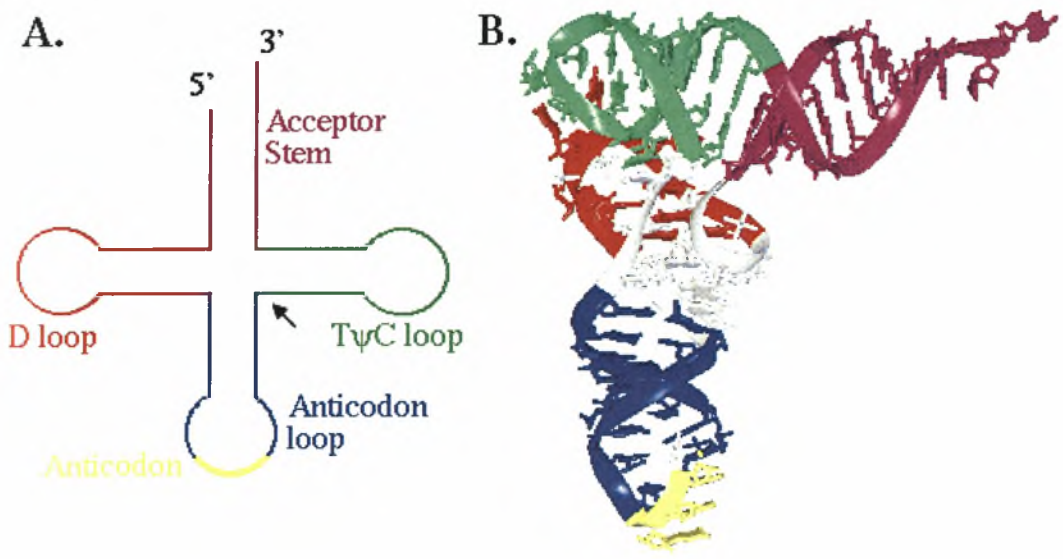
ΠΙΝΑΚΑΣ 2 Τα ζεύγη ταλάντευσης στη 3η θέση του κωδικονίου	
Βάση στην πρώτη θέση του αντικωδικονίου	**Βάση ή βάσεις που αναγνωρίζονται στη τρίτη θέση του κωδικονίου**
U	A ή G
C	μόνο G
A	μόνο U
G	C ή U

Πίνακας 2: Το ζευγάρωμα κωδικονίου - αντικωδικονίου περιλαμβάνει ταλάντευση στην τρίτη θέση.

2.6.2 ΔΟΜΗ tRNA

Τα μόρια tRNA έχουν πρωτοταγή δομή, δευτεροταγή (προσομοιάζει το σχήμα τριφυλλιού) δομή και τριτοταγή (προσομοιάζει το σχήμα του λατινικού γράμματος L) δομή. Συγκεκριμένα έχουν:

- Μια 5΄φωσφορική ομάδα.
- Τον βραχίονα υποδοχής που σχηματίζεται από το ζευγάρωμα του 5΄τελικού νουκλεοτιδίου με το 3΄τελικό νουκλεοτίδιο (το οποίο περιέχει την τριπλέτα CCA με την οποία συνδέεται το αμινοξύ). Ο βραχίονας υποδοχής συχνά περιέχει ζεύγη βάσεων που συνδέονται διαφορετικά από το κλασικό ζευγάρωμα κατά Watson και Crick.
- Μια τριπλέτα CCA στο 3΄άκρο, η οποία είναι απαραίτητη για την αναγνώριση του μορίου από τα μεταφραστικά ένζυμα. Στους ευκαρυώτες η συγκεκριμένη τριπλέτα προστίθεται κατά τη μεταγραφική επεξεργασία και επομένως η αλληλουχία της δεν υπάρχει στο tRNA γονίδιο.
- Τη θηλιά DHU (διϋδροουριδίνη).
- Τη θηλιά του αντικωδικονίου.
- Τη θηλιά TψC (όπου ψ είναι η ψευδοουριδίνη).
- Στο σημείο συνένωσης της θηλιάς του αντικωδικονίου και της TψC υπάρχει μία μικρή μεταβλητή θηλιά (variable loop).
- Τροποποιημένες βάσεις που προκύπτουν κυρίως από μεθυλίωση υπάρχουν σε αρκετές θέσεις εκτός από το αντικωδικόνιο. Η πρώτη βάση του αντικωδικονίου συνήθως τροποποιείται από αδενίνη σε ινοσίνη ή από ουρακίλη σε ψευδοουριδίνη.



***Εικόνα 7**: Α) Δευτεροταγής δομή tRNA Β) Τριτοταγής δομή tRNA. Με μωβ χρώμα απεικονίζεται ο βραχίονας υποδοχής, με πράσινο η θηλιά ΤψC, με μπλε η θηλιά του αντικωδικονίου (με κίτρινο το αντικωδικόνιο) και με κόκκινο ο D βραχίονα. Με το μαύρο βελάκι απεικονίζεται η θέση της μεταβλητής θηλιάς.*

2.6.3 ΠΑΘΟΓΟΝΕΣ & ΟΥΔΕΤΕΡΕΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ ΣΕ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΑ tRNA ΓΟΝΙΔΙΑ

Δεδομένου του κεντρικού ρόλου που έχουν τα μιτοχόνδρια στον κυτταρικό μεταβολισμό, βλάβες ή δυσλειτουργίες τους συμβάλλουν σε ένα μεγάλο εύρος ανθρώπινων νοσημάτων. Οι δυσλειτουργίες αυτές μπορεί να εκδηλώνονται ως νευρολογικές διαταραχές, μυοπάθειες, διαβήτης, ενδοκρινοπάθειες καθώς και ως πληθώρα σωματικών διαταραχών. Από το 1988, όταν χαρακτηρίστηκαν οι πρώτες μεταλλάξεις που συσχετίστηκαν με παθογένειες, πάνω από 200 εξ' αυτών αναγνωρίστηκαν στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα. Περισσότερες από τις μισές μεταλλάξεις εντοπίζονται στα μιτοχονδριακά tRNA γονίδια, γεγονός αξιοσημείωτο καθώς οι tRNA αλληλουχίες συνιστούν μόνο το 10% του συνολικού μιτοχονδριακού γονιδιώματος. Τα γονίδια tRNA είναι εξαιρετικά πολυμορφικά μόρια, και η πλειοψηφία τους συγκεντρώνει τόσο **παθογόνες** όσο και **ουδέτερες** μεταλλάξεις. Παθογόνες μεταλλάξεις εντοπίζονται σε όλα τα tRNA γονίδια, εκτός εκείνου της αργινίνης, και σχεδόν το 50% όλων των γνωστών παθογόνων μεταλλάξεων εντοπίζεται σε τρία γονίδια tRNA ($tRNA^{Leu(UUR)}$, $tRNA^{Lys}$ και $tRNA^{Ile}$). Οι ουδέτερες μεταλλάξεις ή πολυμορφισμοί απεναντίας βρίσκονται σε όλα τα tRNA γονίδια, είναι κατά κόρον σημειακές αντικαταστάσεις, δεν επηρεάζουν τη δομική ακεραιότητα ή τη λειτουργικότητα των μιτοχονδριακών tRNA, και όπως αναφέρθηκε συνεισφέρουν στη ποικιλομορφία μεταξύ των ανθρώπινων πληθυσμών. Οι περισσότερες μεταλλάξεις είναι μεταπτώσεις (πυριμιδίνη σε πυριμιδίνη/ πουρίνη σε πουρίνη) παρά μετατροπές (πυριμιδίνη σε πουρίνη και αντίστροφα)

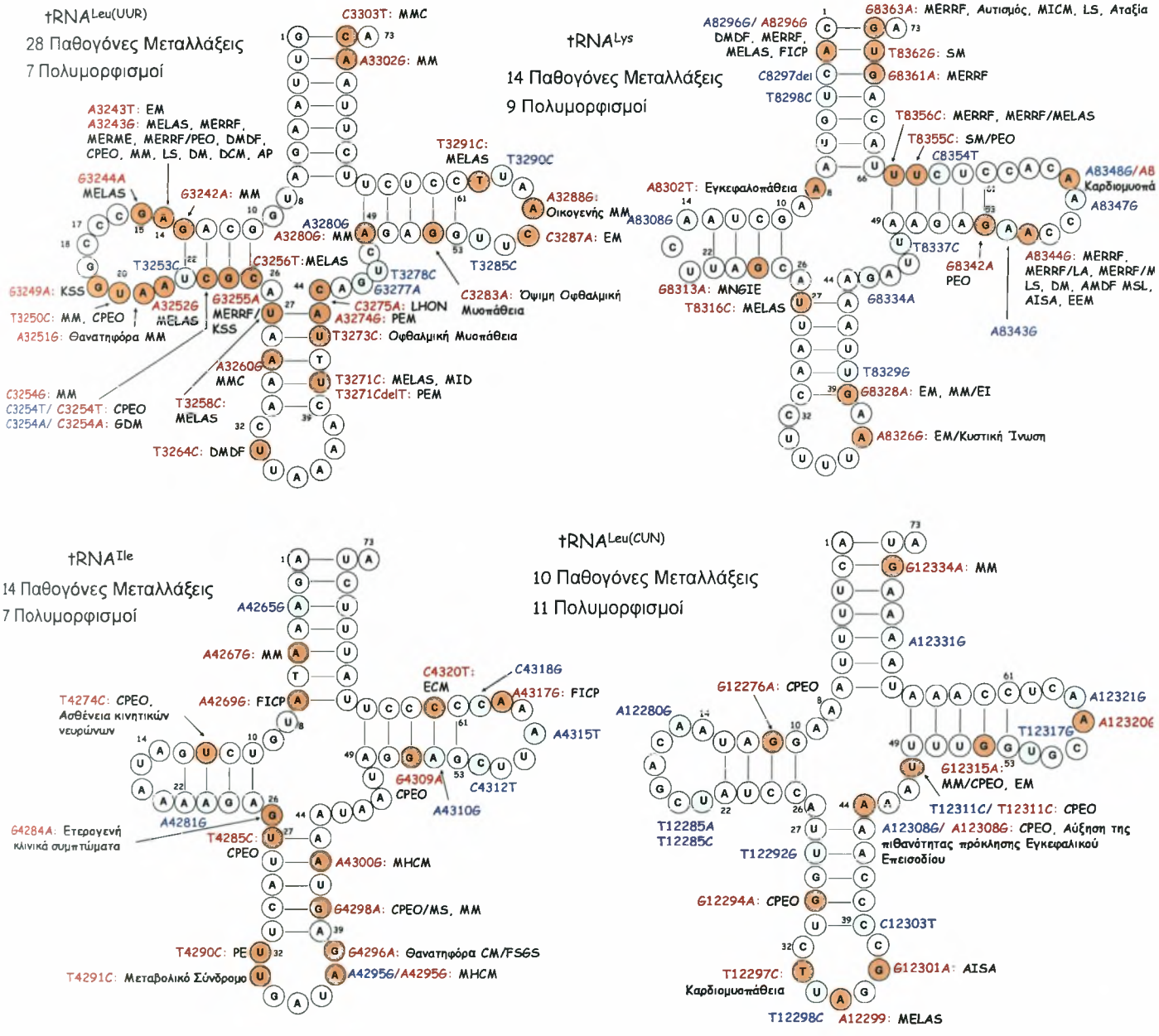
και κατανέμονται ομοιόμορφα σε ολόκληρο το μόριο των tRNA, τόσο στους βραχίονες όσο και στις θηλιές. Αυτές που εντοπίζονται στους βραχίονες διαταράσσουν το φυσιολογικό ζευγάρωμα των βάσεων που έχει διατυπωθεί από τους Watson και Crick, και συνήθως εμφανίζονται ως C-A ή G-U. Επιπλέον, υπάρχει σχεδόν πλήρης απουσία μεταλλάξεων στην τριπλέτα του αντικωδικονίου, καθώς τα συγκεκριμένα κατάλοιπα είναι συντηρημένα εξελικτικά και οποιαδήποτε αλλαγή βάσεως στο σημείο αυτό θα μπορούσε να αποβεί μοιραία για τη διαδικασία της πρωτεϊνοσύνθεσης. Έχει παρατηρηθεί ότι οι περισσότερες παθογόνες μεταλλάξεις επηρεάζουν νουκλεοτίδια που έχουν δείξει υψηλό βαθμό συντήρησης με το χρόνο, ενώ οι περισσότερες πολυμορφικές στοχεύουν όχι σε τόσο συντηρημένα κατάλοιπα, χωρίς όμως αυτό να είναι απόλυτο.

ΠΙΝΑΚΑΣ 3

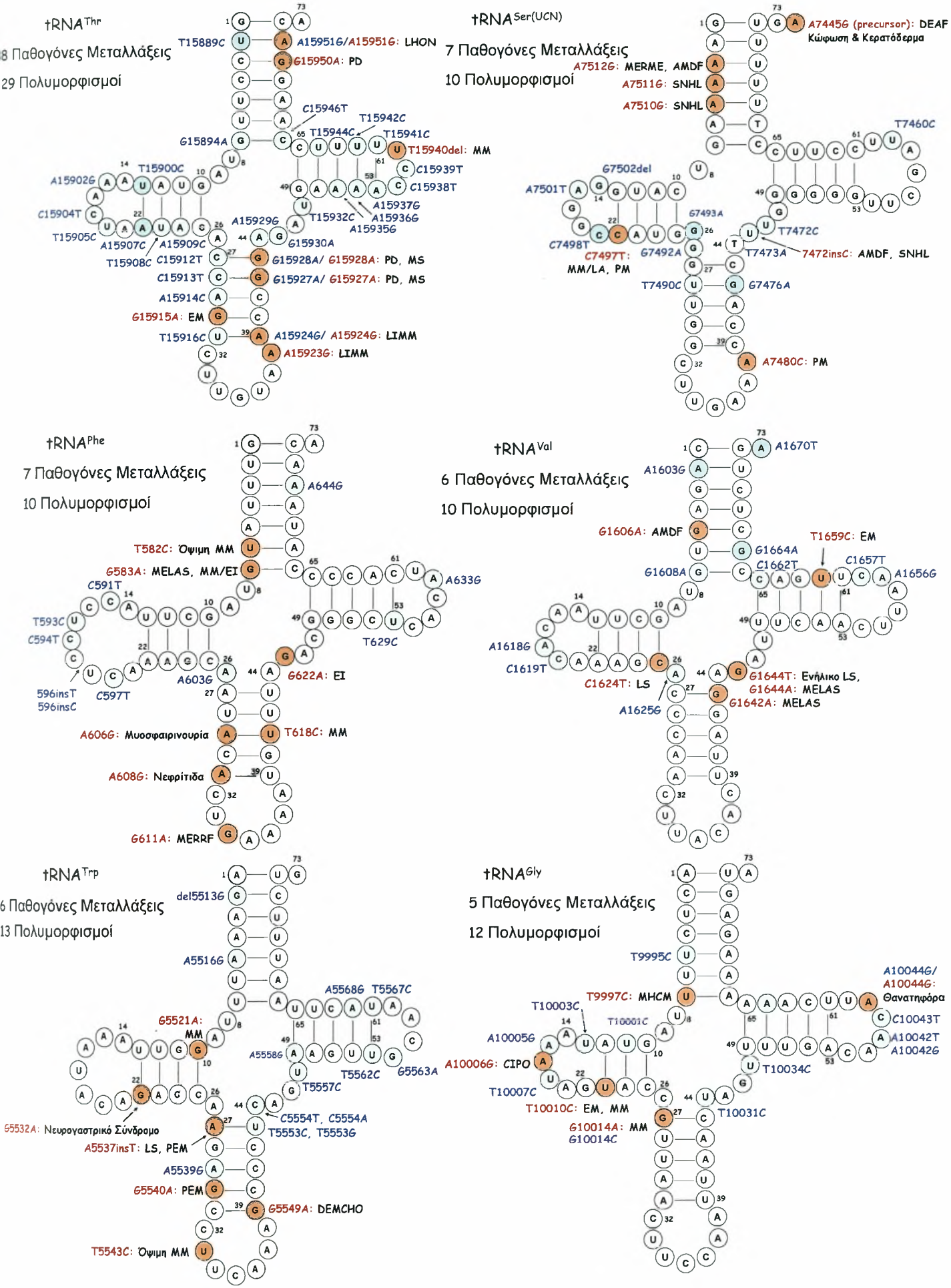
tRNA	Αριθμός παθογόνων μεταλλάξεων	Αριθμός πολυμορφικών μεταλλάξεων
$tRNA^{Leu(UUR)}$	28	7
$tRNA^{Lys}$	14	9
$tRNA^{Ile}$	14	7
$tRNA^{Leu\ (CUN)}$	10	11
$tRNA^{Thr}$	8	29
$tRNA^{Ser(UCN)}$	7	10
$tRNA^{Phe}$	7	10
$tRNA^{Val}$	6	10
$tRNA^{Trp}$	6	13
$tRNA^{Gly}$	5	12
$tRNA^{Tyr}$	4	7
$tRNA^{Pro}$	4	9
$tRNA^{Asn}$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

Πίνακας 3: *Παθογόνες και ουδέτερες μεταλλάξεις στα ανθρώπινα μιτοχονδριακά tRNA γονίδια. Τα δεδομένα πάρθηκαν από δικτυακές βάσεις δεδομένων (www.mitomap.org και www.genpat.uu.se/mtDB).*

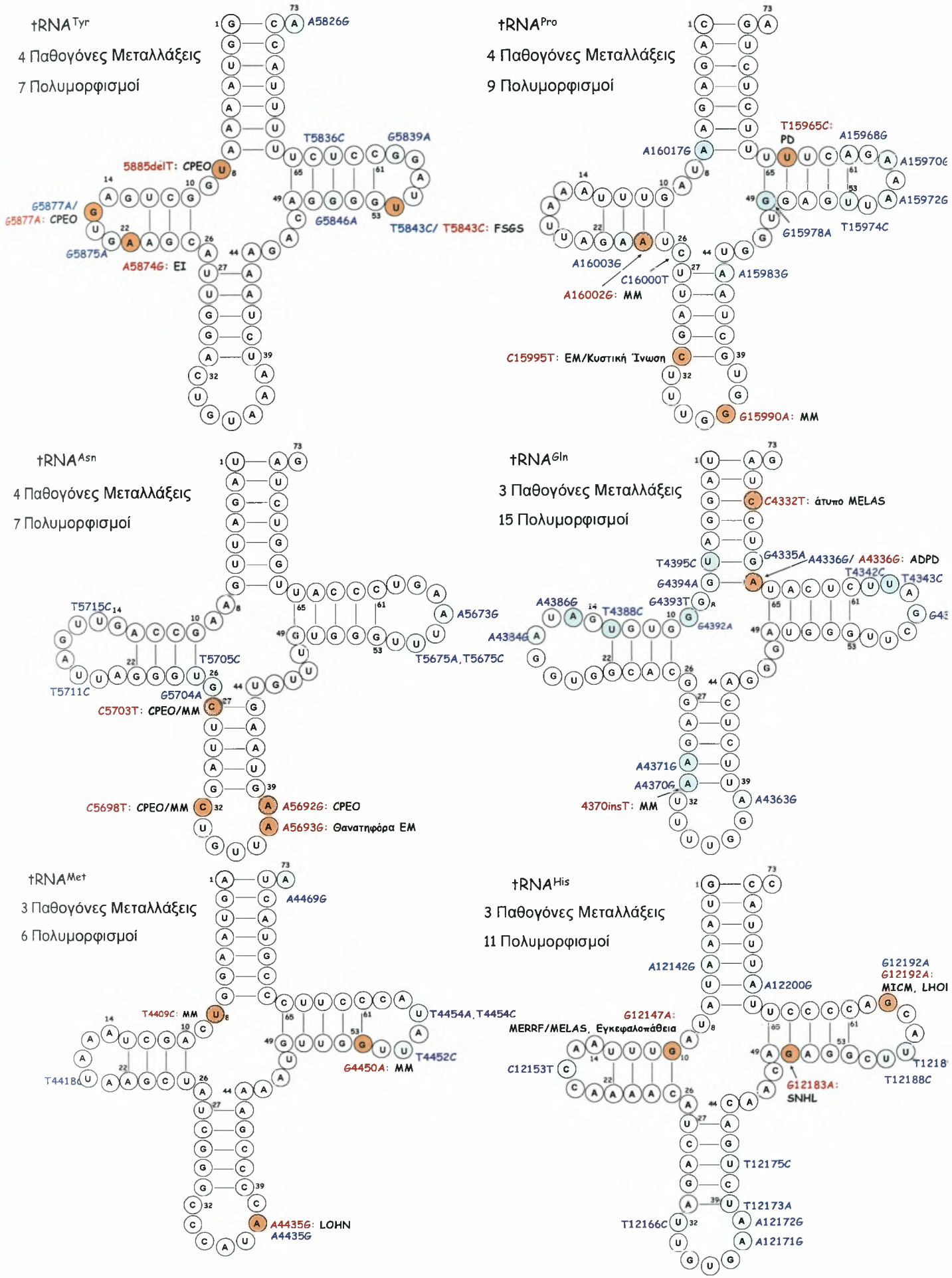
Επιπλέον, το αν μια παθογόνος μετάλλαξη μπορεί να οδηγήσει στον κλινικό φαινότυπο μιας ασθένειας εξαρτάται από τον βαθμό της ετεροπλασμίας του μιτοχονδριακού DNA στο κύτταρο. **Ετεροπλασμία** ονομάζεται η συνύπαρξη φυσιολογικού και μεταλλαγμένου DNA στο κύτταρο, που δημιουργείται ύστερα από τη κυτταρική διαίρεση όπου τα μιτοχόνδρια και τα γονιδιώματα τους κατανέμονται τυχαία στα θυγατρικά κύτταρα. Η αναλογία των μεταλλαγμένων έναντι των φυσιολογικών mtDNA καθορίζει την έκφραση και σοβαρότητα του νοσήματος. Οι παθογόνες μεταλλάξεις των tRNA γονιδίων είναι συνήθως ετεροπλασμικές, ενώ οι πολυμορφισμοί είναι ομοπλασμικοί.



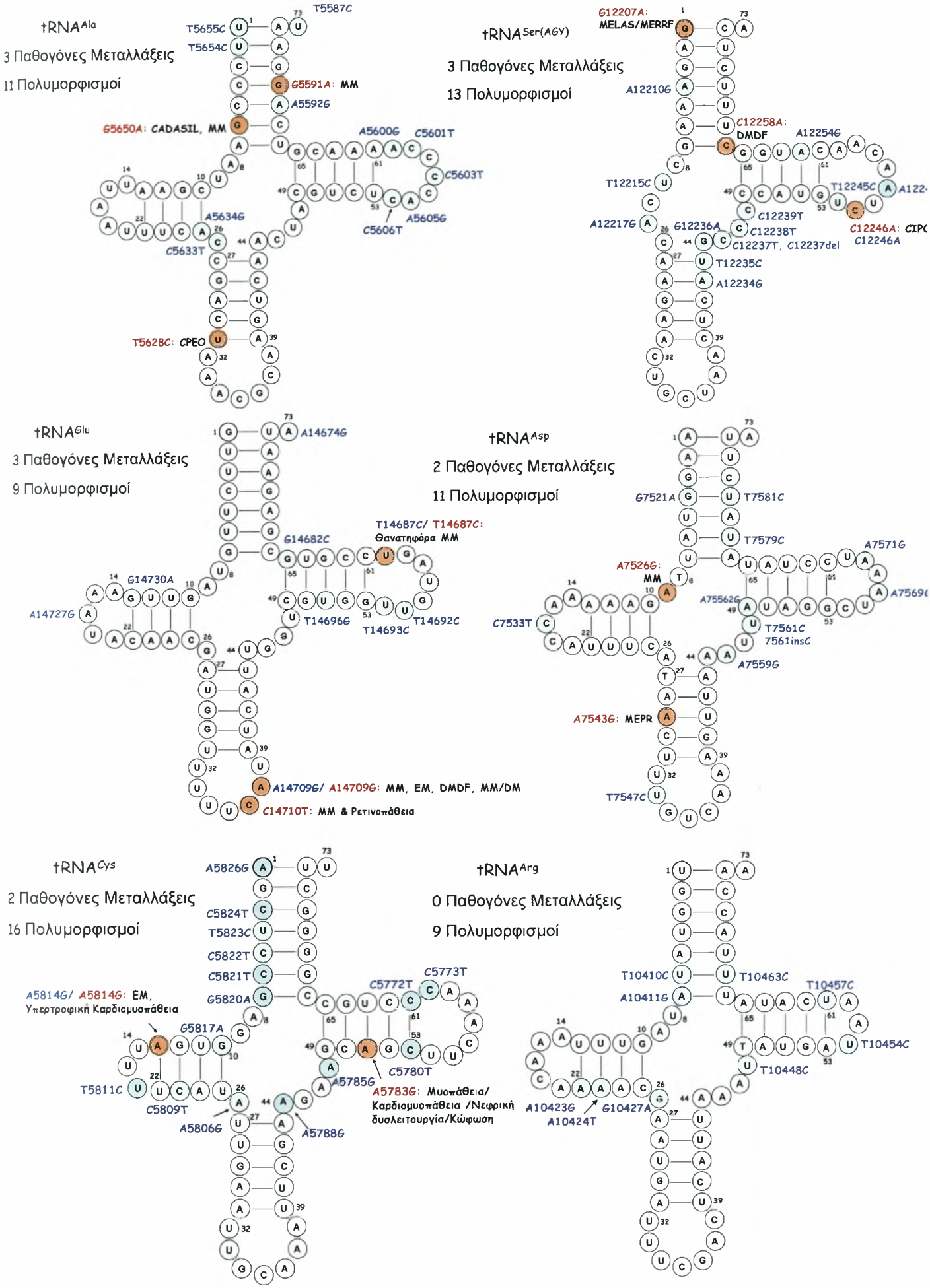
Εικόνα 8. Μέρος 1. *Για λεζάντα βλέπε σελ. 23.*



Εικόνα 8. Μέρος 2. *Για λεζάντα βλέπε σελ. 23.*



Εικόνα 8. Μέρος 3. *Για λεζάντα βλέπε σελ.23.*



Εικόνα 8. Μέρος 4. *Για λεζάντα βλέπε σελ. 23.*

Εικόνα 8. *Παθογόνες και πολυμορφικές μεταλλάξεις στα ανθρώπινα μιτοχονδριακά tRNA. Οι παθογόνες μεταλλάξεις απεικονίζονται με κόκκινο ενώ οι πολυμορφισμοί με κυανό. Οι αλληλουχίες των tRNA πάρθηκαν από την βάση δεδομένων αναφοράς www.tRNA.uni-bayreuth.de και οι παθογόνες και πολυμορφικές μεταλλάξεις από τις www.mitomap.org και www.genpat.uu.se/mtDB βάσεις δεδομένων. Στο σχήμα αναφέρονται επίσης οι ασθένειες που οφείλονται σε αυτές τις μεταλλάξεις:. ADPD: Νόσος Alzheimer και Parkinson, AISA: Επίκτητη ιδιοπαθής σιδηροβλαστική αναιμία, AP: Ασυμπτωματική πρωτεϊνουρία, BD: Διπολική διαταραχή, CIPO: Χρόνια εντερική ψευδοαπόφραξη, CPEO: Χρόνια προοδευτική έξω οφθαλμοπληγία, DCM: Διατακτική καρδιομυοπάθεια, DEAF: Μητρικά κληρονομούμενη κώφωση, DM: Σακχαρώδης διαβήτης, DMDF: Κληρονομούμενος σακχαρώδης διαβήτης με κώφωση, ECM: εγκεφαλοκαρδιομυοπάθεια, EEM: Εγκεφαλοεντερομυοπάθεια, EI: Μη ανοχή στην άσκηση, EM: Εγκεφαλομυοπάθεια, FSGS: Είδος νεφρίτιδας με πρόβλημα «εστιασμένο» σε τμήμα των νεφρικών σπειραμάτων, GDM: Σακχαρώδης διαβήτης κατά την περίοδο της εγκυμοσύνης, KSS: Σύνδρομο Kearns-Sayre, LA: Γαλακτική οξέωση, LHON: Κληρονομική οπτική νευροπάθεια του Leber, LIMM: Θανατηφόρος βρεφική μυοπάθεια, LS: Σύνδρομο Leigh, MELAS: Μιτοχονδριακή εγκεφαλομυοπάθεια, γαλακτική οξέωση και εγκεφαλικά επεισόδια, MEPR: Μυοκλονική επιληψία με ψυχοκινητική καθυστέρηση, MERRF: Μυοκλονική επιληψία με ανώμαλες ερυθρές μυϊκές ίνες, MERME: επικάλυψη των συνδρόμων MERRF/MELAS, MHCM: Μητρικά κληρονομούμενη υπερτροφική καρδιομυοπάθεια, MICM: Μητρικά κληρονομούμενη καρδιομυοπάθεια, MID: Μητρικά κληρονομούμενος διαβήτης, MM: Μιτοχονδριακή μυοπάθεια, MNGIE: μιτοχονδριακή νευρογαστροεντερική εγκεφαλοπάθεια, MS: Σκλήρυνση κατά πλάκας, MSL: Πολλαπλή λιπομάτωση, PEM: Προοδευτική εγκεφαλομυοπάθεια, PEO: προοδευτική έξω οφθαλμοπληγία, SNHL: Νευροαισθητήρια κώφωση.*

2.7. ΓΕΝΙΚΑ ΓΙΑ ΤΟΥΣ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥΣ

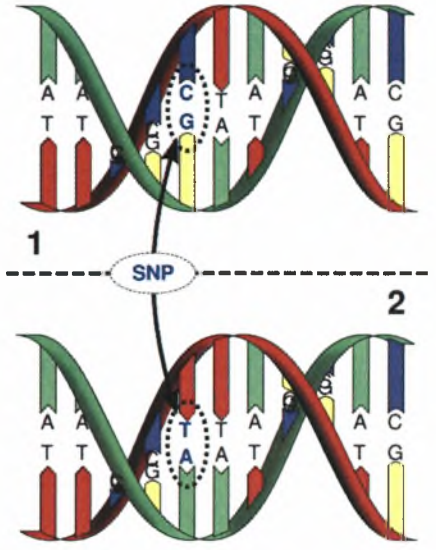
2.7.1 ΓΕΝΕΤΙΚΟΙ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ

Η κλασική μεντελική θεώρηση του γονιδιώματος χαρακτηρίζει τα αλληλόμορφα των γονιδίων είτε ως άγριου τύπου, είτε ως μεταλλαγμένα. Στη πορεία αναγνωρίστηκε η ύπαρξη πολλαπλών αλληλομόρφων για κάθε γονίδιο, καθένα από τα οποία έχει διαφορετική επίδραση στο φαινότυπο. Η ύπαρξη πολλαπλών αλληλομόρφων (multiple alleles) ενός γενετικού τόπου (genetic locus) αναφέρεται ως **γενετικός πολυμορφισμός (polymorphism)**. Κάθε τόπος για τον οποίο υπάρχουν πολλαπλά αλληλόμορφα σε σταθερές συχνότητες μέσα στο πληθυσμό είναι εξ' ορισμού πολυμορφικός. Ένα αλληλόμορφο θεωρείται πολυμορφικό εάν απαντάται στο πληθυσμό σε συχνότητα >1%. Τα μεταλλαγμένα αλληλόμορφα είναι επίσης πολυμορφικά, όμως στη περίπτωση αυτή αλλοιώνεται η λειτουργία της πρωτεΐνης που παράγεται από το γονίδιο και άρα μεταβάλλεται ο φαινότυπος. Ακόμη είναι πολυμορφικά και τα αλληλόμορφα άγριου τύπου όπως γίνεται άμεσα αντιληπτό από το φαινότυπο. Διαφορετικές παραλλαγές ενός αλληλομόρφου άγριου τύπου μπορεί να διακριθούν μεταξύ τους από διαφορές στην αλληλουχία τους. Αυτές, ωστόσο, δεν επηρεάζουν τη λειτουργικότητα του αλληλομόρφου και κατά συνέπεια δεν οδηγούν σε φανοτυπικές αλλαγές. Ένας πληθυσμός μπορεί να εμφανίζει εκτεταμένο πολυμορφισμό στο επίπεδο του γονοτύπου. Σε κάθε γενετικό τόπο είναι δυνατόν να υπάρχουν πολλές διαφορετικές παραλλαγές της αλληλουχίας. Μερικές από αυτές είναι προφανείς, επειδή επηρεάζουν το φαινότυπο, ενώ άλλες μπορεί να είναι κρυφές, χωρίς παρατηρήσιμες συνέπειες. Επομένως κάποιες αλλαγές τις αλληλουχίας του DNA: i) δεν αλλάζουν την αλληλουχία της πρωτεΐνης ii) αλλάζουν την αλληλουχία, χωρίς να επηρεάζουν τη λειτουργικότητα της iii) δημιουργούν πρωτεΐνες με διαφορετική λειτουργία iv) δημιουργούν μη λειτουργικές πρωτεΐνες.

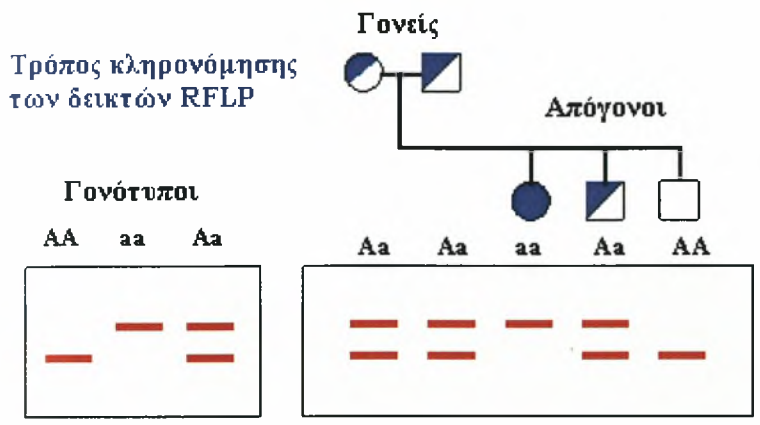
2.7.2 ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ ΜΟΝΟΥ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΟΥ (SNPs)

Όταν τα αλληλόμορφα διαφέρουν μόνο σε ένα νουκλεοτίδιο (A,G,C,T) το φαινόμενο καλείται **πολυμορφισμός μονού νουκλεοτιδίου (**Single Noucleotide **P**olymorphism**).** Η συχνότητα τέτοιων αλλαγών στο ανθρώπινο γονιδίωμα είναι περίπου μία ανά ~1.330 βάσεις. Κάθε άνθρωπος χαρακτηρίζεται από ένα μοναδικό πρότυπο SNP. Οι αλλαγές αυτές συμβαίνουν είτε στις κωδικές περιοχές των γονιδίων, είτε στις περιοχές ανάμεσα τους. Ένας SNP δεν οδηγεί αποκλειστικά στην αλλαγή της αμινοξικής αλληλουχίας της παραγόμενης πρωτεΐνης, εξαιτίας του εκφυλισμού του γενετικού κώδικα. Εάν η αλλαγή δεν επηρεάσει τη σύνθεση της πρωτεΐνης τότε ονομάζεται *συνώνυμη* (πολλές φορές καλείται σιωπηλή μετάλλαξη), ενώ εάν έχει ως αποτέλεσμα τη σύνθεση μιας διαφορετικής αλυσίδας ονομάζεται *μη συνώνυμη*.

Επιπλέον, οι αλλαγές που δεν επηρεάζουν περιοχές που κωδικοποιούν πρωτεΐνες, μπορεί να επηρεάζουν το μάτισμα των γονιδίων, τη σύνδεση των μεταγραφικών παραγόντων ή την αλληλουχία του μη κωδικού RNA. Οι SNP μπορεί να προσδιοριστούν με διάφορους τρόπους, όπως με απευθείας σύγκριση αλληλουχιών, με φασματοσκοπία μάζας ή βιοχημικές μεθόδους που ανιχνεύουν διαφορές σε πολυμορφικές θέσεις εντός μιας συγκεκριμένης περιοχής. Με βάση τη παρατηρούμενη συχνότητά τους στο γονιδίωμα υπολογίζεται ότι το σύνολο του ανθρώπινου πληθυσμού θα πρέπει να περιέχει >10 εκατομμύρια SNP, που απαντώνται με συχνότητα >1%. Ήδη έχουν αναγνωριστεί >1 εκατομμύριο τέτοιο πολυμορφισμοί. Μερικοί πολυμορφισμοί του γονιδιώματος είναι δυνατόν να ανιχνευθούν με σύγκριση των χαρτών περιορισμού που παράγονται με ανάλυση του γονιδιωματικού DNA διαφορετικών ατόμων. Το κριτήριο είναι η αλλαγή στο πρότυπο των τμημάτων που παράγονται από τη πέψη με ένα ένζυμο περιορισμού. Τα τμήματα αρχικά πέπτονται από το ένζυμο περιορισμού, στη συνέχεια διαχωρίζονται βάσει του μήκους τους σε ηλεκτροφόρηση πηκτής αγαρόζης και τελικά μεταφέρονται σε μια μεμβράνη μέσω της τεχνικής Southern Blot. Η υβριδοποίηση της μεμβράνης με ένα σημασμένο ανιχνευτή DNA καθορίζει το μέγεθος των τμημάτων που είναι συμπληρωματικά με τον ανιχνευτή. Οι διαφορές ανάμεσα στους χάρτες περιορισμού δύο ατόμων αποκαλούνται **πολυμορφισμοί μήκος τμημάτων περιορισμού** (**R**estriction **F**ragment **L**ength **P**olymorphisms). Ουσιαστικά ένας RFLP είναι ένας SNP που εντοπίζεται στη θέση αναγνώρισης ενός ένζυμου περιορισμού. Ένας RFLP μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως γενετικός δείκτης με τον ίδιο ακριβώς τρόπο που χρησιμοποιείται οποιοσδήποτε άλλος πολυμορφικός δείκτης. Αντί να εξετάσουμε κάποιο φαινοτυπικό χαρακτηριστικό μπορούμε να αναλύσουμε απευθείας το γονότυπο με τη βοήθεια του χάρτη περιορισμού. Οι RFLP χρησιμεύουν για την ταυτοποίηση ατόμων (γενετικό αποτύπωμα), για τον κατηγορηματικό προσδιορισμό της πατρότητας, για τον χαρακτηρισμό της γενετικής ποικιλότητας μεταξύ πληθυσμών, για τη γενετική χαρτογράφηση και τη γενετική ανάλυση διάφορων ασθενειών ανάμεσα στα μέλη οικογενειών.



Εικόνα 9: *Ο DNA κλώνος 1 διαφέρει από τον κλώνο 2 κατά ένα ζεύγος βάσεων (πολυμορφισμός C/T).*



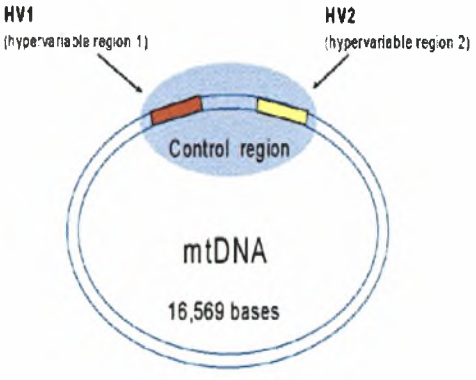
Εικόνα 10: *Τρόπος κληρονόμησης των αλληλικών RFLP τμημάτων ανάμεσα στα μέλη (δύο αλληλόμορφα για κάθε άτομο) μιας οικογένειας, όπως φαίνεται με τη τεχνική Southern Blot.*

2.8 ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟΙ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ & Η ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΟΥΣ

2.8.1 ΕΞΕΛΙΚΤΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ

Ο μεγάλος ρυθμός μεταλλαξιγένεσης, το ότι δεν είναι υψηλά συντηρημένο και η απουσία του γενετικού ανασυνδυασμού στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα το καθιστά ως μια σημαντική πηγή πληροφοριών για την εξελικτική βιολογία, καθώς και για πληθυσμιακές γονιδιακές μελέτες· μελέτες δηλαδή της κατανομής των αλληλικών συχνοτήτων, που μεταβάλλονται από τις τέσσερις εξελικτικές δυνάμεις: τη φυσική επιλογή, τη γενετική παρέκκλιση, τη μεταλλαγή και την γονιδιακή ροή. Καθώς ολόκληρο το μιτοχονδριακό DNA κληρονομείται σαν αδιάσπαστη μονάδα ή *απλότυπος*, οι συγγένειες μεταξύ διάφορων ατόμων μπορούν να απεικονιστούν σχηματικά σε γενεολογικά δέντρα. Γενεολογικά ή εξελικτικά, δέντρα είναι σχεδιαγράμματα τα οποία απεικονίζουν τις εξελικτικές σχέσεις μεταξύ διάφορων βιολογικών ειδών που προέρχονται από κοινό πρόγονο. Στα «δέντρα» αυτά κάθε «κλαδί», ή κόμβος, αντιπροσωπεύει έναν κοινό πρόγονο και καταλήγει σε «παρακλάδια» που αντιπροσωπεύουν τους απογόνούς του. Κάθε κόμβος ονομάζεται ταξινομική μονάδα και το μήκος του αντιστοιχεί στο χρονικό διάστημα που διανύθη. Τα πρότυπα που απεικονίζονται με τα γενεολογικά δέντρα χρησιμοποιούνται για την εξαγωγή συμπερασμάτων για την εξελικτική πορεία των διάφορων πληθυσμών. Το γεγονός ότι το μιτοχονδριακό DNA κληρονομείται μητρικά, δίνει τη δυνατότητα στους ερευνητές, μελετώντας τους πολυμορφισμούς του με τη βοήθεια ειδικών περιοριστικών ενζύμων (ανάλυση RFLP), να αποτυπώσουν σε βάθος χρόνου την γραμμή της μητρική γενεάς (maternal lineage). Αναλυτικότερα, αυτό επιτυγχάνεται ύστερα από αλληλούχιση μίας ή περισσότερες εκ των **υπερμεταβλητών ρυθμιστικών περιοχών (hypervariable control regions) του ανθρώπινου μιτοχονδριακού γονιδιώματος (HVR1 ή HVR2).** Η HVR1 περιοχή αποτελείται από περισσότερα από 440 ζευγάρια βάσεων, των οποίων οι πολυμορφισμοί, μπορούν να συγκριθούν με ρυθμιστικές περιοχές άλλων ατόμων (είτε

πραγματικών ατόμων, είτε από βάσεις δεδομένων), για να καθοριστεί η γραμμή της μητρικής γενεάς. Μία κλασική εφαρμογή της μελέτης της γραμμής αυτής είναι ο προσδιορισμός της προέλευσης της ανθρωπότητας. Συγκεκριμένα, είναι ο χρονολογικός προσδιορισμός της μιτοχονδριακής Εύας, με τη τεχνική του μοριακού ρολογιού· τεχνική με την οποία υπολογίζεται ο χρόνος απόκλισης δύο ειδών βάσει των αλλαγών (πολυμορφισμών) που εντοπίζονται στις DNA αλληλουχίες ή πρωτεΐνες των ειδών αυτών. Ακολουθώντας, λοιπόν, το μονοπάτι της εξέλιξης του μιτοχονδριακού DNA και μόνο τη γραμμή της μητρικής γενεάς, αποδεικνύεται ότι η μιτοχονδριακή Εύα είναι ο πιο πρόσφατος κοινός πρόγονος όλων των σύγχρονων ανθρώπων και προέρχεται από την Αφρική. Εν τούτοις, το μιτοχονδριακό DNA αντιπροσωπεύει την ιστορία μόνο των θηλυκών ατόμων του πληθυσμού και άρα δεν μπορεί να αντιπροσωπεύσει την ιστορία του πληθυσμού ως σύνολο. Γενικά, για να εξαχθούν αντιπροσωπευτικά συμπεράσματα για την ιστορική εξέλιξη ενός πληθυσμού θα πρέπει να μελετηθεί τόσο το μιτοχονδριακό όσο και το πυρηνικό γονιδίωμα.



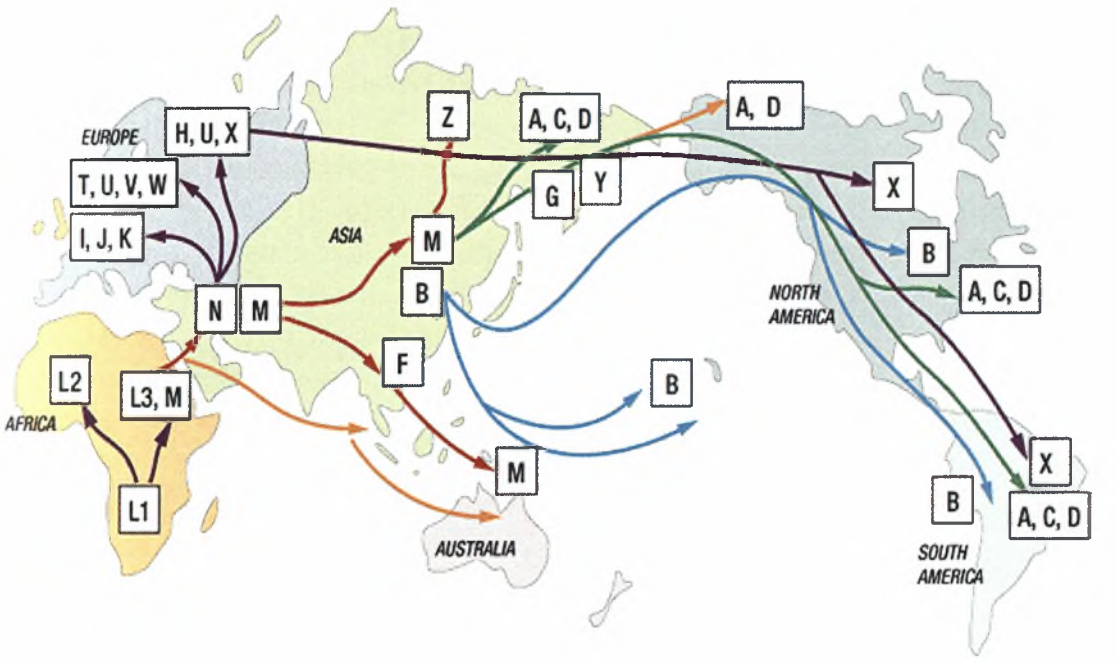
Εικόνα 11: *Η ρυθμιστική περιοχή (control region) ή αλλιώς μη κωδικοποιούσα περιοχή του mtDNA αποτελείται από δύο υψηλά πολυμορφικές περιοχές τις HV1 και HV2.*

2.8.2 ΑΝΘΡΩΠΙΝΕΣ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΕΣ ΑΠΛΟΟΜΑΔΕΣ

Κάθε άνθρωπος έχει ένα μοναδικό συνδυασμό SNP και RFLP. Ο συγκεκριμένος συνδυασμός πολυμορφικών θέσεων που βρίσκονται σε μια καθορισμένη χρωμοσωμική περιοχή καλείται **απλότυπος** και είναι ένας γονότυπος σε μικρογραφία. Ο απλότυπος ορίζεται επίσης ως η ομάδα διαφορετικών αλληλομόρφων και γενετικών τόπων, τα οποία συγκληρονομούνται από ένα άτομο στους απογόνους του. Η εισαγωγή της έννοιας αρχικά αποσκοπούσε στο να περιγράψει τη σύσταση του γενετικού τόπου του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας, μιας περιοχής που κωδικοποιεί πρωτεΐνες σημαντικές για το ανοσοποιητικό σύστημα. Πλέον η έννοια έχει επεκταθεί έτσι ώστε να αναφέρεται στον ακριβή συνδυασμό αλληλομόρφων ή θέσεων ενζύμων περιορισμού που εντοπίζονται σε μια συγκεκριμένη περιοχή του γονιδιώματος. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, το μιτοχονδριακό DNA κληρονομείται ως ένας απλότυπος. Στις εξελικτικές μελέτες γίνεται χρήση των **απλοομάδων (haplogroups)**, οι οποίες είναι ομάδες που αποτελούνται από παρεμφερείς απλότυπους που προέρχονται από έναν κοινό πρόγονο και με τον οποίο μοιράζονται κοινούς SNP. Τα ονόματα

των απλοομάδων αντιστοιχούν σε συνδυασμούς καθορισμένων γραμμάτων της αλφαβήτου και αριθμών. Οι **ανθρώπινες μιτοχονδριακές DNA απλοομάδες** καθορίζονται από διαφορές στο ανθρώπινο mtDNA και οδήγησαν τους ερευνητές στο να εντοπίσουν τη μητρική γενεά των σύγχρονων ανθρώπων στην Αφρική. Το σύνολο των ομάδων αυτών περιγράφεται με τα ακόλουθα κωδικά γράμματα: A, B, C, CZ, D, E, F, G, H, pre-HV, HV, I, J, pre-JT, JT, K, L0, L1, L2, L3, L4, L5, L6, L7, M, N, P, Q, R, S, T, U, UK, V, W, X, Y, and Z. Οι mtDNA απλοομάδες είναι επίσης καθορισμένες βάσει γεωγραφίας. Για παράδειγμα:

- Αφρικανοί: L, L1, L2, L3
- Νοτιοευρωπαίοι: J, K
- Κεντροευρωπαίοι: H, V
- Βορειοευρωπαίοι: T, U, X
- Ασιάτες: A,B,C,D,E,F,G και M (όπου M: C,D,E,G)
- Λατινοαμερικάνοι: A,B,C,D και μερικές φορές X



ΠΙΝΑΚΑΣ 4 **Εξάπλωση (σε χρόνια)**	
Αφρική	120.000-150.000
Έξω από την Αφρική	55.000-75.000
Ασία	40.000-70.000
Αυστραλία	40.000-60.000
Ευρώπη	35.000-50.000
Αμερική	15.000-35.000
Αλάσκα	8.000-10.000

Εικόνα 12: *Υποθετικός χάρτης των ανθρώπινων mtDNA απλοομάδων που απεικονίζει τη προέλευση των ανθρώπων από την Αφρική καθώς και την μετέπειτα εξάπλωση τους σε ολόκληρη την υδρόγειο. Στον* ***πίνακα 4*** *απεικονίζονται οι χρόνοι εξάπλωσης ξεκινώντας από την Αφρική και συνεχίζοντας στις υπόλοιπες ηπείρους.*

2.9 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η ανίχνευση και η ταυτοποίηση ουδέτερων πολυμορφισμών σε μιτοχονδριακά tRNA γονίδια, οι οποίοι δεν επηρεάζουν τη δομική ακεραιότητα ή τη λειτουργικότητα των μιτοχονδριακών tRNA, αλλά συνεισφέρουν στην ποικιλομορφία μεταξύ των ανθρώπινων πληθυσμών. Η μελέτη έγινε πάνω σε μια ομάδα φυσιολογικού (χωρίς κλινικά συμπτώματα) ανθρώπινου ελληνικού πληθυσμού. Τα tRNA γονίδια που επιλέχθηκαν να μελετηθούν είναι πέντε: το $tRNA^{Leu(UUR)}$, το $tRNA^{Lys}$, το $tRNA^{His}$, το $tRNA^{Ser(AGY)}$ και το $tRNA^{Leu(CUN)}$. Τα δύο πρώτα γονίδια συγκεντρώνουν μικρότερο αριθμό ουδέτερων πολυμορφισμών (7 και 9 αντίστοιχα), ενώ τα τρία τελευταία μεγαλύτερο (11, 13 και 11 αντίστοιχα). Επιπρόσθετα, επιλέχθηκαν να μελετηθούν και παρακείμενα τμήματα των γονιδίων αυτών. Συγκεκριμένα για το $tRNA^{Leu(UUR)}$, η μελέτη επεκτάθηκε στην ευρύτερη περιοχή του γονιδίου που το κωδικοποιεί (MT-TL1) συμπεριλαμβανομένων και τμημάτων των παρακείμενων γονιδίων, MT-RNR2 (16S rRNA) και MT-ND1 (αφυδρογονάση του NADH). Ο συνδυασμός PCR-SSCP ήταν η τεχνική που χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση των πολυμορφισμών. Η εν λόγω μελέτη έγινε παράλληλα με μια αντίστοιχη, σκοπός της οποίας ήταν η ανίχνευση των παθογόνων μεταλλάξεων στα ίδια γονίδια με αποτέλεσμα να είναι δυνατή η σύγκριση των φυσιολογικών δειγμάτων με τα παθογόνα. Τα δείγματα τα οποία παρουσίαζαν διαφορές συγκριτικά με τον αναμενόμενο φυσιολογικό πρότυπο, εστάλησαν για αλληλούχιση προκειμένου να ταυτοποιηθεί ο πολυμορφισμός. Η παρούσα εργασία γίνεται για πρώτη φορά στον Ελλαδικό χώρο και έχει ως στόχο να αποτελέσει σημείο αναφοράς και σύγκρισης για μελέτες παθογένειας όσον αφορά τα «μιτοχονδριακά νοσήματα». Επιπλέον, εάν ο αριθμός του δείγματος ήταν πολύ μεγαλύτερος και κατά συνέπεια περισσότερο αντιπροσωπευτικός, θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για την εξαγωγή φυλογενετικών συμπερασμάτων και συσχετίσεων μεταξύ των επιμέρους ελληνικών πληθυσμών.

3. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 ΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΥΛΙΚΟ

Στη παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε ως βιολογικό υλικό ολικό αίμα από ένα σύνολο 150 υγιών ατόμων από την ευρύτερη περιοχή του νομού της Θεσσαλίας. Τα άτομα επιλέχθηκαν τυχαία και δεν είναι συγγενή μεταξύ τους. Τα δείγματα αίματος διατηρήθηκαν σε θερμοκρασία -20^0 C μέχρι την εφαρμογή της διαδικασίας απομόνωσης DNA.

Εικόνα 13: *Δοκιμαστικοί σωλήνες με δείγματα ολικού αίματος στα οποία έχει προστεθεί αντιπηκτικό.*

3.2 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA

Το πρώτο βήμα για τη μελέτη ανίχνευσης πολυμορφισμών σε γονιδιακό επίπεδο, αποτελεί η απομόνωση του μιτοχονδριακού DNA από το ολικό αίμα. Τα κύρια διαλύματα που χρησιμοποιούνται στο πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε είναι:

A. TE Buffer (100mL).

Το διάλυμα αυτό αποτελείται από :

- 10 mM Tris pH 7.4 (0,5 mL από 2 M stock)
  Το Tris χρησιμοποιείται ως ρυθμιστικό του pH.
- 0,1mM EDTA pH 8.0 (20 μL από 0,5 M stock)
  Το EDTA χρησιμοποιείται ως χηλικός παράγοντας δεσμεύοντας κατιόντα Ca^{2+} και Mg^{2+}, τα οποία είναι απαραίτητα για τη δράση νουκλεασών.
- dd-H_2O 99,5 mL
  Το απιονισμένο νερό (double distilled H_2O) είναι απαλλαγμένο από ιόντα.

Το παραπάνω διάλυμα αποθηκεύεται στους 4^oC.

B. Lysis Buffer (100mL & aliquots του 1mL)

- 0,2 M NaCl 1,17 gr
  Το NaCl συμβάλλει στην διάσπαση των κυτταρικών μεμβρανών.
- 0,025M EDTA pH 8 5 mL από 0,5 M stock
- 0,5% SDS 5 mL από 10% stock
  Το δωδεκακυλοθειϊκό νάτριο (SDS: Sodium Dodecyl Sulfate), είναι ένα ανιονικό απορρυπαντικό, το οποίο συμβάλλει στη διάσπαση των κυτταρικών

μεμβρανών, ενώ ταυτόχρονα συντελεί στην αποδιάταξη πρωτεϊνών. Το γεγονός αυτό προστατεύει το DNA από την δράση νουκλεασών.

- 0,2 M Tris pH 8,5 10 mL από 2 M stock
- dd-H_2O μέχρι τα 100 mL

Το Lysis Buffer αποθηκεύεται στους -20°C

❖ Η διαδικασία που ακολουθείται είναι η εξής :

1. Ανάμιξη 100 μL αίματος με 1 mL TE σε eppendorf του 1,5 mL.
2. Ανακίνηση και φυγοκέντρηση για 10 δευτερόλεπτα στις 13000 rpm.
3. Απομάκρυνση του υπερκείμενου και διάλυση του ιζήματος σε 1mL TE.
4. Ανακίνηση και φυγοκέντρηση για 10 δευτερόλεπτα στις 13000 rpm.
5. Απομάκρυνση του υπερκείμενου και διάλυση του ιζήματος σε 1mL TE.
6. Ανακίνηση και φυγοκέντρηση για 10 δευτερόλεπτα στις 13000 rpm.
7. Απομάκρυνση το υπερκείμενου και διάλυση του ιζήματος ξανά σε 200 μL Lysis buffer, προσθέτοντας 20 μL πρωτεϊνάσης Κ (10mg/mL). *Η πρωτεϊνάση Κ συντελεί στην αποδιάταξη των πρωτεϊνών.*
8. Επώαση των δειγμάτων στους 56°C για 45 λεπτά και στη συνέχεια στους 95°C για 10 λεπτά. *Το τελευταίο βήμα της σύντομης θέρμανσης στους 95°C, αποσκοπεί στην απενεργοποίηση της πρωτεϊνάσης Κ.*
9. Πρόσθεση 1mL παγωμένης αιθανόλης 100% (έτσι πραγματοποιείται κατακρήμνιση μόνο του DNA, λόγω της μεγάλης διηλεκτρικής σταθεράς της). Τα δείγματα παραμένουν overnight στους -20°C.

---

10. Την επόμενη μέρα, τα δείγματα φυγοκεντρούνται στις 13000 rpm, για 20 λεπτά, στους 4°C.
11. Απομάκρυνση το υπερκείμενου προσεκτικά και τοποθέτηση του ιζήματος στους 37°C για 1 ώρα.
12. Πρόσθεση 50 μL dd-H_2O και ήπια ανάδευση σε vortex.
13. Ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πηκτή αγαρόζης 1% με σκοπό την ποιοτική ανίχνευση του mtDNA.

➢ Για την παρασκευή **πηκτής αγαρόζης** 1% χρησιμοποιούνται τα εξής :

- 40 ml TAE 1x *
- 0,3 gr αγαρόζης
- 3 μL βρωμιούχο αιθίδιο

Ζυγίζονται και τοποθετούνται 0,3 gr αγαρόζης σε κωνική φιάλη των 100 mL αφού έχουν προστεθεί προηγουμένως 30 mL TAE. Το μίγμα θερμαίνεται (σε φούρνο μικροκυμάτων) για περίπου 1-2 λεπτά μέχρι η αγαρόζη να διαλυθεί πλήρως, και στη συνέχεια προστίθενται προσεκτικά 3 μL βρωμιούχου αιθίδιου. Το βρωμιούχο αιθίδιο (BrEt) έχει την χαρακτηριστική ιδιότητα να φθορίζει στο υπεριώδες καθώς παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων του DNA. Έτσι δίνει

πρότυπα ζωνώσεων που αντιστοιχούν στην ποσότητα του DNA που δέσμευσε το BrEt. Το διάλυμα, αφού έχει μεταφερθεί σε κατάλληλη πλάκα οριζόντιας ηλεκτοφόρησης και έχουν προστεθεί οι κατάλληλες χτένες για το σχηματισμό πηγαδιών, απαιτεί περίπου 20-30 λεπτά για να πήξει πλήρως.

* Το ρυθμιστικό διάλυμα **TAE** 1x παρασκευάζεται από stock διάλυμα 50x. Ανάμιξη 20 mL 50xTAE + 980ml dd-H_2O.
Τα 500 mL του 50x TAE περιέχουν :

- Tris 121 gr
- Οξικό οξύ 28,5mL
- EDTA 0,5M 50mL
- dd-H_2O μέχρι τα 500mL

Η φόρτωση του δείγματος στη πηκτή αγαρόζης γίνεται αφού συμπληρωθεί η συσκευή με το ίδιο διάλυμα TAE 1x μέχρι η πηκτή να είναι πλήρως βυθισμένη στο διάλυμα αυτό. Ακολουθεί ανάμιξη 3μL loading buffer με 5 μL δείγματος και τοποθέτηση τους προσεκτικά σε κάθε πηγαδάκι της πηκτής.
Το **loading buffer** (6x) 10 mL περιέχει:

- 1 mL χρωστική μπλε της βρωμοφαινόλης
- 5 mL γλυκερόλη (συμβάλλει στην καθίζηση του δείγματος μέσα στα πηγαδάκια)
- 0,5 mL TBE 20x
- 3,5 mL dd-H_2O

Η τάση που εφαρμόζεται είναι 100V και τα δείγματα «τρέχουν» στο πήκτωμα έως να διανύσουν τα 2/3 της διαδρομής (για περίπου 20-30 λεπτά). Τέλος, το πήκτωμα παρατηρείται σε συσκευή UV. Όσα δείγματα δίνουν θετικό αποτέλεσμα (ανίχνευση ζωνών) χρησιμοποιούνται στην αντίδραση της PCR.

3.3 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)

3.3.1 ΓΕΝΙΚΑ ΓΙΑ ΤΗΝ PCR

Η **αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης** (**P**olymerase **C**hain **R**eaction) είναι μια τεχνική ευρέως χρησιμοποιούμενη στη μοριακή βιολογία. Είναι ευαίσθητη, γρήγορη, εύκολη και αυτοματοποιημένη τεχνική και αποτελεί ένα σύνηθες και απαραίτητο εργαλείο που χρησιμοποιείται τόσο στα ιατρικά όσο και στα βιολογικά εργαστήρια με πληθώρα εφαρμογών. Αναπτύχθηκε από τον Karyl Mills το 1983, ο οποίος κέρδισε το βραβείο Nobel το 1993 για την δουλειά του αυτή. Το όνομά της προέρχεται από ένα εκ των κύριων συστατικών της, το ένζυμο DNA πολυμεράση, το οποίο χρησιμοποιείται για να ενισχύσει ένα τμήμα DNA μέσω ενζυματικής αντιγραφής *in vitro*. Με την αντίδραση PCR είναι δυνατόν να ενισχυθεί ένα ή αρκετά αντίγραφα ενός τμήματος DNA, δημιουργώντας εκατομμύρια ή και περισσότερα αντίγραφα του συγκεκριμένου

τμήματος. Σχεδόν όλες οι εφαρμογές της PCR περιλαμβάνουν τη χρήση ενός θερμοσταθερού ένζυμου, όπως η πολυμεράση Taq, που απομονώνεται από το θερμόφιλο βακτήριο *Thermus Aquaticus*. Η πολυμεράση συνθέτει έναν νέο κλώνο DNA, χρησιμοποιώντας ως εκμαγείο ένα μονόκλωνο DNA, καθώς και DNA ολιγονουκλεοτίδια (DNA primers), που είναι απαραίτητα για την έναρξη της σύνθεσης. Η πλειοψηφία των μεθόδων PCR χρησιμοποιεί τη διαδικασία της θερμικής κυκλοποίησης, δηλαδή της εναλλαγής θέρμανσης και ψύξης του δείγματος PCR σε μια σειρά προκαθορισμένων σταδίων. Τα στάδια αυτά είναι απαραίτητα ώστε το δίκλωνο DNA, που χρησιμοποιείται ως εκμαγείο, να αποδιαταχθεί φυσιολογικά (σε υψηλές θερμοκρασίες) και στη συνέχεια να λάβει χώρα η ενίσχυση του επιλεγμένου τμήματος DNA και η σύνθεση των νέων κλώνων από τη DNA πολυμεράση (σε χαμηλές θερμοκρασίες). Η επιλεκτικότητα της μεθόδου προκύπτει από την χρήση συγκεκριμένων primers (παραπλήσιας θερμοκρασίας τήξεως *Tm*) συμπληρωματικών με τη περιοχή του τμήματος DNA που επιλέγεται για ενίσχυση. Η επιλογή των primers γίνεται βάσει της περιεκτικότητας σε GC, η οποία θα πρέπει να ξεπερνάει το 50% των επιλεγόμενων βάσεων. Επιπλέον, θα πρέπει να μην υπάρχουν αλληλουχίες που να περιέχουν πολυπουρίνες, πολυπυριμιδίνες και άλλες ασυνήθιστες αλληλουχίες, διότι κάτι τέτοιο οδηγεί σε σχηματισμό διμερών μορφών.

3.3.2. ΑΡΧΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Το τμήμα του γονιδίου που πρόκειται να ενισχυθεί μπορεί να είναι ένα μοναδικό γονίδιο, ένα μέρος ενός γονιδίου ή μια μη κωδική αλληλουχία. Οι περισσότερες μέθοδοι PCR ενισχύουν DNA τμήματα περίπου 10-40 kb. Για την αντίδραση είναι απαραίτητα αρκετά συστατικά και αντιδραστήρια. Αυτά περιλαμβάνουν:

- Ένα τμήμα DNA.
- Ένας ή περισσότεροι primers, συμπληρωματικοί με τα 5΄και 3΄ του τμήματος DNA που πρόκειται να ενισχυθεί.
- Μία DNA πολυμεράση, όπως η Taq πολυμεράση, με βέλτιστη θερμοκρασία τους 70^0 C.
- Τριφωσφορικά δεοξυνουκλεοζίδια (dNTPs), *τα οποία αποτελούν τα δομικά συστατικά από τα οποία η DNA πολυμεράση συνθέτει τους νέους κλώνους DNA.*
- Ρυθμιστικό διάλυμα (buffer solution), *το οποίο δημιουργεί ένα κατάλληλο χημικό περιβάλλον για τη βέλτιστη δραστικότητα και σταθερότητα της DNA πολυμεράσης.*
- Δισθενή κατιόντα, κυρίως Mg^{+2} και Mn^{+2}, εκ των οποίων προτιμάται κυρίως το πρώτο.
- Μονοσθενή κατιόντα καλίου.

Η αντίδραση εκτελείται κυρίως σε όγκο 15-100 μl σε eppendorf των 0.2-0.5 ml σε θερμικό κυκλοποιητή, ο οποίος ρυθμίζει τη διαδοχική θέρμανση και ψύξη των δειγμάτων σε κάθε στάδιο.

3.3.3 ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ tRNA

Πέντε γονίδια tRNA ενισχύθηκαν με την αντίδραση της PCR είναι και για τη διαδικασία αυτή χρησιμοποιήθηκαν τρία ζευγάρια primers (πίνακας 5). Το πρώτο ζευγάρι επιλέχθηκε για να ενισχύσει το γονίδιο $tRNA^{Leu(UUR)}$ (MT-TL1), καθώς και τμήματα των παρακείμενων γονιδίων MT-RNR2 (*16S rRNA*) και MT-ND1 (*NADH αφυδρογονάση*). Το δεύτερο επιλέχθηκε για να ενισχύσει το γονίδιο το $tRNA^{Lys}$. Τέλος, το τρίτο ζευγάρι επιλέχθηκε για να ενισχύσει και τα τρία γονίδια $tRNA^{His}$, $tRNA^{Ser(AGY)}$ και $tRNA^{Leu(CUN)}$.

ΠΙΝΑΚΑΣ 5

tRNA	**FW Primer 5' - 3'** AGGACAAGAGAAATAAGGCC	**νουκλεοτιδική θέση**	**μήκος(bp)**
Leu(UUR)	**RV Primer 5' - 3'** CACGTTGGGGCCTTTGCGTA	(FW 3130-3149) (RV 3423-3404)	294
tRNA	**FW Primer 5' - 3'** GCTCTGAAATCTGTGGAGCA	**νουκλεοτιδική θέση**	**μήκος(bp)**
Lys	**RV Primer 5' - 3'** ACGGTAGTATTTAGTTGGGG	(FW 8172-8191) (RV 8388-8369)	217
tRNA	**FW Primer 5' - 3'** CATCATTACCGGGTTTTCCT	**νουκλεοτιδική θέση**	**μήκος(bp)**
His, Ser(AGY) Leu(CUN)	**RV Primer 5' - 3'** TGGTTATAGTAGTGTGCATG	(FW 12115-12134) (RV 12361-12342)	247

❖ Για μια αντίδραση PCR των 50μL χρησιμοποιηθήκαν τα παρακάτω :

- **DNA** (περίπου 200ngr) 2-3μL
- 50 pmol από τον κάθε **primer** 1μL + 1μL
- 800 μM **dNTPs** (από 40mM) 1μL
- 2 mM **$MgCl_2$** (από 50mM) 2μL
- 1x PCR **Buffer** (από 10x) 5μL
- 1U **Taq** πολυμεράση (5U/μL) 0,2μL
- **dd-H_2O** μέχρι τα 50μL + 37-38μL

3.3.4 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΕΝΙΣΧΥΣΗΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ PCR

❖ Τα στάδια ενίσχυσης για την PCR στον θερμικό κυκλοποιητή ήταν τα ακόλουθα (τα στάδια 2-4 επαναλαμβάνονται για 35 κύκλους):

1. **Αρχικό στάδιο:** Στο στάδιο αυτό η θερμοκρασία ανέρχεται στους 95^0C και διατηρείται για 4 λεπτά.

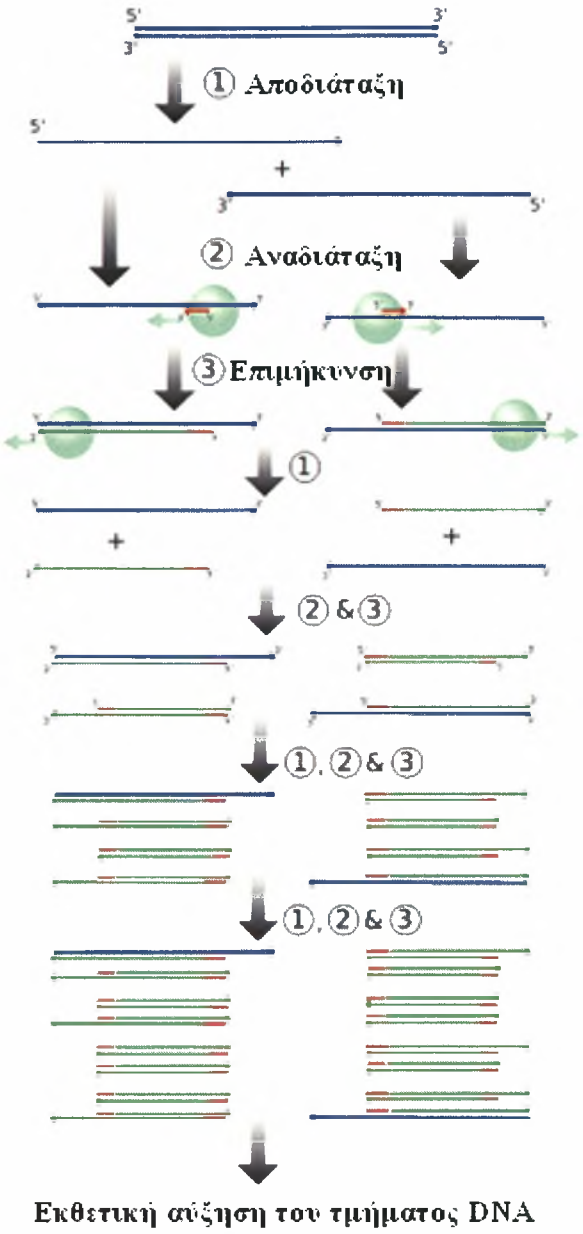
2. **Στάδιο αποδιάταξης:** Στο στάδιο αυτό η θερμοκρασία ανέρχεται στους 95^0C για 30 δευτερόλεπτα. *Το γεγονός αυτό προκαλεί τήξη του τμήματος DNA καθώς διασπώνται οι δεσμοί υδρογόνου μεταξύ των συμπληρωματικών βάσεων των δύο κλώνων, δημιουργώντας μονούς κλώνους DNA.*

3. **Στάδιο αναδιάταξης:** Στο στάδιο αυτό η θερμοκρασία κατέρχεται στους 55^0C για 40 δευτερόλεπτα, επιτρέποντας την υβριδοποίηση των primers με το μονόκλωνο DNA-εκμαγείο. *Γενικά η θερμοκρασία αναδιάταξης είναι 3-5 βαθμούς χαμηλότερη από την θερμοκρασία τήξεως Tm των primers που χρησιμοποιούνται. Όσο περισσότερο συμπληρωματική είναι η αλληλουχία των primers με την αλληλουχία του εκμαγείου, τόσο σταθερότεροι δεσμοί υδρογόνου σχηματίζονται μεταξύ τους. Η DNA πολυμεράση προσδένεται στο υβρίδιο εκμαγείο-primers και ξεκινά τη σύνθεση του νέου DNA.*

4. **Στάδιο επιμήκυνσης:** Στο στάδιο αυτό η θερμοκρασία ανέρχεται ξανά στους 72^0C για 40 δευτερόλεπτα, όπου η Taq πολυμεράση λειτουργεί βέλτιστα. *Στο στάδιο αυτό η DNA πολυμεράση συνθέτει το νέο κλώνο DNA, παρουσία $MgCl_2$, προσθέτοντας dNTPs συμπληρωματικά με τον κλώνο-εκμαγείο, με κατεύθυνση 5' - 3' συμπυκνώνοντας τη 5'-φωσφορική ομάδα των dNTPs με την 3'-υδροξυλομάδα με το τέλος του νεοσυντιθέμενου κλώνου. Η DNA πολυμεράση συνθέτει το νέο κλώνο με εκθετικό ρυθμό, πολυμερίζοντας περίπου 1.000 βάσεις ανά λεπτό.*

5. **Στάδιο τελικής επιμήκυνσης:** Στο στάδιο αυτό η θερμοκρασία παραμένει στους 72^0C για 10 λεπτά, ύστερα από τον τελευταίο κύκλο PCR. *Αυτό γίνεται για να εξασφαλισθεί ότι το απομένον μονόκλωνο DNA έχει πλήρως πολυμεριστεί*

6. **Τελικό στάδιο:** Στο στάδιο αυτό η θερμοκρασία κατέρχεται στους 4^0C. *Έτσι το PCR δείγμα μπορεί να παραμείνει βραχυπρόθεσμα «αποθηκευμένο» στον θερμικό κυκλοποιητή για όσο χρόνο απαιτείται, μέχρι την εφαρμογή της επόμενης τεχνικής.*



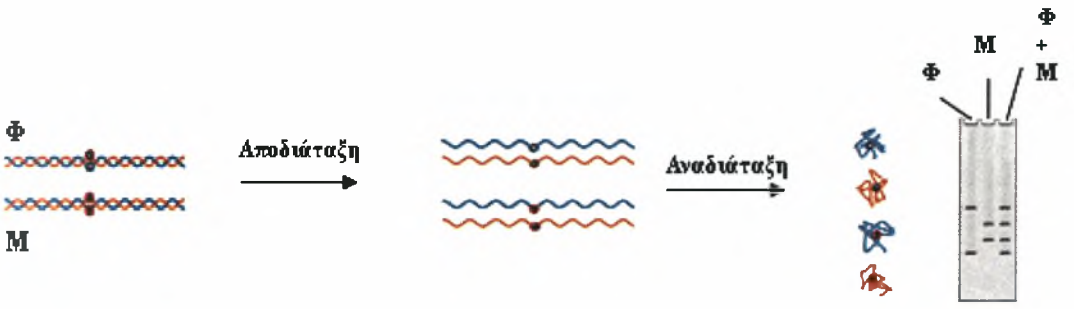
***Εικόνα 14**: Σχηματική απεικόνιση του κύκλου της PCR. **(1) Αποδιάταξη στους 94-96°C (2) Αναδιάταξη στους ~65°C (3) Επιμήκυνση στους 72°C**. Στην εικόνα απεικονίζονται τέσσερις κύκλοι. Οι κυανές γραμμές απεικονίζουν το εκμαγείο DNA στο οποίο οι primers (κόκκινα βέλη) αναδιατάσσουν και η DNA polymerase (πράσινοι κύκλοι) επιμηκύνει με σκοπό να δημιουργήσει μικρότερα προϊόντα PCR (πράσινες γραμμές), τα οποία στη συνέχεια της διαδικασίας χρησιμοποιούνται εκ νέου ως εκμαγεία.*

3.3.5 ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ PCR ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ

Ύστερα από το τέλος της αντίδρασης PCR, η οποία διαρκεί κατά μέσο όρο δύο ώρες, πραγματοποιούμε ηλεκτροφόρηση των PCR προϊόντων σε πήκτωμα αγαρόζης 2% (0,6gr + 30ml TAE 1x), για να διαπιστώσουμε αν όντως έχει πραγματοποιηθεί επιτυχής ενίσχυση. Η ηλεκτροφόρηση γίνεται κατά ανάλογο τρόπο με εκείνη που πραγματοποιούμε για τα προϊόντα απομόνωσης, παρουσία μάρτυρα (blank). Η παρουσία του μάρτυρα καθίσταται αναγκαία καθώς είναι ο μόνος τρόπος για να είμαστε σίγουροι ότι δεν ενισχύθηκαν μη ειδικά προϊόντα. Όσα δείγματα δίνουν θετικό αποτέλεσμα (ανίχνευση ζωνών) χρησιμοποιούνται στην ποιοτική ανάλυση πολυμορφισμών με τη μέθοδο SSCP.

3.4 ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥ ΜΟΝΟΚΛΩΝΗΣ ΑΛΥΣΙΔΑΣ (SSCP)

Η **ανάλυση πολυμορφισμού μονόκλωνης αλυσίδας** (Single Stranded Conformation Polymorphism) χρησιμοποιήθηκε πρώτη φορά το 1989 και αποτελεί μια φθηνή, ευαίσθητη και αξιόπιστη μέθοδο για τον προσδιορισμό της γενετικής ποικιλομορφίας. Στηρίζεται στον ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό μονόκλωνων νουκλεϊκών οξέων βάσει μικρών διαφορών στην αλληλουχία τους, οι οποίες έχουν ως αποτέλεσμα το σχηματισμό μιας διαφορετικής δευτεροταγούς δομής, καθώς και μια μετρίσιμη διαφορά στη κινητικότητα των μορίων αυτών μέσα σε πήκτωμα. Η κινητικότητα των δίκλωνων μορίων DNA μέσα σε ένα ηλεκτροφορητικό πήκτωμα εξαρτάται από το μέγεθος και το μήκος του μορίου και είναι σχετικά ανεξάρτητη από την αλληλουχία των νουκλεοτιδίων του. Εν τούτοις, η κινητικότητα επηρεάζεται αισθητά όταν συμβαίνουν μικρές αλλαγές στην νουκλεοτιδική αλληλουχία, όπως είναι οι πολυμορφισμοί SNP. Αυτό συμβαίνει λόγω της ασταθούς φύσης του μονόκλωνου DNA: απουσία συμπληρωματικού κλώνου, ο μονός κλώνος δύναται να σχηματίσει ενδομοριακούς δεσμούς, οι οποίοι έχουν ως αποτέλεσμα τη δημιουργία αναδιπλώσεων και θηλειών, προσδίδοντας του μία χαρακτηριστική τρισδιάστατη δομή. Η μέθοδος SSCP εκμεταλλεύεται ακριβώς αυτή την ιδιότητα του μονόκλωνου DNA. Τμήματα DNA έως 300-600 bp αναλύονται επιτυχώς. Τροποποιώντας συνθήκες όπως η θερμοκρασία, η σύνθεση του ρυθμιστικού διαλύματος (buffer) και του πηκτώματος καθώς και τις συνθήκες που τρέχουν τα δείγματα, μπορούμε να πάρουμε πληροφορίες για όλες τις διαφορές που προκύπτουν μεταξύ των δειγμάτων.



Εικόνα 15: *Σχηματική αναπαράσταση της ανάλυσης SSCP. Τα δείγματα DNA (φυσιολογικά -Φ και μεταλλαγμένα -Μ) θα πρέπει να υποστούν αποδιάταξη πριν την φόρτωση τους στο πήκτωμα. Μία σημειακή μετάλλαξη είναι ικανή να προσδώσει στη μονόκλωνη αλυσίδα τέτοια μοναδική διαμόρφωση ώστε μετά την ηλεκτροφόρηση, το πρότυπο της αντίστοιχης ζώνης να διαφέρει από αυτό του φυσιολογικού.*

3.4.1 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΤΩΝ PCR ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ

Από τα θετικά δείγματα της PCR, λαμβάνουμε μικρή ποσότητα δείγματος (4μL) τα οποία τοποθετήσαμε σε eppendorf των 250 μL, προσθέτοντας και 10μL αποδιατακτικού διαλύματος (denaturation buffer).

Denaturation Buffer (στα 3 mL)
- 95% φορμαμίδιο (2,85 mL)
- 20 mM EDTA
- 10 mM NaOH
- 0.05% κυανό του ξυλενίου (1,5 μL)
- 0.05% κυανό της βρωμοφαινόλης (1,5 μL)

Ακολούθως, τα δείγματα τοποθετούνται στη συσκευή του θερμοκυκλοποιητή, ούτως ώστε να πραγματοποιηθεί η πλήρης αποδιάταξη των δίκλωνων μορίων DNA, και επιλέγεται το ακόλουθο πρόγραμμα:

1. 92^0 C για 2 λεπτά
2. 95^0 C για 2 λεπτά
3. 97^0 C για 7 λεπτά. (*Τα δείγματα πριν το τέλος του $7^{ου}$ λεπτού εξέρχονται της συσκευής και τοποθετούνται αμέσως σε πάγο προκειμένου να αποφευχθεί η επανασύνδεση των μονόκλωνων μορίων DNA)*

Τα αποδιαταγμένα δείγματα, στη συνέχεια, φορτώνονται σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου.

3.4.2 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΠΗΚΤΗΣ ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΙΟΥ

Συνήθως για τις συγκεντρώσεις πολυακρυλαμιδίου επιλέγονται συγκεντρώσεις από 8% έως 12%. Όσο πιο μικρό σε μήκος είναι το τμήμα του εξεταζόμενου μονόκλωνου μορίου, τόσο πιο πυκνό θα πρέπει να είναι το πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου. Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν τμήματα από 217bp έως 294bp και η συγκέντρωση του πολυακρυλαμιδίου που επιλέχθηκε να χρησιμοποιηθεί ήταν 10%, καθώς ήταν η μόνη που, ύστερα από δοκιμές, επέτρεπε τελικώς την καλύτερη ανάγνωση των αποτελεσμάτων.

❖ Για **2 πηκτώματα** πυκνότητας 10% και 100mL χρησιμοποιήθηκαν:

- 10 gr Ακρυλαμίδιο
- 0.25 gr Δις-ακρυλαμίδιο

Τα πηκτώματα δημιουργούνται ύστερα από πολυμερισμό των δύο αντιδραστηρίων. Το μέγεθος των πόρων του πολυμερούς που προκύπτει είναι συνάρτηση του βαθμού του πολυμερισμού, ο οποίος ποικίλει ανάλογα με τις συγκεντρώσεις των μονομερών.

- 7.5 mL TBE 10x
- 10 mL Γλυκερόλη 50%.

Η προσθήκη γλυκερόλης στο πήκτωμα ελαττώνει την τιμή του pH του διαλύματος ηλεκτροφόρησης που καθορίζεται από την παρουσία του ρυθμιστικού διαλύματος TBE, με αποτέλεσμα να αυξάνεται η ευαισθησία της SSCP ανάλυσης και να λαμβάνονται πιο ευδιάκριτα αποτελέσματα.

Στο σημείο αυτό ακολουθεί διήθηση και συμπλήρωση με H_2O έως τα 100 mL και έπειτα πρόσθεση των:

- 100 μL TEMED
- 600 μL APS 20%

Η αντίδραση πολυμερισμού αρχίζει με την προσθήκη του υπερθειϊκού αμμωνίου (APS: ammonium persulfate), που δημιουργεί ελεύθερες ρίζες : $S_2O_8^{2-} \rightarrow 2\ SO4^{\bullet -}$ που μαζί με το φωτοχημικό καταλύτη N,N΄ τετραμεθυλοαιθυλενοδιαμίνη (TEMED), διαδίδονται στο σύστημα πολυμερισμού.

Τέλος, το ρευστό πήκτωμα, αφού πρώτα πήξει (χρειάζεται περίπου 30 λεπτά), τοποθετείται σε κατάλληλη συσκευή κάθετης ηλεκτροφόρησης. Στη συσκευή προστίθεται ρυθμιστικό διάλυμα TBE 0,5x (100mL TBE 10x + 1900mL H2O) και της εφαρμόζεται τάση 210V. Τα δείγματα, έπειτα, «τρέχουν» στο πήκτωμα για 20 ώρες (overnight) σε θερμοκρασία 4°C. Για τη λήψη των αποτελεσμάτων ακολουθεί χρώση του πηκτώματος.

3.4.3 ΧΡΩΣΗ ΝΙΤΡΙΚΟΥ ΑΡΓΥΡΟΥ (SILVER STAINING)

❖ Για **2 πηκτώματα** χρησιμοποιούνται:

- Δ/μα 1 : 800mL dd-H_2O + 20mL Et100% + 1mL CH_3COOH
- Δ/μα 2 : 400mL $AgNO_3$ 1gr / L (1gr $AgNO_3$ σε 1 L dd-H_2O)
- Δ/μα 3 : 6gr NaOH, + 0,02gr $NaBH_4$ + 2 mL HCHO και dd-H_2O έως 400mL

❖ Τα διαλύματα εμποτίζονται στα πηκτώματα στο ξεπλένονται με dd-H_2O το κάθε ένα με την ακόλουθη σειρά:

1. Α΄ εμποτισμός 200 mL του Δ/ματος 1 για 3 min & πλύση με dd-H_2O
2. Β΄ εμποτισμός 200 mL του Δ/μα 1 για 3 min & πλύση με dd-H_2O
3. Εμποτισμός 200 mL Δ/μα 2 για 20 min & 2 φορές πλύση με dd-H_2O
4. Εμποτισμός 200 mL Δ/μα 3 έως εμφάνιση χρώματος & πλύση με dd-H_2O

3.5 ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ DNA (DNA SEQUENCING)

Τα δείγματα εκείνα που εμφάνισαν διαφορετικά πρότυπα συγκριτικά με τα δείγματα control (δείγματα με φυσιολογικό πρότυπο), εστάλησαν για **ταυτοποίηση της DNA αλληλουχίας τους (DNA sequencing)**, αφού προηγουμένως υποστούν κατάλληλο καθαρισμό.

3.5.1 ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ PCR ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ

Για τον καθαρισμό των PCR προϊόντων χρησιμοποιήθηκαν στήλες QIAquick Spin^{R}. Ο λόγος που πραγματοποιείται είναι για να απομακρυνθούν οι ελεύθεροι ή/και διμερισμένοι primers, τα νουκλεοτίδια, οι DNA πολυμεράσες και άλατα που τυχόν υπάρχουν στο διάλυμα μαζί με τα PCR προϊόντα, ούτως ώστε να μη προκαλέσουν προβλήματα ανάγνωσης κατά τη διαδικασία του sequencing. Ακολουθήθηκε το παρακάτω πρωτόκολλο καθαρισμού:

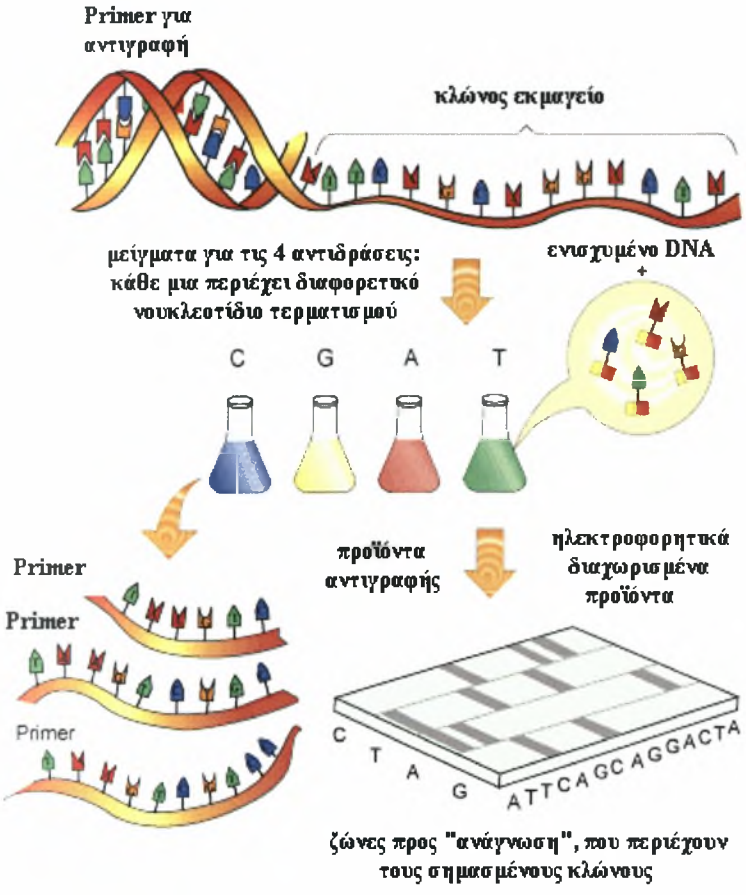
1. Τοποθέτηση των στηλών QIAquick Spin σε eppendorf των 1.5 mL.
2. Προσθήκη 250 μL από το διάλυμα συλλογής (capture buffer) και 50μL PCR προϊόντος στις στήλες QIAquick Spin.
3. Φυγοκέντρηση του περιεχόμενου των στηλών για 1 λεπτό στις 13.000 rpm. *Σε αυτό το βήμα πραγματοποιείται η πρόσδεση των επιθυμητών αλληλουχιών πάνω στη στήλη.*
4. Απομάκρυνση του εκλούσματος και επανατοποθέτηση των στηλών στα eppendorf.
5. Προσθήκη 750μL από το διάλυμα πλύσης (wash buffer) στις στήλες και φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στις 13.000 rpm..
6. Απομάκρυνση του εκλούσματος, επανατοποθέτηση των στηλών στα eppendorf και ξανά φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στις 13.000 rpm. *Το βήμα αυτό είναι σημαντικό, καθώς είναι αναγκαίο να απομακρυνθεί πλήρως η αιθανόλη από το διάλυμα πλύσης μέσα στη στήλη.*
7. Εκ νέου τοποθέτηση των στηλών QIAquick Spin σε αποστειρωμένα eppendorf των 1.5 mL.
8. Προσθήκη 50μL από το διάλυμα έκλουσης (elution buffer) και επώαση των δειγμάτων για περίπου 1 λεπτό.
9. Τέλος, φυγοκέντρηση για 1.5 λεπτό στις 13.000 rpm για ανάκτηση του καθαρισμένου DNA από τα eppendorf.

Στη συνέχεια, ακολουθεί υπολογισμός της ποσότητας του PCR προϊόντος ποσοτικά με φωτόμετρο (1μL και 49μL dd-H_2O) ή ποιοτικά με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 2%. Ενδείξεις φωτόμετρου γύρω στα 100ng/μL είναι ικανοποιητικές.

Το DNA που στέλνεται για αλληλούχιση πρέπει να είναι σε στερεά μορφή (ίζημα) και όχι σε διάλυμα. Αυτό επιτυγχάνεται με κατακρήμνιση του DNA με αιθανόλη και CH_3COONa (sodium acetate). Για 50μL δείγμα απαιτούνται 500μL Et και 5μL CH_3COONa. Τα δείγματα μένουν overnight στους -20°C και την επόμενη μέρα φυγοκεντρώνται στις 13.000 rpm, για 20 λεπτά, στους 4°C. Το υπερκείμενο απομακρύνεται προσεκτικά και το ίζημα τοποθετείται στους 37° C για 1 ώρα. Τέλος, παράλληλα με τα δείγματα, αποστέλλονται επίσης για αλληλούχιση και οι primers που χρησιμοποιήθηκαν κατά την αντίδραση PCR. Οι primers αραιώνονται 1/10 σε τελικό όγκο 40 μL (4μL primer + 36μL H_2O).

3.5.2 ΜΕΘΟΔΟΣ SANGER

Ο όρος **DNA sequencing** περικλείει το σύνολο των βιοχημικών μεθόδων που ταυτοποιούν την αλληλουχία των νουκλεοτιδικών βάσεων (A, G, C, T) σε ένα τμήμα DNA. Για πολλά χρόνια, η δημοφιλέστερη μέθοδος για την εκτέλεση του DNA sequencing ήταν η μέθοδος τερματισμού αλυσίδας ή **μέθοδος Sanger**, η οποία σχεδιάστηκε από τον Frederick Sanger και τους συνεργάτες του το 1975. Η μέθοδος Sanger απαιτεί την ύπαρξη ενός μονόκλωνου DNA εκμαγείου, ενός DNA primer, μιας DNA πολυμεράσης, ραδιενεργών ή φθοριζόντων νουκλεοτιδίων και τέλος τροποποιημένων νουκλεοτιδίων, τα οποία τερματίζουν την επιμήκυνση των DNA κλώνων. Το δείγμα DNA χωρίζεται σε τέσσερις αντιδράσεις sequencing, οποίες περιέχουν την DNA πολυμεράση, καθώς και τα τέσσερα δεοξυνουκλεοτίδια (dATP, dGTP, dCTP και dTTP). Σε κάθε αντίδραση προστίθεται μόνο ένα εκ των τεσσάρων διδεοξυνουκλεοτιδίων (ddATP, ddGTP, ddCTP και ddTTP). Τα εν λόγω διδεοξυνουκλεοτίδια αποτελούν νουκλεοτίδια τερματισμού αλυσίδας, τα οποία στερούνται μίας 3'-OH ομάδας που απαιτείται για το σχηματισμό ενός φωσφοδιεστερικού δεσμού μεταξύ δύο νουκλεοτιδίων κατά την επιμήκυνση του DNA κλώνου. Συνεπώς, η ενσωμάτωση ενός διδεοξυνουκλεοτιδίου στον αρτιγενή κώνο οδηγεί στη δημιουργία τμημάτων DNA πολλαπλού μήκους. Τα διδεοξυνουκλεοτίδια προστίθενται σε χαμηλότερη συγκέντρωση από τα δεοξυνουκλεοτίδια για να επιτρέψουν επαρκώς την επιμήκυνση των κλώνων κατά την ανάλυση sequencing. Τα νεοσυντιθέμενα και σημασμένα τμήματα DNA αποδιατάσσονται έπειτα από θέρμανση και στη συνέχεια διαχωρίζονται βάσει μεγέθους με ηλεκτροφόρηση σε πολυακρυλαμιδικό πήκτωμα ουρίας. Κάθε αντίδραση συμβαίνει σε μία εκ των τεσσάρων ξεχωριστών λωρίδων (λωρίδα A, T, G, C). Οι ζώνες DNA (DNA bands) γίνονται ορατές ύστερα από αυτοραδιογραφία ή υπεριώδες φως και η αλληλουχία DNA μπορεί να «διαβαστεί» άμεσα από φιλμ ακτίνων X. Μια σκούρα ζώνη υποδεικνύει ένα τμήμα DNA που είναι το αποτέλεσμα του τερματισμού αλυσίδας. Η τελευταία νουκλεοτιδική βάση μπορεί να ταυτοποιηθεί σύμφωνα με το ποιο διδεοξυνουκλεοτίδιο προστέθηκε στην συγκεκριμένη αντίδραση.



Εικόνα 16: *Σχηματική απεικόνιση της μεθόδου Sanger. Μονόκλωνο DNA ενισχύεται παρουσία φθορίζοντων σημασμένων ddNTPs που τερματίζουν την αντίδραση και σημαίνουν όλα τα τμήματα DNA που παράγονται. Τα τμήματα DNA στη συνέχεια διαχωρίζονται μέσω ηλεκτροφόρησης πολυακρυλαμιδίου και τέλος, η αλληλουχία «διαβάζεται» μέσω μιας ακτίνας laser και ενός υπολογιστή.*

3.5.3 ΦΘΟΡΙΖΟΥΣΑ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ DNA (DYE TERMINATION SEQUENCING)

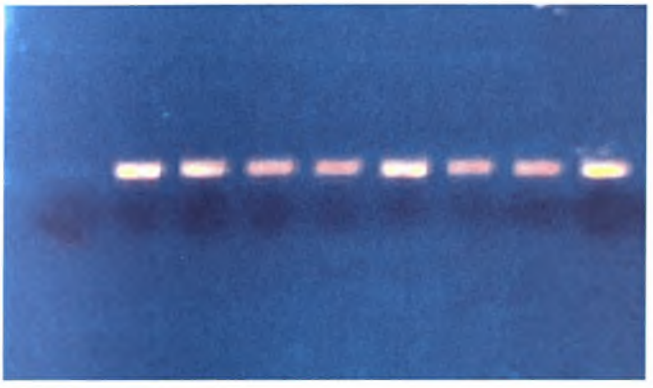
Μια εναλλακτική μέθοδος του τερματισμού αλυσίδας αποτελεί η **φθορίζουσα αλληλούχιση DNA (dye-termination sequencing)**. Το μεγαλύτερο πλεονέκτημα της μεθόδου είναι ότι η διαδικασία μπορεί να εκτελεστεί σε μία μόνο αντίδραση, σε αντίθεση με τις τέσσερις που προαναφέρθηκαν με τη μέθοδο Sanger. Στη διαδικασία αυτή, κάθε ένα από τα διδεοξυνουκλεοτίδια σημαίνεται με διαφορετική φθορίζουσα ουσία, εκ των οποίων η κάθε μια έχει διαφορετικό μήκος κύματος φθορισμού. Το κάθε προϊόν με την ειδική χρωστική για κάθε βάση, διεγείρεται από ένα λέιζερ και η χρωστική εκλύει ακτινοβολία στο χαρακτηριστικό της μήκος κύματος. Ένα σύστημα περίθλασης διαχωρίζει τις εκπομπές των κυμάτων, οι οποίες ανιχνεύονται από μια συσκευή ανίχνευσης και η αλληλουχίες αποκωδικοποιούνται από έναν υπολογιστή. Τα μήκη που αναλύονται φτάνουν έως και 1.000 bp. Η συγκεκριμένη μέθοδος είναι ελκυστική και συμφέρουσα λόγω της ταχύτητας της του γεγονότος ότι είναι αυτοματοποιημένη και σε συνδυασμό με τους, υψηλά παραγωγικούς, αυτοματοποιημένους DNA αναλυτές sequencing, χρησιμοποιείται σήμερα κατά κόρον για αναλύσεις sequencing.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

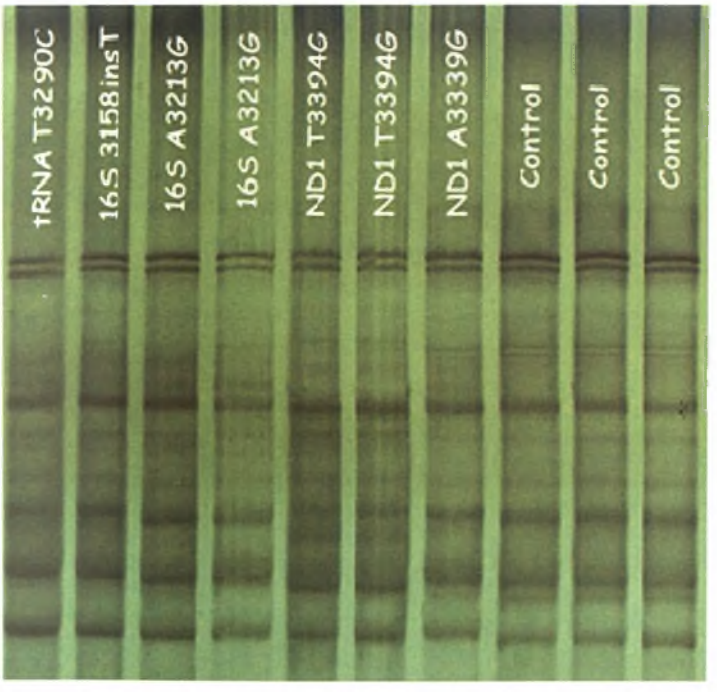
Στα 150 φυσιολογικά άτομα που μελετήθηκαν εντοπίστηκαν στο σύνολο 16 πολυμορφισμοί. Οι έντεκα αποτελούν ήδη ταυτοποιημένους πολυμορφισμούς, όπως αναφέρονται στη δικτυακή βάση δεδομένων για το μιτοχόνδριο www.mitomap.org, ενώ οι υπόλοιποι πέντε αποτελούν πολυμορφισμούς που απαντώνται για πρώτη φορά. Αναλυτικότερα:

4.1 ΓΟΝΙΔΙΟ $tRNA^{Leu(UUR)}$

Συγκεκριμένα για το τμήμα των 295 bp που κωδικοποιεί το $tRNA^{Leu(UUR)}$ καθώς και τμήματα των παρακείμενων γονιδίων της 16S ριβοσωμικής υπομονάδας και της ND1 υπομονάδας του συμπλόκου της αναπνευστικής αλυσίδας, εντοπίστηκαν 6 διαφορετικά πρότυπα με τη μέθοδο του SSCP.



***Εικόνα 17** : Ενδεικτική απεικόνιση της ηλεκτροφόρησης μερικών PCR προϊόντων σε πηκτή αγαρόζης. Οι φωτεινές ζώνες απεικονίζουν τα προϊόντα ενίσχυσης, ενώ στο πρώτο πηγαδάκι από αριστερά, η απουσία ζώνης αντιστοιχεί στο τυφλό (negative) της αντίδρασης.*



***Εικόνα 18**: Απεικόνιση με την ανάλυση SSCP του συνόλου των 6 διαφορετικών προτύπων για το γονίδιο $tRNA^{leu(UUR)}$ και για τα παρακείμενα τμήματα του σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου 10%. Τα πρότυπα των 7 δειγμάτων που φέρουν τις 5 μεταλλάξεις συγκρίνονται με τα πρότυπα συγκεκριμένων δειγμάτων control (δείγματα στα οποία απουσιάζουν οι πολυμορφισμοί και των οποίων τα πρότυπα αντιστοιχούν σε φυσιολογικό φαινότυπο).*

ΠΙΝΑΚΑΣ 6

Άτομα	Πολυμορφισμοί
No 22	ND1 T3338G
No 21.8	ND1 T3394C
No 14.1	ND1 T3394C
No 6.3	$tRNA^{Leu(UUR)}$ T3290C
No 13.2	16S 3158insT
No 13.5	16S A3213G
No 13.6	16S A3213G

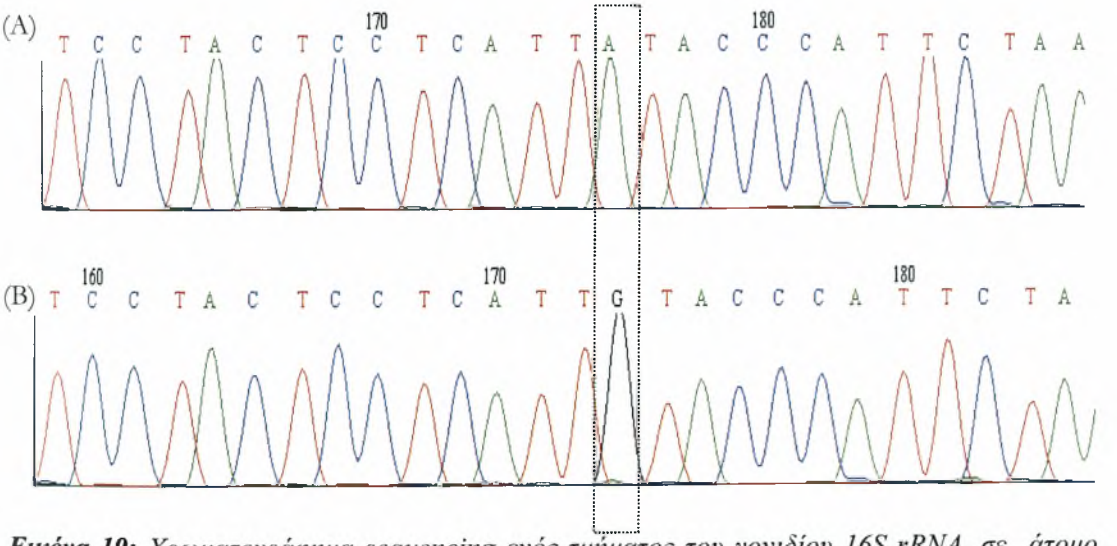
***Πίνακας 6**: Στον Πίνακα απεικονίζονται με κυανό χρώμα οι ήδη ταυτοποιημένοι πολυμορφισμοί όπως αναφέρονται στη δικτυακή βάση δεδομένων του mitomap και με κόκκινο χρώμα οι νέοι πολυμορφισμοί που ανιχνεύσαμε. Συγκεκριμένα:*

Στο $tRNA^{Leu(UUR)}$ γονίδιο: 1 γνωστός πολυμορφισμός (T3290C).

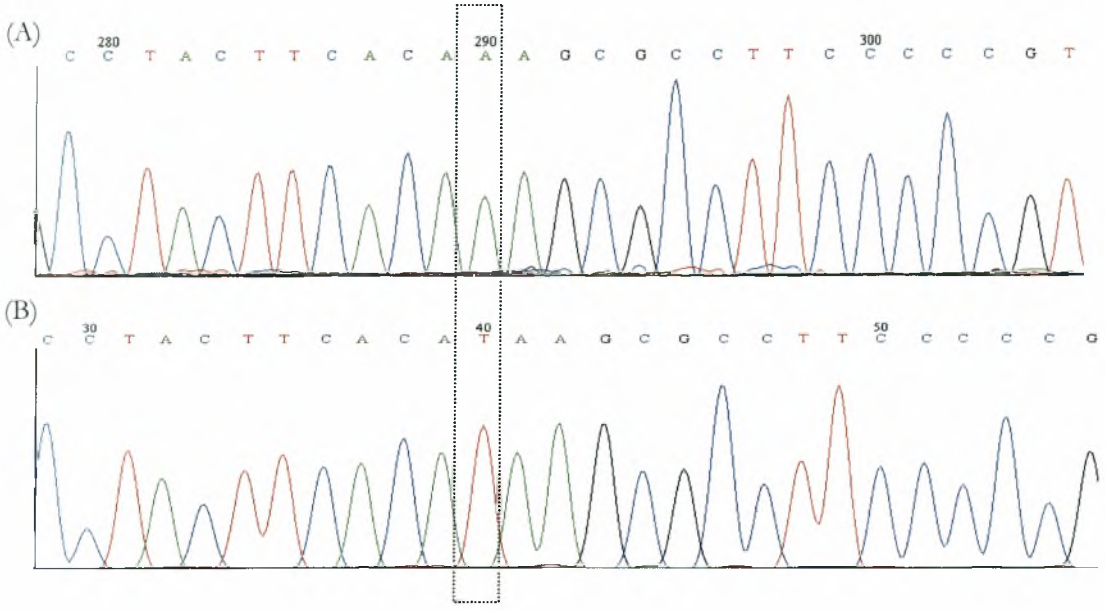
Στην ND1 υπομονάδα του συμπλόκου I της αναπνευστικής αλυσίδας: 2 γνωστοί πολυμορφισμοί (T3338G, T3394C).

Στη 16S ριβοσωμική υπομονάδα: 2 νέοι πολυμορφισμοί (3158 insT, A3213G).

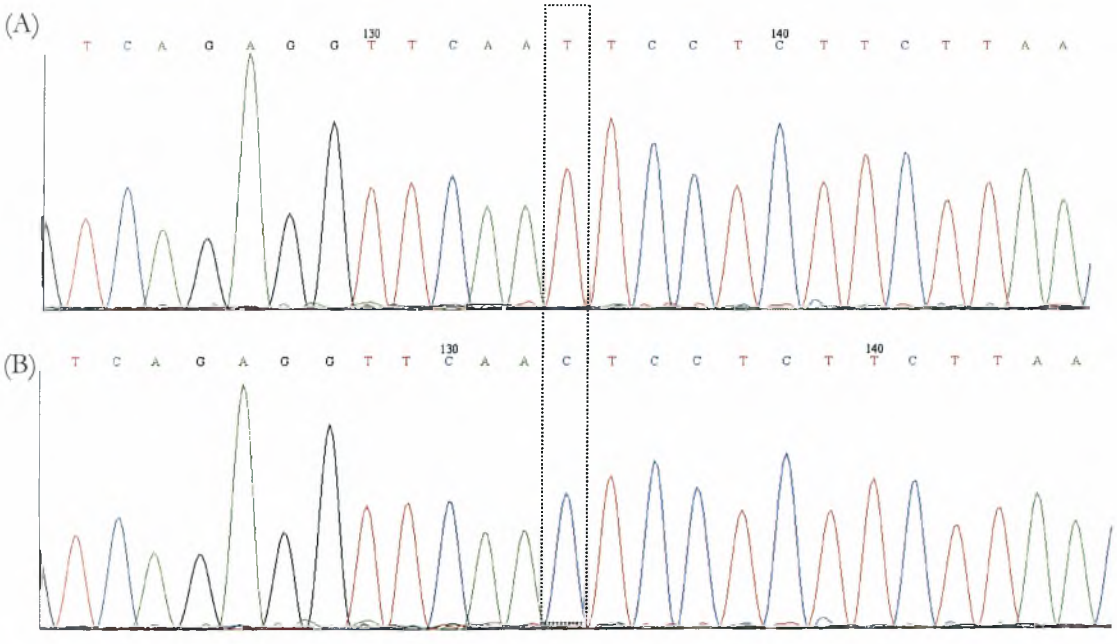
- Για την στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων των δεδομένων του sequencing χρησιμοποιήθηκαν τα προγράμματα βιοπληροφορικής: BIOEDIT 7.0 και CLUSTALX 1.8. Το πρώτο χρησιμεύει στην «ανάγνωση» της αλληλουχίας του κάθε γονιδίου που απεικονίζεται σε μορφή χρωματογραφίματος, με κάθε κορυφή του να αντιστοιχεί και σε μια συγκεκριμένη βάση. Με τον τρόπο αυτό συγκρίνοντας την ζητούμενη αλληλουχία με μια πρότυπη, εντοπίζουμε τη σημειακή μετάλλαξη, την προσθήκη ή την έλλειψη βάσει των διαφορών στις κορυφές τους. Το δεύτερο χρησιμεύει για την εκτέλεση πολλαπλής ομοπαράθεσης της ζητούμενης αλληλουχίας με μια πρότυπη, ως επιβεβαίωση της ορθής «ανάγνωσης» της αλληλουχίας με το BIOEDIT. Επιπλέον, με το CLUSTALX μπορούμε να προσδιορίσουμε και αν η σημειακή μετάλλαξη οδηγεί σε αλλαγή ή όχι του αρχικού νοήματος της αλληλουχίας.



***Εικόνα 19:** Χρωματογράφημα sequencing ενός τμήματος του γονιδίου 16S rRNA, σε άτομο control (A) και στο άτομο 13.5 (B). Είναι εμφανής η μετάπτωση A→G στη θέση 3213.*



Εικόνα 20: *Χρωματογράφημα sequencing τμήματος του γονιδίου 16S rRNA, σε άτομο control (A) και στο άτομο 13.2 (B). Είναι εμφανής η προσθήκη T στη θέση 3158.*



Εικόνα 21: *Χρωματογράφημα sequencing τμήματος του γονιδίου $tRNA^{leu(UUR)}$, σε άτομο control (A) και στο άτομο 6.3 (B). Είναι εμφανής η μετάπτωση T→C στη θέση 3290.*

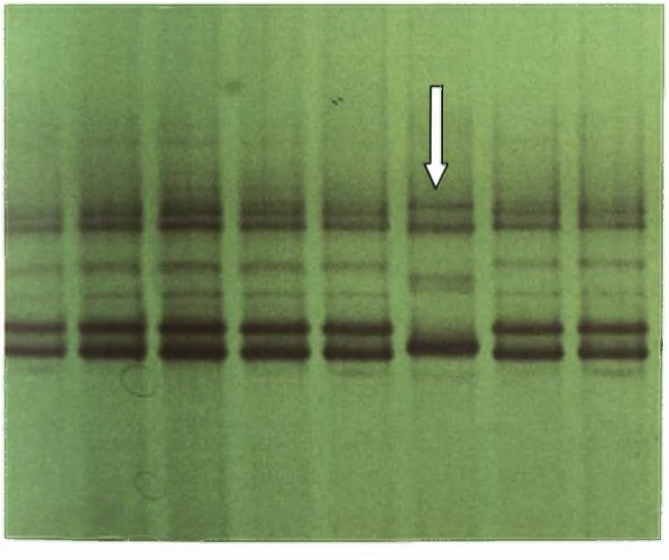
4.2 ΓΟΝΙΔΙΑ $tRNA^{His}$, $tRNA^{Ser(AGY)}$, $tRNA^{Leu(CUN)}$

Για το τμήμα των 247 bp που κωδικοποιεί τα $tRNA^{His}$, $tRNA^{Ser(AGY)}$, $tRNA^{Leu(CUN)}$, εντοπίστηκαν 5 διαφορετικά πρότυπα με τη μέθοδο του SSCP.

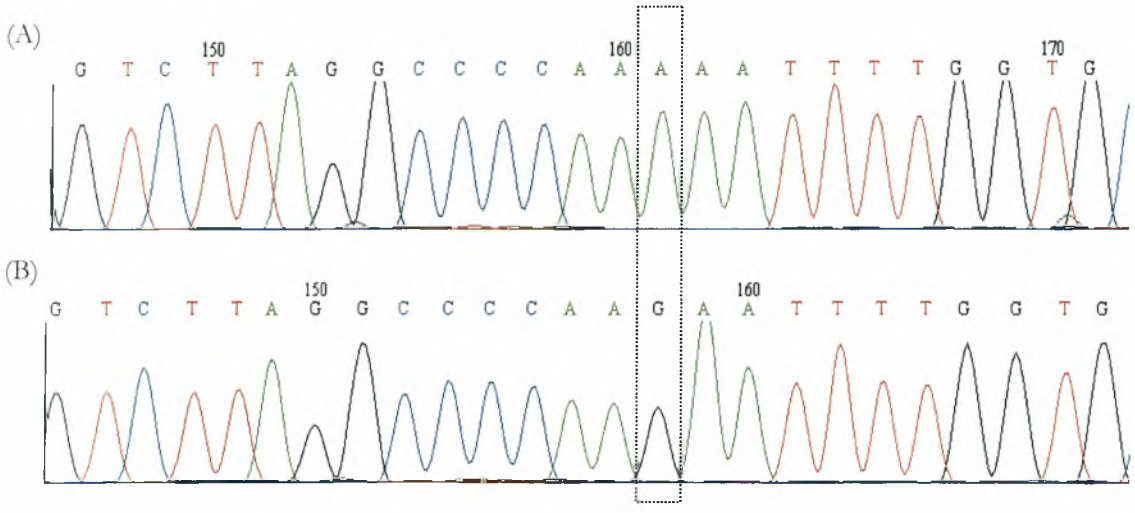
ΠΙΝΑΚΑΣ 7

Άτομα	**Πολυμορφισμοί**
No 2.3/2.8/5.9/6.7/ 9.5/9.15/12.13/13.1/ 13.8/13.12/13.16/16.6/ 16.8/18.5/18.12/18.14/ 20.13/21.6/21.12/21.14/ 21.24/21.25/27.5	**$tRNA^{Leu(CUN)}$ A12308G**
No 7.1	**$tRNA^{Leu(CUN)}$ T12285C**
No 8.8	**$tRNA^{Ser(AGY)}$ A12234G** **$tRNA^{Leu(CUN)}$ A12308G**
No 12.16 **No 16.12**	**$tRNA^{His}$ T12189C** **$tRNA^{His}$ G12164A**

Πίνακας *7 : Στον Πίνακα απεικονίζονται με κυανό χρώμα οι ήδη ταυτοποιημένοι πολυμορφισμοί όπως αναφέρονται στη δικτυακή βάση δεδομένων του mitomap και με κόκκινο χρώμα οι νέοι πολυμορφισμοί που ανιχνεύσαμε. Συγκεκριμένα:*
Στο $tRNA^{His}$ γονίδιο: 1 γνωστός (T12189C) και 1 καινούργιος πολυμορφισμός (G12164A).
Στο $tRNA^{Ser(AGY)}$: 1 γνωστό πολυμορφισμό (A12234G)
Στο $tRNA^{Leu(CUN)}$ γονίδιο: 2 γνωστοί πολυμορφισμός (A12308G, T12285C).



Εικόνα 22 : *Στο πήκτωμα πολυακρυλαμιδιου SSCP της εικόνας απεικονίζεται με το λευκό βελάκι το πρότυπο του πολυμορφισμού* **$tRNA^{Leu(CUN)}$** ***A1308G****, σε σύγκριση με τα παραπλήσια πρότυπα control. Το εν λόγω πρότυπο παρατηρείται σε μεγάλη συχνότητα, καθώς εντοπίστηκε σε 24 από τα 150 άτομα που μελετήθηκαν.*



Εικόνα 23: *Χρωματογράφημα sequencing τμήματος του γονιδίου $tRNA^{Leu(CUN)}$, σε άτομο control (A) και πολλαπλά άτομα (B). Είναι εμφανής η μετάπτωση A→G στη θέση 12308.*

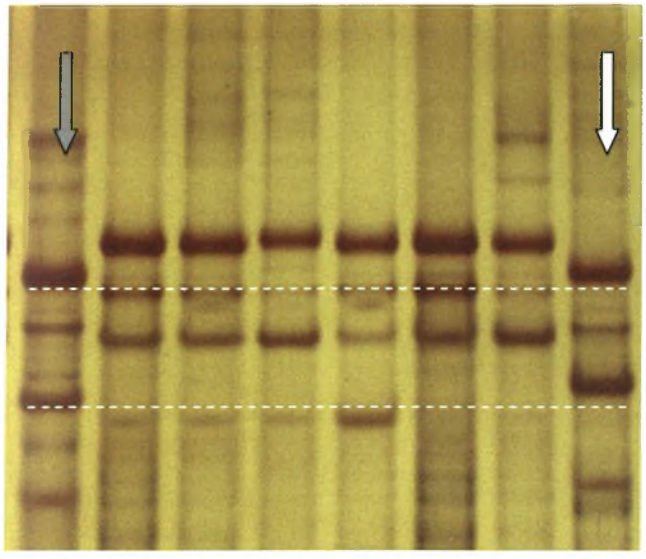
4.3 ΓΟΝΙΔΙΟ $tRNA^{Lys}$

Για το τμήμα των 247 bp που κωδικοποιεί το, $tRNA^{Lys}$ και μέρος του συμπλόκου COII της αναπνευστικής αλυσίδας, εντοπίστηκαν 6 διαφορετικά πρότυπα με τη μέθοδο του SSCP.

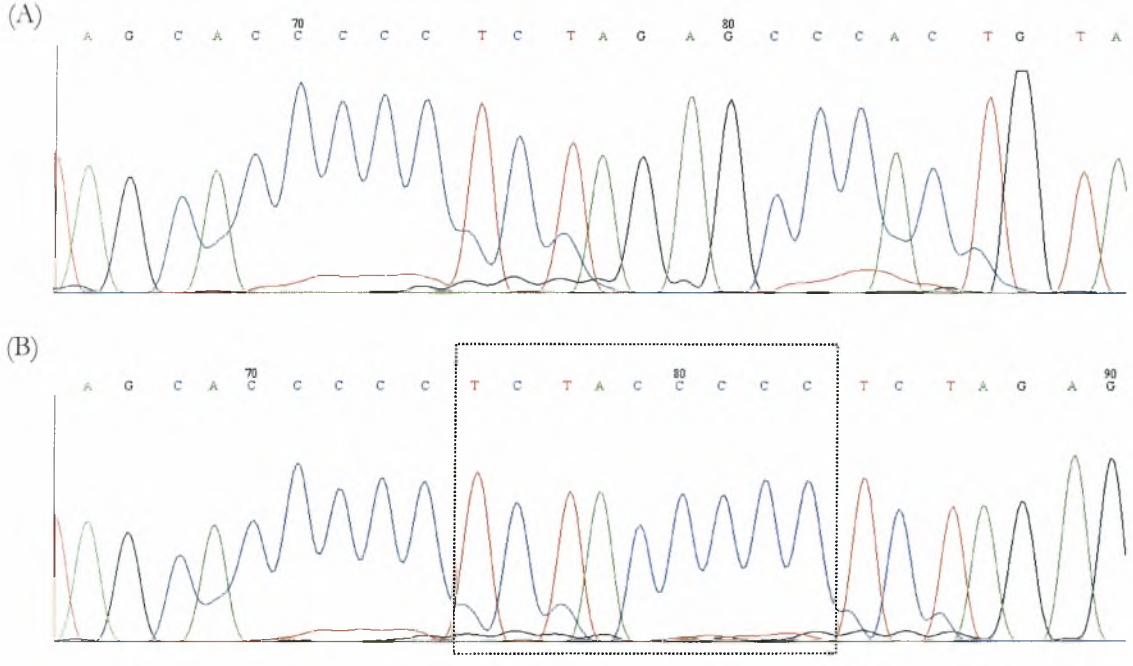
ΠΙΝΑΚΑΣ 8

Άτομα	**Πολυμορφισμοί**
No 2.4/2.9/ 27.10	**NC7 - COII G8251A**
No 7.8	**8270 - 8278 del NC7 - COII**
No 12.7/18.11	**$tRNA^{Lys}$ A8308G**
No 12.16/20.1	**G8292A NC7 – COII**
No 13.11/16.2/ 16.3	**8277 - 8285 del NC7 - COII**
No 20.5	**8290 - 8307 ins NC7 - COII**

Πίνακας 8*: Στον Πίνακα απεικονίζονται με κυανό χρώμα οι ήδη ταυτοποιημένοι πολυμορφισμοί, όπως αναφέρονται στη δικτυακή βάση δεδομένων του mitomap και με κόκκινο χρώμα οι νέοι πολυμορφισμοί που ανιχνεύσαμε. Συγκεκριμένα:*
Στο $tRNA^{Lys}$ γονίδιο: 1 γνωστός πολυμορφισμός (A8308G)
Στην NC7 υπομονάδα του συμπλόκου COII της αναπνευστικής αλυσίδας: 2 γνωστοί πολυμορφισμοί και (G8251A, G8292A) και 1 γνωστή έλλειψη 9 βάσεων (8270-8278 del). Επίσης, 1 νέα έλλειψη 9 βάσεων (8277-8285 del) και μια νέα προσθήκη 18 βάσεων (8290-8307 ins).



Εικόνα 24 : *Στο πήκτωμα πολυακρυλαμιδιου SSCP 10% της εικόνας απεικονίζεται με το λευκό βελάκι το πρότυπο της γνωστής έλλειψης* **8270 - 8278 del NC7 – COII,** *και με το γκρι το πρότυπο της νέας έλλειψης* **8277 - 8285 del NC7 - COII** *, σε σύγκριση με τα ενδιάμεσα πρότυπα control. .Με τις λευκές διακεκομμένες γραμμές γίνεται ευδιάκριτη η λεπτομέρεια στο διαφορετικό πρότυπο της μίας με την άλλη.*



Εικόνα 25: *Χρωματογράφημα sequencing μέρος της NC7-COII, στο άτομο 16.2(A) και σε άτομο control (B). Είναι εμφανής η έλλειψη 9 νουκλεοτιδίων στη θέση 8277-8285.*

4.4 ΣΥΝΟΨΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

ΠΙΝΑΚΑΣ 9

Γονίδιο	Νουκλεοτιδική Αλλαγή	Αποτέλεσμα αλλαγής	Αριθμός αλλαγών	Θέση στο tRNA	Αριθμός νουκλεοτιδίου στο tRNA	Απλοομάδες
$tRNA^{Leu(UUR)}$	T3290C	μη κωδικοποιούσα	1	Θηλιά TψC	59	H
$tRNA^{Lys}$	A8308G	μη κωδικοποιούσα	2	Θηλιά DHU	14	H
$tRNA^{Leu(CUN)}$	T12285C	μη κωδικοποιούσα	1	Θηλιά DHU	21	U
$tRNA^{Leu(CUN)}$	A12308G	μη κωδικοποιούσα	24	Μεταβλητή Θηλιά	44	K,U
$tRNA^{His}$	T12189C	μη κωδικοποιούσα	1	Θηλιά TψC	56	H
$tRNA^{Ser(AGY)}$	A12234G	μη κωδικοποιούσα	1	Μεταβλητή Θηλιά	36	J
ND1	T3394G	Tyr - His	2	-	-	-
ND1	T3338C	Val - Ala	1	-	-	-
NC7-COII	G8251A	συνώνυμη	3	-	-	-
NC7-COII	8270-8278del	μη κωδικοποιούσα	1	-	-	-
NC7-COII	G8292G	μη κωδικοποιούσα	2	-	-	-
$tRNA^{His}$	G12164A	μη κωδικοποιούσα	1	Θ. Αντικω-δικονίου	30	T
NC7-COII	8277-8285del	-	3	-	-	-
NC7-COII	8290-8307ins	-	1	-	-	-
16S	3158insT	-	1	-	-	-
16S	A3213G	-	2	-	-	-

Πίνακας 9: *Συγκεντρωτικός πίνακας με τους 16 πολυμορφισμούς που εντοπίστηκαν. Με κυανό χρώμα απεικονίζονται οι γνωστοί πολυμορφισμοί, ενώ με κόκκινο οι καινούργιοι. Για τους γνωστούς πολυμορφισμούς στα tRNA αναγράφονται οι θέσεις και οι αριθμοί στους οποίους παρατηρούνται οι αλλαγές, καθώς και οι απλοομάδες στις οποίες ανήκουν τα άτομα που φέρουν τους πολυμορφισμούς αυτούς.*

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα εργασία, όπου μελετήθηκε μία ομάδα φυσιολογικών ατόμων, εντοπίστηκε με τη χρήση απλών μοριακών τεχνικών ένας σημαντικός αριθμός πολυμορφισμών, αρκετά αυξημένος από ότι αναμενόταν. Συγκεκριμένα, στο σύνολο των 150 ατόμων εντοπίστηκαν 16 πολυμορφικές θέσεις 47 φορές. Αξιοσημείωτο είναι ότι σχεδόν κανένα άτομο δε συγκέντρωσε πάνω από έναν πολυμορφισμό, με εξαίρεση δύο άτομα που εμφάνισαν δύο πολυμορφισμούς σε δύο διαφορετικά γονίδια (άτομο 8.8 στο γονίδιο MT-TS2 και στο MT-TL2 και άτομο 12.16 στο γονίδιο NC7 – COII και MT-TH). Από τις 16 θέσεις οι 7 αφορούν μόρια tRNA και συναντώνται 31 φορές. Συνεπώς, η συχνότητα των πολυμορφισμών για τα πέντε μόρια tRNA που μελετήθηκαν ανέρχεται στους p=0.20 πολυμορφισμούς ανά άτομο. Έξι πολυμορφικές θέσεις εντοπίστηκαν στις θηλιές TψC, DHU και στη μεταβλητή θηλιά (2 σε κάθε μία αντίστοιχα), ενώ μία στη θηλιά του αντικωδικονίου. Όλες οι αλλαγές ήταν μεταπτώσεις, τόσο μεταξύ βάσεων πουρίνης όσο και πυριμιδίνης. Επιπλέον, η **απλοομάδα H** είναι εκείνη που συγκεντρώνει τις περισσότερες πολυμορφικές θέσεις, ενώ ακολουθεί η **απλοομάδα U**, στοιχεία που συμφωνούν με αντίστοιχη μελέτη που έγινε σε πληθυσμό 477 Φιλανδών και συμπεριελάμβανε και τα 22 tRNA (p=0.66 πολυμορφισμούς ανά άτομο). Το ότι δύο συγκεκριμένες απλοομάδες συγκεντρώνουν τους περισσότερους πολυμορφισμούς, και συγκεκριμένα τα 2/3 όλων των tRNA αλληλουχιών, ενισχύει το γεγονός της μικρής ποικιλομορφίας που παρουσιάζουν τα μόρια tRNA, καθώς έχει δειχθεί ότι η νουκλεοτιδική τους αλληλουχία είναι περισσότερο συντηρημένη σε σύγκριση με δομικά γονίδια, γονίδια rRNA και ρυθμιστικές περιοχές.

Ο πολυμορφισμός **T3290C** που εντοπίστηκε στο γονίδιο $tRNA^{Leu(UUR)}$ αποτελεί, σύμφωνα με τη δικτυακή βάση δεδομένων του mitomap, ταυτοποιημένο πολυμορφισμό, που δεν επηρεάζει τον ενεργειακό μεταβολισμό του κυττάρου. Αυτό συμβαίνει επειδή η μετάπτωση της θυμίνης σε κυτοσίνη στη συγκεκριμένη θέση της θηλιάς TψC δεν διαταράσσει σημαντικά τη δομή του μορίου και συνεπώς δεν επηρεάζει τη λειτουργία του. Το συγκεκριμένο γονίδιο καταχωρείται στο mitomap ως ένα γονίδιο που σχετίζεται με 21 διαφορετικές ασθένειες (ένα hot-spot γονίδιο), όμως σε μία εργασία που έγινε πάνω σε 912 Ευρωπαίους βρέθηκε μόνο ένας πολυμορφικός τόπος. Επιπλέον, σε μια πρόσφατη εργασία που έγινε σε Τυνήσιο πληθυσμό 128 ασθενών και 100 φυσιολογικών ατόμων δε βρέθηκε καμμία πολυμορφική θέση. Τα δεδομένα αυτά δείχνουν ότι πρέπει να υπάρχει μία αντίστροφη σχέση μεταξύ του αριθμού των επιβλαβών θέσεων μεταλλαγής και του αριθμού των πολυμορφικών θέσεων πάνω στο tRNA, υποθέτοντας ότι αλλαγές σε κάποια tRNA μπορεί να είναι περισσότερο επιβλαβείς από ότι σε άλλα.

Στη θηλιά TψC εντοπίζεται και ο επίσης ταυτοποιημένος πολυμορφισμός **T12189C** στο γονιδίου $tRNA^{His}$. Κατά ανάλογο τρόπο υποθέτουμε ότι και ο συγκεκριμένος δεν επηρεάζει τον ενεργειακό μεταβολισμό του κυττάρου. Το

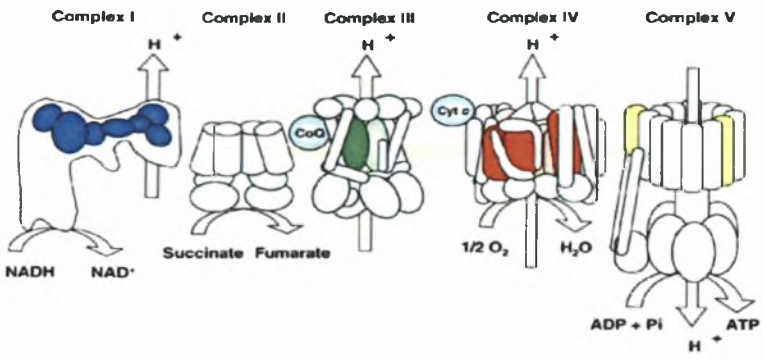
ίδιο ισχύει και για τους ταυτοποιημένους πολυμορφισμούς **A8308G** στο γονίδιο $tRNA^{Lys}$ και **T12285C** $tRNA^{Leu(CUN)}$ των οποίων οι αλλαγές εντοπίζονται στη θηλιά DHU, όπως και για τους **A12308G** στο γονίδιο $tRNA^{Leu(CUN)}$ και **A12234G** στο γονίδιο $tRNA^{Ser(AGY)}$, των οποίων οι αλλαγές εντοπίζονται στη μεταβλητή θηλιά.

Περίπου το 6% των νουκλεοτιδίων στα ανθρώπινα μιτοχονδριακά tRNA τροποποιούνται μετα-μεταγραφικά και οι θηλιές είναι συνήθως οι περιοχές αυτών των τροποποιήσεων. Στα νουκλεοτίδια αυτά αποδίδεται ένας δομικός ρόλος καθώς είναι κατά κόρον συντηρημένα. Συγκεκριμένα, όλες οι θηλιές των μορίων tRNA είναι σε πολύ μεγαλύτερο βαθμό συντηρημένες από άλλες συνώνυμες περιοχές σε γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες. Η μεταβλητή θηλιά είναι η λιγότερο συντηρημένη από όλες, κάτι που επιβεβαιώνεται και από το γεγονός ότι στην εν λόγω εργασία ο πολυμορφισμός A12308G που εντοπίζεται στη μεταβλητή θηλιά του γονιδίου της $tRNA^{Leu(CUN)}$ απαντάται 24 φορές. Αντίθετα, η περισσότερο συντηρημένη θηλιά είναι εκείνη του αντικωδικονίου. Ο πολυμορφισμός **G12164A** που εντοπίστηκε για πρώτη φορά στο $tRNA^{His}$ απαντάται στη θηλιά του αντικωδικονίου και για αυτό τον λόγο καθίστανται αναγκαίες περαιτέρω βιοχημικές μελέτες, καθώς και μελέτες στερεοδιάταξης ώστε να διαπιστωθεί κατά πόσο επηρεάζει τη δομική ακεραιότητα του $tRNA^{His}$ και κατ' επέκταση η αλληλεπίδρασή του με τις ριβοσωμικές υπομονάδες.

Πέρα από τα μόρια tRNA αλλαγές εντοπίστηκαν και σε σύμπλοκα της αναπνευστικής αλυσίδας, καθώς οι primers που χρησιμοποιήθηκαν δεν ενίσχυαν επακριβώς τα γονίδια των tRNA, αλλά ενίσχυαν και κομμάτια των παρακείμενων γονιδίων τους. Ειδικότερα, στην ND1 υπομονάδα του συμπλόκου I της αναπνευστικής αλυσίδας εντοπίστηκαν 2 ήδη ταυτοποιημένοι πολυμορφισμοί: ο **T3394G** και ο **T3338C**. Ο πρώτος προκαλεί αλλαγή της τριπλέτας που κωδικοποιεί φυσιολογικά το αμινοξύ Τυροσίνη με αποτέλεσμα να κωδικοποιεί Ιστιδίνη, ενώ ο δεύτερος αντί για Βαλίνη οδηγεί στη κωδικοποίηση της Αλανίνης. Αφενός όμως οι αλλαγές αυτές οδηγούν σε αντικατάσταση ενός πολικού αμινοξέος με ένα πολικό στη πρώτη περίπτωση και ενός μη πολικού με ένα μη πολικό στη δεύτερη περίπτωση και αφετέρου αποτελούν σημειακές μεταλλάξεις σε μη κομβικά σημεία της πρωτεΐνης, οπότε και δεν επηρεάζουν τη τρισδιάστατη δομή της. Συνεπώς, οι αλλαγές αυτές δεν επηρεάζουν σημαντικά τη λειτουργικότητα του συμπλόκου και κατ' επέκταση την ομαλή λειτουργία της αναπνευστικής αλυσίδας. Αυτός είναι και ο λόγος που τα άτομα δεν παρουσιάζουν μεταβολικές διαταραχές και δε νοσούν.

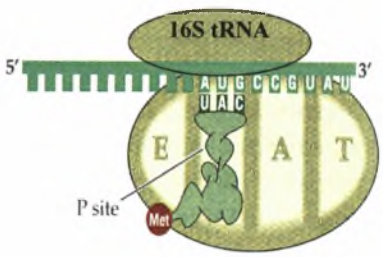
Στην NC7 υπομονάδα του συμπλόκου II της αναπνευστικής αλυσίδας εντοπίστηκαν 3 ήδη γνωστοί και 2 καινούργιοι πολυμορφισμοί. Ο ταυτοποιημένος πολυμορφισμός **G8251A** οδηγεί σε συνώνυμη αλλαγή και συνεπώς δεν επηρεάζει καθόλου τη δομή του συμπλόκου, ενώ ο επίσης ταυτοποιημένος πολυμορφισμός **G8292G** καθώς και η ταυτοποιημένη έλλειψη 9 νουκλεοτιδίων **8270-8278del** δεν οδηγούν σε κωδικοποίηση κάποιου

αμινοξέος. Επιπλέον αναλύσεις στερεοδιάταξης πρέπει να γίνουν για την νέα έλλειψη επίσης 9 νουκλεοτιδίων **8277-8285del**, όπως και για την νέα προσθήκη 18 νουκλεοτιδίων **8290-8307ins**, για να διαπιστωθεί ο ρόλος τους στη τρισδιάστατη δομή της πρωτεΐνης.



Εικόνα 26: *Σχηματική απεικόνιση της αναπνευστικής αλυσίδας.*

Στη 16S ριβοσωμική υπομονάδα εντοπίστηκαν δύο νέοι πολυμορφισμοί: μία ένθεση στη θέση **3158** και η μετάπτωση **A3213G**. Καθώς το 16S rRNA αποτελεί μέρος της μικρής ριβοσωμικής υπομονάδας διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο στη πρωτεϊνοσύνθεση αφού ευθύνεται για τη σύνδεση με τα tRNA που μεταφέρουν αμινοξέα. Οπότε, είναι απαραίτητο να γίνουν επιπρόσθετες μελέτες που θα εξετάζουν τη λειτουργικότητα του ριβοσώματος, ώστε να εξαχθεί κάποιο συμπέρασμα ως προς τη σημασία της μεταλλαγής αυτής.



Εικόνα 27: *Σχηματική απεικόνιση της αλληλεπίδρασης της μικρής ριβοσωμικής υπομονάδας με το tRNA έναρξης της μεθειονίνης.*

Τέλος, φαίνεται ότι η επιλογή που ασκείται στη μιτοχονδριακή DNA αλληλουχία όσον αφορά δομικά γονίδια, όπως αυτά των tRNA και 16S rRNA, δεν είναι ουδέτερη. Καθίσταται πιο δύσκολο να εκτιμηθεί η βάση για την αρνητική επιλογή στη περίπτωση των μορίων tRNA από ότι στη περίπτωση των γονιδίων που κωδικοποιούν σύμπλοκα της αναπνευστικής αλυσίδας. Η αρνητική επιλογή μπορεί να βασίζεται σε αλλαγές στη συνολική σταθερότητα της δομής των tRNA, στο εύρος ή τη ποιότητα των μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων της αλληλουχίας τους ή στην αλληλεπίδραση τους με αμινοάκυλο-tRNA συνθετάσες, μεταγραφικούς παράγοντες και ριβοσωμικές υπομονάδες. Παρόλα αυτά κάποιοι πολυμορφισμοί στα γονίδια των tRNA φαίνεται να μην είναι ουδέτεροι και μπορεί να είναι δυνητικά ήπια επιβλαβείς. Το τελευταίο στοιχείο προκύπτει από υπολογισμούς της ελεύθερης ενέργειας σε μεγάλες αλληλουχίες, οι οποίοι μπορούν να παρέχουν ένα μέσο για την εκτίμηση του δυναμικού παθογένειας των tRNA πολυμορφισμών, χωρίς όμως αυτό να είναι απόλυτα ακριβές.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Henze K, Martin W. Evolutionary biology: essence of mitochondria. Nature 2003, 426:127–128.
2. Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MH, Coulson AR. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. Nature 1981, 290:4-65.
3. Mitchell P. Proton current flow in mitochondrial systems. Nature 1967, 25: 1327–1328.
4. Mitchell P, Moyle J. Chemiosmotic hypothesis of oxidative phosphorylation. Nature 1967, 213:137–9.
5. Huang, K.; K. G. Manton. The role of oxidative damage in mitochondria during aging: A review. Frontiers in Bioscience 2004, 9: 1100–1117.
6. DiMauro S, Schon EA. Mitochondrial respiratory-chain diseases. N Engl J Med 2003, 348:2656-68.
7. Emelyanov VV. Rickettsiaceae, rickettsia-like endosymbionts, and the origin of mitochondria. Biosci. Rep. 2001, 21: 1–17.
8. Brian F.C. Clark. The crystal structure of tRNA. J. Biosci. 2006, 31:453-457.
9. Varani G, McClain W. "The G x U wobble base pair. A fundamental building block of RNA structure crucial to RNA function in diverse biological systems. EMBO Rep 200, 1:18-23.
10. Taylor RW, Turnbull DM. Mitochondrial DNA mutations in human disease. Nat. Rev. Genet. 2005, 6 (5): 389–402.
11. Zifa E, Giannouli S, Theotokis P, Stamatis C, Mamuris Z, Stathopoulos C. Mitochondrial tRNA mutations: Clinical and functional perturbations. RNA Biology 2007, 4:1-30.
12. Florentz C, Sissler M. Disease- related versus polymorphic mutations in human mitochondrial tRNAs. Where is the difference? EMBO Rep 2001, 2:481-486
13. Ford E.B. Genetic polymorphism. MIT Press 1965, p17-25.
14. Brown WM. Polymorphism in mitochondrial DNA of humans as revealed by restriction endonuclease analysis. Proc Natl Acad Sci USA 1980, 77: 3605-3609
15. Castro JA, Picornell A, Ramon M. Mitochondrial DNA: a tool for populational genetics studies. Int Microbiol.1998,1: 327-332.
16. Cann RL, Stoneking M, Wilson AC. Mitochondrial DNA and human evolution. Nature. 1987, 325: 31-36.
17. Ingman M, Kaessmann H, Pääbo S, Gyllenstein U. Mitochondrial genome variation and the origin of modern humans. Nature 2000; 408:708-713.

18. Torroni A, Achilli A, Macaulay V, Richards M, Bandelt HJ. Harvesting the fruit of the human mtDNA tree. Trends Genet. 2006, 22:339–45.

19. Gonzalez et al. Mitochondrial lineage M1 traces an early human backflow to Africa. BMC Genomics 2007, 8:223

20. Lewin HA, Stewart-Haynes JA. A simple method for DNA extraction from leukocytes for use in PCR. Biotechniques 1992, 13:522-524.

21. Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. Methods Enzymol 1987, 155:335-350.

22. Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. Proc Natl Acad Sci USA 1989, 86:2766-2770.

23. Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T.; Hrsg. (1989). Molecular Cloning - A Laboratory Manual, 2nd Edition. Cold Spring Habour Laboratory Press, NY.

24. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci U S A. 1977, 74:5463-5467.

25. Fischer SG, Lerman LS. DNA fragments differing by single base-pair substitutions are separated in denaturating gradient gels. Proc Natl Acad Sci USA 1983, 80:1579-1583.

26. Andrews RM, Kubacha I, Chinnery PF, Lightowlers RN, Turnbull DM, Howell N. Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. Nat Genet 1999, 23:147.

27. Schaefer AM, Taylor RW, Turnbull DM, Chinnery PF. The epidemiology of mitochondrial disorders – past, present and future. Biochim Biophys Acta 2004, 1659:115-120.

28. Mkaouar-Rebai E, Tlili A, Masmoudi S, Belguith N, Charfeddine I, Mnif M, Triki C, Fakhfakh F. Mutational analysis of the mitochondrial $tRNA^{Leu(UUR)}$ gene in Tunisian patients with mitochondrial diseases. Biochem Biophys Res Commun 2007, [Epub ahead of print]

29. Pulkes T, Sweeney MG, Hanna MG. Increased risk of stroke in patients with the A12308G polymorphism in mitochondria. Lancet 2000, 356:2068-69.

30. Hammans, S. R., Sweeney, M. G., Hanna, M. G., Brockington, M., Morgan-Hughes, J. A., Harding, A. E. The mitochondrial DNA transfer RNALeu(UUR) A-->G(3243) mutation. A clinical and genetic study. Brain 1995, 118:721-734

31. Vilmi T, Moilanen JS, Finnilä S, Majamaa K. Sequence variation in the tRNA genes of human mitochondrial DNA. J Mol Evol. 2005, 60:587-97.

32. Torroni A, Huoponen K, Francalacci P, Petrozzi M, Morelli L, Scozzari R, Obinu D, Savontaus ML, Wallace DC. Classification of European mtDNAs from an analysis of three European populations. Genetics. 1996; 144:1835-50.

33. Richards M, Macaulay V, Hickey E, Vega E, Sykes B, Guida V, Rengo C, Sellitto D, Cruciani F, Kivisild T, Villems R, Thomas M, Rychkov S, Rychkov O, Rychkov Y, Gölge M, Dimitrov D, Hill E, Bradley D, Romano V, Calì F, Vona G, Demaine A, Papiha S, Triantaphyllidis C, Stefanescu G, Hatina J, Belledi M, Di Rienzo A, Novelletto A, Oppenheim A, Nørby S, Al-Zaheri N, Santachiara-Benerecetti S, Scozari R, Torroni A, Bandelt HJ. Tracing European founder lineages in the Near Eastern mtDNA pool. Am J Hum Genet. 2000; 67:1251-76.

34. Ingman M, Gyllensten U. Analysis of the complete human mtDNA genome: methodology and inferences for human evolution. J Hered. 2001; 92:454-61.

35. Moilanen JS, Majamaa K. Phylogenetic network and physicochemical properties of nonsynonymous mutations in the protein-coding genes of human mitochondrial DNA. Mol Biol Evol. 2003; 20:1195-210.

36. Higgs PG, Jameson D, Jow H, Rattray M. The evolution of tRNA-Leu genes in animal mitochondrial genomes. J Mol Evol. 2003; 57:435-45.

37. Herrnstadt C, Elson JL, Fahy E, Preston G, Turnbull DM, Anderson C, Ghosh SS, Olefsky JM, Beal MF, Davis RE, Howell N. Reduced-median-network analysis of complete mitochondrial DNA coding-region sequences for the major African, Asian, and European haplogroups. Am J Hum Genet. 2002; 70:1152-71.

38. Maca-Meyer N, González AM, Larruga JM, Flores C, Cabrera VM. Major genomic mitochondrial lineages delineate early human expansions. BMC Genet. 2001; 2:13.

39. Richards M, Macaulay V, Hickey E, Vega E, Sykes B, Guida V, Rengo C, Sellitto D, Cruciani F, Kivisild T, Villems R, Thomas M, Rychkov S, Rychkov O, Rychkov Y, Gölge M, Dimitrov D, Hill E, Bradley D, Romano V, Calì F, Vona G, Demaine A, Papiha S, Triantaphyllidis C, Stefanescu G, Hatina J, Belledi M, Di Rienzo A, Novelletto A, Oppenheim A, Nørby S, Al-Zaheri N, Santachiara-Benerecetti S, Scozari R, Torroni A, Bandelt HJ. Tracing European founder lineages in the Near Eastern mtDNA pool. Am J Hum Genet. 2000; 67:1251-76.

40. Tajima A, Sun CS, Pan IH, Ishida T, Saitou N, Horai S. Mitochondrial DNA polymorphisms in nine aboriginal groups of Taiwan: implications for the population history of aboriginal Taiwanese. Hum Genet. 2003; 113:24-33.