



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΚΑΙ ΜΕΛΕΤΗ
ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ ΣΕ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΑ
ΓΟΝΙΔΙΑ tRNA ΣΕ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΟ
ΑΝΘΡΩΠΙΝΟ ΕΛΛΗΝΙΚΟ ΠΛΗΘΥΣΜΟ**

Πολυχρονίδου Νεραντζιά

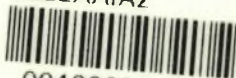
ΛΑΡΙΣΑ 2009



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

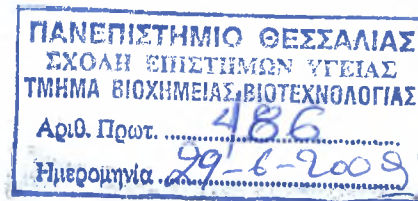
Αριθ. Εισ.: 7368/1
Ημερ. Εισ.: 20-07-2009
Δωρεά: Π.Θ.
Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ
2009
ΠΟΛ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087213

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Γενετικής, Συγκριτικής & Εξελικτικής Βιολογίας του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κατά το έτος 2008-2009, υπό την επίβλεψη της κας Αιμιλίας Ζίφα.



Τριμελής εξεταστική επιτροπή:

Αιμιλία Ζίφα, Επίκουρος Καθηγήτρια Βιολογίας /
Νευροβιολογίας, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας

Κωνσταντίνος Σταθόπουλος, Αναπληρωτής Καθηγητής
Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας.

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

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ:

την καθηγήτρια μου Α. Ζίφα για την εμπιστοσύνη, 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.

τον υποψήφιο διδάκτορα Κ. Σταμάτη και τον μεταπτυχιακό φοιτητή Θ. Γιαννούλη για την επιστημονική υποστήριξη τους κατά την εκτέλεση του πειραματικού μέρους της εργασίας.

τη συνάδελφό μου Α. Καλογρίδη και την μεταπτυχιακή φοιτήτρια Ε. Σκουμή για την ομαδική συνεργασία τους.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	Σελ.
1.1 ΠΕΡΙΛΗΨΗ	4
1.2 ABSTRACT	5
2. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	6
2.1 ΤΑ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑ	6
2.1.1 ΔΟΜΗ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΟΥ.....	6
2.1.2 ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΟΥ.....	8
2.1.3 ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ ΤΟΥ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΟΥ.....	9
2.2 ΤΟ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑ (mtDNA)	10
2.2.1 ΑΝΤΙΓΡΑΦΗ, ΜΕΤΑΓΡΑΦΗ ΚΑΙ ΜΕΤΑΦΡΑΣΗ ΤΟΥ mtDNA.....	11
2.2.2 ΠΟΙΚΙΛΟΜΟΡΦΙΑ ΣΤΟ ΓΕΝΕΤΙΚΟ ΚΩΔΙΚΑ.....	14
2.3 ΤΑ ΜΟΡΙΑ tRNAs	15
2.3.1 ΔΟΜΗ ΤΟΥ tRNA.....	15
2.3.2 ΥΠΟΘΕΣΗ ΤΑΛΑΝΤΕΥΣΗΣ.....	18
2.3.3 ΠΑΘΟΓΟΝΕΣ ΚΑΙ ΟΥΔΕΤΕΡΕΣ (ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ) ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ ΣΕ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΑ ΓΟΝΙΔΙΑ tRNA	19
2.4 ΟΙ ΓΕΝΕΤΙΚΟΙ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ	27
2.4.1 ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ ΜΟΝΟΥ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΟΥ (SNPs) & ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ ΜΗΚΟΥΣ ΤΜΗΜΑΤΩΝ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΥ (RFLPs).....	27
2.4.2 ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟΙ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ.....	29
2.4.3 ΑΝΘΡΩΠΙΝΑ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΑ ΗΑΡΛΟΓΡΟΥΠΣ.....	30
2.5 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	32
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	33
3.1 ΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΥΛΙΚΟ	33
3.2 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA	33
3.3 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)	35
3.3.1 ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟ.....	35
3.3.2 ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣ ΤΩΝ tRNA ΓΟΝΙΔΙΩΝ.....	38
3.3.3 ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ PCR ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ.....	41
3.4 ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥ ΜΟΝΟΚΛΩΝΗΣ ΑΛΥΣΙΔΑΣ	41
3.4.1 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΠΗΚΤΗΣ ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΙΟΥ.....	42
3.4.2 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΚΑΙ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΤΩΝ PCR ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ.....	43
3.4.3 ΧΡΩΣΗ ΝΙΤΡΙΚΟΥ ΑΡΓΥΡΟΥ (SILVER STAINING).....	44
3.5 ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ DNA (DNA SEQUENCING)	44
3.5.1 ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ PCR ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ.....	44
3.5.2 ΜΕΘΟΔΟΣ ΤΕΡΜΑΤΙΣΜΟΥ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΗΣ ΑΛΥΣΙΔΑΣ ΜΕ ΔΙΔΕΟΞΥΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΑ (ΜΕΘΟΔΟΣ SANGER).....	46

3.5.3 ΦΘΟΡΙΖΟΥΣΑ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ DNA (DYE TERMINATION SEQUENCING).....	48
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	49
4.1 ΓΟΝΙΔΙΟ tRNA ^{Arg} & ΠΑΡΑΚΕΙΜΕΝΑ ΓΟΝΙΔΙΑ ΤΩΝ ND3 ΚΑΙ ND4L ΥΠΟΜΟΝΑΔΩΝ ΤΟΥ ΣΥΜΠΛΟΚΟΥ I.....	49
4.2 ΓΟΝΙΔΙΟ tRNA ^{Leu(UUR)} & ΠΑΡΑΚΕΙΜΕΝΑ ΓΟΝΙΔΙΑ ΤΗΣ 16S ΡΙΒΟΣΩΜΙΚΗΣ ΥΠΟΜΟΝΑΔΑΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ND1 ΥΠΟΜΟΝΑΔΑΣ ΤΟΥ ΣΥΜΠΛΟΚΟΥ I	51
4.3 ΓΟΝΙΔΙΟ tRNA ^{Lys} & ΠΑΡΑΚΕΙΜΕΝΑ ΓΟΝΙΔΙΑ ΕΝΟΣ ΜΕΡΟΥΣ ΤΟΥ ΣΥΜΠΛΟΚΟΥ II	53
4.4 ΓΟΝΙΔΙΑ tRNA ^{His} και tRNA ^{Ser(AGY)} και tRNA ^{Leu(CUN)} & ΠΑΡΑΚΕΙΜΕΝΑ ΓΟΝΙΔΙΑ ΤΩΝ ND4 ΚΑΙ ND5 ΥΠΟΜΟΝΑΔΩΝ ΤΟΥ ΣΥΜΠΛΟΚΟΥ I	54
4.5 ΓΟΝΙΔΙΑ tRNA ^{Trp} ΚΑΙ tRNA ^{Ala} & ΠΑΡΑΚΕΙΜΕΝΑ ΓΟΝΙΔΙΑ ΤΗΣ ND2 ΥΠΟΜΟΝΑΔΑΣ ΤΟΥ ΣΥΜΠΛΟΚΟΥ I	55
4.6 ΓΟΝΙΔΙΟ tRNA ^{Thr} ΚΑΙ tRNA ^{Pro} & ΠΑΡΑΚΕΙΜΕΝΑ ΓΟΝΙΔΙΑ ΤΟΥ ΚΥΤΟΧΡΩΜΑΤΟΣ b ΚΑΙ ΤΟΥ ΒΡΟΓΧΟΥ D.....	57
4.7 ΓΟΝΙΔΙΟ tRNA ^{Phe} & ΠΑΡΑΚΕΙΜΕΝΑ ΓΟΝΙΔΙΑ ΤΗΣ 12S ΡΙΒΟΣΩΜΙΚΗΣ ΥΠΟΜΟΝΑΔΑΣ ΚΑΙ ΤΟΥ ΒΡΟΓΧΟΥ D	60
4.8 ΥΠΟΛΟΙΠΑ ΓΟΝΙΔΙΑ & ΠΑΡΑΚΕΙΜΕΝΑ ΓΟΝΙΔΙΑ.....	62
4.9 ΣΥΝΟΨΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ	63
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	65
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	69

1.1 ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Πρόσφατα, ένας μεγάλος αριθμός μεταλλάξεων που ανιχνεύθηκαν σε μιτοχονδριακά γονίδια tRNA έχει συνδεθεί με τη 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 στην σύνθεση ενζύμων απαραίτητων για τον ενεργειακό μεταβολισμό. Στην πλειοψηφία των μιτοχονδριακών μορίων tRNA έχουν παρατηρηθεί τόσο πολυμορφικές μεταλλάξεις, όσο και μεταλλάξεις οι οποίες έχουν χαρακτηριστεί ως παθογόνες. Οι πρώτες δεν επηρεάζουν τη δομική ακεραιότητα ή τη λειτουργικότητα των μιτοχονδριακών tRNAs και εμπλουτίζουν τον πληθυσμό με νέα γενετική ποικιλότητα, πάνω στην οποία θα δράσουν συστηματικές ή τυχαίες διεργασίες. Στη παρούσα μελέτη εξετάστηκε η ύπαρξη τέτοιων πολυμορφισμών και στα 22 μιτοχονδριακά γονίδια σε ελληνικό πληθυσμό φυσιολογικών ατόμων. Ειδικότερα, από δείγματα ολικού αίματος 32 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 μονής αλυσίδας (SSCP) και η περαιτέρω ταυτοποίηση τους επετεύχθη ύστερα από ταυτοποίηση της DNA αλληλουχίας τους (sequencing). Συνολικά, ανιχνεύθηκαν 12 ήδη ταυτοποιημένοι πολυμορφισμοί από τους οποίους μόνο οι τέσσερις εντοπίζονται σε γονίδια tRNA, ενώ οι υπόλοιποι οκτώ εντοπίζονται σε παρακείμενα γονίδια. Το γεγονός ότι μόνο το 12,5% των φυσιολογικών αυτών ατόμων εμφανίζει το φαινόμενο της συγκληρόνομησης ενισχύει την αντίθεση της συνύπαρξης πολλαπλών πολυμορφισμών σε φυσιολογικά άτομα και ασθενείς με διάφορα κλινικά συμπτώματα, όπου στα τελευταία βρέθηκε ότι ανέρχεται στο ποσοστό του 37,5%.

1.2 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 enhance the population with new genetic diversity on which will act systematic or eventual fermentations. In the present study we examined the sequence variation of all the 22 mitochondrial genes in a Greek population of healthy individuals. Specifically, we examined blood samples from 32 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 12 already known polymorphisms from which only four are detected on tRNA genes whereas the rest eight are detected on their neighbouring genes. The fact that, only 12,5% of the healthy individuals present coinheritance, amplify the contrast of multiple polymorphisms coexistence between healthy individuals and patients with various clinical features in which the percentage was found to arise to 37,5%.

2. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

2.1 ΤΑ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑ

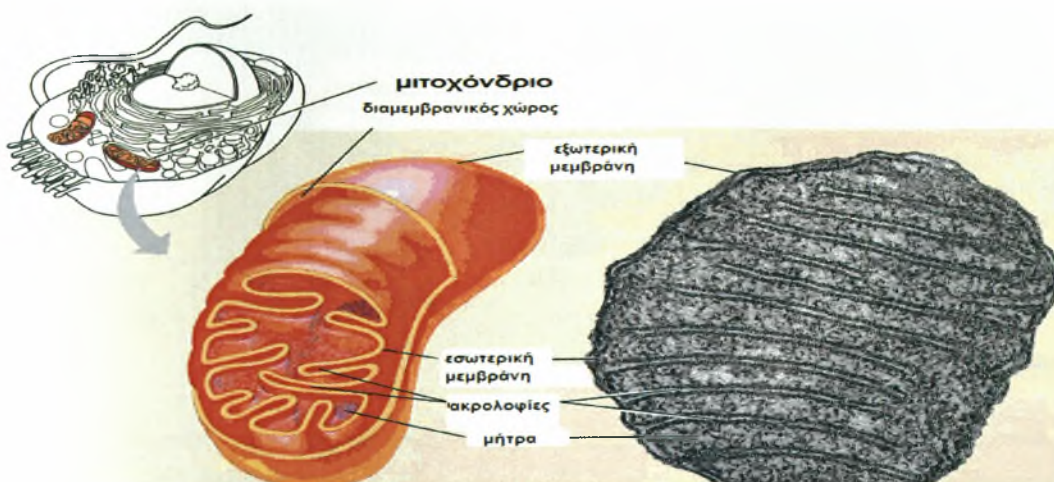
Τα **μιτοχόνδρια** (*μίτος + χόνδρος, κόκκος*) ανακαλύφθηκαν ως συστατικά του κυττάρου το 1886 από τον Altmann. Το 1898 ο Benda εισάγει τον όρο «μιτοχόνδριο», το 1904 ο Meves περιγράφει τα μιτοχόνδρια στα φυτικά κύτταρα και το 1934 οι Bensley και Hoerr απομονώνουν τα οργανίδια με υπερφυγοκέντρηση. Η λεπτομερειακή λεπτή δομή, όμως, έγινε γνωστή αρκετά χρόνια αργότερα, μετά την κατασκευή του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου και χάρη στις πρωτοποριακές έρευνες των G. Palade, K.R. Porter, F. Sjostrand και άλλων, το 1952, επέτρεψε την κατανόηση των βιοχημικών μηχανισμών και τη συσχέτιση δομής και λειτουργίας των σημαντικότερων αυτών κυτταρικών οργανιδίων. Είναι ωσειδή οργανίδια, με διαστάσεις 1-10 μm σε μήκος και 0,3-1 μm σε διάμετρο, αποτελούν συνήθως το 18-20% του συνολικού κυτταροπλασματικού όγκου και ο αριθμός τους στο κύτταρο ποικίλει ανάλογα με τον ιστό και τον οργανισμό. Τα κύτταρα, με την εξελικτική διαδικασία εκατομμυρίων ετών, για τη διατήρηση της ζωής, προσαρμόστηκαν στο να παράγουν (κυτταρική αναπνοή) και να χρησιμοποιούν ενέργεια με τη μορφή τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP), μεγάλα ποσά της οποίας παράγονται στα μιτοχόνδρια γι' αυτό συχνά περιγράφονται ως «**εργοστάσια παραγωγής κυτταρικής ενέργειας**». Εμπλέκονται έτσι 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. Επίσης παρουσιάζουν μια γενετική ημιαυτονομία καθώς φέρουν τα δικά τους ανεξάρτητα γονιδιώματα. Τέλος, σύμφωνα με την ενδοσυμβιωτική θεωρία, τα μιτοχόνδρια προέρχονται από αρχαία βακτήρια που εγκολπώθηκαν σε προγόνους ευκαρυωτικών κυττάρων, πριν από ένα εκατομμύριο χρόνια.

2.1.1 ΔΟΜΗ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΟΥ

Η δομή των μιτοχονδρίων είναι χαρακτηριστική, όπως φαίνεται με ηλεκτρονική μικροσκοπία λεπτών τομών: τα μιτοχόνδρια περιβάλλονται από ένα σύστημα δύο μεμβρανών, μιας *εξωτερικής μεμβράνης* και μιας *εσωτερικής μεμβράνης*, οι οποίες διαχωρίζουν το εσωτερικό των μιτοχονδρίων, που ονομάζεται *μήτρα*, από το κυτταρόπλασμα. Το διάστημα που δημιουργείται ανάμεσα στις δύο μεμβράνες ονομάζεται *διαμεμβρανικός χώρος*. Η εσωτερική μεμβράνη δημιουργεί αναδιπλώσεις, που ονομάζονται *ακρολοφίες*.

➤ Πιο αναλυτικά:

- ☑ **Η εξωτερική μεμβράνη** περιβάλλει ολόκληρο το μιτοχόνδριο όπου οι πρωτεΐνες διατάσσονται με τέτοιο τρόπο ώστε να δημιουργούν πόρους, οι οποίοι διευκολύνουν το πέρασμα των προϊόντων του μεταβολισμού με μοριακό βάρος μικρότερο των 10000 Daltons. *Μια τέτοια διαπερατότητα επιβεβαιώνεται από τη βιοχημική σύνθεση του διαμεμβρανικού χώρου, η οποία συγγενεύει με εκείνη του κυτταροπλάσματος.*
- ☑ **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 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.
- ☑ **Οι ακρολοφίες** είναι συνήθως κάθετες προς τον επιμήκη άξονα του μιτοχονδρίου και σχηματίζουν ατελή διαφράγματα, τα οποία δε διακόπτουν τη συνέχεια της μήτρας. Επηρεάζουν τη χημειοσμωτική λειτουργία της εσωτερικής μεμβράνης και ενισχύουν την ικανότητά της να παράγει ATP.
- ☑ **Η μήτρα**. Η πυκνότητά της ποικίλλει ανάλογα με τη λειτουργική κατάσταση του οργανιδίου. Τη σταθερή χημική σύνθεσή τους αποτελούν:
 - τα μόρια του μιτοχονδριακού DNA,
 - τα μιτοχονδριακά ριβοσώματα,
 - ακανόνιστα, πυκνά συσσωματώματα, διαμέτρου 50nm, τα οποία δημιουργούνται από τη συσσώρευση των κατιόντων,
 - όλα τα ένζυμα που παίρνουν στον κύκλο του κιτρικού οξέος και στη βιοσύνθεση των λιπαρών οξέων.

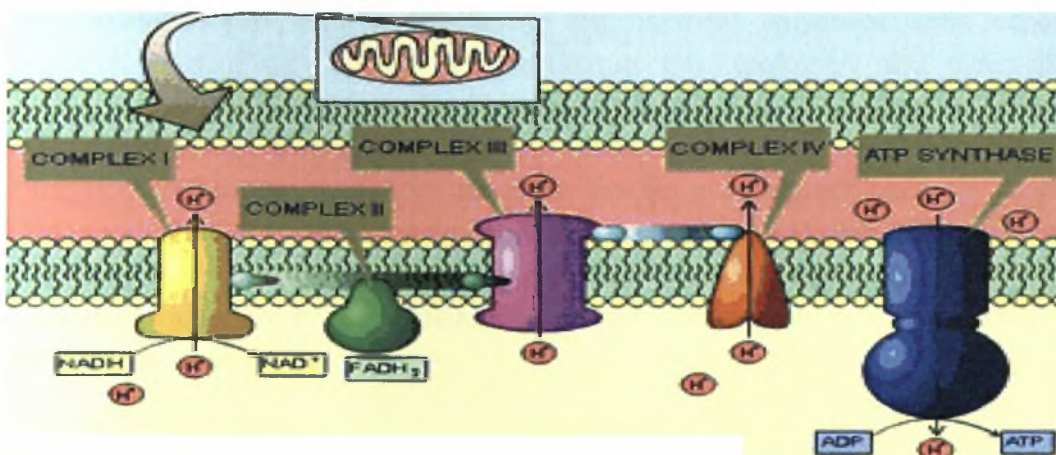


Εικόνα 1: Σχηματική απεικόνιση της δομής του μιτοχονδρίου με παράλληλη φωτογραφία του μιτοχονδρίου όπως φαίνεται από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο.

2.1.2 ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΟΥ

Οι βιοχημικές αντιδράσεις, οι οποίες καταλήγουν στην παραγωγή ενέργειας και τη σύνθεση του ATP, είναι εκείνες της κυτταρικής αναπνοής, κοινές σε όλους τους ευκαρυώτες. Τα μιτοχόνδρια αποτελούν τα εξειδικευμένα οργανίδια όπου επιτελείται η κυτταρική αναπνοή γι' αυτό και καλούνται τα ενεργειακά κέντρα των ευκαρυωτικών κυττάρων. Η παραγωγή του ATP επιτυγχάνεται με την οξείδωση των βασικών προϊόντων της γλυκολυτικής πορείας: το πυροσταφυλικό οξύ και το $NADH$. Ο κύκλος του κιτρικού οξέος, γνωστός και ως κύκλος του Krebs, αποτελεί το πρώτο στάδιο στην κυτταρική αναπνοή, την αφαίρεση ηλεκτρονίων υψηλής ενέργειας από τις πηγές καύσιμων οργανικών μορίων— αμινοξέων, λιπαρών οξέων και υδατανθράκων. Αυτά τα ηλεκτρόνια ανάγουν το οξυγόνο για να δημιουργηθεί μια βαθμίδωση συγκέντρωσης πρωτονίων, που χρησιμοποιείται για την παραγωγή ATP. Η αναγωγή του οξυγόνου και η σύνθεση του ATP απαρτίζουν την οξειδωτική φωσφορυλίωση.

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 (P_i). Η διαδικασία αυτή ονομάζεται χημειόσμωση και παρατηρήθηκε πρώτα από τον Peter Mitchell, που τιμήθηκε με το βραβείο Nobel το 1978 για την εργασία αυτή.



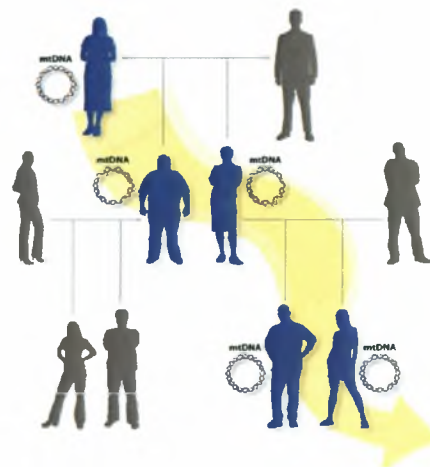
Εικόνα 2: Σχηματική απεικόνιση της αναπνευστικής αλυσίδας. Το σύμπλοκο I ($NADH$ αφυδρογονάση) ανάγει το $NADH$, αντλεί H^+ και προσδίδει e^- στην αλυσίδα. Το σύμπλοκο II (αφυδρογονάση του ηλεκτρίσιου) δέχεται e^- από το $FADH_2$ και τα μεταφέρει στο σύμπλοκο III (κυτοχρωμική αναγωγάση), μέσω του συνενζύμιου 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.

2.1.3 ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ ΤΟΥ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΟΥ

Το γεγονός ότι τα μιτοχόνδρια παρουσιάζουν πολλές ομοιότητες με τους προκαρυωτικούς οργανισμούς οδήγησε στην ανάπτυξη της **ενδοσυμβιωτικής προέλευσης** των μιτοχονδρίων. Η διπλή μεμβράνη του μιτοχονδρίου, το κυκλικό του γονιδίωμα και ο ειδικός μηχανισμός μιτοχονδριακής μεταγραφής και μετάφρασης συνηγορούν γι' αυτό το ενδεχόμενο. Κεντρικό σημείο της ενδοσυμβιωτικής θεωρίας είναι ότι τα μιτοχόνδρια προήλθαν συμβιωτικά από ένα προγονικό τύπο βακτηρίου όμοιο με τα σημερινά *Daptobacter* και *Bdellovibrio*, που διαβίωνε ελεύθερο και απέκτησε την ικανότητα της αποδοτικής κυτταρικής αναπνοής. Σήμερα, είναι αποδεκτή η **τμηματική ενδοσυμβιωτική θεωρία** που ανέπτυξε η Lynn Margulis το 1981, σύμφωνα με την οποία η εξέλιξη των ευκαρυωτών από τους προκαρυώτες περιελάμβανε τη συμβιωτική ένωση πολλών προγενέστερων ανεξάρτητων προγόνων. Τις προγονικές αυτές μορφές αποτελούσαν το κύτταρο-ξενιστής, ο πρόγονος των μιτοχονδρίων, ο πρόγονος των χλωροπλαστών και ένας προκαρυωτικός οργανισμός (ο περισσότερο αμφιλεγόμενος), που διέθετε τις δομές που σήμερα εξασφαλίζουν την κυτταρική κίνηση. Σύμφωνα με τη θεωρία, το αρχικό προκαρυωτικό κύτταρο-ξενιστής ήταν ένα αρχαιοβακτήριο όμοιο με το σημερινό *Thermoplasma*, που είναι ανθεκτικό σε υψηλές θερμοκρασίες και όξινες συνθήκες. Το κύτταρο-ξενιστής δεν έχε φωτοσυνθετική ικανότητα ούτε ήταν ικανό να χρησιμοποιεί αποτελεσματικά το οξυγόνο. Τα τελευταία, όμως, χρόνια αναπτύχθηκε από τους Martin και Muller (1998) μία νέα ενδοσυμβιωτική θεωρία για την προέλευση των μιτοχονδρίων που ονομάστηκε **«υπόθεση οξυγόνου»**. Σύμφωνα με αυτή τη θεωρία το πρώτο ευκαρυωτικό κύτταρο δεν σχηματίστηκε απλά από "ατύχημα", αλλά ήταν αποτέλεσμα σκόπιμης ένωσης μεταξύ του αρχαιοβακτηριακού κυττάρου-ξενιστή, ενός μεθανιογόνου που κατανάλωνε υδρογόνο και διοξείδιο του άνθρακα για την παραγωγή μεθανίου και του μελλοντικού μιτοχονδριακού συμβιώτη, ο οποίος απέβαλε υδρογόνο και διοξείδιο του άνθρακα ως προϊόντα του αναερόβιου μεταβολισμού. Έτσι, ενώ ο συμβιώτης είχε πιθανόν ικανότητα στην αερόβια αναπνοή, η συμβίωση άρχισε ως αποτέλεσμα των προϊόντων του αναερόβιου μεταβολισμού. Η εξάρτηση του ξενιστή από το υδρογόνο που παρήγαγε ο συμβιώτης αναγνωρίστηκε ως η αρχή επιλογής που σταθεροποίησε τον κοινό πρόγονο των ευκαρυωτικών κυττάρων. Τέλος, μια τρίτη θεωρία αναπτύχθηκε από τους Lopez-García και Moreira (1998), η οποία ονομάστηκε **«υπόθεση συντροφικότητας»**, όπου θεωρείται ότι η αρχική συμβίωση πραγματοποιήθηκε μεταξύ ενός μεθανιογόνου αρχαιοβακτηρίου και ενός προγονικού δέλτα-πρωτοβακτηρίου, που χρησιμοποιούσε θείο για την αναπνοή του.

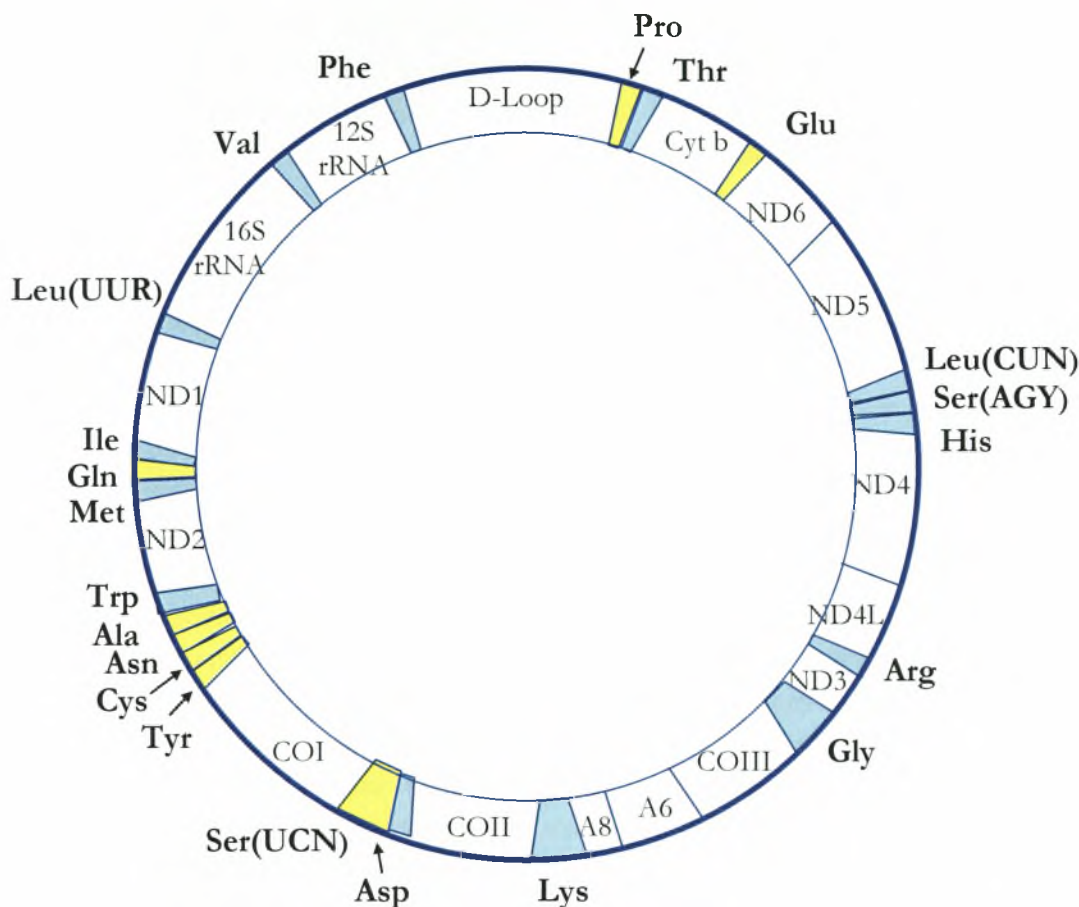
2.2 ΤΟ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑ (mt DNA)

Το 1981 δημοσιεύτηκε η πρωτοταγής δομή του ανθρώπινου μιτοχονδριακού DNA (mt DNA). 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 (12S και 16S). Ειδικότερα, ο κλώνος Η κωδικοποιεί 28 γονίδια και ο κλώνος L κωδικοποιεί 9 γονίδια, 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. Λόγω της κυτταροπλασματικής του εντόπισης, το μιτοχονδριακό γονιδίωμα κληρονομείται αποκλειστικά μητρικά (τα ώριμα σπερματοζωάρια περιέχουν πολύ λίγο κυτταρόπλασμα με λίγα μιτοχόνδρια). Ως εκ τούτου, σύμφωνα με την μητρική κληρονομηση μόνο τα θηλυκά άτομα μπορούν να μεταβιβάσουν τις μεταλλάξεις σε όλους τους απογόνους ανεξαρτήτου φύλου.



Εικόνα 3: Σχηματική απεικόνιση της μητρικής κληρονομησης. Το μιτοχονδριακό γονιδίωμα μεταβιβάζεται αποκλειστικά μητρικά σε όλους τους απογόνους ανεξαρτήτου φύλου.

Ο ρυθμός μεταλλαγής του μιτοχονδριακού γονιδιώματος είναι περίπου είκοσι φορές μεγαλύτερος από αυτόν του πυρηνικού γονιδιώματος, πιθανόν δευτερογενώς λόγω της παραγωγής μεταλλαξιγόνων ελεύθερων ριζών οξυγόνου στα μιτοχόνδρια, αλλά και λόγω της ελαττωμένης τους ικανότητας για επιδιόρθωση του DNA. Ως συνέπεια αυτού είναι η αυξημένη συσσώρευση πολυμορφισμών και η δημιουργία μεγάλης ποικιλομορφίας μεταξύ των μιτοχονδρίων, όχι μόνο μεταξύ διαφορετικών ειδών, αλλά και ανάμεσα στο ίδιο είδος. Τα ανθρώπινα μιτοχονδριακά γονίδια δεν περιέχουν επαναλήψεις και ιντρόνια και μεταγράφονται ως πολυγονιδιακά μετάγραφα, τα οποία στη συνέχεια ματίζονται και πολυαδενιλιώνονται για να δώσουν ώριμα mRNAs. Τέλος πρέπει να σημειωθεί ότι η πλειοψηφία των πρωτεϊνών που είναι απαραίτητες για τη μιτοχονδριακή λειτουργία κωδικοποιείται από το πυρηνικό και όχι από το μιτοχονδριακό γονιδίωμα.



Εικόνα 4: 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.

2.2.1 ΑΝΤΙΓΡΑΦΗ, ΜΕΤΑΓΡΑΦΗ ΚΑΙ ΜΕΤΑΦΡΑΣΗ ΤΟΥ mtDNA

Αντιγραφή

Η αντιγραφή του mt DNA γίνεται με ημισυντηρητικό τρόπο και δεν περιορίζεται μόνο στη φάση S της μεσόφασης, δηλαδή αντιγράφεται ανεξάρτητα από τον κυτταρικό κύκλο. Στα ευκαρυωτικά κύτταρα υπάρχει όμως κάποιος μηχανισμός ρύθμισης της μιτοχονδριακής αντιγραφής ως απάντηση στις ενεργειακές ανάγκες του κυττάρου. 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 πολυμεράση αρχίζει την αντιγραφή από καθορισμένο σημείο έναρξης του δίκλωνου κυκλικού μορίου. Μετά την αποδιάταξη γίνεται αντιγραφή του ενός μόνον από τους δύο γονικούς κλώνους, του κλώνου H, για τη βιοσύνθεση θυγατρικού κλώνου L. Η αντιγραφή προχωράει σε σχετικά λίγα νουκλεοτίδια και με αυτόν τον τρόπο εκτοπίζεται ο γονικός κλώνος L, που παραμένει μονόκλωνος. Η όλη διαμόρφωση της περιοχής

ονομάζεται βρόγχος D (D loop). Ο μικρός θυγατρικός κλώνος L έχει πάντοτε ένα και το αυτό 5'-άκρο. Αντίθετα, το 3'-άκρο μπορεί να είναι διαφορετικό, γιατί η αρχική αντιγραφή του κλώνου H μπορεί να τερματίσει σε τρία ή τέσσερα διαφορετικά σημεία. Ο θυγατρικός αυτός κλώνος είναι ασταθής, συνήθως διασπάται, αλλά γίνεται πάλι σύνθεσή του για να διατηρείται ανοιχτό το σημείο έναρξης της αντιγραφής. Σημειώνεται ότι η αντιγραφή του mt DNA βρίσκεται κάτω από τον έλεγχο του πυρηνικού DNA καθώς η μιτοχονδριακή DNA πολυμεράση και άλλες απαραίτητες πρωτεΐνες για την αντιγραφή του mt DNA κωδικοποιούνται από το πυρηνικό DNA.

Η όλη διαδικασία της αντιγραφής διαρκεί μία περίπου ώρα, γεγονός που δείχνει πως η ταχύτητα αντιγραφής του mt DNA είναι εκατό φορές βραδύτερη από εκείνη του πυρηνικού DNA. Μια ακόμη διαφορά μεταξύ της μιτοχονδριακής και πυρηνικής αντιγραφής είναι ότι στην πρώτη απουσιάζει η επιδιόρθωση λαθών από τη δράση εξωνουκλεάσης της μιτοχονδριακής DNA πολυμεράσης. Αυτό οδηγεί σε υψηλότερο ρυθμό μεταλλαξιγένεσης στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα από ότι στο πυρηνικό, με συνέπεια το πρώτο να εξελίσσεται εξαιρετικά γρήγορα.

Η μιτοχονδριακή DNA πολυμεράση χρησιμοποιώντας ως μήτρα τον κλώνο H προσθέτει νουκλετίδια στο 3'-άκρο του μικρού κλώνου του βρόγχου D. Ο γονικός κλώνος L συνεχίζει να παραμένει μονόκλωνος, μέχρι ότου η αντιγραφή του κλώνου H φθάσει στα 2/3 του μεγέθους του κυκλικού μορίου και αποκαλυφθεί το σημείο έναρξης της αντιγραφής του κλώνου L. Από το σημείο αυτό και έπειτα μια μιτοχονδριακή DNA πολυμεράση χρησιμοποιώντας ως μήτρα τον κλώνο L και με αντίθετη κατεύθυνση αντιγραφής συνθέτει θυγατρικό κλώνο H. Επειδή καθυστερεί η έναρξη της αντιγραφής του κλώνου L, γι' αυτό όταν ολοκληρώνεται η αντιγραφή του κλώνου H, η σύνθεση του θυγατρικού κλώνου H έχει προχωρήσει μόνο 30-40%. Σ' αυτό το στάδιο, από τη μια μεριά υπάρχει ένα πλήρες κυκλικό δίκλωνο θυγατρικό μόριο και από την άλλη ένα που είναι μερικά μονόκλωνο και μερικά δίκλωνο. Τελικά ολοκληρώνεται και η αντιγραφή του κλώνου L και προκύπτουν δύο όμοια θυγατρικά κυκλικά μιτοχονδριακά γονιδιώματα.

Μεταγραφή

Στο mt DNA η μεταγραφή αρχίζει μόνο από δύο προαγωγείς, έναν για κάθε συμπληρωτική αλυσίδα. Η μεταγραφή είναι σχεδόν συμμετρική και κάθε κλώνος μεταγράφεται σε ένα μεγάλο μόριο RNA. Αυτά τα δύο μεγάλα πρωταρχικά μόρια RNA διασπώνται με τη δράση ενδονουκλεάσης και δημιουργούνται τα ώριμα μόρια RNA. Η μεταγραφή του κλώνου H δίνει πρόδρομο μόριο RNA που μετά τη διάσπασή του από νουκλεάσες προκύπτουν: 2 μόρια rRNA, 14 μόρια tRNA και 12 μόρια mRNA. Αντίθετα, η μεταγραφή του κλώνου L και η διάσπασή του δίνει 8 μόρια tRNA και ένα μόριο mRNA. Το υπόλοιπο πρόδρομο μόριο, άρα και το DNA, ίσως δεν έχει πληροφορίες. Οι αλληλουχίες που καθορίζουν μόρια tRNA βρίσκονται ανάμεσα στις αλληλουχίες που καθορίζουν μόρια mRNA και rRNA, χωρίς να υπάρχει μεσοδιαστημικό DNA μεταξύ τους, αλλά ούτε και αλληλουχίες-σήματα τερματισμού και έναρξης μεταξύ τους. Τα πρόδρομα μόρια mRNA δεν έχουν κολλώδες άκρο, αλλά ούτε κωδικόνια τερματισμού. Τα τελευταία δημιουργούνται με

την προσθήκη των αλληλουχιών poly-A. Τα mRNA έχουν κωδικόνια έναρξης (AUG, AUA, AUU) ακριβώς στο 5' άκρο τους ή μερικές βάσεις μετά από αυτό. Αντίθετα, δεν αποκτούν ποτέ τη δομή του 5 καλύμματος.

Μετάφραση

Τα μιτοχόνδρια έχουν το δικό τους μηχανισμό πρωτεϊνικής σύνθεσης. Έτσι δεν είναι παράδοξο που έχουν ριβοσώματα. Αυτά διαφέρουν από τα κυτταροπλασματικά ριβοσώματα στο μέγεθος, στο συντελεστή καθίζησης, στα είδη rRNA και στους αναστολείς της πρωτεϊνοσύνθεσης. Τα μιτοχονδριακά ριβοσώματα έχουν διαφορετικό μέγεθος ανάλογα με το είδος. Στις περισσότερες περιπτώσεις απουσιάζει το 5 και 5,8 S rRNA. Έτσι συνήθως τα mt ριβοσώματα αποτελούνται από δύο άνισες υπομονάδες με ένα μόριο rRNA. Το ανθρώπινο rRNA των ριβοσωμάτων έχει συντελεστή καθίζησης 16S και 12S. Οι μιτοχονδριακές ριβοσωμικές πρωτεΐνες είναι διαφορετικές από τις πρωτεΐνες των κυτταροπλασματικών ριβοσωμάτων και καθορίζονται από πυρηνικά γονίδια. Η έναρξη της μετάφρασης στα μιτοχονδριακά ριβοσώματα μοιάζει με εκείνη των ευκαρυωτών. Παρόλο αυτά η πρωτεϊνοσύνθεση αρχίζει με fmet. Τα μιτοχονδριακά ριβοσώματα βρίσκονται στη μιτοχονδριακή μήτρα είτε ελεύθερα είτε συνδεδεμένα στις μιτοχονδριακές ακρολοφίες. Η πρωτεϊνοσύνθεση στα μιτοχονδριακά ριβοσώματα αναστέλλεται από τη γλωραμφαινικόλη, ενώ στα κυτταροπλασματικά ριβοσωμάτα από το κυκλοεξαμίδιο. Τέτοιες διαφορές στην ευαισθησία επιτρέπουν να προσδιοριστεί αν και κατά πόσο πρωτεΐνες που βρίσκονται στα μιτοχόνδρια κωδικοποιούνται από πυρηνικά ή μιτοχονδριακά γονίδια. Από τα προηγούμενα, αλλά και με άλλα στοιχεία, προκύπτει ότι η μιτοχονδριακή πρωτεϊνοσύνθεση έχει αρκετά κοινά σημεία με τη βακτηριακή. Τέλος, τα πολυπεπίδια που καθορίζονται από το μιτοχονδριακό γονιδίωμα αποτελούν το 5-10% του συνόλου των μιτοχονδριακών πρωτεϊνών. Οι υπόλοιπες πρωτεΐνες που είναι απαραίτητες για τη βιογένεση των μιτοχονδρίων κωδικοποιούνται από το πυρηνικό γονιδίωμα, μεταφράζονται στα κυτταροπλασματικά ριβοσωμάτα και μεταφέρονται στα μιτοχόνδρια.

2.2.2 ΠΟΙΚΙΛΟΜΟΡΦΙΑ ΣΤΟ ΓΕΝΕΤΙΚΟ ΚΩΔΙΚΑ

Το 1979 ερευνητές που μελετούσαν τα ανθρώπινα μιτοχονδριακά γονίδια ανακάλυψαν ότι η μιτοχονδριακή πρωτεϊνοσυνθετική μηχανή διαφέρει από την κυτταροπλασματική. Πως όμως τροποποιήθηκε ο κώδικας του μιτοχονδριακού γονιδιώματος; Μια και ο μιτοχονδριακός κώδικας είναι απλούστερος από τον παγκόσμιο, μια άποψη που διατυπώθηκε είναι ότι αντιπροσωπεύει ένα πιο πρωτόγονο πρότυπο. Αυτή η άποψη ίσως θα μπορούσε να ισχύει για το κωδικόνιο UGA – που μαζί με το UGG – καθορίζουν το αμινοξύ τρυπτοφάνη. Κατά μια άλλη εκδοχή, ο απλούστερος μιτοχονδριακός γενετικός κώδικας μπορεί να έχει εξελιχθεί ως ανταπόκριση στις ειδικές ανάγκες πρωτεϊνοσύνθεσης του μιτοχονδρίου. Σύμφωνα με μια τρίτη άποψη, τα τροποποιημένα κωδικόνια αντιπροσωπεύουν εξελικτικά ατυχήματα, τα οποία όμως διατηρήθηκαν γιατί συμμετέχουν στη βιοσύνθεση ελάχιστων πρωτεϊνών και είναι κατά συνέπεια αβλαβή για τα οργανίδια και τα κύτταρα. Γεγονός είναι όμως πως οι λόγοι για τους οποίους διαφέρει ο μιτοχονδριακός κώδικας από τον βακτηριακό και τον πυρηνικό παραμένουν άγνωστοι. Τελικά όλα τα πειραματικά δεδομένα συνηγορούν υπέρ της άποψης ότι η προέλευση των μιτοχονδρίων προήλθε από μια μορφή ενδοσυμβίωσης με βακτήρια. Αλλαγές στον παγκόσμιο γενετικό κώδικα έγιναν μετά τον διαχωρισμό των ειδών. Οι αλλαγές οφείλονται σε μεταλλακτικές πιέσεις ή οικονομικότερη χρήση των κωδικονίων του γονιδιώματος. Έτσι τα μιτοχονδριακά γονίδια χρησιμοποιούν έναν εναλλακτικό κώδικα σε αντίθεση με τον παγκόσμιο γενετικό κώδικα. Οι παραλλαγές από τον παγκόσμιο γενετικό κώδικα (universal genetic code) συνοψίζονται στον πίνακα 1.

ΠΙΝΑΚΑΣ 1

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

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

Πίνακας 1: Παραλλαγές στο γενετικό κώδικα των μιτοχονδρίων στα θηλαστικά.

2.3 ΤΑ ΜΟΡΙΑ tRNAs

Το **μεταφορικό RNA** (*transfer RNA* ή *tRNA*) αποτελεί το μόριο κλειδί, όσον αφορά την αποκωδικοποίηση των «λέξεων», που μεταφέρει το mRNA αφού κάθε αμινοξύ έχει το δικό του τύπο tRNA. Ειδικότερα, κάθε tRNA έχει διπλή λειτουργία. Λειτουργεί ως προσαρμοστικό μόριο το οποίο δεσμεύεται σε ένα ειδικό κωδικόνιο στο mRNA και φέρει μαζί του ένα αμινοξύ για ενσωμάτωση σε μια πολυπεπτιδική αλυσίδα. Το σωστό tRNA με το προσδεδεμένο του αμινοξύ επιλέγεται σε κάθε βήμα καθώς κάθε ειδικό tRNA περιέχει μια αλληλουχία τριών βάσεων που ονομάζεται **αντικωδικόνιο** που σχηματίζει δεσμούς με τη συμπληρωματική της στο mRNA. Ειδικότερα, τα tRNAs είναι μικρά μόρια με 73-93 νουκλεοτίδια και ειδική στερεοδιάταξη που επιτρέπει, μέσω μιας ειδικής τριπλέτας βάσεων, την αναγνώριση της αντίστοιχης τριπλέτας στο mRNA με βασική αρχή:

κωδικόνιο mRNA=αντικωδικόνιο tRNA=αμινοξύ

Εξαιτίας του εκφυλισμού του γενετικού κώδικα, υπάρχουν περισσότερα από 20 διαφορετικά είδη μορίων tRNA, ενώ αρκετά tRNA χρησιμοποιούν για την αναγνώριση του αντίστοιχου κωδικονίου mRNA μόνο τις δύο από τις τρεις βάσεις. Η δράση αποκωδικοποιητή των tRNAs βασίζεται στην τρισδιάστατη δομή τους και απαιτεί επίσης τη συμμετοχή των αμινο-ακυλο-tRNA συνθετασών που μεταφέρουν το ειδικό αμινοξύ στο κατάλληλο tRNA, καθώς αναγνωρίζουν τις θηλίες του αντικωδικονίου και τους βραχίονες υποδοχής των tRNA. Κάθε ένα tRNA αναγνωρίζεται από μία μόνο από τις 20 αμινο-ακυλο-tRNA συνθετάσες. Κάθε ένα από αυτά τα ένζυμα προσδένει ένα από τα 20 αμινοξέα σε ένα δεδομένο tRNA δημιουργώντας έτσι ένα αμινο-ακυλο-tRNA.

2.3.1 ΔΟΜΗ ΤΟΥ tRNA

Πρώτος ο Robert Holley προσδιόρισε το 1965 την αλληλουχία βάσεων ενός μορίου tRNA ως αποκορύφωμα επταετούς προσπάθειας. Οι μελέτες του με το αλανυλο-tRNA ζυμομυκήτων έδωσαν την πρώτη αλληλουχία νουκλεϊκού οξέος. Αυτό το προσαρμοστικό μόριο είναι μία μονή αλυσίδα 76 ριβονουκλεοτιδίων με το 5'-άκρο φωσφορυλιωμένο (pG), ενώ το 3'-άκρο έχει μία ελεύθερη υδροξυλική ομάδα. Η **θέση δέσμευσης του αμινοξέος** είναι η 3'-υδροξυλική ομάδα του καταλοίπου αδενοσίνης στο 3'-άκρο το μορίου. Η αλληλουχία IGC στη μέση του μορίου αποτελεί το **αντικωδικόνιο**, και είναι συμπληρωματικό με το GCG, ένα από τα κωδικόνια της αλανίνης.

Οι αλληλουχίες μερικών άλλων μορίων tRNA προσδιορίστηκαν λίγο αργότερα. Σήμερα είναι γνωστές εκατοντάδες τέτοιες αλληλουχίες. Η εντυπωσιακή ανακάλυψη είναι ότι όλες μπορούν να διατάσσονται κατά ένα πρότυπο **σχήμα τριφυλλίου** (δευτεροταγής δομή) στο οποίο τα μισά περίπου νουκλεοτιδικά κατάλοιπα είναι συνδεδεμένα με ζεύγη βάσεων. Επομένως, τα μόρια tRNA έχουν

πολλά κοινά δομικά χαρακτηριστικά. Η ανακάλυψη αυτή δεν ήταν απροσδόκητη, διότι όλα τα μόρια tRNA πρέπει να είναι ικανά να αλληλεπιδρούν κατά τον ίδιο σχεδόν τρόπο με τα ριβοσώματα, με τα mRNA και με τους πρωτεϊνικούς παράγοντες που συμμετέχουν στη μετάφραση.

Όλα τα γνωστά μόρια μεταφορικού RNA στη δευτεροταγή δομή έχουν τα παρακάτω χαρακτηριστικά:

1. Το κάθε ένα είναι μία μονόκλωνη αλυσίδα που περιέχει από 73 έως 93 ριβονουκλεοτίδια (~ 25kd).
2. Περιέχουν πολλές ασυνήθιστες βάσεις, συνήθως από 7 έως 15 ανά μόριο. Μερικές από αυτές είναι μεθυλιωμένα ή διμεθυλιωμένα παράγωγα των A, U, C και G και σχηματίζονται με ενζυμική τροποποίηση ενός πρόδρομου μορίου tRNA. Η μεθυλίωση εμποδίζει τον σχηματισμό ορισμένων ζευγών βάσεων και έτσι καθιστά μερικές από τις βάσεις αυτές προσιτές σε άλλες αλληλεπιδράσεις. Επιπλέον, η μεθυλίωση προσδίδει έναν υδρόφοβο χαρακτήρα σε ορισμένες περιοχές των tRNA, οι οποίες μπορεί να είναι σημαντικές για την αλληλεπίδρασή τους με συνθετάσες και ριβοσωματικές πρωτεΐνες.
3. Περίπου τα μισά από τα νουκλεοτίδια των μορίων tRNA συνδέονται με ζεύγη βάσεων σχηματίζοντας διπλές έλικες. Πέντε ομάδες βάσεων δεν είναι ζευγαρωμένες με τον τρόπο αυτό:

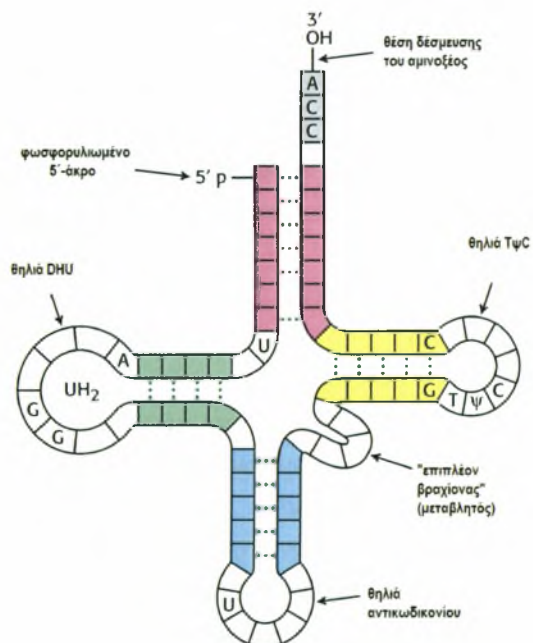
ί. Η περιοχή του 3'-άκρου CCA, η οποία είναι τμήμα της περιοχής του βραχίονα υποδοχής (acceptor stem).

ίι. Η θηλιά TψC, η οποία πήρε το όνομά της από την αλληλουχία ριβοθυμίνης-ψευδοουρακίλης-κυτοσίνης.

ίιι. Ο «επιπλέον βραχίονας», ο οποίος περιέχει έναν ποικίλο αριθμό καταλοίπων.

ίiv. Η θηλιά διδρσουρακίλης (θηλιά DHU), η οποία περιέχει μερικά κατάλοιπα διδρσουρακίλης.

v. Η θηλιά η οποία περιέχει το αντικωδικόνιο.



Εικόνα 5: Η δευτεροταγής δομή του tRNA. Φαίνονται η θέση δέσμευσης του αμινοξέος στο 3'-άκρο, η θηλιά TψC, ο επιπλέον «βραχίονας», η θηλιά αντικωδικονίου και η θηλιά DHU.

Η δομική ποικιλομορφία που δημιουργείται με αυτόν τον συνδυασμό των ελίκων και θηλιών και που περιέχει τροποποιημένες βάσεις διασφαλίζει την αποτελεσματική διάκριση του κάθε μορίου tRNA μέσα από ένα σύνολο δομικά παρόμοιων μορίων.

4. Το 5'-άκρο ενός μορίου tRNA είναι φωσφορυλιωμένο και το 5'-τελικό κατάλοιπο είναι συνήθως pG.
5. Το ενεργοποιημένο αμινοξύ είναι συνδεδεμένο με μια υδροξυλική ομάδα του καταλοίπου αδενosίνης, το οποίο βρίσκεται στο 3'-άκρο της αλληλουχίας CCA του βραχίονα υποδοχής. Η περιοχή αυτή στο 3'-άκρο ώριμων μορίων tRNA είναι μονόκλωνη.
6. Το αντικωδικόνιο βρίσκεται σε μια θηλιά κοντά στο κέντρο της αλληλουχίας.

Η τρισδιάστατη δομή ενός μορίου tRNA προσδιορίστηκε για πρώτη φορά το 1974 με μελέτες κρυσταλλογραφίας με ακτίνες X που έγιναν στα εργαστήρια των Alexander Rich και Aaron Klug. Η δομή που προσδιορίστηκε ήταν εκείνη του φαινυλαλανυλο- tRNA της ζύμης και εντυπωσιακά όμοια με όλες τις δομές άλλων μορίων tRNA που προσδιορίστηκαν στη συνέχεια.

🔗 Οι πιο σημαντικές ιδιότητες της τριτοταγούς δομής του tRNA είναι:

1. Το μόριο έχει το σχήμα του γράμματος Γ.
2. Υπάρχουν δύο εμφανώς συνεχή τμήματα διπλής έλικας. Τα τμήματα αυτά είναι μορφής A, όπως το DNA. Το ζευγάρι των βάσεων που προβλέπεται από την αλληλουχία των βάσεων είναι σωστό. Η έλικα που περιέχει τα 5'- και 3'-άκρα βρίσκεται επάνω από την έλικα που τελειώνει με τη θηλιά TψC, σχηματίζοντας τον έναν βραχίονα του Γ. Οι υπόλοιπες δύο έλικες σχηματίζουν τον άλλον βραχίονα.
3. Οι περισσότερες βάσεις των μη ελικοειδών περιοχών συμμετέχουν σε αλληλεπιδράσεις δεσμών υδρογόνου, ακόμη και αν οι αλληλεπιδράσεις αυτές δεν μοιάζουν με εκείνες των ζευγών βάσεων των Watson-Crick.
4. Το άκρο CCA που περιέχει τη θέση δέσμευσης του αμινοξέος προεξέχει από το ένα άκρο του Γ. Αυτή η μονόκλωνη περιοχή μπορεί να αλλάξει στερεοδιάταξη κατά την ενεργοποίηση του αμινοξέος και τη σύνθεση πρωτεϊνών.
5. Η θηλιά του αντικωδικονίου βρίσκεται στο άλλο άκρο του Γ, το οποίο καθιστά προσιτές τις τρεις βάσεις που σχηματίζουν το αντικωδικόνιο.

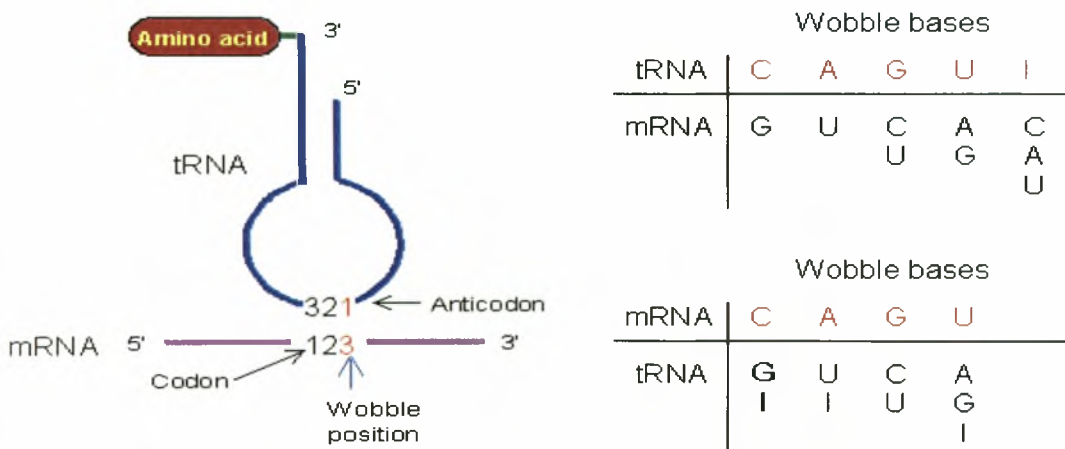


Επομένως, η αρχιτεκτονική των tRNA ανταποκρίνεται καλά στον ρόλο της ως προσαρμοστική. Με άλλα λόγια, το αντικωδικόνιο είναι διαθέσιμο να αλληλεπιδρά με ένα κατάλληλο κωδικόνιο στο mRNA, ενώ το άκρο που συνδέεται με ένα ενεργοποιημένο αμινοξύ είναι τοποθετημένο κατάλληλα ώστε να μπορεί να συμμετέχει στον σχηματισμό πεπτιδικών δεσμών.

Εικόνα 6: Η τριτοταγής δομή του tRNA με το χαρακτηριστικό σχήμα Γ. Στο ένα άκρο του Γ βρίσκεται η θέση δέσμευσης του αμινοξέος, ενώ στο άλλο άκρο του η θηλιά του αντικωδικονίου.

2.3.2 ΥΠΟΘΕΣΗ ΤΑΛΑΝΤΕΥΣΗΣ

Το 1966 Francis Crick ανακάλυψε ότι μερικά καθαρά μόρια tRNA μπορούν να αναγνωρίζουν περισσότερα από ένα κωδικόνια. Οι δύο πρώτες βάσεις των κωδικονίων αυτών είναι οι ίδιες, ενώ η τρίτη είναι διαφορετική. Το πρότυπο του εκφυλισμού του γενετικού κώδικα υποδηλώνει ότι η αναγνώριση της τρίτης βάσης ενός κωδικονίου μπορεί να είναι μερικές φορές λιγότερο ειδική από ό,τι η αναγνώριση των άλλων δύο. Κωδικόνια του τύπου XYU και XYC πάντοτε κωδικοποιούν το ίδιο αμινοξύ, ενώ του τύπου XYA και XYG συνήθως κωδικοποιούν το ίδιο αμινοξύ. Ο Francis Crick υπέθεσε από τα δεδομένα αυτά ότι τα στερεοχημικά κριτήρια θα μπορούσαν να είναι λιγότερο αυστηρά για το ζευγάρι στην τρίτη βάση από ό,τι στις άλλες δύο. Μοντέλα διαφόρων ζευγών βάσεων κατασκευάστηκαν για να προσδιορίσουν ποια από αυτά ήταν όμοια με τα κανονικά A-U και G-C σε σχέση με την απόσταση και τη γωνία μεταξύ των γλυκοζιτικών δεσμών. Η ινোসίνη (I) συμπεριλήφθηκε στις μελέτες αυτές διότι εμφανιζόταν σε μερικά αντικωδικόνια. Υποθέτοντας ότι υπάρχει κάποια στερεοχημική ελευθερία (ταλάντευση – «wobble») στο ζευγάρι με την τρίτη βάση του αντικωδικονίου, οι συνδυασμοί που σημειώνονται στην Εικόνα 7 φάνηκαν πιθανοί. Η **υπόθεση ταλάντευσης (wobble hypothesis)** σήμερα έχει γίνει πλήρως αποδεκτή. Τα αντικωδικόνια των μορίων tRNA γνωστής αλληλουχίας δεσμεύονται στα προβλεπόμενα κωδικόνια με βάση την υπόθεση αυτή.



Εικόνα 7: Παρουσίαση της υπόθεσης ταλάντευσης. Το ζευγάρι κωδικονίου-αντικωδικονίου περιλαμβάνει ταλάντευση στην τρίτη θέση. Η πρώτη βάση του αντικωδικονίου προσδιορίζει τη βάση που αναγνωρίζεται στην τρίτη θέση του κωδικονίου. Συγκεκριμένα:

- αν η βάση στην πρώτη θέση του κωδικονίου είναι C, τότε η βάση στην τρίτη θέση του κωδικονίου μπορεί να είναι μόνο G,
- αν η βάση στην πρώτη θέση του κωδικονίου είναι A, τότε η βάση στην τρίτη θέση του κωδικονίου μπορεί να είναι μόνο U,
- αν η βάση στην πρώτη θέση του κωδικονίου είναι G, τότε η βάση στην τρίτη θέση του κωδικονίου μπορεί να είναι είτε C είτε U,
- αν η βάση στην πρώτη θέση του κωδικονίου είναι U, τότε η βάση στην τρίτη θέση του κωδικονίου μπορεί να είναι είτε A είτε G,
- αν η βάση στην πρώτη θέση του κωδικονίου είναι I, τότε η βάση στην τρίτη θέση του κωδικονίου μπορεί να είναι είτε C είτε A είτε U.

➤ Μπορούν να γίνουν δύο γενικεύσεις για τις αλληλεπιδράσεις κωδικονίου-αντικωδικονίου:

1. Οι δύο πρώτες βάσεις ενός κωδικονίου ζευγαρώνουν κατά το συνηθισμένο τρόπο. Η αναγνώριση είναι ακριβής. Επομένως, κωδικόνια που διαφέρουν σε οποιαδήποτε από τις δύο πρώτες βάσεις θα πρέπει να αναγνωρίζονται από διαφορετικά tRNA. Παραδείγματος χάριν, το UUA και το CUA κωδικοποιούν λευκίνη αλλά διαβάζονται από διαφορετικά tRNA.

2. Η πρώτη βάση του αντικωδικονίου προσδιορίζει το εάν ένα ιδιαίτερο μόριο tRNA διαβάζει ένα, δύο ή τρία είδη κωδικονίων: C ή A (ένα κωδικόνιο), U ή G (δύο κωδικόνια), I (τρία κωδικόνια). Άρα, μέρος από τον εκφυλισμό του γενετικού κώδικα προκύπτει από την ανακρίβεια (ταλάντευση) στο ζευγάρι της τρίτης βάσης του κωδικονίου με την πρώτη βάση του αντικωδικονίου.

Επομένως, και τα 22 tRNA που κωδικοποιούνται στα μιτοχόνδρια επαρκούν για την αντίστοιχη μιτοχονδριακή μετάφραση:

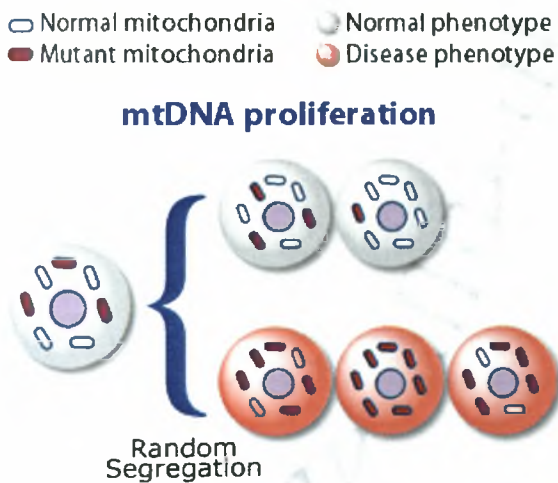
- ο ένα tRNA ειδικό για καθένα από τα δεκαοκτώ αμινοξέα,
- ο δύο tRNA ειδικά για τη σερίνη (tRNA^{Ser(AGY)} και tRNA^{Ser(UCN)}),
- ο και δύο tRNA ειδικά για τη λευκίνη (tRNA^{Leu(UUR)} και tRNA^{Leu(CUN)}).

2.3.3 ΠΑΘΟΓΟΝΕΣ ΚΑΙ ΟΥΔΕΤΕΡΕΣ (ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ) ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ ΣΕ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΑ ΓΟΝΙΔΙΑ tRNA

Όπως αρμόζει σε ένα οργανίδιο που είναι τόσο απαραίτητο στην παραγωγή μεταβολικής ενεργείας, η δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων μπορεί να οδηγήσει σε παθολογικές καταστάσεις. Ο αριθμός των νοσημάτων που μπορούν να αποδοθούν σε μιτοχονδριακές μεταλλάξεις αυξάνεται διαρκώς, παράλληλα με την αυξανόμενη κατανόηση από μέρους μας της βιοχημείας και της γενετικής των μιτοχονδρίων. 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}). Τουναντίον ουδέτερες μεταλλάξεις ή πολυμορφισμοί βρίσκονται σε όλα τα tRNA γονίδια, είναι κατά κόρον σημειακές αντικαταστάσεις, δεν επηρεάζουν τη δομική ακεραιότητα ή τη λειτουργικότητα των μιτοχονδριακών tRNA και

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 ζευγάρι των βάσεων που έχει διατυπωθεί από τους Watson και Crick, και συνήθως εμφανίζονται ως C-A ή G-U. Όσον αφορά τη τριπλέτα του αντικωδικονίου, όπου τα κατάλοιπα είναι εξελικτικά συντηρημένα και οποιαδήποτε αλλαγή βάσεως θα μπορούσε να αποβεί μοιραία για τη διαδικασία της πρωτεϊνοσύνθεσης, εκλείπουν σχεδόν πλήρως οι μεταλλάξεις. Πρέπει να σημειωθεί ότι οι περισσότερες παθογόνες μεταλλάξεις επηρεάζουν νουκλεοτίδια που έχουν δείξει υψηλό βαθμό συντήρησης με το χρόνο, ενώ οι περισσότεροι πολυμορφισμοί στοχεύουν όχι σε τόσο συντηρημένα κατάλοιπα, χωρίς όμως αυτό να είναι απόλυτο.

Το ποσοστό των μιτοχονδρίων, που φέρουν στο γενετικό τους υλικό τη μετάλλαξη, μπορεί να διαφέρει σημαντικά μεταξύ διαφορετικών σωματικών κυττάρων και ιστών, δεδομένου ότι το μιτοχονδριακό γονιδίωμα διπλασιάζεται αυτόνομα και ανεξάρτητα από το πυρηνικό γονιδίωμα, και ότι τα μιτοχόνδρια διαχωρίζονται στα θυγατρικά κύτταρα ανεξάρτητα από τα πυρηνικά χρωμοσώματα. Αυτή η ετερογένεια ονομάζεται **ετεροπλάσμία** και παίζει σημαντικό ρόλο στο φαινότυπο μιας μιτοχονδριακής νόσου, που κατά κανόνα χαρακτηρίζεται από ποικιλομορφία και ιστοειδικότητα.



Εικόνα 8: Ο πολλαπλασιασμός των mt DNA και ο τυχαίος διαχωρισμός τους.

- Ένα κύτταρο μπορεί να έχει μερικά μιτοχόνδρια που να έχουν μία μετάλλαξη στο mt DNA και μερικά που να μην έχουν. Αυτό ορίζεται ως **ετεροπλάσμία**. Η αναλογία των μεταλλαγμένων μορίων mt DNA καθορίζει και την διεισδυτικότητα και την σοβαρότητα της έκφρασης κάποιων ασθενειών.
- Η **ομοπλάσμία** αποδίδεται σε ένα κύτταρο το οποίο έχει μία ενιαία συλλογή mt DNA μορίων, είτε όλα του τα mt DNA είναι φυσιολογικά είτε όλα του τα mt DNA είναι μεταλλαγμένα.
- Σε κύτταρα με ετεροπλάσμία, κάθε θυγατρικό κύτταρο δύναται να προσλάβει διαφορετική αναλογία μιτοχονδρίων φέροντας και φυσιολογικά και μεταλλαγμένα μόρια mt DNA.

Ετεροπλάσμία λοιπόν, είναι η συνύπαρξη φυσιολογικού και μεταλλαγμένου DNA στο κύτταρο, που δημιουργείται ύστερα από τη κυτταρική διαίρεση όπου τα μιτοχόνδρια και τα γονιδιώματά 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 ετεροπλάσμικές, ενώ οι πολυμορφισμοί είναι ομοπλάσμικοί. Επιπρόσθετα, οι ιστοί διαφέρουν ως προς την εξάρτησή τους από την οξειδωτική

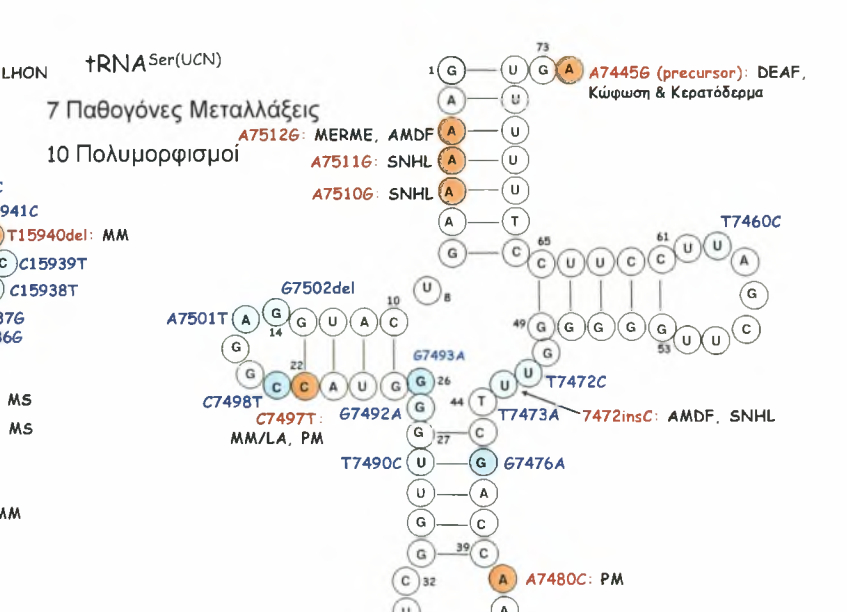
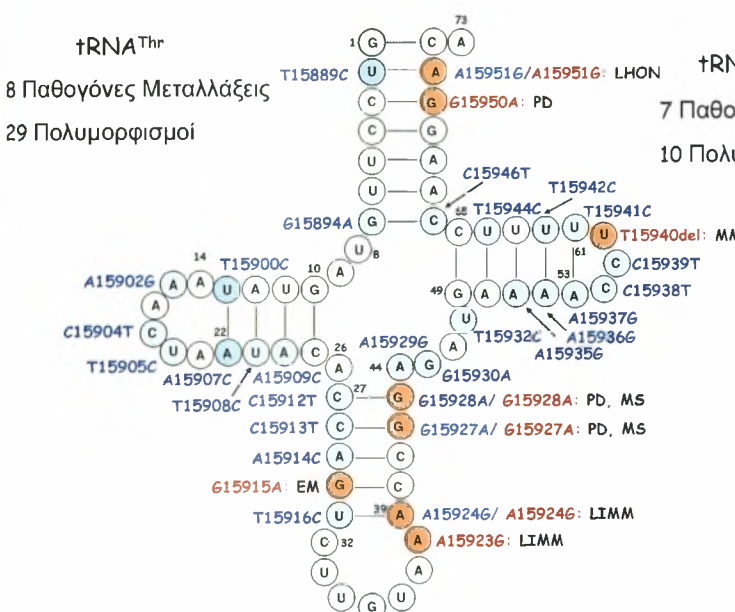
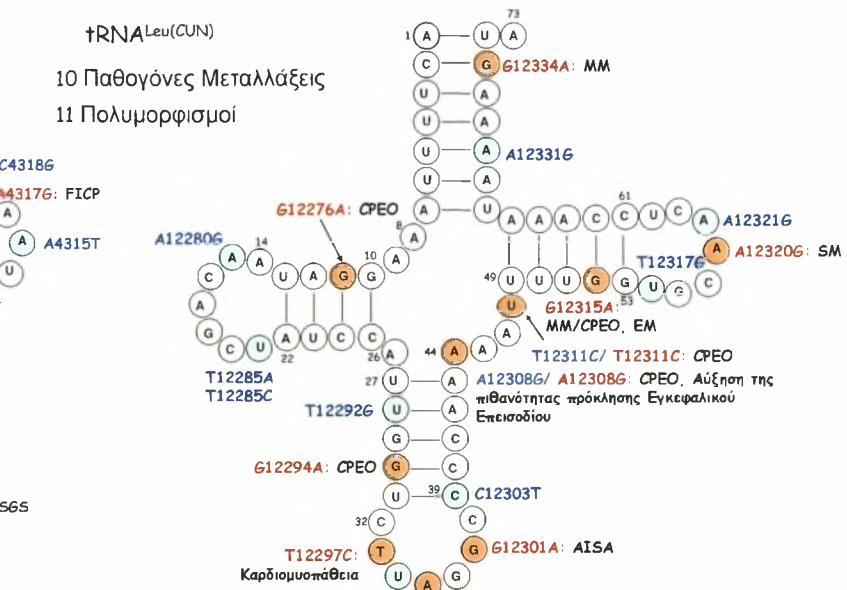
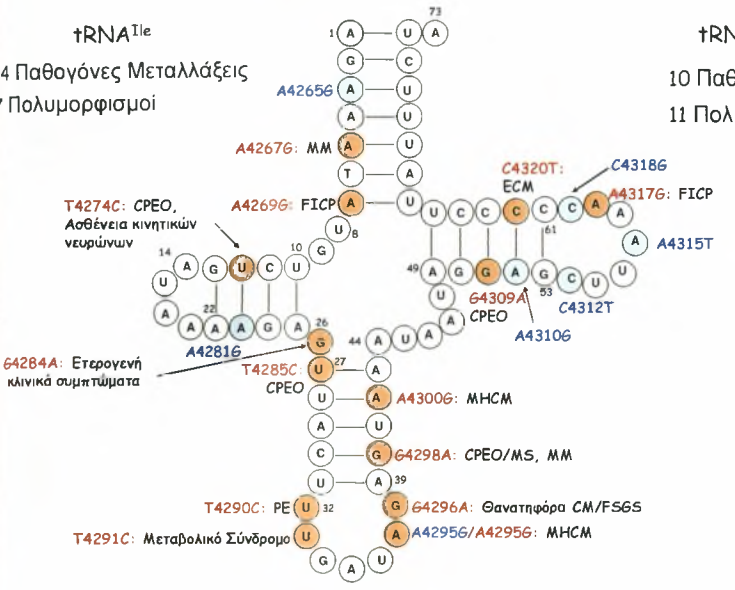
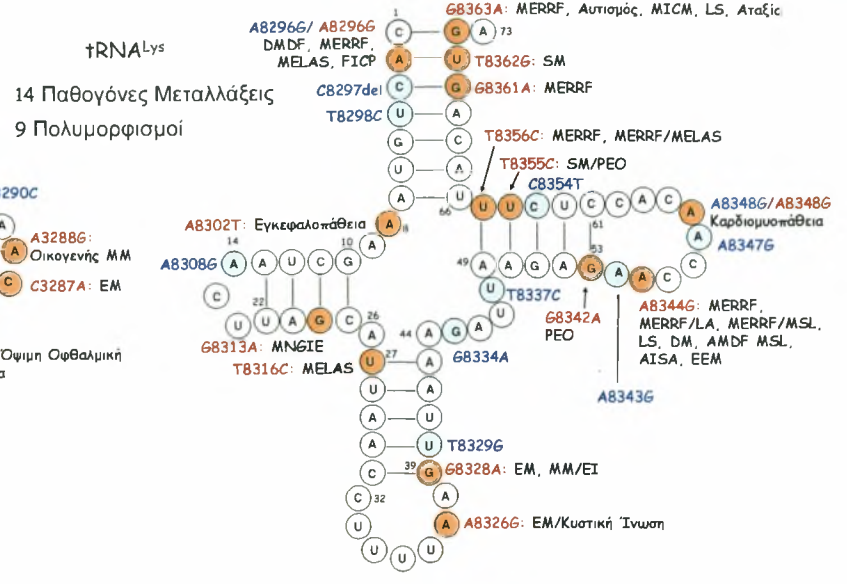
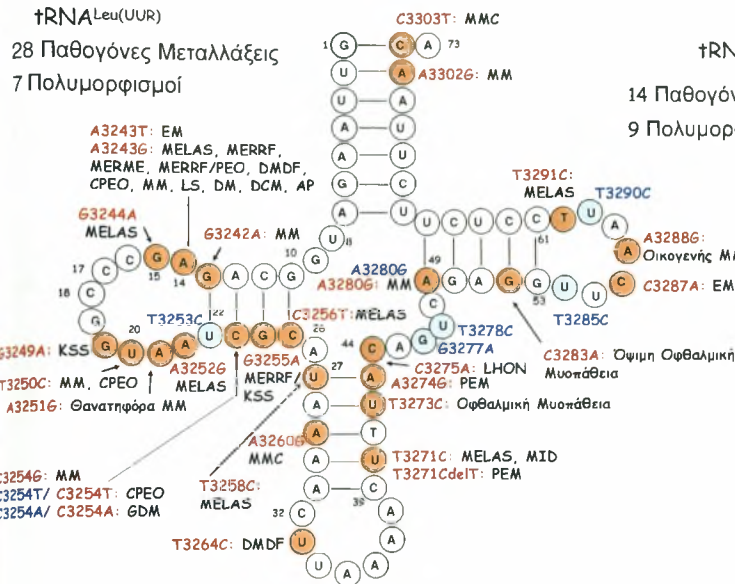
φωσφορυλίωση, με την καρδιά, τους σκελετικούς μύες και ο κεντρικό νευρικό σύστημα να είναι τα πιο εξαρτημένα. Έτσι, τα μιτοχondριακά νοσήματα χαρακτηρίζονται συχνά από μυοπάθειες και εγκεφαλοπάθειες.

ΠΙΝΑΚΑΣ 2

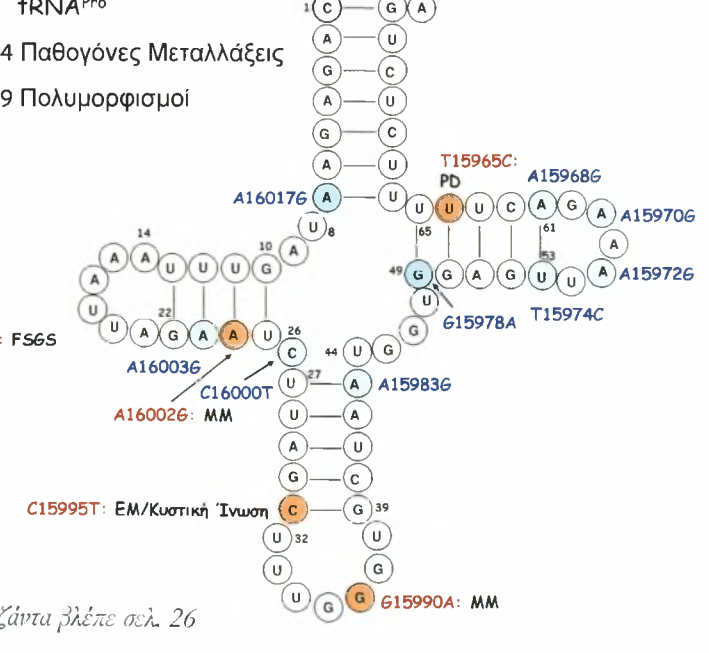
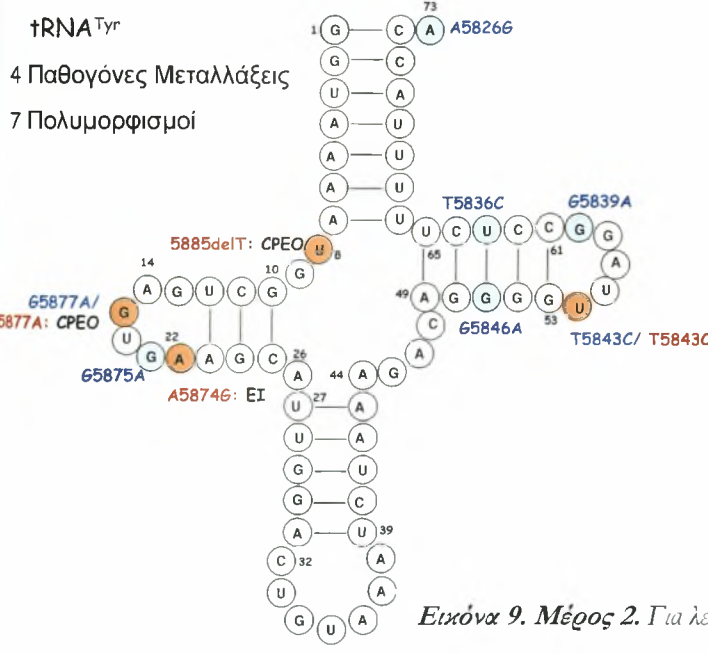
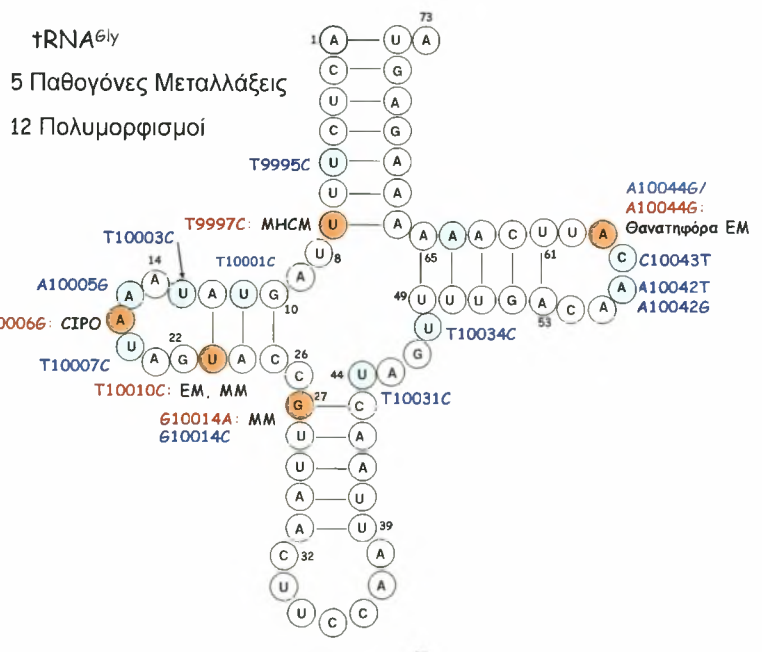
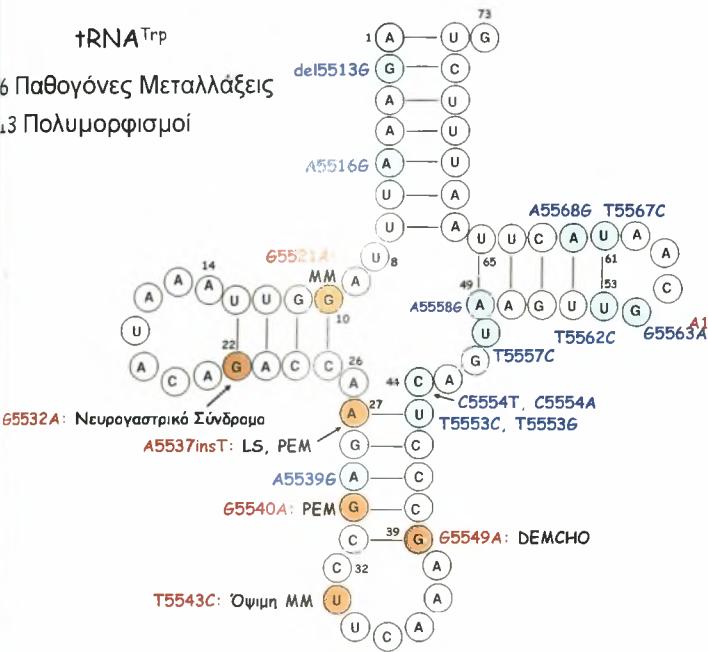
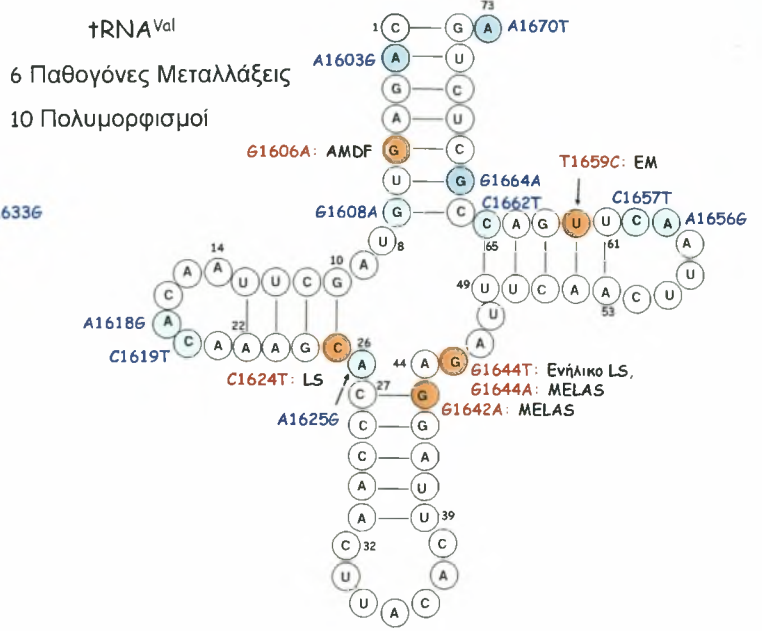
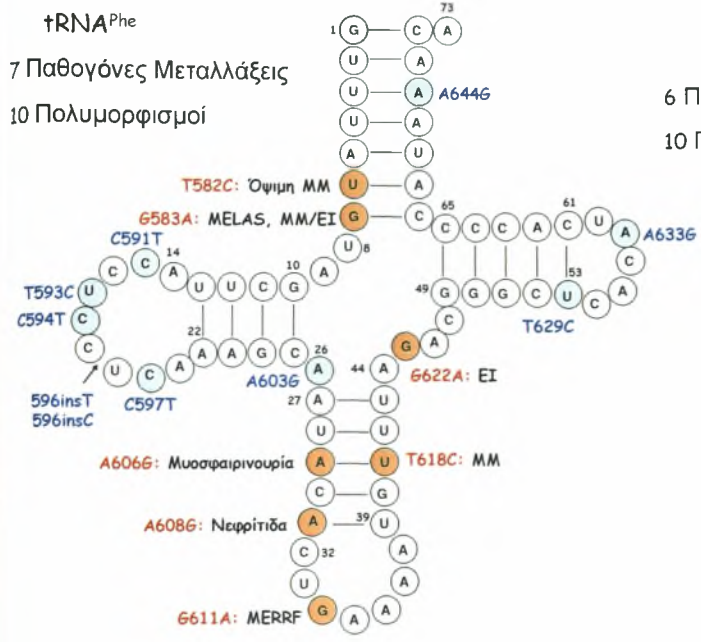
tRNA	Αριθμός παθογόνων μεταλλάξεων	Αριθμός πολυμορφισμών
tRNA ^{I_{Leu}(UUR)}	28	7
tRNA ^{Lys}	14	9
tRNA ^{Ile}	14	7
tRNA ^{I_{Leu}(CUN)}	10	11
tRNA ^{Thr}	8	29
tRNA ^{Ser(UCN)}	7	10
tRNA ^{Phe}	7	10
tRNA ^{Val}	6	10
tRNA ^{Trp}	6	13
tRNA ^{Gly}	5	12
tRNA ^{Tyr}	4	7
tRNA ^{Pro}	4	9
tRNA ^{Asn}	4	7
tRNA ^{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 2: Παθογόνες και ουδέτερες μεταλλάξεις στα ανθρώπινα μιτοχondριακά tRNA γονίδια. Παθογόνες μεταλλάξεις εντοπίζονται σε όλα τα tRNA γονίδια, εκτός εκείνου της Αργινίνης, και συνολικά αριθμούνται σε 139 μεταλλάξεις, ενώ οι 243 ταυτοποιημένοι πολυμορφισμοί εντοπίζονται σε όλα τα tRNA γονίδια.

Πηγές: (www.mitomap.org και www.genpat.uni.se/mitDB)



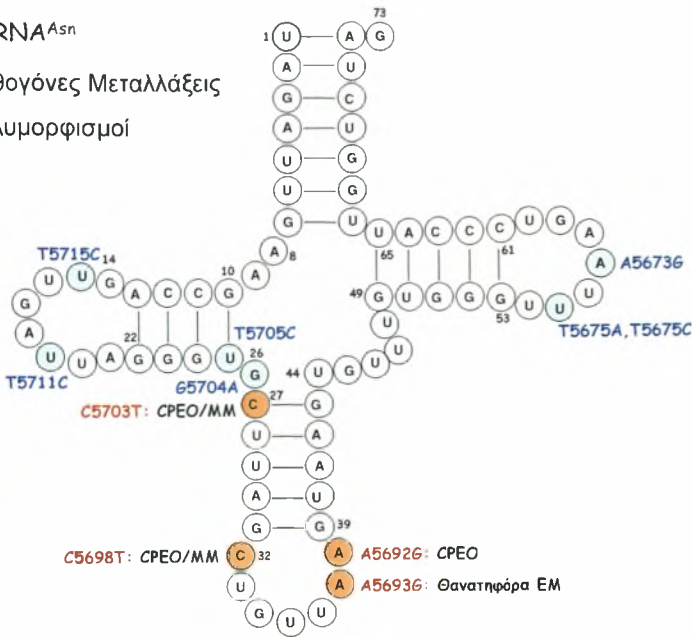
Εικόνα 9: Μέρος 1. Για λεζάντα βλέπε σελ. 26



Εικόνα 9. Μέρος 2. Για λεζάντα βλέπε σελ. 26

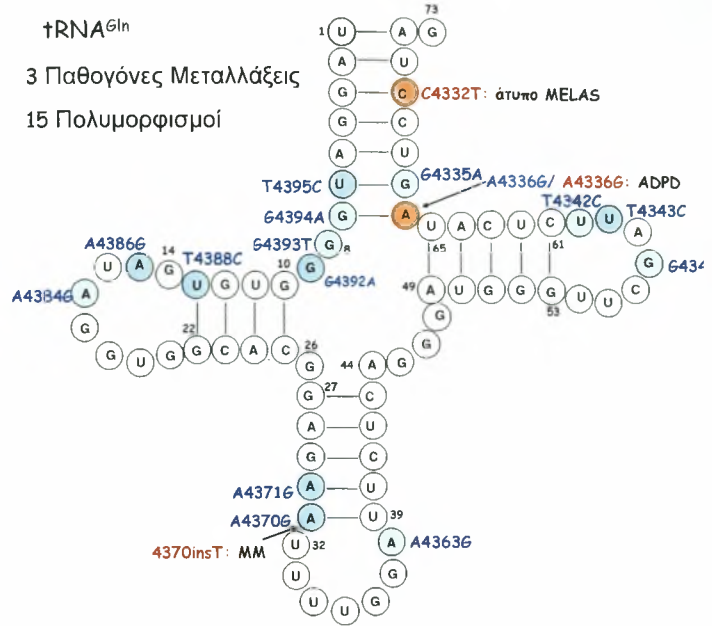
†RNA^{Asn}

4 Παθογόνες Μεταλλάξεις
7 Πολυμορφισμοί



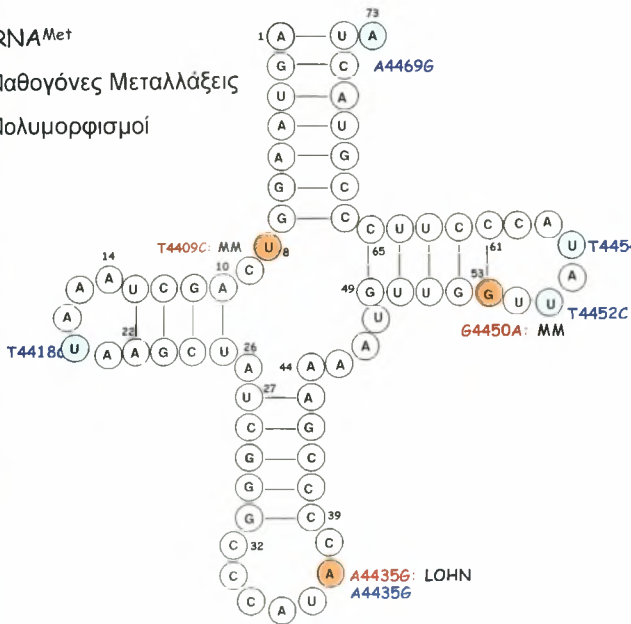
†RNA^{Gln}

3 Παθογόνες Μεταλλάξεις
15 Πολυμορφισμοί



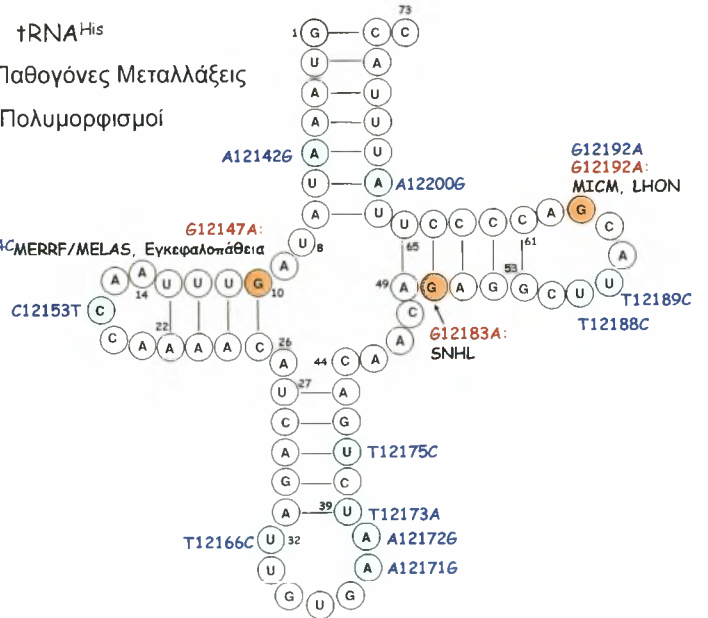
†RNA^{Met}

3 Παθογόνες Μεταλλάξεις
6 Πολυμορφισμοί



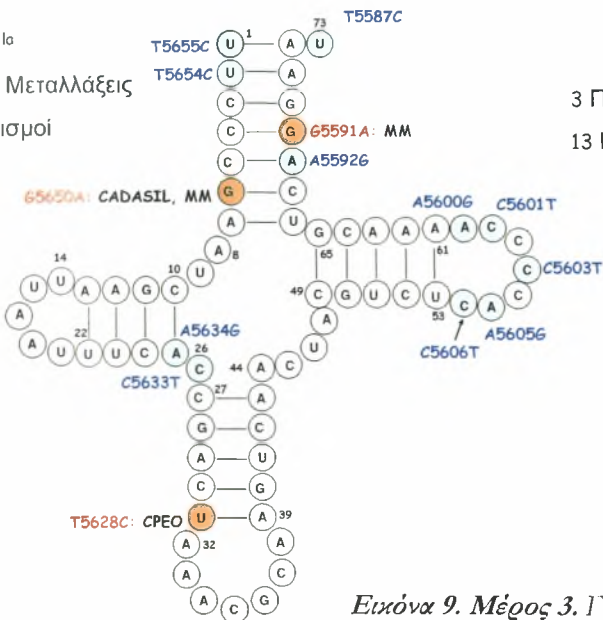
†RNA^{His}

3 Παθογόνες Μεταλλάξεις
11 Πολυμορφισμοί



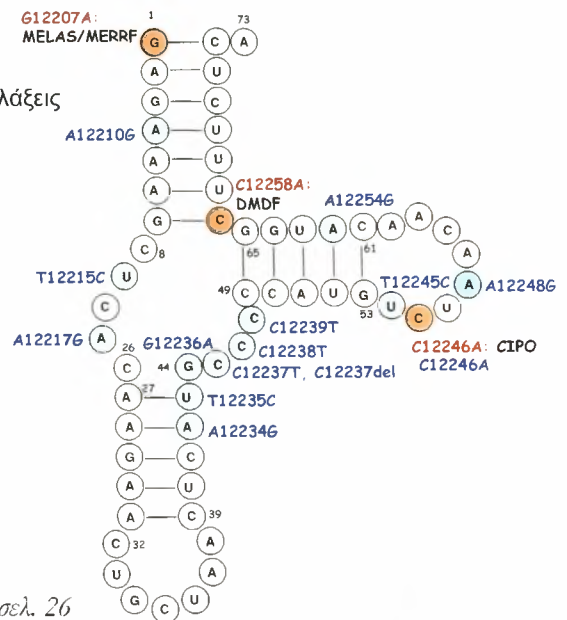
†RNA^{Ala}

3 Παθογόνες Μεταλλάξεις
11 Πολυμορφισμοί



†RNA^{Ser(AGY)}

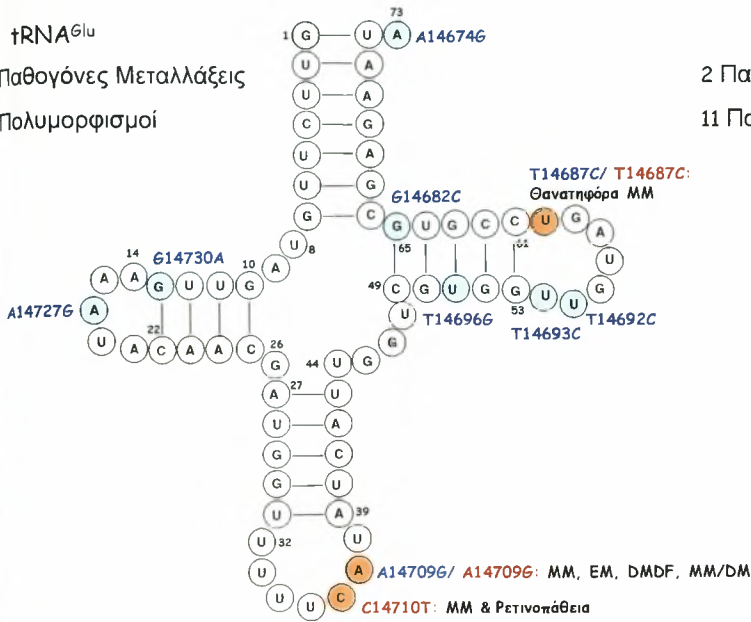
3 Παθογόνες Μεταλλάξεις
13 Πολυμορφισμοί



Εικόνα 9. Μέρος 3. Για λεζάντα βλέπε σελ. 26

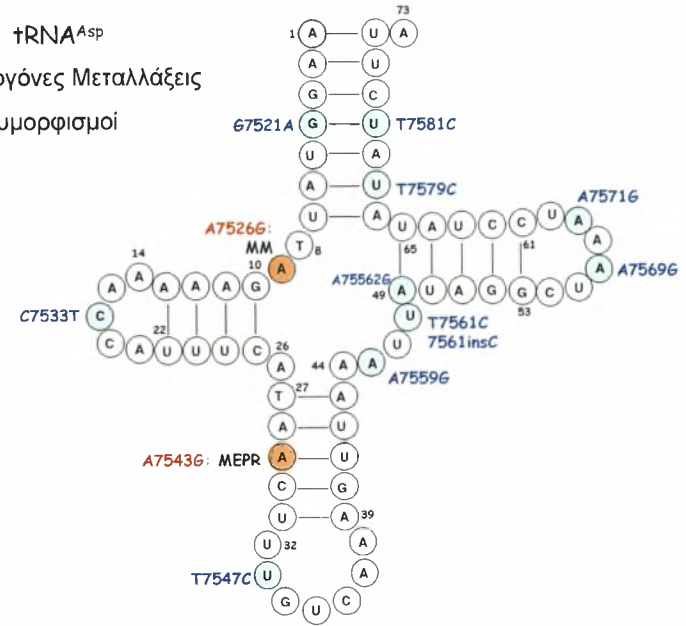
†RNA^{Glu}

3 Παθογόνες Μεταλλάξεις
9 Πολυμορφισμοί



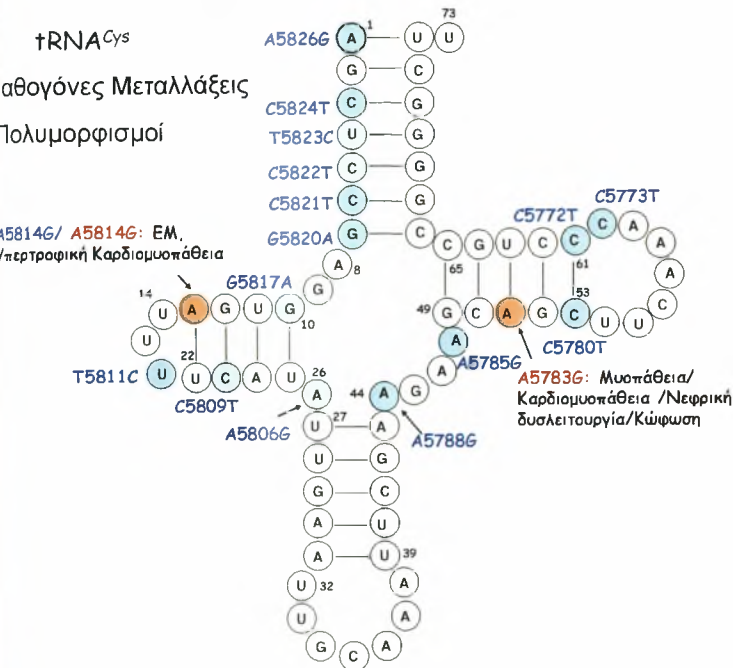
†RNA^{Asp}

2 Παθογόνες Μεταλλάξεις
11 Πολυμορφισμοί



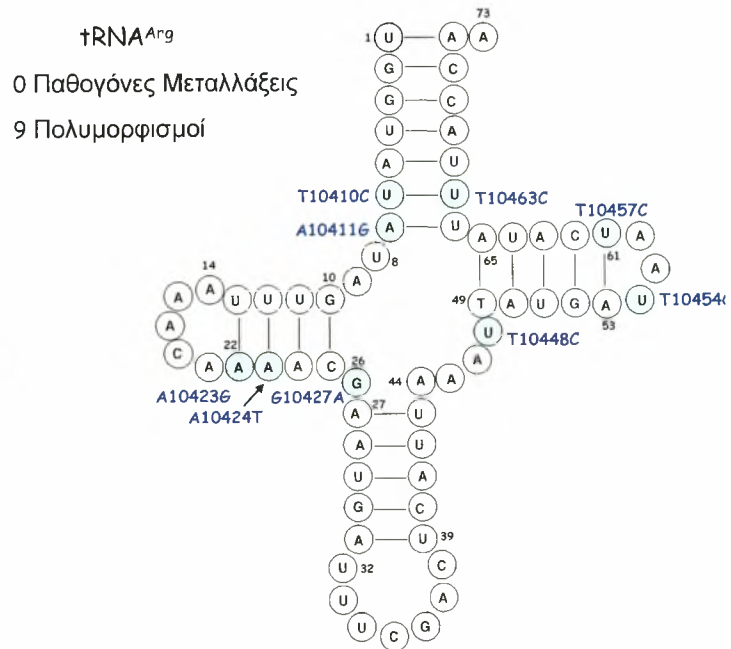
†RNA^{Cys}

3 Παθογόνες Μεταλλάξεις
9 Πολυμορφισμοί



†RNA^{Arg}

0 Παθογόνες Μεταλλάξεις
9 Πολυμορφισμοί



Εικόνα 9. Μέρος 4. Για λεζάντα βλέπε σελ. 26

Εικόνα 9: Παθολόνες και πολυμορφικές μεταλλάξεις στα ανθρώπινα μιτοχονδριακά tRNA. Οι παθολόνες μεταλλάξεις απεικονίζονται με κόκκινο ενώ οι πολυμορφισμοί με μπλε. Οι αλληλουχίες των tRNA πάρθηκαν από την βάση δεδομένων αναφοράς www.tRNA.uni-hayreuth.de και οι παθολόνες 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 πρωτεΐνουρία, **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 σε περίοδο 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.

2.4 ΟΙ 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 φαινοτυπικές 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:

- α) δεν αλλάζουν την αλληλουχία της πρωτεΐνης,
- β) αλλάζουν την αλληλουχία χωρίς να επηρεάζουν τη λειτουργικότητα της,
- γ) δημιουργούν πρωτεΐνες με διαφορετική λειτουργία,
- δ) δημιουργούν μη λειτουργικές πρωτεΐνες.

2.4.1 ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ ΜΟΝΟΥ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΟΥ (SNPs) & ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ ΜΗΚΟΥΣ ΤΜΗΜΑΤΩΝ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΥ (RFLPs)

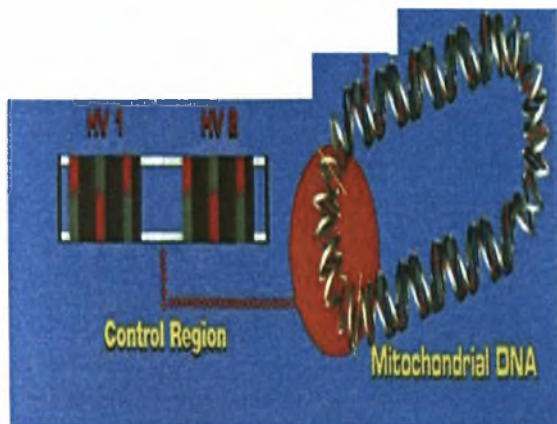
Όταν τα αλληλόμορφα διαφέρουν μόνο σε ένα νουκλεοτίδιο (A,G,C,T) το φαινόμενο καλείται **πολυμορφισμός μονού νουκλεοτιδίου (Single Nucleotide Polymorphism)**. Η συχνότητα τέτοιων αλλαγών στο ανθρώπινο γονιδίωμα είναι περίπου μία ανά ~1.330 βάσεις. Κάθε άνθρωπος χαρακτηρίζεται από ένα μοναδικό πρότυπο 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 πολυμορφισμοί 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 SNPs, που απαντώνται με συχνότητα >1%. Ήδη έχουν αναγνωρισθεί >1 εκατομμύριο τέτοιοι πολυμορφισμοί και **~90% της νουκλεοτιδικής ποικιλότητας μεταξύ των ατόμων οφείλεται σ' αυτούς τους πολυμορφισμούς**. 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 αгарόζης 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 (Restriction Fragment Length Polymorphisms)**. 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 τη ταυτοποίηση ατόμων (γενετικό αποτύπωμα), για τον κατηγορηματικό προσδιορισμό της πατρότητας, για το χαρακτηρισμό της γενετικής ποικιλότητας μεταξύ πληθυσμών, για τη γενετική χαρτογράφηση και γενετική ανάλυση διάφορων ασθενειών ανάμεσα στα μέλη οικογενειών.

2.4.2 ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟΙ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ

Καθώς η εξελικτική ιστορία είναι αποτυπωμένη στις νουκλεοτιδικές αλληλουχίες του DNA, γονιδιακές διαφορές μεταξύ πληθυσμών του ανθρώπου μπορεί να αντανakλούν την εξελικτική τους ιστορία. Προς το σκοπό αυτόν μελετάται λεπτομερέστερα το **mtDNA** (είτε το πυρηνικό είτε το περιττό είτε το DNA του Y χρωμοσώματος). Ο ρυθμός των συνώνυμων νουκλεοτιδικών υποκαταστάσεων στο mtDNA των θηλαστικών υπολογίζεται ίσος με $5,7 \times 10^{-8}$ υποκαταστάσεις ανά θέση, ανά μονάδα χρόνου· ένας ρυθμός περίπου 10 φορές μεγαλύτερος από τον αντίστοιχο που παρατηρείται στις πυρηνικές περιοχές κωδικοποίησης. Όσον αφορά το ρυθμό στις μη συνώνυμες υποκαταστάσεις, αν και παρατηρείται μια ποικιλία μεταξύ των διαφόρων περιοχών κωδικοποίησης του mtDNA, είναι και αυτός σχετικά υψηλός. Πιστεύεται ότι οι υψηλοί αυτοί ρυθμοί μπορούν να αποδοθούν εύκολα στη δράση της μετάλλαξης παρά της φυσικής επιλογής, αν και έχουν αποκαλυφθεί περιπτώσεις σύμφωνα με τις οποίες ορισμένοι απλότυποι αντιδρούν στη φυσική επιλογή. Με τον όρο «απλότυπος» αναφερόμαστε σε μια ομάδα αλληλόμορφων γονιδίων διαφορετικών γενετικών τύπων στενά συνδεδεμένων που συγκληρονομούνται από ένα άτομο στους απογόνους του· χρησιμοποιείται για το mtDNA καθώς είναι απλοειδές, όλα τα γονίδια του είναι συνδεδεμένα και κληρονομείται σαν αδιάσπαστη μονάδα. Οι απλότυποι έχουν ευρεία χρήση στην κατασκευή μητρικών φυλογενετικών δέντρων, αφού το mtDNA προέρχεται από τη μητέρα. Γενικά, 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 απογόνους 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. Παράδειγμα αξιοποίησης του mtDNA αποτελεί ο προσδιορισμός της προέλευσης της ανθρωπότητας, όπου ακολουθώντας 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. Για τον προσδιορισμό αυτό απαιτείται αλληλούχιση μίας ή περισσότερων εκ των **υπερμετάβλητων ρυθμιστικών περιοχών (hypervariable control regions)** του ανθρώπινου μιτοχονδριακού γονιδιώματος (**HVR1 ή HVR2**). Η HVR1 περιοχή αποτελείται από περισσότερα από 440 ζεύγη 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.



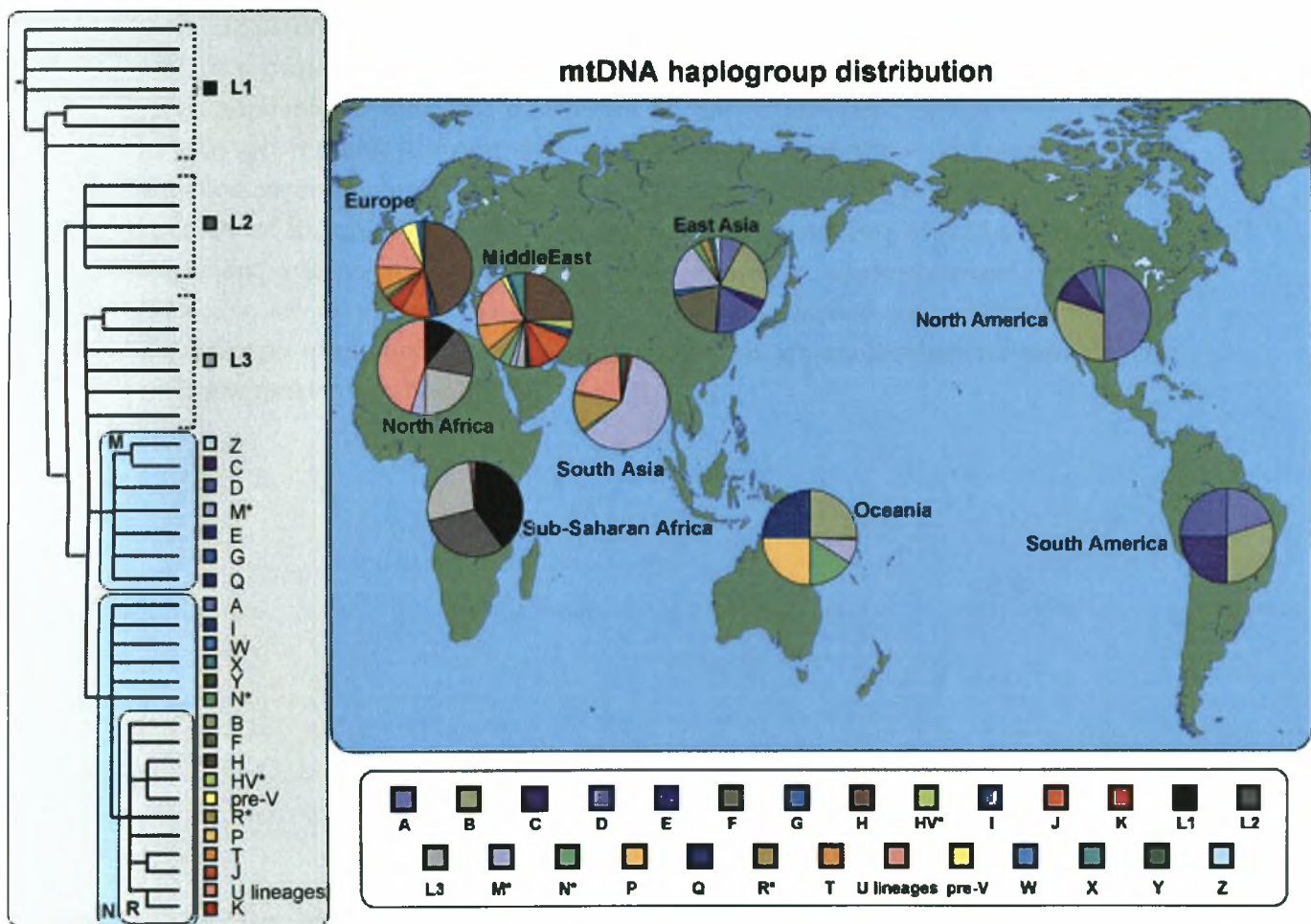
Εικόνα 10: Η ρυθμιστική περιοχή (*control region*) ή αλλιώς μη κωδικοποιούσα περιοχή του *mtDNA* αποτελείται από δύο υψηλά πολυμορφικές περιοχές τις HV1 και HV2.

Εν τούτοις, το μιτοχονδριακό DNA αντιπροσωπεύει την ιστορία μόνο των θηλυκών ατόμων του πληθυσμού. Συνεπώς 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.

2.4.2 ΑΝΘΡΩΠΙΝΑ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΑ HAPLOGROUPS

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, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, ως ομάδα στενά συνδεδεμένων γονιδίων που έχουν την τάση συγκληρονόμησης και το μιτοχονδριακό DNA κληρονομείται ως ένας απλότυπος. Στις εξελικτικές μελέτες γίνεται χρήση των **απλοομάδων** ή **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 haplogroups αντιστοιχούν σε συνδυασμούς καθορισμένων γραμμάτων της αλφαβήτου και αριθμών. Τα **ανθρώπινα μιτοχονδριακά DNA haplogroups** είναι απλοομάδες που καθορίζονται από διαφορές στο ανθρώπινο mt DNA. Τα τελευταία 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 και Z. Τα mtDNA haplogroups είναι επίσης καθορισμένα 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



Εικόνα 11: Υποθετικός χάρτης των ανθρώπινων mtDNA haplogroups που απεικονίζει τη προέλευση των ανθρώπων από την Αφρική καθώς και την μετέπειτα εξάπλωση τους σε ολόκληρη την υδρόγειο. Στα αριστερά παρουσιάζεται επίσης το εξελικτικό τους δένδρο όπου φαίνεται ο κοινός πρόγονος όλων των haplogroups από τον L απλότυπο της Αφρικής.

2.5 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η ανίχνευση και η ταυτοποίηση πολυμορφισμών σε μιτοχονδριακά γονίδια tRNA. Η μελέτη έγινε πάνω σε μια ομάδα φυσιολογικού (χωρίς κλινικά συμπτώματα) ανθρώπινου ελληνικού πληθυσμού 32 ατόμων. Μελετήθηκαν όλα τα tRNA γονίδια καθώς και παρακείμενα τμήματα των γονιδίων. 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 παθογόνων μεταλλάξεων σε ασθενείς με άσθμα και άλλα διάφορα κλινικά συμπτώματα 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 αποτελεί συνέχεια της πρώτης προσπάθειας που πραγματοποιήθηκε το 2008 σε 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.


3. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 ΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΥΛΙΚΟ

Στη παρούσα πειραματική μελέτη χρησιμοποιήθηκε ως βιολογικό υλικό ολικό αίμα (στο οποίο προηγουμένως έχει προστεθεί αντιπηκτικό) από ένα σύνολο 32 υγιών ατόμων από την ευρύτερη περιοχή της Θεσσαλίας. Τα άτομα επιλέχθηκαν τυχαία και δεν είναι συγγενή μεταξύ τους. Τα δείγματα αίματος διατηρήθηκαν σε θερμοκρασία -20°C μέχρι την εφαρμογή της διαδικασίας απομόνωσης DNA.

3.2 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA

Το πρώτο βήμα για τη μελέτη ανίχνευσης μεταλλάξεων και πολυμορφισμών σε γονιδιακό επίπεδο, αποτελεί η απομόνωση του μιτοχονδριακού DNA από το ολικό αίμα.

 Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η εξής :

1. Ανάμιξη 0,5 mL ολικού αίματος με 1 mL SSC 1x σε eppendorf του 1,5 mL.
2. Ανάδευση στο vortex και φυγοκέντρηση για 3 λεπτά στις 13.000 rpm.
3. Απομάκρυνση 1 mL του υπερκείμενου και διάλυση του ιζήματος σε 1mL SSC 1x.
4. Ανάδευση στο vortex και φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στις 13.000 rpm.
5. Απομάκρυνση το υπερκείμενου και διάλυση του ιζήματος ξανά σε 0,5 mL NaOAc 0,2M και 50 μL SDS 5%, προσθέτοντας 10 μL πρωτεΐνάσης K (10mg/mL). Η πρωτεΐνάση K συντελεί στην αποδιάταξη των πρωτεϊνών.
6. Επώαση των δειγμάτων στους 55°C για 1 ώρα.
7. Προσθήκη 0,5 mL φαινόλης και 0,5 mL χλωροφορμίου.
8. Ανάδευση στο vortex και φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 13.000 rpm.
9. Μεταφορά του υπερκείμενου σε νέα eppendorf και προσθήκη 1 mL χλωροφορμίου.
10. Ήπια ανακίνηση και φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 13.000 rpm.
11. Μεταφορά του υπερκείμενου σε νέα eppendorf και προσθήκη 1 mL ισοπροπανόλης.
12. Επώαση των δειγμάτων στους -20°C για 15 λεπτά.
13. Φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 13.000 rpm.
14. Απομάκρυνση του υπερκείμενου και προσθήκη 1mL παγωμένης αιθανόλης 70% (έτσι πραγματοποιείται κατακρήμνιση μόνο του DNA, λόγω της μεγάλης διηλεκτρικής σταθεράς της).
15. Φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 13.000 rpm.
16. Απομάκρυνση του υπερκείμενου.

17. Επώαση-ξήρανση του ιζήματος (τα erpendorf με ανοιχτό καπάκι) για 1 ώρα στους 37 °C.

18. Προσθήκη 100 dd H₂O και παραμονή overnight στους 4 °C για διάλυση.

19. Την επόμενη μέρα, τα δείγματα ηλεκτροφορούνται σε πηκτή αγαρόζης 1% με σκοπό την ποιοτική ανίχνευση του mtDNA.

➤ Για την παρασκευή **πηκτής αγαρόζης 1%** χρησιμοποιούνται :

- 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 και προστίθενται σε αυτά 40 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 αιθιδίου. 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-H₂O.

Τα 500 mL του 50x TAE περιέχουν :

- Tris 121 gr
- Οξικό οξύ 28,5mL
- EDTA 0,5M 50mL
- dd-H₂O 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-H₂O

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 αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).

3.3 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction) πρωτοεμφανίστηκε από την ομάδα των ερευνητών Mullis, Fallona και Saiki της εταιρίας Cetus και αποτελεί αναμφίβολα μία σημαντική εξέλιξη στην τεχνολογία του DNA που έχει τεράστιες επιπτώσεις στη βασική έρευνα και τη γενετική διαγνωστική, καθώς παρέχει την ικανότητα να πολλαπλασιάζει κανείς μια μικρή αλληλουχία DNA από ένα πολύπλοκο μίγμα. Αυτό επιτρέπει την ανάλυση ενός ειδικού τμήματος DNA χωρίς να κλωνοποιηθεί πρώτα, πράγμα το οποίο αυξάνει σημαντικά την ταχύτητα της ανάλυσης. Το βραβείο Νόμπελ Χημείας απενεμήθη στον Δρ. K Mullis τον Οκτώβριο του 1993, για την καθοριστική του συμβολή στην ανακάλυψη και ανάπτυξη της τεχνικής PCR.

3.3.1. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Με την PCR επιτυγχάνεται η σύνθεση ενός τμήματος DNA, ανεξαρτήτου προελεύσεως, *in vitro*. Σε χρονικό διάστημα ολίγων ωρών, η συγκεκριμένη περιοχή του DNA που επεκτείνεται (DNA στόχος), πολλαπλασιάζεται σε ένα μεγάλο αριθμό αντιγράφων. Επειδή κατά την τεχνική της PCR γίνεται πολλαπλασιασμός του DNA, η αρχική ποσότητα που απαιτείται είναι πολύ μικρή, ακόμη και ένα μόριο DNA αρκεί. Ο αριθμός των αντιγράφων εξαρτάται από τον αριθμό των κύκλων της αντίδρασης. Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στην κινητική επανασύνδεσης των αποδιαταγμένων συμπληρωτικών αλυσίδων δίκλωνου νουκλεϊκού οξέος, που ανέπτυξαν οι Britten και Kohne στα τέλη του 1960.

Το τμήμα του γονιδίου που πρόκειται να ενισχυθεί μπορεί να είναι ένα μοναδικό γονίδιο, ένα μέρος ενός γονιδίου ή μια μη κωδική αλληλουχία. Για την αντίδραση απαιτούνται:

- ☞ Ένα τμήμα DNA ως εκμαγείο.
- ☞ Ένας ή περισσότεροι εκκινητές (primers), συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια 15-25 βάσεων, που έχουν δομή συμπληρωματική προς τις πλευρικές αλληλουχίες του DNA στόχου, το καθένα αντίστοιχα προς τον ένα κλώνο του στόχου και με αντίθετη κατεύθυνση.

! Προσέχουμε να μην έχουν συμπληρωματικές αλληλουχίες μεταξύ τους ώστε να αποφεύγεται ο σχηματισμός διμερών, η περιεκτικότητα σε GC να μην ξεπερνάει το 50% των επιλεγόμενων βάσεων, να έχουν παραπλήσια θερμοκρασία τήξεως (T_m , melting temperature) -η θερμοκρασία τήξεως είναι αυτή στην οποία, στατιστικά, τα μισά μόρια του εκκινητή ζευγαρώνουν με την αλληλουχία-στόχο, ενώ τα άλλα μισά σε σταθεροποιούνται πάνω σε αυτή και παραμένουν ελεύθερα- και η απόστασή τους να είναι μεγαλύτερη των 100 βάσεων ώστε να επιτρέπεται ο σχηματισμός του νέου κλώνου DNA.

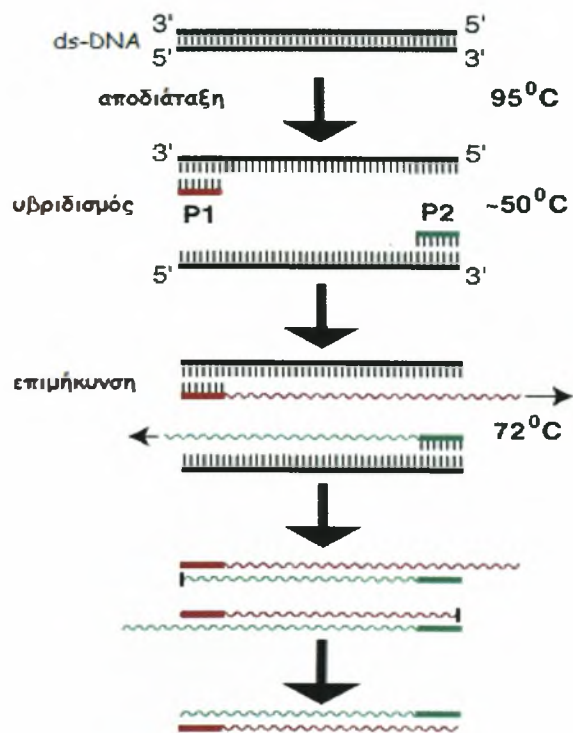
- ☞ Μία DNA πολυμεράση, όπως η Taq πολυμεράση, που είναι θερμοάντοχη DNA πολυμεράση η οποία απομονώθηκε από το βακτήριο *Thermus aquaticus* (Taq) που ζει στο νερό σε θερμοκρασία 75 °C και έχει την ιδιότητα να μην αποδιατάσσεται σε υψηλές θερμοκρασίες, με βέλτιστη θερμοκρασία 72 °C, ενώ είναι αρκετά σταθερή ακόμη και στους 95 °C, παραμένοντας έτσι ενεργή σε όλη τη διάρκεια των κύκλων του πολλαπλασιασμού.
- ☞ 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 δραστηριότητα και σταθερότητα της DNA πολυμεράσης.
- ☞ Δισθενή κατιόντα, κυρίως Mg^{+2} και Mn^{+2} , εκ των οποίων προτιμάται κυρίως το πρώτο, τα οποία επιδρούν στην ειδικότητα της αντίδρασης και στην ευαισθησία και σταθεροποιούν το δίκλωνο DNA.

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. 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 °C και διατηρείται για 4 λεπτά.

2. Στάδιο αποδιάταξης (denaturation): Στο στάδιο αυτό η θερμοκρασία ανέρχεται στους 95 °C 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 υβριδισμού (annealing): Στο στάδιο αυτό η θερμοκρασία κατέρχεται στους 55°C για 40 δευτερόλεπτα, επιτρέποντας την υβριδοποίηση των εκκινητών, οι οποίοι βρίσκονται σε περίσσεια, με το μονόκλωνο DNA-εκμαγείο. Όσο περισσότερο συμπληρωματική είναι η αλληλουχία των εκκινητών με την αλληλουχία του εκμαγείου, τόσο σταθερότεροι δεσμοί υδρογόνου σχηματίζονται μεταξύ τους. Η DNA πολυμεράση προσδένεται στο υβρίδιο εκμαγείο-εκκινητές και ξεκινά τη σύνθεση του νέου DNA.



Εικόνα 12: Σχηματική απεικόνιση του κύκλου της τεχνικής PCR. Αποδιάταξη στους 95 °C, υβριδισμός στους ~50 °C και επιμήκυνση στους 72 °C.

4. Στάδιο επιμήκυνσης (extention): Στο στάδιο αυτό η θερμοκρασία ανέρχεται ξανά στους 72 °C για 40 δευτερόλεπτα, όπου η Ταq πολυμεράση λειτουργεί βέλτιστα. 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 °C 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 °C. Έτσι το PCR δείγμα μπορεί να παραμείνει βραχυπρόθεσμα «αποθηκευμένο» στον θερμικό κυκλοποιητή για όσο χρόνο επιθυτούμε, μέχρι την εφαρμογή της επόμενης τεχνικής.

Διάρκεια: κατά μέσο όρο περίπου δύο ώρες.

3.3.2 ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣ ΤΩΝ tRNA ΓΟΝΙΔΙΩΝ

Ενισχύθηκαν 13 τμήματα DNA που περιέκλειαν και τα 22 γονίδια tRNA. Στον πίνακα 3 παρουσιάζονται τα ζεύγη των primers που χρησιμοποιήθηκαν, η νουκλεοτιδική τους θέση καθώς και το μήκος τους.

ΠΙΝΑΚΑΣ 3

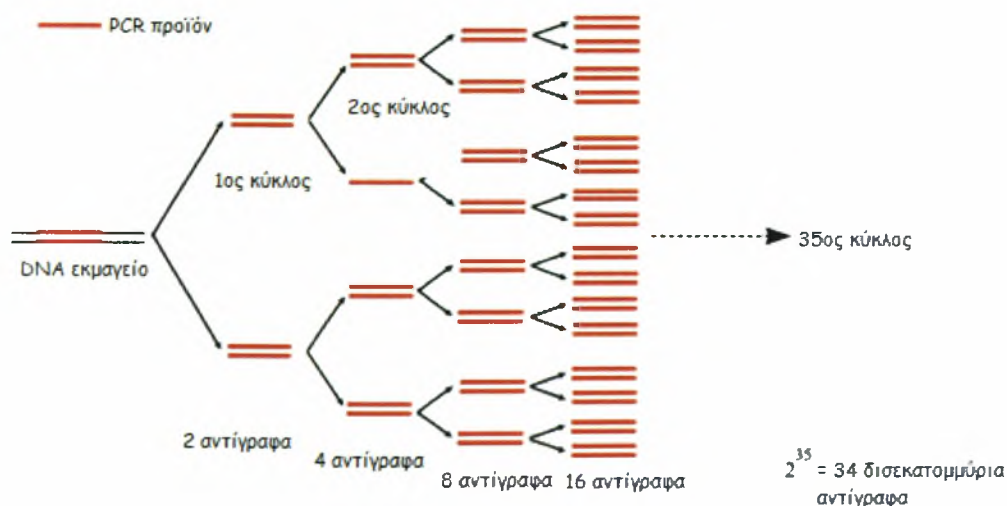
<u>tRNA</u> Phe	<u>FW Primer 5' - 3'</u> CAGCACACACACACCGCTGC	<u>νουκλεοτιδική</u> <u>θέση</u> (FW 511-530) (RV 780-761)	<u>μήκος(bp)</u> 280
	<u>RV Primer 5' - 3'</u> GAGCTGCATTGCTGCGTGCT		
<u>tRNA</u> Val	<u>FW Primer 5' - 3'</u> GTACTGGAAAGTCCACTTGG	<u>νουκλεοτιδική</u> <u>θέση</u> (FW 1576-1595) (RV 1715-1698)	<u>μήκος(bp)</u> 140
	<u>RV Primer 5' - 3'</u> GGTTGTCTGGTAGTAAGG		
<u>tRNA</u> Leu(UUR)	<u>FW Primer 5' - 3'</u> AGGACAAGAGAAATAAGGCC	<u>νουκλεοτιδική</u> <u>θέση</u> (FW 3130-3149) (RV 3423-3404)	<u>μήκος(bp)</u> 294
	<u>RV Primer 5' - 3'</u> CACGTTGGGGCCTTTGCGTA		
<u>tRNA</u> Ile-Gln-Met	<u>FW Primer 5' - 3'</u> CCAGCATTCCTCAAACC	<u>νουκλεοτιδική</u> <u>θέση</u> (FW 4241-4260) (RV 4486-4468)	<u>μήκος(bp)</u> 246
	<u>RV Primer 5' - 3'</u> TGGGCCAGGGGATTAATTA		
<u>tRNA</u> Trp-Ala	<u>FW Primer 5' - 3'</u> CGCTACTCCTACCTATCTCC	<u>νουκλεοτιδική</u> <u>θέση</u> (FW 5470-5489) (RV 5711-5691)	<u>μήκος(bp)</u> 242
	<u>RV Primer 5' - 3'</u> TTAGGGTGCTTAGCTGTTAC		

<u>tRNA</u> Asn-Cys-Tyr	<u>FW Primer 5' - 3'</u> CAATGGGACTTAAACCCACAA	<u>νουκλεοτιδική θέση</u> (FW 5663-5683) (RV 5911-5892)	<u>μήκος(bp)</u> 294
	<u>RV Primer 5' - 3'</u> GCGAACATCAGTGGGGTGA		
<u>tRNA</u> Ser(UCN)-Asp	<u>FW Primer 5' - 3'</u> ATTCGAAGAACCCGTATACA	<u>νουκλεοτιδική θέση</u> (FW 7415-7434) (RV 7643-7624)	<u>μήκος(bp)</u> 229
	<u>RV Primer 5' - 3'</u> GCTCTTCTATGATAGGGGAA		
<u>tRNA</u> Lys	<u>FW Primer 5' - 3'</u> GCTCTGAAATCTGTGGAGCA	<u>νουκλεοτιδική θέση</u> (FW 8172-8191) (RV 8388-8369)	<u>μήκος(bp)</u> 217
	<u>RV Primer 5' - 3'</u> ACGGTAGTATTTAGTTGGGG		
<u>tRNA</u> Gly	<u>FW Primer 5' - 3'</u> CCATCTATTGATGAGGGTCT	<u>νουκλεοτιδική θέση</u> (FW 9970-9989) (RV 10193-10173)	<u>μήκος(bp)</u> 224
	<u>RV Primer 5' - 3'</u> GGATATAGGGTCCAAGCCGCA		
<u>tRNA</u> Arg	<u>FW Primer 5' - 3'</u> GCCCTACAAACAACCTAACCT	<u>νουκλεοτιδική θέση</u> (FW 10290-10309) (RV 10516-10497)	<u>μήκος(bp)</u> 227
	<u>RV Primer 5' - 3'</u> AGTGAGATGGTAAATGCTAG		
<u>tRNA</u> His- Ser(AGY)- Leu(CUN)	<u>FW Primer 5' - 3'</u> CATCATTACCGGGTTTTCCT	<u>νουκλεοτιδική θέση</u> (FW 12115-12134) (RV 12361-12342)	<u>μήκος(bp)</u> 247
	<u>RV Primer 5' - 3'</u> TGGTTATAGTAGTGTGCATG		

tRNA Glu	FW Primer 5' - 3' CCCACACTCAACAGAAACA	νουκλεοτιδική θέση (FW 14642-14660) (RV 14763-14745)	μήκος(bp) 122
	RV Primer 5' - 3' TTGCGTATTGGGGTCATTG		
tRNA Thr-Pro	FW Primer 5' - 3' CTAATACCAACTATCTCCCT	νουκλεοτιδική θέση (FW 15839-15858) (RV 16050-16031)	μήκος(bp) 212
	RV Primer 5' - 3' ACCCAAATCTGCTTCCCCAT		

Για μία αντίδραση PCR των 50μL χρησιμοποιήθηκαν:

- **DNA** (περίπου 200 ngr) 2-3 μL
- 50 pmol από τον κάθε **primer** 1 + 1 μL
- 1x **PCR Buffer** (από 10x) 5 μL
- 800 μM **dNTPs** (από 40 mM) 1 μL
- 2 mM **MgCl₂** (από 50 mM) 2 μL
- 1U **Taq** πολυμεράση (5U/μL) 0,2 μL
- **dd H₂O** μέχρι τα 50 μL 37-38 μL



Εικόνα 13: Σχηματική παράσταση του εκθετικού πολλαπλασιασμού του DNA μέσω της τεχνητής της PCR. Έπειτα από n κύκλους προκύπτουν 2^n αντίγραφα.

3.3.3 ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ PCR ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ

Μετά το πέρας της αντίδρασης PCR γίνεται ηλεκτροφόρηση των PCR προϊόντων σε πήκτωμα αγαρόζης 2% (0,6gr + 30ml TAE 1x), για την διαπίστωση της επιτυχούς ενίσχυσης. 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.

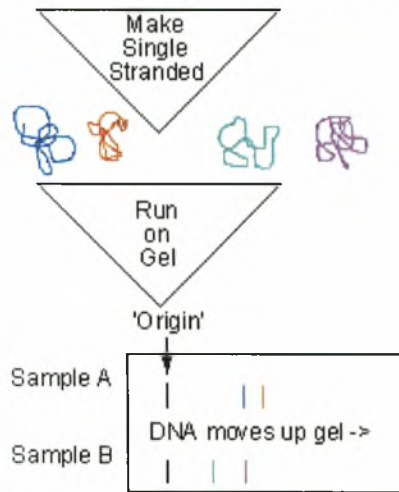
3.4 ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥ ΜΟΝΟΚΛΩΝΗΣ ΑΛΥΣΙΔΑΣ (SSCP)

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.

Double Stranded DNA

...GCTACTTTGCATGACTA... Strand 1 Sample A
...CGATGAAAGCTAGTGAT... Strand 2

...GCTACTTTGCATGACTA... Strand 1 Sample B
...CGATGAAAGCTAGTGAT... Strand 2



Εικόνα 14: Σχηματική αναπαράσταση της ανάλυσης SSCP. Τα δείγματα DNA A και B πρέπει να υποστούν αποδιάταξη πριν την ηλεκτροφόρησή τους στο πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου. Μία σημειακή μετάλλαξη είναι ικανή να προσδώσει στη μονόκλωνη αλυσίδα τέτοια μοναδική διαμόρφωση ώστε μετά την ηλεκτροφόρηση, το πρότυπο της αντίστοιχης ζώνης να διαφέρει στα δύο διαφορετικά δείγματα.

3.4.1 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΠΗΚΤΗΣ ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΙΟΥ

Συνήθως 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. Στη παρούσα μελέτη η συγκέντρωση του πολυακρυλαμιδίου που επιλέχθηκε να χρησιμοποιηθεί ήταν 10%, καθώς κρίθηκε η καταλληλότερη, ύστερα από δοκιμές, που επέτρεπε την καλύτερη ανάγνωση των αποτελεσμάτων.

➤ Για 2 πηκτώματα πυκνότητας 10% και 125mL χρησιμοποιήθηκαν:

- ☞ 12,5 gr Ακρυλαμίδιο
- ☞ 0,33 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.

- ☞ 10 mL TBE 10x
- ☞ 12,5 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 H₂O έως τα 125 mL και έπειτα πρόσθεση των:

- ☞ 120 μL TEMED
- ☞ 650 μL APS 20%

Η αντίδραση πολυμερισμού αρχίζει με την προσθήκη του υπερθειικού αμμωνίου (APS: ammonium persulfate) που δημιουργεί ελεύθερες ρίζες : $S_2O_8^{2-} \rightarrow 2 SO_4^{\bullet-}$ που μαζί με το φωτοχημικό καταλύτη N,N' τετραμεθυλοαιθυλενοδιαμίνη (TEMED) διαδίδονται στο σύστημα πολυμερισμού.

Αφού προστεθούν οι κατάλληλες χτένες (2mm) για το σχηματισμό πηγαδιών, το ρευστό πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου απαιτεί περίπου 30 λεπτά για να πήξει πλήρως. Έπειτα το τοποθετούμε στην κατάλληλη συσκευή κάθετης ηλεκτροφόρησης.

3.4.2 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΚΑΙ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΤΩΝ PCR ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ

Καθώς αναμένουμε να πήξει το πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου προετοιμαζουμε τα PCR προϊόντα που έδωσαν θετικό αποτέλεσμα. Σε eppendorf των 0,5 μL προσθέτουμε:

- 5 μL δείγματος και
- 10μL αποδιατακτικού διαλύματος (denaturation buffer).

Αποδιατακτικό Διάλυμα (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 επιλέγοντας το ακόλουθο πρόγραμμα:

1. 92 °C για 2 λεπτά
2. 95 °C για 2 λεπτά
3. 97 °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).

Τέλος, τα αποδιαταγμένα δείγματα φορτώνονται στο πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου αφού πρώτα στη συσκευή προστεθεί ρυθμιστικό διάλυμα TBE 0,5x (100mL TBE 10x + 1900mL H₂O). Εφαρμόζεται τάση 220V και τα δείγματα ηλεκτροφορούνται στο πήκτωμα για 22 ώρες (overnight) σε θερμοκρασία 4°C. Για τη λήψη αποτελεσμάτων ακολουθεί χρώση του πηκτώματος με νιτρικό άργυρο.

3.4.3 ΧΡΩΣΗ ΝΙΤΡΙΚΟΥ ΑΡΓΥΡΟΥ (SILVER STAINING)

 Για 2 πηκτώματα χρησιμοποιούνται:

- Δ/μα 1 : 800mL dd-H₂O + 20mL Et100% + 1mL CH₃COOH
- Δ/μα 2 : 400mL AgNO₃ 1gr / L (1gr AgNO₃ σε 1 L dd-H₂O)
- Δ/μα 3 : 6gr NaOH, + 0,02gr NaBH₄ + 2 mL HCHO και dd-H₂O έως 400mL

Τα διαλύματα εμποτίζονται στα πηκτώματα στο ξεπλένονται με dd-H₂O το κάθε ένα με την ακόλουθη σειρά:

1. Α' εμποτισμός με 200 mL του Δ/ματος 1 για 3 min & πλύση με dd-H₂O
2. Β' εμποτισμός με 200 mL του Δ/ματος 1 για 3 min & πλύση με dd-H₂O
3. Εμποτισμός με 200 mL του Δ/ματος 2 για 20 min & διπλή πλύση με dd-H₂O
4. Εμποτισμός με 200 mL του Δ/ματος 3 έως την εμφάνιση χρώματος & πλύση με dd-H₂O

3.5 ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ DNA (DNA SEQUENCING)

Τα δείγματα εκείνα που εμφάνισαν διαφορετικά πρότυπα συγκριτικά με τα δείγματα control (δείγματα με φυσιολογικό πρότυπο), αποστέλλονται 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 50 μL 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 750 μL 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 50 μL 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 (1 μL και 49 μL dd-H₂O) ή ποιοτικά με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 2%. Ενδείξεις φωτόμετρου γύρω στα 100ng/ μL είναι ικανοποιητικές.

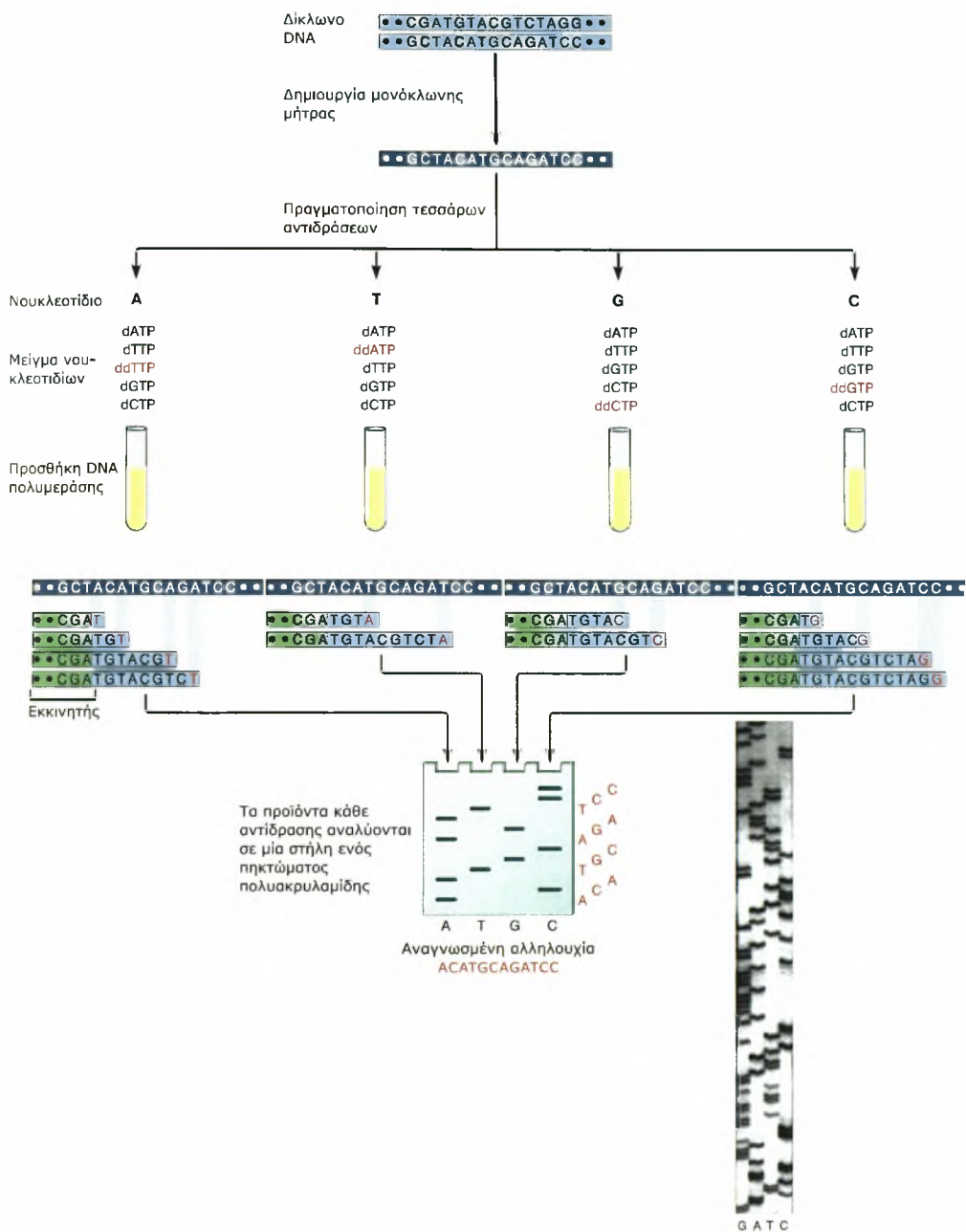
Το DNA που στέλνεται για αλληλούχιση πρέπει να είναι σε στερεά μορφή (ίζημα) και όχι σε διάλυμα. Αυτό επιτυγχάνεται με κατακρήμνιση του DNA με αιθανόλη και CH₃COONa (sodium acetate). Για 50 μL δείγμα απαιτούνται 500 μL Et και 5 μL CH₃COONa. Τα δείγματα μένουν overnight στους -20 °C και την επόμενη μέρα 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 (4 μL primer + 36 μL H₂O).

3.5.2 ΜΕΘΟΔΟΣ ΤΕΡΜΑΤΙΣΜΟΥ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΗΣ ΑΛΥΣΙΔΑΣ ΜΕ ΔΙΔΕΟΞΥΝΟΚΛΕΟΤΙΔΙΑ (ΜΕΘΟΔΟΣ SANGER)

Η μέθοδος Sanger, γνωστή ως διδεόξυ-μέθοδος, η πλέον διαδεδομένη μέθοδος για τον προσδιορισμό της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας μορίων DNA, βασίζεται στον βασεο-ειδικό τερματισμό μιας ενζυμικά καταλυόμενης αντίδρασης επέκτασης εκκινητή. Τέσσερις ξεχωριστές αντιδράσεις γίνονται ταυτόχρονα, που όλες περιέχουν εκκινητή, DNA-μήτρα, ένζυμο πολυμερισμού και τα τέσσερα δεοξυ-νουκλεοτίδια (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), αλλά κάθε μία περιέχει και ένα τροποποιημένο νουκλεοτίδιο, το οποίο σταματά την επέκταση της συμπληρωματικής αλυσίδας. Το νουκλεοτίδιο αυτό είναι ένα διδεόξυ-νουκλεοτίδιο (ddNTP), το οποίο μπορεί και ενσωματώνεται στην νεοσυντιθέμενη αλυσίδα, όμως δεν μπορεί να σχηματίσει φωσφοδιεστερικό δεσμό με επόμενο νουκλεοτίδιο, γιατί λείπει το υδροξύλιο στην 3' θέση. Συνεπώς, σε κάθε αντίδραση παράγεται ένα μίγμα θραυσμάτων που όλα τερματίζουν στο ίδιο τροποποιημένο νουκλεοτίδιο. Όταν τα προϊόντα αυτών των αντιδράσεων ηλεκτροφορηθούν στη σειρά, η ακολουθία με την οποία τα νουκλεοτίδια προστίθενται στον εκκινητή μπορεί να βρεθεί από τα αυξανόμενου μεγέθους διαδοχικά θραύσματα που προκύπτουν στις τέσσερις σειρές του πηκτώματος ηλεκτροφόρησης. Η θέση των θραυσμάτων αυτών αποκαλύπτεται με τη σήμανσή τους (ραδιενεργή ή φθορίζουσα), πριν ή κατά τη διάρκεια των αντιδράσεων επέκτασης.

 Η μεθοδολογία είναι η ακόλουθη:

1. Το δείγμα DNA που θέλουμε να αναλύσουμε γίνεται μονόκλωνο και χωρίζεται σε τέσσερα δείγματα.
2. Σημαίνουμε με κάποιο τρόπο τον εκκινητή ή κάποιο νουκλεοτίδιο.
3. Σε κάθε δείγμα προστίθενται ο εκκινητής, τα τέσσερα δεοξυ-νουκλεοτίδια, DNA πολυμεράση και ένα από τα τέσσερα διδεόξυ-νουκλεοτίδια (αυτό σε περιορισμένη ποσότητα).
4. Ακολουθεί η επέκταση του DNA, η οποία τερματίζεται όταν ενσωματωθεί το διδεόξυ-νουκλεοτίδιο (δίνοντας έτσι τμήματα DNA διαφόρων μεγεθών, ανάλογα με το πότε ενσωματώθηκε το διδεόξυ-νουκλεοτίδιο).
5. Το DNA αποδιατάσσεται και ηλεκτροφορείται σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου, όπου τα κομμάτια διαχωρίζονται βάση μεγέθους.
6. Η οπτικοποίηση γίνεται σε φιλμ αυτοραδιογραφίας, αν η σήμανση έγινε με ραδιενέργεια, ή σε υπεριώδες φως, αν η σήμανση έγινε με φθορισμό.



Εικόνα 15: Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας αλληλούχισης DNA με τη μέθοδο 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 πολυακρυλαμίδης 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)**. Η ανάπτυξη των διαφόρων φθορίζουσών χρωστικών έχει επιτρέψει την εξέλιξη της μεθόδου Sanger. Σημαίνοντας τα νουκλεοτίδια τερματισμού, όχι με ραδιένεργεια, αλλά με χρωστικές που μπορούν να εκπέμπουν φθορισμό σε διαφορετικά μήκη κύματος, είναι δυνατόν να ηλεκτροφορηθούν οι τέσσερις αντιδράσεις στην ίδια διαδρομή. Έτσι η μέθοδος γίνεται πιο γρήγορη και εύκολη. Το κάθε προϊόν με την ειδική χρωστική για κάθε νουκλεοτίδιο, διεγείρεται από ένα λέιζερ και η χρωστική εκλύει ακτινοβολία στο χαρακτηριστικό της μήκος. Ένα σύστημα περίθλασης διαχωρίζει τις εκπομπές των κυμάτων, οι οποίες ανιχνεύονται από μια συσκευή ανίχνευσης και οι αλληλουχίες αποκωδικοποιούνται από έναν υπολογιστή. Οι σύγχρονες συσκευές αλληλούχισης μπορούν να αναλύσουν έως και 384 δείγματα σημασμένα με φθορισμό σε ένα "τρέξιμο" και μπορούν να τρέξουν 24 φορές δείγματα σε μια ημέρα. Μπορούν να αναλυθούν έως και 1000 ζεύγη βάσεων μήκος αλληλουχίας.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στα 32 φυσιολογικά άτομα που μελετήθηκαν εντοπίστηκαν 12 ήδη ταυτοποιημένοι πολυμορφισμοί όπως αναφέρονται στη δικτυακή βάση δεδομένων για το μιτοχόνδριο www.mitomap.org. Μόνο τέσσερις εκ των αυτών εντοπίζονται σε γονίδια tRNA (στο tRNA^{Leu(CUN)} και στο tRNA^{Thr}) ενώ οι υπόλοιποι οκτώ εντοπίζονται σε κωδικοποιημένες και μη κωδικοποιημένες περιοχές παρακείμενων γονιδίων που βρίσκονται σε τμήματα εκατέρωθεν των γονιδίων tRNA. Νέοι πολυμορφισμοί δεν εντοπίστηκαν. Αναλυτικότερα:

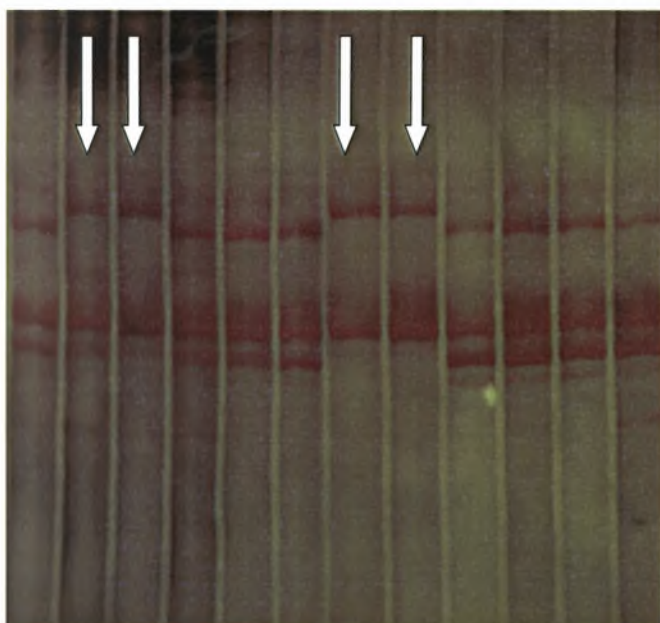
4.1 ΓΟΝΙΔΙΟ tRNA^{Arg} & ΠΑΡΑΚΕΙΜΕΝΑ ΓΟΝΙΔΙΑ ΤΩΝ ND3 ΚΑΙ ND4L ΥΠΟΜΟΝΑΔΩΝ ΤΟΥ ΣΥΜΠΛΟΚΟΥ I

Συγκεκριμένα για το τμήμα των που κωδικοποιεί το tRNA^{Arg} καθώς και τμήματα των παρακείμενων γονιδίων των ND3 και ND4L υπομονάδων του συμπλόκου I της αναπνευστικής αλυσίδας, εντοπίστηκε 1 διαφορετικό πρότυπο σε 6 δείγματα με τη μέθοδο του SSCP.

ΠΙΝΑΚΑΣ 4

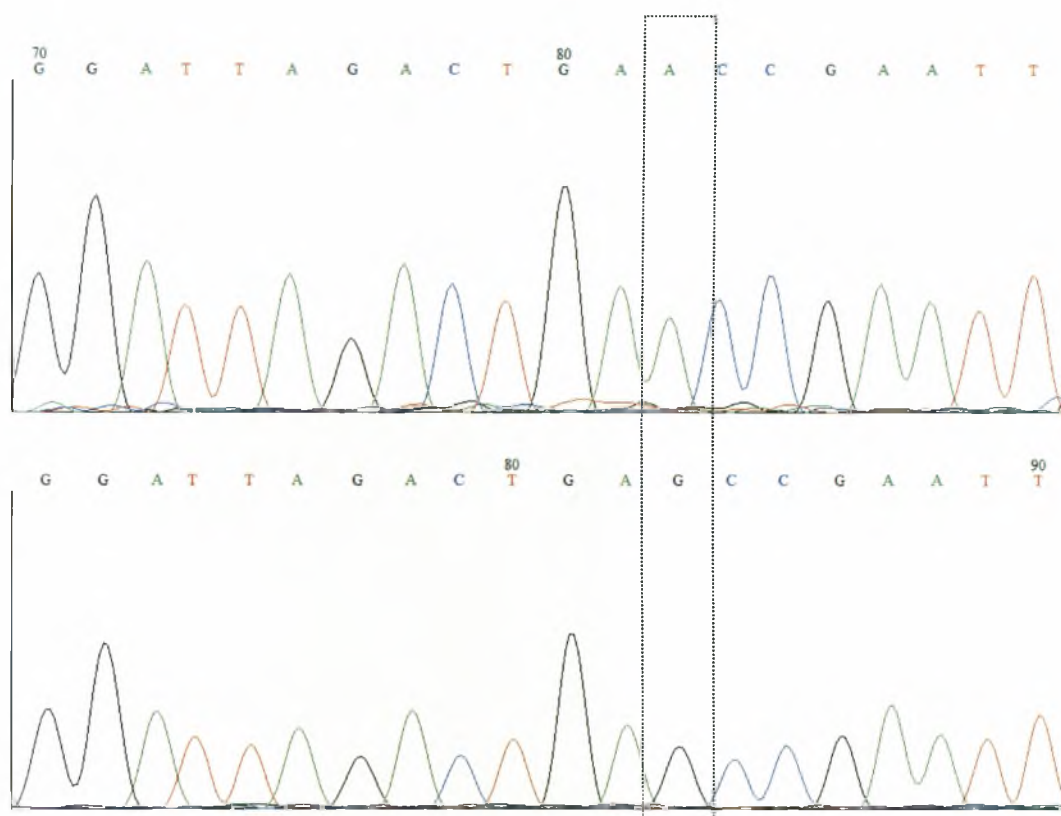
<u>Άτομα (6)</u>	<u>Πολυμορφισμοί</u>
No 28.2, 28.3 28.7, 28.8 2.3.1, 8.3.1	ND3 A10398G

Πίνακας 4: Στον Πίνακα απεικονίζεται με κωνό χρώμα ο ήδη ταυτοποιημένος πολυμορφισμός στην ND3 υπομονάδα του συμπλόκου I της αναπνευστικής αλυσίδας όπως αναφέρεται στη δικτυακή βάση δεδομένων του *mitomap*.



Εικόνα 16: Απεικόνιση με την ανάλυση SSCP του προτύπου του γονιδίου tRNA^{Arg} και για τα παρακείμενα τμήματα του σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου 10%. Το πρότυπο των 4 δειγμάτων που φέρουν τον πολυμορφισμό A10398G στην ND3 υπομονάδα συγκρίνονται με τα πρότυπα συγκεκριμένων δειγμάτων control (δείγματα στα οποία απουσιάζουν οι πολυμορφισμοί και των οποίων τα πρότυπα αντιστοιχούν σε φυσιολογικό φαινότυπο).

Για την στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων των δεδομένων του sequencing χρησιμοποιήθηκαν τα προγράμματα βιοπληροφορικής: BIOEDIT 7.0 και CLUSTALX 1.81. Το πρώτο χρησιμεύει στην «ανάγνωση» της αλληλουχίας του κάθε γονιδίου που απεικονίζεται σε μορφή χρωματογραφήματος, με κάθε κορυφή του να αντιστοιχεί και σε μια συγκεκριμένη βάση. Με τον τρόπο αυτό συγκρίνοντας τη 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 17: Χρωματογράφημα sequencing τμήματος του γονιδίου της ND3 υπομονάδας του συμπλόκου της αναπνευστικής αλυσίδας, σε άτομο control (A) και σε πολλαπλά άτομα (B). Είναι εμφανής η μετάπτωση A→G στη θέση 10398.

4.2 ΓΟΝΙΔΙΟ tRNA^{Leu(UUR)} & ΠΑΡΑΚΕΙΜΕΝΑ ΓΟΝΙΔΙΑ ΤΗΣ 16S ΡΙΒΟΣΩΜΙΚΗΣ ΥΠΟΜΟΝΑΔΑΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ND1 ΥΠΟΜΟΝΑΔΑΣ ΤΟΥ ΣΥΜΠΛΟΚΟΥ I

Συγκεκριμένα για το τμήμα των 296 bp που κωδικοποιεί το tRNA^{Leu(UUR)} καθώς και τμήματα των παρακείμενων γονιδίων της 16S ριβοσωμικής υπομονάδας και της ND1 υπομονάδας του συμπλόκου I της αναπνευστικής αλυσίδας, εντοπίστηκαν 2 διαφορετικά πρότυπα με τη μέθοδο του SSCP.

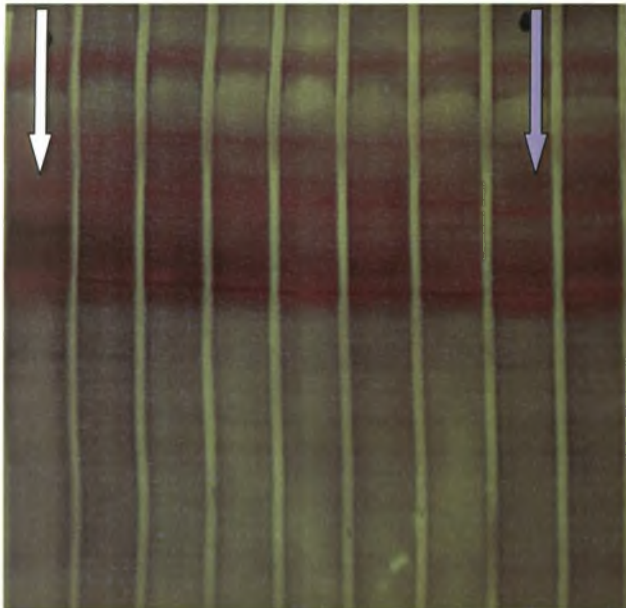
ΠΙΝΑΚΑΣ 5

<u>Άτομα (2)</u>	<u>Πολυμορφισμοί</u>
No 28.1	16S rRNA T3197C
No 28.8	ND1 T3394C

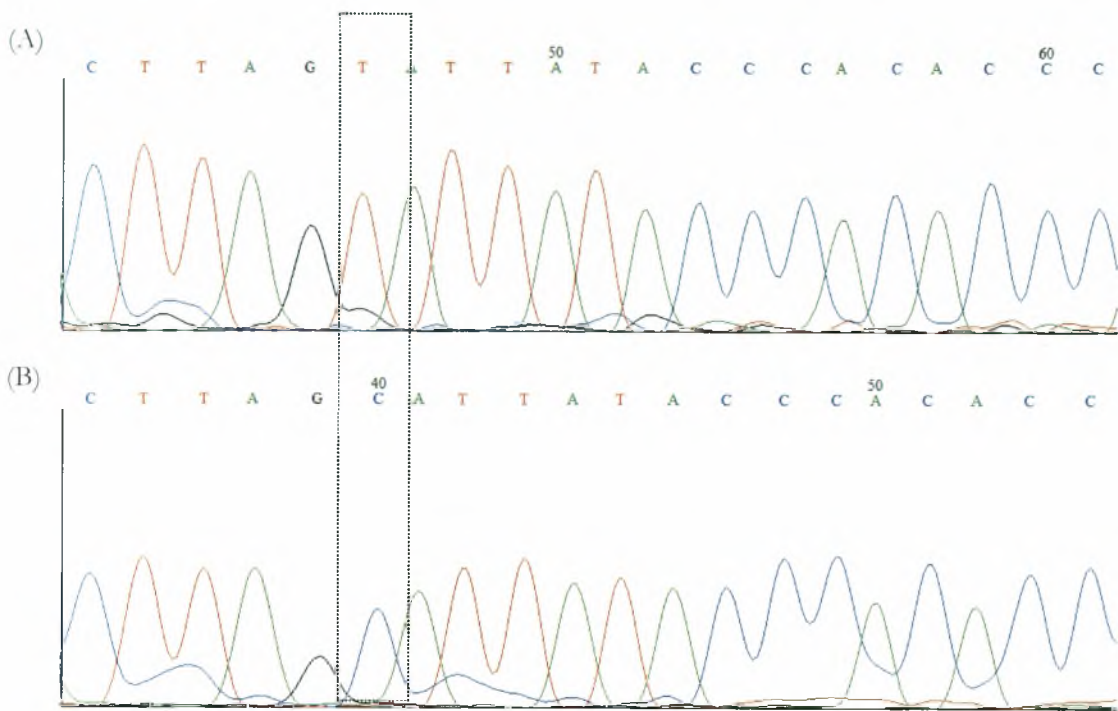
Πίνακας 5: Στο Πίνακα απεικονίζονται με κίτρινο χρώμα οι ήδη ταυτοποιημένοι πολυμορφισμοί όπως αναφέρονται στη δικτυακή βάση δεδομένων του *mitomap*. Συγκεκριμένα:

Στη 16S ριβοσωμική υπομονάδα: 1 γνωστός πολυμορφισμός.

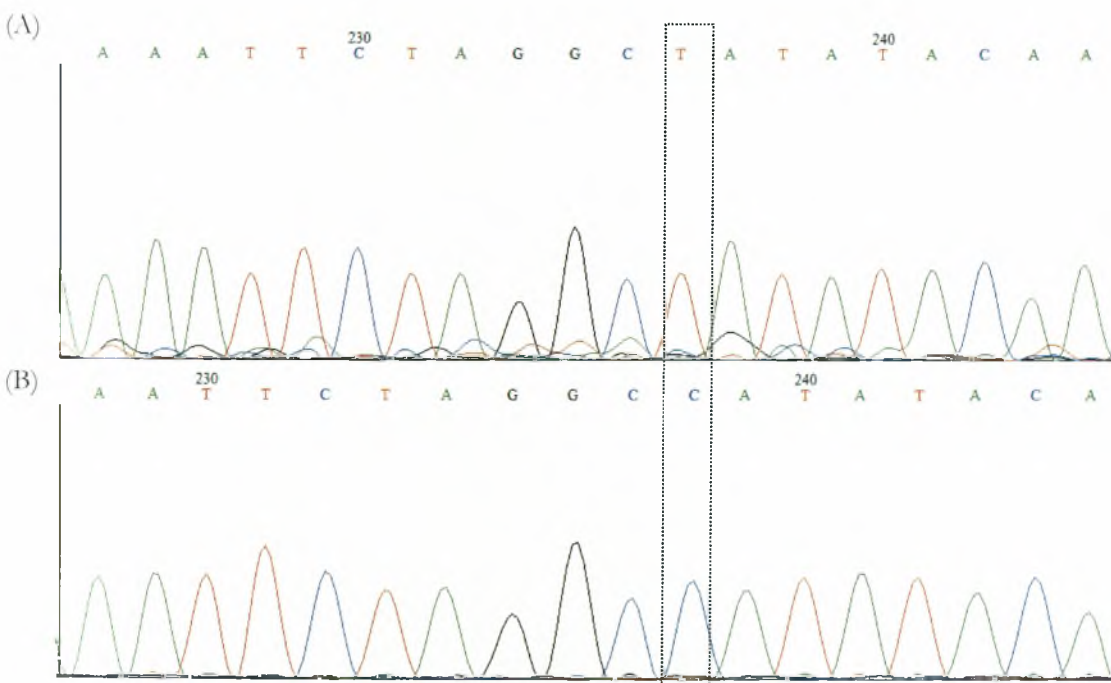
Στην ND1 υπομονάδα του συμπλόκου I της αναπνευστικής αλυσίδας: 1 γνωστός πολυμορφισμός.



Εικόνα 18: Στο πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου 10% SSCP της εικόνας απεικονίζονται με το λευκό βελάκι το πρότυπο του πολυμορφισμού **16S rRNA T3197C** και με το μωβ βελάκι το πρότυπο του πολυμορφισμού **ND1 T3394C**, σε σύγκριση με τα παραπλήσια πρότυπα *control*.



Εικόνα 19: Χρωματογράφημα sequencing τμήματος του γονιδίου 16S rRNA, σε άτομο control (A) και στο άτομο 28.1 (B). Είναι εμφανής η μετάπτωση T→C στη θέση 3197.



Εικόνα 20: Χρωματογράφημα sequencing ενός τμήματος του γονιδίου ND1, σε άτομο control (A) και στο άτομο 28.8 (B). Είναι εμφανής η μετάπτωση T→C στη θέση 3394.

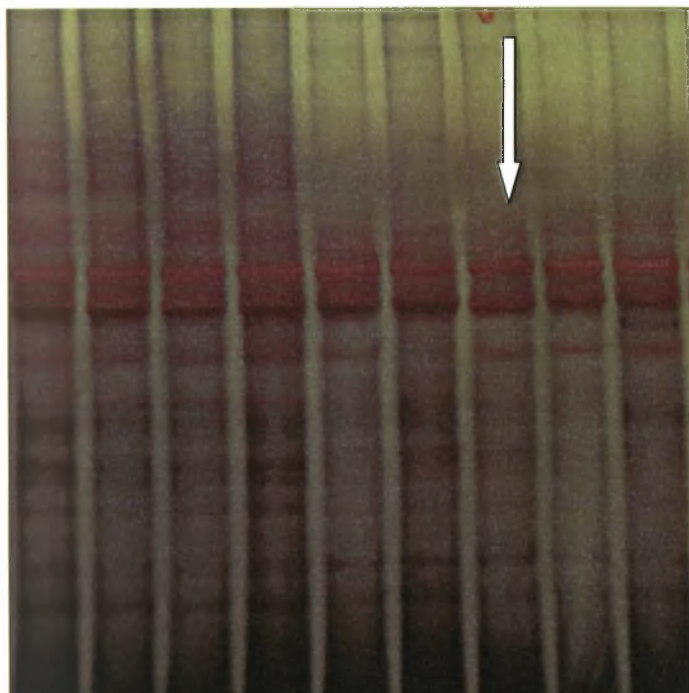
4.3 ΓΟΝΙΔΙΟ tRNA^{Lys} & ΠΑΡΑΚΕΙΜΕΝΑ ΓΟΝΙΔΙΑ ΕΝΟΣ ΜΕΡΟΥΣ ΤΟΥ ΣΥΜΠΛΟΚΟΥ II

Για το τμήμα των 217 bp που κωδικοποιεί το γονίδιο tRNA^{Lys} και μέρος του συμπλόκου COII της αναπνευστικής αλυσίδας, εντοπίστηκε 1 διαφορετικό πρότυπο με τη μέθοδο του SSCP.

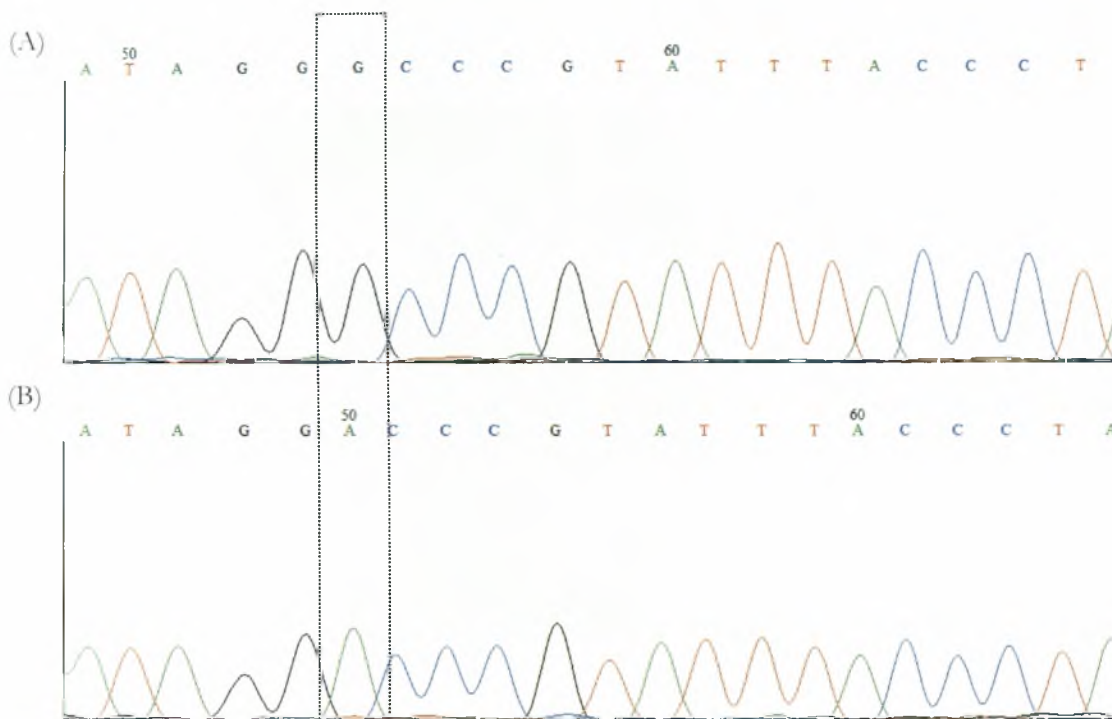
ΠΙΝΑΚΑΣ 6

<u>Άτομα (1)</u>	<u>Πολυμορφισμοί</u>
No 14.3.1	NC7 - COII G8251A

Πίνακας 6: Στον Πίνακα απεικονίζεται με κωνό χρώμα ο ήδη ταυτοποιημένος πολυμορφισμός στην NC7 περιοχή του συμπλόκου COII της αναπνευστικής αλυσίδας όπως αναφέρεται στη δικτυακή βάση δεδομένων του *mitomap*.



Εικόνα 21: Στο πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου 10% SSCP της εικόνας απεικονίζονται με το λευκό βελάκι το πρότυπο του πολυμορφισμού **NC7-COII G8251A** σε σύγκριση με τα παραπλήσια πρότυπα *control*.



Εικόνα 22: Χρωματογράφημα sequencing ενός τμήματος της NC7-COII περιοχής, σε άτομο control (A) και στο άτομο 14.3.1 (B). Είναι εμφανής η μετάπτωση G→A στη θέση 8251.

4.4 ΓΟΝΙΔΙΑ tRNA^{His}, tRNA^{Ser(AGY)}, tRNA^{Leu(CUN)} & ΠΑΡΑΚΕΙΜΕΝΑ ΓΟΝΙΔΙΑ ΤΩΝ ND4 ΚΑΙ ND5 ΥΠΟΜΟΝΑΔΩΝ ΤΟΥ ΣΥΜΠΛΟΚΟΥ I

Για το τμήμα των 246 bp που κωδικοποιεί τα γονίδια tRNA^{His}, tRNA^{Ser(AGY)}, tRNA^{Leu(CUN)} καθώς και τμήματα των παρακείμενων γονιδίων των ND4 και ND5 υπομονάδων του συμπλόκου I της αναπνευστικής αλυσίδας, εντοπίστηκε 1 διαφορετικό πρότυπο με τη μέθοδο του SSCP.

ΠΙΝΑΚΑΣ 7

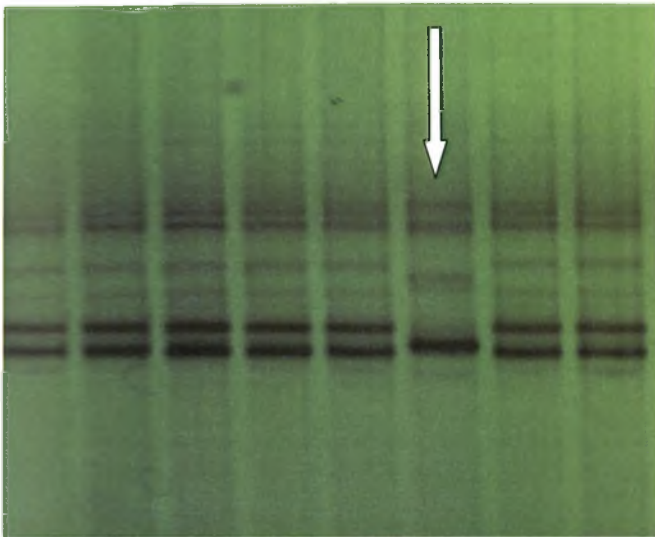
Άτομα (2)

No 28.7 και
28.20

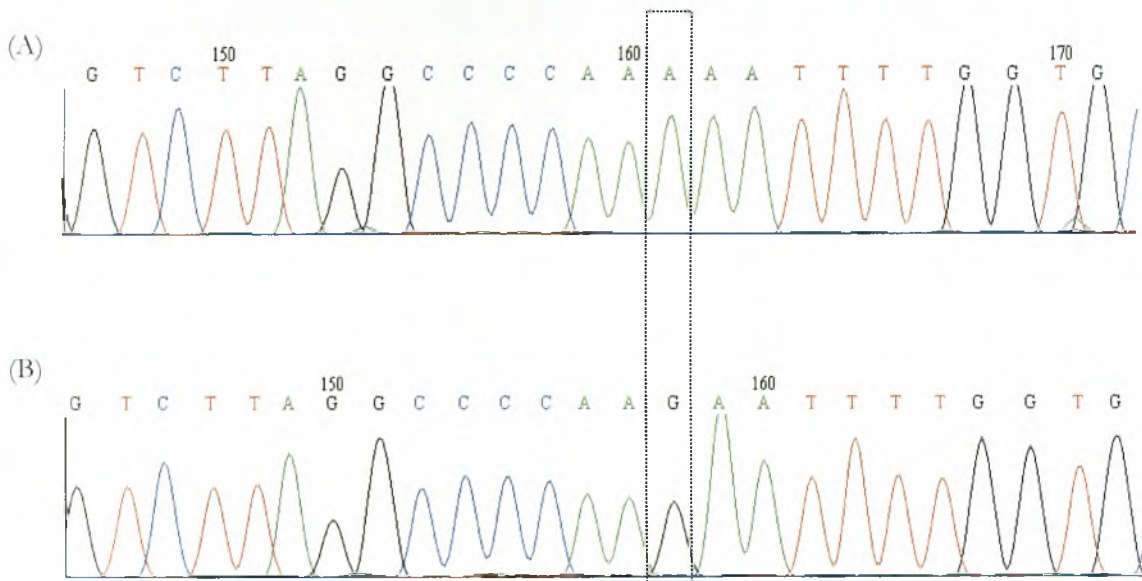
Πολυμορφισμοί

tRNA^{Leu(CUN)}
A12308G

Πίνακας 7: Στον Πίνακα απεικονίζεται με κίτρινο χρώμα ο ήδη ταυτοποιημένος πολυμορφισμός στο γονίδιο tRNA^{Leu(CUN)} όπως αναφέρεται στη δικτυακή βάση δεδομένων του *mitomap*.



Εικόνα 23: Στο πήκτωμα πολυακρυλαμίδιου 10% SSCP της εικόνας απεικονίζεται με το λευκό βελάκι το πρότυπο του πολυμορφισμού **tRNA^{Leu(CUN)} A12308G**, σε σύγκριση με τα παραπλήσια πρότυπα *control*.



Εικόνα 24: Χρωματογράφημα *sequencing* τμήματος του γονιδίου tRNA^{Leu(CUN)}, σε άτομο *control* (Α) και στα άτομα 28.7 και 28.20 (Β). Είναι εμφανής η μετάπτωση A→G στη θέση 12308.

4.5 ΓΟΝΙΔΙΑ tRNA^{Trp} ΚΑΙ tRNA^{Ala} & ΠΑΡΑΚΕΙΜΕΝΑ ΓΟΝΙΔΙΑ ΤΗΣ ND2 ΥΠΟΜΟΝΑΔΑΣ ΤΟΥ ΣΥΜΠΛΟΚΟΥ Ι

Για το τμήμα των 221 bp που κωδικοποιεί τα γονίδια tRNA^{Trp} και tRNA^{Ala} καθώς και τμήμα των παρακειμένων γονιδίων της ND2 υπομονάδας του συμπλόκου Ι της αναπνευστικής αλυσίδας, εντοπίστηκε 1 διαφορετικό πρότυπο με τη μέθοδο του SSCP.

ΠΙΝΑΚΑΣ 8

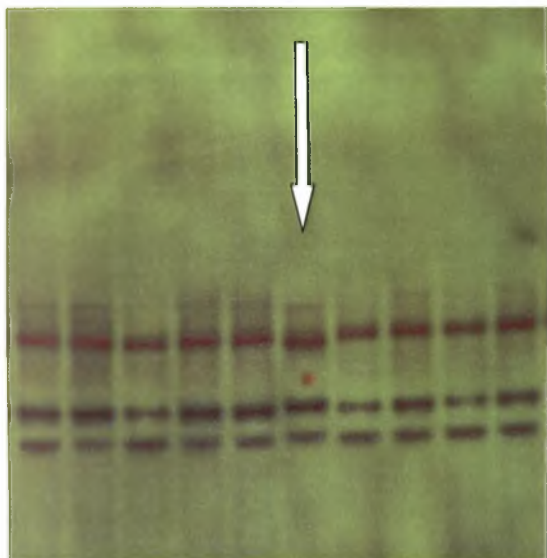
Άτομα (1)

Πολυμορφισμοί

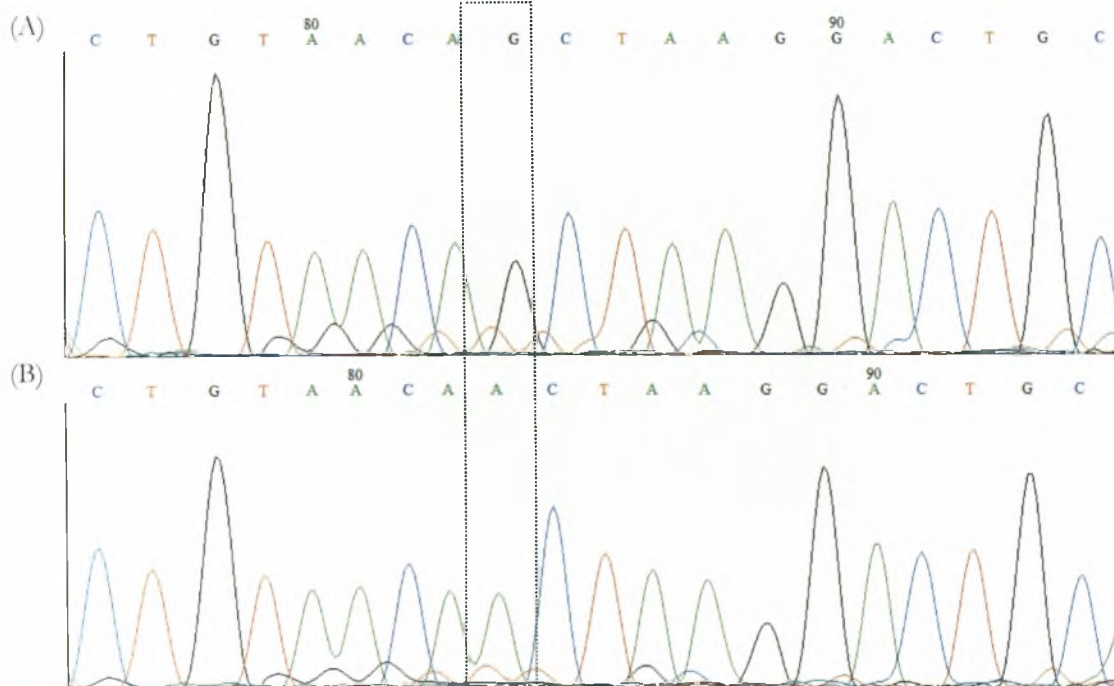
No 13.3.1

**NC3-COII
G5585A**

Πίνακας 8: Στον Πίνακα απεικονίζεται με κίτρινο χρώμα ο ήδη ταυτοποιημένος πολυμορφισμός στην NC3 περιοχή του συμπλόκου II της αναπνευστικής αλυσίδας όπως αναφέρεται στη δικτυακή βάση δεδομένων του *mitomap*.



Εικόνα 25: Στο πήγτωμα πολυακρυλαμιδίου 10% SSCP της εικόνας απεικονίζεται με το λευκό βελάκι το πρότυπο του πολυμορφισμού **NC3-COII G5585A**, σε σύγκριση με τα παραπλήσια πρότυπα *control*.



Εικόνα 26: Χρωματογράφημα *sequencing* ενός τμήματος της NC3-COII περιοχής σε άτομο *control* (A) και στο άτομο 13.3.1 (B). Είναι εμφανής η μετάπτωση $G \rightarrow A$ στη θέση 5585.

4.6 ΓΟΝΙΔΙΑ tRNA^{Thr} ΚΑΙ tRNA^{Pro} & ΠΑΡΑΚΕΙΜΕΝΑ ΓΟΝΙΔΙΑ ΤΟΥ ΚΥΤΟΧΡΩΜΑΤΟΣ b ΚΑΙ ΤΟΥ ΒΡΟΓΧΟΥ D

Για το τμήμα των 216 bp που κωδικοποιεί τα γονίδια tRNA^{Thr} και tRNA^{Pro} καθώς και τμήματα των παρακειμένων γονιδίων του κυτοχρώματος b και του βρόγχου D, εντοπίστηκαν 4 διαφορετικά πρότυπα με τη μέθοδο του SSCP.

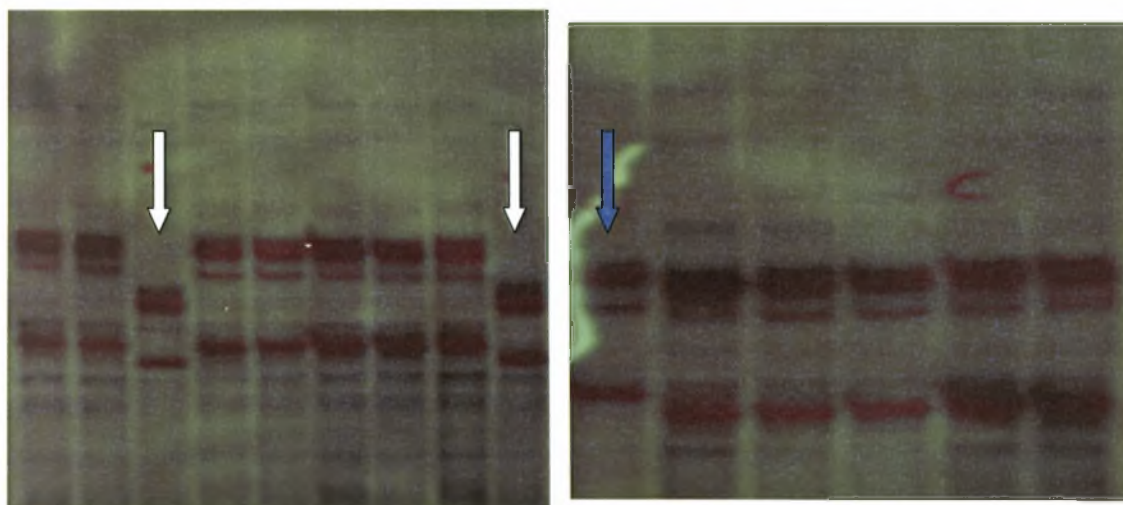
ΠΙΝΑΚΑΣ 9

<u>Άτομα (6)</u>	<u>Πολυμορφισμοί</u>
No 28.7	tRNA ^{Thr} A15924G
No 28.?	tRNA ^{Thr} G15927A
No 4.3.1, 11.3.1, 13.3.1	tRNA ^{Thr} G15928A
No 16.3.1	NC10 - tRNA ^{Thr/Pro} A15954C

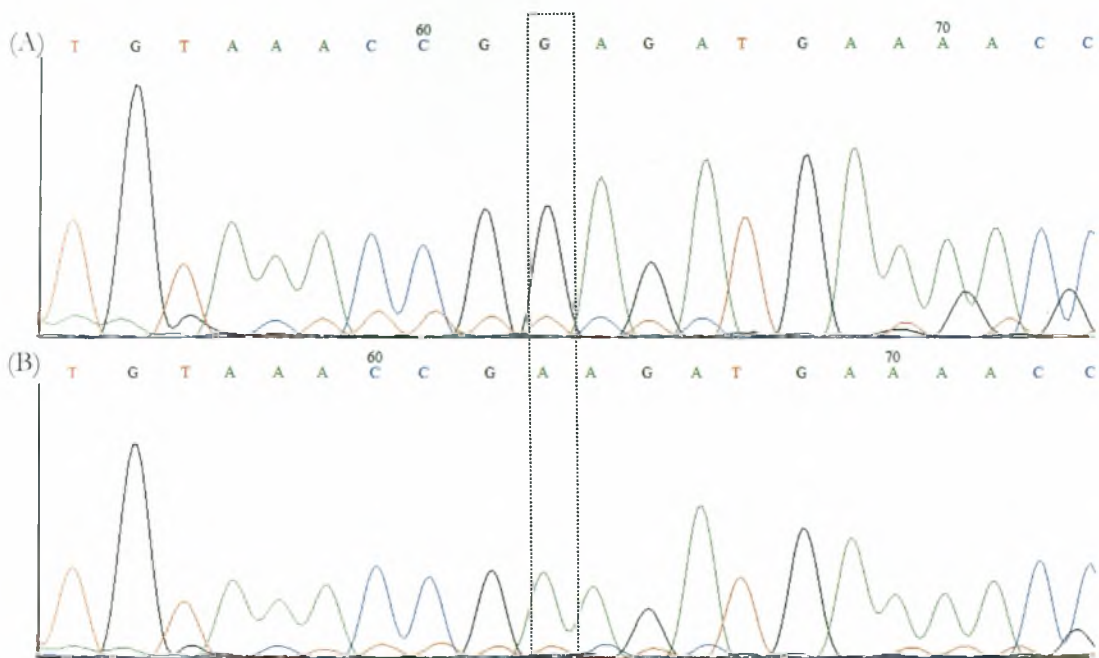
Πίνακας 9: Στο Πίνακα απεικονίζονται με κωνό χρώμα οι ήδη ταυτοποιημένοι πολυμορφισμοί όπως αναφέρονται στη δικτυακή βάση δεδομένων του *mitomap*. Συγκεκριμένα:

Στο tRNA^{Thr} γονίδιο: 3 γνωστοί πολυμορφισμοί.

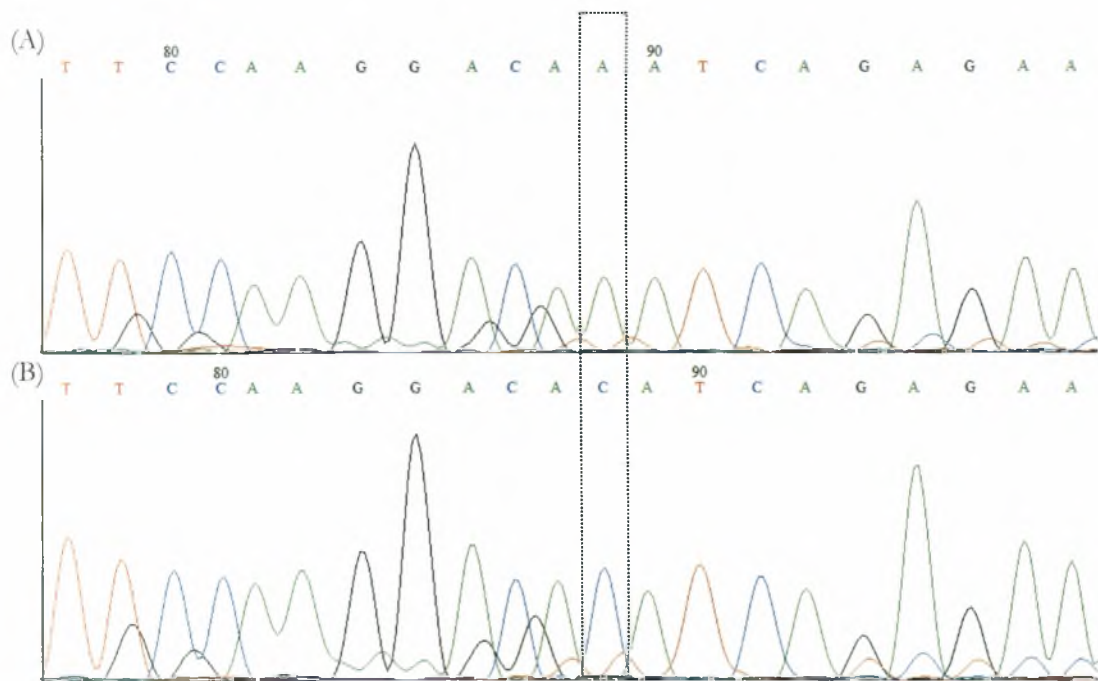
Στην περιοχή NC10 μεταξύ των γονιδίων tRNA^{Thr} και tRNA^{Pro}: 1 γνωστός πολυμορφισμός.



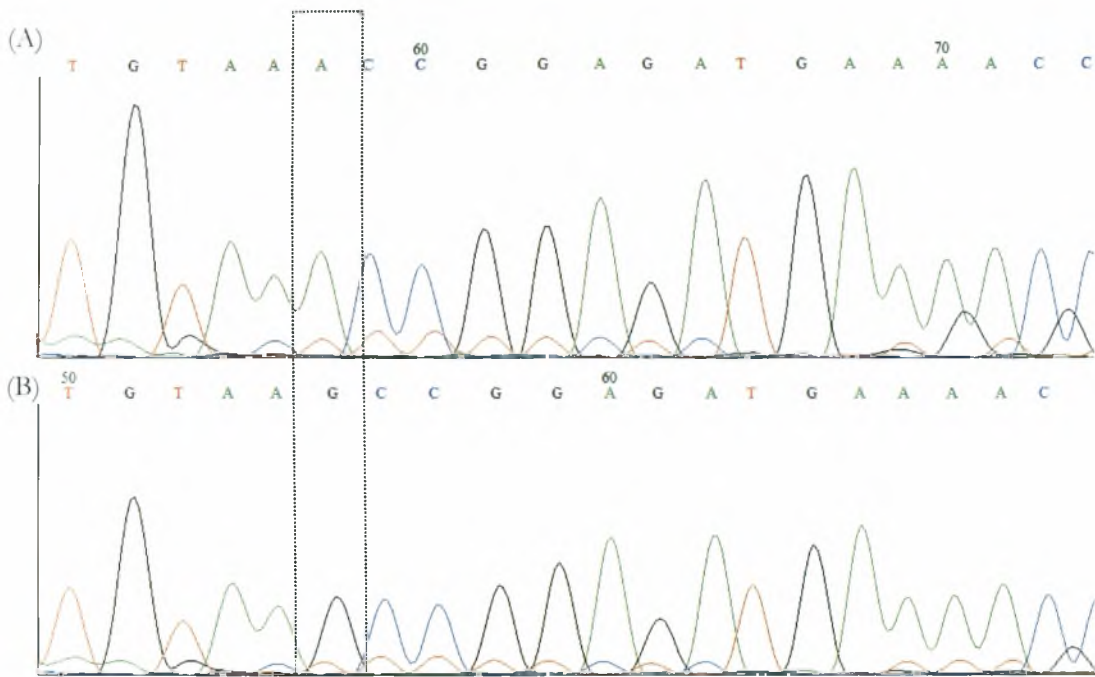
Εικόνα 27: Στο πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου 10% SSCP απεικονίζονται με το λευκό βελάκι το πρότυπο του πολυμορφισμού tRNA^{Thr} G15928A και με το μπλε βελάκι το πρότυπο του πολυμορφισμού NC10-tRNA^{Thr/Pro} A15954C, σε σύγκριση με τα παραλλήσια πρότυπα control.



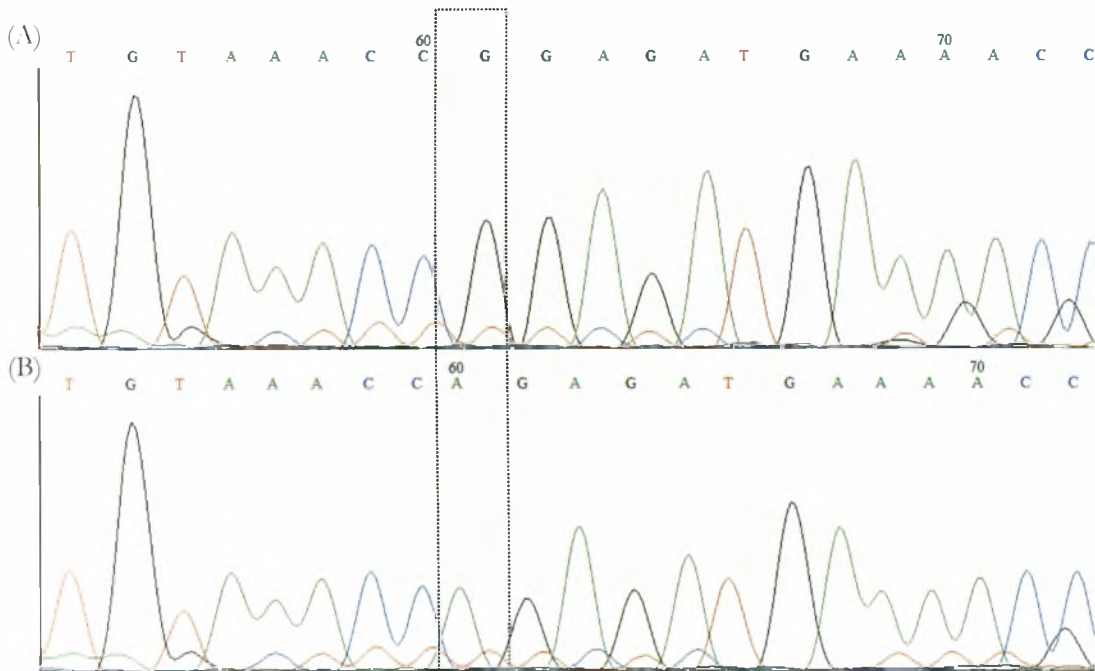
Εικόνα 28: Χρωματογράφημα sequencing τμήματος του γονιδίου *tRN^{Ala}* σε άτομο control (A) και σε πολλαπλά άτομα (B). Είναι εμφανής η μετάπτωση $G \rightarrow A$ στη θέση 15928.



Εικόνα 29: Χρωματογράφημα sequencing τμήματος των γονιδίων *tRN^{Ala}* και *tRN^{Pro}* σε άτομο control (A) και στο άτομο 16.3.1 (B). Είναι εμφανής η μετάπτωση $A \rightarrow C$ στη θέση 15954.



Εικόνα 30: Χρωματογράφημα sequencing τμήματος του γονιδίου *tRN^{Ala}* σε άτομο control (A) και στο άτομο 28.7 (B). Είναι εμφανής η μετάπτωση *A*→*G* στη θέση 15924.



Εικόνα 31: Χρωματογράφημα sequencing τμήματος του γονιδίου *tRN^{Ala}* σε άτομο control (A) και στο άτομο 28.7 (B). Είναι εμφανής η μετάπτωση *G*→*A* στη θέση 15927.

4.7 ΓΟΝΙΔΙΟ tRNA^{Phe} & ΠΑΡΑΚΕΙΜΕΝΑ ΓΟΝΙΔΙΑ ΤΗΣ 12S ΡΙΒΟΣΩΜΙΚΗΣ ΥΠΟΜΟΝΑΔΑΣ ΚΑΙ ΤΟΥ ΒΡΟΓΧΟΥ D

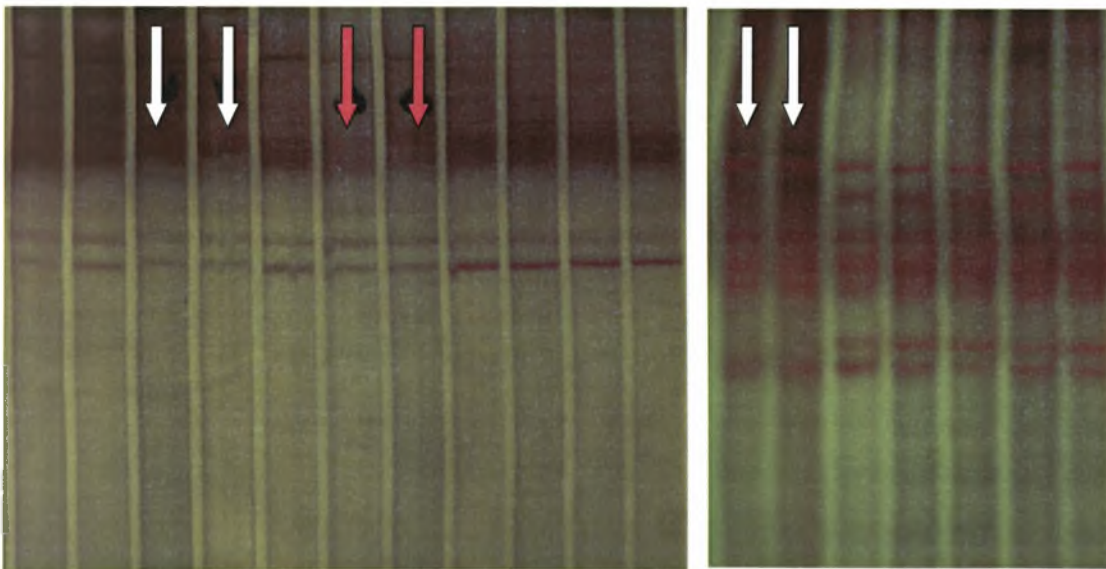
Για το τμήμα των 258 bp που κωδικοποιεί το γονίδιο tRNA^{Phe} καθώς και τμήματα των παρακείμενων γονιδίων της 12S ριβοσωμικής υπομονάδας και του βρόγχου D, εντοπίστηκαν 2 διαφορετικά πρότυπα με τη μέθοδο του SSCP.

ΠΙΝΑΚΑΣ 10

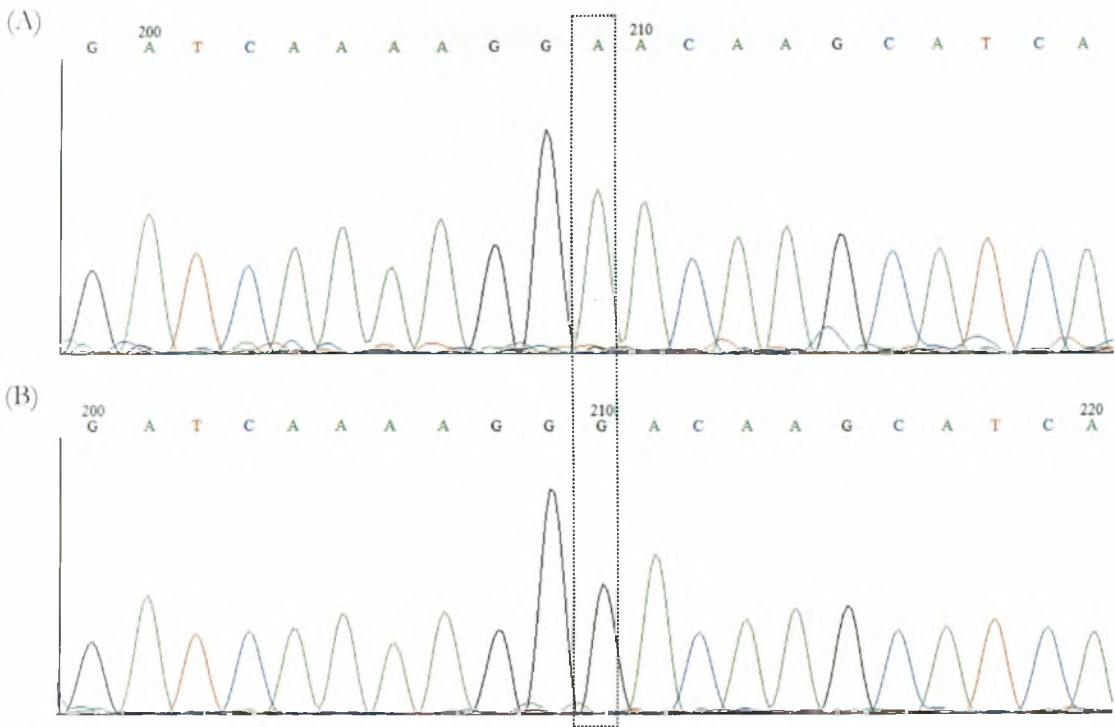
<u>Άτομα (6)</u>	<u>Πολυμορφισμοί</u>
No 28.4, 28.5, 1.3.1, 2.3.1	12S rRNA A750G

No 28.7, 28.8	12S rRNA A750G & D-loop A574G

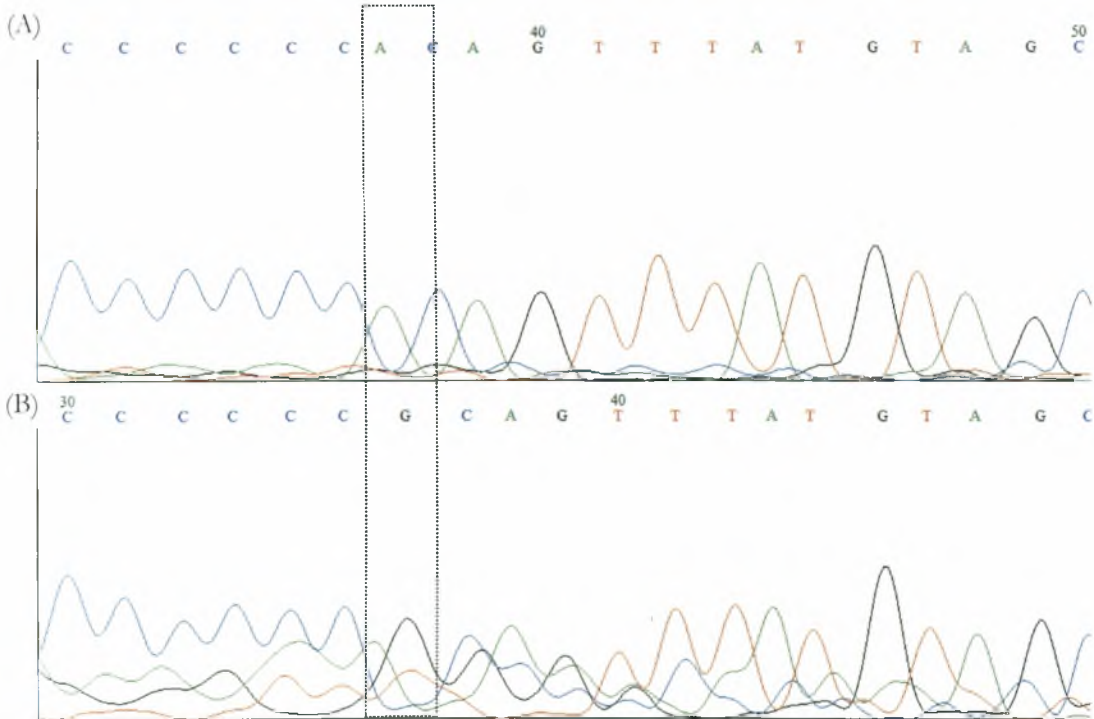
Πίνακας 10: Στο Πίνακα απεικονίζονται με κωνό χρώμα οι ήδη ταυτοποιημένοι πολυμορφισμοί όπως αναφέρονται στη δικτυακή βάση δεδομένων του *mitomap*.
Συγκεκριμένα:
 Στη 12S ριβοσωμική υπομονάδα: 1 γνωστός πολυμορφισμός.
 Στον βρόγχο D: 1 γνωστός πολυμορφισμός.



Εικόνα 32: Στο πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου 10% SSCP της εικόνας απεικονίζονται με το λευκό βελάκι το πρότυπο του πολυμορφισμού **12S rRNA A750G** και με το ροζ βελάκι το πρότυπο **12S rRNA A750G** μαζί με **D-loop A574G**, σε σύγκριση με τα παραπλήσια πρότυπα *control*.



Εικόνα 33: Χρωματογράφημα sequencing τμήματος του γονιδίου 12S rRNA, σε άτομο control (A) και σε πολλαπλά άτομα (B). Είναι εμφανής η μετάπτωση A→G στη θέση 750.



Εικόνα 34: Χρωματογράφημα sequencing τμήματος του βρόγχου D, σε άτομο control (A) και στα άτομα 28.7 και 28.8 (B). Είναι εμφανής η μετάπτωση A→G στη θέση 574.

4.8 ΥΠΟΛΟΙΠΑ ΓΟΝΙΔΙΑ & ΠΑΡΑΚΕΙΜΕΝΑ ΓΟΝΙΔΙΑ

Όσον αφορά τα υπόλοιπα γονίδια καθώς και γονίδια παρακείμενων τμημάτων τους, που είναι:

- ☞ το γονίδιο tRNA^{Val} και τμήματα των παρακείμενων γονιδίων των 12S και 16S ριβοσωμικών υπομονάδων,
- ☞ το γονίδιο tRNA^{Glu} και τμήματα των παρακείμενων γονιδίων της ND6 υπομονάδας του συμπλόκου I της αναπνευστικής αλυσίδας και του κυτοχρώματος b,
- ☞ το γονίδιο tRNA^{Gly} και τμήματα των παρακείμενων γονιδίων του συμπλόκου III και της ND3 υπομονάδας του συμπλόκου I της αναπνευστικής αλυσίδας,
- ☞ τα γονίδια tRNA^{Asn}, RNA^{Cys} και RNA^{Tyr} και τμήμα των παρακείμενων γονιδίων του συμπλόκου I της αναπνευστικής αλυσίδας,
- ☞ τα γονίδια tRNA^{Ile}, RNA^{Gln} και RNA^{Met} και τμήματα των παρακείμενων γονιδίων των ND1 και ND2 υπομονάδων του συμπλόκου I της αναπνευστικής αλυσίδας,
- ☞ τα γονίδια tRNA^{Ser(UCN)} και RNA^{Asp} και τμήματα των παρακείμενων γονιδίων των συμπλόκων I και III της αναπνευστικής αλυσίδας,

δεν εντοπίστηκαν πολυμορφισμοί.

4.9 ΣΥΝΟΨΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

ΠΙΝΑΚΑΣ 11

Γονίδιο	Νουκλεοτιδική Αλλαγή	Αποτέλεσμα αλλαγής	Αριθμός αλλαγών	Θέση στο tRNA	Αριθμός νουκλεοτιδίου στο tRNA	Haplogroup
tRNA ^{Leu(CUN)}	A12308G	μη κωδικοποιούσα	2	Μεταβλητή Θηλιά	44	K,U
tRNA ^{Thr}	A15924G	μη κωδικοποιούσα	1	Θηλιά Αντικωδικονίου	39	T
tRNA ^{Thr}	G15927A	μη κωδικοποιούσα	1	Θηλιά Αντικωδικονίου	42	T
tRNA ^{Thr}	G15928A	μη κωδικοποιούσα	3	Θηλιά Αντικωδικονίου	43	T
D-loop	A574G	μη κωδικοποιούσα	2	-	-	-
12S rRNA	A750G	συναίνετική	6	-	-	-
16S rRNA	T3197C	μη κωδικοποιούσα	1	-	-	U
ND1	T3394G	Tyr - His	1	-	-	-
NC3-COII	G5585A	μη κωδικοποιούσα	1	-	-	-
NC7-COII	G8251A	συνώνυμη	1	-	-	I
ND3	A10398G	Thr - Ala	6	-	-	J, K
NC10	A15954C	μη κωδικοποιούσα	1	-	-	U

Πίνακας 11: Συγκριτικός πίνακας με τους 12 πολυμορφισμούς που εντοπίστηκαν στα 32 φυσιολογικά άτομα που μελετήθηκαν. Αναγράφονται οι θέσεις και οι αριθμοί στους οποίους παρατηρούνται οι αλλαγές, καθώς και τα haplogroups στα οποία ανήκουν τα άτομα που φέρουν τους πολυμορφισμούς αυτούς.

ΠΙΝΑΚΑΣ 12

α/α	Πολυμορφισμοί							
	D-loop A574G	12S rRNA A750G	ND1 T3394C	NC3-COII G5585A	ND3 A10398G	tRNA ^{Leu(CUN)} A12308G	tRNA ^{Thr} A15924G	tRNA ^{Thr} G15928A
28.7	✓	✓			✓	✓	✓	
28.8	✓	✓	✓		✓			
2.3.1		✓			✓			
13.3.1				✓				✓

Πίνακας 12: Πίνακας με τα φυσιολογικά άτομα στα οποία εντοπιστήκαν πολλαπλοί πολυμορφισμοί (>1 πολυμορφισμοί).

ΠΙΝΑΚΑΣ 13

Πολυμορφισμός	Εντοπισμός σε άτομα της Θεσσαλίας	
	Σε φυσιολογικά άτομα	Σε ασθενείς με διάφορους κλινικούς φαινότυπους
tRNA ^{Leu(CUN)} A12308G	26/182	<ol style="list-style-type: none"> 1. άσθμα (7/26) 2. στραβισμός και σπασμοί 10 ετών 3. PFAPPA 4. σκλήρυνση κατά πλάκας 5. διαβήτης, υποθυρεοειδισμό, προβλήματα ομιλίας
tRNA ^{Thr} A15924G	1/62	<ol style="list-style-type: none"> 1. στραβισμός και σπασμοί 10 ετών
tRNA ^{Thr} G15927A	3/62	-
tRNA ^{Thr} G15928A	8/62	<ol style="list-style-type: none"> 1. άσθμα (2/26) 2. εγκεφαλικό 45 ετών 3. αρρυθμίες, σπασμοί 18 ετών 4. νευρομυϊκά προβλήματα 5 ετών
D-loop A574G	2/62	-
12S rRNA A750G	21/62	<ol style="list-style-type: none"> 1. άσθμα (13/26) 2. νευρολογικό σύνδρομο 3. εγκεφαλικό 32 ετών 4. εγκεφαλικό 50 ετών 5. εγκεφαλικό 58 ετών 6. νευρομυϊκά προβλήματα 5 ετών 7. συγγενής καρδιοπάθεια 1 έτους 8. ψυχοκινητική καθυστέρηση
16S rRNA T3197C	1/182	<ol style="list-style-type: none"> 1. άσθμα (1/26) 2. στραβισμός και σπασμοί 10 ετών
ND1 T3394G	3/182	<ol style="list-style-type: none"> 1. στραβισμός και σπασμοί 10 ετών
NC3-COII G5585A	1/32	-
NC7-COII G8251A	4/182	-
ND3 A10398G	6/32	<ol style="list-style-type: none"> 1. άσθμα (2/26) 2. σύνδρομο Down 3. εγκεφαλικό 32 ετών
NC10 A15954C	1/62	<ol style="list-style-type: none"> 1. άσθμα (1/26) 2. PFAPPA 3. σκλήρυνση κατά πλάκας

Πίνακας 13: Συγκριτικός πίνακας με τους 12 πολυμορφισμούς που εντοπίστηκαν σε σχέση με φυσιολογικά άτομα και διάφορους ασθενείς.

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα εργασία, όπου μελετήθηκαν όλα τα tRNA γονίδια 32 φυσιολογικών ατόμων (χωρίς κλινικά συμπτώματα), εντοπίστηκε με τη χρήση απλών μοριακών τεχνικών ένας αξιοσημείωτος αριθμός πολυμορφισμών. Καθώς οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν δεν ενίσχυαν επακριβώς τα γονίδια των tRNA, αλλά ενίσχυαν και κομμάτια των παρακείμενων γονιδίων τους, στους πολυμορφισμούς που μελετάμε συμπεριλαμβάνονται και αλλαγές στα παρακείμενα γονίδια. Συγκεκριμένα, εντοπίστηκαν 12 πολυμορφικές θέσεις 26 φορές. Από τις 12 αυτές θέσεις μόνο οι 4 αφορούν μόρια tRNA, η μία στο γονίδιο tRNA^{Leu(CUN)} και οι άλλες 3 στο γονίδιο tRNA^{Thr}, ενώ οι υπόλοιπες 8 πολυμορφικές θέσεις εντοπίστηκαν σε τμήματα παρακείμενων γονιδίων.

Αναλυτικότερα, στο γονίδιο tRNA^{Leu(CUN)} εντοπίστηκε σε δύο άτομα η μεταλλαγή **A12308G**, η οποία σύμφωνα με τη δικτυακή βάση δεδομένων του miTomap αποτελεί ταυτοποιημένο πολυμορφισμό ο οποίος δεν επηρεάζει τον ενεργειακό μεταβολισμό του κυττάρου. Αυτό συμβαίνει επειδή η νουκλεοτιδική αλλαγή της αδενίνης σε γουανίνη στη συγκεκριμένη θέση της μεταβλητής θηλιάς δεν διαταράσσει σημαντικά τη δομή του μορίου και συνεπώς δεν επηρεάζει τη λειτουργία του. 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.

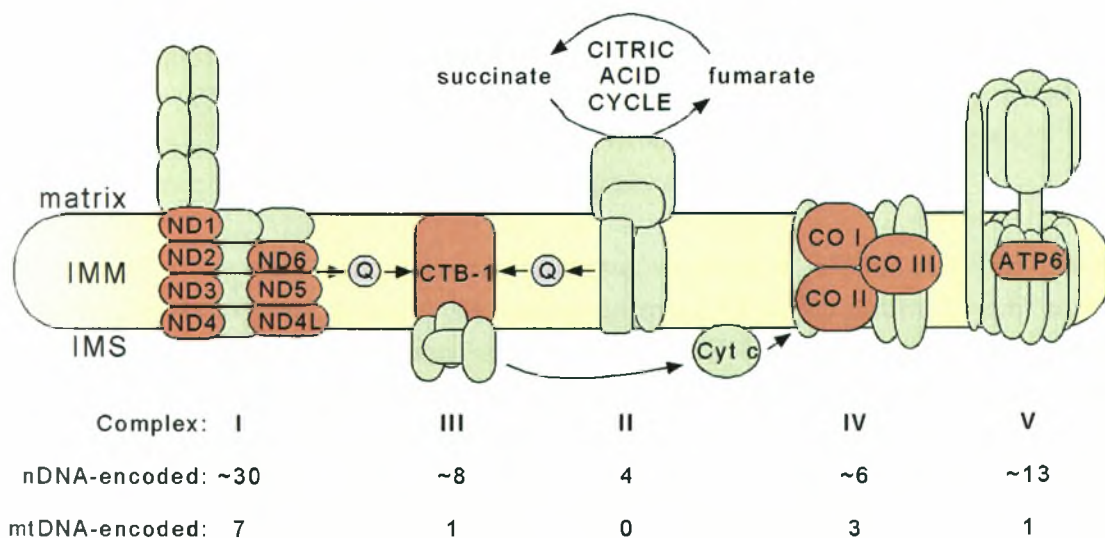
Στο γονίδιο tRNA^{Thr} ανιχνεύτηκαν 3 διαφορετικοί ήδη ταυτοποιημένοι πολυμορφισμοί όπου και οι τρεις εντοπίζονται στη θηλιά του αντικωδικονίου. Είναι οι μεταλλαγές **A15924G** (σε 1 άτομο) **G15927A** (σε 1 άτομο) και **G15928A** (σε 3 άτομα) με την πρώτη να έχει αναλυθεί ότι επηρεάζει το τελευταίο ζεύγος βάσεων του στελέχους του αντικωδικονίου που βρίσκεται παρακείμενα με τη θηλιά του αντικωδικονίου. Η ανίχνευση αυτών των πολυμορφισμών έρχεται σε αντίθεση με την θεωρία ότι η θηλιά του αντικωδικονίου είναι η πιο συντηρημένη, παρόλο αυτά οι μεταλλαγές αυτές δεν επηρεάζουν τη δομική ακεραιότητα του tRNA^{Thr} και κατ' επέκταση την αλληλεπίδραση του με τις ριβοσωμικές υπομονάδες.

Στον βρόγχο D, ο οποίος αποτελεί μη κωδικοποιούσα περιοχή και εμφανίζει μεγάλο βαθμού μεταβλητότητα της νουκλεοτιδικής του αλληλουχίας, εντοπίστηκε σε 2 άτομα ο πολυμορφισμός **A574G**. Στην 12S ριβοσωμική υπομονάδα σε 6 άτομα ανιχνεύτηκε ο ήδη ταυτοποιημένος πολυμορφισμός **A750G**, η νουκλεοτιδική αλλαγή του οποίου είναι συναινετική και επομένως δεν προκαλεί κάποια δυσλειτουργία της ριβοσωμικής υπομονάδας. Στην 16S ριβοσωμική υπομονάδα εντοπίστηκε σε 1 άτομο ο ήδη ταυτοποιημένος πολυμορφισμός **T3197C**. Καθώς το 16S tRNA αποτελεί μέρος της μικρής ριβοσωμικής υπομονάδας διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο στη πρωτεϊνοσύνθεση αφού ευθύνεται για τη σύνδεση με τα tRNA που μεταφέρουν

αμινοξέα. Η μεταλλαγή αυτή όμως αποτελεί μη κωδικοποιούσα αλλαγή, συνεπώς δεν επηρεάζει τη δομή της ριβοσωμικής υπομονάδας.

Στην ND1 υπομονάδα του συμπλόκου I της αναπνευστικής αλυσίδας εντοπίστηκε σε 1 άτομο ο ήδη ταυτοποιημένος πολυμορφισμός **T3394G** ο οποίος προκαλεί αλλαγή της τριπλέτας που κωδικοποιεί φυσιολογικά το αμινοξύ Τυροσίνη με αποτέλεσμα να κωδικοποιεί Ιστιδίνη. Αφενός όμως η αλλαγή αυτή οδηγεί σε αντικατάσταση ενός πολικού αμινοξέος με ένα πολικό και αφετέρου αποτελεί σημειακή μετάλλαξη σε μη κομβικό σημείο της πρωτεΐνης, οπότε δεν επηρεάζει τη τρισδιάστατη δομή της. Συνεπώς, δεν επηρεάζει σημαντικά τη λειτουργικότητα του συμπλόκου και κατ' επέκταση την ομαλή λειτουργία της αναπνευστικής αλυσίδας. Στην ND3 υπομονάδα του συμπλόκου I της αναπνευστικής αλυσίδας εντοπίστηκε σε 6 άτομα ο ήδη ταυτοποιημένος πολυμορφισμός **A10398G**. Η μεταλλαγή αυτή αποτελεί έναν πολυμορφισμό μονού νουκλεοτιδίου (SNP) ο οποίος προκαλεί αλλαγή της τριπλέτας που κωδικοποιεί φυσιολογικά το αμινοξύ Θρεονίνη με αποτέλεσμα να κωδικοποιεί Αλανίνη και επηρεάζει τα επίπεδα Ca^{+2} των μιτοχονδρίων.

Επίσης εντοπίστηκαν πολυμορφισμοί και σε μη κωδικοποιούσες περιοχές. Συγκεκριμένα, στην NC3 περιοχή του συμπλόκου II της αναπνευστικής αλυσίδας εντοπίστηκε σε 1 άτομο ο ήδη ταυτοποιημένος πολυμορφισμός **G5585A** που καταλήγει σε μη κωδικοποιούσα αλλαγή, ενώ στην NC7 περιοχή του ίδιου συμπλόκου ο επίσης ήδη ταυτοποιημένος πολυμορφισμός **G8251A**, ο οποίος οδηγεί σε συνώνυμη αλλαγή και συνεπώς δεν επηρεάζει διόλου τη δομή του συμπλόκου. Τέλος, ανιχνεύτηκε ένας ακόμη ήδη ταυτοποιημένος πολυμορφισμός στην περιοχή μεταξύ του τέλους του γονιδίου $tRNA^{Thr}$ και της αρχής του γονιδίου $tRNA^{P10}$ (NC10 περιοχή), που είναι η μεταλλαγή **A15954C**, που και αυτή δεν οδηγεί σε κωδικοποιούσα αλλαγή.



Εικόνα 35: Οι συνολικές υπομονάδες των συμπλόκων της αναπνευστικής αλυσίδας. Η έκφραση του μιτοχονδριακού γονιδιώματος οδηγεί στη σύνθεση 2 μορίων rRNA, 22 μορίων tRNA και 13 πολυπεπτιδίων. Τα 13 πολυπεπτιδία περιλαμβάνουν 7 υπομονάδες της αφυδρογονάσης NADH, 3 υπομονάδες της κυτοχρωμικής αναγωγής, 2 υπομονάδες της ATP συνθάσης και το κυτόχρωμα b. Το σύνολο των συμπλόκων της αναπνευστικής αλυσίδας συγκροτείται από υπομονάδες που εκφράζονται στο μιτοχόνδριο αλλά και στο πυρηνικό DNA, γεγονός που φανερώνει την εξάρτηση του μιτοχονδρίου από τον πυρήνα για τη σωστή διεξαγωγή της παραγωγής ενέργειας.

Από τα δεδομένα του **πίνακα 12** παρατηρούμε ότι μόνο το 12,5% (4 άτομα από τα 32 άτομα που μελετήθηκαν) παρουσιάζουν το φαινόμενο συγκληρονόμησης πολλαπλών πολυμορφισμών. Συγκεκριμένα, στο άτομο 28.7 συγκληρονομούνται 5 πολυμορφισμοί, στο άτομο 28.8 συγκληρονομούνται 4 πολυμορφισμοί εκ των οποίων οι τρεις είναι οι ίδιοι μ' αυτών του ατόμου 28.7, το άτομο 2.3.1 φέρει τους δύο από αυτούς τους πολυμορφισμούς ενώ στο άτομο 13.3.1 συνυπάρχουν 2 άλλοι διαφορετικοί πολυμορφισμοί. Στα υπόλοιπα 28 άτομα αυτής της μελέτης δε βρέθηκε τέτοια τάση συγκληρονόμησης, αλλά σε όσα άτομα εντοπίστηκαν πολυμορφισμοί έφεραν μόνο έναν πολυμορφισμό. Συνεπώς, μπορούμε να συμπεράνουμε ότι τα φυσιολογικά άτομα δε δείχνουν υψηλές τάσεις συγκληρονόμησης των πολυμορφισμών, γεγονός που ενισχύεται και από τα δεδομένα μελέτης που έγινε σε 150 φυσιολογικά άτομα [όπου μελετήθηκαν μόνο τα γονίδια tRNA^{His}, tRNA^{Ser(AGY)}, tRNA^{Leu(CUN)}, tRNA^{Lys} και tRNA^{Leu(UUR)}], όπου μόνο σε 2 άτομα συγκέντρωσαν πάνω από δύο πολυμορφισμούς.

Ο **πίνακας 13** αποτελεί έναν συγκριτικό πίνακα όπου παρουσιάζονται οι 12 πολυμορφισμοί που ανιχνεύτηκαν στην παρούσα μελέτη σε σχέση με φυσιολογικά άτομα αλλά και με ασθενείς με διάφορους κλινικούς φαινότυπους. Συγκεκριμένα:

- για τα φυσιολογικά άτομα τα δεδομένα αντανακλούν σε:
 - 182 άτομα για τα γονίδια tRNA^{Leu(CUN)}, tRNA^{Lys} και tRNA^{Leu(UUR)} καθώς και παρακείμενα γονίδια τμημάτων εκατέρωθεν αυτών,
 - 62 άτομα για τα γονίδια tRNA^{Phe}, tRNA^{Thr} και tRNA^{Pro} καθώς και παρακείμενα γονίδια τμημάτων εκατέρωθεν αυτών,
 - 32 άτομα για τα γονίδια tRNA^{Arg}, tRNA^{Trp} και tRNA^{Ala} καθώς και παρακείμενα γονίδια τμημάτων εκατέρωθεν αυτών.
- για τους διάφορους ασθενείς τα δεδομένα αντανακλούν σε:
 - 26 άτομα με άσθμα για όλα τα γονίδια καθώς και παρακείμενα γονίδια τμημάτων εκατέρωθεν αυτών,
 - 30 άτομα με διάφορους κλινικούς φαινότυπους για τα γονίδια tRNA^{Phe}, tRNA^{Thr}, tRNA^{Pro}, tRNA^{Arg}, tRNA^{Trp}, tRNA^{Ala}, tRNA^{Leu(CUN)} και tRNA^{Leu(UUR)} καθώς και παρακείμενα γονίδια τμημάτων εκατέρωθεν αυτών.

Ο πιο κοινός πολυμορφισμός φαίνεται να είναι ο **A750G** στο 12S rRNA καθώς εντοπίστηκε με ποσοστό που ανέρχεται στο 33,9%, δηλαδή σε 21 από τα 62 φυσιολογικά άτομα, αλλά και σε ποσοστό 35,7% σε διάφορους κλινικούς φαινότυπους που συμπεριλαμβάνουν ασθενείς με άσθμα (13/26), εγκεφαλικά, ψυχοκινητική καθυστέρηση, νευρολογικό σύνδρομο, νευρομυϊκά προβλήματα και συγγενής καρδιοπάθεια. Συνεπώς αποτελεί μια κοινή μεταλλαγή. Παρόλο αυτά ο συγκεκριμένος πολυμορφισμός δείχνει υψηλή τάση συγκληρονόμησης με άλλους πολυμορφισμούς ή μεταλλάξεις ενώ σπάνια μεταβιβάζεται μόνος του. Στα 2 φυσιολογικά άτομα όπου ανιχνεύτηκε ο πολυμορφισμός **A574G** στον βρόγχο D, ο πολυμορφισμός μεταβιβάζεται μονάχα μαζί με τον πολυμορφισμό **A750G** στο 12S rRNA, ενώ στους διάφορους ασθενείς μεταβιβάζεται συνήθως μαζί με τον πολυμορφισμό **G709A** στο 12S rRNA.

Επίσης μεγάλη συχνότητα παρουσιάζει ο πολυμορφισμός **A12308G** στο tRNA της Λευκίνης^(CUN) καθώς εντοπίστηκε σε 26 από τα 182 φυσιολογικά άτομα, ποσοστό που φτάνει στο 14,3%. Παράλληλα όμως αναφέρεται και ως μετάλλαξη όπου ανιχνεύτηκε σε ασθενείς με άσθμα (7/26) αλλά και σε άλλους διάφορους κλινικούς φαινότυπους με συνολικό ποσοστό εντόπισης 19,6%.

Στο γονίδιο tRNA^{Thr}, το οποίο μελετήθηκε σε 62 φυσιολογικά άτομα, εντοπίστηκαν οι τρεις πολυμορφισμοί **A15924G**, **G15927A** και **G15928A**, με τον τελευταίο να ανιχνεύεται σε υψηλότερη συχνότητα (σε 8 άτομα) από τους άλλους δύο. Οι νουκλεοτιδικές αυτές αλλαγές αναφέρονται και ως μεταλλάξεις με τον τελευταίο και πάλι να εντοπίζεται σε διάφορα κλινικά συμπτώματα.

Οι υπόλοιποι πολυμορφισμοί εντοπίστηκαν σε παρακείμενα γονίδια τμημάτων που βρίσκονται εκατέρωθεν των γονιδίων tRNA. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει ο πολυμορφισμός **A10398G** στην ND3 υπομονάδα του συμπλόκου I της αναπνευστικής αλυσίδας. Στα 3 από τα 6 φυσιολογικά άτομα που εντοπίστηκε δεν μεταβιβάζεται μόνος του αλλά συνυπάρχει με άλλους πολυμορφισμούς. Αυτό το φαινόμενο συγκληρονόμησης παρατηρείται και σε όσους ασθενείς εντοπίστηκε η μεταλλαγή αυτή, δηλαδή ποτέ δεν κληρονομείται μόνη της.

Επομένως, από τα παραπάνω δεδομένα προκύπτουν τα δύο παρακάτω συμπεράσματα:

I) η τάση συγκληρονόμησης στα φυσιολογικά άτομα εμφανίζει χαμηλό ποσοστό, 12,5%, σε σύγκριση με αυτό των διάφορων ασθενών που ανέρχεται στο ποσοστό του 37,5%. Συνεπώς, σε φυσιολογικούς πληθυσμούς κάθε πολυμορφισμός "προτιμά" να μεταβιβάζεται μόνος του.

II) η ανίχνευση των ίδιων μεταλλαγών και σε φυσιολογικά άτομα και σε άτομα με διάφορες ασθένειες ενισχύει την άποψη πως οι συγκεκριμένες μεταλλαγές δεν συνδέονται ως αιτία της κάθε δυσλειτουργίας στους ασθενείς.

Τέλος, φαίνεται ότι η επιλογή που ασκείται στη μιτοχονδριακή DNA αλληλουχία όσον αφορά δομικά γονίδια, όπως αυτά των tRNA, του 12S και του 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 αμινοκύκλο-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. Cortopassi, G.A. and Wong, A. (1999). Mitochondria in organismal aging and degeneration. *Biochim. Biophys. Acta* 1410, 183-193.
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. Jukes T. H. and S. Osawa, 1990. The genetic code in mitochondria and chloroplasts. *Experientia* 46: 1117-1126.
9. Brian F.C. Clark. The crystal structure of tRNA. *J. Biosci.* 2006, 31:453-457.
10. Normanly, J., and Abelson, J., 1989. Transfer RNA identity. *Annu. Rev. Biochem.* 58:1029-1049.
11. Weisblum, B., 1999. Back to Camelot: Defining the specific role of tRNA in protein synthesis. *Trends Biochem. Sci.* 24:247-250.
12. 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.
13. 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.
14. Florentz C, Sissler M. Disease- related versus polymorphic mutations in human mitochondrial tRNAs. Where is the difference? *EMBO Rep* 2001, 2:481-486
15. Ford E.B. Genetic polymorphism. MIT Press 1965, p17-25.
16. Brown WM. Polymorphism in mitochondrial DNA of humans as revealed by restriction endonuclease analysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980, 77: 3605-3609
17. Castro JA, Picornell A, Ramon M. Mitochondrial DNA: a tool for populational genetics studies. *Int Microbiol.*1998,1: 327-332.
18. Cann RL, Stoneking M, Wilson AC. Mitochondrial DNA and human evolution. *Nature.* 1987, 325: 31-36.

19. Ingman M, Kaessmann H, Pääbo S, Gyllenstein U. Mitochondrial genome variation and the origin of modern humans. *Nature* 2000; 408:708-713.
20. Torroni A, Achilli A, Macaulay V, Richards M, Bandelt HJ. Harvesting the fruit of the human mtDNA tree. *Trends Genet.* 2006, 22:339–45.
21. Gonzalez et al. Mitochondrial lineage M1 traces an early human backflow to Africa. *BMC Genomics* 2007, 8:223
22. Markoulatos P., Samara V., Marinakis J., Kaparos C., Fountoukidou P., Krikelis V., Spirou N., Vamvakopoulos N. Polymerase Chain Reaction in Iology Diagnose. *Hellenic Virology* 1996, 1(1):83-85
23. Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 1987, 155:335-350.
24. 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.
25. Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T.; Hrsg. (1989). *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*, 2nd Edition. Cold Spring Harbour Laboratory Press, NY.
26. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1977, 74:5463-5467.
27. Fischer SG, Lerman LS. DNA fragments differing by single base-pair substitutions are separated in denaturing gradient gels. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983, 80:1579-1583.
28. 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.
29. Schaefer AM, Taylor RW, Turnbull DM, Chinnery PF. The epidemiology of mitochondrial disorders – past, present and future. *Biochim Biophys Acta* 2004, 1659:115-120.
30. Brandon, M., Baldi, P., Wallace, D. C. (2006) "Mitochondrial mutations in cancer " *Oncogene* . 25 (34): 4647-4662.
31. Yeh, J. J., Lunetta, K. L., van Orsouw, N. J., Moore, F. D., Jr., Mutter, G. L., Vijg, J., Dahia, P. L., Eng, C. (2000) "Somatic mitochondrial DNA (mtDNA) mutations in papillary thyroid carcinomas and differential mtDNA sequence variants in cases with thyroid tumours " *Oncogene* . 19 (16): 2060-2066.
32. Lorenc, A., Bryk, J., Golik, P., Kupryjanczyk, J., Ostrowski, J., Pronicki, M., Semczuk, A., Szolkowska, M., Bartnik, E. (2003) "Homoplasmic MELAS A3243G mtDNA mutation in a colon cancer sample " *Mitochondrion* . 3 (2): 119-124.
33. Brandon, M., Baldi, P., Wallace, D. C. (2006) "Mitochondrial mutations in cancer " *Oncogene* . 25 (34): 4647-4662.
34. Jeronimo, C., Nomoto, S., Caballero, O. L., Usadel, H., Henrique, R., Varzim, G., Oliveira, J., Lopes, C., Fliss, M. S., Sidransky, D. (2001) "Mitochondrial mutations in early stage prostate cancer and bodily fluids " *Oncogene* . 20 (37): 5195-5198.

35. Konings, A., Van Camp, G., Goethals, A., Van Eyken, E., Vandeveld, A., Ben Azza, J., Peeters, N., Wuyts, W., Smeets, H., Van Laer, L. (2008) "Mutation analysis of mitochondrial DNA 12SrRNA and tRNASer(UCN) genes in non-syndromic hearing loss patients " *Mitochondrion* . 8 (5-6): 377-382.
36. Herrstadt, C., Elson, J. L., Fahy, E., Preston, G., Turnbull, D. M., Anderson, C., Ghosh, S. S., Olefsky, J. M., Beal, M. F., Davis, R. E., Howell, N. (2002) "Reduced-median-network analysis of complete mitochondrial DNA coding-region sequences for the major African, Asian, and European haplogroups " *American Journal of Human Genetics* . 70 (5): 1152-1171.
37. Hofmann, S., Jaksch, M., Bezold, R., Mertens, S., Aholt, S., Paprotta, A., Gerbitz, K.D. (1997) "Population genetics and disease susceptibility: characterization of central European haplogroups by mtDNA gene mutations, correlation with D loop variants and association with disease " *Human Molecular Genetics*. 6 (11): 1835-1846.
38. Ruppert, V., Nolte, D., Aschenbrenner, T., Pankuweit, S., Funck, R., Maisch, B. (2004) "Novel point mutations in the mitochondrial DNA detected in patients with dilated cardiomyopathy by screening the whole mitochondrial genome " *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 318 (2): 535-543.

