



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος Βιοχημείας
και Βιοτεχνολογίας

**"ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ-ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ"**

**ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ ΣΤΟ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟ
ΓΟΝΙΔΙΟ $tRNA^{Val}$ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΔΙΑΒΗΤΗ**



ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΚΑΡΤΣΑΝΑ ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ

ΛΑΡΙΣΑ 2013

**Ανίχνευση μεταλλάξεων σε μιτοχονδριακό t RNA^{Val}
γονίδιο σε ασθενείς με διαβήτη**

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ

Ζίφα Αιμιλία,

Επίκουρος Καθηγήτρια Βιολογίας / Νευροβιολογίας, Τμήμα Βιοχημείας &
Βιοτεχνολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Ζίφα Αιμιλία

Επίκουρος Καθηγήτρια Βιολογίας / Νευροβιολογίας, Τμήμα Βιοχημείας &
Βιοτεχνολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Μαμούρης Ζήσης

Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας
Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Κομιώτης Δημήτριος

Καθηγητής Οργανικής Χημείας με έμφαση στη σύνθεση Βιοδραστικών Μορίων,
Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Πρόλογος

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Γενετικής, Συγκριτικής & Εξελικτικής Βιολογίας του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας στα πλαίσια του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών Βιοτεχνολογία – Ποιότητα Διατροφής & Περιβάλλοντος.

Για την εκπόνηση της εργασίας θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους όσους συνέβαλαν στην εκπόνηση αυτής της διπλωματικής εργασίας. Την Επίκουρο Καθηγήτρια Βιολογίας / Νευροβιολογίας Αιμιλία Ζίφα, για την ανάθεση της εργασίας, την κατανόηση και την υπομονή της. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της εξεταστικής επιτροπής, τον Καθηγητή Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών Μαμούρη Ζήση και τον Καθηγητή Οργανικής Χημείας Κομιώτη Δημήτριο για την στήριξη και την βοήθεια στην εκπόνηση της εργασίας.

Θα ήθελα ακόμη να ευχαριστήσω θερμά όλη την ομάδα του εργαστηρίου Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας και ιδιαίτερα το διδάκτορα Κωνσταντίνο Σταμάτη για την πολύτιμη βοήθεια του σ' όλη τη διάρκεια της διεξαγωγής του πειράματος και την άψογη συνεργασία μας. Τον Αλέξανδρο για την πολύτιμη βοήθεια και τις συμβουλές και την Κατερίνα για την βοήθεια και την ψυχολογική υποστήριξη.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	6
ABSTRACT.....	7
1.ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΟ.....	8
1.1ΔΟΜΗ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΟΥ.....	8
1.1.2 ΣΥΣΤΗΜΑ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΟΥ.....	9
1.2 ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΚΑΙ ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΟΥ.....	10
1.3 ΚΑΤΑΓΩΓΗ ΤΟΥ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΟΥ.....	12
1.4 ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑ (DNA).....	12
2. ΜΕΤΑΛΛΑΓΕΣ ΤΟΥ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟΥ DNA.....	14
2.1 Η ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΩΝ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΩΝ ΝΟΣΗΜΑΤΩΝ.....	14
2.2 ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΚΕΣ ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ ΚΑΙ ΝΟΣΗΜΑΤΑ.....	15
2.3. Η ΝΟΣΟΣ ΣΑΚΧΑΡΩΔΗΣ ΔΙΑΒΗΤΗΣ.....	19
2.3.1 ΣΑΚΧΑΡΩΔΗΣ ΔΙΑΒΗΤΗΣ ΤΥΠΟΥ Ι.....	20
2.3.2 ΣΑΚΧΑΡΩΔΗΣ ΔΙΑΒΗΤΗΣ ΤΥΠΟΥ ΙΙ.....	20
2.3.3 ΑΛΛΟΙ ΕΙΔΙΚΟΙ ΤΥΠΟΙ ΔΙΑΒΗΤΗ.....	21
2.3.4 ΔΙΑΒΗΤΗΣ ΤΗΣ ΚΥΗΣΕΩΣ.....	21
2.4 ΕΡΕΥΝΑ ΚΑΙ ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΕΣ ΓΙΑ ΤΗ ΝΟΣΟ.....	22
3.ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	24
4. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	25
4.1 ΔΕΙΓΜΑ ΚΑΙ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA	25
4.2 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR).....	27
4.3 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΗ ΑΓΑΡΟΖΗΣ.....	33
4.4 ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥ ΜΟΝΟΚΛΩΝΙΚΗΣ ΔΙΑΜΟΡΦΩΣΗΣ(Single Strand Conformation Polymorphism- SSCP).....	35
4.5 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΠΗΚΤΩΜΑΤΟΣ ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΙΟΥ.....	37
4.6 ΑΠΟΔΙΑΤΑΞΗ ΚΑΙ ΦΟΡΤΩΜΑ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ.....	38
4.7 ΧΡΩΣΗ ΜΕ ΔΙΑΛΥΜΑ ΝΙΤΡΙΚΟΥ ΑΡΓΥΡΟΥ (Silver Staining).....	39
4.8 ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ PCR.....	40
4.9 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ ΤΟΥ DNA (SEQUENCING).....	42
5.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	43
6. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	49
7.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	50

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο σακχαρώδης διαβήτης είναι μία ασθένεια από την οποία προσβάλλεται μεγάλο ποσοστό του πληθυσμού. Είναι μία ασθένεια όπου τα ποσοστά που ασθενούν αυξάνονται με γρήγορους ρυθμούς. Γι' αυτό το λόγο γίνονται πολλές έρευνες για να προσδιοριστούν οι αιτίες που την προκαλούν, είτε αυτές βρίσκονται στον τρόπο ζωής του σύγχρονου ανθρώπου, είτε είναι θέμα γονιδίων.

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν 16 δείγματα (Δ1, Δ2, Δ3, Δ4, Δ5, Δ6, Δ7, Δ8, Δ9, Δ10, Δ11, Δ12, Δ13, Δ14, Δ15, Δ16) ασθενών του διαβήτη στα οποία εξετάσαμε το μιτοχονδριακό tRNA^{VAL}. Αρχικά απομονώσαμε το ολικό DNA των δειγμάτων. Έπειτα εφαρμόσαμε τη μέθοδο πολλαπλασιασμού της αλληλουχίας του DNA με τη μέθοδο PCR. Στη συνέχεια ελέγξαμε ποσοτικά και ποιοτικά τα αποτελέσματα που πήραμε από την PCR μέσω της ηλεκτροφόρισης των δειγμάτων σε πηκτική αгарόζη. Μέσω της ανάλυσης πολυμορφισμού μονόκλωνης διαμόρφωσης (SSCP) επιτύχαμε αποδιάταξη της μονόκλωνης αλυσίδας έτσι ώστε να καταφέρουμε να ανιχνεύσουμε τις μεταλλάξεις στο γονίδιο. Η μέθοδος προσδιορισμού της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας μορίων DNA (sequencing) μας έδωσε τα αποτελέσματα για τις μεταλλάξεις που υπήρχαν στα γονίδια. Με βάση τα δεδομένα και εξετάζοντας τα αποτελέσματα εντοπίσαμε την ύπαρξη μετάλλαξης σε ένα δείγμα από τα 16 που χρησιμοποιήθηκαν. Μετάλλαξη παρουσιάστηκε στο δείγμα Δ9 στη θέση 12s rRna , **G1598A** όπου η γουανίνη (G) μετατράπηκε σε αδενίνη (A).

ABSTRACT

Diabetes mellitus is a disease that affected a large proportion of the population. It is a disease where the percentages ill grow rapidly. For this reason, many studies done to determine the causes giving rise to it, be they lifestyle of modern man, whether it is a matter of genes.

In the present study used 16 samples ($\Delta 1$, $\Delta 2$, $\Delta 3$, $\Delta 4$, $\Delta 5$, $\Delta 6$, $\Delta 7$, $\Delta 8$, $\Delta 9$, $\Delta 10$, $\Delta 11$, $\Delta 12$, $\Delta 13$, $\Delta 14$, $\Delta 15$, $\Delta 16$) of patients with diabetes who examined the mitochondrial t RNA^{VAL}. Originally isolated the total DNA samples. Then we apply method propagation of DNA sequencing by the method (PCR). Then we examined the quantitative and qualitative results obtained by PCR using the electrophoresis of the samples in agarose gel. Through analysis of polymorphism monoclonal configuration (SSCP) achieved denaturation of single-stranded so that we can study the mutations in the gene. The method for determining the nucleotide sequence of molecules DNA (sequencing) gave the results for the mutations were in genes. Based on the data and examining the results we found that there was a polymorphism in a sample of 16 used.

Polymorphism in the sample D9, presented to the position 12s r Rna, **G1598A** where guanine converted into adenine.

1. ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΟ

1.1 ΔΟΜΗ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΟΥ

Τα μιτοχόνδρια (μίτος + χόνδρος) είναι ωσειδή οργανίδια που βρίσκονται σε όλα τα ευκαρυωτικά κύτταρα και χρησιμοποιούνται για το μεταβολισμό των βιολογικών μακρομορίων που προσλαμβάνουν οι οργανισμοί με τις τροφές. Ανακαλύφθηκαν το 1949 από τον *Albert Lehninger* ο οποίος αποκάλυψε το ρόλο τους στη κυτταρική αναπνοή ενώ το 1952 μέσω πειραμάτων ηλεκτρονικής μικροσκοπίας από τον *George Palade* έγινε γνωστή και η δομή τους. Κάθε κύτταρο διαθέτει 2-100 μιτοχόνδρια, τα οποία παρουσιάζουν δύο συστήματα μεμβρανών. Λόγω της διπλής αυτής μεμβρανικής οργάνωσης, το μιτοχόνδριο χωρίζεται σε πέντε διακριτά μέρη. Την εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη, την εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη, τον διαμεμβρανικό χώρο, τις ακρολοφίες και την μήτρα. Η εξωτερική τους μεμβράνη περιβάλλει ολόκληρο το μιτοχόνδριο και περιλαμβάνει μεγάλο αριθμό πρωτεϊνών. Περιέχει συγκεκριμένες πρωτεΐνες, τις πορίνες που επιτρέπουν την διέλευση ακόμα και μεγάλων μορίων.

Η εσωτερική μεμβράνη είναι από την φύση της αδιαπέραστη από όλα τα ιόντα και τα πολικά μόρια, που απαιτούν ειδικούς μεμβρανικούς μεταφορείς για να εισέλθουν στη μήτρα. Περιέχει μεγάλο αριθμό πρωτεϊνών που εκτελούν διαφορετικές λειτουργίες. Πρωτεΐνες που διεκπεραιώνουν τις οξειδωτικές αντιδράσεις της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων, τη σύνθεση του ATP που παράγει ATP στο στρώμα και μεταφορικές πρωτεΐνες που επιτρέπουν τη δίοδο μεταβολιτών προς και από το στρώμα. Διαμέσου αυτής της μεμβράνης σχηματίζεται μια βαθμίδωση H⁺ που ενεργοποιεί τη συνθάση του ATP. Η αυξημένη παραγωγή ATP, ειδικά σε κύτταρα με μεγαλύτερες απαιτήσεις ,όπως τα μυϊκά κύτταρα, εξασφαλίζεται από το μεγάλο συνολικό μέγεθος της εσωτερικής μεμβράνης μέσω των πτυχώσεων που παρουσιάζει.

Οι πτυχές της εσωτερικής μεμβράνης ονομάζονται **ακρολοφίες** και αυξάνουν σημαντικά την συνολική επιφάνεια της.

Οι **ακρολοφίες** αποτελούν ειδικές αναδιπλώσεις της εσωτερικής μεμβράνης που επηρεάζουν τη χημειοσμωτική λειτουργία της καθώς και ενισχύουν την ικανότητα της να παράγει ATP.

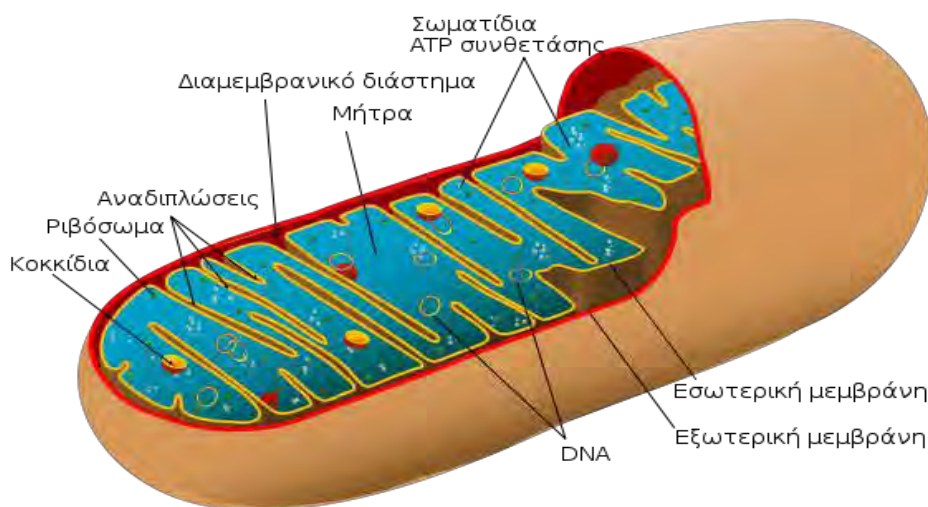
Ο διαμεμβρανικός χώρος αποτελεί τον χώρο μεταξύ εσωτερικής και της εξωτερικής μεμβράνης .

Η μήτρα ή στρώμα είναι ο χώρος που περιβάλλεται από την εσωτερική μεμβράνη και περιέχει εκατοντάδες ένζυμα, ριβοσώματα, tRNA και αντίγραφα του μιτοχονδριακού γονιδιώματος.

1.1.2 ΣΥΣΤΗΜΑ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΟΥ

Τα μιτοχόνδρια είναι ημιαυτόνομα οργανίδια και διαθέτουν δικό τους DNA, έτσι ώστε να μπορούν να αναπαράγονται χωρίς να χρειάζεται να διαιρεθεί το κύτταρο. Το DNA των μιτοχονδρίων είναι δίκλωνο κυκλικό. Κάθε μιτοχόνδριο περιέχει 2 έως 10 αντίγραφα του κυκλικού αυτού μορίου DNA.

Επίσης υπάρχει ένα ολοκληρωμένο σύστημα έκφρασης των γονιδίων που περιλαμβάνει ριβοσώματα και άλλες πρωτεΐνες που είναι απαραίτητες για αυτήν την λειτουργία. Η είσοδος των πρωτεϊνών στο μιτοχόνδριο πραγματοποιείται με τη βοήθεια ενός ειδικού σήματος και της κυτοσολικής συνοδού HSC70, η οποία αποτρέπει το πρώιμο δίπλωμα της πρωτεΐνης. Στη συνέχεια προσδένεται σε ένα πρωτεϊνικό σύμπλοκο της εξωτερικής μεμβράνης του μιτοχονδρίου (Tom Complex) και έπειτα στο εσωτερικό σύμπλοκο (Tim Complex). Μόλις φτάσει στη μήτρα του μιτοχονδρίου, μια πεπτιδάση αφαιρεί το ειδικό σήμα διαλογής. Εάν όμως η πρωτεΐνη έχει στόχο να αγκυροβολήσει στις βιομεμβράνες του οργανιδίου, θα εμφανιστεί μετά την αποκοπή του σήματος διαλογής, ένα άλλο ειδικό σήμα θέσης.



Εικόνα 1: Δομή μιτοχονδρίου

1.2 ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΚΑΙ ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΟΥ

Τα μιτοχόνδρια συχνά αναφέρονται ως κυτταρικά εργοστάσια παραγωγής ηλεκτρικής ενέργειας επειδή παρέχουν μεγάλη ποσότητα τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP) που είναι απαραίτητη για το κύτταρο ως πηγή χημικής ενέργειας. Υπάρχουν ιστοί που παρουσιάζουν υψηλότερο μεταβολικό ρυθμό επομένως έχουν μεγαλύτερες απαιτήσεις σε ενέργεια, όπως και η καρδιά, οι σκελετικοί μυες και το κεντρικό νευρικό σύστημα. Για το λόγο αυτό τα μιτοχονδριακά νοσήματα χαρακτηρίζονται συχνά από μυοπάθειες και εγκεφαλοπάθειες.

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

A) Ο ΚΥΚΛΟΣ ΤΟΥ ΚΙΤΡΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ

Ο κύκλος του κιτρικού οξέος ανακαλύφθηκε το 1937 από τον *Hans Krebs*, και είναι μια σειρά ενζυμικών διεργασιών με κεντρικό ρόλο στο μεταβολικό καταβολισμό των θρεπτικών ουσιών των τροφών. Λαμβάνει χώρα στη μήτρα του μιτοχονδρίου και αποτελεί τη διαδικασία που ακολουθεί τη γλυκολυτική πορεία. Κάθε μόριο πυροσταφυλικού οξέος που παραγεται από τη γλυκόλυση εισάγεται στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη μέσω ενεργητικής μεταφοράς, οξειδώνεται και αντιδρά με το συνένζυμο A, σχηματίζοντας ακετυλοσυνένζυμο A και NADH. Το ακετυλοσυνένζυμο A είναι το πρωτεύον υπόστρωμα του κύκλου του κιτρικού οξέος ή κύκλου του Krebs. Όλα τα ένζυμα του κύκλου του κιτρικού οξέος εντοπίζονται στη μήτρα του μιτοχονδρίου, εκτός από το ένζυμο ηλεκτρική αφυδρογονάση που εντοπίζεται στην εσωτερική μεμβράνη ως μέρος του συμπλόκου II. Καθ'όλη την

διεργασία, το ακετυλοσυνένζυμο Α μετατρέπεται σε διοξείδιο του άνθρακα (δύο μόρια CO₂), παράγονται αναγωγικοί παράγοντες (τρία μόρια NADH και ένα μόριο FADH₂), που αποτελούν πηγή ηλεκτρονίων για την αναπνευστική αλυσίδα και ένα μόριο GTP (το οποίο αμέσως μετατρέπεται σε ATP).

B) Η ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΗ ΑΛΥΣΙΔΑ

Η αναγωγική ενέργεια από τα NADH και FADH₂ μεταφέρεται στο μόριο του οξυγόνου (O₂) 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 δια μέσου του ενζυμικού συμπλόκου της ATP συνθάσης και το ενεργειακό δυναμικό τους χρησιμοποιείται για τη συνθάση ATP από ADP και ανόργανο φωσφορικό άλας (Pi). Η διαδικασία αυτή ονομάζεται χημειόσμωση και παρατηρήθηκε πρώτα από τον *Peter Mitchell* που τιμήθηκε το 1978 με το βραβείο Nobel. Παρ'όλη την αποτελεσματικότητα της αναπνευστικής αλυσίδας, ένα μικρό ποσοστό των ηλεκτρονίων δύναται να ανάγει το οξυγόνο και να σχηματίσει οξειδωτικές ρίζες όπως το H₂O₂. Το γεγονός αυτό μπορεί να οδηγήσει σε οξειδωτικό stress τα μιτοχόνδρια και κατ'έπекταση στη μείωση της μιτοχονδριακής λειτουργίας, κάτι που σχετίζεται με τη διαδικασία της γήρανσης (*Cortopassi, 1999, Huang et al., 2004*).

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

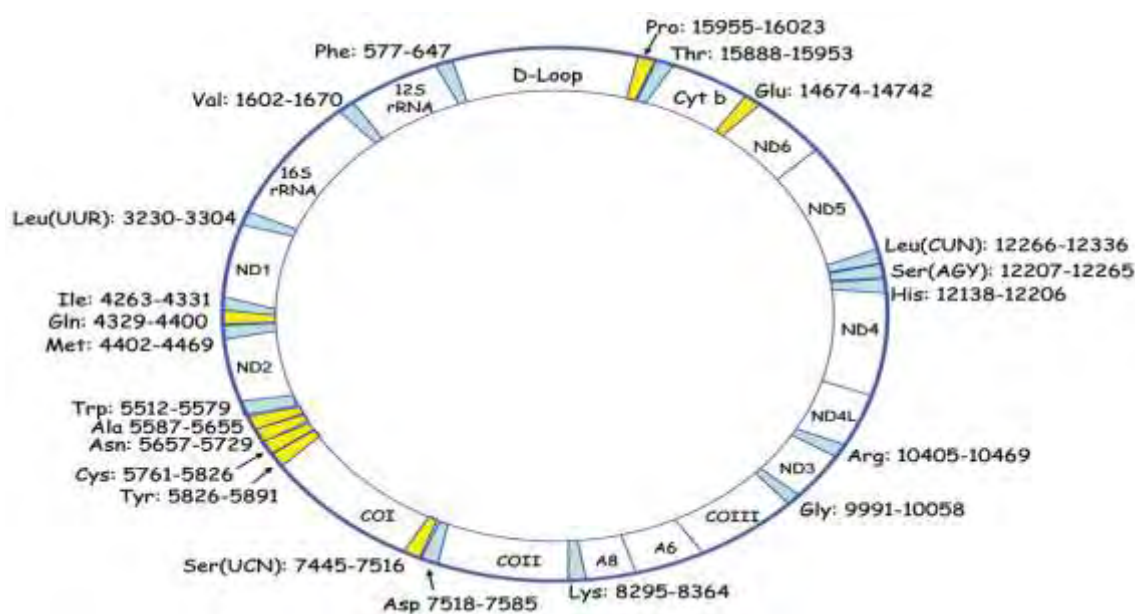
1.3 ΚΑΤΑΓΩΓΗ ΤΟΥ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΟΥ

Βασίζομενη στο γεγονός ότι τα μιτοχόνδρια παρουσιάζουν πολλές ομοιότητες με τους προκαρυωτικούς οργανισμούς όπως για παράδειγμα ότι περιέχουν μόνο ριβοσώματα και DNA και αναπαράγονται αγενώς, η *Lynn Margulis* το 1981 οδηγήθηκε στην ανάπτυξη της ενδοσυμβιωτικής θεωρίας. Σύμφωνα με τη θεωρία αυτή τα μιτοχόνδρια προέρχονται από μία κατηγορία ειδικών βακτηρίων, τα Πρωτεοβακτήρια. Τα μιτοχόνδρια προέρχονται από προκαρυωτικούς οργανισμούς, οργανισμούς δηλαδή που δε διαθέτουν πυρήνα οι οποίοι ενσωματώθηκαν σε ευκαρυωτικά κύτταρα, συμβιώνοντας με αυτά. Το DNA των μιτοχονδρίων παρουσιάζει σημαντικές ομοιότητες με το DNA σύγχρονων βακτηρίων, των απογόνων των αρχέγονων προκαρυωτικών οργανισμών. Επίσης ο τρόπος πολλαπλασιασμού τους και το γεγονός ότι περιβάλλονται από διπλή μεμβράνη και συμμετέχουν ελάχιστα στην διακίνηση υλικών στο εσωτερικό του κυττάρου θυμίζει την διαίρεση των βακτηρίων (*Βασικές αρχές κυτταρικής βιολογίας του Alberts*).

1.4 ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑ (DNA)

Το ανθρώπινο μιτοχονδριακό γονιδίωμα είναι ένα κυκλικό δίκλωνο (κλώνος H 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 2Rrna (*Anderson et al., 1981*). Ειδικότερα, ο κλώνος H κωδικοποιεί 28 γονίδια και ο κλώνος L 9, εκ των οποίων τα 8 κωδικοποιούν μιτοχονδριακά μόρια tRNA. Ολόκληρο το μόριο συντονίζεται από μια ρυθμιστική περιοχή, η οποία περιέχει σημεία έναρξης τόσο για τον κλώνο H όσο και για τον κλώνο L. Κάθε μιτοχόνδριο περιλαμβάνει περίπου 2 έως 10 αντίγραφα του γονιδιώματος του. Το μιτοχονδριακό γονιδίωμα έχει διαφορετική προέλευση από το πυρηνικό και η κληρονομία του είναι αποκλειστικά μητρική (συνεπώς παραμένει अपαράλλακτο από γονέα σε απόγονο) εν αντιθέση με το δεύτερο που κληρονομείται και από τους δύο γονείς και υπόκειται στη διαδικασία του ανασυνδυασμού.

Η μητρική κληρονομία οφείλεται στο ότι κατά τη γονιμοποίηση τα μιτοχόνδρια του σπερματοζωαρίου, που στο συνολό τους εντοπίζονται στην ουρά του, δεν εισέρχονται στο ωάριο καθώς εκείνη αποκόπτεται κατά την σύντηξη του σπερματοζωαρίου με το ωάριο. Το ολικό μιτοχονδριακό DNA αντιστοιχεί ποσοτικά στο 0,5% του DNA που περιέχει ο πυρήνας ενός σωματικού κυττάρου. Οι 13 μιτοχονδριακές πρωτεΐνες μαζί με περίπου 60 πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από το πυρηνικό DNA σχηματίζουν 5 ενζυμικά συμπλέγματα που είναι απαραίτητα για την οξειδωτική φωσφορυλίωση και την παραγωγή ενέργειας με τη μορφή ATP. Το γονιδίωμα του ανθρώπινου μιτοχονδρίου αλληλουχήθηκε το 1981 από τον *Fred Sanger* και συναδέλφους του στο Chambridge.



Εικόνα 2: Χάρτης του ανθρώπινου μιτοχονδριακού γονιδιώματος. Το mtDNA περιλαμβάνει 37 γονίδια που κωδικοποιούν 13 πρωτεΐνες, 2 rRNAs και 22 tRNAs. Τα tRNAs είναι διάσπαρτα κατανεμημένα ως μονάδες ή σχηματίζοντας ομάδες, μεταξύ των άλλων RNAs.

2. ΜΕΤΑΛΛΑΓΕΣ ΤΟΥ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟΥ DNA

Οι μιτοχονδριακές μεταλλάξεις συλλέγονται στη βάση δεδομένων του μιτοχονδριακού DNA του ανθρώπου (<http://www.mitomap.org/>). Γενικότερα, οι μεταλλάξεις αυτές μπορούν να διαχωριστούν σε μεγάλες ανακατατάξεις και σε μεταλλάξεις που περιορίζονται σε μικρό αριθμό ζευγών βάσεων. Από τις τελευταίες, η πλειοψηφία αφορά σε σημειακές μεταλλάξεις. Οι περισσότερες ελλείψεις, διπλασιασμοί, εισαγωγές, αναστροφές ή άλλες σύνθετες ανακατατάξεις, περιλαμβάνουν αρκετά γονίδια, αφού τα μιτοχονδριακά γονίδια βρίσκονται πολύ κοντά το ένα με το άλλο (37 γονίδια σε 16,5 kb).

Οι σημειακές μεταλλάξεις του μιτοχονδριακού DNA μπορούν να εμφανίζονται σε όλα τα γονίδια και οι συνέπειες τους μπορεί να εξαρτώνται από τις αλλαγές που επιφέρουν στα προϊόντα των γονιδίων αυτών, από το εύρος των ιστών που φέρουν τις μεταλλάξεις, τη μεταβολή της παραγωγής ATP στους ιστούς αυτούς, άλλους πολυμορφισμούς του μιτοχονδριακού DNA, παράγοντες που κωδικοποιούνται από τον πυρήνα και αλληλεπιδρούν με τα προϊόντα των γονιδίων του μιτοχονδριακού DNA καθώς επίσης και από περιβαλλοντικούς παράγοντες.

Διπλασιασμοί στο μιτοχονδριακό DNA έχουν περιγραφεί, όμως δε θεωρούνται ότι είναι παθογενείς και μπορούν να προκαλέσουν παθολογικό φαινότυπο μόνο έμμεσα. Παλαιότερα είχε προταθεί πως το μιτοχονδριακό DNA δεν έχει μηχανισμούς επιδιόρθωσης, όμως πρόσφατες μελέτες έδειξαν πως υπάρχει κάποια επιδιορθωτική δραστηριότητα, μικρότερου όμως εύρους συγκρινόμενη με το πυρηνικό DNA.

2.1 Η ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΩΝ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΩΝ ΝΟΣΗΜΑΤΩΝ

Ο τύπος της κληρονομικότητας των μιτοχονδριακών νοσημάτων μπορεί να ποικίλει, αλλά ένα νόσημα που οφείλεται αποκλειστικά σε μεταλλάξεις στο μιτοχονδριακό DNA κληρονομείται πάντα από τη μητέρα (μητρική κληρονομικότητα) και έτσι τα άρρενα τέκνα δεν μεταδίδουν τη νόσο στους απογόνους τους.

Ο πατέρας του πάσχοντος δεν είναι σε κίνδυνο να φέρει την παθολογική μετάλλαξη στο mtDNA, αλλά η μητέρα (συνήθως) έχει τη μιτοχονδριακή μετάλλαξη και είναι δυνατό να εκδηλώνει συμπτώματα της νόσου ή όχι. Ελλείψεις του

μιτοχονδριακού DNA είναι γενικά de novo κι έτσι δεν υπάρχει αυξημένος κίνδυνος για άλλα μέλη της οικογένειας. Αντίστοιχα, σημειακές μεταλλάξεις του μιτοχονδριακού DNA και διπλασιασμοί μπορεί να μεταδίδονται από τη μητρική γραμμή, ενώ μια γυναίκα που φέρει σε ετεροπλασμία μια μετάλλαξη μπορεί να μεταδώσει ένα μεταβλητό ποσό του μεταλλαγμένου mtDNA στους απογόνους της, με αποτέλεσμα τη σημαντική κλινική ετερογένεια μεταξύ πασχόντων μέσα στην ίδια οικογένεια.

Η αποκάλυψη της συγκεκριμένης γενετικής βλάβης στα μιτοχονδριακά νοσήματα είναι συχνά δύσκολη. Πολλά άτομα δεν εμπίπτουν σε μια συγκεκριμένη κατηγορία ασθενειών, ενώ η κατάσταση γίνεται ακόμη πιο περίπλοκη από την ασαφή συσχέτιση μεταξύ γονοτύπου και φαινοτύπου. Για παράδειγμα, ασθενείς με εξωτερική οφθαλμοπληγία μπορεί να έχουν ίδια κλινικά συμπτώματα, αλλά μερικοί μπορεί να φέρουν μια έλλειψη του mtDNA, άλλοι μπορεί να φέρουν μια σημειακή μετάλλαξη του mtDNA (π.χ. m.3243A>G), κι άλλοι μπορεί να φέρουν μια αυτοσωματική επικρατή μετάλλαξη σε πυρηνικό γονίδιο, που σχετίζεται με δευτερογενείς ανωμαλίες του mtDNA.

Επιπλέον, η ίδια γενετική μετάλλαξη μπορεί να προκαλέσει μια σειρά από πολύ διαφορετικά κλινικά σύνδρομα (π.χ. η σημειακή μετάλλαξη m.3243A>G, μπορεί να προκαλέσει CPEO, σακχαρώδη διαβήτη και κώφωση, ή μια σοβαρή εγκεφαλοπάθεια με εγκεφαλικά επεισόδια και επιληψία) (*Βασικές αρχές κυτταρικής βιολογίας του Alberts*).

2.2 ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΚΕΣ ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ ΚΑΙ ΝΟΣΗΜΑΤΑ

Το ενδιαφέρον που εμπερικλείει μέσα του το μιτοχονδριακό DNA είναι αναμφίβολα μεγάλο. Και τούτο γιατί στη δομή αυτού του μορίου βρίσκονται οι εξηγήσεις πολλών βιολογικών φαινομένων, τα οποία δεν προσεγγίζονταν με την τρέχουσα γνώση.

Ο όρος ‘μιτοχονδριακά νοσήματα’ αναφέρεται σε μια μεγάλη και ετερογενή ομάδα γενετικών νοσημάτων, τα οποία προκαλούν ανωμαλίες της μιτοχονδριακής αναπνευστικής αλυσίδας. Ένα μιτοχονδριακό νόσημα μπορεί να είναι αποτέλεσμα

μεταλλάξεων του πυρηνικού DNA (γονίδια που βρίσκονται στα ανθρώπινα χρωμοσώματα) ή μεταλλάξεων γονιδίων του μιτοχονδριακού DNA (DNA που βρίσκεται στα μιτοχόνδρια). Η μεγάλη ετερογένεια τους οφείλεται εν μέρει στη βιοχημική πολυπλοκότητα του μηχανισμού της μιτοχονδριακής αναπνοής, αλλά και στο γεγονός ότι δύο γονιδιώματα, το μιτοχονδριακό και το πυρηνικό, κωδικοποιούν τις υπομονάδες πρωτεΐνης των αναπνευστικών συμπλοκών. Γενικά, όργανα και ιστοί με την υψηλότερη ενεργειακή απαίτηση, όπως ο εγκέφαλος και οι μύες, είναι πιο πιθανό να επηρεαστούν και γ'αυτό τα νοσήματα αυτά αναφέρονται κι ως "μιτοχονδριακές εγκεφαλομυοπάθειες". Η ομάδα των παθήσεων, που σχετίζονται με την οξειδωτική φωσφορυλίωση (Oxidative phosphorylation - OXPHOS), είναι τα σχετικά συχνότερα, με χαρακτηριστικά κλινικά χαρακτηριστικά αλλά μεγάλη γενετική ετερογένεια. Οι μιτοχονδριακές παθήσεις γενικά αποτελούν τη συνηθέστερη αιτία νευρομεταβολικών νοσημάτων κατά την παιδική ηλικία, με συχνότητα εμφάνισης 1/10.000 γεννήσεις, κι η κλινική τους πορεία είναι συνήθως προοδευτική.

Η ετερογένεια στην κατανομή του μιτοχονδριακού DNA (ετεροπλάσμία) και η ιστο-ειδική έκφραση πολλών γονιδίων του πυρηνικού DNA αποτελούν τις κύριες αιτίες για τη μεγάλη ποικιλία των φαινοτυπικών χαρακτηριστικών, που εκδηλώνουν οι ασθενείς. Στην πλειοψηφία των περιπτώσεων η διάγνωση είναι δύσκολη αν και ορισμένες ασθένειες (π.χ. κληρονομική οπτική νευροπάθεια Leber) διαγνώσκονται πιο εύκολα. Επιπλέον, ο φαινότυπος των μιτοχονδριακών νοσημάτων ποικίλει, αφού πολλά προσβάλλουν τις λειτουργίες πολλών οργάνων (π.χ. ακοή, καρδιά, κλπ) ή ένα μόνο όργανο (π.χ. τα μάτια). Γενικά, η διάγνωση βασίζεται σε ένα λεπτομερές ιατρικό οικογενειακό ιστορικό και σε γενετικό έλεγχο για συγκεκριμένες μεταλλάξεις του μιτοχονδριακού DNA, που θα επιβεβαιώσει την παρουσία του συγκεκριμένου νοσήματος.

Πάνω από το 50% των παθογόνων mtDNA μεταλλάξεων εμφανίζονται στα tRNA γονίδια. Οι παθογόνες μεταλλάξεις στα γονίδια που κωδικοποιούνται από το μιτοχονδριακό γονιδίωμα οδηγούν στην εμφάνιση νευρομυϊκών διαταραχών, άρα ο παθογενής μηχανισμός περιλαμβάνει μειωμένη παραγωγή ATP (*Maassen et al. 2007*). 21 από τα 22 tRNA γονίδια σχετίζονται με μεταλλάξεις που προκαλούν σοβαρές ασθένειες.

Πίνακας 1: Παθογόνες και πολυμορφικές μεταλλάξεις στα tRNA.

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

Ο βαθμός ετεροπλασμίας και η κατανομή των μεταλλαγμένων mtDNAs καθορίζουν τον κλινικό φαινότυπο. Γι' αυτό και οι αντίστοιχες ασθένειες, στις οποίες εκδηλώνονται ανωμαλίες στον εγκέφαλο και το μυϊκό ιστό, μπορούν να εμφανιστούν σε οποιοδήποτε ιστό και οποιαδήποτε χρονική στιγμή. Όταν το ποσοστό των μεταλλαγμένων μιτοχονδρίων υπερβεί ένα συγκεκριμένο όριο, επηρεάζονται αρνητικά οι δραστηριότητες των κυττάρων (Sato et al. 2003). Ο κίνδυνος εμφάνισης μιας ασθένειας σε ένα άτομο εξαρτάται όχι μόνο από την ποσότητα των μεταλλαγμένων mtDNAs στο ζυγωτό, αλλά και από τις αυθόρμητες αλλαγές που μπορούν να συμβούν κατά την κατανομή των μιτοχονδρίων, οι οποίες μπορεί να είναι τυχαίες ή όχι.

Ως τώρα έχουν συσχετιστεί αρκετές σοβαρές ασθένειες με μεταλλάξεις του mtDNA, όπως σκελετικές μυοπάθειες (Del Bo et al. 2003), καρκίνος των ωοθηκών (Liu, V. W. et al. 2001), καρκίνος του θυρεοειδούς (Maximo et al. 2002) και του παγκρέατος (Jones et al. 2001), καρδιομυοπάθειες, εγκεφαλομυοπάθειες, Parkinson (Ozawa, T. Et al. 1991), οξεία λευχαιμία (Fliss et al. 2000), σύνδρομο MELAS (Kobayashi et al. 1991), μυογλοβινουρία (Chinnery et al. 1997), σύνδρομο MERRF (Mancuso, M et al. 2004), μιτοχονδριοπάθειες (Kleinle S. et al. 1998), κώφωση (Guan et al. 1996), σύνδρομο Leigh (Santorelli et al. 1997), σύνδρομο Rett (Tang, J. et al. 1997), σύνδρομο Kearns Sayre (Seneca, S. et al. 2001), σύνδρομο LHON (Garcia-Lozano et al. 2000), υπέρταση (Li, R. et al. 2009), εκφύλιση της ωχράς κηλίδας (Sacconi, S. et al. 2002), Alzheimer (Coskun, P. E. et al. 2004). Μεταξύ αυτών, έχουν συσχετιστεί μεταλλάξεις και με τον σακχαρώδη διαβήτη (Gerbitz et al. 1995, Whittaker, R. G. 2007).

Σκέψεις ενοχοποίησης του μεταλλαγμένου μιτοχονδριακού DNA υπάρχουν για τον σακχαρώδη διαβήτη τύπου II, καθώς παρουσιάζει οικογενειακό ιστορικό και η μητέρα, διαμέσου της οποίας γίνεται η μιτοχονδριακή κληρονομικότητα, είναι συνήθως ο άρρωστος γονιός. Η ασθένεια αυτή μπορεί να προκληθεί από αναδιατάξεις του DNA ή από σημειακές μεταλλάξεις.

2.3 Η ΝΟΣΟΣ ΣΑΚΧΑΡΩΔΗΣ ΔΙΑΒΗΤΗΣ

Η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία παίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεση ποικίλων ασθενειών, οι οποίες σχετίζονται με δυσλειτουργίες του κυτταρικού μεταβολισμού και των μονοπατιών επιβίωσης και απόπτωσης. Τέτοιες ασθένειες είναι οι νευροεκφυλιστικές, διάφορες περιπτώσεις καρκίνου και ο διαβήτης. Οι δράσεις των κυτοκινών και το στρες προκαλούν απόπτωση των κυττάρων και στην περίπτωση του διαβήτη, απόπτωση των β-κυττάρων του παγκρέατος. Επιπλέον διαταράσσεται η φυσιολογική παραγωγή και έκκριση ινσουλίνης (Szabadkai *et al.* 2009). Η σωστή λειτουργία των μιτοχονδρίων είναι απαραίτητη για τη φυσιολογική παραγωγή και έκκριση ινσουλίνης από τα παγκρεατικά κύτταρα. Βλάβες στο mtDNA που κληρονομούνται μητρικά και διαταράσσουν τη φυσιολογική μιτοχονδριακή λειτουργία, οδηγούν στην εμφάνιση διαβήτη (Lowell *et al.* 2005).

Ο σακχαρώδης διαβήτης είναι μια χρόνια νόσος που χαρακτηρίζεται από διαταραχή του μεταβολισμού της γλυκόζης και των υπόλοιπων πηγών ενέργειας, καθώς και από την εμφάνιση αγγειακών και νευρολογικών επιπλοκών και οφείλεται στην έλλειψη, ή ανεπάρκεια ινσουλίνης. Η ινσουλίνη είναι μια ορμόνη ζωτικής σημασίας που εκκρίνεται από τα β-κύτταρα του παγκρέατος και δρα σε υποδοχείς της στο ήπαρ, όπου επάγει την πρόσληψη γλυκόζης. Η διατήρηση των επιπέδων της γλυκόζης απαιτεί τη δράση ενός ενδογενούς ανιχνευτή γλυκόζης στα παγκρεατικά β-κύτταρα, ο οποίος πυροδοτεί την αυξημένη έκκριση ινσουλίνης, όταν χρειάζεται.

Η διατήρηση της ομοιόστασης της γλυκόζης στον ανθρώπινο οργανισμό αποτελεί ισορροπία ανάμεσα στην εμφάνιση και την απομάκρυνση της γλυκόζης. Η εμφάνιση της γλυκόζης στην κυκλοφορία καθορίζεται από την πρόσληψη τροφής, τη φύση των θρεπτικών συστατικών, τις παραμέτρους πέψης και την παραγωγή γλυκόζης από το ήπαρ. Όταν στο ανθρώπινο σώμα ανιχνεύονται σημαντικές αποκλίσεις από τη φυσιολογικά επίπεδα συγκέντρωσης της γλυκόζης, ρυθμίζεται η έκκριση ινσουλίνης. Βλάβες στη διαδικασία παγκρεατικής έκκρισης ινσουλίνης και στη δράση της ινσουλίνης στο ήπαρ και τους περιφερικούς ιστούς, οδηγούν στην εμφάνιση διαβήτη. Τα ηπατικά κύτταρα διαθέτουν υποδοχέα ινσουλίνης.

Ο διαβήτης ανήκει σε μια κατηγορία διαταραχών, στις οποίες ενέχονται διαφορετικοί παθογενετικοί μηχανισμοί, με κοινό παρονομαστή την χρόνια υπεργλυκαιμία (Maassen *et al.*, 2004). Η έλλειψη ινσουλίνης έχει βασικό ρόλο στις μεταβολικές διαταραχές που σχετίζονται με το διαβήτη και η υπεργλυκαιμία με τη

σειρά της, έχει βασικό ρόλο στην εμφάνιση των επιπλοκών της νόσου. Ο σακχαρώδης διαβήτης σχετίζεται με βλάβες στα μάτια, στα νεφρά, στα αιμοφόρα αγγεία, στο κεντρικό νευρικό σύστημα και στην ικανότητα μάθησης και μνήμης. Επιπλέον, στους διαβητικούς παράγονται ελεύθερες ρίζες, οι οποίες προκαλούν σημαντική βλάβη στο DNA των κυττάρων τους.

2.3.1 ΣΑΚΧΑΡΩΔΗΣ ΔΙΑΒΗΤΗΣ ΤΥΠΟΥ I

Ο διαβήτης τύπου I αντιστοιχεί στο 5-10% των διαβητικών ασθενών. Η υπεργλυκαιμία είναι χαρακτηριστικό στοιχείο του διαβήτη τύπου I και η εμφάνισή της οφείλεται στην αυτοάνοση καταστροφή που υφίστανται τα παγκρεατικά β-κύτταρα.

Οι ασθενείς με τη διαταραχή αυτή χαρακτηρίζονται από πλήρη έλλειψη ινσουλίνης και υφίστανται ινσουλινοθεραπεία εφ' όρου ζωής αμέσως μετά τη διάγνωση της ασθένειας. Ο διαβήτης τύπου I αποκαλείται και διαβήτης νεανικού τύπου, οφείλεται σε διαταραχή του ανοσολογικού συστήματος και μπορεί να εκδηλωθεί σε οποιαδήποτε ηλικία, αλλά παρουσιάζεται κυρίως σε παιδιά και νεαρούς ενήλικες. Συνήθως, είναι σοβαρότερος από το διαβήτη τύπου II.

2.3.2 ΣΑΚΧΑΡΩΔΗΣ ΔΙΑΒΗΤΗΣ ΤΥΠΟΥ II

Ο διαβήτης τύπου II είναι η συχνότερη και πιο ετερογενής μορφή της νόσου και αντιστοιχεί στο 80-95% του διαβητικού πληθυσμού. Οι ασθενείς έχουν μια ελαττωμένη ενδογενή ικανότητα έκκρισης ινσουλίνης και δεν εξαρτώνται από την ινσουλίνη για την άμεση επιβίωση. Παρ' όλα αυτά, μπορεί να χρειάζονται ινσουλινοθεραπεία για να ελέγξουν την υπεργλυκαιμία. Ο διαβήτης τύπου II αναπτύσσεται συνήθως αργά στην ενηλικίωση και οφείλεται σε ποικίλους περιβαλλοντικούς και γενετικούς παράγοντες (*Cormio et al. 2009*). Η ανθεκτικότητα στην ινσουλίνη αρχίζει να αναπτύσσεται 10-20 χρόνια πριν την έναρξη της νόσου. Η εξέλιξη του είναι προοδευτική και μπορεί μερικές φορές να αντιμετωπιστεί με τη διατροφή και την άσκηση.

Παρατηρείται απόπτωση των β-κυττάρων του παγκρέατος, για την οποία κύριο ρόλο παίζουν τα μιτοχόνδρια, με την ενεργοποίηση της κασπάσης 3 και την εξαγωγή του κυτοχρώματος C. Ο διαβήτης τύπου II χαρακτηριστικά εμφανίζεται μετά την ηλικία των 40 ετών και είναι πολύ πιο συχνός σε παχύσαρκα άτομα με έναν ή δύο διαβητικούς γονείς. Αποτελεί κύρια αιτία τύφλωσης, νεφροπάθειας και χάσιμου σωματικού άκρου.

2.3.2 ΑΛΛΟΙ ΕΙΔΙΚΟΙ ΤΥΠΟΙ ΔΙΑΒΗΤΗ

Πέρα από τις δύο βασικές κατηγορίες διαβήτη (τύπου I και II), υπάρχουν και διάφορα σύνδρομα με διαβήτη, λόγω κάποιας ειδικής νόσου, λήψης φαρμάκου ή άλλης κατάστασης. Στις περισσότερες περιπτώσεις ο σακχαρώδης διαβήτης μπορεί να ταξινομηθεί με κλινικά κριτήρια. Μερικοί ασθενείς μπορούν να εμφανίσουν χαρακτηριστικά κοινά τόσο του τύπου I, όσο και του τύπου II διαβήτη. Είναι συνήθως μη παχύσαρκα άτομα και έχουν μειωμένη έκκριση ινσουλίνης. Πολλοί αρχικά ανταποκρίνονται στα αντιδιαβητικά φάρμακα, αλλά με το χρόνο απαιτούν ινσουλίνη.

2.3.4 ΔΙΑΒΗΤΗΣ ΤΗΣ ΚΥΗΣΕΩΣ

Ο σακχαρώδης διαβήτης της κύησης είναι μια πάθηση που αναπτύσσεται κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης όταν η μητέρα έχει υπερβολικά μεγάλα ποσοστά σακχάρου στο αίμα της. Συνήθως θεραπεύεται από μόνος του αφότου γεννηθεί το μωρό, αντίθετα από άλλους τύπους διαβήτη που δεν θεραπεύονται ποτέ από μόνοι τους (*Lowell et al. 2005*).

Ο διαβήτης της κύησης εμφανίζεται περίπου στο 2% των κυήσεων και συνήθως εκδηλώνεται στο δεύτερο ή στο τρίτο τρίμηνο κατά το χρονικό διάστημα όπου οι ανταγωνιστικές της ινσουλίνης ορμόνες που σχετίζονται με την κύηση, φτάσουν στο υψηλότερο σημείο τους. Μετά τον τοκετό, η ανοχή στη γλυκόζη συνήθως επιστρέφει στα φυσιολογικά επίπεδα. Εντούτοις, μέσα σε 5-10 χρόνια, το 30-40% αναπτύσσουν διαβήτη τύπου II. Κάποιες φορές η κύηση μπορεί να επιταχύνει την εμφάνιση του διαβήτη τύπου I.

2.4 ΕΡΕΥΝΑ ΚΑΙ ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΕΣ ΓΙΑ ΤΗ ΝΟΣΟ

Πάνω από 171 εκατομμύρια άνθρωποι πάσχουν από τον σακχαρώδη διαβήτη τύπου II σε όλον τον κόσμο και αναμένεται ο αριθμός να διπλασιαστεί ως το 2030, ενώ την τελευταία δεκαετία η αύξηση ήταν 25%. Ανάλογα ισχύουν και στη χώρα μας. Το κόστος αντιμετώπισης της εν λόγω ασθένειας, που είναι έβδομη κατά σειρά αιτία θανάτου, εκτιμάται ότι προσεγγίζει το 13%-14% του συνολικού ποσού για την υγεία, με διαγνωσμένους διαβητικούς περίπου 8%.

Στον τύπο I τα β κύτταρα του παγκρέατος δεν παράγουν (αρκετή) ινσουλίνη και χωρίς εξωγενή χορήγησή της επέρχεται ο θάνατος. Στον τύπο αυτόν αναπτύσσονται αντισώματα και αυτοανοσία στην παγκρεατική ινσουλίνη. Γενετικές μελέτες διδύμων έδειξαν ότι η σύμπτωση να προκληθεί ασθένεια και στα δύο είναι ελάχιστη, γι' αυτό ο κληρονομικός παράγοντας θεωρείται μικρός. Η πάθηση αποδίδεται σε περιβαλλοντικούς παράγοντες, πιθανόν σε αντιγόνα ιών.

Ο τύπος II είναι περίπου 10 φορές πιο συχνός από τον τύπο I, π.χ., στην Αμερική και αντιπροσωπεύει γενικά το 90%-95% των διαβητικών. Η πάθηση αντανακλά την αδυναμία μεταβολισμού των υδατανθράκων και αν δεν ελεγχθεί μπορεί να προκαλέσει πολλές οργανικές βλάβες, όπως τύφλωση, νεφρική ανεπάρκεια, ακρωτηριασμούς κτλ. Η ελαττωματική αντίδραση της ινσουλίνης με τα όργανα-στόχους (μυς, συκώτι, λιπώδης ιστός) και η συνακόλουθη ανεπαρκής απορρόφησή της, γνωστή και ως αντίσταση στην ινσουλίνη, οδηγεί τον οργανισμό σε υψηλότερες απαιτήσεις ινσουλίνης, με τα προαναφερθέντα κύτταρα να πιέζονται για τη σύνθεση μεγαλύτερης ποσότητας λόγω της εξασθενημένης ανοχής του οργανισμού στη γλυκόζη και τελικά την κατάρρευσή τους.

Ο τύπος II δεν υπήρχε ουσιαστικά πριν από 100 χρόνια· είναι προϊόν του σύγχρονου πολιτισμού μας, περιβαλλοντικής πρόκλησης δηλαδή συνδυαστικά με προϋπάρχουσα γενετική προδιάθεση που ποικίλλει μεταξύ εθνικών ομάδων - με τους ιθαγενείς Αμερικανούς και Ισπανούς, λ.χ., να δείχνουν σαφή προδιάθεση και τους Καυκάσιους, Μελανήσιους και Εσκιμώους μικρότερη. Τα υψηλά ποσοστά διαβητικών ανά τον κόσμο και τα συνακόλουθα κόστη έχουν φέρει την αναγκαιότητα της γενετικής διαλεύκανσης της ασθένειας και των περιβαλλοντικών παραμέτρων με τις οποίες φαίνεται να συνδέεται (διατροφή, παχυσαρκία, ελλιπής σωματική άσκηση, στρες) σε πρώτη γραμμή.

Στο γενετικό επίπεδο λίγα ήταν γνωστά πριν από ελάχιστα χρόνια. Οι πρώτες μελέτες κλασικής προσέγγισης βασίζονταν στην αξιοποίηση γενεαλογικών δέντρων. Τα αρχικά συμπεράσματα οδήγησαν στον γενετικό προσδιορισμό της ασθένειας ως μεντελικού αυτοσωματικού χαρακτήρα, μη συνδεδεμένου δηλαδή με το φύλο. Ωστόσο τα πράγματα δεν είναι τόσο απλά καθώς ο περιβαλλοντικός επηρεασμός και το γενετικό υπόβαθρο έχουν σημαντικό ρόλο. Γι' αυτό οι προσπάθειες πέρασαν στη μελέτη αδελφών και διδύμων στα οποία συνεκδηλώνεται σε ποσοστό 80%-90%, σε μελέτες σύνδεσης με ανιχνεύσιμους μοριακούς μάρτυρες και τελευταία σε πιο συγκεκριμένες γενετικές μοριακές αναλύσεις.

Στο πλαίσιο αυτό έχουν ενοχοποιηθεί πολλά υποψήφια γονίδια πρόκλησης διαβήτη II, κατάσταση που υποδηλώνει ότι η ασθένεια είναι πολυπαραγοντική συμβάλλουν δηλαδή πολλά γονίδια, χωρίς να έχει αποκαλυφθεί κάποιο κυρίαρχο γονίδιο. Ανάλυση 30 γονιδιωμάτων ενοχοποιεί, λ.χ., πάνω από δύο δεκάδες γονίδια, ευρισκόμενα σε διάφορα χρωμοσώματα (1, 3, 8, 12, 17, 20, ενώ αν συνυπολογιστούν και γονίδια που συνδέουν την παχυσαρκία με τον διαβήτη II, ο αριθμός αυξάνεται και άλλο. Τον Σεπτέμβριο του 2005 δημοσιεύθηκαν πιο ενδιαφέροντα στοιχεία που συγκεκριμενοποιούν ως αιτιατό παράγοντα τη δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων, οργανιδίων του κυττάρου τα οποία παράγουν ενέργεια: η σοβαρή απόκλιση στην παραγωγή ενέργειας φαίνεται να είναι το κλειδί του προβλήματος που οδηγεί στο σύνδρομο της αντίστασης στην ινσουλίνη και συνακόλουθα στον διαβήτη II. Φυσιολογικά μιτοχόνδρια αντιδρούν στην ινσουλίνη και αυξάνουν τη σύνθεση ενεργειακών μορίων (ATP) κατά 90% και μόνο κατά 5% σε απογόνους διαβητικών με αντίσταση στην ινσουλίνη. Η αρχική μιτοχονδριακή λοιπόν δυσλειτουργία φαίνεται να είναι ένα σήμα για όσους θα εκδηλώσουν αργότερα διαβήτη II.

Πιο εξειδικευμένη προσέγγιση του προβλήματος, δημοσιευμένη τον Αύγουστο του 2005 στο περιοδικό «Nature Genetics» από ερευνητές του Ινστιτούτου Pasteur στη Γαλλία σε συνεργασία με Αμερικανούς, ανέδειξε τη σημασία της παραλλαγής μιας κοινής πρωτεΐνης που φαίνεται να παίζει πρωταρχικό ρόλο στον διαβήτη II. Χαρακτηριστικά του συνδρόμου αντίστασης στην ινσουλίνη που επηρεάζει 50 εκατομμύρια Αμερικανούς και άλλους τόσους Ευρωπαίους, μορφοποιώντας το λεγόμενο μεταβολικό σύνδρομο που συνδέεται με τη στεφανιαία νόσο, την υψηλή πίεση, την υψηλή χοληστερόλη και υψηλά τριγλυκερίδια - από αυτό πάσχει ένας στους τέσσερις Έλληνες και εκτιμάται ότι το 2030 η αναλογία θα είναι 1 προς 2.

Τέτοιες βασικές ερευνητικές προσεγγίσεις είναι αναμφίβολα πολύ σημαντικές καθώς το πρόβλημα του διαβήτη II μεγεθύνεται πολύ γοργά και είναι αναγκαία πιο αποτελεσματικά φάρμακα που θα σταματούν ή θα αναστρέφουν την πορεία της ασθένειας. (κ. Σταμάτης Ν. Αλαχιώτης, Καθηγητής της Γενετικής και Πρύτανης του Πανεπιστημίου Πατρών)

3.ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας είναι να ανιχνεύσουμε την ύπαρξη μεταλλάξεων στο μιτοχονδριακό γονίδιο tRNA^{Val} σε μια ομάδα ασθενών που πάσχουν από διαβήτη. Η έρευνα επικεντρώνεται στο μιτοχονδριακό γονίδιο διότι είναι εξαιρετικά πολυμορφικό μόριο και χρησιμοποιείται ευρύτατα σε φυλογενετικές μελέτες. Τα τελευταία χρόνια η ανίχνευση μεγάλου αριθμού μεταλλάξεων σε μιτοχονδριακά tRNAs και η πιθανή συσχέτιση αυτών των μεταλλάξεων με τις διαταραχές που παρουσιάζονται στον ανθρώπινο οργανισμό έχει οδηγήσει το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας στο μιτοχονδριακό DNA.

Οι φαινοτυπικές εκφράσεις των μιτοχονδριακών μεταλλάξεων περιλαμβάνουν κυρίως δυσλειτουργίες σε όργανα και ιστούς που εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από την μιτοχονδριακή λειτουργία όπως είναι η καρδιά, ο εγκέφαλος και οι μύες.

4. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

4.1 ΔΕΙΓΜΑ ΚΑΙ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA

Τα δείγματα αίματος που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία παραχωρήθηκαν από το Περιφερειακό Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας. Συλλέχθηκαν 16 δείγματα αίματος από ασθενείς με διαβήτη, τα οποία αποθηκεύτηκαν στους -20°C μέχρι την έναρξη του πειράματος.

ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΟΛΙΚΟΥ DNA

Για την απομόνωση ολικού DNA από αίμα εφαρμόστηκε η παρακάτω διαδικασία :

- Προσθέτουμε σε σωλήνες eppendorf των 2 ml, 0,5 ml αίμα και 1 ml SSC (Standard Saline Citrate) 1X. Ακολουθεί έντονη ανάδευση και φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 3 λεπτά.
- Απομακρύνουμε το υπερκείμενο, προσθέτουμε 1 ml SSC 1X, ακολουθεί έντονη ανάδευση και φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 1 λεπτό.
- Απομακρύνουμε το υπερκείμενο, προσθέτουμε 0,5 ml NaOAc 0,2 M, ακολουθεί έντονη ανάδευση, προσθέτουμε 50 μl SDS (θειικό δωδεκυλικό νάτριο) 5% και 5 μl proteinase K (20 ng/ μl). Το SDS 5% είναι ανιοντικό απορρυπαντικό που καταστρέφει όλες σχεδόν τις μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις, προκαλεί ρήξη των πυρηνικών και των κυτταρικών μεμβρανών και διαλυματοποιεί τις πρωτεΐνες. Η πρωτεΐνάση K είναι πρωτεολυτικό ένζυμο το οποίο καταστρέφει τις DNAάσες, βοηθώντας έτσι στην απελευθέρωση του DNA. Βάζουμε τα δείγματα για επώαση στο φούρνο, στους 55°C , για 1 ώρα.
- Προσθέτουμε 0,5 ml φαινόλη και 0,5 ml χλωροφόρμιο. Η φαινόλη και το χλωροφόρμιο αποτελούν οργανικούς διαλύτες για την εκχύλιση του μείγματος και την απομάκρυνση των πρωτεϊνών και του RNA. Συγκεκριμένα, η φαινόλη καθαρίζει το DNA από τις πρωτεΐνες. Το χλωροφόρμιο απομακρύνει υπολείμματα φαινόλης. Ακολουθεί έντονη ανάδευση και φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 7 λεπτά.

- Μεταφέρουμε το υπερκείμενο σε νέα erpendorf των 2 ml, προσθέτουμε 1 ml χλωροφόρμιο και ακολουθεί ελαφρή ανακίνηση και φυγοκέντριση στις 13000 rpm για 10 λεπτά.
- Μεταφέρουμε το υπερκείμενο σε νέα erpendorf των 2 ml και προσθέτουμε 1 ml ισοπροπανόλη. Η ισοπροπανόλη συμβάλλει στην κατακρήμνιση του DNA. Βάζουμε τα δείγματα στους $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ για 15 λεπτά. Ακολουθεί φυγοκέντριση στις 13000 rpm για 20 λεπτά.
- Απομακρύνουμε το υπερκείμενο, προσθέτουμε 1 ml παγωμένη αιθανόλη 70% για έκπλυση του ιζήματος. Ακολουθεί φυγοκέντριση στις 13000 rpm για 10 λεπτά.
- Απομακρύνουμε το υπερκείμενο και τοποθετούμε τα δείγματα στο φούρνο, στους $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, για ξήρανση.
- Προσθέτουμε 100 μl ddH₂O, ώστε να επαναδιαλυθεί το DNA που βρίσκεται υπό τη μορφή ιζήματος.
- Τα δείγματα διατηρούνται στους $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ για 1-2 ημέρες, έως ότου ολοκληρωθεί η επαναδιάλυση του DNA και έπειτα φυλάσσονται στους $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- Μετά την ολοκλήρωση της απομόνωσης του DNA, ελέγχονται 5 μl διαλύματος DNA από κάθε δείγμα, με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης συγκέντρωσης 1% στα 100 V. Εφόσον η ποσότητα και η ποιότητα του DNA είναι ικανοποιητικές και το DNA, ακολουθεί ενίσχυση με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης.

4.2 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)

Η ανακάλυψη της PCR (*Saiki et al. 1985, Mullis και Faloona, 1987*), και η γρήγορη βελτιστοποίησή της με τη χρήση μιας θερμοσταθερής Taq(*Thermus aquaticus*) DNA πολυμεράσης έχει συνεισφέρει σημαντικά στη μοριακή διαγνωστική.

Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR) είναι απλή και ταχεία μέθοδος πολλαπλασιασμού επιλεγμένης αλληλουχίας από μικρή ποσότητα μητρικού DNA, με τη χρήση της DNA πολυμεράσης. Με τη συγκεκριμένη μέθοδο επιτυγχάνεται η ανάλυση πολύ μικρών ποσοτήτων DNA. Τα προϊόντα της PCR μπορούν να αναλυθούν ακολούθως με διάφορες μεθόδους ώστε να διερευνηθούν:

α) η παρουσία με υψηλή ευαισθησία ενδογενούς ή εξωγενούς DNA ή RNA με ηλεκτροφόρηση του προϊόντος

β) μεταβολές γενετικού υλικού

γ) απώλειες γενετικού υλικού (π.χ. με πολλαπλό PCR).

Το σημαντικότερο στοιχείο της PCR είναι ο μεγάλος αριθμός αντιγράφων της επιθυμητής αλληλουχίας που παράγεται με την εκθετική ενίσχυσή της, γεγονός που επιτρέπει την ανίχνευση γνωστών μεταλλάξεων μέσα σε μία μόνο ημέρα, αντί για το διάστημα μηνών που χρειαζόταν παλιότερα. Επιπλέον, η PCR έχει μειώσει ή εξαλείψει πλήρως την ανάγκη για χρήση ραδιενέργειας στη μοριακή διαγνωστική ρουτίνας. Η εξαιρετική ευαισθησία των τεχνικών που βασίζονται στην PCR δημιουργεί και το μεγάλο μειονέκτημα της, δηλ. την επιμόλυνση των δειγμάτων.

Η ευαισθησία της τεχνικής και η δυνατότητα ενίσχυσης μικρού μήκους προϊόντος επιτρέπει τη χρήση της ακόμη και σε μερικώς κλασματοποιημένο DNA, όπως αυτό που λαμβάνεται από ιστούς μονιμοποιημένους σε φορμόλη και εμπεδωμένους σε παραφίνη.

Η αλυσιδωτή αντίδραση πραγματοποιείται ως εξής :

1. Αποδιάταξη

Στο στάδιο αυτό, το δείγμα που περιέχει το DNA θερμαίνεται σε υψηλή θερμοκρασία (91-94 °C). Στη θερμοκρασία αυτή επιτυγχάνεται η διάσπαση των δεσμών υδρογόνου, οι οποίοι συνδέουν τους δύο κλώνους της αλυσίδας του DNA. Οι

δύο ελεύθεροι, πλέον, κλώνοι μπορούν να λειτουργήσουν ως εκμαγεία για τη σύνθεση των θυγατρικών αλυσίδων.

2. Υβριδισμός

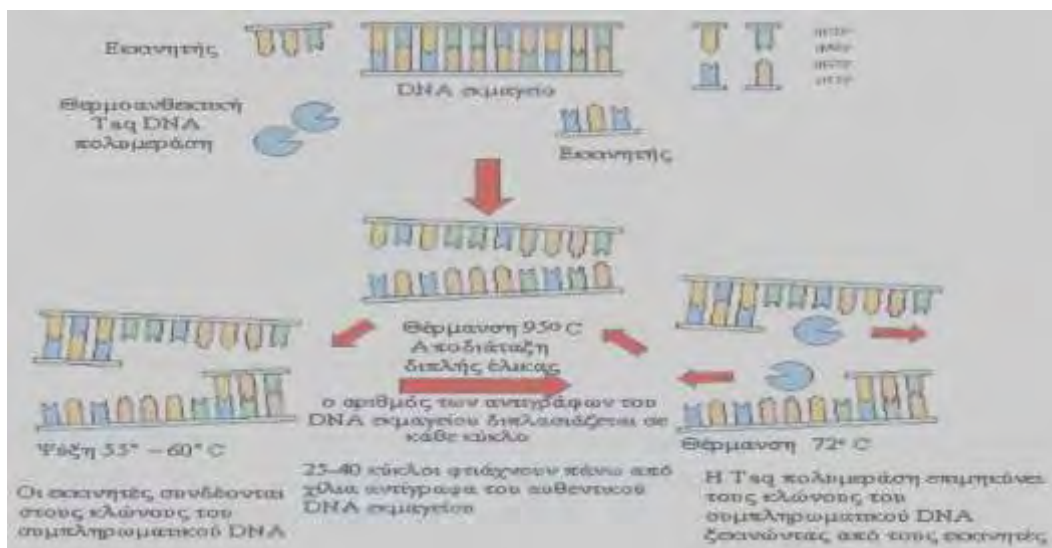
Στο στάδιο αυτό η θερμοκρασία ρυθμίζεται κατάλληλα ώστε να διευκολυνθεί η υβριδοποίηση των εκκινητών με τις συμπληρωματικές τους αλληλουχίες στα μονόκλιωνα μόρια του εκμαγείου του DNA. Η θερμοκρασία εξαρτάται από τη σύσταση των εκκινητών που χρησιμοποιούνται.

3. Επιμήκυνση

Στο τελευταίο στάδιο της επιμήκυνσης η θερμοκρασία ανέρχεται στους 72 °C και η θερμοανθεκτική Taq πολυμεράση επιμηκώνει την αλυσίδα του DNA χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα το DNA και τα τριφωσφορικά δεοξυνουκλεοτίδια (dNTPs).

Οι παραπάνω διαδικασίες επαναλαμβάνονται για περίπου 30 κύκλους . Στο τέλος των επαναλήψεων το στάδιο της επιμήκυνσης επαναλαμβάνεται, αλλά για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα (περίπου 5-10 λεπτά), ώστε η πολυμεράση να ολοκληρώσει τη σύνθεση αλυσίδων οι οποίες ενδεχομένως να έχουν μείνει ημιτελείς.

Ο πολλαπλασιασμός της συγκεκριμένης περιοχής DNA είναι εκθετικός. Το τελικό αποτέλεσμα της PCR μετά από n κύκλους είναι η παραγωγή 2^n δίκλωνων μορίων DNA, πιστών αντιγράφων της ακολουθίας που περικλείεται μεταξύ των εκκινητών.



Εικόνα 3: Τρόπος λειτουργίας της PCR. Η δίκλωνη έλικα DNA αποδιατάσσεται σε κατάλληλη θερμοκρασία, οι εκκινητές συνδέονται στα αντίστοιχα συμπληρωματικά τμήματα του κάθε κλώνου και η Ταq πολυμεράση συνθέτει τους συμπληρωματικούς κλώνους, ξεκινώντας από τους εκκινητές.

ΑΠΑΡΑΙΤΗΤΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ PCR

1) DNA εκμαγείο

Το εκμαγείο είναι η απαραίτητη αλληλουχία-στόχος όπου θα υβριδιστούν οι εκκινητές. Επειδή η PCR είναι εξειδικευμένη και ευαίσθητη μέθοδος, είναι σημαντικό το απομονωμένο DNA να είναι όσο το δυνατόν πιο καθαρό.

2) DNA πολυμεράση

Η θερμοανθεκτική Ταq πολυμεράση προέρχεται από το θερμοφίλο βακτήριο *Thermus aquaticus*. Σημαντικό ρόλο στη δράση της πολυμεράσης παίζει το στέλεχος του βακτηρίου από το οποίο η ίδια απομονώνεται, καθώς και ο τρόπος απομόνωσής της.

3) Ρυθμιστικό διάλυμα

Με το διάλυμα αυτό ρυθμίζεται το pH της αντίδρασης, δηλαδή το pH στο οποίο η δραστηριότητα της πολυμεράσης είναι βέλτιστη.

4) Ιόντα Mg^{2+}

Τα ιόντα Mg^{2+} προστίθενται στο μίγμα της αντίδρασης μέσω του διαλύματος $MgCl_2$ και χρησιμοποιούνται από την πολυμεράση ως μεταλλικός συμπαράγοντας. Τα ιόντα αυτά αυξάνουν την ειδικότητα της αντίδρασης βοηθώντας τον υβριδισμό των εκκινητών.

5) Τριφωσφορικά δεοξυνουκλεοτίδια (dNTPs)

Τα dNTPs αποτελούν το υπόστρωμα της πολυμεράσης, η οποία τα προσθέτει με κατεύθυνση $5' \rightarrow 3'$.

6) Εκκινητές

Οι εκκινητές είναι ολιγονουκλεοτιδικές ακολουθίες, συμπληρωματικές ως προς τις αλληλουχίες οι οποίες περικλείουν το τμήμα που θέλουμε να ενισχύσουμε.

Εκκινητής και αλληλουχία που αναγνωρίζει

A/A	tRNA	FW Primer RV Primer	νουκλεοτιδική θέση	μήκος (bp)
1	Val	GCT TGT CTG GTA GTA AGG GTA CTG GAA AGT GCA CTT GG	1576-1595 1715-1698	140

Ο όγκος των χημικών αντιδραστηρίων που απαιτούνται ανά δείγμα για την αντίδραση PCR για τα δείγματα DNA

Αντιδραστήρια	Όγκος (μl)	Τελική συγκέντρωση
DNA	1 (50- 100 ng)	1-2 ng/μl
Ρυθμιστικό διάλυμα (Buffer 10x)	5	1X
MgCl ₂ (50 mM)	1	1 mM
dNTPs (Διάλυμα δεοξυνουκλεοτιδίων): Παρασκευάζεται από dATP,dCTP,dGTP και dTTP με μίξη ίσων ποσών από ξεχωριστά διαλύματα stock από 0,2mM καθενός dNTP	1	0,004 mM το καθένα
FW Primer (50pmol/μl)	1	1pmol/μl
RV Primer (50pmol/μl)	1	1pmol/μl
Taq pol (5U/μl)	0,2	0,02 U/μl
H ₂ O	39	
Τελικός όγκος	50	

Οι συνθήκες του προγράμματος του θερμικού κυκλοποιητή για την ενίσχυση του απαιτούμενου τμήματος του DNA

Στάδιο	Θερμοκρασία	Χρόνος	Κύκλοι
1. Αποδιάταξη	95 °C	4 min	1
2. Αποδιάταξη	95 °C	30 sec	
3. Υβριδισμός	50 °C	40 sec	35
4. Πολυμερισμός	72 °C	40 sec	
5. Επιμήκυνση	72 °C	10 min	1

Κατά την προετοιμασία της αντίδρασης PCR πρέπει να δίνεται ιδιαίτερη προσοχή στη θερμοκρασία των αντιδραστηρίων, αλλά και στον κίνδυνο επιμόλυνσης. Γι' αυτό τα αντιδραστήρια τοποθετούνται σε πάγο κατά τη διεξαγωγή του πειράματος. Όσον αφορά την επιμόλυνση, είναι μια από τις πιο σημαντικές και συνηθέστερες παραμέτρους που επηρεάζουν αρνητικά το αποτέλεσμα της PCR.

Για να γίνεται αντιληπτή τυχόν επιμόλυνση στα δείγματα θα συμπεριλάβουμε στα δείγματα ένα μάρτυρα ελέγχου. Αυτός περιέχει όλα τα χημικά αντιδραστήρια, πλην του DNA. Αν στον έλεγχο της PCR παρατηρηθεί ζώνη στο μάρτυρα ελέγχου (τυφλό), τότε υπάρχει επιμόλυνση.

4.3 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΗ ΑΓΑΡΟΖΗΣ

Για τον έλεγχο της απομόνωσης DNA και των προϊόντων PCR χρησιμοποιείται η τεχνική της ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αγαρόζης. Η τεχνική αυτή είναι μια διαδικασία η οποία διαχωρίζει κομμάτια DNA. Το μέγεθος των πόρων εξαρτάται από τη συγκέντρωσή της. Οι πόροι είναι αυτοί που επιτρέπουν τη διέλευση των τμημάτων του DNA ανάμεσά τους.

Παρασκευή πηκτής αγαρόζης συγκέντρωσης 1%

1. Ετοιμάζουμε το καλούπι κλείνοντας προσεκτικά τα άκρα του και τοποθετώντας τις κτένες.
2. Τοποθετούμε σε κωνική φιάλη 40 ml ρυθμιστικού διαλύματος TAE 1X. Ακολουθεί προσθήκη 0,4 gr αγαρόζης (για έλεγχο DNA) ή 0,6 gr αγαρόζης (για έλεγχο PCR προϊόντων)
3. Θερμαίνουμε το διάλυμα για 1-2 λεπτά σε φούρνο μικροκυμάτων.
4. Προστίθενται 4 μl βρωμιούχο αιθίδιο (10 ng/ml)
5. Το διάλυμα ανακινείται καλά και αδειάζεται στον υποδοχέα.
6. Αφήνουμε την πηκτή να πήξει.
7. Αφαιρούνται οι ταινίες από τα άκρα του υποδοχέα και οι κτένες, ώστε να αποκαλυφθούν τα πηγαδάκια.
8. Το πήκτωμα τοποθετείται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης, την οποία γεμίζουμε με TAE 1X.
9. Ακολουθεί το φόρτωμα των δειγμάτων. Φορτώνονται 5 μl από κάθε δείγμα αφού πρώτα αναμειχθούν με 2 μl χρωστικής (loading buffer). Μαζί με τα δείγματα φορτώνεται και ένας μάρτυρας για τον υπολογισμό του μοριακού βάρους των προϊόντων της PCR.
10. Η πηκτή ηλεκτροφορείται σε οριζόντια συσκευή στα 100-130 V. Το αποτέλεσμα παρατηρείται σε τράπεζα UV και στη συνέχεια φωτογραφίζεται.

Στη συγκεκριμένη μέθοδο προστίθεται βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr) στην πηκτή αγαρόζης. Το βρωμιούχο αιθίδιο με μια πλευρική ομάδα που περιέχει παρεμβάλλεται μεταξύ γειτονικών βάσεων του DNA και φθορίζει όταν ακτινοβολείται με υπεριώδη

ακτινοβολία. Συγκεκριμένα η υπεριώδης ακτινοβολία που απορροφάται από το DNA στα 260 nm μεταφέρεται στη χρωστική.

Η τεχνική της ηλεκτροφόρησης βασίζεται στην ιδιότητα των αρνητικά φορτισμένων φωσφορικών ομάδων να κινούνται προς το θετικό πόλο του ηλεκτρικού πεδίου.

Σύσταση διαλυμάτων

TAE 50X

Σε 500 ml ddH₂O προστίθενται:

- | | | |
|---|------------------|---------|
| ✓ | Tris-base | 121 gr |
| ✓ | Acetic acid | 28,5 ml |
| ✓ | EDTA 0,5 M, pH 8 | 50 ml |

Για την παρασκευή **TAE 1X** αραιώνουμε 20 ml TAE 50X σε 980 ml ddH₂O.

LOADING BUFFER 6X

Σε ένα falcon των 50 ml προστίθενται:

- | | | |
|---|--------------------|-------|
| ✓ | Γλυκερόλη | 25 ml |
| ✓ | Bromophenol Blue | 5 ml |
| ✓ | TBE 10X | 5 ml |
| ✓ | ddH ₂ O | 15 ml |

$V_{\text{τελ}} = 50 \text{ ml}$

TBE 10X

Σε 1 L ddH₂O προστίθενται:

- | | | |
|---|------------|----------|
| ✓ | Tris-base | 60,5 gr |
| ✓ | Boric acid | 30,85 gr |
| ✓ | EDTA 0,5M | 40 ml |

$V_{\text{τελ}} = 1 \text{ L}$

4.4 ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥ ΜΟΝΟΚΛΩΝΙΚΗΣ ΔΙΑΜΟΡΦΩΣΗΣ(Single Strand Conformation Polymorphism- SSCP)

Η μέθοδος SSCP αναπτύχθηκε για την ανίχνευση μοριακών βλαβών σε γονιδιακούς τόπους, παρέχοντας ένα εξαιρετικό, απλό και ταχύ σύστημα ανίχνευσης μεταλλάξεων με χαμηλό κόστος λειτουργίας και με δυνατότητα εύκολης αυτοματοποίησης, ώστε να είναι δυνατή η ανάλυση μεγάλου αριθμού δειγμάτων DNA μέσα σε μικρό χρόνο.

Η συγκεκριμένη μέθοδος επιτρέπει την ταχεία και ταυτόχρονη ανίχνευση διάφορων νουκλεοτιδικών παραλλαγών, με ποσοστό ανίχνευσης που πλησιάζει το 100%.

Η ανάλυση SSCP βασίζεται στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) και στο γεγονός ότι η ταχύτητα μετακίνησης των τμημάτων μονόκλωνου DNA με σχετικά μικρό μήκος εξαρτάται όχι μόνο από το μέγεθός τους, αλλά και από την αλληλουχία τους. Έτσι, μετά από ενίσχυση μιας δεδομένης αλληλουχίας DNA, τα ενισχυμένα τμήματα DNA υποβάλλονται σε αποδιάταξη είτε με θέρμανση είτε με χημικούς παράγοντες, όπως το φορμαμίδιο. Έπειτα τα αποδιαταγμένα τμήματα DNA ηλεκτροφορούνται σε μη αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης. Κατά την ηλεκτροφόρηση, τα μονόκλινα τμήματα DNA παίρνουν ένα συγκεκριμένο τρισδιάστατο σχήμα, ανάλογα με τη νουκλεοτιδική τους αλληλουχία και αποκτούν διαφορετική διαμόρφωση. Με βάση τις αρχές αυτές, είναι σαφές ότι τμήματα με διαφορά έστω και σε μία μόνο βάση, αποκτούν διαφορετική διαμόρφωση και μετακινούνται με διαφορετικό τρόπο κατά την ηλεκτροφόρηση.

Η ανάλυση SSCP παρουσιάζει πολλά πλεονεκτήματα για τον γρήγορο μαζικό έλεγχο γνωστών γονιδιακών τόπων για μεταλλάξεις, δεν απαιτεί χρήση ραδιενεργών ουσιών για την ανίχνευση και δεν χρειάζεται ειδικό εξοπλισμό. Η SSCP δεν θεωρείται μέθοδος εκλογής για την ανάλυση άγνωστων αλληλουχιών, καθώς δεν υπάρχει μέχρι στιγμής το θεωρητικό υπόβαθρο που θα επιτρέψει να προβλεφθεί η ακριβής ηλεκτροφορητική κινητικότητα ενός δεδομένου τμήματος DNA, με βάση την αλληλουχία του. Ωστόσο, αξίζει να σημειωθεί πως η ανάλυση SSCP έχει γνωρίσει τεράστια επιτυχία στην αναγνώριση παραλλαγών στην αλληλουχία προϊόντων DNA που εξετάστηκαν.

ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗΣ SSCP

Υπάρχουν κάποιες παράμετροι οι οποίες είναι εξίσου σημαντικές και πρέπει να λαμβάνονται υπόψιν για την επιτυχία της SSCP εκτός από το μέγεθος του τμήματος του DNA και την περιεκτικότητα του σε GC. Αυτές είναι οι ακόλουθες:

Σύσταση του πηκτώματος: Το πιο κοινό πήκτωμα, είναι το διασυνδεδεμένο πολυμερές ακρυλαμιδίου (8-12 %). Το μικρό μέγεθος των πόρων του πηκτώματος αυτού, το καθιστά ιδανικό για υψηλή διακριτική ικανότητα και ανάλυση, ακόμα και σε επίπεδο νουκλεοτιδίων. Ακόμα υψηλότερη διακριτική ικανότητα επιτυγχάνεται με την προσθήκη σακχαρόζης ή γλυκερόλης σε ποσοστό 10- 15 %.

Σύσταση του ρυθμιστικού διαλύματος: Η προσθήκη 50% γλυκερόλης μειώνει το pH και ελαττώνει την ηλεκτροστατική απόθεση μεταξύ των αρνητικά φορτισμένων φωσφορικών ομάδων του σκελετού των νουκλεϊκών οξέων, επιτρέποντας έτσι υψηλότερη δυνατότητα διάκρισης μεταξύ των μεταλλαγμένων και των φυσιολογικών τμημάτων DNA. Επίσης οι δομές διαμόρφωσης πιθανόν να καταστούν πιο συμπαγείς αν αυξηθεί η συγκέντρωση του άλατος.

Μήκος πηκτώματος και διάρκεια ηλεκτροφόρησης: Ο χρόνος της ηλεκτροφόρησης εξαρτάται από το μήκος του πηκτώματος και την τάση που εφαρμόζεται. Είναι προτιμότερο να ξεκινήσει η ηλεκτροφόρηση με σχετικά χαμηλή τάση, η οποία θα αυξηθεί μόλις τα τμήματα της PCR έχουν εισέλθει στο πήκτωμα. Το μήκος του πηκτώματος μπορεί να κυμαίνεται από 10- 40 cm. Κατά κανόνα, όσο μεγαλύτερο είναι το μήκος του πηκτώματος, τόσο καλύτερη είναι η διακριτική ικανότητα, καθώς συχνά οι διαφορές στη διαμόρφωση του φυσιολογικού και του μεταλλαγμένου μονόκλωνου DNA είναι τόσο μικρές, ώστε να μετακινούνται σε μικρή απόσταση μεταξύ τους.

Θερμοκρασία: Η θερμοκρασία παίζει σημαντικό ρόλο στις αλλαγές διαμόρφωσης των τμημάτων DNA. Εκτός από τη μείωση του pH, έχει διαπιστωθεί ότι και η μείωση της θερμοκρασίας στους 4 °C βελτιώνει τη σταθερότητα της διαμόρφωσης οποιουδήποτε μονόκλωνου τμήματος DNA.

Συγκέντρωση του DNA: Υψηλές συγκεντρώσεις DNA οδηγούν συχνά στη μείωση της ειδικής συγκέντρωσης του μονόκλωνου DNA. Ακόμα και μετά την προσθήκη φορμαμιδίου, έχει αποδειχθεί ότι, σε υψηλές συγκεντρώσεις, τα δύο μονόκλινα μόρια τείνουν να επανασυνδεθούν και να σχηματίσουν δίκλωνο DNA.

Συνεπώς, καλό είναι να διατηρείται σχετικά χαμηλή συγκέντρωση DNA στο ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης.

Τα προϊόντα PCR που ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης και εμφάνισαν θετικό αποτέλεσμα, προετοιμάζονται κατάλληλα για ανάλυση με τη μέθοδο SSCP ως εξής:

4.5 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΠΗΚΤΩΜΑΤΟΣ ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΙΟΥ

Ποσότητες αντιδραστηρίων για την παρασκευή πηκτώματος πολυακρυλαμιδίου 12%.

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	Ποσότητες
Ακρυλαμίδη	15 gr
Bis- Ακρυλαμίδη	0,375 gr
TBE 10X	10 ml
Γλυκερόλη 50%	12,5 ml
TEMED	125 μl
APS	650 μl

Προστίθεται ddH₂O μέχρι ο τελικός όγκος να γίνει 125 ml.

Acrylamide / Bis- Acrylamide (N,N'-methylenebisacrylamide): Τα πηκτώματα πολυακρυλαμιδίου δημιουργούνται με τον πολυμερισμό του ακρυλαμιδίου και του N,N'-μεθυλενο-δις-ακρυλαμιδίου.

TBE10X: Ρυθμιστικό διάλυμα για καλύτερη αγωγιμότητα.

Γλυκερόλη 50% : Ελαττώνει την τιμή του pH του διαλύματος ηλεκτροφόρησης και αυξάνει την ευαισθησία της μεθόδου.

APS 20% (ammonium persulfate: υπερθειικό αμμώνιο): Ξεκινά την αντίδραση πολυμερισμού με το να δημιουργεί ελεύθερες ρίζες.

TEMED (φωτοχημικός καταλύτης): Καταλύει την αντίδραση

- Τα πηκτώματα πήζουν σε 30 min περίπου.
- Στη συσκευή ηλεκτροφόρησης προσθέτουμε TBE 0,5X και τοποθετούμε τα πηκτώματα μόλις πήξουν.

4.6 ΑΠΟΔΙΑΤΑΞΗ ΚΑΙ ΦΟΡΤΩΜΑ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

- Σε eppendorf 0.5ml προσθέτουμε 5 μl από το προϊόν PCR και 10 μl ρυθμιστικού διαλύματος αποδιάταξης (Denaturation Buffer).

- Σε Θερμικό Κυκλοποιητή με εφαρμογή ειδικού προγράμματος αποδιάταξης:

- 2 λεπτά στους 92 °C

- 2 λεπτά στους 95 °C

- 7 λεπτά στους 97 °C

Τα δίκλιωνα μόρια DNA αποδιάσσονται πλήρως. Πριν ολοκληρωθεί το τελευταίο στάδιο τα δείγματα εξέρχονται από τη συσκευή και τοποθετούνται αμέσως σε πάγο, για την αποφυγή της επαναδιάταξης των μονόκλωνων μορίων DNA.

- Τα δείγματα φορτώνονται στα πηκτώματα, τα οποία βρίσκονται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης, την οποία τοποθετούμε στο ψυγείο και ηλεκτροφορούνται για 16-22 h στα 220 V. Στο συγκεκριμένο πείραμα η ηλεκτροφόριση διήρκησε 14 h στα 200 V.

4.7 ΧΡΩΣΗ ΜΕ ΔΙΑΛΥΜΑ ΝΙΤΡΙΚΟΥ ΑΡΓΥΡΟΥ (Silver Staining)

Με το πέρας της ηλεκτροφόρησης, ακολουθεί η χρώση των πηκτωμάτων, η οποία περιλαμβάνει πλύσεις με τρία διαφορετικά διαλύματα:

Για 2 πηκτώματα:

1^ο διάλυμα:

- Προσθέτουμε σε ογκομετρικό κύλινδρο 780 ml ddH₂O, 20 ml αιθανόλη 100% και 1 ml οξικό οξύ.
- *1^η πλύση:* Προσθέτουμε 200 ml σε κάθε πήκτωμα για 3 min. Απομάκρυνση.
- *2^η πλύση:* Προσθέτουμε 200 ml σε κάθε πήκτωμα για 3 min. Απομάκρυνση.
- Ξεπλένουμε τα πηκτώματα με ddH₂O.

2^ο διάλυμα:

- Προσθέτουμε σε ογκομετρικό κύλινδρο 400 ml διάλυμα νιτρικού αργύρου (1 gr silver staining / L ddH₂O).
- Προσθέτουμε 200 ml σε κάθε πήκτωμα για 20 min.
- Ξεπλένουμε δύο φορές τα πηκτώματα με ddH₂O.

3^ο διάλυμα:

- Προσθέτουμε σε ποτήρι ζέσεως 6 gr NaOH, 0,02 gr NaBH₄, 2 ml φορμαλδεΐδη και συμπληρώνουμε με ddH₂O μέχρι να γίνει ο τελικός όγκος του διαλύματος 400 ml.
- Προσθέτουμε 200 ml διαλύματος σε κάθε πήκτωμα μέχρι την εμφάνιση των ζωνών.
- Απομάκρυνση του διαλύματος και πλύση με ddH₂O.

Στο τέλος της διαδικασίας συσκευάζουμε τα πηκτώματα πολυακρυλαμιδίου σε διαφανείς μεμβράνες και συγκρίνουμε τα αποτελέσματα. Επιλέγουμε τα δείγματα που εμφάνισαν διαφορετικά πρότυπα ηλεκτροφόρησης σε σχέση με τα φυσιολογικά υπό εξέταση άτομα και ακολουθεί η διαδικασία του καθαρισμού των PCR προϊόντων των επιλεγμένων δειγμάτων, ώστε να σταλούν για αλληλούχιση.

4.8 ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ PCR

Ο καθαρισμός των PCR προϊόντων των δειγμάτων έγινε με QIAquick Spin[®] PCR Purification Kit, κατάλληλο για την απομάκρυνση εκκινητών, νουκλεοτιδίων, πολυμερασών, αλάτων και άλλα που έχουν απομείνει μαζί με τα PCR προϊόντα μετά την αντίδραση PCR. Η ανάκτηση του DNA είναι 90 – 95%. Τα υλικά που απαιτούνται για τη διαδικασία καθαρισμού φαίνονται στον Πίνακα 8.

Αντιδραστήρια για τον καθαρισμό των προϊόντων PCR

PB Buffer	<u>Διάλυμα συλλογής (capture buffer)</u> Επιτρέπει την αποτελεσματική δέσμευση προϊόντος PCR ακόμα κι αν είναι πολύ μικρό (100 bp) και την ποσοτική (99,5%) απομάκρυνση των εκκινητών έως και 40 νουκλεοτιδίων
PE Buffer	<u>Διάλυμα πλύσης (wash buffer)</u> Περιέχει αιθανόλη και χρησιμοποιείται για ξέπλυμα και την απομάκρυνση των αλάτων
EB Buffer (10 mM Tris-Cl, pH 8,5)	<u>Διάλυμα έκλουσης (elution buffer)</u> Εξάγει το DNA

Η διαδικασία καθαρισμού είναι η εξής:

- Προσθέτουμε σε νέα eppendorf (1,5 ή 2 ml) 200 μl PB buffer και 50 μl προϊόν PCR.
- Προσθέτουμε 50 μl PB buffer στα eppendorf που είχαμε το προϊόν PCR, αναρροφούμε με την πιπέτα για ξέπλυμα και προσθέτουμε όλη την ποσότητα στα αρχικά eppendorf.
- Μεταφέρουμε όλη την ποσότητα από τα αρχικά eppendorf στα eppendorf με την QIAquick στήλη (Εικόνα 10) και ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 1 min.

Στη συνέχεια:

- Απομακρύνουμε το υγρό. Τοποθετούμε την QIAquick στήλη στο ίδιο erpendorf συλλογής.
- Προσθέτουμε 750 μ l PE buffer. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 1 min.
- Απομακρύνουμε το υγρό. Τοποθετούμε την QIAquick στήλη στο ίδιο erpendorf συλλογής. Βάζουμε τα δείγματα κατευθείαν για φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 1 min.
- Μεταφέρουμε την QIAquick στήλη σε καθαρά καινούρια erpendorf (1,5 ή 2 ml) και σημειώνουμε τον αριθμό του δείγματος και το γονίδιο.
- Προσθέτουμε 50 μ l Buffer EB (10 mM Tris-Cl, pH 8.5) προσεκτικά στο κέντρο της QIAquick μεμβράνης, περιμένουμε περίπου 3 min και ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 1 min.
- Πετάμε την QIAquick στήλη από κάθε δείγμα και κρατάμε τα erpendorf για να σταλούν.

4.9 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ ΤΟΥ DNA (SEQUENCING)

Δύο διαφορετικές μέθοδοι αναπτύχθηκαν σχεδόν συγχρόνως για τον προσδιορισμό της αλληλουχίας ενός κλωνοποιημένου τμήματος DNA.

Η τεχνολογική επανάσταση στις μεθόδους ανάλυσης του γενετικού υλικού ξεκίνησε το 1977, όταν οι Maxam & Gilbert περιέγραψαν μία μέθοδο ανάλυσης της αλληλουχίας με ειδική χημική αποικοδόμηση των βάσεων. Η χημική μέθοδος (Maxam and Gilbert) σήμερα σπάνια χρησιμοποιείται.

Τον ίδιο χρόνο ο Sanger με τους συνεργάτες του πρότειναν μία ενζυμική μέθοδο για ανάγνωση της αλληλουχίας του DNA χρησιμοποιώντας διδεοξυνουκλεοτίδια (ddNTP's), τα οποία οδηγούν στον πρόωρο τερματισμό της νουκλεϊκής σύνθεσης. Η ενζυμική μέθοδος (Sanger) απαιτεί μονόκλωνο DNA, που χρησιμοποιείται σαν μήτρα για την σύνθεση ραδιοσημασμένης συμπληρωματικής αλυσίδας *in vitro*. Η αντίδραση αυτή επιτυγχάνεται με την DNA πολυμεράση της *E. coli* στην παρουσία των τεσσάρων δεοξυνουκλεοτιδίων (dATP, dTTP, dGTP, dCTP, ένα από τα οποία είναι ραδιοσημασμένο) και ενός συνθετικού ολιγονουκλεοτιδίου που είναι συμπληρωματικό στο DNA μήτρα και χρησιμεύει ως εκκινητής. Τέσσερες κατά τ' άλλα όμοιες αντιδράσεις σύνθεσης αναμειγνύονται με προσθήκη στην κάθε μία μικρής ποσότητας ενός διαφορετικού 2',3'-διδεοξυνουκλεοτιδίου (ddATP, ddGTP κλπ.). Η ενσωμάτωση ενός ddNMP στο 3' άκρο μιάς αντιγραφόμενης αλυσίδας σταματάει την περαιτέρω σύνθεση, γιατί δεν υπάρχει πια 3' -OH για προέκταση της αλυσίδας. Έτσι κάθε αντίδραση καταλήγει να περιέχει μίγμα περατωμένων αλυσίδων, όλες σε διαφορετική περίσταση που συναντάται A, G, C ή T, ανάλογα με το ddNTP που συμπεριλήφθηκε. Μετά από ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης και αυτοραδιογραφία μπορούμε να διαβάσουμε την αλληλουχία του DNA.

Οι δύο αυτές μέθοδοι παράγουν πληθυσμούς σημασμένων πολυνουκλεοτιδίων τα οποία αρχίζουν από ένα συγκεκριμένο σημείο και τελειώνουν σε σημεία εξαρτώμενα από τη θέση μιας συγκεκριμένης βάσης του αρχικού κλώνου.

Τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί αυτόματοι αναλυτές που μειώνουν εξαιρετικά το χρόνο αλληλούχισης. Τα σημασμένα τμήματα του DNA ανιχνεύονται από μία πηγή laser και τα δεδομένα αποθηκεύονται για να αναλυθούν. Όλοι οι αυτόματοι αναλυτές περιέχουν προγράμματα περαιτέρω επεξεργασίας ή επιτρέπουν την εξαγωγή των δεδομένων για ανάλυση σε άλλα προγράμματα επεξεργασίας νουκλεϊνικών αλληλουχιών.

5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στη παρούσα εργασία χρησιμοποιήσαμε για την διεξαγωγή του πειράματος 16 δείγματα ασθενών του διαβήτη, προσπαθώντας να μελετήσουμε την ύπαρξη μεταλλάξεων στο μιτοχονδριακό **tRNA^{VAL}** και στις παρακείμενες περιοχές αυτού.

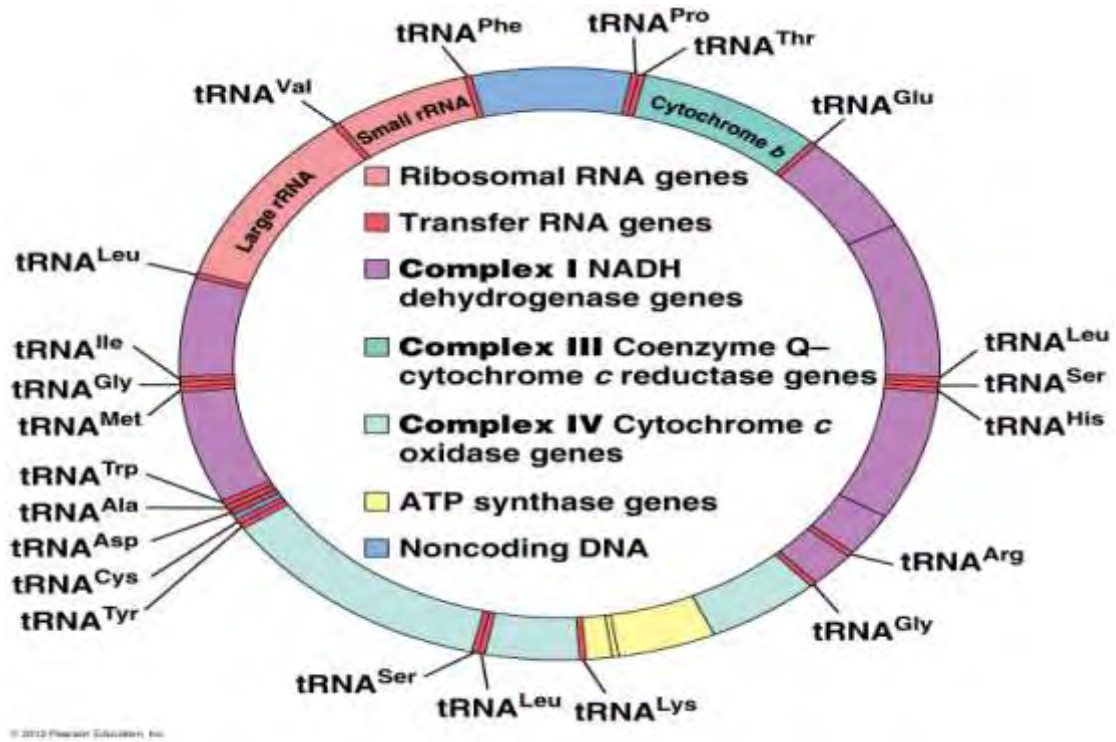
Για την ανίχνευση και ταυτοποίηση των μεταλλάξεων ακολουθήσαμε ένα πειραματικό κύκλο που αρχικά περιελάμβανε την απομόνωση του DNA από τα κύτταρα του αίματος, την ενίσχυση των τμημάτων των αρχικών δειγμάτων με τη μέθοδο της **PCR** χρησιμοποιώντας τους εκκινητές του **tRNA^{VAL}** και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ανάλυση με τη μέθοδο της **SSCP** για την κατάταξη των δειγμάτων καθώς και ανίχνευση μεταλλάξεων. Μετά την ολοκλήρωσή του κύκλου των διαδικασιών τα δείγματα στα οποία ανιχνεύθηκε μετάλλαξη ταυτοποιήθηκαν με τη μέθοδο αυτόματης αλληλούχισης για τον εντοπισμό της ακριβής θέσης της. Από το σύνολο των δειγμάτων, 3 δείγματα στάλθηκαν στο Τμήμα Ιατρικής Θεσσαλίας για αλληλούχιση για τον εντοπισμό μεταλλάξεων.

ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ PCR

Αρχικά χρησιμοποιήσαμε το ζεύγος των εκκινητών του **tRNA^{VAL}**, **Fw Val** και **Rv Val** για να ενισχύσουμε το τμήμα του **μιτοχονδριακού γονιδίου tRNA^{Val}** των δειγμάτων. Το **μιτοχονδριακού tRNA^{Val}** αποτελεί το γονίδιο που θα εξετάσουμε για την ύπαρξη μεταλλάξεων που μπορεί να σχετίζονται με την εμφάνιση του σακχαρώδη διαβήτη.

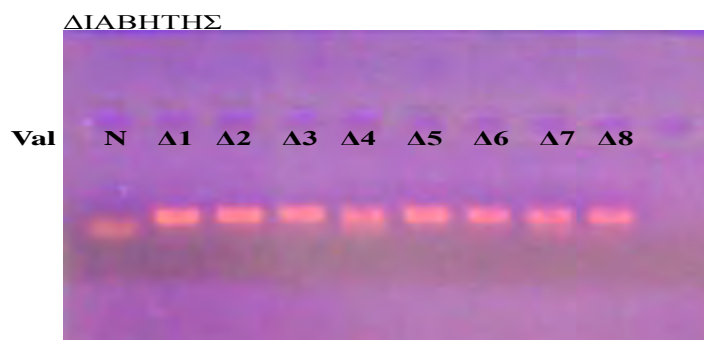
Το τμήμα του γονιδίου που ενισχύθηκε και περιλαμβάνει το **tRNA^{Val}** είναι ένα τμήμα μήκους 140 bp του μιτοχονδριακού γονιδιώματος. Το **tRNA^{Val}** γονίδιο βρίσκεται στη θέση **1602-1670** στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα μεταξύ των 2 rRNA, του **16S rRna** και **12S rRna**.

➤ t RNA Val - 140 bp [1602-1670]



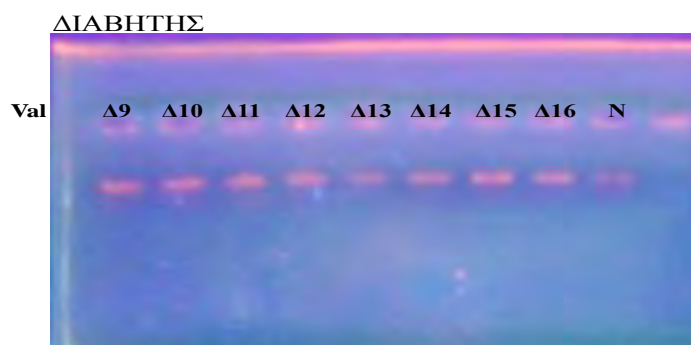
Εικόνα 4: Μιτοχονδριακό γονιδίωμα. Θέση του μιτοχονδριακού γονιδίου t RNA^{Val}.

8/06/2011



Φωτογραφία 1: Gel πηκτής αγαρόζης που περιέχει τα ενισχυμένα τμήματα των δειγμάτων Δ1-Δ8, αποτελέσματα της PCR που εφαρμόσθηκε.

20/06/2011

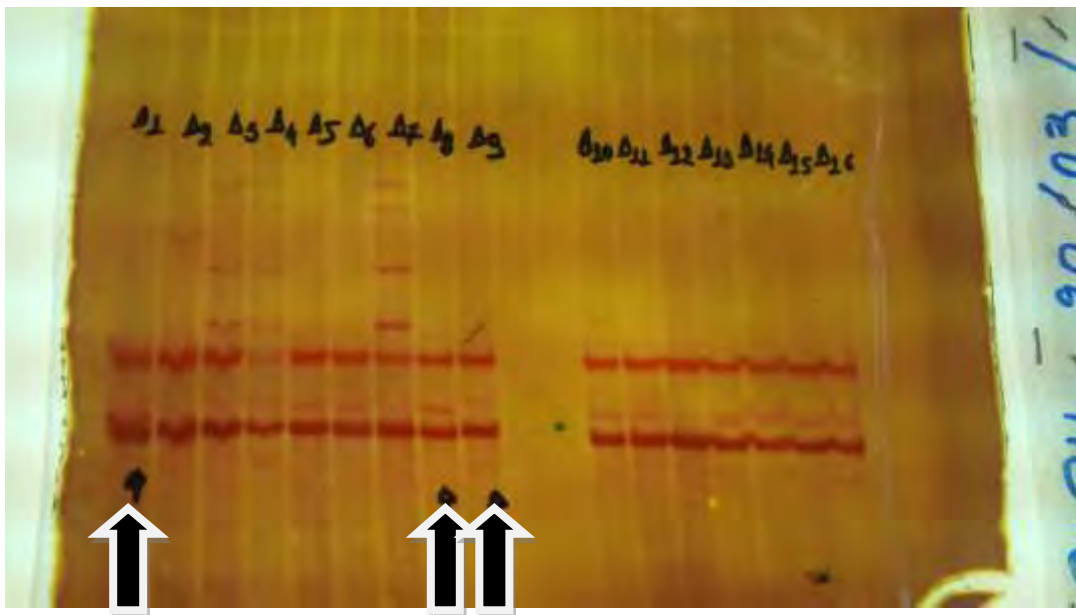


Φωτογραφία 2: Gel πηκτής αγαρόζης που περιέχει τα ενισχυμένα τμήματα των δειγμάτων Δ9-Δ16, αποτελέσματα της PCR που εφαρμόσθηκε.

ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ SSCP ΚΑΙ ΤΗΝ
ΕΥΡΕΣΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ

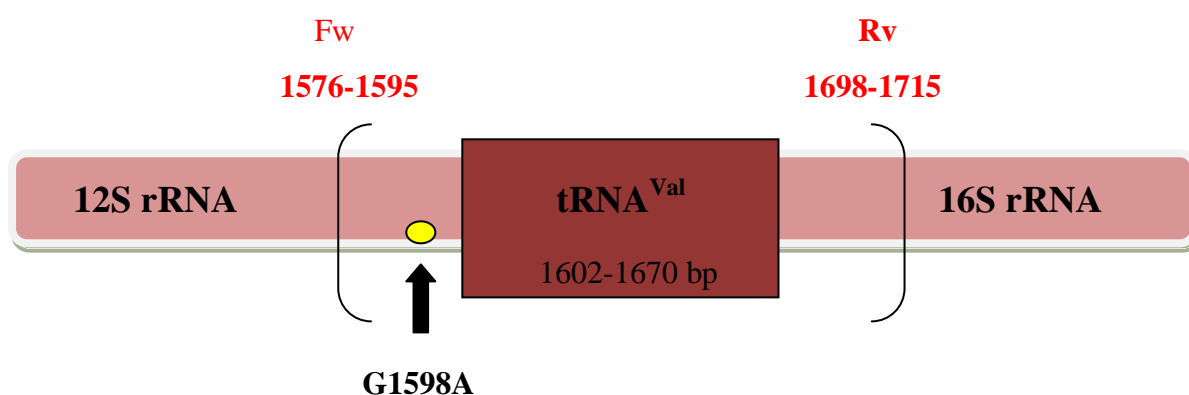
Με τη μέθοδο της SSCP και της αυτόματης αλληλούχισης ταυτοποιήθηκαν και ανιχνεύθηκαν οι μεταλλάξεις που μελετήθηκαν στο μιτοχονδριακό γονίδιο **12S rRNA** των δειγμάτων που παρουσίασαν πρότυπη πορεία ηλεκτροφόρισης. Για αλληλούχιση στάλθηκαν 3 δείγματα **Δ1, Δ8, Δ9**.

Με τη χρήση των προγραμμάτων MITOMAP και CLUSTALX 1.8, πραγματοποιήθηκε στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων της αλληλούχισης. Με τη χρήση του προγράμματος επιτυγχάνεται η «ανάγνωση» της αλληλουχίας του γονιδίου το οποίο ενισχύσαμε και το οποίο λόγω εμφάνισης διαφορετικού προτύπου μετά από πραγματοποίηση SSCP, κρίναμε ότι έπρεπε να σταλεί για αλληλούχιση. Η αλληλουχία βρίσκεται υπό μορφή χρωματογραφήματος, όπου σε κάθε κορυφή αντιστοιχεί και μια βάση της αλληλουχίας.



Φωτογραφία 3: Gel πολυακρυλαμίδης έπειτα από ηλεκτροφόριση των δειγμάτων για 14 ώρες στα 200 V. Με βέλος απεικονίζονται τα δείγματα που παρουσιάζουν πρότυπη πορεία και στάλθηκαν για αλληλούχιση.

Από τα δείγματα που στάλθηκαν για αλληλούχιση μόνο στο δείγμα Δ9 εντοπίστηκε μετάλλαξη. Το γονίδιο **tRNA^{Val}** βρίσκεται στη θέση **1602-1670** στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα μεταξύ των **Rrna**, **16S r Rna** και **12S r Rna**. Στο γονίδιο **tRNA^{Val}** δεν εντοπίστηκε μετάλλαξη. Η μετάλλαξη **G1598A** ανιχνεύτηκε με τη μέθοδο SSCP στη θέση **1598** του δείγματος Δ9, παρακείμενη περιοχή **12S rRna**. Παρουσιάστηκε γονιδιακή αλλαγή και βρέθηκε μετάλλαξη στη θέση **1598** όπου η **G** (γουανίνη) μετατράπηκε σε **A** (αδενίνη), *Εικόνα 5*.

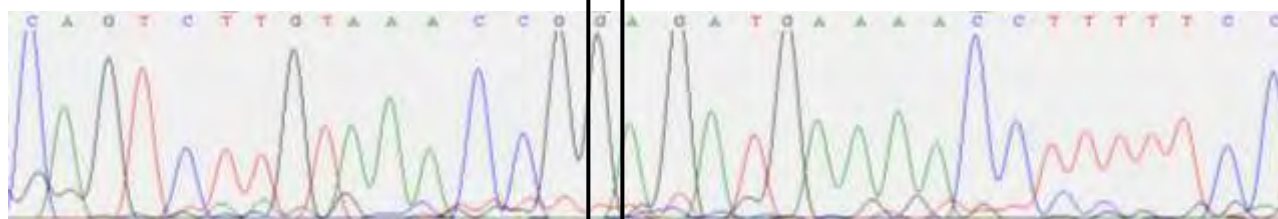


Εικόνα 5: Απεικόνιση της μετάλλαξης που ανιχνεύθηκε στην παρακείμενη περιοχή 12S Rrna στη θέση G1598A.

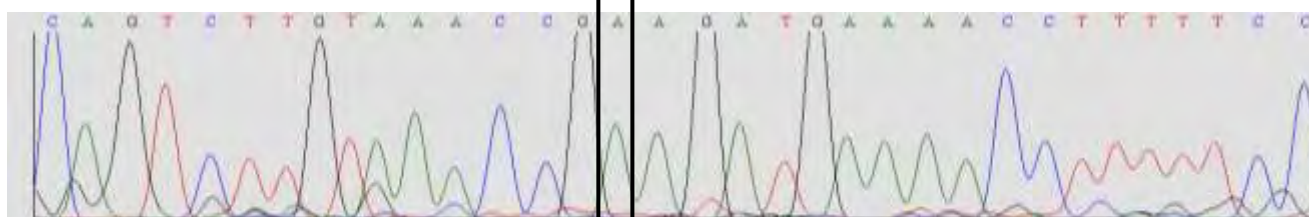
Μετάλλαξη στο 12S r Rna

ΓΟΝΙΔΙΟ	ΜΕΤΑΛΛΑΞΗ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΣΘΕΝΩΝ	ΠΟΣΟΣΤΟ
12S r Rna	G1598A	1/16	6%

A.



B.



Εικόνα 6: Τμήμα χρωματογράφησης αλληλούχισης της περιοχής του *t* RNA γονιδίου. Το A αντιστοιχεί σε φυσιολογικό άτομο, το B αντιστοιχεί σε ασθενεί του σακχαρώδη διαβήτη. Μετάπτωση της G(γουανίνη) σε A(αδενίνη).

6.ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο ρόλος των μιτοχονδρίων στον οργανισμό, είναι καίριος, εφόσον εμπλέκονται σε βασικές για τον οργανισμό λειτουργίες, όπως ο μεταβολισμός, η απόπτωση και ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός. Η ύπαρξη και ταυτοποίηση μεταλλάξεων στο μιτοχόνδριο οδηγεί τον επιστημονικό κόσμο σε συνεχόμενη έρευνα γύρω από το μιτοχόνδριο και σε ασθένειες που εμφανίζονται και σχετίζονται με αυτό. Μεταλλάξεις στο μιτοχόνδριο έχουν συσχετισθεί με την εμφάνιση του σακχαρώδους διαβήτη καθώς και πολλών “μιτοχονδριακών” νοσημάτων.

Μέσα από το παρόν πείραμα, ανιχνεύσαμε μεταλλάξεις στο, ώστε να ελέγξουμε την πιθανότητα τέτοιες μεταλλάξεις να αποτελούν παράγοντες πρόκλησης του σακχαρώδους διαβήτη. Στην εργασία που πραγματοποιήθηκε, ερευνήσαμε, ανιχνεύσαμε και ταυτοποιήσαμε την ύπαρξη μίας μετάλλαξης στο **12S rRNA** και πιο συγκεκριμένα στη θέση **G1598A** του δείγματος **Δ9**.

Η μετάλλαξη G1598A:

Η θέση όπου εντοπίστηκε η μετάλλαξη βρίσκεται στο **12S rRNA**, το οποίο αποτελεί παρακαείμενη περιοχή του μιτοχονδριακού γονιδίου **tRNA^{Val} γονιδίου**. Η μετάλλαξη εμφανίστηκε σε ένα μόνο δείγμα, **Δ9**, από 16 δείγματα ασθενών του σακχαρώδους διαβήτη. Το ποσοστό εμφάνισης της μετάλλαξης στο σύνολο των δειγμάτων είναι (1/16). Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία που έχει αναφερθεί στη δικτυακή βάση δεδομένων για το μιτοχόνδριο (www.mitomap.org) η μετάλλαξη στη θέση **G1598A** έχει εμφανιστεί συχνά σε δείγματα πληθυσμών. Η θέση εντοπισμού καθώς και η συχνότητα εμφάνισης της μετάλλαξης **G1598A** την καθιστά πολυμορφισμό και όχι παθογόνο μετάλλαξη. Η μετάλλαξη δεν βρίσκεται στο **γονίδιο tRNA^{Val}** επομένως δεν επηρεάζει άμεσα την λειτουργία του συγκεκριμένου γονιδίου. Η θέση που εμφανίζεται η μετάλλαξη δεν καθιστά μη λειτουργικό το γονίδιο. Τα αποτελέσματα του πειράματος αποτελούν μικρό ποσοστό για την διεξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων.

Η περαιτέρω μελέτη των αποτελεσμάτων σε εργαστηριακό επίπεδο θα οδηγήσει στη διαλεύκανση της φύσης των μεταλλάξεων που εμφανίζονται συχνά στο μιτοχονδριακό tRNA. Η μελέτη και η εφαρμογή πειραμάτων συνεχίζεται για την ανίχνευση της αιτίας των ‘μιτοχονδριακών’ νοσημάτων που αποτελούν τις πιο συνηθισμένες ασθένειες και πλήττουν πολύ μεγάλο μέρος του πληθυσμού ανεξαρτήτως ηλικίας.

7.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Anderson S., Bankier A.T, Barrell B.G., Bruijn M.H., Coulson A.R., Drouin J., Eperon I.C., Nierlich D.P., Roe B.A., Sanger F., Schreier P.H., Smith A.J., Staden R., Young I.G., Sequence and organization of the human mitochondrial genome, *Nature*, 1981, 290:457-65

Cortopassi, G. A., and Wang, E. (1996). "There is substantial agreement among interspecies estimates of DNA repair activity." *Mech Ageing Dev* **91**(3):211-218

Coskun, P.E., Beal, M.F., Wallace, D.C., Somatic mitochondrial DNA control region mutations are prevalent in Alzheimer Disease brains, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004, 101:10726-10731

Fischer S.G., Lerman L.S., DNA fragments differing by single base-pair substitutions are separated in denaturing gradient gels, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1983, 80:1579-1583

Margulis L., *Origin of Eukaryotic Cells*, 1970, Yale University Press.

Margulis L., *Early Life*, 1982, Science Books International.

Mitchell P, Moyle J., Chemiosmotic hypothesis of oxidative phosphorylation, *Nature*, 1967, 213:137–9.

Mitchell P., Proton current flow in mitochondrial systems, *Nature*, 1967, 25: 1327–1328.

Lauber, J., Marsac, C., Kadenbach, B., Seibel, P., Mutations in mitochondrial tRNA genes: a frequent cause of neuromuscular diseases, *Nucleic Acids Research*, 1991, 19:1393-1397.

Lowell, J. E., and Pillus, L. (1998). "Telomere tales: chromatin, telomerase and telomere function in *Saccharomyces cerevisiae*." *Cell Mol Life Sci* **54**(1):32-49

Liu, V. W., Zhang, C., and Nagley, P. (1998). "Mutations in mitochondrial DNA accumulate differentially in three different human tissues during ageing." *Nucleic Acids Res* **26**(5):1268-1275

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

Ozawa, T., Tanaka, M., Sugiyama, S., Ino, H., Ohno, K., Hattori, K., Ohbayashi, T., Ito, T., Deguchi, H., Kawamura, K., Nakane, Y., Hashiba, K., Patients with idiopathic cardiomyopathy belong to the same mitochondrial DNA gene family of Parkinson's disease and mitochondrial encephalomyopathy. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1991, 177:518-525

Zifa E, Giannouli S, Theotokis P, Stamatis C, Mamuris Z, Stathopoulos C. Mitochondrial tRNA mutations: clinical and functional perturbations. *RNA Biol.* (2007) Jan-Mar;4(1):38-66. Epub 2007 Jun 6. Department of Biochemistry and Biotechnology, University of Thessaly

Βασικές αρχές κυτταρικής βιολογίας των Alberts, Bray, Hopkin, Johnson, Lewis, Raff, Roberts και Walter

κ. Σταμάτης Ν. Αλαχιώτης, Καθηγητής της Γενετικής και Πρύτανης του Πανεπιστημίου Πατρών

Διεύθυνση Γενετικής (Χ. Κόκοτας /Μ. Γρηγοριάδου /Γ. Σ. Κορρές /Α. Γιαννούλια-Καραντανά /Μ. Β. Petersen)

SITES

<http://www.mitomap.org/>

www.genpat.uu.se/mtDB

http://wikipedia.qwika.com/en2el/Mitochondrial_disease

<http://www.tovima.gr/opinions/article/?aid=97423>

<http://www.intergenetics.eu/1525+M54a708de802.html>

www.scienceinschool.org/evolution