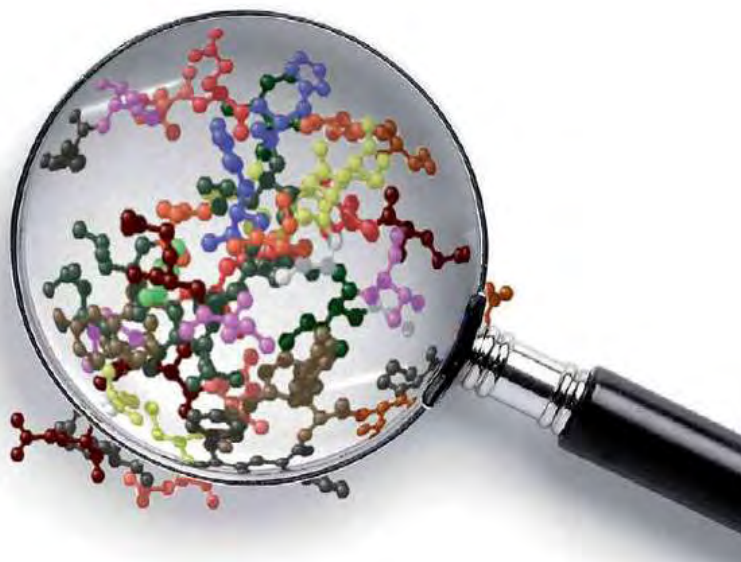


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος Βιοχημείας  
και Βιοτεχνολογίας  
«ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ-ΜΟΡΙΑΚΗ  
ΓΕΝΕΤΙΚΗ, ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ»

**ΒΑΪΤΣΟΠΟΥΛΟΥ ΧΡΙΣΤΙΝΑ**

*ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ ΣΕ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΑ tRNA  
ΓΟΝΙΔΙΑ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΔΙΑΒΗΤΗ*



**ΛΑΡΙΣΑ 2010**



***«Ανίχνευση μεταλλάξεων σε μιτοχονδριακά tRNA γονίδια σε ασθενείς με διαβήτη»***

### **Τριμελής Επιτροπή**

**Ζίφα Αιμιλία**, Επίκουρος Καθηγήτρια Βιολογίας  
(Νευροβιολογίας), Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας.

**Μαμούρης Ζήσης**, Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών,  
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας.

**Λεωνίδας Δημήτριος**, Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας,  
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας.

## Ευχαριστίες....

Η παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Γενετικής του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας στη Λάρισα, στα πλαίσια του προγράμματος μεταπτυχιακών σπουδών με τίτλο: «Εφαρμογές Μοριακής Βιολογίας, Μοριακή Γενετική-Διαγνωστικοί Δείκτες», με την επίβλεψη της Επίκουρης Καθηγήτριας Βιολογίας (Νευροβιολογίας) Αιμιλίας Ζίφα, το έτος 2009-2010.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την κ. Αιμιλία Ζίφα για που μου ανέθεσε τη συγκεκριμένη εργασία, δίνοντας μου τη δυνατότητα να εκπαιδευτώ σε καινούριες, για μένα, μοριακές μεθόδους. Επίσης την ευχαριστώ για την καθοδήγησή της κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων στο Εργαστήριο Γενετικής, αλλά και για τις πολύτιμες συμβουλές της, όσον αφορά τη συγγραφή της διπλωματικής μου εργασίας.

Επιπλέον ευχαριστώ ιδιαίτερα όλα τα μέλη ΔΕΠ του εργαστηρίου, τους μεταπτυχιακούς και διδακτορικούς φοιτητές για την θερμή τους υποδοχή στο εργαστήριο, την βοήθειά τους στο πειραματικό μέρος, αλλά και για το πολύ ευχάριστο κλίμα που δημιούργησαν.

Τέλος, ευχαριστώ τη Σκουμή Ελευθερία που με εκπαίδευσε με υπομονή στις τεχνικές που εφάρμοσα για τη διεκπεραίωση των πειραμάτων μου.

# Περιεχόμενα

Περίληψη / Abstract.....	6-7
<b>1. Εισαγωγή.....</b>	<b>8</b>
Μιτοχόνδρια.....	9
Λειτουργίες των μιτοχονδρίων.....	12
mtDNA και Μεταλλάξεις.....	14
Σακχαρώδης Διαβήτης.....	17
Διαβήτης και Μιτοχονδριακή λειτουργία.....	20
Σκοπός της εργασίας.....	22
<b>2. Υλικά και Μέθοδοι.....</b>	<b>23</b>
2.1 Απομόνωση ολικού DNA.....	24
2.2 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	26
2.3 Απαραίτητοι παράγοντες για την αντίδραση της PCR.....	28
2.4 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης.....	31
2.5 Σύσταση διαλυμάτων.....	33
2.6 Μέθοδος ανάλυσης πολυμορφισμού μονοκλωνικής διαμόρφωσης.....	34
2.7 Παράμετροι ηλεκτροφόρησης SSCP.....	36
2.8 Καθαρισμός προϊόντων PCR.....	39
2.9 Φωτομέτρηση- Λυοφυλίωση.....	41
2.10 Προσδιορισμός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας.....	42
2.11 Αυτόματος αναλυτής αλληλουχιών.....	45
<b>3. Αποτελέσματα.....</b>	<b>46</b>
3.1 Απομόνωση DNA.....	47
3.2 Ενίσχυση με τη μέθοδο PCR.....	48
3.3 Μεταλλάξεις στο γονίδιο tRNA <sup>Leu(UUR)</sup> και στις παρακείμενες περιοχές.....	50
3.4 Μεταλλάξεις στο γονίδιο tRNA <sup>Lys</sup> και στις παρακείμενες περιοχές.....	52
3.5 Μεταλλάξεις στο γονίδιο tRNA <sup>Leu(CUN)</sup> .....	58
3.6 Μεταλλάξεις στο γονίδιο tRNA <sup>Glu</sup> .....	60
<b>4. Συζήτηση.....</b>	<b>63</b>
<b>5. Βιβλιογραφία.....</b>	<b>69</b>

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο σακχαρώδης διαβήτης είναι μια διαδεδομένη νόσος, η οποία έχει μελετηθεί αρκετά σε γενετική και μοριακή βάση. Μέχρι τώρα έχουν συσχετιστεί πολλές χρωμοσωμικές περιοχές και γονίδια, πυρηνικά και μιτοχονδριακά, με τη συγκεκριμένη ασθένεια. Ιδιαίτερα η μελέτη του μιτοχονδριακού γονιδιώματος παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον, καθώς μπορεί να εξηγήσει το μητρικό τρόπο κληρονομικότητας του διαβήτη. Επιπλέον, αποτελεί έγκυρο τρόπο πρόγνωσης της ασθένειας, ώστε να γίνει σωστή διάγνωση και θεραπεία, κυρίως στα νεαρά άτομα. Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν 4 tRNA γονίδια του μιτοχονδριακού γονιδιώματος και οι παρακείμενες περιοχές των γονιδίων αυτών σε 102 ασθενείς με διαβήτη. Πραγματοποιήθηκε απομόνωση ολικού DNA και με τις μεθόδους PCR και SSCP και τέλος, η ταυτοποίηση των μεταλλάξεων πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της αλληλούχισης (sequencing). Ανιχνεύτηκαν 4 διαφορετικές μεταλλάξεις σε 3 tRNA γονίδια: A8308G και T8362G στο γονίδιο tRNA<sup>Lys</sup>, A12308G στο γονίδιο tRNA<sup>Leu (CUN)</sup> και A14687G στο γονίδιο tRNA<sup>Glu</sup>. Επίσης, ανιχνεύτηκαν 6 διαφορετικές μεταλλάξεις σε περιοχές παρακείμενες των tRNA γονιδίων: T3197C και ins.3159(T) στο γονίδιο 16S rRNA, T3336C στο γονίδιο ND1, Del: 8271-8281 στη μη κωδική νουκλεοτιδική περιοχή NC7 και G8206A και G8251A στο γονίδιο CO2. Όλες οι μεταλλάξεις ανιχνεύτηκαν σε μικρό ποσοστό στους διαβητικούς ασθενείς, με εξαίρεση τη μετάλλαξη A12308G στο γονίδιο tRNA<sup>Leu (CUN)</sup>, η οποία βρέθηκε στο 22% των ασθενών. Κάποιες από αυτές τις μεταλλάξεις ανιχνεύτηκαν και στο φυσιολογικό πληθυσμό, αλλά σε χαμηλότερα ποσοστά, παρά το μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων φυσιολογικών ατόμων. Η μετάλλαξη T3197C ανήκει στον υποκλάδο U5 της απλοομάδας U, η μετάλλαξη G8251A χαρακτηρίζει τους απλοτύπους I και W και η A12308G χαρακτηρίζει τον απλότυπο U. Επιπλέον η A12308G συγκληρονομείται με τη μετάλλαξη T3197C στον εκφυλισμό της ωχράς κηλίδας. Από όλες τις μεταλλάξεις που ανιχνεύτηκαν στην εργασία αυτή, μόνο η G8251A είχε αναφερθεί ότι σχετίζεται με το σακχαρώδη διαβήτη. Οι υπόλοιπες μεταλλάξεις έχουν ανιχνευτεί σε άλλες ασθένειες, ενώ η G8206A δεν είχε ανιχνευτεί προηγουμένως σε καμία άλλη ασθένεια, συμπεριλαμβανομένου και του διαβήτη. Όσον αφορά τη μετάλλαξη ins.3159(T), αυτή είχε προσδιοριστεί μόνο ως πολυμορφισμός και δεν είχε σχετιστεί με κάποια ασθένεια, ως τώρα. Είναι σημαντικό να πραγματοποιηθεί περαιτέρω μελέτη του μιτοχονδριακού γονιδιώματος και της λειτουργίας του για τον προσδιορισμό ακόμα περισσότερων μεταλλάξεων σε διαβητικούς ασθενείς και παράλληλα να χαρακτηριστούν περισσότερες απλοομάδες για ακόμα πιο αξιόπιστα αποτελέσματα.

## ABSTRACT

Diabetes mellitus is a very common disease which has been studied briefly on genetical and molecular base. So far, various chromosomal regions and genes, nuclear and mitochondrial, have been related to this disease. Especially studies of mitochondrial genome are of great interest because the predominantly maternal transmission of diabetes could be explained. In addition, these studies comprise a valid way of precognition of the disease, so that its diagnosis and cure can be correct, mainly as far as young people are concerned. In this project 4 tRNA genes of the mitochondrial genome, including the nucleotide sequences near them, were studied in 102 diabetic patients. Isolation of total DNA was made, PCR and SSCP methods were applied and the mutations were identified by sequencing. Four different mutations were detected in 3 tRNA genes of the patients: A8308G and T8362G in tRNA<sup>Lys</sup> gene, A12308G in tRNA<sup>Leu (CUN)</sup> gene and A14687G in tRNA<sup>Glu</sup> gene. There were, also, detected six different mutations in the nucleotide sequences near tRNA genes: T3197C and ins.3159(T) in 16S rRNA gene, T3336C in ND1 gene, Del: 8271-8281 in the non-coding region 7 (NC7) and G8206A and G8251A in CO2 gene. All the mutations were identified in a small percent at diabetic patients, with the exception of A12308G in tRNA<sup>Leu (CUN)</sup> gene, which was found on the 22% of the patients. Some of the mutations mentioned above, were identified on normal subjects as well, but at smaller amount in perspective of the diabetic patients, despite the bigger number of the control subjects. Finally, the mutations were identified by sequencing. The mutation T3197C belongs to the subclade U5 of the haplogroup U, the mutation G8251A belongs to the haplogroups I and W and A12308G belongs to the haplogroup U. Furthermore, the mutation A12308G is inherited together with the mutation T3197C in Age-Related Macular Degeneration disease. From all the mutations that were identified in this project, only G8251A had been found to be related to diabetes mellitus. The other mutations have been found in other diseases, while G8206A had never been identified in any other disease, including diabetes mellitus. As far as ins.3159(T) is concerned, it had been identified as a polymorphism and had not been related to a disease, until now with diabetes mellitus. It is of utmost importance that farther studies of the mitochondrial genome and its function will take place in the future for the identification of more mutations in diabetic patients. Last but not least, more haplogroups should be identified for more reliable results.



# ΕΙΣΑΓΩΓΗ



# ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑ

Τα μιτοχόνδρια είναι μικρά υποκυτταρικά οργανίδια, τα οποία μπορούν να πολλαπλασιαστούν με διαίρεση. Κάθε ανθρώπινο κύτταρο περικλείει πολλά μιτοχόνδρια, τα οποία είναι πολυπλοειδή. Κάθε μιτοχόνδριο περιλαμβάνει 2-10 αντίγραφα ενός δίκλωνου κυκλικού DNA, μήκους 16569 bp.

Τα μιτοχόνδρια περιέχουν τουλάχιστον 689 διαφορετικές πρωτεΐνες, η κύρια λειτουργία τους είναι η προώθηση της αερόβιας αναπνοής και η παροχή ενεργειακών υποστρωμάτων για τη σωστή λειτουργία των ενδοκυτταρικών μεταβολικών μονοπατιών και πραγματοποιούν πολλαπλές διεργασίες σχάσης-σύντηξης. Στο εσωτερικό των μιτοχονδρίων πραγματοποιούνται οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις, οι οποίες είναι συνδυασμένες με τη φωσφορυλίωση του ADP σε ATP, η οποία γίνεται με τη βοήθεια των ATP-συνθασών. Επιπλέον ρυθμίζουν τη διαδικασία της απόπτωσης, την παραγωγή ενεργών ριζών οξυγόνου (ROS), αίμης, πυριμιδινών και στεροειδών και την ομοιόσταση ασβεστίου, γλυκόζης και σιδήρου.

Συγκεκριμένα, στα β-κύτταρα του παγκρέατος, τα μιτοχόνδρια είναι υπεύθυνα για την έκκριση ινσουλίνης ανάλογα με τα επίπεδα της γλυκόζης στον οργανισμό, αφού η εξωκύτωση των εκκριτικών κοκκίων εξαρτάται από μεταβολές της αναλογίας ATP/ADP σαν αποτέλεσμα της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης στα μιτοχόνδρια. Μεταλλάξεις των μιτοχονδριακών γονιδίων έχουν ως αποτέλεσμα τη μη σωστή παραγωγή ATP, περιορίζοντας, έτσι, την έκκριση ινσουλίνης.

## ΔΟΜΗ ΤΩΝ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΩΝ

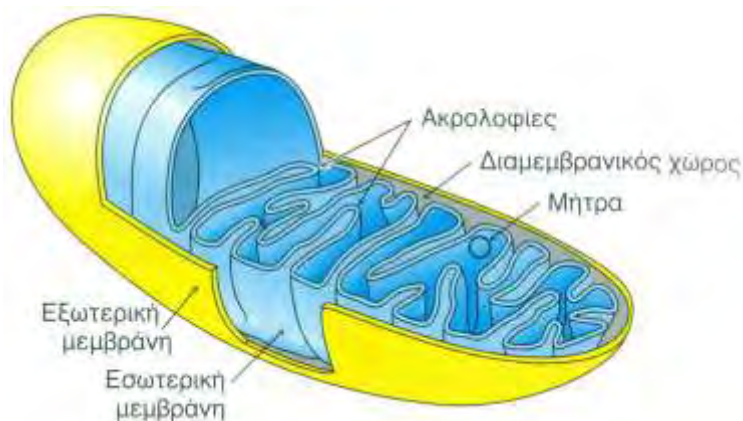
Τα μιτοχόνδρια περιβάλλονται από ένα σύστημα δύο μεμβρανών, της *εξωτερικής* και της *εσωτερικής*, οι οποίες διαχωρίζουν το εσωτερικό των μιτοχονδρίων, που ονομάζεται *μήτρα (matrix)*, από το κυτταρόπλασμα (Εικόνα 1).

Η *εξωτερική μεμβράνη (outer membrane)* είναι διαπερατή από όλα τα μικρά μόρια και ιόντα, αφού περιέχει μια μεγάλη πρωτεΐνη, την *πορίνη* και άλλες μεταφορικές πρωτεΐνες.

Η *εσωτερική μεμβράνη (inner membrane)* δημιουργεί αναδιπλώσεις, τις *ακρολοφίες (cristae)*, είναι αδιαπέραστη από όλα τα ιόντα και τα πολικά μόρια και περιέχει πρωτεΐνες που εκτελούν τρεις διαφορετικές λειτουργίες: α) τις πρωτεΐνες που διεκπεραιώνουν τις αντιδράσεις της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων ώστε να γίνει η οξειδωτική φωσφορυλίωση, β) τη συνθάση του ATP, η οποία παράγει ATP και γ) μεταφορικές πρωτεΐνες.

Η *μήτρα (matrix)* περιέχει ένζυμα για την οξείδωση του πυροσταφυλικού και των λιπαρών οξέων, τα ένζυμα του κύκλου του Krebs, αρκετά αντίγραφα του μιτοχονδριακού DNA, μιτοχονδριακά ριβοσώματα, μόρια t-RNA και ποικίλα ένζυμα απαραίτητα για την έκφραση των μιτοχονδριακών γονιδίων.

Το διάστημα που δημιουργείται ανάμεσα στις δύο μεμβράνες ονομάζεται *διαμεμβρανικός χώρος (intermembrane space)*.



*Εικόνα 1: Διάγραμμα ενός μιτοχονδρίου*

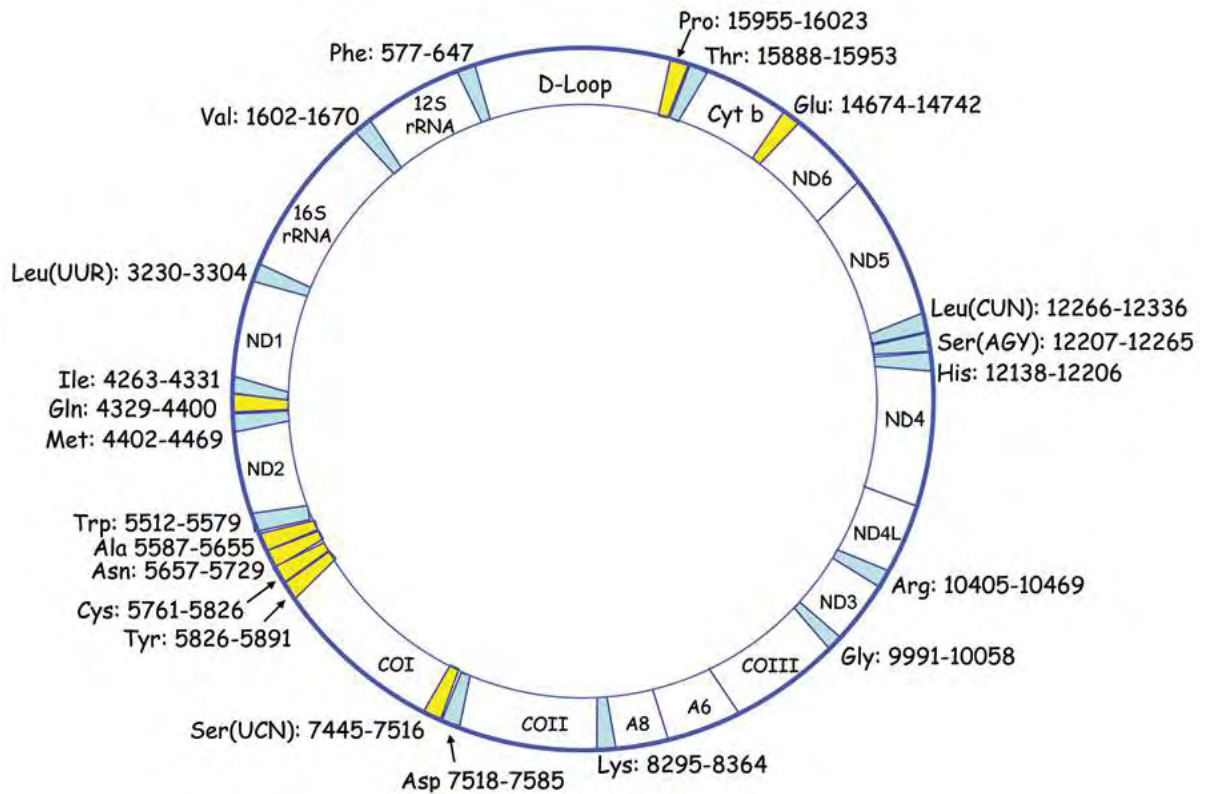
## **ΗΜΙΑΥΤΟΝΟΜΙΑ ΤΩΝ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΩΝ**

Το mtDNA είναι δίκλωνο κυκλικό μόριο, 100-1000 φορές μικρότερο του πυρηνικού. Κληρονομείται μητρικά από τη μητέρα σε όλους τους απογόνους της, καθώς το mtDNA του σπέρματος εκφυλίζεται μετά τη γονιμοποίηση. Το mtDNA διαθέτει δύο μη κωδικές περιοχές: μία περιοχή ελέγχου που περιλαμβάνει τρεις υπερμεταβλητές περιοχές και μια περιοχή μετατόπισης, την D-loop, η οποία ελέγχει την αντιγραφή του mtDNA.

Τα μιτοχόνδρια διαθέτουν τον απαραίτητο μηχανισμό για να αξιοποιήσουν τη δική τους γενετική πληροφορία, ο οποίος περιλαμβάνει μιτοχονδριακές DNA-πολυμεράσες και RNA-πολυμεράσες, ριβοσώματα και μεταφορικά RNA. Συγκεκριμένα, το μιτοχονδριακό γονιδίωμα περιλαμβάνει 37 γονίδια (Εικόνα 2), τα οποία κωδικοποιούν:

- 13 υδρόφοβες πρωτεΐνες- υπομονάδες των συμπλόκων της αναπνευστικής αλυσίδας που συμμετέχουν στη μεταφορά ηλεκτρονίων και τη σύνθεση ATP (σύμπλοκα I, III και IV).
- 2 ριβοσωμικά RNAs (rRNAs): το 12S και το 16S. Τα μιτοχονδριακά ριβοσώματα σχηματίζονται από τη μικρή 28S υπομονάδα, η οποία περιλαμβάνει το 12S rRNA και 29 πρωτεΐνες πυρηνικής προέλευσης και τη μεγάλη 39S υπομονάδα, η οποία αποτελείται από το 16S rRNA και 48 πρωτεΐνες πυρηνικής προέλευσης.
- 22 μεταφορικά RNAs (tRNAs)

Η συνεισφορά των μιτοχονδρίων στα κύτταρα εξαρτάται όχι μόνο από την έκφραση του μιτοχονδριακού γονιδιώματος, αλλά και από την έκφραση των πολυάριθμων πυρηνικών γονιδίων, των οποίων τα προϊόντα εισάγονται στα μιτοχόνδρια.



**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 καταναμημένα ως μονάδες ή σχηματίζοντας ομάδες, μεταξύ των άλλων RNAs.

## ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ ΤΩΝ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΩΝ

Ο κύριος ρόλος των μιτοχονδρίων είναι η παραγωγή ενέργειας με μηχανισμούς που είναι γνωστοί ως **βιολογικές οξειδώσεις** και οι οποίοι περιλαμβάνουν τις αντιδράσεις παραγωγής CO<sub>2</sub> από τρι- και δικαρβονικά οξέα (κύκλος του Krebs), τη μεταφορά ηλεκτρονίων, την παραγωγή ATP, την οξείδωση λιπαρών οξέων και τον καταβολισμό των αμινοξέων.

### Οξειδωτική φωσφορυλίωση

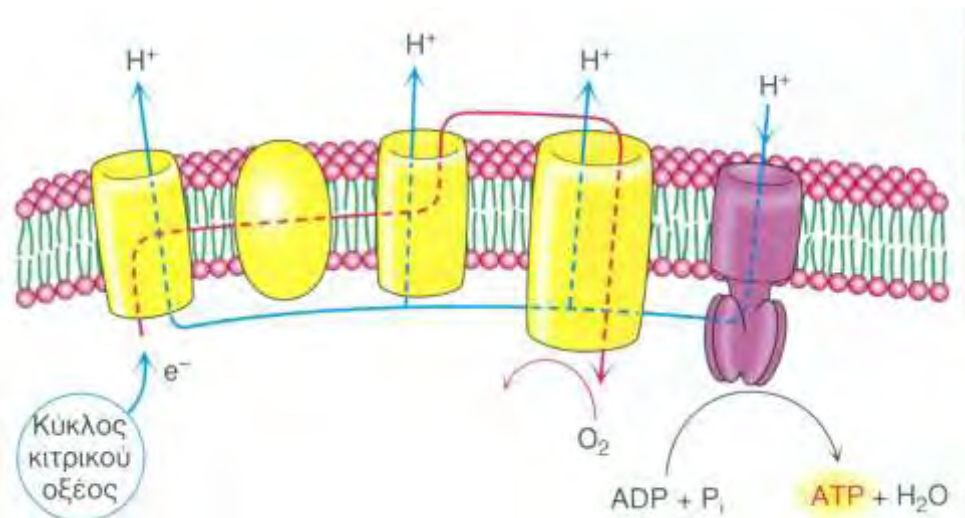
**Οξειδωτική φωσφορυλίωση** ονομάζεται η διαδικασία παραγωγής ATP από ADP και Pi στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη, κατά τη μεταφορά ηλεκτρονίων από το NADH και το FADH<sub>2</sub> προς το O<sub>2</sub> δια μέσου μιας σειράς φορέων ηλεκτρονίων (Εικόνα 3). Η αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη περιλαμβάνει τέσσερα σύμπλοκα. Το NADH και το FADH<sub>2</sub> μεταφέρουν ηλεκτρόνια στα σύμπλοκα I και II (Εικόνα 4). Η αλυσίδα αυτή συνδέεται άμεσα με την παραγωγή ATP, καθώς κάθε σύμπλοκο συνδέεται με μεταφορά H<sup>+</sup>. Με την ενέργεια που παράγεται μέσω της μεταφοράς ηλεκτρονίων αντλούνται πρωτόνια από τη μήτρα στον ενδομεμβρανικό χώρο. Έτσι, δημιουργείται διαβάθμιση πυκνότητας στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη και άρα, διαφορά δυναμικού εκατέρωθεν αυτής. Η ATP-συνθάση επιτρέπει τη μεταφορά μέσω της μεμβράνης αυτής, ώστε να αποκτήσει την απαιτούμενη ενέργεια για να παράγει ATP.

Η οξειδωτική φωσφορυλίωση είναι η κύρια πηγή ATP και αποτελεί το επιστέγασμα μιας σειράς ενεργειακών μετασχηματισμών, οι οποίοι ονομάζονται στο σύνολό τους **κυτταρική αναπνοή**. Γενικά, κατά την κυτταρική αναπνοή καταναλώνονται πυροσταφυλικό οξύ, λιπαρά οξέα, ADP, φωσφορικές ομάδες και οξυγόνο, ενώ παράγονται CO<sub>2</sub> και H<sub>2</sub>O με τη χρήση ενζύμων της αναπνευστικής αλυσίδας (Εικόνα 4), όπως το NADH στο σύμπλοκο I, η ηλεκτρική δεϋδρογενάση στο σύμπλοκο II, το κυτόχρωμα bc<sub>1</sub> στο σύμπλοκο III και η οξειδάση του κυτοχρώματος c στο σύμπλοκο IV (Johannsen et al. 2009).

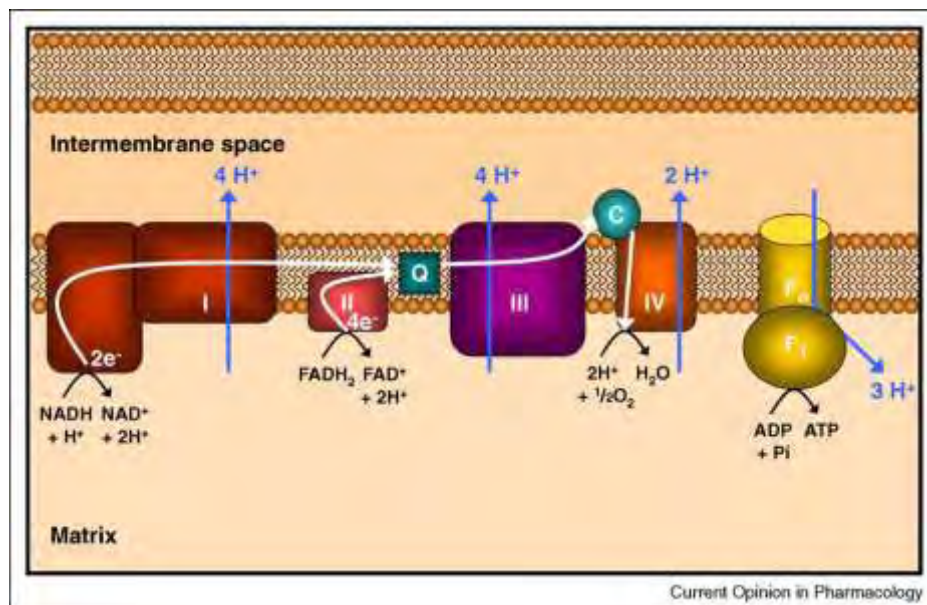
Κατά τον αερόβιο μεταβολισμό, το πυροσταφυλικό άλας οξειδώνεται σε ακετυλο-συνένζυμο A, το οποίο συμμετέχει στον κύκλο του Krebs που λαμβάνει χώρα στη μιτοχονδριακή μήτρα. Τελικά παράγονται τα υποστρώματα μεταφοράς ηλεκτρονίων, το NADH και το FADH<sub>2</sub>.

Στον αναερόβιο μεταβολισμό, το πυροσταφυλικό άλας μετατρέπεται σε γαλακτικό οξύ και πλέον, τα κύτταρα εξαρτώνται από τη σύνθεση ATP που θα παραχθεί μέσω της γλυκόλυσης.

Οι δύο κύριες λειτουργίες της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης είναι: α) Παραγωγή ATP από ADP και Pi, β) παραγωγή θερμότητας. Καθώς η αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων, η οποία σχηματίζεται και διατηρείται μέσω της αλληλεπίδρασης μιτοχονδριακού και πυρηνικού γονιδιώματος, παίζει ουσιαστικό ρόλο στην παραγωγή κυτταρικής ενέργειας. Διαταραχές που επηρεάζουν τη δραστηριότητα της αναπνευστικής αλυσίδας προκαλούν διάφορες δυσλειτουργίες στα ποικίλα συστήματα του ανθρώπινου οργανισμού.



**Εικόνα 3:** Παραγωγή ATP. Τα μιτοχόνδρια οξειδώνουν οργανικά μόρια για την παραγωγή ενέργειας. Αυτή η διαδικασία απαιτεί τη μεταφορά ηλεκτρονίων μέσω πρωτεϊνικών συμπλόκων (κίτρινο χρώμα), ορισμένα από τα οποία αντλούν πρωτόνια, σχηματίζοντας έτσι μια βαθμίδα συγκέντρωσης πρωτονίων, η οποία ωθεί τη σύνθεση ATP.



**Εικόνα 4:** Αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων στα μιτοχόνδρια. Το σύμπλοκο I δέχεται ηλεκτρόνια από το NADH. Το συνένζυμο Q δέχεται  $e^-$  από τα σύμπλοκα I και II. Μέσω της ουβικινόνης τα  $e^-$  μεταφέρονται στο σύμπλοκο III και έπειτα στο κυτόχρωμα c, το οποίο τα μεταφέρει στο σύμπλοκο IV. Το σύμπλοκο IV αξιοποιεί τα  $e^-$  και τα  $H^+$  για τη μετατροπή του  $O_2$  σε  $H_2O$ .

## mtDNA ΚΑΙ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ

Αν και το mtDNA ανακαλύφθηκε πριν από περίπου 40 χρόνια και έχει μελετηθεί εκτενώς, οι πρώτες αναφορές για μεταλλάξεις του μιτοχονδριακού γονιδιώματος δεν έγιναν πριν το 1988, όταν βρέθηκαν ελλείμματα μεγάλου μεγέθους σε ασθενείς με μιτοχονδριακή μυοπάθεια. Το ίδιο έτος ανιχνεύτηκε μια σημειακή μετάλλαξη στο γονίδιο ND4 σε μια οικογένεια που έπασχε από το σύνδρομο LHON. Από τότε και μέχρι σήμερα έχουν βρεθεί ποικίλες μεταλλάξεις στο mtDNA (DiMauro et al. 2001).

Σε αντίθεση με τα πυρηνικά γονίδια, καθένα από τα οποία περιέχει ένα πατρικό και ένα μητρικό αλληλόμορφο, το mtDNA υπάρχει σε εκατοντάδες ή χιλιάδες αντίγραφα σε κάθε κύτταρο. Επιβλαβείς μεταλλάξεις στο mtDNA συχνά επηρεάζουν μερικά, αλλά όχι όλα τα αντίγραφα σε ένα κύτταρο. Έτσι, τα κύτταρα μπορούν να διαθέτουν δύο πληθυσμούς mtDNA: το φυσιολογικό (άγριος τύπος) και το μεταλλαγμένο. Το φαινόμενο αυτό λέγεται **ετεροπλασμία**. Αντίθετα, στα φυσιολογικά άτομα όλα τα αντίγραφα mtDNA είναι πανομοιότυπα (**ομοπλασμία**).

Τα βιοχημικά μονοπάτια που σχετίζονται με tRNA- ασθένειες αφορούν ενεργειακές ανεπάρκειες, όπως μειωμένη κυτταρική αναπνοή (κατανάλωση οξυγόνου), μειωμένη δραστηριότητα της αναπνευστικής αλυσίδας (ανεπαρκής δραστηριότητα των συμπλόκων I και IV) και μειωμένη σύνθεση ATP. Αυτές οι ανωμαλίες οφείλονται σε απορρύθμιση της μετάφρασης των πρωτεϊνών-συμπλόκων στην αναπνευστική αλυσίδα.

Οι περισσότερες μιτοχονδριακές tRNA μεταλλάξεις είναι κυρίως **μεταπτώσεις** (από πυριμιδίνη σε πυριμιδίνη ή από πουρίνη σε πουρίνη) και λιγότερο **μεταστροφές**. Γνωρίζοντας το θεμελιώδη ρόλο των αντικωδικονίων, είναι κατανοητό πως οποιαδήποτε αντικατάσταση υποστούν θα έχει σοβαρές επιπτώσεις στην υγεία.

Το mtDNA είναι πιο επιρρεπές σε μεταλλάξεις, σε σχέση με το πυρηνικό DNA, γιατί συνδέεται άμεσα με την παραγωγή ενεργών ριζών οξυγόνου (ROS), δε διαθέτει προστατευτικούς μηχανισμούς (ιστόνες, δομή χρωματίνης, εσώνια) και ο μηχανισμός πλαισίου ανάγνωσης δεν είναι ακριβής. Οι μεταλλάξεις του mtDNA μπορούν να έχουν καταστρεπτικά αποτελέσματα, λόγω των μειωμένων μη κωδικών περιοχών. Γενικά, έχουν ταυτοποιηθεί, μέχρι τώρα, 139 παθογενείς και 243 πολυμορφικές μιτοχονδριακές t-RNA μεταλλάξεις (Πίν. 1).

**ΠΙΝΑΚΑΣ 1: ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΣ ΚΑΙ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΚΕΣ ΣΗΜΕΙΑΚΕΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ ΣΤΑ tRNAs ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΥ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΟΥ**

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

Πάνω από το 50% των παθογόνων mtDNA μεταλλάξεων εμφανίζονται στα tRNA γονίδια. Οι παθογενείς 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.

Ο βαθμός ετεροπλασμίας και η κατανομή των μεταλλαγμένων mtDNAs στο χώρο και στο χρόνο, 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).

## **ΣΑΚΧΑΡΩΔΗΣ ΔΙΑΒΗΤΗΣ**

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. Η σύνδεση υποδοχέα ινσουλίνης ενεργοποιεί τη σύντηξη κυστιδίων Glu 4 με τη μεμβράνη και την πρόσληψη γλυκόζης.

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. Ταξινομείται σε τρεις κύριες υποκατηγορίες, ενώ υπάρχουν και κάποιες άλλες ειδικές μορφές (Πίνακας 2).

## **ΠΙΝΑΚΑΣ 2: ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΤΟΥ ΔΙΑΒΗΤΗ**

<b>Τύποι διαβήτη</b>
<b>Τύπου I</b> (ινσουλινοεξαρτώμενος, διαβήτης πρώιμης έναρξης)
<b>Τύπου II</b> (μη-ινσουλινοεξαρτώμενος, διαβήτης όψιμης έναρξης ή διαβήτης των ενηλίκων)
Διαβήτης που οφείλεται σε γενετικές διαταραχές της λειτουργίας των β-κυττάρων (π.χ. σημειακές μεταλλάξεις του mtDNA)
Διαβήτης που οφείλεται σε παγκρεατική νόσο (π.χ. χρόνια παγκρεατίτιδα, αιμοχρωμάτωση, κυστική ίνωση, καρκίνος του παγκρέατος)
Διαβήτης που οφείλεται σε ενδοκρινική νόσο (π.χ. ακρομεγαλία, σύνδρομο Cushing, σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών, φαιοχρωμοκύτωμα)
Διαβήτης της κήσεως

### **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.

### **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.

## 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 (Πίν. 2). 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.

## 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).

Το γυναικείο σώμα πρέπει να παράγει περισσότερη ινσουλίνη αφού κατά την εγκυμοσύνη η δραστηριότητά της ελαττώνεται, ειδικά από το μέσο της εγκυμοσύνης και μετά. Εάν το σώμα δεν μπορεί να το καταφέρει αυτό, προκύπτει σακχαρώδης διαβήτης της κύησης.

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.

# ΔΙΑΒΗΤΗΣ ΚΑΙ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ

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).

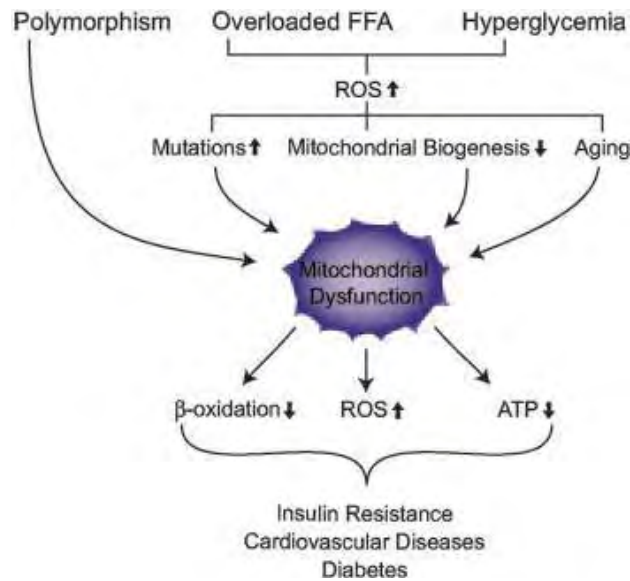
Η διατήρηση της γλυκόζης σε φυσιολογικά επίπεδα στο αίμα εξαρτάται από δύο παράγοντες: α) τη σωστή απόκριση του σκελετικού μυός και του ήπατος στην παραγωγή ινσουλίνης και β) από την έκκριση ινσουλίνης στα β-κύτταρα του παγκρέατος. Βλάβες στον πρώτο παράγοντα προκαλούν ανθεκτικότητα στην ινσουλίνη, ενώ βλάβες στο δεύτερο παράγοντα προκαλούν υπεργλυκαιμία. Οι βλάβες αυτές οφείλονται σε δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων.

Στο διαβήτη, κάποια αντικατάσταση, έλλειμμα ή διπλασιασμός μίας ή περισσότερων βάσεων, καθώς και μείωση των αντιγράφων mtDNA σε ποσοστό μεγαλύτερο από 50%, οδηγούν στην εμφάνισή του. Η σοβαρότητα της ασθένειας εξαρτάται από το ποσοστό των μεταλλαγμένων αντιγράφων mtDNA. Στην περίπτωση αυτή ελαττώνεται σημαντικά η παραγωγή ATP και έτσι εκδηλώνεται η ασθένεια. Βέβαια, σημαντικό ρόλο παίζει και ο ιστός στον οποίο θα συμβούν οι αντίστοιχες μεταλλάξεις, καθώς κάθε ιστός απαιτεί διαφορετικά ποσά ενέργειας και αντιδρά διαφορετικά στη μιτοχονδριακή δυσλειτουργία.

Ο φαινότυπος του μιτοχονδριακού διαβήτη αποδεικνύει τη σημασία της φυσιολογικής λειτουργίας της αναπνευστικής αλυσίδας στα παγκρεατικά β-κύτταρα για τη σωστή παραγωγή γλυκόζης (Maassen et al. 2007). Εκτός από το πάγκρεας, στην ομοίωση της γλυκόζης συμβάλλουν και το ήπαρ, ο μυϊκός και ο λιπώδης ιστός.

Ο διαβήτης θεωρείται ετερογενής πάθηση λόγω ποικίλων παραγόντων που οδηγούν στο συγκεκριμένο φαινότυπο. Δύο από τους παράγοντες αυτούς αποτελούν α) η δυσλειτουργία των β-κυττάρων του παγκρέατος και β) τα μειωμένα επίπεδα παραγωγής ινσουλίνης.

Όσον αφορά τα β-κύτταρα των νησιδίων Langerhans του παγκρέατος στους διαβητικούς ασθενείς, τα μιτοχόνδριά τους αυξάνονται σε αριθμό, αλλά μειώνεται ο όγκος τους και ο αριθμός των αντιγράφων mtDNA, οπότε αυξάνεται η παραγωγή ενεργών ριζών οξυγόνου (ROS) λόγω δυσλειτουργίας της αναπνευστικής αλυσίδας. Έτσι προκαλείται απόπτωση των β-κυττάρων και μειώνονται ή εξαλείφονται τα επίπεδα έκκρισης ινσουλίνης (Εικόνα 5). Η μείωση του όγκου των β-κυττάρων έχει σαν αποτέλεσμα να μην μπορούν να ανταποκριθούν στην αύξηση των επιπέδων της γλυκόζης. Έτσι διαταράσσεται η ομοίωση της γλυκόζης στον οργανισμό. Ταυτόχρονα εξαλείφονται οι μηχανισμοί άμυνας του κυττάρου ενάντια στις ROS.



**Εικόνα 5:** Μηχανισμός μιτοχονδριακής δυσλειτουργίας. Η υπερβολική πρόσληψη θρεπτικών ουσιών, σε συνδυασμό με συνθήκες υπεργλυκαιμίας, αυξάνει την παραγωγή ROS και περιορίζει σημαντικά τη βιογένεση των μιτοχονδρίων, με αποτέλεσμα τη μιτοχονδριακή δυσλειτουργία. Έτσι, μειώνονται η β-οξείδωση και η παραγωγή ATP και αυξάνεται η παραγωγή ROS, με αποτέλεσμα την ανθεκτικότητα στην ινσουλίνη και την εμφάνιση διαβήτη και καρδιαγγειακής νόσου (FFA= λιπαρά οξέα).

Οι ενεργές ρίζες οξυγόνου (ROS), οι οποίες παράγονται όχι μόνο στα μιτοχόνδρια, αλλά και ενδοκυτταρικά, συμβάλλουν σημαντικά στην εμφάνιση του διαβήτη. Στις ROS συμπεριλαμβάνονται τα ανιόντα υπεροξειδίου, τα ιόντα υδροξειδίου του υδρογόνου, και το υπεροξείδιο του υδρογόνου. Αν και παίζουν σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της βιωσιμότητας των κυττάρων, οι ROS μπορούν να αλληλεπιδράσουν με το DNA, προκαλώντας μεταλλάξεις και οδηγώντας στην παραγωγή μη λειτουργικών πρωτεϊνών, ενζύμων και λιπιδίων (ή τη μη παραγωγή τους), με αποτέλεσμα να προκύψουν βλάβες στις ενδοκυτταρικές μεμβράνες. Έτσι πραγματοποιείται απόπτωση των κυττάρων, για την οποία τα μιτοχόνδρια δέχονται και αποστέλλουν σήματα (Friederich et al. 2009).

Στους διαβητικούς ασθενείς **αυξάνεται** η οξείδωση των λιπαρών οξέων, ενώ **μειώνονται** η οξείδωση της γλυκόζης και της γλυκόλυσης, η πυκνότητα των μιτοχονδρίων, η παραγωγή μιτοχονδριακών mRNAs, ο ρυθμός φωσφορυλίωσης, η σύνθεση ATP, η μεταφορά φωσφορικού άλατος και η παραγωγή υπομονάδων και, άρα, η δραστηριότητα της αναπνευστικής αλυσίδας. Η μειωμένη οξειδωτική φωσφορυλίωση προκαλεί ανθεκτικότητα των σκελετικών μυών στην ινσουλίνη και υπεργλυκαιμία, αφού συσσωρεύονται λιπαρά οξέα και τριγλυκερίδια στα μυϊκά κύτταρα. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον προκαλεί το γεγονός ότι στους διαβητικούς μειώνεται η έκφραση των γονιδίων που παράγουν τα προϊόντα-υποστρώματα για την οξειδωτική φωσφορυλίωση, καθώς μειώνεται η έκφραση των γονιδίων που κωδικοποιούν τους ενεργοποιητές PGC-1a και PGC-1b (Friederich et al. 2009).

Η ανθεκτικότητα στην ινσουλίνη σχετίζεται άμεσα με την παχυσαρκία, η οποία επηρεάζει τη μάζα, τη δομή και τη λειτουργία των μιτοχονδρίων. Εξαιτίας της παχυσαρκίας συσσωρεύεται μεγάλη ποσότητα λίπους στους παραπάνω ιστούς, αλλά

και στον καρδιακό μυ και στα β-κύτταρα του παγκρέατος μέσω της ενεργοποίησης των κινασών της σερίνης, οι οποίες αναστέλλουν ενδιάμεσα στάδια του μεταβολισμού της γλυκόζης (Civitarese et al. 2008). Στα φυσιολογικά άτομα, τα μιτοχόνδρια έχουν την ικανότητα να μεταβαίνουν από οξείδωση της γλυκόζης σε οξείδωση των λιπαρών οξέων και το αντίστροφο. Όμως, στην περίπτωση του διαβήτη, τα μιτοχόνδρια χάνουν αυτή την ικανότητα, φαινόμενο που ονομάζεται **‘μεταβολική ακαμψία’**.

Εκτός από την παχυσαρκία, η ανθεκτικότητα στην ινσουλίνη οφείλεται και στους εξής μηχανισμούς: την ανώμαλη μετάδοση σημάτων μεταξύ των παγκρεατικών κυττάρων από πεπτιδικές ορμόνες και κυτοκίνες, τη μη σωστή λειτουργία του μεταβολισμού και την αύξηση στρες που επηρεάζει τα μονοπάτια μεταγωγής σήματος. Το οξειδωτικό στρες παράγεται από την υπερπαραγωγή υπεροξειδίου από τη μιτοχονδριακή αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων και παίζει σημαντικό ρόλο στην εμφάνιση του διαβήτη, την καταστροφή των β-κυττάρων, την επαγωγή ανθεκτικότητας στην ινσουλίνη και την ανάπτυξη καρδιαγγειακής νόσου. Οι μηχανισμοί αυτοί σχετίζονται άμεσα με τα μιτοχόνδρια των παγκρεατικών β-κυττάρων (Szabadkai et al. 2009).

Οι κυτοκίνες που εκκρίνονται από το λιπώδη ιστό ρυθμίζουν την απόκριση του ήπατος και των μυών στην έκκριση ινσουλίνης. Ωστόσο, τα λιπαρά οξέα και οι μεταβολίτες τους, όπως το ακυλ-συνένζυμο As, η διακυλγλυκερόλη και τα κεραμίδια παίζουν εξίσου σημαντικό ρόλο στην παραγωγή ινσουλίνης (Lowell et al. 2005). Με την αύξηση της οξείδωσης των λιπαρών οξέων στους διαβητικούς ασθενείς, αυξάνονται τα επίπεδα του ακυλ-συνενζύμου As και του κιτρικού άλατος, με αποτέλεσμα την αναστολή της πυροσταφυλικής δεϋδρογενάσης και της φωσφοφρουκτοκινάσης, δύο ένζυμα απαραίτητα για την αξιοποίηση της γλυκόζης. Επομένως αναστέλλονται αυτά τα στάδια της γλυκόλυσης, με αποτέλεσμα την αύξηση της γλυκόζης στο κύτταρο και της 6-P-γλυκόζης και τη μείωση της παραγωγής και έκκρισης ινσουλίνης.

Περίπου στα 3/4 των ασθενών με μιτοχονδριακές μεταλλάξεις έχει εμφανιστεί μητρικά κληρονομούμενος διαβήτης στο οικογενειακό ιστορικό και περισσότερες από δύο σημειακές μεταλλάξεις είναι υπεύθυνες για την εμφάνισή του (Ming-zhen et al. 2008).

## ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Εκτιμάται ότι μέχρι το 2025 το 5,4% του παγκόσμιου πληθυσμού (300 εκατ.) θα πάσχει από διαβήτη (Stirban et al 2008). Αυτό δείχνει τη σημασία κατανόησης και προσπάθειας καταπολέμησης της συγκεκριμένης ασθένειας και των επιπλοκών της. Οι επιπλοκές εμφανίζονται μακροπρόθεσμα και επιβαρύνουν σημαντικά την ποιότητα ζωής αυτών των ανθρώπων. Η γενετική ανάλυση δίνει τη δυνατότητα ακριβούς ταυτοποίησης του μιτοχονδριακού διαβήτη.

Δεδομένου του ρόλου των μιτοχονδρίων στο μηχανισμό εμφάνισης διαβήτη, θελήσαμε να ταυτοποιήσουμε μεταλλάξεις σε μιτοχονδριακά t-RNA γονίδια σε ασθενείς που πάσχουν από διαβήτη, με σκοπό να μελετήσουμε το ρόλο μεταλλάξεων mtDNA στη δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων.

# ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ





# Βιολογικό υλικό

Τα δείγματα αίματος που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία συλλέχθηκαν από το Περιφερειακό Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας. Συνολικά συλλέχθηκαν 102 δείγματα αίματος από ασθενείς με διαβήτη, τα οποία αποθηκεύτηκαν στους -20 °C.

## ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΟΛΙΚΟΥ DNA

Για την απομόνωση ολικού DNA από αίμα χρησιμοποιήθηκε το εξής πρωτόκολλο:

- Προσθέτουμε σε σωλήνες erpendorf 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 5μl 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 φυγοκέντρηση 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 °C για 15 λεπτά. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 20 λεπτά.
- Απομακρύνουμε το υπερκείμενο, προσθέτουμε 1 ml παγωμένη αιθανόλη 70% για έκπλυση του ιζήματος. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 10 λεπτά.
- Απομακρύνουμε το υπερκείμενο και τοποθετούμε τα δείγματα στο φούρνο, στους 37 °C, για ξήρανση.
- Προσθέτουμε 100 μl ddH<sub>2</sub>O, ώστε να επαναδιαλυθεί το DNA που βρίσκεται υπό τη μορφή ιζήματος.
- Τα δείγματα διατηρούνται στους 4 °C για 1-2 ημέρες, έως ότου ολοκληρωθεί η επαναδιάλυση του DNA και έπειτα φυλάσσονται στους -20 °C.

Μετά την ολοκλήρωση της απομόνωσης του DNA, ελέγχονται 5 µl διαλύματος DNA από κάθε δείγμα, με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 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.

# 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 DNA πολυμεράσης από το *Thermus aquaticus*, έχει διευκολύνει σε τεράστιο βαθμό και έχει επιφέρει πραγματική επανάσταση στη μοριακή διαγνωστική.

Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR) είναι μια σχετικά 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.

Στην αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης διακρίνονται τα εξής στάδια:

## 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

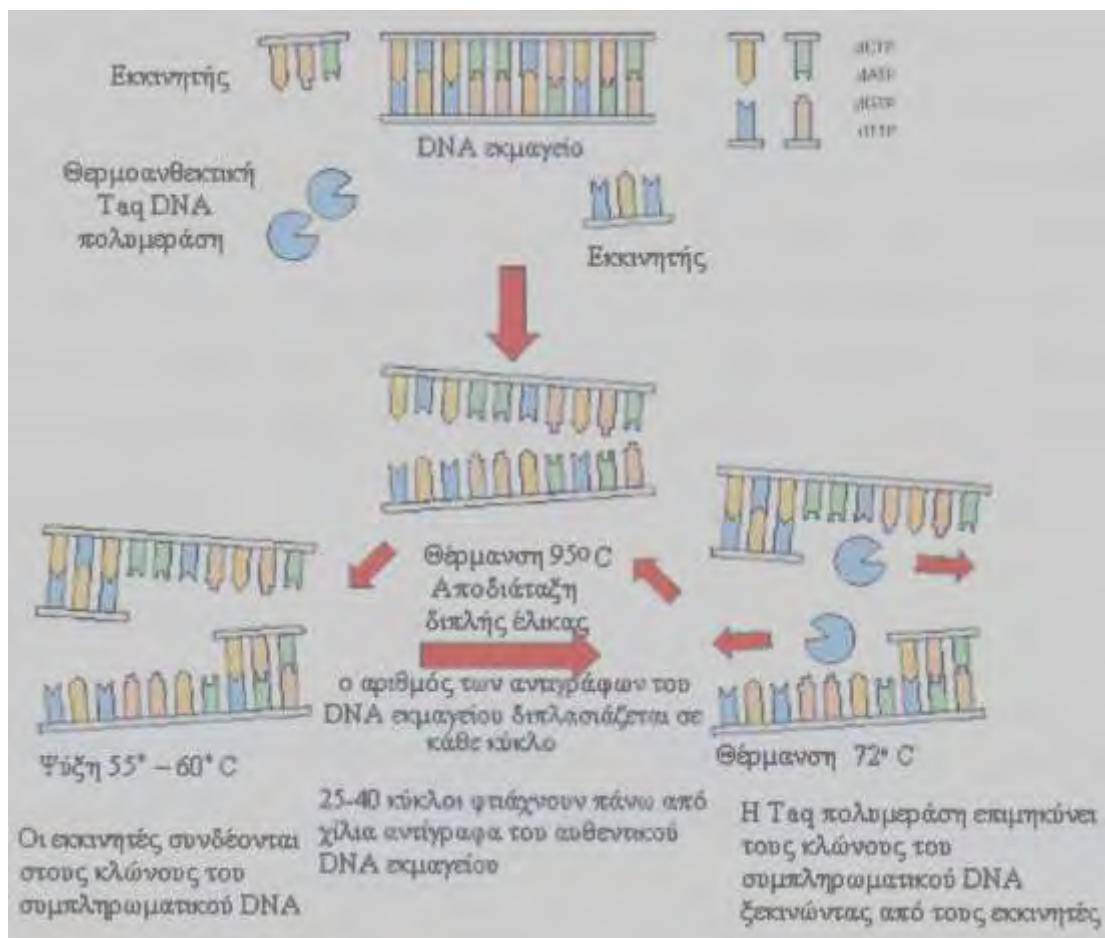
Στο στάδιο αυτό η θερμοκρασία ρυθμίζεται κατάλληλα ώστε να διευκολυνθεί η υβριδοποίηση των εκκινητών με τις συμπληρωματικές τους αλληλουχίες στα μονόκλιωνα μόρια του εκμαγείου του DNA. Η θερμοκρασία εξαρτάται από τη σύσταση των εκκινητών που χρησιμοποιούνται.

## 3. Επιμήκυνση

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

Τα παραπάνω στάδια επαναλαμβάνονται για περίπου 30 κύκλους (Εικόνα 6). 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 6:** Τρόπος λειτουργίας της PCR. Η δίκλωνη έλικα DNA αποδιάσσεται σε κατάλληλη θερμοκρασία, οι εκκινητές συνδέονται στα αντίστοιχα συμπληρωματικά τμήματα του κάθε κλώνου και η Taq 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. Επιπλέον πρέπει κατά την απομόνωση να αποφεύγεται το σπάσιμο του DNA, ώστε να μην δυσχεραίνεται ο υβριδισμός των εκκινητών.

## 2) DNA πολυμεράση

Η θερμοανθεκτική Taq πολυμεράση προέρχεται από το θερμόφιλο βακτήριο *Thermus aquaticus*. Με την ανακάλυψη της πολυμεράσης αυτής αυτοματοποιήθηκε η όλη διαδικασία ενίσχυσης με τη βοήθεια θερμικών κυκλοποιητών. 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'→3'.

## 6) Εκκινητές

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

Τα ζεύγη εκκινητών τα οποία χρησιμοποιήθηκαν φαίνονται στον Πίνακα 3.

**Πίνακας 3:** Εκκινητές και αλληλουχία που αναγνωρίζουν

A/A	tRNA	FW Primer RV Primer	νουκλεοτιδική θέση	μήκος (bp)
1	Leu(UUR)	AGGACAAGAGAAATAAGGCC CACGTTGGGGCCTTTGCGTA	3130-3149 3423-3404	294
2	Lys	GCTCTGAAATCTGTGGAGCA ACGGTAGTATTTAGTTGGGG	8172-8191 8388-8369	217
3	Leu(CUN)/Ser(AGY)/His	CATCATTACCGGGTTTTCCT ACCCAAATCTGCTTCCCAT	12115-12134 12361-12342	247
4	Glu	CCCACACTCAACAGAAACA TTGCGTATTGGGGTCATTG	14642-14660 14763-14745	122

Ο όγκος των χημικών αντιδραστηρίων που απαιτούνταν ανά δείγμα για την αντίδραση PCR για τα δείγματα DNA, φαίνονται στον Πίνακα 4.

**Πίνακας 4:** Ο όγκος των αντιδραστηρίων ανά δείγμα που απαιτούνται για την ενίσχυση των συγκεκριμένων τμημάτων των τεσσάρων γονιδίων t-RNA του mtDNA

Αντιδραστήρια	Όγκος (μl)	Τελική συγκέντρωση
DNA	1 (50- 100 ng)	1-2 ng/μl
Ρυθμιστικό διάλυμα (Buffer 10x)	5	1X
MgCl <sub>2</sub> (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 <sub>2</sub> O	39	
<b>Τελικός όγκος</b>	<b>50</b>	

Οι συνθήκες του προγράμματος του θερμικού κυκλοποιητή (Εικόνα 7) που εφαρμόστηκαν για την ενίσχυση του απαιτούμενου τμήματος του DNA φαίνονται στον Πίνακα 5:



*Εικόνα 7: Συσκευή PCR (Θερμικός κυκλοποιητής)*

*Πίνακας 5: Συνθήκες του προγράμματος στο θερμικό κυκλοποιητή*

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

Για κάποια από τα δείγματα για τα οποία εφαρμόστηκε το παραπάνω πρόγραμμα, χρησιμοποιήθηκαν 2 ή και 3 μl DNA. Ο όγκος του νερού ρυθμίστηκε ανάλογα ώστε ο τελικός όγκος των δειγμάτων να είναι 50 μl.

Η θερμοκρασία υβριδισμού για κάποια δείγματα ρυθμίστηκε στους 52 °C, 54 °C και 56 °C, ώστε να ενισχυθούν τα επιθυμητά τμήματα DNA.

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.

Ένας απλός τρόπος για να γίνεται αντιληπτή τυχόν επιμόλυνση στα δείγματα είναι να συμπεριλαμβάνεται στο πείραμα ένας μάρτυρας ελέγχου. Αυτός περιέχει όλα τα

χημικά αντιδραστήρια, πλην του DNA. Αν στον έλεγχο της PCR, που περιγράφεται παρακάτω, παρατηρηθεί ζώνη στο μάρτυρα ελέγχου, τότε υπάρχει επιμόλυνση.

## 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 γρήγορη και εύκολη 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.

*Η κινητικότητα των μορίων DNA κατά την ηλεκτροφόρηση στην πηκτή αγαρόζης εξαρτάται από:*

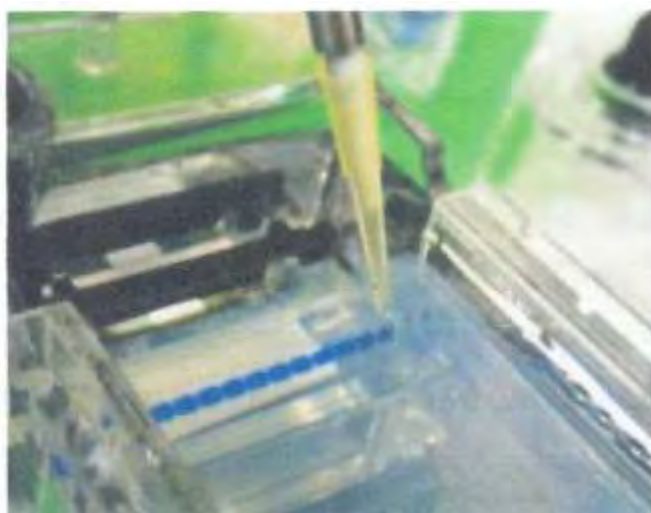
- **Το μοριακό μέγεθος των τμημάτων DNA που πρόκειται να διαχωριστούν.** Η κινητικότητα γραμμικών δίκλωνων μορίων DNA είναι αντιστρόφως ανάλογη προς το δεκαδικό λογάριθμο ( $\log_{10}$ ) του αριθμού των ζευγών των νουκλεοτιδίων.
- **Τη συγκέντρωση της αγαρόζης.** Η αγαρόζη είναι φυτικός πολυσακχαρίτης που παράγεται από θαλάσσια φύκη. Η πηκτή που σχηματίζεται από την αγαρόζη δεν είναι συμπαγής. Περιλαμβάνει πόρους με μέγεθος αντιστρόφως ανάλογο προς τη συγκέντρωση της αγαρόζης. Τα κομμάτια DNA διαχωρίζονται ανάλογα με το μέγεθος των πόρων.
- **Τη διαμόρφωση του DNA.** Κυκλικό και γραμμικό DNA του ίδιου MB παρουσιάζουν διαφορετική ηλεκτροφορητική κινητικότητα. Κάτω από τις ίδιες συνθήκες ηλεκτροφόρησης, το κυκλικό DNA μετακινείται ταχύτερα από το γραμμικό DNA αντίστοιχου μεγέθους.
- **Την εφαρμοζόμενη τάση.** Αύξηση της τάσης προκαλεί αύξηση της ηλεκτροφορητικής κινητικότητας του DNA.
- **Το ρυθμιστικό διάλυμα.** Η ηλεκτροφορητική κινητικότητα του DNA εξαρτάται από τη σύσταση του ρυθμιστικού διαλύματος του DNA, αλλά και από την ιονική του ισχύ.

*Για την παρασκευή πηκτής αγαρόζης συγκέντρωσης 1% ακολουθούνται τα εξής βήματα:*

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 (είτε γενωματικό DNA είτε προϊόν PCR), αφού πρώτα αναμειχθούν με 2 μl χρωστικής (loading buffer) (Εικόνα 8). 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.



*Εικόνα 8: Φόρτωμα δειγμάτων σε πηκτή αγαρόζης*

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 οποία επανεκπέμπεται στα 590 nm.

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

## ΣΥΣΤΑΣΗ ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ

### **TAE 50X**

Σε 500 ml ddH<sub>2</sub>O 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 ddH<sub>2</sub>O.

### **LOADING BUFFER 6X**

Σε ένα falcon των 50 ml προστίθενται:

- ✓ Γλυκερόλη 25 ml
- ✓ Bromophenol Blue 5 ml
- ✓ TBE 10X 5 ml
- ✓ ddH<sub>2</sub>O 15 ml

$V_{\text{τελ}} = 50 \text{ ml}$

### **TBE 10X**

Σε 1 L ddH<sub>2</sub>O προστίθενται:

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

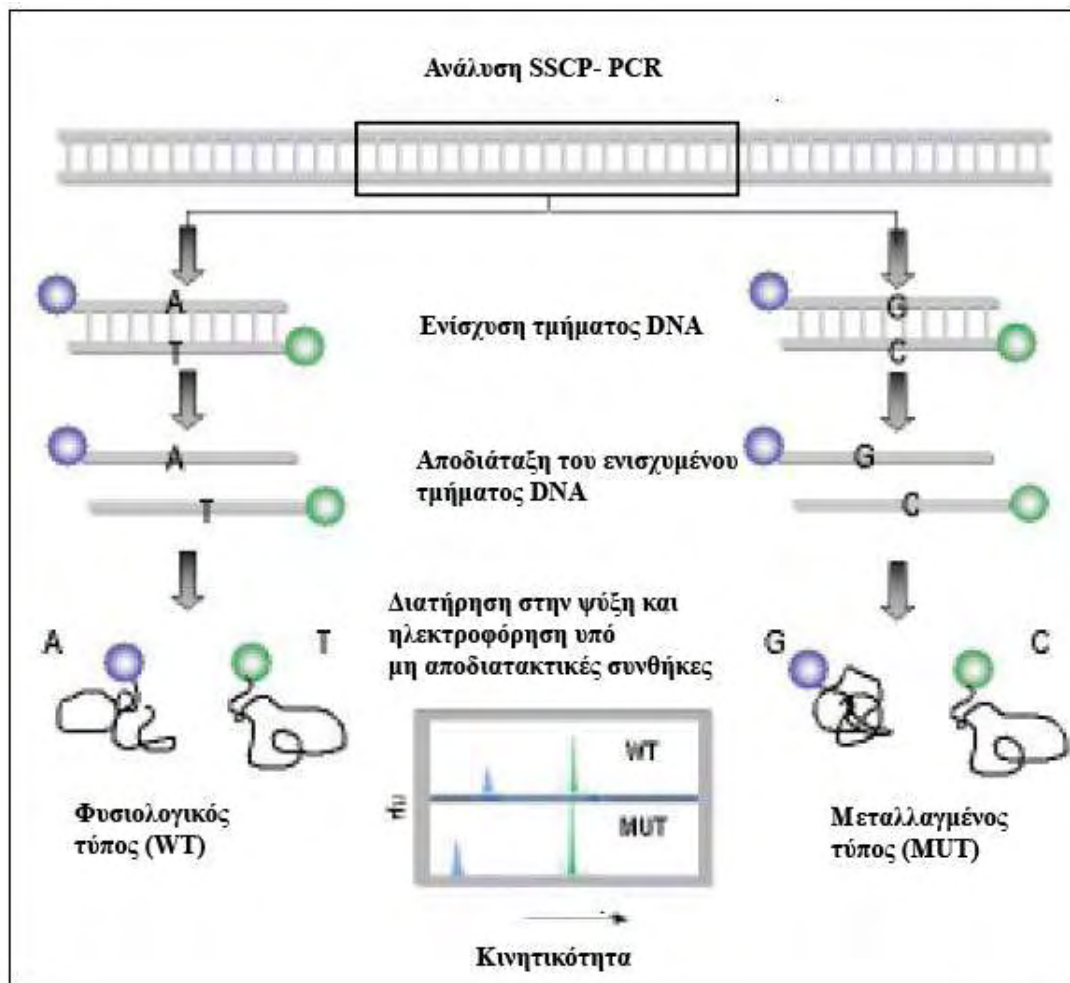
$V_{\text{τελ}} = 1 \text{ L}$

## **Μέθοδος Ανάλυσης Πολυμορφισμού μονοκλωνικής διαμόρφωσης (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 μονόκλιωνα τμήματα DNA παίρνουν ένα συγκεκριμένο τρισδιάστατο σχήμα, ανάλογα με τη νουκλεοτιδική τους αλληλουχία και αποκτούν διαφορετική διαμόρφωση (Εικόνα 9). 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.



**Εικόνα 9:** Ηλεκτροφόρηση αποδιαταγμένων τμημάτων DNA κατά την ανάλυση SSCP. Τα προϊόντα PCR αποδιατάσσονται και ηλεκτροφορούνται σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου και ανάλογα με την νουκλεοτιδική τους αλληλουχία, αποκτούν διαφορετική διαμόρφωση.

Η ανάλυση SSCP παρουσιάζει πολλά πλεονεκτήματα για τον γρήγορο μαζικό έλεγχο γνωστών γονιδιακών τύπων για μεταλλάξεις, καθώς είναι εύρηστη, δεν απαιτεί χρήση ραδιενεργών ουσιών για την ανίχνευση και δεν χρειάζεται ειδικό εξοπλισμό. Από την άλλη πλευρά, 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

Εκτός από το μέγεθος του τμήματος DNA και την περιεκτικότητά του σε GC, άλλες παράμετροι που επηρεάζουν την ευαισθησία της ανάλυσης SSCP είναι:

- **Σύσταση του πηκτώματος:** Το πιο κοινό πήκτωμα, με την ευρύτερη αποδοχή, 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:

### **ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΠΗΚΤΩΜΑΤΟΣ ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΙΟΥ**

- Για δύο gel διαστάσεων 20x18 cm, πάχους 2 mm, τελικού όγκου 125 ml και πυκνότητας 10%, οι ποσότητες των αντιδραστηρίων αναφέρονται στον Πίνακα 6:

**Πίνακας 6:** Ποσότητες αντιδραστηρίων για την παρασκευή πηκτώματος πολυακρυλαμιδίου 10%.

<b>ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ</b>	<b>Ποσότητες</b>
Ακρυλαμίδη	12,375 gr
Bis- Ακρυλαμίδη	0,33 gr
TBE 10X	10 ml
Γλυκερόλη 50%	12,5 ml
TEMED	125 μl
APS 20%	650 μl

Προστίθεται ddH<sub>2</sub>O μέχρι ο τελικός όγκος να γίνει 125 ml.

- Για δύο gel διαστάσεων 20x18 cm, πάχους 2 mm, τελικού όγκου 125 ml και πυκνότητας 12%, οι ποσότητες των αντιδραστηρίων αναφέρονται στον Πίνακα 7:

**Πίνακας 7:** Ποσότητες αντιδραστηρίων για την παρασκευή πηκτώματος πολυακρυλαμιδίου 12%.

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

Προστίθεται ddH<sub>2</sub>O μέχρι ο τελικός όγκος να γίνει 125 ml.

**Acrylamide / Bis- Acrylamide (N,N'-methylenebisacrylamide):** Τα πηκτώματα πολυακρυλαμίδιου δημιουργούνται με τον πολυμερισμό του ακρυλαμίδιου και του N,N'-μεθυλενο-δισ-ακρυλαμίδιου.

**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 πήζουν.

## **ΑΠΟΔΙΑΤΑΞΗ ΚΑΙ ΦΟΡΤΩΜΑ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ**

- Σε eppendorf 0.5ml προσθέτουμε 5 μl από το προϊόν PCR και 10 μl ρυθμιστικό διάλυμα 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

αποδιάσσονται πλήρως τα δίκλινα μόρια DNA. 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.

## **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<sup>ο</sup> διάλυμα:** Προσθέτουμε σε ογκομετρικό κύλινδρο 780 ml ddH<sub>2</sub>O, 20 ml αιθανόλη 100% και 1 ml οξικό οξύ.

- **1<sup>η</sup> πλύση:** Προσθέτουμε 200 ml σε κάθε πηκτώμα για 3 min.

Απομάκρυνση.

- **2<sup>η</sup> πλύση:** Προσθέτουμε 200 ml σε κάθε πήκτωμα για 3 min.

Απομάκρυνση.

- Ξεπλένουμε τα πηκτώματα με ddH<sub>2</sub>O.
- **2<sup>ο</sup> διάλυμα:** Προσθέτουμε σε ογκομετρικό κύλινδρο 400 ml διάλυμα νιτρικού αργύρου (1 gr silver staining / L ddH<sub>2</sub>O).
- Προσθέτουμε 200 ml σε κάθε πήκτωμα για 20 min.
- Ξεπλένουμε δύο φορές τα πηκτώματα με ddH<sub>2</sub>O.

➤ **3<sup>ο</sup> διάλυμα:** Προσθέτουμε σε ποτήρι ζέσεως 6 gr NaOH, 0,02 gr NaBH<sub>4</sub>, 2 ml φορμαλδεΐδη και συμπληρώνουμε με ddH<sub>2</sub>O 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 ddH<sub>2</sub>O.

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.

## ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ PCR

Ο καθαρισμός των PCR προϊόντων των δειγμάτων που επελέγησαν έγινε με QIAquick Spin<sup>®</sup> 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.

**Πίνακας 8:** Αντιδραστήρια για τον καθαρισμό των προϊόντων PCR

<b>PB Buffer</b>	<b><u>Διάλυμα συλλογής (capture buffer)</u></b> 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
<b>PE Buffer</b>	<b><u>Διάλυμα πλύσης (wash buffer)</u></b> Περιέχει αιθανόλη και χρησιμοποιείται για ξέπλυμα και την απομάκρυνση των αλάτων
<b>EB Buffer (10 mM Tris-Cl, pH 8,5)</b>	<b><u>Διάλυμα έκλυσης (elution buffer)</u></b> Εξάγει το DNA



Η διαδικασία καθαρισμού είναι η εξής:

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



*Εικόνα 10: Erpendorf με την QIAquick στήλη*

- Απομακρύνουμε το υγρό. Τοποθετούμε την QIAquick στήλη στο ίδιο erpendorf συλλογής.
- Προσθέτουμε 750 μl 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 μl 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.

## ΦΩΤΟΜΕΤΡΗΣΗ

Μετά τη διαδικασία του καθαρισμού, ακολουθεί ποσοτικός προσδιορισμός του PCR προϊόντος με φωτομέτρηση 1 μl κάθε δείγματος DNA αραιωμένο με 49 μl ddH<sub>2</sub>O (Εικόνα 11). Ανάλογα με τις τιμές της φωτομέτρησης υπολογίζουμε τη συγκέντρωση του δείγματος και τα δείγματα αποστέλλονται για αλληλούχιση (sequencing). Τα δείγματα τα στέλνουμε σε λυοφυλιωμένη μορφή.



*Εικόνα 11: Φωτόμετρο*

## ΛΥΟΦΙΛΙΩΣΗ

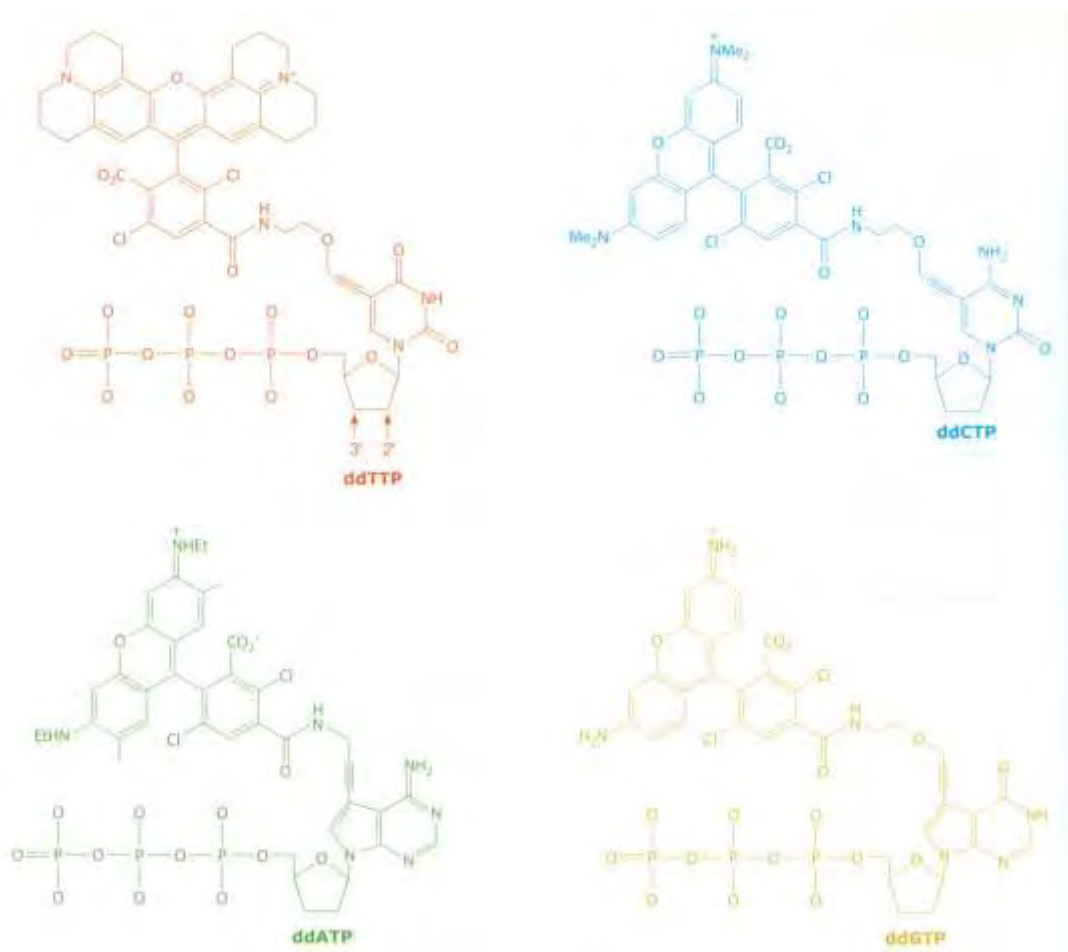
Η διαδικασία λυοφιλίωσης πριν σταλούν τα δείγματα DNA για αλληλούχιση, είναι η εξής:

- Προσθέτουμε 300 μl παγωμένη αιθανόλη 100% και 10 μl NaOAc 3M.
- Τα ανακατεύουμε ελαφρώς και τα τοποθετούμε στους -20 °C overnight.
- Φυγοκεντρούμε τα δείγματα στους 4 °C στις 13000 rpm για 20 min.
- Απομακρύνουμε το υπερκείμενο.
- Βάζουμε τα δείγματα στο φούρνο, στους 37 °C, για περίπου μία ώρα, μέχρι να απομακρυνθεί η αιθανόλη.

Παράλληλα με τα δείγματά μας στέλνουμε και τους κατάλληλους εκκινητές σε συγκέντρωση 10 pmol/μl, για τη χρησιμοποίησή τους στη διαδικασία της αλληλούχισης.

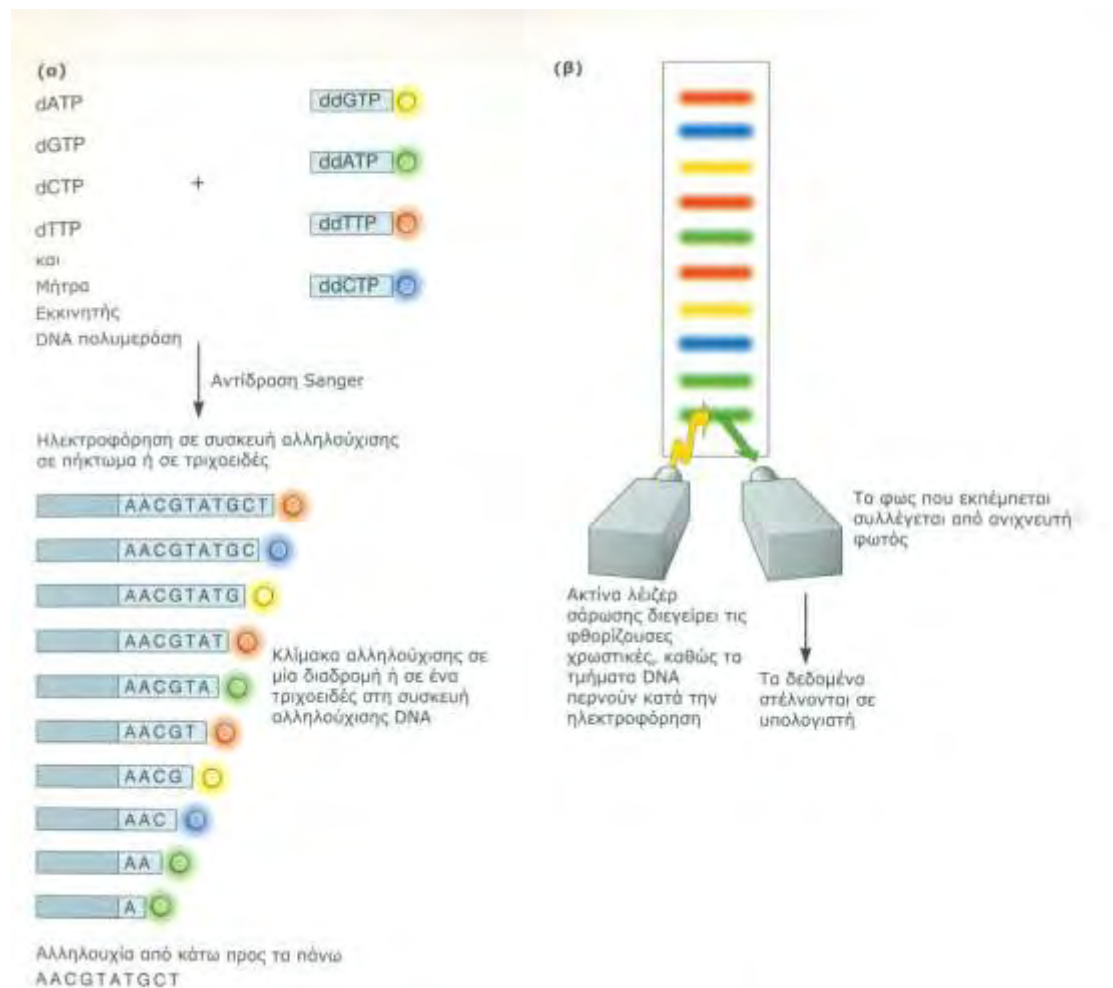
## Προσδιορισμός της Νουκλεοτιδικής Αλληλουχίας Μορίων DNA (Sequencing)

Η μέθοδος εύρεσης αλληλουχιών χρησιμοποιείται για την ανίχνευση πιθανών πολυμορφισμών σε έναν ή περισσότερους πληθυσμούς. Η αλληλούχιση τεσσάρων χρωμάτων βασίζεται στην αρχή σήμανσης καθενός από τα τέσσερα ddNTP με διαφορετική φθορίζουσα ομάδα (Εικόνα 12).



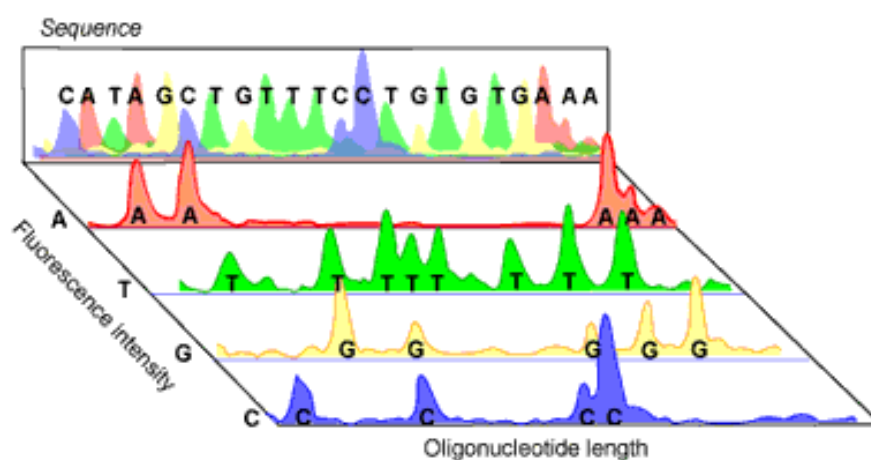
**Εικόνα 12:** Δομές διδεοξυνουκλεοτιδίων (ddNTPs) σημεισμένων με φθορίζουσες χημικές ομάδες. Κάθε ddNTP περιλαμβάνει ένα μόριο δεοξυριβόζης που φέρει μία τριφωσφορική ομάδα στην 5' θέση και τη βάση στην 1' θέση, τα και στα κανονικά dNTPs. Το σάκχαρο δεν διαθέτει OH στην 3' θέση κι έτσι ονομάζεται διδεοξυριβόζη. Αυτά τα πρόδρομα μόρια ενσωματώνονται στην νεοσυντιθέμενη αλυσίδα DNA από την DNA πολυμεράση, τα προκαλούν τον τερματισμό τα αντίδρασης, αφού δεν υπάρχει δυνατότητα προσθήκης επόμενου καταλοίπου. Σε κάθε ddNTP (ddATP, ddTTP, ddCTP, ddGTP) ενώνεται μία διαφορετική φθορίζουσα ομάδα, σε θέση που δεν επηρεάζει το ζευγάρωμα των βάσεων κατά τη σύνθεση του DNA.

Οι φθορίζουσες χρωστικές συνδέονται στα ddNTP με τρόπο που δεν εμποδίζει την DNA πολυμεράση να τα ζευγαρώνει με τη συμπληρωματική τα βάση στη DNA-μήτρα. Επειδή τα φωτεινά σήματα που εκπέμπονται από καθεμιά από τα χρωστικές διακρίνονται μεταξύ τα, μπορούν να γίνουν και οι τέσσερις αντιδράσεις τερματισμού των αλυσίδων ταυτόχρονα στο ίδιο σωληνάκι και να διαχωριστούν σε μία μόνο διαδρομή τα πηκτώματος ηλεκτροφόρησης. Τα φθοροσημασμένα τμήματα εντοπίζονται αυτόματα σε πραγματικό χρόνο κατά την ηλεκτροφόρηση, καθώς κάθε διαδοχικό τμήμα, μεγαλύτερο από το προηγούμενο κατά μία βάση, διέρχεται από το σύστημα ανίχνευσης του μηχανήματος αλληλούχισης που λειτουργεί με λείζερ (Εικόνα 13).



**Εικόνα 13:** Αυτοματοποιημένη αλληλούχιση.

Η χρωστική που έχει προσδεθεί σε κάθε ddNTP, στο άκρο κάθε τμήματος DNA, διεγείρεται από το λέιζερ και εκπέμπει ένα σήμα χαρακτηριστικό για τη χρωστική αυτή. Κάθε σήμα αντιστοιχεί σε μία από τα τέσσερις διαφορετικές βάσεις και η ανίχνευσή του αποκαλύπτει την ταυτότητα τα βάσης που υπάρχει στο άκρο όπου έχει τερματιστεί η σύνθεση τα αλυσίδας. Ευαίσθητοι ανιχνευτές συλλέγουν τα σήματα αυτά, τα οποία στέλνονται σε έναν υπολογιστή για ανάλυση (Εικόνα 14). Η αυτόματη συλλογή δεδομένων από τα ανιχνευτές εξαλείφει το πιο δύσκολο και επισφαλές βήμα τα συμβατικής αλληλούχισης, αυτό τα ερμηνείας τα εικόνας του ραδιενεργού πηκτώματος, καθιστώντας τη διαδικασία τα αλληλούχισης ευκολότερη και αποδοτικότερη.



**Εικόνα 14:** Γράφημα μιας αντίδρασης αλληλούχισης. Κατά την ηλεκτροφόρηση, μια ακτίνα λέιζερ αναγνωρίζει την ακτίνα φθορισμού κάθε βάσης και οι πληροφορίες συγκεντρώνονται σε μία εικόνα. Κάθε χρώμα ή ένταση φθορισμού αντιστοιχεί σε μια διαφορετική νουκλεοτιδική βάση, με αποτέλεσμα να ερμηνεύεται η σειρά των νουκλεοτιδίων στην αλληλουχία που τα ενδιαφέρει.

## Αυτόματος Αναλυτής Αλληλουχιών (Sequencer)

Τα δείγματα που στέλνονται στην Κορέα για αλληλούχιση (sequencing), όπου αναλύονται με τον αυτόματο αναλυτή, ο οποίος λειτουργεί σύμφωνα με τη μέθοδο εύρεσης αλληλουχίας κατά Sanger. Η μέθοδος αυτή αποτελείται από τρία στάδια:

### Α' Στάδιο

Η DNA πολυμεράση συνθέτει έναν συμπληρωματικό κλώνο ξεκινώντας από έναν εκκινητή, κατά μήκος του άγνωστου ενθέματος που θα αλληλουχηθεί. Χρησιμοποιούνται τέσσερις διαφορετικές αντιδράσεις που η κάθε μια περιλαμβάνει ένα διδεοξυ-ανάλογο των τεσσάρων νουκλεοτιδίων G, A, C και Τα αναμειγμένα σε καθορισμένη ποσότητα με κανονικά νουκλεοτίδια. Με τη βοήθεια των διδεοξυ-αναλόγων, οι αντιδράσεις επιμήκυνσης σταματούν τυχαία τη στιγμή που η DNA πολυμεράση προσθέτει το διδεοξυ-ανάλογο αντί του κανονικού νουκλεοτιδίου. Για την επισήμανση των τεσσάρων αντιδράσεων χρησιμοποιούνται τέσσερις διαφορετικές φθορίζουσες χρωστικές, οι οποίες συνδέονται με τα διδεοξυ-νουκλεοτίδια ή με τα εκκινητές.

### Β' Στάδιο

Οι τέσσερις διαφορετικές αντιδράσεις με τα κομμάτια διαφορετικών μεγεθών, που έχουν προκύψει από το τυχαίο σταμάτημα των αντιδράσεων, ομαδοποιούνται και ηλεκτροφορούνται μαζί, σε μια στήλη ή τριχοειδές. Οι ηλεκτροφορητικές συνθήκες επιτρέπουν το διαχωρισμό τμημάτων DNA που διαφέρουν σε μέγεθος τα νουκλεοτιδίου.

### Γ' Στάδιο

Καθώς τα τμήματα DNA φτάνουν στο τέλος τα ηλεκτροφόρησης, σαρώνονται με τη βοήθεια λέιζερ. Το λέιζερ προκαλεί την εκπομπή φωτός από τα επισημασμένα τμήματα DNA σε διαφορετικό μήκος κύματος, ανάλογα με τη φθορίζουσα χρωστική. Με τη βοήθεια φωτοκυττάρου ανιχνεύεται η εκπομπή του φωτός και το σήμα μεταφέρεται σε ηλεκτρονικό υπολογιστή, ο οποίος αυτόματα αναλύει και αποθηκεύει τα δεδομένα. Η ύπαρξη νουκλεοτιδίου A επισημαίνεται και φθορίζει σε χρώμα πράσινο, το G μαύρο, το C μπλε και το Τα κόκκινο.

Η ανάλυση των αλληλουχιών πραγματοποιήθηκε με τα προγράμματα **Bioedit** και **Clustal**.

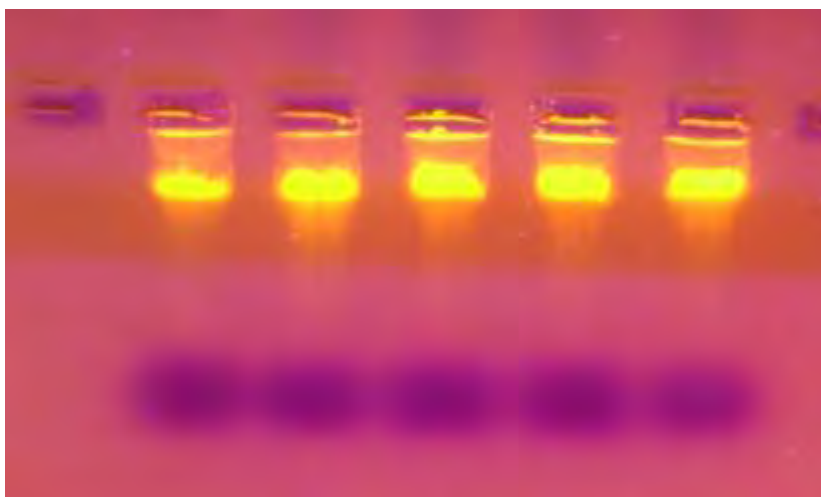
# ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ



Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν 102 ασθενείς που πάσχουν από διαβήτη με σκοπό τον προσδιορισμό μεταλλάξεων στα μιτοχονδριακά γονίδια tRNA και στις παρακείμενες περιοχές των γονιδίων αυτών. Στους διαβητικούς ασθενείς μελετήθηκαν συνολικά 4 μιτοχονδριακά tRNA γονίδια.

## ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA

Πραγματοποιήθηκε απομόνωση DNA από δείγματα αίματος 102 ασθενών, τα οποία προήλθαν από το Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας. Το αποτέλεσμα της απομόνωσης εκτιμήθηκε μετά από ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης συγκέντρωσης 2% στα 100 V και εξέταση σε τράπεζα υπεριώδους φωτός (Εικόνα 15). Στις περιπτώσεις εκείνες που το αποτέλεσμα κρίθηκε ικανοποιητικό, ακολούθησε ενίσχυση με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR). Η απομόνωση DNA ήταν επιτυχής και στα 102 δείγματα.



**Εικόνα 15:** Αποτελέσματα απομόνωσης DNA από ολικό αίμα ασθενών μετά από ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 2% στα 100 V.



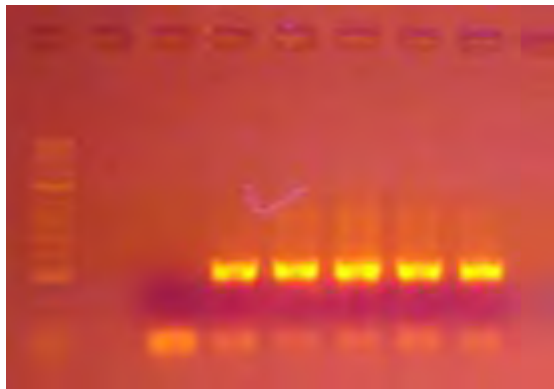
## ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΑΛΥΣΙΑΩΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)

Μετά τη διαδικασία απομόνωσης DNA, ενισχύθηκαν τμήματα που περιλαμβάνουν 4 μιτοχονδριακά tRNA γονίδια, τα οποία ήταν τα εξής:

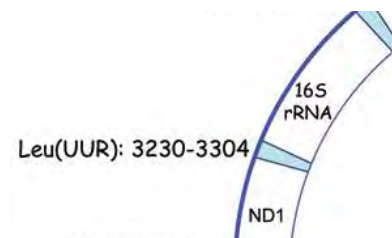
- tRNA Leu(UUR) – 294 bp
- tRNA Lys – 217 bp
- tRNA Leu(CUN)/Ser(AGY)/His (HSL) – 247 bp
- tRNA Glu – 122 bp

Τα αποτελέσματα της PCR εξετάστηκαν μετά από ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αγαρόζης 2% στα 100 V και παρατήρηση σε τράπεζα υπεριώδους φωτός (Εικόνα 16).

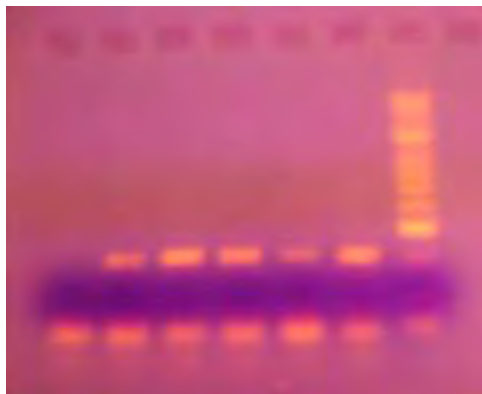
**A**



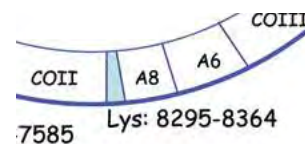
→ 294 bp



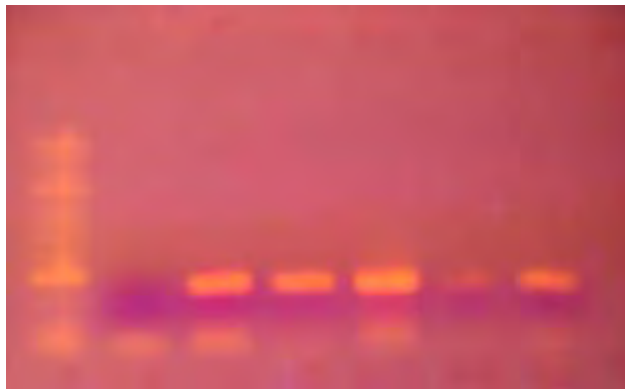
**B**



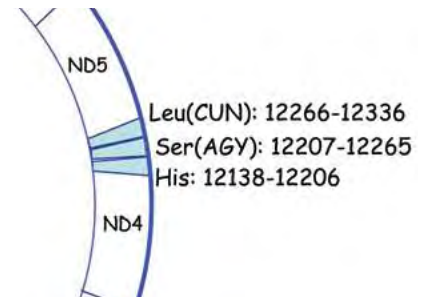
→ 217 bp



**Γ**



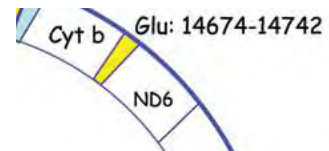
→ 247 bp



**Δ**



→ 122 bp



**Εικόνα 16:** Αποτελέσματα PCR για τις περιοχές που περιλαμβάνουν τα 4 tRNA γονίδια που ενισχύθηκαν με τη χρήση κατάλληλων εκκινητών και ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης 2% στα 100 V. A: tRNA Leu(UUR), B: tRNA Lys, Γ: tRNA Leu(CUN)/Ser(AGY)/His (HSL), Δ: tRNA Glu

## Μέθοδος Ανάλυσης Πολυμορφισμού μονοκλωνικής διαμόρφωσης (SSCP) και Εύρεση Αλληλουχίας

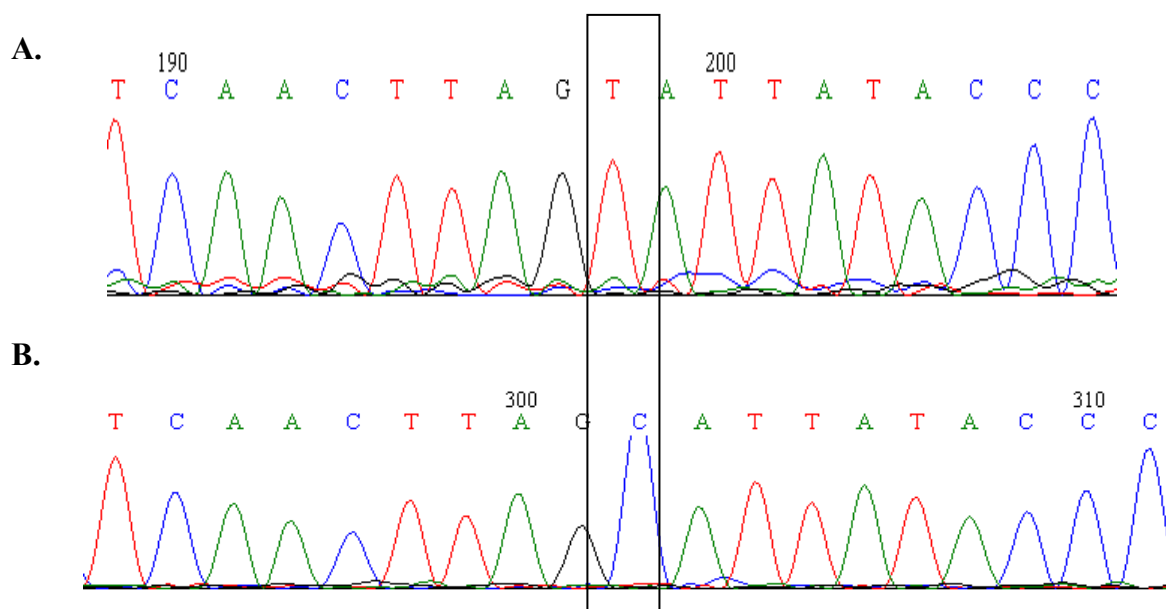
Όλες οι μεταλλάξεις και οι πολυμορφισμοί των μιτοχondριακών γονιδίων tRNA που μελετήθηκαν, ανιχνεύτηκαν με τη μέθοδο SSCP και ταυτοποιήθηκαν με τη μέθοδο της αυτόματης αλληλούχισης.

Το tRNA γονίδιο για τη λευκίνη [Leu(UUR)] βρίσκεται στη θέση 3230-3304 στο μιτοχondριακό γονιδίωμα, μεταξύ των γονιδίων ND1 και 16S rRNA (Εικόνα 16Α). Δεν ανιχνεύτηκαν μεταλλάξεις στο συγκεκριμένο γονίδιο. Ωστόσο, στον Πίνακα 9 παρατίθενται οι μεταλλάξεις που ανιχνεύτηκαν στις παρακείμενες περιοχές ND1 και 16S rRNA στους διαβητικούς ασθενείς.

**ΠΙΝΑΚΑΣ 9:** Μεταλλάξεις στις παρακείμενες περιοχές του γονιδίου tRNA<sup>Leu(UUR)</sup>

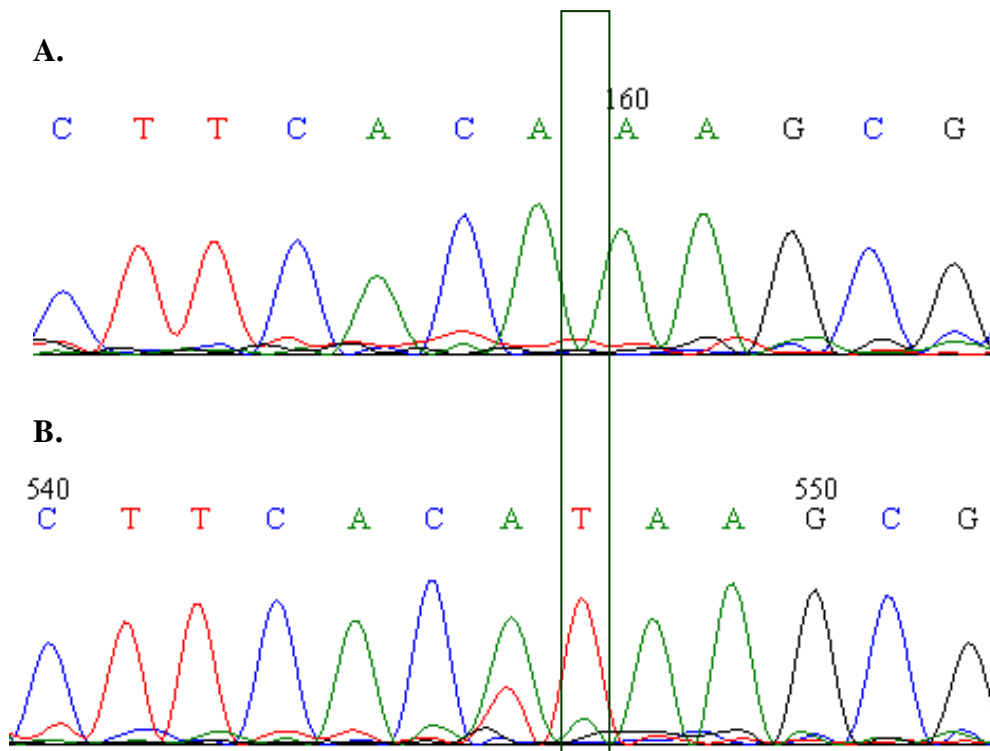
	ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΣΘΕΝΩΝ	ΠΟΣΟΣΤΑ
16S rRNA	<b>T3197C</b>	3 / 102	3%
16S rRNA	<b>Ins.3159 (T)</b>	1 / 102	1%
ND1	<b>T3336C</b>	1 / 102	1%

Η μετάλλαξη **T3197C** ανιχνεύτηκε με τη μέθοδο SSCP εντοπίζεται στη θέση 3197 του γονιδίου του μιτοχondριακού γονιδιώματος που αντιστοιχεί στο γονίδιο 16S rRNA. Η αλλαγή είναι μετάπτωση βάσης από T σε C (Εικόνα 17).



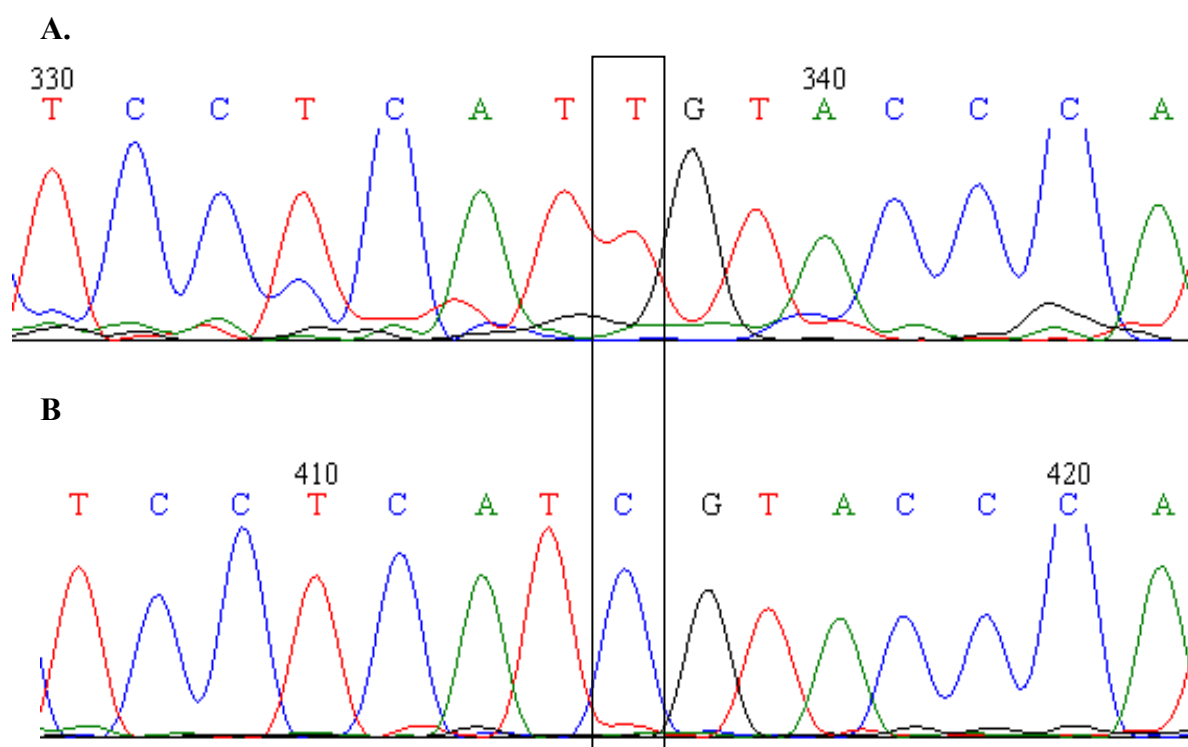
**Εικόνα 17:** Τμήμα χρωματογράφησης αλληλούχισης της περιοχής που περιλαμβάνει το γονίδιο tRNA<sup>Leu(UUR)</sup>. Α. Τμήμα της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας ενός φυσιολογικού ατόμου. Β. Τμήμα ενός ατόμου που φέρει τη μετάλλαξη **T3197C**.

Η μετάλλαξη **ins.3159 (T)** εντοπίζεται στο γονίδιο 16S rRNA και αντιστοιχεί σε προσθήκη μίας βάσης T (Εικόνα 18).



**Εικόνα 18:** Τμήμα χρωματογράφησης αλληλούχησης της περιοχής που περιλαμβάνει το γονίδιο  $tRNA^{Leu(UUR)}$ . *A.* Τμήμα της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας ενός φυσιολογικού ατόμου. *B.* Τμήμα ενός ατόμου που φέρει τη μετάλλαξη **ins.3159 (T)**.

Η μετάλλαξη **T3336C** εντοπίζεται στη θέση 3336 στο γονίδιο ND1 του μιτοχondριακού γονιδιώματος. Η αλλαγή είναι μετάπτωση βάσης από T σε C (Εικόνα 19).



**Εικόνα 19:** Τμήμα χρωματογράφησης αλληλούχησης της περιοχής που περιλαμβάνει το γονίδιο  $tRNA^{Leu(UUR)}$ . A. Τμήμα της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας ενός φυσιολογικού ατόμου. B. Τμήμα ενός ατόμου που φέρει τη μετάλλαξη **T3336C**.

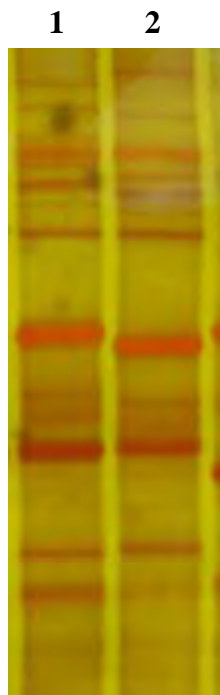
Το tRNA γονίδιο για τη λυσίνη (**Lys**) βρίσκεται στη θέση 8295-8364 στο μιτοχondριακό γονιδίωμα, μεταξύ των γονιδίων της υπομονάδας 2 της οξειδάσης του κυτοχρώματος C (COII) και της περιοχής A8 (Εικόνα 16B).

Στον Πίνακα 10 παρατίθενται οι μεταλλάξεις που ανιχνεύθηκαν στο γονίδιο  $tRNA^{Lys}$  και στις παρακείμενες περιοχές, στους διαβητικούς ασθενείς.

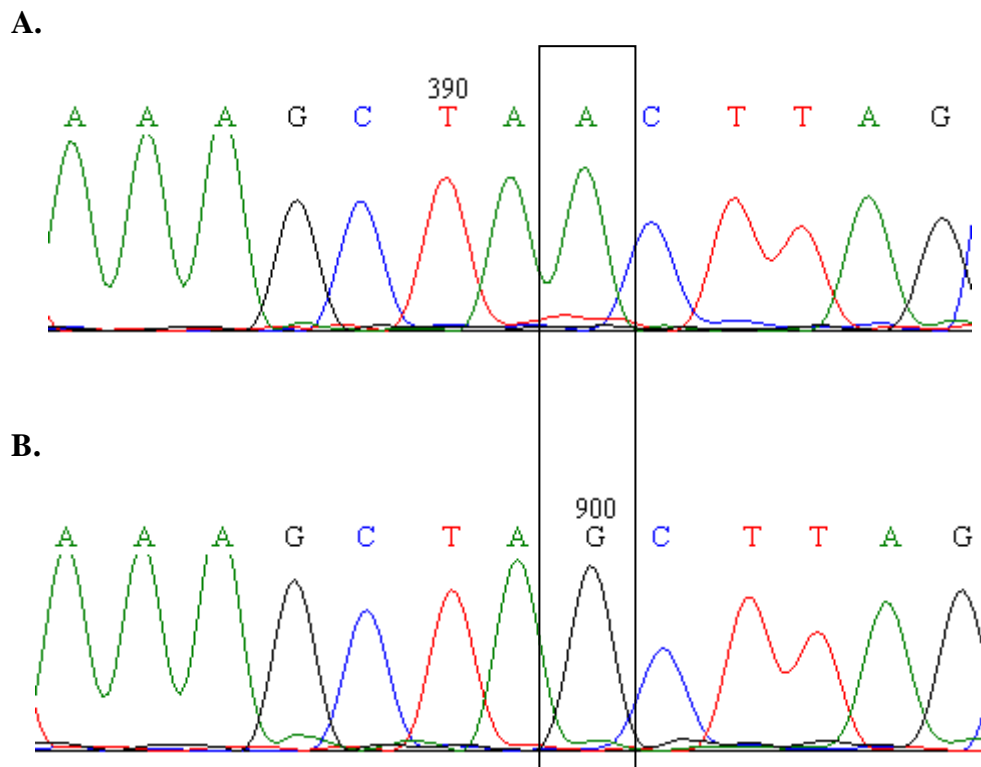
**ΠΙΝΑΚΑΣ 10:** Μεταλλάξεις στο γονίδιο  $tRNA^{Lys}$  και στις παρακείμενες περιοχές αυτού

	ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΣΘΕΝΩΝ	ΠΟΣΟΣΤΑ
$tRNA^{Lys}$	<b>A8308G</b>	4 / 102	4%
$tRNA^{Lys}$	<b>T8362G</b>	1 / 102	1%
NC7	<b>Del: 8271-8281</b>	3 / 102	3%
COII	<b>G8206A</b>	1 / 102	1%
COII	<b>G8251A</b>	1 / 102	1%

Η μετάλλαξη **A8308G** εντοπίζεται στη θέση 8308 στο tRNA γονίδιο για τη λυσίνη (Εικόνα 20). Η αλλαγή είναι μετάπτωση βάσης από A σε G (Εικόνα 21).

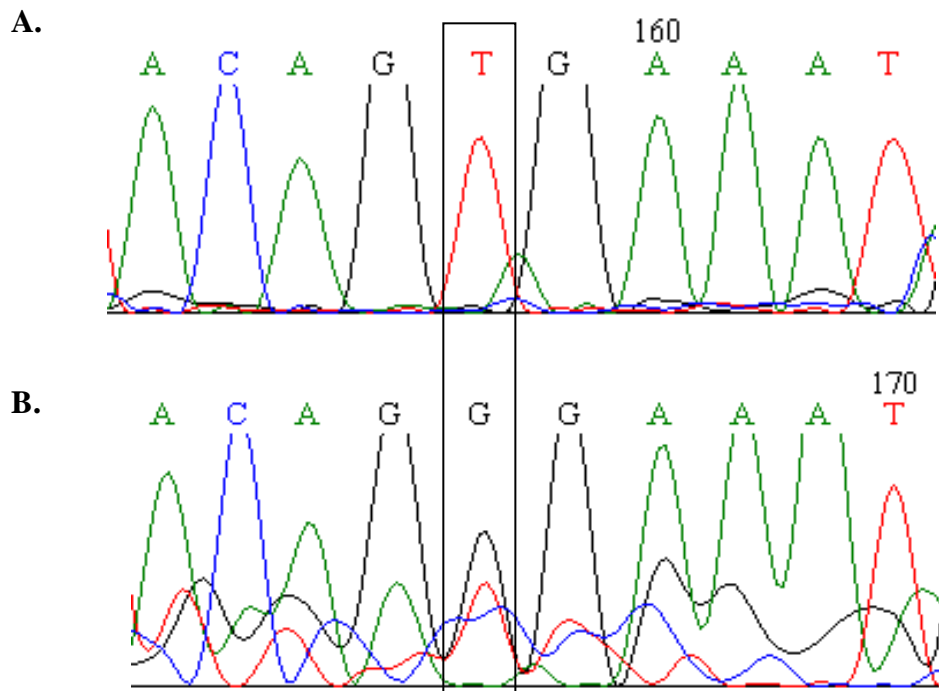


**Εικόνα 20:** Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης 10% για 22 ώρες στα 220V (μέθοδος SSCP). Στο δείγμα 2 φαίνεται η διαφορά ζωνώσεων που υποδηλώνουν τη μετάλλαξη **A8308G**. (Δείγμα 1: φυσιολογικό).



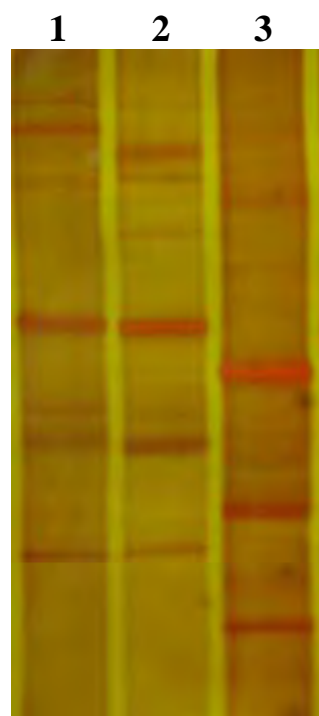
**Εικόνα 21:** Τμήμα χρωματογράφησης αλληλούχησης της περιοχής που περιλαμβάνει το γονίδιο  $tRNA^{Lys}$ . A. Τμήμα της αλληλουχίας του γονιδίου  $tRNA^{Lys}$  ενός φυσιολογικού ατόμου. B. Τμήμα ενός ατόμου που φέρει τη μετάλλαξη **A8308G**.

Η μετάλλαξη **T8362G** εντοπίζεται στη θέση 8362 στο tRNA γονίδιο για τη λυσίνη (Lys). Η αλλαγή είναι μετάπτωση βάσης από T σε G (Εικόνα 22).



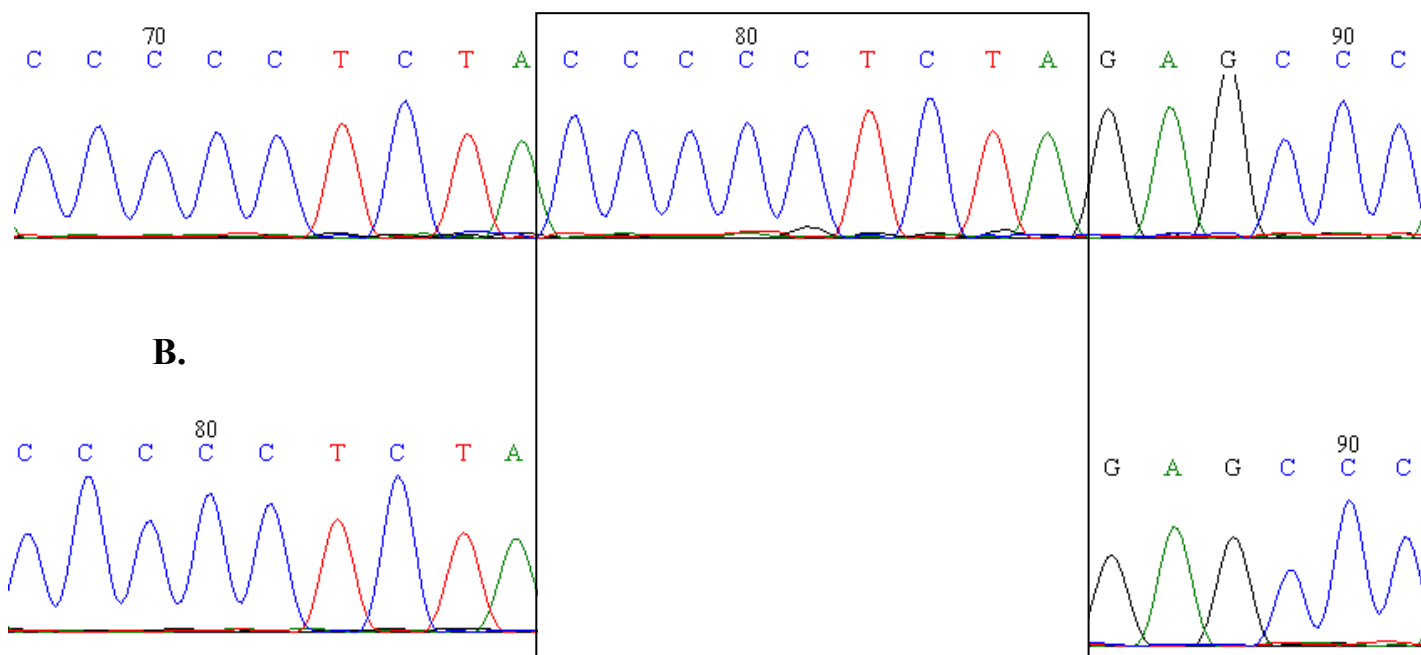
**Εικόνα 22:** Τμήμα χρωματογράφησης αλληλούχισης της περιοχής που περιλαμβάνει το γονίδιο  $tRNA^{Lys}$ . A. Τμήμα της αλληλουχίας του γονιδίου  $tRNA^{Lys}$  ενός φυσιολογικού ατόμου. B. Τμήμα ενός ατόμου που φέρει τη μετάλλαξη **T8362G**.

Το έλλειμμα **Del: 8271-8281** εντοπίζεται στη θέση 8271-8281, στη μη κωδική περιοχή NC7, όπου παρουσιάζεται έλλειμμα μεγέθους ~ 9 bp (Εικόνες 23 και 24).



**Εικόνα 23:** Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης 10% για 22 ώρες στα 220V (μέθοδος SSCP). Στο δείγμα 3 φαίνεται η διαφορά ζωνώσεων που υποδηλώνουν το έλλειμμα **Del:8271-8281**. (Δείγματα 1,2: φυσιολογικά).

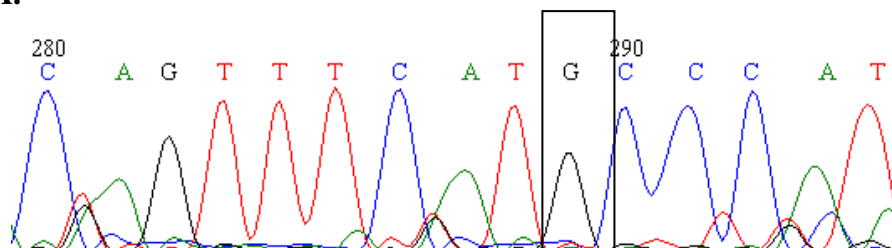
**A.**



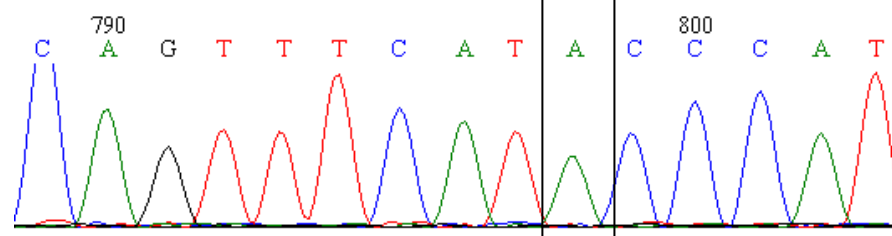
**Εικόνα 24:** Τμήμα χρωματογράφησης αλληλούχισης της περιοχής που περιλαμβάνει το γονίδιο  $tRNA^{Lys}$ . A. Τμήμα της αλληλουχίας του γονιδίου  $tRNA^{Lys}$  ενός φυσιολογικού ατόμου. B. Τμήμα ενός ατόμου που φέρει το έλλειμμα **Del:8271-8281**

Η μετάλλαξη **G8206A** εντοπίζεται στη θέση 8206 στο γονίδιο της υπομονάδας II της οξειδάσης του κυτοχρώματος C του μιτοχondριακού γονιδιώματος. Η αλλαγή είναι μετάπτωση βάσης από G σε A (Εικόνα 25).

**A.**



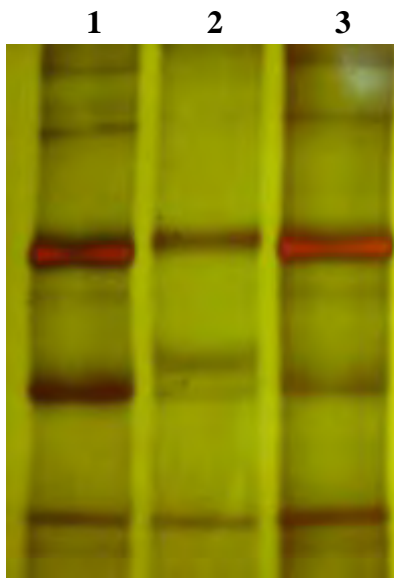
**B.**



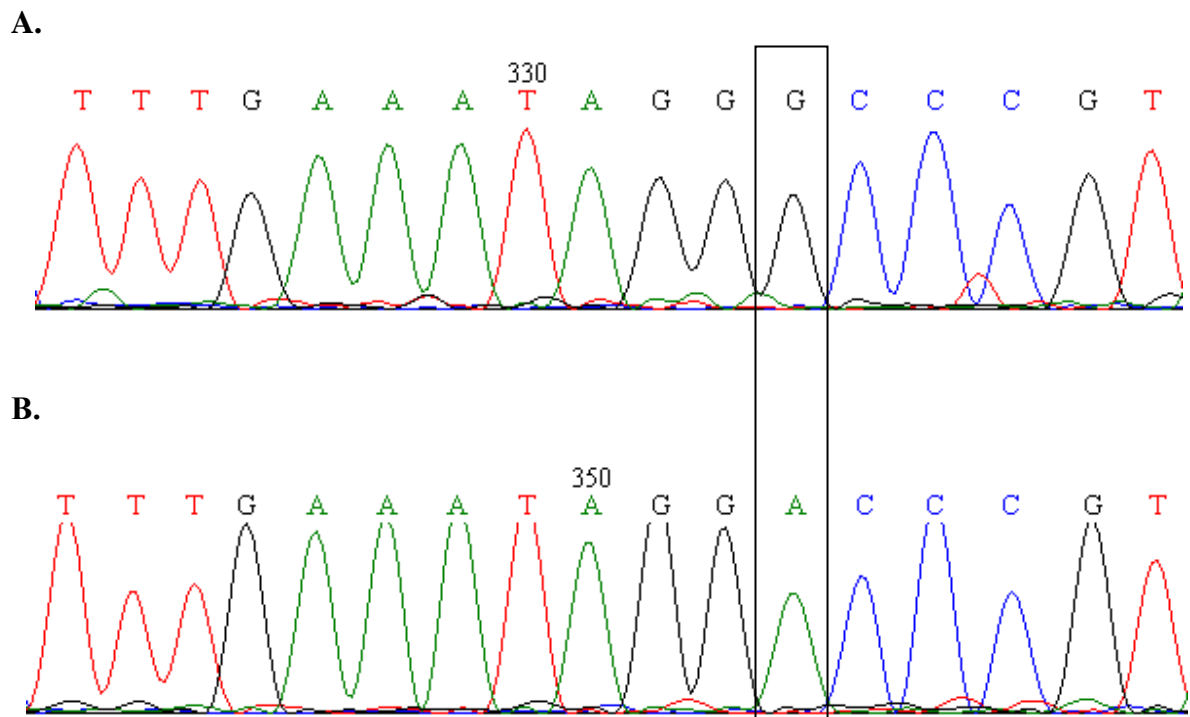
**Εικόνα 25:** Τμήμα χρωματογράφησης αλληλούχισης της περιοχής που περιλαμβάνει το γονίδιο  $tRNA^{Lys}$ . A. Τμήμα της αλληλουχίας του γονιδίου  $tRNA^{Lys}$  ενός φυσιολογικού ατόμου. B. Τμήμα ενός ατόμου που φέρει τη μετάλλαξη **G8206A**.



Η μετάλλαξη **G8251A** εντοπίζεται στη θέση 8251 στο γονίδιο της υπομονάδας 2 της οξειδάσης του κυτοχρώματος C (COII) του μιτοχondριακού γονιδιώματος (Εικόνα 26). Η αλλαγή είναι μετάπτωση βάσης από G σε A (Εικόνα 27).

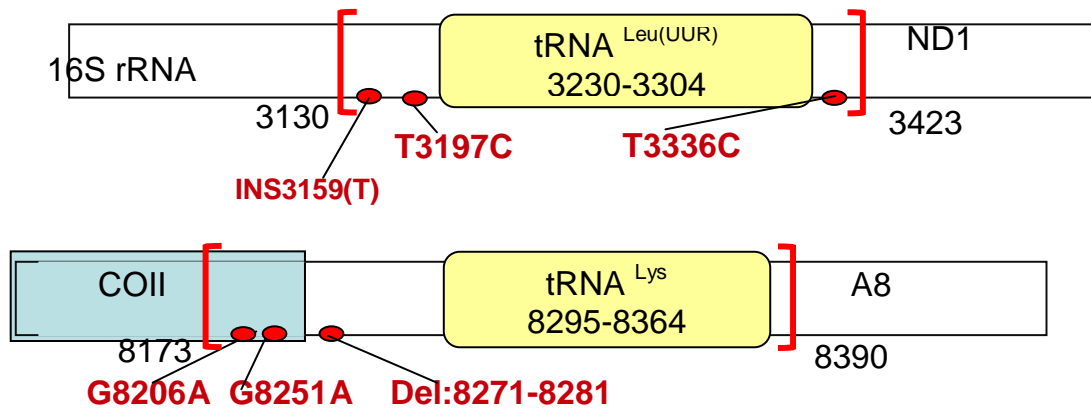


**Εικόνα 26:** Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης 10% για 22 ώρες στα 220V (μέθοδος SSCP). Στο **δείγμα 2** φαίνεται η διαφορά ζωνώσεων που υποδηλώνουν τη μετάλλαξη **G8251A** (Δείγματα 1,3: φυσιολογικά).



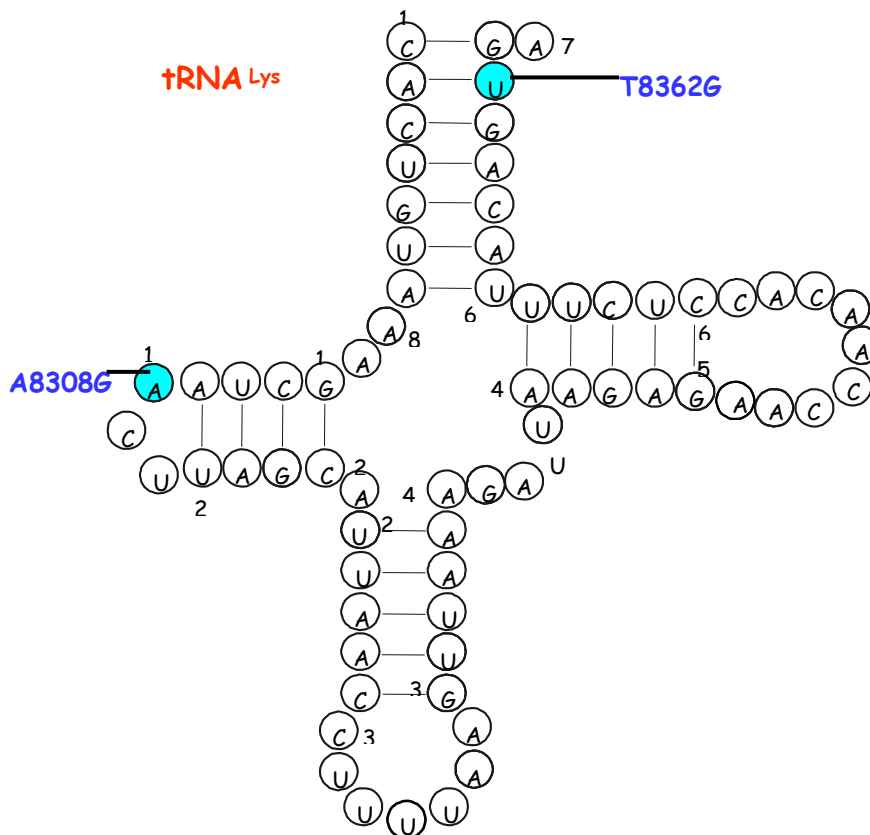
**Εικόνα 27:** Τμήμα χρωματογράφησης αλληλούχισης της περιοχής που περιλαμβάνει το γονίδιο  $tRNA^{Lys}$ . A. Τμήμα της αλληλουχίας του γονιδίου  $tRNA^{Lys}$  ενός φυσιολογικού ατόμου. B. Τμήμα ενός ατόμου που φέρει τη μετάλλαξη **G8251A**.

Στην Εικόνα 28 παρουσιάζονται συνολικά οι μεταλλάξεις που βρέθηκαν στις παρακαίμενες περιοχές των tRNA γονιδίων για τη λευκίνη και τη λυσίνη.



**Εικόνα 28:** Μεταλλάξεις που εντοπίστηκαν στις παρακαίμενες περιοχές των γονιδίων  $tRNA^{Leu(UUR)}$  και  $tRNA^{Lys}$

Στην Εικόνα 29 παρουσιάζονται οι μεταλλάξεις που βρέθηκαν στο tRNA γονίδιο για τη λυσίνη.



**Εικόνα 29:** Μεταλλάξεις που εντοπίστηκαν στο γονίδιο  $tRNA^{Lys}$

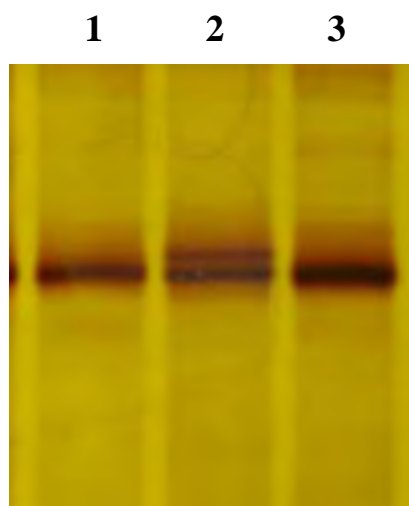
Το tRNA γονίδιο για τη λευκίνη [**Leu(CUN)**] βρίσκεται στη θέση 12266-12336 στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα μεταξύ του tRNA γονιδίου της σερίνης και του γονιδίου ND5 (Εικόνα 16Γ).

Στον Πίνακα 11 παρατίθεται η μετάλλαξη που ανιχνεύτηκε στο γονίδιο tRNA<sup>Leu(CUN)</sup> στους διαβητικούς ασθενείς.

#### ΠΙΝΑΚΑΣ 11: Μετάλλαξη στο γονίδιο tRNA<sup>Leu(CUN)</sup>

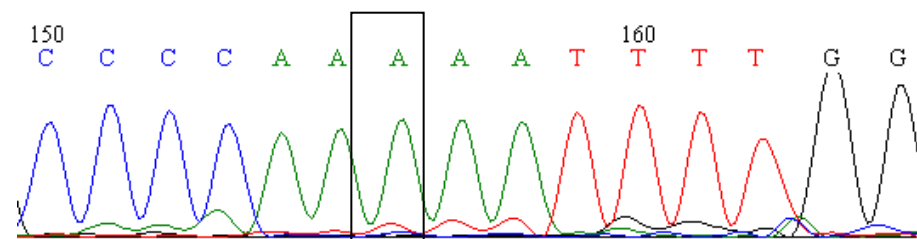
	ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΣΘΕΝΩΝ	ΠΟΣΟΣΤΑ
tRNA <sup>Leu(CUN)</sup>	<b>A12308G</b>	22 / 102	22%

Η μετάλλαξη **A12308G** εντοπίζεται στη θέση 12308 στο tRNA γονίδιο για τη λευκίνη [**Leu<sup>(CUN)</sup>**] του μιτοχονδριακού γονιδιώματος (Εικόνα 30). Η αλλαγή είναι μετάπτωση βάσης από A σε G (Εικόνα 31).

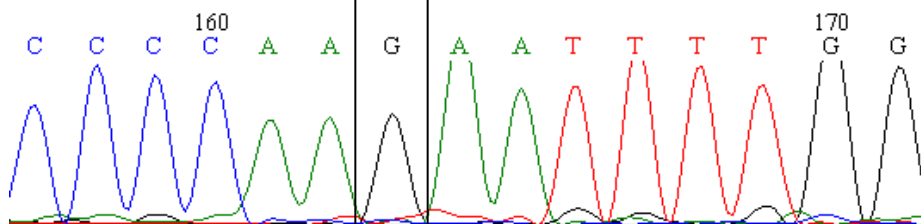


**Εικόνα 30:** Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης 10% για 22 ώρες στα 220V (μέθοδος SSCP). Στα δείγματα **1 και 3** φαίνεται η διαφορά ζωνώσεων που υποδηλώνουν τη μετάλλαξη **A12308G**. (Δείγματα 2: φυσιολογικό).

**A.**

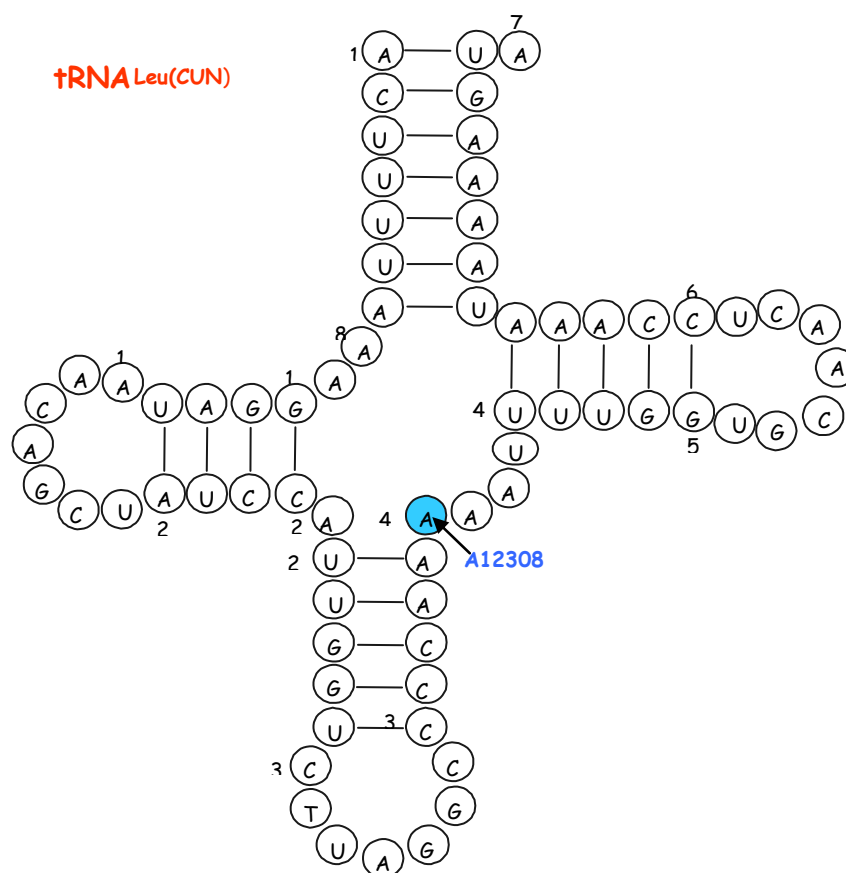


**B.**



**Εικόνα 31:** Τμήμα χρωματογράφησης αλληλούχισης του γονιδίου  $tRNA^{Leu(CUN)}$ . *A.* Τμήμα της αλληλουχίας του γονιδίου  $tRNA^{Leu(CUN)}$  ενός φυσιολογικού ατόμου. *B.* Τμήμα ενός ατόμου που φέρει τη μετάλλαξη **A12308G**.

Στην Εικόνα 32 φαίνεται η θέση της μετάλλαξης **A12308G** στο  $tRNA$  γονίδιο για τη λευκίνη.



**Εικόνα 32:** Θέση της μετάλλαξης **A12308G** στο γονίδιο  $tRNA^{Leu(CUN)}$

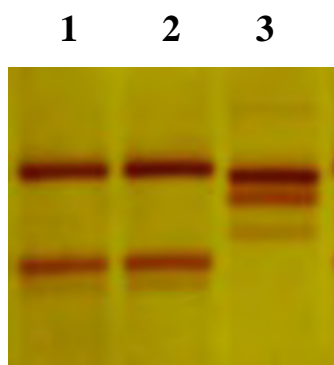
Το tRNA γονίδιο για το γλουταμικό (tRNA<sup>Glu</sup>) βρίσκεται στη θέση 14674-14742 στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα, μεταξύ των γονιδίων του κυτοχρώματος b (Cyt b), ND5 και ND6 (Εικόνα: 16Δ).

Στον Πίνακα 12 παρατίθεται η μετάλλαξη που ανιχνεύτηκε στο tRNA γονίδιο για το γλουταμικό, στους διαβητικούς ασθενείς.

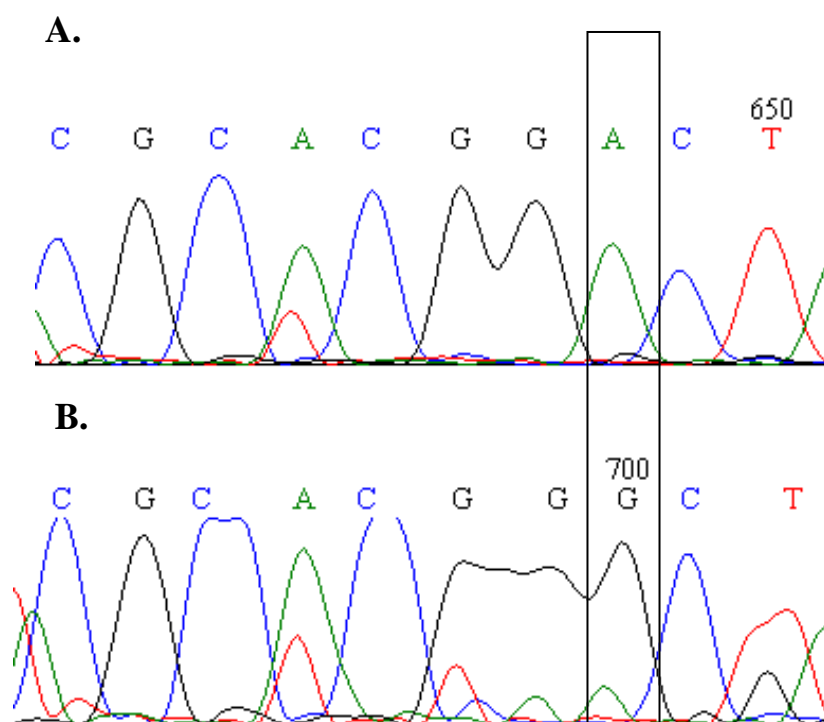
**ΠΙΝΑΚΑΣ 12:** Μετάλλαξη που ανιχνεύτηκε στο γονίδιο tRNA<sup>Glu</sup>

	ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΣΘΕΝΩΝ	ΠΟΣΟΣΤΑ
tRNA <sup>Glu</sup>	<b>A14687G</b>	1/102	1%

Η μετάλλαξη **A14687G** εντοπίζεται στη θέση 14867 στο γονίδιο tRNA<sup>Glu</sup> του μιτοχονδριακού γονιδιώματος (Εικόνα 33). Η αλλαγή είναι μετάπτωση βάσης από A σε G (Εικόνα 34).

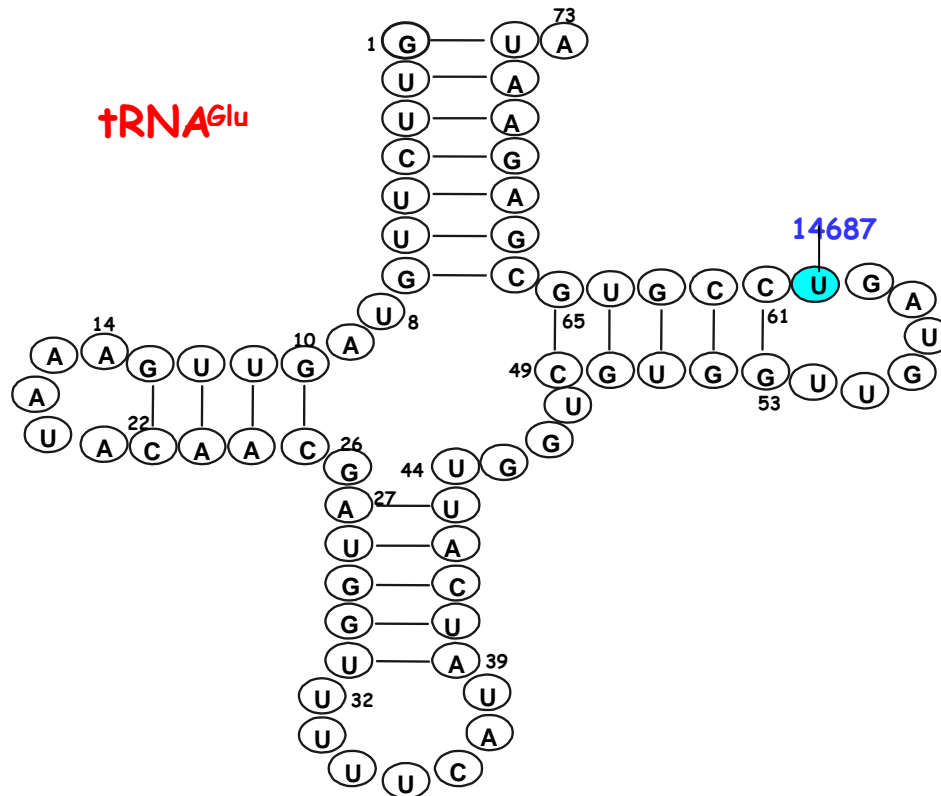


**Εικόνα 33:** Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης 12% για 22 ώρες στα 220V (μέθοδος SSCP). Στο δείγμα 3 φαίνεται η διαφορά ζωνώσεων που υποδηλώνουν τη μετάλλαξη **A14687G** (Δείγματα 1,2: φυσιολογικά).



**Εικόνα 34:** Τμήμα χρωματογράφησης αλληλούχησης της περιοχής που περιλαμβάνει το γονίδιο tRNA<sup>GLU</sup>. Α. Τμήμα της αλληλούχησης του γονιδίου tRNA<sup>GLU</sup> ενός φυσιολογικού ατόμου. Β. Τμήμα ενός ατόμου που φέρει τη μετάλλαξη **A14687G**.

Στην Εικόνα 35 φαίνεται η θέση της μετάλλαξης **A14687G** στο tRNA γονίδιο για το γλουταμικό.



*Εικόνα 35: Θέση της μετάλλαξης A14687G στο γονίδιο tRNA<sup>Glu</sup>.*

Στον Πίνακα 13 παρουσιάζονται συνοπτικά τα αποτελέσματα των μεταλλάξεων που εντοπίστηκαν στους διαβητικούς ασθενείς, συγκριτικά με το φυσιολογικό πληθυσμό.

**ΠΙΝΑΚΑΣ 13:** Μεταλλάξεις που ανιχνεύτηκαν στους ασθενείς με διαβήτη

A/A	tRNA ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ	ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΣΤΟΥΣ ΔΙΑΒΗΤΙΚΟΥΣ	ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΣΤΟ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΟ ΠΛΗΘΥΣΜΟ
1	<b>16S rRNA</b> T3197C	3 % (3 / 102)	0,6% ( 1 / 175)
2	<b>16S rRNA</b> ins.3159(T)	1 % (1 / 102)	0,6% ( 1 / 175)
3	<b>ND1</b> T3336C	1 % (1 / 102)	-
4	<b>tRNA<sup>Lys</sup></b> A8308G	4% (4 / 102)	1,1 % ( 2/ 175)
5	<b>tRNA<sup>Lys</sup></b> T8362G	1% (1 / 102)	-
6	<b>NC7 Del:</b> 8271-8281	3% (3 / 102)	-
7	<b>COII</b> G8206A	1% (1 / 102)	-
8	<b>COII</b> G8251A	1% (1 / 102)	-
9	<b>tRNA<sup>Leu (CUN)</sup></b> A12308G	22 % (22 / 102)	14,3% (25 / 175)
10	<b>tRNA<sup>Glu</sup></b> A14687G	1 % (1 / 102)	-

# ΣΥΖΗΤΗΣΗ





Τα μιτοχόνδρια είναι ενδοκυτταρικά οργανίδια που παίζουν σημαντικό ρόλο στην παραγωγή ενέργειας, την ισορροπία των οξειδοαναγωγικών αντιδράσεων, τη διαφοροποίηση και την απόπτωση των κυττάρων, την ομοίωση ασβεστίου και την παραγωγή θερμότητας. Επιπλέον διαθέτουν δικό τους γενετικό υλικό που κληρονομείται μητρικά. Το mtDNA είναι δίκλωνο κυκλικό μόριο που κωδικοποιεί 13 υπομονάδες των ενζύμων της αναπνευστικής αλυσίδας, 22 μόρια tRNA και 2 μόρια rRNA. Το mtDNA διπλασιάζεται με μεγαλύτερη ταχύτητα σε σχέση με το πυρηνικό DNA, δε διαθέτει μηχανισμούς επιδιόρθωσης, βρίσκεται κοντά στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη και εκτίθεται στις ενεργές ρίζες οξυγόνου και σε άλλες ελεύθερες ρίζες, οι οποίες παράγονται στο εσωτερικό των μιτοχονδρίων ή ενδοκυτταρικά. Αυτά τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά του mtDNA το καθιστούν επιρρεπές σε ενδογενείς και εξωγενείς οξειδωτικές βλάβες. Γι' αυτό, η συχνότητα εμφάνισης μεταλλάξεων στο mtDNA είναι πιο υψηλή συγκριτικά με το πυρηνικό.

Έχουν πραγματοποιηθεί αρκετές μελέτες σχετικά με το ρόλο των μιτοχονδρίων στην εμφάνιση του διαβήτη. Για να μελετηθεί εκτενέστερα ο ρόλος αυτός, στην παρούσα εργασία εξετάστηκαν 4 tRNA γονίδια του μιτοχονδριακού γονιδιώματος με σκοπό την ανίχνευση μεταλλάξεων σε διαβητικούς ασθενείς. Η απομόνωση DNA έγινε από ολικό αίμα και ενισχύθηκαν τα συγκεκριμένα tRNA γονίδια με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR). Έπειτα η ανίχνευση μεταλλάξεων έγινε με τη μέθοδο SSCP και μέσω της αυτοματοποιημένης αλληλούχισης.

Συνολικά ανιχνεύτηκαν 10 μεταλλάξεις, εκ των οποίων οι τέσσερις εντοπίστηκαν στα μιτοχονδριακά tRNA γονίδια που μελετήθηκαν και οι υπόλοιπες έξι εντοπίστηκαν στις παρακείμενες περιοχές αυτών. Συγκεκριμένα στο γονίδιο tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> δεν ανιχνεύτηκε κάποια μετάλλαξη. Ωστόσο, εντοπίστηκαν τρεις μεταλλάξεις στις παρακείμενες περιοχές αυτού:

- **Η μετάλλαξη T3197C** εντοπίστηκε στο γονίδιο 16S rRNA, σε τρεις από τους 102 ασθενείς με διαβήτη. Η μετάλλαξη αυτή έχει βρεθεί σε ποσοστό 0,6% στα δείγματα φυσιολογικού πληθυσμού που έχουν μελετηθεί στο εργαστήριο και έχει χαρακτηριστεί ως πολυμορφισμός, αλλά έχει βρεθεί και σε ασθένειες, όπως το σύνδρομο MELAS (Mitochondrial Encephalomyopathy, Lactic Acidosis, and Stroke-like episodes), το σύνδρομο LHON (Leber Hereditary Optic Neuropathy) εγκεφαλικά επεισόδια (Uusimaa et al. 2004), καρδιοπάθεια (Ruppert et al. 2004), σχιζοφρένεια (Martorell et al. 2007), Alzheimer (Tanaka et al. 2010), ισχαιμική κολλίτιδα, Parkinson (Vives-Bauza et al. 2002), άσθμα και καρκίνο του θυρεοειδούς (Yeh et al. 2000). Επιπλέον, η μετάλλαξη αυτή σχετίζεται με μείωση του κινδύνου εμφάνισης καρκίνου του μαστού. Η συγκεκριμένη μετάλλαξη περιλαμβάνεται στον υποκλάδο U5 της απλοομάδας U.
- **Η μετάλλαξη T3336C** εντοπίστηκε στο γονίδιο ND1 (NADH dehydrogenase subunit 1), σε έναν από τους 102 διαβητικούς ασθενείς και έχει βρεθεί σε ασθένειες, όπως τα εγκεφαλικά επεισόδια (Sternberg et al. 1998), το Alzheimer και το νευρογαστρεντερικό σύνδρομο (Maniura-Weber et al. 2004).
- **Η μετάλλαξη: ins.3159(T)** εντοπίστηκε στο γονίδιο 16S rRNA, σε έναν από τους 102 ασθενείς. Η συγκεκριμένη προσθήκη έχει βρεθεί στο φυσιολογικό πληθυσμό σε ποσοστό 0,6%, αλλά δεν είχε ανιχνευτεί προηγουμένως σε κάποια άλλη ασθένεια, συμπεριλαμβανομένου και του διαβήτη.

Όσον αφορά το γονίδιο tRNA<sup>Lys</sup>, ανιχνεύτηκαν μεταλλάξεις στο εσωτερικό του, αλλά και στις παρακείμενες περιοχές. Οι μεταλλάξεις που βρέθηκαν στο γονίδιο είναι:

- **Η μετάλλαξη T8362G.** Εντοπίστηκε σε έναν από τους 102 ασθενείς και έχει βρεθεί στο σύνδρομο MERRF (Myoclonic Epilepsy and Ragged Red Fibers) και στη σκελετική μυοπάθεια (Sternberg et al. 2001, Levinger et al. 2004).
- **Η μετάλλαξη A8308G.** Εντοπίστηκε σε τέσσερις από τους 102 ασθενείς και έχει βρεθεί στο σύνδρομο MELAS (Hanna et al. 1998), την υπερτροφική και ιδιοπαθή καρδιομυοπάθεια (Obayashi et al. 1992, Ozawa et al. 1991, Sternberg et al. 2001). Η συγκεκριμένη μετάλλαξη έχει βρεθεί και στο φυσιολογικό πληθυσμό σε ποσοστό 1,1% και έχει χαρακτηριστεί και ως πολυμορφισμός.

Στις παρακείμενες περιοχές του γονιδίου **tRNA<sup>Lys</sup>** βρέθηκαν οι εξής μεταλλάξεις:

- **Το έλλειμμα Del: 8271-8281.** Εντοπίστηκε στην περιοχή NC7 σε 3 από τους 102 ασθενείς και έχει βρεθεί σε εγκεφαλικά επεισόδια, στην καρδιομυοπάθεια, στην ημικρανία, στη νευροαισθητήρια απώλεια ακοής (Sensorineural Hearing Impairment - SNHI) (Mervi et al. 2003), στο σύνδρομο LHON, σε παιδικούς σπασμούς και στη διανοητική καθυστέρηση (Sternberg et al. 1998).
- **Η μετάλλαξη G8206A.** Εντοπίστηκε στην περιοχή COII (υπομονάδα 2 της οξειδάσης του κυτοχρώματος C) σε έναν από τους 102 ασθενείς και δεν είχε ανιχνευτεί προηγουμένως σε κάποια άλλη ασθένεια, συμπεριλαμβανομένου και του διαβήτη.
- **Η μετάλλαξη G8251A.** Εντοπίστηκε στην περιοχή COII (Υπομονάδα 2 της οξειδάσης του κυτοχρώματος C) σε έναν από τους 102 ασθενείς και έχει βρεθεί στο σύνδρομο MELAS, στο σύνδρομο LHON (Luberichs et al. 2002, Puomila et al. 2007), στο Alzheimer (Van der Walt et al. 2004, Mancuso et al. 2007), στον καρκίνο του θυρεοειδούς (Yeh et al. 2000), στη νευροαισθητήρια απώλεια ακοής (Lehtonen et al. 2003) και στο διαβήτη τύπου II (Janssen et al. 2006, Feder et al. 2008). Επιπλέον έχει συσχετιστεί με μείωση του κινδύνου εμφάνισης της νόσου Parkinson (Uusimaa et al. 2004). Η μετάλλαξη αυτή χαρακτηρίζει τους απλοτύπους I και W.

Στο εσωτερικό του γονιδίου **tRNA<sup>Leu</sup> (CUN)** ανιχνεύτηκε **η μετάλλαξη A12308G** σε 22 από τους 102 ασθενείς και έχει βρεθεί στο φυσιολογικό πληθυσμό, αλλά και στις εξής ασθένειες: τα σύνδρομα CPEO (Chronic Progressive External Ophthalmoplegia) και CIPO (Chronic Intestinal Pseudoobstruction with myopathy and ophthalmoplegia), εγκεφαλικά επεισόδια (Da Pozzo et al. 2004), υπερτροφική καρδιομυοπάθεια και καρδιαγγειακές παθήσεις (Benn et al. 2008), σύνδρομο MERRF, σύνδρομο Wolfram, σύνδρομο MELAS, σύνδρομο LHON (Puomila et al. 2007), Parkinson (Grasbon-Frodl et al. 1999), καρκίνο του θυρεοειδούς (Martorell et al. 2007), σχιζοφρένεια (Rollins et al. 2009), εκφυλισμό της ωχράς κηλίδας (Age-Related Macular Degeneration), οστεοαρθρίτιδα (Rego-Perez et al. 2008), άσθμα και καρκίνο του εντέρου, του προστάτη και των νεφρών (Webb et al. 2008) και έχει σχετιστεί με ελάττωση της σύσπασης της αριστερής κοιλίας (Tang et al. 2010). Αξίζει να σημειωθεί πως έχει παρατηρηθεί συγκληρονόμηση της μετάλλαξης A12308G με τη μετάλλαξη T3197C στον εκφυλισμό της ωχράς κηλίδας. Επιπλέον έχει ανιχνευτεί και στο φυσιολογικό πληθυσμό σε ποσοστό 14,3%, έχει χαρακτηριστεί και ως πολυμορφισμός και ανήκει στις απλοομάδα U.

Τέλος, στο εσωτερικό του γονιδίου **tRNA<sup>Glu</sup>** ανιχνεύτηκε **η μετάλλαξη A14687G** σε έναν από τους 102 ασθενείς και έχει βρεθεί σε μιτοχονδριακές μυοπάθειες, στην

αναπνευστική ανεπάρκεια (Bruno et al. 2003), στη νεφροπάθεια και σε περιπτώσεις γαλακτικής οξείδωσης (Saxena et al. 2006).

Όπως φαίνεται από τα αποτελέσματα, μόνο μία από τις μεταλλάξεις που ανιχνεύτηκαν στην εργασία αυτή, έχει σχετιστεί σε άλλες μελέτες με το σακχαρώδη διαβήτη και συγκεκριμένα με το διαβήτη τύπου II: η μετάλλαξη G8251A. Οι υπόλοιπες μεταλλάξεις έχουν ανιχνευτεί σε άλλες ασθένειες αλλά όχι στο διαβήτη, ενώ η G8206A δεν είχε ανιχνευτεί προηγουμένως σε καμία άλλη ασθένεια. Τέλος, όσον αφορά τη μετάλλαξη ins.3159(T), αυτή είχε προσδιοριστεί μόνο ως πολυμορφισμός και δεν είχε σχετιστεί με κάποια ασθένεια, ως τώρα.

Στον Πίνακα 14 παρουσιάζονται οι μεταλλάξεις που βρέθηκαν μελετώντας τα 4 tRNA γονίδια της λευκίνης (UUR), της λυσίνης, της λευκίνης (CUN) και του γλουταμικού και τις παρακείμενες περιοχές αυτών καθώς και οι ασθένειες με τις οποίες σχετίζονται.

**Πίνακας 14: Μεταλλάξεις και οι ασθένειες στις οποίες έχουν βρεθεί**

ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΣΘΕΝΩΝ	ΜΕΤΑΛΛΑΞΗ	ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΗ ΘΕΣΗ	ΓΟΝΙΔΙΟ	ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΗ ΑΛΛΑΓΗ	ΑΜΙΝΟΞΙΚΗ ΑΛΛΑΓΗ	ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ
1	T8362G	8362	tRNA <sup>Lys</sup>	T-G	Μη-κωδική	-MERRF -Σκελετική μυοπάθεια
4	A8308G	8308	tRNA <sup>Lys</sup>	A-G	Μη-κωδική	-MELAS -Υπερτροφική και ιδιοπαθής καρδιομυοπάθεια
22	A12308G	12308	tRNA <sup>Leu(CUN)</sup>	A-G	Μη-κωδική	-CPEO -CIPO -Εγκεφαλικά επεισόδια -Υπερτροφική καρδιομυοπάθεια -Καρδιαγγειακές παθήσεις -MERRF -Wolfram -MELAS -LHON -Parkinson -Καρκίνο του θυρεοειδούς -Σχιζοφρένεια -Εκφυλισμός της ωχράς κηλίδας -Οστεοαρθρίτιδα -Καρκίνος του εντέρου, του προστάτη και των νεφρών
1	A14687G	14687	tRNA <sup>Glu</sup>	A-G	-	-Μιτοχονδριακές μυοπάθειες -Αναπνευστική ανεπάρκεια -Νεφροπάθεια -Γαλακτική οξείδωση
3	T3197C	3197	16s rRNA	T-C	Μη-κωδική	-MELAS -LHON -Εγκεφαλικά επεισόδια -Καρδιοπάθεια -Σχιζοφρένεια -Αλτσχάμερ -Ισχαιμική κολλίτιδα -Parkinson -Καρκίνος του θυρεοειδούς
1	Ins.3159(T)	3158-3159	16s rRNA	Προσθήκη T	Μη-κωδική	(Πολυμορφισμός)
1	T3336C	3336	ND1	T-C	Συνώνυμη	-Εγκεφαλικά επεισόδια -Αλτσχάμερ

						-Νευρογ/ρικό σύνδρομο
1	G8251A	8251	CO2	G-A	Συνώνυμη	-MELAS -LHON -Αλτσχάμερ -Καρκίνος του θυρεοειδούς -Νευροαισθητήρια απώλεια ακοής -Διαβήτης τύπου II
1	G8206A	8206	CO2	G-A	-	-
3	Del: 8271-8281	8271-8281	NC7	Έλλειμμα μεγέθους 9 bp	Μη-κωδική	-εγκεφαλικά επεισόδια -καρδιομυοπάθεια -ημικρανία -νευροαισθητήρια απώλεια ακοής -LHON -παιδικό σπασμοί -διανοητική καθυστέρηση

Οι επιβλαβείς επιπτώσεις των μιτοχονδριακών μεταλλάξεων στη λειτουργία του μεταβολισμού αποτελούν σημαντικό παθογενή παράγοντα, γι' αυτό έχουν μελετηθεί εκτενώς η μιτοχονδριακή αναπνευστική αλυσίδα και η αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων, καθώς και τα ένζυμα που συμμετέχουν σ' αυτές. Αν και οι μιτοχονδριακές ασθένειες, όπως ο διαβήτης, είναι πλέον κατανοητές σε σημαντικό βαθμό, δεν έχουν προσδιοριστεί επακριβώς οι παθοφυσιολογικοί μηχανισμοί που εμπλέκονται.

Είναι σημαντικό να διευκρινιστεί η σχέση μεταξύ γονοτύπου και φαινοτύπου. Οι μοναδικοί κανόνες της γενετικής του μιτοχονδριακού γονιδιώματος, όπως η ετεροπλασμία, επεξηγούν εν μέρει τη σοβαρότητα των κλινικών συμπτωμάτων σε σχέση με το ποσοστό εμφάνισης της εκάστοτε μετάλλαξης. Όμως, πολλές ανωμαλίες δεν μπορούν να ερμηνευτούν μόνο με τους κανόνες αυτούς. Εκτός από τη μειωμένη δραστηριότητα της αναπνευστικής αλυσίδας και της παραγωγής ATP, υπάρχουν και άλλοι παράγοντες που εμπλέκονται στην εμφάνιση μιτοχονδριακών ασθενειών. Γι' αυτό, έχει αναπτυχθεί ιδιαίτερο ενδιαφέρον για την παραγωγή ενεργών ριζών οξυγόνου (ROS) και τον έλεγχο της απόπτωσης από τα μιτοχόνδρια.

Εξαιτίας της παραγωγής ROS, το mtDNA εμφανίζει υψηλή συχνότητα μεταλλάξεων και είναι ιδιαίτερα πολυμορφικό, κάτι που οδηγεί στην εμφάνιση σοβαρών νοσημάτων, όπως ο σακχαρώδης διαβήτης (Wen-Qiang Liao *et al.* 2008).

Έχουν εφαρμοστεί ποικίλες τεχνικές για την ανίχνευση μιτοχονδριακών μεταλλάξεων, εκ των οποίων η πιο αποτελεσματική για τον προσδιορισμό καινούριων μεταλλάξεων είναι η άμεση αλληλούχιση.

Αναμφίβολα, οι μιτοχονδριακές μεταλλάξεις αποτελούν σημαντική αιτία εμφάνισης γενετικών ασθενειών, συμπεριλαμβανομένου και του διαβήτη. Η ακριβής και έγκαιρη διάγνωση αυτών των ασθενειών απαιτεί συνδυασμό διαφόρων επιστημονικών τεχνικών, οι οποίες πρέπει να εφαρμόζονται σε ειδικά κέντρα.

Χρειάζεται περαιτέρω προσπάθεια και εκτενής έρευνα προκειμένου να προσδιοριστούν όσο το δυνατόν περισσότερες μεταλλάξεις που αφορούν το σακχαρώδη διαβήτη για όσο το δυνατόν πιο έγκαιρη διάγνωση και σωστή πρόληψη της νόσου.

# ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

## ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Αιμιλία Ζίφα, Ζήσης Μαμούρης, Κατερίνα Μούτου. «Βιολογία». Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Θεσσαλίας.
- Γεώργιος Ν. Θωμόπουλος. «Ο Υποκυτταρικός κόσμος- Οργανίδια και Ασθένειες». Εκδόσεις: University Studio Press.
- Ι. Γ. Γεωργάτσου. «Εισαγωγή στη Βιοχημεία» (Πέμπτη έκδοση) Εκδόσεις Γιαχρούδη
- George P. Patrinos, Wilhelm Ansorge. «Μοριακή Διαγνωστική» Επιστημονικές Εκδόσεις ΠΑΡΙΣΙΑΝΟΥ Α.Ε.
- James D.Watson, Amy A. Caudy, Richard M. Myers, Jan A. Witkowski. «ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΟ DNA» (Τρίτη αγγλική έκδοση- Πρώτη ελληνική έκδοση), Ακαδημαϊκές εκδόσεις
- Jeremy M. Berg, John L. Tymoczko, Lubert Stryer. «ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ» Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης
- Lee Goldman, M.D., J. Claude Bennet, M.D. Cecil. Textbook of Medicine (21<sup>η</sup> Έκδοση). W.B. Saunders Company

## ΞΕΝΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Alcolado JC, Laji K, Gill-Randall R. Maternal transmission of diabetes. Diabet Med. (2002) Feb;19(2):89-98.
- Benn, M., Schwartz, M., Nordestgaard, B. G., Tybjaerg-Hansen, A. (2008) Mitochondrial haplogroups: ischemic cardiovascular disease, other diseases, mortality, and longevity in the general population Circulation . 117 (19): 2492-2501.
- Bhopal RS, Rafnsson SB. Could mitochondrial efficiency explain the susceptibility to adiposity, metabolic syndrome, diabetes and cardiovascular diseases in South Asian populations? Int J Epidemiol. (2009) Aug;38(4):1072-81. Epub 2009 May 7.
- Bruno, C., Sacco, O., Santorelli, F. M., Assereto, S., Tonoli, E., Bado, M., Rossi, G. A., Minetti, C. (2003) Mitochondrial myopathy and respiratory failure associated with a new mutation in the mitochondrial transfer ribonucleic acid glutamic acid gene Journal of Child Neurology . 18 (4): 300-303.

- Civitarese AE, Ravussin E. Mitochondrial energetics and insulin resistance. *Endocrinology*. (2008) Mar;149(3):950-4. Epub 2008 Jan 17. Review.
- Cormio A, Milella F, Marra M, Pala M, Lezza AM, Bonfigli AR, Franceschi C, Cantatore P, Gadaleta MN. Variations at the H-strand replication origins of mitochondrial DNA and mitochondrial DNA content in the blood of type 2 diabetes patients. *Biochim Biophys Acta*. (2009) May;1787(5):547-52. Epub 2009 Jan 22.
- Coskun, P. E., Beal, M. F., Wallace, D. C. (2004). 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* . 101 (29): 10726-10731.
- Da Pozzo, P., Cardaioli, E., Radi, E., Federico, A. (2004) Sequence analysis of the complete mitochondrial genome in patients with mitochondrial encephalomyopathies lacking the common pathogenic DNA mutations *Biochemical and Biophysical Research Communications* . 324 (1): 360-364.
- Del Bo, R., Bordoni, A., Sciacco, M., Di Fonzo, A., Galbiati, S., Crimi, M., Bresolin, N., Comi, G. P. (2003) Remarkable infidelity of polymerase gammaA associated with mutations in POLG1 exonuclease domain *Neurology* 61 (7): 903-908.
- DiMauro S, Schon EA. Mitochondrial DNA mutations in human disease. *Am J Med Genet*. (2001) Spring;106(1):18-26. Review.
- Enns GM. The contribution of mitochondria to common disorders. *Mol Genet Metab*. (2003) Sep-Oct;80(1-2):11-26.
- Feder, J., Blech, I., Ovadia, O., Amar, S., Wainstein, J., Raz, I., Dadon, S., Arking, D. E., Glaser, B., Mishmar, D. (2008) Differences in mtDNA haplogroup distribution among 3 Jewish populations alter susceptibility to T2DM complications *BMC Genomics* . 9 (): 198.
- Fliss, M. S., Usadel, H., Caballero, O. L., Wu, L., Buta, M. R., Eleff, S. M., Jen, J., Sidransky, D. (2000) Facile detection of mitochondrial DNA mutations in tumors and bodily fluids *Science* . 287 (5460): 2017-2019.
- Friederich M, Hansell P, Palm F. Diabetes, oxidative stress, nitric oxide and mitochondria function. *Curr Diabetes Rev*. 2009 May;5(2):120-44. Review.
- Garcia-Lozano, J. R., Aguilera, I., Bautista, J., Nunez-Roldan, A. (2000) A new mitochondrial DNA mutation in the tRNA leucine 1 gene (C3275A) in a patient with Leber's hereditary optic neuropathy *Human Mutation* . 15 (1): 120-121 .

- Gerbitz, K. D., van den Ouweland, J. M., Maassen, J. A., Jaksch, M. (1995) Mitochondrial diabetes mellitus: a review *Biochimica et Biophysica Acta* . 1271 (1): 253-260 .
- Grasbon-Frodl, E. M., Kosel, S., Sprinzl, M., von Eitzen, U., Mehraein, P., Graeber, M. B. (1999) Two novel point mutations of mitochondrial tRNA genes in histologically confirmed Parkinson disease *Neurogenetics* . 2 (2): 121-127.
- Guan, M. X., Fischel-Ghodsian, N., Attardi, G. (1996) Biochemical evidence for nuclear gene involvement in phenotype of non-syndromic deafness associated with mitochondrial 12S rRNA mutation *Human Molecular Genetics* . 5 (7): 963-971 .
- Hirano M, Konishi K, Arata N, Iyori M, Saruta T, Kuramochi S, Akizuki M. Renal complications in a patient with A-to-G mutation of mitochondrial DNA at the 3243 position of leucine tRNA. *Intern Med.* (2002) Feb;41(2):113-8.
- Ikebe, S., Tanaka, M., Ozawa, T. (1995) Point mutations of mitochondrial genome in Parkinson's disease *Molecular Brain Research* . 28 (2): 281-295.
- Janssen, G. M., Neu, A., t Hart, L. M., van de Sande, C. M., Antonie Maassen, J. (2006) Novel mitochondrial DNA length variants and genetic instability in a family with diabetes and deafness *Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes* . 114 (4): 168-174.
- Johannsen DL, Ravussin E. The role of mitochondria in health and disease. *Curr Opin Pharmacol.* (2009) Dec;9(6):780-6. Epub 2009 Sep 30. Review.
- Kawasaki E, Eguchi K. Genetics of fulminant type 1 diabetes. *Ann N Y Acad Sci.* (2006) Oct;1079:24-30.
- Kim JA, Wei Y, Sowers JR. Role of mitochondrial dysfunction in insulin resistance. *Circ Res.* (2008) Feb 29;102(4):401-14.
- Kleinle, S., Schneider, V., Moosmann, P., Brandner, S., Krahenbuhl, S., Liechti-Gallati, S. (1998) A novel mitochondrial tRNA(Phe) mutation inhibiting anticodon stem formation associated with a muscle disease *Biochemical and Biophysical Research Communications* . 247 (1): 112-115.
- Kobayashi, Y., Momoi, M. Y., Tominaga, K., Shimoizumi, H., Nihei, K., Yanagisawa, M., Kagawa, Y., Ohta, S. (1991) Respiration-deficient cells are caused by a single point mutation in the mitochondrial tRNA<sup>Leu</sup>(UUR) gene in mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes (MELAS) *American Journal of Human Genetics* . 49 (3): 590-599 .



- Konings, A., Van Camp, G., Goethals, A., Van Eyken, E., Vandeveldel, 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.
- Krishnan KJ, Greaves LC, Reeve AK, Turnbull D. The ageing mitochondrial genome. *Nucleic Acids Res.* (2007);35(22):7399-405. Epub 2007 Oct 2.
- Lamson DW, Plaza SM. Mitochondrial factors in the pathogenesis of diabetes: a hypothesis for treatment. *Altern Med Rev.* (2002) Apr;7(2):94-111.
- Lehtonen, M. S., Moilanen, J. S., Majamaa, K. (2003) Increased variation in mtDNA in patients with familial sensorineural hearing impairment *Human Genetics* . 113 (3): 220-227.
- Levinger, L., Morl, M., Florentz, C. (2004) Mitochondrial tRNA 3' end metabolism and human disease *Nucleic Acids Research* . 32 (18): 5430-5441.
- Liao WQ, Pang Y, Yu CA, Wen JY, Zhang YG, Li XH. Novel mutations of mitochondrial DNA associated with type 2 diabetes in Chinese Han population. *Tohoku J Exp Med.* (2008) Aug;215(4):377-84.
- Li, R., Liu, Y., Li, Z., Yang, L., Wang, S., Guan, M. X. (2009) Failures in mitochondrial tRNAMet and tRNAGln metabolism caused by the novel 4401A>G mutation are involved in essential hypertension in a Han Chinese Family Hypertension . 54 (2): 329-337 .
- Li MZ, Yu DM, Yu P, Liu DM, Wang K, Tang XZ. Mitochondrial gene mutations and type 2 diabetes in Chinese families. *Chin Med J (Engl).* (2008) Apr 20;121(8):682-6.
- Liu, V. W., Shi, H. H., Cheung, A. N., Chiu, P. M., Leung, T. W., Nagley, P., Wong, L. C., Ngan, H. Y. (2001) High incidence of somatic mitochondrial DNA mutations in human ovarian carcinomas *Cancer Research.* 61 (16): 5998-6001.
- Lowell BB, Shulman GI. Mitochondrial dysfunction and type 2 diabetes. *Science.* (2005) Jan 21;307(5708):384-7.
- Luberichs, J., Leo-Kottler, B., Besch, D., Fauser, S. (2002) A mutational hot spot in the mitochondrial ND6 gene in patients with Leber's hereditary optic neuropathy *Graefes Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology* . 240 (2): 96-100.
- Maassen JA, 't Hart LM, Ouwens DM. Lessons that can be learned from patients with diabetogenic mutations in mitochondrial DNA: implications for common type 2 diabetes. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* (2007) Nov;10(6):693-7.

- Maassen JA, 'T Hart LM, Van Essen E, Heine RJ, Nijpels G, Jahangir Tafrechi RS, Raap AK, Janssen GM, Lemkes HH. Mitochondrial diabetes: molecular mechanisms and clinical presentation. *Diabetes*. (2004) Feb;53 Suppl 1:S103-9.
- Maassen JA. Mitochondrial diabetes: pathophysiology, clinical presentation, and genetic analysis. *Am J Med Genet*. (2002) May 30;115(1):66-70.
- Malecki MT. Genetics of type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract*. (2005) Jun;68 Suppl1:S10-21. Epub (2005) Mar 19.
- Mancuso, M., Nardini, M., Micheli, D., Rocchi, A., Nesti, C., Giglioli, N. J., Petrozzi, L., Rossi, C., Ceravolo, R., Bacci, A., Choub, A., Ricci, G., Tognoni, G., Manca, M. L., Siciliano, G., Murri, L. (2007) Lack of association between mtDNA haplogroups and Alzheimer's disease in Tuscany *Neurological Sciences* . 28 (3): 142-147.
- Mancuso, M., Filosto, M., Mootha, V. K., Rocchi, A., Pistolesi, S., Murri, L., DiMauro, S., Siciliano, G. (2004) A novel mitochondrial tRNAPhe mutation causes MERRF syndrome *Neurology* . 62 (11): 2119-2121.
- Maniura-Weber, K., Taylor, R. W., Johnson, M. A., Chrzanowska-Lightowlers, Z., Morris, A. A., Charlton, C. P., Turnbull, D. M., Bindoff, L. A. (2004) A novel point mutation in the mitochondrial tRNA(Trp) gene produces a neurogastrointestinal syndrome *European Journal of Human Genetics* . 12 (6): 509-512.
- Martorell, L., Vilella, E. (2007) Reply to Bandelt et al ('Distorted' mitochondrial DNA sequences in schizophrenic patients *EJHG* 15(4):400-402) *European Journal of Human Genetics* . 15 (4): 402-404.
- Mauvais-Jarvis F, Sobngwi E, Porcher R, Garnier JP, Vexiau P, Duvallat A, Gautier JF. Glucose response to intense aerobic exercise in type 1 diabetes: maintenance of near euglycemia despite a drastic decrease in insulin dose. *Diabetes Care*. (2003) Apr;26(4):1316-7.
- Maximo, V., Soares, P., Lima, J., Cameselle-Teijeiro, J., Sobrinho-Simoes, M. (2002) Mitochondrial DNA somatic mutations (point mutations and large deletions) and mitochondrial DNA variants in human thyroid pathology: a study with emphasis on Hurthle cell tumors *American Journal of Pathology* . 160 (5): 1857-1865.
- McKenzie M, Liolitsa D, Hanna MG. Mitochondrial disease: mutations and mechanisms. *Neurochem Res*. (2004) Mar;29(3):589-600.
- Moreira PI, Santos MS, Seica R, Oliveira CR. Brain mitochondrial dysfunction as a link between Alzheimer's disease and diabetes. *J Neurol Sci*. (2007) Jun 15;257(1-2):206-14. Epub 2007 Feb 20.

- Mulder H, Ling C. Mitochondrial dysfunction in pancreatic beta-cells in Type 2 diabetes. *Mol Cell Endocrinol.* (2009) Jan 15;297(1-2):34-40.
- Nisoli E, Cozzi V, Carruba MO. Amino acids and mitochondrial biogenesis. *Am J Cardiol.* (2008) Jun 2;101(11A):22E-25E.
- Obayashi, T., Hattori, K., Sugiyama, S., Tanaka, M., Tanaka, T., Itoyama, S., Deguchi, H., Kawamura, K., Koga, Y., Toshima, H., Takeda, N., Nagano, M., Ito, T., Ozawa, T. (1992) Point mutations in mitochondrial DNA in patients with hypertrophic cardiomyopathy *American Heart Journal* . 124 (5): 1263-1269.
- Ohkubo K, Yamano A, Nagashima M, Mori Y, Anzai K, Akehi Y, Nomiya R, Asano T, Urae A, Ono J. Mitochondrial gene mutations in the tRNA(Leu(UUR)) region and diabetes: prevalence and clinical phenotypes in Japan. *Clin Chem.* (2001) Sep;47(9):1641-8.
- Ozawa, T., Tanaka, M., Sugiyama, S., Ino, H., Ohno, K., Hattori, K., Ohbayashi, T., Ito, T., Deguchi, H., Kawamura, K., Nakane, Y., Hashiba, K. (1991) Patients with idiopathic cardiomyopathy belong to the same mitochondrial DNA gene family of Parkinson's disease and mitochondrial encephalomyopathy *Biochemical and Biophysical Research Communications* . 177 (1): 518-525.
- Pierre Maechler, Claes B. Wollheim. Mitochondrial function in normal and diabetic b-cells. *Nature* (2001) VOL 414
- Puomila, A., Hamalainen, P., Kivioja, S., Savontaus, M. L., Koivumaki, S., Huoponen, K., Nikoskelainen, E. (2007) Epidemiology and penetrance of Leber hereditary optic neuropathy in Finland *European Journal of Human Genetics* . 15 (10): 1079-1089.
- Rabøl R, Boushel R, Dela F. Mitochondrial oxidative function and type 2 diabetes. *Appl Physiol Nutr Metab.* (2006) Dec;31(6):675-83.
- Rego-Perez, I., Fernandez-Moreno, M., Fernandez-Lopez, C., Arenas, J., Blanco, F. J. (2008) Mitochondrial DNA haplogroups: role in the prevalence and severity of knee osteoarthritis *Arthritis and Rheumatism* . 58 (8): 2387-2396.
- Robert W. Taylor, Doug M. Turnbull. Mitochondrial DNA Mutations in Human Disease. *Nat Rev Genet.* (2005) May; 6(5): 389-402
- Rollins, B., Martin, M. V., Sequeira, P. A., Moon, E. A., Morgan, L. Z., Watson, S. J., Schatzberg, A., Akil, H., Myers, R. M., Jones, E. G., Wallace, D. C., Bunney, W. E., Vawter, M. P. (2009) Mitochondrial variants in schizophrenia, bipolar disorder, and major depressive disorder *PLoS One* . 4 (3): e4913.

- 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.
- Ruxer J, Mozdzan M, Czupryniak L, Loba J. Long-term discontinuation of insulin treatment in a type 1 diabetic patient: a case for late autoimmune diabetes of the adult? *Diabetes Care*. (2003) Apr;26(4):1314-5.
- Saara Finnilä, Jaana Autere, Maarit Lehtovirta, Päivi Hartikainen, Arto Mannermaa, Hilikka Soininen, Kari Majamaa. Increased risk of sensorineural hearing loss and migraine in patients with a rare mitochondrial DNA variant 4336A>G in tRNAGln. *J Med Genet* (2001);38:400–405.
- Santorelli, F. M., Tanji, K., Sano, M., Shanske, S., El-Shahawi, M., Kranz-Eble, P., DiMauro, S., De Vivo, D. C. (1997) Maternally inherited encephalopathy associated with a single-base insertion in the mitochondrial tRNATrp gene *Annals of Neurology* . 42 (2): 256-260.
- Sato A, Endo H, Umetsu K, Sone H, Yanagisawa Y, Saigusa A, Aita S, Kagawa Y. Polymorphism, heteroplasmy, mitochondrial fusion and diabetes. *Biosci Rep*. (2003) Oct-Dec;23(5-6):313-37.
- Saxena, R., de Bakker, P. I., Singer, K., Mootha, V., Burt, N., Hirschhorn, J. N., Gaudet, D., Isomaa, B., Daly, M. J., Groop, L., Ardlie, K. G., Altshuler, D. (2006) Comprehensive association testing of common mitochondrial DNA variation in metabolic disease *American Journal of Human Genetics* . 79 (1): 54-61.
- Schapira AH. Primary and secondary defects of the mitochondrial respiratory chain. *J Inherit Metab Dis*. (2002) May;25(3):207-14.
- Seneca, S., Verhelst, H., De Meirleir, L., Meire, F., Ceuterick-De Groote, C., Lissens, W., Van Coster, R. (2001) A new mitochondrial point mutation in the transfer RNA(Leu) gene in a patient with a clinical phenotype resembling Kearns-Sayre syndrome *Archives of Neurology* . 58 (7): 1113-1118.
- Sissler, M., Helm, M., Frugier, M., Giege, R., Florentz, C. (2004) Aminoacylation properties of pathology-related human mitochondrial tRNA(Lys) variants *RNA* . 10 (5): 841-853.
- Sternberg, D., Chatzoglou, E., Laforet, P., Fayet, G., Jardel, C., Blondy, P., Fardeau, M., Amselem, S., Eymard, B., Lombes, A. (2001) Mitochondrial DNA transfer RNA gene sequence variations in patients with mitochondrial disorders *Brain* . 124 (Pt 5): 984-994.

- Sternberg Damien, Claude Danan, Anne Lombès, Pascal Laforêt, Emmanuelle Girodon, Michel Goossens and Serge Amselem. Exhaustive scanning approach to screen all the mitochondrial tRNA genes for mutations and its application to the investigation of 35 independent patients with mitochondrial disorders. *Human Molecular Genetics* (1998) Vol. 7, No. 1
- Stirban A, Rösen P, Tschoepe D. Complications of type 1 diabetes: New molecular findings. *Mt Sinai J Med.* (2008) Aug;75(4):328-51.
- Szabadkai G, Duchon MR. Mitochondria mediated cell death in diabetes. *Apoptosis.* 2009 Dec;14(12):1405-23. Review.
- Tanaka, N., Goto, Y. I., Akanuma, J., Kato, M., Kinoshita, T., Yamashita, F., Tanaka, M., Asada, T. (2010) Mitochondrial DNA variants in a Japanese population of patients with Alzheimer's disease *Mitochondrion* . 10 (1): 32-37.
- Tang, J., Qi, Y., Bao, X. H., Wu, X. R. (1997) Mutational analysis of mitochondrial DNA of children with Rett syndrome *Pediatric Neurology* . 17 (4): 327-330 .
- Tang, S., Batra, A., Zhang, Y., Ebenroth, E. S., Huang, T. (2010) Left ventricular noncompaction is associated with mutations in the mitochondrial genome *Mitochondrion* . ePub ahead of print (Mar 5): <http://dx.doi.org/10.1016/j.mito.2010.02.003> .
- Tseng, L. M., Yin, P. H., Chi, C. W., Hsu, C. Y., Wu, C. W., Lee, L. M., Wei, Y. H., Lee, H. C. (2006) Mitochondrial DNA mutations and mitochondrial DNA depletion in breast cancer *Genes, Chromosomes and Cancer* . 45 (7): 629-638 .
- Uusimaa, J., Finnila, S., Remes, A. M., Rantala, H., Vainionpaa, L., Hassinen, I. E., Majamaa, K. (2004) Molecular epidemiology of childhood mitochondrial encephalomyopathies in a Finnish population: sequence analysis of entire mtDNA of 17 children reveals heteroplasmic mutations in tRNA<sup>Arg</sup>, tRNA<sup>Glu</sup>, and tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> genes *Pediatrics* . 114 (2): 443-450.
- Van der Walt, J. M., Dementieva, Y. A., Martin, E. R., Scott, W. K., Nicodemus, K. K., Kroner, C. C., Welsh-Bohmer, K. A., Saunders, A. M., Roses, A. D., Small, G. W., Schmechel, D. E., Murali Doraiswamy, P., Gilbert, J. R., Haines, J. L., Vance, J. M., Pericak-Vance, M. A. (2004) Analysis of European mitochondrial haplogroups with Alzheimer disease risk *Neuroscience Letters* . 365 (1): 28-32.
- Van Houten B, Woshner V, Santos JH. Role of mitochondrial DNA in toxic responses to oxidative stress. *DNA Repair (Amst).* (2006) Feb 3;5(2):145-52.

- Van Trappen, P. O., Cullup, T., Troke, R., Swann, D., Shepherd, J. H., Jacobs, I. J., Gayther, S. A., Mein, C. A. (2007) Somatic mitochondrial DNA mutations in primary and metastatic ovarian cancer *Gynecologic Oncology* . 104 (1): 129-133.
- Vives-Bauza, C., Andreu, A. L., Manfredi, G., Beal, M. F., Janetzky, B., Gruenewald, T. H., Lin, M. T. (2002) Sequence analysis of the entire mitochondrial genome in Parkinson's disease *Biochemical and Biophysical Research Communications* . 290 (5): 1593-1601.
- Webb, E., Broderick, P., Chandler, I., Lubbe, S., Penegar, S., Tomlinson, I. P., Houlston, R. S. (2008) Comprehensive analysis of common mitochondrial DNA variants and colorectal cancer risk *British Journal of Cancer* . 99 (12): 2088-2093.
- Whittaker, R. G., Schaefer, A. M., McFarland, R., Taylor, R. W., Walker, M., Turnbull, D. M. (2007) Prevalence and progression of diabetes in mitochondrial disease *Diabetologia* . 50 (10): 2085-2089.
- 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.
- 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

## INTERNET SITES

[www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)

[www.mitomap.org](http://www.mitomap.org)