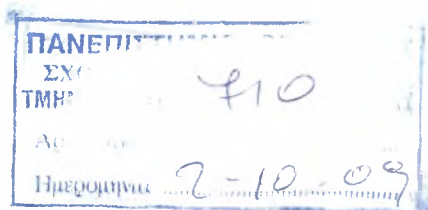


**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**



**Ταυτοποίηση πολυμορφισμών σε γονίδια της  
τρανσφεράσης της γλουταθειόνης**

**ΑΓΓΕΛΟΣ Χ. ΚΟΤΣΙΦΗΣ**

**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**ΛΑΡΙΣΑ ΟΚΤΩΒΡΙΟΣ 2009**



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

Αριθ. Εισ.: 7665/1

Ημερ. Εισ.: 05-11-2009

Δωρεά: Π.Θ.

Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ

2009

ΚΟΤ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ  
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087174

**Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Γενετικής Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας από τον Οκτώβριο του 2008 έως το Μάιο του 2009.  
Επιβλέπων ήταν ο Καθηγητής του Τμήματος κ. Ζήσης Μαμούρης.**

**Θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους όσους συνέβαλλαν με τον δικό τους τρόπο στην εκπόνηση αυτής της διπλωματικής εργασίας. Τον Καθηγητή κ. Ζήση Μαμούρη για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπο μου αναθέτοντας μου ένα ενδιαφέρον ερευνητικό έργο. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω την Επίκουρο καθηγήτρια κα. Αιμιλία Ζίφα για την παροχή των δειγμάτων στα οποία πραγματοποιήθηκαν οι μελέτες. Θα ήθελα ακόμη να ευχαριστήσω θερμά την Επίκουρο καθηγήτρια Κατερίνα Μούτου που συμμετείχε στην τριμελή μου επιτροπή. Επίσης, όλη την ομάδα του εργαστηρίου Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας και ιδιαίτερα τη Λέκτορα κα. Θεολογία Σαραφίδου και τους υποψήφιους Διδάκτορες Κώστα Σταμάτη και Θεμιστοκλή Γιαννούλη για την πολύτιμη βοήθεια και το φιλικό κλίμα συνεργασίας.**

Η τριμελής εξεταστική επιτροπή απαρτίζεται από τους :

**κ. Ζήση Μαμούρης**, Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

**κα. Αικατερίνη Μούτου**, Επίκουρος Καθηγήτρια Βιολογίας Σπονδυλωτών του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

**κα. Θεολογία Σαραφίδου**, Λέκτορας Μοριακής Γενετικής Ζωικών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

<b>ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ</b> .....	3
Περίληψη.....	4
<b>ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b> .....	5
Οξειδωτικό stress.....	6
Γλουταθειόνη και S-Τρανσφεράσες της γλουταθειόνης .....	8
Ασθένειες που σχετίζονται με το οξειδωτικό stress και το γενετικό τους υπόβαθρο.....	9
<b>ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ</b> .....	12
<b>ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</b> .....	14
Απομόνωση DNA.....	15
Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	16
Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.....	20
Μέθοδος RFLP.....	22
Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή ακρυλαμίδης.....	25
<b>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b> .....	27
Απομόνωση γενωμικού DNA .....	28
Ταυτοποίηση πολυμορφισμών C341T και A313G του γονιδίου <i>GSTP1</i> με PCR-RFLP .....	28
Ταυτοποίηση ομόζυγου ελλείμματος των γονιδίων <i>GSTM1</i> και <i>GSTT1</i> με πολλαπλήPCR.....	30
<b>ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b> .....	34
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b> .....	37

## Περίληψη

Στη συγκεκριμένη εργασία προσδιορίστηκαν οι συχνότητες πολυμορφισμών των γονιδίων *GSTP1*, *GSTM1* και *GSTT1* τα οποία εκφράζουν την τρανσφεράση της γλουταθειόνης, ένα ένζυμο το οποίο παίζει σημαντικό ρόλο στην αποτοξικοποίηση του οργανισμού. Οι πολυμορφισμοί οι οποίοι μελετήθηκαν σε άτομα έλεγχου του ελληνικού πληθυσμού ήταν οι εξής: α) ο C341T και ο A313G για το *GSTP1* και β) το ομόζυγο έλλειμμα των *GSTM1* και *GSTT1*. Η ταυτοποίηση των C341T και ο A313G έγινε με τη μέθοδο PCR-RFLP ενώ η ταυτοποίηση των ελλειμμάτων με πολλαπλή PCR. Ο σκοπός της μελέτης αυτής ήταν να προσδιοριστεί η συχνότητα των πολυμορφισμών αυτών στο γενικό πληθυσμό, αποτέλεσμα που μελλοντικά θα χρησιμοποιηθεί σε μελέτες πιθανής συσχέτισής τους με πολυπαραγοντικά νοσήματα τα οποία σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες.

# ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## Οξειδωτικό stress

Το οξυγόνο είναι ο κύριος βιολογικός αποδέκτης ηλεκτρονίων ( $e^-$ ) ο οποίος παίζει σημαντικό ρόλο στις κύριες λειτουργίες του κυττάρου. Ωστόσο, η παρουσία του οδηγεί στο σχηματισμό ενεργών ριζών οξυγόνου (ROS) οι οποίες αποτελούν μια σημαντική απειλή και μπορούν να οδηγήσουν στον θάνατο των αερόβιων κυττάρων καθώς μπορούν να οξειδώσουν και να βλάψουν τις κυτταρικές μεμβράνες, τις πρωτεΐνες και τα νουκλεϊκά οξέα.

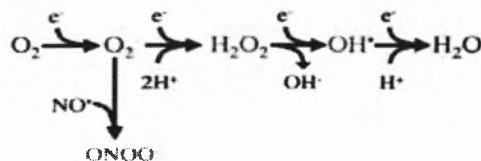
Για να μειώσουν τις καταστρεπτικές επιπτώσεις των ROS οι αερόβιοι οργανισμοί διαθέτουν μη ενζυματικές και ενζυματικές αντιοξειδωτικές άμυνες. Οι μη ενζυματικές άμυνες περιλαμβάνουν μόρια όπως οι βιταμίνες C και E, η γλουταθειόνη και το  $\beta$ -καροτένιο. Οι ενζυματικές άμυνες αποτελούνται από ένζυμα όπως η δισμουτάση του υπεροξειδίου (SOD), οι καταλάσες (CAT) και οι υπεροξειδάσες (SODs) και οι S-τρανσφεράσες της γλουταθειόνης (GSTs). Οι υπεροξειδάσες (SODs) καταλύουν την αναγωγή του  $O_2$  σε  $H_2O_2$ , οι καταλάσες και οι υπεροξειδάσες μειώνουν τα επίπεδα του  $H_2O_2$  μετατρέποντάς το σε  $O_2$  και  $H_2O$  και οι τρανσφεράσες καταλύουν την σύζευξη ενός ξενοβιοτικού ή κάποιας οξειδωτικής ένωσης με την γλουταθειόνη με αποτέλεσμα την απενεργοποίηση τους.

Οι κυτταρικοί μηχανισμοί των ROS δεν είναι πλήρως κατανοητοί αλλά αρκετοί μεταγραφικοί παράγοντες που ρυθμίζουν την έκφραση των αντιοξειδωτικών γονιδίων είναι καλά χαρακτηρισμένοι στους προκαρυώτες και στις ζύμες. Στους ανώτερους ευκαρυώτες η απόκριση στο οξειδωτικό στρές είναι πιο πολύπλοκη και διαμορφώνεται από διάφορους ρυθμιστές. Στα συστήματα των θηλαστικών δύο τάξεις μεταγραφικών παραγόντων έχουν ταυτοποιηθεί που εμπλέκονται στην απόκριση στο οξειδωτικό stress, ο πυρηνικός παράγοντας NF $\kappa$ B και η πρωτεΐνη ενεργοποιητής 1 (Scandalios JG, 2005).

Η διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ οξειδωτικών και αντιοξειδωτικών είναι αυτή που κατά βάση χαρακτηρίζει το οξειδωτικό στρές, μια τέτοια δε διαταραχή μπορεί να οδηγήσει σε κυτταρική βλάβη και παθοφυσιολογικές διαταραχές. Η παρουσία του οξειδωτικού stress μπορεί να διαπιστωθεί είτε μέσω ανίχνευσης των ελευθέρων ριζών οξυγόνου (EPO) είτε μέσω προσδιορισμού των αντιοξειδωτικών παραγόντων είτε τέλος μέσω ανίχνευσης προϊόντων βλάβης βασικών βιομορίων, όπως για παράδειγμα προϊόντων λιπιδικής υπεροξειδωσης, ως αποτέλεσμα δράσης των EPO στα λιπίδια της κυτταρικής μεμβράνης. Αυξημένη παραγωγή EPO μπορεί να οδηγήσει σε μείωση ενός ή περισσότερων αντιοξειδωτικών και αυτό να

χρησιμοποιηθεί ως δείκτης οξειδωτικού στρες. Με τον όρο ελεύθερη ρίζα καλούμε ένα άτομο ή ομάδα ατόμων (ανόργανα ή οργανικά μόρια) που φέρει ένα ή παραπάνω ασύζευκτα ηλεκτρόνια στην εξωτερική του στιβάδα. Ο ευρύς αυτός ορισμός περιλαμβάνει μεγάλο αριθμό μορίων στη Χημεία και στη Βιολογία. Εάν δεν αντιμετωπιστούν άμεσα οι ελεύθερες ρίζες αναζητούν το ηλεκτρόνιο στον περιβάλλοντα χώρο των κυττάρων. Εάν όμως αυτή η διαδικασία της αναζήτησης δεν πραγματοποιηθεί μεταβαίνουν στο πυρήνα δημιουργώντας σοβαρές βλάβες και αλλοιώσεις.

Οι πιο ευρέως διαδεδομένες ελεύθερες ρίζες στα βιολογικά συστήματα είναι αυτές που προέρχονται από μόρια που περιέχουν οξυγόνο και έχουν μία υψηλότερη αντιδραστικότητα από την αρχική κατάσταση του μοριακού οξυγόνου ( $O_2$ ). Τα μόρια αυτά είναι ευρύτερα γνωστά ως δραστικές οξυγονούχες μορφές (ΔΟΜ)-Reactive Oxygen Species (ROS). Τέτοιες ενώσεις είναι το υπεροξειδίο του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ) και το μονήρες οξυγόνο ( $O_2$ ) και υπό φυσιολογικές συνθήκες, ο σχηματισμός τους στο κύτταρο βρίσκεται υπό έλεγχο από ένα αντιοξειδωτικό σύστημα άμυνας και έτσι επικρατεί ισορροπία. Σ' αυτό περιλαμβάνονται ουσίες που ονομάζονται αντιοξειδωτικά (π.χ βιταμίνες E, C, καροτινοειδή, φλαβονοειδή κ.α), οι οποίες καταπολεμούν την οξείδωση δηλαδή την δράση των ελεύθερων ριζών. Οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου (EPO) είναι παραπροϊόντα του φυσιολογικού αερόβιου μεταβολισμού. Η σταδιακή πρόσληψη ηλεκτρονίων από το μοριακό οξυγόνο οδηγεί στο σχηματισμό τριών βασικών ειδών EPO (Εικ. 1). Με την πρόσληψη ενός ηλεκτρονίου σχηματίζεται το ανιόν του υπεροξειδίου ( $O_2^{\cdot-}$ ), με ένα δεύτερο ηλεκτρόνιο σχηματίζεται το υπεροξειδίο του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ), ενώ ένα τρίτο ηλεκτρόνιο οδηγεί στο σχηματισμό της υδροξυλικής ρίζας ( $OH^{\cdot}$ ). Όταν το οξυγόνο προσλάβει και τέταρτο ηλεκτρόνιο ανάγεται πλήρως σε νερό. Οι αρχικές αυτές EPO αντιδρούν με άλλα μόρια και σχηματίζουν και άλλες EPO όπως λιπιδικά υπεροξειδία ( $ROO^{\cdot}$ ), υποχλωριώδες οξύ ( $HOCl$ ), υπεροξυνιτρώδες ( $ONOO^{\cdot}$ ) κ.α (Κατσούλης.Κ., 2006).



Εικ. 1: Παραγωγή EPO από αναγωγή ελεύθερου οξυγόνου.



## Γλουταθειόνη και S-Τρανσφεράσες της γλουταθειόνης

Η γλουταθειόνη (GSH) αποτελεί τριπεπτίδιο αποτελούμενο από γλυκίνη, γλουταμικό οξύ και κυστεΐνη. Οι τρανσφεράσες της γλουταθειόνης (GST) είναι τα ένζυμα που καταλύουν την αντίδραση των διαφόρων τοξικών ουσιών με τη σουλφιδρυλική ομάδα (-SH) της γλουταθειόνης. Οι αντιδράσεις που καταλύονται από τα ένζυμα αυτά αποτελούν αντιδράσεις υποκατάστασης και προσθήκης. Αυτή η μεταβολική οδός οδηγεί στην αποτοξίνωση πολλών χημικά δραστικών τοξικών ουσιών (ηλεκτρονιόφιλα εποξειδία, ελεύθερες ρίζες, κ.ά.) και τα τελικά προϊόντα που απεκκρίνονται στα ούρα είναι παράγωγα του μερκαπτουρικού οξέος. Αναλυτικά οι αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα είναι οι παρακάτω: Αρχικά αντιδρά το υδρόφοβο ξενοβιοτικό (RX) με τη γλουταθειόνη με τη βοήθεια της S-τρανσφεράσης της GSH και σχηματίζεται ομοιοπολικός θειοαιθερικός δεσμός. Στη συνέχεια, με τη βοήθεια της γ-γλουταμυλοτρανσπεπτιδάσης, απομακρύνεται το γλουταμικό οξύ. Κατόπιν με τη βοήθεια της γλυκινάσης της κυστεΐνης απομακρύνεται και η γλυκίνη. Τέλος ακολουθεί N-ακετυλίωση με τη βοήθεια της N-ακετυλοτρανσφεράσης και σχηματίζεται το παράγωγο του μερκαπτουρικού οξέος  $RSCH_2CH(COOH)NHCOCH_3$  το οποίο απεκκρίνεται στα ούρα. Η ενζυμική και μη ενζυμική αδρανοποίηση των ελεύθερων ριζών από την αναχθείσα γλουταθειόνη οδηγεί σε παραγωγή οξειδωμένης γλουταθειόνης. Γενικά η γλουταθειόνη εκπληρώνοντας το ρόλο της σαν αντιοξειδωτική ουσία, χρειάζεται διατήρηση υψηλής αναλογίας αναχθείσας / οξειδωμένης γλουταθειόνης.

Τα γονίδια GST είναι υπεύθυνα για την έκφραση της S τρανσφεράσης της γλουταθειόνης η οποία καταλύει την σύζευξη της γλουταθειόνης με ηλεκτρονιόφιλους υποκαταστάτες. Υπάρχουν δύο ομάδες GSTs, η πρώτη περιέχει τις οικογένειες alpha, mu, pi theta, sigma, zeta και omega των οποίων τα προϊόντα εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα και την οικογένεια των kappa που εντοπίζονται στα μιτοχόνδρια. Η δεύτερη ομάδα αποτελείται από πρωτεΐνες οι οποίες εντοπίζονται στη μεμβράνη του κυττάρου και σχετίζονται με το μεταβολισμό του εικοσανοϊκού και της γλουταθειόνης.

### Ασθένειες που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρές και το γενετικό τους υπόβαθρο.

Συγκεκριμένοι πολυμορφισμοί των γονιδίων GST έχουν συσχετιστεί σε διάφορες μελέτες που έχουν γίνει συσχετίζονται με την εμφάνιση ασθενειών. Συγκεκριμένα, το οξειδωτικό στρές εμπλέκεται σε πολλά νοσήματα όπως:

αθηροσκλήρωση, έμφραγμα του μυοκαρδίου, εγκεφαλικό επεισόδιο, υπογονιμότητα, φλεγμονές, νόσο Parkinson, νόσο Alzheimer, νόσο Crohn, παγκρεατίτιδα, ασθένειες ήπατος, καταρράκτη, τενοντίτιδες, κυστική ίνωση, ρευματοειδή αρθροπάθεια, άσθμα καθώς σε αρκετές μορφές καρκίνου (Κατσούλης.Κ., 2006)

### Πολυμορφισμός μονού νουκλεοτιδίου (SNP)

Πολυμορφισμός μονού νουκλεοτιδίου (SNP) είναι η υποκατάσταση μίας μόνο βάσης στην αλληλουχία του DNA. Η συχνότητα του είναι μία φορά ανά 1000-2000 νουκλεοτίδια και στην περίπτωση που εντοπίζεται μέσα σε γονίδιο που κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη μπορεί να οδηγήσει στην παραγωγή μιας, έστω και ελάχιστα τροποποιημένης πρωτεΐνης ή ενζύμου, γεγονός το οποίο μπορεί να προκαλέσει αλλαγές στην βιοχημεία και στον μεταβολισμό του ατόμου. Πολυμορφισμοί οι οποίοι εντοπίζονται σε ρυθμιστικά στοιχεία που ελέγχουν την έκφραση του γονιδίων, όπως ο υποκινητής, μπορούν να επηρεάσουν τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων αυτών σε σημαντικό βαθμό. Οι πολυμορφισμοί εντοπίζονται και σε περιοχές του DNA που δεν αντιστοιχούν σε γονίδια και μάλιστα σ' αυτές τις περιοχές η συχνότητά τους είναι υψηλότερη. Η μελέτη των SNPs έχει πολλές εφαρμογές στην ιατρική και στη βιολογική έρευνα, καθώς τα πολυπαραγοντικά νοσήματα, τα οποία είναι και τα πιο συχνά στον πληθυσμό, μπορούν να συσχετιστούν με τον εντοπισμό συγκεκριμένων SNPs, τα οποία αυξάνουν την προδιάθεση των ατόμων για την εμφάνιση συγκεκριμένων ασθενειών.

Η συμβολή των προγραμμάτων αλληλούχησης του γονιδιώματος του ανθρώπου (HGP, International Human Genome Sequencing Consortium, 2001, Venter *et al*, 2001) και της ταυτοποίησης των SNPs σε επίπεδο γονιδιώματος, στον προσδιορισμό γενετικής ποικιλότητας ήταν καθοριστική. Ο αριθμός των SNPs σε επίπεδο γονιδιώματος που έχουν τυποποιηθεί ανέρχεται σε 3 εκατομμύρια (IHGSC, 2004) και σημαντικό μέρος της παγκόσμιας έρευνας στοχεύει στον προσδιορισμό των λειτουργικών SNPs, δηλαδή αυτών που τροποποιούν τα επίπεδα έκφρασης ή τη λειτουργία ενός γονιδίου και την συσχέτιση των συγκεκριμένων SNPs με πολυπαραγοντικές διαταραχές. Οι συσχετίσεις που έχουν ταχτοποιηθεί σε συγκεκριμένους πληθυσμούς μπορεί να οφείλονται είτε σε λειτουργικά αίτια, όπως στο ότι πράγματι η συγκεκριμένη νουκλεοτιδική αντικατάσταση έχει κάποιο λειτουργικό αποτέλεσμα, το οποίο συμμετέχει στην εκδήλωση του φαινοτύπου, είτε σε φαινόμενο ανισορροπίας σύνδεσης, δηλαδή, της μη τυχαίας συσχέτισης δύο η περισσότερων συνδεδεμένων αλληλομόρφων. Στην τελευταία περίπτωση το SNP που

ταυτοποιήθηκε δεν είναι πράγματι το λειτουργικό αλλά βρίσκεται πολύ κοντά στο λειτουργικό.

#### *GSTP1, GSTM1, GSTT1 και ασθένειες*

Οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου, τα αντιοξειδωτικά και γενικότερα το οξειδωτικό stress αποκτούν κατά τελευταία χρόνια όλο και μεγαλύτερο ενδιαφέρον καθώς αυξάνει διαρκώς ο αριθμός των νοσημάτων με τα οποία έχουν συσχετιστεί.

Στην συγκεκριμένη εργασία μελετήσαμε τις συχνότητες πολυμορφισμών των γονιδίων *GSTP1*, *GSTM1*, *GSTT1* σε πληθυσμό μη νοσούντων με καταγωγή από τη Κεντρική Ελλάδα. Το *GSTM1* ανήκει στην ομάδα των mu και χαρτογραφείται στο χρωμόσωμα 1 στη ζώνη 1q13.3. Το *GSTT1* ανήκει στην οικογένεια των theta και χαρτογραφείται στο χρωμόσωμα 22 στη ζώνη 22q11.2. Τέλος το *GSTP1* ανήκει στην οικογένεια των pi και χαρτογραφείται στο χρωμόσωμα 11 στη ζώνη 11q13.

Οι πολυμορφισμοί οι οποίοι μελετήσαμε για το γονίδιο *GSTP1* είναι ο C341T που έχει ως αποτέλεσμα την μετατροπή της αλανίνης 114 σε βαλίνη και ο A313G ο οποίος έχει ως αποτέλεσμα την μετατροπή της ισολευκίνης 105 σε βαλίνη. Οι δυο συγκεκριμένοι πολυμορφισμοί έχουν ως αποτέλεσμα τη μειωμένη ενεργότητα του ένζυμου διότι το αμινοξύ το οποίο αλλάζει βρίσκεται στο ενεργό κέντρο. Οι πολυμορφισμοί οι οποίοι μελετήσαμε για τα γονίδια *GSTM1* και *GSTT1* αφορούν ομόζυγο έλλειμμα των γονιδίων και συνεπώς έχουν ως αποτέλεσμα την πλήρη έλλειψη της δραστηριότητας του ενζύμου.

Αρκετές μελέτες συσχετίζουν πολυμορφισμούς των παραπάνω γονιδίων με την προδιάθεση εμφάνιση άσθματος. Έχει βρεθεί ότι τα γονίδια *GSTM1*, *GSTT1* και *GSTP1* εκφράζονται σε υψηλά επίπεδα στους πνεύμονες και ότι εμπλέκονται στην αντιοξειδωτική άμυνα του οργανισμού. Έτσι μελέτη σε Τούρκους δείχνει ότι το έλλειμμα των *GSTM1* και *GSTT1* και ο ομόζυγος γονότυπος A313G (Val/Val) για το *GSTP1* σε ενήλικα άτομα συσχετίζονται με την προδιάθεση εμφάνισης άσθματος. Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι υπάρχει αλληλεπίδραση μεταξύ του *GSTM1* και του *GSTP1*, συγκεκριμένα το αλληλόμορφο A313G του *GSTP1* αυξάνει τον κίνδυνο παρουσία του *GSTM1* όχι όμως όταν υπάρχει ομόζυγο έλλειμμα. Ο ομόζυγος γονότυπος του *GSTP1* A313G (Val<sup>105</sup>/Val<sup>105</sup>) έχει συσχετιστεί με 6 φορές χαμηλότερο κίνδυνο εμφάνισης άσθματος και 4 έως 10 φορές χαμηλότερο σε σχέση με τον αντίστοιχο ετερόζυγο γονότυπο (Ile<sup>105</sup>/Val<sup>105</sup>), (Hulya Ercan *et al*, 2006). Επιπλέον, στους Κινέζους, έχει βρεθεί ότι η έλλειψη του *GSTM1* δρα προστατευτικά ως προς την

προδιάθεση εμφάνισης άσθματος σε αντίθεση με άλλους πληθυσμούς (π.χ. Καυκάσιοι) στους οποίους βρέθηκε ακριβώς το αντίθετο (Mak JCW *et al*, 2007).

Συσχέτιση έχει βρεθεί και μεταξύ των ελλειμμάτων των *GSTMI* και *GSTT1* με το σύνδρομο μυελοβλαστικών κυττάρων (MDS) που είναι διαταραχή των βλαστικών κυττάρων των οστών με αποτέλεσμα την μυελώδη λευχαιμία (AML). Συγκεκριμένα, στον Ελληνικό πληθυσμό έχει βρεθεί ότι το 57,4% των ασθενών με MDS είχαν έλλειμμα του *GSTMI* σε αντίθεση με την ομάδα ελέγχου που το ποσοστό ήταν 33,3%. Όσον αφορά το έλλειμμα του *GSTT1* το 11,1% των ασθενών είχε έλλειμμα ενώ στους μη νοσούντες το αντίστοιχο ποσοστό ήταν 6,66% (Tsabouri SE *et al*, 2000).

Επίσης διαφορά παρατηρήθηκε και στη συχνότητα των πολυμορφισμών μεταξύ θηλυκών ατόμων με και χωρίς καρκίνο του μαστού. Συγκεκριμένα, η συχνότητα του ελλείμματος του *GSTT1* στα άτομα με το συγκεκριμένο καρκίνο ήταν 0,14 ενώ στα υγιή άτομα η αντίστοιχη συχνότητα ήταν 0,10. Όσον αφορά το ομόζυγο έλλειμμα του *GSTMI* η συχνότητα ήταν η ίδια (0,52) και σε υγιή και σε άτομα με καρκίνο του μαστού. Επιπλέον, με RT-PCR βρέθηκε ότι στα παραπάνω άτομα έχουν απορρυθμιστεί τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *GSTMI*, *GSTT1* και *GSTP1* και έτσι προτείνεται ότι αυτά θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες για την καλύτερη κλινική αντιμετώπιση των ασθενών σε σχέση με τη χημειοθεραπεία (Dialyna IA *et al*, 2007).

Επίσης, το οξειδωτικό stress έχει συσχετιστεί και με τη δημιουργία σκλήρυνσης κατά πλάκας (MS). Συγκεκριμένα, στις γυναίκες ασθενείς παρατηρήθηκε αυξημένο ποσοστό ελλείμματος του *GSTMI* (65.5%), όχι όμως και στους άνδρες που μπορεί να οφείλεται στο ότι το γονίδιο πιθανόν παίζει ρόλο σε αντιοξειδωτικό μονοπάτι το οποίο εξαρτάται από το φύλο (Stavropoulou C *et al*, 2007).

Μία άλλη μελέτη έχει δείξει ότι υπάρχει συσχέτιση όσον αφορά την απόκριση ασθενών με λευχαιμία (MDS) σε χορήγηση ανασυνδυασμένης ανθρώπινης ερυθροποιητίνης και του γονοτύπου των *GSTMI* και *GSTT1*, με τα άτομα με ομόζυγο έλλειμμα του *GSTMI* να έχουν περισσότερες πιθανότητες ανταπόκρισης στη θεραπεία (Tsabouri SE *et al*, 2004).

Επίσης, ο γονότυπος ομόζυγου ελλείμματος του *GSTMI* έχει συσχετιστεί με την εμφάνιση καρκίνου του πνεύμονα, που πιθανώς οφείλεται στη μειωμένη αντιοξειδωτική ικανότητα των συγκεκριμένων γονοτύπων. Πιο συγκεκριμένα, το

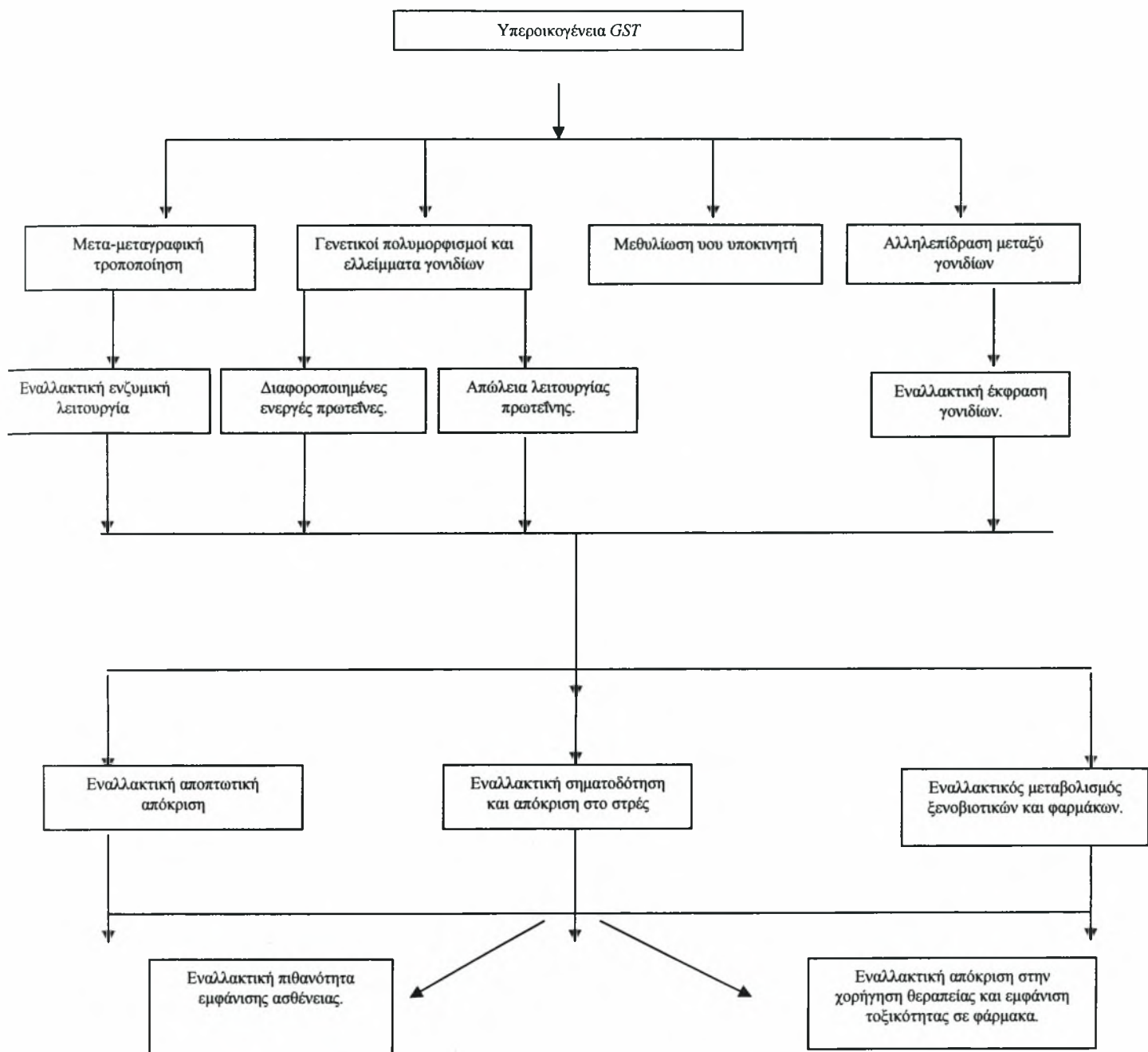
ομόζυγο έλλειμμα του *GSTM1* εμφανιζόταν συχνότερα στους ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα (Dialyna IA *et al*, 2004).

Επιπλέον, μελέτες σε ελληνικής καταγωγής οικογένειες με περιστατικά ενδομητρίωσης, έδειξαν ότι ποσοστό 13% αυτών είχαν ομόζυγο έλλειμμα του *GSTM1* σε συνδυασμό με το γονότυπο wt/m1 του *CYP1A1* (κυτόχρωμα) ενώ ο συγκεκριμένος γονότυπος δεν εμφανίστηκε σε καμία από τις γυναίκες της ομάδας ελέγχου. Αντίθετα, για το *GSTT1* δεν έχει βρεθεί κάποιος συσχετισμός με την ασθένεια (Arvanitis DA *et al*, 2004).

Στην εικόνα 2 βλέπουμε ένα υποθετικό μοντέλο των γεγονότων και των αλληλεπιδράσεων που αφορούν τα γονίδια *GST* και που διαταραχές τους μπορεί να οδηγήσουν σε παθολογικό φαινότυπο. Π.χ. η μετα-μεταγραφική τροποποίηση μπορεί υποθετικά να οδηγήσει σε εναλλακτική ενζυμική λειτουργία. Επιπλέον, γενετικοί πολυμορφισμοί και ελλείμματα γονιδίων μπορεί να δώσουν τροποποιημένες πρωτείνες ακόμα και απώλεια της ενζυμικής λειτουργίας. Τέλος, μεθυλίωση του υποκινητή και αλληλεπιδράσεις μεταξύ των γονιδίων μπορεί να έχουν ως αποτέλεσμα την εναλλακτική έκφραση των γονιδίων (Hui-Wen Lo *et al*, 2007).

### **Σκοπός της εργασίας**

Στην εργασία αυτή μελετήθηκαν οι συχνότητες των πολυμορφισμών A313G και C341T του γονιδίου *GSTP1* και οι συχνότητες του ομόζυγου ελλείμματος των γονιδίων *GSTT1* και *GSTM1* σε άτομα ελέγχου του ελληνικού πληθυσμού με καταγωγή από την Κεντρική Ελλάδα. Τα αποτελέσματα αυτά θα χρησιμοποιηθούν σε επόμενες μελέτες συσχέτισης με πολυπαραγοντικά νοσήματα με προτεραιότητα αναπνευστικές διαταραχές όπως το άσθμα, η χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια και η άπνοια κατά τον ύπνο, βάσει των μελετών που δείχνουν ότι οι παραπάνω διαταραχές σχετίζονται με συστηματικό οξειδωτικό στρες.



**Εικ. 2: Δομή, ρύθμιση και λειτουργία των GSTs και συσχέτιση με νοσήματα**

# ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

## 1. Απομόνωση γενωμικού DNA

Το γενωμικό DNA που χρησιμοποιήθηκε, απομονώθηκε από αίμα ατόμων μη νοσούντων με καταγωγή από την Κεντρική Ελλάδα κατόπιν συγκατάθεσής τους.

Μια αποτελεσματική μέθοδος απομόνωσης πρέπει να δίνει αρκετή ποσότητα DNA, καλής ποιότητας ώστε να είναι κατάλληλο για την πραγματοποίηση PCR. Στην εργασία αυτή χρησιμοποιήθηκε η κλασική μέθοδος επώασης με πρωτεΐνάση K και εκχυλίσεων με φαινόλη/χλωροφόρμιο. Όσον αφορά το ρόλο των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιούνται σε αυτή την μέθοδο ισχύουν τα εξής: Το SDS είναι ένα ιοντικό απορρυπαντικό και χρησιμοποιείται για τη διάσπαση της πυρηνικής μεμβράνης, καθώς επίσης και την αποδιάταξη των πρωτεϊνών, προστατεύοντας έτσι το DNA από τις νουκλεάσες. Η πρωτεΐνάση K χρησιμοποιείται για την αποικοδόμηση των πρωτεϊνών. Η φαινόλη χρησιμοποιείται για την αποδιάταξη των πρωτεϊνών και το διαχωρισμό των λιπιδίων, πρωτεϊνών και των νουκλειικών οξέων. Το διάλυμα φαινόλης που χρησιμοποιείται είναι εξισορροπημένο σε pH >7 ώστε το DNA να κατανέμεται στην υπερκείμενη υδατική φάση. Η προσθήκη του χλωροφορμίου στη συνέχεια έχει ως στόχο τον καλύτερο διαχωρισμό των φάσεων λόγω μεγάλης πυκνότητας. Επίσης συμμετέχει στη μετουσίωση των πρωτεϊνών και στην απομάκρυνση της διαλυμένης φαινόλης από την υδατινή φάση. Η κατακρήμνιση του DNA πραγματοποιείται με ισοπροπανόλη καθώς το DNA είναι αδιάλυτο σε αυτήν και κατόπιν απομονώνεται με φυγοκέντρηση.

Η σύσταση των διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν είναι η εξής:

### **1x SSC**

Sodium Chloride 150 mM

Sodium Citrate: 15 mM

### **3M CH<sub>3</sub>COONa pH 5.2**

CH<sub>3</sub>COONa 24,6 gr

ddH<sub>2</sub>O ως τα 100 mL

Ρύθμιση του pH στο 5,2 με διάλυμα υδροχλωρίου

### **SDS 5% w/v**

Sodium dodecyl sulphate 5 gr

ddH<sub>2</sub>O ως τα 100 mL

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η παρακάτω:



1. Αρχικά τοποθετείται 0,5 ml αίματος σε σωλήνα ependorf και προστίθεται 1ml 1xSSC. Στη συνέχεια πραγματοποιείται ανάδευση με vortex και φυγοκέντρηση στις 13000rpm για 3min.
2. Ακολουθεί απομάκρυνση του υπερκείμενου, προσθήκη 1ml 1xSSC, ανάδευση με vortex και φυγοκέντρηση για 1min στις 13000 rpm.
3. Μετά την απομάκρυνση του υπερκείμενου, ακολουθεί προσθήκη 0,5 ml οξικού νατρίου ( $\text{CH}_3\text{COONa}$ ) 0,2 M, ανάδευση και προσθήκη 50  $\mu\text{l}$  5% SDS και 10  $\mu\text{l}$  πρωτεΐνάσης K (10mg/ml). Η επώαση πραγματοποιείται για 1h στους  $55^\circ\text{C}$ .
4. Προσθέτουμε 0,5ml φαινόλης και 0,5ml χλωροφορμίου. Στη συνέχεια αναδεύουμε και φυγοκεντρούμε για 5 min στις 13000rpm.
5. Μεταφέρουμε το υπερκείμενο σε νέα eppendorfs, προσθέτουμε 1ml χλωροφορμίου και φυγοκεντρούμε για 10 min στις 13000 rpm.
6. Μεταφέρουμε το υπερκείμενο, προσθέτουμε 1ml ισοπροπανόλης και επωάζουμε στους  $-20^\circ\text{C}$  για 15 min.
7. Αφαιρούμε το υπερκείμενο, προσθέτουμε 1ml αιθανόλης 70% και φυγοκεντρούμε για 10 min στις 13000rpm.
8. Αφαιρούμε το υπερκείμενο και τοποθετούμε το δείγμα στους  $37^\circ\text{C}$  έτσι ώστε να απομακρυνθεί η αιθανόλη πλήρως.
9. Επαναδιαλύουμε προσθέτοντας 100 $\mu\text{l}$  ddH<sub>2</sub>O και επωάζοντας σε θερμοκρασία δωματίου ή στους  $4^\circ\text{C}$ .

## 2. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η τεχνική της PCR βασίζεται στον επαναλαμβανόμενο κύκλο τριών αντιδράσεων οι οποίες διαφέρουν στη θερμοκρασία και το χρόνο. Κάθε κύκλος αποτελείται από τα εξής στάδια :

1. Αποδιάταξη του δίκλωνου DNA.
2. Υβριδοποίηση των εκκινητών με την αλληλουχία στόχο (primer annealing)
3. Σύνθεση συμπληρωματικών κλώνων του DNA με επέκταση του 3' άκρου των εκκινητών με τη βοήθεια της Taq πολυμεράσης (primer extension).

Στο πρώτο βήμα (Εικ. 3) του κύκλου γίνεται αποδιάταξη του DNA-υποστρώματος, αυξάνοντας τη θερμοκρασία της αντίδρασης συνήθως μεταξύ  $92^\circ\text{C}$  και  $96^\circ\text{C}$ . Με αυτόν τον τρόπο απομακρύνονται οι δυο αλυσίδες του DNA διότι σπάνε οι δεσμοί υδρογόνου.

Στο δεύτερο βήμα (Εικ. 3), με μείωση της θερμοκρασίας της αντίδρασης (50°C-60°C), επιτυγχάνεται ο υβριδισμός των εκκινητών με την αλληλουχία του DNA. Οι εκκινητές είναι συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια, μήκους 18-30 βάσεων, τα οποία προσδένονται στην αλληλουχία του DNA βάσει συμπληρωματικότητας. Οι εκκινητές αποτελούνται από αλληλουχίες μη συμπληρωματικές μεταξύ τους έτσι ώστε να μην υβριδίζονται μεταξύ τους αλλά με τη συμπληρωματική αλληλουχία στο DNA. Η θερμοκρασία αυτού του βήματος εξαρτάται από τη σύσταση των εκκινητών, δηλαδή το περιεχόμενό τους σε βάσεις CG-AT.

Στο τρίτο και τελευταίο βήμα (Εικ. 3) πραγματοποιείται η σύνθεση των συμπληρωματικών κλώνων του DNA σε θερμοκρασία 72°C. Αυτό το βήμα επιτυγχάνεται με τη χρήση του ενζύμου Taq πολυμεράση που συνθέτει το DNA με κατεύθυνση 5' προς 3'. Η Taq πολυμεράση συνθέτει περίπου 2000 νουκλεοτίδια ανά λεπτό και συνεπώς ο χρόνος που απαιτείται για την αντιγραφή του DNA-στόχου εξαρτάται από το μήκος του προϊόντος PCR. Το ένζυμο αυτό επειδή έχει απομονωθεί από το βακτήριο *Thermus aquaticus* έχει την ικανότητα να λειτουργεί σε πολύ υψηλές θερμοκρασίες ενώ η παραπάνω είναι η βέλτιστη θερμοκρασία πολυμερισμού.

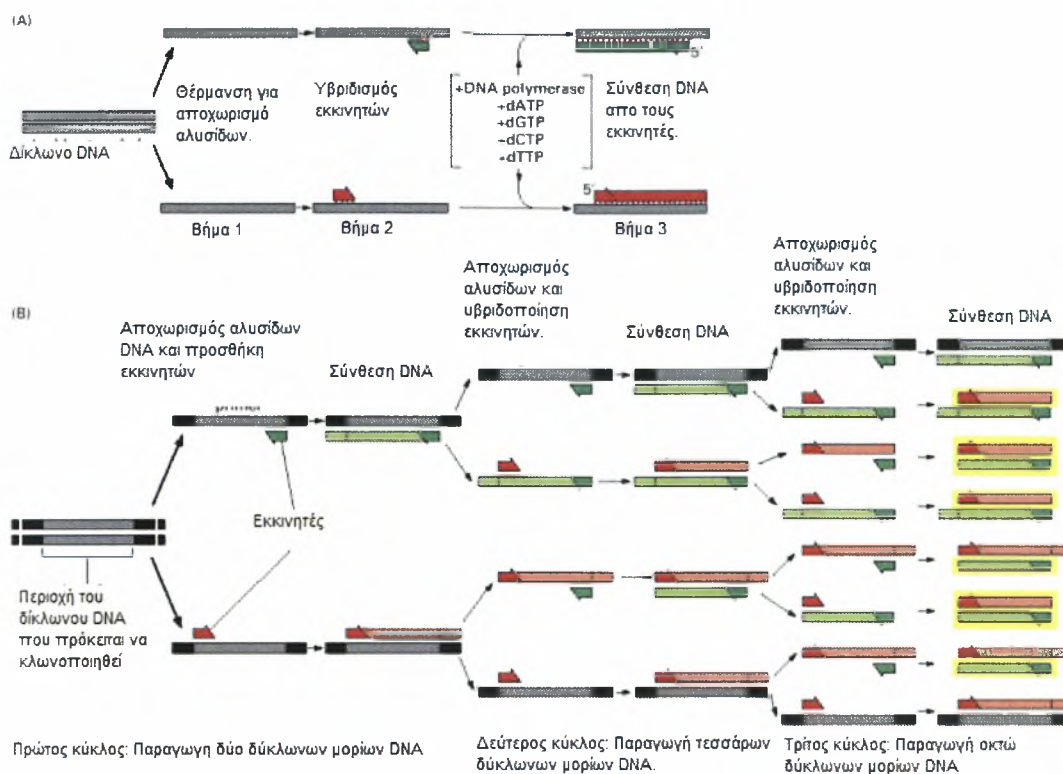
Σε μια PCR ο κύκλος αποδιάταξης, υβριδισμού και σύνθεσης επαναλαμβάνεται συνήθως 30-35 φορές με αποτέλεσμα την εκθετική αύξηση του προϊόντος.

Ο έλεγχος του παραγόμενου προϊόντος γίνεται συνήθως με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης. Ο τελικός όγκος της αντίδρασης ήταν 50μl. Τα αντιδραστήρια που προστέθηκαν και οι ποσότητες τους παρτίθεται στον πίνακα 1.

**Πίνακας 1 :**

	Ποσότητα	Τελική συγκέντρωση
Υπόστρωμα DNA	3 μl (200ng)	
dNTPs 10 mM το καθένα	1,2 μl	0.2mM το καθένα
Εκκινητής For 50pmol/μl	1 μl	1pmol/μl
Εκκινητής Rev 50pmol/μl	1 μl	1pmol/μl
MgCl <sub>2</sub> (50mM)	1,5 μl	2mM
Buffer 10x	5 μl	1x
BSA 100x	0,5 μl	1x
Taq DNA πολυμεράση 5U/μl	0,2 μl	1 Unit
ddH <sub>2</sub> O	37 μl	

Συνολικός όγκος	50 μl	
-----------------	-------	--



**Εικ. 3: Σχηματική απεικόνιση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR).** Α: Θέρμανση για την αποδιάταξη των δύο κλώνων του DNA-υποστρώματος, επώαση του δείγματος σε θερμοκρασία 50-65<sup>0</sup> C ώστε να γίνει η υβριδοποίηση των εκκινητών στα άκρα της περιοχής που θέλουμε να πολλαπλασιάσουμε και επώαση στους 70-78<sup>0</sup> C όπου η Taq πολυμεράση συνθέτει τα συμπληρωματικά αντίγραφα του κάθε κλώνου. Β: Ενδεικτικά απεικονίζεται ο εκθετικός πολλαπλασιασμός των κλώνων (από Alberts B., 2002).

Οι παραπάνω συνθήκες ισχύουν για το τμήμα του γονιδίου *GSTP1* που περιέχει το SNP C341T και για τα τμήματα των γονιδίων *GSTM1* και *GSTT1*. Για το τμήμα του *GSTP1* που περιέχει το SNP A313G οι συνθήκες ήταν οι ίδιες με μόνη διαφορά την τελική συγκέντρωση του MgCl<sub>2</sub> που ρυθμίστηκε στο 1mM.

Οι συνθήκες της PCR στις οποίες ενισχύθηκε το τμήμα του *GSTP1* που περιέχει το SNP C341T και τα τμήματα των γονιδίων *GSTM1* και *GSTT1* είναι οι εξής:

Στάδιο PCR	Θερμοκρασία	Χρόνος
Αρχική αποδιάταξη	95 <sup>0</sup> C	4min
Αποδιάταξη (Denaturation)	94 <sup>0</sup> C	40sec
Υβριδοποίηση εκκινητή (Annealing)	58 <sup>0</sup> C	50sec
Πολυμερισμός (Extension)	72 <sup>0</sup> C	45sec
Τελική επέκταση	72 <sup>0</sup> C	10min

} 35 κύκλοι

Για την ενίσχυση του τμήματος του *GSTP1* που περιέχει το SNP A313G, οι συνθήκες είναι ακριβώς οι ίδιες με μόνη διαφορά τη θερμοκρασία υβριδοποίησης στους 55<sup>0</sup>C.

Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση των τεσσάρων διαφορετικών τμημάτων είναι οι παρακάτω:

GSTP1\_A313G\_For

5'-CCA GGC TGG GGC TCA CAG ACA GC-3'

GSTP1\_A313G\_Rev

5'-GGT CAG CCC AAG CCA CCT GAG G-3'

GSTP1\_C341T\_For

5'-GTT GTG GGG AGC AAG CAG AGG-3'

GSTP1\_C341T\_Rev

5'-CAC AAT GAA GGT CTT GCC TCC C-3'

GSTM1\_For

5'-CTG CCC TAC TTG ATT GAT GGG-3'

GSTM1\_Rev

5'-CTGGATTGTAGCAGATCATGC-3'

GSTT1\_For

5'-TTC CTT ACT GGT CCT CAC ATC TC-3'

GSTT1\_Rev

5'-TCA CCG GAT CAT GGC CAG CA-3'

### 3. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης είναι η μέθοδος που χρησιμοποιείται συνήθως για την αξιολόγηση, το διαχωρισμό και την απομόνωση τμημάτων DNA. Η ηλεκτροφορητική κινητικότητα του DNA εξαρτάται από τις παρακάτω παραμέτρους:

1. Το μέγεθος των μορίων DNA. Δίκλιωνα γραμμικά μόρια DNA κινούνται μέσω του πηκτώματος με ρυθμούς αντιστρόφως ανάλογους του λογάριθμου ( $\log_{10}$ ) του αριθμού των ζευγών των βάσεων (Helling RB, *et al*, 1974).
2. Τη συγκέντρωση της αγαρόζης στο πήκτωμα. Η κίνηση των μορίων είναι αντιστρόφως ανάλογη της πυκνότητας.
3. Τη στερεοδομή των μορίων DNA. Η κινητικότητα των μορίων DNA εξαρτάται από το αν είναι γραμμικό ή κυκλικό. Τα γραμμικά μόρια κινούνται γρηγορότερα για αυτό μόρια DNA του ίδιου μοριακού βάρους κινούνται με διαφορετικούς ρυθμούς στο ίδιο πήκτωμα αγαρόζης (Thorne HV, 1996).
4. Την τάση του ηλεκτρικού πεδίου που εφαρμόζεται. Σε χαμηλές τάσεις ο ρυθμός μετανάστευσης των γραμμικών μορίων DNA είναι μικρός ενώ σε μεγάλες τάσεις ο ρυθμός μετανάστευσης είναι μεγάλος.

Η ανίχνευση των μορίων γίνεται με την προσθήκη βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr) στο πήκτωμα αγαρόζης, που παρεμβάλλεται μεταξύ γειτονικών βάσεων του DNA και φθορίζει όταν ακτινοβολείται με υπεριώδη ακτινοβολία. Η διακριτική ικανότητα της μεθόδου είναι της τάξεως των 10ng DNA και εξαρτάται από το μέγεθος του τμήματος, καθώς μεγαλύτερα τμήματα δεσμεύουν περισσότερη ποσότητα βρωμιούχου αιθιδίου.

Η σύσταση των διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν είναι η εξής:

#### **50x TAE (500ml)**

Tris base 121 gr

Acetic acid 28.5 ml

EDTA 0.5M 50 ml

ddH<sub>2</sub>O ως τα 500 ml

Για την παρασκευή διαλύματος 1x TAE αραιώνουμε το διάλυμα 50x (49 όγκοι ddH<sub>2</sub>O: 1 όγκος 50x TAE )

### **Loading buffer 6x (10ml)**

Bromophenol blue 1% w/v 1 ml

10xTBE 1ml

Glycerol 100% 5 ml

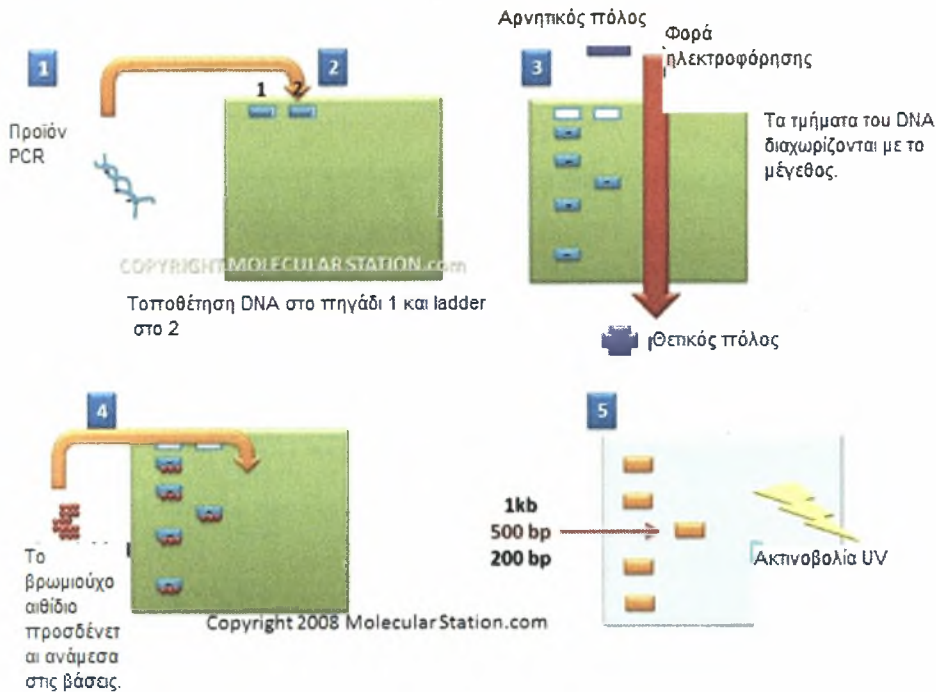
ddH<sub>2</sub>O ως τα 10 ml

Για την προετοιμασία του πηκτώματος 2% και βάσει του όγκου του διαλύματος που χρειαζόμαστε, ζυγίζουμε την αντίστοιχη ποσότητα αγαρόζης και την τοποθετούμε σε μια κωνική φιάλη μαζί με τον απαιτούμενο όγκο 1xTAE. Αφού θερμανθούν, με ανάδευση κατά διαστήματα και διαλυθεί η αγαρόζη, κρυνώνουμε το διάλυμα και προσθέτουμε βρωμιούχο αιθίδιο.

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η παρακάτω:

1. Αρχικά ετοιμάζεται η ειδική συσκευή στην οποία τοποθετείται το πήκτωμα.
2. Στη συνέχεια και καθώς τα προϊόντα που ηλεκτροφορήθηκαν είχαν μέγεθος <500bp χρησιμοποιήθηκε πήκτωμα συγκέντρωσης 2% σε ρυθμιστικό διάλυμα 1x TAE.
3. Θέρμανση του διαλύματος έτσι ώστε να διαλυθεί η αγαρόζη (με ανάδευση κατά διαστήματα).
4. Το διάλυμα κρυνώνει, προστίθεται 3ml βρωμιούχο αιθίδιο (10mg/ml) για 4ml πηκτώματος και στη συνέχεια τοποθετείται στην ειδική συσκευή.
5. Εισάγεται το χτενάκι της συσκευής έτσι ώστε να σχηματιστούν οι θέσεις του πηκτώματος.
6. Αφήνουμε την αγαρόζη να πήξει καλά για περίπου για 30 min και αφαιρούνται τα χτενάκια.
7. Τοποθέτηση του πηκτώματος σε ειδική συσκευή ηλεκτροφόρησης η οποία περιέχει ρυθμιστικό διάλυμα 1x TAE
8. Ανάμειξη 3 μl loading buffer με 5 μl (10%) προϊόντος της PCR και στη συνέχεια εισαγωγή των δειγμάτων στις θέσεις του πηκτώματος.
9. Παρέχουμε ρεύμα στο κύκλωμα διατηρώντας σταθερά τα Volts κατά τη διάρκεια της ηλεκτροφόρησης ανάμεσα σε 80-100V. Η ηλεκτροφόρηση διαρκεί ~30 min. Διακόπτεται όταν είναι ικανοποιητική η απόσταση που έχει διατρέξει το μέτωπο της ταχέως κινούμενης χρωστικής του loading buffer μέσα στο πήκτωμα.

10. Παρατηρείται το πήκτωμα κάτω από υπεριώδη ακτινοβολία και ακολουθεί φωτογράφησή του και ανάλυση του αποτελέσματος.



**Εικ 4: Ηλεκτροφόρηση δειγμάτων DNA σε πήκτωμα αγαρόζης.** 1-2: Τα δείγματα τοποθετούνται σε ειδικές θέσεις-πηγάδια, 3: Εφαρμόζεται ηλεκτρικό πεδίο, 4: Τα μόρια μετακινούνται με βάση το φορτίο και το μέγεθός τους (από τον αρνητικό προς το θετικό πόλο). (από [www.MolecularStration.com](http://www.MolecularStration.com))

#### **4. Η μέθοδος RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)**

Με τη συγκεκριμένη διαδικασία μπορούμε κατά κύριο λόγο να προσδιορίσουμε τα SNPs. Ο πολυμορφισμός των τμημάτων περιορισμού προκύπτει από τις διαφορές στη νουκλεοτιδική αλληλουχία των σημείων αναγνώρισης και κοπής από τα ένζυμα περιορισμού μεταξύ διαφορετικών ατόμων ή αλληλομόρφων, που οδηγεί στη δημιουργία τμημάτων περιορισμού διαφορετικού μεγέθους τα οποία μπορούν να διαχωριστούν και να ανιχνευτούν με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης ή πολυακρυλαμίδης μετά από κατάλληλη χρώση.

Η ταυτοποίηση του πολυμορφισμού πραγματοποιήθηκε με πέψη του προϊόντος PCR με περιοριστικό ένζυμο και ακόλουθη ηλεκτροφόρηση των προϊόντων τεμαχισμού σε πήκτωμα ακρυλαμίδης. Η ακρυλαμίδα επιλέχθηκε γιατί έχει μεγάλη διακριτική ικανότητα και μπορεί να μας δείξει τη διαφορά ακόμα και σε λίγες βάσεις.

Ένα σημαντικός παράγοντας για την επιτυχία της μεθόδου είναι η πλήρης πέψη των τμημάτων DNA που θέλουμε να αναλύσουμε, ώστε τα προϊόντα μερικής πέψης να μην εμποδίζουν την σωστή ανάλυση των τμημάτων περιορισμού. Για τον αποτελεσματικότερο τεμαχισμό του DNA, χρησιμοποιείται συνήθως περίσσεια του ενζύμου. Τα units αποτελούν μονάδα ενεργότητας των ενζύμων και 1 unit απαιτείται για τον τεμαχισμό 1μg DNA. Επίσης, επειδή τα ένζυμα φυλάσσονται παρουσία γλυκερόλης, η οποία χρησιμοποιείται ως κρυπροστατευτικός παράγοντας, ο όγκος του ενζύμου που προστίθεται δεν πρέπει να υπερβαίνει το 1/10 του τελικού όγκου της αντίδρασης, ώστε αυτή να μην αναστέλλεται.

#### Τεμαχισμός του DNA με ένζυμα περιορισμού

Πολλά βακτήρια παράγουν ένζυμα τα οποία ονομάζονται ενδονουκλεάσες περιορισμού και ρόλος τους είναι να αποικοδομούν το εξωγενές DNA αναστέλλοντας έτσι την ικανότητά του να μολύνει το κύτταρο.

Τα ένζυμα περιορισμού αναγνωρίζουν μια συγκεκριμένη αλληλουχία μήκους τεσσάρων έως οκτώ νουκλεοτιδίων. Αυτές οι αλληλουχίες όπου υπάρχουν μέσα στο κύτταρο προστατεύονται από τον τεμαχισμό λόγω της μεθυλίωσης μιας τριφωσφορικής αδενοσίνης ή τριφωσφορικής κυτοσίνης ενώ οι αντίστοιχες αλληλουχίες του εξωγενούς DNA δεν είναι γενικώς μεθυλιωμένες ώστε να μπορούν να εκφράζονται, με αποτέλεσμα να τεμαχίζονται από τις ενδονουκλεάσες περιορισμού. Πολλές τέτοιες ενδονουκλεάσες έχουν απομονωθεί από διαφορετικά είδη βακτηρίων, αναγνωρίζουν διαφορετικές νουκλεοτιδικές αλληλουχίες και είναι διαθέσιμες εμπορικά.

Η δράση του ενζύμου μετά την αναγνώριση εξαρτάται από τον τύπο του. Υπάρχουν τρεις τύποι ενζύμων, τα ένζυμα τύπου I, II και III. Συνήθως χρησιμοποιούνται τα ένζυμα τύπου II τα οποία αναγνωρίζουν αλληλουχίες 4-8 βάσεων, δρουν ανεξαρτήτως μεθυλίωσης και τεμαχίζουν το DNA σε θέσεις μέσα η δίπλα στην αλληλουχία που αναγνωρίζουν. Τέλος, χρειάζεται μόνο ένα μόριο ενζύμου τύπου II για τον τεμαχισμό και των δύο κλώνων του DNA (όπως και στη περίπτωση των ενζύμων τύπου III) ενώ στα ένζυμα τύπου I χρειάζονται δύο μόρια. Στις κατηγορίες τύπου I και III η δραστηριότητα περιορισμού και μεθυλίωσης διεκπεραιώνεται από ένα μεγάλο ενζυμικό σύμπλοκο. Παρ' όλο που το συγκεκριμένο σύμπλοκο αναγνωρίζει συγκεκριμένες αλληλουχίες DNA, τα ακριβή σημεία στα



οποία τέμνεται το DNA μπορεί να βρίσκονται σε διάφορες αποστάσεις από το σημείο αναγνώρισης και μπορεί ακόμη να είναι και εκατοντάδες βάσεις μακριά.

Οι παράγοντες οι οποίοι παίζουν σημαντικό ρόλο στην αποτελεσματικότητα του ενζύμου είναι η ποσότητα του ενζύμου, η καθαρότητα του DNA, το ρυθμιστικό διάλυμα πέψης και η σωστή συντήρηση του ενζύμου κατά τη μεταφορά και αποθήκευση. Τα ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν και η σύσταση των αντιδράσεων τεμαχισμού παρατίθενται στον Πίνακα 2.

**Πίνακας 2: Συστατικά αντίδρασης τεμαχισμού.**

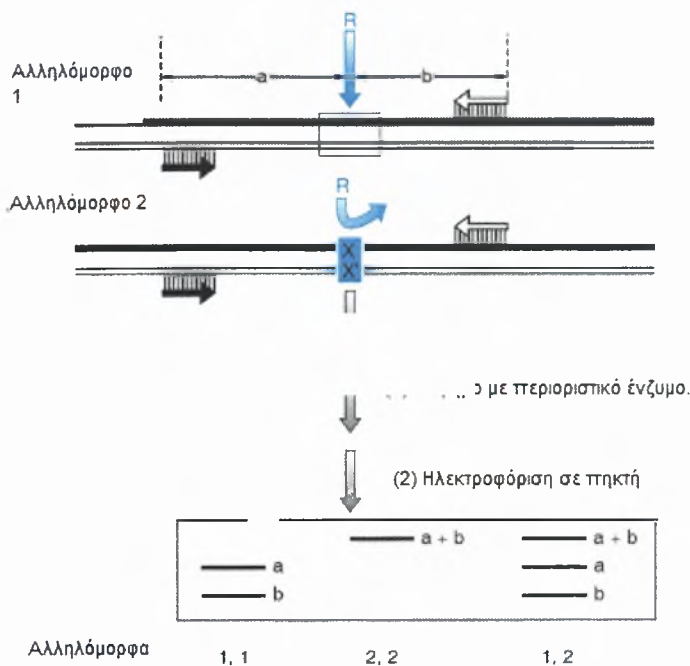
Αντιδραστήρια	Ποσότητα	Τελικές Συγκεντρώσεις
Προϊόν PCR	15 μl (30% της PCR)	
Ρυθμιστικό διάλυμα 10x	2μl	1x
<i>AciI</i> ή <i>HpyCH4IV</i> (10u/μl)	0.5 μl	5 units
ddH <sub>2</sub> O	2.5 μl	-
Τελικός όγκος	20μl	-

Το ένζυμο *AciI* αναγνωρίζει και κόβει την παρακάτω αλληλουχία και το ρυθμιστικό του διάλυμα είναι το 1X NEBuffer3 (100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM Dithiothreitol pH 7.9).



Το ένζυμο *HpyCH4IV* αναγνωρίζει και κόβει την παρακάτω αλληλουχία και το ρυθμιστικό του διάλυμα είναι το 1X NEBuffer1 (10 mM Bis-Tris-Propane-HCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM Dithiothreitol, pH 7.0).





**Εικ. 5: Μέθοδος PCR-RFLP.** Το αλληλόμορφο 1 δεν έχει θέση που αναγνωρίζει το περιοριστικό ένζυμο με αποτέλεσμα να μην τέμνεται και κατά την ηλεκτροφόρηση να παίρνουμε ένα τμήμα που αντιστοιχεί στο άθροισμα των a και b. Αντίθετα το αλληλόμορφο 2 έχει θέση που αναγνωρίζει το περιοριστικό ένζυμο με αποτέλεσμα να τεμαχίζεται από το ένζυμο και τα τμήματα a και b να εμφανίζονται ως δύο ζώνες στο πήκτωμα. (Strachan T, Read AP, 1999).

### **5. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτική πολυακρυλαμίδης**

Η πηκτική πολυακρυλαμίδης χρησιμοποιείται για την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων PCR τα οποία έχουν υποστεί πέψη με ένζυμο περιορισμού. Η συγκέντρωση της πηκτής εξαρτάται από το μέγεθος των τμημάτων DNA που αναλύονται και στη μελέτη αυτή ήταν 8%. Για την παρασκευή των πηκτών χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω διαλύματα:

#### **Διάλυμα ακρυλαμίδης 30% (100ml)**

Ακρυλαμίδα 99% 29 gr

Δις- ακρυλαμίδα 1 gr

ddH<sub>2</sub>O ως τα 2 lt

#### **TBE 10x (2 lt)**

Tris base 216 gr

Boric acid 110 g

EDTA 0.5M 80 ml

ddH<sub>2</sub>O ως τα 2 lt

### APS 20% w/v (10 ml)

Ammonium persulfate 2 gr

ddH<sub>2</sub>O ως τα 10 ml

### TEMED

Έτοιμο διάλυμα συγκέντρωσης 99%

Για την παρασκευή μιας πηκτής διαστάσεων 20x20cm και πάχους 2mm παρασκευάζουμε 62,5 ml διαλύματος ακρυλαμίδης 8%. Σε ποτήρι ζέσεως των 100 ml προσθέτουμε 13,3 ml από το διάλυμα ακρυλαμίδης 30%, 6,4 gr ουρίας και 6,25 ml 10x TBE σε 30ml ddH<sub>2</sub>O. Στη συνέχεια αναδεύουμε ώστε να διαλυτοποιηθεί πλήρως η ουρία και διηθούμε το διάλυμα με τη χρήση διηθητικού χαρτιού. Στη συνέχεια συμπληρώνουμε το διάλυμα με ddH<sub>2</sub>O ως τον τελικό όγκο. Τέλος, για τον πολυμερισμό της πηκτής προσθέτουμε 50 μl TEMED και 300 μl APS 20%, αναδεύουμε και την τοποθετούμε στη συσκευή όπου και παραμένει για 30 min ώστε να πολυμεριστεί. Μετά τον πολυμερισμό ακολουθεί ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε κάθετη συσκευή με χρήση ρυθμιστικού διαλύματος 1x TBE. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε θερμοκρασία δωματίου, για ~3 h και με τάση 220 volts.

Το πλεονέκτημα αυτής της μεθόδου έναντι της ηλεκτροφόρησης σε αγαρόζη είναι η μεγαλύτερη ευκρίνεια που παρέχει καθώς διαχωρίζει αποτελεσματικότερα τμήματα DNA που διαφέρουν μεταξύ τους ακόμη και λίγα ζεύγη βάσεων. Επιπλέον, η μέθοδος αυτή έχει μεγαλύτερη διακριτική ικανότητα, ανιχνεύοντας ποσότητα DNA της τάξεως των λίγων ng.

### Χρώση των πηκτών πολυακρυλαμίδης με νιτρικό άργυρο (Silver Staining)

Η χρώση των πηκτών με νιτρικό άργυρο χρησιμοποιείται προκειμένου να εμφανιστούν τα τμήματα DNA μετά από την ηλεκτροφόρηση. Η τεχνική αυτή βασίζεται στο γεγονός ότι ο άργυρος συνδέεται στο DNA και εν συνεχεία αντιδρά με τη φορμαλδεΰδη, παρουσία βάσης. Οι ζώνες του DNA εμφανίζονται σκούρες καφέ πάνω στο κίτρινο πήκτωμα (Sambrook *et al*, 1989). Για τη χρώση με νιτρικό άργυρο χρησιμοποιούνται τα εξής διαλύματα:

Διάλυμα 1: αιθανόλη 100% 10 ml

Οξικό οξύ 99% 0,5 ml

ddH<sub>2</sub>O ως τα 400 ml

Διάλυμα 2 : 200 ml διαλύματος AgNO

Διάλυμα 3: NaOH 3 gr

NaBH<sub>4</sub> gr

Formaldehyde 1 ml

ddH<sub>2</sub>O ως τα 200 ml

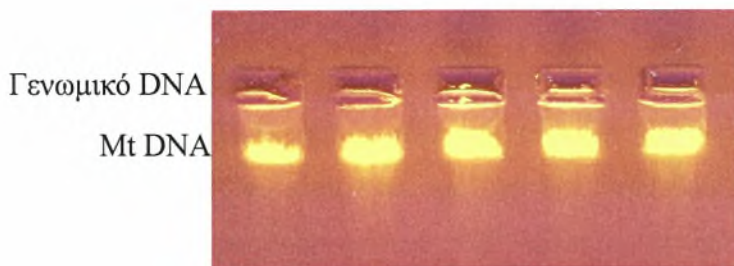
Στο πρώτο στάδιο της χρώσης, οι πηκτές εμβαπτίζονται σε 200 ml διαλύματος 1 και αναδεύονται για 3 min. Το διάλυμα 1 στη συνέχεια αποχύνεται και επαναλαμβάνεται η ίδια διαδικασία. Στη συνέχεια ακολουθεί πλύση των πηκτών με απεσταγμένο νερό για 1 min. Στο δεύτερο στάδιο προστίθεται το διάλυμα 2 και οι πηκτές αναδεύονται για 15 min. Έπειτα ακολουθούν δυο πλύσεις με απεσταγμένο νερό για ένα 1 min η καθεμία, με σκοπό να απομακρυνθεί εντελώς το διάλυμα του AgNO<sub>3</sub>. Στο τρίτο στάδιο προστίθεται το διάλυμα 3 και πραγματοποιείται ανάδευση για 10 min περίπου μέχρι να εμφανιστούν οι ζώνες του DNA στις πηκτές. Τέλος παρατηρούμε την πηκτή σε φως (light box) για την εκτίμηση των αποτελεσμάτων.

# **ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**

## 1. Απομόνωση γενωμικού DNA

Στη μελέτη που πραγματοποιήθηκε εφαρμόστηκε η μέθοδος PCR-RFLP με σκοπό την ταυτοποίηση των πολυμορφισμών C341T και A313G του γονιδίου *GSTP1* και η πολλαπλή PCR για τον έλεγχο της ομόζυγης έλλειψης των γονιδίων *GSTM1* και *GSTT1*.

Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε γενωμικό DNA που απομονώθηκε από αίμα 50 ατόμων με καταγωγή από την Κεντρική Ελλάδα, εφαρμόζοντας τη μεθοδολογία που ήδη περιγράφηκε. Ο ποσοτικός και ποιοτικός έλεγχος του DNA πραγματοποιήθηκε με φωτομέτρηση και ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πήκτωμα αγαρόζης. Η φωτομέτρηση έδειξε ότι η ποσότητα που λήφθηκε ήταν 5-100μg συνολικά (50-200ng/μl), που ήταν αρκετή για την πραγματοποίηση τουλάχιστον 50 αντιδράσεων PCR δεδομένου ότι σε κάθε αντίδραση χρησιμοποιούνται 100-200 ng. Επίσης, βάσει του λόγου των απορροφήσεων των δειγμάτων 260/280nm (~2) φάνηκε ότι αυτά είναι καθαρά από άλλα συστατικά όπως οι πρωτεΐνες και τα λιπίδια και συνεπώς ικανό να δώσει ικανοποιητικά προϊόντα PCR. Ο ποιοτικός έλεγχος της απομόνωσης με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1%, έδειξε ότι το γενωμικό DNA ήταν μεγαλομοριακό και χωρίς θραύσματα μικρών μεγεθών, όπως φαίνεται στην Εικ 6.

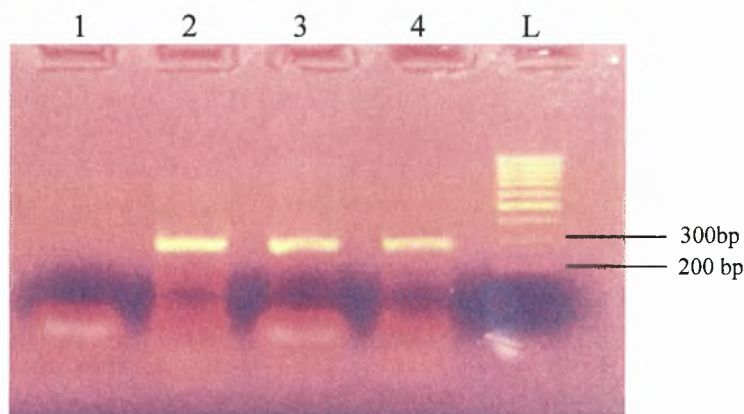


Εικόνα 6: Απομόνωση DNA. Ενδεικτική απεικόνιση της ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αγαρόζης (1%) του DNA

## 2. Ταυτοποίηση των πολυμορφισμών C341T και A313G του γονιδίου *GSTP1* με PCR-RFLP

Με την μέθοδο της PCR ενισχύθηκαν δύο τμήματα του γονιδίου *GSTP1* που περιλαμβάνουν τους πολυμορφισμούς C341T και A313G, μεγέθους 216 bp και 306 bp αντίστοιχα. Σε κάθε περίπτωση, το 10% του τελικού προϊόντος ελεγχόταν με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 2% (Εικ. 7) Συγκεκριμένα, ελέγχονταν κατά πόσο το προϊόν της PCR παρουσίαζε μόνο μία ζώνη του αναμενόμενου μεγέθους,

χωρίς την εμφάνιση παραπροϊόντων καθώς επίσης και η ποσότητά του, ώστε να ήταν διακριτή με τη χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο. Τέλος, ελέγχονταν ο αρνητικός μάρτυρας ώστε να μην εμφάνιζε καμία ζώνη-προϊόν



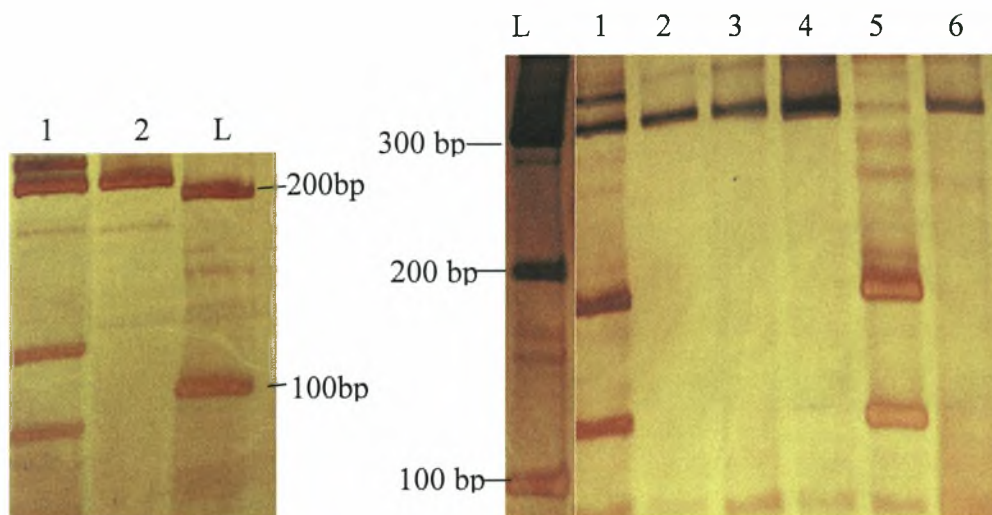
Εικ. 7: Προϊόντα PCR (306 bp) του γονιδίου *GSTP1* που περιέχουν τον πολυμορφισμό A313G (δείγματα 2, 3 και 4). Το δείγμα 1 αντιστοιχεί στον αρνητικό έλεγχο της αντίδρασης και το L στο ladder 100bp.

Μετά τον έλεγχο των προϊόντων PCR, πραγματοποιήθηκε η πέψη τους με τα κατάλληλα ένζυμα περιορισμού (*AciI* για το SNP C341T και *HpyCH4IV* για το A313G) και η ηλεκτροφόρηση των προϊόντων τεμαχισμού σε πήκτωμα ακρυλαμίδης ώστε να ταυτοποιηθεί η παρουσία/απουσία των SNPs.

Συγκεκριμένα για τον έλεγχο του C341T, το ένζυμο *AciI* αναγνωρίζει και τέμνει το προϊόν της PCR όταν στην πολυμορφική θέση υπάρχει το νουκλεοτίδιο C, με αποτέλεσμα από το τμήμα 216bp να προκύπτουν δύο τμήματα μεγέθους 124bp και 92bp. Έτσι, στην περίπτωση ετερόζυγων ατόμων C/T προκύπτουν τρεις ζώνες (216bp, 124bp και 92bp) ενώ στα ομόζυγα C/C μόνο οι δύο μικρότερες ζώνες. Αντίστοιχα, για τον προσδιορισμό του SNP A313G το ένζυμο *HpyCH4IV*, πέπτει το τμήμα 306bp του γονιδίου όταν στην πολυμορφική θέση υπάρχει το νουκλεοτίδιο G παράγοντας έτσι δύο τμήματα 186bp και 120bp.

Η εφαρμογή της PCR-RFLP στα 50 άτομα έλεγχου για τον πολυμορφισμό C341T του γονιδίου *GSTP1* έδειξε δύο γονότυπους, τους C/T και C/C (Εικ. 8). Ωστόσο, για τον πολυμορφισμό A313G του ίδιου γονιδίου ταυτοποιήθηκαν και οι τρεις πιθανοί γονότυποι, οι A/G, A/A /και G/G (Εικ. 8).

Ενδεικτικά, στην Εικ. 8. παρουσιάζονται τα πρότυπα που προσδιορίστηκαν για το τμήμα του γονιδίου *GSTP1* και αφορούσε το SNP C341T και το SNP A313G.



Εικ. 8: Αριστερά ενδεικτικά φαίνεται ανάλυση RFLP του γονιδίου *GSTP1* για το SNP C341T. Το δείγμα 1 είναι ετερόζυγο (CT), το 2 είναι άκοπο προϊόν PCR και το L είναι ο ladder 100 bp. Δεξιά φαίνεται ανάλυση RFLP του γονιδίου *GSTP1* για το SNP A313G. Το δείγμα 1 είναι ετερόζυγο (AG), τα 2, 3 και 4 είναι ομόζυγα (AA) το 5 είναι ομόζυγο (GG), το 6 είναι άκοπο προϊόν PCR και το L είναι ο ladder 100 bp.

Συνολικά, για το SNP C341T, το 82% των ατόμων ήταν ομόζυγοι (C/C), το 18% ετερόζυγοι (C/T) ενώ δεν ταυτοποιήθηκαν άτομα ομόζυγα ως προς τον πολυμορφισμό. Αντίστοιχα, για το SNP A313G το 44% είναι ομόζυγα (A/A), το 52% ετερόζυγα (A/G) και το 4% ομόζυγα (G/G) (Πίνακας 3)

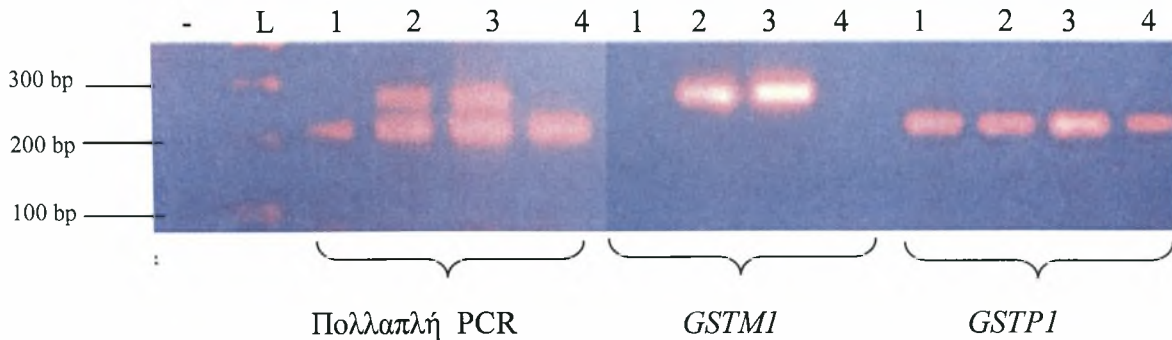
### 3. Ταυτοποίηση ομόζυγου ελλείμματος των γονιδίων *GSTM1* και *GSTT1* με πολλαπλή PCR

Η ταυτοποίηση των πολυμορφισμών ομόζυγου ελλείμματος των γονιδίων *GSTM1* και *GSTT1* πραγματοποιήθηκε με πολλαπλή PCR, χρησιμοποιώντας στην ίδια αντίδραση δύο ζεύγη εκκινητών. Το ένα ζεύγος υβριδοποιούνταν με τμήμα του *GSTM1* και το άλλο με τμήμα του γονιδίου *GSTP1* που βρίσκεται το SNP C341T.

Στην Εικ. 9 παρατηρούμε το προϊόν της πολλαπλής PCR μετά την ηλεκτροφόρησή του σε πήκτωμα αγαρόζης 2% για το γονίδιο *GSTM1*. Το δείγμα (-) είναι ο αρνητικός έλεγχος της αντίδρασης. Στα δείγματα 1-4 της πολλαπλής PCR (αριστερά) παρατηρούμε σε όλα την παρουσία του προϊόντος για το γονίδιο *GSTP1* (216bp) που χρησιμοποιήσαμε ως εσωτερικό μαρτύρα και υποδηλώνει την επιτυχία της αντίδρασης. Παράλληλα, φαίνεται ότι τα δείγματα 1 και 4 εμφανίζουν το ομόζυγο έλλειμμα του *GSTM1*, καθώς δεν παράγουν προϊόν PCR για το αντίστοιχο τμήμα του γονιδίου (272bp). Συνολικά, το 50% των δειγμάτων έφερε ομόζυγο έλλειμμα για το γονίδιο *GSTM1*.



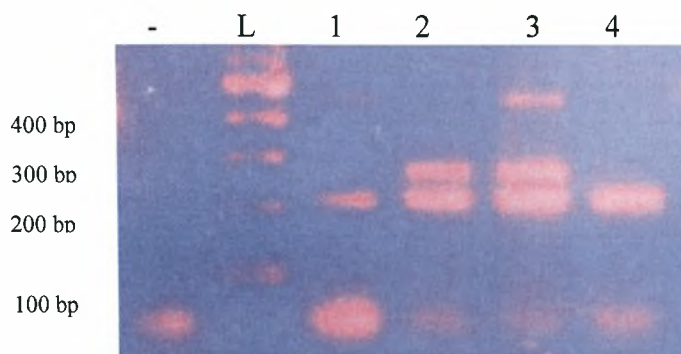
Επιπλέον, στην Εικ. 9 και στα ίδια δείγματα 1-4 φαίνεται το προϊόν της PCR μόνο για το γονίδιο *GSTM1* (κέντρο) και μόνο για το *GSTP1* (δεξιά), που είναι σε συμφωνία με την ταυτοποίηση ομόζυγου ελλείμματος στα δείγματα 1 και 4.



**Εικ. 9:** Ενδεικτική PCR ταυτοποίησης ομόζυγου ελλείμματος του γονιδίου *GSTM1* σε τέσσερα άτομα (1-4). Το L είναι ladder 100 bp και το (-) ο αρνητικός έλεγχος. Στα δείγματα 1 και 4 έχουμε ομόζυγο έλλειμμα του *GSTM1*.

Με την ίδια μέθοδο έγινε και η ταυτοποίηση του ομόζυγου ελλείμματος του *GSTT1* (δεν παρατίθεται εικόνα). Το ποσοστό των δειγμάτων που είχε ομόζυγο έλλειμμα στο *GSTT1* ήταν 10%.

Επιπλέον, για την ταυτόχρονη ταυτοποίηση των ομόζυγων ελλειμμάτων των γονιδίων *GSTT1* και *GSTM1* επιχειρήθηκε πολλαπλή PCR χρησιμοποιώντας και τα τρία ζεύγη εκκινητών, ένα ζεύγος για το *GSTT1* ένα για το *GSTM1* και ένα ζεύγος για την περιοχή του *GSTP1* που βρίσκεται το SNP C341T (Εικ. 10). Ωστόσο, παρόλο που εκ πρώτης όψεως φαίνεται ότι η προσέγγιση αυτή ήταν κατάλληλη και ταχύτερη, η αναλυτικότερη εξέταση των ελλειμμάτων, με χρήση δύο ζευγών εκκινητών, έδειξε ότι κάποια άτομα εμφανιζόταν ψευδώς αρνητικά να έχουν ομόζυγο έλλειμμα του *GSTT1*, πιθανότατα λόγω του μεγαλύτερου μεγέθους αυτού του προϊόντος PCR και της δυσκολίας του σε σχέση με τα άλλα να πολλαπλασιαστεί. Έτσι, αυτή η μέθοδος δεν ακολουθήθηκε.



**Εικ. 10:** Προϊόν πολλαπλής PCR στα δείγματα 1, 2, 3, 4, για τα γονίδια *GSTP1*, *GSTT1* και *GSTM1*. Στο δείγμα 1 υπάρχει ομόζυγο έλλειμμα του *GSTM1*, στο δείγμα 2 του *GSTT1* και στο 4 και των δύο γονιδίων. Το δείγμα 3 δεν έχει έλλειψη κανενός γονιδίου.

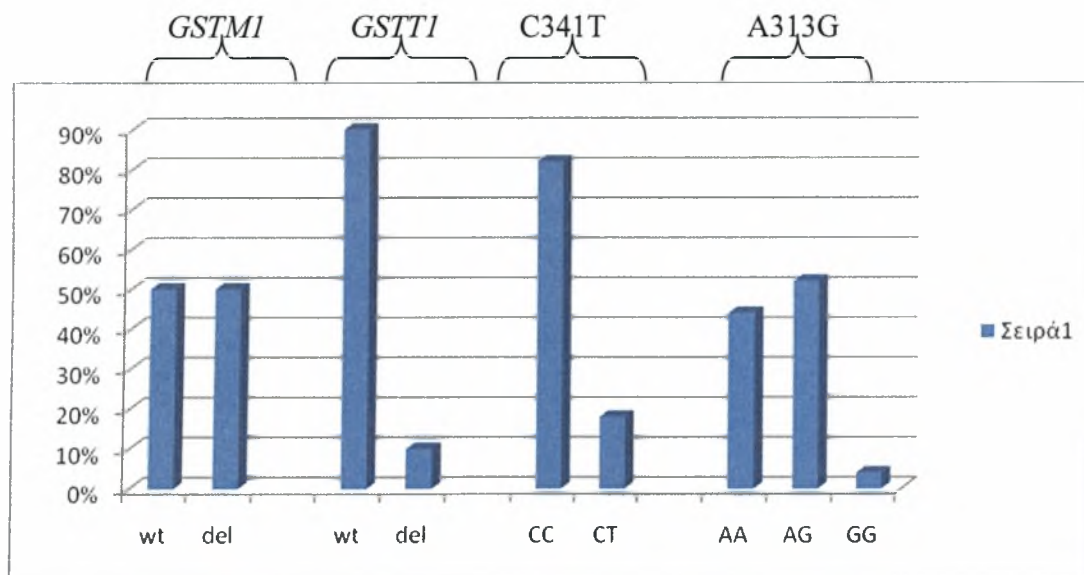
Αναλυτικά, οι γονότυποι όλων των ατόμων και για τους τέσσερις πολυμορφισμούς παρατίθενται στον Πίνακα 3 και η συγκεντρωτική απεικόνιση αυτών στην Εικ. 11

**Πίνακας 3:** Γονότυποι των ατόμων για τα SNP C341T και A313G του γονιδίου *GSTP1* και για το ομόζυγο έλλειμμα των *GSTM1*, *GSTT1*.

Κωδικός δειγμάτων	<i>GSTP1</i> (C341T)	<i>GSTP1</i> (A313G)	<i>GSTM1</i>	<i>GSTT1</i>
22/2/07:2	CT	AG		
22/2/07:3	CC	AG		
22/2/07:8	CT	AA		-
22/2/07:9	CC	?		
22/2/07:10	CC	AG	-	
22/2/07:16	CC	AA	-	
2/2/07:5	CC	AA	-	-
2/2/07:7	CC	AG		-
2/2/07:9	CC	AG	-	
2/2/07:11	CC	AG		
2/2/07:12	CT	AG		-
2/2/07:17	CC	AG		
2/2/07:18	CT	AA		
18/2/07:3	CC	?		-
2/2/07:23	CC	AA	-	
2/2/07:24	CT	AG	-	
2/2/07:25	CC	AG		
2/2/07:26	CC	AG		
2/2/07:28	CC	AA		
2/2/07:29	CT	AA	-	-
1/3/07:14	CC	AA		
1/3/07:6	CT	AG	-	
1/3/07:1	CC	AA	-	
1/3/07:16	CC	?	-	
1/3/07:2	CC	AA	-	-
1/3/07:4	CC	AA		

1/3/07:23	CC	AG	?	
1/3/07:7	CC	AA		
28/2/07:14	CC	AG	-	
28/2/07:6	CC	AA	-	
28/2/07:3	CC	AA		
28/2/07:18	CC	AA	-	?
23/2/07:7	CC	?	-	
23/2/07:16	CC	AA	-	
23/2/07:5	CC	AG		
23/2/07:2	CT	GG		
23/2/07:8	CC	GG	-	
16/2/07:18	CC	AA	-	-
16/2/07:14	CC	AA	-	-
16/2/07:12	CC	AA		
16/2/07:1	CT	AA	-	
16/2/07:6	CC	AG	-	
16/2/07:8	CC	AA		?
16/2/07:13	CC	AG	-	
18/2/07:12	CC	GG		?
18/2/07:4	CC	AG	?	
18/2/07:14	CC	AG		
18/2/07:2	CC	GG		
18/2/07:3	?	AA		

(-): Δείγματα με ομόζυγο έλλειμμα του γονιδίου, (?): Δείγματα προς επιβεβαίωση.



**Εικ. 11: Ιστόγραμμα συγκεντρωτικών αποτελεσμάτων γονοτύπων για τα γονίδια *GSTP1*, *GSTM1* και *GSTT1*.** Στις δύο πρώτες στήλες παρουσιάζονται τα ποσοστά των ατόμων που είχαν ομόζυγο έλλειμμα (del) για το *GSTM1* και τα αγρίου τύπου (wt). Στις επόμενες δύο παρουσιάζονται τα αποτελέσματα για το ομόζυγο έλλειμμα του *GSTT1*. Στη συνέχεια παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των SNP C341T και A313G για το *GSTP1*.

# ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα γονίδια *GSTM1*, *GSTT1* και *GSTP1* παίζουν σημαντικό ρόλο στην αποτοξικοποίηση του οργανισμού. Οι πολυμορφισμοί οι οποίοι μελετήθηκαν στην εργασία αυτή επηρεάζουν τις λειτουργίες των αντίστοιχων ενζύμων. Πιο συγκεκριμένα, οι πολυμορφισμοί A313G και C341T αλλάζουν αμινοξέα τα οποία βρίσκονται στο ενεργό κέντρο του ενζύμου με αποτέλεσμα τη μειωμένη ενεργότητά του. Οι πολυμορφισμοί για τα γονίδια *GSTT1* και *GSTM1* αφορούν ομόζυγο έλλειμμα των γονιδίων που έχουν ως αποτέλεσμα την πλήρη έλλειψη της ενζυμικής δραστηριότητας. Επομένως, οι παραπάνω πολυμορφισμοί επηρεάζουν και τους μηχανισμούς αποτοξικοποίησης του οργανισμού στους οποίους εμπλέκονται τα συγκεκριμένα γονίδια.

Στη μελέτη που πραγματοποιήθηκε ταυτοποιήσαμε τις συχνότητες των γονοτύπων του ομόζυγου ελλείμματος του *GSTT1* και του *GSTM1* σε άτομα με καταγωγή από την Κεντρική Ελλάδα και τις συχνότητες των SNP A313G και C341T για το γονίδιο *GSTP1*. Τα άτομα τα οποία μελετήθηκαν για τους παραπάνω πολυμορφισμούς δεν είχαν κάποιο νόσημα και αποτελούν την ομάδα ελέγχου ή το γενικό πληθυσμό. Το ποσοστό του ομόζυγου ελλείμματος του *GSTT1* στον πληθυσμό που μελετήσαμε ήταν 10%. Αυτό το ποσοστό είναι περίπου ίσο με το 10,4% σε άτομα με καταγωγή από την βορειοδυτική Ελλάδα (Tsabouri SE *et al*, 2000).

Σε διαφορετικές μελέτες που έγιναν στο γενικό ελληνικό πληθυσμό η συχνότητα των γονοτύπων του ομόζυγου ελλείμματος του *GSTT1* ήταν περίπου ίση με το αποτέλεσμα που βρέθηκε στον πληθυσμό που μελετήσαμε (Agorastos T *et al*, 2007). Αντίθετα σε μελέτες συσχέτισης πολυπαραγοντικών νοσημάτων σε πληθυσμούς με ελληνική καταγωγή το ποσοστό του ελλείμματος του *GSTT1* είχε απόκλιση από το 10%. Στις περισσότερες περιπτώσεις εντοπίζουμε μια αύξηση του ομόζυγου ελλείμματος του γονιδίου.

Όσον αφορά το ποσοστό του ομόζυγου ελλείμματος του *GSTM1* στο πληθυσμό που μελετήσαμε ήταν 50%. Σε έρευνες που έχουν γίνει σε πληθυσμούς ελληνικής καταγωγής το ποσοστό του ομόζυγου ελλείμματος του *GSTM1* ήταν περίπου ίσο με 50% και εντοπιζόταν και σε υγιή αλλά και σε ασθενή άτομα (Dialyna IA *et al*, 2003). Σε διαφορετικές μελέτες στον ελληνικό πληθυσμό που αποτελούνταν από υγιή άτομα το ποσοστό του ομόζυγου ελλείμματος του γονιδίου ήταν στο 33,3%. Αυξημένα ποσοστά ομόζυγου ελλείμματος του *GSTM1* (πάνω από 65%) σε επίπεδο πληθυσμιακών ομάδων, έχουν συσχετιστεί με την προδιάθεση εμφάνισης ασθενειών όπως η σκλήρυνση κατά πλάκας, η λευχαιμία και το αδενοκαρκίνωμα. Ακόμα έχει

βρεθεί ότι το ομόζυγο έλλειμμα του γονιδίου έχει συσχετιστεί με την αλληλεπίδραση με πολυμορφισμούς άλλων γονιδίων όπως γονίδια που εκφράζουν το κυτόχρωμα P450 (που παίζει και αυτό σημαντικό ρόλο στην αποτοξικοποίηση του οργανισμού και πιο συγκεκριμένα στην φάση I του μεταβολισμού) (Stavroulou C *et al*, 2007).

Σχετικά με το ποσοστό του SNP A313G στο *GSTP1* στον πληθυσμό που μελετήσαμε βρήκαμε ότι το 44% ήταν ομόζυγοι AA το 52% ετερόζυγοι AG και το 4% ομόζυγοι GG ως προς το SNP. Το συγκεκριμένο SNP έχει ως αποτέλεσμα την μετατροπή της ισολευκίνης σε βαλίνη στο αμινοξύ 105. Όσον αφορά το SNP C341T βρήκαμε ότι το 82% ήταν ομόζυγοι CC που είναι και το αγρίου τύπου και το 18% ετερόζυγοι CT. Το συγκεκριμένο SNP οδηγεί σε αντικατάσταση της αλανίνης σε βαλίνη στο αμινοξύ 114. Σε έρευνες που έχουν γίνει στη λευκή φυλή το 54% ήταν ομόζυγοι για τα δυο αγρίου τύπου SNP που μελετήσαμε ενώ 42% ήταν ετερόζυγοι για το A313G και 4% ήταν ομόζυγοι GG. Από τα συγκεκριμένα αποτελέσματα μπορούμε να συμπεράνουμε ότι τα αποτελέσματα που βρήκαμε είναι συγκρίσιμα με έρευνες που έχουν γίνει σε υγιή άτομα της λευκής φυλής.

Το αντιοξειδωτικό δυναμικό του οργανισμού είναι πιθανώς ένας μηχανισμός ο οποίος επηρεάζεται από την διατροφή και μπορεί να μεταβάλει την πιθανότητα εμφάνισης κάποιας ασθένειας. Από την άλλη, οι πολυμορφισμοί οι οποίοι αλλάζουν την αλληλουχία της πρωτεΐνης ή/και τη λειτουργία της μπορούν να μεταβάλουν τον κίνδυνο εμφάνισης κάποιας ασθένειας όταν το ένζυμο εκτίθεται στο κατάλληλο υπόστρωμα. Ωστόσο, είναι πιθανόν ότι σημαντικό ρόλο παίζει η συσχέτιση του πολυμορφισμού με τον τρόπο ζωής του ατόμου για την εμφάνιση της ασθένειας. Ένα άτομο μπορεί να φέρει πολυμορφισμούς που του αυξάνουν την προδιάθεση ωστόσο αυτό πιθανώς θα μπορούσε να προστατευτεί με μειωμένη έκθεσή του σε οξειδωτικούς παράγοντες και με την ενίσχυση της αντιοξειδωτικής λειτουργίας μέσω πρόσληψης αντιοξειδωτικών με την τροφή.

Τα αποτελέσματα που ταυτοποιήθηκαν στη συγκεκριμένη μελέτη θα χρησιμοποιηθούν ως ομάδα ελέγχου σε επόμενες μελέτες που θα γίνουν για τα ίδια γονίδια και για τους ίδιους πολυμορφισμούς σε άτομα τα οποία θα έχουν κάποιο πολυπαραγοντικό νόσημα με προτεραιότητα τις αναπνευστικές διαταραχές όπως το άσθμα, η χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια και η άπνοια κατά τον ύπνο, καθώς οι παραπάνω διαταραχές φαίνεται ότι σχετίζονται με συστηματικό οξειδωτικό στρες.

## **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

1. Agorastos T, Papadopoulos N, Lambropoulos AF, Chrisafi S, Mikos T, Goulis DG, Constantinidis TC, Kotsis A, Bontis JN (2007). Glutathione-S-transferase M1 and T1 and cytochrome P1A1 genetic polymorphisms and susceptibility to cervical intraepithelial neoplasia in Greek women. *European journal of cancer prevention*, 16 (6): 498-504.
2. Alberts B, Johnson A, Lewis. J, Raff . M, Roberts. K, Walter. P (2007). *Molecular Biology of the Cell*, Fifth Edition, Garland Science
3. Arvanitis DA, Koumantakis GE, Goumenou AG, Matalliotakis IM, Koumantakis EE, Spandidos DA (2003). CYP1A1, CYP19, and GSTM1 polymorphisms increase the risk of endometriosis. *American Society for Reproductive Medicine*, 79 (1): 702-709.
4. Coles B. and Kadlubar F (2003). Detoxification of electrophilic compounds by glutathione S-transferase catalysis: Determinants of individual response to chemical carcinogens and chemotherapeutic drugs. *Biofactors*, 17 (1-4): 115-30.
5. Dialyna IA, Arvanitis DA, Spandidos DA (2005). Genetic polymorphisms and transcriptional pattern analysis of CYP1A1, AhR, GSTM1, GSTP1 and GSTT1 genes in breast cancer. *Int J Mol Med*, 8 (1) :79-87.
6. Dialyna IA, Miyakis S, Georgatou N, Spandidos DA (2003). Genetic polymorphisms of CYP1A1, GSTM1 and GSTT1 genes and lung cancer risk. *International Journal of Cancer*, 119 (9): 2155-2164.
7. Ercan H, Birben E, Evrim A. Dizdar, Keskin O, Karaaslan C, Soyer O, Dut R, Cansin S, Besler T and Kalayci O, (2006. Oxidative stress and genetic and epidemiologic determinants of oxidant injury in childhood asthma. *J Allergy Clin Immunol*, 118 (5): 1097-104.
8. Georgiadis P, Demopoulos NA, Topinka J, Stephanou G, Stoikidou M, Bekyrou M, Katsouyianni K, Sram R, Autrup H, Kyrtopoulos SA (2004). Impact of phase I or phase II enzyme polymorphisms on lymphocyte DNA adducts in subjects exposed to urban air pollution and environmental tobacco smoke. *Toxicology letters*, 149 (1): 269-280.
9. Georgiou I, Filiadis IF, Alamanos Y, Bouba I, Giannakopoulos X, Lolis D (2000). Glutathione S-transferase null genotypes in transitional cell bladder cancer: a case-control study. *European Urology*, 37 (6): 660-664.
10. Golbe LI, Di Iorio G, Markopoulou K, Athanassiadou A, Papapetropoulos S, Watts RL, Vance JM, Bonifati V, Williams TA, Spsychala JR, Stenroos ES, Johnson WG (2007). Glutathione S-transferase polymorphisms and onset age in alpha-synuclein A53T mutant Parkinson's disease. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 144B (2): 254-8.
11. Hui-Wen Lo and Francis Ali-Osman (2007). Genetic polymorphism and function of glutathione S-transferases in tumor drug resistance. *Curr Opin Pharmacol*, 7 (4): 367-74.
12. Kamada F, Mashimo Y, Inoue H, Shao C, Hirota T, Doi S, Kameda M, Fujiwara H, Fujita K, Enomoto T, Sasaki S, Endo H, Takayanagi R, Nakazawa C, Morikawa T, Morikawa M, Miyabayashi S, Chiba Y, TamuraTaro G, Yoichi S, Akira M, Mayumi H, Suzuki Y (2007). The *GSTP1* gene is a susceptibility gene for childhood asthma and the *GSTM1* gene is a modifier of the *GSTP1* Gene. *Int Arch Allergy Immunol*, 144 (4): 275-86.



13. Lampe JW (2007). Diet, Genetic Polymorphisms, and Health risks. *Altern Ther Health Med* 13 (2): S108-11.
14. Mak JCW, Ho SP, Leung HCM, Cheung AHK, Law BKW, L. Sow K. Y., Chanz J. W. M., C. H. Cha, Lamz W. K., M. S. M. Ip and ChanYeung M., (2007). Relationship between glutathione S-transferase gene polymorphisms and enzyme activity in Hong Kong Chinese asthmatics. *Clinical & Experimental Allergy*, 37 (8): 1150-1157.
15. Menegon A, Board P, Blackburn A, Mellick G, Couteur David G (1998). Parkinson's disease, pesticides, and glutathione transferase polymorphisms. *Lancet*, 352 (9137): 1344-6.
16. Ntais Christos, Polycarpou Anastasia, and Ioannidis J (2005). Association of GSTM1, GSTT1, and GSTP1 Gene Polymorphisms with the Risk of Prostate Cancer. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 13: 137.
17. Sampsonas F, Archontidou MA, Salla E, Karkoulas K, Tsoukalas G, Spiropoulos K (2007). Genetic alterations of glutathione S-transferases in asthma: do they modulate lung growth and response to environmental stimuli. *Allergy Asthma Proc*, 28 (3) : 282-6.
18. Scandalios J.G. (2005). Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* , 38 (7): 995-1014.
19. Stavropoulou C, Korakaki D, Rigana H, Voutsinas G, Polyzoi M, Georgakakos VN, Manola KN, Karageorgiou CE, Sambani C (2007). Glutathione-S-transferase T1 and M1 gene polymorphisms in Greek patients with multiple sclerosis. *European Journal of Neurology*, 14 (5): 572-574.
20. Strachan T, Read AP (1999). *Human Molecular Genetics 2*, Garland Science.
21. Tsabouri S, Georgiou I, Katsaraki A, Bourantas KL., (2000) Glutathione sulfur transferase M1 and T1 genotypes in chronic lymphoblastic leukemia. *Hematol J*, 5 (6): 500-4.
22. Tsabouri SE, Georgiou I, Alamanos I, Bourantas KL., (2000) Increased prevalence of GSTM(1) null genotype in patients with myelodysplastic syndrome: a case-control study. *Acta Haematol*, 104 (4): 169-173.
23. Tsabouri SE, Georgiou I, Katsaraki A, Bourantas KL., (2004) Treatment of MDS patients with recombinant human erythropoietin and the role of GSTs. *Journal of experimental & clinical cancer research*, 104 (4): 417-424.
24. K. Κατσούλης (2006). Οξειδωτικό stress και βρογχικό άσθμα. *Pneumon*, 19 (4): 311-323.