



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

**Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος Βιοχημείας και
Βιοτεχνολογίας**

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

**«ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ ΣΕ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΑ $tRNA^{Trp}$ και $tRNA^{Ala}$
ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΔΙΑΒΗΤΗ»**

ΚΑΛΦΟΥΝΤΖΟΥ ΔΗΜΗΤΡΑ

Λάρισα 2013



ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ

Ζίφα Αιμιλία,

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

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Ζίφα Αιμιλία,

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

Μαμούρης Ζήσης,

Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών, Τμήμα Βιοχημείας &
Βιοτεχνολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Κομιώτης Δημήτριος,

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

Πίνακας περιεχομένων

1.1 ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	6
1.2 ABSTRACT.....	7
2.ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	8
2.1 ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑ-ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ	8
2.2 ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΗ ΔΟΜΗ	8
2.3 ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΕΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ	9
2.4 ΤΟ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟ DNA	11
2.4.1 ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΕΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ	12
2.5 ΔΙΑΒΗΤΗΣ	15
2.6 ΕΠΙΠΛΟΚΕΣ	21
2.7 ΔΙΑΒΗΤΗΣ ΚΑΙ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ	22
2.8 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	24
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	25
3.1 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΟΛΙΚΟΥ DNA	25
3.2 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ PCR (Polymerase Chain Reaction)	27
3.2.1 Η ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ	28
3.2.2 ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ PCR ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ	30
3.3 SSCP-ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥ ΜΟΝΟΚΛΩΝΙΚΗΣ ΔΙΑΜΟΡΦΩΣΗΣ 31	
3.3.1 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΠΗΚΤΗΣ ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΙΟΥ.....	31
3.3.2 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΚΑΙ ΑΠΟΔΙΑΤΑΞΗ ΤΩΝ PCR ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ.....	32
3.3.3 ΑΠΟΔΙΑΤΑΞΗ ΚΑΙ ΦΟΡΤΩΜΑ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ.....	33
3.3.4 ΧΡΩΣΗ ΠΗΚΤΩΜΑΤΟΣ ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΗΣ ΜΕ ΔΙΑΛΥΜΑ ΝΙΤΡΙΚΟΥ ΑΡΓΥΡΟΥ ..	34
3.4 ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ DNA	35
3.4.1 ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ PCR ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ.....	35
3.4.2 ΦΩΤΟΜΕΤΡΗΣΗ	36
3.4.3 ΛΥΟΦΙΛΙΩΣΗ	36
3.5 ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗ	36
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	40
4.1 Ενίσχυση με PCR των γονιδίων Trp και Ala του mtDNA.....	40
4.2 Ανάλυση δειγμάτων με τη μέθοδο SSCP	41

4.3 Ταυτοποίηση μεταλλάξεων	41
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	43
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	44

1.1 ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο σακχαρώδης διαβήτης είναι μεταβολική ασθένεια η οποία χαρακτηρίζεται από αύξηση της συγκέντρωσης του σακχάρου στο αίμα (υπεργλυκαιμία) και διαταραχή του μεταβολισμού της γλυκόζης, είτε ως αποτέλεσμα ελαττωμένης έκκρισης ινσουλίνης είτε λόγω ελάττωσης της ευαισθησίας των κυττάρων του σώματος στην ινσουλίνη.

Από έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί, έχει βρεθεί ότι ένας μεγάλος αριθμός μεταλλάξεων που ανιχνεύθηκαν σε μιτοχονδριακά γονίδια tRna συνδέεται με την εμφάνιση της συγκεκριμένης νόσου. Στην πλειοψηφία των μιτοχονδριακών μορίων tRNA έχουν ανιχνευθεί και πολυμορφικές και παθογόνες μεταλλάξεις. Οι πολυμορφικές μεταλλάξεις δεν αλλάζουν την δομή των μιτοχονδριακών tRNA. Στη συγκεκριμένη έρευνα, πραγματοποιήθηκε ανίχνευση μεταλλάξεων στα μιτοχονδριακά γονίδια tRNA^{Trp} και tRNA^{Ala}. Συγκεκριμένα, από δείγματα αίματος 20 ατόμων που πάσχουν από τη νόσο του σακχαρώδους διαβήτη, απομονώθηκε το γενετικό υλικό DNA και στη συνέχεια με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης PCR ενισχύθηκε το τμήμα του DNA που επιθυμούσαμε από τα παραπάνω αναφερθέντα γονίδια. Ακολούθησε η ανίχνευση πολυμορφισμών στα προϊόντα της PCR με τη μέθοδο SSCP, και τέλος μελετήσαμε τη ταυτοποίησή τους ύστερα από την αλληλούχιση τους (sequencing). Συνολικά ανιχνεύθηκαν 2 αποκλίσεις από το κοινό πρότυπο. Οι αποκλίσεις που βρέθηκαν είναι A5656G και T5693G. Οι συγκεκριμένες μεταλλάξεις δεν έχουν αναφερθεί ξανά.

1.2 ABSTRACT

Diabetes mellitus, or simply diabetes, is a group of metabolic diseases in which a person has high blood sugar, either because the pancreas does not produce enough insulin, or because cells do not respond to the insulin that is produced. This high blood sugar produces the classical symptoms of polyuria (frequent urination), polydipsia (increased thirst) and polyphagia (increased hunger).

The investigations have been carried out, it has been found that a large number of mutations in mitochondrial genes detected tRna associated with occurrence of the disease. The majority of mitochondrial tRNA molecules have been detected and polymorphic and pathogenic mutations. Polymorphic mutations do not alter the structure of mitochondrial tRNA. In this research , a detection of mutations in mitochondrial genes tRNA^{Trp} and tRNA^{Ala}. Specifically , blood samples from 20 individuals suffering from the disease of diabetes mellitus , the isolated genetic material DNA and then using the polymerase chain reaction PCR amplified segment of the DNA that like the above -mentioned genes. Followed by detection of polymorphisms in the products of the PCR method SSCP, and then studied the identification after the sequencing (sequencing). Overall detected two deviations from the common standard. The discrepancies found are A5656G and T5693G. These mutations have been reported again .

2.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

2.1 ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑ-ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ

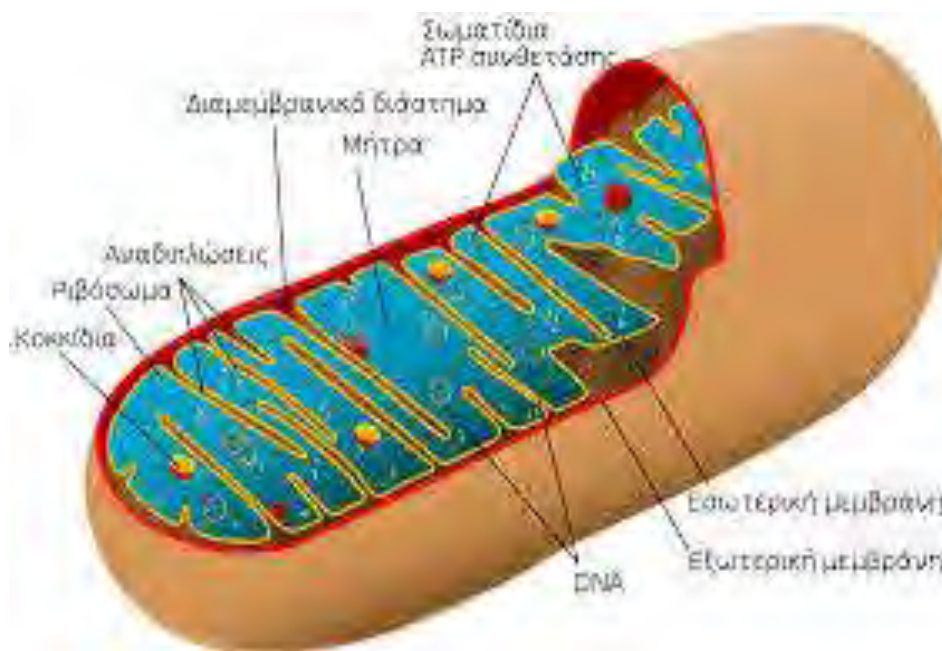
Τα μιτοχόνδρια κατέχουν κεντρική θέση στη βιολογία των κυττάρων και είναι απαραίτητα για την ύπαρξη ζωής. Τα περισσότερα ευκαρυωτικά κύτταρα έχουν πολλά μιτοχόνδρια, τα οποία περιέχουν πολλά αντίγραφα mtDNA μορίων. Τα μιτοχόνδρια είναι ικανά να συντήκονται, να χωρίζονται και να μετακινούνται μέσα στο κύτταρο (Bereiter-Hann&Volth, 1994).

Σχετικά με την προέλευση του μιτοχονδρίου έχουν διατυπωθεί δύο θεωρίες. Σύμφωνα με την πρώτη, το γονιδίωμα των οργανιδίων (μιτοχόνδρια και χλωροπλάστες) έχουν αυτογενή καταγωγή μέσα στα ευκαρυωτικά κύτταρα και προέρχονται από θραύσματα του πυρηνικού γονιδιώματος που εγκοιλώθηκαν σε μεμβράνες και σχημάτισαν τα μιτοχόνδρια και τους χλωροπλάστες (Cavalier-Smith, 1975; Uzell & Spolsky, 1981). Η δεύτερη θεωρία υποστηρίζει ότι το γονιδίωμα των οργανιδίων αυτών έχει εξωγενή προέλευση, και συγκεκριμένα προέρχονται από βακτηριακούς προγόνους οι οποίοι εισέβαλλαν (ή εγκοιλώθηκαν) σε πρωτοευκαρυωτικά κύτταρα (Margulis, 1981). Η δεύτερη θεωρία που καλείται «θεωρία ενδοσυμβίωσης» υποστηρίζεται από διάφορες μοριακές αποδείξεις (Gray, 1992). Μία από τις μοριακές αποδείξεις που συνηγορούν υπέρ της ενδοσυμβιωτικής θεωρίας προέρχεται από την αλληλούχιση των rRNA γονιδίων. Διαπιστώθηκε ότι οι rRNA αλληλουχίες τόσο των χλωροπλαστών όσο και των μιτοχονδρίων έχουν μεγαλύτερη συγγένεια με τις βακτηριακές αλληλουχίες παρά με τις πυρηνικές αλληλουχίες των ευκαρυωτικών. Σήμερα πιστεύεται ότι τα ευκαρυωτικά κύτταρα είναι γενετικές χίμαιρες που περιέχουν ένα μίγμα από διακριτές εξελικτικές γραμμές (Avisé, 1994).

2.2 ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΗ ΔΟΜΗ

Τα μιτοχόνδρια είναι οργανίδια, με μέγεθος αντίστοιχο των βακτηρίων (περίπου 1 x 2 μm), τα οποία απαντώνται σε μεγάλους αριθμούς σε όλα σχεδόν τα ευκαρυωτικά κύτταρα. Τυπικά, υπάρχουν περίπου 2000 μιτοχόνδρια ανά κύτταρο, αντιπροσωπεύοντας το 25%, περίπου, του κυτταρικού όγκου. Αποτελούνται από δύο

μεμβράνες και διακρίνονται από δύο διακριτά τμήματα όπου η εξωτερική είναι λεία, ενώ η εσωτερική είναι αναδιπλωμένη και σχηματίζει πολυάριθμες δισκοειδείς ή δακτυλοειδείς πτυχώσεις. Αμφότερες οι μιτοχονδριακές μεμβράνες είναι πλούσιες σε πρωτεΐνες. Η εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη είναι αδιαπέραστη ακόμη και σε μικρά μόρια με εξαίρεση το O_2 , το CO_2 και το H_2O .



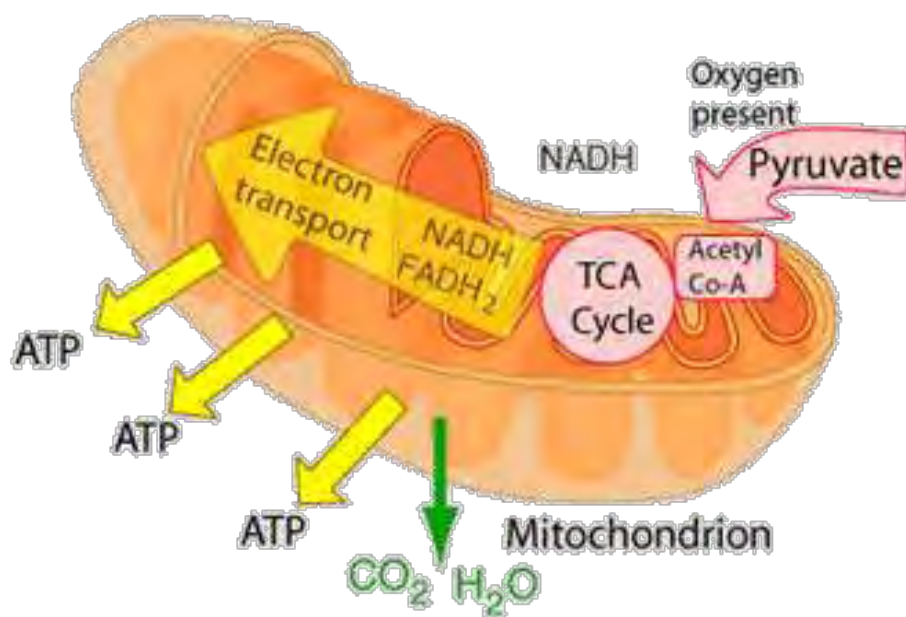
Εικόνα 1: Δομή μιτοχονδρίου

Η εισαγωγή και εξαγωγή σημαντικών μεταβολιτών διασφαλίζεται από την παρουσία πολυάριθμων μεταφορέων στην εσωτερική μεμβράνη. Η εσωτερική μεμβράνη μεταφέρει, επίσης, συμπλέγματα της αναπνευστικής αλυσίδας την ATP συνθάση και άλλα ένζυμα. Πλούσια σε ένζυμα είναι και η θεμέλια ουσία.

2.3 ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΕΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ

Τα μιτοχόνδρια περιγράφονται και ως το βιοχημικό εργοστάσιο παραγωγής ενέργειας του κυττάρου, αφού –μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης- παράγουν το μεγαλύτερο μέρος του κυτταρικού ATP. Στη θεμέλια ουσία εντοπίζονται η πυροσταφυλική αφυδρογονάση (PDH), ο κύκλος του τρικαρβοξυλικού οξέως, η β-οξείδωση των λιπαρών οξέων και μέρη του κύκλου της ουρίας. Η αναπνευστική

αλυσίδα, η σύνθεση της ATP και τα ένζυμα, που συμμετέχουν στη βιοσύνθεση της αίμης συσχετίζονται με την εσωτερική μεμβράνη.



Εικόνα 2: Μιτοχόνδριο και ενέργεια

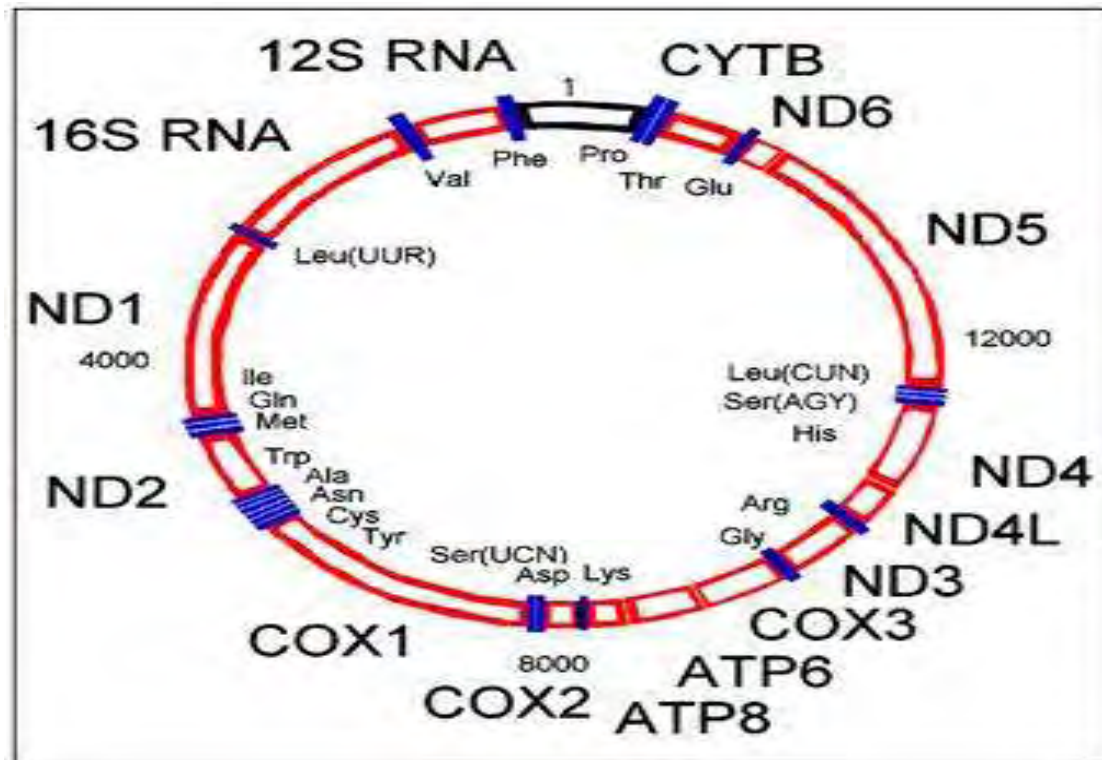
Η ίδια η εσωτερική μεμβράνη διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην οξειδωτική φωσφορυλίωση. Καθώς δεν είναι διαπερατή στα πρωτόνια, η αναπνευστική αλυσίδα –που αντλεί πρωτόνια από τη θεμέλια ουσία στο διαμεμβρανικό χώρο μέσω των συμπλεγμάτων I, III και IV- εδραιώνει μία βαθμίδωση πρωτονίων δια μέσου της εσωτερικής μεμβράνης, μέσω της οποίας διατηρείται η χημική ενέργεια, που απελευθερώνεται κατά την διάρκεια της οξείδωσης του NADH. Στη συνέχεια, η συνθάση της ATP χρησιμοποιεί την ενέργεια, που έχει αποθηκευθεί στη βαθμίδωση, για να σχηματίσει ATP και ADP κι ανόργανο φώσφορο. Αρκετά από τα μεταφορικά συστήματα εξαρτώνται, επίσης, από τη βαθμίδωση H⁺.

Μαζί με το ενδοπλασματικό δίκτυο, τα μιτοχόνδρια λειτουργούν, επίσης και ως ενδοκυτταρική δεξαμενή ασβεστίου. Τα μιτοχόνδρια διαδραματίζουν, επίσης, σημαντικό ρόλο στον «προγραμματιζόμενο κυτταρικό θάνατο» την απόπτωση. Τα μιτοχόνδρια περιβάλλονται από μία εσωτερική και μία εξωτερική μεμβράνη. Η εξωτερική μεμβράνη περιέχει πορίνες, που επιτρέπουν σε μικρότερα μόρια μεγέθους μέχρι 10 kDa να περάσουν. Αντίθετα, η εσωτερική μεμβράνη είναι αδιαπέραστη και στα μικρά μόρια (με την εξαίρεση του H₂O, των αερίων O₂, CO₂ και της NH₃). Όλα

τα υπόλοιπα υποστρώματα του μιτοχονδριακού μεταβολισμού μαζί με τα προϊόντα τους θα πρέπει, επομένως, να μετακινηθούν μέσω της εσωτερικής μεμβράνης με τη βοήθεια ειδικών μεταφορέων.

2.4 ΤΟ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟ DNA

Το μιτοχονδριακό DNA είναι ένα δίκλωνο, υπερελικώμενο, κυκλικό (με κάποιες εξαιρέσεις των πρωτόζωων που είναι ραβδόμορφο) μόριο που εντοπίζεται στη μήτρα των μιτοχονδρίων. Υπάρχει σε πολλαπλά αντίγραφα από 2 έως 10 σε κάθε μιτοχόνδριο, με αποτέλεσμα να υπάρχουν 1000-100000 αντίγραφα του μορίου σε κάθε κύτταρο. Η αντιγραφή, η μεταγραφή και η μετάφραση του μιτοχονδριακού DNA πραγματοποιούνται καθ' όλη την διάρκεια του κυτταρικού κύκλου ανεξάρτητα από τις αντίστοιχες διαδικασίες του πυρηνικού DNA. Αν και τα μιτοχόνδρια περιέχουν το δικό τους DNA, το οποίο κωδικοποιεί μια ποικιλία πρωτεϊνών και μορίων RNA, δεν περιέχει όλες τις απαραίτητες πληροφορίες για τη σύνθεση όλων των λειτουργικών και δομικών αναγκών των οργανιδίων –γι' αυτό χαρακτηρίζονται ημιαυτόνομα οργανίδια- και γίνεται εισαγωγή μορίων από το κυτταρόπλασμα (ενζύμων, ρυθμιστικών και ριβοσωματικών πρωτεϊνών) που η σύνθεσή τους ελέγχεται από το πυρηνικό DNA. Οι διαδικασίες της αντιγραφής και της μεταγραφής στηρίζονται σε πυρηνικούς παράγοντες. Οι πυρηνικοί παράγοντες που προορίζονται για τα μιτοχόνδρια μεταφράζονται στα ριβοσώματα του κυτταροπλάσματος και τροποποιούνται μεταμεταφραστικά με μια αλληλουχία-οδηγό στο N-άκρο, ώστε να εισαχθούν στα μιτοχόνδρια με τη βοήθεια μεταφορέων.



Εικόνα 3: Μιτοχονδριακό DNA (mtDNA)

Υπάρχουν αρκετά σημεία που η βιολογία των μιτοχονδρίων διαφέρει ουσιαστικά από αυτή των πυρηνικών γονιδιωμάτων, και αυτό συνεπώς επηρεάζει το μοντέλο και την διαδικασία της εξέλιξής του. Για παράδειγμα, υπάρχουν 16.569 ζεύγη βάσεων στο ανθρώπινο μιτοχονδριακό γονιδίωμα αλλά περίπου 3 δισεκατομμύρια στο πυρηνικό μας απλοειδές γονιδίωμα. Συνεπώς, το μιτοχονδριακό γονιδίωμα είναι μόνο περίπου το 0,00055% του συνολικού ανθρώπινου γονιδιώματος. Τα μιτοχονδριακά και τα πυρηνικά γονιδιώματα διαφέρουν και σε αρκετά άλλα στοιχεία, όπως είναι ο αριθμός επαναλήψεων των μορίων (ploidy), ο τρόπος κληρονόμησης, ο βαθμός ανασυνδυασμού, ο αριθμός των ιντρονίων, το δραστικό μέγεθος του πληθυσμού, ο ρυθμός μεταλλάξεων, οι μηχανισμοί επιδιόρθωσης κ.α. (Sheffler, 1999).

2.4.1 ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΕΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ

Το mtDNA παρουσιάζει μεγάλη ευαισθησία στις μεταλλάξεις, σε αντίθεση με το πυρηνικό γονιδίωμα, καθώς αποτελείται μόνο από κωδικές αλληλουχίες και οι

μηχανισμοί επιδιόρθωσης είναι περιορισμένοι. Οι περισσότερες μεταλλάξεις του μιτοχονδριακού DNA είναι σημειακές. Παρατηρούνται, επίσης, μικρές ή μεγάλες ελλείψεις. Οι μεταλλάξεις είναι είτε κληρονομούμενες, είτε επίκτητες. Είναι αξιοσημείωτο ότι οι κληρονομούμενες μεταλλάξεις είναι σχεδόν πάντα σημειακές και όχι μεγάλες ανακατατάξεις όπως ελλείψεις ή διπλασιασμοί. Είναι πιθανό πως η γενεαλογική γραμμή δεν επιτρέπει μεγάλες ανακατατάξεις του μιτοχονδριακού DNA, γι' αυτό οι ελλείψεις είναι πάντα επίκτητες και ετεροπλασμικές. Οι σημειακές μεταλλάξεις μπορεί να είναι κληρονομούμενες ή επίκτητες και να παρουσιάζουν μοσπασμία ή ετεροπλασμία (Gellerich *et al.*, 2002).

Οι ελλείψεις του mtDNA ήταν οι πρώτες μεταλλάξεις οι οποίες περιγράφηκαν και σχετίστηκαν με ανθρώπινη ασθένεια (Holt *et al.*, 1988). Το μέγεθος της έλλειψης μπορεί να ποικίλλει από μία μόνο βάση έως αρκετές Kb και εντοπίζονται σε οποιοδήποτε τμήμα του μορίου. Η πιο κοινή έλλειψη έχει μήκος 5 Kb και εκτείνεται μεταξύ των γονιδίων που κωδικοποιούν για το κυτόχρωμα b και για την υπομονάδα II της κυτοχρωμικής οξειδάσης, δηλαδή σε περιοχή όπου απαντώνται tRNAs και γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες. Μεγάλης κλίμακας ελλείψεις, όπως η προαναφερθείσα, έχουν συσχετιστεί με ειδικούς φαινότυπους που αντιστοιχούν σε σύνδρομα όπως το Kearns-Sayre, το Pearson και η χρόνια προοδευτική εξωτερική οφθαλμοπληγία (CPEO). Ωστόσο, η παθολογική έκφραση των ελλείψεων δεν περιορίζεται σε αυτούς τους φαινότυπους αλλά έχει συνδεθεί με όλες σχεδόν τις μιτοχονδριακές εγκεφαλοπάθειες.

Ελλείψεις εντοπίζονται σε καταστάσεις ετεροπλασμίας, το ποσοστό των μορίων με έλλειμμα ποικίλλει ανάμεσα στους ιστούς και ο βαθμός ετεροπλασμίας μπορεί να αλλάξει με την πάροδο του χρόνου. Οι ελλείψεις προκύπτουν ως mtDNA προ-μετάλλαξη, πιθανόν, μέσα στο ωοκύτταρο και μεταφέρονται στο νεογνό το οποίο μπορεί να εμφανίσει κλινικά χαρακτηριστικά. Είναι εξαιρετικά ασυνήθιστο να προσβληθούν περισσότερα από ένα νεογνά και ο κίνδυνος της μετέπειτα μετάδοσης από μία προσβεβλημένη γυναίκα έχει εκτιμηθεί στο 4% (Chinnery *et al.*, 2004). Ορισμένοι ασθενείς έχουν διπλασιασμούς στο mtDNA, οι οποίοι θα μπορούσαν να αποτελέσουν ενδιάμεσο βήμα στο σχηματισμό ελλείψεων. Μικρές ελλείψεις έχουν περιγραφεί σε γονίδια όπως αυτά που κωδικοποιούν ένζυμα της αναπνευστικής αλυσίδας (Scharira, 2006).

Περισσότερες από 100 μεταλλάξεις που έχουν συνδεθεί με ανθρώπινες ασθένειες έχουν περιγραφεί σε γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες, tRNAs, rRNAs (Servidei,

2004). Από τις μεταλλάξεις που έχουν εντοπιστεί και συσχετιστεί με ασθένειες, περισσότερες από τις μισές εντοπίζονται στα γονίδια των tRNAs, γεγονός αξιοσημείωτο δεδομένου ότι οι αλληλουχίες των tRNAs αποτελούν μόνο το 10% του μιτοχονδριακού γονιδιώματος. Αυτό μπορεί να εξηγηθεί λόγω του ουσιαστικού ρόλου των tRNAs στη σύνθεση πρωτεϊνών οι οποίες συμμετέχουν στην παραγωγή ενέργειας. Από τα 22 tRNAs τα 21 σχετίζονται με μεταλλάξεις που προκαλούν ασθένειες. Η μόνη γνωστή εξαίρεση είναι το γονίδιο για το tRNA της αργινίνης (tRNA^{Arg}). Αξίζει να σημειωθεί ότι το 50% των παθολογικών μεταλλάξεων παρατηρείται σε 3 μόνο tRNAs : tRNA^{Leu(UUR)}, tRNA^{Lys} και tRNA^{Ile}.

Η κλινική τους έκφραση ποικίλλει και περιλαμβάνει ποικίλους φαινότυπους όπως τα σύνδρομα: MELAS (μιτοχονδριακή εγκεφαλομυοπάθεια, γαλακτική οξέωση και αγγειακά εγκεφαλικά επεισόδια), MERRF (μυοκλονική επιληψία με ερυθρές ρακώδεις ίνες), NARP (νευροπάθεια, αταξία, μελαγχρωστική αμφιβληστροειδοπάθεια), LHON (κληρονομική οπτική νευροπάθεια του Leber). Επίσης, ολιγοσυμπτωματικά σύνδρομα που προκύπτουν από σημειακές μεταλλάξεις του mtDNA περιλαμβάνουν το σακχαρώδη διαβήτη, καρδιομυοπάθειες, νευροαισθητήρια κώφωση. Ωστόσο, ασθενείς με ολιγοσυμπτωματικές μορφές μπορούν διαδοχικά να αναπτύξουν επιπλέον κλινικά χαρακτηριστικά, π.χ η μητρική κληρονομικότητα υπέρτασης, υπερχοληστερολαιμίας και υπερμαγνησιαμίας που προκαλείται από μετάλλαξη στο μιτοχονδριακό tRNA της ισολευκίνης (Wilson *et al.*, 2004).

Επίσης, διάφορες ασθένειες έχει αποδειχτεί ότι οφείλονται σε μεταλλάξεις πυρηνικών γονιδίων που κωδικοποιούν μιτοχονδριακές πρωτεΐνες. Αυτές περιλαμβάνουν διαταραχές που προκαλούνται από μεταλλάξεις πρωτεϊνών που συμμετέχουν στον κύκλο του κιτρικού οξέος, στη β-οξείδωση και στον κύκλο της ουρίας. Μεταλλάξεις πυρηνικών γονιδίων τα οποία συμμετέχουν στην αντιγραφή του μιτοχονδριακού DNA ή κωδικοποιούν πρωτεΐνες της αναπνευστικής αλυσίδας μπορούν να οδηγήσουν σε φαινότυπους όμοιους με τις προαναφερθείσες μεταλλάξεις του mtDNA. Άλλες προκαλούν διακριτά κλινικά συμπτώματα που πιθανόν συμπεριλαμβάνουν προοδευτικές νευροεκφυλιστικές ασθένειες. (Scharira, 2006)

2.5 ΔΙΑΒΗΤΗΣ

Ο σακχαρώδης διαβήτης αποτελεί ομάδα μεταβολικών παθήσεων που χαρακτηρίζονται από υπεργλυκαιμία το οποίο είναι αποτέλεσμα διαταραχών στην έκκριση ινσουλίνης, στην δράση της ή και στα δύο. Η χρόνια υπεργλυκαιμία στον σακχαρώδη διαβήτη σχετίζεται με την πρόκληση μακροχρόνιων βλαβών, δυσλειτουργίας ή ανεπάρκειας διαφόρων οργάνων, και ιδιαίτερος των οφθαλμών, των νεφρών, των νεύρων, της καρδιάς και των αγγείων.

Ποικιλία παθογενετικών μηχανισμών εμπλέκεται στην ανάπτυξη του σακχαρώδη διαβήτη, συμπεριλαμβανομένων της αυτοάνοσης καταστροφής των β-κυττάρων του παγκρέατος, με επακόλουθο την ινσουλινοανεπάρκεια, και των διαταραχών που οδηγούν σε ινσουλινοαντίσταση. Οι διαταραχές του μεταβολισμού των υδατανθράκων, του λίπους και των πρωτεϊνών που παρατηρούνται στο σακχαρώδη διαβήτη προέρχονται από την ανεπαρκή δράση της ινσουλίνης στους ιστούς-στόχους είτε λόγω ανεπαρκούς έκκρισής της είτε λόγω ελαττωμένης ανταπόκρισης των ιστών στην κυκλοφορούσα ινσουλίνη σε ένα ή περισσότερα σημεία των πολύπλοκων οδών δράσης της ορμόνης. Συχνά οι ανωτέρω διαταραχές συνυπάρχουν στον ίδιο ασθενή, χωρίς να μπορεί να καθοριστεί με σαφήνεια ποια διαταραχή αποτελεί την κύρια αιτία της υπεργλυκαιμίας.

Στα συμπτώματα της υπεργλυκαιμίας περιλαμβάνονται η πολουρία, η πολυδιψία, η απώλεια βάρους, μερικές φορές η πολυφαγία και το θάμβος όρασης. Αναπτυξιακές διαταραχές και ευαισθησία σε συγκεκριμένες λοιμώξεις μπορούν επίσης να συνοδεύουν τη χρόνια υπεργλυκαιμία. Οξείες, δυνητικά θανατηφόρες, επιπλοκές του μη ελεγχόμενου σακχαρώδη διαβήτη αποτελούν η διαβητική κετοξέωση και το μη κετοσικό υπερωσμωτικό σύνδρομο.

Μακροχρόνιες επιπλοκές του σακχαρώδη διαβήτη είναι η αμφιβληστροειδοπάθεια που μπορεί να οδηγήσει σε πλήρη απώλεια της όρασης, η νεφροπάθεια με την επακόλουθη νεφρική ανεπάρκεια, η περιφερική νευροπάθεια με κίνδυνο πρόκλησης ελκών στα κάτω άκρα, ακρωτηριασμού και άρθρωσης Charcot και η νευροπάθεια ΑΝΣ με συμπτώματα από το γαστρεντερικό, ουροποιογενετικό και καρδιαγγειακό σύστημα, αλλά και με στυτική δυσλειτουργία. Οι ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη παρουσιάζουν αυξημένη επίπτωση καρδιαγγειακής, περιφερικής αρτηριακής και αγγειακής εγκεφαλικής νόσου. Επιπρόσθετα, συχνά συνυπάρχουν σε

ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη αρτηριακή υπέρταση και διαταραχές του μεταβολισμού των λιποπρωτεϊνών.

Η συντριπτική πλειοψηφία των περιπτώσεων με σακχαρώδη διαβήτη ανήκει σε δύο μεγάλες αιτιοπαθογενετικές κατηγορίες. Στην πρώτη κατηγορία, στον σακχαρώδη διαβήτη τύπου 1, παρατηρείται πλήρης έλλειψη ινσουλίνης. Η διάγνωση σε άτομα υψηλού κινδύνου για ανάπτυξη σακχαρώδους διαβήτη τύπου 1 τίθεται με την διενέργεια αιματολογικών εξετάσεων που δείχνουν την παρουσία αυτοάνοσης παθολογικής διεργασίας και με τη χρήση γενετικών δεικτών. Αντίθετα, στη δεύτερη και πιο συχνή κατηγορία, στον σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2, ως κύριο αίτιο θεωρείται ο συνδυασμός αντίστασης στην δράση της ινσουλίνης και ανεπαρκούς έκκρισης της ορμόνης από το πάγκρεας. Σε αυτήν την κατηγορία σακχαρώδη διαβήτη, μπορεί να προϋπάρχει κάποιος βαθμός υπεργλυκαιμίας, ικανός να προκαλέσει παθολογικές και λειτουργικές βλάβες σε διάφορους ιστούς-στόχους, για μεγάλο χρονικό διάστημα πριν την διάγνωση του σακχαρώδη διαβήτη. Κατά την διάρκεια αυτής της ασυμπτωματικής περιόδου, δύναται να ανιχνευθεί διαταραχή του μεταβολισμού των υδατανθράκων με μέτρηση της γλυκόζης πλάσματος νηστείας ή με την διενέργεια της δοκιμασίας ανοχής γλυκόζης.

Ο βαθμός υπεργλυκαιμίας (εάν υπάρχει) μεταβάλλεται με την πάροδο του χρόνου, ανάλογα με την έκταση της εκάστοτε υποκείμενης παθολογικής διεργασίας, η οποία μπορεί να μην έχει εξελιχθεί τόσο ώστε να προκαλέσει υπεργλυκαιμία, αλλά μόνο διαταραχή γλυκόζης νηστείας ή/και διαταραχή ανοχής γλυκόζης, χωρίς όμως να πληροί τα διαγνωστικά κριτήρια του σακχαρώδη διαβήτη. Σε κάποιους ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη, μπορεί να επιτευχθεί ικανοποιητικός γλυκαιμικός έλεγχος με απώλεια βάρους, άσκηση ή/και χρήση από του στόματος υπογλυκαιμικών παραγόντων. Αυτοί οι ασθενείς δεν χρήζουν ινσουλινοθεραπείας. Επίσης, ασθενείς με υπολειμματική έκκριση ινσουλίνης που χρειάζονται όμως εξωγενή χορήγηση ινσουλίνης για την επίτευξη ευγλυκαιμίας, μπορούν να επιβιώσουν χωρίς τη λήψη ινσουλίνης. Αντίθετα, ασθενείς με εκτεταμένη καταστροφή των β-κυττάρων, και κατά συνέπεια με απουσία έκκρισης ινσουλίνης, χρήζουν ινσουλινοθεραπείας για την επιβίωσή τους. Η βαρύτητα αυτής της μεταβολικής διαταραχής δύναται να αυξηθεί, να μετριαστεί ή να παραμείνει σταθερή. Επομένως, ο βαθμός υπεργλυκαιμίας αντανακλά τη βαρύτητα της εκάστοτε υποκείμενης παθολογικής διεργασίας και την αποτελεσματικότητα της θεραπείας της και όχι τη φύση της.

Σακχαρώδης διαβήτης τύπου I

❖ Αυτοάνοσος σακχαρώδης διαβήτης

Αυτός ο τύπος σακχαρώδη διαβήτη που αφορά μόνο το 5-10% των ασθενών με σακχαρώδη διαβήτη και παλαιότερα αναφερόταν ως ινσουλινοεξαρτώμενος σακχαρώδης διαβήτης, σακχαρώδης διαβήτης τύπου 1 ή νεανικός σακχαρώδης διαβήτης, προκαλείται από αυτοάνοση καταστροφή των β-κυττάρων του παγκρεάτος. Δείκτες της αυτοάνοσης φύσης της νόσου αποτελούν αντιησιδιακά αυτοαντισώματα, αυτοαντισώματα έναντι της ινσουλίνης, της δεκαρβοξυλάσης του γλουταμινικού οξέος (GAD₆₅) και των φωσφοτάσων της τυροσίνης IA-2 και IA-2β. Ένα ή συνήθως περισσότερα αυτοαντισώματα διαπιστώνονται σε ποσοστό 85-90% των ασθενών με πρωτοδιαγνωσμένη υπεργλυκαιμία. Επιπρόσθετα, αυτός ο τύπος σακχαρώδη διαβήτη χαρακτηρίζεται παρουσιάζει υψηλές συσχετίσεις HLA με σύνδεση των DQA και DQB γονιδίων, ενώ επηρεάζεται και από τα DRB γονίδια. Αυτά τα HLA-DR/DQ μπορεί είτε να προδιαθέτουν είτε να προστατεύουν από τη νόσο.

Σε αυτόν τον τύπο σακχαρώδη διαβήτη, η συχνότητα καταστροφής των β-κυττάρων ποικίλλει από ταχεία, ιδίως σε νηπιακή και παιδική ηλικία, μέχρι βραδεία, ιδίως στους ενήλικες. Σε μερικούς ασθενείς, ιδίως παιδιά και εφήβους, η κετοξέωση αποτελεί την πρώτη κλινική εκδήλωση του σακχαρώδη διαβήτη. Άλλοι ασθενείς παρουσιάζουν μέτριας βαρύτητας υπεργλυκαιμία νηστείας που μπορεί να εξελιχθεί ταχέως σε σοβαρή υπεργλυκαιμία ή/και κετοξέωση στο πλαίσιο συνυπάρχουσας λοίμωξης ή άλλου στρεσογόνου παράγοντα. Αντίθετα, άλλοι ασθενείς, κυρίως ενήλικες, διατηρούν κάποια υπολειμματική λειτουργία των β-κυττάρων, ικανή να τους προφυλάξει από την εμφάνιση κετοξέωσης για αρκετά χρόνια, αν και τελικά χρειάζονται ινσουλίνη για την επιβίωσή τους και βρίσκονται σε διαρκή κίνδυνο κετοξέωσης. Σε αυτό το τελικό στάδιο της νόσου, παρατηρείται ελάχιστη έως καθόλου έκκριση ενδογενούς ινσουλίνης, όπως αποκαλύπτεται από τη χαμηλή ή μη ανίχνευση C-πεπτιδίου στο πλάσμα. Κατά κανόνα, ο αυτοάνοσος σακχαρώδης διαβήτης εμφανίζεται στην παιδική και εφηβική ηλικία, χωρίς όμως να αποκλείεται η

εκδήλωσή του σε οποιαδήποτε ηλικία, ακόμη και στην όγδοη και ένατη δεκαετία της ζωής.

Η αυτοάνοση καταστροφή των β-κυττάρων αποδίδεται σε πολλαπλούς γενετικούς προδιαθεσικούς παράγοντες, ενώ επίσης επηρεάζεται και από περιβαλλοντικούς παράγοντες που δεν έχουν όμως ακόμη πλήρως διευκρινισθεί. Αν και οι ασθενείς σπάνια είναι υπέρβαροι, η παρουσία παχυσαρκίας δεν αποκλείεται ήδη κατά τη διάγνωση της νόσου. Αυτοί οι ασθενείς χαρακτηρίζονται από υψηλή προδιάθεση για εμφάνιση και άλλων αυτοάνοσων διαταραχών, όπως νόσο του Addison, λεύκη, κοιλιοκάκη, αυτοάνοση ηπατίτιδα, μυασθένεια gravis και κακοήγη αναιμία.

Ιδιοπαθής σακχαρώδης διαβήτης

Κάποιοι από αυτούς τους ασθενείς παρουσιάζουν μόνιμη ινσουλινοπενία και έχουν προδιάθεση για κετοξέωση, χωρίς όμως αυτοάνοσο υπόβαθρο. Αποτελούν μειονότητα των ασθενών με σακχαρώδη διαβήτη τύπου 1 και οι περισσότεροι είναι αφρικανικής ή ασιατικής καταγωγής. Σε αυτόν τον τύπο σακχαρώδη διαβήτη παρατηρούνται επεισόδια κετοξέωσης με ποικίλης βαρύτητας ινσουλινοανεπάρκεια στα ενδιάμεσα διαστήματα. Υπάρχει μεγάλος βαθμός κληρονομικότητας, χωρίς τεκμηριωμένη αυτοάνοση καταστροφή των β-κυττάρων και χωρίς HLA-συσχέτιση. Η ανάγκη ινσουλινοθεραπείας σε αυτούς τους ασθενείς ποικίλλει.

Σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2

Αυτός ο τύπος που αφορά περίπου το 90-95% των ασθενών με σακχαρώδη διαβήτη και παλαιότερα αναφερόταν ως μη ινσουλινοεξαρτώμενος σακχαρώδης διαβήτης, σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2 ή σακχαρώδης διαβήτης των ενηλίκων, χαρακτηρίζεται κατά κύριο λόγο από αντίσταση στην δράση της ινσουλίνης με συνοδό σχετική (και όχι πλήρη) ανεπάρκεια έκκρισης ινσουλίνης. Αρχικά τουλάχιστον, συχνά όμως και εφ' όρου ζωής, οι ασθενείς δεν χρειάζονται ινσουλινοθεραπεία για την επιβίωσή τους. Τα αίτια αυτού του τύπου σακχαρώδη διαβήτη ποικίλλουν, χωρίς να μπορούν να διευκρινισθούν πλήρως, ωστόσο δεν

παρατηρείται αυτοάνοση καταστροφή των β-κυττάρων ούτε ανευρίσκονται οι αιτιολογικοί παράγοντες των υπολοίπων τύπων σακχαρώδη διαβήτη.

Η πλειονότητα των ασθενών με σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 είναι υπέρβαροι. Είναι γνωστό ότι η ίδια η παχυσαρκία ενοχοποιείται για πρόκληση κάποιου βαθμού ινσουλινοαντίστασης. Επίσης, ασθενείς φυσιολογικού σωματικού βάρους μπορεί να παρουσιάζουν αυξημένη κατανομή του λίπους στην κοιλιακή χώρα. Η κετοξέωση σπάνια εμφανίζεται αυτόματα, ενώ συνήθως προκαλείται από συνυπάρχουσα παθολογική διεργασία, όπως λοίμωξη. Η διάγνωση συχνά καθυστερεί για πολλά χρόνια, καθώς η υπεργλυκαιμία εγκαθίσταται βαθμιαία και στα αρχικά στάδια δεν είναι τόσο σοβαρή ώστε να προκαλέσει την κλασική κλινική εικόνα του σακχαρώδη διαβήτη που θα θέσει την παρουσία της νόσου. Ωστόσο, οι ασθενείς ήδη βρίσκονται σε κίνδυνο ανάπτυξης μακροαγγειακών και μικροαγγειακών επιπλοκών.

Αν και τα επίπεδα ινσουλίνης σε αυτούς τους ασθενείς είναι φυσιολογικά ή/και αυξημένα, η σχετικά υψηλότερη συγκέντρωση γλυκόζης στο πλάσμα θα έπρεπε αναλογικά να οδηγήσει σε ακόμη μεγαλύτερες συγκεντρώσεις ινσουλίνης, στην περίπτωση βέβαια που ο μηχανισμός έκκρισης της ορμόνης διατηρούνταν φυσιολογικός. Επομένως, η έκκριση ινσουλίνης είναι διαταραγμένη και αδυνατεί να αντιροπήσει τις ανάγκες που προκύπτουν λόγω της ινσουλινοαντίστασης. Η τελευταία μπορεί να βελτιωθεί με την ελάττωση του σωματικού βάρους ή/και τη χορήγηση υπογλυκαιμικών φαρμακευτικών παραγόντων, όμως σπάνια αποκαθίσταται στο φυσιολογικό.

Ο κίνδυνος εμφάνισης σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 αυξάνεται με την πρόοδο της ηλικίας, την παρουσία παχυσαρκίας και την έλλειψη σωματικής άσκησης. Πιο συχνά προσβάλλει γυναίκες με σακχαρώδη διαβήτη κύησης και ασθενείς με αρτηριακή υπέρταση ή δυσλιπιδαιμία, ενώ η συχνότητα του ποικίλλει στις διάφορες εθνικές/φυλετικές υποομάδες. Επίσης, χαρακτηρίζεται από υψηλή γενετική προδιάθεση, μεγαλύτερη από την αντίστοιχη του αυτοάνοσου σακχαρώδη διαβήτη τύπου 1, η οποία όμως είναι αρκετά σύνθετη και δεν έχει πλήρως διερευνηθεί.

Ειδικοί τύποι σακχαρώδη διαβήτη

❖ Γενετικές διαταραχές των β-κυττάρων

Πολλές μορφές σακχαρώδη διαβήτη σχετίζονται με μονογονιδιακές λειτουργικές διαταραχές του β-κυττάρου. Αυτές οι μορφές σακχαρώδη διαβήτη συχνά χαρακτηρίζονται από έναρξη της υπεργλυκαιμίας σε νεαρή ηλικία, ονομάζονται Maturity-Onset Diabetes of the Young (MODY) και παρουσιάζουν διαταραχή στην έκκριση ινσουλίνης με συνοδό φυσιολογική ή ελάχιστα διαταραγμένη δράση ορμόνης. Κληρονομούνται με τον κυρίαρχο αυτοσωματικό χαρακτήρα, ενώ έχουν μέχρις στιγμής ανιχνευθεί βλάβες σε 6 γονιδιακούς τόπους σε διαφορετικά χρωμοσώματα.

Η πιο συχνή μορφή σχετίζεται με μεταλλάξεις στο χρωμόσωμα 12, στο γονίδιο του ηπατικού μεταγραφικού παράγοντα HNF-1a (ηπατοκυτταρικός πυρηνικός παράγοντας-1α), ενώ μια άλλη μορφή σχετίζεται με μεταλλάξεις στο γονίδιο της γλυκοκινάσης στο χρωμόσωμα 7p, με αποτέλεσμα παραγωγή ελαττωματικού μορίου του ενζύμου. Η γλυκοκινάση μετατρέπει τη γλυκόζη σε γλυκοζο-6-φωσφατάση, ο μεταβολισμός της οποίας διεγείρει την έκκριση ινσουλίνης από το β-κύτταρο. Επομένως, η γλυκοκινάση λειτουργεί ως «αισθητήρας της γλυκόζης» για τα β-κύτταρα. Λόγω των βλαβών του γονιδίου της γλυκοκινάσης, απαιτούνται αυξημένα επίπεδα γλυκόζης πλάσματος για την επίτευξη φυσιολογικών επιπέδων ινσουλινοέκκρισης. Λιγότερο συχνές μορφές προκαλούνται από μεταλλάξεις άλλων μεταγραφικών παραγόντων, περιλαμβανομένων των HNF-4a, HNF-1β, παραγωγέα ινσουλίνης- 1 (IPF-1) και NeuroD1.

Σημειακές μεταλλάξεις στο μιτοχondριακό DNA έχουν συσχετιστεί με σακχαρώδη διαβήτη και κώφωση. Η πιο συχνή από αυτές αφορά τη θέση 3243 στο γονίδιο του tRNA της λευκίνης, με αντικατάσταση της αδενίνης από γουανίνη.

Γενετικές διαταραχές που καθιστούν αδύνατη τη μετατροπή της προϊνσουλίνης σε ινσουλίνη έχουν επίσης ανιχνευθεί σε μερικές οικογένειες και κληρονομούνται με τον κυρίαρχο αυτοσωματικό χαρακτήρα. Η προκαλούμενη διαταραχή ανοχής γλυκόζης είναι ήπια. Αλλά και η παραγωγή μεταλλαγμένων μορίων ινσουλίνης με διαταραχή στη σύνδεση του υποδοχέα της έχει διαπιστωθεί σε άλλες οικογένειες με αυτοσωματική κληρονομικότητα και συνοδό φυσιολογικό ή ήπια επηρεασμένο μεταβολισμό της γλυκόζης.

2.6 ΕΠΙΠΛΟΚΕΣ

Οι επιπλοκές που προκύπτουν από την ασθένεια του σακχαρώδους διαβήτη είναι σημαντική αιτία νοσηρότητας και θνησιμότητας και έχουν συσχετισθεί με την καταστροφή ή δυσλειτουργία διαφόρων οργάνων, όπως τα μάτια, οι νεφροί και τα νεύρα (Turner *et al.*,1999). Η πιθανότητα ανάπτυξης επιπλοκών λόγω του σακχαρώδους διαβήτη μειώνεται όσο καλύτερα ρυθμίζονται οι τιμές του σακχάρου στο αίμα. Μια σειρά παραγόντων, όπως το κάπνισμα, τα αυξημένα επίπεδα χοληστερόλης, η παχυσαρκία, η αρτηριακή υπέρταση και η καθιστική ζωή, επιταχύνουν την ανάπτυξη επιπλοκών. Οι επιπλοκές του σακχαρώδους διαβήτη διακρίνονται σε οξείες και χρόνιες.

Στις οξείες επιπλοκές υπάγονται:

Διαβητική κετοξέωση και διαβητικό κώμα: είναι μια επικίνδυνη επιπλοκή, θεωρείται επείγον περιστατικό και είναι πιο συχνή σε σακχαρώδη διαβήτη τύπου 1. Στην περίπτωση που η αρχική μεταβολική οξέωση δεν αντιμετωπισθεί έγκαιρα και κατάλληλα εμφανίζεται το διαβητικό κώμα. Το επίπεδο συνείδησης δεν επηρεάζεται αρχικά, στη συνέχεια όμως μπορεί να εμφανιστούν σταδιακά πτώση του επιπέδου συνείδησης, υπνηλία, λήθαργος και τελικά κώμα. Σε σοβαρότερες περιπτώσεις παρατηρούνται υπόταση και κυκλοφορική καταπληξία (shock).

➤ Υπερωσμωτικό μη κετονικό κώμα: χαρακτηρίζεται από αύξηση της ωσμωτικότητας του πλάσματος (>350 mOsm/L), πολύ υψηλά επίπεδα σακχάρου αίματος (>600 mg/dl) και απουσία κετοξέωσης. Εμφανίζεται συχνότερα σε ασθενείς με διαβήτη τύπου 2.

➤ Υπογλυκαιμία: αποτελεί ουσιαστικά επιπλοκή της θεραπείας του σακχαρώδους διαβήτη.

Στις χρόνιες επιπλοκές υπάγονται:

➤ Διαβητική μικροαγγειοπάθεια στην οποία προκαλείται προσβολή των τριχοειδών αγγείων που με τη σειρά της προκαλεί:

➤ Διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια: υπερπλασία των τριχοειδών στην επιφάνεια του αμφιβληστροειδή και προσβολή της ωχράς κηλίδας, που οδηγούν σε απώλεια όρασης.

➤ Διαβητική νεφροπάθεια: προσβολή των νεφρών με βλάβες του σπειράματος, των αγγείων και του διάμεσου ιστού που μπορεί να οδηγήσουν σε νεφρική ανεπάρκεια.

- Διαβητική νευροπάθεια: νευροπάθεια του αυτόνομου νευρικού συστήματος. Συχνά εμφανίζεται απώλεια της αισθητικότητας και στυτική δυσλειτουργία.
- Διαβητική μακροαγγειοπάθεια κατά την οποία προκύπτει εμφάνιση αρτηριοσκλήρυνσης, νωρίτερα και σοβαρότερης μορφής. Προσβολή αρτηριών μεσαίου και μεγάλου μεγέθους.
- Στεφανιαία νόσος, που μπορεί να οδηγήσει σε στηθάγχη ή οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου.
 - Αγγειακά εγκεφαλικά επεισόδια, κυρίως ισχαιμικού τύπου.
 - Περιφερική αγγειακή νόσος.
 - Άλλες επιπλοκές είναι οι ακόλουθες:
 - Ευπάθεια σε λοιμώξεις.
 - Υπερλιπιδαιμίες, λιπώδης διήθηση του ήπατος
 - Περιοδοντίτιδα.

Στο σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 τα συμπτώματα της πολουρίας και πολυδιψίας μπορεί να είναι ήπια και η διάγνωση ενδέχεται να καθυστερήσει για μήνες ή χρόνια. Έτσι εξηγείται γιατί σε μερικούς ασθενείς υπάρχουν ήδη κατά την διάγνωση χρόνιες διαβητικές επιπλοκές. Αλλά και με συμπτώματα που διαρκούν επί μήνες παρατηρείται καθυστέρηση στη διάγνωση. Οι διαβητικοί τύπου 2 δεν παθαίνουν εύκολα κετοξέωση, μπορεί να πάθουν όμως υπερωσμωτικό μη κετονικό υπεργλυκαιμικό κώμα. Ο κίνδυνος εμφάνισης ορισμένων παθολογικών προβλημάτων είναι μεγαλύτερος στους διαβητικούς σε σχέση με το γενικό πληθυσμό.

2.7 ΔΙΑΒΗΤΗΣ ΚΑΙ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ

Τα μιτοχόνδρια εκτελούν μια ποικιλία βιοενεργειακών λειτουργιών οι οποίες είναι υποχρεωτικές για τη ρύθμιση της ενδοκυττάριας παραγωγής ενέργειας. Η αλλοίωση των βιοενεργειακών δραστηριοτήτων ενδέχεται να έχει δραματικές

συνέπειες για την κυτταρική λειτουργία, μέσω της διαταραχής του ενεργειακού φορτίου και της ισορροπίας του κυττάρου.

Αν και η δομή του μιτοχονδριακού DNA (mtDNA) περιγράφηκε πριν από 45 χρόνια (Clayton & Vinograd, 1967) και οι ασθένειες που οφείλονται σε βλάβες στο μονοπάτι της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης πολύ νωρίτερα (Luft *et al.*, 1962), οι παθολογικές μεταλλάξεις του μιτοχονδριακού γονιδιώματος δεν είχαν περιγραφεί μέχρι το 1988 (Holt *et al.*, 1988). Το σύνδρομο MELAS, για παράδειγμα, περιγράφηκε για πρώτη φορά 28 χρόνια πριν (Pavlakis *et al.*, 1984), ενώ πολλές αναφορές διασαφηνίζουν και τη σχέση μεταξύ της μιτοχονδριακής δυσλειτουργίας και του διαβήτη. Τα τελευταία χρόνια, έχει καταστεί σαφές ότι ανάμεσα στις μιτοχονδριακές ασθένειες περιλαμβάνεται και ο σακχαρώδης διαβήτης. Ωστόσο, ορισμένοι μηχανισμοί του ρόλου του μιτοχονδρίου σε αυτήν την παθολογία εξακολουθούν να χρειάζονται περαιτέρω διευκρίνιση.

Η πιο σημαντική λειτουργία του μιτοχονδρίου, όπως προαναφέρθηκε, είναι η παραγωγή ενέργειας στην μορφή τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP), μέσω της λειτουργίας της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων (ETC) και της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Ο κύριος μηχανισμός που οδηγεί στην οξειδωτική φωσφορυλίωση είναι ο εξής: ηλεκτρόνια υψηλού δυναμικού (e^-) που προέρχονται από το NADH και $FADH_2$ (Duchen, 2004), κινούνται κατά μήκος της αναπνευστικής αλυσίδας η οποία αποτελείται από τέσσερα πρωτεϊνικά σύμπλοκα (Complex I - IV) και δύο επιπλέον μεταφορείς ηλεκτρονίων, το συνένζυμο Q (ουβικινόνη), ένα μικρό μόριο που κινείται ελεύθερα στο εσωτερικό της μιτοχονδριακής μεμβράνης και το κυτόχρωμα c (Cyt c), που βρίσκεται στο διαμεμβρανικό χώρο και συνδέεται με την εσωτερική μεμβράνη. Μέρος της ενέργειας που απελευθερώνεται κατά τη διαδικασία αυτή χρησιμοποιείται από την αντλία πρωτονίων η οποία μεταφέρει πρωτόνια (H^+) από τη μήτρα στο διαμεμβρανικό χώρο. Στην εσωτερική μεμβράνη σχηματίζεται ηλεκτροχημική βαθμίδωση ηλεκτρονίων. Τα πρωτόνια τείνουν να επιστρέφουν στη μήτρα του μιτοχονδρίου ώστε να αποκατασταθεί η ισορροπία στη συγκέντρωση των ηλεκτρονίων και στις πλευρές της μεμβράνης. Η επιστροφή επιτυγχάνεται μέσω διαμεμβρανικού πρωτεϊνικού συμπλόκου - ATP συνθετάση - και η ενέργεια που παράγεται χρησιμοποιείται για την σύνθεση ATP από ADP και ανόργανου φωσφόρου (P_i).

Στην περίπτωση του διαβήτη παρατηρείται αύξηση των δοτών ηλεκτρονίων (NADH και $FADH_2$), που επάγεται από την υπεργλυκαιμία, με αποτέλεσμα την

αύξηση της ροής ηλεκτρονίων μέσα από τη μιτοχονδριακή αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων. Η αναλογία ATP/ADP αυξάνεται και παρατηρείται υπερπόλωση της μεμβράνης των μιτοχονδρίων (διαφορά ηλεκτροχημικού δυναμικού). Αυτή η υψηλή διαφορά ηλεκτροχημικού δυναμικού που δημιουργείται από τη βαθμίδωση πρωτονίων οδηγεί σε μερική αναστολή της μεταφοράς των ηλεκτρονίων στο σύμπλοκο III (Complex III), με αποτέλεσμα την αυξημένη ροή ηλεκτρονίων προς το συνένζυμο Q. Αυτό με τη σειρά του, οδηγεί σε μερική αναγωγή του Οξυγόνου (O₂) για την παραγωγή ελεύθερων ριζών ανιόντος υπεροξειδίου. Επιταχύνεται η αναγωγή του συνενζύμου Q και η παραγωγή των ROS, τα οποία πιστεύεται ότι αποτελούν τη βασική πηγή για τη δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων η οποία συμβάλλει καθοριστικά στην εμφάνιση μεταβολικών συνδρόμων που σχετίζονται με το διαβήτη (Labiencic-Watala *et al.*, 2012).

2.8 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η ανίχνευση και η ταυτοποίηση μεταλλάξεων σε μιτοχονδριακά γονίδια tRNA σε 20 ασθενείς που πάσχουν από τη νόσο του διαβήτη. Πραγματοποιήθηκε μελέτη για το ρόλο των μεταλλάξεων του mtDNA στη δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων και κατά πόσο σχετίζεται με την εμφάνιση της νόσου του σακχαρώδους διαβήτη. Τα γονίδια που μελετήθηκαν στους ασθενείς είναι tRNA^{Trp} και tRNA^{Ala}.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Στην παρούσα πειραματική μελέτη χρησιμοποιήθηκε ως βιολογικό υλικό 20 δείγματα αίματος από ασθενείς με διαβήτη. Τα δείγματα αίματος συλλέχθηκαν από το Περιφερειακό Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας και αποθηκεύτηκαν στους -20 °C μέχρι την έναρξη της διαδικασίας απομόνωσης DNA.

3.1 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΟΛΙΚΟΥ DNA

Το πρώτο βήμα για την έναρξη της μεθόδου PCR είναι η απομόνωση του DNA από τα κύτταρα του αίματος. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιήθηκε με βάση το εξής πρωτόκολλο:

- ❖ Σε σωλήνες eppendorf των 2ml, έγινε ανάμιξη 0,5ml ολικού αίματος με 1ml SSC (Standard Saline Citrate) 1x.
- ❖ Ακολούθησε έντονη ανάδευση στο vortex και φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm για 3 λεπτά.
- ❖ Απομάκρυνση 1 ml του υπερκειμένου και διάλυση του ιζήματος σε 1ml SSC 1x.
- ❖ Ακολούθησε έντονη ανάδευση στο vortex και φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm για 1 λεπτό.
- ❖ Απομάκρυνση του υπερκειμένου και διάλυση του ιζήματος ξανά σε 0,5 ml NaOAc 0,2M και 50 μl SDS 5%, προσθέτοντας 10μl πρωτεϊνάσης K. *(Η πρωτεϊνάση K συντελεί στην αποδιάταξη των πρωτεϊνών.)*
- ❖ Τοποθέτηση των δειγμάτων για επώαση στο φούρνο, στους 55 °C, για 1 ώρα.
- ❖ Προσθήκη, 0,5 ml φαινόλης και 0,5 ml χλωροφόρμιο. *(Η φαινόλη και το χλωροφόρμιο αποτελούν οργανικούς διαλύτες κατάλληλοι 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.)*
- ❖ Ακολούθησε έντονη ανάδευση στο vortex και φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm για 5 λεπτά.

- ❖ Μεταφορά του υπερκειμένου σε νέα erpendorf των 2 ml και προσθήκη 1 ml χλωροφορμίου.
- ❖ Ακολούθησε ήπια ανακίνηση και φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm για 10 λεπτά.
- ❖ Μεταφορά του υπερκειμένου σε νέα erpendorf των 2 ml και προσθήκη 1 ml ισοπροπανόλης. *(Η ισοπροπανόλη συμβάλλει στην κατακρήμνιση του DNA.)*
- ❖ Τοποθέτηση των δειγμάτων στους -20°C για 15 λεπτά.
- ❖ Ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 10 λεπτά.
- ❖ Απομάκρυνση του υπερκειμένου και προσθήκη 1 ml παγωμένης αιθανόλης 70% για έκπλυση του ιζήματος. *(Κατ' αυτόν τον τρόπο πραγματοποιείται κατακρήμνιση μόνο του DNA, λόγω της μεγάλης διηλεκτρικής σταθεράς της.)*
- ❖ Ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm για 10 λεπτά.
- ❖ Απομάκρυνση του υπερκειμένου.
- ❖ Τοποθέτηση των δειγμάτων στο φούρνο, για επώαση-ξήρανση του ιζήματος, τα erpendorf με ανοιχτό καπάκι, για 1 ώρα.
- ❖ Ακολούθησε προσθήκη 100 μl ddH₂O. *(επαναδιάλυση του DNA που βρίσκεται υπό τη μορφή ιζήματος)*
- ❖ Διατήρηση των δειγμάτων στους 4°C για 1 ημέρα μέχρι την ολοκλήρωση της επαναδιάλυσης του DNA.

Μετά την ολοκλήρωση της απομόνωσης του DNA, έγινε ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πηκτή αгарόζης 1% με σκοπό την ποιοτική ανίχνευση του mtDNA. Εφόσον η ποσότητα και η ποιότητα του DNA ήταν ικανοποιητικές, ακολούθησε ενίσχυση με τη μέθοδο της PCR *(αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης)*.

- Τα υλικά για την παρασκευή πηκτής αгарόζης 1% είναι:
 - 40 ml TAE 1x
 - 0,3 gr αгарόζης
 - 3 μl βρωμιούχο αιθίδιο

Η διαδικασία ξεκίνησε με τοποθέτηση των 0,3 gr αгарόζης σε κωνική φιάλη των 100 ml και προσθήκη σε αυτά 40 ml TAE. Ακολούθησε θέρμανση του μίγματος σε φούρνο μικροκυμάτων για περίπου 1-2 λεπτά μέχρι την πλήρη διάλυση της αгарόζης. Στη συνέχεια έγινε προσθήκη με ιδιαίτερη προσοχή, 3 μl βρωμιούχου αιθιδίου *(το βρωμιούχο αιθίδιο έχει την χαρακτηριστική ιδιότητα να φθορίζει στο υπεριώδες καθώς παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων του DNA. Μ' αυτόν τον τρόπο δίνει πρότυπα ζωνώσεων*

που αντιστοιχούν στην ποσότητα του DNA που δέσμευσε το BrEt). Ακολούθησε μεταφορά του διαλύματος σε κατάλληλες οριζόντιες πλάκες ηλεκτροφόρησης, αφού τοποθετήθηκαν οι κατάλληλες χτένες για το σχηματισμό των πηγαδιών. Τέλος, χρειάστηκαν 20-30 λεπτά για να πήξει πλήρως.

Στη συνέχεια και αφού η συσκευή συμπληρωθήκαν με το ίδιο διάλυμα TAE 1x, έγινε η φόρτωση του δείγματος στη πηκτή αγαρόζης, μέχρι η πηκτή να είναι πλήρως βυθισμένη στο διάλυμα αυτό. Ακολούθησε ανάμιξη 3 μl loading buffer με 5μl δείγματος και τοποθέτησή τους με ιδιαίτερη προσοχή σε κάθε πηγαδάκι της πηκτής.

- Το loading buffer (6x) 10ml περιέχει:
 - 1 ml χρωστική μπλε της βρωμοφαινόλης
 - 5 ml γλυκερόλη, (συμβάλλει στην καθίζηση του δείγματος μέσα στα πηγαδάκια)
 - 0,5 ml TBE 20x
 - 3,5 ml dd-H₂O

Η τάση που εφαρμόστηκε είναι 100 Volt και τα δείγματα «έτρεξαν» στο πήκτωμα μέχρις ότου διένυσαν τα 2/3 της διαδρομής για περίπου 20-30 λεπτά. Στο τελικό στάδιο, το πήκτωμα παρατηρήθηκε σε συσκευή UV. Όσα δείγματα έδωσαν θετικό αποτέλεσμα χρησιμοποιήθηκαν στη συνέχεια στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, PCR.

3.2 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ PCR (Polymerase Chain Reaction)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης PCR (Polymerase Chain Reaction), είναι μία πολύ γρήγορη και οικονομική τεχνική που χρησιμοποιείται για να πολλαπλασιάσει με ακρίβεια μικρά τμήματα του DNA. Κάτι τέτοιο είναι απαραίτητο γιατί για να γίνει ανάλυση των μεταλλάξεων ή των πολυμορφισμών σε μοριακό επίπεδο, είναι απαραίτητες αρκετά μεγάλες ποσότητες του DNA. Απομονωμένα τμήματα DNA θα ήταν αδύνατο να μελετηθούν επαρκώς χωρίς την μέθοδο της PCR. Η PCR ανακοινώθηκε στην επιστημονική κοινότητα για πρώτη φορά το 1985. Σήμερα αντιμετωπίζεται σαν μια από τις πιο σημαντικές επιστημονικές ανακαλύψεις

της δεκαετίας και έχει αλλάξει, με επαναστατικό τρόπο, τη μελέτη του DNA. Ο εφευρέτης της μεθόδου Karry Mullis, τιμήθηκε με το βραβείο Νόμπελ το 1993. Μέχρι το 1993, η PCR χρησιμοποιήθηκε σε περισσότερες από 7.000 επιστημονικές εργασίες.

3.2.1 Η ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Για τον πολλαπλασιασμό ενός τμήματος DNA χρησιμοποιώντας την μέθοδο PCR, το δείγμα του DNA αρχικά θερμαίνεται έτσι ώστε να αποδιαταχθεί το δίκλωνο DNA και να διαχωριστεί σε δυο μονόκλινα τμήματα. Στη συνέχεια ένα ένζυμο, το οποίο λέγεται πολυμεράση TAQ, συνθέτει δυο συμπληρωματικούς κλώνους DNA χρησιμοποιώντας τους αρχικούς κλώνους ως πρότυπα (μήτρες). Αυτή η διαδικασία καταλήγει στον πολλαπλασιασμό του DNA, με κάθε ένα από τα καινούργια μόρια να περιέχει έναν παλιό και έναν καινούργιο κλώνο DNA. Ο κύκλος αυτός αποδιάταξης και σύνθεσης νέου DNA μπορεί να επαναληφθεί πολλές φορές, συνήθως 30 ή 40, καταλήγοντας στο σχηματισμό περισσότερων από 1 δισεκατομμύριο ακριβών αντιγράφων του αρχικού τμήματος του DNA. Το υπόλοιπο γονιδίωμα δεν πολλαπλασιάζεται, και έτσι δεν ανιχνεύεται με τις μοριακές τεχνικές.

Σήμερα, η όλη διαδικασία της PCR έχει αυτοματοποιηθεί και με τα καινούργια και τελειότερα μηχανήματα μπορεί να τελειώσει σε λίγες μόνο ώρες. Η όλη διαδικασία των κύκλων της θέρμανσης και της μείωσης της θερμοκρασίας προγραμματίζεται από ένα μηχάνημα το οποίο ονομάζεται θερμικός κυκλοποιητής (PCR thermal cycler) και το οποίο έχει τη δυνατότητα να αυξομειώνει την θερμοκρασία της αντίδρασης κάθε λίγα λεπτά ή δευτερόλεπτα, έτσι ώστε να επιτρέψει τη σύνθεση νέων τμημάτων DNA.

Η αντίδραση εκτελείται κυρίως σε όγκο 15-100 μl σε eppendorf των 0,2-0,5 ml στον θερμικό κυκλοποιητή. Τα στάδια ενίσχυσης για την PCR στον θερμικό κυκλοποιητή ήταν τα ακόλουθα (τα στάδια 2-4 επαναλαμβάνονται για 35 κύκλους):

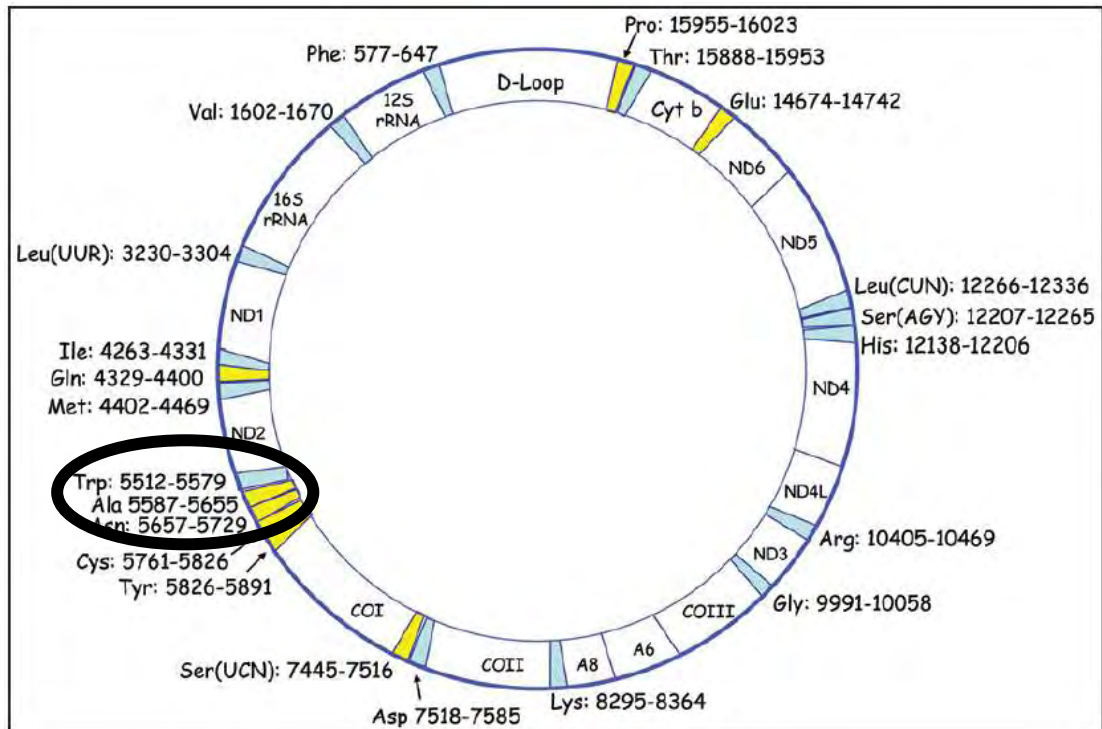
1. **Αρχικό στάδιο:** Η θερμοκρασία ανέρχεται στους 95° C και διατηρείται για 4 λεπτά.
2. **Στάδιο αποδιάταξης:** Η θερμοκρασία ανέρχεται στους 95° C για 30 δευτερόλεπτα.

3. **Στάδιο υβριδισμού:** Η θερμοκρασία κατέρχεται στους 55° C για 40 δευτερόλεπτα, επιτρέποντας έτσι την υβριδοποίηση των εκκινητών, οι οποίοι βρίσκονται σε περίσσεια, με το μονόκλωνο DNA-εκμαγείο.
4. **Στάδιο επιμήκυνσης:** Η θερμοκρασία ανέρχεται ξανά στους 72° C για 40 δευτερόλεπτα, όπου η Taq πολυμεράση λειτουργεί βέλτιστα.
5. **Στάδιο τελικής επιμήκυνσης:** Η θερμοκρασία παραμένει στους 72° C για 10 λεπτά, ύστερα από τον τελευταίο κύκλο PCR.
6. **Τελικό στάδιο:** Η θερμοκρασία κατέρχεται στους 4° C.

Για την ενίσχυση του DNA και συγκεκριμένα του γονιδίου TA, που απομονώθηκε από τα δείγματα αίματος ατόμων με διαβήτη, πραγματοποιήθηκε η μέθοδος PCR. Το ζεύγος εκκινητών που χρησιμοποιήθηκε είναι το **FwTA** και **RevTA**. Στον παρακάτω πίνακα (πίνακας 1) αναφέρονται τα χαρακτηριστικά του ζεύγους εκκινητών που χρησιμοποιήθηκε:

Πίνακας 1 : Τα χαρακτηριστικά των εκκινητών

<ul style="list-style-type: none"> • tRNA^{Trp} • tRNA^{Ala} 	Όνομα Primer	Αλληλουχία	Μήκος (bp)	Νουκλεοτιδική θέση
Forward Primer	FwTA 5'-3'	TTAGGGTGCTTAGCTGTTAAC	242	5470-5489
Reverse primer	RevTA 5'-3'	GGCTACTCCTACCTATCTCC		5711-5691



Εικόνα 4 : Η περιοχή του mtDNA που αντιστοιχεί στα ζεύγη των εκκινήτων που χρησιμοποιήθηκαν φαίνεται μέσα στο μαύρο κύκλο.

Το ζεύγος εκκινήτων FwTA και RevTA ενισχύει το τμήμα των 242 bp που κωδικοποιεί τα γονίδια tRNA^{Trp} και tRNA^{Ala}.

Για μία αντίδραση PCR των 50 μl χρησιμοποιήθηκαν:

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

3.2.2 ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ PCR ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ

Αφού ολοκληρώθηκε η αντίδραση της PCR ακολούθησε ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της σε πήκτωμα αγαρόζης 2% η οποία βασίστηκε στο διαχωρισμό τμημάτων DNA ανάλογα με το μέγεθός τους. Η παρασκευή της αγαρόζης καθώς και

η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι ακριβώς η ίδια που αναφέρθηκε παραπάνω για την απομόνωση του DNA με τη διαφορά ότι εδώ έγινε παρουσία μάρτυρα μοριακών μεγεθών τμημάτων DNA, καθώς είναι ο μόνος τρόπος για την απόδειξη ότι δεν ενισχύθηκαν μη ειδικά προϊόντα. Στη συνέχεια όσα δείγματα έδωσαν θετικό αποτέλεσμα χρησιμοποιήθηκαν στην εφαρμογή της μεθόδου SSCP για την ποιοτική ανάλυση πολυμορφισμών.

3.3 SSCP-ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥ ΜΟΝΟΚΛΩΝΙΚΗΣ ΔΙΑΜΟΡΦΩΣΗΣ

Η μέθοδος αυτή μπορεί να ανιχνεύσει μεταλλαγές σε βάσεις μονόκλωνης αλυσίδας. Η βασική αρχή αυτής της δοκιμής είναι ότι το δίκλωνο DNA όταν αποδιατάσσεται παίρνει μια ειδική διαμόρφωση. Αυτή η διαμόρφωση είναι μοναδική και εξαρτάται από την αρχική ακολουθία νουκλεοτιδίων. Αποτελεί μία μέθοδο αρκετά ευαίσθητη για να ανιχνεύσει ακόμη και διαφορά στις μονόκλωνες νουκλεοτιδικές αλυσίδες που καταλαμβάνουν μια διαφορετική διαμόρφωση και όταν υποβάλλονται σε ηλεκτροφόρηση, η παραλλαγή των νουκλεοτιδίων καταλαμβάνει μια διαφορετική θέση.

3.3.1 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΠΗΚΤΗΣ ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΙΟΥ

Η αρχή της συγκεκριμένης μεθόδου διαφέρει από την ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης για το λόγο ότι εδώ πρόκειται για κάθετη ηλεκτροφόρηση. Πλεονεκτεί στο ότι η πηκτή πολυακρυλαμίδης έχει μεγαλύτερη διαχωριστική ικανότητα και τα αποτελέσματα διαχωρισμού είναι πιο ευδιάκριτα. Επίσης, τα δείγματά στα πηκτώματα μπορούν να διατηρηθούν για μεγάλο χρονικό διάστημα σε θερμοκρασία δωματίου.

Για δύο πηκτώματα πολυακρυλαμίδιου πυκνότητας 12% και όγκου 130 ml χρησιμοποιήθηκαν:

- 15 gr Ακρυλαμίδιο
- 0,375 gr Δις-Ακρυλαμίδιο
- 10 ml TBE 10x
- 12,5 ml Γλυκερόλη 50%

- 125 μl TEMED
 - 650 μl APS
- *Διαδικασία*
 - Προετοιμάστηκε η συσκευή παρασκευής της πηκτής.
 - Σε ποτηράκι ζέσεως έγινε καλή ανάδευση με μαγνητάκι στα υλικά εκτός από TEMED, APS.
 - Έγινε φιλτράρισμα με διηθητικό χαρτί και σε έναν ογκομετρητή το περιεχόμενο του ποτηριού (ροή σταγόνας), συμπληρώθηκε μέχρι τα 100 ml με ddH₂O και μεταφέρθηκε το διάλυμα σε κωνική φιάλη.
 - Προστέθηκαν και τα υπόλοιπα ώστε να αρχίσει ο πολυμερισμός της ακρυλαμίδης (TEMED, καταλύει το σχηματισμό ελεύθερων ριζών από το APS και APS που ξεκινάει τον πολυμερισμό).
 - Έγινε γρήγορη περίχυση του διαλύματος στη συσκευή ηλεκτροφόρησης και τοποθετήθηκαν τα χτενάκια δημιουργίας πηγαδιών.
 - Σταθεροποιήθηκε η πηκτή, αφαιρέθηκαν τα χτενάκια και καθαρίστηκαν με βελόνα τα πηγάδια.
 - Προστέθηκε buffer TBE 0.5x στη συσκευή.
 - Τοποθετήθηκαν τα δείγματα στα πηγάδια και άρχισε η ηλεκτροφόρηση στα 220V.

3.3.2 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΚΑΙ ΑΠΟΔΙΑΤΑΞΗ ΤΩΝ PCR ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ

Σε eppendorf του 0,5 ml έγινε προσθήκη 5 μl PCR προϊόντος και 10 μl αποδιατακτικού διαλύματος. Το αποδιατακτικό διάλυμα στα 3 ml περιείχε:

- 95% φορμαμίδιο
- 20 mM EDTA
- 10 mM NaOH
- 0,05 % κυανό του ξυλενίου
- 0,05 % κυανό της βρωμοφαινόλης

Ακολούθησε αποδιάταξη των δειγμάτων σε θερμικό κυκλοποιητή σύμφωνα με το ακόλουθο πρόγραμμα:

- ✓ 92° C για 2 λεπτά
- ✓ 95° C για 2 λεπτά
- ✓ 97° C για 7 λεπτά

Ακολούθως και πριν ολοκληρωθεί το τελευταίο στάδιο, έγινε τοποθέτηση των δειγμάτων απ' ευθείας στον πάγο για την αποφυγή της επαναδιάταξης των μονόκλωνων μορίων DNA. Στη συνέχεια έγινε φόρτωση των αποδιεταγμένων δειγμάτων στο πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου αφού προηγήθηκε η προσθήκη στη συσκευή με ρυθμιστικό διάλυμα TBE 0,5x. Η ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων έγινε σε τάση 220 V για 22 ώρες και θερμοκρασία 4° C. Για τη λήψη αποτελεσμάτων ακολούθησε χρώση του πηκτώματος με νιτρικό άργυρο.

3.3.3 ΑΠΟΔΙΑΤΑΞΗ ΚΑΙ ΦΟΡΤΩΜΑ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

- ❖ Σε eppendorfs των 0,5 ml προστέθηκαν 5 μl προϊόντος PCR και 10 μl ρυθμιστικό διάλυμα αποδιάταξης (Denaturation Buffer)
- ❖ Σε Θερμικό Κυκλοποιητή με εφαρμογή ειδικού προγράμματος αποδιάταξης, αποδιατάσσονται πλήρως τα δίκλιωνα μόρια DNA. Πριν ολοκληρωθεί το τελευταίο στάδιο τα δείγματα εξήλθαν από τη συσκευή και τοποθετήθηκαν αμέσως σε πάγο, για την αποφυγή της επαναδιάταξης των μονόκλωνων μορίων DNA.
- ❖ Έπειτα τα δείγματα φορτώθηκαν στις πηκτές, οι οποίες βρίσκονται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης. Η συσκευή ηλεκτροφόρησης τοποθετήθηκε στο ψυγείο. Τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν για 16 – 22 h στα 220Volts.

3.3.4 ΧΡΩΣΗ ΠΗΚΤΩΜΑΤΟΣ ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΗΣ ΜΕ ΔΙΑΛΥΜΑ ΝΙΤΡΙΚΟΥ ΑΡΓΥΡΟΥ

Ακολούθησε η χρώση των πηκτωμάτων, η οποία περιλαμβάνει πλύσεις με τρία διαφορετικά διαλύματα με σκοπό την εμφάνιση των ζωνών στο πήκτωμα. (για 2 πηκτώματα)

1^ο διάλυμα:

- Σε ογκομετρικό κύλινδρο έγινε προσθήκη 800 ml ddH₂O, 20 ml αιθανόλης 100% και 1ml οξικού οξέως
- Ακολούθησε ανακίνηση και η πρώτη πλύση με προσθήκη 200 ml του διαλύματος σε κάθε πήκτωμα για 3 λεπτά
- Τοποθέτηση των πηκτωμάτων στον αναδευτήρα
- Απομάκρυνση του διαλύματος μετά τα 3 λεπτά
- Προσθήκη ξανά 200 ml διαλύματος σε κάθε πήκτωμα για 3 λεπτά για να γίνει μια δεύτερη πλύση και έπειτα απομάκρυνση του διαλύματος
- Ακολούθησαν 2 φορές πλύσεις με ddH₂O για 1 λεπτό

2^ο διάλυμα:

- Σε ογκομετρικό κύλινδρο έγινε προσθήκη 400 ml διαλύματος νιτρικού αργύρου
- Τοποθέτηση των πηκτωμάτων στον αναδευτήρα
- Προσθήκη σε κάθε πήκτωμα από 200 ml διαλύματος για 20 λεπτά
- Ξέπλυμα των πηκτωμάτων 2 φορές με ddH₂O

3^ο διάλυμα:

- Προσθήκη σε ποτήρι ζέσεως 6 gr NaOH, 0,02 gr NaBH₄, 2 ml φορμαλδεΐδης και συμπλήρωση με ddH₂O μέχρι ο τελικός όγκος του διαλύματος να φθάσει 400ml
- Προσθήκη 200 ml διαλύματος σε κάθε πήκτωμα
- Τοποθέτηση των πηκτωμάτων στον αναδευτήρα
- Παραμονή των πηκτωμάτων στο διάλυμα μέχρι την εμφάνιση των ζωνών
- Απομάκρυνση του διαλύματος και μια πλύση με ddH₂O

Στο τέλος της διαδικασίας τα πηκτώματα πολυακρυλαμιδίου συσκευάστηκαν σε διαφανείς μεμβράνες για να γίνει η σύγκριση των αποτελεσμάτων. Έγινε επιλογή

των δειγμάτων που εμφάνισαν διαφορετικά πρότυπα ηλεκτροφόρησης και ακολούθησε η διαδικασία του καθαρισμού των PCR προϊόντων των επιλεγμένων δειγμάτων, ώστε να σταλούν για αλληλούχιση.

3.4 ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ DNA

Αρχικά, τα δείγματα που εμφάνισαν διαφορετικά πρότυπα πριν σταλούν για ταυτοποίηση της DNA αλληλουχίας τους (DNA sequencing), υπόκεινται σε καθαρισμό.

3.4.1 ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ PCR ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ

Η διαδικασία του καθαρισμού των PCR προϊόντων έγινε με το Purelink™ PCR Purification Kit της Invitrogen. Το πρωτόκολλο καθαρισμού που ακολουθήθηκε είναι:

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

9. Τέλος, φυγοκέντρωση για 1,5 λεπτό στις 13.000 rpm για ανάκτηση του καθαρισμένου DNA από τα erpendorf.

3.4.2 ΦΩΤΟΜΕΤΡΗΣΗ

Αφού ολοκληρώθηκε η διαδικασία του καθαρισμού των PCR προϊόντων ακολουθεί η διαδικασία της φωτομέτρησης 1 ml κάθε δείγματος DNA αραιωμένο με 49 ml ddH₂O. Έγινε υπολογισμός της συγκέντρωσης του δείγματος ανάλογα με τις τιμές φωτομέτρησης και τα δείγματα στάλθηκαν για αλληλούχιση. Στη συνέχεια έγινε η αποστολή των δειγμάτων σε λυοφιλιωμένη μορφή.

3.4.3 ΛΥΟΦΙΛΙΩΣΗ

Η διαδικασία της λυοφιλίωσης περιλαμβάνει:

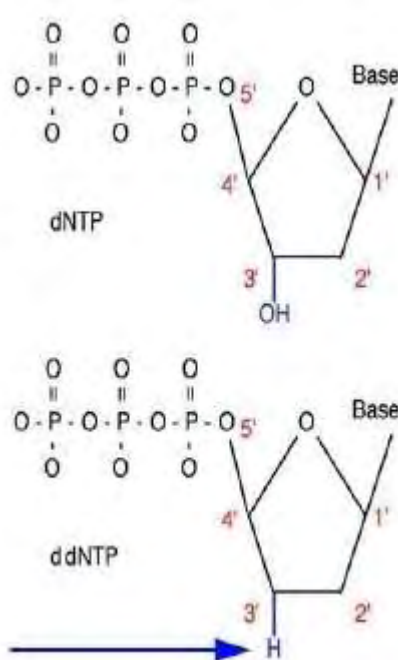
1. Προσθήκη 300 ml παγωμένης αιθανόλης 100% και 10ml NaOAc 3M
2. Ελαφρά ανάδευση και τοποθέτηση στους -20°C overnight
3. Φυγοκέντρωση των δειγμάτων στους 4°C στις 13000rpm για 20 λεπτά
4. Απομάκρυνση του υπερκείμενου
5. Τοποθέτηση των δειγμάτων στο φούρνο, στους 37°C, για περίπου 1 ώρα, μέχρι την απομάκρυνση της αιθανόλης.

Με την αποστολή των δειγμάτων έγινε και η αποστολή των κατάλληλων εκκινητών σε συγκέντρωση 10 pmol/ml για την διαδικασία της αλληλούχισης.

3.5 ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗ

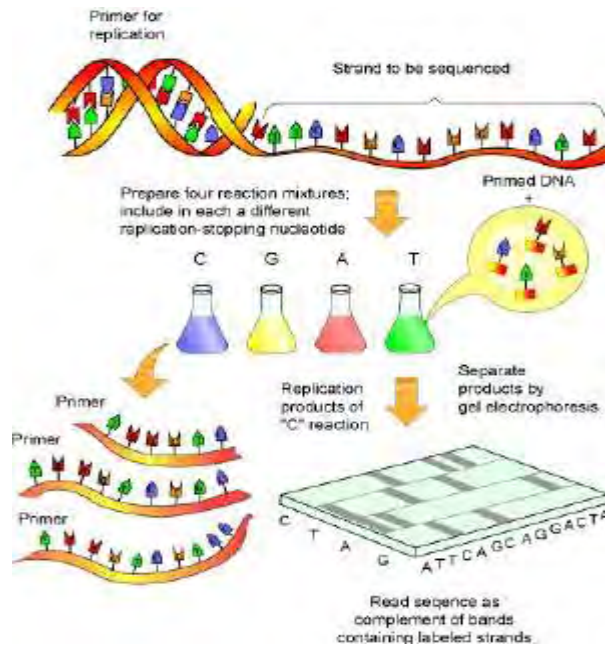
- *Μέθοδος τερματισμού νουκλεοτιδικής αλυσίδας με δι-δεοξυνουκλεοτίδια – Μέθοδος κατά Sanger-*

Το προς ανάλυση τμήμα του DNA χρησιμεύει ως εκμαγείο για τη σύνθεση αντιγράφων τα οποία έχουν το ίδιο σημείο έναρξης αλλά διακόπτονται σε διαφορετικά σημεία. Η αρχή της μεθόδου κατά Sanger βασίζεται στην εισαγωγή τροποποιημένων δεσοξυνουκλεοτιδίων που ονομάζονται διδεσοξυνουκλεοτίδια ddNTP. Το υδρογόνο αντί υδροξυλίου στη θέση 3' της δεσοξυριβόζης και η ενσωμάτωσή τους στη νεοσυντιθέμενη αλυσίδα εμποδίζει την περαιτέρω επιμήκυνση της καθώς δεν είναι εφικτός ο σχηματισμός φωσφοδιεστερικού δεσμού. (εικόνα 5)



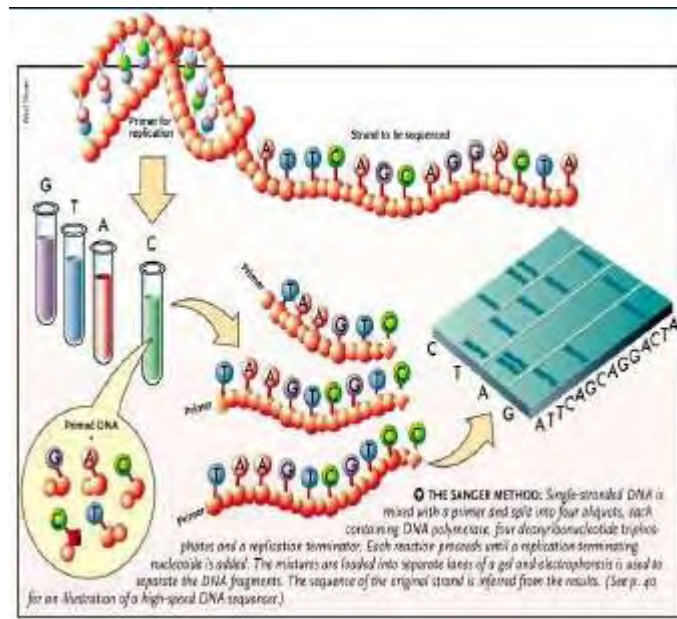
Εικόνα 5: Αντικατάσταση του υδροξυλίου με υδρογόνο στη μέθοδο Sanger

Σύμφωνα με την διαδικασία της μεθόδου κατά Sanger πραγματοποιούνται παράλληλα τέσσερις διαφορετικές αντιδράσεις αντιγραφής της αλληλουχίας που χρησιμοποιείται ως εκμαγείο από την DNA πολυμεράση. Απαιτείται συνθετικό ολιγονουκλεοτίδιο, συμπληρωματικό του αρχικού τμήματος που χρησιμεύει ως εκκινητής (primers). Κάθε μία από τις τέσσερις αντιδράσεις περιέχει ένα διαφορετικό ddNTP αλλά όλα τα dNTP, ένα εκ των οποίων οφείλει να είναι ραδιοσημασμένο. (εικόνα 6)



Εικόνα 6: Διαδικασία μεθόδου κατά Sanger

Καθώς αρχίζει ο πολυμερισμός του εκκινήτη, οι θέσεις για παράδειγμα της κυτοσίνης καταλαμβάνονται από το φυσιολογικό dC, οπότε εξακολουθεί ο πολυμερισμός, αλλά που και που γίνεται ενσωμάτωση ddC, οπότε έχουμε λήξη του πολυμερισμού. Παρόμοιες επώσεις γίνονται παρουσία του καθενός από τα υπόλοιπα διδεοξυριβονοκλεοτίδια με αποτέλεσμα τη λήξη του πολυμερισμού στις θέσεις G, A ή T. Θα προκύψει ένα μίγμα από σεσημασμένες αλυσίδες, που τελειώνουν με ένα ddNTP στο 3' άκρο, τα μήκη των οποίων εξαρτώνται από τη σχετική θέση της συγκεκριμένης βάσης από το άκρο του DNA. Ακολουθεί διαχωρισμός με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης και λήψη αποτυπώματος σε φιλμ. (εικόνα 3)



Εικόνα 7: Διαχωρισμός με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης και λήψη αποτυπώματος σε φιλμ

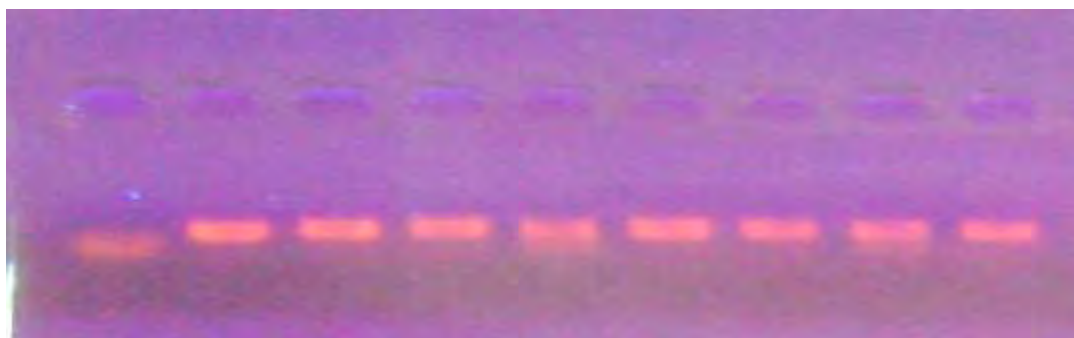
Σήμερα χρησιμοποιούνται ευρέως συστήματα αυτόματης ανάλυσης της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας όπου εφαρμόζεται η μέθοδος κατά Sanger αλλά στην πρώτη φάση γίνεται εκθετικός πολλαπλασιασμός του DNA-στόχου με PCR. Χρησιμοποιούνται τέσσερις διαφορετικές φθορίζουσες χρωστικές, μια για κάθε βάση, laser για την διέγερση των φθοριοχρωμάτων, ανιχνευτές για τη συλλογή των εκπομπών. Τα τελικά προϊόντα ηλεκτροφορούνται όλα μαζί για να μειώνονται τα προβλήματα που οφείλονται στη διαφορετική ηλεκτροφορητική κινητικότητα από σειρά σε σειρά του πηκτώματος. Τα συστήματα αυτά διαθέτουν ειδικά software, τα οποία δίνουν σε σύντομο χρονικό διάστημα το αποτέλεσμα.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα εργασία, χρησιμοποιήθηκαν 20 δείγματα αίματος από ασθενείς που πάσχουν από τη νόσο του διαβήτη. Τα δείγματα αίματος συλλέχθηκαν από το Περιφερειακό Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας. Σκοπός της εργασίας ήταν η ανίχνευση και η ταυτοποίηση μεταλλάξεων στα μιτοχονδριακά γονίδια tRNA^{Trp} και tRNA^{Ala} στους ασθενείς αυτούς. Για την ανίχνευση και ταυτοποίηση των μεταλλάξεων ακολουθήθηκε μία πειραματική διαδικασία η οποία περιλάμβανε αρχικά την απομόνωση του DNA από τα κύτταρα του αίματος, ακολούθησε η ενίσχυση των δειγμάτων με τη μέθοδο της PCR χρησιμοποιώντας τους κατάλληλους εκκινητές και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ανάλυση με τη μέθοδο της SSCP για την κατάταξη των δειγμάτων σε πρότυπα, ανάλογα με την ηλεκτροφορητική τους ικανότητα. Στη συνέχεια, τα δείγματα στα οποία ανιχνεύθηκαν μεταλλάξεις και πολυμορφισμοί, στάλθηκαν για ταυτοποίηση με τη μέθοδο της αυτόματης αλληλούχισης. Η μέθοδος αυτή διεκπεραιώθηκε στο τμήμα Ιατρικής Σχολής Θεσσαλίας και τα αποτελέσματα στη συνέχεια μελετήθηκαν για την αναζήτηση στις αλληλουχίες των πιθανών μεταλλάξεων.

4.1 Ενίσχυση με PCR των γονιδίων Trp και Ala του mtDNA

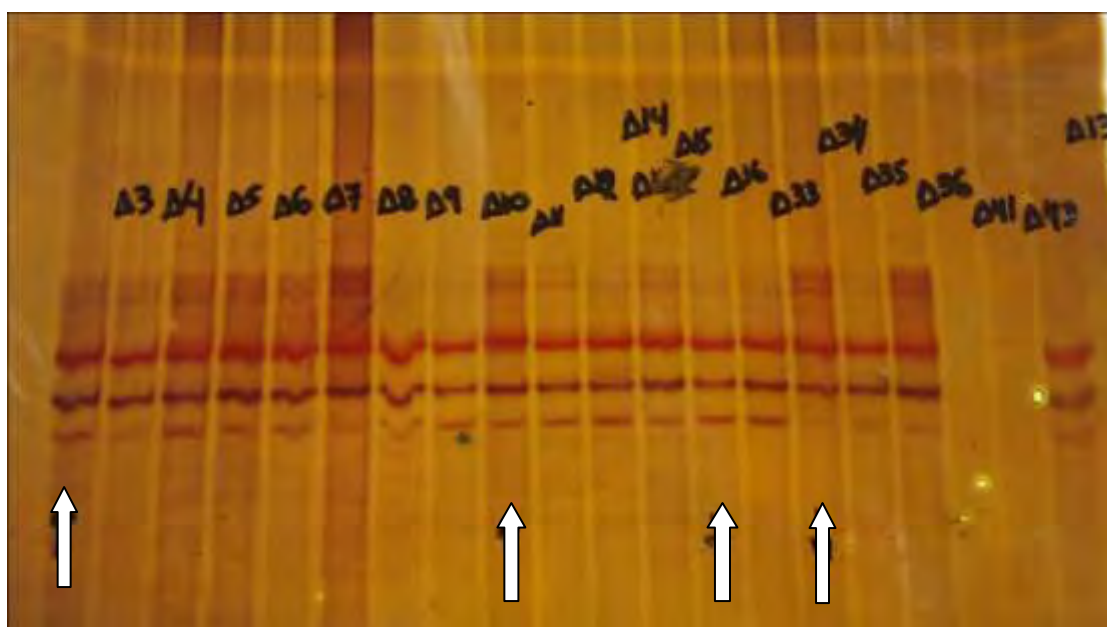
Το ζεύγος εκκινητών FwTA και RevTA χρησιμοποιήθηκε για να ενισχυθεί το τμήμα των 242 bp που κωδικοποιεί τα γονίδια tRNA^{Trp} και tRNA^{Ala}. Πραγματοποιήθηκε έλεγχος στα αποτελέσματα της PCR με ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αгарόζης ώστε να επιβεβαιωθεί ότι το τμήμα που ενισχύθηκε είναι το επιθυμητό (242 bp).



Εικόνα 7: Απεικονίζεται το πήκτωμα αγαρόζης όπου στο 1^ο πηγάδι το Negative Control, είναι καθαρό και έτσι διαπιστώνεται ότι δεν υπήρχε επιμόλυνση. Στα υπόλοιπα πηγάδια απεικονίζονται τα ενισχυμένα μιτοχονδριακά τμήματα DNA τα οποία προέρχονται από ασθενείς με διαβήτη.

4.2 Ανάλυση δειγμάτων με τη μέθοδο SSCP

Ακολούθησε η μέθοδος SSCP έτσι ώστε να διαχωριστούν σε πρότυπα ανάλογα με την ηλεκτροφορητική τους ικανότητα. Παρακάτω απεικονίζεται το πήκτωμα πολυακρυλαμίδης της ανάλυσης SSCP.



Εικόνα 8: Απεικονίζεται το πήκτωμα πολυακρυλαμίδης και με τα άσπρα βελάκια απεικονίζονται τα δείγματα τα οποία στάλθηκαν για αλληλούχιση.

4.3 Ταυτοποίηση μεταλλάξεων

Τα δείγματα τα οποία παρουσίασαν διαφορετικό πρότυπο στην ανάλυση SSCP στάλθηκαν για αλληλούχιση. Με τη βοήθεια χρωματογραφημάτων στον ιστότοπο με διεύθυνση www.mitomap.org , ταυτοποιήθηκαν μεταλλάξεις στα δείγματα Δ11 και Δ34. Συγκεκριμένα:

- **Δείγμα Δ11**

Στο δείγμα Δ11 παρατηρήθηκε μετάλλαξη στη θέση 5656, με αντικατάσταση της A (αδενίνης) από G (γουανίνη).

- **Δείγμα Δ34**

Στο δείγμα Δ34 παρατηρήθηκε μετάλλαξη στη θέση 5693 με αντικατάσταση της T (θυμίνης) από G (γουανίνη).

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε για την ανίχνευση και ταυτοποίηση μεταλλάξεων στα μιτοχονδριακά γονίδια tRNA σε ασθενείς που πάσχουν από διαβήτη με σκοπό να διαπιστώσουμε το ρόλο των μεταλλάξεων του mtDNA στη δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων και πως αυτή μπορεί να ευθύνεται για την εμφάνιση της νόσου του σακχαρώδους διαβήτη.

Οι μεταλλάξεις που εντοπίστηκαν στους ασθενείς δεν είναι καταχωρημένοι στη βάση δεδομένων του mitomap και δεν υπάρχει καμία αναφορά στη βιβλιογραφία. Επομένως θα πρέπει να ερευνηθεί περισσότερο για να διαπιστωθεί πόσο συχνά εμφανίζεται και αν όντως σχετίζεται με τη νόσο του σακχαρώδους διαβήτη.

Για την πραγματοποίηση της παρούσας εργασίας χρησιμοποιήθηκαν δείγματα αίματος από 20 ασθενείς με διαβήτη από τα οποία απομονώθηκε μιτοχονδριακό DNA. Το ζεύγος εκκινητών FwTA και RevTA χρησιμοποιήθηκε για να ενισχυθεί το τμήμα των 242 bp που κωδικοποιεί τα γονίδια tRNA^{Trp} και tRNA^{Ala}. Στη συνέχεια, τα δείγματα αναλύθηκαν με τη μέθοδο SSCP για την κατάταξη τους σε πρότυπα ανάλογα με την ηλεκτροφορητική τους κινητικότητα. Με τη μέθοδο SSCP έγινε η ανίχνευση διάφορων νουκλεοτιδικών παραλλαγών. Τα δείγματα που παρουσίασαν διαφορετικό πρότυπο στην ανάλυση SSCP στάλθηκαν για αλληλούχιση.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα από την αλληλούχιση στους 20 ασθενείς με διαβήτη που μελετήθηκαν εντοπίστηκαν 2 μεταλλάξεις. Οι πολυμορφισμοί αυτοί εντοπίστηκαν στις ακόλουθες θέσεις A5656G και T5693G. Και οι δύο αυτοί πολυμορφισμοί δεν έχουν μέχρι στιγμής αναφερθεί στη δικτυακή βάση δεδομένων για το μιτοχόνδριο www.mitomap.org. Οι πολυμορφισμοί αυτοί είναι μοναδικοί, τα δείγματα των υπόλοιπων ασθενών που μελετήθηκαν δεν παρουσιάζουν κοινό πρότυπο, και εμφανίστηκαν με συχνότητα 2/20.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Avise J.C. 1991. Ten unorthodox perspectives on evolution prompted by comparative population genetic findings on mitochondrial DNA. *Annual Reviews of Genetics* 25: 45-69.
2. Avise J.C. 1994. *Molecular Markets, Natural History and Evolution*. Chamman and Hall, New York.
3. Beraiter-Hann J., Volth M. 1994 Dynamics of mitochondria in living cells: shape changes, dislocations, fusion and fission of mitochondria. *Microscopy Research Techniques* 27: 198-219
4. Carpenter MW, Coustan DR. Criteria for screening tests for gestational diabetes. *Am J Obstet Gynecol* 1982;144: 768-773.
5. Cavalier-Smith T. 1975. The origin of nuclei and eukaryotic cells. *Nature* 256 : 463-468.
6. Chamberlain, J.S., et al. 1990. Multiplex PCR for the diagnosis of Duchenne muscular dystrophy. In *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (M.A. Innis, et al., eds.). Academic Press, New York, pp. 272-281.
7. Committee on the Diagnosis and classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 1997; 20: 1183-97.
8. Duchen, M.R. (2004). Mitochondria in health and disease: perspectives on a new mitochondrial biology. *Mol Aspects Med*, pp. 365-451
9. Ferdinando Palmieri (2008). Diseases caused by defects of mitochondrial carriers: A review. 564-578
10. Gray M.W. 1992. The endosymbiotic hypothesis revisited. *International Reviews of Cytology* 141: 233-257.
11. Holt IJ, Harding AE, Morgan-Hughes JA. (1988). Deletions of musclemitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathies. *Nature* 331 , pp 717–19.
12. Labieniec M. & Watala C. (2010). Use of poly (amido).amine dendrimers in prevention of early non-enzymatic modifications of biomacromolecules. *Biochimie*, pp. 1296-1305
13. Luft R, Ikkos D, Palmieri G, Ernster L, Afzelius B (1962). A case of severe hypermetabolism of nonthyroid origin with a defect in the maintenance of

- mitochondrial respiratory control: a correlated clinical, biochemical, and morphological study. *J Clin Invest* 41, pp. 1776–1804
14. Margulis L. 1981. *Symbiosis in Cell Evolution: Life and Its Environment in the Early Earth*. Freeman, San Francisco.
 15. Mullis, K.B. 1990. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American* 262: 56-65.
 16. O'Sullivan JB, Mahan CM. Criteria for the oral glucose tolerance test in pregnancy. *Diabetes* 1964; 13: 278.
 17. Paabo, S., R.G. Higuchi, and A.C. Wilson. 1989. Ancient DNA and the polymerase chain reaction. *Journal of biological Chemistry* 264:9709-9712.
 18. Pavlakis SG, Phillips PC, DiMauro S, De Vivo DC, Rowland LP (1984). Mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes: a distinctive clinical syndrome. *Ann Neurol* 16, pp.4818.
 19. Scheffler I.E. 1999. *Mitochondria*. John Wiley & Sons, Inc., New York.
 20. Taanman Jan-Willem, The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication, *Biochimica et Biophysica Acta* 1999; 1410:103-123.
 21. The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus: Report of the Expert
 22. The Expert Committee on the Diagnosis and classification of Diabetes Mellitus: Follow-up report on the diagnosis of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2003; 26:3160-7.
 23. Turner, R.C, Cull, C.A, Frighi, V. & Holman. R.R. (1999). Glycemic control with diet, sulfonylurea, metformin, or insulin in patients with type 2 diabetes mellitus: progressive requirement for multiple therapies (UKPDS 49).. UK Prospective Diabetes Study (UKPDS). Group. *JAMA*, pp.2005-2012
 24. Uzzell T., Spolsky C. 1981. Two data sets: alternative explanations and interpretations. *Annals of the New Yorks Academy of Sciences* 361: 481-499.
 25. Εγχειρίδιο Βιοχημείας Αθανάσιος Γ. Παπαβασιλείου Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης 2007.
 26. Εγχειρίδιο Παθολογικής Ανατομικής Ευστράτιος Σ. Πατσούρης Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης 2007.

