

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**

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

**«ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ – ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ  
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ»**

**«ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ- ΜΟΡΙΑΚΗ  
ΓΕΝΕΤΙΚΗ, ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ»**

**ΒΗΧΟΥ ANNA**

**ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ ΣΕ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΑ t RNA  
ΓΟΝΙΔΙΑ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΔΙΑΒΗΤΗ**



**ΛΑΡΙΣΑ 2012**

«Ανίχνευση μεταλλάξεων σε μιτοχονδριακά t RNA γονίδια σε ασθενείς με διαβήτη»

### **Τριμελής Επιτροπή**

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

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

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

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την κ. Ζίφα Αιμιλία για την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με ένα θέμα ιδιαίτερα ενδιαφέρον το οποίο έχει ως στόχο την μελέτη τμήματος του μιτοχονδρίου σε σχέση με τον σακχαρώδη διαβήτη που είναι μία ασθένεια από την οποία νοσούν πολλοί άνθρωποι στις μέρες μας. Μέσα από την εργασία αυτή έμαθα πολλά νέα και ενδιαφέροντα πράγματα γύρω από την ασθένεια αυτή καθώς και νέες τεχνικές τις οποίες εφάρμοσα στο εργαστήριο στο πειραματικό μέρος της εργασίας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω επίσης τον κ. Σταμάτη Κώστα για την σημαντική καθοδήγησή του στην εκμάθηση όλων των καινούργιων τεχνικών που έπρεπε να εφαρμόσω στο εργαστήριο ώστε να πραγματοποιηθεί το πειραματικό μέρος της εργασίας. Καθώς και όλους τους διδακτορικούς, μεταπτυχιακούς και προπτυχιακούς φοιτητές οι οποίοι με βοήθησαν στην εφαρμογή των νέων τεχνικών που έπρεπε να πραγματοποιηθούν στο εργαστήριο.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου για την ηθική αλλά και ουσιαστική βοήθεια που μου προσέφεραν για να μπορέσω να ολοκληρώσω την πτυχιακή μου εργασία.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη .....	σελ7
Abstract .....	σελ8
1 Εισαγωγή .....	σελ9
1.1 Διαβήτης .....	σελ9
1.1.1 Τι είναι ο Διαβήτης .....	σελ9
1.1.2 Τύποι Σακχαρώδους Διαβήτη .....	σελ9
1.1.3 Ο ρόλος της ινσουλίνης .....	σελ10
1.1.4 Παράγοντες που συμβάλλουν στην εκδήλωση Διαβήτη .....	σελ11
1.1.5 Τα συμπτώματα του Διαβήτη .....	σελ12
1.1.6 Οι επιπτώσεις του Σακχαρώδους Διαβήτη στον οργανισμό .....	σελ13
1.2 Μιτοχόνδριο .....	σελ14
1.2.1 Τι είναι το Μιτοχόνδριο .....	σελ14
1.2.2 Δομή .....	σελ15
1.2.3 Γονιδίωμα .....	σελ16
1.2.4 Λειτουργία .....	σελ16
1.3 Μιτοχόνδριο και Μεταλλάξεις .....	σελ17
1.4 Διαβήτης και Μιτοχονδριακή Λειτουργία .....	σελ18
1.4.1 Η κλινική εικόνα του μιτοχονδριακού διαβήτη .....	σελ18
1.4.2 Παθοφυσιολογία μηχανισμών που οδηγούν στο διαβήτη .....	σελ20
1.4.3 Σχέση μεταλλάξεων και παθολογικών καταστάσεων .....	σελ21
1.4.4 Ο διαβήτης σε σχέση με την ηλικία του ατόμου .....	σελ23

2 Υλικά και Μέθοδοι .....	σελ26
2.1 Εξαγωγή και Απομόνωση του ολικού DNA .....	σελ 26
2.2 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1% .....	σελ27
2.3 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) .....	σελ29
2.3.1 Τι είναι η PCR .....	σελ30
2.3.2 Η αντίδραση .....	σελ31
2.3.3 Στάδια της PCR .....	σελ31
2.3.4 Πως δουλεύει η PCR .....	σελ32
2.3.5 Γιατί είναι χρήσιμη η PCR .....	σελ32
2.4 Οι παράγοντες από τους οποίους εξαρτάται η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης .....	σελ34
2.5 Μέθοδος Ανάλυσης Πολυμορφισμού Μονόκλωνης Διαμόρφωσης (SSCP) .....	σελ36
2.6 Παράμετροι ηλεκτροφόρησης SSCP .....	σελ40
2.7 Ομαδοποίηση των αποτελεσμάτων .....	σελ41
2.8 Καθαρισμός Προϊόντων PCR .....	σελ43
2.9 Φωτομέτρηση .....	σελ43
2.10 Λυοφιλίωση .....	σελ43
2.11 Προσδιορισμός της Νουκλεοτιδικής Αλληλουχίας μορίων DNA (Sequencing) .....	σελ44
3 Αποτελέσματα .....	σελ46
3.1 Απομόνωση DNA .....	σελ46
3.2 Ενίσχυση με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) .....	σελ46
3.3 Μέθοδος Ανάλυσης Πολυμορφισμού Μονόκλωνης Διαμόρφωσης (SSCP) .....	σελ47

3.4 Εύρεση Αλληλουχίας .....	σελ49
3.5 Επεξεργασία Αποτελεσμάτων .....	σελ49
3.6 Αποτελέσματα της μελέτης των μιτοχονδριακών t RNA γονιδίων της Θρεονίνης (T) και της Προλίνης (P) για τυχών μεταλλάξεις .....	σελ50
3.7 Αποτελέσματα της μελέτης των μιτοχονδριακών t RNA γονιδίων της Ασπαργίνης (A), της Κυστεΐνης (C ) και της Τυροσίνης (T) για τυχών μεταλλάξεις .....	σελ59
4 Συζήτηση .....	σελ61
Βιβλιογραφία .....	σελ65

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο σακχαρώδης διαβήτης είναι μία νόσος από την οποία ασθενεί μεγάλο ποσοστό του σημερινού πληθυσμού της γης. Είναι μία νόσος όπου τα ποσοστά των ανθρώπων που ασθενούν κάθε χρόνο αυξάνονται με γρήγορους ρυθμούς. Γι' αυτό το λόγο γίνονται πολλές έρευνες για να προσδιοριστούν οι αιτίες που τον προκαλούν, είτε αυτές βρίσκονται στον τρόπο ζωής του σύγχρονου ανθρώπου, είτε είναι θέμα γονιδίων. Στην εργασία αυτή ερευνήσαμε την μιτοχονδριακή φύση του σακχαρώδους διαβήτη. Μελετήσαμε πέντε t RNA γονίδια του μιτοχονδριακού γονιδιώματος (την Θρεονίνη, την Προλίνη, την Ασπαργίνη, την Κυστεΐνη, την Τυροσίνη) σε 102 δείγματα ατόμων που πάσχουν από σακχαρώδη διαβήτη καθώς και σε 40 δείγματα ατόμων που δεν πάσχουν από τη συγκεκριμένη νόσο. Τα δείγματα αίματος τα οποία μελετήσαμε μας παραχωρήθηκαν από το Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας. Με το υλικό αυτό ακολουθήσαμε στο εργαστήριο μία σειρά εργασιών η οποία μας οδήγησε στο να επεξεργαστούμε τα δείγματα και να εξάγουμε συμπεράσματα. Αρχικά από τα δείγματα αίματος εξήγαμε και απομονώσαμε το ολικό DNA. Στη συνέχεια με την Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR) πολλαπλασιάσαμε το τμήμα του DNA που επιθυμούσαμε και κατόπιν αφού ελέγξαμε ποιοτικά και ποσοτικά το αποτέλεσμα της PCR με τη μέθοδο της Ηλεκτροφόρησης σε πηκτή Αγαρόζης, εφαρμόζουμε τη Μέθοδο Ανάλυσης Πολυμορφισμού Μονόκλωνης Διαμόρφωσης (SSCP) όπου αποδιατάσσουμε την μονόκλωνη αλυσίδα και μπορούμε πλέον να μελετήσουμε τις πιθανές μεταλλάξεις σε επίπεδο γονιδίων. Τέλος με τη μέθοδο του Προσδιορισμού της Νουκλεοτιδικής Αλληλουχίας μορίων DNA (sequencing) κάνουμε ταυτοποίηση των μεταλλάξεων που προκύπτουν. Με τις παραπάνω μεθόδους λοιπόν οδηγηθήκαμε στο συμπέρασμα πως για τα άτομα που δεν πάσχουν από σακχαρώδη διαβήτη παρατηρήθηκαν 4 σημεία απόκλισης από το «κοινό πρότυπο». Τα σημεία αυτά είναι τα εξής G15928A, C15904T, A15924G και G15927A. Από αυτές τις μεταλλάξεις οι τρεις, οι G15928A, C15904T, A15924G παρουσιάζονται και στα άτομα που πάσχουν από σακχαρώδη διαβήτη. Την μετάλλαξη G15927A τη συναντάμε μόνο στα άτομα που δεν πάσχουν από τη συγκεκριμένη νόσο. Επίσης παρατηρούμε πως τα άτομα που πάσχουν από σακχαρώδη διαβήτη παρουσιάζουν και τα εξής σημεία απόκλισης από το «κοινό πρότυπο» A15903C, T15905A, A15954C, G16000A, A15878G. Οι μεταλλάξεις αυτές έχουν συσχετιστεί και με άλλες ασθένειες. Οι μόνες που δεν έχουν αναφερθεί ξανά είναι οι A15954C και C15904T. Με βάση τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης καθώς και σχετικών μελετών με αυτή, θα μπορούσαμε να προχωρήσουμε ένα βήμα πιο μακριά την έρευνα και να εξάγουμε συμπεράσματα που θα μας δώσουν σημαντικές απαντήσεις για τη νόσο του σακχαρώδους διαβήτη και της κληρονομικότητάς της.

## ABSTRACT

Diabetes is a disease which is found in a large percentage of the current population on earth. It is a disease where the proportions of people that sick every year grow rapidly. For this reason, a lot of research to identify the causes, whether they are in the lifestyle of modern man, or a matter of genes. In this study we investigated the nature of mitochondrial diabetes. We studied five tRNA genes of the mitochondrial genome (Treonin, Prolin, Aspargin, Cistein, Tirosin) in 102 samples of people with diabetes and in 40 samples of people who do not suffer from this disease. Blood samples which we studied were provided by the University Hospital of Larissa. With this material in workshop followed a series of operations which led us to process samples and draw conclusions. Originally from blood samples explains the isolated total DNA. Then with the Polymerase Chain Reaction (PCR) multiply the portion of DNA that we wanted and then after we checked qualitatively and quantitatively the results of PCR using the agarose gel electrophoresis, we apply the single-strand polymorphism method Modulation (SSCP) where break the single-chain and we can now study the possible mutations in the gene level. Finally using the sequencing molecules DNA (sequencing) we identified the mutations that arise. With these methods we were led to the conclusion that for people without diabetes were observed at 4 points of divergence from the "common standard". These points are as follows G15928A, C15904T, A15924G and G15927A. Of these three mutations, the G15928A, C15904T, A15924G presented to people suffering from diabetes. The G15927A mutation is found only in people who do not suffer from this disease. We also note that people suffering from diabetes and have the following points of divergence from the "common standard» A15903C, T15905A, A15954C, G16000A, A15878G. These mutations have been associated with other diseases. The only ones that have not been reported again are A15954C and C15904T. Based on the results of this study and other relevant studies, we could go one step further this research and draw conclusions that will give us important answers about the disease of diabetes and its heredity.



# 1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## 1.1 ΔΙΑΒΗΤΗΣ

### 1.1.1 Τι είναι ο Διαβήτης

Ο διαβήτης είναι μία χρόνια νόσος στο πλαίσιο της οποίας ο οργανισμός μας δεν παράγει ινσουλίνη ή δεν τη χρησιμοποιεί σωστά. Η ινσουλίνη είναι η ορμόνη που μεταβολίζει τα συστατικά των τροφών και βοηθά τον οργανισμό να χρησιμοποιεί την ενέργεια που παίρνει από σάκχαρα, άμυλα και άλλες τροφές. Έλλειψη αυτής έχει σαν αποτέλεσμα να μην πραγματοποιείται ο μεταβολισμός των συστατικών της τροφής, με αποτέλεσμα να μην παίρνει ο οργανισμός την ενέργεια που χρειαζόμαστε και το σάκχαρο που δεν έχει μεταβολισθεί (γλυκόζη) να συσσωρεύεται στο αίμα προκαλώντας βλάβες σε πολλά συστήματα. Η γλυκόζη αποτελεί ένα είδος σακχάρου που παράγεται όταν ο οργανισμός μας αφομοιώνει υδατάνθρακες (σάκχαρα και άμυλα). Η γλυκόζη είναι η βασική καύσιμη ύλη για την ενέργεια που χρειάζεται ο οργανισμός μας. Η διατήρηση της ομοιόστασης της γλυκόζης στον ανθρώπινο οργανισμό αποτελεί την ισορροπία ανάμεσα στην εμφάνιση και την απομάκρυνση της γλυκόζης. Όταν στο ανθρώπινο σώμα ανιχνεύονται σημαντικές αποκλίσεις από τα φυσιολογικά επίπεδα συγκέντρωσης της γλυκόζης, ρυθμίζεται η έκκριση ινσουλίνης. Βλάβες στη διαδικασία παγκρεατικής έκκρισης ινσουλίνης και στη δράση της ινσουλίνης στο ήπαρ και τους περιφερικούς ιστούς, οδηγούν στην εμφάνιση διαβήτη. Τα ηπατικά κύτταρα διαθέτουν υποδοχέα ινσουλίνης. Η σύνδεση του υποδοχέα με την ινσουλίνη ενεργοποιεί τη σύντηξη κυστιδίων Glu 4 με τη μεμβράνη και την πρόσληψη γλυκόζης. Όταν δεν υπάρχει ινσουλίνη ή όταν δεν χρησιμοποιείται αποτελεσματικά, τα επίπεδα σακχάρου στο αίμα αυξάνονται. Υψηλά επίπεδα σακχάρου στο αίμα μπορεί να προκαλέσουν τόσο βραχυπρόθεσμα όσο και μακροπρόθεσμα προβλήματα.

### 1.1.2 Τύποι Σακχαρώδους Διαβήτη

Συχνότερα γίνεται αναφορά στους δύο κύριους τύπους σακχαρώδη διαβήτη: τον τύπο 1 και τον τύπο 2. Αν θέλουμε όμως να συμπληρώσουμε την κατάταξη πρέπει να βάλουμε και τον διαβήτη της κήσης, καθώς και αρκετούς «ειδικούς» τύπους διαβήτη.

Αναλυτικότερα:

-Διαβήτης τύπου 1: Είναι ο τύπος που παλαιότερα λεγόταν «β-ινσουλινοεξαρτώμενος» ή «νεανικός» σακχαρώδης διαβήτης. Σε αυτόν τον τύπο, τα β- κύτταρα του παγκρέατος που είναι υπεύθυνα για την παραγωγή της ινσουλίνης

καταστρέφονται με αυτοάνοσο μηχανισμό, με αποτέλεσμα η ινσουλίνη να ελαττώνεται και πολύ σύντομα να λείπει τελείως.

-Διαβήτης τύπου 2: Αναφέρεται συχνά ως «τύπος ενηλίκου». Ο διαβήτης τύπου 2 είναι αποτέλεσμα δύο διαταραχών όπου αφενός υπάρχει «αντίσταση» στην ινσουλίνη, δηλαδή η ινσουλίνη που υπάρχει στον οργανισμό δεν καταφέρνει να δράσει διότι τα κύτταρα των ιστών και των οργάνων αντιστέκονται στην υπάρχουσα ποσότητα και ζητούν μεγαλύτερη ποσότητα ινσουλίνης για να μπορέσει να δράσει η γλυκόζη και αφετέρου υπάρχει μειωμένη δυνατότητα του παγκρέατος να αυξήσει την παραγωγή της ινσουλίνης όσο απαιτούν οι ιστοί και τα όργανα.

Υπάρχει όμως και μια ενδιάμεση κατάσταση, που είναι ο λεγόμενος τύπος LADA (Latent Autoimmune Diabetes in Adults), ο οποίος μοιάζει με τον τύπο 2 στην εκδήλωσή του, αλλά τελικά ο μηχανισμός που τον προκαλεί είναι αυτός του τύπου 1 (απλά σε ηπιότερη μορφή ή με πιο αργή εξέλιξη).

-Ο διαβήτης της κύησης: Είναι ο διαβήτης που πρωτοεμφανίζεται σε γυναίκες κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης τους (συνήθως κατά το δεύτερο μισό της εγκυμοσύνης). Όταν η εγκυμοσύνη ολοκληρωθεί μπορεί ο διαβήτης να παρέλθει, μπορεί όμως και να παραμείνει.

-Άλλοι ειδικοί τύποι: Εδώ εντάσσονται οι τύποι που οφείλονται σε διάφορες ειδικές γενετικές διαταραχές (όπως διάφοροι τύποι «MODY», Maturity Onset Diabetes of the Young), σε συγκεκριμένες παθήσεις του παγκρέατος (παγκρεατίτιδα, τραύματα, καρκίνο κ.ά.), σε παθήσεις διαφόρων ενδοκρινών αδένων (επινεφρίδια, θυρεοειδής κ.ά.), σε λήψη φαρμάκων (κορτιζόνη, διουρητικά κ.ά.), σε ειδικά γενετικά σύνδρομα (πχ σύνδρομο Down) και πολλά άλλα.

### 1.1.3 Ο ρόλος της ινσουλίνης

Η ινσουλίνη είναι μια ορμόνη που παράγεται από το πάγκρεας. Παίζει κύριο ρόλο στο μεταβολισμό των συστατικών της τροφής, δηλαδή των λιπών, των πρωτεϊνών και κυρίως των υδατανθράκων (όπως είναι η γλυκόζη). Η ινσουλίνη λοιπόν επιτρέπει στη γλυκόζη που έχει απορροφηθεί από τις τροφές να εισέλθει μέσα στους ιστούς των διαφόρων οργάνων. Έτσι η γλυκόζη αφενός απομακρύνεται από την κυκλοφορία και αφετέρου μέσα στα κύτταρα συμμετέχει σε απαραίτητες αντιδράσεις με κυριότερο σκοπό την παραγωγή ενέργειας. Όταν λοιπόν η ινσουλίνη λείπει, αθροίζεται μεγάλη ποσότητα γλυκόζης στο αίμα, όμως στα κύτταρα των οργάνων παρατηρείται έλλειψη αυτής.

Αναλυτικότερα η ινσουλίνη είναι μια ορμόνη μέλος της οικογένειας των πεπτιδίων που ονομάζονται ινσουλινόμορφοι αυξητικοί παράγοντες. Το μητρικό μόριο της ινσουλίνης, δηλαδή η προ-προϊνσουλίνη με M.B. 11500 Daltons, συντίθεται στο αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο των β-κυττάρων του παγκρέατος. Με την επίδραση μικροσωματικών ενζύμων διασπάται στην προϊνσουλίνη με M.B. περίπου 9000 Daltons σχεδόν αμέσως μετά τη σύνθεσή του. Η προϊνσουλίνη μεταφέρεται στη συσκευή Golgi όπου «συσκευάζεται» σε εκκριτικά κοκκία καλυμμένα με την πρωτεΐνη «κλαθρίνη». Η ωρίμανση των εκκριτικών κοκκίων

σηματοδοτείται από την απώλεια της κλαθρίνης και μετατροπή του μορίου της προϊνσουλίνης σε ινσουλίνη και ενός μικρότερου πεπτιδίου (C-πεπτιδίο) με πρωτεολυτική διάσπαση. Τα φυσιολογικά ώριμα εκκριτικά κοκκία περιέχουν ισομοριακές ποσότητες ινσουλίνης και C- πεπτιδίου. Το μόριο της ινσουλίνης αποτελείται από δύο αλυσίδες, την α-αλυσίδα και τη β- αλυσίδα. Η α-αλυσίδα περιλαμβάνει 21 κατάλοιπα αμινοξέων και έχει ένα ενδοαλυσιδικό δισουλφιδικό δεσμό. Η β-αλυσίδα περιέχει 30 κατάλοιπα αμινοξέων. Υπάρχουν επίσης δύο δισουλφιδικοί δεσμοί που ενώνουν τις δύο αλυσίδες. Ο υποδοχέας της ινσουλίνης είναι μια μεγάλη διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη που αποτελείται από δύο α-αλυσίδες (135.000 daltons) και από δύο β-αλυσίδες (95.000 daltons). Οι α-αλυσίδες είναι εξωκυττάρειες και περιέχουν το σημείο αναγνώρισης από την ινσουλίνη ενώ οι β-αλυσίδες είναι διαμεμβρανικές και το ενδοκυττάριο άκρο τους έχει ιδιότητες κινάσης τυροσινικής. Με τη σύνδεση της ινσουλίνης, οι υποδοχείς εμφανίζουν αλλαγές στη διαμόρφωσή τους, σχηματίζουν ετεροδιμερή που συγκρατούνται με δισουλφιδικούς δεσμούς και στη συνέχεια το ετεροδιμερές αυτό εισέρχεται στο κυτταρόπλασμα. (Κόκκα Π. 2010)

### 1.1.4 Παράγοντες που συμβάλλουν στην εκδήλωση Διαβήτη

Υπάρχουν κάποιες λίγες περιπτώσεις όπου η αιτιολογία του διαβήτη είναι πολύ συγκεκριμένη όπως στους διάφορους «ειδικούς» τύπους διαβήτη. Οι παράγοντες όμως που συμβάλλουν στο να εκδηλώσει κάποιος διαβήτη είναι συνήθως πολλοί και δρουν ταυτόχρονα. Αναλυτικότερα:

- Για τον διαβήτη τύπου 1:

Η κληρονομικότητα είναι αυτή που παίζει το μεγαλύτερο ρόλο στην προδιάθεση ενός ατόμου να αναπτύξει διαβήτη. Ωστόσο πολλοί διαβητικοί τύπου 1 δεν είχαν στο οικογενειακό τους περιβάλλον κανέναν συγγενή που να πάσχει από διαβήτη. Όταν η πιθανότητα ενός παιδιού να εμφανίσει διαβήτη τύπου 1 είναι γενικά 0,5-1%, αυτή γίνεται περίπου 2% αν η μητέρα του έχει διαβήτη τύπου 1, περίπου 6% αν πάσχει ο πατέρας και περίπου 15-20% αν πάσχουν και οι δύο γονείς.

Εκτός από την κληρονομικότητα παίζει και το περιβάλλον μεγάλο ρόλο στην προδιάθεση ενός ατόμου να αναπτύξει διαβήτη, χωρίς όμως να υπάρχουν στοιχεία για συγκεκριμένους παράγοντες. Έχουν γίνει υποθέσεις για διάφορους ιούς και χημικές ουσίες, που μπορεί να γίνουν η αφορμή για να ξεκινήσει η αυτοάνοση διαδικασία που θα οδηγήσει στο διαβήτη. Έχει αναφερθεί πως είναι πιθανό να αυξάνεται ο κίνδυνος εμφάνισης διαβήτη όταν ένα μωρό τρέφεται από πολύ νωρίς με αγελαδινό γάλα. Αντιθέτως, έχει αποδειχθεί πως κανένα ρόλο δεν παίζει η κατανάλωση πολλών γλυκών και ζάχαρης.

- Για τον διαβήτη τύπου 2:

Η κληρονομικότητα παίζει σημαντικό ρόλο και στην ανάπτυξη διαβήτη τύπου 2 και είναι πιθανό σημαντικότερο ρόλο απ' ότι στον διαβήτη τύπου 1. Η πιθανότητα που έχει κάποιος να εμφανίσει διαβήτη τύπου 2 όταν δεν έχει συγγενείς που πάσχουν, πολλαπλασιάζεται περίπου 5-10 φορές αν πάσχει κάποιος συγγενής 1ου βαθμού. Η προδιάθεση αυτή μπορεί να αφορά και την αυξημένη «αντίσταση» στην ινσουλίνη

και την ελαττωματική έκκριση ινσουλίνης που είναι οι δύο διαταραχές που συνεργάζονται για την εκδήλωση του διαβήτη.

Από τις επιδράσεις του περιβάλλοντος, φαίνεται ότι οι σημαντικότεροι παράγοντες είναι η παχυσαρκία και η καθιστική ζωή. Είναι οι δύο παράγοντες που αυξάνουν ακόμα περισσότερο την «αντίσταση» στην ινσουλίνη ή θα μπορούσαμε να πούμε πως μειώνουν την «ευαισθησία» στην ινσουλίνη). Μπορεί να είναι οι παράγοντες που θα κάνουν τη διαφορά μεταξύ μιας κατάστασης όπου απλά υπάρχει μειονεκτική έκκριση ινσουλίνης και της άλλης κατάστασης, του έκδηλου διαβήτη.

- Για τον διαβήτη της κύησης:

Μπορούμε να πούμε πως υπεύθυνες για τον συγκεκριμένο τύπο διαβήτη είναι οι ορμόνες που παράγονται κατά το δεύτερο κυρίως μισό της εγκυμοσύνης και αυξάνουν την «αντίσταση» στην ινσουλίνη. Σε αντίθεση με τον διαβήτη τύπου 2 όπου η αυξημένη αντίσταση δεν είναι επιθυμητή, ο μηχανισμός αυτός κατά την εγκυμοσύνη είναι φυσιολογικός και απαραίτητος, με σκοπό να στέλνει η μητέρα περισσότερα θρεπτικά συστατικά στο έμβρυο. Όταν το πάγκρεας της μητέρας λειτουργεί φυσιολογικά, απλώς αυξάνει την ποσότητα της ινσουλίνης και καλύπτει τις ανάγκες των κυττάρων της. Όταν όμως το πάγκρεας δεν είναι σε θέση να δώσει την ποσότητα της ινσουλίνης που χρειάζεται, τότε πλέον εκδηλώνεται ο διαβήτης.

### **1.1.5 Τα συμπτώματα του διαβήτη**

Ο τύπος του διαβήτη είναι η κύρια αιτία που επηρεάζει τα συμπτώματα με τα οποία γίνεται φανερός ο διαβήτης. Γενικότερα ο διαβήτης τύπου 1 είναι αυτός που είναι πιθανότερο να εκδηλωθεί ξαφνικά (και σε μικρότερη ηλικία), με έντονα συμπτώματα, ενώ ο διαβήτης τύπου 2 συνήθως ακολουθεί πιο ήπια πορεία ή μπορεί να είναι ακόμα και τελείως ασυμπτωματικός.

Τα κλασικότερα συμπτώματα που μπορεί να παρουσιαστούν σε έναν ασθενή από οποιονδήποτε τύπο διαβήτη είναι:

- Πολλά ούρα. Αυτό οφείλεται στο ότι, όταν υπάρχει πολύ σάκχαρο στο αίμα, αυτό διαφεύγει και στα ούρα παρασύροντας και νερό.
- Απώλεια βάρους. Αυτό μπορεί να συμβεί, γιατί η έλλειψη ινσουλίνης αφήνει τα κύτταρα χωρίς θρεπτικά συστατικά και χωρίς ενέργεια. Έτσι ο ασθενής αδυνατίζει, όμως αυτό που χάνει δεν είναι λίπος, είναι κυρίως μυϊκή μάζα.
- Άλλα συμπτώματα που μπορεί να παρουσιαστούν είναι εύκολη κούραση (από έλλειψη ενέργειας), θολή όραση (από συσσώρευση γλυκόζης στο φακό του ματιού, η οποία προσελκύει και νερό και προκαλεί προσωρινό «φούσκωμα» του φακού), κράμπες στα πόδια, φαγούρα και μυκητιάσεις στα γεννητικά όργανα κ.ά.

Τα παραπάνω συμπτώματα μπορεί να λείπουν και τελείως όταν μιλάμε για ασθενή με διαβήτη τύπου 2. Οπότε δεν είναι καθόλου απίθανο η πρώτη εμφάνιση του

διαβήτη (ο οποίος μπορεί να «δουλεύει» αδιάγνωστος για 5, 10 ή και περισσότερα χρόνια) να γίνει με τα συμπτώματα κάποιας από τις επιπλοκές του.

### **1.1.6 Οι επιπτώσεις του σακχαρώδους διαβήτη στον οργανισμό**

Η ανάγκη έναρξης θεραπείας από τη στιγμή που θα διαγνωστεί ο διαβήτης είναι επιτακτική και σε ορισμένες περιπτώσεις που αφορούν κυρίως ασθενείς με διαβήτη τύπου 1 είναι και πολύ επείγουσα. Ο διαβητικός που δεν παίρνει θεραπεία είναι εκτεθειμένος στις επιπλοκές του διαβήτη, τόσο τις οξείες όσο και τις χρόνιες.

Οι οξείες επιπλοκές του διαβήτη μπορούν να συμβούν σε οποιοδήποτε σημείο της πορείας του και απαιτούν άμεση αντιμετώπιση. Οι κυριότερες είναι:

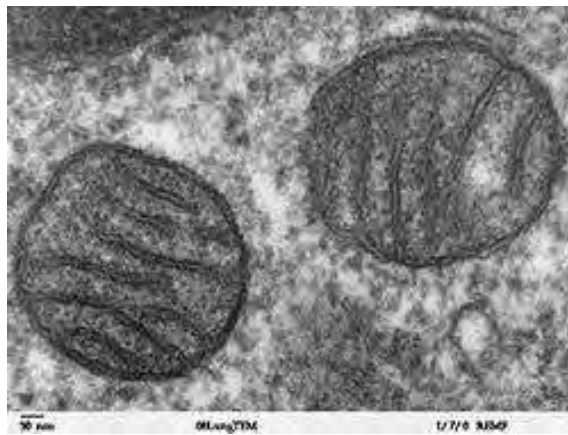
1. Διαβητική κετοξέωση
2. Υπερωσμωτική (μη κετωτική) κατάσταση

Οι χρόνιες επιπλοκές είναι αρκετά συχνές και συμβαίνουν συνήθως μετά το πέρασμα αρκετών χρόνων από την έναρξη του διαβήτη. Στην περίπτωση όμως του ασθενή με διαβήτη τύπου 2, δεν μπορεί κανένας να είναι σίγουρος πότε ακριβώς πραγματικά ξεκίνησε. Έτσι δεν είναι σπάνιο κάποιες από αυτές τις επιπλοκές να υπάρχουν ήδη κατά τη στιγμή της διάγνωσης. Ο καλύτερος τρόπος για να τις αποφύγει κάποιος είναι να φροντίζει να έχει πάντα τα επίπεδα της ινσουλίνης του μέσα στα ενδεδειγμένα πλαίσια. Οι κυριότερες χρόνιες επιπλοκές είναι:

1. Διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια
2. Διαβητική νεφροπάθεια
3. Διαβητική νευροπάθεια
4. Μακροαγγειοπάθεια
5. Διαβητικό πόδι

## 1.2 ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΟ

### 1.2.1 Τι Είναι Το Μιτοχόνδριο

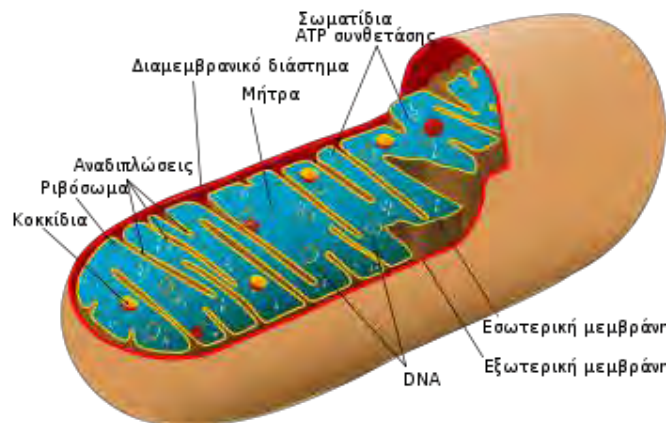


Εικ. 1 Μιτοχόνδριο

Το μιτοχόνδριο είναι κυτταρικό οργανίδιο, το οποίο περιβάλλεται από διπλή μεμβράνη. Μιτοχόνδρια απαντούν μόνο στα ευκαρυωτικά κύτταρα και αποκαλούνται συχνά "εργοστάσια του κυττάρου", επειδή τα ένζυμά τους διενεργούν τα στάδια του αερόβιου μεταβολισμού τα οποία αποδίδουν ενέργεια.

Τα μιτοχόνδρια σε μεγάλη ποσότητα εμφανίζονται σε κύτταρα με υψηλές απαιτήσεις σε ενέργεια όπως είναι τα μυϊκά κύτταρα και νευρικά κύτταρα. Στα μυϊκά κύτταρα της καρδιάς, έχουμε ένα ποσοστό μιτοχονδρίων του 36%. Κάθε μιτοχόνδριο περιλαμβάνει 2-10 αντίγραφα ενός δίκλωνου κυκλικού DNA, μήκους 16569 bp. Τα μιτοχόνδρια περιέχουν τουλάχιστο 689 διαφορετικές πρωτεΐνες. Ευκαρυωτικά κύτταρα, που θα χάσουν τα μιτοχόνδριά τους, δεν μπορούν πλέον να αναζωογονηθούν. Μέχρι σήμερα, έχουν γνωστοποιηθεί περίπου 50 ασθένειες οφειλόμενες στα μιτοχόνδρια οι λεγόμενες μιτοχονδριοπάθειες οι οποίες συμπεριλαμβάνονται στα μεταβολικά νοσήματα.

## 1.2.2 Δομή



Σχηματική απεικόνιση 1. Διάγραμμα Μιτοχονδρίου

Τα μιτοχόνδρια τα συναντούμε σε διάφορα μεγέθη και σχήματα. Περιβάλλονται από δύο μεμβράνες, την εξωτερική και την εσωτερική. Η εξωτερική τους μεμβράνη είναι λεία, έχει κυλινδρικό σχήμα. Αντίθετα η εσωτερική μεμβράνη είναι αναδιπλωμένη, σχηματίζει πολυάριθμες δισκοειδείς ή δακτυλιοειδείς πτυχώσεις και φέρει οξυσώματα που αποτελούνται από πολυενζυμικά συστήματα τα οποία και ευθύνονται για τη φωσφορυλίωση και την αναπνευστική αλυσίδα. Ο ενδιάμεσος χώρος μεταξύ των δύο μεμβρανών ονομάζεται διαμεμβρανικό διάστημα ή μεσομεμβρανικός χώρος του μιτοχονδρίου. Ο χώρος αυτός πληρούται από υγρό που χρησιμεύει στη λειτουργική επικοινωνία των δύο μεμβρανών.

Είναι ημιавтоνομα οργανίδια και διαθέτουν δικό τους DNA, έτσι ώστε να μπορούν να αναπαράγονται χωρίς να χρειάζεται να διαιρεθεί το κύτταρο. Η είσοδος των πρωτεϊνών στο μιτοχόνδριο πραγματοποιείται με τη βοήθεια ενός ειδικού σήματος και της κυτοσολικής συνοδού HSC70, η οποία αποτρέπει το πρώιμο δίπλωμα της πρωτεΐνης. Στη συνέχεια προσδένεται σε ένα πρωτεϊνικό σύμπλοκο της εξωτερικής μεμβράνης του μιτοχονδρίου (Tom Complex) και έπειτα στο εσωτερικό σύμπλοκο (Tim Complex). Μόλις φτάσει στη μήτρα του μιτοχονδρίου, μια πεπτιδάση αφαιρεί το ειδικό σήμα διαλογής. Εάν όμως η πρωτεΐνη έχει στόχο να ανγκυροβολήσει στις βιομεμβράνες του οργανιδίου, θα εμφανιστεί μετά την αποκοπή του σήματος διαλογής, ένα άλλο ειδικό σήμα θέσης.

### 1.2.3 Γονιδίωμα

Τα μιτοχόνδρια διαθέτουν δικό τους γονιδίωμα, το οποίο υπάρχει σε πολλά αντίγραφα. Το DNA τους είναι κυκλικό και διαθέτει έναν ανεξάρτητο κύκλο αναπαραγωγής (ημιαυτόνομα). Το μιτοχόνδριακο DNA κληρονομείται μόνο από τη μητέρα. Αυτό συμβαίνει επειδή το μαστίγιο του σπερματοζωαρίου, το οποίο φέρει τη συντριπτική πλειοψηφία των μιτοχονδρίων του, δεν εισέρχεται στο ωάριο κατά τη γονιμοποίηση και γι αυτό εκφυλίζεται. Κωδικοποιεί μόνο ένα υποσύνολο των πρωτεϊνών που χρειάζεται το μιτοχόνδριο το λεγόμενο mtDNA. Το mtDNA είναι δίκλωνο κυκλικό μόριο, 100-1000 φορές μικρότερο του πυρηνικού. Το mtDNA διαθέτει δύο μη κωδικές περιοχές: μία περιοχή ελέγχου που περιλαμβάνει τρεις υπερμεταβλητές περιοχές και μία περιοχή μετατόπισης, την D-loop, η οποία ελέγχει την αντιγραφή του mtDNA.

### 1.2.4 Λειτουργία

Τα μιτοχόνδρια χρησιμοποιούνται από τα κύτταρα για το μεταβολισμό των βιολογικών μακρομορίων που προσλαμβάνουν οι οργανισμοί με τις τροφές. Έτσι, με τη βοήθεια των μιτοχονδρίων τα κύτταρα διασπών τους υδατάνθρακες και τα λίπη, συνθέτοντας μόρια τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP), μέσω της διαδικασίας της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Οξειδωτική φωσφορυλίωση ονομάζεται η διαδικασία παραγωγής ATP από ADP και Pi στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη, κατά τη μεταφορά ηλεκτρονίων από το NADH και το FADH<sub>2</sub> προς το O<sub>2</sub> δια μέσου μίας σειράς φορέων ηλεκτρονίων. Η οξειδωτική φωσφορυλίωση είναι η κύρια πηγή ATP και αποτελεί το επιστέγασμα μίας σειράς ενεργειακών μετασχηματισμών, οι οποίοι ονομάζονται στο σύνολό τους κυτταρική αναπνοή. Οι κύριες λοιπόν λειτουργίες της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης είναι η παραγωγή ATP και ADP και Pi, καθώς και η παραγωγή θερμότητας.



### 1.3 ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΟ ΚΑΙ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ

Η μελέτη του μιτοχονδριακού DNA και των μεταλλάξεων του έχει πολύ μεγάλη σημασία για την έρευνα στις μέρες μας και μπορεί να δώσει απαντήσεις για τη φύση κάποιων νόσων διότι στη δομή αυτού βρίσκονται οι εξηγήσεις πολλών βιολογικών φαινομένων. Υπάρχουν ασθένειες οι οποίες προκαλούνται από τη γενετική διαταραχή ή τις μεταλλάξεις του μιτοχονδριακού DNA.

Οι μεταλλάξεις αυτές μπορεί να είναι μικρές, σημειακές ή να έχει δοθεί λάθος μήνυμα, και αφορούν την υποκατάσταση μιας βάσης, η οποία αντανακλά μίαν αντικατάσταση ενός αμινοξέος στην πρωτεΐνη που κωδικοποιεί το μεταλλαγμένο γονίδιο. Επίσης υπάρχουν και περιπτώσεις που για να εκδηλωθούν προβλήματα πρέπει να δημιουργηθεί ομοπλασμία, δηλαδή να είναι όλα τα μόρια μεταλλαγμένα. Μια τέτοια περίπτωση είναι η κληρονομική οπτική νευροπάθεια, γνωστή και ως LHON (Leber's Hereditary Optic Neuropathy), στην οποία συμβάλλουν τρεις μεταλλάξεις.

Είναι γνωστό επίσης ότι ένας αριθμός μεταλλάξεων του μιτοχονδριακού DNA προκαλεί ανωμαλίες στα μεταφορικά μόρια RNA, τα οποία είναι μέρος του μηχανισμού σύνθεσης πρωτεϊνών στα μιτοχόνδρια και έτσι μπορεί να διαταραχθεί η φυσιολογική σύνθεση διάφορων μιτοχονδριακών πρωτεϊνών ταυτόχρονα, προκαλώντας και μείωση της σύνθεσης του ATP. Άτομα - φορείς τέτοιων μεταλλάξεων υποφέρουν από σοβαρές ασθένειες που αφορούν το κεντρικό νευρικό σύστημα και τις μυϊκές ανωμαλίες.

Λόγο των παραπάνω θα μπορούσαμε να πούμε πως το μεταλλαγμένο μιτοχονδριακό DNA ενοχοποιείται και για τον σακχαρώδη διαβήτη τύπου II, καθώς παρουσιάζει οικογενειακό ιστορικό και η μητέρα, διαμέσου της οποίας γίνεται η μιτοχονδριακή κληρονομικότητα, είναι συνήθως ο άρρωστος γονιός. Η ασθένεια αυτή μπορεί να προκληθεί από αναδιατάξεις του DNA ή από σημειακές μεταλλάξεις. (Αλαχιώτης Σ. 1998)

## 1.4 ΔΙΑΒΗΤΗΣ ΚΑΙ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ

Ο διαβήτης είναι η ασθένεια που χαρακτηρίζεται από την παρουσία της χρόνιας υπεργλυκαιμίας. Η διατήρηση της φυσιολογικής ομοιοστασίας της γλυκόζης περιλαμβάνει τη δράση ενός αισθητήρα γλυκόζης των παγκρεατικών β-κυττάρων, που ανιχνεύει την αύξηση της συγκέντρωσης της γλυκόζης στο αίμα και οδηγεί σε αυξημένη έκκριση της ινσουλίνης. Οι αυξημένες συγκεντρώσεις της ινσουλίνης που κυκλοφορούν καταστέλλουν την ηπατική παραγωγή της γλυκόζης και τονώνουν την πρόσληψη γλυκόζης από τους μύες και τον λιπώδη ιστό.

Οι παθοφυσιολογικοί μηχανισμοί που οδηγούν σε διαβήτη μπορεί να είναι είτε η περιορισμένη έκκριση της ινσουλίνης, είτε η αντίσταση της ινσουλίνης στο ήπαρ, στους μύες και στο λίπος, είτε σε συνδυασμό με κάποιο ελάττωμα. Ο κίνδυνος ενός ατόμου να αναπτύξει διαβήτη είναι αποτέλεσμα μιας περίπλοκης αλληλεπίδρασης μεταξύ των γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων. Παραλλαγές γονιδίων που έχει εντοπιστεί ότι συμβάλουν στις κύριες μορφές του διαβήτη είναι ο αυτοάνοσος διαβήτης τύπου 1 και το μεταβολικό σύνδρομο τα οποία σχετίζονται με τον διαβήτη τύπου 2. Επίσης κάποιες παραλλαγές γονιδίων μπορούν να διαμορφώσουν την ευαισθησία ενός ατόμου να αναπτύξει διαβήτη ή να προστατεύσουν από την ανάπτυξη της νόσου.

Ένας μεγάλος αριθμός μεταλλάξεων γονιδίων που έχουν εντοπιστεί κατά την τελευταία δεκαετία και αντιπροσωπεύουν γονίδια με υψηλή διεισδυτικότητα ενέχουν τον κίνδυνο για εκδήλωση διαβήτη. Οι φορείς αυτών των μεταλλάξεων γονιδίων έχουν σχεδόν 100% πιθανότητα να αναπτύξουν διαβήτη κατά την διάρκεια της ζωής τους. Αυτές οι αποκαλούμενες μονογενετικές μορφές του διαβήτη περιλαμβάνουν τις διάφορες μορφές του διαβήτη, καθώς και του μιτοχονδριακού διαβήτη. Αυτές οι μονογενετικές μορφές αντιπροσωπεύουν ένα μικρό ποσοστό του συνολικού αριθμού των περιπτώσεων διαβήτη. (Mary- Elizabeth Patti, Silvia Corvera , 2010)

### 1.4.1 Η κλινική εικόνα του μιτοχονδριακού διαβήτη

Αρχικά αξίζει να αναφέρουμε για μία ακόμη φορά πως η φύση του διαβήτη μπορεί να είναι τύπου 1 ή τύπου 2, ανάλογα με τη σοβαρότητα της ινσουλινοπενίας. Μια υποψία για μιτοχονδριακό διαβήτη παρέχεται από μια ισχυρή οικογενειακή ομαδοποίηση του διαβήτη. Τελική απόδειξη για την παρουσία του μιτοχονδριακού διαβήτη παρέχεται από τη γενετική ανάλυση. Για παράδειγμα παρατηρούμε τη μετάλλαξη A3243G στο μιτοχονδριακό DNA (mtDNA), όπου έχει πραγματοποιηθεί και μια σειρά από άλλες μεταλλάξεις στο μιτοχονδριακό DNA. Η θέση της μετάλλαξης A3243G στο tRNA γονίδιο που περιγράφεται στο σχήμα. 1.

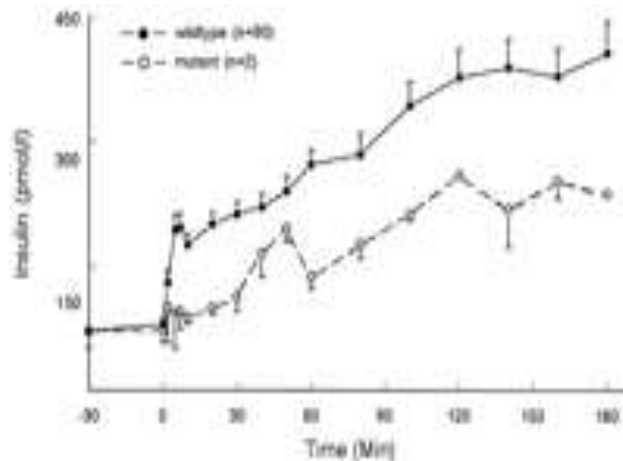


Σύνοδα νοσήματα έχουν συχνά αναφερθεί σε ασθενείς με μιτοχονδριακό διαβήτη. Εν συντομία θα αναφέρουμε τα προβλήματα ακοής τα οποία αντικατοπτρίζουν την μειωμένη αντίληψη των υψηλών συχνοτήτων τόνου και είναι ιδιαίτερα χαρακτηριστικό για τους μεταφορείς της μετάλλαξης A3243G. Τα προβλήματα ακοής προηγούνται συνήθως την κλινική εμφάνιση του σακχαρώδους διαβήτη αρκετά χρόνια. Επίσης οι αλλαγές στο χρώμα του αμφιβληστροειδούς είναι ένα σύνοδο νόσημα σε πολλούς φορείς της μετάλλαξης A3243G.

Άλλα σύνοδα νοσήματα που φαίνονται να παρουσιάζονται αρκετά συχνά, και η παρουσία τους δεν είναι τυχαία είναι οι γαστρεντερικές ανωμαλίες, οι μυοκαρδιοπάθειες καθώς και η νεφρική δυσλειτουργία με την ομοιότητα στην κλινική πορεία της ως προς το σύνδρομο Alport. (Davis W. Lamson, Steve M. Plaza, 2002)

## 1.4.2 Παθοφυσιολογία μηχανισμών που οδηγούν στο διαβήτη

Θα μπορούσαμε να αναφέρουμε πως έχει εντοπιστεί μία μειωμένη έκκριση ινσουλίνης στο πάγκρεας γενικότερα, σε απάντηση στη διέγερση της γλυκόζης σε φορείς της μετάλλαξης π.χ A3243G. Πραγματοποιήθηκε γι αυτό το λόγο μία έρευνα. Προκλήθηκε υπεργλυκαιμία με 10 mmol / l γλυκόζης σε μια ομάδα από 92 άτομα με IGT. Τα άτομα αυτά συμμετείχαν σε μια μελέτη βασισμένη στον πληθυσμό σχετικά με τη δυσανεξία στη γλυκόζη στο γενικό πληθυσμό του Hoorn που ανήκει στις Κάτω Χώρες. Η επιλογή έγινε ανάμεσα σε άτομα με IGT και βασίζεται σε δύο διαδοχικές δοκιμασίες ανοχής στη γλυκόζη με χορήγηση αυτής από το στόμα. Τελικά δύο άτομα βρέθηκαν να είναι φορείς της μετάλλαξης A3243G. Αυτά τα δύο άτομα έδειξαν σημαντικά χαμηλότερη έκκριση ινσουλίνης από τους μη φορείς (Σχήμα. 3). Όταν η ευαισθησία στην ινσουλίνη εκτιμήθηκε από την αναλογία μεταξύ του ποσοστού διάθεσης της γλυκόζης σε 10 γλυκόζης mmol / l και το περιβάλλον, μεγαλύτερη ευαισθησία στην ινσουλίνη είχε σημειωθεί και στους δύο A3243G φορείς σε σύγκριση με μη φορείς IGT ( $0,12 \mu\text{mol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{pmol}^{-1} \cdot \text{l}^{-1}$  σε μη φορείς έναντι 0,27 σε φορείς,  $P < 0,01$ ). Εξετάσαμε επίσης 25 μη διαβητικούς φορείς της μετάλλαξης A3243G ηλικίας 25 ετών και ανεξαρτήτου φύλου και εξετάσαμε σε αυτούς την καμπύλη ζαχάρου τους. Δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές των επιπέδων της γλυκόζης, της ινσουλίνης, του C-πεπτιδίου, και οι συγκεντρώσεις γλυκαγόνης έδειξαν ενδιαφέρον μετά τα 75gr γλυκόζης. Τα ευρήματα αυτά υποδηλώνουν την απουσία ανιχνεύσιμων συνεπειών της παρουσίας της μετάλλαξης A3243G πριν από την ανάπτυξη της δυσανεξίας στη γλυκόζη.



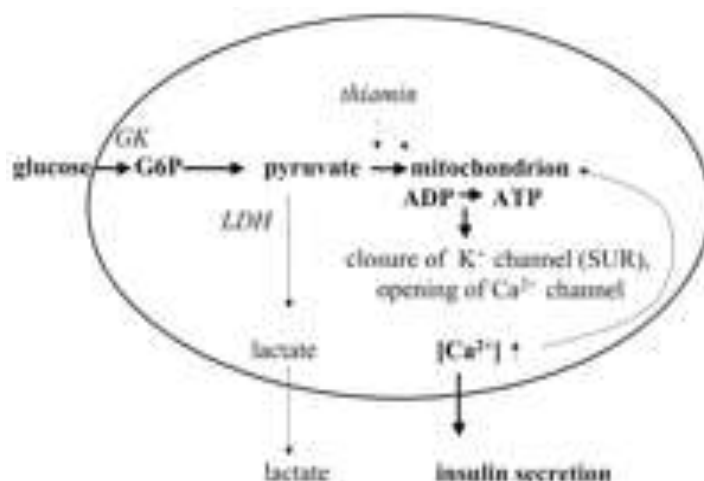
Σχήμα 3 Έκκριση ινσουλίνης κατά τη διάρκεια ενός σφιγκτήρα υπεργλυκαιμίας σε A3243G φορείς σε σύγκριση με μη φορείς. Τα άτομα με IGT (n = 92) επιλέχθηκαν τυχαία, και η έκκριση ινσουλίνης καθορίστηκε με την προσθήκη 10 mmol / l γλυκόζης στο 0-λεπτό χρονικό σημείο. Έκκριση ινσουλίνης ακολούθησε κατά τη διάρκεια 180 λεπτά. Δύο άτομα ήταν φορείς της μετάλλαξης A3243G (Davis W. Lamson, Steve M. Plaza, 2002)

### 1.4.3 Σχέση μεταλλάξεων και παθολογικών καταστάσεων

Ένας μεγάλος αριθμός mtDNA μεταλλάξεων έχουν εντοπιστεί σε παθολογικές καταστάσεις. Μερικές μεταλλάξεις mtDNA έχουν ως χαρακτηριστικό γνώρισμα κάποια μυϊκή δυσλειτουργία, όπως στην περίπτωση της μυοκλονικής επιληψίας και των κουρελιασμένων κόκκινων ινών, τα οποία συνδέονται με μεταλλάξεις στη θέση 8344 του tRNA (Lys) γονιδίου. Άλλες μεταλλάξεις επηρεάζουν κυρίως τη λειτουργικότητα του οπτικού νεύρου, όπως μεταλλάξεις στη θέση 11.778 στο mtDNA, τα οποία συνδέουν με την κληρονομική οπτική νευροπάθεια Lebers. Έτσι, οι μεμονωμένες μεταλλάξεις τείνουν να συνδεθούν με διαφορετικά σύνδρομα. Για να εξηγηθούν οι διακυμάνσεις στις κλινικές παρουσιάσεις, έχει δοθεί ο όρος ετεροπλάσμα όπου η επιρροή του πάνω σε συγκεκριμένους ιστούς μπορεί να καθορίσει τη φύση του φαινοτύπου. Οι τιμές του ετεροπλάσματος παρουσιάζουν μεγάλες διακυμάνσεις μεταξύ των επιμέρους ιστών με μια τάση προς τις υψηλές τιμές σε σχέση με τα ταχέως διαιρούμενα κύτταρα. Οι τιμές του ετεροπλάσματος παρουσιάζουν ακόμη υψηλό βαθμό μεταβλητότητας σε ατομικό επίπεδο κυττάρου. Έτσι, οι διακυμάνσεις στην κατανομή των τιμών του ετεροπλάσματος είναι παράγοντες που καθορίζουν τους κλινικούς φαινοτύπους.

Οι επιβλαβείς συνέπειες των μεταλλάξεων του mtDNA συχνά συνοδεύονται από μειωμένη παραγωγή ATP, αν και πιστεύεται ότι οι επιπτώσεις στις επιπλέον κυτταρικές διεργασίες στις οποίες εμπλέκονται τα μιτοχόνδρια θα πρέπει να ληφθούν πολύ σοβαρά υπόψη. Στα παγκρεατικά β-κύτταρα, ο δείκτης ATP / ADP καθορίζει το αν το κανάλι KATP θα εμπλέκεται στην έκκριση ινσουλίνης. Επίσης καθορίζει και το αν θα προκύψουν αλλαγές σε αυτό το ποσοστό, ως αποτέλεσμα της δυσλειτουργίας των μιτοχονδρίων, η οποία θα επηρεάσει σίγουρα τη ρύθμιση της γλυκόζης που προκαλείται από αντίδραση της έκκρισης της ινσουλίνης, όπως

απεικονίζεται στο σχήμα. 4. Σε συμφωνία με τα παραπάνω είναι και το ότι στις γραμμές των παγκρεατικών β-κυττάρων το περιεχόμενο του μιτοχondριακού DNA έχει μειωθεί σημαντικά με την παρουσία του βρωμιούχο αιθίδιο. Αυτό δείχνει μια απώλεια που προκαλείται στη γλυκόζη με την έκκριση ινσουλίνης, αν και το κλείσιμο του καναλιού K από την σουλφονυλουρία που σχετίζεται με φαρμακευτικά προϊόντα εξακολουθεί να διεγείρει την έκκριση ινσουλίνης. Πειράματα στα οποία το αντίγραφο του mtDNA μειώνεται στα παγκρεατικά β-κύτταρα από τον ειδικό ιστό του πυρηνικού κωδικοποιητή γονιδίου για το μιτοχondριακό μεταγραφικό παράγοντα A στα παγκρεατικά β-κύτταρα που υποστηρίζουν την ιδέα του περιορισμού της λειτουργίας των μιτοχondρίων στην έκκριση ινσουλίνης. Αρκετές παρατηρήσεις είναι πιο δύσκολο να συμβαδίσουν με αυτή την απλή έννοια. Θεωρητικά θα μπορούσαμε να πούμε πως ο μιτοχondριακός διαβήτης αναπτύσσεται μόνο κατά τη γήρανση. Στην περίπτωση των MODY2, στην οποία ένα ελάττωμα στο πρώτο βήμα της γλυκόλυσης έχει σαν αποτελέσματα στον τομέα της παραγωγής εξασθενημένο ATP για την αντιμετώπιση της γλυκόζης, οδηγεί σε υπεργλυκαιμία και είναι ήδη έκδηλο πολύ νωρίς αμέσως δηλαδή μετά τη γέννηση. Ο μιτοχondριακός διαβήτης, ωστόσο, έχει κατά μέσο όρο ηλικίας έναρξης της νόσου τις ηλικίες μεταξύ 35 και 40 ετών. Έτσι, φαίνεται ότι στην περίπτωση του μιτοχondριακού διαβήτη, η γήρανση του πληθυσμού ευνοεί τις σχετικές διεργασίες και συντελεί στην προοδευτική επιδείνωση και πιθανή απόπτωση των β-κυττάρων.



Σχήμα 4. Σχηματική επισκόπηση των βημάτων που συνδέουν διακυμάνσεις στην συγκέντρωση γλυκόζης με διακυμάνσεις στην έκκριση ινσουλίνης. Η αποτελεσματικότητα με την οποία οι διακυμάνσεις των συγκεντρώσεων γλυκόζης σε συνδυασμό με το μέγεθος της μεταβολής της αναλογίας ADP / ATP είναι ένας κύριος καθοριστικός παράγοντας για την έκκριση ινσουλίνης. Τα βήματα που διαμορφώνονται είναι τα εξής: η δραστηριότητα της γλυκοκινάσης (GK), η δραστηριότητα της γαλακτικής δεϋδρογενάσης (LDH), η οποία έχει χαμηλή περιεκτικότητα σε λειτουργικά β-κύτταρα, καθώς και η κατάσταση της θειαμίνης του κυττάρου. Η θειαμίνη είναι συμπαραγοντας για το πυροσταφυλικό. Η αφυδρογονάση και η α-κετογλουταρική αφυδρογονάση είναι τα ένζυμα που καθορίζουν τη ροή της γλυκόζης μέσω της γλυκόλυσης και στον κύκλο του Krebs. Η δραστηριότητά τους στον κύκλο του Krebs επαναπροσδιορίζεται από την πρόσληψη του Ca<sup>2+</sup> από τα μιτοχondρία μετά την ATP / ADP που προκαλείται από το κλείσιμο του καναλιού K και την επακόλουθη έναρξη των τασεοελεγχόμενων καναλιών Ca.

Επιπλέον υπάρχουν μόρια σηματοδότησης δίπλα στο λόγο ATP / ADP όπου συμβάλλουν στην παθογένεση του μιτοχονδριακού DNA που σχετίζεται με ασθένειες. Τα μιτοχόνδρια συμβάλλουν στην ρύθμιση πολλών ενώσεων στο κυτταρόπλασμα .Πολλοί από αυτούς εμπλέκονται στην κυτταρική ρύθμιση, όπως Ca, γλουταμινικό οξύ, το κυτόχρωμα C, και το γαλακτικό. Επιπλέον, τα μιτοχόνδρια αποτελούν την κύρια πηγή των ριζών. Διαφορετικές μεταλλάξεις που μπορεί να επηρεάσουν διαφορικές συγκεντρώσεις αυτών των σηματοδοτικών μορίων, με αποτέλεσμα να δημιουργηθούν διαφορετικές συνέπειες για την κυτταρική ιδιότητες και την κατάσταση της νόσου.

Οι μελέτες στις γραμμές των παγκρεατικών β-κυττάρων, με μειωμένο αριθμό αντιγράφων mtDNA έδειξαν ότι οι μεταλλάξεις της γλυκοκινάσης καθώς και η κυτταρική ανεπάρκεια θειαμίνης φαίνεται να ανταποκρίνεται στη μεγαλοβλαστική αναιμία των ατόμων που πάσχουν από διαβήτη και σύνδρομο κώφωσης. Διαβητογονιδιακά επίσης θα μπορούσε να εξηγηθεί με βάση τον κρίσιμο ρόλο της ATP / ADP αναλογίας η διαδικασία της έκκρισης ινσουλίνης. Μια πιο πρόσφατη μελέτη για τη γραμμή των παγκρεατικών β-κυττάρων βHC9 έδειξε ότι η εξάντληση του mtDNA δεν επηρέασε σημαντικά τη βασική συγκέντρωση των ATP, αν και η γλυκόζη που προκαλείται από την απελευθέρωση της ινσουλίνης έχει αποκλειστεί. Αυτή η παρατήρηση δείχνει επίσης ότι η ίδια η λειτουργία των μιτοχονδρίων συμβάλλει στη διαδικασία της έκκρισης ινσουλίνης. (Davis W. Lamson, Steve M. Plaza,2002)

#### **1.4.4 Ο διαβήτης σε σχέση με την ηλικία του ατόμου**

Αρχικά παρατηρούμε πως οι μη διαβητικοί φορείς της μετάλλαξης A3243G έχουν μια κανονική τιμή στο λόγο της έκκρισης ινσουλίνης / C-πεπτίδιο κατά τη διάρκεια μιας καμπύλης ζαχάρου. Όμως βλέπουμε πως κατά την γήρανση, συμβαίνει μια προοδευτική επιδείνωση της ομοιόστασης της γλυκόζης. Βέβαια η αντίσταση στην ινσουλίνη δεν φαίνεται να αποτελεί σημαντικό αιτιολογικό παράγοντα. Αντίθετα, μια προοδευτική απώλεια της έκκρισης ινσουλίνης σε απάντηση της γλυκόζης φαίνεται να είναι ο βασικός παράγοντας. Η κατάσταση αυτή έρχεται σε αντίθεση με τους μεταφορείς μεταλλάξεων της γλυκοκινάσης που πάσχουν από μια μη προϊούσα μορφή διαβήτη, η οποία είναι ήδη έκδηλο νωρίς μετά τη γέννηση. Επειδή δεν υπάρχουν αποδείξεις ότι τα εταιροπλασματικά επίπεδα για τη μετάλλαξη A3243G αυξάνουν κατά τη γήρανση, θα πρέπει να συμμετέχουν και άλλοι παράγοντες στην επιδείνωση των β-κυττάρων με το πέρασμα του χρόνου. Αυτή τη στιγμή, αυτοί οι παράγοντες δεν έχουν ακόμη προσδιοριστεί, αν και μια πεποίηση σχετιζόμενη με την ηλικία θανάτου των β-κυττάρων φαίνεται ένας πιθανός παράγοντας.

Τα μιτοχόνδρια είναι οι βασικοί παραγωγοί των ενεργών ριζών οξυγόνου (ROS) στο εσωτερικό των κυττάρων . Το ποσό των ROS που υπάρχει συμβάλλει στην απόπτωση και ίσως και στη διαφοροποίηση των παγκρεατικών β-κυττάρων. Τα παγκρεατικά β-κύτταρα έχουν μια φτωχή ικανότητα αναγέννησης, όταν τα κύτταρα

χάνονται. Έτσι, κάτω από συνθήκες αυξημένης απώλειας των β-κυττάρων, είτε με την απόπτωση είτε με τη διαφοροποίηση, η κατάσταση εκτροχιάζεται αφού είναι ανεπαρκής η αντικατάσταση της απώλειας αυτής που λαμβάνει χώρα. Στο τέλος, αυτό θα οδηγήσει σε ανεπαρκή έκκριση ινσουλίνης και δεν θα είναι δυνατόν να διατηρήσουν τη σωστή ομοιόσταση της γλυκόζης. Επίσης ενισχυμένη παραγωγή ROS μπορεί να διευκολύνει αυτή τη διαδικασία. Θεωρητικά, θα μπορούσαμε να πούμε πως το ύψος της παραγωγής ROS των μιτοχονδρίων εξαρτάται από διάφορους παράγοντες. Ένα υψηλό δυναμικό της μεμβράνης των μιτοχονδρίων φαίνεται να ευνοεί την παραγωγή των ROS. Αυτό συμβαίνει υπό συνθήκες χαμηλών επιπέδων αποσύνθεσης πρωτεϊνών, όπως φαίνεται σε πειράματα που γίνανε σε ποντίκια που στερούσαν την αποσύνθεση πρωτεΐνης. Η παρατήρηση αυτή σημαίνει ότι ένα υψηλό ποσοστό σχηματισμού των NADH/FADH<sub>2</sub> ενώ η προσφορά της ADP μειώνεται ενισχύει επίσης την παραγωγή ROS. Συνθήκες που ευνοούν αυτή την κατάσταση είναι τα υψηλά επίπεδα γλυκόζης σε συνδυασμό με το αυξημένο ενδοκυτταρικό Ca, μια κατάσταση που αναμένεται να είναι παρούσα σε παγκρεατικά β-κύτταρα σε συνθήκες υπεργλυκαιμίας. Γνωρίζουμε επίσης πως τα παγκρεατικά β-κύτταρα έχουν μειωμένη την δραστηριότητα της γαλακτικής δεϋδρογενάσης. Έτσι, το μεγαλύτερο μέρος της γλυκόζης που λαμβάνεται από το κύτταρο θα συμβάλει στη δημιουργία της μεμβράνης των μιτοχονδρίων. Η ταυτόχρονη αύξηση του Ca, οδηγεί σε εισροή Ca στα μιτοχόνδρια, όπου το Ca θα δρα ως συμπαράγοντας για το ποσοστό περιορισμού των ενζύμων στον κύκλο του κιτρικού οξέος. Έτσι, παράγεται περισσότερο NADH/FADH<sub>2</sub>, το οποίο αναμένεται να οδηγήσει σε αυξημένη συγκέντρωση του δυναμικού μεμβράνης πάνω από την εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων. Κανονικά, το ADP χρησιμεύει για να μειώσει το δυναμικό της μεμβράνης από το σχηματισμό του ATP. Υπό τους όρους της υπεργλυκαιμίας όμως η αναγέννηση του ADP μπορεί να φθάσει στο ανώτατο όριο, το οποίο εξαντλεί τα μιτοχόνδρια του ADP, και το συνακόλουθο υψηλό δυναμικό μεμβράνης αναμένεται να οδηγήσει σε αυξημένη παραγωγή ROS. Αυτό μπορεί να συμβάλει στην διαφοροποίηση των παγκρεατικών β-κυττάρων και την απώλεια της ανταπόκρισης προς την κατεύθυνση της γλυκόζης. Είναι ενδιαφέρον το ότι η διαθεσιμότητα του ADP καθορίζεται επίσης από τη δραστηριότητα της αδενίνης των μεταλλαγμένων νουκλεοτιδίων, η οποία διαμεσολαβεί στην ανταλλαγή ADP-ATP μεταξύ μιτοχονδριακής μήτρας και κυτταροπλάσματος. Οι υψηλές συγκεντρώσεις των εστέρων λιπαρών οξέων-CoA είναι μια κατάσταση που αναμένεται να υπάρχει σε παχύσαρκα άτομα και φαίνεται να μειώνει τη δραστηριότητα της αδενίνης των μεταλλαγμένων νουκλεοτιδίων, ευνοώντας έτσι τον σχηματισμό των ROS.

Μια άλλη κατάσταση που ευνοεί την παραγωγή ROS είναι η μείωση του αριθμού των μιτοχονδρίων αντιγράφων ανά κελί. Κάθε μιτοχόνδριο παρουσιάζει αυξημένο φόρτο εργασίας υπό αυτές τις συνθήκες, οδηγώντας σε υψηλό δυναμικό μεμβράνης και σχηματισμό ROS. In vivo, η μείωση του αριθμού αντιγράφων των mtDNA μπορεί να προκληθεί από την αναστολή της πολυμεράσης του μιτοχονδριακού DNA από ανάλογα των διδεοξυνουκλεοτιδίων. Αυτά τα φάρμακα χρησιμοποιούνται για την αντιρετροϊκή θεραπεία. Όταν αυτά εφαρμόζονται in vivo, θα αυξήσουν τον κίνδυνο για διαβήτη και ινσουλοπενική παγκρεατίτιδα. Οι παρατηρήσεις αυτές δείχνουν ότι η διατήρηση του κατάλληλου αριθμού αντιγράφων του μιτοχονδριακού DNA είναι κρίσιμης σημασίας για την κατάλληλη in vivo έκκριση ινσουλίνης. (Davis W. Lamson, Steve M. Plaza, 2002)

Γενικά οι παράγοντες που μειώνουν το σχηματισμό των ROS είναι τα



αυξημένα επίπεδα έκφρασης της αποσύνδεσης πρωτεϊνών. Αν και αυτά μειώσουν το μέγεθος της γλυκόζης που προκαλείται από αντίδραση έκκριση ινσουλίνης, κάνοντας το β-κύτταρο λιγότερο αποτελεσματικό, μπορεί να προστατευτεί το β-κύτταρο από την αυξημένη παραγωγή ROS.

Εν ολίγοις, τα περισσότερα στοιχεία υποστηρίζουν την ιδέα ότι η σωστή λειτουργία των μιτοχονδρίων είναι κρίσιμης σημασίας για τη διατήρηση ενός επαρκούς ποσοστού γλυκόζης που προκαλεί έκκριση ινσουλίνης. Στην περίπτωση της μετάλλαξης A3243G καθώς και σε άλλες πιο σπάνιες μεταλλάξεις mtDNA, η συνολική χωρητικότητα της μιτοχονδριακής λειτουργίας γίνεται ποσοστό περιορισμού της και διατηρεί τα επαρκή επίπεδα έκκρισης ινσουλίνης. Επιπλέον, η ταχεία επιδείνωση των β-κυττάρων συνεχίζεται.

Η σωστή λοιπόν λειτουργία των μιτοχονδρίων είναι απαραίτητη για τη φυσιολογική παραγωγή και έκκριση ινσουλίνης από τα παγκρεατικά κύτταρα. Η διατήρηση της γλυκόζης σε φυσιολογικά επίπεδα στο αίμα γενικά εξαρτάται από τους εξής δύο παράγοντες 1) τη σωστή απόκριση του σκελετικού μυός και του ήπατος στην παραγωγή ινσουλίνης και 2) από την έκκριση ινσουλίνης στα β-κύτταρα του παγκρέατος. Βλάβες στον πρώτο παράγοντα προκαλούν ανθεκτικότητα στην ινσουλίνη, ενώ βλάβες στο δεύτερο παράγοντα προκαλούν υπεργλυκαιμία. Οι βλάβες αυτές οφείλονται σε δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων. Έτσι η εμφάνιση του διαβήτη οφείλεται σε κάποια αντικατάσταση, έλλειμμα ή διπλασιασμό μίας ή περισσότερων βάσεων, καθώς και μείωση των αντιγράφων mtDNA σε ποσοστό μεγαλύτερο από 50%.

Οι παραπάνω αλλοιώσεις τις περισσότερες φορές είναι κληρονομικές. Γι' αυτό περίπου τα  $\frac{3}{4}$  των ασθενών με μιτοχονδριακές μεταλλάξεις έχουν εμφανίσει μητρικά κληρονομούμενο διαβήτη και περισσότερες από δύο σημειακές μεταλλάξεις είναι υπεύθυνες για την εμφάνιση του.

## 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Είναι γνωστό πως ο διαβήτης είναι μία ασθένεια καλπάζουσα στις σημερινές δυτικές χώρες. Όλο και περισσότεροι άνθρωποι ασθενούν και γι' αυτό αξίζει να στραφούν οι έρευνες στην κληρονομική προδιάθεση των ανθρώπων, ώστε να γνωρίζει κάποιος αν υπάρχει πιθανότητα να ασθενήσει στο μέλλον από τη συγκεκριμένη ασθένεια.

Δείγματα αίματος παραχωρήθηκαν στο εργαστήριό μας από το Περιφερειακό Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας για τους σκοπούς της έρευνας μας. Η έρευνά μας στηρίχθηκε σε 40 δείγματα υγιών ατόμων (που δεν ασθενούν από διαβήτη) και σε 102 δείγματα ατόμων που είναι ασθενείς με διαβήτη. Τα δείγματα βρίσκονται σε συνθήκες κατάψυξης στους  $-20^{\circ}\text{C}$ . Αρχικά, λοιπόν, θα έπρεπε τα δείγματα αίματος να αποψυχθούν και έπειτα να εξαχθεί και να απομονωθεί από αυτά το ολικό DNA.

### 2.1 Εξαγωγή και απομόνωση του ολικού DNA

Για την απομόνωση του ολικού DNA ακολουθήθηκε το εξής πρωτόκολλο:

- 1) Παίρνουμε 0,5ml ολικού αίματος με μια πιπέτα και προσθέτουμε 1ml SSC 1x σε eppendorf 2ml

Κάνουμε ανάδευση σε vortex

Φυγοκεντρούμε για 3min σε 13000 στροφές

- 2) Απομακρύνουμε το υπερκείμενο
- 3) Προσθήκη με επαναδιάλυση του ιζήματος με 1ml SSC 1x

Κάνουμε ανάδευση σε vortex

Φυγοκεντρούμε για 2min σε 13000 στροφές

- 4) Απομακρύνουμε το υπερκείμενο
- 5) Διάλυση ιζήματος σε 0,5ml NaOAc 0,2M
- 6) 50ml SDS 5%
- 7) Προσθέτουμε 10ml πρωτεϊνάσης K [10V (ml)]

- 8) Επώαση στους 55°C για 1h
- 9) Προσθέτουμε 0,5ml φαινόλης και 0,5ml χλωροφορμίου
- 10) Κάνουμε ανάδευση σε vortex και φυγοκεντρούμε για 7min σε 13000 στροφές
- 11) Μεταφέρουμε το υπερκείμενο σε νέα eppendorf
- 12) Προσθέτουμε 1ml χλωροφορμίου
- 13) Ανακινούμε ήπια  
Φυγοκεντρούμε για 10min σε 13000 στροφές
- 14) Μεταφέρουμε το υπερκείμενο σε νέα eppendorf
- 15) Προσθέτουμε 1ml ισοπροπανόλης
- 16) Επώαση στους -20°C για 15min
- 17) Φυγοκεντρούμε για 20min σε 13000 στροφές
- 18) Απομακρύνουμε το υπερκείμενο
- 19) Προσθέτουμε 1ml παγωμένης αιθανόλης 70%
- 20) Φυγοκεντρούμε για 15min σε 13000 στροφές
- 21) Απομακρύνουμε το υπερκείμενο
- 22) Επώαση – ξήρανση με ανοιχτό καπάκι για 1h στους 55°C
- 23) Προσθέτουμε 100dd H<sub>2</sub>O και το αφήνουμε για διάλυση σε θερμοκρασία δωματίου
- 24) Ηλεκτροφορούμε σε πηκτή αγαρόζης 1% (ποιοτική ανίχνευση mtDNA).

Αφού λοιπόν απομονώσουμε το ολικό DNA θέλουμε να ελέγξουμε αν οι ποσότητες DNA που πήραμε είναι ικανοποιητικές. Γι' αυτό το λόγο κάνουμε ηλεκτροφόρηση του δείγματος σε πηκτή αγαρόζης 1%.

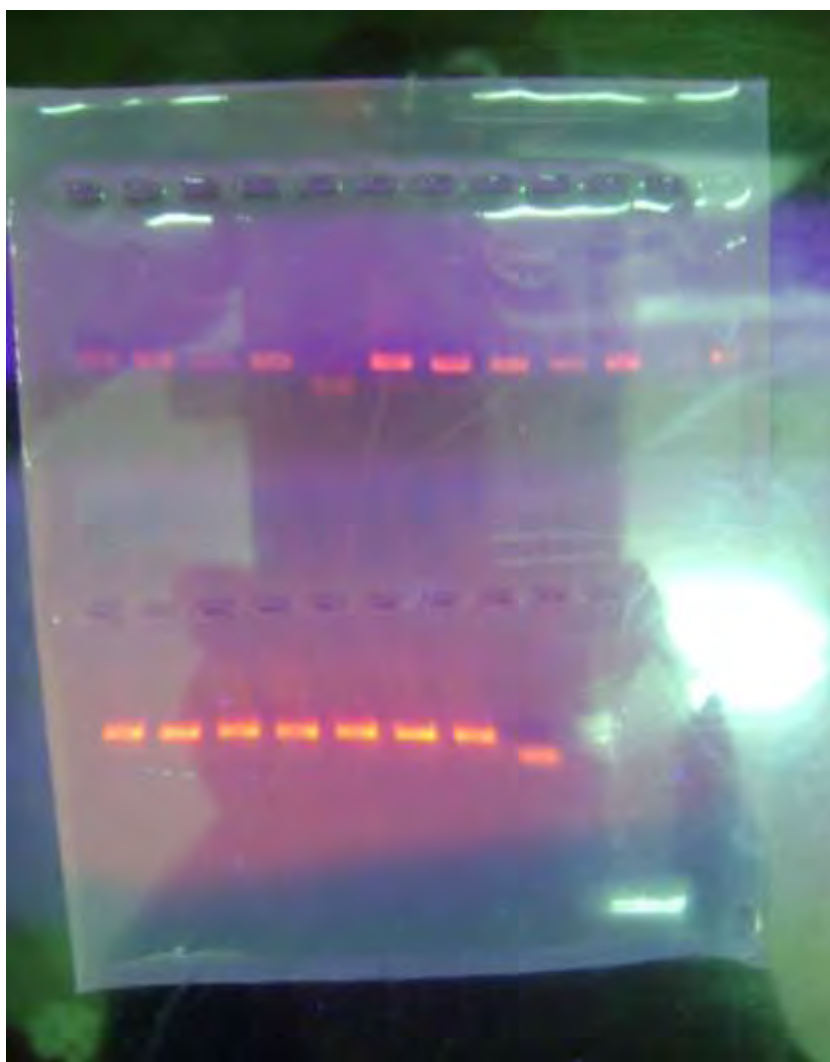
## 2.2 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1%

Για να κάνουμε την ηλεκτροφόρηση, δηλαδή τον έλεγχο της ποσότητας του mtDNA που απομονώσαμε, ακολουθούμε τα παρακάτω βήματα:

- 1) Σε κωνική φιάλη βάζουμε 0,4gr αγαρόζη.
- 2) Στην ίδια κωνική φιάλη προσθέτουμε 40ml TAE 1x.
- 3) Τοποθετούμε την κωνική φιάλη στο φούρνο μικροκυμάτων μέχρι να πάρει βράση δύο – τρεις φορές.  
Σκοπός μας είναι να διαλυθεί η αγαρόζη αλλά να μην βράσει και φουσκώσει το διάλυμα. Γι' αυτό σταματάμε τον φούρνο και ελέγχουμε το διάλυμα συχνά.
- 4) Κρυώνουμε ελαφρά το διάλυμά μας με προσοχή. Δεν το αραιώνουμε.
- 5) Στον απαγωγό προσθέτουμε 4ml βρωμιούχο αιθίδιο.
- 6) Ανακινούμε ελαφρά το διάλυμα.
- 7) Χύνουμε το διάλυμα στο πηγαδάκι και αφήνουμε να πήξει για περίπου 15 λεπτά.
- 8) Αφαιρούμε τα χτενάκια με προσοχή να μην σπάσουμε τα πηγαδάκια.
- 9) Φτιάχνουμε σταγόνες από 3ml loading buffer και 3ml απομονωμένο DNA.

- 10) Φορτώνουμε μία σταγόνα σε κάθε πηγαδάκι.
- 11) Τοποθετούμε μέσα σε TAE 1x και ηλεκτροφορούμε στα 100V για περίπου 15min.
- 12) Τοποθετούμε το άγαρ στην υπέρυθρη ακτινοβολία (φθορίζων τραπέζι) και βλέπουμε αν η ποσότητα mtDNA που απομονώσαμε είναι ποιοτικά και ποσοτικά επαρκής.

Αν λοιπόν το DNA που απομονώσαμε είναι ποιοτικά και ποσοτικά ικανοποιητικό, προχωράμε σε ενίσχυση του DNA με την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR).



Εικ. 2 Μικρό τζέλ πηκτής αγαρόζης (24 θέσεων) σε φθορίζον τραπέζι

## 2.3 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (polymerase chain reaction) είναι μία μέθοδος βιοχημείας και μοριακής βιολογίας για την απομόνωση και τον πολλαπλασιασμό μίας αλληλουχίας DNA, μέσω της ενζυμικής αναπαραγωγής του DNA, χωρίς τη χρήση ζωντανών μικροοργανισμών.

Για να πραγματοποιηθεί η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης είναι απαραίτητοι κάποιοι παράγοντες. Τέτοιοι παράγοντες είναι κάποιες ουσίες ή διαλύματα τα οποία τα προσθέτουμε μέσα στα ειδικά eppendorfs μέσα στα οποία τοποθετούμε και το δείγμα DNA για να μπουν στο ειδικό μηχάνημα για PCR (thermal cycler).

Οι παράγοντες που προσθέτουμε είναι οι εξής :

### 1) Το DNA.

Το DNA είναι η απαραίτητη αλληλουχία όπου θα υβριδιστούν οι εκκινητές. Επειδή η PCR είναι μία μέθοδος ακριβείας και είναι πολύ ευαίσθητη, είναι σημαντικό το απομονωμένο DNA να είναι όσο το δυνατόν πιο καθαρό. Αν μετά την ηλεκτροφόρηση η μπάντα που παρουσιάζεται είναι πολύ αχνή σημαίνει πως έχουμε μικρή ποσότητα DNA και θα πρέπει να βάλουμε μεγαλύτερη συγκέντρωση κατά την PCR.

### 2) Τα dNTPs (τριφωσφορικά δεοξυνουκλεοτίδια).

Τα dNTPs είναι τα δομικά στοιχεία τα οποία η πολυμεράση DNA θα συνδέσει μεταξύ τους για να συντεθεί μία νέα αλυσίδα DNA. Τα dNTPs λοιπόν είναι το υπόστρωμα της πολυμεράσης, η οποία τα προσθέτει με κατεύθυνση 5'→3'.

### 3) Η Taq (DNA πολυμεράση).

Η Taq είναι το ένζυμο που πολυμερίζει τους εκκινητές συμμετρικά με την μητρική αλυσίδα. Με την ανακάλυψη της πολυμεράσης αυτής αυτοματοποιήθηκε η όλη διαδικασία ενίσχυσης με τη βοήθεια θερμικών κυκλοποιητών. Σημαντικό ρόλο στη δράση της πολυμεράσης παίζει το στέλεχος του βακτηρίου από το οποίο η ίδια απομονώνεται, καθώς και ο τρόπος απομονώσής της.

### 4) Το buffer (ρυθμιστικό διάλυμα).

Το buffer είναι το διάλυμα που ρυθμίζει και διατηρεί το pH της αντίδρασης έτσι ώστε να λειτουργεί σωστά το ένζυμο της πολυμεράσης.

### 5) Το MgCl<sub>2</sub> (ιόντα Mg<sup>2+</sup>).

Το διάλυμα MgCl<sub>2</sub> προστίθεται για να μας δώσει τα ιόντα Mg<sup>2+</sup>. Αυτά λειτουργούν σαν συμπαραγοντες για το ένζυμο της πολυμεράσης διότι αυξάνουν την ειδικότητα της αντίδρασης βοηθώντας τον υβριδισμό των εκκινητών.

6) Οι Fw και Rv εκκινητές.

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

Από τα παραπάνω συμπεραίνουμε πως η διαδικασία της PCR είναι μία πολύπλοκη διαδικασία στην οποία όλοι οι παράγοντες παίζουν ένα σημαντικό ρόλο. Γι' αυτό το λόγο είναι όλοι απαραίτητοι. Βέβαια δεν πρέπει ποτέ να ξεχνάμε πως η συνολική ποσότητα που θα υπάρχει μέσα στο eppendorf που προορίζεται για PCR θα πρέπει να είναι 50ml τελικός όγκος.

### 2.3.1 Τι είναι η PCR



Εικ. 3 Eppendorf PCR

Η PCR είναι μια γρήγορη και οικονομική τεχνική που χρησιμοποιήθηκε για να μπορούμε να πολλαπλασιάζουμε 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 (Kary Mullis) τιμήθηκε με το βραβείο Νόμπελ το 1993. Μέχρι το 1993, η PCR χρησιμοποιήθηκε σε περισσότερες από 7.000 επιστημονικές εργασίες.

### 2.3.2 Η αντίδραση

Με την PCR μια συγκεκριμένη περιοχή του γονιδιώματος μπορεί να πολλαπλασιαστεί μέχρι και δισεκατομμύρια φορές, δεδομένου ότι είναι γνωστή η νουκλεοτιδική του αλληλουχία. Η αλληλουχία του γονιδίου (ή «θραύσματος DNA») είναι απαραίτητη για τον σχεδιασμό των συνθετικών DNA ολιγονουκλεοτιδίων, το καθένα συμπληρωματικό με μία από τις αλυσίδες του δίκλωνου DNA. Τα ολιγονουκλεοτίδια που θα χρησιμοποιηθούν ως εκκινητήρες πρέπει να δεσμεύονται σε θέσεις αντίθετες από την αλληλουχία που πρόκειται να ενισχυθεί, με άλλα λόγια καθορίζουν τα άκρα του θραύσματος DNA που πρόκειται να ενισχυθεί.

### 2.3.3 Στάδια της PCR

Ένας πλήρης κύκλος μιας PCR αντίδρασης περιλαμβάνει τρία στάδια:

- Αποδιάταξη του DNA (denaturation)
- Προσαρμογή των εκκινητήρων στο DNA εκμαγείο (annealing)
- Επιμήκυνση των εκκινητήρων (extension).

Ένας πλήρης τέτοιος κύκλος περιλαμβάνει επώαση των δειγμάτων σε τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες και γίνεται στις μέρες μας αυτόματα από ειδικά μηχανήματα τους θερμοκυκλωτές (thermal cyclers). Σε μια τυπική αντίδραση, το δίκλωνο DNA αποδιατάσσεται με θέρμανση στους 95° C. Στη συνέχεια οι εκκινητήρες σε περίσσια προσαρμόζονται με υβριδισμό στις συμπληρωματικές αλληλουχίες του DNA εκμαγείου με ψύξη του δείγματος στους 50 – 60° C. Ακολουθεί επώαση στους 72° C για την επιμήκυνση των εκκινητήρων από μία θερμοάντοχη πολυμεράση, παρουσία των τεσσάρων νουκλεοτιδίων.

Καθώς η διαδικασία επαναλαμβάνεται, οι νεοσύστατοι κλώνοι με τη σειρά τους χρησιμοποιούνται ως εκμαγεία για την *in vitro* σύνθεση του DNA. Μετά από μερικούς κύκλους το επικρατές προϊόν είναι ένα DNA θραύσμα που το μέγεθος του οποίου αντιστοιχεί στην μεταξύ των δύο αρχικών εκκινητήρων απόσταση. Στη πράξη 20 με 30 κύκλοι της αντίδρασης είναι αρκετοί για την αποτελεσματική ενίσχυση του DNA θραύσματος. Σε κάθε κύκλο που διαρκεί περίπου πέντε λεπτά η ποσότητα του DNA διπλασιάζεται. Η όλη διαδικασία κλωνοποίησης ενός DNA θραύσματος σε ένα *in vitro* σύστημα (χωρίς κύτταρα) διαρκεί μερικές ώρες, σε σχέση με τις μερικές μέρες που απαιτούνται για τις *in vivo* διαδικασίες κλωνοποίησης.



Εικ. 4 thermal cycler

### 2.3.4 Πώς δουλεύει η PCR

Για να μπορέσουμε να πολλαπλασιάσουμε ένα τμήμα DNA χρησιμοποιώντας την PCR, αρχικά θα πρέπει να θερμάνουμε το δείγμα του DNA έτσι ώστε να αποδιαταχθεί το δίκλωνο DNA και να διαχωριστεί σε δυο μονόκλινα τμήματα. Στη συνέχεια το ένζυμο της πολυμεράσης 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.

Στις μέρες μας η όλη διαδικασία της PCR γίνεται αυτόματα και με τα εξελιγμένα μηχανήματα μπορεί να τελειώσει σε λίγες μόνο ώρες. Η όλη διαδικασία των κύκλων της θέρμανσης και της μείωσης της θερμοκρασίας προγραμματίζεται από ένα μηχανήμα 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. Επίσης, θα πρέπει να έχουν καθοριστεί επακριβώς από τον ερευνητή οι χημικές συνθήκες υπό τις οποίες θα γίνει ο πολλαπλασιασμός του DNA, και να έχει γίνει η σύνθεση των ολιγονουκλεοτιδίων που θα ξεκινήσουν την αντίδραση (εκκινητές ή DNA primers) τα οποία πρέπει να έχουν έτσι σχεδιαστεί ώστε να είναι απόλυτα συμπληρωματικά στα άκρα των γονιδιακών τόπων που μας ενδιαφέρουν.

### 2.3.5 Γιατί είναι χρήσιμη η PCR

Μόλις ολοκληρωθεί ο πολλαπλασιασμός των τμημάτων του DNA, μπορούν πλέον να αναλυθούν με πολλές εργαστηριακές τεχνικές. Για παράδειγμα, οι



περισσότερες τεχνικές της χαρτογράφησης του DNA που χρησιμοποιούνται στην αποκωδικοποίηση του ανθρώπινου γονιδιώματος στηρίζονται πάνω στην τεχνική της PCR. Επίσης, η PCR είναι πολύ χρήσιμη σε πολλές καινούργιες μεθόδους, όπως το DNA Finger Printing, η διάγνωση βακτηριδίων και ιών και η διάγνωση γενετικών ανωμαλιών. Η δύναμη της PCR είναι τέτοια που είναι δυνατόν να γίνει ανάλυση από το γενετικό υλικό ενός και μόνο κυττάρου.

Η τεχνική της PCR διαδόθηκε στην επιστημονική κοινότητα με πολύ γρήγορους ρυθμούς. Καθώς όλο και περισσότεροι επιστήμονες ήρθαν σε επαφή με την PCR, εισήγαγαν μετατροπές της μεθόδου και χρησιμοποίησαν την τεχνική σε νέες ασθένειες.

Η PCR είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθεί και για την ανίχνευση γενετικού υλικού μικροοργανισμών που έχουν προσβάλλει τον άνθρωπο. Τα τεστ που μέχρι τώρα χρησιμοποιούνταν όπως η καλλιέργεια των μικροοργανισμών ή η χρήση αντισωμάτων ήταν ιδιαίτερα περίπλοκα. Η μέθοδος της PCR είναι μια γρήγορη και πολύ απλή εναλλακτική λύση. Επίσης σημαντική είναι και η χρήση της PCR για την διάγνωση του ιού του AIDS. Η ανιχνευτική ικανότητα της PCR είναι τόσο μεγάλη που μπορούμε να πάρουμε αποτέλεσμα ακόμα και από δείγματα DNA τα οποία έχουν σχεδόν καταστραφεί και πολύ συχνά και από ένα μόνο κύτταρο. Στις μέρες μας η PCR έχει ήδη χρησιμοποιηθεί για να πολλαπλασιάσουμε DNA από μερικές ασυνήθιστες πηγές όπως ζώα τα οποία έχουν πια εξαφανιστεί ή από Αιγυπτιακές μούμιες. Η ανακάλυψη της PCR έδωσε σημαντικές γενετικές πληροφορίες για την εξέλιξη, εξαφάνιση και σημερινή πορεία πολλών ειδών. Οι εξελικτικοί βιολόγοι χρησιμοποιούν αυτά τα δείγματα και την μέθοδο της PCR για να διερευνήσουν τις γενετικές διασυνδέσεις στον οργανισμό μεταξύ διαφόρων ειδών τώρα και στο παρελθόν.

## 2.4 Οι παράγοντες από τους οποίους εξαρτάται η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης

Έχοντας κάνει την PCR έχουμε πολλαπλασιάσει το τμήμα του DNA που επιθυμούσαμε μέσα στον “θερμικό κυκλοποιητή”. Έχει γίνει λοιπόν η ακολουθία και, θεωρητικά πάντα, πιστεύουμε πως πολλαπλασιάστηκε το DNA. Αυτό όμως πρέπει να ελεγχθεί. Ο έλεγχος γίνεται με την διαδικασία της ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αγαρόζης.

Η τεχνική αυτή είναι μια γρήγορη και εύκολη διαδικασία η οποία διαχωρίζει κομμάτια DNA. Το μέγεθος των πόρων εξαρτάται από τη συγκέντρωση της πηκτής αγαρόζης. Οι πόροι είναι αυτοί που επιτρέπουν τη διέλευση των τμημάτων του DNA ανάμεσά τους.

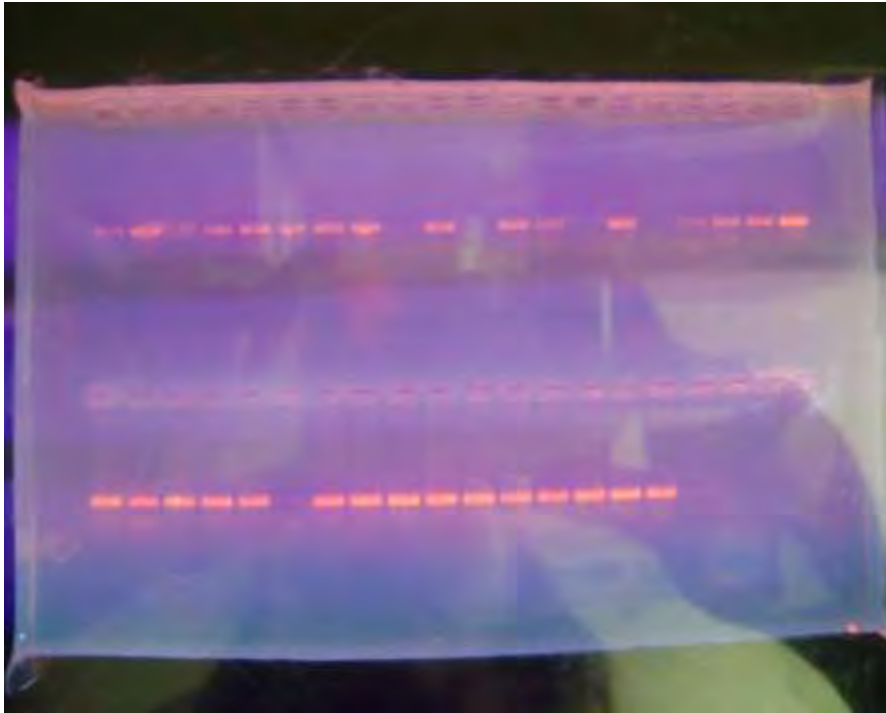
Η κινητικότητα των μορίων DNA κατά την ηλεκτροφόρηση στην πηκτή αγαρόζης εξαρτάται από:

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

Παρασκευάζουμε λοιπόν την πηκτή αγαρόζης όπως αναφέραμε και προηγουμένως και ολοκληρώνοντας τη διαδικασία ελέγχουμε αν το DNA που πήραμε από την PCR είναι ποιοτικά και ποσοτικά επαρκές. Η τεχνική της ηλεκτροφόρησης βασίζεται στην ιδιότητα των αρνητικά φορτισμένων φωσφορικών ομάδων να κινούνται προς το θετικό πόλο του ηλεκτρικού πεδίου.

Στη συγκεκριμένη μέθοδο όπως παρατηρήσαμε προστίθεται βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr). Το βρωμιούχο αιθίδιο με μία πλευρική ομάδα που περιέχει, παρεμβάλλεται μεταξύ γειτονικών βάσεων του DNA και φθορίζει όταν ακτινοβολείται με υπεριώδη ακτινοβολία. Συγκεκριμένα η υπεριώδης ακτινοβολία που απορροφάται από το DNA στα 260nm μεταφέρεται στη χρωστική, η οποία

επανεκπέμπεται στα 590nm. Αυτό λοιπόν βοηθάει στο να γίνουν ευδιάκριτες οι μπάντες που σχηματίζονται. Έτσι τοποθετώντας την πηκτική αгарόζης επάνω σε φθορίζον τραπέζι παίρνουμε τα αποτελέσματα που χρειαζόμαστε για να οδηγηθούμε στο επόμενο βήμα της SSCP.



Εικ. 5 Μεγάλο τζέλ πηκτικής αгарόζης (40 θέσεων) σε φθορίζον τραπέζι

## 2.5 Μέθοδος Ανάλυσης Πολυμορφισμού Μονόκλωνης Διαμόρφωσης (SSCP)

Αφού λοιπόν διαπιστώσουμε πως μετά τον πολλαπλασιασμό με τη μέθοδο της PCR το δείγμα που παίρνουμε είναι ποιοτικά και ποσοτικά ικανοποιητικό κάνουμε τη μέθοδο της ανάλυσης πολυμορφισμού μονόκλωνης αλυσίδας. Εφαρμόζουμε αυτή τη διαδικασία γιατί με την πηκτή αγαρόζης βρίσκουμε τμήματα των 100 βάσεων και περισσότερα. Εμείς με την SSCP παίρνουμε την μονόκλωνη αλυσίδα που βρίσκεται σε τρισδιάστατη μορφή και την αποδιατάσσουμε σε 2 κλώνους. Έτσι μπορούμε να βρούμε τις πιθανές μεταλλάξεις σε επίπεδο γονιδίων.

Για να γίνει αυτό ακολουθούμε τα εξής βήματα:

### 1<sup>η</sup> ημέρα

1. Διαλέγουμε τζάμια, ένα με εγκοπή και ένα χωρίς, ώστε να είναι ίσα.
2. Βάζουμε βαζελίνη στους δύο αποστάτες για να στεγανοποιηθούν και τους τοποθετούμε ανάμεσα στα τζάμια.
3. Γυρίζουμε τους σφιγκτήρες στα πλαϊνά για να σταθεροποιηθούν τα τζάμια.
4. Φτιάχνουμε το τζελ σε ποτήρι ζέσεως.  
Για διάλυμα 10% και 125ml (για 20 + 20 δείγματα) στο τζελ βάζουμε:
  - 12,375 ακρυλαμίδη
  - 0,33 bis – ακρυλαμίδη
  - 10ml TBE 10x
  - 12,5ml γλυκερόλη 50%
  - συμπληρώνουμε νερό μέχρι 100ml.Αναδεύουμε στο stirrer μέχρι να ομογενοποιηθεί το διάλυμα .
5. Φιλτράρουμε σε κωνική φιάλη, με χωνί και διηθητικό χαρτί.
6. Συμπληρώνουμε με νερό μέχρι όγκο 125ml.
7. Συμπληρώνουμε 125ml Temed και 650 ml APS 20%.  
Μόλις προσθέσουμε αυτό ανακινούμε γρήγορα και με γρήγορες κινήσεις το τοποθετούμε στα τζάμια πριν προλάβει να σταθεροποιηθεί.
8. Τοποθετούμε τα χτενάκια στα τζάμια βάζοντάς τα από τη μία πλευρά προς την άλλη.
9. Περιμένουμε λιγάκι και αν αυτό «καθίσει» λίγο συμπληρώνουμε με μία πιπέτα μέχρι εκεί που επιθυμούμε. Αφήνουμε να σταθεροποιηθεί το τζελ αρκετή ώρα.
10. Γράφουμε erppendorf με το νούμερο του δείγματος.

11. Σε κάθε eppendorf βάζουμε:
  - 10ml buffer SSCP
  - 5ml από την PCR.
12. Τα τοποθετούμε στην αποδιάταξη για μερικά λεπτά
13. 1.5min πριν σταματήσει το μηχάνημα το βγάζουμε για να μην ανεβάσει θερμοκρασία πάλι. Διαρκεί περίπου 7min.
14. Μόλις τα βγάλουμε από την αποδιάταξη τα τοποθετούμε σε πάγο για να μην γίνει επανένωση των αποδιατεταγμενων αλυσίδων.
15. Παίρνουμε τα τζάμια με το στεγνό πλέον τζελ και καθαρίζουμε με βελόνα τα πηγαδάκια από τα τυχόν υπολείμματα για να μην εμποδίσουν τα διαλείμματα να τρέξουν σωστά.
16. Φορτώνουμε τα διαλύματα στα πηγαδάκια αφού βάλουμε τη συσκευή σε buffer και συμπληρώνουμε αν χρειάζεται.
17. Τοποθετούμε την συσκευή στο ψυγείο σε ακριβώς οριζόντια θέση. Συνδέουμε το μηχάνημα και αφήνουμε γύρω στις 20h (18-20h).

## 2<sup>η</sup> ημέρα

1. Αποσυνδέουμε το μηχάνημα και το βγάζουμε από το ψυγείο.
2. Παίρνουμε δύο ζελατίνες μέσα στις οποίες θα τοποθετήσουμε τα τζέλ
3. Ανοίγουμε τα τζάμια προσεκτικά χωρίς να προκαλέσουμε κάποια φθορά στο τζέλ.
4. Γυρίζουμε το ένα τζάμι με το τζελ, πάνω στην ανοιγμένη ζελατίνη και σπρώχνουμε απαλά το τζελ για να ξεκολλήσει από το τζάμι.
5. Κόβουμε λίγο τη γωνία της αρχής για να σημαδέψουμε την αρχή.
6. Τοποθετούμε ζελατίνα και τζελ σε ένα μεταλλικό δοχείο και κάνουμε πλύσεις με 3 διαφορετικά διαλύματα.
7. Το 1<sup>ο</sup> διάλυμα περιέχει (ποσότητα για 2 τζελ):
  - 20ml αλκοόλη
  - 1ml οξικό οξύ (acetic acid)
  - 780ml H<sub>2</sub>OΡίχνουμε 200ml σε κάθε τζελ, άρα 400ml.  
  
Περιμένουμε 3min ανακινώντας το τζελ στο μηχάνημα.  
  
Ξεπλένουμε 1 φορά με νερό.  
  
Ρίχνουμε 200ml σε κάθε τζελ, άρα άλλα 400ml.  
  
Περιμένουμε 3min ανακινώντας.  
  
Ξεπλένουμε 1 φορά με νερό.
8. Το 2<sup>ο</sup> διάλυμα περιέχει (ποσότητα για 2 τζελ):
  - 400ml άργυρο (100ml H<sub>2</sub>O + 1gr Silver Nitrate)Ρίχνουμε από 200ml σε κάθε τζελ και ανακινούμε.

Περιμένουμε 20min έχοντας το τζελ σε κίνηση.

Ξεπλένουμε 2 φορές με νερό και ανακινούμε.

9. Το 3<sup>ο</sup> διάλυμα περιέχει (ποσότητα για 2 τζελ):

- 6gr υδροξείδιο του νατρίου
- ελάχιστο NaBH<sub>4</sub> (υβρίδιο)
- H<sub>2</sub>O μέχρι 400ml και ανακατεύουμε στο stirrer
- 2ml φορμαλδεΐδη στον επαγωγό ανακατεύοντας.

Βάζουμε από 200ml σε κάθε τζελ και το αφήνουμε ανακινώντας μέχρι να χρωματιστούν οι μπάντες.

Ξεπλένουμε 1 φορά.

10. Μετά βγάζουμε τα τζελ από το μεταλλικό δοχείο.

Στεγνώνουμε με πετσέτα.

Τα τοποθετούμε σωστά πάνω στη ζελατίνη.

11. Τυλίγουμε και σταθεροποιούμε.

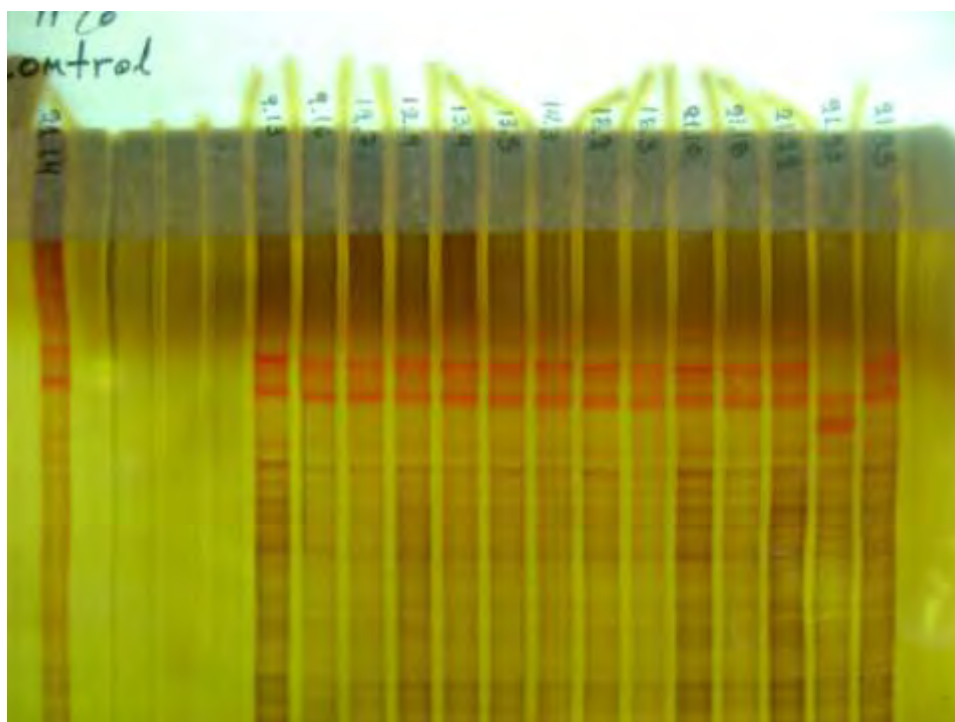
12. Τοποθετούμε ταινία και γράφουμε τους αριθμούς των δειγμάτων.

13. Τα εξετάζουμε στο φωτεινό μηχάνημα και τραβάμε φωτογραφίες για το αρχείο μας.

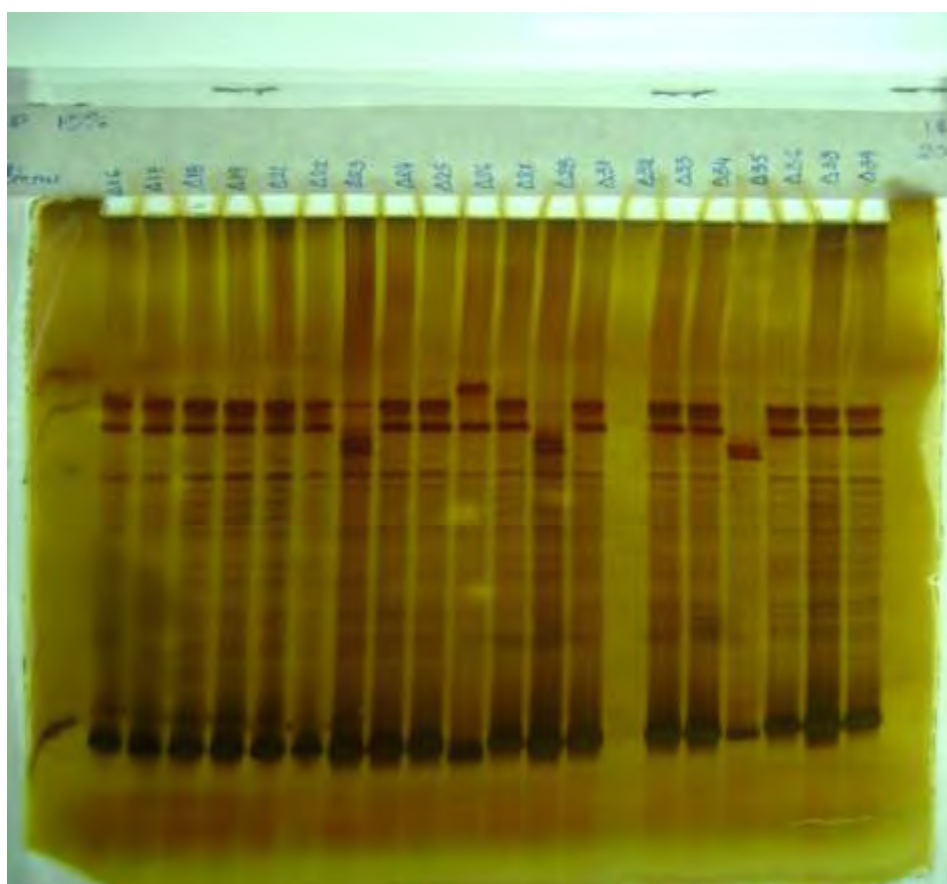
14. Σημειώνουμε ποια δείγματα έχουν υποστεί μετάλλαξη.

Ακολουθώντας λοιπόν όλα τα παραπάνω βήματα παίρνουμε τζελ ακρυλαμίδης που πάνω τους είναι σχηματισμένες μπάντες του DNA. Μελετώντας τες αναλυτικά μπορούμε να δούμε αν τα άτομα τα οποία έχουμε ελέγξει έχουν υποστεί μεταλλάξεις στο DNA τους.

Από το πλήθος των ατόμων που έχουμε μελετήσει θα γίνει φανερό ποια άτομα ακολουθούν το «κοινό πρότυπο» και ποια έχουν υποστεί μεταλλάξεις. Αυτά που θα έχουν υποστεί μεταλλάξεις θα εμφανίζουν μπάντες σε διαφορετικά σημεία από ότι τα άτομα που ανήκουν στο «κοινό πρότυπο».



Εικ. 6 Δείγματα ατόμων που δεν ασθενούν από διαβήτη με τα μιτοχονδριακά tRNA γονίδια Θρεονίνη- Προλίνη



Εικ. 7 Δείγματα ασθενών του διαβήτη με τα μιτοχονδριακά tRNA γονίδια Θρεονίνη- Προλίνη

## 2.6 ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗΣ SSCP

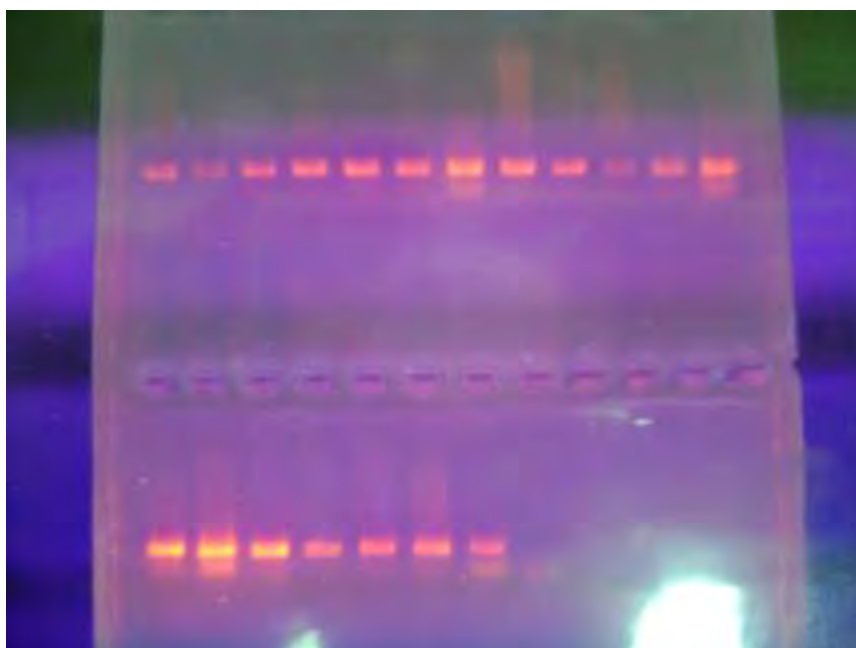
Εκτός από το μέγεθος του τμήματος DNA και την περιεκτικότητά του σε GC, άλλες παράμετροι που επηρεάζουν την ευαισθησία της ανάλυσης SSCP είναι:

- **Σύσταση του πηκτώματος:** Το πιο κοινό πήκτωμα, με την ευρύτερη αποδοχή, είναι το διασυνδεδεμένο πολυμερές ακρυλαμιδίου (8 – 12 %). Το μικρό μέγεθος των πόρων του πηκτώματος αυτού, το καθιστά ιδανικό για υψηλή διακριτική ικανότητα και ανάλυση, ακόμα και σε επίπεδο νουκλεοτιδίων. Ακόμα υψηλότερη διακριτική ικανότητα επιτυγχάνεται με την προσθήκη σακχαρόζης ή γλυκερόλης σε ποσοστό 10 – 15 %.
- **Σύσταση του ρυθμιστικού διαλύματος:** Η προσθήκη 50% γλυκερόλης μειώνει το pH και ελαττώνει την ηλεκτροστατική απώθηση μεταξύ των αρνητικά φορτισμένων ομάδων του σκελετού των νουκλεϊκών οξέων, επιτρέποντας έτσι υψηλότερη δυνατότητα διάκρισης μεταξύ των μεταλλαγμένων και των φυσιολογικών τμημάτων DNA. Επίσης, οι δομές διαμόρφωσης πιθανόν να καταστούν πιο συμπαγείς αν αυξηθεί η συγκέντρωση του άλατος.
- **Μήκος πηκτώματος και διάρκεια ηλεκτροφόρησης:** Ο χρόνος της ηλεκτροφόρησης εξαρτάται από το μήκος του πηκτώματος και την τάση που εφαρμόζεται. Είναι προτιμότερο να ξεκινήσει η ηλεκτροφόρηση με σχετικά χαμηλή τάση, η οποία θα αυξηθεί μόλις τα τμήματα της PCR έχουν εισέλθει στο πήκτωμα. Το μήκος του πηκτώματος μπορεί να κυμαίνεται από 10 – 40cm. Κατά κανόνα, όσο μεγαλύτερο είναι το μήκος του πηκτώματος, τόσο καλύτερη είναι η διακριτική ικανότητα, καθώς συχνά οι διαφορές στη διαμόρφωση του φυσιολογικού και του μεταλλαγμένου μονόκλωνου DNA είναι τόσο μικρές, ώστε να μετακινούνται σε μικρή απόσταση μεταξύ τους.
- **Θερμοκρασία:** Η θερμοκρασία παίζει σημαντικό ρόλο στις αλλαγές διαμόρφωσης των τμημάτων DNA. Εκτός από τη μείωση του pH, έχει διαπιστωθεί ότι και η μείωση της θερμοκρασίας στους 4°C βελτιώνει τη σταθερότητα της διαμόρφωσης οποιουδήποτε μονόκλωνου τμήματος DNA.
- **Συγκέντρωση του DNA:** Υψηλές συγκεντρώσεις DNA οδηγούν συχνά στη μείωση της ειδικής συγκέντρωσης του μονόκλωνου DNA. Ακόμα και μετά την προσθήκη φορμαμιδίου, έχει αποδειχθεί ότι, σε υψηλές συγκεντρώσεις, τα δύο μονόκλινα μόρια τείνουν να επανασυνδεθούν και να σχηματίσουν δίκλινο DNA. Συνεπώς, καλό είναι να διατηρείται σχετικά χαμηλή συγκέντρωση DNA στο ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης.



## 2.7 ΟΜΑΔΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

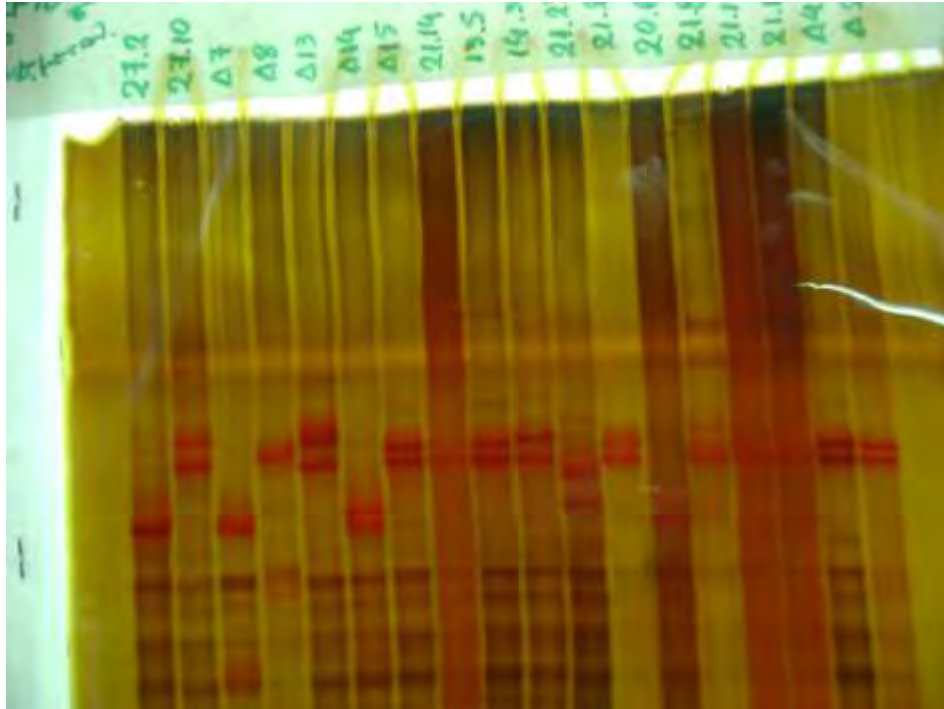
Έχουμε πλέον ακολουθήσει τη διαδικασία της PCR, της ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αгарόζης και της ηλεκτροφόρησης σε τζελ ακρυλαμίδης των 40 δειγμάτων από φυσιολογικά άτομα και των 102 δειγμάτων από άτομα που πάσχουν από διαβήτη για δύο ομάδες μιτοχondριακών t RNA γονιδίων. Η πρώτη ομάδα είναι το ζεύγος των γειτονικών μιτοχondριακών t RNA γονιδίων της Θρεονίνης (T) και της Προλίνης (P), και η δεύτερη ομάδα είναι η τριπλέτα των γειτονικών μιτοχondριακών t RNA γονιδίων της Ασπαργίνης (A), της Κυστεΐνης (C) και της Τυροσίνης (T), και πλέον ομαδοποιούμε τα δεδομένα μας.



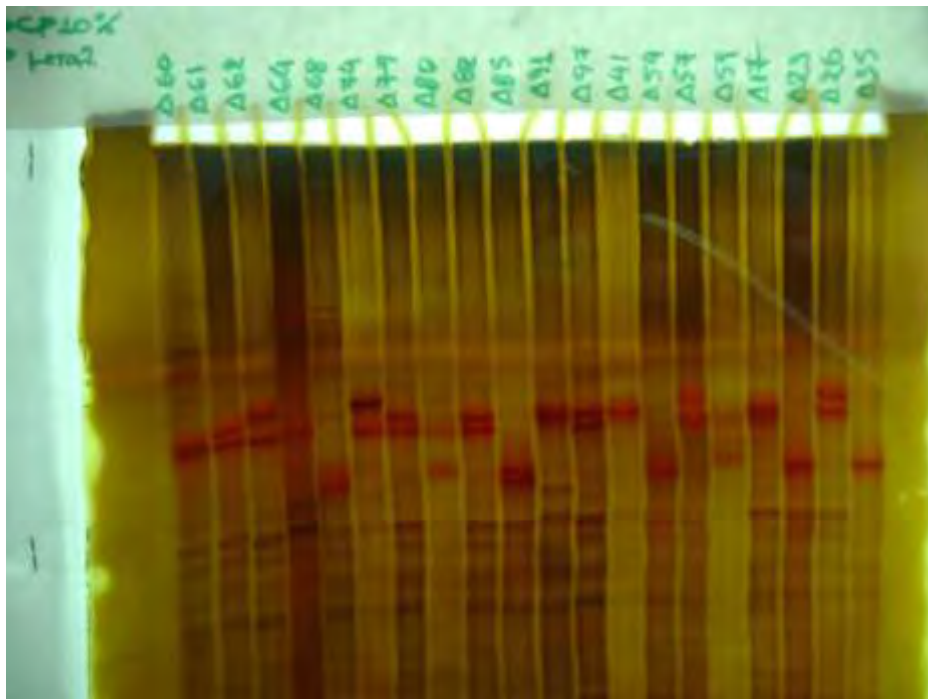
Εικ. 8 Τζελ πηκτής αгарόζης

Συγκεντρώνουμε όλα τα τζελ από όλα τα άτομα και ελέγχοντας τα σημεία στα οποία εμφανίζονται οι μπάντες. Μπορούμε να δούμε ποια άτομα σχηματίζουν ομάδες με άλλα και ποια διαφέρουν μεταξύ τους. Παρατηρούμε λοιπόν το «κοινό πρότυπο» που αποτελεί μία ομάδα και τις πιθανές μεταλλάξεις που έχουμε βρει.

Αφού λοιπόν ομαδοποιήσουμε τα δεδομένα μας διαλέγουμε δύο ή τρία άτομα από κάθε ομάδα και τα οδηγούμε σε καθαρισμό. Τέλος τα δείγματα τα αποστέλλουμε στην Ιατρική Σχολή για Προσδιορισμό της Νουκλεοτιδικής Αλληλουχίας Μορίων DNA (sequencing).



Εικ. 9 Δείγματα με μεταλλάξεις φυσιολογικών ατόμων και ασθενών διαβήτη των μιτοχονδριακών t RNA γονιδίων Θρεονίνη- Προλίνη



Εικ. 10 Δείγματα με μεταλλάξεις ασθενών διαβήτη των μιτοχονδριακών t RNA γονιδίων Θρεονίνη- Προλίνη

## 2.8 ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ PCR

Για τον καθαρισμό των προϊόντων PCR ακολουθούμε τα εξής βήματα:

1. Παίρνω tip μεγέθους 1,5 και γράφω τα νούμερα των δειγμάτων.
2. Βάζουμε από το buffer 200ml στο κάθε ένα.
3. Βάζουμε το προϊόν PCR ένα – ένα σε κάθε tip 50ml .
4. Ανακινούμε με το χέρι.
5. Κάνουμε Spin.
6. Παίρνουμε τις στήλες (φίλτρα) και γράφουμε τα νούμερα των δειγμάτων.
7. Μεταφέρουμε από το erpendorf όλο το υλικό στη στήλη.
8. Κάνουμε φυγοκέντρηση για 1min.
9. Ανοίγουμε το κάτω μέρος και απομακρύνω το υγρό που έχει βγει.
10. Προσθέτουμε 650ml από το Wash Buffer (W<sub>1</sub>).
11. Φυγοκεντρούμε για 1min.
12. Χύνουμε πάλι το υγρό που απέμεινε στο κάτω μέρος του erpendorf.
13. Φυγοκεντρούμε για 2min.
14. Βάζουμε Elution Tubes και γράφουμε τους κωδικούς.
15. Βάζουμε το πάνω μέρος από το ένα κομμάτι στο άλλο. Δηλαδή παίρνουμε το φίλτρο με το υλικό και το βάζουμε στο Elution Tubes.
16. Βάζουμε 50ml Elution Buffer (E<sub>1</sub>) στα φίλτρα.
17. Περιμένουμε για 1min να δράσει.
18. Βάζουμε στη φυγόκεντρο για 2min.
19. Πετάμε το φίλτρο.
20. Κλείνουμε το erpendorf και έχουμε το καθαρό DNA.

## 2.9 ΦΩΤΟΜΕΤΡΗΣΗ

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

## 2.10 ΛΥΟΦΙΛΙΩΣΗ

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

- Προσθέτουμε 300ml παγωμένη αιθανόλη 100% και 10ml NaOAc 3M.
- Τα ανακατεύουμε ελαφρώς και τα τοποθετούμε στους -20°C overnight.
- Φυγοκεντρούμε τα δείγματα στους 4°C στις 13000rpm για 20min.
- Απομακρύνουμε το υπερκείμενο.
- Βάζουμε τα δείγματα στο φούρνο, στους 37°C, για περίπου 1h, μέχρι να απομακρυνθεί η αιθανόλη.

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

## **2.11 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ ΜΟΡΙΩΝ DNA (Sequencing)**

Τα δείγματα του πειράματος μας αποστέλλονται στην Ιατρική Σχολή για αλληλούχιση (sequencing), όπου αναλύονται με τον αυτόματο αναλυτή, ο οποίος λειτουργεί σύμφωνα με τη μέθοδο εύρεσης αλληλουχίας κατά Sanger. Η μέθοδος αυτή αποτελείται από τρία στάδια:

### **Α΄ Στάδιο**

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

## **Β' Στάδιο**

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

## **Γ' Στάδιο**

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

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

### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Όπως αναφέραμε και στην αρχή του κεφαλαίου Υλικά και Μέθοδοι, για να πραγματοποιηθεί η παρούσα εργασία χρησιμοποιήσαμε 40 δείγματα αίματος υγείων ατόμων και 102 δείγματα αίματος ατόμων που πάσχουν από σακχαρώδη διαβήτη. Τα δείγματα αίματος παραχωρήθηκαν από το Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας. Σκοπός της εργασίας μας ήταν να προσδιοριστούν οι μεταλλάξεις στα μιτοχονδριακά tRNA γονίδια σε άτομα που ασθενούν ή όχι από διαβήτη. Έγινε, λοιπόν, μία σειρά διαδοχικών εργασιών που η κάθε μία έδινε κάποια αποτελέσματα χρήσιμα για την πορεία της εργασίας αλλά και απαραίτητα για να οδηγηθούμε στο επόμενο βήμα της εργασίας μας.

#### 3.1 Απομόνωση DNA

Αρχικά πήραμε τα δείγματα αίματος των 40 υγίων ατόμων και των 102 διαβητικών ατόμων και κάναμε απομόνωση του DNA. Εκτιμήσαμε το αποτέλεσμα της απομόνωσης μετά την ολοκλήρωση μίας σειράς εργασιών με την ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης και εξέτασης πάνω σε τράπεζα υπεριώδους φωτός. Εξετάσαμε την κάθε πηκτή αγαρόζης ξεχωριστά και το κάθε δείγμα μεμονωμένα. Τα δείγματα που έδωσαν ικανοποιητικά αποτελέσματα οδηγήθηκαν στην επόμενη διαδικασία. Για τα δείγματα που τα αποτελέσματά τους δεν ήταν ξεκάθαρα επαναλάβαμε τη διαδικασία της απομόνωσης μέχρι να πάρουμε ικανοποιητικά αποτελέσματα.

#### 3.2 Ενίσχυση με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR)

Στη συνέχεια, και αφού πρώτα έχει προηγηθεί η απομόνωση DNA, ακολουθούμε την ενίσχυση τμημάτων του DNA. Στο πείραμά μας έγινε ενίσχυση δύο ομάδων μιτοχονδριακών tRNA γονιδίων, των γειτονικών μιτοχονδριακών tRNA γονιδίων της Θρεονίνης (T) και της Προλίνης (P) καθώς και των γειτονικών μιτοχονδριακών tRNA γονιδίων της Ασπαργίνης (A), της Κυστεΐνης (C) και της Τυροσίνης (T), στα δείγματα αίματος και των υγείων ατόμων αλλά και των ατόμων που έπασχαν από διαβήτη.

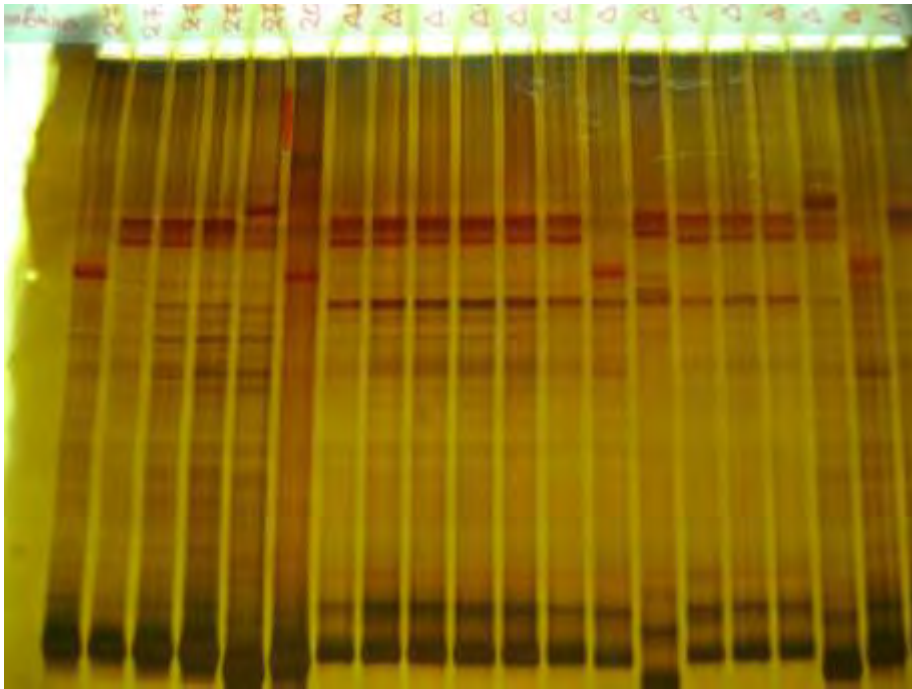
Η ενίσχυση των τμημάτων αυτών του μιτοχονδρίου έγινε με την μέθοδο της PCR. Σύμφωνα με αυτή γίνεται προσθήκη ουσιών και εκκινητών καθώς και DNA, όπως έχει ήδη αναφερθεί, και όλα τοποθετούνται στο μηχάνημα της PCR όπου πραγματοποιεί τον πολλαπλασιασμό συγκεκριμένων τμημάτων του DNA.

Κατόπιν, τα αποτελέσματα της PCR ηλεκτροφορούνται σε πηκτή αγαρόζης και παρατηρούνται σε τράπεζα υπεριώδους φωτός. Τα ικανοποιητικά αποτελέσματα συλλέγονται και οδηγούνται στην επόμενη διαδικασία. Όμως, πολλά δείγματα δεν δίνουν ικανοποιητικά αποτελέσματα λόγω κάποιας επιμόλυνσης που πραγματοποιείται κατά την πορεία του πειράματος. Στα δείγματα αυτά επαναλαμβάνουμε τη διαδικασία μέχρις ότου πάρουμε ικανοποιητικά και καθαρά αποτελέσματα.

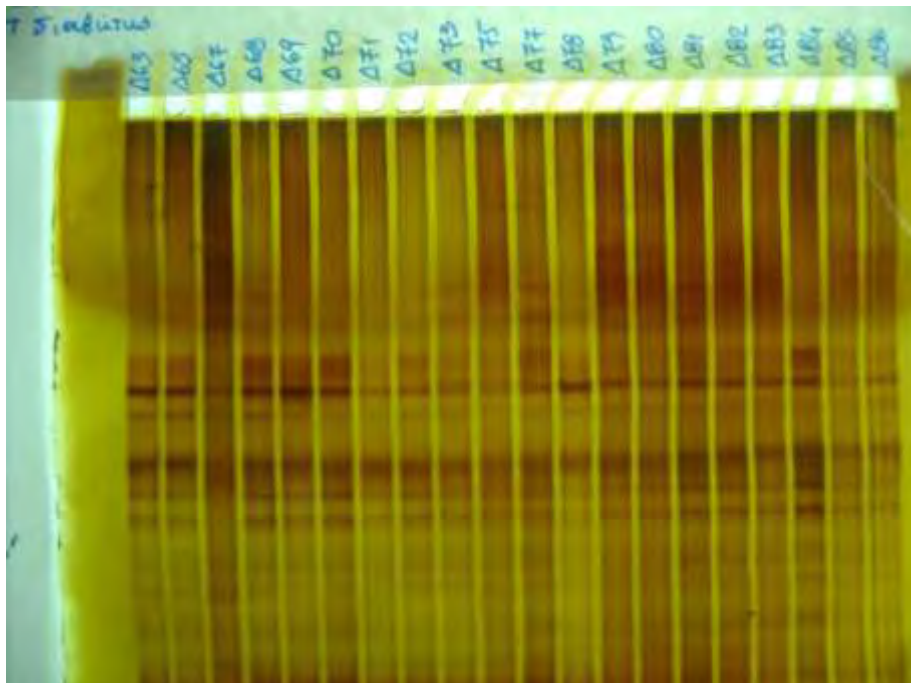
### **3.3 Μέθοδος Ανάλυσης Πολυμορφισμού Μονόκλωνης Διαμόρφωσης (SSCP)**

Έχοντας πλέον πολλαπλασιάσει το τμήμα του DNA που επιθυμούσαμε εφαρμόζουμε τη μέθοδο της SSCP. Γνωρίζουμε πως η ταχύτητα μετακίνησης των τμημάτων μονόκλωνου DNA με σχετικά μικρό μήκος εξαρτάται και από το μέγεθός τους, αλλά και από την αλληλουχία τους. Έτσι, μετά από ενίσχυση μίας δεδομένης αλληλουχίας DNA στην PCR, τα ενισχυμένα τμήματα DNA υποβάλλονται σε αποδιάταξη είτε με θέρμανση είτε με χημικούς παράγοντες, όπως το φορμαμίδιο. Κατόπιν, τα αποδιαταγμένα τμήματα DNA ηλεκτροφορούνται σε μη αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης. Κατά την ηλεκτροφόρηση, τα μονόκλιωνα τμήματα DNA παίρνουν ένα συγκεκριμένο τρισδιάστατο σχήμα, ανάλογα με τη νουκλεοτιδική τους αλληλουχία και αποκτούν διαφορετική μορφή. Με βάση τις παραπάνω αρχές είναι σαφές ότι τμήματα με διαφορά έστω και σε μία μόνο βάση αποκτούν διαφορετική διαμόρφωση και μετακινούνται με διαφορετικό τρόπο κατά την ηλεκτροφόρηση. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα, στα τζελ ακρυλαμίδης που φτιάχνουμε και αφήνουμε να «τρέξουν», να φαίνονται τα τμήματα του DNA να έχουν φτάσει σε διαφορετικά σημεία πάνω στο τζελ, όταν έχουν έστω και μία διαφορετική βάση.

Με βάση τα παραπάνω, εμείς μπορούμε να συμπεράνουμε ποια άτομα παρουσιάζουν διαφοροποιήσεις από το σύνολο. Τα άτομα αυτά είναι πιθανό να έχουν υποστεί στο γονιδίωμά τους κάποια μετάλλαξη, την οποία και αναζητούμε. Ομαδοποιούμε, λοιπόν, τα αποτελέσματα και τα δείγματα ατόμων από κάθε ομάδα αποστέλλονται για εύρεση της Αλληλουχίας, αφού καθαριστούν από τα υπολείμματα της PCR.



Εικ. 11 Δείγματα των μιτοχονδριακών t RNA γονιδίων Θρεονίνη- Πρωλίνη στο διαβήτη



Εικ. 12 Δείγματα των μιτοχονδριακών t RNA γονιδίων της Ασπαργίνης, της Κυστεΐνης και της Τυροσίνης στο διαβήτη



### 3.4 Εύρεση Αλληλουχίας

Στη συνέχεια λοιπόν, αφού έχουμε ανιχνεύσει σε ποια άτομα παρατηρούνται μεταλλάξεις και πολυμορφισμοί, οδηγούμε τα δείγματα σε ταυτοποίηση με τη μέθοδο της αυτόματης αλληλούχησης. Η μέθοδος αυτή δεν λαμβάνει χώρα στο δικό μας εργαστήριο, αλλά σε τμήμα της Ιατρικής Σχολής Θεσσαλίας. Όταν, λοιπόν, πάρουμε τα αποτελέσματα από την αυτόματη αλληλούχηση ακολουθεί επεξεργασία αυτών αναζητώντας στις αλληλουχίες την πιθανή μετάλλαξη.

### 3.5 Επεξεργασία Αποτελεσμάτων

Όπως αναφέραμε και προηγουμένως, όλες οι μεταλλάξεις και οι πολυμορφισμοί των μιτοχονδριακών γονιδίων tRNA, που μελετήθηκαν, ανιχνεύτηκαν με τη μέθοδο SSCP και ταυτοποιήθηκαν με τη μέθοδο αυτόματης αλληλούχησης. Στη συνέχεια επεξεργαζόμαστε τα δεδομένα έτσι ώστε να βρούμε τα σημεία των μεταλλάξεων.

Έχουμε αναφέρει και προηγουμένα πως τα δείγματα τα οποία μελετήσαμε ήταν 40 δείγματα αίματος από φυσιολογικά άτομα και 102 δείγματα ασθενών του διαβήτη. Σε αυτά τα 142 δείγματα, συνολικά, μελετήσαμε τα γειτονικά μιτοχονδριακά t RNA γονίδια της Θρεονίνης (T) και της Προλίνης (P), καθώς και τα γειτονικά μιτοχονδριακά t RNA γονίδια της Ασπαργίνης (A), της Κυστεΐνης (C) και της Τυροσίνης (T). Άρα, προκύπτουν 8 κατηγορίες να μελετήσουμε:

- Τα φυσιολογικά άτομα χωρίς μετάλλαξη στα μιτοχονδριακά t RNA γονίδια της Θρεονίνης (T) και της Προλίνης (P).
- Τα φυσιολογικά άτομα με μετάλλαξη στα μιτοχονδριακά t RNA γονίδια της Θρεονίνης (T) και της Προλίνης (P).
- Τα φυσιολογικά άτομα χωρίς μετάλλαξη στα μιτοχονδριακά t RNA γονίδια της Ασπαργίνης (A), της Κυστεΐνης (C) και της Τυροσίνης (T).
- Τα φυσιολογικά άτομα με μετάλλαξη στα μιτοχονδριακά t RNA γονίδια της Ασπαργίνης (A), της Κυστεΐνης (C) και της Τυροσίνης (T).
- Τα ασθενή άτομα χωρίς μετάλλαξη στα μιτοχονδριακά t RNA γονίδια της Θρεονίνης (T) και της Προλίνης (P).
- Τα ασθενή άτομα με μετάλλαξη στα μιτοχονδριακά t RNA γονίδια της Θρεονίνης (T) και της Προλίνης (P).
- Τα ασθενή άτομα χωρίς μετάλλαξη στα μιτοχονδριακά t RNA γονίδια της Ασπαργίνης (A), της Κυστεΐνης (C) και της Τυροσίνης (T).
- Τα ασθενή άτομα με μετάλλαξη στα μιτοχονδριακά t RNA γονίδια της Ασπαργίνης (A), της Κυστεΐνης (C) και της Τυροσίνης (T).

### **3.6 Αποτελέσματα της μελέτης των μιτοχονδριακών t RNA γονιδίων της Θρεονίνης (T) και της Προλίνης (P) για τυχών μεταλλάξεις.**

Γενικά θα μπορούσαμε να πούμε πως τα μιτοχονδριακά t RNA γονίδια της Θρεονίνης (T) και της Προλίνης (P) είναι δύο γειτονικά γονίδια που στο πείραμά μας τα εξετάσαμε ταυτόχρονα. Ποιό συγκεκριμένα το t RNA γονίδιο για την Θρεονίνη (T) βρίσκεται στη θέση 15888 – 15953 στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα. Μπορούμε λοιπόν να πούμε πως το γενικό της μήκος είναι 66 βάσεις. Το t RNA γονίδιο για την Προλίνη (P) βρίσκεται στη θέση 15956 – 16023 στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα. Μπορούμε λοιπόν να πούμε πως το γενικό της μήκος είναι 68 βάσεις.

Τα μιτοχονδριακά t RNA γονίδια της Θρεονίνης (T) και της Προλίνης (P) παρουσίασαν πολλούς πολυμορφισμούς και στους ασθενείς του διαβήτη αλλά και στα υγιή άτομα. Στα υγιή άτομα παρουσιάστηκαν 5 κατηγορίες πολυμορφισμών, οι οποίες περιλαμβάνουν τα εξής άτομα:

*1<sup>η</sup> κατηγορία:* 14.3

*2<sup>η</sup> κατηγορία:* 20.6, 27.2

*3<sup>η</sup> κατηγορία:* 21.8

*4<sup>η</sup> κατηγορία:* 21.23

*5<sup>η</sup> κατηγορία:* 21.15, 27.10, 21.14.

Στα άτομα με διαβήτη παρουσιάστηκαν 9 κατηγορίες πολυμορφισμών που περιλαμβάνουν τα εξής άτομα:

*1<sup>η</sup> κατηγορία:* D15, D59, D60, D80

*2<sup>η</sup> κατηγορία:* D7, D14, D23, D35, D68

*3<sup>η</sup> κατηγορία:* D26, D57, D62, D13

*4<sup>η</sup> κατηγορία:* D74

*5<sup>η</sup> κατηγορία:* D17

*6<sup>η</sup> κατηγορία:* D8

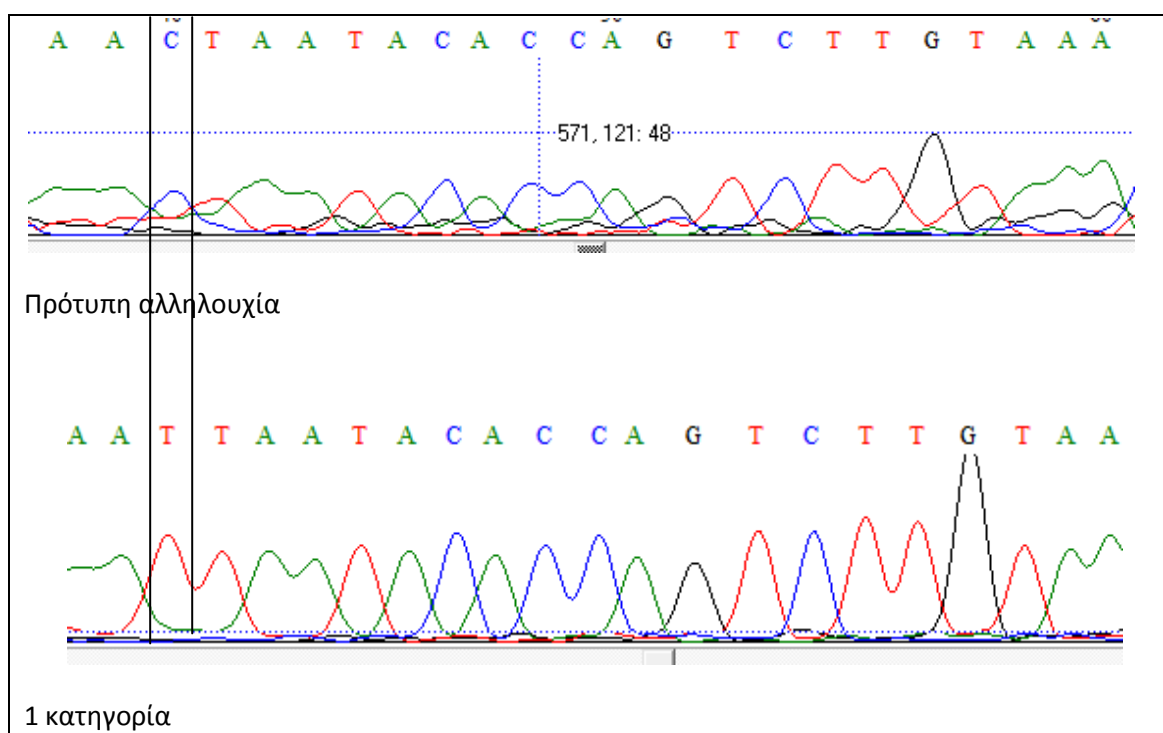
*7<sup>η</sup> κατηγορία:* D41, D91

*8<sup>η</sup> κατηγορία:* D61

### 9<sup>η</sup> κατηγορία: D64.

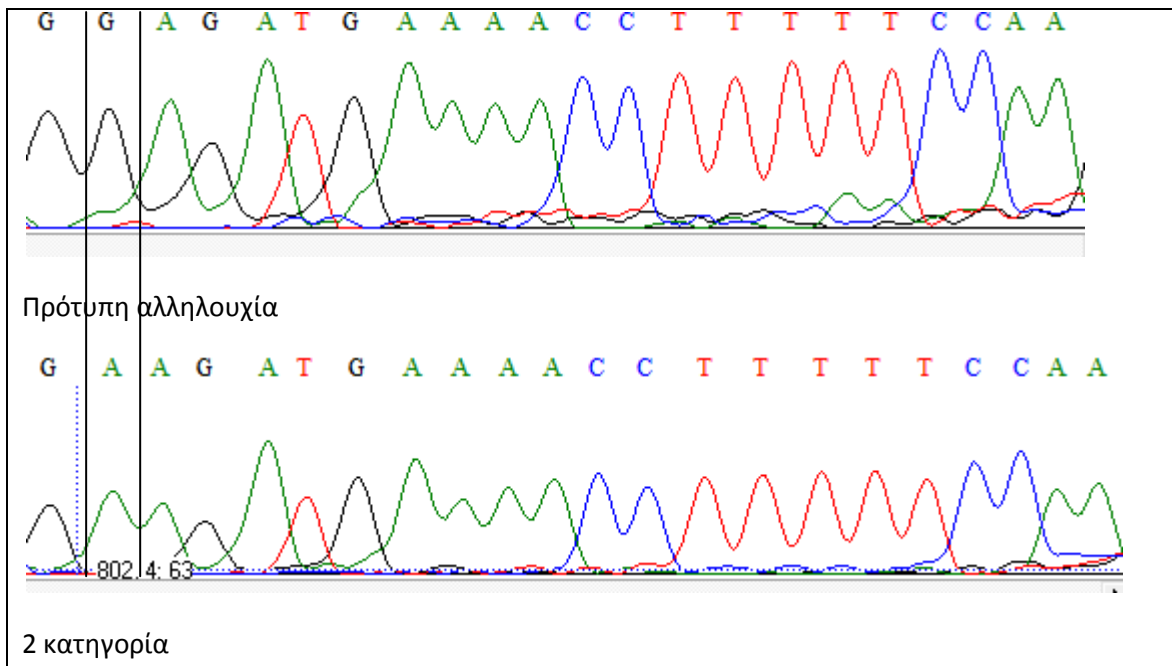
Αφού λοιπόν έχουν σχηματιστεί οι παραπάνω ομάδες πολυμορφισμών, τις εξετάζουμε για να βρούμε σε ποιο σημείο του γονιδιώματος υπάρχει η διαφοροποίηση. Έτσι ξεκινώντας από τα υγιή άτομα αναλύουμε μία – μία τις κατηγορίες.

Η 1<sup>η</sup> κατηγορία περιλαμβάνει το άτομο 14.3, στο οποίο παρατηρούμε την μετάλλαξη C15904T όπου προκύπτει αφού εφαρμόσουμε την μέθοδο της αυτόματης αλληλούχησης. Εντοπίζεται λοιπόν μία μετάλλαξη στη θέση 15904 του μιτοχondριακού γονιδιώματος. Η αλλαγή αυτή είναι μετάπτωση της βάσης από C σε T. Η θέση όπου παρατηρούμε τη διαφοροποίηση αυτή μας δείχνει πως η μετάλλαξη βρίσκεται στο μιτοχondριακό t RNA γονίδιο της Θρεονίνης. Στο Σχήμα 5 που ακολουθεί φαίνεται η διαφοροποίηση αυτή.



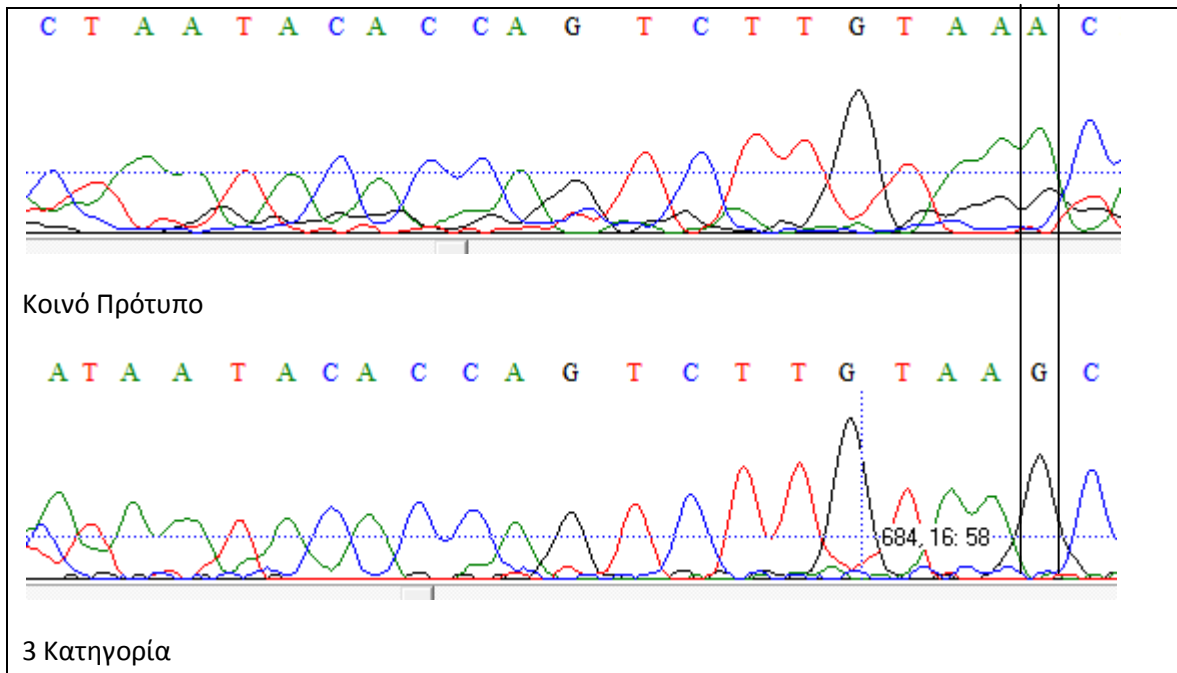
Σχήμα 5 .

Η 2<sup>η</sup> κατηγορία περιλαμβάνει τα άτομα 20.6 και 27.2, στα οποία παρατηρούμε τη μετάλλαξη G15928A όπου προκύπτει αφού εφαρμόσουμε την μέθοδο της αυτόματης αλληλούχησης. Εντοπίζεται λοιπόν μία μετάλλαξη στη θέση 15928 του μιτοχondριακού γονιδιώματος. Η αλλαγή αυτή είναι μετάπτωση της βάσης από G σε A. Η θέση όπου παρατηρούμε τη διαφοροποίηση αυτή μας δείχνει πως η μετάλλαξη βρίσκεται στο μιτοχondριακό t RNA γονίδιο της Θρεονίνης. Στο Σχήμα 6 που ακολουθεί φαίνεται η διαφοροποίηση αυτή.



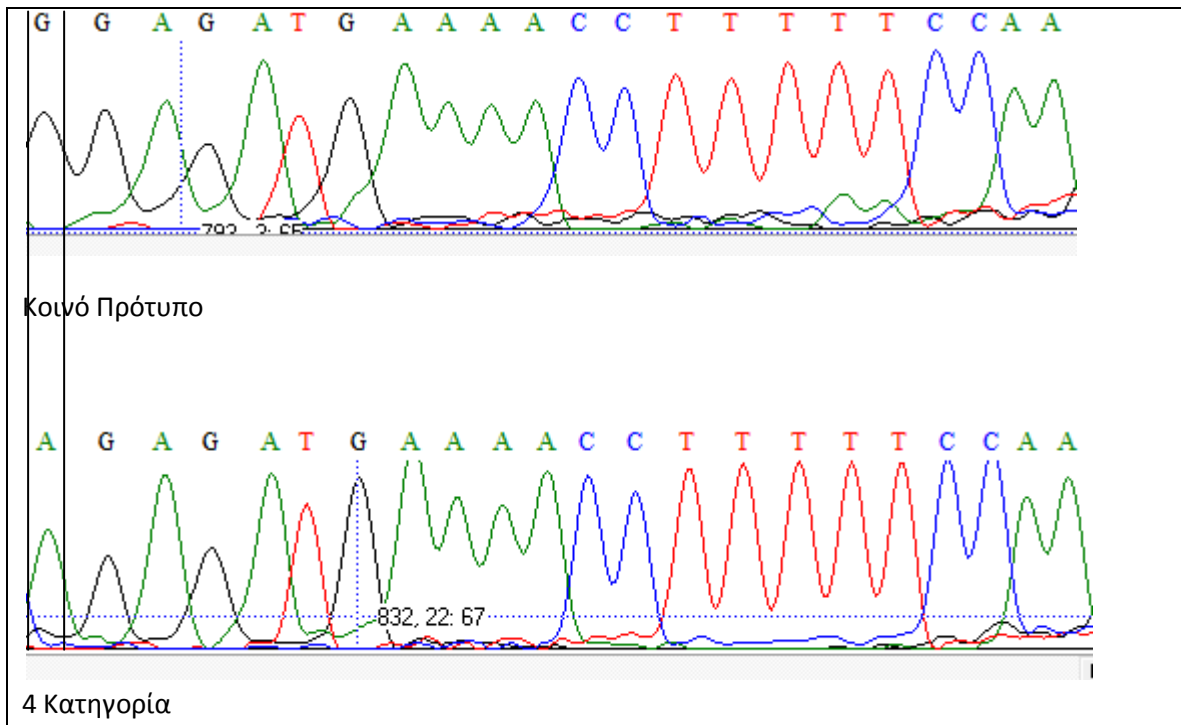
Σχήμα 6.

Η 3<sup>η</sup> κατηγορία περιλαμβάνει το άτομο 21.8 στο οποίο παρατηρούμε τη μετάλλαξη A15924G όπου προκύπτει αφού εφαρμόσουμε την μέθοδο της αυτόματης αλληλούχησης. Εντοπίζεται λοιπόν μία μετάλλαξη στη θέση 15924 του μιτοχονδριακού γονιδιώματος. Η αλλαγή αυτή είναι μετάπτωση της βάσης από A σε G. Η θέση όπου παρατηρούμε τη διαφοροποίηση αυτή μας δείχνει πως η μετάλλαξη βρίσκεται στο μιτοχονδριακό t RNA γονίδιο της Θρεονίνης. Στο Σχήμα 7 που ακολουθεί φαίνεται η διαφοροποίηση αυτή.



Σχήμα 7.

Η 4<sup>η</sup> κατηγορία περιλαμβάνει το άτομο 21.23 στο οποίο παρατηρούμε τη μετάλλαξη G15927A όπου προκύπτει αφού εφαρμόσουμε την μέθοδο της αυτόματης αλληλούχησης. Εντοπίζεται λοιπόν μια μετάλλαξη στη θέση 15927 του μιτοχονδριακού γονιδιώματος. Η αλλαγή αυτή είναι μετάπτωση της βάσης από G σε A. Η θέση όπου παρατηρούμε τη διαφοροποίηση αυτή μας δείχνει πως η μετάλλαξη βρίσκεται στο μιτοχονδριακό t RNA γονίδιο της Θρεονίνης. Στο Σχήμα 8 που ακολουθεί φαίνεται η διαφοροποίηση αυτή.



Σχήμα 8.

Η 5<sup>η</sup> κατηγορία περιλαμβάνει τα άτομα 21.14, 21.15 και 27.10 στα οποία δεν παρατηρούμε κάποια μετάλλαξη αφού εφαρμόσουμε την μέθοδο της αυτόματης αλληλούχησης. Έχουμε λοιπόν πλήρη ταύτιση της πρότυπης αλληλουχίας με την αλληλουχία των παραπάνω ατόμων. Άρα, συμπεραίνουμε πως τα άτομα αυτά ανήκουν στο «κοινό πρότυπο».

Στη συνέχεια θα μελετήσουμε τις ομάδες των ατόμων που πάσχουν από διαβήτη. Μελετώντας τις ομάδες αυτές μία προς μία μπορούμε να βρούμε τη θέση καθώς και το μιτοχονδριακό t RNA γονίδιο στο οποίο παρουσιάζονται οι μεταλλάξεις.

Η 1<sup>η</sup> κατηγορία ατόμων που πάσχουν από διαβήτη περιλαμβάνει τα άτομα D15, D59, D60 και D80 στα οποία δεν παρατηρούμε κάποια μετάλλαξη αφού εφαρμόσουμε την μέθοδο της αυτόματης αλληλούχησης. Έχουμε, λοιπόν, όπως και προηγουμένως πλήρη ταύτιση της πρότυπης αλληλουχίας με την αλληλουχία των ατόμων αυτών. Άρα, συμπεραίνουμε πως τα άτομα αυτά ανήκουν στο «κοινό πρότυπο».

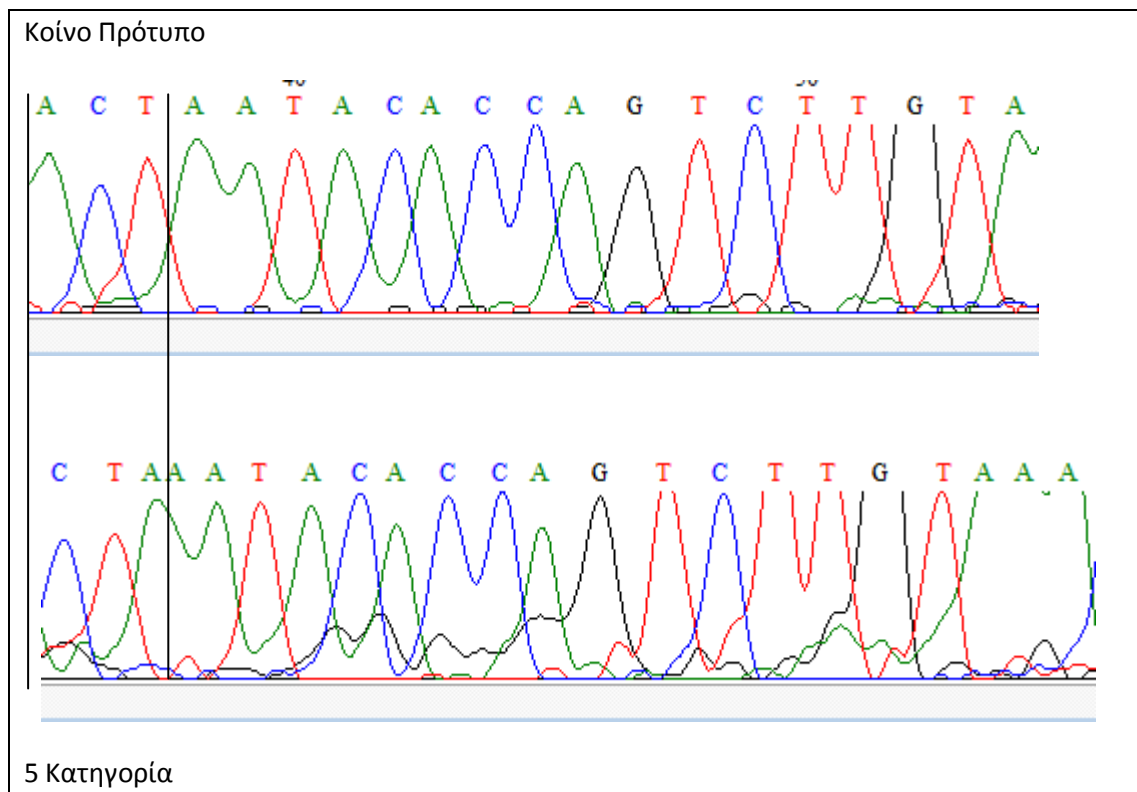
Η 2<sup>η</sup> κατηγορία ατόμων που πάσχουν από διαβήτη περιλαμβάνει τα άτομα D7, D14, D23, D35 και D68 στα οποία παρατηρούμε τη μετάλλαξη G15928A όπου προκύπτει αφού εφαρμόσουμε την μέθοδο της αυτόματης αλληλούχησης. Εντοπίζεται λοιπόν μία μετάλλαξη στη θέση 15928 του μιτοχονδριακού γονιδιώματος. Η αλλαγή αυτή είναι μετάπτωση της βάσης από G σε A. Η θέση όπου παρατηρούμε τη διαφοροποίηση αυτή μας δείχνει πως η μετάλλαξη βρίσκεται στο μιτοχονδριακό t

RNA γονίδιο της Θρεονίνης όπως συνέβει και με τα άτομα που προαναφέραμε και δεν πάσχουν από σακχαρώδη διαβήτη. Στο Σχήμα 6 φαίνεται η διαφοροποίηση αυτή.

Η 3<sup>η</sup> κατηγορία ατόμων που πάσχουν από διαβήτη περιλαμβάνει τα άτομα D26, D57, D62 και D13 στα οποία παρατηρούμε τη μετάλλαξη A15924G όπου προκύπτει αφού εφαρμόσουμε την μέθοδο της αυτόματης αλληλούχησης. Εντοπίζεται λοιπόν μία μετάλλαξη στη θέση 15924 του μιτοχονδριακού γονιδιώματος. Η αλλαγή αυτή είναι μετάπτωση της βάσης από A σε G. Η θέση όπου παρατηρούμε τη διαφοροποίηση αυτή μας δείχνει πως η μετάλλαξη βρίσκεται στο μιτοχονδριακό t RNA γονίδιο της Θρεονίνης όπως συνέβει και με τα άτομα που προαναφέραμε και δεν πάσχουν από σακχαρώδη διαβήτη. Στο Σχήμα 7 φαίνεται η διαφοροποίηση αυτή.

Η 4<sup>η</sup> κατηγορία ατόμων που πάσχουν από διαβήτη περιλαμβάνει το άτομο D74 στο οποίο παρατηρούμε τις μεταλλάξεις C15904T και A15924G όπου προκύπτουν αφού εφαρμόσουμε την μέθοδο της αυτόματης αλληλούχησης. Εντοπίζονται λοιπόν δύο μεταλλάξεις στις θέσεις 15904 και 15924 του μιτοχονδριακού γονιδιώματος. Οι αλλαγές αυτές είναι μεταπτώσεις των βάσεων από C σε T καθώς και από A σε G, στις αντίστοιχες θέσεις. Οι θέσεις όπου παρατηρούμε τις διαφοροποιήσεις αυτές μας δείχνουν πως οι μεταλλάξεις βρίσκονται στο μιτοχονδριακό t RNA γονίδιο της Θρεονίνης όπως συνέβει και με τα άτομα που προαναφέραμε και δεν πάσχουν από σακχαρώδη διαβήτη. Στα Σχήματα 5 και 7 φαίνονται οι διαφοροποιήσεις αυτές.

Η 5<sup>η</sup> κατηγορία ατόμων που πάσχουν από διαβήτη περιλαμβάνει το άτομο D17 στο οποίο παρατηρούμε τις μεταλλάξεις A15903C και C15904T και T15905A όπου προκύπτουν αφού εφαρμόσουμε την μέθοδο της αυτόματης αλληλούχησης. Εντοπίζονται λοιπόν τρεις μεταλλάξεις στις θέσεις 15903 και 15904 και 15905 του μιτοχονδριακού γονιδιώματος. Οι αλλαγές αυτές είναι μεταπτώσεις των βάσεων από A σε C και από C σε T καθώς και από T σε A, στις αντίστοιχες θέσεις. Οι θέσεις όπου παρατηρούμε τις διαφοροποιήσεις αυτές μας δείχνουν πως οι μεταλλάξεις βρίσκονται στο μιτοχονδριακό t RNA γονίδιο της Θρεονίνης. Στο Σχήμα 9 φαίνονται οι διαφοροποιήσεις αυτές.

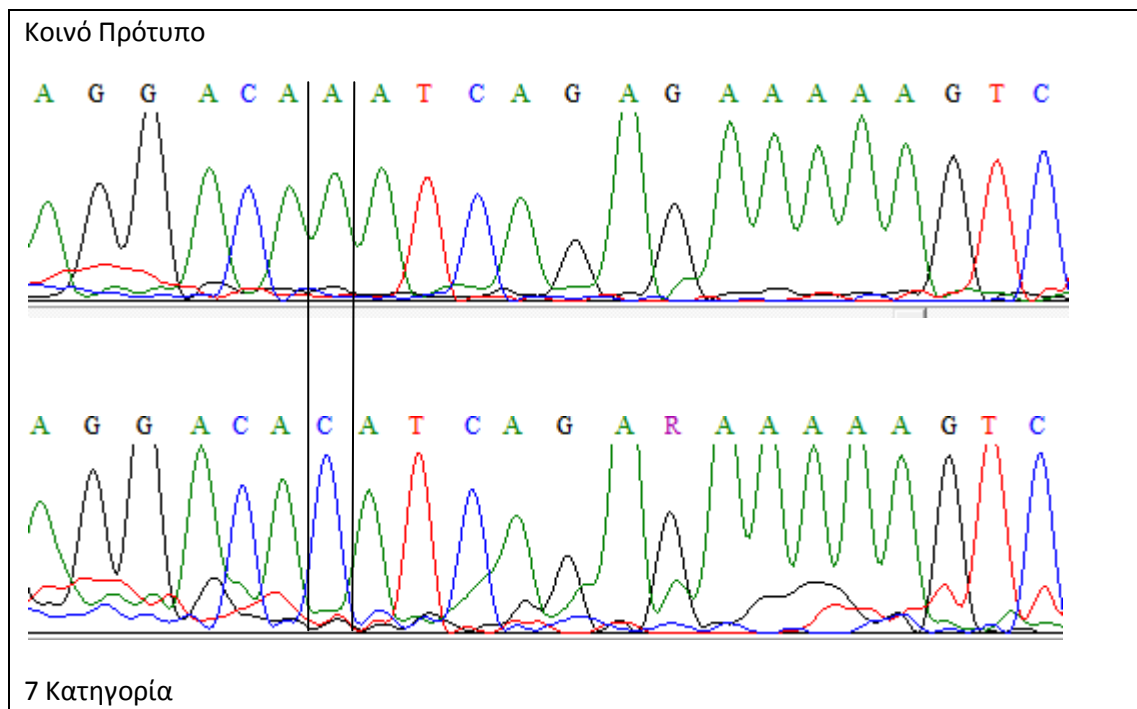


Σχήμα 9 .

Η 6<sup>η</sup> κατηγορία ατόμων που πάσχουν από διαβήτη περιλαμβάνει το άτομο D8 στο οποίο παρατηρούμε τις μεταλλάξεις A15903C και C15904T και T15905A και A15954C όπου προκύπτουν αφού εφαρμόσουμε την μέθοδο της αυτόματης αλληλούχησης. Εντοπίζονται λοιπόν τέσσερις μεταλλάξεις στις θέσεις 15903 και 15904 και 15905 και 15954 του μιτοχondριακού γονιδιώματος. Οι αλλαγές αυτές είναι μεταπτώσεις των βάσεων από A σε C και από C σε T και από T σε A καθώς και από A σε C, στις αντίστοιχες θέσεις. Οι θέσεις όπου παρατηρούμε τις διαφοροποιήσεις αυτές μας δείχνουν πως οι μεταλλάξεις βρίσκονται στο μιτοχondριακό t RNA γονίδιο της Θρεονίνης εκτός από την μετάλλαξη A15954C που βρίσκεται σε παρακείμενη περιοχή του t RNA γονιδίου της Θρεονίνης.

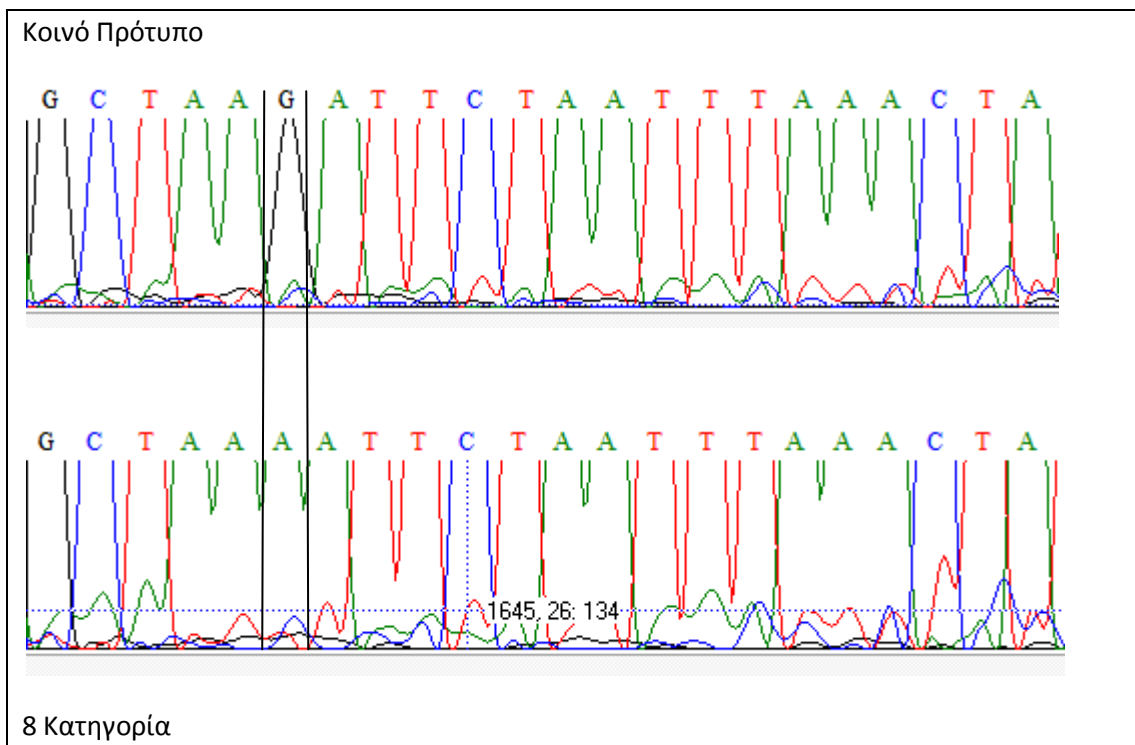
Η 7<sup>η</sup> κατηγορία ατόμων που πάσχουν από διαβήτη περιλαμβάνει τα άτομα D41 και D91 στα οποία παρατηρούμε τη μετάλλαξη A15954C όπου προκύπτει αφού εφαρμόσουμε την μέθοδο της αυτόματης αλληλούχησης. Εντοπίζεται λοιπόν μία μετάλλαξη στη θέση 15954 του μιτοχondριακού γονιδιώματος. Η αλλαγή αυτή είναι μετάπτωση της βάσης από A σε C. Η θέση όπου παρατηρούμε τη διαφοροποίηση αυτή μας δείχνει πως η μετάλλαξη βρίσκεται σε παρακείμενη περιοχή του t RNA γονιδίου της Θρεονίνης. Στο Σχήμα 10 φαίνεται η διαφοροποίηση αυτή.





Σχήμα 10.

Η 8<sup>η</sup> κατηγορία ατόμων που πάσχουν από διαβήτη περιλαμβάνει το άτομο D61 στο οποίο παρατηρούμε τη μετάλλαξη G16000A όπου προκύπτει αφού εφαρμόσουμε την μέθοδο της αυτόματης αλληλούχησης. Εντοπίζεται λοιπόν μία μετάλλαξη στη θέση 16000 του μιτοχondριακού γονιδιώματος. Η αλλαγή αυτή είναι μετάπτωση της βάσης από G σε A. Η θέση όπου παρατηρούμε τη διαφοροποίηση αυτή μας δείχνει πως η μετάλλαξη βρίσκεται στο μιτοχondριακό t RNA γονίδιο της Προλίνης. Στο Σχήμα 11 φαίνεται η διαφοροποίηση αυτή.



Σχήμα 11.

Η 9<sup>η</sup> κατηγορία ατόμων που πάσχουν από διαβήτη περιλαμβάνει το άτομο D64 στο οποίο παρατηρούμε τη μετάλλαξη A15878G όπου προκύπτει αφού εφαρμόσουμε την μέθοδο της αυτόματης αλληλούχησης. Εντοπίζεται λοιπόν μία μετάλλαξη στη θέση 15878 του μιτοχondριακού γονιδιώματος. Η αλλαγή αυτή είναι μετάπτωση της βάσης από A σε G. Η θέση όπου παρατηρούμε τη διαφοροποίηση αυτή μας δείχνει πως η μετάλλαξη βρίσκεται σε κείμενη περιοχή του μιτοχondριακού t RNA γονιδίου της Θρεονίνης.

### **3.7 Αποτελέσματα της μελέτης των μιτοχονδριακών t RNA γονιδίων της Ασπαργίνης (A), της Κυστεΐνης (C ) και της Τυροσίνης (T) για τυχόν μεταλλάξεις.**

Εκτός από τα μιτοχονδριακά t RNA γονίδια της Θρεονίνης (T) και της Προλίνης (P) μελετήσαμε και τα μιτοχονδριακά t RNA γονίδια της Ασπαργίνης (A), της Κυστεΐνης (C ) και της Τυροσίνης (T), σε σύνολο 142 δειγμάτων αίματος τα οποία μας παραχωρήθηκαν από το Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας. Τα δείγματα αίματος περιελάμβαναν άτομα που ασθενούν ή και όχι από τον σακχαρώδη διαβήτη. Τα μιτοχονδριακά t RNA γονίδια της Ασπαργίνης (A), της Κυστεΐνης (C ) και της Τυροσίνης (T) είναι τρία γειτονικά t RNA γονίδια που στο πείραμα που πραγματοποιήσαμε τα εξετάσαμε ταυτόχρονα. Ποιό συγκεκριμένα το t RNA γονίδιο για την Ασπαργίνη (A) βρίσκεται στη θέση 5657 – 5729 στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα. Μπορούμε λοιπόν να πούμε πως το γενικό της μήκος είναι 73 βάσεις. Το t RNA γονίδιο για την Κυστεΐνη (C ) βρίσκεται στη θέση 5761 – 5826 στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα. Μπορούμε λοιπόν να πούμε πως το γενικό της μήκος είναι 66 βάσεις. Το t RNA γονίδιο για την Τυροσίνη (T) βρίσκεται στη θέση 5826 – 5891 στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα. Μπορούμε λοιπόν να πούμε πως το γενικό της μήκος είναι 66 βάσεις.

Στο σύνολο των 142 ατόμων που μελετήσαμε συνολικά κανένα άτομο δεν παρουσίασε πολυμορφισμό στα μιτοχονδριακά t RNA γονίδια της Ασπαργίνης (A), της Κυστεΐνης (C ) και της Τυροσίνης (T). Οι μέθοδοι αναζήτησης πολυμορφισμών βέβαια ακολουθήθηκαν μέχρι τέλους, όμως τα αποτελέσματα πάντα ήταν αρνητικά. Από αυτό λοιπόν μπορούμε να συμπεράνουμε πως τα μιτοχονδριακά t RNA γονίδια της Ασπαργίνης (A), της Κυστεΐνης (C ) και της Τυροσίνης (T) δεν έχουν καμία απολύτως σχέση με την εμφάνιση σακχαρώδους διαβήτη στον ανθρώπινο πληθυσμό.



Εικ. 11 Δείγματα μιτοχονδριακών t RNA γονιδίων της Ασπαργίνης (A), της Κυστεΐνης (C) και της Τυροσίνης (T) στον διαβήτη

## 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Συνοψίζοντας θα μπορούσαμε να αναφέρουμε πως κατά τη διάρκεια του πειράματός μας απομονώσαμε και επεξεργαστήκαμε 40 δείγματα αίματος ατόμων που δεν πάσχουν από σακχαρώδη διαβήτη, καθώς και 102 δείγματα αίματος ατόμων που πάσχουν από τη συγκεκριμένη νόσο. Στα δείγματα αυτά, αφού απομονώσαμε το DNA, κάναμε πολλαπλασιασμό του τμήματος που μας ενδιαφέρει και κατόπιν κάναμε αλληλούχηση του καθαρού πλέον δείγματος, έγινε έλεγχος για τυχών μεταλλάξεις.

Παρατηρήσαμε πως στα 40 δείγματα ατόμων που δεν πάσχουν από σακχαρώδη διαβήτη βρέθηκαν 10 άτομα στα οποία παρατηρήθηκαν πιθανές μεταλλάξεις. Όμως τρία άτομα από αυτά, τα 21.14, 13.5 και 21.20 παρουσίασαν κοινή μετάλλαξη μεταξύ τους. Το ίδιο συνέβη και με τα άτομα 21.15 και 21.17 που παρουσίασαν και αυτά κοινή μετάλλαξη μεταξύ τους. Τα υπόλοιπα άτομα παρουσίασαν μοναδικές μεταλλάξεις.

Κάτι αντίστοιχο παρουσιάστηκε και στα 102 δείγματα ατόμων που πάσχουν από σακχαρώδη διαβήτη. Παρατηρήσαμε πως για τα μιτοχονδριακά t RNA γονίδια της Θρεονίνης (T) και της Προλίνης (P) βρέθηκαν είκοσι πιθανές διαφορετικές μεταλλάξεις όπου οι τρεις από αυτές είχαν περισσότερα από δύο άτομα με κοινή μετάλλαξη.

Παράλληλα παρατηρήσαμε πως έπειτα από τη μελέτη των μιτοχονδριακών t RNA γονιδίων της Ασπαργίνης (A), της Κυστεΐνης (C) και της Τυροσίνης (T) βρέθηκαν πέντε διαφορετικά άτομα που πιθανά να παρουσιάζουν μεταλλάξεις.

Στη συνέχεια στείλαμε τα άτομα αυτά στα οποία παρατηρήθηκαν οι πιθανές μεταλλάξεις στην Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας γνωρίζοντας πως μετά από την ανάλυση που πραγματοποιηθεί πιθανό τα αποτελέσματα να είναι διαφορετικά. Η υποψία αυτή έγινε πραγματικότητα διότι μελετώντας τα δεδομένα της ανάλυσης που προαναφέραμε διαπιστώσαμε πως κάποιες μεταλλάξεις που θεωρούσαμε διαφορετικές εν τέλει συμπίπτανε με άλλες ή ακόμη και με το κοινό πρότυπο. Για το λόγο αυτό οι κατηγορίες των μεταλλάξεων που τελικά δημιουργήθηκαν ήταν λιγότερες από όσες αρχικά υπολογίζαμε.

Για τα άτομα που δεν πάσχουν από τη νόσο του σακχαρώδους διαβήτη θεωρήσαμε αρχικά πως στα 40 άτομα που μελετήσαμε παρουσιάστηκαν οχτώ μεταλλάξεις σε δέκα άτομα στο σύνολο. Μετά την ανάλυση όμως διαπιστώθηκε πως οι μεταλλάξεις που παρουσιάστηκαν ήταν συνολικά τέσσερις, δηλαδή βρέθηκαν τέσσερα σημεία διαφοροποίησης από το κοινό πρότυπο και για το λόγο αυτό δημιουργήθηκαν οι τέσσερις κατηγορίες με τις μεταλλάξεις τους.

Η πρώτη κατηγορία περιλαμβάνει το άτομο 14.3 που παρουσιάζει τη μετάλλαξη C15904T και είναι το μοναδικό άτομο που δεν πάσχει από σακχαρώδη διαβήτη και παρουσιάζει την συγκεκριμένη μετάλλαξη. Έτσι μπορούμε να πούμε πως το 1/40 του συνόλου των ατόμων που μελετήσαμε και δεν πάσχει από σακχαρώδη διαβήτη παρουσιάζει τη μετάλλαξη C15904T η οποία βρίσκεται στο μιτοχονδριακό t RNA γονίδιο της Θρεονίνης (T).

Η δεύτερη κατηγορία περιλαμβάνει τα άτομα 20.6 και 27.2 και παρουσιάζουν τη μετάλλαξη G15928A. Έτσι μπορούμε να πούμε πως τα 2/40 του συνόλου των ατόμων που μελετήσαμε και δεν πάσχουν από σακχαρώδη διαβήτη παρουσιάζουν τη μετάλλαξη G15928A η οποία βρίσκεται στο μιτοχονδριακό t RNA γονίδιο της Θρεονίνης (T).

Η τρίτη κατηγορία περιλαμβάνει το άτομο 21.8 που παρουσιάζει τη μετάλλαξη A15924G και είναι το μοναδικό άτομο που δεν πάσχει από σακχαρώδη διαβήτη και παρουσιάζει την συγκεκριμένη μετάλλαξη. Έτσι μπορούμε να πούμε πως το 1/40 του συνόλου των ατόμων που μελετήσαμε και δεν πάσχει από σακχαρώδη διαβήτη παρουσιάζει τη μετάλλαξη A15924G η οποία βρίσκεται στο μιτοχονδριακό t RNA γονίδιο της Θρεονίνης (T).

Η τέταρτη κατηγορία περιλαμβάνει το άτομο 21.23 που παρουσιάζει τη μετάλλαξη G15927A και είναι το μοναδικό άτομο που δεν πάσχει από σακχαρώδη διαβήτη και παρουσιάζει την συγκεκριμένη μετάλλαξη. Έτσι μπορούμε να πούμε πως το 1/40 του συνόλου των ατόμων που μελετήσαμε και δεν πάσχει από σακχαρώδη διαβήτη παρουσιάζει τη μετάλλαξη G15927A η οποία βρίσκεται στο μιτοχονδριακό t RNA γονίδιο της Θρεονίνης (T).

Αξίζει να αναφερθεί πως και οι τέσσερις προηγούμενες μεταλλάξεις παρουσιάζονται στο μιτοχονδριακό t RNA γονίδιο της Θρεονίνης (T) και καμία στο μιτοχονδριακό t RNA γονίδιο της Προλίνης (P), και πως οι τρεις από τις τέσσερις μεταλλάξεις και ποιο συγκεκριμένα οι G15928A, A15924G και C15904T παρατηρούνται και στα άτομα που δεν πάσχουν από τον σακχαρώδη διαβήτη. Αντιθέτως η μετάλλαξη G15927A που παρουσιάζεται στο άτομο 21.23 είναι μοναδική και τη συναντάμε μόνο στα άτομα που δεν πάσχουν από τη συγκεκριμένη νόσο.

Συνεχίζοντας θα μπορούσαμε να πούμε πως το ίδιο συμβαίνει και με τα άτομα που πάσχουν από σακχαρώδη διαβήτη και γι αυτό προκύπτουν οι ακόλουθες 8 κατηγορίες.

Η πρώτη κατηγορία ατόμων με μετάλλαξη που πάσχουν από σακχαρώδη διαβήτη παρουσιάζεται σε ποσοστό 7/102 του συνόλου των ατόμων που μελετήθηκαν με βάση τα μιτοχονδριακά t RNA γονίδια της Θρεονίνης (T) και της Προλίνης (P). Η κατηγορία αυτή περιλαμβάνει τα άτομα D7, D14, D23, D35 D54, D68, D85, τα οποία παρουσιάζουν τη μετάλλαξη G15928A η οποία βρίσκεται στο μιτοχονδριακό t RNA γονίδιο της Θρεονίνης (T).

Η δεύτερη κατηγορία ατόμων με μετάλλαξη που πάσχουν από σακχαρώδη διαβήτη παρουσιάζεται σε ποσοστό 4/102 του συνόλου των ατόμων που μελετήθηκαν με βάση τα μιτοχονδριακά t RNA γονίδια της Θρεονίνης (T) και της Προλίνης (P). Η κατηγορία αυτή περιλαμβάνει τα άτομα D13, D26, D57, D62 τα οποία παρουσιάζουν τη μετάλλαξη A15924G η οποία βρίσκεται στο μιτοχονδριακό t RNA γονίδιο της Θρεονίνης (T).

Η τρίτη κατηγορία ατόμων με μετάλλαξη που πάσχουν από σακχαρώδη διαβήτη παρουσιάζεται σε ποσοστό 1/102 του συνόλου των ατόμων που μελετήθηκαν με βάση τα μιτοχονδριακά t RNA γονίδια της Θρεονίνης (T) και της Προλίνης (P). Η κατηγορία αυτή περιλαμβάνει το μοναδικό άτομο D74 το οποίο παρουσιάζει τις μεταλλάξεις C15904T A15924G η οποία βρίσκεται στο μιτοχονδριακό t RNA γονίδιο της Θρεονίνης (T).

Η τέταρτη κατηγορία ατόμων με μετάλλαξη που πάσχουν από σακχαρώδη διαβήτη παρουσιάζεται σε ποσοστό 1/102 του συνόλου των ατόμων που μελετήθηκαν με βάση τα μιτοχονδριακά t RNA γονίδια της Θρεονίνης (T) και της Προλίνης (P). Η κατηγορία αυτή περιλαμβάνει το μοναδικό άτομο D17 το οποίο παρουσιάζει τις μεταλλάξεις A15903C C15904T T15905A οι οποίες βρίσκονται στο μιτοχονδριακό t RNA γονίδιο της Θρεονίνης (T).

Η πέμπτη κατηγορία ατόμων με μετάλλαξη που πάσχουν από σακχαρώδη διαβήτη παρουσιάζεται σε ποσοστό 1/102 του συνόλου των ατόμων που μελετήθηκαν με βάση τα μιτοχονδριακά t RNA γονίδια της Θρεονίνης (T) και της Προλίνης (P). Η κατηγορία αυτή περιλαμβάνει το μοναδικό άτομο D8 το οποίο παρουσιάζει τις μεταλλάξεις A15903C C15904T T15905A A15954C οι οποίες βρίσκονται στο μιτοχονδριακό t RNA γονίδιο της Θρεονίνης (T) καθώς και σε κείμενες περιοχές του.

Η έκτη κατηγορία ατόμων με μετάλλαξη που πάσχουν από σακχαρώδη διαβήτη παρουσιάζεται σε ποσοστό 2/102 του συνόλου των ατόμων που μελετήθηκαν με βάση τα μιτοχονδριακά t RNA γονίδια της Θρεονίνης (T) και της Προλίνης (P). Η κατηγορία αυτή περιλαμβάνει τα άτομα D41, D91 τα οποία παρουσιάζουν τη μετάλλαξη A15954C η οποία βρίσκεται σε κείμενη περιοχή του μιτοχονδριακού t RNA γονιδίου της Θρεονίνης (T).

Η έβδομη κατηγορία ατόμων με μετάλλαξη που πάσχουν από σακχαρώδη διαβήτη παρουσιάζεται σε ποσοστό 4/102 του συνόλου των ατόμων που μελετήθηκαν με βάση τα μιτοχονδριακά t RNA γονίδια της Θρεονίνης (T) και της Προλίνης (P). Η κατηγορία αυτή περιλαμβάνει τα άτομα D61, D79, D82, D97 τα οποία παρουσιάζουν τη μετάλλαξη G16000A η οποία βρίσκεται στο μιτοχονδριακό t RNA γονίδιο της Προλίνης (P).

Η όγδοη κατηγορία ατόμων με μετάλλαξη που πάσχουν από σακχαρώδη διαβήτη παρουσιάζεται σε ποσοστό 1/102 του συνόλου των ατόμων που μελετήθηκαν με βάση τα μιτοχονδριακά t RNA γονίδια της Θρεονίνης (T) και της Προλίνης (P). Η κατηγορία αυτή περιλαμβάνει το μοναδικό άτομο D64 το οποίο παρουσιάζει τη

μετάλλαξη A15878G η οποία βρίσκεται σε κείμενη περιοχή του μιτοχονδριακού t RNA γονιδίου της Θρεονίνης (T).

Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός πως τις επτά από το σύνολο των οχτώ μεταλλάξεων που παρατηρήσαμε της συναντούμε στο μιτοχονδριακό t RNA γονίδιο της Θρεονίνης (T) εκτός από τη μετάλλαξη G16000A η οποία παρουσιάζεται σε τέσσερα μόνο άτομα του πληθυσμού που μελετήσαμε.

Τέλος, αξίζει να σημειωθεί πως από τα 102 άτομα που πάσχουν από σακχαρώδη διαβήτη και μελετήθηκαν με βάση τα μιτοχονδριακά t RNA γονίδια της Ασπαργίνης (A), της Κυστεΐνης (C) και της Τυροσίνης (T) κανένα δεν παρουσίασε οποιαδήποτε διαφορά από το «κοινό πρότυπο». Συνεπώς στα μιτοχονδριακά t RNA γονίδια αυτά δεν παρουσιάζεται καμία μετάλλαξη.

Από τα παραπάνω, λοιπόν, γίνεται απόλυτα κατανοητό πως το μιτοχονδριακό t RNA γονίδιο της Θρεονίνης (T) είναι ένα γονίδιο που παρουσιάζει πολλές μεταλλάξεις στο γονιδίωμα του σε σχέση με τον σακχαρώδη διαβήτη. Επομένως θα μπορούσαμε να πούμε πως το μιτοχονδριακό t RNA γονίδιο της Θρεονίνης (T) είναι ένα γονίδιο με πιθανό ενεργό ρόλο στην κληρονομικότητα της συγκεκριμένης νόσου, ιδιαίτερα στην μετάλλαξη που παρουσιάζεται με το μεγαλύτερο ποσοστό εμφάνισης. Το μιτοχονδριακό t RNA γονίδιο της Προλίνης (P) από την άλλη πλευρά παρουσίασε μία μετάλλαξη σε ποσοστό αρκετό ώστε να θεωρήσουμε πως πιθανά και αυτή να παίζει ένα μικρό και συγκεκριμένο ρόλο στην κληρονομικότητα του σακχαρώδους διαβήτη. Αντιθέτως τα μιτοχονδριακά t RNA γονίδια της Ασπαργίνης (A), της Κυστεΐνης (C) και της Τυροσίνης (T) δεν παρουσίασαν καμία μετάλλαξη στο σύνολο των ατόμων που μελετήθηκαν. Επομένως, τα μιτοχονδριακά t RNA γονίδια της Ασπαργίνης (A), της Κυστεΐνης (C) και της Τυροσίνης (T) είναι γονίδια που δεν παίζουν κανένα ρόλο στην κληρονομική διαδικασία του σακχαρώδους διαβήτη.

Ολοκληρώνοντας θα μπορούσαμε να πούμε πως ο σακχαρώδης διαβήτης είναι μία νόσος που παρουσιάζεται σε ολοένα και περισσότερα άτομα του ανθρώπινου πληθυσμού. Η μελέτη των μιτοχονδριακών μεταλλάξεων που σχετίζονται με την κληρονομικότητά του είναι πολύ μεγάλης σημασίας, διότι θα βοηθήσει στην βελτίωση της ποιότητας ζωής των ανθρώπων που έχουν την προδιάθεση να ασθενήσουν από την νόσο αυτή, αφού θα συμβάλλει στην σωστή πρόληψη αλλά και την έγκαιρη διάγνωση της νόσου.



## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Davis W. Lamson, Steve M. Plaza (2002) Mitochondrial factors in the pathogenesis of diabetes: a hypothesis for treatment – Mitochondrial factors/ diabetes
- Stirban A, Rosen P, Tschoepe D. Complications of type 1 diabetes: New molecular findings. Mt Sinai J Med. (2008) Aug: 75(4):328-51
- Mary – Elizabeth Patti, Silvia Corvena (2010) The Role of Mitochondria in the Pathogenesis of Type 2 Diabetes
- Lowell BB, Shulman GI, Mitochondrial dysfunction and type 2 diabetes. Science. (2005) Jan 21; 307(5708):384-7
- Raymond Fox ab, Hyung – Suk Kim b, Robert L. Reddick c, Gregory C. Kujoth d,e, Tomas A. Prolla d, Shuichi Tsutsumi f, Youichiro Wada f, Oliver Smithies a,b,l, Nobuyo Maeda a,b,l (2011) Mitochondrial DNA polymerase editing mutation, PolgD257A, reduces the diabetic phenotype of Akita male mice by suppressing appetite
- Gerbitz KD, Vauden Ouweland JM, Maassen JA, Jaksch M. (1995) Mitochondrial diabetes mellitus: a review
- Mulder H, Ling c. Mitochondrial dysfunction in pancreatic beta-cells in Type 2 diabetes. Mol Cell Endocrinol. (2009) Jan 15;297(1-2):34-40
- J. Antonie Maassen 12, Leen M. ‘t Hart 1, Einar van Essen 3, Rob J. Heine 2, Giel Nijpels 2, Roshan S. Jahangir Tafrechi 1, Anton K. Raap 1, George M. C. Janssen 1, Herman H. P. J. Lemkes 3 (2003) Mitochondrial Diabetes. Molecular Mechanisms and Clinical Presentation
- Julia Szendroedi, Esther Phielix, Michael Roden (2011) The role of mitochondria in insulin resistance and type 2 diabetes mellitus
- Szendroedi J, Schmid AI, Meyerspeer M, Cervin C, Kacerovsky M, Smekal G, Graser – Lang S, Groop L, Roden M (2009) Impaired mitochondrial function and insulin resistance of skeletal muscle in mitochondrial diabetes
- Szendroedi J, Roden M (2008) Mitochondrial fitness and insulin sensitivity in humans
- Szabadkai G., Duchon MR. Mitochondria mediated cell death in diabetes. Apoptosis. 2009 Dec: 14(12):1405-23.Review.
- Whittaker, R. G., Schaefer, A.M., McFarland, R. Taylor, R. W., Walker. M., Turnbull, D.M. (2007) Prevalence and progression of diabetes in mitochondrial disease Diabetologia. 50(10):2085-2089
- 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, p.p. 272-281
- Mullis, K.B. (1990) The unusual origin of the polymerase chain reaction. Scientific American 262: 56-65

- Paabo, S., R. G. Higuchi, A. C. Wilson (1989) Ancient DNA and the polymerase chain reaction. *Jornal of biological Chemistry* 264: 9709-9712
- Ruxer J, Mozdzan M, Czupryniak L, Loba J. Long-term discontinuation of insulin treatment in a type 1 diabetic patient: a case for late autoimmune diabetes of the adult? *Diabetes Care.* (2003) Apr;26(4):1314-5
- Zifa E, Giannoulis S., Theotokis P., Stamatis C., Mamuris Z., Stathopoulos C., Mitochondrial t RNA mutations: clinical and functional perturbations. *RNA Biol.* (2007) Jan-Mar 4(1):38-66. Epub 2007 Jun 6. Department of Biochemistry and Biotechnology, University of Thessaly
- Αιμιλία Ζίφα, Ζήσης Μαμούρης, Κατερίνα Μούτου. «Βιολογία». Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Θεσσαλίας.
- Κόκκα Παρασκευή (2010) Υπερινσουλιναίμια και αντίσταση στην ινσουλίνη σε παχύσαρκα παιδιά και εφήβους με πρόωμη αδρενάρχη

## ΔΙΑΔΥΚΤΙΟ

- <http://www.clinical.bioiatriki.gr/index.php>
- <http://www.diabetes-med.gv>
- <http://el.wikipedia.org/wiki/Μιτοχονδριο>
- <http://www.news-medical.net>
- <http://www.tovima.gr>
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
- <http://www.mitomap.org>