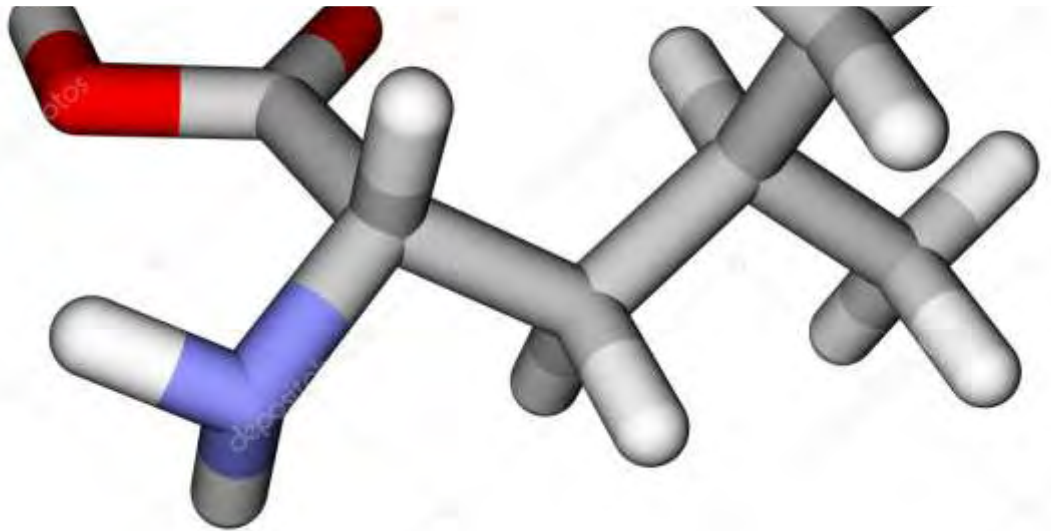


2018

# Ανίχνευση μεταλλάξεων στο tRNA μιτοχονδριακό γονίδιο της λευκίνης σε ασθενείς με διαβήτη



Τσάκος Χρήστος

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ Πρόγραμμα

Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος

Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ – ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

6/25/2018



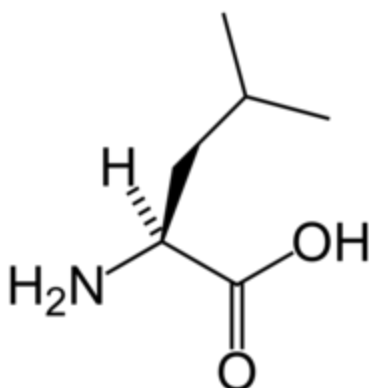
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ - ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

Τσάκος Χρήστος

Ανίχνευση μεταλλάξεων στο tRNA μιτοχονδριακό γονίδιο της λευκίνης σε ασθενείς με διαβήτη



Λάρισα 2018

**Ανίχνευση μεταλλάξεων στο tRNA μιτοχονδριακό γονίδιο της  
λευκίνης σε ασθενείς με διαβήτη**

**Detection of mutations in the tRNA mitochondrial gene of leucine in  
diabetic patients**

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ

Ζίφα Αιμιλία,

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

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Ζίφα Αιμιλία,

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

Μαμούρης Ζήσης,

Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας Πανεπιστημίου  
Θεσσαλίας

Σαραφίδου Θεολογία,

Επίκουρος Καθηγήτρια Μοριακής Γενετικής Ζωικών Οργανισμών, Τμήμα Βιοχημείας &  
Βιοτεχνολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη	σελ 5
Conspectus	σελ 6
Εισαγωγή	σελ 7
Διαβήτης	σελ 7
Μιτοχόνδριο	σελ 12
Μιτοχονδριακό DNA	σελ 17
Η γενετική των μιτοχονδριακών νοσημάτων	σελ 24
Διαβήτης και μιτοχονδριακή λειτουργία-Αναπνευστική αλυσίδα	σελ 28
Λευκίνη	σελ 31
Σκοπός της εργασίας	σελ 34
Υλικά	σελ 35
Απομόνωση ολικού DNA	σελ 35
Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης PCR	σελ 39
Απαραίτητοι παράγοντες για την αντίδραση της PCR	σελ 41
Ποιοτικός προσδιορισμός των PCR προϊόντων	σελ 44
SSCP-Μέθοδος ανάλυσης πολυμορφισμού μονοκλωνικής διαμόρφωσης	σελ 46
Παρασκευή πηκτής πολυακρυλαμίδιου	σελ 47
Προετοιμασία και αποδιάταξη των PCR προϊόντων	σελ 48
Χρώση πηκτώματος πολυακρυλαμίδης με διάλυμα νιτρικού άργυρου	σελ 49
Ταυτοποίηση της αλληλουχίας DNA	σελ 53
Καθαρισμός των PCR προϊόντων	σελ 53
DNAsequencing	σελ 53
Συζήτηση	σελ 55
Βιβλιογραφία-sites	σελ 57
Εικόνες	σελ 59
Πίνακες	σελ 59
Ευχαριστίες	σελ 60

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο σακχαρώδης διαβήτης είναι μεταβολική ασθένεια η οποία χαρακτηρίζεται από αύξηση της συγκέντρωσης του σακχάρου στο αίμα (υπεργλυκαιμία) και διαταραχή του μεταβολισμού της γλυκόζης, είτε ως αποτέλεσμα ελαττωμένης έκκρισης ινσουλίνης λόγω της καταστροφής των παγκρεατικών β-κυττάρων είτε λόγω ελάττωσης της ευαισθησίας των κυττάρων του σώματος στην ινσουλίνη. Τα αυξημένα ποσοστά γλυκόζης στο αίμα προκαλεί τα κλασικά συμπτώματα του διαβήτη, πολυουρία, πολυδιψία και πολυφαγία. Από έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί, έχει βρεθεί ότι ένας μεγάλος αριθμός μεταλλάξεων που ανιχνεύθηκαν σε μιτοχονδριακά γονίδια tRNA συνδέεται με την εμφάνιση της συγκεκριμένης νόσου. Στην πλειοψηφία των μιτοχονδριακών μορίων tRNA έχουν ανιχνευθεί πολυμορφικές και παθογόνες μεταλλάξεις. Οι πολυμορφικές μεταλλάξεις δεν αλλάζουν την δομή των μιτοχονδριακών tRNA. Στη μελέτη μας, πραγματοποιήθηκε μελέτη μεταλλάξεων στο μιτοχονδριακό γονίδιο του tRNA<sup>Leu</sup>. Συγκεκριμένα, από δείγματα αίματος 24 ατόμων που έχουν διαγνωσθεί με διαβήτη, απομονώθηκε το γενετικό υλικό DNA και στη συνέχεια με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης PCR ενισχύθηκε το τμήμα του DNA από τα παραπάνω γονίδιο. Ακολούθησε η ανίχνευση πολυμορφισμών στα προϊόντα της PCR με τη μέθοδο SSCP, και τέλος μελετήσαμε τη ταυτοποίησή τους ύστερα από την αλληλούχιση τους (sequencing). Δεν ανιχνεύτηκαν μεταλλάξεις στο γονίδιο του tRNA<sup>Leu</sup> Βρέθηκε όμως μια καινούρια στο 16srRNA, η μετάλλαξη T3131A.

## CONSPECTUS

Diabetes mellitus, or simply diabetes, is a group of metabolic diseases in which a person has high blood sugar, either because the pancreas does not produce enough insulin due to pancreatic b cell destruction, or because cells do not respond to the insulin that is produced. This high blood sugar produces the classical symptoms of polyuria, polydipsia and polyphagia. The investigations that have been carried out, have found that a large number of mutations in mitochondrial genes detected tRNA are associated with occurrence of the disease. The majority of the mitochondrial tRNA molecules have been detected with polymorphic and pathogenic mutations. Polymorphic mutations do not alter the structure of the mitochondrial tRNA. In this study, we did a search of mutations in the mitochondrial gene tRNA<sup>Leu</sup>. To specify, in blood samples from 24 individuals who have been diagnosed with diabetes, we isolated the genetic material DNA and then using the polymerase chain reaction PCR we amplified the segment of the DNA from the mitochondrial gene tRNA<sup>Leu</sup>. Then we made detections of polymorphisms in the products of the PCR method SSCP, and then we studied the identification after the sequencing of the samples. We didn't trace any mutations of the mitochondrial gene tRNA<sup>Leu</sup>. We found a new one in 16s rRNA, mutation T3131A.

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο σακχαρώδης διαβήτης είναι μεταβολική ασθένεια η οποία χαρακτηρίζεται από αύξηση της συγκέντρωσης του σακχάρου στο αίμα (υπεργλυκαιμία) και διαταραχή του μεταβολισμού της γλυκόζης, είτε ως αποτέλεσμα ελαττωμένης έκκρισης ινσουλίνης είτε λόγω ελάττωσης της ευαισθησίας των κυττάρων του σώματος στην ινσουλίνη. Οι κύριοι τύποι σακχαρώδους διαβήτη είναι ο διαβήτης τύπου 1, ο διαβήτης τύπου 2 και ο διαβήτης της κύησης. Ο σακχαρώδης διαβήτης έχει χρόνια πορεία και μπορεί να προκαλέσει μια σειρά σοβαρών επιπλοκών, όπως καρδιαγγειακή νόσο, χρόνια νεφρική ανεπάρκεια, βλάβες του αμφιβληστροειδούς, βλάβες των νεύρων, στυτική δυσλειτουργία κ.ά. Πρωτεύοντα ρόλο στη θεραπεία του σακχαρώδους διαβήτη παίζει η χορήγηση ινσουλίνης.

## ΔΙΑΒΗΤΗΣ(ασθένεια)

Ο Μπλε Κύκλος είναι σύμβολο του διαβήτη, όπως η κόκκινη κορδέλα για το AIDS.

### **Σακχαρώδης διαβήτης τύπου 1**

Παλαιότερα αποκαλούμενος ινσουλινοεξαρτώμενος ή νεανικός διαβήτης. Χαρακτηρίζεται από καταστροφή των β-κυττάρων του παγκρέατος, που είναι υπεύθυνα για την παραγωγή ινσουλίνης, με αποτέλεσμα ολική έλλειψη ή ελάχιστη έκκριση ινσουλίνης. Η ευαισθησία των κυττάρων στην ινσουλίνη είναι συνήθως φυσιολογική, ιδιαίτερα στα πρώιμα στάδια. Ο τύπος αυτός αποτελεί την κυριότερη αιτία διαβήτη σε παιδιά, μπορεί όμως να προσβάλλει και τους ενήλικες. Η καταστροφή των β-κυττάρων του παγκρέατος είναι στην πλειοψηφία των περιπτώσεων αυτοάνοσης αιτιολογίας. Στο μεγαλύτερο ποσοστό των ασθενών με διαβήτη τύπου 1 ανιχνεύονται στην κυκλοφορία ένα ή περισσότερα είδη αυτοαντισωμάτων, οι ασθενείς δε αυτοί εμφανίζουν αυξημένη προδιάθεση και για άλλες αυτοάνοσες παθήσεις. Παρ' όλα αυτά, σ' ένα μικρό ποσοστό ασθενών με διαβήτη τύπου 1 δεν ανιχνεύονται αυτοαντισώματα, ο τύπος δε αυτός ονομάζεται ιδιοπαθής σακχαρώδης διαβήτης. Ο διαβήτης τύπου 1 εισβάλλει συνήθως απότομα και οδηγεί συχνά στην ανάπτυξη κέτωσης και διαβητικής κετοξέωσης εάν το έλλειμμα ινσουλίνης δεν καλυφθεί. Ο ασθενής είναι απόλυτα εξαρτημένος από την εξωγενή χορήγηση ινσουλίνης προκειμένου τα επίπεδα σακχάρου του αίματος να διατηρηθούν σε φυσιολογικά επίπεδα.

### **Σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2**

Παλαιότερα αποκαλούμενος μη ινσουλινοεξαρτώμενος διαβήτης. Χαρακτηρίζεται από το συνδυασμό ελαττωμένης έκκρισης ινσουλίνης και ελαττωμένης ευαισθησίας των κυττάρων στη δράση της (φαινόμενο που ονομάζεται ινσουλινοαντοχή). Στα πρώτα στάδια της νόσου, η



ελαττωμένη ευαισθησία στην ινσουλίνη είναι η κύρια διαταραχή, ενώ τα επίπεδα ινσουλίνης στο αίμα είναι αυξημένα.

Ο διαβήτης τύπου 2 είναι η συχνότερη αιτία διαβήτη στους ενήλικους. Σπουδαίος προδιαθεσικός παράγοντας για την ανάπτυξη διαβήτη τύπου 2 είναι η παχυσαρκία. Η παχυσαρκία προδιαθέτει στην ανάπτυξη ινσουλινοαντοχής πιθανόν λόγω της παραγωγής από το λιπώδη ιστό ουσιών που ελαττώνουν την ευαισθησία των κυττάρων στην ινσουλίνη. Άλλοι προδιαθεσικοί παράγοντες είναι η ηλικία και το οικογενειακό ιστορικό. Στον διαβήτη τύπου 2, τα συμπτώματα είναι πιο ήπια και η πιθανότητα εμφάνισης διαβητικής κετοξέωσης είναι μικρή. Παρ' όλα αυτά, ο κίνδυνος απώτερων και σοβαρών επιπλοκών παραμένει υψηλός. Το πρώτο βήμα στη θεραπεία του διαβήτη τύπου 2 είναι η αλλαγή του τρόπου ζωής του ασθενούς, με στόχο την απώλεια βάρους, την αύξηση της σωματικής άσκησης και την υγιεινή διατροφή. Εάν κριθεί απαραίτητο, χρησιμοποιούνται αντιδιαβητικά φάρμακα. Στην περίπτωση που η θεραπεία αποτύχει, κρίνεται σκόπιμη η χορήγηση ινσουλίνης για τον έλεγχο και αυτών των ασθενών.

### **Διαβήτης της κύησης**

Πρόκειται για την εμφάνιση σακχαρώδους διαβήτη για πρώτη φορά κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης (δεν συμπεριλαμβάνονται στον ορισμό γυναίκες με γνωστό διαβήτη πριν από την έναρξη της εγκυμοσύνης). Ο τύπος αυτός μοιάζει με το διαβήτη τύπου 2 ως προς το ότι χαρακτηρίζεται από ταυτόχρονη ελαττωμένη έκκριση ινσουλίνης και ελαττωμένη ευαισθησία των κυττάρων στην ινσουλίνη. Παχύσαρκες γυναίκες είναι πιο πιθανό να αναπτύξουν διαβήτη της κύησης. Ο τύπος αυτός διαβήτη αφορά στο 3-5% των κυήσεων. Το 30-40% των γυναικών με διαβήτη κύησης θα αναπτύξουν διαβήτη τύπου 2 αργότερα στη ζωή τους. Ο διαβήτης της κύησης είναι αναστρέψιμος και υποχωρεί μετά τον τοκετό, μπορεί όμως να προκαλέσει περιγεννητικές επιπλοκές και προβλήματα στην υγεία μητέρας και νεογνού.

### **Άλλοι τύποι διαβήτη**

Σακχαρώδης διαβήτης μπορεί να εμφανιστεί και στις ακόλουθες περιπτώσεις :

- Γενετικά ελαττώματα των β-κυττάρων του παγκρέατος
- Γενετικό ελάττωμα της δράσης της ινσουλίνης
- Νόσοι του παγκρέατος
- Ορμονικές διαταραχές και ενδοκρινικά νοσήματα
- Διαβήτης λόγω λήψης φαρμάκων

## **Συμπτώματα**

Η κλασική συμπτωματολογία του σακχαρώδους διαβήτη περιλαμβάνει την πολυουρία, την πολυδιψία, την πολυφαγία και την απώλεια σωματικού βάρους. Στον διαβήτη τύπου 1, η εισβολή της νόσου είναι συνήθως απότομη και συχνά η πρώτη εκδήλωσή της μπορεί να είναι η ανάπτυξη διαβητικής κετοξέωσης με ναυτία, εμέτους, διάχυτο κοιλιακό άλγος και απώλεια συνείδησης. Στον διαβήτη τύπου 2, η νόσος εισβάλλει βαθμιαία, πολυφαγία παρατηρείται σπανιότερα, ενώ συχνά συνυπάρχουν αδυναμία, κόπωση, ζάλη και ευπάθεια σε λοιμώξεις. Συχνά, η συμπτωματολογία στον διαβήτη τύπου 2 λείπει τελείως και ο ασθενής αισθάνεται υγιής.

## **Κλινικά σημεία**

Η αύξηση του σακχάρου στο αίμα προκαλεί απώλεια υγρών μέσω οσμωτικής διούρησης. Σημεία αφυδάτωσης (ψυχρό και ξηρό δέρμα με ελαττωμένη σπαργή, αποξηραμένοι βλεννογόνοι και ανώμαλη και ξηρή γλώσσα) παρατηρούνται όταν η απώλεια υγρών δεν αντισταθμίζεται επαρκώς. Όταν εγκατασταθεί η διαβητική κετοξέωση, χαρακτηριστική είναι η αναπνοή Kussmaul, που συνίσταται σε βαθιές, παρατεταμένες και συνοδευόμενες από αναστεναγμό αναπνοές, καθώς και η απόπνοια ακετόνης (χαρακτηριστική οσμή στην αναπνοή του ασθενούς). Θόλωση της διανοίας, μειωμένη αντίδραση στα ερεθίσματα, υπνηλία και κώμα ακολουθούν εάν η κετοξέωση δεν αντιμετωπιστεί.

## **Διάγνωση**

Η διάγνωση του διαβήτη είναι εύκολη όταν υπάρχουν τα κλασικά συμπτώματα και αρκεί η επιβεβαίωση με τη μέτρηση του σακχάρου του αίματος. Η διάγνωση μπαίνει επίσης εύκολα όταν ο ασθενής παρουσιάζεται με συμπτώματα και σημεία διαβητικής κετοξέωσης. Τα διαγνωστικά κριτήρια που έχουν θεσπιστεί για τη διάγνωση του σακχαρώδους διαβήτη είναι τα ακόλουθα :

-Παρουσία κλασικών συμπτωμάτων του διαβήτη και τιμή γλυκόζης σε οποιαδήποτε στιγμή > 200mg/dl

-Τιμή σακχάρου νηστείας (που λαμβάνεται δηλαδή μετά από 8 τουλάχιστον ώρες αποχής από την πρόσληψη τροφής) > 126 mg/dl

-Τιμή σακχάρου 2 ώρες μετά από φόρτιση με 75g γλυκόζης από του στόματος > 200 mg/dl. Ένας άλλος χρήσιμος δείκτης είναι η τιμή της γλυκοζυλιωμένης αιμοσφαιρίνης (HbA1c). Δεν χρησιμοποιείται για τη διάγνωση του σακχαρώδους διαβήτη, αλλά για την παρακολούθηση της ρύθμισης του σακχάρου αίματος, αφού αντικατοπτρίζει τη μέση τιμή σακχάρου αίματος τους

τελευταίους 3 μήνες πριν την εξέταση. Τιμές HbA1c < 6% θεωρούνται ενδεικτικές καλού γλυκαιμικού ελέγχου.

### **Επιπλοκές**

Η πιθανότητα ανάπτυξης επιπλοκών λόγω του σακχαρώδους διαβήτη μειώνεται όσο καλύτερα ρυθμίζονται οι τιμές του σακχάρου στο αίμα. Μια σειρά παραγόντων, όπως το κάπνισμα, τα αυξημένα επίπεδα χοληστερόλης, η παχυσαρκία, η αρτηριακή υπέρταση και η καθιστική ζωή, επιταχύνουν την ανάπτυξη επιπλοκών. Οι επιπλοκές του σακχαρώδους διαβήτη διακρίνονται σε οξείες και χρόνιες.

### **-Οξείες**

#### **Διαβητική κετοξέωση και διαβητικό κώμα**

Η διαβητική κετοξέωση είναι μια επικίνδυνη επιπλοκή, θεωρείται επείγον περιστατικό και απαιτεί την άμεση διακομιδή του ασθενούς στο νοσοκομείο. Ο ασθενής εμφανίζει σημεία αφυδάτωσης, αναπνοή Kussmaul (βαθιές, παρατεταμένες και συνοδευόμενες από αναστεναγμό αναπνοές) και απόπνοια ακετόνης. Συχνά, τα σημεία αυτά συνοδεύονται από διάχυτο κοιλιακό άλγος. Το επίπεδο συνείδησης δεν επηρεάζεται αρχικά, στη συνέχεια όμως μπορεί να εμφανιστούν σταδιακά πτώση του επιπέδου συνείδησης, υπνηλία, λήθαργος και τελικά κώμα. Σε σοβαρότερες περιπτώσεις παρατηρούνται υπόταση και κυκλοφορική καταπληξία (shock). Με την κατάλληλη και έγκαιρη θεραπεία, η διαβητική κετοξέωση αποτελεί κατάσταση πλήρως αναστρέψιμη. Είναι πιο συχνή σε σακχαρώδη διαβήτη τύπου 1.

#### **Υπερωσμωτικό μη κετωτικό κώμα**

Χαρακτηρίζεται από αύξηση της ωσμωτικότητας του πλάσματος (>350 mOsm/L), πολύ υψηλά επίπεδα σακχάρου αίματος (>600 mg/dl) και απουσία κετοξέωσης. Προέχουν τα σημεία της αφυδάτωσης, ενώ επίσης εμφανίζονται διαταραχές του επιπέδου συνείδησης και ηλεκτρολυτικές διαταραχές. Διάφορες αιτίες μπορούν να πυροδοτήσουν την εμφάνιση του υπερωσμωτικού μη κετωσικού κώματος, όπως η σηψαιμία, το έμφραγμα του μυοκαρδίου, η παγκρεατίτιδα, η αιμορραγία από το γαστρεντερικό και η λήψη φαρμάκων. Εμφανίζεται συχνότερα σε ασθενείς με διαβήτη τύπου 2.

## **Υπογλυκαιμία**

Αποτελεί ουσιαστικά επιπλοκή της θεραπείας του σακχαρώδους διαβήτη. Μπορεί να προκληθεί από λανθασμένη δοσολογία κατά τη χορήγηση ινσουλίνης (αυξημένη δόση), έντονη σωματική άσκηση ή μειωμένη λήψη τροφής ή υδατανθράκων. Ο ασθενής εμφανίζει ευερεθιστότητα και αυξημένη εφίδρωση ενώ μπορεί να προκληθούν διαταραχές του επιπέδου συνείδησης, απώλεια συνείδησης ή και κώμα. Απαιτείται άμεση πρόσληψη γλυκόζης από το στόμα (γλυκά, ζαχαρούχα αναψυκτικά κλπ) ή, σε περίπτωση που ο ασθενής είναι αναίσθητος, ενδοφλέβια χορήγηση γλυκόζης.

## **-Χρόνιες**

### **Διαβητική μικροαγγειοπάθεια**

Προσβολή των τριχοειδών και προτριχοειδών αγγείων που με τη σειρά της προκαλεί :

-Διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια : Υπερπλασία των τριχοειδών στην επιφάνεια του αμφιβληστροειδή και προσβολή της ωχράς κηλίδας, που οδηγούν σε απώλεια όρασης. (Ο σακχαρώδης διαβήτης αποτελεί τη συχνότερη αιτία τύφλωσης στο Δυτικό κόσμο)

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

-Διαβητική νευροπάθεια : Μονο- ή πολυνευροπάθεια ή νευροπάθεια του αυτόνομου νευρικού συστήματος. Συχνά εμφανίζεται απώλεια της αισθητικότητας (αρχικά στα κάτω άκρα) και στυτική δυσλειτουργία.

-Διαβητική μακροαγγειοπάθεια

-Εμφάνιση αρτηριοσκλήρυνσης, νωρίτερα και σοβαρότερης μορφής από ότι σε μη διαβητικούς. Προσβολή αρτηριών μεσαίου και μεγάλου μεγέθους.

-Στεφανιαία νόσος, που μπορεί να οδηγήσει σε στηθάγχη ή οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου.

-Αγγειακά εγκεφαλικά επεισόδια, κυρίως ισχαιμικού τύπου.

-Περιφερική αγγειακή νόσος.

## Άλλες επιπλοκές

-Ευπάθεια σε λοιμώξεις.

-Υπερλιπιδαιμίες, λιπώδης διήθηση του ήπατος, ξανθώματα και ξανθελάσματα.

-Περιοδοντίτιδα.

## Αντιμετώπιση

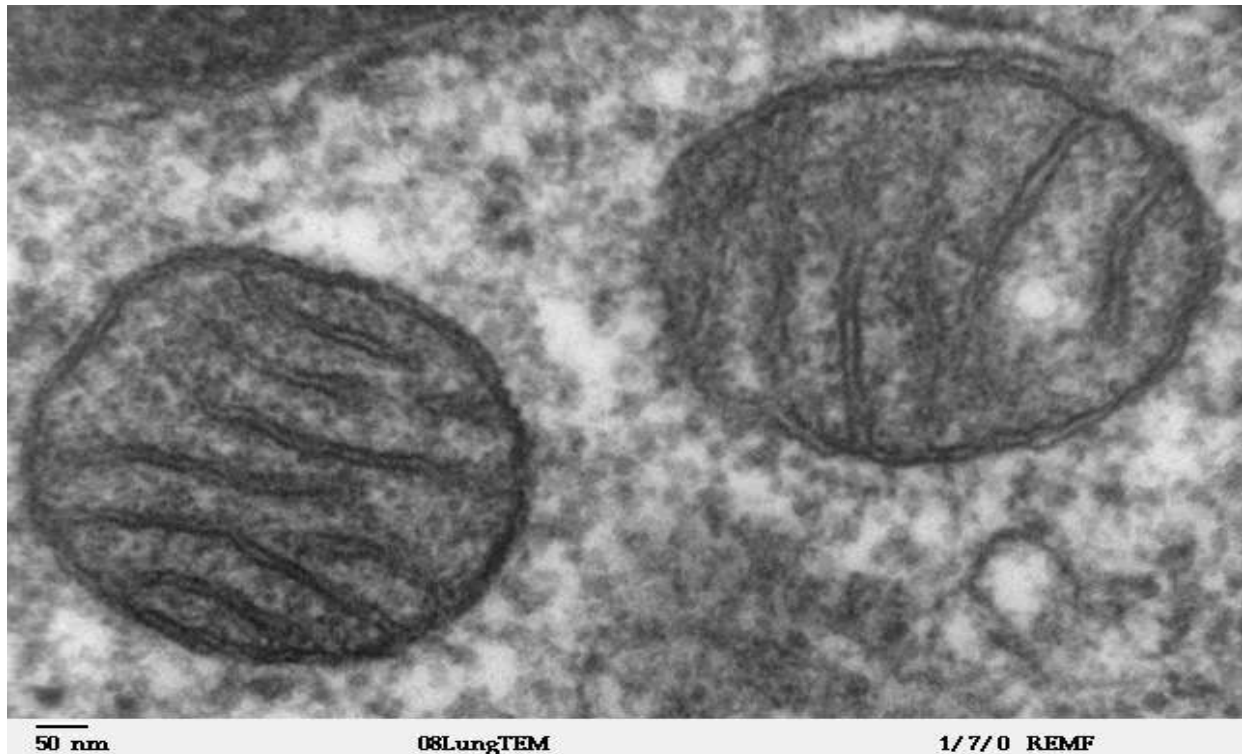
Πολύ σημαντικό ρόλο στην αντιμετώπιση του διαβήτη παίζει η εκπαίδευση του διαβητικού ασθενούς όσον αφορά στη διατροφή που πρέπει να ακολουθεί, στον έλεγχο του σακχάρου από τον ίδιο και στη χορήγηση ινσουλίνης. Η στρατηγική αντιμετώπισης έχει ως στόχο αφενός τον μακροχρόνιο γλυκαιμικό έλεγχο του ασθενούς κι αφετέρου την εξάλειψη των παραγόντων που αυξάνουν τον κίνδυνο εμφάνισης των χρόνιων επιπλοκών του διαβήτη, δηλαδή τη διακοπή του καπνίσματος, τον έλεγχο της αρτηριακής πίεσης και των επιπέδων χοληστερόλης, την αύξηση της σωματικής άσκησης και την υιοθέτηση από τον ασθενή του υγιεινού τρόπου ζωής. Σε ασθενείς με διαβήτη τύπου 1, η χορήγηση ινσουλίνης είναι απαραίτητη για την εξασφάλιση των επιθυμητών επιπέδων γλυκόζης. Αντίθετα, σε ασθενείς με διαβήτη τύπου 2, ο γλυκαιμικός έλεγχος είναι δυνατόν να επιτευχθεί αρχικά με έλεγχο του σωματικού βάρους και δίαιτα ή με χορήγηση αντιδιαβητικών φαρμάκων από του στόματος. Ινσουλίνη θα χρειαστούν οι ασθενείς αυτοί σε περίπτωση αποτυχίας του γλυκαιμικού ελέγχου με τα παραπάνω μέτρα. Ο συνηθέστερος τρόπος χορήγησης της ινσουλίνης είναι η υποδόρια χορήγηση. Ο τύπος ινσουλίνης, η δόση και η συχνότητα χορήγησης εξαρτώνται αποκλειστικά από τις ανάγκες του εκάστοτε ασθενούς. Για το λόγο αυτό, το σχήμα της ινσουλινοθεραπείας είναι απόλυτα εξατομικευμένο.

## ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΟ

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. Μιτοχόνδρια παρατηρήθηκαν για πρώτη φορά την δεκαετία του 1840, ταυτοποιήθηκαν όμως ως ανεξάρτητα κυτταρικά οργανίδια το 1894.

Τα μιτοχόνδρια σε μεγάλη ποσότητα εμφανίζονται σε κύτταρα με υψηλές απαιτήσεις σε ενέργεια (μυϊκά κύτταρα, νευρικά κύτταρα, κύτταρα των αισθητηρίων οργάνων, ωάρια, κ.λπ.). Στα μυϊκά κύτταρα της καρδιάς, έχουμε ένα ποσοστό μιτοχονδρίων του 36%. Ευκαρυωτικά κύτταρα, που θα χάσουν τα μιτοχόνδριά τους, δεν μπορούν πλέον να αναζωογονηθούν. Ωστόσο, υπάρχουν και ευκαρυωτικά κύτταρα χωρίς μιτοχόνδρια (π.χ. ορισμένα πρωτόζωα).

Μέχρι σήμερα, έχουν γνωστοποιηθεί περίπου 50 ασθένειες οφειλόμενες στα μιτοχόνδρια (μιτοχονδριοπάθειες) οι οποίες συμπεριλαμβάνονται στα μεταβολικά νοσήματα.



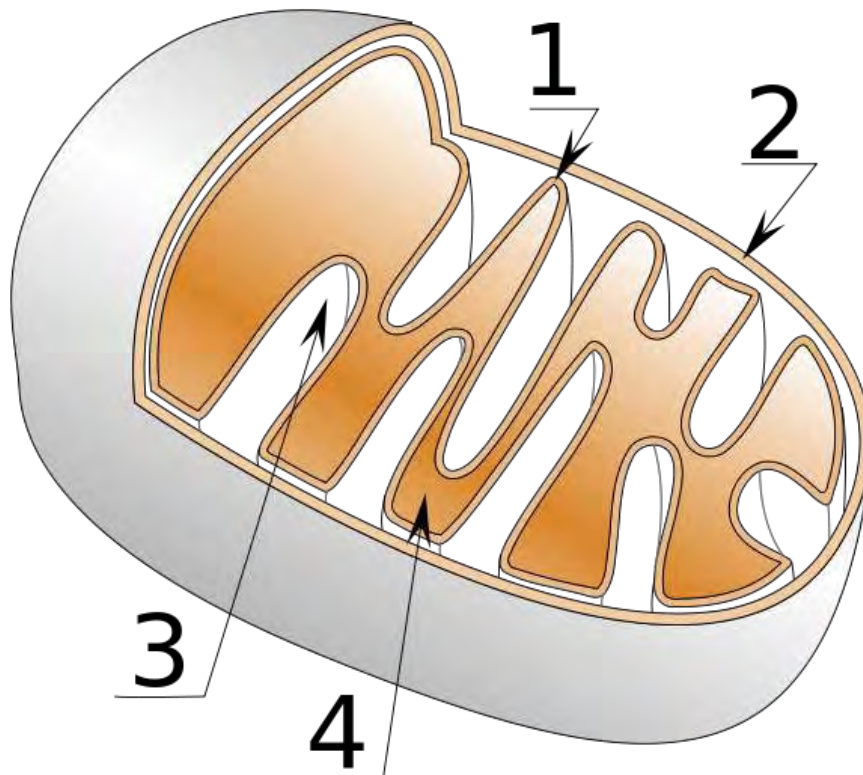
Εικ. 1. Μιτοχόνδρια

### Δομή

Τα μιτοχόνδρια έχουν επίμηκες, σφαιρικό ή ωσειδές σχήμα. Περιβάλλονται από δύο μεμβράνες, την εξωτερική και την εσωτερική. Η εξωτερική τους μεμβράνη είναι λεία, έχει κυλινδρικό σχήμα και δεν φέρει οξυσώματα. Περιέχει συγκεκριμένες πρωτεΐνες, τις πορίνες που επιτρέπουν την διέλευση ακόμα και μεγάλων μορίων. Αντίθετα ορισμένα μόνο μόρια μπορούν να μεταφερθούν διαμέσου της εσωτερικής μεμβράνης. Η εσωτερική μεμβράνη είναι αναδιπλωμένη, σχηματίζει πολυάριθμες δισκοειδείς ή δακτυλοειδείς 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 υπό υγρού που χρησιμεύει στη λειτουργική επικοινωνία των δύο μεμβρανών.

Ο χώρος που περιβάλλεται από την εσωτερική μεμβράνη ονομάζεται μήτρα ή στρώμα, κατ' αναλογία με το στρώμα του χλωροπλάστη. Ο χώρος αυτός περιέχει το DNA, τα ριβοσώματα και τα

πολυάριθμα ένζυμα που καταλύουν τις μεταβολικές αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα στο μιτοχόνδριο. Είναι χώρος με μεγάλη εξειδίκευση, αφού διαφέρει σημαντικά από χημική άποψη, από το κυτταρόπλασμα. Είναι ημιαυτόνομα οργανίδια και διαθέτουν δικό τους DNA, έτσι ώστε να μπορούν να αναπαράγονται χωρίς να χρειάζεται να διαιρεθεί το κύτταρο. Το DNA των μιτοχονδρίων είναι δίκλωνο κυκλικό και είναι τοποθετημένο στις εσοχές που δημιουργεί η εσωτερική μεμβράνη. Κάθε μιτοχόνδριο περιέχει 2 έως δέκα αντίγραφα του κυκλικού αυτού μορίου DNA. Επίσης υπάρχει ένα ολοκληρωμένο σύστημα έκφρασης των γονιδίων που περιλαμβάνει ριβοσωμάτα και άλλες πρωτεΐνες που είναι απαραίτητες γι' αυτήν την λειτουργία. Η είσοδος των πρωτεϊνών στο μιτοχόνδριο πραγματοποιείται με τη βοήθεια ενός ειδικού σήματος και της κυτοσολικής συνοδοού HSC70, η οποία αποτρέπει το πρώιμο δίπλωμα της πρωτεΐνης. Στη συνέχεια προσδένεται σε ένα πρωτεϊνικό σύμπλοκο της εξωτερικής μεμβράνης του μιτοχονδρίου (Tom Complex) και έπειτα στο εσωτερικό σύμπλοκο (Tim Complex). Μόλις φτάσει στη μήτρα του μιτοχονδρίου, μια πεπτιδάση αφαιρεί το ειδικό σήμα διαλογής. Εάν όμως η πρωτεΐνη έχει στόχο να αγκυροβολήσει στις βιομεμβράνες του οργανιδίου, θα εμφανιστεί μετά την αποκοπή του σήματος διαλογής, ένα άλλο ειδικό σήμα θέσης.



Εικ. 2. Τμήματα μιτοχονδρίου. (1) Εσωτερική μεμβράνη, (2) Εξωτερική μεμβράνη, (3) Αναδιπλώσεις, (4) Μήτρα.

## Λειτουργία

Ο ρόλος των μιτοχονδρίων είναι η εξασφάλιση ενέργειας. Τα μιτοχόνδρια χρησιμοποιούνται από τα κύτταρα για τον μεταβολισμό των βιολογικών μακρομορίων που προσλαμβάνουν οι οργανισμοί με τις τροφές. Έτσι με τη βοήθεια των μιτοχονδρίων τα κύτταρα διασπούν τους υδατάνθρακες και τα λίπη συνθέτοντας μόρια τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP), μέσω της διαδικασίας της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Η διαδικασία αυτή είναι αερόβια και συντελείται διαμέσου ενός πολύπλοκου διαμεμβρανικού ενζύμου που βρίσκεται στην εσωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου και ονομάζεται ATP-συνθετάση.

Στην πραγματικότητα η διαδικασία παραγωγής ενέργειας είναι πολύ περίπλοκη. Αρχικά τα μόρια των τροφών, αφού διασπαστούν στα μονομερή τους (δηλαδή οι πολυσακχαρίτες σε μεμονωμένα σάκχαρα όπως η γλυκόζη, τα λίπη σε λιπαρά οξέα και οι πρωτεΐνες σε αμινοξέα), εισάγονται στα κύτταρα. Εκεί τα λιπαρά οξέα εισάγονται κατευθείαν στα μιτοχόνδρια, ενώ τα σάκχαρα εισέρχονται σε μία ακολουθία δέκα διαδοχικών αντιδράσεων τη γλυκόλυση. Αποτέλεσμα της γλυκόλυσης είναι η παραγωγή ενός μορίου του πυροσταφυλικού το οποίο εισάγεται στα μιτοχόνδρια, ενώ παράλληλα παράγονται μικρές ποσότητες ATP και NADH ενός άλλου ενεργοποιημένου μορίου φορέα. Εκεί το πυροσταφυλικό μετατρέπεται ενζυμικά σε ακετυλοσυνένζυμο Α (ακέτυλοCo-A) και έτσι ξεκινάει μια κυκλική αλληλουχία αντιδράσεων, ο κύκλος του κιτρικού οξέος.

### Ο κύκλος του κιτρικού οξέος

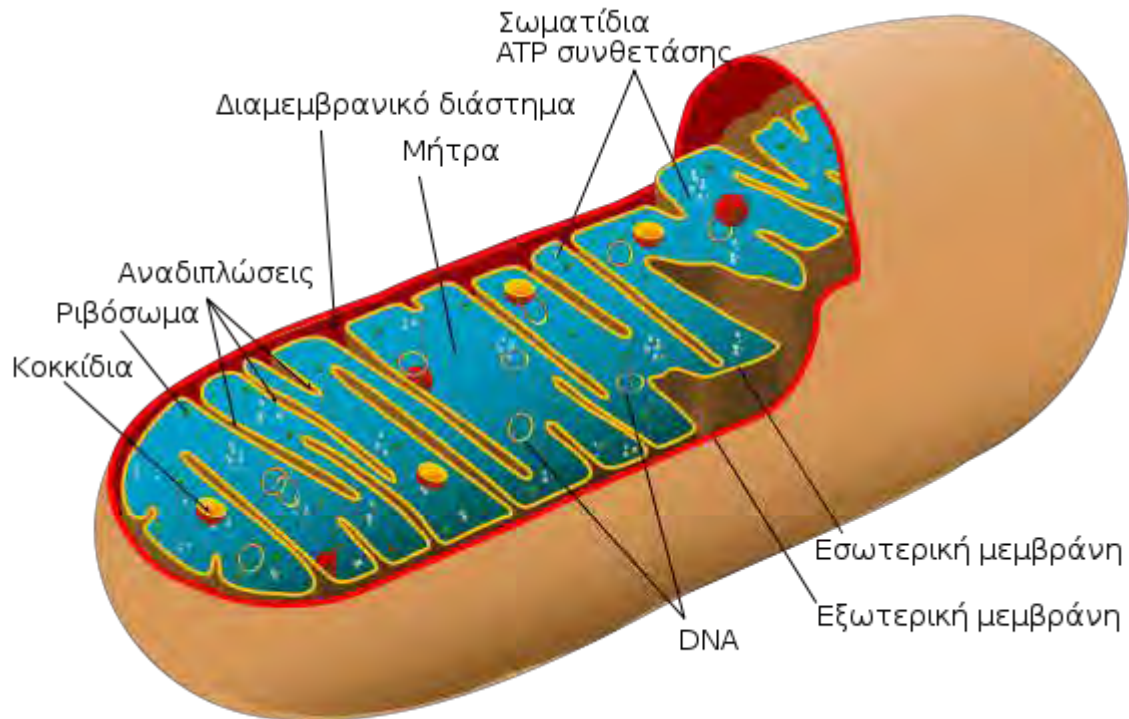
Το ακέτυλο-CoA που παράγεται τόσο από το πυροσταφυλικό όσο και από τα λιπαρά οξέα προστίθεται στο οξαλοξικό οξύ και έτσι παράγεται κιτρικό οξύ. Με αυτόν τον τρόπο το ξεκινά ο κύκλος των οκτώ διαδοχικών αντιδράσεων που ξεκινά από το κιτρικό οξύ και καταλήγει επίσης στο κιτρικό οξύ. Παράλληλα παράγονται τρία μόρια NADH, και ένα μόριο FADH<sub>2</sub> και GTP. Τα μόρια αυτά χρησιμοποιούνται για την παραγωγή ATP, του βασικού ενεργειακού νομίσματος του κυττάρου.

Καθεμιά από τις οκτώ αντιδράσεις καταλύεται από το δικό της ένζυμο. Μόλις ολοκληρωθεί ο κύκλος παράγεται οξαλοξικό οξύ για να μπορεί να ξανακινηθεί η ίδια διαδικασία, με την προσθήκη ενός νέου μορίου ακέτυλο-CoA. Όσον αφορά τα αμινοξέα που προσλαμβάνει το κύτταρο από την αποδόμηση των πρωτεϊνών της τροφής, το καθένα μπορεί να μετατραπεί ανάλογα με την φύση του σε ένα από τα οκτώ ενδιάμεσα προϊόντα του κύκλου ή ακόμα και σε πυροσταφυλικό ή σε ακέτυλο-CoA. Ο κύκλος είναι γνωστός επίσης ως κύκλος του Κρεμπς.

Ο βασικός ρόλος του μιτοχονδρίου είναι η παραγωγή ATP. Επομένως είναι απαραίτητο να χρησιμοποιηθούν τα υπόλοιπα ενεργοποιημένα μόρια φορείς που παράγονται κατά την διάρκεια



του κύκλου για να παραχθεί ATP. Το GTP παράγει εύκολα ATP μέσω της προσφοράς μιας εκ' των τριών φωσφορικών ομάδων του στο ADP. Για τα άλλα δύο μόρια όμως η κατάσταση είναι πιο περίπλοκη.



Εικ. 3. Δομή μιτοχονδρίου

### Χημειωσμωτική σύζευξη

Το NADH και το FADH<sub>2</sub> λειτουργούν ως φορείς ηλεκτρονίων υψηλής ενέργειας. Αυτό πρακτικά σημαίνει ότι τείνουν να αποβάλλουν ένα ζεύγος δύο ηλεκτρονίων ώστε να μετατραπούν στην ανηγμένη μορφή τους που χαρακτηρίζεται από μεγαλύτερη σταθερότητα. Αυτό ακριβώς το γεγονός εκμεταλλεύεται το κύτταρο για να προωθήσει την παραγωγή ATP. Μόλις αποβληθούν τα ηλεκτρόνια εισάγονται σε μια αλυσίδα μορίων που το καθένα λειτουργεί διαδοχικά ως δέκτης και δότης ηλεκτρονίων. Η τάση μεταφοράς οφείλεται στις διαδοχικά μικρότερες ενέργειες των ηλεκτρονίων κατά το πέρασμα τους από το ένα μόριο στο επόμενο.

Η αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων, γνωστή και ως αναπνευστική αλυσίδα είναι εγκατεστημένη στην εσωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου. Εκεί βρίσκονται τρία διαμεμβρανικά σύμπλοκα ενζύμων, το σύμπλοκο αφυδρογονάσης του NADH, το σύμπλοκο των κυτοχρωμάτων b-c<sub>1</sub> και το σύμπλοκο της οξειδάσης του κυτοχρώματος. Τα ηλεκτρόνια μετακινούνται διαδοχικά από το ένα σύμπλοκο στο επόμενο καθοδηγούμενα από τις διαδοχικά χαμηλότερες ενέργειες τους. Η διαφορά ενέργειας αξιοποιείται μέσω της άντλησης πρωτονίων δηλαδή κατιόντων υδρογόνου από το

στρώμα προς τον διαμεμβρανικό χώρο. Τελικός σταθμός των ηλεκτρονίων κατά μήκος της αλυσίδας είναι το  $O_2$  το οποίο προέρχεται από την αναπνοή. Τα ηλεκτρόνια ανάγουν το οξυγόνο και παράγεται νερό με την βοήθεια του συμπλόκου της οξειδάσης του κυτοχρώματος. Έτσι τα ηλεκτρόνια βρίσκονται τώρα στην χαμηλότερη ενεργειακή στάθμη.

Η όλη διαδικασία απελευθερώνει την ενέργεια που απαιτείται για την άντληση των πρωτονίων. Επομένως η συγκέντρωση πρωτονίων εκτός του μιτοχονδρίου είναι περίπου δέκα φορές μεγαλύτερη εκτός του στρώματος γι' αυτό εξάλλου και η διαδικασία της άντλησης απαιτεί ενέργεια και δεν είναι αυθόρμητη. Μόλις λοιπόν τους δοθεί ευκαιρία τα πρωτόνια τείνουν να εισέλθουν στο στρώμα. Εδώ ακριβώς αναλαμβάνει δράση η συνθετάση ATP. Αφού η συγκέντρωση πρωτονίων εκτός του στρώματος είναι πολύ μεγαλύτερη της εσωτερικής, εκείνα χρησιμοποιούν την συνθετάση του ATP για να επανέλθουν. Ταυτόχρονα όμως κινούν τις υπομονάδες της πρωτεΐνης. Αυτή η αλλαγή διαμόρφωσης δίνει την ενέργεια που απαιτείται για να πραγματοποιηθεί η προσθήκη μιας φωσφορικής ομάδας στο ADP και να παραχθεί ATP.

Με την ολοκλήρωση της διαδικασίας που είναι γνωστή ως χημειοσμωτική σύζευξη τα σύμπλοκα ενζύμων ξανααντλούν τα πρωτόνια προς τα έξω ώστε να συνεχίσει η λειτουργία της συνθετάσης του ATP. Το ATP παράγεται στο στρώμα αλλά στη συνέχεια μεταφέρεται με την βοήθεια πρωτεϊνών στο κυτταρόπλασμα. Η ενέργεια που περιέχει στους δεσμούς του είναι αυτή που το καθιστά ως το κύριο ενεργειακό νόμισμα του κυττάρου. Η διάσπαση του δεσμού υψηλής ενέργειας μεταξύ της δεύτερης και της τρίτης φωσφορικής ομάδας παρέχει την ενέργεια για να πραγματοποιηθεί σχεδόν κάθε αντίδραση του κυττάρου που δεν είναι ενεργειακά ευνοϊκή.

#### ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟ DNA

Τα μιτοχόνδρια διαθέτουν δικό τους γενετικό υλικό, το οποίο υπάρχει σε πολλά αντίγραφα. Το DNA τους είναι κυκλικό και διαθέτει έναν ανεξάρτητο κύκλο αναπαραγωγής (ημιαυτόνομα). Κωδικοποιεί όμως μόνο ένα μικρό υποσύνολο των πρωτεϊνών που χρειάζεται το μιτοχόνδριο. Το μιτοχονδριακό DNA κληρονομείται μόνο από τη μητέρα. Αυτό συμβαίνει επειδή το μαστίγιο του σπερματοζωαρίου, το οποίο φέρει τη συντριπτική πλειονότητα των μιτοχονδρίων του, δεν εισέρχεται στο ωάριο κατά τη γονιμοποίηση.

Στον άνθρωπο το μιτοχονδριακό DNA περιλαμβάνει σχετικά λίγα γονίδια. Ο μεγαλύτερος αριθμός των πρωτεϊνών που απαιτούνται για την λειτουργία του οργανιδίου κωδικοποιείται από γονίδια του DNA του πυρήνα. Ωστόσο σοβαρές ασθένειες οφείλονται σε μεταλλάξεις μιτοχονδριακών γονιδίων. Οι ασθένειες αυτές προκαλούν διάφορες μορφές μυϊκής δυστροφίας, αφού το μιτοχόνδριο είναι το κέντρο παραγωγής ATP του κυττάρου.

## **Γονίδια μιτοχονδριακών γονιδιωμάτων**

Τα μιτοχονδριακά γονίδια επιδέχονται μία χρήσιμη κατηγοριοποίηση σε 3 τάξεις: rRNA γονίδια, tRNA γονίδια και γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες («πρωτεϊνικά γονίδια»).

### **Μιτοχονδριακά rRNA γονίδια**

Τα δύο μεγάλα γονίδια rRNA (κωδικοποιούν τα RNAs της μικρής ριβοσωμικής υπομονάδας και της μεγάλης ριβοσωμικής υπομονάδας) είναι παρόντα σε όλα τα χαρακτηρισμένα μιτοχονδριακά γονιδιώματα. Αν και είναι καθολικά συντηρημένα, τα γονίδια αυτά παρουσιάζουν ένα αξιοσημείωτο εύρος στο μήκος τους, ειδικά αν τα συγκρίνει κανείς με αυτά των αντίστοιχων βακτηρίων και χλωροπλαστών/πλαστιδίων. Σε διάφορες περιπτώσεις, τα μιτοχονδριακά rRNA γονίδια έχουν υποστεί μέτριο έως και ακραίο διαμελισμό σε μικρά κομμάτια, που βρίσκονται διασκορπισμένα στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα, των οποίων η μεταγραφή ελέγχεται αυτόνομα, και ύστερα επανενώνονται στο επίπεδο του RNA μέσω δευτερογενών αλληλεπιδράσεων για να σχηματίσουν ένα λειτουργικό μόριο rRNA.

### **Μιτοχονδριακά γονίδια tRNA**

Ο αριθμός των ξεχωριστών tRNA γονιδίων που εντοπίζονται στα mtDNA ποικίλει σε τεράστιο βαθμό μεταξύ των ευκαρυωτικών, από μηδενικό αριθμό έως ένα λογικό αριθμό (ένα αυτό-συντηρούμενο σύνολο) των 22-27 tRNAs, σε πολλά μιτοχονδριακά συστήματα. Δεν υπάρχουν ακόμη αποδείξεις (ούτε ενδείξεις) ότι κάποια από αυτά τα απόντα tRNA γονίδια μιτοχονδριακής προέλευσης έχουν μεταφερθεί λειτουργικά στον πυρήνα. Η κυρίαρχη επεξήγηση για την απώλεια τους είναι η λειτουργική αντικατάσταση/υποκατάσταση τους μέσω πυρηνικών tRNAs αυστηρώς κυτταροπλασματικής προέλευσης, τα οποία περιστασιακά έχουν διττό ρόλο, εξυπηρετώντας τις ανάγκες και της κυττοσολικής και της μιτοχονδριακής πρωτεϊνοσύνθεσης. Η εισαγωγή των πυρηνικά – κωδικοποιούμενων tRNAs στο μιτοχόνδριο φαίνεται να έχει εξελιχθεί, σε μεγάλη ή μικρή έκταση, πολλές φορές κατά την διάρκεια της μιτοχονδριακής εξέλιξης .

### **Γονίδια που κωδικοποιούν mRNAs (πρωτεϊνικά γονίδια)**

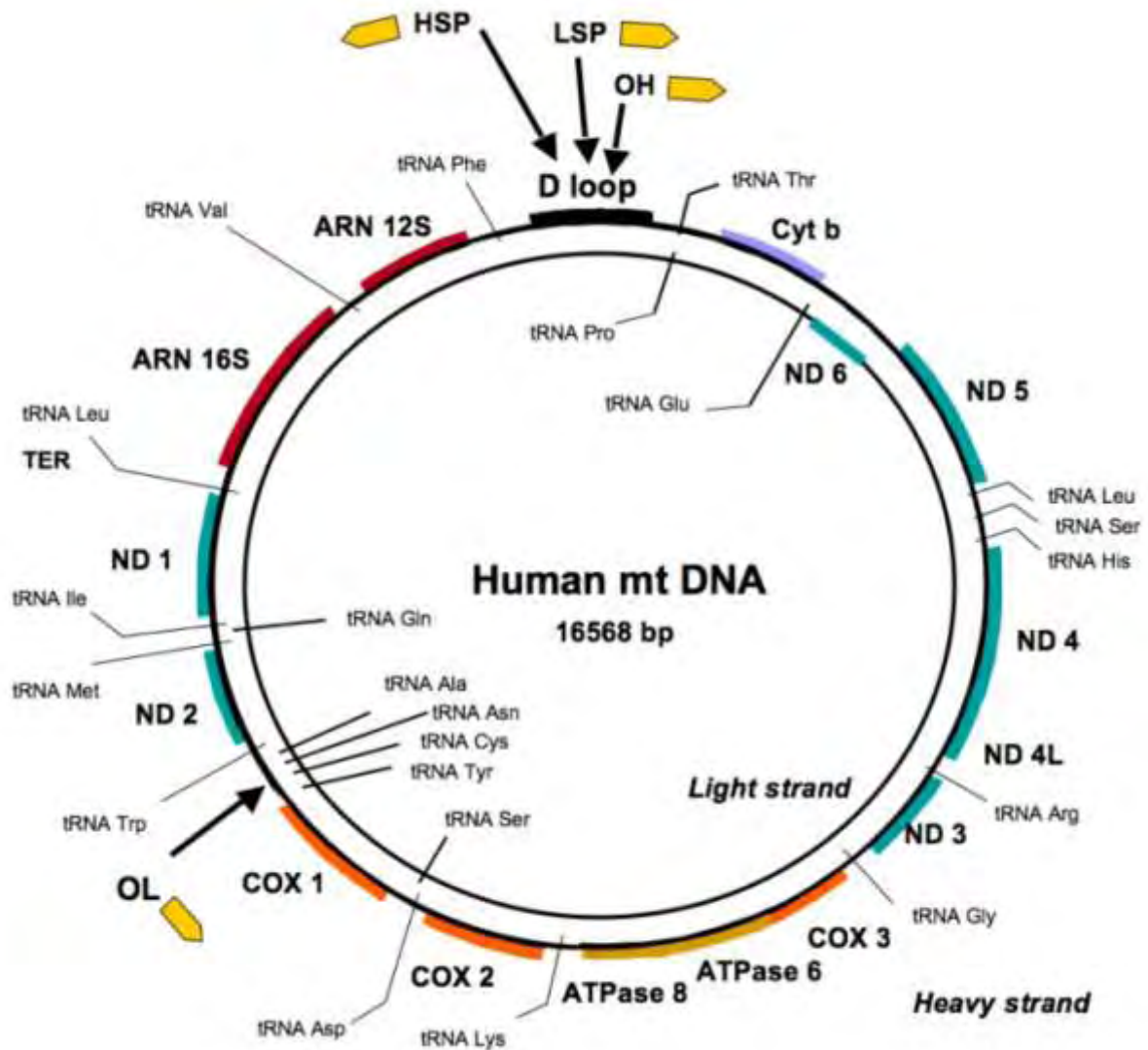
Ο αριθμός των μιτοχονδριακών πρωτεϊνικών γονιδίων εμφανίζει μεγάλη ποικιλία, από μόνο 3 στο παράσιτο *P. falciparum* και όλα τα υπόλοιπα μέλη του φύλου *Apicomplexa* (Feagin, 1994), έως 67 στο πρώτιστο του γλυκού νερού *Reclinomonas americana*.

## **Καταγωγή**

Αυτή η σχετική αυτοδυναμία κάνει τους επιστήμονες να υποθέτουν πως τα μιτοχόνδρια προέρχονται από προκαρυωτικούς οργανισμούς, οργανισμούς δηλαδή που δε διαθέτουν πυρήνα οι οποίοι ενσωματώθηκαν σε ευκαρυωτικά κύτταρα, συμβιώνοντας με αυτά. Το DNA των μιτοχονδρίων παρουσιάζει σημαντικές ομοιότητες με το DNA σύγχρονων βακτηρίων, των απογόνων των αρχέγονων προκαρυωτικών οργανισμών. Επίσης ο τρόπος πολλαπλασιασμού τους θυμίζει την διαίρεση των βακτηρίων. Τέλος το γεγονός ότι περιβάλλονται από διπλή μεμβράνη και συμμετέχουν ελάχιστα στην διακίνηση υλικών στο εσωτερικό του κυττάρου είναι το τρίτο σημείο που οδηγεί τους επιστήμονες να κλίνουν προς αυτήν την υπόθεση.

## **Μιτοχονδριακό γονιδίωμα**

Παρατηρήσεις, που έγιναν στα τέλη του 50 και στις αρχές του 60, απέδειξαν την ύπαρξη ενός μιτοχονδριακού γενετικού συστήματος που ξεχώριζε από τον πυρήνα. Πειράματα που είχαν προηγηθεί, είχαν αποδείξει ότι απομονωμένα μιτοχόνδρια είχαν ένα μηχανισμό πρωτεϊνοσύνθεσης και ήταν ικανά να συνθέσουν έναν μικρό αριθμό πρωτεϊνών. Περαιτέρω μελέτες θεμελίωσαν την ύπαρξη μιτοχονδριακών ριβοσωμάτων rRNA και tRNA. Μετά από τις αρχικές αυτές ανακαλύψεις, πολλά έχουν ακολουθήσει για να καθοριστεί γονιδιακή οργάνωση του mtDNA. Το γονιδίωμα του ανθρώπινου μιτοχονδρίου αλληλουχήθηκε το 1981 από το Fred Sanger και τους συναδέλφους τους στο Cambridge, ενώ πλέον έχουν κατηγοριοποιηθεί αλληλουχίες από περισσότερους οργανισμούς. Εντυπωσιακό εύρημα αποτελεί ανίχνευση ενός συντηρημένου συνόλου γονιδίων σε όλους τους πολυκύτταρους οργανισμούς. Στον άνθρωπο, το mtDNA περιλαμβάνει γονίδια που εκφράζουν 2 μόρια rRNA, 22 tRNA και 13 πολυπεπτίδια που ανήκουν στα σύμπλοκα I, III, IV, V της αναπνευστικής αλυσίδας .



Εικ. 4. Το μιτοχονδριακό γονιδίωμα.

Σε αντίθεση με το πυρηνικό γονιδίωμα, το μιτοχονδριακό εκθέτει μεγάλη οργάνωση στην αλληλουχία του. Το μιτοχονδριακό γένωμα αποτελείται από 16.596 ζεύγη βάσεων σε μήκος, ενώ είναι ένα κλειστό κυκλικό μόριο που τοποθετείται εντός της μιτοχονδριακής μήτρας στο κύτταρο. Έχει δυο κλώνους, έναν πλούσιο σε γουανίνη κλώνο (Heavystrand) και έναν πλούσιο σε κυτοσίνη κλώνο L (Lightstrand). Ιντρόνια απουσιάζουν και όλες οι κωδικοποιούσες περιοχές είναι συνεχιζόμενες. Το μόνο μη εκφραζόμενο τμήμα του είναι περιοχή του βρόγχου D (d - loop), μια περιοχή από 1121 bp που περιέχει την αφετηρία αντιγραφής του κλώνου και τους υποκινητές μεταγραφής των δυο κλώνων.

#### Έκφραση μιτοχονδριακού γονιδιώματος

Η έκφραση του μιτοχονδριακού γονιδιώματος οδηγεί στην σύνθεση 2 μορίων rRNA, 22 tRNA και 13 πολυπεπτιδίων. Τα 13 πολυπεπτιδία περιλαμβάνουν 7 υπομονάδες της αφυδρογονάσης NADH3

υπομονάδες της κυτοχρωμικής αναγωγής, 2 υπομονάδες της ATP συνθάσης και το κυτόχρωμα b. Το σύνολο των συμπλοκών της αναπνευστικής αλυσίδας συγκροτείται από υπομονάδες που εκφράζονται στο μιτοχόνδριο, αλλά και στο πυρηνικό DNA. Γεγονός που φανερώνει την εξάρτηση του μιτοχονδρίου από τον πυρήνα για την σωστή διεξαγωγή παραγωγής ενέργειας.

### **Γενετικός κώδικας μιτοχονδρίων**

Το ανθρώπινο μιτοχονδριακό γονιδίωμα κωδικοποιεί 22 είδη tRNA, τα οποία είναι τα μόνα που χρησιμοποιούνται για την μετάφραση των μιτοχονδριακών mRNA. Αυτό επιτυγχάνεται σύμφωνα με την υπόθεση αστάθειας, όπου U του αντικωδικονίου στο tRNA μπορεί να συζευχθεί με οποιαδήποτε από τις τέσσερις βάσεις στην τρίτη θέση του κωδικονίου στο mRNA, επιτρέποντας την αναγνώριση τεσσάρων κωδικονίων από ένα μόνο μόριο tRNA. Επιπλέον μερικά κωδικόνια καθορίζουν διαφορετικά αμινοξέα στο μιτοχονδριακό γενετικό κώδικα σε σχέση με τον παγκόσμιο. Πρέπει να σημειωθεί ότι το κωδικόνιο AUU στα μιτοχόνδρια κωδικοποιεί ισολευκίνη κατά την επιμήκυνση, αλλά μπορεί να κωδικοποιήσει και την μεθειονίνη κατά την έναρξη της μετάφρασης. Από τα γονίδια που εδράζονται στο μιτοχονδριακό χρωμόσωμα, δύο κωδικοποιούν ριβοσωμικό RNA, το 12S και το 16SrRNA. Τα μιτοχονδριακά ριβοσώματα σχηματίζονται από μια μικρή υπομονάδα με συντελεστή καθίζησης 28S και μια μεγάλη με συντελεστή καθίζησης 39S. μικρή υπομονάδα αποτελείται από το 16S και 29 πρωτεΐνες πυρηνικής προέλευσης, ενώ μεγάλη υπομονάδα αποτελείται από το 12SRNA και 48 πρωτεΐνες πυρηνικής προέλευσης. Τα μιτοχονδριακά ριβοσώματα βρίσκονται στη μήτρα είτε ελεύθερα, είτε συνδεδεμένα στις πτυχώσεις της εσωτερικής μεμβράνης. έναρξη της μετάφρασης στα μιτοχονδριακά ριβοσώματα μοιάζει με εκείνη των ευκαρυωτικών. Παρόλα αυτά, πρωτεϊνοσύνθεση αρχίζει με N-φορμυλομεθειονίνη (fmet). Τα πολυπεπτίδια που καθορίζονται από το μιτοχονδριακό γένωμα αποτελούν το 5-10% του συνόλου των μιτοχονδριακών πρωτεϊνών. Οι υπόλοιπες πρωτεΐνες που είναι απαραίτητες για τη βιογένεση και την φυσιολογική λειτουργία των μιτοχονδρίων, κωδικοποιούνται από το πυρηνικό γένωμα, μεταφράζονται στα κυτταροπλασματικά ριβοσώματα και μεταφέρονται στα μιτοχόνδρια.

ΓΕΝΕΤΙΚΟΣ ΚΩΔΙΚΑΣ												
		Δεύτερο γράμμα										
		U		C		A		G				
Πρώτο γράμμα	U	UUU	φαινυλαλανίνη	UCU	σερίνη	UAU	τυροσίνη	UGU	κυστεΐνη	U C A G		
		UUC		UCC			UAC		UGC			
		UUA	λευκίνη	UCA			UAA	λήξη	UGA		λήξη	
		UUG		UCG			UAG		UGG		τροποσφάνη	
	C	CUU	λευκίνη	CCU	προλίνη	CAU	ιστιδίνη	CGU	αργινίνη	U C A G		
		CUC				CAC		CGC				
		CUA				CCA	γλουταμίνη	CGA				
		CUG				CCG		CAG				CGG
	A	AUU	ισολευκίνη	ACU	θρεονίνη	AAU	ασπαραγινίνη	AGU	σερίνη	U C A G		
		AUC		ACC			AAC		AGC			
		AUA		ACA			AAA	λυσίνη	AGA		αργινίνη	
		AUG	μεθειονίνη έναρξη	ACG			AAG		AGG			
G	GUU	βαλίνη	GCU	αλανίνη	GAU	ασπαρτικό οξύ	GGU	γλυκίνη	U C A G			
	GUC				GCC		GAC				GGC	
	GUA				GCA		GAA			γλουταμινικό οξύ	GGA	
	GUG				GCG		GAG				GGG	

Συνήθως για να διακρίνουμε την κωδική (μη μεταγραφόμενη) και τη μη κωδική (μεταγραφόμενη) αλυσίδα και να εντοπίσουμε ένα γονίδιο, ψάχνουμε να βρούμε κάποιες από τις επόμενες αλληλουχίες:

		Έναρξη		Λήξεις
DNA	κωδική 5' → 3'	ATG ←	κωδικόνια →	TAA TGA TAG
	μη κωδική 3' ← 5'	TAC ←	τριπλέτες →	ATT ACT ATC
mRNA	mRNA 5' → 3'	AUG ←	κωδικόνια →	UAA UGA UAG

#### Σημείωση:

Ο προσανατολισμός των αλυσίδων DNA και RNA είναι πάντα 5' → 3'.

Δεν υπάρχει προσανατολισμός 3' → 5'.

Έτσι όταν έχουμε αλυσίδα 5' → 3' προς τα δεξιά και θέλουμε να δηλώσουμε ότι η αντιπαράλληλή της έχει αντίθετο προσανατολισμό, ένας τρόπος είναι να πούμε ότι έχει προσανατολισμό 5' → 3' προς τα αριστερά. Είναι λάθος να πούμε ότι η αντιπαράλληλη έχει προσανατολισμό 3' → 5'. Επίσης είναι επικίνδυνο να γράψουμε 3' ← 5' γιατί ο συμβολισμός αυτός με το βελάκι προς τα αριστερά μπορεί να μη γίνει αντιληπτός από τον βαθμολογητή.

Εικ. 5. Κωδικόνια

## **Κληρονομικότητα του μιτοχονδριακού DNA**

Τα μη πυρηνικά γονιδιώματα μεταβιβάζονται κατά κανόνα μέσω της μητέρας στις επόμενες γενιές. Σύγχρονες προσεγγίσεις υποστηρίζουν ότι τα μιτοχόνδρια του σπέρματος καταστρέφονται με ενεργό τρόπο λίγο μετά τη γονιμοποίηση μέσω διεργασιών που παρουσιάζουν υψηλή ειδικευση για κάθε είδος. Η μητρική κληρονομία των κυτταροπλασματικών γονιδιωμάτων ερμηνεύεται εξελικτικά σαν ένας χαρακτήρας που ελέγχεται από τον πυρήνα και προστατεύει τα μη-πυρηνικά γονιδιώματα από τις αρνητικές επιδράσεις. Η συγκεκριμένη υπόθεση, προκειμένου να εξηγήσει τους λόγους που συνέβαλαν στην εγκαθίδρυση της μητρικής κληρονομίας, λαμβάνει υπόψη τις ιδιαιτερότητες που παρουσιάζουν τα γονιδιώματα των οργανιδίων σε αντιπαράθεση με τα πυρηνικά. Τέτοιες ιδιαιτερότητες είναι μεγάλος αριθμός αντιγράφων ανά κύτταρο, μικρή έως ελάχιστη επίδραση του ανασυνδυασμού, φυσική επιλογή που συμβαίνει στο επίπεδο του κυττάρου και οι συνακόλουθες επιδράσεις της τυχαίας παρέκκλισης. Επιπλέον σημειώνεται ότι ετεροπλάσμια και ανασυνδυασμός που μπορεί να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη των κυτταροπλασματικών συστημάτων, μετριάζοντας τις αρνητικές συνέπειες της μητρικής κληρονομίας, η βασικότερη από τις οποίες είναι η ταχεία συσσώρευση παθογόνων μεταλλάξεων.

### **Μιτοχονδριακές μεταλλάξεις**

Οι μιτοχονδριακές μεταλλάξεις συλλέγονται στη βάση δεδομένων του μιτοχονδριακού DNA του ανθρώπου. Γενικότερα, οι μεταλλάξεις αυτές μπορούν να διαχωριστούν σε μεγάλες ανακατατάξεις και σε μεταλλάξεις που περιορίζονται σε μικρό αριθμό ζευγών βάσεων. Από τις τελευταίες, η πλειοψηφία αφορά σε σημειακές μεταλλάξεις. Οι περισσότερες ελλείψεις, διπλασιασμοί, εισαγωγές, αναστροφές ή άλλες σύνθετες ανακατατάξεις, περιλαμβάνουν αρκετά γονίδια, αφού τα μιτοχονδριακά γονίδια βρίσκονται πολύ κοντά το ένα με το άλλο (37 γονίδια σε 16,5 kb). Οι σημειακές μεταλλάξεις του μιτοχονδριακού DNA μπορούν να εμφανίζονται σε όλα τα γονίδια και οι συνέπειες τους μπορεί να εξαρτώνται από τις αλλαγές που επιφέρουν στα προϊόντα των γονιδίων αυτών, από το εύρος των ιστών που φέρουν τις μεταλλάξεις, τη μεταβολή της παραγωγής ATP στους ιστούς αυτούς, άλλους πολυμορφισμούς του μιτοχονδριακού DNA, παράγοντες που κωδικοποιούνται από τον πυρήνα και αλληλεπιδρούν με τα προϊόντα των γονιδίων του μιτοχονδριακού DNA καθώς επίσης και από περιβαλλοντικούς παράγοντες. Διπλασιασμοί στο μιτοχονδριακό DNA έχουν περιγραφεί, όμως δε θεωρούνται ότι είναι παθογενείς και μπορούν να προκαλέσουν παθολογικό φαινότυπο μόνο έμμεσα. Παλαιότερα είχε προταθεί πως το μιτοχονδριακό DNA δεν έχει μηχανισμούς επιδιόρθωσης, όμως πρόσφατες μελέτες έδειξαν πως υπάρχει κάποια επιδιορθωτική δραστηριότητα, μικρότερου όμως εύρους συγκρινόμενη με το πυρηνικό DNA.



## Η ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΩΝ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΩΝ ΝΟΣΗΜΑΤΩΝ

Ο τύπος της κληρονομικότητας των μιτοχονδριακών νοσημάτων μπορεί να ποικίλει, αλλά ένα νόσημα που οφείλεται αποκλειστικά σε μεταλλάξεις στο μιτοχονδριακό DNA κληρονομείται πάντα από τη μητέρα (μητρική κληρονομικότητα) και έτσι τα άρρενα τέκνα δεν μεταδίδουν τη νόσο στους απογόνους τους. Ο πατέρας του πάσχοντος δεν είναι σε κίνδυνο να φέρει την παθολογική μετάλλαξη στο mtDNA, αλλά η μητέρα (συνήθως) έχει τη μιτοχονδριακή μετάλλαξη και είναι δυνατό να εκδηλώνει συμπτώματα της νόσου ή όχι. Ελλείψεις του μιτοχονδριακού DNA είναι γενικά de novo κι έτσι δεν υπάρχει αυξημένος κίνδυνος για άλλα μέλη της οικογένειας. Αντίστοιχα, σημειακές μεταλλάξεις του μιτοχονδριακού DNA και διπλασιασμοί μπορεί να μεταδίδονται από τη μητρική γραμμή, ενώ μια γυναίκα που φέρει σε ετεροπλασμία μια μετάλλαξη μπορεί να μεταδώσει ένα μεταβλητό ποσό του μεταλλαγμένου mtDNA στους απογόνους της, με αποτέλεσμα τη σημαντική κλινική ετερογένεια μεταξύ πασχόντων μέσα στην ίδια οικογένεια. Η αποκάλυψη της συγκεκριμένης γενετικής βλάβης στα μιτοχονδριακά νοσήματα είναι συχνά δύσκολη. Πολλά άτομα δεν εμπίπτουν σε μια συγκεκριμένη κατηγορία ασθενειών, ενώ η κατάσταση γίνεται ακόμη πιο περίπλοκη από την ασαφή συσχέτιση μεταξύ γονοτύπου και φαινοτύπου. Για παράδειγμα, ασθενείς με εξωτερική οφθαλμοπληγία μπορεί να έχουν ίδια κλινικά συμπτώματα, αλλά μερικοί μπορεί να φέρουν μια έλλειψη του mtDNA, άλλοι μπορεί να φέρουν μια σημειακή μετάλλαξη του mtDNA (π.χ. m.3243A>G), και άλλοι μπορεί να φέρουν μια αυτοσωματική επικρατή μετάλλαξη σε πυρηνικό γονίδιο, που σχετίζεται με δευτερογενείς ανωμαλίες του mtDNA. Επιπλέον, η ίδια γενετική μετάλλαξη μπορεί να προκαλέσει μια σειρά από πολύ διαφορετικά κλινικά σύνδρομα (π.χ. η σημειακή μετάλλαξη m.3243A>G μπορεί να προκαλέσει CPEO, σακχαρώδη διαβήτη και κώφωση, ή μια σοβαρή εγκεφαλοπάθεια με εγκεφαλικά επεισόδια και επιληψία).

### **Σύνδεση μεταλλάξεων με ασθένειες**

Το μιτοχονδριακό γονιδίωμα παρουσιάζει υψηλό ρυθμό μεταλλαξιγένεσης περίπου 10 με 15 φορές μεγαλύτερο από αυτόν του πυρηνικού DNA. Το γεγονός πιθανόν οφείλεται στην απουσία προστατευτικών πρωτεϊνών (όπως ιστόνες), που έχει ως αποτέλεσμα το mtDNA να ενώνεται με την εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων, όπου παράγονται σε μεγάλες συγκεντρώσεις μεταλλαξογόνες ελεύθερες ρίζες οξυγόνου, αλλά και στην μη αποτελεσματική επιδιόρθωση του DNA. Λόγω της κυτταροπλασματικής του εντόπισης, το mtDNA κληρονομείται, όπως έχουμε ήδη αναφέρει, αποκλειστικά μητρικά. Ως εκ τούτου μόνο τα θηλυκά μπορούν να μεταδώσουν τις μιτοχονδριακές ασθένειες και να μεταβιβάσουν τη μετάλλαξη σε όλους τους απογόνους τους ανεξαρτήτως φύλου. Το ποσοστό των μιτοχονδρίων, που φέρουν στο γενετικό τους υλικό τη μετάλλαξη, μπορεί να διαφέρει σημαντικά μεταξύ διαφορετικών σωματικών κυττάρων και ιστών,

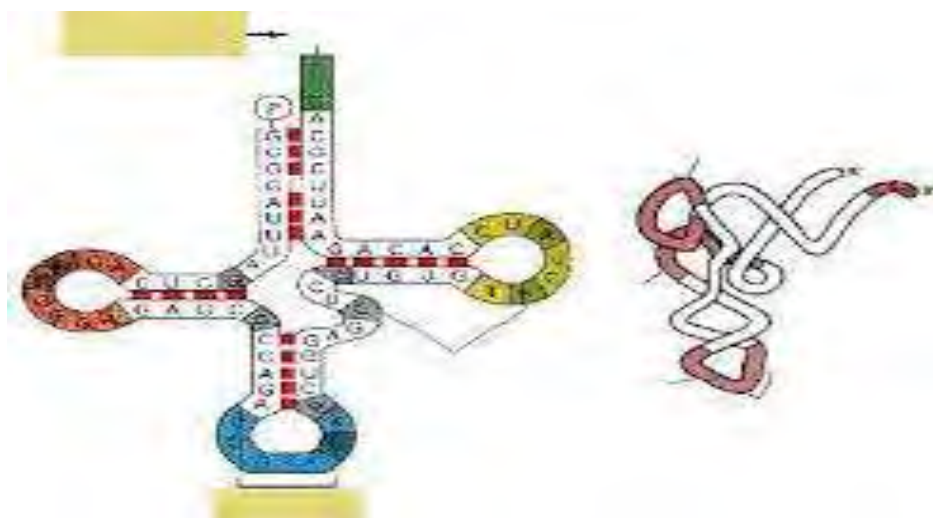
δεδομένου ότι το μιτοχονδριακό DNA διπλασιάζεται αυτόνομα και ανεξάρτητα από το πυρηνικό DNA, και ότι τα μιτοχόνδρια διαχωρίζονται στα θυγατρικά κύτταρα ανεξάρτητα από τα πυρηνικά χρωμοσώματα (μία διαδικασία γνωστή ως πολλαπλασιαστικός διαχωρισμός). Αυτή η ετερογένεια ονομάζεται ετεροπλάσμια και παίζει σημαντικό ρόλο στον φαινότυπο μιας μιτοχονδριακής νόσου, που κατά κανόνα χαρακτηρίζεται από ποικιλομορφία και ιστοειδικότητα. Όπως αναφέραμε οι ιστοί διαφέρουν ως προς την εξάρτησή σε ενέργεια με την καρδιά, τους σκελετικούς μυς και το κεντρικό νευρικό σύστημα που είναι τα πιο εξαρτημένα. Έτσι τα μιτοχονδριακά νοσήματα χαρακτηρίζονται συχνά από μυοπάθειες και εγκεφαλοπάθειες (διαταραχές του μυϊκού ιστού και του εγκεφάλου αντίστοιχα). Η αλληλεπίδραση ανάμεσα στο πυρηνικό και μιτοχονδριακό γονιδίωμα είναι αρκετά πολύπλοκη για να εκτιμηθεί. Παρόλα αυτά ένας μεγάλος αριθμός πυρηνικών γονιδίων, τα οποία ελέγχουν την ακεραιότητα και τον αριθμό των mtDNA αντιγράφων, έχει ταυτοποιηθεί. Μεταλλάξεις σε αυτά τα γονίδια επηρεάζουν είτε τη μιτοχονδριακή αντιγραφή είτε την ενζυμική διαδικασία οδηγώντας σε μείωση του αριθμού των αντιγράφων.

Παθогόνες και πολυμορφικές μεταλλάξεις έχουν βρεθεί στα 13 μιτοχονδριακά γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεϊνικές υπομονάδες της αναπνευστικής αλυσίδας αλλά και στα 2 rRNA, το 12S και 16S. Στις κώδικες περιοχές των 13 γονιδίων έχουν αναφερθεί 163 παθогόνες και 1329 πολυμορφικές μεταλλάξεις ενώ στις μη κώδικες των 2 rRNA, 12 παθогόνες και 168 πολυμορφικές. Εννέα από τις 12 είναι υπεύθυνες για περιπτώσεις κώφωσης ενώ ποικίλοι φαινότυποι αντιστοιχούν στις μεταλλάξεις των γονιδίων που κωδικοποιούν υπομονάδες της αναπνευστικής αλυσίδας. Διάγνωση μιτοχονδριακών διαταραχών εξαρτάται από τον συνδυασμό διαφόρων προσεγγίσεων, περιλαμβάνοντας κλινική ανάλυση, μέτρηση της ενζυμικής δραστηριότητας της αναπνευστικής αλυσίδας και μορφολογική ανάλυση. Μιτοχονδριακές δυσλειτουργίες που συσχετίζονται με μεταβολή της ενζυμικής δραστηριότητας της αναπνευστικής αλυσίδας έχουν συνδεθεί με γαλακτική οξέωση, δηλαδή υψηλή αναλογία γαλακτικού / πυροσταφυλικού. Το γαλακτικό οξύ προέρχεται από το μεταβολισμό του πυροσταφυλικού με την καταλυτική δράση της γαλακτικής αφυδρογονάσης (LDH) και την ταυτόχρονη οξείδωση του NADH και NAD<sup>+</sup>. Η μεγαλύτερη ποσότητα του παραγόμενου πυροσταφυλικού εισέρχεται στα μιτοχόνδρια και μεταβολίζεται στον κύκλο των τρικαρβοξυλικών οξέων προς παραγωγή CO<sub>2</sub>, 20 και επιπρόσθετων ATP μορίων. Οι κυριότερες συνθήκες που προάγουν υπερπαραγωγή και άθροιση γαλακτικού αφορούν στις καταστάσεις ιστικής υποάδρευσης και υποξίας. Σε κυτταρικό επίπεδο συνέπεια αυτών είναι εξάντληση των αποθεμάτων ενέργειας ATP και διαταραχή των μιτοχονδριακών λειτουργιών λόγω έλλειψης οξυγόνου. Η ετερογένεια των μεταλλάξεων που έχουν συνδεθεί με ποικίλα κλινικά συμπτώματα τις έχει κατατάξει σε δυο κατηγορίες, αυτές που επηρεάζουν την μιτοχονδριακή πρωτεϊνοσύνθεση και

αυτές τις μεταλλάξεις σε μιτοχονδριακά γονίδια που κωδικοποιούν 13 ενζυμικές υπομονάδες της αναπνευστικής αλυσίδας.

### Μεταλλάξεις σε μιτοχονδριακά tRNA γονίδια

Στη διάρκεια των τελευταίων δυο δεκαετιών περισσότερες από 250 μεταλλάξεις μιτοχονδριακών γονιδίων έχουν συνδεθεί με ένα αυξανόμενο φάσμα ποικίλων κλινικών συμπτωμάτων. Παρόλο που οι tRNA αλληλουχίες αποτελούν μόνο το 10% του μιτοχονδριακού γενώματος, περισσότερες από τις μισές παθολόγες μεταλλάξεις εντοπίζονται σε αυτά τα γονίδια, επηρεάζοντας την μιτοχονδριακή πρωτεϊνοσύνθεση. Έως τώρα, 136 παθολόγες μεταλλάξεις και 243 πολυμορφισμοί έχουν ταυτοποιηθεί σε όλα τα tRNA γονίδια. Ως πολυμορφισμοί αναφέρονται οι ουδέτερες μεταλλάξεις που βρίσκονται σε όλα τα γονίδια tRNA και γενικά δεν επηρεάζουν τη δομική ακεραιότητα και το λειτουργικό ρόλο των tRNA. Πρόκειται, συνήθως, για αντικαταστάσεις ενός νουκλεοτιδίου και χρησιμοποιούνται σε πολλές μελέτες με σκοπό να καθοριστεί φυλογενετική κατανομή μεγάλων πληθυσμών. Παθολόγες μεταλλάξεις εντοπίζονται σε όλα τα tRNA γονίδια εκτός από το γονίδιο tRNA<sup>Arg</sup>. Επίσης υπάρχουν μεταλλάξεις και σε άλλες περιοχές του mtDNA που μπορούν να θεωρηθούν σημαντικοί παράγοντες παθογένεσης, ωστόσο πληροφορίες για αυτούς τους παράγοντες είναι περιορισμένες. Σε όλο το μόριο των tRNA, τόσο στους βρόγχους όσο και στις θηλιές, κατανέμονται μεταλλάξεις που σε μεγαλύτερο βαθμό είναι μεταπτώσεις (πυριμιδίνη σε πυριμιδίνη και πουρίνη σε πουρίνη) σε σχέση με μετατροπές (πυριμιδίνη σε πουρίνη και το αντίστροφο). Αυτές που βρίσκονται στους βραχίονες διαταράσσουν το φυσιολογικό ζευγάρωμα των βάσεων που έχει διατυπωθεί από τους Watson και Crick, και συνήθως εμφανίζονται ως C-A και G-U. Σημαντική είναι η παρατήρηση ότι απουσιάζουν μεταλλάξεις στη θηλιά του αντικωδικονίου, αφού οποιαδήποτε αλλαγή στο σημείο θα ήταν κρίσιμη για την διαδικασία της πρωτεϊνοσύνθεσης.



Εικ.6.TransferRna.

Ηπλειοψηφία των παθογόνων μεταλλάξεων εντοπίζονται σε θέσεις με υψηλό βαθμό συντήρησης κατά την εξέλιξη, ενώ οι πολυμορφικές σε όχι τόσο συντηρημένες θέσεις.

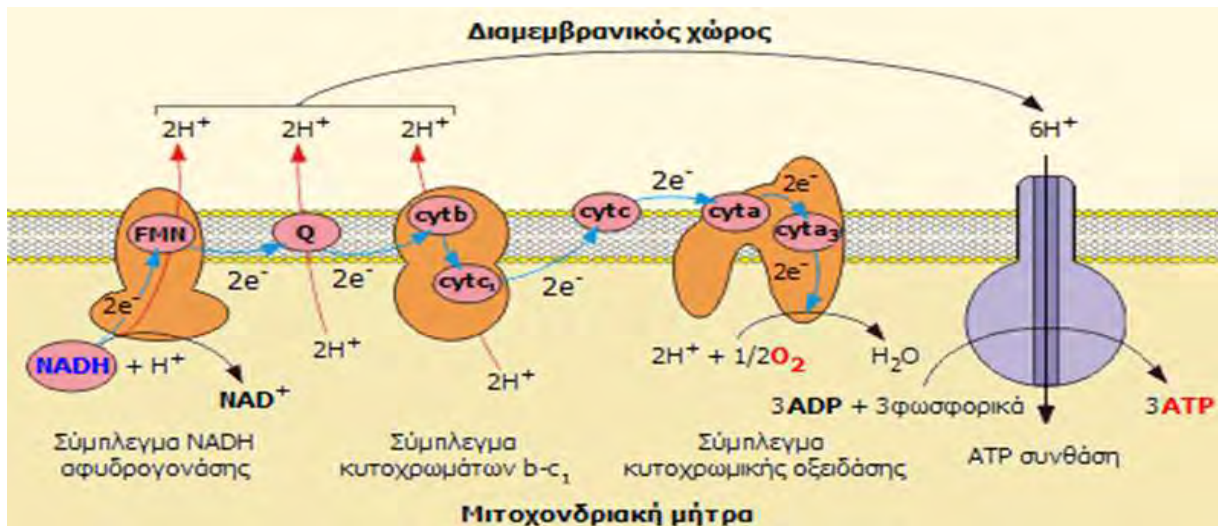
tRNA	Αριθμός παθογόνων μεταλλάξεων	Αριθμός πολυμορφικών μεταλλάξεων
tRNA <sup>Leu</sup> (UUR)	28	7
tRNA <sup>Lys</sup>	14	9
tRNA <sup>Ile</sup>	14	7
tRNA <sup>Leu</sup> (CUN)	10	11
tRNA <sup>Thr</sup>	8	29
tRNA <sup>Ser</sup> (UCN)	7	10
tRNA <sup>Phe</sup>	7	10
tRNA <sup>Val</sup>	6	10
tRNA <sup>Trp</sup>	6	13
tRNA <sup>Gly</sup>	5	12
tRNA <sup>Tyr</sup>	4	7
tRNA <sup>Pro</sup>	4	9
tRNA <sup>Asn</sup>	4	7
tRNA <sup>Gln</sup>	3	15
tRNA <sup>His</sup>	3	11
tRNA <sup>Met</sup>	3	6
tRNA <sup>Ala</sup>	3	11
tRNA <sup>Ser</sup> (AGY)	3	13
tRNA <sup>Glu</sup>	3	9
tRNA <sup>Cys</sup>	3	16
tRNA <sup>Asp</sup>	2	11
tRNA <sup>Arg</sup>	2	9
Ολικά	139	243

Πιν. 1. Σύνολα παθογόνων και πολυμορφικών μεταλλάξεων

## ΔΙΑΒΗΤΗΣ ΚΑΙ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ - ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΗ ΑΛΥΣΙΔΑ

Τα μιτοχόνδρια εκτελούν μία πληθώρα βιοενεργειακών λειτουργιών οι οποίες είναι υποχρεωτικές για τη ρύθμιση της ενδοκυττάριας παραγωγής ενέργειας. Η αλλοίωση βιοενεργειακών δραστηριοτήτων ενδέχεται να έχει δραματικές συνέπειες για την κυτταρική λειτουργία μέσω της διαταραχής του ενεργειακού φορτίου και της ισορροπίας του κυττάρου. Αν και η δομή του μιτοχονδριακού DNA περιγράφηκε πριν από 50 χρόνια (Clayton and Vinograd 1967), οι ασθένειες που οφείλονται σε βλάβες στο μονοπάτι της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης έχουν περιγραφεί πολύ νωρίτερα ενώ οι παθολογικές μεταλλάξεις του μιτοχονδριακού γονιδιώματος δεν είχαν περιγραφεί μέχρι και το 1988. Πλέον έχει καταστηθεί σαφές ότι ανάμεσα στις μεταβολικές ασθένειες περιλαμβάνεται και ο σακχαρώδης διαβήτης. Ωστόσο ορισμένοι μηχανισμοί του ρόλου του μιτοχονδρίου σε αυτή την παθολογία εξακολουθούν να χρειάζονται περαιτέρω διεκρίνιση. Η πιο σημαντική λειτουργία του μιτοχονδρίου είναι η παραγωγή ενέργειας στην μορφή τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP) μέσω της λειτουργίας της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων και της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Στην μιτοχονδριακή αναπνευστική αλυσίδα εντοπίζονται τέσσερα πρωτεϊνικά συμπλέγματα τα οποία ονομάζονται σύμπλεγμα I, II, III και IV. Κατά τον κύκλο του τρικαρβοξυλικού οξέος η γλυκόζη μεταβολίζεται και δημιουργεί δότες ηλεκτρονίων. Ο κύριος δότης ηλεκτρονίων είναι το NADH, το οποίο προσφέρει ηλεκτρόνια στο σύμπλεγμα I. Ένας άλλος δότης ηλεκτρονίων που παράγεται κατά τον κύκλο του τρικαρβοξυλικού, από την δεϋδρογονάση του ηλεκτρικού είναι το FADH<sub>2</sub> το οποίο προσφέρει ηλεκτρόνια στο σύμπλεγμα II. Ηλεκτρόνια και από τα δύο συμπλέγματα μεταφέρονται στο συνένζυμο Q. Έπειτα από τους συνένζυμο Q μεταφέρονται στο σύμπλεγμα III, το κυτόχρωμα C, στο σύμπλεγμα IV και εν τέλει στο μοριακό οξυγόνο. Το σύστημα μεταφοράς ηλεκτρονίων είναι έτσι δομημένο ώστε τα επίπεδα ATP να είναι απόλυτα ελεγχόμενα. Καθώς τα ηλεκτρόνια μεταφέρονται, μερική από την ενέργεια τους χρησιμοποιείται για να μεταφερθούν πρωτόνια διαμέσου της μεμβράνης στα συμπλέγματα I, III και IV. Αυτό δημιουργεί μια διαφορά δυναμικού στο μήκος της μιτοχονδριακής μεμβράνης. Η ενέργεια από την διαφορά δυναμικού είναι αυτή που οδηγεί στη σύνθεση του ATP από την ATP συνθάση. Εναλλακτικά, οι πρωτεΐνες αποσύνδεσης μπορούν να μειώσουν την διαφορά δυναμικού, δημιουργώντας θερμότητα κρατώντας έτσι την παραγωγή ATP σταθερή. Όλα αυτά συμβαίνουν στα φυσιολογικά κύτταρα. Αντίθετα στα διαβητικά κύτταρα, στα οποία βρίσκεται μεγάλη ποσότητα γλυκόζης, υπάρχει και μεγαλύτερη ποσότητα γλυκόζης διαθέσιμη προς οξείδωση στο κύκλο του τρικαρβοξυλικού, που έχει ως αποτέλεσμα να παραχθούν μεγαλύτερες ποσότητες δοτών ηλεκτρονίων στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων. Έτσι, η διαφορά δυναμικού στη μεμβράνη των μιτοχονδρίων αυξάνεται μέχρι να φτάσει στο κρίσιμο όριο. Σε αυτό το σημείο, η μεταφορά ηλεκτρονίων στο σύμπλεγμα III σταματά, οδηγώντας έτσι τα ηλεκτρόνια να παραμείνουν στο

συνένζυμο Q, το οποίο δίνει σταδιακά τα ηλεκτρόνια στο μοριακό οξυγόνο δημιουργώντας έτσι υπεροξειδία. Η μιτοχονδριακή ισομορφή του ενζύμου δισμουτάση του υπεροξειδίου αποικοδομεί αυτή την ελεύθερη ρίζα οξυγόνο σε υπεροξειδίο του υδρογόνου, το οποίο στη συνέχεια μετατρέπεται σε H<sub>2</sub>O και O<sub>2</sub> μέσω άλλων ενζύμων. Αυτή η επιταχυνόμενη μείωση του συνενζύμου Q και η παραγωγή ελευθέρων ριζών πιστεύεται ότι είναι η αρχή για τη μιτοχονδριακή δυσλειτουργία που διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο στις μεταβολικές διαταραχές που σχετίζονται με το διαβήτη και την ιστοπαθολογία των διαφόρων ιστών.



Εικ. 7. Αναπνευστική αλυσίδα

### Μιτοχονδριοπάθειες

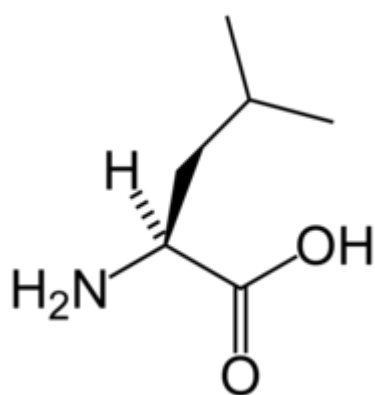
Οι μιτοχονδριοπάθειες είναι μια μεγάλη και ετερογενή ομάδα γενετικών νοσημάτων, τα οποία προκαλούν ανωμαλίες της μιτοχονδριακής αναπνευστικής αλυσίδας. Ένα μιτοχονδριακό νόσημα μπορεί να είναι αποτέλεσμα μεταλλάξεων του πυρηνικού DNA (γονίδια που βρίσκονται στα ανθρώπινα χρωμοσώματα) ή μεταλλάξεων γονιδίων του μιτοχονδριακού DNA (DNA που βρίσκεται στα μιτοχόνδρια). Η μεγάλη ετερογένεια τους οφείλεται εν μέρει στη βιοχημική πολυπλοκότητα του μηχανισμού της μιτοχονδριακής αναπνοής, αλλά και στο γεγονός ότι δύο γονιδιώματα, το μιτοχονδριακό και το πυρηνικό, κωδικοποιούν τις υπομονάδες πρωτεΐνης των αναπνευστικών συμπλοκών. Γενικά, όργανα και ιστοί με την υψηλότερη ενεργειακή απαίτηση, όπως ο εγκέφαλος και οι μύες, είναι πιο πιθανό να επηρεαστούν και γι' αυτό τα νοσήματα αυτά αναφέρονται κι ως "μιτοχονδριακές εγκεφαλομυοπάθειες". Η ομάδα των παθήσεων, που σχετίζονται με την οξειδωτική φωσφορυλίωση (Oxidative phosphorylation - OXPHOS), είναι τα σχετικά συχνότερα, με χαρακτηριστικά κλινικά χαρακτηριστικά αλλά μεγάλη γενετική ετερογένεια. Οι μιτοχονδριακές παθήσεις γενικά αποτελούν τη συνηθέστερη αιτία νευρομεταβολικών νοσημάτων κατά την παιδική ηλικία, με συχνότητα εμφάνισης 1/6.500 γεννήσεις, κι η κλινική τους πορεία είναι συνήθως

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

Πάνω από το 50% των παθογόνων mtDNA μεταλλάξεων εμφανίζονται στα tRNA γονίδια. Οι παθογόνες μεταλλάξεις στα γονίδια που κωδικοποιούνται από το μιτοχονδριακό γονιδίωμα οδηγούν στην εμφάνιση νευρομυϊκών διαταραχών, άρα ο παθογενής μηχανισμός περιλαμβάνει μειωμένη παραγωγή ATP. Τα 21 από τα 22 tRNA γονίδια σχετίζονται με μεταλλάξεις που προκαλούν σοβαρές ασθένειες. Ως τώρα έχουν συσχετιστεί αρκετές σοβαρές ασθένειες με μεταλλάξεις του mtDNA, όπως σκελετικές μυοπάθειες (Del Bo et al. 2003), καρκίνος των ωσθηκών (Liu, V. W. et al. 2001), καρκίνος του θυρεοειδούς (Maximo et al. 2002) και του παγκρέατος (Jones et al. 2001), καρδιομυοπάθειες, εγκεφαλομυοπάθειες, Parkinson (Ozawa, T. Et al. 1991), οξεία λευχαιμία (Fliss et al. 2000), σύνδρομο MELAS (Kobayashi et al. 1991), μυογλοβινουρία (Chinnery et al. 1997), σύνδρομο MERRF (Mancuso, M et al. 2004), μιτοχονδριοπάθειες (Kleinle S. et al. 1998), κώφωση (Guan et al. 1996), σύνδρομο Leigh (Santorelli et al. 1997), σύνδρομο Rett (Tang, J. et al. 1997), σύνδρομο Kearns Sayre (Seneca, S. et al. 2001), σύνδρομο LHON (Garcia Lozano et al. 2000), υπέρταση (Li, R. et al. 2009), εκφύλιση της ωχράς κηλίδας (Sacconi, S. et al. 2002), Alzheimer (Coskun, P. E. et al. 2004). Μεταξύ αυτών, έχουν συσχετιστεί μεταλλάξεις και με τον σακχαρώδη διαβήτη (Gerbitz et al. 1995, Whittaker, R. G. 2007).

## ΛΕΥΚΙΝΗ

Η λευκίνη ή 2-αμινο-4-μεθυλοπεντανικό οξύ (συμβολίζεται με Leu ή L)[2] είναι ένα α-αμινοξύ με σύντομο συντακτικό τύπο  $(\text{CH}_3)_2\text{CHCH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$ . Η L-λευκίνη είναι ένα από τα πρωτεϊνικά αμινοξέα. Οι τριπλέτες της είναι: UUA, UUG, CUU, CUC, CUA και CUG. Ανήκει στα απαραίτητα αμινοξέα, δηλαδή σε αυτά που δεν μπορεί να βιοσυνθέσει ο ανθρώπινος οργανισμός και πρέπει να λαμβάνονται έτοιμα, με την τροφή. Επειδή το τμήμα του μορίου της από το 2 άτομο άνθρακα και μετά  $[\text{R} = (\text{CH}_3)_2\text{CHCH}_2-$ , δηλαδή ισοβουτύλιο] είναι ένα αλκύλιο, ταξινομείται στα «υδρόφοβα» αμινοξέα. Είναι ένα σημαντικό συστατικό υπομονάδων της φερριτίνης, της αστακίνης και άλλων αμυντικών και μεταφορικών πρωτεϊνών. Βρίσκεται στις νουκλεοτιδικές θέσεις 3231-3305.



Εικ. 8. Συντακτικός τύπος λευκίνης

Χημικός τύπος  $\text{C}_6\text{H}_{13}\text{NO}_2$  Μοριακή μάζα 131,17 amu Σύντομος συντακτικός τύπος  $(\text{CH}_3)_2\text{CHCH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$  Συντομογραφίες Leu, L Κωδικός προσθέτου τροφίμων E641.

### Παραγωγή Βιοσύνθεση

Ως ένα βασικό αμινοξύ, η λευκίνη δεν μπορεί να συνδεθεί από τα ζώα, και γι' αυτό πρέπει να προσλαμβάνεται έτοιμη με την τροφή, συνήθως ως συστατικό των πρωτεϊνών. Μπορεί όμως να βιοσυνθεθεί από τα φυτά και από μικροοργανισμούς, μέσω αρκετών σταδίων, αρχίζοντας από το πυροσταφυλικό οξύ. Το αρχικό τμήμα της πορείας αυτής είναι κοινό με το αντίστοιχο της βαλίνης. Το ενδιάμεσο α-κετοβαλερικό οξύ, μετατρέπεται σε α-ισοπροπυλομηλικό οξύ και μετά σε β-ισοπροπυλομηλικό οξύ, που αφυδρογονώνεται σε α-κετοϊσοκαπρικό οξύ που τελικά δίνει τη λευκίνη με αναγωγική αμμωνίωση (δείτε παρακάτω). Τα ένζυμα που εμπλέκονται στην τυπική βιοσύνθεση της λευκίνης είναι τα ακόλουθα.



- Ακετογαλακτική συνθετάση.
- Ισομεραναγωγή των ακετοϋδροξυοξέων.
- Αφυδατάση των διυδροξυοξέων.
- α-Ισοπροπυλομηλική συνθετάση.
- α-Ισοπροπυλομηλική ισομεράση.
- Αμινοτρανσφεράση της λευκίνης.

Η λευκίνη χρησιμοποιείται στο ήπαρ, στο λιπώδη ιστό και στο μυϊκό ιστό. Στο λιπώδη ιστό και στους μύες η λευκίνη χρησιμοποιείται για το σχηματισμό των στερολών και η συνδυασμένη χρήση από τους δυο αυτούς ιστούς είναι μεγαλύτερη από την αντίστοιχη του ήπατος. Η λευκίνη είναι το μόνο διατροφικό αμινοξύ που έχει τη δυνατότητα να τονώσει τη μυϊκή σύνθεση πρωτεϊνών. Ως συμπλήρωμα διατροφής, η λευκίνη έχει χρησιμοποιηθεί για να επιβραδύνει την υποβάθμιση του μυϊκού ιστού, αυξάνοντας τη σύνθεση των πρωτεϊνών των μυών σε υπέργηρους επίμους. Η τοξικότητα (από υπερκατανάλωση) της λευκίνης, όπως φαίνεται στην αποσταθεροποιημένη «ασθένεια ούρων με οσμή σιροπιού σφενδαμιού» Maple Syrup Urine Disease (MSUD), προκαλεί αρχικά ντελίριο και νευρολογική βλάβη, και μπορεί να φθάσει να απειλήσει και τη ίδια την ανθρώπινη ζωή. Στη γενετική του ζυμομόκητα, μεταλλεύματα με ένα ελαττωματικό γονίδιο για τη σύνθεση λευκίνης (LEU2) μετασχηματίζονται με ένα πλασμίδιο που περιέχει ένα λειτουργικό γονίδιο σύνθεσης λευκίνης (LEU2) και καλλιεργούνται σε μη εμπλουτισμένο θρεπτικό υλικό. Η σύνθεση της λευκίνης γίνεται τότε ένας χρήσιμος επιλέξιμος δείκτης του μετασχηματισμού.

### **Χημικές ιδιότητες και παράγωγα**

Αμφολυτική συμπεριφορά

-Η πιο χαρακτηριστική είναι η αμφολυτική διάστασή της

-Παραγωγή αλάτων με οξέα και βάσεις

Εστεροποίηση

Αντιδρά με αλκοόλες σχηματίζοντας αμινεστέρες. Αποτελεί και μέθοδο «προστασίας»[16] της καρβοξυλομάδας.

## Ακυλίωση

Με επίδραση ακυλοαλογονιδίων σχηματίζονται δευτεροταγή αμινοξέα. Αποτελεί και μέθοδο «προστασίας» της αμινομάδας, αφού τα αμίδια υδρολύονται.

## Απαζώτωση

Με επίδραση νιτρώδους οξέος πρακτικά αντικαθίστανται η αμινομάδα με υδροξυλομάδα. Παράγεται 4-μεθυλο-2-υδροξυπεντανικό οξύ:

## Μεταλλάξεις-Ασθένειες

Η πιο συχνή μετάλλαξη η οποία οδηγεί σε μιτοχονδριακό διαβήτη είναι η A3243G μετάλλαξη στο γονίδιο του tRNA<sup>Leu</sup>(UUR) των μιτοχονδρίων. Η αλλοίωση στο γονίδιο του tRNA αυτού, οδηγεί σε ανεπαρκή σύνθεση διάφορων μιτοχονδριακών πρωτεϊνών και σε μια γενικευμένη μιτοχονδριακή δυσλειτουργία. Παρόλο που ο φαινότυπος της μετάλλαξης αυτής μοιάζει με του διαβήτη τύπου 2, η θεραπεία με συχνά χρησιμοποιούμενα φάρμακα όπως η μετφορμίνη, πρέπει να αποφεύγεται εξαιτίας της τάσης των ατόμων αυτών να εμφανίζουν γαλακτική οξέωση, η οποία αποτελεί μία εμφανής αλλά σπάνια παρενέργεια του φαρμάκου.

Ο A3243G τύπος μιτοχονδριακού διαβήτη χαρακτηρίζεται από μειωμένη παραγωγή ινσουλίνης ως ερέθισμα στην υψηλή γλυκόζη αίματος, υποδηλώνοντας πως το πρόβλημα εντοπίζεται στα μιτοχόνδρια των β κύτταρων του παγκρέατος.

Όμως, πρόσφατες έρευνες έχουν αποδείξει πως η A3243G μετάλλαξη συσχετίζεται με ηπατική δυσλειτουργία και μειωμένη πρόσληψη γλυκόζης από τους σκελετικούς μυς. Το σύνδρομο αυτό στην αρχή είναι ελαφρύ και επιδεινώνεται με το πέρασ του χρόνου. Μία πιθανή εξήγηση σε αυτό είναι ότι η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία επιδεινώνεται λόγω των ελεύθερων ριζών που οφείλονται στην υπεργλυκαιμία, οξειδωτική καταστροφή και επιδεινούμενη υπεργλυκαιμία. Τα β-κύτταρα του παγκρέατος φαίνεται πως είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα στην οξειδωτική καταστροφή. Τα β-κύτταρα τα οποία εκτίθενται σε συνεχή υπεργλυκαιμία, η οποία έχει ως συνέπεια την αυξημένη ποσότητα ενδοκυττάριου ασβεστίου, είναι επιρρεπή σε μεγάλη μείωση της ποσότητας του ADP και της κατανάλωσης του οδηγώντας σε υψηλότερο δυναμικό στη μεμβράνη και κατά συνέπεια μεγαλύτερη παραγωγή ελευθέρων ριζών. Ακόμη τα β- κύτταρα έχουν σχετικά χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων που παράγουν αντιοξειδωτικά ένζυμα και τα επίπεδα γαλακτικής αφυδρογονάσης είναι χαμηλά. Έτσι η γλυκόζη μεταφέρεται στα μιτοχόνδρια ως υπόστρωμα και δημιουργείται υψηλό δυναμικό στη μεμβράνη. Έχουν προταθεί και άλλοι λόγοι για την επιδείνωση του μιτοχονδριακού διαβήτη με τα χρόνια. Μειωμένος αριθμός ενεργών β-κυττάρων μπορεί να

μειώσει την απόκριση έκκρισης της ινσουλίνης παρουσία γλυκόζης, με αποτέλεσμα να ενεργοποιεί το μηχανισμό παραγωγής ινσουλίνης σε υψηλότερα επίπεδα γλυκόζης.

Επιπλέον η γενικευμένη αναπνευστική καταστολή στο κύτταρο έχει ως αποτέλεσμα μειωμένο σχηματισμό ATP, το οποίο θα επηρεάσει την απελευθέρωση ινσουλίνης που προκαλείται από τη γλυκόζη.

Σε κύτταρα που εντοπίζεται η μετάλλαξη A3243 η έκταση της ετεροπλασμίας σχετίζεται με την κατανάλωση οξυγόνου από τα μιτοχόνδρια η οποία φαίνεται να μειώνεται απότομα όταν η ετεροπλασμία φθάσει περίπου στο 70%. Αντίθετα δεν είναι ξεκάθαρο ότι η ετεροπλασμία επιδεινώνεται με την ηλικία, επομένως αυτό δεν εξηγεί την καθυστερημένη έναρξη και εξέλιξη του μιτοχονδριακού διαβήτη.

Η μετάλλαξη A3243G εντοπίζεται επίσης στο σύνδρομο MELAS. Το MELAS είναι πιο κοινή μητρικά κληρονομούμενη εγκεφαλομυοπάθεια. Είναι μια κλινικά και γενετικά ετερογενής ασθένεια. Όπως υποδεικνύει και το όνομα της, τα εγκεφαλικά επεισόδια είναι το χαρακτηριστικό που την προσδιορίζει και συχνά συμβαίνει πριν την ηλικία των δεκαπέντε. Η κλινική πορεία της ασθένειας ποικίλει αρκετά, από συμπτωματική έναρξη της ανάπτυξης, σε σταδιακή μυϊκή αδυναμία, γαλακτική οξέωση, γνωστική δυσλειτουργία, σπασμούς, εγκεφαλοπάθεια και πρόωρο θάνατο. Ένα αξιοσημείωτο βιοχημικό χαρακτηριστικό του MELAS είναι οι αυξημένες συγκεντρώσεις γαλακτικού στον ορό και στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό, οι οποίες αυξάνονται σημαντικά με την άσκηση. Τα ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά του MELAS συμπεριλαμβάνουν ανώμαλες και ερυθρές μυϊκές ίνες που συνιστούν το κύριο χαρακτηριστικό όλων των μιτοχονδριακών μυοπαθειών και υποδηλώνουν μη φυσιολογικό πολλαπλασιασμό των μιτοχονδρίων που βρίσκονται κάτω από τη σαρκοπλασματική μεμβράνη των μυϊκών ινών. Αρκετές σημειακές μεταλλάξεις σε γονίδια tRNA έχουν συσχετιστεί με τον MELAS φαινότυπο. πιο κοινή όμως, οποία έχει βρεθεί στο 80% των περιπτώσεων με το σύνδρομο MELAS, είναι ετεροπλασμική (85% στο μυ και 61% στο αίμα) μετάλλαξη A3243G στο γονίδιο του tRNA<sup>Leu</sup>(UUR). Έξι ακόμη μεταλλάξεις που έχουν συσχετιστεί με το MELAS έχουν περιγραφεί στο συγκεκριμένο γονίδιο καθώς και αρκετές άλλες σε λοιπά γονίδια tRNA.

#### ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η ανίχνευση και η ταυτοποίηση μεταλλάξεων σε μιτοχονδριακά γονίδια tRNA σε 24 άτομα που έχουν διαγνωσθεί με διαβήτη. Το γονίδιο που μελετήθηκε είναι το tRNA<sup>Leu</sup>. Επιπλέον πραγματοποιήθηκε μελέτη για το ρόλο των μεταλλάξεων του

mtDNA στη δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων και μελετήθηκε συγκεκριμένα το γονίδιο λευκίνη 3231 για να διαπιστώσουμε εάν και εφόσον ένα μη λειτουργικό tRNA θα δημιουργήσει μεταλλάξεις, σε ποιες νουκλεοτιδικές θέσεις θα είναι και αν αυτές είναι υπεύθυνες για την δημιουργία της νόσου του σακχαρώδη διαβήτη.

#### ΥΛΙΚΑ

Στην παρούσα πειραματική μελέτη χρησιμοποιήθηκε βιολογικό υλικό από 24 ανώνυμα δείγματα αίματος από ασθενείς με διαβήτη από το μικροβιολογικό εργαστήριο του κ. Πουρνάρα που εδρεύει στο Βόλο. Τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους  $-20^{\circ}\text{C}$  μέχρι την έναρξη της διαδικασίας της απομόνωσης του DNA.

#### ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΟΛΙΚΟΥ DNA

Για την απομόνωση του ολικού DNA χρησιμοποιήθηκε το kit απομόνωσης NucleoSpin Tissue (Macharey-Nagel) για το οποίο ακολουθήθηκαν τα βήματα που αναφέρονται στο πρωτόκολλο του kit.

Αφού ξεπάγωσαν τα δείγματα, σε σωλήνες των 1.5ml έγινε ανάμιξη 0,5ml ολικού αίματος με 1ml SSC (Standard Saline Citrate) 1x.

Ακολούθησε έντονη ανάδευση στο vortex και φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 3 λεπτά. Απομακρύνθηκε το υπερκείμενο υγρό και έγινε διάλυση του ιζήματος σε 1 ml SSC 1x.

Ακολούθησε έντονη ανάδευση στο vortex και φυγοκέντρηση στις 13000rpm για 3 λεπτά.

Απομακρύνθηκε το υπερκείμενο υγρό και ακολούθησε διάλυση του ιζήματος σε 180  $\mu\text{L}$  Lysis Buffer T1 και 25 $\mu\text{L}$  πρωτεΐνάσης K. Αναδεύσαμε στο vortex για να αναμιχθούν και επώασαμε με ανάδευση στους  $56^{\circ}\text{C}$  για μία ώρα. Η πρωτεΐνάση K συντελεί στην αποδιάταξη των πρωτεϊνών.

Προσθέσαμε 200  $\mu\text{L}$  Lysis Buffer B3, στροβιλίσαμε και επώασαμε στους  $70^{\circ}\text{C}$  για 10 λεπτά.

Έπειτα προσθέσαμε 210  $\mu\text{L}$  αιθανόλης 100% και αναδεύσαμε στο vortex. Η αιθανόλη προστίθεται για τον καθαρισμό του DNA από τυχόν υπολείμματα από οργανικούς διαλύτες.

Έπειτα «φορτώσαμε» το διάλυμα σε στήλη του kit με φίλτρο στο κάτω μέρος και ένα Collection Tube. Φυγοκεντρίσαμε για 1 λεπτό στις 11.000rpm.

Αδειάσαμε το υλικό από το Collection Tube και προσθέσαμε 500  $\mu\text{L}$  Wash Buffer BW. Φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στις 11.000 rpm και αδειάσαμε το Collection Tube.

Έπειτα προσθέσαμε 600 µL Wash Buffer B5 και φυγοκεντρίσαμε στις 11.000 rpm για 1 λεπτό.

Αδειάσαμε το Collection Tube και φυγοκεντρίσαμε για ένα λεπτό στις 11.000 rpm. Αυτό το βήμα γίνεται για να απαλοιφθούν υπολείμματα αιθανόλης. Επαναλάβαμε την διαδικασία άλλη μία φορά.

Βάλαμε τη στήλη σε σωλήνα 1.5ml και προσθέσαμε 100 µL Elution Buffer BE (5 mM Tris/HCl, pH 8.5). Επώασαμε για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκεντρίσαμε στις 11.000 rpm για 1 λεπτό.

Μετά την ολοκλήρωση της απομόνωσης του DNA, έγινε ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πηκτή αγαρόζης 1,5% με σκοπό την ποιοτική ανίχνευση του mtDNA.

Εφόσον η ποσότητα και η ποιότητα του DNA ήταν ικανοποιητικές, ακολούθησε ενίσχυση με τη μέθοδο της PCR (αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης).

#### **Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή πηκτής αγαρόζης 6% είναι:**

40ml TAE 1x

0.6gr αγαρόζης

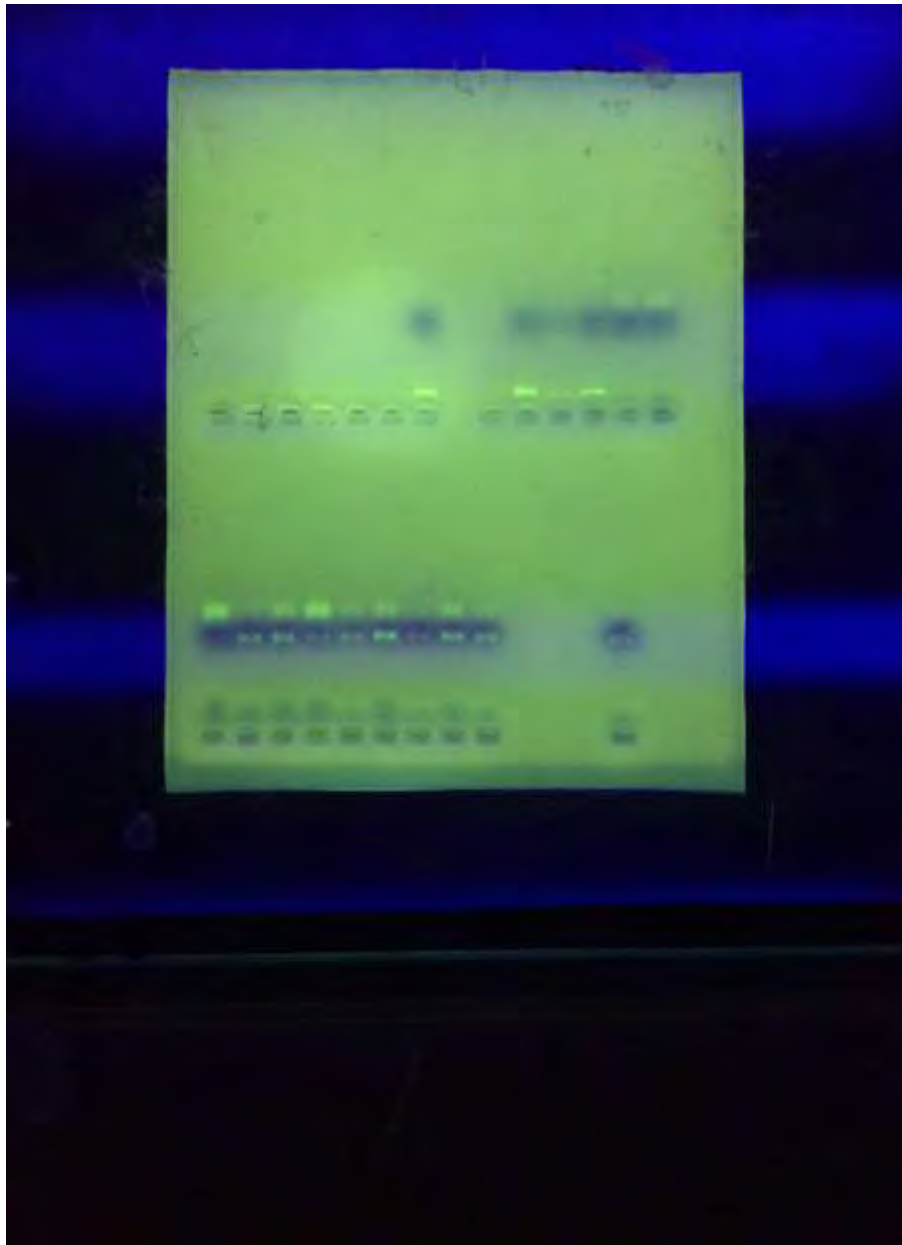
2µl βρωμιούχο αιθίδιο

Σε κωνική φιάλη των 100ml τοποθετήθηκαν τα 40ml TAE και τα 0,6gr αγαρόζης. Ακολούθησε θέρμανση σε φούρνο μικροκυμάτων για περίπου 1-2 λεπτά μέχρι την πλήρη διάλυση της αγαρόζης. Στη συνέχεια, προσθέσαμε 2µl βρωμιούχου αιθιδίου. Έπειτα, το διάλυμα μεταφέρθηκε σε κατάλληλες οριζόντιες πλάκες ηλεκτροφόρησης όπου είχαν τοποθετηθεί τα κατάλληλα καλούπια για το σχηματισμό «πηγαδιών». Χρειάστηκαν περίπου 20-30 λεπτά για την πλήρη πήξη του πηκτώματος αγαρόζης. Έπειτα και αφού η συσκευή συμπληρώθηκε με το ίδιο διάλυμα TAE 1x, έγινε η φόρτωση του δείγματος στη πηκτή αγαρόζης, μέχρι η πηκτή να είναι πλήρως βυθισμένη στο διάλυμα αυτό. Ακολούθησε ανάμιξη 3 µl loading Buffer με 5 µl δείγματος και τοποθέτησή τους με ιδιαίτερη προσοχή σε κάθε πηγαδάκι της πηκτής.

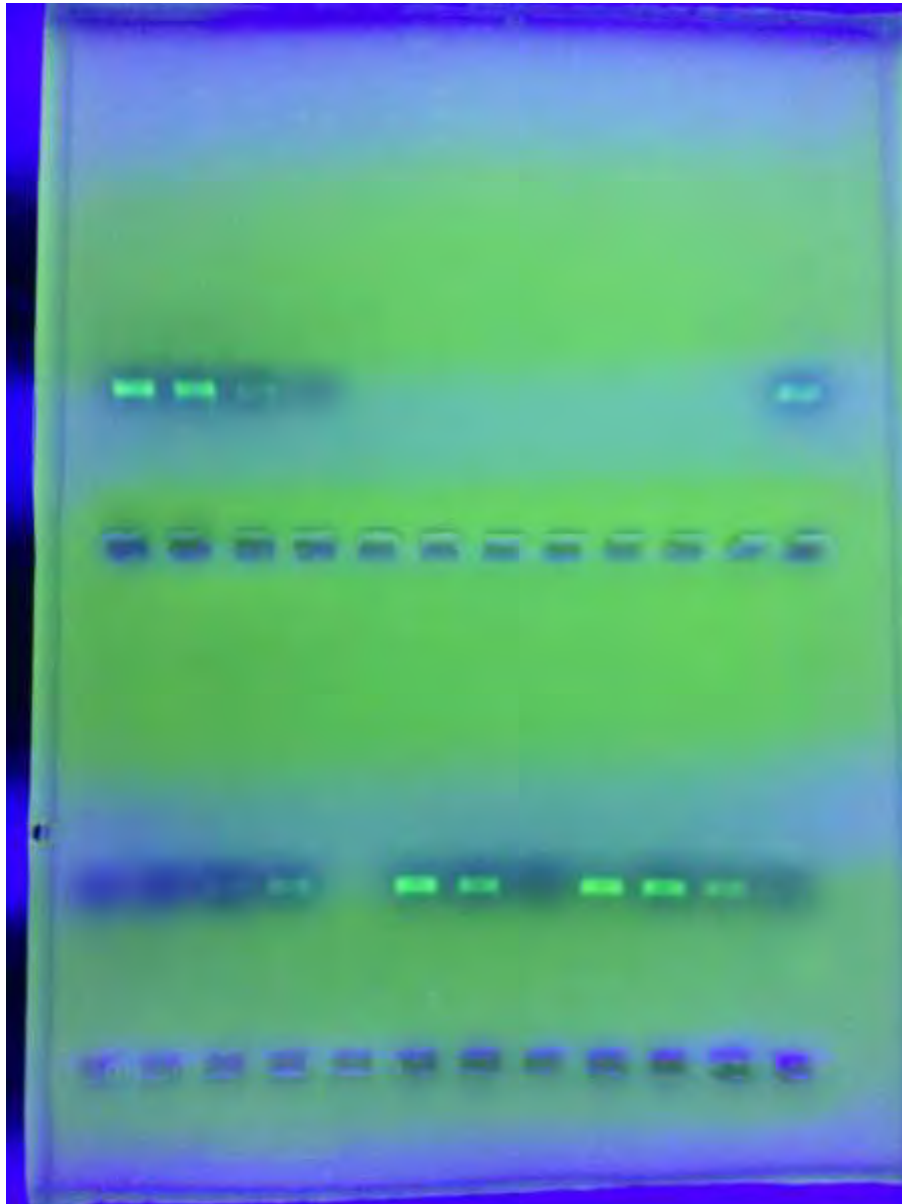
Το loading buffer (6x) 10ml περιέχει:

1. 1 ml χρωστική μπλε της βρωμοφαινόλης
2. 5 ml γλυκερόλη, (συμβάλλει στην καθίζηση του δείγματος μέσα στα πηγαδάκια)
3. 0,5 ml TBE20x
4. 3,5 ml dd-H<sub>2</sub>O

Η τάση που εφαρμόστηκε είναι 150 Volt και τα δείγματα «έτρεξαν» στο πήκτωμα μέχρις ότου διένυσαν τα 2/3 της διαδρομής για περίπου 20-30 λεπτά. Στο τελικό στάδιο, το πήκτωμα παρατηρήθηκε σε συσκευή UV. Όσα δείγματα έδωσαν θετικό αποτέλεσμα χρησιμοποιήθηκαν στη συνέχεια στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).



Εικ. 10 .Πήκτωμα αгарόζης στα οποία προσδιορίσαμε τα θετικά αποτελέσματα των δειγμάτων



Εικ. 10 .Πήκτωμα αгарόζης στα οποία προσδιορίσαμε τα θετικά αποτελέσματα των δειγμάτων

Τα πήκτωμα αгарόζης ήταν με 6% αгарόζη και τα είδαμε σε συσκευή UV αφού έτρεξαν στα 150Vγια 20-30 λεπτά καλυπτόμενα από ΤΑΕ 1X.

Σύσταση διαλυμάτων

TAE 50X

Σε 500 ml ddH<sub>2</sub>O προστίθενται:

Tris-base 121 gr

Acetic acid 28, 5 ml

EDTA 0, 5M, pH 8 50 ml

Για την παρασκευή TAE 1X αραιώνουμε 20 ml TAE 50X σε 980 ml ddH<sub>2</sub>O.

TBE 10X

Σε 1 L ddH<sub>2</sub>O προστίθενται:

Tris-base 60, 5 gr

Boric acid 30, 85 gr

EDTA 0,5M 40 ml

Ντελ = 1 L

#### ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)

Η ανακάλυψη της PCR και η γρήγορη βελτιστοποίησή της με τη χρήση μιας θερμοσταθερής Taq (*Thermus aquaticus*) DNA πολυμεράσης έχει συνεισφέρει σημαντικά στη μοριακή διαγνωστική. Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR) είναι απλή και ταχεία μέθοδος πολλαπλασιασμού επιλεγμένης αλληλουχίας από μικρή ποσότητα μητρικού DNA, με τη χρήση της DNA πολυμεράσης. Με τη συγκεκριμένη μέθοδο επιτυγχάνεται η ανάλυση πολύ μικρών ποσοτήτων DNA. Τα προϊόντα της PCR μπορούν να αναλυθούν ακολούθως με διάφορες μεθόδους ώστε να διερευνηθούν: α) η παρουσία με υψηλή ευαισθησία ενδογενούς ή εξωγενούς DNA ή RNA με ηλεκτροφόρηση του προϊόντος β) μεταβολές γενετικού υλικού γ) απώλειες γενετικού υλικού (π.χ. με πολλαπλό PCR). Το σημαντικότερο στοιχείο της PCR είναι ο μεγάλος αριθμός αντιγράφων της επιθυμητής αλληλουχίας που παράγεται με την εκθετική ενίσχυσή της, γεγονός που επιτρέπει την ανίχνευση γνωστών μεταλλάξεων μέσα σε μία μόνο ημέρα αντί για το διάστημα μηνών που χρειαζόταν παλιότερα. Επιπλέον η PCR έχει μειώσει ή εξαλείψει πλήρως την ανάγκη για χρήση ραδιενέργειας στη μοριακή διαγνωστική ρουτίνας. Η εξαιρετική ευαισθησία των τεχνικών που βασίζονται στην PCR δημιουργεί και το μεγάλο μειονέκτημα της δηλαδή την επιμόλυνση των δειγμάτων. Η ευαισθησία της τεχνικής



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

**Η αλυσιδωτή αντίδραση πραγματοποιείται ως εξής :**

### **1. Αποδιάταξη**

Στο στάδιο αυτό, το δείγμα που περιέχει το DNA θερμαίνεται σε υψηλή θερμοκρασία (91-94 °C). Στη θερμοκρασία αυτή επιτυγχάνεται η διάσπαση των δεσμών υδρογόνου, οι οποίοι συνδέουν τους δύο κλώνους της αλυσίδας του DNA. Οι δύο ελεύθεροι πλέον κλώνοι μπορούν να λειτουργήσουν ως εκμαγεία για τη σύνθεση των θυγατρικών αλυσίδων.

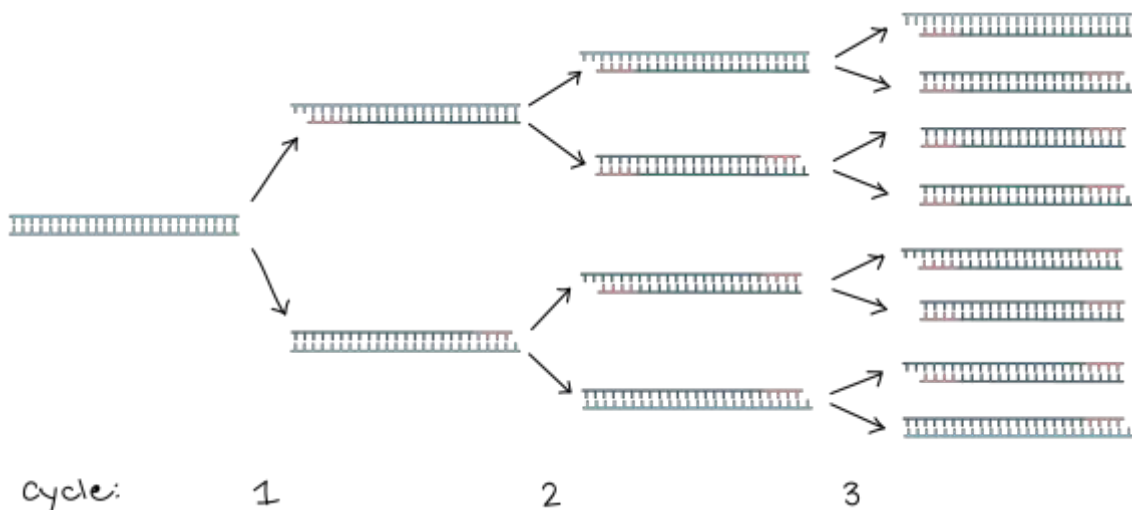
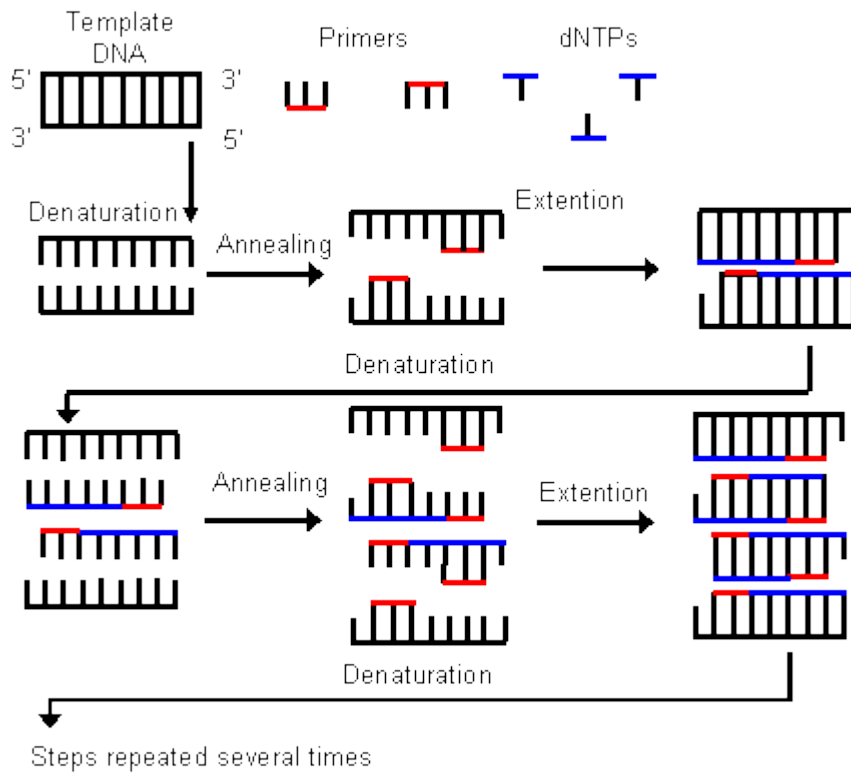
### **2. Υβριδισμός**

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

### **3. Επιμήκυνση**

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

Οι παραπάνω διαδικασίες επαναλαμβάνονται για περίπου 30 κύκλους. Στο τέλος των επαναλήψεων το στάδιο της επιμήκυνσης επαναλαμβάνεται, αλλά για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα (περίπου 5-10 λεπτά), ώστε η πολυμεράση να ολοκληρώσει τη σύνθεση αλυσίδων οι οποίες ενδεχομένως να έχουν μείνει ημιτελείς. Ο πολλαπλασιασμός της συγκεκριμένης περιοχής DNA είναι εκθετικός. Το τελικό αποτέλεσμα της PCR μετά από  $n$  κύκλους είναι η παραγωγή  $2^n$  δίκλωνων μορίων DNA, πιστών αντιγράφων της ακολουθίας που περικλείεται μεταξύ των εκκινητών.



Εικ.11-12. PCR.

#### ΑΠΑΡΑΙΤΗΤΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ PCR

##### -DNA εκμαγείο

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

### -DNA πολυμεράση

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

### -Ρυθμιστικό διάλυμα

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

### -Ιόντα Mg<sup>2+</sup>

Τα ιόντα Mg<sup>2+</sup> προστίθενται στο μίγμα της αντίδρασης μέσω του διαλύματος MgCl<sub>2</sub> και χρησιμοποιούνται από την πολυμεράση ως μεταλλικός συμπράγοντας. Τα ιόντα αυτά αυξάνουν την ειδικότητα της αντίδρασης βοηθώντας τον υβριδισμό των εκκινητών.

### -Τριφωσφορικά δεοξυνουκλεοτίδια (dNTPs)

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

### -Εκκινητές

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

tRNA Leu	Όνομα Primer	Αλληλουχία	Μήκος (bp)
Forward Primer	Fw <sup>Leu</sup> 5' - 3'	AGGACAAGAGAAATAAGGCC	265
Reverse Primer	Rev <sup>Leu</sup> 3' - 5'	CACGTTGGGGCCTTTGCGTA	

Πιν. 2. Εκκινητής και αλληλουχία που αναγνωρίζει

Για τον πολλαπλασιασμό ενός τμήματος DNA χρησιμοποιώντας την μέθοδο PCR, το δείγμα του DNA αρχικά θερμαίνεται έτσι ώστε να αποδιαταχθεί το δίκλωνο DNA και να διαχωριστεί σε δυο μονόκλινα τμήματα. Στη συνέχεια ένα ένζυμο, η TAQ πολυμεράση, συνθέτει δυο

συμπληρωματικούς κλώνους DNA χρησιμοποιώντας τους αρχικούς κλώνους ως πρότυπα (μήτρες). Αυτή η διαδικασία καταλήγει στον πολλαπλασιασμό του DNA, με κάθε ένα από τα καινούργια μόρια να περιέχει έναν παλιό και έναν καινούργιο κλώνο DNA. Ο κύκλος αυτός αποδιάταξης και σύνθεσης νέου DNA μπορεί να επαναληφθεί πολλές φορές, συνήθως 30 ή 40, καταλήγοντας στο σχηματισμό περισσότερων από 1 δισεκατομμύριο ακριβών αντιγράφων του αρχικού τμήματος του DNA. Το υπόλοιπο γονιδίωμα δεν πολλαπλασιάζεται, και έτσι δεν ανιχνεύεται με τις μοριακές τεχνικές. Σήμερα η όλη διαδικασία της PCR έχει αυτοματοποιηθεί με τα καινούργια και πιο άρτια μηχανήματα, και μπορεί να τελειώσει μόλις σε λίγες ώρες. Η όλη διαδικασία των κύκλων της θέρμανσης και της μείωσης της θερμοκρασίας προγραμματίζεται από ένα μηχάνημα, τον θερμικό κυκλοποιητή (PCR thermal cycler), το οποίο έχει τη δυνατότητα να αυξομειώνει την θερμοκρασία της αντίδρασης κάθε λίγα λεπτά ή δευτερόλεπτα, έτσι ώστε να επιτρέψει τη σύνθεση νέων τμημάτων DNA. Η αντίδραση εκτελείται κυρίως σε όγκο 15-100 μl σε eppendorf των 0,2-0,5 ml στον θερμικό κυκλοποιητή. Τα στάδια ενίσχυσης για την PCR στον θερμικό κυκλοποιητή ήταν τα ακόλουθα (τα στάδια 2-4 επαναλαμβάνονται για 35 κύκλους):

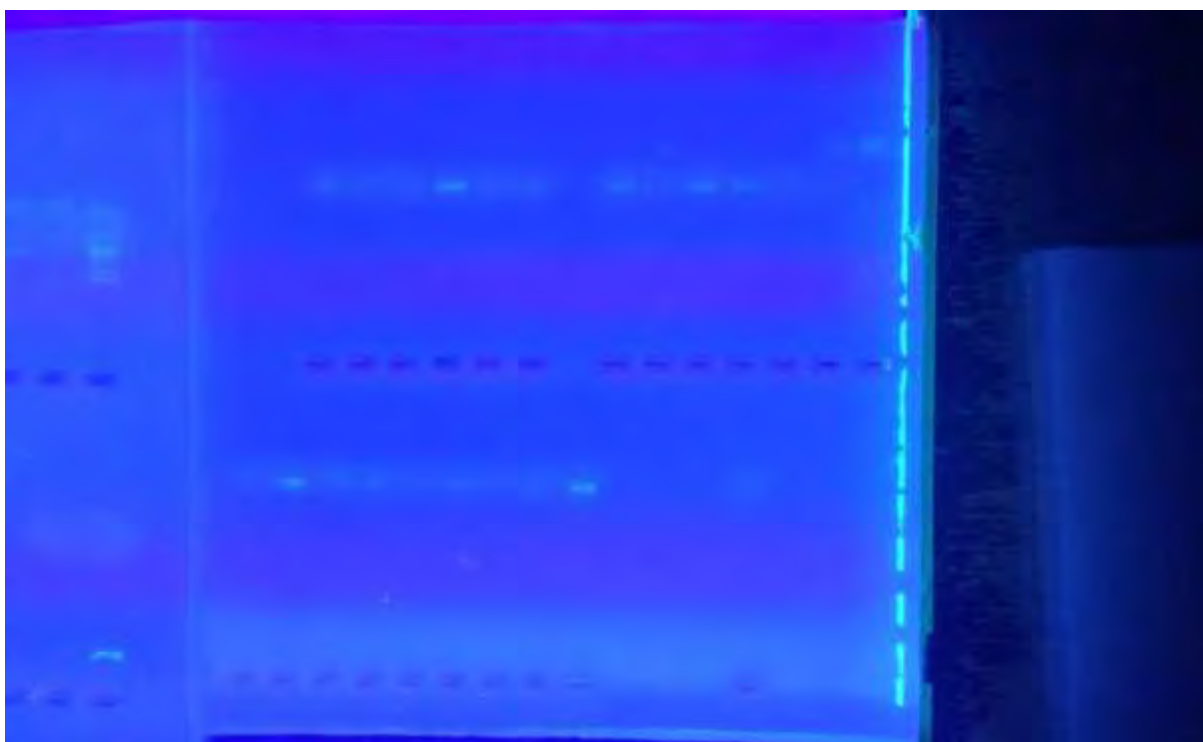
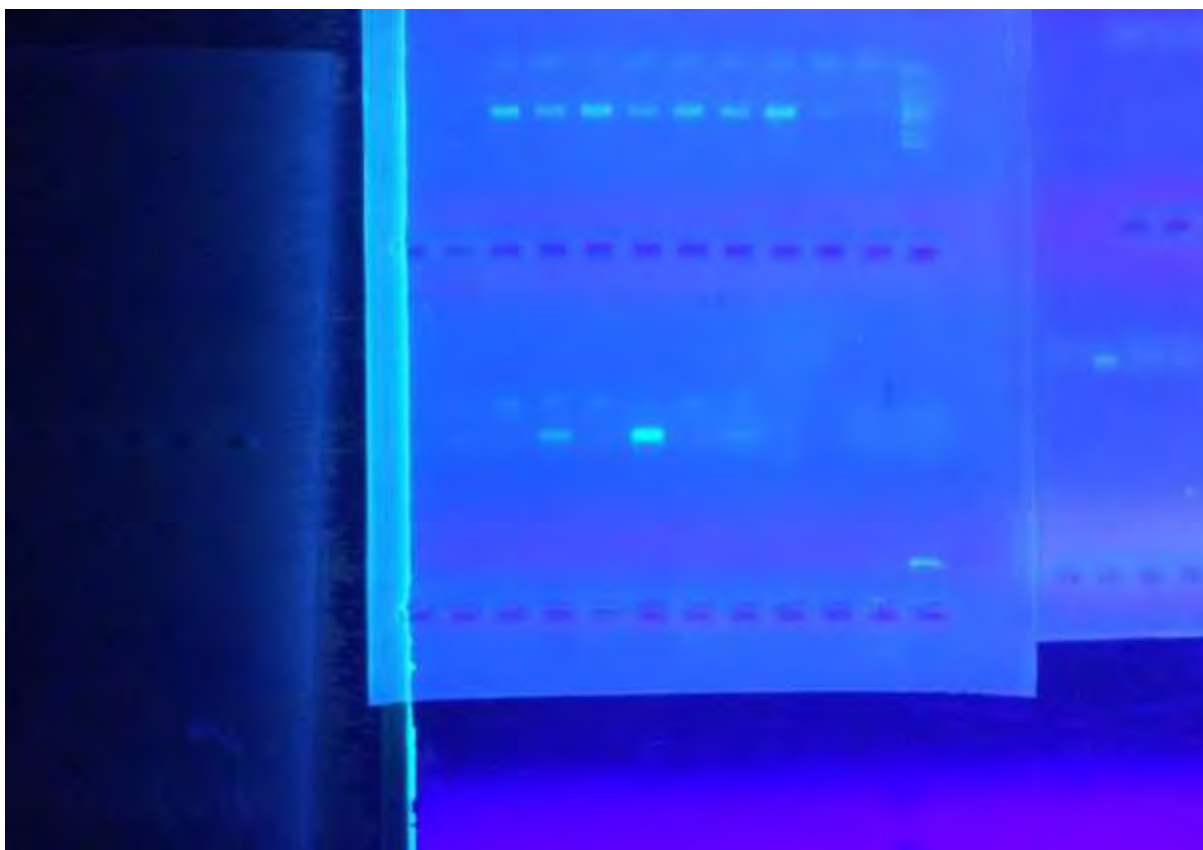
1. Αρχικό στάδιο: Η θερμοκρασία ανέρχεται στους 95ο C και διατηρείται για 4 λεπτά.
  2. Στάδιο αποδιάταξης: Η θερμοκρασία ανέρχεται στους 95ο C για 30 δευτερόλεπτα.
  3. Στάδιο υβριδισμού: Η θερμοκρασία κατέρχεται στους 55ο C για 40 δευτερόλεπτα, επιτρέποντας έτσι την υβριδοποίηση των εκκινητών, οι οποίοι βρίσκονται σε περίσσεια, με το μονόκλωνο DNA-εκμαγείο.
  4. Στάδιο επιμήκυνσης: Η θερμοκρασία ανέρχεται ξανά στους 72ο C για 40 δευτερόλεπτα, όπου η Ταq πολυμεράση λειτουργεί βέλτιστα.
  5. Στάδιο τελικής επιμήκυνσης: Η θερμοκρασία παραμένει στους 72ο C για 10 λεπτά, ύστερα από τον τελευταίο κύκλο PCR.
  6. Τελικό στάδιο: Η θερμοκρασία κατέρχεται στους 4ο C.
- Για την ενίσχυση του DNA και συγκεκριμένα του γονιδίου TA, που απομονώθηκε από τα δείγματα αίματος ατόμων με διαβήτη, πραγματοποιήθηκε η μέθοδος PCR. Το ζεύγος εκκινητών που χρησιμοποιήθηκε είναι το Fw<sup>Leu</sup> και Rev<sup>Leu</sup>. Το ζεύγος εκκινητών Fw<sup>Leu</sup> και Rev<sup>Leu</sup> ενισχύει το τμήμα των 75 bp που κωδικοποιεί τα γονίδια tRNA<sup>Leu</sup>.

Για μία αντίδραση PCR των 50 μl χρησιμοποιήθηκαν:

-DNA	1-2 μl
-50 pmol/μl primer(FW <sup>leu</sup> +REV <sup>leu</sup> )	1 + 1 μl από το κάθε primer( 1pmol/μl)
-Από ρυθμιστικό διάλυμα 10 x PCR Buffer	5 μl συγκέντρωσης 1X
-40 μM dNTPs (Διάλυμα δεοξυνουκλεοτιδίων)	1 μl συγκέντρωσης 0,016
-50 mM MgCl <sub>2</sub>	1μl συγκέντρωσης 1 mM
-1 U Taq πολυμεράση (5U/μl)	0,25 μl συγκέντρωσης 0,025U/μl
-dd H <sub>2</sub> O μέχρι τα 50 μl	38-39 μl
Τελικός όγκος	50μl

#### ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ PCR ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ

Αφού ολοκληρώθηκε η αντίδραση της PCR ακολούθησε ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της σε πήκτωμα αγαρόζης 6% η οποία βασίστηκε στο διαχωρισμό τμημάτων DNA ανάλογα με το μέγεθός τους. Η παρασκευή της αγαρόζης καθώς και η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι ακριβώς η ίδια που αναφέρθηκε παραπάνω για την απομόνωση του DNA με τη διαφορά ότι εδώ έγινε παρουσία μάρτυρα μοριακών μεγεθών τμημάτων DNA, καθώς είναι ο μόνος τρόπος για την απόδειξη ότι δεν ενισχύθηκαν μη ειδικά προϊόντα. Στη συνέχεια όσα δείγματα έδωσαν θετικό αποτέλεσμα χρησιμοποιήθηκαν στην εφαρμογή της μεθόδου SSCP για την ποιοτική ανάλυση πολυμορφισμών.



Εικ.13-14.Πηκτώματα αγαρόζης για την επαλήθευση σωστής απομόνωσης DNA.

Τα πηκτώματα ήταν 6%αγαρόζης βυθισμένα σε TAE 1X στα 150V για 20-30 λεπτά.

## SSCP- ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥ ΜΟΝΟΚΛΩΝΙΚΗΣ ΔΙΑΜΟΡΦΩΣΗΣ

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

### **Παράμετροι ηλεκτροφόρησης SSCP**

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

-Σύσταση του πηκτώματος: Το πιο κοινό πήκτωμα, είναι το διασυνδεδεμένο πολυμερές πολυακρυλαμιδίου (8-12 %). Το μικρό μέγεθος των πόρων του πηκτώματος αυτού, το καθιστά ιδανικό για υψηλή διακριτική ικανότητα και ανάλυση, ακόμα και σε επίπεδο νουκλεοτιδίου. 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 φωσφορικών ομάδων του σκελετού των νουκλεϊκών οξέων, επιτρέποντας έτσι υψηλότερη δυνατότητα διάκρισης μεταξύ των μεταλλαγμένων και των φυσιολογικών τμημάτων DNA. Επίσης οι δομές διαμόρφωσης πιθανόν να καταστούν πιο συμπαγείς αν αυξηθεί η συγκέντρωση του άλατος.

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

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

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

Συνεπώς, καλό είναι να διατηρείται σχετικά χαμηλή συγκέντρωση DNA στο ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης. Τα προϊόντα PCR που ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης και εμφάνισαν θετικό αποτέλεσμα, προετοιμάζονται κατάλληλα για ανάλυση με τη μέθοδο SSCP ως εξής:

#### ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΠΗΚΤΗΣ ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΙΟΥ

Η αρχή της συγκεκριμένης μεθόδου διαφέρει από την ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης επειδή εδώ πρόκειται για κάθετη ηλεκτροφόρηση. Πλεονεκτήματα της πηκτής πολυακρυλαμίδης είναι το ότι έχει μεγαλύτερη διαχωριστική ικανότητα και ότι τα αποτελέσματα διαχωρισμού είναι πιο ευδιάκριτα. Επίσης, τα δείγματά στα πηκτώματα μπορούν να διατηρηθούν για μεγάλο χρονικό διάστημα σε θερμοκρασία δωματίου. Η διαδικασία ακολουθήθηκε 2 φορές, κάθε φορά τοποθετούταν δύο πηκτώματα στη συσκευή. Για δύο πηκτώματα πολυακρυλαμιδίου πυκνότητας 12% και όγκου 130 ml χρησιμοποιήθηκαν:

1. 15,6 gr Ακρυλαμίδιο
2. 0,5 gr Δις-Ακρυλαμίδιο
3. 7 ml TBE 10x Ρυθμιστικό διάλυμα για καλύτερη αγωγιμότητα.
4. 12ml Γλυκερόλη 50%: Ελαττώνει την τιμή του pH του διαλύματος ηλεκτροφόρησης και αυξάνει την ευαισθησία της μεθόδου.
5. 130μl TEMED Καταλύει την αντίδραση
6. 900 μl APS Ξεκινά την αντίδραση πολυμερισμού με το να δημιουργεί ελεύθερες ρίζες.

#### Διαδικασία

1. Προετοιμάστηκε η συσκευή παρασκευής της πηκτής.
2. Σε ποτηράκι ζέσεως έγινε καλή ανάδευση με μαγνητάκι στα υλικά εκτός από TEMED, APS.



3. Έγινε φιλτράρισμα του περιεχομένου του ποτηριού με διηθητικό χαρτί σε έναν ογκομετρικό σωλήνα, συμπληρώθηκε μέχρι τα 100 ml με ddH<sub>2</sub>O και το διάλυμα μεταφέρθηκε σε κωνική φιάλη.
4. Έπειτα προστέθηκαν τα υπόλοιπα υλικά ώστε να αρχίσει ο πολυμερισμός της ακρυλαμίδης (TEMED, καταλύει το σχηματισμό ελεύθερων ριζών από το APS και APS που ξεκινάει τον πολυμερισμό).
5. Έγινε γρήγορη περίχυση του διαλύματος στη συσκευή ηλεκτροφόρησης και τοποθετήθηκαν τα χτενάκια δημιουργίας πηγαδιών.
6. Σταθεροποιήθηκε η πηκτή, αφαιρέθηκαν τα χτενάκια και καθαρίστηκαν με βελόνα τα πηγάδια.
7. Προστέθηκε Buffer TBE 0.5x στη συσκευή.
8. Τοποθετήθηκαν τα δείγματα στα πηγάδια και άρχισε η ηλεκτροφόρηση στα 220V.

#### ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΚΑΙ ΑΠΟΔΙΑΤΑΞΗ ΤΩΝ PCR ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ

Σε erpendorf του 0,5 ml έγινε προσθήκη 7 μl PCR προϊόντος και 10μl αποδιατακτικού διαλύματος. Το αποδιατακτικό διάλυμα στα 3 ml περιείχε:

1. 95% φορμαμίδιο
2. 20 mM EDTA
3. 10 mM NaOH
4. 0,05 % κυανό του ξυλενίου
5. 0,05 % κυανό της βρωμοφαινόλης

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

92o C για 2 λεπτά

95o C για 2 λεπτά

97o C για 7 λεπτά

Πριν την ολοκλήρωση του τελικού σταδίου της αποδιάταξης, έγινε τοποθέτηση των δειγμάτων απ' ευθείας στον πάγο για την αποφυγή της επαναδιάταξης των μονόκλωνων μορίων DNA. Στη συνέχεια έγινε φόρτωση των αποδιεταγμένων δειγμάτων στο πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου αφού

προηγήθηκε η πλήρωση της συσκευής με ρυθμιστικό διάλυμα TBE 0,5x. Η ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων έγινε σε τάση 220 V για 20 ώρες και σε θερμοκρασία δωματίου. Για τη λήψη αποτελεσμάτων ακολούθησε χρώση του πηκτώματος με νιτρικό άργυρο.

#### ΧΡΩΣΗ ΠΗΚΤΩΜΑΤΟΣ ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΗΣ ΜΕΔΙΑΛΥΜΑ ΝΙΤΡΙΚΟΥ ΑΡΓΥΡΟΥ

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

##### 1<sup>ο</sup>διάλυμα:

Σε ογκομετρικό κύλινδρο έγινε προσθήκη 800 ml ddH<sub>2</sub>O, 20 ml αιθανόλης 100% και 1ml οξικού οξέος

Τοποθέτηση των πηκτωμάτων στον αναδευτήρα

Ακολούθησε ανακίνηση του διαλύματος και η πρώτη πλύση με προσθήκη 200 ml του διαλύματος σε κάθε πήκτωμα για 3 λεπτά

Απομάκρυνση του διαλύματος μετά τα 3 λεπτά

Προσθήκη ξανά 200 ml διαλύματος σε κάθε πήκτωμα για 3 λεπτά για να γίνει μια δεύτερη πλύση και έπειτα απομάκρυνση του διαλύματος

Ακολούθησαν 2 φορές πλύσεις με ddH<sub>2</sub>O για 1 λεπτό

##### 2<sup>ο</sup>διάλυμα:

Σε ογκομετρικό κύλινδρο έγινε προσθήκη 400 ml διαλύματος νιτρικού αργύρου

Τοποθέτηση των πηκτωμάτων στον αναδευτήρα

Προσθήκη σε κάθε πήκτωμα από 200 ml διαλύματος για 20 λεπτά

Ξέπλυμα των πηκτωμάτων 2 φορές με ddH<sub>2</sub>O

##### 3<sup>ο</sup>διάλυμα:

Προσθήκη σε ποτήρι ζέσεως 6 gr sodium hydroxide pearls, 0,02 gr NaBH<sub>4</sub>, 2 ml φορμαλδεΐδης και συμπλήρωση με ddH<sub>2</sub>O μέχρι ο τελικός όγκος του διαλύματος να φθάσει 400ml

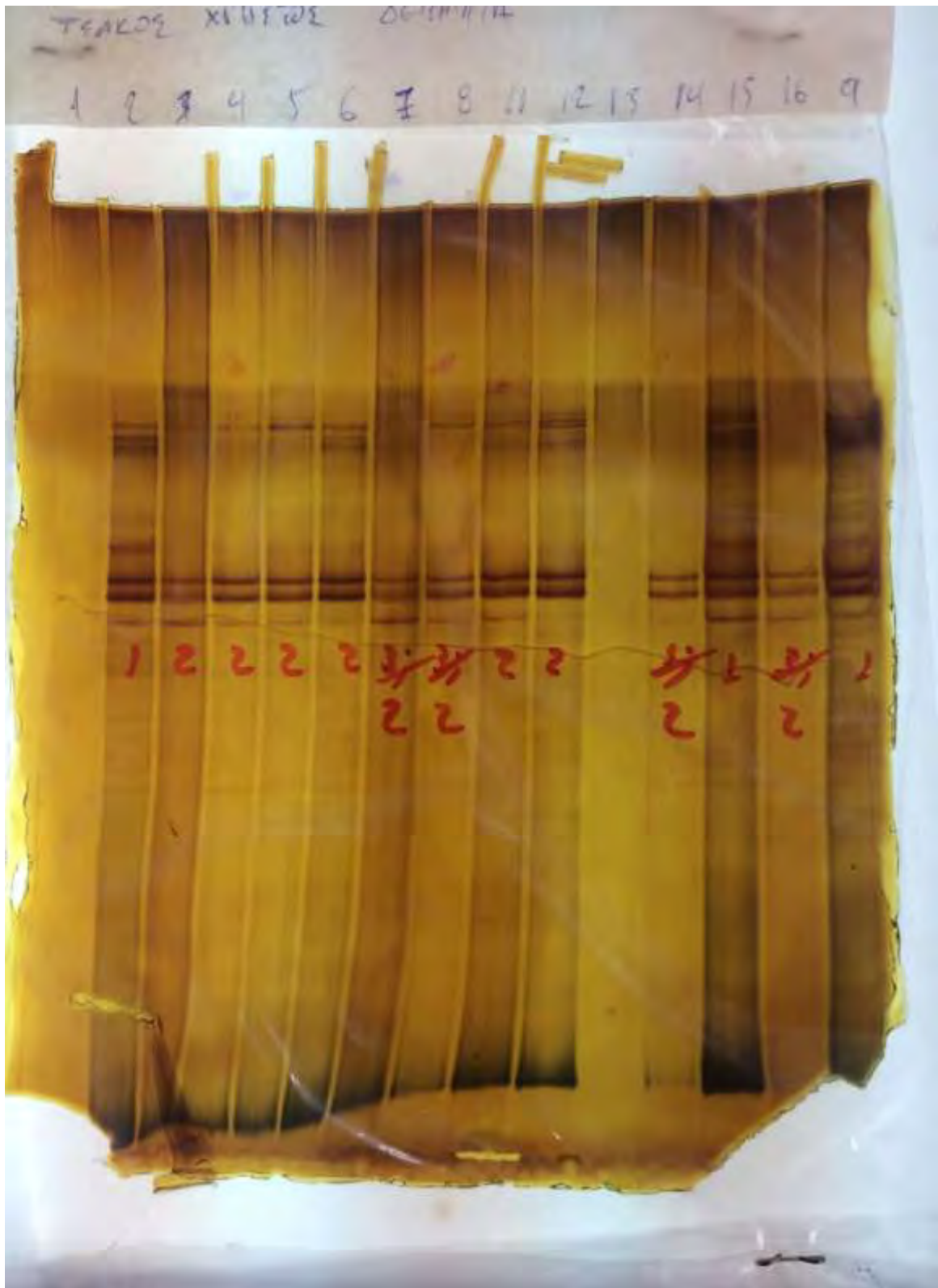
Προσθήκη 200 ml διαλύματος σε κάθε πήκτωμα

Τοποθέτηση των πηκτωμάτων στον αναδευτήρα

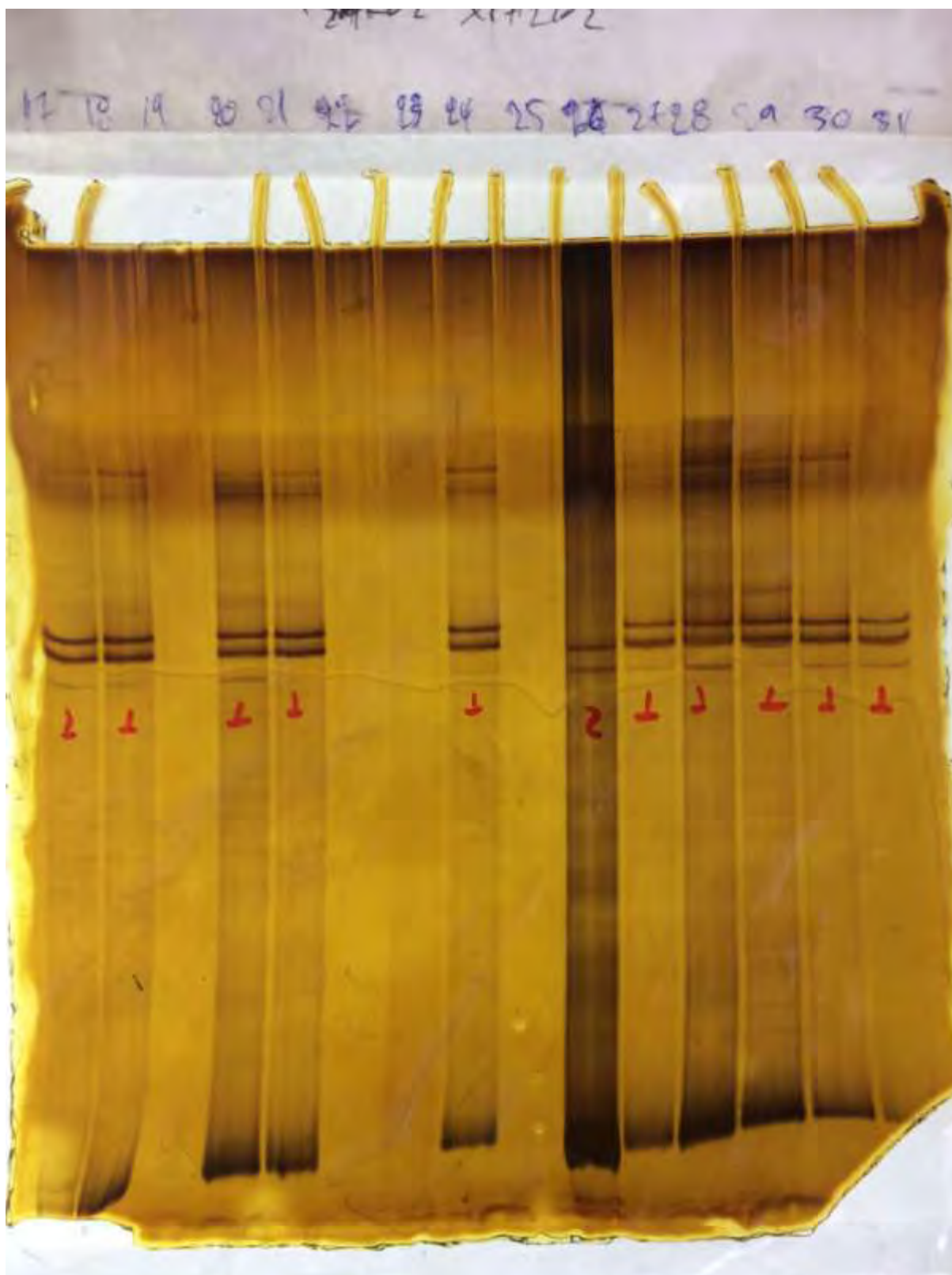
Παραμονή των πηκτωμάτων στο διάλυμα μέχρι την εμφάνιση των ζωνών

Απομάκρυνση του διαλύματος και μια πλύση με ddH<sub>2</sub>O

Στο τέλος της διαδικασίας τα πηκτώματα πολυακρυλαμιδίου συσκευάστηκαν σε διαφανείς μεμβράνες για να γίνει η σύγκριση των αποτελεσμάτων. Έγινε επιλογή των δειγμάτων που εμφάνισαν διαφορετικά πρότυπα ηλεκτροφόρησης και ακολούθησε η διαδικασία του καθαρισμού των PCR προϊόντων των επιλεγμένων δειγμάτων, ώστε να σταλούν για αλληλούχιση.



Εικ.15. Πήκτωμα πολυακρυλαμίδιου των δειγμάτων



Εικ.16. Πήκτωμα πολυακρυλαμίδιου των δειγμάτων

Τα πήκτωματά ήταν 12% πολυακρυλαμίδιου σε TBE 0,5X για 20 ώρες στα 220V.

Από τα πηκτώματα πολυακρυλαμιδίου είδαμε ότι τα δείγματα εμφάνισαν κάποια διαφορετικά πρότυπα. Τα ταυτοποιήσαμε με τους αριθμούς 1,2 έτσι ώστε να τα κατηγοριοποιήσουμε ανάλογα με την ομοιότητα των προτύπων τους. Διαλέξαμε 4 αντιπροσωπευτικά δείγματα για να κάνουμε ταυτοποίηση της αλληλουχίας του DNA. (δειγ. 2-6-26-31)

#### ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ DNA

Τα δείγματα που εμφάνισαν διαφορετικά πρότυπα πριν σταλούν για ταυτοποίηση της DNA αλληλουχίας τους (DNAsequencing) υπόκεινται σε καθαρισμό.

#### ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ PCR ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ

Η διαδικασία του καθαρισμού των PCR προϊόντων έγινε με το kit της Macharey-Nagel. Το πρωτόκολλο καθαρισμού που ακολουθήθηκε είναι:

1. Στα erpendorfs που περιέχουν το δείγμα μετά την διαδικασία της PCR προστίθενται 100μl της χρωστικής NT1 (capture Buffer) και που περιέχεται στο kit και ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 11.000 στροφές για 1 λεπτό.
2. Στο μείγμα προστίθενται 700μl διαλύματος NT3 (wash Buffer) και ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 11.000 στροφές για 1 λεπτό.
3. Τα δείγματα επώασηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 1 λεπτό και έπειτα ακολούθησε φυγοκέντρηση στα 11.000 rpm για 1 λεπτό.
4. Αφαιρέθηκε το υπερκείμενο υγρό και προστέθηκε 25μl ddH<sub>2</sub>O για την επαναδιαλυτοποίηση του DNA.

#### DNA SEQUENCING

Τα δείγματα εστάλησαν στη Ιατρική Σχολή Θεσσαλίας και τα αποτελέσματα στη συνέχεια μελετήθηκαν για την αναζήτηση στις αλληλουχίες των πιθανών μεταλλάξεων.

Το DNAsequencing είχε τα εξής αποτελέσματα:

Στα δείγματα 2, 6, 31 δεν βρέθηκε καμία μετάλλαξη. Η πρότυπη αλληλουχία στις νουκλεοτιδικές θέσεις είναι: 3131-3424 με Sequence ID: KT768206.1 από την βάση δεδομένων NCBI.

Και στα δείγματά μας είχαμε στις νουκλεοτιδικές θέσεις 3131-3230: partial 16SrRNA , 3231-3305: tRNA<sup>Leu</sup> , 3308-3424: partial ND1 gene.

Στο δείγμα 26 είχαμε στην νουκλεοτιδική θέση 3131 μετάλλαξη από A (αδενίνη) σε T (θυμίνη) . Είναι όμως στο τμήμα του 16srRNA.Χρησιμοποιήσαμε το πρόγραμμα Bioeditγια τα διαβάσουμε τα αποτελέσματα.

Οι αλληλουχίες στα δείγματα μας ήταν:

>Δ2

```
AGGACAAGAGAAATAAGGCCTACTTCACAAAGCGCCTTCCCCGTAATGATATCATCTCAACTTAGTATTATA
CCCACACCCACCCAAGAACAGGGTTTGTTAAGATGGCAGAGCCCGTAATCGCATAAAACTTAAACTTTACA
GTCAGAGGTTCAATTCCTCTTCTTAACAACATACCCATGGCCAACCTCCTACTCCTCATTGTACCCATTCTAATC
GCAATGGCATTCCCTAATGCTTACCGAACGAAAAATTCTAGGCTATATACAACACTACGCAAAGGCCCAACGTGA
```

>Δ6

```
AGGACAAGAGAAATAAGGCCTACTTCACAAAGCGCCTTCCCCGTAATGATATCATCTCAACTTAGTATTATA
CCCACACCCACCCAAGAACAGGGTTTGTTAAGATGGCAGAGCCCGTAATCGCATAAAACTTAAACTTTACA
GTCAGAGGTTCAATTCCTCTTCTTAACAACATACCCATGGCCAACCTCCTACTCCTCATTGTACCCATTCTAATC
GCAATGGCATTCCCTAATGCTTACCGAACGAAAAATTCTAGGCTATATACAACACTACGCAAAGGCCCAACGTGA
```

>Δ26

```
IGGACAAGAGAAATAAGGCCTACTTCACAAAGCGCCTTCCCCGTAATGATATCATCTCAACTTAGTATTATA
CCCACACCCACCCAAGAACAGGGTTTGTTAAGATGGCAGAGCCCGTAATCGCATAAAACTTAAACTTTACA
GTCAGAGGTTCAATTCCTCTTCTTAACAACATACCCATGGCCAACCTCCTACTCCTCATTGTACCCATTCTAATC
GCAATGGCATTCCCTAATGCTTACCGAACGAAAAATTCTAGGCTATATACAACACTACGCAAAGGCCCAACGTGA
```

>Δ31

```
AGGACAAGAGAAATAAGGCCTACTTCACAAAGCGCCTTCCCCGTAATGATATCATCTCAACTTAGTATTATA
CCCACACCCACCCAAGAACAGGGTTTGTTAAGATGGCAGAGCCCGTAATCGCATAAAACTTAAACTTTACA
GTCAGAGGTTCAATTCCTCTTCTTAACAACATACCCATGGCCAACCTCCTACTCCTCATTGTACCCATTCTAATC
GCAATGGCATTCCCTAATGCTTACCGAACGAAAAATTCTAGGCTATATACAACACTACGCAAAGGCCCAACGTGA
```

## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα μιτοχόνδρια είναι μικροσκοπικές δομές που βρίσκονται σχεδόν σε όλα τα κύτταρα και αναλαμβάνουν το σημαντικότερο έργο να μετατρέπουν τις τροφές σε αξιοποιήσιμη ενέργεια. Για το λόγο αυτό, τα μιτοχόνδρια συχνά αποκαλούνται τα «εργοστάσια παραγωγής ενέργειας» του οργανισμού. Ένα στα 6.500 μωρά γεννιέται με κάποιο σοβαρό μιτοχονδριακό νόσημα, το οποίο συνεπάγεται σημαντικό έλλειμμα ενέργειας και οδηγεί σε μυϊκή αδυναμία, τύφλωση, καρδιακή ανεπάρκεια ή ακόμη και θάνατο. Το ενδιαφέρον που εμπειρικλείει μέσα του το μιτοχονδριακό DNA είναι αναμφίβολα μεγάλο. Και τούτο γιατί στη δομή αυτού του μορίου βρίσκονται οι εξηγήσεις πολλών βιολογικών φαινομένων, όπως κάποιες ασθένειες που προκαλούνται από τη γενετική διαταραχή, τις μεταλλάξεις του μιτοχονδριακού DNA.

Οι μεταλλάξεις αυτές μπορεί να είναι μικρές, σημειακές, και αφορούν την υποκατάσταση μιας βάσης, η οποία αντανακλά μian αντικατάσταση ενός αμινοξέος στην πρωτεΐνη που κωδικοποιεί το μεταλλαγμένο γονίδιο.. Μια μετάλλαξη, μια υποκατάσταση μιας βάσης στη θέση, που οδηγεί στην αλλαγή ενός αμινοξέος σε μian υπομονάδα - αλυσίδα του μορίου - φορέα της ενέργειας του κυττάρου, της γνωστής τριφωσφορικής αδεσονίνης (ATP), μπορεί να προκαλέσει ποικίλες ανωμαλίες. Οι διαφορές αυτές στη συμπτωματολογία οφείλονται στην ετεροπλασμία. Δηλαδή, τα άτομα είχαν διαφορετικά ποσοστά μεταλλαγμένων μορίων μιτοχονδριακού DNA στους άρρωστους ιστούς τους. Και οι ιστοί με μεγαλύτερο ποσοστό είχαν μικρότερη παραγωγή ATP και σοβαρότερα συμπτώματα. Υπάρχουν και περιπτώσεις που για να εκδηλωθούν προβλήματα πρέπει να δημιουργηθεί ομοπλασμία, δηλαδή να είναι όλα τα μόρια μεταλλαγμένα.

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. Μεταλλάξεις στο ίδιο γονίδιο, για το αναφερόμενο RNA, προκαλούν ποικίλες ασθένειες όπως μιτοχονδριακή μυοπάθεια, υπερτροφική καρδιοπάθεια, μιτοχονδριακή εγκεφαλομυοπάθεια κ.ά.

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



Οπότε είναι μεγάλο το ενδιαφέρον για μια παραπάνω μελέτη στο αν τελικά μια συγκεκριμένη μετάλλαξη στο mtDNA του γονιδίου της λευκίνης (LEU) ή μία συσσώρευση μεταλλάξεων θα οδηγήσει τελικά σε μία μιτοχονδριακή δυσλειτουργία με αποτέλεσμα την δημιουργία της ασθένειας του διαβήτη. Ο μη ινσουλινοεξαρτώμενος (τύπου II) σακχαρώδης διαβήτης χαρακτηρίζεται από υπεργλυκαιμία και αντίσταση στην ινσουλίνη και επηρεάζει σχεδόν το 5% του γενικού πληθυσμού. Οι κληρονομικοί παράγοντες είναι σημαντικοί για την ανάπτυξη του, αλλά τα σχετικά γονίδια είναι άγνωστα. Ο μη ινσουλινοεξαρτώμενος (τύπου II) σακχαρώδης διαβήτης σε συνδυασμό με αισθητηριακή απώλεια ακοής, κληρονομούνται από τη μητέρα. Η μητρική κληρονομιά και η παρατηρούμενη μείωση των δραστηριοτήτων των μιτοχονδριακών ενζύμων της αναπνευστικής αλυσίδας υποδηλώνουν ένα γενετικό ελάττωμα στο μιτοχονδριακό DNA. Μια μετάβαση A έως G έχει ταυτοποιηθεί στο νουκλεοτίδιο 3243, μία θέση στο μιτοχονδριακό γονίδιο για tRNA<sup>Leu</sup>(UUR). Αυτή η μετάλλαξη συσσωματώνεται με την ασθένεια και υποδεικνύει ότι μια σημειακή μετάλλαξη στο μιτοχονδριακό DNA είναι ένας παθογενής παράγοντας για το μη ινσουλινοεξαρτώμενο (τύπου II) σακχαρώδη διαβήτη.

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε για την ανίχνευση περαιτέρω μεταλλάξεων και ταυτοποίηση τους στο μιτοχονδριακό γονίδιο tRNA της λευκίνης σε ασθενείς που πάσχουν από διαβήτη με σκοπό να βρεθούν εάν υπάρχουν μεταλλάξεις σε άλλες θέσεις που να συσχετίζονται με την ασθένεια. Για την πραγματοποίηση της παρούσας μελέτης χρησιμοποιήθηκαν δείγματα αίματος από 24 ασθενείς με διαβήτη από τα οποία απομονώθηκε μιτοχονδριακό DNA. Το ζεύγος εκκινητών FW<sup>LEU</sup> και Rev<sup>LEU</sup> που χρησιμοποιήθηκε για να ενισχυθεί το τμήμα των 265 bp που κωδικοποιεί το γονίδιο tRNA<sup>Leu</sup>. Στη συνέχεια, τα δείγματα αναλύθηκαν με τη μέθοδο SSCP για την κατάταξη τους σε πρότυπα ανάλογα με την ηλεκτροφορητική τους κινητικότητα. Με τη μέθοδο SSCP έγινε η ανίχνευση διάφορων νουκλεοτιδικών παραλλαγών. Τα δείγματα που παρουσίασαν διαφορετικό πρότυπο στην ανάλυση SSCP στάλθηκαν για αλληλούχιση.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα από την αλληλούχιση στους 24 ασθενείς με διαβήτη που μελετήθηκαν δεν εντοπίστηκαν μεταλλάξεις παρά μόνο μία μετάλλαξη T3131A στην νουκλεοτιδική θέση 3131. Βρέθηκε στην θέση 16s του rRNA. Δεν εμφανίστηκαν μεταλλάξεις στην θέση 3243. Θα πρέπει να ερευνηθεί περισσότερο για να διαπιστωθεί πόσο συχνά εμφανίζεται και αν όντως σχετίζεται αυτή με τη νόσο του σακχαρώδους διαβήτη. Οπότε είναι μεγάλο το ενδιαφέρον για μια παραπάνω μελέτη στο αν τελικά μια συγκεκριμένη μετάλλαξη στο mtDNA του γονιδίου της λευκίνης (LEU) ή μία συσσώρευση μεταλλάξεων θα οδηγήσει τελικά σε μία μιτοχονδριακή δυσλειτουργία με αποτέλεσμα την δημιουργία της ασθένειας του διαβήτη.

## BIBΛIOΓPAΦIA-SITES

Τούντας, 1995, Σακχαρώδης Διαβήτης. Αθήνα: Εκδ. Επτάλοφος, σελ 1039- 1073

J.G. McGeown, 2009, Συνοπτική Φυσιολογία του Ανθρώπου, 2η έκδοση, σελ 290-291

Alberts, Bruce, και συν. Βασικές αρχές κυτταρικής βιολογίας. Ιατρικές εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης, n.d  
Gropper, Sareen S, Jack L. Smith, και James L. Groff. Διατροφή & Μεταβολισμός. Ιατρικές εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης, 2007

Kolesnikov, A A. «The Mitochondrial Genome - Nucleoid.» Biochemistry (Moscow), 2016: 1057-1065.

Lenzen, Sigrud, Jens Drinkgern, και Markus Tiedge. «Low antioxidant enzyme gene expression in pancreatic islets compared with various other mouse tissues.» Free Radical Biology and Medicine, 1996: 463-466.

Lightowers, Robert N, Robert W Taylor, και Doug M Turnbull. «Mutations causing mitochondrial disease: What is new and what challenges remain?» Science , 25 September 2015: 1494-1499.

Lindroos, Markus M, και συν. «m.3243A>G Mutation in Mitochondrial DNA Leads to Decreased Insulin Sensitivity in Skeletal Muscle and to Progressive  $\beta$ -Cell Dysfunction.» Diabetes, March 2009: 543-549.

Luna, Brenda, και συν. «Bayesian Network and Mechanistic Hierarchical Structure Modeling of Increased likelihood of Developing Intractable Childhood Epilepsy from the Combined Effect of mtDNA Variants, Oxidative Damage, and Copy Number.» Journal of molecular neuroscience, December 2014: 752-766.

Maassen, J A, L M 't Hart, G M.C Janssen, E Reiling, J A Romijin, και H H Lemkes. «Mitochondrial diabetes and its lessons for common Type 2 diabetes.» Biochemical Society Transactions, 01 October 2006: 819-823.

Mancuso, Michelangelo, και συν. «Redefining phenotypes associated with mitochondrial DNA single deletion.» Journal of Neurology, May 2015: 1301-1309.

Murray, Robert K., Kathleen M. Botham, Victor W. Rodwell, David A. Bender, Peter J. Kennelly, και Anthony P Weil. Harper's Illustrated Biochemistry. Π.Χ. Πασχαλίδης, 2011.

Noble, J.A. et al., 2010. HLA class I and genetic susceptibility to type 1 diabetes: results from the Type 1 Diabetes Genetics Consortium. Diabetes, 59(11), pp.2972–2979

Taylor RW, McDonnell MT, Blakely EL, et al (2003). Genotypes from patients indicate no paternal mitochondrial DNA contribution. *Ann Neurol* 54, pp.521–24.

Temperley R., Richter, R, Dennerlein, S, Lightowlers, R. N. and Chrzanowska-Lightowlers, Z. M. (2010). "Hungry codons promote frameshifting in human mitochondrial ribosomes." *Science* 327, pp.301.

Tranebjaerg L, Schwartz C, Eriksen H, et al. (1995). A new X linked recessive deafness syndrome with blindness, dystonia, fractures, and mental deficiency is linked to Xq22. *J Med Genet* 32, pp. 257–63.

Turner, R.C, Cull, C.A, Frighi, V. & Holman. R.R. (1999). Glycemic control with diet, sulfonylurea, metformin, or insulin in patients with type 2 diabetes mellitus: progressive requirement for multiple therapies (UKPDS 49).. UK Prospective Diabetes Study (UKPDS). Group. *JAMA*, pp.2005-2012.

van der Giezen, M and T. M. Lenton (2012). The rise of oxygen and complex life. *J. Euk. Microbiol* 59, pp.111-113.

Waldbaum, S. & Patel, M. (2009). Mitochondria, oxidative stress, and temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res*, pp. 23-45

Wallace DC, Shoffner, JM, Brown MD, Torroni A, Lott MT, Cabell M (1992). "Mitochondrial DNA mutations associated with Alzheimer's and Parkinson's disease" *American Journal of Human Genetics*, 51: A30.

Wallace DC, Brown MD, Lott MT. (1999). Mitochondrial DNA variation in human evolution and disease. *Gene* 238, pp. 211–30.

Wittenhagen LM, Roy MD, Kelley SO (2003). The pathogenic U3271C human mitochondrial tRNA Leu(UUR). mutation disrupts a fragile anticodon stem. *Nucleic Acids Res* 31, pp.596-601.

Wilson FH, Hariri A, Farhi A, et al (2004). A cluster of metabolic defects caused by mutation in a mitochondrial tRNA. *Science* 306, pp.1190–94.

<http://www.Wikipedia.com/leucine>

<http://www.ONmed.gr/diebetes>

NCBI (National center of biotechnology information) Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus

<http://www.ada.com/MitochondrialDiabetes/>Recent evidence for evolution of the genetic code

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

## ΕΙΚΟΝΕΣ

Εικόνα 1 Μιτοχόνδρια σελ. 13

Εικόνα 2 Τμήματα μιτοχονδρίου σελ 14

Εικόνα 3 Δομή μιτοχονδρίου σελ 16

Εικόνα 4 Το μιτοχονδριακό γονιδίωμα σελ 20

Εικόνα 5 Κωδικόνια σελ 22

Εικόνα 6 TransferRna σελ 26

Εικόνα 7 Αναπνευστική αλυσίδα σελ 29

Εικόνα 8 Συντακτικός τύπος λευκίνης σελ 31

Εικόνες 9-10 Πηκτώματα αγαρόζης στα οποία προσδιορίσαμε τα θετικά αποτελέσματα σελ 37-38

Εικόνες 11-12 PCR σελ 41

Εικόνες 13-14 Πηκτώματα αγαρόζης για την επαλήθευση σωστής απομόνωσης DNA σελ 45

Εικόνες 15-16 Πηκτώματα πολυακρυλαμιδίου των δειγμάτων σελ 51-52

## ΠΙΝΑΚΕΣ

Πίνακας 1 Σύνολα παθογόνων και πολυμορφικών μεταλλάξεων σελ 27

Πίνακας 2 Εκκινητές και αλληλουχία που αναγνωρίζει σελ 42

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την κα. Αιμιλία Ζίφα για την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με ένα ιδιαίτερα ενδιαφέρον θέμα καθώς και την κατανόηση που έδειξε αλλά και την άψογη συνεργασία και καθοδήγησή της. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον υποψήφιο διδάκτορα κ. Θέμη Γιαννούλη όπως και τον υποψήφιο διδάκτορα κ. Αντρέα Τσιπουρλιάνο και τον κ. Κώστα Σταμάτη για την πολύτιμη βοήθειά τους και για την εκμάθηση των τεχνικών του εργαστηρίου Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας του κ.Ζήση Μαμούρη. Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους φοιτητές του εργαστηρίου για την βοήθεια τους και την οικογένεια μου για την υποστήριξη.

Τσάκος Χρήστος