

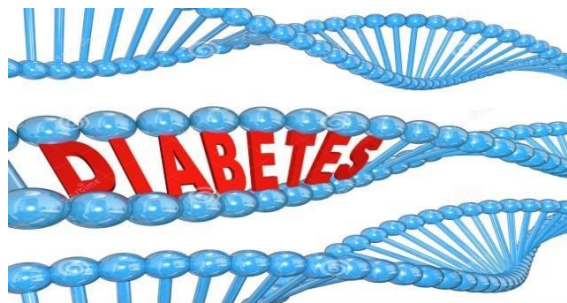


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

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

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

Συσχέτιση του διαβήτη με μεταλλάξεις του μιτοχονδριακού DNA



ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΠΑΠΑΦΙΓΚΟΥ ΖΩΗ

ΛΑΡΙΣΑ 2021

Συσχέτιση του διαβήτη με μεταλλάξεις του μιτοχονδριακού DNA

Correlation of diabetes with mutations in mitochondrial DNA

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

Καρπούζας Δημήτριος

Καθηγητής Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας & Βιοτεχνολογίας, Τμήμα Βιοχημείας
& Βιοτεχνολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Κοντού Μαρία

Επίκουρος Καθηγήτρια Πρωτεϊνικής Χημείας, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας
Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Πρόλογος

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Γενετικής, Συγκριτικής & Εξελικτικής Βιολογίας του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας στα πλαίσια του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών Βιοτεχνολογία - Ποιότητα Διατροφής & Περιβάλλοντος.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την Επίκουρο Καθηγήτρια Βιολογίας / Νευρολογίας κ. Αιμιλία Ζίφα για την ανάθεση της συγκεκριμένης εργασίας και την υπομονή της. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της εξεταστικής επιτροπής, τον Καθηγητή Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας & Βιοτεχνολογίας κ. Καρπούζα Δημήτριο και την Επίκουρο Καθηγήτρια Πρωτεϊνικής Χημείας κ. Κοντού Μαρία.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	6
ABSTRACT	7
1. ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΟ	8
1.1 ΔΟΜΗ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΟΥ	8
1.2 ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΚΑΙ ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΟΥ	10
1.3 ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑ	12
2. ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ mtDNA ΚΑΙ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΕΣ ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ	14
2.1 ΣΑΚΧΑΡΩΔΗΣ ΔΙΑΒΗΤΗΣ	17
2.1.1. ΣΑΚΧΑΡΩΔΗΣ ΔΙΑΒΗΤΗΣ ΤΥΠΟΥ I	18
2.1.2 ΣΑΚΧΑΡΩΔΗΣ ΔΙΑΒΗΤΗΣ ΤΥΠΟΥ II	18
2.1.3 ΑΛΛΟΙ ΕΙΔΙΚΟΙ ΤΥΠΟΙ ΔΙΑΒΗΤΗ	19
2.1.4 ΔΙΑΒΗΤΗΣ ΤΗΣ ΚΥΗΣΕΩΣ	19
2.2 ΕΡΕΥΝΑ ΚΑΙ ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΕΣ ΓΙΑ ΤΗ ΝΟΣΟ	20
2.3 ΔΙΑΒΗΤΗΣ ΚΑΙ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ	22
3. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	24
4. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	25
4.1 ΔΕΙΓΜΑ ΚΑΙ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA	25
4.2 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ	26
4.3 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΗ ΑΓΑΡΟΖΗΣ	30
4.4 ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥ ΜΟΝΟΚΛΩΝΙΚΗΣ ΔΙΑΜΟΡΦΩΣΗΣ (Single Strand Conformation Polymorphism-SSCP)	32
4.5 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΠΗΚΤΩΜΑΤΟΣ ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΙΟΥ	34
4.6 ΑΠΟΔΙΑΤΑΞΗ ΚΑΙ ΦΟΡΤΩΜΑ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	35
4.7 ΧΡΩΣΗ ΜΕ ΔΙΑΛΥΜΑ ΝΙΤΡΙΚΟΥ ΑΡΓΥΡΟΥ (Silver Staining)	35
4.8 ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ PCR	36
4.9 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ ΜΟΡΙΩΝ DNA (SEQUENCING)	37
5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	39
6. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	45
7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	46

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο σακχαρώδης διαβήτης είναι μια διαδεδομένη νόσος, η οποία έχει μελετηθεί αρκετά σε γενετική και μοριακή βάση. Μέχρι τώρα έχουν συσχετιστεί πολλές χρωμοσωμικές περιοχές και γονίδια, πυρηνικά και μιτοχονδριακά, με τη συγκεκριμένη ασθένεια. Ιδιαίτερα η μελέτη του μιτοχονδριακού γονιδιώματος παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον, καθώς μπορεί να εξηγήσει το μητρικό τρόπο κληρονομικότητας του διαβήτη. Επιπλέον, αποτελεί έγκυρο τρόπο πρόγνωσης της ασθένειας, ώστε να γίνει σωστή διάγνωση και θεραπεία, κυρίως στα νεαρά άτομα.

Στην παρούσα εργασία επιχειρήθηκε ανίχνευση των μεταλλάξεων σε ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη. Για την πραγματοποίηση της έρευνας χρησιμοποιήθηκαν δείγματα αίματος από ασθενείς με διαβήτη από τα οποία απομονώθηκε μιτοχονδριακό DNA, ενώ έγινε και σύγκριση με δείγματα αίματος υγιών ατόμων. Αρχικά απομονώσαμε το ολικό DNA των δειγμάτων. Έπειτα εφαρμόσαμε τη μέθοδο πολλαπλασιασμού της αλληλουχίας του DNA με τη μέθοδο PCR. Στη συνέχεια ελέγξαμε ποσοτικά και ποιοτικά τα αποτελέσματα που πήραμε από την PCR μέσω της ηλεκτροφόρισης των δειγμάτων σε πηκτή αγαρόζη. Μέσω της ανάλυσης πολυμορφισμού μονόκλωνης διαμόρφωσης (SSCP) επιτύχαμε αποδιάταξη της μονόκλωνης αλυσίδας έτσι ώστε να καταφέρουμε να ανιχνεύσουμε τις μεταλλάξεις στο γονίδιο. Η μέθοδος προσδιορισμού της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας μορίων DNA (Sequencing) μας έδωσε τα αποτελέσματα για τις μεταλλάξεις που υπήρχαν στα γονίδια.

Για να εξάγουμε ασφαλή συμπεράσματα για το ρόλο των γονιδίων του mtDNA στην εμφάνιση και κληρονομικότητα της νόσου του διαβήτη πρέπει να ολοκληρωθεί η έρευνα σε όλα τα tRNA γονίδια στους ασθενείς και να γίνει σύγκριση με μεγάλη ομάδα του φυσιολογικού πληθυσμού. Τέλος, είναι απαραίτητο να προσδιοριστεί η ακριβής επίδραση των μεταλλάξεων που έχουν βρεθεί, στη λειτουργία των μιτοχονδρίων.

ΛΕΞΕΙΣ-ΚΛΕΙΔΙΑ: ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ, DNA, ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ, mtDNA, ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑ, ΣΑΚΧΑΡΩΔΗΣ ΔΙΑΒΗΤΗΣ, tRNA, PCR, ΓΟΝΙΔΙΑ, ΑΣΘΕΝΕΙΑ

ABSTRACT

Diabetes mellitus is a widespread disease, which has been studied extensively on a genetic and molecular basis. So far, many chromosomal regions and genes, nuclear and mitochondrial, have been associated with this disease. In particular, the study of mitochondrial genome is of particular interest, as it may explain the maternal mode of inheritance of diabetes. In addition, it is a valid way to predict the disease, so that it can be correctly diagnosed and treated, especially in young people.

The present study sought to detect mutations in patients with diabetes mellitus. Blood samples were taken from patients with diabetes to isolate mitochondrial DNA, and a comparison was made with blood samples from healthy individuals. We first isolated the total DNA of the samples. Then we applied the method of multiplying the DNA sequence with the PCR method. Then we quantitatively and qualitatively checked the results we obtained from the PCR by electrophoresis of the samples in agarose gel. Through the monoclonal configuration polymorphism (SSCR) analysis, we succeeded in decomposing the monoclonal chain so that we could detect mutations in the gene. The method of determining the nucleotide sequence of DNA molecules (Sequencing) gave us the results for mutations in the genes.

In order to draw safe conclusions about the role of mtDNA genes in the onset and inheritance of diabetes, research should be completed in all tRNA genes in patients and compared with a large group of normal populations. Finally, it is necessary to determine the exact effect of the mutations that have been found on the function of the mitochondria.

KEY WORDS: BIOCHEMISTRY, DNA, MUTATIONS, mtDNA, MITOCHONDRIA, DIABETES, tRNA, PCR, GENES, DISEASE

1. 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.

1.1 ΔΟΜΗ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΟΥ

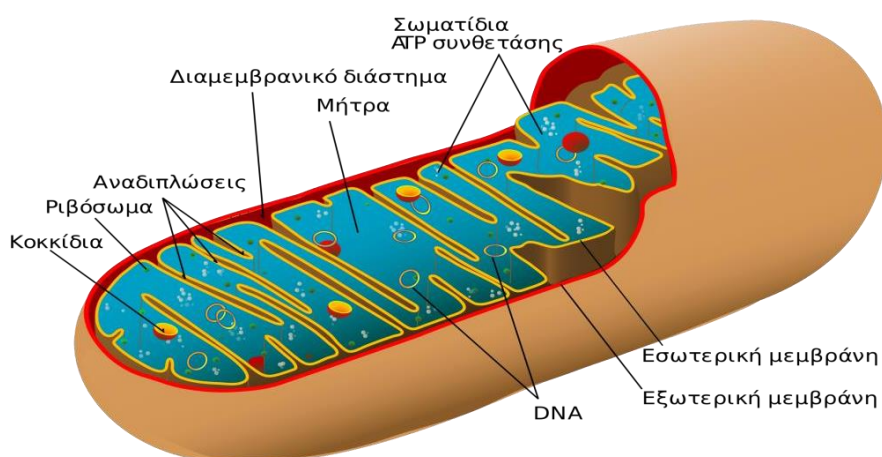
Τα μιτοχόνδρια έχουν επίμηκες, σφαιρικό ή ωοειδές σχήμα. Περιβάλλονται από δύο μεμβράνες, την εξωτερική και την εσωτερική. Η εξωτερική τους μεμβράνη είναι λεία, έχει κυλινδρικό σχήμα και δεν φέρει οξυσώματα. Περιέχει συγκεκριμένες πρωτεΐνες, τις πορίνες που επιτρέπουν την διέλευση ακόμα και μεγάλων μορίων.

Αντίθετα ορισμένα μόνο μόρια μπορούν να μεταφερθούν διαμέσου της εσωτερικής μεμβράνης. Η εσωτερική μεμβράνη είναι αναδιπλωμένη, σχηματίζει πολυάριθμες δισκοειδείς ή δακτυλιοειδείς πτυχώσεις και φέρει οξυσώματα που αποτελούνται από πολυενζυμικά συστήματα τα οποία και ευθύνονται για τη φωσφορυλίωση και την αναπνευστική αλυσίδα.

Ο ενδιάμεσος χώρος μεταξύ των δύο μεμβρανών ονομάζεται **διαμεμβρανικό διάστημα** ή **μεσομεμβρανικός χώρος** του μιτοχονδρίου. Ο χώρος αυτός πληρούται 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 ριβοσώματα 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 συνοδού HSC70**, η οποία αποτρέπει το πρώιμο δίπλωμα της πρωτεΐνης. Στη συνέχεια προσδένεται σε ένα πρωτεϊνικό σύμπλοκο της εξωτερικής μεμβράνης του μιτοχονδρίου (Tim Complex) και έπειτα στο εσωτερικό σύμπλοκο (Tim Complex). Μόλις φθάσει 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.



Εικόνα 1: Δομή Μιτοχονδρίου

1.2 ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΚΑΙ ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΟΥ

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 διασπών 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 εκκινεί μια κυκλική αλληλουχία αντιδράσεων, ο κύκλος του κιτρικού οξέος.

Ο κύκλος του κιτρικού οξέος

Το ακέτυλο-CoA που παράγεται τόσο από το Πυροσταφυλικό Οξύ 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 εκκινεί από το Κιτρικό Οξύ και καταλήγει επίσης στο κιτρικό οξύ.

Παράλληλα παράγονται τρία μόρια NADH, και ένα μόριο FADH₂ και GTP. Τα μόρια αυτά χρησιμοποιούνται για την παραγωγή ATP, του βασικού ενεργειακού νομίσματος του κυττάρου.

Κάθε μια από τις οκτώ αντιδράσεις καταλύεται από το δικό της ένζυμο. Μόλις ολοκληρωθεί ο κύκλος παράγεται Οξαλοξικό Οξύ για να μπορεί να επανεκινήσει 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 Crebs.

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.

Χημειωσμοτική σύζευξη

Το NADH και το FADH₂ λειτουργούν ως φορείς ηλεκτρονίων υψηλής ενέργειας. Αυτό πρακτικά σημαίνει ότι τείνουν να αποβάλλουν ένα ζεύγος δύο ηλεκτρονίων ώστε να μετατραπούν στην ανοιγμένη 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-c₁ 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 O₂ το οποίο προέρχεται από την αναπνοή. Τα ηλεκτρόνια ανάγουν το οξυγόνο και παράγεται ύδωρ 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 για 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. Η πρωτεΐνη αυτή ομοιάζει με ένα υδρόμυλο. 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 όπως το ύδωρ μετακινεί τις πτέρυγες του υδρόμυλου. Αυτή η

αλλαγή διαμόρφωσης παρέχει 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 επαναντλούν 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 που απαιτείται για την πραγματοποίηση σχεδόν κάθε βιολογικής αντίδρασης του κυττάρου που δεν είναι ενεργειακά ευνοϊκή.

1.3 ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑ

Τα μιτοχόνδρια διαθέτουν δικό τους γονιδίωμα, το οποίο υπάρχει σε πολλά αντίγραφα. Το DNA τους είναι κυκλικό και διαθέτει έναν ανεξάρτητο κύκλο αναπαραγωγής (ημιαυτόνομο). 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.

Το εξωπυρηνικό μιτοχονδριακό DNA (mtDNA), βρίσκεται στη μήτρα του μιτοχονδρίου και είναι ένα μικρό, κυκλικό, 'γυμνό' από ιστόνες, δίκλωνο μόριο DNA με μορφή υπερέλικας. Περιέχει κωδικές αλληλουχίες οι οποίες απαντούν μία μόνο φορά στο γονιδίωμα του. Χαρακτηριστική επίσης είναι η έλλειψη νουκλεοτιδικών αλληλουχιών μεταξύ των γονιδίων καθώς και η απουσία ιντρονίων, ψευδογονιδίων και ανασυνδυασμού σε σχέση με το πυρηνικό DNA.

Κάθε ανθρώπινο κύτταρο περικλείει εκατοντάδες μιτοχόνδρια, καθένα από τα οποία περιέχει από 2 έως 10 αντίγραφα του δίκλωνου, κυκλικού DNA των 16,569 ζευγών νουκλεοτιδίων. Αυτό το εξωπυρηνικό γενετικό υλικό κληρονομείται από τη μητέρα προς όλους τους απόγονους (αρσενικούς και θηλυκούς), αλλά μόνο η κόρη θα

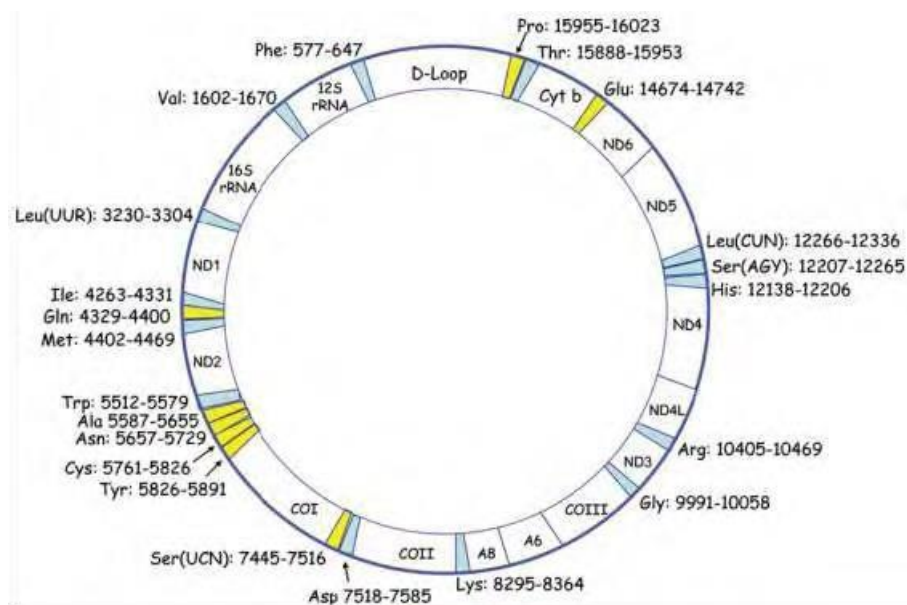
το μεταβιβάζει στους απογόνους της. Το μιτοχondριακό γονιδίωμα περιέχει 37 γονίδια.

Αυτά τα γονίδια κωδικοποιούν:

A) Δεκατρείς πρωτεΐνες που είναι όλες υπομονάδες των συμπλόκων της αναπνευστικής αλυσίδας και εμπλέκονται στη μεταφορά ηλεκτρονίων και στη σύνθεση του ATP (complex I, III και IV). Αυτά τα ολοένζυμα συμπληρώνονται με 70 περίπου υπομονάδες πυρηνικής προέλευσης, οι οποίες εισάγονται στα μιτοχόνδρια από το κυτταρόπλασμα για τη δημιουργία ενεργών συμπλόκων και τη σύνθεση του ATP. Οι υπομονάδες των συμπλόκων της αναπνευστικής αλυσίδας που κωδικοποιούνται από το μιτοχondριακό

B) Δύο rRNAs, ένα 12S και ένα 16S. Τα μιτοχondριακά ριβοσώματα σχηματίζονται από μια μικρή 28S υπομονάδα και μια μεγάλη 39S υπομονάδα. Η μικρή υπομονάδα αποτελείται από 12S RNA και 29 πρωτεΐνες πυρηνικής προέλευσης, ενώ η μεγάλη υπομονάδα αποτελείται από 16S RNA και 48 πρωτεΐνες πυρηνικής προέλευσης.

Γ) Είκοσι δύο μεταφορικά RNAs. Τα tRNAs είναι τα μόρια που μεταφέρουν αμινοξέα στο ριβόσωμα και μεσολαβούν για την ενσωμάτωση αυτών των αμινοξέων σε πολυπεπίδια με μεγάλη πιστότητα. Το μιτοχondριακό γονιδίωμα περιέχει ένα Tpa ειδικό για κάθε ένα από 18 αμινοξέα, δύο tRNAs ειδικά για τη σερίνη (tRNASer(AGY) και tRNASer(UCN) και 2 tRNAs ειδικά για την λευκίνη (tRNA^{Leu}(UUR) και tRNA^{Leu}(CUN)). Τα 22 tRNAs γονίδια σχηματίζουν την ελάχιστη ομάδα μετάφρασης όλων των απαραίτητων κωδικονίων που απαιτούνται στη βιοσύνθεση των δεκατριών πρωτεϊνών.



Εικόνα 2: Χάρτης του ανθρώπινου μιτοχondριακού γονιδιώματος. Το mtDNA περιλαμβάνει 37 γονίδια που κωδικοποιούν 13 πρωτεΐνες, 2 rRNAs και 22 tRNAs. Τα tRNAs είναι διάσπαρτα καταναμημένα ως μονάδες ή σχηματίζοντας ομάδες, μεταξύ των άλλων RNAs.

Άλλο ένα χαρακτηριστικό των μιτοχονδρίων είναι η υπερβολική ευαισθησία τους στη δημιουργία μεταλλάξεων και αλλαγών. Αυτό συμβαίνει εξαιτίας της υψηλής συχνότητας αντιγραφής του mtDNA και των λίγων μηχανισμών επιδιόρθωσης που διαθέτει σε σχέση με το πυρηνικό DNA. Το mtDNA υφίσταται 10-17 φορές υψηλότερο ρυθμό μετάλλαξης συγκριτικά με το πυρηνικό. Ταυτόχρονα είναι ευαίσθητο και σε βλάβες από εξωγενείς αιτίες. Όλα αυτά οδηγούν σε ανωμαλίες στη μιτοχονδριακή αναπνευστική αλυσίδα, οι οποίες αποτελούν ένα από τα πιο κοινά λάθη του μεταβολισμού και ανωμαλίες στα μονοπάτια της απόπτωσης.

2. ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ mtDNA ΚΑΙ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΕΣ ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ

Οι μεταλλάξεις διακρίνονται σε **παθογόνες μεταλλάξεις** και **πολυμορφισμούς**. Οι πολυμορφικές ουδέτερες μεταλλάξεις είναι απλές νουκλεοτιδικές υποκαταστάσεις και δεν επηρεάζουν τη δομή και τη λειτουργία του μιτοχονδριακού γονιδιώματος και χρησιμοποιούνται στην ανίχνευση της φυλογενετικής κατανομής μεγάλων πληθυσμιακών ομάδων. Οι παθογόνες μεταλλάξεις επηρεάζουν ιδιαίτερα συντηρημένα στην εξέλιξη νουκελοτίδια, σε αντίθεση με τις πολυμορφικές ουδέτερες μεταλλάξεις, οι οποίες επηρεάζουν μη συντηρημένα νουκλεοτίδια (Ingman et al., 2000). Από το 1988 όπου και χαρακτηρίστηκε η πρώτη παθογόνος μετάλλαξη του μιτοχονδριακού γονιδιώματος, πολλές παθογόνες μιτοχονδριακές μεταλλάξεις (υποκαταστάσεις, ελλείψεις, προσθήκες) έχουν ταυτοποιηθεί.

Οι μεταλλάξεις αυτές προκαλούν μιτοχονδριακές βλάβες και συγκεκριμένα επηρεάζουν τρεις θεμελιώδεις μηχανισμούς του μιτοχονδρίου: την οξειδωτική φωσφορυλίωση, την παραγωγή ελεύθερων ριζών και τη ρύθμιση της απόπτωσης και έχουν σχετισθεί με την εκδήλωση εκφυλιστικών ασθενειών, τη γήρανση και τον καρκίνο. Οι μιτοχονδριακές ασθένειες χαρακτηρίζονται από έναν ασυνήθιστο συνδυασμό κλινικών προβλημάτων σε όργανα και ιστούς με υψηλές απαιτήσεις ενέργειας όπως η καρδιά, ο εγκέφαλος, οι μύες τα νεφρά και το ενδοκρινικό σύστημα. Έρευνες που έχουν γίνει σε άτομα με μιτοχονδριακές ασθένειες δείχνουν την πολυπλοκότητα αυτών των ασθενειών. Σε ορισμένες μιτοχονδριακές ασθένειες παρατηρήθηκε μια συνεργασία μεταλλάξεων σε μιτοχονδριακά και πυρηνικά γονίδια, η αδρανοποίηση των οποίων είτε αναστέλλει την δράση των συμπλόκων της αναπνευστικής αλυσίδας και κατ' επέκταση την παραγωγή ενέργειας, ή διακόπτει τη βιογένεση των μιτοχονδρίων και του μιτοχονδριακού DNA (Douglas C.Wallace, 1999).

Μεταλλάξεις έχουν βρεθεί σε όλο το μήκος του μιτοχονδριακού γενετικού υλικού, σε κωδικές και μη κωδικές περιοχές. Στις κωδικές περιοχές του mtDNA που κωδικοποιούν πρωτεΐνες της αναπνευστικής αλυσίδας, έχουν βρεθεί συνολικά 214 παθογόνες μεταλλάξεις και στα 13 γονίδια (mitomap). Στα μιτοχονδριακά rRNA γονίδια έχουν βρεθεί συνολικά δεκαέξι παθογόνες μεταλλάξεις. Οι δεκατρείς από αυτές αφορούν ασθένειες που σχετίζονται με κώφωση και απώλεια ακοής και βρέθηκαν στο 12S rRNA. Τρεις μεταλλάξεις έχουν βρεθεί στο 16S rRNA, η C2835T, η οποία έχει σχετισθεί με σύνδρομο Rett, η C3039G η οποία αναφέρθηκε σε μια

μελέτη για την ασθένεια MELAS και η G3196A, που σχετίζεται με τη νόσο Alzheimer και Parkinson.

Σήμερα το μεγαλύτερο ενδιαφέρον των επιστημόνων συγκεντρώνουν τα mt-tRNAs εξαιτίας της ανακάλυψης μεγάλου αριθμού σημειακών μεταλλάξεων στα γονίδια που τα κωδικοποιούν και της συσχέτισης αυτών των μεταλλάξεων με νευρομυϊκές και νευροεκφυλιστικές διαταραχές. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι στα tRNA γονίδια του μιτοχονδρίου, αν και αποτελούν μόλις το 10% του μιτοχονδριακού γονιδιώματος, συγκεντρώνουν πάνω από τις μισές μεταλλάξεις του mtDNA που έχουν χαρακτηριστεί ως παθογόνες και σχετίζονται με ασθένεια. Μέχρι σήμερα, έχουν εντοπιστεί και χαρακτηριστεί 139 παθογόνες μεταλλάξεις στα 21 από τα 22 tRNA γονίδια (Πίνακας 1). Η μόνη εξαίρεση μέχρι στιγμής είναι το γονίδιο tRNAArg. Αξίζει επίσης να αναφερθεί ότι μόνο τρία tRNA γονίδια (tRNALeu(UUR), tRNALys, tRNAIle) φέρουν το 50% όλων των γνωστών παθογόνων μεταλλάξεων στον άνθρωπο.

Οι περισσότερες παθογόνες μεταλλάξεις έχουν βρεθεί στο γονίδιο tRNALeu(UUR). Αν και η λευκίνη είναι το πιο συχνά χρησιμοποιούμενο αμινοξύ στα ανθρώπινα μιτοχόνδρια (16%), το κωδικόνιο UUR χρησιμοποιείται λιγότερο συχνά (12%) από το κωδικόνιο CUN (88%). Αυτό ίσως εξηγεί το γεγονός ότι οι μεταλλάξεις στο γονίδιο tRNALeu(UUR) φαίνεται να είναι λιγότερο θανατηφόρες και πιο κοινές (Nakamura et al., 2000). Οι περισσότερες μεταλλάξεις των tRNA γονιδίων είναι μεταπτώσεις (αλλαγές βάσεων από πουρίνες σε πουρίνες ή από πυριμιδίνες σε πυριμιδίνες) και έχουν ομοιόμορφη κατανομή στη δομή ενός tRNA (τόσο στους βραχίονες όσο και στις θηλιές).

Οι μεταλλάξεις μπορεί να προκαλέσουν λάθος στο ενδομοριακό ζευγάρι των βάσεων που συμβαίνει στους βραχίονες, κυρίως εμφανίζονται με τη μορφή C-A ή G-U. Υπάρχει σχεδόν πλήρης απουσία μεταλλάξεων στην περιοχή του αντικωδικονίου, με μόνο τρεις εξαιρέσεις, την T12298C πολυμορφική μετάλλαξη στο γονίδιο tRNALeu(CUN), την G15990A παθογόνο μετάλλαξη στο tRNAPro γονίδιο και την G611A παθογόνο μετάλλαξη στο tRNAPhe γονίδιο. Γνωρίζοντας τον θεμελιώδη ρόλο του αντικωδικονίου είναι κατανοητό γιατί προστατεύεται τόσο πολύ, αφού οι περισσότερες αλλαγές του θα ήταν θανατηφόρες.

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

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

Παρά τον μεγάλο αριθμό των μεταλλάξεων στα tRNA γονίδια που έχουν σχετισθεί με ασθένειες, μόνο το 20% έχει αποδειχθεί χωρίς αμφιβολία ότι προκαλεί νόσο. Το 77% των μεταλλάξεων αναφέρονται στο *mitomap* ως πιθανά παθογόνες, ενώ το 4% αυτών, δεν είναι ξεκάθαρο αν ανήκουν στις παθογόνες μεταλλάξεις ή στους πολυμορφισμούς. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι οι μεταλλάξεις του μιτοχονδριακού DNA μπορούν να δημιουργούνται αυθόρμητα σε μεγάλη συχνότητα και οι περισσότερες αλλαγές του γονιδιώματος είναι ουδέτεροι πολυμορφισμοί χωρίς κλινική σημασία. Γι' αυτό έχουν δημιουργηθεί ορισμένοι κανόνες σύμφωνα με τους οποίους αποδεικνύεται η παθογένεια μίας νέας μετάλλαξης του μιτοχονδριακού DNA.

Πρώτον, η μετάλλαξη δεν θα πρέπει να είναι παρούσα σε υγιή άτομα του ίδιου εθνικού υπόβαθρου. Δεύτερον, η μετάλλαξη θα πρέπει να δημιουργεί αλλαγές σε ένα τμήμα του μιτοχονδριακού DNA το οποίο είναι συντηρητικό στην εξέλιξη και κατά συνέπεια σημαντικό λειτουργικά.

Τρίτον, θα πρέπει να δημιουργεί μία ή περισσότερες βλάβες στην ενζυμική αλυσίδα της αναπνοής ή βλάβες στη σύνθεση των μιτοχονδριακών πρωτεϊνών.

Τέταρτον, θα πρέπει να υπάρχει συσχέτιση μεταξύ του βαθμού της ετεροπλασμίας και της βαρύτητας της κλινικής εικόνας, καθώς και συσχέτιση μεταξύ του βαθμού της ετεροπλασμίας και της κυτταρικής παθολογίας (DiMauro et al., 2005). Το τελευταίο κριτήριο πάντως, δεν είναι τόσο ισχυρό, αφού ο συσχετισμός δεν είναι πάντα τόσο αντιπροσωπευτικός. Επίσης, παρατηρούνται αλληλεπιδράσεις των πυρηνικών γονιδίων με περιβαλλοντικούς παράγοντες οι οποίοι επηρεάζουν τη βαρύτητα της νόσου.

2.1 ΣΑΚΧΑΡΩΔΗΣ ΔΙΑΒΗΤΗΣ

Η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία παίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεση ποικίλων ασθενειών, οι οποίες σχετίζονται με δυσλειτουργίες του κυτταρικού μεταβολισμού και των μονοπατιών επιβίωσης και απόπτωσης. Τέτοιες ασθένειες είναι οι νευροεκφυλιστικές, διάφορες περιπτώσεις καρκίνου και ο διαβήτης. Οι δράσεις των κυτοκινών και το στρες προκαλούν απόπτωση των κυττάρων και στην περίπτωση του διαβήτη, απόπτωση των β-κυττάρων του παγκρέατος. Επιπλέον διαταράσσεται η φυσιολογική παραγωγή και έκκριση ινσουλίνης (Szabadkai et al. 2009). Η σωστή λειτουργία των μιτοχονδρίων είναι απαραίτητη για τη φυσιολογική παραγωγή και έκκριση ινσουλίνης από τα παγκρεατικά κύτταρα. Βλάβες στο mtDNA που κληρονομούνται μητρικά και διαταράσσουν τη φυσιολογική μιτοχονδριακή λειτουργία, οδηγούν στην εμφάνιση διαβήτη (Lowell et al. 2005).

Ο σακχαρώδης διαβήτης είναι μια χρόνια νόσος που χαρακτηρίζεται από διαταραχή του μεταβολισμού της γλυκόζης και των υπόλοιπων πηγών ενέργειας, καθώς και από την εμφάνιση αγγειακών και νευρολογικών επιπλοκών και οφείλεται στην έλλειψη, ή ανεπάρκεια ινσουλίνης. Η ινσουλίνη είναι μια ορμόνη ζωτικής σημασίας που εκκρίνεται από τα β-κύτταρα του παγκρέατος και δρα σε υποδοχείς της στο ήπαρ, όπου επάγει την πρόσληψη γλυκόζης. Η διατήρηση των επιπέδων της γλυκόζης απαιτεί τη δράση ενός ενδογενούς ανιχνευτή γλυκόζης στα παγκρεατικά β-κύτταρα, ο οποίος πυροδοτεί την αυξημένη έκκριση ινσουλίνης, όταν χρειάζεται.

Η διατήρηση της ομοιόστασης της γλυκόζης στον ανθρώπινο οργανισμό αποτελεί ισορροπία ανάμεσα στην εμφάνιση και την απομάκρυνση της γλυκόζης. Η εμφάνιση της γλυκόζης στην κυκλοφορία καθορίζεται από την πρόσληψη τροφής, τη φύση των θρεπτικών συστατικών, τις παραμέτρους πέψης και την παραγωγή γλυκόζης από το ήπαρ. Όταν στο ανθρώπινο σώμα ανιχνεύονται σημαντικές αποκλίσεις από τη φυσιολογικά επίπεδα συγκέντρωσης της γλυκόζης, ρυθμίζεται η έκκριση ινσουλίνης. Βλάβες στη διαδικασία παγκρεατικής έκκρισης ινσουλίνης και η δράση της ινσουλίνης στο ήπαρ και τους περιφερικούς ιστούς, οδηγούν στην εμφάνιση διαβήτη. Τα ηπατικά κύτταρα διαθέτουν υποδοχέα ινσουλίνης.

Ο διαβήτης ανήκει σε μια κατηγορία διαταραχών, στις οποίες ενέχονται διαφορετικοί παθογενετικοί μηχανισμοί, με κοινό παρονομαστή την χρόνια υπεργλυκαιμία (Maassen et al. 2004). Η έλλειψη ινσουλίνης έχει βασικό ρόλο στις μεταβολικές διαταραχές που σχετίζονται με το διαβήτη και η υπεργλυκαιμία με τη σειρά της, έχει βασικό ρόλο στην εμφάνιση των επιπλοκών της νόσου. Ο

σακχαρώδης διαβήτης σχετίζεται με βλάβες στα μάτια, στα νεφρά, στα αιμοφόρα αγγεία, στο κεντρικό νευρικό σύστημα και στην ικανότητα μάθησης και μνήμης. Επιπλέον, στους διαβητικούς παράγονται ελεύθερες ρίζες, οι οποίες προκαλούν σημαντική βλάβη στο DNA των κυττάρων τους.

2.1.1. ΣΑΚΧΑΡΩΔΗΣ ΔΙΑΒΗΤΗΣ ΤΥΠΟΥ I

Ο διαβήτης τύπου I αντιστοιχεί στο 5-10% των διαβητικών ασθενών. Η υπεργλυκαιμία είναι χαρακτηριστικό στοιχείο του διαβήτη τύπου I και η εμφάνισή της οφείλεται στην αυτοάνοση καταστροφή που υφίστανται τα παγκρεατικά β-κύτταρα. Οι ασθενείς με τη διαταραχή αυτή χαρακτηρίζονται από πλήρη έλλειψη ινσουλίνης και υφίστανται ινσουλινοθεραπεία εφ' όρου ζωής αμέσως μετά τη διάγνωση της ασθένειας: Ο διαβήτης τύπου I αποκαλείται και διαβήτης νεανικού τύπου, οφείλεται σε διαταραχή του ανοσολογικού συστήματος και μπορεί να εκδηλωθεί σε οποιαδήποτε ηλικία, αλλά παρουσιάζεται κυρίως σε παιδιά και νεαρούς ενήλικες. Συνήθως, είναι σοβαρότερος από το διαβήτη τύπου II.

2.1.2 ΣΑΚΧΑΡΩΔΗΣ ΔΙΑΒΗΤΗΣ ΤΥΠΟΥ II

Ο διαβήτης τύπου II είναι η συχνότερη και πιο ετερογενής μορφή της νόσου και αντιστοιχεί στο 80-95% του διαβητικού πληθυσμού. Οι ασθενείς έχουν μια ελαττωμένη ενδογενή ικανότητα έκκρισης ινσουλίνης και δεν εξαρτώνται από την ινσουλίνη για την άμεση επιβίωση. Παρ' όλα αυτά, μπορεί να χρειάζονται ινσουλινοθεραπεία για να ελέγξουν την υπεργλυκαιμία. Ο διαβήτης τύπου II αναπτύσσεται συνήθως αργά στην ενηλικίωση και οφείλεται σε ποικίλους περιβαλλοντικούς και γενετικούς παράγοντες (Cormio et al. 2009). Η ανθεκτικότητα στην ινσουλίνη αρχίζει να αναπτύσσεται 10-20 χρόνια πριν την έναρξη της νόσου. Η εξέλιξη του είναι προοδευτική και μπορεί μερικές φορές να αντιμετωπιστεί με τη διατροφή και την άσκηση.

Παρατηρείται απόπτωση των β-κυττάρων του παγκρέατος, για την οποία κύριο ρόλο παίζουν τα μιτοχόνδρια, με την ενεργοποίηση της κασπάσης 3 και την εξαγωγή του κυτοχρώματος C. Ο διαβήτης τύπου II χαρακτηριστικά εμφανίζεται μετά την ηλικία των 40 ετών και είναι πολύ πιο συχνός σε παχύσαρκα άτομα με έναν ή δύο διαβητικούς γονείς. Αποτελεί κύρια αιτία τύφλωσης, νεφροπάθειας και χάσιμο σωματικού άκρου.

2.1.3 ΑΛΛΟΙ ΕΙΔΙΚΟΙ ΤΥΠΟΙ ΔΙΑΒΗΤΗ

Πέρα από τις δύο βασικές κατηγορίες διαβήτη (τύπου I και II), υπάρχουν και διάφορα σύνδρομα με διαβήτη, λόγω κάποιας ειδικής νόσου, λήψης φαρμάκου ή άλλης κατάστασης. Στις περισσότερες περιπτώσεις ο σακχαρώδης διαβήτης μπορεί να ταξινομηθεί με κλινικά κριτήρια. Μερικοί ασθενείς μπορούν να εμφανίσουν χαρακτηριστικά κοινά τόσο του τύπου I, όσο και του τύπου II διαβήτη. Είναι συνήθως μη παχύσαρκα άτομα και έχουν μειωμένη έκκριση ινσουλίνης. Πολλοί αρχικά ανταποκρίνονται στα αντιδιαβητικά φάρμακα, αλλά με το χρόνο απαιτούν ινσουλίνη.

2.1.4 ΔΙΑΒΗΤΗΣ ΤΗΣ ΚΥΗΣΕΩΣ

Ο σακχαρώδης διαβήτης της κύησης είναι μια πάθηση που αναπτύσσεται κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης όταν η μητέρα έχει υπερβολικά μεγάλα ποσοστά σακχάρου στο αίμα της. Συνήθως θεραπεύεται από μόνος του αφότου γεννηθεί το μωρό, αντίθετα από άλλους τύπους διαβήτη που δεν θεραπεύονται ποτέ από μόνους (Lowell et al. 2005).

Το γυναικείο σώμα πρέπει να παράγει περισσότερη ινσουλίνη αφού κατά την εγκυμοσύνη η δραστηριότητά της ελαττώνεται, ειδικά από το μέσο της εγκυμοσύνης και μετά. Εάν το σώμα δεν μπορεί να το καταφέρει αυτό, προκύπτει σακχαρώδης διαβήτης της κύησης. Ο διαβήτης της κύησης εμφανίζεται περίπου στο 2% των κυήσεων και συνήθως εκδηλώνεται στο δεύτερο ή στο τρίτο τρίμηνο κατά το χρονικό διάστημα όπου οι ανταγωνιστικές της ινσουλίνης ορμόνες που σχετίζονται με την κύηση, φτάσουν στο υψηλότερο σημείο τους. Μετά τον τοκετό, η ανοχή στη γλυκόζη συνήθως επιστρέφει στα φυσιολογικά επίπεδα. Εντούτοις, μέσα σε 5-10 χρόνια, το 30-40% αναπτύσσουν διαβήτη τύπου II. Κάποιες φορές η κύηση μπορεί να επιταχύνει την εμφάνιση του διαβήτη τύπου I.

2.2 ΕΡΕΥΝΑ ΚΑΙ ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΕΣ ΓΙΑ ΤΗ ΝΟΣΟ

Πάνω από 171 εκατομμύρια άνθρωποι πάσχουν από τον σακχαρώδη διαβήτη τύπου II σε όλον τον κόσμο και αναμένεται ο αριθμός να διπλασιαστεί ως το 2030, ενώ την τελευταία δεκαετία η αύξηση ήταν 25%. Ανάλογα ισχύουν και στη χώρα μας. Το κόστος αντιμετώπισης της εν λόγω ασθένειας, που είναι έβδομη κατά σειρά αιτία θανάτου, εκτιμάται ότι προσεγγίζει το 13%-14% του συνολικού ποσού για την υγεία, με διαγνωσμένους διαβητικούς περίπου 8%.

Στον τύπο I τα β κύτταρα του παγκρέατος δεν παράγουν (αρκετή) ινσουλίνη και χωρίς εξωγενή χορήγησή της επέρχεται ο Θάνατος. Στον τύπο αυτόν αναπτύσσονται αντισώματα και αυτοανοσία στην παγκρεατική ινσουλίνη. Γενετικές μελέτες διδύμων έδειξαν ότι η σύμπτωση να προκληθεί ασθένεια και στα δύο είναι ελάχιστη, γι' αυτό ο κληρονομικός παράγοντας θεωρείται μικρός. Η πάθηση αποδίδεται σε περιβαλλοντικούς παράγοντες, πιθανόν σε αντιγόνα ιών.

Ο τύπος II είναι περίπου 10 φορές πιο συχνός από τον τύπο I, π.χ., στην Αμερική και αντιπροσωπεύει γενικά το 90%-95% των διαβητικών. Η πάθηση αντανάκλα την αδυναμία μεταβολισμού των υδατανθράκων και αν δεν ελεγχθεί μπορεί να προκαλέσει πολλές οργανικές βλάβες, όπως τύφλωση, νεφρική ανεπάρκεια, ακρωτηριασμούς κτλ. Η ελαττωματική αντίδραση της ινσουλίνης με τα όργανα-στόχους (μυς, συκώτι, λιπώδης ιστός) και η συνακόλουθη ανεπαρκής απορρόφησή της, γνωστή και ως αντίσταση στην ινσουλίνη, οδηγεί τον οργανισμό σε υψηλότερες απαιτήσεις ινσουλίνης, με τα προαναφερθέντα κύτταρα να πιέζονται για τη σύνθεση μεγαλύτερης ποσότητας λόγω της εξασθενημένης ανοχής του οργανισμού στη γλυκόζη και τελικά την κατάρρευσή τους.

Ο τύπος II δεν υπήρχε ουσιαστικά πριν από 100 χρόνια. είναι προϊόν του σύγχρονου πολιτισμού μας, περιβαλλοντικής πρόκλησης δηλαδή συνδυαστικά με προϋπάρχουσα γενετική προδιάθεση που ποικίλλει μεταξύ εθνικών ομάδων - με τους ιθαγενείς Αμερικανούς και Ισπανούς, π.χ., να δείχνουν σαφή προδιάθεση και τους Καυκάσιους, Μελανήσιους και Εσκιμώους μικρότερη. Τα υψηλά ποσοστά διαβητικών ανά τον κόσμο και τα συνακόλουθα κόστη έχουν φέρει την αναγκαιότητα της γενετικής διαλεύκανσης της ασθένειας και των περιβαλλοντικών παραμέτρων με τις οποίες φαίνεται να συνδέεται (διατροφή, παχυσαρκία, ελλιπής σωματική άσκηση, στρες) σε πρώτη γραμμή.

Στο γενετικό επίπεδο λίγα ήταν γνωστά πριν από ελάχιστα χρόνια. Οι πρώτες μελέτες κλασικής προσέγγισης βασίζονταν στην αξιοποίηση γενεαλογικών δέντρων. Τα αρχικά συμπεράσματα οδήγησαν στον γενετικό προσδιορισμό της ασθένειας ως μεντελικού αυτοσωματικού χαρακτήρα, μη συνδεδεμένου δηλαδή με το φύλο. Ωστόσο τα πράγματα δεν είναι τόσο απλά καθώς ο περιβαλλοντικός επηρεασμός και το γενετικό υπόβαθρο έχουν σημαντικό ρόλο. Γι' αυτό οι προσπάθειες πέρασαν στη μελέτη αδελφών και διδύμων στα οποία συνεκδηλώνεται σε ποσοστό 80%-90%, σε

μελέτες σύνδεσης με ανιχνεύσιμους μοριακούς μάρτυρες και τελευταία σε πιο συγκεκριμένες γενετικές μοριακές αναλύσεις.

Στο πλαίσιο αυτό έχουν ενοχοποιηθεί πολλά υποψήφια γονίδια πρόκλησης διαβήτη II, κατάσταση που υποδηλώνει ότι η ασθένεια είναι πολυπαραγοντική συμβάλλουν δηλαδή πολλά γονίδια , χωρίς να έχει αποκαλυφθεί κάποιο κυρίαρχο γονίδιο. Ανάλυση 30 γονιδιωμάτων ενοχοποιεί, λ.χ., πάνω από δύο δεκάδες γονίδια, ευρισκόμενα σε διάφορα χρωμοσώματα (1, 3, 8,12,17, 20, ενώ αν συνυπολογιστούν και γονίδια που συνδέουν την παχυσαρκία με τον διαβήτη II, ο αριθμός αυξάνεται και άλλο. Τον Σεπτέμβριο του 2005 δημοσιεύθηκαν πιο ενδιαφέροντα στοιχεία που συγκεκριμενοποιούν ως αιτιατό παράγοντα τη δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων, οργανιδίων του κυττάρου τα οποία παράγουν ενέργεια . η σοβαρή απόκλιση στην παραγωγή ενέργειας φαίνεται να είναι το κλειδί του προβλήματος που οδηγεί στο σύνδρομο της αντίστασης στην ινσουλίνη και συνακόλουθα στον διαβήτη II. Φυσιολογικά μιτοχόνδρια αντιδρούν στην ινσουλίνη και αυξάνουν τη σύνθεση ενεργειακών μορίων (ATP) κατά 90% και μόνο κατά 50% σε απογόνους διαβητικών με αντίσταση στην ινσουλίνη. Η αρχική μιτοχονδριακή λοιπόν δυσλειτουργία φαίνεται να είναι ένα σήμα για όσους θα εκδηλώσουν αργότερα διαβήτη II.

Πιο εξειδικευμένη προσέγγιση του προβλήματος, δημοσιευμένη τον Αύγουστο του 2005 στο περιοδικό «Nature Genetics» από ερευνητές του Ινστιτούτου Pasteur στη Γαλλία σε συνεργασία με Αμερικανούς, ανέδειξε τη σημασία της παραλλαγής μιας κοινής πρωτεΐνης που φαίνεται να παίζει πρωταρχικό ρόλο στον διαβήτη II. Χαρακτηριστικά του συνδρόμου αντίστασης στην ινσουλίνη που επηρεάζει 50 εκατομμύρια Αμερικανούς και άλλους τόσους Ευρωπαίους, μορφοποιώντας το λεγόμενο μεταβολικό σύνδρομο που συνδέεται με τη στεφανιαία νόσο, την υψηλή πίεση, την υψηλή χοληστερόλη και υψηλά τριγλυκερίδια από αυτό πάσχει ένας στους τέσσερις Έλληνες και εκτιμάται ότι το 2030 η αναλογία θα είναι 1 προς 2.

Τέτοιες βασικές ερευνητικές προσεγγίσεις είναι αναμφίβολα πολύ σημαντικές καθώς το πρόβλημα του διαβήτη II μεγεθύνεται πολύ γοργά και είναι αναγκαία πιο αποτελεσματικά φάρμακα που θα σταματούν ή θα αναστρέφουν την πορεία της ασθένειας. (κ. Σταμάτης Ν. Αλαχιώτης, Καθηγητής της Γενετικής και Πρύτανης του Πανεπιστημίου Πατρών)

2.3 ΔΙΑΒΗΤΗΣ ΚΑΙ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ

Τα μιτοχόνδρια εκτελούν μια ποικιλία βιοενεργειακών λειτουργιών οι οποίες είναι υποχρεωτικές για τη ρύθμιση της ενδοκυττάριας παραγωγής ενέργειας. Η αλλοίωση των βιοενεργειακών δραστηριοτήτων ενδέχεται να έχει δραματικές συνέπειες για την κυτταρική λειτουργία, μέσω της διαταραχής του ενεργειακού φορτίου και της ισορροπίας του κυττάρου.

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

Η πιο σημαντική λειτουργία του μιτοχονδρίου, όπως προαναφέρθηκε, είναι η παραγωγή ενέργειας στην μορφή τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP), μέσω της λειτουργίας της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων (ETC) και της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Ο κύριος μηχανισμός που οδηγεί στην οξειδωτική φωσφορυλίωση είναι ο εξής: ηλεκτρόνια υψηλού δυναμικού (e^-) που προέρχονται από το NADH και FADH₂ (Duchen, 2004), κινούνται κατά μήκος της αναπνευστικής αλυσίδας η οποία αποτελείται από τέσσερα πρωτεϊνικά σύμπλοκα (Complex I - IV) και δύο επιπλέον μεταφορείς ηλεκτρονίων, το συνένζυμο Q (ουβικινόνη), ένα μικρό μόριο που κινείται ελεύθερα στο εσωτερικό της μιτοχονδριακής μεμβράνης και το κυτόχρωμα c (Cyt c), που βρίσκεται στο διαμεμβρανικό χώρο και συνδέεται με την εσωτερική μεμβράνη. Μέρος της ενέργειας που απελευθερώνεται κατά τη διαδικασία αυτή χρησιμοποιείται από την αντλία πρωτονίων η οποία μεταφέρει πρωτόνια (H^+) από τη μήτρα στο διαμεμβρανικό χώρο. Στην εσωτερική μεμβράνη σχηματίζεται ηλεκτροχημική βαθμίδωση ηλεκτρονίων. Τα πρωτόνια τείνουν να επιστρέφουν στη μήτρα του μιτοχονδρίου ώστε να αποκατασταθεί η ισορροπία στη συγκέντρωση των ηλεκτρονίων και στις πλευρές της μεμβράνης. Η επιστροφή επιτυγχάνεται μέσω διαμεμβρανικού πρωτεϊνικού συμπλόκου - ATP συνθετάση - και η ενέργεια που παράγεται χρησιμοποιείται για την σύνθεση ATP από ADP και ανόργανου φωσφόρου (P_i).

Στην περίπτωση του διαβήτη παρατηρείται αύξηση των δοτών ηλεκτρονίων (NADH και FADH₂), που επάγεται από την υπεργλυκαιμία, με αποτέλεσμα την αύξηση της ροής ηλεκτρονίων μέσα από τη μιτοχονδριακή αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων. Η αναλογία ATP/ADP αυξάνεται και παρατηρείται υπερπόλωση της

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

3. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας είναι να ανιχνεύσουμε την ύπαρξη μεταλλάξεων στο μιτοχονδριακό γονίδιο tRNA^{Val} σε μια ομάδα ασθενών που πάσχουν από διαβήτη. Η έρευνα επικεντρώνεται στο μιτοχονδριακό γονίδιο διότι είναι εξαιρετικά πολυμορφικό μόριο και χρησιμοποιείται ευρύτατα σε φυλογενετικές μελέτες. Τα τελευταία χρόνια η ανίχνευση μεγάλου αριθμού μεταλλάξεων σε μιτοχονδριακά tRNAs και η πιθανή συσχέτιση αυτών των μεταλλάξεων με τις διαταραχές που παρουσιάζονται στον ανθρώπινο οργανισμό έχει οδηγήσει το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας στο μιτοχονδριακό DNA.

Οι φαινοτυπικές εκφράσεις των μιτοχονδριακών μεταλλάξεων περιλαμβάνουν κυρίως δυσλειτουργίες σε όργανα και ιστούς που εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από την μιτοχονδριακή λειτουργία όπως είναι η καρδιά, ο εγκέφαλος και οι μύες.

4. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

4.1 ΔΕΙΓΜΑ ΚΑΙ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA

Τα δείγματα αίματος που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία παραχωρήθηκαν από το Περιφερειακό Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας. Συλλέχθηκαν 16 δείγματα αίματος από ασθενείς με διαβήτη, τα οποία αποθηκεύτηκαν στους -20 °C μέχρι την έναρξη του πειράματος.

ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΟΛΙΚΟΥ DNA

Για την απομόνωση ολικού DNA από αίμα εφαρμόστηκε η παρακάτω διαδικασία :

- Προσθέτουμε σε σωλήνες eppendorf των 2 ml, 0,5 ml αίμα και 1 ml SSC (Standard Saline Citrate) 1X. Ακολουθεί έντονη ανάδευση και φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 3 λεπτά.
- Απομακρύνουμε το υπερκείμενο, προσθέτουμε 1 ml SSC 1X, ακολουθεί έντονη ανάδευση και φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 1 λεπτό.
- Απομακρύνουμε το υπερκείμενο, προσθέτουμε 0,5 ml NaOAc 0,2 M ακολουθεί έντονη ανάδευση, προσθέτουμε 50 μl SDS (Θειικό δωδεκυλικό νάτριο) 5% και 5μl proteinase K (20 ng/μl). Το SDS 5% είναι ανιοντικό απορρυπαντικό που καταστρέφει όλες σχεδόν τις μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις, προκαλεί ρήξη των πυρηνικών και των κυτταρικών μεμβρανών και διαλυματοποιεί τις πρωτεΐνες. Η πρωτεΐναση K είναι πρωτεολυτικό ένζυμο το οποίο καταστρέφει τις DNAάσες, βοηθώντας έτσι στην απελευθέρωση του DNA. Βάζουμε τα δείγματα για επώαση στο φούρνο, στους 55 °C, για 1 ώρα.
- Προσθέτουμε 0,5 ml φαινόλη και 0,5 ml χλωροφόρμιο. Η φαινόλη και το χλωροφόρμιο αποτελούν οργανικούς διαλύτες για την εκχύλιση του μείγματος και την απομάκρυνση των πρωτεϊνών και του RNA. Συγκεκριμένα, η φαινόλη καθαρίζει το DNA από τις πρωτεΐνες. Το χλωροφόρμιο απομακρύνει υπολείμματα φαινόλης. Ακολουθεί έντονη ανάδευση και φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 7 λεπτά.
- Μεταφέρουμε το υπερκείμενο σε νέα eppendorf των 2 ml, προσθέτουμε 1 ml χλωροφόρμιο και ακολουθεί ελαφρά ανακίνηση και φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 10 λεπτά.
- Μεταφέρουμε το υπερκείμενο σε νέα eppendorf των 2 ml και προσθέτουμε 1 ml ισοπροπανόλη. Η ισοπροπανόλη συμβάλλει στην κατακρήμνιση του DNA. Βάζουμε τα δείγματα στους -20 °C για 15 λεπτά. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 20 λεπτά.
- Απομακρύνουμε το υπερκείμενο, προσθέτουμε 1 ml παγωμένη αιθανόλη 70% για έκπλυση του ιζήματος. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 10 λεπτά.
- Απομακρύνουμε το υπερκείμενο και τοποθετούμε τα δείγματα στο φούρνο, στους 37 °C, για ξήρανση.
- Προσθέτουμε 100 μl ddH₂O, ώστε να επαναδιαλυθεί το DNA που βρίσκεται υπό τη μορφή ιζήματος.

- Τα δείγματα διατηρούνται στους 4 °C για 1-2 ημέρες, έως ότου ολοκληρωθεί η επαναδιάλυση του DNA και έπειτα φυλάσσονται στους -20 °C.
- Μετά την ολοκλήρωση της απομόνωσης του DNA, ελέγχονται 5 μl διαλύματος DNA από κάθε δείγμα, με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης συγκέντρωσης 1% στα 100 V. Εφόσον η ποσότητα και η ποιότητα του DNA είναι ικανοποιητικές και το DNA, ακολουθεί ενίσχυση με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης.

4.2 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase chain reaction, PCR) είναι ίσως η ευρύτερα χρησιμοποιούμενη μέθοδος της μοριακής βιολογίας, με αναρίθμητες εφαρμογές τόσο σε ερευνητικό όσο και σε διαγνωστικό επίπεδο. Ανακαλύφθηκε το 1983 από τον βιοχημικό Karry Mullis, που εργαζόταν σε μια εταιρεία βιοτεχνολογίας της Καλιφόρνιας. Για την ανακάλυψη αυτή τιμήθηκε 10 χρόνια αργότερα με το βραβείο Νόμπελ. Η PCR είναι μια ενζυμική μέθοδος ενίσχυσης συγκεκριμένων τμημάτων γενετικού υλικού *in vitro*. Κατά τη διάρκεια μιας τυπικής αντίδρασης PCR το επιθυμητό τμήμα γενετικού υλικού πολλαπλασιάζεται μέχρι και ένα τρισεκατομμύριο φορές, γεγονός που είναι απαραίτητο για μετέπειτα χειρισμούς, όπως η ηλεκτροφόρηση, η πέψη με ένζυμα περιορισμού, η ανάγνωση της αλληλουχίας βάσεων κ.ά.

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).

Η αντίδραση PCR πραγματοποιείται σε τρία στάδια, τα οποία επαναλαμβάνονται διαδοχικά

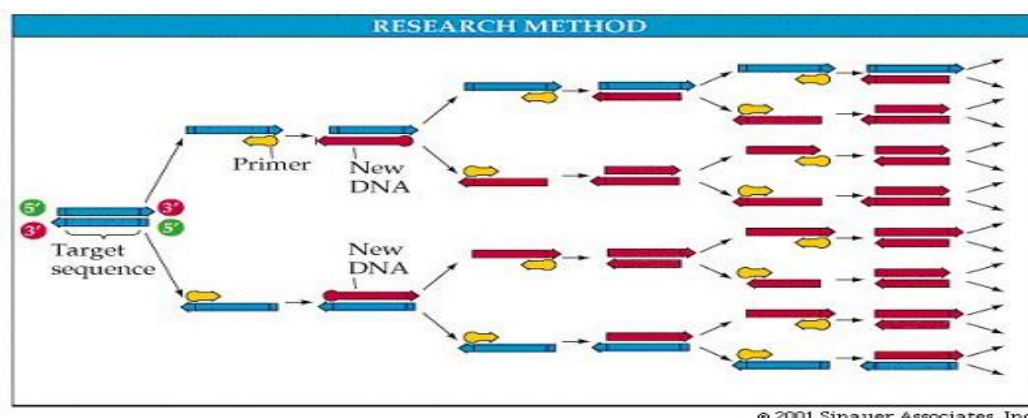
1. Αποδιάταξη: Οι δύο αλυσίδες του DNA διαχωρίζονται (αποδιατάσσονται) με θέρμανση σε θερμοκρασία 94-95° C για περίπου 30 sec έως 1 min.

2. Υβριδισμός εκκινητών: Με μείωση της θερμοκρασίας στους 55-65° C για περίπου 30 sec έως 1 min, οι εκκινητές υβριδίζονται στις συμπληρωματικές τους αλληλουχίες στο εκμαγείο DNA.

3. Επιμήκυνση: Για τη σύνθεση της νέας αλυσίδας αυξάνουμε τη θερμοκρασία στους 72° C, τη βέλτιστη θερμοκρασία δράσης της Taq πολυμεράσης. Η πολυμεράση επιμηκύνει τους εκκινητές εισάγοντας τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (Deoxynucleotide triphosphates, dNTPs) χρησιμοποιώντας τη συμπληρωματική αλληλουχία DNA ως εκμαγείο. Η ταχύτητα σύνθεσης της νέας αλυσίδας είναι της τάξης των 1000 bp ανά λεπτό.

Τα παραπάνω στάδια επαναλαμβάνονται από 25 έως 35 φορές. Η PCR εκτελείται στον θερμικό κυκλοποιητή (Thermal cycler), συσκευή που φέρει θερμαινόμενη πλάκα που μπορεί να εναλλάσσει θερμοκρασίες με ταχύτητα και ακρίβεια. Ο θερμικός κυκλοποιητής είναι μια προγραμματιζόμενη συσκευή, στην

οποία μπορούμε να ρυθμίσουμε την επιθυμητή θερμοκρασία και τη διάρκεια κάθε σταδίου αλλά και τη διαδοχή τους.



Εικόνα 3: Τρόπος λειτουργίας της PCR. Η δίκλωνη έλικα DNA αναδιατάσσεται σε κατάλληλη θερμοκρασία, οι εκκινητές συνδέονται στα αντίστοιχα συμπληρωματικά τμήματα του κάθε κλώνου και η Taq πολυμεράση συνθέτει τους συμπληρωματικούς κλώνους, ξεκινώντας από τους εκκινητές.

Τα βασικά συστατικά για τη διενέργεια της αντίδρασης PCR είναι:

1. DNA πολυμεράση
2. Ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινητές
3. Γενετικό υλικό – αλληλουχία στόχος
4. Ρυθμιστικό διάλυμα της αντίδρασης και Mg^{2+}
5. Νουκλεοτίδια (dNTPs)

DNA πολυμεράση Η DNA πολυμεράση είναι ένζυμο που υπάρχει σε όλους τους οργανισμούς (ευκαρυωτικοί, προκαρυωτικοί και ιοί) και συμμετέχει στην αντιγραφή του DNA. Δεν μπορεί να συνθέσει ένα νέο μόριο DNA, μπορεί όμως να αντιγράψει ένα υπάρχον που χρησιμοποιείται ως εκμαγείο. Η πολυμεράση που χρησιμοποιείται στην PCR έχει απομονωθεί από το βακτήριο *Thermus aquaticus* (Taq).

Εκκινητές Οι εκκινητές (Primers) είναι ολιγονουκλεοτίδια που οριοθετούν το τμήμα DNA που πρόκειται να πολλαπλασιαστεί. Ο σωστός σχεδιασμός των εκκινητών επηρεάζει σημαντικά το αποτέλεσμα της PCR.

Γενετικό υλικό (αλληλουχία στόχος) Ως αρχικό υλικό μπορεί να χρησιμοποιηθεί DNA το οποίο θα έχει μεταγραφεί στην πιο σταθερή μορφή του. Για τη βέλτιστη απόδοση της PCR το DNA πρέπει να είναι μακρομοριακό και υψηλής καθαρότητας, απαλλαγμένο από υπολείμματα αιθανόλης ή αλάτων που μπορούν να αναστείλουν την αντίδραση.

Ρυθμιστικό διάλυμα της αντίδρασης και συγκέντρωση Mg^{2+} Το διάλυμα της αντίδρασης διατηρεί το pH και τη συγκέντρωση αλάτων στις βέλτιστες συνθήκες

διεξαγωγής της αντίδρασης. Περιέχει επίσης ιόντα Mg^{2+} , που είναι απαραίτητος συμπαράγοντας της DNA πολυμεράσης. Τα ιόντα Mg^{2+} σχηματίζουν διαλυτά σύμπλοκα με τα dNTPs, το DNA εκμαγείο και τους εκκινητές.

Νουκλεοτίδια Τα δομικά μόρια που χρησιμοποιούνται για τη σύνθεση της νέας αλυσίδας είναι τα τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (deoxynucleotide triphosphates, dNTPs). Τα dNTPs χρησιμοποιούνται ως ισομοριακό μίγμα των τεσσάρων νουκλεοτιδίων (ATP, TTP, CTP και GTP) σε συγκεντρώσεις που κυμαίνονται στα 80-800 Μμ

Εκκινητής και αλληλουχία που αναγνωρίζει

A/A	TRna	FW Primer Rv Primer	Νουκλεοτιδική θέση	Μήκος (bp)
1	Val	GCT TGT CTG GTA GTA AGG GTA CTG GAA AGT GCA CTT GG	1576-1595 1715-1698	140

Ο όγκος των γημικών αντιδραστηρίων που απαιτούνταν ανά δείγμα για την αντίδραση PCR για τα δείγματα DNA

Αντιδραστήρια	Όγκος (ml)	Τελική συγκέντρωση
DNA	1 (50-100 ng)	1-2 ng/μl
Ρυθμιστικό διάλυμα (Buffer 10x)	5	1X
MgCl ₂ (50 mM)	1	1mM
dNTPS (Διάλυμα δεοξυνουκλεοτιδίων): Παρασκευάζεται από dATP, dCTP, dGTP και dTTP με μίξη ίσων ποσών από ξεχωριστά διαλύματα stock από 0,2mM καθενός dNTP	1	0,004 mM το καθένα
FW primer (50pmol/μl)	1	1pmol/μl
RV primer (50pmol/μl)	1	1pmol/μl
Taq pol (5U/μl)	0,2	0.02 U/μl
H ₂ O	39	
Τελικός όγκος	50	

Οι συνθήκες του προγράμματος του Θερμικού κυκλοποιητή για την ενίσχυση του απαιτούμενου τμήματος του DNA

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

Κατά την προετοιμασία της αντίδρασης PCR πρέπει να δίνεται ιδιαίτερη προσοχή στη θερμοκρασία των αντιδραστηρίων, αλλά και στον κίνδυνο επιμόλυνσης. Γι' αυτό τα αντιδραστήρια τοποθετούνται σε πάγο κατά τη διεξαγωγή του πειράματος. Όσον αφορά την επιμόλυνση, είναι μια από τις πιο σημαντικές και συνηθέστερες παραμέτρους που επηρεάζουν αρνητικά το αποτέλεσμα της PCR. Για να γίνεται αντιληπτή τυχόν επιμόλυνση στα δείγματα θα συμπεριλάβουμε ένα μάρτυρα ελέγχου. Αυτός περιέχει όλα τα χημικά αντιδραστήρια, πλην του DNA. Αν στον έλεγχο της PCR παρατηρηθεί ζώνη στο μάρτυρα ελέγχου (τυφλό), τότε υπάρχει επιμόλυνση.

4.3 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΗ ΑΓΑΡΟΖΗΣ

Για τον έλεγχο της απομόνωσης DNA και των προϊόντων PCR χρησιμοποιείται η τεχνική της ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αгарόζης. Η τεχνική αυτή είναι μια διαδικασία η οποία διαχωρίζει κομμάτια DNA. Το μέγεθος των πόρων εξαρτάται από τη συγκέντρωσή της. Οι πόροι είναι αυτοί που επιτρέπουν τη διέλευση των τμημάτων του DNA ανάμεσά τους.

Παρασκευή πηκτής αгарόζης συγκέντρωσης 1%

1. Ετοιμάζουμε το καλούπι κλείνοντας προσεκτικά τα άκρα του και τοποθετώντας τις κτένες.
2. Τοποθετούμε σε κωνική φιάλη 40 ml ρυθμιστικού διαλύματος TAE 1X. Ακολουθεί προσθήκη 0,4 gr αгарόζης (για έλεγχο DNA) ή 0,6 gr αгарόζης (για έλεγχο PCR προϊόντων)
3. Θερμαίνουμε το διάλυμα για 1 -2 λεπτά σε φούρνο μικροκυμάτων.
4. Προστίθενται 4 ml βρωμιούχο αιθίδιο (10 ng/ml)
5. Το διάλυμα ανακινείται καλά και αδειάζετε στον υποδοχέα.
6. Αφήνουμε την πηκτή να πήξει.
7. Αφαιρούνται οι ταινίες από τα άκρα του υποδοχέα και οι κτένες, ώστε να αποκαλυφθούν τα πηγαδάκια.
8. Το πήκτωμα τοποθετείται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης, την οποία γεμίζουμε με TAE 1X.
9. Ακολουθεί το φόρτωμα των δειγμάτων. Φορτώνονται 5 ml από κάθε δείγμα αφού πρώτα αναμειχθούν με 2 ml χρωστικής (loading buffer). Μαζί με τα δείγματα φορτώνεται και ένας μάρτυρας για τον υπολογισμό του μοριακού βάρους των προϊόντων της PCR.
10. Η πηκτή ηλεκτροφορείται σε οριζόντια συσκευή στα 100-130 V. Το αποτέλεσμα παρατηρείται σε τράπεζα UV και στη συνέχεια φωτογραφίζεται.

Στη συγκεκριμένη μέθοδο προστίθεται βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr) στην πηκτή αгарόζης. Το βρωμιούχο αιθίδιο με μια πλευρική ομάδα που περιέχει παρεμβάλλεται μεταξύ γειτονικών βάσεων του DNA και φθορίζει όταν ακτινοβολείται με υπεριώδη ακτινοβολία. Συγκεκριμένα η υπεριώδης ακτινοβολία που απορροφάται από το DNA Μστα 260 nm μεταφέρεται στη χρωστική.

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

Σύσταση διαλυμάτων

TAE 50X

Σε 500 ml ddH₂O προστίθενται:

- Tris-base 121 gr
- Acetic acid 28,5 ml
- EDTA 0,5 M, pH 8 50ml

Για την παρασκευή TAE 1X αραιώνουμε 20 ml TAE 50X σε 980 ml ddH₂O.

LOADING BUFFER 6X

Σε ένα falcon των 50 ml προστίθενται:

- Γλυκερόλη 25 ml
- Bromophenol Blue 5 ml
- TBE 10X 5 ml
- ddH₂O 15ml

Vτελ = 50 ml

TBE 10X

Σε 1 L ddH₂O προστίθενται:

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

Vτελ = 1 L

4.4 ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥ ΜΟΝΟΚΛΩΝΙΚΗΣ ΔΙΑΜΟΡΦΩΣΗΣ (Single Strand Conformation Polymorphism- SSCP)

Η μέθοδος SSCP αναπτύχθηκε για την ανίχνευση μοριακών βλαβών σε γονιδιακούς τόπους, παρέχοντας ένα εξαιρετικό, απλό και ταχύ σύστημα ανίχνευσης μεταλλάξεων με χαμηλό κόστος λειτουργίας και με δυνατότητα εύκολης αυτοματοποίησης, ώστε να είναι δυνατή η ανάλυση μεγάλου αριθμού δειγμάτων DNA μέσα σε μικρό χρόνο.

Η συγκεκριμένη μέθοδος επιτρέπει την ταχεία και ταυτόχρονη ανίχνευση διάφορων νουκλεοτιδικών παραλλαγών, με ποσοστό ανίχνευσης που πλησιάζει το 100%.

Η ανάλυση SSCP βασίζεται στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) και στο γεγονός ότι η ταχύτητα μετακίνησης των τμημάτων μονόκλωνου DNA με σχετικά μικρό μήκος εξαρτάται όχι μόνο από το μέγεθός τους, αλλά και από την αλληλουχία τους. Έτσι, μετά από ενίσχυση μιας δεδομένης αλληλουχίας DNA, τα ενισχυμένα τμήματα DNA υποβάλλονται σε αποδιάταξη είτε με θέρμανση είτε με χημικούς παράγοντες, όπως το φορμαμίδιο. Έπειτα τα αποδιαταγμένα τμήματα DNA ηλεκτροφορούνται σε μη αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης. Κατά την ηλεκτροφόρηση, τα μονόκλιωνα τμήματα DNA παίρνουν ένα συγκεκριμένο τρισδιάστατο σχήμα, ανάλογα με τη νουκλεοτιδική τους αλληλουχία και αποκτούν διαφορετική διαμόρφωση. Με βάση τις αρχές αυτές, είναι σαφές ότι τμήματα με διαφορά έστω και σε μία μόνο βάση, αποκτούν διαφορετική διαμόρφωση και μετακινούνται με διαφορετικό τρόπο κατά την ηλεκτροφόρηση.

Η ανάλυση SSCP παρουσιάζει πολλά πλεονεκτήματα για με τον γρήγορο μαζικό έλεγχο γνωστών γονιδιακών τόπων για μεταλλάξεις, καθώς είναι εύχρηστη, δεν απαιτεί χρήση ραδιενεργών ουσιών για την ανίχνευση και δεν χρειάζεται ειδικό εξοπλισμό. Από την άλλη πλευρά, η SSCP δεν θεωρείται μέθοδος εκλογής για την ανάλυση άγνωστων αλληλουχιών, καθώς δεν υπάρχει μέχρι στιγμής το θεωρητικό υπόβαθρο που θα επιτρέψει να προβλεφθεί η ακριβής ηλεκτροφορητική κινητικότητα ενός δεδομένου τμήματος DNA, με βάση την αλληλουχία του. Ωστόσο, αξίζει να σημειωθεί πως η ανάλυση SSCP έχει γνωρίσει τεράστια επιτυχία στην αναγνώριση παραλλαγών στην αλληλουχία προϊόντων DNA που εξετάστηκαν.

ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗΣ SSCP

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

- Σύσταση του πηκτώματος: Το πιο κοινό πήκτωμα, με την ευρύτερη αποδοχή, είναι το διασυνδεδεμένο πολυμερές ακρυλαμιδίου (8-12 %). Το μικρό μέγεθος των πόρων του πηκτώματος αυτού, το καθιστά ιδανικό για υψηλή διακριτική ικανότητα και ανάλυση, ακόμα και σε επίπεδο νουκλεοτιδίων. Ακόμα υψηλότερη διακριτική ικανότητα επιτυγχάνεται με την προσθήκη σακχαρόζης ή γλυκερόλης σε ποσοστό 10- 15 %.

- Σύσταση του ρυθμιστικού διαλύματος: Η προσθήκη 50% γλυκερόλης μειώνει το pH και ελαττώνει την ηλεκτροστατική 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.

4.5 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΠΗΚΤΩΜΑΤΟΣ ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΙΟΥ

Ποσότητες αντιδραστηρίων για την παρασκευή πηκτώματος πολυακρυλαμιδίου 12%.

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	Ποσότητες
Ακρυλαμίδη	15gr
Bis- Ακρυλαμίδη	0,375 gr
TBE 10X	10 ml
Γλυκερόλη 50%	12,5 ml
TEMED	125 μl
APS 20%	650 μl

Προστίθεται ddH₂O μέχρι ο τελικός όγκος να γίνει 125 ml.

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

TBE 10X: Ρυθμιστικό διάλυμα για καλύτερη αγωγιμότητα.

Γλυκερόλη 50% : Ελαττώνει την τιμή του pH του διαλύματος ηλεκτροφόρησης και αυξάνει την ευαισθησία της μεθόδου.

APS 20% (ammonium persulfate: υπερθευκό αμμώνιο): Ξεκινά την αντίδραση πολυμερισμού με το να δημιουργεί ελεύθερες ρίζες.

TEMED (φωτοχημικός καταλύτης): Καταλύει την αντίδραση

- Τα πηκτώματα πήζουν σε 30 min περίπου.
- Στη συσκευή ηλεκτροφόρησης προσθέτουμε TBE 0,5X και τοποθετούμε τα πηκτώματα μόλις πήξουν.

4.6 ΑΠΟΔΙΑΤΑΞΗ ΚΑΙ ΦΟΡΤΩΜΑ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Σε eppendorf 0.5ml προσθέτουμε 5 μl από το προϊόν PCR και 10 μl ρυθμιστικό διάλυμα αποδιάταξης (Denaturation Buffer).

Σε Θερμικό Κυκλοποιητή με εφαρμογή ειδικού προγράμματος αποδιάταξης:

2 λεπτά στους 92 °C

2 λεπτά στους 95 °C

7 λεπτά στους 97 °C

αποδιάσσονται πλήρως τα δίκλιωνα μόρια DNA. Πριν ολοκληρωθεί το τελευταίο στάδιο τα δείγματα εξέρχονται από τη συσκευή και τοποθετούνται αμέσως σε πάγο, για την αποφυγή της επαναδιάταξης των μονόκλωνων μορίων DNA.

Τα δείγματα φορτώνονται στα πηκτώματα, τα οποία βρίσκονται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης, την οποία τοποθετούμε στο ψυγείο και ηλεκτροφορούνται για 16-22 h στα 220 V.

4.7 ΧΡΩΣΗ ΜΕ ΔΙΑΛΥΜΑ ΝΙΤΡΙΚΟΥ ΑΡΓΥΡΟΥ (Silver Staining)

Με το πέρας της ηλεκτροφόρησης, ακολουθεί η χρώση των πηκτωμάτων, η οποία περιλαμβάνει πλύσεις με τρία διαφορετικά διαλύματα:

Για 2 πηκτώματα:

1^ο διάλυμα:

- Προσθέτουμε σε ογκομετρικό κύλινδρο 780 ml ddH₂O, 20 ml αιθανόλη 100% και 1 ml οξικό οξύ.
 - **1η πλύση:** Προσθέτουμε 200 ml σε κάθε πηκτώμα για 3 min. Απομάκρυνση.
 - **2η πλύση:** Προσθέτουμε 200 ml σε κάθε πηκτώμα για 3 min. Απομάκρυνση.
 - Ξεπλένουμε τα πηκτώματα με ddH₂O.

2^ο διάλυμα:

- Προσθέτουμε σε ογκομετρικό κύλινδρο 400 ml διάλυμα νιτρικού αργύρου (1 gr silver staining / L ddH₂O).
 - Προσθέτουμε 200 ml σε κάθε πηκτώμα για 20 min.
 - Ξεπλένουμε δύο φορές τα πηκτώματα με ddH₂O.

3^ο διάλυμα:

- Προσθέτουμε σε ποτήρι ζέσεως 6 gr NaOH, 0,02 gr NaBH₄, 2 ml φορμαλδεΐδη και συμπληρώνουμε με ddH₂O μέχρι να γίνει ο τελικός όγκος του διαλύματος 400 ml.
 - Προσθέτουμε 200 ml διαλύματος σε κάθε πηκτώμα μέχρι την εμφάνιση των ζωνών.
 - Απομάκρυνση του διαλύματος και πλύση με ddH₂O.

Στο τέλος της διαδικασίας συσκευάζουμε τα πηκτώματα πολυακρυλαμιδίου σε διαφανείς μεμβράνες και συγκρίνουμε τα αποτελέσματα. Επιλέγουμε τα δείγματα που εμφάνισαν διαφορετικά πρότυπα ηλεκτροφόρησης σε σχέση με τα φυσιολογικά υπό εξέταση άτομα και ακολουθεί η διαδικασία του καθαρισμού των PCR προϊόντων των επιλεγμένων δειγμάτων, ώστε να σταλούν για αλληλούχιση.

4.8 ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ PCR

Ο καθαρισμός των PCR προϊόντων των δειγμάτων που επελέγησαν έγινε με QIAquick Spin® PCR Purification Kit, κατάλληλο για την απομάκρυνση εκκινητών, νουκλεοτιδίων, πολυμερασών, αλάτων και άλλα που έχουν απομείνει μαζί με τα PCR προϊόντα μετά την αντίδραση PCR. Η ανάκτηση του DNA είναι 90 – 95%. Τα υλικά που απαιτούνται για τη διαδικασία καθαρισμού φαίνονται στον Πίνακα 1.

Πίνακας 1: Αντιδραστήρια για τον καθαρισμό των προϊόντων PCR

PB Buffer	<u>Διάλυμα συλλογής (capture buffer)</u> Επιτρέπει την αποτελεσματική δέσμευση προϊόντος PCR ακόμα κι αν είναι πολύ μικρό (100 bp) και την ποσοτική (99,5%) απομάκρυνση των εκκινητών έως και 40 νουκλεοτιδίων
PE Buffer	<u>Διάλυμα πλύσης (wash buffer)</u> Περιέχει αιθανόλη και χρησιμοποιείται για ξέπλυμα και την απομάκρυνση των αλάτων
EB Buffer (10 mM Tris-Cl, pH 8,5)	<u>Διάλυμα έκλουσης (elution buffer)</u> Εξάγει το DNA

Η διαδικασία καθαρισμού είναι η εξής:

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

στις 13000 rpm για 1 min. Απομακρύνουμε το υγρό. Τοποθετούμε την QIAquick στήλη στο ίδιο eppendorf συλλογής.

- Προσθέτουμε 750 µl PE buffer. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 1 min.

- Απομακρύνουμε το υγρό. Τοποθετούμε την QIAquick στήλη στο ίδιο eppendorf συλλογής. Βάζουμε τα δείγματα κατευθείαν για φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 1 min.

- Μεταφέρουμε την QIAquick στήλη σε καθαρά καινούρια eppendorf (1,5 ή 2 ml) και σημειώνουμε τον αριθμό του δείγματος και το γονίδιο.

- Προσθέτουμε 50 µl Buffer EB (10 mM Tris-Cl, pH 8.5) προσεκτικά στο κέντρο της QIAquick μεμβράνης, περιμένουμε περίπου 3 min και ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 1 min.

- Πετάμε την QIAquick στήλη από κάθε δείγμα και κρατάμε τα eppendorf για να σταλούν.

4.9 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ ΜΟΡΙΩΝ DNA (SEQUENCING)

Δύο διαφορετικές μέθοδοι αναπτύχθηκαν σχεδόν συγχρόνως για τον προσδιορισμό της αλληλουχίας ενός κλωνοποιημένου τμήματος DNA.

Η τεχνολογική επανάσταση στις μεθόδους ανάλυσης του γενετικού υλικού ξεκίνησε το 1977, όταν οι Maxam & Gilbert περιέγραψαν μία μέθοδο ανάλυσης της αλληλουχίας με ειδική χημική αποικοδόμηση των βάσεων. Η χημική μέθοδος (Maxam and Gilbert) σήμερα σπάνια χρησιμοποιείται.

Τον ίδιο χρόνο ο Sanger με τους συνεργάτες του πρότειναν μία ενζυμική μέθοδο για ανάγνωση της αλληλουχίας του DNA χρησιμοποιώντας διδεοξυνουκλεοτίδια (ddNTP'S), τα οποία οδηγούν στον πρόωρο τερματισμό της νουκλεϊκής σύνθεσης. Η ενζυμική μέθοδος (Sanger) απαιτεί μονόκλωνο DNA, που χρησιμοποιείται σαν μήτρα για την σύνθεση ραδιοσημασμένης συμπληρωματικής αλυσίδας *in vitro*. Η αντίδραση αυτή επιτυγχάνεται με την DNA πολυμεράση της *E. coli* στην παρουσία των τεσσάρων δεοξυνουκλεοτιδίων (dATP, dTTP, dGTP, dCTP, ένα από τα οποία είναι ραδιοσημασμένο) και ενός συνθετικού ολιγονουκλεοτιδίου που είναι συμπληρωματικό στο DNA μήτρα και χρησιμεύει ως εκκινητής. Τέσσερες κατά τ' άλλα όμοιες αντιδράσεις σύνθεσης αναμειγνύονται με προσθήκη στην κάθε μία μικρής ποσότητας ενός διαφορετικού 2',3'-διδεοξυνουκλεοτιδίου (ddATP, ddGTP κλπ.). Η ενσωμάτωση ενός ddNMP στο 3' άκρο μιάς αντιγραφόμενης αλυσίδας σταματάει την περαιτέρω σύνθεση, γιατί δεν υπάρχει πια 3' -OH για προέκταση της αλυσίδας. Έτσι κάθε αντίδραση καταλήγει να περιέχει μίγμα περατωμένων αλυσίδων, όλες σε διαφορετική κατάσταση που συναντάται A, G, C ή T, ανάλογα με το ddNTP

που συμπεριλήφθηκε. Μετά από ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης και αυτοραδιογραφία μπορούμε να διαβάσουμε την αλληλουχία του DNA.

Οι δύο αυτές μέθοδοι παράγουν πληθυσμούς σημασμένων πολυνουκλεοτιδίων τα οποία αρχίζουν από ένα συγκεκριμένο σημείο και τελειώνουν σε σημεία εξαρτώμενα από τη θέση μιας συγκεκριμένης βάσης του αρχικού κλώνου.

Τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί αυτόματοι αναλυτές που μειώνουν εξαιρετικά το χρόνο αλληλούχισης. Τα σημασμένα τμήματα του DNA ανιχνεύονται από μία πηγή laser και τα δεδομένα αποθηκεύονται για να αναλυθούν. Όλοι οι αυτόματοι αναλυτές περιέχουν προγράμματα περαιτέρω επεξεργασίας ή επιτρέπουν την εξαγωγή των δεδομένων για ανάλυση σε άλλα προγράμματα επεξεργασίας νουκλεϊνικών αλληλουχιών.

5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

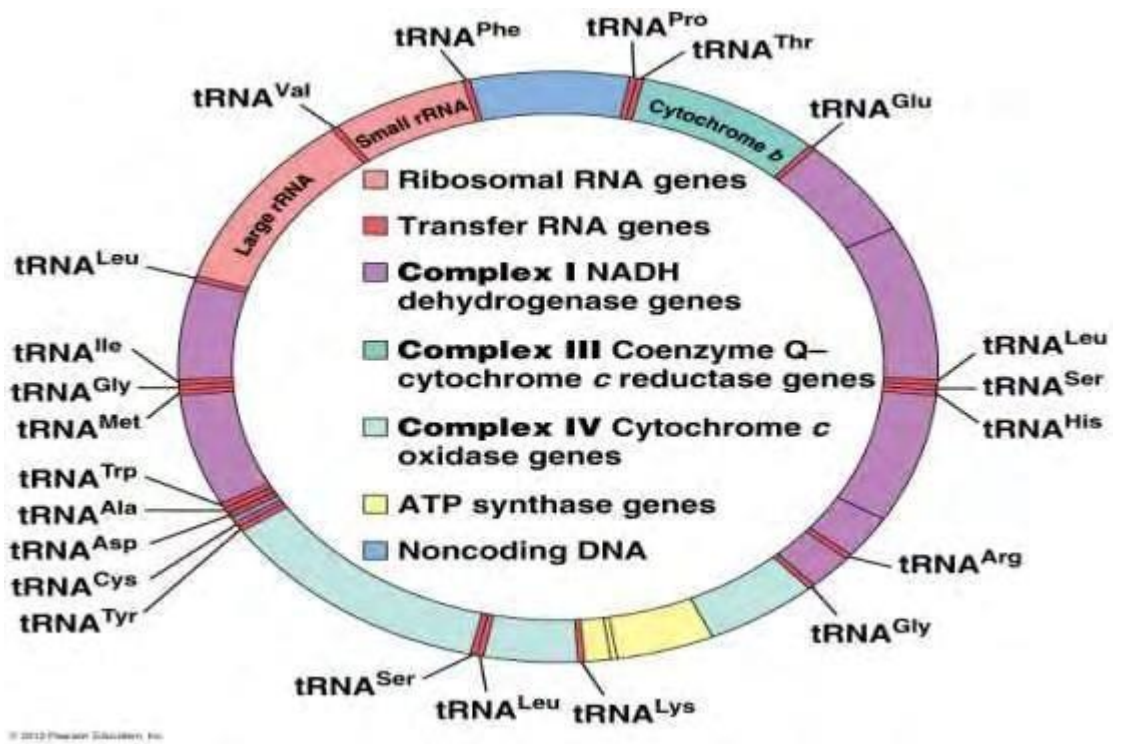
Στη παρούσα εργασία χρησιμοποιήσαμε για την διεξαγωγή του πειράματος 16 δείγματα ασθενών του διαβήτη, προσπαθώντας να μελετήσουμε την ύπαρξη μεταλλάξεων στο μιτοχονδριακό **tRNA^{Val}** και στις παρακείμενες περιοχές αυτού.

Για την ανίχνευση και ταυτοποίηση των μεταλλάξεων ακολουθήσαμε ένα πειραματικό κύκλο που αρχικά περιελάμβανε την απομόνωση του DNA από τα κύτταρα του αίματος, την ενίσχυση των τμημάτων των αρχικών δειγμάτων με τη μέθοδο της **PCR** χρησιμοποιώντας τους εκκινητές του **tRNA^{Val}** και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ανάλυση με τη μέθοδο της **SSCP** για την κατάταξη των δειγμάτων καθώς και ανίχνευση μεταλλάξεων. Μετά την ολοκλήρωσή του κύκλου των διαδικασιών τα δείγματα στα οποία ανιχνεύθηκε μετάλλαξη ταυτοποιήθηκαν με τη μέθοδο αυτόματης αλληλούχισης για τον εντοπισμό της ακριβής θέσης της. Τα 3 δείγματα στάλθηκαν στο Τμήμα Ιατρικής Θεσσαλίας για αλληλούχιση για τον εντοπισμό μεταλλάξεων.

ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ PCR

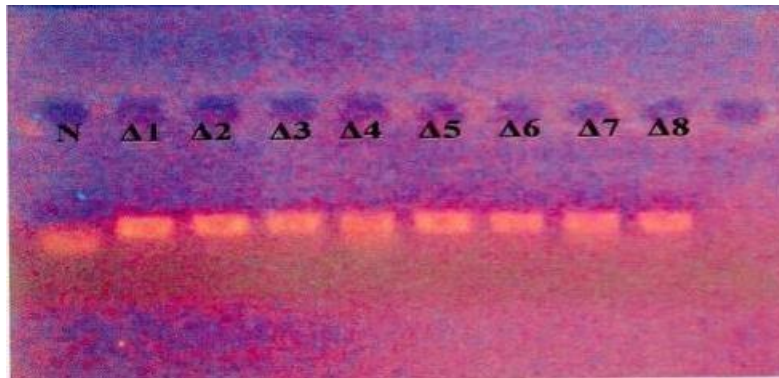
Αρχικά χρησιμοποιήσαμε το ζεύγος των εκκινητών του **tRNA^{Val}**, **FW Val** και **Rv Val** για να ενισχύσουμε το τμήμα του μιτοχονδριακού γονιδίου **tRNA^{Val}** των δειγμάτων. Το **μιτοχονδριακό tRNA^{Val}** αποτελεί το γονίδιο που θα εξετάσουμε για την ύπαρξη μεταλλάξεων που μπορεί να σχετίζονται με την εμφάνιση του σακχαρώδη διαβήτη.

Το τμήμα του γονιδίου που ενισχύθηκε και περιλαμβάνει το **tRNA^{Val}** είναι ένα τμήμα μήκους 140 bp του μιτοχονδριακού γονιδιώματος. Το **tRNA^{Val}** γονίδιο βρίσκεται στη Θέση 1602-1670 στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα μεταξύ των 2 rRNA, του 16S rRna και 12S rRna.



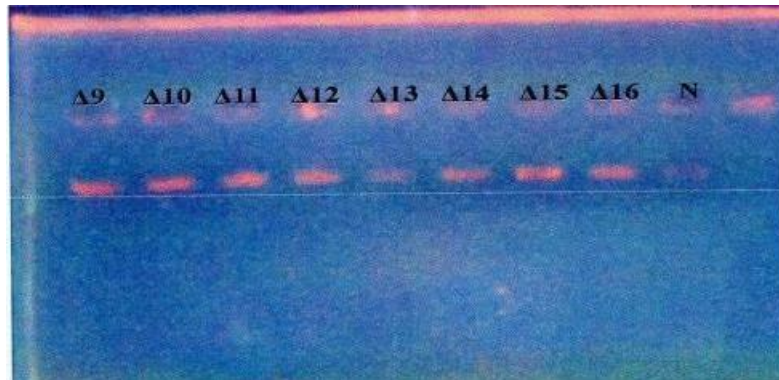
Εικόνα 4: Μιτοχονδριακό γονιδίωμα. Θέση του μιτοχονδριακού γονιδίου tRNA^{Val}.

ΔΙΑΒΗΤΗΣ



Φωτογραφία 1: Gel πηκτής αгарόζης που περιέχει τα ενισχυμένα τμήματα των δειγμάτων Δ1-Δ8, αποτελέσματα της PCR που εφαρμόστηκε.

ΔΙΑΒΗΤΗΣ

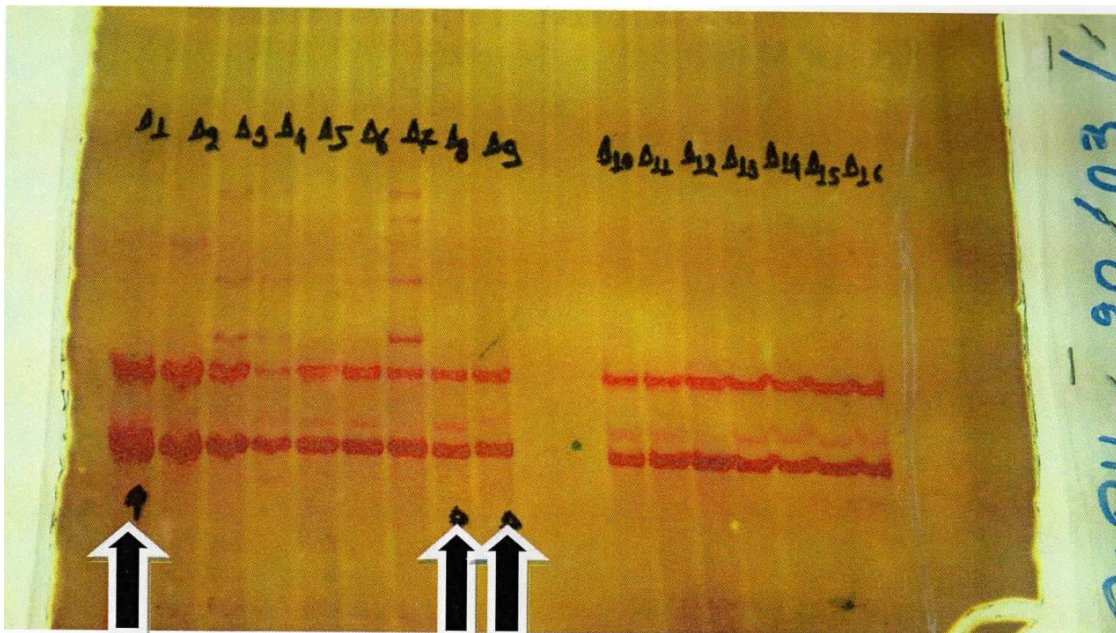


Φωτογραφία 2: Gel πηκτής αгарόζης που περιέχει τα ενισχυμένα τμήματα των δειγμάτων Δ8-Δ16, αποτελέσματα της PCR που εφαρμόστηκε.

ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ SSCP ΚΑΙ ΤΗΝ ΕΥΡΕΣΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ

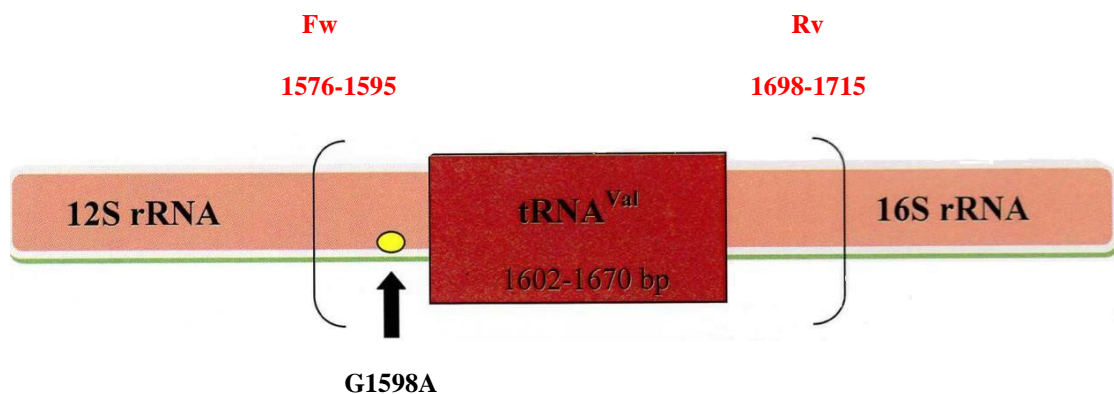
Με τη μέθοδο της SSCP και της αυτόματης αλληλούχησης ταυτοποιήθηκαν και ανιχνεύθηκαν οι μεταλλάξεις που μελετήθηκαν στο μιτοχονδριακό γονίδιο 12S Rrna των δειγμάτων που παρουσίασαν πρότυπη πορεία ηλεκτροφόρισης. Για αλληλούχιση στάλθηκαν 3 δείγματα Δ1, Δ8, Δ9.

Με τη χρήση των προγραμμάτων MITOMAP και CLUSTALX 1.8, πραγματοποιήθηκε στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων της αλληλούχησης. Με τη χρήση του προγράμματος επιτυγχάνεται η «ανάγνωση» της αλληλουχίας του γονιδίου το οποίο ενισχύσαμε και το οποίο λόγω εμφάνισης διαφορετικού προτύπου μετά από πραγματοποίηση SSCP, κρίναμε ότι έπρεπε να σταλεί για αλληλούχιση. Η αλληλουχία βρίσκεται υπό μορφή χρωματογραφήματος, όπου σε κάθε κορυφή αντιστοιχεί και μια βάση της αλληλουχίας.



Φωτογραφία 3 : Gel πολυακρυλαμίδης έπειτα από ηλεκτροφόριση των δειγμάτων για 14 ώρες στα 200 V. Με βέλος απεικονίζονται τα δείγματα που παρουσιάζουν πρότυπη πορεία και στάλθηκαν για αλληλούχιση.

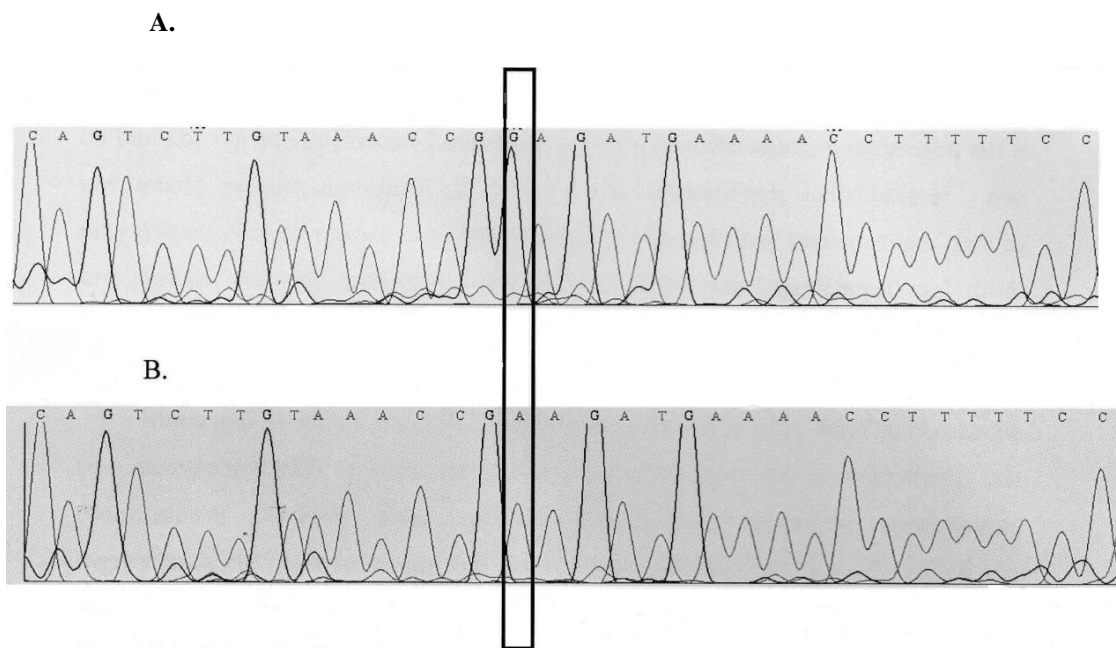
Από τα δείγματα που στάλθηκαν για αλληλούχιση μόνο στο δείγμα Δ9 εντοπίστηκε μετάλλαξη. Το γονίδιο **tRNA^{Val}** βρίσκεται στη θέση **1602-1670** στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα μεταξύ των **Rrna, 16S r Rna και 12s r Rna**. Στο γονίδιο **tRNA^{Val}** δεν εντοπίστηκε μετάλλαξη. Η μετάλλαξη **G1598A** ανιχνεύτηκε με τη μέθοδο SSCP στη θέση **1598** του δείγματος Δ9, παρακείμενη περιοχή **12S rRna**. Παρουσιάστηκε γονιδιακή αλλαγή και βρέθηκε μετάλλαξη στη θέση **1598** όπου η **G (γουανίνη)** μετατράπηκε σε **A (αδενίνη)**, *Εικόνα 5*.



Εικόνα 5 : Απεικόνιση της μετάλλαξης που ανιχνεύθηκε στην παρακείμενη περιοχή **12S Rrna** στη θέση **G1598A**.

Μετάλλαξη στο 12S r Rna

ΓΟΝΙΔΙΟ	ΜΕΤΑΛΛΑΞΗ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΣΘΕΝΩΝ	ΠΟΣΟΣΤΟ
12S r Rna	G1598A	1/16	6%



Εικόνα 6: Τμήμα χρωματογράφησης αλληλούχισης της περιοχής του *tRNA* γονιδίου. Το A αντιστοιχεί σε φυσιολογικό άτομο, το B αντιστοιχεί σε ασθενή του σακχαρώδη διαβήτη. Μετάπτωση της G(γουανίνη) σε A(αδερίνη).

6. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο ρόλος των μιτοχονδρίων στον οργανισμό, είναι καίριος, εφόσον εμπλέκονται σε βασικές για τον οργανισμό λειτουργίες, όπως ο μεταβολισμός, η απόπτωση και ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός. Η ύπαρξη και ταυτοποίηση μεταλλάξεων στο μιτοχόνδριο οδηγεί τον επιστημονικό κόσμο σε συνεχόμενη έρευνα γύρω από το μιτοχόνδριό, και σε ασθένειες που εμφανίζονται και σχετίζονται με αυτό. Μεταλλάξεις στο μιτοχόνδριο έχουν συσχετισθεί με την εμφάνιση του σακχαρώδους διαβήτη καθώς και πολλών μιτοχονδριακών νοσημάτων.

Μέσα από το παρόν πείραμα, ανιχνεύσαμε μεταλλάξεις στο, ώστε να ελέγξουμε την πιθανότητα τέτοιες μεταλλάξεις να αποτελούν παράγοντες πρόκλησης του σακχαρώδους διαβήτη. Στην εργασία που πραγματοποιήθηκε, ερευνήσαμε, ανιχνεύσαμε και ταυτοποιήσαμε την ύπαρξη μίας μετάλλαξης στο 12S rRNA και πιο συγκεκριμένα στη θέση G1598A του δείγματος Δ9.

Η μετάλλαξη G1598A: Η θέση όπου εντοπίστηκε η μετάλλαξη βρίσκεται στο 12S rRNA, το οποίο αποτελεί παρακείμενη περιοχή του μιτοχονδριακού γονιδίου tRNA^{Val} γονιδίου. Η μετάλλαξη εμφανίστηκε σε ένα μόνο δείγμα, Δ9, από 16 δείγματα ασθενών του σακχαρώδους διαβήτη. Το ποσοστό εμφάνισης της μετάλλαξης στο σύνολο των δειγμάτων είναι (1/16). Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία που έχει αναφερθεί στη δικτυακή βάση δεδομένων για το μιτοχόνδριο (www.mitomap.org) η μετάλλαξη στη θέση G1598A έχει, εμφανιστεί συχνά σε δείγματα πληθυσμών. Η θέση εντοπισμού καθώς και η συχνότητα εμφάνισης της μετάλλαξης G1598A την καθιστά πολυμορφισμό και όχι παθογόνο μετάλλαξη. Η μετάλλαξη δεν βρίσκεται στο γονίδιο tRNA^{Val} επομένως δεν επηρεάζει άμεσα την λειτουργία του συγκεκριμένου γονιδίου. Η θέση που εμφανίζεται η μετάλλαξη δεν καθιστά μη λειτουργικό το γονίδιο. Τα αποτελέσματα του πειράματος αποτελούν μικρό ποσοστό για την διεξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων.

Η περαιτέρω μελέτη των αποτελεσμάτων σε εργαστηριακό επίπεδο θα οδηγήσει στη διαλεύκανση της φύσης των μεταλλάξεων που εμφανίζονται συχνά στο μιτοχονδριακό tRNA. Η μελέτη και η εφαρμογή πειραμάτων συνεχίζεται για την ανίχνευση της αιτίας των 'μιτοχονδριακών' νοσημάτων που αποτελούν τις πιο συνηθισμένες ασθένειες και πλήττουν πολύ μεγάλο μέρος του πληθυσμού ανεξαρτήτως ηλικίας.

7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Anderson S., BanKier A.T, BarreII B.G., Bruijn M.H., Coulson A.R., Drouin J.Eperon I.C., Nierlich D.P., Roe B.A., Sanger F., Schreier P.H., Smith A.J., Staden R.Young I.G., Sequence and organization of the human mitochondrial genome, Nature 1981, 290:457-65

AntonellaCormio, FrancescoMilella, Maurizio Marra, Maria Pala,Angela Maria Serena Lezza, Anna Rita Bonfigli, Claudio Franceschi,Palmiro Cantatore, Maria Nicola Gadaleta, Variations at the H-strand replication origins of mitochondrial DNA and mitochondrial DNA content in the blood of type 2 diabetes patients
Volume 1787, Issue 5, May 2009, Pages 547-552

Cortopassi, G. A., and Wang, E. (1996). "There is Substantial agreement among interspecies estimates of DNA repair activity. " *Mech Ageing Dev*; 91 (3):211 -218

Coskun, P.E., Beal, M.F., Wallace, D.C., Somatic mitochondrial DNA control region mutations are prevalent in Alzheimer Disease brains, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004, 101 : 10726-10731

DiMauro S, Davidzon G. Mitochondrial DNA and disease. *Ann Med* 2005; 37:222-232.

Duchen, M.R. (2004). Mitochondria in health and disease: perspectives on a new mitochondrial biology. *Mol Aspects Med*, pp. 365-451

Douglas C. Wallace et al. Mitochondrial Diseases in Man and Mouse. *Science* 1999 ; 283 : 1482.

Douglas C. Wallace. The pathophysiology of mitochondrial disease as modeled in the mouse. *Genes Dev.* 2009; 23:1714-1736.

Fischer S.G., Leman L.S., DNA fragments differing by single base-pair substitutions are Separated in denaturing gradient gels, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1983, 80:1579-1583

Gyorgy Szabadkai & Michael R. Duchen Mitochondria mediated cell death in diabetes *Apoptosis* volume 14, pages1405–1423(2009)

Holt PG, Stumbles PA, McWilliam AS. Functional studies on dendritic cells in the respiratory tract and related mucosal tissues. *J Leukoc Biol* 1999; 66(2):272- 275.

J. Antonie Maassen, Leen. M. 't Hart, Einar van Essen, Rob J. Heine, Giel Nijpels, Roshan S. Jahangir Tafrechi, Anton K. Raap, George M.C. Janssen **and** Herman H.P.J. Lemkes Mitochondrial Diabetes Molecular Mechanisms and Clinical Presentation *Diabetes* 2004 Feb; 53(suppl 1): S103-S109.

Ingman M, Kaessmann H, Pääbo S, Gyllenstein U. Mitochondrial genome variation and origin of modern humans. *Nature* 2000; 28:292.

Labieniec M. & Watala C. (2010). Use of poly (amido).amine dendrimers in prevention of early non-enzymatic modifications of biomacromolecules. *Biochimie*, pp. 1296-1305

Margulis L., *Origin of Eukaryotic Cells*, 1970, Yale University Press.
Margulis L., *Early Life*, 1982, Science Books International.

Mitchell P, Moyle J., Chemiosmotic hypothesis of oxidative phosphorylation, *Nature*, 1967, 213:137-9.

Mitchell P., Proton current now in mitochondrial systems, *Nature*, 1967, 25: 1327-1328.

Nature 1967 Nov 18;216(5116):652-7. doi: 10.1038/216652a0. Circular Dimer and Catenate Forms of Mitochondrial DNA in Human Leukaemic Leucocytes
D A Clayton, J Vinograd

Lauber, J., Marsac, C., Kadenbach, B., Seibel, P., Mutations in mitochondrial tRNA genes: α frequent cause of neuromuscular diseases, *Nucleic Acids Research*, 1991, 19:1393-1397.

Lowell, J. E., and Pillus, L. (1998). "Telomere tales: chromatin, telomerase and telomere function in *Saccharomyces cerevisiae*." *Cell Mol life Sci.* 54(1):32-49

Liu, V. W., Zhang, C., and Nagley, P. (1998). "Mutations in mitochondrial DNA accumulate differentially in three different human tissues during ageing." *Nucleic Acids Res* 26(5):1268-1275

Luft R, Ikkos D, Palmieri G, Ernster L, Afzelius B (1962). A case of severe hypermetabolism of nonthyroid origin with a defect in the maintenance of mitochondrial respiratory control: a correlated clinical, biochemical, and morphological study. *J Clin Invest* 41, pp. 1776-1804

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR, DNA Sequencing with chain-terminating Inhibitors *Proc Natl Acad Sci USA*, 1977, 74:5463-5467

Ozawa, T., Tanaka, M., Sugiyama, S., Ino, H., Ohno, K, Hattori, K, Ohbayashi, T. Ito, T., Deguchi, H., Kawamura K., Nakane, Y., Hashiba, K, Patienta with idiopathic cardiomyopathy belong to the same mitochondrial DNA gene family of Parkinson's disease and mitochondrial encephalomyopathy. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1991, 177:518-525

Pavlakakis SG, Phillips PC, DiMauro S, De Vivo DC, Rowland LP (1984). Mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes: a distinctive clinical syndrome. *Ann Neurol* 16, pp.4818.

Yasukazu Nakamura, Takashi Gojobori, Toshimichi Ikemura *Nucleic Acids Research*, Volume 28, Issue 1, 1 January 2000, Page 292

Zífa E, Giannouli S, Theotokis P, Stamatis C, Mamuris Z, Stathopoulos
Mitochondrial tRNA mutations: clinical. and functional perturbations. RNA Biol
(2007) Jan-Mar;4(1):38-66. Epub 2007 Jun 6. Department of Biochemistry and
Biotechnology, university of Thessaly

Βασικές αρχές κυτταρικής βιολογίας των Alberts, Bray, Hopkin, Johnson, Lewis,
Raff., Roberts και Walter

κ. Σταμάτης Ν. Αλαχιώτης, Καθηγητής της Γενετικής και Πρύτανης του
Πανεπιστημίου Πατρών

Διεύθυνση Γενετικής (Χ. Κόκοτας /Μ. Γρηγοριάδου/Γ. Σ. Κορρές /Α. Γιαννούλια-
Καραντανά /Μ. Β. Petersen)

SITES

<http://w.mitomap.org/>

www.genpat.uu.se/mtDB

[http://wikipedia.qwika.com/en2el/Mitochondrial disease](http://wikipedia.qwika.com/en2el/Mitochondrial+disease)

http://www.tovima.gr/opinions/article/?aid=97423_

<http://www.intergenetics.eu/1525+M54a708de802.html>

www.scienceinschool.org/evolution