



Πτυχιακή εργασία:

ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΗΣ ΤΕΧΝΙΚΗΣ MADGE ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΟΥ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥ
PRO12ALA ΣΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ ΤΟΥ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΜΕΝΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ
ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ ΤΩΝ ΥΠΕΡΟΞΕΙΔΙΟΣΩΜΑΤΩΝ- γ 2 (PPAR γ 2).

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΣΥΧΝΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥ ΣΤΟΝ ΕΛΛΗΝΙΚΟ
ΠΛΗΘΥΣΜΟ ΣΕ ΔΕΙΓΜΑ ΑΠΟ ΤΗ ΜΕΛΕΤΗ «ΑΤΤΙΚΗ».

ΘΕΟΔΩΡΑΚΗ ΕΙΡΗΝΗ
ΑΜ:9808



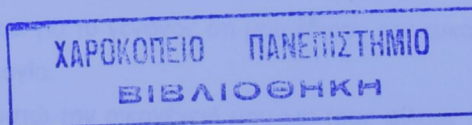
ΠΤΥ
ΘΕΟ

Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο
Αθήνα, 2003

Επιβλέπον καθηγητής
Δεδούσης Γεώργιος, Λέκτορας

Τριμελής επιτροπή
Δεδούσης Γεώργιος, Λέκτορας
Ζαμπέλας Αντώνιος, Επίκουρος καθηγητής
Σκοπούλη Φωτεινή, Καθηγήτρια

Την πτυχιακή μου αφιερώνω στους γονείς μου



ΣΚΟΠΟΙ

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η εύρεση της συχνότητας του πολυμορφισμού RsaI/2A16 στα γονόδια του PPA/My2 του γονότυπου DNA σε δείγμα του δείγματος της έρευνας "ΑΓΓΙΚΗ". Εξετάστηκε για πρώτη φορά στο εργαστήριο μιας η ηλικιακή ομάδα, τεχνική αρχής στο χώρο της Μοριακής Βιολογίας. Με την τεχνική αυτή έγινε ο έλεγχος της πίεσης με περιεχόμενες ενδοκυτταρικές. Σε μήκος του δείγματος (116 άτομα) έγινε εκτίμηση του ποσομορφισμού με βιοχημικές παραμέτρους.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Ευχαριστώ τη συμφοιτήριά μου Κανόνη Σταυρούλα, για τη βοήθεια και τη συμπαράστασή της όλο αυτό το διάστημα. Ευχαριστώ τη Δέσποινα Χουμεριανού για το γεγονός ότι ήταν δίπλα μου σε κάθε πρόβλημα που προέκυπτε στο εργαστήριο. Επίσης, ευχαριστώ τον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Γιώργο Δεδούση για τη βοήθειά του και για το γεγονός ότι μου έδωσε την ευκαιρία να έρθω σε επαφή με τη Μοριακή Βιολογία.

Τέλος, ευχαριστώ την οικογένειά μου και τους φίλους μου που με στήριξαν αυτό το διάστημα.

Ιδιαίτερα ευχαριστώ τη φίλη μου, Εύη.

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η εύρεση της συχνότητας του πολυμορφισμού **Pro12Ala** στο γονίδιο του PPAR γ 2 του γενωμικού DNA σε άτομα του δείγματος της έρευνας “ΑΤΤΙΚΗ”. Εφαρμόστηκε για πρώτη φορά στο εργαστήριό μας η τεχνική **MADGE**, τεχνική αιχμής στο χώρο της Μοριακής Βιολογίας. Με την τεχνική αυτή έγινε ο έλεγχος της πέψης με περιοριστικές ενδονουκλεάσες. Σε μέρος του δείγματος (114 άτομα) έγινε συσχέτιση του πολυμορφισμού με βιοχημικές παραμέτρους.

Στους αιτούς, και κυρίως από αυτά που έχουν διαφορετικές λειτουργίες. Το PPAR γ αποτελεί στόχο για τους κατασκευαστές της νευρικής διαβρομολιθίας, φάρμακα που χρησιμοποιούνται εκτενώς για τη θεραπεία του διαβήτη τύπου II. Επιπλέον σε διεργασίες όπως η λιπιδγένεση, η φλεγμονώδης απόκριση, η διαφοροποίηση κυττάρων, ο μεταβολισμός των λιπιδίων, η ευαισθησία στην ινσουλίνη κλπ (1).

Αντιβιολύμ μεταγραφικούς παράγοντες που ενεργοποιούν γονότυπ-στόχους με πρόσδεση τους σε συγκεκριμένη αλληλουχία του DNA, που ονομάζεται σήματα απόκρισης (PPAR ενεργοποιείται κλειστό-PPRE), και βρίσκεται στον υποκινητή των γονιδίων αυτών (2). Το PPAR γ γονίδιο, είναι το 3ο διαφορετικό «PML» το PPAR γ 1, PPAR γ 2 και PPAR γ 3, που διαφέρουν στο σπινθηρικό άκρο τους. (3) Η έκφρασή τους είναι διαφορετική στους ιστούς. Το PPAR γ 2 εκφράζεται σχεδόν αποκλειστικά στο λιποκύτταρο (4).

Ο συχνότερος πολυμορφισμός στην κωδονική PPAR γ 2 είναι ο Pro12Ala που προκύπτει από αντικατάσταση της κωστικής από γλουταμίνη στο κωδικό 12, με αποτέλεσμα την αντικατάσταση του αμινοξέος προλίνη από το αμινοξύ αλάνη στο σημείο αυτό (5). Ο πολυμορφισμός έχει φανεί να σχετίζεται με μεταβολή επιτόκιση διαβήτη τύπου II και αυξημένη ευαισθησία στην ινσουλίνη. Το αποτέλεσμα για το δείγμα μας είναι ότι οι αιτίες διαβήτη και οι αιτίες λιπιδίων μεταβολίζονται μεταξύ τους.

Η παρούσα έρευνα έγινε σε συνεργασία με την κορυφαία κλινική του υποκράτους νοσοκομείο στο πλαίσιο της μελέτης «ΑΤΤΙΚΗ». Το έργο που αποτέλεσαν το δείγμα της έρευνας προήλθαν στο υποκράτιο νοσοκομείο. Παράλαβε δείγμα 365 ατόμων, που συλλέχθηκαν με τυχαίο τρόπο. Η ανίχνευση του πολυμορφισμού έγινε με την τεχνική MADGE (μέθοδος της Απλής Διαφορικής Gel Electrophoresis) που εφαρμόστηκε για πρώτη φορά στο εργαστήριό μας. Αποτελεί τεχνική αιχμής στο πεδίο της Μοριακής Βιολογίας, που εφαρμόζεται σε μικρό αριθμό εργαστηρίων στην Ευρώπη. Ο στόχος της μελέτης ήταν η εύρεση της συχνότητας του Ala αλληλίου στον Ελληνικό πληθυσμό, και η ανίχνευση της τάσης μεταβολής

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο ενεργοποιημένος υποδοχέας πολλαπλασιασμού των υπεροξειδιοσωμάτων (**PPAR**) πήρε το όνομά του από το γεγονός ότι αποτελεί το στόχο φαρμάκων που ενεργοποιούν τον πολλαπλασιασμό των υπεροξειδιοσωμάτων στο ήπαρ των τρωκτικών. Ανήκει στην υπεροικογένεια των πυρηνικών υποδοχέων των οποίων η δράση εξαρτάται από τη σύνδεσή τους με διάφορα μόρια. Έχουν ταυτοποιηθεί τρεις ισομορφές: τα **PPARα**, **PPARβ** και **PPARγ** που εμφανίζουν διαφορετική κατανομή στους ιστούς, και καθένα από αυτά έχει διαφορετικές λειτουργίες. Το **PPARγ** αποτελεί στόχο για τους ευαισθητοποιητές της ινσουλίνης θειαζολιδινεδιόνες, φάρμακα που χρησιμοποιούνται εκτενώς για τη θεραπεία του διαβήτη τύπου II. Εμπλέκεται σε διεργασίες όπως η λιπογένεση, η φλεγμονώδης απόκριση, η διαφοροποίηση κυττάρων, ο καταβολισμός των λιπιδίων, η ευαισθησία στην ινσουλίνη, κλπ. **(1)**

Αποτελούν μεταγραφικούς παράγοντες που ενεργοποιούν γονίδια-στόχους με πρόσδεσή τους σε συγκεκριμένη αλληλουχία του DNA, που ονομάζεται στοιχείο απόκρισης (**PPAR response element-PPRE**), και βρίσκεται στον υποκινητή των γονιδίων αυτών **(2)**. Το **PPARγ** γονίδιο, δίνει τρία διαφορετικά mRNAs τα **PPARγ1**, **PPARγ2** και **PPARγ3**, που διαφέρουν στο αμινοτελικό άκρο τους. **(3)** Η έκφραση τους είναι διαφορετική στους ιστούς. Το **PPARγ2** εκφράζεται σχεδόν αποκλειστικά στο λιπώδη ιστό **(4)**.

Ο συχνότερος πολυμορφισμός στην ισομορφή **PPARγ2** είναι ο **Pro12Ala** που προκύπτει από αντικατάσταση της κυτοσίνης από γουανίνη στο κωδικόνιο 12, με αποτέλεσμα την αντικατάσταση του αμινοξέος προλίνη από το αμινοξύ αλανίνη στο σημείο αυτό **(5)**. Ο πολυμορφισμός έχει φανεί να σχετίζεται με μειωμένη επίπτωση διαβήτη τύπου II και αυξημένη ευαισθησία στην ινσουλίνη. Τα αποτελέσματα για το δείκτη μάζας σώματος και για τους δείκτες λιπιδίων συγκρούονται μεταξύ τους.

Η παρούσα έρευνα έγινε σε συνεργασία με την καρδιολογική κλινική του Ιπποκράτειου νοσοκομείου στα πλαίσια της μελέτης «**ΑΤΤΙΚΗ**». Τα άτομα που αποτέλεσαν το δείγμα της έρευνας προσήλθαν στο Ιπποκράτειο νοσοκομείο. Περιέλαβε δείγμα 365 ατόμων, που επιλέχθηκαν με τυχαίο τρόπο. Η ανίχνευση του πολυμορφισμού έγινε με την τεχνική **MADGE** (Micro titer Array Diagonal Gel Electrophoresis) που εφαρμόστηκε για πρώτη φορά στο εργαστήριο μας. Αποτελεί τεχνική αιχμής στο πεδίο της Μοριακής Βιολογίας, που εφαρμόζεται σε μικρό αριθμό εργαστηρίων στην Ευρώπη. Ο στόχος της μελέτης ήταν η εύρεση της συχνότητας του Ala αλληλίου στον Ελληνικό πληθυσμό, και η ανίχνευση της τυχόν συσχέτισης

του, σε 114 άτομα από το δείγμα αυτό, με δείκτες λιπιδίων αίματος, με το Δείκτη Μάζας Σώματος και τα επίπεδα γλυκόζης.

Η τεχνική MADGE εφαρμόστηκε στο δείγμα μας με επιτυχία. Τα αποτελέσματα έδειξαν μεγάλη συχνότητα (**31%**) αλληλίου Ala στον Ελληνικό πληθυσμό, σε σχέση με τη συχνότητα που εμφανίζεται σε άλλους Καυκάσιους πληθυσμούς, στους οποίους κυμαίνεται από 12%-23%. Δε βρέθηκε συσχέτιση του πολυμορφισμού με κανέναν από τους δείκτες που μελετήθηκαν.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η τεχνική MAGEE αποτελεί μια γενική μέθοδο στο χώρο της Μηχανικής Μετρήσεων που αναπτύσσεται πρόοδος. Εφαρμόζεται από τη στιγμή που αρχικά της Εφαρμογής σε διάφορα είδη μετρήσεων, για να αναπτυχθεί σε διάφορα είδη μετρήσεων.

Η τεχνική MAGEE αποτελεί μια γενική μέθοδο στο χώρο της Μηχανικής Μετρήσεων που αναπτύσσεται πρόοδος. Εφαρμόζεται από τη στιγμή που αρχικά της Εφαρμογής σε διάφορα είδη μετρήσεων, για να αναπτυχθεί σε διάφορα είδη μετρήσεων. Η τεχνική MAGEE αποτελεί μια γενική μέθοδο στο χώρο της Μηχανικής Μετρήσεων που αναπτύσσεται πρόοδος. Εφαρμόζεται από τη στιγμή που αρχικά της Εφαρμογής σε διάφορα είδη μετρήσεων, για να αναπτυχθεί σε διάφορα είδη μετρήσεων.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η τεχνική MAGEE (Horizontal Polyamorphous Data) αποτελεί μια γενική μέθοδο στο χώρο της Μηχανικής Μετρήσεων που αναπτύσσεται πρόοδος. Εφαρμόζεται από τη στιγμή που αρχικά της Εφαρμογής σε διάφορα είδη μετρήσεων, για να αναπτυχθεί σε διάφορα είδη μετρήσεων. Η τεχνική MAGEE αποτελεί μια γενική μέθοδο στο χώρο της Μηχανικής Μετρήσεων που αναπτύσσεται πρόοδος. Εφαρμόζεται από τη στιγμή που αρχικά της Εφαρμογής σε διάφορα είδη μετρήσεων, για να αναπτυχθεί σε διάφορα είδη μετρήσεων. Η τεχνική MAGEE αποτελεί μια γενική μέθοδο στο χώρο της Μηχανικής Μετρήσεων που αναπτύσσεται πρόοδος. Εφαρμόζεται από τη στιγμή που αρχικά της Εφαρμογής σε διάφορα είδη μετρήσεων, για να αναπτυχθεί σε διάφορα είδη μετρήσεων.

Η τεχνική MAGEE αποτελεί μια γενική μέθοδο στο χώρο της Μηχανικής Μετρήσεων που αναπτύσσεται πρόοδος. Εφαρμόζεται από τη στιγμή που αρχικά της Εφαρμογής σε διάφορα είδη μετρήσεων, για να αναπτυχθεί σε διάφορα είδη μετρήσεων. Η τεχνική MAGEE αποτελεί μια γενική μέθοδο στο χώρο της Μηχανικής Μετρήσεων που αναπτύσσεται πρόοδος. Εφαρμόζεται από τη στιγμή που αρχικά της Εφαρμογής σε διάφορα είδη μετρήσεων, για να αναπτυχθεί σε διάφορα είδη μετρήσεων.

H ΤΕΧΝΙΚΗ MADGE (Micro titer Array Diagonal Gel Electrophoresis)

Η τεχνική **MADGE** αποτελεί μια τεχνική αιχμής στο χώρο της Μοριακής Βιολογίας που ανακαλύφθηκε πρόσφατα. Εφαρμόζεται αυτή τη στιγμή σε λίγα εργαστήρια της Ευρώπης, σε επιδημιολογικού τύπου έρευνες, για την ηλεκτροφόρηση τμημάτων DNA.

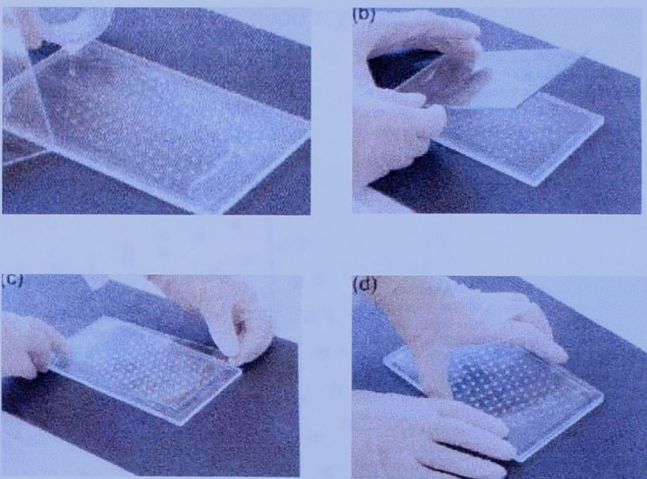
Η ηλεκτροφόρηση του DNA παραδοσιακά γίνεται ή σε πήκτωμα αγαρόζης ή σε πήκτωμα ακρυλαμίδης. Μεγάλη προσπάθεια έχει γίνει για να βελτιωθεί η ποιότητα των πηκτωμάτων αγαρόζης όσον αφορά στη διαχωριστική τους ικανότητα. Παρόλα αυτά, για μικρά τμήματα DNA, όπως αυτά που προκύπτουν από την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης, τα πηκτώματα ακρυλαμίδης αποτελούν ακόμη τη μέθοδο επιλογής. Παρά το ότι τα πηκτώματα αγαρόζης μπορούν να προετοιμαστούν παρουσία αέρα και η ηλεκτροφόρηση μπορεί να γίνει στην οριζόντια διάσταση, η ακρυλαμίδα δεν πολυμερίζεται παρουσία αέρα και η ηλεκτροφόρηση γίνεται κάθετα και συνήθως μεταξύ δυο γυάλινων πλακών.

Με την τεχνική **H-PAGE** (Horizontal Polyacrylamide Gels) καθίσταται δυνατή η ηλεκτροφόρηση σε οριζόντιο επίπεδο οπότε και γίνεται δυνατή η φόρτωση των δειγμάτων σε σειρές. Η τεχνική **MADGE** προέκυψε από το γεγονός ότι πολλές διαδικασίες στο εργαστηριακό περιβάλλον έχουν σαν βάση τυποποιημένες πλάκες 96 θέσεων. Η τεχνική αυτή περιλαμβάνει τη δημιουργία πηκτωμάτων με 96 κελιά σε διάσταση ίδια με τη διάσταση του τυποποιημένου μοντέλου των 96 θέσεων που χρησιμοποιείται σε διάφορες εργαστηριακές πρακτικές. Τα κελιά βρίσκονται στα πηκτώματα διαγώνια μεταξύ τους, σχηματίζοντας γωνία $71,6^\circ$. Τα πηκτώματα που χρησιμοποιούνται στην τεχνική αυτή είναι είτε πηκτώματα ακρυλαμίδης είτε πηκτώματα αγαρόζης. Η τεχνική μειώνει κατά πολύ το χρόνο προετοιμασίας, φόρτωσης των δειγμάτων και διάγνωσης των αποτελεσμάτων και προσφέρει μεγάλη διαχωριστική ικανότητα. (6) Υπάρχει δυνατότητα ταυτόχρονης ηλεκτροφόρησης μεγάλου αριθμού πηκτωμάτων, γεγονός που επιταχύνει ακόμη περισσότερο τη διαδικασία λήψης αποτελεσμάτων για μεγάλο αριθμό δειγμάτων. (7)

Στην τεχνική **MADGE**, για το σχηματισμό των πηκτωμάτων χρησιμοποιείται σαν μήτρα ένα δισδιάστατο πλαστικό καλούπι κι ένα τζάμι καλυμμένο με γ-μεθακρυλοξυπροπυλτριμεθοξυ-σιλικό οξύ. Η μήτρα αυτή έχει βάθος 2mm, είναι ορθογώνια (100X150 mm) και φέρει 96 κυβικά «δόντια» μεγέθους 2mm. Τα «δόντια» τοποθετούνται σε σειρές των 8 θέσεων, ο δε συνολικός αριθμός σειρών είναι 12. Το συνολικό σχήμα ταιριάζει απόλυτα με τις τυποποιημένες πλάκες 96 θέσεων που χρησιμοποιούνται ευρέως σε εργαστηριακές τεχνικές. Η διαμόρφωση των σειρών σχηματίζει γωνία $71,6^\circ$ με τη μεγαλύτερη πλευρά του καλουπιού, που είναι

παράλληλη προς τη φορά της ηλεκτροφόρησης. Με αυτόν τον τρόπο, κατά την ηλεκτροφόρηση τα δείγματα κινούνται ανάμεσα στις θέσεις των δειγμάτων της επόμενης σειράς. Η διαμόρφωση αυτή φαίνεται στο σχήμα 2.

Η προετοιμασία του διαλύματος του πηκτώματος διαρκεί 5 λεπτά για την ακρυλαμίδα (αρκετά περισσότερο όμως για την αгарόζη). Το διάλυμα τοποθετείται στη μήτρα, μεταξύ καλουπιού και γυάλινης πλάκας, ενώ αφού πήξει αφαιρείται το καλούπι και το πήκτωμα με τα 96 κελιά βρίσκεται πάνω στη γυάλινη πλάκα. Η διαδικασία προετοιμασίας φαίνεται στο σχήμα 1. Η τοποθέτηση των δειγμάτων στο πήκτωμα μπορεί να γίνει με πιπέτα πολλαπλών θέσεων, γεγονός που επιταχύνει κατά πολύ τη διαδικασία (διαρκεί περίπου 5 λεπτά). **(8)** Η ηλεκτροφόρηση μπορεί να διαρκέσει από 30-60 λεπτά, ανάλογα με το ρυθμό μετακίνησης του DNA πάνω στο πήκτωμα, τη συγκέντρωση του ρυθμιστικού διαλύματος και την επί τοις εκατό περιεκτικότητα του διαλύματος του πηκτώματος. **(6)**



Σχήμα1: Στις παραπάνω εικόνες φαίνεται η διαδικασία σχηματισμού του πηκτώματος στη μήτρα. Διακρίνονται η γυάλινη πλάκα και το πλαστικό καλούπι που χρησιμοποιούνται στην τεχνική MADGE.

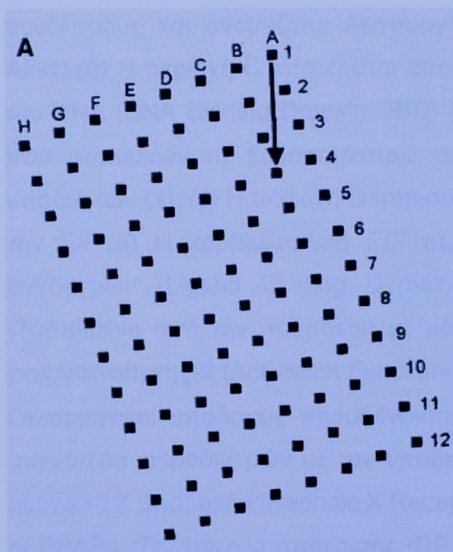
Μετά την ηλεκτροφόρηση, η οποία μπορεί να γίνει για πέντε πηκτώματα ταυτόχρονα, ακολουθεί διαδικασία χρώσης με βρωμιούχο αιθίδιο για 30 λεπτά και μια δεκάλεπτη διαδικασία αποχρωματισμού σε ρυθμιστικό διάλυμα. Η διαδικασία της ανάγνωσης των αποτελεσμάτων γίνεται σε υπεριώδες φως με τη βοήθεια ηλεκτρονικού υπολογιστή. **(8)**

Η ακρυλαμίδη σε σχέση με την αгарόζη δίνει καλύτερο διαχωριστικό αποτέλεσμα (80-600bp) σε μικρότερη μετακίνηση του DNA κατά την ηλεκτροφόρηση, με αποτέλεσμα να γίνεται πιο γρήγορα η διαδικασία. (6)

Τα πλεονεκτήματα της μεθόδου είναι τα ακόλουθα:

- είναι οικονομική, αφού απαιτεί μικρές ποσότητες αντιδραστηρίων
- επιτρέπει γρήγορο εύκολο χειρισμό πολλών δειγμάτων ταυτόχρονα
- το γυαλί αποτελεί καλό αγωγό της θερμότητας
- τα έτοιμα πηκτώματα μπορούν να αποθηκευτούν για μεγάλο διάστημα. (8)
- μπορούν να ξαναχρησιμοποιηθούν αν το πήκτωμα μετακινηθεί κατά 90° και γίνει ηλεκτροφόρηση σε πλατύτερη συσκευή. (6)

Η τεχνική **MADGE** δημιουργήθηκε για να καλύψει τις ανάγκες επιδημιολογικής φύσεως ερευνών, που απαιτούν πρακτικές χαμηλού κόστους, τη δυνατότητα χειρισμού πολλών δειγμάτων ταυτόχρονα και τεχνικές ικανές να πραγματοποιηθούν τόσο σε μεγάλα όσο και σε μικρά εργαστήρια. Οι απαιτήσεις αυτές δεν καλύπτονταν επαρκώς με τις μέχρι τώρα τεχνικές. (8)



Σχήμα 2: Στο διπλανό σχήμα φαίνεται η διαμόρφωση του πηκτώματος σύμφωνα με το μοντέλο των 96 κελιών. Το βέλος δείχνει τη φορά μετακίνησης του DNA κατά την ηλεκτροφόρηση

Η ΥΠΕΡΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ΤΩΝ ΟΡΜΟΝΙΚΩΝ ΠΥΡΗΝΙΚΩΝ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ ΚΑΙ ΟΙ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΜΕΝΟΙ ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ ΤΩΝ ΥΠΕΡΟΞΕΙΔΙΟΣΜΑΤΩΝ (PPARS)

Οι ενεργοποιημένοι υποδοχείς πολλαπλασιασμού των υπεροξειδιοσωμάτων (Peroxisome Proliferator- Activated Receptors-**PPARs**) ανήκουν στην μεγάλη υπεροικογένεια των πυρηνικών ορμονικών υποδοχέων. Η οικογένεια αυτή περιλαμβάνει μεταγραφικούς παράγοντες ρυθμιζόμενους από λιπόφιλα μόρια-συνδέσμους, όπως οι κλασικοί στεροειδικοί και θυρεοειδικοί ορμονικοί υποδοχείς, οι ρετινοειδικοί ορμονικοί υποδοχείς κ.λ.π. Αυτοί οι μεταγραφικοί παράγοντες ενεργοποιούν γονίδια-στόχους με πρόσδεσή τους σε συγκεκριμένη αλληλουχία του DNA, που ονομάζεται στοιχείο απόκρισης (response element-**RE**) και βρίσκεται στον υποκινητή των γονιδίων αυτών **(2)** Η λειτουργία των πυρηνικών υποδοχέων στο κύτταρο είναι να προσαρμόζουν το πρόγραμμα της γονιδιακής έκφρασης σύμφωνα με τα σήματα που δέχονται με τη μορφή λιπόφιλων μορίων-συνδέσμων **(1)**.

Οι πυρηνικοί υποδοχείς έχουν κοινή δομική και λειτουργική οργάνωση. Διακρίνονται τέσσερις κύριες περιοχές: **(α)** Η αμινοτελική A/B περιοχή, που ποικίλει τόσο στην αλληλουχία όσο και στο μήκος της ανάμεσα στους διάφορους υποδοχείς, επιτελεί ενεργοποιητική λειτουργία ανεξάρτητη από την πρόσδεση του υποδοχέα με μόρια συνδέσμων και ονομάζεται **λειτουργία ενεργοποίησης-1** (Activation Function-1, **AF-1**). **(β)** Η περιοχή C αποτελείται από 70 αμινοξέα και είναι η περιοχή πρόσδεσης του DNA (DNA Binding Domain-**DBD**) **(2)**, που φέρει δύο «δάκτυλα» ψευδαργύρου που αποτελούν το χαρακτηριστικό των μελών της οικογένειας των πυρηνικών υποδοχέων **(1)**. **(γ)** Η περιοχή D που συνδέει την περιοχή C με την επόμενη περιοχή, την E/F. **(δ)** Η καρβοξυτελική E/F περιοχή ή περιοχή πρόσδεσης των μορίων-συνδέσμων (Ligand Binding Domain-**LBD**), επιτελεί ενεργοποιητική λειτουργία εξαρτώμενη από την πρόσδεση με μόρια-συνδέσμους, και ονομάζεται **λειτουργία ενεργοποίησης-2** (Activation Function-2, **AF-2**).

Οι πυρηνικοί υποδοχείς προσδένονται στο DNA με μορφή είτε ομοδιμερών, είτε συχνότερα ετεροδιμερών με τον υποδοχέα του 9-cis-ρετινοϊκού οξέος, γνωστό σαν ρετινοϊκό X υποδοχέα (Retinoic X Receptor-**RXR**). Στην περίπτωση αυτή ανήκουν και οι PPARs. Το στοιχείο απόκρισης (RE) των πυρηνικών υποδοχέων, που βρίσκεται στο γονίδιο-στόχο, αποτελείται από δυο εξαμερείς αλληλουχίες που είναι ίδιες, ή μοιάζουν πολύ με την αλληλουχία AGGTCA. Η οργάνωση αυτών των αλληλουχιών και η μεταξύ τους απόσταση καθορίζουν την ειδίκευση του κάθε στοιχείου απόκρισης ως προς κάθε διμερές της οικογένειας των πυρηνικών υποδοχέων. Το στοιχείο απόκρισης των PPAR (**PPRE**), που ενώνεται με το ετεροδιμερές PPAR:RXR, είναι η

επανάληψη των δύο εξαμερών αλληλουχιών με την παρεμβολή ανάμεσά τους ενός νουκλεοτιδίου.

Ο μεταγραφικός έλεγχος διαμέσου των πυρηνικών υποδοχέων πιστεύεται ότι συμβαίνει με μια διαδικασία τουλάχιστον δύο βημάτων. Απουσία μορίου-συνδέσμου, το διμερές ενώνεται με μια πρωτεΐνη που εμποδίζει τη δράση του. Παρουσία μορίου-συνδέσμου, ή μετά από ενεργοποίηση από εναλλακτικό μονοπάτι, όπως με φωσφορυλίωσή του, η πρωτεΐνη απελευθερώνεται και ενώνονται συνενεργοποιητές που ευνοούν την καλύτερη σύνδεσή του με τη μεταγραφική μηχανή, που οδηγεί σε ενεργοποίηση της μεταγραφής των γονιδίων-στόχων **(1)**.

Οι PPARs αποτελούν το σύνολο C στην υποοικογένεια 1 της υπεροικογένειας των πυρηνικών ορμονικών υποδοχέων (Nuclear Receptors-**NR**). Υπάρχουν τρεις τύποι PPAR: το PPARα (NR1C1), το PPARβ (NR1C2) και το PPARγ (NR1C3) **(2)**.

ΕΙΔΙΚΗ ΙΣΤΙΚΗ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ PPARS

Τα επίπεδα του PPARα είναι υψηλότερα στον φαιό λιπώδη ιστό και στο ήπαρ, ενώ μικρότερες ποσότητες υπάρχουν στην καρδιά, στους νεφρούς και στα εντεροκύτταρα. **(1)** Επίσης, έκφραση του PPARα αναφέρεται να υπάρχει στο σκελετικό μύ και στο πάγκρεας **(9)**, καθώς και στους πνεύμονες σε μικρότερα ποσά. **(2)** Γενικά, μεγαλύτερη έκφραση του γονιδίου παρουσιάζεται σε ιστούς που έχουν αυξημένη ικανότητα οξείδωσης λιπαρών οξέων, όπως η καρδιά και οι σκελετικοί μύες. **(6)**

Η έκφρασή του PPARβ φαίνεται να είναι πιο διαδεδομένη, με επίπεδα που ποικίλουν στα διάφορα όργανα. **(1)** Παρόλα αυτά, δεν έχει μελετηθεί εκτενώς η έκφραση του γονιδίου στους διάφορους ιστούς. **(9)**

Από διαφορετικούς υποκινητές και με άλλη διαδικασία ματίσματος (splicing) προκύπτουν τρεις ισομορφές του PPARγ, το PPARγ1, το PPARγ2 και το PPARγ3. **(1)** Οι ιστοί που εμφανίζουν τα υψηλότερα επίπεδα mRNA και πρωτεΐνης του PPARγ, είναι ο λιπώδης ιστός, το παχύ έντερο και τα αιμοποιητικά κύτταρα. Μέτρια έκφραση του γονιδίου παρατηρείται στο ήπαρ, στο νεφρό και το λεπτό έντερο, ενώ η έκφραση είναι μικρή στο μυϊκό ιστό. Το PPARγ1 είναι η ισομορφή που κυριαρχεί, ενώ το PPARγ2 βρίσκεται σε αρκετά μικρότερες ποσότητες. **(4)** Το PPARγ1 εκφράζεται κυρίως στο φαιό και λευκό λιπώδη ιστό, αλλά επίσης στο κόλον, στη σπλήνα, στον αμφιβληστροειδή και στα αιμοποιητικά κύτταρα. **(1)** Ο μόνος ιστός που εμφανίζει μεγάλες ποσότητες του PPARγ2 είναι ο λιπώδης ιστός, όπου το PPARγ2 mRNA αποτελεί περίπου το 20% της συνολικής έκφρασης του PPARγ. **(4)** Έτσι, το PPARγ2 εκφράζεται κυρίως στο λευκό και φαιό λιπώδη ιστό. **(1)**

Η έκφραση του PPAR γ περιορίζεται στα μακροφάγα και στο παχύ έντερο. (4)

ΜΟΡΙΑ-ΣΥΝΔΕΣΜΟΙ ΤΩΝ PPARs

Η περιοχή πρόσδεσης των μορίων-συνδέσμων έχει αρκετά διαφορετική αμινοξική αλληλουχία ανάμεσα στα διάφορα PPARs, επιτρέποντας την ειδίκευση του κάθε τύπου ως προς συγκεκριμένα μόρια-συνδέσμους. Τα μόρια-σύνδεσμοι χωρίζονται σε δύο κατηγορίες: στα συνθετικά όπως οι παράγοντες πολλαπλασιασμού των υπεροξειδωσωμάτων, οι φιβράτες, διάφορα αντιφλεγμονώδη και υπολιπιδαιμικά φάρμακα, καθώς και οι ευαισθητοποιητές της ινσουλίνης, και σε φυσικά όπως τα μέσης και μακράς αλύσου λιπαρά οξέα και τα εικοσανοειδή. (2)

Το PPAR α είναι ο κυτταρικός στόχος για τις φιβράτες γεμφιβροζίλη, βεζαφιβράτη, φενοφιβράτη που είναι υπολιπιδαιμικά φάρμακα ευρέως χρησιμοποιούμενα για τη θεραπεία των καρδιαγγειακών νοσημάτων. Το PPAR γ είναι ο στόχος για ένα σύνολο φαρμάκων που ονομάζονται θειαζολιδινεδιόνες (TZDs), όπως η ροζιλιταζόνη και η πιогλιταζόνη, που χρησιμοποιούνται στη θεραπεία του διαβήτη τύπου II. Τα φάρμακα αυτά είναι αποτελεσματικά για τη μείωση της γλυκόζης αίματος κι έχουν μέτρια αποτελέσματα στα λιπίδια των ασθενών αυτών. (1)

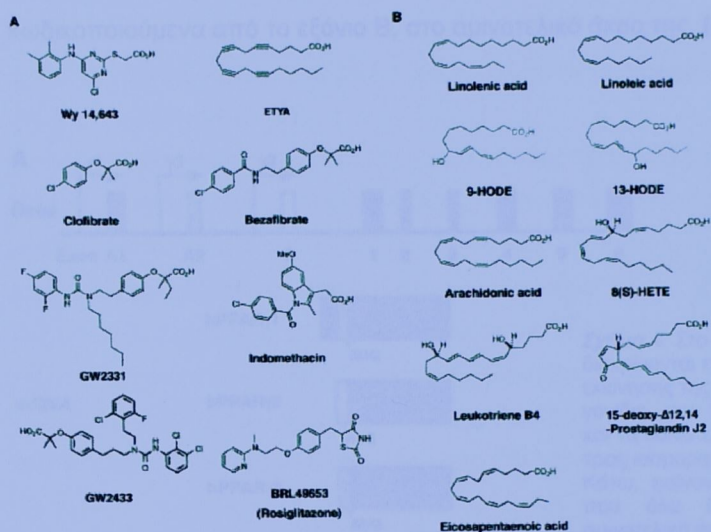
Όσον αφορά στα ενδογενώς συντιθέμενα μόρια-συνδέσμους των PPARs, το PPAR α ενεργοποιείται από ποικιλία λιπαρών οξέων μακράς αλύσου (μόρια-σύνδεσμοι), κυρίως από πολυακόρεστα λιπαρά οξέα όπως το δοκοσαεξενικό οξύ, το εικοσαπεντανοϊκό οξύ, το λινολενικό οξύ, το λινελαϊκό οξύ και το αραχιδονικό οξύ. (1),(2). Φαίνεται όμως να ενεργοποιείται σε μικρότερο βαθμό και από κορεσμένα λιπαρά οξέα. Ο βαθμός ακορεστότητας των ακόρεστων λιπαρών οξέων, δε φαίνεται να επηρεάζει τη συμπληρωματικότητα του υποδοχέα με το μόριο-σύνδεσμο. (10) Επίσης το 8-ύδροξυ-εικοσατετρανοϊκό οξύ και το λευκοτριένιο B $_4$ ταυτοποιήθηκαν ως μόρια-σύνδεσμοι για το PPAR α .

Όσον αφορά στο PPAR γ , πολλά μακράς αλύσου λιπαρά οξέα όπως το λινελαϊκό οξύ, το λινολενικό οξύ και το αραχιδονικό οξύ αποτελούν γι αυτό μόρια-συνδέσμους. (1) Επίσης, προσταγλαδίνες προερχόμενες από την PGD $_2$ και συγκεκριμένα ο μεταβολίτης της 15-δέοξυ- Δ 12,14PGJ $_2$ ταυτοποιήθηκε σαν ειδικό μόριο-σύνδεσμος για το PPAR γ . (1),(9),(10) Ακόμη, φαίνεται ότι η δραστικότητα της συνθάσης της PGD $_2$ είναι μεγαλύτερη σε ιστούς που εκφράζουν σε μεγάλο ποσοστό το PPAR γ . (10) Η πρόσδεση στο PPAR γ της 15-δέοξυ- Δ 12,14PGJ $_2$ οδηγεί σε ενεργοποίηση της μεταγραφής γονιδίων του λιπώδους ιστού, όπως το γονίδιο της φωσφοενολοπυροσταφυλικής καρβοξυκινάσης. (11) Επιπλέον οξειδωμένοι μεταβολίτες του λινελαϊκού οξέος που βρίσκονται στις οξειδωμένες λιποπρωτείνες

χαμηλής πυκνότητας (ox-LDL), όπως το 9-υδροξυ-οκταδεκανικό οξύ και το 13-υδροξυ-οκταδεκανικό οξύ, ταυτοποιήθηκαν ως μόρια-σύνδεσμοι για το PPAR γ . **(1),(9)**. Επίσης, η ενεργοποίηση της 12/15 λιποοξυγενάσης από την ιντερλευκίνη-4 παράγει μόρια-συνδέσμους για το PPAR γ .

Μόρια-σύνδεσμοι για το PPAR β είναι τα ακόρεστα λιπαρά οξέα λινολενικό οξύ, λινελαικό οξύ και αραχιδονικό οξύ. **(1)** Επίσης διάφορα προστανοειδή έχουν ταυτοποιηθεί σαν πιθανά μόρια-σύνδεσμοι για το PPAR β . **(9)**

Τα διάφορα μόρια-σύνδεσμοι των PPARs φαίνονται στο σχήμα 3.



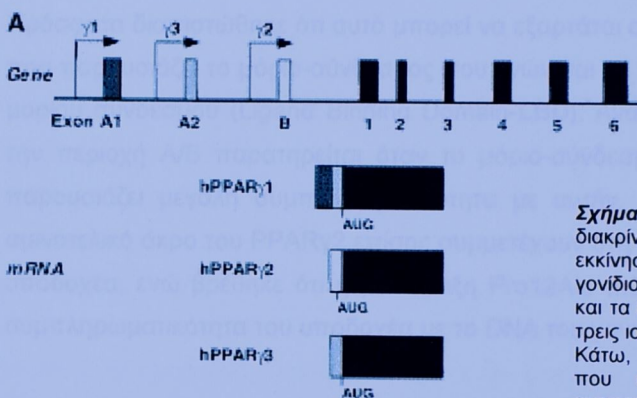
Σχήμα 3: Στις παραπάνω εικόνες φαίνονται τα μόρια-σύνδεσμοι των PPARs. Στο τμήμα A, διακρίνονται τα συνθετικά μόρια-σύνδεσμοι, ενώ στο σχήμα B τα ενδογενώς συντιθέμενα

ΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ ΤΟΥ PPAR γ , ΤΟ m-RNA ΚΑΙ Η ΠΡΩΤΕΙΝΗ

Γονίδιο και m-RNA του PPAR γ

Το ανθρώπινο γονίδιο του PPAR γ αποτελείται από 9 εξόνια και εκτείνεται σε απόσταση πάνω από 100kb στο γενομικό DNA και βρίσκεται πάνω στο χρωμόσωμα 3p25. Σε αντίθεση με τα ποντίκια στα οποία έχουν ταυτοποιηθεί δύο ισομορφές του PPAR γ , η PPAR γ 1 και η PPAR γ 2, στον άνθρωπο τρεις ισομορφές έχουν ταυτοποιηθεί: PPAR γ 1, PPAR γ 2, PPAR γ 3. Διαφορετικά σημεία εκκίνησης της μεταγραφής και διαφορετική διαδικασία ματίσματος (splicing), δίνουν τρία PPAR γ mRNAs, που διαφέρουν στο 5' άκρο τους. Οι σχετικές θέσεις εκκίνησης αντιγραφής και τα mRNAs που προκύπτουν φαίνονται στο σχήμα 4.

Το PPAR γ 1 κωδικοποιείται από 8 εξόνια, ενώ τα PPAR γ 2 και PPAR γ 3 από 7 εξόνια. Η 5' αμετάφραστη περιοχή του PPAR γ 1 αποτελείται από τα εξόνια A1 και A2, ενώ αυτή του PPAR γ 3 αποτελείται μόνο από το εξόνιο A2. Η 5' αμετάφραστη περιοχή του PPAR γ 2 καθώς και η επιπρόσθετη-ειδική για το PPAR γ 2 αμινοτελική αμινοξική αλληλουχία, κωδικοποιούνται από το εξόνιο B, που βρίσκεται ανάμεσα στα εξόνια A1 και A2. Τα υπόλοιπα εξόνια, τα 1-6 είναι κοινά για τα τρία PPAR γ . Υπάρχουν όπως αναφέρθηκε και τρεις διαφορετικοί υποκινητές για κάθε ένα από τα PPAR γ . Ενώ τα PPAR γ 1 και PPAR γ 3 δίνουν το ίδιο ακριβώς πρωτεϊνικό προϊόν, το PPAR γ 2 mRNA δίνει την PPAR γ 2 πρωτεΐνη που φέρει 28 επιπλέον αμινοξέα, τα κωδικοποιούμενα από το εξόνιο B, στο αμινοτελικό άκρο της. (4)



Σχήμα 4: Στο διπλανό σχήμα, διακρίνονται επάνω τα σημεία εκκίνησης της αντιγραφής στο γονίδιο του PPAR γ , καθώς και τα κοινά εξόνια 1-6 για τις τρεις ισομορφές. Κάτω, φαίνονται τα m-RNAs που όλα διαφέρουν στο αμινοτελικό άκρο τους.

Δομή και λειτουργία της πρωτεΐνης των PPAR

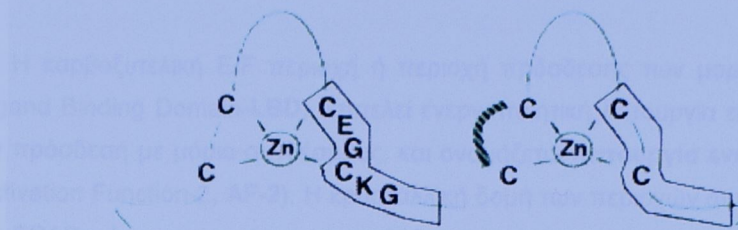
Η πρωτεΐνη των PPARs αποτελείται από τομείς και προσομοιάζει σε αυτήν όλων των πυρηνικών ορμονικών υποδοχέων που ήδη αναφέρθηκε. Συγκεκριμένα:

(α) Η αμινοτελική A/B περιοχή, που ποικίλει τόσο στην αλληλουχία όσο και στο μήκος της ανάμεσα στους διάφορους υποδοχείς, επιτελεί ενεργοποιητική ή ανασταλτική λειτουργία, ανεξάρτητη από την πρόσδεση του υποδοχέα με μόρια συνδέσμων και ονομάζεται **λειτουργία ενεργοποίησης-1** (Activation Function-1, **AF-1**). (1) Η περιοχή αυτή μέσω π.χ. φωσφορυλιώσεων των αμινοξέων μπορεί να

αναστείλει ή και να διεγείρει την μεταγραφική λειτουργία του υποδοχέα. **(2)** Συγκεκριμένα, η δραστικότητα του υποδοχέα μειώνεται με φωσφορυλίωση μιας σερίνης στη θέση 112 ή στη θέση 82 από μέλη της οικογένειας των πρωτεϊνικών κινασών των ενεργοποιούμενων από τη μίτωση (Mitogen-activated Protein Kinase-**MAP kinase**). **(12),(13)** Αντιθέτως, φωσφορυλίωση από την **πρωτεϊνική κινάση A** φαίνεται να ενισχύει την μεταγραφική ικανότητα του υποδοχέα. Τα αποτελέσματα των ερευνών φαίνονται αντιφατικά όσον αφορά στη δράση των κινασών αυτών *in vivo*, αφού παράγοντες όπως η αγγειοτενσίνη II ενεργοποιούν τις κινάσες αυτές, ενώ ταυτόχρονα προάγουν τη διαφοροποίηση των λιποκυττάρων στην οποία σημαντικό ρόλο παίζει το PPARγ. **(13)** Σε κάθε περίπτωση, η δέσμευση των μορίων-συνδέσμων φαίνεται να ρυθμίζεται από ενδομοριακή αλληλεπίδραση μεταξύ της A/B περιοχής και της περιοχής LBD. **(11)**

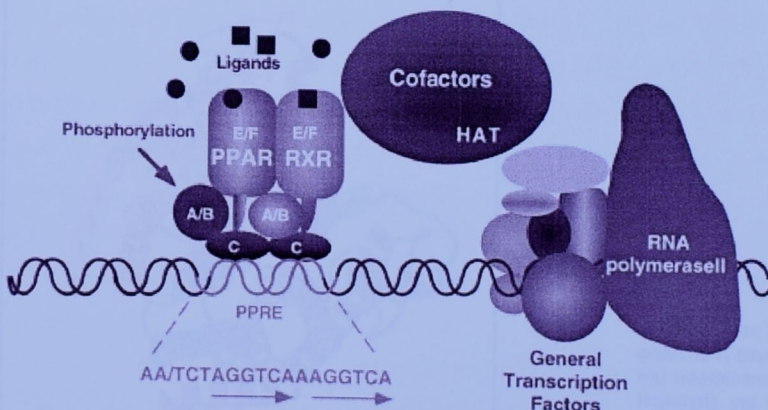
Πρόσφατα διαπιστώθηκε ότι αυτό μπορεί να εξαρτάται από τη συμπληρωματικότητα που παρουσιάζει το μόριο-σύνδεσμος που ενώνεται με την περιοχή πρόσδεσης του μορίου συνδέσμου (Ligand Binding Domain-**LBD**). Αναστολή της μεταγραφής από την περιοχή A/B παρατηρείται όταν το μόριο-σύνδεσμος της περιοχής LBD δεν παρουσιάζει μεγάλη συμπληρωματικότητα με αυτήν. Τα επιπλέον αμινοξέα στο αμινοτελικό άκρο του PPARγ2 επίσης συμμετέχουν στη ρύθμιση της λειτουργίας του υποδοχέα, ενώ βρέθηκε ότι η μετάλλαξη Pro12Ala πιθανά σχετίζεται με μειωμένη συμπληρωματικότητα του υποδοχέα με το DNA του γονιδίου-στόχου. **(2)**

(β) Η περιοχή C αποτελείται από 70 αμινοξέα και είναι η περιοχή πρόσδεσης του DNA (DNA Binding Domain-**DBD**). **(2)** Φέρει δύο «δάκτυλα» ψευδαργύρου που αποτελούν το χαρακτηριστικό των μελών της οικογένειας των πυρηνικών υποδοχέων **(1)**. Δεν έχει μελετηθεί η δομή για τους PPARs, αλλά η καλά διατηρούμενη αμινοξική αλληλουχία ανάμεσα στα είδη, μας επιτρέπει να θεωρήσουμε ότι η δομή αυτή στους PPAR μοιάζει κατά πολύ με αυτήν στους άλλους ορμονικούς πυρηνικούς υποδοχείς. Κάθε «δάκτυλο» ψευδαργύρου φέρει ένα άτομο ψευδαργύρου που ενώνεται με δυο κυστείνες και η α-έλικα του κάθε δακτύλου βρίσκεται ακριβώς κάθετα στην άλλη. Το καρβοξυτελικό άκρο του πρώτου δακτύλου περιλαμβάνει το αποκαλούμενο P-κουτί (**P-box**), που ενώνεται με τα συγκεκριμένα νουκλεοτίδια του DNA του γονιδίου-στόχου. Η πρωταρχική αλληλουχία του P-κουτιού (CEGCKG) του PPAR είναι ίδια με αυτήν των άλλων μελών της υποοικογένειας 1, και όλοι οι υποδοχείς αυτοί αναγνωρίζουν στο DNA του γονιδίου-στόχου την αλληλουχία AGGTCA. Μεταλλάξεις στο P-κουτί μπορούν να καταργήσουν την μεταγραφική λειτουργία. Η μορφή των «δακτύλων» αυτών φαίνεται στο σχήμα 5.



Σχήμα 5: Στο παραπάνω σχήμα διακρίνονται τα δυο «δάκτυλα» ψευδαργύρου, καθώς και η αλληλουχία του Ρ-κουτιού.

Καθώς το PPAR ενώνεται ως ετεροδιμερές με το DNA του γονιδίου-στόχου με άλλο μέλος της υπερικογένειας των ορμονικών πυρηνικών υποδοχών, τον υποδοχέα του 9-cis-ρετινοϊκού οξέος (**RXR**), η λειτουργική περιοχή του στοιχείου απόκρισης φέρει δύο αντίγραφα του παραπάνω μοτίβου (AGGTCA). Οργανώνονται είτε ως άμεσες επαναλήψεις, ή χωρίζονται από ένα νουκλεοτίδιο, οπότε και ονομάζονται DR-1. Η περιοχή ανάμεσα στις δυο κυστείνες του δεύτερου δακτύλου των πυρηνικών υποδοχών είναι το κουτί D (**D-box**). Περιέχει τρία αμινοξέα σε αντίθεση με αυτά των περισσότερων πυρηνικών υποδοχών που περιέχουν πέντε αμινοξέα. Αυτό πιθανά εκφράζει την μοναδική διαμόρφωση του ετεροδιμερούς PPAR/RXR στο DR-1, με το PPAR τοποθετημένο 5' ως προς τον RXR. Η συμπληρωματικότητα του ετεροδιμερούς με το γονίδιο-στόχο επιπλέον αυξάνεται όταν το DR-1 είναι μια αδενίνη. (2) Η σχετικές θέσεις των PPAR και RXR αλλά και η διαμόρφωσή τους ώστε να επιτευχθεί η έκφραση των γονιδίων-στόχων φαίνεται στο σχήμα 6.

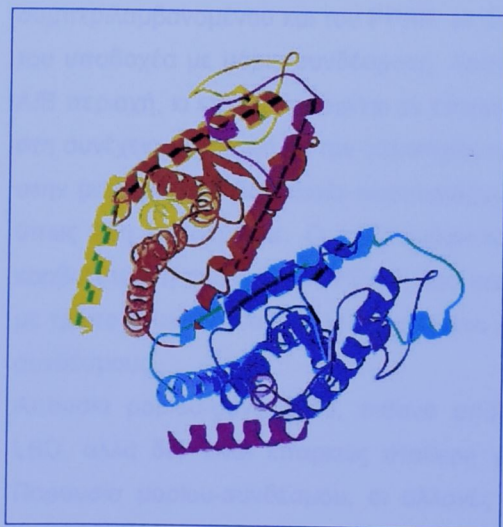


Σχήμα 6: Στο παραπάνω σχήμα διακρίνεται η μεταγραφική μηχανή στην οποία συμμετέχει το ετεροδιμερές **PPAR:RXR**. Φαίνεται η επανάληψη των δυο εξαμερών αλληλουχιών καθώς και η παρεμβολή μιας βάσης μεταξύ τους (**DR-1**). Φαίνονται επίσης οι διάφορες περιοχές στο μόριο των υποδοχών, καθώς και η τοποθέτηση του RXR 5' ως προς τον PPAR.

(γ) Η περιοχή D που συνδέει την περιοχή C με την επόμενη περιοχή, την E/F.

(δ) Η καρβοξυτελική E/F περιοχή ή περιοχή πρόσδεσης των μορίων-συνδέσμων (Ligand Binding Domain-**LBD**), επιτελεί ενεργοποιητική λειτουργία εξαρτώμενη από την πρόσδεση με μόρια-συνδέσμους, και ονομάζεται **λειτουργία ενεργοποίησης-2** (Activation Function-2, **AF-2**). Η κρυσταλλική δομή των περιοχών αυτών στα PPARα και PPARγ έγινε γνωστή με τις μεθόδους της κρυσταλλογραφίας με ακτίνες Χ. Παρουσιάζουν κάποια ομολογία στις δύο αυτές ισομορφές των PPAR. Συγκεκριμένα οι περιοχές οι καλύτερα διατηρούμενες, είναι οι θέσεις της δέσμευσης του μορίου-συνδέσμου, η θέση όπου συμβαίνει ο ετεροδιμερισμός και οι θέσεις αλληλεπίδρασης με τους συμπαράγοντες.

Σε γενικές γραμμές, η περιοχή αποτελείται από 13 α-έλικες με την παρεμβολή διαμορφώσεων β-δομής. Σε σχέση με την περιοχή αυτή στους άλλους πυρηνικούς υποδοχείς, στους PPAR περιέχεται μια επιπλέον α-έλικα. Η όλη οργάνωση της πρωτεΐνης σε αυτήν την περιοχή φαίνεται στο σχήμα 7.(2) Οι έλικες αυτές οργανώνονται σε τρεις λωρίδες, σχηματίζοντας ανάμεσα τους μια υδρόφοβη «τσέπη», που αποτελεί την ακριβή θέση δέσμευσης του μορίου-συνδέσμου. Μετά την δέσμευση, η «τσέπη» κλείνει. Το μέγεθος της, είναι αρκετά μεγαλύτερο από αυτής των άλλων πυρηνικών υποδοχέων. Από το γεγονός αυτό φαίνεται να εξηγείται η ικανότητα των PPAR να έχουν μεγάλη ποικιλία μορίων-συνδέσμων, που η δέσμευση μπορεί να γίνεται και με μικρή συμπληρωματικότητα μεταξύ της περιοχής LBD και του μορίου-συνδέσμου. (1)



Σχήμα 7: Στη διπλανή εικόνα φαίνεται η περιοχή πρόσδεσης του μορίου-συνδέσμου (LBD περιοχή), για το PPAR. Διακρίνονται οι χαρακτηριστικές α-έλικες της δευτεροταγούς δομής της πρωτεΐνης.

Επίδραση συμπαραγόντων και αλλαγές στη διαμόρφωση του υποδοχέα κατά την πρόσδεση μορίων-συνδέσμων

Η σύνδεση του υποδοχέα με το μόριο-σύνδεσμο έχει σαν αποτέλεσμα, όπως ήδη αναφέρθηκε, αλλαγές στη διαμόρφωση της LBD και κυρίως της καρβοξυτελικής περιοχής AF-2. Η ροζιλιταζόνη (συνθετικό μόριο-σύνδεσμος για το PPARγ) σχηματίζει δεσμούς υδρογόνου με το Y473 και υδρόφοβους δεσμούς με το L469, που βρίσκονται και τα δύο στην μέση της έλικας της AF. Αφού προσδεθεί ο υποκατάστατης, η έλικα AF διπλώνεται και σχηματίζει μια υδρόφοβη σχισμή με την έλικες 3 και 4, επιτρέποντας την αλληλεπίδραση με τους συμπαραγόντες. **(2)**

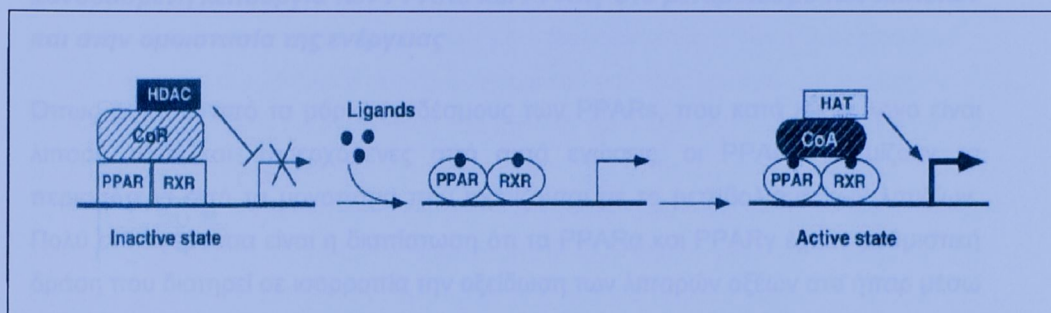
Οι συμπαραγόντες αυτοί βοηθούν στην καλύτερη επαφή των παραγόντων μεταγραφής με τη μεταγραφική μηχανή, αλλά και κάποιες φορές παρουσιάζουν ενζυματική δράση και κατά συνέπεια θα μπορούσαν να παίζουν ρόλο στον έλεγχο της γονιδιακής έκφρασης τροποποιώντας κατάλληλα τη δομή του DNA και της χρωματίνης. Πέρα από τους συμπαραγόντες, στην περιοχή LBD δεσμεύονται και πρωτεΐνες που εμποδίζουν τη δέσμευση του μορίου-συνδέσμου.

Μέλη τριών οικογενειών συμπαραγόντων, του συνενεργοποιητή του στερεοειδικού υποδοχέα-1 (Steroid receptor co activator-1, **SRC-1**), της πρωτεΐνης δέσμευσης του στοιχείου απόκριση του c-AMP, (**CBP/p300**) και του παράγοντα συσχέτισης με τον CBP/p300, του **P/CAF**, μπορούν να ακετυλιώνουν ιστόνες. Αντιθέτως, οι πρωτεΐνες που εμποδίζουν τη δέσμευση του μορίου-συνδέσμου, απακετυλιώνουν ιστόνες. Η ακετυλίωση της ιστόνης μεταβάλλει τη διαμόρφωση του νουκλεοσώματος, οδηγώντας σε καλύτερη επαφή του παράγοντα μεταγραφής με τη μεταγραφική μηχανή. **(4)**

Ο **SRC-1** αλληλεπιδρά με διάφορους ορμονικούς πυρηνικούς υποδοχείς, συμπεριλαμβανομένου και του PPAR, με διαδικασία εξαρτώμενη από την πρόσδεση του υποδοχέα με μόρια-συνδέσμους. Αλληλεπιδρά τόσο με την E/F όσο και με την A/B περιοχή, κι επιπλέον έρχεται σε επαφή με τον **CBP/p300**. Ο τελευταίος έρχεται στη συνέχεια σε επαφή με τον συμπαραγόντα **P/CAF**. Οι τρεις αυτοί συμπαραγόντες στην μεταγραφική διαδικασία παρουσιάζουν δράση ακετυλοτρανσφεράσης ιστόνης, όπως ήδη αναφέρθηκε. Ο συμπαραγόντας **CBP/p300** αλληλεπιδρά τόσο με την καρβοξυτελική περιοχή των PPAR, όσο και με τα αμινοξέα 31-99 της περιοχής A/B, με τρόπο εξαρτώμενο και μη εξαρτώμενο αντίστοιχα, από την πρόσδεση με μόρια-συνδέσμους.

Απουσία μορίου-συνδέσμου, πιθανά υπάρχει ενεργή διαμόρφωση της περιοχής LBD, αλλά δεν είναι επαρκώς σταθερή για την δέσμευση των συμπαραγόντων. Παρουσία μορίου-συνδέσμου, οι αλλαγές στη διαμόρφωση του PPAR, όχι μόνο

επιτρέπουν τη δέσμευση των συμπαραγόντων, αλλά και προκαλούν την απομάκρυνση των πρωτεϊνών που δεσμεύονται στον υποδοχέα και εμποδίζουν τη δράση του όταν δεν υπάρχει μόριο-σύνδεσμος. (2) Ο συντονισμός των παραπάνω διαδικασιών φαίνεται στο σχήμα 8.



Σχήμα 8: Η ενεργοποίηση της μεταγραφικής λειτουργίας του ετεροδιμερούς PPAR/RXR απαιτεί την αποδέσμευση των πρωτεϊνών που εμποδίζουν τη δράση του συμπλόκου (CoR), που έχουν δράση απακετυλάσης ιστόνης (HDAC). Στη συνέχεια δεσμεύονται οι συμπράγοντες (CoA) με δράση ακετυλοτρανσφεράσης ιστόνης (HAT). Η δέσμευση των συμπαραγόντων διευκολύνεται από δομικές αλλαγές του ετεροδιμερούς που προκαλούνται είτε από την πρόσδεση μορίων- συνδέσμων (ligands) είτε από φωσφορυλίωση του υποδοχέα.

ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ PPAR γ ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΔΙΕΡΓΑΣΙΕΣ

Το PPAR γ αποτελεί την καλύτερα μελετημένη ισομορφή των PPARs. Έρευνες έχουν δείξει ότι ο υποδοχέας αυτός συμμετέχει σε βιολογικά μονοπάτια μεγάλου κλινικού ενδιαφέροντος όπως ο μεταβολισμός των λιπιδίων, η διαφοροποίηση κυττάρων, η λιπογένεση, η ευαισθησία στην ινσουλίνη και η αθηροσκλήρυνση (12)

Συνδυασμένη λειτουργία των PPAR α και PPAR γ στο μεταβολισμό των λιπιδίων και στην ομοιοστασία της ενέργειας

Όπως φαίνεται από τα μόρια-συνδέσμους των PPARs, που κατά κύριο λόγο είναι λιπαρά οξέα και προερχόμενες από αυτά ενώσεις, οι PPARs ρυθμίζουν τα περισσότερα από τα μονοπάτια που σχετίζονται με το μεταβολισμό των λιπιδίων. Πολύ ενδιαφέρουσα είναι η διαπίστωση ότι τα PPAR α και PPAR γ έχουν ρυθμιστική δράση που διατηρεί σε ισορροπία την οξειδωση των λιπαρών οξέων στο ήπαρ μέσω των PPAR α και την αποθήκευση των λιπαρών οξέων στο λιπώδη ιστό μέσω του PPAR γ .

Τα γονίδια-στόχοι για το PPAR α αποτελούν ένα σύνολο γονιδίων που συμμετέχει στις περισσότερες, αν όχι σε όλες, τις διαδικασίες του καταβολισμού των λιπιδίων. Συγκεκριμένα περιλαμβάνει γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες που έχουν να κάνουν με τη μεταφορά των λιπαρών οξέων στην κυκλοφορία, την πρόσληψη τους από τα ηπατοκύτταρα, την ενδοκυτταρική δέσμευση από πρωτεΐνες δέσμευσης των λιπαρών οξέων, την ενεργοποίηση από την συνθάση του άκυλο-CoA, καθώς επίσης και τον καταβολισμό με τη διαδικασία της β-οξειδωσης στα υπεροξειδιοσώματα και στα μιτοχόνδρια, και την ω-οξειδωση στα μικροσώματα.

Αντιθέτως, το PPAR γ εμπλέκεται στο πρόγραμμα διαφοροποίησης των λιποκυττάρων και στην αποθήκευση του λίπους. Η δράση του PPAR γ μπορεί να προκαλέσει τη μετατροπή των ινοβλαστών σε λιποκύτταρα. Στα γονίδια-στόχους για το PPAR γ συμπεριλαμβάνονται αυτά που κωδικοποιούν για την πρωτεΐνη δέσμευσης λιπαρών οξέων στα λιποκύτταρα (aP2), για τη λιποπρωτεϊνική λιπάση, την συνθάση του άκυλο-CoA, τη φωσφοένολο-πυροσταφυλική καρβοξυκινάση και την πρωτεΐνη μεταφοράς λιπαρών οξέων. 1)

Από τα παραπάνω φαίνεται ότι τα PPARs μπορούν να ρυθμίσουν τους ρυθμούς οξειδωσης και αποθήκευσης λιπών ανάλογα με τις διακυμάνσεις της πρόσληψης λίπους από την τροφή και την παραγωγή ενέργειας από τον οργανισμό. Με αυτό τον τρόπο μπορούν να συμβάλλουν στη μακροβιότητα. (10)

Πέρα από τη δράση των PPAR στο μεταβολισμό των λιπιδίων σε κυτταρικό επίπεδο, φαίνεται να παίζουν ρόλο και στον έλεγχο των λιποπρωτεϊνών και ειδικότερα των υψηλής περιεκτικότητας σε τριγλυκερίδια.

Γενικά, η συγκέντρωση τριγλυκεριδίων στο αίμα εξαρτάται αφενός από το ρυθμό παράγωγής τους από το ήπαρ και το έντερο, που εξαρτώνται από τη διαθεσιμότητα υποστρωμάτων όπως τα λιπαρά οξέα, κι αφετέρου από το βαθμό κάθαρσης τους που γίνεται μέσω έλεγχου από τη λιποπρωτεϊνική λιπάση και την απολιποπρωτεΐνη C-III. Ενεργοποίηση τόσο του PPAR γ όσο και του PPAR α οδηγούν σε μείωση της συγκέντρωσης των τριγλυκεριδίων με διαφορετικούς όμως μηχανισμούς. Ενεργοποίηση του PPAR γ επιδρά περισσότερο στο ρυθμό κάθαρσης των τριγλυκεριδίων, ενώ η ενεργοποίηση του PPAR α τόσο στο ρυθμό κάθαρσης όσο και το ρυθμό παραγωγής τους.

Συγκεκριμένα, **η ενεργοποίηση του PPAR α οδηγεί σε μείωση της παραγωγής απολιποπρωτεΐνης C, ενώ η ενεργοποίηση του PPAR γ οδηγεί σε αύξηση της έκφρασης στο λιπώδη ιστό της LPL.** Και οι δύο μηχανισμοί οδηγούν σε πιο αποτελεσματική κάθαρση των τριγλυκεριδίων από την κυκλοφορία μέσω αύξησης της λιπόλυσης. Η αύξηση της λιπόλυσης μέσω της λιποπρωτεϊνικής λιπάσης οδηγεί σε αύξηση των επιπέδων της λιποπρωτεΐνης χαμηλής πυκνότητας (LDL). Επιπλέον έρευνα απαιτείται για να διαπιστωθεί εάν η αύξηση των επιπέδων της LDL που παρατηρείται σε ασθενείς που λαμβάνουν θιαζολιδινεδιόνες, υποδηλώνει αυξημένη τάση εμφάνισης αθηροσκληρώσεως. (4)

PPAR γ και λιπογένεση

Ο λιπώδης ιστός αποτελείται από λιποκύτταρα που αποθηκεύουν ενέργεια σε μορφή τριγλυκεριδίων όταν αυτή λαμβάνεται σε αφθονία από την τροφή, και απελευθερώνουν την αποθηκευμένη ενέργεια στη μορφή μη εστεροποιημένων λιπαρών οξέων σε περίπτωση νηστείας. Υπερβολική συσσώρευση λιπώδους ιστού οδηγεί σε παχυσαρκία, ενώ η απουσία του σχετίζεται με λιποδυστροφικά σύνδρομα. Ο μοριακός μηχανισμός που ελέγχει τη διαφοροποίηση των λιποκυττάρων από πρόδρομα κύτταρα του λιπώδους ιστού, παρουσιάζει μεγάλη πολυπλοκότητα και ελέγχεται από πολλά ρυθμιστικά μονοπάτια. (4) Η ισομορφή των PPARs PPAR γ , έχει ταυτοποιηθεί σαν ένας μεταγραφικός παράγοντας-κλειδί στη διαδικασία της τελικής διαφοροποίησης των λιποκυττάρων σε λευκό και φαιό λιπώδη ιστό. Αυτό φαίνεται από το γεγονός ότι γονίδια-στόχοι για το PPAR γ , όπως το κωδικοποιούν γονίδιο για την πρωτεΐνη δέσμευσης των λιπαρών οξέων και το γονίδιο για την φωσφοένολοπυροσταφυλική καρβοξυκινάση, αποτελούν δείκτες τελικής

διαφοροποίησης των λιποκυττάρων και η ρύθμισή τους από το PPAR γ δείχνει τη μεγάλη συμβολή του υποδοχέα αυτού στη διατήρηση του φαινοτύπου των κυττάρων του λιπώδους ιστού. (2)

Γενικά η διαδικασία της λιπογένεσης απαιτεί την αλληλεπίδραση ανάμεσα στο ετεροδιμερές PPAR γ /RXR και δύο άλλων ομάδων μεταγραφικών παραγόντων: των πρωτεϊνών δέσμευσης στο «κουτί» CCAAT (CCAAT enhancer binding proteins-**C/EBP**) και του παράγοντα-1 διαφοροποίησης και καθορισμού των λιποκυττάρων/πρωτεΐνη δέσμευσης ρυθμιστικού στοιχείου στερολών-1 (adipocyte differentiation and determination factor 1/ sterol regulatory element binding protein 1 **ADD-1/SREBP-1**). Οι παράγοντες αυτοί δρουν συνεργιστικά στην διαδικασία της λιπογένεσης. (4), (14)

Στις αρχικές φάσεις της λιπογένεσης, με την επίδραση ορμονών που επάγουν τη λιπογένεση, όπως η ινσουλίνη και τα γλυκοκορτικοειδή, ενεργοποιούνται οι παράγοντες **C/EBP β** και **δ** . Και οι δύο αυτοί παράγοντες επάγουν τη μεταγραφή του PPAR γ 2 με επίδρασή τους στον υποκινητή του γονιδίου του PPAR γ 2. Στη συνέχεια, το PPAR γ 2 ενεργοποιεί την έκφραση του γονιδίου του PPAR γ 1. (4), (12)

Ο Ρετινοϊκός Χ υποδοχέας (**RXR**), που σχηματίζει ετεροδιμερές με το PPAR γ , αποτελεί άλλον έναν ρυθμιστικό παράγοντα της διαδικασίας της λιπογένεσης. Συγκεκριμένα, στα στοιχεία απόκρισης του PPAR γ , όταν ο RXR βρίσκεται ως ετεροδιμερές με τον υποδοχέα του ρετινοϊκού οξέος (retinoic acid receptor-**RAR**), εμποδίζει τη μεταγραφή των γονιδίων-στόχων. Όταν βρίσκεται σε μορφή ετεροδιμερούς με τον υποδοχέα PPAR γ στα ίδια γονίδια επάγει τη μεταγραφική διαδικασία. Η έκφραση των RAR και PPAR γ αλλάζει σημαντικά κατά την έναρξη της λιπογένεσης. Η έκφραση του PPAR γ αυξάνεται σημαντικά, ενώ αυτή του RAR μειώνεται. Κατά συνέπεια, ο RXR βρίσκεται σε μορφή που επιτρέπει τη μεταγραφική διαδικασία αφού βρίσκεται κυρίως ενωμένος με τον υποδοχέα PPAR γ .(4)

Ο παράγοντας **ADD-1/SREBP-1**, που παίζει σημαντικό ρόλο στην ομοιοστασία της χοληστερόλης, εμπλέκεται όπως αναφέρθηκε και στη διαδικασία της λιπογένεσης. Σαν μεταγραφικός παράγοντας, επάγει τη μεταγραφή γονιδίων που παίζουν ρόλο στο μεταβολισμό των λιπαρών οξέων, κι έτσι φαίνεται να τροφοδοτεί το PPAR γ με μόρια-συνδέσμους που αυξάνουν τη μεταγραφική ενεργότητα του υποδοχέα. (2),(4)

Το τελικό στάδιο της διαφοροποίησης των λιποκυττάρων απαιτεί τη συντονισμένη δράση των PPAR γ και **C/EBP α** . Το **C/EBP α** ενεργοποιείται από τα **C/EBP β** και **C/EBP δ** . Η έκφραση του **C/EBP α** ελέγχεται και από το PPAR γ , αλλά και το **C/EBP α** με τη σειρά του ενεργοποιεί την έκφραση του γονιδίου του PPAR γ μέσω της σύνδεσης του **C/EBP α** με το στοιχείο απόκρισης του PPAR γ , που βρίσκεται στον υποκινητή του γονιδίου του. (4), (12)

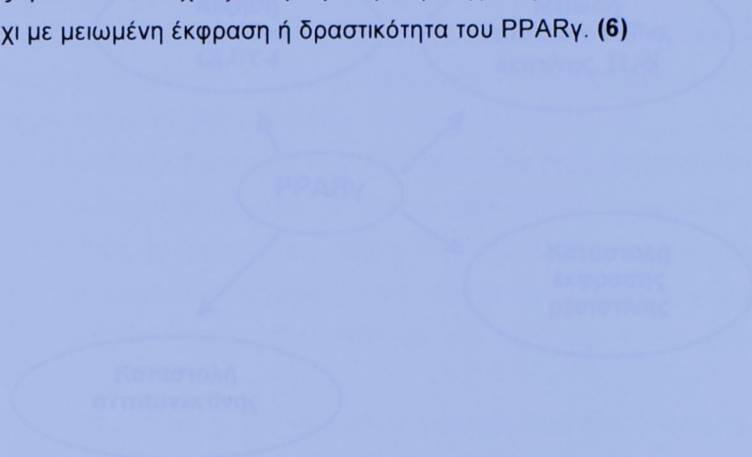
Η ανίχνευση στοιχείων απόκρισης του PPAR γ σε γονίδια όπως αυτά που κωδικοποιούν για την πρωτεΐνη δέσμευσης λιπαρών οξέων στα λιποκύτταρα (aP2), για τη λιποπρωτεϊνική λιπάση, την συνθάση του άκυλο-CoA, την φωσφοένολο-πυροσταφυλική καρβοξυκινάση και την πρωτεΐνη μεταφοράς λιπαρών οξέων, μας επιτρέπει να θεωρήσουμε ότι το PPAR γ μπορεί να ενεργοποιήσει την παραγωγή αλλά και την πρόσληψη από το κύτταρο μορίων-συνδέσμων και ενεργοποιητών του. Δύο κυτοκίνες που παράγονται από τα λιποκύτταρα εμπλέκονται επίσης στη διαδικασία της λιπογένεσης: η **λεπτίνη** και ο παράγοντας νέκρωσης του όγκου α (Tumor Necrosis Factor α -**TNF α**).

Η **λεπτίνη** προσδενόμενη σε ειδικούς υποδοχείς προκαλεί γενικευμένη απόκριση που περιλαμβάνει έλεγχο του σωματικού βάρους και της κατανάλωσης ενέργειας. Η έκφραση του γονιδίου της λεπτίνης μειώνεται με τη δράση του PPAR γ και αυξάνεται με τη δράση του C/EBP α . Η μείωση των επιπέδων λεπτίνης στο αίμα μετά από επίδραση του PPAR γ , σχετίζεται με αύξηση της πρόσληψης τροφής, που οδηγεί σε αύξηση των διατιθέμενων υποστρωμάτων και κατά συνέπεια σε αποθήκευση αυτών στα λιποκύτταρα.

Όσον αφορά στον **TNF α** , αυτός αποτελεί έναν πιθανό ανασταλτικό παράγοντα στη διαδικασία της διαφοροποίησης των λιποκυττάρων. Ο TNF α φαίνεται να δρα μερικώς μέσω καταστολής της έκφρασης των PPAR γ και C/EBP α . Σε περιπτώσεις παχυσαρκίας, παρατηρούνται αυξημένα επίπεδα TNF α , που ίσως προστατεύουν από επιπλέον αύξηση της μάζας του λιπώδους ιστού και πιθανώς σχετίζονται με τη μειωμένη ευαισθησία στην ινσουλίνη που είναι χαρακτηριστικό των περιπτώσεων παχυσαρκίας. Όταν σε παχύσαρκα ζώα χορηγήθηκαν αγωνιστές του PPAR γ , παρατηρήθηκε μείωση της παραγωγής TNF α από το λιπώδη ιστό και αύξηση του βάρους. Επιπλέον η χορήγηση αγωνιστών του PPAR γ φάνηκε να καταργεί την ανασταλτική δράση του TNF α στην ευαισθησία στην ινσουλίνη, καθώς και να αναστέλλει την απελευθέρωση με εστεροποιημένων λιπαρών οξέων και γλυκερόλης από το λιπώδη ιστό.

Πέρα από το ρόλο του PPAR γ στην διαφοροποίηση των λιποκυττάρων, φαίνεται να εμπλέκεται και στη ρύθμιση του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου των λιποκυττάρων. Συγκεκριμένα, ευνοεί την απόπτωση κυρίως πλήρως διαφοροποιημένων και μεγάλου μεγέθους κυττάρων. Συνδυάζοντας τη δράση στη διαφοροποίηση και στην απόπτωση των λιποκυττάρων, συμπεραίνουμε με τη δράση του PPAR γ τείνουν να αντικαθίστανται τα μεγάλα λιποκύτταρα που συνήθως αποτελούν το λιπώδη ιστό από άλλα μικρότερου μεγέθους **(4)**. Η αλλαγή αυτή στη μέγεθος των λιποκυττάρων έχει διαπιστωθεί από μελέτες σε τρωκτικά, ενώ μελέτες σε ανθρώπους δεν έχουν επιβεβαιώσει αυτές τις αλλαγές.

Ενδιαφέρον είναι το γεγονός ότι οι θειαζολιδινεδιόνες (συνθετικά μόρια-σύνδεσμοι του PPAR γ) ενεργοποιούν τη διαφοροποίηση πρόδρομων κυττάρων του λιπώδους ιστού σε λιποκύτταρα κυρίως περιφερικά και όχι στο λιπώδη ιστό των σπλάχνων. Αυτό όμως φαίνεται να σχετίζεται με μειωμένη έκφραση του RXR στο σπλαχνικό λίπος, κι όχι με μειωμένη έκφραση ή δραστικότητα του PPAR γ . (6)



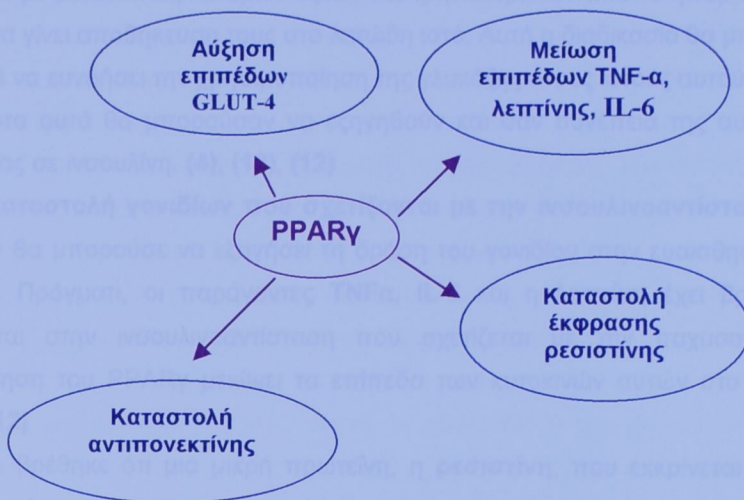
Εικόνα 16. Τα παραπάνω οργάνωθηκαν σε μηχανισμό για να απεικονιστεί πώς και πού το PPAR γ δαπάνει την ενέργειά στην κοιλιά.

Ο ρόλος του PPAR γ στην ενεργοποίηση στην κοιλιακή περιφέρεια από τη διαπίστωση ότι οι θειαζολιδινεδιόνες δρουν μέσω του υποδοχέα αυτού. Τα πρώτα αυτά που χρησιμοποιήσαντε μεγάλα αριθμά αυτών με δοσολογία κύπου 2, αύξησαν την εναπόθεση στην κοιλιακή. Επίσης, συνδέσατε μόρια-σύνδεσμοι για το PPAR γ διαπιστώθηκε ότι έχουν παρόμοια δράση ή ναι. Έτσι, λοιπόν, περιελάμβαντε στο γονότυπο του PPAR γ , βρήκατε ότι σχετίζονται με αυξημένη απόθεση στην κοιλιακή. (10), (12) Παρόλο αυτό, ο πειραματικός PPAR γ στο σπλάχνος με αυξημένη εναπόθεση στην κοιλιακή.

Ο μηχανισμός μέσω του οποίου το PPAR γ δρα ώστε να προάγει την εναπόθεση στην κοιλιακή δεν είναι ακόμη πλήρως γνωστός. Ο υποδοχέας για τις θειαζολιδινεδιόνες περιέχει ένα δραστικό Υποδοχέας υποδοχής είναι ο λιπώδης ιστός, αλλά και ο σκελετός μας, το ήπαρ και τα β-κύτταρα του παγκρέατος. Ανάμεσά τους υπάρχει κοινό από τα μεταγραφικά μηχανήματα μέσω των οποίων το PPAR γ ενεργεί στην κοιλιακή κοιλότητα.

Η ενεργοποίηση του PPAR γ οδηγεί σε αύξηση των επιπέδων του σκελετομυοκίνου από την κοιλιακή μεταφορά της ενέργειας στο λιπώδη ιστό. GLUT-4 (4), (12) και

Ο ρόλος του PPAR γ στην ευαισθησία στην ινσουλίνη



Σχήμα 10: Στο παραπάνω σχήμα φαίνονται οι προτεινόμενοι μηχανισμοί μέσω των οποίων το PPAR γ βελτιώνει την ευαισθησία στην ινσουλίνη

Ο ρόλος του PPAR γ στην ευαισθησία στην ινσουλίνη τεκμηριώθηκε από τη διαπίστωση ότι οι θειαζολιδινεδιόνες δρουν μέσω του υποδοχέα αυτού. Τα φάρμακα αυτά που χορηγούνται σε μεγάλο αριθμό ασθενών με διαβήτη τύπου II, αυξάνουν την ευαισθησία στην ινσουλίνη. Επίσης, συνθετικά μόρια-σύνδεσμοι για το PPAR γ διαπιστώθηκε ότι έχουν παρόμοια δράση *in vivo*. Επιπλέον, μεταλλάξεις στο γονίδιο του PPAR γ , βρέθηκε ότι σχετίζονται με αυξημένη αντίσταση στην ινσουλίνη. (10), (12) Παρόλα αυτά, ο πολυμορφισμός Pro12Ala έχει συσχετιστεί με αυξημένη ευαισθησία στην ινσουλίνη.

Ο μηχανισμός μέσω του οποίου το PPAR γ δρα ώστε να προάγει την ευαισθησία στην ινσουλίνη δεν είναι ακόμη πλήρως γνωστός. Ο ιστός-στόχος για τις θειαζολιδινεδιόνες παραμένει άγνωστος. Υποψήφιος ιστός-στόχος είναι ο λιπώδης ιστός, αλλά και ο σκελετικός μυς, το ήπαρ και τα β-κύτταρα του παγκρέατος. Ακόμη, ασάφεια υπάρχει γύρω από τα μεταγραφικά γεγονότα μέσω των οποίων το PPAR γ αναστέλλει την ινσουλινοαντοχή.

Η ενεργοποίηση του PPAR γ οδηγεί σε αύξηση των επιπέδων του ενεργοποιούμενου από την ινσουλίνη μεταφορέα της γλυκόζης στο λιπώδη ιστό, GLUT-4. (4), (12) και

μπορεί να επιδρά άμεσα και σε άλλα γονίδια σημαντικά για την ομοιοστασία της γλυκόζης. (12) Η ενεργοποίηση του PPAR γ οδηγεί στην έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με μετατόπιση λιπαρών οξέων και τριγλυκεριδίων από το ήπαρ και τους, μύες για να γίνει αποθήκευση τους στο λιπώδη ιστό. Αυτή η διαδικασία θα μπορούσε θεωρητικά να ευνοήσει την χρησιμοποίηση της γλυκόζης στους ιστούς αυτούς, αν και τα γεγονότα αυτά θα μπορούσαν να εξηγηθούν και σαν συνέπεια της αυξημένης ευαισθησίας σε ινσουλίνη. **(4), (10), (12)**

Επίσης, **καταστολή γονιδίων που σχετίζονται με την ινσουλινοαντίσταση** από το PPAR γ θα μπορούσε να εξηγήσει τη δράση του γονιδίου στην ευαισθησία στην ινσουλίνη. Πράγματι, οι παράγοντες **TNF α , IL-6** και η **λεπτίνη** έχει βρεθεί ότι εμπλέκονται στην ινσουλινοαντίσταση που σχετίζεται με την παχυσαρκία. Η ενεργοποίηση του PPAR γ μειώνει τα επίπεδα των κυτοκινών αυτών στο λιπώδη ιστό.**(4), (12)**

Πρόσφατα βρέθηκε ότι μια μικρή πρωτεΐνη, η **ρεισιστίνη**, που εκκρίνεται από το λιπώδη ιστό προάγει συστηματική ινσουλινοαντοχή. Φάνηκε ότι πιθανά οι θειαζολιδινεδιόνες καταστέλλουν την έκφραση του παράγοντα αυτού, αν και πρόσφατα δεδομένα αμφισβητούν αυτήν την άποψη.

Τέλος, μια άλλη πρωτεΐνη που ανακαλύφθηκε πρόσφατα, εκκρινόμενη από το λιπώδη ιστό, η **αντιπανεκτίνη**, φαίνεται να αποτελεί στόχο για τις θειαζολιδινεδιόνες, αλλά και διαμεσολαβητή για την ευαισθησία στην ινσουλίνη. **(12)**

Είναι σημαντικό το γεγονός ότι ο υποδοχέας RXR μετά από ενεργοποίηση του επίσης προάγει την διαφοροποίηση των λιποκυττάρων και βελτιώνει την ομοιοστασία της γλυκόζης. **Η διαπίστωση αυτή οδηγεί στο συμπέρασμα ότι βελτίωση του μεταβολισμού της γλυκόζης συμβαίνει μέσω του ετεροδιμερούς PPAR/RXR. (4)**

Ο ρόλος του PPAR γ στην ευαισθησία στην ινσουλίνη φαίνεται συνοπτικά στο σχήμα 10.

Ο ρόλος του PPAR γ στην φλεγμονή και στην αθηροσκλήρωση

Η πιθανή εμπλοκή του PPAR γ στις φλεγμονώδεις διαδικασίες προτάθηκε αρχικά λόγω του ανταγωνισμού μεταξύ προ-φλεγμονωδών κυτοκινών, όπως ο TNF α και του PPAR γ . Επίσης, αγωνιστές του PPAR γ φάνηκε ότι αναστέλλουν την ενεργοποίηση των μακροφάγων και την παραγωγή κυτοκινών. Μεγάλες δόσεις μορίων-συνδέσμων ή συνθετικών αγωνιστών του PPAR γ στα μονοκύτταρα μειώνουν την παραγωγή των TNF α , IL-1 β και IL-6. **(4), (9), (11)** Επιπλέον, οι αγωνιστές του PPAR γ καταστέλλουν την ζελατινάση B, τη συνθάση του νιτρικού οξέος και τον

scavenger υποδοχέα A. **(4), (9), (11), (12)** Αυτές οι διαδικασίες φαίνεται να λαμβάνουν χώρα με αλληλεπίδραση του PPAR γ με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες οι οποίοι ρυθμίζουν την έκφραση κυτοκινών. Όμως, από τις έρευνες αυτές φάνηκε ότι απαιτούνται πολύ μεγάλες δόσεις αγωνιστών του PPAR γ , που ξεπερνούν κατά πολύ τις απαραίτητες για την ενεργοποίηση του υποδοχέα, οπότε ίσως στη διαδικασία αυτή εμπλέκονται και άλλοι παράγοντες πέραν του PPAR γ . **(4)**

Μια άλλη συσχέτιση του PPAR γ με τις διαδικασίες της φλεγμονής είναι το γεγονός ότι κάποια φυσικά μόρια-σύνδεσμοι για το PPAR γ είναι προϊόντα στο μονοπάτι της κυκλοοξυγενάσης, όπως η 15-δέοξυ προσταγλαδίνη J2. Η καταστολή της κυκλοοξυγενάσης από μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα, αποτελεί συνήθη θεραπεία φλεγμονωδών καταστάσεων. Υπάρχουν ενδείξεις ότι στόχος των φαρμάκων αυτών δεν είναι μόνο η κυκλοοξυγενάση, αλλά και το PPAR γ . Θα μπορούσαμε λοιπόν να υποθέσουμε ότι τα μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα δρουν σε ένα βαθμό μέσω της καταστολής της παραγωγής κυτοκινών από το PPAR γ . **(4),(11)**

Η δημιουργία της αθηρωματικής πλάκας αποτελεί μια πολύπλοκη διαδικασία στην οποία εμπλέκονται διάφοροι παράγοντες. Ο τραυματισμός του ενδοθηλίου, ο πολλαπλασιασμός λείων μυϊκών κυττάρων, η μετανάστευση μονοκυττάρων/μακροφάγων, ρυθμιστικοί παράγοντες όπως αυξητικοί παράγοντες και κυτοκίνες, είναι σημαντικοί παράμετροι της διαδικασίας της αθηροσκλήρυνσης. Επίσης, η χρόνια φλεγμονή του αγγειακού τοιχώματος εμπλέκεται στη διαδικασία. **(9)** Όσον αφορά στο ρόλο του PPAR γ στην αθηρωμάτωση, φαίνεται ότι αυτός είναι αρκετά πολύπλοκος.

Τα μακροφάγα, αυξάνουν την τάση των αθηρωματικών πλακών να υποστούν ρήξη, γιατί φαίνεται να εμπλέκονται στην έκκριση μεταλλοπρωτεασών της μήτρας, ενζύμων που είναι σημαντικά στην αποδόμηση της εξωκυτταρικής μήτρας. Στα μακροφάγα και στα λεία μυϊκά κύτταρα των αγγειακών τοιχωμάτων, τα μόρια-σύνδεσμοι για το PPAR γ φάνηκε ότι **μειώνουν την έκφραση των μεταλλοπρωτεασών**, που εμπλέκονται τόσο στην αποσταθεροποίηση των πλακών όσο και στην μετανάστευση των λείων μυϊκών κυττάρων των αγγειακών τοιχωμάτων.

Ο πολλαπλασιασμός και η μετανάστευση των λείων μυϊκών κυττάρων είναι επίσης σημαντικά γεγονότα στη διαδικασία δημιουργίας της αθηρωματικής πλάκας. Οι θειαζολιδινεδιόνες φαίνεται να αναστέλλουν τις αλλαγές αυτές στα λεία μυϊκά κύτταρα των αγγειακών τοιχωμάτων. Επίσης, η έκφραση του μορίου πρόσδεσης στα ενδοθηλιακά κύτταρα, που οδηγεί σε πρόσδεση λευκοκυττάρων στο ενδοθήλιο, αποτελεί σημαντικό βήμα στη διαδικασία της αθηρωμάτωσης. **Τα μόρια-σύνδεσμοι**

του PPARγ φαίνεται να αναστέλλουν την παραγωγή του μορίου πρόσδεσης των αγγειακών τοιχωμάτων-1 και να μειώνουν την παραγωγή κυτοκινών όπως της IL-8 στα αορτικά ενδοθηλιακά κύτταρα στον άνθρωπο.

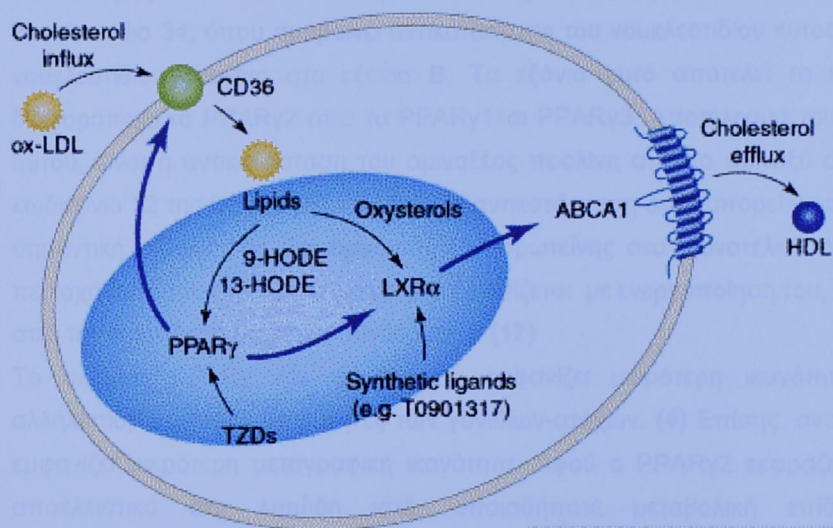
Επίσης, αναστέλλουν την έκφραση της ενδοθηλίνης-1, που εμπλέκεται στη ρύθμιση του αγγειακού τόνου και σε λειτουργίες του ενδοθηλίου. Η ενδοθηλίνη-1 εκφράζεται στις αθηρωματικές πλάκες και προάγει τον πολλαπλασιασμό των λείων μυϊκών κυττάρων. (9)

Η αθηροσκληρυνση ξεκινά με βλάβη του εσωτερικού τοιχώματος των ενδοθηλιακών κυττάρων, όπου μεταναστεύουν τα μονοκύτταρα. Κατά τη διαδικασία αυτή, τα μονοκύτταρα διαφοροποιούνται σε μακροφάγα. Τα τελευταία προσλαμβάνουν οξειδωμένες λιποπρωτείνες (ox-LDL) και μετατρέπονται σε αφρώδη κύτταρα. (11) Ενώ η έκφραση του PPARγ στα μονοκύτταρα του περιφερικού αίματος είναι μικρή, αυτή αυξάνεται κατά τη διαφοροποίηση των μακροφάγων. Η ενεργοποίηση του ετεροδιμερούς PPARγ/RXR προάγει περαιτέρω την διαφοροποίηση των μακροφάγων. Ακόμη, η έκθεση των μονοκυττάρων σε μόρια οξειδωμένης λιποπρωτείνης χαμηλής πυκνότητας (ox-LDL), επίσης αυξάνει την έκφραση του PPARγ. Αυτό με τη σειρά του, προάγει τη μεταγραφή του υποδοχέα των ox-LDL CD-36/ τρανσλοκάση των λιπαρών οξέων (fatty acid translocase-FAT), μέσω ενός στοιχείου απόκρισης για το PPARγ στον υποκινητή του γονιδίου των CD-36/FAT. Έτσι, εγκαθίσταται ένα μονοπάτι που οδηγεί στο σχηματισμό αφρωδών κυττάρων. (4), (9), (11), (12), (15)

Η έκθεση των μονοκυττάρων μακροφάγων στην ox-LDL, όχι μόνο αυξάνει την έκφραση του PPARγ, αλλά και προμηθεύει το κύτταρο με δυο νέα μόρια-συνδέσμους για το PPARγ, τα 9-ύδροξυ-οκταδεκανοϊκό οξύ και 13-ύδροξυ-οκταδεκανοϊκό οξύ που είναι και τα δύο οξειδωμένοι μεταβολίτες του λινολειακού οξέος παρόντες στην οξειδωμένη LDL. (4), (9), (11), (12) Σύμφωνα με αυτήν τη θεωρία είναι η παρατήρηση, τόσο στον άνθρωπο όσο και στο ποντίκι, ότι μεγάλα ποσά PPARγ βρίσκονται στις αθηρωματικές πλάκες. Επιπλέον, τόσο η αυξημένη έκφραση του PPARγ στα μακροφάγα αφρώδη κύτταρα και στις αθηρωματικές πλάκες, όσο και οι μεγάλες ποσότητες των δυο ενδογενών μορίων-συνδέσμων του που ανευρίσκονται στις οξειδωμένες LDL, υποδεικνύουν ότι ένας τέτοιος μηχανισμός θα μπορούσε να υπάρχει. (4) Σε κάποιες έρευνες όμως, φάνηκε ότι τόσο στον άνθρωπο όσο και στο ποντίκι, η ενεργοποίηση του PPARγ από αγωνιστές του δεν οδήγησε σε συσσώρευση λίπους παρά την παρουσία οξειδωμένων LDL.

Μια άλλη θεωρία, υποστηρίζει ότι το PPARγ ενεργοποιεί τόσο την έκφραση του υποδοχέα CD-36, όσο και των υποδοχέων LXRα και LXRβ, οι οποίοι είναι υποδοχείς οξυστερολών και οδηγούν σε απέκκριση χοληστερόλης από τα μακροφάγα

τροποποιώντας την έκφραση ενός μεταφορέα της κυτταρικής επιφάνειας εξαρτώμενου από το ATP (ATP-binding cassette transporter 1-**ABCA1**). Μπορούμε έτσι να υποθέσουμε ότι μέσω του υποδοχέα CD-36 προσλαμβάνονται από το κύτταρο λιπίδια τα οποία στη συνέχεια απεκκρίνονται μέσω του ABCA1. Έτσι, η σχετική ισορροπία μεταξύ των δύο δράσεων θα μπορούσε να ρυθμίζει τη διαδικασία της αθηρωμάτωσης. **(11)** Η θεωρία αυτή φαίνεται να συμβιβάζει τις μέχρι τώρα παρατηρήσεις για τη δράση του PPAR γ στην αθηρωμάτωση in vivo και φαίνεται συνοπτικά στο σχήμα 11.



Σχήμα 11: Στο σχήμα φαίνεται ο προτεινόμενος μηχανισμός μέσω του οποίου το PPAR γ , αλληλεπιδρά με τους υποδοχείς CD-36 και ABCA-1, στη ρύθμιση της πρόσληψης και της απέκκρισης λιπιδίων από τα μακροφάγα.

9-HODE: 9-ύδροξυ-οκταδεκανοϊκό οξύ

13-HODE: 13-ύδροξυ-οκταδεκανοϊκό οξύ

Ο ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΣ PRO12ALA ΣΤΟ PPAR γ 2

Στο γενετικό τόπο του PPAR γ 2 έχουν αναφερθεί διάφορες μεταλλάξεις. Η μεταλλαγή **Pro115Gln**, στην αμινοτελική περιοχή, είναι πολύ σπάνια και οδηγεί σε υπερλειτουργία του υποδοχέα. Σχετίζεται με παχυσαρκία αλλά όχι ινσουλινοαντίσταση.

Έχουν αναφερθεί και δυο άλλες μεταλλάξεις, εξαιρετικά σπάνιες, οι **Val290Met** και **Pro465Leu**, που οδηγούν σε απώλεια της δραστικότητας του υποδοχέα. Έχουν αναφερθεί σε τρία άτομα μόνο, τα οποία είχαν φυσιολογικό βάρος σώματος αλλά εμφάνιζαν σοβαρή ινσουλινοαντίσταση. Η μετάλλαξη αυτή συμβαίνει στην περιοχή πρόσδεσης του μορίου-συνδέσμου. **(16)**

Ο πολυμορφισμός Pro12Ala, αποτελεί τη πιο συχνά εμφανιζόμενη μεταλλαγή. Ανακαλύφθηκε το 1997 και οφείλεται σε μια παρερμηνεύσιμη μετάλλαξη στο νουκλεοτίδιο 34, όπου συμβαίνει αντικατάσταση του νουκλεοτιδίου κυτοσίνη από το νουκλεοτίδιο γουανίνη στο εξόνιο Β. Το εξόνιο αυτό αποτελεί το εξόνιο που διαφοροποιεί το PPAR γ 2 από τα PPAR γ 1 και PPAR γ 3. Αποτέλεσμα του γεγονότος αυτού, είναι η αντικατάσταση του αμινοξέος προλίνη από το αμινοξύ αλανίνη στο κωδικόνιο 12 της ισομορφής PPAR γ 2. Η αντικατάσταση αυτή μπορεί να οδηγήσει σε σημαντική αλλαγή της διαμόρφωσης της πρωτεΐνης στο αμινοτελικό άκρο της. Η περιοχή αυτή του υποδοχέα φαίνεται να σχετίζεται με ενεργοποίηση του, ανεξάρτητη από την πρόσδεση με μόρια-συνδέσμους. **(17)**

Το αλληλίο PPAR γ Ala φάνηκε ότι εμφανίζει μικρότερη ικανότητα στο να αλληλεπιδρά με τους υποκινητές των γονιδίων-στόχων. **(4)** Επίσης, αναφέρεται ότι εμφανίζει μικρότερη μεταγραφική ικανότητα. Αφού ο PPAR γ 2 εκφράζεται σχεδόν αποκλειστικά στο λιπώδη ιστό, οποιαδήποτε μεταβολική επίδραση του πολυμορφισμού αναμένουμε να ασκείται μέσω του ιστού αυτού.

Έχει διαπιστωθεί ότι ο πολυμορφισμός με μειωμένη συχνότητα εμφάνισης διαβήτη τύπου II και πιθανώς βελτιωμένη ευαισθησία στην ινσουλίνη. Η επίδραση του στο BMI και στα επίπεδα λιπιδίων αίματος δεν έχει ακόμη διευκρινιστεί. **(16)**

Συχνότητα του πολυμορφισμού Pro12Ala σε διάφορους πληθυσμούς

Η συχνότητα του αλληλίου διαφέρει στους διάφορους πληθυσμούς, αλλά η συχνότητα στους Καυκάσιους είναι μεγαλύτερη από αυτήν στους Κινέζους και Γιαπωνέζους. (17) Ενδιαφέρουσα είναι η διαπίστωση από μια έρευνα ότι στις Ευρωπαϊκές χώρες, η συχνότητα του αλληλίου είναι μεγαλύτερη στις Βαλτικές χώρες (21%), ενώ μειώνεται στις Μεσογειακές (7%). (18)

- Σε έρευνα από τους Lindi et al., σε **Καυκάσιο πληθυσμό** από πέντε διαφορετικές Ευρωπαϊκές χώρες (KANWU study), αναφέρεται συχνότητα αλληλίου ίση με **13,7%** (Μέγεθος δείγματος:150 άτομα τυχαία επιλεγμένα). (19)
- Σε μια έρευνα από τους Schlaffer et al., η συχνότητα ήταν **12%** σε **Γερμανικό** πληθυσμό (μέγεθος δείγματος: 359 άτομα τυχαία επιλεγμένα) (20) Η συχνότητα που αναφέρεται όμως από τους Tschritter et al., πάλι για το Γερμανικό πληθυσμό είναι διαφορετική, και μάλιστα αρκετά μεγαλύτερη (**23%**) (μέγεθος δείγματος:406 άτομα με φυσιολογική ανοχή στη γλυκόζη)). (21) ενώ από τους Hermann et al., αναφέρεται συχνότητα ίση με **14%** και πάλι σε γερμανικό πληθυσμό (μέγεθος δείγματος:445 άτομα με διαβήτη τύπου II). (22)
- Σε πληθυσμό από το **Ηνωμένο Βασίλειο**, από τους Ahluwalia et al., αναφέρεται συχνότητα αλληλίου **12,5%** (μέγεθος δείγματος:183 διαβητικού τύπου II ασθενείς που λάμβαναν θεραπεία με θειαζολιδινεδιόνες). (23)
- Σε **Ιταλικό** πληθυσμό, από τους Vaccaro et al., αναφέρεται συχνότητα **16,7%** (μέγεθος δείγματος:438 άτομα τυχαία επιλεγμένα). (24)
- Σε πληθυσμό από τη **Δανία**, αναφέρεται συχνότητα **14%** από τους Frederiksen et al. (μέγεθος δείγματος: 2245 μη διαβητικά άτομα). (25)
- Στην **Σουηδία**, από τους Rosmond et al., αναφέρεται συχνότητα του αλληλίου Ala 16% (μέγεθος δείγματος:284 τυχαία επιλεγμένα άτομα). (26)
- Σε πληθυσμό προερχόμενο από τη **Γαλλία**, έρευνα από τους Merchaenge et al., αναφέρει συχνότητα 11%. (μέγεθος δείγματος:839 τυχαία επιλεγμένα άτομα). (27)

Σε **Αμερικανικό** πληθυσμό, από τους Nicklas et al., αλλά και από άλλους ερευνητές αναφέρεται συχνότητα **11%**, (28) Σε **Αφρικανούς Αμερικανούς** η συχνότητα που αναφέρεται από τους Kao et al., είναι **1,9%**. (29) Σε πληθυσμό **αμερικανικό, και συγκεκριμένα της Νέας Ορλεάνης** αναφέρεται από τους Li et al., συχνότητα ίση με

10,4% στους Λευκούς και συχνότητα ίση με **1,7%** στους Μαύρους. **(30)** Σε **Καναδούς** αναφέρεται από τους Robitaille et al., συχνότητα ίση με **9,2%**. **(31)**

Σε **Κινέζικο** πληθυσμό η συχνότητα είναι αρκετά μικρότερη. Από τους Fu et al., αναφέρεται συχνότητα **3,85%**. **(32)** Σε **Γιαπωνέζους**, από τους Kahara et al., αναφέρεται συχνότητα αλληλίου **2,4%**. **(33)** Σε **Ιαπωνικό** πληθυσμό, από άλλους ερευνητές αναφέρεται συχνότητα **4%**. **(34)** Σε **Κινεζικό και Ιαπωνικό πληθυσμό**, από τους Chuang et al., αναφέρεται συχνότητα αλληλίου **4,27% και 2,72% αντίστοιχα**. **(5)**

Συμπερασματικά, η συχνότητα του πολυμορφισμού εμφανίζεται σχετικά αυξημένη στους Ευρωπαίους σε σχέση με τους υπόλοιπους πληθυσμούς. Στην Αμερική από την άλλη, στους Αμερικανούς Αφρικανούς είναι πολύ μικρή, στους Καναδούς μικρότερη από αυτήν στους Ευρωπαίους, ενώ στη Νέα Ορλεάνη και στις Ηνωμένες Πολιτείες η συχνότητα είναι περίπου ίδια και μάλιστα σχεδόν ίδια με τη συχνότητα του πολυμορφισμού στη Γαλλία όσον αφορά στους λευκούς. Όσον αφορά στους μαύρους, από τα παραπάνω συμπεραίνουμε ότι πρόκειται για τον πληθυσμό με τη μικρότερη συχνότητα του αλληλίου. Τέλος, στο Κινεζικό και Ιαπωνικό πληθυσμό η συχνότητα είναι πολύ μικρή, και μάλιστα μικρότερη στους Γιαπωνέζους από ότι στους Κινέζους.

Επίδραση του πολυμορφισμού σε βιοχημικές παραμέτρους και στο Δείκτη Μάζας Σώματος

Έρευνες σε τυχαίο πληθυσμιακό δείγμα

Η έρευνα των **Vaccaro et al.**, περιέλαβε 438 μη διαβητικούς υπαλλήλους της Ιταλικής Τηλεφωνικής Εταιρίας που επιλέχθηκαν τυχαία από συνολικό δείγμα 3900 ατόμων. Στην έρευνα αυτή **δε βρέθηκε συσχέτιση του πολυμορφισμού με το Δείκτη Μάζας Σώματος, τα επίπεδα νηστείας των ελεύθερων λιπαρών οξέων, τη συστολική και τη διαστολική πίεση, τα επίπεδα γλυκόζης αίματος, τα επίπεδα HDL χοληστερόλης και τα επίπεδα ινσουλίνης**. Ακόμη και όταν το δείγμα χωρίστηκε σε παχύσαρκους και μη παχύσαρκους, δε φάνηκε κάποια συσχέτιση των αποτελεσμάτων με τον πολυμορφισμό. **(24)**

Η έρευνα των **Meirchaeghe et al.** περιέλαβε δείγμα 839 ατόμων τυχαία επιλεγμένων από πληθυσμό μιας αστικής περιοχής της Γαλλίας. Επίσης, περιέλαβε 170 ασθενείς

με διαβήτη τύπου II ώστε να αξιολογηθεί η επίδραση του πολυμορφισμού στην εμφάνιση του διαβήτη. Στο τυχαία επιλεγμένο δείγμα φάνηκε ότι ο πολυμορφισμός συνδέεται στατιστικώς σημαντικά με αυξημένο BMI ($p:0,02$), με αυξημένο βάρος σώματος ($p:0,002$), αυξημένο ύψος ($p:0,02$) και αυξημένες συγκεντρώσεις ολικής χοληστερόλης ($p:0,01$), LDL-χοληστερόλης ($p:0,004$) και απολιποπρωτεΐνης B ($p:0,01$). **Ο πολυμορφισμός δε φάνηκε να σχετίζεται με τη εμφάνιση του διαβήτη τύπου II**, αφού η συχνότητά του στους διαβητικούς τύπου II ασθενείς δεν διέφερε από τη συχνότητα στο τυχαία επιλεγμένο δείγμα. Φάνηκε όμως ότι **ο πολυμορφισμός φαίνεται να σχετίζεται με αυξημένο BMI και αυξημένες τιμές λιπιδίων αίματος (27).**

Η έρευνα των **Rosmond et al.**, περιέλαβε δείγμα 284 Σουηδών μεσήλικων ανδρών που επιλέχθηκαν τυχαία μέσα από μια κοορτή ανδρών γεννημένων το 1944 σε μια πόλη της Σουηδίας. Οι ομοζυγώτες για τον πολυμορφισμό παρουσίαζαν σημαντικά υψηλότερο BMI ($p:0,038$) και περίπου τρεις φορές υψηλότερα επίπεδα ινσουλίνης νηστείας ($p<0,001$), σε σχέση με τους άλλους γονότυπους. Υψηλότερος ήταν και ο δείκτης αντίστασης στην ινσουλίνη που μετρήθηκε με το μοντέλο εκτίμησης της ομοιόστασης για την αντίσταση στην ινσουλίνη (HOMA-IR) ($p:0,011$). Επίσης τα άτομα με γονότυπο Ala/Ala εμφάνισαν χαμηλότερη τιμή ολικής χοληστερόλης ($p:0,012$), καθώς και HDL και LDL χοληστερόλης ($p:0,071$ και $p:0,095$ αντίστοιχα). Δεν φάνηκε συσχέτιση με τα επίπεδα γλυκόζης αίματος και τριγλυκεριδίων. Από την έρευνα αυτή φάνηκε ότι **ο πολυμορφισμός Pro12Ala πιθανά σχετίζεται θετικά με την εμφάνιση παχυσαρκίας και ινσουλινοαντοχής στον Καυκάσιο πληθυσμό, καθώς και με χαμηλότερες τιμές λιπιδίων αίματος. (26)**

Η έρευνα των **Schaffler et al.**, που έγινε σε δείγμα 359 ατόμων που ανήκουν στην καυκάσια φυλή, **δε βρήκε συσχέτιση του πολυμορφισμού με το BMI, το φύλο, την ολική χοληστερόλη αίματος, την LDL και HDL χοληστερόλη, την VLDL χοληστερόλη, τα επίπεδα τριγλυκεριδίων, την λιποπρωτεΐνη α, το ουρικό οξύ και την εμφάνιση διαβήτη.** Άρα, ο ρόλος του πολυμορφισμού στην παθογένεια της παχυσαρκίας και του διαβήτη τύπου II, αποκλείεται από την έρευνα αυτή. **(20)**

Η έρευνα των **Poirier et Al.**, περιέλαβε δείγμα 675 ατόμων που προήλθε από φοιτητές, αρσενικού φύλου, και ηλικίας 18-25 ετών από 11 διαφορετικές Ευρωπαϊκές χώρες. Στην έρευνα αυτή **δε βρέθηκε συσχέτιση του πολυμορφισμού με το BMI, την αρτηριακή πίεση, τα επίπεδα λιπιδίων νηστείας, τα επίπεδα γλυκόζης και**

τα επίπεδα γλυκόζης και ινσουλίνης. Διατυπώθηκε η υπόθεση ότι πιθανά ο πολυμορφισμός ασκεί την επίδραση του στο φαινότυπο σε μεγαλύτερη ηλικία. **(18)**

Έρευνες άλλου τύπου

Σε έρευνα που έγινε από τους **Azuma et al.**, φάνηκε σε διαβητικούς τύπου II ασθενείς με BMI μεγαλύτερο από 23, ότι οι φορείς του πολυμορφισμού **εμφανίζουν μικρότερα επίπεδα ολικής χοληστερόλης ($p:0,033$), LDL χοληστερόλης ($p:0,023$) και non-HDL χοληστερόλης ($p:0,028$) σε σχέση με τους φορείς του αλληλίου Pro**. Στην ομάδα με BMI μικρότερο από 23, δε φάνηκε συσχέτιση του πολυμορφισμού με κανέναν από τους παραπάνω δείκτες. Σύμφωνα με τη μελέτη αυτή ο πολυμορφισμός πιθανά ασκεί κάποια επίδραση στο μεταβολισμό των λιπιδίων. Η έρευνα περιέλαβε 106 διαβητικούς τύπου II ασθενείς. **(34)**

Στην έρευνα των **Swabrick et al.**, περιλήφθηκε δείγμα αποτελούμενο από ομάδα παχύσαρκων και από ομάδα μη παχύσαρκων ατόμων ($BMI=30$). **Η ομάδα των παχύσαρκων ατόμων, παρουσίασε σημαντικά μεγαλύτερες τιμές ολικής χοληστερόλης, LDL χοληστερόλης, τριγλυκεριδίων, αρτηριακής πίεσης, και χαμηλότερες τιμές HDL χοληστερόλης, από την ομάδα των μη παχύσαρκων ατόμων. (για όλα $p<0,0001$) Επίσης τα παχύσαρκα άτομα παρουσίασαν μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης διαβήτη II ($p:0,009$)** Κατά συνέπεια, οι παχύσαρκοι που φέρουν τον πολυμορφισμό παρουσιάζουν περισσότερο αθηρογόνο προφίλ λιπιδίων αίματος και φαίνεται η παχυσαρκία να σχετίζεται με συνδυασμένη υπερλιπιδαιμία για του φορείς του πολυμορφισμού. **(35)**

Στην έρευνα των **Lindi et al.**, περιλήφθηκε μια ομάδα παρέμβασης στην οποία χορηγήθηκε συμπλήρωμα από ιχθυέλαια, και μια ομάδα ελέγχου στην οποία χορηγήθηκε σκεύασμα placebo που περιείχε ελαιόλαδο για διάστημα τριών μηνών. Πριν τη χορήγηση, ο δε βρέθηκε συσχέτιση του πολυμορφισμού με τους δείκτες λιπιδίων αίματος και τη δραστηριότητα της λιποπρωτεϊνικής λιπάσης σε φάση νηστείας. **Μετά το πέρας των τριών μηνών, οι φορείς του πολυμορφισμού στην ομάδα παρέμβασης, εμφάνισαν χαμηλότερα επίπεδα τριγλυκεριδίων αίματος από τους Pro/Pro ομοζυγώτες.** Δεν παρατηρήθηκε διαφορά στα επίπεδα ολικής, LDL και HDL χοληστερόλης. Το γεγονός αυτό αποτελεί απόδειξη της αλληλεπίδρασης γονοτύπου και διατροφικών στοιχείων στο γενετικό τόπο του PPAR γ 2. **(19)**

Επίδραση του πολυμορφισμού στην εμφάνιση παχυσαρκίας

Όσον αφορά στην επίδραση του πολυμορφισμού στην εμφάνιση παχυσαρκίας, φαίνεται από έρευνες με μικρό έως μέτριο μέγεθος δείγματος, ότι ο πολυμορφισμός είτε δε σχετίζεται με το BMI, είτε σχετίζεται αλλά με μικρή διαφορά μεταξύ φορέων και μη φορέων του αλληλίου Ala. Δύο έρευνες με επαρκώς μεγάλο δείγμα, μια σε Φιλανδούς και μία σε Γιαπωνέζους βρήκαν συσχέτιση του πολυμορφισμού με μικρότερο BMI και καμία συσχέτισή του με το BMI, αντίστοιχα. Δεν έχει διαπιστωθεί τελικά τι ακριβώς συμβαίνει. Πάντως, εάν ισχύει ότι ο πολυμορφισμός σχετίζεται με αυξημένο BMI, πιθανά αυτό δεν αποτελεί άμεση επίδραση του πολυμορφισμού στο λιπώδη ιστό, αλλά πιθανά συμβαίνει μέσω της αυξημένης ευαισθησίας στην ινσουλίνη, που οδηγεί σε συσσώρευση λίπους στο λιπώδη ιστό λόγω της μειωμένης λιπόλυσης.

Πάντως, σε κάθε περίπτωση τα συμπεράσματα για το BMI θα πρέπει να είναι πολύ προσεκτικά ελεγχόμενα, αφού στην παθογένεια της παχυσαρκίας εμπλέκονται πολλοί περιβαλλοντικοί παράγοντες καθώς και σημαντικός αριθμός γονιδίων. Πράγματι, σε έρευνα των Luan et al., παρατηρήθηκε στους φορείς του αλληλίου Ala αυξημένο BMI, όταν ο λόγος πολυακόρεστα λιπαρά οξέα/ κορεσμένα λιπαρά οξέα στη διατροφή είναι χαμηλός, υποδεικνύοντας την πιθανή αλληλεπίδραση διατροφικών συστατικών και γονιδίου στο γενετικό τόπο του PPAR γ 2. (16)

Συσχέτιση του πολυμορφισμού με την εμφάνιση Διαβήτη τύπου II

Η συσχέτιση του πολυμορφισμού με την εμφάνιση διαβήτη τύπου II φάνηκε αρχικά από έρευνα που έγινε σε Γιαπωνέζους της Αμερικής. Η συχνότητα του πολυμορφισμού φάνηκε κατά πολύ μεγαλύτερη σε διαβητικούς τύπου II ασθενείς, σε σχέση με άτομα με φυσιολογική ανοχή στη γλυκόζη. Από τότε αρκετές έρευνες έδειξαν πιθανή συσχέτιση του πολυμορφισμού με την εμφάνιση διαβήτη, αλλά ο ρόλος του πολυμορφισμού στην αιτιολογία της νόσου ουσιαστικά θεμελιώθηκε από δυο μεγάλες πληθυσμιακές έρευνες σε Φιλανδούς και Γιαπωνέζους που περιέλαβαν δείγμα πάνω από 4000 ατόμων. Αρχικά, προτάθηκε ότι η συμβολή του πολυμορφισμού στην μείωση της επίπτωσης του διαβήτη ήταν 75%. Στη συνέχεια, διαπιστώθηκε ότι η μείωση της επίπτωσης στον πληθυσμό αντιστοιχεί σε 25%. (16), (36). Δηλαδή, εάν όλος ο πληθυσμός έφερε το αλληλίο Ala, η επίπτωση της νόσου θα μειωνόταν κατά 25%. Έτσι, το γονίδιο PPAR γ 2 προτάθηκε ανάμεσα στα γονίδια που παίζουν καθοριστικό ρόλο στην εμφάνιση του διαβήτη τύπου II.

Πάντως, μετά την εμφάνιση του διαβήτη, η προστατευτική επίδραση του πολυμορφισμού πιθανά χάνεται, αφού φαίνεται να σχετίζεται με αυξημένες αγγειακές βλάβες και περαιτέρω επιβάρυνση της λειτουργίας των β-κυττάρων. **(16)**

Επίδραση του πολυμορφισμού στην ευαισθησία στην ινσουλίνη

Στην έρευνα των Deeb et al., διαπιστώθηκε η κατά πολύ μεγαλύτερη ευαισθησία στην ινσουλίνη των μη διαβητικών φορέων του αλληλίου Ala. Παρόλα αυτά επειδή οι φορείς του πολυμορφισμού είχαν υψηλότερο BMI, όταν έγινε προσαρμογή ως προς το BMI εξαφανίστηκε η συσχέτιση. Στην μεγαλύτερη έρευνα που έχει γίνει μέχρι τώρα (616 άτομα-Σουηδοί άντρες 70 ετών) που μελέτησε το θέμα αυτό, φάνηκε κατά 7% καλύτερη ευαισθησία στην ινσουλίνη των φορέων του πολυμορφισμού με φυσιολογική ανοχή στη γλυκόζη. Διάφορες έρευνες έχουν γίνει στο πεδίο αυτό, όπου άλλες καταλήγουν σε συσχέτιση του πολυμορφισμού με αυξημένη ευαισθησία στην ινσουλίνη, ενώ άλλες δεν βρίσκουν συσχέτιση. Η έρευνα των Kao et al., σε Αφρικανούς Αμερικανούς κατέληξε σε θετική συσχέτιση του πολυμορφισμού με την ευαισθησία στην ινσουλίνη **(29)**, όπως και η έρευνα των Jacobs et al. **(37)** Από την άλλη, η έρευνα των Kawasaki et al., σε ιαπωνικό πληθυσμό δεν βρήκε συσχέτιση του πολυμορφισμού με αυξημένη ευαισθησία στην ινσουλίνη σε διαβητικούς ασθενείς, αλλά συσχέτιση μόνο με αυξημένο BMI. **(38)**

Σε έρευνες που χρησιμοποίησαν δείγμα παχύσαρκων ασθενών και ομάδα μαρτύρων, η θετική συσχέτιση του πολυμορφισμού με την ευαισθησία στην ινσουλίνη ήταν περισσότερο εμφανής, δείχνοντας την πιθανή αλληλεπίδραση του πολυμορφισμού με παράγοντες που προέρχονται από το λιπώδη ιστό και καθορίζουν την ευαισθησία στην ινσουλίνη.

Από έρευνες που έγιναν πάνω στο πιθανό μηχανισμό μέσω του οποίου ο πολυμορφισμός θα μπορούσε να επηρεάζει την ευαισθησία στην ινσουλίνη, φάνηκε ότι ίσως στα λιποκύτταρα, καταστέλλεται η δράση της ινσουλίνης στη λιπόλυση και μειώνονται τα επίπεδα των λιπαρών οξέων στο αίμα, με αποτέλεσμα να αυξάνεται τελικά η πρόσληψη της γλυκόζης από τους μύες. **(16)**

Η ΕΡΕΥΝΑ «ΑΤΤΙΚΗ»

Η έρευνα “ΑΤΤΙΚΗ” αποτελεί μια προοπτική μελέτη παρακολούθησης δείγματος του γενικού πληθυσμού που διεξάγεται από την καρδιολογική κλινική της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών σε συνεργασία με το Ιπποκράτειο νοσοκομείο Αθηνών. Στόχος της μελέτης είναι η καταγραφή των τιμών διαφόρων δημογραφικών, βιοχημικών, κλινικών, γενετικών, διατροφικών και ψυχολογικών παραμέτρων σε αντιπροσωπευτικό και τυχαία επιλεγμένο δείγμα του νομού Αττικής. Παράλληλα, στόχος είναι η προοπτική παρακολούθηση των ατόμων της μελέτης κάθε πέντε χρόνια και για συνολικό χρόνο παρακολούθησης εικοσιπέντε ετών, έτσι ώστε να αποτιμηθεί ο ρόλος που έχουν οι διερευνούμενοι παράγοντες στον κίνδυνο, θανατηφόρας ή μη, εκδήλωσης καρδιαγγειακής νόσου (στεφανιαία νόσος και εγκεφαλικά επεισόδια) και καρκίνου στον Ελληνικό πληθυσμό.

Το δείγμα της μελέτης αποτελείται από 3073 ενήλικα άτομα (48% άντρες και 52% γυναίκες) του νομού Αττικής. Σύμφωνα με επιδημιολογικά στοιχεία, ο νομός Αττικής καταγράφει ένα γενικό τύπο του σύγχρονου Έλληνα, καθώς αποτελείται από άτομα αστικών, ημιαστικών και αγροτικών περιοχών. Παράλληλα αποτελεί το 40% του γενικού πληθυσμού της χώρας. Το τυχαίο δείγμα της μελέτης είναι αντιπροσωπευτικό γιατί έχει σχεδιαστεί με βάση τις αρχές της πολυδιάστατης δειγματοληψίας και αφορά ολόκληρο τον πληθυσμό της γεωγραφικής περιφέρειας του νομού Αττικής.

Οι κυριότεροι παράγοντες που μελετώνται είναι:

- Δημογραφικά στοιχεία (φύλο, ηλικία, διαμονή, επάγγελμα).
- Σωματομετρικά στοιχεία (βάρος, ύψος, περιφέρεια μέσης και γοφών).
- Καθημερινές ατομικές συνήθειες (φυσική άσκηση, κατανάλωση αλκοόλ, κάπνισμα).
- Διατροφικές συνήθειες (με βάση πλήρες διατροφικό προφίλ, όπως διερευνάται από το ερωτηματολόγιο της Ευρωπαϊκής μελέτης ΕΠΙΚ που συντονίζεται από το εργαστήριο Υγιεινής και Επιδημιολογίας της Ιατρικής Σχολής Αθηνών).
- Ιατρικό οικογενειακό ιστορικό (αναφορικά με την καρδιαγγειακή νόσο και τους άλλους παράγοντες κινδύνου).
- Πιθανές φαρμακευτικές αγωγές.
- Νοσηρότητα.
- Γενετικοί δείκτες.

- Ψυχολογική εκτίμηση.
- Εργαστηριακά ευρήματα, όπως αυτά προκύπτουν από πλήρεις αιματολογικές εξετάσεις και ηλεκτροκαρδιογράφημα.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

ΔΕΙΓΜΑ

Το δείγμα αποτελούσαν **365 άτομα** από τον πληθυσμό της μελέτης “ΑΤΤΙΚΗ”. Το δείγμα της μελέτης “ΑΤΤΙΚΗ” περιλαμβάνει 3073 άτομα ηλικίας 18-88 ετών. Εξ αυτών 1475 είναι άνδρες (48%) και οι 1598 γυναίκες (52%). Το δείγμα είναι τυχαίο και αντιπροσωπευτικό του πληθυσμού της γεωγραφικής περιφέρειας του νομού Αττικής. Με βάση την πληθυσμιακή στρωματοποίηση της Εθνικής Στατιστικής Υπηρεσίας της Ελλάδος (ΕΣΥΕ, 1991) δημιουργήθηκαν «χάρτες» ανά περιοχή μελέτης έτσι ώστε να προσδιορίζεται επακριβώς ο πληθυσμός στόχος. Η συνεισφορά των περιοχών της Αττικής στην μελέτη είναι η ακόλουθη: Δήμος Αθηναίων (20%), Δήμος Πειραιώς (8%), ευρύτερη περιφέρεια πρωτευούσης (41%), Υπόλοιπο Αττικής (29%) και νήσοι (2%). Η επιλογή των ατόμων έγινε κατά τρόπο ώστε να επιλέγεται (τυχαία) ένα άτομο ανά οικογένεια, οικοδομικό συγκρότημα και τετράγωνο.

ΣΥΛΛΟΓΗ ΣΤΟΙΧΕΙΩΝ

Τα στοιχεία συγκεντρώθηκαν σε ειδικό ερωτηματολόγιο και έπειτα κωδικοποιήθηκαν σε στατιστική βάση δεδομένων που σχεδιάστηκε για το σκοπό αυτό. Τα ερωτηματολόγια της μελέτης είναι εμπιστευτικά, απλά και γρήγορα προσπελάσιμα.

➤ **Ανθρωπομετρικές παράμετροι:** Το ύψος των ατόμων μετρήθηκε μια φορά. Τα άτομα του δείγματος ήταν χωρίς παπούτσια, με την πλάτη ίσια και ακουμπισμένη σε μεζούρα του τοίχου και τα μάτια να κοιτάζουν ίσια εμπρός. Χρησιμοποιήθηκε ορθογώνιο τρίγωνο με τη μια κάθετη πλευρά του να εφάπτεται στο τριχωτό της κεφαλής του ατόμου και την άλλη στον τοίχο. Εξασφαλίστηκε έτσι ο οπτικός άξονας να είναι οριζόντιος αφού η άνω πλευρά του έξω ακουστικού πόρου βρίσκεται στο ίδιο επίπεδο με τη κάτω πλευρά του οφθαλμικού κόγχου. Οι μετρήσεις στρογγυλοποιήθηκαν στο πλησιέστερο 0,5 cm του μέτρου. Το βάρος των ατόμων επίσης μετρήθηκε μια φορά. Τα άτομα ήταν χωρίς παπούτσια και με ελαφρά εσωτερική ένδυση. Η ζυγαριά ρυθμιζόταν και ελεγχόταν πριν και μετά από κάθε ζύγιση. Οι μετρήσεις στρογγυλοποιήθηκαν στη πλησιέστερη εκατοντάδα γραμμαρίων. Ο δείκτης μάζας σώματος υπολογίστηκε σαν βάρος (Kg) / ύψος² (m²).

➤ **Βιοχημικές παράμετροι:** Μετά από 12ώρη νηστεία των εξεταζόμενων ατόμων, λήφθηκε αίμα για: (α) γενική εξέταση αίματος με χρήση αυτόματου αιματολογικού αναλυτή H1 ή H2 της Medicon, (β) βιοχημικό έλεγχο που περιελάμβανε ολική χοληστερόλη (TC), HDL-C, οξειδωμένη LDL-C, τριγλυκερίδια (TG), με τη χρήση

αυτόματου βιοχημικού αναλυτή RA 1000 της Techikon (χρωματομετρική ενζυματική μέθοδος), (γ) προσδιορισμό ApoA1 και ApoB, Lp(a), C αντιδρώσας πρωτεΐνης (CRP), ινωδογόνου, με αυτόματο νεφελόμετρο BNII της Dade Behring και (δ) προσδιορισμό ομοκυστεΐνης (Hcy) με αυτόματο ανοσολογικό αναλυτή AxSYM της Abbott (τεχνολογία του πολωμένου ανοσοφθορισμού, FPIA). Παράλληλα έγινε φύλαξη δείγματος στους -80°C για μελλοντική χρήση και γενετικό έλεγχο.

➤ **Κλινικές παράμετροι:** Η αρτηριακή πίεση μετρήθηκε στο αριστερό χέρι έχοντας τα άτομα σε καθιστή θέση και σε ήρεμη κατάσταση. Έγιναν τρεις μετρήσεις και υπολογίστηκε ο μέσος όρος τους. Αν για κάποιο λόγο η μέτρηση έγινε στο δεξί χέρι αυτό σημειώθηκε στο ερωτηματολόγιο του ατόμου. Επίσης σημειώθηκε, αν ψηλαφώντας τις κερκιδικές αρτηρίες άμφω, διαπιστώθηκε διαφορά στο σφυγμό στα δυο χέρια, οπότε μετρήθηκε η αρτηριακή πίεση και στο δεξί χέρι. Η τιμή της συστολικής πίεσης αντιστοιχεί στη τιμή που δείχνει το πιεσόμετρο όταν ακουστεί ο πρώτος ήχος. Η τιμή της διαστολικής πίεσης καθορίστηκε όταν ο ήχος σταμάτησε να ακούγεται ρυθμικός και ακούστηκε συνεχόμενος. Ο χρόνος μεταξύ των μετρήσεων ήταν ακριβώς όσος χρειαζόταν για να καταγραφεί η προηγούμενη μέτρηση και αφού η περιχειρίδα του πιεσόμετρου ξεφουσκωνόταν εντελώς. Το σφυγμομανόμετρο που χρησιμοποιήθηκε είχε ελεγχθεί πρόσφατα και η στήλη του υδραργύρου ήταν στο 0 mmHg της κλίμακας, όταν η περιχειρίδα ήταν εντελώς ξεφουσκωμένη. Ως υπερτασικά χαρακτηρίστηκαν τα άτομα που είχαν συστολική αρτηριακή πίεση $\geq 140\text{mm Hg}$, ή/και διαστολική αρτηριακή πίεση $\geq 90\text{mm Hg}$ ή λάμβαναν κάποια αντιυπερτασική φαρμακευτική αγωγή.

➤ **Αποτίμηση του τρόπου ζωής:** Τα άτομα ομαδοποιήθηκαν με βάση την σωματική τους δραστηριότητα σε τρεις κατηγορίες. Στην κατηγορία I συμπεριλήφθηκαν τα άτομα που δεν ασκούσαν καθόλου, στην κατηγορία II αυτά που ασκούσαν λίγο και στην κατηγορία III αυτά που ασκούσαν συστηματικά. Η κατάταξη έγινε με βάση τις απαντήσεις των ατόμων σε ανάλογες ερωτήσεις σχετικές για οποιαδήποτε μορφή σωματικής άσκησης που δεν σχετιζόταν με το κύριο επάγγελμα. Οι πληροφορίες σχετικά με τις καπνιστικές συνήθειες συλλέχθηκαν με βάση τυποποιημένο ερωτηματολόγιο που σχεδιάστηκε για τη μελέτη και το οποίο διερευνούσε τα έτη καπνίσματος, τον ημερήσιο αριθμό τσιγάρων, τα αίτια διακοπής καθώς επίσης και την έκθεση σε παθητικό κάπνισμα.

ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA

Η απομόνωση DNA έγινε από λευκοκύτταρα ολικού αίματος (5-6ml) με τη μέθοδο NaCl. Τα βήματα της μεθόδου περιγράφονται παρακάτω:

ΗΜΕΡΑ 1^η

1. Απομάκρυνση πλάσματος με πλαστική πιπέτα Pasteur μετά από φυγοκέντρωση (10min, 3000rpm).
2. Μεταφορά 3ml κυττάρων αίματος σε σωλήνα Falcon 50ml.
3. Προσθήκη διαλύματος Lysis I (αραιωμένο 1x) μέχρι τελικό όγκο 50ml.
4. Ισχυρή ανακίνηση και επώαση σε πάγο για 20min (ανακίνηση και κατά τη διάρκεια των 20min).
5. Φυγοκέντρωση (10min, 2000rpm).
6. Απομάκρυνση υπερκείμενου.
7. Προσθήκη 25ml Lysis I (αραιωμένο 1x) και ισχυρή ανακίνηση για διάλυση ιζήματος.
8. Φυγοκέντρωση (10min, 2500rpm).
9. Απομάκρυνση υπερκείμενου.
10. Προσθήκη 3ml διαλύματος LysisII και ισχυρή ανακίνηση.
11. Προσθήκη 50μl πρωτεϊνάσης K (20mg/ml).
12. Προσθήκη 150μl SDS 20% και ήπια ανάδευση.
13. Επώαση στους 56°C σε υδατόλουτρο.

ΗΜΕΡΑ 2^η

1. Μεταφορά διαλύματος σε σωλήνα Falcon 15ml.
2. Προσθήκη 1ml NaCl 6M και ισχυρή ανακίνηση για 15-20sec.
3. Φυγοκέντρωση (10min, 3000rpm). Με την φυγοκέντρωση παρουσία της μεγάλης συγκέντρωσης άλατος που αποδιατάσσει τις πρωτεΐνες, γίνεται κατακρήμνιση των πρωτεϊνών. Το DNA είναι διαλυτό σε διαλύματα αλάτων.
4. Ισχυρή ανακίνηση για διάλυση του ιζήματος και φυγοκέντρωση (10min, 3000rpm).
5. Μεταφορά υπερκείμενου σε σωλήνα Falcon 50ml.
6. Προσθήκη 2,5 φορές του όγκου σε αιθανόλη 96% και ήπια ανάδευση. Σε αυτή τη φάση γίνεται ορατό το DNA. Συγκέντρωση DNA σε κουβάρι σε roller bench.
7. Απομάκρυνση DNA από το διάλυμα με πιπέτα Pasteur, της οποίας το άκρο έχει κλείσει με θέρμανση.

8. Πλύσιμο του DNA (εμβάπτιση της πιπέτας σε 70% αιθανόλη) και στέγνωμα (20min). Το επιπλέον βήμα καθαρισμού με αιθανόλη χρειάζεται για την απομάκρυνση άλατος που έχει καταβυθιστεί με την αιθανόλη.
9. Μεταφορά του DNA σε σωλήνα eppendorf που περιέχει 0,5ml διαλύματος TE.
11. Διαλυτοποίηση DNA σε roller bench και αποθήκευση (4°C).

ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ. POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)

Μετά την απομόνωση ακολούθησε εφαρμογή της μεθόδου PCR (84), η οποία χρησιμεύει στην εκλεκτική αντιγραφή κατά εκατομμύρια φορές ειδικών τμημάτων DNA. Η μέθοδος είναι εξαιρετικά ευαίσθητη και επιτρέπει τη γρήγορη ανάλυση περιοχών του DNA που περιέχονται σε ένα πολύ μικρό δείγμα. Πρόκειται για μία αντίδραση πολυμερισμού, η οποία μιμείται in vitro τον τρόπο με τον οποίο τα ένζυμα του πυρήνα (DNA πολυμεράσες) αντιγράφουν το DNA του κυττάρου. Η εφαρμογή της μεθόδου προϋποθέτει να είναι γνωστή η νουκλεοτιδική αλληλουχία που πρόκειται να πολλαπλασιαστεί. Η αλληλουχία αυτή χρησιμοποιείται για το σχεδιασμό δύο συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων, ενός συμπληρωματικού προς το 3' άκρο της μιας αλυσίδας του DNA και ενός συμπληρωματικού προς το 3' άκρο της άλλης αλυσίδας. Τα ολιγονουκλεοτίδια αυτά μήκους 20-30 βάσεων χρησιμοποιούνται ως πρωταρχικά τμήματα (εκκινητές-primers) για in vitro σύνθεση DNA και οριοθετούν τα άκρα του τελικού προϊόντος. Παρουσία περισσειας των τεσσάρων τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), ιόντων μαγνησίου και της κατάλληλης DNA πολυμεράσης επιτυγχάνεται η αντίδραση πολυμερισμού. Το ένζυμο που χρησιμοποιείται για τον πολυμερισμό είναι η Taq πολυμεράση, η οποία απομονώνεται από το θερμοφιλό βακτήριο *Thermus aquaticus* και είναι ανθεκτική στις υψηλές θερμοκρασίες. Η πολυμεράση αυτή παρουσιάζει τη μεγαλύτερη ενεργότητα πολυμερισμού στους 72°C, ενώ παραμένει ενεργή σε θερμοκρασία μέχρι 95°C.

Η τεχνική της PCR περιλαμβάνει την κυκλική επανάληψη τριών αντιδράσεων:

1. **Αποδιάταξη** (template denaturation). Το δίκλωνο DNA αποδιατάσσεται σε μονόκλωνες αλυσίδες σε υψηλή θερμοκρασία (94-96°C).
2. **Σύνδεση εκκινητών** (primer annealing). Οι δύο εκκινητές συνδέονται με τις συμπληρωματικές προς αυτούς αλληλουχίες που βρίσκονται στις δύο αλυσίδες του DNA. Η σύνδεση αυτή πραγματοποιείται σε θερμοκρασία που εξαρτάται αποκλειστικά από την αλληλουχία των εκκινητών.

3. **Επιμήκυνση** (primer extension). Στο στάδιο αυτό γίνεται σύνθεση DNA με επιμήκυνση των εκκινητών κατά την 5'-3'κατεύθυνση, χρησιμοποιώντας τα νουκλεοτίδια που βρίσκονται στο διάλυμα και έχοντας ως καλούπι τις μονόκλωνες αλυσίδες του DNA. Η αντίδραση πολυμερισμού καταλύεται από την Taq DNA πολυμεράση και πραγματοποιείται σε θερμοκρασία 72°C.
4. Οι νεοσυντιθέμενες αλυσίδες αποδιατάσσονται ξανά και οι μονόκλωνες αλυσίδες επανυβριδίζονται με τους εκκινητές και ο κύκλος αυτός επαναλαμβάνεται 25-35 φορές.\

Το κύριο προϊόν της εκθετικής αυτής αντίδρασης είναι ένα δίκλωνο τμήμα DNA του οποίου τα άκρα ορίζονται από τα 5'άκρα των εκκινητών και έχει μήκος ίσο με την απόσταση των εκκινητών. Για παράδειγμα 30 κύκλοι PCR δίνουν πολλαπλασιασμό της τάξης του εκατομμυρίου. Το προϊόν της PCR χρησιμοποιείται στη συνέχεια για τη μελέτη του τμήματος DNA που πολλαπλασιάστηκε.

Για την εφαρμογή της μεθόδου PCR στο εξόνιο 10 του γονιδίου GNβ3 χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα αντιδραστήρια (39):

▪ **ΕΚΚΙΝΗΤΕΣ**

Ο αριστερός εκκινητής (forward primer) είχε την αλληλουχία 5'-CA-AG-CCC-AGT-CCT-TTC-TGT-G-3' και ήταν σε ξηρή μορφή. Προστέθηκαν 543 μl απεσταγμένου και αποστειρωμένου νερού, έτσι ώστε η συγκέντρωση να είναι 54 pmol/μl. (stock solution)

Ο δεξιός εκκινητής (reverse primer) είχε την αλληλουχία 5'-AGT-GAA-GGA-ATC-GCT-TTC-CG-3' και ήταν σε μορφή σκόνης. Προστέθηκαν 605 μl απεσταγμένου και αποστειρωμένου νερού, έτσι ώστε η συγκέντρωση να είναι 60 pmol/μl. (stock solution)

Από τα διαλύματα των εκκινητών που σχηματίστηκαν (stock solutions), παρασκευάστηκαν νέα διαλύματα με αραιώση 1:8 (working solutions: 25 μl stock + 175 μl απεσταγμένο και αποστειρωμένο νερό), τα οποία χρησιμοποιήθηκαν στην PCR. Η τελική συγκέντρωση των διαλυμάτων ήταν 12,5 pmol/μl. Τα διαλύματα των εκκινητών (stock και working solutions) διατηρούνται σε θερμοκρασία -20°C.

▪ **Taq ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗ**

Χρησιμοποιήθηκε η Bioron Taq πολυμεράση και είχε συγκέντρωση 5 U/ μl. Το αντιδραστήριο διατηρείται σε θερμοκρασία -20°C.

▪ **PCR BUFFER**

Η συγκέντρωσή του ήταν 10X και περιείχε: 200 mM Tris-HCL (pH 8,4) και 500 mM KCL. Το αντιδραστήριο διατηρείται σε θερμοκρασία -20°C .

- **ΔΙΑΛΥΜΑ MgCl_2**

Η συγκέντρωσή του ήταν 100 mM. Το αντιδραστήριο διατηρείται σε θερμοκρασία -20°C .

- **ΜΙΓΜΑ ΟΛΙΓΟΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΩΝ (dNTP's)**

Τα τέσσερα ολιγονουκλεοτίδια είχαν συγκέντρωση 100 mM το καθένα. Αναμίχθηκαν και μεταφέρθηκαν σε errendorf. Το αντιδραστήριο διατηρείται σε θερμοκρασία -20°C .

- **ΑΠΕΣΤΑΓΜΕΝΟ ΚΑΙ ΑΠΟΣΤΕΙΡΩΜΕΝΟ ΝΕΡΟ**

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για την πραγματοποίηση της PCR έχει ως εξής:

1. ΜΙΓΜΑ ΤΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ ΤΗΣ PCR.

Αρχικά παρασκευάζεται το μίγμα των αντιδραστηρίων της PCR. Οι ποσότητες των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν φαίνονται στον πίνακα 2.1. Τα αντιδραστήρια διατηρούνται σε πάγο σε όλη τη διάρκεια της διαδικασίας. Η ποσότητα από το κάθε αντιδραστήριο πολλαπλασιάζεται με τον αριθμό των δειγμάτων στα οποία θα γίνει PCR, συν 1 δείγμα για τυχόν απώλειες. Αφού παρασκευαστεί το μίγμα, αναδεύεται σε vortex και διατηρείται σε πάγο.

ΠΙΝΑΚΑΣ 1. ΜΙΓΜΑ ΓΙΑ PCR ΣΤΟ ΕΞΟΝΙΟ Β ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ PPAR γ 2

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟ	ΟΓΚΟΣ
Taq ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗ	0,15 μl
PCR BUFFER	1,2 μl
MgCl_2	0,6 μl
dNTP's	0,1 μl
ΔΕΞΙΟΣ ΕΚΚΙΝΗΤΗΣ	0,2 μl
ΑΡΙΣΤΕΡΟΣ ΕΚΚΙΝΗΤΗΣ	0,2 μl
ΝΕΡΟ ΑΠΕΣΤΑΓΜΕΝΟ ΚΑΙ ΑΠΟΣΤΕΙΡΩΜΕΝΟ	4,55 μl

2. Το μίγμα χωρίζεται σε αποστειρωμένες πλάκες των 96 θέσεων. Σε κάθε θέση της πλάκας τοποθετούνται 7 μl από το μίγμα με πιπέτα πολλαπλών εξόδων. Η πλάκα με το μίγμα διατηρείται στον πάγο.

3. Σε κάθε θέση της πλάκας προστίθενται 5 μl DNA από δείγματα αραιωμένα 1:10. Ο συνολικός όγκος του μίγματος για την PCR είναι 12 μl.

4. Η πλάκα μεταφέρεται σε θερμικό κυκλοποιητή (μηχάνημα PCR) και ακολουθείται το ακόλουθο πρόγραμμα (40):

BHMA 1^ο: 94°C για 3 min

BHMA 5^ο: (Βήμα 2^ο, Βήμα 3^ο και Βήμα 4^ο) x

40

BHMA 2^ο: 94°C για 30 seconds

BHMA 6^ο: 72°C για 9 min

BHMA 3^ο: 53°C για 30seconds

BHMA 7^ο: 4°C αποθήκευση

BHMA 4^ο: 72°C για 1 min

ΕΛΕΓΧΟΣ ΕΠΙΤΥΧΙΑΣ PCR

Ο έλεγχος της επιτυχίας της PCR γίνεται με ηλεκτροφόρηση του προϊόντος της σε πήκτωμα αγαρόζης 2%. Η ηλεκτροφορητική κινητικότητα του DNA στηρίζεται στο γεγονός ότι σε ουδέτερο pH το DNA είναι αρνητικά φορτισμένο. Επομένως αν τοποθετηθούν τμήματα DNA στην κάθοδο (-), θα μετακινηθούν προς την άνοδο (+). Η ηλεκτροφορητική κινητικότητα του DNA κατά μήκος των πηκτωμάτων εξαρτάται κυρίως από το μοριακό μέγεθος του DNA και τη συγκέντρωση της αγαρόζης. Η ταχύτητα μετακίνησης του DNA είναι αντιστρόφως ανάλογη του μεγέθους των κλασμάτων DNA που ηλεκτροφορούνται και αντιστρόφως ανάλογη της συγκέντρωσης του πηκτώματος. Σημειώνεται τέλος, ότι χρησιμοποιώντας πηκτώματα διαφορετικών συγκεντρώσεων μπορούμε να διαχωρίσουμε ένα μεγάλο εύρος μεγεθών DNA. Με συγκέντρωση 2% γίνεται διαχωρισμός γραμμικών τμημάτων DNA μήκους 0,1-3 Kb.

➤ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΠΗΚΤΩΜΑΤΟΣ ΑΓΑΡΟΖΗΣ 2%

- Ζυγίζονται 1,5gr αγαρόζης και τοποθετούνται σε κωνική φιάλη.
- Προσθήκη 100 ml διαλύματος TBE 0,5X (Tris Borate Acid).
- Ταχεία θέρμανση μερικών λεπτών σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρι να διαλυθεί πλήρως η αγαρόζη.
- Αφού κρυώσει το διάλυμα προστίθενται 9μl διαλύματος βρωμιούχου αιθιδίου 10 mg/ml (EtBr) και αναδεύεται το διάλυμα.

Το βρωμιούχο αιθίδιο είναι μια φθορίζουσα χρωστική. Το μόριο του περιλαμβάνει έναν οριζόντιο δακτύλιο που έχει την ιδιότητα να παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων του DNA, με

αποτέλεσμα το DNA να φθορίζει όταν εκτεθεί σε υπεριώδη ακτινοβολία μήκους κύματος 302-366 nm. Το αντιδραστήριο αυτό είναι καρκινογόνο.

- Το διάλυμα χύνεται στο εκμαγείο της ηλεκτροφορητικής συσκευής, αφού πρώτα έχουν τοποθετηθεί σε αυτό “χτένες” ώστε να δημιουργηθούν “πηγάδια” καθώς πήζει το πήκτωμα της αγαρόζης.
- Το διάλυμα αφήνεται να πήξει (~10 min).
- Αφού δημιουργηθεί το πήκτωμα αγαρόζης, αφαιρούνται οι “χτένες” από αυτό και προστίθεται στο δοχείο της ηλεκτροφόρησης ρυθμιστικό διάλυμα TBE 0,5X μέχρι την ένδειξη της ηλεκτροφορητικής συσκευής (fill line), ώστε να καλύπτεται πλήρως το πήκτωμα.

➤ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΓΙΑ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ

- Σε μη αποστειρωμένα erppendorf των 0,5 ml μεταφέρονται 3 μl του προϊόντος PCR από κάθε δείγμα και σε ένα erppendorf τοποθετείται 0,5 μl μάρτυρα (DNA ladder 100bp). Το υπόλοιπο προϊόν της PCR διατηρείται στους 4 °C, ενώ ο μάρτυρας διατηρείται στους -20 °C.
- Σε όλα τα erppendorf προστίθενται 2 μl χρωστικής κυανού της ξυλόλης και φυγοκεντρούνται (short spin) για να αναμιχθεί η χρωστική με το προϊόν της PCR και το μάρτυρα.
- Στη συνέχεια, μεταφέρεται κάθε δείγμα με τη χρωστική σε ένα από τα “πηγάδια” του πηκτώματος, ενώ σε ένα από τα πηγάδια μεταφέρεται ο “μάρτυρας”.

➤ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΤΟΥ ΠΗΚΤΩΜΑΤΟΣ

- Η ηλεκτροφόρηση γίνεται στα 100 V για περίπου 20 λεπτά.
- Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης, το πήκτωμα παρατηρείται στο υπεριώδες. Σε κάθε δείγμα φαίνεται μια ζώνη DNA, η οποία αντιπροσωπεύει το κομμάτι του DNA που πολλαπλασιάστηκε από την PCR. Το μήκος του κομματιού ελέγχεται σε σύγκριση με τον “μάρτυρα”, οπότε και ελέγχεται η επιτυχία της PCR.

ΠΕΨΗ ΜΕ ΠΕΡΙΟΡΙΣΤΙΚΗ ΕΝΔΟΝΟΥΚΛΕΑΣΗ

Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες είναι ένζυμα που παράγονται από βακτήρια. Λέγονται ενδονουκλεάσες γιατί κόβουν το DNA στο εσωτερικό του μορίου και όχι στα άκρα, ενώ λέγονται περιοριστικές επειδή η δραστηριότητά τους περιορίζεται σε "ξένο" DNA. Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες αναγνωρίζουν ειδικές δίκλωνες αλληλουχίες DNA και κόβουν το μόριο μέσα ή κοντά

στην αλληλουχία αναγνώρισης. Οι αλληλουχίες αναγνώρισης έχουν συνήθως μήκος 4-8 νουκλεοτίδια και συχνά είναι παλίνδρομες ("διαβάζονται" το ίδιο και από τις δύο κατευθύνσεις 5'-3' και 3'-5' του

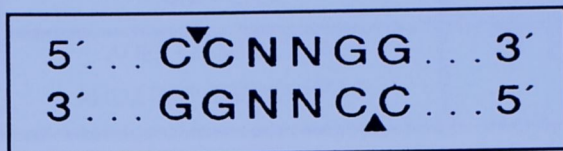
DNA). Τα τμήματα DNA που παράγονται από την πέψη με μια περιοριστική ενδονουκλεάση έχουν

πάντα τα ίδια άκρα, είτε αυτά είναι προεξέχοντα (sticky ends), είτε όχι (blunt ends). Η συχνότητα και η θέση ανεύρεσης των αλληλουχιών αναγνώρισης οποιασδήποτε περιοριστικής ενδονουκλεάσης μέσα σε ένα μόριο DNA, εξαρτάται από την ακριβή αλληλουχία του δείγματος που εξετάζεται. Οι ιδιότητες των περιοριστικών ενδονουκλεασών μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την χαρτογράφηση ενός συγκεκριμένου μορίου DNA με βάση τον εντοπισμό των θέσεων αναγνώρισης, αλλά και στην διαδικασία σύνδεσης τμημάτων DNA που περιέχουν τα ίδια προεξέχοντα άκρα ακόμη και αν αυτά προέρχονται από διαφορετικά δείγματα .

Τα περιοριστικά ένζυμα ποικίλουν ως προς τις συνθήκες άριστης δράσης τους. Οι παραλλαγές αυτές αναφέρονται στη θερμοκρασία επώασης και στη σύσταση του διαλύματος επώασης. Η επιλογή της κατάλληλης θερμοκρασίας είναι αυστηρή, ενώ οι διαφορές στη σύσταση των διαλυμάτων επώασης είναι μικρές. Τα ρυθμιστικά διαλύματα μέσα στα οποία γίνεται η αντίδραση της επώασης περιέχουν συνήθως Mg^{+2} που λειτουργεί ως συμπαραγόντας του ενζύμου, καθώς και Na^{+} . Τα συστατικά των διαλυμάτων επώασης πρέπει να είναι καθαρά και απαλλαγμένα από νουκλεάσες. Οι σουλφιδριλικοί παράγοντες (β-μερκαπτοαιθανόλη, DTT κ.ά.) που προστίθενται αποσκοπούν στην αναστολή των νουκλεασών που ενδεχομένως συνυπάρχουν. Η προσθήκη BSA (αλβουμίνη ορού βοός) στην αντίδραση επώασης προφυλάσσει το ένζυμο από πρωτεάσες και άλλους παράγοντες, ωστόσο η προσθήκη ή όχι BSA καθορίζεται από το ένζυμο. Το DNA που χρησιμοποιείται πρέπει να είναι απαλλαγμένο από προσμίξεις (όπως EDTA, SDS, φαινόλη, βρωμιούχο αιθίδιο) που μπορεί να παρεμποδίζουν τη δραστηριότητα του ενζύμου. Τα ένζυμα διατηρούνται στους $-20^{\circ}C$ μέσα σε διάλυμα που περιέχει 50% v/v γλυκερόλη (41).

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε για την πέψη το ένζυμο **Hpa II (40)**. Αυτή η περιοριστική ενδονουκlease απομονώνεται από το στέλεχος *Haemophilus Parainfluenza*.

Η αλληλουχία αναγνώρισης του ενζύμου φαίνεται στην εικόνα 2.1.



Σχήμα 11: ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΝΑΓΝΩΡΙΣΗΣ ΤΟΥ ΕΝΖΥΜΟΥ PPARγ2. ΤΑ ΒΕΛΗ ΔΕΙΧΝΟΥΝ ΤΑ ΣΗΜΕΙΑ ΚΟΠΗΣ.

Για την πέψη του προϊόντος της PCR χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα αντιδραστήρια:

- **ΕΝΖΥΜΟ**

Η συγκέντρωση του ενζύμου ήταν 2.500 U/ml και διατηρείται σε θερμοκρασία -20°C.

- **ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΟ ΔΙΑΛΥΜΑ (BUFFER 2)**

Το ρυθμιστικό διάλυμα (buffer 2) ήταν σε συγκέντρωση 1X και περιείχε: 33mM tris-acetate, 10mM magnesium acetate, 66mM potassium acetate, 0,1mg/ml BSA. Διατηρείται στους -20° C.

- **ΑΠΕΣΤΑΓΜΕΝΟ ΚΑΙ ΑΠΟΣΤΕΙΡΩΜΕΝΟ ΝΕΡΟ**

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για την πραγματοποίηση της πέψης έχει ως εξής:

1. **ΜΙΓΜΑ ΤΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ ΤΗΣ ΠΕΨΗΣ.**

Αρχικά παρασκευάζεται το μίγμα αντιδραστηρίων της πέψης. Οι ποσότητες των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν φαίνονται στον πίνακα 2.2. Τα αντιδραστήρια διατηρούνται σε πάγο σε όλη τη διάρκεια της διαδικασίας. Η ποσότητα από το κάθε αντιδραστήριο πολλαπλασιάζεται με τον αριθμό των δειγμάτων στα οποία θα γίνει πέψη, συν 2 δείγματα για τυχόν απώλειες. Αφού παρασκευαστεί το μίγμα αναδεύεται σε vortex και διατηρείται σε πάγο.

2. Το μίγμα χωρίζεται σε μια αποστειρωμένη «οχτάδα». Σε κάθε θέση της «οχτάδας» μεταφέρονται 4μlX12 από το μίγμα με πιπέτα και το ίδιο tip για να μειωθούν οι απώλειες. Οι «οχτάδες» με το μίγμα της πέψης διατηρούνται σε πάγο.

ΠΙΝΑΚΑΣ 2. ΜΙΓΜΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΕΨΗ.

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟ	ΟΓΚΟΣ
ΕΝΖΥΜΟ HpaII	0,2 μl
BUFFER 2	1,4 μl
ΑΠΕΣΤΑΓΜΕΝΟ ΚΑΙ ΑΠΟΣΤΕΙΡΩΜΕΝΟ ΝΕΡΟ	2,4 μl

3. Στη συνέχεια, με πιπέτα πολλαπλών εξόδων, το μίγμα μοιράζεται στις θέσεις της πλάκας, όπου ήδη υπάρχουν τα προϊόντα της PCR. Ο τελικός όγκος για την πέψη είναι 13μl.
4. Η πλάκα τοποθετείται σε εκκολαπτικό θάλαμο στους 37°C για ένα βράδυ.

ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΟΥ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ ΤΗΣ ΠΕΨΗΣ

Ο έλεγχος του προϊόντος της πέψης έγινε με την τεχνική MADGE (micro titer array diagonal gel electrophoresis) σε ακρυλαμίδα 7,5%.

➤ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΠΗΚΤΩΜΑΤΟΣ

1. Η γυάλινη πλάκα καλύπτεται από τη μια πλευρά με κολλώδες διάλυμα (sticking solution) και αφήνεται να στεγνώσει.
2. Σε δοχείο τοποθετούνται τα συστατικά του διαλύματος ακρυλαμίδης. Για ένα πήκτωμα:
 - 12,5ml διαλύματος ακρυλαμίδης 19:1
 - 27,5ml απιονισμένο νερό
 - 150μl APS
 - 150μl TEMED
 - 10ml διαλύματος TBE 0,5X (Tris Borate Acid)
3. Το πλαστικό καλούπι τοποθετείται οριζόντια με τα «δόντια» προς τα πάνω.
4. Ρίχνεται μέσα στο καλούπι το διάλυμα ακρυλαμίδης

5. Σκεπάζεται με τη γυάλινη πλάκα, από την πλευρά που έχει καλυφθεί με το κολλώδες διάλυμα
6. Αφού το πήξει το διάλυμα αφαιρείται με τη γυάλινη πλάκα από το καλούπι
7. Το πήκτωμα βρίσκεται πάνω στη γυάλινη πλάκα

➤ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΓΙΑ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ

- Αφού αποσυρθούν τα erppendorf με το προϊόν της πέψης από τους 37°C, προστίθενται στο καθένα 5 μl χρωστικής κυανού της ξυλόλης. Σε καθαρό erppendorf τοποθετείται 0,5 μl μάρτυρα (DNA ladder 100bp) και 5 μl χρωστικής.
- Ακολουθεί φυγοκέντριση (short spin) για την ανάμιξη του προϊόντος της πέψης με τη χρωστική και του μάρτυρα με την χρωστική.
- Στη συνέχεια, μεταφέρονται 5μl από τα δείγματα με τη χρωστική ανά οχτάδες στα «πηγάδια» του πηκτώματος, με τη βοήθεια πιπέτας πολλαπλών θέσεων με τη χρωστική. Σε ένα από τα επιπρόσθετα «πηγάδια» που φέρει το πήκτωμα (πέραν αυτών που ανήκουν σε οχτάδες) τοποθετείται ο μάρτυρας.

➤ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΤΟΥ ΠΗΚΤΩΜΑΤΟΣ

- Η ηλεκτροφόρηση γίνεται στα 150 V για περίπου 15 λεπτά. (μπορεί να γίνει μέχρι και για πέντε πηκτώματα ταυτόχρονα)
- Στη συνέχεια γίνεται χρώση του πηκτώματος για 30 λεπτά με βρωμιούχο αιθίδιο σε διάλυμα TBE (2μl Br Et/100ml TBE)
- Στη συνέχεια το πήκτωμα αποχρωματίζεται για 10 λεπτά σε διάλυμα TBE
- Το πήκτωμα παρατηρείται στο υπεριώδες. Σε κάθε δείγμα φαίνονται ζώνες ανάλογα με την ύπαρξη ή όχι του πολυμορφισμού στο ένα ή και στα δύο αλληλόμορφα. Τα κομμάτια DNA που αντιστοιχούν στις ζώνες συγκρίνονται με τον "μάρτυρα" και γίνεται διάγνωση του γονότυπου για τον συγκεκριμένο πολυμορφισμό (Pro12Ala) σε κάθε δείγμα.

ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

➤ Lysis I (20x)

- 82,9gr NH_4CL (3,1M).
- 10,01gr KHCO_3 (200mM).
- 20ml EDTA (0,5M).
- Ανάδευση.
- Προσθήκη απεσταγμένου νερού μέχρι $V_{\text{τελ}}=500\text{ml}$.
- Έλεγχος και ρύθμιση pH στο 7,4.
- Αποστείρωση.

➤ Lysis I (1x)

- 25ml Lysis I 20x.
- Προσθήκη απεσταγμένου νερού μέχρι $V_{\text{τελ}}=500\text{ml}$.
- Ανάδευση.

➤ Lysis II

- 0,61gr TrisHCL (10mM).
- 11,69gr NaCL (400mM).
- 2ml EDTA (0,5M).
- Ανάδευση.
- Προσθήκη απεσταγμένου νερού μέχρι $V_{\text{τελ}}=500\text{ml}$.
- Έλεγχος και ρύθμιση pH στο 8,4.
- Αποστείρωση.

➤ Πρωτεΐνάση K (20mg/ml)

- 100mg πρωτεΐνάση K.
- 5ml αποστειρωμένο νερό.
- Ανάδευση σε Vortex.
- Κατανομή σε eppendorfs των 1,5ml.
- Αποθήκευση στους -20°C .

➤ Tris Borate Acid 5x (TBE 5x)

- 54gr Tris Base.
- 27,5gr Boric Acid.
- 20ml EDTA 0,5M.
- Προσθήκη ~800ml απεσταγμένου νερού.

- Ανάδευση.
- Έλεγχος και ρύθμιση pH στο 8,3.
- Προσθήκη απεσταγμένου νερού μέχρι Vτελ=1lt.

➤ **Tris Borate Acid 1x (TBE 1x)**

- 200ml TBE 5x.
- Προσθήκη απεσταγμένου νερού μέχρι Vτελ=1lt.
- Ανάδευση.

➤ **EDTA 0,5M**

- 186,1gr EDTA $2H_2O$.
- Προσθήκη ~700ml απεσταγμένου νερού.
- Ρύθμιση pH με προσθήκη NaOH (pellets) υπό ανάδευση στο 8.
- Προσθήκη απεσταγμένου νερού μέχρι Vτελ=1lt.

➤ **SDS 20%**

- 20gr SDS.
- 60ml απεσταγμένο νερό.
- Ανάδευση.

➤ **Βρωμιούχο αιθίδιο (10mg/ml)**

- 10mg EtBr.
- 1ml αποστειρωμένο νερό.
- Ανάδευση σε Vortex.
- Φύλαξη στους 4°C.

➤ **Tris-EDTA (TE)**

- 0,61gr Tris Base 10Mm.
- 1ml EDTA 0,05M.
- Προσθήκη ≈ 400ml απεσταγμένο νερό.
- Ανάδευση.
- Προσθήκη απεσταγμένου νερού μέχρι Vτελ=500ml.
- Έλεγχος και ρύθμιση pH στο 7,4.
-
- Αποστείρωση.

➤ **ΚΟΛΛΩΔΕΣ ΔΙΑΛΥΜΑ (STICKING SOLUTION)**

- 1,25ml gracial οξικό οξύ
- 1,25ml γ-μεθυλο-σιλικό οξύ
- πάνω από 250ml αιθανόλης

➤ **ΑΚΡΥΛΑΜΙΔΗ 19:1**

- 30% ακρυλαμίδη/bis

➤ **APS**

- 1ml νερό
- 0,25g υπερθειικό αμμώνιο

Η ολοκληρωτή αναίτηση της πολυμεράσης συμπυκνώνεται σε έναν κλάδο μεγέθους 345bp. Ο ρόστρους που χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο της PCR είναι ζώνες από 100 bp. Κατά συνέπεια αναμένεται το προϊόν της PCR να εμφανίζεται μεταξύ των ζωνών 200 και 300bp. Στην εικόνα 1 φαίνεται ο έλεγχος της PCR που πραγματοποιήθηκε σε πλάσμα συγκέντρωσης 1,5%.

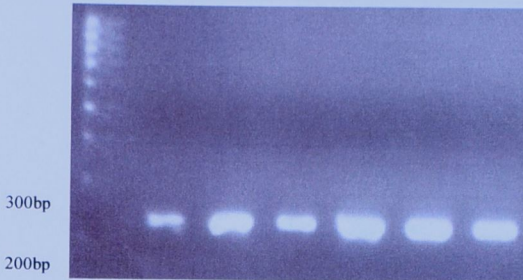
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Από την ολοκληρωτή αναίτηση του ελέγχου PCR, όπως και η προσεγγιστική εκτίμηση της ζώνης DNA στην εικόνα του ρόστρου.

Ο έλεγχος της διαδικασίας πήξης με περιοριστικό ένζυμο έγινε με την χρήση του **MAE** σε πλάσμα συγκέντρωσης 7,5%. Το περιοριστικό ένζυμο **MAE** αναμένεται να κόψει το DNA στην περίπτωση που το στόμα δεν είναι ένα συνεχές μόριο, όπως και διακρίνονται δύο ζώνες που αντιστοιχούν σε 212 και 43bp. Αναμένονται τρεις ζώνες στην περίπτωση των ελαφρώς γαλκωμένων ατόμων (252bp, 43bp και 245 bp) και μία ζώνη στην περίπτωση των αρθροειδών ή σκληρών Απλ. ατόμων (245bp). Ο έλεγχος της πήξης φαίνεται στην εικόνα 2.

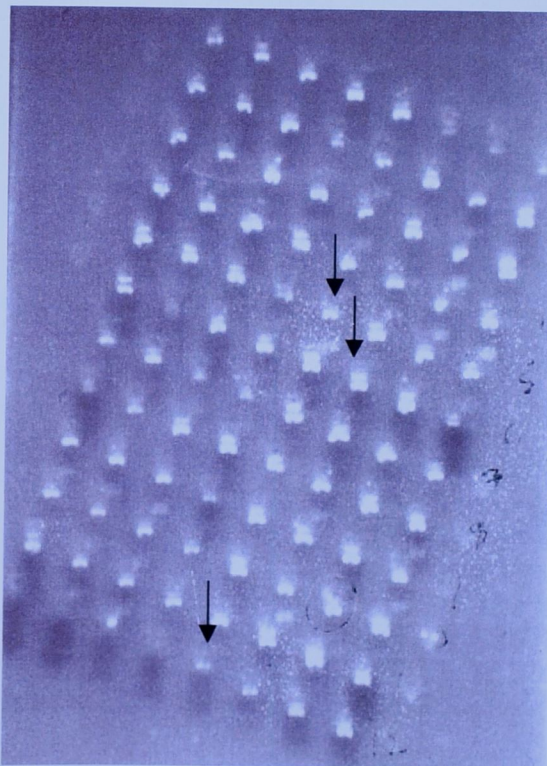
Από την ολοκληρωτή αναίτηση του ελέγχου PCR, όπως και η προσεγγιστική εκτίμηση της ζώνης DNA στην εικόνα του ρόστρου.

Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης αναμενόταν να δώσει προϊόν μεγέθους 245bp. Ο μάρτυρας που χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο της PCR έφερε ζώνες ανά 100 bp. Κατά συνέπεια αναμενόταν το προϊόν της PCR να εμφανίζεται μεταξύ των ζωνών 200 και 300bp. Στην εικόνα 1 φαίνεται ο έλεγχος της PCR που πραγματοποιήθηκε σε πήκτωμα αγαρόζης 1,5%



Εικόνα 1: Στη διπλανή εικόνα φαίνεται ο έλεγχος της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης. Το προϊόν από τη διαδικασία αυτή, αναμένεται να έχει μέγεθος 245bp, οπότε κι εμφανίζεται ανάμεσα στις ζώνες 200-300bp του μάρτυρα

Ο έλεγχος της διαδικασίας πέψης με περιοριστικά ένζυμα έγινε με την τεχνική **MADGE** σε πήκτωμα ακρυλαμίδης 7,5%. Το περιοριστικό ένζυμο, διακόπτει την αλληλουχία του DNA στην περίπτωση που το άτομο δεν φέρει τον πολυμορφισμό, οπότε και διακρίνονται δυο ζώνες που αντιστοιχούν σε 202 και 43bp. Αναμένουμε τρεις ζώνες στην περίπτωση των ετερόζυγων για τον πολυμορφισμό ατόμων (202bp, 43bp και 245 bp) και μια ζώνη στην περίπτωση των ομόζυγων για το αλληλίο Ala ατόμων (245bp). Ο έλεγχος της πέψης φαίνεται στην εικόνα 2.



Εικόνα 2: Στην εικόνα αυτή φαίνεται ο έλεγχος της διαδικασίας πέψης με περιοριστικές ενδονουκλεάσες. Εφαρμόστηκε η τεχνική MADGE σε πήκτωμα ακρυλαμίδης. Το περιοριστικό ένζυμο, διακόπτει την αλληλουχία του DNA στην περίπτωση που το άτομο δεν φέρει τον πολυμορφισμό. Αναμένουμε τρεις ζώνες στην περίπτωση των ετερόζυγων για τον πολυμορφισμό ατόμων (202bp, 43bp και 245 bp). Δύο ζώνες εμφανίζονται στην περίπτωση των ομόζυγων για το αλληλίο Pro ατόμων (202 και 43bp), και μια ζώνη στην περίπτωση των ομόζυγων για το αλληλίο Ala ατόμων (245bp). Το πρώτο από πάνω βέλος δείχνει άτομο ομόζυγο ως προς το Pro αλληλίο. Το δεύτερο, άτομο ετερόζυγο ως προς τον πολυμορφισμό, ενώ το τρίτο δείχνει άτομο ομόζυγο ως προς το αλληλίο Ala.

Από τη διάγνωση της πέψης με περιοριστικά ένζυμα προέκυψε ότι η συχνότητα του αλληλίου στον πληθυσμό είναι **31%**. Η συχνότητα των ατόμων με γονότυπο Pro/Pro είναι **39,72%**, η συχνότητα των ατόμων με Pro/Ala είναι **58,09%** και η συχνότητα των Ala/Ala ατόμων είναι **2,19%**. (ΠΙΝΑΚΑΣ 3)

ΓΟΝΟΤΥΠΟΙ	ΣΥΧΝΟΤΗΤΕΣ
Pro/Pro	39,72%
Pro/ Ala	58,09%
Ala/ Ala	2,19%

ΠΙΝΑΚΑΣ 3: Αποτελέσματα για την κατανομή γονοτύπων

Όσον αφορά στην ανίχνευση της συσχέτισης του πολυμορφισμού με βιοχημικές παραμέτρους και το Δείκτη Μάζας Σώματος, σε 114 άτομα από το συνολικό δείγμα, τα αποτελέσματα φαίνονται στον ΠΙΝΑΚΑ 4. Φαίνεται ότι 114 άτομα από το συνολικό δείγμα, έλαβαν μέρος στην πιλοτική έρευνα για την ανίχνευση τυχόν συσχέτισης του αλληλίου Ala με βιοχημικούς δείκτες και το BMI. Οι βιοχημικές παράμετροι που μελετήθηκαν είναι:

- ολική χοληστερόλη
- LDL- χοληστερόλη
- HDL-χοληστερόλη
- Τριγλυκερίδια νηστείας
- Απολιποπρωτεΐνη A1
- Απολιποπρωτεΐνη C
- Λιποπρωτεΐνη (α)
- Γλυκόζη

Όπως φαίνεται από τον πίνακα 4 ο πολυμορφισμός Pro 12Ala 26 φαίνεται να συσχετίζεται με οριστά από τις παραμέτρους που μελετήθηκαν.

	ΓΟΝΟΤΥΠΟΣ	N	Mean	Std. Deviation	95% Confidence Interval for Mean	
					Lower Bound	Upper Bound
BMI	CC	44	26,9935	4,60652	25,5930	28,3940
	CG	75	25,8815	3,85265	24,9951	26,7679
	CG	1	24,2215	,	,	,
	ΣΥΝΟΛΟ	120	26,2754	4,14990	25,5253	27,0255
TC_ADJ	CC	42	176,3345	29,49103	167,1445	185,5246
	CG	70	189,4286	39,42199	180,0287	198,8284
	G	2	178,9250	6,61145	119,5235	238,3265
	ΣΥΝΟΛΟ	114	184,4202	36,12868	177,7163	191,1240
TGL	CC	42	78,29	31,392	68,50	88,07
	CG	70	98,26	55,298	85,07	111,44
	GG	2	96,0	35,355	-211,66	423,66
	ΣΥΝΟΛΟ	114	91,04	48,296	82,07	100,00
GLU_LEVE	CC	42	86,19	9,959	83,09	89,29
	CG	70	84,39	12,778	81,34	87,43
	GG	2	86,00	5,657	35,18	136,82
	ΣΥΝΟΛΟ	114	85,08	11,694	82,91	87,25
HDL	CC	41	47,46	12,705	43,45	51,47
	CG	69	50,10	16,460	46,15	54,06
	GG	2	48,50	10,607	-46,80	143,80
	ΣΥΝΟΛΟ	112	49,11	15,059	46,29	51,93
LDL	CC	41	111,04	26,774	102,59	119,49
	CG	69	119,32	38,597	110,05	128,59
	GG	2	109,23	24,289	-109,00	327,45
	ΣΥΝΟΛΟ	112	116,11	34,540	109,64	122,58
Lp(a)	CC	42	15,4795	15,92956	10,5155	20,4435
	CG	70	17,9839	18,00192	13,6915	22,2763
	GG	1	2,3900	,	,	,
	ΣΥΝΟΛΟ	113	16,9150	17,20207	13,7087	20,1214
APOB	CC	42	94,5619	22,91223	87,4220	101,7019
	CG	70	103,4757	30,50361	96,2024	110,7490
	GG	2	98,4000	7,91960	27,2453	169,5547
	ΣΥΝΟΛΟ	114	100,1026	27,88735	94,9280	105,2773
APOA1	CC	42	159,8571	23,27416	152,6044	167,1099
	CG	70	161,7571	32,15832	154,0893	169,4250
	GG	2	163,0000	69,29646	-459,6040	785,6040
	ΣΥΝΟΛΟ	114	161,0789	29,51980	155,6014	166,5565

ΠΙΝΑΚΑΣ 4:Αποτελέσματα από την αναζήτηση συσχέτισης του πολυμορφισμού με βιοχημικούς δείκτες και το BMI

Όπως φαίνεται από τον πίνακα 4 ο πολυμορφισμός Pro12Ala δε φάνηκε να σχετίζεται με καμία από τις παραμέτρους που μελετήθηκαν.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο ενεργοποιημένος υποδοχέας πολλαπλασιασμού των υπεροξειδιοσωμάτων-γ2 (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-γ2, **PPARγ2**) ανήκει στην υπεροικογένεια των ορμονικών πυρηνικών υποδοχέων. Αποτελεί μεταγραφικό παράγοντα του οποίου η δράση εξαρτάται από την πρόσδεσή του με διάφορα μόρια-συνδέσμους. Μόρια-σύνδεσμοι για το PPARγ είναι διάφορα προϊόντα του μεταβολισμού των λιπιδίων, καθώς και οι ευαισθητοποιητές της ινσουλίνης Θειαζολιδινεδιόνες, που χρησιμοποιούνται ευρέως σήμερα στη θεραπεία του Διαβήτη τύπου II. Το PPARγ2 εκφράζεται σχεδόν αποκλειστικά στο λιπώδη ιστό.

Προσδεδεμένο σε ειδική θέση του υποκινητή του γονιδίου-στόχου (στοιχείο απόκρισης), το PPARγ2 ελέγχει τη μεταγραφή γονιδίων που εμπλέκονται σε κυτταρικές διεργασίες μεγάλου κλινικού ενδιαφέροντος, όπως ο καταβολισμός των λιπιδίων, η ευαισθησία στην ινσουλίνη, η λιπογένεση, η φλεγμονώδης απόκριση και η αθηροσκληρυνση. Φαίνεται ακόμη να εμπλέκεται στη διαφοροποίηση κυττάρων και άρα να παίζει ρόλο στην εμφάνιση καρκίνου, ενώ φαίνεται να εμπλέκεται ακόμη και στην επούλωση πληγών του δέρματος. (1)

Σκοπός της παρούσας μελέτης, ήταν η ανίχνευση του πιο συχνού πολυμορφισμού στο γενετικό τόπο του PPARγ2, του Pro12Ala, και η εύρεση της συχνότητας του στον Ελληνικό πληθυσμό με την εφαρμογή της τεχνικής **MADGE** (Micro titer Array Diagonal Gel Electrophoresis), που χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά στο εργαστήριό μας, για την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων πέψης με περιοριστικές ενδονουκλεάσες. Το δείγμα προήλθε από τυχαίο πληθυσμό, συλλέχθηκε στα πλαίσια της μελέτης «ΑΤΤΙΚΗ» και περιέλαβε 365 άτομα. Σε 114 από τα άτομα αυτά πραγματοποιήθηκε ανίχνευση της πιθανής συσχέτισης του πολυμορφισμού με δείκτες λιπιδίων αίματος, με τα επίπεδα γλυκόζης και το Δείκτη Μάζας Σώματος.

Η τεχνική **MADGE** αποτελεί μια τεχνική αιχμής στο χώρο της Μοριακής Βιολογίας που ανακαλύφθηκε πρόσφατα. Εφαρμόζεται αυτή τη στιγμή σε λίγα εργαστήρια της Ευρώπης, σε επιδημιολογικού τύπου έρευνες, για την ηλεκτροφόρηση τμημάτων DNA.

Η τεχνική αυτή συνίσταται στην μαζική ηλεκτροφόρηση μεγάλου αριθμού δειγμάτων σε πηκτώματα ακρυλαμίδης ή αγαρόζης. Τα πηκτώματα που προκύπτουν περιέχουν κελιά 96 θέσεων σε διαστάσεις που ταιριάζουν απόλυτα με το μοντέλο των 8 θέσεων σε 12 σειρές που εφαρμόζεται σε πολλές εργαστηριακές τεχνικές. Με τη χρήση πιπέτας πολλαπλών εξόδων, περιορίζεται σημαντικά ο χρόνος φόρτωσης των δειγμάτων στα πηκτώματα, όταν τα δείγματα τόσο κατά την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης όσο και κατά την πέψη με περιοριστικές ενδονουκλεάσες είναι τοποθετημένα σε πλάκες που φέρουν 96 θέσεις, κατά το μοντέλο των 8 θέσεων σε

12 σειρές. Η ρομποτική φόρτωση των δειγμάτων καθώς και η δυνατότητα ηλεκτροφόρησης έως και 5 πηκτωμάτων ταυτόχρονα, δηλαδή έως και 480 δειγμάτων, μειώνει στο ελάχιστο το χρόνο προετοιμασίας της ηλεκτροφόρησης, αλλά και της διεξαγωγής αποτελεσμάτων. **(6), (7), (8)**

Η μέθοδος εφαρμόστηκε με απόλυτη επιτυχία και χωρίς προβλήματα, εκπληρώνοντας τις προδιαγραφές της. Οι χειρισμοί αποδείχθηκαν εύκολοι, ενώ τόσο το κόστος όσο και ο χρόνος για την διεξαγωγή τυποποιημένων διαδικασιών μειώθηκαν κατά πολύ, συγκρινόμενα με τις αντίστοιχες παραμέτρους της κλασικής τεχνικής ηλεκτροφόρησης των δειγμάτων σε πηκτώματα αγαρόζης. Η τελευταία, απαιτεί μεγάλες ποσότητες αντιδραστηρίων υψηλού κόστους και αρκετό χρόνο προετοιμασίας και φόρτωσης των δειγμάτων. Επίσης, αποδεικνύεται αρκετά περιοριστική ως προς τον αριθμό των δειγμάτων που μπορούν να ηλεκτροφορούνται ταυτόχρονα.

Επιπλέον, το μικρό μέγεθος των κελιών στα πηκτώματα της τεχνικής MADGE οδηγεί τόσο σε οικονομία χώρου όσο και αντιδραστηρίων στο σύνολο των διαδικασιών για τη διεξαγωγή συμπερασμάτων. Αφενός καταλήγει σε πηκτώματα μεγέθους παλάμης που είναι περισσότερο εύχρηστα σε σχέση με τα μεγάλα και «δυσκίνητα» πηκτώματα αγαρόζης, κι αφετέρου ο συνολικός όγκος των μιγμάτων των αντιδραστηρίων στο στάδιο της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης και στο στάδιο της πέψης με περιοριστικές ενδονουκλεάσες μπορεί να μειωθεί στο μισό. Συγκεκριμένα, αντί των κλασικών 25μl που αποτελούσαν των όγκο επιλογής στο στάδιο της PCR και κατά συνέπεια και στο στάδιο της πέψης, (αφού για καλύτερο διαγνωστικό αποτέλεσμα απαιτούνταν κατά την ηλεκτροφόρηση σε αγαρόζη μεγάλος όγκος προϊόντος πέψης), η μικρή χωρητικότητα των κελιών στα πηκτώματα της τεχνικής MADGE (6μl), επιτρέπει τη μείωση του όγκου κατά τις παραπάνω διαδικασίες σε 12μl, δηλαδή περίπου στο μισό. Με τον τρόπο αυτό, αφενός μειώνεται η ποσότητα των χρησιμοποιούμενων αντιδραστηρίων σε όλα τα στάδια της διαδικασίας ανίχνευσης γνωστών πολυμορφισμών, κι αφετέρου μειώνεται η ποσότητα του DNA που καταναλώνεται, επιτρέποντας την εξοικονόμηση DNA και την χρησιμοποίησή του σε πολλές έρευνες διαφόρων αντικειμένων.

Κατά συνέπεια, η τεχνική ενδείκνυται για τις περιπτώσεις που απαιτείται χειρισμός μεγάλου αριθμού δειγμάτων, όπως συμβαίνει στις επιδημιολογικές έρευνες για την ταυτοποίηση της τυχόν συσχέτισης πολυμορφισμών με την εκδήλωση νοσολογικών καταστάσεων. Η τεχνική αποδείχθηκε εύκολη στους χειρισμούς της και αποτελεσματική. Μπορεί να συμβάλλει στην ουσιαστική διευκόλυνση του ερευνητικού έργου, τόσο σε επίπεδο εξοικονόμησης χρόνου, όσο και σε επίπεδο εξοικονόμησης χρημάτων.

Όσον αφορά στη **συχνότητα του πολυμορφισμού (31%)** στον Ελληνικό πληθυσμό, αυτή διαπιστώθηκε ότι είναι αρκετά μεγαλύτερη από όλες τις συχνότητες που αναφέρονται σε άλλους πληθυσμούς.

Η συχνότητα του αλληλίου Ala τον Ελληνικό πληθυσμό, ήταν μεγαλύτερη από την αντίστοιχη συχνότητα στους Κινέζους (4,2%), τους Γιαπωνέζους (2,4%-4,2%), στους Μαύρους της Νέας Ορλεάνης (1,7%) και στους Αφρικανούς Αμερικάνους (1,9%). Το γεγονός αυτό ήταν αναμενόμενο, αφού ανήκουμε σε διαφορετικές φυλές. Η Καυκάσια φυλή, παρουσιάζει αρκετά μεγαλύτερη συχνότητα του πολυμορφισμού.

Διαφοροποίηση διαπιστώθηκε και με τον αμερικανικό πληθυσμό στον οποίο από τους Nickhlas et al., αναφέρεται συχνότητα 11% στις Ηνωμένες Πολιτείες (για τους Καυκάσιους) (27), ενώ σε Καναδούς αναφέρεται από τους Robitaille et al., συχνότητα ίση με 9,2%. (28) Αυτό ήταν επίσης αναμενόμενο λόγω της μειωμένης αλληλεπίδρασης του πληθυσμού αυτού με τον Ελληνικό πληθυσμό.

Αναμενόταν όμως συχνότητα στα πλαίσια αυτών που αναφέρονται για τους διάφορους Ευρωπαϊκούς πληθυσμούς. Παρόλα αυτά, τα αποτελέσματα της έρευνας έδειξαν ότι **το αλλήλιο Ala είναι αρκετά συχνό στον Ελληνικό πληθυσμό, και μάλιστα συχνότερο από κάθε άλλο Ευρωπαϊκό πληθυσμό που έχει μελετηθεί.** Ενδιαφέρον είναι το γεγονός ότι σε μια έρευνα φάνηκε ότι στις Ευρωπαϊκές χώρες, η συχνότητα του αλληλίου είναι μεγαλύτερη στις Βαλτικές χώρες (21%), ενώ μειώνεται στις Μεσογειακές (7%). (18)

Για τους άλλους Ευρωπαϊκούς πληθυσμούς αναφέρθηκαν νωρίτερα οι παρακάτω συχνότητες:

- Σε έρευνα από τους Lindi et al., σε **Καυκάσιο πληθυσμό** από πέντε διαφορετικές Ευρωπαϊκές χώρες (KANWU study), αναφέρεται συχνότητα αλληλίου ίση με **13,7%** (Μέγεθος δείγματος:150 άτομα τυχαία επιλεγμένα). (19)
- Σε μια έρευνα από τους Schlaffer et al., η συχνότητα ήταν **12%** σε **Γερμανικό** πληθυσμό (μέγεθος δείγματος: 359 άτομα τυχαία επιλεγμένα) (20) Η συχνότητα που αναφέρεται όμως από τους Tschritter et al., πάλι για το Γερμανικό πληθυσμό είναι διαφορετική, και μάλιστα αρκετά μεγαλύτερη (**23%**) (μέγεθος δείγματος:406 άτομα με φυσιολογική ανοχή στη γλυκόζη)). (21) ενώ από τους Hermann et al., αναφέρεται συχνότητα ίση με **14%** και πάλι σε γερμανικό πληθυσμό (μέγεθος δείγματος:445 άτομα με διαβήτη τύπου II). (22)

- Σε πληθυσμό από το **Ηνωμένο Βασίλειο**, από τους Ahluwalia et al., αναφέρεται συχνότητα αλληλίου **12,5%** (μέγεθος δείγματος: 183 διαβητικού τύπου II ασθενείς που λάμβαναν θεραπεία με θειαζολιδινεδιόνες). **(23)**
- Σε **Ιταλικό** πληθυσμό, από τους Vaccaro et al., αναφέρεται συχνότητα **16,7%** (μέγεθος δείγματος: 438 άτομα τυχαία επιλεγμένα). **(24)**
- Σε πληθυσμό από τη **Δανία**, αναφέρεται συχνότητα **14%** από τους Frederiksen et al. (μέγεθος δείγματος: 2245 μη διαβητικά άτομα). **(25)**
- Στην **Σουηδία**, από τους Rosmond et al., αναφέρεται συχνότητα του αλληλίου Ala 16% (μέγεθος δείγματος: 284 τυχαία επιλεγμένα άτομα). **(26)**
- Σε πληθυσμό προερχόμενο από τη **Γαλλία**, έρευνα από τους Merchaenge et al., αναφέρει συχνότητα 11%. (μέγεθος δείγματος: 839 τυχαία επιλεγμένα άτομα). **(27)**

Όπως φαίνεται από τα παραπάνω, η συχνότητα στους Έλληνες προσομοιάζει περισσότερο σε αυτήν των Βόριων Ευρωπαίων και σε αυτή των Γερμανών που αναφέρεται από τους Tschritter et al. (23%). Η διαπίστωση αυτή φαίνεται αρκετά παράδοξη αν λάβουμε υπ' όψιν μας το γεγονός ότι η σχετική γεωγραφική θέση των διαφόρων χωρών οδηγεί και σε ανάλογη διακίνηση των γονιδίων ανάμεσα στον πληθυσμό των χωρών αυτών. Παρά το γεγονός αυτό, ο ελληνικός πληθυσμός φαίνεται να διαφοροποιείται αρκετά από τον πληθυσμό των γειτονικών χωρών ως προς τον συγκεκριμένο πολυμορφισμό.

Όμως, αν εξαιρέσουμε το γαλλικό πληθυσμό, η συχνότητα του πολυμορφισμού φαίνεται να είναι μεγαλύτερη στις έρευνες που περιέλαβαν τυχαίο δείγμα ατόμων αντί για διαβητικούς ασθενείς, και φαίνεται να αυξάνεται όσο αυξάνεται το μέγεθος του δείγματος. Παρόλα αυτά, και στις έρευνες που περιέλαβαν δείγμα ίδιου μεγέθους με την παρούσα έρευνα, η συχνότητα του πολυμορφισμού εμφανίζεται αρκετά μικρότερη.

Η ανίχνευση της τυχόν **συσχέτισης του πολυμορφισμού με βιοχημικές παραμέτρους και με το Δείκτη Μάζας Σώματος** είχε το χαρακτήρα πιλοτικής έρευνας και περιέλαβε δείγμα 114 ατόμων. Δε συμμετείχαν όλα τα άτομα στη φάση αυτή. Τα αποτελέσματα της έρευνας δεν έδειξαν συσχέτιση του πολυμορφισμού με καμία από τις παραμέτρους που μελετήθηκαν.

Οι βιοχημικές παράμετροι που ελέγχθηκαν περιλαμβάνουν τα επίπεδα γλυκόζης, ολικής χοληστερόλης, LDL και HDL χοληστερόλης, τριγλυκεριδίων, λιποπρωτεΐνης

(α), απολιποπρωτεΐνης C και απολιποπρωτεΐνης A1. Ελέγχθηκε επίσης και ο δείκτης Μάζας Σώματος.

Τα αποτελέσματα της έρευνας αυτής συμφωνούν με τα αποτελέσματα άλλων ερευνών σε τυχαίο πληθυσμό. Η έρευνα των **Vaccaro et al.**, σε δείγμα 438 ατόμων, η έρευνα των **Schaffer et al.**, σε δείγμα 359 ατόμων, αλλά και οι έρευνα των **Poirier et al.**, σε δείγμα 675 ατόμων, δεν κατόρθωσαν να καταλήξουν σε συσχέτιση του πολυμορφισμού με κάποιον από τους παραπάνω δείκτες. (24), (20),(18)

Παρόλα αυτά, άλλες έρευνες σε τυχαίο δείγμα ατόμων κατέληξαν σε συσχετίσεις. Στην έρευνα των **Meirchaeghe et al.**, σε δείγμα 839 ατόμων, ο πολυμορφισμός σχετίστηκε με **αυξημένα επίπεδα λιπιδίων αίματος και αυξημένο BMI.** (27) Επίσης, στην έρευνα των **Rosmond et al.**, σε δείγμα 284 ατόμων, ο πολυμορφισμός σχετίστηκε και πάλι με **αυξημένο BMI, αλλά με χαμηλότερα επίπεδα ολικής, LDL και HDL χοληστερόλης.** (27), (26)

Οι έρευνες που κυρίως καταλήγουν σε συσχετίσεις του πολυμορφισμού, είτε θετικές είτε αρνητικές, με τις παραπάνω παραμέτρους είναι αυτές που περιλαμβάνουν ομάδες ασθενών και ομάδες μαρτύρων. Έτσι, σε διαβητικούς ασθενείς ο πολυμορφισμός φάνηκε να σχετίζεται **μειωμένα επίπεδα λιπιδίων αίματος** (34). Σε παχύσαρκους ασθενείς, φάνηκε ότι ο πολυμορφισμός σχετίζεται με **υψηλότερα επίπεδα λιπιδίων αίματος.** (35) Τέλος, σε έρευνα που περιέλαβε ομάδα παρέμβασης και ομάδα ελέγχου, χορηγήθηκε για τρεις μήνες συμπλήρωμα ιχθυελαίων ή placebo, φάνηκε ότι παρά την έλλειψη συσχέτισης των λιπιδίων αίματος με τον πολυμορφισμό πριν τη χορήγηση, **μετά το πέρας των τριών μηνών οι φορείς του πολυμορφισμού εμφάνισαν χαμηλότερα επίπεδα τριγλυκεριδίων.** (19)

Από τα παραπάνω συμπεραίνουμε, ότι οι γνώσεις μας για την επίδραση του πολυμορφισμού στο μεταβολισμό των λιπιδίων είναι περιορισμένες, αφού δεν υπάρχουν έρευνες που να έχουν καταλήξει σε σαφή συμπεράσματα. Φαίνεται πάντως, να παρουσιάζει θετική ή αρνητική συσχέτιση ανάλογα με τις υποκείμενες νοσολογικές καταστάσεις.

Όσον αφορά στο Δείκτη Μάζας Σώματος, τα αποτελέσματα των διαφόρων ερευνών φαίνεται να συγκλίνουν είτε στην έλλειψη επίδρασης του πολυμορφισμού Pro12Ala στη συγκεκριμένη παράμετρο, είτε στην πιθανή συσχέτισή του με αυξημένες τιμές του δείκτη αυτού.

Για να ελεγχθεί η συσχέτιση του πολυμορφισμού με τους παραπάνω δείκτες, πρέπει σε πρώτη φάση να αυξηθεί το μέγεθος του δείγματος. Τόσο στις έρευνες που βρέθηκε συσχέτιση του πολυμορφισμού με κάποιον από τους παραπάνω

βιοχημικούς δείκτες όσο και σε αυτές που δε βρέθηκε συσχέτιση, το δείγμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν αρκετά μεγαλύτερο.

Επίσης, ο χωρισμός του δείγματος σε ομάδες ασθενών-μαρτύρων θα μπορούσε να διευκολύνει την εύρεση πιθανών συσχετίσεων και τη διατύπωση συμπερασμάτων για την επίδραση του πολυμορφισμού κάτω από συγκεκριμένες παθοφυσιολογικές καταστάσεις. Με τον τρόπο αυτό, μέσω της διερεύνησης της πιθανής αλληλεπίδρασης διαφόρων παραγόντων στην εκδήλωση φαινοτύπων, μπορούμε να κατανοήσουμε πιο εύκολα τους μηχανισμούς επίδρασης του πολυμορφισμού στις διάφορες φυσιολογικές πορείες.

Σε κάθε περίπτωση δεν πρέπει να αγνοείται η επίδραση των περιβαλλοντικών παραγόντων στην εκδήλωση του φαινοτύπου. Εξάλλου, είναι γνωστή η αλληλεπίδραση του γενετικού τόπου του PPAR γ 2 με διατροφικούς παράγοντες, καθώς και η διαφορετική επίδραση του συγκεκριμένου πολυμορφισμού ανάλογα με το διατροφικό “status”. Είναι πλέον δεδομένη η διαφοροποίηση του φαινοτύπου ανάλογα με την ποιότητα και την ποσότητα του προσλαμβανόμενου λίπους από τη διατροφή.

Η έρευνα πάνω στο συγκεκριμένο πολυμορφισμό, ειδικά για τον Ελληνικό πληθυσμό που εμφανίζει μεγάλη συχνότητα του αλληλίου Ala, θα πρέπει να συνεχίσει να αποτελεί θέμα μεγάλου κλινικού ενδιαφέροντος. Η ερευνητική μας ομάδα κατέθεσε πρόταση χρηματοδότησης για τη συνέχιση της έρευνας στο πεδίο αυτό, για τον εκτενή έλεγχο του πολυμορφισμού και την πιθανή συσχέτισή του τόσο με ποικιλία βιοχημικών και ανθρωπομετρικών δεικτών, όσο και με διατροφικούς παράγοντες. Η καθιέρωση της τεχνικής **MADGE** θα διευκολύνει κατά πολύ τις διαδικασίες αυτές.

1. Peroxisome Proliferator-Activated Receptors (PPARs): from metabolic control to epidermal wound healing (Review). Walter Wahl, *Swiss Med* 2002; 132: 63-69.
2. Peroxisome Proliferator-activated receptors: insight into multiple cellular functions. Pascal Escher, Walter Wahl, *Mutation research* (2000) 448: 121-132.
3. Peroxisome Proliferator-activated receptor 7C151-->T polymorphism and coronary artery disease. Xing-Li Wang, Jorina Oosterhof and Natalie Duarte, *Cardiovascular Research* (1999) Dec. 585-594.
4. PPAR γ : The ultimate fatty gene (Review). *Annex. Diabetologia* (1999); 42: 1033-1049.
5. Sibling-based association study of the PPAR γ 2 Pro12Ala polymorphism and metabolic variables in Chinese and Japanese. Family-based association study. Loo-Ming Chuang, Chao Agnes Huang, Shou-Dei Pao, Craig H. Nakajima, David Cox, Richard E. Pratt, Hsiao-Hsuan Lai, Tong-Yuan Tai, *J-Met Med* (2001) 79: 550-554.
6. Electrophoresis for genotyping: Micro titer Array Diagonal Gel Electrophoresis on Horizontal Polyacrylamide gels, Hydro link or Agarose. Ian N. M. Day, Steve E. Humphries, *Analytical Biochemistry* (1994) 222: 389-395.
7. SNT: Genotyping by combination of 192-Melt MADGE, ARMS, and Computerized Gel Image Analysis. *Biotechniques* (2000) 29: 590-596.
8. Micro plate array diagonal-gel electrophoresis (MADGE) and melt-MADGE: tools for molecular genetic epidemiology. Ian N. M. Day, Emmanuel Spanakis, Chris Palmieri, Glenn P. Weewind, Sandra S. O'Dea, *Tibtech* (1998), Vol. 16.
9. Role of Peroxisome Proliferator-activated receptor γ in cardiovascular disease. Takano, Komuro, *Journal of diabetes and its complications* (2002) 16: 105-114.
10. Peroxisome Proliferator-activated Receptor and the regulation of mammalian lipid metabolism. S. A. Smith, *Biochemical society Transactions* (2002), 30, part 6.
11. Peroxisome Proliferator-activated receptor γ in mammalian lipid homeostasis (Review). Chio-Hao Lee, Ronald M. Evans, *The JBC in Endocrinology & Metabolism* (2002), 13, No 5.
12. PPAR γ : a Nuclear Regulator of Metabolism, Differentiation, and Cell Growth (Review) Rutter, Spiegelman, *The Journal of Biological Chemistry* (2001), 276: 37331-37334.
13. Regulation of PPAR γ transcriptional activity in 3T3-L1 adipocytes. Yafanhe, Fupin, Aoyu, Yushanov, Ota, Katayama, *Biochemical and Biophysical Research Communications* (2002), 290: 425-436.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Peroxisome Proliferator-Activated Receptors (PPARS): from metabolic control to epidermal wound healing (Review). Walter Wahli. *Swiss Med* 2002;132; 83-91
2. Peroxisome Proliferator-activated receptors: insight into multiple cellular functions. Pascal Escher, Walter Wahli. *Mutation research* (2000) 448, 121-138
3. Peroxisome Proliferator-activated receptor γ C161 $\longrightarrow$ T polymorphism and coronary artery disease. Xing Li Wang, Janine Oosterhof and Natalia Duarte, *Cardiovascular Research* (1999) Dec, 588-594
4. PPAR γ : The ultimate thrifty gene (Review). Auwerx. *Diabetologia* (1999) 42; 1033-1049
5. Sibling-based association study of the PPAR γ 2 Pro12Ala polymorphism and metabolic variables in Chinese and Japanese hypertension families: a SAPHIRE study. Lee-Ming Chuang, Chao Agnes Hsiung, Yii-Der Ida Chen, Low-Ton Ho, H-H. Sheu, Dee Pei, Craig H. Nakatsuka, David Cox, Richard E. Pratt, Hsien-Hsien Lei, Tong-Yuan Tai. *J Mol Med* (2001) 79; 656-664
6. Electrophoresis for genotyping: Micro titer Array Diagonal Gel Electrophoresis on Horizontal Polyacrylamide gels, Hydro link or Agarose. Ian N. M. Day, Steve E. Humphries. *Analytical Biochemistry* (1994) 222, 389-395
7. SNT Genotyping by combination of 192-Well MADGE, ARMS and Computerized Gel image Analysis. *Biotechniques* (2000), 29; 500-506
8. Micro plate-array diagonal-gel electrophoresis (MADGE) and melt-MADGE: tools for molecular-genetic epidemiology. Ian N. M. Day, Emmanuel Spanakis, Divia Palamand, Glenn P. Weavind, Sandra d. O'Deil. *Tibtech* (1998), Vol.16
9. Roles of Peroxisome Proliferator-activated receptor γ in cardiovascular disease. Takano, Komuro. *Journal of diabetes and its complications* (2002) 16; 108-114
10. Peroxisome Proliferator-activated Receptor and the regulation of mammalian lipid metabolism. S. A. Smith. *Biochemical society Transactions* (2002), 30; part 6
11. Peroxisome Proliferator-activated receptor- γ in macrophage lipid homeostasis (Review). Chic-Hao Lee, Ronald M. Evans, *TRENDS in Endocrinology & Metabolism* (2002), 13; No 8
12. PPAR γ : a Nuclear Regulator of Metabolism, Differentiation, and Cell Growth. (Minireview) Rosen, Spiegelman. *The Journal of Biological Chemistry* (2001), 276; 37331-37734
13. Regulation of PPAR γ transcriptional activity in 3T3-L1 adipocytes. Watanebe, Inukai, Awata, Yoshimoto, Oka, Katayama. *Biochemical and Biophysical Research Communications* (2003), 300; 429-436

14. The organization, Promoter Analysis, and Expression of the Human PPAR γ Gene. Fajas, Raspe, Lefebvre, Saladin, Flier, Briggs, Staels, Vidal, Auwerx. *The Journal of Biological Chemistry* (1997), 25; 18779-18789
15. Vascular Protective effects by activation of nuclear receptor PPAR γ . Wakino, Law, Husueh. *Journal of Diabetes and its Complications* (2002), 16; 46-49
16. The Peroxisome Proliferator- activated receptor- γ 2 Pro12Ala polymorphism. Stumvoll, Haring. *Diabetes* (2002), vol. 5
17. Molecular scanning of the human Peroxisome Proliferator-activated receptor γ Gene in Diabetic Caucasians: Identification of a Pro12Ala missense mutation. Yen. Beamer, Negri, Silver, Brown, Yarnall, Burns, Roth, Shuldiner. *Biochemical and Biophysical Research Communications* (1997), 241; 270-274
18. The Pro12Ala polymorphism in the Peroxisome Proliferator-activated receptor γ 2 gene is not associated with postprandial responses to glucose or fat tolerance tests in young healthy individuals: The European Atherosclerosis Study. Poirier, Nicaud, Tiret. *J Mol Med*, (2000), 78; 346-351.]
19. Impact of the Pro12Ala polymorphism of the PPAR γ 2 gene on serum triacylglycerol in response to n-3 fatty acid supplementation. Lindi, Schwab, Louheranta, Laakso, Riccardi. *Molecular Genetics and Metabolism*, (2003) 79; 52-60
20. Frequency and significance of Pro12Ala and Pro115Gln polymorphism in gene for Peroxisome Proliferator-activated receptor- γ regarding metabolic parameters in a Caucasian Cohort. Schlaffer, Barth, Schmitz, Zietz, Palitzsch. *Endocrine* (2001), 14; 369-73
21. Increased Insulin Clearance in Peroxisome Proliferator-activated receptor γ 2 Pro12Ala. Tschritter, Stefan, Haap, Thamer, Bachmann, Dahl, Meerker, Teigeler, Machicao. *Metabolism* (2003), 52; 778-783
22. Peroxisome Proliferator-activated receptor γ 2 Pro12Ala polymorphism is associated with nephropathy in type 2 diabetes: The Berlin Diabetes mellitus study. Hermann, Ringel, Wang, Staessen, Brand. *Diabetes* (2002), 51; 2653-7
23. The influence of the Pro12Ala mutation of the PPAR- γ receptor gene on metabolic and clinical characteristics in treatment naive patients with type 2 diabetes. Ahluwalia, Evans, Morris, Currie, Davies, Rees, Thomas. *Diabetes, Obesity and metabolism* (2002), 4; 376-378
24. Fasting plasma free fatty acids concentrations and Pro12Ala polymorphism of the Peroxisome Proliferator-activated receptor (PPAR) γ 2 gene in healthy individuals. Vaccaro, Mancini, Ruffa, Sabatino, Colantuoni, Riccardi. *Clinical Endocrinology* (2002), 57; 481-486

25. Comment: studies of the Pro12Ala polymorphism of the PPAR-gamma gene in the Danish MONICA cohort: homozygosity of the Ala allele confers a decreased risk of the insulin resistance syndrome. Frederiksen, Brodback, Fenger, Jorgensen. *Journal of Clinical Endocrinology and metabolism* (2002), 87; 3989-92
26. The Pro12Ala PPAR γ 2 gene missense mutation is associated with obesity and insulin resistance in Swedish middle-aged men. Rosmond, Chagnon, Bouchard. *Metabolism/ research and reviews* (2003), 19; 159-163
27. Impact of the Peroxisome Proliferator-activated receptor gamma 2 Pro12Ala polymorphism on adiposity, lipids and NIDDM. Meirhaeghe, Fajas, Helbecque, Cottel, Ayrwerx, Deeb, Amoyel. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders* (2000), 24; 195-9
28. Genetic Variation in the Peroxisome Proliferator-activated receptor- γ 2 gene (Pro12Ala) affects metabolic responses to weight loss and subsequent weight regain. Nicklas, Rossum, Berman, Ryan, Dennis, Shuldiner. *Diabetes* (2001), vol.50
29. Pro12Ala of the Peroxisome Proliferator-activated receptor- γ 2 gene is associated with lower serum insulin levels in non-obese African Americans. Kao, Coresh, Shuldiner, Boerwinkle, Bray, Brancati. *Diabetes* (2003), vol.52
30. The Peroxisome Proliferator-activated receptor-gamma2 gene polymorphism (Pro12Ala) beneficially influences insulin resistance and it's tracking from Childhood to adulthood: The Bogalusa Heart Study. Chen, Srinivasan, Boerwinkle, Berenson. *Diabetes* (2003), 52; 1265 –69
31. The PPAR-gamma P12A polymorphism modulates the relationship between dietary fat intake and components of the metabolic syndrome: results from the Quebec Family Study. Robitaille, Despres, Perusse, Vohl. *Clinical Genetics* (2003), 63 ;109-116
32. Association of Pro12Ala variant in Peroxisome Proliferator-activated receptor-gamma-2 gene with type 2 diabetes mellitus. Fu, Li, Wu, Cheng, Cai. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi* (2002)- Abstract
33. PPAR γ gene polymorphism is associated with exercise-mediated changes of insulin resistance in healthy men. Kahara, Takamura, Hayakawa, Katsuki, Kobayashi. *Metabolism* (2003), 52; 209-212
34. Mutations of the Peroxisome Proliferator-activated receptor γ gene in a Japanese population: the Pro12Ala mutation in PPAR γ 2 gene is associated with lower concentrations of serum total and non-HDL cholesterol. *Diabetologia* (2001), 44; 1354-1356
35. A Pro12Ala polymorphism in the human Peroxisome Proliferator-activated receptor- γ 2 is associated with combined hyperlipidaemia in obesity. Swarbrick,

Chapman, Brendan, McQuillan, Hung. European Journal of Clinical Endocrinology (2001), 144; 277-282

36. The common PPAR gamma P12A polymorphism is associated with decreased risk of type 2 diabetes. Atshuler, Hirschhorn, Bolk, Schaffner, Groop. Natural Genetics (2000), 26(1); 76-80-Abstract

37. The PPAR gamma2 polymorphism pro12ala is associated with better insulin sensitivity in the offspring of type 2 diabetic patients. Jacob, Koch, Becker, Renn, Loblein, Volk, Rett, Stumvoll. Horm Metab Res (2000), 32; 413-16-Abstract

38. Impact of Pro12Ala variant in the Peroxisome Proliferator-activated receptor (PPAR) gamma2 on obesity and insulin resistance in Japanese type2 diabetic patients. Kawasaki, Thara, Emoto, Shioji, Okuno, Nishizawa. Osaka City Med J (2002), 48(1): 23-8

39. Αρχές Ιατρικής Γενετικής. Gelehrter, Collins. Ιατρικές εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης 1999.

40. Homozygosity of the Pro12Ala variant of the Peroxisome Proliferator-activated receptor - γ 2 (PPAR γ 2): divergent modulating effects on BMI in obese and lean Caucasian. Ek, Urhammer, Sorensen, Andersen, Auwerx, Pedersen. Diabetologia (1999), 42; 892-895

41. Εισαγωγή στη Μοριακή Βιολογία. Λεκανίδου Ρ., Τσιπήλου Σ., Ροδάκης Γ. ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ –Τμήμα Βιολογίας.1998

ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΗΣ ΤΕΧΝΙΚΗΣ ΠΤΥ ΘΕΟ
MADGE ΓΙΑ ΤΗΝ...
ΘΕΟΔΩΡΑΚΗ ΕΙΡ.
11302 10299

**ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ**

ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ



* 1 1 3 0 2 *