



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
Εθνικόν και Καποδιστριακόν
Πανεπιστήμιον Αθηνών

— ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837 —

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΠΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥΝ ΤΑ ΕΠΙΠΕΔΑ ΕΚΦΡΑΣΗΣ
ΣΥΓΚΕΚΡΙΜΕΝΩΝ ΜΕΤΑΓΡΑΦΩΝ ΠΟΥ ΣΥΝΔΕΟΝΤΑΙ ΜΕ ΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΟΥ
ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΥ ΣΑΚΧΑΡΩΔΟΥΣ ΔΙΑΒΗΤΗ ΤΥΠΟΥ 2

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΑ ΚΟΚΚΙΝΟΠΟΥΛΟΥ

ΒΙΟΛΟΓΟΣ

Το έργο συγχρηματοδοτείται από την Ελλάδα και την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο) μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού, Εκπαίδευση και Διά Βίου Μάθηση», στο πλαίσιο της Πράξης «Πρόγραμμα Χορήγησης Υποτροφιών για Μεταπτυχιακές Σπουδές Δευτέρου Κύκλου Σπουδών» (MIS-5003404), που υλοποιεί το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών (ΙΚΥ).



Ευρωπαϊκή Ένωση
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο

Επιχειρησιακό Πρόγραμμα
Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού,
Εκπαίδευση και Διά Βίου Μάθηση

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



ΑΘΗΝΑ 2019



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ

Εθνικόν και Καποδιστριακόν
Πανεπιστήμιον Αθηνών

— ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837 —

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΠΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥΝ ΤΑ ΕΠΙΠΕΔΑ ΕΚΦΡΑΣΗΣ
ΣΥΓΚΕΚΡΙΜΕΝΩΝ ΜΕΤΑΓΡΑΦΩΝ ΠΟΥ ΣΥΝΔΕΟΝΤΑΙ ΜΕ ΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΟΥ
ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΥ ΣΑΚΧΑΡΩΔΟΥΣ ΔΙΑΒΗΤΗ ΤΥΠΟΥ 2

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΑ ΚΟΚΚΙΝΟΠΟΥΛΟΥ

ΒΙΟΛΟΓΟΣ

Το έργο συγχρηματοδοτείται από την Ελλάδα και την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο) μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού, Εκπαίδευση και Διά Βίου Μάθηση», στο πλαίσιο της Πράξης «Πρόγραμμα Χορήγησης Υποτροφιών για Μεταπτυχιακές Σπουδές Δευτέρου Κύκλου Σπουδών» (MIS-5003404), που υλοποιεί το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών (ΙΚΥ).



Επιχειρησιακό Πρόγραμμα
Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού,
Εκπαίδευση και Διά Βίου Μάθηση
Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



ΑΘΗΝΑ 2019

«Η έγκριση της Διδακτορικής Διατριβής από το Τμήμα Βιολογίας της Σχολής Θετικών Επιστημών του ΕΚΠΑ δεν υποδηλώνει αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα (ν.5343/1932, άρθρο 202, παρ.2)».

«Το κείμενο της Διδακτορικής Διατριβής δεν αποτελεί προϊόν λογοκλοπής».

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής

Εμμανουήλ Φραγκούλης (Επιβλέπων)	Ομότιμος Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ
Διαμάντης Σίδερης	Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ
Ανδρέας Σκορίλας	Καθηγητής Κλινικής Βιοχημείας, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ

Μέλη Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής

Εμμανουήλ Φραγκούλης (Επιβλέπων)	Ομότιμος Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ
Διαμάντης Σίδερης	Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ
Ανδρέας Σκορίλας	Καθηγητής Κλινικής Βιοχημείας, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ
Παρασκευή Μουτσάτσου	Καθηγήτρια Κλινικής Βιοχημείας, Τμήμα Ιατρικής, ΕΚΠΑ
Ελένη Μπουτάτη	Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παθολογίας, Τμήμα Ιατρικής, ΕΚΠΑ
Ουρανία Τσιτσιλώνη	Καθηγήτρια Ανοσολογίας, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ
Διδώ Βασιλακοπούλου	Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοχημείας, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ

Πρόλογος

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στον Τομέα Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας, του Τμήματος Βιολογίας, της Σχολής Θετικών Επιστημών, του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών (ΕΚΠΑ), το χρονικό διάστημα Μάρτιος 2014- Δεκέμβριος 2019 και χρηματοδοτήθηκε από το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών (ΙΚΥ) στα πλαίσια του «Προγράμματος Χορήγησης Υποτροφιών για μεταπτυχιακές σπουδές Δευτέρου Κύκλου Σπουδών» (MIS-5003404), ΕΣΠΑ 2014-2020» για το χρονικό διάστημα Μάιος 2017- Σεπτέμβριος 2018.

Ολοκληρώνοντας την παρούσα διδακτορική διατριβή, μου δίνεται η ευκαιρία να εκφράσω τις ευχαριστίες μου σε όλους όσους συνέβαλαν, ο καθένας με το δικό του μοναδικό τρόπο, στην επιτυχή περάτωσή της. Ξεκινώντας, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα της διδακτορικής μου διατριβής, Ομότιμο Καθηγητή κ. Εμμανουήλ Φραγκούλη, για την ανάθεση του θέματος, την εμπιστοσύνη που μου έδειξε κατά την εκπόνηση της διατριβής, τη συνεχή καθοδήγηση και συμπαράσταση καθώς και την πολύ καλή συνεργασία που είχαμε σε όλη την πορεία ολοκλήρωσης της παρούσας εργασίας.

Επιπρόσθετα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Αναπληρωτή Καθηγητή και μέλος της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής κ. Διαμάντη Σίδηρη, για τις πολύτιμες παρατηρήσεις του, τη σημαντική καθοδήγηση καθώς και τη στήριξη που μου προσέφερε το διάστημα αυτό. Δεδομένου ότι οι πειραματικές διαδικασίες της παρούσας εργασίας υλοποιήθηκαν στην ερευνητική του μονάδα, νιώθω ιδιαίτερα τυχερή για τη συνεργασία όλων αυτών των χρόνων καθώς και για την εργαστηριακή εμπειρία που αποκόμισα συμμετέχοντας στην ερευνητική του ομάδα από το 2011. Επιπλέον, προσωπικές ευχαριστίες οφείλω και στον Καθηγητή κ. Ανδρέα Σκορίλα και μέλος της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής για τις εύστοχες συμβουλές του και το ειλικρινές ενδιαφέρον του στην ολοκλήρωση της εργασίας.

Θερμές ευχαριστίες οφείλω ακόμη και στα υπόλοιπα μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής για την αξιολόγηση της παρούσας διατριβής.

Θα ήθελα ακόμη να ευχαριστήσω, από καρδιάς, την Επίκουρη Καθηγήτρια Μαρία-Ιωάννα Χριστοδούλου της οποίας η συμβολή ήταν καθοριστική στο σχεδιασμό, στην οργάνωση, στην υλοποίηση και στην αξιολόγηση της παρούσας διδακτορική διατριβής. Πάνω από όλα όμως, θα ήθελα να την ευχαριστήσω για τη φιλία της, την υποστήριξή της, την υπομονή της και την αγάπη της.

Πολλές ευχαριστίες οφείλω σε όλα τα μέλη των ερευνητικών ομάδων του Τομέα Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας για την ευχάριστη συνεργασία που είχαμε όλο αυτό το διάστημα. Ένα ιδιαίτερο ευχαριστώ οφείλω στο μεταδιδακτορικό ερευνητή Μαργαρίτη Αυγέρη

για τη χρήσιμη βοήθειά του στη διεξαγωγή των πειραμάτων αλλά και το ειλικρινές ενδιαφέρον του για την ολοκλήρωση της παρούσας διατριβής. Ιδιαίτερο και πολύ σημαντικό ρόλο στην περάτωση αυτής της εργασίας είχαν επίσης όλοι οι συνάδελφοι της ερευνητικής ομάδας του κ.Σίδερη που συνεργαστήκαμε το διάστημα 2011-2019. Αθηνά, Λάρα, Χαρά, Νίκη, Ευαγγελία, Μαρία, Αγγελική, Βασιλική, Δέσποινα, Βαγγέλη και Ασημίνα σας ευχαριστώ για όλες τις ευχάριστες στιγμές μας.

Η εκπόνηση της παρούσας διατριβής δε θα ήταν δυνατή χωρίς την αμέριστη υποστήριξη των φίλων και της οικογένειάς μου. Βασίλη, Διονυσία, Έλσα, Αθανασία, Μαρία, Θανάση, Στέλλα και Δέσποινα σας ευχαριστώ για όλα. Απόλυτα καθοριστική υπήρξε και η ηθική και η οικονομική συμπαράσταση της οικογένειάς μου, της αδερφής μου Αγγελικής και της μητέρας μου Ευαγγελίας, στην οποία και αφιερώνω την παρούσα εργασία.

Συντομογραφίες

ABCC8	ATP-binding cassette transporter sub-family C member 8
AD	Alzheimer Disease
	Νόσος Αλτσχάϊμερ
ADAMTS9	A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 9
AGEs	Advanced glycation end products
	Προχωρημένα προϊόντα τελικής γλυκοζυλίωσης
AMP	Adenosine monophosphate
	Μονοφωσφορική αδενοσίνη
APS	Ammonium persulfate
	Υπερθειικό αμμώνιο
ATP	Adenosine triphosphate
	Τριφωσφορική αδενοσίνη
AKT	Protein Kinase B
	Πρωτεϊνική κινάση Β
BMI	Body Mass Index
	Δείκτης μάζας σώματος
bp	Base pair
	Ζεύγη βάσεων
C	Cytosine
	Νουκλεοτίδιο κυτοσίνης
CAMK1D	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase I delta
cAMP	cyclic Adenosine Monophosphate
	Κυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη
CAPN10	Calpain 10
	Καλπαΐνη 10
CDC123	Cell division cycle 123 homolog
CDK4	Cyclin-dependent kinase 4
	Κυκλινο-εξαρτώμενη κινάση 4
CDK5	Cyclin dependent kinase 5
	Κυκλινο-εξαρτώμενη κινάση 5
CDK5RAP1	cyclin-dependent kinase 5 (cdk5) regulatory subunit-associated protein 1
CDKAL1	CDK5 regulatory subunit associated protein 1-like1
CDKN2A/B	Cyclin-dependent kinase Inhibitor 2A/B
cDNA	complementary DNA
	Συμπληρωματικό DNA
CNVs	Copy Number Variation
	Ποικιλομορφία αριθμού αντιγράφων
Ct	Threshold cycle
	Τιμή κατώφλι
CTLA4	Cytotoxic T- Lymphocyte- Associated protein 4
DEPC	Diethyl pyrocarbonate
	Πυρανθρακικό διαιθύλιο
DIAGRAM	DIAbetes Genetics Replication And Meta-analysis
dNTPs	Deoxynucleotide
	Δεοξυνουκλεοτίδια
DTT	Dithiothreitol
	Διθειοθρεϊτόλη

EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid Αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ
EPD	Eukaryotic promoter database Βάση δεδομένων για την εύρεση των ευκαρυωτικών υποκινητών γονιδίων
eQTLs	Expression quantitative trait loci Γενετικοί τόποι ποσοτικής έκφρασης
eSNPs	Expression regulatory Single Nucleotide Polymorphisms
EWAS	Epigenome-wide association studies
FTO	Fat mass and obesity-associated protein
G-6-P	Glucose 6-phosphate 6-φωσφορική γλυκόζη
GAD	Glutamic Acid Decarboxylase Αποκαρβοξυλάση γλουταμικού οξέος
GCK	Glucokinase Γλυκοκινάση
GDM	Gestational Diabetes Mellitus Διαβήτης κύησης
GIP	Insulinotropic Polypeptide
GLP-1	Glucagon-Like Peptide 1 Ινσουλινοτρόπο πολυπεπτίδιο
GLUT2	Glucose transporter 2 Μεταφορέας γλυκόζης τύπου 2
GLUT4	Glucose Transporter Type 4 Μεταφορέας γλυκόζης τύπου 4
GPR35	G protein-coupled receptor 35
Grb-2	Growth factor receptor-bound protein 2
GTEx	Genotype-Tissue Expression Βάση δεδομένων για την ιστοειδική έκφραση γονιδίων
GWAS	Genome Wide Association Studies Μελέτες σάρωσης ολόκληρου του γονιδιώματος
HDL	High density lipoprotein Λιποπρωτεΐνη υψηλής πυκνότητας
HHEX	Hematopoietically-expressed homeobox protein
HLA	Human Leukocyte Antigen Αντιγόνο ανθρώπινων λευκοκυττάρων
HNF1A	Hepatocyte Nuclear Factor 1 homeobox A
HNF1B	Hepatocyte nuclear factor 1 homeobox B
HNF4A	Hepatocyte nuclear factor 4 alpha
HPRT1	Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase
IGF2	Insulin-like Growth Factor 2
IGF2BP2	Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 2
IL2RA	Interleukin-2 Receptor Alpha chain
INS	Insulin Ινσουλίνη
INSR	Insulin Receptor Υποδοχέας ινσουλίνης
IRS	Insulin Receptor Substrate Υπόστρωμα υποδοχέα ινσουλίνης

IRS1	Insulin receptor substrate 1
	Υπόστρωμα υποδοχέα ινσουλίνης τύπου 1
IRS2	Insulin receptor substrate 2
	Υπόστρωμα υποδοχέα ινσουλίνης τύπου 2
JAZF1	Juxtaposed with another zinc finger protein 1
KCNJ11	Potassium voltage-gated channel subfamily J member 11
KCNQ1	Potassium voltage gated channel, KQT like subfamily, member 1
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
	Βάση δεδομένων για δημιουργία δικτύων αλληλεπίδρασης γονιδίων
LADA	Latent Autoimmune Diabetes in Adults
	Λανθάνων αυτοάνοσος διαβήτης των ενηλίκων
LDL	Low density lipoprotein
	Λιποπρωτεΐνη χαμηλής πυκνότητας
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
MIDD	Maternally Inherited Diabetes and Deafness
	Μητρικός κληρονομούμενος διαβήτης που προκαλεί κώφωση
miRNAs	MicroRNAs
	Μικρά- μη κωδικά RNA
MMLV	Moloney Murine Leukemia Virus
MODY	Maturity-Onset Diabetes of the Young
	Οψίμου έναρξης διαβήτης των νέων
mRNA	Messenger RNA
	Αγγελιαφόρο μήνυμα RNA
MTNR1B	Melatonin receptor 1B
	Υποδοχέας μελατονίνης τύπου 1B
MuTHER	Multiple Tissue Human Expression Resource
N/A	No applicable
	Μη εφαρμόσιμο
NGS	Next Generation Sequencing
	Αλληλούχηση νέας γενιάς
NOTCH2	Neurogenic locus notch homolog protein 2
NR2C2	Nuclear receptor subfamily 2, group C, member 2
nt	nucleotide
	νουκλεοτίδιο
oligo-dT	Oligo-deoxy-thymine nucleotides
	Ολιγονουκλεοτίδια δεοξυθυμίνης
PAM	Peptidylglycine alpha-amidating monooxygenase
PAP	Poly A polymerase
	Πολυ(A) πολυμεράση
PBMCs	Peripheral Blood Mononuclear Cells
	Περιφερικά μονοπύρηννα κύτταρα του αίματος
PCR	Polymerase chain reaction
	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης
PDX1	Pancreatic Duodenal homeobox 1
PI3K	Phosphoinositide 3-Kinase
PIP3	Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate
PKC	Protein kinase C
	Πρωτεϊνική κινάση C
PPARG	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma

PPi	Pyrophosphate
	Πυροφωσφορικό
pre-miRNA	Precursor micro-RNA
	Πρόδρομο micro-RNA
pri-miRNA	Primary micro-RNA
	Πρωταρχικό micro-RNA
PSEN1	Presenilin-1
PTPN22	Protein Tyrosine Phosphatase, Non-receptor type 22
qPCR	quantitative Polymerase Chain Reaction
	Ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης
RISC	RNA-induced silencing complex
	Σύμπλεγμα γονιδιακής αποσιώπησης
RNA seq	RNA sequencing
	RNA αλληλούχηση
RNPEPL1	Arginyl Aminopeptidase Like 1
ROS	Reactive oxygen species
	Ενεργές ρίζες οξυγόνου
RQ	Relative Quantification Units
	Μονάδες σχετικής ποσοτικοποίησης
rRNA	Ribosomal RNA
	Ριβοσωμικό RNA
RT	Reverse Transcription
	Αντίστροφη μεταγραφή
SEN2	Sentrin-specific protease 2
Shc	Transforming protein
Src	Proto-oncogene tyrosine-protein kinase
SLC30A8	Solute carrier family 30 (zinc transporter), member 8
SNORD48	Small nucleolar RNA 48
SNPs	Single Nucleotide Polymorphisms
	Νουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί
SOS	Son of Sevenless (a set of genes encoding guanine nucleotide exchange factors)
SRPs	Signal Recognition Particles
STRING	Search Tool for the retrieval of interacting genes/proteins
STZ	Streptozotocin
	Στρεπτοζοτοκίνη
SUR1	Sulfonylurea receptor 1
T	Thymidine
	Νουκλεοτίδιο θυμίνης
T2D	Type 2 diabetes mellitus
	Σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2
TBE	Tris/Borate/EDTA buffer
TCF7L2	Transcription factor 7-like 2
THADA	Thyroid adenoma associated
Tm	Melting temperature
	Θερμοκρασία τήξης
TPM	Transcripts per million
TSPAN8	Tetraspanin-8
TSS	Transcription Start Site

	Θέση έναρξης της μεταγραφής
Tv	Transcript variant
	Εναλλακτικό μετάγραφο
U	Uracil
	Νουκλεοτίδιο ουρακίλης
U.S.A	United States of America
	Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής
UTR	Untranslated region
	Μη μεταφραζόμενη περιοχή
Vs	versus
	Σε αντίθεση
w/v	weight/volume
	Βάρος κατ'όγκον
WFS1	Wolfram syndrome 1

Πίνακας Περιχομένων

1. Εισαγωγή.....	16
1.1 Φυσιολογία παγκρέατος	16
1.2 Μηχανισμός έκκρισης της ινσουλίνης.....	17
1.3 Μηχανισμός δράσης της ινσουλίνης.....	19
1.4 Σακχαρώδης Διαβήτης- Γενικά στοιχεία.....	20
1.5 Ταξινόμηση τύπων Σακχαρώδους Διαβήτη.....	22
1.6 Παθοφυσιολογία Σακχαρώδους Διαβήτη τύπου 2	27
1.7 Γενετική βάση Σακχαρώδους Διαβήτη τύπου 2	28
1.7.1 Τρόποι ταυτοποίησης γονιδίων που εμπλέκονται στον αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης Σακχαρώδους Διαβήτη τύπου 2	28
1.7.1.1 Μελέτες σύνδεσης	28
1.7.1.2 Μελέτες που στηρίζονται στη διερεύνηση γονιδίων που θεωρούνται πιθανόν να εμπλέκονται στον αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης Σακχαρώδους Διαβήτη τύπου 2 λόγω της λειτουργίας τους	30
1.7.1.3 Μελέτες σάρωσης ολόκληρου του γονιδιώματος (Genome Wide Associations Studies-GWAS)	32
1.7.2 Η κατανόηση της «χαμένης κληρονομικότητας» στην εμφάνιση του Σακχαρώδους Διαβήτη τύπου 2	37
1.7.2.1 Παρουσία σπάνιων αλληλομόρφων.....	38
1.7.2.2 Δομική ποικιλομορφία	39
1.7.2.3 Παρουσία «προστατευτικών» γονιδίων.....	39
1.7.2.4 Η σχέση των γενετικών τόπων ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης (Expression quantitative trait loci-eQTLs) με την ανάπτυξη του Σακχαρώδους Διαβήτη τύπου 2	40
1.7.2.5 Αλληλεπιδράσεις γονιδίων- γονιδίων και γονιδίων- περιβάλλοντος	41
1.8 Επιγενετική βάση Σακχαρώδους Διαβήτη τύπου 2	42
1.8.1 Η συμβολή της μεθυλίωσης του DNA στην ανάπτυξη Σακχαρώδους Διαβήτη τύπου 2	42
1.8.2 Η συνεισφορά της αλληλεπίδρασης της επιγενετικής με τη γενετική στον κίνδυνο εμφάνισης Σακχαρώδους Διαβήτη τύπου 2	44
1.9 Η συμβολή των microRNAs (miRNAs) στην ανάπτυξη του Σακχαρώδους Διαβήτη τύπου 2	44
1.10 Ο ρόλος της βιολογίας συστημάτων στην κατανόηση των μηχανισμών παθογένειας του Σακχαρώδους Διαβήτη τύπου 2	48
1.11 Σκοπός διδακτορικής διατριβής	51

2. Μεθοδολογία	53
2.1 Βιολογικό Υλικό: Δείγματα περιφερικού αίματος από ασθενείς με ΣΔτ2 και υγιείς δότες	53
2.2 Απομόνωση Νουκλεϊκών Οξέων	55
2.2.1 Απομόνωση RNA, Ποιοτικός και Ποσοτικός έλεγχος.....	55
2.2.2 Απομόνωση DNA.....	56
2.3 Αντίδραση πολυαδενυλίωσης του ολικού RNA για την ανάλυση των μορίων miRNAs	57
2.4 Αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής- (Reverse Transcription).....	58
2.4.1 Αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής του συνόλου των μορίων mRNA	59
2.4.2 Αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής των πολυαδενυλιωμένων μορίων miRNAs	59
2.5 Αντίδραση ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου- (Quantitative Real-Time PCR, qPCR)	60
2.5.1 Βασική αρχή μεθόδου	60
2.5.2 Ανάπτυξη μεθοδολογίας για την ποσοτικοποίηση των επιπέδων έκφρασης των mRNA.....	63
2.5.2.1 Σχεδιασμός και σύνθεση εκκινητών των αντιδράσεων qPCR.....	63
2.5.2.2 Συνθήκες αντίδρασης qPCR.....	68
2.5.3 Ανάπτυξη μεθοδολογίας για την ποσοτικοποίηση των επιπέδων έκφρασης των miRNAs.....	68
2.5.3.1 Σχεδιασμός και σύνθεση εκκινητών των αντιδράσεων qPCR.....	68
2.5.3.2 Συνθήκες αντίδρασης qPCR.....	69
2.5.4 Ανάλυση των αποτελεσμάτων της qPCR με τη μέθοδο της σχετικής ποσοτικοποίησης μέσω σύγκρισης των τιμών Ct ($2^{-\Delta\Delta CT}$)	70
2.6 Πυροαλληλούχηση- (Pyrosequencing)	70
2.6.1 Βασική αρχή μεθόδου	70
2.6.2 Εκτίμηση του ποσοστού μεθυλίωσης των γονιδίων διαμέσου της μεθόδου της πυροαλληλούχησης	72
2.6.3. Επεξεργασία DNA δειγμάτων με Όξινο Θειώδες Νάτριο- (Bisulfite Conversion)	73
2.6.4 Συμβατική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης- (Regular PCR)	75
2.6.4.1 Σχεδιασμός εκκινητών για την αντίδραση της συμβατικής PCR.....	75
2.6.4.2 Συνθήκες αντίδρασης συμβατικής PCR	77
2.6.4.3 Ανίχνευση των προϊόντων της αντίδρασης συμβατικής PCR διαμέσου ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης	78
2.6.5 Συνθήκες αντίδρασης πυροαλληλούχησης.....	79
2.6.6 Ανάλυση αποτελεσμάτων των αντιδράσεων πυροαλληλούχησης	80
2.7 Βιοστατιστική Ανάλυση	81
2.8 Βιοπληροφορική αναζήτηση-Αναζήτηση σε βάσεις δεδομένων.....	82

2.8.1 Ανάπτυξη πάνελ SNPs που συνδέονται με την εμφάνιση του Σακχαρώδους Διαβήτη τύπου 2	82
2.8.2 Αναζήτηση της ιστοειδικής έκφρασης των γονιδίων/μεταγράφων	84
2.8.3 Ανάπτυξη miRNA πάνελ	84
2.8.4 Αναζήτηση σε βάσεις δεδομένων για τον εντοπισμό των υποκινητών των γονιδίων <i>CDK5</i> , <i>CDKN2A</i> και <i>TSPAN8</i>	85
2.8.5 Δημιουργία δικτύων αλληλεπίδρασης γονιδίων	86
3. Αποτελέσματα	87
3.1 Έλεγχος ποιότητας ολικού RNA	87
3.2 Μελέτη των συνολικών επιπέδων έκφρασης των γονιδίων που εμπλέκονται στον αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης Σακχαρώδους Διαβήτη τύπου 2	88
3.2.1 Ανάπτυξη μεθοδολογίας ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου (qPCR)	88
3.2.2 Βελτιστοποίηση συνθηκών αντιδράσεων qPCR και έλεγχος ποιότητας της μεθόδου	88
3.2.3 Ποσοτικός προσδιορισμός και διαφορική έκφραση των γονιδίων που εμπλέκονται στον αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης Σακχαρώδους Διαβήτη τύπου 2	92
3.3 RNA αλληλούχηση- (RNA-seq)- για την εκτίμηση των επιπέδων έκφρασης των επιμέρους εναλλακτικών μεταγράφων των γονιδίων που σχετίζονται με τον αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης ΣΔτ2	94
3.4 Μελέτη των επιπέδων έκφρασης των επιμέρους εναλλακτικών μεταγράφων των γονιδίων που σχετίζονται με τον αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης ΣΔτ2	96
3.4.1 Ανάπτυξη μεθοδολογίας ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου (qPCR)	96
3.4.2 Βελτιστοποίηση συνθηκών αντιδράσεων qPCR και έλεγχος ποιότητας της μεθόδου	96
3.4.3 Ποσοτικός προσδιορισμός και διαφορική έκφραση των επιμέρους εναλλακτικών μεταγράφων των γονιδίων που εμπλέκονται στον αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης ΣΔτ2 ...	100
3.4.4 Διερεύνηση συσχετίσεων μεταξύ των επιπέδων έκφρασης των επιμέρους εναλλακτικών μεταγράφων με συγκεκριμένα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά της νόσου	104
3.4.5 Διερεύνηση της ιστοειδικής έκφρασης των γονιδίων/μεταγράφων που σχετίζονται με τον αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης ΣΔτ2	105
3.5 Μελέτη των επιπέδων έκφρασης των miRNAs που στοχεύουν τα γονίδια/μετάγραφα που σχετίζονται με τον αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης ΣΔτ2	107
3.5.1 Ανάπτυξη μεθοδολογίας ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου (qPCR)	107
3.5.2 Βελτιστοποίηση συνθηκών αντιδράσεων qPCR και έλεγχος ποιότητας της μεθόδου qPCR	107
3.5.3 Ποσοτικός προσδιορισμός και διαφορική έκφραση των miRNAs που στοχεύουν τα γονίδια/μετάγραφα που σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης ΣΔτ2	110
3.5.4 Διερεύνηση συσχετίσεων μεταξύ των επιπέδων έκφρασης των miRNAs και των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων/μεταγράφων-στόχων τους	112

3.5.5 Διερεύνηση συσχετίσεων μεταξύ των επιπέδων έκφρασης των miRNAs με συγκεκριμένα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά της νόσου	115
3.5.6 Βιοπληροφορική ανάλυση για τη δημιουργία δικτύων- αλληλεπιδράσεων μεταξύ των γονιδίων/στόχων των miRNAs	115
3.6 Μελέτη του προφίλ μεθυλίωσης των υποκινητών των γονιδίων που σχετίζονται με τον αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης ΣΔτ2	117
3.6.1 Απομόνωση DNA από τα δείγματα του περιφερικού αίματος και επεξεργασία με όξινο θειώδες νάτριο-Bisulfite Conversion	117
3.6.2 Ανάπτυξη μεθοδολογίας συμβατικής PCR	119
3.6.3 Ανάπτυξη μεθοδολογίας πυροαλληλούχησης	120
3.6.4 Διαφορικά επίπεδα μεθυλίωσης των γονιδίων <i>CDK5</i> και <i>CDKN2A</i> στο περιφερικό αίμα των ασθενών με ΣΔτ2 και των υγιών δοτών	122
4. Συζήτηση	125
5. Βιβλιογραφία	137
Περίληψη	151
Abstract	155
ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ	158
ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ	162

1. Εισαγωγή

1.1 Φυσιολογία παγκρέατος

Το πάγκρεας αποτελεί ένα όργανο με εξωκρινή και ενδοκρινή λειτουργία και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της μεταβολικής και ενεργειακής ομοιόστασης του οργανισμού, διαμέσου της έκκρισης συγκεκριμένων πεπτικών ενζύμων και παγκρεατικών ορμονών. Το μεγαλύτερο μέρος της παγκρεατικής μοίρας αποτελείται από τα εξωκρινή κύτταρα, τα οποία εκκρίνουν διαμέσου των παγκρεατικών αγωγών το παγκρεατικό υγρό, που περιλαμβάνει τα ένζυμα της πέψης, όπως την αμυλάση, την παγκρεατική λιπάση και το θρυψινογόνο. Από την άλλη πλευρά, τα ενδοκρινή κύτταρα εντοπίζονται μέσα στην εξωκρινή μοίρα του παγκρέατος, απαρτίζουν το 1-2% του συνόλου των κυττάρων του οργάνου και οργανώνονται σε νησίδες, τις νησίδες του Langerhans (1).

Οι ανθρώπινες παγκρεατικές νησίδες απαρτίζονται από πέντε διαφορετικές ομάδες κυττάρων που είναι υπεύθυνες για την έκκριση των παγκρεατικών ορμονών. Ανάμεσα σε αυτές συγκαταλέγεται η ομάδα των β κυττάρων που αποτελούν περίπου το 60-80% του συνόλου της νησίδας και είναι υπεύθυνη για την έκκριση της ινσουλίνης, της αμυλίνης και του πεπτιδίου C (2). Μεταξύ των β κυττάρων παρεμβάλλονται τα α κύτταρα που αποτελούν το 15-20% του συνόλου των κυττάρων της νησίδας και εκκρίνουν το γλυκαγόνο (2), τα γ κύτταρα που αποτελούν το 3-5% των κυττάρων της νησίδας και εκκρίνουν το παγκρεατικό πολυπεπτίδιο (3), τα δ κύτταρα που αποτελούν το 3-10% και εκκρίνουν τη σωματοστατίνη (2) καθώς και τα ε κύτταρα που αποτελούν <1% των κυττάρων της νησίδας και είναι υπεύθυνα για την έκκριση της γκρελίνης (4). Μέσα στις νησίδες αυτές τα β κύτταρα οργανώνουν σποραδικές υποομάδες μεταξύ των οποίων παρεμβάλλονται περιοχές με ρόλο λειτουργικής συνδεσιμότητας (5). Τα β κύτταρα έχουν την ικανότητα να επικοινωνούν μεταξύ τους καθώς και με τις άλλες νησίδες των ενδοκρινών κυττάρων με τη βοήθεια πρωτεϊνών σύνδεσης καθώς και άλλων συμπλεγμάτων προσκόλλησης (5).

Κάθε μια από τις προαναφερόμενες παγκρεατικές ορμόνες έχει διακριτούς ρόλους και λειτουργίες στη διατήρηση της ομοιόστασης της γλυκόζης: το γλυκαγόνο είναι υπεύθυνο για την αύξηση των επιπέδων της γλυκόζης στο αίμα ενώ η ινσουλίνη για την αντίστοιχη μείωση (6). Η σωματοστατίνη αναστέλλει την έκκριση του γλυκαγόνου και της ινσουλίνης (7), ενώ το παγκρεατικό πολυπεπτίδιο ρυθμίζει την εξωκρινή και ενδοκρινή δραστηριότητα του παγκρέατος (3). Συνολικά, όλες οι παραπάνω παγκρεατικές ορμόνες συμμετέχουν στη ρύθμιση των επιπέδων της γλυκόζης στο αίμα, η οποία πρέπει να διατηρείται φυσιολογικά σε ένα μικρό επιτρεπτό όριο. Η διατήρηση των επιπέδων της γλυκόζης στο όριο αυτό επιτυγχάνεται κυρίως μέσω των αντίθετων και ισορροπημένων δράσεων της ινσουλίνης και της γλυκαγόνης, οι

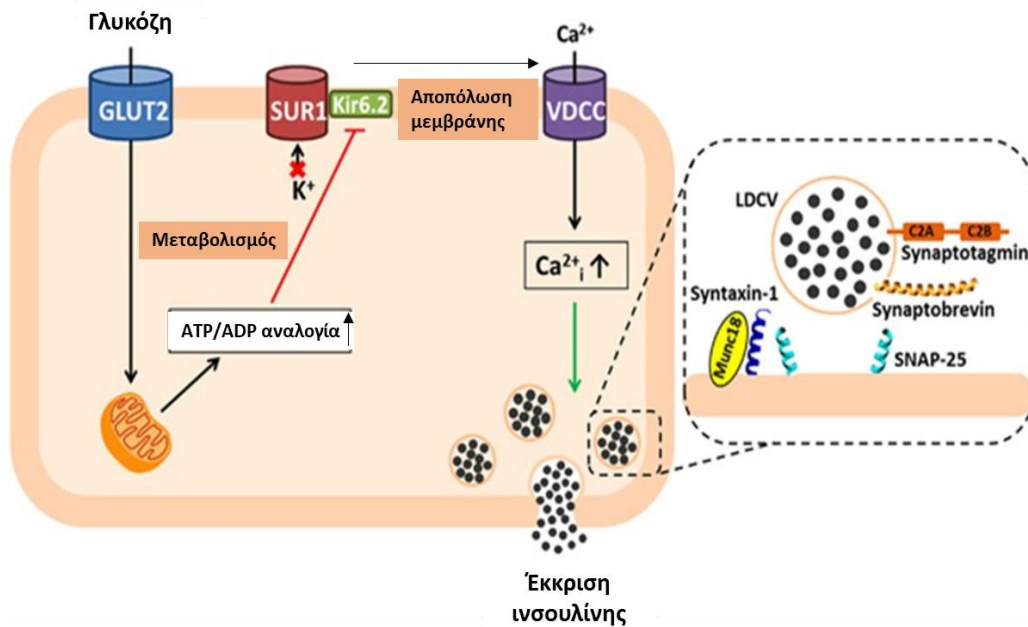
οποίες και έχουν τον κυριότερο ρόλο στη διατήρηση της ομοιόστασης της γλυκόζης. Έτσι, για παράδειγμα, κατά τη διάρκεια του ύπνου ή μεταξύ των γευμάτων, όπου τα επίπεδα της γλυκόζης παραμένουν χαμηλά, επάγεται αύξηση της έκκρισης του γλυκαγόνου από τα α κύτταρα, το οποίο με τη σειρά του επάγει την ηπατική γλυκογονόλυση. Σε αντίθετη περίπτωση, όπου τα επίπεδα της γλυκόζης παραμένουν υψηλά, όπως κατά τη διάρκεια ενός γεύματος, επάγεται η έκκριση της ινσουλίνης από τα β κύτταρα, η οποία επάγει την πρόσληψη της γλυκόζης από τους περιφερικούς ιστούς με απώτερο στόχο τη μείωση των επιπέδων της γλυκόζης στο αίμα (8, 9).

1.2 Μηχανισμός έκκρισης της ινσουλίνης

Η εκκρινόμενη ινσουλίνη αποτελεί μια πρωτεΐνη 51 αμινοξικών καταλοίπων και μοριακού βάρους 5.8 kDa. Αρχικά, το γονίδιο της ινσουλίνης κωδικοποιεί μια πρωτεϊνική πρόδρομη ισομορφή 110 αμινοξικών καταλοίπων, γνωστή ως πρόδρομη προ-ινσουλίνη. Όπως όλες οι εκκρινόμενες πρωτεΐνες, η πρόδρομη προ-ινσουλίνη εμπεριέχει ένα υδρόφοβο αμινοτελικό σινιάλο, το οποίο αναγνωρίζεται από τα κυτταροπλασματικά ριβονουκλεοπρωτεϊνικά σωματίδια SRPs (Signal Recognition Particles) και διευκολύνει τη μετάβασή της στο αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο (10). Εκεί, με τη βοήθεια μιας πεπτιδάσης, το πεπτίδιο-σινιάλο αποκόπτεται και η πρόδρομη προ-ινσουλίνη μετατρέπεται στην προ-ινσουλίνη. Η προ-ινσουλίνη, στη συνέχεια, αναδιπλώνεται και πτυχώνεται, επάγοντας τη δημιουργία τριών δισουλφιδικών δεσμών, μια διαδικασία η οποία πραγματοποιείται με τη βοήθεια μιας πληθώρας τσαπερονών του ενδοπλασματικού δικτύου (11). Ακολούθως, η πλήρως πλέον πτυχωμένη προ-ινσουλίνη μεταφέρεται στο σύμπλεγμα Golgi όπου «πακετάρεται» σε πρόδρομα εκκριτικά κυστίδια και διασπάται για τη σύνθεση της ινσουλίνης και του πεπτιδίου C. Τόσο η ινσουλίνη όσο και το C πεπτίδιο αποθηκεύονται σε εκκριτικά κυστίδια μαζί με την αμυλίνη καθώς και με άλλα προϊόντα των β κυττάρων (12).

Το κύριο έναυσμα που επάγει την έκκριση της ινσουλίνης από τα β κύτταρα, όπως προαναφέρθηκε, αποτελεί η αύξηση των επιπέδων της γλυκόζης στο αίμα. Σε πρώτο στάδιο, η γλυκόζη προσλαμβάνεται από τον μεταφορέα γλυκόζης 2 (GLUT2), ο οποίος βρίσκεται στην επιφάνεια των β κυττάρων και στη συνέχεια, εντός του κυττάρου, φωσφορυλιώνεται από τη γλυκοκινάση σε 6-φωσφορική γλυκόζη, ενεργοποιώντας την πορεία της γλυκόλυσης. Τα περαιτέρω βήματα του μεταβολισμού της γλυκόζης οδηγούν στην απελευθέρωση του πυροσταφυλικού, το οποίο προσλαμβάνεται από τα μιτοχόνδρια και μεταβολίζεται περαιτέρω με τελικό στόχο την απελευθέρωση του ATP. Το ATP «μεταφέρει» την απαραίτητη ενέργεια που απαιτείται για την έκκριση της ινσουλίνης, επάγοντας μέσω μιας σειράς γεγονότων την αποπόλωση της κυτταρικής μεμβράνης. Πιο συγκεκριμένα, η αύξηση της αναλογίας ATP/ADP

προκαλεί το κλείσιμο του ATP-εξαρτώμενου καναλιού καλίου (K_{ATP}), το οποίο είναι υπεύθυνο για τη διατήρηση του δυναμικού ηρεμίας της μεμβράνης. Το κλείσιμο του καναλιού αυτού επάγει, με τη σειρά του, την αλλαγή του δυναμικού της μεμβράνης και τελικά το άνοιγμα των καναλιών ιόντων ασβεστίου (Ca^{2+}). Η εισροή των Ca^{2+} επάγει την σύντηξη των κυστιδίων της ινσουλίνης με την πλασματική μεμβράνη και πυροδοτεί την εξωκύττωση της ορμόνης (Εικόνα 1.1) (1).



Εικόνα 1.1 Η -επαγόμενη από τη γλυκόζη- έκκριση της ινσουλίνης από τα παγκρεατικά β κύτταρα. Η εξωγενής γλυκόζη προσλαμβάνεται από τον υποδοχέα GLUT2 του κυττάρου και μεταβολίζεται περαιτέρω μέσα στο κύτταρα διαμέσου της διαδικασίας της γλυκόλυσης. Η αύξηση των επιπέδων του ATP προκαλεί την αλλαγή της αναλογίας ATP/ADP, η οποία με τη σειρά της οδηγεί στο κλείσιμο των ATP- εξαρτώμενων καναλιών καλίου (K_{ATP}). Η επακόλουθη επαναπόλωση της μεμβράνης επάγει το άνοιγμα των τασεοεξαρτώμενων καναλιών ασβεστίου (Ca^{2+}), τα αυξημένα επίπεδα του οποίου τελικά πυροδοτούν την έκκριση της ινσουλίνης διαμέσου σύντηξης των κοκκίων της με την πλασματική μεμβράνη του κυττάρου. Ανατύπωση από τους: Roder PV et al, *Exp Mol Med.* 2016;48:e219) (1).

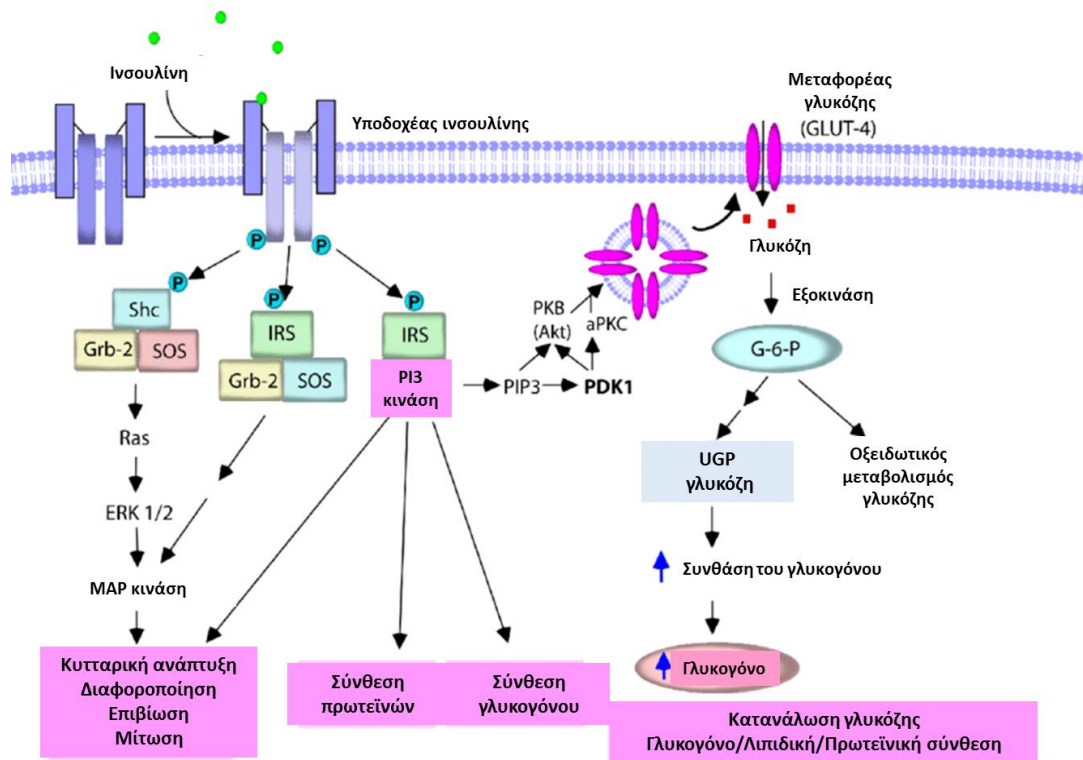
Αν και η γλυκόζη αποτελεί το βασικό έναυσμα των β κυττάρων για την απελευθέρωση της ινσουλίνης, ο ρυθμός έκκρισης της ορμόνης επηρεάζεται επιπλέον τόσο από τη συγκέντρωση αμινοξέων όσο και από τη συγκέντρωση ελεύθερων λιπαρών οξέων στο αίμα. Σε κυτταρικό επίπεδο, η έκκριση της ινσουλίνης εξαρτάται από τη συγκέντρωση των πρωτεϊνών σύντηξης των κυστιδίων με την πλασματική μεμβράνη καθώς και από τη συγκέντρωση του ενδοκυττάρου Ca^{2+} και του κυκλικού AMP (cAMP- Cyclic adenosine monophosphate), ενώ ορμονικά εξαρτάται από τις ινκρετίνες, GLP-1 (Glucagon-like peptide 1) και GIP (Insulinotropic polypeptide), από τα οιστρογόνα, τη μελατονίνη, τη λεπτίνη καθώς και από την αυξητική

ορμόνη. Συνοπτικά, η ομοιόσταση της γλυκόζης ρυθμίζεται από ένα πολύπλοκο δίκτυο αλληλεπίδρασης του παγκρέατος με τον εγκέφαλο, το ήπαρ, το λιπώδη και το μυϊκό ιστό διαμέσου ενός δικτύου ορμονών, νευροδιαβιβαστών και κυττοκινών (9, 13).

1.3 Μηχανισμός δράσης της ινσουλίνης

Παρά το γεγονός ότι ένας μεγάλος αριθμός σωματικών κυττάρων εκφράζουν τους υποδοχείς της ινσουλίνης, ο ρόλος της ορμόνης στη διατήρηση της ομοιόστασης της γλυκόζης περιορίζεται στη δράση της στο σκελετικό μυ, στο ήπαρ και στο λιπώδη ιστό, στους οποίους και μπορεί να επάγει ιστο-ειδικά μονοπάτια σηματοδότησης. Πιο συγκεκριμένα, η ινσουλίνη δρα στο σκελετικό μυ επάγοντας την πρόσληψη της γλυκόζης και τη σύνθεση του γλυκογόνου, στο ήπαρ ενεργοποιώντας τη σύνθεση του γλυκογόνου, αυξάνοντας την έκφραση γονιδίων της λιπογένεσης και μειώνοντας την έκφραση γονιδίων της γλυκονεογένεσης, ενώ στο λιπώδη ιστό καταστέλλοντας τη λιπόλυση και αυξάνοντας τη λιπογένεση (14).

Η ινσουλίνη επάγει τις δράσεις της μέσω της πρόσδεσής της στον υποδοχέα της INSR (Insulin Receptor), ο οποίος αποτελείται από δύο εξωκυττάρειες υπομονάδες α , υπεύθυνες για τη δέσμευση της ινσουλίνης και δύο μεμβρανικές β υπομονάδες με ενεργότητα κινάσης τυροσίνης. Ανεξάρτητα από το τελικό αποτέλεσμα των δράσεων της ινσουλίνης στους ιστούς-στόχους, το σηματοδοτικό της μονοπάτι περιλαμβάνει πολλούς κοινούς μεσολαβητές. Έτσι, αρχικά, η πρόσδεση της ινσουλίνης στον υποδοχέα της επάγει την αυτοφωσφορυλίωσή του και επακόλουθα την ενεργοποίηση δύο διαφορετικών σηματοδοτικών μονοπατιών: το μιτογονικό και το μεταβολικό. Το μιτογονικό σηματοδοτικό μονοπάτι περιλαμβάνει την ενεργοποίηση της κινάσης MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) ενώ τα μεταβολικό επάγει τη στρατολόγηση των υποστρωμάτων IRS (Insulin Receptor Substrate), με σημαντικότερα τα IRS1 και IRS2. Η επακόλουθη φωσφορυλίωση των υποστρωμάτων αυτών σε θέσεις τυροσίνης επάγουν τη στρατολόγηση της φωσφατιδυλινοσιτολικής 3-κινάσης (PI3K- Phosphoinositide 3-kinase) και τελικά την ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης B (AKT- Protein kinase B). Η κινάση AKT φωσφορυλιώνει, με τη σειρά της, ένα μεγάλο αριθμό υποστρωμάτων επάγοντας έναν καταρράκτη αντιδράσεων που οδηγεί τελικά στη μετατόπιση του μεταφορέα της γλυκόζης τύπου 4 (GLUT4- Glucose Transporter Type 4) στην πλασματική μεμβράνη των ινσουλινο-εξαρτώμενων περιφερικών ιστών για την πρόσληψη της γλυκόζης (**Εικόνα 1.2**) (14, 15).



Εικόνα 1.2: Το σηματοδοτικό μονοπάτι δράσης της ινσουλίνης. Η δέσμευση της ινσουλίνης στον υποδοχέα της πυροδοτεί έναν ενδοκυττάριο καταρράκτη αντιδράσεων. Ο ενεργοποιημένος υποδοχέας της ινσουλίνης φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί πρωτεΐνες υποστρώματα, όπως οι Shc και IRS. Η φωσφορυλίωση των Shc υποστρωμάτων επάγει τη δημιουργία του συμπλόκου Shc/Grb-2/SOS που με τη σειρά του ενεργοποιεί το μονοπάτι MAPK και ενεργοποιεί διεργασίες διαφοροποίησης, κυτταρικής ανάπτυξης και μίτωσης. Από την άλλη πλευρά, η φωσφορυλίωση των IRS υποστρωμάτων επάγει την αλληλεπίδρασή τους με άλλες πρωτεΐνες, συμπεριλαμβανομένου των Grb-2 και PI3K, και προκαλεί αλλαγές στην κυτταρική λειτουργία. Η PI3K καταλύει τη δημιουργία της PIP3, η οποία με τη σειρά της ενεργοποιεί την Akt και την αPKC, ελέγχοντας τη δράση της ινσουλίνης, συμπεριλαμβανομένου της σύνθεσης πρωτεϊνών, της σύνθεσης του γλυκογόνου και της πρόσληψης της γλυκόζης, διαμέσου της μετατόπισης του GLUT4 στην πλασματική μεμβράνη. Η γλυκόζη που προσλαμβάνεται από το κύτταρο φωσφορυλιώνεται ταχέως από την εξοκινάση για τη δημιουργία της 6-φωσφορικής γλυκόζης (G-6-P) και έπειτα μεταβολίζεται ή/και αποθηκεύεται στο κύτταρο με τη μορφή γλυκογόνου. Ανατύπωση από τους Mangmool S. et al, *Biomol Ther (Seoul)*. 2017;25(1):44-56 (15).

1.4 Σακχαρώδης Διαβήτης- Γενικά στοιχεία

Ο Σακχαρώδης Διαβήτης (ΣΔ) περιλαμβάνει ένα εύρος ετερογενών και πολυπαραγοντικών μεταβολικών διαταραχών που χαρακτηρίζονται από καταστάσεις υπεργλυκαιμίας, ως αποτέλεσμα διαταραχών των μηχανισμών έκκρισης ή/και δράσης της ινσουλίνης. Η ινσουλίνη, όπως προαναφέρθηκε, αποτελεί μια αναγκαία ορμόνη που εκκρίνεται από τα παγκρεατικά β κύτταρα και είναι υπεύθυνη για τη ρύθμιση της πρόσληψης της γλυκόζης από τους περιφερικούς ιστούς, διαδραματίζοντας συνεπώς καθοριστικό ρόλο στη διατήρηση

της ομοιοστασίας της. Οι παθολογικές διεργασίες που εμπλέκονται στην ανάπτυξη του διαβήτη ποικίλουν και περιλαμβάνουν κυρίως τη δυσλειτουργία των β κυττάρων του παγκρέατος, με επακόλουθη συνέπεια την ανεπάρκεια ινσουλίνης, καθώς και την ανάπτυξη συγκεκριμένων διαταραχών που έχουν ως αποτέλεσμα τη μειωμένη ευαισθησία των ιστών στη δράση της (16).

Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας, ο ΣΔ συγκαταλέγεται ανάμεσα στις κυριότερες αιτίες θνησιμότητας καθώς θεωρήθηκε υπεύθυνος για το 9.9% των θανάτων του πληθυσμού παγκοσμίως ηλικίας 20-99 ετών για το έτος 2017. Η χρόνια υπεργλυκαιμία, κύριο χαρακτηριστικό των ασθενών με ΣΔ, οδηγεί σε γενικές αγγειακές βλάβες στον οργανισμό, οι οποίες επηρεάζουν τη λειτουργία πολλών οργάνων, συμπεριλαμβανομένης της καρδιάς, των οφθαλμών, των νεφρών και των νεύρων. Το γεγονός ότι η υπέρταση είναι δύο με τρεις φορές πιο συχνή στους ασθενείς με ΣΔ, αυξάνει σημαντικά τον κίνδυνο εμφάνισης μακροαγγειακών επιπλοκών, όπως έμφραγμα του μυοκαρδίου, εγκεφαλικό επεισόδιο, περιφερικές αγγειοπάθειες και καρδιακή ανεπάρκεια αλλά και μικροαγγειακών επιπλοκών, όπως ρετινοπάθειες, νεφροπάθειες και νευροπάθειες, με αποτέλεσμα οι ασθενείς να χαρακτηρίζονται από αυξημένη νοσηρότητα και πρόωμη θνησιμότητα κυρίως λόγω των ποικίλων χρόνιων επιπλοκών της νόσου (17, 18).

Ο παγκόσμιος επιπολασμός του ΣΔ έχει αυξηθεί ραγδαία τις τελευταίες δεκαετίες, γεγονός που μπορεί να αποδοθεί κυρίως στην υιοθέτηση του σημερινού σύγχρονου τύπου «καθιστικής» ζωής καθώς και στην αύξηση της παχυσαρκίας (18, 19). Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας, το 8.4% του πληθυσμού παγκοσμίως ηλικίας 18-99 ετών έπασχε από ΣΔ το 2017, ποσοστό το οποίο αναμένεται να αυξηθεί στο 9.9% του πληθυσμού μέχρι και το 2045. Ο δυτικός Ειρηνικός θεωρείται η περιοχή με τους περισσότερους ασθενείς με ΣΔ, αφού φιλοξενεί το 37% του συνολικού πληθυσμού που πάσχει από τη νόσο. Επιδημιολογικά δεδομένα του έτους 2017, δείχνουν ότι η επικράτηση του ΣΔ στο ηλικιακό εύρος 65-69 ετών είναι τρεις φορές υψηλότερη στις χώρες υψηλού συγκριτικά με τις χώρες χαμηλού εισοδήματος ενώ παραμένει χαμηλότερη στις γυναίκες ηλικίας 18-99 ετών (8.4%) συγκριτικά με τους άντρες (8.9%) (18).

Ο υψηλός επιπολασμός της νόσου επιβεβαιώνει αδιαμφισβήτητα το γεγονός ότι ο ΣΔ αποτελεί σήμερα μια σύγχρονη επιδημία και μία σοβαρότατη απειλή για τη δημόσια υγεία, αν και φαίνεται πως επηρεάζεται σημαντικά από το γεωγραφικό, κοινωνικό και οικονομικό υπόβαθρο της έκαστοτε χώρας. Ταυτόχρονα, το γεγονός ότι σχεδόν οι μισοί από τους ασθενείς με ΣΔ (49.7%) παρέμειναν αδιάγνωστοι το έτος 2017, ενώ πολλοί από τους ασθενείς είχαν ήδη εμφανίσει μικροαγγειακές επιπλοκές τη στιγμή της διάγνωσης, καθιστά επιτακτική την ανάγκη

της έγκαιρης διάγνωσης, παρακολούθησης και άμεσης αντιμετώπισης των επιπλοκών της νόσου (18).

1.5 Ταξινόμηση τύπων Σακχαρώδους Διαβήτη

Ο ΣΔ συνηθιζόταν να υποδιαιρείται σε δύο κύριες μορφές: το ΣΔ τύπου 1 και το ΣΔ τύπου 2, όμως η κατανόηση των διαφορετικών μηχανισμών παθογένειας της νόσου σε συνδυασμό με την αλληλοεπικαλυπτόμενη συνεισφορά των γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων στην ανάπτυξή της έχει οδηγήσει στον καθορισμό πολλών και διαφορετικών τύπων της. Έτσι, πλέον οι δύο κύριοι τύποι ΣΔ, τύπου 1 και 2, θεωρούνται τα άκρα ενός ευρέος φάσματος εκδηλώσεων της νόσου, το οποίο περιλαμβάνει μεταξύ άλλων τον οψίμου έναρξης διαβήτη των νέων (MODY- Maturity-Onset Diabetes of the Young), το λανθάνοντα αυτοάνοσο διαβήτη των ενηλίκων (LADA- Latent Autoimmune Diabetes in Adults) καθώς και πολλούς ακόμη υποτύπους (**Εικόνα 1.3**) (20).

Ο **Σακχαρώδης Διαβήτης τύπου 1 (ΣΔτ1)**, γνωστός και ως Νεανικός Διαβήτης, ή Ινσουλινο-εξαρτώμενος Διαβήτης, αποτελεί μια χρόνια διαταραχή που οφείλεται στην ανοσολογική καταστροφή των παγκρεατικών β κυττάρων και χαρακτηρίζεται από την (σχεδόν) πλήρη ανεπάρκεια της έκκρισης ινσουλίνης καθώς και από την παρουσία αυτοαντισωμάτων, συμπεριλαμβανομένων των αντισωμάτων έναντι της αποκαρβοξυλάσης του γλουταμικού οξέος (GAD- Glutamic Acid Decarboxylase). Συνέπεια των προηγούμενων αποτελεί η πλήρης εξάρτηση των ασθενών από την εξωγενή χορήγηση της ορμόνης, από την αρχή κιόλας της διάγνωσης της νόσου. Ο ΣΔτ1 συναντάται πιο συχνά στα παιδιά, στους εφήβους ή σε νέους κάτω των 35 ετών, ενώ οι επιπτώσεις του ποικίλουν ανάλογα με την ηλικία, το φύλο και το οικογενειακό ιστορικό (21, 22).

Ο ΣΔτ1 είναι αποτέλεσμα αλληλεπίδρασης τόσο γενετικών και επιγενετικών όσο και περιβαλλοντικών παραγόντων. Γενετικές μελέτες έχουν καταφέρει να συσχετίσουν το 80% της κληρονομικότητας της νόσου με συγκεκριμένους γενετικούς τόπους. Οι σημαντικότεροι από αυτούς περιλαμβάνουν την τάξη II των αντιγόνων επιφανείας HLA (Human Leukocyte Antigen), που ευθύνονται για το 50% της γενετικής προδιάθεσης της νόσου, καθώς και τα γονίδια *CTLA4* (Cytotoxic T-lymphocyte-Associated protein 4), *PTPN22* (Protein Tyrosine Phosphatase, Non-receptor type 22) και *IL2RA* (Interleukin-2 Receptor Alpha chain). Διάφοροι περιβαλλοντικοί παράγοντες έχουν ακόμη ενοχοποιηθεί ότι συμμετέχουν στην παθογένεια της νόσου, και στους οποίους περιλαμβάνονται κυρίως μολύνσεις από την οικογένεια των ιών *picorna*, λόγω της αυξημένης συχνότητας εμφάνισής τους στα νεοδιαγνωσθέντα άτομα με ΣΔτ1, σε σύγκριση με το γενικό πληθυσμό (23, 24).

Ο **Λανθάνων Αυτοάνοσος Διαβήτης των Ενηλίκων (Latent Autoimmune Diabetes in Adults-LADA)**, αποτελεί μια κοινή υποομάδα διαταραχών που είναι υπεύθυνη για το 7% των ασθενών με ΣΔ στην Ευρώπη. Όπως και στη περίπτωση του ΣΔτ1, οι ασθενείς με ΣΔ τύπου LADA χαρακτηρίζονται από την παρουσία αυτοαντισωμάτων GAD αν και η εμφάνισή του παρατηρείται μετά την ηλικία των 35 χρόνων. Οι ασθενείς με υψηλό τίτλο αντισωμάτων GAD προσομοιάζουν φαινοτυπικά με τους ασθενείς με ΣΔτ1, ενώ αντίστοιχα ασθενείς με χαμηλό τίτλο αντισωμάτων παρουσιάζουν φαινότυπο παρόμοιο με εκείνο των ασθενών με ΣΔ τύπου 2 (25). Και στην περίπτωση του ΣΔ τύπου LADA, το οικογενειακό ιστορικό συνεισφέρει σε μεγάλο βαθμό στον κίνδυνο εμφάνισης της νόσου, επιβεβαιώνοντας την εμπλοκή των γενετικών παραγόντων στην παθογένεια της νόσου (26).

Ο **Οψίμου Έναρξης Διαβήτης των Νέων (Maturity Onset-Diabetes of the Young-MODY)** αποτελεί μια μονογονιδιακή μορφή διαβήτη με καλά έως τώρα χαρακτηρισμένες μεταλλάξεις σε περισσότερους από 10 γενετικούς τόπους, με τον αριθμό αυτό να αυξάνεται συνεχώς. Ο ΣΔ τύπου MODY χαρακτηρίζεται από αυτοσωμική επικρατή κληρονομικότητα και εμφανίζεται συνήθως πριν τα 25 έτη ζωής. Μέχρι σήμερα έχουν καταγραφεί περισσότερες από 200 μεταλλάξεις στα γονίδια *GCK* (Glucokinase) (MODY2) και *HNF1A* (Hepatocyte nuclear factor 1 homeobox A) (MODY3), τα οποία αποτελούν και τα πιο συχνά απαντώμενα αλληλόμορφα στην εμφάνιση του διαβήτη τύπου MODY (27, 28). Είναι γνωστό σήμερα ότι αρκετοί πολυμορφισμοί στα γονίδια που συνδέονται με το MODY μπορούν να συμμετέχουν και στον κίνδυνο εμφάνισης του ΣΔ τύπου 2, συμπεριλαμβανομένων των γονιδίων *HNF1A* (Hepatocyte nuclear factor 1 homeobox A), *HNF4A* (Hepatocyte nuclear factor 4 alpha), *HNF1B* (Hepatocyte nuclear factor 1 homeobox B), *GCK* (Glucokinase) και *PDX1* (Pancreatic Duodenal homeobox 1), επισημαίνοντας τους κοινούς υποκείμενους μηχανισμούς που εμφανίζουν οι δύο αυτοί τύποι ΣΔ (28). Αδιαμφισβήτητα σήμερα, η εξέλιξη των τεχνολογιών αλληλούχησης νέας γενιάς έχει καταστήσει εύκολη και γρήγορη τη διάγνωση του ΣΔ τύπου MODY, επιτρέποντας την έγκαιρη ανίχνευση των μεταλλάξεων και συνεπώς τη καλύτερη δυνατή αντιμετώπισή του (29).

Ο **Μητρικός Κληρονομούμενος Διαβήτης (Maternally Inherited Diabetes and Deafness-MIDD)**, ο οποίος προκαλεί κώφωση, οφείλεται στη μεταλλαγή A3242G του μιτοχονδριακού DNA. Δεδομένου ότι το μιτοχονδριακό DNA κληρονομείται μόνο από τη μητέρα, ο ΣΔ τύπου MIDD παρουσιάζει μητρική κληρονομικότητα. Επιπρόσθετα με την απώλεια της ακοής, πολλοί ασθενείς εμφανίζουν νευρολογικά προβλήματα, παρόμοια με εκείνα των ασθενών με σύνδρομο MELAS (μιτοχονδριακή μυοπάθεια, εγκεφαλοπάθεια, γαλακτική οξέωση και εγκεφαλικά επεισόδια), το οποίο επίσης προκαλείται από την ίδια μετάλλαξη στο μιτοχονδριακό DNA (30).

Ο **Νεογνικός Σακχαρώδης Διαβήτης (ΝΣΔ)** εμφανίζεται αμέσως μετά τη γέννηση ή μέχρι τους πρώτους 6 μήνες ζωής και χαρακτηρίζεται από παροδικές και μόνιμες μορφές της νόσου. Πολλές μεταλλάξεις σε αρκετά γονίδια συμπεριλαμβανομένων των *KCNJ11* (Potassium voltage-gated channel subfamily J member 11), *ABCC8* (ATP-binding cassette transporter subfamily C member 8), *GCK* (Glucocinase) και *INS* (Insulin) έχουν ενοχοποιηθεί για την εμφάνιση του συγκεκριμένου τύπου ΣΔ, ενώ η έγκαιρη γενετική ταυτοποίηση των μεταλλάξεων των γονιδίων είναι και στη περίπτωση αυτή, προαπαιτούμενη για την καλύτερη δυνατή αντιμετώπιση της νόσου. Οι σοβαρότερες επιπλοκές της νόσου, οι οποίες συνδυάζονται με αναπτυξιακές δυσκολίες, σχετίζονται με μεταλλάξεις του γονιδίου *KCNJ11*, και μπορούν να προληφθούν με την έγκαιρη διάγνωση και αντιμετώπιση (31).

Ο **Σακχαρώδης Διαβήτης Κύησης (Gestational Diabetes Mellitus-GDM)** αποτελεί μια παροδική μορφή ΣΔ, η οποία χαρακτηρίζεται από υπεργλυκαιμία κατά τη διάρκεια της κύησης ενώ τα επίπεδα της γλυκόζης επανέρχονται στα φυσιολογικά επίπεδα συνήθως αμέσως μετά τη γέννηση του νεογνού. Πολλά γενετικά αλληλόμορφα που έχουν ενοχοποιηθεί για την εμφάνιση του ΣΔ κύησης φαίνεται πως εμπλέκονται και στην εμφάνιση του ΣΔ τύπου 2, γεγονός που μπορεί να δικαιολογήσει και την αυξημένη πιθανότητα των γυναικών με ΣΔ κύησης να εκδηλώσουν αργότερα ΣΔ τύπου 2 (32-34). Παρά την αναστρέψιμη κατάσταση της νόσου, φαίνεται πως γυναίκες με διαβήτη κύησης έχουν αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης δυσμενών συνθηκών για το έμβρυο, όπως νεογνικό υπερινσουλινισμό ή ακόμη και νεογνά με μακροσωμία (35).

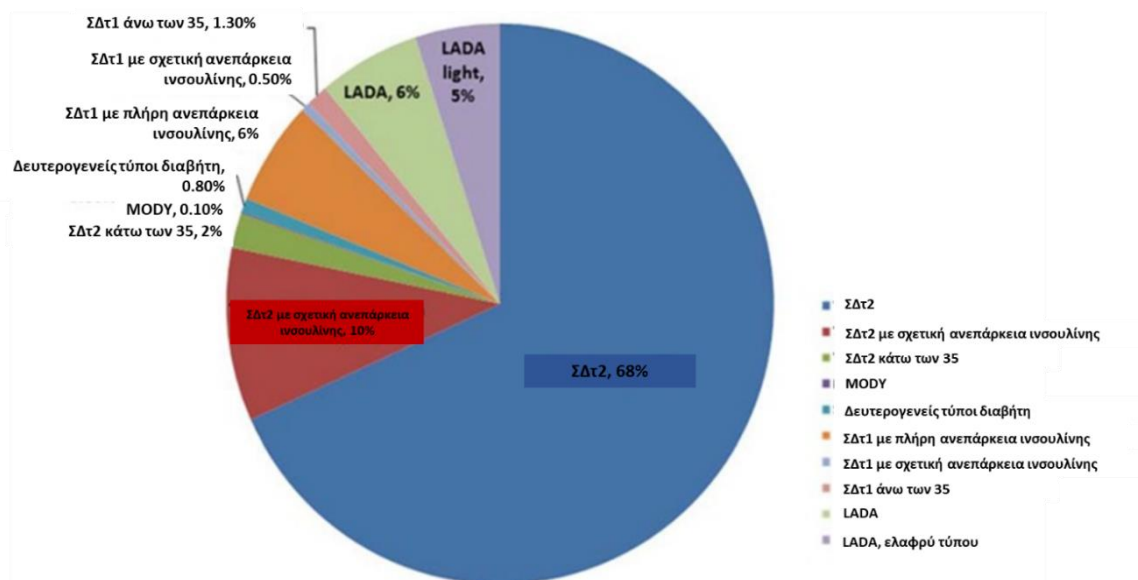
Ο **Σακχαρώδης Διαβήτης τύπου 2 (ΣΔτ2)** είναι μια χρόνια πολυπαραγοντική μεταβολική διαταραχή που χαρακτηρίζεται από διαταραχές στους μηχανισμούς έκκρισης της ινσουλίνης σε συνδυασμό με τη μειωμένη ευαισθησία των περιφερικών ιστών (μύες, λιπώδης ιστός, ήπαρ) στη δράση της, μια κατάσταση γνωστή ως ινσουλινοαντίσταση. Αποτελεί τον πιο συχνά απαντώμενο τύπο ΣΔ (>90%) και η εμφάνισή του θεωρείται αποτέλεσμα αλληλεπίδρασης γενετικών, επιγενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων, συμπεριλαμβανομένου του οικογενειακού ιστορικού, του ΣΔ κύησης, της ηλικίας, του φύλου, της κεντρικής παχυσαρκίας, της έλλειψης σωματικής δραστηριότητας, του καπνίσματος, της διατροφής, της εθνικότητας, της αυξημένης πίεσης του αίματος, της δυσλιπιδαιμίας, του στρες αλλά και της χορήγησης συγκεκριμένων φαρμάκων (36, 37).

Τα συμπτώματα της νόσου είναι πανομοιότυπα με εκείνα του ΣΔτ1 και μεταξύ άλλων περιλαμβάνουν: πολυδιψία, πολουρία, κόπωση, θολή όραση καθώς και αργή επούλωση τραυμάτων. Παρόλα αυτά, η εξέλιξη της νόσου είναι αργή, σε σύγκριση με το ΣΔτ1, ενώ πολλές φορές η έναρξή της είναι δύσκολο να καθοριστεί. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα οι ασθενείς με ΣΔτ2

να παραμένουν αδιάγνωστοι αφού σχεδόν οι μισοί από τους ασθενείς παραμένουν ασυμπτωματικοί για μεγάλα χρονικά διαστήματα. Οι περισσότεροι μάλιστα από τους ασθενείς διαγιγνώσκονται με τη νόσο λόγω κάποιας άλλης μικρο- ή μακρο αγγειακής επιπλοκής, ως αποτέλεσμα της χρόνιας υπεργλυκαιμίας.

Η διάγνωση του ΣΔτ2 επιτυγχάνεται αρχικά διαμέσου της τυχαίας μέτρησης της γλυκόζης στο αίμα, η οποία φυσιολογικά δεν πρέπει να ξεπερνά τα 110 mg/dl, της επάκολουθης μέτρησής της μετά από 8 ώρες νηστείας καθώς και από τον μετέπειτα έλεγχο της απόκρισης του οργανισμού στην εξωγενή χορήγηση γλυκόζης (δοκιμασία ανοχής στη γλυκόζη) (38). Ο βαθμός της υπεργλυκαιμίας, κύριο χαρακτηριστικό της νόσου, μεταβάλλεται συνεχώς, ποικίλει και καθορίζει την εξέλιξη και τις επιπτώσεις της νόσου, καθιστώντας απαραίτητο το συνεχή έλεγχο του γλυκαιμικού δείκτη των ασθενών. Σημαντικός δείκτης του βαθμού της υπεργλυκαιμίας, μέχρι και σήμερα, αποτελεί η συγκέντρωση των γλυκιωμένων πρωτεϊνών, η οποία αντικατοπτρίζει τη μακροχρόνια έκθεση του οργανισμού στα μόρια της γλυκόζης και παρέχει σημαντικές πληροφορίες σχετικά με τα επίπεδα και τη διάρκεια της υπεργλυκαιμίας (38). Ο σημαντικότερος αναδρομικός δείκτης για τον υπολογισμό της μέσης συγκέντρωσης γλυκόζης στο αίμα αλλά και προγνωστικός δείκτης για τον μελλοντικό κίνδυνο εμφάνισης αγγειακών επιπλοκών αποτελεί η γλυκιωμένη αιμοσφαιρίνη, Hb1Ac, που φυσιολογικά δε πρέπει να ξεπερνά το 6,5% (39).

Η έγκαιρη αντιμετώπιση της νόσου έχει ως στόχο τη διατήρηση της ομοιόστασης της γλυκόζης στα φυσιολογικά επιτρεπτά όρια για όσο το δυνατόν μεγαλύτερο χρονικό διάστημα από τη στιγμή της διάγνωσης της νόσου, αποτρέποντας ή/και καθυστερώντας την ανάπτυξη επιπλοκών. Σήμερα για την αντιμετώπιση της νόσου χρησιμοποιείται μια ευρεία γκάμα αντιδιαβητικών φαρμάκων, τα οποία δρουν αυξάνοντας την ευαισθησία των ιστών στην ινσουλίνη (διγουανίδες, θειαζολιδινεδιόνες- μη εκκριταγωγά) (40, 41), ενισχύοντας την έκκριση της ινσουλίνης από το πάγκρεας (σουλφονουλourίες, μεγλιτινίδες- εκκριταγωγά) (42) ή επιβραδύνοντας τη διάσπαση των υδατανθράκων της τροφής (αναστολείς της α-γλυκοσιδάσης) (43), ενώ σε ορισμένες περιπτώσεις χορηγείται και εξωγενώς ινσουλίνη ή ανάλογα αυτής. Ιδιαίτερη παρακολούθηση και αντιμετώπιση χρήζουν, επιπλέον, οι προ-διαβητικοί ασθενείς, οι οποίοι χαρακτηρίζονται από οριακά υψηλά επίπεδα γλυκόζης πλάσματος ή/και από μη φυσιολογική απόκριση του οργανισμού στην εξωγενή χορήγηση γλυκόζης, χωρίς όμως να πληρούν τα υπόλοιπα απαραίτητα κριτήρια διάγνωσης της νόσου. Στις περιπτώσεις αυτές, η γλυκαιμική ρύθμιση είναι αναγκαία για την παρακολούθηση της εξέλιξης της νόσου και επιτυγχάνεται μέσω της απώλειας βάρους, της άσκησης ή της χορήγησης ήπιων αντιδιαβητικών φαρμάκων με σκοπό τη διατήρηση των επιπέδων της γλυκόζης στα φυσιολογικά επίπεδα (38).



Εικόνα 1.3: Το ευρύ φάσμα των τύπων του Διαβήτη. Τα δεδομένα συλλέχθηκαν από το πρόγραμμα ANDIS (All New Diabetics in Scania) (<http://andis.ludc.med.lu.se>) τον Απρίλιο του 2012 και περιελάμβανε 5800 νεο-διαγνωσθέντες διαβητικούς ασθενείς, ηλικίας 0-100 ετών. Τα κριτήρια που χρησιμοποιήθηκαν για τη διάγνωση και την κατηγοριοποίηση των ασθενών ήταν τα ακόλουθα: ΣΔτ1: ηλικία έναρξης κάτω των 35 ετών, πεπτιδίο- C <0.2nmol/L και αντισώματα GAD >20, ΣΔτ1 με σχετική ανεπάρκεια ινσουλίνης: εάν πεπτιδίο- C ήταν 0.2–0.6 nmol/L. ΣΔτ2: ηλικία έναρξης άνω των 35 ετών, πεπτιδίο- C >0.6 nmol/L, αντισώματα GAD <10, ΣΔτ2 με σχετική ανεπάρκεια ινσουλίνης εάν πεπτιδίο- C 0.2–0.6 nmol/L. LADA (latent autoimmune diabetes in adults): ηλικία έναρξης άνω των 5 ετών, αντισώματα GAD >20, LADA ελαφρού τύπου εάν αντισώματα GAD 10–20. Τα παραπάνω δεδομένα επιβεβαιώνουν τη δυσκολία ταξινόμησης των διαβητικών ασθενών, δεδομένου ότι το 19% από αυτούς δεν ανήκει σε καμία από τις παραπάνω κατηγορίες. *Ανατύπωση από τους Prasad RB, Genes (Basel). 2015;6(1):87-123* (20).

Αδιαμφισβήτητα, ο ΣΔτ2 αποτελεί μια περίπλοκη, χρόνια διαταραχή που απαιτεί συνεχή ιατρική φροντίδα, συμμόρφωση του ασθενούς για τον έλεγχο του γλυκαιμικού δείκτη καθώς και ανάπτυξη πολυπαραγοντικών στρατηγικών για τη ρύθμιση των επιπέδων της γλυκόζης στο αίμα, των λιπιδίων και της πίεσης (44). Ο ΣΔτ2 θα πρέπει να αντιμετωπίζεται ως μια ετερογενής διαταραχή, στην οποία εμπλέκονται πολλοί παθοφυσιολογικοί μηχανισμοί, με ποικίλου βαθμού επιπλοκές και απόκριση στη θεραπευτική αγωγή. Αδιαμφισβήτητα, η αποτελεσματική και στοχευμένη θεραπεία της νόσου απαιτεί αρχικά τον καθορισμό της μοριακής της αιτιολογίας καθώς και ειδικές προσεγγίσεις για την αντιμετώπιση της παχυσαρκίας, που αποτελεί έναν από τους πιο σημαντικούς προδιαθεσικούς δείκτες εμφάνισης της νόσου (37). Παρά τη μεγάλη πρόοδο που υπάρχει τα τελευταία χρόνια στους τομείς της διάγνωσης και του τρόπου αντιμετώπισης της νόσου, υπάρχουν ακόμη αρκετά ζητήματα τα οποία χρήζουν διερεύνησης, ώστε να αναπτυχθούν αποτελεσματικές στρατηγικές για την πρόληψη ή/και την εξατομικευμένη θεραπεία της νόσου.

1.6 Παθοφυσιολογία Σακχαρώδους Διαβήτη τύπου 2

Η αντίσταση των ιστών στην ινσουλίνη θεωρείται η πρωταρχική αιτία για την εμφάνιση ΣΔτ2 και μάλιστα προϋπάρχει αρκετά χρόνια πριν την εξέλιξη της νόσου. Αποτελεί μια κατάσταση η οποία χαρακτηρίζεται από μειωμένη ευαισθησία των ιστών στην ινσουλίνη, κυρίως λόγω της αναστολής του σηματοδοτικού μονοπατιού δράσης της ορμόνης. Παρουσιάζεται όχι μόνο στους μύες, στο ήπαρ και το λιπώδη ιστό αλλά και στα νεφρά (45), στον εγκέφαλο (46), στο γαστρεντερικό (47), στο αγγειακό σύστημα (48) καθώς και στο πάγκρεας (37, 49, 50). Η ινσουλινοαντίσταση οδηγεί συχνά σε υπερινσουλιναίμια, λόγω της αντιστάθμισης των β κυττάρων να εκκρίνουν μεγάλες ποσότητες ινσουλίνης με σκοπό την κάλυψη των αναγκών των περιφερικών ιστών σε γλυκόζη. Έτσι, σε αντίθεση με το ΣΔτ1, όπου οι ασθενείς αντιμετωπίζουν καταστάσεις υπεργλυκαιμίας και υποϊνσουλιναίμιας, οι ασθενείς με ΣΔτ2 αντιμετωπίζουν συχνά καταστάσεις υπεργλυκαιμίας και υπερινσουλιναίμιας.

Σε μοριακό επίπεδο, η ινσουλινοαντίσταση είναι αποτέλεσμα της αναστολής του σηματοδοτικού μονοπατιού δράσης της ορμόνης κυρίως λόγω της φωσφορυλίωσης των πρωτεϊνών IRS σε θέσεις σερίνης, αντί για θέσεις τυροσίνης, διαδικασία η οποία επάγει την αποικοδόμηση των αντίστοιχων υποστρωμάτων και τελικά την αδυναμία πρόσληψης της γλυκόζης από τους περιφερικούς ιστούς (51). Μια πληθώρα παραγόντων έχει δειχθεί ότι εμπλέκονται στην ανάπτυξη της ινσουλινοαντίστασης και περιλαμβάνουν την παχυσαρκία, τη φλεγμονή, τη μιτοχονδριακή δυσλειτουργία, την υπερινσουλιναίμια, την υπερλιπιδαιμία, το γενετικό υπόβαθρο, το στρες του ενδοπλασματικού δικτύου, την ηλικία, το οξειδωτικό στρες, το λιπώδες ήπαρ, την υποξία και την κύηση (50, 52).

Η αδυναμία πρόσληψης της γλυκόζης από τους περιφερικούς ιστούς επάγει τελικά, μέσω ποικίλων μηχανισμών, την εγκαθίδρυση της υπεργλυκαιμίας. Στο ήπαρ, η ινσουλινοαντίσταση προκαλεί την αύξηση της γλυκονεογένεσης, ενώ στο λιπώδη ιστό επάγει την αύξηση της λιπόλυσης. Ταυτόχρονα, η αυξημένη επαναρρόφηση της γλυκόζης από τα νεφρά συνεισφέρει με τη σειρά της στη διατήρηση της υπεργλυκαιμίας. Από την άλλη πλευρά, η αντίσταση των ιστών στις κατασταλτικές επιδράσεις της ινσουλίνης, της λεπτίνης, των ινκρετινών και της αμυλίνης σε συνδυασμό με τα μειωμένα επίπεδα της ντοπαμίνης και τα αυξημένα επίπεδα της σεροτονίνης από τον εγκέφαλο επιδεινώνουν την υποκείμενη ινσουλινοαντίσταση και οδηγούν στην υπεργλυκαιμία. Επιπλέον, σε όλο αυτό το πολύπλοκο δίκτυο αλληλεπίδρασης θα πρέπει να προστεθεί και η ινσουλινοαντίσταση του αγγειακού ενδοθηλίου που οδηγεί στη μείωση των αγγειοδιασταλτικών δράσεων της ινσουλίνης (37).

Η χρόνια υπεργλυκαιμία αποτελεί το κύριο χαρακτηριστικό του ΣΔ, όμως η τοξικότητα της γλυκόζης είναι εκείνη που θεωρείται υπεύθυνη τόσο για την ανάπτυξη των διαβητικών

επιπλοκών όσο και για την ενεργοποίηση των μηχανισμών απόπτωσης των β κυττάρων. Πολλοί μηχανισμοί και σηματοδοτικά μονοπάτια ενεργοποιούνται παρουσία συνθηκών γλυκοτοξικότητας και λιποτοξικότητας και περιλαμβάνουν τη μιτοχονδριακή δυσλειτουργία, την αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών οξυγόνου (ROS) και οξειδωτικού στρες, την αυξημένη γλυκοζυλίωση των πρωτεϊνών (AGEs), το ενδοπλασματικό στρες, την ενεργοποίηση φλεγμονωδών αποκρίσεων καθώς και την τοξική συσσώρευση του αμυλοειδούς πολυπεπτιδίου στις παγκρεατικές νησίδες, συνεισφέροντας συνολικά στην ανάπτυξη επιπλοκών αλλά και στη β κυτταρική αποδιαφοροποίηση και απόπτωση (37, 53, 54).

1.7 Γενετική βάση Σακχαρώδους Διαβήτη τύπου 2

Σήμερα είναι γνωστό ότι ο ΣΔτ2 εμφανίζει υψηλού βαθμού κληρονομικότητα και ο κίνδυνος εμφάνισής του καθορίζεται κυρίως από τη γενετική προδιάθεση. Επιδημιολογικές μελέτες έχουν δείξει ότι η πιθανότητα εμφάνισης ΣΔτ2 στο γενικό πληθυσμό είναι 40% για άτομα που έχουν έναν γονέα που νοσεί και σχεδόν 70% όταν πάσχουν και οι δύο γονείς (55). Επιπλέον, η πιθανότητα εμφάνισης της νόσου είναι 70% στη περίπτωση των μονοζυγωτικών διδύμων και μόλις 20%-30% στη περίπτωση των διζυγωτικών (56). Εκτεταμένες μελέτες στο γενικό πληθυσμό, σε οικογένειες με ιστορικό για τη νόσο αλλά και σε δίδυμα αδέρφια έχουν καταφέρει να ταυτοποιήσουν αρκετά γονίδια, τα οποία μπορούν να συνεισφέρουν στον κίνδυνο εμφάνισης της νόσου, με απώτερο στόχο την κατανόηση της παθογένειάς της αλλά και την εύρεση νέων μορίων- στόχων για την κλινική θεραπεία αλλά και την πρόγνωση του ΣΔτ2.

1.7.1 Τρόποι ταυτοποίησης γονιδίων που εμπλέκονται στον αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης Σακχαρώδους Διαβήτη τύπου 2

1.7.1.1 Μελέτες σύνδεσης

Οι μελέτες σύνδεσης αποτελούν μια παραδοσιακή μέθοδο για τη χαρτογράφηση γονιδίων που εμπλέκονται στην εμφάνιση ασθενειών. Οι μελέτες αυτές εκμεταλλεύονται την τάση των γονιδίων καθώς και άλλων γενετικών δεικτών να συνκληρονομούνται μαζί εξαιτίας της κοντινής γεινιάσής τους στο ίδιο χρωμόσωμα. Παρόλο που οι μελέτες σύνδεσης βασίζονται σε μια απλή βασική αρχή, η διακριτική ικανότητα διαχωρισμού είναι αρκετά χαμηλή καθώς λίγοι γενετικοί δείκτες είναι αναγνωρισμένοι κατά μήκος του γονιδιώματος ενώ οι περιοχές που ταυτοποιούνται από τέτοιου είδους μελέτες περιλαμβάνουν χιλιάδες βάσεις και εκατοντάδες γονίδια. Τέτοιου είδους μελέτες επιτυγχάνουν κυρίως την ανίχνευση αιτιωδών γονιδίων μεγάλης επίδρασης που είναι υπεύθυνα για την εμφάνιση μονογονιδιακών νοσημάτων, όπως ο διαβήτης τύπου MODY. Μόνο δύο υποψήφια γονίδια κινδύνου για την

εμφάνιση ΣΔτ2 έχουν καταφέρει να ταυτοποιηθούν από τις μελέτες σύνδεσης και αφορούν το *CAPN10* (Calpain 10) και το *TCF7L2* (Transcription factor 7-like 2).

CAPN10: Το γονίδιο *CAPN10* κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη κυστεΐνης, εδράζεται στο χρωμόσωμα 2 και αποτελεί μέλος της οικογένειας των καλπαϊνών, μιας μεγάλης οικογένειας που περιλαμβάνει γονίδια συνεχούς και σταθερής έκφρασης με πολλαπλούς ρόλους στην ενδοκυτταρική διαμόρφωση, στη σηματοδότηση αλλά και σε πολλές ακόμη ενδοκυτταρικές λειτουργίες. Αποτελεί το πρώτο γονίδιο το οποίο ενοχοποιήθηκε για τον αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης ΣΔτ2 μέσα από τέτοιου είδους μελέτες (57, 58). Μέχρι αυτή τη στιγμή, ο ακριβής ρόλος της καλπαΐνης στο μεταβολισμό της γλυκόζης παραμένει υπό διερεύνηση, όπως και η σύνδεσή της με την εμφάνιση του ΣΔτ2 αν και η εμπλοκή της στην εμφάνιση της νόσου, μέσω συγκεκριμένων πολυμορφισμών, είναι πλέον επιβεβαιωμένη και μελετημένη σε πολλούς και διαφορετικούς πληθυσμούς (59-61). Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι η παραπάνω καλπαΐνη έχει σημαντικό ρόλο στους μηχανισμούς εξωκύττωσης και συνεπώς πιθανολογείται ότι οι SNPs του γονιδίου της μπορούν να επηρεάζουν τόσο την έκκριση της ινσουλίνης όσο και τη μετατόπιση του μεταφορέα GLUT4 στην πλασματική μεμβράνη των περιφερικών ιστών (62).

TCF7L2: Το γονίδιο *TCF7L2* αποτελεί το πιο ισχυρά συσχετιζόμενο γονίδιο για την εμφάνιση ΣΔτ2 μέχρι σήμερα. Η εμπλοκή του αυτή αρχικά ταυτοποιήθηκε μέσα από μελέτες σύνδεσης αλλά στη συνέχεια ισχυροποιήθηκε και από πολλές άλλες μελέτες. Συγκεκριμένα αλληλόμορφα του γονιδίου (rs7903146, rs12255372, rs11196205, rs7901695, rs7895340 και rs4506565) έχουν συσχετισθεί με 1.2-1.4 φορές υψηλότερο κίνδυνο εμφάνισης ΣΔτ2 σε σύγκριση με το φυσιολογικού τύπου αλληλόμορφο (63-65). Το γονίδιο *TCF7L2* κωδικοποιεί ένα μεταγραφικό παράγοντα, ο οποίος αποτελεί μέλος του μονοπατιού σηματοδότησης Wnt και το οποίο, όπως είναι μέχρι σήμερα γνωστό, είναι σημαντικό για την ανάπτυξη των β κυττάρων του παγκρέατος. Μελέτες έχουν δείξει ότι ο πολυμορφισμός rs7903146 του T-αλληλομόρφου οδηγεί σε αύξηση των επιπέδων της αντίστοιχης πρωτεΐνης στα β κύτταρα, προκαλώντας διαταραχές στους μηχανισμούς έκκρισης της ινσουλίνης και των ινκρετινών καθώς και στο ρυθμό σύνθεσης της ηπατικής γλυκόζης (66). Τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου στις ανθρώπινες παγκρεατικές νησίδες από ομοζυγώτες διαβητικούς ασθενείς για τα συγκεκριμένα αλληλόμορφα κινδύνου, βρέθηκαν 5 φορές αυξημένα σε σχέση με τα φυσιολογικά ενώ η υπερέκφραση του γονιδίου φαίνεται πως οδηγεί σε μείωση, της επαγόμενης από τη γλυκόζη, έκκρισης ινσουλίνης. Τα παραπάνω ευρήματα πιθανολογούν ότι ο πολυμορφισμός rs7903146 του γονιδίου *TCF7L2* εμπλέκεται στην ανάπτυξη του ΣΔτ2 επηρεάζοντας τη δράση των ινκρετινών, οι οποίες εκκρίνονται από τα εντερικά κύτταρα, ως απόκριση στα υψηλά επίπεδα της γλυκόζης, και

συμμετέχουν στη ρύθμιση της έκκρισης της ινσουλίνης (67, 68). Άλλα δεδομένα υποστηρίζουν ότι ο παραπάνω SNP επηρεάζει το εναλλακτικό μάτισμα του γονιδίου, δημιουργώντας διαφορετικές πρωτεϊνικές ισομορφές στους ιστούς (λιπώδης ιστός και ήπατος), οι οποίες με τη σειρά τους επηρεάζουν την απόκριση του εκάστοτε ιστού στην ινσουλίνη (69-71). Τέλος, μελέτες έχουν αποδείξει και την εμπλοκή του *TCF7L2* στην καρκινογένεση, οδηγώντας στην ταυτοποίηση άγνωστων μέχρι σήμερα παθοφυσιολογικών μηχανισμών που πιθανόν μπορούν να συμμετέχουν στα κοινά μονοπάτια των δύο ασθενειών (72, 73).

1.7.1.2 Μελέτες που στηρίζονται στη διερεύνηση γονιδίων που θεωρούνται πιθανόν να εμπλέκονται στον αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης Σακχαρώδους Διαβήτη τύπου 2 λόγω της λειτουργίας τους

Αυτού του τύπου οι μελέτες στηρίζονται στη διερεύνηση γονιδίων που θεωρούνται πιθανόν να εμπλέκονται στην παθογένεια της νόσου λόγω της λειτουργίας τους, συμπεριλαμβανομένης της εμπλοκής τους στο μεταβολισμό της γλυκόζης, στην έκκριση και στο σηματοδοτικό μονοπάτι δράσης της ινσουλίνης καθώς και στο μεταβολισμό των λιπιδίων. Το μειονέκτημα των παραπάνω μελετών είναι ότι υστερούν στην ταυτοποίηση καινούργιων γονιδίων που πιθανόν, μέσω δευτερογενών μηχανισμών, μπορούν να εμπλέκονται στην εμφάνιση της νόσου. Παρόλο βέβαια που οι μελέτες αυτές έχουν καταφέρει να συσχετίσουν αρκετά γονίδια κινδύνου με την εμφάνιση ΣΔτ2, φαίνεται πως πολλά από αυτά δεν επιβεβαιώνονται από μεταγενέστερες μελέτες σε άλλους πληθυσμούς, κυρίως λόγω της έλλειψης στατιστικής σημαντικότητας που έχουν οι συγκεκριμένες μελέτες. Από τις μελέτες αυτές έχουν προκύψει τα παρακάτω γονίδια συσχέτισης με τον αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης ΣΔτ2: *PPARG* (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma), τα υποστρώματα *IRS1* (Insulin receptor substrate 1) και *IRS2* (Insulin receptor substrate 2), το κανάλι *KCNJ11* (Potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 11), το *WFS1* (Wolfram syndrome 1), το *HNF1A* (Hepatocyte nuclear factor 1 homeobox A), το *HNF1B* (Hepatocyte nuclear factor 1 homeobox B) και το *HNF4A* (Hepatocyte nuclear factor 4 alpha).

PPARG: Το γονίδιο *PPARG* κωδικοποιεί τον πυρηνικό υποδοχέα τύπου II PPAR-γ, που εκφράζεται κατά κύριο λόγο στο λιπώδη ιστό και εμπλέκεται στη ρύθμιση του μεταβολισμού των λιπιδίων. Εμφανίζει σήμερα ιδιαίτερο ερευνητικό ενδιαφέρον τόσο ως μοριακός στόχος των θειαζολιδινεδιονών, μιας κατηγορίας αντιδιαβητικών φαρμάκων, όσο και για την εμπλοκή του στον κίνδυνο εμφάνισης της νόσου διαμέσου της εμφάνισης συγκεκριμένων SNPs (74). Μελέτες έχουν δείξει ότι ο συχνότερος SNP που έχει καταγραφεί στο γονίδιο αυτό αφορά την αντικατάσταση μιας προλίνης από αργινίνη στη θέση 12 της πρωτεΐνης (Pro12Arg) η οποία

σχετίζεται με 20% αύξηση του κινδύνου εμφάνισης της νόσου σε σύγκριση με τη φυσικού τύπου πρωτεΐνη (75). Η εμπλοκή του γονιδίου στην παθογένεια του ΣΔτ2 είναι σήμερα αποδεδειγμένη μέσα από πολλές μελέτες σε πληθυσμούς διαφορετικών εθνικοτήτων ενώ ταυτόχρονα αρκετοί ακόμη SNPs του γονιδίου έχουν καταγραφεί και ενοχοποιηθεί ότι διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στην εμφάνιση της νόσου, με μικρότερη όμως επαναληψιμότητα και συνεισφορά (76).

IRS1 και IRS2: Τα γονίδια *IRS1* και *IRS2* κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες/υποστρώματα του υποδοχέα της ινσουλίνης INSR και έχουν καθοριστικό ρόλο στη μεταγωγή σήματος από τον υποδοχέα στα ενδοκυτταρικά σηματοδοτικά μονοπάτια του μονοπατιού δράσης της ορμόνης. Η φωσφορυλίωσή τους στις θέσεις τυροσίνης αποτελεί κομβικό σημείο του καταρράκτη αντιδράσεων που καταλήγει στη μετατόπιση του υποδοχέα GLUT4 για την -επαγόμενη από την ινσουλίνη- πρόσληψη της γλυκόζης. Διάφοροι SNPs στα γονίδια αυτά, με κυριότερο την αντικατάσταση της γλυκίνης από αργινίνη στη θέση 972 (Gly972Arg) της πρωτεΐνης *IRS1*, έχουν συσχετισθεί με μειωμένη ευαισθησία στην ινσουλίνη και αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης ΣΔτ2 (77).

KCNJ11: Το γονίδιο *KCNJ11* κωδικοποιεί την υπομονάδα Kir6.2 που σε συνδυασμό με τις υπομονάδες Sur1 (Sulfonylurea receptor 1), που κωδικοποιούνται από το γονίδιο *ABCC8*, οργανώνουν το ATP-εξαρτώμενο κανάλι καλίου. Το κανάλι αυτό συμμετέχει στη ρύθμιση του μεμβρανικού δυναμικού και διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στην έκκριση της ινσουλίνης από τα β κύτταρα. Συγκεκριμένα αλληλόμορφα των δύο αυτών γονιδίων έχουν ενοχοποιηθεί κυρίως για την εμφάνιση του νεογνικού διαβήτη αν και σήμερα προσελκύουν το ερευνητικό ενδιαφέρον και για τη μελέτη της εμπλοκής τους στην εμφάνιση ΣΔτ2. Ο πιο συχνός και με μεγαλύτερες επιπτώσεις SNP του γονιδίου *KCNJ11* αφορά την αντικατάσταση του γλουταμινικού οξέος στη θέση 32 της πρωτεΐνης από λυσίνη (Glu23Lys) και μπορεί να αυξάνει τον κίνδυνο εμφάνισης της νόσου 1.2 φορές συγκριτικά με τη φυσιολογικού τύπου πρωτεΐνη (78, 79).

WFS1: Το γονίδιο *WFS1* κωδικοποιεί τη βολφραμίνη, μια μεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη, η οποία συμμετέχει στη ρύθμιση της ομοιόστασης του ασβεστίου στο ενδοπλασματικό δίκτυο (80). Συγκεκριμένες μεταλλάξεις του γονιδίου οδηγούν στο σύνδρομο Wolfram, το οποίο χαρακτηρίζεται από νεανικό διαβήτη, οπτική ατροφία και κώφωση. Δεδομένου ότι η πρωτεΐνη αυτή είναι απαραίτητη για την επιβίωση και τη λειτουργία των β κυττάρων, αρκετοί SNPs και στο γονίδιο αυτό έχουν συσχετισθεί με τον κίνδυνο εμφάνισης ΣΔτ2 (81, 82).

HNF1A, HNF1B και **HNF4A**: Τα γονίδια αυτά είναι γνωστά ως γονίδια MODY, γιατί συγκεκριμένες μεταλλάξεις σε αυτά σχετίζονται με την εμφάνιση του μονογονιδιακού νεανικού διαβήτη. Τα γονίδια αυτά κωδικοποιούν μεταγραφικούς παράγοντες που διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στην ανάπτυξη του ήπατος, στη ρύθμιση των ηπατικών μεταβολικών λειτουργιών καθώς και στην ανάπτυξη και τη λειτουργία των β κυττάρων. Συγκεκριμένα αλληλόμορφα των γονιδίων αυτών που δεν οδηγούν στην ανάπτυξη διαβήτη MODY, έχει βρεθεί ότι σχετίζονται με μειωμένη έκκριση ινσουλίνης και αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης ΣΔτ2 (83).

1.7.1.3 Μελέτες σάρωσης ολόκληρου του γονιδιώματος (Genome Wide Associations Studies-GWAS)

Οι προηγούμενες μελέτες οδήγησαν στην ταυτοποίηση λίγων μόνο γονιδίων που πραγματικά εμπλέκονται στην παθογένεια της νόσου ενώ η γενική τους συνεισφορά στην κληρονομικότητα του ΣΔτ2 παρέμεινε πολύ μικρή, επισημαίνοντας την άμεση ανάγκη για την εύρεση νέων τεχνικών που θα μπορούσαν να οδηγήσουν στην ταυτοποίηση νέων αλληλομόρφων. Η ολοκλήρωση της χαρτογράφησης ολόκληρου του γονιδιώματος και η ανάπτυξη των τεχνολογιών αλληλούχησης νέας γενιάς επέτρεψαν τον έλεγχο εκατοντάδων χιλιάδων SNPs κατά μήκος του γονιδιώματος σε μεγάλους αριθμητικά πληθυσμούς με στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα. Τα δεδομένα αυτά κατέστησαν εφικτές τις μελέτες Σάρωσης Ολόκληρου του Γονιδιώματος (Genome Wide Association Studies-GWAS), οι οποίες αποτελούν μεγάλης κλίμακας μελέτες που διερευνούν τη γενετική ποικιλομορφία κατά μήκος ολόκληρου του ανθρώπινου γονιδιώματος με στόχο τη συσχέτιση συγκεκριμένων πολυμορφισμών με τον αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης μιας νόσου. Με τον τρόπο αυτό, οι μελέτες αυτές έχουν καταφέρει έως σήμερα να επιβεβαιώσουν την εμπλοκή ήδη γνωστών γενετικών τόπων στον κίνδυνο εμφάνισης της νόσου, να ταυτοποιήσουν νέα γενετικά αλληλόμορφα αλλά και να παρέχουν δεδομένα για τη σύνδεση νέων βιολογικών μονοπατιών με την εμφάνιση ΣΔτ2. Έτσι, μέχρι σήμερα, έχουν καταγραφεί συνολικά 144 SNPs σε περισσότερους από 129 γενετικούς τόπους που μπορούν να συνεισφέρουν στον κίνδυνο εμφάνισης της νόσου (84-87). Για το λόγο αυτό, οι μελέτες GWAS θεωρούνται σήμερα οι πλέον κατάλληλες για την ταυτοποίηση αλληλομόρφων που μπορεί να ευθύνονται για την εμφάνιση πολυγονιδιακών νοσημάτων σε διαφορετικούς και μεγάλους αριθμητικά πληθυσμούς. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον εμφανίζουν ακόμη οι μετα-αναλύσεις DIAGRAM (DIAbetes Genetics Replication And Meta-analysis), οι οποίες αναλύουν και ομαδοποιούν προηγούμενα αποτελέσματα από μελέτες GWAS, περιλαμβάνοντας περισσότερα από 50000 άτομα συνολικά

και χρησιμοποιούνται ευρέως σήμερα για την κατανόηση του γενετικού υποβάθρου του ΣΔτ2 (88).

Μερικά από τα πιο σημαντικά γονίδια που έχουν ενοχοποιηθεί, μέχρι σήμερα διαμέσου των μελετών GWAS, με την εμφάνιση του ΣΔτ2 είναι τα παρακάτω:

HHEX (Hematopoietically-expressed homeobox protein): Το γονίδιο *HHEX* εδράζεται στον ίδιο γενετικό τόπο με το *TCF7L2* (10q) και κωδικοποιεί επίσης ένα μεταγραφικό παράγοντα, που διαμέσου του μονοπατιού σηματοδότησης Wnt, εμπλέκεται στην ηπατική και παγκρεατική ανάπτυξη (89). Δεδομένου ότι το γονίδιο *TCF7L2* συνεχίζει να παραμένει ο πιο σημαντικός, μέχρι σήμερα, γενετικός δείκτης για την εμφάνιση ΣΔτ2, το γονίδιο *HHEX* αποτελεί ένα πολλά υποσχόμενο υποψήφιο γονίδιο κινδύνου για την εμφάνιση ΣΔτ2. Μελέτες έχουν δείξει ότι συγκεκριμένοι SNPs του γονιδίου (rs1111875, rs5015480, rs7923837) μπορούν να αυξάνουν την πιθανότητα εμφάνισης ΣΔτ2, μέχρι και 1.5 φορά, συγκριτικά με το φυσιολογικού τύπου αλληλόμορφο, πιθανότατα μέσω της εμπλοκής τους στη β κυτταρική ανάπτυξη και λειτουργία (90).

SLC30A8 (Solute carrier family 30 (zinc transporter), member 8): Το γονίδιο *SLC30A8* εκφράζεται κυρίως στα παγκρεατικά β κύτταρα και κωδικοποιεί το μεταφορέα ψευδαργύρου ZnT8, ο οποίος είναι υπεύθυνος για τη ρύθμιση της ομοιόστασης των ιόντων ψευδαργύρου και συνεπώς για την αποθήκευση της ινσουλίνης στα εκκριτικά κυστίδια (91). Η λειτουργία του αυτή παρέχει έναν προφανή μηχανισμό, με τον οποίο μπορεί το γονίδιο αυτό να εμπλέκεται στην ανάπτυξη ΣΔτ2 ενώ η συσχέτιση συγκεκριμένων SNPs του γονιδίου με την εμφάνιση της νόσου (rs11558471) έχει επιβεβαιωθεί από πολλές μελέτες σε διαφορετικούς πληθυσμούς (92-94).

CDKN2A/B (Cyclin-dependent kinase Inhibitor 2A/B): Οι πρωτεΐνες p16INK4a και p15INK4b κωδικοποιούνται από τα γονίδια *CDKN2A* και *CDKN2B*, αντίστοιχα, τα οποία και εδράζονται στον ίδιο γενετικό τόπο. Αποτελούν δύο ογκοκατασταλτικά γονίδια, δεδομένου ότι αναστέλλουν τις κινάσες CDK4 (Cyclin-dependent kinase 4) και CDK5 (Cyclin-dependent kinase 5), αντίστοιχα, δύο βασικούς ρυθμιστές του πολλαπλασιασμού των παγκρεατικών β κυττάρων. Συγκεκριμένοι SNPs του παραπάνω γενετικού τόπου (rs10811661) έχουν συσχετισθεί με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης ΣΔτ2, δεδομένου ότι μπορούν να αυξάνουν την πιθανότητα εμφάνισης ΣΔτ2 μεταξύ 1.2 και 1.5 φορά, συγκριτικά με το φυσικού τύπου αλληλόμορφο (95). Ο μηχανισμός που τα γονίδια αυτά εμπλέκονται στην παθογένεια της νόσου δεν είναι ακόμη ξεκάθαρος αν και μελέτες υποστηρίζουν ότι πιθανόν εμπλέκονται στη μείωση της β κυτταρικής μάζας και επακόλουθα στη μείωση της έκκρισης της ινσουλίνης (96).

IGF2BP2 (Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 2): Το γονίδιο *IGF2BP2* εκφράζεται κατά κύριο λόγο στις παγκρεατικές νησίδες και ανήκει στην οικογένεια των πρωτεϊνών δέσμευσης στο mRNA. Πιο συγκεκριμένα, δεσμεύεται στη 5' -μη μεταφραζόμενη περιοχή του mRNA του γονιδίου *IGF2* (Insulin-like Growth Factor 2), ρυθμίζοντας τη μετάφρασή του. Έχει σημαντικούς ρόλους στην εμβρυϊκή ανάπτυξη ενώ συγκεκριμένοι SNPs του γονιδίου (rs1470579, rs4402960) έχουν συσχετισθεί με μειωμένη έκκριση ινσουλίνης και ανάπτυξη ΣΔτ2. Παρόλα αυτά, και στην περίπτωση αυτή, ο μοριακός μηχανισμός εμπλοκής του στη νόσο παραμένει άγνωστος (97, 98).

CDKAL1 (CDK5 regulatory subunit associated protein 1-like1): Η πρωτεΐνη που κωδικοποιεί το γονίδιο *CDKAL1* εμφανίζει υψηλή ομοιότητα με τη πρωτεΐνη CDK5RAP1 (cyclin-dependent kinase 5 (cdk5) regulatory subunit-associated protein 1), και αποτελεί μια νευρωνική πρωτεΐνη που ρυθμίζει την ενεργότητα του CDK5 (Cyclin dependent kinase 5). Η πρωτεΐνη CDK5, από την άλλη πλευρά, αποτελεί μια μικρή πρωτεϊνική κινάση σερίνης/θρεονίνης με σημαντικό ρόλο στον εγκέφαλο ενώ εμφανίζει επιπλέον και πολλές εξω-νευρωνικές λειτουργίες (99). Μελέτες έχουν δείξει ότι η κινάση CDK5 επάγει τη μείωση της έκφρασης του γονιδίου της ινσουλίνης ενώ συνεισφέρει και στη δυσλειτουργία των β κυττάρων του παγκρέατος με επακόλουθο την αύξηση του κινδύνου εμφάνισης ΣΔτ2. Πιθανολογείται ότι η μειωμένη έκφραση του *CDKAL1* οδηγεί σε αυξημένη ενεργότητα του CDK5 στα β παγκρεατικά κύτταρα και συνεπώς σε μειωμένη έκκριση της ινσουλίνης (100). Σύμφωνα με την παραπάνω υπόθεση, συγκεκριμένοι SNPs του γονιδίου *CDKAL1* (rs7756992, rs7754840, rs10946398) έχουν συσχετισθεί σημαντικά με μειωμένη έκκριση ινσουλίνης, ως απόκριση στη γλυκόζη, και αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης ΣΔτ2 (101).

KCNQ1 (Potassium voltage gated channel, KQT like subfamily, member 1): Το γονίδιο *KCNQ1* κωδικοποιεί μια υπομονάδα του τασσεοεξααρτώμενου καναλιού καλίου KV7.1 και εκφράζεται σε πολλούς ιστούς, συμπεριλαμβανομένης της καρδιάς, του παγκρέατος και των νεφρών (102). Μεταλλάξεις του συγκεκριμένου γονιδίου έχουν συσχετισθεί κυρίως με την εμφάνιση του συνδρόμου Long QT (LQTS), το οποίο αποτελεί μιας μενδελιανής μορφής καρδιακή αρρυθμία (103). Στα παγκρεατικά β κύτταρα, συγκεκριμένα, το κανάλι αυτό είναι απαραίτητο για τη δημιουργία κατάλληλου δυναμικού που επιτρέπει την -επαγόμενη από τη γλυκόζη- έκκριση της ινσουλίνης (104). Τα αλληλόμορφα κινδύνου του γονιδίου *KCNQ1* έχουν συσχετισθεί με διαταραχές στους μηχανισμούς έκκρισης της ινσουλίνης, οι οποίες πιθανώς αντανακλούν και τη σχέση αυτών με την ανάπτυξη ΣΔτ2. Πιο συγκεκριμένα, το αλληλόμορφο rs2237895 του γονιδίου έχει συσχετισθεί με μειωμένου βαθμού εξωκύτωση και έκκριση ινσουλίνης,

προτείνοντας ότι τα συγκεκριμένα αλληλόμορφα κινδύνου, καθώς και άλλοι εσωνικοί SNPs του γονιδίου, οδηγούν σε αυξημένη μεταγραφική δραστηριότητα (gain of function) και συνεπώς σε αυξημένη πιθανότητα εμφάνισης ΣΔτ2, διαμέσου της μειωμένης έκκρισης της ινσουλίνης (105, 106).

NOTCH2 (Neurogenic locus notch homolog protein 2): Το σηματοδοτικό μονοπάτι Notch, το οποίο περιλαμβάνει τέσσερις υποδοχείς (Notch1-Notch4), αποτελεί ένα υψηλά συντηρημένο μονοπάτι με σημαντικό ρόλο στην ενδοκυτταρική επικοινωνία, στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και στην ομοίωση των ιστών κάτω από φυσιολογικές αλλά και παθολογικές καταστάσεις (107). Πιο συγκεκριμένα, η πρωτεΐνη Notch2 έχει δειχθεί ότι είναι αναγκαία για τη λειτουργία του ενδοθηλίου και του λείου μυ καθώς και για τη νεφρική και παγκρεατική ανάπτυξη. Διαταραχές του σηματοδοτικού μονοπατιού Notch έχουν συσχετισθεί με πολλές παθολογικές καταστάσεις ενώ συγκεκριμένοι SNPs του γονιδίου *NOTCH2* (rs10923931) έχουν συσχετισθεί με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης ΣΔτ2 αλλά και με αυξημένη πιθανότητα εμφάνισης επιπλοκών της νόσου (88, 108, 109).

ADAMTS9 (A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 9): Η πρωτεΐνη ADAMTS9 αποτελεί μια εκκρινόμενη μεταλλοπρωτεάση που εντοπίζεται στην εξωκυττάρια μήτρα και είναι ενεργή παρουσία συσσωματωμάτων πρωτεογλυκάνης. Μελέτες έχουν αποδείξει την αιτιώδη σχέση μεταξύ συγκεκριμένων SNPs του γονιδίου (rs4607103) με τη μειωμένη ευαισθησία του σκελετικού μυ στην ινσουλίνη, καθιστώντας το ένα ακόμη υποψήφιο γονίδιο για την ανάπτυξη ινσουλινοαντίστασης και ΣΔτ2 (110, 111).

TSPAN8 (Tetraspanin-8): Το γονίδιο *TSPAN8* κωδικοποιεί μιας ευρείας έκφρασης γλυκοπρωτεΐνη της κυτταρικής επιφάνειας, που δημιουργεί συχνά σύμπλοκα με τις ιντεγκρίνες. Πιο συγκεκριμένα, η δέσμευση της 6-ινγκρετίνης με τη λαμνίνη έχει δειχθεί ότι επηρεάζει αρνητικά τη διατήρηση της β κυτταρικής μάζας και έτσι είναι πιθανόν οι SNPs του γονιδίου *TSPAN8* να έχουν σημαντικό ρόλο στη λειτουργία των β κυττάρων. Πολλές μελέτες έχουν συσχετίσει συγκεκριμένους SNPs του γονιδίου *TSPAN8* (rs7961581) με διαταραχές στην έκκριση της ινσουλίνης, επηρεάζοντας τη β κυτταρική λειτουργία και τελικά την ανάπτυξη ΣΔτ2 (112).

JAZF1 (Juxtaposed with another zinc finger protein 1): Το γονίδιο *JAZF1* κωδικοποιεί ένα μεταγραφικό καταστολέα του πυρηνικού υποδοχέα NR2C2 (Nuclear receptor subfamily 2, group C, member 2), ο οποίος είναι γνωστός και ως TR4. Ο υποδοχέας TR4 είναι μέλος της οικογένειας των πυρηνικών ορμονικών υποδοχέων και έχει ενεργότητα μεταγραφικού παράγοντα. Εκφράζεται σε μια πληθώρα κυτταρικών τύπων ενώ η έλλειψή του οδηγεί σε καθυστέρηση

στην ανάπτυξη, υπογλυκαιμία και μειωμένη γλυκονεογένεση ενώ δε φαίνεται να έχει άμεση εμπλοκή στη λειτουργία των β κυττάρων. Δεδομένου ότι το γονίδιο *JAZF1* εκφράζεται κατά κύριο λόγο στο πάγκρεας, θεωρείται πιθανόν συγκεκριμένοι SNPs του γονιδίου (rs864745) να οδηγούν σε αύξηση της λειτουργίας του καταστολέα (gain of function) και συνεπώς σε καθυστέρηση στην ανάπτυξη ή/και δυσλειτουργία των β κυττάρων (112, 113).

FTO (Fat mass and obesity-associated protein): Περισσότεροι από 10 SNPs έχουν ταυτοποιηθεί στο γονίδιο *FTO* (rs9939609, rs8050136) σε ασθενείς με ΣΔτ2 (114, 115). Παρόλο που οι μηχανισμοί εμπλοκής αυτών των αλληλομόρφων στην ανάπτυξη ΣΔτ2 δεν έχουν καθοριστεί, φαίνεται ότι το γονίδιο *FTO* εμπλέκεται, μέσω αλληλεπιδράσεων με άλλες πρωτεΐνες, στο καθορισμό του δείκτη μάζας σώματος ενώ πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι συνεισφέρει και στην ομοιόσταση της γλυκόζης με σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση του μεταβολισμού των υδατανθράκων (116).

THADA (Thyroid adenoma associated): Το γονίδιο *THADA* κωδικοποιεί μια θυρεοειδοσχετιζόμενη πρωτεΐνη, η οποία έχει προταθεί ότι εμπλέκεται, μέσω υποδοχών θανάτου, στην απόπτωση των κυττάρων ενώ συγκεκριμένοι SNPs του γονιδίου (rs7578597) έχει δείχθει ότι σχετίζονται με μειωμένη β κυτταρική μάζα, πιθανόν λόγω αυξημένης απόπτωσης (117).

MTNR1B (Melatonin receptor 1B): Το γονίδιο του υποδοχέα της μελατονίνης 1B αποτελεί ένα πρόσφατα ταυτοποιημένο γονίδιο που σχετίζεται με την εμφάνιση ΣΔτ2, διαμέσου της ρύθμισης των επιπέδων της γλυκόζης πλάσματος. Η μελατονίνη αποτελεί μια βασική ορμόνη που εκκρίνεται, με κερκάρδιο ρυθμό, από την επίφυση και έχει ανασταλτική δράση στην έκκριση της ινσουλίνης. Τόσος ο υποδοχέας της μελατονίνης 1A όσο και ο 1B εκφράζονται στα παγκρεατικά β κύτταρα, ενώ συγκεκριμένοι SNPs του 1B (rs1387153 και rs10830963) έχουν συσχετισθεί με αυξημένη γλυκόζη πλάσματος. Η σχέση μεταξύ του υποδοχέα *MTNR1B*, της υπεργλυκαιμίας, της διαταραχής του μηχανισμού έκκρισης της ινσουλίνης και της β κυτταρικής λειτουργίας παρουσιάζει σήμερα μεγάλο ερευνητικό ενδιαφέρον, με συνέπεια ο παραπάνω υποδοχέας να προτείνεται ακόμη και ως θεραπευτικός στόχος για την αντιμετώπιση του ΣΔτ2 (118).

CDC123 (Cell division cycle 123 homolog)/CAMK1D (Calcium/calmodulin-dependent protein kinase I delta): Το γονίδιο *CDC123* κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη που εμπλέκεται στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου καθώς και στον έλεγχο της μεταγραφικής ενεργότητας με άγνωστο μέχρι σήμερα ρόλο στην ανάπτυξη του ΣΔτ2. Από την άλλη πλευρά, το γονίδιο *CAMK1D* είναι υπεύθυνο για την εξωκύτωση των κυστιδίων της ινσουλίνης και πιθανολογείται ότι

συγκεκριμένοι SNPs του παραπάνω γενετικού τόπου (rs12779790) μπορούν να επηρεάζουν τη λειτουργία των παγκρεατικών β κυττάρων διαμέσου ενεργοποίησης αποπτωτικών μηχανισμών (112).

Συμπερασματικά, η πλειονότητα των γονιδίων που έχουν συσχετισθεί έως σήμερα με τον αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης ΣΔτ2 φαίνεται πως εμπλέκεται κυρίως στους μηχανισμούς λειτουργίας των β κυττάρων, παρά στους μηχανισμούς της ινσουλινοαντίστασης, ενώ επιβεβαιώνεται και γενετικά η συνεισφορά της παχυσαρκίας και του δείκτη μάζας σώματος στον κίνδυνο ανάπτυξης της νόσου. Οι παραπάνω γενετικές μελέτες έχουν καταφέρει να οδηγήσουν στην ταυτοποίηση της εμπλοκής καινούργιων μηχανισμών/μονοπατιών στην ανάπτυξη του ΣΔτ2, όπως το σηματοδοτικό μονοπάτι Wnt, το «πακετάρισμα» της ινσουλίνης στα εκκριτικά κυστίδια αλλά και αρκετοί μηχανισμοί ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου που πιθανόν έχουν σημαντικό ρόλο στον πολλαπλασιασμό των παγκρεατικών β κυττάρων. Τέλος, η εμπλοκή του υποδοχέα της μελατονίνης στην εμφάνιση της νόσου, υποδεικνύει και το σημαντικό ρόλο του κερκάδιου ρυθμού στο μεταβολισμό της γλυκόζης.

Αδιαμφισβήτητα, η ταυτοποίηση όλων αυτών των γονιδίων έχει συνεισφέρει σημαντικά στην κατανόηση των μηχανισμών της παθοφυσιολογίας της νόσου, δεδομένου ότι άγνωστοι μέχρι σήμερα γενετικοί τόποι, που δε σχετίζονται άμεσα με τους μηχανισμούς ομοιόστασης της γλυκόζης, μπορούν να εμπλέκονται στην ανάπτυξη ΣΔτ2. Σήμερα, οι μελέτες εστιάζονται κυρίως στη διερεύνηση του φυσιολογικού ρόλου όλων αυτών των γονιδίων καθώς και στην εμπλοκή τους στα μονοπάτια του μεταβολισμού, για την κατανόηση των μηχανισμών που συμμετέχουν στη ρύθμιση της έκκρισης και της δράσης της ινσουλίνης. Η κατανόηση του τρόπου που τα παραπάνω αλληλόμορφα μπορούν να εμπλέκονται στην παθογένεια της νόσου και συνεπώς να επηρεάζουν τον κίνδυνο εμφάνισής της, θα συμβάλει πιθανότατα στην ταυτοποίηση νέων θεραπευτικών προσεγγίσεων και διαγνωστικών δοκιμασιών. Δεδομένου ακόμη, ότι πολλά από αυτά τα γονίδια συνδέονται και με άλλους παθολογικούς μηχανισμούς, όπως τη δυσλιπιδαιμία, την αθηροσκλήρωση αλλά και την καρκινογένεση, η μελέτη του ρόλου των παραπάνω γονιδίων μπορεί να παρέχει επιπλέον πληροφορίες για τη σύνδεση του ΣΔτ2 με άλλα νοσήματα, όπως το μεταβολικό σύνδρομο, την καρκινογένεση και την παχυσαρκία (119, 120).

1.7.2 Η κατανόηση της «χαμένης κληρονομικότητας» στην εμφάνιση του Σακχαρώδους Διαβήτη τύπου 2

Παρά τη ραγδαία εξέλιξη της τεχνολογίας και την ταυτοποίηση της εμπλοκής αυτού του μεγάλου αριθμού γενετικών αλληλομόρφων στον κίνδυνο εμφάνισης της νόσου, φαίνεται ότι

οι μέχρι τώρα γνωστοί ταυτοποιημένοι γενετικοί τόποι μπορούν να εξηγήσουν λιγότερο από το 20% της κληρονομικότητάς της. Έτσι, τα παραπάνω γενετικά αλληλόμορφα δεν μπορούν να συνεισφέρουν στον υπολογισμό του γενετικού κινδύνου εμφάνισης ΣΔτ2 και η ταυτοποίησή τους στα άτομα με οικογενειακό ιστορικό, φαίνεται πως μέχρι σήμερα τουλάχιστον, δεν είναι πληροφοριακή (121, 122). Δεδομένου ότι ο ΣΔτ2 είναι μια πολυγονιδιακή νόσος όπου ο τρόπος αλληλεπίδρασης των γονιδίων μεταξύ τους αλλά και με το περιβάλλον δεν είναι πλήρως καθορισμένος, η πιθανότητα ανάπτυξης ΣΔτ2 φαίνεται πως καθορίζεται τελικά από τον αριθμό, τη συχνότητα καθώς και το μέγεθος της επίδρασης των αλληλομόρφων κινδύνου.

Πολλές υποθέσεις έχουν προταθεί σήμερα για να εξηγήσουν τη «χαμένη κληρονομικότητα» της νόσου. Μία από αυτές βασίζεται στο γεγονός ότι ένας μεγάλος αριθμός κοινών αλληλομόρφων, υψηλής συχνότητας (>5%), με μικρές επιδράσεις και χαμηλή διεισδυτικότητα μπορεί να συνεισφέρει στην ανάπτυξη της («common disease common variant») (123) ενώ μία άλλη υπόθεση προτείνει ότι σπάνια αλληλόμορφα, χαμηλής συχνότητας (<5%), με μεγάλη επίδραση και υψηλή διεισδυτικότητα είναι υπεύθυνα για την εμφάνιση της νόσου και μπορούν να εξηγούν ένα μεγάλο μέρος της κληρονομικότητάς της («common disease rare variant») (124). Σύμφωνα με την πρώτη υπόθεση, αν και η γενετική ποικιλομορφία είναι πλεονεκτική κατά τη διάρκεια της εξέλιξης, πιθανόν σήμερα, λόγω της αλλαγής του περιβάλλοντος και του τρόπου ζωής, πολλά ουδέτερα ή/και πλεονεκτικά μέχρι πρότινος γονίδια, έχουν αποκτήσει επιβαρυντικό ρόλο για τον οργανισμό και μπορούν να οδηγήσουν στην ανάπτυξη της νόσου. Από την άλλη πλευρά, σύμφωνα με τη δεύτερη υπόθεση, τα αλληλόμορφα κινδύνου για την ανάπτυξη μιας νόσου είναι σπάνια καθώς κατά τη διάρκεια της αρνητικής φυσικής επιλογής αυτά εξαλείφονται ή/και παραμένουν σε χαμηλές συχνότητες στο γενικό πληθυσμό (125-127).

1.7.2.1 Παρουσία σπάνιων αλληλομόρφων

Όπως προαναφέρθηκε, η θεωρία της ύπαρξης σπάνιων αλληλομόρφων γονιδίων θα μπορούσε πιθανόν να εξηγήσει, τουλάχιστον εν μέρει, τη «χαμένη κληρονομικότητα» της νόσου. Δεδομένου ότι η φυσική επιλογή δρα απομακρύνοντας τα επιβλαβή αλληλόμορφα προτού αυτά φθάσουν σε υψηλές συχνότητες εμφάνισης στο γενικό πληθυσμό, τα αλληλόμορφα κινδύνου που είναι υπεύθυνα για την εμφάνιση μιας νόσου θα πρέπει να βρίσκονται σε πολύ χαμηλές συχνότητες. Μάλιστα, πρόσφατα δεδομένα υποστηρίζουν ότι ακόμη και η συνδυαστική δράση σπάνιων και κοινών αλληλομόρφων μπορούν να συνεισφέρουν στην εμφάνιση μιας νόσου και πιθανόν μπορούν να εξηγούν το μεγαλύτερο μέρος της κληρονομικότητάς της (128). Η ραγδαία ανάπτυξη των τεχνολογιών αλληλούχησης

νάας γενιάς επιτρέπει σήμερα την ταυτοποίηση τέτοιων αλληλομόρφων και μπορεί να παρέχει ακόμη μεγαλύτερη κάλυψη της γενετικής ποικιλομορφίας. Πιο συγκεκριμένα, η αλληλούχηση ολόκληρου του γονιδιώματος (Whole Genome Sequencing) καθώς και η αλληλούχηση των εξωνίων (Exome Sequencing) έχουν οδηγήσει σήμερα στην ταυτοποίηση σπάνιων αλληλομόρφων των γονιδίων *PAM* (p.Asp563Gly και p.Ser539Trp), *PDX1* (p.Gly218Alafs*12) και *HNF1A* (p.E508K) που σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης ΣΔτ2 σε πολλούς πληθυσμούς (129, 130).

1.7.2.2 Δομική ποικιλομορφία

Μεγάλο ενδιαφέρον παρουσιάζει ακόμη η δομική ποικιλομορφία του γονιδιώματος, αν και δεν θεωρείται αρκετά πιθανόν να εξηγεί μεγάλο μέρος της «χαμένης κληρονομικότητας» της νόσου. Σήμερα είναι γνωστό ότι οι χρωμοσωμικές αναδιατάξεις μπορούν να είναι υπεύθυνες για την ανάπτυξη σπάνιων νοσημάτων ή συνδρόμων. Μελέτες έχουν αποδείξει ότι οι μεγάλες επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες κατά μήκος του γονιδιώματος, γνωστές ως CNVs, (Copy Number Variation) μπορούν να επηρεάζουν τη λειτουργία των γονιδίων και συνεπώς να συνεισφέρουν στον κίνδυνο εμφάνισης συγκεκριμένων νοσημάτων, κυρίως νευροαναπτυξιακού τύπου (131). Μέχρι σήμερα, λίγες μόνο μελέτες έχουν γίνει για τη διερεύνηση της εμπλοκής των CNVs στον κίνδυνο εμφάνισης ΣΔτ2, γεγονός το οποίο μπορεί να οφείλεται στην έλλειψη πειραματικών δοκιμασιών ταυτοποίησης τέτοιου είδους αναδιατάξεων και συνεπώς στην ανεπαρκή ενημέρωση των αντίστοιχων διαθέσιμων βάσεων καταγραφής. Μία πρόσφατη μελέτη έχει συσχετίσει τον πολυμορφισμό CNVR5583.1 του γονιδίου *SPAN8* με την εμφάνιση του ΣΔτ2, αν και η εμπλοκή του γονιδίου αυτού στην ανάπτυξη της νόσου ήταν ήδη γνωστή, λόγω και άλλων γνωστών SNPs που το γονίδιο αυτό εμφανίζει (132).

1.7.2.3 Παρουσία «προστατευτικών» γονιδίων

Δεδομένου του μεγάλου αριθμού γονιδίων που έχουν ενοχοποιηθεί για την εμφάνιση ΣΔτ2, η πιθανότητα παρουσίας ενός τέτοιου αλληλομόρφου «κινδύνου» στο γενικό πληθυσμό φτάνει το 54%, γεγονός το οποίο γεννά το ερώτημα εάν τελικά ο ΣΔτ2 αποτελεί μια προκαθορισμένη κατάσταση. Αν συμβαίνει αυτό, πιθανολογείται ότι ο πληθυσμός μπορεί να φέρει τελικά περισσότερα «προστατευτικά» γονίδια για τη νόσο παρά γονίδια «κινδύνου» που οδηγούν στην εμφάνισή της. Οι μελέτες που διερευνούν το παραπάνω ερώτημα, μελετούν άτομα τα οποία αν και έφεραν υψηλούς προδιαθεσικούς παράγοντες κινδύνου για τη νόσο, τελικά δεν ανέπτυξαν ΣΔτ2. Μέχρι σήμερα, δύο κύρια αλληλόμορφα του γονιδίου *SLC30A8* (p.Arg138* και p.Lys34Serfs*50) φαίνεται πως έχουν προστατευτικό ρόλο στην εμφάνιση ΣΔτ2,

οδηγώντας σε σχετική απώλεια της λειτουργίας του γονιδίου ενώ ταυτόχρονα το γονίδιο αυτό έχει προταθεί ακόμη και ως θεραπευτικός στόχος για την αντιμετώπιση της νόσου (133).

1.7.2.4 Η σχέση των γενετικών τόπων ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης (Expression quantitative trait loci-eQTLs) με την ανάπτυξη του Σακχαρώδους Διαβήτη τύπου 2

Γενετικές μελέτες σε ανθρώπινους πληθυσμούς έχουν δείξει μια ευρεία και κληρονομήσιμη ποικιλομορφία στα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων μεταξύ των ατόμων, τα οποία φαίνεται ότι ρυθμίζονται και ελέγχονται από συγκεκριμένους γενετικούς ρυθμιστικούς τόπους, τα eQTLs (Expression quantitative trait loci). Τα eQTLs αποτελούν κληρονομήσιμες γενετικές περιοχές που αντιγράφονται σε όλους τους ανθρώπινους ιστούς και κυτταρικούς τύπους. Με τον τρόπο αυτό, τα επίπεδα έκφρασης των μεταγράφων μπορούν να ρυθμίζονται από συγκεκριμένους SNPs που εδράζονται σε τέτοιες μη κωδικοποιούσες, ρυθμιστικές περιοχές του γονιδιώματος και ονομάζονται eSNPs (Expression regulatory SNPs). Οι eSNPs συχνά εδράζονται σε περιοχές πολύ κοντά στο σημείο έναρξης της μεταγραφής (Transcription Start Site (TSS)) και για αυτό ονομάζονται 'cis' eSNPs ενώ eSNPs που εδράζονται $>\pm 500$ kb από το TSS ή βρίσκονται ακόμη και σε διαφορετικό χρωμόσωμα καλούνται 'trans' eSNPs (134).

Η μελέτη της σχέσης μεταξύ των eQTLs-SNPs και της γονιδιακής έκφρασης σε διάφορους ανθρώπινους ιστούς αλλά και μεταξύ διαφορετικών ατόμων, καταγράφεται στη βάση δεδομένων GTEx (Genotype-Tissue Expression). Η βάση αυτή, η οποία έχει ξεκινήσει από το 2010, περιλαμβάνει δεδομένα αλληλούχησης ολόκληρου του γονιδιώματος αλλά και RNA-αλληλούχησης από περίπου 960 θανάοντες ενήλικες δότες, από τους οποίους και συλλέγονται πολλαπλά δείγματα ιστών, συμπεριλαμβανομένου παγκρέατος, δέρματος, εγκεφάλου κ.ά. Η βάση GTEx μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μια βιβλιοθήκη αναφοράς που μπορεί να προβλέψει τα επίπεδα της γονιδιακής έκφρασης με βάση τη νουκλεοτιδική αλληλουχία και χρησιμοποιείται ευρέως για την ταυτοποίηση γονιδίων που σχετίζονται με διάφορα νοσήματα όπως ο διαβήτης, οι διπολικές διαταραχές, η ρευματοειδής αρθρίτιδα, τα καρδιαγγειακά κ.ά (135).

Δεδομένου των παραπάνω, πολλές μελέτες έχουν υποθέσει ότι όλοι οι GWAS-SNPs που εδράζονται σε μη κωδικοποιούσες περιοχές μπορούν να αποτελούν eSNPs και να συμβάλλουν στον κίνδυνο εμφάνισης της νόσου μεταβάλλοντας τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων ή ακόμη και το μηχανισμό του εναλλακτικού ματίσματος (136, 137). Δεδομένου βέβαια του γεγονότος ότι τα ρυθμιστικά στοιχεία μπορούν να επηρεάζουν την έκφραση γονιδίων από μεγάλες αποστάσεις του γονιδιώματος, σίγουρα απαιτούνται περαιτέρω μελέτες για να καθοριστούν οι 'στόχοι' των eQTLs. Δύο μελέτες (138, 139) σε δείγματα ανθρώπινων παγκρεατικών νησίδων έχουν καταφέρει να ταυτοποιήσουν με την τεχνολογία της RNA αλληλούχησης (RNA-seq) 616

και 2341 eSNPs αντίστοιχα, και αποτελούν τις πρώτες αναλύσεις που συνδέουν SNPs με αλλαγές στη γονιδιακή έκφραση στις παγκρεατικές νησίδες. Παρόλα αυτά, από τα 216 κοινά eQTLs των δύο μελετών, μόνο τα 14 από αυτά φαίνεται ότι ρυθμίζουν την έκφραση γνωστών για την εμφάνιση ΣΔτ2 γενετικών τόπων.

1.7.2.5 Αλληλεπιδράσεις γονιδίων- γονιδίων και γονιδίων- περιβάλλοντος

Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των γονιδίων, ή αλλιώς επίσταση, έχουν προταθεί σαν μια ακόμη πιθανή εξήγηση των δυσκολιών της ταυτοποίησης του γενετικού υποβάθρου πολύπλοκων πολυγονιδιακών νοσημάτων, όπως ο ΣΔτ2 (140). Οι περισσότερες αναλύσεις περιορίζονται στη μελέτη της επίδρασης ενός μόνο γενετικού τόπου στην εμφάνιση της νόσου και όχι στην μεταξύ τους αλληλεπίδραση. Σήμερα, βέβαια, ο τεράστιος όγκος δεδομένων που παρέχουν οι μελέτες GWAS έχει καταστήσει εφικτές τέτοιου είδους συνδυαστικές αναλύσεις. Το κύριο πρόβλημα αυτών των αναλύσεων έγκειται στο γεγονός ότι η επίσταση αποτελεί ένα δυναμικό φαινόμενο ενώ ταυτόχρονα η μελέτη της αλληλεπίδρασης δύο γενετικών τόπων χαμηλής επίδρασης στην εμφάνιση της νόσου απαιτεί ένα πολύ μεγάλο υπό μελέτη πληθυσμό. Αδιαμφισβήτητα όμως, η επίσταση έχει σημαντικό και αναγνωρισμένο ρόλο στη «χαμένη κληρονομικότητα» της νόσου και συνεισφέρει σε μεγάλο βαθμό στον κίνδυνο εμφάνισής της (141).

Σήμερα, είναι ξεκάθαρο ότι ο κίνδυνος ανάπτυξης ΣΔτ2 επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό και από περιβαλλοντικούς παράγοντες, με σημαντικότερο την αύξηση της παχυσαρκίας, όπως αποδεικνύεται και από τα παράλληλα επιδημιολογικά πρότυπα που τα δύο νοσήματα εμφανίζουν. Η αύξηση της επικράτησης της παχυσαρκίας σχετίζεται αδιαμφισβήτητα με τις σημερινές αλλαγές στις διατροφικές συνήθειες του ατόμου καθώς και με την υιοθέτηση του σημερινού τύπου «καθιστικής» ζωής. Είναι γνωστό ότι, τα γονίδια μπορούν να επηρεάζουν τον κίνδυνο εμφάνισης της νόσου όχι μόνο μέσω της άμεσης εμπλοκής τους στους μηχανισμούς έκκρισης και δράσης της ινσουλίνης αλλά και διαμέσου της εμπλοκής τους στους μηχανισμούς αλληλεπίδρασης του ατόμου με το περιβάλλον, με αποτέλεσμα ορισμένα άτομα να είναι πιο ευάλωτα στις αρνητικές επιπτώσεις του σημερινού τρόπου ζωής. Η μελέτη των αλληλεπιδράσεων των γονιδίων με το περιβάλλον αποτελεί ένα εξαιρετικά περίπλοκο ζήτημα και πιθανολογείται ότι ευθύνεται, ως ένα βαθμό, και αυτό στην κατανόηση της «χαμένης κληρονομικότητας» της νόσου (142).

1.8 Επιγενετική βάση Σακχαρώδους Διαβήτη τύπου 2

Η επιγενετική είναι ο τομέας που αναφέρεται σε συγκεκριμένες κληρονομήσιμες αλλαγές που μπορούν να επηρεάζουν τη γονιδιακή λειτουργία χωρίς να προκαλούν κάποια νουκλεοτιδική αλλαγή. Η μεθυλίωση του DNA και οι τροποποιήσεις των ιστονών αποτελούν δύο βασικούς επιγενετικούς μηχανισμούς ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης, ως αποκρίση σε συγκεκριμένα περιβαλλοντικά ερεθίσματα. Οι επιγενετικές αλλαγές είναι αποτέλεσμα γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων, συμπεριλαμβανομένης της ηλικίας, του φύλου, της διατροφής, της άσκησης, της γλυκοτοξικότητας και της λιποτοξικότητας και μπορούν να εμφανίζονται από τα πρώτα στάδια της ζωής. Είναι σήμερα γνωστό ότι το μητρικό περιβάλλον και η πρώιμη βρεφική ηλικία έχουν καθοριστικό ρόλο στην εγκαθίδρυση τέτοιων επιγενετικών αλλαγών και μπορούν να επηρεάζουν τον μελλοντικό κίνδυνο εμφάνισης μιας χρόνιας νόσου, όπως ο ΣΔτ2 (143-145). Αυτό σημαίνει πως μέρος του κινδύνου αυτού μπορεί να οφείλεται σε επιγενετικές αλλαγές που λαμβάνουν χώρα σε κρίσιμα γονίδια της ανάπτυξης από την αρχή της ενδομήτριας ζωής και πιθανολογείται ότι εξηγούν εν μέρει τη σχέση μεταξύ του ενδομήτριου περιβάλλοντος και του βάρους του νεογνού ή/και της πιθανότητας εμφάνισης παχυσαρκίας, διαβήτη και μεταβολικού συνδρόμου στη μετέπειτα ζωή (146). Έτσι, πιθανολογείται, μέρος της κληρονομικότητας της νόσου να οφείλεται κυρίως στις επιγενετικές αλλαγές που λαμβάνουν χώρα κατά τη διάρκεια της ενδομήτριας ακόμη ζωής, ως αποτέλεσμα των μητρικών περιβαλλοντικών επιρροών, παρά στη ποικιλομορφία των νουκλεοτιδικών αλλαγών.

Αδιαμφισβήτητα, οι επιγενετικοί μηχανισμοί μπορούν να έχουν καθοριστικό ρόλο στην εξέλιξη της νόσου ή/και στην ανάπτυξη των επιπλοκών της (147, 148). Καθώς η κατανόηση του τομέα της επιγενετικής προοδεύει με ταχείς ρυθμούς, σε συνδυασμό με τη δυνατότητα που υπάρχει σήμερα για την ανίχνευση του προφίλ των επιγενετικών αλλαγών, είναι πολύ πιθανόν συγκεκριμένες επιγενετικές αλλαγές να έχουν καθοριστικό ρόλο στην παθογένεια της νόσου αλλά και να μπορούν να εξηγήσουν ένα μεγάλο μέρος της «χαμένης κληρονομικότητάς» της.

1.8.1 Η συμβολή της μεθυλίωσης του DNA στην ανάπτυξη Σακχαρώδους Διαβήτη τύπου 2

Η μεθυλίωση του DNA αποτελεί έναν ευρέως μελετούμενο και πολύ καλά χαρακτηρισμένο επιγενετικό μηχανισμό, ο οποίος περιλαμβάνει την ομοιοπολική πρόσδεση μιας μεθυλομάδας στον C5 των νουκλεοτιδίων της κυτοσίνης, για τη δημιουργία της 5-μεθυλοκυτοσίνης (5mC) (149). Η μεθυλίωση των καταλοίπων της κυτοσίνης παρατηρείται σε συγκεκριμένες θέσεις δινουκλεοτιδίων κυτοσίνης-γουανίνης (CpG), οι οποίες οργανώνονται σε ομάδες επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών, γνωστές ως CpG νησίδες και σχετίζονται κυρίως με τη γονιδιακή αποσιώπηση. Οι νησίδες CpG ανιχνεύονται κυρίως μέσα στη περιοχή των

υποκινητών των γονιδίων ή σε περιοχές με υψηλές κεντρομερικές διαδοχικές επαναλήψεις αν και πρόσφατες μελέτες επισημαίνουν και την αξία των τυχαίων περιοχών μεθυλίωσης τόσο στη φυσιολογική ανάπτυξη όσο και στην παθογένεια διαφόρων νοσημάτων (149). Αλλαγές στα πρότυπα μεθυλίωσης συγκεκριμένων γονιδίων, ως απόκριση σε βιολογικούς και περιβαλλοντικούς παράγοντες, σχετίζονται με αλλαγές στη γονιδιακή έκφραση και συνδέονται συχνά περαιτέρω με παθολογικές δυσλειτουργίες (150, 151). Δεδομένου ότι η μεθυλίωση του DNA αποτελεί μια αντιστρεπτή κατάσταση, ιδιαίτερου ενδιαφέροντος αποτελεί σήμερα η μελέτη της εμπλοκής συγκεκριμένων επιγενετικών αλλαγών στην ανάπτυξη και στην αντιμετώπιση ανθρώπινων ασθενειών, συμπεριλαμβανομένου και του ΣΔτ2 (145, 152, 153). Πιο συγκεκριμένα, πολλά δεδομένα υποστηρίζουν ότι αλλαγές του προφίλ μεθυλίωσης συγκεκριμένων γονιδίων στους ιστούς που σχετίζονται με τη νόσο, μπορούν να έχουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη παχυσαρκίας, στη μειωμένη ευαισθησία των ιστών στην ινσουλίνη καθώς και στην παθογένεια/εξέλιξη του ΣΔτ2. Ταυτόχρονα, δεδομένου του γεγονότος ότι οι παραπάνω επιγενετικές αλλαγές μπορούν να εντοπιστούν ακόμη και στην ασυμπτωματική φάση της νόσου, καθιστά ιδιαίτερου ενδιαφέροντος τη μελέτη αυτών ως πολλά υποσχόμενους βιοδείκτες με προγνωστική και διαγνωστική αξία (154, 155).

Οι πρώτες προσεγγίσεις για τη συσχέτιση του προφίλ μεθυλίωσης του DNA με την εμφάνιση ΣΔτ2 πραγματοποιήθηκαν διαμέσου της ανάλυσης της μεθυλίωσης όλου του γονιδιώματος συνολικά (Global DNA methylation studies), με σκοπό τη συσχέτιση της υπερ- ή υπο- μεθυλίωσης από συγκεκριμένες κυτταρικές ομάδες ασθενών με ΣΔτ2. Στη συνέχεια, ακολούθησε η μελέτη του προφίλ μεθυλίωσης συγκεκριμένων γονιδίων που είναι ήδη γνωστό ότι εμπλέκονται στον αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης ΣΔτ2 (Candidate gene studies) (156). Σύμφωνα με τις μελέτες αυτές, έχουν καταγραφεί αλλαγές στα πρότυπα μεθυλίωσης γονιδίων που εμπλέκονται στο μεταβολισμό της γλυκόζης και των λιπιδίων, συμπεριλαμβανομένου του *TCF7L2* και του *FTO* (157, 158) στους μηχανισμούς έκκρισης και δράσης της ινσουλίνης, συμπεριλαμβανομένου του *SLC30A8* (159) καθώς και γονιδίων που εμπλέκονται στην παγκρεατική και καρδιαγγειακή λειτουργία, όπως το *CAMK1D* (160) στους ασθενείς με ΣΔτ2 συγκριτικά με τους υγιείς δότες. Σήμερα, η πρόοδος των τεχνολογιών αλληλούχησης νέας γενιάς έχει επιτρέψει τη μελέτη και ταυτοποίηση των επιγενετικών αλλαγών σε συγκεκριμένες θέσεις ολόκληρου του γονιδιώματος (Epigenome wide association studies- EWAS), καθιστώντας εφικτή την ανίχνευση αλλαγών του προφίλ μεθυλίωσης πολλών γονιδίων ή/και διαγονιδιακών περιοχών (161).

Δεδομένου ότι αρκετά συχνά, η πρόσβαση στους ανθρώπινους ιστούς που εμπλέκονται με την παθοφυσιολογία μιας νόσου είναι δύσκολη ή/και αδύνατη, η μελέτη των αλλαγών στα

πρότυπα μεθυλίωσης του DNA στα παγκρεατικά β κύτταρα ή/και στους ιστούς-στόχους της νόσου εστιάζεται σήμερα στο περιφερικό αίμα των ασθενών, λόγω της αντανάκλασης των γενετικών αυτών αλλαγών στα κύτταρα του αίματος (155). Με τον τρόπο αυτό, το περιφερικό αίμα παρέχει ένα εύκολα προσβάσιμο υλικό που επιτρέπει τη μελέτη της ανάλυσης του προφίλ της μεθυλίωσης σε μεγάλο αριθμό κλινικών δειγμάτων. Το γεγονός αυτό, σε συνδυασμό με τη χημική και βιολογική σταθερότητα της φύσης της μεθυλίωσης, καθιστά τη μελέτη του προφίλ μεθυλίωσης γονιδίων στο περιφερικό αίμα ένα πολλά υποσχόμενο προγνωστικό και διαγνωστικό εργαλείο.

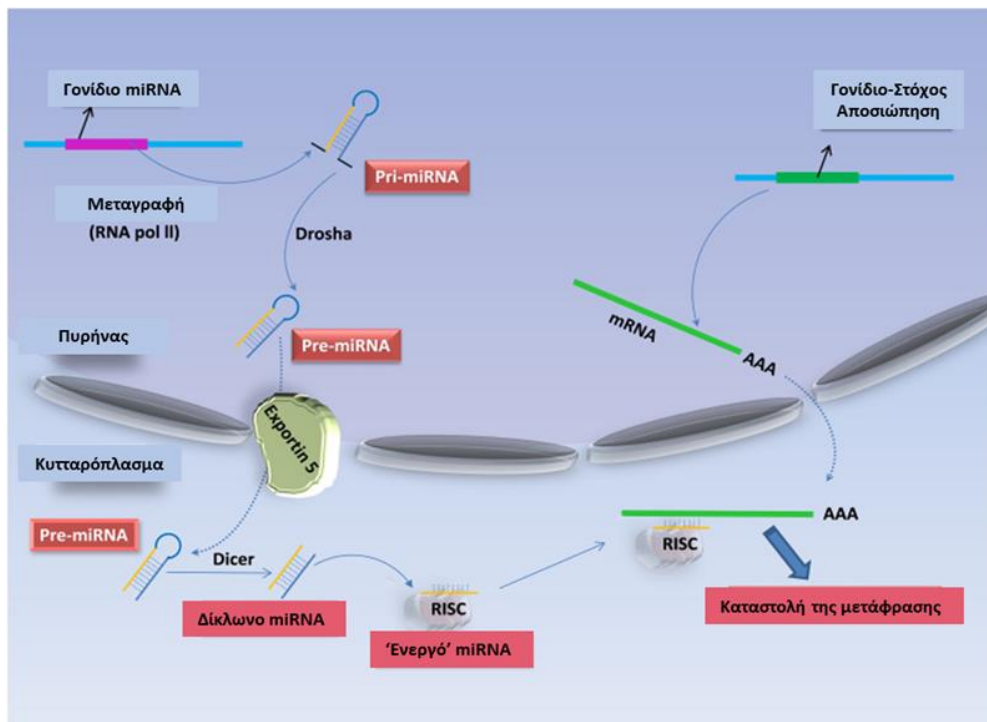
1.8.2 Η συνεισφορά της αλληλεπίδρασης της επιγενετικής με τη γενετική στον κίνδυνο εμφάνισης Σακχαρώδους Διαβήτη τύπου 2

Πολλά δεδομένα υποστηρίζουν ότι οι SNPs που έχουν μέχρι σήμερα ενοχοποιηθεί για την εμφάνιση ΣΔτ2 μπορούν να σχετίζονται και με αλλαγές στην επιγενετική υπογραφή (162). Δεδομένου ότι περισσότερο από το 25% όλων των SNPs του γονιδιώματος μπορούν να οδηγούν στην προσθήκη ή στην αφαίρεση CpG θέσεων, οι CpG-SNPs μπορούν να αποτελούν ένα μηχανισμό διαμέσου του οποίου οι SNPs μπορούν να επηρεάζουν τη γονιδιακή έκφραση, επισημαίνοντας την ισχυρή σύνδεση της γενετικής με την επιγενετική (163). Αν και πολλές μελέτες έχουν ταυτοποιήσει την ύπαρξη SNPs-CpG σε γονίδια που σχετίζονται με την παχυσαρκία, λίγες είναι οι μελέτες που εξετάζουν τη συσχέτιση αυτών με τον κίνδυνο εμφάνισης ΣΔτ2 (164). Λόγω του γεγονότος ότι η πλειονότητα των γονιδίων που σχετίζεται με τον αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης ΣΔτ2, εμφανίζει ένα μεγάλο αριθμό εσωκινικών SNPs, αποτελεί σήμερα ιδιαίτερου ενδιαφέροντος εάν αυτοί οι SNPs μπορούν απευθείας να προκαλούν αλλαγές στα πρότυπα μεθυλίωσης γονιδίων που εμπλέκονται στην παθογένεια της νόσου ή/και να επηρεάζουν τη συγγένεια/πρόσδεση μεταγραφικών παραγόντων.

1.9 Η συμβολή των microRNAs (miRNAs) στην ανάπτυξη του Σακχαρώδους Διαβήτη τύπου 2

Τα microRNAs (miRNAs) αποτελούν μικρά (19-23 νουκλεοτίδια) μη κωδικά μόρια RNA, που δρουν ως ρυθμιστές της γονιδιακής έκφρασης στα ευκαρυωτικά κύτταρα, επάγοντας την αποικοδόμηση του μηνύματος RNA (mRNA) ή/και την καταστολή της μετάφρασης (165). Μεταγράφονται στον πυρήνα από την RNA πολυμεράση II, η οποία συνθέτει από τα αντίστοιχα γονίδια το pri-miRNA και το οποίο με τη σειρά του, μετά την επεξεργασία του από την ριβονουκλεάση Drosha μετατρέπεται σε pre-miRNA και μεταφέρεται στο κυτταρόπλασμα με τη βοήθεια της εξπορτίνης 5. Εκεί εν συνεχεία, καταλύεται επιπλέον από τη Dicer, ένα μέλος της οικογένειας των ενδοριβονουκλεασών III, όπου και τελικά μετατρέπεται στο δίκλωνο ώριμο

miRNA (166). Το miR μεταφέρεται στη συνέχεια στο σύμπλεγμα RISC (RNA-induced silencing complex), όπου οι δύο αλυσίδες διαχωρίζονται, και τελικά αυτό οδηγείται, μέσω συμπληρωματικότητας, στην 3'UTR του mRNA-στόχου, προκαλώντας την καταστολή της μετάφρασής του. Με τον τρόπο αυτό τα miRNAs μπορούν να αναστέλλουν τη σύνθεση πρωτεϊνών, συμπεριλαμβανομένων ενζύμων, υποδοχέων, δομικών πρωτεϊνών, ορμονών καθώς και άλλων βιολογικών υποστρωμάτων (167) **(Εικόνα 1.4)**. Πολλά δεδομένα σήμερα υποστηρίζουν ότι, εκτός από καταστολείς της γονιδιακής έκφρασης, τα miRNAs μπορούν να δράουν και ως ενεργοποιητές σε συγκεκριμένους κυτταρικούς τύπους και κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες (168).

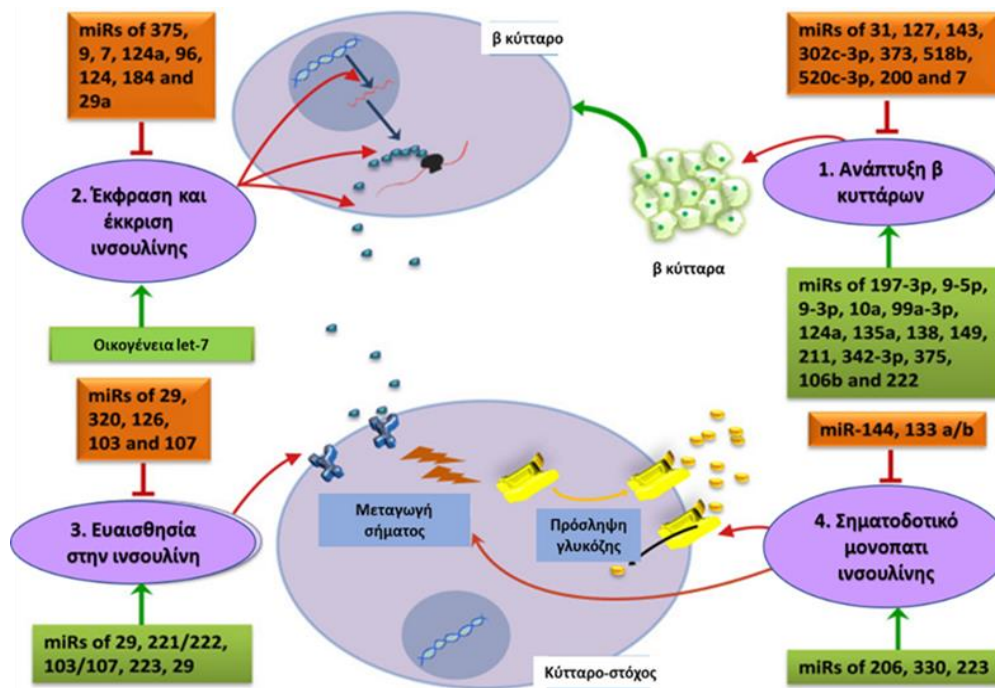


Εικόνα 1.4: Σχηματική αναπαράσταση της βιοσύνθεσης και του μηχανισμού δράσης των microRNAs (miRs). Η RNA πολυμεράση II (RNA pol II) μεταγράφει από το αντίστοιχο γονίδιο το pri-miR, το οποίο στη συνέχεια μετατρέπεται σε pre-miR από το ένζυμο Drosha. Το pre-miR μεταφέρεται από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα από την εξπορτίνη-5, όπου το ένζυμο Dicer καταλύει τη μετατροπή του σε ώριμο miR. Η μία αλυσίδα του ώριμου miR ενσωματώνεται στη συνέχεια στο σύμπλοκο RISC (RNA induced silencing complex), το οποίο τελικά είναι υπεύθυνο για την καταστολή της μετάφρασης του -συμπληρωματικού με την αλυσίδα του miR-mRNA 'στόχου'. Ανατύπωση από τους Yariibeygi, H. Et al. *Metabolism*. 2018;87:48-55) (169).

Μέχρι και σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί περισσότερα από 2000 miRNAs στο ανθρώπινο γονιδίωμα τα οποία φαίνεται ότι μπορούν να εμπλέκονται σε μια πληθώρα φυσιολογικών και παθολογικών διεργασιών. Ο ρόλος των miRNAs στην ανάπτυξη του ΣΔτ2 αναφέρθηκε για πρώτη φορά το 2004 από τους Poy et al., οι οποίοι απέδειξαν ότι το miR-375 εμπλέκεται άμεσα

στη ρύθμιση της έκκρισης της ινσουλίνης (170), γεγονός που αποτέλεσε την πρώτη μελέτη σύνδεσης ενός miRNA με το φαινότυπο μιας νόσου. Έπειτα από τη μελέτη αυτή, εκατοντάδες ακόμη μελέτες έχουν αναφέρει ότι πολλά miRNAs συμμετέχουν σε σηματοδοτικά μονοπάτια τα οποία πυροδοτούνται από τη νόσο ή/και συνεισφέρουν στην ανάπτυξή της (171). Ταυτόχρονα, η μελέτη του προφίλ έκφρασης των miRNAs συγκεκριμένων ιστών-στόχων της νόσου (πάγκρεας, λιπώδης ιστός, ήπαρ κ.ά) από ασθενείς με ΣΔτ2 ή υπεργλυκαιμικά μοντέλα ζώων παρέχει ήδη σημαντικές πληροφορίες για την ανάδειξη καινούργιων miRNAs με ρυθμιστικό ρόλο στην ανάπτυξη του διαβήτη (172). Αδιαμφισβήτητα, η πολυπαραγοντική και πολυσυστηματική φύση της συγκεκριμένης νόσου, σε συνδυασμό με το όλο και αυξανόμενο ερευνητικό ενδιαφέρον για τα μικρά ρυθμιστικά μόρια RNA, αναμένεται να συνεισφέρει σε μεγάλο βαθμό στην κατανόηση της γενετικής βάσης της νόσου και να παρέχει νέες εναλλακτικές διαγνωστικές, προγνωστικές και θεραπευτικές προσεγγίσεις. Επιπλέον, η μελέτη των miRNAs αναμένεται να εξηγήσει πιθανότατα ακόμη ένα μέρος της «χαμένης κληρονομικότητας» της νόσου, δεδομένου ότι οι μέχρι τώρα γνωστοί εσωνικοί SNPs θα μπορούσαν να επηρεάζουν αλληλουχίες 'στόχευσης' των miRNAs, επηρεάζοντας άμεσα τη γονιδιακή έκφραση και έμμεσα τη λειτουργία των γονιδίων (173).

Τα miRs είναι γνωστό ότι μπορούν να εμπλέκονται στην ανάπτυξη του ΣΔτ2 διαμέσου της ρύθμισης της κυτταρικής επιβίωσης, της απόπτωσης, του πολλαπλασιασμού, της διαφοροποίησης ή/και της λειτουργίας των β κυττάρων (169, 174). Αρκετά miRNAs μπορούν ακόμη να επηρεάζουν τους μηχανισμούς έκκρισης της ινσουλίνης, ρυθμίζοντας τη μετάφραση του γονιδίου της, την αποπόλωση της πλασματικής μεμβράνης των β κυττάρων, καθώς και τη διαδικασία της εξωκύττωσης των κοκκίων της. Δεδομένου των παραπάνω, συγκεκριμένα miRNAs δρουν στοχεύοντας απευθείας το γονίδιο της ινσουλίνης, γονίδια που είναι υπεύθυνα για το δυναμικό της μεμβράνης των β κυττάρων ή/και γονίδια που συμμετέχουν στους μηχανισμούς έκκρισης της ινσουλίνης, όπως κανάλια και μεμβρανικές πρωτεΐνες σύντηξης (175). Μελέτες έχουν δείξει ότι τα miRNAs μπορούν να εμπλέκονται και στους μηχανισμούς της ινσουλινοαντίστασης, επηρεάζοντας την ευαισθησία των περιφερικών ιστών στην ινσουλίνη. Έτσι συγκεκριμένα miRNAs δρουν στοχεύοντας το γονίδιο του υποδοχέα της ινσουλίνης, *INSR*, γονίδια που κωδικοποιούν τα υποστρώματα του υποδοχέα της ινσουλίνης, *IRS1* και *IRS2* αλλά και το γονίδιο που κωδικοποιεί το μεταφορέα πρόσληψης της γλυκόζης *GLUT4* στους περιφερικούς ιστούς (**Εικόνα 1.5**) (175).



Εικόνα 1.5: Τα microRNAs (miRs) μπορούν να επηρεάζουν τον μεταβολισμό της γλυκόζης διαμέσου τεσσάρων μηχανισμών/μονοπατιών. Στην εικόνα απεικονίζονται μερικά από τα πιο σημαντικά miRs τα οποία μπορούν να δρουν ως ενισχυτές ή αναστολείς για την ανάπτυξη σακχαρώδους διαβήτη. Ανατύπωση από τους Yaribeygi, H. Et al. *Metabolism*. 2018;87:48-55) (169).

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον σήμερα παρουσιάζουν τα ελεύθερα κυκλοφορούντα miRNAs, τα οποία αποτελούν μια πρόσφατα αναγνωρισμένη και χαρακτηρισμένη ομάδα miRs που ανιχνεύονται στα εξωκυττάρια υγρά, συμπεριλαμβανομένου του ορού, του πλάσματος και των ούρων. Δεδομένης της αφθονίας των ριβονουκλεασών στο αίμα, τα ελεύθερα κυκλοφορούντα miRs προστατεύονται από την αποικοδόμηση διαμέσου συγκεκριμένων μηχανισμών έκκρισης, που περιλαμβάνει τα εξωσώματα, τα μικροκυτίδια ή τα αποπτωτικά σωμάτια. Μπορούν επιπλέον να εκκρίνονται σε συμπλέγματα με RNA πρωτεΐνες, όπως η πρωτεΐνη Αργοναύτης 2 ή μέσω υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεϊνικών συμπλεγμάτων (176). Παρόλο που ο ακριβής μηχανισμός έκκρισής τους παραμένει ακόμη άγνωστος, φαίνεται πως τα εξωκυττάρια miRs μπορούν να μεταφέρονται, διαμέσου της παραπάνω διαδικασίας, σε συγκεκριμένα κύτταρα «παραλήπτες». Ο ρόλος τους, μεταξύ άλλων, περιλαμβάνει κατά κύριο λόγο τη ρύθμιση της έκφρασης γονιδίων στα κύτταρα-στόχους, καθιστώντας τα μόρια αυτά σημαντικούς εξωκυττάριους μεσολαβητές της διακυτταρικής επικοινωνίας (177). Πολλές μελέτες υποστηρίζουν ότι τα διαφορετικά πρότυπα έκφρασης των κυκλοφορούντων miRs στον ορό μπορούν να αντικατοπτρίζουν τους υποκείμενους παθοφυσιολογικούς μηχανισμούς της νόσου (172, 178). Τα συγκεκριμένα πρότυπα διαφορικής έκφρασης που παρουσιάζουν, η

σταθερότητα των μορίων αυτών καθώς και η μη επεμβατικότητα της διαδικασίας για την απομόνωση και τη μελέτη τους, έχουν καταστήσει τα μόρια αυτά πολλά υποσχόμενους βιοδείκτες για τη διάγνωση και την πρόγνωση μιας πληθώρας ασθενειών, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου, των καρδιαγγειακών νοσημάτων και του ΣΔτ2 (179-181). Πιο συγκεκριμένα, η μελέτη του προφίλ έκφρασης των miRNAs στον ορό ασθενών με ΣΔτ2, τα οποία μπορούν να εμπλέκονται στη ρύθμιση της σύνθεσης της ινσουλίνης, στην ευαισθησία των ιστών στην ινσουλίνη, στην ομοιόσταση της γλυκόζης ή/και στο μεταβολισμό των λιπιδίων, μπορεί να παρέχει χρήσιμες πληροφορίες για την έγκαιρη διάγνωση ή ακόμη και νέες στρατηγικές αντιμετώπισης της νόσου.

Επιπλέον, ένας μεγάλος αριθμός miRs φαίνεται πως έχει εξίσου σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της ομοιόστασης των ιστών, και για αυτό τα ελεύθερα κυκλοφορούντα miRs προτείνονται και ως βιοδείκτες, με σημαντική κλινική αξία, για την εμφάνιση επιπλοκών της νόσου σε ασθενείς υψηλού κινδύνου για ΣΔτ2 (182, 183). Η διαβητική νεφροπάθεια για παράδειγμα, αποτελεί μία από τις πιο σοβαρές επιπλοκές της νόσου. Πρόσφατα, μια μελέτη έδειξε ότι συγκεκριμένα miRs, συμπεριλαμβανομένων των miR-21, miR-29 a/b/c και miR-192, μπορούν να αντικατοπτρίζουν την παθογένεια της διαβητικής νεφροπάθειας και αποτελούν σημαντικούς κλινικούς δείκτες για τον έλεγχο και την πρόγνωση της (184). Οι καρδιαγγειοπάθειες, από την άλλη πλευρά, αποτελούν ακόμη μία σοβαρή επιπλοκή των ασθενών με ΣΔτ2 και πολλά miRNAs έχουν μελετηθεί σαν υποψήφιοι βιοδείκτες για την εμφάνιση και παρακολούθησή τους, με σημαντικότερο το miR-126, που αποτελεί σήμερα ένα ακόμη σημαντικό βιοδείκτη για τη διαβητική καρδιαγγειοπάθεια (185).

1.10 Ο ρόλος της βιολογίας συστημάτων στην κατανόηση των μηχανισμών παθογένειας του Σακχαρώδους Διαβήτη τύπου 2

Παρόλο που η κατανόηση του γενετικού υποβάθρου του ΣΔτ2 έχει προοδεύσει ραγδαία, πολλά ακόμη δεδομένα παραμένουν διφορούμενα, συμπεριλαμβανομένου του τρόπου που οι περιβαλλοντικοί παράγοντες μπορούν να συνεισφέρουν στις επιγενετικές αλλαγές του DNA και των ιστονών, επηρεάζοντας τη γονιδιακή έκφραση σε ιστούς οι οποίοι εμπλέκονται είτε στην παθογένεια είτε στην εξέλιξη του ΣΔτ2. Επιπλέον, δεδομένου ότι οι γνωστοί ταυτοποιημένοι γενετικοί τόποι εξηγούν μόνο ένα μικρό ποσοστό της κληρονομικότητας της νόσου, είναι πολύ πιθανόν η αναζήτηση σπάνιων αλληλομόρφων, διαμέσου των τεχνολογιών αλληλούχησης νέας γενιάς, να παρέχει επιπρόσθετες πληροφορίες και νέες εναλλακτικές θεραπευτικές προσεγγίσεις.

Η σύνδεση μεταξύ του γονοτύπου και του φαινοτύπου επιχειρείται σήμερα κυρίως διαμέσου της μελέτης του συνόλου του μεταγραφώματος (186), δηλαδή της μελέτης του συνόλου των επιπέδων έκφρασης του γονιδιώματος σε συγκεκριμένους ιστούς ή υποπληθυσμούς κυττάρων, αλλά και του επιγενώματος που ρυθμίζει την έκφραση του πρώτου (187). Ειδικότερα, η μελέτη του μεταγραφώματος μπορεί να παρέχει αρκετές πληροφορίες για τη σχέση μεταξύ της γονιδιακής έκφρασης και της εμφάνισης ΣΔτ2, δεδομένου ότι αυτό αντικατοπτρίζει τη λειτουργικότητα των γονιδίων (186). Λόγω του γεγονότος ότι η πλειονότητα των SNPs που έχουν συσχετιστεί με την εμφάνιση της νόσου, μέσω των μελετών GWAS, εδράζονται σε μη κωδικοποιούσες περιοχές του γονιδιώματος σε συνδυασμό με το γεγονός ότι τα αλληλόμορφα αυτά εμφανίζουν μια πληθώρα ρυθμιστικών στοιχείων και eQTLs, θεωρείται αρκετά πιθανόν τα παραπάνω αλληλόμορφα να επηρεάζουν τον κίνδυνο εμφάνισης ΣΔτ2 κυρίως μεταβάλλοντας την έκφραση των αντίστοιχων γονιδίων. Στην υπόθεση αυτή καθοριστικό ρόλο αναμένεται να έχουν οι σύγχρονες τεχνολογίες αλληλούχησης νέας γενιάς (Next generation sequencing-NGS) (188, 189), όπως η τεχνολογία της RNA αλληλούχησης (RNA seq) η οποία παρέχει τη δυνατότητα ανάλυσης όλων των μορίων RNA, τόσο ποιοτικά (προσδιορισμός προϊόντων εναλλακτικής συρραφής, μη κωδικοποιούντων μορίων RNA και νουκλεοτιδικών αλλαγών), όσο και ποσοτικά (προσδιορισμός επιπέδων έκφρασης) (190, 191). Επιπλέον, πολλές βάσεις δεδομένων, συμπεριλαμβανομένου των Multiple Tissue Human Expression Resource (MuTHER) και Genotype-Tissue Expression (GTEx), μπορούν να παρέχουν δεδομένα ποσοτικής έκφρασης σε συνάρτηση με την παρουσία συγκεκριμένων αλληλομόρφων γονιδίων, επιτρέποντας ακόμη και την ταυτοποίηση νέων γονιδίων των οποίων η έκφραση ρυθμίζεται από SNPs που εδράζονται σε ρυθμιστικές περιοχές γνωστών- εμπλεκόμενων με τη νόσο γονιδίων (192).

Μέχρι σήμερα το προφίλ ολόκληρου του μεταγραφώματος του ΣΔτ2 στον άνθρωπο δεν έχει μελετηθεί. Η αδυναμία πρόσβασης στους ιστούς-στόχους της νόσου, όπως ο παγκρεατικός ιστός, πιθανά υπήρξε ο κύριος ανασταλτικός παράγοντας για τέτοιου είδους μελέτες (193). Ωστόσο, ερευνητικά δεδομένα έχουν δείξει ότι το προφίλ έκφρασης των γονιδίων των κυττάρων του περιφερικού αίματος, με σημαντικότερη πηγή τα μονοπύρηννα κύτταρα (Peripheral Blood Mononuclear Cells- PBMCs), αντανακλά σε σημαντικά υψηλό ποσοστό (>80%) το αντίστοιχο προφίλ άλλων ιστών του οργανισμού, μεταξύ των οποίων ιστών-στόχων νοσημάτων, και οι μεταβολές του σε αυτό αντικατοπτρίζουν αλλαγές στο μικρο- και μακρο-περιβάλλον των τελευταίων. Συνεπώς, το περιφερικό αίμα αποτελεί σήμερα μια εναλλακτική και ασφαλή επιλογή για τη μελέτη όλων των παραπάνω μηχανισμών, δεδομένου ότι είναι

άμεσα προσβάσιμο και αντανακλά τις παθοφυσιολογικές διαδικασίες που λαμβάνουν χώρα στα διάφορα όργανα (194, 195).

Είναι σήμερα εμφανές το γεγονός ότι η μελέτη των υποκείμενων μηχανισμών της παθογένειας της νόσου θα πρέπει να συνδυάζεται και με την περαιτέρω ανάλυση και άλλων παραμέτρων, όπως η μεθυλίωση του DNA, οι τροποποιήσεις των ιστονών, η μελέτη των επιπέδων έκφρασης γονιδίων, τόσο σε μεταγραφικό όσο και σε πρωτεϊνικό επίπεδο, καθώς και η συσχέτιση των παραπάνω με τα κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών. Για το λόγο αυτό, οι μελέτες σήμερα εστιάζονται στη συνδυαστική μελέτη του προφίλ του γενώματος, του μεταγραφώματος, του λιπιδώματος, του πρωτεώματος και του μεταβολώματος με στόχο τη δημιουργία δικτύων/μονοπατιών αλληλεπίδρασης και συσχέτισης όλων των παραπάνω με τις μεταβολικές παραμέτρους της νόσου. Τα δεδομένα αυτά αναμένεται να οδηγήσουν στη δημιουργία «μοριακών αποτυπωμάτων» και «μοριακών υπογραφών» τα οποία θα συμβάλουν στην κατανόηση της παθοφυσιολογίας της νόσου αλλά και της ετερογένειας των αποκρίσεων στις διάφορες θεραπευτικές αγωγές ενώ μακροπρόθεσμα, μπορούν να οδηγήσουν στην ταυτοποίηση νέων -εμπλεκόμενων με τη νόσο- γονιδίων και μεταβολικών βιοδεικτών (196).

Είναι ακόμη γνωστό ότι, τα πολύπλοκα και πολυπαραγοντικά νοσήματα, όπως ο ΣΔτ2, συχνά μοιράζονται κοινά χαρακτηριστικά και συμπτώματα ενώ είναι ξεκάθαρο ότι πολλαπλά γονίδια αλληλεπιδρούν μεταξύ τους για τη δημιουργία αλληλοεπικαλυπτόμενων γενετικών δικτύων, τα οποία εμπλέκονται σε πολλές κοινές παθοβιολογικές διεργασίες. Για το λόγο αυτό, η ταυτοποίηση τέτοιων δικτύων αλληλεπίδρασης μπορεί να οδηγήσει ακόμη και στη δημιουργία «μοριακών υπογραφών» για άλλα πολυπαραγοντικά νοσήματα, τα οποία εμφανίζουν συννοσηρότητα με το ΣΔτ2, διαμέσου της αλληλεπικάλυψης των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των γονιδίων. Έτσι, σήμερα πραγματοποιείται μια συστηματική προσπάθεια για την κάλυψη των ανθρώπινων μοριακών αλληλεπιδράσεων (Interactome), το οποίο αποτελεί ένα χάρτη από βιολογικά σχετιζόμενες αλληλεπιδράσεις. Ο συνδυασμός της κλινικής γνώσης με τα αποτελέσματα από τις κυτταρικές και μοριακές αλληλεπιδράσεις, παρέχει τη δυνατότητα διερεύνησης συσχετίσεων μεταξύ των δικτύων αυτών καθώς και μελέτης των προφίλ συννοσηρότητας για την ανάπτυξη νέων υποθέσεων των μηχανισμών παθογένειας των πολυπαραγοντικών νοσημάτων (197).

1.11 Σκοπός διδακτορικής διατριβής

Ο ΣΔτ2 αποτελεί μια κοινή, χρόνια πολυπαραγοντική μεταβολική διαταραχή και μια από τις παγκόσμιες επιδημίες και κύριες αιτίες πρώιμης θνησιμότητας, κυρίως λόγω της υψηλής επίπτωσης των αγγειοπαθειών στα άτομα που πάσχουν. Κατά την τελευταία δεκαετία, πάνω από 60 μελέτες σάρωσης ολόκληρου του γονιδιώματος (GWAS) οδήγησαν στην ταυτοποίηση αρκετών γονιδίων που μπορούν να εμπλέκονται στον αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης ΣΔτ2, συμπεριλαμβανομένου και πολλών ακόμη που δεν έχουν άμεση συμμετοχή στους γνωστούς μοριακούς μηχανισμούς παθογένειας της νόσου. Μέχρι και σήμερα, οι μελέτες αυτές έχουν καταφέρει να ταυτοποιήσουν περισσότερους από 250 SNPs σε πολλούς και διαφορετικούς γενετικούς τόπους που μπορούν να συνδέονται με τον αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης ΣΔτ2. Ωστόσο, το μέγεθος της επίδρασης κάθε ενός από αυτούς στον κίνδυνο εμφάνισης της νόσου παραμένει ιδιαίτερα χαμηλό ενώ το γεγονός ότι η πλειονότητα αυτών εδράζεται σε μη κωδικοποιούσες περιοχές του γονιδιώματος, καθιστά δύσκολη την ταυτοποίηση των «ένοχων» για τη νόσο γονιδίων. Η ανάγκη ανάδειξης ικανών βιοδεικτών αποτελεσματικής πρόγνωσης, διάγνωσης και παρακολούθησης της πορείας των ασθενών και των ατόμων υψηλού κινδύνου, αλλά και κατανόησης των υποκείμενων μοριακών μηχανισμών που είναι υπεύθυνοι για την παθοφυσιολογία της νόσου είναι σήμερα επιτακτική. Ταυτόχρονα, η μελέτη της βιολογίας συστημάτων, η δημιουργία δικτύων αλληλεπίδρασης γονιδίων και η ταυτοποίηση των εμπλεκόμενων μοριακών μεσολαβητών αναμένεται να παρέχουν πληροφορίες και νέες υποθέσεις για τους μηχανισμούς παθογένειας της νόσου αλλά και για την κατανόηση της συννοσηρότητας που παρατηρείται μεταξύ του ΣΔτ2 με άλλα νοσήματα.

Δεδομένου ότι σήμερα για την διαλεύκανση της συμβολής του μεταγραφώματος και του επιγενώματος στην εμφάνιση νοσημάτων είναι απαραίτητη η σύνδεση του γονοτύπου με το φαινότυπο, στόχος της παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν η μελέτη του μοριακού προφίλ των ασθενών με ΣΔτ2, ως προς συγκεκριμένους γενετικούς και επιγενετικούς δείκτες καθώς και η σχέση αυτών με συγκεκριμένους κλινικοπαθολογικούς και προδιαθεσικούς παράγοντες της νόσου. Για το σκοπό αυτό, αναπτύχθηκαν και εφαρμόστηκαν υψηλής ανάλυσης, σύγχρονες μεθοδολογίες αλληλούχησης και ποσοτικοποίησης των επιπέδων έκφρασης γονιδίων που σχετίζονται με τον αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης ΣΔτ2. Αρχικά, επιλέχθηκαν να μελετηθούν τα επίπεδα έκφρασης 24 γονιδίων, τα οποία είναι γνωστό από μελέτες GWAS ότι εμπλέκονται στον αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης ΣΔτ2 διαμέσου SNPs που αυτά φέρουν, στο περιφερικό αίμα ασθενών με ΣΔτ2 και υγιών δοτών. Σε συνέχεια των παραπάνω αποτελεσμάτων, επόμενος στόχος τέθηκε η διερεύνηση των ρυθμιστικών μηχανισμών ελέγχου των επιπέδων της γονιδιακής έκφρασης μέσω i) της ανάλυσης των

miRNAs που επιβεβαιωμένα στοχεύουν τα γονίδια αυτά και ii) της μελέτης του προφίλ μεθυλίωσης των υποκινητών τους. Τα παραπάνω αποτελέσματα αναμένεται να συμβάλλουν στην ανάπτυξη και περιγραφή της «μοριακής υπογραφής» του ΣΔτ2, η οποία θα αποτελέσει τη βάση για τη διερεύνηση των παθογενετικών μηχανισμών της νόσου αλλά και την ανάδειξη νέων πιθανών βιοδεικτών για την πρόγνωση, διάγνωση και την παρακολούθηση των ασθενών με ΣΔτ2.

2. Μεθοδολογία

2.1 Βιολογικό Υλικό: Δείγματα περιφερικού αίματος από ασθενείς με ΣΔτ2 και υγιείς δότες

Για τους σκοπούς της παρούσας διατριβής συλλέχθηκαν συνολικά 88 δείγματα περιφερικού αίματος, εκ των οποίων τα 48 προήλθαν από ασθενείς με ΣΔτ2 και τα 40 από υγιείς δότες, έπειτα από ενημέρωση και έγγραφη συγκατάθεσή τους. Η συλλογή των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε στο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο «Αττικών», μετά την έγκριση της μελέτης από την Επιτροπή Βιοηθικής του Νοσοκομείου, σε συνεργασία με το Εθνικό Κέντρο Έρευνας, Πρόληψης και Θεραπείας του Σακχαρώδη Διαβήτη και των Επιπλοκών του (ΕΚΕΔΙ) στα πλαίσια του Ερευνητικού Προγράμματος: «ΣΥΝΕΡΓΑΣΙΑ 2011»-‘ARETAEUS’ (11ΣΥΝ-10-1821) τα έτη 2014-2015. Η επιλογή των υπό μελέτη δειγμάτων βασίστηκε στα πιο πρόσφατα κριτήρια διάγνωσης της νόσου (198), ενώ για κάθε δείγμα ξεχωριστά καταγράφηκαν συγκεκριμένα κλινικά και εργαστηριακά χαρακτηριστικά, που χρησιμοποιούνται κατά κύριο λόγο σήμερα για τη διάγνωση ή/και την παρακολούθηση της νόσου (**Πίνακας 2.1**). Ανάμεσα σε αυτά περιλαμβάνονται ο δείκτης μάζας σώματος, η παρουσία κεντρικής παχυσαρκίας, η υπέρταση, η υπερλιπιδαιμία, το μεταβολικό σύνδρομο, τα επίπεδα γλυκοζυλιωμένης αιμοσφαιρίνης (%), τα επίπεδα γλυκόζης (mg/dl) και ινσουλίνης πλάσματος (μU/ml), τα επίπεδα χοληστερόλης (mg/dl) και τριγλυκεριδίων (mg/dl) καθώς και το εκάστοτε θεραπευτικό σχήμα των ασθενών με ΣΔτ2. Η ομάδα των υγιών δοτών κατηγοριοποιήθηκε επιπλέον στις δύο ακόλουθες διακριτές υποομάδες: 17 υγιείς δότες που δεν εμφάνιζαν προδιαθεσικούς παράγοντες για την εμφάνιση της νόσου και 23 υγιείς που εμφάνιζαν συγκεκριμένους παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση ΣΔτ2. Οι προδιαθεσικοί παράγοντες που σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης ΣΔτ2 και χρησιμοποιήθηκαν για τον διαχωρισμό των ομάδων στην παρούσα μελέτη περιλαμβάνουν: i) δείκτη μάζας σώματος >25, ii) προηγούμενο ιστορικό διαβήτη κύησης, iii) παρουσία υπέρτασης, iv) δυσλιπιδαιμίας, v) καρδιαγγειακής νόσου, vi) προηγούμενου οικογενειακού ιστορικού ΣΔτ2 ή vii) προδιαβήτη (19).

Πίνακας 2.1: Κλινικοεργαστηριακά χαρακτηριστικά των ασθενών με ΣΔτ2 και των υγιών δοτών που συμμετείχαν στην παρούσα μελέτη

Χαρακτηριστικά	Υγιείς (n=40)	Ασθενείς με ΣΔτ2 (n=48)
Γενικά		
Ηλικία (χρόνια), <i>Μ.Ο (εύρος)</i>	50 (19-69)	60 (35-77)
Φύλο (άρρεν/θήλυ), <i>αριθμός (%)</i>	21/19 (53/47)	27/21 (56/44)
Χρόνος διάγνωσης ΣΔτ2 (χρόνια), <i>Μ.Ο (εύρος)</i>	ΜΕ	5 (0-26)
Οικογενειακό ιστορικό (ΝΑΙ/ΟΧΙ), <i>αριθμός (%)</i>	16/24 (40/60)	34/14 (71/29)
Παράγοντες κινδύνου ^α (παρουσία/απουσία), <i>αριθμός (%)</i>	23/17 (57/43)	ΜΕ
Ανθρωπομετρικά		
Δείκτης Μάζας Σώματος (ΔΜΣ) ^β , <i>Μ.Ο (εύρος)</i>	27,0 (21,3-36,3)	29,5 (21,5-46,5)
<25: φυσιολογικό βάρος, <i>αριθμός (%)</i>	18 (45)	7 (15)
25-30: υπέρβαροι, <i>αριθμός (%)</i>	14 (35)	19 (41)
>30: παχύσαρκοι, <i>αριθμός (%)</i>	8 (20)	22 (46)
Αναλογία Μέσης-Γοφών, <i>Μ.Ο (εύρος)</i>	0,90 (0,71-1,09)	0,93 (0,83-1,18)
Κεντρική παχυσαρκία ^γ (ΝΑΙ/ΟΧΙ), <i>αριθμός (%)</i>	15/25 (38/62)	43/5 (90/10)
Κλινικά		
Υπέρταση ^δ (ΝΑΙ/ΟΧΙ), <i>αριθμός (%)</i>	5/35 (13/87)	29/19 (60/40)
Υπερλιπιδαιμία ^ε (ΝΑΙ/ΟΧΙ), <i>αριθμός (%)</i>	8/32 (20/80)	37/11 (77/23)
Μεταβολικό σύνδρομο ^{στ} (ΝΑΙ/ΟΧΙ), <i>αριθμός (%)</i>	6/34 (15/85)	37/11 (77/23)
Εργαστηριακά		
Επίπεδα γλυκοζυλιωμένης αιμοσφαιρίνης (% ή mmol/ml), <i>Μ.Ο (εύρος)</i>	5,6 (4,9-6,1)	6,6 (5,2-12,1)
<7 % or 53, <i>αριθμός (%)</i>	40 (100)	33 (69)
≥7 % or 53, <i>αριθμός (%)</i>	0 (0)	15 (31)
Επίπεδα γλυκόζης (mg/dl), <i>Μ.Ο (εύρος)</i>	85 (68-120)	
<130, <i>αριθμός (%)</i>	40 (100)	29 (60)
≥130, <i>αριθμός (%)</i>	0 (100)	19 (40)
Επίπεδα ινσουλίνης (μU/ml), <i>Μ.Ο (εύρος)</i>	9,4 (5,2-19,1)	13,7 (3,8-56,0)
Επίπεδα χοληστερόλης (mg/dl), <i>Μ.Ο (εύρος)</i>		
Ολική χοληστερόλη	199 (109-281)	184 (119-256)
Λυποπρωτεΐνη υψηλής πυκνότητας (HDL)	49 (6-79)	41 (17-125)
Λυποπρωτεΐνη χαμηλής πυκνότητας (LDL)	122 (19-192)	113 (53-191)
Επίπεδα τριγλυκεριδίων (mg/dl), <i>Μ.Ο (εύρος)</i>	114 (65-176)	147 (79-363)
Σχήματα Θεραπείας για τον ΣΔτ2		
Χωρίς θεραπεία, <i>αριθμός (%)</i>	ΜΕ	8 (16,7)
Δισκία (μετφορμίνη, βινταγλιπτίνη, σιταγλιπτίνη, σαξαγλιπτίνη, γλιμεπιρίδη, γλικλαζίδη), <i>αριθμός (%)</i>	ΜΕ	22 (45,8)
Δύο δισκία (μετφορμίνη+γλιμεπιρίδη, μετφορμίνη+βινταγλιπτίνη), ή ένα δισκίο (μετφορμίνη) + ενέσιμο ανάλογο GLP-1 (λιραγλουτίδη), <i>αριθμός (%)</i>	ΜΕ	8 (16,7)
Τρία δισκία (μετφορμίνη+βινταγλιπτίνη+πιογλιταζόνη ή μετφορμίνη+βινταγλιπτίνη+γλιμεπιρίδη ή μετφορμίνη+σιταγλιπτίνη+γλιμεπιρίδη), <i>αριθμός (%)</i>	ΜΕ	3 (6,3)
Ενέσιμη ινσουλίνη (±δισκία: μετφορμίνη+σιταγλιπτίνη), <i>αριθμός (%)</i>	ΜΕ	3 (6,3)
Πολλαπλές ενέσεις ινσουλίνης; <i>αριθμός (%)</i>		

^α Οι παράγοντες κινδύνου που σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης ΣΔτ2 περιλαμβάνουν:

i) δείκτη μάζας σώματος >25, ii) προηγούμενο ιστορικό διαβήτη κύησης, iii) υπέρταση, iv) δυσλιπιδαιμία, v) καρδιαγγειακή νόσο ή vi) προηγούμενο οικογενειακό ιστορικό (19), ^β ο ΔΜΣ υπολογίζεται από το πηλίκο του βάρους (kg) προς το τετράγωνο του ύψους (m²), ^γ η κεντρική παχυσαρκία αναφέρεται όταν η περιφέρεια της μέσης είναι ≥102 cm στους άντρες ή ≥88 cm στις γυναίκες, ^δ η υπέρταση αναφέρεται όταν η πίεση του αίματος είναι ≥130/85 mm Hg (ή όταν

κάποιος λαμβάνει φαρμακευτική αγωγή για την υπέρταση, ^ε η υπερλιπιδαιμία καθορίζεται από το Adult Treatment Panel III του Εθνικού Προγράμματος Εκπαίδευσης για τη Χοληστερόλη (199), ^{στ} το μεταβολικό σύνδρομο διαγιγνώσκεται σύμφωνα με τα κριτήρια του NCEP-ATP III report (200) κατά τα οποία απαιτείται η παρουσία τουλάχιστον τριών από τις πέντε ακόλουθες καταστάσεις: i) γλυκόζη κατά τη διάρκεια της νηστείας ≥ 100 mg/dL (ή να λαμβάνει κάποιος φαρμακευτική αγωγή για υπεργλυκαιμία), ii) πίεση αίματος $\geq 130/85$ mm Hg (ή να λαμβάνει κάποιος φαρμακευτική αγωγή για υπέρταση), iii) τριγλυκερίδια ≥ 150 mg/dL (ή να λαμβάνει κάποιος φαρμακευτική αγωγή για την υπερτριγλυκεριδαιμία), iii) HDL-C < 40 mg/dL στους άνδρες ή < 50 mg/dL στις γυναίκες (ή να λαμβάνει κάποιος φαρμακευτική αγωγή για μειωμένη HDL-C), iv) περιφέρεια μέσης ≥ 102 cm στους άνδρες ή ≥ 88 cm στις γυναίκες ΜΕ: μη εφαρμόσιμο
Ανατύπωση από τους Christodoulou MI, Avgeris M., Kokkinoroulou I. et al. Sci Rep. 2019;9(1):1512) (201).

2.2 Απομόνωση Νουκλεϊκών Οξέων

2.2.1 Απομόνωση RNA, Ποιοτικός και Ποσοτικός έλεγχος

Η απομόνωση του ολικού RNA πραγματοποιήθηκε από 0,4 ml περιφερικού αίματος με τη βοήθεια του NucleoSpin® RNA Blood kit (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Germany), μεθοδολογία η οποία βασίζεται στην εκλεκτική δέσμευση των νουκλεϊκών οξέων σε μεμβράνες διαχωρισμού, παρουσία συγκεκριμένων συνθηκών pH και αλατότητας. Σύμφωνα με τη διαδικασία αυτή, το ολικό αίμα αναμειγνύεται με ίσο όγκο κατάλληλου διαλύματος λύσης κυττάρων, παρουσία υψηλής ποσότητας χαστροπικών ιόντων και πρωτεΐνης K. Για την επιτυχή πρόσδεση του RNA στις ειδικές μεμβράνες των στηλών διαχωρισμού, ακολουθεί προσθήκη αιθανόλης 70% στο εκχύλισμα (400μL), η οποία εξασφαλίζει τις κατάλληλες συνθήκες δέσμευσης, και ακολούθως μεταφορά του εκχυλίσματος στις αντίστοιχες στήλες διαχωρισμού. Τα δείγματα φυγοκεντρώνται στα 11000 x g για 30 δευτερόλεπτα και ακολουθεί απομάκρυνση του υπερκειμένου. Για τον καθαρισμό του RNA προστίθεται 350 μL κατάλληλου διαλύματος πλύσης και ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 11000 x g για 30 δευτερόλεπτα. Η απομάκρυνση του -προσδεμένου στη μεμβράνη- DNA πραγματοποιείται με επώαση του δείματος παρουσία rDNase στους 25°C για 15 λεπτά. Η έκλυση του RNA πραγματοποιείται με προσθήκη 60 μL H₂O ελεύθερου νουκλεασών και ακολούθως φυγοκέντρηση στα 11000 x g για 30 δευτερόλεπτα. Το ολικό RNA που απομονώνεται με την παραπάνω διαδικασία φυλάσσεται στους -80°C.

Για τον προσδιορισμό της ποσότητας και της καθαρότητας του RNA λαμβάνονται τιμές απορρόφησης σε μήκη κύματος 260 nm, όπου παρουσιάζουν μέγιστο απορρόφησης τα νουκλεϊκά οξέα και 280 nm, όπου παρουσιάζουν μέγιστο απορρόφησης οι πρωτεΐνες. Ο λόγος της απορρόφησης στα 260 nm προς την απορρόφηση στα 280 nm αποτελεί κριτήριο καθαρότητας του απομονωμένου RNA. Οι τιμές του προαναφερθέντος λόγου θα πρέπει να

κυμαίνονται μεταξύ 1,8- 2,2, καθώς οι τιμές που είναι μικρότερες του 1,8 είναι ενδεικτικές της ύπαρξης σημαντικής ποσότητας πρωτεϊνών στο δείγμα ενώ αντίθετα οι τιμές που υπερβαίνουν το 2,2 υποδηλώνουν υψηλά επίπεδα γενωμικού DNA στο εξεταζόμενο δείγμα. Επιπλέον, κριτήριο καθαρότητας του απομονωμένου RNA αποτελεί ο λόγος της απορρόφησης 230 nm προς 260 nm, ο οποίος πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 2,0- 2,2. Η συγκέντρωση του RNA σε $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ προσδιορίζεται πολλαπλασιάζοντας την τιμή της απορρόφησης στα 260 nm με τον παράγοντα της αραιώσης και με την τιμή 0,04 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, η οποία αντιπροσωπεύει τη συγκέντρωση του RNA που αντιστοιχεί σε μια μονάδα απορρόφησης (202). Ο ποιοτικός έλεγχος του απομονωμένου RNA καθώς και ο υπολογισμός της συγκέντρωσής του πραγματοποιήθηκε στο φωτόμετρο BioSpec-nano Micro-volume UV-Vis Spectrophotometer (Shimadzu Scientific Instruments, Columbia, MD, U.S.A). Η ποσότητα του απομονωμένου RNA από τα δείγματα του περιφερικού αίματος κυμάνθηκε μεταξύ 0,5- 4 μg .

Για την πιστοποίηση της ακεραιότητας του RNA που απομονώθηκε πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1,0 % (w/v) όπου ελέγχθηκε η παρουσία δυο ευδιάκριτων ζωνών, των 28S και 18S ριβοσωμικών (rRNA) μορίων, οι οποίες ιδανικά θα πρέπει να παρουσιάζονται με αναλογία έντασης σήματος 2:1. Ο κατακερματισμός του RNA επιβεβαιώνεται από την παρουσία πολλών μικρότερων μοριακού βάρους ζωνών. Το πήκτωμα παρασκευάζεται χρησιμοποιώντας διάλυμα TBE 1X (89 mM Tris-HCl pH 8.3, 89 mM βορικό οξύ και 2,0 mM EDTA) καθώς και βρωμιούχο αιθίδιο σε τελική συγκέντρωση 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Για την προετοιμασία των δειγμάτων που πρόκειται να ηλεκτροφορηθούν προστίθεται 1 μg RNA και κατάλληλος όγκος διαλύματος χρωστικής 6X (0,2% w/v μπλε της βρωμοφαινόλης, 60% v/v γλυκερόλη και 60mM EDTA), τελικής συγκέντρωσης 1X. Οι συνθήκες ηλεκτροφόρησης του πηκτώματος, το οποίο έχει τοποθετηθεί σε διάλυμα TBE 1X, είναι εφαρμογή σταθερής τάσης 100 V για 50 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

2.2.2 Απομόνωση DNA

Η απομόνωση DNA πραγματοποιήθηκε από 0,4 ml ολικού περιφερικού αίματος, με τη βοήθεια του kit NucleoSpin® DNA Blood (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Germany), μεθοδολογία η οποία βασίζεται στην εκλεκτική δέσμευση των νουκλεϊϊκών οξέων σε μεμβράνες διαχωρισμού, παρουσία συγκεκριμένων συνθηκών pH και αλατότητας. Σύμφωνα με τη διαδικασία αυτή, το ολικό αίμα αναμειγνύεται με ίσο όγκο κατάλληλου διαλύματος λύσης κυττάρων, παρουσία υψηλής ποσότητας χαστροπικών ιόντων και πρωτεΐνάσης K. Για την επιτυχή πρόσδεση του DNA στις ειδικές μεμβράνες των στηλών διαχωρισμού, ακολουθεί προσθήκη αιθανόλης 100% στο εκχύλισμα (420 μL), η οποία εξασφαλίζει τις κατάλληλες

συνθήκες δέσμευσης, και ακολούθως μεταφορά του εκχυλίσματος στις αντίστοιχες στήλες διαχωρισμού. Τα δείγματα φυγοκεντρώνται στα 4000 x g για 3 λεπτά και ακολουθεί απομάκρυνση του υπερκειμένου. Για τον καθαρισμό του -προσδεμένου στη μεμβράνη- DNA προστίθονται κατάλληλα διαλύματα πλύσης και ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 11000 x g για 1 λεπτό. Η έκλυση του DNA πραγματοποιείται με προσθήκη 100 μ L H₂O ελεύθερου νουκλεασών και ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 11000 x g για 1 λεπτό. Το ολικό DNA που απομονώνεται με την παραπάνω διαδικασία φυλάσσεται στους -20°C.

Ο έλεγχος της καθαρότητας του απομονωμένου DNA πραγματοποιείται με μέτρηση της οπτικής απορρόφησής του σε μήκος κύματος 280 nm, μήκος κύματος όπου απορροφούν οι πρωτεΐνες, ενώ ταυτόχρονα ελέγχεται και ο λόγος απορρόφησης 260 nm προς 280 nm, ο οποίος πρέπει να υπολογίζεται περίπου στο 1,8 (αποδεκτά όρια 1,6- 1,8). Η συγκέντρωση του DNA σε μ g/ μ L προσδιορίζεται πολλαπλασιάζοντας την τιμή της απορρόφησης στα 260 nm με τον παράγοντα της αραιώσης και με την τιμή 0,05 μ g/ μ L, η οποία αντιπροσωπεύει τη συγκέντρωση του DNA που αντιστοιχεί σε μια μονάδα απορρόφησης (202). Η μέτρηση των τιμών απορρόφησης στα παραπάνω μήκη κύματος καθώς και ο υπολογισμός της συγκέντρωσης του απομονωμένου DNA πραγματοποιήθηκε στο φωτόμετρο BioSpec-nano Micro-volume UV-Vis Spectrophotometer (Shimadzu Scientific Instruments, Columbia, MD, U.S.A). Η ποσότητα του απομονωμένου DNA σε όλες τις περιπτώσεις κυμάνθηκε μεταξύ 1,5-7,5 μ g.

2.3 Αντίδραση πολυαδενυλίωσης του ολικού RNA για την ανάλυση των μορίων miRNAs

Η αντίδραση πολυαδενυλίωσης χρησιμοποιείται στη συγκεκριμένη περίπτωση για την προσθήκη καταλοίπων αδενοσίνης στο 3' άκρο των ωρίμων μορίων miRNA, τα οποία φυσιολογικά στερούνται poly(A) αλυσίδας, ούτως ώστε να είναι ικανή η πρόσδεση του τροποποιημένου poly(T) εκκινήτη που χρησιμοποιείται στην αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής που ακολουθεί (203). Με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται αύξηση του μεγέθους των συμπληρωματικών μορίων DNA (cDNA) που παράγονται, αποφυγή προσδιορισμού μορίων pre-miRNA -καθώς η δομή θηλιάς-μίσχου που διαθέτουν αναστέλλει την ενεργότητα της poly(A) πολυμεράσης- και μείωση του κόστους προσδιορισμού, καθώς αποφεύγονται οι επαναλαμβανόμενες αντιδράσεις αντίστροφης μεταγραφής.

Το ένζυμο που χρησιμοποιείται για την αντίδραση της πολυαδενυλίωσης απομονώνεται από το βακτήριο *Escherichia coli* και ονομάζεται poly(A) πολυμεράση (PAP). Το ένζυμο αυτό καταλύει την προσθήκη μονοφωσφορικής αδενοσίνης (AMP), χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα την τριφωσφορική αδενοσίνη (ATP), στο 3' άκρο του RNA, χωρίς να απαιτεί την παρουσία κάποιου μορίου εκκινήτη.

Στα πλαίσια της παρούσας μελέτης, για την αντίδραση της πολυαδενυλίωσης προστέθηκαν 0,5 µg ολικού RNA, 0,60 mM ATP, 1 U poly(A) πολυμεράσης (5,000 units/ml), 1X ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης (250 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂ pH 7.9 (New England Biolabs, Inc., Ipswich, MA, USA) και H₂O ελεύθερου νουκλεασών σε τελικό όγκο 12 µL. Η αντίδραση πραγματοποιείται στους 37 °C για 60 λεπτά και τερματίζεται μέσω θέρμανσης στους 65 °C για 10 λεπτά.

2.4 Αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής- (Reverse Transcription)

Η αντίστροφη μεταγραφή (Reverse Transcription) αποτελεί μια τεχνική κατά την οποία το RNA μεταγράφεται *in-vitro* σε cDNA, με τη βοήθεια του ενζύμου αντίστροφη μεταγραφάση. Το ένζυμο αυτό είναι μια RNA-εξαρτώμενη DNA πολυμεράση, η οποία χρησιμοποιεί RNA μόρια ως μήτρα και συνθέτει συμπληρωματικά μόρια DNA (cDNA) ενώ σαν εκκινητής χρησιμοποιείται συνήθως μια μικρή αλληλουχία δεοξυριβονουκλεοτιδίων, αποτελούμενη από περίπου 20 μονοφωσφορικές θυμιδίνες (oligo dT). Η χρήση αυτών βασίζεται στην ύπαρξη της poly(A) αλυσίδας στο 3' άκρο των ευκαρυωτικών mRNAs, όπου και υβριδοποιούνται, επιτρέποντας τη δημιουργία cDNA μορίων από κάθε mRNA μετάγραφο. Ως εκκινητές όμως μπορούν να χρησιμοποιηθούν και τυχαίες αλληλουχίες εξανουκλεοτιδίων (random hexamers) ή συγκεκριμένες νουκλεοτιδικές αλληλουχίες που επιτρέπουν την επιλεκτική μεταγραφή (204).

Στην παρούσα μελέτη, το ένζυμο που χρησιμοποιήθηκε για την αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφής ήταν η αντίστροφη μεταγραφάση του ρετροϊού Moloney που προκαλεί λευχαιμία σε ποντικούς (MMLV-Moloney Murine Leukemia Virus), η οποία απομονώνεται από το βακτήριο *Escherichia coli* και i) δεν έχει ενεργότητα DNA νουκλεάσης ενώ ii) χαρακτηρίζεται από υψηλότερη ενεργότητα και ευαισθησία και για αυτό είναι αποτελεσματικότερη στην αντίστροφη μεταγραφή μεγάλων τμημάτων RNA καθώς και σε δείγματα που περιέχουν πολύ μικρή ποσότητα RNA. Τα δείγματα που κρίθηκαν κατάλληλα, μετά τον ποσοτικό και ποιοτικό έλεγχο του RNA, υποβλήθηκαν σε αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής για τη σύνθεση συμπληρωματικών μορίων DNA (cDNA).

Για τους σκοπούς της παρούσας διατριβής, χρησιμοποιήθηκαν δύο τύποι αντιδράσεων αντίστροφης μεταγραφής. Ο πρώτος είχε ως σκοπό την αντίστροφη μεταγραφή του συνόλου των μορίων mRNA, όπου χρησιμοποιήθηκαν τα ολιγονουκλεοτίδια δεοξυθυμιδίνης ως εκκινητές και ο δεύτερος τύπος αποσκοπούσε στη μεταγραφή των πολυαδενυλιωμένων miRNA μέσω της χρήσης ενός τροποποιημένου poly(T) εκκινητή.

2.4.1 Αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής του συνόλου των μορίων mRNA

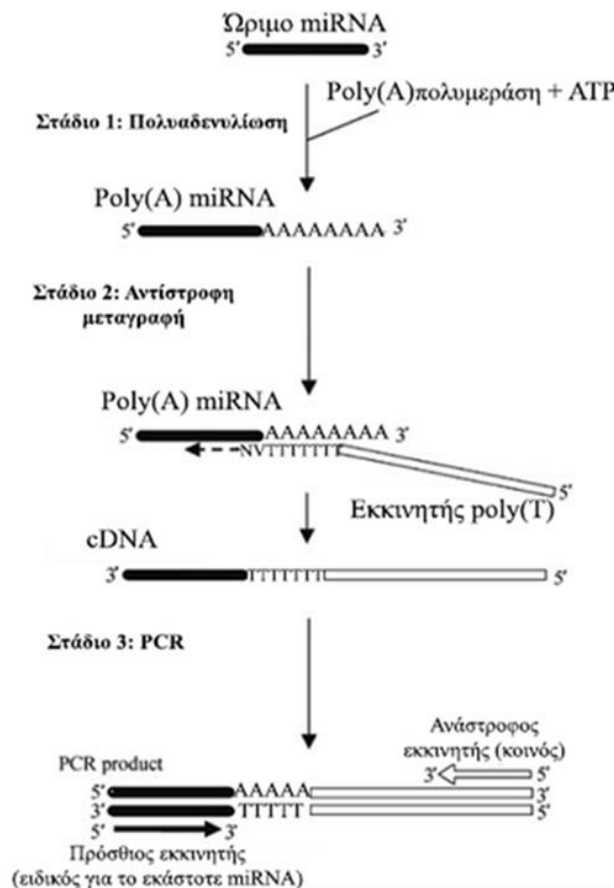
Η πορεία της αντίδρασης της αντίστροφης μεταγραφής του συνόλου των μορίων mRNA σε cDNA που ακολουθήθηκε περιλάμβανε δύο διακριτά στάδια. Στο πρώτο πραγματοποιήθηκε η αποδιάταξη των δευτεροταγών δομών του RNA και η πρόσδεση των μορίων εκκινητών oligo-dT. Το μίγμα της αντίδρασης περιελάμβανε κατάλληλο όγκο διαλύματος RNA που αντιστοιχούσε σε 0,5 μg ολικού RNA, 6,67 μM oligo-dT εκκινητή, αποτελούμενο από 18 θυμιδίνες, 0,5 mM μίγματος δεοξυριβονουκλεοτιδίων και συμπληρώθηκε με H₂O ελεύθερου νουκλεασών μέχρι τελικού όγκου 12 μL. Κατόπιν, επωάστηκε σε θερμοκρασία 70°C για 5 λεπτά και ακολούθησε γρήγορη μεταφορά των μιγμάτων στους 4°C μετά το τέλος της επώασης.

Το δεύτερο στάδιο αφορούσε την υβριδοποίηση των μορίων oligo-dT με την 3' polyA αλυσίδα των mRNA μεταγράφων και τη σύνθεση των μορίων cDNA από το ένζυμο αντίστροφη μεταγραφάση MMLV, ένζυμο που απομονώνεται από το βακτήριο *E.coli*. Έτσι, μετά το τέλος του πρώτου σταδίου στα δείγματα προστέθηκαν 1X ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης (50 mM Tris-HCl pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂), 40 U αναστολέα RNασών, ο οποίος αναστέλλει τις ακόλουθες ριβονουκλεάσες: RNase A, RNase B και RNase C (20 U/μL), 200U αντίστροφη μεταγραφάση του ρετροϊού Moloney που προκαλεί λευχαιμία σε ποντικούς (Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase, M-MLV-RT) (200U/μL) και 1mM DTT (Invitrogen by Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA). Το μίγμα της αντίδρασης, τελικού όγκου 20 μL, επωάστηκε σε θερμοκρασία 37°C για 50 λεπτά και στη συνέχεια στους 70°C για 15 λεπτά για τον τερματισμό της αντίδρασης.

2.4.2 Αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής των πολυαδενυλιωμένων μορίων miRNAs

Για την αντίστροφη μεταγραφή των πολυαδενυλιωμένων miRNAs χρησιμοποιήθηκε 0,5 μg ολικού RNA και ένας ειδικός poly(T) εκκινητής σε τελική συγκέντρωση 0,25 μM, ο οποίος διαθέτει την παρακάτω νουκλεοτιδική αλληλουχία: 5'-GCGAGCACAGAATTAATACGACTCACTATAGGTTTTTTTTTTTNN-3' (V = G, A, C και N = G, A, T, C). Το μίγμα της αντίδρασης τελικού όγκου 14,5 μl επωάζεται στους 70°C για 5 λεπτά. Τα 12 κατάλοιπα θυμιδίνης υβριδοποιούνται με τις αντίστοιχες αδενοσίνες που έχουν προστεθεί κατά την πολυαδενυλίωση ενώ τα δύο τελευταία νουκλεοτίδια είναι εκφυλισμένα. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να υβριδοποιούνται με τα τελευταία νουκλεοτίδια του μικρομοριακού RNA, καθώς το νουκλεοτίδιο V δε μπορεί να προσδεθεί σε αδενοσίνη και το νουκλεοτίδιο N μπορεί να προσδεθεί σε οποιοδήποτε νουκλεοτίδιο. Με τον τρόπο αυτό αποφεύγεται η τυχαία πρόσδεση του εκκινητή στην poly(A) περιοχή (**Εικόνα 2.1**) (203). Η αντίστροφη μεταγραφή των πολυαδενυλιωμένων miRNAs πραγματοποιείται σε τελικό όγκο αντίδρασης 20 μl και περιέχει 50

U MMLV (200U/μL), 10 U αναστολέα RNασών (20 U/μL), ο οποίος αναστέλλει τις ριβονουκλεάσες: RNase A, RNase B και RNase C και 0,5 mM από κάθε δεοξυριβονουκλεοτίδιο (Invitrogen by Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA). Ακολουθεί επώαση στους 37°C για 55 λεπτά και η αντίδραση τερματίζεται με επώαση στους 70°C για 15 min.



Εικόνα 2.1: Σύνοψη των σταδίων για την ποσοτικοποίηση των miRNAs με Real Time PCR. Βήμα 1: Πραγματοποιείται πολυαδενυλίωση των ώριμων miRNAs με σκοπό τη προσθήκη poly(A) άκρων. Βήμα 2: Πραγματοποιείται αντίστροφη μεταγραφή με τη χρήση ειδικού poly(T) εκκινητή. Βήμα 3: Τα cDNAs που προκύπτουν από την παραπάνω διαδικασία χρησιμοποιούνται ως υπόστρωμα για τη Real Time PCR με χρήση ειδικού για κάθε miRNA πρόσθιου εκκινητή και κοινού ανάστροφου που υβριδοποιείται στην κοινή περιοχή του poly(T) εκκινητή. *Ανατύπωση από Shi R. et al, Biotechniques. 2005;39(4):519-25) (203).*

2.5 Αντίδραση ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου- (Quantitative Real-Time PCR, qPCR)

2.5.1 Βασική αρχή μεθόδου

Στην περίπτωση της Real-Time PCR, η ποσότητα του προϊόντος που σχηματίζεται παρακολουθείται σε πραγματικό χρόνο μέσω φθορισμού που εκπέμπεται από ειδικές χρωστικές ή ιχνηθέτες που συμμετέχουν στην αντίδραση και αυτό αποτελεί τη βασική διαφορά

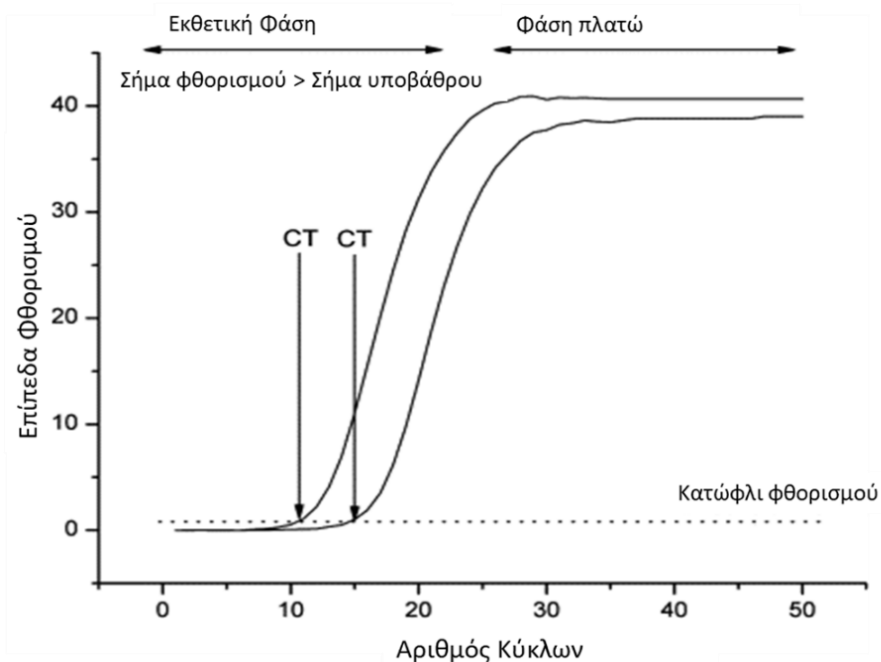
μεταξύ της ποσοτικής Real-Time PCR με τη συμβατική. Οι αντιδράσεις χαρακτηρίζονται από το χρονικό εκείνο σημείο (ή κύκλο ενίσχυσης) στο οποίο το αντίγραφο-στόχος ανιχνεύεται για πρώτη φορά. Αυτή η τιμή χαρακτηρίζεται ως κατώφλι (Ct, threshold cycle) και αντιπροσωπεύει τη στιγμή που το σήμα φθορισμού είναι για πρώτη φορά εντονότερο του θορύβου υποβάθρου. Επομένως, όσο μεγαλύτερη είναι η αρχική ποσότητα του DNA στόχου, τόσο γρηγορότερα θα εμφανιστεί το πρώτο σήμα, δηλαδή τόσο μικρότερη θα είναι η τιμή του Ct. Ο ποσοτικός προσδιορισμός είναι εφικτός κατά τη διάρκεια της εκθετικής φάσης της αντίδρασης αφού κατά τη διάρκεια της γραμμικής φάσης (συνήθως οι πρώτοι 10-15 κύκλοι), η αντίδραση ενίσχυσης έχει μόλις αρχίσει και το ποσοστό φθορισμού που εκπέμπεται δεν έχει ξεπεράσει το φθορισμό υποβάθρου. Στη φάση πλατώ δεν παρατηρείται πια ενίσχυση και η αντίδραση θεωρείται ότι έχει τελειώσει (205, 206). Το σημαντικότερο πλεονέκτημα της qPCR σε σχέση με τη συμβατική PCR είναι ότι η ανίχνευση του σήματος πραγματοποιείται στην εκθετική φάση της αντίδρασης (μέσω του προσδιορισμού της τιμής του Ct) και όχι στη φάση κορεσμού, όπου τα επίπεδα του σήματος μπορεί να φτάσουν να είναι παρόμοια και όχι ανάλογα της αρχικής ποσότητας υποστρώματος, οδηγώντας σε αξιόπιστα αποτελέσματα προσδιορισμού της αρχικής ποσότητας υποστρώματος.

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται στην qPCR είναι παρόμοια με αυτά της συμβατικής PCR και περιλαμβάνουν το αρχικό υπόστρωμα DNA, ειδικούς εκκινητές για την επιθυμητή περιοχή ενίσχυσης, ρυθμιστικό διάλυμα πολυμερισμού (200 mM Tris HCl pH 8.4, 500 mM KCl, 50 mM MgCl₂), τα δεοξυριβονουκλεοτίδια και την DNA πολυμεράση, με τη διαφορά ότι χρησιμοποιούνται επιπλέον φθορίζοντα μόρια που προσδέονται, είτε ειδικά είτε μη ειδικά, στην αλληλουχία που ενισχύεται. Τα φθορίζοντα συστήματα ανίχνευσης κατέχουν κεντρικό ρόλο στην qPCR και κατηγοριοποιούνται σε δύο μεγάλες ομάδες: στα συστήματα που χρησιμοποιούν μόρια που προσδέονται μη ειδικά στο δίκλωνο DNA με αποτέλεσμα την παραγωγή φθορισμού, και στα συστήματα που βασίζονται στην ειδική δέσμευση των μορίων ανιχνευτών σε συγκεκριμένο μέρος της ενισχυόμενης αλληλουχίας με αποτέλεσμα τη μετέπειτα εκπομπή φθορισμού (205, 206).

Στην πρώτη κατηγορία, αυτή των μη ειδικών μορίων, ανήκει το σύστημα ανίχνευσης που βασίζεται στη χρωστική SYBR Green και το οποίο είναι ιδιαίτερα διαδομένο στα ερευνητικά πρωτόκολλα παγκοσμίως. Η χρωστική SYBR Green αποτελεί τον απλούστερο και πιο οικονομικό τρόπο ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης των PCR προϊόντων. Πρόκειται για μια ασύμμετρη χρωστική κυανίνης η οποία δημιουργεί σύμπλοκα με το DNA. Τα σύμπλοκα αυτά απορροφούν σε μήκος κύματος 497 nm (μπλε) και εκπέμπουν πράσινο φως (520 nm). Η SYBR Green αποτελεί την πιο συχνή επιλογή για δοκιμασίες Real-time PCR και τα αποτελέσματά της

θεωρούνται αξιόπιστα εφόσον έχει προηγηθεί σωστός σχεδιασμός των εκκινήτων της αντίδρασης, ενώ για την ανάλυση των αποτελεσμάτων και την εξακρίβωση της αξιοπιστίας τους απαιτείται να ακολουθήσουν περαιτέρω αναλύσεις μετά την αντίδραση, όπως η ανάλυση των καμπύλων τήξης των προϊόντων (207).

Μέσω της καμπύλης τήξης, είναι εφικτό να υπολογιστεί το T_m (Melting Temperature) των εκάστοτε προϊόντων που παράγονται κατά την αντίδραση, το οποίο και επιτρέπει τη διάκριση μεταξύ των ειδικών και των μη ειδικών προϊόντων ή/και των διμερών των εκκινήτων που πιθανώς σχηματίζονται κατά την αντίδραση. Η καμπύλη τήξης κατασκευάζεται, σε πραγματικό χρόνο, καθώς η θερμοκρασία αυξάνεται βαθμιαία από τους 60°C έως τους 95°C και λαμβάνονται παράλληλα επαναλαμβανόμενες μειωμένες τιμές φθορισμού καθώς τα προϊόντα της PCR αποδιατάσσονται σταδιακά. Χρησιμοποιώντας την πρώτη αρνητική παράγωγο της καμπύλης φθορισμού-θερμοκρασίας απεικονίζονται γραφικά κορυφές που αντιστοιχούν στα εκάστοτε προϊόντα της αντίδρασης και από τις οποίες υπολογίζεται η μοναδική τιμή T_m για κάθε διαφορετικό προϊόν (Εικόνα 2.2).



Εικόνα 2.2: Αντιπροσωπευτικές καμπύλες ενίσχυσης Real Time PCR. Το κατώφλι φθορισμού τοποθετείται υψηλότερα από το σήμα υποβάθρου και το ποσοστό φθορισμού ανιχνεύεται μετά τους πρώτους 10-15 κύκλους. Ανατύπωση από τους Kubista M. et al, *Mol Aspects Med.* 2006;27(2-3):95-125) (205).

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή έγινε χρήση των συστημάτων ανίχνευσης προϊόντων της qPCR μέσω της χρωστικής SYBR Green. Ταυτόχρονα, για την κανονικοποίηση του εκπεμπόμενου φθορισμού, χρησιμοποιήθηκε η χρωστική αναφοράς (Passive reference dye)

ROX. Η χρωστική ROX προστίθεται στο μίγμα της αντίδρασης qPCR και χρησιμοποιείται για τη διόρθωση των τιμών φθορισμού που ενδεχομένως να παρουσιάζουν μικρές διαφορές από αντίδραση σε αντίδραση. Στο τέλος κάθε κύκλου αντίδρασης, ο φθορισμός της χρωστικής αναφοράς διαιρείται με το φθορισμό της χρωστικής ROX, η οποία εκπέμπει σε διαφορετικό μήκος κύματος και παρουσιάζει αμετάβλητο φθορισμό κατά τη διάρκεια της αντίδρασης. Με τον τρόπο αυτό προκύπτουν οι κανονικοποιημένες τιμές φθορισμού, με τη βοήθεια των οποίων κατασκευάζονται οι καμπύλες ενίσχυσης (amplification curve).

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων πραγματοποιείται με την εξαγωγή των τιμών Ct, με τη βοήθεια κατάλληλου λογισμικού (Applied Biosystems). Καθοριστικό σημείο, για τον υπολογισμό μιας τιμής Ct, αποτελεί η τοποθέτηση του κατωφλιού (threshold) στις καμπύλες ενίσχυσης, το οποίο τοποθετείται στην εκθετική φάση της καμπύλης, ενώ μπορεί να διαφέρει μεταξύ μιας σειράς αντιδράσεων. Για το λόγο αυτό, χρησιμοποιείται ένα κοινό δείγμα (βαθμονομητής) μεταξύ διαφορετικών σειρών αντιδράσεων, ούτως ώστε να μπορεί να γίνει διόρθωση των αναμενόμενων διακυμάνσεων στην τιμή του Ct. Ως αποτέλεσμα, όσο και να μεταβάλλεται η τιμή Ct, η διαφορά του Ct από το βαθμονομητή παραμένει αμετάβλητη (208, 209).

2.5.2 Ανάπτυξη μεθοδολογίας για την ποσοτικοποίηση των επιπέδων έκφρασης των mRNAs

2.5.2.1 Σχεδιασμός και σύνθεση εκκινητών των αντιδράσεων qPCR

Ο σχεδιασμός των εκκινητών-ανιχνευτών της αντίδρασης γίνεται ακολουθώντας τους γενικούς κανόνες που περιγράφηκαν για τη συμβατική PCR λαμβάνοντας υπόψη επιπλέον τα παρακάτω: i) οι εκκινητές θα πρέπει να σχεδιάζονται με τέτοιο τρόπο ούτως ώστε να παρουσιάζουν Tm κοντά στους 60°C. Αυτό γίνεται γιατί στα περισσότερα πρωτόκολλα qPCR η υβριδοποίηση των εκκινητών και ο πολυμερισμός γίνεται σε ένα στάδιο, στους 60°C, καθώς αυτή είναι η βέλτιστη θερμοκρασία πολυμερισμού για την ειδική Taq πολυμεράση που χρησιμοποιείται στην αντίδραση και ii) λαμβάνοντας υπόψη το γεγονός ότι η αντίδραση αποκτά τη μέγιστη απόδοσή της όταν ενισχύονται αλληλουχίες μικρού μεγέθους, το συνιστώμενο μέγεθος προϊόντων PCR είναι μεταξύ 60 και 300 bp.

Για την εκτίμηση των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων αλλά και των επιμέρους μεταγράφων ενδιαφέροντος καθώς και του γονιδίου αναφοράς *HPRT1* σχεδιάστηκαν ειδικοί για την αλληλουχία του κάθε μεταγράφου πρόσθιοι και ανάστροφοι εκκινητές, σύμφωνα με τις καταχωρημένες αλληλουχίες τους στο NCBI (NCBI Reference Sequence), χρησιμοποιώντας το λογισμικό Primer Premier (PREMIER Biosoft International, Palo Alto CA, U.S.A). Οι περιοχές

ενίσχυσης του κάθε μεταγράφου, η αλληλουχία του κάθε εκκινητή καθώς και το μέγεθος των προϊόντων της αντίδρασης συνοψίζονται στον **Πίνακας 2.2**.

Πίνακας 2.2: Χαρακτηριστικά εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στις αντιδράσεις qPCR για την ενίσχυση των υπό μελέτη γονιδίων/επιμέρους μεταγράφων.

Γονίδιο / Επιμέρους μετάγραφα που μελετήθηκαν (αριθμοί πρόσβασης)	Πρόσθιος εκκινητής		Ανάστροφος εκκινητής		Μέγεθος προϊόντος (bp)
	Αλληλουχία (5'→3')	C (nM)	Αλληλουχία (5'→3')	C (nM)	
ADAMTS9 Σύνολο μεταγράφων NM_182920.1 (tv 1) NM_001318781.1 (tv 4)	GCAACCCTGCGAGTA TGCTCG	200	GGCAGTTGATGGTGGTTTGGT	200	152
CAMK1D Σύνολο μεταγράφων NM_020397.3 (tv 1) NM_153498.3 (tv 2)	CCTGATGGAGAAGGA CCCCGA	200	GCTGACGGACTCGTGGATGT	200	109
CAPN10 Σύνολο μεταγράφων NM_023083.3 (tv 1) NM_023085.3 (tv 3)	CTGAAGGGCGTAGCA GGAAG	200	CGAGACAATGAAGGCATGGA A	200	171
CAPN10 tv 3 NM_023085.3	GCACCTCTGGAAGGT CCCA	200	CTCCTGGGCGTAGCGATGT	200	103
CDC123 Σύνολο μεταγράφων NM_006023.2	CGGGGGCAGTGTCTT TCCTA	200	AGAAAGATGTCGCTGAGGGTT T	200	105
CDK5 Σύνολο μεταγράφων NM_004935.3 (tv 1) NM_001164410.2 (tv 2)	TTCCCGTCCGCTGTTA CTCA	150	TCGATGGACGTGGAGTACAGC	150	94
CDK5 tv 1 NM_004935.3	GGGCTGGGATTCTGT CATAGC	150	GATGGACGTGGAGTACAGCTT G	150	213
CDK5 tv 2 NM_001164410.2	TCCTGAGATTGTA GAATGGGGAG	200	TCGATGGACGTGGAGTACAGC	200	159
CDKAL1 Σύνολο μεταγράφων NM_017774.3	CTGCAAACTAAACA CGCCAGA	200	CCCGTGTCTTCACTGGTCAAC	200	123
CDKN2A Σύνολο μεταγράφων NM_000077.4 (tv 1) NM_058197.4 (tv 3) NM_058195.3 (tv 4) NM_001195132.1 (tv 5)	GCGATGTCGCACGGT ACCT	200	CTGTAGGACCTTCGGTGACTG AT	200	166
CDKN2A tv 1 & 5 NM_000077.4 (tv 1); <i>p16INK4A</i> NM_001195132.1 (tv 5)	TGGAGCCTTCGGCTG ACTG	200	GCCCATCATCATGACCTGGAT	200	140
CDKN2A tv 3 NM_058197.4	CCCAACGCACCGAAT AGTTACG	200	TTCCCCTGCAAACCTTCGTCC	200	108
CDKN2A tv 4 NM_058195.3; <i>p14ARF</i>	TGAGGGTTTTTCGTGG TTCACA	200	CCCATCATCATGACCTGGTCTT CT	200	149
CDKN2B Σύνολο	GTGTCGTTAAGTTTA CGGCCAA	150	CCCATCATCATGACCTGGATC	150	233

μεταγράφων NM_004936.3 (tv 1) NM_078487.2 (tv 2)					
FTO Σύνολο μεταγράφων NM_001080432.2	ACTGGAAGCACTGTG GAAGAAGA	200	TCAAGATTTTCATTCCCTTTGTT CA	200	101
HHEX Σύνολο μεταγράφων NM_002729.4	GCGGACGGTGAACG ACTACA	200	GATGGTCTGGTTCGTTGGAGAA T	200	139
HNF1B Σύνολο μεταγράφων NM_000458.3 (tv 1) NM_001165923.3 (tv 2) NM_001304286.1 (tv 3)	CTCCAACCAGACTCA CAGCCT	200	GGTGACTGATTGTTGAGGAG GAA	200	149
HNF4A Σύνολο μεταγράφων NM_178849.2 (tv 1) NM_000457.4 (tv 2) NM_178850.2 (tv 3) NM_001030003.2 (tv 4) NM_175914.4 (tv 5) NM_001030004.2 (tv 6) NM_001258355.1 (tv 7) NM_001287182.1 (tv 8) NM_001287183.1 (tv 9) NM_001287184.1 (tv 10)	TCCATACGCATCCTTG ACGAG	200	GGCGGTCGTTGATGTAGTCC	200	187
HPRT1 Σύνολο μεταγράφων NM_000194.2	TGGAAAGGGTGTTTA TTCCTCAT	300	ATGTAATCCAGCAGGTCAGCA A	300	151
IGF2BP2 Σύνολο μεταγράφων NM_006548.5 (tv 1) NM_001007225.2 (tv 2) NM_001291869.2 (tv 3) NM_001291872.2 (tv 4) NM_001291873.2 (tv 5) NM_001291874.2 (tv 6) NM_001291875.2 (tv 7)	GAAGTCATCGTGCCT CGTGAC	200	AGGCGACTCCCTGAGGGTAT	200	160
IGF2BP2 tv 4 NM_001291872.2	GACACTACCACGTTG ATGGCT	200	TGTGTTGACTAGGGAAAAGGC A	200	161
IGF2BP2 tv 7 NM_001291875.2	AATGTGGAACAAGAG CCATGGAG	100	GCAGCGGAAATCAATCTGTC T	100	198
IGF2BP2 tv 4, 5, 6 & 7 * NM_001291872.2 (tv 4) NM_001291873.2 (tv 5) NM_001291874.2 (tv 6) NM_001291875.2 (tv 7)	TGGACACTACCACGT TGATGG	300	GTTCTCAAAGTATGCCCGC	300	174
JAZF1 Σύνολο μεταγράφων NM_175061.3	GGACCACAGAGAGT GCCATCA	100	TTCTGTGACCATTCTTAGCGTG A	100	156
KCNJ11 Σύνολο μεταγράφων NM_001166290.1 (tv 1) NM_000525.3 (tv 2)	CAACAGCCCACTCTA CGACCT	150	CACTTTGACGGTGTGCCAA	150	229
KCNQ1 Σύνολο μεταγράφων NM_000218.2 (tv 1) NM_181798.1 (tv 2)	GGTCATTGACGCAT GCAGT	200	TGAGGGCTTCCAATGGACT	200	169
KCNQ1 tv 1 NM_000218.2	AATGCTTCGTTTACCA CTTCGC	200	ATCCAGAAGAGAGTCCCGT	200	115

MTNR1B total transcripts NM_005959.3	TCCTGGTGATCCTCTC CGTG	200	GCCCAGCCGTCATAGAAGAT	200	145
NOTCH2 Σύνολο μεταγράφων NM_024408.3 (tv 1) NM_001200001.1 (tv 2)	TTTGCCAACACTAACGTA GAAACTCAAC	200	TGCCAAGAGCATGAATACAGA GA	200	145
PPARG Σύνολο μεταγράφων NM_138712.3 (tv 1) NM_015869.4 (tv 2) NM_138711.3 (tv 3) NM_005037.5 (tv 4) NM_001330615.1 (tv 5)	TTGCAGTGGGGATGT CTCATAA	200	TCAGCGGGAAGGACTTTATGT AT	200	174
SLC30A8 Σύνολο μεταγράφων NM_173851.2 (tv 1) NM_001172814.1 (tv 2) NM_001172811.1 (tv 3) NM_001172813.1 (tv 4) NM_001172815.2 (tv 5)	AGGTGACTTGGCAAAA CACACAA	200	TCCCTCCATAATGATTACCTGA CA	200	124
TCF7L2 Σύνολο μεταγράφων NM_001146274.1 (tv 1) NM_030756.4 (tv 2) NM_001146283.1 (tv 3) NM_001146284.1 (tv 4) NM_001146285.1 (tv 5) NM_001146286.1 (tv 6) NM_001198525.1 (tv 7) NM_001198526.1 (tv 8) NM_001198527.1 (tv 9) NM_001198528.1 (tv 10) NM_001198529.1 (tv 11) NM_001198530.1 (tv 12) NM_001198531.1 (tv 13)	AACCCACCTCCACACT TACCAG	200	CTACGGTGCCAGGCGATAGT	200	109
TCF7L2 tv 4 & 9 * NM_001146284.1 (tv 4) NM_001198527.1 (tv 9)	CCCTCACGCCTCTTAT CACG	200	ACTGTTGACCTTGCCATCCTA	200	196
TCF7L2 tv 12 NM_001198530.1	CGCCCGAACCTCTAA CAAAGT	200	TGCCAGGCGATAGTGGGTAAT	200	203
THADA Σύνολο μεταγράφων NM_022065.4 (tv 1) NM_001083953.1 (tv 3) NM_001271643.1 (tv 4) NM_001271644.1 (tv 5)	TGGGAGAACCTCGTG TCTGATG	200	CTGGAGACTGGCTGTTAAGAT TGT	200	181
THADA tv 1 & 3 * NM_022065.4 (tv 1) NM_001083953.1 (tv 3)	CTACACCACTTTTCCT CACCAACC	200	AGGCAAACCTCTGTTGACTGGC A	200	180
THADA tv 4 NM_001271643.1	GCTGCTGTGGTGGAA AGGAAC	200	TGGATTTCTGAGACAGGAGGC A	200	206
THADA tv 5 NM_001271644.1	ACATTTTCAGGATTCG GGGAAAC	200	AAGAGCAAACATCAATACAAA CCCA	200	243
TSPAN8 Σύνολο μεταγράφων NM_004616.2	TTCCGAAATGGCAGG TGTGA	150	CAGCAATCAATATGTCCACAG CA	150	191
WFS1 Σύνολο μεταγράφων NM_006005.3 (tv 1)	GGCGACACGGATGA AGAACTC	100	CCTCACCTCCCGTTCGTCT	100	150

Στον πίνακα αναγράφονται τα γονίδια και επιμέρους μετάγραφα που επιλέχθηκαν να μελετηθούν (αριθμός πρόσβασης GeneBank), η αλληλουχία και η τελική συγκέντρωση (nM) των εκκινητών της αντίδρασης, καθώς και το μέγεθος του προϊόντος (ζεύγη βάσεων, bp) της αντίδρασης για κάθε περίπτωση. Ανατύπωση από τους Christodoulou MI, Avgeris M., Kokkinopoulou I. et al. *Sci Rep.* 2019;9(1):1512) (201).

* Λόγω της αδυναμίας ποσοτικοποίησης των επιπέδων έκφρασης του μεταγράφου 5 του γονιδίου *IGF2BP2*, αναπτύχθηκαν πρωτόκολλα qPCR για την ταυτόχρονη μελέτη των επιπέδων έκφρασης των μεταγράφων 4, 5, 6 και 7 του γονιδίου. Παρομοίως, σχεδιάστηκαν κοινά ζεύγη εκκινητών για την ποσοτικοποίηση των επιπέδων έκφρασης των μεταγράφων 4 και 9 του γονιδίου *TCF7L2* καθώς και των μεταγράφων 1 και 3 του γονιδίου *THADA*.

2.5.2.2 Συνθήκες αντίδρασης qPCR

Οι συνθήκες αντίδρασης για τον ποσοτικό προσδιορισμό των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων/μεταγράφων περιελάμβαναν 5 ng cDNA, 5,0 μ L Kara SYBR® Fast Universal 2X qPCR Master Mix (το μείγμα περιλαμβάνει την χρωστική SYBR® Green I, την DNA πολυμεράση, τα δεοξυριβονουκλεοτίδια, τη χρωστική αναφοράς και το ρυθμιστικό διάλυμα της αντίδρασης) (Kara Biosystems, Inc., Woburn, MA, USA) καθώς και κατάλληλη συγκέντρωση του εκάστοτε ζεύγους εκκινητών που καταγράφεται στον πίνακα 2.2, σε τελικό όγκο αντίδρασης 10 μ L. Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν στο 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA). Το θερμοκρασιακό πρωτόκολλο είναι κοινό για όλες τις περιπτώσεις των γονιδίων και περιλαμβάνει τα παρακάτω στάδια: 95°C για 3 λεπτά (αρχικό στάδιο αποδιάταξης και ενεργοποίησης του ενζύμου), 40 κύκλοι: 95°C για 3 δευτερόλεπτα (στάδιο αποδιάταξης), 60°C για 30 δευτερόλεπτα (στάδιο υβριδοποίησης των εκκινητών και των ανιχνευτών, επιμήκυνσης και καταγραφής του εκπεμπόμενου φθορισμού). Σε κάθε σειρά αντιδράσεων περιλαμβάνονται, εκτός από τα άγνωστα δείγματα, ένα δείγμα βαθμονομητής που στη συγκεκριμένη περίπτωση χρησιμοποιήθηκε cDNA από την αθανατοποιημένη παγκρεατική σειρά 1.2B4 (ECACC, Salisbury, UK) και δείγματα αρνητικού ελέγχου.

Η έκφραση του γονιδίου της φωσφοριβοζυλοτρανσφεράσης της υποξανθίνης-γουανίνης (*HPRT1*) χρησιμοποιήθηκε για την κανονικοποίηση των επιπέδων έκφρασης των υπό μελέτη γονιδίων στόχων καθώς παρουσιάζει σταθερή έκφραση στα δείγματα του περιφερικού αίματος χωρίς σημαντικές διακυμάνσεις. Επομένως, όπως έχει προταθεί και από τη διεθνή βιβλιογραφία (210, 211) μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την κανονικοποίηση της γονιδιακής έκφρασης μεταξύ διαφορετικών δειγμάτων. Η κανονικοποίηση χρησιμοποιείται κυρίως για να επιτευχθεί η διόρθωση των διακυμάνσεων, που ενδεχομένως λαμβάνουν χώρα, στην απόδοση της αντίστροφης μεταγραφής μεταξύ των δειγμάτων.

Μετά από κάθε αντίδραση qPCR ακολουθεί η ανάλυση ειδικότητας των προϊόντων μέσω παραγωγής καμπυλών τήξης με βάση το παρακάτω θερμοκρασιακό πρωτόκολλο: σταδιακή ανύψωση θερμοκρασίας από 59°C έως 95°C με ρυθμό 0,1°C/δευτερόλεπτο και παράλληλη μέτρηση του εκπεμπόμενου φθορισμού για κάθε 0,3 °C ανύψωσης.

2.5.3 Ανάπτυξη μεθοδολογίας για την ποσοτικοποίηση των επιπέδων έκφρασης των miRNAs

2.5.3.1 Σχεδιασμός και σύνθεση εκκινητών των αντιδράσεων qPCR

Για την ενίσχυση των cDNAs που αντιστοιχούν στα υπό μελέτη miRNAs, αλλά και στο μόριο αναφοράς SNORD48, χρησιμοποιήθηκαν ειδικοί πρόσθιοι εκκινητές και ο κοινός

ανάστροφος εκκινητής ο οποίος υβριδοποιείται στην περιοχή του poly(T) εκκινητή που χρησιμοποιήθηκε κατά τη διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής. Οι πρόσθιοι εκκινητές σχεδιάζονται με βάση την καταχωρημένη αλληλουχία των υπό μελέτη miRNA στις βάσεις δεδομένων NCBI και miRBase. Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ποσοτικοποίηση των επιπέδων έκφρασης των miRNAs αλλά και του μορίου αναφοράς SNORD48 καθώς και τα επιμέρους χαρακτηριστικά τους, συνοψίζονται στον **Πίνακα 2.3**.

Πίνακας 2.3: Λίστα των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη των επιπέδων έκφρασης των miRNAs που πειραματικά επιβεβαιωμένα στοχεύουν τα γονίδια που σχετίζονται με τον αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης ΣΔτ2.

Όνομα miRNA	Αλληλουχία (5'→3')	Μήκος (nt)	Ποσοστό GC (%)	Tm (°C)	C (nM)
Πρόσθιος εκκινητής					
hsa-let-7g-5p	TGAGGTAGTAGTTGTACAGTT	22	36.0	49.0	200
hsa-miR-125b-5p	TCCCTGAGACCCCTAACTTGTGAA	23	48.0	55.0	200
hsa-miR-24-3p	TGGCTCAGTTCAGCAGGAAC	20	55.0	54.0	200
hsa-miR-10b-5p	TACCCTGTAGAACCGAATTTGTG	23	43.0	53.0	100
hsa-miR-124-3p	TAAGGCACGCGGTGAATGCC	20	60.0	56.0	200
hsa-miR-34a-5p	TGGCAGTGTCTTAGCTGGTTGT	22	50.0	55.0	200
hsa-miR-155-5p	AATGCTAATCGTGATAGGGGTAA	23	39.0	52.0	200
hsa-let-7b-5p	TGAGGTAGTAGGTTGTGTGGTT	22	45.0	53.0	200
hsa-miR-98-5p	TGAGGTAGTAAGTTGTATTGTT	22	32.0	47.0	200
hsa-miR-133a-3p	TTGGTCCCTTCAACCAGCT	20	55.0	54.0	100
hsa-miR-1-3p	GGGGTGAATGTAAAGAAGTATGTAT	26	38.0	55.0	300
hsa-miR-5682	GTAGCACCTTGACAGGATAAGGT	22	50.0	55.0	200
hsa-miR-29b-3p	TAGCACCATTTGAAATCAGTGTT	23	35.0	50.0	200
hsa-miR-29a-3p	TAGCACCATCTGAAATCGGTTA	22	41.0	51.0	200
RNU48	TGATGATGACCCAGGTAAGTCT	23	48.0	55.0	200
Ανάστροφος (κοινός) εκκινητής					
PAP-R	GCGAGCACAGAATTAATACGAC	22	45.0	53.0	100-300

Στον πίνακα αναγράφονται τα miRNAs που επιλέχθηκαν να μελετηθούν καθώς και τα χαρακτηριστικά των εκκινητών τους (αλληλουχία, μήκος (nt), ποσοστό GC (%), θερμοκρασία τήξης (Tm, °C), τελική συγκέντρωση στην αντίδραση (nM)). Ανατύπωση από τους Kokkinoroulou *l. et al., Endocrine. 2019;66(2):226-39* (212).

2.5.3.2 Συνθήκες αντίδρασης qPCR

Για την ποσοτικοποίηση των επιπέδων έκφρασης των miRNAs χρησιμοποιήθηκε ξανά, όπως και στην περίπτωση της ποσοτικοποίησης των γονιδίων/μεταγράφων, η μέθοδος της ποσοτικής PCR με χρήση της χρωστικής SYBR Green. Το πρωτόκολλο της αντίδρασης είναι ίδιο με αυτό που περιγράφηκε στην ενότητα 2.5.2.2 με τη διαφορά ότι στην περίπτωση αυτή χρησιμοποιήθηκε ως μόριο αναφοράς το μικρό πυρηνισκικό RNA 48 (Small nucleolar RNA 48,

SNORD48, RNU48), για την κανονικοποίηση των επιπέδων έκφρασης όλων των miRNAs που επιλέχθηκαν να μελετηθούν, λόγω της σταθερής και αμετάβλητης έκφρασής του στα δείγματα περιφερικού αίματος, σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία (213).

Οι συγκεντρώσεις των εκκινητών που επιλέχθηκαν για την ποσοτικοποίηση των επιπέδων έκφρασης των miRNAs συνοψίζονται στον πίνακα 2.3 Για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων μεταξύ των διαφορετικών σειρών αντιδράσεων χρησιμοποιήθηκε ξανά η αθανатоποιημένη παγκρεατική σειρά 1.2B4.

2.5.4 Ανάλυση των αποτελεσμάτων της qPCR με τη μέθοδο της σχετικής ποσοτικοποίησης μέσω σύγκρισης των τιμών Ct ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)

Τόσο για την ανάλυση της έκφρασης των γονιδίων/επιμέρους μεταγράφων τους όσο και των miRNAs επιλέχθηκε η μέθοδος της σχετικής ποσοτικοποίησης μέσω της μεθόδου σύγκρισης των τιμών Ct (Comparative Ct method, $2^{-\Delta\Delta Ct}$). Το πλεονέκτημα της συγκεκριμένη μεθόδου είναι ότι το μόριο στόχος και το μόριο αναφοράς προσδιορίζονται, παράλληλα, στην ίδια σειρά αντιδράσεων. Ωστόσο, απαραίτητες προϋποθέσεις για την εφαρμογή της μεθόδου αυτής, είναι η ενίσχυση των δύο αυτών μορίων να πραγματοποιείται με παρόμοιες αποδόσεις αντίδρασης, ενώ ταυτόχρονα, επιβάλλεται σε κάθε σειρά αντιδράσεων η παρουσία ενός δείγματος βαθμονομητή, η έκφραση του οποίου χρησιμοποιείται για την κανονικοποίηση της τιμής του Ct κάθε δείγματος (209).

Για κάθε δείγμα, συμπεριλαμβανομένου του βαθμονομητή, υπολογίζεται η τιμή $\Delta Ct = Ct(\text{μόριο-στόχος}) - Ct(\text{μορίου αναφοράς})$, η οποία επιτρέπει την κανονικοποίηση της έκφρασης του μορίου στόχου με αυτή του μορίου αναφοράς σε κάθε δείγμα. Στη συνέχεια, υπολογίζεται, για κάθε δείγμα, η τιμή $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct(\text{δείγματος}) - \Delta Ct(\text{βαθμονομητή})$, και έπειτα η τιμή $2^{-\Delta\Delta Ct}$ η οποία και αποτελεί τις Σχετικές Μονάδες Ποσοτικοποίησης (Relative Quantification Units, RQ), και χρησιμοποιείται περαιτέρω στη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων (209).

2.6 Πυροαλληλούχηση- (Pyrosequencing)

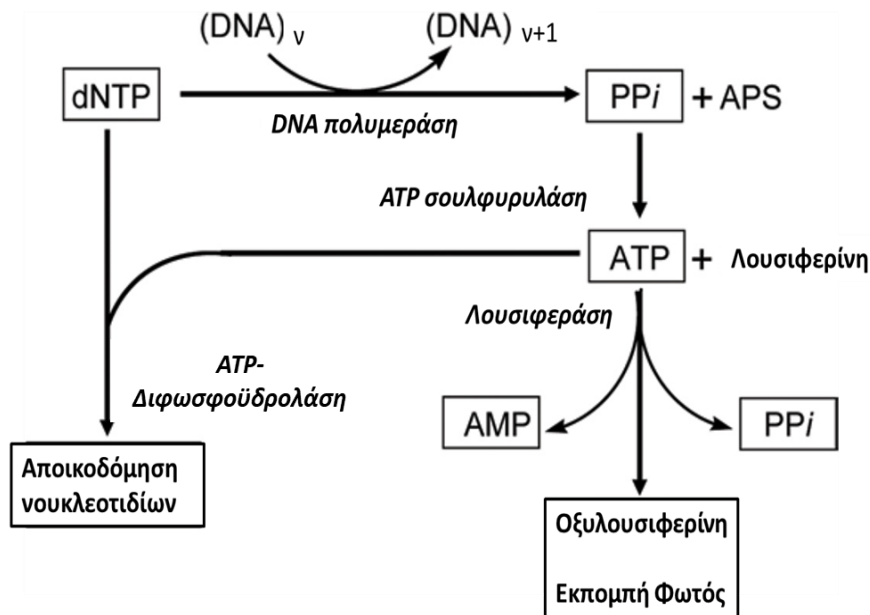
2.6.1 Βασική αρχή μεθόδου

Η πυροαλληλούχηση αποτελεί μια σύγχρονη μέθοδο αλληλούχησης η οποία επιτρέπει την παρακολούθηση της ενσωμάτωσης των νουκλεοτιδίων σε πραγματικό χρόνο μέσω της ενζυμικής μετατροπής του πυροφωσφορικού (PPi) σε αναλογικό εκπεμπόμενο φως. Η ενσωμάτωση κάθε νουκλεοτιδίου καθορίζεται από τη συμπληρωματικότητα του μονόκλωνου DNA εκμαγείου που μελετάται και επιτυγχάνεται διαμέσου της ταυτόχρονης παρουσίας της DNA πολυμεράσης και ενός ειδικού εκκινητή αλληλούχησης στην αντίδραση. Η τεχνολογία της

πυροαλληλούχησης βασίζεται στην ποσοτική μετατροπή του PPi που απελευθερώνεται, κατά την επαναλαμβανόμενη διαδικασία της ενσωμάτωσης των νουκλεοτιδίων, σε βιολογικομετρικό σήμα. Κατά τη διάρκεια διεξαγωγής της αντίδρασης μόνο ένα από τα τέσσερα νουκλεοτίδια είναι παρόν ενώ οι βιοχημικές αντιδράσεις επιτελούνται λόγω της παρουσίας των ακόλουθων τεσσάρων ενζύμων: i) της DNA πολυμεράσης I (*Escherichia coli*), ii) της ATP-σουλφυρυλάσης (*Saccharomyces cerevisiae*), iii) της λουσιφεράσης (*Photinus pyralis*) και iv) της ATP-διφωσφοϋδρολάσης (*Solanum tuberosum*). Βασική προϋπόθεση για την αποφυγή της αποικοδόμησης του εκκινητή αλληλούχησης και συνεπώς της παρουσίας ψευδών θετικών σημάτων, η DNA πολυμεράση που χρησιμοποιείται στα πειράματα της πυροαλληλούχησης δεν διαθέτει ενεργότητα εξωνουκλεάσης (214).

Βασική αρχή της μεθόδου είναι ότι το PPi που ελευθερώνεται, μετά από κάθε επιτυχή ενσωμάτωση νουκλεοτιδίου, μετατρέπεται μέσω της ATP σουλφυρυλάσης σε ATP, χρησιμοποιώντας σαν υπόστρωμα την 5' φωσφοθειϊκή αδενοσίνη (APS). Η αντίδραση αυτή παράγει την ενέργεια που απαιτεί η λουσιφεράση για την οξείδωση της D- λουσιφερίνης σε οξυλουσιφερίνη. Η διάσπαση της οξυλουσιφερίνης επάγει, με τη σειρά της, την εκπομπή φωτονίου σε μήκος κύματος 560 nm, το οποίο ανιχνεύεται και καταγράφεται από ειδική συσκευή ανίχνευσης. Τα νουκλεοτίδια που δεν ενσωματώνονται στο DNA εκμαγείο αποικοδομούνται παρουσία της ATP-διφωσφοϋδρολάσης, προτού προστεθούν τα επόμενα νουκλεοτίδια στην αντίδραση, μέσω μιας διαδικασίας που επιτρέπει την επαναλαμβανόμενη και ελεγχόμενη προσθήκη των νουκλεοτιδίων σπό το ειδικό δοχείο ελεγχόμενης πίεσης και θερμοκρασίας (**Εικόνα 2.3**).

Η ευκολία χρήσης της μεθόδου καθώς και η υψηλή αξιοπιστία της έχουν καταστήσει την πυροαλληλούχηση ευρέως γνωστή και εφαρμόσιμη σε μια ποικιλία διαγνωστικών εφαρμογών όπως είναι η ανίχνευση μεταλλαγών, η ταυτοποίηση μικροοργανισμών, ο καθορισμός πολυμορφισμών (SNPs) καθώς και η γονοτύπηση πολυπλοειδικών δειγμάτων (214).



Εικόνα 2.3: Ένζυμα και υποστρώματα που χρησιμοποιούνται στη μέθοδο της πυροαλληλούχησης. Το μονόκλωνο DNA, αφού υβριδοποιηθεί με τον εκκινήτη αλληλούχησης, αναμιγνύεται με κατάλληλα ένζυμα (πλάγια γράμματα) και υποστρώματα (APS και λουσιφερίνη). Μετά την επιτυχή ενσωμάτωση ενός νουκλεοτιδίου από την DNA πολυμεράση στη νεοσυντιθέμενη αλυσίδα DNA επάγεται απελευθέρωση PP_i. Το PP_i που ελευθερώνεται αλληλεπιδρά με το APS, παρουσία της ATP σουλφυρυλάσης, με αποτέλεσμα την παραγωγή ATP. Το ATP με τη σειρά του, παρουσία του υποστρώματος λουσιφερίνη και του ενζύμου λουσιφεράση, επάγει την παραγωγή της οξυλουσιφερίνης καθώς και ταυτόχρονη ανιχνεύσιμη εκπομπή φωτός. Κάθε νουκλεοτίδιο που δεν ενσωματώνεται, αποικοδομείται από την ATP-διφωσφοϋδρολάση προτού προστεθεί το επόμενο. ATP: τριφωσφορική αδενοσίνη, APS: 5-φωσφοθειϊκή αδενοσίνη, PP_i: πυροφωσφορικό. Ανατύπωση από τους *Delaney C. et al, Methods Mol Biol. 2015;1343:249-64* (215).

2.6.2 Εκτίμηση του ποσοστού μεθυλίωσης των γονιδίων διαμέσου της μεθόδου της πυροαλληλούχησης

Η μεθυλίωση του DNA αποτελεί μια επιγενετική τροποποίηση η οποία λαμβάνει χώρα στη 5' θέση του νουκλεοτιδίου της κυτοσίνης σε περιοχές νησίδων CpG (περιοχές πλούσιες σε δινουκλεοτίδια CpG, >55%) από τις DNA μεθυλοτρανσφεράσες και διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στη ρύθμιση της έκφρασης γονιδίων κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης αλλά και της γήρανσης (216, 217).

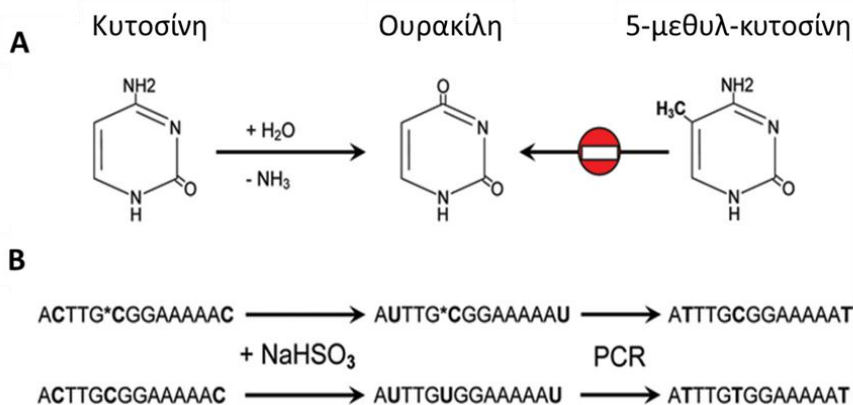
Διαφορικά πρότυπα μεθυλίωσης γονιδίων έχουν ενοχοποιηθεί για την ανάπτυξη πολλών ασθενειών, συμπεριλαμβανομένου της καρκινογένεσης, όπου παρατηρείται γενική μείωση του προφίλ μεθυλίωσης με ταυτόχρονη υπερμεθυλίωση των υποκινητών των γονιδίων που εμπλέκονται στην επιδιόρθωση του DNA, στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και στην απόπτωση (218). Ως αποτέλεσμα, η ανάλυση του προφίλ μεθυλίωσης στο DNA έχει αποδειχθεί

μέχρι σήμερα ένα χρήσιμο εργαλείο για την πρόγνωση, πρόωμη διάγνωση, ταξινόμηση και θεραπεία πολλών ανθρώπινων νεοπλασιών (219).

Πολλές μέθοδοι υπάρχουν σήμερα για την ανάλυση των επιπέδων μεθυλίωσης των υποκινητών συγκεκριμένων γονιδίων, με ευρύτερα γνωστή τη μελέτη του προτύπου μεθυλίωσης σε συγκεκριμένες CpG θέσεις μέσω της διαδικασίας της πυροαλληλούχησης, αφού έχει προηγηθεί η αντίδραση των DNA δειγμάτων με το όξινο θειώδες νάτριο, διαδικασία που ακολουθήθηκε και στα πλαίσια της παρούσας διδακτορικής διατριβής (215). Αποτέλεσμα της παραπάνω αντίδρασης είναι, τα μη μεθυλιωμένα νουκλεοτίδια της κυτοσίνης να μετατρέπονται σε νουκλεοτίδια ουρακίλης, ενώ ταυτόχρονα τα μεθυλιωμένα νουκλεοτίδια της κυτοσίνης να προστατεύονται από τη διαδικασία αυτή και να διατηρούν την νουκλεοτιδική αλληλουχία σταθερή στις μετέπειτα αντιδράσεις. Η παραπάνω χημική αντίδραση μπορεί με τον τρόπο αυτόν να «μεταφράζει» μια συγκεκριμένη επιγενετική πληροφορία σε ανιχνεύσιμη αλλαγή στην νουκλεοτιδική αλληλουχία και επιτρέπει την ανάλυση των επιπέδων μεθυλίωσης σε συγκεκριμένες θέσεις του γονιδιώματος.

2.6.3. Επεξεργασία DNA δειγμάτων με Όξινο Θειώδες Νάτριο- (Bisulfite Conversion)

Τα επίπεδα της μεθυλίωσης του DNA είναι εφικτό σήμερα να προσδιοριστούν μετά την επεξεργασία των DNA δειγμάτων με όξινο θειώδες νάτριο (Bisulfite Conversion), το οποίο επιτρέπει τη μετατροπή των αμεθυλιωτών καταλοίπων κυτοσίνης σε ουρακίλη, αφήνοντας ανέπαφες τις αντίστοιχες μεθυλιωμένες. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκε το Epiect Bisulfite Kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany), με τη βοήθεια του οποίου προσδιορίστηκαν τα επίπεδα μεθυλίωσης των υποκινητών των γονιδίων *CDKN2A* και *CDK5*. Η αντίδραση αυτή αποτελεί καθοριστικό βήμα κατά τη διαδικασία της μελέτης του προφίλ μεθυλίωσης των γονιδίων, δεδομένου ότι τα δείγματα επωάζονται σε υψηλές συγκεντρώσεις άλατος, παρουσία υψηλής θερμοκρασίας και χαμηλού pH. Μερικά από τα μειονεκτήματα της μεθόδου είναι η -περιορισμένου βαθμού- αποικοδόμηση του DNA, λόγω των ακραίων συνθηκών της αντίδρασης, καθώς και η μερική απώλεια της αρχικής ποσότητας DNA, λόγω των πολλών σταδίων καθαρισμού των προϊόντων που απαιτεί η παραπάνω διαδικασία. Με την εφαρμογή του παρακάτω πρωτοκόλλου εξασφαλίζεται η προστασία του δείγματος με τη χρήση κατάλληλων διαλυμάτων, όπως το διάλυμα προστασίας του DNA (DNA Protect Buffer) και κατάλληλους δείκτες pH ενώ η απόδοση της αντίδρασης φτάνει το 99% (**Εικόνα 2.4**).



Εικόνα 2.4: Α) Η απαμίνωση της κυτοσίνης μετά την επεξεργασία των DNA δειγμάτων με όξινο θειώδες νάτριο (NaHSO₃) οδηγεί στη μετατροπή της σε ουρακίλη. Αντίθετα, η μεθυλομάδα στη 5' θέση του καταλοίπου της κυτοσίνης παρεμποδίζει τη διαδικασία αυτή. Β) Η μεθυλιωμένη κυτοσίνη (πάνω σειρά) παραμένει ανεπηρέαστη μετά την επεξεργασία με το άλας ενώ η μη μεθυλιωμένη (κάτω σειρά) μετατρέπεται σε ουρακίλη και ακολούθως μετά την PCR σε θυμίνη. * μεθυλιωμένη κυτοσίνη. Ανατύπωση από τους Delaney C. et al, *Methods Mol Biol.* 2015;1343:249-64 (215).

Για την παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε αρχική ποσότητα DNA από δείγματα του περιφερικού αίματος που αντιστοιχούσε σε 200 ng, 85 μl Bisulfite Mix, 35 μl DNA Protect Buffer (διάλυμα το οποίο αποτρέπει την αποικοδόμηση του DNA κατά τη διάρκεια της αντίδρασης με το όξινο θειώδες νάτριο ενώ ταυτόχρονα επάγει την αποδιάταξη του DNA που απαιτείται για την αποτελεσματική μετατροπή των αμεθυλιωτών κυτοσινών σε ουρακίλες) και H₂O ελεύθερου νουκλεασών, μέχρι τελικού όγκου 140 μl (Epiect Bisulfite Kit Qiagen, GmbH, Hilden, Germany). Το θερμοκρασιακό πρωτόκολλο περιελάμβανε τους ακόλουθους διαδοχικούς κύκλους αποδιάταξης και επώασης: 95 °C για 5 λεπτά, 60 °C για 25 λεπτά, 95 °C για 5 λεπτά, 60 °C για 85 λεπτά, 95 °C για 5 λεπτά και 60 °C για 175 λεπτά. Με το πέρας της αντίδρασης, προστίθεται στο μίγμα 560 μl διαλύματος που επιτρέπει τη δέσμευση του DNA στις στήλες διαχωρισμού και έπειτα για την απομάκρυνση των αλάτων από τα προϊόντα της αντίδρασης ακολουθούν τα παρακάτω βήματα καθαρισμού: Προσθήκη 500 μl διαλύματος πλύσης, φυγοκέντρηση στις μέγιστες στροφές για 1 λεπτό και απομάκρυνση του υπερκειμένου. Προσθήκη 500 μl ενός δεύτερου διαλύματος πλύσης, φυγοκέντρηση στις μέγιστες στροφές για 1 λεπτό και απομάκρυνση του υπερκειμένου. Για την έκλυση του δεσμευμένου DNA προστίθενται 20 μl διαλύματος έκλυσης και ακολουθεί φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στα 12000 x g. Όλα τα παραπάνω διαλύματα και αντιδραστήρια περιλαμβάνονται στο Epiect Bisulfite Kit της Qiagen (Cat. No 59104). Τα DNA δείγματα μετά το πέρας της διαδικασίας διατηρούνται στους -20°C.

2.6.4 Συμβατική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης- (Regular PCR)

Η βασική αρχή της PCR αφορά την *in vitro* ενίσχυση συγκεκριμένων αλληλουχιών DNA με τη βοήθεια διαδοχικών μεταβολών θερμοκρασίας. Απαραίτητα στοιχεία για την πραγματοποίηση της αντίδρασης, εκτός από το αρχικό DNA που θα χρησιμοποιηθεί ως εκμαγείο για την δημιουργία αντιγράφων, είναι η DNA πολυμεράση, το μείγμα δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dATP, dCTP, dGTP και dTTP), ένα ειδικό ζευγάρι εκκινητών που σχεδιάζεται ανάλογα με την επιθυμητή περιοχή ενίσχυσης και καθορίζει το μέγεθος του προϊόντος, καθώς και ρυθμιστικό διάλυμα δράσης του ενζύμου.

Η αντίδραση πραγματοποιείται σε αυτόματους κυκλικούς θερμοποιητές που μεταβαίνουν αυτόματα στις καθορισμένες επιθυμητές θερμοκρασίες κάθε κύκλου. Τα πρωτόκολλα που χρησιμοποιούνται κάθε φορά ποικίλλουν ανάλογα με τις απαιτήσεις του ενζύμου, τη δομή και το μέγεθος του DNA που χρησιμοποιείται ως εκμαγείο, καθώς και τις βέλτιστες συνθήκες υβριδοποίησης του εκκινητή. Ωστόσο, ένα γενικό πρωτόκολλο εργασίας της συμβατικής τεχνικής PCR (Regular PCR) περιλαμβάνει: i) την αποδιάταξη του αρχικού δείγματος (denaturation), κατά την οποία επιτυγχάνεται η διάσπαση των δευτεροταγών δομών του DNA, ii) την υβριδοποίηση (annealing), κατά την οποία πραγματοποιείται η επιλεκτική πρόσδεση των εκκινητών στο μονόκλωνο DNA-εκμαγείο του 3' άκρου κάθε αλυσίδας, iii) την προέκταση (extension) ή επιμήκυνση (elongation), κατά την οποία επιτρέπεται η σύνθεση της συμπληρωματικής αλυσίδας του DNA χρησιμοποιώντας δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs) και iv) την αποδιάταξη των προϊόντων, κατά την οποία επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός των δίκλωνων DNA μορίων, τα οποία θα αποτελέσουν εκμαγεία για τον επόμενο κύκλο σύνθεσης DNA.

2.6.4.1 Σχεδιασμός εκκινητών για την αντίδραση της συμβατικής PCR

Ο σχεδιασμός των ολιγονουκλεοτιδίων που χρησιμοποιούνται ως εκκινητές στις αντιδράσεις PCR αποτελεί κομβικό σημείο κατά την ανάπτυξη του πρωτοκόλλου της συμβατικής PCR. Οι βασικοί κανόνες που ακολουθούνται για το σχεδιασμό ενός ζεύγους εκκινητών, όπου τα προϊόντα της αντίδρασης θα χρησιμοποιηθούν μεταγενέστερα στις αντιδράσεις της πυροαλληλούχησης είναι οι παρακάτω (214, 215): i) το μέγεθος τους θα πρέπει να κυμαίνεται από 18-24 νουκλεοτίδια και η θερμοκρασία υβριδοποίησης τους (annealing temperature) να κυμαίνεται μεταξύ 50 °C έως 68 °C, ii) θα πρέπει να αποφεύγονται διαδοχικές επαναλήψεις των ίδιων νουκλεοτιδίων, ιδιαίτερα όταν πρόκειται για επαναλήψεις GC κοντά στο 3' άκρο του εκκινητή, για να αποφεύγεται η δημιουργία δομών φουρκέτας iii) τα 3' άκρα των εκκινητών δε θα πρέπει να εμφανίζουν συμπληρωματικότητα μεταξύ τους αλλά και μεταξύ αυτών και του εκκινητή αλληλούχησης, ούτως ώστε να ελαχιστοποιείται η δημιουργία διμερών

εκκινητών, iv) ένας από τους δύο εκκινητές, είτε ο πρόσθιος είτε ο ανάστροφος, θα πρέπει να είναι βιοτυνλιωμένος και να έχει υψηλού βαθμού καθαρότητα. Ο εκκινητής αλληλούχησης θα πρέπει να έχει μήκος 15-20 νουκλεοτίδια και θερμοκρασία υβριδοποίησης από 45 °C έως 55 °C ενώ τα προϊόντα της αντίδρασης PCR θα πρέπει να έχουν μέγεθος 80 έως 200 bp. Το πρόγραμμα PyroMark Assay Design Software 2.0 επιτρέπει τον επιτυχή σχεδιασμό τόσο των εκκινητών της PCR όσο και του εκκινητή αλληλούχησης, λαμβάνοντας υπόψη τα ανωτέρω κριτήρια και χρησιμοποιήθηκε και στην παρούσα μελέτη.

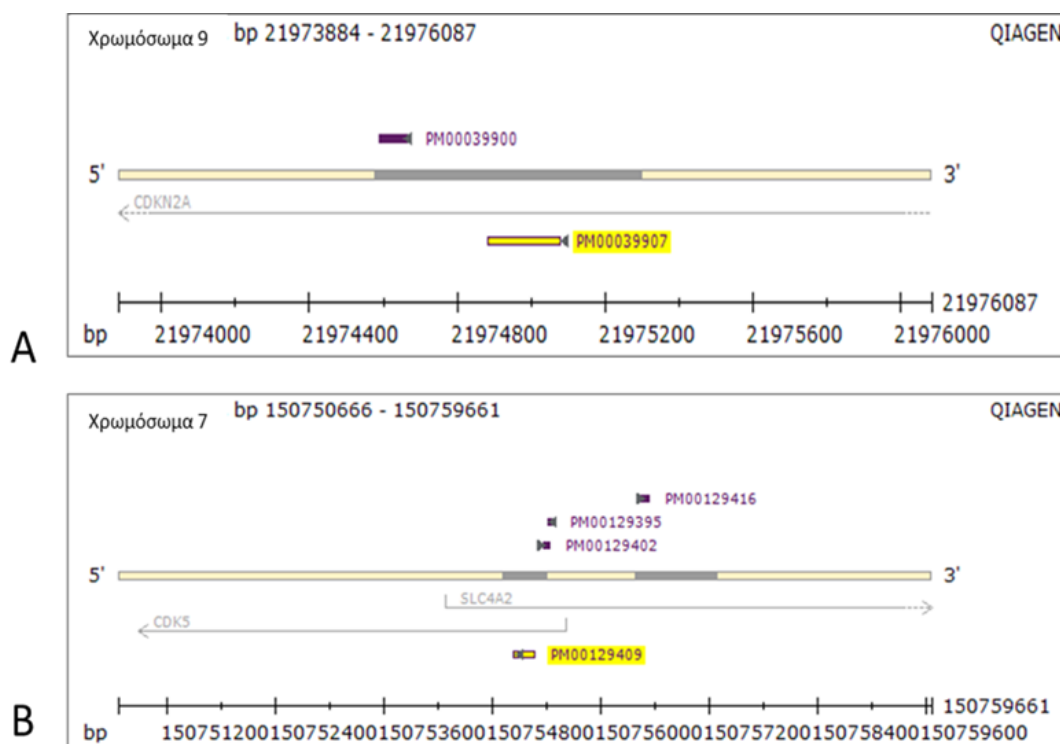
Για την ενίσχυση των επιλεγμένων περιοχών των υποκινητών των γονιδίων *CDKN2A* και *CDK5*, που μελετήθηκαν στα πλαίσια της παρούσας διδακτορικής διατριβής, χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές Hs_CDKN2A_02_PM PyroMark CpG assay (PM00039907) (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany) για την μελέτη του προφίλ μεθυλίωσης του γονιδίου *CDKN2A* και Hs_CDK5/SLC4A2_01_PM PyroMark CpG assay (PM00129409) (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany) για τη μελέτη του προφίλ μεθυλίωσης του *CDK5*, οι οποίοι είναι σχεδιασμένοι με τέτοιο τρόπο έτσι ώστε να υβριδοποιούνται στην καινούργια αλληλουχία που προκύπτει μετά την επεξεργασία των DNA δειγμάτων με όξινο θειώδες νάτριο. Και στις δύο περιπτώσεις χρησιμοποιήθηκε βιοτυνλιωμένος ανάστροφος εκκινητής, ο οποίος επιτρέπει την ακινητοποίηση των προϊόντων της PCR στα σφαιρίδια στρεπταβιδίνης κατά τη μεταγενέστερη διαδικασία της πυροαλληλούχησης. Τα χαρακτηριστικά της αλληλουχίας που επιλέχθηκε να αναλυθεί -ως προς τα επίπεδα μεθυλίωσης- για κάθε περίπτωση συνοψίζονται στον **Πίνακα 2.4 (Εικόνα 2.5)**.

Πίνακας 2.4: Αλληλουχίες που επιλεχθηκαν να μελετηθούν -ως προς τα επίπεδα μεθυλίωσής τους- για τις περιπτώσεις των γονιδίων *CDKN2A* και *CDK5*.

Συμβολισμός γονιδίου	<i>CDKN2A</i>	<i>CDK5</i>
Όνομα γονιδίου	cyclin-dependent kinase inhibitor 2A	cyclin-dependent kinase 5
Αριθμός πρόσβασης στη βάση Ensembl	ENSG00000147889	ENSG00000164885
Αλληλουχία που αναλύεται	TCGCTAAGTGCTCGGAGTTAATA GCACCTCCTCCGAGCACTCGCTC ACGGCGT	CGGCGCCGCGGCGGGGCGCCCG GAAAACGGAC
Αλληλουχία που αναλύεται (μετά την επεξεργασία με το όξινο θειώδες νάτριο)	TYGTAAAGTGTTYGGAGTTAATA GTATTTTTTYGAGTATTYGTTTA YGGYGT	YGGYGTGYGGYGGGYGTTYG GAAAAYGGA
Θέσεις νουκλεοτιδίων ως προς το TSS	-210 έως -158	-274 έως -243
Αριθμός CpG νησίδων	6	8
Μέγεθος προϊόντος (bp)	199	248
Βιοτυνλιωμένος	Ανάστροφος	Ανάστροφος

εκκινητής

TSS: Transcription Start Site- Θέση έναρξης της μεταγραφής



Εικόνα 2.5: Χρωμοσωμικές θέσεις που επιλέχθηκαν να μελετηθούν ως προς τα πρότυπα μεθυλίωσής τους στη περίπτωση A) του *CDKN2A* και B) του *CDK5*. (Ανατύπωση από Qiagen).

2.6.4.2 Συνθήκες αντίδρασης συμβατικής PCR

Για την ενίσχυση των προαναφερόμενων αλληλουχιών του πίνακα, πραγματοποιήθηκε συμβατική PCR με τη βοήθεια του PyroMark PCR kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany), το οποίο είναι ειδικά σχεδιασμένο και βελτιστοποιημένο για τη μετέπειτα ανάλυση των δειγμάτων με τη διαδικασία της πυροαλληλούχησης και περιλαμβάνει όλα τα αντιδραστήρια και τα διαλύματα που απαιτούνται για την ενίσχυση της υπό μελέτη περιοχής. Η επεξεργασία των DNA δειγμάτων με όξινο θειώδες νάτριο, που περιγράφηκε στην ενότητα 2.3 και επιτυγχάνει τη μετατροπή των μη μεθυλιωμένων κυτοσινών σε ουρακίλες, οδηγεί στη δημιουργία ενός DNA εκμαγείου που χαρακτηρίζεται από την παρουσία 3 νουκλεοτιδικών βάσεων. Λόγω των παραπάνω χαρακτηριστικών, το εκμαγείο DNA που προκύπτει χαρακτηρίζεται από χαμηλή απόδοση και μπορεί να οδηγήσει σε δημιουργία παραπροϊόντων κατά την αντίδραση της PCR. Τα αντιδραστήρια που επιλέχθηκαν ωστόσο, στα πλαίσια της παρούσας μελέτης, επιτρέπουν την επιλεκτική πρόσδεση των εκκινητών παρεμποδίζοντας το

αταίριαστο ζευγάρι, λόγω της παρουσίας ενός ισορροπημένου συνδυασμού αλάτων που προστίθενται στην αντίδραση, επιτυγχάνοντας την παρουσία ενός μοναδικού ειδικού προϊόντος απαραίτητου για τα μεταγενέστερα πειράματα της πυροαλληλούχησης. Επιπλέον, η Hot Start DNA πολυμεράση που επιλέχθηκε για την ενίσχυση των υπό μελέτη τμημάτων DNA προσφέρει υψηλή ειδικότητα και απόδοση αντίδρασης.

Για την ενίσχυση των αλληλουχιών ενδιαφέροντος στις περιοχές των υποκινητών των γονιδίων *CDKN2A* και *CDK5* πραγματοποιήθηκε συμβατική PCR με 15 ng DNA (το οποίο έχει προηγουμένως υποστεί επεξεργασία με όξινο θειώδες νάτριο για τη σήμανση των μεθυλιωμένων καταλοίπων κυτοσίνης), 1X PyroMark Master Mix (μείγμα που περιλαμβάνει την DNA πολυμεράση, τα δεοξυριβονουκλεοτίδια και το ρυθμιστικό διάλυμα της αντίδρασης), 1X CoralLoad (χρωστική φόρτωσης), 1X Q-solution -προαιρετικό διάλυμα που διευκολύνει την αντίδραση ενίσχυσης και αυξάνει την ειδικότητα της αντίδρασης (PyroMark PCR kit, QIAGEN GmbH, Hilden, Germany) καθώς και 0,2 μM από κάθε εκκινητή, σε τελικό όγκο αντίδρασης 20 μl. Το θερμοκρασιακό πρωτόκολλο περιελάμβανε την αρχική ενεργοποίηση της πολυμεράσης που πραγματοποιείται στους 95°C για 15 λεπτά, ενώ στη συνέχεια ακολουθήσαν τα στάδια: 94 °C για 30 δευτερόλεπτα, 56 °C για 30 δευτερόλεπτα και 72 °C για 30 δευτερόλεπτα, τα οποία επαναλαμβάνονται για 45 κύκλους, ενώ το τελικό στάδιο της επέκτασης πραγματοποιείται στους 72 °C για 10 λεπτά.

2.6.4.3 Ανίχνευση των προϊόντων της αντίδρασης συμβατικής PCR διαμέσου ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης

Ο πιο κλασικός τρόπος ανίχνευσης των προϊόντων της PCR είναι η ηλεκτροφόρηση του δείγματος σε gel αγαρόζης, παράλληλα με γνωστή μοριακού βάρους ποσότητα DNA, ώστε να μπορεί να καθορισθεί το μέγεθος των μορίων του προϊόντος. Τα νουκλεϊκά οξέα είναι αρνητικά φορτισμένα, οπότε ο διαχωρισμός των μορίων επιτυγχάνεται με τη μετακίνησή τους μέσα από τους πόρους του πηκτώματος προς τον θετικό πόλο υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου. Η βασική αρχή της μεθόδου βασίζεται στο γεγονός ότι τα μόρια μικρότερου μοριακού βάρους μεταναστεύουν γρηγορότερα σε αντίθεση με τα μόρια μεγαλύτερου μοριακού βάρους.

Για την ανάλυση των προϊόντων PCR πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1 % (w/v) που περιείχε TBE 1X (89 mM Tris-HCl, pH 8,3, 89 mM βορικό οξύ και 2,0 mM EDTA) και 1 μg/mL βρωμιούχο αιθίδιο. Οι συνθήκες ηλεκτροφόρησης που εφαρμόζονται στο πήκτωμα, το οποίο έχει τοποθετηθεί σε ρυθμιστικό διάλυμα TBE 1X, περιλαμβάνουν εφαρμογή σταθερής τάσης 100 V για 50 min σε θερμοκρασία δωματίου. 5 μl προϊόντος PCR ηλεκτροφορούνται για την ανίχνευση του επιθυμητού προϊόντος της αντίδρασης, ενώ

ταυτόχρονα σε κάθε πήκτωμα αγαρόζης ηλεκτροφορείται και μάρτυρας DNA τμημάτων με γνωστά μεγέθη (DNA Ladder) GeneRuler™ 100 bpDNA Ladder (Fermentas International Ltd.), ο οποίος περιείχε τμήματα DNA μεγέθους 1000 bp, 900 bp, 800 bp, 700 bp, 600 bp, 500 bp, 400 bp, 300 bp, 200 bp, και 100 bp.

2.6.5 Συνθήκες αντίδρασης πυροαλληλούχησης

Μετά την επεξεργασία των DNA δειγμάτων περιφερικού αίματος με όξινο θειώδες νάτριο και την μετέπειτα αντίδραση της συμβατικής PCR για την ενίσχυση των επιθυμητών υπό μελέτη περιοχών, ακολουθεί η ανάπτυξη πρωτοκόλλου της πυροαλληλούχησης. Για το σχεδιασμό του πρωτοκόλλου της αντίδρασης χρησιμοποιήθηκε το PyroMark Q24 Software (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany), το οποίο αποτελεί το λογισμικό σχεδιασμού του πειράματος. Ταυτόχρονα, σχεδιάζεται ένας εκκινητής αλληλούχησης που υβριδοποιείται ακριβώς πριν από την αλληλουχία που πρόκειται να αλληλουχηθεί. Για την προετοιμασία των δειγμάτων που πρόκειται να αλληλουχηθούν προστέθηκαν σε 15 μl PCR βιοτυνιλιωμένου προϊόντος, 40 μl διαλύματος δέσμησης (PyroMark Binding Buffer, QIAGEN GmbH, Hilden, Germany), που επιτρέπει τη δέσμηση των PCR προϊόντων στα σφαιρίδια στρεπταβιδίνης και 1 μl σφαιρίδια στρεπταβιδίνης (Streptavidin Sepharose High Performance, GE Healthcare), σε τελικό όγκο 80 μl με προσθήκη H₂O ελεύθερου νουκλεασών. Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται στις 1400 rpm για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, προκειμένου να επιτυχθεί η δέσμηση των βιοτυνιλιωμένων προϊόντων στα σφαιρίδια της στρεπταβιδίνης. Ακολουθεί διαλυτοποίηση του εκκινητή αλληλούχησης στο διάλυμα υβριδοποίησης (PyroMark Annealing Buffer, QIAGEN GmbH, Hilden, Germany) σε τελική συγκέντρωση 0,3 μM και διανομή 25 μl αυτού σε στο ειδικό πιάτο 24 θέσεων (PyroMark Q24 Plate, QIAGEN GmbH, Hilden, Germany). Η διαδικασία της αποδιάταξης των προϊόντων και της υβριδοποίησης του εκκινητή αλληλούχησης στο μονόκλωνο DNA εκμαγείο πραγματοποιείται στον ειδικό σταθμό εργασίας PyroMark Q24 Vacuum Workstation (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany), όπου σε ειδικά δοχεία τοποθετούνται με την ακόλουθη σειρά τα διαλύματα: i) 50 ml 70% αιθανόλης, 40 ml διαλύματος αποδιάταξης (PyroMark Denaturation Solution, QIAGEN GmbH, Hilden, Germany), 50 ml διαλύματος πλύσης (1X PyroMark Wash Buffer, QIAGEN GmbH, Hilden, Germany) και νερό υψηλής καθαρότητας.

Κατά την έναρξη της διαδικασίας, υπό την εφαρμογή κενού συστήματος αέρος και με τη βοήθεια αντλίας, προσλαμβάνονται ξεχωριστά στις αντίστοιχες θέσεις της κάθε ένα από τα προϊόντα της PCR. Εν συνεχεία, η αντλία μεταφέρεται για 5 δευτερόλεπτα στο διάλυμα αιθανόλης 70 % και από εκεί για 5 δευτερόλεπτα στο διάλυμα της αποδιάταξης. Εφαρμόζοντας κενό αέρος κατά τη διάρκεια όλης της διαδικασίας, η αντλία μεταφέρεται για 10 δευτερόλεπτα

στο διάλυμα πλύσης και στη συνέχεια σηκώνεται για 5 δευτερόλεπτα υπό ορθή γωνία. Μετά το πέρας της διαδικασίας, η αντλία στοιχίζεται ακριβώς πάνω από το ειδικό πιάτο των 24 θέσεων, που βρίσκεται ήδη διανεμημένος ο εκκινητής αλληλούχησης, φροντίζοντας η αντλία με το ειδικό πιάτο να έχουν τον ίδιο προσανατολισμό για τον καθορισμό των θέσεων των προϊόντων. Στη φάση αυτή, η αντλία κενού χαμηλώνει προς το ειδικό πιάτο και η εφαρμογή κενού σταματάει για την απελευθέρωση των προϊόντων στις αντίστοιχες στοιχισμένες θέσεις ενώ το πιάτο, μετά το πέρας της διαδικασίας, μεταφέρεται για 2 λεπτά στους 80 °C.

Η διαδικασία της αλληλούχησης πραγματοποιήθηκε στον αλληλουχητή PyroMark Q24® (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany) στον οποίο τοποθετούνται, εκτός από το ειδικό πιάτο με τα PCR προϊόντα που πρόκειται να αλληλουχισθούν, και ειδικό δοχείο (PyroMark Q24 Cartridge, QIAGEN GmbH, Hilden, Germany), στο οποίο είναι τοποθετημένα σε καθορισμένες θέσεις, τα ένζυμα με τα αντίστοιχα υποστρώματα καθώς και τα τέσσερα δεοξυριβονουκλεοτίδια, αντιδραστήρια απαραίτητα για τη διαδικασία της πυροαλληλούχησης (PyroMark Gold Q24 Reagents, QIAGEN GmbH, Hilden, Germany).

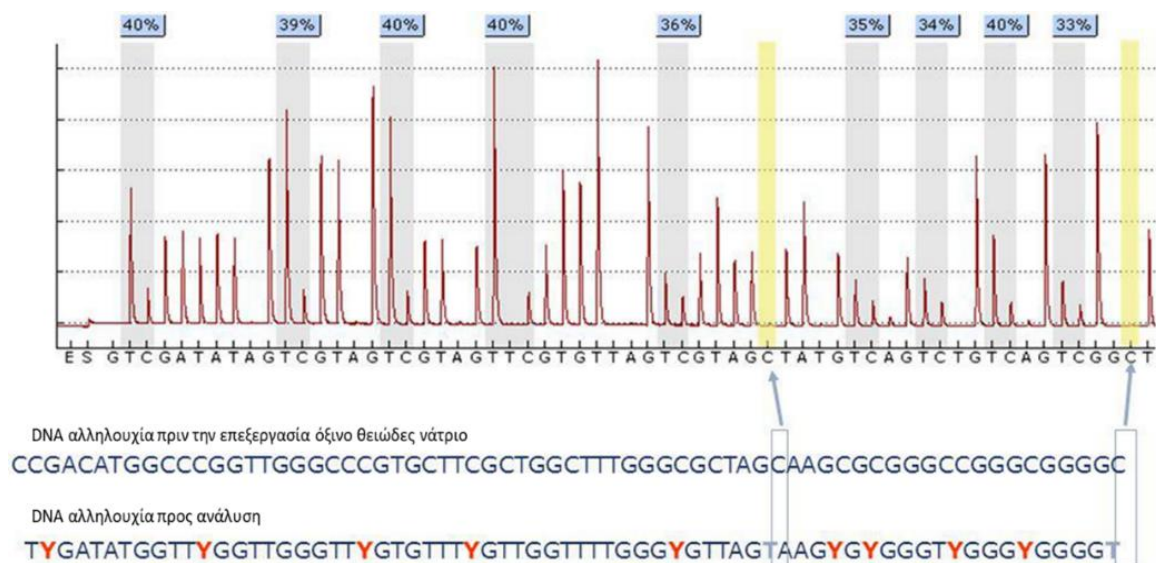
2.6.6 Ανάλυση αποτελεσμάτων των αντιδράσεων πυροαλληλούχησης

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων της πυροαλληλούχησης απεικονίζονται με τη μορφή κορυφών, το ύψος των οποίων είναι ενδεικτικό της στοιχειομετρικής ενσωμάτωσης των νουκλεοτιδίων. Μετά από κάθε επιτυχή ενσωμάτωση νουκλεοτιδίου, που δεν βρίσκεται σε υπό μελέτη πιθανή θέση μεθυλίωσης (CpG), προκύπτουν οι κορυφές αναφοράς από τις οποίες μπορεί να προσδιοριστεί η θεωρητικά αναμενόμενη προς την πειραματικά υπολογισθείσα τιμή φθορισμού για κάθε θέση που αλληλουχείται. Η ανάλυση των δεδομένων της πυροαλληλούχησης για τη μελέτη του προφίλ μεθυλίωσης των γονιδίων πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του λογισμικού PyroMark Q24 Software (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany), το οποίο επιτρέπει τον αυτόματο υπολογισμό του ποσοστού μεθυλίωσης για κάθε θέση αλλά και τον έλεγχο ποιότητας κάθε μεμονωμένου πειράματος και δείγματος.

Ο έλεγχος ποιότητας των αποτελεσμάτων επιτυγχάνεται από τις κορυφές αναφοράς που προκύπτουν μετά από κάθε επιτυχή ενσωμάτωση νουκλεοτιδίου που δεν βρίσκεται σε υπό μελέτη πιθανή θέση μεθυλίωσης. Τα ποσοστά φθορισμού που προκύπτουν από τις καμπύλες αναφοράς θα πρέπει να συμπίπτουν με τις θεωρητικά αναμενόμενες τιμές, με μικρές βέβαια αποδεκτές αποκλίσεις. Τα ποσοστά μεθυλίωσης που προκύπτουν για τις υπό μελέτη CpG θέσεις κάθε δείγματος μπορούν να απεικονίζονται με μπλέ χρώμα, όταν υπάρχει υψηλή αξιοπιστία μέτρησης, με κίτρινο όταν οι μετρήσεις είναι αμφίβολες και με κόκκινο όταν οι περιοχές αυτές είναι αδύνατον να μελετηθούν, συχνά λόγω χαμηλής ποσότητας DNA ή κακής

ποιότητας δείγματος. Σύνηθες χαρακτηριστικό αποτελεί η ύπαρξη διαφορετικών ποιοτικά αποτελεσμάτων στο ίδιο πείραμα ή ακόμη και σε διαφορετικές υπό μελέτη θέσεις του ίδιου δείγματος (215) (Εικόνα 2.6).

Για τον έλεγχο της ειδικότητας των εκκινητών στην ανίχνευση των μεθυλιωμένων και μη μεθυλιωμένων, επεξεργασμένων με το άλας DNA δειγμάτων, ταυτόχρονα με τα προς μελέτη δείγματα ενισχύονται με την ίδια ακριβώς διαδικασία, DNA δείγματα ελέγχου πλήρως μεθυλιωμένα, πλήρως αμεθυλίωτα καθώς και γενωμικό DNA που δεν έχει υποστεί την επεξεργασία με το όξινο θειώδες νάτριο, με σκοπό τον έλεγχο της αποτελεσματικότητας των αντιδράσεων (Epitect Control DNA Set, QIAGEN GmbH, Hilden, Germany). Για κάθε δείγμα υπολογίζεται το ποσοστό μεθυλίωσης κάθε επιμέρους CpG υπό μελέτη θέσης, που προκύπτει από την αναλογία T/C, καθώς και ο μέσος όρος των επιπέδων μεθυλίωσης, τιμές οι οποίες χρησιμοποιούνται για την μετέπειτα στατιστική επεξεργασία.



Εικόνα 2.6: Αντιπροσωπευτικό διάγραμμα πυροαλληλούχησης, χρησιμοποιώντας το λογισμικό PyroMark Q24. Η κάθε κορυφή αντιστοιχεί σε κάθε επιτυχή ενσωμάτωση νουκλεοτιδίου ενώ το ύψος τους είναι ανάλογο της στοιχειομετρίας της αντίδρασης. Για κάθε υπό μελέτη θέση μεθυλίωσης (γκρι μπάρες) υπολογίζεται αυτόματα το ποσοστό μεθυλίωσης από την αναλογία θυμίνης προς κυτοσίνης (T/C) και αναγράφεται στο πλαίσιο της πάνω σειράς, το χρώμα του οποίου δηλώνει την αξιοπιστία και την ποιότητα της αντίδρασης. Τα κίτρινα πλαίσια επιβεβαιώνουν την υψηλής απόδοσης μετατροπή των αμεθυλιωτων κυτοσινών. Ανατύπωση από τους Delaney C. et al, *Methods Mol Biol.* 2015;1343:249-64) (215).

2.7 Βιοστατιστική Ανάλυση

Ο έλεγχος της διαφορικής έκφρασης των mRNA αλλά και των miRNA μεταξύ υγιών και ασθενών με ΣΔτ2 ή μεταξύ υγιών χωρίς προδιάθεση για τη νόσο, υγιών με προδιάθεση και ασθενών με διαβήτη διερευνήθηκε με τις μη παραμετρικές στατιστικές δοκιμασίες Mann-

Whitney U και Jonckheere-Terpstra, αντίστοιχα. Οι μη παραμετρικές στατιστικές δοκιμασίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν χωρίς να είναι απαραίτητη η ύπαρξη συγκεκριμένης κατανομής στις υπό μελέτη μεταβλητές και για το λόγο αυτό είναι ιδιαίτερα διαδεδομένες σε μελέτες που αφορούν τη μέτρηση βιομορίων σε πληθυσμούς βιολογικών δειγμάτων. Σε κάθε περίπτωση, οι διαφορές που ανιχνεύτηκαν σε επίπεδο σημαντικότητας (p value) $<0,05$ θεωρήθηκαν στατιστικώς σημαντικές. Η δοκιμασία Benjamini-Hochberg εφαρμόστηκε επίσης για την προσαρμογή του False Discovery Rate (FDR=0.25) στη διαδικασία των πολλαπλών συγκρίσεων. Η διερεύνηση των γραμμικών συσχετίσεων μεταξύ των επιπέδων έκφρασης των miRNAs και των επιπέδων έκφρασης των mRNA 'στόχων' τους, αναλύθηκε μέσω του συντελεστή γραμμικής συσχέτισης Spearman (r).

Πιθανές συσχετίσεις με δυαδικές, κανονικές ή συνεχείς μεταβλητές που αφορούν κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά της νόσου, διερευνήθηκαν μέσα από τις δοκιμασίες Mann-Whitney U , Jonckheere-Terpstra και του συντελεστή Spearman αντίστοιχα. Εφαρμόστηκε επιπλέον πολυμεταβλητή ανάλυση λογιστικής παλινδρόμησης, χρησιμοποιώντας την εμφάνιση του ΣΔτ2 ως εξαρτημένη μεταβλητή και τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων ή/και των miRNAs, το φύλο και την ηλικία ως ανεξάρτητες. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια των προγραμμάτων Graph Pad Prism 5.00 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) και IBM SPSS Statistics 21 (IBM Corp., Armonk, NY, USA).

2.8 Βιοπληροφορική αναζήτηση-Αναζήτηση σε βάσεις δεδομένων

2.8.1 Ανάπτυξη πάνελ SNPs που συνδέονται με την εμφάνιση του Σακχαρώδους Διαβήτη τύπου 2

Για την επιλογή των υπό μελέτη γονιδίων ενδιαφέροντος πραγματοποιήθηκε αναζήτηση στον κατάλογο NHGRI-EBI των μελετών GWAS (Genome Wide Association Studies) καθώς και στη βάση δεδομένων SNPedia με σκοπό την εύρεση γενετικών αλληλομόρφων που έχουν συσχετιστεί με την εμφάνιση ή/και παραμέτρους του ΣΔτ2, διαμέσου γνωστών SNPs που αυτά φέρουν (87, 220). Ο κατάλογος αυτός συνοψίζει βιβλιογραφικά δεδομένα από εξειδικευμένες και αξιόπιστες επιστημονικές πηγές, οι οποίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως σημεία αναφοράς σε περαιτέρω μελέτες για τον εντοπισμό των υπεύθυνων γονιδίων που εμπλέκονται σε μία νόσο, την κατανόηση των υποκείμενων μηχανισμών παθογένειας της νόσου αλλά και την εύρεση νέων θεραπευτικών στόχων για την αντιμετώπισή της (87). Τα κριτήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την επιλογή των υπό μελέτη γονιδίων ενδιαφέροντος ήταν i) η στατιστική σημαντικότητα συσχέτισης (p value) του κάθε αλληλομόρφου με τον αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης της νόσου καθώς και ii) ο αριθμός των μελετών που συσχετίζουν τα

συγκεκριμένα αλληλόμορφα με την εμφάνισή της. Από την αναζήτηση αυτή προέκυψε μια λίστα 23 γονιδίων, τα οποία παρουσιάζουν τον υψηλότερο βαθμό συσχέτισης με την εμφάνιση ΣΔτ2, είτε λόγω του μεγάλου αριθμού κλινικών και GWAS μελετών που τα συσχετίζουν με τη νόσο, είτε λόγω του υψηλού βαθμού στατιστικής σημαντικότητας (p -value) (Πίνακας 2.5). Στον παρακάτω πίνακα, που περιλαμβάνει τα 23 γονίδια ενδιαφέροντος, συμπεριλαμβάνεται επιπλέον το γονίδιο *CDK5* το οποίο αν και δεν εμφανίζει συγκεκριμένους πολυμορφισμούς συνδεόμενους απευθείας με τον αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης της νόσου, ρυθμίζεται ισχυρά από το γονίδιο *CDKAL1*, που είναι γνωστό ότι περιλαμβάνει SNPs που εμπλέκονται στην ανάπτυξη ΣΔτ2 (221).

Πίνακας 2.5: Λίστα των γονιδίων που είναι γνωστό από GWAS μελέτες ότι εμπλέκονται στον αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης ΣΔτ2, μέσω SNPs αυτά φέρουν, και επιλέχθηκαν να μελετηθούν ως προς τα επίπεδα έκφρασής τους στο περιφερικό αίμα ασθενών με ΣΔτ2 και υγιών δοτών.

Σύμβολο γονιδίου	Όνομα γονιδίου	Χρωμοσωμική περιοχή	SNP	Αριθμός CS/GWAS μελετών	p -value ελάχιστη	p -value μέγιστη
<i>ADAMTS9</i>	ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif 9	3p14.1	rs4607103	1	1.00e-08	-
<i>CAPN10</i>	Calpain 10	2q37.3	rs3792267	4	3.00e-03	3.00e-02
				2	1.00e-02	3.00e-02
			rs5030952	1	5.00e-02	-
<i>CDC123/CAMK1D</i>	Cell division cycle 123/calcium/calmodulin dependent protein kinase ID	10p13	rs10906115	1	1.00e-08	-
			rs12779790	1	1.00e-10	-
			rs11257655	3	1.00e-12	7.00e-09
<i>CDKAL1</i>	CDK5 regulatory subunit associated protein 1 like 1	6p22.3	rs7766070	4	2.00e-11	9.00e-09
			rs7754840	4	2.00e-13	7.00e-10
			rs7756992	2	1.00e-16	8.00e-09
			rs10946398	2	1.00e-08	7.00e-07
			rs4712523	1	7.00e-20	-
			rs6931514	1	1.00e-11	-
			rs4712524	1	3.00e-10	-
			rs10440833	1	2.00e-22	-
			rs9295474	1	9.00e-06	-
			rs35612982	1	6.00e-36	-
			rs9465871	1	3.00e-07	-
<i>CDKN2A/CDKN2B</i>	Cyclin dependent kinase inhibitor 2A/cyclin dependent kinase inhibitor 2B	9p21.3	rs2383208	1	2.00e-29	-
			rs10811661	6	1.00e-27	5.00e-06
			rs564398	1	1.00e-06	-
			rs1333051	1	6.00e-10	-
			rs7020996	1	2.00e-07	-
<i>CDK5</i>	Cyclin-dependent kinase 5			2	5.00e-33	3.00e-06
				Ρυθμίζεται από το <i>CDKAL1</i>		
<i>FTO</i>	FTO, alpha-ketoglutarate dependent dioxygenase	16q12.2	rs9939609	2	1.00e-20	2.00e-07
			rs8050136	5	2.00e-17	7.00e-06
			rs11642841	1	3.00e-08	-
			rs9936385	1	1.00e-12	-
			rs1421085	1	4.00e-15	-
<i>HHEX</i>	Hematopoietically expressed homeobox	10q23.33	rs5015480	5	1.00e-15	9.00e-06
			rs1111875	6	3.00e-19	3.00e-06
			rs78627331	1	2.00e-14	-
			rs34773007	1	2.00e-14	-
			rs7087591	1	6.00e-20	-
<i>HNF1B</i>	HNF1 homeobox B	17q12	rs4430796	4	2.00e-11	4.00e-06
			rs10908278	1	4.00e-15	-
<i>HNF4A</i>	hepatocyte nuclear factor 4 alpha	20q13.12	rs4812829	2	3.00e-10	5.00e-08
			rs6017317	1	1.00e-11	-
<i>IGF2BP2</i>	Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 2	3q27.2	rs4402960	7	1.00e-17	1.00e-06
			rs1374910	1	1.00e-07	-
			rs1470579	8	2.00e-24	5.00e-06
			rs138306797	1	3.00e-06	-
			rs6769511	1	1.00e-09	-
<i>JAZF1</i>	JAZF zinc finger 1	7p15.1	rs11927381	1	3.00e-14	-
			rs864745	1	5.00e-14	-
			rs849134	2	6.00e-13	3.00e-09
<i>KCNQ1</i>	Potassium voltage-gated	11p15.4	rs849135	1	2.00e-09	-
			rs2237892	5	2.00e-14	4.00e-06

	channel subfamily Q member 1		rs163182	1	2.00e-17	-
			rs2237895	1	1.00e-09	-
			rs2237897	2	1.00e-16	9.00e-15
			rs231362	1	3.00e-13	-
			rs2283228	2	5.00e-13	1.00e-10
			rs231356	1	4.00e-08	-
			rs8181588	1	5.00e-09	-
			rs163184	1	2.00e-14	-
			rs2237896	1	3.00e-70	-
			rs117601636	1	1.00e-07	-
KCNJ11	Potassium voltage-gated channel subfamily J member 11	11p15.1	rs5215	3	3.00e-11	4.00e-07
			rs5219	4	7.00e-11	5.00e-07
MTNR1B	Melatonin receptor 1B	11q14.3	rs1387153	1	8.00e-15	-
			rs10830963	1	2.00e-07	-
NOTCH2	Neurogenic locus notch homolog protein 2	1p12	rs10923931	1	4.00e-08	-
PPARG	Peroxisome proliferator activated receptor gamma	3p25.2	rs1801282	4	6.00e-10	2.00e-06
			rs17036101	1	2.00e-07	-
			rs13081389	1	2.00e-07	-
SLC30A8	Solute carrier family 30 member 8	8q24.11	rs13266634	10	2.00e-14	7.00e-06
			rs3802177	3	2.00e-18	4.00e-08
TCF7L2	Transcription factor 7 like 2	10q25.2	rs7903146	24	4.00e-94	5.00e-08
			rs7901695	2	1.00e-48	1.00e-06
			rs34872471	3	6.00e-53	8.00e-08
			rs4506565	1	5.00e-12	-
THADA	THADA, armadillo repeat containing	2p21	rs7578597	1	1.00e-09	-
TSPAN8	Tetraspanin 8	12q21.1	rs7961581	1	1.00e-09	-
			rs4760790	1	4.00e-06	-
			rs1495377	1	7.00e-06	-
WFS1	Wolframin ER transmembrane glycoprotein	4p16.1	rs1801214	1	3.00e-08	-
			rs4458523	1	2.00e-09	-

Στον πίνακα αναγράφονται οι γνωστοί καταγεγραμμένοι SNPs των γενετικών τόπων που επιλέχθηκαν να μελετηθούν, ο αριθμός των GWAS μελετών που συσχετίζουν τον κάθε SNP με την εμφάνιση της νόσου, καθώς επίσης και οι ελάχιστες- μέγιστες τιμές στατιστικής σημαντικότητας (p -value) συσχέτισης που προκύπτουν από τις μελέτες αυτές (στις περιπτώσεις όπου υπάρχει μόνο μια τέτοια μελέτη, αναφέρεται μία μοναδική τιμή p -value). Ανατύπωση από τους *Christodoulou MI, Avgeris M., Kokkinopoulou I. I et al. Sci Rep. 2019;9(1):1512* (201).

2.8.2 Αναζήτηση της ιστοειδικής έκφρασης των γονιδίων/μεταγράφων

Η διερεύνηση της ιστοειδικής έκφρασης των γονιδίων/μεταγράφων που σχετίζονται με τον αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης ΣΔτ2, διαμέσου γνωστών SNPs αυτά φέρουν, πραγματοποιήθηκε μετά από αναζήτηση στη βάση δεδομένων GTEx (Genotype-Tissue Expression) portal 19 (135).

2.8.3 Ανάπτυξη miRNA πάνελ

Η αναζήτηση των υπό μελέτη miRNAs που στοχεύουν τα γονίδια ενδιαφέροντος: *CDK5*, *CDKN2A*, *IGF2BP2*, *KCNQ1* και *TSPAN8* πραγματοποιήθηκε μετά από αναζήτηση στις βάσεις δεδομένων: DIANNA TarBase v.7, miRTarBase, miRSearch_Exiquon, miRgator και miRtarget Link Human (Πρόσβαση: Δεκέμβριος 2017) (222-225). Οι βάσεις αυτές προσφέρουν την δυνατότητα εύρεσης εκείνων των miRNAs τα οποία επιβεβαιωμένα -από συγκεκριμένες πειραματικές τεχνικές (Μικροσυστοιχίες, ανοσοσύτωση κατά Western, ποσοτική qPCR, ανάλυση κατά Northern, ELISA κ.ά) στοχεύουν τα υπό μελέτη γονίδια ενδιαφέροντος. Οι παραπάνω

αλγόριθμοι συνδυάζουν τις υπολογιστικές προβλέψεις αλληλεπίδρασης mRNA/miRNA με εργαστηριακές τεχνικές επιβεβαίωσης της θεωρητικής πρόβλεψης (226). Για την επιλογή των υπό μελέτη miRNAs συμπεριλήφθηκαν όλα εκείνα τα miRNAs που εντοπίστηκαν σε τουλάχιστον έναν από τους προαναφερόμενους αλγόριθμους και περιελάμβαναν συνολικά τη μελέτη 14 miRNAs (Πίνακας 2.6).

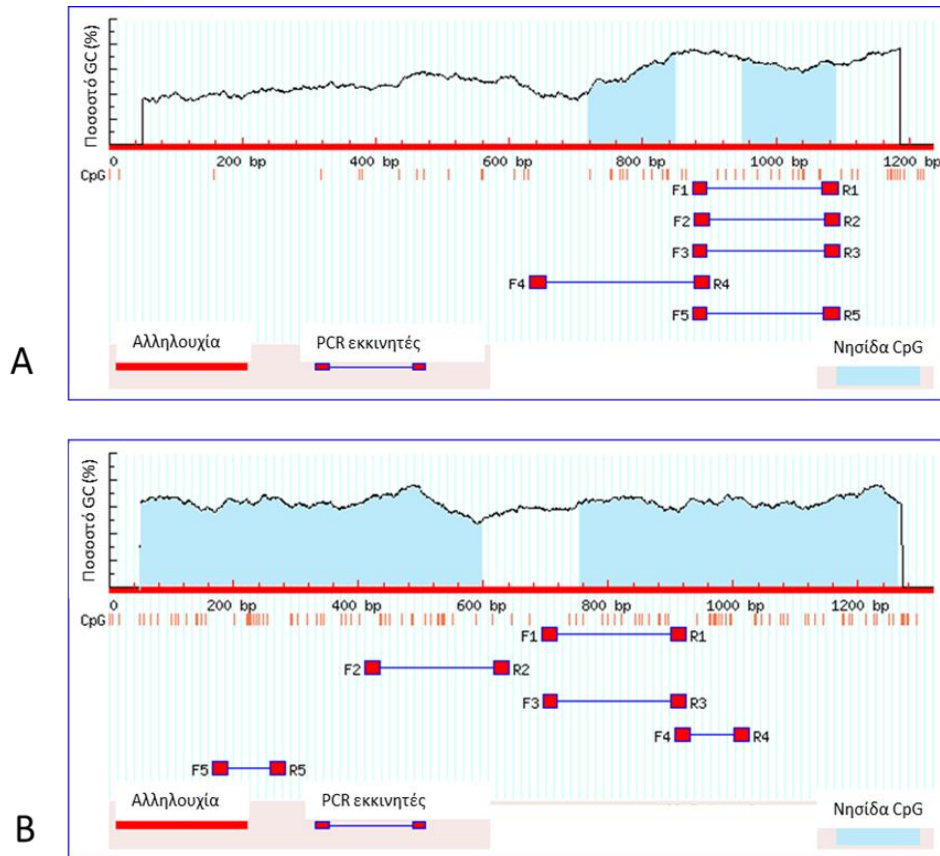
Πίνακας 2.6: Λίστα των miRNAs που επιλέχθηκαν να μελετηθούν, ως προς τα επίπεδα έκφρασής τους, στο περιφερικό αίμα ασθενών με ΣΔτ2 και υγιών δοτών και τα οποία πειραματικά επιβεβαιωμένα στοχεύουν τα γονίδια που εμπλέκονται στον αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης ΣΔτ2: *CDK5*, *CDKN2A*, *IGF2BP2*, *KCNQ1* και *TSPAN8*, χρησιμοποιώντας 5 καλά χαρακτηρισμένους αλγόριθμους. Κάθε ένα από τα miRNA που επιλέχθηκαν να μελετηθούν, εμφανίζεται σε τουλάχιστον μία βάση δεδομένων (σημειώνεται με X). Δεν εντοπίστηκαν πειραματικά επιβεβαιωμένα miRNAs να στοχεύουν τα γονίδια *CAPN10* και *THADA*. Ανατύπωση από τους Kokkinoroulou I. et al., *Endocrine*. 2019;66(2):226-39 (212).

Όνομα miRNA	Αριθμός πρόσβασης στη βάση NCBI	Αριθμός πρόσβασης στη βάση miRBase	DIANNA TarBase v.7	miRTar Base	miRSearch_ Exiquon	miRGator	miRTarget Link Human
miRNAs που στοχεύουν το CDKN2A							
hsa-let-7g-5p	NR_029660.1	MIMAT0000414	X	X	X	X	X
hsa-miR-125b-5p	NR_029671.1	MIMAT0000423		X	X	X	X
hsa-miR-24-3p	NR_029496.1	MIMAT0000080	X	X		X	X
hsa-miR-10b-5p	NR_029609.1	MIMAT0000254	X	X			X
hsa-miR-124-3p	NR_029670.1	MIMAT0000422	X	X		X	X
hsa-miR-34a-5p	NR_029610.1	MIMAT0000255		X	X	X	X
miRNA που στοχεύουν το CDK5							
hsa-miR-155-5p	NR_030784.1	MIMAT0000646	X	X			X
miRNAs που στοχεύουν το IGF2BP2							
hsa-let-7b-5p	NR_029479.1	MIMAT0000063	X	X	X		X
hsa-miR-98-5p	NR_029513.1	MIMAT0000096	X	X	X		
hsa-let-7g-5p	NR_029660.1	MIMAT0000414	X				
miRNA που στοχεύουν το KCNQ1							
hsa-miR-133a-3p	NR_029675.1	MIMAT0000427	X	X	X	X	X
hsa-miR-34a-5p	NR_029610.1	MIMAT0000255	X				
hsa-miR-1-3p	NR_029780.1	MIMAT0000416				X	
miRNAs που στοχεύουν το TSPAN8							
hsa-miR-125b-5p	NR_029671.1	MIMAT0000423		X			
hsa-miR-5682	NR_049861.1	MIMAT0022470	X				
hsa-miR-29b-3p	NR_029517.1	MIMAT0000100	X				
hsa-miR-29a-3p	NR_029503.1	MIMAT0000086	X				

2.8.4 Αναζήτηση σε βάσεις δεδομένων για τον εντοπισμό των υποκινητών των γονιδίων *CDK5*, *CDKN2A* και *TSPAN8*

Για την εύρεση της αλληλουχίας των υποκινητών των γονιδίων *CDK5*, *CDKN2A* και *TSPAN8* χρησιμοποιήθηκαν οι βάσεις δεδομένων Ensembl, NCBI και Eukaryotic Promoter Database (EPD), οι οποίες προσφέρουν την δυνατότητα εντοπισμού της αλληλουχίας αρκετών χιλιάδων βάσεων πριν τη θέση έναρξης της μεταγραφής (Transcription Start Site-TSS) του εκάστοτε γονιδίου. Η αλληλουχία 1000 περίπου βάσεων πριν το TSS κάθε γονιδίου ελέγχθηκε

στη συνέχεια με τη βοήθεια του λογισμικού MethPrimer για την εύρεση πιθανών CpG νησίδων (κριτήρια εύρεσης: μέγεθος νησίδας >100 bp, ποσοστό (%) GC >50 και Obs/Exp > 0.6) οι οποίες και αποτελούν πιθανές περιοχές μεθυλίωσης και συνεπώς πιθανές περιοχές ρύθμισης της έκφρασης των υπό μελέτη γονιδίων (**Εικόνα 2.7**).



Εικόνα 2.7: Η αλληλουχία 1000 περίπου βάσεων πριν το TSS κάθε γονιδίου ελέγχεται στο λογισμικό MethPrimer για την εύρεση πιθανών CpG νησίδων για την περίπτωση των γονιδίων A) *CDKN2A* και B) *CDK5*. Οι περιοχές που σύμφωνα με τα κριτήρια του προγράμματος πληρούν τις προϋποθέσεις ύπαρξης CpG νησίδων απεικονίζονται με μπλέ χρώμα και στις περιοχές αυτές προτείνονται και σχεδιάζονται ειδικοί εκκινήτες για την ενίσχυση της επιθυμητής υπό μελέτη περιοχής.

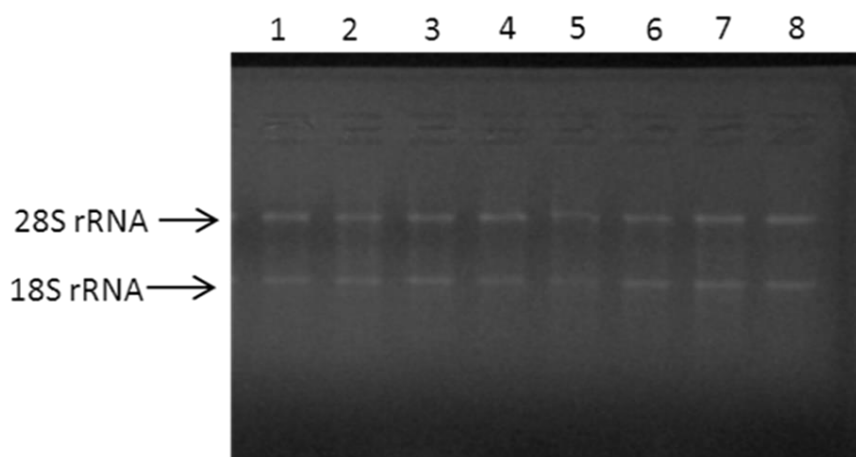
2.8.5 Δημιουργία δικτύων αλληλεπίδρασης γονιδίων

Η δημιουργία των δικτύων αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών καθώς και η ανάλυση των μονοπατιών σηματοδότησης που αυτές συμμετέχουν πραγματοποιήθηκε με την εφαρμογή των προγραμμάτων STRING (Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins) (227) και KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) (228).

3. Αποτελέσματα

3.1 Έλεγχος ποιότητας ολικού RNA

Στην παρούσα μελέτη αναλύθηκαν 88 δείγματα περιφερικού αίματος, από τα οποία τα 48 αντιστοιχούσαν σε ασθενείς με ΣΔτ2 και τα 40 σε υγιείς δότες. Για την απομόνωση του ολικού RNA πραγματοποιήθηκε η διαδικασία όπως περιγράφεται στην ενότητα 2.2.1 και στη συνέχεια ακολούθησε η ποιοτική και ποσοτική ανάλυσή του. Για κάθε δείγμα ξεχωριστά, η συγκέντρωση του απομονωμένου ολικού RNA προσδιορίστηκε φασματοφωτομετρικά στην περιοχή του υπεριώδους-ορατού ενώ η ακεραιότητά του ελέγχθηκε με την ηλεκτροφορητική μέθοδο σε πήκτωμα αγαρόζης 1% (w/v) για την παρουσία των δύο χαρακτηριστικών ζωνών, των 28S και 18S του ριβοσωμικού RNA. Με τον τρόπο αυτό διαπιστώθηκε ότι δεν υπήρχαν ενδείξεις αποικοδόμησης, δεδομένου ότι στο πήκτωμα δεν ανιχνεύονται μη αναμενόμενες ζώνες από προϊόντα αποικοδόμησης. Η παρουσία των ευδιάκριτων ζωνών 28S και 18S ριβοσωμικού RNA αποτελεί απόδειξη της επιτυχούς απομόνωσης ολικού RNA καλής ποιότητας, γεγονός που καθιστά εφικτή τη χρήση αυτών των δειγμάτων για τις περαιτέρω διαδικασίες μελέτης της έκφρασης των υπό μελέτη γονιδίων (**Εικόνα 3.1**).



Εικόνα 3.1: Ηλεκτροφορητικός προσδιορισμός RNA από 8 αντιπροσωπευτικά δείγματα καλής ποιότητας (1-8) σε πήκτωμα αγαρόζης (1% w/v).

3.2 Μελέτη των συνολικών επιπέδων έκφρασης των γονιδίων που εμπλέκονται στον αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης Σακχαρώδους Διαβήτη τύπου 2

3.2.1 Ανάπτυξη μεθοδολογίας ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου (qPCR)

Μετά την απομόνωση του ολικού RNA και τον έλεγχο ποιότητας, ακολούθησε η σύνθεση του cDNA μέσω της αντίδρασης της αντίστροφης μεταγραφής των μορίων mRNA, όπως περιγράφηκε στην ενότητα 2.4.1. Για την ποσοτική εκτίμηση των συνολικών επιπέδων έκφρασης των παρακάτω γονιδίων που είναι γνωστό από μελέτες GWAS ότι σχετίζονται με τον αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης ΣΔτ2 -*TCF7L2*, *IGF2BP2*, *SLC30A8*, *KCNQ1*, *FTO*, *JAZF1*, *CDKN2A*, *CDKAL1*, *KCNJ11*, *NOTCH2*, *PPARG*, *HHEX*, *CDK5*, *CDC123*, *THADA*, *CAMK1D*, *ADAMTS9*, *WFS1*, *CDKN2B*, *HNF1B*, *CAPN10*, *TSPAN8*, *MTNR1B*, *HNF4A*- στα δείγματα του περιφερικού αίματος ασθενών και υγιών δοτών, σχεδιάστηκαν, βελτιστοποιήθηκαν και εκτελέστηκαν κατάλληλα πρωτόκολλα qPCR (**Πίνακας 2.5**).

Για την ποσοτική εκτίμηση των επιπέδων έκφρασης των παραπάνω 24 γονιδίων ενδιαφέροντος πραγματοποιήθηκε η μέθοδος της ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου (qPCR), στο θερμικό κυκλοποιητή 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems), όπως περιγράφεται στην ενότητα 2.5.2. Για το σκοπό αυτό, σχεδιάστηκαν αρχικά ειδικοί εκκινητές με στόχο την ποσοτικοποίηση των συνολικών επιπέδων έκφρασης των υπό μελέτη γονιδίων (**Πίνακας 2.2**), ενώ ως γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο *HPRT1*, ως προς το οποίο κανονικοποιείται η έκφραση του εξεταζόμενου γονιδίου σε κάθε δείγμα. Σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία, το γονίδιο αυτό παρουσιάζει καθολική και αμετάβλητη έκφραση στα δείγματα του περιφερικού αίματος ενώ δεν παρουσιάστηκαν αξιοσημείωτες μεταβολές στην έκφρασή του και στον πληθυσμό των δειγμάτων της παρούσας εργασίας. Επιπρόσθετα, τα επίπεδα έκφρασης του *HPRT1* είναι παρόμοια με αυτά των υπό μελέτη γονιδίων και κατά συνέπεια κρίνεται ιδανικό για την κανονικοποίηση των επιπέδων έκφρασής τους. Ως βαθμονομητής χρησιμοποιήθηκε η αθανατοποιημένη κυτταρική σειρά παγκρέατος 1.2B4, αφού προηγουμένως ελέγχθηκε για την ικανοποιητική έκφραση των εξεταζόμενων γονιδίων. Επίσης, σε κάθε σειρά πειραμάτων συμπεριλαμβάνονταν δείγματα αρνητικού έλεγχου της αντίδρασης αντίστροφης μεταγραφής και της αντίδρασης qPCR. Σε όλα τα παραπάνω δείγματα ελέγχου δεν παρατηρήθηκαν ανιχνεύσιμες τιμές Ct.

3.2.2 Βελτιστοποίηση συνθηκών αντιδράσεων qPCR και έλεγχος ποιότητας της μεθόδου

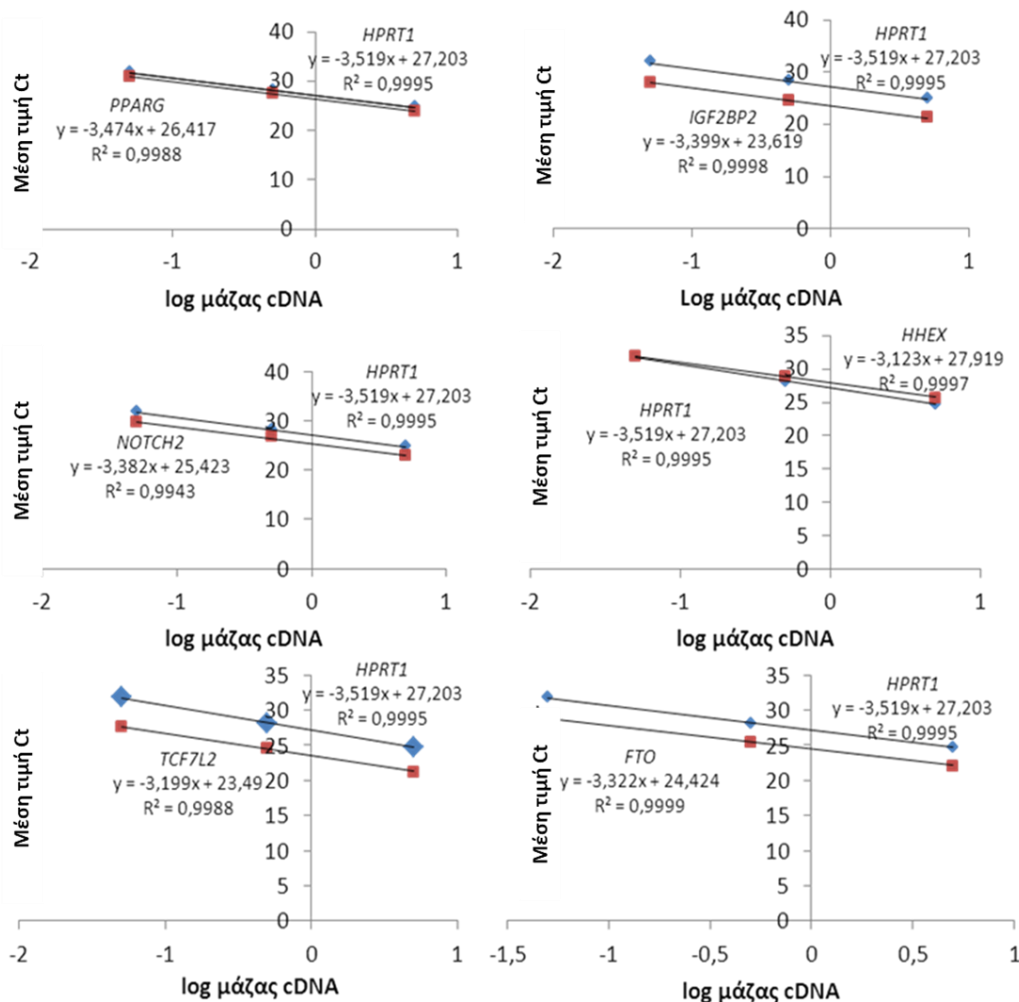
Μετά το σχεδιασμό των εκκινητών με στόχο την επιλεκτική ενίσχυση και ανίχνευση των συνολικών επιπέδων έκφρασης των υπό μελέτη γονιδίων καθώς και του γονιδίου αναφοράς, ακολούθησε ανάπτυξη πρωτοκόλλου, βελτιστοποίηση των συνθηκών και έλεγχος ποιότητας της

μεθόδου. Για την επίτευξη των βέλτιστων συνθηκών πραγματοποιήθηκε έλεγχος διαφορετικών συγκεντρώσεων εκκινητών (50-350 nM), χρησιμοποιώντας ένα κοινό δείγμα περιφερικού αίματος, με στόχο την επιλογή των συγκεντρώσεων εκείνων όπου επιτρέπουν χαμηλό όριο ποσοτικοποίησης και υψηλή ειδικότητα της αντίδρασης. Οι συνθήκες οι οποίες επιλέχθηκαν για κάθε αντίδραση περιγράφονται στην παράγραφο 2.5.2.2 ενώ οι τελικές συγκεντρώσεις των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στις αντιδράσεις στον πίνακα 2.2.

Για τον έλεγχο της ποιότητας της μεθόδου πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις qPCR χρησιμοποιώντας σειριακές αραιώσεις 1:10 του θετικού μάρτυρα (cDNA από την κυτταρική σειρά 1.2B4) με στόχο τη δημιουργία καμπυλών αναφοράς, από τις οποίες είναι εφικτό να υπογιστεί η απόδοση της εκάστοτε αντίδρασης καθώς και ο συντελεστής γραμμικότητας των καμπυλών. Ο υπολογισμός των αποδόσεων των αντιδράσεων (%) πραγματοποιείται με τη βοήθεια του παρακάτω τύπου:

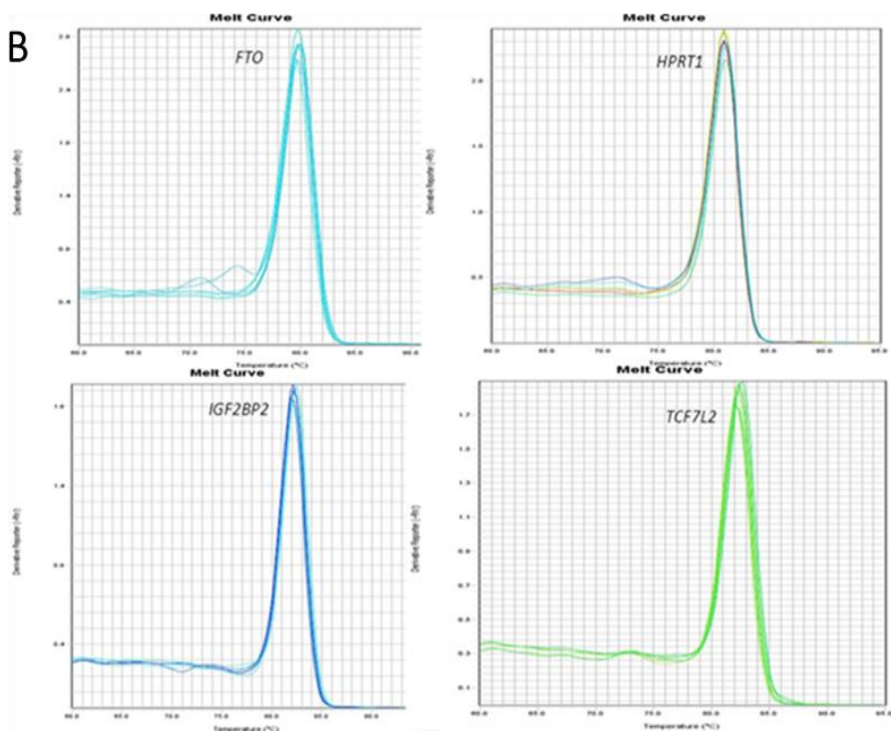
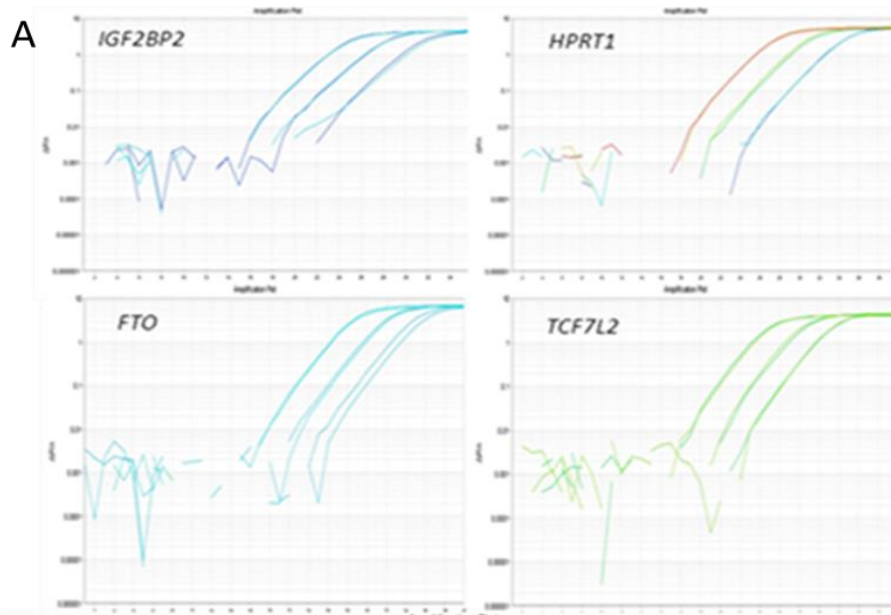
$$\text{Απόδοση \%} = (-1 + 10^{(-1/\kappa_{\text{λίση}})}) \times 100.$$

Δεδομένου ότι η σχετική ποσοτικοποίηση με τη βοήθεια της μεθόδου $2^{-\Delta\Delta C_t}$, που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη για την ποσοτική εκτίμηση των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων, προϋποθέτει ότι η απόδοση της ενίσχυσης της αλληλουχίας-στόχου είναι ίδια με εκείνη της αλληλουχίας-αναφοράς, είναι απαραίτητο να ελεγχθεί ο συντελεστής γραμμικότητας και η απόδοση της αντίδρασης της ενίσχυσης τόσο του γονιδίου αναφοράς όσο και των υπό μελέτη γονιδίων. Ενδεικτικά, παρουσιάζονται καμπύλες αναφοράς για 6 από τα υπό μελέτη γονίδια, που αναπαριστούν την μεταβολή της μέσης τιμής C_t ως προς το λογάριθμο της μάζας του cDNA καθώς και οι αντίστοιχες τιμές των συντελεστών γραμμικότητας. Οι υπολογισθείσες αποδόσεις των αντιδράσεων των εξεταζόμενων γονιδίων και εκείνων του γονιδίου αναφοράς βρεθήκαν να είναι παρόμοιες, όπως φαίνεται άλλωστε και από την παραλληλία των καμπυλών, και εμπίπτουν στα αποδεκτά όρια της μεθόδου (**Εικόνα 3.2**).



Εικόνα 3.2: Καμπύλες αναφοράς που αναπαριστούν τη μεταβολή της μέσης τιμής Ct ως προς τον log της μάζας του cDNA για 6 υπό μελέτη γονίδια (*PPARG*, *IGF2BP2*, *NOTCH2*, *HHEX*, *TCF7L2*, *FTO*) καθώς και του γονιδίου αναφοράς (*HPRT1*). Τόσο οι τιμές του συντελεστή γραμμικότητας όσο και οι τιμές της απόδοσης της αντίδρασης εμπίπτουν στα αποδεκτά όρια της μεθόδου.

Όσον αφορά την ειδικότητα των αντιδράσεων, αυτή διασφαλίστηκε μέσω της ανάλυσης των καμπυλών τήξης, μετά από κάθε αντίδραση ενίσχυσης, και της ηλεκτροφόρησης των προϊόντων από τυχαία επιλεγμένα δείγματα σε πήκτωμα αγαρόζης. Στην **Εικόνα 3.3** παρατίθενται χαρακτηριστικές καμπύλες ενίσχυσης και τήξης που προέκυψαν από την ενίσχυση cDNAs δειγμάτων περιφερικού αίματος για τα γονίδια *HPRT1*, *IGF2BP2*, *FTO* και *TCF7L2*. Η ύπαρξη μίας μοναδικής κορυφής σε κάθε περίπτωση ($T_m=86.2^\circ\text{C}$ για το *IGF2BP2*, $T_m=80.9^\circ\text{C}$ για το *HPRT1*, $T_m=79.5^\circ\text{C}$ για το *FTO* και $T_m=84.4^\circ\text{C}$ για το *TCF7L2*) είναι ενδεικτική της ενίσχυσης και ανίχνευσης των ειδικών προϊόντων (**Εικόνα 3.3**).



Εικόνα 3.3: Α. Αντιπροσωπευτικές καμπύλες ενίσχυσης ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου, για τα γονίδια *HPRT1*, *IGF2BP2*, *FTO* και *TCF7L2*. Β. Αντιπροσωπευτικές καμπύλες τήξης ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου, για τα γονίδια *HPRT1*, *FTO*, *IGF2BP2* και *TCF7L2*.

3.2.3 Ποσοτικός προσδιορισμός και διαφορική έκφραση των γονιδίων που εμπλέκονται στον αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης Σακχαρώδους Διαβήτη τύπου 2

Η μελέτη που αφορά την ποσοτικοποίηση της έκφρασης των 24 υπό μελέτη γονιδίων ανέδειξε ότι, τα γονίδια *TCF7L2*, *IGF2BP2*, *SLC30A8*, *KCNQ1*, *FTO*, *JAZF1*, *CDKN2A*, *CDKAL1*, *KCNJ11*, *NOTCH2*, *PPARG*, *HHEX*, *CDK5*, *CDC123*, *THADA*, *CAMK1D*, *WFS1*, *CDKN2B*, *CAPN10* και *TSPAN8* εκφράζονται στους κυτταρικούς πληθυσμούς του ανθρώπινου περιφερικού αίματος. Αντίθετα, δεν ανιχνεύθηκε έκφραση των γονιδίων *ADAMTS9*, *MTNR1B*, *HNF1B* και *HNF4A* στα δείγματα αυτά.

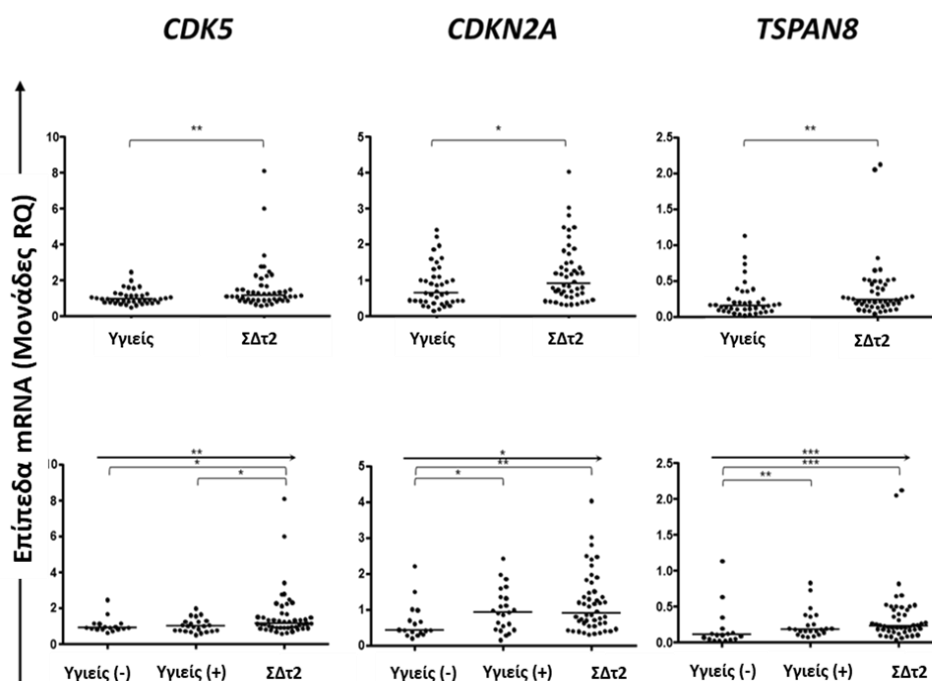
Οι μονάδες σχετικής ποσοτικοποίησης (RQ) των mRNA των παραπάνω γονιδίων για την ομάδα των διαβητικών ασθενών (n=48) καθώς και των υγιών δοτών (n=40), συνοψίζονται στον **Πίνακα 3.1**. Τα αποτελέσματα της στατιστικής δοκιμασίας Mann Whitney *U* ανέδειξαν ότι οι ασθενείς με ΣΔτ2 εκφράζουν σημαντικά υψηλότερα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *CDK5* (p=0.0056), *CDKN2A* (p=0.0411) και *TSPAN8* (p=0.0055), συγκριτικά με τους υγιείς δότες (**Εικόνα 3.4**). Περαιτέρω ανάλυση της ομάδας των υγιών ανέδειξε ότι εκείνοι που εμφάνιζαν προδιαθεσικούς παράγοντες εμφάνισης ΣΔτ2 (n=23) χαρακτηρίζονταν από αυξημένα επίπεδα έκφρασης των προαναφερόμενων τριών γονιδίων σε σχέση με τους υγιείς που δεν χαρακτηρίζονταν από τους συγκεκριμένους παράγοντες (n=17). Τα αποτελέσματα της δοκιμασίας Jonckheere-Terpstra επιβεβαίωσαν τα παραπάνω δεδομένα, αναδεικνύοντας μια σταδιακή διαβάθμιση αύξησης των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων αυτών μεταξύ των τριών ομάδων: υγιείς χωρίς προδιάθεση για τη νόσο, υγιείς με προδιάθεση για τη νόσο και ασθενείς με ΣΔτ2. Οι αντίστοιχες τιμές στατιστικής σημαντικότητας που προέκυψαν είναι: για την περίπτωση του γονιδίου *CDK5*: p=0.009, του γονιδίου *CDKN2A*: p=0.010 και του γονιδίου *TSPAN8* p=0.001 (**Εικόνα 3.4**). Μετά τη διαδικασία της διόρθωσης των πολλαπλών συγκρίσεων, τα διαφορικά πρότυπα έκφρασης παρέμειναν στατιστικά σημαντικά στις περιπτώσεις των γονιδίων *CDK5* και *TSPAN8* μεταξύ των δύο ομάδων και στις περιπτώσεις των γονιδίων *CDK5*, *CDKN2A* και *TSPAN8* μεταξύ των τριών ομάδων που προαναφέρθηκαν.

Πίνακας 3.1: Μονάδες σχετικές ποσοτικοποίησης (RQ) των επιπέδων έκφρασης των 24 υπό μελέτη γονιδίων και τιμές στατιστικής σημαντικότητας (p value) μεταξύ των ομάδων.

Γονίδιο	Μονάδες RQ, διάμεσος (εύρος)				Στατιστική σημαντικότητα, p				
	Υγιείς (n=40)	Υγιείς (-) (n=17)	Υγιείς (+) (n=23)	ΣΔτ2 (n=48)	Υγιείς vs. ΣΔτ2	Υγιείς (-) vs. ΣΔτ2	Υγιείς (+) vs. ΣΔτ2	Υγιείς (-) vs. Υγιείς (+)	Γραμμική τάση των ομάδων vs. ΣΔτ2
<i>Γονίδια μελέτης (Σύνολο μεταγράφων)</i>									
<i>ADAMTS9</i>	ME	ME	ME	ME	ME	ME	ME	ME	ME
	29.82 (9.467-61.03)	30.24 (21.71- 61.03)	29.27 (9.467-49.79)	33.66 (15.99-52.76)	0.9142	0.8178	0.7229	0.4455	0.907
<i>CAMK1D</i>	2.784 (0.968-5.987)	2.785 (2.199- 5.987)	2.783 (0.968-5.721)	2.699 (1.026-5.384)	0.4390	0.1306	0.9116	0.2881	0.193
<i>CAPN10</i>	4.859 (2.959-6.831)	4.808 (3.196- 6.019)	4.937 (2.959-6.831)	4.909 (3.069-11.59)	0.1160	0.2612	0.1711	0.9086	0.135
<i>CDC123</i>	0.945 (0.512-2.473)	0.919 (0.625- 2.473)	1.005 (0.512-1.998)	1.151 (0.600-8.103)	0.0056	0.0263	0.0264	0.9943	0.009
<i>CDK5</i>	4.311 (0.934-6.972)	4.544 (2.545- 6.440)	4.214 (0.934-6.972)	3.733 (0.652-8.709)	0.3256	0.1688	0.7639	0.3135	0.238
<i>CDKALI</i>	0.655 (0.150-2.420)	0.426 (0.200- 2.220)	0.920 (0.150-2.420)	0.910 (0.320-4.030)	0.0411	0.0032	NS	0.0385	0.010
<i>CDKN2A</i>	0.596 (0.198-1.376)	0.576 (0.379-1.376)	0.615 (0.198-1.018)	0.652 (0.155-1.819)	0.2766	0.4521	0.3519	0.9112	0.230
<i>CDKN2B</i>	1.583 (0.641-2.559)	1.432 (0.734- 2.352)	1.780 (0.641-2.559)	1.512 (0.320-2.638)	0.3015	0.9741	0.1235	0.2506	0.626
<i>FTO</i>	20.25 (5.30-37.23)	20.00 (5.300- 37.23)	20.25 (5.30-33.41)	23.50 (5.300-45.59)	0.1802	0.3541	0.2340	0.8076	0.145
<i>HHEX</i>	ME	ME	ME	ME	ME	ME	ME	ME	ME
<i>HNF1B</i>	ME	ME	ME	ME	ME	ME	ME	ME	ME
<i>HNF4A</i>	3.139 (0.443-12.57)	3.670 (1.568- 5.501)	3.100 (0.443-12.57)	3.671 (0.777-20.09)	0.2438	0.4521	0.3046	0.8953	0.143
<i>IGF2BP2</i>	197.9 (12.46-688.8)	214.9 (45.36- 688.8)	182.4 (12.46-498.3)	173.9 (6.230-549.2)	0.7540	0.8944	0.6639	0.6765	0.956
<i>JAZF1</i>	0.536 (0.010-15.50)	0.338 (0.010- 15.50)	0.568 (0.010-11.01)	0.466 (0.010-43.85)	0.6220	0.1509	0.6551	0.9618	0.605
<i>KCNJ11</i>	8.939 (2.083-15.48)	9.363 (5.344-12.15)	8.431 (2.083-15.48)	7.760 (1.040-15.07)	0.2640	0.1509	0.6551	0.3687	0.191
<i>KCNQ1</i>	ME	ME	ME	ME	ME	ME	ME	ME	ME
<i>MTNR1B</i>	5.228 (0.710-9.706)	5.303 (0.710-9.706)	5.153 (0.710-9.069)	4.859 (0.710-11.94)	0.5411	0.5588	0.6850	0.9353	0.640
<i>NOTCH2</i>	0.01533 (0.0012-0.0361)	0.01540 (0.0012- 0.0279)	0.01520 (0.0012-0.0361)	0.01475 (0.0012- 0.0738)	0.8397	0.8562	0.8860	0.9622	0.856
<i>PPARG</i>	5.094 (0.0-695.4)	20.48 (1.001-695.4)	3.075 (0.0-364.0)	6.099 (0.0-3139)	0.3922	0.5728	0.1908	0.1574	0.796
<i>SLC30A8</i>	3.803 (0.911-8.146)	3.678 (1.942-8.146)	3.827 (0.911-7.488)	3.782 (1.673-10.13)	0.6388	0.6860	0.7138	0.7475	0.507
<i>TCF7L2</i>	1.867 (0.592-4.052)	1.542 (0.592- 3.985)	1.951 (0.817-4.052)	1.788 (0.362-3.962)	0.8096	0.6147	0.8160	0.7117	0.602
<i>THADA</i>	0.1590 (0.0247-1.132)	0.1071 (0.0247- 1.132)	0.1894 (0.0741-0.832)	0.2340 (0.0398-2.124)	0.0055	0.0007	0.1889	0.0057	0.001
<i>TSPAN8</i>	0.2015 (0.0362-0.4887)	0.2193 (0.0362- 0.4887)	0.1861 (0.0842-0.3805)	0.2235 (0.0388- 0.4155)	0.2984	0.8687	0.1603	0.3743	0.465
<i>WFS1</i>									

Στον πίνακα παρουσιάζεται η τιμή της διαμέσου (έντονος μαύρος τιμές) καθώς και το εύρος των μονάδων σχετικής ποσοτικοποίησης (ελάχιστη-μέγιστη τιμή). Οι τιμές της στατιστικής σημαντικότητας (p value) που αναγράφονται με έντονα μαύρα αναφέρονται σε p <0.05. Υγιείς (-): Υγιείς χωρίς προδιάθεση για τη νόσο, Υγιείς (+): Υγιείς με προδιάθεση εμφάνισης της νόσου, ΣΔτ2: ασθενείς με ΣΔτ2, ME: μη εφαρμόσιμο

Ανατύπωση από τους Christodoulou MI, Avgeris M., Kokkinopoulou I. et al. *Sci Rep.* 2019;9(1):1512) (201).

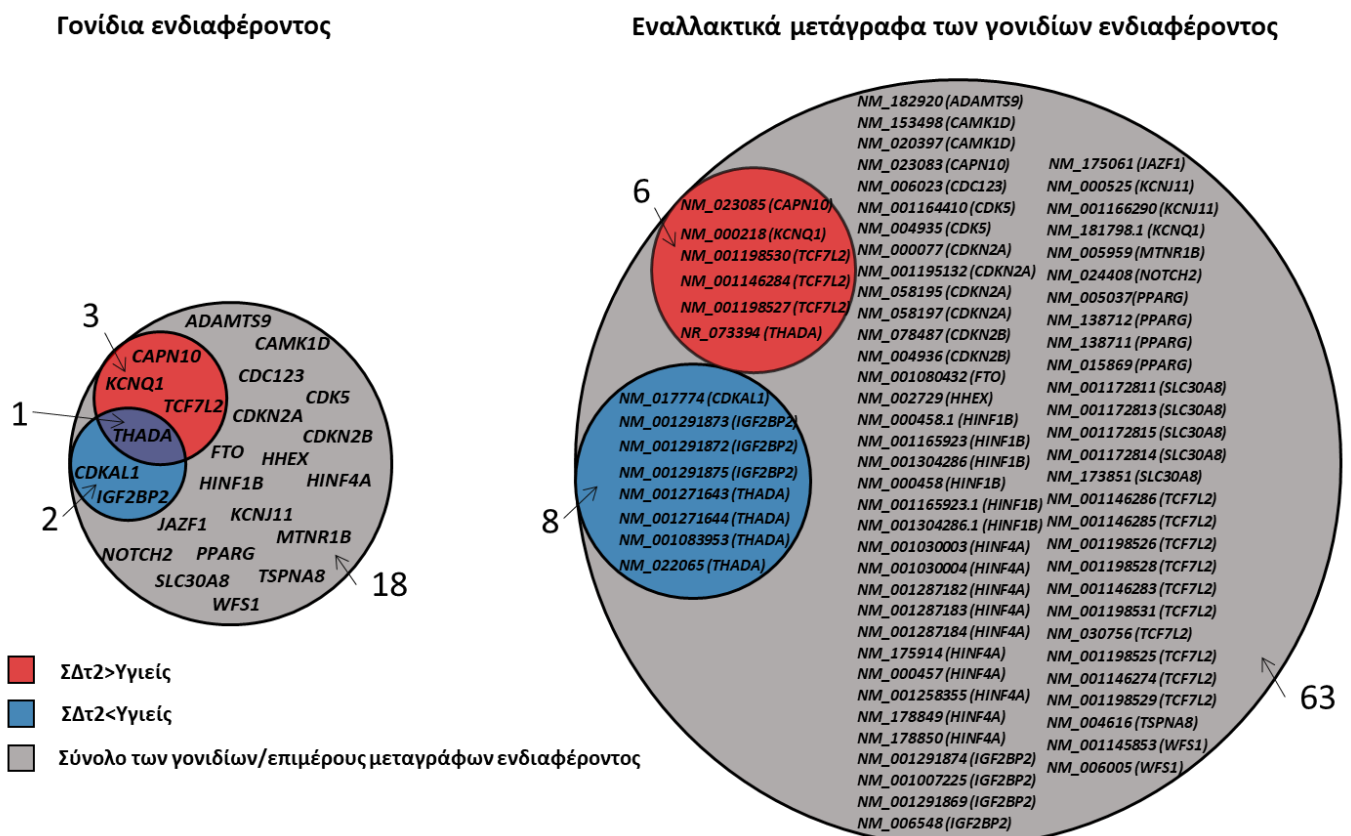


Εικόνα 3.4: Τα διαγράμματα απεικονίζουν τη διαφορετική κατανομή των επιπέδων mRNA (μονάδες RQ) των γονιδίων *CDK5*, *CDKN2A* και *TSPAN8* στους υγιείς και στους ασθενείς με ΣΔτ2 (πάνω σειρά), καθώς επίσης και μεταξύ των υγιών χωρίς προδιάθεση για τη νόσο (Υγιείς (-)), των υγιών με προδιάθεση (Υγιείς (+)) και των ασθενών με ΣΔτ2 (κάτω σειρά). Οι τιμές της στατιστικής σημαντικότητας (p-value) απεικονίζονται με αστερίσκο (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$), ενώ οι οριζόντιες μπάρες αντιπροσωπεύουν την τιμή της διαμέσου των μονάδων σε κάθε ομάδα. Ανατύπωση από τους Christodoulou MI, Avgeris M., Kokkinopoulou I. et al. *Sci Rep.* 2019;9(1):1512) (201).

3.3 RNA αλληλούχηση- (RNA-seq)- για την εκτίμηση των επιπέδων έκφρασης των επιμέρους εναλλακτικών μεταγράφων των γονιδίων που σχετίζονται με τον αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης ΣΔτ2

Ακολούθως της ποσοτικοποίησης των επιπέδων έκφρασης των προαναφερθέντων γονιδίων, πραγματοποιήθηκαν από μέλη του εργαστηρίου μας πειράματα RNA αλληλούχησης σε αντιπροσωπευτικά δείγματα περιφερικού αίματος 4 ασθενών και 2 υγιών δοτών με σκοπό την ποσοτικοποίηση των επιπέδων έκφρασης των επιμέρους εναλλακτικών μεταγράφων των υπό μελέτη γονιδίων. Στόχος αυτής της πειραματικής προσέγγισης ήταν η ταυτοποίηση των επιμέρους εναλλακτικών μεταγράφων που πιθανόν ήταν υπεύθυνα για τις διαφορές που παρατηρήθηκαν στην έκφραση των τριών γονιδίων (*CDK5*, *CDKN2A*, *TSPAN8*) μεταξύ των δύο ομάδων αλλά και η ανακάλυψη νέων, πιθανά μη ανιχνεύσιμων έως τώρα, διαφορών των επιπέδων έκφρασης των επιμέρους μεταγράφων των υπόλοιπων 17 γονιδίων μεταξύ των δύο ομάδων.

Εστιάζοντας στην ανάλυση των 20 προαναφερθέντων γονιδίων, που είχαν ανιχνεύσιμα επίπεδα έκφρασης στα δείγματα του περιφερικού αίματος, η ανάλυση των πειραμάτων της RNA αλληλούχησης ανέδειξε ότι οι ασθενείς με ΣΔτ2 παρουσίαζαν υψηλότερα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *CAPN10*, *KCNQ1* και *TCF7L2* και των μεταγράφων NM_023085 (*CAPN10*), NM_000218 (*KCNQ1*), NM_001198530, NM_001146284, NM_001198527 (*TCF7L2*), NR_073394 (*THADA*) και μειωμένα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *CDKAL1* και *IGF2BP2* και των μεταγράφων NM_017774 (*CDKAL1*), NM_001291873, NM_001291872, NM_001291875 (*IGF2BP2*), NM_001271643, NM_001271644, NM_001083953, NM_022065 (*THADA*), συγκριτικά με τους υγιείς δότες (Εικόνα 3.5).



Εικόνα 3.5: Τα διαγράμματα παρουσιάζουν τα γονίδια/εναλλακτικά μετάγραφα διαφορετικής έκφρασης (κόκκινος κύκλος: υπερέκφραση, μπλέ κύκλος: υποέκφραση), μεταξύ των ασθενών με ΣΔτ2 και των υγιών δοτών, όπως αυτά προέκυψαν από τα πειράματα της RNA αλληλούχησης, ανάμεσα από το σύνολο των 24 -υπό μελέτη- γονιδίων και των επιμέρους μεταγράφων αυτών (γκρι κύκλος). Η διαφορετική έκφραση θεωρήθηκε σημαντική όταν ο βαθμός της διαφοράς (fold-change) των σχετικών επιπέδων έκφρασης (mean of reads per kilobase million, RPKM) μεταξύ των δύο ομάδων ήταν <0.5 ή >2. Ανατύπωση από τους Christodoulou MI, Avgeris M., Kokkinopoulou I. et al. *Sci Rep.* 2019;9(1):1512) (201).

3.4 Μελέτη των επιπέδων έκφρασης των επιμέρους εναλλακτικών μεταγράφων των γονιδίων που σχετίζονται με τον αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης ΣΔτ2

3.4.1 Ανάπτυξη μεθοδολογίας ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου (qPCR)

Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε ποσοτική qPCR στο σύνολο του πληθυσμού της μελέτης, με σκοπό τον έλεγχο/επιβεβαίωση της διαφορικής έκφρασης των επιμέρους εναλλακτικών μεταγράφων των γονιδίων μεταξύ των δύο ομάδων, όπως αυτή προέκυψε από τα πειράματα της RNA αλληλούχησης καθώς και τη μελέτη των επιπέδων έκφρασης των μεταγράφων των γονιδίων *CDK5*, *CDKN2A*, *TSPAN8*.

Τα επιμέρους μετάγραφα (transcript variants- tv) που επιλέχθηκαν να μελετηθούν ποσοτικά, ως προς τα επίπεδα έκφρασής τους, με τη μέθοδο της qPCR στο σύνολο του πληθυσμού της μελέτης ήταν τα: NM_023085 (*CAPN10* tv3), NM_004935.3 και NM_001164410.2 (*CDK5* tv1 και 2, αντίστοιχα), NM_000077.4 ή *p16INK4A*, NM_058197.4, NM_058195.3 ή *p14ARF* και NM_001195132.1 (*CDKN2A* tv1, 3, 4 και 5, αντίστοιχα), NM_001291872, NM_001291873 και NM_001291875 (*IGF2BP2* tv4, 5 και 7, αντίστοιχα), NM_000218 (*KCNQ1* tv1), *TCF7L2* tv4, 9 and 12 (NM_001146284, NM_001198527 και NM_001198530, αντίστοιχα), NM_022065, NM_001083953, NM_001271643 και NM_001271644 (*THADA* tv1, 3, 4 και 5, αντίστοιχα). Τα γονίδια *CDKAL1* και *TSPAN8* κωδικοποιούν ένα μόνο μετάγραφο (NM_017774 και NM_004616.2, αντίστοιχα) και για αυτό δε μελετήθηκαν περαιτέρω. Το μετάγραφο NR_073394 του γονιδίου *THADA* αποτελεί ένα μη κωδικό μόριο RNA και δεν μελετήθηκε περαιτέρω.

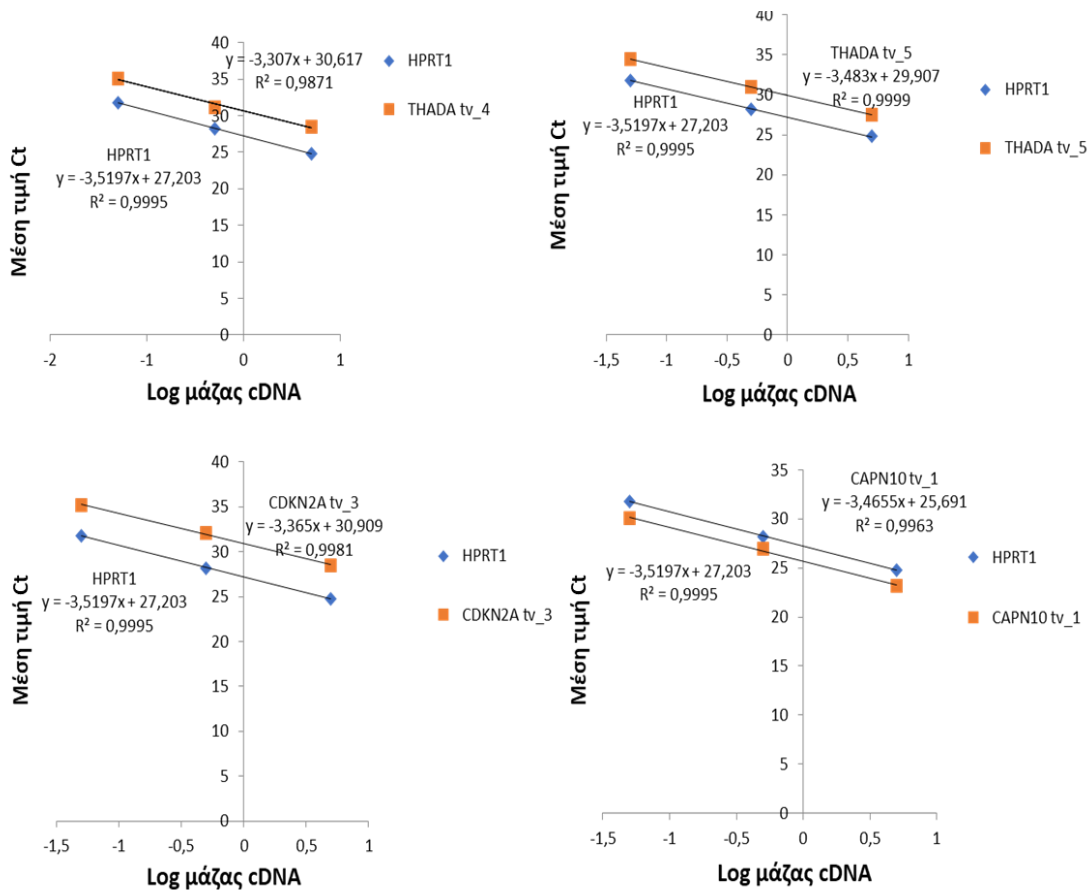
Για την ποσοτική εκτίμηση των επιπέδων έκφρασης των επιμέρους μεταγράφων των γονιδίων πραγματοποιήθηκε η μέθοδος της ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου (qPCR), με παρόμοια μεθοδολογία που εφαρμόστηκε και για τη μελέτη των συνολικών επιπέδων έκφρασης των 24 γονιδίων ενδιαφέροντος. Ως γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο *HPRT1* ενώ ως βαθμονομητής χρησιμοποιήθηκε η αθανатоποιημένη κυτταρική σειρά παγκρέατος 1.2B4, αφού προηγουμένως ελέγχθηκε για την ικανοποιητική έκφραση των εξεταζόμενων μεταγράφων.

3.4.2 Βελτιστοποίηση συνθηκών αντιδράσεων qPCR και έλεγχος ποιότητας της μεθόδου

Για την ποσοτικοποίηση των επιπέδων έκφρασης των επιμέρους μεταγράφων των γονιδίων σχεδιάστηκαν αρχικά ειδικοί εκκινητές για την εκλεκτική ενίσχυση και ανίχνευση των υπό μελέτη μεταγράφων. Ακολούθως, για την βελτιστοποίηση των συνθηκών των αντιδράσεων ελέγχθηκαν όλα τα ζεύγη των εκκινητών σε διαφορετικές συγκεντρώσεις, εύρους από 50nM

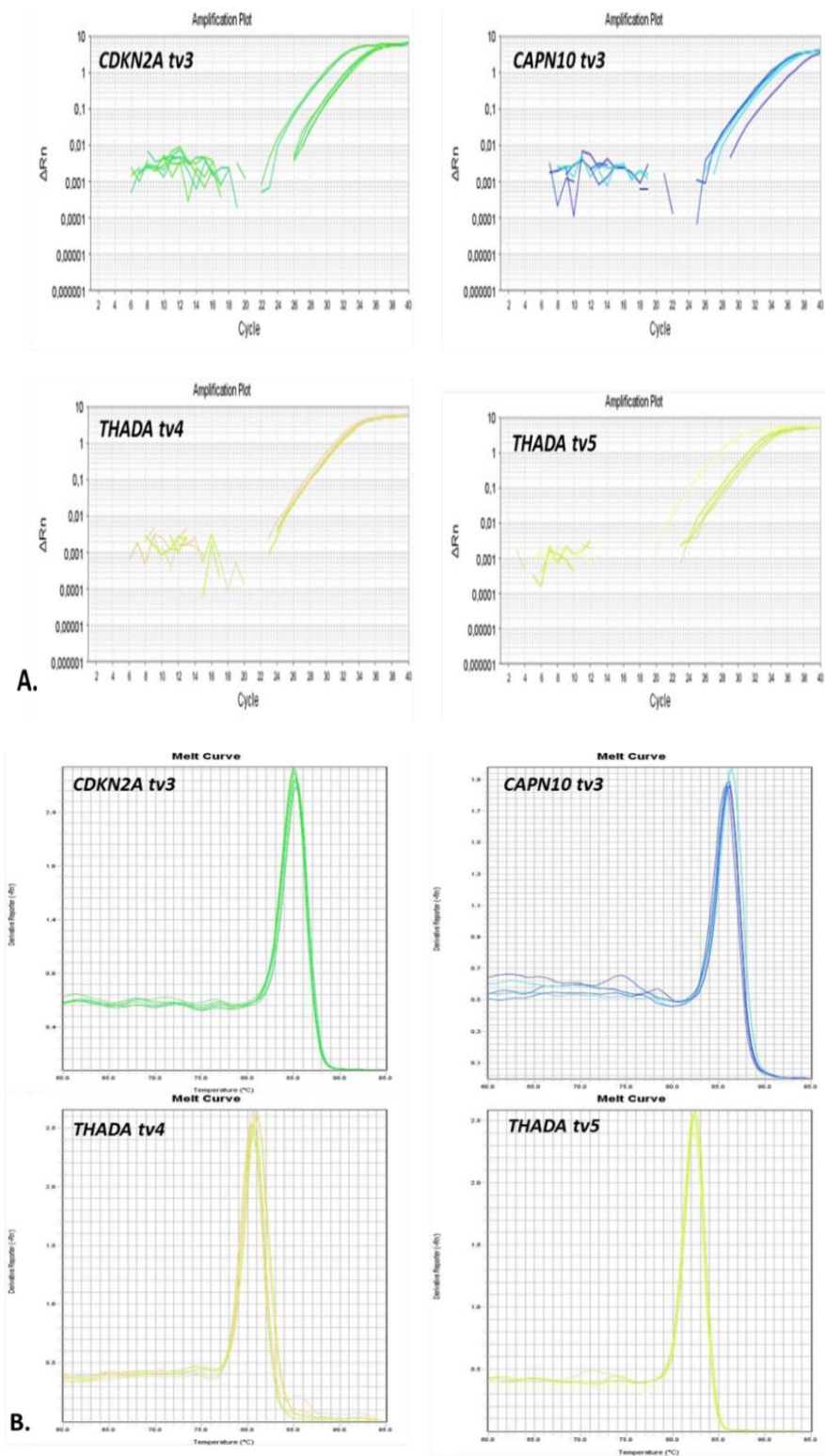
έως 350nM, χρησιμοποιώντας ένα κοινό δείγμα περιφερικού αίματος, προκειμένου να επιλεγούν οι συγκεντρώσεις εκείνες που επιτρέπουν χαμηλότερο Ct και υψηλότερη ειδικότητα αντίδρασης. Οι συνθήκες οι οποίες επιλέχθηκαν για κάθε αντίδραση περιγράφονται στην παράγραφο 2.5.2 ενώ οι τελικές συγκεντρώσεις των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στις αντιδράσεις στον πίνακα 2.2.

Ομοίως, για τον έλεγχο ποιότητας της μεθόδου, χρησιμοποιήθηκαν διαδοχικές σειριακές αραιώσεις 1:10 του θετικού μάρτυρα (cDNA από την κυτταρική σειρά 1.2B4) με σκοπό τη δημιουργία καμπυλών αναφοράς. Και στην περίπτωση της ποσοτικής εκτίμησης των επιπέδων έκφρασης των επιμέρους μεταγράφων των γονιδίων που μελετήθηκαν, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της σχετικής ποσοτικοποίησης $2^{-\Delta\Delta Ct}$, η οποία, όπως προαναφέρθηκε, προϋποθέτει ότι η απόδοση της ενίσχυσης της αλληλουχίας-στόχου πρέπει να είναι ίδια με εκείνη της αλληλουχίας-αναφοράς. Ενδεικτικά, παρουσιάζονται καμπύλες αναφοράς για 4 υπό μελέτη επιμέρους μεταγράφα των γονιδίων, που αναπαριστούν την μεταβολή της μέσης τιμής Ct ως προς το λογάριθμο της μάζας του cDNA καθώς και οι αντίστοιχες τιμές των συντελεστών γραμμικότητας (ελάχιστη-μέγιστη τιμή), οι οποίες και εμπίπτουν στα αποδεκτά όρια της μεθόδου (**Εικόνα 3.6**).



Εικόνα 3.6: Αντιπροσωπευτικές καμπύλες αναφοράς που αναπαριστούν τη μεταβολή της μέσης τιμής Ct ως προς τον log της μάζας του cDNA για 4 υπό μελέτη επιμέρους μεταγράφα (*THADA tv4*, *THADA tv5*, *CDKN2A tv3*, *CAPN10 tv1*) καθώς και του γονιδίου αναφοράς (*HPRT1*). Τόσο οι τιμές του συντελεστή γραμμικότητας όσο και οι τιμές της απόδοσης των αντιδράσεων εμπίπτουν στα αποδεκτά όρια της μεθόδου

Και στην περίπτωση της μελέτης των επιπέδων έκφρασης των επιμέρους μεταγράφων, η ειδικότητα των αντιδράσεων διασφαλίστηκε μέσω της ανάλυσης των καμπυλών τήξης, που ακολουθούν μετά από κάθε αντίδραση ενίσχυσης, και την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων από τυχαία επιλεγμένα δείγματα σε πήκτωμα αγαρόζης. Στην **Εικόνα 3.7** παρατίθενται χαρακτηριστικές καμπύλες ενίσχυσης και τήξης που προήλθαν από την ενίσχυση cDNAs δειγμάτων περιφερικού αίματος για τα επιμέρους μεταγράφα *THADA tv4*, *THADA tv5*, *CAPN10 tv1* και *CDKN2A tv3*. Η ύπαρξη μίας μοναδικής κορυφής σε κάθε περίπτωση ($T_m=80.5^\circ\text{C}$ για το *THADA tv4*, $T_m=82.4^\circ\text{C}$ για το *THADA tv5*, $T_m=87.5^\circ\text{C}$ για το *CAPN10 tv1* και $T_m=85.2^\circ\text{C}$ για το *CDKN2A tv3*) είναι ενδεικτική της ενίσχυσης και της ανίχνευσης των ειδικών προϊόντων.



Εικόνα 3.7: Α. Αντιπροσωπευτικές καμπύλες ενίσχυσης ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου, για τα επιμέρους μετάγραφα *CDKN2A tv3*, *CAPN10 tv3*, *THADA tv4* και *THADA tv5*. Β. Αντιπροσωπευτικές καμπύλες τήξης ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου για τα επιμέρους μετάγραφα *CDKN2A tv3*, *CAPN10 tv3*, *THADA tv4* και *THADA tv5*.

3.4.3 Ποσοτικός προσδιορισμός και διαφορική έκφραση των επιμέρους εναλλακτικών μεταγράφων των γονιδίων που εμπλέκονται στον αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης ΣΔτ2

Η ποσοτική εκτίμηση των επιπέδων έκφρασης των υπό μελέτη μεταγράφων ανέδειξε ότι, τα μετάγραφα *CDKN2A* tv1, *CDKN2A* tv5 και *IGF2BP2* tv4 δεν εκφράζονται στα κύτταρα του ανθρώπινου περιφερικού αίματος.

Οι μονάδες σχετικής ποσοτικοποίησης (μονάδες RQ) που αφορούν τα επίπεδα έκφρασης των επιμέρους μεταγράφων, στο σύνολο του πληθυσμού της μελέτης, συνοψίζονται στον **Πίνακα 3.2**. Τα αποτελέσματα της στατιστικής δοκιμασίας Mann Whitney *U*, ανέδειξαν ότι οι ασθενείς με ΣΔτ2 εμφάνισαν μειωμένα επίπεδα έκφρασης των μεταγράφων *CAPN10* tv3 ($p=0.0004$) και *KCNQ1* tv1 ($p=0.0761$), συγκρινόμενοι με τους υγιείς δότες (**Εικόνα 3.8 A**). Η δοκιμασία Jonckheere-Terpstra ανέδειξε επιπλέον μια σταδιακή μείωση των επιπέδων έκφρασης των μεταγράφων αυτών μεταξύ των τριών ομάδων: υγιείς χωρίς προδιάθεση για τη νόσο, υγιείς με προδιάθεση για τη νόσο και ασθενείς με ΣΔτ2 για την περίπτωση των μεταγράφων *CAPN10* tv3 ($p<0.0005$) και *KCNQ1* tv1 ($p=0.013$) (**Εικόνα 3.8 A**).

Από την άλλη πλευρά, συγκρινόμενοι με την ομάδα των υγιών, οι ασθενείς με ΣΔτ2 παρουσίασαν αυξημένα επίπεδα έκφρασης των μεταγράφων *CDK5* tv1 ($p=0.0034$), *CDKN2A* tv3 ($p=0.0035$), *CDKN2A* tv4 ($p=0.0125$) καθώς και του μεταγράφου *IGF2BP2* tv7 ($p=0.22$) (**Εικόνα 3.8 A**). Επιπλέον, στατιστικά σημαντική σταδιακή αύξηση παρατηρήθηκε μεταξύ των τριών ομάδων: υγιείς χωρίς προδιάθεση για τη νόσο, υγιείς με προδιάθεση για τη νόσο και ασθενείς με ΣΔτ2 για τα επιμέρους μετάγραφα *CDK5* tv1 ($p=0.006$), *CDKN2A* tv3 ($p=0.002$), *CDKN2A* tv4 ($p=0.001$) και *IGF2BP2* tv7 ($p=0.050$) (**Εικόνα 3.8 A**).

Ένα διαφορετικό πρότυπο διαφορικής έκφρασης παρατηρήθηκε στην περίπτωση του *CDK5* tv2 και του *THADA* tv5. Πιο συγκεκριμένα, οι ασθενείς με ΣΔτ2 εμφάνισαν υψηλότερα επίπεδα έκφρασης των παραπάνω μεταγράφων, συγκρινόμενοι με τους υγιείς (*CDK5* tv2: $p=0.0367$ και *THADA* tv5: $p=0.0479$). Παρόλα αυτά, οι χαμηλότερες τιμές των επιπέδων έκφρασης παρατηρήθηκαν στην ομάδα των υγιών με προδιάθεση για τη νόσο ενώ οι ενδιάμεσες τιμές παρατηρήθηκαν στην ομάδα των υγιών χωρίς προδιάθεση (**Εικόνα 3.8 B**).

Επιπλέον, η διαδικασία της διόρθωσης των πολλαπλών συγκρίσεων επιβεβαίωσε τις στατιστικά σημαντικές διαφορές στα επίπεδα έκφρασης των μεταγράφων *CAPN10* tv3, *CDK5* tv1, *CDK5* tv2, *CDKN2A* tv3, *CDKN2A* tv4 και *THADA* tv5 μεταξύ των υγιών και των ασθενών με ΣΔτ2 και των επιμέρους μεταγράφων *CAPN10* tv3, *CDK5* tv1, *CDKN2A* tv3, *CDKN2A* tv4, *IGF2BP2* tv7, *KCNQ1* tv1 μεταξύ των τριών ομάδων.

Βασιζόμενοι στα παραπάνω αποτελέσματα, το πάνελ των επιμέρους μεταγράφων των γονιδίων που διαφοροποιείται- ως προς τα επίπεδα έκφρασης- στο περιφερικό αίμα των

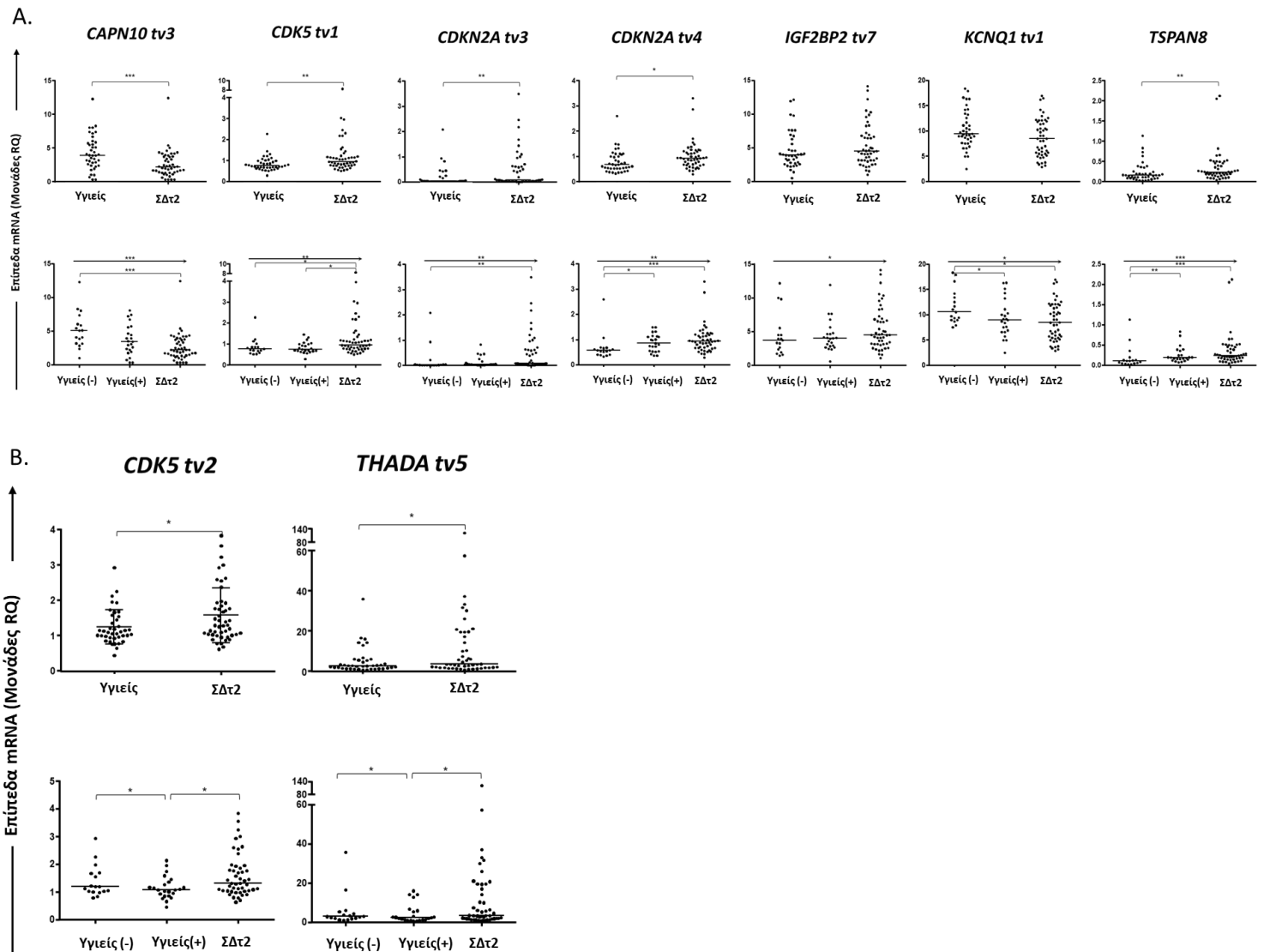
ασθενών με ΣΔτ2 περιλαμβάνει τα παρακάτω: *CAPN10* tv3, *CDK5* tv1, *CDK5* tv2, *CDKN2A* tv3, *CDKN2A* tv4, *IGF2BP2* tv7, *KCNQ1* tv1, *THADA* tv5 και *TSPAN8*. Μεταξύ αυτών, η διωνυμική πολυμεταβλητή ανάλυση, διορθωμένη για την ηλικία και το φύλο, ανέδειξε ότι το μετάγραφο *CAPN10* tv3 μπορεί ακόμη να προβλέψει την εμφάνιση ΣΔτ2 στον πληθυσμό της μελέτης ($p=0.022$, $OR=0.726$). Μια σχηματική αναπαράσταση των επιμέρους μεταγράφων των γονιδίων που διαφοροποιήθηκαν -ως προς τα επίπεδα έκφρασής τους- στο περιφερικό αίμα των ασθενών με ΣΔτ2, συγκριτικά με το κλασικού τύπου μετάγραφο του κάθε γονιδίου, απεικονίζεται στην **εικόνα 3.9**.

Πίνακας 3.2: Μονάδες σχετικές ποσοτικοποίησης (μονάδες RQ) των επιπέδων έκφρασης των επιμέρους μεταγράφων των γονιδίων καθώς και οι τιμές της στατιστικής σημαντικότητας (p value) μεταξύ των ομάδων.

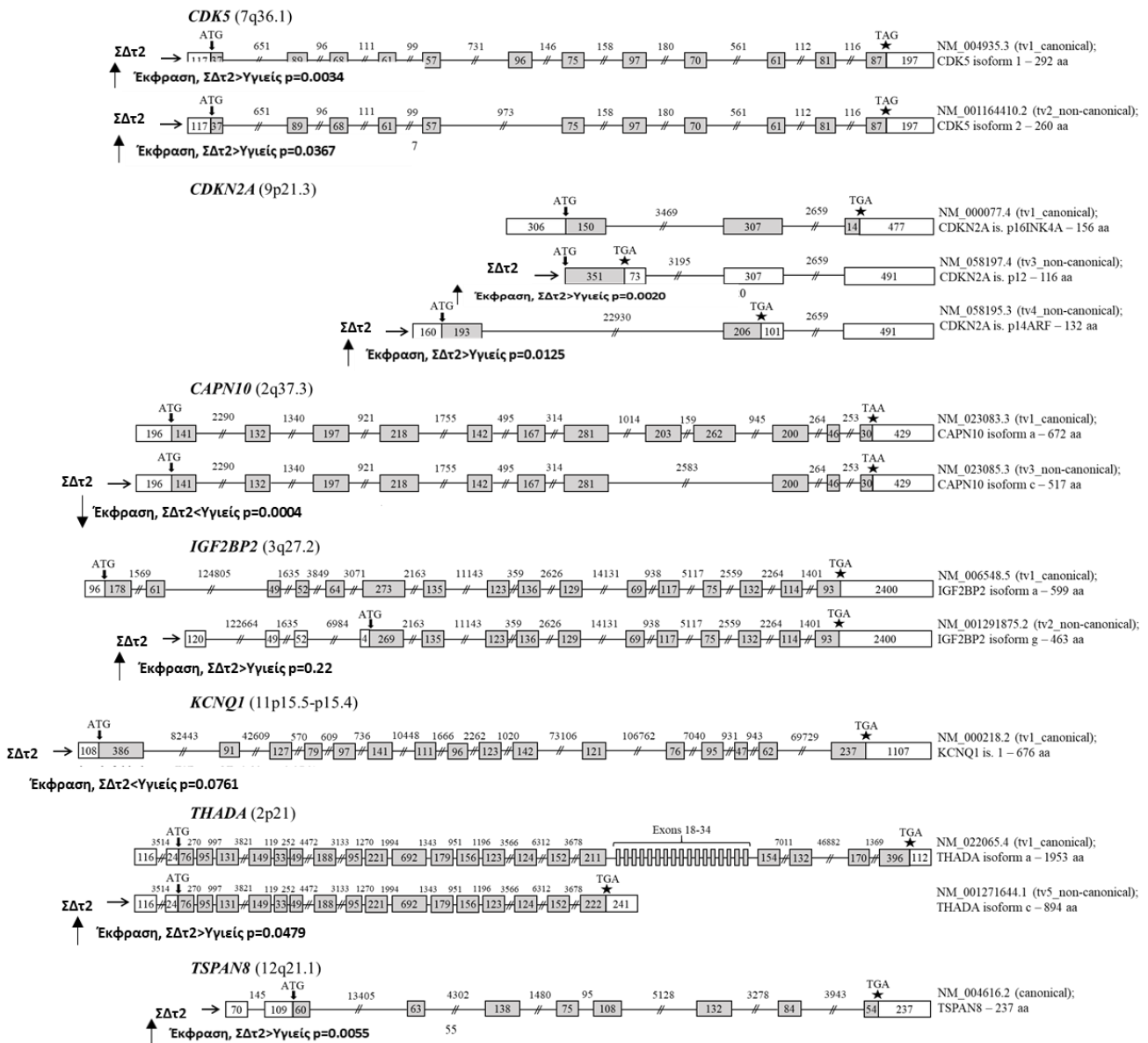
Μετάγραφο	Επίπεδα RQ, διάμεσος (μέσος)				Στατιστική σημαντικότητα, p				
	Υγιείς (n=40)	Υγιείς (-) (n=17)	Υγιείς (+) (n=23)	ΣΔτ2 (n=48)	Υγιείς vs. ΣΔτ2	Υγιείς (-) vs. ΣΔτ2	Υγιείς (+) vs. ΣΔτ2	Υγιείς (-) vs. Υγιείς (+)	Γραμμική τάση των ομάδων Υγιείς (-) → Υγιείς (+) → ΣΔτ2
<i>Επιμέρους μετάγραφο γονιδίων</i>									
<i>CAPN10</i> tv 3	3.924 (0.313-12.30)	5.098 (1.016-12.30)	3.405 (0.313-8.056)	2.208 (0.313-12.43)	0.0004	<0.0001	0.0521	0.0655	<0.0005
<i>CDK5</i> tv 1	0.745 (0.285-2.266)	0.754 (0.509-2.266)	0.735 (0.285-1.441)	0.943 (0.494-8.233)	0.0034	0.0206	0.0177	0.8196	0.006
<i>CDK5</i> tv 2	1.117 (0.453-2.938)	1.190 (0.788-2.938)	1.071 (0.453-2.139)	1.308 (0.631-3.843)	0.0367	0.3732	0.0196	0.2098	0.167
<i>CDKN2A</i> tv 1	NE	NE	NE	NE	NA	NA	NA	NA	NA
<i>CDKN2A</i> tv 3	0.0300 (0.0062-2.083)	0.0145 (0.0062-2.083)	0.0390 (0.0094-0.820)	0.0722 (0.0062-3.481)	0.0035	0.0022	0.0770	0.0579	0.002
<i>CDKN2A</i> tv 4	0.669 (0.321-2.600)	0.570 (0.321-2.600)	0.850 (0.360-1.489)	0.928 (0.292-3.300)	0.0125	0.0002	0.4922	0.0151	0.001
<i>CDKN2A</i> tv 5	ME	ME	ME	ME	ME	ME	ME	ME	ME
<i>IGF2BP2</i> tv 4	ME	ME	ME	ME	ME	ME	ME	ME	ME
<i>IGF2BP2</i> tv 4, 5, 6 & 7	0.0106 (0.0106-0.4114)	0.0106 (0.0106-0.3017)	0.0106 (0.0106-0.4114)	0.0106 (0.0106-0.9255)	0.8008	0.8537	0.5898	0.6346	0.970
<i>IGF2BP2</i> tv 7	3.903 (0.5160-12.14)	3.670 (1.4040-12.14)	3.989 (0.5160-11.91)	4.485 (1.032-14.14)	0.2167	0.1665	0.2076	0.5629	0.050
<i>KCNQ1</i> tv 1	9.408 (2.445-18.34)	10.520 (7.504-18.34)	8.951 (2.445-16.34)	8.456 (2.880-16.93)	0.0761	0.0143	0.5530	0.0448	0.013
<i>TCF7L2</i> tv 4 & 9	1.478 (0.842-3.843)	1.773 (0.842-3.843)	1.476 (1.087-3.190)	1.392 (0.396-4.554)	0.4641	0.6832	0.5051	0.8466	0.567
<i>TCF7L2</i> tv 12	3.036 (0.247-7.023)	3.315 (1.434-6.988)	2.808 (0.247-7.023)	3.490 (0.494-7.614)	0.7903	0.3856	0.2659	0.1558	0.945
<i>THADA</i> tv 1 & 3	2.513 (1.256-5.316)	2.736 (1.559-4.599)	2.126 (1.256-5.316)	2.326 (1.008-7.321)	0.5999	0.1509	0.6596	0.1302	0.382
<i>THADA</i> tv 4	2.319 (0.916-6.221)	2.241 (1.519-6.221)	2.397 (0.916-4.080)	2.464 (0.912-8.510)	0.4336	0.9741	0.2606	0.4618	0.549
<i>THADA</i> tv 5	2.582 (0.596-35.83)	2.933 (1.128-35.83)	2.304 (0.596-16.01)	3.452 (0.718-120.7)	0.0479	0.0237	0.0341	0.3544	0.129

Στον πίνακα παρουσιάζεται η τιμή της διαμέσου (έντονες μαύρες τιμές) καθώς και το εύρος των μονάδων σχετικής ποσοτικοποίησης (ελάχιστη-μέγιστη τιμή). Οι τιμές της στατιστικής σημαντικότητας (p value) που

αναγράφονται με έντονο μαύρο αναφέρονται σε $p < 0.05$. Υγιείς (-): Υγιείς χωρίς προδιάθεση, Υγιείς (+): Υγιείς με προδιάθεση εμφάνισης της νόσου, ΣΔτ2: ασθενείς με ΣΔτ2, ΜΕ: μη εφαρμόσιμο
 Ανατύπωση από τους Christodoulou MI, Avgeris M., Kokkinopoulou I. et al. *Sci Rep.* 2019;9(1):1512 (201).



Εικόνα 3.8: **A.** Διαγράμματα που απεικονίζουν τα επίπεδα διαφορικής έκφρασης (μονάδες RQ) των μεταγράφων: *CAPN10 tv3*, *CDK5 tv1*, *CDKN2A tv3*, *CDKN2A tv4*, *IGF2BP2 tv7*, *KCNQ1 tv1* και *TSPAN8* στους υγιείς και στους ασθενείς με ΣΔτ2 (πάνω σειρά), καθώς και μεταξύ των υγιών χωρίς προδιάθεση εμφάνισης της νόσου (Υγιείς (-)), υγιών με προδιάθεση (Υγιείς (+)) και των ασθενών με ΣΔτ2 (κάτω σειρά). **B.** Τα διαγράμματα απεικονίζουν τα επίπεδα διαφορικής έκφρασης (μονάδες RQ) των μεταγράφων *CDK5 tv2* και *THADA tv5* στους υγιείς και στους ασθενείς με ΣΔτ2 (πάνω σειρά), καθώς και μεταξύ των Υγιών (-), των Υγιών (+) και των ασθενών με ΣΔτ2 (κάτω σειρά). Η τιμή της στατιστικής σημαντικότητας (p-value) απεικονίζεται με αστερίσκο (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$), ενώ οι οριζόντιες μπάρες αντιπροσωπεύουν τη τιμή της διαμέσου των μονάδων κάθε ομάδας. Ανατύπωση από τους Christodoulou MI, Avgeris M, Kokkinopoulou I. et al. *Sci Rep.* 2019;9(1):1512 (201).



Εικόνα 3.9: Σχηματική αναπαράσταση των εναλλακτικών μεταγράφων των γονιδίων *CDK5*, *CDKN2A*, *CAPN10*, *IGF2BP2*, *KCNQ1*, *THADA* και *TSPAN8* τα οποία παρουσίασαν διαφορετικά πρότυπα έκφρασης στο περιφερικό αίμα των ασθενών με ΣΔt2, συγκριτικά με τους υγιείς. Τα εξώνια απεικονίζονται με κουτιά και τα εσώνια με γραμμές. Τα γκρι και τα άσπρα κουτιά αντιπροσωπεύουν κωδικές και μη κωδικές περιοχές, αντίστοιχα. Οι αριθμοί μέσα στα κουτιά και πάνω από τις γραμμές απεικονίζουν το μήκος των εξωνίων και των ιντρονίων, αντίστοιχα. Τα βέλη (↓) και οι αστερίσκοι (*) δείχνουν τις θέσεις του κωδικονίου έναρξης ATG και του κωδικονίου λήξης της μετάφρασης (TGA ή TAA ή TAG), αντίστοιχα. Σε κάθε γονίδιο, το κλασικό τύπου μετάγραφο (canonical) καθώς και τα εναλλακτικά του μετάγραφα (non-canonical) που διαφοροποιούνται -ως προς τα επίπεδα έκφρασής τους- στους ασθενείς με ΣΔt2, απεικονίζονται με βέλη (→). Για κάθε μετάγραφο, αναγράφεται ο αριθμός πρόσβασης στη βάση δεδομένων GenBank®, καθώς και ο αριθμός των αμινοξέων της κάθε πρωτεϊνικής ισομορφής (aa) που το κάθε μετάγραφο κωδικοποιεί. Ανατύπωση από τους Christodoulou MI, Avgeris M., Kokkinopoulou I. et al. *Sci Rep.* 2019;9(1):1512) (201).

3.4.4 Διερεύνηση συσχετίσεων μεταξύ των επιπέδων έκφρασης των επιμέρους εναλλακτικών μεταγράφων με συγκεκριμένα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά της νόσου

Τα επίπεδα έκφρασης των επιμέρους μεταγράφων διαφορετικής έκφρασης μεταξύ των ομάδων βρέθηκαν επιπλέον να συσχετίζονται με συγκεκριμένα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά της νόσου. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός μάλιστα ότι οι συσχετίσεις αυτές βρέθηκαν να διαφοροποιούνται ανάλογα με την εκάστοτε υπό μελέτη ομάδα. Πιο συγκεκριμένα, τα επίπεδα έκφρασης του μεταγράφου *CDK5* *tv1* συσχετίστηκαν θετικά με τα επίπεδα της ινσουλίνης πλάσματος ($\mu\text{U/ml}$) καθώς και με τα επίπεδα της γλυκοζυλιωμένης αιμοσφαιρίνης (HbA1c % ή mmol/mol) και αρνητικά με την υπερλιπιδαιμία στους ασθενείς με ΣΔτ2 ενώ συσχετίστηκαν θετικά με τα επίπεδα των τριγλυκεριδίων (mg/dl) ($p<0.05$) στους υγιείς με προδιάθεση για τη νόσο. Από την άλλη πλευρά, τα επίπεδα έκφρασης του μεταγράφου *CDK5* *tv2* συσχετίστηκαν σημαντικά με τα επίπεδα της ινσουλίνης πλάσματος καθώς και με την παρουσία της κεντρικής παχυσαρκίας στους ασθενείς με ΣΔτ2 ($p<0.05$).

Τα επίπεδα έκφρασης του μεταγράφου *CDKN2A* *tv3* συσχετίστηκαν σημαντικά με τα επίπεδα ινσουλίνης πλάσματος στην ομάδα των διαβητικών ασθενών ($p<0.01$) ενώ τα επίπεδα του μεταγράφου *CDKN2A* *tv4* συσχετίστηκαν θετικά με το δείκτη μάζας σώματος και την αναλογία μέσης-γοφού και αρνητικά με τα επίπεδα της HDL (mg/dl) στην ομάδα των υγιών με προδιάθεση για τη νόσο ($p<0.05$).

Τα επίπεδα της ινσουλίνης πλάσματος στους ασθενείς με διαβήτη συσχετίστηκαν ακόμη με τα επίπεδα έκφρασης των μεταγράφων *THADA* *tv5* ($p<0.01$) και *TSPAN8* ($p<0.05$) και παρουσίασαν μια τάση αρνητικής συσχέτισης με τα επίπεδα έκφρασης του μεταγράφου *KCNQ1* *tv1* ($p=0.06$) ενώ στους υγιείς με προδιάθεση για τη νόσο συσχετίστηκαν με τα επίπεδα έκφρασης του μεταγράφου *IGF2BP2* *tv7* ($p<0.05$). Επιπρόσθετα, στους ασθενείς με ΣΔτ2, τα επίπεδα έκφρασης του μεταγράφου *THADA* *tv5* συσχετίστηκαν αντίστροφα με την υπερλιπιδαιμία ενώ τα επίπεδα του *IGF2BP2* *tv7* συσχετίστηκαν θετικά με το δείκτη μάζας σώματος ($p<0.05$). Στους υγιείς με προδιάθεση για τη νόσο, τα επίπεδα mRNA του μεταγράφου *TSPAN8* συσχετίστηκαν με την παρουσία οικογενειακού ιστορικού για ΣΔτ2 ($p<0.01$) και του *IGF2BP2* *tv7* με τα επίπεδα της γλυκόζης πλάσματος ενώ στο σύνολο των υγιών τα επίπεδα έκφρασης του μεταγράφου *KCNQ1* *tv1* συσχετίστηκαν αντίστροφα με το δείκτη μάζας σώματος, την κεντρική παχυσαρκία, τη γλυκόζη και τα επίπεδα της LDL (mg/dl) ($p<0.05$).

Τέλος, με τη διαδικασία της διόρθωσης των πολλαπλών συγκρίσεων επιβεβαιώθηκαν οι παρακάτω συσχετίσεις: α) Στους ασθενείς με ΣΔτ2, τα επίπεδα της ινσουλίνης πλάσματος συσχετίστηκαν με τα επίπεδα έκφρασης των μεταγράφων *CDK5* *tv1*, *CDK5* *tv2*, *CDKN2A* *tv3*, *KCNQ1* *tv1*, *THADA* *tv5* και *TSPAN8*, η υπερλιπιδαιμία συσχετίστηκε με τα επίπεδα έκφρασης

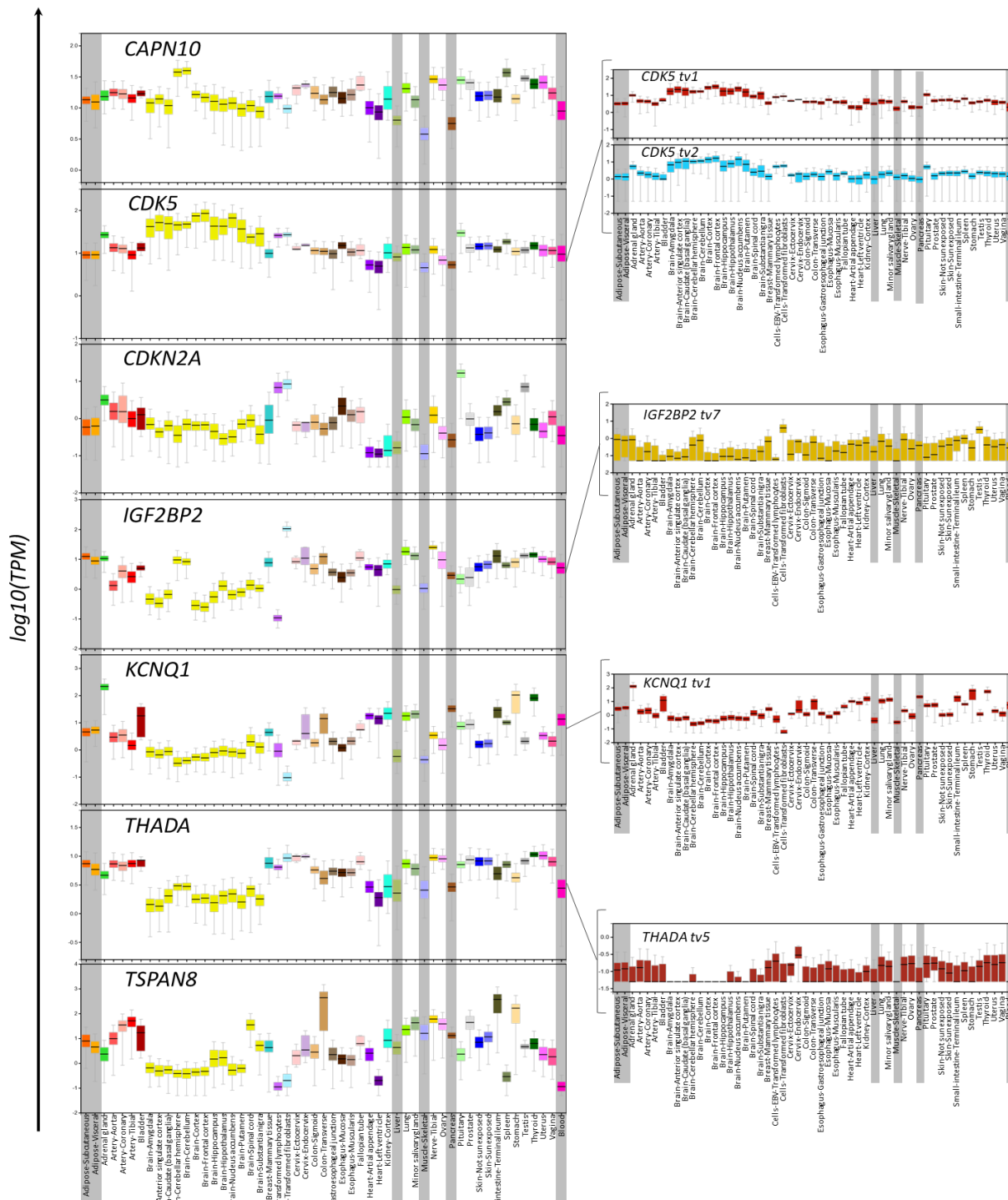
των μεταγράφων *CDK5* tv1 και *THADA* tv5 και ο δείκτης μάζας σώματος με τα επίπεδα έκφρασης του μεταγράφου *IGF2BP2* tv7 β) Στην ομάδα των υγιών δοτών, τα επίπεδα της ινσουλίνης πλάσματος συσχετίστηκαν με τα επίπεδα έκφρασης του μεταγράφου *IGF2BP2* tv7, τα επίπεδα της HDL, ο δείκτης μάζας σώματος και η αναλογία μέσης-γοφού με τα επίπεδα έκφρασης των μεταγράφων *CDKN2A* tv4 και το οικογενειακό ιστορικό για ΣΔτ2 με τα επίπεδα έκφρασης του *TSPAN8*. Αν και ανιχνεύθηκαν αρκετές ακόμη συσχετίσεις μεταξύ των κλινικοπαθολογικών χαρακτηριστικών της νόσου και των επιπέδων έκφρασης των επιμέρους μεταγράφων διαφορετικής έκφρασης μεταξύ των ομάδων, δεν παρατηρήθηκαν διαφορετικά πρότυπα συσχέτισης μεταξύ των ομάδων.

3.4.5 Διερεύνηση της ιστοειδικής έκφρασης των γονιδίων/μεταγράφων που σχετίζονται με τον αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης ΣΔτ2

Η αναζήτηση στη βάση δεδομένων GTEx portal¹⁹ ανέδειξε ότι τα γονίδια *CAPN10*, *CDK5*, *CDKN2A*, *IGF2BP2*, *KCNQ1*, *THADA* και *TSPAN8* καθώς και τα επιμέρους μεταγράφα *CDK5* tv1, *CDK5* tv2, *IGF2BP2* tv7, *KCNQ1* tv1 και *THADA* tv5 εκφράζονται σε μια πληθώρα ανθρώπινων ιστών, συμπεριλαμβανομένου του περιφερικού αίματος και των ιστών-στόχων του ΣΔτ2 (λιπώδης ιστός, ήπαρ, σκελετικός μυς, πάγκρεας) (**Εικόνα 3.10**) ενώ δεν βρέθηκαν διαθέσιμα δεδομένα για τις περιπτώσεις των μεταγράφων *CAPN10* tv3, *CDKN2A* tv3 και tv4.

Επιπλέον, αναζήτηση στη βάση δεδομένων blood eQTL browser και GTEx για την ανίχνευση eQTLs που σχετίζονται με την εμφάνιση ΣΔτ2 στο περιφερικό αίμα ή/και στους ιστούς- στόχους της νόσου, ανέδειξε ότι σημαντικά eQTLs-SNPs που σχετίζονται με την εμφάνιση ΣΔτ2 εδράζονται στα γονίδια *CAPN10*, *CDKN2A*, *IGF2BP2* και *KCNQ1* στα κύτταρα του αίματος και στα γονίδια *CAPN10* και *TSPAN8* στο σκελετικό μυ.

Επιπλέον, το γονίδιο *CAPN10*, το οποίο και αποτελεί το πιο σημαντικό, στην παρούσα μελέτη, γονίδιο διαφορετικής έκφρασης φέρει τουλάχιστον ένα cis-eQTL (με δράση στο ίδιο γονίδιο) ενώ η έκφρασή του επηρεάζεται από αρκετά eQTLs που εδράζονται σε άλλα γονίδια (*GPR35*, *RNPEPL1*). Παρόλα αυτά, μόνο ο rs5030952-eQTL είναι γνωστός από τις GWAS μελέτες ότι εμπλέκεται στην ανάπτυξη ΣΔτ2.



Εικόνα 3.10: Τα διαγράμματα απεικονίζουν το προφίλ έκφρασης των γονιδίων/μεταγράφων διαφορετικής έκφρασης μεταξύ των ασθενών και των υγιών σε μια πληθώρα ανθρώπινων ιστών και κυττάρων, όπως έχουν προκύψει από τη βάση GTEx portal 19. Τα επίπεδα έκφρασης εκφράζονται ως TPM (transcripts per million). Τα κουτιά παρουσιάζουν την τιμή της διαμέσου (εύρος) των κανονικοποιημένων τιμών. Τα κουτιά που αντιστοιχούν στο περιφερικό αίμα ή στους -εμπλεκόμενους με τη νόσο- ιστούς απεικονίζονται με γκρι επισήμανση. *Ανατύπωση από τους Christodoulou MI, Avgeris M, Kokkinoroulou I. et al. Sci Rep. 2019;9(1):1512) (201).*

3.5 Μελέτη των επιπέδων έκφρασης των miRNAs που στοχεύουν τα γονίδια/μετάγραφα που σχετίζονται με τον αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης ΣΔτ2

3.5.1 Ανάπτυξη μεθοδολογίας ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου (qPCR)

Σε συνέχεια των προηγούμενων αποτελεσμάτων, ακολούθησε βιοπληροφορική αναζήτηση σε κατάλληλες βάσεις δεδομένων για την εύρεση των miRNAs εκείνων που έχει επιβεβαιωθεί πειραματικά ότι στοχεύουν τα γονίδια/μετάγραφα διαφορετικής έκφρασης *CAPN10*, *CDK5*, *CDKN2A*, *IGF2BP2*, *KCNQ1*, *THADA* και *TSPAN8*- όπως αυτά διαφοροποιήθηκαν- ως προς τα επίπεδα έκφρασής τους- μεταξύ των δύο ή/και των τριών ομάδων στα υπό μελέτη δείγματα του περιφερικού αίματος των ασθενών και των υγιών δοτών. Στόχος ήταν η κατανόηση των ρυθμιστικών μηχανισμών που πιθανόν μπορούν να συμμετέχουν στη ρύθμιση της έκφρασης των παραπάνω γονιδίων. Η αναζήτηση αυτή ανέδειξε τα παρακάτω 14 miRNAs: let-7b-5p, let-7g-5p, miR-1-3p, miR-10b-5p, miR-24-3p, miR-29a-3p, miR-29b-3p, miR-34a-5p, miR-98-5p, miR-124-3p, miR-125b-5p, miR-133a-3p, miR-155-5p και miR-5682, ενώ δεν βρέθηκαν επιβεβαιωμένα πειραματικά miRNAs να στοχεύουν τα γονίδια *CAPN10* και *THADA*.

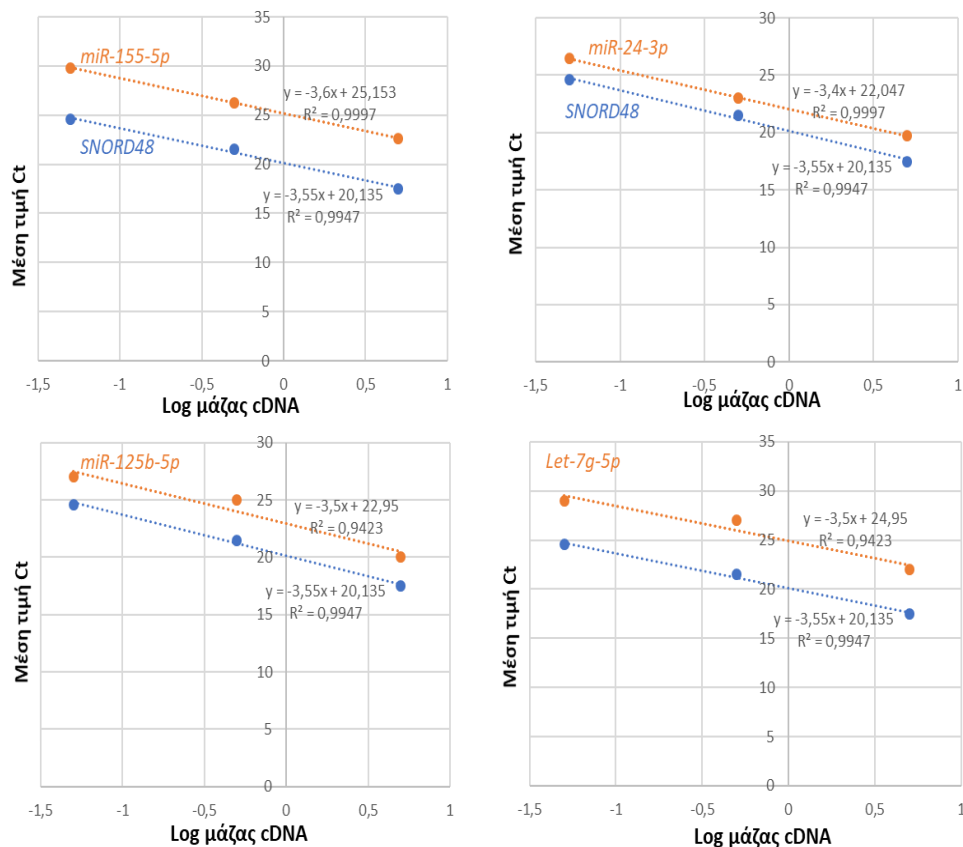
Για την ποσοτική εκτίμηση των επιπέδων έκφρασης των miRNAs που στοχεύουν τα γονίδια/μετάγραφα διαφορετικής έκφρασης στα δείγματα του περιφερικού αίματος, πραγματοποιήθηκε η μέθοδος της ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου (qPCR). Η σύνθεση του cDNA, το οποίο χρησιμοποιήθηκε ως εκμαγείο για την αντίδραση της qPCR, πραγματοποιήθηκε μέσω της αντίδρασης της αντίστροφης μεταγραφής των μορίων miRNA, όπως περιγράφηκε στην ενότητα 2.4.2. Στη συνέχεια, σχεδιάστηκαν ειδικοί πρόσθιοι εκκινητές για την εκλεκτική ενίσχυση κάθε miRNA ξεχωριστά ενώ χρησιμοποιήθηκε ένας κοινός ανάστροφος εκκινητής σε όλες τις περιπτώσεις. Ως γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο *SNORD48 (RNU48)*, το οποίο σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία παρουσιάζει καθολική και αμετάβλητη έκφραση στα δείγματα του περιφερικού αίματος ενώ δεν παρουσιάστηκαν αξιοσημείωτες μεταβολές στην έκφρασή του και στον πληθυσμό των δειγμάτων της παρούσας εργασίας. Ως βαθμονομητής χρησιμοποιήθηκε η αθανατοποιημένη κυτταρική σειρά παγκρέατος 1.2B4, αφού προηγουμένως ελέγχθηκε για την ικανοποιητική έκφραση όλων των υπό μελέτη miRNAs.

3.5.2 Βελτιστοποίηση συνθηκών αντιδράσεων qPCR και έλεγχος ποιότητας της μεθόδου qPCR

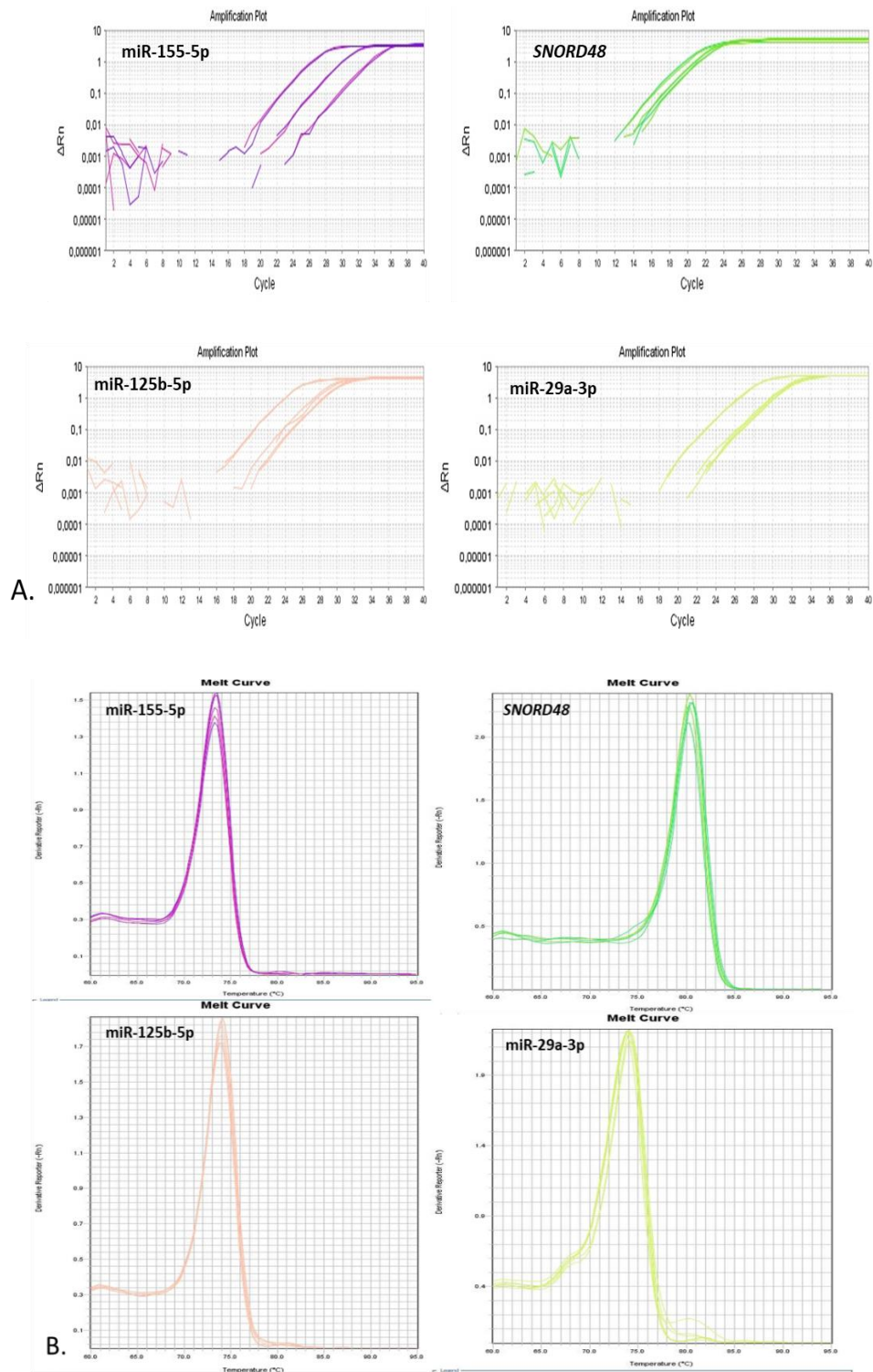
Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε έλεγχος διαφορετικών συγκεντρώσεων πρόσθιων και ανάστροφων εκκινητών (50, 100, 150, 200, 250, 300, 350 nM) για όλα τα υπό μελέτη miRNAs καθώς και για το μικρομοριακό RNA αναφοράς *SNORD48*, χρησιμοποιώντας ένα κοινό δείγμα περιφερικού αίματος, με σκοπό την επίτευξη της χαμηλότερης τιμής Ct και της μέγιστης απόδοσης και ειδικότητας της αντίδρασης. Οι συνθήκες οι οποίες επιλέχθηκαν για κάθε

αντίδραση περιγράφονται στην παράγραφο 2.5.3 ενώ οι τελικές συγκεντρώσεις των εκκινητών στον Πίνακα 2.3.

Για την ποσοτική ανάλυση της έκφρασης των υπό μελέτη miRNAs έγινε χρήση της μεθόδου της σχετικής ποσοτικοποίησης, μέσω της μεθόδου σύγκρισης των τιμών Ct ($2^{-\Delta\Delta Ct}$). Βασική προϋπόθεση για την εφαρμογή της παραπάνω προσέγγισης είναι η διασφάλιση ότι η απόδοση της αντίδρασης ενίσχυσης του μορίου-στόχου και της αντίδρασης ενίσχυσης του μορίου-αναφοράς είναι παρόμοιες και μέσα στα επιτρεπτά όρια (90 – 100%). Για το σκοπό αυτό διεξήχθησαν, και στην περίπτωση αυτή, πειράματα αξιολόγησης στα οποία χρησιμοποιήθηκαν σειριακές αραιώσεις 1:10 του θετικού μάρτυρα (cDNA από την κυτταρική σειρά 1.2B4) και κατασκευάστηκαν πρότυπες καμπύλες αναφοράς. Οι υπολογισθείσες αποδόσεις είναι παρόμοιες, όπως φαίνεται άλλωστε και από την παραλληλία των καμπυλών, και εμπίπτουν στα αποδεκτά όρια της μεθόδου (**Εικόνα 3.11**).



Εικόνα 3.11: Αντιπροσωπευτικές καμπύλες αναφοράς που αναπαριστούν τη μεταβολή της μέσης τιμής Ct ως προς τον log της μάζας του cDNA για 4 υπό μελέτη miRNAs (miR-155-5p, miR-24-3p, miR-125b-5p, let-7g-5p) καθώς και του γονιδίου αναφοράς (SNORD48). Τόσο οι τιμές του συντελεστή γραμμικότητας όσο και οι τιμές της απόδοσης των αντιδράσεων εμπίπτουν στα αποδεκτά όρια της μεθόδου.



Εικόνα 3.12: Α. Αντιπροσωπευτικές καμπύλες ενίσχυσης ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου, για τα miRNAs: miR-155-5p, miR-125b-5p, miR-29a-3p, SNORD48 Β. Αντιπροσωπευτικές καμπύλες τήξης ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου για τα miRNAs: miR-155-5p, miR-125b-5p, miR-29a-3p, SNORD48.

Όσον αφορά την ειδικότητα των αντιδράσεων, αυτή διασφαλίστηκε, και στην περίπτωση αυτή, μέσω της ανάλυσης των καμπυλών τήξης μετά από κάθε αντίδραση ενίσχυσης και την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων από τυχαία επιλεγμένα δείγματα σε πήκτωμα αгарόζης. Στην **Εικόνα 3.12** παρατίθενται χαρακτηριστικές καμπύλες τήξης για τα προϊόντα PCR που προήλθαν από την ενίσχυση των cDNAs δειγμάτων του περιφερικού αίματος για τα *SNORD48* και τα miR-29a-3p, miR-125b-5p και miR-155-5p. Η ύπαρξη μίας μοναδικής κορυφής σε κάθε περίπτωση ($T_m=80.3^\circ\text{C}$ για το *SNORD48*, $T_m=74.1^\circ\text{C}$ για το miR-125b-5p, $T_m=73.9^\circ\text{C}$ για το miR-29a-3p και $T_m=73.2^\circ\text{C}$ για το miR-155-5p) είναι ενδεικτική της ενίσχυσης και της ανίχνευσης των ειδικών προϊόντων.

3.5.3 Ποσοτικός προσδιορισμός και διαφορική έκφραση των miRNAs που στοχεύουν τα γονίδια/μετάγραφα που σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης ΣΔτ2

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων της qPCR ανέδειξαν ότι 10 από τα υπό μελέτη miRNAs εκφράζονται στα κύτταρα του περιφερικού αίματος: let-7b-5p, let-7g-5p, miR-1-3p, miR-24-3p, miR-29a-3p, miR-34a-5p, miR-98-5p, miR-125b-5p, miR-133a-3p και miR-155-5p. Στις περιπτώσεις των miR-10b-5p, miR-29b-3p, miR-124-3p και miR-5682 δεν παρατηρήθηκαν ανιχνεύσιμα επίπεδα έκφρασης στα υπό μελέτη δείγματα του περιφερικού αίματος.

Οι μονάδες σχετικής ποσοτικοποίησης (μονάδες RQ) των επιπέδων έκφρασης των miRNAs στο σύνολο του πληθυσμού της μελέτης, συνοψίζονται στον **Πίνακα 3.3**. Τα αποτελέσματα της στατιστικής επεξεργασίας των αποτελεσμάτων (δοκιμασία Mann Whitney *U*) ανέδειξαν ότι οι ασθενείς με ΣΔτ2 εμφανίζουν σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης των miRNAs let-7b-5p ($p=0.0014$), miR-1-3p ($p<0.0001$), miR-24-3p ($p=0.0084$), miR-34a-5p ($p<0.0001$), miR-98-5p ($p=0.0013$) και miR133a-3p ($p=0.0003$), συγκρινόμενοι με τους υγιείς δότες (**Εικόνα 3.13 A**). Παρόμοια, στους ασθενείς με ΣΔτ2 παρατηρήθηκαν μειωμένα επίπεδα έκφρασης του miR-125b-5p ($p=0.0801$), συγκρινόμενοι με τους υγιείς δότες, χωρίς ωστόσο να είναι στατιστικά σημαντικά.

Περαιτέρω ανάλυση μέσα στην ομάδα των υγιών ανέδειξε ότι οι υγιείς με προδιάθεση για τη νόσο, σε σύγκριση με τους υγιείς χωρίς προδιάθεση, χαρακτηρίζονταν από μειωμένα επίπεδα έκφρασης των miRNAs: miR-1-3p ($p<0.0001$), miR-34a-5p ($p=0.008$), miR-98-5p ($p=0.073$) και miR-133a-3p ($p=0.001$) (**Εικόνα 3.13 B**). Επιπλέον, η δοκιμασία Jonckheere Terpstra ανέδειξε μια γραμμική τάση μείωσης των επιπέδων έκφρασης των let-7b-5p ($p=0.002$), miR-1-3p ($p<0.0001$), miR-24-3p ($p=0.011$), miR-34a-5p ($p<0.0001$), miR-98-5p ($p<0.0001$), miR-125b-5p ($p=0.049$) και miR-133a-3p ($p<0.0001$) μεταξύ των τριών ομάδων: υγιείς χωρίς προδιάθεση για τη νόσο, υγιείς με προδιάθεση και ασθενείς με ΣΔτ2 (**Εικόνα 3.13 B**). Τέλος,

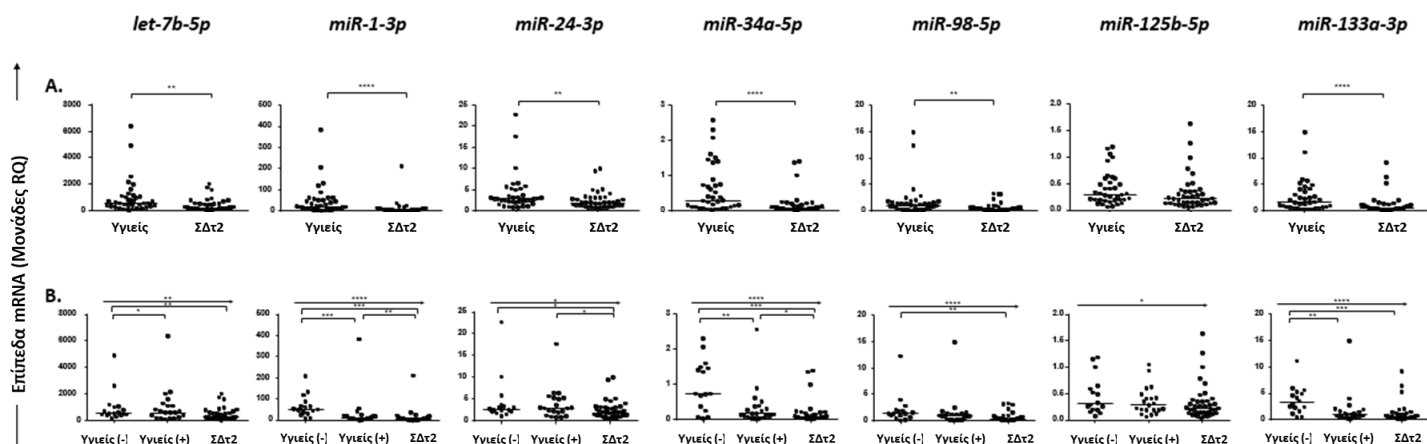
μετά τη διαδικασία της διόρθωσης των πολλαπλών συγκρίσεων, τα διαφορικά πρότυπα έκφρασης όλων των παραπάνω miRNAs, εκτός από το miR-125b-5p, παρέμειναν στατιστικά σημαντικά.

Σύμφωνα με τα παραπάνω δεδομένα, το πάνελ των miRNAs που διαφοροποιείται -ως προς τα επίπεδα έκφρασης- στο περιφερικό αίμα των ασθενών με ΣΔτ2 περιλαμβάνει τα εξής: let-7b-5p, miR-1-3p, miR-24-3p, miR-34a-5p, miR-98-5p, miR-125b-5p και miR-133a-3p. Μεταξύ αυτών, η διωνυμική πολυμεταβλητή ανάλυση, διορθωμένη για την ηλικία και το φύλο, ανέδειξε ότι τα miR-24-3p και miR-133a-3p μπορούν να προβλέψουν τη νόσο μεταξύ των ατόμων του πληθυσμού της μελέτης ($p=0.042$, $OR=0.390$ και $p=0.025$, $OR=30.86$, αντίστοιχα).

Πίνακας 3.3: Μονάδες σχετικές ποσοτικοποίησης (μονάδες RQ) των επιπέδων έκφρασης των miRNAs που στοχεύουν τα γονίδια/μετάγραφα που σχετίζονται με τον αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης ΣΔτ2 και παρουσίασαν διαφορετική έκφραση στο περιφερικό αίμα των ασθενών με ΣΔτ2.

Γονίδια/Επιμέρους μετάγραφα	Μονάδες RQ, διάμεσος (εύρος)				Στατιστική σημαντικότητα, p				
	Υγιείς (n=37)	Υγιείς (-) (n=16)	Υγιείς (+) (n=21)	ΣΔτ2 (n=40)	Υγιείς vs ΣΔτ2	Υγιείς (-) vs ΣΔτ2	Υγιείς (+) vs ΣΔτ2	Υγιείς (-) vs Υγιείς (+)	Γραμμική τάση των ομάδων Υγιείς (-)→Υγιείς (+)→ΣΔτ2
miRNAs									
let-7b-5p	561.6 (53.55-6363)	508.29 (89.60-4911.16)	573.05 (53.55-6363.20)	212.4 (43.26-2008)	0.0014	0.005	0.018	0.868	0.002
let-7g-5p	19.13 (4.232-171.7)	11.77 (4.23-171.74)	30.95 (4.39-153.30)	24.34 (2.571-389.3)	0.627	0.095	0.504	0.115	0.333
miR-1-3p	20.36 (1.549-383.1)	50.62 (5.08-206.13)	9.082 (1.55-383.06)	4.183 (0.683-211.2)	<0.0001	<0.0001	0.008	<0.0001	<0.0001
miR-24-3p	2.827 (0.740-22.67)	2.616 (1.09-22.67)	2.858 (0.74-17.61)	1.826 (0.444-10.04)	0.0084	0.026	0.042	0.868	0.011
miR-29a-3p	0.174 (0.034-0.905)	0.158 (0.04-0.91)	0.186 (0.03-0.55)	0.133 (0.032-0.478)	0.301	0.384	0.412	0.868	0.353
miR-34a-5p	0.296 (0.032-2.568)	0.733 (0.03-2.30)	0.166 (0.03-2.57)	0.077 (0.016-1.402)	<0.0001	<0.0001	0.018	0.008	<0.0001
miR-98-5p	0.998 (0.078-14.84)	1.334 (0.09-12.25)	0.879 (0.08-14.84)	0.356 (0.049-3.226)	0.0013	0.001	0.052	0.073	<0.0001
miR-125b-5p	0.288 (0.058-1.195)	0.302 (0.08-1.19)	0.279 (0.06-1.05)	0.211 (0.043-1.631)	0.0801	0.075	0.261	0.370	0.049
miR-133a-3p	1.545 (0.219-14.86)	3.289 (0.50-11.09)	0.975 (0.22-14.86)	0.476 (0.114-9.176)	0.0003	<0.0001	0.095	0.001	<0.0001
miR-155-5p	0.132 (0.027-0.514)	0.104 (0.03-0.51)	0.152 (0.03-0.49)	0.120 (0.034-0.981)	0.479	0.758	0.187	0.229	0.772

Στον πίνακα παρουσιάζεται η τιμή της διαμέσου (έντονες μαύρες τιμές) καθώς και το εύρος των μονάδων (ελάχιστη-μέγιστη τιμή). Οι τιμές της στατιστικής σημαντικότητας (p value) που αναγράφονται με έντονα μαύρα αναφέρονται σε $p < 0.05$. Υγιείς (-): Υγιείς χωρίς προδιάθεση, Υγιείς (+): Υγιείς με προδιάθεση εμφάνισης της νόσου, ΣΔτ2: ασθενείς με ΣΔτ2. Ανατύπωση από τους Kokkinoroulou I. et al., *Endocrine*. 2019;66(2):226-39) (212).



Εικόνα 3.13: Α. Τα διαγράμματα απεικονίζουν τη διαφορική κατανομή των επιπέδων έκφρασης των miRNA (μονάδες RQ) στους υγιείς και στους ασθενείς με ΣΔτ2, όπως προέκυψε από κατάλληλες μη παραμετρικές στατιστικές δοκιμασίες. Β. Τα διαγράμματα απεικονίζουν τη διαφορική κατανομή των επιπέδων έκφρασης των miRNAs (μονάδες RQ) στους υγιείς χωρίς προδιαθεσικούς παράγοντες για τη νόσο (Υγιείς (-)), στους υγιείς με προδιάθεση εμφάνισης της νόσου (Υγιείς (+)) και στους ασθενείς με ΣΔτ2. Οι τιμές της στατιστικής σημαντικότητας (p-value) απεικονίζονται με αστερίσκο (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$), ενώ οι οριζόντιες γραμμές αντιπροσωπεύουν την τιμή της διαμέσου των μονάδων για κάθε ομάδα. Ανατύπωση από τους Kokkinorouliou I. et al., *Endocrine*. 2019;66(2):226-39 (212).

3.5.4 Διερεύνηση συσχετίσεων μεταξύ των επιπέδων έκφρασης των miRNAs και των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων/μεταγράφων-στόχων τους

Στη συνέχεια, ακολούθησε μελέτη για τη διερεύνηση των συσχετίσεων μεταξύ των επιπέδων έκφρασης των miRNAs που διαφοροποιούνται- ως προς τα επίπεδα έκφρασής τους- μεταξύ υγιών και ασθενών με ΣΔτ2 και των επιπέδων έκφρασης των mRNAs- στόχων τους, όπως αυτά προσδιορίστηκαν στις ενότητες 3.2.3 και 3.4.3 (**Πίνακας 3.4**).

Η στατιστική δοκιμασία Spearman ανέδειξε σημαντικές αρνητικές συσχετίσεις μεταξύ των επιπέδων έκφρασης των miRNAs που στοχεύουν το γονίδιο *CDKN2A* με τα επίπεδα έκφρασης του μεταγράφου *CDKN2A* tn3 στην ομάδα των υγιών με προδιάθεση για τη νόσο ($r = -0.6313$, $p = 0.0021$ για το miR-24-3p, $r = -0.6988$, $p = 0.0004$ για το miR-34a-5p, $r = -0.4421$, $p = 0.0448$ για το miR-125b-5p) αλλά και στην ομάδα των ασθενών με ΣΔτ2 ($r = 0.5371$, $p = 0.0004$ για το miR-24-3p, $r = -0.4578$, $p = 0.0030$ για το miR-34a-5p). Τα επίπεδα έκφρασης του miR-34-5p συσχετίστηκαν επιπλέον με τα επίπεδα έκφρασης του μεταγράφου *CDKN2A* tn4 στην ομάδα των υγιών ($r = -0.3636$, $p = 0.0270$) και εμφάνισαν τάση συσχέτισης στην ομάδα των ασθενών με ΣΔτ2 ($r = -0.2802$, $p = 0.0799$).

Από την άλλη πλευρά, η παραπάνω στατιστική δοκιμασία ανέδειξε επιπλέον θετικές

συσχετίσεις μεταξύ των επιπέδων έκφρασης των miRNAs που στοχεύουν το γονίδιο *KCNQ1* με τα επίπεδα έκφρασης του μεταγράφου *KCNQ1* tv1 στους ασθενείς με ΣΔτ2 ($r=0.5902$, $p<0.0001$ για το miR-1-3p, $r=0.4867$, $p=0.0015$ για το miR-34a-5p, $r=0.6124$, $p<0.0001$ για το miR-133a-3p), ενώ παρόμοιες συσχετίσεις παρατηρήθηκαν και στην ομάδα των υγιών δοτών ($r=0.5000$, $p=0.0016$ για το miR-1-3p, $r=0.4047$, $p=0.0130$ για το miR-34a-5p, $r=0.3992$, $p=0.0144$ για το miR-133a-3p). Οι παραπάνω συσχετίσεις φαίνεται ότι οφείλονται σε μεγάλο βαθμό στην ομάδα των υγιών χωρίς προδιάθεση για τη νόσο, αφού ξεχωριστές αναλύσεις στις δύο ομάδες ανέδειξαν ότι η συγκεκριμένη ομάδα παρουσιάζει μια σημαντική τάση συσχέτισης των επιπέδων έκφρασης των miRNAs με εκείνα του *KCNQ1* tv1 ($r=0.4794$, $p=0.0624$ για το miR-1-3p, $r=0.4412$, $p=0.0889$ για το miR-34a-5p, $r=0.4676$, $p=0.0698$ για το miR-133a-3p), συγκριτικά με την ομάδα των υγιών με προδιάθεση για τη νόσο, οι οποίοι δεν παρουσίασαν καμία είδους συσχέτιση. Επιπλέον, τα επίπεδα έκφρασης των παραπάνω miRNAs συσχετίστηκαν θετικά με τα επίπεδα έκφρασης του συνόλου των mRNA του γονιδίου *KCNQ1* στην ομάδα των υγιών δοτών ($r=0.3037$, $p=0.0676$ για το miR-1-3p, $r=0.4116$, $p=0.0114$ για το miR-34a-5p, $r=0.3772$, $p=0.0214$ για το miR-133a-3p) αλλά και στην ομάδα των υγιών χωρίς προδιάθεση για τη νόσο ($r=0.6294$, $p=0.0106$ για το miR-1-3p, $r=0.5000$, $p=0.0508$ για το miR-34a-5p, $r=0.4618$, $p=0.0738$ για το miR-133a-3p). Καμία συσχέτιση δεν παρατηρήθηκε μεταξύ των επιπέδων έκφρασης των miRNAs που στοχεύουν τα γονίδια *IGF2BP2* ή *TSPAN8* με τα αντίστοιχα επίπεδα των mRNAs στόχων τους.

miRNA /mRNA 'στόχος'		CDKN2A																
		CDKN2A (Σύνολο μεταγράφων)					CDKN2A εναλλακτικό μετάγραφο 3					CDKN2A εναλλακτικό μετάγραφο 4						
		Σύνολο	Υγιείς	Υγιείς (-)	Υγιείς (+)	ΣΔτ2	Σύνολο	Υγιείς	Υγιείς (-)	Υγιείς (+)	ΣΔτ2	Σύνολο	Υγιείς	Υγιείς (-)	Υγιείς (+)	ΣΔτ2		
miR-24-3p	p	0.4835	0.3717	0.3158	0.5556	0.1827	<0.0001	0.1573	0.3188	0.0021	0.0004	0.1640	0.9334	0.8412	0.9110	0.2378		
	r	-0.0810	0.1512	0.2666	0.1364	-0.2150	-0.4709	-0.2373	0.2646	-0.6313	-0.5371	-0.1602	0.0142	-0.0530	0.0259	-0.1910		
miR-34a-5p	p	0.0573	0.0953	0.5991	0.9377	0.8039	<0.0001	0.0017	0.8342	0.0004	0.0030	0.0010	0.0270	0.4340	0.9465	0.0799		
	r	-0.2176	-0.2783	-0.1399	0.0181	-0.0405	-0.5665	-0.4982	0.0422	-0.6988	-0.4578	-0.3684	-0.3636	-0.2077	-0.0155	-0.2802		
miR-125b-5p	p	0.9174	0.5842	0.1550	0.7626	0.9076	0.0312	0.2910	0.5163	0.0448	0.3246	0.0808	0.8165	0.7900	0.5051	0.1591		
	r	0.0120	0.0929	0.3726	0.0701	0.0189	-0.2458	-0.1783	0.1737	-0.4421	-0.1598	-0.2002	-0.0394	0.0721	-0.1540	-0.2269		
IGF2BP2																		
		IGF2BP2 (Σύνολο μεταγράφων)					IGF2BP2 εναλλακτικό μετάγραφο 7											
		Σύνολο	Υγιείς	Υγιείς (-)	Υγιείς (+)	ΣΔτ2	Σύνολο	Υγιείς	Υγιείς (-)	Υγιείς (+)	ΣΔτ2							
let-7b-5p	p	0.4503	0.3820	0.7139	0.5219	0.2336	0.9748	0.9972	0.9781	0.8866	0.2336							
	r	0.0937	0.1752	0.2000	0.1481	0.1927	-0.0036	0.0005	0.0088	-0.0331	0.1927							
miR-98-5p	p	0.8053	0.4848	0.7139	0.6868	0.8146	0.4869	0.7692	0.9258	0.7370	0.8146							
	r	0.0306	0.1404	0.2000	0.0935	0.0382	-0.0804	-0.0499	0.0264	-0.0779	0.0382							
KCNQ1																		
		KCNQ1 (Σύνολο μεταγράφων)					KCNQ1 εναλλακτικό μετάγραφο 1											
		Σύνολο	Υγιείς	Υγιείς (-)	Υγιείς (+)	ΣΔτ2	Σύνολο	Υγιείς	Υγιείς (-)	Υγιείς (+)	ΣΔτ2							
miR-1-3p	p	0.0186	0.0676	0.0106	0.3218	0.3651	<0.0001	0.0016	0.0624	0.1134	<0.0001							
	r	0.2678	0.3037	0.6294	0.2273	0.1471	0.5532	0.5000	0.4794	0.3558	0.5902							
miR-34a-5p	p	0.0045	0.0114	0.0508	0.1563	0.4577	<0.0001	0.0130	0.0889	0.4856	0.0015							
	r	0.3202	0.4116	0.5000	0.3208	0.1208	0.4967	0.4047	0.4412	0.1610	0.4867							
miR-133a-3p	p	0.0336	0.0214	0.0738	0.0949	0.7155	<0.0001	0.0144	0.0698	0.3570	<0.0001							
	r	0.2424	0.3772	0.4618	0.3740	0.0594	0.5543	0.3992	0.4676	0.2117	0.6124							
TSPAN8																		
		Σύνολο	CT _{TOTAL}	Υγιείς (-)	Υγιείς (+)	ΣΔτ2												
miR125b-5p	p	0.2250	0.4487	0.5682	0.3121	0.7426												
	r	-0.1399	-0.1284	0.1533	-0.2318	-0.0535												

Πίνακας 3.4 Συσχετίσεις μεταξύ των επιπέδων έκφρασης των miRNAs και των επιπέδων έκφρασης των πειραματικά επιβεβαιωμένων mRNA στόχων τους, όπως αυτά προσδιορίστηκαν στον ίδιο πληθυσμό της μελέτης. Οι τιμές της στατιστικής σημαντικότητας (p value) που αναγράφονται με έντονα μαύρα αναφέρονται σε $p < 0.05$. Υγιείς (-): Υγιείς χωρίς προδιάθεση, Υγιείς (+): Υγιείς με προδιάθεση εμφάνισης της νόσου, ΣΔτ2: ασθενείς με ΣΔτ2 (r): συντελεστής συσχέτισης. Ανατύπωση από τους Kokkinoroulou I. et al., *Endocrine*. 2019;66(2):226-39) (212).







3.5.5 Διερεύνηση συσχετίσεων μεταξύ των επιπέδων έκφρασης των miRNAs με συγκεκριμένα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά της νόσου

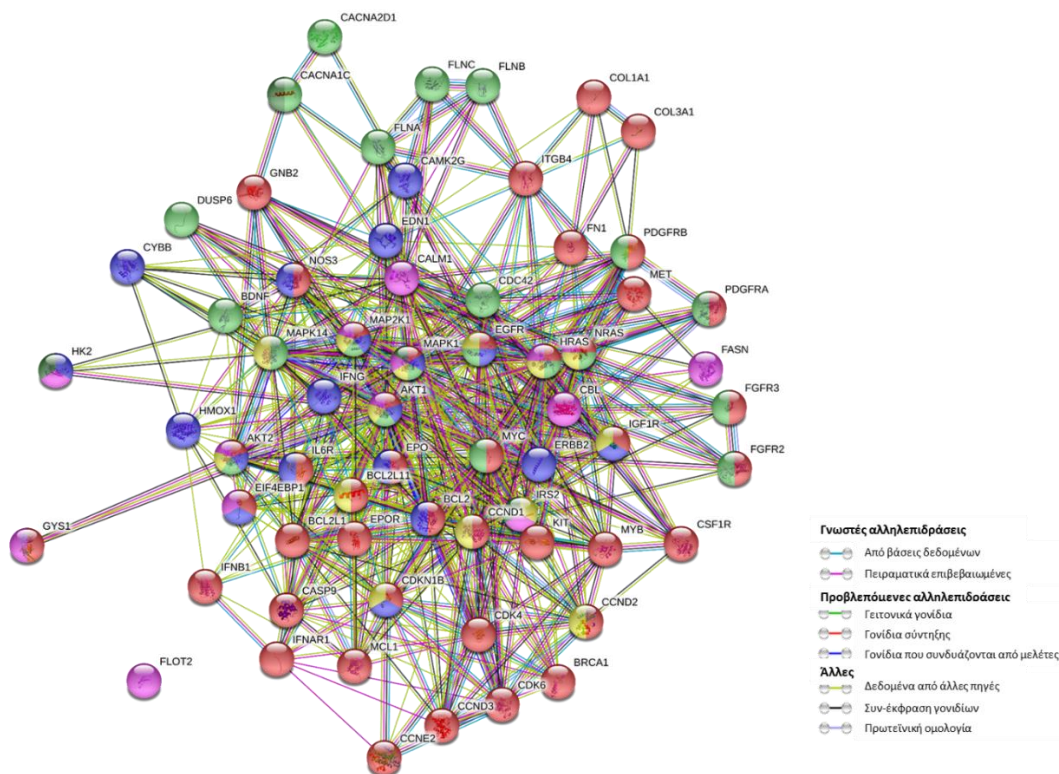
Τα επίπεδα έκφρασης των miRNAs διαφορετικής έκφρασης μεταξύ των ομάδων συσχετίστηκαν με συγκεκριμένα κλινικοπαθολογικά και εργαστηριακά χαρακτηριστικά της νόσου και αξιολογήθηκαν στην κάθε ομάδα ξεχωριστά. Πιο συγκεκριμένα, τα επίπεδα έκφρασης του: α) miR-125b-5p συσχετίστηκαν αρνητικά με τα επίπεδα της ινσουλίνης (μU/ml) ($p=0.0157$) καθώς και με τα % επίπεδα της HbA1c ($p=0.0198$) στον ορό των ασθενών με ΣΔτ2, β) let-7b-5p και γ) miR-98-5p επίσης συσχετίστηκαν αρνητικά με τα επίπεδα της ινσουλίνης στην ομάδα των ασθενών ($p=0.0241$ και $p=0.0441$, αντίστοιχα), δ) miR-1-3p συσχετίστηκαν αρνητικά με τα % επίπεδα της HbA1c ($p=0.0115$) καθώς και με τη παρουσία του οικογενειακού ιστορικού για ΣΔτ2 ($p=0.0077$) στην ομάδα των υγίων, ε) miR-34a-5p συσχετίστηκαν αρνητικά με τα επίπεδα των τριγλυκεριδίων (mg/dl) στην ομάδα των υγίων ($p=0.0390$) αλλά και με τα % επίπεδα της HbA1c στην ομάδα των υγίων με προδιάθεση για τη νόσο ($p=0.0402$) και του στ) miR-24-3p συσχετίστηκαν θετικά με το δείκτη μάζας σώματος (BMI) στους υγιείς με προδιάθεση για τη νόσο ($p=0.0168$).

3.5.6 Βιοπληροφορική ανάλυση για τη δημιουργία δικτύων- αλληλεπιδράσεων μεταξύ των γονιδίων/στόχων των miRNAs

Για τη διερεύνηση της συμμετοχής των miRNAs διαφορετικής έκφρασης μεταξύ των ομάδων στη ρύθμιση των μοριακών μηχανισμών που εμπλέκονται στην ανάπτυξη ΣΔτ2, ακολούθησε αναζήτηση όλων των γονιδίων-στόχων των miRNAs τα οποία παρουσιάζουν διαφορετική έκφραση μεταξύ των δύο ομάδων. Η βιοπληροφορική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του αλγορίθμου miRTargetLink Human (224) και οδήγησε στη δημιουργία μιας λίστας 635 γονιδίων. Η λίστα των γονιδίων/πρωτεϊνών αναλύθηκε, στη συνέχεια, περαιτέρω για τη δημιουργία δικτύων αλληλεπίδρασης χρησιμοποιώντας τις βάσεις δεδομένων STRING-DB και KEGG.

Η παραπάνω ανάλυση ανέδειξε ότι ένας μεγάλος αριθμός πρωτεϊνών εμπλέκονται σε σημαντικό βαθμό σε μονοπάτια που σχετίζονται με την εμφάνιση ΣΔτ2, συμπεριλαμβανομένων των: PI3K-Akt, HIF-1, MAPK, FoxO καθώς και με το σηματοδοτικό μονοπάτι της ινσουλίνης (false discovery rate $<5E-06$) (Εικόνα 3.14).

Σηματοδοτικό Μονοπάτι	Αριθμός γονιδίων	False discovery rate	Πρωτεΐνες που συμμετέχουν στο δίκτυο
 Σηματοδοτικό μονοπάτι PI3K	43	1.23E-19	AKT1,AKT2,BCL2,BCL2L1,BCL2L11,BRCA1,CASP9,CCND1,CCND2,CCND3,CCNE2,CDK4,CDK6,CDKN1B,COL1A1,COL3A1,CSF1R,EGFR,EIF4EBP1,EPO,EPOR,FGFR2,FGFR3,FN1,GNB2,GYS1,HRAS,IFNAR1,IFNB1,IGF1R,IL6R,ITGB4,KIT,MAP2K1,MAPK1,MCL1,MET,MYB,MYC,NOS3,NRAS,PDGFRA,PDGFRB
 Σηματοδοτικό μονοπάτι HIF-1	19	7.78E-12	AKT1,AKT2,BCL2,CAMK2G,CDKN1B,CYBB,EDN1,EGFR,EIF4EBP1,EPO,ERBB2,HK2,HMOX1,IFNG,IGF1R,IL6R,MAP2K1,MAPK1,NOS3
 Σηματοδοτικό μονοπάτι MAPK	21	6.93E-07	AKT1,AKT2,BDNF,CACNA1C,CACNA2D1,CDC42,DUSP6,EGFR,FGFR2,FGFR3,FLNA,FLNB,FLNC,HRAS,MAP2K1,MAPK1,MAPK14,MYC,NRAS,PDGFRA,PDGFRB
 Σηματοδοτικό μονοπάτι FoxO	14	1.68E-06	AKT1,AKT2,BCL2L11,CCND1,CCND2,CDKN1B,EGFR,HRAS,IGF1R,IRS2,MAP2K1,MAPK1,MAPK14,NRAS
 Σηματοδοτικό μονοπάτι ινσουλίνης	14	4.83E-06	AKT1,AKT2,CALM1,CBL,EIF4EBP1,FASN,FLOT2,GYS1,HK2,HRAS,IRS2,MAP2K1,MAPK1,NRAS
 Σακχαρώδης Διαβήτης τύπου 2	4	0.0391	CACNA1C,HK2,IRS2,MAPK1



Εικόνα 3.14: Δίκτυο αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών που κωδικοποιούνται από τα γονίδια-στόχους των miRNAs διαφορετικής έκφρασης, όπως αυτά προσδιορίστηκαν στην παρούσα μελέτη, εστιάζοντας στους μοριακούς μηχανισμούς που εμπλέκονται στην παθογένεια του ΣΔτ2. Διαφορετικά γονίδια/πρωτεΐνες εμπλέκονται σε διαφορετικά (ένα ή περισσότερα) μονοπάτια που σχετίζονται με το ΣΔτ2, όπως αυτό φαίνεται από τις διαφορετικές χρωματιστές σφαίρες. Οι γραμμές απεικονίζουν αλληλεπιδράσεις πρωτεϊνών-πρωτεϊνών (επιβεβαιωμένες, προβλεπόμενες και άλλες). Ο συνοδευτικός πίνακας αναφέρει τον αριθμό και τα ονόματα των γονιδίων-στόχων που εμπλέκονται σε κάθε σηματοδοτικό μονοπάτι καθώς και το false discovery rate για κάθε περίπτωση. Ανατύπωση από τους Kokkinoroulou I. et al., *Endocrine*. 2019;66(2):226-39) (212).

3.6 Μελέτη του προφίλ μεθυλίωσης των υποκινητών των γονιδίων που σχετίζονται με τον αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης ΣΔτ2

Για τη διερεύνηση του προφίλ μεθυλίωσης των υποκινητών των γονιδίων διαφορετικής έκφρασης μεταξύ υγιών και ασθενών της παρούσας μελέτης, επικεντρωθήκαμε στα γονίδια *CDK5*, *CDKN2A* και *TSPAN8* τα οποία, σε ότι αφορά το σύνολο των μεταγράφων τους, παρουσίασαν αυξημένα επίπεδα έκφρασης στους ασθενείς σε σύγκριση με τους υγιείς δότες. Για το σκοπό αυτό, αρχικά, πραγματοποιήθηκε βιβλιογραφική αναζήτηση στις βάσεις δεδομένων NCBI, Ensembl και Eukaryotic Promoter Database για την εύρεση της αλληλουχίας των υποκινητών των παραπάνω γονιδίων και ακολούθως ανάλυση αυτής στη βάση MethPrimer για εντοπισμό πιθανών CpG νησίδων στην περιοχή αυτή. Με βάση τα παραπάνω δεδομένα και τα χαρακτηριστικά της κάθε αλληλουχίας, επιλέχθηκαν να μελετηθούν 8 CpG θέσεις (θέσεις -274 έως -243 ως προς τη θέση έναρξης της μεταγραφής (TSS)) για το *CDK5* και 6 CpG θέσεις (θέσεις -210 έως -158, ως προς το TSS), για το *CDKN2A* ενώ αντίστοιχες περιοχές δεν εντοπίστηκαν στην περίπτωση του *TSPAN8* (Εικόνα 3.15).

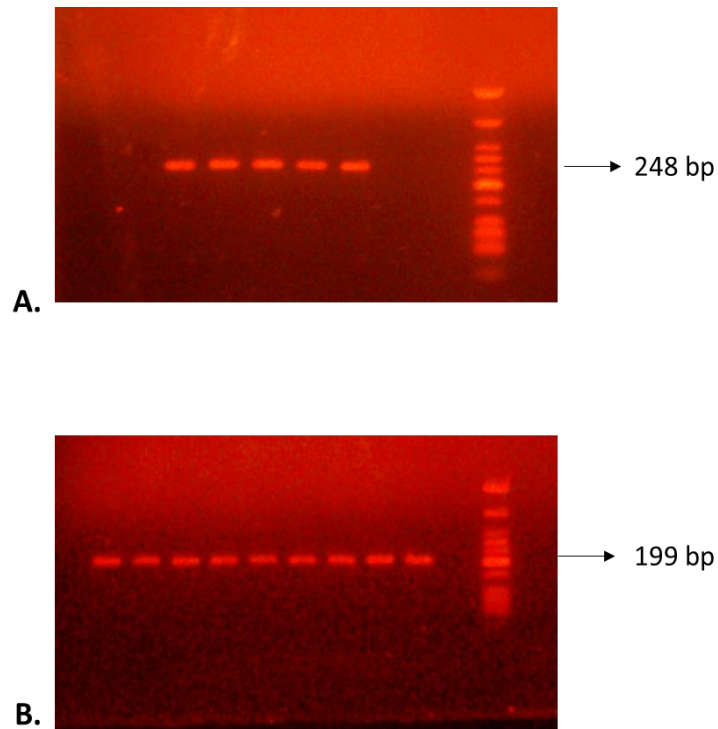
3.6.1 Απομόνωση DNA από τα δείγματα του περιφερικού αίματος και επεξεργασία με όξινο θειώδες νάτριο-Bisulfite Conversion

Η μελέτη των επιπέδων μεθυλίωσης των υποκινητών των γονιδίων απαιτεί αρχικά την απομόνωση DNA από τα δείγματα του περιφερικού αίματος, όπως περιγράφηκε στην ενότητα 2.2.2 και ακολούθως, την επεξεργασία των DNA δειγμάτων με όξινο θειώδες νάτριο για την μετατροπή των μη μεθυλιωμένων κυτοσινών σε ουρακίλες (Bisulfite conversion), όπως αυτή περιγράφηκε στην ενότητα 2.6.3. Τα δείγματα που προκύπτουν μετά την επεξεργασία, υπόκεινται σε διαδοχικές πλύσεις για την απομάκρυνση των αλάτων, σύμφωνα με το πρωτόκολλο, και αποτελούν το υπόστρωμα για την αντίδραση της συμβατικής PCR που ακολουθεί (Εικόνα 3.15).

3.6.2 Ανάπτυξη μεθοδολογίας συμβατικής PCR

Για την εκλεκτική ενίσχυση και επακόλουθη μελέτη των περιοχών των υποκινητών των γονιδίων, που περιλαμβάνουν τις επιλεγόμενες θέσεις μεθυλίωσης, σχεδιάστηκαν ειδικοί εκκινητές με βάση την αλληλουχία που προκύπτει μετά την επεξεργασία των DNA δειγμάτων με το όξινο θειώδες άλας. Ακολούθως, σχεδιάστηκε, βελτιστοποιήθηκε και εφαρμόστηκε πρωτόκολλο συμβατικής PCR, όπως περιγράφεται στην ενότητα 2.6.4 χρησιμοποιώντας ως εκμαγεία DNA δείγματα περιφερικού αίματος μετά την επεξεργασία με το άλας, πρότυπα δείγματα γενωμικού DNA πλήρως μεθυλιωμένα και πλήρως αμεθυλίωτα (θετικά δείγματα ελέγχου) καθώς και DNA δείγματα που δεν έχουν υποστεί την επεξεργασία με το όξινο θειώδες άλας (αρνητικά δείγματα). Τα προϊόντα της συμβατικής PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 1% w/v, από όπου μπορεί να ελεγχθεί η ειδικότητα των εκκινητών, δεδομένου της ανίχνευσης μιας μοναδικής ζώνης στο αναμενόμενο μέγεθος για όλα τα DNA δείγματα περιφερικού αίματος που ελέγχθηκαν (μεγέθους 199 bp για το γονίδιο *CDK5* και 248 bp για το γονίδιο *CDKN2A*) ενώ, όπως ήταν αναμενόμενο, δεν παρατηρείται ζώνη στην περίπτωση του DNA δείγματος που δεν έχει υποστεί την επεξεργασία με το άλας. όπως και στην αντίδραση αρνητικού ελέγχου (αντίδραση PCR απουσία DNA) (Εικόνα 3.16).

Για τον προσδιορισμό της επιθυμητής ποσότητας του DNA-εκμαγείου που προστίθεται στην αντίδραση, προηγήθηκαν πειράματα ελέγχου συμβατικής PCR με διαφορετικές ποσότητες DNA δειγμάτων, εύρους 15-20 ng. Ακολούθως, τα πρωτόκολλα της συμβατικής PCR που αναπτύχθηκαν, εφαρμόστηκαν σε όλα τα υπό μελέτη δείγματα του περιφερικού αίματος και για τα δύο γονίδια διαφορεικής έκφρασης.

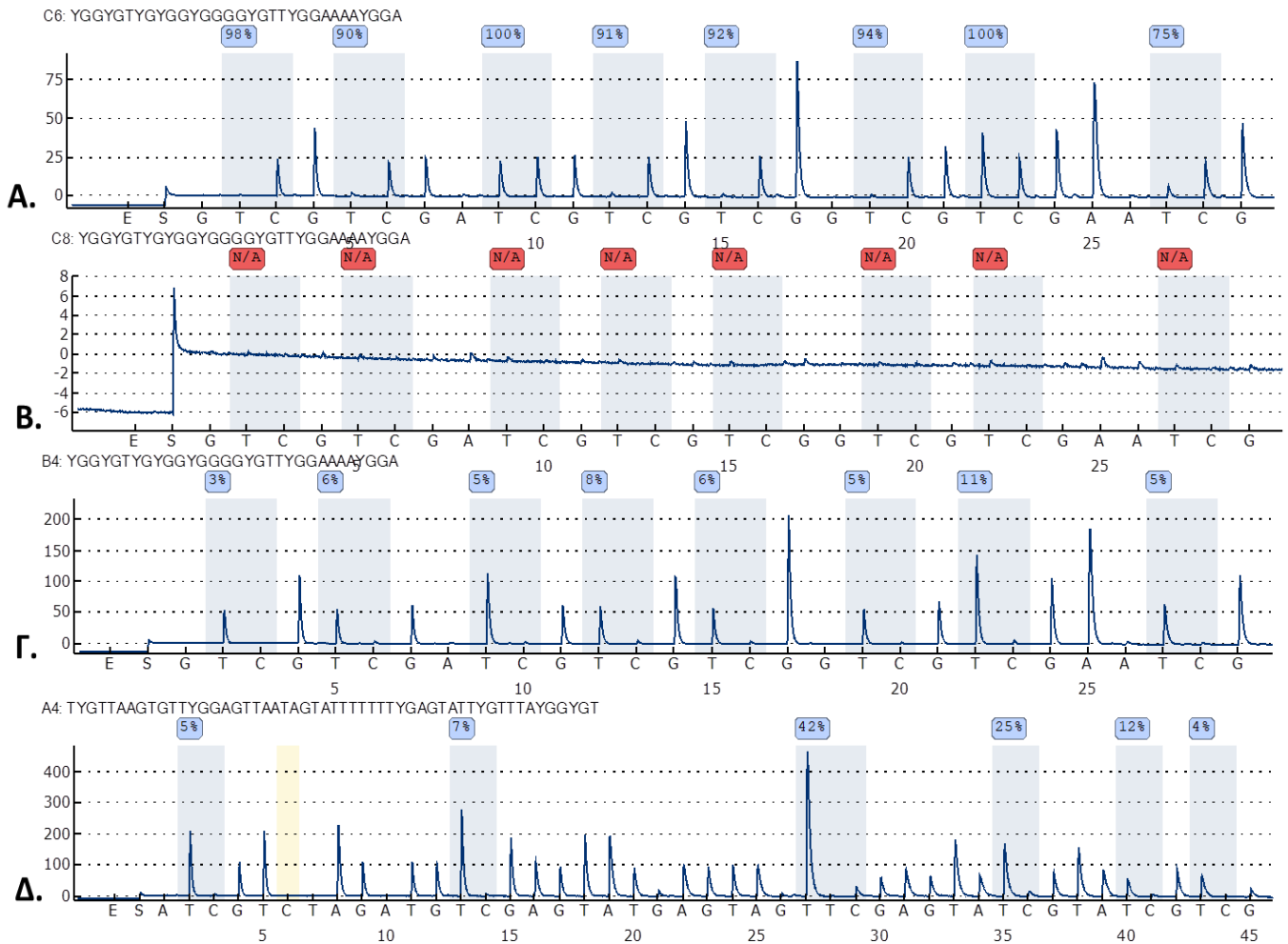


Εικόνα 3.16: Ηλεκτροφορητικός προσδιορισμός προϊόντων PCR που προκύπτουν από την ενίσχυση των υπό μελέτη περιοχών των υποκινητών των γονιδίων A. *CDK5* και B. *CDKN2A* από αντιπροσωπευτικά DNA δείγματα περιφερικού αίματος σε πήκτωμα αγαρόζης 1% w/v. Οι τελευταίες 3 διαδρομές για την περίπτωση του γονιδίου *CDK5* (A) και η τελευταία διαδρομή για την περίπτωση του γονιδίου *CDKN2A* (B) περιλαμβάνουν δείγματα αρνητικού ελέγχου. Και στις δύο περιπτώσεις επιβεβαιώνεται η παρουσία ενός μοναδικού προϊόντος στο επιθυμητό μέγεθος (248 bp και 199 bp για τα γονίδια *CDK5* και *CDKN2A*, αντίστοιχα).

3.6.3 Ανάπτυξη μεθοδολογίας πυροαλληλούχησης

Για τον προσδιορισμό των επιπέδων μεθυλίωσης στις επιλεγόμενες θέσεις των υποκινητών των γονιδίων *CDK5* και *CDKN2A*, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της πυροαλληλούχησης, η οποία πραγματοποιήθηκε στον αλληλουχητή PyroMark Q24® της Qiagen. Για την αντίδραση αυτή, χρησιμοποιούνται ως εκμαγεία τα προϊόντα της PCR ενώ ταυτόχρονα απαιτείται και ένας εκκινητής αλληλούχησης που υβριδοποιείται ακριβώς πριν από την περιοχή αλληλούχησης και είναι απαραίτητος για την έναρξη της ενσωμάτωσης των νουκλεοτιδίων από την DNA πολυμεράση. Το πρωτόκολλο της αντίδρασης της πυροαλληλούχησης περιγράφεται στην ενότητα 2.6.5. Κάθε πείραμα πυροαλληλούχησης περιλαμβάνει εκτός από τα υπό μελέτη DNA δείγματα του περιφερικού αίματος, και πρότυπα δείγματα γενωμικού DNA πλήρως μεθυλιωμένα και αμεθυλιωτά, DNA που δεν έχει υποστεί την επεξεργασία με το όξινο θειώδες άλας και αρνητικά δείγματα ελέγχου (αντιδράσεις απουσία DNA). Για τη βελτιστοποίηση των συνθηκών προηγήθηκαν πειράματα ελέγχου με διαφορετικές

ποσότητες DNA εύρους 10-20 μl των προϊόντων της PCR με σκοπό την εύρεση της κατάλληλης ποσότητας που επιτρέπει την- υψηλής αξιοπιστίας- αλληλούχηση των δειγμάτων.



Εικόνα 3.17: Αντιπροσωπευτικά διαγράμματα πυροαλληλούχησης και εκτίμησης του ποσοστού μεθυλίωσης των υπό μελέτη CpG θέσεων για Α. Πλήρως μεθυλιωμένο γενωμικό DNA (θετικός μάρτυρας) που έχει αλληλουχηθεί για το γονίδιο *CDK5* Β. Αρνητικό δείγμα ελέγχου (απουσία DNA) που έχει αλληλουχηθεί για το γονίδιο *CDK5* Γ. DNA δείγμα περιφερικού αίματος που έχει αλληλουχηθεί για το γονίδιο *CDK5* και Δ. DNA δείγμα περιφερικού αίματος που έχει αλληλουχηθεί για το γονίδιο *CDKN2A*. Τα μπλέ σκιαγραφημένα κουτιά αντιπροσωπεύουν τις υπό μελέτη CpG θέσεις ενώ πάνω από αυτά υπολογίζεται και καταγράφεται το ποσοστό μεθυλίωσης, το οποίο και προκύπτει από την αναλογία T/C που έχει μετρηθεί για κάθε θέση. N/A:No applicable-Μη εφαρμόσιμο

Τα αποτελέσματα της αντίδρασης απεικονίζονται με χαρακτηριστικές κορυφές και το ποσοστό μεθυλίωσης υπολογίζεται από την αναλογία θυμίνη/κυτοσίνη που προκύπτει για την κάθε υπό μελέτη πιθανή θέση μεθυλίωσης. Ενδεικτικά, παρουσιάζονται διαγράμματα κορυφών που αφορούν την αλληλούχηση προτύπων διαλυμάτων, DNA υπό μελέτη δειγμάτων περιφερικού αίματος και αρνητικών δειγμάτων και για τα δύο υπό μελέτη γονίδια (**Εικόνα 3.17**).

3.6.4 Διαφορικά επίπεδα μεθυλίωσης των γονιδίων *CDK5* και *CDKN2A* στο περιφερικό αίμα των ασθενών με ΣΔτ2 και των υγιών δοτών

Στον **Πίνακα 3.5** καταγράφεται ο μέσος όρος των ποσοστών μεθυλίωσης (%) καθώς και το ποσοστό μεθυλίωσης ξεχωριστά για κάθε θέση που μελετήθηκε στην περιοχή του υποκινητή των γονιδίων *CDK5* και *CDKN2A* στην ομάδα των ασθενών με ΣΔτ2 και των υγιών δοτών.

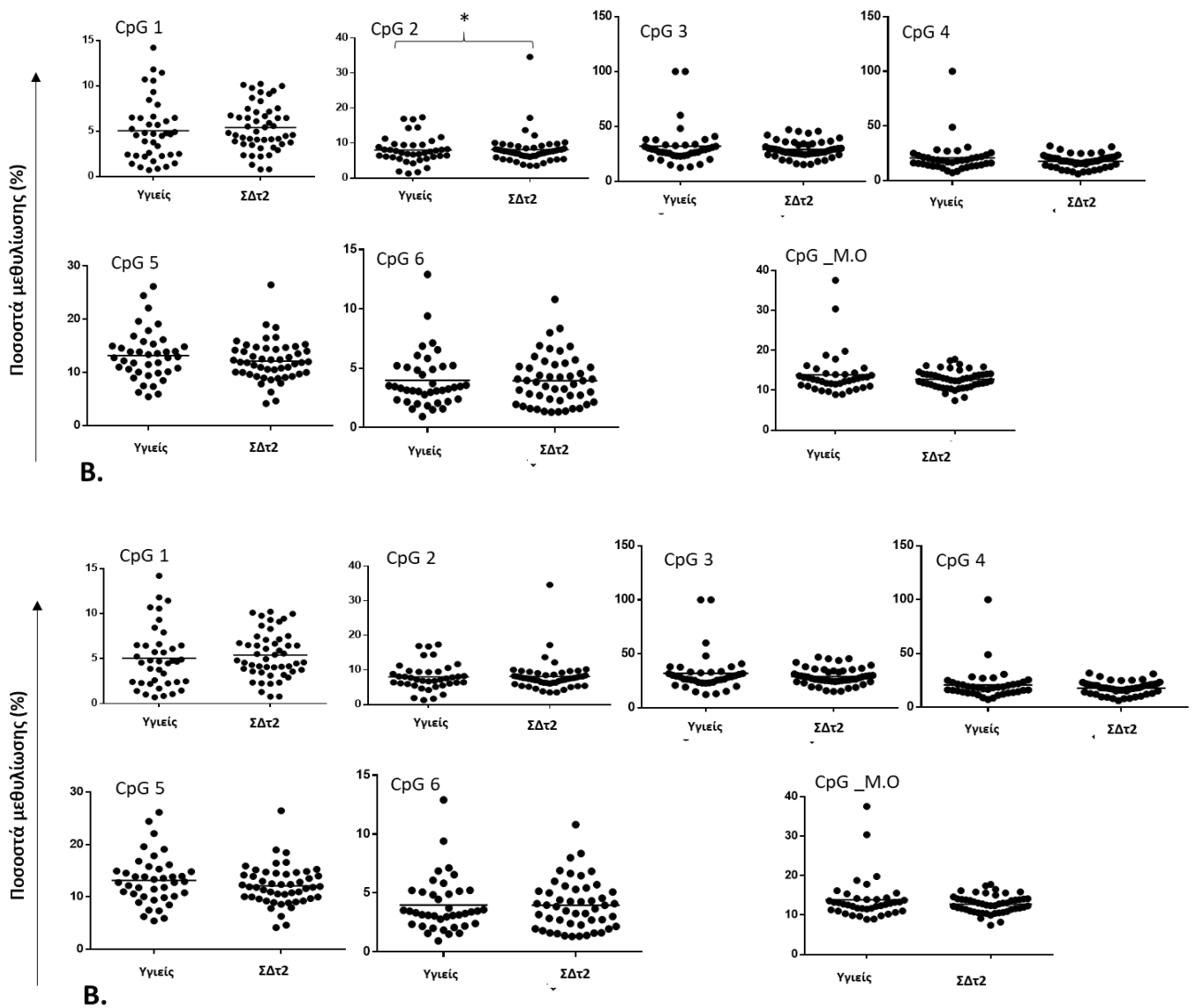
Η στατιστική επεξεργασία (Mann Whitney *U*) των αποτελεσμάτων ανέδειξε ότι οι ασθενείς με ΣΔτ2 χαρακτηρίζονται από υψηλότερα ποσοστά μεθυλίωσης των υπό μελέτη CpG θέσεων του υποκινητή του γονιδίου *CDK5*, συγκριτικά με τους υγιείς δότες (**Εικόνα 3.18 A**). Το παραπάνω συμπέρασμα αποδεικνύεται από την τάση αύξησης ($p=0.08$) που παρατηρείται στο μέσο όρο των επιπέδων μεθυλίωσης των υπό μελέτη θέσεων στους ασθενείς με ΣΔτ2 για το γονίδιο αυτό. Τα σημαντικότερα ποσοστά αύξησης ($p=0.03$) των επιπέδων μεθυλίωσης παρατηρήθηκαν στη CpG θέση 2 (θέση – 271 ως προς το TSS του γονιδίου) του υποκινητή του γονιδίου *CDK5* στους ασθενείς με ΣΔτ2.

Για την περίπτωση των υπό μελέτη CpG θέσεων του υποκινητή του γονιδίου *CDKN2A* δεν παρατηρήθηκαν αξιοσημείωτες μεταβολές στα ποσοστά μεθυλίωσης μεταξύ των ασθενών με ΣΔτ2 και των υγιών δοτών (**Εικόνα 3.18 B**).

Πίνακας 3.5: Ποσοστά μεθυλίωσης (%) για κάθε θέση CpG θέση που μελετήθηκε στην περιοχή των υποκινητών των γονιδίων *CDK5* και *CDKN2A*.

	Ποσοστά Μεθυλίωσης (%), Διάμεσος (εύρος τιμών)		Στατιστική σημαντικότητα
	Υγιείς (n=37)	ΣΔτ2 (n=40)	(p value) Υγιείς vs ΣΔτ2
<i>CDK5/ CpG θέσεις (ως προς TSS)</i>			
CpG 1 (-274)	3.03 (0.85-11.76)	3.97 (0.55-23.99)	0.938
CpG 2 (-271)	2.8 (0-17.91)	4.48 (0.95-26.27)	0.038
CpG 3 (-268)	5.15 (1.58-20.65)	6.79 (1.38-22.66)	0.206
CpG 4 (-266)	2.98 (0-10.47)	3.87 (0.74-20.64)	0.186
CpG 5 (-263)	2.88 (0.5-12.74)	3.13 (0.75-17.98)	0.958
CpG 6 (-258)	2.97 (0.74-11.1)	3.05 (0.64-9.81)	0.951
CpG 7 (-254)	7.73 (1.33-21.27)	8.7 (1.72-66.07)	0.499
CpG 8 (-247)	2.58 (0.75-9.59)	3.27 (0.88-9.58)	0.617
M.O	4.36 (1.98-10.02)	5.06 (1.35-21.22)	0.083
<i>CDKN2A/ CpG θέσεις (ως προς TSS)</i>			
CpG 1 (-209)	4.68 (0.71-14.21)	4.88 (0.78-10.22)	0.363
CpG 2 (-198)	7.38 (1.3-17.35)	7.46 (3.5-34.59)	0.937
CpG 3 (-177)	28.63 (12.41-100)	27.6 (15.31-47.04)	0.934
CpG 4 (-169)	18.27 (7.37-100)	17.69 (6.18-31.85)	0.606
CpG 5 (-163)	12.845 (5.44-26.17)	11.9 (4.16-26.45)	0.314
CpG 6 (-160)	3.355 (0.93-12.91)	3.84 (1.31-10.8)	0.910
M.O	12.72 (8.90-37.55)	12.6 (7.4-17.77)	0.905

Στον πίνακα παρουσιάζεται η τιμή της διαμέσου (έντονες μαύρες τιμές) καθώς και το εύρος των ποσοστών μεθυλίωσης (ελάχιστη-μέγιστη τιμή). Οι τιμές της στατιστικής σημαντικότητας (p value) που αναγράφονται με έντονα μαύρα αναφέρονται σε $p < 0.05$. M.O: μέσος όρος ποσοστού μεθυλίωσης



Εικόνα 3.18: Τα διαγράμματα απεικονίζουν τα ποσοστά μεθυλίωσης (%) των υπό μελέτη CpG θέσεων των υποκινητών των γονιδίων A. *CDK5* και B. *CDKN2A* μεταξύ των ασθενών με ΣΔτ2 και των υγιών dotών, όπως αυτά προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο της πυροαλληλούχησης σε DNA δείγματα περιφερικού αίματος. Οι τιμές της στατιστικής σημαντικότητας (p-value) απεικονίζονται με αστερίσκο (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$), ενώ οι οριζόντιες γραμμές αντιπροσωπεύουν την τιμή της διαμέσου των ποσοστών για κάθε ομάδα. M.O: μέσος όρος ποσοστού μεθυλίωσης

4. Συζήτηση

Ο ΣΔτ2 αποτελεί μια χρόνια μεταβολική πολυπαραγοντική διαταραχή με αυξημένη καρδιαγγειακή νοσηρότητα και θνησιμότητα και θεωρείται σήμερα μια παγκόσμια επιδημία με υψηλό επιπολασμό (18). Η επιδημία της νόσου οφείλεται κυρίως στην αύξηση της παχυσαρκίας, η οποία αποδίδεται στην υιοθέτηση του σημερινού τρόπου «καθιστικής» ζωής (19), ενώ ο κίνδυνος εμφάνισης της νόσου είναι γνωστό σήμερα ότι εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από γενετικούς παράγοντες. Κατά την τελευταία δεκαετία, πάνω από 60 μελέτες σάρωσης ολόκληρου του γονιδιώματος (GWAS) οδήγησαν στην ταυτοποίηση αρκετών γονιδίων που μπορούν να εμπλέκονται στην παθογένεια του ΣΔτ2, διαμέσου της συσχέτισης συγκεκριμένων νουκλεοτιδικών πολυμορφισμών (SNPs) με τον αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης ΣΔτ2 ή/και συγκεκριμένων γλυκαιμικών χαρακτηριστικών της νόσου (87). Παρόλα αυτά, κάθε ένας από αυτούς φαίνεται ότι συνεισφέρει σε πολύ μικρό ποσοστό στον κίνδυνο εμφάνισης της νόσου (25–40% αύξηση στην ομόζυγη κατάσταση για τα γονίδια «κινδύνου») (121, 122) ενώ η παραπάνω γενετική πληροφορία, μέχρι και σήμερα τουλάχιστον, δεν είναι πληροφοριακή για την πιθανότητα εμφάνισης ΣΔτ2. Δεδομένου ακόμη ότι η πλειονότητα των παραπάνω SNPs εδράζονται σε μη κωδικοποιούσες περιοχές του γονιδιώματος καθιστά δύσκολη τη διερεύνηση των παθογενετικών μηχανισμών που απαιτούνται για την ανάπτυξη της νόσου καθώς και την ταυτοποίηση των «ένοχων» για τη νόσο γονιδίων. Σήμερα είναι γνωστό ότι, τα παραπάνω γενετικά αλληλόμορφα θα μπορούσαν να συνεισφέρουν στον κίνδυνο εμφάνισης ΣΔτ2, μεταξύ άλλων, διαμέσου των eQTLs (137), που αποτελούν συγκεκριμένους ρυθμιστικούς γενετικούς τόπους που επηρεάζουν την έκφραση των γονιδίων, αλλά και διαμέσου άλλων ρυθμιστικών μηχανισμών, όπως τα miRNAs και τη μεθυλίωση του DNA, που έχουν εξίσου σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης (20, 163, 171, 173).

Η εμπλοκή του γονιδιώματος στην ανάπτυξη ανθρώπινων διαταραχών διερευνάται κυρίως σήμερα διαμέσου της μελέτης του μεταγραφώματος, δεδομένου ότι αυτό αντανακλά τη λειτουργικότητα των γονιδίων (186) αλλά και του επιγενώματος που ρυθμίζει την έκφραση του πρώτου (187). Οι τεχνολογίες αλληλούχησης νέας γενιάς έχουν διευκολύνει σε μεγάλο βαθμό σήμερα τη μελέτη του προφίλ του μεταγραφώματος και του επιγενώματος, παρέχοντας τη δυνατότητα ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης των επιπέδων έκφρασης συγκεκριμένων γονιδίων αλλά και μελέτης του προφίλ μεθυλίωσης μεγάλων περιοχών του γονιδιώματος (189-191). Πρόσφατες μελέτες που επικεντρώνονται στην ανάλυση του μεταγραφώματος αλλά και του επιγενώματος έχουν αναδείξει βασικά δεδομένα για (i) το σύνδεσμο μεταξύ του γονοτύπου και του φαινοτύπου, (ii) τα μοριακά δίκτυα που εμπλέκονται σε πολλές παθοφυσιολογικές

διεργασίες καθώς και (iii) τα μοριακά αποτυπώματα που βοηθούν στην ανάδειξη και ταυτοποίηση νέων πιθανών θεραπευτικών στόχων ή/και βιοδεικτών (189, 190).

Η μελέτη του γονιδιακού προφίλ έκφρασης των ασθενών με ΣΔτ2, συμπεριλαμβανομένων και των γονιδίων που έχουν μέχρι σήμερα ενοχοποιηθεί για την εμφάνιση της νόσου, ήταν δύσκολο μέχρι σήμερα να πραγματοποιηθεί. Όλες οι μέχρι τώρα έρευνες έχουν επικεντρωθεί στη μελέτη των γονιδίων αυτών στις παγκρεατικές νησίδες ή/και σε β κυτταρικές σειρές από ζωικά μοντέλα ή θανάοντες δότες (193), κυρίως λόγω της αδυναμίας πρόσβασης και λήψης βιοπτικών δειγμάτων από τους ιστούς-στόχους της νόσου των ζώντων δοτών. Παρόλα αυτά, πρόσφατα δεδομένα υποστηρίζουν ότι η μελέτη του προφίλ της γονιδιακής έκφρασης στα κύτταρα του περιφερικού αίματος αντανακλά σημαντικά (>80%) το προφίλ της γονιδιακής έκφρασης άλλων ιστών, συμπεριλαμβανομένων των προσβεβλημένων από τη νόσο- ιστών. Με τον τρόπο αυτό, οι αλλαγές στο προφίλ της γονιδιακής έκφρασης που παρατηρούνται στο αίμα μπορούν να αντανακλούν τις αντίστοιχες αλλαγές στο μικρο ή μακρο-περιβάλλον των ιστών-στόχων της νόσου (194). Έτσι, το περιφερικό αίμα θεωρείται σήμερα ένα αξιόπιστο υλικό για τη μελέτη της δυναμικής του μεταγραφώματος διαφόρων νοσημάτων, δεδομένου και της ευκολίας συλλογής του, ενώ μπορεί να παρέχει δεδομένα για διάφορες παθοφυσιολογικές διεργασίες που λαμβάνουν χώρα στους ιστούς του ανθρώπινου σώματος (195).

Δεδομένου ότι σήμερα για τη διελεύκανση της συμβολής του μεταγραφώματος και του επιγενώματος στην εμφάνιση νοσημάτων είναι απαραίτητη η σύνδεση του γονοτύπου με το φαινότυπο, στόχος της παρούσας διατριβής τέθηκε η μελέτη του μοριακού προφίλ των ασθενών με ΣΔτ2 διαμέσου της ανάλυσης συγκεκριμένων γενετικών και επιγενετικών δεικτών. Αρχικά, επιλέχθηκε να διερευνηθεί το προφίλ έκφρασης ενός πάνελ γονιδίων/επιμέρους μεταγράφων που είναι ήδη γνωστό από μελέτες GWAS ότι σχετίζονται με τον αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης ΣΔτ2, λόγω γνωστών SNPs που αυτά φέρουν, στο περιφερικό αίμα ασθενών με ΣΔτ2 και υγιών δοτών, αναπτύσσοντας υψηλής ευαισθησίας μοριακές μεθοδολογίες (RNA-Seq και qPCR). Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων ανέδειξε ένα -ειδικό για το ΣΔτ2- πρότυπο διαφορικής έκφρασης για εννιά επιμέρους μετάγραφα των παρακάτω γονιδίων: *CAPN10*, *CDK5*, *CDKN2A*, *IGF2BP2*, *KCNQ1*, *THADA* και *TSPAN8*. Πιο συγκεκριμένα, συγκρινόμενοι με τους υγιείς δότες, οι ασθενείς με ΣΔτ2 εμφάνισαν μειωμένα επίπεδα έκφρασης των *tv3* του *CAPN10* και *tv1* του *KCNQ1* και αντίστοιχα, αυξημένα επίπεδα έκφρασης των *CDK5 tv1* και *tv2*, *CDKN2A tv3* και *tv4*, *IGF2BP2 tv7*, *THADA tv5* και *TSPAN8* (201). Σύμφωνα με τις διαθέσιμες βάσεις δεδομένων, πολλοί ανθρώπινοι ιστοί, συμπεριλαμβανομένου του περιφερικού αίματος και των ιστών-στόχων του ΣΔτ2 (ήπαρ, λιπώδης ιστός, πάγκρεας, μυϊκός

ιστός), εκφράζουν τα προαναφερόμενα γονίδια/μετάγραφα, γεγονός το οποίο ενισχύει την υπόθεση ότι το ειδικό- για το ΣΔτ2- πρότυπο διαφορικής έκφρασης που παρατηρήθηκε στην παρούσα μελέτη, πιθανόν αντανακλά τους παθογενετικούς μηχανισμούς που λαμβάνουν χώρα στα προσβεβλημένα όργανα της νόσου ή/και στο περιφερικό αίμα (135, 194, 195).

Μεταξύ των μεταγράφων που βρέθηκαν να παρουσιάζουν σημαντικά μειωμένα επίπεδα έκφρασης στους ασθενείς με ΣΔτ2, συγκριτικά με τους υγιείς, ήταν το εναλλακτικό μετάγραφο 3 του γονιδίου *CAPN10*. Το γονίδιο *CAPN10* κωδικοποιεί μια πρωτεάση κυστεΐνης, η οποία εμπλέκεται στην- επαγόμενη από την ινσουλίνη- μετατόπιση του μεταφορέα της γλυκόζης τύπου 4 (GLUT4) στην πλασματική μεμβράνη των κυττάρων των περιφερικών ιστών για την πρόσληψη γλυκόζης, στους μηχανισμούς έκκρισης της ινσουλίνης καθώς και στα αποπτωτικά σηματοδοτικά μονοπάτια των παγκρεατικών β κυττάρων (229). Συγκριτικά με το κλασικού τύπου μετάγραφο 1 του γονιδίου, το μετάγραφο 3 στερείται δύο διαδοχικών εξωνίων, με συνέπεια την έλλειψη ενός τμήματος στην 3' κωδική περιοχή του γονιδίου και συνεπώς την κωδικοποίηση μιας πρωτεϊνικής ισομορφής που διαθέτει λιγότερα αμινοξέα από την κλασική ισομορφή (**Εικόνα 3.9**). Σύμφωνα με τις διαθέσιμες βάσεις δεδομένων, το γονίδιο *CAPN10* εμφανίζει τους παρακάτω -εμπλεκόμενους με τον αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης ΣΔτ2- SNPs: rs3792267 και rs5030952 (87, 220), χωρίς όμως κανένας από αυτούς να εδράζεται στην κωδική περιοχή του γονιδίου. Συνεπώς, τα μειωμένα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *CAPN10* που παρατηρούνται στην ομάδα των ασθενών, θα μπορούσαν πιθανόν να αποδοθούν σε επιγενετικούς ή/και άλλους μεταγραφικούς ρυθμιστικούς μηχανισμούς (171, 173). Αξίζει να σημειωθεί εδώ, ότι το *CAPN10* tn3, σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, ανέδειξε την υψηλότερη συσχέτιση με τη νόσο και αποτέλεσε το σημαντικότερο γονίδιο διαφορικής έκφρασης, συγκριτικά με τα υπόλοιπα υπό μελέτη γονίδια. Ωστόσο, αποτέλεσε ακόμη και το μόνο μετάγραφο που δεν ανέδειξε καμία συσχέτιση με κάποιο από τα υπό μελέτη κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά της νόσου, ενισχύοντας την υπόθεση της εμπλοκής περίπλοκων παθοφυσιολογικών μηχανισμών στην παθογένεια του ΣΔτ2.

Τα επίπεδα έκφρασης του κλασικού μεταγράφου 1 (tv1) του γονιδίου *KCNQ1* (**Εικόνα 3.9**) βρέθηκαν επίσης να είναι μειωμένα στην ομάδα των ασθενών με ΣΔτ2 συγκριτικά με τους υγιείς, ενώ παρατηρήθηκαν να είναι και σημαντικά μειωμένα στην ομάδα των υγιών με προδιαθεσικούς παράγοντες για την εμφάνιση της νόσου, συγκριτικά με τους υγιείς χωρίς προδιάθεση. Είναι γνωστό ότι το γονίδιο *KCNQ1* κωδικοποιεί μια υπομονάδα του τασεοεξαρτώμενου καναλιού K^+ (*KvLQT1*), το οποίο είναι απαραίτητο για την επαναπόλωση του καρδιακού μυ (230). Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι εκφράζεται στα β παγκρεατικά κύτταρα με σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της έκκρισης της ινσουλίνης (231) ενώ συγκεκριμένα γενετικά

αλληλόμορφα του γονιδίου έχουν συσχετιστεί με διαταραχές στον μηχανισμό έκκρισης της ινσουλίνης (232, 233). Δεδομένου των παραπάνω, τα μειωμένα επίπεδα έκφρασης του *KCNQ1* tn1 στην ομάδα των υγιών με προδιάθεση για τη νόσο και στους ασθενείς με ΣΔτ2, που παρατηρήθηκαν στα πλαίσια της παρούσας μελέτης, καθώς και η αρνητική συσχέτιση αυτών με τα επίπεδα της ινσουλίνης ορού, πιθανόν υποδηλώνουν τον ρυθμιστικό ρόλο του γονιδίου *KCNQ1* στους μηχανισμούς έκκρισης της ινσουλίνης στους ασθενείς με ΣΔτ2 και στους υγιείς με προδιαθεσικούς παράγοντες για τη νόσο.

Μεταξύ των γονιδίων/μεταγράφων που παρουσίασαν αυξημένα επίπεδα έκφρασης στην ομάδα των ασθενών με ΣΔτ2, συγκαταλέγονται τα δύο μετάγραφα του γονιδίου *CDK5* (**Εικόνα 3.9**). Το γονίδιο *CDK5* κωδικοποιεί μια πρωτεϊνική κινάση σερίνης/θρεονίνης, η οποία εμπλέκεται στον εκφυλισμό των παγκρεατικών β κυττάρων καθώς και στην αναστολή της έκκρισης της ινσουλίνης, διαμέσου της δημιουργίας του συμπλόκου p35/CDK5 (234). Μελέτες έχουν δείξει ότι η αναστολή της έκφρασης του γονιδίου δρα προστατευτικά στα β παγκρεατικά κύτταρα, παρουσία συνθηκών γλυκοτοξικότητας (100). Η αυξημένη ενεργότητα της κινάσης CDK5 και της πρωτεΐνης p35 που αυτή αλληλεπιδρά, έχει δειχθεί ότι σχετίζεται ακόμη με τη νευρωνική δυσλειτουργία στους ασθενείς με Alzheimer (AD) και θα μπορούσε ίσως ακόμη να αποτελεί έναν πιθανό κοινό μηχανισμό που μοιράζονται οι δύο αυτές εκφυλιστικές διαταραχές (100). Από την άλλη πλευρά, το γονίδιο *CDK5* ρυθμίζεται ισχυρά από το γονίδιο *CDKAL1* (221), το οποίο διαμέσου του SNP rs7756992 είναι γνωστό ότι εμπλέκεται στον αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης ΣΔτ2 (235). Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης ανέδειξαν αυξημένα επίπεδα έκφρασης των μεταγράφων (tn) 1 και 2 του γονιδίου *CDK5* στους ασθενείς με ΣΔτ2 συγκριτικά με τους υγιείς. Τα επίπεδα έκφρασης των δύο μεταγράφων παρουσίασαν όμως διαφορετικά πρότυπα κατανομής και συσχέτισης με τις υπό μελέτη κλινικοπαθολογικές παραμέτρους της νόσου μεταξύ των ομάδων, αν και τα επίπεδα έκφρασης και των δύο μεταγράφων συσχετίστηκαν με τα επίπεδα ινσουλίνης ορού στους ασθενείς με ΣΔτ2. Τα παραπάνω δεδομένα πιθανότατα επιβεβαιώνουν τη συνεισφορά των διαφορετικών και πολύπλοκων μεταγραφικών ρυθμιστικών και παθογενετικών μηχανισμών που απαιτούνται για την ανάπτυξη της νόσου. Επιπλέον, μελέτες έχουν δείξει ότι τόσο το μετάγραφο 1 όσο και το μετάγραφο 2 του γονιδίου *CDK5*, στο οποίο παραλείπεται ένα εξόνιο (236) συγκριτικά με το κλασικού τύπου μετάγραφο 1 του γονιδίου (**Εικόνα 3.9**), αποτελούν αρνητικούς ρυθμιστές του σηματοδοτικού μονοπατιού Wnt/β-κατενίνη, το οποίο είναι επίσης γνωστό ότι εμπλέκεται στην ανάπτυξη του ΣΔτ2 (237).

Τα επίπεδα έκφρασης των μεταγράφων του γενετικού τόπου *CDKN2A/B* βρέθηκαν επίσης να διαφοροποιούνται μεταξύ υγιών και ασθενών με ΣΔτ2, στα πλαίσια της παρούσας

διατριβής. Συγκεκριμένοι SNPs στο γενετικό τόπο *CDKN2A/B* έχει δειχθεί ότι εμπλέκονται στην αρνητική ρύθμιση της μάζας των β κυττάρων, στον πολλαπλασιασμό καθώς και στους μηχανισμούς έκκρισης της ινσουλίνης, όπως επίσης και σε διάφορες μεταβολικές διεργασίες στο λιπώδη ιστό, στο ήπαρ και τους μύες (238). Επιπλέον, ο παραπάνω γενετικός τόπος έχει δειχθεί ότι ελέγχεται από μια πληθώρα επιγενετικών παραγόντων (239) στις ανθρώπινες παγκρεατικές νησίδες, χωρίς ωστόσο να είναι γνωστή η επίδραση αυτών στην έκφραση του γονιδίου (238). Συγκεκριμένα γενετικά αλληλόμορφα του γενετικού τόπου *CDKN2A/B* έχει δειχθεί ότι συνεισφέρουν ακόμη στον κίνδυνο ανάπτυξης καρδιαγγειακών νοσημάτων (240) και κακοηθειών (241), γεγονός το οποίο θα μπορούσε να αποτελέσει ένα σύνδεσμο των κοινών παθογενετικών μηχανισμών που εμφανίζουν τα νοσήματα αυτά με το ΣΔτ2 (242). Επιπρόσθετα, στο περιφερικό αίμα, οι -σχετιζόμενοι με την εμφάνιση ΣΔτ2- SNPs του γονιδίου *CDKN2A* εδράζονται σε περιοχές eQTLs (eSNPs) που επηρεάζουν την έκφραση του γονιδίου *PSEN1*. Το γονίδιο αυτό είναι γνωστό ότι εμπλέκεται στην ανάπτυξη AD και καρκίνου (243, 244), γεγονός που θα μπορούσε επίσης να δικαιολογήσει τη σύνδεση των τριών αυτών νοσημάτων. Στην παρούσα μελέτη, οι ασθενείς με ΣΔτ2 παρουσίασαν αυξημένα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *CDKN2A*, και συγκεκριμένα των μεταγράφων του (tv) 3 και 4: το πρώτο συσχετίστηκε σημαντικά με τα επίπεδα ινσουλίνης ορού στην ομάδα των ασθενών και το δεύτερο με συγκεκριμένους παράγοντες κινδύνου εμφάνισης της νόσου στην ομάδα των υγιών, προτείνοντας τη διαφορετική εμπλοκή των δύο μεταγράφων στην ανάπτυξη ή/και την εξέλιξη της νόσου. Το μετάγραφο 3 του γονιδίου *CDKN2A*, που εκφράζεται κατά κύριο λόγο στο πάγκρεας (245), καθώς και το μετάγραφο 4 εμφανίζουν διαφορετικά ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης, συγκριτικά με το κλασικού τύπου μετάγραφο (tv) 1 του γονιδίου (**Εικόνα 3.9**). Ως αποτέλεσμα, η κωδικοποιούσα πρωτεϊνική ισομορφή του μεταγράφου 4 (p14ARF), που εντοπίζεται κυρίως στο πυρηνόπλασμα και στα μιτοχόνδρια (246), δεν εμφανίζει ομοιότητα στην αλληλουχία με την κλασική πρωτεϊνική ισομορφή (p16INK4a). Συμπερασματικά, τα δεδομένα αυτά προτείνουν ότι η κάθε πρωτεϊνική ισομορφή εμφανίζει εξειδικευμένες κυτταρικές λειτουργίες, οι οποίες μπορούν να εμπλέκονται στους πολύπλοκους μηχανισμούς που είναι υπεύθυνοι για την παθογένεια της νόσου.

Στα πλαίσια της παρούσας μελέτης, τα επίπεδα έκφρασης του μεταγράφου (tv) 7 του γονιδίου *IGF2BP2* (το οποίο στερείται των εξωνίων 1 και 2 συγκριτικά με το κλασικού τύπου μετάγραφο) παρουσίασαν γραμμική τάση αύξησης μεταξύ των υγιών χωρίς προδιάθεση εμφάνισης ΣΔτ2, των υγιών με προδιάθεση και των ασθενών με ΣΔτ2. Η πρωτεΐνη *IGF2BP2* είναι γνωστό ότι προσδένεται στην 5' UTR του mRNA του παράγοντα *IGF2* (Insulin-like growth factor 2), συμμετέχοντας στη ρύθμιση της μετάφρασης (220). Συγκεκριμένοι SNPs του γονιδίου

IGF2BP2, που είναι γνωστό ότι εμπλέκονται στον αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης ΣΔτ2, εδράζονται σε eQTLs (eSNPs) και επηρεάζουν την έκφραση του γονιδίου *SENP2*, ένα γονίδιο το οποίο έχει σημαντικό ρόλο στη λιπογένεση αλλά και στην ανάπτυξη ΣΔτ2 (247). Επιπλέον, η συσχέτιση των επιπέδων έκφρασης του μεταγράφου 7 με το δείκτη μάζας σώματος (BMI) στους ασθενείς καθώς και με τα επίπεδα της γλυκόζης και της ινσουλίνης ορού στους υγιείς με προδιάθεση εμφάνισης ΣΔτ2, ενισχύει περαιτέρω την υπόθεση της λειτουργικής εμπλοκής του στην παθογένεια του ΣΔτ2.

Οι ασθενείς με ΣΔτ2 εμφάνισαν επιπλέον αυξημένα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *TSPAN8* (το γονίδιο κωδικοποιεί ένα μόνο μετάγραφο) και του μεταγράφου 5 του γονιδίου *THADA* (tv5). Πιο συγκεκριμένα, το *THADA* tv5 κωδικοποιεί μια μικρότερη πρωτεϊνική ισομορφή με διαφορετικό καρβοξυτελικό άκρο, συγκριτικά με την κλασική πρωτεϊνική ισομορφή του γονιδίου (**Εικόνα 3.9**). Το γονίδιο *TSPAN8* αποτελεί το πρώτο γονίδιο που έχει προταθεί έως σήμερα ως προγνωστικός δείκτης και δυνητικά θεραπευτικός στόχος για συγκεκριμένες ανθρώπινες νεοπλασίες (248-250), ενώ συγκεκριμένες χρωμοσωμικές αναδιατάξεις του γονιδίου *THADA* έχουν συσχετισθεί με την έναρξη του θυροειδικού αδενώματος (251). Και τα δύο γονίδια εμφανίζουν SNPs που σχετίζονται με τον αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης ΣΔτ2, αν και μέχρι σήμερα δεν υπάρχουν δεδομένα που να προτείνουν πιθανούς μοριακούς μηχανισμούς εμπλοκής τους στην ανάπτυξη της νόσου (87, 220). Η συσχέτιση των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων με συγκεκριμένα χαρακτηριστικά της νόσου ή/και παράγοντες κινδύνου ανάπτυξης ΣΔτ2, που παρατηρήθηκε στην παρούσα μελέτη, παρέχει τις πρώτες ενδείξεις για τους πιθανούς μηχανισμούς εμπλοκής τους στην παθογένεια του ΣΔτ2.

Τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *TCF7L2* το οποίο αποτελεί μέχρι σήμερα, σύμφωνα με τη γνωστή βιβλιογραφία, το πιο υψηλά συσχετιζόμενο γονίδιο για την εμφάνιση ΣΔτ2, βρέθηκαν να είναι παρόμοια μεταξύ των ασθενών με ΣΔτ2 και των υγιών δοτών στα πλαίσια της παρούσας μελέτης. Παρόλα αυτά, τα επίπεδα έκφρασης τόσο του γονιδίου *TCF7L2* όσο και αρκετών άλλων γονιδίων που μελετήθηκαν -ως προς τα επίπεδα έκφρασής τους- στην παρούσα διατριβή συσχετίστηκαν με συγκεκριμένα χαρακτηριστικά της νόσου ή προδιαθεσικούς παράγοντες, ακόμη και αν δεν εμφάνισαν σημαντική διαφορική έκφραση μεταξύ των ομάδων, υποδεικνύοντας την πιθανή εμπλοκή τους στους μηχανισμούς που απαιτούνται για την ανάπτυξη ΣΔτ2. Τα παραπάνω αποτελέσματα δημοσιεύτηκαν το Φεβρουάριο του 2019 στο περιοδικό *Scientific Reports* (Christodoulou MI, Avgeris M, Kokkinopoulou I, Maratou E, Mitrou P, Kontos CK, Pappas E, Boutati E, Scorilas A, Fragoulis EG, *Sci Rep.* 2019 Feb 6;9(1):151) (201).

Οι υποκείμενοι μοριακοί παθοφυσιολογικοί μηχανισμοί που είναι υπεύθυνοι για τη ρύθμιση της διαφορικής έκφρασης των γονιδίων/μεταγράφων στους ασθενείς με ΣΔτ2 δεν

έχουν μελετηθεί έως τώρα. Σήμερα είναι γνωστό, ότι η γονιδιακή έκφραση μπορεί να ρυθμιστεί διαμέσου ποικίλων μηχανισμών, συμπεριλαμβανομένου της μεθυλίωσης του DNA, των τροποποιήσεων των ιστονών και των miRNAs, και να συμβάλει στον καθορισμό του φαινοτύπου ή/και στην εξέλιξη της νόσου (148). Πιο συγκεκριμένα, ένας μεγάλος αριθμός μελετών έχει δείξει ότι συγκεκριμένα miRNAs αποτελούν βασικούς ρυθμιστές σηματοδοτικών μονοπατιών που επάγονται από τη νόσο ή συνεισφέρουν στην παθοφυσιολογία του ΣΔτ2 (171, 174). Τα miRNAs μπορούν να εμπλέκονται στην παθογένεια του ΣΔτ2, ρυθμίζοντας την έκφραση γονιδίων που εμπλέκονται στην ανάπτυξη των β κυττάρων καθώς και στους μηχανισμούς ευαισθησίας των ιστών στην ινσουλίνη, συμπεριλαμβανομένου του ήπατος, του λιπώδους ιστού και του σκελετικού μυ (175). Ταυτόχρονα, πολλές μελέτες υποστηρίζουν ότι τα διαφορικά πρότυπα έκφρασης των miRNAs στους -προσβεβλημένους από τη νόσο- ιστούς αλλά και στον ορό των ασθενών (172), μπορούν να αποτελέσουν πολλά υποσχόμενους βιοδείκτες για την ανάπτυξη ΣΔτ2 αλλά και την παρακολούθηση των επιπλοκών του (181, 183). Επιπλέον, το γεγονός ότι συγκεκριμένα γενετικά αλληλόμορφα που έχουν συσχετιστεί με τον αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης ΣΔτ2 αποτελούν, σύμφωνα με βάσεις δεδομένων, στόχους miRNAs που εκφράζονται κατά κύριο λόγο στις παγκρεατικές νησίδες, ενισχύει περαιτέρω την υπόθεση της πιθανής εμπλοκής των miRNAs στους υποκείμενους μοριακούς παθοφυσιολογικούς μηχανισμούς της νόσου (252).

Μέχρι σήμερα, δεν υπάρχει κάποια μελέτη που να έχει διερευνήσει το προφίλ έκφρασης των miRNAs που στοχεύουν τα παραπάνω -υπό μελέτη- γονίδια/μετάγραφα διαφορικής έκφρασης στους ασθενείς με ΣΔτ2. Έτσι, σε συνέχεια των προηγούμενων αποτελεσμάτων, επόμενος στόχος της παρούσας διατριβής τέθηκε η μελέτη του προφίλ έκφρασης των miRNAs που επιβεβαιωμένα πειραματικά στοχεύουν τα γονίδια διαφορικής έκφρασης: *CAPN10*, *CDK5*, *CDKN2A*, *IGF2BP2*, *KCNQ1*, *THADA* και *TSPAN8* στο περιφερικό αίμα των ασθενών με ΣΔτ2 και των υγιών δοτών. Ταυτόχρονα, διερευνήθηκαν οι πιθανές συσχετίσεις των επιπέδων έκφρασης των miRNAs με συγκεκριμένες κλινικές παραμέτρους και προδιαθεσικούς παράγοντες της νόσου. Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων ανέδειξε ότι τα επίπεδα έκφρασης των *let-7b-5p*, *miR-1-3p*, *miR-24-3p*, *miR-34a-5p*, *miR-98-5p*, *miR-125b-5p* και *miR-133a-3p* είναι μειωμένα στο περιφερικό αίμα των ασθενών με ΣΔτ2, συγκριτικά με την ομάδα των υγιών ενώ μεταξύ αυτών, τα *miR-24-3p* και *miR-133a-3p* αποτέλεσαν ανεξάρτητους προγνωστικούς δείκτες της μελέτης. Περαιτέρω ανάλυση μέσα στην ομάδα των υγιών ανέδειξε ακόμη ότι, οι υγιείς που χαρακτηρίζονταν από προδιαθεσικούς παράγοντες εμφάνισης ΣΔτ2 παρουσίασαν μειωμένα επίπεδα έκφρασης

των προαναφερθέντων miRNAs συγκριτικά με τους υγιείς που δεν εμφάνιζαν παράγοντες κινδύνου ανάπτυξης ΣΔτ2 (212). Τα παραπάνω αποτελέσματα βρίσκονται σε συμφωνία με αρκετές μελέτες που υποστηρίζουν ότι τα επίπεδα έκφρασης των miR-24 και miR-125b είναι μειωμένα στο πλάσμα των ασθενών με ΣΔτ2 (253-255), τα επίπεδα έκφρασης των miR-133a και miR-98-5p είναι μειωμένα στο σκελετικό μυ των ασθενών με ΣΔτ2 (256) και τα επίπεδα έκφρασης του miR-1-3p είναι μειωμένα στην καρδιά STZ (Streptozotocin)-επαγόμενων διαβητικών ποντικών (257). Επιπλέον, τα επίπεδα έκφρασης συγκεκριμένων μελών της οικογένειας let-7 έχουν βρεθεί να είναι γενικά μειωμένα στους ασθενείς με ΣΔτ2, συγκριτικά με τους υγιείς. Πιο συγκεκριμένα, τα επίπεδα έκφρασης των let-7a και let-7f έχουν βρεθεί να είναι μειωμένα στα εξωσώματα του πλάσματος (258) ενώ του let-7i στον ορό των ασθενών με ΣΔτ2 (259).

Η ανάλυση των επιπέδων έκφρασης των miRNAs με τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων/στόχων τους (όπως αυτά προκύπτουν από κατάλληλες βάσεις δεδομένων) ανέδειξε ότι τα miR-24-3p και miR-34a-5p συσχετίστηκαν αρνητικά με τα αντίστοιχα επίπεδα έκφρασης των μεταγράφων που αυτά στοχεύουν (tv3 και tv4) του γονιδίου *CDKN2A* στην ομάδα των ασθενών και των υγιών με προδιάθεση εμφάνισης της νόσου. Επιπλέον, τα επίπεδα έκφρασης του miR-125b-5p συσχετίστηκαν αρνητικά με τα επίπεδα έκφρασης του tv3 του γονιδίου *CDKN2A* στην ομάδα των υγιών με προδιάθεση εμφάνισης ΣΔτ2 ενώ από την άλλη πλευρά, τα επίπεδα έκφρασης των miR-133a-5p, miR-1-3p και miR-34a-5p συσχετίστηκαν θετικά με τα επίπεδα έκφρασης του *KCNQ1* tv1. Τα μειωμένα επίπεδα έκφρασης των miR-24-3p, miR-34a-5p και miR-125b-5p που εμφάνισαν οι ασθενείς με ΣΔτ2 καθώς και η αρνητική συσχέτισή τους με τα αυξημένα επίπεδα έκφρασης του mRNA-στόχου *CDKN2A* tv3, θα μπορούσαν πιθανότατα να συνδέονται με συγκεκριμένους μηχανισμούς μεταγραφικής ρύθμισης που εμπλέκονται στην παθογένεια του ΣΔτ2. Από την άλλη πλευρά, η θετική συσχέτιση που παρατηρήθηκε μεταξύ των μειωμένων επιπέδων έκφρασης των miR-133a-5p και miR-1-3p με τα μειωμένα επίπεδα έκφρασης του mRNA-στόχου *KCNQ1* tv1 στους ασθενείς και στους υγιείς, θα μπορούσε να υποδηλώνει τους μηχανισμούς που σχετίζονται με την αύξηση της γονιδιακής έκφρασης και εμπλέκονται περαιτέρω στις διαταραχές του μονοπατιού έκκρισης της ινσουλίνης.

Πολλά από τα παραπάνω miRNAs διαφορετικής έκφρασης έχουν βρεθεί ότι εμπλέκονται στην παθοφυσιολογία του ΣΔτ2. In-vitro πειράματα σε δείγματα ανθρώπινου περιφερικού αίματος καθώς και σε κυτταρικές σειρές ενδοθηλιακών κυττάρων έχουν δείξει ότι το miR-24 εμπλέκεται στις θρομβωτικές επιπλοκές του διαβήτη καθώς και στη δημιουργία αθηρωματικής πλάκας (254, 260). Από την άλλη πλευρά, τα miR-1 και miR-133,

γνωστά και ως 'μυο-miRs' (συνεντοπίζονται στον ίδιο χρωμοσωμικό τόπο και μεταγράφονται με ιστοειδικό τρόπο (261, 262)), συγκαταλλέγονται μεταξύ των miRNAs που έχουν σημαντικό ρόλο στις καρδιαγγειακές επιπλοκές του ΣΔτ2 (263-265). Σε μια περαιτέρω προσπάθεια ενίσχυσης της υπόθεσης της πιθανής εμπλοκής των παραπάνω -διαφορικής έκφρασης- miRNAs στην παθογένεια του ΣΔτ2, ακολούθησε αναζήτηση των -σχετιζόμενων με το ΣΔτ2- μοριακών μονοπατιών, τα οποία ρυθμίζονται από τα υπό μελέτη miRNAs, ακολουθώντας μια βιοπληροφορική προσέγγιση. Τα δεδομένα ανέδειξαν ότι τα miRNAs αυτά συμμετέχουν στη ρύθμιση των βασικών μονοπατιών PI3K-Akt, HIF-1, MAPK, FoxO καθώς και στο σηματοδοτικό μονοπάτι της ινσουλίνης, τα οποία είναι γνωστό ότι εμπλέκονται στην παθογένεια του ΣΔτ2. Αξίζει να σημειωθεί ότι, η ανάλυση αυτή δεν περιελάμβανε τα υπό μελέτη γονίδια που είναι γνωστό ότι συμμετέχουν στον αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης ΣΔτ2, πιθανότατα λόγω του γεγονότος ότι η λειτουργική εμπλοκή των γονιδίων αυτών στην ανάπτυξη του ΣΔτ2 δεν έχει πλήρως διευκρινιστεί (122). Συνδυάζοντας τα αποτελέσματα της qPCR με τα αποτελέσματα της παραπάνω βιοπληροφορικής ανάλυσης, θα ήταν εφικτή η υπόθεση ότι τα παραπάνω miRNAs διαφορικής έκφρασης μπορούν να εμπλέκονται στους παθογενετικούς μηχανισμούς του ΣΔτ2, ρυθμίζοντας γονίδια που συμμετέχουν στα μονοπάτια αυτά ή/και γονίδια που σχετίζονται με τη νόσο. Αξίζει επίσης να σημειωθεί ότι, σύμφωνα με τα αποτελέσματα της βιοπληροφορικής ανάλυσης, τα miRNAs διαφορικής έκφρασης ρυθμίζουν επιπλέον γονίδια που εμπλέκονται στην ανάπτυξη νεοπλασιών, γεγονός που πιθανώς θα μπορούσε να αποτελέσει ένα μηχανισμό που συνδέει τους κοινούς παθογενετικούς μηχανισμούς που μοιράζονται αυτά τα δυο νοσήματα (266).

Τέλος, τα επίπεδα έκφρασης των miRNAs διαφορικής έκφρασης βρέθηκαν να σχετίζονται με συγκεκριμένες κλινικοπαθολογικές παραμέτρους της νόσου και μάλιστα με διαφορετικό τρόπο μεταξύ των ασθενών με ΣΔτ2 και των υγιών δοτών. Το γεγονός ότι τα επίπεδα έκφρασης των miR-125b-5p, let-7b-5p και miR-98-5p συσχετίστηκαν αρνητικά με τα επίπεδα ινσουλίνης ορού αποκλειστικά στην ομάδα των ασθενών, προτείνει την πιθανή εμπλοκή των παραπάνω miRNAs στους μηχανισμούς ομοιόστασης της ινσουλίνης στα άτομα αυτά. Επιπλέον, τα επίπεδα έκφρασης του miR-34a-5p συσχετίστηκαν αρνητικά με τα επίπεδα των τριγλυκεριδίων του ορού στην ομάδα των υγιών καθώς και με τα % επίπεδα της HbA1c στους υγιείς με προδιάθεση εμφάνισης της νόσου, υποδεικνύοντας την πιθανή εμπλοκή τους στους υποκείμενους ρυθμιστικούς μηχανισμούς που είναι υπεύθυνοι για την παθογένεια του ΣΔτ2 ή/και τα μονοπάτια μεταβολισμού της χοληστερόλης. Το σύνολο των παραπάνω αποτελεσμάτων δημοσιεύτηκε το Σεπτέμβριο του 2019 στο περιοδικό *Endocrine*

(Kokkinopoulou I, Maratou E, Mitrou P, Boutati E, Sideris DC, Fragoulis EG, Christodoulou MI, Endocrine. 2019 Nov;66(2):226-239) (212).

Ταυτόχρονα, όλο και αυξανόμενα είναι τα δεδομένα που υποστηρίζουν ότι η αλληλεπίδραση των γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων, με σημαντικότερους την παχυσαρκία και την ηλικία, είναι καθοριστικής σημασίας για την αύξηση του κινδύνου εμφάνισης ΣΔτ2, επηρεάζοντας είτε τη λειτουργία των παγκρεατικών β κυττάρων είτε την ευαισθησία των ιστών στην ινσουλίνη (145). Η επιγενετική, με σημαντικότερη τη μεθυλίωση του DNA, έχει δειχθεί ότι εμπλέκεται τόσο στην παθογένεια του ΣΔτ2 όσο και σε άλλα νοσήματα του μεταβολισμού, διαμέσου της ρύθμισης της έκφρασης συγκεκριμένων γονιδίων που εμπλέκονται στους μηχανισμούς ομοιόστασης της γλυκόζης (144, 267, 268). Δεδομένου ακόμη ότι, πολλά ένζυμα είναι υπεύθυνα τόσο για τη μεθυλίωση όσο και για την τροποποίηση των ιστονών του ανθρώπινου γονιδιώματος, είναι αρκετά πιθανόν τόσο η ενεργότητα των ενζύμων αυτών όσο και η διαθεσιμότητα των υποστρωμάτων που απαιτούνται για τις αντιδράσεις αυτές να επηρεάζουν την παθογένεια του ΣΔτ2 (145). Διαφορές στα πρότυπα μεθυλίωσης των υποκινητών διαφόρων γονιδίων στα ανθρώπινα β παγκρεατικά κύτταρα, στο λιπώδη ιστό, στο σκελετικό μυ και στο ήπαρ έχουν συσχετισθεί με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης ΣΔτ2, ενώ διάφοροι αναστολείς συγκεκριμένων επιγενετικών τροποποιήσεων χρησιμοποιούνται σήμερα για τη θεραπεία διαφόρων νοσημάτων, συμπεριλαμβανομένου και του ΣΔτ2 (145, 269, 270).

Στην παρούσα διατριβή, η μελέτη του προφίλ μεθυλίωσης συγκεκριμένων θέσεων στην περιοχή των υποκινητών των γονιδίων *CDK5* και *CDKN2A*, ανέδειξε ότι οι ασθενείς με ΣΔτ2 εμφανίζουν γενικά υψηλότερα ποσοστά μεθυλίωσης στις υπό μελέτη θέσεις του υποκινητή του γονιδίου *CDK5*, με σημαντικότερες διαφορές στην κυτοσίνη της θέσης -271 (ως προς το TSS), συγκριτικά με τους υγιείς δότες. Μελέτες έχουν δείξει ότι το μειωμένο προφίλ μεθυλίωσης του *CDK5* στον υπόκαμπο αρουραίων που χαρακτηρίζεται από την παρουσία αμυλοειδών, σχετίζεται με αντίστοιχη αυξημένη έκφραση του γονιδίου και έχει προταθεί ως ένας σημαντικός επιγενετικός μηχανισμός που μπορεί να εμπλέκεται στη νόσο AD (271). Ταυτόχρονα, μία πρόσφατη μελέτη έχει δείξει ότι η μειωμένη μεθυλίωση και η αυξημένη ακετυλίωση του γονιδίου *CDK5*, που παρατηρήθηκε στον υπόκαμπο αρουραίων που χαρακτηρίζονταν από την ταυτόχρονη παρουσία αμυλοειδών και ινσουλινοαντίστασης, σχετίζεται με αυξημένη έκφραση του γονιδίου και προτείνει ότι οι παραπάνω επιγενετικοί μηχανισμοί μπορούν να έχουν σημαντικό ρόλο στην -σχετιζόμενη με το ΣΔτ2- ανάπτυξη AD (272). Στην παρούσα μελέτη παρατηρήθηκε αυξημένη μεθυλίωση των υπό μελέτη θέσεων στην περιοχή του υποκινητή του *CDK5*, παρουσιάζοντας θετική συσχέτιση με τα επίπεδα

έκφρασης του γονιδίου που βρέθηκαν και αυτά να είναι αυξημένα στους ασθενείς με ΣΔτ2, συγκριτικά με τους υγιείς δότες. Δεδομένου ότι η μεθυλίωση του DNA οδηγεί σε μείωση της προσβασιμότητας των μεταγραφικών παραγόντων και επάγει, κατά κύριο λόγο, τη γονιδιακή αποσιώπηση αλλά και του γεγονότος ότι μια διαγονιδιακή περιοχή μπορεί να λειτουργεί ως καταστολέας/ενισχυτής για γονιδιακά που εδράζονται χιλιάδες βάσεις μακριά, είναι πιθανόν τα παραπάνω δεδομένα να προτείνουν την εμπλοκή του παραπάνω επιγενετικού μηχανισμού στην παθογένεια του ΣΔτ2, επηρεάζοντας την έκφραση του γονιδίου *CDK5* ή/και άλλων -εμπλεκόμενων με τη νόσο- γονιδίων.

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής προτείνουν μία ειδική για το ΣΔτ2 «υπογραφή», διαμέσου της μελέτης γενετικών και επιγενετικών δεικτών στο περιφερικό αίμα των ασθενών με ΣΔτ2. Για την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων όμως, θα πρέπει να ληφθεί υπόψη ο σχετικά μικρός αριθμός συμμετεχόντων της μελέτης καθώς και το γεγονός ότι η ομάδα των ασθενών με ΣΔτ2 αποτελούνταν κυρίως από άτομα που λάμβαναν κάποια είδους φαρμακευτική αγωγή, γεγονός που θα μπορούσε να επηρεάζει το προφίλ έκφρασης των miRNAs, τα ποσοστά μεθυλίωσης των γονιδίων αλλά και διάφορους άλλους βιοχημικούς παράγοντες. Αδιαμφισβήτητα, η αντίστοιχη ανάλυση σε νεο-διαγνωσθέντες ασθενείς πριν τη χορήγηση κάποιου είδους αντιδιαβητικής αγωγής, θα μπορούσε να οδηγήσει στην εξαγωγή ασφαλέστερων αποτελεσμάτων κάτι το οποίο στην παρούσα μελέτη δεν ήταν εφικτό, δεδομένου ότι το σύνολο των ασθενών της μελέτης περιελάμβανε μόνο 8 τέτοιους ασθενείς.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον θα είχε επιπλέον, η επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων αυτών σε μια μεγαλύτερη κοόρτη πληθυσμού καθώς και ο έλεγχος της έκφρασης επιπρόσθετων γονιδίων που σχετίζονται με τον αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης ΣΔτ2 και εμπλέκονται σε μονοπάτια που δεν έχουν άμεση σχέση με τους μηχανισμούς ομοιόστασης της γλυκόζης. Επιπλέον, σημαντικά δεδομένα θα μπορούσε να παρέχει και η διερεύνηση της συσχέτισης των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων/μεταγράφων με την παρουσία συγκεκριμένων SNPs στους ασθενείς με ΣΔτ2 της μελέτης και τα οποία θα μπορούσαν να συμβάλλουν στην κατανόηση του ρόλου των SNPs στην έκφραση των γονιδίων και περαιτέρω στην εμπλοκή τους στους μηχανισμούς παθογένειας της νόσου.

Παρά τους περιορισμούς της μελέτης που περιγράφηκαν, τα αποτελέσματα της παρούσας διδακτορικής διατριβής προτείνουν, για πρώτη φορά, ένα -ειδικό για το ΣΔτ2- προφίλ έκφρασης συγκεκριμένων γονιδίων/μεταγράφων που εμπλέκονται στον αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης ΣΔτ2 και θα μπορούσε να αντικατοπτρίζει τους παθογενετικούς μηχανισμούς που λαμβάνουν χώρα στους ιστούς 'στόχους' της νόσου. Η διαφορική

έκφραση των επιμέρους μεταγράφων των γονιδίων καθώς και των miRNAs που πειραματικά επιβεβαιωμένα στοχεύουν τα γονίδια αυτά θα μπορούσε πιθανόν να συνδέεται με τους υποκείμενους παθοφυσιολογικούς μηχανισμούς που εμπλέκονται στην ανάπτυξη του ΣΔτ2 και υποδηλώνει πιθανώς την ύπαρξη πολύπλοκων μηχανισμών που ρυθμίζουν τη γονιδιακή έκφραση. Αδιαμφιβήτητα, οι μεγάλης-κλίμακας κλινικές μελέτες θα μπορούσαν να συνεισφέρουν σε μεγάλο βαθμό στην κατανόηση της εμπλοκής των παραπάνω δεικτών στα παθογενετικά μονοπάτια της νόσου αλλά και στην αξιολόγηση τους ως πιθανοί βιοδείκτες με διαγνωστική και προγνωστική αξία.

5. Βιβλιογραφία

1. Roder PV, Wu B, Liu Y, Han W. Pancreatic regulation of glucose homeostasis. *Exp Mol Med*. 2016;48:e219.
2. Brissova M, Fowler MJ, Nicholson WE, Chu A, Hirshberg B, Harlan DM, et al. Assessment of human pancreatic islet architecture and composition by laser scanning confocal microscopy. *J Histochem Cytochem*. 2005;53(9):1087-97.
3. Katsuura G, Asakawa A, Inui A. Roles of pancreatic polypeptide in regulation of food intake. *Peptides*. 2002;23(2):323-9.
4. Wierup N, Svensson H, Mulder H, Sundler F. The ghrelin cell: a novel developmentally regulated islet cell in the human pancreas. *Regul Pept*. 2002;107(1-3):63-9.
5. Hodson DJ, Mitchell RK, Bellomo EA, Sun G, Vinet L, Meda P, et al. Lipotoxicity disrupts incretin-regulated human beta cell connectivity. *J Clin Invest*. 2013;123(10):4182-94.
6. Goke B. Islet cell function: alpha and beta cells--partners towards normoglycaemia. *Int J Clin Pract Suppl*. 2008(159):2-7.
7. Hauge-Evans AC, King AJ, Carmignac D, Richardson CC, Robinson IC, Low MJ, et al. Somatostatin secreted by islet delta-cells fulfills multiple roles as a paracrine regulator of islet function. *Diabetes*. 2009;58(2):403-11.
8. Khan AH, Pessin JE. Insulin regulation of glucose uptake: a complex interplay of intracellular signalling pathways. *Diabetologia*. 2002;45(11):1475-83.
9. Komatsu M, Takei M, Ishii H, Sato Y. Glucose-stimulated insulin secretion: A newer perspective. *J Diabetes Investig*. 2013;4(6):511-6.
10. Egea PF, Stroud RM, Walter P. Targeting proteins to membranes: structure of the signal recognition particle. *Curr Opin Struct Biol*. 2005;15(2):213-20.
11. Huang XF, Arvan P. Intracellular transport of proinsulin in pancreatic beta-cells. Structural maturation probed by disulfide accessibility. *J Biol Chem*. 1995;270(35):20417-23.
12. Akter R, Cao P, Noor H, Ridgway Z, Tu LH, Wang H, et al. Islet Amyloid Polypeptide: Structure, Function, and Pathophysiology. *J Diabetes Res*. 2016;2016:2798269.
13. Rorsman P, Braun M. Regulation of insulin secretion in human pancreatic islets. *Annu Rev Physiol*. 2013;75:155-79.
14. Petersen MC, Shulman GI. Mechanisms of Insulin Action and Insulin Resistance. *Physiol Rev*. 2018;98(4):2133-223.
15. Mangmool S, Denkaew T, Parichatikanond W, Kurose H. beta-Adrenergic Receptor and Insulin Resistance in the Heart. *Biomol Ther (Seoul)*. 2017;25(1):44-56.
16. Kharroubi AT, Darwish HM. Diabetes mellitus: The epidemic of the century. *World J Diabetes*. 2015;6(6):850-67.
17. Harding JL, Pavkov ME, Magliano DJ, Shaw JE, Gregg EW. Global trends in diabetes complications: a review of current evidence. *Diabetologia*. 2019;62(1):3-16.
18. Cho NH, Shaw JE, Karuranga S, Huang Y, da Rocha Fernandes JD, Ohlrogge AW, et al. IDF Diabetes Atlas: Global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045. *Diabetes Res Clin Pract*. 2018;138:271-81.
19. Nathan DM. Diabetes: Advances in Diagnosis and Treatment. *JAMA*. 2015;314(10):1052-62.
20. Prasad RB, Groop L. Genetics of type 2 diabetes-pitfalls and possibilities. *Genes (Basel)*. 2015;6(1):87-123.
21. Atkinson MA, Eisenbarth GS, Michels AW. Type 1 diabetes. *Lancet*. 2014;383(9911):69-82.
22. Forlenza GP, Rewers M. The epidemic of type 1 diabetes: what is it telling us? *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. 2011;18(4):248-51.
23. Stankov K, Benc D, Draskovic D. Genetic and epigenetic factors in etiology of diabetes mellitus type 1. *Pediatrics*. 2013;132(6):1112-22.
24. Sugihara S. Genetic susceptibility of childhood type 1 diabetes mellitus in Japan. *Pediatr Endocrinol Rev*. 2012;10 Suppl 1:62-71.

25. Tuomi T, Santoro N, Caprio S, Cai M, Weng J, Groop L. The many faces of diabetes: a disease with increasing heterogeneity. *Lancet*. 2014;383(9922):1084-94.
26. Carlsson S, Midthjell K, Grill V. Influence of family history of diabetes on incidence and prevalence of latent autoimmune diabetes of the adult: results from the Nord-Trøndelag Health Study. *Diabetes Care*. 2007;30(12):3040-5.
27. Murphy R, Ellard S, Hattersley AT. Clinical implications of a molecular genetic classification of monogenic beta-cell diabetes. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*. 2008;4(4):200-13.
28. Voight BF, Scott LJ, Steinthorsdottir V, Morris AP, Dina C, Welch RP, et al. Twelve type 2 diabetes susceptibility loci identified through large-scale association analysis. *Nat Genet*. 2010;42(7):579-89.
29. Tatsi EB, Kanaka-Gantenbein C, Scorilas A, Chrousos GP, Sertedaki A. Next Generation Sequencing Targeted Gene Panel in Greek MODY patients increases diagnostic accuracy. *Pediatr Diabetes*. 2019.
30. Murphy R, Turnbull DM, Walker M, Hattersley AT. Clinical features, diagnosis and management of maternally inherited diabetes and deafness (MIDD) associated with the 3243A>G mitochondrial point mutation. *Diabet Med*. 2008;25(4):383-99.
31. Pearson ER, Flechtner I, Njolstad PR, Malecki MT, Flanagan SE, Larkin B, et al. Switching from insulin to oral sulfonylureas in patients with diabetes due to Kir6.2 mutations. *N Engl J Med*. 2006;355(5):467-77.
32. Robitaille J, Grant AM. The genetics of gestational diabetes mellitus: evidence for relationship with type 2 diabetes mellitus. *Genet Med*. 2008;10(4):240-50.
33. Cho YM, Kim TH, Lim S, Choi SH, Shin HD, Lee HK, et al. Type 2 diabetes-associated genetic variants discovered in the recent genome-wide association studies are related to gestational diabetes mellitus in the Korean population. *Diabetologia*. 2009;52(2):253-61.
34. Lauenborg J, Grarup N, Damm P, Borch-Johnsen K, Jorgensen T, Pedersen O, et al. Common type 2 diabetes risk gene variants associate with gestational diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009;94(1):145-50.
35. Young BC, Ecker JL. Fetal macrosomia and shoulder dystocia in women with gestational diabetes: risks amenable to treatment? *Curr Diab Rep*. 2013;13(1):12-8.
36. Zheng Y, Ley SH, Hu FB. Global aetiology and epidemiology of type 2 diabetes mellitus and its complications. *Nat Rev Endocrinol*. 2018;14(2):88-98.
37. DeFronzo RA, Ferrannini E, Groop L, Henry RR, Herman WH, Holst JJ, et al. Type 2 diabetes mellitus. *Nat Rev Dis Primers*. 2015;1:15019.
38. American Diabetes A. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2010;33 Suppl 1:S62-9.
39. International Expert C. International Expert Committee report on the role of the A1C assay in the diagnosis of diabetes. *Diabetes Care*. 2009;32(7):1327-34.
40. Madiraju AK, Erion DM, Rahimi Y, Zhang XM, Braddock DT, Albright RA, et al. Metformin suppresses gluconeogenesis by inhibiting mitochondrial glycerophosphate dehydrogenase. *Nature*. 2014;510(7506):542-6.
41. Gastaldelli A, Ferrannini E, Miyazaki Y, Matsuda M, Mari A, DeFronzo RA. Thiazolidinediones improve beta-cell function in type 2 diabetic patients. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2007;292(3):E871-83.
42. Sola D, Rossi L, Schianca GP, Maffioli P, Bigliocca M, Mella R, et al. Sulfonylureas and their use in clinical practice. *Arch Med Sci*. 2015;11(4):840-8.
43. van de Laar FA, Lucassen PL, Akkermans RP, van de Lisdonk EH, Rutten GE, van Weel C. Alpha-glucosidase inhibitors for patients with type 2 diabetes: results from a Cochrane systematic review and meta-analysis. *Diabetes Care*. 2005;28(1):154-63.
44. Inzucchi SE, Bergenstal RM, Buse JB, Diamant M, Ferrannini E, Nauck M, et al. Management of hyperglycemia in type 2 diabetes: a patient-centered approach: position statement of

- the American Diabetes Association (ADA) and the European Association for the Study of Diabetes (EASD). *Diabetes Care*. 2012;35(6):1364-79.
45. Gerich JE, Meyer C, Woerle HJ, Stumvoll M. Renal gluconeogenesis: its importance in human glucose homeostasis. *Diabetes Care*. 2001;24(2):382-91.
 46. Blazquez E, Velazquez E, Hurtado-Carneiro V, Ruiz-Albusac JM. Insulin in the brain: its pathophysiological implications for States related with central insulin resistance, type 2 diabetes and Alzheimer's disease. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2014;5:161.
 47. Honka H, Makinen J, Hannukainen JC, Tarkia M, Oikonen V, Teras M, et al. Validation of [18F]fluorodeoxyglucose and positron emission tomography (PET) for the measurement of intestinal metabolism in pigs, and evidence of intestinal insulin resistance in patients with morbid obesity. *Diabetologia*. 2013;56(4):893-900.
 48. Meijer RI, De Boer MP, Groen MR, Eringa EC, Rattigan S, Barrett EJ, et al. Insulin-induced microvascular recruitment in skin and muscle are related and both are associated with whole-body glucose uptake. *Microcirculation*. 2012;19(6):494-500.
 49. Samuel VT, Shulman GI. Mechanisms for insulin resistance: common threads and missing links. *Cell*. 2012;148(5):852-71.
 50. Wilcox G. Insulin and insulin resistance. *Clin Biochem Rev*. 2005;26(2):19-39.
 51. Copps KD, White MF. Regulation of insulin sensitivity by serine/threonine phosphorylation of insulin receptor substrate proteins IRS1 and IRS2. *Diabetologia*. 2012;55(10):2565-82.
 52. Ye J. Mechanisms of insulin resistance in obesity. *Front Med*. 2013;7(1):14-24.
 53. Robertson RP. Chronic oxidative stress as a central mechanism for glucose toxicity in pancreatic islet beta cells in diabetes. *J Biol Chem*. 2004;279(41):42351-4.
 54. Tomita T. Apoptosis in pancreatic beta-islet cells in Type 2 diabetes. *Bosn J Basic Med Sci*. 2016;16(3):162-79.
 55. Meigs JB, Cupples LA, Wilson PW. Parental transmission of type 2 diabetes: the Framingham Offspring Study. *Diabetes*. 2000;49(12):2201-7.
 56. Poulsen P, Kyvik KO, Vaag A, Beck-Nielsen H. Heritability of type II (non-insulin-dependent) diabetes mellitus and abnormal glucose tolerance--a population-based twin study. *Diabetologia*. 1999;42(2):139-45.
 57. Hanis CL, Boerwinkle E, Chakraborty R, Ellsworth DL, Concannon P, Stirling B, et al. A genome-wide search for human non-insulin-dependent (type 2) diabetes genes reveals a major susceptibility locus on chromosome 2. *Nat Genet*. 1996;13(2):161-6.
 58. Horikawa Y, Oda N, Cox NJ, Li X, Orho-Melander M, Hara M, et al. Genetic variation in the gene encoding calpain-10 is associated with type 2 diabetes mellitus. *Nat Genet*. 2000;26(2):163-75.
 59. Bodhini D, Radha V, Ghosh S, Sanapala KR, Majumder PP, Rao MR, et al. Association of calpain 10 gene polymorphisms with type 2 diabetes mellitus in Southern Indians. *Metabolism*. 2011;60(5):681-8.
 60. Ezzidi I, Mtiraoui N, Nemr R, Kacem M, Al-Khateeb GM, Mahjoub T, et al. Variants within the calpain-10 gene and relationships with type 2 diabetes (T2DM) and T2DM-related traits among Tunisian Arabs. *Diabetes Metab*. 2010;36(5):357-62.
 61. Zhou X, Wang Y, Zhang Y, Gao P, Zhu D. Association of CAPN10 gene with insulin sensitivity, glucose tolerance and renal function in essential hypertensive patients. *Clin Chim Acta*. 2010;411(15-16):1126-31.
 62. Turner MD. Coordinated control of both insulin secretion and insulin action through calpain-10-mediated regulation of exocytosis? *Mol Genet Metab*. 2007;91(4):305-7.
 63. Peng S, Zhu Y, Lu B, Xu F, Li X, Lai M. TCF7L2 gene polymorphisms and type 2 diabetes risk: a comprehensive and updated meta-analysis involving 121,174 subjects. *Mutagenesis*. 2013;28(1):25-37.
 64. Sladek R, Rocheleau G, Rung J, Dina C, Shen L, Serre D, et al. A genome-wide association study identifies novel risk loci for type 2 diabetes. *Nature*. 2007;445(7130):881-5.

65. Wellcome Trust Case Control C. Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature*. 2007;447(7145):661-78.
66. Lyssenko V, Lupi R, Marchetti P, Del Guerra S, Orho-Melander M, Almgren P, et al. Mechanisms by which common variants in the TCF7L2 gene increase risk of type 2 diabetes. *J Clin Invest*. 2007;117(8):2155-63.
67. Gjesing AP, Kjems LL, Vestmar MA, Grarup N, Linneberg A, Deacon CF, et al. Carriers of the TCF7L2 rs7903146 TT genotype have elevated levels of plasma glucose, serum proinsulin and plasma gastric inhibitory polypeptide (GIP) during a meal test. *Diabetologia*. 2011;54(1):103-10.
68. Schafer SA, Tschritter O, Machicao F, Thamer C, Stefan N, Gallwitz B, et al. Impaired glucagon-like peptide-1-induced insulin secretion in carriers of transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene polymorphisms. *Diabetologia*. 2007;50(12):2443-50.
69. Grant SF. Understanding the elusive mechanism of action of TCF7L2 in metabolism. *Diabetes*. 2012;61(11):2657-8.
70. Kaminska D, Kuulasmaa T, Venesmaa S, Kakela P, Vaittinen M, Pulkkinen L, et al. Adipose tissue TCF7L2 splicing is regulated by weight loss and associates with glucose and fatty acid metabolism. *Diabetes*. 2012;61(11):2807-13.
71. Boj SF, van Es JH, Huch M, Li VS, Jose A, Hatzis P, et al. Diabetes risk gene and Wnt effector Tcf7l2/TCF4 controls hepatic response to perinatal and adult metabolic demand. *Cell*. 2012;151(7):1595-607.
72. Connor AE, Baumgartner RN, Baumgartner KB, Kerber RA, Pinkston C, John EM, et al. Associations between TCF7L2 polymorphisms and risk of breast cancer among Hispanic and non-Hispanic white women: the Breast Cancer Health Disparities Study. *Breast Cancer Res Treat*. 2012;136(2):593-602.
73. Burwinkel B, Shanmugam KS, Hemminki K, Meindl A, Schmutzler RK, Sutter C, et al. Transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) variant is associated with familial breast cancer risk: a case-control study. *BMC Cancer*. 2006;6:268.
74. Jay MA, Ren J. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) in metabolic syndrome and type 2 diabetes mellitus. *Curr Diabetes Rev*. 2007;3(1):33-9.
75. Ruchat SM, Weisnagel SJ, Vohl MC, Rankinen T, Bouchard C, Perusse L. Evidence for interaction between PPAR γ Pro12Ala and PARGC1A Gly482Ser polymorphisms in determining type 2 diabetes intermediate phenotypes in overweight subjects. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2009;117(9):455-9.
76. Clement K, Hercberg S, Passinge B, Galan P, Varroud-Vial M, Shuldiner AR, et al. The Pro115Gln and Pro12Ala PPAR γ gene mutations in obesity and type 2 diabetes. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2000;24(3):391-3.
77. Le Fur S, Le Stunff C, Bougneres P. Increased insulin resistance in obese children who have both 972 IRS-1 and 1057 IRS-2 polymorphisms. *Diabetes*. 2002;51 Suppl 3:S304-7.
78. Gloyn AL, Weedon MN, Owen KR, Turner MJ, Knight BA, Hitman G, et al. Large-scale association studies of variants in genes encoding the pancreatic beta-cell KATP channel subunits Kir6.2 (KCNJ11) and SUR1 (ABCC8) confirm that the KCNJ11 E23K variant is associated with type 2 diabetes. *Diabetes*. 2003;52(2):568-72.
79. Nielsen EM, Hansen L, Carstensen B, Echwald SM, Drivsholm T, Glumer C, et al. The E23K variant of Kir6.2 associates with impaired post-OGTT serum insulin response and increased risk of type 2 diabetes. *Diabetes*. 2003;52(2):573-7.
80. Inoue H, Tanizawa Y, Wasson J, Behn P, Kalidas K, Bernal-Mizrachi E, et al. A gene encoding a transmembrane protein is mutated in patients with diabetes mellitus and optic atrophy (Wolfram syndrome). *Nat Genet*. 1998;20(2):143-8.
81. Franks PW, Rolandsson O, Debenham SL, Fawcett KA, Payne F, Dina C, et al. Replication of the association between variants in WFS1 and risk of type 2 diabetes in European populations. *Diabetologia*. 2008;51(3):458-63.

82. Sandhu MS, Weedon MN, Fawcett KA, Wasson J, Debenham SL, Daly A, et al. Common variants in WFS1 confer risk of type 2 diabetes. *Nat Genet.* 2007;39(8):951-3.
83. Muller YL, Infante AM, Hanson RL, Love-Gregory L, Knowler W, Bogardus C, et al. Variants in hepatocyte nuclear factor 4alpha are modestly associated with type 2 diabetes in Pima Indians. *Diabetes.* 2005;54(10):3035-9.
84. Xue A, Wu Y, Zhu Z, Zhang F, Kemper KE, Zheng Z, et al. Genome-wide association analyses identify 143 risk variants and putative regulatory mechanisms for type 2 diabetes. *Nat Commun.* 2018;9(1):2941.
85. Morris AP, Voight BF, Teslovich TM, Ferreira T, Segre AV, Steinthorsdottir V, et al. Large-scale association analysis provides insights into the genetic architecture and pathophysiology of type 2 diabetes. *Nat Genet.* 2012;44(9):981-90.
86. Flannick J, Florez JC. Type 2 diabetes: genetic data sharing to advance complex disease research. *Nat Rev Genet.* 2016;17(9):535-49.
87. MacArthur J, Bowler E, Cerezo M, Gil L, Hall P, Hastings E, et al. The new NHGRI-EBI Catalog of published genome-wide association studies (GWAS Catalog). *Nucleic Acids Res.* 2017;45(D1):D896-D901.
88. Zeggini E, Scott LJ, Saxena R, Voight BF, Marchini JL, Hu T, et al. Meta-analysis of genome-wide association data and large-scale replication identifies additional susceptibility loci for type 2 diabetes. *Nat Genet.* 2008;40(5):638-45.
89. Bort R, Signore M, Tremblay K, Martinez Barbera JP, Zaret KS. Hex homeobox gene controls the transition of the endoderm to a pseudostratified, cell emergent epithelium for liver bud development. *Dev Biol.* 2006;290(1):44-56.
90. Li X, Li Y, Song B, Guo S, Chu S, Jia N, et al. Hematopoietically-expressed homeobox gene three widely-evaluated polymorphisms and risk for diabetes: a meta-analysis. *PLoS One.* 2012;7(11):e49917.
91. Lefebvre B, Vandewalle B, Balavoine AS, Queniat G, Moerman E, Vantyghem MC, et al. Regulation and functional effects of ZNT8 in human pancreatic islets. *J Endocrinol.* 2012;214(2):225-32.
92. Xu J, Wang J, Chen B. SLC30A8 (ZnT8) variations and type 2 diabetes in the Chinese Han population. *Genet Mol Res.* 2012;11(2):1592-8.
93. Strawbridge RJ, Dupuis J, Prokopenko I, Barker A, Ahlqvist E, Rybin D, et al. Genome-wide association identifies nine common variants associated with fasting proinsulin levels and provides new insights into the pathophysiology of type 2 diabetes. *Diabetes.* 2011;60(10):2624-34.
94. Manning AK, Hivert MF, Scott RA, Grimsby JL, Bouatia-Naji N, Chen H, et al. A genome-wide approach accounting for body mass index identifies genetic variants influencing fasting glycemic traits and insulin resistance. *Nat Genet.* 2012;44(6):659-69.
95. Li H, Tang X, Liu Q, Wang Y. Association between type 2 diabetes and rs10811661 polymorphism upstream of CDKN2A/B: a meta-analysis. *Acta Diabetol.* 2013;50(5):657-62.
96. Grarup N, Rose CS, Andersson EA, Andersen G, Nielsen AL, Albrechtsen A, et al. Studies of association of variants near the HHEX, CDKN2A/B, and IGF2BP2 genes with type 2 diabetes and impaired insulin release in 10,705 Danish subjects: validation and extension of genome-wide association studies. *Diabetes.* 2007;56(12):3105-11.
97. Duesing K, Fatemifar G, Charpentier G, Marre M, Tichet J, Hercberg S, et al. Evaluation of the association of IGF2BP2 variants with type 2 diabetes in French Caucasians. *Diabetes.* 2008;57(7):1992-6.
98. Huang Q, Yin JY, Dai XP, Pei Q, Dong M, Zhou ZG, et al. IGF2BP2 variations influence repaglinide response and risk of type 2 diabetes in Chinese population. *Acta Pharmacol Sin.* 2010;31(6):709-17.
99. Rosales JL, Lee KY. Extraneuronal roles of cyclin-dependent kinase 5. *Bioessays.* 2006;28(10):1023-34.

100. Ubeda M, Rukstalis JM, Habener JF. Inhibition of cyclin-dependent kinase 5 activity protects pancreatic beta cells from glucotoxicity. *J Biol Chem*. 2006;281(39):28858-64.
101. Dehwah MA, Wang M, Huang QY. CDKAL1 and type 2 diabetes: a global meta-analysis. *Genet Mol Res*. 2010;9(2):1109-20.
102. Jespersen T, Grunnet M, Olesen SP. The KCNQ1 potassium channel: from gene to physiological function. *Physiology (Bethesda)*. 2005;20:408-16.
103. Bokil NJ, Baisden JM, Radford DJ, Summers KM. Molecular genetics of long QT syndrome. *Mol Genet Metab*. 2010;101(1):1-8.
104. Yamagata K, Senokuchi T, Lu M, Takemoto M, Fazlul Karim M, Go C, et al. Voltage-gated K⁺ channel KCNQ1 regulates insulin secretion in MIN6 beta-cell line. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011;407(3):620-5.
105. Rosengren AH, Braun M, Mahdi T, Andersson SA, Travers ME, Shigeto M, et al. Reduced insulin exocytosis in human pancreatic beta-cells with gene variants linked to type 2 diabetes. *Diabetes*. 2012;61(7):1726-33.
106. Tan JT, Nurbaya S, Gardner D, Ye S, Tai ES, Ng DP. Genetic variation in KCNQ1 associates with fasting glucose and beta-cell function: a study of 3,734 subjects comprising three ethnicities living in Singapore. *Diabetes*. 2009;58(6):1445-9.
107. Kim W, Shin YK, Kim BJ, Egan JM. Notch signaling in pancreatic endocrine cell and diabetes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010;392(3):247-51.
108. Sharaf SA, Kantoush NA, Ayoub DF, Ibrahim AA, Abdelaal AA, Aziz RA, et al. Altered expression of WFS1 and NOTCH2 genes associated with diabetic nephropathy in T2DM patients. *Diabetes Res Clin Pract*. 2018;140:304-13.
109. Rasheed MA, Kantoush N, Abd El-Ghaffar N, Farouk H, Kamel S, Ibrahim AA, et al. Expression of JAZF1, ABCC8, KCNJ11 and Notch2 genes and vitamin D receptor polymorphisms in type 2 diabetes, and their association with microvascular complications. *Ther Adv Endocrinol Metab*. 2017;8(6):97-108.
110. Boesgaard TW, Gjesing AP, Grarup N, Rutanen J, Jansson PA, Hribal ML, et al. Variant near ADAMTS9 known to associate with type 2 diabetes is related to insulin resistance in offspring of type 2 diabetes patients--EUGENE2 study. *PLoS One*. 2009;4(9):e7236.
111. Graae AS, Grarup N, Ribel-Madsen R, Lystbaek SH, Boesgaard T, Staiger H, et al. ADAMTS9 Regulates Skeletal Muscle Insulin Sensitivity Through Extracellular Matrix Alterations. *Diabetes*. 2019;68(3):502-14.
112. Grarup N, Andersen G, Krarup NT, Albrechtsen A, Schmitz O, Jorgensen T, et al. Association testing of novel type 2 diabetes risk alleles in the JAZF1, CDC123/CAMK1D, TSPAN8, THADA, ADAMTS9, and NOTCH2 loci with insulin release, insulin sensitivity, and obesity in a population-based sample of 4,516 glucose-tolerant middle-aged Danes. *Diabetes*. 2008;57(9):2534-40.
113. Nakajima T, Fujino S, Nakanishi G, Kim YS, Jetten AM. TIP27: a novel repressor of the nuclear orphan receptor TAK1/TR4. *Nucleic Acids Res*. 2004;32(14):4194-204.
114. Chang YC, Liu PH, Lee WJ, Chang TJ, Jiang YD, Li HY, et al. Common variation in the fat mass and obesity-associated (FTO) gene confers risk of obesity and modulates BMI in the Chinese population. *Diabetes*. 2008;57(8):2245-52.
115. Yang Y, Liu B, Xia W, Yan J, Liu HY, Hu L, et al. FTO Genotype and Type 2 Diabetes Mellitus: Spatial Analysis and Meta-Analysis of 62 Case-Control Studies from Different Regions. *Genes (Basel)*. 2017;8(2).
116. Mizuno TM, Lew PS, Luo Y, Leckstrom A. Negative regulation of hepatic fat mass and obesity associated (Fto) gene expression by insulin. *Life Sci*. 2017;170:50-5.
117. Simonis-Bik AM, Nijpels G, van Haeften TW, Houwing-Duistermaat JJ, Boomsma DI, Reiling E, et al. Gene variants in the novel type 2 diabetes loci CDC123/CAMK1D, THADA, ADAMTS9, BCL11A, and MTNR1B affect different aspects of pancreatic beta-cell function. *Diabetes*. 2010;59(1):293-301.

118. Mulder H, Nagorny CL, Lyssenko V, Groop L. Melatonin receptors in pancreatic islets: good morning to a novel type 2 diabetes gene. *Diabetologia*. 2009;52(7):1240-9.
119. Ali O. Genetics of type 2 diabetes. *World J Diabetes*. 2013;4(4):114-23.
120. Billings LK, Florez JC. The genetics of type 2 diabetes: what have we learned from GWAS? *Ann N Y Acad Sci*. 2010;1212:59-77.
121. Bonnefond A, Froguel P. Rare and common genetic events in type 2 diabetes: what should biologists know? *Cell Metab*. 2015;21(3):357-68.
122. Lyssenko V, Laakso M. Genetic screening for the risk of type 2 diabetes: worthless or valuable? *Diabetes Care*. 2013;36 Suppl 2:S120-6.
123. Plomin R, Haworth CM, Davis OS. Common disorders are quantitative traits. *Nat Rev Genet*. 2009;10(12):872-8.
124. Gibson G. Rare and common variants: twenty arguments. *Nat Rev Genet*. 2012;13(2):135-45.
125. Mitchell KJ. What is complex about complex disorders? *Genome Biol*. 2012;13(1):237.
126. Queitsch C, Carlson KD, Girirajan S. Lessons from model organisms: phenotypic robustness and missing heritability in complex disease. *PLoS Genet*. 2012;8(11):e1003041.
127. Stancakova A, Laakso M. Genetics of Type 2 Diabetes. *Endocr Dev*. 2016;31:203-20.
128. Manolio TA, Collins FS, Cox NJ, Goldstein DB, Hindorff LA, Hunter DJ, et al. Finding the missing heritability of complex diseases. *Nature*. 2009;461(7265):747-53.
129. Consortium STD, Estrada K, Aukrust I, Bjorkhaug L, Burt NP, Mercader JM, et al. Association of a low-frequency variant in HNF1A with type 2 diabetes in a Latino population. *JAMA*. 2014;311(22):2305-14.
130. Steinthorsdottir V, Thorleifsson G, Sulem P, Helgason H, Grarup N, Sigurdsson A, et al. Identification of low-frequency and rare sequence variants associated with elevated or reduced risk of type 2 diabetes. *Nat Genet*. 2014;46(3):294-8.
131. International Schizophrenia C. Rare chromosomal deletions and duplications increase risk of schizophrenia. *Nature*. 2008;455(7210):237-41.
132. Wellcome Trust Case Control C, Craddock N, Hurles ME, Cardin N, Pearson RD, Plagnol V, et al. Genome-wide association study of CNVs in 16,000 cases of eight common diseases and 3,000 shared controls. *Nature*. 2010;464(7289):713-20.
133. Flannick J, Thorleifsson G, Beer NL, Jacobs SB, Grarup N, Burt NP, et al. Loss-of-function mutations in SLC30A8 protect against type 2 diabetes. *Nat Genet*. 2014;46(4):357-63.
134. Rockman MV, Kruglyak L. Genetics of global gene expression. *Nat Rev Genet*. 2006;7(11):862-72.
135. Consortium GT. The Genotype-Tissue Expression (GTEx) project. *Nat Genet*. 2013;45(6):580-5.
136. Das SK, Sharma NK. Expression quantitative trait analyses to identify causal genetic variants for type 2 diabetes susceptibility. *World J Diabetes*. 2014;5(2):97-114.
137. Liang X, He A, Wang W, Liu L, Du Y, Fan Q, et al. Integrating Genome-Wide Association and eQTLs Studies Identifies the Genes and Gene Sets Associated with Diabetes. *Biomed Res Int*. 2017;2017:1758636.
138. Fadista J, Vikman P, Laakso EO, Mollet IG, Esguerra JL, Taneera J, et al. Global genomic and transcriptomic analysis of human pancreatic islets reveals novel genes influencing glucose metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(38):13924-9.
139. van de Bunt M, Manning Fox JE, Dai X, Barrett A, Grey C, Li L, et al. Transcript Expression Data from Human Islets Links Regulatory Signals from Genome-Wide Association Studies for Type 2 Diabetes and Glycemic Traits to Their Downstream Effectors. *PLoS Genet*. 2015;11(12):e1005694.
140. Phillips PC. Epistasis--the essential role of gene interactions in the structure and evolution of genetic systems. *Nat Rev Genet*. 2008;9(11):855-67.

141. Zuk O, Hechter E, Sunyaev SR, Lander ES. The mystery of missing heritability: Genetic interactions create phantom heritability. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(4):1193-8.
142. Grarup N, Andersen G. Gene-environment interactions in the pathogenesis of type 2 diabetes and metabolism. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2007;10(4):420-6.
143. Al-Haddad R, Karnib N, Assaad RA, Bilen Y, Emmanuel N, Ghanem A, et al. Epigenetic changes in diabetes. *Neurosci Lett*. 2016;625:64-9.
144. Ling C, Groop L. Epigenetics: a molecular link between environmental factors and type 2 diabetes. *Diabetes*. 2009;58(12):2718-25.
145. Davegardh C, Garcia-Calzon S, Bacos K, Ling C. DNA methylation in the pathogenesis of type 2 diabetes in humans. *Mol Metab*. 2018;14:12-25.
146. Slomko H, Heo HJ, Einstein FH. Minireview: Epigenetics of obesity and diabetes in humans. *Endocrinology*. 2012;153(3):1025-30.
147. Kato M, Natarajan R. Diabetic nephropathy--emerging epigenetic mechanisms. *Nat Rev Nephrol*. 2014;10(9):517-30.
148. Desiderio A, Spinelli R, Ciccarelli M, Nigro C, Miele C, Beguinot F, et al. Epigenetics: spotlight on type 2 diabetes and obesity. *J Endocrinol Invest*. 2016;39(10):1095-103.
149. Jones PA. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nat Rev Genet*. 2012;13(7):484-92.
150. Pheiffer C, Erasmus RT, Kengne AP, Matsha TE. Differential DNA methylation of microRNAs within promoters, intergenic and intragenic regions of type 2 diabetic, pre-diabetic and non-diabetic individuals. *Clin Biochem*. 2016;49(6):433-8.
151. Jang HS, Shin WJ, Lee JE, Do JT. CpG and Non-CpG Methylation in Epigenetic Gene Regulation and Brain Function. *Genes (Basel)*. 2017;8(6).
152. Kasinska MA, Drzewoski J, Sliwinska A. Epigenetic modifications in adipose tissue - relation to obesity and diabetes. *Arch Med Sci*. 2016;12(6):1293-301.
153. Kim M, Long TI, Arakawa K, Wang R, Yu MC, Laird PW. DNA methylation as a biomarker for cardiovascular disease risk. *PLoS One*. 2010;5(3):e9692.
154. Kwak SH, Park KS. Recent progress in genetic and epigenetic research on type 2 diabetes. *Exp Mol Med*. 2016;48:e220.
155. Geach T. Epigenetics: Blood-based markers for T2DM. *Nat Rev Endocrinol*. 2016;12(6):311.
156. Mutize T, Mkandla Z, Nkambule BB. Global and gene-specific DNA methylation in adult type 2 diabetic individuals: a protocol for a systematic review. *Syst Rev*. 2018;7(1):46.
157. Canivell S, Ruano EG, Siso-Almirall A, Kostov B, Gonzalez-de Paz L, Fernandez-Rebollo E, et al. Differential methylation of TCF7L2 promoter in peripheral blood DNA in newly diagnosed, drug-naive patients with type 2 diabetes. *PLoS One*. 2014;9(6):e99310.
158. van Otterdijk SD, Binder AM, Szarc Vel Szic K, Schwald J, Michels KB. DNA methylation of candidate genes in peripheral blood from patients with type 2 diabetes or the metabolic syndrome. *PLoS One*. 2017;12(7):e0180955.
159. Seman NA, Mohamud WN, Ostenson CG, Brismar K, Gu HF. Increased DNA methylation of the SLC30A8 gene promoter is associated with type 2 diabetes in a Malay population. *Clin Epigenetics*. 2015;7:30.
160. Cheng J, Tang L, Hong Q, Ye H, Xu X, Xu L, et al. Investigation into the promoter DNA methylation of three genes (CAMK1D, CRY2 and CALM2) in the peripheral blood of patients with type 2 diabetes. *Exp Ther Med*. 2014;8(2):579-84.
161. Willmer T, Johnson R, Louw J, Pheiffer C. Blood-Based DNA Methylation Biomarkers for Type 2 Diabetes: Potential for Clinical Applications. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2018;9:744.
162. Olsson AH, Volkov P, Bacos K, Dayeh T, Hall E, Nilsson EA, et al. Genome-wide associations between genetic and epigenetic variation influence mRNA expression and insulin secretion in human pancreatic islets. *PLoS Genet*. 2014;10(11):e1004735.

163. Dayeh TA, Olsson AH, Volkov P, Almgren P, Ronn T, Ling C. Identification of CpG-SNPs associated with type 2 diabetes and differential DNA methylation in human pancreatic islets. *Diabetologia*. 2013;56(5):1036-46.
164. Voisin S, Almen MS, Zheleznyakova GY, Lundberg L, Zarei S, Castillo S, et al. Many obesity-associated SNPs strongly associate with DNA methylation changes at proximal promoters and enhancers. *Genome Med*. 2015;7:103.
165. Fabian MR, Sonenberg N, Filipowicz W. Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs. *Annu Rev Biochem*. 2010;79:351-79.
166. Ha M, Kim VN. Regulation of microRNA biogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014;15(8):509-24.
167. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 2004;116(2):281-97.
168. Valinezhad Orang A, Safaralizadeh R, Kazemzadeh-Bavili M. Mechanisms of miRNA-Mediated Gene Regulation from Common Downregulation to mRNA-Specific Upregulation. *Int J Genomics*. 2014;2014:970607.
169. Yaribeygi H, Katsiki N, Behnam B, Iranpanah H, Sahebkar A. MicroRNAs and type 2 diabetes mellitus: Molecular mechanisms and the effect of antidiabetic drug treatment. *Metabolism*. 2018;87:48-55.
170. Poy MN, Eliasson L, Krutzfeldt J, Kuwajima S, Ma X, Macdonald PE, et al. A pancreatic islet-specific microRNA regulates insulin secretion. *Nature*. 2004;432(7014):226-30.
171. Fernandez-Valverde SL, Taft RJ, Mattick JS. MicroRNAs in beta-cell biology, insulin resistance, diabetes and its complications. *Diabetes*. 2011;60(7):1825-31.
172. He Y, Ding Y, Liang B, Lin J, Kim TK, Yu H, et al. A Systematic Study of Dysregulated MicroRNA in Type 2 Diabetes Mellitus. *Int J Mol Sci*. 2017;18(3).
173. Hariharan M, Scaria V, Brahmachari SK. dbSMR: a novel resource of genome-wide SNPs affecting microRNA mediated regulation. *BMC Bioinformatics*. 2009;10:108.
174. Feng J, Xing W, Xie L. Regulatory Roles of MicroRNAs in Diabetes. *Int J Mol Sci*. 2016;17(10).
175. Chen H, Lan HY, Roukos DH, Cho WC. Application of microRNAs in diabetes mellitus. *J Endocrinol*. 2014;222(1):R1-R10.
176. Kosaka N, Iguchi H, Yoshioka Y, Takeshita F, Matsuki Y, Ochiya T. Secretory mechanisms and intercellular transfer of microRNAs in living cells. *J Biol Chem*. 2010;285(23):17442-52.
177. Creemers EE, Tijssen AJ, Pinto YM. Circulating microRNAs: novel biomarkers and extracellular communicators in cardiovascular disease? *Circ Res*. 2012;110(3):483-95.
178. Keller A, Leidinger P, Bauer A, Elsharawy A, Haas J, Backes C, et al. Toward the blood-borne miRNome of human diseases. *Nat Methods*. 2011;8(10):841-3.
179. Al-Muhtareh HA, Al-Kafaji G. Evaluation of Two-Diabetes Related microRNAs Suitability as Earlier Blood Biomarkers for Detecting Prediabetes and type 2 Diabetes Mellitus. *J Clin Med*. 2018;7(2).
180. Gilad S, Meiri E, Yogev Y, Benjamin S, Lebanony D, Yerushalmi N, et al. Serum microRNAs are promising novel biomarkers. *PLoS One*. 2008;3(9):e3148.
181. Guay C, Regazzi R. Circulating microRNAs as novel biomarkers for diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol*. 2013;9(9):513-21.
182. Kantharidis P, Wang B, Carew RM, Lan HY. Diabetes complications: the microRNA perspective. *Diabetes*. 2011;60(7):1832-7.
183. McClelland AD, Kantharidis P. microRNA in the development of diabetic complications. *Clin Sci (Lond)*. 2014;126(2):95-110.
184. Chien HY, Chen CY, Chiu YH, Lin YC, Li WC. Differential microRNA Profiles Predict Diabetic Nephropathy Progression in Taiwan. *Int J Med Sci*. 2016;13(6):457-65.
185. Al-Kafaji G, Al-Mahroos G, Abdulla Al-Muhtareh H, Sabry MA, Abdul Razzak R, Salem AH. Circulating endothelium-enriched microRNA-126 as a potential biomarker for coronary artery disease in type 2 diabetes mellitus patients. *Biomarkers*. 2017;22(3-4):268-78.

186. Faherty SL, Campbell CR, Larsen PA, Yoder AD. Evaluating whole transcriptome amplification for gene profiling experiments using RNA-Seq. *BMC Biotechnol.* 2015;15:65.
187. Birney E, Smith GD, Grealley JM. Epigenome-wide Association Studies and the Interpretation of Disease -Omics. *PLoS Genet.* 2016;12(6):e1006105.
188. Mutz KO, Heilkenbrinker A, Lonne M, Walter JG, Stahl F. Transcriptome analysis using next-generation sequencing. *Curr Opin Biotechnol.* 2013;24(1):22-30.
189. Nasykhova YA, Barbitoff YA, Serebryakova EA, Katserov DS, Glotov AS. Recent advances and perspectives in next generation sequencing application to the genetic research of type 2 diabetes. *World J Diabetes.* 2019;10(7):376-95.
190. Costa V, Angelini C, De Feis I, Ciccodicola A. Uncovering the complexity of transcriptomes with RNA-Seq. *J Biomed Biotechnol.* 2010;2010:853916.
191. Wilhelm BT, Landry JR. RNA-Seq-quantitative measurement of expression through massively parallel RNA-sequencing. *Methods.* 2009;48(3):249-57.
192. Jenkinson CP, Goring HH, Arya R, Blangero J, Duggirala R, DeFronzo RA. Transcriptomics in type 2 diabetes: Bridging the gap between genotype and phenotype. *Genom Data.* 2016;8:25-36.
193. Segerstolpe A, Palasantza A, Eliasson P, Andersson EM, Andreasson AC, Sun X, et al. Single-Cell Transcriptome Profiling of Human Pancreatic Islets in Health and Type 2 Diabetes. *Cell Metab.* 2016;24(4):593-607.
194. Liew CC, Ma J, Tang HC, Zheng R, Dempsey AA. The peripheral blood transcriptome dynamically reflects system wide biology: a potential diagnostic tool. *J Lab Clin Med.* 2006;147(3):126-32.
195. Mohr S, Liew CC. The peripheral-blood transcriptome: new insights into disease and risk assessment. *Trends Mol Med.* 2007;13(10):422-32.
196. Kahn SE, Cooper ME, Del Prato S. Pathophysiology and treatment of type 2 diabetes: perspectives on the past, present, and future. *Lancet.* 2014;383(9922):1068-83.
197. Li JW, Lee HM, Wang Y, Tong AH, Yip KY, Tsui SK, et al. Interactome-transcriptome analysis discovers signatures complementary to GWAS Loci of Type 2 Diabetes. *Sci Rep.* 2016;6:35228.
198. Standards of Medical Care in Diabetes-2017: Summary of Revisions. *Diabetes Care.* 2017;40(Suppl 1):S4-S5.
199. Expert Panel on Detection E, Treatment of High Blood Cholesterol in A. Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA.* 2001;285(19):2486-97.
200. Cheng AY, Leiter LA. Metabolic syndrome under fire: weighing in on the truth. *Can J Cardiol.* 2006;22(5):379-82.
201. Christodoulou MI, Avgeris M, Kokkinopoulou I, Maratou E, Mitrou P, Kontos CK, et al. Blood-based analysis of type-2 diabetes mellitus susceptibility genes identifies specific transcript variants with deregulated expression and association with disease risk. *Sci Rep.* 2019;9(1):1512.
202. Manchester KL. Value of A260/A280 ratios for measurement of purity of nucleic acids. *Biotechniques.* 1995;19(2):208-10.
203. Shi R, Chiang VL. Facile means for quantifying microRNA expression by real-time PCR. *Biotechniques.* 2005;39(4):519-25.
204. Lutfalla G, Uze G. Performing quantitative reverse-transcribed polymerase chain reaction experiments. *Methods Enzymol.* 2006;410:386-400.
205. Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonak J, Lind K, et al. The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med.* 2006;27(2-3):95-125.
206. Valasek MA, Repa JJ. The power of real-time PCR. *Adv Physiol Educ.* 2005;29(3):151-9.

207. Zipper H, Brunner H, Bernhagen J, Vitzthum F. Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. *Nucleic Acids Res.* 2004;32(12):e103.
208. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc.* 2008;3(6):1101-8.
209. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001;25(4):402-8.
210. Oturai DB, Sondergaard HB, Bornsen L, Sellebjerg F, Christensen JR. Identification of Suitable Reference Genes for Peripheral Blood Mononuclear Cell Subset Studies in Multiple Sclerosis. *Scand J Immunol.* 2016;83(1):72-80.
211. Usarek E, Baranczyk-Kuzma A, Kazmierczak B, Gajewska B, Kuzma-Kozakiewicz M. Validation of qPCR reference genes in lymphocytes from patients with amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS One.* 2017;12(3):e0174317.
212. Kokkinopoulou I, Maratou E, Mitrou P, Boutati E, Sideris DC, Fragoulis EG, et al. Decreased expression of microRNAs targeting type-2 diabetes susceptibility genes in peripheral blood of patients and predisposed individuals. *Endocrine.* 2019;66(2):226-39.
213. Schwarzenbach H, da Silva AM, Calin G, Pantel K. Data Normalization Strategies for MicroRNA Quantification. *Clin Chem.* 2015;61(11):1333-42.
214. Tost J, Gut IG. DNA methylation analysis by pyrosequencing. *Nat Protoc.* 2007;2(9):2265-75.
215. Delaney C, Garg SK, Yung R. Analysis of DNA Methylation by Pyrosequencing. *Methods Mol Biol.* 2015;1343:249-64.
216. Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev.* 2002;16(1):6-21.
217. Klutstein M, Nejman D, Greenfield R, Cedar H. DNA Methylation in Cancer and Aging. *Cancer Res.* 2016;76(12):3446-50.
218. Jones PA, Baylin SB. The epigenomics of cancer. *Cell.* 2007;128(4):683-92.
219. Laird PW. The power and the promise of DNA methylation markers. *Nat Rev Cancer.* 2003;3(4):253-66.
220. Carriao M, Lennon G. SNPedia: a wiki supporting personal genome annotation, interpretation and analysis. *Nucleic Acids Res.* 2012;40(Database issue):D1308-12.
221. Wei FY, Nagashima K, Ohshima T, Saheki Y, Lu YF, Matsushita M, et al. Cdk5-dependent regulation of glucose-stimulated insulin secretion. *Nat Med.* 2005;11(10):1104-8.
222. Cho S, Jang I, Jun Y, Yoon S, Ko M, Kwon Y, et al. MiRGator v3.0: a microRNA portal for deep sequencing, expression profiling and mRNA targeting. *Nucleic Acids Res.* 2013;41(Database issue):D252-7.
223. Chou CH, Shrestha S, Yang CD, Chang NW, Lin YL, Liao KW, et al. miRTarBase update 2018: a resource for experimentally validated microRNA-target interactions. *Nucleic Acids Res.* 2018;46(D1):D296-D302.
224. Hamberg M, Backes C, Fehlmann T, Hart M, Meder B, Meese E, et al. MiRTargetLink--miRNAs, Genes and Interaction Networks. *Int J Mol Sci.* 2016;17(4):564.
225. Vlachos IS, Paraskevopoulou MD, Karagkouni D, Georgakilas G, Vergoulis T, Kanellos I, et al. DIANA-TarBase v7.0: indexing more than half a million experimentally supported miRNA:mRNA interactions. *Nucleic Acids Res.* 2015;43(Database issue):D153-9.
226. Lee YJ, Kim V, Muth DC, Witwer KW. Validated MicroRNA Target Databases: An Evaluation. *Drug Dev Res.* 2015;76(7):389-96.
227. Szklarczyk D, Franceschini A, Wyder S, Forslund K, Heller D, Huerta-Cepas J, et al. STRING v10: protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life. *Nucleic Acids Res.* 2015;43(Database issue):D447-52.
228. Kanehisa M, Goto S. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res.* 2000;28(1):27-30.
229. Ridderstrale M, Nilsson E. Type 2 diabetes candidate gene CAPN10: first, but not last. *Curr Hypertens Rep.* 2008;10(1):19-24.

230. Barhanin J, Lesage F, Guillemare E, Fink M, Lazdunski M, Romey G. K(V)LQT1 and IsK (minK) proteins associate to form the I(Ks) cardiac potassium current. *Nature*. 1996;384(6604):78-80.
231. Ullrich S, Su J, Ranta F, Wittekindt OH, Ris F, Rosler M, et al. Effects of I(Ks) channel inhibitors in insulin-secreting INS-1 cells. *Pflugers Arch*. 2005;451(3):428-36.
232. Mussig K, Staiger H, Machicao F, Kirchhoff K, Guthoff M, Schafer SA, et al. Association of type 2 diabetes candidate polymorphisms in KCNQ1 with incretin and insulin secretion. *Diabetes*. 2009;58(7):1715-20.
233. Yasuda K, Miyake K, Horikawa Y, Hara K, Osawa H, Furuta H, et al. Variants in KCNQ1 are associated with susceptibility to type 2 diabetes mellitus. *Nat Genet*. 2008;40(9):1092-7.
234. Ching YP, Leong VY, Wong CM, Kung HF. Identification of an autoinhibitory domain of p21-activated protein kinase 5. *J Biol Chem*. 2003;278(36):33621-4.
235. Ohara-Imaizumi M, Yoshida M, Aoyagi K, Saito T, Okamura T, Takenaka H, et al. Deletion of CDKAL1 affects mitochondrial ATP generation and first-phase insulin exocytosis. *PLoS One*. 2010;5(12):e15553.
236. Li Q, Liu X, Zhang M, Ye G, Qiao Q, Ling Y, et al. Characterization of a novel human CDK5 splicing variant that inhibits Wnt/beta-catenin signaling. *Mol Biol Rep*. 2010;37(5):2415-21.
237. Elghazi L, Gould AP, Weiss AJ, Barker DJ, Callaghan J, Opland D, et al. Importance of beta-Catenin in glucose and energy homeostasis. *Sci Rep*. 2012;2:693.
238. Kong Y, Sharma RB, Nwosu BU, Alonso LC. Islet biology, the CDKN2A/B locus and type 2 diabetes risk. *Diabetologia*. 2016;59(8):1579-93.
239. Popov N, Gil J. Epigenetic regulation of the INK4b-ARF-INK4a locus: in sickness and in health. *Epigenetics*. 2010;5(8):685-90.
240. Hannou SA, Wouters K, Paumelle R, Staels B. Functional genomics of the CDKN2A/B locus in cardiovascular and metabolic disease: what have we learned from GWASs? *Trends Endocrinol Metab*. 2015;26(4):176-84.
241. Li WQ, Pfeiffer RM, Hyland PL, Shi J, Gu F, Wang Z, et al. Genetic polymorphisms in the 9p21 region associated with risk of multiple cancers. *Carcinogenesis*. 2014;35(12):2698-705.
242. Carling D. AMPK signalling in health and disease. *Curr Opin Cell Biol*. 2017;45:31-7.
243. Rosenberg RN, Lambracht-Washington D, Yu G, Xia W. Genomics of Alzheimer Disease: A Review. *JAMA Neurol*. 2016;73(7):867-74.
244. Telerman A, Amson R. The molecular programme of tumour reversion: the steps beyond malignant transformation. *Nat Rev Cancer*. 2009;9(3):206-16.
245. Robertson KD, Jones PA. Tissue-specific alternative splicing in the human INK4a/ARF cell cycle regulatory locus. *Oncogene*. 1999;18(26):3810-20.
246. Irvine M, Philipasz S, Frausto M, Mijatov B, Gallagher SJ, Fung C, et al. Amino terminal hydrophobic import signals target the p14(ARF) tumor suppressor to the mitochondria. *Cell Cycle*. 2010;9(4):829-39.
247. Chung SS, Ahn BY, Kim M, Choi HH, Park HS, Kang S, et al. Control of adipogenesis by the SUMO-specific protease SENP2. *Mol Cell Biol*. 2010;30(9):2135-46.
248. El Kharbili M, Robert C, Witkowski T, Danty-Berger E, Barbolat-Boutrand L, Masse I, et al. Tetraspanin 8 is a novel regulator of ILK-driven beta1 integrin adhesion and signaling in invasive melanoma cells. *Oncotarget*. 2017;8(10):17140-55.
249. Fang T, Lin J, Wang Y, Chen G, Huang J, Chen J, et al. Tetraspanin-8 promotes hepatocellular carcinoma metastasis by increasing ADAM12m expression. *Oncotarget*. 2016;7(26):40630-43.
250. Maisonia-Besset A, Witkowski T, Navarro-Teulon I, Berthier-Vergnes O, Fois G, Zhu Y, et al. Tetraspanin 8 (TSPAN 8) as a potential target for radio-immunotherapy of colorectal cancer. *Oncotarget*. 2017;8(13):22034-47.

251. Rippe V, Drieschner N, Meiboom M, Murua Escobar H, Bonk U, Belge G, et al. Identification of a gene rearranged by 2p21 aberrations in thyroid adenomas. *Oncogene*. 2003;22(38):6111-4.
252. van de Bunt M, Gaulton KJ, Parts L, Moran I, Johnson PR, Lindgren CM, et al. The miRNA profile of human pancreatic islets and beta-cells and relationship to type 2 diabetes pathogenesis. *PLoS One*. 2013;8(1):e55272.
253. Ortega FJ, Mercader JM, Moreno-Navarrete JM, Rovira O, Guerra E, Esteve E, et al. Profiling of circulating microRNAs reveals common microRNAs linked to type 2 diabetes that change with insulin sensitization. *Diabetes Care*. 2014;37(5):1375-83.
254. Xiang Y, Cheng J, Wang D, Hu X, Xie Y, Stitham J, et al. Hyperglycemia repression of miR-24 coordinately upregulates endothelial cell expression and secretion of von Willebrand factor. *Blood*. 2015;125(22):3377-87.
255. Zampetaki A, Kiechl S, Drozdov I, Willeit P, Mayr U, Prokopi M, et al. Plasma microRNA profiling reveals loss of endothelial miR-126 and other microRNAs in type 2 diabetes. *Circ Res*. 2010;107(6):810-7.
256. Gallagher IJ, Scheele C, Keller P, Nielsen AR, Remenyi J, Fischer CP, et al. Integration of microRNA changes in vivo identifies novel molecular features of muscle insulin resistance in type 2 diabetes. *Genome Med*. 2010;2(2):9.
257. Yang Z, Wu J. MicroRNAs and regenerative medicine. *DNA Cell Biol*. 2007;26(4):257-64.
258. Santovito D, De Nardis V, Marcantonio P, Mandolini C, Paganelli C, Vitale E, et al. Plasma exosome microRNA profiling unravels a new potential modulator of adiponectin pathway in diabetes: effect of glycemic control. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014;99(9):E1681-5.
259. Yang Z, Chen H, Si H, Li X, Ding X, Sheng Q, et al. Serum miR-23a, a potential biomarker for diagnosis of pre-diabetes and type 2 diabetes. *Acta Diabetol*. 2014;51(5):823-31.
260. Xiang Y. miR-24 in diabetes. *Oncotarget*. 2015;6(19):16816-7.
261. Chen JF, Mandel EM, Thomson JM, Wu Q, Callis TE, Hammond SM, et al. The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation. *Nat Genet*. 2006;38(2):228-33.
262. Xu C, Lu Y, Pan Z, Chu W, Luo X, Lin H, et al. The muscle-specific microRNAs miR-1 and miR-133 produce opposing effects on apoptosis by targeting HSP60, HSP70 and caspase-9 in cardiomyocytes. *J Cell Sci*. 2007;120(Pt 17):3045-52.
263. Fichtlscherer S, Zeiher AM, Dimmeler S. Circulating microRNAs: biomarkers or mediators of cardiovascular diseases? *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011;31(11):2383-90.
264. Gangwar RS, Rajagopalan S, Natarajan R, DeJulius JA. Noncoding RNAs in Cardiovascular Disease: Pathological Relevance and Emerging Role as Biomarkers and Therapeutics. *Am J Hypertens*. 2018;31(2):150-65.
265. Liu X, Liu S. Role of microRNAs in the pathogenesis of diabetic cardiomyopathy. *Biomed Rep*. 2017;6(2):140-5.
266. Collins KK. The diabetes-cancer link. *Diabetes Spectr*. 2014;27(4):276-80.
267. Barres R, Zierath JR. DNA methylation in metabolic disorders. *Am J Clin Nutr*. 2011;93(4):897S-900.
268. Ling C, Ronn T. Epigenetic markers to further understand insulin resistance. *Diabetologia*. 2016;59(11):2295-7.
269. Zhou Z, Sun B, Li X, Zhu C. DNA methylation landscapes in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Nutr Metab (Lond)*. 2018;15:47.
270. Bansal A, Pinney SE. DNA methylation and its role in the pathogenesis of diabetes. *Pediatr Diabetes*. 2017;18(3):167-77.
271. Li L, Zhang C, Zi X, Tu Q, Guo K. Epigenetic modulation of Cdk5 contributes to memory deficiency induced by amyloid fibrils. *Exp Brain Res*. 2015;233(1):165-73.

272. Cai HB, Fan ZZ, Tian T, Zhao CC, Ge ZM. Epigenetic Control of CDK5 Promoter Regulates Diabetes-Associated Development of Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis.* 2019;69(3):743-50.

Περίληψη

Ο Σακχαρώδης Διαβήτης τύπου 2 (ΣΔτ2) αποτελεί μια χρόνια μεταβολική πολυπαραγοντική διαταραχή που χαρακτηρίζεται από υψηλά επίπεδα γλυκόζης αίματος και συνδέεται με την ινσουλινοαντοχή ή/και την ανεπάρκεια ινσουλίνης. Κατά την τελευταία δεκαετία, πάνω από 60 μελέτες σάρωσης ολόκληρου του γονιδιώματος (Genome-Wide Association Studies- GWAS) αποκάλυψαν την παρουσία περισσότερων από 250 νουκλεοτιδικών πολυμορφισμών (Single Nucleotide Polymorphism- SNPs) που συνδέονται με την ανάπτυξη ΣΔτ2. Ωστόσο, το μέγεθος της επίδρασης κάθε ενός από αυτούς στον κίνδυνο εμφάνισης της νόσου παραμένει ιδιαίτερα χαμηλό και δεν μπορεί να εξηγήσει μεγάλο μέρος της κληρονομικότητάς της (<30%). Δεδομένου ακόμη, ότι η πλειονότητα των πολυμορφισμών αυτών εδράζονται σε μη κωδικοποιούσες περιοχές του γονιδιώματος, καθιστά δύσκολη την διερεύνηση των μηχανισμών παθογένειας της νόσου καθώς και την ταυτοποίηση των «ένοχων» - για τη νόσο- γονιδίων.

Η σύνδεση μεταξύ του γονοτύπου και του φαινοτύπου επιχειρείται σήμερα με τη μελέτη του συνόλου του μεταγραφώματος, που θεωρείται ότι αντικατοπτρίζει τη λειτουργικότητα των γονιδίων αλλά και του επιγενώματος που ρυθμίζει την έκφραση του πρώτου. Μέχρι σήμερα, το προφίλ του μεταγραφώματος του ΣΔτ2 στον άνθρωπο δεν έχει μελετηθεί. Η αδυναμία πρόσβασης στους ιστούς-στόχους της νόσου, όπως ο παγκρεατικός ιστός, πιθανά υπήρξε ο κύριος ανασταλτικός παράγοντας για τέτοιου είδους μελέτες. Ωστόσο, ερευνητικά δεδομένα έχουν δείξει ότι το προφίλ έκφρασης των γονιδίων των κυττάρων του περιφερικού αίματος αντανακλά σε σημαντικά υψηλό ποσοστό (>80%) το αντίστοιχο προφίλ άλλων ιστών του οργανισμού, μεταξύ των οποίων ιστών-στόχων νοσημάτων, και οι μεταβολές του σε αυτό αντικατοπτρίζουν αλλαγές στο μικρο- και μακρο- περιβάλλον των τελευταίων.

Με βάση τα παραπάνω δεδομένα, στόχος της παρούσας διδακτορικής διατριβής τέθηκε η μελέτη του μοριακού προφίλ των ασθενών με ΣΔτ2 διαμέσου γενετικών και επιγενετικών δεικτών καθώς και η σχέση αυτών με συγκεκριμένους κλινικοπαθολογικούς και προδιαθεσικούς παράγοντες της νόσου, εφαρμόζοντας υψηλής ανάλυσης, σύγχρονες μεθοδολογίες αλληλούχησης και ποσοτικοποίησης γονιδίων. Αρχικά, εστιαστήκαμε στη μελέτη των επιπέδων έκφρασης 24 γονιδίων (*TCF7L2*, *IGF2BP2*, *SLC30A8*, *KCNQ1*, *FTO*, *JAZF1*, *CDKN2A*, *CDKAL1*, *KCNJ11*, *NOTCH2*, *PPARG*, *HHEX*, *CDK5*, *CDC123*, *THADA*, *CAMK1D*, *ADAMTS9*, *WFS1*, *CDKN2B*, *HNF1B*, *CAPN10*, *TSPAN8*, *MTNR1B*, *HNF4A*) τα οποία είναι γνωστό από τις μελέτες GWAS ότι φέρουν SNPs που σχετίζονται με τον αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης ΣΔτ2. Τα επίπεδα έκφρασης των προαναφερόμενων γονιδίων μελετήθηκαν στο περιφερικό αίμα καλά χαρακτηρισμένων ασθενών και υγιών δοτών, αναπτύσσοντας κατάλληλα πρωτόκολλα

ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου (qPCR). Από τα αποτελέσματα αυτά προέκυψε ότι, οι ασθενείς με ΣΔτ2 εμφανίζουν υψηλότερα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *CDK5* ($p=0.0056$), *CDKN2A* ($p=0.0411$) και *TSPAN8* ($p=0.0511$), συγκριτικά με τους υγιείς δότες.

Ακολούθως της ποσοτικοποίησης των συνολικών επιπέδων έκφρασης των 24 γονιδίων, πραγματοποιήθηκαν πειράματα RNA αλληλούχησης σε αντιπροσωπευτικά δείγματα περιφερικού αίματος ασθενών και υγιών δοτών με σκοπό τη μελέτη των επιπέδων έκφρασης των επιμέρους εναλλακτικών μεταγράφων των υπό μελέτη γονιδίων. Ο έλεγχος/επαλήθευση των ενδείξεων της διαφορικής έκφρασης των μεταγράφων που προέκυψαν από τα πειράματα αυτά, πραγματοποιήθηκε έπειτα στο σύνολο του πληθυσμού της μελέτης, αναπτύσσοντας αντίστοιχα πρωτόκολλα qPCR. Από την ανάλυση και την επεξεργασία των δεδομένων με κατάλληλες στατιστικές δοκιμασίες προέκυψε ότι οι ασθενείς με ΣΔτ2 εμφανίζουν μειωμένα επίπεδα έκφρασης των μεταγράφων *CAPN10* tv3 ($p=0.0004$) και *KCNQ1* tv1 ($p=0.0761$) και αυξημένα επίπεδα έκφρασης των μεταγράφων *CDK5* tv1 ($p=0.0034$), *CDKN2A* tv3 ($p=0.0035$), *CDKN2A* tv4 ($p=0.0125$) *CDK5* tv2 ($p=0.0367$), *THADA* tv5 ($p=0.0479$) καθώς και του μεταγράφου *IGF2BP2* tv7 ($p=0.22$), συγκρινόμενοι με του υγιείς δότες. Τα επίπεδα έκφρασης των παραπάνω μεταγράφων συσχετίστηκαν, επιπλέον, με συγκεκριμένες κλινικοπαθολογικές παραμέτρους της νόσου και μάλιστα με διαφορετικό πρότυπο μεταξύ των ομάδων.

Επόμενος στόχος της παρούσας διδακτορικής διατριβής τέθηκε η διερεύνηση των μηχανισμών ρύθμισης της έκφρασης των γονιδίων που διαφοροποιήθηκαν- ως προς τα επίπεδα έκφρασής τους- μεταξύ των ομάδων διαμέσου της μελέτης των miRNAs, που επιβεβαιωμένα στοχεύουν τα γονίδια αυτά, και του προφίλ μεθυλίωσης των υποκινητών τους. Για το σκοπό αυτό, πραγματοποιήθηκε αρχικά αναζήτηση σε κατάλληλες βάσεις δεδομένων για τον εντοπισμό των miRNAs που επιβεβαιωμένα πειραματικά στοχεύουν τα ακόλουθα γονίδια διαφορικής έκφρασης: *CAPN10*, *CDK5*, *CDKN2A*, *IGF2BP2*, *KCNQ1*, *THADA* και *TSPAN8*. Η αναζήτηση αυτή οδήγησε στην ταυτοποίηση 14 miRNAs (let-7b-5p, let-7g-5p, miR-1-3p, miR-10b-5p, miR-24-3p, miR-29a-3p, miR-29b-3p, miR-34a-5p, miR-98-5p, miR-124-3p, miR-125b-5p, miR-133a-3p, miR-155-5p και miR-5682) τα οποία μελετήθηκαν αρχικά, ως προς τα επίπεδα έκφρασής τους, στο περιφερικό αίμα των ασθενών και των υγιών δοτών, αναπτύσσοντας κατάλληλα πρωτόκολλα qPCR. Από τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων προέκυψε ότι, οι ασθενείς με ΣΔτ2 εμφανίζουν χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης των miRNAs: let-7b-5p ($p=0.0014$), miR-1-3p ($p<0.0001$), miR-24-3p ($p=0.0084$), miR-34a-5p ($p<0.0001$), miR-98-5p ($p=0.0013$), miR133a-3p ($p=0.0003$) και miR-125b-5p ($p=0.0801$), συγκρινόμενοι με τους υγιείς δότες. Ακόμη, τα επίπεδα έκφρασης των miRNAs που διαφοροποιήθηκαν μεταξύ υγιών και ασθενών με ΣΔτ2 συσχετίστηκαν (θετικά ή αρνητικά) με τα επίπεδα έκφρασης των mRNAs-

στόχων τους καθώς και με συγκεκριμένες κλινικοπαθολογικές παραμέτρους της νόσου με διαφορετικό πρότυπο μεταξύ των ομάδων. Σε μια περαιτέρω προσπάθεια ενίσχυσης της υπόθεσης της πιθανής εμπλοκής των παραπάνω miRNAs στην παθογένεια του ΣΔτ2, ακολούθησε αναζήτηση σε συγκεκριμένες βάσεις δεδομένων για την εύρεση όλων των γονιδίων-στόχων των miRNAs διαφορικής έκφρασης μεταξύ των ομάδων. Η ανάλυση αυτή ανέδειξε ότι τα παραπάνω miRNAs στοχεύουν γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες που εμπλέκονται σε σημαντικό βαθμό σε μονοπάτια που σχετίζονται με την εμφάνιση ΣΔτ2, συμπεριλαμβανομένων των PI3K-Akt, HIF-1, MAPK, FoxO καθώς και με το σηματοδοτικό μονοπάτι της ινσουλίνης.

Για τη μελέτη του προφίλ μεθυλίωσης των υποκινητών των γονιδίων διαφορικής έκφρασης η μελέτη εστιάστηκε στα γονίδια *CDK5*, *CDKN2A* και *TSPAN8*, τα οποία παρουσίαζαν διαφορετικά επίπεδα έκφρασης, ως προς το σύνολο των μεταγράφων τους, μεταξύ των ομάδων. Η αναζήτηση σε κατάλληλες βάσεις δεδομένων για την εύρεση πιθανών CpG νησίδων στην περιοχή των υποκινητών οδήγησε στη μελέτη 8 CpG νησίδων (θέσεις -274 έως -243 ως προς τη θέση έναρξης της μεταγραφής (TSS)) για το *CDK5* και 6 CpG νησίδων (θέσεις -210 έως -158, ως προς το TSS), για το *CDKN2A* ενώ αντίστοιχες περιοχές δεν εντοπίστηκαν στην περίπτωση του *TSPAN8*. Για τη διερεύνηση του ποσοστού μεθυλίωσης των προαναφερόμενων περιοχών αναπτύχθηκαν κατάλληλα πρωτόκολλα πυροαλληλούχησης σε DNA δείγματα περιφερικού αίματος από ασθενείς και υγιείς δότες. Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων ανέδειξε ότι το γονίδιο *CDK5* στους ασθενείς με ΣΔτ2 εμφανίζει μια τάση αύξησης του μέσου όρου του ποσοστού μεθυλίωσης ($p=0.08$) στις υπό μελέτη θέσεις με σημαντικότερες διαφορές στη θέση της κυτοσίνης -271 (ως προς το TSS) ($p=0.03$), συγκριτικά με τους υγιείς δότες.

Τα παραπάνω αποτελέσματα περιγράφουν μια -ειδική για το ΣΔτ2- γενετική και επιγενετική «υπογραφή», στο περιφερικό αίμα ασθενών με ΣΔτ2 και υγιών δοτών. Η διαφορική έκφραση των επιμέρους μεταγράφων των γονιδίων καθώς και των miRNAs που πειραματικά επιβεβαιωμένα στοχεύουν τα γονίδια αυτά θα μπορούσε πιθανόν να συνδέεται με τους υποκείμενους παθοφυσιολογικούς μηχανισμούς που εμπλέκονται στην ανάπτυξη του ΣΔτ2 και υποδηλώνει την ύπαρξη πολύπλοκων μηχανισμών που ρυθμίζουν τη γονιδιακή έκφραση. Τα αποτελέσματα αναμένεται να συμβάλλουν σε μελλοντικές μελέτες βιολογίας συστημάτων με στόχο τη διερεύνηση των παθογενετικών μηχανισμών του ΣΔτ2 αλλά και σε μεγάλης- κλίμακας κλινικές μελέτες πληθυσμών με στόχο την ανάδειξη νέων πιθανών βιοδεικτών για την πρόγνωση, διάγνωση και τη θεραπευτική αντιμετώπιση των ασθενών. Τα παραπάνω αποτελέσματα έχουν δημοσιευτεί στο περιοδικό Scientific Reports καθώς και στο περιοδικό

Endocrine το 2019, ενώ τα δεδομένα που αφορούν τα αποτελέσματα της μεθυλίωσης του γονιδίου *CDK5* είναι προς δημοσίευση.

Abstract

Type 2 Diabetes mellitus (T2D) is a chronic metabolic disorder which is characterized by high blood glucose levels and associated with insulin resistance and/or insulin deficiency. During the last decade, over 60 Genome Wide Association Studies (GWAS) revealed more than 250 Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) related to T2D or glycemic traits. However, each of them individually increases disease risk with rather modest effect sizes and can not explain the inheritance of the disease (<30%). Moreover, the fact that the vast majority of them are harbored in non-coding DNA regions, makes difficult the investigation of the pathogenic mechanisms as well as the identification of the 'causal' genes of the disease.

The implication of the genome in the development of human disorders can be elucidated through the study of the transcriptome, given that the last reflects functionality, and epigenome, which regulates the expression of the first. Until today, the gene expression signature of T2D has been hardly investigated, mainly due to difficulties in obtaining biopsy specimens, including pancreatic tissue, from the T2D-target tissues of living donors. However, recent evidence supports that the gene-expression profile of peripheral blood cells reflects significantly (>80%) the gene-expression profile of other tissues, including disease-affected tissues, and that changes in the former mirror changes in the micro- and macro-environment of the latter.

Based on the above data, the aim of this thesis was to investigate the molecular profile of T2D patients through the study of genetic and epigenetic markers and explore possible associations with disease parameters and risk factors, applying high-throughput and highly sensitive molecular methodologies of RNA sequencing and quantification (RNA-Seq, Pyrosequencing and Real-Time PCR). Initially, we focus on the study of the expression profile of 24 T2D susceptibility genes (*TCF7L2*, *IGF2BP2*, *SLC30A8*, *KCNQ1*, *FTO*, *JAZF1*, *CDKN2A*, *CDKAL1*, *KCNJ11*, *NOTCH2*, *PPARG*, *HHEX*, *CDK5*, *CDC123*, *THADA*, *CAMK1D*, *ADAMTS9*, *WFS1*, *CDKN2B*, *HNF1B*, *CAPN10*, *TSPAN8*, *MTNR1B*, *HNF4A*), which are known from GWAS studies that bear SNPs associated with T2D development and/or characteristics of the disease. For the evaluation of the expression profile of the abovementioned genes, we applied in the peripheral blood of T2D patients and healthy individuals quantitative PCR (qPCR) methodology. As a result, our data revealed that T2D patients exhibit higher expression levels of the genes *CDK5* ($p=0.0056$), *CDKN2A* ($p=0.0411$) and *TSPAN8* ($p=0.0511$), compared to healthy individuals.

Following the quantification of the expression levels of the abovementioned genes, we studied also the expression patterns of their individual transcript variants, applying RNA-Seq methodology in representative peripheral blood samples of T2D patients and healthy

individuals. After collecting data from RNA-Seq assays, we further evaluated the expression levels of certain transcript variants of T2D-susceptibility genes- found to be differentially expressed in the representative samples of T2D patients- in the total cohort of the study, applying Real- Time PCR methodology. Statistical analysis revealed that T2D patients exhibit lower expression levels of the transcript variants (tv): *CAPN10* tv3 ($p=0.0004$) and *KCNQ1* tv1 ($p=0.0761$) and higher expression levels of the tv: *CDK5* tv1 ($p=0.0034$), *CDKN2A* tv3 ($p=0.0035$), *CDKN2A* tv4 ($p=0.0125$) *CDK5* tv2 ($p=0.0367$), *THADA* tv5 ($p=0.0479$) and *IGF2BP2* tv7 ($p=0.22$), compared to healthy individuals. mRNA levels of the abovementioned transcript variants also correlated with certain clinicopathological parameters of the disease. Moreover, these correlations differed between the two groups: T2D patients and healthy individuals.

The next aim of this thesis was to investigate the regulation mechanisms of gene expression through the study of miRNAs which are experimentally validated to target the differentially expressed genes/tv and to study the methylation profile of these genes in the peripheral blood of T2D patients and healthy individuals. To start with, a panel of 14 miRNAs (let-7b-5p, let-7g-5p, miR-1-3p, miR-10b-5p, miR-24-3p, miR-29a-3p, miR-29b-3p, miR-34a-5p, miR-98-5p, miR-124-3p, miR-125b-5p, miR-133a-3p, miR-155-5p and miR-5682) validated to target the *CDKN2A*, *CDK5*, *IGF2BP2*, *KCNQ1*, and *TSPAN8* genes, was developed upon combined search throughout suitable algorithms. The expression patterns of the abovementioned miRNAs were studied in the peripheral blood of T2D patients and healthy individuals, applying specific Real- Time PCR protocols. Statistical analysis revealed that T2D patients expressed lower levels of let-7b-5p ($p=0.0014$), miR-1-3p ($p<0.0001$), miR-24-3p ($p=0.0084$), miR-34a-5p ($p<0.0001$), miR-98-5p ($p=0.0013$), miR133a-3p ($p=0.0003$) and miR-125b-5p ($p=0.0801$), compared to healthy individuals. Furthermore, the expression levels of these miRNAs correlated (positively or negatively) with the expression levels of their mRNA-targets as well as with certain clinicopathological parameters of the disease, even with different patterns between the groups. In an attempt to further support our suggestion on the possible involvement of these differentially expressed miRNAs in T2D pathogenesis, we searched for T2D-related molecular pathways regulated by these miRNAs, following a bioinformatics approach. Our data revealed enhanced regulation of PI3K-Akt, HIF-1, MAPK, FoxO, and insulin signaling pathways, all pivotally involved in T2D pathogenesis.

In order to study the methylation profile of the -differentially expressed- genes *CDK5*, *CDKN2A* and *TSPAN8*, we searched in suitable databases to find CpG islands in the promoter region of these genes, which are known to be potential regulatory sites. In this way, we decided to study the percentage of methylation of 8 CpG sites (sites: from -274 to -243, regarding the

Transcription Start Site- TSS) in the case of *CDK5* and 6 CpG sites (sites: from -210 to -158, regarding TSS), in the case of *CDKN2A*, while corresponding regions were not detected in the case of the gene *TSPAN8*. For the evaluation of the percentage of methylation in the abovementioned sites of the genes' promoters, we applied Pyrosequencing methodology in DNA samples from peripheral blood of T2D patients and healthy individuals. Statistical analysis revealed that T2D patients exhibited general higher percentage of methylation in the promoter region of the gene *CDK5* ($p=0.08$), with statistically significant results for the position -271 (regarding TSS) ($p=0.03$), compared to healthy individuals.

Our data revealed a T2D- specific «signature» through the investigation of genetic and epigenetic markers in the peripheral blood of T2D patients and healthy individuals. The differential expression patterns of the specific transcript variants of the T2D- susceptibility genes as well as the differential expression pattern of miRNAs which are experimentally validated to target these genes could be related to the underlying pathophysiological mechanisms involved in the development of the disease and suggest the presence of complex molecular mechanisms that can regulate gene expression. Future research is required to elucidate the involvement of these genetic and epigenetic markers in molecular and biochemical networks underlying T2D pathogenesis. Also, large-scale perspective clinical studies are needed to evaluate their potential to serve as possible biomarkers for the diagnosis, prognosis and/or monitoring of the disease. The abovementioned data have been published in the Scientific Reports and Endocrine journal, while the paper which regards the data of methylation is under preparation.

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

ΙΩΑΝΝΑ ΚΟΚΚΙΝΟΠΟΥΛΟΥ

ΠΡΟΣΩΠΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ

📍 Μοναστηρίου 20, Ίλιον, 13123, Αθήνα, Ελλάδα

📞 +306984050911 📠 2105026282

✉️ iwanna-k@biol.uoa.gr

Φύλο Θήλυ | Ημερομηνία γέννησης 06/11/1988 | Εθνικότητα Ελληνική

ΞΕΝΕΣ ΓΛΩΣΣΕΣ

Αγγλικά, Certificate of Proficiency in English (ECPE), University of Michigan

Γερμανικά, Goethe-Zertifikat B2

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ

Υποψήφια διδάκτωρ, Τομέας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Σχολή Θετικών Επιστημών, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών (ΕΚΠΑ) (2014-2019)

Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης «ΚΛΙΝΙΚΗ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ-ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ», Τμήμα Βιολογίας, Σχολή Θετικών Επιστημών, Εθνικό Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών (ΕΚΠΑ) (2011-2014) Βαθμός: 8,9/10 «Άριστα»

Πτυχίο Βιολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Σχολή Θετικών Επιστημών, Εθνικό Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών (ΕΚΠΑ) (2006-2011) Βαθμός: 6,68/10 «Λίαν καλώς»

ΒΡΑΒΕΙΑ ΚΑΙ ΔΙΑΚΡΙΣΕΙΣ

1) Χρηματικό βραβείο της Eurobank «Η μεγάλη στιγμή για την παιδεία» (2006)

Επιβράβευση των αριστούχων φοιτητών με τον υψηλότερο βαθμό πρόσβασης στην τριτοβάθμια εκπαίδευση

2) Υποτροφία συμμετοχής στο 67^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ελληνικής Εταιρείας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας, Ιωάννινα (25-27/11/2016)

3) Υποτροφία συμμετοχής στο DAAD-Workshop, Essen, Germany (15-16/09/2017)

4) Διδακτορική υπότροφος μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού, Εκπαίδευση και Διά Βίου Μάθηση», στο πλαίσιο της Πράξης «Πρόγραμμα Χορήγησης Υποτροφιών για Μεταπτυχιακές Σπουδές Δευτέρου Κύκλου Σπουδών» (MIS-5003404), που υλοποιεί το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών (ΙΚΥ) (2017-2018)

5) Αρωγό μέλος στην Ελληνική Εταιρεία Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας (2016-2018)

6) Υποτροφία συμμετοχής στο 43^ο CONGRESS OF THE FEDERATION OF EUROPEAN BIOCHEMICAL SOCIETIES/FEBS (Prague, Czech Republic, 7-12/07/2018)

ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΣΕ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΑ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΑ

Επιστημονική συνεργάτης στο έργο με τίτλο: «Ανάπτυξη ενός πολυπαραμετρικού μοντέλου μοριακών δεικτών με τη χρήση τεχνολογιών 'αλληλούχησης επόμενης γενιάς' για την αποτελεσματική πρόγνωση και παρακολούθηση των ασθενών με σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 στην Ελλάδα»

Συνεργασία 2011, 'ARETAEUS'-11SYN_10_1821, συγχρηματοδοτούμενο από την Ευρωπαϊκή Ένωση και Εθνικούς Πόρους-Σε συνεργασία με το Εθνικό Κέντρο Διαβήτη (2014-2015)

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΩΝ ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΩΝ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ

1) Kokkinopoulou I, Maratou E, Mitrou P, Boutati E, Sideris DC, Fragoulis EG, Christodoulou MI. Decreased expression of microRNAs targeting type-2 diabetes susceptibility genes in peripheral blood of patients and predisposed individuals. *Endocrine*, 66(2):226-239, 2019

2) Christodoulou MI, Avgeris M, **Kokkinopoulou I**, Maratou E, Mitrou P, Kontos CK, Pappas E, Boutati E, Scorilas A, Raptis SA, Fragoulis EG. Blood-based analysis of type-2 diabetes mellitus susceptibility genes identifies specific transcript variants with deregulated expression and association with disease risk. *Scientific Reports*, 6;9(1):1512, 2019

3) Mavrogiannis AV, **Kokkinopoulou I**, Kontos CK, Sideris DC. Effect of vinca alkaloids on the expression levels of microRNAs targeting apoptosis-related genes in breast cancer cell lines. *Curr Pharm Biotechnol*. 19(13):1076-1086, 2018

4) Sakavitsi ME, Christodoulou MI, Tchoumtchoua J, Fokialakis N, **Kokkinopoulou IK**, Papageorgiou E, Argyropoulou A, Skaltsounis AL, Halabalaki M, Scorilas A. Comparative HPLC-DAD and UHPLC-ESI(-)-HRMS&MS/MS profiling of Hypericum species and correlation with necrotic cell death activity in human leukemic cell. *Phytochem Lett.*, (20) 481-490 2017.

ΣΥΜΜΕΤΟΧΕΣ ΣΕ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΑ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

A. ΠΡΟΦΟΡΙΚΕΣ ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ

1) 21^ο ΣΥΝΕΔΡΙΟ ΕΣΩΤΕΡΙΚΗΣ ΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ (Αθήνα, 31/10-3/11/2018).

Μαρία-Ιωάννα Χριστοδούλου, Μαργαρίτης Αυγέρης, Ιωάννα Κοκκινοπούλου, Ειρήνη Μαράτου, Παναγιώτα Μήτρου, Ελένη Μπουτάτη, Ανδρέας Σκορίλας, Εμμανουήλ Γ. Φραγκούλης

ΤΟ ΜΙΡΝΑ LET-7B ΠΑΡΟΥΣΙΑΖΕΙ ΜΕΙΩΜΕΝΑ ΕΠΙΠΕΔΑ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΣΤΟ ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΟ ΑΙΜΑ ΤΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΣΑΚΧΑΡΩΔΗ ΔΙΑΒΗΤΗ ΤΥΠΟΥ-2 ΚΑΙ ΣΕ ΑΤΟΜΑ ΜΕ ΠΡΟΔΙΑΘΕΣΙΚΟΥΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΓΙΑ ΤΗ ΝΟΣΟ

2) Summer School 'From Structural Biology to Drug Discovery' (Anavissos, Attika, Greece, 28/08-04/09/2018)

I. Kokkinopoulou

Analysis of the profile of susceptibility genes and epigenetic mechanisms associated with the development of type 2 diabetes mellitus.

3) 68^ο ΠΑΝΕΛΛΗΝΙΟ ΣΥΝΕΔΡΙΟ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΕΤΑΙΡΕΙΑΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ (Αθήνα, 10-12/11/2017)

I.K. Kokkinopoulou, M.I. Christodoulou, E.G. Fragoulis

Comparative analysis of micro-RNA molecules targeting type-2 diabetes mellitus susceptibility genes in peripheral blood of patients versus controls: differential expression patterns and association with risk factors of the disease

4) DAAD Workshop-Essen-2017 (Essen, Germany, 15-16/09/2017)

I. Kokkinopoulou

Analysis of the profile of susceptibility genes and epigenetic mechanisms associated with the development of type 2 diabetes mellitus.

5) 67^ο ΠΑΝΕΛΛΗΝΙΟ ΣΥΝΕΔΡΙΟ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΕΤΑΙΡΕΙΑΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ (Ιωάννινα, 25-27/11/2016)

I.K. Kokkinopoulou, M.I. Christodoulou, M. Avgeris, E. Maratou, P. Mitrou, E. Pappas, E. Boutati, A. Scorilas, S.A. Raptis, E.G. Fragoulis

Analysis of the transcript variants of 28 type-2 diabetes related genetic loci in human peripheral blood: correlation with laboratory and clinical features of the disease

6) 41st CONGRESS OF THE FEDERATION OF EUROPEAN BIOCHEMICAL SOCIETIES/FEBS (Ephesus/Kusadasi, Turkey, September 3-8,2016)

M.I. Christodoulou, M. Avgeris, I.K. Kokkinopoulou, E. Maratou, P. Mitrou, C.K. Kontos, E. Pappas, E. Boutati, A. Scorilas, S.A. Raptis, E.G. Fragoulis

Investigation of the peripheral blood gene-expression signature in patients with type-2 diabetes mellitus, using mRNA next-generation sequencing

7) 66^ο ΠΑΝΕΛΛΗΝΙΟ ΣΥΝΕΔΡΙΟ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΕΤΑΙΡΕΙΑΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ (Αθήνα, 11-13/12/2015)

Ioanna K. Kokkinopoulou, Maria-Ioanna Christodoulou, Margaritis Avgeris, Eleni Boutati, Eirini Maratou, Panagiota Mitrou, Andreas Scorilas, Sotirios A. Raptis, Emmanouel G. Fragoulis

Expression levels of 28 type 2 diabetes mellitus-related genes in peripheral blood: correlation with certain laboratory and clinical features of the disease

B. ΑΝΑΡΤΗΜΕΝΕΣ ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ

1) 69^ο ΠΑΝΕΛΛΗΝΙΟ ΣΥΝΕΔΡΙΟ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΕΤΑΙΡΕΙΑΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ (ΛΑΡΙΣΑ, 23-25/11/2018)

Maria-Ioanna Christodoulou, Margaritis Avgeris, Ioanna K. Kokkinopoulou, Eirini Maratou, Panagiota Mitrou, Eleni Boutati, Andreas Scorilas, Emmanuel G. Fragoulis

MiR-24-3p and let-7f-5p exhibit deregulated expression patterns in patients with type-2 diabetes mellitus and individuals with risk factors for the disease, as revealed by semi-high throughput blood-based analysis

2) 43rd CONGRESS OF THE FEDERATION OF EUROPEAN BIOCHEMICAL SOCIETIES/FEBS (Prague, Czech Republic, 7-12/07/2018)

Kokkinopoulou I, Avgeris M, Mitrou P, Scorilas A, Fragoulis EG, Christodoulou MI

Semi-high throughput blood-based microRNA analysis identifies specific molecules with deregulated expression in patients with type-2 diabetes mellitus.

3) 40th CONGRESS OF THE FEDERATION OF EUROPEAN BIOCHEMICAL SOCIETIES/FEBS (Berlin, Germany, July 4-9,2015)

M.I. Christodoulou, M. Avgeris, I.K. Kokkinopoulou, E. Boutati, E. Maratou, P. Mitrou, A. Scorilas, S.A. Raptis, E.G. Fragoulis

Study of the expression of 28 diabetes-related genes in peripheral blood: indications for clinical significance in type 2 diabetes mellitus

4) INTERNATIONAL SOCIETY OF ENZYMOLOGY ANNUAL CONFERENCE 2015 (June 29-July 1,2015, Corfu, Greece)

Ioanna K. Kokkinopoulou, Evangelos D. Karousis and Diamantis C. Sideris

The effect of the Single Nucleotide Polymorphism Asn53Ser in Human RNase κ

5) 39th CONGRESS OF THE FEDERATION OF EUROPEAN BIOCHEMICAL SOCIETIES/FEBS (Paris, France, 30 August-4 September, 2014)

Ioanna K. Kokkinopoulou, Evangelos D. Karousis and Diamantis C. Sideris

Biochemical and enzymatic characterization of the single nucleotide polymorphism Asn53Ser in human RNase κ

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ



Decreased expression of microRNAs targeting type-2 diabetes susceptibility genes in peripheral blood of patients and predisposed individuals

Ioanna Kokkinopoulou¹ · Eirini Maratou² · Panayota Mitrou³ · Eleni Boutati² · Diamantis C. Sideris¹ · Emmanuel G. Fragoulis¹ · Maria-Ioanna Christodoulou^{1,4}

Received: 14 June 2019 / Accepted: 20 August 2019 / Published online: 26 September 2019
© Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2019

Abstract

Aim Certain microRNA molecules (miRNAs) that target genes involved in beta-cell growth and insulin resistance are found deregulated in patients with type-2 diabetes mellitus (T2D) and correlate with its complications. However, the expression profile of miRNAs that regulate genes bearing T2D-related single-nucleotide polymorphisms has been hardly studied. We recently reported that the mRNA patterns of specific T2D-susceptibility genes are impaired in patients, and associate with disease parameters and risk factors. The aim of this study was to explore the levels of miRNAs that target those genes, in peripheral blood of patients versus controls.

Methods A panel of 14 miRNAs validated to target the *CDKN2A*, *CDK5*, *IGF2BP2*, *KCNQ1*, and *TSPAN8* genes, was developed upon combined search throughout the DIANNA TarBase v7.0, miRTarBase, miRSearch v3.0-Exiqon, miRGator v3.0, and miRTarget Link Human algorithms. Specifically developed poly(A)polyadenylation(PAP)-reverse transcription (RT)-qPCR protocols were applied in peripheral blood RNA samples from patients and controls. Possible correlations with the disease, clinicopathological parameters and/or risk factors were evaluated.

Results T2D patients expressed decreased levels of let-7b-5p, miR-1-3p, miR-24-3p, miR-34a-5p, miR-98-5p, and miR-133a-3p, compared with controls. Moreover, these levels correlated with certain disease features including insulin and % HbA1c levels in patients, as well as BMI, triglycerides' levels and family history in controls.

Conclusions A T2D-specific expression profile of miRNAs that target disease-susceptibility genes is for the first time described. Future studies are needed to elucidate the associated transcription-regulatory mechanisms, perchance involved in T2D pathogenesis, and to evaluate the potential of these molecules as possible biomarkers for this disorder.

Supplementary information The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s12020-019-02062-0>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Ioanna Kokkinopoulou
iwanna-k@biol.uoa.gr

✉ Maria-Ioanna Christodoulou
mchrist@biol.uoa.gr

¹ Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Biology, National and Kapodistrian University of Athens, Athens, Greece

² Second Department of Internal Medicine and Research Institute, School of Medicine, National and Kapodistrian University of Athens, “Attikon” University Hospital, Athens, Greece

³ Ministry of Health, Athens, Greece

⁴ Institute of Infection, Immunity and Inflammation, University of Glasgow, Glasgow, UK

Highlights

- Let-7b-5p, miR-1-3p, miR-24-3p, miR-34a-5p, miR-98-5p, and miR-133a-3p, which target certain T2D-susceptibility genes, are decreased in peripheral blood samples of patients compared with controls.
- The expression levels of let-7b-5p, miR-1-3p, miR-24-3p, miR-34a-5p, miR-98-5p, and miR-133a-3p correlate with the mRNA levels of their target T2D-susceptibility genes.
- The levels of these miRNAs correlate with certain disease parameters, including insulin, % HbA1c levels, BMI, triglycerides' levels, and family history.

Keywords MicroRNA (miRNA) · Type-2 diabetes mellitus (T2D) · T2D-susceptibility genes · Peripheral blood · PAP-RT-qPCR

Introduction

Nowadays, type-2 diabetes mellitus (T2D), a chronic metabolic disorder with growing cardiovascular morbidity and mortality, is considered as one of the worldwide epidemics with increasing prevalence [1]. T2D outbreak is tightly linked to the global obesity rise, which, in turn, is highly associated with the adoption of a sedentary lifestyle [2]. Also, it is now well established that the development of the disease is ascribed to the interplay between environmental factors and genetic components [3].

So far, numerous genome-wide association studies have identified a large pool of single-nucleotide polymorphisms related to T2D [4, 5]. Until very recently, the gene-expression signature of those disease-susceptibility genes had been little investigated. Lately, using a blood-based transcriptome analysis, we identified that the expression of specific transcript variants of certain T2D-susceptibility genes, is differentially regulated in patients versus control individuals [6]. Specifically, T2D patients and healthy individuals at risk of developing the disease were suggested to exhibit deregulated mRNA levels of the transcript variants (tv) 1 and tv2 of *CDK5*, tv3 and tv4 of *CDKN2A*, tv7 of *IGF2BP2*, tv5 of *THADA*, tv3 of *CAPN10*, tv1 of *KCNQ1*, and *TSPAN8* compared with controls. This disease-specific mRNA signature probably reflects the transcriptome dynamics taking place in the target tissues of T2D (including the pancreas, muscle, and adipose tissue), and/or peripheral blood cells, further implicated in disease's pathogenetic pathways [6].

Nevertheless, the molecular mechanisms underlying this deregulated expression in T2D patients have not yet been studied. It is known that the expression of the genome can be regulated by various mechanisms, including methylation of DNA, post-translational modification of histones, or activation of microRNAs, which ultimately influence the phenotype [3]. A number of studies have shown that certain microRNAs (miRNAs) are components of pathways triggered by, or contributing to, the pathophysiology of T2D [7, 8]. They have been found to be functionally involved in

beta-cell growth and insulin resistance, in liver, fat, and skeletal muscle [9], while many findings confirm that several miRNAs are deregulated both in the affected tissues and blood of patients [10] and proposed them as promising biomarkers for T2D and its complications [11, 12]. Furthermore, certain T2D-susceptibility loci are bioinformatically predicted to be targets of islet-expressing miRNAs, further supporting the possible involvement of these molecules in molecular pathophysiological mechanisms of T2D [13].

However, nothing is yet known about the expression profile of those miRNAs that target the recently described differentially expressed T2D-susceptibility genes [6]. Following our previous study, we herein investigated the expression patterns of these miRNAs, in peripheral blood samples of T2D versus control subjects. Possible associations with certain disease parameters and risk factors were also explored.

Methods

Study design

We first aimed to develop a panel of miRNAs that are experimentally validated to target the *CAPN10*, *CDK5*, *CDKN2A*, *IGF2BP2*, *KCNQ1*, *THADA*, and *TSPAN8* T2D-susceptibility genes, using appropriate algorithms. For the evaluation of miRNAs' levels, specific poly(A)polyadenylation(PAP)-reverse transcription (RT)-qPCR protocols were developed and applied in RNA extracted from peripheral blood samples of T2D patients and control individuals (CT). Appropriate statistical tests were performed to explore the possible differential expression of these miRNAs in T2D versus CT subjects. Moreover, to examine specific distribution patterns in individuals at high risk of developing the disease, a distinct group of CTs bearing T2D risk factors was included in the total CT group. The two subgroups were analyzed both together and separately. Possible associations with certain disease parameters

were also explored. In addition, correlations between the levels of expression of these miRNAs and those of their T2D-susceptibility target genes and/or transcript variants, as described previously [6], were examined. Finally, a bioinformatics approach was applied to explore the T2D-related signaling pathways and networks possibly regulated by the differentially expressed miRNAs found herein.

Development of the miRNA panel

The panel of the miRNAs that have been experimentally shown to target the aforementioned T2D-susceptibility genes was developed upon in-depth and combined search in the following algorithms: DIANA-TarBase v7.0, miRTarBase, miRSearch v3.0-Exiqon, miRgator v3.0, and miRtarget Link Human [14–17] (assessed: May 2018).

Patients and samples

The study examined 77 peripheral blood samples, obtained from 40 consecutive T2D patients and 37 controls (CT) with normal glucose metabolism (Table 1), as described previously [6].

RNA extraction, polyadenylation, and quantitative real-time PCR (qPCR)

Total RNA was isolated using the PAXgene Blood miRNA Kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany), using direct-blood lysis, according to manufacturer's instructions (manual process). A total of 0.5 µg of total RNA was polyadenylated at the 3' end using *E. coli* poly(A) polymerase (New England Biolabs Inc., Ipswich, MA, USA), and reverse transcribed using MMLV Reverse Transcriptase (Invitrogen by Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA), following manufacturer's instructions.

Specific SYBR-Green fluorescent-based qPCR assays were developed and applied for the quantification of each of the 14 miRNAs of the panel. The small nucleolar RNA C/D box 48 (SNORD48; RNU48), was used as the endogenous reference control miRNA. Specific forward primers were designed based on published sequences (NCBI Reference Sequence) and upon in-silico specificity analysis. All specific forward as well as the universal reverse primer are reported in Supplementary Table 1. The reaction was performed using the Kapa SYBR® Fast qPCR Master Mix (2×) (Kapa Biosystems, Inc., Woburn, MA, USA), 5 ng of cDNA template and optimized amount (ng) of each primer (Supplementary Table 1). The thermal protocol was: 95 °C for 3 min, 95 °C for 3 sec (40 cycles), 60 °C for 30 s. qPCR reactions were performed in duplicates in a 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA).

Details regarding the PAP-RT and qPCR protocols are reported in Supplementary Table 2.

The relative quantification (RQ) levels of the above-mentioned miRNAs in each sample were assessed by the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method [18]. The 1.2B4 human immortalized beta-pancreatic cell line (ECACC, Salisbury, UK) was used as the calibrator sample.

Statistical analysis

The possible differential distribution of the miRNAs' RQ levels between T2D and CTs, or among T2D, CT_{RF+}, and CT_{RF-} individuals, were explored using the nonparametric Mann–Whitney *U* or Jonckheere–Terpstra tests, respectively. Benjamini–Hochberg procedures for adjusting the false discovery rate (FDR = 0.25) in multiple comparisons were also applied. Possible correlations between the expression levels of miRNAs and those of T2D-susceptibility genes/transcript variants (described previously [6]) were analyzed by Spearman's correlation test. Possible associations with binary, ordinal or continuous values of various clinicopathological and laboratory parameters were investigated by Mann–Whitney *U*, Jonckheere–Terpstra, or Spearman's rank correlation coefficient tests, respectively. Binominal logistic regression analysis was performed exploiting the enter model and using the occurrence of T2D as the dependent variable and the miRNA levels, age, and sex, as independent variables. Analyses were performed using the Graph Pad Prism 5.00 or SPSS 21.0 softwares. *P*-values < 0.05 were considered significant.

Bioinformatics analysis

In order to explore which pathways of the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) [19] were enriched within the genes regulated by the differentially expressed miRNAs, gene set enrichment analysis was performed using the STRING (Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins) database [20].

Results

The developed miRNA panel

Upon search in appropriate algorithms, the developed panel included 14 miRNAs, namely the: let-7b-5p, let-7g-5p, miR-1-3p, miR-10b-5p, miR-24-3p, miR-29a-3p, miR-29b-3p, miR-34a-5p, miR-98-5p, miR-124-3p, miR-125b-5p, miR-133a-3p, miR-155-5p, and miR-5682 (Supplementary Table 3). No validated miRNAs were found to target the *CAPN10* or *THADA* genes.

Table 1 Characteristics of control individuals (CT) and patients (T2D) included in the study

Features		CT (n = 37)	T2D (n = 40)
General	Age (years); median (range)	49 (19–69)	59 (35–75)
	Sex (male/female); number (%)	19/18 (51/49)	19/21 (48/52)
	Disease duration (years); median (range)	NA	5 (0–26)
	Family history (yes/no); number (%)	15/22 (41/59)	28/12 (70/30)
	Risk factors ^a (presence/absence); number (%)	21/16 (57/43)	NA
Anthropometric	BMI (body mass index) ^b ; median (range)	26.9 (21.3–36.3)	29.3 (21.5–46.5)
	<25: normal weight; number (%)	19 (51)	6 (15)
	25–30: overweight; number (%)	10 (27)	16 (40)
	>30: obese; number (%)	8 (22)	18 (45)
	W/H (waist-to-hip ratio); median (range)	0.89 (0.71–1.09)	0.93 (0.83–1.18)
Clinical	Central obesity ^c (yes/no); number (%)	14/23 (38/62)	36/4 (90/10)
	Hypertension ^d (yes/no); number (%)	5/32 (14/86)	24/16 (60/40)
	Hyperlipidemia ^e (yes/no); number (%)	7/30 (19/81)	31/9 (77/23)
Laboratory	Metabolic syndrome ^f (yes/no); number (%)	5/32 (14/86)	32/8 (80/20)
	HbA1c levels (% or mmol/ml); median (range)	5.6 (5.0–6.1)	6.7 (5.2–12.1)
	<7% or 53; number (%)	37 (100)	25 (63)
	≥7% or 53; number (%)	0 (0)	15 (37)
	Glucose levels (mg/dl); median (range)	85 (68–120)	118 (75–229)
	<130; number (%)	37 (100)	23 (58)
	≥130; number (%)	0 (100)	17 (42)
	Insulin levels (μU/ml); median (range)	9.2 (5.2–19.1)	13.7 (6.9–56.0)
	Cholesterol levels (mg/dl); median (range)		
	Total cholesterol	204 (109–281)	192 (119–256)
	High-density cholesterol (HDL)	48.5 (6–79)	41 (27–125)
Low-density cholesterol (LDL)	124 (19–192)	113 (66–191)	
Triglycerides levels (mg/dl); median (range)	117 (65–176)	148 (79–363)	
T2D therapy	Naïve (prior to treatment); number (%)	NA	7 (17.5)
	Tablets (metformin, vildagliptin, sitagliptin, saxagliptin, glimepiride, and gliclazide); number (%)	NA	18 (45.0)
	Two tablets (metformin + glimepiride, metformin + vildagliptin); or one tablet (metformin) + injectable GLP-1 analog (liraglutide); number (%)	NA	6 (15.0)
	Three tablets (metformin + vildagliptin + pioglitazone or metformin + vildagliptin + glimepiride or metformin + sitagliptin + glimepiride); number (%)	NA	4 (10.0)
	Injectable insulin (±tablets: metformin + sitagliptin); number (%)	NA	2 (5.0)
	Multiple injections of insulin; number (%)	NA	3 (7.5)

^aRisk factors associated with higher risk of T2D, included: (i) BMI > 25, (ii) prior history of gestational diabetes, (iii) hypertension, (iv) dyslipidemia, (v) cardiovascular disease, or (vi) first-degree family member with T2D [3]

^bBMI was calculated as weight (kg) divided by the square of height (m²)

^cCentral obesity was regarded if waist circumference was ≥102 cm (40 in) in men or ≥88 cm (35 in) in women

^dHypertension was regarded if blood pressure was ≥130/85 mm Hg (or receiving drug therapy for hypertension)

^eHyperlipidemia (defined by the Adult Treatment Panel III of the National Cholesterol Education Program [38])

^fMetabolic syndrome was diagnosed according to the NCEP-ATP III report [39] requiring at least 3 of the following 5 conditions: (i) fasting glucose ≥ 100 mg/dL (or receiving drug therapy for hyperglycemia), (ii) blood pressure ≥ 130/85 mm Hg (or receiving drug therapy for hypertension), (iii) triglycerides ≥ 150 mg/dL (or receiving drug therapy for hypertriglyceridemia), (iv) HDL-C < 40 mg/dL in men or < 50 mg/dL in women (or receiving drug therapy for reduced HDL-C), (v) waist circumference ≥ 102 cm (40 in) in men or ≥ 88 cm (35 in) in women

NA not applicable

Differential miRNA expression patterns in patients versus controls

Quantifiable miRNA levels were detected in peripheral blood samples in the cases of the following 10 molecules: let-7b-5p, let-7g-5p, miR-1-3p, miR-24-3p, miR-29a-3p, miR-34a-5p, miR-98-5p, miR-125b-5p, miR-133a-3p, and miR-155-5p. No expression of miR-10b-5p, miR-29b-3p, miR-124-3p, or miR-5682 was detected in the samples of patients or controls.

RQ values (median; range) of the miRNA levels in the groups of T2D patients ($n = 40$) and CTs ($n = 37$) are summarized in Table 2. Mann–Whitney U test revealed that T2D patients expressed significantly lower levels of let-7b-5p ($p = 0.0014$), miR-1-3p ($p < 0.0001$), miR-24-3p ($p = 0.0084$), miR-34a-5p ($p < 0.0001$), miR-98-5p ($p = 0.0013$), and miR-133a-3p ($p = 0.0003$), compared with CTs (Fig. 1a). Although not with statistical significance, lower levels in patients versus controls were detected also in the case of miR-125b-5p ($p = 0.0801$). Further analysis within the group of CTs, revealed that CT_{RF+} individuals ($n = 21$) were characterized by reduced miRNA levels compared with CT_{RF-} ones ($n = 16$) in the cases of miR-1-3p ($p < 0.0001$), miR-34a-5p ($p = 0.008$), miR-98-5p ($p = 0.073$), and miR-133a-3p ($p = 0.001$) (Fig. 1b). Moreover, Jonckheere–Terpstra test revealed a linear trend of decrease in the levels of let-7b-5p ($p = 0.002$), miR-1-3p ($p < 0.0001$), miR-24-3p ($p = 0.011$), miR-34a-5p ($p < 0.0001$), miR-98-5p ($p < 0.0001$), miR-125b-5p ($p = 0.049$), and miR-133a-3p ($p < 0.0001$), among the groups of CT_{RF-}, CT_{RF+}, and T2D patients (Fig. 1b). The differential expression patterns for all the above miRNAs, except for the miR-125b-5p, remained significant upon corrections for multiple comparisons.

As for the levels of let-7g-5p, miR-29a-3p, and miR-155-5p, these were not found to be statistically different in any of the comparisons among the groups of patients and controls (Table 2).

According to the abovementioned data, the panel of the T2D-specific miRNAs finally included the: let-7b-5p, miR-1-3p, miR-24-3p, miR-34a-5p, miR-98-5p, miR-125b-5p, and miR-133a-3p. Among them, binomial multivariate analysis corrected for age and sex revealed that miR-24-3p and miR-133a-3p can predict T2D among participants of the current study ($p = 0.042$, OR = 0.390 and $p = 0.025$, OR = 30.86, respectively).

Correlations between miRNA and target-mRNA expression levels

Possible correlations between the levels of the differentially expressed miRNAs and the levels of expression of their target mRNAs (T2D-susceptibility genes or transcript variants that

show a T2D-specific expression pattern), as evaluated previously [6] in the same cohort, were explored (Table 3), for those miRNAs that displayed statistically significant differential expression between patients and controls, or among patients, controls with and controls without risk factors, namely the miR-24-3p, miR-34a-5p, miR-125b-5p, let-7b-5p, miR-98-5p, miR-1-3p, and miR-133a-3p.

Spearman's rank correlation test revealed significantly negative correlations between the levels of miRNAs that target the *CDKN2A* gene and the levels of the tv3 of *CDKN2A*, in CT_{RF+} individuals ($r = -0.6313$; $p = 0.0021$ for miR-24-3p, $r = -0.6988$; $p = 0.0004$ for miR-34a-5p, $r = -0.4421$; $p = 0.0448$ for miR-125b-5p) and T2D patients ($r = -0.5371$; $p = 0.0004$ for miR-24-3p, $r = -0.4578$; $p = 0.0030$ for miR-34a-5p). MiR-34a-5p levels also correlated with *CDKN2A* tv4 levels in CTs ($r = -0.3636$; $p = 0.0270$) and tended to correlate with the last, in T2D patients ($r = -0.2802$; $p = 0.0799$).

On the other hand, positive correlations were detected between the levels of miRNAs that target *KCNQ1* and those of the *KCNQ1* tv1 in T2D patients ($r = 0.5902$; $p < 0.0001$ for miR-1-3p, $r = 0.4867$; $p = 0.0015$ for miR-34a-5p, and $r = 0.6124$; $p < 0.0001$ for miR-133a-3p). Similar correlations were also observed in the CT group ($r = 0.5000$; $p = 0.0016$ for miR-1-3p, $r = 0.4047$; $p = 0.0130$ for miR-34a-5p, and $r = 0.3992$; $p = 0.0144$ for miR-133a-3p). This was mainly attributed to the CT_{RF-} participants, as suggested by the tendencies of significance revealed ($r = 0.4794$; $p = 0.0624$ for miR-1-3p, $r = 0.4412$; $p = 0.0889$ for miR-34a-5p, and $r = 0.4676$; $p = 0.0698$ for miR-133a-3p), rather than the CT_{RF+} participants, where no correlation was detected. Also, the levels of these miRNAs correlated positively with the levels of total *KCNQ1* mRNA, in the total CT group ($r = 0.3037$; $p = 0.0676$ for miR-1-3p, $r = 0.4116$; $p = 0.0114$ for miR-34a-5p, and $r = 0.3772$; $p = 0.0214$ for miR-133a-3p) and in the CT_{RF-} subgroup ($r = 0.6294$; $p = 0.0106$ for miR-1-3p, $r = 0.5000$; $p = 0.0508$ for miR-34a-5p, $r = 0.4618$; $p = 0.0738$ for miR-133a-3p).

No correlations were revealed between the levels of miRNAs that target *IGF2BP2* or *TSPAN8* and those of their mRNAs. Correlations between the levels of miR-155-5p and those of its target *CDK5* mRNA, were not explored, since the first did not exhibit any significant difference among the samples of patients and controls.

Associations of the levels of miRNAs with clinicopathological data

Possible associations between the expression levels of the differentially expressed miRNAs and certain clinicopathological and laboratory characteristics of the disease were further evaluated in the groups of CTs and T2D patients (Table 4).

Table 2 Relative quantification (RQ) expression levels of the miRNAs-of-interest

Gene/Variant	RQ levels, median (range)				Statistical significance, <i>p</i>				
	CT _{TOTAL} (n = 37)	CT _{RF-} (n = 16)	CT _{RF+} (n = 21)	T2D (n = 40)	CT _{TOTAL} vs. T2D	CT _{RF-} vs. T2D	CT _{RF+} vs. T2D	CT _{RF-} vs. CT _{RF+}	Linear trend following the CT _{RF-} → CT _{RF+} → T2D order
miRNAs									
let-7b-5p	561.6 (53.55–6363)	508.29 (89.60–4911.16)	573.05 (53.55–6363.20)	212.4 (43.26–2008)	0.0014	0.005	0.018	0.868	0.002
let-7g-5p	19.13 (4.232–171.7)	11.77 (4.23–171.74)	30.95 (4.39–153.30)	24.34 (2.571–389.3)	0.627	0.095	0.504	0.115	0.333
miR-1-3p	20.36 (1.549–383.1)	50.62 (5.08–206.13)	9.082 (1.55–383.06)	4.183 (0.683–211.2)	< 0.0001	< 0.0001	0.008	< 0.0001	< 0.0001
miR-24-3p	2.827 (0.740–22.67)	2.616 (1.09–22.67)	2.858 (0.74–17.61)	1.826 (0.444–10.04)	0.0084	0.026	0.042	0.868	0.011
miR-29a-3p	0.174 (0.034–0.905)	0.158 (0.04–0.91)	0.186 (0.03–0.55)	0.133 (0.032–0.478)	0.301	0.384	0.412	0.868	0.353
miR-34a-5p	0.296 (0.032–2.568)	0.733 (0.03–2.30)	0.166 (0.03–2.57)	0.077 (0.016–1.402)	< 0.0001	< 0.0001	0.018	0.008	< 0.0001
miR-98-5p	0.998 (0.078–14.84)	1.334 (0.09–12.25)	0.879 (0.08–14.84)	0.356 (0.049–3.226)	0.0013	0.001	0.052	0.073	< 0.0001
miR-125b-5p	0.288 (0.058–1.195)	0.302 (0.08–1.19)	0.279 (0.06–1.05)	0.211 (0.043–1.631)	0.0801	0.075	0.261	0.370	0.049
miR-133a-3p	1.545 (0.219–14.86)	3.289 (0.50–11.09)	0.975 (0.22–14.86)	0.476 (0.114–9.176)	0.0003	< 0.0001	0.095	0.001	< 0.0001
miR-155-5p	0.132 (0.027–0.514)	0.104 (0.03–0.51)	0.152 (0.03–0.49)	0.120 (0.034–0.981)	0.479	0.758	0.187	0.229	0.772

The power of the sample size for the comparison of CT versus T2D with Type I error probability $\alpha = 0.05$ is: 0.82 for miR-34a-5p, 0.73 for miR-1-3p, 0.71 for let-7b-5p, 0.70 for miR-24-3p, 0.70 for miR-133a-3p, and 0.58 for miR-98-5p, as calculated using the PS: Power and Sample Size Calculation v3.1.6 software

NE not expressed, NA not applicable, NS not significant, CT_{TOTAL} the total cohort of controls, CT_{RF-} controls with risk factors for T2D, CT_{RF+} controls without risk factors for T2D, T2D patients Data are expressed as median values (range). The between-group differential distribution and the CT_{RF-} → CT_{RF+} → T2D-ordered linear trend were evaluated by Mann–Whitney *U* and Jonckheere–Terpstra non-parametric tests, respectively

Bold values indicate median values and the statistical significance $p < 0.05$

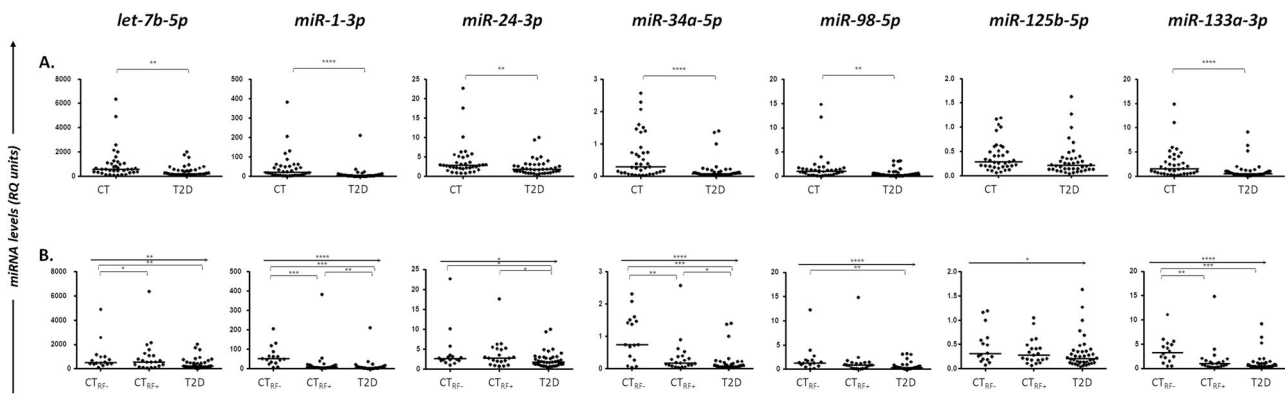


Fig. 1 a Dot-plots depicting the differential distribution of miRNA levels (RQ units) in controls (CT) and T2D patients (T2D), as attested by appropriate nonparametric tests. Mann–Whitney analysis revealed that T2D patients are characterized by lower levels of the miRNAs: let-7b-5p, miR-1-3p, miR-24-3p, miR-34a-5p, miR-98-5p, miR-125b-5p, and miR-133a-3p, compared with CTs. **b** Dot-plots depicting the differential distribution of miRNA levels (RQ units) in controls

without T2D risk factors (CT_{RF-}), controls with T2D risk factors (CT_{RF+}) and T2D patients. Jonckheere–Terpstra test showed a stepwise decrease in the levels of the abovementioned miRNAs among the CT_{RF-} , CT_{RF+} , and T2D groups. *P*-values are designated by asterisks (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$), whereas horizontal bars represent the median value of the group

More specifically the levels of: (1) miR-125b-5p correlated negatively with the levels of insulin ($\mu\text{U/ml}$) ($p = 0.0157$) and % HbA1c in the serum of T2D patients ($p = 0.0198$), (2) let-7b-5p and (3) miR-98-5p also negatively with insulin levels in patients ($p = 0.0241$ and $p = 0.0441$, respectively), (4) miR-1-3p negatively with % HbA1c levels ($p = 0.0115$) and with family history for T2D ($p = 0.0077$) in the CTs subgroup, (5) miR-34a-5p negatively with triglycerides' levels (mg/dl) in the total group of CTs ($p = 0.0390$) and % HbA1c levels in the CT_{RF+} subgroup ($p = 0.0402$), and (6) miR-24-3p positively with body mass index (BMI) in CT_{RF+} individuals ($p = 0.0168$).

Pathway analysis of the proteins encoded by target genes of the differentially expressed miRNAs

To further explore the involvement of the differentially expressed miRNAs in the regulation of T2D-associated molecular mechanisms, we explored their validated target genes (including, but also other than, the T2D-susceptibility genes). The panel of the target genes was developed upon search in the miRTarget Link Human algorithm [17] and included 635 molecules (Supplementary Table 4). This gene/protein set was further analyzed in terms of network interactions, using STRING-DB tools and KEGG database. The analysis revealed that numerous proteins of the above set are significantly involved in T2D-related pathways including PI3K-Akt, HIF-1, MAPK, FoxO, and insulin-signaling pathways (false discovery rate $< 5E-06$ for all) (Fig. 2). All the regulated pathways revealed by this approach are included in Supplementary Table 5.

Discussion

Herein, we described impaired levels of certain miRNAs that target the T2D-susceptibility genes *CDKN2A*, *IGF2BP2*, *KCNQ1*, and *TSPAN8*, previously found deregulated in peripheral blood of patients and controls with risk factors for the disease [6]. More specifically, the levels of let-7b-5p, miR-1-3p, miR-24-3p, miR-34a-5p, miR-98-5p, miR-125b-5p, and miR-133a-3p were detected to be lower in the peripheral blood of T2D patients compared with control individuals; of them, miR-24-3p and miR-133a-3p displayed independent prognostic values. Furthermore, among controls, those bearing risk factors for T2D displayed decreased miRNA levels compared with those without.

These findings are in line with previous data reporting decreased levels of miR-24 and miR-125b in plasma samples [21–23] and of miR-133a and miR-98-5p in skeletal-muscle biopsies of T2D patients [24]. Furthermore, the levels of certain let-7 family members have been reported to be reduced in T2D patients compared with controls; the first exhibit lower levels of let-7a and let-7f in plasma exosomes [25] and let-7i in the serum [26]. As for miR-1-3p, its levels have been found decreased in the heart of STZ-induced diabetic mice [27].

Moreover, in this study, paired analysis between the expression levels of miR-24-3p or miR-34a-5p and the levels of specific transcript variants (tv3 and tv4) of their target T2D-susceptibility gene *CDKN2A* (previously found upregulated in T2D peripheral blood [6]), revealed a significant negative association, in the groups of patients and CT_{RF+} individuals, while not in CT_{RF-} individuals. Also, the levels of miR-125b-5p were negatively associated with

Table 3 Correlations between the expression levels of the differentially expressed miRNAs and those of their validated mRNA targets, as these were previously analyzed in the same cohort [6]

miRNA/target-mRNA	CDKN2A				CDKN2A transcript variant 3				CDKN2A transcript variant 4							
	All	CT _{TOTAL}	CT _{RF-}	CT _{RF+}	T2D	All	CT _{TOTAL}	CT _{RF-}	CT _{RF+}	T2D	All	CT _{TOTAL}	CT _{RF-}	CT _{RF+}	T2D	
miR-24-3p	P	0.4835	0.3717	0.3158	0.5556	0.1827	<0.0001	0.1573	0.3188	0.0021	0.0004	0.1640	0.9334	0.8412	0.9110	0.2378
	r	-0.0810	0.1512	0.2666	0.1364	-0.2150	-0.4709	-0.2373	0.2646	-0.6313	-0.5371	-0.1602	0.0142	-0.0530	0.0259	-0.1910
miR-34a-5p	P	0.0573	0.0953	0.5991	0.9377	0.8039	<0.0001	0.0017	0.8342	0.0004	0.0030	0.0010	0.0270	0.4340	0.9465	0.0799
	r	-0.2176	-0.2783	-0.1399	0.0181	-0.0405	-0.5665	-0.4982	0.0422	-0.6988	-0.4578	-0.3684	-0.3636	-0.2077	-0.0155	-0.2802
miR-125b-5p	P	0.9174	0.5842	0.1550	0.7626	0.9076	0.0312	0.2910	0.5163	0.0448	0.3246	0.0808	0.8165	0.7900	0.5051	0.1591
	r	0.0120	0.0929	0.3726	0.0701	0.0189	-0.2458	-0.1783	0.1737	-0.4421	-0.1598	-0.2002	-0.0394	0.0721	-0.1540	-0.2269
IGF2BP2																
IGF2BP2 transcript variant 7																
	All	CT _{TOTAL}	CT _{RF-}	CT _{RF+}	T2D	All	CT _{TOTAL}	CT _{RF-}	CT _{RF+}	T2D	All	CT _{TOTAL}	CT _{RF-}	CT _{RF+}	T2D	
let-7b-5p	P	0.4503	0.3820	0.7139	0.5219	0.2336	0.9748	0.9781	0.8866	0.2336						
	r	0.0937	0.1752	0.2000	0.1481	0.1927	-0.0036	0.0088	-0.0331	0.1927						
miR-98-5p	P	0.8053	0.4848	0.7139	0.6868	0.8146	0.4869	0.9258	0.7370	0.8146						
	r	0.0306	0.1404	0.2000	0.0935	0.0382	-0.0804	0.0264	-0.0779	0.0382						
KCNQ1																
KCNQ1 transcript variant 1																
	All	CT _{TOTAL}	CT _{RF-}	CT _{RF+}	T2D	All	CT _{TOTAL}	CT _{RF-}	CT _{RF+}	T2D	All	CT _{TOTAL}	CT _{RF-}	CT _{RF+}	T2D	
miR-1-3p	P	0.0186	0.0676	0.0106	0.3218	0.3651	<0.0001	0.0624	0.1134	<0.0001						
	r	0.2678	0.3037	0.6294	0.2273	0.1471	0.5532	0.4794	0.3558	0.5902						
miR-34a-5p	P	0.0045	0.0114	0.0508	0.1563	0.4577	<0.0001	0.0889	0.4856	0.0015						
	r	0.3202	0.4116	0.5000	0.3208	0.1208	0.4967	0.4412	0.1610	0.4867						
miR-133a-3p	P	0.0336	0.0214	0.0738	0.0949	0.7155	<0.0001	0.0698	0.3570	<0.0001						
	r	0.2424	0.3772	0.4618	0.3740	0.0594	0.5543	0.4676	0.2117	0.6124						
TSPAN8																
	All	CT _{TOTAL}	CT _{RF-}	CT _{RF+}	T2D	All	CT _{TOTAL}	CT _{RF-}	CT _{RF+}	T2D						
miR125b-5p	P	0.2250	0.4487	0.5682	0.3121	0.7426										
	r	-0.1399	-0.1284	0.1533	-0.2318	-0.0535										

Bold values indicate statistical significance $p < 0.05$

Table 4 Analysis of correlations between the levels of miRNAs with differential distribution among the CT_{RF+}, CT_{RF-}, and T2D groups, and certain clinical and laboratory features

Variable	Type	<i>let-7b-3p</i>					<i>miR-1-3p</i>					<i>miR-24-3p</i>					<i>miR-34a-5p</i>				
		CT _{RF+}	CT _{RF-}	CT	T2D	CT _{RF+}	CT _{RF-}	CT	T2D	CT _{RF+}	CT _{RF-}	CT	T2D	CT _{RF+}	CT _{RF-}	CT	T2D	CT _{RF+}	CT _{RF-}	CT	T2D
BMI	ordinal	<i>p</i>	NA	0.482	0.706	0.383	NA	0.574	0.279	0.161	0.140	0.888	0.328	NA	0.725	0.814	0.153				
		<i>r</i>	<25	339.195	864.78	157.95	29	44.475	3.335	4.14	0.955	4.14	1.845	NA	0.125	0.26	(0.03–2.57)	(0.02–0.12)			
			(108.28–636.2)	(108.28–636.2)	(56.05–460.77)	(1.55–383.06)	(1.44–11.78)														
25–30	NA	0.618	618.695	181.735	8.64	8.64	2.58	1.555	2.95	0.895	2.58	1.555	NA	0.21	0.14	(0.03–0.61)	0.07	(0.03–1.36)			
			(53.55–2144.91)	(53.55–2144.91)	(64.93–1562.05)	(2.19–18.12)	(0.86–21.22)														
>30	NA	0.676	676.125	291.81	11.83	11.83	3.865	6.71	3.865	3.865	3.865	1.89	NA	0.215	0.215	0.11	(0.02–1.4)				
			(138.64–1987.14)	(138.64–1987.14)	(43.26–2007.8)	(3.63–39.46)	(0.68–36.11)														
		0.8125	0.8125	0.3807	0.0583	0.2595	0.4359	0.0574	0.1028	0.0168	0.4957	0.3173	0.5639	0.2096	0.6216	(0.04–0.89)	0.1245				
WH ratio	continuous	<i>p</i>	>0.9999	0.1758	0.3312	0.8088	0.4752	0.8887	0.7736	>0.9999	0.5254	0.6927	0.7282	>0.9999	0.4960	0.4994	0.8701				
		<i>r</i>	>0.9999	0.3339	0.2230	-0.0417	0.0325	-0.0496	0.0325	0.0916	0.5000	0.1716	-0.0282	0.5000	0.1716	0.1560	-0.0282	0.3833			
			0.7355	0.7283	0.0980	0.3713	0.2268	0.2683													
Metabolic syndrome	categorical	<i>p</i>	NA	618.7	611.1	130.2	NA	10.39	14.43	2.540	2.948	2.948	1.290	NA	0.1742	0.1600	0.0789				
		<i>r</i>	>0.9999	0.3335	0.0488	0.1443	-0.8286	0.2647	-0.1597	0.3069	0.7714	0.5278	0.1644	-0.3143	0.2932	0.1015	0.2502	0.8701			
			0.7355	0.7283	0.0980	0.3713	0.2268	0.2683													
Central obesity	categorical	<i>p</i>	NA	618.7	611.1	130.2	NA	10.39	14.43	2.540	2.948	2.948	1.290	NA	0.1742	0.1600	0.0789				
		<i>r</i>	>0.9999	0.3335	0.0488	0.1443	-0.8286	0.2647	-0.1597	0.3069	0.7714	0.5278	0.1644	-0.3143	0.2932	0.1015	0.2502	0.8701			
			0.7355	0.7283	0.0980	0.3713	0.2268	0.2683													
Family history	categorical	<i>p</i>	NA	618.7	611.1	130.2	NA	10.39	14.43	2.540	2.948	2.948	1.290	NA	0.1742	0.1600	0.0789				
		<i>r</i>	>0.9999	0.3335	0.0488	0.1443	-0.8286	0.2647	-0.1597	0.3069	0.7714	0.5278	0.1644	-0.3143	0.2932	0.1015	0.2502	0.8701			
			0.7355	0.7283	0.0980	0.3713	0.2268	0.2683													
Hypertension	categorical	<i>p</i>	NA	618.7	611.1	130.2	NA	10.39	14.43	2.540	2.948	2.948	1.290	NA	0.1742	0.1600	0.0789				
		<i>r</i>	>0.9999	0.3335	0.0488	0.1443	-0.8286	0.2647	-0.1597	0.3069	0.7714	0.5278	0.1644	-0.3143	0.2932	0.1015	0.2502	0.8701			
			0.7355	0.7283	0.0980	0.3713	0.2268	0.2683													
Hyperlipidemia	categorical	<i>p</i>	NA	618.7	611.1	130.2	NA	10.39	14.43	2.540	2.948	2.948	1.290	NA	0.1742	0.1600	0.0789				
		<i>r</i>	>0.9999	0.3335	0.0488	0.1443	-0.8286	0.2647	-0.1597	0.3069	0.7714	0.5278	0.1644	-0.3143	0.2932	0.1015	0.2502	0.8701			
			0.7355	0.7283	0.0980	0.3713	0.2268	0.2683													
HbA1c (%)	categorical	<i>p</i>	NA	618.7	611.1	130.2	NA	10.39	14.43	2.540	2.948	2.948	1.290	NA	0.1742	0.1600	0.0789				
		<i>r</i>	>0.9999	0.3335	0.0488	0.1443	-0.8286	0.2647	-0.1597	0.3069	0.7714	0.5278	0.1644	-0.3143	0.2932	0.1015	0.2502	0.8701			
			0.7355	0.7283	0.0980	0.3713	0.2268	0.2683													
Glucose (mg/dl)	categorical	<i>p</i>	NA	618.7	611.1	130.2	NA	10.39	14.43	2.540	2.948	2.948	1.290	NA	0.1742	0.1600	0.0789				
		<i>r</i>	>0.9999	0.3335	0.0488	0.1443	-0.8286	0.2647	-0.1597	0.3069	0.7714	0.5278	0.1644	-0.3143	0.2932	0.1015	0.2502	0.8701			
			0.7355	0.7283	0.0980	0.3713	0.2268	0.2683													

Table 4 (continued)

Variable	Type	let-7b-5p			miR-1-3p			miR-2-4-3p			miR-34a-5p						
		CT _{Reg-}	CT _{Reg+}	T2D	CT _{Reg-}	CT _{Reg+}	T2D	CT _{Reg-}	CT _{Reg+}	T2D	CT _{Reg-}	CT _{Reg+}	T2D				
Cholesterol total (mg/dl)	continuous	p	>0.9999	0.0835	0.6381	>0.9999	0.4916	0.6063	0.7105	>0.9999	0.1257	0.2331	0.9128	>0.9999	0.3887	0.5690	0.5306
		r	-0.5000	0.4331	-0.0989	0.1779	0.1227	-0.0781	-0.0781	-0.5000	0.3865	0.2793	-0.0230	-0.5000	0.2221	0.1355	-0.1316
HDL (mg/dl)	continuous	p	>0.9999	0.4589	0.9307	0.6957	0.6584	0.7894	0.7894	>0.9999	0.4707	0.8009	0.4651	>0.9999	0.6540	0.2465	0.6557
		r	0.5000	-0.1902	-0.0187	-0.1006	0.1054	-0.0575	-0.0575	0.5000	-0.1853	0.0602	-0.1565	0.5000	0.1166	0.2717	-0.0959
LDL (mg/dl)	continuous	p	0.3333	0.3111	0.4931	0.3333	0.7781	0.8923	0.8369	0.3333	0.4888	0.8625	0.5489	0.3333	0.7550	0.9950	0.4403
		r	-1.0000	0.2600	-0.1470	0.0735	-0.0323	-0.0443	-0.0443	-1.0000	0.1790	0.0413	-0.1287	-1.0000	0.0821	0.0015	-0.1653
Triglycerides (mg/dl)	continuous	p	0.3333	0.7729	0.9505	0.7084	0.2145	0.7841	0.7841	0.3333	0.9284	0.2567	0.6110	0.3333	0.2390	0.0390	0.5803
		r	-1.0000	-0.0759	-0.0130	-0.0980	-0.2902	0.0576	0.0576	-1.0000	-0.0245	-0.2662	0.1069	-1.0000	-0.3015	-0.4647	0.1162
Variable	Type		miR-98-5p			miR-125b-3p			miR-123a-3p			miR-133a-3p					
			CT _{Reg-}	CT _{Reg+}	T2D	CT _{Reg-}	CT _{Reg+}	T2D	CT _{Reg-}	CT _{Reg+}	T2D	CT _{Reg-}	CT _{Reg+}	T2D	CT _{Reg-}	CT _{Reg+}	T2D
BMI	ordinal	p	NA	0.440	0.851	0.226	NA	0.399	0.346	0.146	0.146	0.146	NA	0.440	0.572	0.398	
		<25	NA	0.69	1.29	0.11-14.84	NA	0.165	0.615	0.145	0.145	0.145	NA	0.66	1.69	0.645	
		25-30	NA	0.86	0.525	0.08-1.76	NA	0.275	0.202	0.205	0.205	0.205	NA	0.99	0.75	0.375	
		>30	NA	0.995	0.995	0.23-2.47	NA	0.295	0.295	0.26	0.26	0.26	NA	1.1	1.1	0.49	
		p	0.1028	0.1038	0.7463	0.5061	0.0583	0.0645	0.5889	0.1636	0.1636	0.1636	0.1361	0.1317	0.9881	0.4728	
		r	-0.7714	0.3744	0.0666	0.1097	-0.8286	0.4211	-0.1111	0.2275	0.2275	-0.7143	0.3489	0.0030	0.1184		
W/H ratio	continuous	p	>0.9999	0.2169	0.3458	0.5468	>0.9999	0.3553	0.9176	0.3329	0.3329	>0.9999	0.2848	0.5400	0.5127	0.5127	
		r	-0.5000	0.3059	0.2165	-0.1038	-0.5000	0.2315	0.0240	-0.1661	-0.1661	-0.5000	0.2667	0.1417	-0.1127		
Metabolic syndrome	categorical	p	NA	0.7956	0.8795	0.1478	NA	0.6200	0.4585	0.5673	0.5673	NA	0.5652	0.4585	0.4208		
		ab	NA	0.8980	0.8778	0.2178	NA	0.9089	0.4073	0.1802	0.1802	NA	0.9863	1.058	0.4067		
		pr	NA	0.6012	0.6012	0.4173	NA	0.2002	0.2002	0.2118	0.2118	NA	0.7409	0.7409	0.5129		
		p	NA	0.8012	>0.9999	0.3491	NA	0.4434	0.0945	0.1917	0.1917	NA	0.9628	0.5208	0.8255		
		r	NA	0.8778	0.8778	0.3536	NA	0.3785	0.5546	0.0873	0.0873	NA	0.9572	1.145	0.9240		
		ab	NA	0.1686	0.1686	0.1484	NA	0.0581	0.0581	0.0581	0.0581	NA	0.3768	0.3768	0.1235		
		pr	NA	0.9166	0.9166	0.4091	NA	0.2470	0.2470	0.2118	0.2118	NA	0.9863	0.9863	0.4762		
		p	NA	0.4916	0.4840	0.0497-3.226	NA	0.7534	0.6485	0.8357	0.8357	NA	0.4453	0.0850	0.3500		
		r	NA	0.8401	1.105	0.3885	NA	0.2187	0.2732	0.1662	0.1662	NA	0.6881	2.346	0.4213		
		ab	NA	0.1686	0.1686	0.1212	NA	0.0581	0.0581	0.0581	0.0581	NA	0.5250	0.5250	0.1235		
		pr	NA	0.9540	0.9540	0.3562	NA	0.3145	0.3145	0.2343	0.2343	NA	1.172	1.172	0.6071		
		p	NA	NA	NA	0.5866	NA	NA	0.1048	0.1048	0.1048	NA	0.2193	0.2193	0.1142		
		ab	NA	NA	NA	0.3219	NA	NA	NA	0.0738	0.0738	NA	NA	NA	0.8918		
		pr	NA	NA	NA	0.4615	NA	NA	NA	0.1607	0.1607	NA	NA	NA	0.5009		
		p	NA	0.7391	0.5625	0.0575	NA	0.3834	0.2648	0.2648	0.2648	NA	0.8225	0.8225	0.4542		
		ab	NA	0.8198	1.092	0.2155	NA	0.3263	0.3157	0.2261	0.2261	NA	0.8690	2.111	0.1817		
		pr	NA	0.9169	0.9169	0.4206	NA	0.2002	0.2002	0.2022	0.2022	NA	0.9755	0.9755	0.3493		
		p	NA	NA	NA	0.6125	NA	NA	0.0581	0.0581	0.0581	NA	NA	NA	0.5376		
		<7%	NA	NA	NA	0.3562	NA	NA	NA	0.0925	0.0925	NA	NA	NA	0.9592		
		>7%	NA	NA	NA	0.0497-3.151	NA	NA	NA	0.2581	0.2581	NA	NA	NA	0.4776		
		p	NA	NA	NA	0.2980	NA	NA	NA	0.0568	0.0568	NA	NA	NA	0.1142		
		r	NA	NA	NA	0.0701-3.226	NA	NA	NA	0.0437	0.0437	NA	NA	NA	0.4251		
		p	NA	NA	NA	0.0701-3.226	NA	NA	NA	0.0437	0.0437	NA	NA	NA	0.4251		

Table 4 (continued)

Variable	Type	miR-98-5p			miR-125b-3p			miR-133a-3p					
		CT _{RF-}	CT _{RF+}	CT	T2D	CT _{RF-}	CT _{RF+}	CT	T2D	CT _{RF-}	CT _{RF+}	CT	T2D
Glucose (mg/dl)	continuous	<i>p</i>	NA	0.1205	0.4608	NA	0.0840	0.0840	0.0198	NA	0.0580	0.0580	0.8453
	categorical	<i>r</i>	NA	-0.3804	-0.1288	NA	-0.4213	-0.4213	-0.3921	NA	-0.4598	-0.4598	-0.0342
Insulin (μU/ml)	continuous	<i>p</i>	NA	NA	0.7990	NA	NA	NA	0.2805	NA	NA	NA	0.2962
	categorical	<i>r</i>	NA	NA	0.3789	NA	NA	NA	0.2624	NA	NA	NA	0.4226
Cholesterol total (mg/dl)	continuous	<i>p</i>	NA	NA	0.3048	NA	NA	NA	0.1638	NA	NA	NA	0.4762
	categorical	<i>r</i>	NA	NA	0.1251	NA	NA	NA	0.0568	NA	NA	NA	0.1363
HDL (mg/dl)	continuous	<i>p</i>	0.9500	0.3388	0.5620	0.6833	0.8378	0.7686	0.4376	0.6833	0.4777	0.6134	0.1970
	categorical	<i>r</i>	-0.1000	-0.2256	0.0970	0.3000	-0.0488	-0.0619	-0.1297	-0.3000	-0.1685	-0.1062	0.2140
LDL (mg/dl)	continuous	<i>p</i>	0.5167	0.3227	0.0441	0.6833	0.4899	0.1183	0.0157	>0.9999	0.2120	0.2078	0.0869
	categorical	<i>r</i>	-0.4000	-0.2331	-0.1978	-0.3000	-0.1639	-0.3205	-0.4113	0.0	-0.2917	-0.2609	-0.2980
Triglycerides (mg/dl)	continuous	<i>p</i>	>0.9999	0.1516	0.9287	>0.9999	0.0762	0.0913	0.5966	>0.9999	0.2315	0.3812	0.6713
	categorical	<i>r</i>	-0.5000	0.3632	-0.0188	0.5000	0.4429	0.3877	-0.1112	-0.5000	0.3055	0.2070	0.0892
T2D	continuous	<i>p</i>	>0.9999	0.5932	0.9179	0.3333	0.5541	0.8377	0.4489	>0.9999	0.9905	0.3620	0.8476
	categorical	<i>r</i>	0.5000	-0.1374	0.0222	1.000	-0.1521	0.0489	0.1622	0.5000	-0.0024	0.2153	-0.0340
T2D	continuous	<i>p</i>	0.3333	0.4920	0.6131	>0.9999	0.2707	0.4937	0.3987	0.3333	0.5195	0.8526	0.5904
	categorical	<i>r</i>	-1.000	0.1778	-0.1087	-0.5000	0.2820	0.1625	-0.1805	-1.000	0.1668	0.0433	-0.1157
T2D	continuous	<i>p</i>	0.3333	0.6053	0.9070	>0.9999	0.4264	>0.9999	0.5528	0.3333	0.5214	0.0923	0.8782
	categorical	<i>r</i>	-1.000	-0.1348	0.0246	-0.5000	0.2059	0.0	-0.1246	-1.000	-0.1667	-0.3865	0.0323

Analysis was applied in the CT_{RF-} and CT_{RF+} subgroups separately, the total CT group and the T2D group, using appropriate non-parametric tests as required: differential expression levels in the cases of categorical variables [namely metabolic syndrome, central obesity, hypertension, hyperlipidemia (presence; *p* or absence; *ab* of the manifestation), HbA1c levels (<7% = 53 mmol/mol or > 7% = 53 mmol/mol) and glucose levels (<130 mg/dl or > 130 mg/dl)] were evaluated by the Mann-Whitney test, in the cases of ordinal variables [namely BMI levels (<25, 25–30, > 30)] by the Jonckheere-Terpstra test, while correlations with continuous variables [namely levels of BMI, W/H ratio, HbA1c, glucose, total cholesterol, HDL, LDL, and triglycerides] were evaluated by the Spearman's rank correlation test. The statistical significance (*p*), the miRNA levels [median (range)] in the groups of categorical and ordinal variables, and the regression (*r*) for continuous variables examined, are displayed

Bold values indicate median values and statistical significance *p* < 0.05

NA not applicable

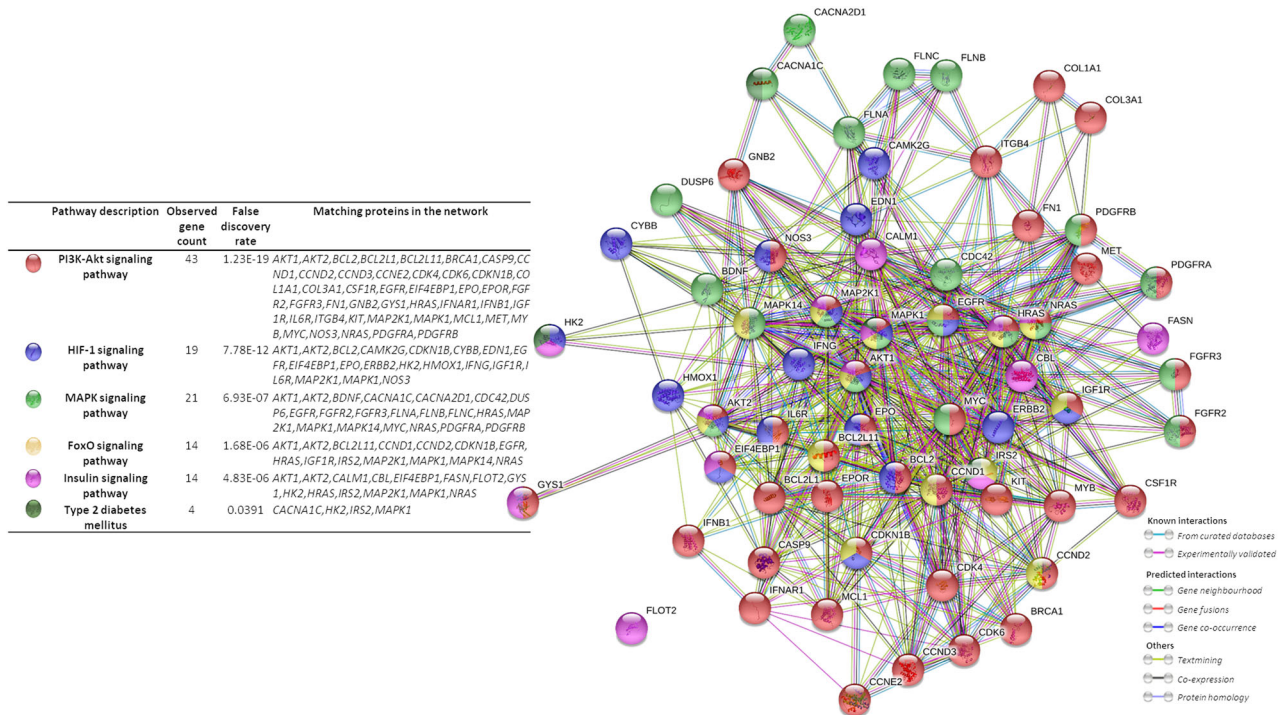


Fig. 2 Network of interactions among the proteins encoded by the set of genes targets of the T2D-specific miRNA panel developed in this study, focusing on molecular pathways involved in T2D pathogenesis. Network analysis was performed using the STRING (Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins) and KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) databases. Different genes/proteins are involved in different (one or more) T2D-related pathways,

as this is designated by the differently colored nodes. Edges represent protein–protein associations; either known interactions, predicted interactions or other associations. The incorporated table reports the number and the name of the target genes observed in each pathway and the false discovery rate of significance of the pathway in the analysis

those of the tv3 of *CDKN2A* in the CT_{RF+} group. On the other hand, miR-133a-5p, miR-1-3p, or miR-34a-5p levels were positively associated with *KCNQ1* tv1 levels (recently found to be decreased in T2D patients and individuals at risk of T2D [6]).

CDKN2A genetic variants were previously implicated in the negative regulation of beta-cell mass, proliferation, and insulin secretory function [28], while in human islets the locus can be affected by epigenetic factors [29]. The decreased levels of miR-24-3p, miR-34a-5p, and miR-125b-5p observed in this study, associated with T2D, and their negative correlation with the impaired levels of *CDKN2A* tv 3, may be linked to miRNA transcriptional-regulation events involved in T2D pathogenesis. On the other hand, *KCNQ1* encodes for the potassium voltage-gated channel, implicated in insulin secretion. The positive association between the decreased levels of miR-133a-5p or miR-1-3p with the decreased levels of *KCNQ1* tv1 observed in patients and predisposed individuals, may be implicated in molecular pathways associated with inhibition of repression/disturbance of feedback loops, related to impaired insulin secretion.

Nevertheless, some of the above miRNAs have been already reported to be involved in T2D-related

pathophysiology. In vitro experiments in human and murine blood samples and endothelial cells showed that miR-24 is involved in the thrombotic complications of diabetes and atherosclerotic plaque progression [21, 30]. Also, miR-1, and miR-133, the so-called ‘myo-miRs’ (they are clustered on the same chromosomal locus and transcribed together in a tissue-specific manner [31, 32]), are among the miRNA molecules that perchance play a key role in the cardiovascular complications of diabetes [33–35].

In an attempt to further support our suggestion on the possible involvement of these differentially expressed miRNAs in T2D pathogenesis, we searched for T2D-related molecular pathways regulated by these miRNAs, following a bioinformatics approach. Our data revealed enhanced regulation of PI3K-Akt, HIF-1, MAPK, FoxO, and insulin-signaling pathways, all pivotally involved in T2D pathogenesis. However, gene-set analysis did not reveal any of the T2D-susceptibility genes; this is probably to be expected since their functional involvement in T2D-related pathways is not yet fully elucidated and deposited in any database [36]. Though, by combining the qPCR data and results of the pathway analysis, one could speculate that the differentially expressed miRNAs can be involved in pathogenetic mechanisms and regulate both the genes in the

abovementioned pathways and T2D-susceptibility genes, and not exclude that the last may be also implicated in these pathways. It is also of note, that other pathways regulated by the T2D-related miRNA panel (Supplementary Table 5), are crucially implicated in cancer development, which may imply the common pathogenetic mechanisms shared by these two human disorders [37].

Lastly, the levels of the differentially expressed miRNAs were found to correlate with certain clinicopathological parameters, in a different manner in T2D versus control subjects. MiR-125b-5p, let-7b-5p, and miR-98-5p levels associated negatively with serum insulin levels, exclusively in the group of patients, suggesting possibly their involvement in insulin homeostasis in T2D. MiR-34a-5p levels associated negatively with serum triglycerides levels in the total group of controls and with % HbA1c levels in predisposed individuals, indicating probably their implication in regulatory mechanisms, underlying T2D pathogenesis and/or cholesterol metabolism. Nevertheless, one should be particularly concerned on the interpretation of these results, since, in the current study, the group of patients consisted of individuals both prior and under treatment, and thus miRNA expression as well as biochemical parameters may be regulated also by these anti-diabetic agents. Clearer evidence could arise from corresponding analysis on samples from newly-diagnosed T2D patients before the initiation of any treatment. This was not able to be performed in this study, since the cohort included only seven naïve patients.

Despite its limitations, including the relatively small number of participants and that only a single population is examined, this study describes for the first time to the best of our knowledge, a disease-specific expression profile of miRNAs validated to target T2D-susceptibility genes, in peripheral blood of patients and predisposed individuals. Power analysis suggests that this approach provides with promising data for further evaluation in larger cohorts. The impaired miRNA expression described herein may be linked to pathophysiological mechanisms underlying T2D development; the fact that these patterns correlated with certain disease parameters, differently in patients versus controls, may further support their involvement in disease's pathogenesis. Also, associations between the expression levels of these miRNAs and those of certain transcript variants of their target T2D-susceptibility genes exclusively in T2D and CT_{RF+} subjects, propose a transcript variant specific and disease-related regulation of transcription. Large-scale perspective clinical studies in diverse populations are essential to evaluate the potential of these miRNAs to serve as possible biomarkers for T2D diagnosis, prognosis, and/or monitoring.

Acknowledgements This research was co-financed by Greece and the European Union (European Social Fund - ESF) through the

Operational Program “Human Resources Development, Education and Lifelong Learning” in the context of the project “Scholarships program for post-graduate studies-2nd study Cycle” (MIS-5003404), implemented by the State Scholarships Foundation (IKY).

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

References

1. International Diabetes Federation, *IDF Diabetes Atlas*. 7th edn. (International Diabetes Federation, Brussels, Belgium, 2015)
2. D.M. Nathan, Diabetes: advances in diagnosis and treatment. *JAMA* **314**, 1052–1062 (2015)
3. A. Desiderio, R. Spinelli, M. Ciccarelli, C. Nigro, C. Miele, F. Beguinot et al. Epigenetics: spotlight on type 2 diabetes and obesity. *J. Endocrinol. Investig.* **39**, 1095–1103 (2016)
4. A.P. Morris, B.F. Voight, T.M. Teslovich, T. Ferreira, A.V. Segre, V. Steinthorsdottir et al. Large-scale association analysis provides insights into the genetic architecture and pathophysiology of type 2 diabetes. *Nat. Genet.* **44**, 981–990 (2012)
5. J. MacArthur, E. Bowler, M. Cerezo, L. Gil, P. Hall, E. Hastings et al. The new NHGRI-EBI Catalog of published genome-wide association studies (GWAS Catalog). *Nucleic Acids Res.* **45**, D896–D901 (2017)
6. M.I. Christodoulou, M. Avgeris, I. Kokkinopoulou, E. Maratou, P. Mitrou, C.K. Kontos et al. Blood-based analysis of type-2 diabetes mellitus susceptibility genes identifies specific transcript variants with deregulated expression and association with disease risk. *Sci. Rep.* **9**, 1512 (2019)
7. S.L. Fernandez-Valverde, R.J. Taft, J.S. Mattick, MicroRNAs in beta-cell biology, insulin resistance, diabetes and its complications. *Diabetes* **60**, 1825–1831 (2011)
8. J. Feng, W. Xing, L. Xie, Regulatory roles of MicroRNAs in diabetes. *Int J Mol Sci.* **17**, 1729 (2016)
9. H. Chen, H.Y. Lan, D.H. Roukos, W.C. Cho, Application of microRNAs in diabetes mellitus. *J. Endocrinol.* **222**, R1–R10 (2014)
10. Y. He, Y. Ding, B. Liang, J. Lin, T. K. Kim, H. Yu, et al. A systematic study of dysregulated MicroRNA in type 2 diabetes mellitus. *Int J Mol Sci.* **18**, 456 (2017).
11. C. Guay, R. Regazzi, Circulating microRNAs as novel biomarkers for diabetes mellitus. *Nat. Rev. Endocrinol.* **9**, 513–521 (2013)
12. A.D. McClelland, P. Kantharidis, MicroRNA in the development of diabetic complications. *Clin. Sci. (Lond.)* **126**, 95–110 (2014)
13. M. van de Bunt, K.J. Gaulton, L. Parts, I. Moran, P.R. Johnson, C. M. Lindgren et al. The miRNA profile of human pancreatic islets and beta-cells and relationship to type 2 diabetes pathogenesis. *PLoS ONE* **8**, e55272 (2013)
14. I.S. Vlachos, M.D. Paraskevopoulou, D. Karagkouni, G. Georgakilas, T. Vergoulis, I. Kanellos et al. DIANA-TarBase v7.0: indexing more than half a million experimentally supported miRNA:mRNA interactions. *Nucleic Acids Res.* **43**, D153–D159 (2015)
15. C.H. Chou, S. Shrestha, C.D. Yang, N.W. Chang, Y.L. Lin, K.W. Liao et al. MiRTarBase update 2018: a resource for experimentally validated microRNA-target interactions. *Nucleic Acids Res.* **46**, D296–D302 (2018)

16. S. Cho, I. Jang, Y. Jun, S. Yoon, M. Ko, Y. Kwon et al. MiR-Gatorv3.0: a microRNA portal for deep sequencing, expression profiling and mRNA targeting. *Nucleic Acids Res.* **41**, D252–D257 (2013)
17. M. Hamberg, C. Backes, T. Fehlmann, M. Hart, B. Meder, E. Meese et al. MiRTargetLink-miRNAs, genes and interaction networks. *Int J. Mol. Sci.* **17**, 564 (2016)
18. K.J. Livak, T.D. Schmittgen, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods* **25**, 402–408 (2001)
19. M. Kanehisa, S. Goto, KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res.* **28**, 27–30 (2000)
20. D. Szklarczyk, A. Franceschini, S. Wyder, K. Forslund, D. Heller, J. Huerta-Cepas et al. STRINGv10: protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life. *Nucleic Acids Res.* **43**, D447–D452 (2015)
21. Y. Xiang, J. Cheng, D. Wang, X. Hu, Y. Xie, J. Stitham et al. Hyperglycemia repression of miR-24 coordinately upregulates endothelial cell expression and secretion of von Willebrand factor. *Blood* **125**, 3377–3387 (2015)
22. A. Zampetaki, S. Kiechl, I. Drozdov, P. Willeit, U. Mayr, M. Prokopi et al. Plasma microRNA profiling reveals loss of endothelial miR-126 and other microRNAs in type 2 diabetes. *Circ. Res.* **107**, 810–817 (2010)
23. F.J. Ortega, J.M. Mercader, J.M. Moreno-Navarrete, O. Rovira, E. Guerra, E. Esteve et al. Profiling of circulating microRNAs reveals common microRNAs linked to type 2 diabetes that change with insulin sensitization. *Diabetes Care* **37**, 1375–1383 (2014)
24. I.J. Gallagher, C. Scheele, P. Keller, A.R. Nielsen, J. Remenyi, C. P. Fischer et al. Integration of microRNA changes in vivo identifies novel molecular features of muscle insulin resistance in type 2 diabetes. *Genome Med.* **2**, 9 (2010)
25. D. Santovito, V. De Nardis, P. Marcantonio, C. Mandolini, C. Paganelli, E. Vitale et al. Plasma exosome microRNA profiling unravels a new potential modulator of adiponectin pathway in diabetes: effect of glycemic control. *J. Clin. Endocrinol. Metabol.* **99**, E1681–E1685 (2014)
26. Z. Yang, H. Chen, H. Si, X. Li, X. Ding, Q. Sheng et al. Serum miR-23a, a potential biomarker for diagnosis of pre-diabetes and type 2 diabetes. *Acta Diabetol.* **51**, 823–831 (2014)
27. Z. Yang, J. Wu, MicroRNAs and regenerative medicine. *DNA Cell Biol.* **26**, 257–264 (2007)
28. Y. Kong, R.B. Sharma, B.U. Nwosu, L.C. Alonso, Islet biology, the CDKN2A/B locus and type 2 diabetes risk. *Diabetologia* **59**, 1579–1593 (2016)
29. N. Popov, J. Gil, Epigenetic regulation of the INK4b-ARF-INK4a locus: in sickness and in health. *Epigenetics* **5**, 685–690 (2010)
30. Y. Xiang, MiR-24 in diabetes. *Oncotarget* **6**, 16816–16817 (2015)
31. J.F. Chen, E.M. Mandel, J.M. Thomson, Q. Wu, T.E. Callis, S.M. Hammond et al. The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation. *Nat. Genet.* **38**, 228–233 (2006)
32. C. Xu, Y. Lu, Z. Pan, W. Chu, X. Luo, H. Lin et al. The muscle-specific microRNAs miR-1 and miR-133 produce opposing effects on apoptosis by targeting HSP60, HSP70 and caspase-9 in cardiomyocytes. *J. Cell Sci.* **120**, 3045–3052 (2007)
33. S. Fichtlscherer, A.M. Zeiher, S. Dimmeler, Circulating microRNAs: biomarkers or mediators of cardiovascular diseases? *Arterioscler Thromb. Vasc. Biol.* **31**, 2383–2390 (2011)
34. R.S. Gangwar, S. Rajagopalan, R. Natarajan, J.A. DeJulius, Non-coding RNAs in cardiovascular disease: pathological relevance and emerging role as biomarkers and therapeutics. *Am. J. Hypertens.* **31**, 150–165 (2018)
35. X. Liu, S. Liu, Role of microRNAs in the pathogenesis of diabetic cardiomyopathy. *Biomed. Rep.* **6**, 140–145 (2017)
36. V. Lyssenko, M. Laakso, Genetic screening for the risk of type 2 diabetes: worthless or valuable? *Diabetes Care* **36**(Suppl 2), S120–S126 (2013)
37. K.K. Collins, The diabetes-cancer link. *Diabetes Spectr.* **27**, 276–280 (2014)
38. A.Y. Cheng, L.A. Leiter, Implications of recent clinical trials for the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III guidelines. *Curr. Opin. Cardiol.* **21**, 400–404 (2006)
39. Expert Panel on Detection E, Treatment of high blood cholesterol in a: executive summary of the third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA* **285**, 2486–2497 (2001)