

«Σχολή Θετικών Επιστημών και Τεχνολογίας»

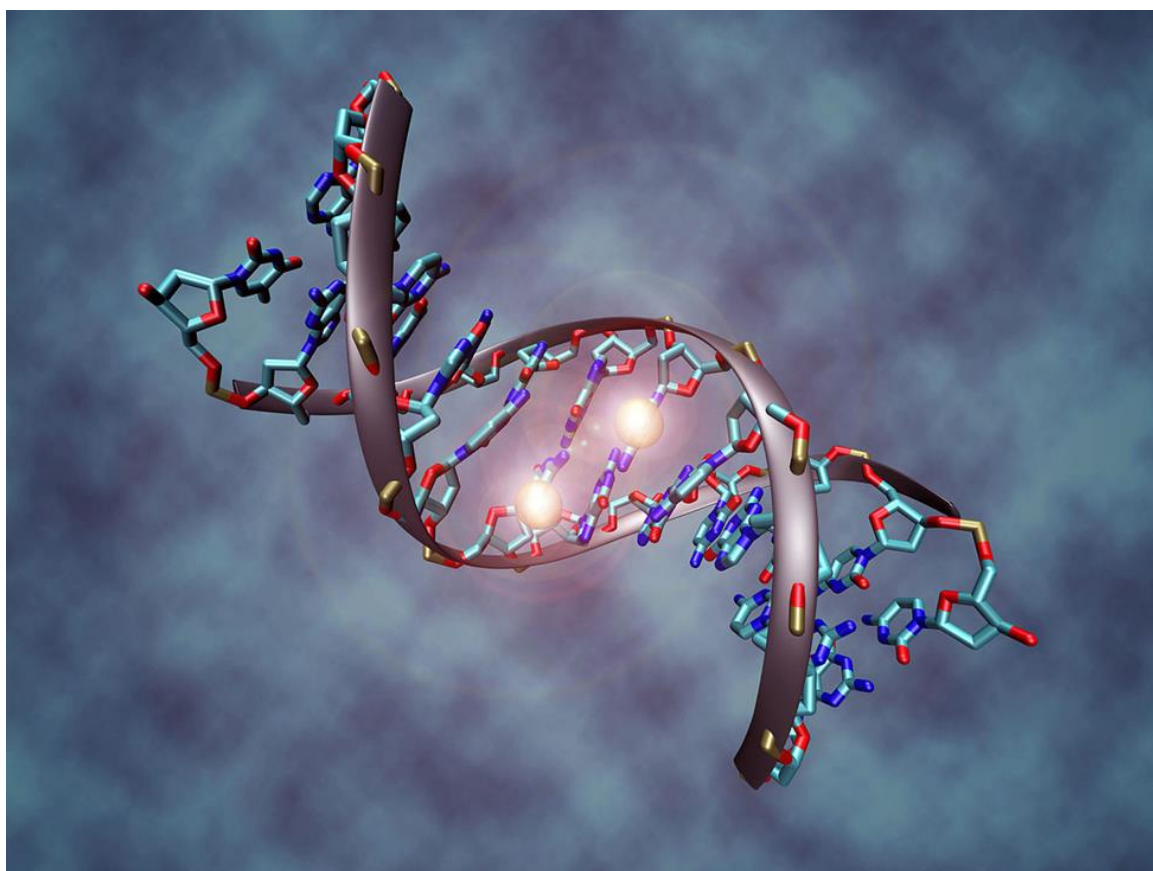
«Χημική και Βιομοριακή Ανάλυση»

Διπλωματική Εργασία

«Ο ρόλος της μεθυλίωσης του DNA στην ανάπτυξη και εξέλιξη του  
Σακχαρώδους Διαβήτη Τύπου 2»

Γιοβάνη Μαρία Βασιλική

Επιβλέπουσα καθηγήτρια: Κωνσταντίνου Αικατερίνη



Πάτρα, Ιούλιος 2023

Η παρούσα εργασία αποτελεί πνευματική ιδιοκτησία του φοιτητή (Γιοβάνη Μαρία Βασιλική) που την εκπόνησε. Στο πλαίσιο της πολιτικής ανοικτής πρόσβασης ο συγγραφέας/δημιουργός εκχωρεί στο ΕΑΠ, μη αποκλειστική άδεια χρήσης του δικαιώματος αναπαραγωγής, προσαρμογής, δημόσιου δανεισμού, παρουσίασης στο κοινό και ψηφιακής διάχυσής τους διεθνώς, σε ηλεκτρονική μορφή και σε οποιοδήποτε μέσο, για διδακτικούς και ερευνητικούς σκοπούς, άνευ ανταλλάγματος και για όλο το χρόνο διάρκειας των δικαιωμάτων πνευματικής ιδιοκτησίας. Η ανοικτή πρόσβαση στο πλήρες κείμενο για μελέτη και ανάγνωση δεν σημαίνει καθ' οιονδήποτε τρόπο παραχώρηση δικαιωμάτων διανοητικής ιδιοκτησίας του συγγραφέα/δημιουργού ούτε επιτρέπει την αναπαραγωγή, αναδημοσίευση, αντιγραφή, αποθήκευση, πώληση, εμπορική χρήση, μετάδοση, διανομή, έκδοση, εκτέλεση, «μεταφόρτωση» (downloading), «ανάρτηση» (uploading), μετάφραση, τροποποίηση με οποιονδήποτε τρόπο, τμηματικά ή περιληπτικά της εργασίας, χωρίς τη ρητή προηγούμενη έγγραφη συναίνεση του συγγραφέα/δημιουργού. Ο συγγραφέας/δημιουργός διατηρεί το σύνολο των ηθικών και περιουσιακών του δικαιωμάτων.



«Ο ρόλος της μεθυλίωσης του DNA στην ανάπτυξη και εξέλιξη του  
Σακχαρώδους Διαβήτη Τύπου 2»

Γιοβάνη Μαρία Βασιλική

Επιτροπή Επίβλεψης Πτυχιακής / Διπλωματικής Εργασίας

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια

Κωνσταντίνου Αικατερίνη

«Μέλος ΣΕΠ»

«Ελληνικό Ανοικτό Πανεπιστήμιο»

Συν-Επιβλέπουσα Καθηγήτρια

Μαρκοπούλου Σουλτάνα

«Μέλος ΣΕΠ»

«Ελληνικό Ανοικτό Πανεπιστήμιο»

Πάτρα, Ιούλιος 2023

## Ευχαριστίες

Τελειώνοντας τις σπουδές του πρώτου μου πτυχίου στη Βιοτεχνολογία, είχα πάντα σαν επόμενο στόχο την κατάκτηση ενός μεταπτυχιακού τίτλου. Οι συνθήκες που δημιουργήθηκαν με την πανδημία του κορονοϊού μου επέτρεψαν να ξεκινήσω να δίνω μορφή σε αυτό το όνειρο μέσα από τα Μεταπτυχιακά Προγράμματα Σπουδών του Ελληνικού Ανοικτού Πανεπιστημίου. Το πρόγραμμα «Χημική και Βιομοριακή Ανάλυση» αποτέλεσε για εμένα μια πόρτα που άνοιξε νέους ορίζοντες.

Με την ολοκλήρωση των ενοτήτων αυτού του Μεταπτυχιακού, θα ήθελα πρωτίστως να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα καθηγήτρια Κωνσταντίνου Αικατερίνη, η οποία μέσω του τρόπου διδασκαλίας και της προσωπικότητάς της, τόσο στα θεωρητικά όσο και στα εργαστηριακά μαθήματα, με ενέπνευσε να ασχοληθώ με το αντικείμενο που πραγματεύεται η Μεταπτυχιακή Διπλωματική μου Εργασία και ήταν δίπλα μου καθοδηγώντας με όποτε και αν τη χρειαζόμουν. Δεν θα είναι υπερβολή σε αυτό σημείο να εκφράσω τον θαυμασμό μου προς εκείνη.

Έπειτα θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου προς τους γονείς μου, τη μητέρα μου Χριστίνα και τον πατέρα μου Γρηγόρη, για τα εφόδια που μου έχουν δώσει μέχρι σήμερα και τη γνώση του πόσο σημαντικό είναι να θέτω και να κατακτώ στόχους καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής μου.

Τέλος, δεν θα μπορούσα να μην συμπεριλάβω την αδερφή μου Κωνσταντίνα, το Θάνο και φυσικά τον σύντροφό μου Στέφανο Χριστοδουλάκη, που σε μια δύσκολη χρονιά για εμένα ήταν δίπλα μου σε κάθε βήμα και με στήριξαν ψυχολογικά ώστε να καταφέρω να ολοκληρώσω τις σπουδές μου.

Γιοβάννη Μαρία Βασιλική

20-6-2023

## Περίληψη

Ο Σακχαρώδης Διαβήτης τύπου 2 αποτελεί αποδεδειγμένα μάστιγα στη σύγχρονη εποχή. Έχουν καταγραφεί για το 2019 περίπου 463 εκατομμύρια περιπτώσεις ενώ αναμένεται αυτές να έχουν ξεπεράσει τα 500 εκατομμύρια ως το 2030. Οι παράγοντες που ενισχύουν αυτό το φαινόμενο πέραν των γενετικών, είναι φυσικά ο τρόπος ζωής, η διατροφή και διάφοροι περιβαλλοντικοί παράγοντες.

Τα τελευταία χρόνια έγινε μια στροφή προς την επιγενετική, οι τροποποιήσεις που συμβαίνουν στο γενετικό υλικό και επηρεάζουν τη λειτουργία και την έκφραση των γονιδίων, προκαλούμενες κυρίως από εξωγενή ερεθίσματα (όπως οι διατροφικές συνήθειες, την ηλικία/γήρανση και το επίπεδο της φυσικής δραστηριότητας του οργανισμού).

Ο στόχος της παρούσας εργασίας είναι, η μελέτη του ρόλου της μεθυλίωσης του DNA, του πιο καλά μελετημένου επιγενετικού μηχανισμού, στην ανάπτυξη και εξέλιξη του σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 (ΣΔ2), η παρουσίαση των σημαντικότερων υποψήφιων, για ΣΔ2, γονιδίων των οποίων η μεθυλίωση ή/και οι πολυμορφισμοί επηρεάζουν την εμφάνιση της ασθένειας και εξήγηση της συνέργειας των μηχανισμών που οδηγούν σε αυτή.

Καταλήγοντας σε μια συγκριτική μελέτη, παρατηρήθηκαν 15 γονίδια σημαντικά για τον ΣΔ2, που εμφανίζουν μεθυλιώσεις και SNPs και αυτά είναι: *INS*, *CDKN2A*, *KCNQ1*, *PDX-1*, *ADCY5*, *PPARG1A*, *FTO*, *HHEX*, *THADA*, *IRS1*, *TCF7L2*, *DUSP9*, *KLF11*, *KLF14*, *SLC30A8*.

Τέλος φαίνεται να υπάρχει πολύς χώρος για επιπλέον μελέτη της (επι)γενετικής του ΣΔ2, ώστε να αποσαφηνιστούν πλήρως οι μηχανισμοί που οδηγούν στην ασθένεια και να υπάρχει εξέλιξη στη χρήση αυτών των υποψήφιων γονιδίων ως στόχους για τον έλεγχο ή/και τελικά τη θεραπεία της ασθένειας.

## Λέξεις – Κλειδιά

Σακχαρώδης Διαβήτης τύπου 2, επιγενετική, επιγενετικοί μηχανισμοί, μεθυλίωση, υποψήφια γονίδια, SNPs, μετάλλαξη

## “The role of DNA methylation in the onset and progress of Type 2 Diabetes Mellitus”

### Abstract

Type 2 Diabetes Mellitus is a proven scourge in modern times. About 463 million cases have been recorded until 2019, while it is expected that these will have exceeded 500 million by 2030. The factors that support this phenomenon beyond genetics are, of course, lifestyle, diet and various environmental factors.

The last decades there has been a shift towards epigenetics, the modifications that occur in the DNA and affect the function and expression of genes, mainly caused by exogenous stimuli (such as dietary habits, aging and the level of physical activity).

The aim of this work is to study the role of DNA methylation, the most well-studied epigenetic mechanism, in the development and progression of type 2 diabetes (T2D), to present the most important candidate genes for T2D, genes whose methylation and/or polymorphisms affect the onset of the disease and to explain the synergy of the mechanisms leading to the disease.

Coming to a comparative study, 15 genes proved to be important for T2DM, showing methylations and SNPs were observed and these are: *INS*, *CDKN2A*, *KCNQ1*, *PDX-1*, *ADCY5*, *PPARG1A*, *FTO*, *HHEX*, *THADA*, *IRS1*, *TCF7L2*, *DUSP9*, *KLF11*, *KLF14*, *SLC30A8*.

Finally, there appears to be much room for further study of the (epi)genetics of T2DM to fully elucidate the mechanisms leading to the disease and progress to be done in the use of these candidate genes as therapeutic targets to control and/or eventually treat the disease.

### Keywords

Type 2 Diabetes Mellitus, epigenetics, epigenetic mechanisms, methylation, candidate genes, SNPs, mutation.

## Περιεχόμενα

Περίληψη .....	v
Abstract .....	vi
Περιεχόμενα .....	vii
Κατάλογος Εικόνων / Σχημάτων .....	ix
Κατάλογος Πινάκων .....	x
Συντομογραφίες & Ακρωνύμια .....	xi
1. Εισαγωγή στην Επιγενετική .....	1
1.1 Από τη Γενετική στην Επιγενετική .....	1
1.2 Οι επιγενετικοί Μηχανισμοί .....	4
1.2.1 Η Τροποποίηση των Ιστονών .....	4
1.2.2 Μη κωδικά RNA (Non coding RNAs) .....	6
1.2.3 Μεθυλίωση του DNA (DNA methylation) .....	8
1.3 Παράγοντες που Επηρεάζουν τη Μεθυλίωση του DNA .....	12
2. Ο Σακχαρώδης Διαβήτης .....	14
2.1 Ιστορική Αναδρομή .....	14
2.2 Ορισμός του Σακχαρώδους Διαβήτη .....	16
2.3 Τύποι Σακχαρώδους Διαβήτη .....	17
2.4 Επιδημιολογία Σακχαρώδους Διαβήτη .....	18
2.5 Κλινική Εικόνα .....	20
2.6 Η Παθοφυσιολογία του Σακχαρώδους Διαβήτη Τύπου 1 και 2 .....	20
2.7 Παράγοντες Κινδύνου Εμφάνισης Σακχαρώδους Διαβήτη .....	23
2.8 Επιπλοκές του Σακχαρώδους Διαβήτη Τύπου 2 .....	24
3 Μεθυλίωση των γονιδίων του ΣΔ2 .....	27
3.1 Μεθυλίωση και Παχυσαρκία .....	27
3.2 Μεθυλίωση και Σακχαρώδης Διαβήτης 2 .....	29
3.2.1 Πάγκρεας (παγκρεατικά νησίδια, pancreatic islets) .....	30
3.2.2 Λιπώδης Ιστός (adipose tissue) .....	32
3.3.3 Ήπαρ (liver) .....	33
3.3.4 Σκελετικοί μύες (skeletal muscles) .....	34
3.3.5 Αίμα (Blood) .....	35
4. Μεταλλάξεις που επηρεάζουν το ΣΔ2 .....	38
4.1 KCNJ11 .....	42
4.2 PPAR-GAMMA (PPARG) .....	43
4.3 HNF1B/TCF2 .....	45
4.4 WFS1 .....	45
4.5 TCF7L2 .....	47
4.6 PDX-1 .....	49
4.7 HNF1α .....	49
4.8 GLIS3 .....	51
4.9 THADA .....	52
4.10 SLC30A8 .....	52
4.11 FTO .....	54
4.12 KCNQ1 .....	54
4.13 CDKAL1 .....	55
4.14 HHEX .....	55

4.15 CDKN2A.....	56
4.16 ADCY5 .....	56
4.17 DUSP9.....	57
4.18 IRS-1 .....	59
5. Συζήτηση-Συμπεράσματα .....	60
5.1 Συγκριτική μελέτη .....	61
5.2 Συνέργεια μεταξύ CpG-SNPs.....	63
Βιβλιογραφία.....	68



## Κατάλογος Εικόνων / Σχημάτων

<b>Εικόνα Εξωφύλλου:</b> Ένα μοριο DNA το οποίο μεθυλιώνεται και στις δυο αλυσίδες στην κεντρική κυτοσίνη. [Details: The picture shows the crystal structure of a short DNA helix with sequence "accgcCGgcgc", The structure was taken from the Protein Data Bank (accession number 3Z9D), rendering was performed with VMD (Visual Molecular Dynamics rendering program) and post-processing was done in Photoshop. (Date:18 February 2006, Source: Own work Author: Christoph Bock, Max Planck Institute for Informatics)	
<b>Εικόνα 2.1:</b> Α. Ο επιπολασμός του ΣΔ σε ποσοστό για κάθε χώρα το 2019 και η πρόβλεψη για το 2045 Β. Οι περιπτώσεις ΣΔ αριθμητικά ανά χώρα. ( Alam et al.2021)	19
<b>Εικόνα 2.2:</b> Η δομή της ινσουλίνης	21
<b>Εικόνα 2.3:</b> Η διαδικασία έκκρισης της ινσουλίνης και σχηματική απεικόνιση της λειτουργίας των τάσεο-εξαρτώμενων διαύλων $K_{ATP}$ και $Ca^{2+}$ .	21
<b>Εικόνα 2.4:</b> Το σηματοδοτικό μονοπάτι της ινσουλίνης.	23
<b>Εικόνα 3.1:</b> Τα γονίδια των οποίων η μεθυλίωση αλλάζει και έχουν συσχετιστεί με την παχυσαρκία	29
<b>Εικόνα 3.2:</b> Τα γονίδια των οποίων η μεθυλίωση αλλάζει και έχουν συσχετιστεί με τον ΣΔ2.	35
<b>Εικόνα 4.1:</b> Διαγραμματική απεικόνιση της δομής του διαύλου $K_{ATP}$ .	42
<b>Εικόνα 4.2:</b> Η ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης από τον PPAR $\gamma$	44
<b>Εικόνα 4.3:</b> Σχηματική απεικόνιση του μηχανισμού μετακίνησης πρωτεϊνών φορτίου μέσω κυστιδίων από το ενδοπλασματικό δίκτυο στο σύμπλεγμα Golgi με τη μεσολάβηση της βολφραμίνης (WFS1	46
<b>Εικόνα 4.4:</b> Η δομή του TCF7L2 γονιδίου	48
<b>Εικόνα 4.5:</b> Η κλασσική οδός ή σηματοδοτικό μονοπάτι Wnt/B-κατενίνης	48
<b>Εικόνα 4.6:</b> Η δομή της πρωτεΐνης HNF1 $\alpha$	50
<b>Εικόνα 4.7:</b> Σχηματική αναπαράσταση της λειτουργίας του ADCY5 στα ανθρώπινα παγκρεατικά κύτταρα.	57
<b>Εικόνα 4.8:</b> Η ρύθμιση της έκφρασης του DUSP9 και η σύνδεση του με τα μονοπάτια των MAPK.	58
<b>Εικόνα 4.9:</b> Το σηματοδοτικό μονοπάτι της PI3K.	59
<b>Εικόνα 5.1:</b> Σχηματική αναπαράσταση της αλληλεπίδρασης των παραγόντων που προκαλούν ΣΔ2 (T2D) και των υψηλής ταχύτητας (HT), αλληλούχισης νέας γενιάς (NGS), προσεγγίσεων που χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη των (επι)γενετικών τροποποιήσεων.	60
<b>Εικόνα 5.2:</b> Παράδειγμα στο οποίο η μεθυλίωση επηρεάζεται έμμεσα από ένα SNP σε θέση γειτνίασης	64
<b>Εικόνα 5.3:</b> Η άμεση επίδραση SNPs στη μεθυλίωση πρόσθιας και ανάστροφης αλυσίδας εντός CpG («απώλεια CpG»).	66

## Κατάλογος Πινάκων

<b>Πίνακας 1.1:</b> Τύποι και λειτουργίες ρυθμιστικών μη-κωδικοποιητικών RNAs (ncRNAs) σε κύτταρα θηλαστικών.....	8
<b>Πίνακας 3.1:</b> Μελέτες που εξετάζουν τη σχέση μεταξύ του ΣΔ2 και της μεθυλίωσης του DNA στους διάφορους ιστούς.....	36
<b>Πίνακας 4.1:</b> Γονίδια που σχετίζονται με τον ΣΔ2 και εμφανίζουν μεταλλάξεις.....	39
<b>Πίνακας 4.2:</b> Τα αλληλόμορφα του GLIS3 που σχετίζονται με ΣΔ2.....	52
<b>Πίνακας 5.1:</b> Συγκεντρωτική λίστα των γονιδίων, που αναφέρονται στην παρούσα εργασία, και των οποίων η διαφοροποιημένη μεθυλίωση σχετίζεται με την ανάπτυξη ΣΔ2.....	62
<b>Πίνακας 5.2:</b> Τα 15 γονίδια που παρουσιάζουν και διαφοροποιημένη μεθυλίωση αλλά και πολυμορφισμούς SNPs και σχετίζονται με ΣΔ2. (συνδυασμός στοιχείων Πίνακα 3.1 και Πίνακα 4.1).....	62

## Συντομογραφίες & Ακρωνύμια

HMT	Histone methyl-transferase- Μεθυλοτρανσφεράση των ιστονών
SAM	S-adenosyl methionine- S-αδενοσυλομεθειονίνη
LSD1	Λυσίνη απομεθυλάσης
HAT	Ακετυλοτρανσφεράση ιστονών
HDAC	Αποακετυλάση
UTR	Untranslated region- Μη-μεταφραστική περιοχή
RBD	RNA binding domains- περιοχές σύνδεσης
DNMT	Μεθυλοτρανσφεράση του DNA
CpG	Δινουκλεοτίδιο CG
CGI	CpG island- περιοχή πλούσια σε CG (>60%)
ΜΣ	Μεταβολικό Σύνδρομο
ΣΔ-DM	Σακχαρώδης Διαβήτης- Diabetes mellitus
ΣΔ2-T2D	Σακχαρώδης Διαβήτης τύπου 2– Type 2 Diabetes mellitus
ΣΔ1-T1D	Σακχαρώδης Διαβήτης τύπου 1– Type 1 Diabetes mellitus
MODY	Maturity-onset diabetes of the young- Οικογενής Διαβήτης
ATP	Τριφωσφορική αδενοσίνη (adenosine triphosphate)
BMI-ΔΜΣ	Body mass index- Δείκτης Μάζας Σώματος
SNP	Single nucleotide polymorphism-Πολυμορφισμός ενός νουκλεοτιδίου

# 1. Εισαγωγή στην Επιγενετική

## 1.1 Από τη Γενετική στην Επιγενετική

Γενετική είναι ο κλάδος της Βιολογίας που μελετά τα γονίδια, την κληρονομικότητα και τη βιοποικιλότητα στους ζωντανούς οργανισμούς. Συμβάλλει στην κατανόηση πολλών εφαρμοσμένων επιστημών και συνδέεται με τη μελέτη των συστημάτων πληροφοριών. Ο όρος «γενετική» αναφέρθηκε πρώτη φορά από τον Άγγλο William Bateson, γνωστός υποστηρικτής της Μεντελικής θεωρίας, για να ορίσει την επιστήμη της κληρονομικότητας και της ποικιλομορφίας, σε μια επιστολή προς τον συνεργάτη του, Adam Sedgwick, τον Απρίλιο του 1905. Αργότερα ο όρος προτάθηκε για την ονομασία της έδρας που δημιουργήθηκε στο πανεπιστήμιο του Cambridge για τον ίδιο η οποία όμως τελικά ονομάστηκε «Έδρα της Βιολογίας». Τελικά το 1906 στο 3ο Διεθνές Συνέδριο για τον Υβριδισμό των Φυτών ο Bateson πρότεινε τον όρο «γενετική» για να περιγράψει τη νέα αυτή επιστήμη της κληρονομικότητας που βασιζόταν στους νόμους του Μέντελ κάτι που έγινε αποδεκτό με ενθουσιασμό και τελικά το 1907 έγινε επίσημο.

Παρότι η επισημοποίηση του όρου έγινε το 1907, πατέρας της Γενετικής θεωρείται μέχρι και σήμερα ο Αυστριακός επιστήμονας και μοναχός Gregor Mendel. Ο Mendel, το 1866 δημοσίευσε ένα άρθρο σχετικό με τα «Πειράματα για τον Υβριδισμό των Φυτών» που ο ίδιος πραγματοποίησε την περίοδο 1856-63 και λίγο αργότερα το 1869 ένα δεύτερο. Το έργο του είχε πολλές επιρροές από τη θεωρία του Δαρβίνου καθώς έχει αποδειχτεί ότι τον μελετούσε, όμως παρέμεινε παραγκωνισμένο μέχρι τις αρχές του επόμενου αιώνα όταν τρεις άλλοι επιστήμονες ο Hugo de Vries στην Ολλανδία, ο Carl Correns στη Γερμανία και ο Erich von Tschermak στην Αυστρία, ανεξάρτητα ο καθένας, το 1900, ξανά ανακάλυψαν τους νόμους του Mendel. Τις δύο πρώτες δεκαετίες του 20ου αιώνα υπήρξαν κάποιες αντιπαραθέσεις σε σχέση με τις θεωρίες του Μέντελ οι οποίες τελικά συνδυάστηκαν στη σύγχρονη μορφή της εξελικτικής βιολογίας το 1918 μέσα από το έργο του Ronald Fisher, σημαντικό στοιχείο αυτής ήταν και η εξέλιξη του κλάδου της στατιστικής.

Η εμφάνιση της μοριακής γενετικής έγινε όταν οι Beadle και Tatum έκαναν μια προσπάθεια να συνδέσουν τη γενετική με τη βιοχημεία το 1941. Παρ' όλα αυτά όμως μέχρι και τα τέλη της δεκαετίας του '40 η μοριακή φύση των γονιδίων παρέμενε άγνωστη. Όταν τελικά οι Francis Crick και James Watson ανακάλυψαν το 1953 τη δομή του μορίου DNA, έγινε γνωστό ότι το DNA ήταν αυτό που μεταφέρει τις ιδιότητες της κληρονομικότητας. Αυτή η

ανακάλυψη οδήγησε σε πολλές καινοτομίες στον τομέα της Μοριακής Βιολογίας τις δεκαετίες 1950-60, ανάμεσα σε αυτές η ήταν και η αποκρυπτογράφηση του Γενετικού Κώδικα. Τότε ήταν που, το μοντέλο των Francois Jacob και Jacques Monod, για τη γονιδιακή ρύθμιση και έκφραση, έγινε ιδιαιτέρως σημαντικό.

Ενδιαφέρον προκαλεί το γεγονός ότι, πριν από αυτή την περίοδο εμφανίζονταν τρεις διαφορετικές αναφορές για τον χαρακτηρισμό του γονιδίου, οι οποίες συνυπήρχαν σχεδόν αρμονικά. Κατά την αυστηρή Μεντελική θεωρία το γονίδιο αναφέρονταν ως «μονάδα λειτουργίας» η οποία μετέφερε κάτι και το αποτέλεσμα εμφανιζόταν στο φαινότυπο. Στο πλαίσιο της χρωμοσωμικής γενετικής το γονίδιο αναφέρονταν και ως «μονάδα ανασυνδυασμού» και τελικά μετά τα πειράματα μεταλλάξεων μέσω ακτίνων X του Muller αναφέρονταν και ως «μονάδα μετάλλαξης». Τα πειράματα όμως του Seymour Benzer στον βακτηριοφάγο T4 στις αρχές του '60 οδήγησαν στην κατάλυση των παραδοσιακών μέχρι τότε χαρακτηρισμών του γονιδίου και προτάθηκε η χρήση της ιδέας του κιστρονίου (σιστρονίου) η οποία εξυπηρέτησε αρκετούς μοριακούς βιολόγους, ανάμεσα σε αυτούς οι Jacob και Monod και αποτελεί όρο που χρησιμοποιείται και σήμερα. Η ιδέα όμως ότι γονίδιο είναι μια αλληλουχία DNA που κωδικοποιεί την αλληλουχία των αμινοξέων μιας πρωτεΐνης (πολυπεπτίδιο), πολύ γρήγορα, στα μέσα της ίδιας δεκαετίας εμφανίστηκε η ανάγκη να εξομαλυνθεί. Αυτό συνέβη επειδή προέκυψε ο προβληματισμός του κατά πόσο ο όρος «γονίδιο» μπορούσε να συμπεριλάβει τις δομικές αλληλουχίες, τις ρυθμιστικές αλληλουχίες και τις αλληλουχίες που καθορίζουν τα ριβοσωμικά/μεταφορικά RNA. Τελικά όμως τα αποτελέσματα της εργασίας των Jacob και Monod σχετικά με το οπερόνιο της λακτόζης οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι πολλές από αυτές τις έννοιες αλληλοεπικαλύπτονται και τελικά είναι πολύ δύσκολο να βρεθεί ένας μη συγκεκριμένος και γενικός μοριακός ορισμός για το γονίδιο ο οποίος να είναι και ανάλογος αυτού της κλασσικής γενετικής.

Μετά το 2000 και με την ανακάλυψη των μη κωδικών RNA υπήρξε η άποψη να εγκαταλειφθεί η λέξη «γονίδιο» και να αντικατασταθεί με πιο ακριβείς όρους. Επειδή αυτό αποτελεί μια ακραία ιδέα ίσως είναι καλύτερη η υπόθεση ότι η σχετικότητα των όρων είναι ανάλογη του επιστημονικού περιεχομένου που εξετάζεται.

Με το πέρασμα του χρόνου και την καλύτερη κατανόηση όλων αυτών των εννοιών, οι επιστήμονες κατάφεραν να εξηγήσουν, τον τρόπο που λειτουργεί η κληρονομικότητα, την μεταφορά της γενετικής πληροφορίας από γενιά σε γενιά αλλά και των δυσλειτουργιών που παρουσιάζονται στη διάρκεια αυτής της μεταφοράς. Κάπως έτσι εμφανίστηκε η έννοια της

Επιγενετικής. Για αρκετό καιρό, ήταν αδύνατο να εξηγηθούν κάποια φαινόμενα που αφορούσαν κυρίως δυσλειτουργίες βασιζόμενα μόνο σε γενετικούς ή μόνο σε περιβαλλοντικούς παράγοντες. Ο όρος εισήχθη για πρώτη φορά το 1942 από τον Conrad Waddington για να περιγράψει αλλαγές που δεν τροποποιούν την αλληλουχία βάσεων του DNA αλλά αλλάζουν τη λειτουργία του. Πιο συγκεκριμένα, ανέφερε: «Ένα επιγενετικό χαρακτηριστικό είναι ένας σταθερά κληρονομούμενος φαινότυπος που προκαλείται από αλλαγές στο χρωμόσωμα χωρίς διαφοροποιήσεις στην αλληλουχία του DNA». Με πιο απλά λόγια, η επιγενετική με την ευρεία έννοια του όρου είναι η σύνδεση μεταξύ γονοτύπου και φαινοτύπου (κατά την οποία τροποποιείται το τελικό προϊόν του γονιδίου χωρίς να αλλάξει η ακολουθία του DNA). Οι επιγενετικοί μηχανισμοί επηρεάζουν τη λειτουργία ενός γονιδίου σε μεταγραφικό και μετά-μεταγραφικό επίπεδο και/ή σε μεταφραστικό και μετά-μεταφραστικό επίπεδο προσφέροντας έτσι ένα είδος μεταγραφικού/μεταφραστικού ελέγχου, που ρυθμίζει την έκφραση των γονιδίων. [39]

Οι μελέτες των τελευταίων δεκαετιών έχουν δείξει ότι οι επιγενετικοί μηχανισμοί εμπλέκονται στη ρύθμιση σχεδόν όλων των βιολογικών διεργασιών ενός οργανισμού από τη σύλληψη ως το θάνατο και αυτό γιατί εμφανίζονται στην αναδιοργάνωση του γονιδιώματος κατά την εμβρυογένεση και τη γαμετογένεση αλλά και κατά την κυτταρική διαφοροποίηση. Το κοινό χαρακτηριστικό των επιγενετικών αλλαγών είναι η σταθερότητά τους. Αν και αυτή η σταθερότητα είναι δεδομένη, κάποιες από αυτές είναι κληρονομούμενες ενώ κάποιες άλλες όχι. Ακόμα, τα αποτελέσματα των επιγενετικών αλλαγών πολλές φορές έχουν μακροχρόνιες εντυπώσεις και είναι μη αντιστρεπτά, για παράδειγμα στην ικανότητα μάθησης, της μνήμης, στην προδιάθεση για διάφορα είδη καρκίνων, επιγενετικοί δείκτες εμφανίζονται σε τοκετούς με επιπλοκές και σε παιδικές ασθένειες ή ασθένειες που εμφανίζονται σε άλλα στάδια του βιολογικού κύκλου. Παρ' όλ' αυτά, φαίνεται να υπάρχουν και κάποιοι που είναι αντιστρεπτοί και πάνω σε αυτό ενθαρρύνεται η εστίαση σε επιγενετικές θεραπείες. Στην πραγματικότητα φαίνεται να μην υπάρχει ομοφωνία για τον ακριβή ορισμό της επιγενετικής και γι' αυτό το λόγο το 'Epigenomics Mapping Consortium' of NIH (National Institutes of Health, USA) πρόσφατα ξανά όρισε την επιγενετική ώστε να υπάρχει «χώρος» για όλες τις περιπτώσεις. Πιο συγκεκριμένα αναφέρει: *'For purposes of this program, epigenetics refers to both heritable changes in gene activity and expression (in the progeny of cells or of individuals) and also stable, long-term alterations in the transcriptional potential of a cell that are not necessarily heritable'*. [20]

## 1.2 Οι επιγενετικοί Μηχανισμοί

Η δυναμική κατάσταση στην οποία βρίσκεται το γονιδίωμα μέσα στα κύτταρα όσον αφορά την επιγενετική του κατάσταση αναφέρεται ως επιγονιδίωμα. Ο ρόλος του επιγονιδιώματος είναι να ρυθμίζει τη γονιδιακή έκφραση και να διαμορφώνει τους διαφορετικούς φαινοτύπους κατά την κυτταρική διαφοροποίηση, όπως ήδη έχει αναφερθεί, και αυτό συμβαίνει σε συνεργασία με μεγάλο αριθμό ενζύμων τα οποία συντονίζονται με αυτό. Εντοπίζονται τρεις βασικοί επιγενετικοί μηχανισμοί που διαμορφώνουν το επιγονιδίωμα και αυτοί είναι: η τροποποίηση των ιστονών, τα μη κωδικοποιητικά RNAs (ncRNAs) και τέλος η μεθυλίωση του DNA.

Καθώς ο κλάδος της επιγενετικής αναπτύσσεται ταχύτατα έχει εμφανιστεί η ανάγκη να βρεθούν νέες τεχνολογίες που θα οδηγήσουν στην αποκωδικοποίηση επιγενετικών σημείων αναφοράς που σχετίζονται με το επίπεδο υγείας ή ασθένειας ενός οργανισμού. Τέτοιες τεχνολογίες δίνουν τη δυνατότητα εντοπισμού των διάφορων καταστάσεων της χρωματίνης είτε σε επίπεδο συγκεκριμένου γενετικού τόπου είτε σε επίπεδο αλληλούχισης ολόκληρου του γονιδιώματος.

### 1.2.1 Η Τροποποίηση των Ιστονών

Η χρωματίνη αποτελεί μια κατάσταση στην οποία βρίσκεται πακεταρισμένο το DNA στο εσωτερικό ενός κυττάρου. Το νουκλεόσωμα είναι η θεμελιώδης μονάδα της χρωματίνης η οποία αποτελείται από έναν οκταμερή πυρήνα των τεσσάρων βασικών ιστονών (H3, H4, H2A, H2B) και γύρω από αυτόν περιελίσσονται 147 ζεύγη βάσεων. Από τις ιστόνες προεξέχουν αμινο-τελικές «ουρές» οι οποίες μπορεί να έρχονται σε επαφή με κοντινά νουκλεοσώματα. Οι τροποποιήσεις που συμβαίνουν σε αυτές τις ουρές επηρεάζουν τις ένδο-νουκλεοσωμικές αλληλεπιδράσεις και τελικά ολόκληρη τη δομή της χρωματίνης. Οι τροποποιήσεις των ιστονών είναι δυναμικές και αλλάζουν ταχύτατα. Προς το παρόν οι μέθοδοι ανάλυσης και ανίχνευσης για τον προσδιορισμό τους δεν είναι επαρκείς και αυτό συμβάλλει αδιαμφισβήτητα στην υποτίμηση της έκτασης και της έντασης των τροποποιήσεων που υπάρχουν σε μια δεδομένη στιγμή.

Την τελευταία 15ετία έχει ενταθεί η έρευνα για τα ένζυμα που προκαλούν τις τροποποιήσεις. Από αυτά πιο εξειδικευμένες φαίνεται να είναι οι μεθυλοτρανσφεράσες και οι κινάσες. Πολλές φορές όμως η εξειδίκευση των ενζύμων επηρεάζεται από άλλους



παράγοντες που τα «ωθούν» να προτιμούν τις ιστόνες των νουκλεοσωμάτων έναντι των ελεύθερων ιστονών. Τέτοιοι παράγοντες μπορεί να είναι μια πρωτεΐνη που συνεργάζεται-δημιουργεί σύμπλοκο με το ένζυμο. Μέχρι στιγμής έχουν χαρακτηριστεί δύο μηχανισμοί τροποποίησης. Ο πρώτος περιλαμβάνει τη διάσπαση δεσμών μεταξύ νουκλεοσωμάτων και το «ξεδίπλωμα» της χρωματίνης ενώ ο δεύτερος περιλαμβάνει στρατολόγηση πρωτεϊνών οι οποίες ανάλογα με τους συνδυασμούς των τροποποιήσεων που συμβαίνουν σε μια δεδομένη στιγμή σε μια ιστόνη προσδένεται ή απομακρύνεται και το σύμπλοκο που δημιουργείται τροποποιεί περαιτέρω τη χρωματίνη.

Υπάρχουν περίπου οκτώ προσδιορισμένοι τύποι τροποποίησης που αφορούν τις ιστόνες στους οποίους περιλαμβάνονται οι ακετυλιώσεις, οι μεθυλιώσεις, οι φωσφορυλιώσεις, οι ουβικοτυλιώσεις κ.α.. Οι ιστόνες τροποποιούνται σε πολλά σημεία και μέχρι στιγμής έχουν εντοπιστεί πάνω από 60 διαφοροποιημένα κατάλοιπα ιστονών. Εντούτοις, αυτή η διαπίστωση αποτελεί μια υποτίμηση του πραγματικού αριθμού τροποποιήσεων και αυτό συμβαίνει λόγω της πολυπλοκότητας που προκύπτει από τις μορφές μεθυλίωσης, ακετυλιώσεων κλπ. Για παράδειγμα στις αργινίνες και λυσίνες υπάρχουν δύο ή και τρεις αντίστοιχα διαφορετικές μορφές τροποποιήσεων. Τέλος είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι δεν συμβαίνουν όλες οι τροποποιήσεις στην ίδια ιστόνη και η εμφάνισή τους εξαρτάται από τις συνθήκες στις οποίες εκτίθεται το κύτταρο και τη σηματοδότηση που δέχεται σε μια δεδομένη στιγμή.

**Μεθυλίωση:** Συμβαίνει συνήθως στα κατάλοιπα λυσίνης (K) των ιστονών H3 και H4, στα οποία προστίθενται μεθυλομάδες. Είναι η πιο σημαντική μετα-μεταφραστική τροποποίηση και καταλύεται από τη μεθυλοτρανσφεράση των ιστονών (HMT) η οποία χρησιμοποιεί ως υπόστρωμα S-αδενοσυλμεθειονίνη (SAM, S-adenosyl methionine) προκειμένου να μεταφέρει μεθυλομάδες πάνω στα κατάλοιπα λυσίνης (K). Όπως αναφέρθηκε τα κατάλοιπα λυσίνης μπορεί να είναι μόνο- δι- ή τρι- μεθυλιωμένα. Υπάρχουν 3 δείκτες που φαίνεται να βρίσκονται σε περιοχές που είναι ενεργές μεταγραφικά (H3K4, H3K36, H3K79) και 3 που έχουν συνδεθεί με τη σίγηση γονιδίων και τη συμπύκνωση της χρωματίνης (H3K9, H3K27, H4K20). Γενικώς δεν είναι απόλυτη η παρουσία ενός μόνο δείκτη αλλά μπορεί να εντοπίζονται δύο ή τρεις σε ένα γενετικό τόπο. Πριν την ανακάλυψη της πρώτης εξειδικευμένης για τη λυσίνη απομεθυλάσης (LSD1) θεωρούνταν μη αντιστρεπτή τροποποίηση. [63]

**Ακετυλίωση:** Ρυθμίζεται από την ισορροπία στην οποία βρίσκονται οι ακετυλοτρανσφεράσες των ιστονών (HATs) με τις αποακετυλάσες (HDACs). Η μείωση του



θετικού φορτίου στις λυσίνες έχει ως αποτέλεσμα τη σύνδεση μεταξύ των ουρών και του αρνητικά φορτισμένου DNA. Γενικά η ακετυλίωση θεωρείται δείκτης ενεργοποίησης του DNA. Τέλος υπάρχει το φαινόμενο του ανταγωνισμού στο ίδιο κατάλοιπο λυσίνης όταν υπάρχει μεθυλίωση και ακετυλίωση, που οδηγεί στην επονομαζόμενη «διασταυρούμενη επικοινωνία» (crosstalk), ένα είδος παρεμβολής/αλληλεπίδρασης, το οποίο δεν θα αναλυθεί περαιτέρω σε αυτή την εργασία.

*Φωσφορυλίωση*: μια από τις πιο κοινές μετά-μεταφραστικές τροποποιήσεις που συμβαίνει και σε σερίνες, θρεονίνες και τυροσίνες. Συμμετέχει σε ένα ευρύ φάσμα των κυτταρικών διαδικασιών όπως η γονιδιακή έκφραση και η ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου. Για παράδειγμα, υπάρχουν δυο σημαντικές θέσεις μεθυλίωσης σε κατάλοιπα λυσίνης (H3K9 και H3K27), τις οποίες έπεται ένα κατάλοιπο σερίνης (S), το οποίο όταν φωσφορυλιώνεται δημιουργείται μια KS επικράτεια που επηρεάζει τη συγγένεια των «αναγνώστών» του κατάλοιπου της λυσίνης. Κατ' επέκταση το crosstalk που δημιουργείται επηρεάζει ρυθμιστικά τη δομή της χρωματίνης.

Οι τροποποιήσεις των ιστονών φαίνεται να εμπλέκονται σε αρκετά επιγενετικά φαινόμενα. Αναφέρθηκε προηγουμένως, στον ορισμό της επιγενετικής, ο όρος «κληρονομήσιμος φαινότυπος», με την έννοια αυτή να προσδιορίζει την πληροφορία που μεταφέρει το γονιδίωμα και η οποία δεν κωδικοποιείται από το DNA. Εντούτοις, υπάρχει το ερώτημα αν οι τροποποιήσεις αυτές μεταφέρουν τη «μνήμη» για μια δεδομένη κατάσταση της χρωματίνης ή αν απλώς εφαρμόζουν αυτή τη «μνήμη» η οποία έχει μεταφερθεί με κάποιον ξεχωριστό τρόπο. Τελικά, διάφορες εργασίες (Verdel et al. 2004, Buhler et al. 2006) οδηγούν στο συμπέρασμα ότι οι τροποποιήσεις των ιστονών μάλλον είναι οι εκτελεστές των επιγενετικών φαινομένων παρά οι μεταφορείς της μνήμης από γενιά σε γενιά. [28]

### 1.2.2 Μη κωδικά RNA (Non coding RNAs)

Είναι γνωστό πλέον πως περίπου το 80% του γονιδιώματος μεταγράφεται σε RNA και από αυτό ένα πολύ μικρό ποσοστό, της τάξης μόλις του 2% μεταφράζεται σε πρωτεΐνη. Το υπόλοιπο θεωρούνταν παραπροϊόν της μεταγραφής, όμως πλέον μέσω της εξέλιξης των υψηλής ανάλυσης τεχνολογιών και της βιοπληροφορικής ανακαλύπτονται συνεχώς νέα μετάγραφα τα οποία χωρίζονται σε κλάσεις που διαφοροποιούνται σε μέγεθος και λειτουργία και φαίνεται να παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στη γονιδιακή έκφραση και την

αρχιτεκτονική της χρωματίνης. Τέλος, είναι σημαντικοί ρυθμιστές που συμμετέχουν ενεργά σε φυσιολογικά και παθολογικά μονοπάτια.

Αυτή η ταξινόμηση βοηθάει να γίνονται καλύτερα κατανοητοί οι διάφοροι ρόλοι που έχουν όσον αφορά τη γονιδιακή ρύθμιση. Τα πιο σημαντικά και καλύτερα μελετημένα, αυτή τη στιγμή, σε μεταγραφικό και μετα-μεταγραφικό επίπεδο είναι: τα Housekeeping RNAs που περιλαμβάνουν τα tRNA, small nuclear RNA, snoRNA (small nucleolar) και τα rRNAs και τα Ρυθμιστικά (Regulatory) στα οποία περιλαμβάνονται τα μη κωδικά RNAs (non coding RNAs – ncRNAs) microRNA (miRNA), small interfering RNA (siRNA), piwi-interacting RNA (piRNA), long non coding RNA (lncRNA).

Τα *microRNAs* είναι μικρά μόρια μήκους 22 νουκλεοτιδίων που ρυθμίζουν την έκφραση των αγγελιαφόρων RNA (mRNA). Συνήθως προσδένονται σε μια μικρή συμπληρωματική αλληλουχία στην 3' UTR περιοχή.

Τα *small interfering RNAs*, έχουν μέγεθος 22-24 νουκλεοτίδια και προέρχονται από μεγαλύτερα πρόδρομα δίκλωνα μόρια RNA που κόβονται από το ένζυμο dicer ribonuclease. Τα *piwi RNAs*, είναι μικρά τμήματα RNA που δεσμεύουν πρωτεΐνες αργοναύτες της οικογένειας piwi σχηματίζουν σύμπλοκα και παίζουν ρόλο στη σίγηση γονιδίων (gene silencing). [24]

Τα *long non coding RNAs* είναι μεγαλύτερα τμήματα RNA, συνήθως από 200 και πάνω νουκλεοτίδια και μπορεί να φτάσουν τις μερικές χιλιάδες χωρίς όμως να κωδικοποιούν κάποια πρωτεΐνη. Ο ρόλος τους εμφανίζεται στην εξασφάλιση των κυτταρικών λειτουργιών και σε ένα επιπλέον επίπεδο ρύθμισης που αφορά την επιγενετική ελέγχουν τη γονιδιακή έκφραση κυρίως κατά την ανάπτυξη του οργανισμού. [26]

Αναφέρθηκε ήδη ότι από τα μη κωδικοποιητικά RNA μπορεί να επηρεαστεί και η δομή της χρωματίνης. Αυτό έχει βρεθεί ότι συμβαίνει μέσω των RBDs (RNA binding domains), δηλαδή, χρωματινικές επικράτειες οι οποίες είναι δεκτικές στην ενσωμάτωση μορίων RNA. Μέσω πρωτεωμικών και γενομικών μελετών φαίνεται ότι αυτές οι δομές είναι διατηρημένες από τις ζύμες έως τον άνθρωπο και τροποποιούν τη γονιδιακή ρύθμιση και τη δομή της χρωματίνης ως απάντηση σε διάφορα περιβαλλοντικά ερεθίσματα. [58]

ΠΙΝΑΚΑΣ 1.1: Τύποι και λειτουργίες ρυθμιστικών μη-κωδικοποιητικών RNAs (ncRNAs) σε κύτταρα θηλαστικών				
Τύποι ncRNA	Ακρωνύμιο	Τύπος Αλυσίδας	Μέγεθος (νουκλεοτίδια)	Λειτουργία
Small ncRNAs			<200	
Small interfering RNAs	siRNAs	Διπλή	21-23	Διώχνουν την ομολογία που περιέχουν τα μετάγραφα, μέσω της αποδόμησης του mRNA
Micro-RNAs	miRNAs	Μονή	≈22	Συγκρατούν τη μετάφραση μέσω ταχύτερης αποδόμησης του mRNA
Piwi-interacting RNAs	piRNAs	Μονή	21-25	Ρυθμίζουν τη γονιδιακή έκφραση, «πολεμούν» την ιική μόλυνση
Small nucleolar RNAs	snoRNAs	Μονή	60-300	rRNA, snRNA και άλλα, μετά-μεταγραφική τροποποίηση
Small Cajal body RNAs (snoRNAs)	scaRNAs	Μονή	60-300	Βιοχημική τροποποίηση του RNA του ανώριμου σωματίου συρραφής
Long non-coding RNAs	lncRNAs	Μονή	>300	Αναδιαμόρφωση της χρωματίνης, μετά-μεταγραφική και μετά-μεταφραστική τροποποίηση
Willbanks, A.; Wood, S.; Cheng, J.X. RNA Epigenetics: Fine-Tuning Chromatin Plasticity and Transcriptional Regulation, and the Implications in Human Diseases. <i>Genes</i> 2021, 12, 627. <a href="https://doi.org/10.3390/genes12050627">https://doi.org/10.3390/genes12050627</a>				

### 1.2.3 Μεθυλίωση του DNA (DNA methylation)

Εντοπίστηκε για πρώτη φορά το 1925 σε βακτήρια. Από τότε έχει εντοπιστεί σε μια ευρεία γκάμα οργανισμών και έχει συνδεθεί με τη γονιδιακή ρύθμιση, την οργάνωση του γονιδιώματος (δομή χρωματίνης), την αναπαραγωγή και την ανάπτυξη, την ασθένεια και τη γήρανση. Είναι ο πιο καλά μελετημένος επιγενετικός μηχανισμός και συχνά χρησιμοποιείται ως κλασσικό παράδειγμα επιγενετικής κληρονομικότητας ακόμα και αν οι πρόσφατες εξελίξεις έχουν αποδείξει πως αυτή η τροποποίηση είναι δυναμική και άρα πιο πολύπλοκη απ' ό,τι είχε αρχικά εκτιμηθεί.

Η μεθυλίωση του DNA αφορά την ομοιοπολική τροποποίησή του και συμβαίνει μέσω της προσθήκης μιας μεθυλομάδας (-CH<sub>3</sub>) στον 5' άνθρακα του πυριμιδινικού δακτυλίου της κυτοσίνης (C). Με αυτόν τον τρόπο σχηματίζεται μια «νέα» βάση που αναφέρεται συχνά ως η «5<sup>η</sup> βάση» και αναγράφεται ως 5mC. Αυτή η τροποποίηση (μεθυλίωση) γίνεται μέσω ενζύμων που ονομάζονται μεθυλοτρανσφεράσες (DNMTs). Οι μεθυλοτρανσφεράσες μεταφέρουν μια μεθυλομάδα από το ενεργό τους κέντρο σε ένα κατάλοιπο κυτοσίνης και αυτό συμβαίνει πάντα σε κυτοσίνη που ακολουθεί μια γουανίνη (G). Το δινουκλεοτίδιο CG αναγράφεται ως CpG ενώ ως CGIs (CpG islands) αναφέρονται οι περιοχές του γονιδιώματος που είναι πλούσιες (>60% του μήκους τους) σε αλληλουχίες CG και βρίσκονται συνήθως σε υποκινητές και ρυθμιστικές περιοχές των γονιδίων.

Στα φυσιολογικά κύτταρα παρατηρείται ένα ποσοστό μεθυλίωσης 3-6% και σε ένα πολύ γενικό πλαίσιο τα γεγονότα στα οποία εμπλέκεται αυτή η επιγενετική τροποποίηση έχουν να κάνουν με τη γονιδιακή ρύθμιση, όπως ήδη αναφέρθηκε, την προστασία από μεταθετά στοιχεία, το γονιδιακό εντύπωμα, την αδρανοποίηση του X χρωμοσώματος και την ιστοειδική έκφραση γονιδίων.

Παρά το μεγάλο αριθμό των εργασιών που αφορούν τη μεθυλίωση του DNA, παραμένει δύσκολο να προσδιοριστεί η ακριβής λειτουργία της μέσα στο σύνολο του γονιδιώματος. Είναι ακόμα άγνωστος ο λόγος για παράδειγμα, που η μεθυλίωση είναι σημαντική για τα διαφοροποιημένα κύτταρα και όχι για τα πολυδύναμα ή ακόμα γιατί διαφοροποιείται στα διάφορα είδη καρκίνου.

Στη συνέχεια θα γίνει μια ιστορική αναδρομή από την ανακάλυψη της μεθυλίωσης ως το τέλος της δευτέρης δεκαετίας αυτής της χιλιετίας προκειμένου να αναλυθεί η πολυπλοκότητα που συνοδεύει αυτή την τροποποίηση και να γίνουν πιο κατανοητοί οι πολυάριθμοι ρόλοι της.

Το 1925 λοιπόν, οι Johnson και Coghill απομόνωσαν DNA από *Mycobacterium tuberculosis* σε μια προσπάθεια να εντοπίσουν τον παθογόνο παράγοντα. Ένας από τους υποψηφίους ήταν η 5-μεθυλοκυτοσίνη (5mC), ένα νουκλεοτίδιο που όπως θεώρησε ο Johnson προκύπτει φυσικά στους ζωντανούς οργανισμούς. Παρά τη σχετικά πρώιμη ανακάλυψη της η επόμενη δημοσιευμένη μελέτη σχετικά με την 5mC ήρθε μόλις 23 χρόνια αργότερα που ο Hotchkiss επισήμανε τη διαφορά της από την κυτοσίνη. Ένας από τους λόγους και ίσως ο πιο σημαντικός που καθυστέρησε τόσο η πρόοδος για την κατανόηση της 5mC σε σχέση με την ανακάλυψή της ήταν ότι τότε δεν ήταν ακόμα γνωστό ότι τα νουκλεϊκά οξέα είναι αυτά που μεταφέρουν τη γενετική πληροφορία. Τελικά δυο χρόνια αργότερα ο Wyatt επιβεβαίωσε την παρουσία της σε DNA θηλαστικών, εντόμων και φυτών. Μόλις τη δεκαετία του '60 σταχυολογήθηκαν και συγκεντρώθηκαν οι πρώτες πληροφορίες για τους βιολογικούς ρόλους της 5mC από μελέτες που αφορούσαν τη βακτηριακή ανοσία και την αντιγραφή του DNA. Εντούτοις, παρέμενε ακόμα άγνωστο το κατά πόσο αυτά τα δεδομένα έβρισκαν εφαρμογή και συντηρούνταν και στους ανώτερους οργανισμούς. Ανακάλυψη-κλειδί αποτέλεσε το γεγονός ότι υπεύθυνα για την προσθήκη της μεθυλομάδας στις κυτοσίνες ήταν ένζυμα και αυτό οδήγησε στο συμπέρασμα ότι η μεθυλίωση μπορεί να ρυθμιστεί.

Περνώντας στην επόμενη δεκαετία ('70-'79) δημοσιοποιούνται όλο και περισσότερες αναφορές για διαφορετικά προφίλ μεθυλίωσης (κυρίως μέσω της ατομικής απορρόφησης).

Γίνονται πλέον κάποιες προτάσεις που αφορούν το ρόλο της στους ανώτερους οργανισμούς. Οι επικρατέστερες εκείνη την εποχή ήταν: i) ότι η 5mC δεν παίζει ρόλο και δεν επηρεάζει την ανάπτυξη των ευκαρυωτικών κυττάρων, ii) ότι η 5mC μπορεί να οδηγήσει σε μεταλλάξεις του DNA (που μέχρι τότε θεωρούνταν προαπαιτούμενο για τις αλλαγές που εμφανίζονταν στη μεταγραφή) και iii) ότι είναι παράγοντας έναρξης/ενεργοποίησης της μεταγραφής. Ήταν το 1975 όμως όταν δημοσιεύτηκαν τρεις ανεξάρτητες αναφορές και ενώ διέφεραν σε εξειδίκευση, και οι τρεις σύγκλιναν στο συμπέρασμα ότι η 5mC έχει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης και στην ενορχήστρωση της ανάπτυξης. Στα τέλη πλέον αυτής της δεκαετίας υπήρχε μια αρκετά καλή εκτίμηση για τη μεθυλίωση του DNA ανάμεσα στα διάφορα είδη οργανισμών και έγινε ευρέως αποδεκτό ότι επιδρά κατασταλτικά στη γονιδιακή έκφραση.

Οι μεγάλες καινοτομίες που συνόδευσαν την επόμενη δεκαετία (80-89) επέτρεψαν την εκπόνηση νέων πειραματικών διαδικασιών για την εξερεύνηση του περιεχομένου της αλληλουχίας και το λειτουργικό ρόλο του μεθυλιωμένου DNA. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα που έθεσε τα θεμέλια για πολλές νέες μελέτες, ήταν η δυνατότητα ένθεσης μεθυλιωμένου και μη-μεθυλιωμένου DNA σε ζωντανά κύτταρα αλλά και η πολύ σημαντική ανακάλυψη των CGIs. Μεγάλη συμβολή στην πρόοδο όμως είχε και το γεγονός ότι χαρακτηρίστηκαν πολλές βακτηριακές αλλά και οι πρώτες προερχόμενες από θηλαστικά, μεθυλοτρανσφεράσες. Ακόμα, δημιουργήθηκε μια πρώτη εικόνα ότι η μεθυλίωση στον 5' υποκινητή (promoter) καταστέλλει τη μεταγραφή. Φυσικά εντοπίζονται εξαιρέσεις οι οποίες υποδεικνύουν την ανάγκη για περαιτέρω μελέτη του φαινομένου. Ολοκληρώνοντας αυτή την περίοδο θα ήταν χρήσιμο να αναφερθεί ότι οι οργανισμοί μοντέλα που χρησιμοποιούνταν ήταν ο *Saccharomyces cerevisiae*, η *Drosophila melanogaster* και ο *Caenorhabditis elegans* οι οποίοι δεν παρουσιάζουν μεθυλώσεις στο γονιδίωμα τους και έτσι υπήρχαν αρκετές ασάφειες στη σημασία της 5mC που άφηναν περιθώρια μελλοντικής έρευνας.

Η περίοδος του '90 χαρακτηρίστηκε έντονα από την προσπάθεια της λειτουργικής αξιολόγησης των DNA μεθυλοτρανσφερασών από θηλαστικά και φυτά, των 5mC αναγνωστών (readers) που διέθεταν επικράτειες δέσμευσης μεθυλομάδων καθώς και εργασίες που αφορούσαν την καταστολή της μεταγραφής. Ο πιο σημαντικός αν και όχι ακόμα πλήρως κατανοητός ρόλος της μεθυλίωσης κράτησε σε ένταση το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας. Εντούτοις έμεινε αναπάντητο το ερώτημα παρά τις πολλές δημοσιεύσεις για το πότε και το πώς συμβαίνει η ενεργή απομεθυλίωση του DNA.

Μπαίνοντας στη νέα χιλιετία, αποκτήθηκε μια σημαντική γνώση σχετικά με τη διασπορά του μεθυλιωμένου DNA σε όλο το μήκος του γονιδιώματος καθώς και μηχανιστικές και δομικές πληροφορίες που έδωσαν μια πιο ολοκληρωμένη εικόνα. Αυτά τα επιτεύγματα επέτρεψαν σε αρχές που είχαν καθιερωθεί τα προηγούμενα χρόνια, ξεχωριστά η κάθε μία και σε πιο ασαφές πλαίσιο, να γενικοποιηθούν και να βρουν αντίκρισμα στο γονιδίωμα. Ένα τέτοιο παράδειγμα είναι η αποτελεσματικότητα αλλά όχι η υποχρεωτικότητα της 5mC να καταστέλλει τη μεταγραφή μέσω των πλούσιων σε CpG υποκινητών. Το γεγονός λοιπόν ότι οι υποκινητές δεν ρυθμίζονται από την 5mC κατέρριψε την μέχρι τότε επικεντρωμένη στους υποκινητές άποψη και έδωσε μία συνολική και καθολική προσέγγιση στη μεθυλίωση του DNA. Σημαντικό ορόσημο επίσης, ήταν η σύνδεση της μεθυλίωσης σε σχέση με άλλους επιγενετικούς μηχανισμούς και τελικά η ανακάλυψη ενός ενζύμου απομεθυλίωσης που αποτέλεσε δομικό λίθο στην εξήγηση της δυναμικής της μεθυλίωσης όσον αφορά την κυτταρική διαφοροποίηση και τη φυσιολογική ανάπτυξη.

Φτάνοντας στη σύγχρονη εποχή, και ως το 2019, παρατηρήθηκε μια αύξηση των δημοσιευμένων εργασιών που επικεντρώθηκαν στο να εξελίσσουν ή να επεκτείνουν τις θεμελιώδεις αρχές που διέπουν την 5mC και το ρόλο της στη γονιδιακή ρύθμιση, κλείνοντας τα κενά που υπήρχαν τα προηγούμενα χρόνια. Σε αυτό φυσικά βοήθησε η αυξημένη ευαισθησία, η διεκπεραιωτικότητα και το γεγονός ότι ήταν πλέον πιο προσιτές οικονομικά όλες οι τεχνολογίες αλληλούχησης που μεγέθυναν την εμβέλεια στις μελέτες χαρτογράφησης των μεθυλωμάτων σε εκατοντάδες διαφορετικούς τύπους κυττάρων. Κάποια από τα θέματα που είναι πλέον επίκαιρα στην έρευνα θεωρούνται τα παρακάτω:

- Η αλληλεπίδραση του μεθυλιωμένου DNA και των μεταγραφικών παραγόντων
- Η αλλοστερική ρύθμιση των μεθυλοτρανσφερασών
- Η επιστράτευση και η ρύθμιση των μεθυλοτρανσφερασών
- Τα DMVs (DNA methylation valleys- εκτάσεις μεθυλιωμένου DNA) κοντά σε γονίδια ανάπτυξης
- Οι καθολικές αλλαγές, που οφείλονται σε μεθυλίωση, στην ανάπτυξη και την ασθένεια

Εν κατακλείδι, η μεθυλίωση του DNA είναι μια δυναμική τροποποίηση, η οποία αρχικά δεν είχε εκτιμηθεί ως τέτοια. Υπάρχουν ακόμα πολλά που πρέπει να διευκρινιστούν για την



πλήρη κατανόηση της ακριβούς λειτουργίας της στο κύτταρο αλλά και τη γενεαλογική ρύθμιση. [22, 38]

### 1.3 Παράγοντες που Επηρεάζουν τη Μεθυλίωση του DNA

Ο στόχος της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη του ρόλου της μεθυλίωσης του DNA στην ανάπτυξη και εξέλιξη του σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 (ΣΔ2). Προς αυτή την κατεύθυνση, έχουν εντοπιστεί κάποιοι συγκεκριμένοι παράγοντες που επιδρούν στη μεθυλίωση των γονιδίων που συμμετέχουν στην εμφάνιση παχυσαρκίας και την ανάπτυξη του Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 2. Αυτοί έχουν να κάνουν με τις διατροφικές συνήθειες, την ηλικία/γήρανση και το επίπεδο της φυσικής δραστηριότητας του οργανισμού.

Πιο συγκεκριμένα, δεδομένα που έχουν συλλεχθεί υποστηρίζουν πως, οι ανθυγιεινές διατροφικές συνήθειες επηρεάζουν το μεθύλωμα και εν γένει την παθογένεια του ΣΔ2. Είναι γεγονός άλλωστε πως, η τροφή μας παρέχει μεθειονίνη και φυλικά άλατα (folate) τα οποία θεωρούνται δότες μεθυλίων (Ducker and Rabinowitz, 2017, Duncan et al., 2013). Έχουν γίνει έρευνες που αφορούν δίαιτες: α) υψηλές σε λιπαρά, β) με συνθήκες νηστείας, γ) με υψηλή περιεκτικότητα σε κορεσμένα ή πολυακόρεστα λιπαρά οξέα και δ) με επιπλέον προσθήκη γλυκόζης ή/και παλμιτικών αλάτων. Σε όλες τις περιπτώσεις εντοπίστηκε διαφορετικό επίπεδο μεθυλίωσης και γονιδιακής έκφρασης το οποίο ήταν διαφορετικό και ανάλογο με το φύλο του ασθενή αλλά και την ηλικία. Εντυπωσιάζει η διαπίστωση πως η μεθυλίωση αυξάνεται μέσω της αύξησης της πρόσληψης της τροφής σχετικά εύκολα, όμως δεν ελέγχεται μέσω της ελεγχόμενης διατροφής εξίσου.

Όσον αφορά την ηλικία, το 2005 οι Fraga et al. μελετώντας μονοζυγωτικούς διδύμους απέδειξαν ότι ζεύγη νεότερων ηλικιακά διδύμων είχαν παρόμοιο επιγονιδίωμα, ενώ ζευγάρια διδύμων μεγαλύτερης ηλικίας παρουσίαζαν εντονότερες διαφορές. Αυτό που αφορά την παρούσα εργασία είναι ότι αυτά τα δεδομένα ελήφθησαν μελετώντας και ιστούς ενδιαφέροντος για τον ΣΔ2 όπως ο λιπώδης ιστός, το ήπαρ, το πάγκρεας και οι σκελετικοί μύες. Δυστυχώς όμως, ο τρόπος με τον οποίο συμβαίνουν, επακριβώς, αυτές οι αλλαγές παραμένει άγνωστος και χρειάζονται περισσότερα δεδομένα προκειμένου να κατανοηθούν καλύτερα οι μοριακοί μηχανισμοί της γήρανσης που προδιαθέτουν για την ανάπτυξη ΣΔ2 και αυτό θα βοηθούσε και την ανάπτυξη νέων θεραπειών και στρατηγικών αντιμετώπισης. Τέλος, αν και από το 2001-2 είναι γνωστή η επίδραση της άσκησης στην πρόληψη του ΣΔ2 (Knowler et al., 2002, Tuomilehto et al., 2001) σχετικά πιο πρόσφατα (Nitert et al., 2012,

Rohn et al., 2013, Fabre et al., 2018) αποδείχτηκε η επίδρασή της στη μεθυλίωση συγκεκριμένων γονιδίων στο λιπώδη ιστό και στους μύες. Διαφορετικά επίπεδα δραστηριότητας, όσον αφορά την ένταση και τη συχνότητα της άσκησης, φαίνεται να επιδρούν και με διαφορετικό τρόπο. Γενικά όμως, η επιγενετική απόκριση φαίνεται να είναι πιο εμφανής στο προπονημένο στάδιο απ' ότι στο απροπόνητο ενώ η μεταγραφική απόκριση μετά από οξεία άσκηση είναι μειωμένη έπειτα από ένα διάστημα προπόνησης αντοχής.



## 2. Ο Σακχαρώδης Διαβήτης

Ο σύγχρονος τρόπος ζωής, οι διατροφικές συνήθειες των ανθρώπων καθώς και διάφοροι περιβαλλοντικοί και γενετικοί παράγοντες έχουν συμβάλλει στην εμφάνιση μιας παθολογικής κατάστασης η οποία ορίζεται ως Μεταβολικό Σύνδρομο. Αν και υπάρχουν αναφορές γι' αυτό από το 1930 και πολλοί ερευνητές προσπάθησαν να ορίσουν τη συγκεκριμένη κατάσταση, (Himsworth και Kerr 1930, Jean Vague 1940, Rosalyn Yalow και Solomon Benson 1960, Avogaro και Crepaldi 1965, Gerald Phillips 1977, Modan et al. 1980) τελικά έχει επικρατήσει και είναι γνωστό και ως σύνδρομο X (Gerald Reaven, 1988) ή σύνδρομο αντίστασης στην ινσουλίνη. Το ΜΣ, όπως ορίστηκε, δεν είναι μια απλή ασθένεια αλλά μια παθολογική κατάσταση με υπόβαθρο ένα άθροισμα παραγόντων κινδύνου μεταβολικής αιτιολογίας, που μπορούν να περιλαμβάνουν διάφορες μεταβολικές ανωμαλίες όπως: αντίσταση στην ινσουλίνη, αρτηριακή υπέρταση, υπερλιπιδαιμία και κεντρική παχυσαρκία (Παπαθεοδώρου, 2012; Amihaesei & Chelaru, 2014). Πρόσφατα δεδομένα έχουν δείξει ότι το ΜΣ έχει μεγαλύτερη αξία ως προγνωστικός δείκτης για το σακχαρώδη διαβήτη από ότι η δυσανεξία στη γλυκόζη, ενώ είναι καλά κατανοητό, από διάφορες μελέτες, ότι συσχετίζεται με αυξημένη καρδιαγγειακή νοσηρότητα και θνητότητα.

### 2.1 Ιστορική Αναδρομή

Ο διαβήτης είχε ήδη περιγραφεί και καταγραφεί για πρώτη φορά περίπου το 1500 π.Χ. από τους αρχαίους Αιγύπτιους. Αυτό διαπιστώθηκε από χειρόγραφο που ανακαλύφθηκε το 1962 σε έναν τάφο Αιγύπτου ευγενούς στο Λούξορ και ονομάστηκε «Πάπυρος Ebers» προς τιμήν του αρχαιολόγου που ήταν υπεύθυνος των ερευνών. Στο εύρημα αυτό περιγράφεται μια σπάνια κατάσταση κατά την οποία ο ασθενής ουρούσε υπερβολικά και έχανε βάρος χωρίς όμως να υπάρχει πόνος. Ακόμα, υπάρχουν ευρήματα που υποδεικνύουν ότι ο διαβήτης ήταν γνωστός στην Ελλάδα κατά τον 1-2<sup>ο</sup> αι. μ.Χ. με την ονομασία «Δίψακο» η οποία εισήχθη από τον Γαληνό (199-299μ.Χ.) και ήταν εμπνευσμένη από το σύμπτωμα της πολυδιψίας. Πολύ λίγο αργότερα, ο όρος «Διαβήτης» προτάθηκε από τον Αρεταίο (120-200 μ.Χ.) από το ρήμα «διαβαίνω» θεωρώντας ότι ανταποκρίνεται καλύτερα στο γεγονός ότι το νερό δεν μένει στο σώμα αλλά βγαίνει αμέσως. Ο ίδιος εξέφρασε την ενδιαφέρουσα παρατήρηση ότι ο διαβήτης προκαλείται από μια σειρά προβλημάτων που συνηγορούν στην

εμφάνισή του, όμως ανέφερε ακόμα σαν πιθανή αιτία του το δάγκωμα από διψάδα, ένα ερπετό, το οποίο και αυτό, επέφερε το σύμπτωμα της πολυδιψίας. Η περιγραφή του Διαβήτη (από τον Αρεταίο) στο βιβλίο *«Περί αιτιών και σημείων Οξέων και χρόνιων παθών»* ήταν: *«Ο Διαβήτης είναι μια εντυπωσιακή αρρώστια και όχι από τις πιο συνηθισμένες στον άνθρωπο. Χαρακτηρίζεται από υγρή και ψυχρή σύντηξη της σάρκας και των άκρων, που αποβάλλονται με τα ούρα. Τα νεφρά και η κύστη αποβάλλουν ασταμάτητα και σε μεγάλα ποσά, ούρα. Η δίψα είναι αχαλιναγώγητη. Η φύση της νόσου είναι χρόνια, αν και ο άρρωστος δεν επιζεί επί πολύ, γιατί όταν η νόσος πλήρως εξελιχθεί, γρήγορα έρχεται ο μαρasmus και ο θάνατος»*. Τελικά και ο Αρεταίος, επηρεασμένος από το Γαληνό, θεώρησε ότι ο διαβήτης είναι νεφρική διαταραχή, κάτι που αργότερα οδήγησε στη διαπίστωση από τον P.M. Allen ότι η άποψη αυτή καθυστέρησε κατά πολύ την πρόοδο της αιτιολογικής κατανόησης της ασθένειας.[29, 42]

Όσον αφορά την ίδια περίοδο, ο Διαβήτης ήταν ήδη γνωστός στην Άπω Ανατολή, σύμφωνα με αναφορές από συγγράμματα. Παραδείγματα αποτελούν οι αναφορές του κινέζου γιατρού Tsang-Tsong-King για τη «νόσο της δίψας», των Ινδών συγγραφέων Susruta και Charuka για τη «νόσο με τα μελώδη ούρα».

Λίγο πιο μετά, τον 6<sup>ο</sup> αι. περιγράφεται η τριάδα των συμπτωμάτων που συγκλίνουν στην διάγνωση του Διαβήτη (πολυφαγία, πολυουρία, πολυδιψία) και αναγνωρίζεται ο κληρονομικός χαρακτήρας του.

Αρκετά αργότερα, γίνεται η διαπίστωση από τον Παράκελσο (1493-1541μ.Χ.) ότι μετά την εξάτμιση των ούρων των διαβητικών ασθενών απομένει ένα ίζημα το οποίο θεώρησε ότι είναι «άλας» και με αυτό το λάθος καθυστερεί περαιτέρω την επιβεβαίωση των «γλυκών» ούρων. Μετά από 150 χρόνια, ο Άγγλος Thomas Willis (1621-1675) έδωσε στο Διαβήτη τον χαρακτηρισμό «Σακχαρώδης» (mellitus) αφού καθόρισε πλέον την εξέταση των ούρων σαν ένα ποιοτικό εργαλείο διάγνωσης της νόσου. Μόλις το 1776, ο Dobson ταυτοποίησε τη γλυκιά ουσία ως σάκχαρο και τη μέτρησε ποσοτικά στα ούρα των ασθενών και ο Chelreul, το 1815, απέδειξε ότι είναι γλυκόζη.

Μια παρατήρηση του Cawley, το 1783, κατά τη διάρκεια νεκροτομής, ήταν ότι το πάγκρεας διαβητικών ασθενών ήταν διαφορετικό από εκείνων που δεν έπασχαν από Διαβήτη, που όμως δεν έλαβε τη δέουσα προσοχή διότι επικρατούσε ακόμα η άποψη ότι η ασθένεια οφείλεται στα νεφρά.

Ορόσημο στην ιστορία της ασθένειας αποτέλεσε το έτος 1889 όπου οι Minkowski και von Mering από το Στρασβούργο, με τα πειράματά τους κατάφεραν να συνδέσουν το διαβήτη

με το πάγκρεας. Τελικά το 1921-22 οι Banting και Best κατάφεραν να παρουσιάσουν ως θεραπεία-αντιμετώπιση του διαβήτη, «εκχύλισμα του παγκρέατος» που σε συνδυασμό με τον Macleod προωθήθηκε με τη γνωστή ως σήμερα ονομασία «ινσουλίνη» και με τη βοήθεια του Collip μεγιστοποίησαν την καθαρότητά της ώστε να γίνει εμπορικά διαθέσιμη. Στα τέλη του 1923 οι Banting και Macleod τιμήθηκαν με βραβείο Νόμπελ γι' αυτή τους την ανακάλυψη και το βραβείο μοιράστηκαν με τους συνεργάτες τους, Best και Collip. [19, 23] Τη σύγχρονη εποχή τα δεδομένα που αφορούν την ασθένεια έχουν αλλάξει σε σχέση με 200 χρόνια πριν. Σίγουρα η έλλειψη ινσουλίνης είναι ένας κύριος παράγοντας εμφάνισης διαβήτη αλλά πλέον αφορά μόλις το 10% των περιπτώσεων. Η πλειοψηφία των διαβητικών περιπτώσεων σήμερα αφορά παχύσαρκους ασθενείς με συνδυασμό αντίστασης στην ινσουλίνη κι ελλιπή έκκριση ινσουλίνης. Η επικράτηση αυτής της μορφής αυξάνεται εκθετικά και μετατρέπεται σε επιδημία και αυτό είναι που καθιστά τον διαβήτη μια από τις πιο κοινές και σοβαρές ασθένειες που χρήζουν αντιμετώπισης από την ιατρική κοινότητα αυτή τη στιγμή.

## 2.2 Ορισμός του Σακχαρώδους Διαβήτη

Ο σακχαρώδης Διαβήτης (ΣΔ) ορίζεται ως μια χρόνια, σοβαρή μεταβολική διαταραχή προερχόμενη από σύνθετες αλληλεπιδράσεις γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων. Χαρακτηρίζεται από υπεργλυκαιμία, πολυουρία και πολυφαγία ενώ, αν παραμείνει αρρυθμιστο το υψηλό σάκχαρο στο αίμα, οι συνέπειες της διαταραχής μπορεί να είναι απειλητικές για τη ζωή του ασθενή. Τα τελευταία χρόνια, ο επιπολασμός της ασθένειας παίρνει μεγέθη παγκόσμιας επιδημίας και κάθε χρόνο όλο και μεγαλύτερο μέρος του Ετήσιου Παγκόσμιου Προϋπολογισμού για την Υγεία ξοδεύεται για την αντιμετώπιση του ΣΔ και των επιπλοκών που προκαλεί. Υπάρχουν πολλοί παράγοντες που κινδύνου που εμπλέκονται στην αιτιοπαθογένεια του διαβήτη και τον καθιστούν επιδημία. Δυστυχώς δεν υπάρχει ακόμα θεραπεία και η αντιμετώπισή του έγκειται κυρίως, στον έλεγχο και τη ρύθμιση των διαταραχών μέσω της διατήρησης ενός υγιούς καθημερινού τρόπου ζωής και τη σωστή εκπαίδευση των ασθενών. [1]

## 2.3 Τύποι Σακχαρώδους Διαβήτη

Υπάρχουν τέσσερις κοινοί τύποι Σακχαρώδους Διαβήτη (Diabetes Mellitus, DM). Ο **Τύπος 1 (T1DM)** που προκαλείται από αυτοάνοση καταστροφή των β-παγκρεατικών κυττάρων, οπότε και σταματά η παραγωγή ινσουλίνης και γι' αυτό ονομάζεται και ινσουλινο-εξαρτώμενος διαβήτης (IDDM). Το πάγκρεας εμφανίζει λεμφοκυτταρική διήθηση και καταστρέφονται τα κύτταρα των νησίδων Langerhans (τα οποία εκκρίνουν την ινσουλίνη) και τελικά ο ασθενής αποκτά ανεπάρκεια ινσουλίνης. Οι ασθενείς έχουν την ανάγκη εξωγενούς χορήγησης ινσουλίνης και την καθιέρωση κατάλληλης διαίτας προκειμένου να επιβιώσουν αφού ο οργανισμός δεν δύναται να παράγει την απαραίτητη ινσουλίνη. Μια σοβαρή επιπλοκή αποτελεί η διαβητική κετοξέωση. Αυτός ο τύπος αν και μπορεί να εμφανιστεί σε όλες τις ηλικιακές ομάδες παρατηρείται σε μεγαλύτερο ποσοστό στην παιδική ηλικία και περιλαμβάνει περίπου το 5-10% του συνόλου των διαβητικών ασθενών. Τέλος, είναι σημαντικό, να αναφερθεί η μεταβλητότητα των συμπτωμάτων που εμφανίζει ανάλογα με την ηλικιακή ομάδα στην οποία εντοπίζεται και έτσι παρατηρούνται στους μεν νέους σοβαρά συμπτώματα πολυουρίας, πολυδιψίας και κετοναιμίας, στους δε ενήλικες αυτά είναι πιο σταδιακά και συχνά προσομοιάζουν αυτά του τύπου 2. [1, 9]

Ο βασικός τύπος διαβήτη είναι ο **Τύπος 2 (T2DM)** ο οποίος προκαλείται από την ανεπάρκεια της παραγωγής ινσουλίνης όπου το πάγκρεας δεν παράγει την απαιτούμενη ποσότητα ή την από-ευαισθητοποίηση των υποδοχέων ινσουλίνης που επιτρέπουν την είσοδο της γλυκόζης στα κύτταρα και αυτά δεν μπορούν να την αξιοποιήσουν. Αυτός ο τύπος παρατηρείται στο 90-95% των διαβητικών περιπτώσεων και εμφανίζεται σε μεγαλύτερες ηλικιακές ομάδες από τον τύπου 1. Για τη διαχείριση αυτού του τύπου δεν απαιτείται εξωγενής χορήγηση ινσουλίνης παρ' όλ' αυτά μπορεί δυνητικά να χρειαστεί, καθώς και από του στόματος διαχείριση της υπεργλυκαιμίας με φάρμακα. Το μεγαλύτερο ποσοστό αυτών των ασθενών είναι παχύσαρκοι και έχουν οικογενειακό ιστορικό της ασθένειας. [1, 41]

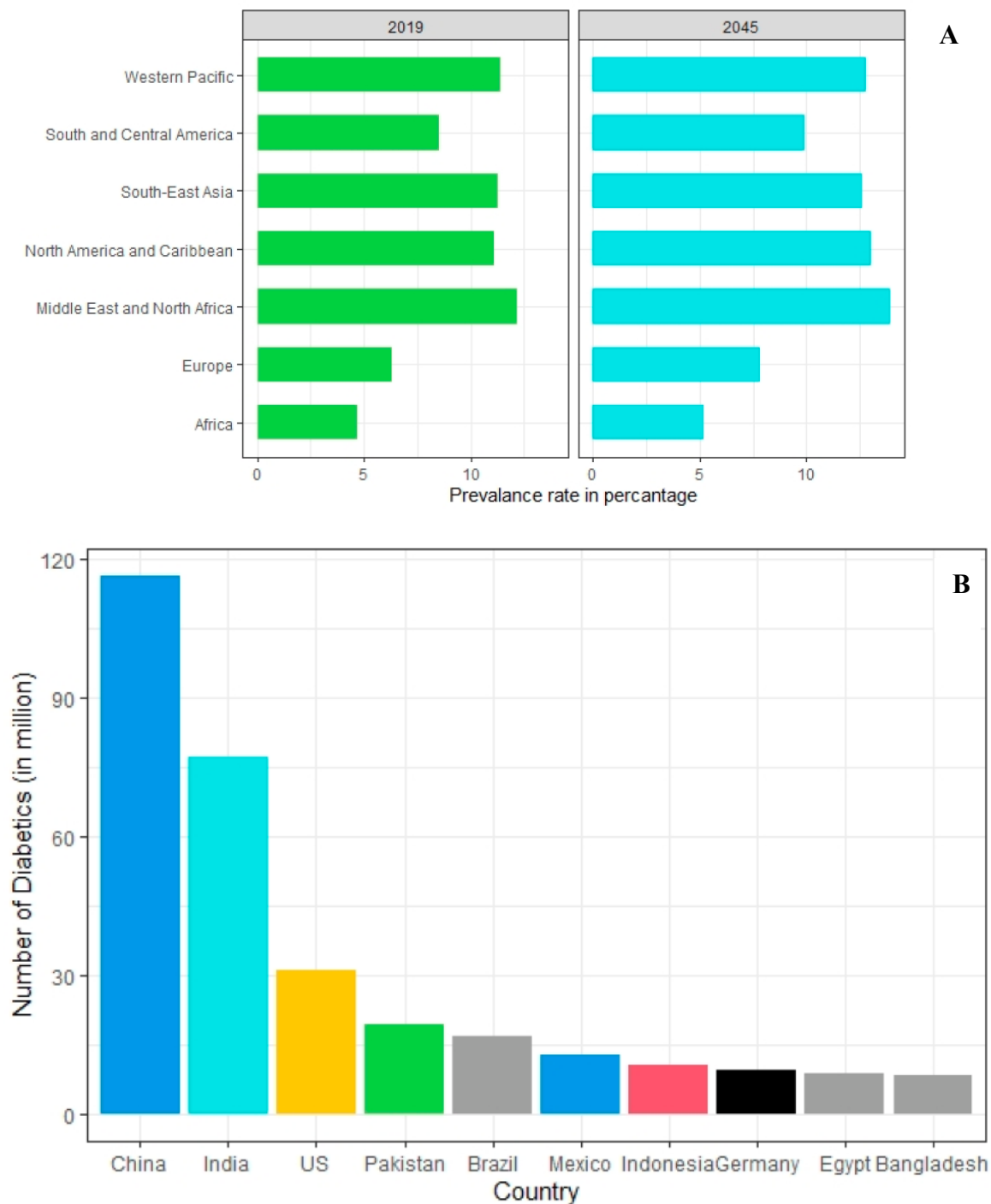
Ένας άλλος τύπος, είναι ο **Διαβήτης Κύησης** (gestational diabetes mellitus, GDM) ο οποίος, όπως είναι και το όνομά του, εμφανίζεται την περίοδο της εγκυμοσύνης στις γυναίκες, κυρίως ως αντίσταση στην ινσουλίνη. Ο διαβήτης κύησης εμφανίζεται περίπου στο 5-15% των εγκύων χωρίς να διαφαίνεται κάποια προδιάθεση σε εθνικότητες ή περιοχές. Οι παράγοντες που τον προκαλούν είναι ποικίλοι όπως: γενετικές ανωμαλίες, παγκρεατική απόφραξη, κάποιο χειρουργείο, μεταμόσχευση οργάνων κ.α.. Οι γυναίκες που εμφανίζουν

αυτόν τον τύπο θα ήταν πολύ πιθανό, σε ποσοστό 40-60%, να εμφανίσουν ΣΔ2 σε κάποια επόμενη φάση της ζωής τους (συνήθως μέσα στα επόμενα 5-10 χρόνια). Η μειωμένη ανοχή στη γλυκόζη είναι πιθανό να εκφραστεί ως ΣΔ2 ενώ ο αρρυθμιστος διαβήτης μπορεί να οδηγήσει στην εκδήλωση άλλων ασθενειών, ενδεχομένως απειλητικών για τη ζωή, όπως: καρδιαγγειακές παθήσεις, τύφλωση λόγω ανάπτυξης γλαυκώματος, νεφρική ανεπάρκεια, νευρολογικές διαταραχές, ανισορροπίες στην ωσμωτικότητα του αίματος, υπέρταση και πολλές ακόμα ασθένειες. [1]

Τέλος, υπάρχει και ο **Μονογονιδιακός** τύπος Διαβήτη ο οποίος συχνά, λανθασμένα, διαγιγνώσκεται ως ΣΔ1 ή ΣΔ2, προκαλείται από μετάλλαξη σε ένα μόνο γονίδιο ή σε μια ομάδα γονιδίων, είναι αυτοσωμική-κυρίαρχη ασθένεια και οι ασθενείς εμφανίζουν ποικίλα συμπτώματα και κλινική εικόνα. Υπάρχουν δύο περιπτώσεις αυτού του τύπου, ο **νεογνικός διαβήτης** που εμφανίζεται μέχρι τους πρώτους 6 μήνες ζωής και μπορεί να είναι παροδικός ή μόνιμος και ο **οικογενής (MODY, maturity-onset diabetes of the young)** ο οποίος εκδηλώνεται συνήθως στο τελείωμα της παιδικής ηλικίας ως και τη νεαρή ενήλικη περίοδο του ασθενούς, παρόλο που έχει διαγνωσθεί και σε ασθενείς κατά την 5<sup>η</sup> δεκαετία ζωής τους. Σε αυτόν τον τύπο διαβήτη οι μεταλλάξεις αφορούν κυρίως γονίδια που κωδικοποιούν μεταγραφικούς παράγοντες. Έχουν εντοπιστεί τουλάχιστον 10 γονίδια που εμπλέκονται στην εμφάνιση του MODY και πάνω από 20 για τον νεογνικό. [1, 2]

## 2.4 Επιδημιολογία Σακχαρώδους Διαβήτη

Σύμφωνα με δεδομένα από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO <https://www.who.int/health-topics/diabetes>) οι περιπτώσεις της ασθένειας τετραπλασιάστηκαν μέσα σε μόλις 34 χρόνια (από 108 εκατομμύρια το 1980 σε 422 το 2014). Η πλειοψηφία των ασθενών κατοικούν σε χαμηλού και μέτριου εισοδήματος χώρες, ενώ περίπου 1,5 εκατομμύριο θάνατοι ετησίως συνδέονται άμεσα με τον ΣΔ. Όσον αφορά κάποια επιδημιολογικά στοιχεία, υπολογίζεται ότι ο επιπολασμός της ασθένειας από το 2019 θα ανέβει κατά μέσο όρο περίπου 2% μέχρι το 2045. Σύμφωνα με έρευνα (Saeedi et al.) το 2019 καταγράφηκαν 463 εκατομμύρια περιπτώσεις διαβήτη που αντιστοιχούν σε ποσοστό επιπολασμού 9,3% και εκτιμάται ότι αυτός θα ανέβει στα 10,2% μέχρι το 2030 και ως 10,9% το 2045. Μια εικόνα για τις χώρες με τις περισσότερες περιπτώσεις ακολουθεί στην εικόνα (\*). Γενικά παρατηρείται ότι οι χώρες της νότιο-ανατολικής Ασίας και της Νότιας Αμερικής παρουσιάζουν αυξημένο αριθμό περιπτώσεων.



**Εικόνα 2.1:** Α. ο επιπολασμός του ΣΔ σε ποσοστό για κάθε χώρα το 2019 και η πρόβλεψη για το 2045  
Β. Οι περιπτώσεις ΣΔ αριθμητικά ανά χώρα. ( Alam et al.2021)

## 2.5 Κλινική Εικόνα

Τα συμπτώματα των διαφορετικών τύπων διαβήτη δεν διαφέρουν κατά πολύ, διαφέρει όμως η ένταση και η εμφάνισή τους. Τα πιο συνήθη είναι η πολουρία, η πολυδιψία, η συνεχής πείνα (πολυφαγία), η απώλεια βάρους, η θολή όραση και η κούραση. Το πιο σύνηθες δε, είναι ότι αυτά εμφανίζονται απότομα και όχι σταδιακά. Τα παραπάνω, αφορούν κυρίως το Διαβήτη τύπου 1, ενώ στον Τύπου 2 υπάρχει σαν πιο σύνηθες σύμπτωμα η παχυσαρκία, αντί της απώλειας βάρους και το γεγονός ότι τα συμπτώματα αυτά είναι λιγότερο διακριτά/εμφανή. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα ο ΣΔ2 να διαγιγνώσκεται αρκετό καιρό ως και χρόνια μετά την έναρξή του και συνήθως όταν οι επιπλοκές του έχουν ήδη αρχίσει να επηρεάζουν τον οργανισμό του ασθενή.

## 2.6 Η Παθοφυσιολογία του Σακχαρώδους Διαβήτη Τύπου 1 και 2

Σε αυτή την ενότητα θα γίνει μια σύντομη περιγραφή της βιοχημείας και της φυσιολογίας που αφορά τους τύπους διαβήτη, ώστε να γίνει κατανοητό αργότερα πως επιδρούν οι διάφοροι παράγοντες κινδύνου στην εμφάνιση της ασθένειας.

Είναι γνωστό πως το κύριο ενεργειακό νόμισμα του ανθρώπινου οργανισμού είναι το ATP. Υπάρχουν διάφορες μεταβολικές πορείες μέσα από τις οποίες αποδομούνται τα μεγάλα μόρια-καύσιμα μέχρι να σχηματιστεί το ATP. Όλες αυτές οι πορείες αποτελούν τον Μεταβολισμό, δηλαδή μια αλυσίδα χημικών αντιδράσεων που ξεκινάει από ένα βιομόριο και το μετατρέπει σε άλλα απαιτούμενα με ένα πολύ προσεκτικά καθορισμένο και ελεγχόμενο τρόπο. Τα κύρια βιομόρια που προσλαμβάνει ο οργανισμός τα οποία υπόκεινται σε μετατροπή είναι τα λίπη, οι πολυσακχαρίτες και οι πρωτεΐνες.

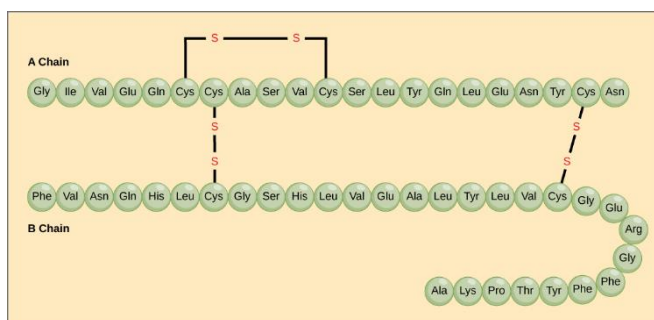
Η πρώτη μετατροπή λαμβάνει χώρα μέσω της πέψης. Όσον αφορά τους υδατάνθρακες της τροφής, αυτοί μετατρέπονται μέσω των ενζύμων της πέψης, που δεν θα αναλυθούν στην παρούσα εργασία, στους μονοσακχαρίτες, γλυκόζη, γαλακτόζη και φρουκτόζη.

Από αυτούς η γλυκόζη είναι το πιο σημαντικό καύσιμο ενώ στα θηλαστικά είναι το μοναδικό που χρησιμοποιεί ο εγκέφαλος σε συνθήκες επάρκειας τροφής και το μόνο που χρησιμοποιούν τα ερυθρά αιμοσφαίρια. Ο λόγος που η γλυκόζη είναι το πιο βασικό μόριο σε σχέση με άλλους μονοσακχαρίτες έχει να κάνει με τη χημική της δομή και τις βιοχημικές τις ιδιότητες. Για να παραχθεί ATP από τη γλυκόζη, πρέπει αυτή να είναι διαθέσιμη σε επάρκεια στα κύτταρα, προκειμένου να λάβει χώρα η διαδικασία της γλυκόλυσης.



Η ρύθμιση αυτής της διαδικασίας γίνεται από το ήπαρ, το οποίο επί της ουσίας είναι υπεύθυνο για τη ρύθμιση των επιπέδων γλυκόζης στο αίμα και την αποθηκεύει ως γλυκογόνο όταν αυτή είναι άφθονη ενώ την απελευθερώνει όταν η παροχή, μέσω της τροφής, είναι χαμηλή. Υπάρχει μια οικογένεια μεταφορέων, GLUT (1-5), οι οποίοι επιτρέπουν στη γλυκόζη να εισέρχεται και να εξέρχεται από τα κύτταρα. Κάποιοι από αυτούς απαντώνται στα κύτταρα όλων των ιστών στα θηλαστικά, ενώ κάποιοι βρίσκονται σε συγκεκριμένους ιστούς και λειτουργούν υπό συγκεκριμένες συνθήκες, που αφορούν την παρουσία της ινσουλίνης.

Η ινσουλίνη είναι μια ορμόνη (πολυπεπτιδική) η οποία εκκρίνεται όπως έχει ήδη αναφερθεί από τα β-κύτταρα του παγκρέατος. Αυτή η έκκριση συμβαίνει σαν απάντηση της αύξησης συγκέντρωσης γλυκόζης στο αίμα, κάτι που επέρχεται μετά

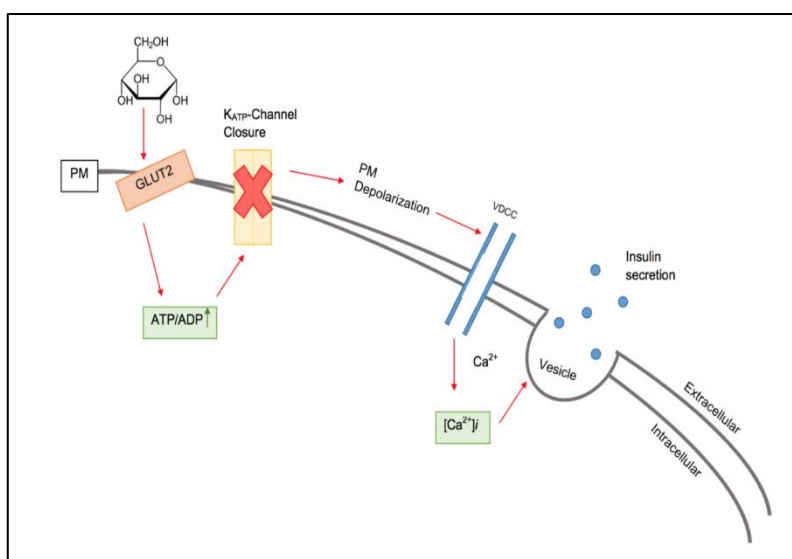


**Εικόνα 2.2:** Η δομή της ινσουλίνης, By CNX OpenStax [CC BY 4.0 (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)], via Wikimedia Commons

από ένα γεύμα. Η κύρια λειτουργία της ινσουλίνης είναι να διεγείρει την πρόσληψη της γλυκόζης από τους διάφορους ιστούς κυρίως όμως τους μύες και το λιπώδη ιστό.

Η έκκρισή της είναι μια διαδικασία που ξεκινάει με την παρουσία της αυξημένης γλυκόζης στο αίμα. Πρώτα γίνεται η είσοδος της γλυκόζης στο β-παγκρεατικό κύτταρο μέσω του υποδοχέα GLUT 2, εκεί αυτή μεταβολίζεται σε πυροσταφυλικό οξύ και παράγεται ATP. Η αύξηση του ATP στο εσωτερικό του κυττάρου (αύξηση του λόγου ATP/ADP) κλείνει έναν δίαυλο  $K^+$  (καλίου) ο οποίος βρίσκεται στην κυτταρική μεμβράνη και η αλλαγή του

ιοντικού περιβάλλοντος στο κύτταρο εκπολώνει την κυτταρική



**Εικόνα 2.3:** Η διαδικασία έκκρισης της ινσουλίνης και σχηματική απεικόνιση της λειτουργίας των τάσεων-εξαρτώμενων διαύλων  $K_{ATP}$  και  $Ca^{2+}$ .  
[https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Insulin\\_secretion.png](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Insulin_secretion.png)  
Creative Commons Attribution-Share Alike 4.0 International



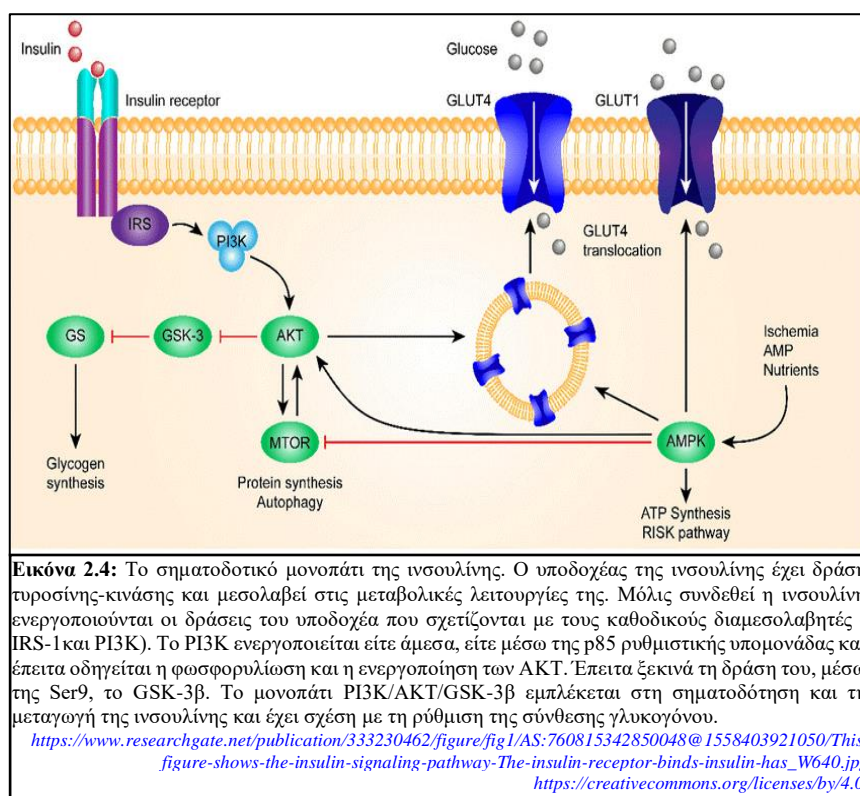
μεμβράνη, γεγονός, που με τη σειρά του ενεργοποιεί έναν τάσηο-εξαρτώμενο διάυλο  $\text{Ca}^{2+}$  (ασβεστίου).

Η εισροή των ιόντων  $\text{Ca}^{2+}$  έχει ως αποτέλεσμα τα εκκριτικά κυστίδια που βρίσκονται μέσα στο κύτταρο να συντηχθούν με την κυτταρική του μεμβράνη και να απελευθερώσουν στην κυκλοφορία του αίματος την ινσουλίνη που περιέχουν.

Μια άλλη λειτουργία της ινσουλίνης είναι η αναστολή της γλυκονεογένεσης, διαδικασία κατά την οποία παράγεται γλυκόζη όταν δεν είναι επαρκής και φυσικά η έναρξη της γλυκόλυσης, μέσω ενός καταρράκτη σηματοδότησης που αυξάνει την έκφραση γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες της διαδικασίας αυτής. Παρατηρείται δηλαδή μια αυτορρύθμιση στα διάφορα μεταβολικά μονοπάτια η οποία επιτρέπει τη διαχείριση των «καυσίμων» από τον οργανισμό σε κάθε περίπτωση. [3]

Όσον αφορά τους διάφορους τύπους διαβήτη, ο Τύπου 1 όπως ήδη έχει αναφερθεί, οφείλεται στην αυτοάνοση καταστροφή των β-κυττάρων του παγκρέατος και άρα στη μη έκκριση της απαραίτητης ινσουλίνης (γι' αυτό το λόγο απαιτείται εξωτερική χορήγηση). Η ανεπάρκεια αυτή οδηγεί φυσιολογικά στην αυξημένη συγκέντρωση γλυκαγόνης, πέραν των επιτρεπτών ορίων. Απουσία ινσουλίνης η γλυκόζη δεν εισέρχεται στα μυϊκά κύτταρα, ούτε στα κύτταρα του λιπώδους ιστού και στο ήπαρ επικρατούν συνθήκες γλυκονεογένεσης, κετογένεσης ή χρησιμοποίησης λίπους (εξ ου και η απώλεια βάρους). Ο ασθενής ενώ τρέφεται κανονικά βρίσκεται σε μια κατάσταση βιοχημικού υποσιτισμού και η γλυκόζη στο αίμα ανεβαίνει σε υπερφυσικά επίπεδα. Η υψηλή τιμή του λόγου γλυκαγόνη/ινσουλίνη προωθεί τη διάσπαση του γλυκογόνου, με αποτέλεσμα την περαιτέρω παραγωγή και συσσώρευση γλυκόζης.

Στον Διαβήτη Τύπου 2 η ινσουλίνη είναι παρούσα μεν, αποτυγχάνει ωστόσο να αναστείλει την έκφραση των γονιδίων της γλυκονεογένεσης και αυτή η μεταβολική κατάσταση είναι η επονομαζόμενη αντίσταση στην ινσουλίνη. Κατ' επέκταση υπάρχει αυξημένη εκροή γλυκόζης στο αίμα από το ήπαρ, ακόμα και όταν υπάρχει αρκετή λόγω της λήψης τροφής (υπεργλυκαιμία). Αυτή η κατάσταση μεταβάλλει την ωσμωτικότητα του αίματος προκαλώντας απώλεια νερού απ' τους ιστούς (μέσω μιας διουρητικής ορμόνης ADH) οδηγώντας στην υπερβολική δίψα (πολυδιψία). Η περίσσια της γλυκόζης απεκκρίνεται μαζί με το νερό από τους νεφρούς έχοντας ως αποτέλεσμα τη συνεχή ούρηση (πολυουρία). Τελικά η ανικανότητα του οργανισμού να διακινήσει και να χρησιμοποιήσει τη γλυκόζη που υπάρχει άφθονη οδηγεί σε έλλειψη ενέργειας η οποία εμφανίζεται ως κόπωση, θολή όραση, κεφαλαλγία.



## 2.7 Παράγοντες Κινδύνου Εμφάνισης Σακχαρώδους Διαβήτη

Οι παράγοντες κινδύνου εμφάνισης της ασθένειας είναι πολλοί και επιδρούν τις περισσότερες φορές συνδυαστικά. Μερικοί από αυτούς είναι: γενετικοί, περιβαλλοντικοί, ο καθιστικός τρόπος ζωής, η έλλειψη άσκησης, το αλκοόλ, το κάπνισμα, διάφορες δυσλιπιδαιμίες, η υπερινσουλιναιμία, η μειωμένη ευαισθησία των β-κυττάρων κ.α.. Οι παράγοντες αυτοί φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο στην αντίσταση στην ινσουλίνη και στην δυσλειτουργία έκκρισης ινσουλίνης και τελικά στην εξέλιξη του ΣΔ. Η αύξηση που παρατηρείται στις περιπτώσεις ΣΔ παγκοσμίως, οφείλεται κυρίως από την επικράτηση της παχυσαρκίας στον πληθυσμό και την εγκατάσταση ενός ανθυγιεινού τρόπου ζωής. Πιο συγκεκριμένα, ο διακοπτόμενος ύπνος και η άπνοια κατά τη διάρκεια του ύπνου (διαταραχές ύπνου) που παρατηρούνται στους υπέρβαρους ενήλικες είναι σημαντικοί παράγοντες κινδύνου εμφάνισης αντίστασης στην ινσουλίνη και υπεργλυκαιμίας. Έπειτα, δίαιτες που περιέχουν λίγες φυτικές ίνες και είναι υψηλού γλυκαιμικού δείκτη ή/και τα ελεύθερα λιπαρά οξέα επηρεάζουν άμεσα την αντίσταση στην ινσουλίνη και την εμφάνιση ΣΔ. Τα τελευταία χρόνια γίνονται πολλές συμπληρωματικές μελέτες που προσθέτουν στη γνώση σχετικά με τους παράγοντες κινδύνου και επεκτείνουν το φάσμα τους [1]. Κάποιοι πρόσφατα ανακαλυφθέντες είναι: το ουρικό οξύ, το οποίο φαίνεται να έχει σημαντικό ρόλο

στην εμφάνιση ΣΔ ακόμα και ανεξάρτητα από άλλους παράγοντες, το οξειδωτικό στρες που επηρεάζει τη λειτουργία του ενδοθηλίου, η αυξημένη ανοσοσφαιρίνη E (IgE) σε συνδυασμό όμως με άλλους παράγοντες, ο αυξημένος σίδηρος και κάποια φάρμακα όπως αντιψυχωσικά, διουρητικά, ανοσοκατασταλτικά, βήτα αναστολείς, μπορούν να συμβάλλουν στην εμφάνιση ΣΔ. Πιο συγκεκριμένα για τον ΣΔ1, φαίνεται να επηρεάζεται αρκετά από διάφορες μολυσματικές ασθένειες (προκαλούμενες από ιούς) γιατί επηρεάζουν την ανοχή του ανοσοποιητικού συστήματος και διαταράσσουν την ισορροπία και τη λειτουργία του. Κάποιοι ενδεικτικά είναι: ο κοξάκι, ιοί με γραμμικό-μονόκλωνο RNA ως γενετικό υλικό, ο κυτταρομεγαλοϊός και ο ροταϊός. Τέλος, κάποιες παγκρεατικές ασθένειες που προκαλούνται από την ιλαρά, την ερυθρά ή/και την παρωτίτιδα (MMR measles, mumps, rubella) συμβάλλουν στην εμφάνιση ΣΔ1 λόγω της παραγωγής αυτοαντισωμάτων.

[1]

## 2.8 Επιπλοκές του Σακχαρώδους Διαβήτη Τύπου 2

Ο Διαβήτης τύπου 2 έχει συνδεθεί με διάφορες ασθένειες λόγω των επιπλοκών που προκαλεί στον ανθρώπινο οργανισμό. Τα όργανα που εμπλέκονται στην ανάπτυξη και εξέλιξη του ΣΔ2 είναι το πάγκρεας, το ήπαρ, οι σκελετικοί μύες, τα νεφρά ο εγκέφαλος, το λεπτό έντερο και ο λιπώδης ιστός.

Έχει βρεθεί ότι, οι ασθενείς με διαβήτη τύπου 2 έχουν 15% αυξημένο κίνδυνο για θάνατο από οποιαδήποτε αιτία σε σχέση με ανθρώπους που δεν έχουν διαβήτη, ποσοστό που είναι διπλάσιο στους νέους αλλά, και οι ασθενείς κάτω των 55 ετών με συγκέντρωση γλυκοζιωμένης αιμοσφαιρίνης (HbA1c) 6-9% (55 mmol/mol) ή λιγότερο, έχουν διπλάσιες πιθανότητες θανάτου από αυτούς που δεν νοσούν από διαβήτη τύπου 2. [7]

Οι επιπλοκές που προκαλεί ο ΣΔ2 διακρίνονται σε οξείες και χρόνιες ανάλογα με το χρόνο που χρειάζονται για να εκδηλωθούν. Μια πολύ γνωστή οξεία επιπλοκή αποτελεί η **υπογλυκαιμία**. Σε αυτή την περίπτωση τα επίπεδα της γλυκόζης στο αίμα πέφτουν δραματικά (50-60mg/dL). Αν η υπογλυκαιμία παραταθεί, επειδή δεν υπάρχει παροχή γλυκόζης, εμφανίζονται συμπτώματα δυσλειτουργίας του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος: διαταραχή όρασης, κεφαλαλγία, λήθαργος,

αδυναμία συγκέντρωσης, απώλεια μνήμης, σύγχυση, υπνηλία, επιληπτικοί σπασμοί (Κατσιλάμπρος,2012). Άλλες οξείες μεταβολικές επιπλοκές που απορρυθμίζουν τον ΣΔ2, σχετίζονται με θνητότητα και είναι αποτέλεσμα των αυξημένων επιπέδων γλυκόζης στο

αίμα (υπεργλυκαιμία), περιλαμβάνουν τη **Διαβητική Κετοξέωση (ΔΚ)** και το **Υπεργλυκαιμικό μη Κετονικό Υπερωσμωτικό Κώμα (ΥΚΥΚ)** το οποίο είναι δυνατόν να παρατηρηθεί και σε ασθενείς με ΣΔ1 (Ελληνική Διαβητολογική Εταιρεία, 2018). [33]  
Οι χρόνιες επιπλοκές του ΣΔ προέρχονται κυρίως από τη χρόνια αύξηση των επιπέδων της γλυκόζης στο αίμα η οποία καταστρέφει σταδιακά τα αιμοφόρα αγγεία. Αυτές, κατηγοριοποιούνται σε μικροαγγειακές και μακροαγγειακές επιπλοκές.

#### *A) Μικροαγγειακές επιπλοκές*

Η συχνότερη μικροαγγειακή επιπλοκή του ΣΔ είναι η **Διαβητική Αμφιβληστροειδοπάθεια (retinopathy)** και συνιστά τη συχνότερη αιτία τύφλωσης διαβητικών ηλικίας 25-74 ετών. Μια άλλη είναι η **Διαβητική Νεφροπάθεια (nephropathy)**, η οποία ορίζεται ως η βλάβη των νεφρών, εξαιτίας του ΣΔ και αφορά το 30%-60% των ασθενών με νεφρική νόσο και ΣΔ (KDOQI, 2007). Τέλος, η **Διαβητική Νευροπάθεια (neuropathy)**, αποτελεί μικροαγγειακή επιπλοκή του ΣΔ, δηλαδή η «παρουσία συμπτωμάτων ή και σημείων δυσλειτουργίας των περιφερικών νεύρων, σε άτομα με διαβήτη, μετά τον αποκλεισμό άλλων αιτιών» (Watkins, 2003).

#### *B) Μακροαγγειακές επιπλοκές*

Μακροαγγειακή επιπλοκή του ΣΔ αποτελεί η **καρδιαγγειακή νόσος**, η οποία μπορεί να είναι αιτία νοσηρότητας και θνητότητας σε μεγάλο ποσοστό των ασθενών με ΣΔ (70-75%, Μελιδώνης, 2007). Η αντιμετώπιση της είναι πολυπαραγοντική και η ρύθμιση της δυσλιπιδαιμίας, της υπέρτασης και του ΣΔ, μπορεί να μειώσει τον κίνδυνο των θανάτων. Άλλη μακροαγγειακή επιπλοκή του ΣΔ, είναι ο αυξημένος κίνδυνος εκδήλωσης **Αγγειακού Εγκεφαλικού Επεισοδίου (ΑΕΕ)**. Η συχνότητα εμφάνισής του στους διαβητικούς ασθενείς είναι από 1,5 έως 6 φορές περισσότερο, σε σχέση με το γενικό πληθυσμό καθώς και αυξημένη νοσηρότητα και θνητότητα.

Μια τρίτη μακροαγγειακή επιπλοκή του ΣΔ, είναι η **Περιφερική Αγγειακή Νόσος (ΠΑΝ)**, στην οποία παρουσιάζεται στένωση ή απόφραξη των λαγόνιων και των αρτηριών των κάτω άκρων. Ο ΣΔ αυξάνει τον κίνδυνο εμφάνισης ΠΑΝ 2-4 φορές περισσότερο, ενώ σημαντικός παράγοντας εμφάνισης της επιπλοκής είναι και το κάπνισμα.

Άλλες επιπλοκές του ΣΔ, είναι:

Το **Διαβητικό Πόδι (ΔΠ)**. Ο όρος, περιλαμβάνει λοιμώξεις, έλκη, γάγγραινα και άρθρωση charcot, σε συνδυασμό με περιφερική νευροπάθεια και αγγειοπάθεια. Περίπου το 25% των ασθενών παρουσιάζει κάποιου είδους έλκος, ενώ ≈29% υφίστανται κάποιον ακρωτηριασμό. Σημαντική για τη μείωση του κινδύνου του ΔΠ και την εμφάνιση ελκών και

ακρωτηριασμών στα κάτω άκρα, είναι η πρόληψη της εμφάνισης προβλημάτων στα πόδια μέσω της εκπαίδευσης των ασθενών.

Η **Στυτική δυσλειτουργία**, η αδυναμία δηλαδή να επιτύχει ή να διατηρήσει κάποιος στύση, ικανή για σεξουαλική επαφή, είναι αποτέλεσμα αγγειακών, νευρικών δυσλειτουργιών και ορμονικών διαταραχών. Υπολογίζεται ότι αυτό συμβαίνει στο 30%-50% των διαβητικών ανδρών και η πιθανότητα εμφάνισής της συσχετίζεται με την ηλικία, την καρδιαγγειακή νόσο, τη συμπτωματική νευροπάθεια (περιφερική και αυτόνομη), την ύπαρξη αμφιβληστροειδοπάθειας, αλλά και με τη γλυκαιμική ρύθμιση. Γι' αυτούς του λόγους θα μπορούσε να ερευνηθεί η χρήση της ΣΔ ως πρώιμος βιοδείκτης των διαβητικών επιπλοκών, βοηθώντας στην έγκαιρη παρέμβαση και την αποδοτικότερη θεραπεία.[35] Όσον αφορά τη σεξουαλική δυσλειτουργία στις διαβητικές γυναίκες, δεν υπάρχει η ίδια έκταση ερευνών όμως από κάποιες κλινικές έρευνες προέκυψε ότι στις γυναίκες με ΣΔ υπάρχει υψηλός επιπολασμός σεξουαλικής δυσλειτουργίας όμως, και για την κατάσταση αυτή, ενοχοποιούνται κυρίως ψυχολογικοί παράγοντες, με κυριότερο την ύπαρξη κατάθλιψη (Μελιδώνης,2010).

Υπάρχουν ενδείξεις πως ο ΣΔ προκαλεί και άλλου είδους επιπλοκές όπως η κατάθλιψη η άνοια κ.α. [18]

Συνοψίζοντας, ο ΣΔ προκαλεί μεγάλο εύρος επιπλοκών ειδικότερα όταν τα επίπεδα της γλυκόζης στο αίμα παραμένουν αρρυθμιστα. Όσο η ασθένεια βρίσκεται υπό έλεγχο και υπάρχει βελτίωση των συνθηκών που συμβάλλουν αρνητικά τόσο μειώνονται οι κίνδυνοι των επιπλοκών (νοσηρότητα, θνητότητα) και επιπλέον βελτιώνεται η ποιότητα της ζωής των ασθενών.

### 3 Μεθυλίωση των γονιδίων του ΣΔ2

Στο προηγούμενο κεφάλαιο έγινε λόγος για τον τρόπο με τον οποίο οι επιγενετικοί μηχανισμοί ρυθμίζουν την γονιδιακή δραστηριότητα και την ανάπτυξη ενός οργανισμού. Φαίνεται πως η διατάραξη της ισορροπίας του επιγονιδιώματος μπορεί να οδηγήσει σε αρκετές παθογένειες οι οποίες συμβάλλουν στην εμφάνιση της παχυσαρκίας και του ΣΔ2. Έπειτα από αρκετές έρευνες έχουν πλέον χαρακτηριστεί συγκεκριμένες επιγενετικές υπογραφές (epigenetic signatures) σε διάφορους ιστούς όπως ο λιπώδης ιστός, τα παγκρεατικά νησίδια, το ήπαρ, οι σκελετικοί μύες και το αίμα που αφορούν την παχυσαρκία και τον ΣΔ2. Αν και η έρευνα σε αυτόν τον τομέα είναι ακόμα σε πρώιμα στάδια, τα συνολικά δεδομένα υποδεικνύουν όχι μόνο το ρόλο της επιγενετικής ως παράγοντα ανάπτυξης της ασθένειας αλλά και πως οι επιγενετικές τροποποιήσεις συμβαίνουν ως απάντηση στην ασθένεια. Η γενετική προδιάθεση και η ηλικία συμβάλλουν στην επιγενετική ποικιλομορφία, όμως και οι περιβαλλοντικοί παράγοντες, συμπεριλαμβανομένων της διατροφής και της άσκησης που έχουν ήδη αναφερθεί, επιδρούν περαιτέρω στο επιγονιδίωμα του ανθρώπου. Εντούτοις, η αντιστρεπτή φύση των επιγενετικών τροποποιήσεων τις καθιστά ως πολλά υποσχόμενες θεραπευτικές προσεγγίσεις για την παχυσαρκία και τον ΣΔ2.

#### 3.1 Μεθυλίωση και Παχυσαρκία

Παρακάτω παρατίθενται τα αποτελέσματα κάποιων μελετών εστιασμένα κυρίως στη μεθυλίωση του DNA, που είναι και το αντικείμενο ανάλυσης της παρούσας εργασίας, αλλά και κάποια στοιχεία από όλους τους επιγενετικούς μηχανισμούς που αφορούν την παχυσαρκία και κυρίως τον ΣΔ2.

Έχει ήδη αναφερθεί η αύξηση της παχυσαρκίας στον πληθυσμό και έχει βρεθεί πως είναι αποτέλεσμα κυρίως περιβαλλοντικών παραγόντων και του σύγχρονου τρόπου ζωής και λιγότερο γενετικών παραγόντων. Η επιγενετική είναι ο μηχανισμός που συνδέει το περιβάλλον με τη διαφοροποιημένη γονιδιακή λειτουργία και κατ' επέκταση ο συνδετικός κρίκος ανάμεσα στις ταχείες αλλαγές των διατροφικών συνηθειών και των παρατηρούμενων παχύσαρκων φαινοτύπων.

Ήδη απ' το 2013 έχει γίνει συσχέτιση της μεθυλίωσης του DNA σε λευκοκύτταρα του περιφερικού αίματος με την παχυσαρκία, χρησιμοποιώντας τη μέθοδο Infinium Human

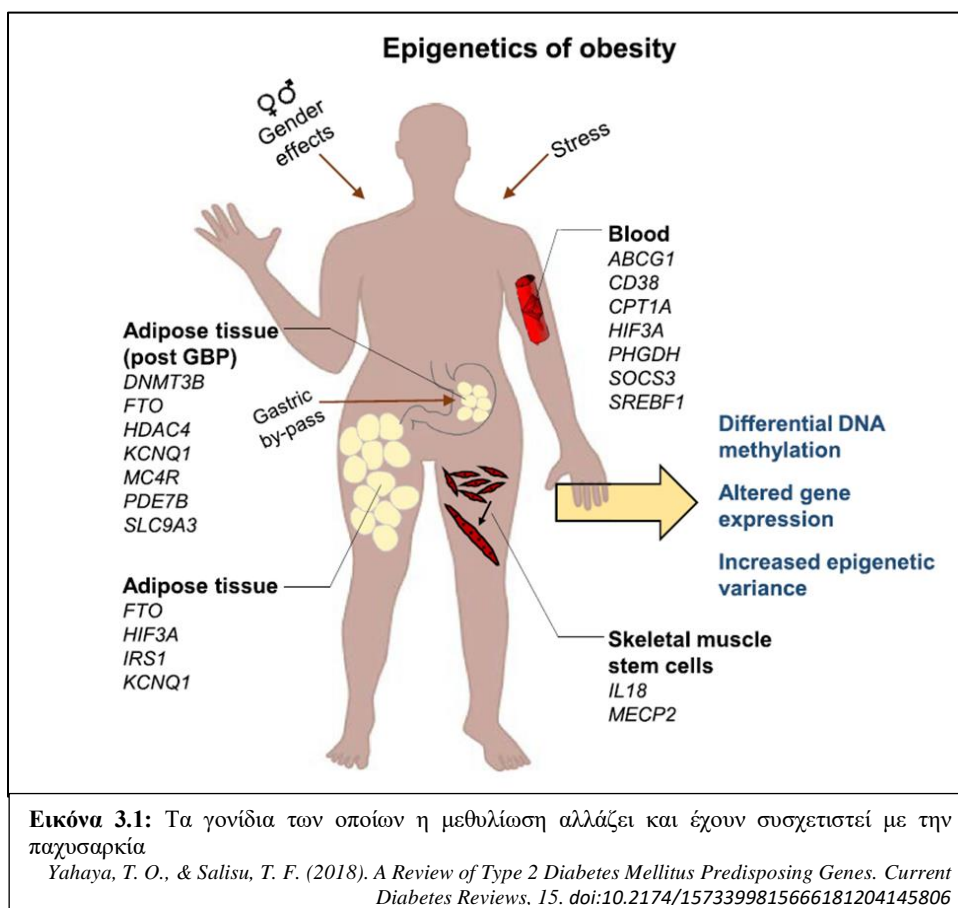


Methylation 450K Beadchip (Xu et al., 2013). Πιο συγκεκριμένα, βρέθηκε ότι, η μεθυλίωση στους παχύσαρκους ασθενείς ήταν μεγαλύτερη απ' ότι στα υποκείμενα ελέγχου. Ακόμα, ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η διαφοροποιημένη μεθυλίωση και η μεταβλητότητά της προέβλεπε την παχυσαρκία με επίπεδο εμπιστοσύνης 70%. Συνοπτικά, αλλάζοντας τις μεταβλητές που εξετάζονταν κάθε φορά, BMI (δείκτης μάζας σώματος), περιφέρεια μέσης κλπ στους διαφορετικούς ιστούς που αναφέρθηκαν προηγουμένως, υπάρχουν γενετικοί τόποι συγκεκριμένων γονιδίων που εμφανίζουν διαφορετικά επίπεδα μεθυλίωσης σε CpG νησίδια (sites) και συνδέονται με την παχυσαρκία. Μερικά παραδείγματα από γονίδια που εμφανίζουν μεθυλιωμένα CpG νησίδια, σε δείγματα αίματος και σε CD4+T κύτταρα από παχύσαρκους ασθενείς, είναι τα: HIF3A (Dick et al., 2014), CPT1A, CD38 (Aslibekyan et al., 2015 and Lemas et al., 2012), ABCG1, SREBF1, CPT1A (Mendelson et al., 2017) κ.α.. Τα γονίδια αυτά εμπλέκονται στη μεταφορά των φωσφολιπιδίων και της χοληστερόλης ή σε άλλα μονοπάτια του μεταβολισμού των λιπιδίων. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι τα περισσότερα από αυτά τα γονίδια αυξάνουν τις περιπτώσεις της παχυσαρκίας όταν η μεθυλίωση τους είναι μεγαλύτερη απ' το σύνηθες, εντούτοις υπάρχουν και κάποιες, λιγότερες, περιπτώσεις όπως η μεθυλίωση του SOCS3 που συνδέεται με την παχυσαρκία όταν η μεθυλίωσή του είναι χαμηλότερη από το σύνηθες (Wang et al., 2018) γιατί τότε υπερεκφράζεται και ενισχύει την αντίσταση στην ινσουλίνη και την έκφραση της λεπτίνης (Pedroso et al., 2018). Κατ' αντιστοιχία υπάρχουν άλλα γονίδια που έχουν εντοπιστεί σε άλλους ιστούς και παρουσιάζονται στην **εικόνα (5)**.

Τα αποτελέσματα των ερευνών των τελευταίων χρόνων που σύγκριναν το μεθύλωμα του DNA από διάφορους ιστούς πριν και μετά την απώλεια βάρους των ασθενών, ανέδειξαν μικρές αλλά καθολικές αλλαγές του γονιδιώματος που συνιστούν ότι η συνολική μεθυλίωση του DNA μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως βιοδείκτης για το αποτέλεσμα (δηλαδή την απώλεια βάρους) (Aronica et al., 2017).

Εν κατακλείδι, είναι σημαντικό να γίνει προσεκτική ερμηνεία στα αποτελέσματα των προαναφερθέντων ερευνών, γιατί παρ' ότι φαίνεται να υπάρχει μια συσχέτιση της μεθυλίωσης του DNA και της παχυσαρκίας οι περισσότερες χρησιμοποιούν ως δείγμα το αίμα, έναν ιστό που δέχεται και μεταφέρει μηνύματα από και προς όλα τα κύτταρα του οργανισμού και όχι μόνο εκείνων που εμπλέκονται στην εμφάνιση και την εγκατάσταση της παχυσαρκίας. Επιπλέον υπάρχει μια αλληλοεπικάλυψη των στατιστικών ομάδων που εξετάζονται προκειμένου να αυξηθεί ο όγκος του δείγματος. Όσον αφορά αυτές που χρησιμοποιούν δείγμα προς μελέτη από το λιπώδη ιστό, ένα όργανο πολύ σημαντικό στην

εξέλιξη της παχυσαρκίας, φαίνεται να υποστηρίζουν το ρόλο της μεθυλίωσης στην παθογένεια της ασθένειας. Συνολικά, διαφαίνεται μια επίδραση του BMI στην επιγενετική μεταβλητότητα των υποψήφιων γονιδίων για την παχυσαρκία και τον ΣΔ2 και φαίνεται να επηρεάζει τη γονιδιακή έκφραση και το μεταβολισμό. [34]



### 3.2 Μεθυλίωση και Σακχαρώδης Διαβήτης 2

Μόλις το 2008-9 ξεκίνησε η έρευνα σε παγκρεατικά κύτταρα και κύτταρα σκελετικών μυών για να μελετηθεί η συσχέτιση του ΣΔ2 με τη μεθυλίωση του DNA (Barres et al., 2009, Ling et al., 2008). Αν και επικεντρώθηκαν σε γονίδια ή σημεία του γονιδιώματος που εμπλέκονται στην παθοφυσιολογία του ΣΔ2, εντόπισαν διαφορετικά μοτίβα μεθυλίωσης σε ασθενείς με ΣΔ2 και σε υποκείμενα ελέγχου που δεν νοσούσαν από ΣΔ2, κάτι που υποδηλώνει άμεση σχέση της μεθυλίωσης με την ασθένεια. Ωστόσο, πρέπει να γίνει κατανοητό εάν πράγματι η επιγενετική συμβάλλει στην εμφάνιση του ΣΔ2. Για να γίνει αυτό, πρέπει να προσδιοριστεί ο ρόλος των μεθυλιώσεων στη λειτουργία των υποψήφιων γονιδίων μεταξύ ασθενών και υγιών ατόμων. Έπειτα είναι απαραίτητο να γίνει ξεκάθαρο



κατά πόσο αυτές οι διαφορές είναι αίτια της νόσου ή αιτιατά. Προς αυτή την κατεύθυνση και εφ' όσον τα μοτίβα μεθυλίωσης είναι εξειδικευμένα για κάθε κύτταρο, είναι κρίσιμο να μελετηθούν οι ιστοί ενδιαφέροντος της συγκεκριμένης ασθένειας (ΣΔ2). Είναι σημαντικό να αναφερθεί πως, οι επιγενετικές τροποποιήσεις φαίνεται να συμβάλλουν και στην ανάπτυξη αγγειακών επιπλοκών του Διαβήτη όπως: η αμφιβληστροειδοπάθεια, το εγκεφαλικό, το έμφραγμα του μυοκαρδίου και η διαβητική νεφροπάθεια (Agardh et al., 2015, Bell et al., 2017, Chen et al., 2016, Nakatochi et al., 2017) και είναι κρίσιμο να εκπονηθούν επιπλέον μελέτες που θα ελέγξουν κατά πόσο αυτές οι επιγενετικές τροποποιήσεις όχι μόνο συμβάλλουν αλλά είναι αιτιατές του ΣΔ2.

### 3.2.1 Πάγκρεας (παγκρεατικά νησίδια, pancreatic islets)

Κάνοντας την αρχή από τη λεπτομερή παρουσίαση του ανθρώπινου μεθυλώματος στα παγκρεατικά κύτταρα (Dayeh et al., 2014) έγινε μια πρώτη συσχέτιση της μεθυλίωσης του DNA με το μεταγράφομα και το κατά πόσο η διαφοροποιημένη μεθυλίωση επηρεάζει τη γονιδιακή έκφραση των συγκεκριμένων κυττάρων. Έγινε μελέτη των γονιδίων που θεωρούνται σημαντικά στην ανάπτυξη ΣΔ2 και οι έρευνες επικεντρώθηκαν σε δείγματα από β-παγκρεατικά κύτταρα ασθενών με ΣΔ2 και δείγματα ελέγχου από άτομα που δεν νοσούσαν. Σαν μια πρώτη διαπίστωση, παρατηρήθηκε ότι η πλειοψηφία των μονο-νουκλεοτιδικών πολυμορφισμών (SNPs, single nucleotide polymorphisms) που εντοπίστηκαν στα γονίδια σχετίζονταν με προβλήματα στην έκκριση της ινσουλίνης και όχι τόσο στη δράση της. Ακόμα, αυτοί οι πολυμορφισμοί, από μόνοι τους, εξηγούσαν μόνο ένα μικρό ποσοστό της αναμενόμενης κληρονομικότητας του ΣΔ2 και μένει να βρεθούν ποιοι άλλοι γενετικοί παράγοντες ενδεχομένως συμβάλλουν σε αυτή. Σημαντική μεταβλητή, στις ανωτέρω μελέτες, αποτέλεσε η θέση που βρίσκεται το SNP σε σχέση με το γονίδιο ενδιαφέροντος (εκτός ή εντός της κωδικής περιοχής, ανοδικά ή καθοδικά του γονιδίου, στον υποκινητή κ.α.) γιατί βρέθηκε ότι αλλάζει το ποσοστό μεθυλίωσης αλλά και ο τρόπος που αυτή επηρεάζει την έκφρασή τους. Η εξέλιξη της τεχνολογίας και πιο συγκεκριμένα της μεθόδου της Illumina Infinium Methylation Assay, μεθόδου που παρέχει ποσοτική μέτρηση της μεθυλίωσης βασισμένη σε δείκτες, με επίπεδο ακρίβειας ενός σημείου CpG, μπόρεσαν να αναλυθούν ταυτόχρονα πολλοί γενετικοί τόποι. Με τη βοήθειά της, εντοπίστηκαν ως και εκατοντάδες χιλιάδες νησίδια CpG ταυτόχρονα (Dayeh et al., 2014, Volkmar et al., 2012) και παρατηρήθηκαν τουλάχιστον 1649 διαφοροποιημένα νησίδια τα οποία αντιστοιχήθηκαν σε 853 γονίδια κυττάρων των παγκρεατικών νησιδίων.

Από αυτά, τουλάχιστον 102 γονίδια παρουσίαζαν διαφοροποιημένη έκφραση στους ασθενείς με ΣΔ2, με το  $\approx 75\%$  αυτών να έχει αντίστροφη σχέση με τη μεθυλίωση (πχ.: υπομεθυλίωση=υπερέκφραση) και μόλις ένα  $\approx 25\%$  να έχει σχέση σύμφωνη με τη μεθυλίωση (πχ.: υπομεθυλίωση=χαμηλότερη έκφραση).

Γονίδια όπως το INS (της ινσουλίνης), το PDX1 (κωδικοποιεί έναν μεταγραφικό παράγοντα σημαντικό για την παγκρεατική ανάπτυξη και λειτουργία), το GLP1R (κωδικοποιεί τον GLP-1 υποδοχέα που ενεργοποιεί την έκκριση ινσουλίνης και «προστατεύει» τα β-κύτταρα), το PPARGC1A (κωδικοποιεί το PGC1α, μιτοχονδριακός ρυθμιστής) παρουσιάζουν υποκινητές με αυξημένη μεθυλίωση κάτι που οδηγεί σε χαμηλή έκφραση του αντίστοιχου γονιδίου στο κύτταρο. Αυτή η χαμηλή έκφραση, συνδυασμό με την υψηλή γλυκόζη του αίματος και την γλυκοζυλιωμένη αιμοσφαιρίνη (HbA1c) φαίνεται να διαταράσσει την έκκριση της ινσουλίνης στους ασθενείς με ΣΔ2 (Hall et al., 2018, Yang et al., 2011, 2012).

Επιπλέον, οι Dayeh et al. (2014) παρατήρησαν για πρώτη φορά ότι η μειωμένη έκφραση (λόγω της υπέρμεθυλίωσης) του EXOC3L2 (μέλος του συμπλέγματος εξωκυστών) προκαλεί μειωμένη εξωκυττάρωση στα β-κύτταρα και συμβάλλει στην εμφάνιση του φαινότυπου του ΣΔ2. Σε συνδυασμό, αυτά τα αποτελέσματα εξηγούν την υπεργλυκαιμία των ασθενών με ΣΔ2 αφού μειώνεται η έκκριση ινσουλίνης και αυξάνεται η έκκριση γλυκαγόνης από τα παγκρεατικά κύτταρα.

Κάποια από τα γονίδια στα οποία εντοπίστηκε μειωμένη μεθυλίωση και αυξημένη έκφραση στους ασθενείς σε σχέση με τα δείγματα ελέγχου είναι τα: CDKN1A (καταστέλλει όγκους και ρυθμίζει τον κυτταρικό κύκλο), PDE7B (ρυθμίζει τα επίπεδα cAMP στο κύτταρο), SEPT9. Αυτά τα γονίδια επιλέχθηκαν προς μελέτη λόγω της σημαντικότητάς τους για τον ΣΔ2 και του γεγονότος ότι παρουσίασαν εντονότερη διαφοροποιημένη μεθυλίωση. Στην ίδια περίπτωση εμπίπτει το HDAC7 (που κωδικοποιεί μια αποακετυλάση ιστονών, HDAC) και η υπέρεκφρασή του οδηγεί σε προβληματική έκκριση ινσουλίνης και δυσλειτουργίες στα μιτοχόνδρια. [1, 10]

Ένα άλλο μοτίβο μεθυλίωσης, που έχει παρατηρηθεί, είναι τα DMRs (differentially methylated regions) δηλαδή, τουλάχιστον 3 συνεχόμενες θέσεις διαφοροποιημένης μεθυλίωσης με απόλυτο βαθμό μεθυλίωσης  $\geq 5\%$  και με λιγότερο από 300ζβ ανάμεσα σε κάθε CpG «θέση». Τέτοιο μοτίβο εμφανίζεται σε άλλα γονίδια που έχουν σχέση με το ΣΔ2 και την παχυσαρκία και κάποια από αυτά είναι τα THADA, KCNQ1, ADCY5, FTO, HHEX, IRS1 και TCF7L2.

Άλλα γονίδια όπως τα NR4A3, PARK2, PID1 και το SOCS2 εμφανίζουν και διαφοροποιημένη μεθυλίωση και αλλαγές στην έκφρασή τους. Όταν αυτή η έκφραση αλλάζει με όμοιο τρόπο στα γονίδια αυτά, σε κλωνικά β-κύτταρα, τότε παρεμποδίζεται η έκκριση της ινσουλίνης που κανονικά θα προκαλούσαν. [10]

Συνολικά, από τις ανωτέρω μελέτες, διαφαίνεται μια σχέση των επιγενετικών τροποποιήσεων, σε ασθενείς με ΣΔ2, που συμβάλλουν στη διαφοροποιημένη έκφραση υποψήφιων γονιδίων, με την ανάπτυξη και την παθογένεια της ασθένειας.

### 3.2.2 Λιπώδης Ιστός (adipose tissue)

Ο λιπώδης ιστός έχει σημαντικό ρόλο στον έλεγχο της ενέργειας του μεταβολισμού χάρις στην ιδιότητα του να αποθηκεύει και να απελευθερώνει λιπίδια. Λειτουργεί ακόμα και με ενδοκρινή τρόπο εκκρίνοντας αδιποκίνες (όπως η λεπτίνη και η αδιπονεκτίνη) και τον παράγοντα νέκρωσης όγκων TNF $\alpha$  (tumor necrosis factor  $\alpha$ ). Η κυκλοφορία των αδιποκινών ελέγχει την πρόσληψη της τροφής, την ευαισθησία στην ινσουλίνη και το μεταβολισμό. Μέχρι σήμερα έχει ήδη συσχετιστεί η διαφοροποιημένη μεθυλίωση σε αυτόν τον ιστό με την παχυσαρκία και τον ΣΔ2.

Έχει ήδη αναφερθεί ότι η ιστοειδική μεταγραφική γονιδιακή ρύθμιση που επηρεάζεται από επιγενετικές τροποποιήσεις, παίζει σημαντικό ρόλο στην αντίσταση στην ινσουλίνη και την εξέλιξη του ΣΔ2. Σε αυτή την παράγραφο θα γίνει αναφορά για τη μεθυλίωση του DNA στον σπλαχνικό και υποδόριο λιπώδη ιστό, σε άτομα με παχυσαρκία και ΣΔ2 και πως αυτή επηρεάζει τα μοτίβα γονιδιακής έκφρασης.

Είναι γνωστό ότι υπάρχει συγκεκριμένο επιγενετικό προφίλ για γονίδια που συναντώνται σε συγκεκριμένο ιστό, ανεξαρτήτως ΣΔ2. Εντούτοις τα μοτίβα μεθυλίωσης για τον σπλαχνικό (visceral, VAT) και τον υποδόριο (subcutaneous, SAT) λιπώδη ιστό παρουσιάζουν έντονη συσχέτιση, υποδεικνύοντας την έντονη ομοιότητα στις λειτουργίες τους. Όταν όμως έγινε παραλληλισμός σε σχέση με την ύπαρξη του ΣΔ2 παρατηρήθηκαν και εκεί διαφορές.

Οι διαφορές αυτές αφορούσαν τα, ήδη γνωστά ως υποψήφια, γονίδια: PPARG, IRS1, TCF7L2, ADIPOQ, LEP, και KCNQ1, στα οποία υπήρχε έντονα διαφορετική μεθυλίωση, η οποία όμως δεν είναι ξεκάθαρο κατά πόσο προκάλεσε τον ΣΔ2 ή προκλήθηκε από τον ΣΔ2.

Το γονίδιο-στόχος για τις μεθυλοτρανσφεράσες, FGF21 φαίνεται να εμφανίζει υπερμεθυλίωση και τελικά χαμηλότερη έκφραση στο λιπώδη ιστό σε ασθενείς με ΣΔ2. Ο

ρόλος του είναι να εξισορροπεί την αντίσταση στην ινσουλίνη που προκαλείται από τη μεθυλοτρανσφεράση DNMT3A. [10]

Σε γενικές γραμμές τα δεδομένα που αφορούν το λιπώδη ιστό είναι συγκεχυμένα, γιατί παρουσιάζουν διαφορές ανάλογα με το είδος του δείγματος που εξετάζεται. Φαίνεται να υπάρχουν διαφορές ανάμεσα στα δύο φύλα και διαφορές ανάλογα με το βάρος (και το ΔΜΣ, δείκτης μάζας σώματος). Με βάση αυτά τα δεδομένα παρατηρήθηκαν διαφορές στη μεθυλίωση των: FTO, τις αποακετυλάσες HDAC4, HDAC7, HDAC10, το MBD4 (κωδικοποιεί πρωτεΐνη που συνδέεται μόνο σε μεθυλιωμένες κυτοσίνες) αλλά και σε 2.825 γονίδια με διαφοροποιημένη μεθυλίωση (σε μικρότερο βαθμό) που σχετίζονται με το ΔΜΣ (Ronn et al., 2015). [34]

### 3.3.3 Ήπαρ (liver)

Το ήπαρ είναι ένα πολύ σημαντικό όργανο για τον οργανισμό και το μεταβολισμό. Η αύξηση των ελεύθερων λιπιδίων στην κυκλοφορία του αίματος, συμβάλλει στην αντίσταση στην ινσουλίνη. Όταν αυτό το φαινόμενο εμμένει, τότε διαταράσσεται η λειτουργία του ήπατος.

Η διαφοροποιημένη μεθυλίωση του DNA στο ήπαρ φαίνεται να εντοπίζεται κυρίως στα γονίδια που σχετίζονται με τα γλυκολυτικά και λιπογενετικά μονοπάτια. Και σε αυτή την περίπτωση, του ήπατος, η μεθυλίωση φαίνεται να έχει αντιστρόφως ανάλογη σχέση με τη γονιδιακή έκφραση και πιο συγκεκριμένα στους ασθενείς με ΣΔ2 φαίνεται μια υπό μεθυλίωση στο  $\approx 94\%$  των γονιδίων που εντοπίστηκαν. Αυτό το εύρημα συνάδει με τα δεδομένα από τα κύτταρα του παγκρέατος (υπόμεθυλίωση  $\approx 97\%$ ) όσον αφορά το μοτίβο της μεθυλίωσης.

Έχουν εντοπιστεί περίπου 251 CpG θέσεις με διαφοροποιημένη μεθυλίωση σε κύτταρα του ήπατος ασθενών με ΣΔ2, εντούτοις μόλις τα 86 από αυτά εμφανίζουν σημαντικά διαφορετική μεθυλίωση (5-18,5%) σε σχέση με τους ασθενείς ελέγχου (που δεν νοσούν με ΣΔ2). Οι CpG θέσεις που εμφανίζουν διαφοροποιημένη μεθυλίωση σε ασθενείς με ΣΔ2 και ασθενείς ελέγχου, εντοπίζονται στα γονίδια PDK4, HNF4A, XBP1 και PON1.

Στο ήπαρ, 29 περίπου γονίδια εμφανίζουν εκτός από διαφορετική μεθυλίωση στους ασθενείς με ΣΔ2, και διαφοροποιημένη γονιδιακή έκφραση. Σε ανάλυση GO enrichment τα γονίδια με μεθυλίωση  $\geq 5\%$  και διαφοροποιημένη έκφραση ήταν τα: SYT7, LTBR, CATSPER2, LPAL2, NCALD, ZDHHC11, LGTN, OXT και PRSS21, πολλά από τα οποία δεν είχαν προηγουμένως συσχετιστεί με το ΣΔ2. [5] Όσον αφορά γονίδια που ήδη έχουν

συσχετίζεται με την εμφάνιση του ΣΔ2, όντως υπάρχει διαφοροποιημένη μεθυλίωση στα: GRB10, ABCC3, MOGAT1 και PRDM16. Σε αυτά περιλαμβάνονται ακόμα, το H19 (γονικής προέλευσης, επηρεάζεται από ΣΔ2 της μητέρας) και το RIPK4 (κωδικοποιεί έναν παράγοντα που συμμετέχει στην προφλεγμονή) όπου και στα δύο εμφανίζεται υπό-μεθυλίωση και υπερέκφραση. [40] Τέλος, μόλις το 2016 οι Chen et al., εντόπισαν ότι το NR4A1 γονίδιο (κωδικοποιεί έναν μεταγραφικό ρυθμιστή του μεταβολισμού της γλυκόζης) εμφάνιζε υπερμεθυλίωση και μειωμένη έκφραση στο ήπαρ αλλά και στους σκελετικούς μύες, και επηρέαζε τη σηματοδότηση του μονοπατιού της ινσουλίνης σε ασθενείς με ΣΔ2. Αυτή η παρατήρησή τους θα μπορούσε να καταστήσει το NR4A1 ως ένα νέο βιοδείκτη που υποδεικνύει την ανάπτυξη και εξέλιξη του ΣΔ2 στους ασθενείς.

### 3.3.4 Σκελετικοί μύες (skeletal muscles)

Ο μυϊκός ιστός είναι αυτός που προσλαμβάνει τη γλυκόζη με τη βοήθεια της ινσουλίνης και είναι υπεύθυνος για τη φυσική δραστηριότητα. Έχουν παρατηρηθεί επιγενετικές τροποποιήσεις στα κύτταρα των σκελετικών μυών που σχετίζονται με τον ΣΔ2. Τα δεδομένα βέβαια, όσον αφορά αυτόν το ιστό ποικίλουν.

Σε κάποιες πρώτες μελέτες φάνηκε μια μόνο διαφοροποίηση σε ένα CpG στο γονίδιο IL8 (το οποίο εκφράζεται στους μύες ως απόκριση στη φλεγμονή της άσκησης) και κάποιες διαφορές στις αλληλουχίες LINE1, που αποτελούν το 17% περίπου, του γονιδιώματος (Lander et al., 2001). Άτομα με προδιάθεση στο ΣΔ2 φάνηκε να παρουσιάζουν διαφορές στη μεθυλίωση των γονιδίων που κωδικοποιούν τις MAP κινάσες (σημαντικά σηματοδοτικά μόρια). Έπειτα αρκετά γονίδια της οικογένειας HOX έχει παρατηρηθεί ότι είχαν μειωμένη μεθυλίωση σε ασθενείς με ΣΔ2 (Nitert et al., 2012). Αργότερα οι Barres et al., αξιολόγησαν τη μεθυλίωση του PPARGC1A ως σημαντική και βρήκαν ότι η υπερμεθυλίωση του οδηγούσε σε μειωμένη έκφραση του.

Υπάρχουν 8 υποψήφια γονίδια για ΣΔ2 στους σκελετικούς μύες με διαφοροποιημένες θέσεις μεθυλίωσης (CDKN2A, DUSP9, HNF4A, HHEX, KCNQ1, KLF11, PPARGC1A και SLC30A8), εμφανίζουν, όμως, πολύ χαμηλότερο ποσοστό μεθυλίωσης σε σχέση με άλλους ιστούς όπως το πάγκρεας ( $\approx 20-30\%$ ), κάτι που υποδηλώνει ότι, όντως είναι ο ιστός που παίζει σημαντικότερο ρόλο στην παθοφυσιολογία του ΣΔ2. Ένα όμως από αυτά το DUSP9 (κωδικοποιεί την φωσφατάση 4) εμφανίζει ένα ποσοστό μεθυλίωσης 8-9%, το μεγαλύτερο από τα υπόλοιπα, και φαίνεται να έχει σημαντικό ρόλο (Ribel-Madsen et al., 2012). Ένα άλλο γονίδιο που εντοπίζεται ότι έχει διαφοροποιημένη μεθυλίωση στους



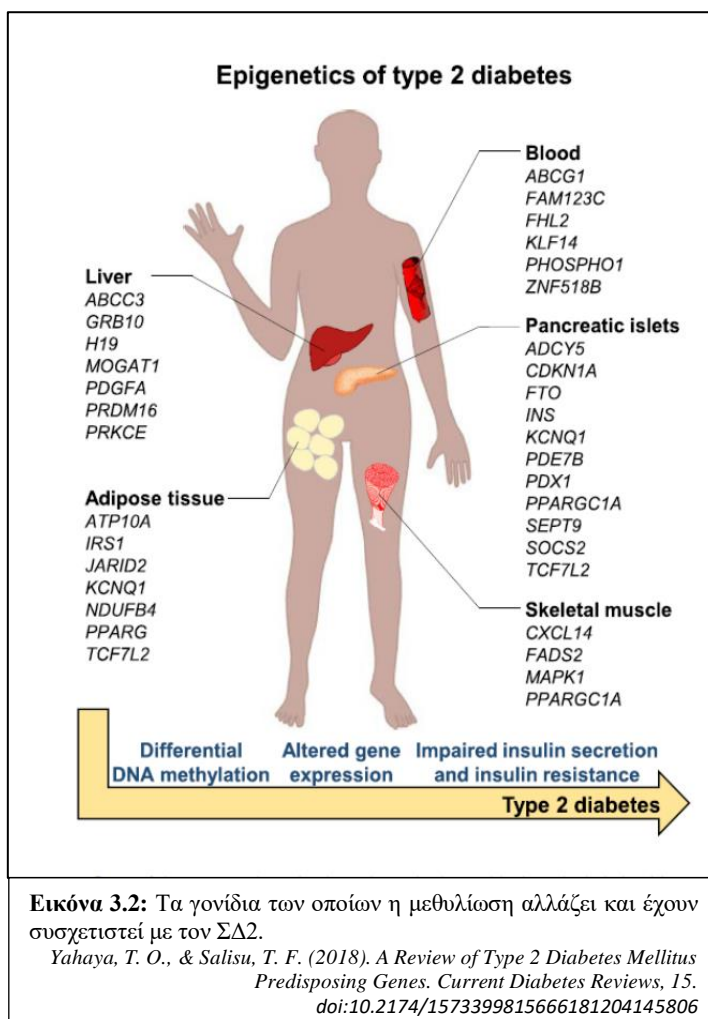
σκελετικούς μύες και επηρεάζει τη λειτουργία σημαντικών μεταβολικά μονοπατιών είναι: το PDK4 (Kulkarni et al., 2012). Απλή αναφορά θα γίνει και στο NR4A1 το οποίο εκφράζεται στους μύες αναλύθηκε όμως στην προηγούμενη ενότητα (ήπαρ).

Τελικά τα γονίδια που εμφανίζουν διαφορές, στη μεθυλίωσή τους, στους μύες εμπλέκονται κατά κύριο λόγο στα μονοπάτια της φλεγμονής, του μεταβολισμού των λιπιδίων και των υδατανθράκων. Η ύπαρξη φλεγμονής αποτελεί σημαντικό παράγοντα που οδηγεί στην αντίσταση στην ινσουλίνη.

### 3.3.5 Αίμα (Blood)

Συνήθως το πιο αντιπροσωπευτικό δείγμα ιστού για μελέτη του ΣΔ2 είναι τα παγκρεατικά κύτταρα. Είναι όμως δύσκολο να γίνει λήψη δείγματος οπότε υπήρχε η ανάγκη να γίνει χρήση κάποιου εναλλακτικού ιστού. Το περιφερικό αίμα δεν αποτελεί ακριβώς ιστός ενδιαφέροντος για τον ΣΔ2, είναι όμως το πιο προσβάσιμο δείγμα ιστού που αντικατοπτρίζει σχετικά καλά, πολλαπλά μονοπάτια της παθοφυσιολογίας του ΣΔ2 καθώς αυτά συνδέονται με διαδικασίες φλεγμονής που είναι εμφανείς στο αίμα. Ακόμα, το αίμα αποτελεί σημαντικό υποψήφιο απ' τον οποίο μπορεί να προκύψουν βιοδείκτες της ασθένειας.

Από μελέτες που γίνονται εντοπίζονται γονίδια στα κύτταρα του αίματος που παρουσιάζουν επιγενετικές αλλαγές (μεθυλιώσεις) σε σχέση με τον ΣΔ2, αλλά όχι στατιστικά σημαντικές. Τα γονίδια αυτά είναι: ALOX2, PAMR1 και GNAS. [5] Έχουν επίσης εντοπιστεί διαφορές στα: ABCG1, FAM123C, FHL2,



KLF14, PHOSPHO1, ZNF518B (Ling and Ronn, 2019).

Σε μελέτη του 2014 των Yuan et al., εντοπίστηκε μια ισχυρή συσχέτιση της μεθυλίωσης του υποκινητή του γονιδίου MALT1 (που εμπλέκεται στο γλυκαιμικό μονοπάτι, στο μονοπάτι της ινσουλίνης και σχετίζεται με τα επίπεδα του ταυροχολικού άλατος στο αίμα) αλλά και των υποψήφιων για ΣΔ2, GPR61 και PRKCB. Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν πιθανή αιτιότητα αλλά και τυχαία συμβολή τους στα μονοπάτια της ασθένειας.

ΠΙΝΑΚΑΣ 3.1: Μελέτες που εξετάζουν τη σχέση μεταξύ του ΣΔ2 και της μεθυλίωσης του DNA στους διάφορους ιστούς			
Βιβλιογραφία	Σχεδιασμός Μελέτης/ Υποκείμενα	Μέθοδος Μεθυλίωσης και Αποτελέσματα	Γονίδια που εντοπίστηκαν και σχετίζονται με ΣΔ2
ΠΑΓΚΡΕΑΣ			
Ling et al., 2008 9	Non-diabetics and 10 diabetics	- Sequencing of bisulfite treated DNA - PPARGC1A expression is downregulated in T2D islets by promoter hypermethylation MassARRAY EpiTYPER	PPARGC1A
Yang et al., 2011	48 Non-diabetics and 9 diabetics	- Insulin expression is downregulated in T2D islets by promoter hypermethylation MassARRAY EpiTYPER	INS
Yang et al., 2012	55 Non-diabetics and 9 diabetics	- PDX1 expression is downregulated in T2D islets by promoter and enhancer hypermethylation	PDX1
Volkmar et al., 2012	11 Non-diabetics and 5 diabetics	- Illumina 27k array - 276 CpG sites differentially methylated in T2D islets	Genes involved in b-cell survival and adaptation
Dayeh et al., 2014	34 Non-diabetics and 15 diabetics	- Illumina 450k array - 3116 CpG sites differentially methylated in T2D islets, 1649 (located in or near 853 genes) of these had a methylation difference >5%	CDKN1A, PDE7B, EXOC3L2, HDAC7 and several candidate genes for T2D and obesity as identified by GWAS. Identified changes associate with impaired b-cell function
Volkov et al., 2017	8 Non-diabetics and 6 diabetics	- Whole-genome bisulfite sequencing - 25,820 DMRs	ARX, TFAM, PDX1, SOCS2, PID1, NR4A3 and several candidate genes for T2D as identified by GWAS. DMRs were also enriched for motifs for key islet transcription factors. Identified changes associate with impaired bcell function
ΣΚΕΛΕΤΙΚΟΙ ΜΥΕΣ			
Barres et al., 2009	10 Non-diabetics and 10 diabetics	- MeDIP-Chip (GeneChip Human Promoter 1.0R Array (Affymetrix)) - 838 Genes differentially methylated (p < 0.05), only PPARGC1A was validated	PPARGC1A with differential methylation and gene expression
Ribel-Madsen et al., 2012	11 Monozygotic twin pairs discordant for T2D	- Infinium HumanMethylation27 BeadChips (Illumina) - Pyrosequencing for repetitive regions (LINE1, D4Z4 and NBL2) and validation of PPARGC1A - Overall DNA methylation explained by interaction of twin pair and T2D status - 1 Gene with decreased methylation in T2D (padj < 0.05) - Increased methylation of PPARGC1A in T2D (unadjusted p < 0.05) was validated	IL8 and PPARGC1A differentially methylated
(συνεχίζεται....)			



Kulkarni et al., 2012	4 Non-diabetics and 4 diabetics	- Bisulfite sequencing of selected gene - Decreased methylation in T2D	PDK4 differentially methylated and expressed
Nitert et al., 2012	Individuals with (n ¼ 15) and without (n ¼ 13) a first-degree relative with T2D	- MeDIP-Chip (Human 2.1 promoter DeLuxe tiling Array (Roche-Nimblegen)) - 60 Genes with decreased and 5 genes with increased DNA methylation in FHþ (Bonferroni correction)	Differential methylation of genes in the MAPK, Insulin, Calcium, Sphingolipid and Adipocytokine signaling pathways
ΛΗΠΩΔΗΣ ΙΣΤΟΣ			
Ribel-Madsen et al., 2012	5 Monozygotic twin pairs discordant for T2D	- Infinium HumanMethylation27 BeadChips (Illumina) - Pyrosequencing for repetitive regions - Overall DNA methylation explained by interaction of twin pair and T2D status	ZNF668, HSPA2, C8orf31, CD320, SFT2D3, TWIST1 and MYO5A differentially methylated
Nilsson et al., 2015	14 Monozygotic twin pairs discordant for T2D 28 Non-diabetic and 28 diabetics	- Illumina 450k array - Differential methylation of 15,627 sites annotated to 7,046 genes	Some examples of genes with differential methylation; PPARG, KCNQ1, TCF7L2, and IRS1
ΗΠΑΡ			
Nilsson et al., 2015	60 Non-diabetic and 35 diabetics	- Illumina 450k array - Hypomethylation in liver from T2D subjects (94% of CpG sites), 251 CpG sites with significant differences (FDR < 0.05)	- GRB10, ABCC3, MOGAT1, PRDM16 differentially methylated - H19 and RIPK4 with differential methylation and gene expression
Kirchner et al., 2016	7 Non-obese, 7 obese non-diabetic and 8 obese T2D	- Illumina 450k array - Hypomethylation in liver from T2D subjects compared to non-obese controls (92% of CpG sites), 5834 CpG sites differentially methylated among the three groups (FDR < 0.25)	PRKCE, ABR, PDGFA, ARHGEF16, ADCY6, RPS6KA1, CTBP1, CCND1, WNT11 and genes at an important ATF-motif regulatory site with differential methylation and gene expression

Davegårdh, C., García-Calzón, S., Bacos, K., & Ling, C. (2018). DNA methylation in the pathogenesis of type 2 diabetes in humans. *Molecular Metabolism*, 14, 12–25. doi:10.1016/j.molmet.2018.01.022

## 4. Μεταλλάξεις που επηρεάζουν το ΣΔ2

Πολλές μελέτες έχουν συνδέσει τις μεταλλάξεις σε διάφορα γονίδια με την παθογένεια του ΣΔ2. Αυτές οι μεταλλάξεις σε συνδυασμό με περιβαλλοντικά ερεθίσματα προκαλούν ΣΔ2 μέσα από διάφορους μηχανισμούς. Αυτή η γνώση, έχει δώσει στους επιστήμονες τα «όπλα» για την εύρεση μιας εξατομικευμένης και πιο αποτελεσματικής προσέγγισης όσον αφορά τη θεραπεία της ασθένειας. Για να γίνει, όμως, αυτό πραγματικότητα πρέπει να αποσαφηνιστούν πλήρως οι μηχανισμοί με τους οποίους δρουν τα υποψήφια γονίδια και να διευκρινιστεί ο ρόλος της διαφοροποιημένης (από τις μεταλλάξεις) λειτουργίας τους στην παθογένεια του ΣΔ2.

Μέχρι στιγμής, έχουν εντοπιστεί περισσότερα από 70 γονίδια που εμπλέκονται στην ανάπτυξη του ΣΔ2 ενώ συνεχώς προστίθενται, στον ήδη μακρύ κατάλογο, καινούργια όπου νέες μελέτες τα συνδέουν με την ασθένεια. Στον **Πίνακα (4.1)** παρατίθεται μια απογραφή των γονιδίων αυτών, ως το 2020, μαζί με πληροφορίες για τη λειτουργία τους και τις φαινοτυπικές εκφορές τους.

Παρ' ότι έγινε λόγος για αρκετά μεγάλο αριθμό γονιδίων, των οποίων οι μεταλλάξεις επηρεάζουν την ανάπτυξη και εξέλιξη του ΣΔ2, μέσα από μελέτες γενετικής σύνδεσης και αναλύσεις γονιδίων-στόχων, οι επιστήμονες έχουν καταλήξει σε μια ομάδα συγκεκριμένων γονιδίων που θεωρούνται ότι είναι τα πιο συχνά εμπλεκόμενα στην παθοφυσιολογία της ασθένειας και αυτά είναι: *KCNJ11*, *PPARG*, *HNF1B/TCF2* και *WFS1*. Τα αποτελέσματα αυτά, επιβεβαιώνονται και από πιο πρόσφατες μελέτες σάρωσης του γονιδιώματος (GWAS). [58]

Σε συνέχεια όμως αυτών των γονιδίων, που αναφέρθηκαν στην προηγούμενη παράγραφο, θα γίνει μια παρουσίαση και άλλων γονιδίων, που διαπιστώνεται η παρουσία τους αρκετά συχνά, όταν μελετώνται τα αίτια που προκαλούν ΣΔ2. Αυτά τα γονίδια είναι: το *TCF7L2*, *PDX1*, *HNF1A*, *GLIS3*, *THADA*, *SCL30A8*, *FTO*, *KCNQ1*, *CDKAL1*, *HHEX* και *CDKN2A*, *ADCY5*.

Άλλα γονίδια που επηρεάζουν την εμφάνιση και την ανάπτυξη ΣΔ2 είναι τα: *IRS1*, *DUSP9*, τα οποία μεν εμφανίζουν σημαντικά ποσοστά συσχέτισης, χρειάζεται όμως περαιτέρω έρευνα για τους μηχανισμούς μέσω των οποίων καθίστανται υποψήφια για το ΣΔ2. [52]

ΠΙΝΑΚΑΣ 4.1: Γονίδια που σχετίζονται με τον ΣΔ2 και εμφανίζουν μεταλλάξεις			
ΓΟΝΙΔΙΟ	ΠΛΗΡΕΣ ΟΝΟΜΑ	ΓΕΝΕΤΙΚΟ Σ ΤΟΠΟΣ	ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ
<b>INS</b>	Insulin Gene	11p15.5	Increases endoplasmic reticulum (ER) stress, leading to gradual pancreatic beta cell death
<b>INSR</b>	Insulin Receptor	19p13.2	It leads to the production of receptors with slightly decreased kinase activity or affinity for insulin.
<b>SIRT1</b>	Sirtuin 1	10q21.3	It decreases SIRT1 activity, which may influence the development of obesity-related conditions, including insulin resistance.
<b>SIRT4</b>	Sirtuin 4	12q24.23	It heightens insulin biosynthesis in response to glucose insensitivity, causing insulin hypersensitivity.
<b>HMGA1</b>	High-Mobility Group A1	6p21.31	It suppresses INSR expression, leading to insulin resistance.
<b>Amylin</b>	Islet amyloid-Associated Peptide	12p12.1	Amylin aggregates cause membrane disruption, ER stress and mitochondrial damage, leading to beta cell death.
<b>TCF7L2</b>	Transcription Factor 7-like 2	10q25	It disrupts glucagon-like peptide-1-induced insulin secretion. It also hinders the maturation of new $\beta$ cells.
<b>CAPN10</b>	Calpain 10	2q37.3	It triggers gradual destruction of beta cells, resulting in insulin insufficiency
<b>HNF4A/TCF1</b>	Hepatocyte Nuclear Factor 4 Alpha	20q12	Alterations of transcriptional binding sites in the pancreas, leading to beta cell malfunction.
<b>HNF1B/TCF2</b>	Hepatocyte Nuclear Factor 1B	17q12	It altered GLUT2 expression in $\beta$ -cells.
<b>ABCC8</b>	ATP Binding Cassette Subfamily C Member 8	11p15.1	Disruption of the nucleotide-binding domain of SUR1, hindering the secretion of insulin.
<b>GCGR</b>	Glucagon Receptor	17q25.3	Causes hyperglucagonemia, $\alpha$ cell hyperplasia, and islet cell tumor.
<b>KCNJ11</b>	Potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 11	11p15.1	It reduces KATP channel activity, leading to an impaired insulin response.
<b>LPL</b>	Lipoprotein Lipase	8p21.3	It causes inflammatory kidney disease, resulting in microalbuminuria and insulin resistance.
<b>PPARG</b>	Peroxisome Proliferator Activated Receptor gamma	3p25.2	It lessens the binding affinity of the receptor PPAR $\gamma$ -RXR complex, causing reduced transcriptional activity of certain genes involved in glucose metabolism. It may also cause obesity, culminating in insulin resistance.
<b>PIK3R1</b>	Phosphoinositide-3-Kinase Regulatory Subunit 1	5q13.1	It causes syndromic insulin resistance with lipodystrophy.
<b>TNFR5/CD40</b>	Tumour Necrosis Factor Receptor	20q13.12	It causes overexpression of the gene, leading to glucolipotoxicity, and pancreatic $\beta$ -cell death.
<b>SLC30A8</b>	Zinc Transporter-8 Gene	8q24.11	Affects zinc accumulation in insulin granules and hence influences insulin stability and insulin trafficking.
<b>MAFA</b>	MAF BZIP Transcription Factor A	8q24.3	Initiates age-dependent pancreatic islet abnormalities, culminating in diminished insulin1, insulin2, PDX1, Beta2, and Glut-2 transcripts,
<b>PTEN</b>	Phosphatase and Tensin Homolog	10q23.31	Causes insulin resistance and predisposes to obesity.
<b>IPF-1/PDX-1</b>	Insulin Promoter Factor/Pancreatic Duodenal Homeobox	13q27.92	It affects the transcription of the insulin gene, causing an impaired response to elevated levels of glucose.
<b>NEUROD1</b>	Neurogenic Differentiation 1	2q31.3	Causes marked reduction in the beta cell number and a lack of proper islet formation.
(συνεχίζεται...)			

<b>KLF11</b>	Kruppel-like Factor 11	2p25.1	Causes oxidative stress in the pancreas, which impairs the activation of insulin promoter and beta cell physiology.
<b>KLF14</b>	Kruppel-like Factor 14	7q32.2	Causes reduction in PGC -1 $\alpha$ , inhibiting glucose production in the hepatocytes
<b>PAX4</b>	Paired Box 4	7q32.1	Impairs glucose tolerance.
<b>PSX6</b>	Paired Box 6	11p13	It markedly decreases $\beta$ and $\delta$ cells as well as causes absence of $\alpha$ cells, which impairs glucose tolerance.
<b>NKX2.</b>	2 NK2 Homeobox 2	20p11.22	It causes $\beta$ cell configuration dysfunction, resulting in insulin insufficiency
<b>NKX6.1</b>	Homeobox Protein NKX-6.1	4q21.23	Loss of beta cell configuration, causing beta cells to assume the characteristics of delta cells.
<b>GATA6</b>	GATA Binding Protein 6	18q11.2	It initiates beta cell ultrastructural abnormalities, including increased immature insulin granules, swollen mitochondria, and disorganized
<b>GLIS3</b>	GLI-similar	3 9p24.2	It suppresses insulin gene expression as well as causing poor beta cell
<b>HFE</b>	Hemochromatosis	6p21.3	Increases iron load in the pancreas, causing diabetic nephropathy.
<b>ISL-1</b>	ISL LIM Homeobox 1	5q11	Impairment of insulin expression mediated by dexamethasone.
<b>AKT2</b>	AKT Serine/Threonine Kinase 2	19q13	Causes severe insulin resistance and partial lipodystrophy.
<b>WFS1</b>	Wolfram Syndrome 1	4p16.1	Causes chronic endoplasmic reticulum stress, leading to pancreatic beta
<b>HHEX/IDE</b>	Hematopoietically Expressed Homeobox	10q23.33	Inhibits the maturation of islet $\delta$ cells to $\beta$ cells, hampering the release of
<b>CDKAL1</b>	Cyclin-dependent Kinase 5 Regulatory Subunit-associated Protein 1-like 1	6p22.3	It causes loss of pancreatic beta cell islet due to dysfunctional mitochondrial, affecting insulin secretion.
<b>CDKN2A/2B</b>	Cyclin-dependent Kinase Inhibitor 2A	9p21.3	Causes over-expression of the gene, leading to islet hypoplasia and hyperglycemia.
<b>IGF2BP2</b>	Insulin-like Growth Factor 2 mRNA Binding Protein 2	3q27.2	Disruption of first-phase insulin secretion, resulting in insulin insufficiency.
<b>FTO</b>	Fat Mass and Obesity-Associated Gene/Alpha-Ketoglutarate	16q12.2	Increases body mass index (BMI), leading to obesity and insulin resistance.
<b>MC4R</b>	Melanocortin-4 Receptor	18q21.32	Causes severe obesity, hyperphagia, and severe hyperinsulinemia.
<b>JAZF</b>	JAZF Zinc Finger 1	7p15.2	Affects cell cycle control, causing cell death potentially affecting beta cell mass and function
<b>ADAMTS9</b>	ADAM Metalloproteinase with Thrombospondin Type 1 Motif, 9	3p14.1	Decreases insulin sensitivity of peripheral tissues, leading to reduced insulin-stimulated glucose uptake
<b>CDC123/CAMK1D</b>	Cell Division Cycle 123/Calcium/Calmodulin Dependent Protein Kinase 1D	10p14/10p13	Affects beta cell function by causing reduced beta cell mass due to enhanced apoptosis. Disrupts first phase glucose stimulated immune secretion.
<b>THADA</b>	Armadillo Repeat Containing Gene	2p21	Reduces beta cell mass due to increased apoptosis, culminating in insulin sensitivity.
(συνεχίζεται...)			

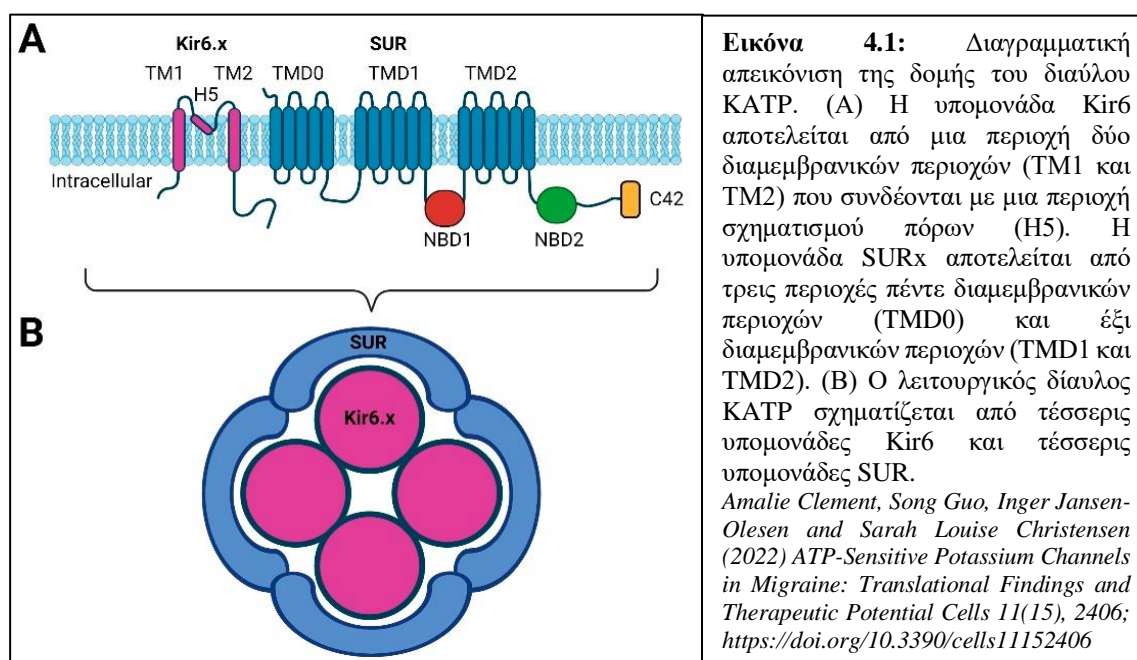
<b>TSPAN8/LGR5</b>	Tetraspanin 8Leucine-Rich Repeat-Containing G Protein-Coupled Receptor	12q21	Negatively affects pancreatic $\beta$ -cell mass maintenance, disrupting pancreatic $\beta$ -cell function.
<b>NOTCH2</b>	Notch 2	1p12	Disruption of cell cycle control and communication, leading to dysfunction beta cells
<b>MTNR1</b>	B Melatonin Receptor 1B	11q14.3	Causes elevated blood melatonin and a reduced capacity to secrete insulin in response to sugar intake.
<b>BCL11A</b>	B cell CLL/Lymphoma 11A	2p16.1	Causes a loss of beta cell function with a significant reduction in 1st phase glucose stimulated insulin secretion.
<b>PROX1</b>	Prospero Homeobox 1	1q32.3	Decreases $\beta$ -cell function and increases fasting glucose.
<b>KCNQ1</b>	Potassium Voltage-gated Channel Subfamily KQT Member 1	11p15.5	Starts off beta-cell dysfunction.
<b>DGKB-TMEM195</b>	Diacylglycerol Kinase Beta Alkylglycerolmonooxygenase	7p21.2	Decreases $\beta$ -cell function and increases fasting glucose.
<b>IRS1</b>	Insulin Receptor Substrate 1	2q36.3	Increases insulin resistance.
<b>GCK</b>	Glucokinase	7p13	Increases insulin sensitivity.
<b>GCKR</b>	Glucokinase regulatory protein	2p23.3	Increases insulin resistance
<b>ADCYS</b>	Adenylatecyclase 5	3q21.1	Decreases insulin sensitivity.
<b>mtDNA</b>	Mitochondrial DNA	All cells	It alters the expression of mitochondrial genes followed by reduced oxidative capacity and low insulin secretion.
<b>DUSP9</b>	Dual Specificity Phosphatase	9 Xq28	It raises the serum alkaline phosphatase, culminating in high fasting serum glucose
<b>ZBED3</b>	Zinc Finger BED Domain-Containing Protein 3	5q13.3	Causes beta-cell dysfunction
<b>TP53INP1</b>	Tumor Protein p53-inducible Nuclear Protein 1	8q22.1	Its diabetogenic mechanism is not well understood, but suspected to regulate p53-dependent programmed cell death
<b>CHCHD9/TLE4</b>	Putative Coiled-coil-helix-coiled-coilhelix Domain-containing Protein CHCHD2P9	9q21.31	Unknown diabetogenic mechanism.
<b>CENTD2/ARAP1</b>	ANK Repeat and PH Domain-Containing Protein 1	11q13.4	It causes beta-cell dysfunction.
<b>ZFAND6</b>	AN1-type Zinc Finger Protein 6	15q25.1	It causes beta-cell dysfunction
<b>PRC1</b>	Protein Regulator of Cytokinesis 1	15q26.1	Unknown diabetogenic mechanism
<b>PTPRD</b>	Protein Tyrosine Phosphatase Receptor Type Delta	9p23	Down-regulation of the insulin receptor, reducing its cellular communications.
<b>SOS1</b>	Son of Sevenless Homolog 1	2p22.1	Disrupts insulin signaling pathway, leading to insulin resistance
(συνεχίζεται...)			

<b>TNF-<math>\alpha</math>/TNF</b>	Tumor Necrosis Factor- $\alpha$	6p21.33	Causes obesity, leading to insulin resistance
<b>PCK1</b>	Phosphoenolpyruvate Carboxykinase 1	20q13.31	It results in overproduction of glucose through hepatic gluconeogenesis. Alternatively, it selectively affects PCK1 expression in adipose tissue, resulting in changes in glyceroneogenesis that affects the storage and release of fatty acids
<b>IL6</b>	Interleukin 6	7p15.3	Causes insulin resistance and an increase in fasting glucose
<b>IL10</b>	Interleukin 10	1q32.1	Causes insulin resistance and increase in fasting glucose
<b>ENPP1</b>	Ectonucleotide Pyrophosphatase/Phosphodiesterase 1	6q23.2	Inhibits insulin receptor signaling, leading to insulin resistance
<b>GALNT2</b>	GalNAc-T2 or Polypeptide NAcetylgalactosaminyltransferase 2	1q42.13	It deregulates the expression of ENPP1, insulin signaling and metabolism, leading to insulin resistance

*Yahaya, T. O., & Salisu, T. F. (2018). A Review of Type 2 Diabetes Mellitus Predisposing Genes. Current Diabetes Reviews, 15. doi:10.2174/1573399815666181204145806*

## 4.1 KCNJ11

Το γονίδιο KCNJ11 κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη απαραίτητη για τη συγκρότηση μιας υπομονάδας του διαύλου  $K^+$ /ATP (KATP) (βλ. **Εικόνα 2.3**). Οι υπομονάδες του διαύλου κατηγοριοποιούνται σε δύο τύπους και κάθε τύπος εκπροσωπείται τέσσερις φορές σε ένα λειτουργικό οκταμερές. Οι δυο τύποι των υπομονάδων είναι: 1) ο Kir6.2 και 2) ο υποδοχέας της σουλφονυλουρίας (SUR, Sulfonylurea Receptor), δραστικής ουσίας που χρησιμοποιείται για τη διαχείριση του ΣΔ2 σε ασθενείς. Η πρωτεΐνη που κωδικοποιεί το



KCNJ11 αφορά την υπομονάδα Kir6.2, η οποία σχηματίζει τους πόρους (**Εικόνα 4.1**), μέσα από τους οποίους διέρχονται τα κατιόντα  $K^+$  και φέρει ακόμα τις θέσεις σύνδεσης του ATP. Ένα άλλο γονίδιο, το ABCC8, κωδικοποιεί τον SUR και επηρεάζει την δραστηριότητα του διαύλου. Μεταλλάξεις σε αυτά τα γονίδια διαταράσσουν, την ομοιοστατική από τη γλυκόζη, δράση του διαύλου KATP μέσω του οποίου ρυθμίζεται η απελευθέρωση της ινσουλίνης και η γλυκόζη του αίματος.

Τα είδη των μεταλλάξεων που εντοπίζονται είναι πολυμορφισμοί ενός νουκλεοτιδίου (SNP, single nucleotide polymorphism) οι οποίοι οδηγούν σε χαρακτηριστικά διαφορετική αμινοξική αλληλουχία της πρωτεΐνης και στα τέσσερα μέλη της μιας υπομονάδας. Οι πιο χαρακτηριστικοί πολυμορφισμοί που εντοπίστηκαν σε καυκάσιους πληθυσμούς και αφορούν το KCNJ11 είναι 3: *E23K* (η γουανίνη αντικαθιστά μια αδερίνη στο κωδικόνιο 23 οδηγώντας σε αλλαγή από γλουταμινικό οξύ (E) σε λυσίνη (K)), *L270V*, *I1337V*. Από αυτούς μόνο το στέλεχος *E23K* φάνηκε να επηρεάζει τη λειτουργία του διαύλου και συνδέθηκε στενά με την παθογένεια του ΣΔ2. Όταν μελετήθηκε ο κίνδυνος εμφάνισης ΣΔ2 βάση αυτού του πολυμορφισμού στις διάφορες εθνικότητες, σημαντικά αυξημένος εμφανίστηκε σε Καυκάσιους και Ασιάτες ενώ μια άλλη μελέτη έδωσε θετικά αποτελέσματα για άτομα ανεξαρτήτου εθνικότητας με αυξημένο BMI. [58]

## 4.2 PPAR-GAMMA (PPARG)

Το γονίδιο PPAR-gamma κωδικοποιεί έναν πυρηνικό υποδοχέα στεροειδών ορμονών που ανήκει στην οικογένεια των υποδοχέων που ενεργοποιούνται από παράγοντες που επάγουν το πολλαπλασιασμό των υπεροξεισωμάτων. Υπάρχουν οι υπότυποι: alpha, delta και gamma. Ο Gamma που αναφέρεται εδώ, αποτελείται από δυο τμήματα (PPAR $\gamma$ 1 και PPAR $\gamma$ 2) και ρυθμίζει την διαφοροποίηση των αδιποκινών. Εκφράζεται κυρίως στο λιπώδη ιστό αλλά σε μικρές ποσότητες στο ήπαρ, το πάγκρεας και στους μύες όπου η δράση του εκεί αφορά την ενεργό συμμετοχή του στη διαχείριση του λίπους και την ευαισθησία στην ινσουλίνη.

Η σύνδεση του γονιδίου με την εμφάνιση του ΣΔ2 είναι ήπια, είναι όμως από τα πρώτα που συνδέθηκαν με τη νόσο. Όμως, τα συσσωρευτικά φαινόμενα που προκαλεί η αλλαγή της λειτουργίας, του εξαιτίας των μεταλλάξεων, αυξάνει το βαθμό του κινδύνου εμφάνισης ΣΔ2. Ο πιο καλά μελετημένος πολυμορφισμός (SNP) είναι ο *Pro12Ala*, που προκαλεί δομικές αλλαγές στον υποδοχέα γεγονός που οδηγεί σε μειωμένη συγγένεια σύνδεσης

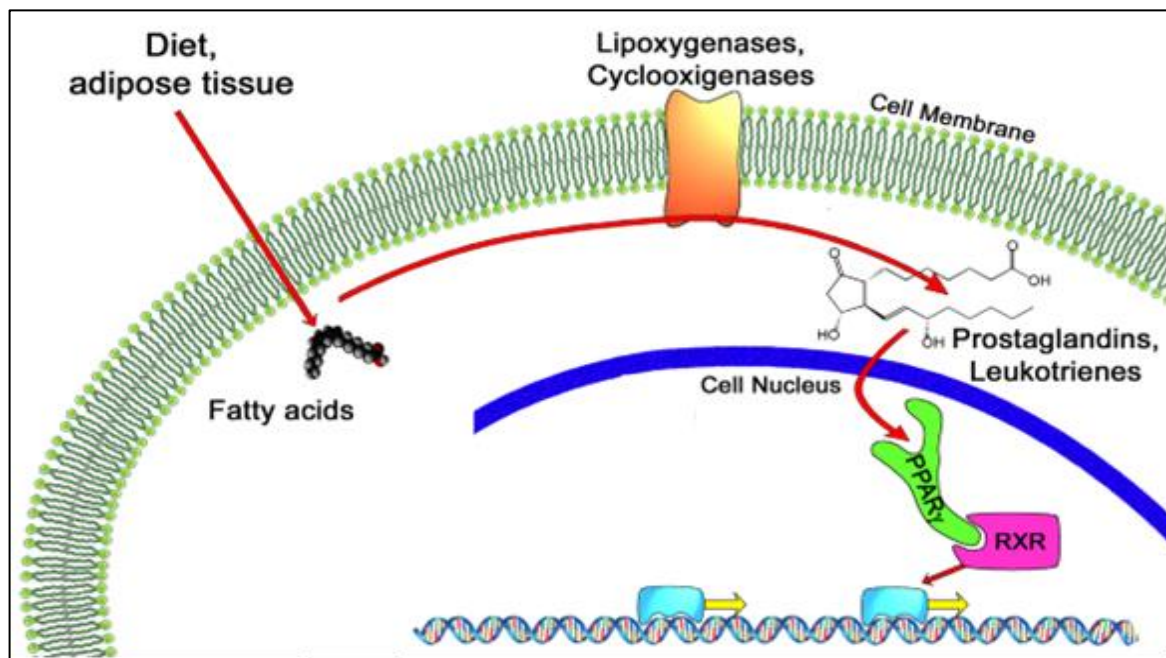


(binding affinity) του υποδοχέα με τους συνδέτες του, που περιλαμβάνουν: ελεύθερα λιπαρά οξέα, εικοσανοειδή, τη βιταμίνη B3, επιπλέον ενεργοποιείται από την προσταγλαδίνη PGJ2 και ορισμένα μέλη της οικογένειας 5-HETE (μεταβολίτες του αραχιδονικού οξέως) συμπεριλαμβανομένων και των 5-οξο-15(S)-HETE και 5-οξο-HETE (Εικόνα 4.2). Αυτό συνεπάγεται μειωμένη μεταγραφική δραστηριότητα των γονιδίων-στόχων του.

Άλλα SNPs στο συγκεκριμένο γονίδιο, που συνδέθηκαν με το ΣΔ2 είναι τα: *Val290Met* και *Pro467Leu* τα οποία προκαλούν σοβαρή αντίσταση στην ινσουλίνη σε ασθενείς με φυσιολογικό βάρος. Επιπλέον, η σιωπηλή μετάλλαξη *CAC478CAT*, έχει συνδεθεί με κίνδυνο εμφάνισης παχυσαρκίας και τέλος κάποιοι λιγότερο σημαντικοί πολυμορφισμοί εντοπίστηκαν στην περιοχή του υποκινητή του γονιδίου.

Τελικά, το συγκεκριμένο γονίδιο έχει και ρυθμιστικούς ρόλους, όσον αφορά την ομοιόσταση του λιπώδους ιστού, αλλά και αντιφλεγμονώδεις δράσεις συνδυαστικά με άλλους παράγοντες. Λαμβάνοντας υπόψιν αυτούς τους ρόλους, η ενεργοποίησή του, θα μπορούσε να αποτελέσει στόχο για τη διαχείριση ασθενειών όπως εν προκειμένω ο ΣΔ2.

[58]



**Εικόνα 4.2:** η ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης από τον PPARγ. Οι ενδογενείς συνδέτες για τους υποδοχείς περιλαμβάνουν: ελεύθερα λιπαρά οξέα, εικοσανοειδή και τη βιταμίνη B3. Επιπλέον ενεργοποιείται από την προσταγλαδίνη PGJ2 και ορισμένα μέλη της οικογένειας 5-HETE (μεταβολίτες του αραχιδονικού οξέως) συμπεριλαμβανομένων και των 5-οξο-15(S)-HETE και 5-οξο-HETE.

*Hernandez-Quiles M, Broekema MF, Kalkhoven E. PPARgamma in Metabolism, Immunity, and Cancer: Unified and Diverse Mechanisms of Action. Front Endocrinol (Lausanne). 2021 Feb 26;12:624112. doi: 10.3389/fendo.2021.624112. eCollection 2021.*

### 4.3 HNF1B/TCF2

Το γονίδιο αυτό (HNF1B) είναι επίσης γνωστό ως TCF2 (transcription factor 2) καθώς κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη η οποία συνδέεται σε συγκεκριμένες θέσεις στο DNA και ελέγχει την έκφραση άλλων γονιδίων. Εκφράζεται σε αρκετά όργανα και ιστούς του ανθρώπινου οργανισμού όπως: πνεύμονες, ήπαρ, νεφρά, πάγκρεας, έντερο, στην ουροποιητική οδό και στο αναπαραγωγικό σύστημα. Έχει σημαντικό ρόλο στην εμβρυογένεση και στην ωρίμανση και έκφραση των β-παγκρεατικών κυττάρων, γι' αυτό άλλωστε, έχει επανειλημμένα συνδεθεί με την ανάπτυξη του ΣΔ.

Οι μεταλλάξεις που έχουν αναφερθεί για το συγκεκριμένο γονίδιο φαίνεται να οδηγούν σε ένα τύπο διαβήτη, που αναφέρθηκε σε προηγούμενη ενότητα, MODY5, όσον αφορά Ασιατικούς πληθυσμούς. Είναι όμως καλά τεκμηριωμένο πως, στελέχη γονιδίων που οδηγούν σε μονογονιδιακό τύπο διαβήτη όπως, ο MODY5, είναι υπαίτια για την παθογένεση του ΣΔ2.

Πιο συγκεκριμένα, τα SNPs που είναι αναγνωρισμένα περιλαμβάνουν: *rs757210* (intron 2), *rs1008284* (intron 6) και *rs3110641* (intron 8) και έχουν εντοπιστεί σε διαβητικούς (ΣΔ2) Βόρειο-ευρωπαϊκούς και Καναδικούς πληθυσμούς.

Εντούτοις, νέες μελέτες εντόπισαν δυο νέους πολυμορφισμούς σε διαβητικά άτομα, που εμφανίζονταν σε ετερόζυγη κατάσταση, τον *R276X* (nonsense mutation, ανερμηνεύσιμη μεταλλαγή) και τον *S456R* (missense mutation, παρερμηνεύσιμη μεταλλαγή). Στην πρώτη περίπτωση, *R276X*, όπως ήταν αναμενόμενο, απενεργοποιήθηκε το γονίδιο ενώ στη δεύτερη περίπτωση, *S456R*, παρατηρήθηκε μια κατά 22% μειωμένη έκφραση του γονιδίου συγκρινόμενη με την πρωτεΐνη αγρίου τύπου. [58]

### 4.4 WFS1

Το γονίδιο αυτό κωδικοποιεί τη βολφραμίνη (wolframine), μια πρωτεΐνη που εμφανίζεται σε πολλούς ιστούς (εγκέφαλος, οστά, μύες, πάγκρεας, πνεύμονες, ήπαρ, νεφρά). Οι μεταλλαγές του γονιδίου αυτού, έχουν συσχετιστεί με το σύνδρομο Wolfram του οποίου τα συμπτώματα περιλαμβάνουν αυτά του ΣΔ. Μέσα στο κύτταρο, η πρωτεΐνη βολφραμίνη, είναι εγκαταστημένη στη μεμβράνη του ενδοπλασματικού δικτύου και έχει σημαντικό ρόλο στην αναδίπλωση των πρωτεϊνών και στη δραστηριότητα των διαφόρων οργανιδίων. Ακόμα είναι υπεύθυνη για τη διατήρηση της ισορροπίας του ασβεστίου (calcium) και την

απόκριση σε συνθήκες καταπόνησης του κυττάρου (stress). Η βιογένεση και η μεταφορά πρωτεϊνών φορτίου σε κυστίδια, όπως η ινσουλίνη, είναι κρίσιμες για τη διατήρηση της ομοιόστασης της γλυκόζης στο αίμα και τα ελλείματα στη διακίνηση τέτοιων πρωτεϊνών συνδέονται με την εμφάνιση της νόσου του διαβήτη. Οι πρωτεΐνες φορτίου που μεταφέρονται με κυστίδια συντίθενται στο ενδοπλασματικό δίκτυο (ER) και μεταφέρονται στο σύμπλεγμα Golgi για περαιτέρω επεξεργασία πριν μεταφερθούν στα κυστίδια πυκνού πυρήνα στα β-παγκρεατικά κύτταρα. Το πρώτο στάδιο μετακίνησής τους από το ενδοπλασματικό δίκτυο στο σύμπλεγμα Golgi καθοδηγείται από σύμπλοκα πρωτεϊνών περιβλήματος όπως το COPII, το οποίο αποτελείται από την SAR1 GTPάση, τα ετεροδιμερή SEC23/SEC24 και τα ετεροτετραμερή SEC13/SEC314. Τα εκκρινόμενα φορτία τέτοιων πρωτεϊνών ενσωματώνονται σε κυστίδια επικαλυμμένα με COPII μέσω δύο μηχανισμών, τη «σύλληψη φορτίου» και τη «ροή χύδην». Η σύλληψη φορτίου αφορά την έξοδο πρωτεϊνών από το ενδοπλασματικό δίκτυο με τη μεσολάβηση υποδοχέα, σε αντίθεση

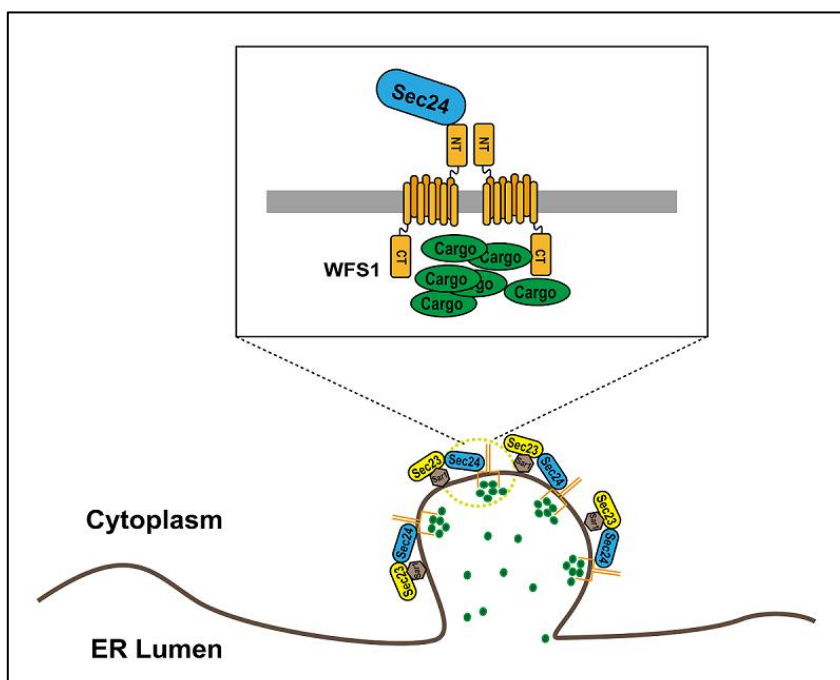
με τη μαζική ροή, μέσω της οποίας τα φορτία εισέρχονται σε κυστίδια

επικαλυμμένα με COPII μέσω παθητικής διάχυσης.

Οι υποδοχείς φορτίου πιστεύεται ότι

επιταχύνουν την εξαγωγή ER

εκλεκτικών πρωτεϊνών



**Εικόνα 4.3:** Σχηματική απεικόνιση του μηχανισμού μετακίνησης πρωτεϊνών φορτίου μέσω κυστιδίων από το ενδοπλασματικό δίκτυο στο σύμπλεγμα Golgi με τη μεσολάβηση της βολφραμίνης (WFS1). Πιο ειδικά, η βολφραμίνη συνδέεται απευθείας με τις πρωτεΐνες φορτίου, συμπεριλαμβανομένης της προ-ινσουλίνης μέσω του C-τελικού τμήματός της εντός του αυλού ενδοπλασματικού δικτύου και το αμινοτελικό τμήμα της που εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα αναγνωρίζεται από τις υπομονάδες SEC24 του COPII, οι οποίες εμπλέκονται στο σχηματισμό κυστιδίων, στην επιλογή φορτίου και στη διακίνηση προς το σύμπλεγμα Golgi. Οι παθογόνες μεταλλάξεις (G695V, P724L, E809K και E830A) στο καρβόξυτελικό τμήμα της διαταράσσουν την αναγνώριση των πρωτεϊνών του φορτίου υποδεικνύοντας ότι η εξασθενημένη μεταφορά πεπτιδικών ορμονών αποτελεί τη βάση του διαβήτη που προκύπτει από παθογόνες μεταλλάξεις στο γονίδιο WFS1.

Wang L, Liu H, Zhang X, Song E, Wang Y, Xu T, Li Z. WFS1 functions in ER export of vesicular cargo proteins in pancreatic β-cells. *Nat Commun.* 2021 Nov 30;12(1):6996. doi: 10.1038/s41467-021-27344-y

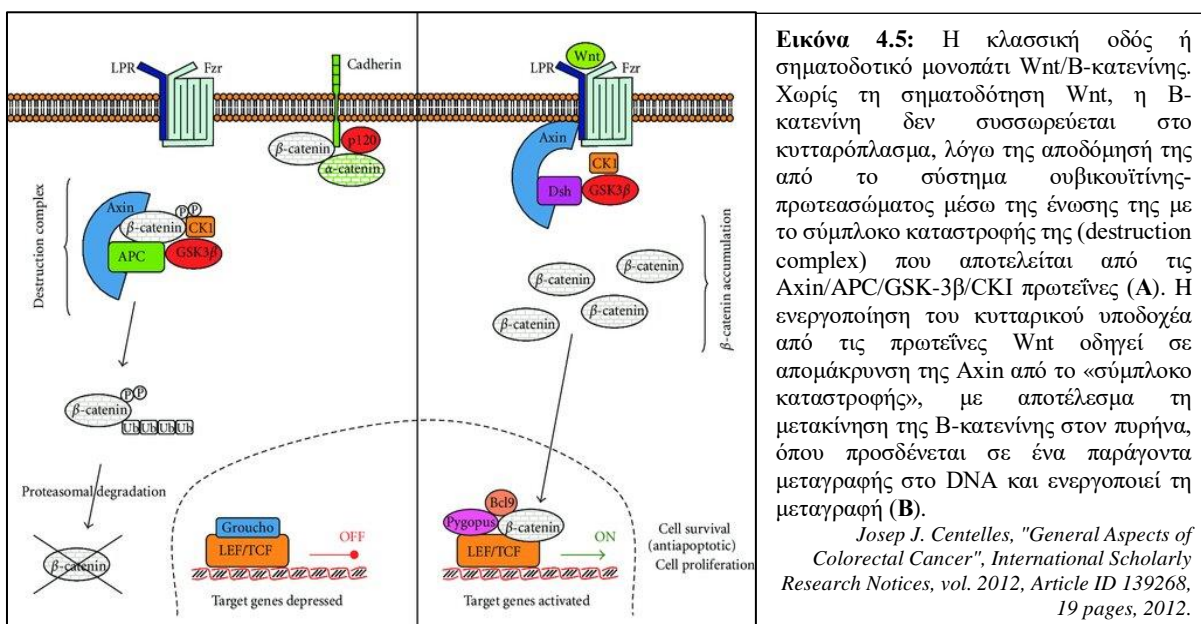
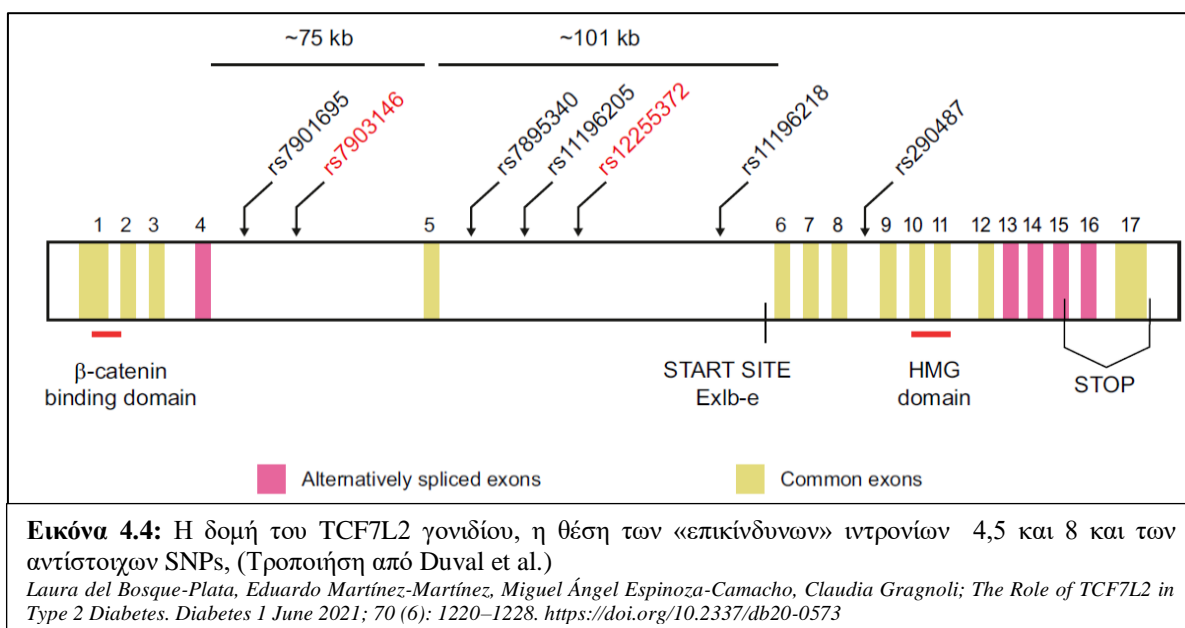
συγκεντρώνοντας αυτά τα φορτία σε κυστίδια COPII (**Εικόνα 4.3**). Η βολφραμίνη είναι ένας τέτοιος υποδοχέας φορτίου που διαμεσολαβεί την μετακίνηση της προ-ινσουλίνης στο σύμπλεγμα Golgi και η ανεπάρκειά του έχει συνδεθεί με συσσώρευση προ-ινσουλίνης στο ενδοπλασματικό δίκτυο και κατά συνέπεια, με παρεμπόδιση της ωρίμανσης της προ-ινσουλίνης σε ινσουλίνη, καταλήγοντας στην απορρύθμιση της γλυκόζης του αίματος. Τέλος φαίνεται να έχει σημαντικό ρόλο, στη δραστηριότητα και άλλων ορμονών όπως την GLP-1 η οποία με τη σειρά της ρυθμίζει την έκκριση της ινσουλίνης και εμποδίζει την καταστροφή των β-παγκρεατικών κυττάρων.

Συγκεκριμένα στελέχη του WFS1 έχουν συσχετιστεί με την εμφάνιση ΣΔ2 σε ευρωπαϊκούς πληθυσμούς. Σε μελέτες έχουν αναφερθεί τέσσερα SNP του συγκεκριμένου γονιδίου, τα: *rs10010131*, *rs6446482*, *rs752854* και *rs734312*. Το κύριο σύμπτωμα των διαβητικών υποκειμένων με μεταλλαγή σε αυτό το γονίδιο είναι η προοδευτική μείωση της έκκρισης ινσουλίνης. [58]

## 4.5 TCF7L2

Αυτό το γονίδιο αποτελεί έναν από τους καλύτερα μελετημένους γενετικούς τόπους με υψηλό δείκτη κινδύνου για την εμφάνιση ΣΔ2, αλλά και το γονίδιο το οποίο επανειλημμένα έχει εμφανιστεί σε μελέτες γενετικής σύνδεσης. Έχει συσχετιστεί με θεμελιώδεις κυτταρικές διαδικασίες όπως: η λιπογένεση, η φυσική επιλογή, το εναλλακτικό μάτισμα, αλλά και διάφορες ασθένειες συμπεριλαμβανομένων κάποιων τύπων καρκίνου. Κωδικοποιεί έναν μεταγραφικό παράγοντα που αποτελεί βασικό τμήμα του μονοπατιού σηματοδότησης των πρωτεϊνών Wnt/β-κατενίνης, (**Εικόνα 4.5**) το οποίο ενεργοποιεί ένα σύνθετο δίκτυο αλληλοεπιδρώντων πρωτεϊνών που ρυθμίζουν με τη σειρά τους, την ενδοκυτταρική επικοινωνία. Βρίσκεται στο γενετικό τόπο 10q25.3 και έχει 18 εξώνια τα οποία εμφανίζουν διαφορετικό μοτίβο συρραφής ανάλογα με τον ιστό στον οποίο εκφράζεται το γονίδιο. Η αλληλουχία δε, που ανταποκρίνεται σε ισχυρά λειτουργικές πρωτεϊνικές επικράτειες, θεωρείται σε μεγάλο βαθμό συντηρημένη. Αρχικά τα αλληλόμορφα που συμβάλλουν στον ΣΔ2 δεν είχαν καθοριστεί, είτε επειδή βρίσκονται σε συνδετική ανισορροπία (linkage disequilibrium, LD), είτε επειδή τα SNPs βρίσκονταν σε μη κωδική περιοχή του γονιδίου με μη ορατά λειτουργικά αποτελέσματα. Αργότερα με νέες έρευνες εντοπίστηκαν κάποιοι πολυμορφισμοί, των οποίων η μεταξύ τους συσχέτιση και η συχνότητα εμφάνισης διαφέρει ανάλογα με την περιοχή και τον πληθυσμό που μελετάται

και φαίνονται στην **Εικόνα (4.4)**. Μέχρι στιγμής οι μηχανισμοί με τους οποίους το γονίδιο ασκεί την επίδρασή του στον ΣΔ2 δεν είναι πλήρως κατανοητοί, μέσω όμως μιας GWAS ανάλυσης, χρησιμοποιώντας μια συστηματική στρατηγική βελτίωσης, βασισμένη στο κύτταρο, δίνεται μια πιο καθαρή εικόνα σε σχέση με τα cis-ρυθμιστικά στοιχεία που εμπλέκονται στην παθογένεση της ασθένειας. [30]





## 4.6 PDX-1

Το PDX-1 (pancreatic duodenal homeobox 1- insulin promoting factor-1 IPF1) εκφράζεται κυρίως στο πάγκρεας, αλλά και στο δωδεκαδάκτυλο και το στομάχι. Είναι κύριος ρυθμιστής για την οργανογένεση του παγκρέατος, την ωρίμανση και τη διατήρηση της ταυτότητας των β-κυττάρων αλλά και του ρόλου τους στην ομαλή λειτουργία της ινσουλίνης. Μεταλλάξεις σε αυτό οδηγούν στον τύπο διαβήτη MODY4 ένα σπάνιο είδος μονογονιδιακού διαβήτη. Μια μελέτη του *De Vas et al., 2015*, έδειξε μια αύξηση των σχετιζόμενων με ΣΔ2-SNPs σε θέσεις που καταλαμβάνει το PDX1 στις περιοχές των ιντρονίων των γονιδίων TCF7L2 και HNF1B (γονίδια υψηλού κινδύνου για ΣΔ2 που έχουν ήδη αναφερθεί) ενώ μια πιο πρόσφατη (*Wang et al., 2021*) εντόπισε SNPs στο PDX1 (*rs11619319, rs2293941, rs9581943, και rs7981781*) που αυξάνουν τον κίνδυνο εμφάνισης της ασθένειας, όμως αυτό διαφοροποιείται ανάλογα με την ηλικία, το φύλο, το κάπνισμα ή/και το περιβάλλον που βρίσκονται οι πληθυσμοί που εξετάζονται.

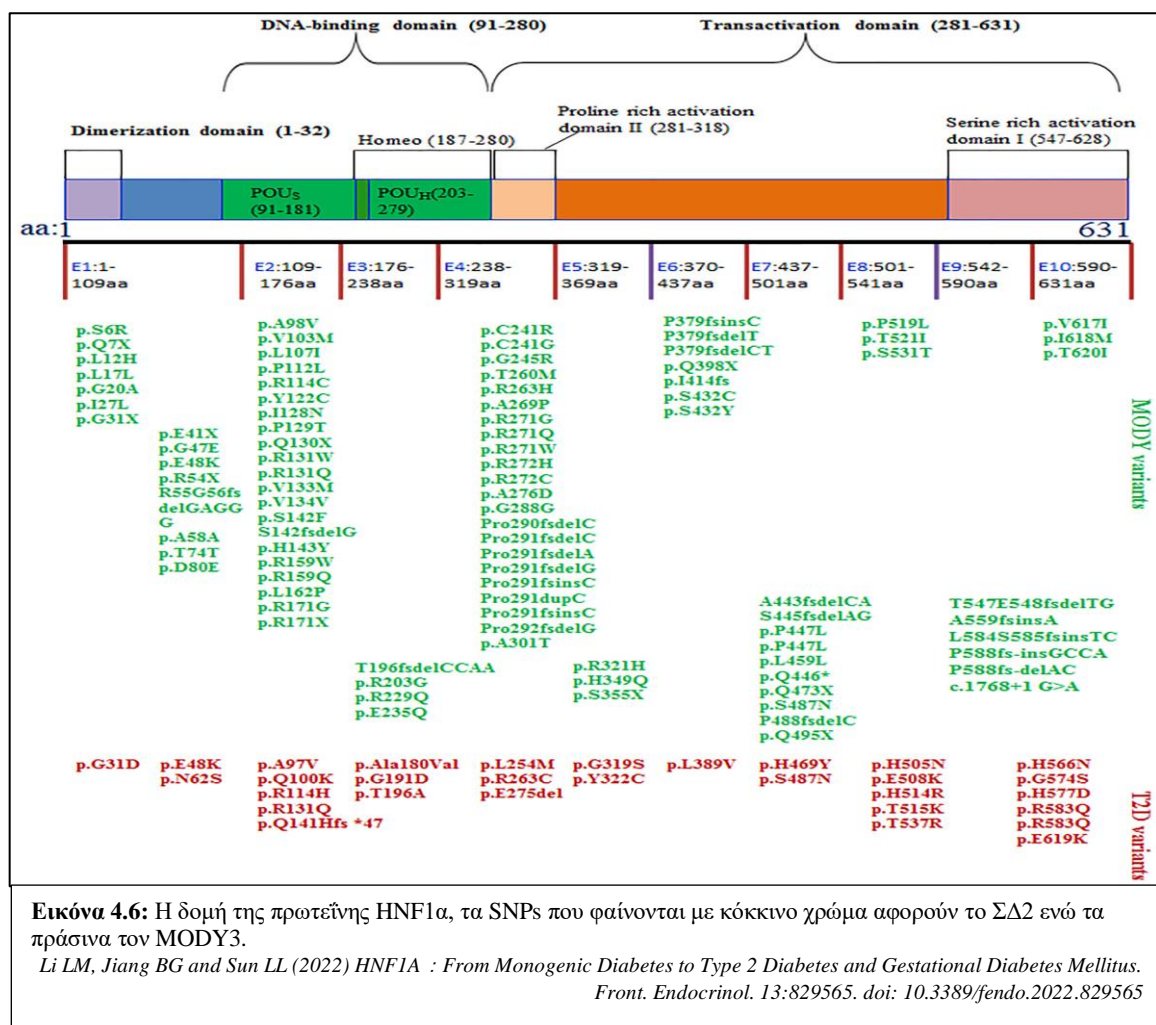
Το αξιοσημείωτο, όσον αφορά αυτό το γονίδιο αφορά μια από τις δράσεις του, που του επιτρέπει να μετατρέπει αδιαφοροποίητα β-κύτταρα σε κύτταρα που παράγουν ινσουλίνη και αυτό το καθιστά ιδανικό στόχο γονιδίων ή προσεγγίσεων για τη θεραπεία και την αντιμετώπιση του ΣΔ2. [15]

## 4.7 HNF1α

Το HNF1α γονίδιο στον άνθρωπο βρίσκεται στον γενετικό τόπο 12q24.31 και κωδικοποιεί έναν ιστό-ειδικό μεταγραφικό παράγοντα. Στο ήπαρ αυτός, ρυθμίζει πολυάριθμα ηπατικά γονίδια και συμμετέχει στο μεταβολισμό της γλυκόζης, του λίπους κι άλλων ουσιών. Στο πάγκρεας, ελέγχει εξειδικευμένα γονίδια που εμπλέκονται στην ανάπτυξη και ωρίμανση των β-κυττάρων και την έκκριση της ινσουλίνης. Έχει εντοπιστεί ένας αρκετά μεγάλος αριθμός πολυμορφισμών που αφορούν αυτό το γονίδιο ( $\approx 1231$ ) (**Εικόνα 4.6**) χωρίς όμως αυτό να παρουσιάζει ειδικά hot-spot μεταλλάξεων.

Ενώ το HNF1α είναι γνωστό ως γονίδιο του διαβήτη τύπου MODY3, σε πρόσφατες έρευνες εντοπίστηκαν SNPs που εμπλέκονται στην εμφάνιση του ΣΔ2. Τα SNPs του γονιδίου για το διαβήτη τύπου MODY3 εντοπίζονται στις περιοχές σύνδεσης της πρωτεΐνης ενώ αυτά του ΣΔ2 εντοπίζονται σε διαφορετικές θέσεις στο γονίδιο. Το πιο συχνά παρατηρούμενο SNP που εμφανίζεται σε περιπτώσεις ΣΔ2 είναι το *G319S*. Έχει βρεθεί από μελέτες ότι η μεταγραφική ικανότητα του γονιδίου ή/και η δυνατότητα σύνδεσης της πρωτεΐνης, στα

αλληλόμορφα του ΣΔ2 βρίσκονται κάπου ενδιάμεσα στου άγριου τύπου και αυτά του MODY3, γεγονός που ενδεχομένως να υποδεικνύει ότι τα αλληλόμορφα του ΣΔ2 μπορεί να υστερούν σε αποτελεσματική «διεισδυτικότητα» ώστε να προκαλέσουν την ασθένεια, όμως αυξάνουν τις πιθανότητες αυτή να εμφανιστεί σε συνδυασμό με άλλους παράγοντες (πχ περιβαλλοντικούς). Τέλος, στους ασθενείς με HNF1α-ΣΔ2 συστήνεται αρχικά, θεραπεία μέσω διατροφικού ελέγχου και όχι φαρμακευτική, γιατί η δεύτερη φαίνεται να μην αποδίδει σε αυτές τις περιπτώσεις. [31]





## 4.8 GLIS3

Το γονίδιο αυτό κωδικοποιεί την αντίστοιχη πρωτεΐνη GLIS3 (GLI-similar 3) που είναι μέλος της υπο-οικογένειας των πρωτεϊνών Krüppel-like δάκτυλοι ψευδαργύρου (πήραν το όνομά τους από την ομοιότητά τους με τις ρυθμιστικές πρωτεΐνες Krüppel της *Drosophila*). Μεταλλάξεις σε αυτό οδηγούν σε νεογνικό διαβήτη, εκ γενετής υποθυροειδισμό, πολυκυστικό νεφρό και άλλες ασθένειες (τύπους καρκίνου, Alzheimer's, κ.α.). Το γονίδιο εκφράζεται σε πολλούς ιστούς: πάγκρεας, νεφρό, θυροειδής αδένας, ήπαρ, σκελετικοί μύες και καρδιά. Υπάρχουν δύο κυρίαρχα μετάγραφα του γονιδίου, διαφορετικού μεγέθους (7.5Kb και 0.8-2Kb), τα οποία εμφανίζονται στους διαφορετικούς ιστούς αν και έχουν αναφερθεί κάποια αλληλόμορφα που εμφάνισαν διαφοροποιημένη συρραφή στα μετάγραφα τους. Η κύρια λειτουργία της πρωτεΐνης που κωδικοποιεί το συγκεκριμένο γονίδιο είναι αυτή του εξειδικευμένου για το εκάστοτε κύτταρο, συν-ενεργοποιητή (transactivator) ή αυτή του καταστολέα. Αφού κάποια στιγμή είχε γίνει η σύνδεση του γονιδίου αυτού με άλλες ασθένειες και τελικά τον ΣΔ1, μόλις το 2010, οι Dupius et al. Εντόπισαν ένα αλληλόμορφο (*rs7034200*) του GLIS3 ως έναν από τους εννέα καινούργιους γενετικούς τόπους που συνδέθηκαν με τη γλυκόζη νηστείας του ΣΔ2 (αλλά όχι το BMI). Η συσχέτιση αυτή πιστοποιήθηκε μελετώντας πληθυσμούς διαφορετικών γενετικών καταβολών και εθνικοτήτων. Λίγο αργότερα εμφανίστηκαν ακόμα δυο πολυμορφισμοί που αφορούσαν όμως μόνο ασιατικούς πληθυσμούς (*rs7041847*, *rs10814916*) (Cho et al., 2012, Sakai et al., 2013, Li et al., 2013). Ενδιαφέρον όμως εμφάνισε η ανακάλυψη του *rs2380949* (Goodarzi et al., 2013) στους Λατινοαμερικανικούς πληθυσμούς που σχετίστηκε με την καθαρότητα της ινσουλίνης. Το ενδιαφέρον προκύπτει από το διπλό ρόλο που διαφαίνεται να έχει, το γονίδιο, τόσο στη ρύθμιση της ινσουλίνης όσο και στην παραγωγή και καθαρότητά της. Στον Πίνακα 4.2 συνοψίζονται τα γνωστά SNPs. [56]

Πίνακας 4.2 Τα αλληλόμορφα του GLIS3 που σχετίζονται με ΣΔ2		
Πληθυσμός	Ευρήματα	Αναφορά
Ευρωπαίοι	rs7034200 associated with fasting glucose and impaired $\beta$ cell function	(Dupuis, et al. 2010)
Δανοί	rs7034200 associated with reduced glucose-stimulated $\beta$ cell function	(Boesgaard, et al. 2010)
Κινέζοι	rs7034200 associated with T2D	(Hu, et al. 2010)
Ευρωπαίοι και Αυστραλοί	rs7034200 associated with impaired $\beta$ cell function and altered fasting glucose	Barker, et al. 2011)
Νότιο-ασιάτες	rs7034200 associated with T2D	(Rees, et al. 2011)
Κινέζοι-Χαν	rs7034200 associated with fasting glucose, $\beta$ cell function and T2D	Liu, et al. 2011)
Ανατολικο-ασιάτες	rs7041847 associated with T2D	(Cho, et al. 2012)
Γιαπωνέζοι	rs7034200 Borderline associated with T2D	(Fujita, et al. 2012)
Πολλαπλών εθνικοτήτων	No impact of rs7034200 on diabetes incidence or interaction with preventive interventions	Florez, et al. 2012)
Λατινοαμερικάνοι	rs2380949 associated with insulin clearance	(Goodarzi, et al. 2013)
Γιαπωνέζοι	rs7041847 Confers susceptibility to T2D	(Sakai, et al. 2013)
Κινέζοι-Χαν και Ανατολικο-ασιάτες	rs10814916 associated with the risk of T2D	(Li, et al. 2013)
Κορεάτες	rs7034200 associated with impaired $\beta$ cell function	(Hong, et al. 2014)
Κινέζοι-Χαν	rs7034200 associated with the risk of T2D	Dou, et al. 2016)

*Τροποποίηση από: Wen X, Yang Y.*  
*Emerging roles of GLIS3 in neonatal diabetes, type 1 and type 2 diabetes. J Mol Endocrinol. 2017 Feb;58(2):R73-R85. doi: 10.1530/JME-16-0232. Epub 2016 Nov 29. PMID: 27899417.*

## 4.9 THADA

Η πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από αυτό το γονίδιο σχετίζεται με το θυροειδή αδέν (THyroid ADenoma-Associated protein) και θεωρείται ότι εμπλέκεται στο μονοπάτι «θανάτου» των υποδοχέων αλλά και στην απόπτωση. Το SNP που θεωρείται ως το πιο σημαντικό είναι το rs7578597. Φαίνεται ότι σε ομόζυγη κατάσταση το αλληλόμορφο κινδύνου εμφανίζει χαμηλές ενδείξεις για τις λειτουργίες των  $\beta$ -κυττάρων ενώ οι Stancakova et al. παρουσίασαν ενδείξεις για, πρώιμης φάσης, μειωμένη απόκριση στην ινσουλίνη (GLP-1), μειωμένη απόκριση στην ενεργοποίηση της ινσουλίνης από την αργινίνη και μειωμένη μάζα των  $\beta$ -κυττάρων, πιθανόν λόγω της έντονης απόπτωσης. Σε κάθε περίπτωση συστήνεται περαιτέρω έρευνα για το συγκεκριμένο γονίδιο γιατί ενώ οι ενδείξεις είναι πολλές, δεν στοιχειοθετούνται επαρκώς. [47]

## 4.10 SLC30A8

Το SLC30A8 είναι το γονίδιο που κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη μεταφοράς ψευδαργύρου (zinc transporter-8 gene). Έχει μελετηθεί κυρίως ως προς τη σχέση της πρόσληψης ψευδαργύρου με τη γλυκόζη νηστείας σε μη διαβητικά υποκείμενα. Εκφράζεται κυρίως στο πάγκρεας,

στα β-κύτταρα και η πρωτεΐνη που κωδικοποιεί μεταφέρει τον ψευδάργυρο από το κυτταρόπλασμα μέσα στα εκκριτικά κυστίδια της ινσουλίνης (σημαντική λειτουργία, για τη σύνθεση και έκκρισή της). Έπειτα από διάφορες έρευνες, έχει βρεθεί ότι το αλληλόμορφο C του *rs13266634* πολυμορφισμού του γονιδίου σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο παρεμπόδισης της ρύθμισης της γλυκόζης (IGR) και ΣΔ2.

Αν και δεν είχε μελετηθεί η σχέση της συγκέντρωσης ψευδαργύρου στο κυτταρόπλασμα και του ΣΔ2 το 2013 οι Shan et al., έκαναν μια πρώτη μελέτη πάνω σε αυτή τη σχέση και παρατήρησαν μικρά ποσοστά σύνδεσης. Εντούτοις, επιβεβαιώθηκε η σχέση του πολυμορφισμού με την ανάπτυξη ΣΔ2, με διαφορετικά ποσοστά συσχέτισης ανάλογα με την ομοζυγία/ετεροζυγία του αλληλόμορφου. Οι μηχανισμοί που θα μπορούσαν να εξηγούν το φαινόμενο είναι αρκετοί, για παράδειγμα ότι τα β-κύτταρα είναι αυτά που περιέχουν τον περισσότερο ψευδάργυρο καθώς η σύνθεση και η αποθήκευση της ινσουλίνης σε αυτά γίνεται στη μορφή Zn/κρύσταλλοι ινσουλίνης (2:6). Έπειτα ο ψευδάργυρος, ως ενζυματικός συμπαράγοντας, εμπλέκεται σε όλες τις πορείες (σύνθεση, αποθήκευση και έκκριση) της ινσουλίνης και επιπλέον λειτουργεί ως μόριο σηματοδότησης μετά την έκκρισή της. Ακόμα, φαίνεται να έχει δράσεις μιμητικές της ινσουλίνης, όπως μείωση της γλυκόζης του αίματος, λιπογένεση λόγω της στενής σύνδεσής του με αυτή. Τέλος, υπάρχουν στοιχεία πως προστατεύει την ινσουλίνη και τα β-κύτταρα από το θάνατο που προκαλείται από τις κυτοκίνες της φλεγμονής.

Για όλους αυτούς τους λόγους, φαίνεται η έκφραση του γονιδίου ρυθμίζει έντονα την έκκριση της ινσουλίνης. Ο συγκεκριμένος πολυμορφισμός δε, σχετίζεται με την έκφραση αυτή στα παγκρεατικά νησίδια, την έκκριση της ινσουλίνης και την ομοιόσταση της γλυκόζης όμως δεν επηρεάζει το ίδιο την απευθείας έκκριση ινσουλίνης όσο την ίδια την έκφραση του γονιδίου. Αυτό επιβεβαιώνεται από τις έρευνες των Kanoni et al., που παρέθεσαν πως, εξωτερική πρόσληψη ψευδαργύρου ακυρώνει το φαινόμενο αύξησης της γλυκόζης που προκαλείται από το αλληλόμορφο *rs13266634* SLC30A8.

Σε κάθε περίπτωση προτείνεται περαιτέρω έρευνα, γιατί τα δεδομένα αυτά προέρχονται από δείγμα πληθυσμού Κινέζων-Χαν και επιβάλλεται να διασταυρωθούν τα ευρήματα με έρευνες που θα χρησιμοποιούν διαφορετικής εθνικότητας δείγματα.[46]

#### 4.11 FTO

Υπάρχουν ήδη αρκετές έρευνες που κατατάσσουν τους πολυμορφισμούς του συγκεκριμένου γονιδίου ανάμεσα σε αυτούς που συνδέονται ισχυρά με τη μάζα του λίπους και την παχυσαρκία, που έτσι και αλλιώς αποτελεί παράγοντα υψηλού κινδύνου για την εμφάνιση ΣΔ2. Το γονίδιο FTO (fat mass and obesity associated gene) βρίσκεται στον γενετικό τόπο 16q12.2 και εμπλέκεται σε διάφορα μοριακά μονοπάτια που ενισχύουν την παχυσαρκία και άλλες μεταβολικές ασθένειες. Αν και πολλοί συσχέτισαν αργότερα το γονίδιο και με την εμφάνιση του ΣΔ2, υπήρξαν και αυτοί που δεν μπόρεσαν να αναπαράγουν τα αποτελέσματα. Αν και ο BMI θεωρείται χρήσιμος δείκτης για τις αναλύσεις, ενδεχομένως δεν επικυρώνει την ανεξάρτηση της σχέσης του FTO με το ΣΔ2 από την επιρροή της παχυσαρκίας. Για να πιστοποιηθεί η εγκυρότητα των αποτελεσμάτων έγινε μια μελέτη σε πληθυσμό Γιαπωνέζων με διαφορετικές συνθήκες στον BMI κατά την ενήλικη ζωή των υποκειμένων. Βρέθηκαν δυο SNPs (*rs1121980* και *rs1558902*) τα οποία έδειξαν συσχέτιση με το ΣΔ2 μόνο όταν η ανάλυση έγινε βάση φύλου και διαχωρίστηκαν άνδρες από γυναίκες. [25]

Πρόσφατα δεδομένα αποδεικνύουν πως ανάλογα με το είδος του πολυμορφισμού που εντοπίζεται, αλλάζει το προφίλ και το επίπεδο της έκφρασης του γονιδίου. Ακόμα, η επίδραση των περιβαλλοντικών παραγόντων φαίνεται να επηρεάζει την επίδραση της έκφρασής του. Οι πιο πρόσφατα ανακαλυφθέντες πολυμορφισμοί του είναι: *rs1421085*, *rs8050136* και *rs9939609*. Το FTO φαίνεται να επηρεάζει σημαντικά και τη δράση άλλων γονιδίων. [42]

Τελικά δεν έχει πιστοποιηθεί κάποια άμεση επίδραση στην εμφάνιση ΣΔ2, όσο η έμμεση συνεισφορά του στην ασθένεια μέσω κυρίως της παχυσαρκίας και της επιρροής του σε άλλα γονίδια. Χρειάζεται περαιτέρω έρευνα για τους τρόπους με τους οποίους το γονίδιο επηρεάζει τις διάφορες μεταβολικές οντότητες.

#### 4.12 KCNQ1

Ακόμα ένα γονίδιο που φαίνεται να έχει έντονο ρόλο στην ανάπτυξη του ΣΔ2 είναι το KCNQ1. Βρίσκεται στη θέση 11p15.5 και εκφράζεται κυρίως στην καρδιά και το πάγκρεας και δευτερευόντως στον πνεύμονα, το ήπαρ, τα νεφρά και τον πλακούντα. Κωδικοποιεί την υπομονάδα α που συμμετέχει στο σχηματισμό των πόρων του τάση-εξαρτώμενου διαύλου

καλίου ( $K^+$ ). Όταν αυτός δεν λειτουργεί σωστά προκαλούνται διάφορες ασθένειες και σύνδρομα (QT syndrome, Lange-Nielsen κ.α.) καθώς και καρδιακές ανωμαλίες. Στα νεφρά ενισχύεται η μεταφορά που εξαρτάται από τα  $Na^+$  ενώ στο πάγκρεας εκφράζεται στα β-κύτταρα και ο τρόπος που επιδρά στην εμφάνιση ΣΔ2 δεν έχει αποσαφηνιστεί. Τα SNPs που έχουν εντοπιστεί και σχετίζονται με την εμφάνιση της ασθένειας είναι: *rs2283228*, *rs2237897*, *rs2237895*. Μετά από έρευνες, σε ποντίκια στα οποία απενεργοποιήθηκε η λειτουργία του γονιδίου, μέσω ομόζυγης μετάλλαξης, αυτά δεν εμφάνισαν υπεργλυκαιμία ούτε δυσανεξία στη γλυκόζη. Από αυτό το αποτέλεσμα θεωρείται, λογικό το συμπέρασμα, πως η αυξημένη έκφραση του γονιδίου στα β-κύτταρα είναι υπεύθυνη για την εμφάνιση ΣΔ2. Εντούτοις αυτό δεν έχει διευκρινιστεί, καθώς υπάρχουν και ενδείξεις πως ένα γειτονικό γονίδιο το *CDKN1C* φαίνεται να επηρεάζεται και να θέτει υποψηφιότητα για την ασθένεια. [51]

#### 4.13 CDKAL1

Ένα γονίδιο που εμφανίζεται συχνά στις λίστες με τα υποψήφια για ΣΔ2 γονίδια είναι το: *CDKAL1*. Αυτό το γονίδιο βρίσκεται στο γενετικό τόπο 6p22.3 και η λειτουργία του προϊόντος που κωδικοποιεί δεν είναι γνωστή, επειδή ανήκει όμως στην οικογένεια των *CDK15* (κινάσες εξαρτώμενες από κυκλίνη) έχει κάποιο ρόλο στην απώλεια της λειτουργίας των β-κυττάρων σε γλυκοτοξικές συνθήκες. Έχουν εντοπιστεί τουλάχιστον δυο πολυμορφισμοί που επηρεάζουν τη λειτουργία του συγκεκριμένου γονιδίου (*rs10946398*, *rs7756992*) και αυτή (η δυσλειτουργία) αντιστοιχεί στη μείωση της έκκρισης της ινσουλίνης με υποτελή τρόπο. Σε μελέτες έχει βρεθεί ως και 20% μειωμένη απόκριση στην ινσουλίνη στους ομοζυγώτες ασθενείς-υποκείμενα σε σχέση με τους ετεροζυγώτες. [8, 49]

#### 4.14 HHEX

Υποψήφιο γονίδιο για την εμφάνιση ΣΔ2 θεωρείται και το *HHEX*, το οποίο κωδικοποιεί έναν μεταγραφικό παράγοντα που είναι απαραίτητος για το σχηματισμό του κοιλιακού παγκρέατος κατά το εμβρυακό στάδιο και εδράζεται στο 10q23.33 γενετικό τόπο. Τα υποκείμενα που είναι φορείς του αλληλόμορφου *rs1111875*, εμφανίζουν δυσλειτουργία την έκκριση της ινσουλίνης, που προκαλείται από είτε από τη γλυκόζη είτε από την

τολβουταμίδη (ουσία που ανήκει στις σουλφονουλουρίες, που χρησιμοποιούνται για τη ρύθμιση του ΣΔ2). Αυτό συμβαίνει πιθανόν λόγω της κακής ανάπτυξης του παγκρέατος, (κατά το εμβρυακό στάδιο όπως αναφέρθηκε προηγουμένως), το οποίο κατ' επέκταση καθιστά το άτομο ευαίσθητο σε καταπονήσεις (stress) των β-κυττάρων κατά την ενήλικη ζωή. [21]

#### 4.15 CDKN2A

Ακόμα ένα γονίδιο που φαίνεται να επηρεάζει την εμφάνιση ΣΔ2 μέσω της επιρροής του στη λειτουργία των β παγκρεατικών κυττάρων είναι το CDKN2A. το γονίδιο αυτό βρίσκεται στον 9q21.3 γενετικό τόπο και εμφανίζει μετάγραφα με διαφορετικά μοτίβα συρραφής. Ένα από αυτά κωδικοποιεί την πρωτεΐνη P16INK4A, έναν καταστολέα όγκων, ο οποίος όμως επηρεάζει την ανάπτυξη των β-κυττάρων και εκφράζεται στα λιποκύτταρα και το πάγκρεας. Σε μελέτες που έγιναν εντοπίστηκε το αλληλόμορφο *rs10811661*, το οποίο εμφάνισε υψηλές τιμές στην πιθανότητα για την εμφάνιση ΣΔ2 στα υποκείμενα. Σε δύο μελέτες που εξέτασαν διαφορετικά πληθυσμιακά δείγματα, εμφανίστηκε προβληματική έκκριση στην ινσουλίνη που πυροδοτούνταν είτε από τη γλυκόζη είτε την τολβουταμίδη, στα υποκείμενα που έφεραν τον πολυμορφισμό, υποδεικνύοντας και στις δύο περιπτώσεις έναν υποτελή βαθμό κληρονομικότητας.

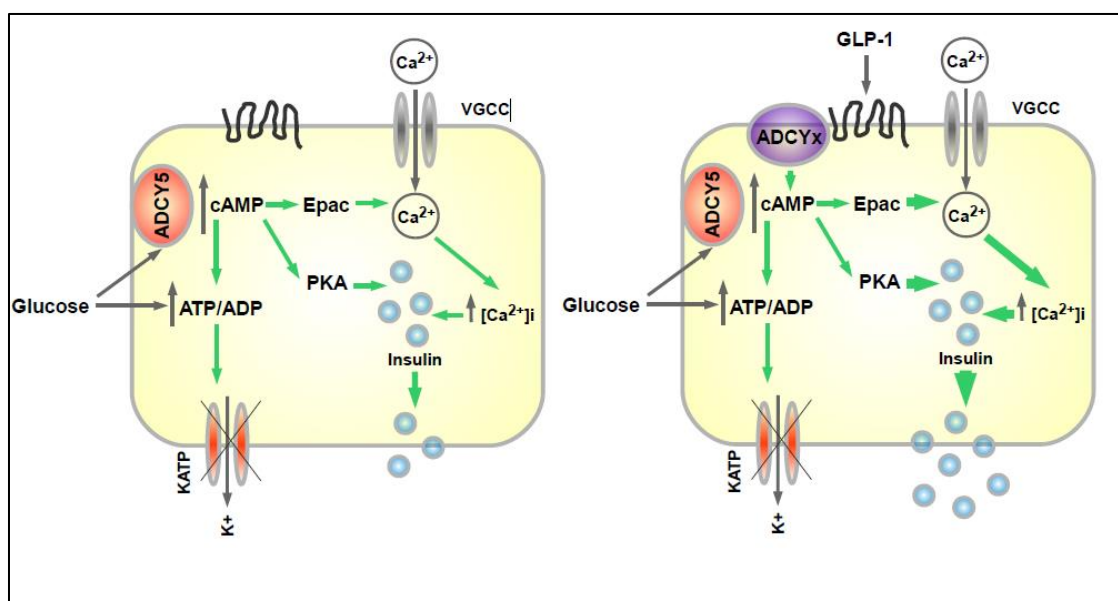
Τα αποτελέσματα δείχνουν πως, η μη αποτελεσματική έκκριση ινσουλίνης σε συνθήκες που απαιτούν υψηλή έκκριση αυτής, πιθανόν συμβαίνει εξαιτίας της μειωμένης μάζας των β-κυττάρων. [21]

#### 4.16 ADCY5

Το γονίδιο της αδενυλικής κυκλάσης 5 (ADCY5) βρίσκεται στη θέση 3q21.1. κωδικοποιεί ένα ένζυμο, μιας μεγάλης οικογένειας ενζύμων, το οποίο εμπλέκεται στη σύνθεση της cAMP, η οποία με τη σειρά της ενεργοποιεί την πρωτεϊνική κινάση A, τη μεταγραφή του γονιδίου της ινσουλίνης αλλά και ενεργοποιεί τις διαδικασίες έκκρισης της ινσουλίνης. Πιο απλά, είναι ένα μόριο πολύ σημαντικό για τα σηματοδοτικά μονοπάτια του κυττάρου (Εικόνα 4.7). Μέχρι στιγμής έχουν ταυτοποιηθεί δυο πολυμορφισμοί που διαταράσσουν τη λειτουργία του γονιδίου (*rs11708067*, *rs2877716*) και τα αποτελέσματα των μελετών υποδεικνύουν ότι μειωμένη έκφραση του γονιδίου και κατ' επέκταση μειωμένη λειτουργία



οδηγούν στην παθογένεση ΣΔ2. Φαίνεται ότι οι ινκρετίνες όπως το GLP-1, παραμένουν επαρκείς να προκαλέσουν την έκκριση ινσουλίνης απουσία του ADCY5, κάτι που ισχυροποιεί την άποψη ότι η ελλειμματική λειτουργία του γονιδίου συμβάλλει στην μειωμένη γλυκόζη νηστείας, δεδομένο που προκύπτει από τη χαμηλή έκφραση του γονιδίου στο πάγκρεας, που εμφανίζουν τα υποκείμενα που φέρουν το αλληλόμορφο *rs11708067*. Αυτή η παρατήρηση πιστοποιείται να εμφανίζεται και σε ασθενείς που πάσχουν από ΣΔ2 έναντι υγιών υποκειμένων. [23]



**Εικόνα 4.7:** Σχηματική αναπαράσταση της λειτουργίας του ADCY5 στα ανθρώπινα παγκρεατικά κύτταρα. Η εξαρτώμενη από τη γλυκόζη έκκριση ινσουλίνης (GSIS) βασίζεται σε KATP -εξαρτώμενα και -ανεξάρτητα σήματα. Τα τελευταία περιλαμβάνουν την σύνθεση της cAMP και αυτό πιθανά να απαιτεί ενεργοποίηση του ADCY5 από τη γλυκόζη ώστε να αυξηθεί η σύνθεση ATP, ακόμα φαίνεται η εισροή  $Ca^{2+}$  και η εξωκύτωση (αριστερά). Σε αντίθεση, οι ινκρετίνες όπως το GLP-1, που θεωρούνταν πως ενεργοποιούν τα cAMP-μονοπάτια, μάλλον ενισχύουν την έκκριση ινσουλίνης μέσω άλλων ADCY(x) (δεξιά).

Hodson, D. J., Mitchell, R. K., Marselli, L., Pullen, T. J., Gimeno Brias, S., Semplici, F., ... Rutter, G. A. (2014). ADCY5 Couples Glucose to Insulin Secretion in Human Islets. *Diabetes*, 63(9), 3009–3021. doi:10.2337/db13-1607

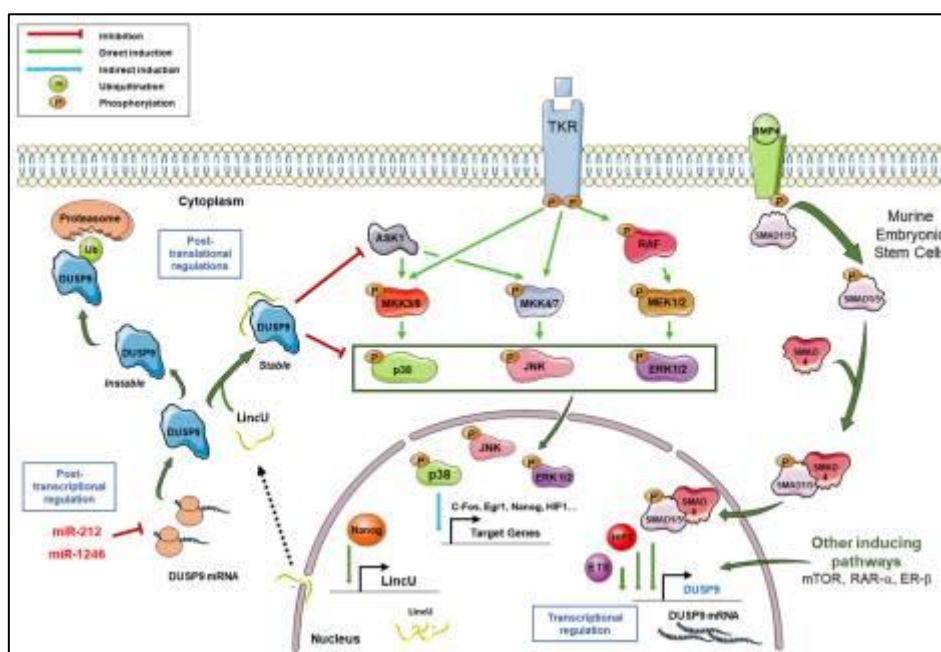
#### 4.17 DUSP9

Ένα από τα υποψήφια γονίδια για ΣΔ2, ανήκει στα φυλετικά χρωμοσώματα, πιο συγκεκριμένα στον γενετικό τόπο Xq28 και είναι το DUSP9. Φυσιολογικά, το γονίδιο εκφράζεται στον πλακούντα, τα νεφρά και το λιπώδη ιστό. Κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη μέλος της υποοικογένειας των φωσφατασών με διπλή εξειδίκευση. Αυτού του τύπου οι πρωτεΐνες ρυθμίζουν αρνητικά τη δράση των κινασών MAPK, οι οποίες εμπλέκονται σε διάφορα σηματοδοτικά μονοπάτια, κυρίως της ανάπτυξης και της διαφοροποίησης των κυττάρων. Η



προβληματική έκφραση του γονιδίου, έχει συσχετιστεί με την εμφάνιση ΣΔ2 και την ανάπτυξη καρκίνου σε διάφορους τύπους κυττάρων. Ο πολυμορφισμός που έχει εντοπιστεί σε διάφορους πληθυσμούς και θεωρείται υπεύθυνος για τη συσχέτιση του γονιδίου με τον ΣΔ2 είναι το αλληλόμορφο *rs5945326*. [6]

Καταλήγοντας, για το γονίδιο αυτό, έχει σημαντικό ρόλο στις διαφορές του φύλου, σε μεταβολικές δυσλειτουργίες και στην καρκινογένεση. Όσον αφορά φυσιολογικά μονοπάτια, εμπλέκεται ισχυρά στη ρύθμιση της σηματοδότησης της ινσουλίνης και κατ' επέκταση στην καθοδική φωσφορυλίωση καταρρακτών και μεταβολικών διαδικασιών. Αυτά τα γεγονότα, το καθιστούν ενδεχόμενο θεραπευτικό στόχο για τον έλεγχο της δράσης των MAP κινασών (ERK1/2, JNK, p38 MAPK, ASK1) (Εικόνα 4.8) σε ασθενείς με ΣΔ2 καθώς και άλλες ασθένειες όπως κίρρωση του ήπατος, παχυσαρκία κλπ. [27]



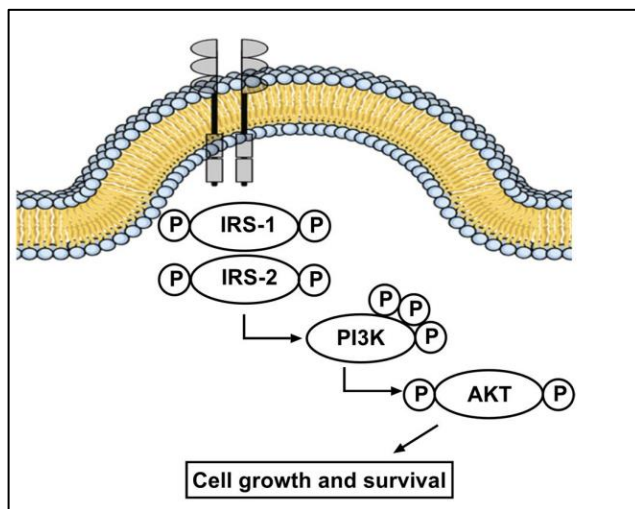
**Εικόνα 4.8:** Η ρύθμιση της έκφρασης του DUSP9 και η σύνδεση του με τα μονοπάτια των MAPK. Ακολουθώντας την ενεργοποίηση των υποδοχέων τυροσίνης-κινάσης (TKR), τα μονοπάτια MAPK ενεργοποιούνται μέσω επιτυχούς γωσγορυλίωσης των MAPKKKs (among which ASK1), MAPKKs MKK3/6, MKK4/7 and MEK1/2, and MAPKs p38, JNK and ERK. Αυτά μεταφέρονται στον πυρήνα και ενεργοποιούν την έκφραση καθοδικών στόχων (c-FOS, ERG1, NANOG and HIF1, among others). Συνοψίζοντας η έκφραση του ρυθμίζεται στενά από μεταγραφικούς, μετά-μεταγραφικούς και μετά-μεταφραστικούς μηχανισμούς.

Khoubaï FZ, Grosset CF. DUSP9, a Dual-Specificity Phosphatase with a Key Role in Cell Biology and Human Diseases. *Int J Mol Sci.* 2021 Oct 26;22(21):11538. doi: 10.3390/ijms22111538. PMID: 34768967; PMCID: PMC8583968.

#### 4.18 IRS-1

Αυτό το γονίδιο βρίσκεται στον γενετικό τόπο 2q36.3 και κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη IRS (Insulin Receptor Substrate) που εμπλέκεται στη μετάδοση του σήματος μεταξύ του υποδοχέα της ινσουλίνης (IR), με τον οποίο συνδέεται, και της φωσφατιδυλοϊνositόλης-κινάσης (PI3K). Η δράση της φαίνεται σχηματικά στην **Εικόνα 2.4** και **Εικόνα 4.9**. Οι πολυμορφισμοί του γονιδίου που εμφανίζουν συσχέτιση με τον ΣΔ2 είναι: *rs1801278*, *rs2943641*, *rs2943640*. Η σχέση που εμφανίζουν οι πολυμορφισμοί του γονιδίου με την ασθένεια αφορούν κυρίως την υπερινσουλιναιμία (είτε νηστείας, είτε προκαλούμενης από τη γλυκόζη) και διαταραχές που αφορούν την ευαισθησία στην ινσουλίνη. Σε πρόσφατες μελέτες, συνδέθηκε ο πολυμορφισμός *rs2943640* με σημαντικά πιο αυξημένες τιμές των λιπιδαιμικών χαρακτηριστικών ασθενών με ΣΔ2 ανεξαρτήτου παρουσίας συννοσηροτήτων. (Marushchak M. et al., 2023).

Φαίνεται πως οι πολυμορφισμοί επηρεάζουν την έκφραση του γονιδίου, και όταν αυτή εμφανίζεται χαμηλότερη του φυσιολογικού υπάρχει μείωση της συγγένειας σύνδεσης με τον υποδοχέα της ινσουλίνης (IR) που οδηγεί κατ' επέκταση στην προβληματική μεταγωγή του σήματος του μονοπατιού. [37, 60, 61]

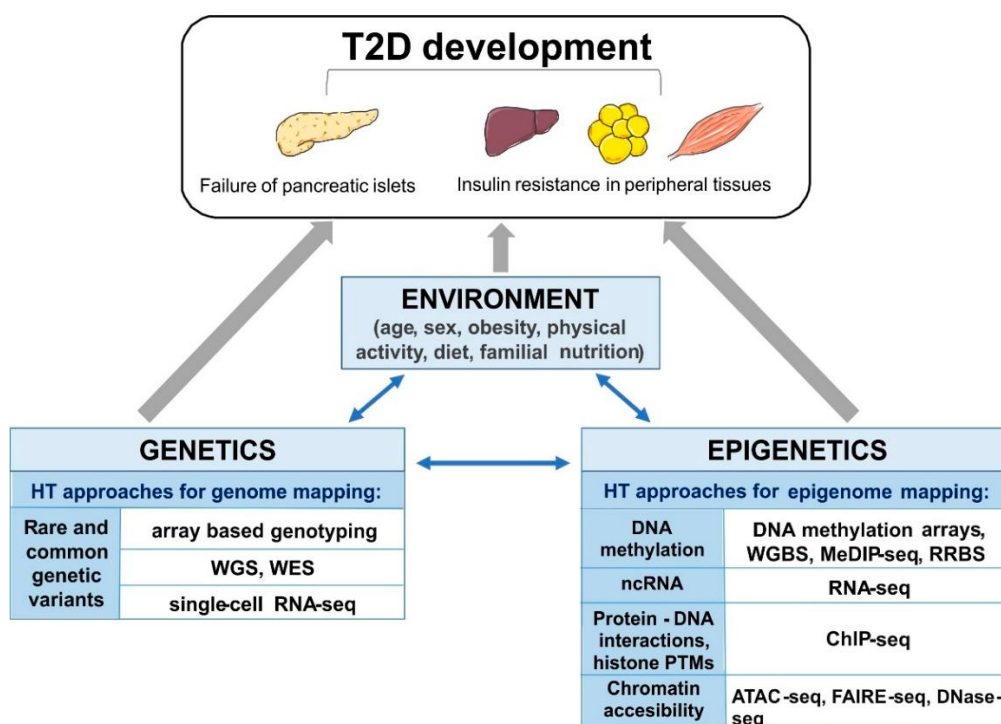


**Εικόνα 4.9:** Το σηματοδοτικό μονοπάτι της PI3K. Η ινσουλίνη συνδέεται στον υποδοχέα της και φωσφορυλιώνει τα IRS-1 and IRS-2 ενεργοποιώντας το μονοπάτι PI3K το οποίο ενισχύει την κυτταρική αύξηση και επιβίωση

De Sousa, R. A. L., Harmer, A. R., Freitas, D. A., Mendonça, V. A., Lacerda, A. C. R., & Leite, H. R. (2020). An update on potential links between type 2 diabetes mellitus and Alzheimer's disease. *Molecular Biology Reports*. doi:10.1007/s11033-020-05693-z

## 5. Συζήτηση-Συμπεράσματα

Ο Σακχαρώδης Διαβήτης Τύπου 2 είναι μια πολυδιάστατη ασθένεια που ταλαιπωρεί τη σύγχρονη κοινωνία με ραγδαία αυξανόμενους ρυθμούς εμφάνισης. Το αυξανόμενο αυτό βάρος, αποζητά νέες και αποτελεσματικές προσεγγίσεις στη θεραπεία της ασθένειας. Για να καταστεί αυτό εφικτό πρέπει να αποσαφηνιστεί ο τρόπος με τον οποίο εμφανίζεται και αναπτύσσεται ο ΣΔ2. Πολυάριθμες μελέτες έχουν συνδέσει μεταλλάξεις, σε διάφορα γονίδια, με την παθογένεια του ΣΔ2. Αυτές οι μεταλλάξεις σε συνδυασμό με περιβαλλοντικά ερεθίσματα προκαλούν την ασθένεια, μέσα από διάφορους μηχανισμούς. Παρά την εξέλιξη των ερευνητικών εργαλείων, έχουν εξηγηθεί και ταυτοποιηθεί στελέχη που αυξάνουν τον κίνδυνο εμφάνισης ΣΔ2 μόλις κατά 10-30%. Η επιγενετική είναι ο τομέας που βοηθάει στην κατανόηση της παθογένειας της ασθένειας και παρέχει τη μοριακή σύνδεση της γενετικής με τους περιβαλλοντικούς παράγοντες.



**Εικόνα 5.1:** Σχηματική αναπαράσταση της αλληλεπίδρασης των παραγόντων που προκαλούν ΣΔ2 (T2D) και των υψηλής ταχύτητας (HT), αλληλούχισης νέας γενιάς (NGS), προσεγγίσεων που χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη των (επι)γενετικών τροποποιήσεων. Whole genome-seq (WGS), whole exome-seq (WES), RNA-sequencing (RNA-seq), single-cell RNA sequencing (single-cell RNA-seq), whole genome bisulfite sequencing (WGBS), reduced representation bisulfite sequencing (RRBS), methylated DNA immunoprecipitation sequencing (MeDIP-seq), chromatin immunoprecipitation sequencing (ChIP-seq), Assay for Transposase-Accessible Chromatin using sequencing (ATAC-seq), Formaldehyde-Assisted Isolation of Regulatory Elements (FAIRE-seq) and DNase I hypersensitive sites sequencing (DNase-seq).

Dziewulska A, Dobosz AM, Dobrznyn A. High-Throughput Approaches onto Uncover (Epi)Genomic Architecture of Type 2 Diabetes. *Genes (Basel)*. 2018 Jul 26;9(8):374. doi: 10.3390/genes9080374. PMID: 30050001; PMCID: PMC6115814.

Ο ρόλος της επιγενετικής, λοιπόν, είναι σημαντικός και έχει ήδη τεκμηριωθεί πως, επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό την εμφάνιση αλλά και την εξέλιξη του ΣΔ2. Αυτό που δεν είναι ακόμα ξεκάθαρο, είναι ο τρόπος με τον οποίο οι επιγενετικές τροποποιήσεις συμβαίνουν, ως απάντηση σε περιβαλλοντικά ερεθίσματα, αλλά και οι μηχανισμοί δράσης τους.

Οι γενετικοί τόποι που συσχετίζονται με το ΣΔ2 έχουν ταυτοποιηθεί μέσω των GWAS και έχει βρεθεί ότι οι περισσότεροι από αυτούς σχετίζονται κυρίως με την παρεμπόδιση της έκκρισης ινσουλίνης και την ευαισθησία στην ινσουλίνη. Εντούτοις, οι μοριακοί μηχανισμοί μέσω των οποίων οι πολυμορφισμοί επηρεάζουν τη γονιδιακή λειτουργία παραμένουν αδιευκρίνιστοι.

## 5.1 Συγκριτική μελέτη

Με τα δεδομένα που συγκεντρώθηκαν, μέσω αυτής της εργασίας μπορεί να γίνει μια συγκριτική μελέτη μεταξύ των γονιδίων που εμφανίζουν μεθυλιώσεις και σχετίζονται με το ΣΔ2 κι αυτών που εμφανίζουν άλλους πολυμορφισμούς και εμπλέκονται στην ανάπτυξη και εξέλιξη της ασθένειας.

Στα προηγούμενα κεφάλαια έγινε ανάλυση των γονιδίων που έχουν μέχρι σήμερα εντοπιστεί και, μέσω της διαφοροποιημένης μεθυλίωσής τους, σχετίζονται με την παχυσαρκία και διάφορους τύπους διαβήτη, κυρίως το Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 2. Με βάση τα δεδομένα που συλλέχθηκαν από την υπάρχουσα βιβλιογραφία, καταγράφονται τουλάχιστον 17 γονίδια που μεθυλιώνονται και σχετίζονται άμεσα με την παχυσαρκία και διάφορα γλυκαιμικά χαρακτηριστικά (HIF3A, CPT1A, CD38, ABCG1, SREBF1, SOCS3, IL8, MECP2, PHGDH, FTO, PDE7B, IRS1, KCNQ1, DNMT3B, HDAC4, MC4R, SLC9A3) (**Εικόνα 3.2**). Από αυτά, έξι (6), έχουν συσχετιστεί και με τον ΣΔ2 (ABCG1, FTO, PDE7B, IRS1, KCNQ1, HDAC4) επιβεβαιώνοντας τη σύνδεση της παχυσαρκίας ως βασικό παράγοντα κινδύνου ανάπτυξης ΣΔ2.

Όσον αφορά τα γονίδια, των οποίων οι μεθυλιώσεις τα εμπλέκουν με την εμφάνιση της ασθένειας, βρέθηκαν σε αυτή την εργασία και καταγράφηκαν τα 80 πιο σημαντικά-αυτά που εμφανίζουν στατιστικά σημαντικό σήμα στις αναλύσεις- από τα εκατοντάδες που αναφέρει η βιβλιογραφία ότι έχουν καταγραφεί. (**Πίνακας 5.1**) και φέρουν χιλιάδες θέσεις μεθυλιώσεων CpGs.

Πίνακας 5.1: Συγκεντρωτική λίστα των γονιδίων, που αναφέρονται στην παρούσα εργασία, και των οποίων η διαφοροποιημένη μεθυλίωση σχετίζεται με την ανάπτυξη ΣΔ2									
INS	PDK4	NR4A3	NR4A1	HHEX	IRS1	GPR61	MALT1	CTBP1	CCND1
PDX-1	PON1	THADA	SOCS2	FTO	PARK2	PRKCB	ZNF518B	RPS6KA1	WNT11
GLP-1	CATSPER2	HDAC10	LEP	ADCY6	FGF21	ARX	ZNF668	ARHGEF16	HSPA2
PPARG1A	ZDHHC11	HDAC7	HNF4A	ADCY5	MBD4	TFAM	PHOSPHO1	PDGFA	MYO5A
EXOC3L2	PRSS21	HDAC4	SYT7	KCNQ1	XBP1	H19	FHL2	ABR	SFT2D3
TCF7L2	MOGAT1	SEPT9	LPAL2	KLF14	LTBR	SLC30A8	FAM123C	PRKCE	TWIST1
PID1	DUSP9	PDE7B	LGTM	KLF11	NCALD	RIPK4	ABCG1	ALOX2	C8orf31
ADIPOQ	CDKN1A	CDKN2A	GRB10	PRDM16	OXT	ABCC3	GNAS	PAMR1	CD320

Κάνοντας μια σύγκριση στα δεδομένα αυτής της μελέτης, τα 80 καταγεγραμμένα γονίδια των οποίων όταν η μεθυλίωση αλλάζει επηρεάζεται η ανάπτυξη ΣΔ2 και τα 70 που παρουσιάζουν μεταλλάξεις-πολυμορφισμούς και εμπλέκονται στην εμφάνιση της ασθένειας, εντοπίζονται κοινά γονίδια τα οποία εμφανίζουν και μεθυλώσεις και πολυμορφισμούς (SNPs). Τα γονίδια αυτά είναι 15: (INS, CDKN2A, KCNQ1, PDX-1, ADCY5, PPARG1A, FTO, HHEX, THADA, IRS1, TCF7L2, DUSP9, KLF11, KLF14, SLC30A8) (Πίνακας 5.2).

Πίνακας 5.2: Τα 15 γονίδια που παρουσιάζουν και διαφοροποιημένη μεθυλίωση αλλά και πολυμορφισμούς SNPs και σχετίζονται με ΣΔ2. (συνδυασμός στοιχείων Πίνακα 3.1 και Πίνακα 4.1)				
ΓΟΝΙΔΙΟ	ΠΛΗΡΕΣ ΟΝΟΜΑ	ΓΕΝΕΤΙΚΟΣ ΤΟΠΟΣ	ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ	ΤΥΠΟΣ ΜΕΘΥΛΙΩΣΗΣ
INS	Insulin Gene	11p15.5	Increases endoplasmic reticulum (ER) stress, leading to gradual pancreatic beta cell death	Insulin expression is downregulated in T2D islets by promoter hypermethylation
TCF7L2	Transcription Factor 7-like 2	10q25	It disrupts glucagon-like peptide-1-induced insulin secretion. It also hinders the maturation of new $\beta$ cells.	Differential methylation, DMR
HNF4A/TCF1	Hepatocyte Nuclear Factor 4 Alpha	20q12	Alterations of transcriptional binding sites in the pancreas, leading to beta cell malfunction.	Differential methylation, DMR
PPARG	Peroxisome Proliferator Activated Receptor gamma	3p25.2	It lessens the binding affinity of the receptor PPAR $\gamma$ -RXR complex, causing reduced transcriptional activity of certain genes involved in glucose metabolism. It may also cause obesity, culminating in insulin resistance.	PPARGC1A expression is downregulated in T2D islets by promoter hypermethylation
SLC30A8	Zinc Transporter-8 Gene	8q24.11	Affects zinc accumulation in insulin granules and hence influences insulin stability and insulin trafficking.	Differential methylation, DMR
(συνεχίζεται...)				

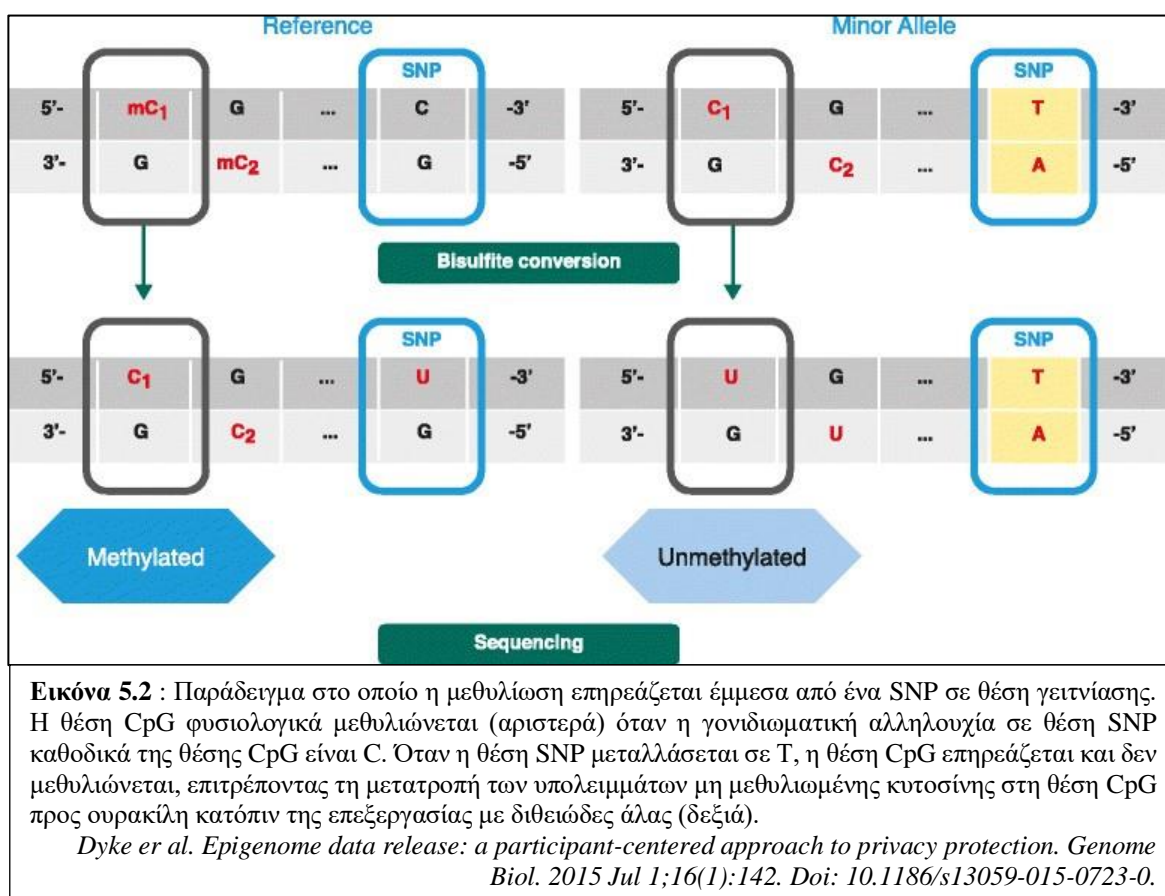
<b>IPF-1/PDX-1</b>	Insulin Promoter Factor/Pancreatic Duodenal Homeobox	13q27.92	It affects the transcription of the insulin gene, causing an impaired response to elevated levels of glucose.	PDX1 expression is downregulated in T2D islets by promoter and enhancer hypermethylation
<b>KLF11</b>	Kruppel-like Factor 11	2p25.1	Causes oxidative stress in the pancreas, which impairs the activation of insulin promoter and beta cell physiology.	Differential methylation, DMR
<b>KLF14</b>	Kruppel-like Factor 14	7q32.2	Causes reduction in PGC -1 $\alpha$ , inhibiting glucose production in the hepatocytes	Differential methylation, DMR
<b>HHEX/IDE</b>	Hematopoietically Expressed Homeobox	10q23.33	Inhibits the maturation of islet $\delta$ cells to $\beta$ cells, hampering the release of insulin from $\beta$ cells.	Differential methylation, DMR
<b>FTO</b>	Fat Mass and Obesity-Associated Gene/Alpha-Ketoglutarate	16q12.2	Increases body mass index (BMI), leading to obesity and insulin resistance.	Differential methylation, DMR
<b>THADA</b>	Armadillo Repeat Containing Gene	2p21	Reduces beta cell mass due to increased apoptosis, culminating in insulin sensitivity.	Differential methylation, DMR
<b>KCNQ1</b>	Potassium Voltage-gated Channel Subfamily KQT Member 1	11p15.5	Starts off beta-cell dysfunction.	Differential methylation, DMR
<b>IRS1</b>	Insulin Receptor Substrate 1	2q36.3	Increases insulin resistance.	Differential methylation, DMR
<b>ADCYS</b>	Adenylatecyclase 5	3q21.1	Decreases insulin sensitivity.	Differential methylation, DMR
<b>DUSP9</b>	Dual Specificity Phosphatase	9 Xq28	It raises the serum alkaline phosphatase, culminating in high fasting serum glucose	Differential methylation, DMR

Παρατηρήθηκε ότι όλα τα γονίδια που είναι κοινά για τις δύο περιπτώσεις αφορούν άμεσα την πορεία της ινσουλίνης (παραγωγή, ωρίμανση, έκκριση, ευαισθησία/αντίσταση), είτε τη λειτουργία των  $\beta$ -κυττάρων, είτε την πορεία της γλυκόζης. Η βιβλιογραφία αναφέρει ότι φαίνεται να υπάρχει σχέση αλληλεπίδρασης μεταξύ της μεθυλίωσης και των SNPs σε ένα γονίδιο (ή/και σε διαφορετικά), γεγονός που αναλύεται παρακάτω.

## 5.2 Συνέργεια μεταξύ CpG-SNPs

Μελέτες έχουν δείξει ότι στα παγκρεατικά νησίδια, [11] 19 από τα 40+ γνωστά SNP, εισάγουν ή διαγράφουν θέσεις CpG, που είναι πιθανές θέσεις μεθυλίωσης και σχετίζονται με τη διαφοροποιημένη μεθυλίωση. Εντυπωσιακό είναι το γεγονός πως 6 από αυτά, σχετίζονται με τη διαφοροποιημένη μεθυλίωση περιφερειακών CpG-SNP θέσεων και επηρεάζουν, εκτός από τη γονιδιακή έκφραση, το εναλλακτικό μάτισμα και την έκκριση διαφόρων ορμονών του παγκρέατος. Επιπλέον, 19 SNP, που σχετίζονται με το ΣΔ2, είναι σε ισχυρή γενετική σύνδεση με άλλα 91 SNP, που δεν σχετίζονται με την ασθένεια, στα οποία παρατηρείται αλλαγή στη μεθυλίωση τους.





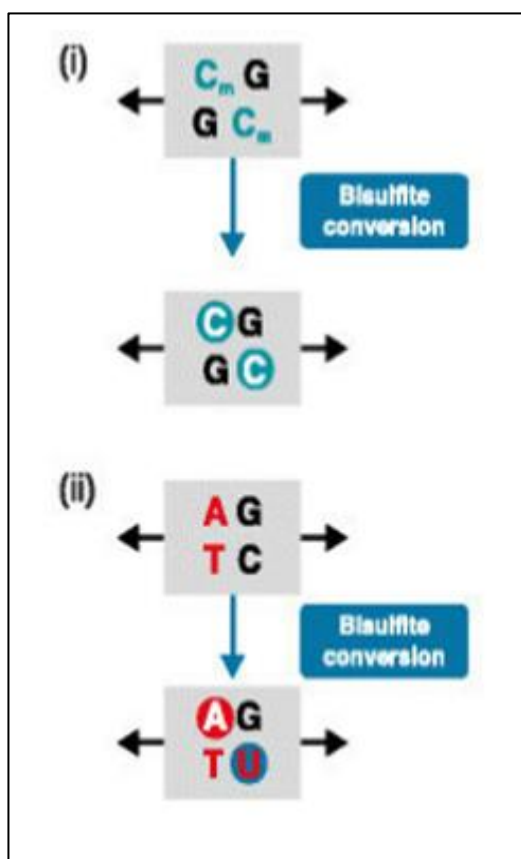
Ένα ενδιαφέρον χαρακτηριστικό των CpG θέσεων είναι η προδιάθεση τους στις μεταλλάξεις γεγονός που τις καθιστά «hot-spots» των γενετικών ασθενειών. Περίπου το 30% των σημειακών μεταλλάξεων στους ανθρώπους είναι αποτέλεσμα της μεθυλίωσης του DNA. Αυτό συμβαίνει επειδή, οι μεθυλιωμένες κυτοσίνες απαμινώνονται, υδρολυτικά, σε θυμίνες, μια βάση γνώριμη στο σύστημα επιδιόρθωσης του DNA, και έτσι δεν επιδιορθώνονται (σε αντίθεση με την απαμίνωση της κυτοσίνης που οδηγεί σε ουρακίλη, μια βάση ξένη για την αλληλουχία του DNA η οποία και επιδιορθώνεται). Δυστυχώς, δεν υπάρχουν επιπλέον δεδομένα που να τεκμηριώνουν, επακριβώς, το ποσοστό των SNPs που σχετίζονται με τον ΣΔ2 που είναι CpG-SNPs, παρά μόνο κάποιες επιμέρους μελέτες που φέρνουν, συνεχώς, στην επιφάνεια νέα δεδομένα. Το 2020, οι Wang et al., σε έρευνα που συνδυάζε τη μελέτη των CpG-SNPs του ΣΔ2 και της καρδιαγγειακής νόσου (CAD), εντόπισαν 98 νέα CpG-SNPs σχετικά με το ΣΔ2, που αντιστοιχήθηκαν σε 10 γονίδια, 2 εκ των οποίων δεν είχαν συσχετιστεί στο παρελθόν με την ασθένεια. Αυτά είναι τα: DLEU1 (εμπλέκεται στην κυκλοφορία των λιπαρών οξέων και στην έκφραση του CDK1, Wang et al., 2017) και το EIF5A2 (εμπλέκεται στο σηματοδοτικό μονοπάτι της αντίστασης στην ινσουλίνη, Zhou et al., 2015). Ακόμα, απέδειξαν ότι, γνωστά, υποψήφια γονίδια του ΣΔ2



(SLC22A2, KNCQ1, CDKN2B-AS1, CDKAL1) περιέχουν CpG-SNPs που συνεργατικά επιδρούν στη μεθυλίωση του DNA και την έκφρασή τους. Τέλος, προτείνουν ότι πιθανά τα CpG-SNPs να εμπλέκονται στην παθογένεια του ΣΔ2 μέσω του μεταβολισμού των κετονών. Λίγο αργότερα, το 2021, οι Liu et al., σε συνδυαστική έρευνα για τον ΣΔ2 και το βάρος γέννησης (birth weight), εντόπισαν 103 νέα CpG-SNPs με 55 από αυτά να είναι πλειοτροπικά. Από το σύνολο των 103 καινούργιων CpG-SNPs, 35 από αυτά, εντοπίστηκαν σε γονίδια που δεν είχαν προηγουμένως συσχετιστεί με τον ΣΔ2. Για παράδειγμα ο πολυμορφισμός, *rs11073964*, εντοπίστηκε στο γονίδιο *VPS33B (15q26.1)*, κωδικοποιεί την πρωτεΐνη 33B (Vascular Protein Sorting-associated protein), η σχέση του όμως με την ασθένεια δεν είναι πλήρως γνωστή. Ένα άλλο καινούργιο CpG-SNP (*rs12786533*) εντοπίστηκε στο γονίδιο *KCNQ1DN (KCNQ1 downstream neighbor)* και ακόμα, επτά νέα CpG-SNPs (*rs151216*, *rs163171*, *rs163177*, *rs2237892*, *rs231354*, *rs234857*, and *rs3852527*) αποδίδονται στο *KCNQ*. Θεωρήθηκε πιθανό, όπως παρατηρήθηκε και προηγουμένως, αυτοί οι «γειτονικοί» πολυμορφισμοί να δρουν με συνεργατικό τρόπο προκειμένου να ρυθμίσουν τη γονιδιακή έκφραση και να επιτελέσουν το ρόλο τους στην παθογένεια του ΣΔ2 (**Εικόνα 5.2**).

Συγκεντρωτικά δεδομένα υποστηρίζουν ότι υπάρχει εκτενής διασταυρούμενη επικοινωνία (crosstalk) μεταξύ της μεθυλίωσης του DNA, της γονιδιακής έκφρασης, της σύνδεσης των μεταγραφικών παραγόντων, που ελέγχουν την γονιδιακή έκφραση, καθώς και της έκθεσης σε περιβαλλοντικά ερεθίσματα. Όλα αυτά τα γεγονότα, συνδυαστικά, καθιστούν ένα άτομο επιρρεπές σε διάφορες ασθένειες. (Cowley et al., 2018; Meehan et al., 2018; Pathak and Feil, 2018; Strakovsky and Schantz, 2018; Zhu et al., 2018).

Όλο και περισσότερα δεδομένα έρχονται στην επιφάνεια τα τελευταία δυο χρόνια που υποδεικνύουν ότι το αποτέλεσμα ενός σημειακού πολυμορφισμού (SNP), εντείνεται εισάγοντας/απαλείφοντας θέσεις μεθυλίωσης και κατ' αυτόν τον τρόπο επηρεάζεται η επιστράτευση ή η απώθηση των μεταγραφικών παραγόντων (**Εικόνα 5.3**). Η εξειδίκευση αυτών (των παραγόντων) είναι που, τελικά, αυξάνει ή μειώνει το πλήθος των μετάγραφων ενός αλληλόμορφου γονιδίου και η αλλαγή αυτή είναι το κλειδί στον κίνδυνο εμφάνισης μιας ασθένειας. Αυτό το μοντέλο αναφέρεται ως SNP intensifier («ενισχυτής» SNP) [54, 55]



Τα CpG-SNPs είναι πολύ πιθανό να αποτελούν έναν μοριακό μηχανισμό μέσω του οποίου ένας σημειακός πολυμορφισμός μπορεί να επηρεάσει το φαινότυπο. Ένα σενάριο που έχει προταθεί είναι ότι, το CpG-SNP επηρεάζει τη μεθυλίωση

**Εικόνα 5.3:** Η άμεση επίδραση SNPs στη μεθυλίωση πρόσθιας και ανάστροφης αλυσίδας εντός CpG («απώλεια CpG»). i) στις αναγνώσεις και των δύο κλώνων του άγριου τύπου αλληλόμορφου, τυχόν μεθυλιωμένη C παραμένει ως C μετά τη μετατροπή με διθειώδες άλας και προσμετράται ως μεθυλιωμένη. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα μια μέση διαφορά μεθυλίωσης μεταξύ των κλώνων του. ii) Για το αλληλόμορφο όπου η μεθυλιωμένη C έχει αντικατασταθεί από A, στις αντίστοιχες αναγνώσεις του πρόσθιου κλώνου υπάρχει A στη θέση CpG και έτσι δεν υπολογίζεται ως θέση μεθυλίωσης, ενώ στις αναγνώσεις του αναστροφικού κλώνου η C στο CpG διατηρείται και υπολογίζεται ως θέση μεθυλίωσης και καταγράφεται ως C αν είναι μεθυλιωμένη ή U/T αν δεν είναι, μετά την κατεργασία με διθειώδες άλας.

Dyke et al. Epigenome data release: a participant-centered approach to privacy protection. *Genome Biol.* 2015 Jul 1;16(1):142. Doi: 10.1186/s13059-015-0723-0.

του DNA της γύρω περιοχής η οποία, με τη σειρά της, επηρεάζει την έκφραση του γονιδίου επιτρέποντας/αποτρέποντας τη σύνδεση πρωτεϊνών, όπως αναφέρθηκε στην προηγούμενη παράγραφο. Ένα δεύτερο σενάριο υποδεικνύει την περίπτωση τα CpG-SNPs να επηρεάζουν το μάτισμα μέσω της μεθυλίωσης του DNA επειδή το σωματίο συρραφής αδυνατεί να ξεχωρίσει πλέον, τα ιντρόνια από τα εξόνια. Μια ακόμα πρόταση είναι ότι, το μεθυλιωμένο DNA επηρεάζει το ρυθμό ανασυνδυασμού ενώ μια άλλη άποψη ενισχύει τη σχέση των CpG-SNPs με καθοδικές τροποποιήσεις, του mRNA ή/και της μετάφρασης.

Μια πιθανή εξήγηση της δυσκολίας στην αποσαφήνιση της δράσης των CpG-SNPs σε σχέση με τη γονιδιακή έκφραση, είναι το γεγονός ότι τα υποκείμενα με ομόζυγο μεταλλαγμένο στέλεχος είναι σπάνια ως απόντα και η βαθύτερη μελέτη του φαινότυπου που προκαλεί η μετάλλαξη καθίσταται δύσκολη.

Σταχυολογώντας τα δεδομένα της παρούσας εργασίας, πιστοποιείται η πολυπαραγοντική φύση του Σακχαρώδους Διαβήτη Τύπου 2, καθώς γίνεται σαφές ότι η εμφάνιση και η εξέλιξη της ασθένειας επηρεάζεται με διάφορους τρόπους. Οι πληροφορίες για τα υποψήφια γονίδια είναι πολλές και είναι δύσκολη η πλήρης παράθεσή τους, αφού συνεχώς νέες μελέτες προσθέτουν γνώση και δεδομένα στα ήδη υπάρχοντα. Εντούτοις μπορεί να γίνει

μια επισήμανση ότι τα γονίδια, για τα οποία έχουν συγκλίνει οι ερευνητές, ότι εμφανίζονται συχνότερα στα μοτίβα μεταλλάξεων είναι κατά μεγάλο ποσοστό όμοια με αυτά που εμφανίζουν συχνότερα επιγενετικές τροποποιήσεις. Πιθανή εξήγηση αυτής της παρατήρησης είναι ότι, ενδεχομένως οι τροποποιήσεις, είτε γενετικές, είτε επιγενετικές, είτε ο συνδυασμός τους, διαταράσσουν σημαντικά παθοφυσιολογικά μονοπάτια της ασθένειας. Μια άλλη εξήγηση θα μπορούσε να αφορά το προαναφερθέν χαρακτηριστικό των CpG-SNPs, ότι αυτά αποτελούν «hot-spot» μεταλλάξεων. Σε κάθε περίπτωση, είναι ξεκάθαρη η πολυπλοκότητα που χαρακτηρίζει το γενετικό προφίλ της ασθένειας και η σημαντικότητα των επιγενετικών τροποποιήσεων σε αυτό. Αυτά τα αποτελέσματα, θα οδηγήσουν μελλοντικές έρευνες να χρησιμοποιήσουν πιο συγκεκριμένα και τυποποιημένα δεδομένα για να αναλύσουν περαιτέρω τις κύριες παθογενετικές διαδικασίες της ασθένειας.

Φαίνεται τελικά, να υπάρχει αλληλεπίδραση μεταξύ γενετικών (SNP) και επιγενετικών (μεθυλίωση του DNA) παραγόντων που επηρεάζουν τον κίνδυνο εμφάνισης ΣΔ2. Προτάθηκαν κάποιοι, πιθανοί, μοριακοί μηχανισμοί που επηρεάζουν τη γονιδιακή έκφραση και λειτουργία μέσω της μεθυλίωσης του DNA και συνεπώς το φαινότυπο της ασθένειας. Τα δεδομένα όμως αυτά, είναι λίγα και εξήχθησαν από μια παλαιότερη μελέτη που αφορά το πάγκρεας καθώς και δυο μόνο πρόσφατες, των τελευταίων δυο ετών. Από αυτά τα στοιχεία, προκύπτει το συμπέρασμα ότι χρειάζεται να εκπονηθούν επιπλέον μελέτες ώστε να αποσαφηνιστεί πλήρως η δράση των CpG-SNPs και τα μέχρι στιγμής δεδομένα υποδεικνύουν πως υπάρχει αρκετός χώρος έρευνας προς αυτή την κατεύθυνση.

Είναι σημαντικό να τονιστεί πως, αυτή η ανάγκη για περαιτέρω έρευνα υπαγορεύεται από το γεγονός ότι χρειάζεται να προστεθεί γνώση στον τομέα της εξατομικευμένης θεραπείας. Αυτή, θα βασίζεται, κυρίως, στο γενετικό προφίλ του ασθενή που θα τον τοποθετεί σε διαφορετική υπό-ομάδα, ανάλογα με την περίπτωση, βασισμένη στο «Hallmarks of Diabetes» (Ahlqvist et al., 2018), και μέσω αυτής της κατηγοριοποίησης θα καταρτίζεται το ανάλογο πλαίσιο αντιμετώπισης/θεραπείας της ασθένειας.

## Βιβλιογραφία

1. Alam, S.; Hasan, M.K.; Neaz, S.; Hussain, N.; Hossain, M.F.; Rahman, T. Diabetes Mellitus: Insights from Epidemiology, Biochemistry, Risk Factors, Diagnosis, Complications and Comprehensive Management. *Diabetology* 2021, 2, 36–50. <https://doi.org/10.3390/diabetology2020004>
2. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2009 Jan;32 Suppl 1(Suppl1): S62-7. doi: 10.2337/dc09-S062. PMID: 19118289; PMCID: PMC2613584.
3. Arneth, B., Arneth, R., & Shams, M. (2019). Metabolomics of Type 1 and Type 2 Diabetes. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(10), 2467. doi:10.3390/ijms20102467
4. Bannister, A. J., & Kouzarides, T. (2011). Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Research*, 21(3), 381–395. doi:10.1038/cr.2011.22
5. Barajas-Olmos, F., Centeno-Cruz, F., Zerrweck, C., Imaz-Rosshandler, I., Martínez-Hernández, A., Cordova, E. J., ... Orozco, L. (2018). Altered DNA methylation in liver and adipose tissues derived from individuals with obesity and type 2 diabetes. *BMC Medical Genetics*, 19(1). doi:10.1186/s12881-018-0542-8
6. Binjawhar DN, Ansari MGA, Sabico S, Hussain SD, Alenad AM, Alokail MS, Al-Masri AA, Al-Daghri NM. Genetic Variants of HNF4A, WFS1, DUSP9, FTO, and ZFAND6 Genes Are Associated with Prediabetes Susceptibility and Inflammatory Markers in the Saudi Arabian Population. *Genes (Basel)*. 2023 Feb 21;14(3):536. doi: 10.3390/genes14030536. PMID: 36980809; PMCID: PMC10048403.
7. Chatterjee, S., Khunti, K., & Davies, M. J. (2017). Type 2 diabetes. *The Lancet*, 389(10085), 2239–2251. doi:10.1016/s0140-6736(17)30058-2
8. Chauhan G, Spurgeon CJ, Tabassum R, Bhaskar S, Kulkarni SR, Mahajan A, Chavali S, Kumar MV, Prakash S, Dwivedi OP, Ghosh S, Yajnik CS, Tandon N, Bharadwaj D, Chandak GR. Impact of common variants of PPARG, KCNJ11, TCF7L2, SLC30A8, HHEX, CDKN2A, IGF2BP2, and CDKAL1 on the risk of type 2 diabetes in 5,164 Indians. *Diabetes*. 2010 Aug;59(8):2068-74. doi: 10.2337/db09-1386. Epub 2010 Apr 27. PMID: 20424228; PMCID: PMC2911051.
9. Chiang, J. L., Kirkman, M. S., Laffel, L. M. B., & Peters, A. L. (2014). Type 1 Diabetes Through the Life Span: A Position Statement of the American Diabetes Association. *Diabetes Care*, 37(7), 2034–2054. doi:10.2337/dc14-1140

10. Davegårdh, C., García-Calzón, S., Bacos, K., & Ling, C. (2018). DNA methylation in the pathogenesis of type 2 diabetes in humans. *Molecular Metabolism*, 14, 12–25. doi: 10.1016/j.molmet.2018.01.022
11. Dayeh, T. A., Olsson, A. H., Volkov, P., Almgren, P., Rönn, T., & Ling, C. (2013). Identification of CpG-SNPs associated with type 2 diabetes and differential DNA methylation in human pancreatic islets. *Diabetologia*, 56(5), 1036–1046. doi:10.1007/s00125-012-2815-7
12. Dayeh T, Volkov P, Salo S, Hall E, Nilsson E, et al. (2014) Genome-Wide DNA Methylation Analysis of Human Pancreatic Islets from Type 2 Diabetic and Non-Diabetic Donors Identifies Candidate Genes That Influence Insulin Secretion. *PLoS Genet* 10(3): e1004160. doi: 10.1371/journal.pgen.1004160
13. Dimas AS, Lagou V, Barker A, Knowles JW, Mägi R, Hivert MF, Benazzo A, Rybin D, Jackson AU, Stringham HM, Song C, Fischer-Rosinsky A, Boesgaard TW, Grarup N, Abbasi FA, Assimes TL, Hao K, Yang X, Lecoœur C, Barroso I, Bonnycastle LL, Böttcher Y, Bumpstead S, Chines PS, Erdos MR, Graessler J, Kovacs P, Morken MA, Narisu N, Payne F, Stancakova A, Swift AJ, Tönjes A, Bornstein SR, Cauchi S, Froguel P, Meyre D, Schwarz PE, Häring HU, Smith U, Boehnke M, Bergman RN, Collins FS, Mohlke KL, Tuomilehto J, Quertemous T, Lind L, Hansen T, Pedersen O, Walker M, Pfeiffer AF, Spranger J, Stumvoll M, Meigs JB, Wareham NJ, Kuusisto J, Laakso M, Langenberg C, Dupuis J, Watanabe RM, Florez JC, Ingelsson E, McCarthy MI, Prokopenko I; MAGIC Investigators. Impact of type 2 diabetes susceptibility variants on quantitative glycemic traits reveals mechanistic heterogeneity. *Diabetes*. 2014 Jun;63(6):2158-71. doi: 10.2337/db13-0949. Epub 2013 Dec 2. PMID: 24296717; PMCID: PMC4030103.
14. Dziejulska A, Dobosz AM, Dobrzyn A. High-Throughput Approaches onto Uncover (Epi)Genomic Architecture of Type 2 Diabetes. *Genes (Basel)*. 2018 Jul 26;9(8):374. doi: 10.3390/genes9080374. PMID: 30050001; PMCID: PMC6115814.
15. Ebrahim N, Shakirova K and Dashinimaev E (2022), PDX1 is the cornerstone of pancreatic  $\beta$ -cell functions and identity. *Front. Mol. Biosci.* 9:1091757. doi: 10.3389/fmolb.2022.1091757
16. Eknayan, G., & Nagy, J. (2005). A history of diabetes mellitus or how a disease of the kidneys evolved into a kidney disease. *Advances in Chronic Kidney Disease*, 12(2), 223-229. doi: 10.1053/j.ackd.2005.01.002
17. Fang, D., & Han, J. (Eds.). (2021). *Histone Mutations and Cancer*. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. doi:10.1007/978-981-15-8104-5

18. Forbes, J. M., & Cooper, M. E. (2013). Mechanisms of Diabetic Complications. *Physiological Reviews*, 93(1), 137–188. doi:10.1152/physrev.00045.2011
19. Gaulton, K. J. (2017). Mechanisms of Type 2 Diabetes Risk Loci. *Current Diabetes Reports*, 17(9). doi:10.1007/s11892-017-0908-x
20. Gayon, J. (2016). From Mendel to epigenetics: History of genetics. *Comptes Rendus Biologies*, 339(7-8), 225–230. doi: .1016/j.crv.2016.05.009
21. Grarup N, Rose CS, Andersson EA, Andersen G, Nielsen AL, Albrechtsen A, Clausen JO, Rasmussen SS, Jørgensen T, Sandbaek A, Lauritzen T, Schmitz O, Hansen T, Pedersen O. 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 Dec;56(12):3105-11. doi: 10.2337/db07-0856. Epub 2007 Sep 7. PMID: 17827400.
22. Greenberg, M.V.C., Bourc'his, D. The diverse roles of DNA methylation in mammalian development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 20, 590–607 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0159-6>
23. Hodson, D. J., Mitchell, R. K., Marselli, L., Pullen, T. J., Gimeno Brias, S., Semplici, F., ... Rutter, G. A. (2014). ADCY5 Couples Glucose to Insulin Secretion in Human Islets. *Diabetes*, 63(9), 3009–3021. doi:10.2337/db13-1607
24. Holoch, D., & Moazed, D. (2015). RNA-mediated epigenetic regulation of gene expression. *Nature Reviews Ge4netics*, 16(2), 71-84. doi:10.1038/nrg3863
25. Kamura, Y., Iwata, M., Maeda, S., Shinmura, S., Koshimizu, Y., Honoki, H., ... Tobe, K. (2016). FTO Gene Polymorphism Is Associated with Type 2 Diabetes through Its Effect on Increasing the Maximum BMI in Japanese Men. *PLOS ONE*, 11(11), e0165523. doi: 10.1371/journal.pone.0165523
26. Kazimierczyk, M.; Wrzesinski, J. Long Non-Coding RNA Epigenetics. *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22,6166. <https://doi.org/10.3390/ijms22116166>
27. Khoubai FZ, Grosset CF. DUSP9, a Dual-Specificity Phosphatase with a Key Role in Cell Biology and Human Diseases. *Int J Mol Sci.* 2021 Oct 26;22(21):11538. doi: 10.3390/ijms222111538. PMID: 34768967; PMCID: PMC8583968
28. Kouzarides, T. (2007). Chromatin Modifications and Their Function. *Cell*, 128(4), 693–705. doi: 1016/j.cell.2007.02.005



29. Laios K. et al., (2012) Aretaeus of Cappadocia and the first description of diabetes, History of Medicine Department, Medical school, University of Athens, Greece, Laboratory of Tumor Cell Biology, Medical school, University of Crete, Heraklion, Greece, HORMONES 2012, 11(1):109-113
30. Laura del Bosque-Plata, Eduardo Martínez-Martínez, Miguel Ángel Espinoza-Camacho, Claudia Gragnoli; The Role of TCF7L2 in Type 2 Diabetes. Diabetes 1 June 2021; 70 (6): 1220–1228. <https://doi.org/10.2337/db20-0573>
31. Li LM, Jiang BG and Sun LL (2022) HNF1A : From Monogenic Diabetes to Type 2 Diabetes and Gestational Diabetes Mellitus. Front. Endocrinol. 13:829565. doi: 10.3389/fendo.2022.829565
32. Linda Sommesse, Giuditta Benincasa, Michele Lanza, Antonio Sorriento, Concetta Schiano, Roberta Lucchese, Roberto Alfano, Giovanni Francesco Nicoletti, Claudio Napoli, Novel epigenetic-sensitive clinical challenges both in type 1 and type 2 diabetes. Jdc (2018), doi: 10.1016/j.jdiacomp.2018.08.012
33. Ling, C. (2020). Epigenetic regulation of insulin action and secretion – role in the pathogenesis of type 2 diabetes. Journal of Internal Medicine. doi:10.1111/joim.13049
34. Ling, C., & Rönn, T. (2019). Epigenetics in Human Obesity and Type 2 Diabetes. Cell Metabolism, 29(5), 1028–1044. doi: 10.1016/j.cmet.2019.03.009
35. Liu R, Lin X, Wang Z, Greenbaum J, Qiu C, Zeng C, Zhu Y, Shen J, Deng H. Identification of novel functional CpG-SNPs associated with Type 2 diabetes and birth weight. Aging (Albany NY). 2021 Apr 4; 13:10619-10658. <https://doi.org/10.18632/aging.202828>
36. Mambiya M, Shang M, Wang Y, Li Q, Liu S, Yang L, Zhang Q, Zhang K, Liu M, Nie F, Zeng F and Liu W (2019) The Play of Genes and Non-genetic Factors on Type 2 Diabetes. Front. Public Health 7:349. doi: 10.3389/fpubh.2019.00349
37. Marushchak M, Mazur L, Krynytska I. Insulin receptor substrate-1 gene polymorphism and lipid panel data in type 2 diabetic patients with comorbid obesity and/or essential hypertension. Endocr Regul. 2023 Feb 8;57(1):1-11. doi: 10.2478/enr-2023-0001. PMID: 36753667.
38. Mattei, Alexandra L. et al. (2022) DNA methylation: a historical perspective, Trends in Genetics, Volume 38, Issue 7, 676 – 707

39. Moosavi A. and Ali Motevalizadeh Ardekani (2016) Role of Epigenetics in Biology and Human Diseases Iranian Biomedical Journal 20(5): 246-258 November 2016 Department of Biochemistry, School of Medicine, Alborz University of Medical Sciences, Alborz, Iran; National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran doi: 10.22045/ibj.2016.01
40. Nilsson E. et al., Epigenetic Alterations in Human Liver From Subjects With Type 2 Diabetes in Parallel With Reduced Folate Levels, The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, Volume 100, Issue 11, 1 November 2015, Pages E1491–E1501, <https://doi.org/10.1210/jc.2015-3204>
41. Pandey, A., Chawla, S. and Guchhait, P. (2015), Type-2 diabetes: Current understanding and future perspectives. IUBMB Life, 67: 506-513. <https://doi.org/10.1002/iub.1396>
42. Polonsky, K. S. (2012). The Past 200 Years in Diabetes. New England Journal of Medicine, 367(14), 1332-1340. doi:10.1056/nejmra1110560
43. Popović AM, Huđek Turković A, Žuna K, Bačun-Družina V, Rubelj I, Matovinović M. FTO Gene Polymorphisms at the Crossroads of Metabolic Pathways of Obesity and Epigenetic Influences. Food Technol Biotechnol. 2023 Mar;61(1):14-26. doi: 10.17113/ftb.61.01.23.7594. PMID: 37200795; PMCID: PMC10187569.
44. Ribel-Madsen R, Fraga MF, Jacobsen S, Bork-Jensen J, Lara E, et al. (2012) Genome-Wide Analysis of DNA Methylation Differences in Muscle and Fat from Monozygotic Twins Discordant for Type 2 Diabetes. PLoS ONE 7(12): e51302. doi: 10.1371/journal.pone.0051302
45. Sayed, S., & Nabi, A. H. M. N. (2020). Diabetes and Genetics: A Relationship Between Genetic Risk Alleles, Clinical Phenotypes and Therapeutic Approaches. Advances in Experimental Medicine and Biology. doi:10.1007/5584\_2020\_518
46. Scott, L. J., Erdos, M. R., Huyghe, J. R., Welch, R. P., Beck, A. T., Wolford, B. N., ... Parker, S. C. J. (2016). The genetic regulatory signature of type 2 diabetes in human skeletal muscle. Nature Communications, 7, 11764. doi:10.1038/ncomms11764
47. Shan, Z., Bao, W., Zhang, Y., Rong, Y., Wang, X., Jin, Y., ... Liu, L. (2013). Interactions Between Zinc Transporter-8 Gene (SLC30A8) and Plasma Zinc Concentrations for Impaired Glucose Regulation and Type 2 Diabetes. Diabetes, 63(5), 1796–1803. doi:10.2337/db13-0606
48. Simonis-Bik AM, Nijpels G, van Haften TW, Houwing-Duistermaat JJ, Boomsma DI, Reiling E, van Hove EC, Diamant M, Kramer MH, Heine RJ, Maassen JA, Slagboom PE,

- Willemsen G, Dekker JM, Eekhoff EM, de Geus EJ, 't Hart LM. 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 Jan;59(1):293-301. doi: 10.2337/db09-1048. Epub 2009 Oct 15. PMID: 19833888; PMCID: PMC2797936.
49. Steinthorsdottir V, Thorleifsson G, Reynisdottir I, Benediktsson R, Jonsdottir T, Walters GB, Styrkarsdottir U, Gretarsdottir S, Emilsson V, Ghosh S, Baker A, Snorrardottir S, Bjarnason H, Ng MC, Hansen T, Bagger Y, Wilensky RL, Reilly MP, Adeyemo A, Chen Y, Zhou J, Gudnason V, Chen G, Huang H, Lashley K, Doumatey A, So WY, Ma RC, Andersen G, Borch-Johnsen K, Jorgensen T, van Vliet-Ostaptchouk JV, Hofker MH, Wijmenga C, Christiansen C, Rader DJ, Rotimi C, Gurney M, Chan JC, Pedersen O, Sigurdsson G, Gulcher JR, Thorsteinsdottir U, Kong A, Stefansson K. A variant in CDKAL1 influences insulin response and risk of type 2 diabetes. *Nat Genet*. 2007 Jun;39(6):770-5. doi: 10.1038/ng2043. Epub 2007 Apr 26. PMID: 17460697.
  50. Udler, M. S. (2019). Type 2 Diabetes: Multiple Genes, Multiple Diseases. *Current Diabetes Reports*, 19(8). doi:10.1007/s11892-019-1169-7
  51. Unoki H, Takahashi A, Kawaguchi T, Hara K, Horikoshi M, Andersen G, Ng DP, Holmkvist J, Borch-Johnsen K, Jørgensen T, Sandbaek A, Lauritzen T, Hansen T, Nurbaya S, Tsunoda T, Kubo M, Babazono T, Hirose H, Hayashi M, Iwamoto Y, Kashiwagi A, Kaku K, Kawamori R, Tai ES, Pedersen O, Kamatani N, Kadowaki T, Kikkawa R, Nakamura Y, Maeda S. SNPs in KCNQ1 are associated with susceptibility to type 2 diabetes in East Asian and European populations. *Nat Genet*. 2008 Sep;40(9):1098-102. doi: 10.1038/ng.208. PMID: 18711366.
  52. Voight BF, Scott LJ, Steinthorsdottir V, Morris AP, Dina C, Welch RP, Zeggini E, Huth C, Aulchenko YS, Thorleifsson G, McCulloch LJ, Ferreira T, Grallert H, Amin N, Wu G, Willer CJ, Raychaudhuri S, McCarroll SA, Langenberg C, Hofmann OM, Dupuis J, Qi L, Segrè AV, van Hoek M, Navarro P, Ardlie K, Balkau B, Benediktsson R, Bennett AJ, Blagieva R, Boerwinkle E, Bonnycastle LL, Bengtsson Boström K, Bravenboer B, Bumpstead S, Burtt NP, Charpentier G, Chines PS, Cornelis M, Couper DJ, Crawford G, Doney AS, Elliott KS, Elliott AL, Erdos MR, Fox CS, Franklin CS, Ganser M, Gieger C, Grarup N, Green T, Griffin S, Groves CJ, Guiducci C, Hadjadj S, Hassanal N, Herder C, Isomaa B, Jackson AU, Johnson PR, Jørgensen T, Kao WH, Klopp N, Kong A, Kraft P, Kuusisto J, Lauritzen T, Li M, Lieve A, Lindgren CM, Lyssenko V, Marre M, Meitinger T, Midtjell K, Morken MA, Narisu N, Nilsson P, Owen KR, Payne F, Perry JR, Petersen AK, Platou C, Proença C, Prokopenko I, Rathmann W, Rayner NW, Robertson NR, Rocheleau G, Roden M, Sampson MJ, Saxena R, Shields BM, Shrader P, Sigurdsson G, Sparsø T, Strassburger K, Stringham HM, Sun Q, Swift AJ, Thorand B, Tichet J, Tuomi T, van Dam RM, van Haeften TW, van Herpt T, van Vliet-Ostaptchouk JV, Walters GB, Weedon MN, Wijmenga C, Witteman J, Bergman RN, Cauchi S, Collins FS, Gloyn AL, Gyllenstein U, Hansen T, Hide WA, Hitman GA, Hofman A, Hunter DJ, Hveem K, Laakso M, Mohlke KL, Morris AD, Palmer CN, Pramstaller PP, Rudan I, Sijbrands E, Stein LD, Tuomilehto J, Uitterlinden A, Walker M, Wareham NJ, Watanabe RM, Abecasis GR, Boehm BO, Campbell H, Daly MJ, Hattersley AT, Hu FB, Meigs JB, Pankow JS, Pedersen

- O, Wichmann HE, Barroso I, Florez JC, Frayling TM, Groop L, Sladek R, Thorsteinsdottir U, Wilson JF, Illig T, Froguel P, van Duijn CM, Stefansson K, Altshuler D, Boehnke M, McCarthy MI; MAGIC investigators; GIANT Consortium. Twelve type 2 diabetes susceptibility loci identified through large-scale association analysis. *Nat Genet.* 2010 Jul;42(7):579-89. doi: 10.1038/ng.609. Erratum in: *Nat Genet.* 2011 Apr;43(4):388. PMID: 20581827; PMCID: PMC3080658.
53. Wang, N., Tong, R., Xu, J. et al. PDX1 and MC4R genetic polymorphisms are associated with type 2 diabetes mellitus risk in the Chinese Han population. *BMC Med Genomics* 14, 249 (2021). <https://doi.org/10.1186/s12920-021-01037-3>
  54. Wang H, Lou D and Wang Z (2019) Crosstalk of Genetic Variants, Allele-Specific DNA Methylation, and Environmental Factors for Complex Disease Risk. *Front. Genet.* 9:695. doi: 10.3389/fgene.2018.00695
  55. Wang, Z., Qiu, C., Lin, X., Zhao, L.-J., Liu, Y., Wu, X., ... Shen, H. (2020). Identification of novel functional CpG-SNPs associated with type 2 diabetes and coronary artery disease. *Molecular Genetics and Genomics*. doi:10.1007/s00438-020-01651-3
  56. Wen X, Yang Y. Emerging roles of GLIS3 in neonatal diabetes, type 1 and type 2 diabetes. *J Mol Endocrinol.* 2017 Feb;58(2): R73-R85. doi: 10.1530/JME-16-0232. Epub 2016 Nov 29. PMID: 27899417.
  57. Wheeler, E., & Barroso, I. (2011). Genome-wide association studies and type 2 diabetes. *Briefings in Functional Genomics*, 10(2), 52–60. doi:10.1093/bfpg/elr008
  58. Willbanks, A.; Wood, S.; Cheng, J.X. RNA Epigenetics: Fine-Tuning Chromatin Plasticity and Transcriptional Regulation, and the Implications in Human Diseases. *Genes* 2021, 12, 627. <https://doi.org/10.3390/genes12050627>
  59. Yahaya, T. O., & Salisu, T. F. (2018). A Review of Type 2 Diabetes Mellitus Predisposing Genes. *Current Diabetes Reviews*, 15. doi:10.2174/1573399815666181204145806
  60. Yiannakouris, N., Cooper, J. A., Shah, S., Drenos, F., Ireland, H. A., Stephens, J. W., ... Humphries, S. E. (2012). IRS1 gene variants, dysglycaemic metabolic changes and type-2 diabetes risk. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 22(12), 1024–1030. doi: 10.1016/j.numecd.2011.05.009
  61. Yousef AA, Behiry EG, Allah WMA, Hussien AM, Abdelmoneam AA, Imam MH, Hikal DM. IRS-1 genetic polymorphism (r.2963G>A) in type 2 diabetes mellitus patients associated with insulin resistance. *Appl Clin Genet.* 2018 Sep 28;11:99-106. doi: 10.2147/TACG.S171096. PMID: 30319284; PMCID: PMC6167972.

62. Yuan, W., Xia, Y., Bell, C. G., Yet, I., Ferreira, T., Ward, K. J., ... Spector, T. D. (2014). An integrated epigenomic analysis for type 2 diabetes susceptibility loci in monozygotic twins. *Nature Communications*, 5(1). doi:10.1038/ncomms6719
63. Zhang Y, Sun Z, Jia J, Du T, Zhang N, Tang Y, Fang Y, Fang D. Overview of Histone Modification. *Adv Exp Med Biol*. 2021;1283:1-16. doi: 10.1007/978-981-15-8104-5\_1. PMID: 33155134.

Υπεύθυνη Δήλωση Συγγραφέα:

Δηλώνω ρητά ότι, σύμφωνα με το άρθρο 8 του Ν.1599/1986, η παρούσα εργασία αποτελεί αποκλειστικά προϊόν προσωπικής μου εργασίας, δεν προσβάλλει κάθε μορφής δικαιώματα διανοητικής ιδιοκτησίας, προσωπικότητας και προσωπικών δεδομένων τρίτων, δεν περιέχει έργα/εισφορές τρίτων για τα οποία απαιτείται άδεια των δημιουργών/δικαιούχων και δεν είναι προϊόν μερικής ή ολικής αντιγραφής, οι πηγές δε που χρησιμοποιήθηκαν περιορίζονται στις βιβλιογραφικές αναφορές και μόνον και πληρούν τους κανόνες της επιστημονικής παράθεσης.