



Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων
Σχολή Επιστημών Υγείας
Ιατρικό Τμήμα
Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα «Βασικές Βιοιατρικές Επιστήμες(ΒΒΕ)»
Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης(ΜΔΕ)
Τεχνολογία και Διάγνωση. Νέες τεχνικές, μέθοδοι, προοπτικές
Δέρμος Παντελής
Επιβλέπουσα: Σύρρου Μαρίκα
2017



Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Σχολή Επιστημών Υγείας

Ιατρικό Τμήμα

Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα «Βασικές Βιοιατρικές Επιστήμες(BBE)»

Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης(MΔΕ)

Τεχνολογία και Διάγνωση. Νέες τεχνικές, μέθοδοι, προοπτικές

Δέρμος Παντελής

Επιβλέπουσα: Σύρρου Μαρίκα

2017

Η έγκριση της Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης από το Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2 (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος).

Δέρμος Παντέλης

Τεχνολογία και Διάγνωση. Νέες τεχνικές, μέθοδοι, προοπτικές.

Πέμπτη 23 Φεβρουαρίου 2017

Επιβλέπουσα: Σύρρου Μαρίκα

Εξεταστές: Αγγελίδης Χαράλαμπος, Κούκλης Παναγιώτης

ΑΝΤΙ ΠΡΟΛΟΓΟΥ

Αν υπάρχει ένα χαρακτηριστικό του ανθρώπου που τον καθιστά ξεχωριστό, πέραν της διάνοιάς του, είναι η περιέργεια και η άγνοια κινδύνου, που επιδεικνύει πάνω στην ορμή του για μάθηση και κατανόηση των φαινομένων που τον περιβάλλουν.

Αναρίθμητες είναι οι ιστορίες κατά την διάρκεια της πορείας μας ως είδος, στις οποίες άνθρωποι πρωτοπόροι, ρίσκαραν τα πάντα για την πρόοδο της επιστήμης και θυσίασαν πολλές φορές την κοινωνική τους ζωή και ευμάρεια.

Βέβαια δεν πορεύθηκαν άπαντες με κίνητρο την μακροήμερευση του είδους, αλλά κάποιοι ίσως μαγεύθηκαν από την ματαιοδοξία της δόξας, της αναγνώρισης, των υλικών ανταλλαγμάτων και της κοινωνικής καταξίωσης. Ουδέν κακόν αμιγές καλού, όμως, και πρέπει αποδεχόμενοι την ατέλεια της ανθρώπινης φύσης αναγνωρίζοντας το ωφέλιμο σε οτιδήποτε.

Η ανθρωπότητα, από τις πρώτες μέρες της ως μια μετεξέλιξη ενός άλλου είδους έως και σήμερα πραγματοποιεί άλματα προόδου. Κάθε φορά καταφέρνει να ξεπεράσει τον εαυτό της στα επιστημονικά επιτεύγματα και να ανεβάσει ακόμη υψηλότερα τον ουδό για το εγγύς ή μακρινό μέλλον.

Δυστυχώς, δεν θα μπορούσε να ειπωθεί το ίδιο, για την βελτίωση της συμπεριφοράς μας ως κοινωνικό σύνολο. Έχοντας στην διάθεσή μας την τεχνολογική πρόοδο, θα μπορούσαμε να απαγκιστρωθούμε από λογικές και αντιλήψεις περασμένων αιώνων, δημιουργώντας έτσι μια κοινωνία-πρότυπο με αρχές αριστείας, αλληλεγγύης και σεβασμού.

Ο ρόλος του ανθρώπου της επιστήμης είναι πολυσύνθετος. Οφείλει στον εαυτό του και στο σύνολο, να ενεργεί με γνώμονα το κοινό συμφέρον και να μεταλαμπαδεύει τόσο την γνώση στο πεδίο του όσο και τις αρχές τις οποίες θα ακολουθήσουν οι σημερινοί μαθητές-οι αυριανοί διδάσκοντες.

Η κατάσταση η οποία παρατηρείται σήμερα ανα την υφήλιο, με την επιστημονική κοινότητα να κρύβεται πίσω από το σάβανο της «πνευματικής ανωτερότητας» στον μικρόκοσμο των πανεπιστημιακών και τεχνολογικών ιδρυμάτων, πλένοντας τα χέρια της ως σύγχρονος Πόντιος Πιλάτος και μένοντας αμέτοχη στα προβλήματα του ευρύτερου κοινωνικού συνόλου, είναι απογοητευτική.

Ο επιστήμονας, οφείλει να βοηθήσει τους συνανθρώπους του, να νοιαστεί για την ευημερία τους, να επιδιώξει την πρόοδο και την μεταστροφή του κίβδηλου status quo των ημερών μας. Τότε μόνο θα έχει πράξει κάτι σπουδαίο, το οποίο ίσως να μην αποφέρει δάφνες και χρήματα, όμως κανένας δεν θα μπορέσει να του αρνηθεί μια θέση στα κιτάπια των ανθρώπων και όχι σε αυτά των μίζερων και χαμερπών ανθρωπάκων.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. Ιστορία και εξέλιξη της Βιολογίας και της Κυτταρογενετικής μέσω ανακαλύψεων-σταθμών (Σελίδες 8-13)
2. Επισκόπηση κατηγοριών χρωμοσωματικών ανωμαλιών (Σελίδες 14-20)
3. Τεχνικές ανάλυσης χρωμοσωμάτων: πλεονεκτήματα, περιορισμοί, εφαρμογές (Σελίδες 21-24)
4. Δομή του χρωμοσώματος (Σελίδες 25-29)
5. Καρυότυπος: ανάλυση τεχνικής, χρώσεις, παρατήρηση χρωμοσωμάτων (Σελίδες 30-34)
6. FISH: in situ υβριδισμός με φθοριοχρώματα, αρχή μεθόδου, διαφορετικές προσεγγίσεις(Σελίδες 35-37)
7. CGH και aCGH(Σελίδα 38)
8. PCR: βασικές αρχές, πλεονεκτήματα, μειονεκτήματα, διαφορετικές προσεγγίσεις (Σελίδες 39-46)
9. Sequencing: ανάλυση συστημάτων πρώτης, δεύτερης και τρίτης γενιάς (Σελίδες 46-57)
10. NIPT: μη επεμβατικός προγεννητικός έλεγχος με τη χρήση cfDNA εμβρύου (Σελίδες 58-61)
11. Αντί επιλόγου και ευχαριστίες (Σελίδες 62-63)
12. Σύνομη περίληψη στην Ελληνική και Αγγλική γλώσσα (Σελίδα 64)
13. Βιβλιογραφία (Σελίδες 65-66)

1.ΙΣΤΟΡΙΑ ΚΑΙ ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΜΕΣΩ ΑΝΑΚΑΛΥΨΕΩΝ-ΣΤΑΘΜΩΝ

Αν κοιτάξει κανείς πίσω στην ιστορία, θα παρατηρήσει πως ουσιαστικά η ανθρωπότητα για ένα εξαιρετικά μεγάλο χρονικά διάστημα, παρέμεινε στάσιμη όσον αφορά το κομμάτι της επιστημονικής-τεχνολογικής προόδου.

Σε αυτή την κατάσταση συνέβαλλε τα μέγιστα, η εσκεμμένη και καθαρά για λόγους χειραγώγησης, έλλειψη μόρφωσης και παιδείας της πλειονότητας των ατόμων και η πεισματική αντίσταση της θρησκευτικής και πολιτικής ηγεσίας, να αποδεχτούν και να ενσωματώσουν νέες θεωρίες και επιτεύγματα, που κατέρριπταν παγιωμένες και λανθασμένες αντιλήψεις χιλιετιών.

Όμως και μετά τις σκοτεινές αυτές περιόδους για το ανθρώπινο πνεύμα, η επιστημονική κοινότητα συνέχισε να κινείται με γνώμονα συγκεκριμένα δόγματα ανα επιστήμη, και να απορρίπτει με ύβρεις και ειρωνείες, κάθε άνθρωπο που τόλμαγε να πειραματιστεί, να δοκιμάσει και να ανακαλύψει νέους ορίζοντες.

Ειδικότερα στην επιστήμη της Βιολογίας, η πρόοδος από την εποχή των αριστοτελικών παρατηρήσεων έως και τον δέκατο-έβδομο αιώνα είναι δίχως διάθεση υπερβολής, απειροελάχιστη. Σχεδόν δυο χιλιάδες χρόνια η επιστήμη που μελετάει την ζωή, παρέμεινε απελπιστικά παραμελημένη. Πραγματικό ειρωνικό, αν σκεφτούμε την εξαθλίωση και τον πόνο που υπέμειναν ολόκληρες γενεές ανθρώπων, λόγω έλλειψης έστω και στοιχειωδών γνώσεων υγιεινής και διατροφής.

Συνυπολογίζοντας τα παραπάνω, θα περίμενε κανείς πως θα ερχόταν η στιγμή για την μεγάλη ανακάλυψη που θα προσέφερε νέες προοπτικές. Όπερ και εγένετο, στα μέσα του 17^{ου} αιώνα με την εφεύρεση του οπτικού μικροσκοπίου.

Βέβαια, για να φτάσουμε στο σήμερα, πέρασαν σχεδόν τέσσερις αιώνες, αργής αλλά τουλάχιστον υπαρκτής εξέλιξης. Στην πορεία αυτή παρατηρούμε ότι από το 1650 έως το 1850 τα βήματα ήταν αν μη τι άλλο νεογονικά. Τεράστιες φυσιογνωμίες όπως ο Δαρβίνος και ο Μέντελ θεωρήθηκαν παρίες της επιστήμης για μεγάλο χρονικό διάστημα και μόνο με τον ερχομό του 20^{ου} αιώνα υπήρξε πραγματικό ενδιαφέρον και πρόοδος.

Οφείλουμε να εξετάσουμε τις χρονολογίες-ορόσημα που σχτίζονται με την ιστορία της Βιολογίας και κατόπιν τούτου να επεκταθούμε στις ανακαλύψεις που προώθησαν το πεδίο της Κυτταρογενετικής, ότως ώστε να βρεθούμε σε θέση να εκτιμήσουμε την κατάσταση στην οποία βρισκόμαστε την σήμερον ημέρα.

Ενδεικτικά

Μετά την ανακάλυψη του μικροσκοπίου, η εσωτερική δομή των φυτών και των ζώων μπορούσε πλέον να μελετηθεί. Το 1665, ο R.Hooke χρησιμοποιώντας το πρώτο οπτικό μικροσκόπιο έδειξε ότι το καλαμπόκι αποτελείται από μικρότερες μονάδες, που τα ονόμασε κύτταρα. Ήταν η απαρχή της επιστήμης που ονομάζουμε Κυτταρολογία, η οποία στόχο της έχει την κατανόηση της δομικής οργάνωσης των κυττάρων. Ο Leeuwenhoek παρατήρησε βακτήρια και πρωτόζωα και ανακάλυψε έτσι για πρώτη φορά τους μικροοργανισμούς. Μετά από προσπάθεια πολλών ερευνητών, διαφορετικά κομμάτια του κυττάρου και των διαδικασιών της ζωής έγιναν γνωστά.

Δεν ήταν παρά μόνο στα 1900 όταν οι νόμοι του G.Mendel επανήλθαν στο προσκήνιο και η επιστήμη της γενετικής άρχισε να σχηματίζεται αποζητώντας να κατανοήσει την βάση και την κληρονομηση της ποικιλότητας στους οργανισμούς.

Οι ιδέες της κυτταρολογίας και της γενετικής συνδυάστηκαν ώστε να σχηματιστεί η επιστήμη της κυτταρογενετικής. Η σύντηξη αυτή προήλθε από την διαπίστωση ότι τα γονίδια που ορίζουν διάφορους χαρακτήρες βρίσκονται στα χρωμοσώματα.

Τα νουκλειικά οξέα απομονώθηκαν για πρώτη φορά το 1869, όμως δεν ήταν παρά μόνο το 1944, όταν ο Avery και οι συνεργάτες του απέδειξαν πως το DNA είναι το γενετικό υλικό. Η δομή, λειτουργία και άλλες εκφάνσεις των νουκλειικών, μελετήθηκαν έκτοτε επισταμένα. Η αποσαφήνιση του γενετικού κώδικα έγινε κατά την διάρκεια της δεκαετίας του 1960. Η πρώτη φορά που συντέθηκε γονίδιο ήταν το 1975 από τον Kohana και τους συνεργάτες του.

Αναλυτικότερα

1665 Hooke: παρατήρηση κυττάρων καλαμποκιού με οπτικό μικροσκόπιο

1672 Grew: μικροσκοπική ανατομία φυτών-Θεωρία αρσενικού και θηλυκού

1674 Leeuwenhoek: βελτίωση μικροσκοπίου μέσω τριβής του φακού και μελέτη βακτηρίων, πρωτοζώων και κυττάρων αίματος

1694 Camerarius: απόδειξη ύπαρξης φύλου στα φυτά

1761-1766 Kolreuter: απόδειξη υβριδισμού στα φυτά

1809 Lamarck: θεωρία εξέλιξης-κληρονομής επίκτητων χαρακτηριστικών

1828 Brown: ανακάλυψη πυρήνα στα φυτά

1835 Mohl: κυτταρική δαίρεση

1838-1839 Schleiden/Schwann: κυτταρική θεωρία

1859 Darwin: θεωρία της εξέλιξης

1865 Mendel: υβριδισμός στα φυτά

1869 Miescher: ανακάλυψη νουκλειικών οξέων στο σπέρμα του σολωμού

1875 Pasteur: δουλεύοντας με μικροοργανισμούς, απέδειξε πως η ζωή προκύπτει από προϋπάρχουσα ζωή

1876 Hertwig: ανακάλυψε ότι η γονιμοποίηση είναι ένωση σπέρματος-ωαρίου

1882 Flemming: μίτωση και χρωματίνη

1883 Galton : ανθρώπινη κληρονομικότητα και ευγονική (Eugenics)

1883 Beneden: ο αριθμός των γαμετικών χρωμοσωμάτων είναι μισός των σωματικών

1883-1885 Weismann: μόνο οι αλλαγές στα γαμετικά κύτταρα κληρονομούνται

1884 Strasburger: επιβεβαίωσε αρχές Hertwig

1886 Abbe: λάδι στο φάκο και άυξηση διακριτικής ικανότητας οπτικού μικροσκοπίου

1891 Henking: παρατήρηση X χρωμοσώματος

1892 Boveri: χρωμοσωμική θεωρία κληρονομικότητας

- 1900 Correis, Tschermak, de Vries: επιβεβαίωση νόμων Mendel
- 1901 de Vries: πρώτη αναφορά του όρου Μετάλλαξη
- 1902 McCiung: Χ χρωμοσώματα σε έντομα
- 1902-1903 Sutton: θεωρία χρωμοσωματικής κληρονομικότητας
- 1903 Johansen: εισαγωγή όρων γονίδιο, γονότυπος, φαινότυπος
- 1904 Montgomery: εισαγωγή όρου αυτοσωμικά
- 1908 Gates: πρώτη παρατήρηση δακτυλιοειδούς χρωμοσώματος
- 1909 Janssens: θεωρία χιασμάτων μείωσης
- 1910 Morgan: μετάλλαξη άσπρου ματιού στην *D.Melanogaster* και συσχέτιση με φυλετικά χρωμοσώματα (Nobel το 1933, πρώτος κυτταρογενετιστής)
- 1917-1919 Bridges: διπλοσυστήμα στην *Drosophilla*
- 1921 Sturtevant: αναστροφή χρωμοσώματος και Blakeslee: τρισωμία στα φυτά
- 1924 Feulgen/Rossenbeck: τεχνική χρώσης χρωμοσωμάτων
- 1926 Stern: μετάθεση στη *Drosophilla*
- 1927 Muller: πρόκληση μεταλλάξεων με ακτίνες Χ στην *Drosophilla* (Nobel 1946)
- 1928 Heitz: εισαγωγή όρων ευχρωματίνη και ετεροχρωματίνη
- 1929 B.McClintock: μορφολογική αναγνώριση χρωμοσωμάτων καλαμποκιού
- 1932 Ruuka/Knoll: περιγραφή αρχών ηλεκτρονικού μικροσκοπίου
- 1937 Blakeslee: κολχικίνη
- 1939 Darlington: ισο-χρωμόσωμα
- 1944 Auerbach/Robson: χρήση χημικών για μεταλλάξεις
- 1944 Avery, McLeod, McCarty, Griffith: Απόδειξη πως το DNA είναι το γενετικό υλικό
- 1949 Barr: σωματίο Barr
- 1950 McClintock: συστήματα ελέγχου στο καλαμόκι (Nobel 1983)
- 1952 Hershey/Chase: ^{35}S και ^{32}P σήμανση απέδειξε πως το DNA είναι το γενετικό υλικό
- 1952 Chargaff: κατέγραψε τις A/T και G/C αναλογίες
- 1953 Watson/Crick/Wilkins/Franklin: δομή διπλής έλικας DNA (Nobel 1962 οι τρεις πρώτοι)
- 1958 Meselson/Stahl: ημισυντηρητική αντιγραφή και Crick: tRNA και αντικωδικόνιο
- 1959 Lejeune: ανακάλυψη συνδρόμου Down και Ford: ανακάλυψη συνδρόμου Turner
- 1961 Jacob/Monod: οπερόνιο (Nobel 1965)

- 1961 Nirenberg/Matthei:σπάσιμο του γενετικού κώδικά(κωδικόνιο/τριπλέτα)
- 1962 Arber:ένζυμα περιορισμού
- 1962-1963 Nass/Nass: ύπαρξη DNA σε μιτοχόνδρια
- 1964 Holiday:υβριδικό μοντέλο και Britten/Wurmg:επαναλαμβανόμενα κομμάτια DNA στους ευκαρυώτες
- 1966 Crick:Wobble hypothesis(ένα αμινοξύ,περισσότερα κωδικόνια)
- 1967 Gellert: ανακάλυψη λιγάσης
- 1970 Pardue/Gill: DNA/DNA και RNA/DNA υβριδισμός in situ
- 1970 Caspersson:φθορίζουσα και G-Banding τεχνική χρωμοσωμάτων και Baltimore/Temin:αντίστροφη μεταγραφάση σε ρετροϊούς
- 1972 Singer/Nicolson: θεωρία ότι οι βιολογικές μεμβράνες είναι υγρά δυο διαστάσεων
- 1973 Nathans:περιοριστικά ένζυμα για χαρτογράφηση χρωμοσωμάτων(Nobel 1978 μαζί με Nathans,Arber)
- 1974 Thomas: παλίνδρομικές ακολουθίες
- 1975 Khorana: τεχνητή σύνθεση γονιδίου
- 1977-78 Sanger: split γονίδια
- 1982 Bloom/Carbon:μοριακή δομή κεντρομεριδίου
- 1983 Evans: ανακάλυψη κυκλινών
- 1987 Greider/Blackburn: ανακάλυψη τελομεράσης και Burk/Corle/Olson:Yeast Artificial Chromosomes

ΑΝΑΚΑΛΥΨΕΙΣ ΚΟΜΒΙΚΗΣ ΣΗΜΑΣΙΑΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗ

A. Καλλιέργεια κυττάρων-ιστών: Ο S.Ringer, Βρετανός φυσιολόγος, αναγνωρίζεται ως ο δημιουργός του «Ringer's Lactate» διαλύματος, το οποίο περιέγραψε σέ ένα από τα πειράματά του το 1882 που αφορούσαν in vitro αλατικά διαλύματα για την διατήρηση οργάνων ζώων έξω από το σώμα.Αργότερα, ο Roux(1885) και ο Harrison(1907-1910) καθιέρωσαν την μεθολογία και τις αρχές.

B. Πολυτενικά χρωμοσώματα: Ο E.Balbani, μικροβιολόγος που έγινε εμβρυολόγος, πρότεινε την θεωρία της αυτονομίας των γαμετικών κυττάρων στο Chironomus. Η αναγνώριση πολυτενικών χρωμοσωμάτων ήταν ένα κρίσιμο βήμα στην αναγνώριση των μοτίβων ζώνωσης που βοηθούν στην αναγνώριση δομικών ανακατατάξεων και γενωμικών αλλαγών.

Γ. Ζώνωση Giemsa: Η ζώνωση G, από τον Gustav Giemsa, χημικό και βακτηριολόγο, έκανε την αρχή για πολλαπλές τεχνικές χρώσης που χρησιμοποιούνται σήμερα σε εργαστηριακές κυτταροκαλλιέργειες. Η πρώτη δημοσίευση έλαβε χώρα το 1904. Η χρωστική αποτελείται από azur B, ηωσίνη και μπλε του μεθυλενίου και χρησιμοποιήθηκε αρχικά για ιστοπαθολογική χρώση, παρασίτων όπως Τρυπανόσωμα, Χλαμύδια κ.α. Η Giemsa χρωματίζει παρασκευάσματα αίματος και μυελού των οστών για να ξεχωρίζουν ερυθροκύτταρα, λεμφοκύτταρα, μονοκύτταρα και αιμοπετάλια. Όμως η ικανότητα της χρωστικής να συνδέεται με τις φωσφορικές ομάδες των δεσμών

A-T της επέτρεψε να χρησιμοποιηθεί στην καρυοτυπική ανάλυση των μεταφασικών χρωμοσωμάτων. Ακόμη και σήμερα χρησιμοποιείται κατά κόρον σε εργαστήρια κυτταρογενετικής. Για να βελτιώσουμε την ποιότητα ανάλυσης χρωμοσωμάτων, προηγείται η πέψη των πρωτεϊνών της χρωματίνης με τρυψίνη πρό της προσθήκης Giemsa.

Δ. Υποτονικό διάλυμα: Η τυχία ανακάλυψη του από το Hsu, Κινέζο-Αμερικάνο κυτταρικό βιολόγο, έδωσε ώθηση στην κυτταρογενετική των θηλαστικών και του ανθρώπου. Στο κλασικό πλέον «Χρωμοσώματα θηλαστικών in vitro-ανθρώπινος καρυότυπος» του 1952, περιγράφονται με ακρίβεια οι διαδικασίες για το στρώσιμο των χρωμοσωμάτων σε πλακίδια και η μεθοδολογία αναγνώρισης των 46 χρωμοσωμάτων των ανθρωπίνων σωματικών κυττάρων. Είναι γνωστός ως ο πατέρας της κυτταρογενετικής των θηλαστικών.

Ε. Ακριβής αριθμός χρωμοσωμάτων: Ο Tjio, σε επίσκεψη στο Πανεπιστήμιο Lund της Σουηδίας το 1955, είναι ο πρώτος καταγεγραμμένος να αναφέρει τον αριθμό 46 σχετικά με τα χρωμοσώματα. Την αμέσως επόμενη χρονιά μαζί με τον Levan, δημοσίευσαν το Hereditas report στο οποίο αναφέρουν πως τα σωματικά κύτταρα του ανθρώπου έχουν 46 χρωμοσώματα. Το προαναφερθέν επετεύχθη μέσω βελτίωσης των τεχνικών του Hsu και ανάλυση ανθρωπίνων πνευμονικών ινοβλαστών.

ΣΤ. Απενεργοποίηση X χρωμοσώματος: Το 1960. Οι Ohno/Hauschka παρείχαν πληροφορίες σχετικά με την οργάνωση του X χρωμοσώματος στα ποντίκια. Η M.F.Lyon, Αγγλίδα γενετίστρια, έκανε έρευνες πάνω στην απενεργοποίηση του X, βασιζόμενη στα πρότερα στοιχεία. Την εποχή εκείνη, μόνο ο αλμπινισμός συνδεδεμένος με φυλετικά χρωμοσώματα ήταν γνωστός στους ανθρώπους, με τους άρρενες να μην διαθέτουν επιθηλιακή χρώση (Pigment) και τις ετεροζυγωτικές γυναίκες να εμφανίζουν αμετροεπή χρώση. Η Lyon ανακάλυψε την απενεργοποίηση ένω εργαζόταν πάνω στους κινδύνους της ραδιενέργειας. Η υπόθεση της πως η απενεργοποίηση συμβαίνει για να αποκατασταθεί η δόση X στις γυναίκες, έγινε σημείο αναφοράς.

Z. Ανακάλυψη τρισωμίας 21(Down): Άσχετα με την διχογνωμία ποιος θα έπρεπε να αναγνωρισθεί περισσότερο και ποιος όχι, η τρισωμία 21 είναι το πρώτο παράδειγμα πνευματικής καθυστέρησης που συνδέθηκε άρρηκτά με χρωμοσωματική ανωμαλία. Αυτό συνέβη το 1959 από τους Lejeune/Gauthier/Turpin. Η ομάδα του Lejeune βρήκε επίσης το σύνδρομο Cri-du-chat(1964), το 18q minus σύνδρομο(1966) και τις τρισωμίες 9(1970) και 8(1971).(Ferguson, 2015)

Η. Ανακάλυψη τρισωμίας 13(Patau): Το 1960, ο Γερμανός K.Patau, ανέφερε την πρώτη περίπτωση τρισωμίας 13, γνωστό και ως Bartholin-Patau σύνδρομο. Ο Bartholin είχε πρώτος περιγράψει την κλινική εικόνα που περιλαμβάνει πνευματική καθυστέρηση, δυσμορφία στα αυτιά, πολυδακτυλία σχιστίες πολύ παλαιότερα. Αργότερα, ανακαλύφθηκε ότι οφείλεται σε μη-διαχωρισμό κατά τη μείωση.

Θ. Ανακάλυψη τρισωμίας 18(Edwards): Το 1960 ο Edwards ανακάλυψε την τρισωμία 18. Επίσης, εισήγαγε την λήψη υλικού από τον πλακούντα, η οποία αργότερα έφερε επανάσταση στην προγεννητική διάγνωση των εμβρύων. Ανέφερε επίσης 20 περιπτώσεις του συνδρόμου Cornelia de Lange και ανέπτυξε το Oxford-grid, έναν χάρτη για την σύγκριση γενετικών αλληλουχιών σε διάφορα είδη και στον άνθρωπο.

Ι. Σύνδρομο εύθραυστου X: Το 1969, ο Αμερικάνος γενετιστής Lubs, παρατήρησε ένα ασυνήθιστο X χρωμόσωμα με μία χαρακτηριστική στένωση στο μακρύ βραχίονα, σε 4 ασθενείς με πνευματική καθυστέρηση. Ονομάστηκε σπασμένο X, ενώ την επόμενη χρονιά ο Hecht το ονόμασε εύθραυστο. Ο Lubs απέσπασε εξαιρετικές κριτικές για την δουλειά του στο σύνδρομο αυτό, το οποίο αποτελεί το πιο συνηθισμένο αίτιο(κληρονομικό) για καθυστέρηση στους άρρενες.

Κ. Μειωτικός επιχιασμός, μεταθέσεις, τελομερή, κεντρομερή: Η Β. McClintock θεωρείται ως μία από τους πιο καταξιωμένους κυτταρογενετιστές με μεγάλη συνεισφορά στην ανάλυση του γονιδιώματος του καλαμποκιού. Η δουλειά της οδήγησε στην ανακάλυψη του γενετικού ανασυνδυασμού μέσω επιχιασμού στην μείωση που οδηγεί σε ανταλλαγή πληροφοριών και στην προώθηση της ποικιλότητας. Ο πρώτος γενετικός χάρτης δημιουργήθηκε στο εργαστήριό της, όπου οι φυσικές ιδιότητες του φυτού αντιστοιχήθηκαν με χρωμοσωματικές περιοχές. Επίσης διερεύνησε το ρόλο των τελομερών και των κεντρομερών στη διατήρηση των γενετικών πληροφοριών.

Λ. Χρωμόσωμα Philadelphia και λευχαιμία: Το 1973, η Αμερικανίδα Janet Rowley, δημοσίευσε την έρευνά της στο χρωμόσωμα Philadelphia, μια ισοζυγισμένη μετάθεση που περιλαμβάνει το γονίδιο BCR του χρωμοσώματος 22 και το γονίδιο ABL1 του χρωμοσώματος 9. Η μετάθεση αυτή είχε ως αποτέλεσμα την εμφάνιση λευχαιμίας και άλλων τύπων καρκίνους. Η ίδια ανακάλυψε επίσης την t(8;21) στην AML και την t(15;17) στην APL. Η αναγνώριση των παραπάνω οδήγησε στην δημιουργία φαρμάκων όπως το Gleevec, Atra.

Μ. Σύνδρομο Smith-Magenis: Το 1986, η γενετίστρια Magenis και η γενετική σύμβουλος Smith, αναγνώρισαν 9 ασθενείς με έλλειμμα στο 17p11.2.

Ν. In situ Υβριδισμός: Το 1969, οι Gall/Pardue πρώτοι ανέφεραν την ύπαρξη υβριδικών μορίων RNA/DNA μέσω αυτοραδιογραφίας. Οι μελέτες αυτές έλαβαν χώρα σε ωκύτταρα του Xenopus. Ο Pardue επίσης είχε συνεισφορά στην απόδειξη της λειτουργίας των τελομερών, στη χρωμοσωματική αντιγραφή, κυτταρική διαίρεση και στην διατήρηση της αρχιτεκτονικής μεσοφασικού πυρήνα.

Ξ. Το 1990 οι Cremer/Lichter συνέλαβαν την ιδέα της CGH.

Ο. Ο Pinkel αξιοποιώντας την γνώση από τους Cremer/Lichter εφάρμοσε την FISH τεχνική για την μλέτη της τρισωμίας 21. Επίσης το 1992 δημοσίευσε μια μέθοδο κυτταρογενετικής ανάλυσης όγκων μέσω CGH.

Π. Ανοσοαποτύπωση και μικροσυστοιχίες: Η ανοσοαποτύπωση κατά Southern έφερε επανάσταση στη μοριακή γενετική. Ο Southern και ο Maskos, περιέγραψαν πρώτοι τον υβριδισμό ολιγονουκλεοτιδίων σε γυάλινα πλακίδια. Ήταν η απαρχή της μεθοδολογίας των μικροσυστοιχιών.

2.ΕΠΙΣΚΟΠΗΣΗ ΧΡΩΜΟΣΩΜΑΤΙΚΩΝ ΑΝΩΜΑΛΙΩΝ

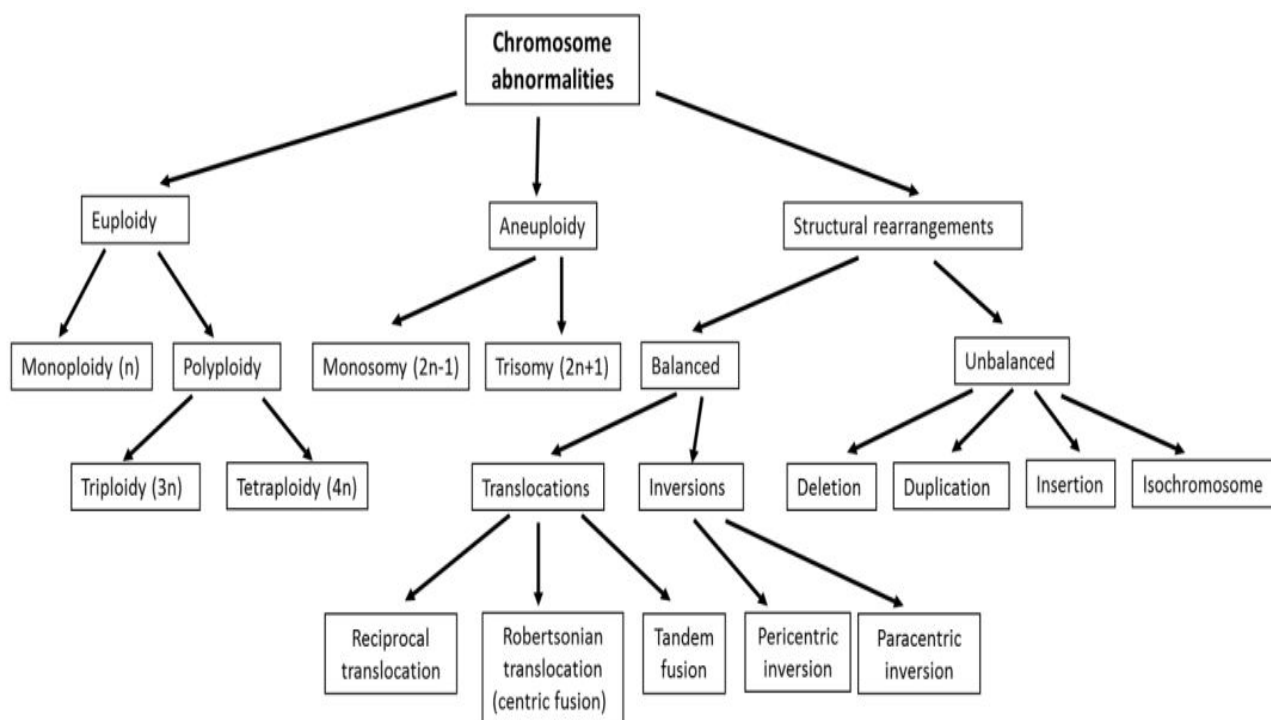
Μια χρωμοσωματική ανωμαλία προκύπτει όταν υφίσταται αλλαγή στον αριθμό ή στη δομή των χρωμοσωμάτων. Η ανωμαλία αυτή στη γενετική πληροφορία μπορεί να προκαλέσει προβλήματα στην ανάπτυξη και στις λειτουργίες του σώματος.(Khandekar et al, 2012) (Ponpuraj, 2011)

Οι χρωμοσωματικές ανωμαλίες αποτελούν μια μεγάλη κατηγορία ανθρώπινων ασθενειών, αντιπροσωπεύουν το 1% όλων των γεννήσεων, το 2% των εγκυμοσυνών σε γυναίκες άνω των 35 ετών και το 50% των αποβολών του πρώτου τριμήνου. Ευθύνονται δε για περισσότερα από 100 σύνδρομα και είναι πολύ πιο συνηθισμένα από τις Μενδελικές μονογονιδιακές διαταραχές.

Οι χρωμοσωματικές ανωμαλίες είναι επίσης γνωστές ως κυτταρογενετικές διαταραχές. Τα περισσότερα έμβρυα με χρωμοσωματικές ανωμαλίες, δεν επιβιώνουν. Η ανίχνευση των διαταραχών, γίνεται συνήθως με δείγμα αίματος ή αμνιακού υγρού και χρήσης τεχνικών καρυστύπου, FISH, CGH, PCR, NGS et cetera. Κάποια σύνδρομα είναι ορατά πολύ εύκολα, με μια απλή χρώση Giemsa, ενώ κάποια άλλα απαιτούν εις βάθος ανάλυση του γονιδιώματος.

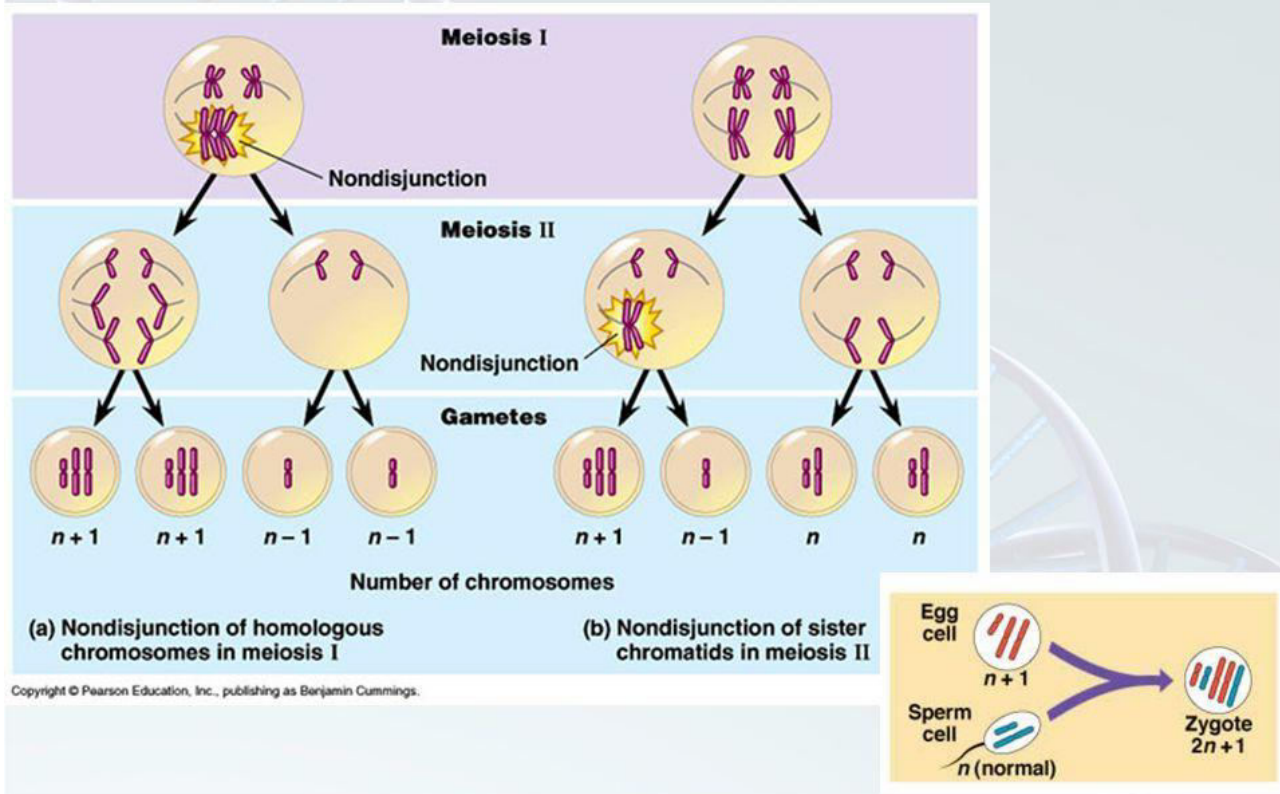
Οι χρωμοσωματικές ανωμαλίες μπορεί να προκύψουν λόγω:

- A. Προβλημάτων κατά την μείωση ή την μίτωση
- B. Χημικών παραγόντων
- Γ. Φυσικών παραγόντων όπως η ιονίζουσα ακτινοβολία
- Δ. Βιολογικών παραγόντων όπως οι ιοί
- E. Αυξημένης ηλικίας της μητέρας
- ΣΤ. Γονέα-φορέα χρωμοσωματικής ανωμαλίας
- Z. Χρωμοσομικών ανακατατάξεων(επιχιασμοί, ανασυνδυασμοί)



Πίνακας 1: Κατηγοριοποίηση χρωμοσωματικών ανωμαλιών

Non-disjunction



Εικόνα 1: Μη διαχωρισμός κατά την μείωση I και II.

ΑΡΙΘΜΗΤΙΚΕΣ ΑΝΩΜΑΛΙΕΣ

Οι αριθμητικές ανωμαλίες περιλαμβάνουν τις περιπτώσεις εκείνες στις οποίες διαφέρει από τον φυσιολογικό αριθμό 46(2n). Πολυπλοειδία ονομάζεται η κατάσταση στην οποία υπάρχουν πολλαπλάσια των 2n χρωμοσωμάτων, όπως τριπλοειδία(69,3n) και τετραπλοειδία(92,4n). Η τριπλοειδία μπορεί να προκύψει από την αλληλεπίδραση ενός φυσιολογικού γαμέτη(n) και ενός μη φυσιολογικού γαμέτη(2n), προκύπτοντας έτσι 3n ζυγωτό. Ο μη φυσιολογικός γαμέτης οφείλεται στο μη διαχωρισμό κατά την μείωση. Η τετραπλοειδία μπορεί να προκύψει είτε λόγω δυο μη φυσιολογικών γαμετών ή λόγω μη διαχωρισμού κατά την πρώτη μιτωτική διαίρεση του ζυγωτού. Οι πολυπλοειδίες επηρεάζουν το σύνολο του γενετικού υλικού και συνήθως δεν είναι βιώσιμες(αποβολές πρώτου τριμήνου ή θνησιγενή νεογνά).

Η ανευπλοειδία ορίζεται ως ο πλεονασμός ή το έλλειμα ενός ή δυο χρωμοσωμάτων, στον φυσιολογικό 2n αριθμό. Συνεπώς υπάρχει η τρισωμία στην οποία υφίσταται ένα παραπάνω χρωμόσωμα(47,2n+1) και η μονοσωμία στην οποία υπολείπεται ένα χρωμόσωμα(45,2n-1). Οι περισσότερες τρισωμίες σε έμβρυα, οδηγούν στο θάνατο. Η επιβίωση ενός εμβρύου με τρισωμία εξαρτάται από τον τύπο χρωμοσώματος που εμπλέκεται και ποιες γενετικές πληροφορίες διαθέτει. Παραδείγματα βιώσιμων τρισωμιών είναι αυτές των χρωμοσωμάτων 13, 18, και 21. Όλες οι υπόλοιπες τρισωμίες των αυτοσωμικών δεν είναι βιώσιμες. Οι τρισωμίες των φυλετικών, έχουν μικρότερο αντίκτυπο στην ανάπτυξη, και είναι συνήθως βιώσιμες έως και τη γέννηση. Η μοναδική μονοσωμία που είναι βιώσιμη είναι το σύνδρομο Turner και αφορά την ύπαρξη ενός μόνο X χρωμοσώματος. Όλες οι υπόλοιπες μονοσωμίες δεν είναι βιώσιμες.

Οι περισσότερες ανευπλοειδίες προκαλούνται από λάθη στον διαχωρισμό των κυττάρων. Σε αυτές τις περιπτώσεις, ο αριθμός των χρωμοσωμάτων στα θυγατρικά κύτταρα, είναι άνισος. Οι ανωμαλίες αυτές συμβαίνουν κατά τη διάρκεια της μείωσης I, II και της μίτωσης.

Οι ανευπλοειδίες μπορούν να κατηγοριοποιηθούν ως εξής:

A. Τύπος του εμπλεκόμενου χρωμοσώματος(αυτοσωμικό, φυλετικό)

B. Αριθμός των επηρεαζόμενων κυττάρων: ομογενής, όταν η ανωμαλία είναι παρούσα σε όλα τα κύτταρα ή μωσαικού τύπου, όταν η ανωμαλία είναι παρούσα σε κάποια κύτταρα και αφήνει άλλα ανεπηρέαστα

Γ. Συσχέτιση ή όχι με δομικές ανωμαλίες: ελεύθερες, δίχως δομικές χρωμοσωματικές ανωμαλίες ή συσχετιζόμενες, παρουσία πλεοναζόντων χρωμοσωμάτων προσκολλημένα σε άλλα χρωμοσώματα δίχως να αλλοιώνεται ο αριθμός 2n ή ψευδής έλλειψη χρωμοσώματος λόγω σύντηξης με κάποιο άλλο

Δ. Ακεραιότητα του χρωμοσώματος: απόλυτη, ένα ολοκλήρο χρωμόσωμα πλεονάζει ή λείπει ή ημιτελής, ένα μέρος του χρωμοσώματος πλεονάζει ή λείπει.

Η βαρύτητα και οι επιπτώσεις των αριθμητικών ανωμαλιών εξαρτάται από: 1) τον τύπο της ανωμαλίας, το πλεονάζον γενετικό υλικό είναι λογότερο επιβλαβές του ελλειπούς, 2) το γονιδιακό περιεχόμενο του χρωμοσώματος π.χ τρισωμία 1 θανατηφόρα ενώ η τρισωμία 21 βιώσιμη και 3) τον τύπο των κυττάρων που επηρεάζονται (αυτοσωμικά ή φυλετικά).

ΔΟΜΙΚΕΣ ΑΝΩΜΑΛΙΕΣ

Οι δομικές χρωμοσωματικές ανωμαλίες είναι ανακατατάξεις γενετικού υλικού, στο ίδιο το χρωμόσωμα ή μεταξύ χρωμοσωμάτων. Με βάση τα φαινοτυπικά αποτελέσματα, οι δομικές χρωμοσωματικές ανωμαλίες χωρίζονται:

I) Ισορροπημένες: συνήθως δεν οδηγούν σε φαινοτυπικές ανωμαλίες. Όλη η γενετική πληροφορία είναι παρούσα στην φυσιολογική ποσότητα, όμως βρίσκεται σε διαφορετική σειρά ή θέση.

II) Μη ισορροπημένες: υπάρχει πλεονάζον ή ελλιπές γενετικό υλικό και ο προκύπτων φαινότυπος είναι μη φυσιολογικός.

ΙΣΟΖΥΓΙΣΜΕΝΕΣ

Η αναστροφή(inversion) είναι δομική ανωμαλία που χαρακτηρίζεται από αλλαγή της σειράς των γονιδίων σε ένα τμήμα χρωμοσώματος. Ο μηχανισμός δημιουργίας της αναστροφής, αποτελείται από το κόψιμο ενός τμήματος σε δύο σημεία και την ακόλουθη περιστροφή 180 μοιρών ακολούθως. Υπάρχουν δύο τύποι αναστροφής: περικεντρική, όταν περιλαμβάνει την δομή του κεντρομερούς και παρακεντρική, όταν δεν περιλαμβάνει το κεντρομερές και συμβαίνει μόνο στον μεγάλο ή στον μικρό βραχίονα.

Η μετάθεση(translocation) είναι δομική ανωμαλία που χαρακτηρίζεται από ένα ή περισσότερα θραύσματα DNA που μεταφέρονται από ένα χρωμόσωμα σε κάποιο άλλο, δίχως να υπάρχουν φαινοτυπικές μεταβολές. Χωρίζεται σε τρεις τύπους:

A. Αμοιβαία ισοζυγισμένη: θραύση δυο χρωμοσωμάτων σε ένα σημείο το καθένα, και ανταλλαγή των δύο θραυσμάτων.

Β. Με εισαγωγές(insertions): μεταφορά από ένα χρωμόσωμα με θραύση δύο σημείων, του προκύπτοντος θραύσματος, σε ένα άλλο μη ομόλογο χρωμόσωμα, με θράυση ενός σημείου.

Γ. Κατά Robertson: ένωση δυο ακροκεντρικών χρωμοσωμάτων, που έχουν θράυση στην περιοχή των κεντρομερών με απώλεια των 2 μικρών βραχιόνων, οι οποίοι περιέχουν γονίδια rRNA και δεν επηρεάζουν το φαινότυπο. Αυτό το είδος μετάθεσης οδηγεί σε μικρότερο αριθμό χρωμοσωμάτων.

Οι ισοζυγισμένες δομικές ανωμαλίες δεν επηρεάζουν τον φαινότυπο, καθώς δεν έχουν ιδιαίτερα σημαντικό αντίκτυπο στην γενετική πληροφορία. Όμως αξίζει να αναφερθεί πως παρά το γεγονός ότι ο φαινότυπος είναι φυσιολογικός, εν τούτοις μπορεί να υπάρξει παραγωγή μη φυσιολογικών γαμετών.

ΜΗ ΙΣΟΖΥΓΙΣΜΕΝΕΣ

Το έλλειμα(deletion) είναι δομική ανωμαλία που χαρακτηρίζεται από απώλεια χρωμοσωματικού θραύσματος. Είναι δύο ειδών: ακραία, όταν κατόπιν θράυσης σε ένα σημείο, ακολουθεί απώλεια του τμήματος έως το τέλος του βραχίονα ή διάμεση, στην οποία κατόπιν θράυσης σε δύο σημεία, το ενδιάμεσο τμήμα χάνεται και ενώνονται τα υπόλοιπα. Τα ελλείματα μπορούν να προκληθούν μέσω άνισου επιχιασμού εσφαλμένα τοποθετημένων ομόλογων χρωμοσωμάτων είτε με μη φυσιολογικό διαχωρισμό στην μείωση όταν ένας από τους γονείς παρουσιάζει μη ισοζυγισμένη ανωμαλία. Το έλλειμα έχει ως αποτέλεσμα τα ομόλογα χρωμοσώματα να διαφέρουν ως προς το μέγεθος.

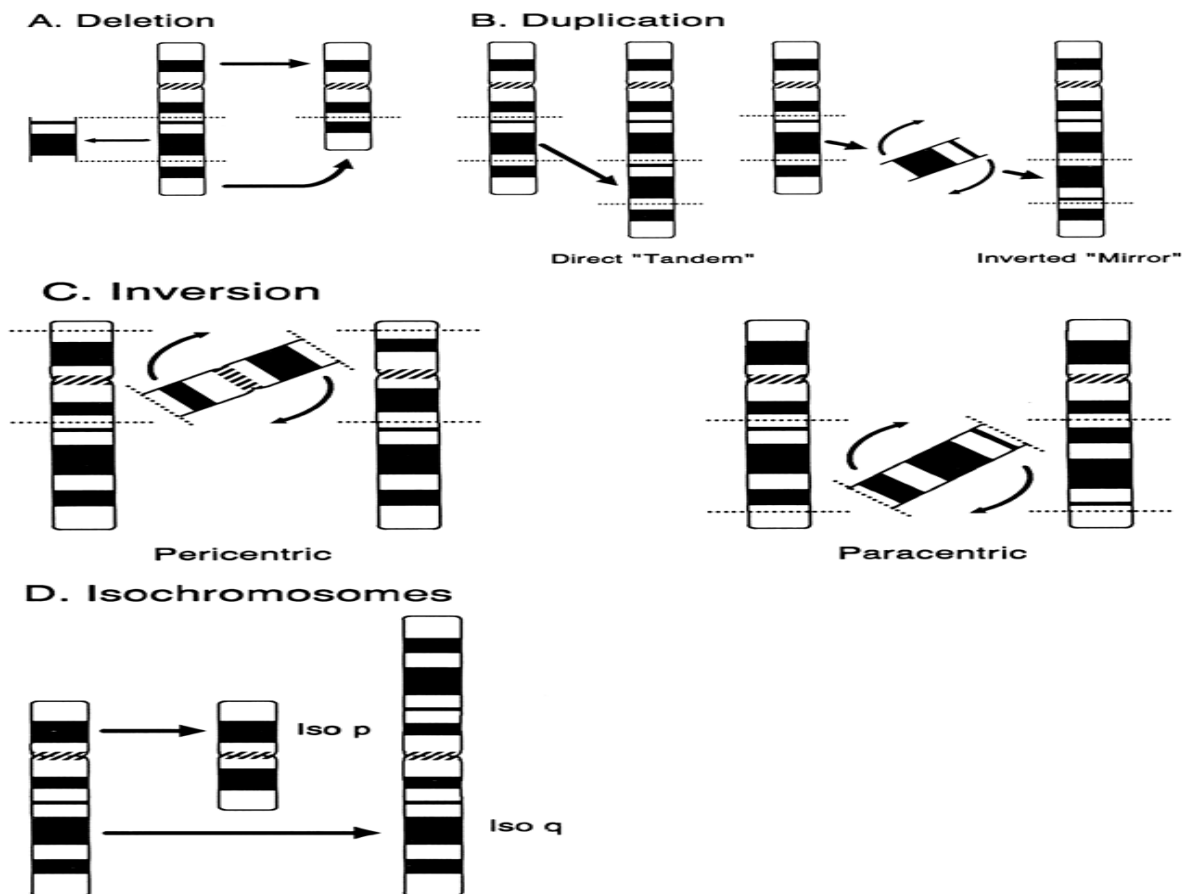
Ο διπλασιασμός(duplication) έχει ως χαρακτηριστικό την ύπαρξη του ίδιου χρωμοσωματικού τμήματος εις διπλούν. Μπορεί να προκληθεί από άνισο επιχιασμό και μη φυσιολογικό διαχωρισμό χρωμοσωμάτων που περιέχουν μεταθέσεις.

Δακτυλιοειδή (Ring) χρωμοσώματα εμφανίζονται όταν υπάρχει θραύση στον μικρό και στον μεγάλο βραχίονα με συνεπακόλουθο την απώλεια των ακραίων περιοχών και τον σχηματισμό δακτυλίου με ένωση των άκρων.

Το ισοχρωμόσωμα (Isochromosome) είναι δομή μη φυσιολογική που αποτελείται από 2 μόνο μικρούς ή μονο μεγάλους βραχίονες. Ο μηχανισμός δημιουργίας του έγκειται στον οριζόντιο διαχωρισμό στο κεντρομερές. Αποτέλεσμα αυτού, η δημιουργία ενός χρωμοσώματος με 2p ή 2q βραχίονες και το υπόλοιπο να χάνεται αντιστοίχως.

Το δικεντρικό χρωμόσωμα (dicentric chromosome) είναι μη φυσιολογική δομή που διαθέτει δύο κεντρομερή σε ένα χρωμόσωμα. Ο μηχανισμός δημιουργίας έγκειται στη θράυση δυο χρωμοσωμάτων σε ένα σημείο το καθένα, την ακόλουθη ένωση των θραυσμάτων που διαθέτουν από ένα κεντρομερές και απώλεια των υπολοίπων.

Οι μη ισοζυγισμένες δομικές ανωμαλίες οδηγούν σε ανισορροπία του γενετικού υλικού και εμφανίζουν φαινοτυπική αναλογία με τις αριθμητικές ανωμαλίες.



Εικόνα 2: Κατηγορίες δομικών χρωμοσωματικών ανωμαλιών, τόσο ισοζυγισμένων όσο και μη ισοζυγισμένων.

ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ ΚΥΡΙΟΤΕΡΩΝ ΧΡΩΜΟΣΩΜΑΤΙΚΩΝ ΑΝΩΜΑΛΙΩΝ

Οι ανευπλοειδίες και οι μη ισοζυγισμένες δομικές ανωμαλίες συνδέονται με καλά χαρακτηρισμένα σύνδρομα. Σύνδρομο ορίζεται μια ομάδα κλινικών χαρακτηριστικών που συσχετίζονται με μία συγκεκριμένη ανωμαλία.

Τρισωμία 21 (Σύνδρομο Down):{ 47, XX, +21 και 47, XY, +21} Εμφανίζει συχνότητα 1/600 γεννήσεις. Χαρακτηριστικά του η πνευματική καθυστέρηση, η υποτονία, η βραχυκεφαλία, το στρογγυλό επίπεδο πρόσωπο, η φαρδιά μύτη, η βραχυδακτυλία και η αυξημένη συχνότητα καρδιοπάθειας.

Τρισωμία 18 (Σύνδρομο Edwards):{ 47, XX, +18 και 47, XY, +18} Εμφανίζει συχνότητα 1/8000 γεννήσεις και αναλογία 4 θηλυκά προς 1 αρσενικό. Χαρακτηριστικά του η καθυστέρηση ανάπτυξης, το μικρό στόμα, η μικρογναθία, τα μυτερά αυτιά, ο κοντός λαιμός, η σχιστία και η καρδιοπάθεια.

Τρισωμία 13 (Σύνδρομο Patau):{ 47, XX, +13 και 47, XY, +13} Εμφανίζει συχνότητα 1/10000 γεννήσεις. Χαρακτηριστικά του η μικροφθαλμία, η σχιστία, η πολυδακτυλία χεριών και ποδιών, η μικροκεφαλία και το πολύ χαμηλό προσδόκιμο επιβίωσης.

Σύνδρομο Cri du Chat:{ 46, XX, 5p⁻ και 46, XY, 5p⁻ } Εμφανίζει συχνότητα 1/50000 γεννήσεις. Χαρακτηριστικά του το κλάμα γαλής λόγω υποανάπτυκτης δομής λάρυγγα, η μικροκεφαλία, το στρογγυλό πρόσωπο, η μικρογναθία και ο υπερτελορισμός των ματιών.

Σύνδρομο Klinefelter: { 47, XXY} Προκύπτει μόνο σε άντρες με συχνότητα 1/1000 γεννήσεις. Χαρακτηριστικά του η ατροφία όρχεων και η αζωοσπερμία, η γυναικομαστία και το υψηλό ανάστημα.

Σύνδρομο Turner: {45, X} Προκύπτει μόνο σε γυναίκες με συχνότητα 1/2500 γεννήσεις. Χαρακτηριστικά του το χαμηλό ανάστημα, η μη ανάπτυξη του εφηβαίου, η αμμηνορυσία, η δυσπλασία ωοθηκών και η χαμηλά ευρισκόμενη γραμμή μαλλιών.

Chromosome	Abnormality	Disease Association
X	XO	Turner's Syndrome
Y	XXY	Klinefelter syndrome
Y	XYY	Double Y syndrome
Y	XXX	Trisomy X syndrome
Y	XXXX	Four X syndrome
Y	Xp21 deletion	Duchenne's/Becker syndrome, congenital adrenal hypoplasia, chronic granulomatus disease
Y	Xp22 deletion	steroid sulfatase deficiency
Y	Xq26 deletion	X-linked lymph proliferative disease
1	1p (somatic) monosomy trisomy	neuroblastoma
2	monosomy trisomy 2q	growth retardation, developmental and mental delay, and minor physical abnormalities
3	monosomy trisomy (somatic)	Non-Hodgkin's lymphoma
4	monosomy trisomy (somatic)	Acute non lymphocytic leukemia (ANLL)
5	5p	Cri du chat; Lejeune syndrome
5	5q (somatic) monosomy trisomy	myelodysplastic syndrome
6	monosomy trisomy (somatic)	clear-cell sarcoma
7	7q11.23 deletion	William's syndrome
7	monosomy trisomy	monosomy 7 syndrome of childhood; somatic: renal cortical adenomas; myelodysplastic syndrome
8	8q24.1 deletion	Langer-Giedon syndrome
8	monosomy trisomy	myelodysplastic syndrome; Warkany syndrome; somatic: chronic myelogenous leukemia
9	monosomy 9p	Alfi's syndrome
9	monosomy 9p partial trisomy	Rethore syndrome
9	trisomy	complete trisomy 9 syndrome; mosaic trisomy 9 syndrome

Πίνακας 2: Χαρακτηριστικά σύνδρομα και ασθένειες των φυλετικών καθώς και των πρώτων εννιά αυτοσωμικών χρωμοσωμάτων.

10	Monosomy trisomy (somatic)	ALL or ANLL
11	11p-	Aniridia; Wilms tumor
11	11q-	Jacobson Syndrome
11	monosomy (somatic) trisomy	myeloid lineages affected (ANLL, MDS)
12	monosomy trisomy (somatic)	CLL, Juvenile granulosa cell tumor (JGCT)
13	13q-	13q-syndrome; Orbeli syndrome
13	13q14 deletion	retinoblastoma
13	monosomy trisomy	Patau's syndrome
14	monosomy trisomy (somatic)	myeloid disorders (MDS, ANLL, atypical CML)
15	15q11-q13 deletion monosomy	Prader-Willi, Angelman's syndrome
15	trisomy (somatic)	myeloid and lymphoid lineages affected, e.g., MDS, ANLL, ALL, CLL)
16	16q13.3 deletion	Rubenstein-Taybi
	monosomy trisomy (somatic)	papillary renal cell carcinomas (malignant)
17	17p-(somatic)	17p syndrome in myeloid malignancies
17	17q11.2 deletion	Smith-Magenis
17	17q13.3	Miller-Dieker
17	monosomy trisomy (somatic)	renal cortical adenomas
17	17p11.2-12 trisomy	Charcot-Marie Tooth Syndrome type 1; HNPP
18	18p-	18p partial monosomy syndrome or Grouchy Lamy Thieffry syndrome
18	18q-	Grouchy Lamy Salmon Landry Syndrome
18	monosomy trisomy	Edwards Syndrome
19	monosomy trisomy	
20	20p-	trisomy 20p syndrome
20	20p11.2-12 deletion	Alagille
20	20q-	somatic: MDS, ANLL, polycythemia vera, chronic neutrophilic leukemia
20	monosomy trisomy (somatic)	papillary renal cell carcinomas (malignant)
21	monosomy trisomy	Down's syndrome
22	22q11.2 deletion	DiGeorge's syndrome, velocardiofacial syndrome, conotruncal anomaly face syndrome, autosomal dominant Opitz G/BBB syndrome, Caylor cardiofacial syndrome
22	monosomy trisomy	complete trisomy 22 syndrome

Πίνακας 3: Χαρακτηριστικά σύνδρομα και ασθενείς των αυτοσωμικών χρωμοσωμάτων 10 έως 22.

3.ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΧΡΩΜΟΣΩΜΑΤΩΝ: ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ, ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ, ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ

Ενώ μια πληθώρα τεχνικών έχουν ανακαλυφθεί από την δεκαετία του 1950 και εντεύθεν, η ακρίβεια και η επαναληψιμότητα διαφέρει. Κάθε κυτταρογενετική τεχνική περιορίζεται από τον τύπο της χρωμοσωματικής ανωμαλίας που μπορεί να ανιχνεύσει και τον τύπο κυττάρου στον οποίο μπορεί να εφαρμοστεί (μετα-μιτωτικό ή διαιρούμενο). Επιπροσθέτως, κάθε μεθοδος είναι επιρρεπής στα δικά της τεχνικά και βιολογικά artifacts, τα οποία πρέπει να ληφθούν σοβαρά υπ' όψιν. Άξιο αναφοράς είναι επίσης το γεγονός, πως υπάρχουν πλέον τεχνικές που μπορούν να ποσοτικοποιήσουν πλήρως καρυοτύπους μη διαιρουμένων κυττάρων, ενός τύπου ανάλυσης που γίνεται σταδιακά μείζονος σημασίας στη μελέτη της της σχέσης μεταξύ χρωμοσωματικής αστάθειας και ασθένειας. Εδώ, θα λαβει χώρα μια επισκόπηση των συνηθέστερων κυτταρογενετικών τεχνικών, όπως επίσης και νέων τεχνικών, παρουσιάζοντας παράλληλα τις εφαρμογές και τους περιορισμούς καθ'εκάστην.(Bakker et al, 2015)

Technique	Whole genome	Aneuploidy	Polyploidy	CNVs (size)	Inversion	Reciprocal translocation	Unbalanced translocation	Heterogeneity	Costs	Reference
Metaphase spread-based (dividing cell populations)	Giemsa staining	+	+	5-10 Mb	+	+	+	+	Inexpensive	[41, 57]
	FISH	-	+	(+) ¹	+	+	+	+	Inexpensive	[34, 43, 57]
	SKY, M-FISH, COBRA-FISH	+	+	-	-	+	+	+	Moderate	[36-42, 44-46]
	mMCB	+	+	+	5-10 Mb	+	+	+	Moderate	[47, 76, 77]
Non-metaphase spread-based (non-dividing cell populations)	Interphase FISH	-	+	+	(+) ¹	+	+	+	Inexpensive	[34, 43, 57]
	CGH & aCGH	+	+	-	10-20 Mb	-	+	(+) ¹	Moderate	[34, 41, 52-55]
	SNP array	+	+	-	500 kb	-	+	(+) ¹	Moderate	[41, 56, 60-62]
	Flow cytometry	-	(+) ¹	+	-	-	-	-	Inexpensive	[50, 51]
Single-cell sequencing	+	+	(+) ¹	200-500 kb ⁴	(+) ⁵	(+) ⁶	+	Expensive	[28, 65, 66]	

Εικόνα 3: Σύγκριση διαφόρων τεχνικών κυτταρογενετικής. Με + σημαίνεται μια τεχνική όταν είναι σε θέση να ανιχνεύσει μια χρωμοσωματική ανωμαλία. Με – σημαίνεται όταν δεν υπάρχει δυνατότητα ανίχνευσης και με (+) σημαίνεται όταν υπάρχουν προαπαιτούμενα για την ανίχνευση ή μόνο μερική ανίχνευση.

ΚΛΑΣΣΙΚΟΣ ΚΑΡΥΟΤΥΠΟΣ ΚΑΙ ΦΘΟΡΙΖΩΝ ΕΠΙ ΤΟΠΟΥ ΥΒΡΙΔΙΣΜΟΣ: Η παραδοσιακή πλέον τεχνική του καρυοτύπου απαιτεί χρωμοσώματα σε μετάφαση. Με την χρήση φυτοαιματογλουτινίνης για πρόκληση μίτωσης σε μεγάλο αριθμό κυττάρων, κολχικίνης για την παύση του κύκλου στη μετάφαση και την υποτονικού διαλύματος για διόγκωση των πυρήνων και χρώσης για ζώνωση, είναι εφικτή η οπτική μικροσκοπία. Το πρωτόκολλο του κλασσικού καρυοτύπου επιτρέπει την έρευνα πολυπλοειδιών, ανευπλοειδιών καθώς και και μεγάλων σε μέγεθος ελλειμάτων, αναστροφών, μεταθέσεων, ισοχρωμοσωμάτων και δακτυλιοειδών χρωμοσωμάτων, μέσω υπολογισμού των ζωνών.

Ο συνδυασμός του κλασσικού καρυοτύπου με την τεχνική FISH είναι συνήθης, για την ανίχνευση μεταθέσεων ή CNVs(copy number variations) όπως το γονίδιο σύντηξης BCR-ABL t(9;22)(q34;q11). Η FISH είναι πανίσχυρο εργαλείο στην ναίχνευση χρωμοσωματικών ανωμαλιών σε ασθενείς και σε προεμφυτικά έμβρυα στην κλινική πράξη. Δυστυχώς, μπορεί να ανιχνεύσει μόνο ένα μικρό αριθμο χαρακτηριστικών ανά κύτταρο καθώς περιορίζεται από τον αριθμό διαθέσιμων φθοριοχρωμάτων. Επίσης, ένα έλλειμα ή διπλασιασμός σε κάποιο χρωμόσωμα μπορεί να δώσει ψευδώς θετικά αποτελέσματα, απώλεια ή πλεονασμού χρωμοσωμάτων. Ακόμη ένα μειονέκτημα είναι η δημιουργία artifacts λόγω θραύσης του μορίου ανιχνευτή, αποτυχίας της

υβριδοποίησης ή λανθασμένων παρασκευασμάτων στα πλακίδια, που μπορεί να οδηγήσουν σε υποτίμηση ή υπερεκτίμηση των αποτελεσμάτων. Τέλος, η τεχνική απαιτεί εξειδίκευση και εντατική δουλειά από τον κυτταρογενετιστή καθώς είναι δύσκολο να αυτοματοποιηθεί. Λαμβάνοντας τα παραπάνω υπ'όψιν, η FISH αποτελεί εργαλείο για την εύρεση γνωστών χρωμοσωματικών ανωμαλιών αλλά όχι για την εύρεση τυχαίων ανευπλοειδιών.

ΚΑΡΥΟΤΥΠΟΣ ΔΙΑΙΡΟΥΜΕΝΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕ ΧΡΩΣΤΙΚΕΣ ΟΛΟΚΛΗΡΟΥ ΧΡΩΜΟΣΩΜΑΤΟΣ: Η M-FISH και η SKY είναι παραλλαγές της FISH τεχνικής, που χρησιμοποιούνται στην ανίχνευση μεταθέσεων και CNVs σε όλο το γένωμα. Η διαφορά με την FISH έγκειται στο γεγονός ότι αντί για έναν ανιχνευτή για ένα χρωμόσωμα, εδώ υπάρχουν συγκεκριμένοι ανιχνευτές για το κάθε χρωμόσωμα, που συνδέονται με φθοριοχρώματα τα οποία δίνουν συγκεκριμένο μοτίβο. Η βασική διαφορά ανάμεσα στις δυο αυτές παραλλαγές είναι ότι ανιχνεύουν τα φθοριοχρώματα με μικροσκόπιο φθορισμού η πρώτη και με ιντερφερόμετρο η άλλη. Και οι δύο απαιτούν περαιτέρω επεξεργασία εικόνας μέσω λογισμικού υπολογιστή, ώστε να προκύψουν τα ψευδοχρωματικά χρωμοσώματα. Αυτό επιτρέπει την ανίχνευση δομικών και αριθμητικών ανωμαλιών. Πολύ σημαντικό, είναι πως τα θραύσματα ενός χρωμοσώματος, μπορούν να ανιχνευθούν ως ιδιοτελή θραύσματα όπου και αν βρίσκονται, κατάσταση στην οποία ακόμη και οι τεχνικές NGS δυσκολεύονται πολύ. Έτσι οι δυο τεχνικές είναι ιδανικές για την ανίχνευση χρωμοσωματικής ανωμαλίας σε διαιρούμενα κύτταρα. Βεβαίως υπάρχουν τα ίδια μειονεκτήματα με την FISH όπως είναι λογικό.

Μια ακόμη ευαίσθητη τεχνική είναι η COBRA FISH(combined binary ratio). Η τεχνική χρησιμοποιεί συνδυασμένη σήμανση με φθοριοχρώματα και υπολογισμό της αναλογίας του εκάστοτε φθορισμού, αυξάνοντας έτσι την ανάλυση. Τρία φθοριοχρώματα συνδυάζονται σε πέντε διαφορετικές αναλογίες, δίνοντας 12 μοναδικές υπογραφές. Η προσθήκη δευτερευόντων φθοριοχρωμάτων(2 τον αριθμό) σε κάθε μία από τις 12 υπογραφές, αυξάνει τον αριθμό των μοναδικών υπογραφών στις 48, αυξάνοντας έτσι και τον πιθανό αριθμό στόχων. Ως αποτέλεσμα, η COBRA FISH επιτρέπει την ανίχνευση των βραχιόνων κάθε χρωμοσώματος ξεχωριστά.

Μια εναλλακτική τεχνική της COBRA είναι η mMCB(multiplex multicolor banding) στην οποία τα μεταφασικά χρωμοσώματα υβριδίζονται με μια ποικιλία ανιχνευτών που ανιχνεύουν διαφορετικές χρωμοσωματικές περιοχές, οδηγώντας σε πολυζωνικά μοτίβα για κάθε χρωμόσωμα.

ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΤΕΧΝΙΚΩΝ ΜΕΤΑΦΑΣΙΚΟΥ ΚΑΡΥΟΤΥΠΟΥ: Ενώ οι τεχνικές αυτές αποτελούν ισχυρό εργαλείο, έχουν το μειονέκτημα πως απαιτούν διαιρούμενα κύτταρα. Κάποιες φορές τα τέτοια κύτταρα δεν είναι διαθέσιμα: υλικό σε παραφίνη ή μετα-μιτωτικά κύτταρα μεταξύ άλλων. Επίσης η συλλογή καρκινικών κυττάρων και η κατεργασία με κολχικίνη αποτυγχάνει και αν συνοπολογιστεί και ο χαμηλός ρυθμός πολλαπλασιασμού σε αρχικό στάδιο του όγκου, καθιστά την ποσοτικοποίηση ανευπλοειδίας μέσω μεταφασο-εξαρτόμενων τεχνικών αδύνατη. Να σημειωθεί πως για νευρώνες ή βλαστικά κύτταρα στην ήρεμη κατάσταση, οι τεχνικές αυτές δεν αποδίδουν. Η λύση στα προβλήματα αυτά δίνονται από τεχνικές που δεν απαιτούν την μιτωτική κατάσταση των κυττάρων και ακολουθούν.

ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ: Μια απλή αλλά χαμηλής ανάλυσης μέθοδος για την ανίχνευση πλοειδίας σε πολλά κύτταρα ταυτόχρονα είναι η χρώση με φθοριόχρωμα ολόκληρου του γενετικού υλικού και η ακόλουθη κυτταρομετρία. Συγκρίνοντας των φθορισμό των κυττάρων του δείγματος αγνώστου πλοειδίας με τον φθορισμό ενός φυσιολογικού κυττάρου, μπορεί να υπολογιστεί εάν υπάρχει ανωμαλία. Τα πλεονεκτήματα της μεθόδου είναι ο μεγάλος αριθμός κυττάρων που μπορεί να αναλυθεί και η ταχύτητα επεξεργασίας δείγματος όσο και της ανίχνευσης. Μειονέκτημα αποτελεί η πολύ χαμηλή ανάλυση της μεθόδου: έλλειμα ή πλεονασμός ξεχωριστών αριθμών χρωμοσωμάτων πόσο δε μάλλον CNVs δεν ανιχνεύονται.

CGH: Μια άλλη πιο ευαίσθητη μέθοδος ποσοτικοποίησης ανευπλοειδίων κυτταρικών πληθυσμών είναι ο συγκριτικός γενωμικός υβριδισμός. Για να συμβεί, το γενωμικό DNA του υπό εξέταση δείγματος υπόκειται σε θράυση και σε χρώση με πράσινη φθορίζουσα χρωστική ενώ το φυσιολογικό DNA πρότυπο σημαίνεται με κόκκινη χρώση. Και τα δύο σημασμένα θραύσματα υβριδίζονται σε ένα διπλοειδές μεταφασικό spread από κυτταρική σειρά του ίδιου οργανισμού. Οι αναλογίες φθορισμού υπολογίζονται μέσω μικροσκοπίας φθορισμού. Πράσινο σήμα σημαίνει ενίσχυση ενώ κόκκινο έλλειμμα. Η ικανότητα της τεχνικής είναι 10-20 μεγαβάσεις.

Η CGH έχει πλέον αντικατασταθεί από την πιο εξειδικευμένη και ευαίσθητη CGH array(μικροσυστοιχιών). Ομοίως με πριν, το δείγμα σημαίνεται πράσινο και το πρότυπο φυσιολογικό κόκκινο. Αντι για χρήση μεταφασικών χρωμοσωμάτων, χρησιμοποιείται μια μικροσυστοιχία που περιέχει γενωμικούς ανιχνευτές από όλο το γένωμα. Οι αναλογίες φθορισμού υπολογίζονται μέσω σαρωτή. Αναλόγως την πυκνότητα ανιχνευτών/μέγεθος(αναλογία), η ανάλυση πλησιάζει τις 400 χιλιάδες, αρκετή για να ποσοτικοποιήσει ανωμαλίες αριθμού αντιγράφων για συγκεκριμένο γενετικό τόπο(loci). Μειονέκτημα των CGH και aCGH πως δεν μπορούν να ανιχνεύσουν αμοιβαίες μεταθέσεις και αναστροφές, καθώς δεν προκαλούν αλλαγές στην ποσότητα του DNA.

SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISM ARRAY: Μια άλλη μέθοδος που ανιχνεύει αριθμητικές χρωμοσωματικές ανωμαλίες είναι η SNP μικροσυστοιχία. Αντί να υβριδίζεται το πλήρες γένωμα του δείγματος και του προτύπου, μόνο το γένωμα του δείγματος υβριδίζεται σε μία μικροσυστοιχία με 100.000 SNP ανιχνευτές. Οι αλλαγές στον αριθμό αντιγράφων υπολογίζονται συγκρίνοντας τον φθορισμό του δείγματος με ένα control. Ένα άλλο σημαντικό επίτευγμα είναι πως η τεχνική μπορεί να υπολογίσει αναλογία των γονικών χρωμοσωμάτων, επιτρέποντας την ανίχνευση της UPD(μονογονεϊκή δισωμία). Εμφανίζει τους ίδιους περιορισμούς όπως και οι CGH,aCGH.

Έως τώρα συζητήθηκαν οι συνηθισμένες τεχνικές ποσοτικοποίησης ανευπλοειδίας. Κάθε μία από αυτές έχει πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα. Οι χρώσεις πλήρους καρυοτύπου είναι ισχυρό εργαλείο, όμως μπορεί να εφαρμοστούν μόνο εάν υπάρχουν διαθέσιμα διαιρούμενα κύτταρα και επίσης τα αποτελέσματα θα είναι αντιπροσωπευτικά μόνο για τον διαιρούμενο κυτταρικό πληθυσμό. Η μεσοφασική FISH, μπορεί να ανιχνεύσει ανωμαλίες στο επίπεδο ενός μοναδικού κυττάρου αλλά μόνο σε μερικά χρωμοσώματα κάθε φορά. Τέλος, οι αναλύσεις μικροσυστοιχιών επιτρέπουν την υψηλή ανάλυση μη διαιρουμένων κυττάρων, όμως όχι στο επίπεδο ενός μοναδικού κυττάρου. Όμως για να κατανοηθεί πως η χρωμοσωματική αστάθεια επηρεάζει την εμφάνιση και ανάπτυξη μιας ασθένειας, χρειάζονται πλατφόρμες που συνδυάζουν ανάλυση στο επίπεδο του ενός κυττάρου και πλήρη καρυοτυπική ανάλυση. Πρόσφατα, σχετικά τέτοιες μέθοδοι ήρθαν στο προσκήνιο και αναφέρονται αμέσως μετά.

NEES TEXNOLOGIES-ALLHLOYXISIH: Ενώ η CGH και η SNP μικροσυστοιχία μπορούν να υπολογίσουν την ανευπλοειδία με πολύ μεγαλύτερη ανάλυση από την μεσοφασική FISH, είναι λιγότερο κατάλληλες για μετρήσεις καρυοτυπικής ετερογένειας(διαφορές ανάμεσα στους καρυοτύπους πολλών κυττάρων με ένα δείγμα). Συνεπώς μια ιδανική μέθοδος θα συνδυάζε τα καλύτερα και από τις δύο πλευρές. Η NGS τεχνολογία άνοιξε νέους δρόμους στη μελέτη του γονιδιώματος του ανθρώπου, επιτρέποντας την χαρτογράφηση μεταλλάξεων ακόμη και στο επίπεδο ενός και μόνο νουκλεοτιδίου.

ALLHLOYXISIH ENOS MONADIKOY KYTTAPOY: Χρησιμοποιείται για την ποσοτικοποίηση καρυοτύπων συγκεκριμένων κυττάρων και έχει βρει εφαρμογή στην ανίχνευση πολυπλοειδίων στο συκώτι, στον εγκέφαλο και στο δέρμα. Αναλόγως τον επιθυμητό κυτταρικό τύπο μελέτης, μπορούν να απομονωθούν κύτταρα μέσω σειριακών διαλυμάτων και FACS μεταξύ άλλων. Λόγω της μικρής ποσότητας DNA που περιέχεται σε ένα μόνο κύτταρο, η δημιουργία βιβλιοθήκης ξεκινάει με την

ενίσχυση ολου του γονιδιώματος(WGA-whole genome amplification). Ένα τυπικό πρωτόκολλο είναι το εξής:το DNA υπόκειται σε θράυση, διορθώνονται τα άκρα, φωσφορυλιώνονται και προστίθεται A-ουρά για την ένωση του με προσδότη αντάππορα που καθιστά τα θραύσματα συμβατά με την εκάστοτε πλατφόρμα. Κατόπιν πρόσδεσης του αντάππορα, τα θραύσματα της βιβλιοθήκης ενισχύονται με PCR. Συνήθως το κάθε θραύσμα διαθέτει ειδική αλληλουχία αναγνώρισης εντός του αντάππορα. Ακολουθεί NGS και εύρεση των ομοιοτήτων και διαφορών στον γενετικό χάρτη.

Ένα μεγάλο πλεονέκτημα της μεθόδου εναντίον της FISH, είναι η ικανότητα να παρατηρούνται ταυτόχρονα όλα τα χρωμοσώματα ταυτοχρόνως στο ίδιο κύτταρο. Επομένως, η αλληλούχιση μοναδικού κυττάρου συνδυάζει την δυνατότητα της FISH να αναλυει μεμονωμένα κύτταρα και την ικανότητα ανάλυσης καρυοτύπου όπως οι μικροσυστοιχίες. Επίσης, η πιθανότητα υποτίμησης ή υπερεκτίμησης των αριθμών αντιγράφων, μειώνεται καθώς χιλιάδες αναγνώσεις κάθε χρωμοσώματος υπάρχουν, αντί για λίγους μόνο τόπους(loci) του κάθε χρωμοσώματος.

Η NGS έχει βέβαια τα μειονεκτήματα της. Αρχικά, είναι πολύ πιο ακριβή συγκριτικά με τις προαναφερθείσες τεχνικές. Δεν ανιχνεύει ισοζυγισμένες μεταθέσεις ή αναστροφές, ειδικότερα αν επιλεγεί χαμηλότερη κάλυψη γονιδιώματος. Αν πάλι επιλεγεί υψηλότερη ανάλυση, μπορεί μια μετάθεση να ανιχνευθεί ως «χμιαϊκή» αλληλουχία, δηλαδή μια ανάγνωση να την αντιστοιχήσει σε δυο χρωμοσώματα, αποκαλύπτοντας το σημείο θραύσης και το μεταθετό τμήμα. Η κάλυψη εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την προετοιμασία της βιβλιοθήκης και τις παραμέτρους της εκάστοτε πλατφόρμας όπως επίσης και των στοιχείων βιοπληροφορικής που χρησιμοποιούνται. Μη ισοζυγισμένες μεταθέσεις ανιχνεύονται εύκολα, με σχετική δυσκολία στον προσδιορισμό θέσης. Βέβαια, όταν υποψιαζόμαστε τέτοιες ανωμαλίες, η χρήση FISH και G-banding βοηθάει. Αξίζει τέλος να αναφερθεί πως λόγω μικρής ποσότητας DNA μπορεί να δημιουργηθούν PCR artifacts ή NGS artifacts,τα οποία ωστόσο μπορούν να διορθωθούν με τα σωστά εργαλεία βιοπληροφορικής.

ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗ ΕΝΟΣ ΜΟΝΑΔΙΚΟΥ ΚΛΩΝΟΥ: Μια εναλλακτική μέθοδος χαρτογράφησης μεταθέσεων και αναστροφών είναι η Strand-seq. Αρχικά χρησιμοποιήθηκε για την μελέτη της κληρονομησης αδελφών χρωματίδων σε ασύμμετρα διαιρούμενα κύτταρα. Κατά τη διάρκεια της κυτταρικής διαίρεσης, κάθε θυγατρικό κύτταρο κληρονομεί μια αδελφή χρωματίδα από κάθε ζεύγος. Η τεχνική βοηθάει τους ερευνητές να ανακαλύψουν το μοτίβο κληρονομησης. Για το σκοπό αυτό, τα κύτταρα καλλιεργούνται παρουσία Βρωμο-ουριδίνης (BrdU), ένα ανάλογο της θυμιδίνης,για έναν ακριβώς κυτταρικό κύκλο, με αποτέλεσμα η BrdU μόνο στις νεοσυντιθέμενες αλυσίδες DNA. Οι βιβλιοθήκες ετοιμάζονται κατόπιν επιλογής FACS, ακολουθούμενη από UV-Hoechst, προκαλεί picks στις περιοχές ενσωμάτωσης στον νεοσυντιθέμενο κλωνο. Έτσι, κατά την ενίσχυση PCR, μόνο ο πρωταρχικός κλώνος ενισχύεται. Κατόπιν αλληλούχισης Strand-seq και χρήσης του εργαλείου βιοπληροφορικής BAIT(bioinformatics analysis inherited templates) χρησιμοποιείται στην ανάλυση των αναγνώσεων. Το Strand-seq, μπορεί επίσης να χαρτογραφήσει μεταθέσεις, αναστροφές,και να ανιχνεύσει χρωμοσωματικές ή τοπικές ενισχύσεις ή ελλείματα, επιτρέποντας έτσι την πιο λεπτομερειακή ανάλυση καρυοτύπου. Επειδή δεν χρησιμοποιείται WGA, αποφεύγονται και τα λάθη ενίσχυσης PCR. Ως αποτέλεσμα, ο αριθμός αναγνώσεων ανα χρωμόσωμα, τυπικά δείχνει ικανοποιητικά αποτελέσματα.

Λαμβάνοντας υπόψιν μαζί την αλληλούχιση ενός κυττάρου και την Strand-seq, παρατηρείται πως η πρώτη δίνει πλήρη καρυότυπο ενός κυττάρου και η δεύτερη περιορίζεται σε διαιρούμενα κύτταρα. Για την ώρα, το οικονομικό κόστος και η ανάγκη για εξειδίκευση στην βιοπληροφορική περιορίζουν την χρήση τους στα ερευνητικά εργαστήρια, όμως με την βελτίωση της απόδοσης και μείωση κόστους των NGS τεχνικών και τη δημιουργία εργαλείων βιοπληροφορικής με φιλικό προς τον χρήστη περιβάλλον αλληλεπίδρασης, οι πλατφόρμες θα γίνουν στο εγγύς μέλλον,αναπόσπαστο κομμάτι της διάγνωσης τόσο σε κλινικό όσο και σε επίπεδο έρευνας.

4.ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΣΗ ΧΡΩΜΟΣΩΜΑΤΟΣ

Τα ανθρώπινα σωματικά κύτταρα έχουν 46 χρωμοσώματα, αποτελούμενα από 23 ζεύγη, με πολύ μεγάλο βαθμό ομοιότητας. Τα χρωμοσώματα περιέχουν το γενετικό υλικό, το οποίο ορίζει σε μεγάλο βαθμό πως θα αναπτυχθεί και λειτουργήσει ένας οργανισμός στο διηνεκές του χρόνου. Έχοντας υπόψιν τα παραπάνω, είναι λογικό ελλείψεις, μεταθέσεις, διπλασιασμοί και άλλες ανωμαλίες να έχουν σοβαρό αντίκτυπο.

Τα χρωμοσώματα αποτελούνται από χρωματίνη, ένα σύμπλεγμα DNA και πρωτεϊνών. Το DNA στο κάθε χρωμόσωμα είναι μια αλυσίδα περίπου 5 εκατοστών που περιέχει 140 εκατομμύρια νουκλεοτίδια. Τα νουκλεοτίδια ανά 200 τον αριθμό, περιτυλίγονται γύρω από ένα οκταμερές ιστονών, δημιουργώντας τα νουκλεοσώματα. Οι ιστόνες, αποτελούμενες στην πλειοψηφία τους από αμινοξέα Λυσίνης και Αργινίνης, είναι θετικά φορτισμένες και κατά συνέπεια αλληλεπιδρούν έντονα με τις αρνητικά φορτισμένες ομάδες του DNA.

Εν συνεχεία, τα νουκλεοσώματα περιτυλίγονται σε ίνες που αποκαλούνται σωληνοειδή(solenoids). Αυτή είναι η δομή των χρωμοσωμάτων κατά την μεσόφαση. Κατά την μίτωση, τα χρωμοσώματα συμπυκνώνονται έως και το στάδιο της μετάφασης. Αυτό συμβαίνει μέσω στηρικτικών πρωτεϊνών(scaffold) οι οποίες λειτουργούν βοηθητικά στην δημιουργία περιοχών περιέλιξης(looped domains) των σωληνοειδών. Στο τελικό στάδιο, η δράση των κοντενσινών, έχει ως αποτέλεσμα την πλέον συμπυκνωμένη εκδοχή των χρωμοσωμάτων.

THE CHEMICAL STRUCTURE OF DNA

DNA (deoxyribonucleic acid) carries genetic information in all multicellular forms of life. It carries instructions for the creation of proteins, which carry out a wide range of roles in the body.

THE SUGAR PHOSPHATE 'BACKBONE'

DNA is a polymer made up of units called nucleotides. The nucleotides are made of three different components: a sugar group, a phosphate group, and a base. There are four different bases: adenine, thymine, guanine & cytosine.

WHAT HOLDS DNA STRANDS TOGETHER?

DNA strands are held together by hydrogen bonds between bases on adjacent strands. Adenine (A) always pairs with thymine (T), whilst guanine (G) always pairs with cytosine (C).

A ADENINE

T THYMINE

G GUANINE

C CYTOSINE

FROM DNA TO PROTEINS

DNA → TRANSCRIPTION → RNA → TRANSLATION → PROTEIN

The bases along a single strand of DNA act as a code. The letters form three letter 'words', or codons, which code for different amino acids - the building blocks of proteins.

An enzyme, RNA polymerase, transcribes DNA into mRNA (messenger ribonucleic acid). It does this by splitting apart the two strands that form the double helix, then reading a strand and copying the sequence of nucleotides. The only difference between the RNA and the original DNA is that in the place of thymine (T), another base with a similar structure is used: uracil (U).

DNA SEQUENCE	T T C C T G A A C C G T T A
mRNA SEQUENCE	U U C C U G A A C C G U U A
AMINO ACID	Phenylalanine Leucine Asparagine Proline Leucine

In multicellular organisms, the mRNA carries genetic code out of the nucleus, to the cell's cytoplasm. Here, protein synthesis takes place. 'Translation' is the process of converting turning the mRNA's 'code' into proteins. Molecules called ribosomes carry out this process, building up proteins from the amino acids coded for.

© COMPOUND INTEREST 2015 - WWW.COMPOUNDCHEM.COM | Twitter: @compoundchem | Facebook: www.facebook.com/compoundchem

This graphic is shared under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives licence.

Εικόνα 4: Η χημική δομή του DNA

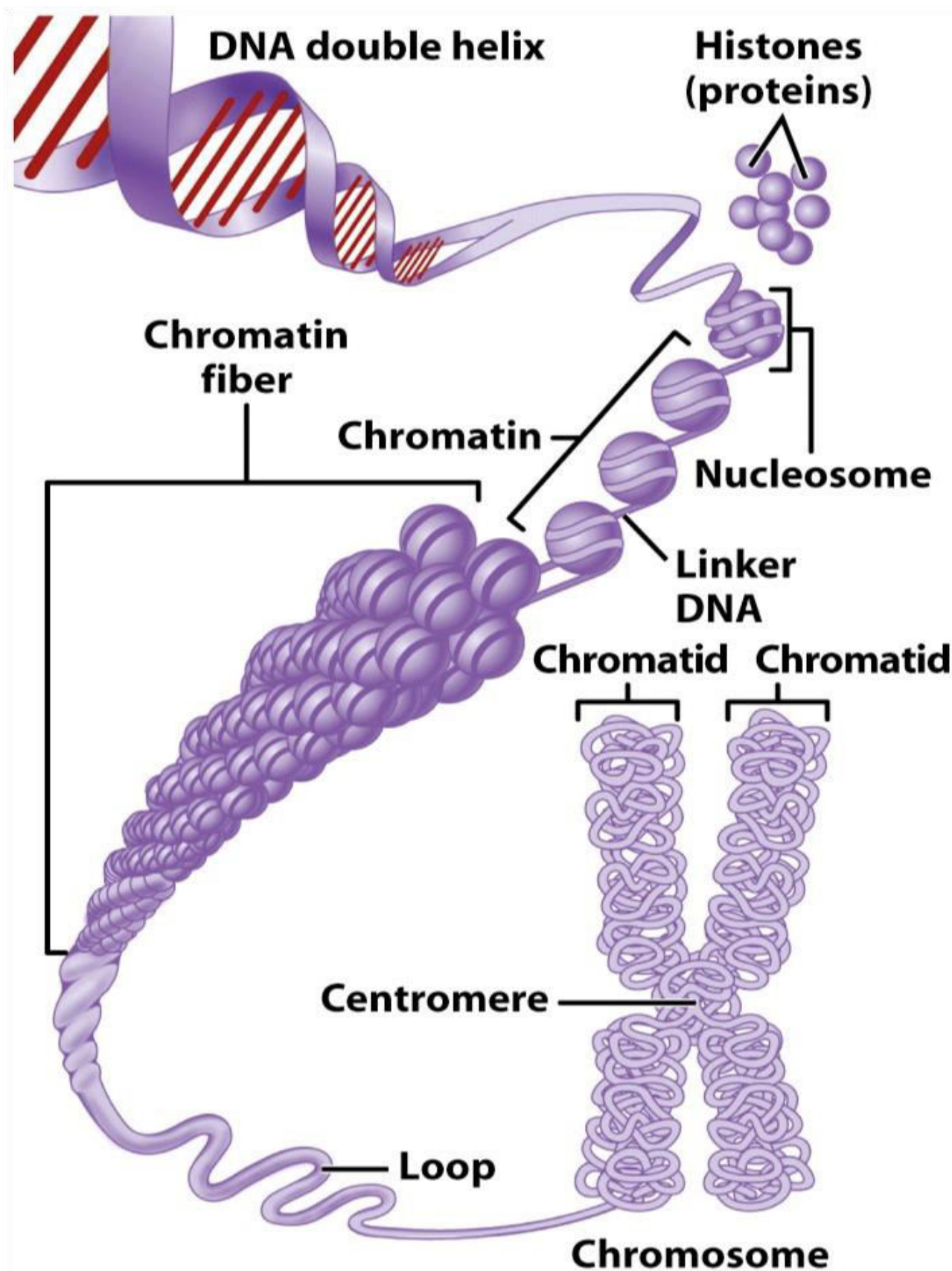


Figure 3-23 Principles of Anatomy and Physiology, 11/e
© 2006 John Wiley & Sons

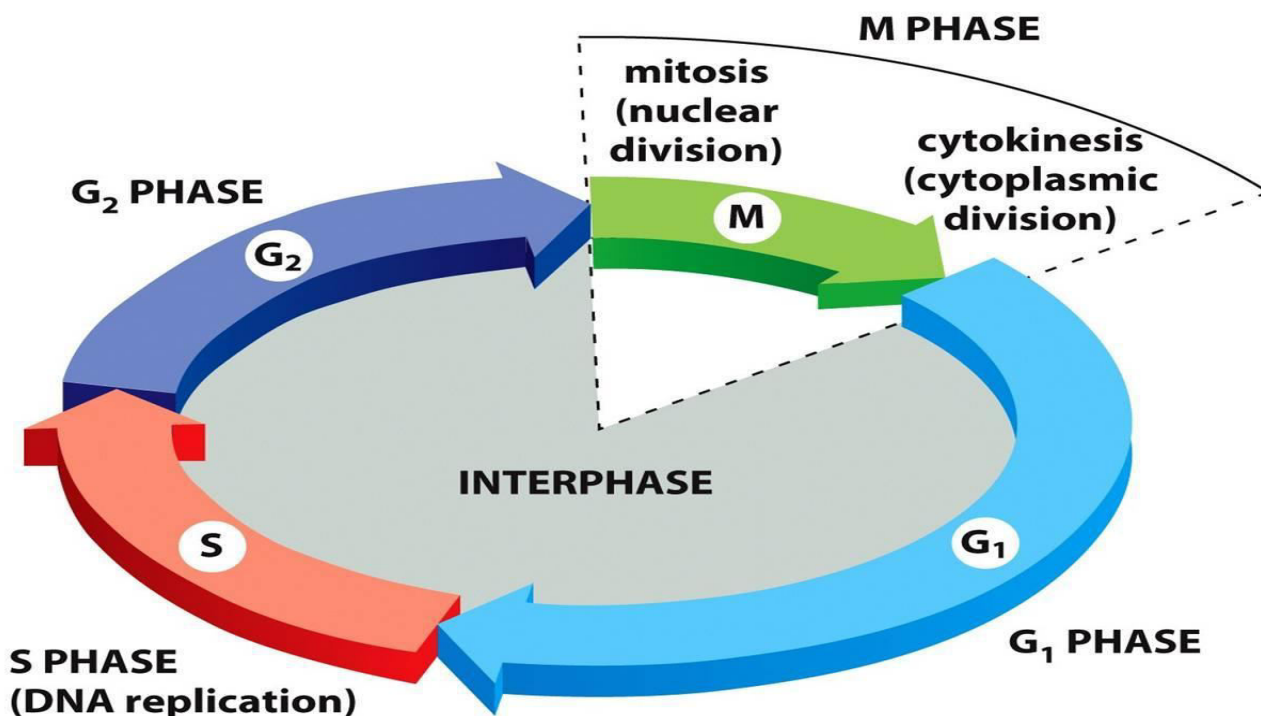
Εικόνα 5: Από το DNA στο χρωμόσωμα.

Υπάρχουν διάφορες τεχνικές παρατήρησης-οπτικοποίησης που μπορούν να χρησιμοποιηθούν στη μελέτη των χρωμοσωμάτων. Η οπτική και φθορίζουσα μικροσκοπία έχει περιορισμένη ανάλυση, παρέχοντας λιγότερα στοιχεία. Το πλεονέκτημα της οπτικής είναι πως δεν προκαλεί μεγάλες ζημιές στα χρωμοσώματα, ενώ της φθορίζουσας ότι εμφανίζει μεγαλύτερη ευαισθησία και εξειδίκευση.

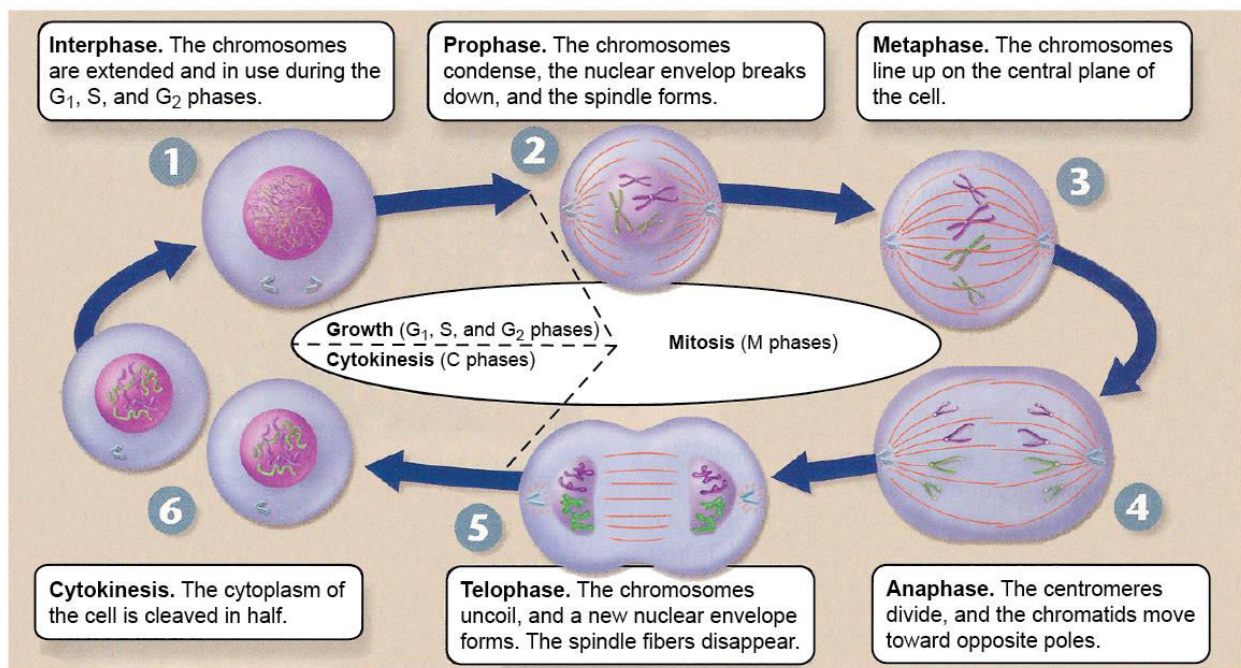
Η ηλεκτρονιακή μικροσκοπία περιλαμβάνει την TEM(transmission electron microscopy) και την SEM(scanning electron microscopy). Παρέχουν πολύ περισσότερες πληροφορίες από τα προηγούμενα είδη μικροσκοπίας όμως μειονέκτημα αποτελεί το γεγονός πως δεν μπορούμε να παρατηρήσουμε την τρισδιάστατη δομή των χρωμοσωμάτων, καθώς το πάχος του δείγματος της TEM περιορίζεται στα 100nm και η SEM εμφανίζει ευαισθησία μόνο στη σάρωση της επιφάνειας.

Η coherent x-ray diffraction(CDI) παρέχει τρισδιάστατες και υψηλής ανάλυσης εικόνες όμως είναι δύσκολο να παρασκευασθούν τα δείγματα και λόγω ραδιενέργειας τα χρωμοσώματα υπόκεινται σε φθορά.

Ο κυτταρικός κύκλος χωρίζεται σε πέντε διακριτές φάσεις. Η μεσόφαση αποτελείται από τις G₁,S,G₂. Στις G₁,G₂ συντίθενται πρωτεΐνες και παράγονται οργανίδια. Στην S φάση, αντιγράφεται το DNA. Μετά την S, κάθε χρωμόσωμα αποτελείται από δύο αδελφές χρωματίδες, οι οποίες συγκρατούνται μαζί στο κεντρομερές. Το κεντρομερές είναι το μέρος όπου συνδέονται διάφορες πρωτεΐνες δημιουργώντας έτσι την δισκοειδή δομή του κινητοχώρου. Ο κινητοχώρος διαδραματίζει εξέχοντα ρόλο στη μίτωση, σχετικό με τον διαχωρισμό των αδελφών χρωματίδων από την μιτωτική άτρακτο. Από την G₂ και μετά τα χρωμοσώματα αρχίζουν να γίνονται ορατά στο οπτικό μικροσκόπιο λόγω αύξησης του βαθμού συμπύκνωσης. Η μίτωση είναι το στάδιο στο οποίο λαμβάνει χώρα ο πλήρης διαχωρισμός των αδελφών χρωματίδων. Διακρίνεται σε πρόφαση, προμετάφαση, μετάφαση, ανάφαση και τελόφαση. Έως και το στάδιο της μετάφασης, τα χρωμοσώματα συμπυκνώνονται. Στην μετάφαση, ευθυγραμμίζονται στον ισημερινό ώστε να διαχωριστούν.Στην ανάφαση πλέον οι αδελφές χρωματίδες διαχωρίζονται εντελώς και στην τελόφαση το DNA αποσυμπυκνώνεται σταδιακά για να εισέλθει στον επόμενο κύκλο.



Εικόνα 6: Σχηματική αναπαράσταση του κυτταρικού κύκλου.



Εικόνα 7: Σχηματική αναπαράσταση των σταδίων της μίτωσης.

Η χρώση χρησιμοποιείται για τονίσει την διαφορά ανάμεσα στα κυτταρικά στοιχεία και συνεπώς την οπτικοποίηση των χρωμοσωμάτων μέσω πληθώρας τεχνικών. Διαφορετικές χρώσεις δημιουργούν χαρακτηριστικές για το κάθε χρωμόσωμα ζώνες(bands). Οι ζώνες που παράγονται αντανακλούν μια συγκεκριμένη περιοχή ή υποδομή του χρωμοσώματος.

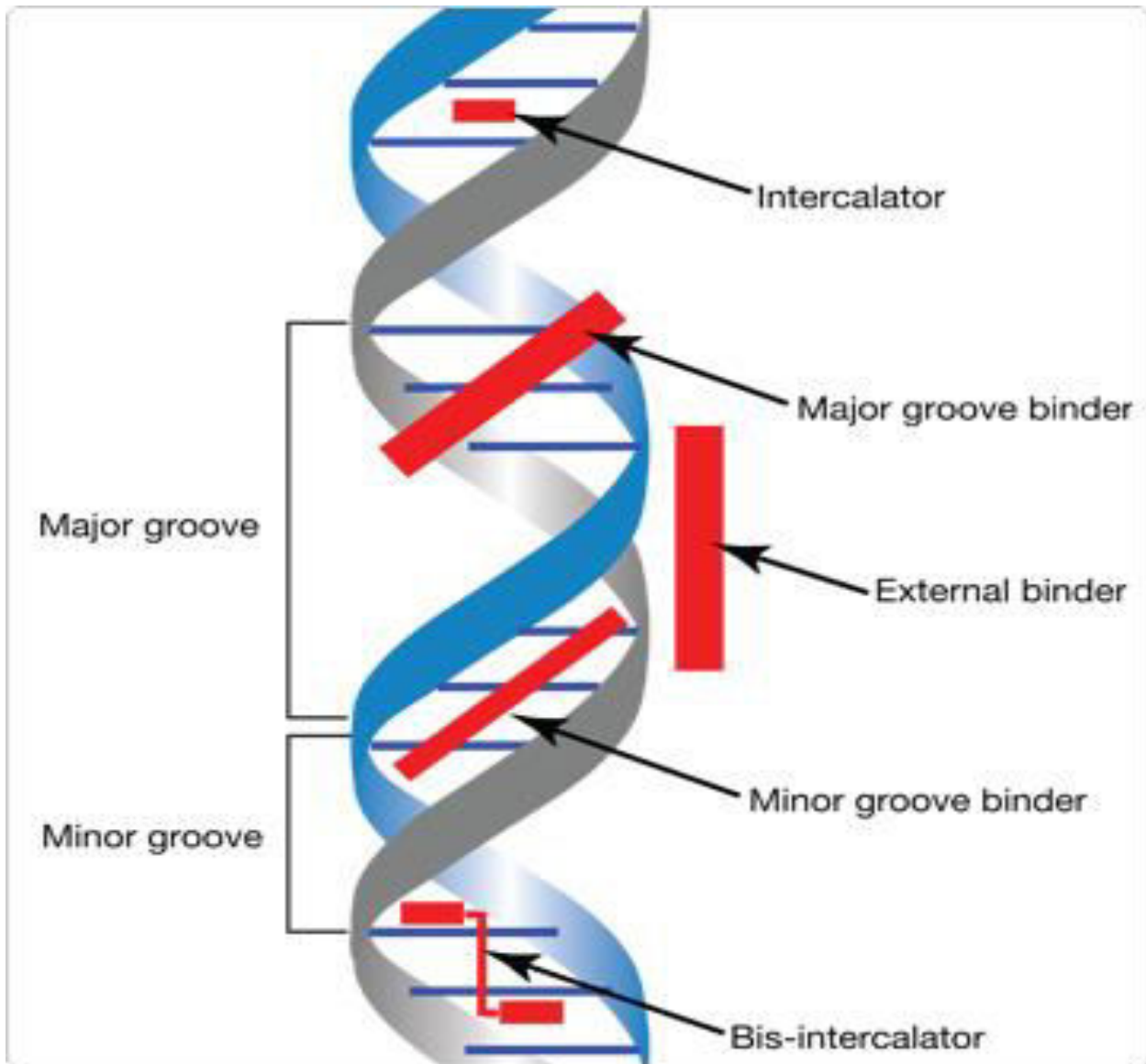
Η χρωματίνη μπορεί να είναι ετεροχρωματίνη ή ευχρωματίνη. Η έτεροχρωματίνη είναι συμπυκνωμένη κατά την διάρκεια του κυτταρικού κύκλου και δεν μεταγράφεται. Αντιγράφεται αργά και τα λίγα γονίδια που περιέχει, είναι ανενεργά. Μόνο το 20% των γονιδίων βρίσκεται στην ετεροχρωματινική κατάσταση. Εν αντιθέσει, οι ευχρωματινικές περιοχές είναι αποσυμπυκνωμένες και υπόκεινται σε μεταγραφή, αντιγράφονται νωρίς και περιέχουν πληθώρα γονιδίων. Η ετεροχρωματίνη είναι ιδιοστατική(constitutive), η οποία αποτελείται από δορυφορικό DNA(επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες) στο κεντρομερές και στα τελομερή και παραμένει συμπυκνωμένη πάντοτε. Μπορεί όμως να είναι δυνητική(facultative), η οποία αν δεχθεί την κατάλληλη σηματοδότηση μπορεί να αποσυμπυκνωθεί σε ευχρωματίνη.

Για να κατανοήσει κανείς, πως προκύπτει η ζώνωση και να συσχετίσει αυτή με την δομή των χρωμοσωμάτων, είναι απαραίτητο να γνωρίζει πως οι χρωστικές προσδένονται στα χρωμοσώματα. Οι χρωστικές μπορούν να προσδεθούν μέσω των εξής τρόπων: intercalation, minor groove, major groove και εξωτερική πρόσδεση. Αυτό εξαρτάται από τον τύπο αλληλεπίδρασης της χρωστικής με το DNA και την ομοιοπολική ή μη, φύση της.

Ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις περιλαμβάνονται στην αντίδραση μετάλλου και ατόμων αζώτου στις βάσεις του DNA. Προκύπτουν συχνά στην θέση 7 της Αδενίνης και της Γουανίνης. Πολλές χρωστικές που περιέχουν Pt(πλατίνα) έχουν τέτοια αλληλεπίδραση, καθώς εμφανίζουν υψηλή συγγένεια για το άζωτο. Ο τύπος αυτός οδηγεί σε πρόσδεση major groove.

Μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις είναι οι δεσμοί υδρογόνου, οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις και οι αντιδράσεις π-π. Δεσμοί υδρογόνου προκύπτουν με χρωστικές που έχουν ηλεκτραρνητικό άτομο όπως άζωτο ή οξυγόνο στις λειτουργικές ομάδες τους και σχηματίζουν δεσμό με τις ομάδες δότες ηλεκτρονίων των βάσεων(θέση 6 Αδενίνης, θέση 4 Κυτοσίνης και θέση 2 Γουανίνης). Οι

δεσμοί αυτοί οδηγούν σε minor ή major groove πρόσδεση. Οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις περιλαμβάνουν χρωστικές με κατιόντα, τα οποία δημιουργούν αλληλεπίδραση με τις αρνητικά φορτισμένες φωσφορικές ομάδες του DNA και οδηγούν σε εξωτερική πρόσδεση. Οι π-π αλληλεπιδράσεις προκύπτουν όταν η χρωστική έχει αρωματικούς δακτυλίους. Τα p τροχιακά των αρωματικών δακτυλίων της χρωστικής και του DNA αλληλεπιδρούν και έχουμε το φαινόμενο intercalation, κατά το οποίο η χρωστική εισέρχεται ανάμεσα στις βάσεις. Το φαινόμενο αυτό οδηγεί σε αποελίκωση του DNA κατά συνέπεια σε επιμήκυνση. Αν μια χρωστική διαθέτει διαφορετικές λειτουργικές ομάδες μπορεί να εμφανίσει ταυτόχρονα διαφορετικούς τρόπους πρόσδεσης.



Εικόνα 8: Διάγραμμα που δείχνει τις θέσεις πρόσδεσης χρωστικών και άλλων μορίων-προσδετών στο DNA. (Thermo Fisher)

5.ΚΑΡΥΟΤΥΠΟΣ

Η τεχνική του καρυοτύπου είναι η συχνότερα χρησιμοποιούμενη τεχνική στον κλάδο της κυτταρογενετικής, τόσο σε ερευνητικό όσο και σε κλινικό επίπεδο. Η ετυμολογία της λέξης προέρχεται από το αρχαιοελληνικό κάρυον(καρύδι,καρπός,σπόρος) και την λέξη τύπος που προέρχεται από το ρήμα τύπτω(χτυπώ). Σε ελεύθερη ερμηνεία, σημαίνει η μορφή του σπόρου-πυρήνα και αποδόθηκε πρώτη φορά το 1888 από τον Γερμανό ανατόμο, Heinrich von Waldeyer.

Ο ορισμός του καρυοτύπου είναι ο εξής:μικροφωτογραφία των χρωμοσωμάτων ενός κυττάρου, που λαμβάνεται κατά την διάρκεια της μετάφασης, όταν κάθε χρωμόσωμα αποτελείται από ένα ζεύγος αδελφών χρωματίδων. Εν συνεχεία, τα χρωμοσώματα τοποθετούνται κατά αριθμητική σειρά,με φθίνουσα σειρά μεγέθους.(Bickmore, 2001)

Για την προετοιμασία του καρυότυπου, απαιτούνται κύτταρα σε μετάφαση. Κάθε τύπος εμπύρηνου κυττάρου μπορεί να χρησιμοποιηθεί δυνητικά. Η πιο εύκολη,γρήγορη,ανέξοδη δειγματοληψία είναι αυτή του αίματος, όμως συχνά χρησιμοποιούνται ινοβλάστες δέρματος και κύτταρα μυελού των οστών. Σχετικά με το αίμα, επιλέγουμε κύτταρα λεμφικά στα οποία δίχως μεγάλη προσπάθεια μπορούμε να επάγουμε τον πολλαπλασιασμό, δίνοντας έτσι ένα πολύ μεγάλο αριθμό μεταφασικών κυττάρων.

Υπάρχει πληθώρα πρωτοκόλλων προετοιμασίας καρυοτύπου από λεμφοκύτταρα περιφερικού αίματος,όμως εμφανίζουν συγκεκριμένα βασικά κοινά σημεία τα οποία θα παρουσιαστούν εδώ.

A. Γίνεται λήψη αίματος και άμεσα προστίθεται ηπαρίνη για να αποφευχθεί η πήξη του. Η ηπαρίνη είναι αντιπηκτικό φαρμακο, αποτελούμενο από πολυσακχαρίτες που αναστέλλουν την πήξη, σχηματίζοντας μια αντιθρομβίνη που αποτρέπει την μετατροπή της προθρομβίνης σε θρομβίνη και αποτρέποντας την απελευθέρωση θρομβοπλαστίνης από τα αιμοπετάλια.

B. Με την βοήθεια της φυγοκέντρωσης του αίματος και με την χρήση ενδιαμέσου που επιτρέπει την καταβύθιση των ερυθροκυττάρων και των κοκκιοκυττάρων, μπορούμε να απομονώσουμε λεμφοκύτταρα και μονοκύτταρα στο υπερκείμενο.

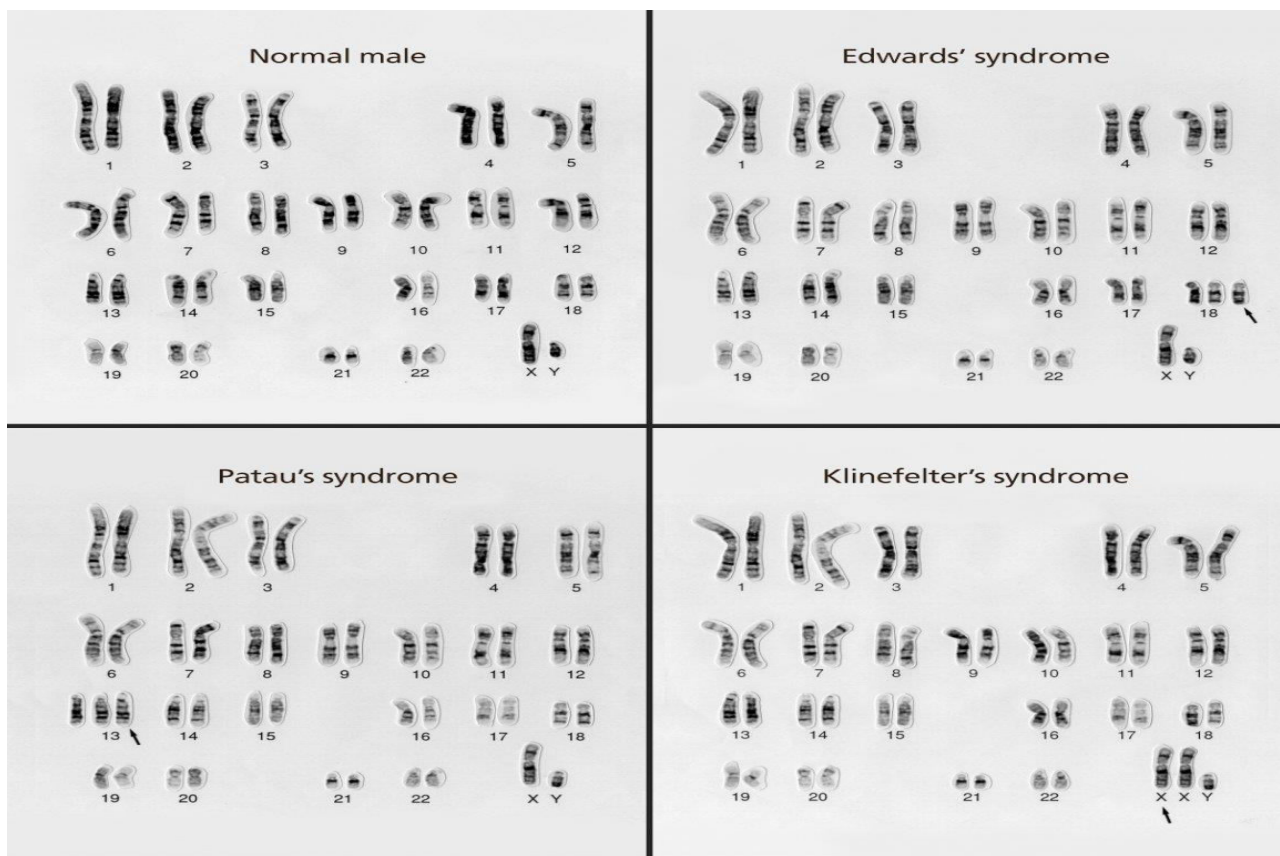
Γ. Τα απομονωμένα κύτταρα καλλιεργούνται σε θρεπτικό υλικό που περιέχει φυτοαιματογλουτινίνη για 3-4 ημέρες και αυτό οδηγεί σε αύξηση του πολλαπλασιασμού κατακόρυφα. Η φυτοαιματογλουτινίνη είναι λεκτίνη εβρισκόμενη στα φυτά, κυρίως σε διάφορες ποικιλίες φασολιού,που προκαλεί μίτωση και επηρεάζει την λειτουργία της μεμβράνης και την διαπερατότητά της ώστε να μεταφέρονται πρωτείνες.

Δ. Όταν η καλλιέργεια τελειώσει, υπάρχει ένας μεγάλος πληθυσμός διαιρουμένων κυττάρων, στον οποίο προστίθεται κολχικίνη για να σταματήσει ο κυτταρικός κύκλος στη μετάφαση. Έτσι, ένας μεγάλος αριθμός των κυττάρων βρίσκονται στο επιθυμητό μεταφασικό στάδιο. Η κολχικίνη δρα ως αναστολέας της συναρμολόγησης μικροσωληνίσκων στα κύτταρα, παρεμβαίνοντας στον πολυμερισμό της τουμπουλίνης.

E. Τα λεμφοκύτταρα συλλέγονται και επεξεργάζονται με υποτονικό διάλυμα για σύντομο χρονικό διάστημα. Η πράξη αυτή έχει ως αποτέλεσμα οι πυρήνες να διογκοθούν οσμωτικά και συνεπώς να διευκολύνει την μικροσκοπική παρατήρηση αφού τα χρωμοσώματα δεν αλληλοεπικαλύπτονται.

ΣΤ. Τα κύτταρα απλώνονται σε πλακίδια και αφήνονται να στεγνώσουν.

Z. Τα πλακίδια υπόκεινται σε επεξεργασία με τρυψίνη, μια υδρολάση που καταλύει την διάσπαση πεπτιδίων και πρωτεϊνικών συμπλόκων, αφήνοντας έτσι καθαρό το πεδίο για την εφαρμογή της χρωστικής και την πρόκληση ζώνωσης.



Εικόνα 9: Καρυότυπος φυσιολογικός και καρυότυπος τριών αριθμητικών ανωμαλιών.

ΧΡΩΣΤΙΚΕΣ ΦΑΣΜΑΤΟΣ ΟΡΑΤΟΥ ΦΩΤΟΣ

A. Χρώση Giemsa και G-banding: Η χρωστική Giemsa είναι ορατή στο φως και προσδένεται στο DNA. Είναι μίγμα κατιονικών θιαζινών όπως azure B και ανιονικών ηωσινών όπως ηωσίνη Y. Τα μόρια θιαζίνης ηωσίνης βρίσκονται σε αναλογία 2:1. Αρχικά, προσδένονται οι θιαζίνες στο DNA, ανάμεσα στις βάσεις, και βάφουν μπλε το μόριο. Ακολούθως η ηωσίνη προσδένεται στη θιαζίνη σε υδροφοβικό πάντα περιβάλλον, η χρώση γίνεται μωβ. Οι αλληλεπιδράσεις θιαζίνης/ηωσίνης αποτελούν ακόμη και σήμερα αντικείμενο προβληματισμού. (Estandarte, 2012)

Η ζώνωση G, είναι η ευρύτερα χρησιμοποιούμενη μέθοδος και αναπτύχθηκε από τον Seabright το 1971. Η τεχνική δίνει σταθερά και αρκετά υψηλής ευκρίνειας αποτελέσματα. Οι πρωτεΐνες που αναφέρθηκαν παραπάνω πως διασπώνται από τις υδρολάσες, έχουν αντίκτυπο που θα δημιουργηθούν οι ζώνες και δείχνουν διαφορές ανάμεσα στις χρωμοσωμικές περιοχές. Οι θετικές G ζώνες, που εμφανίζονται σκοτεινότερες αντιστοιχούν σε υδροφοβικές περιοχές των χρωμοσωμάτων που ευνοούν την δημιουργία συμπλόκου θιαζίνης/ηωσίνης. Αντιστοιχούν σε ετεροχρωματίνη και διαθέτουν δισουλφιδικούς δεσμούς που καθλώνουν το σύμπλοκο. Οι ετεροχρωματικές περιοχές είναι πλούσιες σε A,T. Αντίστροφα οι πιο φωτεινές περιοχές είναι υδρόφιλες και δεν ευνοούν την πρόσδεση συμπλόκου. Αντιστοιχούν σε ευχρωματίνη και δεν διαθέτουν ισχυρούς δισουλφιδικούς δεσμούς ανάμεσα στις πρωτεΐνες. Έτσι κατά την επεξεργασία με τρυψίνη, απομακρύνονται. Φυσικά οι αναφορά γίνεται για μη ιστονικές πρωτεΐνες.

B. R-banding(ζώνωση): αποκαλύπτει G,C πλούσιες ευχρωματικές περιοχές και εμφανίζει την ακριβώς αντίστροφη ζώνωση από την G Η τεχνική διαφορά έγκειται στην επώαση των χρωμοσωμάτων σε ιονικό διάλυμα και υψηλή θερμοκρασία(87 βαθμοί Κελσίου) και ακολούθως

χρώση Giemsa. Η επώαση προκαλεί την μετουσίωση των AT περιοχών λόγω χαμηλότερου σημείου τήξης συγκριτικά με τις G,C περιοχές.

Γ. C-banding: αποκαλύπτει το πλούσιο σε A,T κεντρομερές, αποτελούμενο βέβαια από ετεροχρωματίνη. Η τεχνική περιλαμβάνει επεξεργασία με οξύ, βύθιση σε αλατούχο διάλυμα και αλκαλική επεξεργασία. Τα προηγούμενα προκαλούν θράυση του σκελετού, αφήνοντας ανέπαφο το κομμάτι του κεντρομερούς.

ΦΘΟΡΙΟΧΡΩΜΑΤΑ

Εκτός από τις ορατές χρωστικές, τα χρωμοσώματα μπορούν να υπαχθούν σε χρώση με φθοριοχρώματα, τα οποία είναι οργανικά μόρια με δυνατότητα φθορισμού. Τα μόρια αυτά περιέχουν μεγάλα σύμπλοκα όπως αρωματικές ή ετεροκυκλικές ομάδες και χαρακτηρίζονται από σταθερές και ευθύγραμμες (flat) δομές. Υπάρχουν αρκετές παράμετροι οι οποίες είναι σημαντικές για να περιγραφεί ο φθορισμός ενός φθοριοχρώματος. Αυτές περιλαμβάνουν τα μήκη κύματος απορρόφησης και εκπομπής καθώς και την κβαντική απόδοση (quantum efficiency/yield). Το μήκος κύματος απορρόφησης δείχνει την ενέργεια που απαιτείται για την διέγερση του εκάστοτε φθοριοχρώματος και το μήκος κύματος εκπομπής την ενέργεια που εκπέμπεται. Συνήθως, το μήκος εκπομπής είναι μεγαλύτερο του αντιστοίχου της απορρόφησης. Η κβαντική απόδοση, δείχνει την πιθανότητα ενός διεγερμένου φθοριοχρώματος να φθορίσει και ορίζεται ως:

$\Phi = \text{αριθμός φωτονίων που εκπέμπονται} / \text{αριθμός φωτονίων που απορροφούνται}$

Η ικανότητα φθορισμού ενός φθοριοχρώματος εξαρτάται από την δομή και το περιβάλλον του. Η κβαντική απόδοση αυξάνεται όσο αυξάνεται το μέγεθος των συμπλόκων. Οι περιβαλλοντικοί παράγοντες που πρέπει να ληφθούν υπόψη είναι το pH, η ιοντική ισχύς, η θερμοκρασία, το ιξώδες του μέσου και η ύπαρξη μακρομορίων. Το pH και η ιοντική ισχύς έχουν αντίκτυπο στη δομή του μορίου. Η θερμοκρασία, το ιξώδες και τα μακρομόρια μπορούν να επηρεάσουν τον ανταγωνισμό ανάμεσα σε μη ακτινοβολούσες διαδικασίες και τον φθορισμό.

Στη χρώση χρωμοσωμάτων, τα φθοριοχρώματα χρησιμοποιούνται προφανώς όταν θα ακολουθήσει μελέτη με μικροσκόπιο φθορισμού. Έχουν επίσης την ικανότητα να δημιουργούν ζώνες. Παρά το γεγονός είναι λιγότερο σταθερά από τις χρωστικές του ορατού φωτός, όπως η Giemsa, οι οποίες συζητήθηκαν πριν, προσφέρουν αρκετά πλεονεκτήματα. Η Giemsa απαιτεί την χρήση τρυψίνης για την αφαίρεση μη ιστονικών πρωτεϊνών προ της χρώσης. Τα φθοριοχρώματα δεν απαιτούν την χρήση της οπότε αποφεύγεται ως διαδικασία. Επίσης, τα φθοριοχρώματα επιτρέπουν την ταυτόχρονη ζώνωση και in situ υβριδισμό με μόρια ανιχνευτές. Το τελευταίο είναι εξαιρετικά χρήσιμο, σε τεχνικές όπως η FISH, SKY, CGH που θα αναλυθούν αργότερα.

Τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα φθοριοχρώματα είναι η κουινακρίνη, η δυνομυκίνη, η DAPI, η Hoechst 33258 και η χρονομυκίνη A3. Τα φθοριοχρώματα που φθορίζουν έντονα στις AT περιοχές εμφανίζουν ζώνωση όμοια της G-banding και όσα φθορίζουν στις GC περιοχές εμφανίζουν ζώνωση όμοια της R-banding.

Quinacrine: Η χρώση με φθοριοχρώματα επετεύχθη πρώτη φορά το 1970 από τον Caspersson με τη χρήση Quinacrine mustard, μιας αμινοακριδινικής βαφής. Στη συνέχεια αντικαταστάθηκε λόγω τοξικότητας από την διυδροχλωρική κουινακρίνη. Η χρωστική αυτή είναι θετικά φορτισμένη και έχει την δυνατότητα να αλληλεπιδρά με τις αρνητικά φορτισμένες φωσφορικές ομάδες DNA. Προσδένονται σε όλο το χρωμόσωμα ομοιόμορφα. Στις AT πλούσιες περιοχές φθορίζει πιο έντονα, ενώ στις GC περιοχές λιγότερο, λόγω της αμινομάδας της θέσης 2 της G που παρεμποδίζει τον πλήρη φθορισμό. Οι ζώνες της ονομάζονται Q (έντονο κίτρινοπράσινο χρώμα) και αντιστοιχούν στις σκοτεινές ζώνες της G μείον τις ζώνες G της κεντρομερικής περιοχής. Συνεπώς, οι Q ζώνες

αντιστοιχούν σε δυνητική ετεροχρωματίνη. Το γεγονός ότι η χρωστική δεν φθορίζει αρκετά σε κεντρομερικές περιοχές, δείχνει πως και άλλοι παράγοντες πλην της αναλογίας σε βάσεις, όπως η θέση της εκάστοτε βάσης, επηρεάζουν τις ζώνες. Τα αποτελέσματα του Q-banding μπορούν να επηρεαστούν ακόμη και σε πλούσιες AT περιοχές εάν πέριξ αυτής υφίστανται αρκετές γουανίνες.

Daunomycin: Η δυνομυκίνη είναι μια ανθρακυκλίνη και εμφανίζει δράση αντιβιοτικού και χρωστικής. Το αρωματικό σύστημα δακτυλίου, εισέρχεται μεταξύ δυο διπλανών ζεύγων βάσεων. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα το άνοιγμα κατά 12 μοίρες της έλικας και την αύξηση της απόστασης βάση-βάση. Επίσης έχει την δυνατότητα να δημιουργεί δεσμούς Η με τις βάσεις, λόγω των λειτουργικών ομάδων δοτών και δεκτών, που προσδένονται στο minor groove. Η δυνομυκίνη προσδένεται ομοιόμορφα. Όταν η αναλογία AT ξεπερνάει το 65%, ο φθορισμός εντείνεται ενώ σε αναλογία χαμηλότερη του 60%, είναι αμυδρός. Συνεπώς, στο τελικό αποτέλεσμα, οι ζώνες μοιάζουν κατά πολύ της Q-banding.

DAPI: Γνωστή και ως 4,6-διαμιδινο-2-φαινυλοινδόλη, είναι ευρέως χρησιμοποιούμενο φθοριόχρωμα. Ο λόγος είναι πως εμφανίζει εξαιρετικά υψηλή κβαντική απόδοση $\Phi=0.92$. Επιπροσθέτως, η απόδοση επιτυγχάνεται μόνο στην περίπτωση πρόσδεσης με τα χρωμοσώματα. Η χρωστική στο νερό είναι ελάχιστα φθορίζουσα, όμως κατόπιν σύνδεσης με το χρωμόσωμα, εκτινάσσεται ο φορισμός λόγω απόκρυψης από τον διαλύτη. Λόγω της ιδιότητας αυτής, ο φθορισμός της μη προσδεμένης DAPI είναι απειροελάχιστος και επιτρέπει την πολύ καλύτερη μικροσκοπική παρακολούθηση. Τέλος, αξίζει να αναφερθεί πως ο φθορισμός της DAPI δεν ελαττώνεται με το πέρασμα του χρόνου όπως συμβαίνει με την κουινακρίνη. Σε χαμηλή αναλογία χρωστικής/DNA η DAPI προσδένεται σε AT πλούσιες περιοχές. Σχηματίζει υδρογονοδεσμούς με τα άτομα αζώτου στη θέση 3 των αδενινών ή με άτομα οξυγόνου στη θέση 2 των θυμινών. Εξαιτίας των προηγούμενων, εμφανίζεται ζώνωση παρόμοια της G-banding. Σε υψηλή αναλογία, παρατηρείται πρόσδεση και σε GC περιοχές, αλλοιώνοντας τα αποτελέσματα.

Hoechst 33258: Είναι παράγωγο της βενζιμιδαζόλης και προσδένεται στο minor groove, ειδικά στις AT περιοχές. Ο μηχανισμός πρόσδεσης ομοιάζει σε αυτόν της DAPI. Νομοτελειακά, οι προκύπτουσες ζώνες εμφανίζουν ομοιότητα. Χαρακτηριστικό της η έντονη διαφορά ανάμεσα στις ζώνες(contrast) και η καλύτερη ανάλυση.

Counterstaining: Είναι μια τεχνική ζώνωσης με φθοριοχρώματα που προσδένονται ομοιόμορφα σε όλο το χρωμόσωμα. Χρησιμοποιείται επίσης για την ενίσχυση ζωνών που δεν έχουν υψηλή ανάλυση. Περιλαμβάνει την χρήση μιας αρχικής χρωστικής και μιας δεύτερης χρωστικής ακολούθως. Η δεύτερη οφείλει να έχει μήκος κύματος εκπομπής διαφορετικό από την πρώτη.

Δύο μηχανισμοί είναι υπεύθυνοι για την δημιουργία ή ενίσχυση των ζωνών: μεταφορά ηλεκτρονίων και ευθύς ανταγωνισμός πρόσδεσης. Μεταφορά ηλεκτρονιακής ενέργειας είναι το φαινόμενο κατά το οποίο η δεύτερη χρωστική απορροφά τον φθορισμό της πρώτης. Για να συμβεί αυτό, πρέπει το φάσμα απορρόφησης της δεύτερης να υπερκαλύπτει το φάσμα εκπομπής της πρώτης. Ο άμεσος ανταγωνισμός, περιλαμβάνει την εκτόπιση της αρχικής χρωστικής από την δεύτερη. Για να συμβεί αυτό, πρέπει και οι δύο χρωστικές να έχουν όμοιο τρόπο αλληλεπίδρασης με το DNA. Υπάρχουν αρκετοί συνδυασμοί χρωστικών που μπορούν να χρησιμοποιηθούν, λαμβάνοντας πάντα υπ'όψιν την εξειδίκευση πρόσδεσης και τις ιδιότητες φάσματος των χρωστικών.

ΧΡΩΣΤΙΚΕΣ ΒΑΡΕΩΝ ΜΕΤΑΛΛΩΝ

Η χρήση χρωστικών βαρέων μετάλλων για χρωμοσώματα είναι εξαιρετικά σημαντική, όταν ο στόχος είναι η παρατήρηση με ηλεκτρονική μικροσκοπία και χρήση ακτινών Χ. Η χρήση βαρέων μετάλλων βελτιώνει την οπτικοποίηση των χρωμοσωμάτων, μεσω ενίσχυσης σήματος. Περιέχουν στοιχεία όπως Eu(Ευρώπιο), Tb(Τέρβιο), Os(Όσμιο), και U(ουράνιο) όπως επίσης και DNA-

προσδέτες: d8 συμπλέγματα πλατίνας με τετράγωνη ευθεία γεωμετρία($\text{Pt}(\text{terp})\text{Cl}$)⁺ και d6 οκτάγωνα μεταλλικά συμπλέγματα με διαμινικούς αρωματικούς προσδέτες ($\text{Ru}(\text{dimgr})$)²⁺, όπου Ru(Ρουθένιο).

Συμπλέγματα Pt(Πλατίνα): Το ($\text{Pt}(\text{terp})\text{Cl}$)⁺ προσδένεται στο DNA όμως δεν εμφανίζει φθορισμό. Για να δημιουργηθεί ένα φθορίζον σύμπλεγμα απαιτείται ένας προσδέτης που θα επιτρέψει την εναλλαγή των ηλεκτρονίων σε διαφορετικές ηλεκτρονιακές καταστάσεις. Τέτοιο παράδειγμα είναι η 2-φαίνυλοπυριδίνη που είναι κυκλομεταλλικός προσδέτης. Επίσης η προσθήκη αρυλομάδας σε πυριδίνη μπορεί να αυξήσει την κβαντική απόδοση Φ. Τα συμπλέγματα αυτά δεν εμφανίζουν εξειδίκευση πρόσδεσης και προσδένονται σε όλο το χρωμόσωμα αδιακρίτως. Όμως έτσι είναι αδύνατον να δημιουργηθούν ζώνες. Η λύση στο πρόβλημα είναι η προσθήκη προσδετών εξειδικευμένων για AT ή GC περιοχές. Με την μέθοδο αυτή τα δείγματα είναι κατάλληλα τόσο για μικροσκοπία φθορισμού όσο και για ηλεκτρονιακή.

Οξικό άλας Ουρανίου, Τετροξειδίο Οσμίου: Είναι χρωστικές βαρέων μετάλλων και χρησιμοποιούνται ευρέως στην μελέτη βιολογικών δειγμάτων με ηλεκτρονιακή μικροσκοπία, για θετική ή αρνητική χρώση. Εμφανίζουν καλή εκπομπή ηλεκτρονίων, απορροφούνται εύκολα στην οργανική ύλη και δρουν ως στερεωτικά(fixatives). Το οξικό άλας του Ουρανίου, είναι ραδιενεργή ουσία και αυξάνει την ανάλυση ζώνωσης στα νουκλειικά οξέα. Εβρισκόμενο σε υδατικό ή αλκοολικό διάλυμα σε συγκέντρωση 2-25%, παράγει UO_2^{2+} κατιόντα τα οποία αλληλεπιδρούν με τις φωσφορικές ομάδες του DNA. Ένα κατιόν αλληλεπιδρά με δύο ομάδες φωσφόρου. Η χρωστική βέβαια εμφανίζει αντίδραση και με τα νουκλειικά και με τις πρωτεΐνες, όμως για το DNA εμφανίζει μεγαλύτερη συγγένεια. Μία εφαρμογή του άλατος Ουρανίου είναι η counterstain(αντιχρώση) μετά από lead citrate, που βελτιώνει την ανάλυση πολύ περισσότερο από τις μεμονωμένες δυνατότητες της κάθε χρωστικής.

Το τεροξειδίο του Οσμίου, χρησιμοποιείται εκτενώς στα δείγματα για ηλεκτρονιακή μικροσκοπία, κυρίως γιατί αποτελεί ισχυρό οξειδωτικό. Είναι μη πολικό και εισέρχεται εύκολα στα κύτταρα όμως έχει το μειονέκτημα να είναι εξαιρετικά δηλητηριώδες. Όντας ισχυρό οξειδωτικό, οξειδώνει ακόρεστους διπλούς δεσμούς σε βιολογικά δείγματα. Βρίσκει δε εφαρμογή στη χρώση λιπιδίων που περιέχουν πληθώρα τέτοιων δεσμών.

Τα χρωμοσώματα δεν χρωματίζονται με το OsO_4 . Ακόμη και αν το τετροξειδίο θεωρητικά οξειδώνει τον διπλό δεσμό στους άνθρακες 5 και 6 θυμίνης και κυτοσίνης αντίστοιχα, το DNA παραμένει ανεπηρέαστο γιατί λόγω δομής διπλής έλικας είναι ανέφικτη η αλληλεπίδραση.

Εκεί όμως που μπορεί να υπάρξει αλληλεπίδραση είναι οι πρωτεΐνες. Το τετροξειδίο του Οσμίου μπορεί να αντιδράσει με τις αζωτο-ομάδες των αμινοξέων: αμινομάδα Λυσίνης, γουανιδινική ομάδα Αργινίνης, ιμιδαζόλη Ιστιδίνης, πυρολιδίνη Προλίνης και το ινδολικό άζωτο της Τρυπτοφάνης. Τα παραπάνω αμινοξέα βρίσκονται σε μεγάλους αριθμούς στις ιστόνες Όμως τα βασικά κομμάτια τους συνδέονται αρκετά ισχυρά με το DNA. Αν όμως, χρησιμοποιηθεί αραιωμένο οξικό οξύ που αποδυναμώνει την αλληλεπίδραση DNA-πρωτεϊνών, επιτρέπεται στο τετροξειδίο να οξειδώσει τα αμινοξέα και μόνο σε pH από 6.2-3.5.

6.FISH

Η τεχνική φθορίζοντος υβριδισμού *in situ*, είναι εξαιρετικά ισχυρή και χρησιμοποιείται στην ανίχνευση χρωμοσωματικών ανωμαλιών. Η υψηλή ευαισθησία και εξειδίκευση της, καθώς και η ταχύτητα λαμβάνουν χώρα οι εξετάσεις, κατέστησαν την τεχνική μείζονος σημασίας και παρείχαν τις πληροφορίες για την πρόοδο στο πεδίο της έρευνας και της διάγνωσης. Από ιατρικής σκοπιάς, η FISH μπορεί να εφαρμοστεί στην ανίχνευση ανωμαλιών όπως: σύντηξη γονιδίων(fusion), ανευπλοειδία, απώλεια χρωμοσωματικής περιοχής ή ολόκληρου χρωμοσώματος και στην παρακολούθηση της πορείας-εξέλιξης μιας ασθένειας. Επίσης, μπορεί να χρησιμοποιηθεί στη χαρτογράφηση γονιδίων και στην αναγνώριση ογκογονιδίων και γενετικών ανωμαλιών που προκαλούν μια πληθώρα νεοπλασιών.(Levsky, 2003)

Η τεχνική βασίζεται στην υβριδοποίηση ανιχνευτών DNA(probes) σε συγκεκριμένες κάθε φορά αλληλουχίες-στόχους κατόπιν θερμικής επεξεργασίας του γενετικού υλικού για να αποκτήσουν πρόσβαση. Τα μόρια-ανιχνευτές συνδέονται με φθορίζοντα μόρια αναφοράς, τα οποία στο μικροσκόπιο φθορισμού, επιβεβαιώνουν την ύπαρξη ή την έλλειψη γενετικής ανωμαλίας. Η εξέλιξη της FISH, επιτρέπει την παρακολούθηση σε όλο το χρωμόσωμα μέσω M-FISH,SKY,CGH που θα αναλυθούν μετέπειτα.

Η FISH παρά το γεγονός πως είναι σχετικά απλή στη σύλληψή της, αποδείχτηκε αποτελεσματική και έφερε επανάσταση στην κυτταρογενετική, στην οποία καθιερώθηκε ως διαγνωστική εξέταση σε κάθε εργαστήριο παγκοσμίως.

Οι τεχνικές χρώσης και ζώνωσης όπως η Giemsa, στην εποχή τους ήταν ορόσημο στην κυτταρογενετική έρευνα και την ιατρική διάγνωση και βοήθησαν τα μέγιστα στην κατανόηση κληρονομικών και επίκτητων ασθενειών. Όμως η αποτελεσματικότητά τους προϋποθέτει την ύπαρξη ανωμαλιών μεγαλύτερων των 3 μεγαβάσεων DNA. Οι μικρότερες ανωμαλίες είναι αδύνατο να ανιχνευθούν λόγω μη επαρκούς διακριτικής ικανότητας-ανάλυσης. Ένα άλλο μειονέκτημα είναι πως λαμβάνουν χώρα σε ενεργώς μιτωτικά κύτταρα και είναι στην πλειοψηφία τους μονοχρωματικές, δυσκολεύοντας έτσι το έργο του κυτταρογενετιστή στην παρατήρηση. Η εισαγωγή της FISH στο τέλος της δεκαετίας του 1980, ως μια τεχνική ανίχνευσης τρισωμιών και μεταθέσεων σε μεταφασικούς και μεσοφασικούς πυρήνες χρησιμοποιώντας DNA βιβλιοθήκες για το σύνολο των χρωμοσωμάτων, αντιμετωπίστηκε ως ένα μεγάλο βήμα προόδου στο πεδίο.

Η FISH βασίζεται επί της ουσίας στην ίδια αρχή όπως η ανοσοαποτύπωση κατά Southern, όντας το κυτταρογενετικό αναλόγιο που αξιοποιεί την ικανότητα του μονόκλωνου DNA να υβριδοποιείται με το συμπληρωματικό του. Ο στόχος εδώ, είναι το πυρηνικό DNA των μεσοφασικών κυττάρων ή των μεταφασικών χρωμοσωμάτων. Το δείγμα που χρησιμοποιείται μπορεί να είναι αίμα,μυελός των οστών ή αποτέλεσμα βιοψίας.

Η πρώτη προσέγγιση της FISH, αφορά την ύπαρξη μορίων ανιχνευτών που είναι συνδεδεμένα με φθοριοχρώματα, τα οποία κατόπιν υβριδισμού με τις ακολουθίες στόχους, φθορίζουν και παρατηρούνται με μικροσκόπιο φθορισμού.

Η δεύτερη προσέγγιση(ανοσοιστοχημική-IHC), βασίζεται στην χρήση μορίων ανιχνευτών που διαθέτουν παράλληλα ένα απτένιο(hapten), και την χρήση αντισωμάτων για το συγκεκριμένο κάθε φορά απτένιο. Όταν το αντίσωμα αλληλεπιδράσει με το απτένιο, προκύπτει χρωματισμός, ορατός με οπτικό μικροσκόπιο είτε με μικροσκόπιο φθορισμού εάν χρησιμοποιηθούν φθοριοχρώματα στους ανιχνευτές. Η προσέγγιση αυτή ορίζεται σε μεγάλο βαθμό από την διαθεσιμότητα κατάλληλων αντισωμάτων.

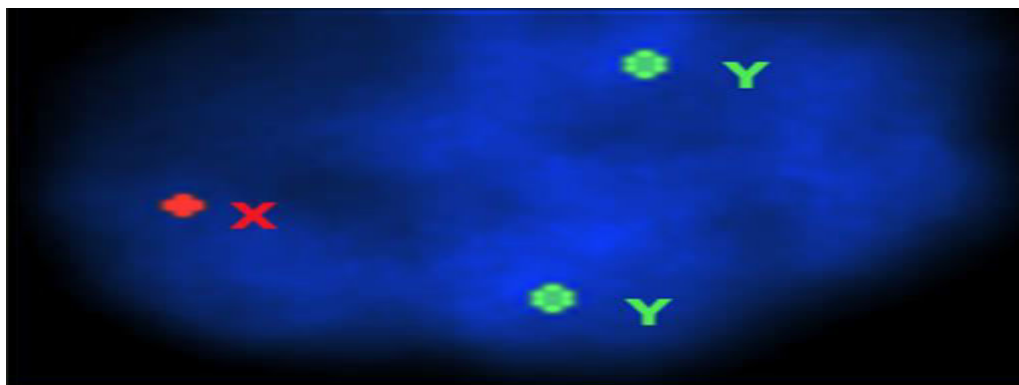
Στην απευθείας προσέγγιση τα πιο γνωστά μόρια αναφοράς είναι: ροδαμίνη, Texas Red, κυτοχρώματα 2,3,5 και AMCA. Στην IHC προσέγγιση χρησιμοποιούνται κατά κύριο λόγο: βιοτίνη, διοξυγενίνη και δινιτροφαινόλη.

ΑΝΙΧΝΕΥΤΕΣ :Οι δυνατότητες της FISH γίνονται ακόμη μεγαλύτερες με την χρήση πολλαπλών ανιχνευτών στο ίδιο δείγμα. Απαραίτητη προϋπόθεση βέβαια, ο κάθε ανιχνευτής να συνδέεται με μόριο αναφοράς που φθορίζει διαφορετικά. Αυτό είναι εξέχως χρήσιμο όταν δομικές ανωμαλίες που περιλαμβάνουν διαφορετικές χρωμοσωματικές περιοχές πρέπει να διαγνωσθούν ή όταν πολλές αριθμητικές ανωμαλίες πρέπει να εξεταστούν ταυτοχρόνως. Η επιλογή μορίων ανιχνευτών έχει προφανώς βαρύνουσα σημασία. Μια μεγάλη ποικιλία ανιχνευτών, από ολόκληρο γένωμα έως και 1-10 χιλιοβάσεις μπορούν να αξιοποιηθούν. Υπάρχουν τρεις τύποι ανιχνευτών:

A. Ανιχνευτές χρώσης ολόκληρου του χρωμοσώματος: Είναι πολύπλοκα DNA συμπλέγματα που κατάγονται από ένα είδος χρωμοσώματος κάθε φορά, το οποίο κατόπιν επεξεργασίας, λειτουργεί ως φθορίζουσα χρωστική. Είναι εξαιρετικά χρήσιμοι για την παρατήρηση δομικών και αριθμητικών ανωμαλιών μεταφασικών πυρήνων. Δεν είναι αποτελεσματικοί σε μεσοφασικούς, καθώς οι αλληλουχίες δεν είναι συμπυκνωμένες και ο υβριδισμός δεν είναι ο επιθυμητός. Η χρώση του συνόλου των ανθρωπίνων χρωμοσωμάτων είναι κλινικά εφικτή εντός 24 ωρών.

B. Ανιχνευτές επαναλαμβανομένων αλληλουχιών: Υβριδίζονται σε συγκεκριμένες χρωμοσωματικές περιοχές ή δομές που περιέχουν σύντομες αλληλουχίες εβρισκόμενες σε χιλιάδες αντίτυπα. Χαρακτηριστικά παραδείγματα τέτοιων ανιχνευτών, αποτελούν οι παν-τελομερικοί, που ανιχνεύουν την ακολουθία TTAGGG η οποία είναι παρούσα σε όλες ανεξαιρέτως τις τελομερικές περιοχές των ανθρωπίνων χρωμοσωμάτων όπως επίσης οι κεντρομερικοί ανιχνευτές που στοχεύουν τις α,β δορυφορικές περιοχές στο κεντρομερίδιο. Οι κεντρομερικοί είναι εξαιρετικοί στην ανίχνευση μονοσομιών, τρισομιών και ανευπλοειδιών.

Γ. Ανιχνευτές συγκεκριμένων γενετιών τόπων(loci) : Είναι συνήθως γενωμικοί κλώνοι που ποικίλλουν σε μέγεθος αναλόγως τον φορέα κλωνοποίησης, από 1-10 χιλιοβάσεις αν χρησιμοποιηθούν πλασμίδια έως και 80 χιλιοβάσεις-1 μεγαβάση εάν χρησιμοποιηθούν PAC,YAC,BAC. Η χρησιμότητά τους έγκειται στην ανίχνευση δομικών ανακατατάξεων όπως μεταθέσεις, αναστροφές, ελλείψεις, διπλασιασμοί στα μεταφασικό και μεσοφασικό DNA. Με την χρήση της πολυχρωματικής FISH, οι μεταθέσεις μπορούν να ανιχνευθούν μέσω ανιχνευτών που βρίσκουν τα θράυσματα. Για παράδειγμα, ο ανιχνευτής για το γονίδιο BCR στο χρωμόσωμα 22q11.2 δίνει πράσινο φθορισμό ανιχνεύοντας την αρχική του περιοχή ενώ ταυτόχρονα ο ανιχνευτής για το ABL γονίδιο του χρωμοσώματος 9q34 δίνει κόκκινο φθορισμό ανιχνεύοντας την τελική περιοχή του. Στην περίπτωση σύντηξης γονιδίων BCR/ABL υφίσταται ταυτόχρονος φθορισμός των μορίων αναφοράς των ανιχνευτών, με αποτέλεσμα να προκύψει κίτρινος φθορισμός ο οποίος δηλώνει t(9;22)(q34;q11.2) μετάθεση.

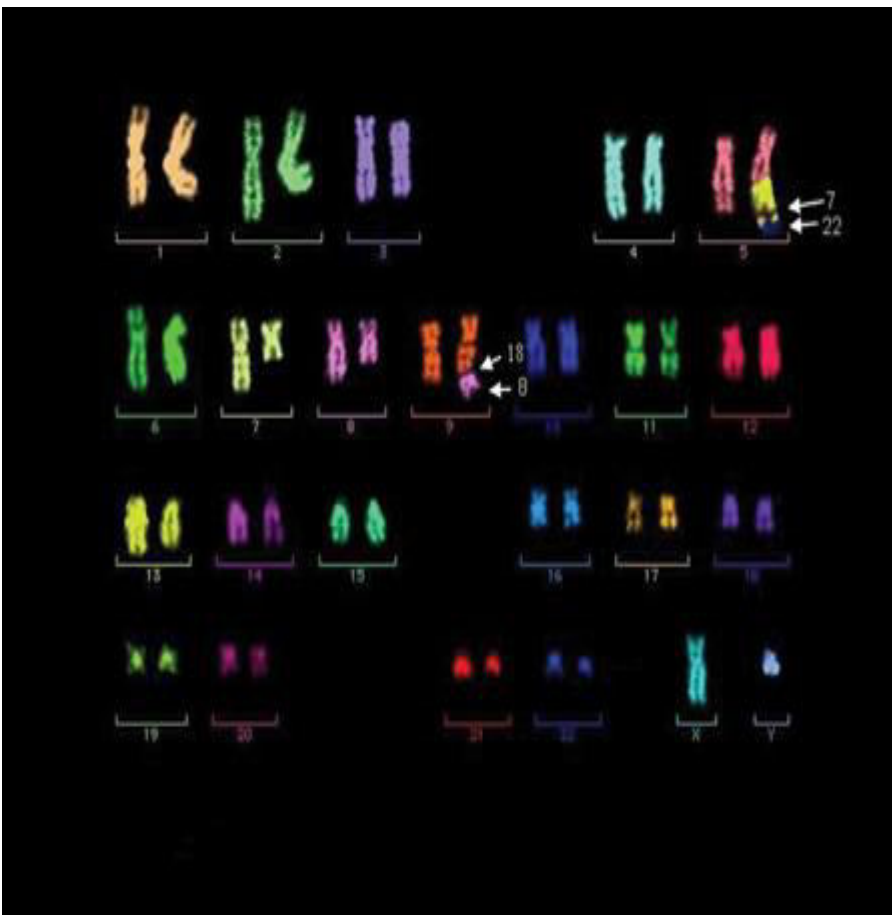


Εικόνα 9: Ανίχνευση μέσω FISH ενός X χρωμοσώματος και δύο Y χρωμοσωμάτων(XYY).

MULTIPLEX FISH (M-FISH) και SPECTRAL KARYOTYPING (SKY)

Το 1996, δύο ερευνητικές ομάδες που δούλευαν ξεχωριστά, επινόησαν ένα καρυότυπο 24 χρωμάτων, που τον ονόμασαν αντίστοιχα M-FISH και SKY. Και οι δύο τεχνικές, επέτρεψαν την χρώση όλων των χρωμοσωμάτων μέσω υβριδισμού, δίνοντας στο κάθε χρωμόσωμα διαφορετικό χρώμα φθορισμού. Οι εικόνες που μικροσκοπίας φθορισμού, που έχει φίλτρο για το κάθε διαφορετικό φθοριόχρωμα, επιτρέπουν την αναγνώριση και τον διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων, μέσω της χρήσης ψευδοχρωμάτων. Για να συμβεί αυτό, απαιτείται ειδικό λογισμικό και συνδυαστικός αλγόριθμος επεξεργασίας της εικόνας. Η μόνη διαφορά των δύο τεχνικών έγκειται καθαρά στον τρόπο δημιουργίας των ψευδοχρωμάτων. Η SKY χρησιμοποιεί ένα σύστημα απεικόνισης που περιλαμβάνει μια κάμερα και ένα φασματογράφο Fourier για την ανάλυση κάθε εικονοστοιχείο (pixel) της εικόνας. Η M-FISH χρησιμοποιεί φίλτρο φθορισμού που μειώνει τον θόρυβο της εικόνας και κατόπιν με την βοήθεια λογισμικού, επεξεργάζεται τα δεδομένα αυτά. (Bishop, 2010)

Η εφεύρεση του καρυότυπου 24 χρωμάτων υπήρξε μια μεγάλη επιτυχία στον τομέα της κυτταρογενετικής. Οι κύριες εφαρμογές είναι ο χαρακτηρισμός μη ισορροπημένων μεταθέσεων και σύνθετων ανακατατάξεων. Δεν μπορούν να ανιχνεύσουν διπλασιασμούς, ελλείψεις ή αναστροφές και η ευαισθησία τους καθώς και η εξειδίκευση του ορίζεται από την επιλογή των κατάλληλων φθοριοχρωμάτων.



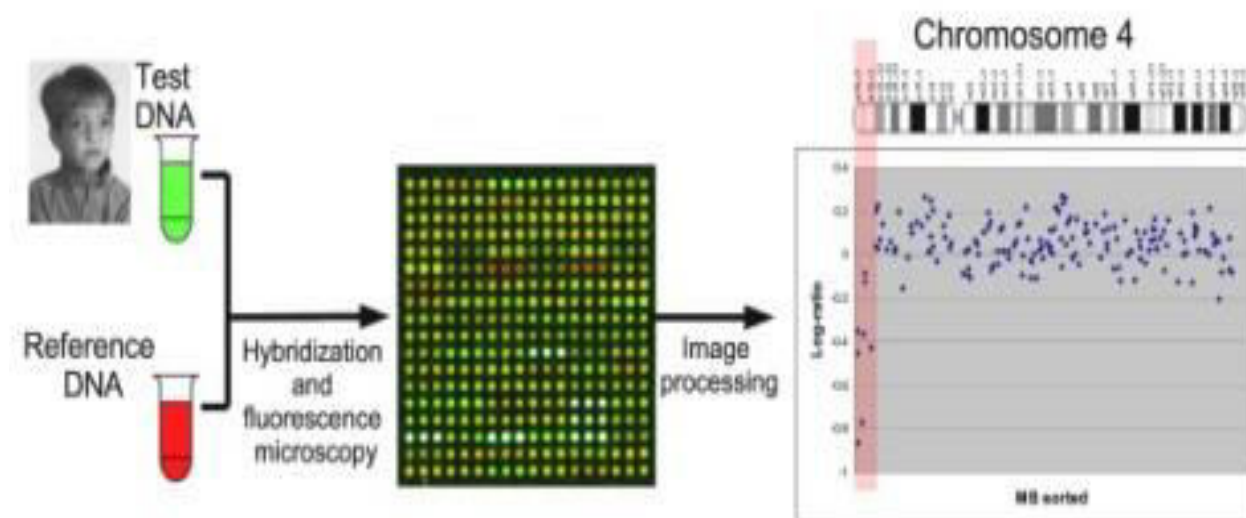
Εικόνα 10: Χαρακτηριστική απεικόνιση multiplex FISH, που εν προκειμένω πολλαπλές μεταθέσεις ανάμεσα σε διάφορα χρωμοσώματα.

7.ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΟΣ ΓΕΝΩΜΙΚΟΣ ΥΒΡΙΔΙΣΜΟΣ (Comparative Genomic Hybridization)

Μία από τις μεγαλύτερες ανακαλύψεις που αφορούν άμεσα την FISH, είναι η εισαγωγή της τεχνικής CGH το 1992, σχετικά με την ανάλυση σε επίπεδο γονιδιώματος. Αυτή η εξέλιξη της προηγούμενης τεχνικής, ενώ στη FISH συνέβαινε υβριδισμός *in situ* και φθορισμός χρωμάτων με την χρήση μεταφασικών χρωμοσωμάτων, χρησιμοποιεί γενωμικό DNA του δείγματος υπό εξέταση, το οποίο χρησιμοποιεί για να δημιουργήσει ένα χάρτη με CNV(copy number variations). Στην CGH, το δείγμα και το πρότυπο DNA από άτομο με φυσιολογικό καρυότυπο, σημαίνονται διαφορετικά με πράσινη και κόκκινη φθορίζουσα χρωστική, αναμιγνύονται σε ίσες ποσότητες και υβριδίζονται με ανιχνευτές. Η διαφορά ποσότητας DNA ανάμεσα στα δύο, εξαρτάται από την αναλογία πράσινο/κόκκινο. Έτσι, εάν το χρωμοσωμικό υλικό είναι ίδιο σε αριθμό αντιγράφων και στα δύο, θα υπάρχει ταυτόχρονος φθορισμός και το παρατηρούμενο χρώμα θα είναι μίξη των άλλων δύο, δηλαδή κίτρινο. Αν το υπό εξέταση δείγμα έχει μικρότερο αριθμό αντιγράφων από το πρότυπο, τότε θα υπερισχύει ο κόκκινος φθορισμός. Τέλος, εάν το δείγμα έχει μεγαλύτερο αριθμό αντιγράφων, θα υπερισχύσει ο πράσινος φθορισμός. Η αναλογία υπολογίζεται πάντα μέσω λογισμικού ανάλυσης εξαλείφοντας σε μεγάλο βαθμό την υποκειμενικότητα της ερμηνείας των χρωματικών αποχρώσεων.(Bejjani et al, 2006)

Κύριο πλεονέκτημα της CGH, είναι πως δεν απαιτείται πρότερη γνώση της ανωμαλίας που πιθανώς υφίσταται. Μειονεκτήματα είναι πως σε περιπτώσεις ισοζυγισμένης μετάθεσης και αναστροφής δεν μπορεί να τις ανιχνεύσει και επίσης δεν μπορεί να εντοπίσει ανευπλοειδία. Περισσότερο δε να πούμε πως δεν ανιχνεύει δομικές ανωμαλίες

CGH μικροσυστοιχιών: Στην εκδοχή αυτή της τεχνικής, τα χρωμοσώματα αντικαθίστανται από μεγάλους αριθμούς κλώνων που στερεώνονται σε γυάλινα πλακίδια, αυξάνοντας την ικανότητα ανάλυσης για CNVs. Το υπό εξέταση δείγμα και το πρότυπο τοποθετούνται σε μικροσυστοιχίες και σημαίνονται με φθοριοχρώματα. Η σχετική απόδοση φθορισμού υπολογίζεται για κάθε κλωνο και συνυπολογίζονται τα CNVs. Η ανάλυση περιορίζεται από το μέγεθος του κλώνου και από την πυκνότητα κλώνων στην μικροσυστοιχία. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την εξαγωγή αποτελεσμάτων σε μικρό χρονικό διάστημα για μεγάλο αριθμό δειγμάτων. Δεν είναι αποδοτική για αναστροφές και ισοζυγισμένες μεταθέσεις.



Εικόνα 11: Χρήση aCGH για την ανίχνευση συνδρόμου Wolf-Hirschhorn.

8.PCR

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης είναι μια *in vitro* τεχνική που βασίζεται στην αρχή της αντίδρασης πολυμερισμού DNA, στην οποία μια συγκεκριμένη αλληλουχία μπορεί να ενισχυθεί και να δώσει πολλαπλά αντίγραφα. Θεωρείται ένα από τα σημαντικότερα εργαλεία έρευνας και διάγνωσης στον τομέα της μοριακής βιολογίας. Δημιουργήθηκε το έτος 1983 από τον Kary Mullis και τους συνεργάτες του, ενώ δούλευε τότε στην Καλιφόρνια και την εταιρεία Cetus. Ο ίδιος δήλωσε αργότερα: «Ξεκινώντας με μικρό μόριο DNA, η μέθοδος μπορεί να δημιουργήσει δισεκατομύρια αντίγραφα, απαιτώντας τίποτα παραπάνω από ένα δοκιμαστικό σωλήνα, μερικά απλά αντιδραστήρια και μια πηγή θερμότητας». Μια δεκαετία αργότερα, το 1993, ο Mullis τιμήθηκε με το βραβείο Nobel για την ανακάλυψή του. Η αρχή της τεχνικής βασίζεται στην κυκλική εναλλαγή θερμοκρασιών για τις διαδικασίες αποδιάταξης και ενζυματικής αντιγραφής, με τη χρήση θερμοσταθερής DNA πολυμεράσης, μορίων εκκινητών συμπληρωματικών προς συγκεκριμένη αλληλουχία και dNTPs. Οι βασικές συσκευές και αντιδραστήρια που απαιτούνται, αναλύονται αμέσως μετά. (McPherson et al, 2006)

A. Σωληνάριο μικροφυγόκεντρου: Είναι ένα μικρό κυλινδρικό πλαστικό δοχείο με κωνικό πάτο και καπάκι που κλείνει. Είναι φτιαγμένο από πολυπροπυλένιο και εμφανίζει ανθεκτικότητα σε ένα ευρύ φάσμα θερμοκρασιών. Επίσης, τα τοιχώματά του είναι πολύ λεπτά, ευνοώντας την θερμική αγωγιμότητα.

B. Θερμοκυκλωτής(thermal cycler): Είναι μια συσκευή που περιέχει ένα θερμικό μπλόκ/βάση όπου εισέρχονται τα σωληνάκια που περιέχουν το μίγμα της αντίδρασης. Η συσκευή λειτουργεί βάσει του φαινομένου Peltier, αυξάνοντας και μειώνοντας την θερμοκρασία με προ-προγραμματισμένο τρόπο, μέσω αντιστροφής του ηλεκτρικού ρεύματος.

Γ. Δείγμα γενετικού υλικού(template): Η αλληλουχία που θα ενισχυθεί σε αριθμό αντιγράφων.

Δ. Μόριο-Εκκινητής(primer): Είναι ολιγονουκλεοτίδιο που στοχεύει την αλληλουχία εξειδικευμένα. Απαιτούνται δύο ενισχυτές και συνδέονται στο 3' άκρο του κωδικού και του αντικωδικού κλώνου, του τμήματος DNA. Κατά προτίμηση, η θερμοκρασία τήξης(T_m) πρέπει να βρίσκεται μεταξύ 52-58 βαθμών Κελσίου. Αν ο εκκινητής παρουσιάζει μεγαλύτερη των 65 βαθμών Κελσίου θερμοκρασία τήξης, μπορεί να παρουσιάσει τάση προς δευτερογενή πρόσδεση. Το περιεχόμενο του εκκινητή σε GC δεν πρέπει να ξεπερνά το 40%. Για να υπολογιστεί η T_m του εκκινητή σε βαθμούς Κελσίου, χρησιμοποιείται ο τύπος:

$T_m = [\Delta H / (\Delta S + R \ln C)] - 273.15$ όπου ΔH είναι η αλλαγή της ενθαλπίας, ΔS η αλλαγή της εντροπίας και C η συγκέντρωση των εκκινητών.

Ως ενθαλπία ορίζεται η ποσότητα θερμικής ενέργειας κάθε ουσίας. Για να υπολογιστεί εν προκειμένω, αθροίζονται οι ενθαλπίες γειτονικών ζευγών νουκλεοτιδίων.

Ως εντροπία ορίζεται η ροπή ενός συστήματος προς αταξία. Υπολογίζεται ομοίως, αθροίζοντας τις επιμέρους εντροπίες των γειτονικών ζευγών νουκλεοτιδίων.

Στην παραπάνω εξίσωση τις περισσότερες φορές λαμβάνεται υπ'όψιν το γεγονός πως το DNA βρίσκεται σε διάλυμα 1M Na(buffer) οπότε συνυπολογίζεται στις εντροπικές τιμές. Για να υπολογιστεί η θερμοκρασία πρόσδεσης(annealing- T_a) χρησιμοποιείται ο τύπος:

$T_a = 0.3 \times T_m$ (εκκινητή) + $0.7 \times T_m$ (προϊόντος) – 149

E. Tris – HCl: Είναι το προτεινόμενο διάλυμα buffer.

ΣΤ. $MgCl_2$: Λειτουργεί ως συμπαραγοντας της DNA πολυμεράσης. Η βέλτιστη συγκέντρωση ιόντων μαγνησίου επηρεάζει την πρόσδεση του εκκινητή, την αποδιάταξη του DNA δείγματος-PCR προϊόντος καθώς και την συγγένεια και τον βαθμό εξειδίκευσης της πολυμεράσης. Η λειτουργία της Taq πολυμεράσης απαιτεί την ύπαρξη ελευθέρων ιόντων που προσδένονται στο δείγμα DNA, στους εκκινητές και στα dNTPs.

Z. KCl: Συμβάλλει στη διευκόλυνση της πρόσδεσης του εκκινητή.

H. Ορός ζελατίνης ή βοδινός: Χρησιμοποιείται για την σταθεροποίηση του ενζύμου. Απαραίτητη προϋπόθεση να είναι απαλλαγμένος από νουκλεάσες(nuclease-free).

Θ. Απεσταγμένο νερό: Ο όγκος του εξαρτάται από τον τύπο αντίδρασης

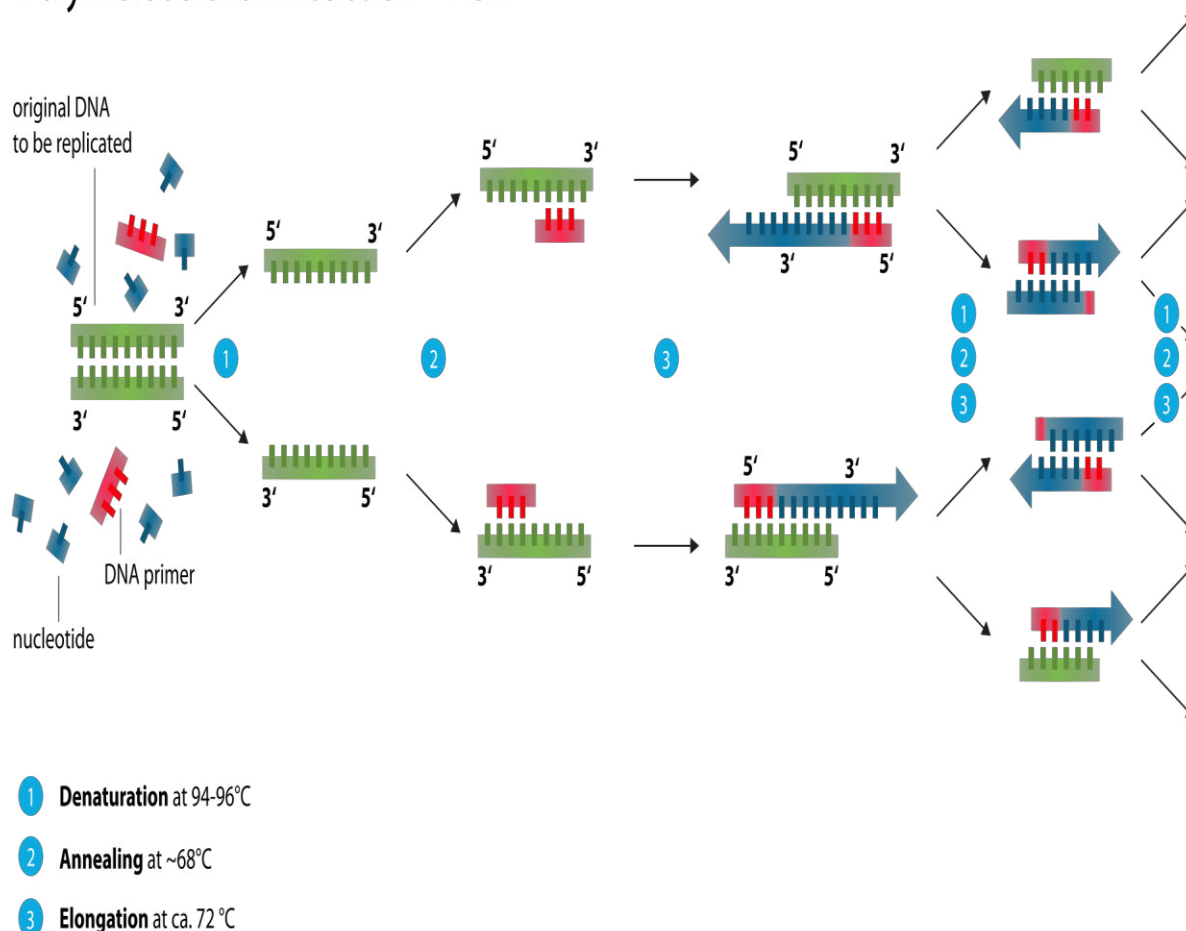
I. Τριφωσφορικά δεοξυνουκλεοτίδια(dNTP): Αποτελούν τις δομικές λίθους του DNA: dATP, dTTP, dCTP, dGTP σε pH=7. Το απόθεμα αραίωvεται, διαιρείται σε κλάσματα και αποθηκεύεται στους -20 βαθμούς Κελσίου. Τα τέσσερα dNTPs πρέπει να βρίσκονται σε σχεδόν ίδιες συγκεντρώσεις, ώστε να αποφεύγονται σφάλματα ενσωμάτωσης.

K. DNA πολυμεράση: Είναι το ένζυμο που καταλύει την αντίδραση. Η πιο διαδεδομένη είναι η Taq πολυμεράση που προέρχεται από το *Thermus Aquaticus*, το οποίο ζει σε θερμοπηγές και παρουσιάζει βέλτιστη θερμοκρασία λειτουργίας στους 72 °C ενώ αποδιατάσσεται στους 90 °C δίχως όμως να καταστρέφεται. Επίσης, υπάρχουν η PFlu πολυμεράση από το *Pyrococcus Furiosus* και η Vent πολυμεράση από το *Thermococcus Litoralis*, οι οποίες εμφανίζουν μεγαλύτερη αποδοτικότητα.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Η τεχνική της PCR λαμβάνει χώρα σε 20-40 κύκλους εναλλαγής θερμοκρασίας και κάθε κύκλος περιλαμβάνει ένα συγκεκριμένο αριθμό βημάτων. Το πρώτο βήμα είναι το εναρκτήριο(initialization)-αποδιάταξης(denaturation) και αποτελείται από άνοδο της θερμοκρασίας στους 94-96 βαθμούς για 20-30 δευτερόλεπτα με στόχο την αποδιάταξη του δίκλωνου DNA σε δύο μονόκλιωνα τμήματα. Ακολουθεί το βήμα πρόσδεσης του εκκινητή στο εκμαγείο(annealing) όπου το μίγμα βρίσκεται σε θερμοκρασία 50-65 °C για 20-40 δευτερόλεπτα και ευνοείται η πρόσδεση του εκκινητών. Για να δημιουργηθούν σταθεροί δεσμοί ανάμεσα στο μονόκλινο DNA και στον εκκινητή απαιτείται η ύπαρξη αρκετών υδρογονοδεσμών ως αποτέλεσμα υψηλής συμπληρωματικότητας. Η συγκέντρωση των εκκινητών είναι πολύ μεγαλύτερη του τμήματος-στόχου και αυτό έχει ως αποτέλεσμα την υβριδοποίηση στόχου-εκκινητή και σε πολύ μικρότερο βαθμό(απειροελάχιστο) τα: στόχος-στόχος και εκκινητής-εκκινητής. Επόμενο είναι το βήμα επιμήκυνσης/επέκτασης(extension/elongation) στην οποία το δείγμα βρίσκεται σε θερμοκρασία 75-78 °C. Στη θερμοκρασία αυτή, η Taq πολυμεράση ανιχνεύει τους εκκινητές και συνθέτει τον συμπληρωματικό κλώνο. Η διαδικασία διαρκεί δύο περίπου λεπτά. Η επιμήκυνση είναι συνήθως δύο χιλιάσεις. Για να υπάρξει μεγαλύτερη επιμήκυνση απαιτούνται ειδικές συνθήκες. Μετά τον τελευταίο κύκλο ακολουθεί ένα βήμα τελικής επιμήκυνσης, το οποίο έχοντας το δείγμα στους 70-74 °C για 5-15 λεπτά εξασφαλίζει πως όλα τα μονόκλιωνα DNA στα οποία προσδέθηκαν οι εκκινητές θα πολυμεριστούν. Τελικό βήμα αποτελεί η ψύξη του μίγματος στους 4-15 °C με στόχο την βραχυπρόθεσμη αποθήκευση.

Polymerase chain reaction - PCR



Εικόνα 12: Βασικά βήματα της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης.

ΣΤΑΔΙΑ

A. Εκθετική αύξηση: Ως αποτέλεσμα κάθε κύκλου, ο αριθμός αντιγράφων του επιθυμητού τμήματος DNA διπλασιάζεται, οδηγώντας έτσι σε γεωμετρική αύξηση. Ένας τύπος υπολογισμού του αποτελέσματος είναι:

$Y = X \times (1 + \text{efficiency})^n$ όπου: Y είναι η τελική ποσότητα του ενισχυόμενου DNA, X ο αριθμός αντιγράφων στην εισαγωγή, n αριθμός των θερμοκύκλων και efficiency, η αποδοτικότητα που ορίζεται ξεχωριστά από το κάθε kit.

B. Φάση σταθεροποίησης: Η πολυμεράση επιβραδύνει την λειτουργία της και τα αντιδραστήρια ελαττώνονται.

Γ. Φάση πλατώ: Πλήρης κατανάλωση πόρων. Δεν αυξάνεται περαιτέρω ο αριθμός αντιγράφων.

ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ(validation): Για να επικυρωθούν τα αποτελέσματα της PCR απαιτείται η χρήση της τεχνικής gel ηλεκτροφόρησης. Το προϊόν της PCR, μεταφέρεται μέσω πιπέττας σε άγαρ που θα διαχωριστούν τα τμήματα DNA, σύμφωνα με το μοριακό τους βάρος χρησιμοποιώντας ηλεκτρισμό. Στο τέλος, τα τμήματα DNA είναι ορατά στο UV φως λόγω της προσθήκης βρωμιούχου αιθιδίου στο gel. Το βρωμιούχο αιθίδιο προσδένεται στο DNA και βοηθάει στην παρατήρηση σε υπεριώδες και στη φωτογράφιση του αποτελέσματος.

ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ: Η ευαισθησία(sensitivity) της μεθόδου μπορεί να αυξηθεί με την αύξηση της συγκέντρωσης των εκκινητών, την αύξηση της συγκέντρωσης πολυμεράσης, προσαρμόζοντας αναλόγως την θερμοκρασία πρόσδεσης στο εκμαγείο και τον χρόνο πρόσδεση και επιμήκυνσης.

Η εξειδίκευση(specificity) αυξάνεται με την μείωση συγκέντρωσης της πολυμεράσης, την μείωση χρόνου πρόσδεσης και επιμήκυνσης, την αύξηση θερμοκρασίας πρόσδεσης, την μείωση αριθμού κύκλων και την χρήση Hot-start.

Η απόδοση(yield) προϊόντων ενισχύεται με την αύξηση συγκέντρωσης dNTPs, Mg^{2+} , πολυμεράσης, χρόνου πρόσδεσης και επιμήκυνσης καθώς και αριθμού κύκλων.

Η πιστότητα(fidelity) αυξάνεται με την μείωση dNTPs, πολυμεράσης, Mg^{2+} , χρόνου πρόσδεσης και επιμήκυνσης, αριθμού κύκλων και με την μείωση του pH.

ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ: Ενώ η τεχνική είναι εξαιρετικά ισχυρή, πολλές φορές προκύπτουν προβλήματα. Η αντίδραση είναι ευαίσθητη στη συγκέντρωση δισθενών κατιόντων και νουκλεοτιδίων. Ο σχεδιασμός των εκκινητών είναι μείζονος σημασίας για να είναι αποδοτική η ενίσχυση. Πρέπει να εμφανίζουν μεγάλη εξειδίκευση για το προς ανάλυση δείγμα DNA. Σε διαφορετική περίπτωση προσδένονται σε τμήματα-μή στόχους και παρατηρείται ενίσχυση μη επιθυμητών τμημάτων γενετικού υλικού. Επίσης, οι εκκινητές δεν πρέπει να είναι σε θέση να συνδεθούν μεταξύ τους, γιατί θα προκύψει μια εξαιρετικά αποδοτική ενίσχυση μικρών μη-κωδικών μορίων. Η αντίδραση εν τω συνόλω περιορίζεται από το μέγεθος DNA που μπορεί να ενισχυθεί. Η πιο αποδοτική ενίσχυση λαμβάνει χώρα σε τμήματα 300-1000 ζευγών βάσεων DNA. Έχει αναφερθεί βέβαια και ενίσχυση σε μεγαλύτερα τμήματα. Η Ταq πολυμεράση έχει αναφερθεί πως διαπράττει αρκετά συχνά σφάλματα, προσθέτοντας . Η πιο σημαντική όμως παράμετρος που πρέπει να ληφθεί υπ' όψιν είναι η μόλυνση. Αν το δείγμα που ερευνάται, μολυνθεί, μπορεί να δώσει εντελώς λάθος αποτελέσματα.

Σήμερα η κλασική πλέον της PCR διαθέτει μια πληθώρα παραλλαγών οι οποίες παρουσιάζουν διαφορετικά χαρακτηριστικά. Ενδεικτικά αναφέρονται: allele-specific, hot start, methylation-specific, reverse transcription, quantitative, multiplex, assembly, helicase-dependent, inverse, intersequence, ligation mediated, miniprimer, solid phase και touchdown. Οι κυριότερες παραλλαγές περιγράφονται αμέσως μετά.

MULTIPLEX

Αποτελεί παραλλαγή της κλασικής τεχνικής, η οποία επιτρέπει την ταυτόχρονη ενίσχυση πολλών διαφορετικών τμημάτων DNA. Χρησιμοποιείται για την ανίχνευση/διάγνωση διαφορετικών ασθενειών στο ίδιο δείγμα. Μπορεί να αναγνωρίσει αλληλουχίες εσονίων και εξονίων σε συγκεκριμένα γονίδια καθώς και να υπολογίσει την παρούσα ποσότητα κάθε γονιδίου. Στον τύπο αυτό είναι εξαιρετικά σημαντικός ο σχεδιασμός/επιλογή μορίων εκκινητών, με μεγάλη εξειδίκευση για την κάθε επιθυμητή αλληλουχία και παρόμοιες θερμοκρασίες πρόσδεσης στα διαφορετικά εκμαγεία. Όπως είναι φυσικό, μια τόσο εξειδικευμένη επιλογή χρειάζεται αρκετές δοκιμές, έως ότου προκύψει μια συγκεκριμένη διαδικασία/πρωτόκολλο.(Hernandez et al, 2012)

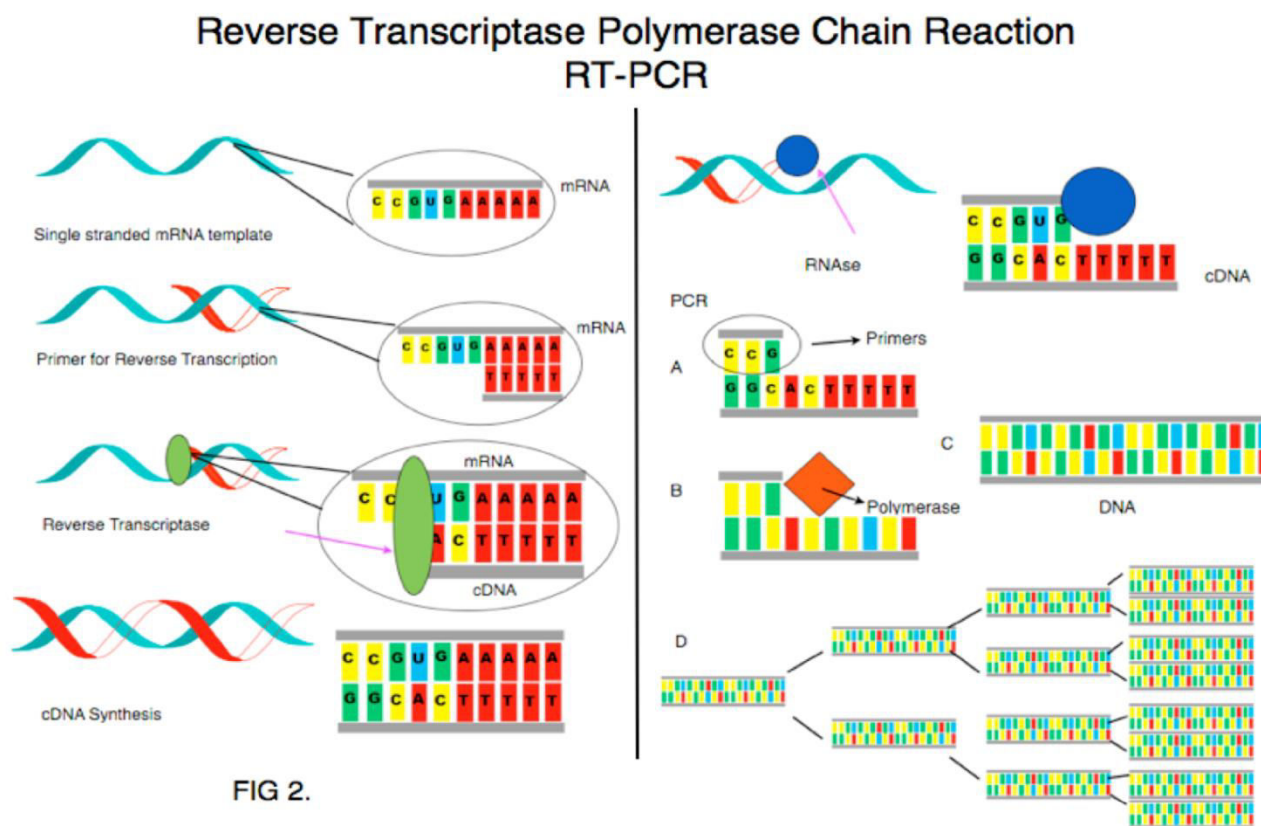
NESTED

Η συγκεκριμένη παραλλαγή αυξάνει την ευαισθησία της μεθόδου, λόγω της χρήσης δύο σετ εκκινητών για μικρές ποσότητες του στόχου. Το πρώτο ζευγάρι εκκινητών, επιτρέπει την αρχική ενίσχυση. Το προϊόν της αρχικής ενίσχυσης, υπόκειται σε δεύτερη ενίσχυση με το άλλο ζευγάρι των εκκινητών. Οι δευτερογενείς εκκινητές εμφανίζουν εξειδίκευση για συγκεκριμένη εσωτερική-ενισχυμένη αλληλουχία της πρώτης PCR. Με τον τρόπο αυτό, η δεύτερη PCR επιβεβαιώνει την επιτυχία της πρώτης. Το μειονέκτημα της τεχνικής, είναι η πιθανότητα μόλυνσης κατά τη διάρκεια μεταφοράς του προϊόντος της αρχικής στο σωληνάριο της δεύτερης ενίσχυσης. Για να ελεγχθεί η

μόλυνση, χρησιμοποιούνται εκκινητές που προσδένονται σε διαφορετικές θερμοκρασίες. Ένας άλλος τρόπος πρόληψης είναι η χρήση ελαίου που διαχωρίζει τα δυο μίγματα της ενίσχυσης.

REVERSE TRANSCRIPTASE

Η παραλλαγή αυτή σχεδιάστηκε ειδικά για την ενίσχυση RNA αλληλουχιών, ειδικότερα mRNA, μέσω σύνθεσης cDNA από την αντίστροφη μεταγραφάση. Ακολούθως, το cDNA ενισχύεται με την γνωστή PCR διαδικασία. Ο τύπος αυτός αποδείχθηκε πολύ χρήσιμς για την διάγνωση RNA ιών και για την αξιολόγηση αντιμικροβιακών θεραπειών. Χρησιμοποιείται βεβαίως και στη μελέτη της γονιδιακής έκφρασης in vitro, λόγω του γεγονότος πως το cDNA, περιέχει την αυθεντική RNA αλληλουχία. Το κύριο πρόβλημα στη χρήση της RT-PCR, έγκειται στο αυτό καθ'αυτό δείγμα RNA, καθώς είναι δύσκολος ο χειρισμός του σε μικρή συγκέντρωση, εμφανίζει χαμηλή σταθερότητα σε θερμοκρασία δωματίου και είναι πολύ ευαίσθητο στη δράση ριβονουκλεασών και στην αλλαγή pH.



Εικόνα 13: Κύρια χαρακτηριστικά της RT-PCR.

SEMI-QUANTITATIVE

Η τεχνική επιτρέπει μια προσέγγιση της σχετικής ποσότητας νουκλεϊκών οξέων που βρίσκονται σε ένα δείγμα. Εάν το δείγμα είναι RNA, τότε εφαρμόζεται αρχικά RT-PCR. Κατόπιν τούτου, εσωτερικά κοντρόλ/δείκτες ενισχύονται. Οι πιο συνηθισμένοι δείκτες είναι η Apo 1 και η B ακτίνη. Το προϊόν της ενίσχυσης, διαχωρίζεται με ηλεκτροφόρηση. Χρησιμοποιείται βρωμιούχο αιθίδιο, για την χρώση του gel αгарόζης, το οποίο φωτογραφίζεται ενώ ακολούθως υπολογίζεται η οπτική πυκνότητα(πυκνόμετρο). Το μειονέκτημα της τεχνικής είναι πως μπορεί να προκύψουν μη εξειδικευμένοι υβριδισμοί, δημιουργώντας μη επιθυμητά αποτελέσματα. Για να ελεγχθεί η εξειδίκευση, δίνεται ιδιαίτερη βαρύτητα στην επιλογή μορίων-εκκινητών.

REAL TIME-QUANTITATIVE

Η PCR πραγματικού χρόνου ή ποσοτική, είναι μια διαφορετική προσέγγιση, η οποία ποσοτικοποιεί τον αριθμό αντιγράφων νουκλεϊκών οξέων κατά τη διάρκειά της. Έτσι, η qPCR χρησιμοποιείται για την ποσοτικοποίηση DNA ή cDNA, υπολογίζοντας τον αριθμό γονιδίων ή μεταγράφων στα εκάστοτε δείγματα. Πλεονεκτήματα της τεχνικής είναι η υψηλή ταχύτητας αποτελέσματος, ο μικρός κίνδυνος μόλυνσης και η ευκολία χειρισμού της τεχνολογίας αυτής. Για να συμβεί αυτό χρησιμοποιούνται δύο ειδών συστήματα ανίχνευσης: αντιδραστήρια πρόσδεσης σε δίκλωνο DNA και σημασμένοι με φθοριοχρώματα εκκινητές. (Argy et al, 2005)

Τα αντιδραστήρια πρόσδεσης (intercalating agents) όπως το SYBR Green είναι φθοριοχρώματα, τα οποία κατόπιν σύνδεσης με το δίκλωνο DNA, αυξάνουν δραματικά τον φθορισμό τους. Επομένως, η αύξηση DNA σε κάθε κύκλο έχει ως αποτέλεσμα την αναλογική αύξηση του εκπεμπόμενου φθορισμού. Όμως τα αντιδραστήρια αυτά, εμφανίζουν χαμηλή εξειδίκευση καθώς μπορεί να προσδεθούν σε μη ειδικές περιοχές ή ακόμη και σε διμερή εκκινητή/εκκινητή. Αρκετές έρευνες έχουν δείξει, πως η προσεκτική επιλογή εκκινητών και η χρήση βέλτιστων συνθηκών PCR, ελαχιστοποιούν την μη ειδικότητα. Η χρήση μιας υψηλής θερμοκρασίας για την έναρξη της σύνθεσης (hot start), μειώνει τον κίνδυνο της μη εξειδικευμένης ενίσχυσης.

Ένα άλλο σύστημα ανίχνευσης, είναι οι εξειδικευμένοι εκκινητές που είναι σημασμένοι με δυο φθοριοχρώματα, ένα δότη και ένα δέκτη. Τα πιο διαδεδομένα μόρια-εκκινητές είναι: υδρολυτικά/TaqMan, μοριακοί φάροι (beacons) και FRET (fluorescent energy transfer). Η αύξηση του DNA σε κάθε κύκλο είναι αναλογική του υβριδισμού των εκκινητών με τα εκμαγεία, η οποία είναι αναλογική της αύξησης του φθορισμού. Η χρήση σημασμένων εκκινητών επιτρέπει την εύρεση πολυμορφισμών και μεταλλάξεων, όμως είναι πιο πολύπλοκη και ακριβή από την χρήση αντιδραστηρίων πρόσδεσης.

DIGITAL PCR

Ο όρος ψηφιακή αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά το 1999 από τους Kenzel/Vogelstein σε μια εργασία που περιέγραφε την ποσοτικοποίηση *ras* μεταλλάξεων σε ένα δείγμα, χωρίζοντας το σε 384 μικροπλακίδια με πηγαδάκια, πραγματοποιώντας πληθώρα PCRs ταυτόχρονα. Ο όρος, κατάφερε να περιγράψει την φιλοσοφία της τεχνικής όπως και το γενικότερα πνεύμα της εποχής, και καθιερώθηκε άμεσα. Βέβαια, παραλλαγές της μεθόδου αυτής με την ονομασία PCR μοναδικού μορίου ή PCR περιορισμένης αραίωσης, είχαν χρησιμοποιηθεί νωρίτερα. Η πρώτη εφαρμογή σε πρωταρχικό στάδιο έγινε το 1988 από τον Sakai και τους συνεργάτες του, οι οποίοι διαχώρισαν ένα δείγμα με γένωμα που περιείχε γονίδια β-γλοβίνης σε δείγμα που δεν περιείχε τα γονίδια της β-γλοβίνης (διαγραφή) και απέδειξαν ότι μεμονωμένα μόρια με το γονίδιο της γλοβίνης μπορούσαν να απομονωθούν και να ενισχυθούν.

Η παραδοσιακή PCR μπορεί να εφαρμοστεί σε ποιοτικές ή ποσοτικές διαδικασίες, για την μελέτη των ιδιοτήτων ενός μορίου και για τον υπολογισμό του αριθμού αντιγράφων αυτού. Η dPCR χρησιμοποιείται παρομοίως, με την μοναδική διαφορά τον διαχωρισμό του δείγματος σε μοναδικά μόρια, πριν την ενίσχυση.

Αρχή dPCR: Οι αναλύσεις μέσω dPCR ξεκινούν με τον διαχωρισμό του δείγματος σε πολλά πηγαδάκια, στα οποία επίσης προστίθεται το μίγμα PCR, με πολύ μικρό συνολικό όγκο αντίδρασης, ώστε κάθε πηγαδάκι να περιέχει μηδέν ή ένα μόριο DNA. Αυτό αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση για την πραγματοποίηση ψηφιακών αναλύσεων. Ακολουθεί εναλλαγή κύκλων θερμοκρασίας. Κάθε πηγαδάκι που περιέχει αλληλουχία-στόχο φθορίζει έντονα, ενώ τα πηγαδάκια δίχως αλληλουχίες-στόχους θα έχουν μόνο αμυδρό background φθορισμό. Μια αντίδραση δίχως μόριο στόχο ορίζεται ως PCR αρνητική και λαμβάνει την τιμή 0. Μια αντίδραση που περιέχει μόριο

στόχο ορίζεται ως PCR θετική και λαμβάνει την τιμή 1. Έτσι, ο υπολογισμός της συγκέντρωσης του στόχου στο δείγμα, υπολογίζεται από το κλάσμα τελικός αριθμός μορίων στόχων(τιμή 1)/ ολικός όγκος. Για να προκύψει αβεβαιότητα, πρέπει να γίνει λάθος μέτρηση ή να υπάρχουν περισσότερα του ενός μόρια στα πηγαδάκια. Συνεπώς, οι τεχνικές dPCR που αποφεύγουν αυτά τα λάθη, εμφανίζουν μεγαλύτερη ακρίβεια.

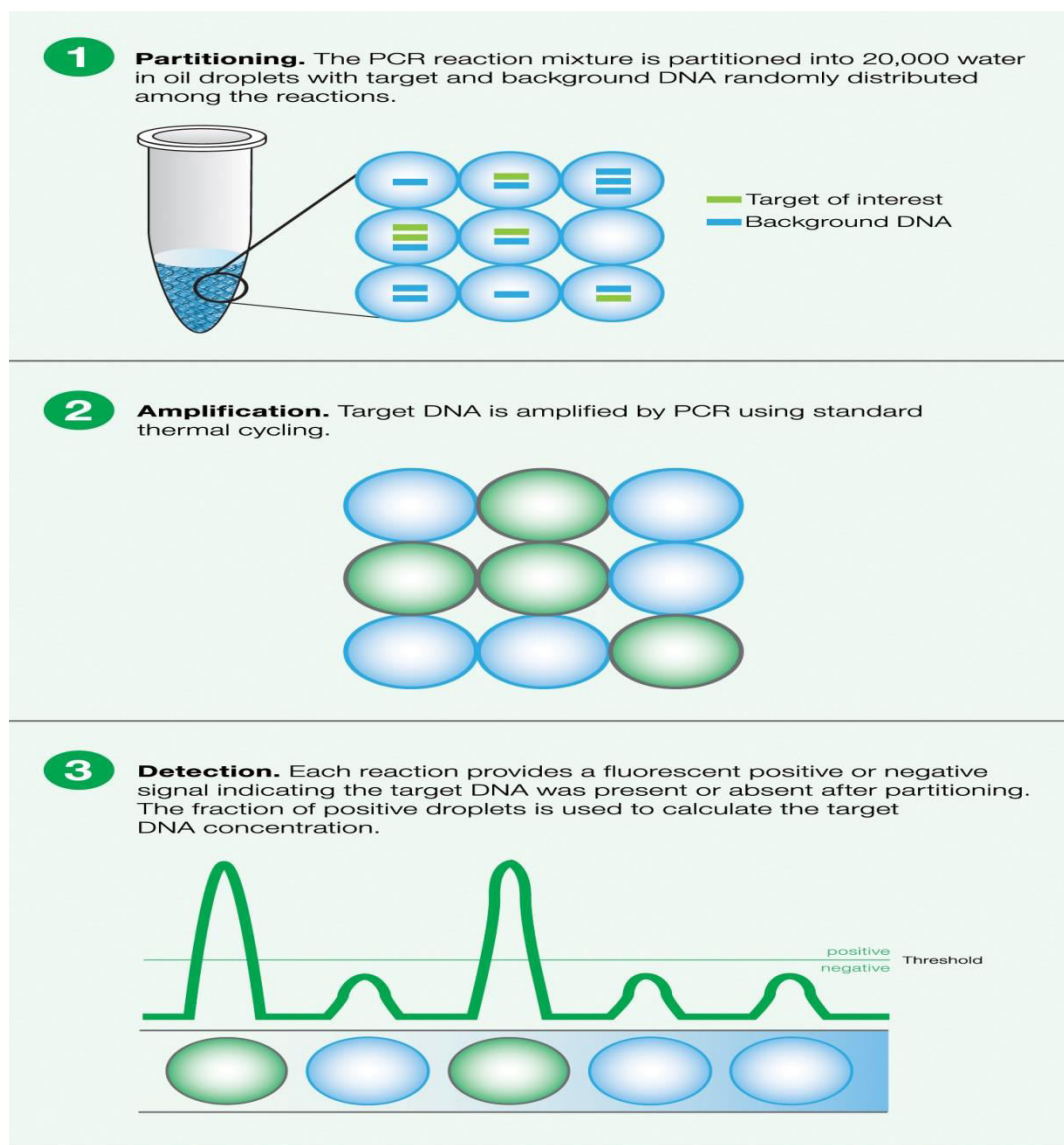


Figure 1. Principles of droplet digital PCR.

Εικόνα 14: Βασικές αρχές ψηφιακής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης.

Multiplex dPCR: Λόγω της ιδιαιτερότητας της dPCR, να περιέχεται στα πηγαδάκια 0 ή 1 μόριο στόχος, είναι εφικτή η multiplex ανάλυση δίχως έγνοια για ανταγωνισμό ή αλληλεπίδραση. Έχοντας κάθε μόριο σε διαφορετικό διαμέρισμα, εγγυάται πως δεν θα υπάρξει το φαινόμενο μη ανίχνευσης των μορίων στόχων που βρίσκονται σε μικρή ποσότητα. Όταν υπολογίζονται π.χ 2 διαφορετικοί στόχοι, η αναλογία καταμετρήσεις τους πρώτου/καταμετρήσεις του δεύτερου, επιτρέπουν την προσέγγιση απολύτων αναλογιών. Με δεδομένο πως η dPCR λαμβάνει χώρα μέχρι τέλους και κατόπιν μετράται ο φθορισμός, έχοντας μοναδικά μόρια-στόχους σε κάθε διαμέρισμα επιτρέπει την χρήση εκκινητών: διαφορετικού χρώματος φθορισμού για την κάθε αλληλουχία και ανιχνευτών ίδιου χρώματος σε διαφορετικές συγκεντρώσεις και διαβάθμισης φθορισμού.

Εφαρμογές dPCR: Η τεχνική μπορεί να εφαρμοστεί:

A. Ανίχνευση σπανίων αλληλίων σε ετερογενείς όγκους και γενετικές ασθένειες

B. Υγρές βιοψίες

Γ. NIPT

Δ. Γονιδιακή έκφραση, CNVs

E. Ανάλυση δείγματος σε πολύ μικρή ποσότητα

Στ. Ποιοτική ανάλυση DNA πριν την τεχνική Sequencing

Πλεονεκτήματα της μεθόδου αποτελούν το πολύ χαμηλό όριο ανίχνευσης, η υψηλότερη ευαισθησία και εξειδίκευση και η απόλυτη ποσοτικοποίηση. Μειονεκτήματα αποτελούν πως κάθε μετάλλαξη απαιτεί την δική της βελτιστοποίηση της τεχνικής, η ευαισθησία περιορίζεται εάν υπάρχει ελάχιστη μόνο ποσότητα DNA, η κατανομή Poisson απαιτεί την προσεκτική αραίωση του δείγματος και το υψηλό κόστος.

9.SEQUENCING (Αλληλούχιση βάσεων)

Η αλληλούχιση της σειράς των νουκλεοτιδίων σε βιολογικά δείγματα είναι αναπόσπαστο κομμάτι ενός ευρέως φάσματος ερευνητικών εφαρμογών. Κατά την περίοδο των τελευταίων πενήντα ετών πολλοί επιστήμονες αφοσιώθηκαν στην δημιουργία τεχνικών και τεχνολογιών για να διευκολυνθεί η αλληλούχιση DNA και RNA μορίων. Στην διάρκεια αυτή, υπήρξε τρομακτική πρόοδος, ξεκινώντας από την αλληλούχιση μικρών τμημάτων γενετικού υλικού στην αλληλούχιση εκατομμυρίων βάσεων, και από την αναγνώριση της κωδικής αλληλουχίας ενός μόνο γονιδίου στην έρευνα του πλήρους γονιδιώματος πληθώρας οργανισμών. Η αλληλουχία των νουκλειικών οξέων στις πολυνουκλεοτιδικές αλυσίδες περιέχει την πληροφορία για τις κληρονομικές και βιοχημικές ιδιότητες της ζωής στη γη. Επομένως, η ικανότητα ανάλυσης λεπτομερειακά τέτοιων αλληλουχιών αποτελεί επιτακτική ανάγκη στη βιολογική έρευνα. Οι Watson και Crick ανέλυσαν την τρισδιάστατη δομή του DNA το 1953, χρησιμοποιώντας κρυσταλλογραφικά δεδομένα των Franklin και Wilkins, το οποίο δημιούργησε ένα νοητικό πλαίσιο αναφορικά με την αντιγραφή του DNA και την κωδικοποίηση πρωτεϊνών από αυτό. Παρ' όλα αυτά, η ικανότητα αλληλούχισης του DNA δεν ακολούθησε για μεγάλο χρονικό διάστημα. Οι στρατηγικές που προσπαθούσαν να συμπεράνουν την αλληλουχία των πρωτεϊνικών αλυσίδων, δεν έβρισκαν εφαρμογή στα νουκλειικά οξέα: τα μόρια DNA είναι πολύ μικρότερα και αποτελούνται από λιγότερες διαφορετικές υπομονάδες (A,T,G,C) , αρκετά όμοιες μεταξύ τους, καθιστώντας δύσκολη τη διάκριση. Έτσι, προέκυψε η ανάγκη για σχεδιασμό νέων τακτικών. Οι αρχικές προσπάθειες επικεντρώθηκαν στην αλληλούχιση των πιο εύκολα διαθέσιμων πληθυσμών RNA ειδών, όπως το ριβοσωμικό ή μεταφορικό RNA βακτηρίων καθώς και το γονιδίωμα του βακτηριοφάγου με μονόκλωνο RNA. Τα πλεονεκτήματα της προσέγγισης αυτής ήταν η παραγωγή μεγάλου αριθμού βακτηρίων/βακτηριοφάγων σε καλλιέργεια, η έλλειψη συμπληρωματικού κλώνου καθιστώντας το μόριο λιγότερο πολύπλοκο και μέγεθος του RNA που ήταν σαφώς μικρότερο του γονιδιώματος των ευκαρυωτικών. Επιπροσθέτως, τα ένζυμα RNAσες που είχαν την δυνατότητα κοπής του RNA σε συγκεκριμένες περιοχές ήταν ήδη γνωστά και διαθέσιμα. Παρά τα πλεονεκτήματα, η πρόοδος παρέμενε αργή, λόγω του γεγονότος πως οι υπάρχουσες τεχνικές προερχόμενες από την αναλυτική χημεία, μπορούσαν να υπολογίσουν την αναλογία/περιεκτικότητα νουκλεοτιδίων όμως σε καμία περίπτωση την σειρά. Παρά τις δυσκολίες όμως, συνδυάζοντας τις τεχνικές αυτές με την επιλεκτική επεξεργασία ριβονουκλεασών για την παραγωγή τμημάτων RNA, το έτος 1965, ο R.Holley και οι συνεργάτες του, κατάφεραν να αποσαφηνίσουν την πρώτη αλληλουχία νουκλειικού οξέος. Ήταν η αλληλουχία tRNA του *S.Cerevisiae* που κωδικοποιούσε το αμινοξύ Αλανίνη. Ταυτόχρονα, ο F.Sanger και οι συνεργάτες

του, δημιούργησαν μια σχετική τεχνική ανίχνευσης ραδιοσημασμένων κομμένων από ριβονουκλεάσες τμημάτων κατόπιν δισδιάστατης κλασματοποίησης, η οποία επέτρεψε στους ερευνητές να αυξήσουν τον όγκο της δεξαμενής πληροφοριών, προσθέτοντας rRNA και tRNA αλληλουχίες. Με τη χρήση της τεχνικής αυτής, ο W.Fiers κατάφερε να ανακαλύψει την πρώτη ολοκληρωμένη αλληλουχία-γονίδιο που κωδικοποιεί πρωτεΐνη το 1972, και ήταν η πρωτεΐνη έλυτρο του βακτηριοφάγου MS2. Το έτος 1976, έγινε και η πλήρης αλληλούχιση του γονιδιώματος του φάγου. Εκείνη τη χρονική στιγμή οι ερευνητές άρχισαν να προσαρμόζουν τις μεθόδους για να επιτύχουν την αλληλούχιση DNA, επωφελούμενοι από την πρόσφατη τότε απομόνωση βακτηριοφάγων με DNA γονιδίωμα, οι οποίοι αποτελούσαν την ιδανική πηγή για την δοκιμή/εφαρμογή νέων πειραματικών πρωτοκόλλων. Παρατηρώντας ότι ο φάγος λ του Εντεροβακτηρίου είχε συνεκτικά άκρα(5' overhanging), οι Wu και Kaiser, χρησιμοποίησαν DNA πολυμεράση για να προσδέσουν ραδιενεργά νουκλεοτίδια, ένα κάθε φορά και υπολογίζοντας την ενσωμάτωση. Δεν άργησε πολύ να γενικευτεί η αρχή μέσω της χρήσης ολιγινουκλεοτιδίων ως εκκινήτων της DNA πολυμεράσης. Η ενσωμάτωση των ραδιενεργών νουκλεοτιδίων μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για την αποσαφήνιση της σειράς νουκλεοτιδίων παντού και όχι μόνο στις άκρες του γενώματος βακτηριοφάγων. Όμως, η ανάλυση της σειράς περιοριζόταν σε μικρά τμήματα DNA και ακόμη περιελάμβανε αρκετές τεχνικές αναλυτικής χημείας και κλασματοποίησης. Η επόμενη πρακτική αλλαγή που είχε σοβαρό αντίκτυπο, ήταν η κατάργηση της 2D κλασματοποίησης(ηλεκτροφόρηση και χρωματογραφία) με την χρήση μόνο της ηλεκτροφόρησης σε γέλη πολυακρυλαμίδιου για το διαχωρισμό τμημάτων νουκλεοτιδίων διαφορετικού μεγέθους. Η γέλη αυτή προσέφερε πολύ μεγαλύτερη δυνατότητα ικανότητα ανάλυσης. Η πρόοδος αυτή αντιπροσωπεύεται σε δυο και κλασσικά πλεόν πρωτόκολλα στα μέσα της δεκαετίας του 1970, το Plus and Minus των Sanger/Coulson και την τεχνική χημικής κοπής των Maxam/Gilbert. Η plus and minus τεχνική χρησιμοποιούσε DNA πολυμεράση για την σύνθεση μέσω εκκινήτη, ενσωματώνοντας ραδιοσημασμένα νουκλεοτίδια, πριν πράξει αντιδράσεις δευτερεύοντως πολυμερισμού: μια plus αντίδραση, στην οποία μόνο ένα τύπος νουκλεοτιδίου είναι παρών και έτσι όλα τα τμήματα έχουν το συγκεκριμένο νουκλεοτίδιο στο τέλος τους και μια minus αντίδραση, στην οποία υπάρχουν τα υπόλοιπα τρία νουκλεοτίδια κάθε φορά και πράγει αλληλουχίες που σταματούν πάντοτε πριν την ενσωμάτωση του τετάρτου νουκλεοτιδίου. Πραγματοποιώντας ηλεκτροφόρηση σε πολυακρυλαμίδιο, είναι εφικτός ο υπολογισμός της αλληλουχίας. Χρησιμοποιώντας την προσέγγιση αυτή, ο Sanger και οι συνεργάτες του, αλληλούχισαν το πρώτο DNA γένωμα, αυτό του βακτηριοφάγου φX174. Η δεύτερη τεχνική παρουσίαζε σημαντικές διαφορές. Αντί της χρήσης πολυμεράσης, το ραδιοσημασμένο DNA επεξεργάζεται με χημικές ουσίες που προκαλούν θράυση σε συγκεκριμένες βάσεις. Κατόπιν της ηλεκτροφόρησης, το μήκος των συγκεκριμένων τμημάτων και επομένως η θέση συγκεκριμένων νουκλεοτιδίων, γίνεται γνωστή. Η τεχνική αυτή έγινε ευρύτατα αποδεκτή και θεωρείται προάγγελος της αλληλούχισης πρώτης γενιάς(First-gen).(Heather et al, 2015)

DEVELOPMENT OF ENZYME-BASED DNA SEQUENCING METHODS 445

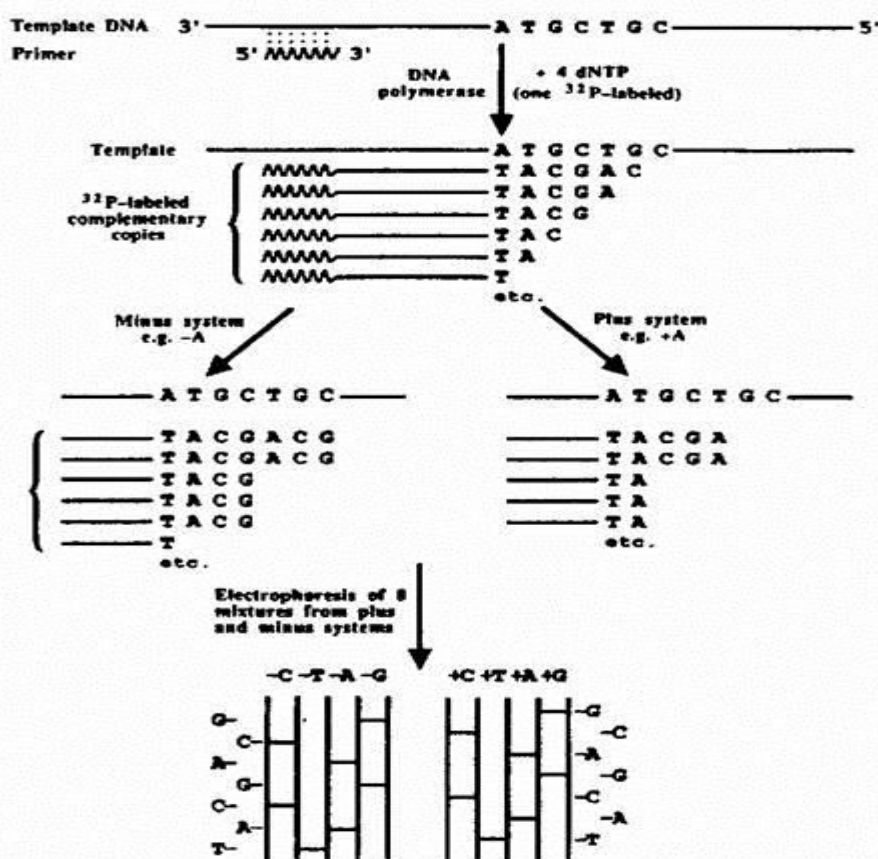
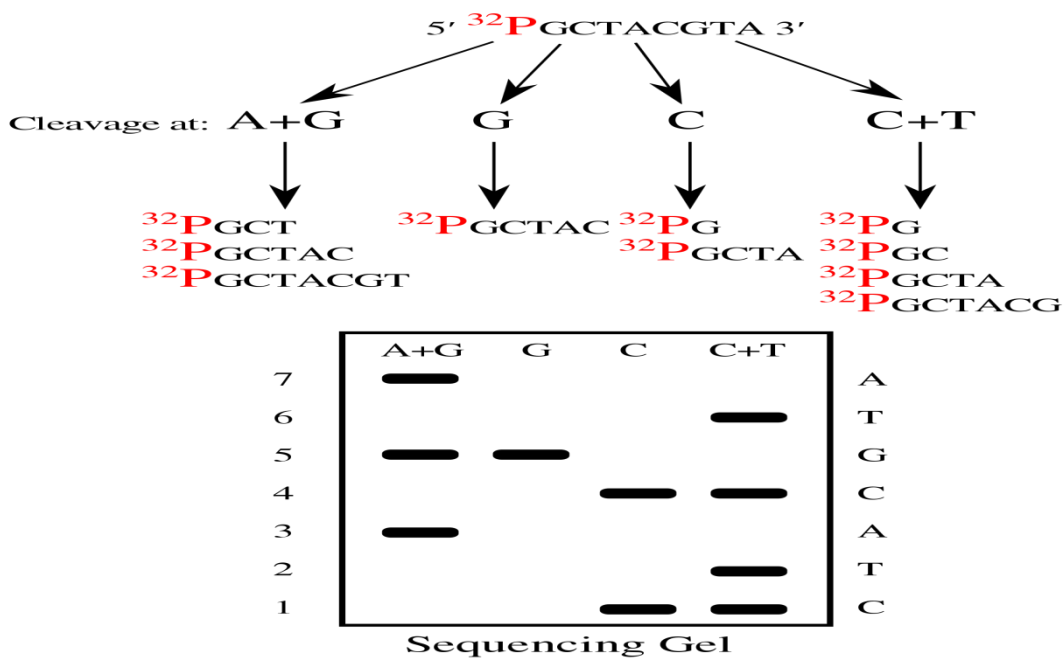


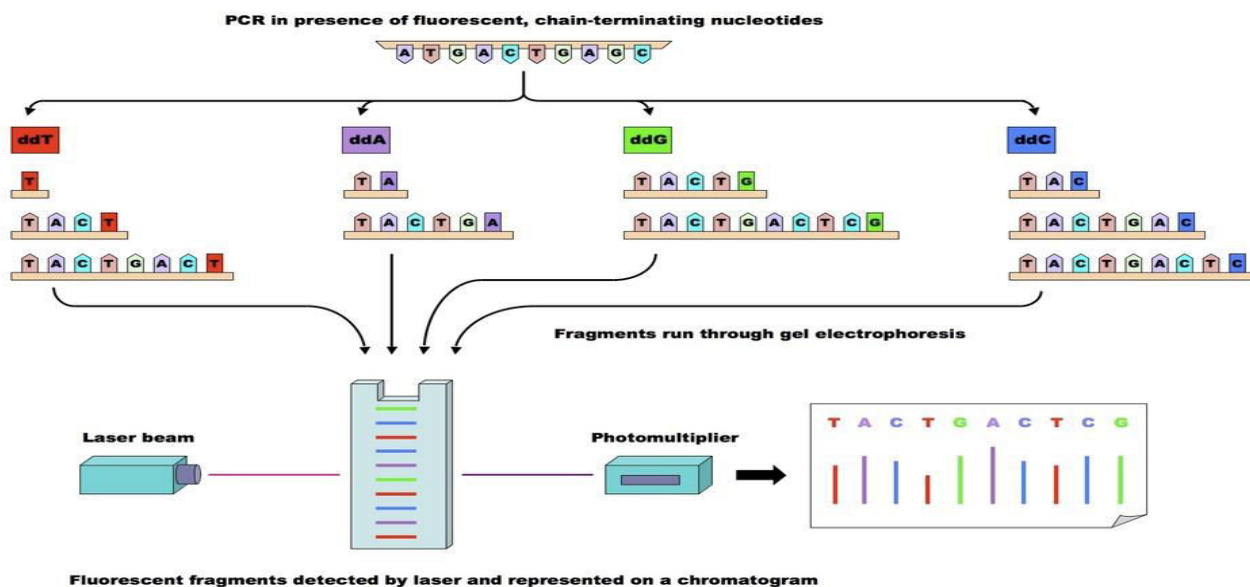
Figure 3. The plus-and-minus method for DNA sequence analysis. Consult text for details.

Εικόνα 15: Σχηματική αναπαράσταση της plus and minus τεχνικής των Sanger/Coulson.



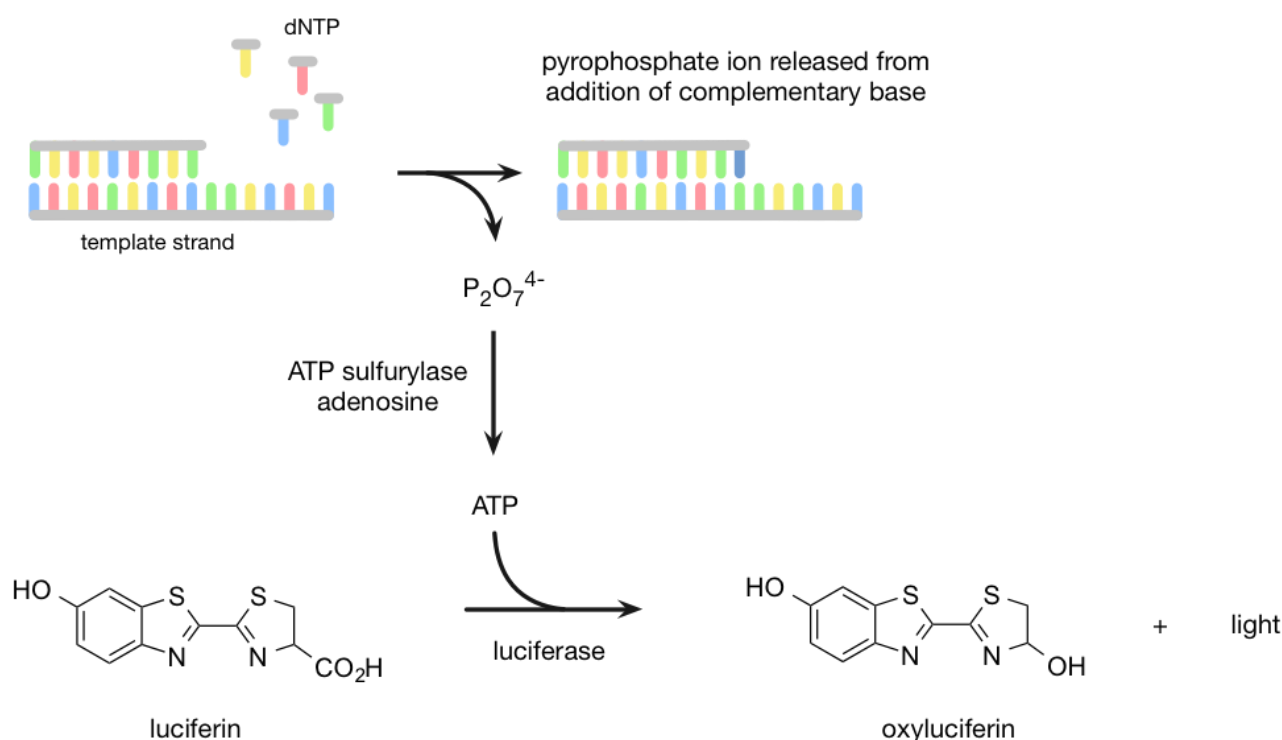
Εικόνα 16: Σχηματική αναπαράσταση της τεχνικής Chemical cleavage των Maxam/Gilbert.

Η μεγάλη πρόοδος, που άλλαξε την πορεία της αλληλούχισης, ήρθε το 1977, με την τεχνική τερματισμού αλυσίδας(ή διδέοξυ) του Sanger. Η τεχνική αυτή χρησιμοποιεί χημικά ανάλογα της των δεοξυριβονουκλεοτιδίων, που είναι μονομερή του DNA. Τα διδέοξυνουκλεοτίδια(ddNTPs) δεν διαθέτουν την 3'-OH ομάδα που απαιτείται για την επέκταση των DNA αλυσίδων, συνεπώς δεν μπορούν να δημιουργήσουν δεσμό με την 5' φωσφορική ομάδα του επομένου νουκλεοτιδίου. Η άναμιξη ραδιοσημασμένων ddNTPs σε μια αντίδραση επιμήκυνσης DNA, σε ένα κλάσμα της συγκέντρωσης dNTPs, έχει ως αποτέλεσμα την δημιουργία αλυσίδων DNA διαφορετικών μεγεθών, αφού τα ddNTPs προσδένονται τυχαία καθώς εκτείνεται ο κλώνος, σταματώντας την επιμήκυνση όταν συνδεθούν. Πραγματοποιώντας τέσσερις παράλληλες αντιδράσεις, με την καθεμία να περιέχει μόνο ένα συγκεκριμένο ddNTP, ακολουθούμενες από ηλεκτροφόρηση σε τέσσερις γραμμές γέλης πολυακρυλαμιδίου, είναι εφικτή η ανάλυση της αλληλουχίας. Ενώ η τεχνική αυτή είχε την ίδια αρχή με τις υπόλοιπες(παραγωγή όλων των πιθανών αλληλουχιών και σήμανση του τελευταίου νουκλεοτιδίου), η ακρίβεια, η ευρωστία και η ευκολία χρήσης οδήγησαν την μέθοδο να γίνει πιο ευρύτερα χρησιμοποιούμενη στρατηγική αλληλούχισης. Ένας σημαντικός αριθμός βελτιώσεων σημειώθηκαν τα ακόλουθα χρόνια επί της Sanger αλληλούχισης. Η χρήση ραδιοσήμανσης αντικαταστάθηκε από τα φθοριοχρώματα και η ανίχνευση βελτιώθηκε χάρη στην χρήση ηλεκτροφόρησης τριχοειδών. Οι δύο αυτές προσθήκες, συνέβαλαν στην ανάπτυξη σταδιακά αυξανόμενης αυτοματοποίησης μηχανημάτων αλληλούχισης και νομοτελειακά στην εμπορική διαθεσιμότητα της πρώτης σοδειάς τετοιων μηχανημάτων. Τα μηχανήματα πρώτης γενιάς μπορούσαν να παράξουν αναγνώσεις(reads) περίπου 1kb σε μήκος. Για την ανάλυση μεγαλύτερων τμημάτων, οι ερευνητές χρησιμοποίησαν την τεχνική shotgun, όπου υπερκαλυπτόμενα τμήματα DNA κλωνοποιούνται και αλληλουχούνται ξεχωριστά και έπειτα ενώνονται σε μια μακριά συνεχή αλυσίδα(contig) in silico. Η ανάπτυξη των διαφόρων τεχνικών PCR και του ανασυνδυασμού DNA, βοήθησαν τη γενωμική επανάσταση προσφέροντας τα μέσα για την δημιουργία υψηλών συγκεντρώσεων «καθαρού» DNA. Βελτιώσεις υπήρξαν και δια μέσω μη εμφανών ευθέως οδών. Για παράδειγμα, το τμήμα Klenow της DNA πολυμεράσης της E.Coli, που παράγεται κατόπιν πέψης πρωτεασών του αρχικού ενζύμου και στερεί την 5' προς 3' δράση εξωνουκλεάσης, είχε αρχικά χρησιμοποιηθεί στην αλληλούχιση λόγω της ικανότητάς του να προσθέτει ddNTPs αποδοτικά. Όμως, τα περισσότερα αλληλουχημένα γονιδιώματα και τα εργαλεία γενετικού χειρισμού, έδωσαν τη δυνατότητα να δημιουργηθούν πολυμεράσες με μεγαλύτερη απόδοση. Νεότερα μηχανήματα αλληλούχισης, επέτρεψαν την ανάλυση χιλιάδων δειγμάτων ταυτόχρονα, επιταγχνώντας τοιοιτοτρόπως το Human Genome Project.



Εικόνα 17: Η μέθοδος αλληλούχισης διδέοξυ-νουκλεοτιδίων του Sanger.

Αλληλούχιση δεύτερης-επόμενης γενιάς(Second-gen or Next-gen): Συγχρόνως με την ανάπτυξη μεγάλης κλίμακας της διδίοξυ-αλληλούχισης, μια άλλη τεχνική ανέκυψε, σηματοτώντας την έναρξη της επόμενης γενιάς. Αυτή η μέθοδος διέφερε στο γεγονός ότι δεν συμπέραινε την θέση/σειρά των νουκλεοτιδίων με την χρήση ραδιοσημασμένων ή φθοριοχρωματισμένων ddNTPs και τη χρήση ηλεκτροφόρησης. Αντ' αυτού, οι έρευνες χρησιμοποίησαν μια πρόσφατη μέθοδο φωταύγειας(luminescent) για τη μέτρηση σύνθεσης πυροφωσφορικού: αυτό συμβαίνει με την δράση δύο ενζύμων, της ATP σουλφυρυλάσης που μετατρέπει το πυροφωσφορικό σε ATP και της Λουσιφεράσης που έχει ως υπόστρωμα το ATP για την παραγωγή φωτός. Η παραγωγή φωτός είναι ανάλογη της παραγωγής πυροφωσφορικού. Η προσέγγιση αυτή για να υπολογίσει την αλληλουχία, μετράει την παραγωγή πυροφωσφορικού καθώς κάθε νουκλεοτίδιο προστίθεται στο σύστημα στο οποίο το δείγμα DNA (template) είναι στερεωμένο. Αξίζει να σημειωθεί πως παρά τις διαφορές τους, η Sanger και η Pyrosequencing, είναι SBS(sequencing by synthesis) τεχνικές, δηλαδή αλληλούχισης μέσω σύνθεσης αφού και οι δύο απαιτούν την χρήση DNA πολυμεράσης.

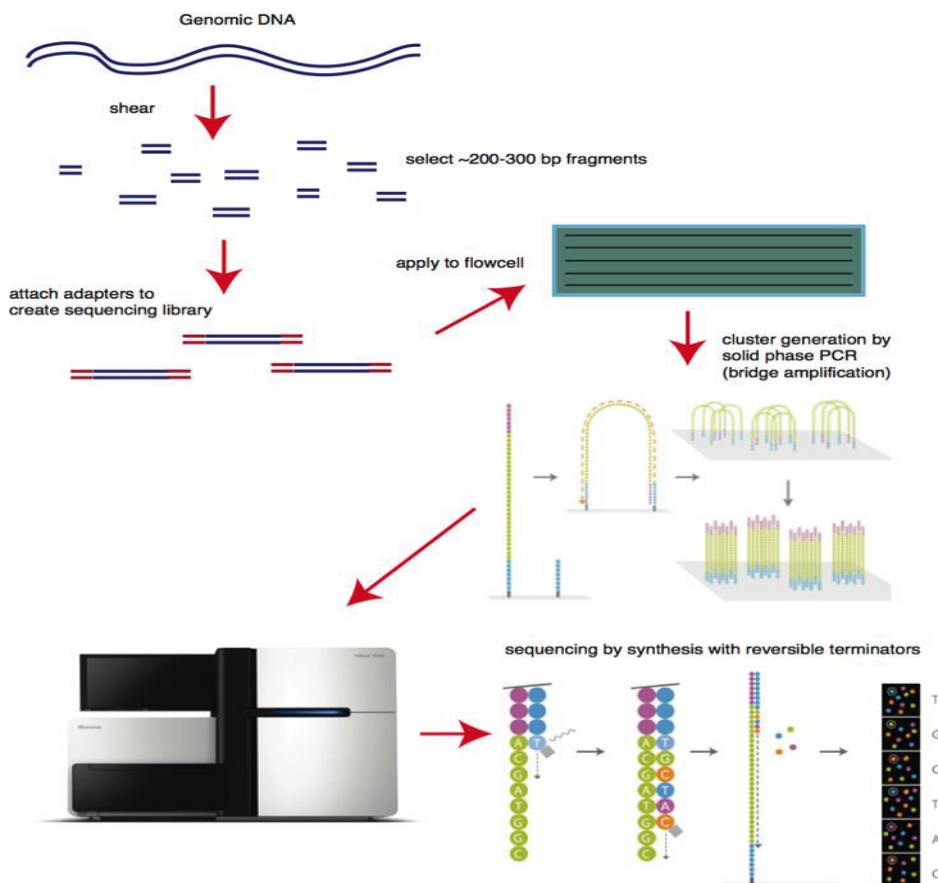


Εικόνα 18: Η βασική αρχή λειτουργίας αλληλούχισης πυροφωσφορικού(Pyrosequencing).

Η Pyrosequencing, η οποία εφαρμόστηκε από τον πρωτοπόρο P.Nyren και τους συνεργάτες του, είχε έναν αριθμό χαρακτηριστικών που θεωρήθηκαν ευεργετικά: μπορεί να πραγματοποιηθεί δίχως την χρήση επεξεργασμένων νουκλεοτιδίων με απλά dNTPs και παρατηρείται σε πραγματικό χρόνο δίχως την ανάγκη ηλεκτροφόρησης. Μετέπειτα βελτιώσεις, περιλαμβάνουν την χρήση παραμαγνητικών beads για την πρόσδεση DNA και την ενζυματική αποδιάταξη μη ενσωματωμένων dNTPs για την αποφυγή πλύσεων που απαιτούν μεγάλο χρονικό διάστημα. Η μεγαλύτερη δυσκολία της προσέγγισης είναι η αποσαφήνιση πόσα ίδια νουκλεοτίδια βρίσκονται σε σειρά στην ίδια περιοχή: η ένταση του φωτός που εκπέμπεται αντιστοιχεί στο μέγεθος του ομοπολυμερούς, όμως παράγεται θόρυβος κατόπιν 4-5 ίδιων νουκλεοτιδίων. Η τεχνική κατοχυρώθηκε αργότερα στην 454 Sciences, μια εταιρεία βιοτεχνολογίας, η οποία με τη σειρά της αγοράστηκε από την Roche. Τα μηχανήματα της 454, επέτρεψαν την μαζική και παράλληλη αλληλούχιση, αυξάνοντας την ποσότητα DNA που μπορούσε να αλληλουχηθεί σε μία προσπάθεια(run). Βιβλιοθήκες DNA αρχικά προσδένονται σε beads μέσω αλληλουχιών-ανταπτόρων και μετά υπόκεινται σε water in oil emulsion PCR(emPCR), με στόχο σε κάθε

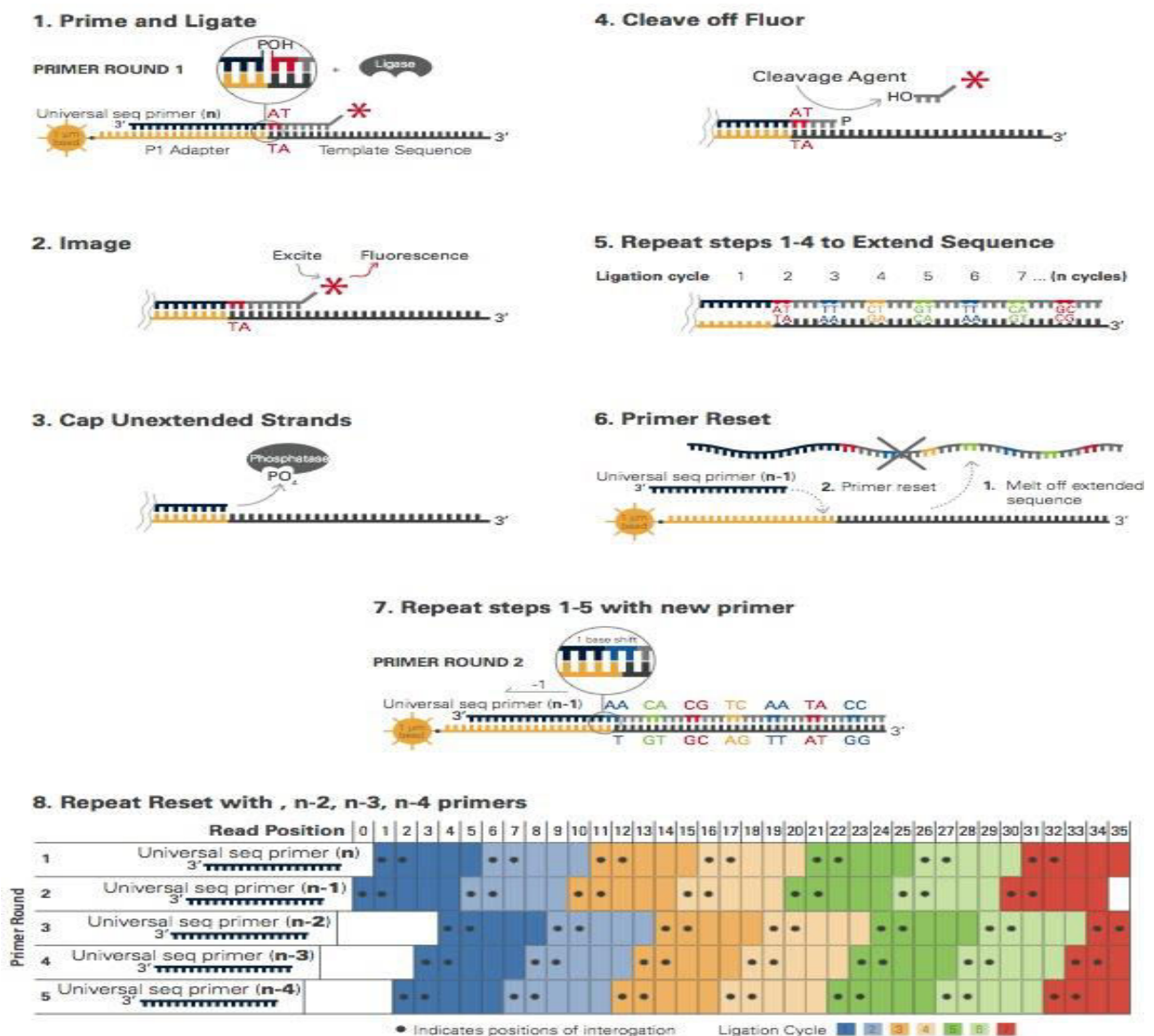
διαμέρισμα να υπάρχει ένα μόριο DNA σε ένα bead, το οποίο ενισχύεται στη δική του σταγόνα. Τα σύμπλοκα DNA-bead ξεπλένονται σε πλακίδιο με όγκο αντίδρασης 1pl, που χωράει μόνο ένα σύμπλοκο ανά διαμέρισμα. Η Pyrosequencing λαμβάνει χώρα καθώς προστίθενται ένζυμα και dNTPs, και η απελευθέρωση πυροφωσφορικού μετράται μέσω αισθητήρα κάτω από τα πηγαδάκια. Αυτό το σύστημα, μπορούσε να δώσει αναγνώσεις 400-500 bp για κάθε ένα από τα πηγαδάκια. Η παράλληλη αυτή αλληλούχηση, αύξησε την απόδοση δραματικά, επιτρέποντας για πρώτη φορά την πλήρη αλληλούχηση για πρώτη φορά του ανθρώπινου γονιδιώματος., το οποίο εν προκειμένω άνηκε στο J.Watson, πολύ πιο γρήγορα και οικονομικά από ότι η προσπάθεια του επιχειρηματία C.Venter που χρησιμοποίησε την μέθοδο Sanger. Η αρχή της πραγματοποίησης τεράστιων αριθμών παράλληλης αλληλούχησης, εφικτών λόγω προόδου στη μικρο-κατασκευή και την απεικόνιση υψηλής ανάλυσης, χαρακτήρισε την αλληλούχηση δεύτερης γενιάς.

Ακολούθως της επιτυχίας της αλληλούχησης πυροφωσφορικού, άλλες τεχνικές ανέκυψαν. Η σημαντικότερη εξ' αυτών ήταν η μέθοδος Solexa, η οποία αγοράστηκε αργότερα από την Illumina. Αντί της χρήσης bead-based emPCR, τα μόρια DNA προσδένονται σε αντάπτορες, διέρχονται μέσω ροής από συμπληρωματικά νουκλεοτίδια. Ακολουθεί μια PCR στερεής φάσης παράγονται γειτονικά clusters κλώνων για κάθε αρχικό DNA. Η διαδικασία ονομάστηκε bridge-amplification, καθώς τα αντιγραφόμενα DNA πρέπει να «λυγίσουν» πριν να είναι σε θέση να πολυμεριστούν. Η αυτή καθ'αυτή αλληλούχηση παραμένει SBS, με τη χρήση φθοριζόντων dNTPs κατηγορίας reversible-terminator, τα οποία κατόπιν ενσωμάτωσής τους δεν μπορούν να προσδεθούν με άλλα νουκλεοτίδια, εφόσον στην θέση 3'-OH υπάρχει το φθοριοχρώμα, οπότε πρέπει πρώτα να αφαιρεθεί και μετά να συνεχιστεί ο πολυμερισμός. Τα ειδικά αυτά dNTPs και η πολυμεράση κατευθύνονται προς τα μονόκλινα DNA στα clusters ανά κύκλους. Σε κάθε κύκλο, η ταυτότητα του νουκλεοτιδίου που ενσωματώνεται, υπολογίζεται με τη διέγερση του φθοριοχρώματος, πριν την ενζυμική απομάκρυνσή του και συνέχισης του πολυμερισμού.

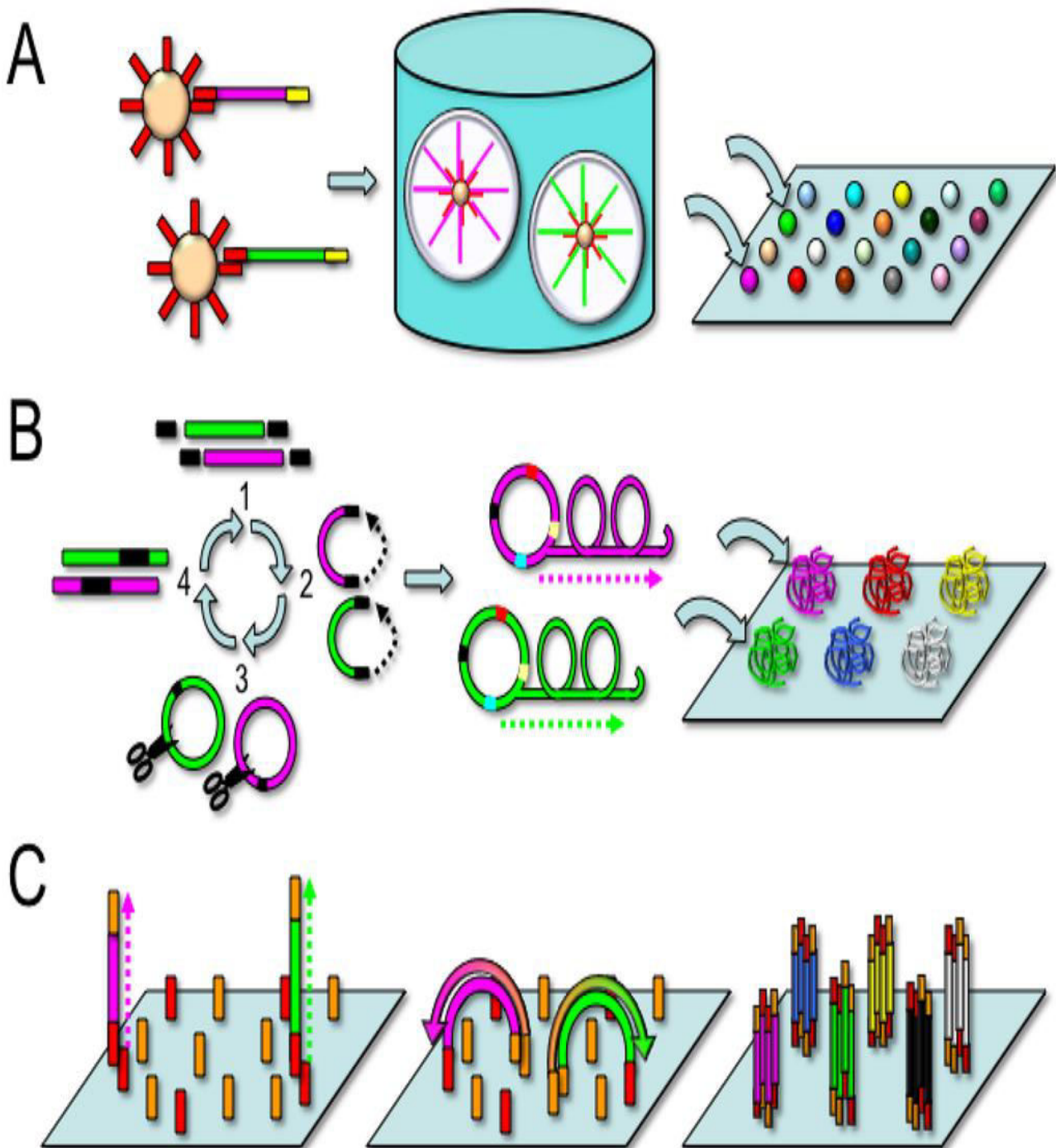


Εικόνα 19: Αρχή λειτουργίας τεχνολογίας Solexa.

Αρκετές ακόμη εταιρείες αλληλούχισης, η κάθεμία με την δική της μεθοδολογία, εμφανίστηκαν(και ενίοτε εξαφανίστηκαν) στο προσκήνιο, επηράζοντας την αγορά σε μεγάλο βαθμό και παρέχοντας στοιχεία σχετικά με την εφικτότητα ή μη κάποιων συγκεκριμένων πειραμάτων. Στα πρώτα χρόνια της αλληλούχισης δεύτερης γενιάς ήταν η SOLiD(sequencing by oligonucleotide ligation and detection) της εταιρείας Applied Biosystems, η οποία αργότερα συγχωνεύθηκε με την Invitrogen, δημιουργώντας την Life Technologies. Όπως αναφέρει και το όνομά της, η αλληλούχιση δεν συμβαίνει μέσω σύνθεσης αλλά μέσω σύνδεσης(ligation), με τη χρήση DNA λιγάσης, χτίζοντας πάνω στις αρχές που καθιερώθηκαν από την open-source colony του G.Church. Ενώ η SOLiD δεν μπορούσε να παράξει αναγνώσεις του μήκους της Solexa, παρέμεινε ανταγωνιστική λόγω χαμηλού κόστους ανά βάση. Μια άλλη τεχνική που χρησιμοποίησε SBL(sequencing by ligation),ήταν η μέθοδος DNA Nanoballs της εταιρείας Complete Genomics, όπου οι αλληλουχίες ανακτώνται μέσω σύνδεσης εκκινήτη(probe) όμως η δημιουργία κλωνικών πληθυσμών ήταν πρωτοποριακή: δεν χρησιμοποιούνται beads ή bridge amplification, οι ενισχυμένες αλληλουχίες σχηματίζουν nanoballs,κυκλικές δομές με τα τμήματα DNA να διαχωρίζονται μόνο από τις αλληλουχίες ανταπτόρων. Οι δομές αυτές στερεώνονται σε πλακίδιο προς αλληλούχιση.



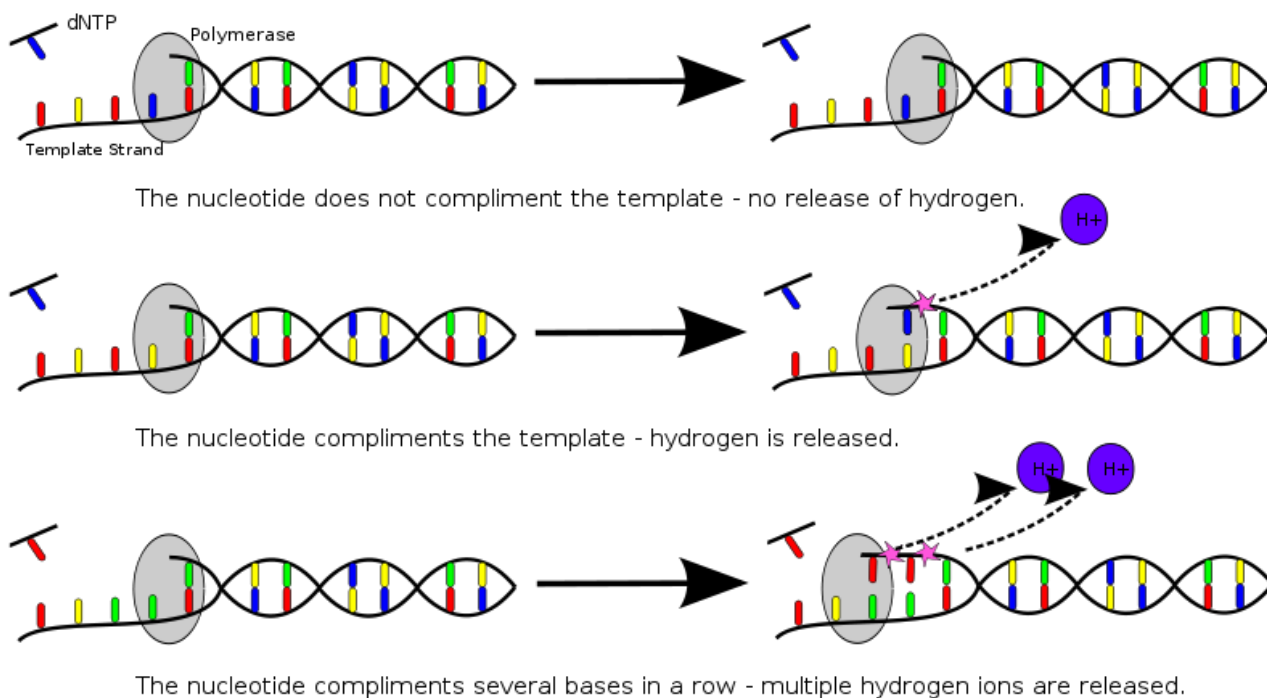
Εικόνα 20: Λειτουργία SOLiD.



Εικόνα 21: Διαφορετικές προσεγγίσεις αλληλούχισης όσον αφορά το κομμάτι της ενίσχυσης. Στο A, emulsion PCR με χρήση beads. Στο B, τεχνολογία nanoballs και στο C, bridge amplification. (Anderson M.W and Schrijver I., 2010, Next Generation DNA Sequencing and the Future of Genomic Medicine)

Η τελευταία αξιοσημείωτη τεχνική της δεύτερης γενιάς, δημιουργήθηκε από τον J. Rothberg αφότου έφυγε από την 454 Sciences. Η τεχνική Ion torrent, κατοχυρωμένη μετέπειτα από την Life Technologies, είναι η πρώτη τεχνική που δεν χρησιμοποιεί φθορισμό ή φωταύγεια, ανήκει συνεπώς στην post-light εποχή. Με τρόπο παρόμοιο της αλληλούχισης πυροφωσφορικού, τα beads περιέχουν πληθυσμούς DNA τμημάτων προερχόμενα από emPCR, προστίθενται σε ένα picowell πλακίδιο, ένα νουκλεοτίδιο τη φορά αυξάνει ο πολυμερισμός και η αλληλουχία υπολογίζεται με την απελευθέρωση πρωτονίων (H^+ ιόντων) και επακόλουθης αλλαγής του pH. Η τεχνική έγινε εφικτή μέσω χρήσης της CMOS (complementary metal-oxide technology) που

χρησιμοποιείται στην δημιουργία μικροεπεξεργαστών. Επιτρέπει την τάχιστη αλληλούχιση, όμως εμφανίζει το ίδιο πρόβλημα με την 454 όταν συναντά ομοπολυμερή.



Εικόνα 22: Η βασική αρχή λειτουργίας της Ion torrent αλληλούχισης.

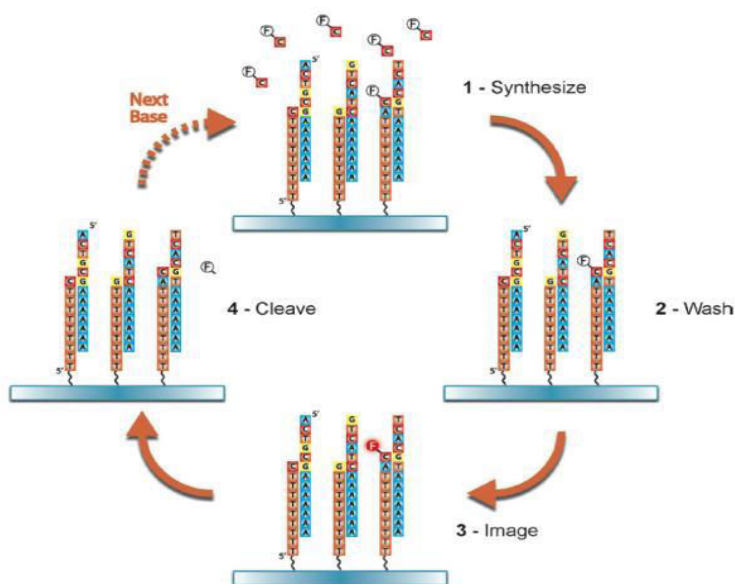
Η συχνά αποκαλούμενη γενωμική επανάσταση, οδηγούμενη εν πολλοίς από τις δραματικές αλλαγές στη τεχνολογία της αλληλούχισης, άλλαξε το κόστος και την ευκολία ανάλυσης. Οι ικανότητες των μηχανημάτων αλληλούχισης αυξάνονται με μεγαλύτερο βαθμό από ότι προβλέπει ο νόμος του Moore για τους επεξεργαστές υπολογιστών: η πολυπλοκότητα του τσιπ, υπολογιζόμενη ως αριθμός μικροεπεξεργαστών ανά κόστος μονάδος, διπλασιάζεται κάθε δύο χρόνια ενώ οι ικανότητες αλληλούχισης διπλασιάζονται κάθε 5 μήνες μεταξύ 2004-2010. Οι διάφορες τεχνολογίες διαφέρουν στη χημική τους προσέγγιση, στην ικανότητα και την εξειδίκευση, παρέχοντας μια ισχυρή εργαλειοθήκη στους ερευνητές για το σχεδιασμό πειραμάτων. Βάσει στατιστικών, η τεχνολογία Solexa Illumina είναι η πιο πετυχημένη, στα όρια του μονοπωλίου και της αποδίδεται το μεγαλύτερο μερίδιο επιτυχίας των τεχνικών δεύτερης γενιάς. (Buermans et al, 2014) (Grada, 2013) (Metzker, 2010)

Σύγκριση συστημάτων: Οι τεχνικές αλληλούχισης δεύτερης γενιάς, προσφέρουν πιο οικονομική και ακριβέστερη προσέγγιση, συγκριτικά με την Sanger αλληλούχιση. Μικρά γονιδιώματα μπορούν πλέον να αλληλουχηθούν σε μία μέρα. Η υψηλής απόδοσης αλληλούχιση του ανθρωπίνου γονιδιώματος, οδηγεί στην ανακάλυψη των γονιδίων και των ρυθμιστικών περιοχών που εμπλέκονται στις εκάστοτε ασθένειες. Η RNA Seq προσφέρει πληροφορίες σε όλο το τρανσκρίπτομα ενός δείγματος σε μία μόνο ανάλυση, προσφέροντας μια ισχυρή εναλλακτική στη χρήση μικροσυστοιχιών για τη μελέτη έκφρασης γονιδίων. Τα συστήματα δεύτερης γενιάς παρά το γεγονός ότι είναι πιο οικονομικά από τα συστήματα πρώτης γενιάς, παραμένουν εξαιρετικά ακριβά για τα περισσότερα εργαστήρια. Οι πλατφόρμες NGS μπορεί να στοιχίζουν περισσότερα από 100.000€ και το κόστος κάθε αντίδρασης να υπερβαίνει τα 1000€. Περιοχές ομοπολυμερών δεν αλληλουχούνται σε ορισμένες πλατφόρμες σωστά και οι μικρές αναγνώσεις μπορεί να οδηγήσουν σε λάθη. Η ανάλυση δεδομένων απαιτεί χρόνο και εξειδικευμένη γνώση βιοπληροφορικής για τη λήψη ακριβούς πληροφορίας. (Kircher, 2010)

Αλληλούχιση τρίτης γενιάς(Third-gen): Υπάρχει μια αέναη συζήτηση σχετικά με τα χαρακτηριστικά που διαχωρίζουν τις γενιές της τεχνολογίας αλληλούχισης, ειδικότερα δε για την μετάβαση από συστήματα δεύτερης σε αυτά της τρίτης. Πολλοί συμφωνούν πως η αλληλούχιση ενός μοναδικού μορίου(SMS-single molecule sequencing), η αλληλούχιση σε πραγματικό χρόνο(real time) και απλές αποκλίσεις από τα μηχανήματα της προηγούμενης τεχνολογίας, θα πρέπει να αποτελούν χαρακτηριστικά της τρίτης γενιάς. Στο παρόν, θεωρούνται τεχνολογίες τρίτης γενιάς όσες μπορούν να αλληλουχίσουν μεμονωμένα μόρια δίχως την ανάγκη ενίσχυσης μέσω PCR.

Η πρώτη SMS τεχνολογία, αναπτύχθηκε εργαστηριακά από τον S.Quake, έγινε διαθέσιμη από την Helicos Biosciences, και λειτούργησε παρόμοια της Illumina, δίχως βέβαια την bridge amplification. Τα δείγματα DNA στερεώνονται σε επίπεδη επιφάνεια και στη συνέχεια καταλλήλως φθορίζοντα reversible terminators dNTPs,αποκαλούμενα virtual(εικονικά), προστίθενται μια βάση κάθε φορά, καταγράφεται ο φθορισμός, αποκόπτονται και ακολουθεί το επόμενο dNTP κ.ο.κ. Ενώ η μέθοδος είναι αργή, ακριβή και παράγει μικρές αναγνώσεις, ήταν η πρώτη που επέτρεψε την αλληλούχιση DNA μη ενισχυμένου, αποφεύγοντας έτσι τις παθογένειες της PCR. Η εταιρεία Helicos χρεωκόπησε το 2012 και άλλες εταιρείες ήρθαν στο προσκήνιο της τεχνολογίας τρίτης γενιάς.

Helicos – True Single Molecule Sequencing (tSMS)



Start with glass surface covered by multi “T” ss-DNA

Capture ss-DNA to be sequenced, with DNA prepared with a multi “A” end, so it is oriented correctly

No colonies. One molecule per spot on the chip

Add fluoro-tagged nucleotide, one at a time. Gather a fluorescent image after each nucleotide.

Alternate C, G, A, T, C, G, A, T, ... and build ds-DNA molecules from bottom up,

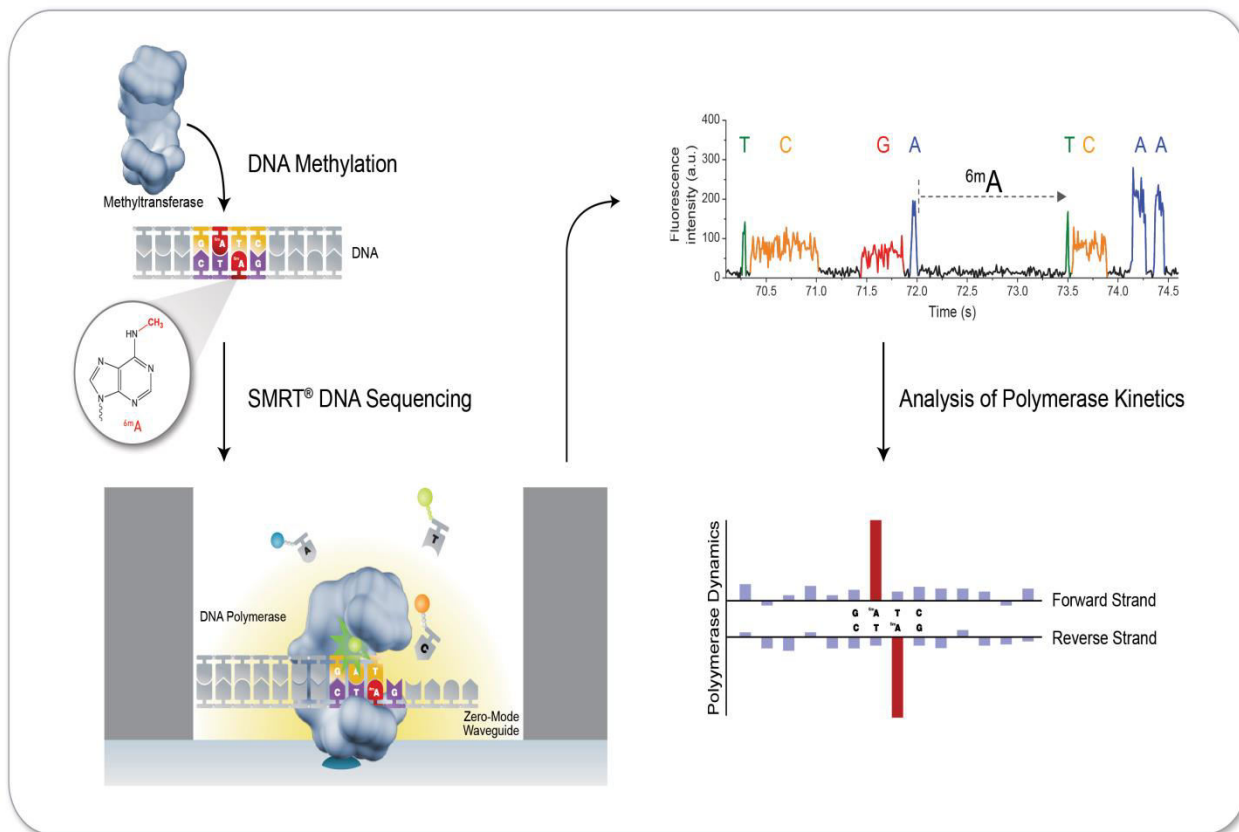
ECE/BioE 416
Lecture 24

19

Εικόνα 23: Ο τρόπος λειτουργίας της τεχνολογίας Helicos.

Την στιγμή που γράφονται αυτές οι λέξεις, η ευρύτερα χρησιμοποιούμενη τεχνολογία της γενιάς αυτής, είναι η SMRT(single molecule real time) της Pacific Biosciences. Κατά τη διάρκεια της μεθόδου, ο πολυμερισμός του DNA προκύπτει σε συστοιχίες κατασκευασμένων νανοδομών που ονομάζονται ZMW(zero mode waveguides), οι οποίες επί της ουσίας είναι μικροσκοπικές οπές σε ένα μεταλλικό φιλμ που καλύπτει τις συστοιχίες. Οι ZMWs εκμεταλλεύονται τις ιδιότητες του φωτός όταν αυτό διέρχεται σε διαμέτρους μικρότερες από το μήκος κύματός του (λ), με συνέπεια τον φωτισμό μόνο των πάτων των πηγαδιών. Αυτό επιτρέπει την οπτικοποίηση του φθορισμού ενός μεμονωμένου μορίου στο βάθος ενός ZMW, λόγω της πολύ συγκεκριμένης ζώνης που η ακτίνα λέιζερ προκαλεί διέγερση των φθοριοχρωμάτων. Η DNA πολυμεράση βρίσκεται στερεωμένη στο

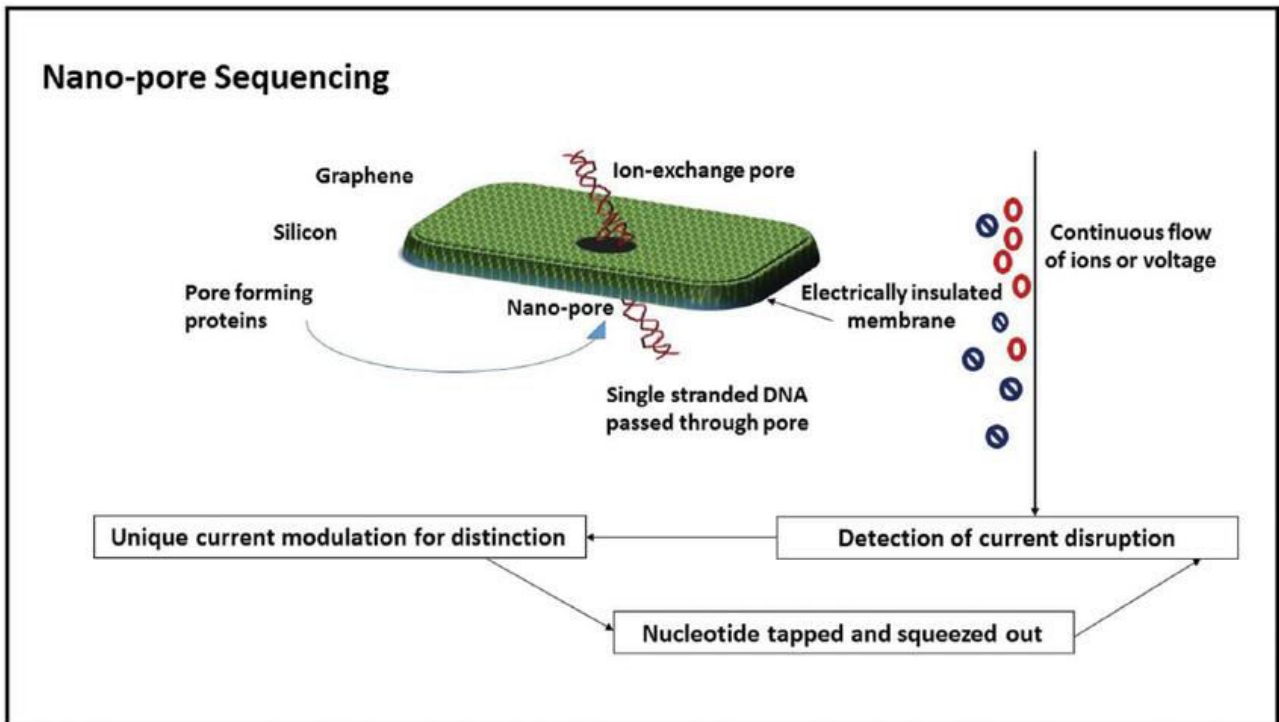
βάθος του διαμερίσματος. Όταν προστίθεται η DNA βιβλιοθήκη ενδιαφέροντος και τα dNTPs, η επιμήκυνση της αλυσίδας κατά ένα μόνο νουκλεοτίδιο τη φορά, μπορεί να παρατηρηθεί σε πραγματικό χρόνο μέσω της πρόσδεσης φθορίζοντων νουκλεοτιδίων. Κατόπιν τα φθοριοχρώματα αποκόπτονται, προκαλώντας λήξη του σήματος για τη θέση αυτή. Η διαδικασία αυτή μπορεί να αλληλουχίσει σε πολύ μικρό χρονικό διάστημα. Συγκριτικά πλεονεκτήματα της τεχνολογίας αποτελούν η παρακολούθηση της κινητικής σε πραγματικό χρόνο κατά την προσθήκη νουκλεοτιδίων από την πολυμεράση, εντοπίζοντας τυχόντα σφάλματα και η ικανότητα αναγνώσεων πολύ μεγάλου μήκους, περίπου 10 kb.



Εικόνα 24: Η τεχνική SMRT.

Ίσως η πιο υποσχόμενη περιοχή έρευνας της τρίτης γενιάς, είναι η αλληλούχιση νανοπόρου (nanopore sequencing) που αποτελεί παρακλάδι ενός μεγαλύτερου πεδίου που περιλαμβάνει την χρήση νανοπόρων για την ανίχνευση και την ποσοτικοποίηση κάθε λογής βιολογικού και χημικού μορίου. Η προοπτική της αλληλούχισης νανοπόρου αναφέρθηκε για πρώτη φορά πριν ακόμη την έναρξη της τεχνολογίας δεύτερης γενιάς, όταν ερευνητές απέδειξαν ότι απέδειξαν ότι μονόκλινα τμήματα RNA ή DNA, μπορούσαν να οδηγηθούν μέσω της διπλοστοιβάδας λιπιδίων με την βοήθεια ιοντικών διαύλων α-αιμολυσίνης και τη χρήση ηλεκτροφόρησης. Η διέλευση μέσω του διαύλου, μπλοκάρει τη ροή ιόντων, μειώνοντας το φορτίο για ένα συγκεκριμένο χρονικό διάστημα, το οποίο είναι αναλογικό του νουκλεϊκού οξέος. Υπάρχει βέβαια και οι πιθανότητα δημιουργίας μη βιολογικών νανοπόρων με στόχο την αλληλούχιση δίκλωνων τμημάτων DNA. Η εταιρεία ONT (Oxford Nanopore Technologies), όντας η πρώτη που δημιούργησε αλληλουχητές νανοπόρων, προκάλεσε ενθουσιασμό με τα μηχανήματα GridION και MinION, εκ των οποίων η δεύτερη είναι μια μικρή, μεγέθους κινητού τηλεφώνου USB συσκευή, η οποία δόθηκε σε τελικούς χρήστες για δοκιμή πρώιμης πρόσβασης (early access) το 2014. Παρά το γεγονός ότι ποιοτικά τα αποτελέσματα δεν είναι ικανοποιητικά ακόμη, οι προσδοκίες μελλοντικά είναι πολύ μεγάλες, για την ανάπτυξη τέτοιων μηχανημάτων που μπορούν να παράξουν

εξαιρετικά μακριές αναγνώσεις δίχως καμία ενίσχυση, με υψηλότερη ταχύτητα και σημαντικά μικρότερο κόστος. Ήδη οι συσκευές MinION χρησιμοποιούνται για την δημιουργία αλληλουχιών αναφοράς βακτηριακού γονιδιώματος και στοχευμένων αμπλικονίων, όπως επίσης και ως υποβόηση στην τεχνολογία Solexa, συνδυάζοντας έτσι τις εξαιρετικά μακριές αναγνώσεις της τεχνολογίας νανοπόρων με την ακρίβεια και το βάθος ανάλυσης της τεχνολογίας δεύτερης γενιάς. Οι συσκευές αυτές μπορούν να χρησιμοποιηθούν και στο πεδίο, όπως απέδειξαν οι J.Quick/N.Loman πρόσφατα, αλληλουχώντας το γονιδίωμα του ιού Εμπόλα στη Γουινέα, δύο μέρες κατόπιν της συλλογής των δειγμάτων. Λαμβάνοντας υπόψιν τα παραπάνω, οι αλληλουχίες νανοπόρων θα μπορούσαν δυνητικά να φέρουν επανάσταση όχι μόνο στην ποσότητα και ποιότητα πληροφοριών που συλλέγονται, αλλά και από ποιόν, που και πότε μπορούν να συλλεχθούν.



Εικόνα 25: Βασική αρχή τεχνολογίας νανοπόρων αλληλούχισης.

Κατηγορίες αλληλούχισης: Η αλληλούχιση ολόκληρου του γονιδιώματος (WGS whole genome sequencing) παρά το πολύ υψηλό κόστος, έχει ως πλεονέκτημα την πλήρη ανάλυση που περιλαμβάνει την αναγνώριση μεταλλάξεων και σε ρυθμιστικές περιοχές και πρόσβαση σε όλο το εύρος γενετικών δεικτών. Η αλληλούχιση του εξώματος (WES whole exome sequencing) προσφέρει την υψηλή κάλυψη των επιλεγμένων περιοχών και μικρότερο κόστος, όμως δεν περιέχει πληροφορίες για μεταλλάξεις ρυθμιστικών περιοχών, βρίσκει μόνο συγκεκριμένους γενετικούς δείκτες και απαιτεί εμπλουτισμό ενίοτε. Η αλληλούχιση RNA (RNA seq) επιτρέπει την ανάλυση διαφορών έκφρασης, τη μείωση πολυπλοκότητας μεγάλων γονιδιωμάτων δίχως πρ'τερη γνώση των γονιδίων, όμως μεταλλάξεις σε ρυθμιστικές περιοχές ή γονίδια που δεν εκφράζονται, δεν ανιχνεύονται και οι γενετικοί δείκτες είναι ορατοί μόνο εάν εκφράζονται.

10. NIPT (NON INVASIVE PRENATAL TESTING)

Ο γενετικός έλεγχος του εμβρύου και η διάγνωση ανευπλοειδίας μέχρι πρόσφατα απαιτούσε την χρήση επεμβατικών διαδικασιών δειγματοληψίας, που εγκυμονούν ένα μικρό αλλά σημαντικό ποσοστό αποβολών. Το έτος 1997 ανακαλύφθηκε για πρώτη φορά η ύπαρξη cffDNA (cell free fetus, ελεύθερο εμβρυικό) στη κυκλοφορία της μητέρας. Η προέλευση του εντοπίζεται στον πλακούντα και μπορεί να ανιχνευθεί από το πρώτο τρίμηνο περίπου και μετά. Το μητρικό αίμα είναι έτσι, μια αξιόπιστη πηγή λήψης δείγματος για προγενετικό έλεγχο. Όμως το cffDNA βρίσκεται σε συνύπαρξη με μια μεγαλύτερη ποσότητα cfDNA (cell free maternal) και οι σύγχρονες-τότε μεθοδολογίες δεν επέτρεπαν *in vitro* τον πλήρη διαχωρισμό μεταξύ τους. Λαμβάνοντας αυτά υπόψιν, οι πρώτες εφαρμογές επικεντρώθηκαν στην ανίχνευση ή μη, εμβρυικών αλληλουχιών πατρικής προέλευσης που δεν υπάρχουν στη μητέρα, όπως αλληλουχίες του Y χρωμοσώματος στις εγκυμοσύνες αρσενικού εμβρύου ή RhesusD (RhD) αλληλουχίες σε γυναίκες που είναι RhD-αρνητικές. Πιο πρόσφατα, η χρήση DNA αλληλούχισης επέτρεψε την πολύ ακριβή ποσοτικοποίηση των DNA θραυσμάτων και συνεπώς την ανίχνευση περίσσειας υλικού λόγω τρισωμιών. Η ανίχνευση πλέον των τρισωμιών στο μητρικό αίμα γίνεται με συνεπή και ακριβή τρόπο.

Η εύρεση του τύπου RhD μέσω cffDNA από το μητρικό αίμα, χρησιμοποιείται μετά το 2000 για την καθοδήγηση/έλεγχο στις εγκυμοσύνες RhD-αρνητικών γυναικών που κυοφορούν RhD-θετικό έμβryo, μιας κατάστασης που προκαλεί αιμολυτική ασθένεια εμβρύου και νεογνού (HDFN: haemolytic disease of fetus or newborn). Σε ορισμένες χώρες, όπως το Ηνωμένο Βασίλειο, η χρήση cffDNA έχει αντικαταστήσει την αμνιοκέντηση, όσον αφορά πάντα την εύρεση ομάδας αίματος και του RhD. Αυτό είναι εξαιρετικά σημαντικό, γιατί εάν το έμβryo είναι RhD-θετικό τελικά, η διάτρηση θα φέρει τα αντισώματα της μητέρας σε άμεση επαφή με το έμβryo, μετατρέποντας μια ήπια κατάσταση σε πολύ σοβαρή. Η εύρεση και άλλων ομάδων αίματος όπως Kell, C, c και E έχουν αναφερθεί. Επίσης, εάν το έμβryo είναι αρσενικό, η χρήση cffDNA του αίματος της μητέρας, βοηθάει στην αναγνώριση αλληλουχιών του Y χρωμοσώματος όπως DYS14 και SRY. Πολλές έρευνες έχουν δείξει την υψηλή ακρίβεια της μεθόδου cffDNA στην αποσαφήνιση φύλου, συνεπικουρούμενη από την ενίσχυση της *real-time* PCR. Σε αρκετές χώρες, χρησιμοποιείται για την εύρεση του φύλου σε γυναίκες των οποίων το έμβryo διατρέχει κίνδυνο X-linked διαταραχής, όπου η έγκαιρη αναγνώριση αρσενικού εμβρύου, οδηγεί αναγκαία στη χρήση επεμβατικών διαγνωστικών εξετάσεων για να βρεθεί εάν το χρωμόσωμα με τη διαταραχή έχει κληρονομηθεί. Εάν το έμβryo είναι θηύκο, δεν απαιτείται περαιτέρω επεμβατικός έλεγχος. Σε εγκυμοσύνες με κίνδυνο X-linked διαταραχής, η χρήση NIPT μειώνει την ανάγκη για χρήση επεμβατικών τεχνικών έως και 50%. Μια πρόγνωση που βασίζεται στην PCR του cffDNA, μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί στις εγκυμοσύνες με κίνδυνο εμφάνισης CAH (congenital adrenal hyperplasia), όπου η χορήγηση θεραπείας σε αρχικό στάδιο μπορεί να μειώσει το βαθμό αλλαγής των εξωτερικών γεννητικών οργάνων. Σποραδικές διαγνώσεις μονογονιδιακών διαταραχών έχουν αναφερθεί μέσω της ανίχνευσης του πατρικού αλληλίου από πατέρα με επικρατή αυτοσωμική κατάσταση, όπως η νόσος του Huntington. Η αχονδροπλασία και η θανατηφόρος δυσπλασία, μπορούν επίσης να ανιχνευθούν σε έμβryo που εμφανίζει *de novo* βραχεία άκρα κατά την διάρκεια πρώτου τριμήνου. Η χρήση της NIPT για την ανίχνευση μονογονιδιακών νοσημάτων (συμπεριλαμβανομένων και X-linked) έγινε εφικτή με την ανάπτυξη της dPCR, η οποία έχει τη δυνατότητα ανίχνευσης μικρών διαφορών ανάμεσα στα επίπεδα μεταλλαγμένων και αγρίου-τύπου αλληλίων σε γονίδια που προκαλούν ασθένειες. Με αυτό τον τρόπο, ο γονότυπος του εμβρύου μπορεί να βρεθεί μη επεμβατικά. Μια εναλλακτική προσέγγιση, περιλαμβάνει την χρήση μαζικής αλληλούχισης περιοχών που εμπλέκονται σε μονογονιδιακά νοσήματα. (Royal College of Obstetricians and Gynaecologists, 2014).

Το 1999 αποδείχθηκε πως οι εγκυμοσύνες με έμβρυα που εμφάνιζαν τρισωμία 21, είχαν υψηλότερες απόλυτες συγκεντρώσεις cffDNA στο μητρικό πλάσμα/ορό και έκτοτε ένας μεγάλος

αριθμός μεθόδων έχουν περιγραφεί για τον υπολογισμό της εμβρυικής δόσης χρωμοσώματος. Οι προσεγγίσεις αυτές περιλαμβάνουν DNA μεθυλίωση, cf RNA ανάλυση και μέτρηση αναλογίας αλληλίων. Όμως, αφού οι μέθοδοι αυτές απαιτούν πολυμορφικούς δείκτες, κανένας μοναδικός δείκτης δεν μπορεί να εφαρμοστεί για κάθε οικογένεια. Ο περιορισμός αυτός καθιστά την ευρεία εφαρμογή τέτοιων προσεγγίσεων μεγάλη πρόκληση. Το έτος 2007 οι Lo, Fan και Quake παρουσίασαν μια προσέγγιση μοριακής καταμέτρησης μέσω dPCR, στην οποία υπολογίζονται μεμονωμένα μόρια DNA. Η κυρίαρχη ιδέα πίσω από τη σύλληψη αυτή, είναι πως όσο μεγαλύτερος είναι ο αριθμός μορίων που υπολογίζονται, τόσο υψηλότερη είναι η ικανότητα διάκρισης της τεχνικής. Η επιτυχία της τεχνικής οφείλεται εν μέρει στη συνειδητοποίηση ότι η αναλογία cffDNA είναι μεγαλύτερη από όση υπολογιζόταν αρχικά στο μητρικό αίμα. Η αναλογία cffDNA/cfmDNA επηρεάζει την αξιοπιστία της τεχνικής. Το 2008, οι Lo και Quake, ανέφεραν πως η μαζική παράλληλη αλληλούχιση (MPS massive parallel sequencing) μητρικού πλάσματος, επιτρέπει την συνεπή ανίχνευση τρισωμίας 21. Με τη χρήση MPS πρακτικά κάθε μόριο DNA στο πλάσμα μπορεί να αναλυθεί. Η MPS προσφέρει μια πιο αποτελεσματική εναλλακτική συγκριτικά με την dPCR. Στις μέρες μας, δύο προσεγγίσεις αλληλούχισης χρησιμοποιούνται κατα κόρον:

A. Shotgun: Σε αυτή την εκδοχή, DNA μόρια που περιέχονται στο μητρικό πλάσμα, αλληλουχούνται τυχαία. Η αναλογική αντιπροσώπευση DNA μορίων του χρωμοσώματος ενδιαφέροντος συγκρίνονται με τις παρούσες αλλού στο γένωμα. Το πλεονέκτημα είναι πως τα βήματα αλληλούχισης είναι ουσιαστικά τα ίδια, ασχέτως των χρωμοσωματικών στόχων. Έτσι, η προσέγγιση μπορεί να εφαρμοστεί για την ανίχνευση χρωμοσωματικών/γενετικών αποκλίσεων οπουδήποτε στο γένωμα. Αυτό είναι εξαιρετικά χρήσιμο στις πρόσφατες προσπάθειες που γίνονται στην δημιουργία εμβρυικού καρυότυπου ή εμβρυικού WGS από μητρικό αίμα. Μειονέκτημα αποτελεί το γεγονός, πως ακόμη και περιοχές που δεν είναι σχετικές-ευθέως, αναλύονται με το NIPT, καθώς όλη η διαδικασία είναι τυχαία (random), αυξάνοντας το κόστος της αλληλούχισης και την απόκτηση μη στοχευμένης πληροφορίας. Όμως, με την μείωση ολοένα του κόστους, τα μειονεκτήματα μπροστά στα οφέλη, ελαχιστοποιούνται.

B. Targeted (Στοχευμένη): Στην εκδοχή αυτή, γενωμικές περιοχές που περιέχονται στα χρωμοσώματα με κίνδυνο ανευπλοειδίας και μια μικρή ομάδα περιοχών αναφοράς, αλληλουχούνται στοχευμένα. Μέχρι σήμερα, υπάρχουν δύο υπότυποι: ο πρώτος, περιλαμβάνει στόχους που δεν διαφέρουν από άτομο σε άτομο και ο δεύτερος, περιλαμβάνει την ανάλυση αναλογίας αλληλίων που διαφέρουν και είναι πολυμορφικοί σε έναν πληθυσμό. Το κύριο πλεονέκτημα είναι πως η ισχύς της αλληλούχισης καταναλώνεται αυστηρά σε περιοχές γενωμικού ενδιαφέροντος και ελαχιστοποιείται η άσκοπη χρήση σε μη σχετικές περιοχές. Μειονέκτημα, αποτελεί το γεγονός πως οι PCR-εκκινητές πρέπει να δημιουργηθούν ξεχωριστά για κάθε στόχο.

ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ: Η ανάλυση των αποτελεσμάτων αλληλούχισης θα περιλαμβάνει (δυναμικά) κλινικές πληροφορίες όπως την περίοδο κύησης, την μητρική ηλικία και αποτελέσματα προηγούμενων εξετάσεων, καθώς και αναλογία cffDNA στο μητρικό αίμα και κάποιες φορές πληροφορίες από άλλες πηγές όπως το πατρικό DNA. Η MPS είτε shotgun είτε targeted, έχει αρκετά υψηλό κόστος. Η χρήση multiplex sequencing, δηλαδή η ταυτόχρονη ανάλυση διαφορετικών γενετικών δεικτών σε δείγματα πολλών διαφορετικών ατόμων, είναι μια προοπτική μείωσης κόστους. Όταν χρησιμοποιούνται multiplex εκδοχές, πρέπει οι σχεδιαστές να λάβουν υπόψιν τον αριθμό αναγνώσεων που πρέπει να πραγματοποιηθούν για μια περιοχή ενδιαφέροντος, έτσι ώστε ένα έμβryo με ανευπλοειδία να ανιχνευθεί σε ένα δείγμα με συγκεκριμένο ποσοστό cffDNA. Με την παρούσα σοδειά αλληλουχητών, ένας σεβαστός αριθμός εμπορικών εργαστηρίων, πράττουν multiplex αλληλούχιση με 12 δείγματα ανά shotgun αντίδραση.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ: Μέχρι σήμερα, οι δημοσιευμένες έρευνες δείχνουν εξαιρετικά συνεπή αποτελέσματα για την πρόγνωση τρισωμίας 18 και τρισωμίας 21. Υπάρχει βέβαια, ένα μονοψήφιο

ποσοστό περιπτώσεων στις οποίες η αλληλούχιση δεν θα δώσει αποτελέσματα, λόγω του ότι τα δείγματα ή τα αποτελέσματα δεν ανταποκρίνονται σε συγκεκριμένα κριτήρια ποιότητας (τα οποία διαφέρουν 1-10% ανά εταιρεία και πάροχο υπηρεσιών). Βέβαια, η επανάληψη εκ νέου αλληλούχισης με νέο δείγμα είναι σε τεράστιο ποσοστό επιτυχημένη. Αρχικά, η εξέταση δεν είχε ικανοποιητικά αποτελέσματα για την τρισωμία 13, όμως με την βελτίωση του αλγόριθμού, βελτιώθηκαν αισθητά. Για τα σύνδρομα Down και Edwards, έχει αναφερθεί ευαισθησία και εξειδίκευση σχεδόν 100%. Οι αναλύσεις είναι επιτυχημένες τόσο σε φρέσκα-νέα δείγματα όσο και σε αποθηκευμένα δείγματα πλάσματος, με απόλυτη συνέπεια. (Fairbrother et al, 2013)

ΠΗΓΕΣ ΛΑΘΟΥΣ

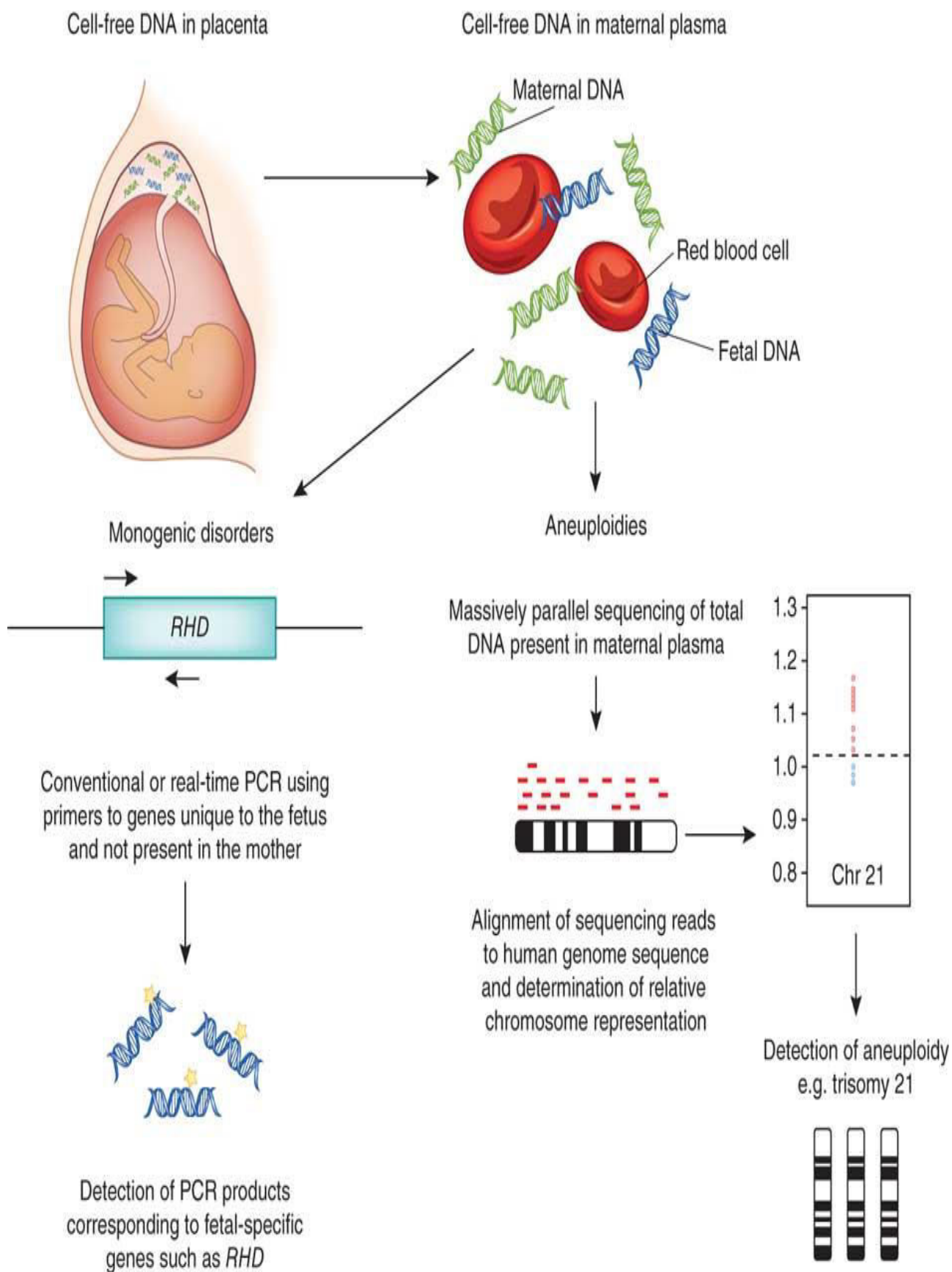
A. Πρόωρη λήψη δείγματος: Η ποσότητα cfDNA στο μητρικό αίμα αυξάνεται σε κάθε στάδιο της κύησης. Αν τα δείγματα ληφθούν πολύ νωρίς, ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα για εξέταση Y χρωμοσώματος ή RhD προκύπτουν. Για την ανίχνευση ανευπλοειδιών, στο παρόν βάθος αλληλούχισης, πολλά πρωτόκολλα επιτρέπουν ανίχνευση μόνο όταν το cfDNA είναι τουλάχιστο 4-5%. Τα εμπορικά ευρέως διαθέσιμα τεστ ανευπλοειδίας που βασίζονται στη MPS προορίζονται για εγκύους στην 10^η εβδομάδα γυναίκες. Αρκετά από αυτά τα πρωτόκολλα περιλαμβάνουν τη μέτρηση του ποσοστού, χρησιμοποιώντας γενετικούς δείκτες. Τέτοιες προληπτικές οδηγούν σε μείωση της εμφάνισης ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων.

B. Μητρική παχυσαρκία: Η αναλογία του cfDNA επηρεάζεται από μητρικά χαρακτηριστικά όπως το σωματικό βάρος. Αυξημένο σωματικό μητρικό βάρος συνδέεται με μικρότερο ποσοστό cfDNA, καταγεγραμμένο σε έρευνες με χιλιάδες περιστατικά. Ο λόγος παραμένει ασαφής. Πιθανές εξηγήσεις είναι ότι ο λιπώδης ιστός έχει την τάση να δημιουργεί cf μητρικό DNA περισσότερο ή στην παραγωγή περισσότερου αίματος. Ασχέτως της αιτίας, από τη στιγμή η παχυσαρκία συνδέεται ευθέως με χαμηλότερο cfDNA κλάσμα, το οποίο μπορεί να οδηγήσει σε ανακριβή NIPT αποτελέσματα, θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψιν στη γενετική συμβουλευτική.

Γ. Πολλαπλή κύηση: Όταν δίδυμα κυοφορούνται μονοζυγωτικά και τα δύο έμβρυα θα επηρεάζονται ή όχι. Με δεδομένο πως η ποσότητα cfDNA θα είναι σχεδόν διπλή μιας μοναδικής κύησης, η εξέταση της ανευπλοειδίας μέσω NIPT θα είναι όχι μόνο εφικτή αλλά και πιο αποδοτική. Στην περίπτωση των ετεροζυγωτικών, η κατάσταση δεν είναι τόσο ξεκάθαρη. Δύο έρευνες αναφέρουν σε ένα μικρό αριθμό δίδυμων κυήσεων πως η shotgun προσέγγιση είναι ικανή να αναγνωρίσει τρισωμίες. Είναι επίσης η αναγνώριση της ζυγωτίας μέσω στοχευμένης προσέγγισης. Στη περίπτωση ετεροζυγωτικών, η προσέγγιση θα αναγνωρίσει το ποσοστό cfDNA του κάθε εμβρύου στο μητρικό αίμα. Η εφαρμογή της NIPT σε δίδυμες κυήσεις, βρίσκεται ακόμη σε αρχικό στάδιο. Πληθώρα ερωτημάτων παραμένουν αναπάντητα: στο σενάριο όπου το ένα εκ των εμβρύων αποβάλλεται, είναι εφικτό να είναι γνωστή η συνεισφορά του αποβληθέντος εμβρύου στο cf; Η πολυπλοκότητα της κατηγορίας αυτής, απαιτεί πριν την NIPT την χρήση υπερήχου.

Δ. Μωσαικισμός πλακούντα: Υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις πως η πηγή των cfDNA είναι ο πλακούντας. Είναι γνωστό από την λήψη χοριακών λαχνών (CVS) ότι ανώμαλες κυτταρικές σειρές είναι παρούσες στον πλακούντα, ενώ δεν υπάρχουν στο έμβρυο, φαινόμενο γνωστό και ως περιορισμένος μωσαικισμός πλακούντα. Καθώς θα υπάρξουν περιπτώσεις τρισωμικού πλακούντα αλλά φυσιολογικού εμβρύου, είναι απαραίτητη η χρήση επεμβατικών μεθόδων πριν την απόφαση τερματισμού εγκυμοσύνης. Θα χρειαστεί χρόνος για να αποκτηθούν δεδομένα τα οποία θα μπορούν να δώσουν ποσοστιαίες πιθανότητες μη ακριβών αποτελεσμάτων NIPT, λόγω φαινομένου μωσαικισμού, κατόπιν βέβαια χιλιάδων αναλύσεων. Η πιο προφανής εμφάνιση ψευδώς θετικών είναι ο μωσαικισμός: το cfDNA που αναλύεται προέρχεται από ανώμαλες κυτταρικές σειρές που εδράζονται εκεί.

Ε. Μητρικές χρωμοσωματικές ανωμαλίες όπως μωσαικισμός ή κακοήθεια μπορούν σε σπάνιες περιπτώσεις να δώσουν αλλοιωμένα αποτελέσματα. (Bianchi, 2012)



Εικόνα 26: Τεχνικές ανάλυσης cffDNA για ανίχνευση ανωμαλιών.

11.ΑΝΤΙ ΕΠΙΛΟΓΟΥ

Τα τελευταία εξήντα χρόνια η πρόοδος στις Βιοιατρικές επιστήμες είναι εντυπωσιακή. Οι εξελίξεις σε αυτό το σχετικά μικρό χρονικό διάστημα έχουν φέρει επανάσταση στον τρόπο πρόγνωσης, διάγνωσης, αντιμετώπισης και βέβαια πρόληψης παθογενειών και νοσημάτων. Πλέον η επιστήμη βρίσκεται σε ένα επίπεδο όπου κατέχει τεράστια ποσότητα ανεπεξέργαστης πληροφορίας (raw data) και προσπαθεί να υπολογίσει την βαρύτητά της, ενώ κάποτε ακόμη και βασικοί μηχανισμοί των βιολογικών συστημάτων ήταν παντελώς άγνωστοι.

Η ανθρωπότητα και η πιο συγκεκριμένα η επιστημονική κοινότητα βρίσκεται σε ένα σημείο καμπής. Πλέον, διαθέτει την γνώση και την τεχνολογική ισχύ να ανακαλύψει μυστήρια εκατομμυρίων ετών. Μπορεί σε βάθος χρόνου, λίγων γενεών, οι απόγονοί μας να ζουν σε ένα κόσμο στον οποίο η ποιότητα και το προσδόκιμο ζωής να έχουν αλλάξει δραματικά.

Η δύναμη που υπάρχει στα χέρια μας είναι εξαιρετικά μεγάλη και απαραιτήτως πρέπει να συνοδεύεται από υπευθυνότητα. Ως είδος, έχουμε πολλακίς αποδείξει ότι είμαστε ικανοί να επιβιώσουμε και να μεγαλοουργήσουμε υπό αντίξοες συνθήκες όμως παράλληλα, σε σημεία κλειδιά της ιστορίας παρουσιάσαμε σημάδια αυτοχειρίας.

Ταπεινή άποψη του συγγραφέα, πως πρέπει να είμαστε πάρα πολύ προσεκτικοί με τον χειρισμό των νέων τεχνολογιών, να σκεφτόμαστε πριν πράξουμε και να έχουμε ως υπέρτατο κίνητρο την μακροήμερευση όλων των ειδών και των φυσικών πόρων του πλανήτη.

Όσο ηδονική φαντάζει η ιδέα πως κάθε ασθένεια θα μπορεί να διορθωθεί σε γενετικό-επιγενετικό επίπεδο, τόσο φόβο προκαλεί η χρήση της τεχνολογίας για την δημιουργία ατόμων με ενισχυμένα χαρακτηριστικά και ικανότητες με άγνωστο αντίκτυπο. Όσα ρίγη ενθουσιασμού προκαλεί η ιδέα καθυστέρησης της γήρανσης και του εκφυλισμού των κυττάρων, τόσο τρόμο φέρνει η πιθανότητα δημιουργίας καστών ανθρώπων, κατάστασης που θα οδηγήσει νομοτελειακά στη σύγκρουση και την απώλεια ζωών.

Οφείλουμε στους εαυτούς μας, στους συνανθρώπους μας και στις μελλοντικές γενιές, κάθε βήμα να είναι μελετημένο. Ο κόσμος χρειάζεται περισσότερο από ποτέ ομοψυχία, αλληλεγγύη, σεβασμό και να αφήσει πίσω του ιδέες εγωιστικές, ματαιόδοξες, μισαλλόδοξες και σκοταδιστικές.

Πρέπει κάποια στιγμή να κατανοήσουμε πως αν δεν υπάρξει ομόνοια και ανιδιοτέλεια, είμαστε καταδικασμένοι ως είδος να κάνουμε δύο βήμα μπροστά και τρία πίσω κάθε φορά. Ακόμη και αν αποκτήσουμε κάποια στιγμή γνώση ακόμη βαθύτερη, αν δεν έχουμε την ποιότητα να τη διαχειριστούμε, είναι βέβαιο πως θα είναι περισσότερα τα δεινά από τα οφέλη.

Ίσως η προσέγγιση αυτή να ξενίζει, όντας γραμμένη σε ένα κείμενο της επιστημονικής κοινότητας. Δεν είναι στόχος του συγγραφέα ως άλλη Κασσάνδρα να αποτρέψει την αέναη προσπάθεια για πρόοδο, μόνο να επισημάνει και να συστήσει επαγρύπνηση σε όλους, καθώς στο όνομα της εκάστοτε προόδου (επιστημονικής, θρησκευτικής, πολιτικής, κοινωνικής) έχουν διαπραχθεί εγκλήματα φρίκης κατά της ανθρωπότητας εν τω συνόλω.

Θα αποτελέσει ευχής έργον, αν οι μελετητές του μέλλοντος που θα τύχει να διαβάσουν τις γραμμές αυτές κατά λάθος, να ζουν σε ένα κόσμο βγαλμένο από τις φαντασιώσεις μας και να γελάσουν με την απαισιόδοξη αυτή προσέγγιση. Θα είναι ίσως από εκείνες τις φορές που ένας άνθρωπος θα είναι πανευτυχής που έκανε σφάλμα στη συλλογιστική του. Στην περίπτωση βέβαια που δεν γελάσουν, μάλλον θα ζουν σε ένα κόσμο κλάσεις χειρότερο και για μία ακόμη φορά θα έχουμε αποδειχθεί κατώτεροι των περιστάσεων.

Κλείνοντας, δεν θα μπορούσα να μην αναφέρω το προφανέστερο όλων: κάθε ένας από εμάς, πριν να αποκτήσει οποιαδήποτε επαγγελματική ιδιότητα, θρησκεία, κοινωνική τάξη, ερωτική προτίμηση κ.ο.κ, ήρθε στο κόσμο ως άνθρωπος και αδελφός με όλους τους άλλους ανθρώπους. Οπότε σε κάθε περίπτωση να θυμάται, πως το μεγαλύτερο χρέος του είναι απέναντι στην ανθρωπότητα και στη διατήρηση της ζωής εν τω συνόλω. Χρέος που είναι απείρως σημαντικότερο από τα εφήμερα και ποταπά κίνητρα που έχουν ποτίσει την καθημερινότητά μας καθώς και τους νόμους που τόσο βολικά ορίστηκαν απο χειραγωγούσες μειοψηφίες προς εξυπηρέτηση ιδίων συμφερόντων.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τους δικούς μου ανθρώπους για την υπομονή και κατανόηση που δείχνουν και με στηρίζουν όλα αυτά τα χρόνια σε κάθε μου επιλογή. Δεν είμαι εύκολος άνθρωπος και καταλαβαίνω πως πολλές φορές η ισχυρογνωμοσύνη μου επί συγκεκριμένων θεμάτων δεν συνάδει με τον τρόπο σκέψης των περισσοτέρων.

Ιδιαίτερη μνεία οφείλω να κάνω στους ανθρώπους που βρίσκονται στον πανεπιστημιακό χώρο και αγαπάνε τη δουλειά τους, σέβονται τους μαθητές τους και κατάφεραν να με ξανακάνουν να ενθουσιαστώ με το αντικείμενο της Βιολογίας μετά από παύση αρκετών ετών. Μπορεί να είναι λίγοι αριθμητικά οι πραγματικά άξιοι στο σύνολο, όμως ο αντίκτυπος της δουλειάς τους είναι εξαιρετικά σημαντικός, και τους προτρέπω κάθε φορά που σκέφτονται να τα παρατήσουν να θυμούνται την έξαψη που είχαν ως νέοι διδάσκοντες κάποτε να μεταλαμπαδεύσουν τις γνώσεις τους και την λάμψη στα μάτια του ακροατηρίου τους, να φαντάζει απείρως σπουδαιότερη από κάθε υλική ανταμοιβή.

Η εργασία αυτή έγινε με μεράκι και προσπάθησα να την κάνω αρκετά προσβάσιμη και ενδιαφέρουσα, τόσο σε ανθρώπους που δεν έχουν ξανακούσει τίποτα από όσα πραγματεύεται, όσο και στους ανθρώπους που κατέχουν πολύ μεγάλη εμπειρία στο χώρο.

Δεν ξέρω αν το μέλλον θα με βρει σε κάποια πανεπιστημιακή/ερευνητική δομή ή εάν θα ακολουθήσω τελείως διαφορετικό μονοπάτι. Αυτό που σίγουρα γνωρίζω είναι πως το διασκέδασα να βρίσκομαι στα θρανία μετά από καιρό και θα κρατήσω τις καλές αναμνήσεις μαζί μου.

12.Περίληψη

Τεχνολογία και Διάγνωση. Νέες τεχνικές, μέθοδοι, προοπτικές.

Δέρμος Παντελής, Ιωάννινα 2017

Στο παρούσα επισκόπηση, γίνεται μια ιστορική αναδρομή στις εξελίξεις που μορφοποίησαν τους κλαδους της Βιολογίας και της Γενετικής, τόσο στο παρελθόν όσο και τα τελευταία εξήντα χρόνια πιο διεξοδικά. Κατόπιν αυτού, αναφέρονται σημεία κλειδιά στην πρόοδο της Κυτταρογενετικής. Ακολούθως, λαμβάνει χώρα μια συγκριτική ανάλυση πλεονεκτημάτων και μειονεκτημάτων διαφόρων μεθόδων στη εύρεση χρωμοσωματικών ανωμαλιών. Στο κυρίως κομμάτι της εργασίας, παρουσιάζονται οι μέθοδοι παρέχοντας ιστορικά στοιχεία, αρχές στις οποίες βασίζονται, ενίοτε πρωτόκολλα εργασίας και οι πιο σύγχρονες εκδοχές τους. Η παρουσίαση περιλαμβάνει όλες τις τεχνικές από τον βασικό καρυότυπο έως τις τελευταίες εξελίξεις στην τεχνολογία αλληλούχισης. Επίσης, γίνεται αναφορά στην τεχνολογία μη επεμβατικής προγενετικής ανάλυσης. Στόχο του κειμένου αποτελεί, η μελέτη της εξέλιξης της τεχνολογίας διάγνωσης, των εφαρμογών και των επακόλουθων περιορισμών.

Abstract

Technology and Diagnosis. Novel techniques, methods, prospects.

Dermos Pantelis, Ioannina 2017

In this review, a historical retrospection on the developments that shaped the fields of Biology and Genetics takes place, covering the past as well as the last sixty years more thoroughly. After that, key points in the progress of Cytogenetics are referred. Next, a comparative analysis between different methods used in detection of chromosomal aberrations, reveals their advantages and disadvantages. At the main part of this review, techniques are presented, providing historical facts, basic principles, working protocols and their most recent iterations. Every technique from basic karyotyping to the latest sequencing technologies is included. Also, non-invasive prenatal testing is discussed. This review's goal is the study of progress in diagnostic technologies, their applications and the subsequent limitations.

13.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Arya, M., Shergill, I.S, Williamson, M., Gommersall, L., Arya, N. and Patel, H.** (2005). Basic principles of real-time quantitative PCR (Expert Rev. Mol. Diagn. 5(2), xxx–xxx (2005)).
- Bakker, B., van den Bos, H., Lansdorp, P.M and Foijer, F.** (2015).How to count chromosomes in a cell: An overview of current and novel technologies (Article in BioEssays · March 2015).
- Bejjani, B.A and Shaffer, L.G.** (2006). Application of Array-Based Comparative Genomic Hybridization to Clinical Diagnostics (Journal of Molecular Diagnostics, Vol. 8, No. 5, November 2006).
- Bianchi, D.W** (2012). From prenatal genomic diagnosis to fetal personalized medicine: progress and challenges (nature medicine VOLUME 18 | NUMBER 7 | JULY 2012).
- Bickmore, W.A.** (2001). Karyotype Analysis and Chromosome Banding (ENCYCLOPEDIA OF LIFE SCIENCES-2001 Nature Publishing Group).
- Bishop, R.** (2010). Applications of fluorescence in situ hybridization (FISH) in detecting genetic aberrations of medical significance (Bioscience Horizons, Volume 3, Number one, March 2010).
- Buermans, H.P.J. and den Dunnen, J.T.** (2014). Next generation sequencing technology: Advances and applications (Biochimica et Biophysica Acta 1842 (2014) 1932–1941).
- Estandarte, A.K.C.** (2012). A Review of the Different Staining Techniques for Human Metaphase Chromosomes (Submitted in partial fulfillment of the requirements for the degree of Masters in Research at the University of London February 24, 2012).
- Fairbrother, G., Johnson, S., Musci, T.J and Song, K.** (2013). Clinical experience of noninvasive prenatal testing with cell-free DNA for fetal trisomies 21, 18, and 13, in a general screening population (Prenatal Diagnosis 2013, 33, 580–583).
- Ferguson-Smith, M.A** (2015). History and evolution of cytogenetics (Molecular Cytogenetics (2015) 8:19 DOI 10.1186/s13039-015-0125-8).
- Grada, A. and Weinbrecht, K.** (2013). Next-Generation Sequencing: Methodology and Application (Journal of Investigative Dermatology (2013) 133, e11; doi:10.1038/jid.2013.248).
- Heather, J.M and Chain, B.** (2015). The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA (Genomics 107 (2016) 1–8).
- Hernández-Rodríguez, P. and Gomez Ramirez, A.** (2012). Polymerase Chain Reaction: Types, Utilities and Limitations (Polymerase Chain Reaction, Edited by Dr Patricia Hernandez-Rodriguez ISBN 978-953-51-0612-8).
- Khandekar, S., Dive, A. and Munde P.** (2012). Chromosomal abnormalities - A review (Research Gate).
- Kircher, M. and Kelso, J.** (2010). High-throughput DNA sequencing –concepts and limitations (Bioessays 32: 524–536, 2010 WILEY Periodicals, Inc.).

Levsky, J.M and Singer, R.H. (2003). Fluorescence in situ hybridization: past, present and future (Journal of Cell Science 116, 2833-2838 © 2003 The Company of Biologists Ltd-
doi:10.1242/jcs.00633).

McPherson, M.J and Møller, S.J .(2006). PCR-Second Edition (© by Taylor & Francis Group-
First published 2000; Second edition published 2006).

Metzker, M.L (2010). Sequencing technologies —the next generation (Nature Reviews | Genetics
volume 11 | January 2010).

Ponnuraj, K.T (2011). Cytogenetic Techniques in Diagnosing Genetic Disorders («Advances in
the Study of Genetic Disorders", book edited by Kenji Ikehara, ISBN 978-953-307-305-7, and
Published: November 21, 2011 under CC BY 3.0 license. © The Author(s)).

Royal College of Obstetricians and Gynaecologists (2014). Non-invasive Prenatal Testing for
Chromosomal Abnormality using Maternal Plasma DNA (Scientific Impact Paper No. 15March
2014).