

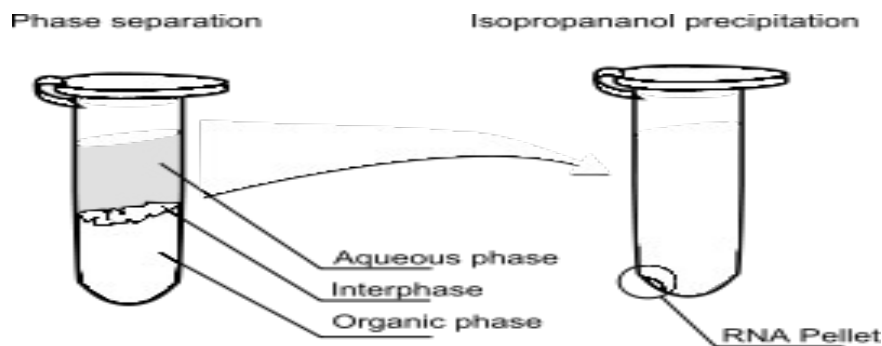
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ 1ο

ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA ΑΠΟ ΙΣΤΟ.

Υπάρχουν αρκετές μέθοδοι απομόνωσης DNA. Στο παρόν μάθημα να αναλυθεί η μέθοδος απομόνωσης από ιστό θηλαστικού που θεωρείται η πιο κλασική. Ομογενοποίηση του ιστού σε γυάλινο ομογενοποιητή με έμβολο από τεφλόν, ο οποίος περιέχει διάλυμα επώασης για πρωτεΐνωση K. Κατά την ομογενοποίηση με την συγκεκριμένη συσκευή σπάνε μηχανικά οι πλασματικές μεμβράνες των κυττάρων και αρκετές από τις πυρηνικές. Το διάλυμα επώασης αποτελείται από 100 mM NaCl, 10 mM Trizma base, 25 mM EDTA και 0,5 % SDS. Το NaCl παρέχει τη κατάλληλη συγκέντρωση άλατος και το Trizma ως ρυθμιστικό το κατάλληλο pH για να δράσει πρωτεΐνωση K. Το SDS που είναι ανιονικό απορρυπαντικό βοηθάει στη διάσπαση των μεμβρανών και την απομάκρυνση των πρωτεϊνών από τις μεμβράνες και το DNA. Το EDTA (αιθυλενο-διαμινο-τετραοξικό οξύ) είναι μια χειλική ένωση που δεσμεύει τα μέταλλα όπως Mg^{++} που είναι απαραίτητο για τη δράση των νουκλεασών, προστατεύοντας έτσι τα νουκλεϊκά οξέα.

Μετά την ομογενοποίηση το διάλυμα επώάζεται με πρωτεΐνωση K για 1 ώρα στους 37 °C. Με αυτό το τρόπο καταστρέφονται μεταξύ άλλων και οι ιστόνες οι πρωτεΐνες.

Τα λιπίδια και οι πρωτεΐνες απομακρύνονται από το ομογενοποίημα με μία ή περισσότερες εκχυλίσεις με τους οργανικούς διαλύτες φαινόλη και χλωροφόρμιο. Η διαδικασία είναι ως εξής: Προστίθεται ίσος όγκος με το ομογενοποίημα φαινόλης και αναμιγνύονται με vortex. Το μίγμα φυγοκεντρείται και δημιουργούνται τρεις φάσεις. Η πάνω φάση είναι υδάτινη (πολική) και περιέχει τα νουκλεϊκά οξέα η ενδιάμεση περιέχει τις πρωτεΐνες και η κάτω φάση η οργανική περιέχει τα λιπίδια. Οι πρωτεΐνες βρίσκονται στην ενδιάμεση φάση καθώς αποτελούνται και από υδρόφοβες και από υδρόφιλες περιοχές. Στην υδάτινη φάση επαναλαμβάνεται η διαδικασία με χλωροφόρμιο (χλωροφόρμιο / ισοαμυλική αλκοόλη 24:1) το οποίο απομακρύνει επιπλέον τα λιπίδια και τη φαινόλη από την υδάτινη φάση και μετουσιώνει τις πρωτεΐνες.



Η υδάτινη φάση (πολική) περιέχει και DNA και RNA. Για να απομακρυνθεί το RNA επώάζεται το διάλυμα με RNAση 1 επί μία ώρα στους 37 °C. Στη συνέχεια η RNAση απομακρύνεται όπως παραπάνω με εκχυλίσεις με φαινόλη και χλωροφόρμιο.

Το DNA κατακρυσταλλίζεται με προσθήκη ίσου όγκου ισοπροπανόλης η οποία παρουσία του NaCl που είχε προστεθεί στην αρχή μειώνει τη διαλυτότητα του DNA.

Μετά από ήπια ανακίνηση του σωληνάριου το DNA όταν είναι σε μεγάλη ποσότητα εμφανίζεται με τη μορφή νεφελώματος και μπορεί να συλλεχθεί εύκολα με μία κεκαμμένη ράβδο. Όταν είναι σε μικρή ποσότητα χρειάζεται φυγοκέντρηση σε ψυχόμενη φυγόκεντρο.

Για να καθαριστεί το DNA από υπόλοιπα αλάτων ξεπλένεται με 70% παγωμένη. Το ίζημα επαναδιαλύεται συνήθως σε διάλυμα Tris-EDTA pH 8,00 (10 mM Tris -1 mM EDTA) που χρησιμοποιείται για τη συντήρηση του DNA για μεγάλο χρονικό διάστημα. Η ποσοτικοποίηση μπορεί να γίνει με φωτομέτρηση που μετράει την οπτική απορρόφηση (O.D.) του DNA σε φασματοφωτόμετρο στα 260 nm (υπεριώδες). Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης του δείγματος γίνεται σύμφωνα με το τύπο $1 \text{ O.D.}_{260\text{nm}} = 50 \mu\text{g/ml}$.

Επιπλέον υπάρχει δυνατότητα να υπολογιστεί η καθαρότητα του δείγματος μετρώντας την οπτική απορρόφηση στα 280 nm, όπου είναι το μήκος κύματος που απορροφούν οι πρωτεΐνες. Για να είναι καθαρό το DNA πρέπει ο λόγος 260/280 να είναι περίπου 1,8 (αποδεκτά όρια είναι 1,6-1,8) και για το RNA, 2 (αποδεκτά όρια είναι 1,8-2).

ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ

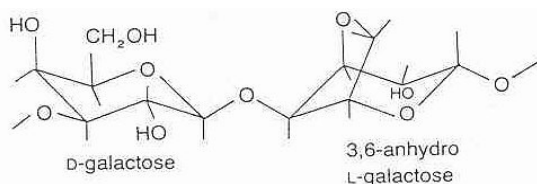
- Τι είναι ομογενοποίηση;
- Τι κάνει το EDTA;
- Τι είναι εκχύλιση;
- Πως βοηθάει το NaCl στην κατακρήμνιση του DNA;
- Με ποιο τρόπο μπορούμε να δούμε αν ένα διάλυμα νουκλεϊνικών οξέων περιέχει πρωτεΐνες;
- Από ένα διάλυμα DNA 500 μl πάρτε 2 μl και προσθέστε σε μία κυψελίδα φωτόμετρου του 1ml. Αφού συμπληρώσετε τον υπόλοιπο όγκο με H₂O υπολογίστε τη συγκέντρωση του DNA στο αρχικό διάλυμα όταν η απορρόφηση του στη κυψελίδα στα 260nm είναι 0,020 OD με βάση το δεδομένο ότι $1 \text{ O.D.}_{260\text{nm}} = 50 \mu\text{g/ml}$.

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ 2ο

ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ DNA ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ

Ηλεκτροφόρηση είναι το φαινόμενο κατά το οποίο φορτισμένα μόρια και σωματίδια, μέσα σε υδάτινα διαλύματα και κάτω από την επίδραση ενός ηλεκτρικού πεδίου, κινούνται προς την κατεύθυνση του ηλεκτροδίου με το αντίθετο φορτίο. Λόγω των διαφορετικών τους φορτίων και μαζών, τα διάφορα μόρια θα κινηθούν με διαφορετικές ταχύτητες (κινητικότητα). Η κινητικότητα αυτή εξαρτάται από την σταθερά pK και το μοριακό βάρος του φορτισμένου σωματιδίου ενώ άλλοι παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν την κινητικότητα είναι το pH και η συγκέντρωση του ρυθμιστικού διαλύματος (buffer), η ένταση του ηλεκτρικού πεδίου, η θερμοκρασία καθώς και η φύση του υλικού μέσα στο οποίο γίνεται η ηλεκτροφόρηση.

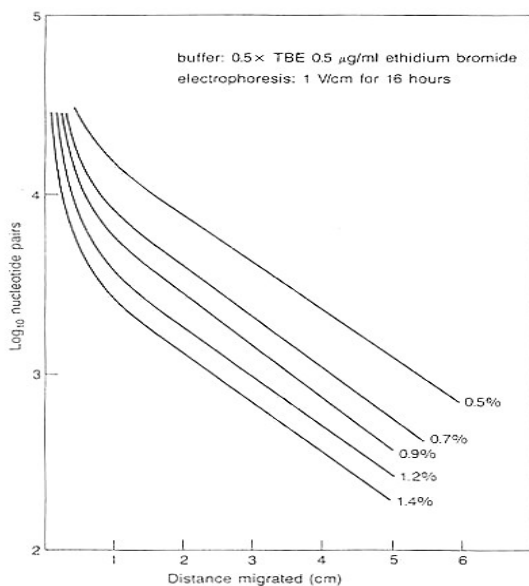
Η καθιερωμένη τεχνική για τον διαχωρισμό, την ταυτοποίηση, την απομόνωση και τον καθαρισμό κομματιών DNA είναι η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης. Η αγαρόζη είναι πολυσακχαρίτης υψηλού μοριακού βάρους, που αποτελείται από D-γαλακτόζη και από ομάδες της 3,6-ανυδρο-L-γαλακτόζης (σχήμα 1).



Σχήμα 1

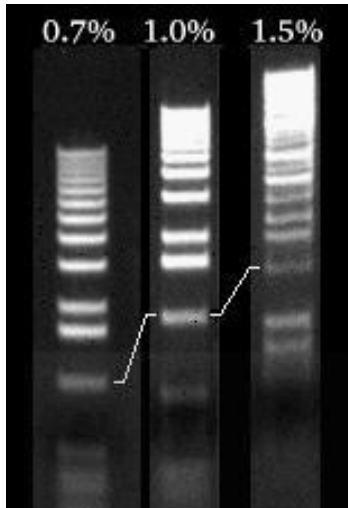
Η ταχύτητα μετακίνησης του DNA σε πήκτωμα αγαρόζης εξαρτάται από 5 παραμέτρους

Το μοριακό μέγεθος του DNA: Τα μόρια του γραμμικού δίκλωνου DNA κινούνται στο πήκτωμα με ταχύτητα που είναι αντιστρόφως ανάλογη του δεκαδικού λογάριθμου (\log_{10}) του μοριακού τους βάρους (σχήμα 2).



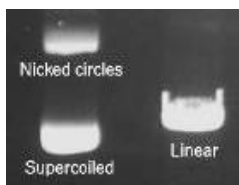
Σχήμα 2

Συγκέντρωση της αγαρόζης: Ένα κομμάτι DNA κινείται με διαφορετική ταχύτητα σε πηκτώματα που περιέχουν διαφορετικές συγκεντρώσεις αγαρόζης (σχήματα 2,3). Τα μεγαλομοριακά κομμάτια διαχωρίζονται σε αραιές συγκεντρώσεις αγαρόζης ενώ τα μικρότερα κομμάτια σε πιο μεγάλες συγκεντρώσεις.



Σχήμα 3

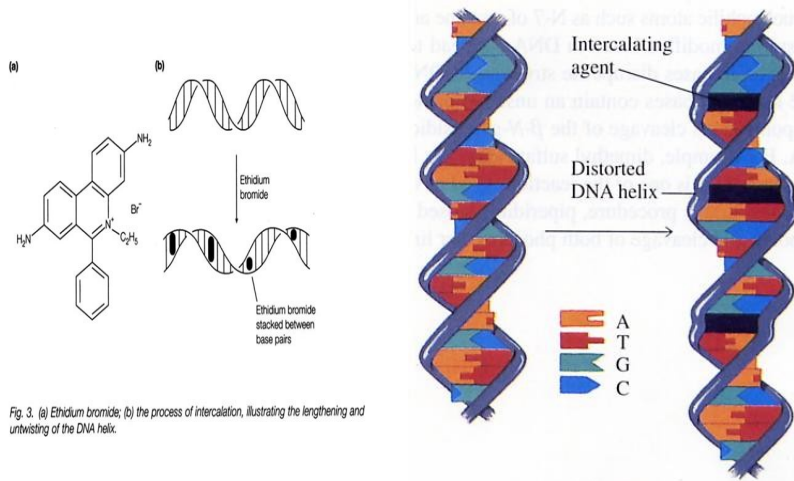
Η μορφή του DNA: Η κλειστή κυκλική (i), η κυκλική που είναι κομμένη (ii) σε ένα σημείο της μίας αλυσίδας (nicked) και η γραμμική μορφή ενός DNA (iii) κινούνται με διαφορετικές ταχύτητες στα πηκτώματα αγαρόζης. Οι σχετικές ταχύτητες των τριών μορφών εξαρτώνται από τη ισχύ του εφαρμοζόμενου ηλεκτρικού ρεύματος, την ιονική ισχύ του διαλύματος ηλεκτροφόρησης και την πυκνότητα των υπερελικώσεων στην μορφή i του DNA. Όταν είναι υπερελικωμένη η μορφή κινείται πιο γρήγορα στο πηκτώμα αγαρόζης από τις υπόλοιπες μορφές (σχήμα 4).



Σχήμα 4

Το εφαρμοζόμενο ηλεκτρικό ρεύμα: Σε χαμηλά δυναμικά (5v/cm) η κίνηση των γραμμικών κομματιών DNA είναι ανάλογη προς το εφαρμοζόμενο δυναμικό. Καθώς αυξάνει η ισχύς του ηλεκτρικού πεδίου, η κινητικότητα των μεγάλων κομματιών του DNA αυξάνεται αναλογικά περισσότερο από ότι των μικρότερων κομματιών. Πρακτικά η διαφορά δυναμικού μπορεί να φτάσει μέχρι 10v/cm χωρίς σημαντική επίπτωση στη σχετική κινητικότητα των κομματιών DNA. Επιπλέον σε υψηλότερη ισχύ ηλεκτρικού πεδίου εκτός από τις μεταβολές στην σχετική κινητικότητα των κομματιών μπορεί από την αύξηση της θερμοκρασίας να αλλοιωθούν τα χαρακτηριστικά του πηκτώματος (πχ να συμβεί τήξη του πηκτώματος).

Οι χρωστικές που ενσωματώνονται στο DNA: Το βρωμιούχο αιθίδιο είναι μια από τις χρωστικές που χρησιμοποιείται για τη χρώση του DNA (σε συγκέντρωση 0,5 μg/ml). Αυτό έχει την ιδιότητα να παρεμβάλλεται στις βάσεις του DNA, να απορροφάει στο υπεριώδες μήκος κύματος και φθορίζει στο ορατό δίνοντας μία πορτοκαλοκίτρινη χροιά. Επειδή όμως παρεμβάλλεται ανάμεσα στις βάσεις του DNA κάνει το μόριο πιο άκαμπτο και μειώνει την κινητικότητα του (σχήμα 5). Επίσης μειώνει και τις υπερελικώσεις.



Σχήμα 5

Για την ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης χρησιμοποιούνται τα εξής διαλύματα.

Διάλυμα φόρτωσης: Στα διαλύματα του DNA πριν την ηλεκτροφόρηση προστίθεται ένα πυκνότερο διάλυμα με τις εξής ιδιότητες. Περιέχει χρωστικές (συνήθως μπλέ) που κατά την ηλεκτροφόρηση σε συγκεκριμένες συγκεντρώσεις αγαρόζης μετακινούνται παράλληλα με κομμάτια DNA γνωστού μεγέθους. Με αυτό τον τρόπο παρέχεται η δυνατότητα παρακολούθησης του βαθμού της μετακίνησης του DNA στο πήκτωμα με την πάροδο του χρόνου. Ακόμη, επειδή χρωματίζεται το διάλυμα του DNA, είναι πιο εύκολη η τοποθέτησή του στις αντίστοιχες θεσούλες του πηκτώματος. Επιπλέον το διάλυμα φόρτωσης περιέχει γλυκερόλη η οποία εξαιτίας του μεγάλου ιξώδους, καταστεί δυνατή τη τοποθέτηση του διαλύματος DNA στον πάτο των θέσεων του πηκτώματος.

Ένα σύνθετο διάλυμα φόρτωσης είναι το παρακάτω που είναι 10X πυκνότερο.

- 0,2% bromophenol blue (κυανούν βρωμοφαινόλης)
- 0,2% xylene cyanol FF (κυανολικό ξυλένιο)
- 50% γλυκερόλη
- 0,2 M EDTA pH 8.0

Διαλύματα ηλεκτροφόρησης: Τα διαλύματα ηλεκτροφόρησης παρέχουν την ανάλογη ιονική ισχύ που χρειάζεται για να γίνει ηλεκτροφόρηση. Τα πιο συνηθισμένα είναι το TAE (0,04 M Tris-οξικό, 0,001 M EDTA) το οποίο παρασκευάζεται αρχικά σε

συγκέντρωση 50X [Tris base 242 g, πυκνό οξικό 57,1 ml και 100ml 0,5 M EDTA (pH 8.0) στο λίτρο] και το TBE (0,089 M Tris-βορικό, 0,089 M βορικό οξύ 0,002 M EDTA) το οποίο παρασκευάζεται σε μια αρχική συγκέντρωση 5X [Tris base 54 g, βορικό οξύ 27,5 g και 20ml 0,5 M EDTA (pH 8.0) στο λίτρο].

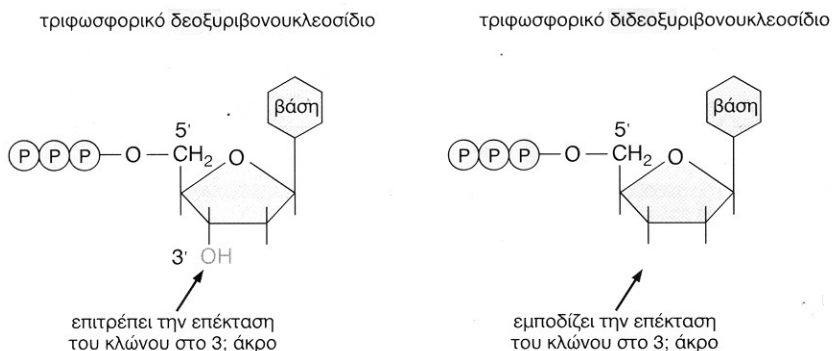
ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ

- Πως επηρεάζεται η κινητικότητα του DNA: α) από το μέγεθος β) από την συγκέντρωση της αгарόζης;
- Γιατί βάζουμε χρωστικές στο διάλυμα φόρτωσης;
- Τι χρειάζεται το βρωμιούχο αιθίδιο;
- Ποια ένζυμα μειώνουν την υπερελίκωση του DNA;

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ 3ο

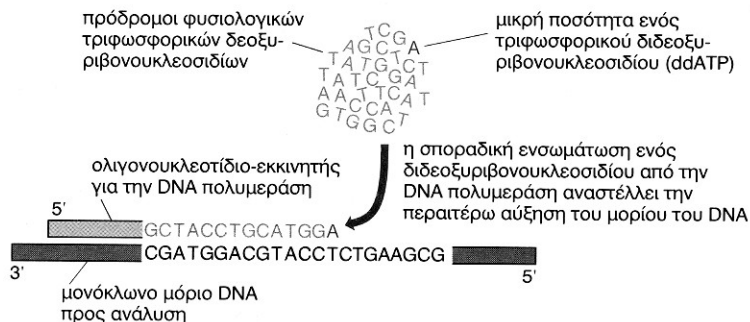
Η ΜΕΘΟΔΟΣ SANGER

Η μέθοδος αυτή βασίζεται τη χρησιμοποίηση διδεοξυριβονουκλεοτιδίων (ddNTP), δηλαδή παραγών των δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTP) χωρίς τη 3'- υδροξυλομάδα (σχήμα 1).



Σχήμα 1

Για να συντεθεί καθαρό DNA *in vitro* χρειάζονται το μονόκλωνο μόριο του DNA που θα αναλυθεί, το ένζυμο DNA πολυμεράση, ένας μικρός DNA εκκινητή που είναι απαραίτητος για να αρχίσει η αντιγραφή, τα τέσσερα τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) και ένα διδεοξυριβονουκλεοτίδιο σε μικρότερη συγκέντρωση από τα υπόλοιπα. Τα διδεοξυριβονουκλεοτίδια όταν ενσωματωθούν κατά την αντιγραφή σε ένα κλώνο του DNA δεν επιτρέπουν την επιπλέον προσθήκη νουκλεοτιδίων καθώς όταν λείπει η 3'- υδροξυλομάδα δεν μπορεί να δημιουργηθεί φωσφοδιεστερικός δεσμός (σχήματα 1,2).

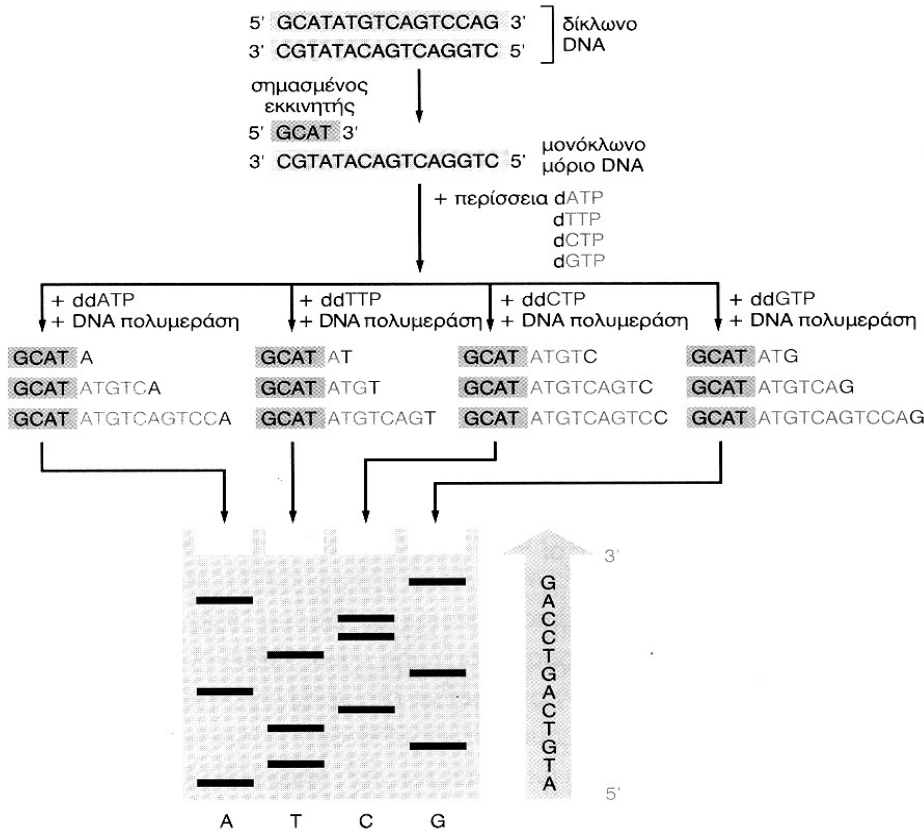


Σχήμα 2

Στο σχήμα 2 στο μείγμα έχει συμπεριληφθεί μικρή ποσότητα διδεοξυATP (ddATP). Το ddATP συναγωνίζεται με τη περίσσεια του dATP και σποραδικά ενσωματώνεται κατά τύχη, σε ένα αυξανόμενο κλώνο DNA. Το μείγμα της αντίδρασης τελικά θα παράγει μία ομάδα μορίων DNA με διαφορετικό μήκος, τα οποία θα είναι συμπληρωματικά με το DNA εκμαγείο που αναλύεται και θα τερματίζουν σε καθένα από τα διαφορετικά νουκλεοτίδια A.

Για το καθορισμό της πλήρους αλληλουχίας ενός τμήματος DNA, το δίκλωνο DNA αρχικά διαχωρίζεται στους επιμέρους κλώνους του και ένας από αυτούς χρησιμοποιείται ως εκμαγείο για τις περισσότερες αντιδράσεις (σχήμα 3). Τέσσερα διαφορετικά ddNTPs

(ddATP, ddGTP, ddTTP, ddCTP) χρησιμοποιούνται σε τέσσερις ξεχωριστές αντιδράσεις σύνθεσης αντιγράφων του ίδιου μονοκλώνου DNA εκμαγείου. Καθε αντιδραση παράγει μια ομάδα μορίων DNA που σταματούν σε διαφορετικά σημεία της αλληλουχίας. Τα προϊόντα των τεσσάρων αυτών αντιδράσεων διαχωρίζονται με ηλεκτροφόρηση σε τέσσερις παράλληλες στήλες μιας πηκτής πολυακρυλαμίδης (εδώ έχουν σημειωθεί ως A, T, C, και G). Τα νεοσυντεθέντα τμήματα ανιχνεύονται από ένα δείκτη, είτε ραδιενεργό στους εκκινητές (στη κλασική μέθοδο), είτε φθορίζοντα στα ddNTP (ημιαυτοματοποιημένη ή πλήρως αυτοματοποιημένη μέθοδος) που έχουν τερματίσει τη επέκταση της αλυσίδας του DNA.



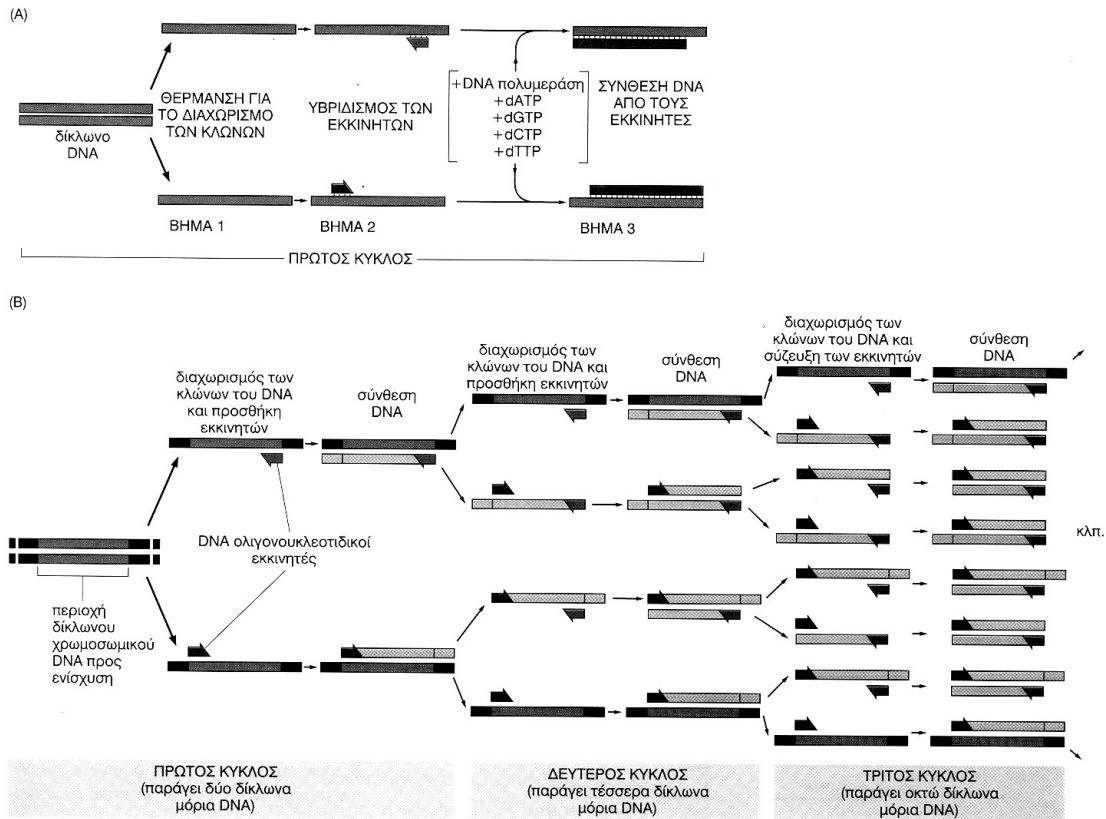
Σχήμα 3

Σε κάθε στήλη, οι ζώνες αναπαριστούν τμήματα που έχουν τερματιστεί σε ένα ορισμένο ddNTP (για παράδειγμα στο G στη τέρμα δεξιά στήλη σχήμα 3) αλλά σε διαφορετικές θέσεις του DNA. Η αλληλουχία του νεοσυντεθένου κλώνου μπορεί να καθοριστεί με ανάγνωση των ζωνών αρχίζοντας από το κάτω άκρο του πηκτώματος. Η αλληλουχία του τμήματος του DNA στο συγκεκριμένο παράδειγμα (σχήμα 3) δίνεται στο βέλος δεξιά του πηκτώματος.

Η αλληλουχία αυτή είναι ταυτόσημη με την αλληλουχία του κώνου 5' → 3' του αρχικού δίκλωνου DNA.

Η ΤΕΧΝΙΚΗ ΤΗΣ PCR

Η τεχνική PCR εξασφαλίζει την παραγωγή πολλών αντιγράφων ενός αρχικού τμήματος DNA. Απαραίτητη προϋπόθεση για την εφαρμογή της είναι να γνωρίζουμε την αλληλουχία των νουκλεοτιδίων στις άκρες του τμήματος του DNA που θέλουμε να αντιγράψουμε. Οι αλληλουχίες αυτές χρησιμοποιούνται για τη σύνθεση δύο συμπληρωματικών ολιγονουκλεοτιδίων εκκινητών (primers) που θα αποτελέσουν τα πρωταρχικά τμήματα για το σχηματισμό συμπληρωματικών τμημάτων DNA.



Σχήμα 1

Σε δοκιμαστικό σωλήνα εισάγουμε το DNA που θέλουμε να πολλαπλασιάσουμε μαζί με τα συμπληρωματικά ολιγονουκλεοτιδικά, ελεύθερα δεοξυριβονουκλεοτιδικά, μια ειδική DNA πολυμεράση (Taq), ανθεκτική σε υψηλές θερμοκρασίες, που καταλύει τη σύνθεση του DNA και ιχνοστοιχεία ($MgCl_2$) που βελτιώνουν την απόδοση της. Θερμαίνοντας (94 °C) το δοκιμαστικό σωλήνα το DNA αποδιατάσσεται. Ακολουθεί η ψύξη (συνήθως στους 54 έως στους 62 °C) του DNA έτσι ώστε οι εκκινητές να υβριδιστούν στις αντίστοιχες συμπληρωματικές περιοχές του DNA κάθε αλυσίδας. Σταδιακά και με τη συμμετοχή της DNA πολυμεράσης (στους 72 °C) γίνεται η σύνθεση δύο νέων αλυσίδων DNA συμπληρωματικών των αρχικών. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται συμπληρώνοντας νέους κύκλους αντιγραφής. Κάθε κύκλος αντιγραφής διαρκεί περίπου πέντε λεπτά. Η ευαισθησία της τεχνικής PCR είναι σημαντική αφού επιτυγχάνει την ταχύτατη ανάλυση συγκεκριμένων περιοχών του DNA που βρίσκονται σε πολύ μικρή ποσότητα. Η μέθοδος PCR βρίσκει εφαρμογές στην ανίχνευση γενετικών ασθενειών και των αρχικών

σταδίων ικών μολύνσεων, στην εξακρίβωση της πατρότητας ή ακόμα και στην εγκληματολογία, όπου ελάχιστες ποσότητες αίματος ή άλλων ιστών μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ανάλυση του DNA.

Η αντίδραση της PCR

Για μια τυπική αντίδραση PCR χρειάζονται τα παρακάτω αντιδραστήρια

Αντιδραστήρια	ποσότητα	Τελική Συγκέντρωση
1. Αποστειρωμένο νερό(pH 7.0)	20.7μL	-
2. 10x PCR Buffer*	2.5μL	1x
3. dNTPs μίγμα (25 mM each nucleotide)	0.2μL	200 μM (each nucleotide)
4. primer μίγμα (25 pmoles/μL each primer)	0.4μL	0.4 μM (each primer)
5. Taq DNA πολυμεράση (native enzyme)	0.2μL	1 Unit/25 μL
6. Γενομικό DNA ως μήτρα (100 ng/μL)	1.0μL	100 ng/25 μL

- Ένα τυπικό διάλυμα για PCR περιέχει τα εξής 10 mM Tris-HCl (pH 8.8), 50 mM KCl και 1.5 mM MgCl₂.
- Η συγκέντρωση του άλατος (KCl) επηρεάζει την απόδοση της PCR. Κατά κανόνα χαμηλή άλατος συγκέντρωση ευνοεί το πολλαπλασιασμό μεγάλων κομματιών DNA, ενώ υψηλή συγκέντρωση το πολλαπλασιασμό μικρών κομματιών
- Το MgCl₂ είναι απαραίτητο για την δράση της DNA πολυμεράσης. Όσο αυξάνει η συγκέντρωση του MgCl₂ αυξάνει και η δραστηριότητα του ενζύμου και η παραγωγή του προϊόντος. Ωστόσο σε αυξημένες συγκεντρώσεις υπάρχει κίνδυνος παραπροϊόντων λόγω μείωσης της ειδικότητας του ενζύμου. Η ιδανική συγκέντρωση του MgCl₂ είναι μεταξύ των 1,5 mM – 2,5 mM.
- Υπάρχει σχέση μεταξύ της συγκέντρωσης των dNTPs και του MgCl₂ διότι τα dNTPs δεσμεύουν και αυτά Mg. Οπότε σε αυξημένες συγκεντρώσεις dNTPs χρειάζονται αυξημένες MgCl₂ αλλιώς αναστέλλεται η πολυμεράση.

Σχεδιασμός των ολιγονουκλεοτιδίων εκκινητών

Το μήκος των primers (ολιγονουκλεοτιδίων εκκινητών) είναι συνήθως μεταξύ των 18-24 bp. Αυτό το μέγεθος όπως φαίνεται και από το τύπο παρακάτω δίνει μια θερμοκρασία υβριδισμού 54 έως στους 62 °C που θεωρείται ικανή ώστε να υπάρχει ικανοποιητική ειδικότητα χωρίς να αυξηθεί πολύ το μέγεθος (και ανάλογα το κόστος) των primers. Η θερμοκρασία υβριδισμού T_m των δύο primers πρέπει να είναι παρόμοια. Δεν πρέπει να διαφέρει παραπάνω από 4 °C, καθώς μπορεί να κατά την αντίδραση να δημιουργηθούν παραπροϊόντα.

Η θερμοκρασία υβριδισμού των primers μέχρι 13 βάσεις υπολογίζεται με το τύπο $T_m = (A+T)2 + (G+C)4$ και για περισσότερες από 13 βάσεις, με το τύπο $T_m = 64,9 + 41(G+C - 16,4) / (A+T+G+C)$

Η αναλογία πουρίνης : πυριμιδίνης πρέπει να είναι 1:1 (μέχρι 40-60%).

Εάν είναι δυνατόν η αλληλουχία τους να αρχίζει και να τελειώνει με 1-2 GC ζευγάρια. Ωστε η αρχή και το τέλος του primer να υβριδοποιείται ειδικά και να δεσμεύεται πιο σταθερά.

Κάθε ζευγάρι από τα primers πρέπει να ελέγχεται για αλληλεπιδράσεις μεταξύ τους. Δηλαδή να μην έχουν συμπληρωματικότητα ώστε να μην υβριδοποιούνται μεταξύ τους. Συνήθως για αυτό τον έλεγχο υπάρχουν ειδικά προγράμματα στο διαδίκτυο (πχ Oligonucleotide Properties Calculator)

Οι αλληλουχίες των primers θα πρέπει να ελέγχονται για ειδικότητα ως προς την αλληλουχία που πρόκειται να πολλαπλασιαστεί. Αυτό γίνεται με ειδικά προγράμματα BLAST στο διαδίκτυο (πχ Virtual PCR, και UCSC In-Silico PCR test Blast).

Ο αριθμός των κύκλων καθώς και οι συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων της αντίδρασης θα πρέπει να προσαρμόζονται σε κάθε ζευγάρι primers για την αποφυγή παραπροϊόντων. Αν αυτό δεν είναι δυνατόν θα πρέπει να σχεδιαστούν νέα primers χρησιμοποιώντας ειδικά προγράμματα τα οποία προσφέρονται δωρεάν στο διαδίκτυο όπως πχ το Advance Primer Design και το Integrated DNA Technologies Primer Design.

Διαδικασία εκτέλεσης της PCR

Για να αποφεύγονται οι επιμολύνσεις καλύτερα η PCR να γίνεται σε ειδικά διαμορφωμένο χώρο ο οποίος αποστειρώνεται κατά διαστήματα από ειδικά διαλύματα (όπως αυτά που καταστρέφουν το DNA) ή/και λάμπες υπεριώδους ακτινοβολίας. Στην ιδανική περίπτωση μπορεί να γίνεται σε απαγωγό αποστειρωμένου αέρα.

Για να μην επιμολύνονται οι αυτόματες πιπέτες καλό είναι τα ρύγχη να έχουν φίλτρο. Όταν ετοιμάζεται η αντίδραση πρώτα μπαίνει το νερό και μετά τα άλλα συστατικά. Δεν παίζει ρόλο μετά η σειρά. Για να μην ξεκινήσει η αντίδραση της PCR πριν μπει στο μηχάνημα όλα τα αντιδραστήρια αναμιγνύονται στον πάγο.

Όταν με το ίδιο διάλυμα πρόκειται να γίνουν ταυτόχρονα πολλές αντιδράσεις καλό είναι να ετοιμάζεται το “master mix” που περιέχει όλες τις ποσότητες των αντιδραστηρίων σε ένα αρχικό διάλυμα. Στη συνέχεια αυτό μοιράζεται ισόποσα στις αντιδράσεις που πρέπει γίνουν. Με τον τρόπο αυτό όλες αντιδράσεις δίνουν συγκρίσιμα αποτελέσματα. Επιπλέον μειώνεται το ποσοστό λάθους από τις πιπέτες (το οποίο είναι αυξημένο στο χειρισμό μικρών ποσοτήτων) καθώς κατά την παρασκευή του “master mix” προσθέτονται συγκριτικά μεγαλύτερες ποσότητες.

Το μηχάνημα συνήθως προγραμματίζεται ως εξής:

1^{ος} κύκλος

Αποδιάταξη στους 94 °C για 2 λεπτά

25-30 κύκλοι

Αποδιάταξη στους 94 °C για 1 λεπτά

Υβρισμός των primers 54-60 °C για 1 λεπτό

Πολλαπλασιασμός στους 72 °C για 1 λεπτό ανά 1000 βάσεις

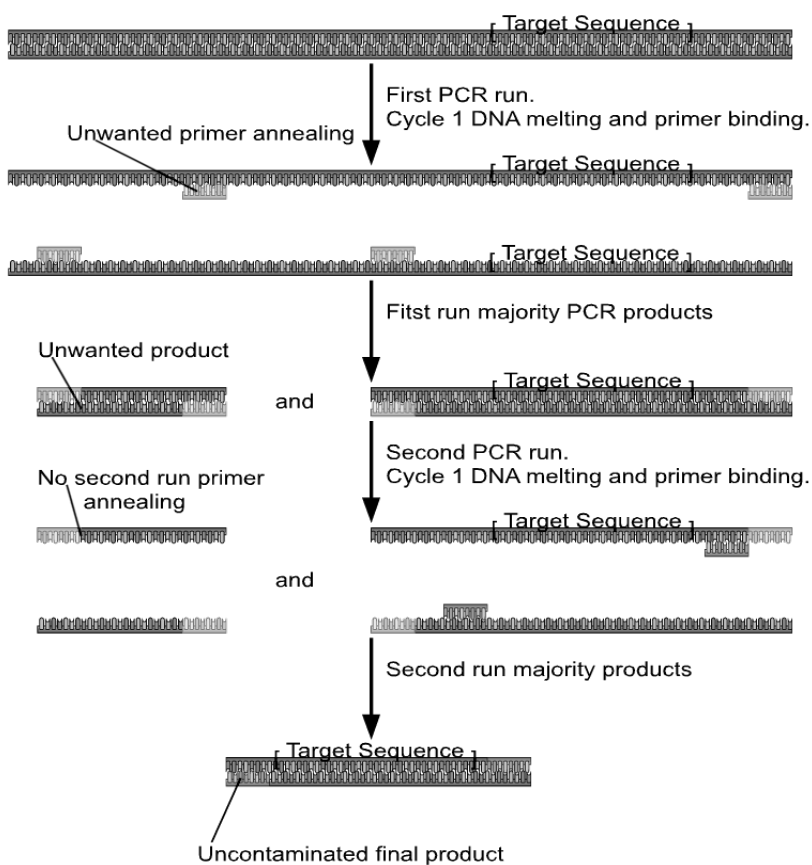
Τελευταίος κύκλος

Πολλαπλασιασμός στους 72 °C για 5 λεπτά

Ψύξη στους 4 °C επ’ αόριστον

Nested PCR.

Με την τεχνική της Nested PCR αυξάνεται η ευαισθησία και η ειδικότητα της μεθόδου. Σε αυτή τη τεχνική χρησιμοποιούνται δύο ζευγάρια primers και γίνονται δύο διαδοχικές PCR. Το πρώτο ζευγάρι πολλαπλασιάζει μεγαλύτερο τμήμα DNA, που περιέχει το τμήμα που πρέπει να πολλαπλασιαστεί στο τέλος (σχήμα 2). Έτσι αυξάνεται η ποσότητα του αρχικού DNA που θα χρησιμοποιηθεί ως μήτρα στη δεύτερη PCR δίνοντας τη δυνατότητα να ξεκινήσει ο πολλαπλασιασμός από ελάχιστο DNA όπως πχ αυτό που περιέχεται σε ένα κύτταρο. Η δεύτερη PCR αυξάνει και την ειδικότητα καθώς χρησιμοποιείται ως μήτρα DNA που περιέχει σε πολύ μεγαλύτερη ποσότητα το περιοχή που περιέχει το τμήμα που χρειάζεται να πολλαπλασιαστεί. Επιπλέον το δεύτερο ζευγάρι primers απαιτεί ένα επιπλέον ειδικό υβρισμό που μειώνει την πιθανότητα για παραπροϊόντα.

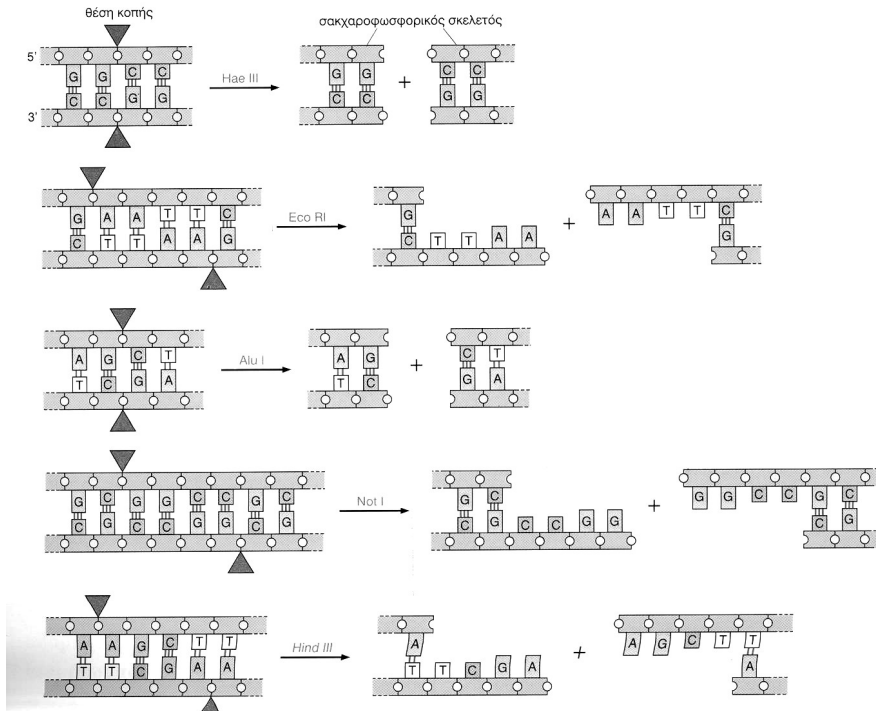


Σχήμα 2

ΕΝΔΟΝΟΥΚΛΕΑΣΕΣ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΥ

Οι ενδονουκλεάσες περιορισμού ανακαλύφθηκαν στα βακτήρια. Είναι ένζυμα που έχουν την ιδιότητα να κόβουν το DNA σε συγκεκριμένες αλληλουχίες νουκλεοτιδίων (σχήμα 3). Χρησιμοποιούνται από τα βακτήρια για αποδομούν ξένο DNA που εισέρχεται στο κυτταρόπλασμα καθώς οι αλληλουχίες που αναγνωρίζει η ενδονουκλεάση που χρησιμοποιούν είναι προστατευμένες στο δικό τους γονιδίωμα (σχήμα 4). Το όνομα τους το παίρνουν από το βακτήριο που προέρχονται όπως αναλύεται στο παράδειγμα του παρακάτω πίνακα.

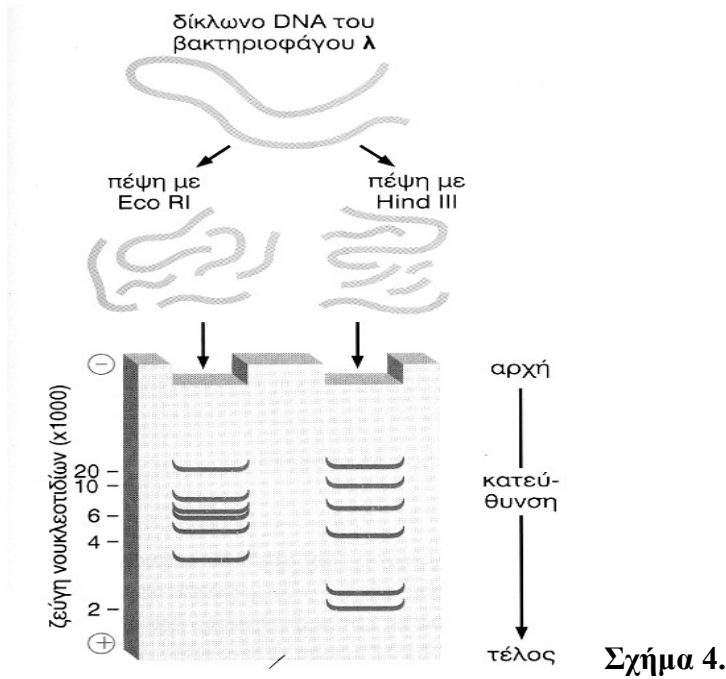
Ανάλυση του ονόματος EcoRI		
Συντόμευση	Ανάλυση	Περιγραφή
E	<i>Escherichia</i>	γένος
co	<i>coli</i>	είδος
R	RY13	στέλεχος
I	First identified	σειρά ανακάλυψης στο βακτήριο



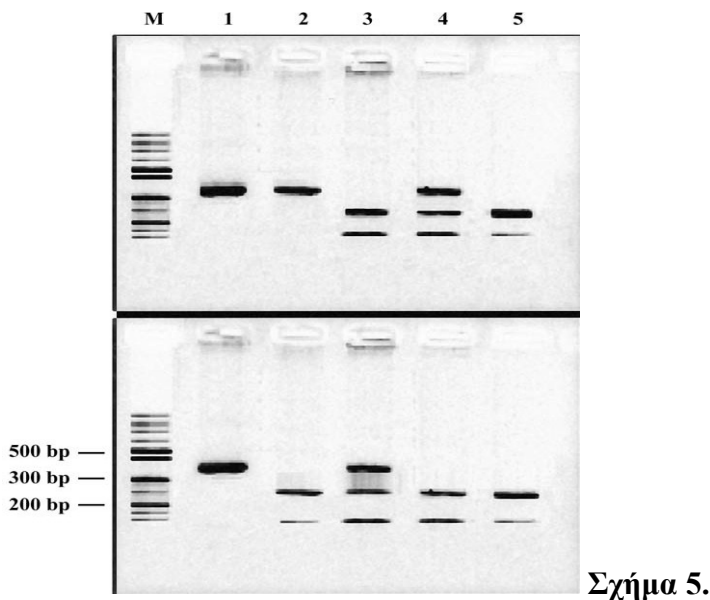
Σχήμα 3

Οι ενδονουκλεάσες περιορισμού χρησιμοποιούνται για τη μελέτη γενετικών πολυμορφισμών στο DNA τα RFLPS (restriction fragment length polymorphism) οι

οποίοι ανιχνεύονται όταν γίνονται (με αλλαγή της αλληλουχίας) στη αλληλουχία που αναγνωρίζει η κάποια ενδονουκλεάση.



Στο παράδειγμα που ακολουθεί στο σχήμα 5 γίνεται ανίχνευση δύο RFLPS. Ο ένας γίνεται με την ενδονουκλεάση Sma I που ανιχνεύει το πολυμορφισμό m1 (CYP219m1) στο επάνω πήκτωμα και ο άλλος γίνεται με ενδονουκλεάση BamHI που ανιχνεύει το πολυμορφισμό m2 (CYP2C19m2) στο κάτω πήκτωμα. Στις στήλες των πηκτωμάτων έχουν φορτωθεί τα εξής δείγματα: Στήλη M ο μάρτυρας που έχει ζώνες ανά 50 bp. Στήλη 1 wt/wt-wt/wt (wt δεν έχει πολυμορφισμό), Στήλη 2 wt/wt – m2/m2, Στήλη 3 m1/m1 – wt/m2, Στήλη 4 wt/m1-m2/m2 και Στήλη 5 m1/m1-m2/m2.

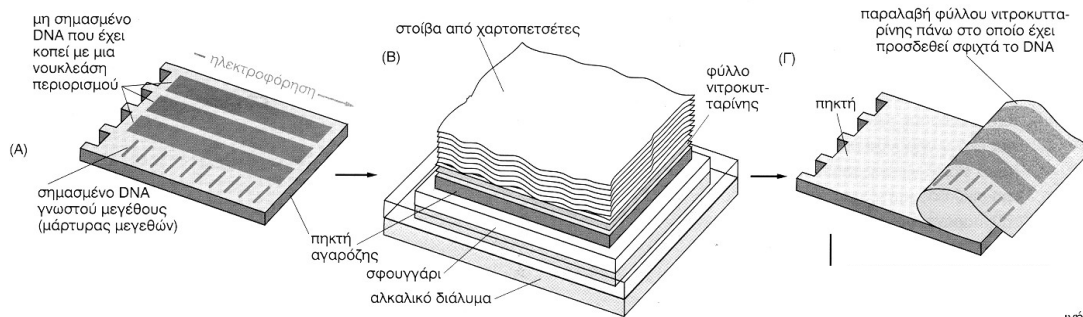


ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ

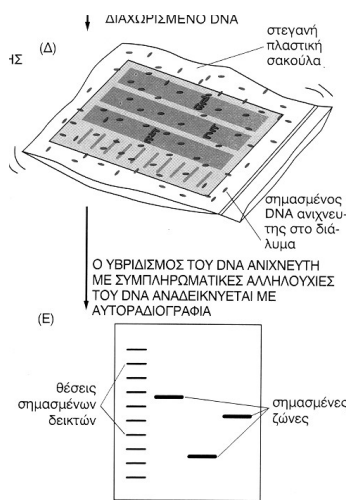
1. Τι είναι η μέθοδος Sanger και σε τι χρησιμοποιείται;
2. Από τι εξαρτάται το T_m των primers που χρησιμοποιούνται για PCR;
3. Ποια PCR ονομάζεται nested και για ποιους λόγους χρησιμοποιείται;
4. Τι είναι τα RFLPS;
5. Εξηγήστε στο σχήμα 5 τις στήλες 3 και 4.

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ 4ο ΣΤΥΠΩΣΗ ΚΑΤΑ SOUTHERN

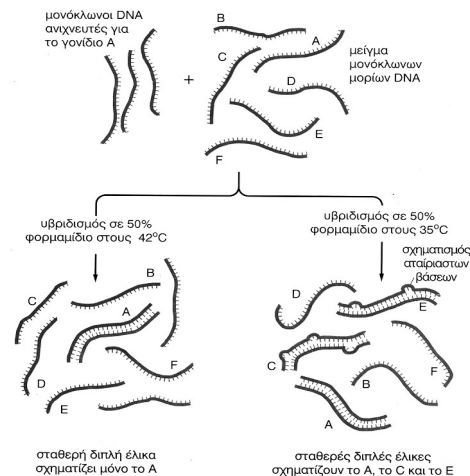
Η στύπωση κατά Southern (Southern blot) ανακαλύφθηκε από τον Edward M. Southern, και χρησιμοποιείται κυρίως για τη μελέτη γενομικού DNA μετά από πέψη με ενδονουκλεάσες περιορισμού. Η τεχνική συνίσταται στην μεταφορά τμημάτων DNA που έχουν ηλεκτροφορηθεί σε πήκτωμα αγαρόζης, από το πήκτωμα σε ένα αδρανές υπόστρωμα που είναι συνήθως μια μεμβράνη νάιλον ή ένα φίλτρο νιτροκυτταρίνης. Για να γίνει η μεταφορά, το πήκτωμα πρώτα τοποθετείται σε ένα διάλυμα (1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH) όπου αποδιατάσσεται το DNA, και μετά σε ένα δοχείο (όπως φαίνεται στο σχήμα 1) το οποίο περιέχει αλκαλικό διάλυμα (1,5 M NaCl, 150 mM κιτρικό Na pH 7.00). Εκεί με τριχοειδή φαινόμενα τα μόρια του DNA μεταφέρονται από το πήκτωμα στη μεμβράνη. Για να ανιχνευτεί το εκάστοτε τμήμα DNA που ερευνάται η μεμβράνη υβριδοποιείται με ειδικό μονόκλωνο ραδιοενεργά σεσημασμένο ανιχνευτή (σχήμα 2). Η στύπωση κατά Southern χρησιμοποιείται στη χαρτογράφηση του DNA με ενδονουκλεάσες περιορισμού, για τον εντοπισμό πολυμορφισμών, σημειακών μεταλλάξεων και χρωμοσωμικών ανωμαλιών. Γι' αυτό χρησιμοποιείται και στην διάγνωση γενετικών παθήσεων όπως φαίνεται στα παραδείγματα που ακολουθούν.



Σχήμα 1

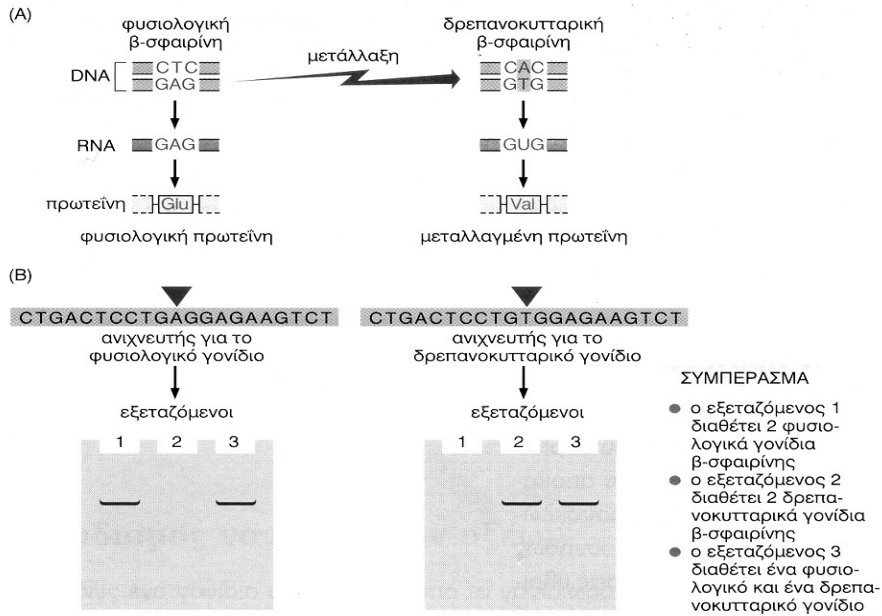


Σχήμα 2



Παράδειγμα 1°.

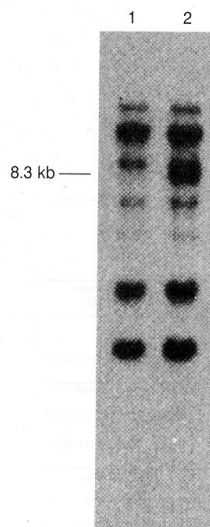
Ανίχνευση της μετάλλαξης που προκαλεί την δρεπανοκυτταρική αναιμία χρησιμοποιώντας την τεχνική υβριδισμού του DNA.



Παράδειγμα 2°

Αιμορροφιλία Α

Το cDNA του παράγοντα VIII επωάζεται με το ένζυμο SstI και ελέγχεται με το ανάλογο ανιχνευτή ολόκληρου του cDNA. Η έλλειψη 39 Kb στο γονίδιο έχει ως αποτέλεσμα την έλλειψη μια ζώνης μεγέθους 8.3 Kb στη θέση 1.



ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ 5ο

ΣΤΥΠΩΣΗ ΚΑΤΑ WESTERN

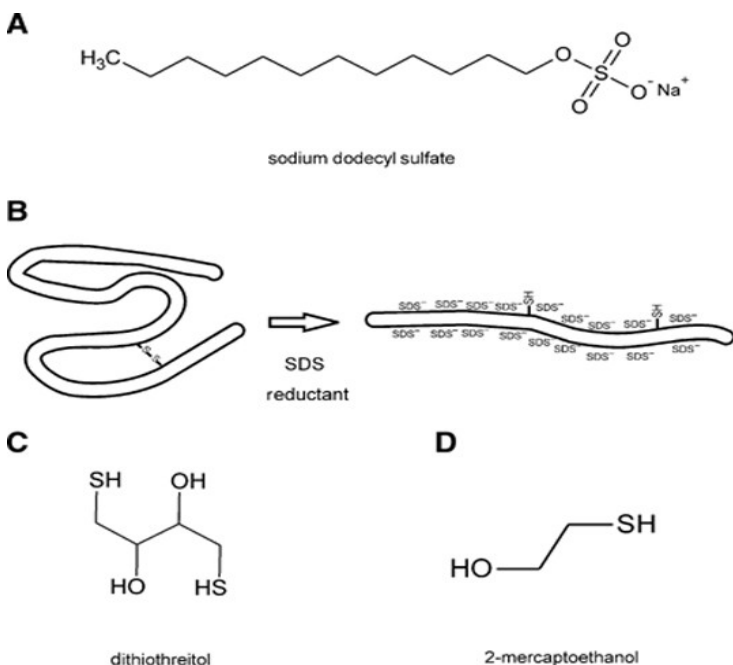
Η στύπωση κατά Western (Western blot) είναι μία αναλυτική τεχνική με τη οποία μελετούνται οι πρωτεΐνες. Η πιο γνωστή μέθοδος Western εφαρμόζεται σε πρωτεΐνες που έχουν διαχωριστεί με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα ακρυλαμιδίου, αφού πρώτα έχουν αποδιαταχθεί με θέρμανση και SDS (Sodium Dodecyl Sulfate). Όπως το Southern και το Northern έτσι και η τεχνική Western ακολουθεί κάποια βασικά βήματα: εκχύλιση, αποδιάταξη, διαχωρισμός, μεταφορά, κάλυψη των κενών θέσεων, επώαση με ένα ανιχνευτή, παρατήρηση και ανάλυση των αποτελεσμάτων.

Εκχύλιση

Για να μην αποδιαταχθούν οι πρωτεΐνες η διαδικασία αυτή θα πρέπει να γίνεται στον πάγο. Τα δείγματα μπορεί να προέρχονται είτε από ολόκληρους ιστούς είτε από καλλιέργειες κυττάρων. Τις περισσότερες φορές οι ιστοί σπάνε μηχανικά (πχ. Ομογενοποιητές από τεφλόν) ή με υπερήχους. Ειδικά αποδιαταχτικά (SDS, Triton X), διαλύματα αλάτων και ρυθμιστικά κάποιες φορές χρησιμοποιούνται για να ενισχύσουν την λύση των κυττάρων και να διαλυτοποιήσουν τις πρωτεΐνες. Αναστολείς των πρωτεασών και των φωσφατασών χρησιμοποιούνται συχνά για να εμποδίσουν την πέψη των πρωτεϊνών.

Αποδιάταξη

Η αποδιάταξη των πρωτεϊνών γίνεται σε θερμοκρασία 100°C για 4 λεπτά με SDS παρουσία β-μερκαπτοαιθανόλης ή διθειοθρεϊτόλης. Το SDS, που είναι ανιονικό απορρυπαντικό (σε αναλογία 1,4 g SDS ανά g πρωτεΐνης) αποδιάτασσει τις πρωτεΐνες, δεσμεύεται σε αυτές και τις φορτίζει αρνητικά (σχήμα 1). Ενώ η β-μερκαπτοαιθανόλης ή διθειοθρεϊτόλη διασπά τους δισουλφιδικούς δεσμούς.



Σχήμα 1

Οπότε, η πρωτεΐνη μπορεί να ηλεκτροφορηθεί και να διαχωριστεί με βάση το μέγεθος της καθώς έχει ομοιόμορφο αρνητικό φορτίο ανά μονάδα μάζας.

Η σύσταση του διαλύματος φόρτωσης των πρωτεϊνών είναι η εξής

- 40% γλυκερόλη (για να αυξηθεί το ιξώδες του δείγματος, το οποίο βοηθάει στο φόρτωμα)
- 240 mM Tris/HCl pH 6.8
- 8% SDS
- 0.04% bromophenol blue (για να παρακολουθείται η πορεία της ηλεκτροφόρησης)
- 5% β-μερκαπτοαιθανόλη

Διαχωρισμός

Ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών σε SDS πήκτωμα ακρυλαμιδίου. Για το σκοπό αυτό φτιάχνονται δύο ειδών πηκτώματα. Το πήκτωμα πακεταρίσματος (πίνακας 1) και το πήκτωμα διαχωρισμού (πίνακας 2).

Πίνακας 1.

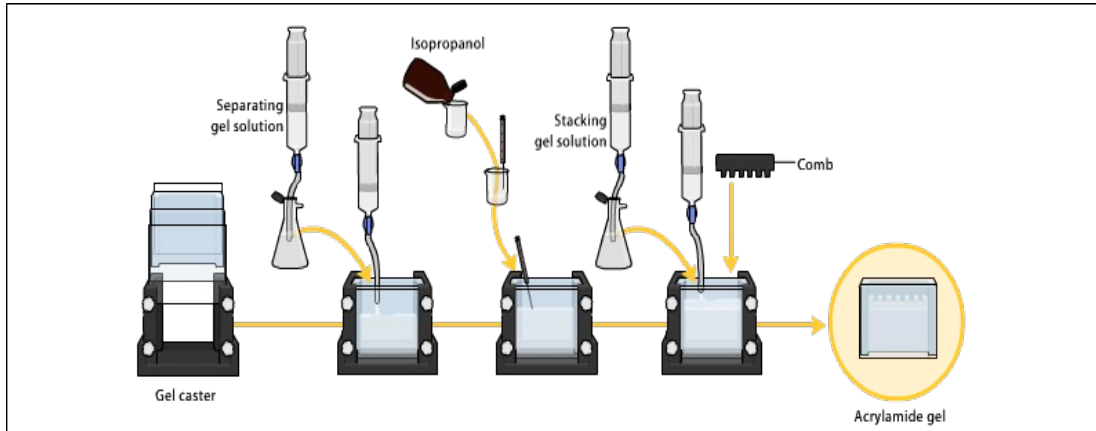
Συγκέντρωση πηκτώματος όγκου 10 ml	3 %
H ₂ O (ml)	4.5
4x Upper Tris Buffer (ml).	2.5
30/8 % Acrylamide/Bis (μl)	1.0
10% SDS (μl)	75
APS (μl)	40
TEMED (μl)	10

Πίνακας 2.

Συγκέντρωση πηκτώματος όγκου 10 ml	5 %	7.5 %	10 %	12.5 %
H ₂ O (ml)	22	14.6	12	9.6
30%/0.8% Acrylamide/Bis (ml)	5	7.5	10	12.5
4x Lower Tris Buffer (ml)	7.5	7.5	7.5	7.5
10% SDS (μl)	300	300	300	300
APS (μl)	150	150	150	150
TEMED (μl)	10	10	10	10

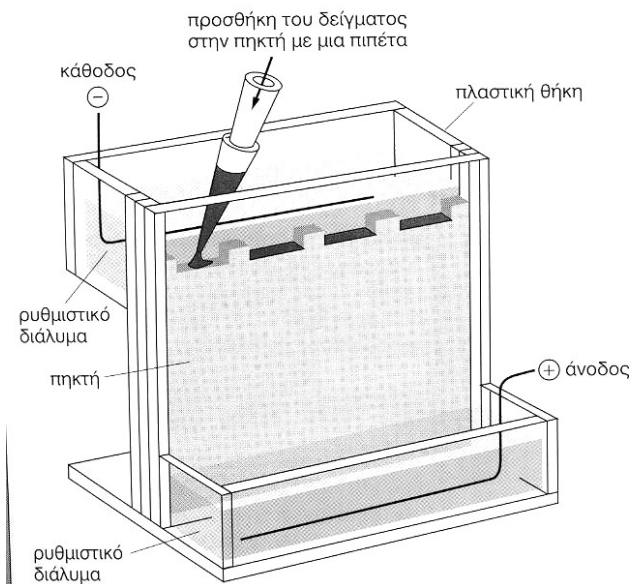
Τα πηκτώματα γενικά αποτελούνται από ακρυλαμίδιο, δισακρυλαμίδιο, SDS και ρυθμιστικό διάλυμα Tris-Cl στο κατάλληλο pH (πίνακες 1,2). Από το διάλυμα απομακρύνονται τα αέρια σε κενό για μην δημιουργηθούν φυσαλίδες κατά τον πολυμερισμό του. Το Ammonium persulfate και το TEMED προστίθενται ως καταλύτες του πολυμερισμού, όταν είναι έτοιμα τα πηκτώματα για πολυμερισμό. Τα πηκτώματα πολυμερίζονται μέσα σε ένα ειδικό καλούπι. Αρχικά μπαίνει το πήκτωμα διαχωρισμού και αφήνεται να πολυμεριστεί. Στη συνέχεια προστίθεται μια λεπτή στρώση ισοπροπανόλης προκειμένου να μην σχηματιστεί ανώμαλη επιφάνεια στο πήκτωμα διαχωρισμού. Από πάνω τοποθετείται το πήκτωμα πακεταρίσματος όπου μπαίνει και το

ειδικό χτενάκι για να σχηματιστούν τα ανάλογα πηγαδάκια. Αφού το πήκτωμα πακεταρίσματος πολυμεριστεί το χτενάκι μπορεί να απομακρυνθεί και το πήκτωμα είναι έτοιμο για ηλεκτροφόρηση (σχήμα 2).



Σχήμα 2

Το διάλυμα ηλεκτροφόρησης αποτελείται συνήθως από 50 mM Tris-Cl και 0,196 M γλυκίνη pH 8,3 (γνωστό ως διάλυμα Laemmli). Τοποθετείται δε σε διαφορετικά δοχεία που δεν επικοινωνούν (σχήμα 3).

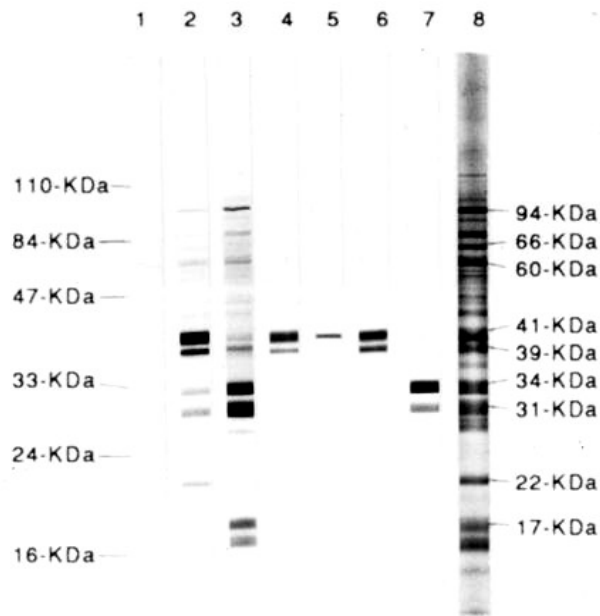


Σχήμα 3

Η γλυκίνη χρησιμοποιείται ως πηγή αρνητικών ιόντων που κινούνται πιο αργά από τις πρωτεΐνες δημιουργώντας έτσι το κατάλληλο υπόστρωμα για τον καλύτερο διαχωρισμό τους. Όπως φαίνεται και στους παραπάνω πίνακες το πήκτωμα πακεταρίσματος είναι

αραιότερο από αυτά του διαχωρισμού. Στο πήκτωμα πακεταρίσματος δίνεται η δυνατότητα στις πρωτεΐνες, που κατά την φόρτωση μπορεί να εκτείνονται σε μεγάλο σχετικά όγκο, να πακεταριστούν και να μπουν ταυτόχρονα στο πήκτωμα διαχωρισμού, ώστε οι ζώνες που θα σχηματιστούν κατά την ηλεκτροφόρηση να μην έχουν μεγάλο εύρος.

Στο πήκτωμα διαχωρισμού οι πρωτεΐνες χωρίζουν ανάλογα με το μοριακό τους βάρος (σχήμα 4)

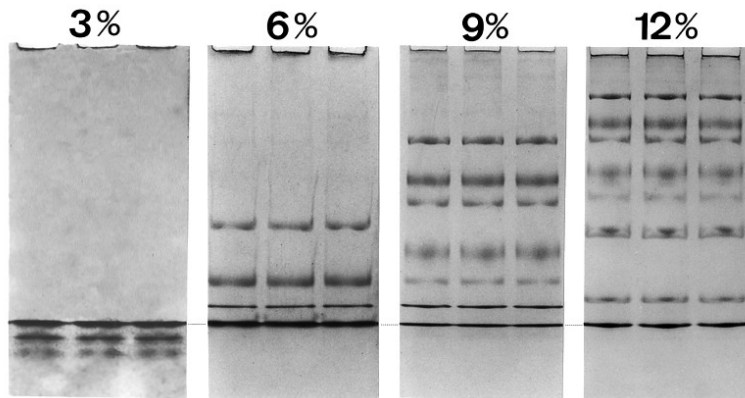


Σχήμα 4

Ανάλογα με το μέγεθος των πρωτεϊνών που μελετώνται επιλέγεται και η συγκέντρωση του πηκτώματος διαχωρισμού (πίνακας 3, σχήμα5).

% Acrylamide	MW Range (kDa)
7	50 – 500
10	20 – 300
12	10 – 200
15	3 - 100

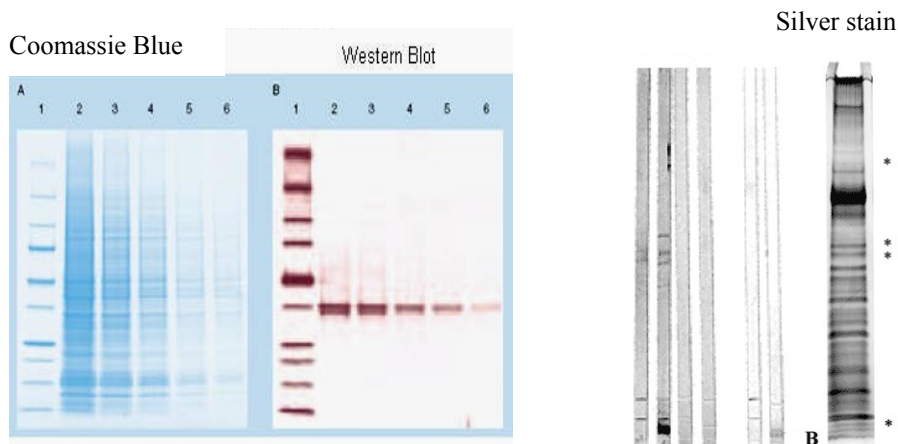
Πίνακας 3



Σχήμα 5

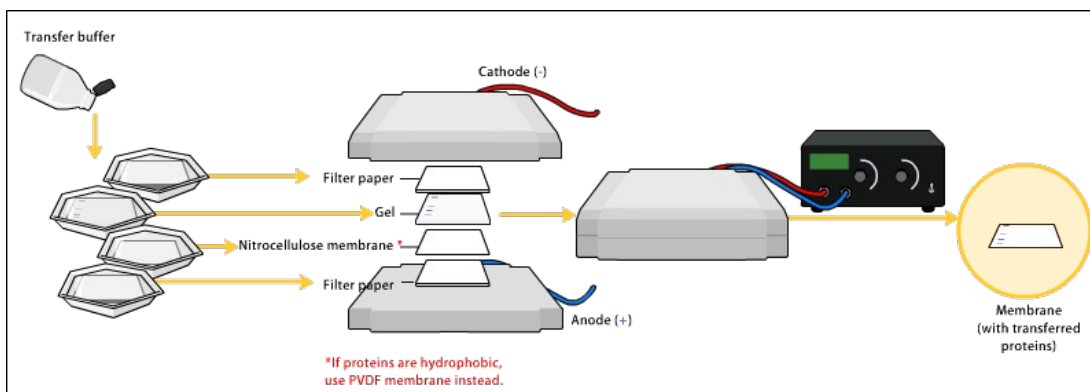
Μαζί με τα προς ανάλυση δείγματα τοποθετείται συνήθως στη αρχή ένα δείγμα μάρτυρας της ηλεκτροφόρησης που είναι ειδικά φτιαγμένος ώστε να δίνει ζώνες γνωστού μοριακού βάρους. Οι ζώνες αυτές συνήθως επιλέγονται ώστε να βρίσκονται σε παρόμοιο μέγεθος με τις πρωτεΐνες που πρόκειται να μελετηθούν.

Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης τα πηκτώματα συνήθως χρωματίζονται για να διαπιστωθεί η ποιότητα της ηλεκτροφόρησης και των πρωτεϊνών που πρόκειται να μελετηθούν. Η πιο διαδεδομένη χρωστική είναι η Coomassie Brilliant Blue. Αυτή είναι μία ανιονική χρωστική που χρωματίζει μη ειδικά τις πρωτεΐνες. Χρησιμοποιείται σε συγκέντρωση 0,025% σε διάλυμα 40% μεθανόλης και 7% οξικού οξέος. Όταν χρειάζεται μεγαλύτερη ευαισθησία, καθώς η Coomassie Blue ανιχνεύει μέχρι 50 ng ποσότητα πρωτεΐνης, τότε χρησιμοποιείται μία άλλη χρώση αυτή του νιτρικού αργύρου που είναι 50 φορές πιο ευαίσθητη (σχήμα 6).



Σχήμα 6

Για τη περαιτέρω μελέτη των πρωτεϊνών απαιτείται η μεταφορά τους σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης όπως και στις περιπτώσεις του Southern και του Northern. Η τεχνική αυτή ονομάζεται Western. Οι πρωτεΐνες από ένα gel ακριλαμιδίου που δεν έχει βαφτεί μεταφέρονται στη μεμβράνη είτε με τριχοειδή φαινόμενο, είτε με ηλεκτροφόρηση (σχήμα 7).



Σχήμα 7

Για να μπορούν οι πρωτεΐνες να ανιχνευθούν από τα αντισώματα, πρέπει να μετακινηθούν από το πήκτωμα (gel) σε μια μεμβράνη νιτροκυτταρίνης *nitrocellulose* ή διφθοριούχου πολυβινυλιδενίου *polyvinylidene difluoride* (PVDF). Η μεμβράνη τοποθετείται απάνω από το gel, και μια στοιβα από διηθητικά φίλτρα χαρτιού τοποθετούνται από πάνω από την μεμβράνη. Ολόκληρη η στοιβα (διηθητικών χαρτιών-gel-νιτροκυτταρίνης- διηθητικών χαρτιών) τοποθετείται σε ρυθμιστικό διάλυμα που κινείται επάνω στο χαρτί με τριχοειδή δράση, φέρνοντας τις πρωτεΐνες σε αυτό.

Διάλυμα μεταφοράς

Reagent	Amount	Final concentration
10X Tris glycine buffer (#B47)	0.3	25 mM
Glycine	1.44g	192 mM
Methanol	10 ml	10% (v/v))
deionized water	to 100 ml	

Σχήμα 8

Μια άλλη μέθοδος για τη μεταφορά των πρωτεϊνών που ονομάζεται *electroblotting* και χρησιμοποιεί ηλεκτρικό πεδίο για να τραβήξει τις πρωτεΐνες από το πήκτωμα (gel) στην PVDF ή στην μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Οι πρωτεΐνες κινούνται μέσα από το πήκτωμα επάνω στην μεμβράνη με παράλληλη διατήρηση της οργάνωσης που είχαν στο gel (Σχήμα 7) με διάλυμα μεταφοράς (Σχήμα 8)

Η πρωτεϊνική δέσμευση βασίζεται στις υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις, όπως επίσης στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ της μεμβράνης και των πρωτεϊνών. Οι μεμβράνες

Νιτροκυτταρίνης είναι φθηνότερες από ότι οι PVDF, αλλά είναι πολύ πιο εύθραυστες και δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν τόσο καλά σε επανειλημμένα probings.

Η ομοιομορφία και η συνολική αποτελεσματικότητα της μεταφοράς των πρωτεϊνών από το πήκτωμα στη μεμβράνη μπορεί να ελεγχθεί με χρώση της μεμβράνης με [Coomassie](#) ή [Ponceau S](#) βαφές. Η [Ponceau S](#) είναι η πιο κοινή από τις δύο, λόγω της υψηλότερης ευαισθησίας της Πονσώ S και της διαλυτότητας της στο νερό, διευκολύνει στη συνέχεια το αποχρωματισμό και την απομάκρυνση του probe από την μεμβράνη.

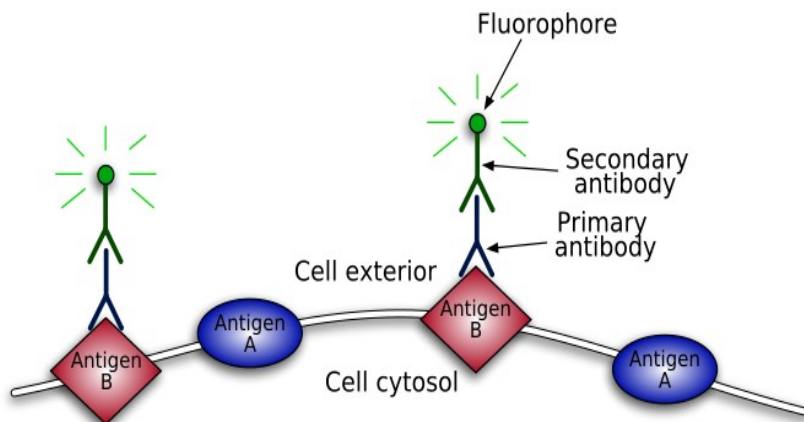
Παρεμπόδιση της μη ειδικής σύνδεσης επιτυγχάνεται με την τοποθέτηση της μεμβράνης σε αραιό διάλυμα της πρωτεΐνης - συνήθως αλβουμίνη ορού βοοειδών [Bovine serum albumin](#) (BSA) ή μη λιπαρό ξηρό γάλα (και τα δύο είναι φθηνά), με ένα μικρό ποσοστό απορρυπαντικών, όπως το [Tween 20](#).

Η πρωτεΐνη στο αραιό διάλυμα προσεγγίζει την μεμβράνη σε όλους τους χώρους όπου οι πρωτεΐνες στόχοι δεν έχουν συνδεθεί. Έτσι, όταν το αντίσωμα προστίθεται, δεν υπάρχει χώρος για τη μεμβράνη για να επισυνάψουν άλλο εκτός από τα σημεία σύνδεσης των συγκεκριμένων πρωτεϊνών στόχου. Αυτό μειώνει το "θόρυβο" στο τελικό προϊόν της Western blot, που οδηγεί σε πιο σαφή αποτελέσματα, και εξαλείφει ψεύτικα θετικά αποτελέσματα.

Κατά τη διάρκεια της διαδικασίας ανίχνευσης η μεμβράνη "probed" για την πρωτεΐνη του ενδιαφέροντος με ένα τροποποιημένο αντίσωμα το οποίο συνδέεται με ένα ένζυμο αναφοράς, το οποίο όταν εκτίθενται σε κατάλληλο υπόστρωμα οδηγεί σε χρωματομετρική αντίδραση και παράγει ένα χρώμα. Για διάφορους λόγους, αυτό γίνεται παραδοσιακά πραγματοποιείται σε δύο στάδια, αν και υπάρχουν τώρα ενός βήματος μέθοδοι ανίχνευσης διαθέσιμοι για ορισμένες εφαρμογές.

Μετά το blocking ένα αραιό διάλυμα του πρώτου αντισώματος (γενικά μεταξύ 0,5 και 5 μικρογραμμάρια / ml) επωάζεται με τη μεμβράνη με ήρεμη ανατάραξη. Συνήθως, το διάλυμα αποτελείται από ρυθμιστικό αλατούχο διάλυμα με ένα μικρό ποσοστό απορρυπαντικού, και μερικές φορές με γάλα σε σκόνη ή με BSA.

Το διάλυμα του αντισώματος και της μεμβράνης μπορεί να σφραγιστεί και να επωάζονται μαζί από 30 λεπτά έως όλη την νύκτα. Μπορεί επίσης να επωάζεται σε διάφορες θερμοκρασίες, με τις υψηλότερες θερμοκρασίες να συνδέονται με πιο καλλίτερη δέσμευση του αντισώματος, τόσο ειδικά (με την πρωτεΐνη-στόχο, το "σήμα") όσο και μη ειδικά ("θόρυβος").



Σχήμα 9.

Μετά την έκπλυση της μεμβράνης για την απομάκρυνση του αδέσμευτου πρώτου αντισώματος, η μεμβράνη εκτίθεται σε ένα άλλο αντίσωμα, απευθύνονται σε ένα είδος-ειδικό τμήμα του πρώτου αντισώματος. Αυτό είναι γνωστό ως δευτερο αντίσωμα, και λόγω των ιδιοτήτων του στόχευση, τείνει να αναφέρεται ως «αντι-ποντίκι, "αντι-αίγας," κλπ. Τα αντισώματα προέρχονται από ζωικές πηγές (ή ζωικής προέλευσης [hybridoma](#) υβριδικές καλλιέργειες). Ένα αντι-ποντίκι δευτερο αντίσωμα θα συνδεθεί με σχεδόν κάθε πρώτο αντίσωμα προέλευσης ποντικίου.

Αυτό επιτρέπει κάποια μείωση του κόστους, επιτρέποντας ένα ολόκληρο εργαστήριο να μοιράζονται μια ενιαία πηγή μαζικής παραγωγής αντισωμάτων, και παρέχει πολύ πιο συνεπή αποτελέσματα. Το δευτερο αντίσωμα συνδέεται συνήθως με βιοτίνη [biotin](#) (βιταμίνη H ή B7) ή σε ένα ένζυμο αναφοράς όπως η αλκαλική φωσφατάση [alkaline phosphatase](#) (ένα υδρολάσης ένζυμο που ευθύνεται για την άρση των φωσφορικών ομάδων από πολλούς τύπους μορίων), ή την υπεροξειδάση αγριοραπανιού [horseradish peroxidase](#) (Αυτή παράγει ένα χρώμα, φθορισμομετρικό η ένα παράγωγο φωταύγειας του επισημασμένου μορίου του αντισώματος επιτρέποντας του να ανιχνεύεται και να προσδιορίζεται ποσοτικά). Αυτό σημαίνει ότι πολλά δεύτερα αντισώματα μπορεί να συνδέονται σε ένα πρώτο αντίσωμα και να ενισχύεται το σήμα.

Συνήθως, μια υπεροξειδάση αγριοραπανιού [horseradish peroxidase](#)-συνδεδεμένη δευτεροταγώς χρησιμοποιείται για να διασπασεί ένα παράγοντα χημειοφωταύγειας [luminescence](#), και το προϊόν αντίδρασης παράγει φωτεινότητα ανάλογα με το ποσό των πρωτεϊνών. Ένα λεπτό φύλλο του φωτογραφικού φιλμ τοποθετείται στη μεμβράνη, και η έκθεση στο φως από την αντίδραση δημιουργεί μια εικόνα των αντισωμάτων που συνδέεται με το blot (Σχήμα 9).

Μια φθηνότερη, αλλά λιγότερο ευαίσθητη μέθοδο χρησιμοποιεί μια χρώση με 1% [hydrogen peroxide](#) υπεροξειδίου του υδρογόνου. Η Αντίδραση των ριζών υπεροξειδίου με το 4-chloronaphthol παράγει μια σκούρο καφέ κηλίδα που μπορεί να φωτογραφηθεί χωρίς να χρησιμοποιηθεί εξειδικευμένο φωτογραφικό φιλμ. (Σχήμα 6).

Αφού όλοι οι μη προσδεδεμένοι ανιχνευτές (probes) πλένονται, το western blot είναι έτοιμο για την ανίχνευση των ανιχνευτών (probes) που είναι επισημασμένοι και συνδέονται με την πρωτεΐνη που μας ενδιαφέρει. Σε πρακτικό επίπεδο, δεν είναι όλα τα γουέστερν που αποκαλύπτουν μια πρωτεΐνη μόνο σε μία ζώνη σε μια μεμβράνη. Οι προσεγγίσεις σε μέγεθος λαμβάνονται από τη σύγκριση των χρωματιζόντων ζώνων με εκείνη του δείκτη (marker) ή την σκάλα (ladder) που φορτώνονται κατά την ηλεκτροφόρηση

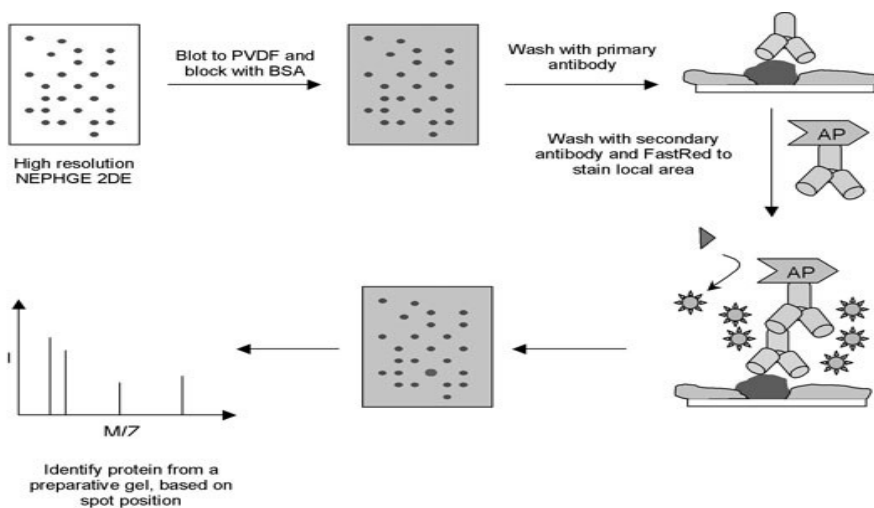
Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται για μια δομική πρωτεΐνη, όπως η ακτίνη ή τουμπουλίνη, ότι δεν θα πρέπει να αλλάξει μεταξύ των δειγμάτων. Το ποσό της πρωτεΐνης-στόχου προκύπτει σε συνάρτηση με τις διαρθρωτικές πρωτεΐνες για τον έλεγχο μεταξύ των ομάδων. Η χρωματομετρική μέθοδος ανίχνευσης εξαρτάται από την επώαση των western blot με ένα υπόστρωμα που αντιδρά με το ένζυμο ανιχνευτή (όπως της υπεροξειδάσης [peroxidase](#)) που συνδέεται με το δευτερο αντίσωμα. Αυτό μετατρέπει το διαλυτό βαφής σε αδιάλυτη μορφή διαφορετικού χρώματος που κατακρημνίζεται μαζί με το ένζυμο και ως εκ τούτου βάφει την μεμβράνη. Ανάπτυξη του blot διακόπτεται και πλένεται μακριά το διαλυτό της βαφής. Τα επίπεδα

πρωτεϊνών αξιολογούνται μέσω της πυκνότητας (πόσο έντονη είναι η βαφή) ή με φασματομετρία [spectrophotometry](#).

Χημειοφωταύγειας μέθοδοι ανίχνευσης εξαρτάται από την επώαση των western blot με ένα υπόστρωμα που θα luminescence όταν εκτίθεται στον ανιχνευτή στο δεύτερο αντίσωμα. Το φως ανιχνεύεται στο φωτογραφικό φιλμ, και πιο πρόσφατα από CCD κάμερα που συλλαμβάνει μια ψηφιακή εικόνα του western blot. Η εικόνα αναλύεται από πυκνότητας, η οποία αξιολογεί το σχετικό ποσό των πρωτεϊνών και ποσοτικοποιεί τα αποτελέσματα όσον αφορά την οπτική πυκνότητα. Νεότερο λογισμικό επιτρέπει την περαιτέρω ανάλυση των δεδομένων, όπως η μοριακή ανάλυση βάρους αν χρησιμοποιηθούν κατάλληλα πρότυπα.

Τα φθορίζοντα επισημασμένα probe είναι διεγερμένα με το φως και η εκπομπή αυτής της διεγερσης εντοπίζεται στη συνέχεια από ένα φωτοαισθητήρα, όπως η φωτογραφική μηχανή CCD που είναι εξοπλισμένη με κατάλληλα φίλτρα εκπομπών που συλλαμβάνει μια ψηφιακή εικόνα του western blot και επιτρέπει την περαιτέρω ανάλυση των δεδομένων, όπως η μοριακή ανάλυση βάρους και η ποσοτική ανάλυση του western blot. Ο Φθορισμός θεωρείται ότι είναι μεταξύ των πιο ευαίσθητων μεθόδων ανίχνευσης για blotting ανάλυση

Κατά την ενζυμική μέθοδο χρησιμοποιούνται κυρίως ως ένζυμα είτε η αλκαλική φωσφατάση (AP) είτε η υπεροξειδάση του αγριораπανιού (horseradish peroxydase). Τα ένζυμα αυτά είναι συνήθως προσδεμένα στο δεύτερο αντίσωμα και ανάλογα με το υπόστρωμα καταλύουν μία αντίδραση που παράγει χρώμα ή φως (σχήμα10).



Σχήμα 10

ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ

- Σχεδιάστε ένα πείραμα όπου με τη μέθοδο Southern μπορείτε να διαχωρίσετε ένα ομοζυγώτη από ένα ετεροζυγώτη.
- Γιατί χρησιμοποιείται το SDS κατά την ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών;
- Γιατί κατά την ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών χρησιμοποιούνται δύο ειδών πηκτώματα; Ποιά είναι η λειτουργία τους;
- Με ποιους τρόπους ανιχνεύονται ειδικά οι πρωτεΐνες πάνω στις μεμβράνες νιτροκυτταρίνης;

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ 6^ο

ΚΑΡΥΟΤΥΠΟΣ

Καρυότυπος είναι η χρωμοσωμική σύσταση ενός ατόμου δηλαδή ο αριθμός χρωμοσωμάτων, η σύνθεση φυλετικών χρωμοσωμάτων και οποιαδήποτε ανωμαλία στη μορφολογία των χρωμοσωμάτων. Ο όρος χρησιμοποιείται συχνά και για την απεικόνιση των χρωμοσωμάτων σε ζεύγη και ομάδες.

Το αρχικό υλικό μπορεί να είναι οποιοσδήποτε ιστός, όπως μυελός των οστών, αμνιακό υγρό ή χοριακές λάχνες, αλλά τα χρωμοσώματα του ανθρώπου μελετώνται καλύτερα στα λεμφοκύτταρα του περιφερικού αίματος.

Η διαδικασία που περιγράφεται παρακάτω αφορά την επεξεργασία σε δείγματα αίματος η οποία πρέπει να γίνεται σύντομα μετά τη λήψη του.

Στο αίμα το οποίο προορίζεται για κυτταροκαλλιέργεια προστίθεται φυτοαιμαγλουτίνη, για πρόκληση κυτταρικής διαίρεσης.

Έπειτα από 48-72 ώρες διακόπτεται η επώαση και προστίθεται κολχικίνη, έτσι ώστε να μη σχηματισθεί η μιτωτική άτρακτος. Στη συνέχεια προκαλείται διόγκωση των κυττάρων με προσθήκη υπότονου διαλύματος και τα χρωμοσώματα διαχωρίζονται.

Μετά τη χρώση, σταγόνες από το χρωματισμένο εναιώρημα τοποθετούνται σε αντικειμενοφόρες πλάκες. Τα χρωμοσώματα απλώνονται πάνω στην πλάκα και είναι έτοιμα για παρατήρηση.

Διαφορετικές χρωστικές μπορούν να χρησιμοποιηθούν, όμως η πιο συνηθισμένη είναι η χρωστική Giemsa, η οποία αλληλεπιδρώντας με τις φωσφορικές ομάδες του DNA έχει την ιδιότητα να χρωματίζει τα χρωμοσώματα, δημιουργώντας εναλλάξ φωτεινές και σκοτεινές ζώνες (ζώνες G), οι οποίες είναι χαρακτηριστικές για κάθε χρωμόσωμα.

Οι σκοτεινές ζώνες είναι πλούσιες σε Αδενίνη και Θυμίνη και περιέχουν σχετικά λίγα ενεργοποιημένα γονίδια.

Μία άλλη φθορίζουσα χρωστική η οποία επίσης χρησιμοποιείται είναι η Quinacrine η οποία συνδέεται με τις περιοχές του DNA οι οποίες είναι πλούσιες σε Αδενίνη και Θυμίνη.

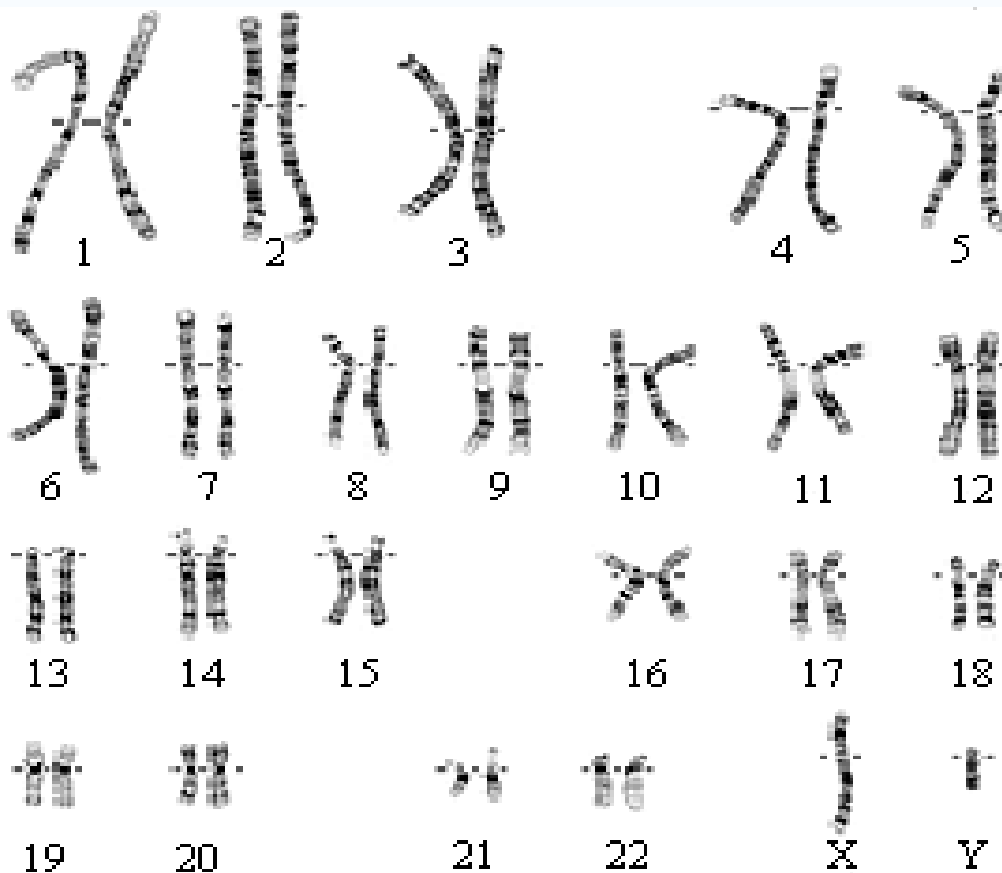
Στον καρυότυπο τα χρωμοσώματα απεικονίζονται με τον μικρό βραχίονα (p) προς τα επάνω και τον μεγάλο (q) προς τα κάτω. Επιπλέον κάθε περιοχή χαρακτηρίζεται αριθμητικά.

Με τον καρυότυπο μπορούμε να δούμε:

1. Διαφορές στο μέγεθος των χρωμοσωμάτων
2. Διαφορές στο αριθμό των ζωνών και το είδος των χαρακτηριστικών ζωνών
3. Διαφορές στη θέση του κεντρομεριδίου, το οποίο παρατηρείται κυρίως στις μεταθέσεις
4. Διαφορές στον αριθμό των χρωμοσωμάτων
5. Διαφορές στον αριθμό και στη θέση των επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών του DNA.

Παραδείγματα χρωμοσωμικών ανωμαλιών που μπορούν να ανιχνευθούν με καρύτυπο.

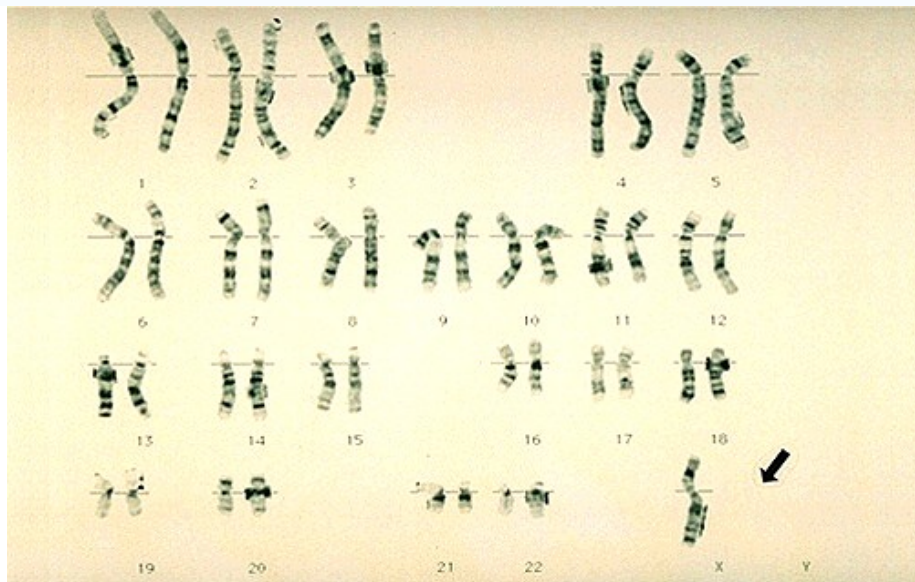
- Σύνδρομο [Turner](#): παρουσία ενός X χρωμοσώματος.
- Σύνδρομο Klinefelter : παρουσία ενός επιπλέον X χρωμοσώματος
- Σύνδρομο [Down](#): παρουσία τριών χρωμοσωμάτων 21.
- [Cri du chat](#) : έλλειψη στο χρωμόσωμα 5.
- Σύνδρομο [Angelman syndrome](#): έλλειψη στον μεγάλο βραχίονα του χρωμοσώματος 15.
- Χρωμόσωμα Φιλαδέλφεια: αμοιβαία χρωμοσωμική μετάθεση μεταξύ των χρωμοσωμάτων 9 και 22



Φυσιολογικός καρύτυπος άνδρα



Καρυότυπος ατόμου με σύνδρομο Down



Καρυότυπος ατόμου με σύνδρομο Turner

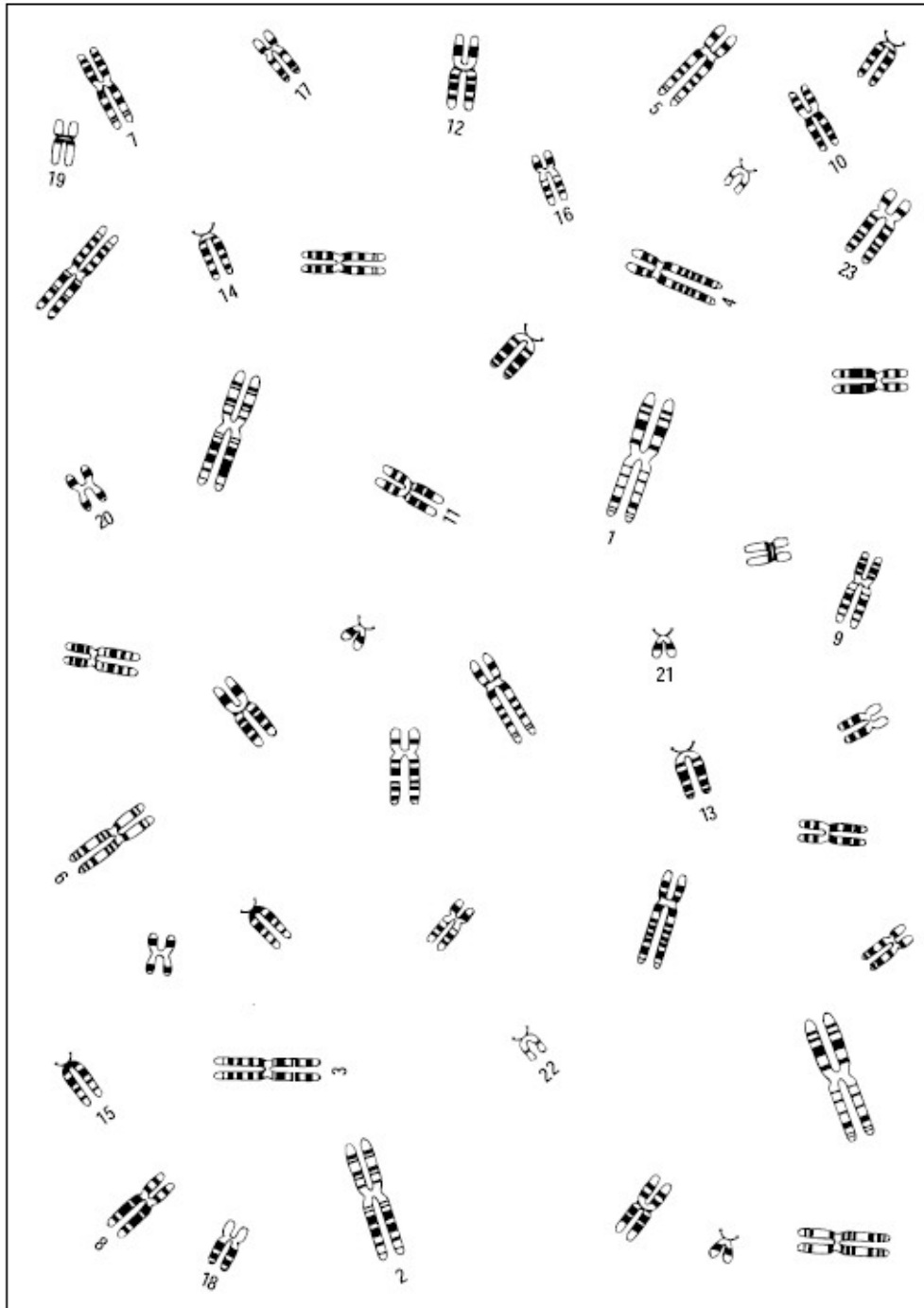
ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ

1. Τι είναι καρυότυπος;
2. Ποιο είδος κυττάρων-ιστού είναι το προτιμότερο για μελέτη του καρυοτύπου;
3. α. Με ποια ομάδα αλληλεπιδρά η χρωστική Giemsa όταν βάφει τα χρωμοσώματα; β. Τι κάνει η κολχικίνη;
4. Σε αλλαγές ποιού χρωμοσώματος κυρίως οφείλεται το σύνδρομο Down;

Άσκηση για το τετράδιο

Με ψαλίδι κόβετε τα χρωμοσώματα από την figure 2. και τα κολλάτε στην κατάλληλη θέση στην figure 3. Επισημάνετε αν υπάρχουν χρωμοσωμικές ανωμαλίες.


Name _____ Class _____ Date _____



© Prentice-Hall, Inc.

Figure 2

Name _____ Class _____ Date _____

-  4. Use scissors to cut out all the chromosomes from Figure 2. Tape them in their appropriate places in Figure 3. Note any chromosomal abnormalities. **CAUTION: Be careful when handling sharp instruments.**

1	2	3		4	5	
6	7	8	9	10	11	12
13	14	15	16	17	18	
19	20		21	22	23	

© Prentice-Hall, Inc.

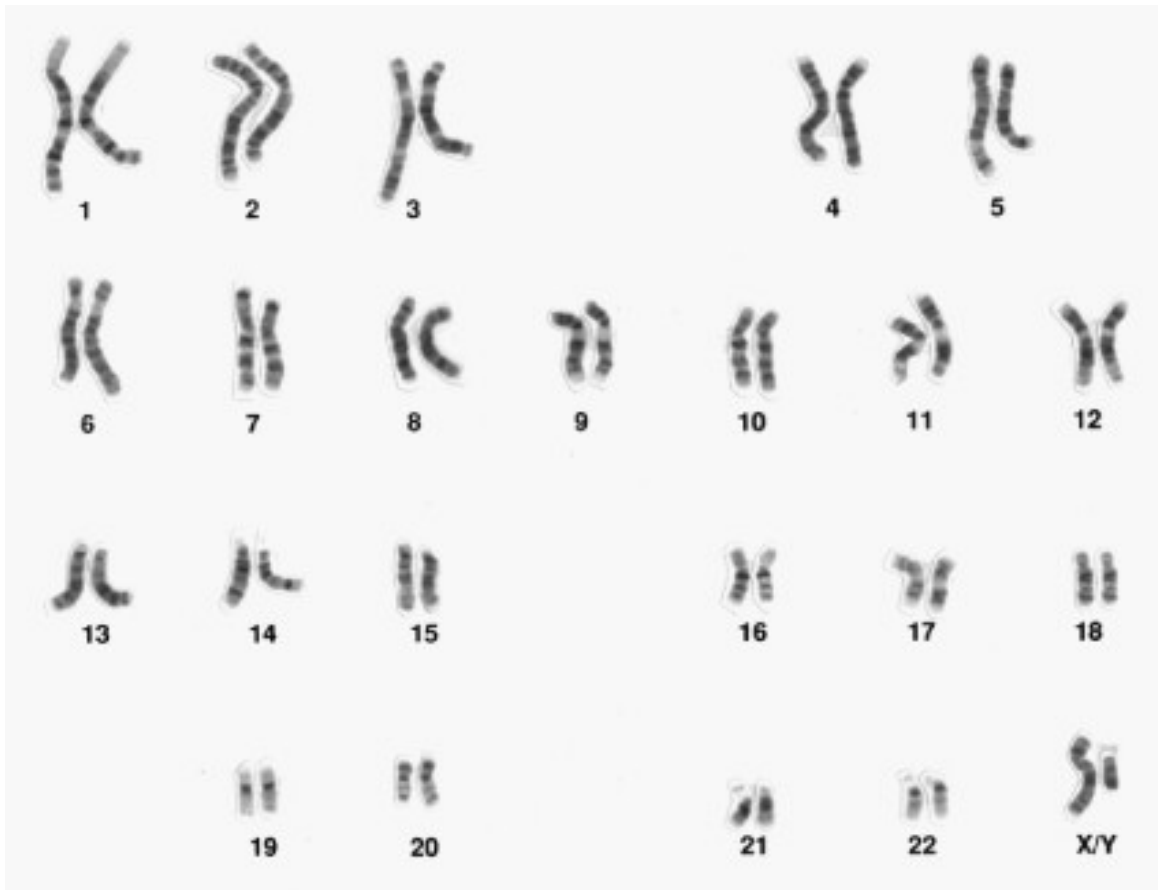
Figure 3

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ 7ο

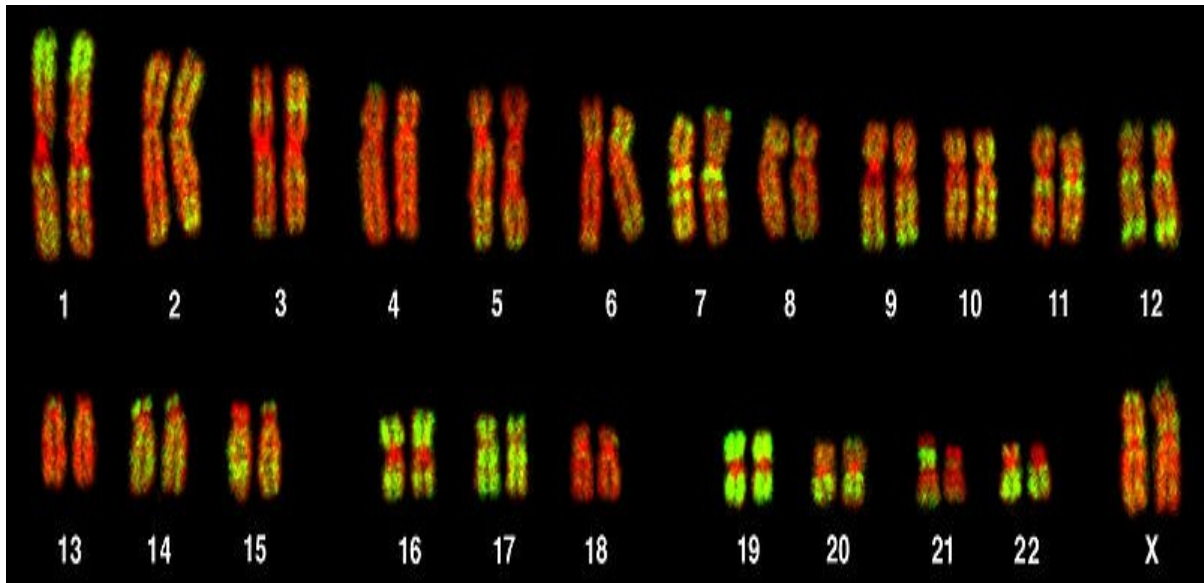
ΥΒΡΙΔΟΠΟΙΗΣΗ ΦΘΟΡΙΣΜΟΥ IN SITU (FISH)

Η Υβριδοποίηση Φθορισμού in situ (FISH) είναι μια εργαστηριακή τεχνική για την ανίχνευση και τον εντοπισμό μιας συγκεκριμένης ακολουθίας DNA σε ένα χρωμόσωμα. Η τεχνική βασίζεται στην έκθεση των χρωμοσωμάτων σε μια μικρή αλληλουχία DNA που ονομάζεται καθετήρας (probe), και ένα φθορίζον μόριο επισυνάπτεται σε αυτήν. Η αλληλουχία του καθετήρα (probe) συνδέεται με την αντίστοιχη αλληλουχία του DNA στο χρωμόσωμα.

Καρυόγραμμα από άρρεν χρησιμοποιώντας βαφή [Giemsa](#)

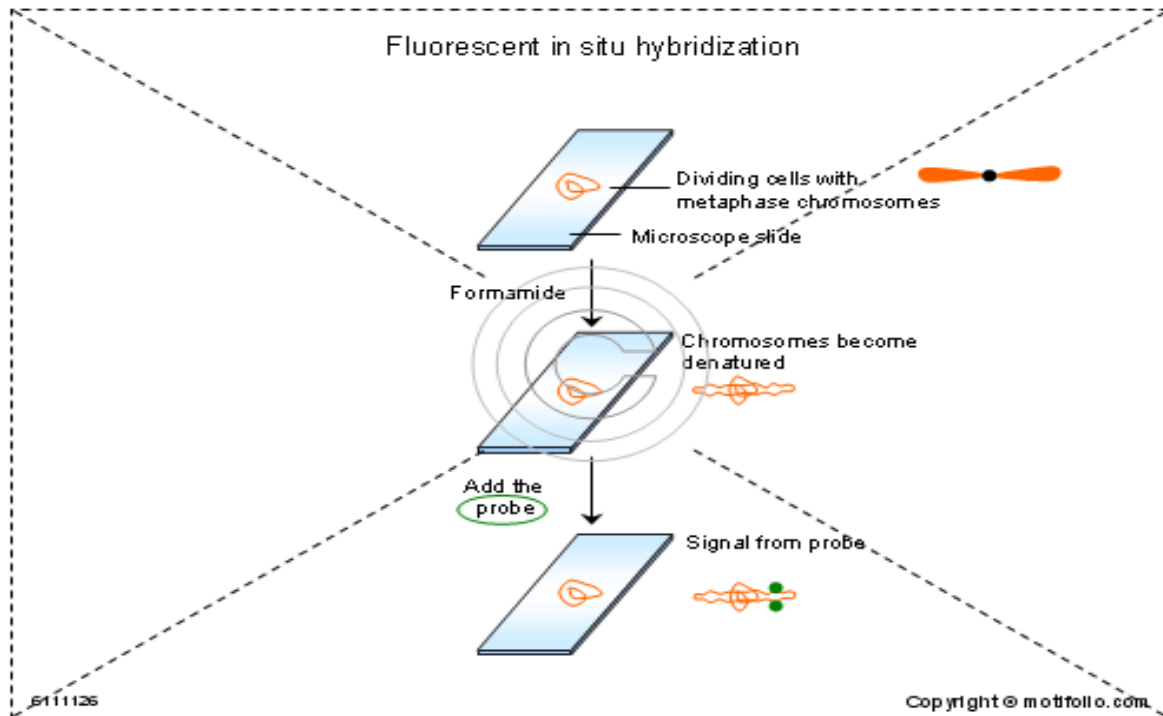


Καρυόγραμμα από λεμφοκύτταρα θήλεος επισημασμένα για την Alu αλληλουχία χρησιμοποιώντας FISH



Μεθοδολογία του FISH

1. Μια χημική ουσία που φθορίζει συνδέεται με μια συγκεκριμένη ακολουθία DNA που θα χρησιμοποιηθεί ως ανιχνευτής (probe).
2. Όταν αυτοί οι ανιχνευτές (probes) αναμειγνύονται με τα χρωμοσώματα από ένα ανθρώπινο κύτταρο, οι ανιχνευτές (probes) υβριδοποιούνται, ή συνδέονται με το DNA στα χρωμοσώματα.
3. Ο σημασμένος ανιχνευτής DNA που είναι συνδεδεμένος με το χρωμόσωμα φθορίζει όταν τα χρωμοσώματα εκτίθενται σε υπεριώδες φως, δηλώνοντας την παρουσία και τη θέση του ανιχνευτή-δεσμευμένου στην αλληλουχία του DNA.
4. Όταν χρησιμοποιούνται locus-δεσμευμένοι ανιχνευτές εάν μπορέσουμε να δούμε φθορισμό στον ανιχνευτή, τότε το γονίδιο είναι παρόν. Αν όχι, το γονίδιο έχει διαγραφεί.
5. Όταν χρησιμοποιούνται ανιχνευτές (probes) για ολόκληρο το χρωμόσωμα μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε ένα λογισμικό ηλεκτρονικών υπολογιστών για την ανάλυση χρωμοσωμάτων και να δημιουργήσουμε ένα καρυότυπο.



Πλεονεκτήματα χρησιμοποίησης της μεθόδου FISH

- Είναι σε θέση να εξετάσουμε τα γονιδιώματα μεμονωμένων κυττάρων.
- Έχει τη δυνατότητα να εξετάσει τα γονίδια στα κύτταρα, τόσο στη μεσόφαση και στη μετάφαση.
- Ως εκ τούτου, είναι ταχύτερη και δεν απαιτεί ενεργά διαιρούμενα κύτταρα.
- Έχει διαπιστωθεί ότι έχει μεγαλύτερη ευαισθησία από ότι κυτταρογενετικές εξετάσεις ρουτίνας.
- Μπορεί να είναι αυτοματοποιημένη, χρησιμοποιώντας ένα πρόγραμμα λογισμικού ηλεκτρονικών υπολογιστών, για την μέτρηση των κουκίδων φθορισμού / χρωμοσώματα.

Τι είδους ανιχνευτές χρησιμοποιούνται και γιατί χρησιμοποιούνται;

- **Ανιχνευτές ολόκληρου χρωμοσώματος**

Είναι πραγματικά συλλογές από μικρότερους ανιχνευτές καθένας από τους οποίους υβριδοποιείται (hybridizes) σε μια διαφορετική σειρά κατά μήκος του ίδιου χρωμοσώματος. Χρησιμοποιώντας αυτές τις βιβλιοθήκες των ανιχνευτών, οι επιστήμονες είναι σε θέση να ζωγραφίσουν ένα ολόκληρο χρωμόσωμα και να δημιουργήσουν ένα φασματικό καρυότυπο.

Αυτή η εικόνα σε πλήρες χρώμα των χρωμοσωμάτων επιτρέπει στους επιστήμονες να γίνει διάκριση μεταξύ των χρωμοσωμάτων που βασίζονται στο χρώμα τους, αντί να βασίζονται στο σκοτάδι και το φως banding πρότυπα τους, εμφανίσεις σε μαύρο και άσπρο μέσω των παραδοσιακών karyotyping. Ολόκληροι ανιχνευτές χρωμοσωμάτων

είναι ιδιαίτερα χρήσιμοι για την εξέταση χρωμοσωμικών ανωμαλιών, για παράδειγμα, όταν ένα κομμάτι από ένα χρωμόσωμα επισυνάπτεται στο τέλος του άλλου χρωμόσωμα.

- **Alphoid ή centromeric επαναλαμβανόμενοι ανιχνευτές:**

Παράγονται από επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες που βρέθηκαν στα κεντρομερή των χρωμοσωμάτων. Επειδή κάθε χρωμόσωμα μπορεί να είναι βαμμένο σε διαφορετικό χρώμα, οι ερευνητές χρησιμοποιούν αυτήν την τεχνική για να προσδιοριστεί αν ένα άτομο έχει το σωστό αριθμό των χρωμοσωμάτων ή, για παράδειγμα, εάν ένα άτομο έχει ένα επιπλέον αντίγραφο του χρωμοσώματος

- **Locus ειδικοί ανιχνευτές**

Υβριδοποιούν (hybridize) μια συγκεκριμένη περιοχή του χρωμοσώματος. Αυτός ο τύπος του ανιχνευτή είναι χρήσιμος όταν οι επιστήμονες έχουν να απομονώσουν ένα μικρό μέρος ενός γονιδίου και επιθυμούν να καθορίσουν σε ποιο χρωμόσωμα βρίσκεται το γονίδιο. Προετοιμάζουν έναν ανιχνευτή από το κομμάτι του γονιδίου και παρατηρούν σε ποιο χρωμόσωμα υβριδοποιείται ο ανιχνευτής.

Πειράματα που μπορούν να πραγματοποιούνται με FISH

Η τεχνική FISH έχει μια ποικιλία εφαρμογών. Η FISH μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη διάγνωση διαφόρων ασθενειών που έχουν χρωμοσωμικές ανωμαλίες, όπως:

- Ελλείψεις σε γονίδια όπως το σύνδρομο Prader-Willi και στεροειδές σουλφατάση Ανεπάρκεια.
- Μετατοπίσεις, όπως η Χρόνια Μυελογενή Λευχαιμία (ΧΜΛ) και οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία (ΟΛΛ).
- Ανευπλοειδίες όπως το σύνδρομο Down

Η τεχνική FISH μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για :

- Εντοπισμός ειδών
- Η σύγκριση των γονιδιωμάτων για να συγκρίνει την εξελικτική σχέση μεταξύ των δύο ειδών
- Η τη σύγκριση διαφορετικών βακτηρίων πώς αλληλεπιδρούν σε ένα περιβάλλον, όπως biofilm.

Ολιγονουκλεοτιδικοί Ανιχνευτές

Oligonucleotide probes. Οι ακόλουθες rRNA-στόχο oligonucleotide ανιχνευτές χρησιμοποιήθηκαν για FISH:

- (i) EUB 338 (5'-GCTGCCTCCCGTAGGAGT-3'), η οποία είναι συμπληρωματική σε μια διατηρημένη περιοχή των περισσότερων βακτηριακών 16S rRNA μορίων
- (ii) NEU (5 «-CCCCTCTGCTGCACTCTA-3'), η οποία είναι συμπληρωματική προς μια περιοχή η υπογραφή του 16S rRNA
- (iii) CTE (5'-TTCCATCCCCCTCTGCCG-3'), η οποία χρησιμοποιήθηκε ως unlabeled ανιχνευτής oligonucleotide ανταγωνιστή να εξασφαλίσει ειδική υβριδοποίηση του ανιχνευτή NEU
- (iv) BET42a (5'-GCCTTCCCACTTCGTTT-3') και GAM42a (5'-GCCTTCCACATCGTTT-3'), που έχουν ως στόχο 23S rRNA περιοχές

ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ

1. Τι σημαίνουν τα αρχικά FISH;
2. Πως δουλεύει η τεχνική του FISH;
3. Ποια πειράματα πραγματοποιούνται με την τεχνική FISH;
4. Τι κάνουν οι Locus ειδικοί ανιχνευτές;

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ 8ο-9ο

ΑΣΚΗΣΕΙΣ ΣΥΝΤΑΞΗΣ ΓΕΝΕΑΛΟΓΙΚΩΝ ΔΕΝΔΡΩΝ

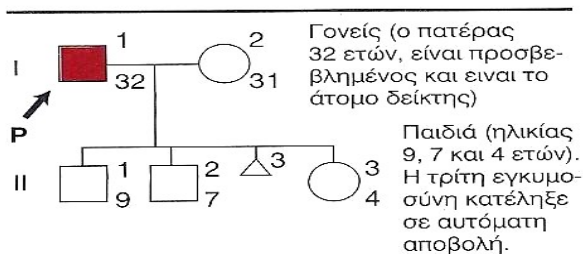
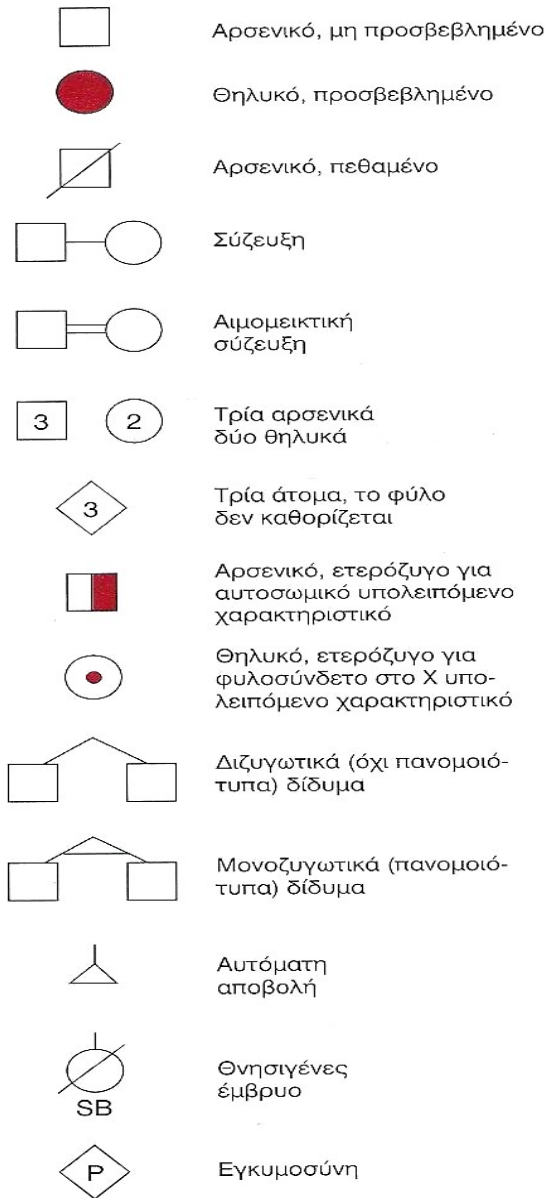
Συμβολισμός γονιδίων (Σχήμα 1)

- **Αυτοσωμικά γονίδια:** συμβολίζονται με κεφαλαία και μικρά γράμματα του ελληνικού αλφαβήτου, εκτός και αν το πρόβλημα δίνει συγκεκριμένο συμβολισμό για τα γονίδια.
- **Επικρατή γονίδια:** συμβολίζονται με **ΚΕΦΑΛΑΙΑ** γράμματα του ελληνικού αλφαβήτου
- **Υπολειπόμενα γονίδια:** : συμβολίζονται με **ΜΙΚΡΑ** γράμματα του ελληνικού αλφαβήτου
- **Συνεπικρατή γονίδια:** συμβολίζονται με **ΚΕΦΑΛΑΙΑ** γράμματα του ελληνικού αλφαβήτου και δείκτες π.χ **A1, A2, B1** και **B2**
- **Φυλοσύνδετα γονίδια:** βρίσκονται στο X χρωμόσωμα και θα συμβολίζονται **XA** και **Xa**
- **Ατελώς φυλοσύνδετα γονίδια:** τηρείται ο συμβολισμός **XA -YA**
- **Πολλαπλά αλληλόμορφα:** (ομάδες αίματος) **IA, IB, i** με σχέση **IA = IB > i**

Το γενεαλογικό δένδρο είναι η απεικόνιση των μελών μιας οικογένειας σχετικά με κάποιο κληρονομικό γνώρισμα, με βάση το φύλλο τους. Για την κατάρτιση του γενεαλογικού δένδρου τηρούνται τα παρακάτω σύμβολα.

- Όταν μελετάμε τον τρόπο με τον οποίο κληρονομείται ένα γνώρισμα με τη βοήθεια του γενεαλογικού δένδρου προσπαθούμε να βρούμε την κατηγορία στην οποία ανήκει το γονίδιο με την ακόλουθη σειρά:
 1. **Ολανδρικό:** Το γνώρισμα υπάρχει και κληρονομείται μόνο στα αρσενικά άτομα και ποτέ στα θηλυκά
 2. **Φυλοπεριορισμένο:** Εκδηλώνεται μόνο σε ένα από τα δύο φύλα
 3. **Φυλοεπηρεαζόμενο:** Το γονίδιο εμφανίζεται στα αρσενικά άτομα ως επικρατές και στα θηλυκά ως υπολειπόμενο.
 4. **Φυλοσύνδετο επικρατές:** Το γνώρισμα εμφανίζεται συχνότερα στις γυναίκες.
 - Φυσιολογική μητέρα με πατέρα φορέα του γνωρίσματος, το γνώρισμα εμφανίζεται μόνο στις κόρες, ενώ τα αγόρια είναι φυσιολογικά
 - Η ετερόζυγη μητέρα μεταβιβάζει το γνώρισμα στα μισά παιδιά της
 - Τα ετερόζυγα θηλυκά εμφανίζουν το γνώρισμα
 5. **Φυλοσύνδετο Υπολειπόμενο:** Το γνώρισμα εμφανίζεται συχνότερα στους άνδρες
 - Φυσιολογική μητέρα με φυσιολογικό πατέρα, το γνώρισμα μπορεί να εμφανιστεί μόνο στα αγόρια
 - Το γνώρισμα πολύ σπάνια εμφανίζεται στο αγόρι και στο πατέρα συνήθως παρατηρείται σε εναλλασσόμενες γενεές
 - Το γνώρισμα δεν κληρονομείται ποτέ από τον πατέρα στο αγόρι
 6. **Ατελώς Φυλοσύνδετο:** Τα γονίδια αυτά κληρονομούνται όπως και τα αυτοσωματικά
 7. **Αυτοσωμικό Επικρατές:** Το γνώρισμα εμφανίζεται σε ίση περίπου αναλογία στα θηλυκά και αρσενικά άτομα και είναι ικανά να το μεταβιβάσουν στους απογόνους τους, εφόσον δεν προκαλεί στείριότητα.

- Κάθε άτομο που εκδηλώνει το γνώρισμα πρέπει να έχει ένα τουλάχιστον γονέα που το φέρει
- Τα ετερόζυγα άτομα εμφανίζουν το γνώρισμα
- Σε γάμους Αα Χ αα το γνώρισμα μεταβιβάζεται στους μισούς απογόνους



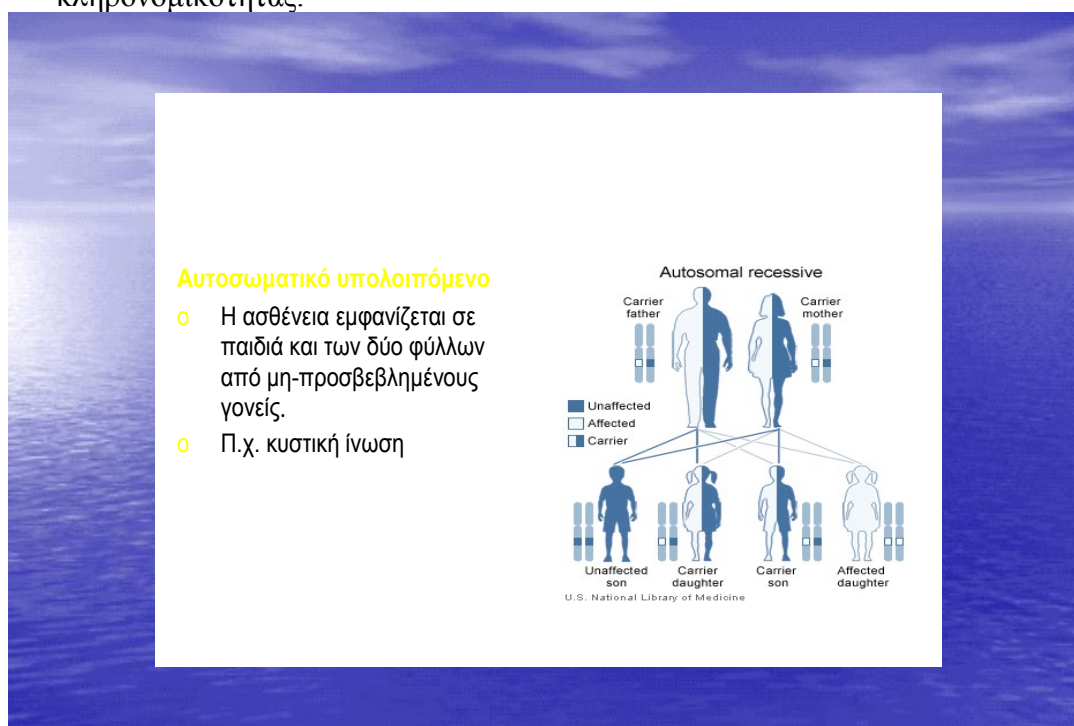
Σχήμα 1.

8. Αυτοσωμικό Υπολειπόμενο: Το γνώρισμα εμφανίζεται σε ίση περίπτωση αναλογία στα θηλυκά και αρσενικά άτομα και είναι ικανά να το μεταβιβάσουν στους απογόνους τους, εφόσον δεν προκαλεί στειρότητα.

- Τα περισσότερα από τα γονίδια αυτά είναι σπάνια, διότι τα ομόζυγα άτομα συνήθως δεν επιβιώνουν ή δεν είναι γόνιμα
- Μόνο τα ομόζυγα εμφανίζουν το γνώρισμα, τα ετερόζυγα είναι φορείς
- Τα παιδιά με το γνώρισμα συνήθως γεννιούνται από γονείς που δεν το εμφανίζουν και ανήκουν συνήθως στην ίδια γενιά

Αυτοσωματική υπολειπόμενη κληρονομικότητα

- Οι αυτοσωματικές υπολειπόμενες παθήσεις παρατηρούνται μόνο στα ομόζυγα άτομα τα οποία έχουν κληρονομήσει ένα παθολογικό υπολειπόμενο γονίδιο από τον κάθε γονιό. Όταν οι δύο γονιοί είναι ετερόζυγοι με φυσιολογικό φαινότυπο, ονομάζονται **φορείς**, γιατί φέρουν το παθολογικό γονίδιο (**στίγμα**) και μπορούν να το μεταβιβάσουν στους απογόνους. Βέβαια η πιθανότητα και οι δύο γονείς να είναι φορείς μιας κληρονομικής υπολειπόμενης πάθησης είναι μικρή, αυξάνεται όμως στις περιπτώσεις που οι δύο σύζυγοι είναι στενοί συγγενείς ή αυτοί προέρχονται από περιοχές γεωγραφικά και, επομένως, γενετικά απομονωμένες. Ο αλφισμός, η δρεπανοκυτταρική αναιμία και η β-θαλασσαιμία είναι μερικές από τις παθήσεις που κληρονομούνται με αυτοσωματικό υπολειπόμενο τύπο κληρονομικότητας.



Αυτοσωματική επικρατής κληρονομικότητα

- Πολλές από τις παθήσεις που έχουν μελετηθεί στον άνθρωπο ελέγχονται από επικρατή γονίδια. Τέτοιες παθήσεις, για παράδειγμα, είναι η **βραχυδακτυλία** (κοντά δάχτυλα), η **πολυδακτυλία** (παρουσία υπεράριθμου δακτύλου στα χέρια και τα πόδια), η **νόσος του Huntington** (προοδευτική εκφυλιστική νευροπάθεια) κ.ά. Η πιο κοινή όμως πάθηση του ανθρώπου που ανήκει στην κατηγορία αυτή

είναι η **υπερχοληστερολαιμία** με συχνότητα 1:500 άτομα. Τα άτομα με υπερχοληστερολαιμία έχουν αυξημένες συγκεντρώσεις χοληστερόλης στο αίμα με αποτέλεσμα να υπάρχει αυξημένος κίνδυνος πρώιμης εμφάνισης της στεφανιαίας νόσου (εμφράγματος του μυοκαρδίου).

Φυλοσύνδετη κληρονομικότητα

- Η **φυλοσύνδετη κληρονομικότητα** (ή αλλιώς **X-συνδεδεμένη κληρονομικότητα**) αναφέρεται σε γνωρίσματα που κληρονομούνται μόνο από τον ένα γονέα και συγκεκριμένα στα θηλαστικά από την μητέρα. Τα **γονίδια** που ελέγχουν τα συγκεκριμένα γνωρίσματα λέγονται *φυλοσύνδετα* και βρίσκονται στο φυλετικό **χρωμόσωμα "X"**. Η αιτία της φυλοσύνδετης κληρονομικότητας είναι ότι δεν υπάρχει αντίστοιχη ομόλογη περιοχή του **"X"** χρωμοσώματος στο **"Y"** χρωμόσωμα (Το Y χρωμόσωμα είναι μικρότερο), με συνέπεια το **"X"** χρωμόσωμα να καθορίζει αποκλειστικά την κληρονομικότητα αυτών των επιπλέον γονιδίων. Δηλαδή τα γονίδια αυτά δεν βρίσκονται σε ζεύγη σε έναν οργανισμό (όπως όλα τα υπόλοιπα γονίδια που ονομάζονται *αυτοσωμικά*) αλλά απαντούν μόνο τους. Υπάρχει και η αντίθετη περίπτωση, όπου κάποια γονίδια του **"Y"** χρωμοσώματος δεν υπάρχουν στο **"X"**. Αυτά λέγονται *ολανδρικά* γονίδια και κληρονομούνται μόνο από τον πατέρα. Για τα γονίδια που κληρονομούνται αποκλειστικά από τον ένα γονέα (τα *φυλοσύνδετα* ή τα *ολανδρικά*) λέμε ότι βρίσκονται σε ημιζυγωτία, ενώ τα γονίδια που κληρονομούνται και από τους δύο γονείς (τα *αυτοσωμικά*) λέμε ότι βρίσκονται σε ομοζυγωτία (αν έχουν μεταξύ τους τον ίδιο *αλληλόμορφο*) και σε ετεροζυγωτία (αν έχουν μεταξύ τους διαφορετικό *αλληλόμορφο*). Γνώστες περιπτώσεις φυλοσύνδετων γνωρισμάτων στον άνθρωπο είναι η *αχρωματοψία*, η *αιμοφιλία* και άλλα.

Αιμοφιλία

- Η **αιμοφιλία** είναι από τις πιο γνωστές *κληρονομικές παθήσεις* που προσβάλλει κυρίως τους άνδρες καθώς μεταδίδεται κληρονομικά από τη μητέρα. Η κληρονομική αυτή ασθένεια σχετίζεται με το *χρωμόσωμα X* και προκαλεί *θρομβώσεις* στο *αίμα* με αποτέλεσμα να μην υπάρχει αρκετή ποσότητα των παραγόντων που παίζουν πρωταρχικό ρόλο στο μηχανισμό *πήξεως του αίματος*. Η αντιμετώπιση της αιμοφιλίας γίνεται με *γονιδιακή θεραπεία*.

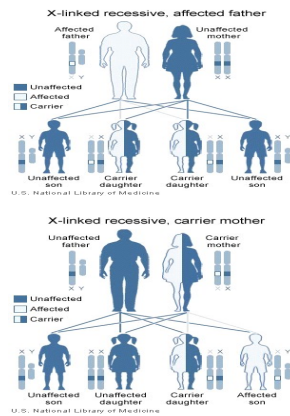
Αιτίες

Διαταραχές παραγόντων πήξης του αίματος:

- Η **Αιμοφιλία A** περιλαμβάνει μια έλλειψη λειτουργικής θρόμβωσης VIII. (Αυτό αντιπροσωπεύει το 90% των ατόμων που πάσχουν από αιμοφιλία).
- Η **Αιμοφιλία B** περιλαμβάνει μια έλλειψη λειτουργικής θρόμβωσης IX. *
- Η **Αιμοφιλία Γ** περιλαμβάνει μια έλλειψη λειτουργικής θρόμβωσης XI. *

Ο όρος Hypofibrinogenemia περιλαμβάνει μια έλλειψη λειτουργικής θρόμβωσης, παράγοντα I. Είναι σπάνια και απαντάται περίπου σε 1 ή 2 περιπτώσεις ανά εκατομμύριο του πληθυσμού. Έχει επιπτώσεις τόσο στους άνδρες όσο και στις γυναίκες. Το αίμα των πασχόντων από Hypofibrinogenemia ούτε απειλείται με θρόμβωση ούτε περιέχει τα ικανοποιητικά ποσά *ινωδογόνου*.

- Υπολειπόμενο συνδεδεμένο στο X
- Η διαταραχή εμφανίζεται πολύ περισσότερο στους άνδρες από ότι στις γυναίκες.
- Όλες οι κόρες ενός προσβεβλημένου πατέρα είναι φορείς.
- Κανένας από τους γιους ενός προσβεβλημένου πατέρα δεν ασθενούν ή είναι φορείς.
- Π.χ. αιμοφιλία



Πολλαπλά αλληλόμορφα γονίδια

Τα γονίδια μιας γενετικής θέσης που καθορίζουν ένα χαρακτήρα και είναι περισσότερα από δύο ονομάζονται **πολλαπλά αλληλόμορφα γονίδια**.

- Ομάδες αίματος

Στον άνθρωπο τα γονίδια που καθορίζουν τις ομάδες αίματος στο σύστημα ABO, που εξετάσαμε στο κυκλοφορικό σύστημα, είναι πολλαπλά αλληλόμορφα και είναι τρία: τα I^A , I^B και I^O .

Τα γονίδια I^A και I^B είναι **συνεπικρατή**, επειδή εκφράζονται και τα δύο στο φαινότυπο ενός ετερόζυγου ατόμου $I^A I^B$.

Το γονίδιο I^O είναι υπολειπόμενο ως προς τα γονίδια I^A και I^B .

Υπάρχουν τέσσερις πιθανοί φαινότυποι του χαρακτήρα ομάδα αίματος, οι A, B, AB και O. Οι γονότυποι της κάθε ομάδας δίδονται στον πίνακα 16.3

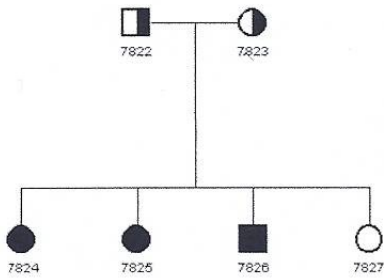
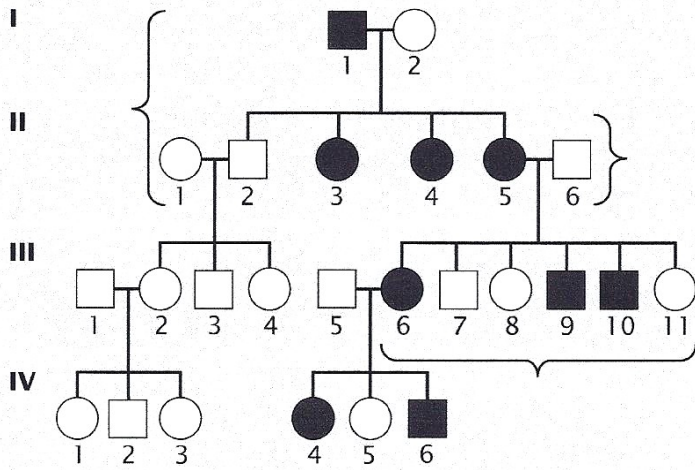
Φαινότυπος (Ομάδα αίματος)	Γονότυπος	Αντισώματα στο πλάσμα	Αποτελέσματα της ανάμιξης ερυθρών αιμοσφαιρίων των πιο κάτω ομάδων με το πλάσμα των ομάδων στην πρώτη στήλη.			
			A	B	AB	O
A	$I^A I^A$ ή $I^A I^O$	Αντι-B				
B	$I^B I^B$ ή $I^B I^O$	Αντι-A				
AB	$I^A I^B$	—				
O	$I^O I^O$	Αντι-A Αντι-B				

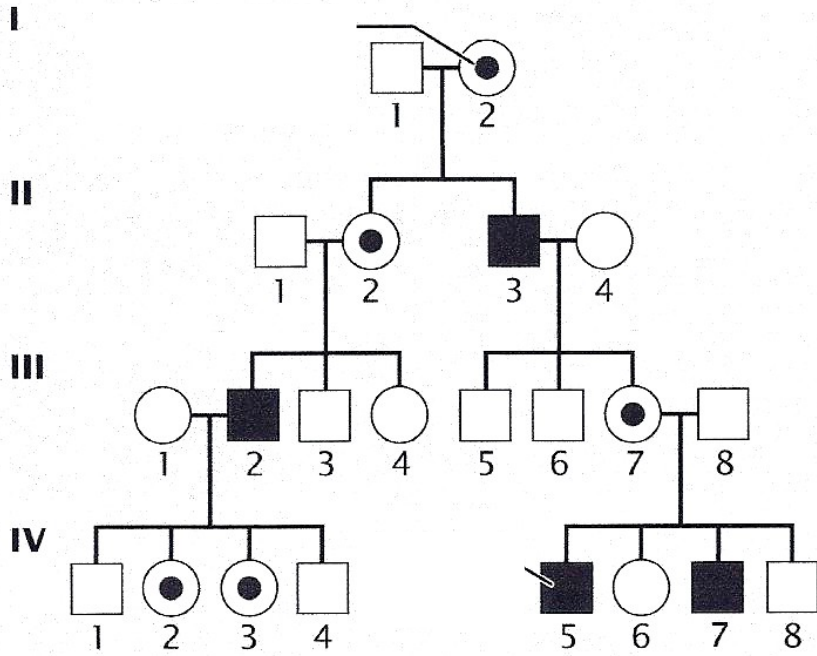
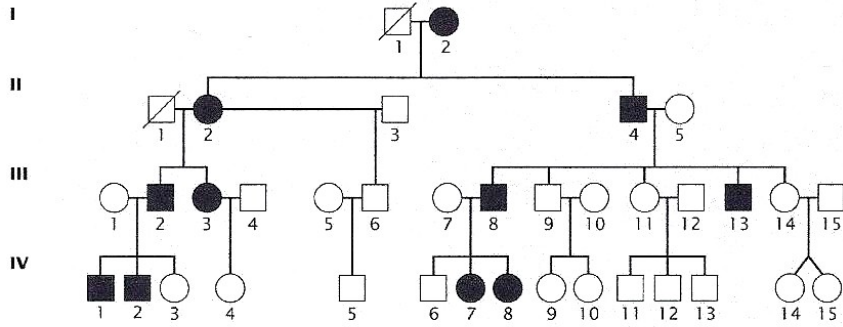
Συγκόλληση ερυθρών αιμοσφαιρίων
 Φυσιολογική κατάσταση ερυθρών αιμοσφαιρίων

Πίνακας 16.3 Πολλαπλά αλληλόμορφα γονίδια στο σύστημα ABO των ομάδων αίματος

Ερωτήσεις

1. Τι είναι το γενεαλογικό δένδρο;
2. Πώς εμφανίζεται το Φυλοσύνδετο επικρατές και το φυλοσύνδετο υπολειπόμενο γνώρισμα στους απογόνους;
3. Πώς εμφανίζονται οι αυτοσωματικές υπολειπόμενες παθήσεις; Ποιές αυτοσωματικές υπολειπόμενες παθήσεις γνωρίζετε;
4. Βρείτε το είδος των μεταλλάξεων και αναλείστε τους γονότυπους στα παρακάτω γενεαλογικά δένδρα.





ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ 10ο

ΚΥΣΤΙΚΗ ΪΝΩΣΗ – ΠΡΟΓΕΝΝΗΤΙΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ

ΤΙ ΕΙΝΑΙ Η ΚΥΣΤΙΚΗ ΪΝΩΣΗ (ΚΙΝ)

Η Κυστική Ϊνωση (ΚΙΝ) είναι μια ανίατη, ιδιαίτερα απειλητική για τη ζωή, γενετική, κληρονομική, μη μεταδοτική ασθένεια. Ένα ελαττωματικό γονίδιο προκαλεί το σώμα να παράγει μια αφύσικα παχιά, κολλώδη βλέννα που φράζει τους πνεύμονες και οδηγεί σε επικίνδυνες μολύνσεις των πνευμόνων. Αυτές οι παχιές εκκρίσεις επηρεάζουν επίσης το πάγκρεας, αποτρέποντας τα ένζυμα της πέψης να φθάσουν στα έντερα και να βοηθήσουν στη διάσπαση και απορρόφηση των τροφών. Η βλέννα μπορεί επίσης να εμποδίσει την έκκριση χολής στο συκώτι, προκαλώντας τελικά μόνιμη βλάβη του συκωτιού στο έξι τοις εκατό περίπου των ασθενών με Κυστική Ϊνωση. Είναι πολυσυστηματική νόσος δεδομένου ότι εμπλέκονται πολλά όργανα (πνεύμονες, πάγκρεας, συκώτι, οστά, αναπαραγωγικό σύστημα κ.ά.).

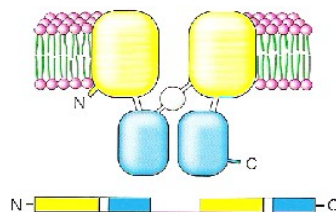
Η Κυστική Ϊνωση, θεωρείται ως η πιο διαδεδομένη κληρονομική νόσος της λευκής φυλής με μέση αναλογία φορέων ως προς το γενικό πληθυσμό περίπου 1/20 - 1/25. Ενδεικτικά αναφέρεται ότι στις ΗΠΑ επηρεάζει πάνω από 30.000 άτομα, στην Αγγλία πάνω από 7.500 άτομα, στη Γερμανία γύρω στα 8.000 άτομα, στον Καναδά γύρω στα 3.100 άτομα και διεθνώς στο σύνολο πάνω από 70.000 άτομα. Στην Ελλάδα εκτιμάται ότι το 5% περίπου των Ελλήνων, είναι ασυμπτωματικοί φορείς του ελαττωματικού γονιδίου ΚΙΝ και ότι οι γεννήσεις παιδιών με ΚΙΝ ανέρχονται στις 50-60 το χρόνο. Το γεγονός αυτό καθιστά την Κυστική Ϊνωση την βασική πλέον κληρονομική νόσο και στη χώρα μας, αφού λόγω των προγαμιαίων και προγενετικών ελέγχων για Μεσογειακή Αναιμία, της οποίας το ποσοστό φορέων εκτιμάται γύρω στο 8%, οι γεννήσεις παιδιών με μεσογειακή αναιμία έχουν περιοριστεί σημαντικά.

Κυστική ίνωση

(Αναστολή των εκκρίσεων του παγκρέατος και πυκνές βλέννες στους πνεύμονες)

Μετάλλαξη στον «διαμεμβρανικό ρυθμιστή της αγωγιμότητας κατά την κυστική ίνωση» (CFTR) =

ATP-εξαρτώμενος διάυλος Cl⁻ των επιθηλιακών κυττάρων

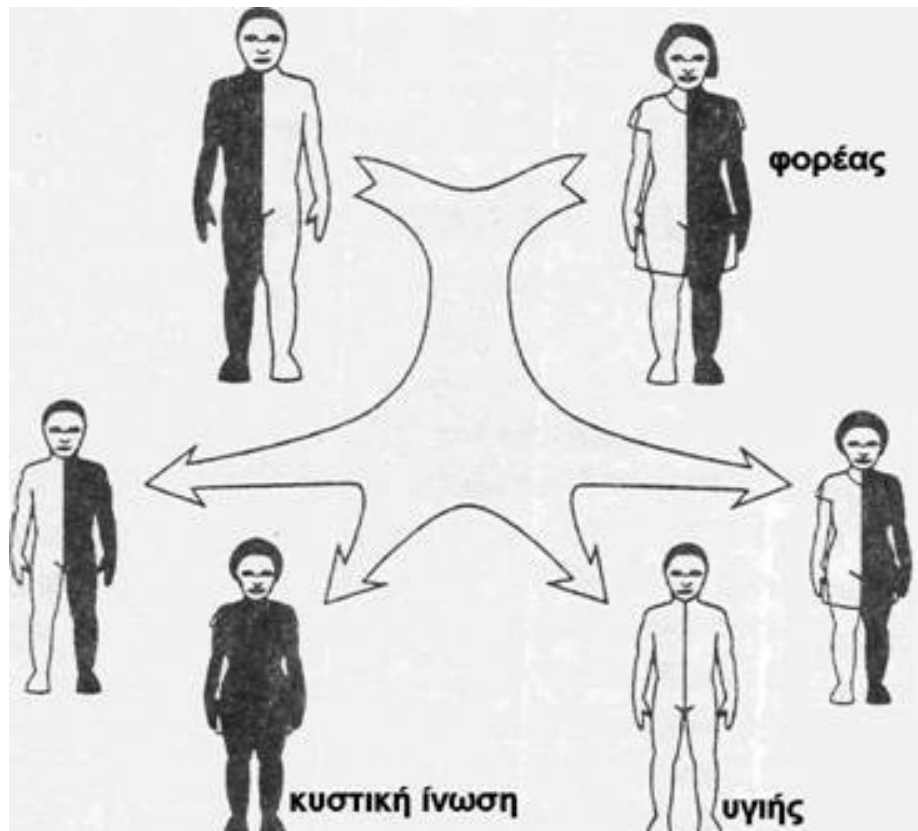


Πρόσφατα μια ειδική επιτροπή του National Institute of Health (NIH) στην Αμερική πρότεινε τον έλεγχο σε όλα τα ζευγάρια πριν την εγκυμοσύνη. Με τα σημερινά δεδομένα στη χώρα μας ο ανιχνευτικός έλεγχος προτείνεται σε όλες τις ομάδες υψηλού κινδύνου που είναι οι εξής:

1. Τα μέλη οικογενειών με ινοκυστική νόσο (cascade screening)
2. Στο άλλο μέλος του ζευγαριού που ο ένας είναι φορέας της νόσου
3. Σε άνδρες με στειρότητα λόγω έλλειψης του σπερματικού πόρου, αποφρακτική αζωοσπερμία και ολιγοσπερμία. Στα άτομα αυτά η παρουσία ινοκυστικής νόσου σε ετερόζυγη τουλάχιστον μορφή υπολογίζεται σε ποσοστό που κυμαίνεται από 30-70%.
4. Σε άτομα με χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια της οποίας η παθογένεια δεν έχει διευκρινιστεί.
5. Σε κήσεις στις οποίες διαπιστώνεται υπερηχογένεια εντέρου στο έμβρυο με υπερηχογραφικό έλεγχο.

Όταν και οι δυο γονείς είναι φορείς Ινοκυστικής νόσου η πιθανότητα να αποκτήσουν παιδί που πάσχει είναι 25% ΣΕ ΚΑΘΕ ΕΓΚΥΜΟΣΥΝΗ

Όταν ο ένας γονέας είναι φορέας και ο άλλος αρνητικός για το 86% των μεταλλάξεων, η πιθανότητα να αποκτήσουν παιδί που πάσχει ανέρχεται στο 1/644 (0.16%)



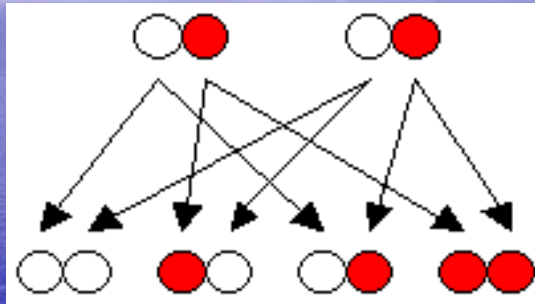
Αυτός ο τύπος κληρονομικότητας καλείται " αυτοσωματικός υπολειπόμενος". Στο ακόλουθο σχήμα δείχνουμε το παιδί με Κ.Ι., τους υγιείς γονείς, τα υγιή αδέρφια του, και τα αδέρφια που είναι φορείς όπως και οι γονείς τους. (Σχήμα)

- Οι γονείς των παιδιών με Κ.Ι. είναι φυσιολογικοί, παρότι ο καθένας τους έχει ένα φυσιολογικό γονίδιο και ένα γονίδιο της Κ.Ι. Υπάρχει η πιθανότητα ο καθένας από τους γονείς να κληρονομήσει το γονίδιό του, της Κ.Ι. στα παιδιά του.
- Όπως μπορείτε να δείτε στο σχήμα θα πρέπει και οι δύο γονείς να έχουν το γονίδιο της Κ.Ι. για να έχει κάποιο από τα παιδιά τους την Κ.Ι. Ένα παιδί θα έχει Κ.Ι. μόνο όταν έχει κληρονομήσει δύο γονίδια της Κ.Ι., ένα από κάθε γονέα. Εάν ένα παιδί κληρονομήσει ένα γονίδιο για Κ.Ι. από τον ένα γονέα και ένα φυσιολογικό γονίδιο από τον άλλο, το παιδί δεν θα έχει Κ.Ι., αλλά θα είναι ένας "φορέας" της Κ.Ι., όπως οι γονείς.

Σε μια οικογένεια όπου και ο πατέρας και η μητέρα έχουν το γονίδιο για την Κ.Ι., το ένα στα τέσσερα παιδιά τους μπορεί να έχει Κ.Ι. και αυτό είναι αποτέλεσμα του νόμου των πιθανοτήτων. Ακόμα και αν η οικογένεια έχει ήδη ένα ή περισσότερα παιδιά με Κ.Ι., αυτό δεν σημαίνει ότι δεν θα αποκτήσουν άλλα παιδιά με Κ.Ι. Οι πιθανότητες της κληρονομής της Κ.Ι. είναι όπως το παιχνίδι της ρουλέτας ή των ζαριών, δηλαδή ο ίδιος αριθμός μπορεί να έρθει ξανά και ξανά.

Μπορεί επίσης να συμβεί το ακριβώς αντίθετο. Δύο γονείς που είναι φορείς μπορεί να έχουν πολλά παιδιά και από τύχη μπορεί κανένα από τα παιδιά να μην έχει Κ.Ι.

Φορέας-Φορέας



- Στη συνήθη περίπτωση δύο γονέων-φορέων, για κάθε παιδί υπάρχει πιθανότητα 25% να πάσχει από τη νόσο, 50% να είναι φορέας και 25% να μην φέρει καν το γονίδιο.

- Από ένα γονέα ασθενή και ένα φορέα, κάθε παιδί έχει πιθανότητα 50% να είναι ασθενής και 50% πιθανότητα να είναι φορέας
- Από ένα γονέα υγιή και ένα φορέα, δεν υπάρχει πιθανότητα γέννησης ασθενούς παιδιού, αλλά κατά 50% κάθε παιδί είναι πιθανό να είναι φορέας.
- Από ένα γονέα υγιή και έναν ασθενή, όλα τα παιδιά θα είναι φορείς
- Τέλος, **δύο γονείς ασθενείς προφανώς μπορούν να κάνουν μόνο ασθενή παιδιά**

ΠΡΟΓΕΝΝΗΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΚΥΣΤΙΚΗΣ ΙΝΩΣΗΣ

- Στις περιπτώσεις όπου στην οικογένεια υπάρχει ιστορικό του νοσήματος και οι δύο γονείς είναι διαπιστωμένοι φορείς, τότε σε κάθε εγκυμοσύνη πρέπει να γίνεται προγεννητικός έλεγχος. Για την εξέταση αυτή απαιτείται καταρχάς αίμα από τους γονείς και το πάσχον παιδί (αν είναι διαθέσιμο) με σκοπό την ανίχνευση των υπεύθυνων μεταλλάξεων (βλαβών) DNA. Για να γίνει ο προγεννητικός έλεγχος θα πρέπει προηγουμενως να έχουν ταυτοποιηθεί οι μεταλλάξεις των γονέων. Οι μεταλλάξεις που ανιχνεύονται στα χρωμοσώματα των Ελλήνων πασχόντων από Κυστική Ίνωση είναι γνωστές σε ποσοστό περίπου 75%. Στις περιπτώσεις όπου οι μεταλλάξεις δεν είναι ανιχνεύσιμες ο προγεννητικός έλεγχος μπορεί να πραγματοποιηθεί με έμμεση ανάλυση των πολυμορφισμών DNA. Σ' αυτές τις περιπτώσεις η ανάλυση DNA του πάσχοντος παιδιού είναι απολύτως απαραίτητη.
- Η διαδικασία που ακολουθείται είναι κοινή και παράλληλη με αυτή για την ΠΔ αιμοσφαιρινοπαθειών.
- Εργαστηριακά είμαστε σε θέση σήμερα να προσφέρουμε ένα πακέτο ελέγχου (**36 μεταλλάξεις**) που καλύπτει το **75%** των γνωστών μεταλλάξεων κυστικής ίνωσης στην Ελλάδα. Το πακέτο αυτό προτείνεται ειδικά στα πλαίσια προγεννητικού ελέγχου αλλά και σε περιπτώσεις ανδρικής υπογονιμότητας, καθώς καλύπτει και τις σπάνιες μεταλλάξεις της κυστικής ίνωσης, και τους πολυ-T πολυμορφισμούς στο εσώνιο 8 (5T, 6T, 9T), οι οποίοι σχετίζονται με αντρική υπογονιμότητα, καθώς επίσης και με ήπια συμπτώματα κυστικής, αν συνυπάρχουν και με κάποια άλλη μετάλλαξη.
- **Μετάλλαξη ΔF508** (περίπου 53 % των περιπτώσεων στην Ελλάδα)
- Η ανίχνευση της **ΔF508** γίνεται με την τεχνική της **Real Time PCR**, ενώ η ανίχνευση των πολλαπλών μεταλλάξεων με την τεχνική της συμβατικής PCR και ακολούθως με ανάστροφο υβριδισμό (Innogenetics/InnoLipa Assay).

Κληρονομικότητα της κυστικής ίνωσης

Αν και οι δύο γονείς είναι φορείς
(ετερόζυγοι) $\frac{1}{4}$ από τα παιδιά τους θα
νοσεί

C C = φυσιολογικό άτομο
C c = φορέας ασυμπτωματικός
c c = κυστική ίνωση

	C	c
C	C C	C c
c	C c	c c

Οι διαγνωστικές μέθοδοι

- Στη διάρκεια της εμβρυϊκής ανάπτυξης είναι δυνατή η εφαρμογή διαγνωστικών μεθόδων, με τις οποίες εξασφαλίζουμε ποικίλες πληροφορίες για την κατάσταση του νέου οργανισμού. Θα μπορούσαμε να διακρίνουμε τις μεθόδους αυτές σε μη επεμβατικές και επεμβατικές.
- **A. Οι μη επεμβατικές μέθοδοι**
- **B. Επεμβατικές μέθοδοι** στην προγεννητική διάγνωση in vivo (prenatal diagnosis – PD) και στην προεμφυτευτική διάγνωση, που διενεργείται in vitro, κατά τη διαδικασία εξωσωματικής γονιμοποίησης (preimplantation genetic diagnosis – PGD).

Προγεννητική διάγνωση (PD)

- Οι κυριότερες μέθοδοι που εφαρμόζονται in vivo είναι η αμνιοκέντηση και ο έλεγχος δείγματος χοριακών λαχνών (chorionic villus sampling). Η εξέταση εμβρυϊκού αίματος (από τον ομφάλιο λώρο) ή εμβρυϊκού ιστού είναι επίσης παρεμβατικές μέθοδοι, που διενεργούνται όμως σπάνια πλέον. Πειραματικά εφαρμόζεται εξ άλλου, προς το παρόν, και η μέθοδος εξέτασης εμβρυϊκών κυττάρων, που κυκλοφορούν στο αίμα της μητέρας.
- Στην αμνιοκέντηση, που διενεργείται μετά τη 14η εβδομάδα, συλλέγεται, με παρακέντηση στην έγκυο, αμνιακό υγρό από τον εμβρυϊκό σάκο, στο οποίο περιέχονται κύτταρα του εμβρύου. Στον έλεγχο δείγματος χοριακών λαχνών, που διενεργείται από την 8η - 10η εβδομάδα, λαμβάνεται δείγμα από ιστό του πλακούντα.
- Η διαδικασία και στις δύο περιπτώσεις παρακολουθείται μέσω υπερηχογραφήματος. Με κατάλληλη επεξεργασία, στη συνέχεια, τα κύτταρα διαχωρίζονται και εξετάζονται τα χρωματοσώματά τους, με το μικροσκόπιο (για χρωματοσωμικές ανωμαλίες, π.χ. τρισωμίες), καθώς και με βιοχημικά ή μοριακά/γενετικά τεστ (για τον εντοπισμό μονογονιδιακών ασθενειών, π.χ. μεσογειακής αναιμίας ή κυστικής ίνωσης). Τα οριστικά αποτελέσματα των εξετάσεων μπορεί να καθυστερούν έως και 3 εβδομάδες από τη διενέργειά τους (περισσότερο στην περίπτωση της αμνιοκέντησης, οπότε η ανάπτυξη του εμβρύου έχει ήδη εξελιχθεί αρκετά, ενώ στον έλεγχο χοριακών λαχνών αποτέλεσμα μπορεί να υπάρξει σε 1 – 3 ημέρες), λόγω της αναγκαίας καλλιέργειας των μικρών σχετικά δειγμάτων. Για τον έλεγχο χοριακών λαχνών αναφέρεται κίνδυνος αποβολής 2 – 4% και για την αμνιοκέντηση 0,5 – 1%. Η πιθανότητα του κινδύνου είναι, πάντως, συνάρτηση και της ικανότητας και εμπειρίας εκείνου που διενεργεί την εξέταση.

- **Προεμφυτευτική διάγνωση (PGD)**

Καλείται ο γενετικός έλεγχος των εμβρύων πριν από την μεταφορά τους στην μήτρα στην εξωσωματική γονιμοποίηση και εφαρμόζεται είτε για την αντιμετώπιση μονογονιδιακών κληρονομικών νοσημάτων (PGD) είτε για τις πιο συχνές χρωμοσωμικές ανωμαλίες (PGS).

Η προεμφυτευτική διάγνωση προϋποθέτει εξωσωματική γονιμοποίηση. Στην περίπτωση αυτή γονιμοποιούνται in vitro PCR/polymerase chain reaction ή FISH/fluorescence in situ hybridization) για τον εντοπισμό χρωμοσωμικών ανωμαλιών, καθώς και ορισμένων σοβαρών μονογονιδιακών γενετικών ασθενειών.

Η μέθοδος αυτή εξασφαλίζει την γενετική διάγνωση για Κυστική Ίνωση στο DNA του κάθε κυττάρου και εμβρυομεταφορά μόνο των υγιών εμβρύων

Ερωτήσεις

1. Τι πάθηση είναι η κυστική ίνωση και ποια μετάλλαξη είναι η πιο συχνή στον πληθυσμό;
2. Από ένα γονέα ασθενή και ένα φορέα, τι παιδιά θα γεννήσουν;
3. Πότε πρέπει να γίνεται προγεννητικός έλεγχος για την κυστική ίνωση;
4. Στη διάρκεια της εμβρυϊκής ανάπτυξης ποιές διαγνωστικές μεθόδους μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε; Τι γνωρίζετε για την προεμφυτευτική διάγνωση;

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ 11ο-12ο

Από το Γονίδιο στη Διάγνωση του Κληρονομικού Καρκίνου

Προσδιοριζόμενες Περιπτώσεις Καρκίνου στην Αμερική το 2002

Άνδρες: 637,000

Προστάτη 30%

Πνεύμονα 14%

Κόλον 11%

Ουροποιητικό 7%

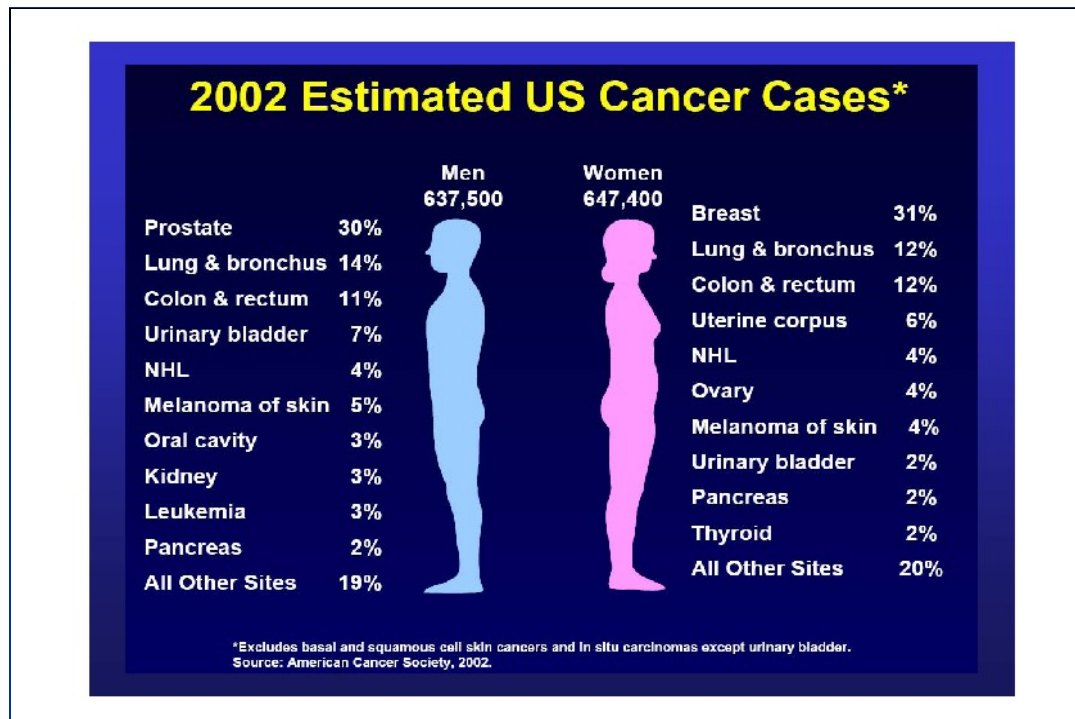
Γυναίκες: 647,000

Μαστού 31%

Πνεύμονα 12%

Κόλον 12%

Μήτρας 7%



ΣΤΟΧΟΙ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ

Γονίδια με ρόλο-κλειδί στη διαδικασία ογκογένεσης:

Γονίδια που ρυθμίζουν την κυτταρική ανάπτυξη

Αλλαγή της γενετικής πληροφορίας: Χάσιμο του 'προγραμματισμού' του κυττάρου.

- **Πρωτοογκογονίδια** : Ρύθμιση της κυτταρικής ανάπτυξης & Πολλαπλασιασμού.
- **Ογκοκατασταλτικά γονίδια**: Ανάσχεση κυτταρικού πολλαπλασιασμού, ξεκινούν την απόπτωση.
- **Γονίδια ελέγχου**: Διατηρούν άθικτο το γονιδίωμα και την γενετική πληροφορία ανιχνεύοντας και διορθώνοντας λάθη.

Κληρονομούμενες βλάβες σε κρίσιμα γονίδια

Σπάνια (5-10% των καρκίνων)

- Υψηλή πιθανότητα για καρκίνο
- Οικογένειες με πολλά περιστατικά

- Εκδήλωση σε νεαρή ηλικία

35 κληρονομικά σύνδρομα καρκίνου

Κυρίαρχα αυτοσωμικά

Αδενωματώδης πολυποδίαση, οικογενής (περιλαμβάνεται το σύνδρομο Gardner)

Σύνδρομο Gorlin (basal cell nevus syndrome)

Καρκίνος μαστού & ωοθηκών, οικογενής: BRCA1

Καρκίνος μαστού & ωοθηκών, οικογενής: BRCA2

Σύνδρομο Carney

Χόρδωμα, οικογενές

Σύνδρομο καρκίνου παχέος εντέρου, HNPCC (σύνδρομο

Lynch—περιλαμβάνεται το σύνδρομο Muir-Torre)

Σύνδρομο Cowden

Καρκίνος οισοφάγου με τύλωση

Καρκίνος στομάχου, οικογενής

Σύνδρομο Li Fraumeni

Μελάνωμα, οικογενές, με ή χωρίς δυσπλαστικούς σπίλους

Πολλαπλή ενδοκρινής νεοπλασία 1

Πολλαπλή ενδοκρινής νεοπλασία 2

Οστεοχονδρομάτωση, πολλαπλή (πολλαπλή εξόστωση)

Οικογενές παραγαγγλίωμα

Σύνδρομο Peutz-Jeghers

Καρκίνος προστάτη

Καρκίνος νεφρού, οικογενής

Ρετινοβλάστωμα

Οζώδης σκλήρυνση

Σύνδρομο Von Hippel-Lindau

Όγκος Wilm's

Υποτελή αυτοσωμικά

Ataxia telangiectasia

Σύνδρομο Bloom

Αναιμία Fanconi

Σύνδρομο Rothmund-Thompson

Σύνδρομο Werner

Xeroderma pigmentosum

Αμφίβолоς τρόπος κληρονόμησης

Καρκινοειδές, οικογενές

Ασθένεια Hodgkin's, οικογενής

Καρκίνος παγκρέατος, οικογενής

Καρκίνωμα όρχεων, οικογενές

Περίπου **10%** των περιπτώσεων καρκίνου ωοθηκών και **7%** των περιπτώσεων καρκίνου μαστού στο γενικό πληθυσμό είναι φορείς μεταλλαγμένου γονιδίου ⇒ κατά κύριο λόγο τα γονίδια είναι τα **BRCA1** και **BRCA2**

Ενδείξεις για Κληρονομική Προδιάθεση

ΜΕΤΑΛΛΑΞΗ

- Η μετάλλαξη αλλάζει μια γονιδιακή μορφή (αλληλόμορφο) σε μια άλλη
- Είναι η κύρια πηγή της γενετικής ποικιλότητας
- Αλλαγή στο DNA, που κληρονομείται
- Αποτέλεσμα της αλλαγής στην αλληλουχία των βάσεων του DNA – αλλαγή στον γενετικό κώδικα
- Πολλαπλές αιτίες: μεταλλαξιγόνα, λάθη στην αντιγραφή του DNA, ενσωμάτωση ξένων στοιχείων (transposons) στο χρωμόσωμα
- Πολλαπλές συνέπειες: Από καμία μέχρι θάνατο
- Μερικοί τύποι μεταλλάξεων μπορούν να διορθωθούν

ΣΙΩΠΗΡΗ ΜΕΤΑΛΛΑΞΗ (Silent) – αλλαγή κωδικονίου δεν συνεπάγεται αλλαγή αμινοξέος, π.χ. Phe UUU > UUC Phe

ΠΑΡΑΝΟΗΜΑΤΙΚΗ ΜΕΤΑΛΛΑΞΗ (Missense) – η αλλαγή κωδικονίου επιφέρει αλλαγή αμινοξέος διαφορετικές συνέπειες:

– **συντηρητική** αντικατάσταση αμινοξέος (συνώνυμη μετάλλαξη): αλλαγή σε χημικά παρόμοιο αμινοξύ, μικρότερη πιθανότητα αλλαγής της πρωτεϊνικής λειτουργίας, π.χ. Lys AAA > AGA Arg, Ser UCU > ACU Thr

– **μη συντηρητική** αντικατάσταση αμινοξέος: αλλαγή σε χημικά διάφορο αμινοξύ, πιο πιθανό να αλλάζει η πρωτεϊνική λειτουργία

ΜΗ ΝΟΗΜΑΤΙΚΗ ΜΕΤΑΛΛΑΞΗ (Nonsense) – κωδικόνιο αμινοξέος αλλάζει σε σήμα τερματισμού

ΜΕΤΑΛΛΑΞΗ ΑΛΛΑΓΗΣ ΠΛΑΙΣΙΟΥ ΑΝΑΓΝΩΣΗΣ (Frameshift) – προσθήκη ή απαλοιφή βάσεων που δεν είναι πολλαπλάσιο του 3, κωδικοποίηση τελείως διαφορετικών αμινοξέων

ΜΕΤΑΛΛΑΞΗ ΘΕΣΗΣ ΣΥΡΡΑΦΗΣ (Splice-site) – αλλαγή σήματος συρραφής εξωνίων, παράλειψη εξωνίων ή προσθήκη ιντρονίων στην πρωτεΐνη

ΣΥΝΕΠΕΙΕΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ ΣΤΟ ΜΟΡΙΑΚΟ ΕΠΙΠΕΔΟ

Αποφυγή λαθών, π.χ.

– διορθωτική δράση της **DNA πολυμεράσης, του ενζύμου που αντιγράφει το DNA**

– υπεροξειδική δισμουτάση, απομάκρυνση ελεύθερων ριζών

Επιδιόρθωση της ζημιάς, π.χ.

– Φωτοεπανενεργοποίηση, αναγέννηση πυριμιδινών παρουσία φωτός

– Αλκυλοτρανσφεράση,

- **Συστήματα επιδιόρθωσης βασισμένα στην ομολογία των βάσεων των 2 αλυσίδων του DNA** (π.χ. mismatch repair, recombination repair, transcription-coupled repair, base excision repair)

ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΕΠΙΔΙΟΡΘΩΣΗΣ ΤΩΝ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ

Ασθένειες που προκαλούνται από βλάβες σε γονίδια επιδιόρθωσης του DNA

Xeroderma pigmentosum (XP) = προδιάθεση σε καρκίνους δέρματος επαγόμενους από υπερϊώδη ακτινοβολία

Ataxia telangiectasia (AT) = πολλαπλά καρκινικά σύνδρομα, νευροεκφυλισμός, δυσλειτουργία ανοσοποιητικού, ραδιοευαισθησία, γονίδια *ATM*, *ATR*

Αναιμία Fanconi (FA) = προδιάθεση σε οξεία μυελοειδή λευχαιμία και άλλους καρκίνους, γονίδια *FancA*, *FancD*, κ.ά.

Σύνδρομο Bloom (BS) = προδιάθεση σε καρκίνο, ανώμαλη ανάπτυξη, φωτοευαισθησία, δυσλειτουργία ανοσοποιητικού, γονίδιο *Blm*

Κληρονομικός μη-πολυποδιακός καρκίνος παχέος εντέρου (HNPCC) = προδιάθεση σε καρκίνο παχέος εντέρου και ωοθηκών, γονίδια *hMSH2*, *hMLH1*, *hPMS1*, *hPMS2*

Κληρονομικός καρκίνος μαστού-ωοθηκών = προδιάθεση σε καρκίνο μαστού και ωοθηκών, γονίδια *BRCA1*, *BRCA2*



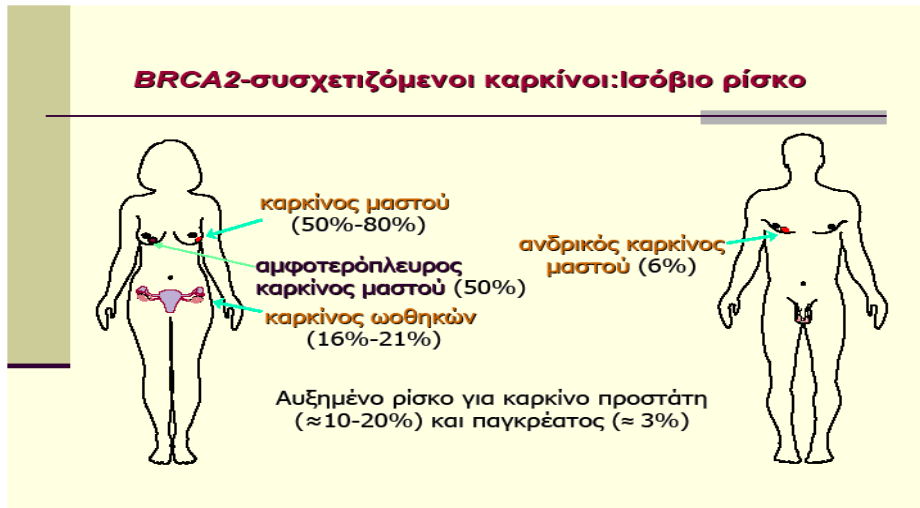
BRCA1-συσχετιζόμενοι καρκίνοι: Ισόβιο ρίσκο

Καρκίνος μαστού 56%-87% (συχνά σε νεαρή ηλικία)

Δεύτερος πρωτοπαθής καρκίνος μαστού 64%

Καρκίνος ωοθηκών 16%-44%

Πιθανώς αυξημένο ρίσκο για καρκίνο προστάτη, παχέος εντέρου



BRCA2-συσχετιζόμενοι καρκίνοι: Ισόβιο ρίσκο

- Η γενετική ανάλυση για τα γονίδια *BRCA1* & *BRCA2* σε οικογένειες με ιστορικό καρκίνου μαστού/ωοθηκών ξεκίνησε το 1995-1996 σε ερευνητικά πλαίσια.
- Από το 2000 προσφέρεται ως εξέταση ρουτίνας σχεδόν σε όλες τις χώρες της Ευρώπης, την Αμερική, τον Καναδά, την Αυστραλία και το Ισραήλ.
- Ο γενετικός έλεγχος εκτιμάται ότι μπορεί να σώσει χιλιάδες ζωές.

Κληρονομικός καρκίνος μαστού-ωοθηκών:

Διαφορά γενετικής ανάλυσης από άλλες ιατρικές εξετάσεις **Αφορά ολόκληρη την οικογένεια ! Λήψη οικογενειακού ιστορικού- ΙΔΙΑΙΤΕΡΗ ΣΗΜΑΣΙΑ.**

Απαραίτητη η λήψη οικογενειακού ιστορικού **των τριών τελευταίων γενεών.**

Συμπλήρωση ερωτηματολογίου σχετικά με την καταγωγή, φυσικές δραστηριότητες, διατροφικές συνήθειες, το ιατρικό ιστορικό της ασθενούς.

Πλήρη κλινικο-παθολογικά δεδομένα

π.χ. Φορείς *BRCA1* εμφανίζουν αρνητικούς υποδοχείς οιστρογόνων, ενώ Φορείς *BRCA2* εμφανίζουν θετικούς υποδοχείς οιστρογόνων

Η παθολόγος μετάλλαξη μπορεί να κληρονομηθεί **εξ' ίσου από τον πατέρα και τη μητέρα**

Οι άρρενες φορείς στο *BRCA1* συνήθως δεν αναπτύσσουν τη νόσο

Οι γυναίκες φορείς μεταλλάξεων **στο *BRCA1*** αναπτύσσουν τη νόσο **πολύ νωρίτερα** από τις φορείς στο *BRCA2*

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

1. Αίμα από τον ασθενή

2. Απομόνωση γονιδιωματικού DNA

3. Ενίσχυση των κατάλληλων περιοχών των γονιδίων *BRCA1/2* με PCR

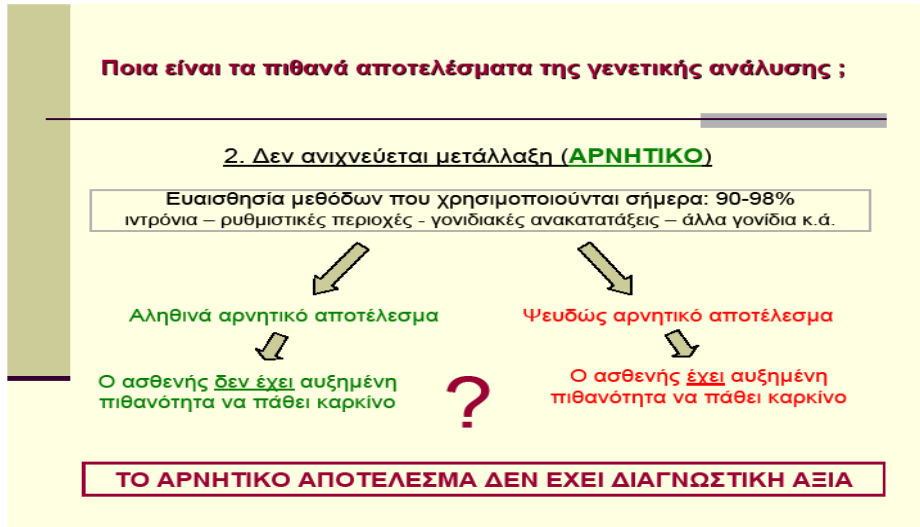
4. DNA sequencing

BRCA1,2 Breast Cancer, P53 Tumor Suppressor protein

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

Ποια είναι τα πιθανά αποτελέσματα της γενετικής ανάλυσης ;

1. Εύρεση μετάλλαξης (**ΘΕΤΙΚΟ**)
2. Δεν ανιχνεύεται μετάλλαξη (**ΑΡΝΗΤΙΚΟ**)
3. Εύρεση γενετικής αλλαγής άγνωστης σημασίας (?)



Ποια είναι τα πιθανά αποτελέσματα της γενετικής ανάλυσης ;

2. Δεν ανιχνεύεται μετάλλαξη (ΑΡΝΗΤΙΚΟ)

Ευαισθησία μεθόδων που χρησιμοποιούνται σήμερα: 90-98% ιντρόνια – ρυθμιστικές περιοχές - γονιδιακές ανακατατάξεις – άλλα γονίδια κ.ά.

Αληθινά αρνητικό αποτέλεσμα

Ο ασθενής δεν έχει αυξημένη πιθανότητα να πάθει καρκίνο

Ψευδώς αρνητικό αποτέλεσμα

Ο ασθενής έχει αυξημένη πιθανότητα να πάθει καρκίνο

ΤΟ ΑΡΝΗΤΙΚΟ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ ΔΕΝ ΕΧΕΙ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΑΞΙΑ

Ποια είναι τα πιθανά αποτελέσματα της γενετικής ανάλυσης ;



Ποια είναι τα πιθανά αποτελέσματα της γενετικής ανάλυσης ;

1. Εύρεση μετάλλαξης (ΘΕΤΙΚΟ)

ΑΣΘΕΝΗΣ

50–85% πιθανότητα καρκίνου μαστού

15–40% πιθανότητα καρκίνου ωοθηκών

Συστηματική επιτήρηση – διάγνωση σε αρχικά στάδια

Μέτρα πρόληψης (αλλαγή τρόπου ζωής, χημειοπροφύλαξη, επεμβάσεις)

ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ

50%ΘΕΤΙΚΟ 50%ΑΡΝΗΤΙΚΟ

ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΑΞΙΑ !

50%ΘΕΤΙΚΟ

ΑΣΘΕΝΗΣ

0–85% πιθανότητα καρκίνου μαστού

15–40% πιθανότητα καρκίνου ωοθηκών

Συστηματική επιτήρηση – διάγνωση σε αρχικά στάδια

Μέτρα πρόληψης (αλλαγή τρόπου ζωής, χημειοπροφύλαξη, επεμβάσεις)

50%ΑΡΝΗΤΙΚΟ

Ο ασθενής δεν έχει αυξημένη πιθανότητα να πάθει καρκίνο .

Ποια είναι τα πιθανά αποτελέσματα της γενετικής ανάλυσης ;

3. Εύρεση γενετικής αλλαγής άγνωστης σημασίας (?)

Συμβαίνει στο 15% των περιπτώσεων

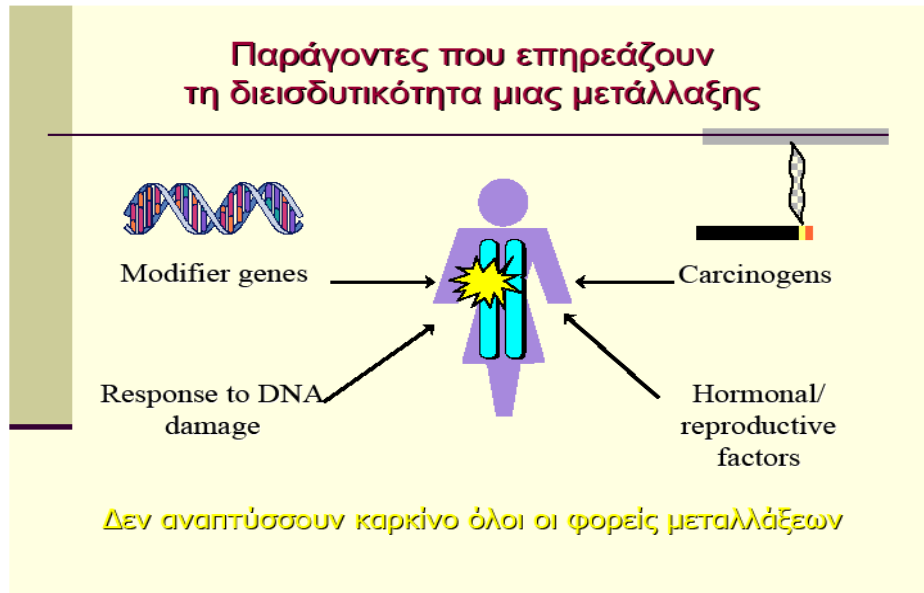
Συλλογή περισσότερων δεδομένων:

- Μελέτες συσχέτισης της αλλαγής με τα άρρωστα ή τα υγιή μέλη της οικογένειας
- Έρευνα – δομικές & λειτουργικές μελέτες

Ο ασθενής παραμένει στην κατηγορία υψηλού κινδύνου μέχρι να υπάρξουν νεότερα δεδομένα.

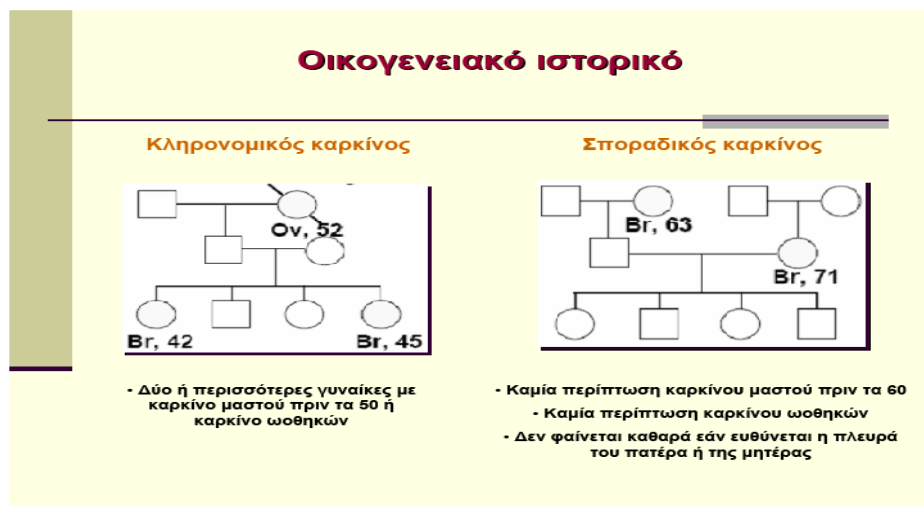
Παράγοντες που επηρεάζουν τη διεισδυτικότητα μιας μετάλλαξης

Τροποποιητής Γονιδίων, Καρκινογόνα (Τσιγάρο), Ορμονικοί/ Αναπαραγωγικοί παράγοντες, Ανταπόκριση στην καταστροφή του DNA
Δεν αναπτύσσουν καρκίνο όλοι οι φορείς μεταλλάξεων



Ποιος θα απευθυνθεί σε εργαστήριο για γενετικό έλεγχο BRCA1-2 ;

- Άτομο με προσωπικό ιστορικό καρκίνου μαστού ή/και ωθηκών
- Άτομο με οικογενειακό ιστορικό καρκίνου μαστού ή/και ωθηκών (συνήθως στενοί συγγενείς έχουν νοσήσει)
- Άτομο που έχει ήδη βρεθεί μετάλλαξη σε άλλο μέλος της οικογένειας



Κληρονομικός καρκίνος

- Δύο ή περισσότερες γυναίκες με καρκίνο μαστού πριν τα 50 ή καρκίνο ωθηκών.

Σποραδικός καρκίνος

- Καμία περίπτωση καρκίνου μαστού πριν τα 60

- Καμία περίπτωση καρκίνου ωοθηκών.
- Δεν φαίνεται καθαρά εάν ευθύνεται η πλευρά του πατέρα ή της μητέρας.

Οικογενειακό ιστορικό- Εσφαλμένες αντιλήψεις

- 'Ο καρκίνος μαστού από την πλευρά του πατέρα δεν μετράει'.
- Οι μισές γυναίκες που φέρουν παθογόνο μετάλλαξη την έχουν κληρονομήσει από τον πατέρα τους.
- 'Ο καρκίνος ωοθηκών στην οικογένεια δεν σημαίνει αυξημένο κίνδυνο για καρκίνο μαστού'.
- Ο καρκίνος ωοθηκών είναι σημαντική ένδειξη για προδιάθεση σε καρκίνο μαστού.
- 'Το πιο σημαντικό στο οικογενειακό ιστορικό είναι ο αριθμός των γυναικών με καρκίνο μαστού'.
- Η ηλικία εκδήλωσης του καρκίνου μαστού είναι πολύ πιο σημαντική ένδειξη από τον αριθμό των περιστατικών όσον αφορά την προδιάθεση της οικογένειας.

Στρατηγική γενετικής ανάλυσης

- Η πλήρης ανάλυση πρέπει να γίνει στο άτομο που είναι πιο πιθανό να φέρει μετάλλαξη !!!
 - ήδη εμφάνισε καρκίνο μαστού ή/και ωοθηκών
 - εμφάνισε τον καρκίνο μαστού ή/και ωοθηκών στη μικρότερη ηλικία
 - αμφοτερόπλευρη εκδήλωση

- Το πιο κατάλληλο άτομο δεν είναι πάντα διαθέσιμο !

Στρατηγική γενετικής ανάλυσης

Η πλήρης ανάλυση πρέπει να γίνει στο άτομο που είναι πιο πιθανό να φέρει μετάλλαξη !!!

- ήδη εμφάνισε καρκίνο μαστού ή/και ωοθηκών
- εμφάνισε τον καρκίνο μαστού ή/και ωοθηκών στη μικρότερη ηλικία
- αμφοτερόπλευρη εκδήλωση
- Το πιο κατάλληλο άτομο δεν είναι πάντα διαθέσιμο !

Το αρνητικό αποτέλεσμα δεν έχει διαγνωστική αξία.

Το αρνητικό αποτέλεσμα έχει διαγνωστική αξία.

ΜΟΝΟ όταν έχει προηγουμένως βρεθεί μετάλλαξη στην οικογένεια.

Στρατηγική γενετικής ανάλυσης Τι γίνεται αν δεν βρεθεί μετάλλαξη; (ΑΡΝΗΤΙΚΟ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ)

Η αποτίμηση του αποτελέσματος θέλει ιδιαίτερη προσοχή

- Εάν δεν βρέθηκε μετάλλαξη στην οικογένεια:
- Η μετάλλαξη υπάρχει, αλλά βρίσκεται σε περιοχή έξω από τα διαγνωστικά όρια του τεστ.
- Ευθύνεται άλλο γονίδιο για τον καρκίνο στη συγκεκριμένη οικογένεια.
- Ο καρκίνος στην οικογένεια έχει μη κληρονομικά αίτια.
- Ελέγχθηκε λάθος άτομο.

Στρατηγική γενετικής ανάλυσης

- Τι γίνεται αν δεν βρεθεί μετάλλαξη; (ΑΡΝΗΤΙΚΟ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ)

- Γνωρίζουμε ήδη ότι στην οικογένεια έχει βρεθεί συγκεκριμένη μετάλλαξη:
 - Υπάρχει βεβαιότητα ότι το συγκεκριμένο άτομο δεν έχει κληρονομήσει τη μετάλλαξη.
- ΠΡΟΣΟΧΗ: Δεν αποκλείεται να νοσήσει το άτομο αυτό – έχει τις ίδιες πιθανότητες με τον γενικό πληθυσμό – συνιστάται η επιτήρηση που ισχύει για όλους!

ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ

1. Ποιά είναι τα γονίδια με ρόλο-κλειδί στη διαδικασία της ογκογένεσης;
2. Ποιά είναι τα γονίδια για Κληρονομικό καρκίνο μαστού-ωοθηκών και ποιά τα ποσοστά τους σε καρκίνο μαστού και ωοθηκών;
3. Τι είναι μετάλλαξη και τι γνωρίζετε για την μετάλλαξη αλλαγής πλαισίου ανάγνωσης (**Frameshift**), και την μη νοηματική μετάλλαξη (**Nonsense**);
4. Ποιές ασθένειες γνωρίζετε που προκαλούνται από βλάβες σε γονίδια επιδιόρθωσης του DNA;
5. Ποιοί παράγοντες επηρεάζουν τη διεισδυτικότητα μιας μετάλλαξης;
6. Στρατηγική γενετικής ανάλυσης. Τι γίνεται αν δεν βρεθεί μετάλλαξη; (ΑΡΝΗΤΙΚΟ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ);