

# ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΑΚΑ ΧΡΟΝΙΚΑ

ΕΚΔΟΣΗ ΤΗΣ ΕΝΩΣΕΩΣ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟΥ ΠΡΟΣΩΠΙΚΟΥ  
ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟΥ "Ο ΕΥΑΓΓΕΛΙΣΜΟΣ"  
ΕΤΟΣ ΙΔΡΥΣΕΩΣ: 1945

ΤΟΜΟΣ 76 ΤΕΥΧΟΣ 1 2014

ΕΠΑΙΝΟΣ ΑΚΑΔΗΜΙΑΣ ΑΘΗΝΩΝ

VOLUME 76 NUMBER 1 2014



**NOSOKOMIAKA CHRONIKA**  
Official publication of the Scientific Society  
of Evangelismos Hospital

## Οδηγίες για τους συγγραφείς

Στις οδηγίες που ακολουθούν ελήφθησαν υπόψη οι τελευταίες υποδείξεις (1997) της Διεθνούς Επιτροπής των Εκδοτών Ιατρικών Περιοδικών (International Committee of Medical Journal Editors - ICM - JE): Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals.

### 1. ΕΙΔΗ ΕΡΓΑΣΙΩΝ. Στα “Νοσοκομειακά Χρονικά”

δημοσιεύονται εργασίες πάνω σε θέματα της Ιατρικής και των συναφών κλάδων καθώς και γενικότερα θέματα με ιατρικό ενδιαφέρον. Ειδικότερα:

**Ανασκοπήσεις**, από δύο το πολύ συγγραφείς. Περιέχουν μέχρι 20 δακτυλογραφημένες σελίδες και μέχρι 100 παραπομπές το πολύ.

**Πρωτότυπες εργασίες**, βασικής ή κλινικής έρευνας. Περιέχουν πρωτοδημοσιεύσιμα στοιχεία. Απαραίτητη η στατιστική ανάλυση.

**Κλινικές μελέτες**, για την παρουσίαση κλινικής εμπειρίας, μέχρι 15 σελίδες το πολύ ή κατάλογη βιβλιογραφία. Στατιστική ανάλυση επιθυμητή.

**Ενδιαφέρουσες περιπτώσεις**, για σύντομη (6-8 σελίδες) παρουσίαση σπάνιας νόσου ή εκδήλωσης ή ασυνήθους κλινικής πορείας. Η συζήτηση περιορίζεται στην υποστήριξη της παρουσίας και δεν πλατειάζει σε βιβλιογραφική ανασκόπηση.

**Εργαστηριακά διαγνωστικά θέματα**, για παρουσίαση ειδικών τεχνικών ή μεθόδων (μέχρι 15 σελίδες).

**Άρθρα σύνταξης**, για σύντομο σχολιασμό επίκαιρων θεμάτων ή δημοσιευόμενων εργασιών, μετά από επιλογή του συγγραφέα από τη Συντακτική Επιτροπή. Αν εκφράζουν συλλογικά τη Σύνταξη του περιοδικού είναι ανυπόγραφα.

**Επίκαιρα θέματα**, για σύντομη (μέχρι 4-5 σελίδες) αναφορά τελευταίων απόψεων σε συγκεκριμένο θέμα, με πολύ περιορισμένη βιβλιογραφία.

**Γραπτά σεμινάρια, γραπτά συμπόσια, στρογγυλά τραπέζια, κλινικοπαθολογοανατομικές συζητήσεις**, κατά την κρίση της Σύνταξης.

**Ειδικά θέματα**, που αφορούν τις επιστήμες υγείας και δεν κατατάσσονται σε άλλη κατηγορία εργασιών, καθώς και γενικότερου ενδιαφέροντος που άπτονται της ιατρικής, έκτασης μέχρι 15-20 σελίδες.

**Γράμματα αναγνωστών**, πάντοτε ενυπόγραφα και έκτασης 1-2 σελίδων, με κρίσεις για δημοσιεύσιμη εργασία ή γενικότερες γνώμες, σύντομες παρατηρήσεις, πρόδρομα αποτελέσματα σε συντομία κ.λπ. Αν αφορούν κρίσεις δημοσιευμένης εργασίας, τίθενται υπόψη του συγγραφέα, που μπορεί να απαντήσει.

### 2. ΑΛΛΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ

- Η γλώσσα των εργασιών αφήνεται στο συγγραφέα, αρκεί να είναι ορθή και ομοιογενής. Πάντως συνιστούμε τη χρήση σωστής δημοτικής.
- Συνίσταται η αποφυγή αναγραφής μεγάλου αριθμού συγγραφέων, ιδιαίτερα στις “Ενδιαφέρουσες Περιπτώσεις”, στις οποίες οι συγγραφείς δεν πρέπει να υπερβαίνουν τους πέντε. Όλοι οι εμφανιζόμενοι συγγραφείς

μιας εργασίας, ιδίως πρωτότυπης, οφείλουν να έχουν συμβάλει ουσιαδώς στην εκπόνησή της και συγκεκριμένα α) στη σύλληψη, το σχεδιασμό και την εκτέλεσή της, τη συλλογή και επεξεργασία αποτελεσμάτων, και β) στη συγγραφή ή/και επιμέλεια κειμένου. Εξυπακούεται ότι πρέπει να έχουν λάβει γνώση της τελικής μορφής του κειμένου και να έχουν εγκρίνει την υποβολή του προς δημοσίευση. Άλλη συμμετοχή, όπως αυτή της χρηματοδότησης, της συλλογής υλικού ή της γενικής εποπτείας της ερευνητικής ομάδας δεν δικαιολογεί την εμφάνιση ονόματος στη συγγραφική ομάδα. Γι’ αυτές τις περιπτώσεις προβλέπεται η δυνατότητα γραπτής αναγνώρισης της όποιας συμβολής, η οποία βεβαίως δημοσιεύεται μαζί με το κείμενο. Η σειρά δημοσίευσης των ονομάτων των συγγραφέων συναποφασίζεται από τους ίδιους.

- Όλες οι εργασίες αποστέλλονται για κρίση σε δύο ανεξάρτητους κριτές και επί διαφωνίας σε τρίτον. Τα ονόματα των κριτών και των συγγραφέων είναι απόρρητα. Η τελική απόφαση για δημοσίευση και ο χρόνος της ανήκει στη Συντακτική Επιτροπή.
- Εάν η εργασία έχει ανακοινωθεί προφορικά ή δημοσιευθεί σε περίληψη (π.χ. πρακτικά συνεδρίων) ή έχει δημοσιευθεί αλλού, αλλά παρουσιάζεται με πρόσθετα ή νεότερα στοιχεία, αυτό υποσημειώνεται στη σελίδα του τίτλου. Θεωρούμε ηθική δέσμευση των συγγραφέων να μην υποβάλλουν εργασία αυτούσια δημοσιευμένη αλλού. Η τελευταία δεν γίνεται δεκτή προς δημοσίευση, εκτός από εξαιρετικές περιπτώσεις κατά την κρίση της Συντακτικής Επιτροπής και με σχετική σημείωση. Η δημοσίευση μιας εργασίας σε ξενόγλωσσο περιοδικό δεν αποκλείει τη δημοσίευσή της στην ελληνική γλώσσα στο παρόν περιοδικό, στο σύνολό της ή μέρος αυτής, φυσικά μετά από τη σχετική διαδικασία κρίσης.
- Πειραματικές κλινικές εργασίες (φάση 1, 2, 3) σε ανθρώπους πρέπει να συνοδεύονται από έγγραφη δήλωση ότι η έρευνα έγινε σύμφωνα με τους διεθνείς δεοντολογικούς κανόνες και τη νομοθεσία (συγκάταθεση ασθενών, έγκριση από επιτροπή δεοντολογίας ή φαρμάκων, έγκριση φαρμάκου από τον ΕΟΦ κ.λπ.).
- Οι εργασίες υποβάλλονται δακτυλογραφημένες σε διπλό διάστημα σε τρία αντίτυπα. Η Σύνταξη του περιοδικού θεωρεί δεδομένο ότι η εργασία είναι σε γνώση και έχει την έγκριση όλων των συγγραφέων και του διευθυντή του τμήματος από το οποίο προέρχεται. Το τυχόν αντίθετο αφορά στις σχέσεις των ενδιαφερομένων και η Συντακτική Επιτροπή (η οποία κρίνει εργασίες και όχι διαπροσωπικές σχέσεις) δεν έχει καμιά ανάμειξη.
- Οι αναφερόμενες ουσίες πρέπει να αναγράφονται με την κοινόχρηστη ονομασία ή το χημικό όνομα. Για τις μονάδες, ενθαρρύνουμε τη χρήση του διεθνούς *Système International (SI)* - βλ. *IATRIKH* 1980, 37:139.

## Οδηγίες για τους συγγραφείς

---

**ΔΟΜΗ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ:** Το χειρόγραφο πρέπει να έχει:

1. Σελίδα τίτλου, με τον τίτλο της εργασίας (μέχρι 15 λέξεις), τα ονόματα των συγγραφέων και σε υποσημείωση το τμήμα από το οποίο προέρχεται, τη θέση ή τον ανώτερο ακαδημαϊκό τίτλο κάθε συγγραφέα και τυχόν υποσημείωση για το εάν η εργασία έχει ανακοινωθεί ή δημοσιευθεί σε περίληψη αλλού (βλ. παραπάνω). Να σημειώνεται ο υπεύθυνος της αλληλογραφίας και τα τηλέφωνα του.
2. Σελίδα περίληψης στα ελληνικά με τις λέξεις ευρετηρίου (key words).
3. Το κείμενο της εργασίας με κατάλληλο χωρισμό σε διάφορα «κεφάλαια».
4. Σελίδα με την αγγλική περίληψη, με τον τίτλο της εργασίας, τα ονόματα των συγγραφέων και τις λέξεις ευρετηρίου στα αγγλικά, με τη μορφή abstract (μέχρι 300 λέξεις), δομημένου με συγκεκριμένο τρόπο: background, material and methods, results, conclusions, key words.
5. Βιβλιογραφία με το σύστημα Vancouver: Ο κατάλογος δεν είναι αλφαβητικός αλλά με τη σειρά που οι παραπομπές ευρίσκονται στο κείμενο. Στο κείμενο αναφέρονται με τον αριθμό του καταλόγου και όχι με όνομα συγγραφέα. Για άρθρα περιοδικών, τα επώνυμα των συγγραφέων γράφονται μέχρι τρία – τα παραπάνω γράφονται et al ή κ.ά. (με τα αρχικά χωρίς τελείες) – ο τίτλος του άρθρου, το περιοδικό γραμμένο με τη διεθνή μορφή σύντμησης όπως στο Index Medicus, η χρονολογία, ο αριθμός τόμου και η πρώτη και τελευταία σελίδα του άρθρου (π.χ. Smith A: Intestinal bleeding. JAMA 1988, 215: 101-103). Για μονογραφία, το όνομα, ο τίτλος, ο εκδότης, ο τόπος και το έτος έκδοσης (π.χ. Smith A: Intestinal bleeding. Saunders Co, London, 1988). Για κεφάλαιο βιβλίου, τα ονόματα, ο τίτλος του κεφαλαίου, ο τίτλος του βιβλίου, ο επιμελητής σύνταξης (editor), ο εκδότης, ο τόπος και το έτος έκδοσης (π.χ. Smith A: Intestinal bleeding. In: Practice of Surgery, H. Kim, ed, Saunders Co, London 1988). Οι βιβλιογραφικές παραπομπές θα πρέπει να μπορούν να ελεγχθούν από τον κριτή και - κυρίως - από τον αναγνώστη. Έτσι, εάν η βιβλιογραφική αναφορά ευρίσκεται σε άρθρο, βιβλίο κ.λπ. που δεν συμβουλευθήκε άμεσα

ο συγγραφέας αλλά αναφέρεται αλλού, ιδιαίτερα για παλιά ή δυσεύρετα στοιχεία, τότε δεν αναγράφεται σαν ξεχωριστή αναφορά διογκώνοντας άσκοπα και τεχνητά το βιβλιογραφικό πίνακα, αλλά αποδίδεται στο στοιχείο που άμεσα μελέτησε ο συγγραφέας (π.χ. “ο Crohn το 1932 ανέφερε<sup>10</sup>” - όπου 10 είναι το άρθρο του Smith που πράγματι συμβουλευτήκε ο συγγραφέας). Ιδιαίτερη σύσταση γίνεται για τη χρησιμοποίηση και της ελληνικής βιβλιογραφίας που είναι ήδη αρκετά πλούσια.

6. Πίνακες και σχήματα σε ξεχωριστή σελίδα το καθένα, σε τρία αντίτυπα, με διαδοχική αρίθμηση και σύντομη επεξήγηση. Πίνακες δακτυλογραφημένοι σε διπλό διάστημα χωρίς διαχωριστικές γραμμές, σχήματα με σινική μελάνη.
7. Φωτογραφίες καλής ποιότητας σε στυλνπό χαρτί. Πίσω από τη φωτογραφία σημειώνεται με μαλακό μολύβι βέλος που δείχνει το πάνω μέρος και ο αύξων αριθμός και σε αυτοκόλλητο τα ονόματα των συγγραφέων της εργασίας. Σε ξεχωριστή σελίδα γράφονται οι υπότιτλοι των φωτογραφιών κατά σειρά. Συνιστούμε τη χρησιμοποίηση των τελείως απαραίτητων για κάθε περίπτωση φωτογραφιών, το μέγεθος των οποίων στην τελική εκτύπωση ανήκει στην κρίση του υπεύθυνου έκδοσης. Σημειώνεται ότι κατά τη δημοσίευση φωτογραφίας ασθενούς θα πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα ώστε να μην αποκαλύπτεται η ταυτότητα του ατόμου. Το ονοματεπώνυμο σε καμιά περίπτωση δεν πρέπει να αναγράφεται (π.χ. σε ακτινογραφίες, κ.λπ.), ενώ στις δημοσιευόμενες φωτογραφίες η απλή επικάλυψη των οφθαλμών δεν αποτελεί επαρκή διαφύλαξη της ανωνυμίας του εικονιζόμενου προσώπου.

### ΔΙΟΡΘΩΣΕΙΣ-ΑΝΑΤΥΠΑ

Ο υπεύθυνος για την αλληλογραφία συγγραφέας κάνει την τελευταία διόρθωση του δοκιμίου κατά την οποία αποκλείονται μεταβολές ή προσθήκες στην εργασία. Η διόρθωση αυτή πρέπει να γίνεται σε 2-3 ημέρες και να επιστρέφεται με την τυχόν αίτηση ανατύπων, τα έξοδα των οποίων βαρύνουν τους συγγραφείς και καθορίζονται από τον εκδότη, χωρίς ανάμειξη της σύνταξης.

**ΙΔΙΟΚΤΗΤΗΣ - ΕΚΔΟΤΗΣ**  
**ΕΝΩΣΗ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟΥ ΠΡΟΣΩΠΙΚΟΥ**  
**Γ.Ν.Α. «Ο ΕΥΑΓΓΕΛΙΣΜΟΣ» (Ε.Ε.Π.Ν.Ε.)**

Υψηλάντου 45-47, 106 76 Αθήνα  
Κτίριο: Οίκος Αδελφών Νοσοκόμων-6<sup>ος</sup> όροφος  
Τηλ.: 213-2041744, 213-2045102  
E-mail: [sseh@evaggelismos-hosp.gr](mailto:sseh@evaggelismos-hosp.gr),  
[sseh.evaggelismos@gmail.com](mailto:sseh.evaggelismos@gmail.com)  
Web: [www.evaggelismos-hosp.gr](http://www.evaggelismos-hosp.gr)

**ΔΙΟΙΚΗΤΙΚΟ ΣΥΜΒΟΥΛΙΟ**

ΠΡΟΕΔΡΟΣ

ΖΑΚΥΝΘΙΝΟΣ Σπύρος

ΑΝΤΙΠΡΟΕΔΡΟΣ

ΠΑΓΩΝΗ Μαρία

ΓΕΝΙΚΗ ΓΡΑΜΜΑΤΕΑΣ

ΤΣΙΡΟΓΙΑΝΝΗ Αλεξάνδρα

ΤΑΜΙΑΣ

ΑΘΑΝΑΣΙΑΔΗ Καλλιόπη

ΜΕΛΗ

ΑΠΟΣΤΟΛΟΥ Θεοφάνης

ΒΑΔΑΛΑ Χαρίκλεια

ΜΠΕΛΕΣΙΩΤΟΥ Ελένη

ΚΑΜΜΕΝΟΣ Αθανάσιος

ΚΑΤΣΟΥΛΗ Σοφία

ISSN: 2241-3936

**ΣΥΝΤΑΚΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ ΣΥΝΤΑΞΗΣ

ΑΠΟΣΤΟΛΟΥ Θεοφάνης

ΑΝΑΠΛ. ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ ΣΥΝΤΑΞΗΣ

ΒΑΔΑΛΑ Χαρίκλεια

ΜΕΛΗ

ΑΛΕΒΙΖΟΠΟΥΛΟΣ Νεκτάριος

ΑΡΓΥΡΑΚΟΣ Θεόδωρος

ΒΑΛΛΙΑΝΟΥ Ναταλία

ΓΙΑΝΝΟΠΟΥΛΟΥ Μυρτώ

ΓΙΑΤΡΑ Χαρά

ΓΡΗΓΟΡΙΟΥ Ειρήνη

ΙΣΧΑΚΗ Ελένη

ΚΗΡΟΠΟΥΛΟΥ Ασημίνα

ΚΟΚΚΟΡΗΣ Στυλιανός

ΚΩΣΤΟΥΡΟΥ Σοφία

ΛΑΖΑΡΙΔΟΥ Ελένη

ΜΑΓΓΑΝΑΣ Δημήτριος

ΜΥΛΩΝΑ Ελένη

ΠΑΠΑΖΟΓΛΟΥ Αντωνία

ΠΕΡΙΒΟΛΙΩΤΗ Ευσταθία

ΤΡΙΑΝΤΑΦΥΛΛΟΥ Κωνσταντίνος

ΤΣΟΥΚΑ Γλυκερία

ΧΡΗΣΤΙΔΟΥ Αγγελική

**ΑΞΙΟΛΟΓΗΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΩΝ**

ΒΑΔΑΛΑ Χαρίκλεια

**ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΗ ΕΠΙΜΕΛΕΙΑ**

ΠΑΠΑΜΑΛΗ Αικατερίνη

**ΔΙΕΥΘΥΝΣΗ ΥΠΕΥΘΥΝΟΥ**  
**ΣΥΜΦΩΝΑ ΜΕ ΤΟ ΝΟΜΟ**

ΖΑΚΥΝΘΙΝΟΣ Σπύρος

**ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΑΚΑ ΧΡΟΝΙΚΑ**



ΤΟΜΟΣ 76

ΤΕΥΧΟΣ 1

2014

**ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ**

**Α Ν Α Σ Κ Ο Π Η Σ Η**

**ΛΟΙΜΩΔΗ ΝΟΣΗΜΑΤΑ ΤΟΥ ΔΕΡΜΑΤΟΣ ΣΤΟ ΒΥΖΑΝΤΙΟ**

*N. Σταθάκος, Σ. Δαμιανάκη, Ν. Σταυριανέας* \_\_\_\_\_ 5

**Α Ν Α Σ Κ Ο Π Η Σ Ε Ι Σ**

*Ανακοινώθηκαν στο Κλινικό Φροντιστήριο: «Μοριακές Τεχνικές. Εφαρμογές στην Ανοσολογία-Ιστοσυμβατότητα (29/03,12/04/11)*

**ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ. ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΣΤΗΝ ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΑ-ΙΣΤΟΣΥΜΒΑΤΟΤΗΤΑ. ΓΕΝΟΜΙΚΗ - ΠΡΩΤΕΟΜΙΚΗ**

*Χ. Παχούλα-Παπαστεριάδη* \_\_\_\_\_ 13

**PCR-SSOP (Polymerase Chain Reaction-Specific Sequence Oligonucleotide Probes)**

*Δ. Κουνιάκη* \_\_\_\_\_ 20

**ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ (EXTRACTION) ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΙΚΟΥ (GENOMIC) DNA**

*Θ. Αθανασιάδης* \_\_\_\_\_ 28

**ΑΝΤΙΓΟΝΑ ΙΣΤΟΣΥΜΒΑΤΟΤΗΤΑΣ (HLA) ΤΑΞΗΣ I ΚΑΙ ΤΑΞΗΣ II**

*Χ. Παχούλα-Παπαστεριάδη* \_\_\_\_\_ 38

**ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (Polymerase chain reaction – PCR)**

*Β. Κίτσιου* \_\_\_\_\_ 54

**ΤΟ ΓΕΝΕΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ - ΝΟΥΚΛΕΪΚΑ ΟΞΕΑ ΡΟΗ ΤΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΑΣ**

*Δ. Κουνιάκη* \_\_\_\_\_ 63

**ΑΝΑΛΥΣΗ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΩΝ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ ΤΟΥ DNA (DNA Sequencing)**

*Ι. Κάκκας* \_\_\_\_\_ 78

**ΑΝΟΣΟΑΠΟΤΥΠΩΣΗ ΣΤΗΝ ΑΥΤΟΑΝΟΣΙΑ**

*Α. Τσιρογιάννη* \_\_\_\_\_ 84

**PCR-SSP (Polymerase-Chain Reaction Specific- Sequence Primers)**

*Α. Ταράση* \_\_\_\_\_ 89

\* Το τεύχος εκδόθηκε αναδρομικά

## ΛΟΙΜΩΔΗ ΝΟΣΗΜΑΤΑ ΤΟΥ ΔΕΡΜΑΤΟΣ ΣΤΟ ΒΥΖΑΝΤΙΟ

**Ν. Σταθάκος<sup>1</sup>, Σ. Δαμιανάκη<sup>2</sup>, Ν. Σταυριανέας<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Καρδιολόγος, Ερευνητής Ανατομείου Ιατρικής Πανεπιστημίου Αθηνών

<sup>2</sup>Τεχνολόγος, Νοσηλεύτρια Τ.Ε.Π., Γ.Ν.Α. «Ο ΕΥΑΓΓΕΛΙΣΜΟΣ»

<sup>3</sup>Καθηγητής Δερματολογίας-Αφροδισιολογίας Πανεπιστημίου Αθηνών

*Στοιχεία επικοινωνίας:*

*Ν. Σταθάκος*

*Τηλ.: 6977564563, 2104817050*

*E-mail: cardiostathakos@hotmail.gr*

### ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι βυζαντινοί ιατροί γνώριζαν πολλά δερματικά νοσήματα όπως για παράδειγμα τη λέπρα και το δερματικό άνθρακα. Τέτοια περιστατικά λοιμωδών δερματικών νοσημάτων περιγράφονται από τον Δ' μέχρι και τον ΙΑ' αιώνα σε τρεις βυζαντινούς αυτοκράτορες, τον Κωνσταντίνο το Μέγα, τον Κωνσταντίνο Ε' Κοπρώνυμο και τον Λέοντα Δ' Χάζαρο καθώς και την πρωτότοκη κόρη του αυτοκράτορα Κωνσταντίνου Η' την Ευδοκία.

**Λέξεις κλειδιά:** λώβη, άνθραξ, λοιμώδες δερματικό νόσημα, βυζάντιο.

### SUMMARY

The byzantines doctors knew many skin diseases such as leprosy and cutaneous anthrax. Such incidents of infectious skin diseases are described from the IV' until the IA' century in three Byzantine Emperors, Constantine the Great, Constantine E' Kopronymos and Leo D' Chazaros and eldest daughter Constantine H', Eudokia.

**Key words:** leprosy, cutaneous anthrax, infectious skin disease, Byzantium.

Είναι γεγονός ότι οι βυζαντινοί γιατροί γνώριζαν πολλά λοιμώδη δερματικά νοσήματα. Άλλωστε, τα δερματικά νοσήματα κατέχουν σημαντική θέση στην ιατρική βυζαντινή θεματολογία. Τέτοια αξιοσημείωτα περιστατικά συναντάμε από τον Δ΄ μέχρι και τον ΙΑ΄ αιώνα σε τρεις βυζαντινούς αυτοκράτορες και σε μια βυζαντινή πριγκήπισσα, τα οποία καταγράφονται στις βυζαντινές πηγές. Για τα δύο πρώτα σημειώνεται στα κείμενα ότι θεραπεύθηκαν, ενώ τα περιστατικά του άνθρακα οδήγησαν στο θάνατο. Από την εποχή του Ομήρου στα έργα πολλών ποιητών, ιστορικών και φυσικών επιστημόνων εντοπίζουμε περιγραφές καταστρεπτικών επιδημιών. Με τους χαρακτηρισμούς που αφορούν αυτές τις επιδημίες υπονοούνται κατά κύριο λόγο δύο, η πανώλη και η λέπρα. Σήμερα αναγνωρίζουμε μεταξύ αυτών δύο σαφώς διαχωρισμένες, μέσω ορισμένων ερεθισμάτων προκαλούμενες, μολυσματικές νόσους. Στην Αρχαιότητα αλλά και στον Μεσαίωνα κάθε επιδημική νόσος με υψηλή θνησιμότητα χαρακτηριζόταν πανώλη ή λοιμός. Επίσης το όνομα «λέπρα» αρχικά ήταν ένας γενικός χαρακτηρισμός για κάθε είδους παραμορφωτική δερματική ασθένεια. Γι' αυτόν τον λόγο η αναδρομική διάγνωση επιδημιών και νόσων που συνέβησαν κατά το παρελθόν είναι πολύ δύσκολη, αφού οι βασικές αρχές της ιατρικής διανόησης έχουν τροποποιηθεί από εποχή σε εποχή. Η ίδια ασθένεια υπόκειται σε μια εντελώς διαφορετική παρουσίαση όταν αυτή εξετάζεται από έναν αρχαίο ιπποκρατικό, έναν μεσαιωνικό γιατρό ή έναν σύγχρονο βιοχημικό. Σ' αυτή τη μονογραφία θα γίνει προσπάθεια παρουσίασης των νόσων σύμφωνα με τις βυζαντινές πηγές. Θεωρούσαν ότι η λέπρα προκαλείται από διαβρωτικό χυμό, που έχει σαν συνέπεια την απόπτωση 'λεπιών' από το πρόσωπο και ότι η πάθηση είναι ανίατη αν παραμείνει (το εκλυτικό αίτιο) :«γίνεται επί χυμω διαβρωτικω, όθεν καί λεπίδες αποπίπτουσιν. Έστι δέ τό πάθος, ει κατακρατήση ανίατον» (1,2).

Για τον άνθρακα γνώριζαν ότι σχηματίζεται όταν αίμα μέλαν και θερμό επιρρεύσει και "καύσει" το μέλος του σώματος προκαλώντας ουλή: «Όταν αίμα μέλαν καί θερμόν επιρρευσαν καύση τό μόριον καί εσχάραν ποιήση» και ότι «είναι ανάγκη το έλκος αυτό να το θεραπεύσεις»: «δει καί τούτο ως ψιλόν έλκος θεραπεύειν» (1,2). Ο Μιχαήλ Ψελλός με τη δική του πέννα συμπλήρωνε ότι ο άνθρακας είναι το αποτέλεσμα της παθολογικής εκτροπής του αίματος (αρτηριακού και φλεβικού-διφυούς) στη μέλαινα φύση, προκαλώντας εσχάρωδη εξέλκωση: «Άνθραξ διφυους αίματος γέννημά τι εις τήν μέλαιναν εκτραπέντος ουσίαν, έχοντος έλκος εσχαρωδες τήν φύσιν» (1,3).

Το πρώτο περιστατικό λώβης (λέπρας) ή ασθένειας, που μοιάζει με τη λώβη, αφορά στον πρώτο βυζαντινό αυτοκράτορα, το Μέγα Κωνσταντίνο (324-337 μ.Χ.), και του συνέβει

κατά τα πρώτα έτη της βασιλείας του. Τις σχετικές πληροφορίες παραδίδουν κατά πολύ μεταγενέστεροι χρονογράφοι και θα μπορούσε κανείς να διατυπώσει σοβαρές αμφιβολίες για τη γνησιότητα της μαρτυρίας καθώς και γιατί το συγκεκριμένο θέμα αποτελεί σημείο αντιπαράθεσης των ιστορικών της ιατρικής δεδομένου ότι μέχρι τον 18<sup>ο</sup> αιώνα επικρατούσε σύγχυση στην περιγραφή των δερματικών βλαβών. Πρόκειται για τον Γεώργιο Μοναχό (Θ' αιώνας), τον Γεώργιο Κεδρηνό (ΙΑ' αιώνας) και τον Ιωάννη Ζωναρά (ΙΒ' αιώνας).

Ο Κεδρηνός περιγράφοντας τον Κωνσταντίνο, μαζί με τα άλλα σωματικά και ψυχικά χαρακτηριστικά, γράφει ότι «είχε πολύ ζωηρό βλέμμα, λιονταρίσιο, ήταν χαρούμενος και εύθυμος, πολύ εγκρατής ως προς τα πάθη της γαστρός και, χάρη στην εγκράτεια, διέφευγε τις αρρώστιες του σώματος, διότι δεν είχε πολύ καλή υγεία, απειλούμενος από τη λώβη (λέπρα) και παρουσιάζοντας πολλά κακά»: «Τό δέ εγκρατεύς περί τάς επιθυμίας της γαστρός εις άκρον κεκοσμημένος», γράφει επί λέξη ο Κεδρηνός, «εν τούτω τάς πολλάς διεφεύγειν του σώματος νόσους, ουχ υγιως αυτου διακειμένου, απειλουντός τε λώβην και φύοντος πλειστα μοχθηρά» (1,4). Ο Ιωάννης Ζωναράς, πιο αναλυτικός από τον Κεδρηνό, γράφει ότι, όταν ο Κωνσταντίνος βρισκόταν ακόμα στη Ρώμη, είχε εξανθήματα, που έμοιαζαν με λέπρα, αλλά οι γιατροί τα ονόμαζαν λώβη. Διασώζει δε ο Ζωναράς και μία πολύ περιεργή, ως προς τη θεραπεία, πληροφορία, ότι δηλαδή οι ιερείς του Διός είπαν στον αυτοκράτορα ότι ο μόνος τρόπος θεραπείας ήταν το λουτρό με αχνιστό αίμα νηπίων(!): «σώματος νοσερου» δηλαδή «λόγω του σώματός του που είχε αδύναμη κράση», γράφει ο Ζωναράς χαρακτηριστικά, «καί πλειστα φύοντος εκ κακοχυμίας και ύλης μοχθηρας εξανθήματα τυχών, ως λώβην ταυτα παρά των ιατρων ονομάζεσθαι και λέπρα παρεικάζεσθαι και τήν τούτων θεραπείαν απαγορεύεσθαι, ευρε τούς ιερεις του εν τω Καπιτωλίω Διός ουκ άλλως λέγοντας τεύξασθαι θεραπείας αυτόν ει μή εν παιδων νηπίων έτι ατμίζοντι λούσαιτο αίματι» (1,5).

Δηλαδή, «ο Κωνσταντίνος έβγαζε πολλά εξανθήματα λόγω διαταραχής στην ισορροπία των χυμών του σώματός του (*Ιπποκράτειος θεώρηση* για τη γένεση των ασθενειών) με συνέπεια τη συγκέντρωση παθολογικών ουσιών που προκαλούσαν την ονομαζόμενη από τους ιατρούς λώβη, την οποία παραλλήλιζαν με τη λέπρα, η θεραπεία της οποίας ήταν αδύνατη. Ο Κωνσταντίνος πήγε στους ιερείς του Καπιτώλιου Δία οι οποίοι του είπαν ότι ο μόνος τρόπος θεραπείας ήταν το λουτρό με αχνιστό αίμα νηπίων».

Ο Γεώργιος Μοναχός σημειώνει: «Τόν δέ γε Κωνσταντινον μετά τήν του πατρός τελευτήν συνέβη νοσησαι, ώστε μήτε μάγων προγνώσεις και μυθολογίαι, μήτε ιατρων επιστημαι και σκευασίαι βοηθημάτων δύνασθαι τό πάθος αυτου θεραπευσαι, πρός όν οι

των ειδώλων μιερες ελθόντες υπέθεντο κολυμβήθραν τινά πλησθεισαν αίματος παιδίων αφθόρων, καί θερμω τω αίματι καί αφρίζοντι βαπτισθέντα αυτόν υγιαναι» (1,6). Δηλαδή, «ο Κωνσταντίνος μετά το θάνατο του πατέρα του, νόσησε και ούτε οι μη επιστημονικά στηριζόμενες προγνώσεις των μάγων της εποχής, ούτε οι γνώσεις και τα φάρμακα των ιατρών μπόρεσαν να θεραπεύσουν την πάθησή του. Έτσι ήλθαν οι ιερείς των ειδώλων και τον έβαλαν σε κάποια κολυμβήθρα γεμάτη με ζεστό αίμα μικρών παιδιών, τον έλουσαν και θεραπεύθηκε».

Ο Μιχαήλ Γλύκας αναφέρει: «...μετά δέ ταυτα υπό της γυναικός αυτου Φαύστας εις ειδωλομανίαν εκκλίνει, αλλ' ο Θεός έλκει πάλιν αυτόν διά της λέπρας. Κατασχουσα γάρ αυτόν μέγα εστενοχώρει παντοίως καί έθλιβε... καλειται ουν ο επίσκοπος Σιλβέστρος καί βαπτίσας αυτόν της λέπρας ελευθεροι» (1,7). Δηλαδή, «...μετά από αυτά επηρεάσθηκε από τη γυναίκα του τη Φαύστα και παρέκκλινε προς την ειδωλομανία, αλλά ο Θεός τον οδήγησε πάλι κοντά Του με τη λέπρα. Έτσι, είχε αυτός λόγω της ασθένειας του μεγάλη θλίψη ... κάλεσαν λοιπόν τον επίσκοπο Σιλβέστρο και αφού τον βάπτισε τον ελευθέρωσε από τη λέπρα».

Όπως αναφέρεται χαρακτηριστικά στη βυζαντινή ιστοριογραφία κατά τις τελευταίες στιγμές της ζωής του Μεγάλου Κωνσταντίνου: «...δυο δάκρυα τρέξαν από τα μάτια του, κύλησαν στα σκαμμένα από την αρρώστια (λέπρα) μάγουλά του,...» (8). Η ασθένεια του Μεγάλου Κωνσταντίνου παρ' ότι εμφανίσθηκε σε προγενέστερο χρόνο από την εκδήλωση της μεγάλης επιδημίας της λέπρας τον 6ο -7ο μ.Χ. αιώνα στη νότια Ευρώπη, κατά την κορύφωση διαδώσεώς της το 13ο μ.Χ. αιώνα αποτέλεσε θέμα πολλών έργων τέχνης όπως για παράδειγμα μιας νωπογραφίας του 13ου μ.Χ. αιώνα στο ναό Santi Quattri Coronati όπου οι Απόστολοι Πέτρος και Παύλος έρχονται σε βοήθεια του βυζαντινού αυτοκράτορα (9).

Το δεύτερο περιστατικό λοιμώδους δερματικού νοσήματος αφορά στην πρώτη κόρη του αυτοκράτορα Κωνσταντίνου Η' (1025-1028 μ.Χ.) Ευδοκία. Μας πληροφορεί πολύ διακριτικά γι' αυτό ο σύγχρονός της Μιχαήλ Ψελλός, που την είχε γνωρίσει από κοντά, και ο χρονογράφος Ιωάννης Ζωναράς (18' αιώνας). Ο Ψελλός εύρισκε ότι από τις κόρες του Κωνσταντίνου η Ευδοκία « δεν έμοιαζε και τόσο με τα άλλα μέλη της οικογένειας...στη μορφή δεν ήταν πολύ ωραία» (10). Ήταν «ομαλωτέρα τό ηθος καί τήν γνώμην απαλωτέρα, κάλλους τε μέσως έχουσα» (1,11). Δηλαδή, «είχε ήρεμο χαρακτήρα με τρυφερή και ευχάριστη άποψη για τη ζωή, με μέτρια ομορφιά».

Στο σημείο αυτό ο Ψελλός αισθάνεται την ανάγκη να αναλύσει, γιατί ήταν μέτριας



ομορφιάς η Ευδοκία. Όταν ήταν παιδί, γράφει, η Ευδοκία είχε περάσει κάποιο λοιμώδες νόσημα, που της είχε αφήσει στο πρόσωπο σημάδια: « διέφθαρτο γάρ εξ έτι παιδός ούσης, λοιμικου ταύτην κατασχόντος νοσήματος» (1,10,11). Την πληροφορία για την Ευδοκία επαναλαμβάνει και ο σχεδόν σύγχρονός της Ζωναράς, σημειώνοντας τη λεπτομέρεια ότι: «Λοιμικω τό κάλλος λωβηθειςα νοσήματι, θελήματι τω Θεω καθιέρωτο» (1,5). Δηλαδή «λόγω του λοιμώδους νοσήματος της λώβης επηρεάσθηκε η ομορφιά της και έτσι θέλησε να αφιερωθεί στο Θεό». Η αρρώστια της επέβαλε την “επιλογή” του μοναστικού βίου, διότι δεν υπήρχε άλλος τρόπος θεραπείας. Κατά τη βυζαντινή παράδοση, στα μοναστήρια βρήκαν καταφύγιο τα θύματα των φοβερών επιδημιών καθώς οι μοναχοί ήταν οι πρώτοι γιατροί που εμπνεόμενοι από αισθήματα φιλαλληλίας και αυτοθυσίας ανέλαβαν με αυταπάρνηση την περίθαλψή τους (9,10).

Τις περιπτώσεις του άνθρακα οφείλουμε στον κατά πάντα αξιόπιστο χρονογράφο Θεοφάνη (Θ' αιώνας). Από τη χρονογραφία του μαθαίνουμε ότι το πρώτο περιστατικό άνθρακα παρουσίασε στα πόδια ο εικονομάχος αυτοκράτορας Κωνσταντίνος Ε' Κοπρώνυμος (741-775 μ.Χ.) σε καιρό που βρισκόταν σε εκστρατεία εναντίον των Βουλγάρων.

Αναφέρει ο Θεοφάνης: «Τούτω τω έτει της ιγ' ινδικτιωνος μηνί Αυγούστω εξηλθεν ο βασιλεύς Κωνσταντινος κατά Βουλγάρων, καί δεινως κατά των σκελων θεηλάτω πληγη ανθρακωθείς καντευθεν πυρετω σφοδροτάτω καί ιατροις αγνώστω δι' υπερβάλλουσιν έκκαυσιν συσχεθείς κατά τήν Αρκαδιούπολιν υπέστρεψεν, επ' ώμων εν κραββάτω φερόμενος κατά των υπηκόων, καί ελθών εν Σηλυμβρία καί εμπλώισας τη ιδ' του Σεπτεμβρίου μηνός της ιδ' ινδικτιωνος φθάσας εν τω Στρογγύλω καστελλίω οικτρως εν τω χελανδίω θνήσκει βοων καί λέγων, ότι ζων έτι πυρί ασβέστω παρεδόθην τήν τε αγίαν παρθένον καί Θεοτόκον υμνεισθαι εξαιτων ο άσπονδος αυτης εχθρός» (1,12). Δηλαδή, «τον Αύγουστο του έτους της ιγ' ινδικτιώνος εκστράτευσε κατά των Βουλγάρων ο βασιλεύς Κωνσταντίνος, και εμφάνησε στα πόδια άσχημη πληγή άνθρακα σταλμένη από το Θεό, την οποία ακολούθησε πολύ υψηλός πυρετός αδιάγνωστος από τους γιατρούς, που τον συνόδευαν. Μεταφέρθηκε με φορείο μέχρι το κοντινό λιμάνι, την Αρκαδιούπολη, για να επιβιβασθεί σε χελάνδιο, σε πολεμικό πλοίο. Καθώς έπλεαν προς την Κωνσταντινούπολη, στη Σιλυμβρία , τη ιδ' του Σεπτεμβρίου της ιδ' ινδικτιώνος φθάνοντας στο Στρογγυλό κάστρο τον βρήκε ο θάνατος οικτρά». Τα τελευταία του λόγια ήταν: «Ζωντανός ακόμα παραδόθηκα στο άσβεστο πυρ» και «ενώ ήταν άσπονδος εχθρός της Παναγίας, ζήτησε στο εξής να υμνείται η Θεοτόκος». Την ίδια περιγραφή των ανωτέρω γεγονότων έχουμε στο

Γεώργιο Μοναχό (Θ' αιώνας) και στο Λέοντα Γραμματικό (6,13).

Ο Ιωάννης Ζωναράς δίνει μια άλλη διάσταση του θανάτου του Κωνσταντίνου Ε', αναφέροντας ότι ο θάνατός του δεν προήλθε από τη δερματοπάθειά του αλλά από...απόπειρα αυτοκτονίας: «Οι πόδες αυτού απηνθράκωντο, όθεν αυτόν λάβροι πυρετοί και φλογώδεις εξέκαιον, ως μηδέν τούτων μηδέ παρ' ιατρων επινοεισθαι αλέξημα...άρτι φθάσας εις τό Στραγγύλον του μεμεθυσμένου θείου ξυρου ο δείλαιος επειράθη και βιαίως εκει τόν βίον κατέστρεψε» (5). Δηλαδή, «τα πόδια του εμφάνισαν πληγές άνθρακα, και πολύ υψηλοί, φλογώδεις πυρετοί τον έκαιαν. Επειδή οι γιατροί δεν μπορούσαν να τον βοηθήσουν...μόλις έφθασε στο Στρογγυλό κάστρο, ο δειλός απειράθη να αυτοκτονήσει με ξυράφι εμβαπτισμένο σε θείον και βίαια εκεί τελείωσε τον βίο του».

Η δεύτερη περίπτωση άνθρακα είναι αυτή του γιού του αυτοκράτορα Κωνσταντίνου Ε' Κοπρωνύμου, Λέοντος Δ' Χαζάρου (775-780μ.Χ.), ο οποίος το Σεπτέμβριο του 780 σε ηλικία 30 ετών πέθανε ξαφνικά από άνθρακα στο κεφάλι (14). Την πρώτη πληροφορία βρίσκουμε και πάλι στο χρονογράφο Θεοφάνη (Θ' αιώνας), τον οποίο ακολουθούν και άλλοι. Πρόκειται για μία ιεροσυλία, που διέπραξε ο Λέων αποσπώντας από το θησαυροφυλάκιο της Αγίας Σοφίας ένα στέμμα με πολύτιμους λίθους, δώρο του αυτοκράτορα Μαυρίκιου, και για τον άνθρακα, που παρουσίασε στη συνέχεια στο κεφάλι του, όπου και φόρεσε το στέμμα: «Τη δέ η' του Σεπτεμβρίου μηνός της δ' ινδικτιωνος τέθνηκε Λέων, ο υιός Κωνσταντίνου, τρόπω τοιούτω, λιθομανής υπάρχων λίαν ηράσθη του στέμματος της μεγάλης εκκλησίας και λαβών εφόρεσεν αυτό, και εξηλθον άνθρακες επί τήν κεφαλήν αυτού, και ληφθείς σφοδρω πυρετω τέθνηκε βασιλεύσας παρά έξ ημέρας έτη πέντε» (1,5,12,14).

Δηλαδή, «την η' του Σεπτεμβρίου της δ' ινδικτιώνος πέθανε ο Λέων, ο υιός του Κωνσταντίνου, με τον ακόλουθο τρόπο: αγαπώντας με υπερβολικά άρρωστο τρόπο τους πολύτιμους λίθους, πολύ πόθησε το στέμμα της μεγάλης εκκλησίας και αποσπώντας το (από το θησαυροφυλάκιο) το φόρεσε παρουσιάζοντας στη συνέχεια δερματικές βλάβες άνθρακα στο κεφάλι του. Λόγω αυτών των βλαβών και του πολύ υψηλού πυρετού πέθανε αφού βασίλευσε πέντε έτη παρά έξι ημερες». Πολλοί χρονογράφοι, αναφερόμενοι στο νόσημα, πιστεύουν ότι ήταν θεία τιμωρία για την ιεροσυλία που είχε διαπράξει ο Λέων Δ'.

Ο Γεώργιος Μοναχός αναφέρει: «Τολμήσας γάρ φορέσαι τό στέμμα της μεγάλης εκκλησίας απηνθρακώθη δεινως η κεφαλή αυτού, και ούτω πυρετω σφοδροτάτω συνεχόμενος και φθειρόμενος ετελεύτησε της ιεροσυλίας τά επίχειρα κομισάμενος» (1,6). Δηλαδή, «αφού λοιπόν τόλμησε να φορέσει το στέμμα της μεγάλης εκκλησίας εμφάνισε

πολύ άσχημες πληγές άνθρακα στο κεφάλη του, με πολύ υψηλό και ασταμάτητο πυρετό, συνεχή επιβάρυνση της υγείας του και τελικά τον θάνατο του ως αποτέλεσμα της ιεροσυλίας του».

Ο Ιωήλ επαναλαμβάνει κατά γράμμα τον Γεώργιο Μοναχό: « όθεν απηνθρακώθη δεινως η κεφαλή αυτου, καί σφοδροτάτω πυρετω συνεχόμενος ετελεύτησε, της ιεροσυλίας επίχειρα κομισάμενος» (1,15). Την ίδια περίπου περιγραφή βρίσκουμε και στον Γεώργιο Κεδρηνό (4) Ολοκληρώνοντας τις περιπτώσεις του άνθρακα θα μπορούσαμε να χαρακτηρίσουμε το νόσημα ως λοιμώδες μεταδοτικό, αφού ο άνθρακας προκαλείται από τον βάκιλο του άνθρακα, σε αντίθεση, κατά κύριο λόγο, με τις πεποιθήσεις της εποχής περί Θείας τιμωρίας των εικονομάχων αυτοκρατόρων. Οι αναφερόμενες ως δερματικές παθήσεις στα βυζαντινά ιατρικά κείμενα είναι αριθμητικά οι περισσότερες συγκριτικά με τις υπόλοιπες παθήσεις που αναγράφονται σ' αυτά. Από αυτές, ορισμένες αφορούν σαφώς δερματικές ασθένειες, ενώ άλλες αποτελούν συμπτώματα συστηματικών νοσημάτων, που εκδηλώνονται και στο δέρμα. Στην παρούσα μονογραφία έγινε προσπάθεια (κρατώντας κάποιες επιφυλάξεις για τις περιπτώσεις της λώβης, ως προς την τελική διάγνωση) περιγραφής με απόλυτη ακρίβεια, από τις βυζαντινές πηγές, τεσσάρων περιπτώσεων λοιμωδών δερματικών νοσημάτων που αφορούν αυτοκρατορικά πρόσωπα, προκαλώντας θαυμασμό για την ακριβή καταγραφή τους από τους βυζαντινούς ιστοριογράφους.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Παπαδημητρίου Νόννα. Νοσήματα και ατυχήματα στις αυτοκρατορικές οικογένειες του Βυζαντίου 1996:120-126.
2. Leonis Philosophi et Medici. Conspectus Medicinae, Anecdota Medica Graeca e Codicibus MSS. Expromsit F.Z. ERMERINS, Amsterdam 1963:209.
3. Michaelis Pselli. Poemata, ed. L.G.WESTERINK, Bibliotheca Scriptorum Graecorum et Romanorum Teubneriana, Lipsiae 1992:1301-1303.
4. Georgius Cedrenus Ioannis Scylitzae ope. Historiarum Compendium, ed. I. BEKKER, Corpus Scriptorum Historiae Byzantinae, Bonn 1839;I:473 & II:20.
5. Ioannis Zonarae. Epitome Historiarum cum Caroli Ducangii suisque Annotationibus, ed. Lud. DINDORFIUS, Bibliotheca Scriptorum Graecorum et Romanorum Teubneriana, Lipsiae 1870-1871;III:175-176, 354-355 και 357& IV:126.
6. Georgii Monachi. Chronicon, ed. Car.DE BOOR-P.WIRTH, Bibliotheca Scriptorum Graecorum et Romanorum Teubneriana, Lipsiae 1978;II:485, 760, 765.

7. Michaelis Glycae. Annales, ed. I. BEKKER, Corpus Scriptorum Historiae Byzantinae, Bonn 1836:460.
8. Κώστας Δ. Κυριαζής. Κωνσταντίνος ο Μέγας, εκδόσεις " Εστίας", 1995:424.
9. Λασκαράτος Ιωάννης. Ιστορία της Ιατρικής, εκδόσεις Πασχαλίδης, 2003;I: 378,436.
10. Μιχαήλ Ψελλός. Χρονογραφία, εκδόσεις Άγρα, Αθήνα 1993:94.
11. Michel Psellos. Chronographie ou Histoire d' un siecle de Byzance (976-1077), ed. E. RENAULD, Belles Lettres, Paris 1967;I:27.
12. Theophanis. Chronographia, ed. Carolus DE BOOR, Bibliotheca Scriptorum Graecorum et Romanorum Teubneriana, Lipsiae 1883;I:448, 453.
13. Leonis Grammatici. Chronographia, ed. I. BEKKER, Corpus Scriptorum Historiae Byzantinae, Bonn 1842:189-190.
14. Λάσκαρης Ηλίας. Βυζαντινοί Αυτοκράτορες, εκδόσεις Βυζαντίς, Αθήνα 1995;I:130.
15. Ioil. Chronographia Compendiaria, ed. I. BEKKER, Corpus Scriptorum Historiae Byzantinae, Bonn 1836:52.

## **ΓΕΝΟΜΙΚΗ - ΠΡΩΤΕΟΜΙΚΗ**

**Χρύσα Παχούλα - Παπαστεριάδη**

τ. Συντονίστρια Διευθύντρια του Τμήματος Ανοσολογίας-Ιστοσυμβατότητας,  
Γ.Ν.Α. «Ο ΕΥΑΓΓΕΛΙΣΜΟΣ»

*Στοιχεία επικοινωνίας:*

*Τηλ.: 6974338209*

*E-mail: cparaste@gmail.com*

### **ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

**Γενομική** (Genomics) είναι η μελέτη του συνόλου των γονιδίων δηλ. του γονιδιώματος (Genome) των οργανισμών. Το πεδίο της γενομικής περιλαμβάνει όλες εκείνες τις τεχνικές και τις διαδικασίες προσδιορισμού της αλληλουχίας του DNA, αλλά και την επακριβή γενετική χαρτογράφηση ενός οργανισμού. Περιλαμβάνει επίσης την μελέτη των ενδογονιδιωματικών φαινομένων, όπως π.χ. επίσταση (epistasis), ετέρωση (heterosis), πλειοτροπισμός (pleiotropy) και άλλες αλληλοεπιδράσεις μεταξύ γενετικών τόπων και αλληλίων εντός του γονιδιώματος.

Αντίθετα, η έρευνα και ο προσδιορισμός της λειτουργίας του γονιδιώματος είναι το πεδίο της μοριακής βιολογίας ή της γενετικής και αποτελεί σημείο συνάντησης της σύγχρονης ιατρικής και μοριακής έρευνας.

Σύμφωνα δε με νεώτερες απόψεις γενομική είναι η μελέτη όλων των γονιδίων ενός κυττάρου ή ενός ιστού σε επίπεδο DNA (genotype), mRNA (transcriptom) ή πρωτεΐνης (proteome).

Η γενομική καθιερώθηκε από τον Fred Sanger την δεκαετία του 1970, όταν πρώτος πέτυχε να προσδιορίσει την αλληλουχία του γονιδιώματος ενός ιού και ενός μιτοχονδρίου. Ο δε όρος «genomics» αποδίδεται στον Dr. Tom Roderick, γενετιστή στο Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA), κατά την διάρκεια μιας συνάντησης για την χαρτογράφηση του ανθρώπινου γονιδιώματος στο Maryland, το 1986.

Ο πρώτος προσδιορισμός αλληλουχίας γονιδίου έγινε το 1972 από τον Walter Fiers και τους συνεργάτες του στο εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας του Πανεπιστημίου Ghent (Ghent, Belgium) και αφορούσε το γονίδιο για Bacteriophage MS2 coat protein.

Η γνώση του γονιδιώματος έδωσε την δυνατότητα διερεύνησης του πεδίου της «λειτουργικής γονιδιωματικής», η οποία έχει κυρίως να περιγράψει την έκφραση γονιδιακών προτύπων σε διάφορες καταστάσεις, όπως κατά τη διάρκεια ενός φαινομένου ή μιας λειτουργικής διαδικασίας.

Σήμερα, είναι γνωστή η πλήρης αλληλουχία γονιδιώματος πολλών ιών (>1879), βακτηρίων (>577) και ευκαρυωτικών οργανισμών (>23). Η μελέτη των οργανισμών αυτών έγινε είτε διότι είναι παθογόνα είτε διότι αποτέλεσαν χρήσιμα μοντέλα μελέτης.

Όσον αφορά το ανθρώπινο γονιδίωμα, ο προσδιορισμός της αλληλουχίας του έγινε με τη συνεργασία πολλών Ερευνητικών Κέντρων ανά τον Κόσμο, μέσω του Human Genome Project-HGP και δηλώθηκε ως «περατωθείς» το 2007.

Το DNA (deoxyribonucleic acid-δεοξυριβονουκλεϊνικό οξύ) είναι το μόριο που φέρει τις γενετικές πληροφορίες και αποτελεί την γενετική ταυτότητα κάθε οργανισμού. Είναι υπεύθυνο για την διατήρηση και την μεταβίβαση στους απογόνους της γενετικής πληροφορίας.

Η ροή της γενετικής πληροφορίας περιλαμβάνει την αντιγραφή του DNA, την μεταγραφή του σε RNA και την μετάφραση σε πρωτεΐνη, η οποία και προσδιορίζει τον τελικό φαινότυπο.

Και ενώ ο Oswald T. Avery με τους συνεργάτες του, το 1944, ανακάλυψαν, ότι το DNA είναι το μόριο που περιέχει τις γενετικές πληροφορίες, η δομή του DNA περιγράφηκε το 1953 από τους James Watson και Francis Crick.

Έτσι, σήμερα είναι γνωστό ότι το DNA είναι ένα λεπτό, μακρύ μεγαλομόριο που βρίσκεται στους πυρήνες των κυττάρων, στα χρωμοσώματα, τυλιγμένο σαν κουβάρι. Το DNA ενός κυττάρου θηλαστικού, εάν ξετυλιχθεί, έχει μήκος δύο περίπου μέτρα. Το συνολικό DNA των χρωμοσωμάτων αποτελεί το γονιδίωμα που όμως, μόνο το 3-5% είναι τα γονίδια που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες.

Το DNA αποτελείται από δύο δεξιόστροφες πολυνουκλεοτιδικές αλύσεις (έλικες-κλώνους) που περιελίσσονται γύρω από τον ίδιο άξονα, ώστε να σχηματίζουν μια διπλή έλικα. Βασική μονάδα της πολυνουκλεοτιδικής αλύσου αποτελούν τα δεοξυριβονουκλεοτίδια, καθένα από τα οποία αποτελείται από μια αζωτούχο βάση (αδενίνη(A), γουανίνη (G), θυμίνη (T), κυτοσίνη (C)) που σχηματίζουν ζεύγη A/T, G/C και φέρουν την γενετική πληροφορία καθώς επίσης και από ένα σάκχαρο (δεοξυριβόζη) και μία φωσφορική ομάδα που αποτελούν τον σκελετό του DNA.

Η δομή του DNA χαρακτηρίζεται από την συμπληρωματικότητα των βάσεων, που σημαίνει ότι η μονή έλικα του DNA έχει την δυνατότητα να αντιγράφεται παρουσία ειδικών ενζύμων και να προκύπτει το «κατοπτρικό» της αντίγραφο. Επίσης, λόγω της συμπληρωματικότητας των βάσεων, μία μονή άλυσος DNA «υβριδίζεται» με συμπληρωματικές αλληλουχίες και παρέχεται έτσι η δυνατότητα αναγνώρισης ενός συγκεκριμένου τμήματος του DNA.

Η αντικατάσταση μιας βάσης από μια άλλη έχει ως αποτέλεσμα αλλαγή της αλληλουχίας (μετάλλαξη), παραγωγή διαφορετικής γενετικής πληροφορίας και αλλαγή του φαινοτύπου, με παθολογικά, συνήθως, αποτελέσματα δηλ. νόσο.

Οι δύο έλικες-κλώνοι του DNA συγκρατούνται μεταξύ τους με τους δεσμούς των ζευγών των βάσεων και με δεσμούς υδρογόνου. Η σταθερότητα των δεσμών αυτών εξαρτάται από το pH του περιβάλλοντος και είναι μέγιστη σε pH 4-11. Σε χαμηλότερο ή υψηλότερο pH, με την επίδραση διαφόρων παραγόντων και με θερμοκρασία 90-95°C, οι δεσμοί διασπώνται και το δίκλωνο DNA γίνεται μονόκλωνο. Η μεταβολή αυτή ονομάζεται μετουσίωση (denaturation) του DNA και είναι αναστρέψιμη. Επαναφορά της θερμοκρασίας σε 25°C περίπου, χαμηλότερα από την θερμοκρασία τήξεως του DNA, έχει ως αποτέλεσμα την μετατροπή του μονόκλωνου σε δίκλωνο DNA (renaturation).

Σήμερα, υπάρχει δυνατότητα παρέμβασης στην διπλή έλικα και αυτή η διαδικασία είναι γνωστή ως βιοτεχνολογία του ανασυνδυαζόμενου DNA. Επίσης υπάρχει δυνατότητα εύκολου πολλαπλασιασμού του DNA με την τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction-PCR). Τα δύο αυτά τεχνολογικά επιτεύγματα άνοιξαν νέους δρόμους στην ιατρική διαγνωστική και την έρευνα.

Η διπλή έλικα εξηγεί πως αποθηκεύονται, πως διακωδίζονται και πως εκφράζονται οι γενετικές πληροφορίες και καθιστά κατανοητούς τους μοριακούς μηχανισμούς της κληρονομικότητας, αλλά και της φυσικής επιλογής. Με άλλα λόγια, οι Watson και Crick ανακάλυψαν την στήλη της Ροζέτας, όπου με χημικά σύμβολα είναι γραμμένη η ιστορία της ζωής. Η ανακάλυψη της διπλής έλικας και οι εξελίξεις που ακολούθησαν αποτελούν αναμφισβήτητα την μεγαλύτερη πρόοδο του εικοστού αιώνα στο πεδίο των βιολογικών επιστημών και οι δύο επιστήμονες Watson και Crick τιμήθηκαν, το 1962, με βραβείο Νόμπελ.

**Πρωτεομική** (proteomics) είναι η μελέτη της δομής και της λειτουργίας των πρωτεϊνών ενός κυττάρου, ιστού ή οργανισμού καθώς επίσης η μελέτη των μεταβολών των πρωτεϊνών αυτών κάτω από ορισμένες συνθήκες.

Οι πρωτεΐνες είναι ζωτικά συστατικά των οργανισμών δεδομένου ότι είναι τα κύρια στοιχεία των φυσιολογικών μεταβολικών μονοπατιών των κυττάρων.

Ο όρος πρωτεομική (proteomics) χρησιμοποιήθηκε 1997 κατ' αναλογία προς τον όρο γενομική (Genomics).

Ο όρος proteome-πρωτέομα αναφέρεται στο σύνολο των πρωτεϊνών ενός οργανισμού, ιστού ή κυττάρου συμπεριλαμβανόμενων των τροποποιήσεών τους.

Το πρωτέομα μπορεί να ποικίλλει τόσο σε φυσιολογικές όσο και παθολογικές καταστάσεις και εξαρτάται π.χ. από την ηλικία του οργανισμού, τον κύκλο του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, ειδικές συνθήκες όπως stress, ειδικές καταστάσεις όπως νοσήματα.

Η λέξη πρωτέομα-proteome προήλθε από την σύμπτυξη των λέξεων protein και genome.

Μετά την γενομική, η πρωτεομική θεωρείται το δεύτερο στάδιο μελέτης ενός βιολογικού συστήματος και είναι εξαιρετικά πολύπλοκη σε σχέση με τη γενομική, διότι, ενώ το γονιδίωμα είναι κατά το μάλλον ή ήττον σταθερό, το πρωτέομα διαφέρει τόσο από κύτταρο σε κύτταρο (διαφορετικά γονίδια εκφράζονται σε διαφορετικούς τύπους κυττάρων), όσο και από χρονική στιγμή σε χρονική στιγμή μελέτης.

Αυτό σημαίνει ότι ακόμη και το βασικό σύνολο πρωτεϊνών που παράγονται από ένα κύτταρο, θα πρέπει κάθε φορά να προσδιορίζεται. Αυτός ο προσδιορισμός παλαιότερα πραγματοποιούνταν με την ανάλυση του mRNA. Σήμερα όμως είναι γνωστό το mRNA δεν μεταφράζεται πάντα σε πρωτεΐνη και ότι το ποσόν της παραγόμενης πρωτεΐνης εξαρτάται από το γονίδιο που μεταφράζεται, αλλά και από την τρέχουσα λειτουργική κατάσταση του κυττάρου.

Η πρωτεομική επιβεβαιώνει την παρουσία μιας δεδομένης πρωτεΐνης και δίδει άμεση μέτρηση της παρούσας ποσότητας.

Εξίσου σημαντικό είναι ότι κάθε πρωτεΐνη δυνατόν να υποστεί τροποποιήσεις, οι οποίες θα έχουν επίδραση στην λειτουργία της πρωτεΐνης αυτής. Μια τέτοια τροποποίηση είναι μέσω φωσφορυλίωσης π.χ. κατά την ενδοκυττάρια μεταβίβαση μηνύματος πολλά ένζυμα και δομικές πρωτεΐνες υφίστανται φωσφορυλίωση με αποτέλεσμα να καθίστανται στόχοι δέσμευσης ή αλληλεπίδρασης με άλλες πρωτεΐνες, οι οποίες αναγνωρίζουν την φωσφορυλιωμένη περιοχή και έτσι προχωράει η οδός ενεργοποίησης του κυττάρου.

Τροποποιήσεις πρωτεϊνών και κατ' επέκταση της λειτουργίας τους, μπορεί επίσης να προέλθουν από μεθυλίωση, ακετυλίωση, γλυκοζυλίωση, νιτροζυλίωση, οξειδωση κ.λ.π. Ορισμένες πρωτεΐνες υφίστανται μέρος αυτών των τροποποιήσεων, ενώ άλλες υφίστανται



το σύνολο των τροποποιήσεων, γεγονός που καθιστά την πρωτεομική εξαιρετικά πολύπλοκη.

Η μελέτη του πρωτεόματος δίδει σαφέστερη εικόνα της δομής και της λειτουργίας ενός οργανισμού απ' ό,τι η μελέτη του γονιδιώματος, για τους εξής λόγους:

- Το επίπεδο μεταγραφής ενός γονιδίου δίδει μια αδρά μόνο εκτίμηση του επιπέδου έκφρασης σε πρωτεΐνη. Ένα mRNA που παράγεται σε μεγάλη ποσότητα μπορεί να αποδομηθεί ταχέως ή να μεταφρασθεί ανεπαρκώς, με αποτέλεσμα παραγωγή μικρής ποσότητας πρωτεΐνης,
- πολλές πρωτεΐνες υφίστανται μετά-μεταφραστικές τροποποιήσεις οι οποίες διαφοροποιούν την λειτουργία τους. Μέθοδοι, όπως φωσφοπρωτεομική και γλυκοπρωτεομική, χρησιμοποιούνται σήμερα για την μελέτη των τροποποιήσεων αυτών,
- από ένα μετάγραφο (transcript) μπορεί να προκύψουν περισσότερες της μίας πρωτεΐνες μέσω εναλλακτικού ματίσματος (splicing) ή εναλλακτικής μετά-μεταφραστικής τροποποίησης,
- πολλές πρωτεΐνες σχηματίζουν σύμπλοκα με άλλες πρωτεΐνες ή μόρια RNA και λειτουργούν μόνο ως τέτοιου είδους σύμπλοκα,
- αποδόμηση πρωτεΐνης είναι δυνατόν να συμβεί, και αυτή η διαδικασία επηρεάζει το πρωτέωμα.

## ΜΕΘΟΔΟΙ ΜΕΛΕΤΗΣ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΟΣ

Για τη μελέτη του γονιδιώματος χρησιμοποιούνται μοριακές τεχνικές ή τεχνικές μοριακής βιολογίας και γενετικής, οι οποίες μελετούν το γενετικό υλικό (DNA) και τη ροή της γενετικής πληροφορίας, την σχέση τους με τις φυσιολογικές λειτουργίες του οργανισμού και την συσχέτισή τους με παθολογικές καταστάσεις.

Οι μοριακές τεχνικές βασίζονται στη δομή, στη λειτουργία και στις χαρακτηριστικές ιδιότητες των DNA και RNA μορίων και έχουν τα μέγιστα υποστηριχθεί από την εφαρμογή των εξελίξεων στην βιοτεχνολογία. Αφαιρετική υβριδοποίηση (subtractive hybridization), διαφορική έκφραση (differential display), RAP-PCR (RNA finger printing by arbitrary primed PCA), EST (expressed sequence Tag) sequencing ανάλυση νουκλεοτιδικής αλληλουχίας, SAGE (serial analysis of gene expression), MPSS (massively parallel signature sequence), DNA μικροσυστοιχίες (microarrays) όπως cDNA μικροσυστοιχίες (spotted array), μικροσυστοιχίες

ολιγονουκλεοτιδίων (gene chip, DNA chip, genome chip), συστοιχίες σφαιριδίων (bead array), είναι ορισμένες από τις χρησιμοποιούμενες τεχνικές.

Η εξέλιξη των τεχνικών αυτών σε εύχρηστες και αυτοματοποιημένες τεχνικές, έφερε την εφαρμογή τους και στα διαγνωστικά εργαστήρια ρουτίνας.

Οι μοριακές τεχνικές δεν είναι παντού και πάντα χρήσιμες. Έχουν τους περιορισμούς τους και τις αδυναμίες τους. Υπάρχουν τεχνικά, ιατρικά και γενετικά λάθη. Ο γονότυπος δεν αντικατοπτρίζει πάντα στον φαινότυπο. Για τους λόγους αυτούς χρειάζεται εξειδικευμένο ιατρικό προσωπικό, συνεργασία άλλων επιστημόνων, όπως βιολόγοι, και άριστη τεχνολογική υποστήριξη προκειμένου οι μοριακές τεχνικές να αποτελούν χρήσιμο εργαλείο στην καθημερινή ιατρική πράξη.

## **ΜΕΘΟΔΟΙ ΜΕΛΕΤΗΣ ΠΡΩΤΕΟΜΑΤΟΣ**

Ολόκληρο το πρωτέομα αποτελείται από 30.000-100.000 πρωτεΐνες. Ορισμένες από τις τεχνικές που χρησιμοποιούνται για την μελέτη των πρωτεϊνών είναι:

- Τεχνικές διαχωρισμού πρωτεϊνών
  - 2D-PAGE (2-dimentional polyacrylamide gel electrophoresis)
  - δισδιάστατη ηλεκτροφόρηση σε γέλη πολυακρυλαμιδίου
  - χρωματογραφία (υγρή και στερεή)
- Τεχνικές ταυτοποίησης πρωτεϊνών
  - φασματομετρία μάζας (mass spectrometry-MS)
  - ανάλυση με χρήση μικροσυστοιχιών (protein microarrays)
  - ανάλυση της αλληλουχίας των αμινοξέων (aminoacid sequence analysis)
  - peptide fingerprinting (αποτύπωση πεπτιδίων)
- Τεχνικές χαρακτηρισμού των PTMs (post translational modifications) των πρωτεϊνών
  - ανάλυση εικόνας σε πειράματα πρωτεομικής (image analysis for proteomics experiments)
  - μελέτη της λειτουργικής πρωτεομικής.

## **ΠΡΑΚΤΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΠΡΩΤΕΟΜΙΚΗΣ ΚΑΙ ΓΕΝΟΜΙΚΗΣ**

Μερικά από τα πεδία εφαρμογής της πρωτεομικής και γενομικής είναι: Διαγνωστική νοσημάτων με την χρήση βιοδεικτών (biomarkers), παραγωγή νέων φαρμάκων, εισαγωγή νέων θεραπευτικών σχημάτων, ανεύρεση μεταλλάξεων γονιδίων που ευθύνονται ή συσχετίζονται με νοσήματα, μελέτη καρκίνου (π.χ. ανίχνευση ογκογονιδίων),

προγενετικός έλεγχος, μελέτη ιστικής συμβατότητας (HLA, KIR) δότη-λήπτη σε μεταμοσχεύσεις ιστών και οργάνων, έλεγχος πατρότητας, αναγνώριση ατόμων στην ιατροδικαστική, φαρμακογενωμική, σχεδιασμός εμβολίων (π.χ. reverse vaccinology), ιατρική των μεταγγίσεων, γενετική μηχανική, διάγνωση λοιμώξεων από βακτηρία, μύκητες, παράσιτα ή ιούς (ελέγχοντας για DNA-RNA του παθογόνου).

## PCR-SSOP (POLYMERASE CHAIN REACTION- SPECIFIC SEQUENCE OLIGONUCLEOTIDE PROBES)

Διαμάντω Κουνιάκη

Βιολόγος, Τμήμα Ανοσολογίας-Ιστοσυμβατότητας, Γ.Ν.Α. «Ο ΕΥΑΓΓΕΛΙΣΜΟΣ»

Στοιχεία επικοινωνίας:

Τηλ.: 6973492610

E-mail: kouniakitzeni@yahoo.gr

### PCR-SSOP: ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η τεχνική PCR-SSOP στηρίζεται στην ενίσχυση συγκεκριμένων τμημάτων των γονιδίων που θέλουμε να μελετήσουμε με εφαρμογή της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (polymerase chain reaction, PCR) και εν'συνεχεία στον υβριδισμό του προϊόντος της PCR αντίδρασης με **ολιγονουκλεοτιδικούς ανιχνευτές** (oligonucleotide probes) συγκεκριμένης αλληλουχίας. Οι ολιγονουκλεοτιδικοί ανιχνευτές είναι μικρά τμήματα DNA (μήκους ~19-24b), τα οποία έχουν αλληλουχία συμπληρωματική με αυτή των περιοχών του γονιδιώματος που θέλουμε να μελετήσουμε.

### Τεχνική PCR-SSOP

- Απομόνωση γενωμικού DNA (genomic-DNA, g-DNA)
- Ενίσχυση της μεταβλητής περιοχής των υπό εξέταση γονιδίων με εφαρμογή της PCR τεχνικής (π.χ. εξόνιο 2 των HLA τάξης II γονιδίων, εξόνια 2 και 3 των HLA τάξης I γονιδίων) με το κατάλληλο ζεύγος εκκινητών σε θερμικό κυκλοποιητή.
- Αποδιάταξη (denaturation) του προϊόντος της PCR αντίδρασης (δηλαδή μετατροπή του δίκλωνου DNA μορίου σε μονόκλωνο) και στη συνέχεια μεταφορά του σε ειδικές μεμβράνες, όπου και ακινητοποιείται.
- Υβριδισμός του μονόκλωνου τμήματος DNA με τους κατάλληλους ολιγονουκλεοτιδικούς ανιχνευτές (κατάλληλη θερμοκρασία και pH). Προκειμένου να γίνει ορατός ο υβριδισμός, το προϊόν της PCR αντίδρασης ή συνηθέστερα οι ολιγονουκλεοτιδικοί ανιχνευτές σημαίνονται είτε με ραδιενεργές ουσίες π.χ.  $^{32}\text{P}$ , είτε με ένζυμα π.χ. το σύστημα βιοτίνης-στρεπταβιδίνης-αλκαλικής φωσφατάσης.
- Ανίχνευση του υβριδικού (δίκλωνου) μορίου DNA, η οποία μπορεί να επιτευχθεί με:  
α. αυτοραδιογραφία, εφόσον χρησιμοποιούνται ραδιενεργοί ιχνηθέτες β. τη μέθοδο της χημειοφωταύγειας και αποτύπωση του οπτικού σήματος σε ακτινογραφικό φιλμ

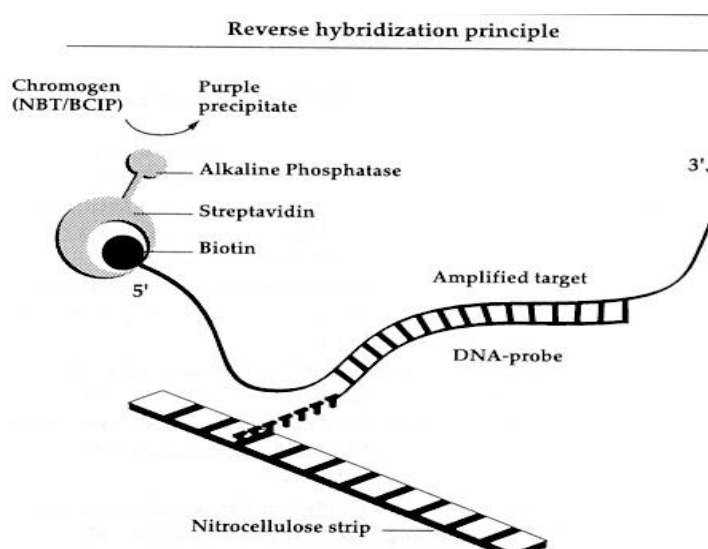
και γ. χρωμογόνα υποστρώματα, στα οποία επιδρούν ένζυμα π.χ. αλκαλική φωσφατάση και προκαλείται αλλαγή ή εμφάνιση χρώματος, και η οποία μπορεί εύκολα να γίνει αντιληπτή με απλή επισκόπηση ή με φωτομέτρηση. Το οπτικό σήμα που λαμβάνεται μπορεί να έχει μορφή κηλίδας (dot-blot) ή γραμμής (Line Probe Assay).

Η αξιολόγηση του αποτελέσματος γίνεται με τη βοήθεια ειδικών πινάκων ανάγνωσης ή ειδικών προγραμμάτων στον Η/Υ (software) και με βάση τους ανιχνευτές που έδωσαν θετική αντίδραση, δηλαδή βρήκαν στο υπό εξέταση δείγμα την συμπληρωματική τους αλληλουχία και υβριδίσθηκαν.

Βασική βέβαια προϋπόθεση για την ανάπτυξη της μεθόδου είναι η ανάλυση της αρχής της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του υπό μελέτη DNA-στόχου, έτσι ώστε να καταστεί δυνατή η σύνθεση των κατάλληλων ολιγονουκλεοτιδικών ανιχνευτών, καθώς επίσης και η επιλογή ή ο κατάλληλος συνδυασμός των ανιχνευτών για την απλούστερη και πιο αξιόπιστη εξαγωγή του αποτελέσματος.

#### **A. Μοριακή τυποποίηση HLA αλληλίων με τη μέθοδο REVERSE PCR-SSOP**

Σε μία παραλλαγή της PCR-SSOP μεθόδου, στα εμπορικά kits, εφαρμόζεται η Reverse PCR-SSOP. Πρόκειται για μία διαδικασία ανάστροφου υβριδισμού (reverse hybridization), η οποία χρησιμοποιεί γραμμικούς ανιχνευτές (Line probe assay-Lipa) (σχήμα 1).



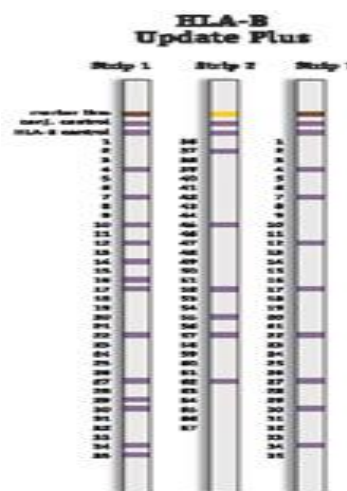
**Σχήμα 1.** Reverse PCR-SSOP (Αρχή της μεθόδου).

### Διαδικασία της μεθόδου

- Το δείγμα DNA που πρόκειται να τυποποιηθεί αναμιγνύεται με διάλυμα που περιέχει περίσσεια δινουκλεοτιδίων (dNTPs), εκκινητές σημασμένους με βιοτίνη (biotinylated primers) και θερμοανθεκτική Taq DNA πολυμεράση.
- Ενίσχυση του DNA στόχου με εφαρμογή της PCR αντίδρασης κάνοντας χρήση βιοτινυλιωμένους εκκινητές (primer), έτσι ώστε στο τέλος 35 κύκλων να έχει παραχθεί αρκετή ποσότητα ενισχυμένου DNA-στόχου, σημασμένου με βιοτίνη.
- Μετουσίωση του προϊόντος της PCR αντίδρασης (με χημικό τρόπο) και υβριδοποίηση των μονόκλωνων DNA τμημάτων με ειδικούς ολιγονουκλεοτιδικούς ανιχνευτές, οι οποίοι είναι ακινητοποιημένοι, υπό μορφή παραλλήλων γραμμών (lines), πάνω σε ταινίες (strips) νιτροκυτταρίνης
- Προσθήκη στρεπταβιδίνης, σημασμένη με αλκαλική φωσφατάση και σύνδεση αυτής με τα βιοτινυλιωμένα δίκλινα υβριδικά μόρια, που έχουν σχηματιστεί κατά τη διαδικασία του υβριδισμού.
- Με στόχο την ανίχνευση του υβριδικού προϊόντος ακολουθεί επώαση με χρωμογόνο υπόστρωμα (BCIP/NBT), το οποίο υπό την επίδραση της αλκαλικής φωσφατάσης δίνει ίζημα με χαρακτηριστικό χρώμα (μωβ/καφέ).
- Διακοπή της αντίδρασης μέσω ενός σταδίου έκπλυσης (εικόνα 1).
- Η τελική αξιολόγηση των αποτελεσμάτων γίνεται με βάση το υπόδειγμα (pattern) των ανιχνευτών που έδωσαν θετική αντίδραση (εικόνα 2). Επιτυγχάνεται είτε με τη βοήθεια ειδικών πινάκων αξιολόγησης, είτε με τη βοήθεια ειδικού προγράμματος στον ηλεκτρονικού υπολογιστή (software - Expert genotyping program).



Εικόνα 1. Αυτόματο σύστημα υβριδισμού.



Εικόνα 2. Ταινίες (strips) νιτροκυτταρίνης που έδωσαν θετική αντίδραση.

## **B. PCR-SSOP τυποποίηση HLA αλληλίων με τεχνολογία BEADS ARRAY και χρήση ΑΝΑΛΥΤΗ ΡΟΗΣ (LUMINEX) (εικόνα 3)**

Τα τελευταία χρόνια έχει πραγματοποιηθεί μία ραγδαία εξέλιξη στη μεθοδολογία. Σε μία παραλλαγή της PCR-SSOP μεθόδου εφαρμόζεται η αυτοματοποιημένη τεχνική ανάστροφου υβριδισμού (reverse hybridization). Όσον αφορά την HLA τυποποίηση χρησιμοποιεί τους κατάλληλους ολιγονουκλεοτιδικούς ανιχνευτές (probes) προσδεμένους σε μικροσφαιρίδια (beads) για την αναγνώριση των HLA αλληλομόρφων στο υπό εξέταση DNA δείγμα.



**Εικόνα 3.** Σύστημα τεχνολογίας Luminex.

### **Αρχή μεθόδου**

Η τεχνολογία Luminex, βασιζόμενη στις αρχές της κυτταρομετρίας ροής, χρησιμοποιεί μικροσφαιρίδια για την ανίχνευση βιομορίων, είτε μέσω των επακόλουθων της αντίδρασης αντιγόνου-αντισώματος, είτε μέσω του συμπλόκου DNA-DNA.

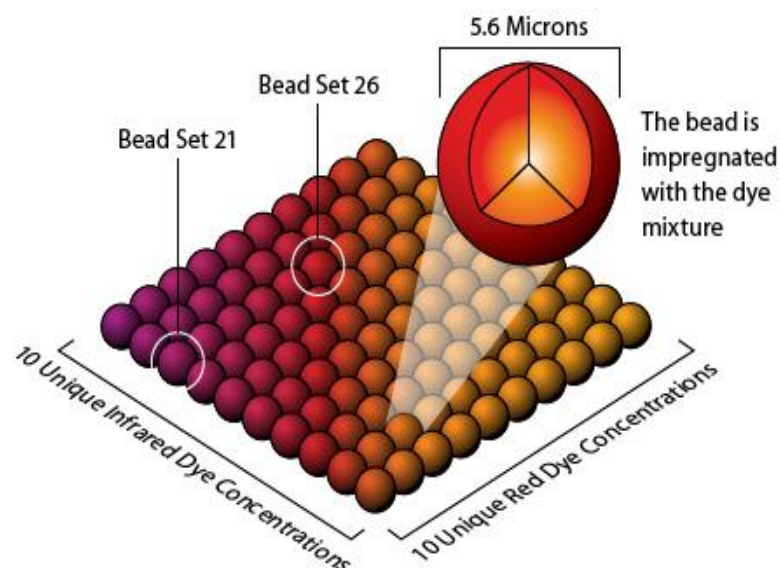
Τα μικροσφαιρίδια πολυστερενίου (διαμέτρου 5-6μm) είναι επικαλυμμένα με δύο διαφορετικά φασματομετρικά φθοριοχρώματα φλουρεσκεΐνης. Με την ανάμιξη διαφορετικών ποσοτήτων των δύο φθοριοχρωμάτων σε ακριβείς αναλογίες μπορεί να παραχθεί μία ποικιλία από 100 διαφορετικές ομάδες μικροσφαιριδίων, η κάθε μία με τη δική της ξεχωριστή φασματομετρική ταυτότητα. (δηλαδή εκπέμπουν σε διαφορετικό μήκος κύματος εφόσον ενεργοποιηθούν από μία ακτίνα laser). Τα μικροσφαιρίδια αυτά χρησιμοποιούνται ως φορείς βιολογικών ανιχνευτών. Συγκεκριμένα, κάθε ομάδα είναι προσδεμένη με διαφορετικό δείκτη-υποδοχέα μιας υπό εξέταση ουσίας (εικόνα 4). Το γεγονός ότι η κάθε ομάδα έχει τη δική της φασματοφωτομετρική ταυτότητα, επιτρέπει την ανάμιξή της με άλλες ομάδες κάνοντας έτσι εφικτή την ταυτόχρονη ανίχνευση/μέτρηση 100 διαφορετικών ουσιών/παραμέτρων στο ίδιο σωληνάριο. Στις μοριακές τεχνικές οι

βιολογικοί ανιχνευτές των μικροσφαιριδίων είναι ολιγονουκλεοτιδικοί ανιχνευτές (probes), οι οποίοι είναι απολύτως ειδικοί για ένα αλληλόμορφο. Ένα τρίτο φθοριόχρωμα, η R-φυκοερυθρίνη, συζευγμένο με δεύτερο δείκτη υποδοχέα, (συμπλέγμα SAPE-βιοτίνη), ειδικό επίσης για κάθε υπό εξέταση ουσία, καθιστά εφικτό τον ποιοτικό/ποσοτικό προσδιορισμό της αντίδρασης των βιομορίων που πραγματοποιείται στην επιφάνεια του μικροσφαιριδίου.

Η όλη διαδικασία είναι αυτοματοποιημένη και εφαρμόζεται με την χρήση αναλυτή ροής (Luminex).

Ο αναλυτής ροής (Luminex) φέρει ένα ιδιαίτερα πολύπλοκο σύστημα φακών, κατόπτρων, φίλτρων φωτοανιχνευτών και φωτοπολλαπλασιαστών, το οποίο συλλέγει τα φωτεινά σήματα φθορισμού και τα διοχετεύει στο ηλεκτρονικό σύστημα. Συγκεκριμένα κάθε σύστημα αποτελείται από τα εξής μέρη:

α. το οπτικό σύστημα (πηγή φωτός δύο λυχνίες ακτίνων laser, 635nm/10-mW και 532nm/13-mW): Χρησιμοποιούνται για τη διέγερση των φθορίζοντων σφαιριδίων (εικόνα 5). Λόγω της προηγηθείσας σήμανσης των σφαιριδίων με φθορίζουσες χρωστικές, η προσπίπτουσα δέσμη ακτίνας laser προκαλεί διέγερση των φθορίζουσών ουσιών και εκπομπή σημάτων, τα οποία είναι χαρακτηριστικά των φθορίζουσών χρωστικών.



**Εικόνα 4.** Μικροσφαιρίδια πολυστυρενίου επικαλημένα με δύο φθοριοχρώματα.

β. το υδραυλικό σύστημα ροής: το υδραυλικό σύστημα με ειδικές ρυθμίσεις στηριζόμενες στις αρχές της υδροδυναμικής αναγκάζει τα σφαιρίδια να ρέουν μέσα στο θάλαμο ροής, το ένα μετά το άλλο με μεγάλη ταχύτητα μπροστά από τις 2 ακτίνες laser. Συγκεκριμένα



αποτελείται από την κυψελίδα ροής, το υδραυλικό σύστημα μεταφοράς του δείγματος και το περιρρέον υγρό (sheath fluid). Η κυψελίδα ροής, δρα ως κανάλι μέσω της οποίας διέρχεται το εναιώρημα των σφαιριδίων, περιβαλλόμενο από το περιρρέον υγρό. Χαρακτηριστικό του συστήματος είναι η εφαρμογή της υδροδυναμικής εστίασης, που επιτυγχάνει τη μονήρη ροή των σφαιριδίων. Οι πληροφορίες μεταβιβάζονται με τεράστια ταχύτητα σε chip.

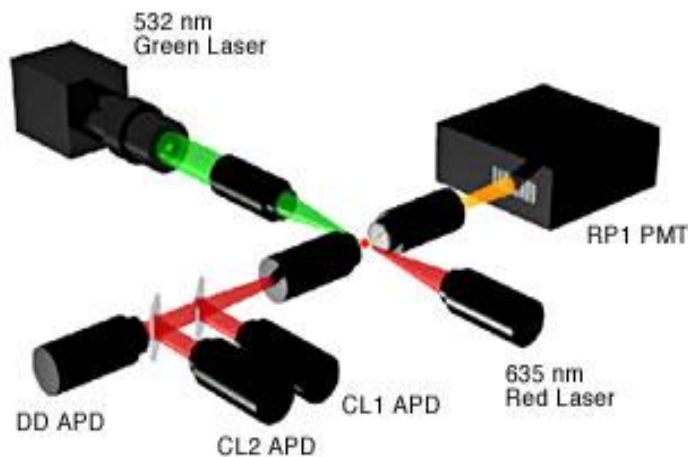
γ. τους ανιχνευτές των δύο φθορισμών

1. ανιχνευτής του φθορισμού του σφαιριδίου (κόκκινη ακτίνα για την φλουρεσκεΐνη)
2. ανιχνευτής του φθορισμού του συμπλέγματος SAPE-βιοτίνη (πράσινη ακτίνα για την R-φυκοερυθρίνη)

δ. έναν υψηλής ταχύτητας επεξεργαστή ψηφιακού σήματος: η μετατροπή των φωτεινών σημάτων σε πληροφορίες και η ανάλυση των πρωτογενών δεδομένων (raw data) γίνεται μέσω ηλεκτρονικού υπολογιστή. Υπάρχει διαθέσιμο λογισμικό για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

#### **Διαδικασία της μεθόδου**

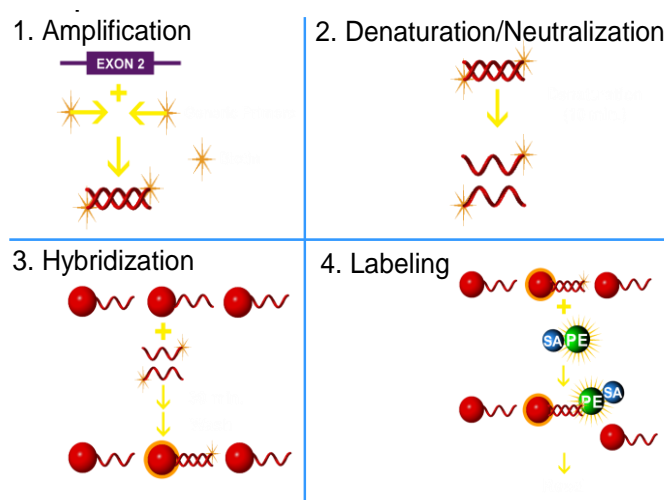
- Ενίσχυση του DNA-στόχου με εφαρμογή της PCR αντίδρασης, χρησιμοποιώντας ειδικούς βιοτινυλιωμένους εκκινητές.



**Εικόνα 5.** Πηγή φωτός (δύο ακτίνες laser).

- Αποδιάταξη με χημικό τρόπο του ενισχυμένου βιοτινυλιωμένου προϊόντος της PCR αντίδρασης και υβριδοποίησή του σε συμπληρωματικούς ανιχνευτές, συζευγμένοι σε 100 μικροσφαιρίδια πολυστυρενίου.
- Ανίχνευση του βιοτινυλιωμένου προϊόντος με προσθήκη στρεπταβιδίνης, συζευγμένης με R-φυκοερυθρίνη (SAPE) (εικόνα 6).

- Αναγνώριση και καταγραφή της έντασης του φθορισμού της φλουρεσκεΐνης και R-φυκοερυθρίνης από τον αναλυτή ροής (Luminex) για κάθε μικροσφαιρίδιο.
- Ανάγνωση και ερμηνεία των αποτελεσμάτων. Η γονοτύπηση των ενισχυμένων HLA DNA γονιδιακών τμημάτων γίνεται μέσω του ειδικού προγράμματος H/Y (*HLA Fusion 3.0 software*). Για το κάθε δείγμα λαμβάνουμε ένα ιστόγραμμα φθορισμού, το οποίο αντιπαραβάλλεται με ιστογράμματα γνωστών δειγμάτων, προκειμένου να γίνει η τυποποίηση του αγνώστου δείγματος.



**Εικόνα 6.** PCR-SSOP: Αρχή της μεθόδου.

Η τεχνολογία Beads Array μας παρέχει τη δυνατότητα ταυτόχρονης ανάλυσης μεγάλου αριθμού δειγμάτων σε διαφορετικούς HLA γενετικούς τόπους τόσο σε επίπεδο χαμηλής (low resolution-two digits), όσο και σε επίπεδο υψηλής ανάλυσης (high resolution-four digits). Συγκεκριμένα τα HLA Class I αλληλία ταυτοποιήθηκαν μέσω των εξωνίων 2 και 3, ενώ τα HLA Class II αλληλία μέσω του εξωνίου 2.

#### ΕΝΔΕΙΚΤΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Decorte R, Buyse I, Zamani M, et al. Distribution of HLA class II genes in Caucasian population as determined by PCR and reversed-dot-blot typing. In: Bar W, Fiori A, Rossi U, Eds. *Advances in Forensic Haemogenetics* 1994;4:490-492.
2. Buyse I, Decorte R, Baens M, et al. Rapid DNA typing of HLA class II antigens using the polymerase chain reaction and reverse dot blot hybridization. *Tissue Antigens* 1993; 41:1-14.
3. Thonnard J, Deldime F, Heusterspreute M, et al. HLA class II genotyping: two assay systems compared. *Clin Chem* 1995; 41:553-556.

4. The Luminex 100 User's Manual, Luminex Corporation, PN 89-00002-00-005 Rev.B.
5. Ng J, Hurley CK, Baxter-Lowe LA, et al. Large-scale oligonucleotide typing for HLA-DRB1/3/4 and HLA-DQB1 is highly accurate, specific, and reliable. *Tissue Antigens*. 1993; 42:473-479.
6. Colinas RJ, Bellisario R, Pass KA. Multiplexed genotyping of beta-globin variants from PCR-amplified newborn bloodspot DNA by hybridization with allele-specific oligodeoxynucleotides coupled to an array of fluorescent microspheres. *Clin Chem* 2000; 46:996-998.
7. Dunckley H: HLA typing by SSO and SSP methods. *Methods Mol Biol* 2012; 882:9–25.
8. Heinemann FM. HLA Genotyping and Antibody Characterization Using the Luminex™ Multiplex Technology. *Transfus Med Hemother* 2009; 36:273-278.
9. Lachmann N, Todorova K, Schulze H, Schönemann C. Luminex® and its applications for solid organ transplantation, hematopoietic stem cell transplantation, and transfusion. *Transfus Med Hemother* 2013; 40:182-189.
10. Vignali DA. Multiplexed particle-based flow cytometric assays. *J Immunol Methods*. 2000; 243:243-55.
11. Yang L, Tran DK, Wang X. BADGE, Beads Array for the Detection of Gene Expression, a high-throughput diagnostic bioassay. *Genome Res* 2001; 11:1888-98.
12. Elshal MF, McCoy,JP, Multiplex bead array assays: performance evaluation and comparison of sensitivity to ELISA. *Methods* 2006; 38:317-323.
13. Marsh SGE, Albert ED, Bodmer WF, et al. Nomenclature for factors of the HLA system. 2010 *Tissue Antigens* 2010; 75: 291-455.

## ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ (EXTRACTION) ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΙΚΟΥ (GENOMIC) DNA

Θεόφιλος Αθανασιάδης

Βιολόγος, Τμήμα Ανοσολογίας-Ιστοσυμβατότητας, Γ.Ν.Α. «Ο ΕΥΑΓΓΕΛΙΣΜΟΣ»

*Στοιχεία επικοινωνίας:*

*Τηλ.: 2132045700*

*E-mail: theofilosathanassiades@yahoo.gr*

Το DNA είναι ένα τεράστιο σε μήκος μόριο, το οποίο είναι ευαίσθητο σε μηχανικές δράσεις και επομένως είναι δύσκολη η απομόνωσή του ως ενιαίο μόριο. Ωστόσο, η απομόνωσή του ως ενιαίο μόριο δεν είναι πάντα απαραίτητη π.χ. για τη χρήση σε PCR όπου τα μεγενθυμένα μόρια έχουν μήκος συνήθως μικρότερο από 1Kb, ενώ αντίθετα για την ηλεκτροφόρηση εναλλασσόμενου πεδίου (Pulsed Field Gel Electrophoresis-PFGE) απαιτούνται, αν είναι δυνατόν, φυσικά μόρια. Με βάση τα ανωτέρω οι μέθοδοι απομόνωσης κατατάσσονται ανάλογα με το μέγεθος του DNA που προκύπτει από την απομόνωση και προορίζεται για διάφορες χρήσεις.

Οι μέθοδοι απομόνωσης DNA που αποσκοπούν στην απομόνωση ενιαίου μορίου DNA δηλαδή σε φυσική κατάσταση, περιλαμβάνουν τη χρήση απορρυπαντικών για τη διάσπαση των κυτταρικών και πυρηνικών μεμβρανών τους, έτσι ώστε να περιορίζονται οι μηχανικές κινήσεις στο ελάχιστο και να αποφεύγεται ο κίνδυνος σπασίματος του ευαίσθητου μορίου DNA. Αντίθετα, κατά την απομόνωση DNA που προορίζεται για τη χρήση σε PCR, δίνεται έμφαση στην ταχύτητα και στην κατά το δυνατόν απομάκρυνση των πρωτεϊνών ή άλλων τυχόν αναστολέων της Taq πολυμεράσης.

Η απομόνωση περιλαμβάνει τη διάσπαση των πρωτεϊνών με πρωτεολυτικά ένζυμα (πρωτεϊνάση K), εκχύλισή τους με οργανικούς διαλύτες (φαινόλη και χλωροφόρμιο) ή με διαλύματα υψηλής ιοντικής ισχύος (μεγάλη συγκέντρωση NaCl) και κατακρήμνιση του DNA σε διαλύματα αλκοόλης (70%) παρουσία άλατος.

Πρέπει να τονιστεί ότι όσο πιο καθαρό είναι το απομονωμένο DNA, τόσο πιο σταθερό είναι σε μακρόχρονη φύλαξή του (για χρόνια στους 4° C).

Σήμερα στο εμπόριο κυκλοφορούν kits απομόνωσης του DNA, τα οποία στηρίζονται, είτε στη χρήση διαλυμάτων, είτε στη χρήση στηλών, είτε στη χρήση παραμαγνητικών σφαιριδίων.

**Γενικά η απομόνωση DNA από τα κύτταρα μπορεί να διακριθεί σε τέσσερα στάδια:**

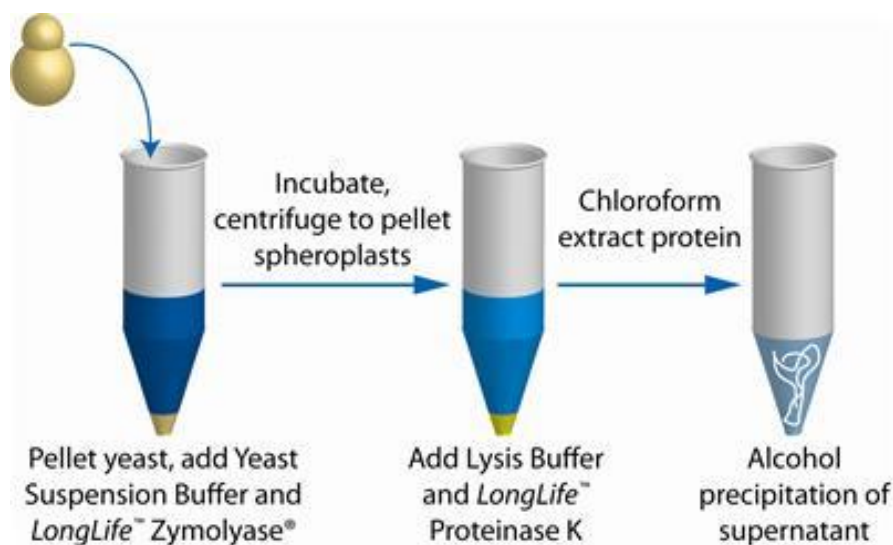
- απομόνωση των εμπύρηνων κυττάρων
- λύση του κυττάρου
- αφαίρεση των πρωτεϊνών και των μολυσματικών παραγόντων
- ανάκτηση του DNA

**Η επιλογή της μεθόδου γίνεται με βάση:**

- την ποσότητα του DNA που απαιτείται
- το μοριακό βάρος και μέγεθος του DNA
- την καθαρότητα του DNA που απαιτείται
- τον διαθέσιμο χρόνο
- την ευκολία της τεχνικής ή της μεθόδου απομόνωσης του DNA
- το κόστος απομόνωσης

## ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΙΚΟΥ (genomic) DNA

### 1. Απομόνωση γονιδιωματικού DNA με φαινόλη και χλωροφόρμιο.



**Εικόνα 1.** Απομόνωση DNA με φαινόλη και χλωροφόρμιο.

Η απομόνωση του DNA με διαδοχικές εκχυλίσεις με οργανικούς διαλύτες (φαινόλη και χλωροφόρμιο) αποτελεί την κλασική μέθοδο απομάκρυνσης των πρωτεϊνών από το DNA. Με τη μέθοδο αυτή προκύπτει DNA μεγάλου μοριακού μεγέθους (100-150Kb) κατάλληλο για υβριδισμό κατά Southern αλλά και για PCR. Το DNA που απομονώνεται είναι σταθερό στους 4° C για πολύ μακρύ χρονικό διάστημα (Εικόνα 1).

### **Υλικά:**

1. EDTA: 10% σε φυσιολογικό ορό
2. Nonidet P40: 1 ml/ 1000 ml H<sub>2</sub>O
3. Λυτικό διάλυμα: 100mM NaCl, 25mM EDTA (pH8), 1% SDS
4. Φαινόλη: Εξισορροπημένη με 0,1M Tris (pH8), +0,1% 8-υδροξυ-κινολίνη
5. Πρωτεΐνάση K: 10mg/ml σε dH<sub>2</sub>O. Φυλάσσεται στους -20° C
6. Χλωροφόρμιο/  
Ισοαμυλική αλκοόλη: 24 ml χλωροφόρμιο + ισοαμυλική αλκοόλη
7. TE: 10 mM Tris, 1 ml EDTA pH 7,5  
(αποστειρώνεται και φυλάσσεται στους 4° C

### **Πρωτόκολλο:**

- Παραλαμβάνουμε 20ml αίμα με αντιπηκτικό EDTA (0.1%)
  - Φυγοκεντρούμε για 20min σε 2.500 rpm.
  - Διαχωρίζουμε τη στιβάδα των λευκών αιμοσφαιρίων (περίπου 3 ml), σε σωλήνα πολυαιθυλενίου των 15ml. Εάν δεν πρόκειται να χρησιμοποιηθεί αμέσως φυλάσσεται στους - 70° C, διαφορετικά στους 20° C.
  - Ακολουθεί ξεπάγωμα σε θερμοκρασία δωματίου και προσθήκη 12 ml dH<sub>2</sub>O (για την αιμόλυση των ερυθρών αιμοσφαιρίων) και ήπια ανακίνηση για 5 min.
  - Φυγοκεντρούμε σε 2500 rpm για 20 min στους 4° C (οι πυρήνες παραμένουν ως ίζημα).
  - Απορρίπτουμε το υπερκείμενο και προσθέτουμε στο ίζημα 12 ml διαλύματος Nonidet και ακολουθεί αναρρόφηση με πιπέττα Pasteur 2-3 φορές για να σπάσει το ίζημα.
  - Ήπια ανακίνηση για 5 min.
  - Φυγοκεντρούμε σε 2500 rpm για 20 min στους 4° C (οι πυρήνες παραμένουν στο ίζημα).
  - Προσθέτουμε 3 ml λυτικό ρυθμιστικό διάλυμα και αναρροφούμε με πιπέττα Pasteur για να σπάσει το ίζημα.
  - Προσθέτουμε 20 μl πρωτεΐνάσης K.
  - Επιάζουμε στους 37° C όλη νύχτα ή στους 55° C σε υδατόλουτρο που διαθέτει σύστημα ανακίνησης.
- Ακολουθεί εκχύλιση με φαινόλη-χλωροφόρμιο ως εξής:***
- Προσθήκη ίσου όγκου (3 ml) φαινόλης εξισορροπημένης σε Tris.

- Ήπια ανακίνηση για 5 min.
- Φυγοκέντρηση στις 3000 rpm στους 20° C για 15 min.
- Μεταφέρουμε το υπερκείμενο (που περιέχει το DNA) σε καθαρό σωλήνα πολυαιθυλενίου.
- Προσθήκη διαλύματος φαινόλης/χλωροφόρμιου [1,5 ml φαινόλη και 1,5 ml διαλύματος χλωροφορμίου-ισοαμυλικής αλκοόλης (24: 1)].
- Ήπια ανακίνηση για 5 min
- Φυγοκέντρηση στις 3000 rpm στους 20° C για 15 min.
- Μεταφέρουμε το υπερκείμενο (που περιέχει το DNA) σε καθαρό σωλήνα πολυαιθυλενίου.
- Προσθήκη ίσου όγκου χλωροφορμίου – ισοαμυλικής αλκοόλης (3ml).
- Επανάληψη των σταδίων 6-9
- Μεταφέρουμε το υπερκείμενο σε καθαρό σωλήνα πολυαιθυλενίου.
- Προσθέτουμε 6 ml απόλυτης αιθανόλης. Ήπια ανακίνηση του σωλήνα μέχρι να σχηματιστεί σφιχτό κουβάρι (ορατό) το DNA, το οποίο παραλαμβάνεται με γυάλινη πιπέττα Pasteur και στεγνώνεται στον αέρα.
- Επαναδιάλυση του DNA σε 0,5 ml ή 1 ml ρυθμιστικού διαλύματος TE.

Το DNA επαναδιαλύεται πιο εύκολα με θέρμανση στους 37° C για 1hr ή με συνεχή ανακίνηση σε οριζόντιο ανακινητήρα στους 4° C για 1-2 ημέρες.

#### **Προετοιμασία φαινόλης:**

Η φαινόλη προσφέρεται στο εμπόριο σε κρυσταλλική μορφή πολύ καθαρή καθώς και σε υγρή μορφή. Η κρυσταλλική μορφή (πολύ καθαρή) χρησιμοποιείται στη χρωματογραφία (chromatography grade). Η κρυσταλλική φαινόλη και σε ορισμένες περιπτώσεις η υγρή, όταν έχει ροζ ή κίτρινο χρώμα, αποστάζεται στους 160° C πριν από τη χρήση της για να απομακρυνθούν οι προσμίξεις που προκαλούν κατάτμηση (σπάσιμο του DNA). Η υγροποιημένη απεσταγμένη φαινόλη διατηρείται στους -20° C.

Όταν η φαινόλη πρόκειται πρέπει να χρησιμοποιηθεί, αποψύχεται από τους -20° C, παραμένει πρώτα σε θερμοκρασία δωματίου και μετά στους 68° C ώσπου να υγροποιηθεί. Προστίθεται 8-υδροξυκινολίνη (αντιοξειδωτικό) σε αναλογία 0,1%, το κίτρινο χρώμα της οποίας υποβοηθά στο διαχωρισμό των δύο φάσεων (φαινόλης και υδατικής) κατά την απομόνωση του DNA.

### **Η εξισορρόπηση γίνεται ως εξής:**

- Προστίθεται ίσος όγκος 1,0 M Tris HCl (pH 8,0) αναδεύεται και αφήνεται σε ηρεμία για διαχωρισμό των δύο φάσεων, της υδατικής και της φαινόλης.
- Απομακρύνεται με πιπέττα η υδατική φάση και προστίθεται ίσος όγκος 0.1M Tris HCl (pH 8,0).
- Ακολουθεί ανάδευση, διαχωρισμός των φάσεων και επανάληψη της εξισορρόπησης, σε διάλυμα 0.1M Tris HCl (pH 8,0) ώστε το pH στην υδατική φάση να γίνει >7,6.
- Η εξισορροπημένη φαινόλη διατηρείται σε 4° C. Όταν χρησιμοποιείται πρέπει να είναι πρόσφατη (1-2 εβδομάδων). Στο εμπόριο κυκλοφορεί φαινόλη εξισορροπημένη καθώς και μίγμα φαινόλης-χλωροφορμίου.

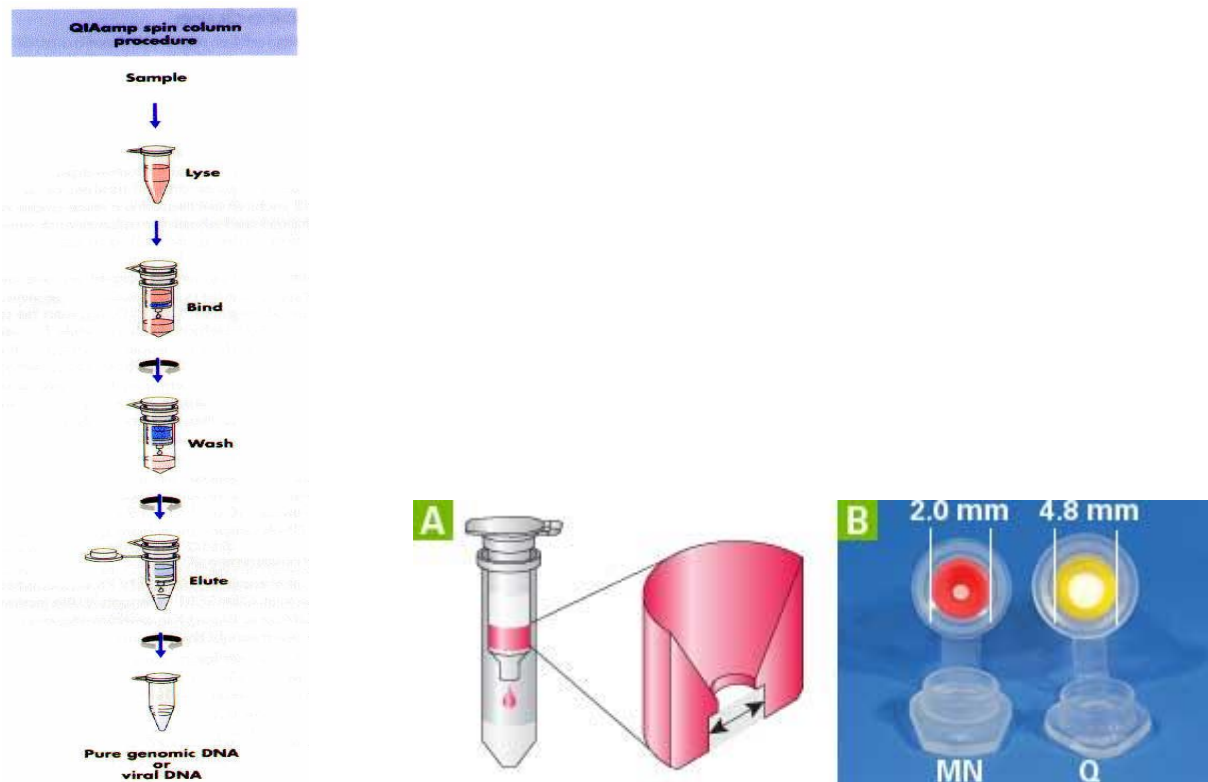
### **2. Απομόνωση γονιδιακού DNA με ισοθειοκυανική γουανιδίνη.**

Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στην κατεργασία των δειγμάτων με ισοθειοκυανική γουανιδίνη για απομάκρυνση του DNA και πρόσδεσή του, σε προσροφητικό υλικό Celite. Το σύμπλοκο DNA-Celite διαχωρίζεται από τις πρωτεΐνες του δείγματος με επανειλημμένες πλύσεις. Το DNA εκλούεται από τον Celite μετά από επώαση με ρυθμιστικό διάλυμα Tris, στους 56° C (Εικόνα 2). Κύρια πλεονεκτήματα της μεθόδου αποτελούν η αξιοπιστία και η επαναληψιμότητα.

#### **Υλικά:**

1. Tris HCl: 10 mM (pH8,0)
2. EDTA: 0,5 M (pH8,0)
3. 70% αιθανόλη:
4. Λυτικό διάλυμα 1: Διάλυση 120g ισοθειοκυανικής γουανιδίνης σε 100ml Tris-HCl, 100mM (pH6,4)  
Προσθήκη 22ml 0,2M EDTA (pH8,0) και 2,5 ml Triton X-100.  
Φύλαξη στους 4° C.
5. Λυτικό διάλυμα 2: Διάλυση 120g ισοθειοκυανικής γουανιδίνης σε 100ml Tris-HCl, 100mM (pH6,4) Φύλαξη στους 4° C.
6. Εναιώρημα Celite: Celite (Janssen Chimika 17.346.80)  
Προστίθενται 10 g Celite σε 50ml απεσταγμένου νερού και 500μl HCl. Το εναιώρημα αναδεύεται ώσπου να ομογενοποιηθεί τελείως.





**Εικόνα 2.** Απομόνωση DNA με ισοθειοκυανική γουανιδίνη.

**Πρωτόκολλο:**

1. Σε 100 µl δείγματος προστίθεται 1 ml ρυθμιστικού διαλύματος Tris-HCl σε σωληνάριο Eppendorf.
2. Προσθήκη 40 µl εναιωρήματος Σελίτη και καλή ανάδευση για 5 sec σε αναδευτήρα Vortex.
3. Επώαση για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου.
4. Ανάδευση για 5 sec.
5. Φυγοκέντρηση σε μέγιστη ταχύτητα για 15 sec σε φυγόκεντρο Eppendorf.
6. Απόρριψη του υπερκείμενου.
7. Προσθήκη 1ml λυτικού διαλύματος 2.
8. Ανάδευση για 5 sec.
9. Φυγοκέντρηση σε μέγιστη ταχύτητα για 15 sec σε φυγόκεντρο Eppendorf. Απόρριψη του υπερκείμενου.
10. Επανάληψη των σταδίων 6 έως 9.
11. Προσθήκη 1 ml 70% αιθανόλης.
12. Ανάδευση για 5 sec.

13. Φυγοκέντρωση σε μέγιστη ταχύτητα για 15 sec σε φυγόκεντρο Eppendorf. Απόρριψη του υπερκείμενου.
14. Επανάληψη των σταδίων 11-13.
15. Προσθήκη 1ml ακετόνης.
16. Ανάδευση για 5 sec.
17. Φυγοκέντρωση σε μέγιστη ταχύτητα για 15 sec σε φυγόκεντρο Eppendorf. Απόρριψη του υπερκείμενου.
18. Ξήρανση του ιζήματος σε κενό για 10 min.
19. Προσθήκη 100 μl 10Mm Tris-HCl
20. Επώαση σε υδατόλουτρο για 10 min στους 56° C.
21. Φυγοκέντρωση σε μέγιστη ταχύτητα για 2min σε φυγόκεντρο Eppendorf.
22. Απομάκρυνση του υπερκείμενου με αυτόματη πιπέττα.
23. Φύλαξη του δείγματος σε -20° C.

### 3. Απομόνωση γονιδιακού DNA με χρήση κεκορεσμένου διαλύματος NaCl (Salting-out technique).

Περιλαμβάνει απομόνωση του DNA από λευκά αιμοσφαίρια του περιφερικού αίματος, με χρήση κεκορεσμένου διαλύματος NaCl.

#### **Διαδικασία της μεθόδου:**

- Οσμωτική λύση των ερυθροκυττάρων και συλλογή των εμπύρηνων λευκών.
- Επώαση με διάλυμα SDS 10% και πρωτεΐνάσης K στους 56° C.
- Απομάκρυνση των πρωτεϊνών και της πρωτεΐνάσης K παρουσία κεκορεσμένου διαλύματος NaCl.
- Κατακρήμιση του ευρισκόμενου στο υψηλής συγκέντρωσης σε άλας διάλυμα DNA, με την προσθήκη αλκοόλης.

#### **Παρασκευή διαλυμάτων:**

α) *Proteinase - K Solution: 10 mg proteinase - K/ml stock buffer*

β) *NaCl (6M) Saturated Solution: 8,8 gr NaCl σε 50ml dH<sub>2</sub>O*

γ) *1 X RCLB*

(0,22M) sucrose: 27,384 gr

1% Triton X-100: 2,5 ml

(5mM) MgCl<sub>2</sub>: 250 gr

(10mM) Tris HCl (pH : 7,5): 0,500 gr

Σύνολο διαλύματος: 250 ml

δ) 10% SDS: 1gr (Sodiumdodecylsulfate) στα 10 ml dH<sub>2</sub>O

ε) 5X Proteinase K stock buffer

750μl: (5M) NaCl

2,4 ml: (0,5M) EDTA (pH8.0) σε 10 ml dH<sub>2</sub>O

στ) 1X TE Buffer

1 ml: (1M) Tris-HCl (pH7,5) σε 100 ml dH<sub>2</sub>O

200μl: (0,5 M) EDTA

**Πρωτόκολλο της μεθόδου:**

- Αναμιγνύουμε 1ml αίμα + 1ml RCLB (Red Cell Lysis Buffer), αναδεύουμε με πιπέττα τύπου Pasteur, ανακινούμε για 3-5 min και φυγοκεντρούμε στις 13000 rpm για 3 min.
- Απορρίπτουμε το υπερκείμενο και επαναλαμβάνουμε την προηγούμενη διαδικασία.
- Απορρίπτουμε το υπερκείμενο και προσθέτουμε 1 ml dH<sub>2</sub>O, αναδεύουμε με πιπέττα Pasteur, ανακινούμε για 5 min και φυγοκεντρούμε στις 13000 rpm για 3 min.
- Απορρίπτουμε το υπερκείμενο και προσθέτουμε μίγμα (80 μl PKB + 150 μl dH<sub>2</sub>O), αναδεύουμε με πιπέττα Pasteur και προσθέτουμε μίγμα (20μl SDS + 20μl PKS).

PCB: Proteinase Kinase Buffer

PCS: Proteinase Kinase Solution

- Αναμιγνύουμε σε Vortex για μερικά sec και επωάζουμε στους 56° C για 30 min.
- Προσθέτουμε 150μl NaCl 6M και αναμιγνύουμε στο Vortex για 45 min.
- Αφήνουμε 5 min να καθιζήσει το ίζημα και φυγοκεντρούμε στις 13000 rpm για 6 min
- Αδειάζουμε προσεχτικά το υπερκείμενο σε σωληνάριο Beckman του 1,5 ml και προσθέτουμε αιθανόλη (το διπλάσιο όγκο), ανακινούμε και συλλέγουμε το DNA και το τοποθετούμε σε σωληνάριο Beckman που περιέχει 1ml αιθανόλη.
- Αφαιρούμε προσεχτικά την αιθανόλη και αφήνουμε το DNA στο σωληνάριο Beckman. Περιμένουμε λίγα λεπτά να εξατμιστεί τυχόν υπόλειμμα αιθανόλης.
- Προσθέτουμε 50-150 μl TE buffer και επωάζουμε στο υδατόλουτρο για 10 min.

**4. Απομόνωση γονιδιακού DNA με τη χρήση σφαιριδίων (SiO<sup>2</sup>): μαγνήτη σε αναλογία 1: 1**

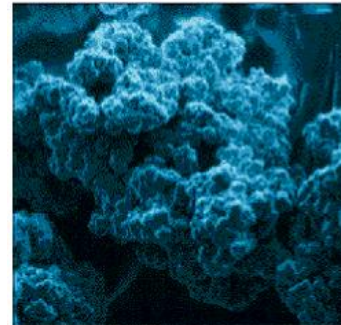
Ένα πλήρως Αυτοματοποιημένο Σύστημα (εικόνα 4) που βασίζεται στην παραπάνω μέθοδο μπορεί να απομονώσει DNA, RNA ή πρωτεΐνες από τα κάτωθι:

- ολικό αίμα (αρχικού όγκου δείγματος 20-400μl)
- buffy coat (αρχικού όγκου δείγματος 250-500μl)
- ιστός (αρχικού όγκου δείγματος έως 100mg)

- κύτταρα (αρχικού όγκου δείγματος έως  $5 \times 10^6$  κύτταρα)
- εγκληματολογικά υλικά: (κηλίδα αίματος, σίελος (buccal swabs), δείγματα σάρωσης, τρίχα, νύχι, τσίχλα, αποσιγάρα κλπ).



**Εικόνα 4.** Αυτοματοποιημένο Σύστημα απομόνωσης DNA, RNA, πρωτεϊνών



**Εικόνα 5.** Magne Sil Paramagnetic Particles όπως φαίνονται στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο

#### **Αρχή της μεθόδου:**

Η απομόνωση των νουκλεϊνικών οξέων επιτυγχάνεται με τη βοήθεια των **παραμαγνητικών σφαιριδίων** (Magne Sil Paramagnetic Particles - PMPs) (εικόνα 5).

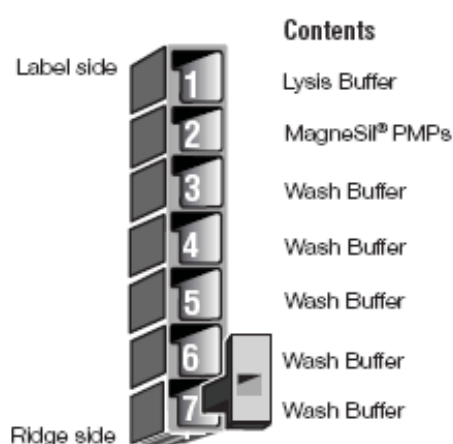
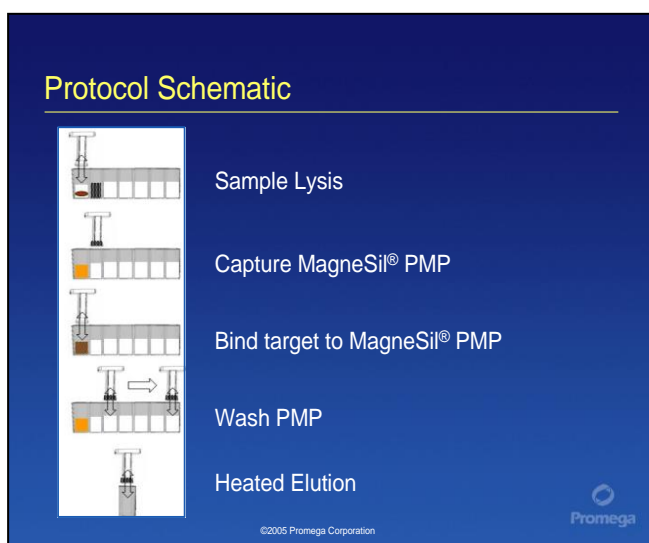
Στο πρώτο βήμα της διαδικασίας γίνεται η λύση των κυττάρων ώστε να ελευθερωθεί το gDNA, το οποίο στη συνέχεια προσδένεται στα PMPs. Το σύμπλοκο gDNA-PMPs, περνά από διαδοχικά ξεπλύματα ώστε στο τέλος να γίνει η έκλυση του gDNA στην ειδικά θερμαινόμενη θέση.

#### **Διαδικασία της μεθόδου (εικόνα 6) :**

1. Το δείγμα τοποθετείται στη θέση 1 της κασέτας, όπου με τη βοήθεια του εμβόλου γίνεται η ομογενοποίηση του δείγματος & η λύση των κυττάρων.
2. Οι μεταλλικές ράβδοι μεταφέρουν το έμβολο στη θέση 2, όπου πραγματοποιείται η δέσμευση των PMPs και η μεταφορά τους στο κυτταρόλυμα (θέση 1).
3. Το gDNA καθώς και τυχόν υπόλοιπο δείγματος που δεν έχει υποστεί πλήρη λύση, δεσμεύονται από τα PMPs. Το σύμπλοκο μεταφέρεται στη θέση 3 όπου πραγματοποιείται περαιτέρω λύση.
4. Ακολουθεί σειρά καθαρισμών στις θέσεις 4 έως 7.
5. Τελικά, το καθαρό πλέον gDNA εκλύεται στην ειδική θερμαινόμενη θέση (μπλε κυβέτα)

### Πλεονεκτήματα:

- Καμία προεργασία των δειγμάτων.
- Υψηλή παραγωγικότητα του συστήματος: 1-16 δείγματα σε 15 έως 40 min ανάλογα με την εφαρμογή.
- Ελάχιστες διαστάσεις ώστε να προσαρμόζεται εύκολα, ακόμα και στον πιο μικρό εργαστηριακό χώρο.
- Απόδοση έως 50 μg DNA
- Καθαρότητα στα (A260/A280>1,8).
- Όγκος έκλουσης ρυθμίζεται ανάλογα με την εφαρμογή 30-300μl.



**Εικόνα 6.** Διαδικασία απομόνωσης DNA με αυτοματοποιημένο σύστημα, με τη βοήθεια παραμαγνητικών σφαιριδίων

### ΕΝΔΕΙΚΤΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J. Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory 1982.
2. Boom R, Sol CJ, Salimans MM, et al. Rapid and simple method for purification of nucleic acids, J. Clin. Micr. 1990;28(3):495-503.
3. Kephant D et al. Promega Notes 2006;92:20-23.
4. Brow MA, Oldenburg MC, Lyamichev V, et al. Differentiation of bacterial 16S rRNA genes and intergenic regions and Mycobacterium tuberculosis katG genes by structure-specific endonuclease cleavage. J. Chin. Microbiol. 1996;34(12):3129-3137.
5. Cremonesi P, Luzzana M, Brasca M, et al. Development of a multiplex PCR assay for the identification of Staphylococcus aureus enterotoxigenic strains isolated from milk and dairy products. Mol. Cell. Probes 2005;19(5):299-305.

## ΑΝΤΙΓΟΝΑ ΙΣΤΟΣΥΜΒΑΤΟΤΗΤΑΣ (HLA) ΤΑΞΗΣ I ΚΑΙ ΤΑΞΗΣ II

**Χρύσα Παχούλα-Παπαστεριάδη**

τ. Συντονίστρια Διευθύντρια του Τμήματος Ανοσολογίας-Ιστοσυμβατότητας,  
Γ.Ν.Α. «Ο ΕΥΑΓΓΕΛΙΣΜΟΣ»

*Στοιχεία επικοινωνίας:*

*Τηλ.:6974338209*

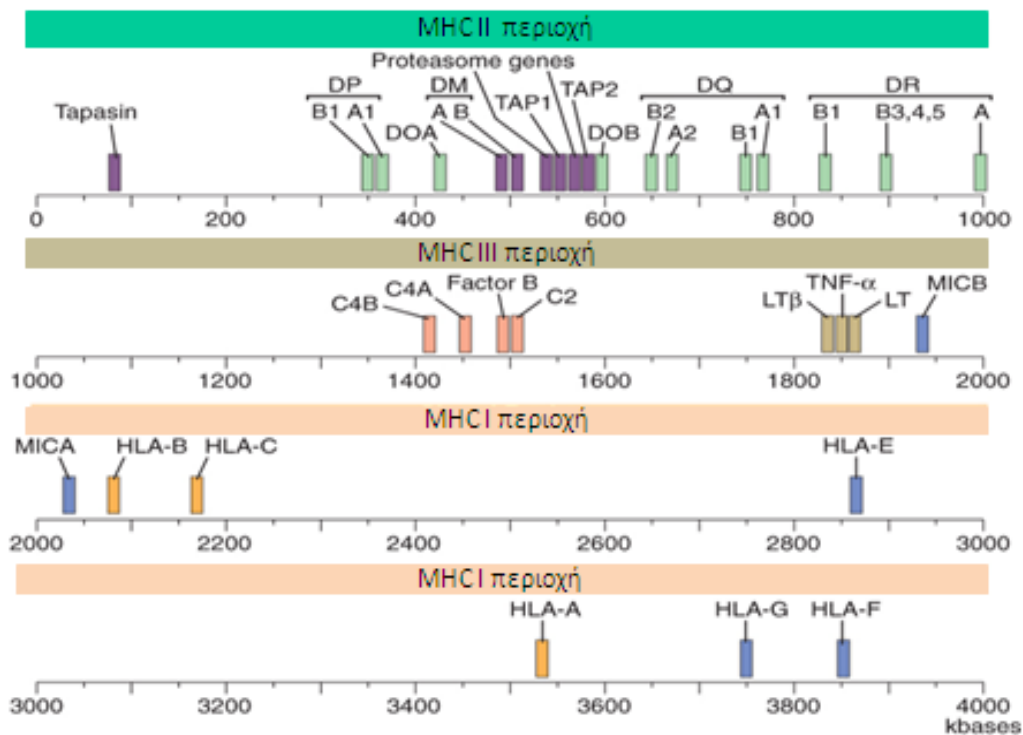
*E-mail: cparaste@gmail.com*

### ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Όλα τα είδη των θηλαστικών διαθέτουν μια ομάδα στενά συνδεδεμένων γονιδίων που απαρτίζουν το **Μείζον Σύμπλεγμα Ιστοσυμβατότητας** (Major Histocompatibility Complex-MHC). Το MHC του ανθρώπου είναι γνωστό και ως **Σύστημα HLA** (Human Leukocyte Antigen-HLA-System), διότι αρχικά περιγράφηκε και μελετήθηκε ως ένα σύστημα αντιγόνων των λευκοκυττάρων του ανθρώπου. Χαρτογραφείται στο βραχύ σκέλος του χρωμοσώματος 6 (6p21) και καταλαμβάνει μια περιοχή 4 Centimorgans DNA ή  $4 \times 10^6$  ζεύγη βάσεων (base pairs-bp). Οι σύγχρονες απόψεις θέλουν η MHC περιοχή του ανθρώπου να εκτείνεται σε  $7,6 \times 10^6$  bp (extended MHC). Είναι η πλέον πολύμορφη γενετική περιοχή του ανθρώπινου γονιδιώματος και περιλαμβάνει 252 γονίδια, ταξινομημένα σε 11 υποομάδες και τρεις κύριες ομάδες ή τάξεις γονιδίων, ήτοι HLA τάξης I, τάξης II και τάξης III (εικόνα 1).

**Τα γονίδια MHC I και II ή HLA τάξης I και II**, έχουν μεγάλο πολυμορφισμό και κωδικοποιούν για πρωτεϊνικά μόρια κυτταρικής μεμβράνης γνωστά ως αντιγόνα HLA τάξης I και II, τα οποία παρουσιάζουν δομικές και λειτουργικές ομοιότητες μεταξύ τους. Έχουν ιδιαίτερη σημασία στην διακυτταρική συνομιλία, στη διάκριση του «ιδίου» από το «μη ίδιο», στην επεξεργασία αντιγονικών μορίων, στην παρουσίαση του αντιγονικού πεπτιδίου στον υποδοχέα του T λεμφοκυττάρου (TCR) και στην αναγνώρισή του, καθώς επίσης και στην ανάπτυξη χυμικής και κυτταρικής ανοσοαπάντησης.

Το πρώτο HLA αντιγόνο περιγράφηκε το 1958 από τον Γάλλο Αιματολόγο Καθηγητή Jean Dausset και ονομάσθηκε MAC. Ο καθηγητής Jean Dausset, το 1980, τιμήθηκε, με τους Baruj Benacerraf και George Davis Snell, με το βραβείο Nobel. Εξαιρετική δε ώθηση στη διερεύνηση και κατανόηση της λειτουργίας των μορίων HLA έδωσε, το 1987, η απεικόνιση της τρισδιάστατης δομής των μορίων, από τους D. Valey και P. Bjorkman με την μέθοδο της κρυσταλλογραφίας ακτίνων Χ.



Εικόνα 1. Η MHC γενετική περιοχή του ανθρώπου

Τα γονίδια MHC τάξης III κωδικοποιούν για πρωτεΐνες του συμπληρώματος (C2, C4A, C4B, Bf), πρωτεΐνες της θερμικής καταπληξίας (Heat Shock Proteins-HSP), ένζυμα (210HA, 210HB) και κυτταροκίνες (TNFα, TNFβ). Αντίθετα προς τα MHC τάξης I και II, τα προϊόντα των MHC τάξης III γονιδίων, δεν είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες, δεν παίρνουν μέρος στην επεξεργασία, παρουσίαση και αναγνώριση του αντιγόνου και δεν έχουν δομικές ομοιότητες μεταξύ τους, αλλά και με τα HLA τάξης I και II πρωτεϊνικά μόρια.

Εντός της MHC περιοχής υπάρχουν επίσης γονίδια που ελέγχουν την ενδοκυττάρια πρωτεολυτική διάσπαση πρωτεϊνικών αντιγόνων, την ενδοκυτταρική μεταφορά των αντιγονικών πεπτιδίων, αλλά και γονίδια με άγνωστη λειτουργία καθώς και μη λειτουργικά γονίδια.

## ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΤΩΝ ΑΝΤΙΓΟΝΩΝ HLA

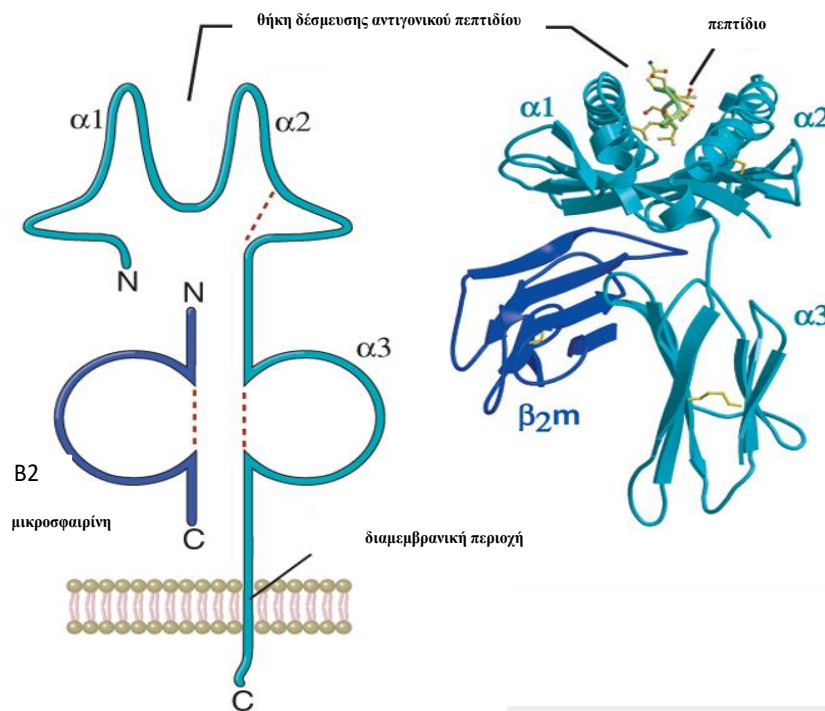
### Αντιγόνα HLA τάξης I

Διακρίνονται στα κλασσικά HLA τάξης I (HLA-A,-B,-C) και τα μη κλασσικά HLA τάξης Ib (HLA-E,-F,-G,-H).

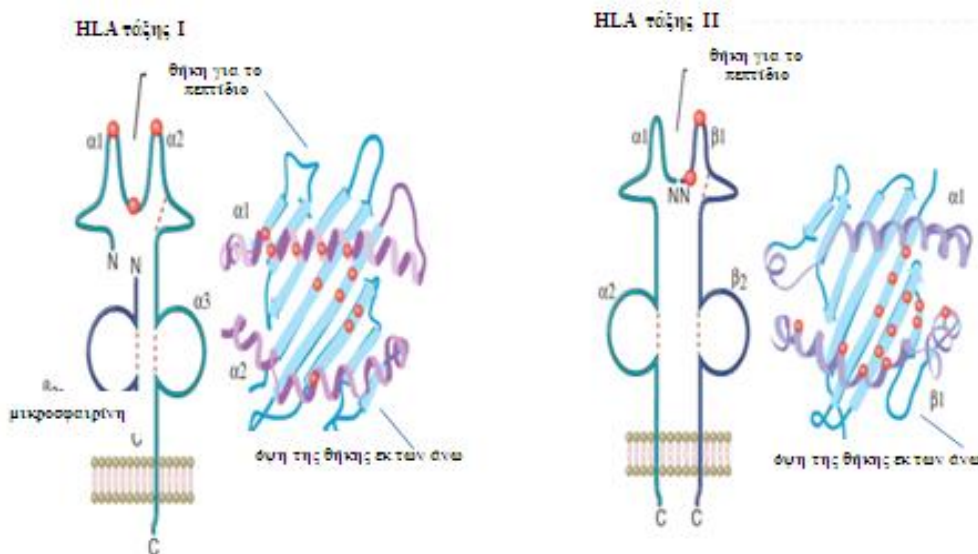
Τα **HLA-A,-B,-C** είναι γλυκοπρωτεΐνες κυτταρικής μεμβράνης όλων των εμπύρηνων κυττάρων του οργανισμού, με εξαίρεση τα σπερματικά κύτταρα και τα κύτταρα της τροφοβλάστης, ενώ παρατηρούνται διαφορές ως προς την ποσοτική έκφρασή τους στους διάφορους ιστούς. Αποτελούνται από δύο πολυπεπτιδικές αλυσούς (εικόνα 2): **1)** Μια

άλυσο β2-μικροσφαιρίνης ή ελαφρά άλυσο (12KD) που δεν παρουσιάζει πολυμορφισμό, δεν κωδικοποιείται από MHC γονίδια και δεν έχει άμεση επαφή με την κυτταρική μεμβράνη, παρά μόνο συνδέεται με μη ομοιοπολικούς δεσμούς με την α-άλυσο. Είναι απαραίτητη για την κυτταρική έκφραση και λειτουργία του μορίου. **2)** Την α ή βαρεία άλυσο (45 KD) που κωδικοποιείται από γονίδιο εντός της MHC I περιοχής (HLA-A, ή B, ή C) και παρουσιάζει μεγάλο πολυμορφισμό, αποτελείται δε από ενδοκυττάριο, διαμεμβρανικό και εξωκυττάριο τμήμα. Το ενδοκυττάριο (30-40 αμινοξέα-aminoacids-aa) και το διαμεμβρανικό (περίπου 25 aa) τμήμα, δεν παρουσιάζουν πολυμορφισμό και χρησιμεύουν για τη στήριξη του μορίου και το πέρασμα των μηνυμάτων ενδοκυτταρίως. Το εξωκυττάριο τμήμα (περίπου 90 aa) διακρίνεται σε τρεις περιοχές ή πεδία (domains) α3, α2, α1 (από την κυτταρική μεμβράνη προς το ελεύθερο αμινοτελικό άκρο του μορίου). Οι α1 και α2 περιοχές είναι πολύμορφες, καθορίζουν τις HLA ειδικότητες π.χ. HLA-A2, HLA-A33, HLA-B18 κ.λπ. και σχηματίζουν τη θήκη (groove ή cleft) υποδοχής του αντιγονικού πεπτιδίου (εικόνα3), ενώ η α3 περιοχή μαζί με την β2-μικροσφαιρίνη χρησιμεύουν για τη στήριξη της θήκης και αποτελούν το τμήμα του μορίου που ομοιάζει με τη σταθερή περιοχή των ανοσοσφαιρινών (Igs). Επιπλέον, η α3 περιοχή αποτελεί το σημείο σύνδεσης του CD8 μορίου επιφάνειας των T λεμφοκυττάρων κατά την κυτταρική συνεργασία. Με διάφορες μεθόδους έχει κατορθωθεί η απεικόνιση του χώρου της θήκης υποδοχής του αντιγονικού πεπτιδίου (εικόνα 3). Η βάση της θήκης απαρτίζεται από 8 παράλληλες ταινίες στα άκρα των οποίων (ένθεν και ένθεν) βρίσκονται δυο αντιπαράλληλες έλικες (α1 και α2). Μεταξύ των δύο ελίκων παραμένει χώρος περίπου  $25^{\text{A}} \times 10^{\text{A}} \times 11^{\text{A}}$  για την υποδοχή του προς παρουσίαση αντιγονικού πεπτιδίου. Η θήκη δεν έχει ομαλή δομή, αλλά εμφανίζει έναν αριθμό εσοχών και εξοχών (ridges and rockets), για την καλύτερη υποδοχή του αντιγονικού πεπτιδίου. Τα άκρα της θήκης είναι κλειστά, με αποτέλεσμα να συνδέει μικρού μεγέθους αντιγονικά πεπτίδια (8-11 αμινοξέα), κατά προτίμηση εννεαμερή. Το είδος των αμινοξέων της θήκης καθορίζει τη σύνδεση με συγκεκριμένο αντιγονικό πεπτίδιο και επομένως την ανοσοαπάντηση σε αυτό το αντιγόνο. Διαφορετικά αντιγόνα HLA παρουσιάζουν ποιοτικές διαφορές (δηλ. διαφορές στο είδος και στη σειρά των αμινοξέων) στη δομή της θήκης και κατ' επέκταση άλλοτε άλλη ικανότητα δέσμευσης διαφορετικών πεπτιδίων. Η ποσοτική έκφραση των αντιγόνων HLA διαφέρει από ιστό σε ιστό. Έτσι π.χ. τα λεμφοκύτταρα εκφράζουν μεγάλο αριθμό HLA μορίων, ενώ τα κύτταρα του εριστικού ιστού, ελάχιστα. Ένα άλλο χαρακτηριστικό στην ποσοτική έκφραση των μορίων αυτών είναι ότι επηρεάζεται από διάφορες ουσίες όπως π.χ. ορμόνες, κυτταροκίνες, φάρμακα.





Εικόνα 2. HLA τάξης I μόριο



Εικόνα 3. Θήκη του HLA μορίου για την υποδοχή και παρουσίαση του αντιγονικού πεπτιδίου

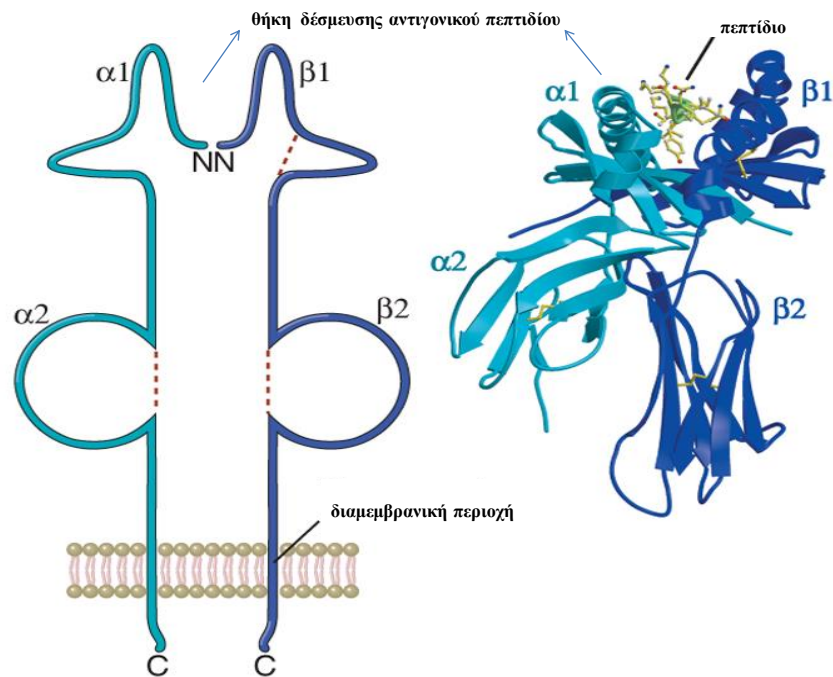
**Γενετικά ελλείμματα** όσον αφορά την έκφραση των HLA τάξης I μορίων στην κυτταρική μεμβράνη, έχουν περιγραφεί, είναι σπάνια και οφείλονται στην ανεπάρκεια των TAP (Transporter-Associated with Antigen Processing) μορίων, τα οποία μεταφέρουν τα HLA τάξης I μόρια στο ενδοπλασματικό δίκτυο.

Τα **HLA τάξης Ib γονίδια**, επίσης κωδικοποιούν για HLA τάξης I πρωτεΐνες κυτταρικής μεμβράνης, εμφανίζουν μικρότερο πολυμορφισμό σε σχέση με τα κλασικά HLA τάξης I

προϊόντα, επιλεκτική έκφραση σε ορισμένους ιστούς π.χ. HLA-G μόρια εκφράζονται επιλεκτικά στα κύτταρα της τροφοβλάστης, καθώς επίσης εμφανίζουν ποικιλία λειτουργιών, ανάλογα με το γονίδιο π.χ. HLA-E και -G μόρια δεσμεύουν αντιγονικά πεπτίδια τα οποία όμως παρουσιάζουν προς αναγνώριση σε φυσικά κυτταροκτόνα (Natural Killer-NK) κύτταρα.

### **Αντιγόνα HLA τάξης II (HLA-DR, -DQ, -DP)**

Αποτελούν διαμεμβρανικά ετεροδιμερή μόρια βαρειών (α) και ελαφρών (β) γλυκοπρωτεϊνικών αλύσεων (30-34 KD και 26-29 KD αντίστοιχα), που συνδέονται μεταξύ τους με μη ομοιοπολικούς δεσμούς. Χαρακτηρίζουν ορισμένες μόνο ομάδες κυττάρων, όπως Β λεμφοκύτταρα, ενεργοποιημένα Τ λεμφοκύτταρα, επιθηλιακά κύτταρα του θύμου, μακροφάγα, δενδριτικά κύτταρα. Υπό ορισμένες συνθήκες όπως π.χ. επίδραση IFN $\gamma$ , παρατηρείται έκτοπη έκφρασή τους, δηλαδή εκφράζονται σε κύτταρα που υπό φυσιολογικές συνθήκες δεν τα εξέφραζαν. Και οι δύο αλύσεις κωδικοποιούνται από MHC γονίδια με μεγάλο πολυμορφισμό και αποτελούνται από ενδοκυττάριο (καρβοξυτελικό, άκρο αποτελούμενο από 10-15 aa), διαμεμβρανικό (περίπου 30 aa) και εξωκυττάριο τμήμα (180-190 αμινοξέα, προς το αμινοτελικό άκρο) (εικόνα4). Το εξωκυττάριο τμήμα κάθε αλύσου παρουσιάζει δύο περιοχές  $\alpha 1, \alpha 2$  και  $\beta 1, \beta 2$ , από τις οποίες οι  $\alpha 1$  και  $\beta 1$  είναι εξαιρετικά πολύμορφες, καθορίζουν τις HLA-DR, -DQ και -DP ειδικότητες και σχηματίζουν τη θήκη υποδοχής των HLA τάξης II μορίων για το αντιγονικό πεπτίδιο. Και τα δυο άκρα της θήκης αυτής είναι ανοικτά, με αποτέλεσμα να συνδέουν μεγαλύτερα, σε σχέση με την θήκη των HLA τάξης I μορίων, αντιγονικά πεπτίδια (10-30 αμινοξέα), συνήθως πεπτίδια αποτελούμενα από 13-18 αμινοξέα. Οι  $\alpha 2$  και  $\beta 2$  περιοχές στηρίζουν τη θήκη και αποτελούν το ομοιάζον με τις Igs τμήμα του μορίου, ενώ μια αγκύλη στην  $\beta 2$  περιοχή αποτελεί το σημείο σύνδεσης του CD4 μορίου επιφανείας των Τ βοηθητικών λεμφοκυττάρων κατά την κυτταρική συνεργασία. Η θήκη για το αντιγονικό πεπτίδιο των HLA-II μορίων, δομικά, είναι παρόμοια με τη θήκη των HLA-I μορίων και ο πολυμορφισμός της καθορίζει το είδος του πεπτιδίου που θα συνδεθεί και θα παρουσιασθεί στα Τ λεμφοκύτταρα και κατ' επέκταση καθορίζει την ανοσιακή απάντηση (εικόνα 3). Ανεπάρκεια έκφρασης των HLA τάξης II μορίων έχει παρατηρηθεί και οφείλεται σε γενετικό έλλειμμα μεταγραφικών παραγόντων.



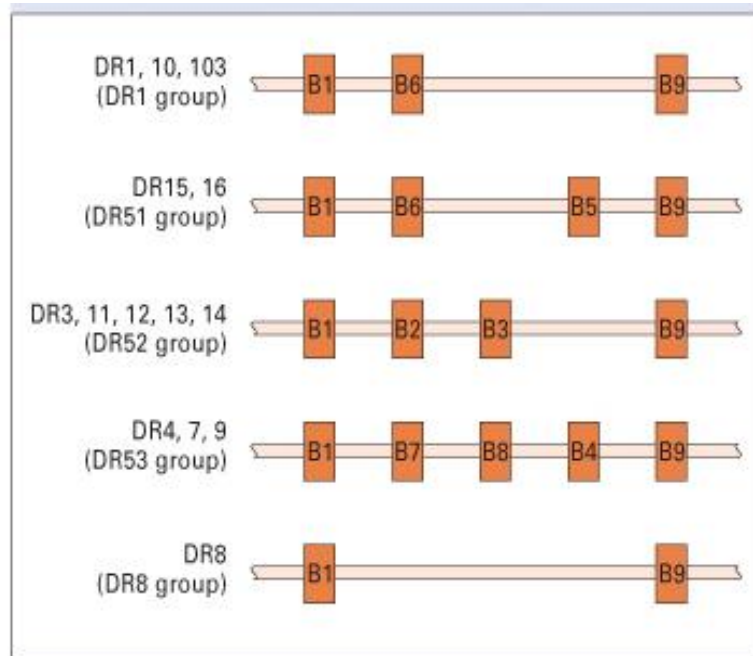
**Εικόνα 4.** HLA τάξης II μόριο

### Γονίδια HLA τάξης I και II (ή MHC-I και -II)

Η MHC περιοχή περιλαμβάνει μεγάλο αριθμό γονιδίων, εκ των οποίων ορισμένα μόνο αποκωδικοποιούνται (είναι δηλαδή γνωστά τα προϊόντα τους). Όσον αφορά τα γονίδια HLA τάξης I, έχει βρεθεί ότι όλα έχουν ένα 5' οδηγό εξόνιο που ακολουθείται από πέντε ή έξι εξόνια τα οποία κωδικοποιούν την α-άλυσσο (βαρεία αλυσος) του μορίου. Τρία εξόνια κωδικοποιούν για τις α1, α2, α3 περιοχές του εξωκυτταρίου τμήματος, ένα το διαμεμβρανικό τμήμα και ένα ή δύο (3') εξόνια κωδικοποιούν το ενδοκυτταριο τμήμα. HLA-A,-B,-C γονίδια κωδικοποιούν αντίστοιχα για HLA-A,-B,-C μόρια. Ανάλογη οργάνωση παρουσιάζουν και τα γονίδια των HLA τάξης II μορίων. Στην HLA τάξης II περιοχή, που εκτείνεται σε μια περιοχή DNA 1000 περίπου Kb, υπάρχουν τουλάχιστον έξι (6) γονίδια για τις α και δέκα (10) γονίδια για τις β αλύσσους των HLA τάξης II μορίων (HLA-DR,-DQ, -DP).

Πιο συγκεκριμένα, η HLA-DR περιοχή περιλαμβάνει ένα (1) α γονίδιο (DRA) και έως εννέα (9) β γονίδια (DRB1-9) συμπεριλαμβανομένων των ψευδογονιδίων. HLA-DRB1 γονίδιο κωδικοποιεί για τις HLA-DR ειδικότητες, DRB2 είναι ψευδογονίδιο, DRB3 κωδικοποιεί για HLA-DR52, DRB4 για HLA-DR53, HLA-DRB5 για HLA-DR51. HLA-DQA1 και -DQB1 γονίδια κωδικοποιούν για HLA-DQ αντιγόνα (DQ1- DQ9), ενώ HLA-DQA2 και DQB2 είναι ψευδογονίδια. HLA-DPA1 και -DPB1 γονίδια κωδικοποιούν για HLA-DP ειδικότητες (DPB1\*01 -DPB1\*125), ενώ HLA-DPA2 και -DPB2 είναι ψευδογονίδια.

Πρέπει να διευκρινισθεί ότι η οργάνωση και η έκταση της HLA-DR περιοχής διαφέρει ανάλογα με τον απλότυπο κάθε ατόμου (εικόνα 5), περιλαμβάνει δε και άλλα γονίδια, τα οποία κωδικοποιούν για προϊόντα - μόρια που εμπλέκονται στην παρουσίαση του αντιγόνου και τα οποία δεν εκφράζονται στην επιφάνεια των κυττάρων (εικόνα 1).



**Εικόνα 5.** Ο αριθμός των HLA-DRB γονιδίων διαφέρει σε διαφορετικούς απλότυπους

Γενικότερα, τα βασικά χαρακτηριστικά των γονιδίων HLA-I και -II είναι:

1. Ο εξαιρετικά μεγάλος πολυμορφισμός τους, δηλαδή η δυνατότητα εμφάνισης εξαιρετικά πολλών διαφορετικών αλληλομόρφων για μια γονιδιακή θέση. Ο πολυμορφισμός αυτός επιτείνεται και από σημειακές μεταλλάξεις, ανταλλαγή γενετικού υλικού, γονιδιακή μετατροπή, ομόζυγη χιασματυπία, διπλασιασμό γονιδίου κλπ. Σήμερα, έχουν προσδιορισθεί με μοριακές (DNA) τεχνικές >5000 διαφορετικά HLA αλλήλια (πίνακας1). Σε επίπεδο προϊόντος, η ανάλυση της αλληλουχίας αμινοξέων των HLA μορίων, έδειξε ότι οι διαφορές μεταξύ των μορίων αφορούν σε 10-40 αμινοξέα και ότι εντοπίζονται στα λειτουργικά τμήματα του μορίου δηλ. στη θέση παρουσίασης του αντιγόνου και μάλιστα τόσο στα σημεία δέσμευσης του προς παρουσίαση πεπτιδίου, όσο και στα σημεία δέσμευσης του TCR (T cell Receptor- υποδοχέα του T λεμφοκυττάρου).
2. Η πολύ στενή γενετική σύνδεση μεταξύ τους, ώστε να κληρονομούνται en block και να απαρτίζουν τον λεγόμενο "απλότυπο".

3. «Η ανισορροπία σύνδεσης» (linkage disequilibrium- LD) που εμφανίζουν δηλ. το φαινόμενο κατά το οποίο ορισμένα αλληλόμορφα των διαφόρων γονιδίων να εμφανίζονται μαζί, ως απλότυπος, περισσότερο συχνά (θετική LD) ή λιγότερο συχνά (αρνητική LD) απ' ό,τι αναμένεται με βάση την συχνότητα των αλληλομόρφων στον υπό μελέτη πληθυσμό.

**Πίνακας 1.** Αριθμός αλληλίων ανά HLA γενετικό τόπο όπως προσδιορίζονται με μοριακές (DNA) τεχνικές.

2010 (IMGT/HLA, Database)			
HLA τάξης I		HLA τάξης II	
γενετικός τόπος	αριθμός αλληλίων	γενετικός τόπος	αριθμός αλληλίων
HLA-A	948	HLA-DRA	3
HLA-B	1520	HLA-DRB1	900
HLA-C	608	HLA-DRB2-9	89
HLA-E	9	HLA-DQA1	35
HLA-F	21	HLA-DQB1	107
HLA-G	42	HLA-DPA1	28
		HLA-DPB1	138

### Ονοματολογία

Κάθε αντιγόνο ή ειδικότητα HLA αναγράφεται ως εξής: Προτάσσονται τα χαρακτηριστικά του συστήματος (HLA), ακολουθεί το χαρακτηριστικό γράμμα του γενετικού τόπου (A, B, C, DR, DQ, DP) και ακολουθεί ένας αριθμός που χαρακτηρίζει το αντιγόνο ή το αλληλίο (π.χ. HLA-A1, HLA-B8 κ.ο.κ.). Το γράμμα w προτάσσεται του αριθμού για τα αλληλία του HLA-C γενετικού τόπου (π.χ. HLA-Cw1) και για τις δύο κοινές ειδικότητες του HLA-B γενετικού τόπου (HLA-Bw4 και HLA-Bw6).

Στις περιπτώσεις κατά τις οποίες για τον προσδιορισμό των αλληλίων χρησιμοποιούνται μοριακές (DNA) τεχνικές, το γράμμα που χαρακτηρίζει τον γενετικό τόπο σημειώνεται με έναν αστερίσκο (\*) σε θέση εκθέτη, π.χ. HLA-B \* ή HLA-DRB1 \*. Ανάλογα δε με την μέθοδο και τα χρησιμοποιούμενα αντιδραστήρια, η ταυτοποίηση των αλληλίων φθάνει στο επίπεδο των 2 έως 8 ψηφίων π.χ. HLA-A\*01, HLA- A\*26:01:02, HLA-B\*15:01:01:01, DRB1\*15:03:01:02.

## Πολυμορφισμός των HLA τάξης I και II μορίων

Οι γενετικοί τόποι που κωδικοποιούν για τα HLA τάξης I και II μόρια είναι οι πλέον πολυμορφικοί του ανθρώπινου γονιδιώματος. Αυτό σημαίνει ότι για κάθε γενετικό τόπο υπάρχει ένας μεγάλος αριθμός διαφορετικών αλληλίων.

Ο πίνακας 2 παρουσιάζει τον αριθμό των αλληλίων του κάθε τόπου, όπως προσδιορίζονται με ορολογικές τεχνικές. Με τη χρήση τεχνικών μοριακής βιολογίας και λειτουργικών δοκιμασιών, ο αριθμός των αλληλίων που χαρακτηρίζουν σήμερα τον κάθε γενετικό τόπο παρουσιάζονται στον πίνακα 1.

**Πίνακας 2.** HLA-A,-B,-C,-DR,-DQ αντιγόνα/ειδικότητες που προσδιορίζονται με ορολογικές τεχνικές (Μάρτιος 2009).

HLA-A	HLA-B			HLA-C	HLA-DR	HLA-DQ
A1	B5	B47	B77(15)	Cw1	DR1	DQ1
A2	B7	B48	B78	Cw2	DR103	DQ2
A203	B703	B49(21)	B81	Cw3	DR2	DQ3
A210	B8	B50(21)	B82	Cw4	DR3	DQ4
A3	B12	B51(5)		Cw5	DR4	DQ5(1)
A9	B13	B5102	Bw4	Cw6	DR5	DQ6(1)
A10	B14	B5103	Bw6	Cw7	DR6	DQ7(3)
A11	B15	B52(5)		Cw8	DR7	DQ8(3)
A19	B16	B53		Cw9(w3)	DR8	DQ9(3)
A23(9)	B17	B54(22)		Cw10(w3)	DR9	
A24(9)	B18	B55(22)			DR10	
A2403	B21	B56(22)			DR11(5)	
A25(10)	B22	B57(17)			DR12(5)	
A26(10)	B27	B58(17)			DR13(6)	
A28	B2708	B59			DR14(6)	
A29(19)	B35	B60(40)			DR1403	
A30(19)	B37	B61(40)			DR1404	
A31(19)	B38(16)	B62(15)			DR15(2)	
A32(19)	B39(16)	B63(15)			DR16(2)	
A33(19)	B3901	B64(14)			DR17(3)	
A34(10)	B3902	B65(14)			DR18(3)	
A36	B40	B67				
A43	B4005	B70			DR51	
A66(10)	B41	B71(70)			DR52	
A68(28)	B42	B72(70)			DR53	
A69(28)	B44(12)	B73				
A74(19)	B45(12)	B75(15)				
A80	B46	B76(15)				

Ένα ενδιαφέρον χαρακτηριστικό των HLA αλληλίων είναι ότι η συχνότητα εμφάνισής τους διαφέρει ανάλογα με τη φυλή, αλλά και την πληθυσμιακή ομάδα π.χ. HLA-A1, -B8, -DR3 είναι μέσης συχνότητας στην Καυκάσια Φυλή, ενώ είναι εξαιρετικά σπάνια στους Ιάπωνες, HLA-B27 δεν υπάρχει στους γηγενείς της Αυστραλίας, HLA-B51 είναι περισσότερο συχνό στους πληθυσμούς γύρω από την Μεσόγειο και λιγότερο συχνό στους πληθυσμούς της Β. Ευρώπης, το HLA-DR18 υπάρχει μόνο στην Μαύρη Φυλή.

### Κληρονομική μεταβίβαση

Η HLA γενετική περιοχή κάθε χρωμοσώματος, συνήθως, κληρονομείται ως σύνολο (en bloc) από τον κάθε γονέα στο παιδί και ακολουθούνται οι νόμοι του Mendel. Επομένως, κάθε άτομο φέρει τα HLA αλλήλια ή αντιγόνα που κωδικοποιούνται από δύο γενετικές περιοχές σε δύο χρωμοσώματα, ένα πατρικής προέλευσης (ο ένας **απλότυπος**) και ένα μητρικής προέλευσης (ο άλλος **απλότυπος**). Δύο απλότυποι αποτελούν τον **γονότυπο**. Η απλή αναγραφή HLA, όπως προσδιορίζονται από την τυποποίηση, αποτελεί τον **φαινότυπο** του ατόμου (πίνακας 3).

**Πίνακας 3.** Αναγραφή HLA απλοτύπου, γονοτύπου και φαινοτύπου.

<b>HLA απλότυπος (1):</b>	HLA-A1; B8(Bw6); Cw7; DR17(DRw52); DQ2
<b>HLA απλότυπος (2):</b>	HLA-A23; B51(Bw4); Cw1; DR11(DRw52); DQ7
<b>HLA γονότυπος:</b>	HLA-A1; B8(Bw6); Cw7; DR17(DRw52); DQ2 / HLA-A23; B51(Bw4); Cw1; DR11(DRw52); DQ7
<b>HLA φαινότυπος:</b>	HLA-A1,23; B8(Bw6), 51(Bw4); Cw1, Cw7; DR17(DRw52), DR11(DRw52); DQ2, DQ7

Ένα χρωμοσωμικό ζεύγος δύναται να έχει ένα μόνο αλλήλιο για τον κάθε γενετικό τόπο στο ένα χρωμόσωμα και το ίδιο ή διαφορετικό αλλήλιο στο άλλο χρωμόσωμα. Επομένως, ένα άτομο μπορεί να έχει μέχρι δύο διαφορετικά αλλήλια HLA για τον κάθε γενετικό τόπο (ετεροζυγωτία). Στην περίπτωση που το αλλήλιο HLA είναι κοινό στα δύο ομόλογα χρωμοσώματα ενός ατόμου, προσδιορίζεται ένα μόνο αλλήλιο HLA για τον συγκεκριμένο γενετικό τόπο (ομοζυγωτία). Είναι προφανές ότι για τον προσδιορισμό του HLA γονοτύπου ενός ατόμου (την καταγραφή των κληρονομηθέντων δυο απλοτύπων), απαιτείται η HLA τυποποίηση και των γονέων του.

## HLA τυποποίηση

Ο προσδιορισμός των HLA- A,-B,-C,-DR,-DQ αντιγόνων γίνεται:

1. Με **ορολογικές μεθόδους**, κυρίως χρησιμοποιώντας την τεχνική της μικρο-λεμφοκυτταροτοξικότητας. Τα HLA-I αντιγόνα (HLA-A,-B,-C) προσδιορίζονται σε ολικό πληθυσμό λεμφοκυττάρων (δηλ. σε T και B λεμφοκύτταρα) ή σε οποιοδήποτε υποπληθυσμό λεμφοκυττάρων (T ή B), ενώ τα HLA-II προσδιορίζονται σε B λεμφοκύτταρα. Τα HLA-DP δεν προσδιορίζονται με ορολογικές μεθόδους.
2. Τα τελευταία χρόνια για τον προσδιορισμό των HLA αλληλίων, εφαρμόζονται ευρέως **οι τεχνικές της μοριακής βιολογίας με την DNA τυποποίηση (RFLP, PCR-SSO, PCR-SSP, sequencing κ.α.)** σε επίπεδο δηλ. γονιδιακών πολυμορφισμών. Οι μοριακές τεχνικές αυτές έχουν συντελέσει στον καθορισμό μεγαλύτερου αριθμού αλληλομόρφων γονιδίων σε κάθε γενετικό τόπο και τείνουν να αντικαταστήσουν ή να περιορίσουν δραστικά τις ορολογικές τεχνικές. Σήμερα δε, έχει καθιερωθεί και η νέα ονοματολογία σύμφωνα με τα αποτελέσματα της DNA τυποποίησης. Κάθε εργαστήριο, ανάλογα με το πεδίο εφαρμογής HLA τυποποίησης (έλεγχος πατρότητας, μεταμόσχευση οργάνων, μεταμόσχευση HSCs, συσχέτιση με νοσήματα κ.α.), τον όγκο εργασίας και το επείγον της περίπτωσης, χρησιμοποιεί και την ανάλογη τεχνική σε επίπεδο υψηλής, μέσης ή χαμηλής διακριτικής ικανότητας.

Τα πλεονεκτήματα των μοριακών τεχνικών έναντι των ορολογικών τεχνικών (μικρο-λεμφοκυτταροτοξικότητα) είναι: δεν απαιτούνται ζωντανά κύτταρα, η υγεία του ασθενούς δεν επηρεάζει την τυποποίηση, τα αντιδραστήρια είναι ποιοτικά σταθερά και μπορούν να παραχθούν σε μεγάλες ποσότητες, υπάρχει δυνατότητα σχεδιασμού τους ανάλογα με το αλληλίο που χρειάζεται να μελετηθεί και μπορεί να σχεδιαστούν αντιδραστήρια χαμηλού, μέσου ή υψηλού επιπέδου διακριτικής ικανότητας HLA τυποποίησης. Όμως, και οι μοριακές τεχνικές απαιτούν περαιτέρω βελτίωση και σε πολλές περιπτώσεις η ορολογική τυποποίηση θεωρείται απαραίτητη και συμπληρωματική των μοριακών τεχνικών.

### Βιολογικός ρόλος των αντιγόνων HLA

Τα αντιγόνα HLA έγιναν γνωστά από το ρόλο τους στην μεταμόσχευση, διότι αποτελούν τον σπουδαιότερο φραγμό στην αλλογενή μεταμόσχευση. Η αναγνώριση (άμεση ή έμμεση) από τα ανοσοϊκανά κύτταρα του λήπτη των διαφορετικών (εφ' όσον υπάρχουν) αντιγόνων HLA στα κύτταρα του μοσχεύματος, οδηγεί σε διέγερση της χυμικής και κυτταρικής ανοσοαπάντησης, με αποτέλεσμα την απόρριψη του μοσχεύματος. Αυτός είναι



ο λόγος για τον οποίο στις μεταμοσχεύσεις επιδιώκουμε όσο το δυνατόν καλύτερη συμβατότητα (δηλ. ομοιότητα αντιγόνων HLA) μεταξύ δότη-λήπτη.

Όμως, σήμερα, 53 χρόνια μετά την περιγραφή του πρώτου αντιγόνου HLA, αρκετά ενδιαφέροντα στοιχεία είναι γνωστά για τη λειτουργία των μορίων αυτών. Γενικά, θα μπορούσε να περιγραφεί ένας ρόλος των HLA μορίων **κεντρικά**, στο θύμο, αρχίζοντας από την ωρίμανση και διαφοροποίηση των T λεμφοκυττάρων και ένας ρόλος **περιφερικά**, ο οποίος αναφέρεται στην επεξεργασία και παρουσίαση του αντιγονικού πεπτιδίου στα T λεμφοκύτταρα.

Έτσι, κατά τα στάδια ωρίμανσης και διαφοροποίησης των T λεμφοκυττάρων μέσα στο θύμο, τα HLA μόρια παίρνουν μέρος σε δύο διαδικασίες:

1. Στη **θετική επιλογή** των λεμφοκυττάρων εκείνων που διαθέτουν TCRs ικανούς να συνδέονται με «ίδια» HLA μόρια, ενώ λεμφοκύτταρα που στερούνται αυτής της ικανότητας αποθνήσκουν (απόπτωση-κυτταρικός θάνατος). Τα CD4 θετικά T λεμφοκύτταρα αναγνωρίζουν και συνδέονται με HLA-II μόρια, ενώ τα CD8 θετικά T λεμφοκύτταρα αναγνωρίζουν και συνδέονται με HLA-I μόρια. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται “MHC περιορισμός,” (MHC restriction).
2. Στην **αρνητική επιλογή**, κατά την οποία T λεμφοκύτταρα με TCRs υψηλής συγγένειας προς τα «ίδια» HLA μόρια, απαλείφονται (αυτοανοχή).

Έτσι, προκύπτουν ώριμα T λεμφοκύτταρα ικανά **α)** να συνεργασθούν με κύτταρα που φέρουν όμοια HLA μόρια και **β)** να διακρίνουν και να δεχθούν τα «ίδια» συστατικά και με βάση αυτή την ικανότητα να αναγνωρίσουν τα «ξένα» και να απαντήσουν ανοσολογικά σ' αυτά.

Όμως, τα HLA μόρια έχουν και το ρόλο κυτταρικού υποδοχέα για το “ίδιο,” και το «ξένο» αντιγόνο. Αντιγονικά πεπτίδια που παράγονται ενδοκυτταρίως ή που προκύπτουν από την ενδοκυττάρωση και την επεξεργασία διαφόρων «ιδίων» ή «ξένων» (ιοί, βακτήρια κ.α.) πρωτεϊνών, εισέρχονται, εφαρμόζουν και συνδέονται στη θήκη των HLA μορίων και παρουσιάζονται στον υποδοχέα του T λεμφοκυττάρου. Στη συνέχεια, το T λεμφοκύτταρο, εφόσον αναγνωρίσει μέσω του TCR ένα «ξένο» αντιγονικό πεπτίδιο, θα ενεργοποιηθεί, θα διαφοροποιηθεί και θα λειτουργήσει ανάλογα, προκειμένου να εξελιχθεί η ανοσοαπάντηση. Είναι προφανές, ότι η δομή του αντιγονικού πεπτιδίου και η δομή της θήκης, θα καθορίσουν εάν θα υπάρξει παρουσίαση του αντιγονικού πεπτιδίου και κατ' επέκταση εάν θα υπάρξει ανοσοαπάντηση.

Ένα δεδομένο HLA μόριο έχει τη δυνατότητα να δεσμεύει μια ποικιλία διαφορετικών πεπτιδίων. Σε κάθε άτομο το ρεπερτόριο των κληρονομούμενων HLA αλληλίων θα καθορίσει ποιά πεπτίδια θα αναγνωρισθούν και θα παρουσιασθούν στα T λεμφοκύτταρα, για τα οποία και θα υπάρξει ανοσοαπάντηση.

Ειδικότερα, η σύνδεση του αντιγονικού πεπτιδίου με HLA-I ή II μόρια και κατ' επέκταση η παρουσίασή του σε CD8<sup>+</sup> T ή CD4<sup>+</sup> T λεμφοκύτταρα, αντίστοιχα, και η δημιουργία ανοσιακής απάντησης, εξαρτώνται από την οδό (ενδογενή ή εξωγενή), επεξεργασίας του αντιγόνου, οι οποίες οδοί έχουν ως εξής:

**Ενδογενής οδός** (εικόνα 6): Τα ενδογενή αντιγόνα, ό,τι δηλαδή παράγεται εντός του κυττάρου, όπως π.χ. φυσιολογικές ή νεοπλασματικές πρωτεΐνες και ιϊκές πρωτεΐνες, υφίστανται πρωτεολυτική διάσπαση (με αποτέλεσμα τον σχηματισμό πεπτιδίων), κυρίως εντός των πρωτεασωμάτων (proteasomes), αλλά και στο ενδοπλασματικό δίκτυο (ΕΔ), με την βοήθεια και της ουμπικουιτίνης (ubiquitin), μιας μικρού μοριακού βάρους πρωτεΐνης. Μέσα στο ενζυμικό σύμπλεγμα των πρωτεασωμάτων σημαντική καταλυτική δράση έχουν τα LMP-2 και LMP-7 μόρια, τα οποία κωδικοποιούνται από γονίδια που βρίσκονται στην MHC-II περιοχή. Στην δημιουργία πεπτιδίων συμμετέχουν και άλλα ενζυμικά συστήματα όπως το TPPII (tripeptidyl aminopeptidase II) σύμπλεγμα. Τα πεπτίδια που παράγονται από την πρωτεόλυση αυτή μεταφέρονται προς το ΕΔ με την βοήθεια των πρωτεϊνών θερμικής καταπληξίας (Heat shock proteins- HSP) και με την βοήθεια των μορίων TAP εισέρχονται, μέσω της πλασματικής μεμβράνης, στο ΕΔ. Οι TAP1 και TAP2 πρωτεΐνες κωδικοποιούνται από γονίδια της MHCII περιοχής. Μέσα στο ΕΔ συντίθενται και οι δύο αλυσείς (α αλυσος και β2 μικροσφαιρίνη) των HLA-I μορίων. Εδώ, η ταπασίνη (tapasin) σχηματίζει γέφυρα μεταξύ HLA-I μορίου και TAP, έως ότου το πεπτίδιο συνδεθεί με το HLA-I μόριο, ενώ οι βοηθητικές πρωτεΐνες (chaperons) καλνεξίνη (calnexin), καλρετικουλίνη (calreticulin) και ERP57, βοηθούν στην διαμόρφωση του συμπλέγματος HLA-I/πεπτίδιο. Μετά την δέσμευση του πεπτιδίου στη θήκη του HLA-I μορίου, αποδεσμεύονται οι βοηθητικές πρωτεΐνες και το σύμπλεγμα HLA-I/πεπτίδιο, μέσω της συσκευής Golgi, οδεύει προς την κυτταρική μεμβράνη και εμφανίζεται επί της κυτταρικής μεμβράνης με τη διαδικασία της εξωκύτωσης. Το σύμπλεγμα αυτό επί της κυτταρικής μεμβράνης αναγνωρίζεται από τα CD8<sup>+</sup> T κυτταροτοξικά λεμφοκύτταρα. Έτσι, ένα μολυσμένο από ιό κύτταρο ή ένα νεοπλασματικό κύτταρο, γίνεται στόχος αναγνώρισης και καταστροφής (λύσης) από T κυτταροτοξικά λεμφοκύτταρα. HLA-I μόρια που δεν κατόρθωσαν να δεσμεύσουν κάποιο πεπτίδιο, είναι ασταθή και κατ' αυτόν τον τρόπο εξασφαλίζεται ότι μόνο λειτουργικά HLA μόρια θα

αλληλοεπιδράσουν με TCRs. Σπανίως, αντιγονικά πεπτίδια προερχόμενα από εξωγενή αντιγόνα, παρουσιάζονται μέσω της ενδογενούς οδού παρουσίασης.

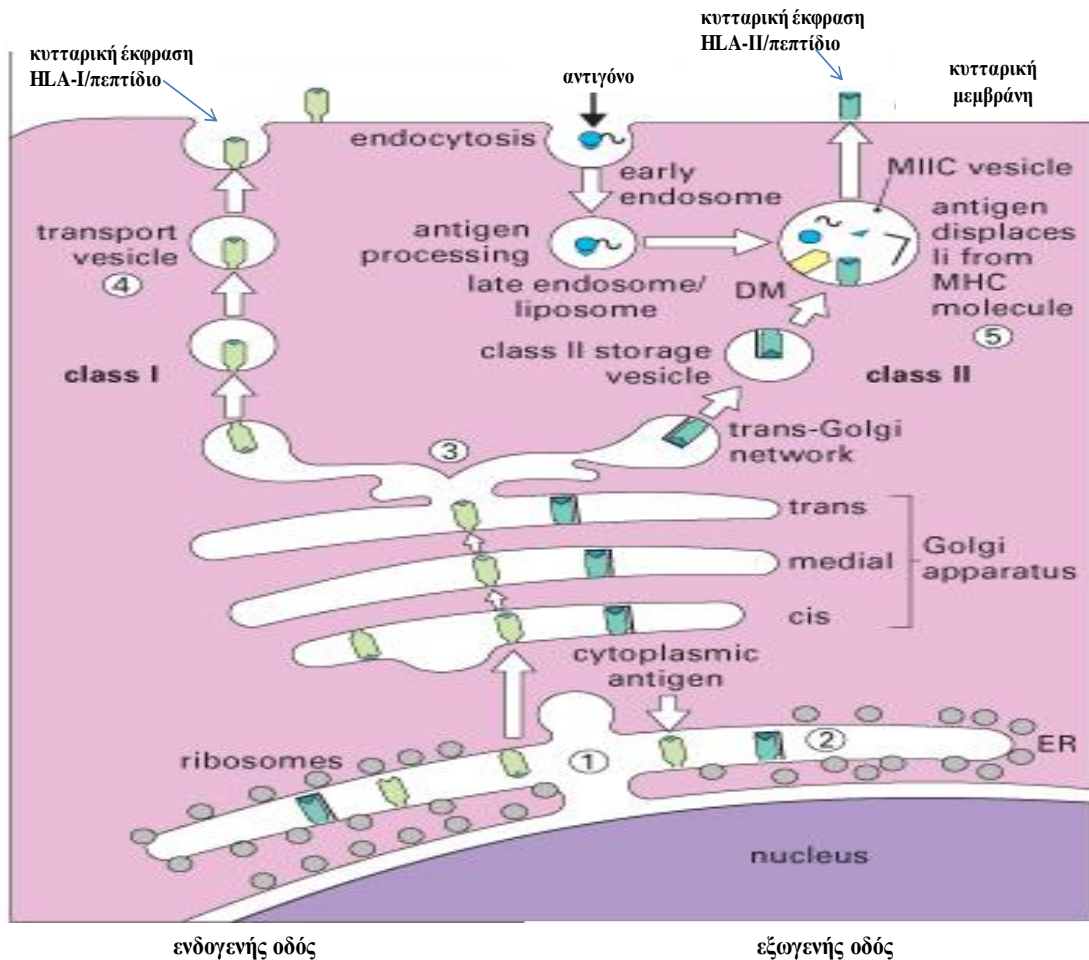
**Εξωγενής οδός** (εικόνα6): Εξωγενή αντιγόνα, όπως πρωτεΐνες βακτηρίων, παρασίτων, μυκήτων, εισέρχονται στο κύτταρο με την διαδικασία της φαγοκυττάρωσης ή της ενδοκύτωσης και σχηματίζουν τα φαγοσώματα, τα οποία συντήκονται με τα λυσοσώματα και σχηματίζουν τα φαγολυσοσώματα. Τα φαγολυσοσώματα περιέχουν πρωτεολυτικά ένζυμα και έχουν όξινο pH. Στο περιβάλλον αυτό τα εξωγενή αντιγόνα υφίστανται επεξεργασία, η οποία συνίσταται από απλό “ξεδίπλωμα” του μορίου, έως διάσπαση σε πεπτίδια μεγέθους 13-18 aa. Όσον αφορά τις α και β αλυσίδες των HLA-II μορίων, αυτές παράγονται στο ΕΔ και η σύνδεσή τους με μια τρίτη αλυσίδα, την Ii (invariant chain), τους εξασφαλίζει την σταθερότητα του μορίου, εμποδίζει την πλήρωση της θήκης από ενδογενή πεπτίδια και επιπλέον διευκολύνει την πορεία του μορίου προς τα ενδοκυτταρικά κυστίδια, όπου θα συναντήσουν τα εξωγενή πεπτίδια. Στα ενδοκυτταρικά (φαγολυσοσωματικά) κυστίδια, το όξινο pH και τα πρωτεολυτικά ένζυμα διασπούν την Ii αλυσίδα και μόνο ένα μικρό τμήμα της καλούμενο CLIP (Class II associated Invariant chain Peptide- CLIP) παραμένει συνδεδεμένο στη θήκη, διατηρώντας την κλειστή και εμποδίζοντας την σύνδεσή της με πεπτίδια. Στη συνέχεια, η ανταλλαγή του CLIP με αντιγονικό πεπτίδιο διευκολύνεται από το μόριο HLA-DM. Τα HLA-DMA και DMB μόρια κωδικοποιούνται από αντίστοιχα γονίδια που εδρεύουν στην MHC-II περιοχή και θεωρούνται μη κλασσικά MHC-II μόρια. Ένα άλλο μη κλασσικό MHC-II μόριο, το HLA-DO, επίσης εμπλέκεται στο “φόρτωμα” της θήκης με πεπτίδια. HLA-DO είναι ετεροδιμερές και τα γονίδια για HLA-DOA και -DOB βρίσκονται στην MHC-II περιοχή.

Ενδοκυττάρια πεπτίδια, τα οποία είχαν εξέλθει του κυττάρου και επαναπροσλήφθηκαν μέσω της εξωγενούς οδού, μπορεί να συνδεθούν στη θήκη ενός HLA-II μορίου και να παρουσιασθούν μέσω της εξωγενούς οδού. Σύμπλεγμα HLA-II/πεπτιδίου εξέρχεται στην κυτταρική μεμβράνη και εκεί το πεπτίδιο παρουσιάζεται και αναγνωρίζεται από τον TCR των βοηθητικών CD4<sup>+</sup>T λεμφοκυττάρων.

Υπάρχουν περιπτώσεις όπου στην επιφάνεια του κυττάρου και προ της αναγνώρισης, το πεπτίδιο της θήκης αντικαθίσταται ανταγωνιστικά, λόγω ισχυρότερης δύναμης σύνδεσης και συγγένειας, από άλλο πεπτίδιο του εξωκυτταρίου χώρου.

Είναι επίσης δυνατόν ορισμένα HLA μόρια να εξέλθουν του κυττάρου με κενή θήκη, οπότε και συνδέουν εξωκυττάρια ελεύθερα αντιγονικά πεπτίδια, τα οποία εξήλθαν του κυττάρου μετά την διάσπαση του πρωτεϊνικού αντιγόνου.

Εκτός όμως από τη συμμετοχή τους στην εκπαίδευση των Τ λεμφοκυττάρων στο θύμο και τη λειτουργία τους ως υποδοχείς αντιγονικού πεπτιδίου, τα μόρια HLA λειτουργούν ως ένζυμα, ως μόρια προσκόλλησης και ως διαβιβαστές μηνυμάτων. Μελετάται δε ο ρόλος τους και ως ελεύθερα διαλυτά μόρια στο μεσοκυττάριο χώρο.



**Εικόνα 6.** Ενδογενής και εξωγενής οδός παρουσίασης του αντιγονικού πεπτιδίου (Elsevier Male et al: Immunology 7e-www.studentconsult.com, τροποποιημένο).

### Χρησιμότητα προσδιορισμού και μελέτης των HLA αντιγόνων/αλληλίων

Μετά την ανωτέρω σύντομη περιγραφή, γίνεται φανερό ότι τα HLA αντιγόνα αφ' ενός μεν αποτελούν την έκφραση ενός εξαιρετικά πολύμορφου γενετικού συστήματος, αφ' ετέρου δε διαδραματίζουν βασικό και ουσιαστικό ρόλο σε πολλές λειτουργίες του οργανισμού και του ανοσιακού συστήματος, με το να αναγνωρίζουν και να ανέχονται το "ίδιο," αλλά και να διακρίνουν το "ξένο," και να εγείρουν ανοσιακή απάντηση έναντι αυτού.

Στην καθημερινή πρακτική, με βάση το χαρακτηριστικό του πολυμορφισμού τους η μελέτη των HLA αντιγόνων χρησιμεύει, κυρίως, στον έλεγχο/αποκλεισμό πατρότητας, σε πληθυσμιακές/φυλογενετικές μελέτες, στον σχεδιασμό του δένδρου της ανθρωπότητας. Με

βάση δε τις λειτουργικές τους ιδιότητες και τον βιολογικό τους ρόλο, η μελέτη των αντιγόνων αυτών χρησιμεύει, κυρίως, στις μεταμοσχεύσεις συμπαγών οργάνων και αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων, στον έλεγχο γενετικής επιδεκτικότητας ή προστασίας σε διάφορα νοσήματα (αυτοάνοσα, λοιμώδη, κακοήθειες), στις μεταγγίσεις αίματος, στην διάγνωση και τον χειρισμό επαναλαμβανόμενων αποβολών ανοσιακής αιτιολογίας. Γενικότερα, πρόκειται για ένα εξαιρετικά ενδιαφέρον πολυμορφικό γενετικό σύστημα, με βιολογικές λειτουργίες μεγάλης σημασίας στην άμυνα του οργανισμού, αλλά και στην διατήρηση ομοιόστασης του οργανισμού, πιθανότατα δε και με άλλες, άγνωστες προς το παρόν, λειτουργίες.

### ΕΝΔΕΙΚΤΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Abbas A, Lichtman J, Pilai S. Cellular and Molecular Immunology (6<sup>th</sup> edition) WB. Saunders Publications, Philadelphia 2007.
2. Chen X, Jensen PE. MHC class II antigen presentation and Immunological abnormalities due to deficiency of MHC class II and its associated genes. *Experimental and Molecular Pathology* 2008;85:40-44.
3. Choo SY. The HLA System: Genetics, Immunology, Clinical Testing and Clinical Implications. *Yonsei Medical Journal* 2007;48(1):11-23.
4. Male D, Brostoff J, Both DB, Roitt I. Immunology (7<sup>th</sup> edition) Mosby Elsevier 2006.
5. Smyth LA, Afzali B, Tsang J, et al. Intracellular Transfer of MHC and Immunological Molecules: Molecular Mechanisms and Biological Significance. *American Journal of Transplantation* 2007;7:1442-1449.
6. The IMGT/HLA Sequence Database <http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla/>.
7. Robinson J, Waller MJ, Fail SJ, Mc William H, Lopez R, Parham P, March SGE: The IMGT / HLA database. *Nucleic Acids Research* (2009) 37 D1013 - D1017.
8. March SGE, Albert ED, Bodmer WF, et al. Nomenclature for Factors of the HLA System. *Tissue Antigens* 2010;75:291-455.
9. Holdsworth R, Hurley CK, Marsh SGE, et al. The HLA Dictionary 2008: a summary of HLA – A,-B, -C, - DRB1/3/4/5, - DQB1 alleles and their association with serologically defined HLA – A, -B, -C, -DR and –DQ antigens. *Tissue Antigens* 2009;73:95-170.

## ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (POLYMERASE CHAIN REACTION – PCR)

**Βασιλική Κίτσιου**

Επιμελήτρια Α', Τμήμα Ανοσολογίας-Ιστοσυμβατότητας, Γ.Ν.Α. «Ο ΕΥΑΓΓΕΛΙΣΜΟΣ»

*Στοιχεία επικοινωνίας:*

*Τηλ.: 6986488412*

*E-mail: vkitsiou@yahoo.gr*

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) είναι μια τεχνική ευρέως χρησιμοποιούμενη στη μοριακή βιολογία. Πήρε την ονομασία της από ένα από τα συστατικά της μεθόδου, το ένζυμο DNA πολυμεράση, που χρησιμοποιείται για τον πολλαπλασιασμό ενός τμήματος DNA με *in vitro* ενζυματική αντιγραφή. Σπάνια μια εφεύρεση έχει αλλάξει την επιστήμη της βιολογίας τόσο ριζικά και σε τόσο μικρή χρονική περίοδο όσο η PCR. Με αυτή την τεχνική πολύ μικρά ποσά DNA μπορούν να αντιγραφούν πολύ γρήγορα και έτσι να πολλαπλασιαστούν σε τέτοια έκταση ώστε να μπορούν εύκολα να ανιχνευτούν, να μελετηθούν και να χρησιμοποιηθούν σε κάθε επιθυμητή εφαρμογή.

### ΙΣΤΟΡΙΑ

Η PCR ανακαλύφθηκε από τον Αμερικανό χημικό Kary Mullis, το 1983. Το διάστημα εκείνο ο Mullis εργαζόταν στην Emeryville της Καλιφόρνια για την Cetus Corporation, μια από τις πρώτες εταιρείες βιοτεχνολογίας. Είχε επιφορτιστεί με την παραγωγή μικρών ελίκων DNA για άλλους επιστήμονες. Ο Mullis έγραψε ότι συνέλαβε την ιδέα της PCR οδηγώντας μια νύχτα το αυτοκίνητό του κατά μήκος του Pacific Coast Highway. Δούλευε στο μυαλό του ένα νέο τρόπο ανάλυσης των DNA μεταλλάξεων όταν συνειδητοποίησε ότι αντ' αυτού είχε ανακαλύψει μια μέθοδο πολλαπλασιασμού οποιασδήποτε νουκλεοτιδικής αλληλουχίας επιθυμούσε.

Μέσα σε λίγα χρόνια η PCR έφερε επανάσταση σε παγκόσμιο επίπεδο στα βιολογικά εργαστήρια. Ήδη από τα μέσα της δεκαετίας του 1980 η τεχνική χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά για τη διάγνωση νοσημάτων, όταν οι ερευνητές κατάφεραν να ταυτοποιήσουν το γονίδιο της δρεπανοκυτταρικής αναιμίας. Περίπου την ίδια χρονική περίοδο η μέθοδος εισήχθει για χρήση στην ιατροδικαστική ιατρική. Η PCR κατάφερε να εξασφαλίσει την ύψιστη επιστημονική διάκριση για τον εφευρέτη της σε χρόνο ρεκόρ. Το 1993 μόλις 10 έτη μετά το ιστορικό ταξίδι με το αυτοκίνητο ο Kary Mullis έλαβε το Νόμπελ Χημείας. Ο λόγος

για αυτή την εξαιρετική επιτυχία είναι ότι η τεχνική παρείχε λύση σε ένα από τα πιο πιεστικά προβλήματα που αντιμετώπιζε η βιολογία τότε, την αντιγραφή του DNA.

## **ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣ ΤΟΥ DNA**

Κατά τη διαδικασία της PCR μικροποσότητες DNA μπορούν γρήγορα και επαναλαμβανόμενα να αντιγραφούν αποδίδοντας μια ποσότητα DNA ικανή να ελεγχθεί με τις συμβατικές εργαστηριακές μεθόδους. Με αυτό τον τρόπο, για παράδειγμα είναι δυνατόν να μελετηθεί η αλληλουχία του DNA δηλ. να καθοριστεί η σειρά των βάσεων που το απαρτίζουν. Θεωρητικά ένα μόλις DNA μόριο είναι επαρκές. Η PCR είναι για αυτό το λόγο μια από τις πλέον ευαίσθητες βιολογικές τεχνικές που έχουν ποτέ επινοηθεί. Δεδομένου αυτών των δυνατοτήτων, η μέθοδος του Mullis μας εισήγαγε στην εποχή της γενωμικής. Από τη μελέτη του ανθρώπινου γονιδιώματος (Human Gene Project), στην έρευνα στόχων και στην ανάπτυξη γονιδιακών θεραπειών, υπάρχουν λίγες μόνο περιοχές της γενετικής έρευνας σήμερα που δεν εξαρτώνται από την PCR.

## **Η PCR ΣΤΗΝ ΠΡΑΞΗ**

Οι βασικές αρχές της PCR είναι απλές. Όπως το όνομά της υποδηλώνει είναι μια αλυσιδωτή αντίδραση: Ένα τμήμα DNA χρησιμοποιείται για να παραχθούν δύο αντίγραφα, στη συνέχεια τέσσερα, οκτώ και ούτω καθ' εξής (Εικόνα 1). Η αλληλουχία του νουκλεϊνικού οξέος-στόχου μπορεί να είναι ένα απλό γονίδιο, ένα τμήμα γονιδίου ή μια μη κωδικοποιούσα αλληλουχία. Οι περισσότερες PCR μέθοδοι τυπικά πολλαπλασιάζουν τμήματα νουκλεϊνικού οξέος (DNA ή RNA) 50-1500 βάσεων αν και ορισμένες τεχνικές επιτρέπουν τον πολλαπλασιασμό μεγαλύτερων τμημάτων. Ο βασικός εξοπλισμός απαιτεί μια σειρά αντιδραστηρίων και συσκευών. Ανάμεσα σ' αυτά συγκαταλέγονται :

1. **Μελετώμενο DNA (DNA template):** Περιλαμβάνει την νουκλεϊνική περιοχή στόχο που επιθυμούμε να πολλαπλασιάσουμε.
2. **Δύο εκκινητές (primers):** Μικρά κομμάτια DNA συμπληρωματικά του 5' ή 3' άκρου της αλληλουχίας που θέλουμε να πολλαπλασιάσουμε.
3. **Δεοξυνουκλεοτίδια (dNTPs):** Για τη σύνθεση DNA απαιτούνται ελεύθερα dNTPs. Οι συγκεντρώσεις dNTPs για την PCR πρέπει να είναι από 20 έως 200 μM για κάθε δεοξυνουκλεοτίδιο, για την επίτευξη της βέλτιστης ειδικότητας και πιστότητας. Τα τέσσερα dNTPs (dATP, dTTP, dGTP & dCTP) πρέπει να συγκεντρώνονται σε ισοδύναμες συγκεντρώσεις για την ελαχιστοποίηση λαθών κατά την ενσωμάτωση.

4. **Taq πολυμεράση (Taq polymerase):** Ένα θερμοάαντοχο στους 70°C ένζυμο, το οποίο αρχικά απομονώθηκε από ένα θερμόφιλο βακτήριο των θερμών πηγών, το *Thermus aquaticus*. Το ένζυμο αυτό έχει την ικανότητα να ενώνεται στους εκκινητές και να φέρει κοντά και να συνδέει μια σειρά νουκλεοτιδίων συμπληρωματικών του αρχικού μορίου DNA.
5. **Ρυθμιστικό διάλυμα (Buffer solution):** Παρέχει το κατάλληλο περιβάλλον για να επιτευχθεί η μέγιστη δραστικότητα και σταθερότητα της DNA πολυμεράσης. Το συνιστώμενο ρυθμιστικό διάλυμα αποτελείται από 10 έως 50 mM Tris.HCl (pH 8,3 έως 8,9). Με την αλλαγή της ρυθμιστικής ικανότητας στην PCR μπορεί να αυξηθεί η παραγωγή των προϊόντων πολλαπλασιασμού του DNA. Η προσθήκη μέχρι και 50mM KCl στο μείγμα της αντίδρασης διευκολύνει την σύνδεση των εκκινητών, όμως συγκέντρωση πάνω από 50 mM αναστέλλει τη δράση της Taq πολυμεράσης.
6. **Ιόντα μαγνησίου (Mg<sup>2+</sup>):** Για την PCR απαιτούνται δισθενή ιόντα μαγνησίου. Η συγκέντρωση ιόντων μαγνησίου επιδρά στην σύνδεση των εκκινητών, στις θερμοκρασίες αποδιάταξης του DNA και στη δράση των ενζύμων. Σε μια αντίδραση PCR πρέπει να περιέχονται 0,5 έως 2,5 mM μαγνησίου.

Η PCR εκτελείται σε μικρά σωληνάρια πολυστυρενίου (reaction tubes) με όγκο αντίδρασης περίπου 20-200 μl (Εικόνα 2). Τα σωληνάρια τοποθετούνται σε ειδικά μηχανήματα που ονομάζονται θερμικοί κυκλοποιητές-thermal cyclers (Εικόνα 3). Οι θερμικοί κυκλοποιητές είναι θερμομαντικά σώματα με δυνατότητα προγραμματισμού που θερμαίνουν και ψύχουν τα σωληνάρια προκειμένου να επιτύχουν τις θερμοκρασίες που απαιτούνται σε κάθε βήμα της αντίδρασης. Πολλοί μοντέρνοι θερμικοί κυκλοποιητές κάνουν χρήση του φαινομένου του Peltier, το οποίο επιτρέπει την θέρμανση και ψύξη του κυκλοποιητή, αντιστρέφοντας απλά την τάση. Τα σωληνάρια έχουν λεπτό τοίχωμα που επιτρέπει τη γρήγορη αλλαγή θερμοκρασίας. Συχνά χρησιμοποιείται ένα επίστρωμα ελαφρού ορυκτού ελαίου επάνω από το μίγμα της αντίδρασης για την πρόληψη της εξάτμισης του υγρού και τη διατήρησή του.

#### **ΟΙ ΕΚΚΙΝΗΤΕΣ (PRIMERS)**

Προκειμένου ένα τεμάχιο DNA να πολλαπλασιαστεί με τη βοήθεια της PCR, κατάλληλοι εκκινητές πρέπει να σχεδιαστούν και να συντεθούν. Οι εκκινητές είναι μικρού μήκους ολιγονουκλεοτίδια δηλ. χημικά σχεδιασμένα, βραχέα θραύσματα DNA μονής έλικας - συχνά όχι μεγαλύτερα των 50 και συνήθως μόνο 18 έως 25 ζευγών βάσεων σε μήκος – τα



οποία περιέχουν νουκλεοτίδια συμπληρωματικά των δύο άκρων του τμήματος του DNA-στόχου που πρόκειται να πολλαπλασιαστεί. Αυτές οι συμπληρωματικές βάσεις διευκολύνουν την ισχυρή σύνδεση του εκκινητή στο μητρικό DNA. Σε αυτόν στη συνέχεια μπορεί να συνδεθεί η DNA πολυμεράση και να ξεκινήσει τη σύνθεση μιας νέας DNA θυγατρικής αλυσού, η οποία είναι συμπληρωματική του αρχικού τμήματος.

Το μήκος των εκκινητών και η επιθυμητή θερμοκρασία τήξης (melting temperature –  $T_m$ ) εξαρτώνται από μια σωρεία παραγόντων. Ως  $T_m$  ενός εκκινητή ορίζεται η θερμοκρασία στην οποία το ήμισυ των βάσεων του εκκινητή είναι συνδεδεμένο στο μητρικό DNA. Καθώς η  $T_m$  αυξάνει με την αύξηση του μήκους του εκκινητή, εκκινητές που έχουν μικρό μήκος απαιτούν χαμηλότερη θερμοκρασία σύνδεσης για αποδοτικό πολλαπλασιασμό. Λόγω όμως της απλούστερης σύνθεσής τους μπορούν να συνδεθούν σε διάφορες θέσεις του μητρικού DNA, γεγονός που θα είχε ως αποτέλεσμα έναν ανεπιθύμητο μη ειδικό πολλαπλασιασμό. Από την άλλη πλευρά, η χρήση ενός επιμήκους εκκινητή που θα είχε ως αποτέλεσμα πιο ειδική σύνδεση και πολλαπλασιασμό, θα απαιτούσε θερμοκρασία σύνδεσης μεγαλύτερη των  $80^\circ\text{C}$  δηλ. θερμοκρασία που επηρεάζει την σταθερότητα και δραστηριότητα της DNA πολυμεράσης. Το ιδεώδες μέγεθος ενός εκκινητή (με περιεκτικότητα βάσεων G+C περίπου 40-60%) είναι γενικά από 15-40 νουκλεοτίδια με μια θερμοκρασία σύνδεσης μεταξύ  $50^\circ\text{C}$  και  $74^\circ\text{C}$ .

Ορισμένες εφαρμογές της PCR απαιτούν τη χρήση εκφυλισμένων εκκινητών (degenerate primers) ειδικών δηλ. μιγμάτων εκκινητών που φέρουν μια ή περισσότερες διαφορές βάσεων σε συγκεκριμένες θέσεις. Η χρήση αυτών των εκκινητών απαιτείται σε περιπτώσεις όπου η ακριβής αλληλουχία του αρχικού DNA είναι άγνωστη, ή όταν είναι επιθυμητός ο πολλαπλασιασμός τμημάτων DNA με ελάχιστες διαφορές αλληλουχίας π.χ. μπορεί να απαιτούνται αν ένα ομόλογο γονίδιο, δηλ. ένα γονίδιο με όμοια λειτουργία αλλά διαφορετική DNA αλληλουχία που ανήκει σε διαφορετικούς οργανισμούς, πρέπει να πολλαπλασιαστεί.

Οι πολλαπλοί παράγοντες που επηρεάζουν τη λειτουργία των εκκινητών κάνουν το σχεδιασμό τους μια διαδικασία εξαιρετικά πολύπλοκη:

- Η περιεκτικότητα G+C βάσεων πρέπει να είναι μεταξύ 40-60%.
- Οι  $T_m$  των δύο εκκινητών που χρησιμοποιούνται σε μια αντίδραση δεν πρέπει να διαφέρουν περισσότερο από  $5^\circ\text{C}$ .
- Η ιδεώδης θερμοκρασία σύνδεσης είναι συνήθως  $5^\circ\text{C}$  μικρότερη της  $T_m$ .

- Ο σχεδιασμός του 3' άκρου του εκκινητή είναι κριτικής σημασίας για την επιτυχία της PCR μιας και η αναπτυσσόμενη DNA αλυσος εκτείνεται από το 3' άκρο του εκκινητή.
- Το 3' άκρο του εκκινητή δεν πρέπει να περιέχει περισσότερες από 3-4 βάσεις που να είναι συμπληρωματικές με άλλη περιοχή του ίδιου ή του άλλου εκκινητή.
- Συχνά είναι επιθυμητό να υπάρχει ένα G ή C νουκλεοτίδιο στο 3' άκρο του εκκινητή, καθώς ενισχύει την επιμήκυνση της έλικας. Όμως πρέπει να αποφεύγεται η παρουσία περισσότερων των τριών G ή C νουκλεοτιδίων στις πέντε τελικές βάσεις του 3' άκρου του εκκινητή.

Παρόλο που είναι πολύ σημαντική η συμμόρφωση με αυτές τις οδηγίες, πρακτικά, είναι συχνά αδύνατος ο σχεδιασμός εκκινητών, που πληρούν όλα τα παραπάνω κριτήρια. Λόγω όμως των πολλών μεταβλητών που επηρεάζουν μια PCR, ακόμη και ατελώς σχεδιασμένοι εκκινητές μπορεί τελικά να αποβούν λειτουργικοί. Υπάρχουν ειδικά software που βοηθούν στο σχεδιασμό των εκκινητών αλλά η τελική επιλογή γίνεται μόνο μετά από επαναλαμβανόμενες δοκιμές.

#### **ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΤΗΣ PCR**

Ένα τυπικό PCR πρωτόκολλο συνήθως περιλαμβάνει 25-40 μεταβολές της θερμοκρασίας που ονομάζονται θερμοκοί κύκλοι. Στη στοιχειώδη μορφή κάθε κύκλος επιτελείται σε 3 βήματα. Οι θερμοκρασίες και το χρονικό διάστημα που αυτές χρησιμοποιούνται σε κάθε κύκλο εξαρτώνται από μια ποικιλία παραμέτρων. Σε αυτές περιλαμβάνονται τα ένζυμα που χρησιμοποιούνται για τη σύνθεση του DNA, η συγκέντρωση των δισθενών κατιόντων και των dNTPs και η  $T_m$  των εκκινητών.

Κάθε θερμοκοί κύκλος περιλαμβάνει τα εξής στάδια (Εικόνα 4):

**Στάδιο αποδιάταξης (Denaturation step):** Στο στάδιο αυτό το DNA-στόχος επωάζεται στους 94-98° C για 20-30 δευτερόλεπτα. Η θερμοκρασία αυτή προκαλεί την τήξη και το διαχωρισμό των ελίκων του DNA-στόχου και των εκκινητών, καταλύοντας τους δεσμούς υδρογόνου συμπληρωματικών βάσεων των DNA ελίκων και οδηγώντας στη δημιουργία μονόκλωνων αλυσίδων.

**Στάδιο σύνδεσης εκκινητών (Annealing step):** Η θερμοκρασία μειώνεται στους 50-65° C για 20-40 δευτερόλεπτα επιτρέποντας την σύνδεση των εκκινητών στις συμπληρωματικές μονόκλωνες αλληλουχίες στόχους. Τυπικά η θερμοκρασία σύνδεσης είναι περίπου 3-5° C κάτω της θερμοκρασίας τήξης ( $T_m$ ) των χρησιμοποιούμενων εκκινητών. Σταθεροί υδρογονικοί DNA προς DNA δεσμοί σχηματίζονται μόνο όταν η αλληλουχία των εκκινητών

είναι συμπληρωματική των DNA στόχων. Η πολυμεράση συνδέεται στη συνέχεια στο 3' άκρο του εκκινητή και ξεκινά η σύνθεση του DNA.

**Στάδιο επιμήκυνσης (Elongation step):** Η θερμοκρασία αυτού του σταδίου εξαρτάται από τη DNA πολυμεράση που χρησιμοποιείται. Η Taq πολυμεράση αποδίδει μέγιστη δραστηριότητα στους 75-80° C και συνήθως μια μέση θερμοκρασία 72° C χρησιμοποιείται με το ένζυμο αυτό. Σε αυτό το βήμα η DNA πολυμεράση προσθέτοντας συμπληρωματικά dNTPs ως επέκταση των εκκινητών από το 5' προς το 3' άκρο του DNA-στόχου, συνθέτει μια νέα DNA αλυσίδα ακριβές αντίγραφο του αρχικού DNA που θέλουμε να πολλαπλασιάσουμε. Ο χρόνος επέκτασης εξαρτάται τόσο από την DNA πολυμεράση που χρησιμοποιείται όσο και από το μήκος του DNA-στόχου. Κατά κανόνα η DNA πολυμεράση θα αντιγράψει 1000 βάσεις το λεπτό. Κάτω από ιδανικές συνθήκες δηλ. αν δεν υπάρχουν περιορισμοί λόγω διαφόρων υποστρωμάτων ή αντιδραστηρίων, το ποσό του DNA-στόχου διπλασιάζεται σε κάθε στάδιο επέκτασης οδηγώντας σε εκθετικό πολλαπλασιασμό της αρχικής αλληλουχίας.

Κατά τη διάρκεια όλων των θερμικών κύκλων ενός πρωτοκόλλου PCR, οι αντιδράσεις επέκτασης κάθε εκκινητή απολήγουν σε διάφορες αποστάσεις από τον εκκινητή, με αποτέλεσμα προϊόντα πολλαπλασιασμού που περιέχουν αντίθετες έλικες DNA απροσδιορίστου μήκους. Μετά το δεύτερο κύκλο, όμως, αρχίζει να συσσωρεύεται ένα ειδικό προϊόν. Πρόκειται για το προϊόν της PCR που ονομάζεται αμπλικόνιο (amplicon).

Μετά το πέρας της PCR, γίνεται ηλεκτροφόρηση σε γέλη (gel) αγαρόζης για το διαχωρισμό των προϊόντων της PCR (Εικόνα 5). Το μέγεθος των PCR προϊόντων καθορίζεται σε σύγκριση με DNA ladder (ένα δείκτη μοριακού βάρους), το οποίο περιέχει κομμάτια DNA γνωστού μεγέθους, που τρέχουν στο gel της ηλεκτροφόρησης μαζί με τα προϊόντα της PCR.

## ΤΕΧΝΙΚΑ ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΑ ΤΗΣ PCR

Η τεχνική της PCR είναι εξαιρετικά ευαίσθητη. Το σύστημα μπορεί να μολυνθεί από εξωτερικά θραύσματα DNA, τα οποία είναι δυνατόν να πολλαπλασιαστούν παράλληλα με το δείγμα. Για την αποφυγή επιμολύνσεων στα διαγνωστικά εργαστήρια απαιτείται τήρηση αυστηρών κανόνων. Επιβάλλεται η χρήση ειδικά διαμορφωμένων εργαστηρίων, στα οποία ο προ-PCR χώρος, στον οποίο πραγματοποιείται ετοιμασία των αντιδραστηρίων, ετοιμασία των δειγμάτων και η μίξη δείγματος-αντιδραστηρίων, πρέπει να είναι διαχωρισμένος από την μετά-PCR περιοχή στην οποία γίνεται ο PCR πολλαπλασιασμός και η ανίχνευση και εξέταση του τελικού προϊόντος. Στην προ-PCR περιοχή συνιστάται η χρήση θαλάμου νηματικής ροής (laminar flow) με UV λάμπες αποστείρωσης και πιπετών με πωματισμένα

ρύγχη φίλτρου. Σε κάθε ένα από τους δύο χώρους πρέπει να υπάρχουν πιπέτες και ειδική περιβολή του προσωπικού, τα οποία θα χρησιμοποιούνται αποκλειστικά στους χώρους αυτούς. Επίσης τα αντιδραστήρια της PCR πρέπει να προετοιμάζονται ξεχωριστά και να χρησιμοποιούνται αποκλειστικά για το σκοπό αυτό. Τα προδιαχωρισμένα αντιδραστήρια (aliquots) πρέπει να αποθηκεύονται ξεχωριστά από τα δείγματα DNA.

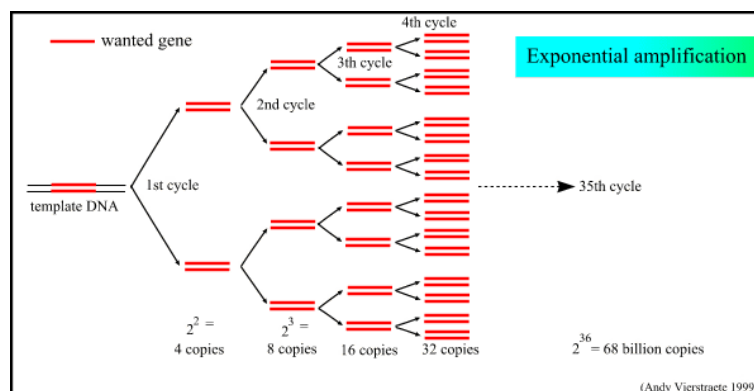
Η PCR απαιτεί τεχνική επιδεξιότητα και ειδικό εργαστηριακό εξοπλισμό. Παρότι η διαγνωστική PCR έχει ημιαυτοματοποιηθεί, η τεχνική εξακολουθεί να απαιτεί κόπο και προσοχή.

### ΕΥΡΕΩΣ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΟΥΜΕΝΕΣ ΠΑΡΑΛΛΑΓΕΣ ΤΗΣ PCR

- 1. Nested PCR:** πρόκειται για δύο συνεχόμενες PCR αντιδράσεις με 25 περίπου κύκλους η καθεμία, που σκοπό έχουν να αυξήσουν την ειδικότητα και να μειώσουν το background που οφείλεται σε μη ειδικό πολλαπλασιασμό του DNA. Στην πρώτη PCR χρησιμοποιείται ένα ζεύγος εκκινητών που περικλείει την ευρύτερη περιοχή της ακολουθίας που πρόκειται να πολλαπλασιαστεί. Το προϊόν του πρώτου πολλαπλασιασμού μεταφέρεται σε δεύτερο δοκιμαστικό σωλήνα και επιτελείται δεύτερη PCR με ένα ζεύγος εκκινητών ειδικών προς την αλληλουχία που πολλαπλασιάστηκε στην πρώτη PCR. Η nested PCR είναι ειδική για τον πολλαπλασιασμό επιμήκων DNA αλληλουχιών.
- 2. Reverse Transcription PCR (RT-PCR):** με τη μέθοδο αυτή επιτελείται ανάστροφη μεταγραφή, με τη βοήθεια του ενζύμου ανάστροφης μεταγραφάσης, ενός στόχου RNA ώστε να παραχθεί αρχικά cDNA και στη συνέχεια ακολουθεί PCR.
- 3. Quantitative PCR (Q-PCR):** χρησιμοποιείται για τη μέτρηση της ποσότητας του τελικού προϊόντος της PCR. Καθορίζει δηλαδή αν μια DNA αλληλουχία είναι παρούσα σε ένα δείγμα και τον αριθμό των αντιγράφων (copies). Πιο ακριβής είναι η quantitative real time PCR (QRT-PCR).
- 4. Multiplex PCR:** περιλαμβάνει τη χρήση πολλαπλών ζευγών εκκινητών μέσα σε μια μόνο PCR αντίδραση για την παραγωγή αμπλικονίων διαφορετικών μεγεθών, ειδικών για διάφορες DNA αλληλουχίες.
- 5. Methylation specific PCR (MSP):** χρησιμοποιείται για την ανίχνευση μεθυλιωμένων νησιδίων CpG στο γενωμικό DNA

## Χρήσεις της PCR

Η τεχνική της PCR έχει αποδειχθεί εξαιρετικά χρήσιμη σε πολλές εφαρμογές. Ιδιαίτερα δε στη διαγνωστική ανίχνευση κληρονομικών και επίκτητων νοσημάτων, στην ιατροδικαστική (γενετικά αποτυπώματα), στην κλωνοποίηση αλληλουχιών DNA, στην ανάλυση αρχαίου DNA, στην ανάλυση ειδικών μεταλλάξεων κ.λπ.



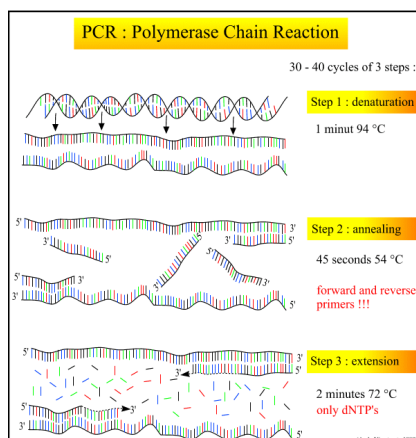
**Εικόνα 1.** Πολλαπλασιασμός τμήματος DNA με PCR (εκθετικός πολλαπλασιασμός).



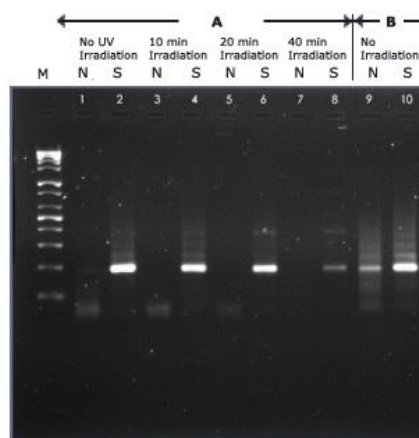
**Εικόνα 2.** Σωληνάρια PCR καθένα από τα οποία περιέχει 100μl μίγματος αντίδρασης



**Εικόνα 3.** Θερμικός κυκλοποιητής



**Εικόνα 4.** Θερμικός κύκλος της PCR αποτελούμενος από τρία στάδια



**Εικόνα 5.** Ηλεκτροφόρηση σε γέλη αγαρόζης για το διαχωρισμό των προϊόντων της PCR

## ΕΝΔΕΙΚΤΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Bartlett JM, Stirling D. A short history of the polymerase chain reaction. *Methods Mol Biol.* 2003;226:3-6.
2. Saiki RK1, Gelfand DH, Stoffel S, et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science.* 1988 Jan 29;239(4839):487-491.
3. Cheng S, Fockler C, Barnes WM, et al. Effective amplification of long targets from cloned inserts and human genomic DNA. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994 Jun 7;91(12):5695-5699.
4. J.F. Sambrook and D.W. Russell in *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed. Chapter 8: In vitro Amplification of DNA by the Polymerase Chain Reaction. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
5. Pavlov AR, Pavlova NV, Kozyavkin SA, et al. Recent developments in the optimization of thermostable DNA polymerases for efficient applications. *Trends Biotechnol.* 2004 May;22(5):253-260.
6. Rychlik W1, Spencer WJ, Rhoads RE. Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro. *Nucleic Acids Res.* 1990 Nov 11;18(21):6409-6412.
7. Herman JG1, Graff JR, Myöhänen S, et al. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996 Sep 3;93(18):9821-9826.
8. Rabinow Paul in *Making PCR: A Story of Biotechnology*. Chicago: University of Chicago Press Books, 1996.
9. Mullis, Kary (1990). The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American* 262(4):56-65.

# ΤΟ ΓΕΝΕΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ - ΝΟΥΚΛΕΪΚΑ ΟΞΕΑ ΡΟΗ ΤΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΑΣ

**Διαμάντω Κουνιάκη**

Βιολόγος, Τμήμα Ανοσολογίας-Ιστοσυμβατότητας, Γ.Ν.Α. «Ο ΕΥΑΓΓΕΛΙΣΜΟΣ»

*Στοιχεία επικοινωνίας:*

*Τηλ.: 6973492610*

*E-mail: kouniakitzeni@yahoo.gr*

Το γενετικό υλικό ενός οργανισμού περιέχει την πληροφορία, η οποία καθορίζει τις ιδιότητές του και είναι υπεύθυνο για την διατήρηση και την μετάβαση αυτής της πληροφορίας στους απογόνους του. Σε όλους σχεδόν τους οργανισμούς το γενετικό υλικό αποτελείται από DNA. Οι εξαιρέσεις είναι σπάνιες και αφορούν μερικούς βακτηριοφάγους, καθώς και μερικούς φυτικούς ή ζωικούς ιούς, των οποίων το γενετικό υλικό αποτελείται από RNA.

Από την δεκαετία του 50 αρχές της δεκαετίας του 60, οι επιστήμονες είχαν χαρακτηρίσει και απομονώσει τα δύο νουκλεϊκά οξέα (DNA και RNA). Ενώ μέχρι τη δεκαετία του 1970 το DNA αποτελούσε το πιο δύσκολο προς μελέτη μακρομόριο, σήμερα, με την μεθοδολογική επανάσταση που παρατηρείται στο χώρο της μοριακής βιολογίας τα νουκλεϊκά οξέα είναι τα πλέον ευκολότερα αναλυόμενα υλικά. Σταθμός στη ανάπτυξη των μοριακών τεχνικών ανασυνδυασμένου DNA ήταν η ανακάλυψη της ίδιας της δομής του DNA ή της Μόνα Λίζα της Σύγχρονης Επιστήμης, όπως αλλιώς ονομάστηκε.

## **ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΟΡΓΑΝΩΣΗ ΤΩΝ ΝΟΥΚΛΕΪΚΩΝ ΟΞΕΩΝ**

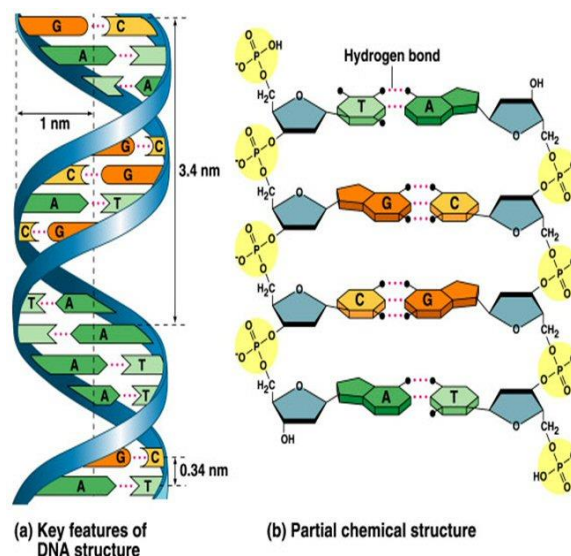
Το όνομα των νουκλεϊκών οξέων προέρχεται από το κύριο οργανίδιο του κυττάρου όπου εντοπίζονται, τον πυρήνα (nucleus). Είναι πολυνουκλεοτίδια, δηλαδή πολυμερή με βασική επαναλαμβανόμενη μονάδα το νουκλεοτίδιο. Κάθε νουκλεοτίδιο αποτελείται από τρία στοιχεία.

1. Ένα κυκλικό σάκχαρο, αποτελούμενο από πέντε άτομα άνθρακα (πεντόζη). Στην περίπτωση των ριβονουκλεοτιδίων (RNA) πρόκειται για μια ριβόζη, ενώ στα δεοξυριβονουκλεοτιδία (DNA) είναι μία δεοξυριβόζη. Η διαφορά τους εντοπίζεται στο άτομο C<sub>2</sub>, όπου υπάρχει μία υδροξυλομάδα (-OH) ή υδρογόνο (-H) αντιστοίχως.
2. Μία βάση, πουρίνη (αδενίνη A ή γουανίνη G) ή πυριμιδίνη (κυτοσίνη C, θυμίνη T και ουρακίλη U), συνδεδεμένη στο πρώτο άτομο άνθρακα του σακχάρου (C<sub>1</sub>). Η ουρακίλη

ανευρίσκεται αντί της θυμίνης μόνο στο RNA. Πεντόζη και αζωτούχος βάση συνδέονται μεταξύ τους με N-γλυκοζιτικό δεσμό.

3. Μία φωσφορική ομάδα, συνδεδεμένη στον άνθρακα C<sub>5</sub> του σακχάρου με φωσφοεστερικό δεσμό.

Η αλληλοδιαδοχή των νουκλεοτιδίων του μορίου του DNA ονομάζεται *πρωτοταγής δομή του DNA*, ενώ *δευτεροταγής δομή* ονομάζεται η δομή της διπλής έλικας (μορφή B-DNA), την οποία περιέγραψαν οι J.Watson και F.Crick το 1953. Πρόκειται για μία δεξιόστροφη διπλή έλικα, με τον υδρόφιλο σκελετό (σακχαρικά κατάλοιπα και φωσφορικές ρίζες) στην περιφέρεια, εκτεθειμένο στο υδατικό περιβάλλον και τις υδρόφοβες βάσεις στο εσωτερικό του μορίου. Οι δύο ελικοειδείς αλυσίδες συγκρατούνται μεταξύ τους με διπλούς ή τριπλούς υδρογονικούς δεσμούς ανάμεσα στις συμπληρωματικές βάσεις (A=T, G=C). Η συμπληρωματικότητα των αλυσίδων, υποδηλώνει ότι η νουκλεοτιδική αλληλουχία της μιας αλυσίδας καθορίζει την νουκλεοτιδική αλληλουχία της άλλης, ενώ η κατεύθυνση των δύο αλυσίδων είναι αντιπαράλληλη δηλ. το 3' άκρο είναι πάντα ζευγαρωμένο με το 5' άκρο (εικόνα 1). Η υπερελίκωση του DNA συχνά αναφέρεται ως *τριτοταγής δομή του DNA*.



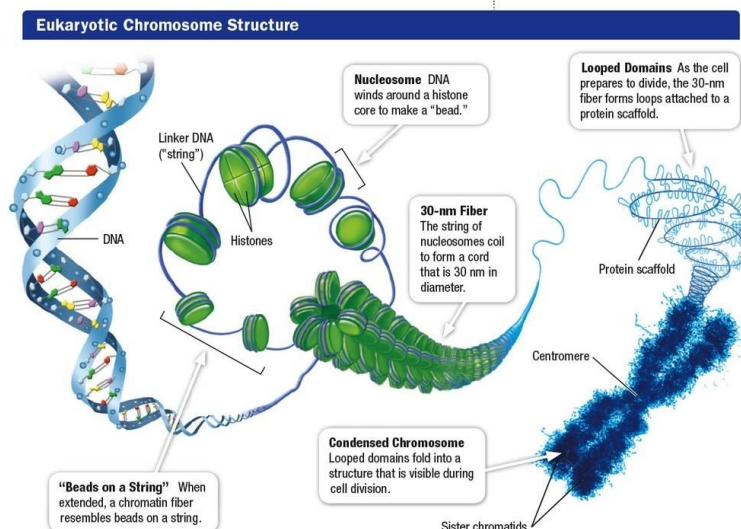
**Εικόνα 1.** Η πρωτοταγής και δευτεροταγής δομή του DNA.

Στους προκαρυωτικούς οργανισμούς το DNA είναι δίκλωνο κυκλικό μόριο μεγέθους  $3-5 \times 10^6$  ζευγών βάσεων (bp) και το οποίο περιέχει ένα αντίγραφο του γονιδιώματος. Η γενετική πληροφορία, σε αντίθεση με τα ευκαρυωτικά, είναι συνεχόμενη. Δεν υπάρχουν δηλ. μη κωδικοποιούσες αλληλουχίες (εσώνια).

Στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς το DNA είναι μεγαλύτερο ( $3 \times 10^9$  bp) και με υψηλότερο βαθμό οργάνωσης. Είναι οργανωμένο σε **γραμμικά χρωμοσώματα**, τα οποία



αποτελούνται από δίκλωνο DNA, συνδεδεμένο με πρωτεΐνες που υπάρχουν μόνο στον πυρήνα του κυττάρου. Οι περισσότερες μελετημένες είναι οι **ιστόνες**. Υπάρχουν 5 κύριοι τύποι ιστονών: H1, H2A, H2B, H3, H4. Πρόκειται για μικρά μόρια, τα οποία περιέχουν περίσσεια θετικά φορτισμένων αμινοξέων (λυσίνη και αργινίνη) και δημιουργούν ιονικούς δεσμούς με τα αρνητικά φορτισμένα νουκλεϊκά οξέα. Παίζουν σημαντικότερο ρόλο στην συμπίεση του DNA, προσδεδεμένες σε αυτό με ειδικό τρόπο και καθιστώντας το προσβάσιμο στις πρωτεΐνες που ενέχονται στο διπλασιασμό και την έκφρασή του. Είναι εξελικτικά πολύ συντηρητικές. Αυτό σημαίνει ότι η συγκεκριμένη αμινοξική αλληλουχία τους είναι αναντικατάστατη για τη λειτουργία τους. Ανώτερη δομή οργάνωσης είναι το **νουκλεόσωμα**, το οποίο περιλαμβάνει 146 bp. Ο πυρήνας του νουκλεοσώματος συνίσταται από ένα οκταμερές ιστονών, αποτελούμενο από δύο αντίγραφα κάθε μιας από αυτές. Το σύμπλεγμα DNA και ιστονών ονομάζεται **χρωματίνη** και ενώ οι αλληλεπιδράσεις πρωτεϊνών στο σύμπλεγμα της χρωματίνης παραμένουν σε μεγάλο βαθμό άγνωστες, φαίνεται δε ότι παίζουν καθοριστικό ρόλο στη ρύθμιση της έκφρασης της γενετικής πληροφορίας (εικόνα 2).



**Εικόνα 2.** Η οργάνωση του ευκαρυωτικού DNA. (Πηγή: William Halmeck, 2014).

## ΡΟΗ ΤΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΑΣ

Όπως είναι γνωστό στα μόρια του DNA κάθε κυττάρου είναι κωδικοποιημένη η γενετική πληροφορία για ολόκληρο τον οργανισμό. Το πρώτο βήμα στην έκφραση αυτής της πληροφορίας είναι η αντιγραφή (DNA replication) και η μεταφορά της στα μόρια του RNA μέσω της διαδικασίας της μεταγραφής (transcription) και στην συνέχεια, τα μόρια RNA

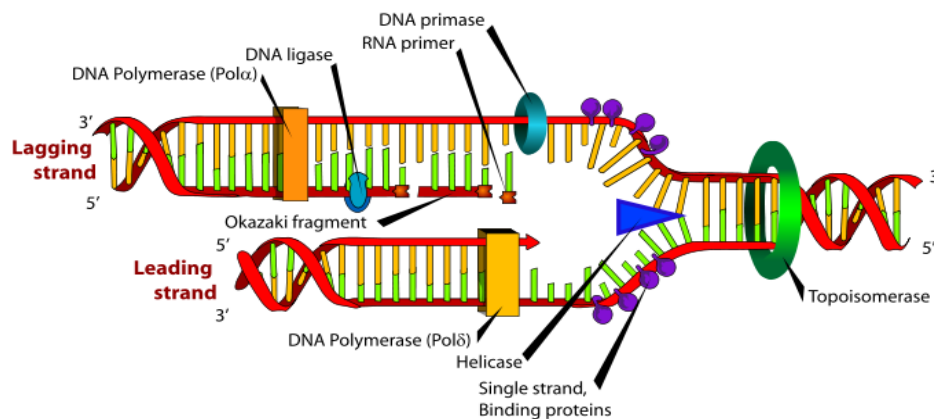
μεταφέρουν την πληροφορία αυτή στο σύστημα σύνθεσης των πρωτεϊνών μέσω της διαδικασίας της μετάφρασης (translation).

### **Αντιγραφή του DNA**

Με τον όρο αντιγραφή του DNA (DNA replication) αναφερόμαστε στη σύνθετη διαδικασία, η οποία επιτρέπει τον διπλασιασμό του. Σύμφωνα με το ημισυντηρητικό μοντέλο του Cairns, η αντιγραφή επιτελείται στη φάση S (synthesis) του κυτταρικού κύκλου, όπου κάθε πατρικός κλώνος χρησιμεύει ως μήτρα για τη σύνθεση ενός νέου πανομοιότυπου θυγατρικού. Η όλη διαδικασία απαιτεί την εμπλοκή πολλών και διαφορετικών ενζύμων και πρωτεϊνών, που πρέπει να δράσουν με μεγάλη πιστότητα και σε σύντομο χρονικό διάστημα για να διατηρηθεί ακέραια η γενετική πληροφορία του DNA.

Για να αρχίσει η αντιγραφή του DNA, η διπλή έλικα οφείλει να ξετυλιχτεί με τη βοήθεια πρωτεϊνών, τις **ελικάσες**. Ακολουθεί η χαλάρωση από τις υπερελικώσεις με την βοήθεια των **τοποισομερασών I και II**, που τέμνουν τον ένα ή και τους δύο κλώνους αντίστοιχα και τον ή τους επανασυνδέουν με δαπάνη ATP. Οι δύο κλώνοι πρέπει να παραμείνουν ανοιχτοί σε μονόκλωνη μορφή, ώστε να είναι εφικτή η αντιγραφή τους. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω των **μονόκλωνων συνδετικών πρωτεϊνών** (single stranded binding proteins, SSB), οι οποίες δεσμεύονται στους μονόκλωνους κλώνους και τους βοηθούν να παραμείνουν στη μορφή αυτή. Η αποδέσμευση των κλώνων δεν συμβαίνει ταυτόχρονα σε όλο το μήκος του DNA, αλλά αποτελεί τοπικό φαινόμενο, με αποτέλεσμα τον σχηματισμό της λεγόμενης «**διχάλα της αντιγραφής**». Στη συνέχεια, το ένζυμο **πριμάση** (εκκινητάση) με κατεύθυνση 5'-3' συνθέτει ένα ολιγομερές από ριβονουκλεοτίδια, συμπληρωματικό του κλώνου που πρόκειται να αντιγραφεί. Το ολιγομερές RNA δημιουργεί μία μικρή δίκλωνη περιοχή, απαραίτητη για τη δράση του ενζύμου της αντιγραφής, **DNA πολυμεράσης** (DNA polymerase). Χρησιμεύει δηλ. ως εκκινητής, ο οποίος διαθέτει στο 3' άκρο του ένα ελεύθερο -OH. Η DNA πολυμεράση συνθέτει τον νέο κλώνο πάντα προς την κατεύθυνση 5'-3' συνδέοντας με φωσφοδιεστερικό δεσμό το 3'-OH του τελευταίου νουκλεοτιδίου με την 5' φωσφορική ομάδα του εισερχόμενου τριφωσφορικού νουκλεοτιδίου, κατάλυση που απαιτεί την παρουσία ιόντων μαγνησίου. Η δε τοποθέτηση των νουκλεοτιδίων γίνεται σύμφωνα με τον κανόνα της συμπληρωματικότητας χρησιμοποιώντας ως μήτρα τον πατρικό κλώνο. Ο πατρικός κλώνος με φορά 5'-3' αντιγράφεται κατά συνεχή τρόπο και ονομάζεται **οδηγός** ή **προπορευόμενος**, ενώ ο άλλος, ο **συνοδός** ή **καθυστερημένος** κλώνος, αντιγράφεται κατά ασυνεχή τρόπο υπό τη μορφή μικρών τμημάτων μήκους μερικών εκατοντάδων bp (τμήματα **Okazaki**), τα οποία στο τέλος της αντιγραφής ενώνονται

μεταξύ τους με τη βοήθεια της DNA **λιγάσης** για τη δημιουργία ενός συνεχούς κλώνου (εικόνα 3).



**Εικόνα 3.** Το ημισυντηρητικό μοντέλο αντιγραφής του DNA. (Πηγή: LadyofHats, 2007).

### Μεταγραφή του DNA

Είναι σαφές ότι η πιστότητα της μεταγραφής (transcription) παίζει τεράστιο ρόλο, πολύ δε περισσότερο, αφού αντίθετα με ό,τι συμβαίνει στην αντιγραφή του DNA, στη μεταγραφή δεν υπάρχει τρόπος να διορθωθούν λάθη και να αντικατασταθούν ακατάλληλα νουκλεοτίδια. Η πιστότητα αυτής της διαδικασίας εξαρτάται από: α) το ειδικό σημείο έναρξης της μεταγραφής β) την ακριβή μεταγραφή μιας αλληλουχίας DNA με βάση τη συμπληρωματικότητα των βάσεων και γ) το ειδικό σημείο λήξης της μεταγραφής. Τα ένζυμα που παίρνουν μέρος σε αυτή τη διαδικασία πρέπει να αναγνωρίζουν τα σημεία έναρξης και λήξης και να διαθέτουν μια αυστηρή εξειδίκευση στον πολυμερισμό νουκλεοτιδίων ακριβώς όπως προσδιορίζεται από τη νουκλεοτιδική αλληλουχία του DNA. Η σύνθεση των μορίων του RNA επιτυγχάνεται με μία αντίδραση πολυμερισμού ριβονουκλεοτιδίων (rNTPs), στην οποία χρησιμοποιείται ως μήτρα ο ένας κλώνος του DNA (3'-5'). Η αντίδραση καταλύεται από ειδικά ένζυμα, τις **RNA πολυμεράσες** (RNA polymerase), οι οποίες μπορούν να ξεκινήσουν τη σύνθεση της αλυσίδας χωρίς την ανάγκη ύπαρξης εκκινήτη.

### Ωρίμανση του πρόδρομου μορίου mRNA

Οι νέες μέθοδοι απομόνωσης και χαρτογράφησης των γονιδίων, υβριδοποίησης και προσδιορισμού της πρωτοδιάταξης DNA και RNA, κατέδειξαν ότι ένα μεγάλο μέρος από τις νουκλεοτιδικές αλληλουχίες DNA δεν εμφανίζονται στο ώριμο **αγγελιοφόρο RNA** (messenger RNA, mRNA). Οι αλληλουχίες αυτές ονομάζονται **ενδιάμεσες αλληλουχίες** (intervening sequences) ή **εσώνια** (introns), ενώ οι αλληλουχίες που εμφανίζονται **εξώνια** (exons). Τα γονίδια που περιέχουν ενδιάμεσες αλληλουχίες ονομάζονται **ασυνεχή** ή

**διακεκομμένα γονίδια** (split ή interrupted genes). Τα αρχικά προϊόντα της μεταγραφής είναι πλήρη αντίγραφα του DNA, δηλ. η αντιγραφή των γονιδίων αυτών είναι συνεχής και περιλαμβάνει και τις ενδιάμεσες αλληλουχίες, οι οποίες στην συνέχεια απομακρύνονται μετά τη μεταγραφή μέσω της διαδικασίας της **μεταμεταγραφικής ωρίμανσης του RNA** (RNA splicing). Η ωρίμανση λαμβάνει χώρα στον πυρήνα του κυττάρου και περιλαμβάνει διαδικασίες όπως, η δημιουργία καλύμματος στο πρόδρομο mRNA (προ-mRNA), η πολυαδενυλίωση και η διαδικασία του ματίσματος (εικόνα 4).

#### *α. Δημιουργία καλύμματος (capping)*

Η τροποποίηση του 5' άκρου γνωστή και ως κάλυψη (capping) πραγματοποιείται μετά την έναρξη της μεταγραφής και προηγείται οποιασδήποτε άλλης τροποποίησης. Συνίσταται στη δημιουργία μιας μεθυλιωμένης γουανίνης (G) στη θέση 7 που συνδέεται με 5'-5' τριφωσφορικό δεσμό με το επόμενο νουκλεοτίδιο, συνήθως μεθυλιωμένο.

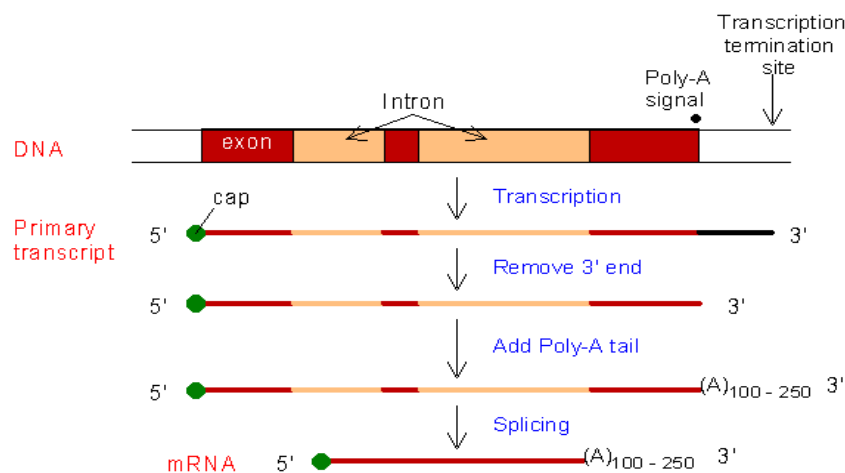
#### *β. Πολυαδενυλίωση (polyA)*

Τη σύνθεση των πρόδρομων mRNA ακολουθεί η αποκοπή στο 3' άκρο νουκλεοτιδικού τμήματος (~20 b) μετά την εξελικτικά συντηρημένη αλληλουχία AAUAAA. Όλα τα mRNA διαθέτουν την αλληλουχία AAUAAA αριστερά της θέσης προσθήκης poly A, όπου είναι και η θέση αναγνώρισης από ένα πρωτεϊνικό σύμπλοκο, γνωστό ως **ειδικός παράγοντας τομής και πολυαδενυλίωσης** (cleavage and polyadenylation specificity factor, CPSF). Μέσω του ενζύμου **πολυ-A πολυμεράση** (poly-A polymerase, PAP) επάγεται ο πολυμερισμός A, δηλ. η προσθήκη 250 αδενινών στο 3' άκρο. Πολυαδενυλίωση δεν παρατηρείται σε όλα τα mRNA (π.χ. mRNA ιστονών). Το polyA πιστεύεται ότι, αφενός αυξάνει τη σταθερότητα του mRNA αφετέρου παίζει σημαντικό ρόλο στην έναρξη της μετάφρασης.

#### *γ. Μάτισμα (RNA splicing)*

Ο ρόλος του ματίσματος είναι η αφαίρεση από τα πρόδρομα μετάγραφα μόρια όλων των μη κωδικοποιών αλληλουχιών (εσώνια), τα οποία μπορεί να αποτελούν και το 50-90% του αρχικού προϊόντος της μεταγραφής. Η απαίτηση για πιστότητα είναι προφανής, διότι λάθος σε μία βάση μπορεί να αλλάξει το πλαίσιο ανάγνωσης του mRNA με σοβαρότατες επιπτώσεις στην σύνθεση και λειτουργικότητα των πρωτεϊνών και του οργανισμού γενικότερα. Η πιστότητα αυτή εξασφαλίζεται με την αναγνώριση συγκεκριμένων αλληλουχιών στα σημεία εκτομής και σύνδεσης και οι οποίες αφορούν συναινετικές αλληλουχίες στα δύο άκρα των εσωνίων, αποτελούμενες από δύο νουκλεοτίδια: GU στο 5' άκρο (θέση δότης) και AG στο 3' άκρο (θέση λήπτης). Στην όλη διαδικασία συμμετέχουν μικρά **ριβονουκλεοπρωτεϊνικά σωματίδια** (small ribonucleoprotein particles, snRNPs). Είναι

προφανές ότι, όλες οι τροποποιήσεις που υφίσταται το πρόδρομο μόριο του mRNA γίνονται στον πυρήνα του κυττάρου. Μετά την ωρίμανσή του μεταφέρεται στο κυτταρόπλασμα για να μεταφραστεί.



**Εικόνα 4.** Η διαδικασία ωρίμανσης του πρόδρομου μορίου mRNA.

## Μετάφραση

Με τον όρο μετάφραση (translation) ή πρωτεϊνοσύνθεση αναφερόμαστε στο σύνολο μίας διαδικασίας, η οποία επιτρέπει τη μεταφορά και μετατροπή της γενετικής πληροφορίας, που περιέχεται στην νουκλεοτιδική αλληλουχία του DNA (και RNA), σε αλληλουχία αμινοξέων. Η διαδικασία σύνθεσης της πρωτεΐνης περιλαμβάνει τα στάδια της έναρξης, της επιμήκυνσης της αμινοξικής αλυσίδας και της λήξης. Ακολουθεί η απελευθέρωση της πρωτεΐνης από το μεταφραστικό μηχανισμό. Επιπλέον, η αναδίπλωση της νεοσυντιθέμενης αλυσίδας στο χώρο, η κατεύθυνση-αποστολή της πρωτεΐνης στο σωστό σημείο του κυττάρου και οι πιθανές μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, που μπορεί να υποστεί, αποτελούν αναγκαίο συμπλήρωμα στην ολοκληρωμένη μελέτη της πρωτεϊνοσύνθεσης.

Τα αμινοξέα από μόνα τους λόγω της χωροταξικής διαμόρφωσής τους δεν μπορούν να αλληλεπιδράσουν με το ριβόσωμα, ούτε να αναγνωρίσουν το mRNA. Αυτό το πρόβλημα λύνεται με την ύπαρξη μεσαζόντων, δηλ. ενδιάμεσων μορίων και συγκεκριμένα των **μεταφορικών RNA** (transfer-RNA, tRNA). Πρόκειται για ένα μικρό μόριο μήκους 73-95b και χαρακτηρίζεται από δύο βασικές ιδιότητες: α) φέρει ομοιοπολικά προσδεμένο ένα και μόνο αμινοξύ και β) περιέχει μία συγκεκριμένη αλληλουχία τριών νουκλεοτιδίων, το **αντικωδικό** (anticodon), η οποία είναι συμπληρωματική του **κωδικού** (codon) του mRNA, καθώς επίσης και τη **θέση πρόσδεσης για το αμινοξύ**, που αντιστοιχεί στο κωδικό βάσει του **γενετικού κώδικα**. Η σύνδεση του αμινοξέος στο tRNA πραγματοποιείται μέσω του

ενζύμου **αμινοάκυλο-tRNA συνθετάση** (aminoacyl-tRNA synthetase) και ο ομοιοπολικός δεσμός δημιουργείται μεταξύ της καρβοξυλικής ομάδας του αμινοξέως και της 2' ή 3' υδροξυλομάδας της τελευταίας νουκλεοτιδικής βάσης του tRNA, η οποία είναι πάντα αδενίνη. Κάθε tRNA έχει τη δυνατότητα μεταφοράς ενός αμινοξέως και χαρακτηρίζεται από ένα συγκεκριμένο αντικωδικό. Ο αντικωδικός καθορίζει την ταυτότητα του tRNA και όχι το αμινοξύ που μεταφέρει. Οι πρωτεΐνες των κυττάρων αποτελούνται από 20 διαφορετικά αμινοξέα και συνήθως υπάρχουν περισσότερα του ενός διαφορετικά tRNA για κάθε αμινοξύ, αλλά και για κάθε αμινοξύ υπάρχει μία τουλάχιστον αμινο-ακυλοtRNA συνθετάση. Ένα tRNA που φέρει συνδεδεμένο ένα αμινοξύ ονομάζεται **φορτισμένο**, ενώ τα tRNA που είναι ειδικά για το ίδιο αμινοξύ ονομάζονται **ισοαποδέκτες**.

Η μετατροπή της γενετικής πληροφορίας που περιέχεται στην νουκλεοτιδική αλληλουχία του DNA (και RNA), σε αλληλουχία αμινοξέων γίνεται βάσει του γενετικού κώδικα. Ως **γενετικός κώδικας** ορίζεται η αντιστοίχιση τριπλετών νουκλεοτιδικών βάσεων του mRNA με συγκεκριμένα αμινοξέα. Οι τριπλέτες αυτές των βάσεων (κωδικοί-codons) και η διαδοχή τους στο mRNA είναι συγγραμμική και συνεχής με την διαδοχή των αμινοξέων της πρωτεΐνης. Ένας κωδικός μπορεί να σχηματιστεί με συνδυασμό των τεσσάρων νουκλεοτιδικών βάσεων δηλ.  $4^3$  (64 διαφορετικοί κωδικοί). Με εξαίρεση δύο αμινοξέα (Met και Try) τα υπόλοιπα 18 κωδικοποιούνται από δύο μέχρι και έξι διαφορετικούς κωδικούς. Οι κωδικοί οι οποίοι καθορίζουν το ίδιο αμινοξύ ονομάζονται **συνώνυμοι** (synonymous). Από άποψη καθορισμού αμινοξέως το μεσαίο νουκλεοτίδιο των κωδικών είναι εξαιρετικά σημαντικό και η αντικατάστασή του με οποιαδήποτε άλλο νουκλεοτίδιο σε οποιονδήποτε κωδικό οδηγεί πάντα σε αμινοξική αλλαγή. Αντίθετα, το τρίτο νουκλεοτίδιο δεν έχει καθοριστικό ρόλο. Το φαινόμενο αυτό περιγράφηκε ως **εκφυλισμός της τρίτης βάσης** (third-base degeneracy) και είναι η κύρια αιτία εμφάνισης συνώνυμων κωδικών.

Η πρωτεϊνοσύνθεση πραγματοποιείται σε συμπλέγματα ριβοσωμικών RNA (rRNA) και πρωτεϊνών, τα **ριβοσώματα**, τα οποία περιέχουν ένα σημείο πρόσδεσης για το mRNA, θέσεις για την είσοδο και την τοποθέτηση στη σειρά των αμινοξέων έως ότου γίνει η σύνδεσή τους στην πολυπεπτιδική αλυσίδα, καθώς και τα απαραίτητα ένζυμα για τη δημιουργία των πεπτιδικών δεσμών. Πρόκειται για κυτταροπλασματικά σωματίδια που αποτελούνται από πρωτεΐνες και RNA (ριβονουκλεοπρωτεϊνικό συσσωμάτωμα) και συγκροτούνται από δύο υπομονάδες: τη μεγάλη (large subunit 60S) και τη μικρή (small subunit 40S) ριβοσωμική υπομονάδα. Κάθε υπομονάδα αποτελείται από αρκετές πρωτεΐνες (r-πρωτεΐνες), οι οποίες συνδέονται μεταξύ τους με ένα έως τρία διαφορετικά μόρια

ριβοσωμικού RNA και τα οποία κωδικοποιούνται από διαφορετικά γονίδια. Σε ένα λειτουργικό ριβόσωμα οι δύο υπομονάδες συνεργάζονται μεταξύ τους, αλλά η κάθε μία έχει ανεξάρτητο και ειδικό ρόλο στην μετάφραση του mRNA..

Η πρωτεϊνοσύνθεση περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

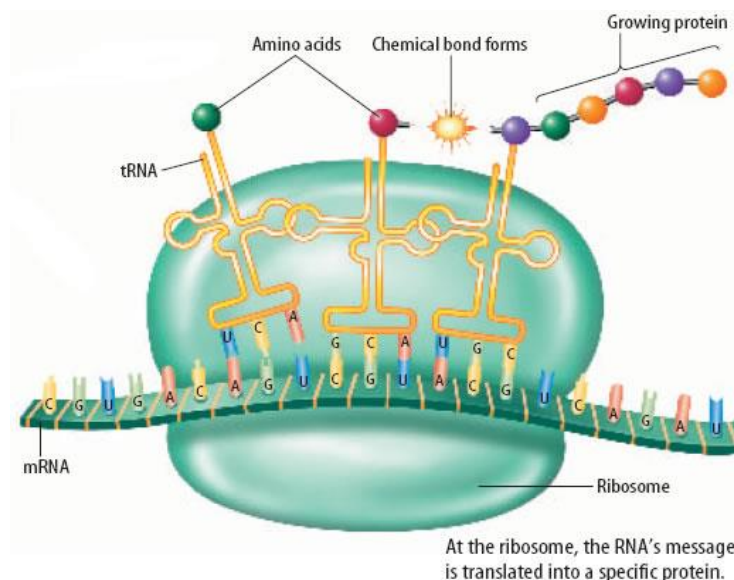
1. Το στάδιο της **έναρξης**, το οποίο αφορά την πρόσδεση του ριβοσώματος στο mRNA και το σχηματισμό ενός συμπλόκου έναρξης, που περιέχει και το πρώτο φορτισμένο tRNA.
2. Το στάδιο της **επιμήκυνσης**, το οποίο αφορά τις διαδικασίες από το σχηματισμό του πρώτου πεπτιδικού δεσμού μέχρι την προσθήκη του τελευταίου αμινοξέως.
3. Το στάδιο της **λήξης**, η οποία αφορά τους μηχανισμούς της ταυτόχρονης απελευθέρωσης της πολυπεπτιδικής αλυσίδας από το σύμπλοκο και της απελευθέρωσης του ριβοσώματος από το mRNA (εικόνα 5).

Στα ευκαρυωτικά κύτταρα, στο στάδιο της έναρξης της μετάφρασης η 40S ριβοσωμική υπομονάδα αναγνωρίζει και προσδένεται στο 5' άκρο του mRNA (θέση CAP) και στη συνέχεια μετακινείται προς την ειδική θέση έναρξης (η οποία περιλαμβάνει τον κωδικό έναρξης), όπου και ενώνεται με τη μεγάλη ριβοσωμική υπομονάδα. Ακολουθεί η πρόσδεση ειδικών πρωτεϊνών, απαραίτητες για την έναρξη, γνωστές ως **δεσμευτικές πρωτεΐνες** (cap binding proteins, CBP). Όσον αφορά την θέση έναρξης της μετάφρασης αυτή απέχει μερικές δεκάδες βάσεις από την θέση έναρξης και είναι μια αρκετά συντηρητική αλληλουχία (GCCRCCAUGG), που περιλαμβάνει τα τελευταία 6 νουκλεοτίδια της 5' μη μεταφραζόμενης περιοχής του mRNA, τον κωδικό έναρξης και ένα ακόμη νουκλεοτίδιο.

Στο στάδιο της επιμήκυνσης, αμέσως μόλις συγκροτηθεί το ακέραιο ριβόσωμα εμφανίζονται τα δύο ενεργά κέντρα του: το **τμήμα της μετάφρασης** (translational domain), το οποίο περιλαμβάνει όλα τα κέντρα που σχετίζονται με τη μετάφραση του mRNA και περιέχει θέσεις πρόσδεσης ειδικών παραγόντων, και το **τμήμα εξόδου** (exit domain), όπου περιλαμβάνει την περιοχή των βάσεων των δύο υπομονάδων και συνήθως βρίσκεται σε επαφή με την μεμβράνη του ενδοπλασματικού δικτύου (ΕΔ). Καθ' όλη τη διάρκεια της μετάφρασης το mRNA είναι προσδεμένο στη μικρή ριβοσωμική υπομονάδα και σε συγκεκριμένη χρονική στιγμή μόνο δύο tRNA μπορούν να αλληλοεπιδράσουν με αυτή. Οι θέσεις πρόσδεσης των δύο tRNA είναι συγκεκριμένες και ονομάζονται **θέση A** ή θέση εισόδου και **θέση P**. Η θέση A καταλαμβάνεται από το αμινοακετυλιωμένο tRNA, δηλαδή αυτό που μεταφέρει το n+1 αμινοξύ της πολυπεπτιδικής αλυσίδας, ενώ η θέση P καταλαμβάνεται από το πεπτιδυλο-tRNA. Την στιγμή κατά την οποία οι δύο θέσεις του ριβοσώματος είναι κατειλημμένες δημιουργείται ο πεπτιδικός δεσμός με την καταλυτική

δράση της **πεπτιδυλικής τρανσφεράσης** (peptidyl transferase), μιας συγκεκριμένης λειτουργίας της μεγάλης ριβοσωμικής υπομονάδας. Στη συνέχεια, το ριβόσωμα μετατοπίζεται κατά μία τριπλέτα του mRNA και με φορά 5'-3'. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα το πεπτιδυλο-tRNA να βρεθεί από τη θέση A στην θέση P, εκτοπίζοντας έτσι το **αποακετυλιωμένο tRNA** και απελευθερώνοντας έτσι τη θέση A, ώστε να δεχτεί το επόμενο αμινοακετυλιωμένο tRNA.

Στο στάδιο του τερματισμού της μετάφρασης συμβαίνουν τα εξής. Τρεις τριπλέτες του γενετικού κώδικα (UAA, UAG και UGA) δεν κωδικοποιούν αμινοξέα, αλλά τερματίζουν τη μετάφραση του mRNA (κωδικοί λήξης). Η ουσία του όρου κωδικός λήξης εντοπίζεται στο γεγονός ότι δεν υπάρχει κανένα tRNA, του οποίου ο αντικωδικός είναι αντίστροφα συμπληρωματικός με έναν από τους κωδικούς λήξης. Δηλαδή όταν ένας κωδικός λήξης προβάλλει στη θέση A του ριβοσώματος δεν είναι αναγνωρίσιμος από κανένα αμινοάκυλο-tRNA. Παράλληλα, η λήξη της μετάφρασης προϋποθέτει την παρουσία ειδικών πρωτεϊνικών παραγόντων, που είναι γνωστοί ως **παράγοντες απελευθέρωσης** (release factors, RF). Η πρόσδεση του RF στο ριβόσωμα, θεωρείται ότι σχετίζεται έμμεσα με τη θραύση του δεσμού, που συνδέει τη συντιθέμενη πολυπεπτιδική αλυσίδα με το tRNA της θέσης P και επίσης η πρόσδεσή του αλλάζει σε κάποιο βαθμό τη στεροδιάταξη του ριβοσώματος, με αποτέλεσμα την αποδέσμευσή του από το mRNA.



**Εικόνα 5.** Η διαδικασία της πρωτεϊνοσύνθεσης.

(Πηγή: <http://www.proteinsynthesis.org/second-step-protein-synthesis/>)



## ΣΤΟΧΕΥΣΗ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΚΑΙ ΜΕΤΑ-ΜΕΤΑΦΡΑΣΤΙΚΕΣ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΕΙΣ

Οι πρωτεΐνες που συντίθενται σε ένα ευκαρυωτικό κύτταρο έχουν διαφορετικούς προορισμούς. Μερικές παραμένουν υπό διαλυτή μορφή μέσα στο κύτταρο, άλλες εκκρίνονται και άλλες κατευθύνονται σε διαφορετικά κυτταρικά διαμερίσματα: κυτταροπλασματική μεμβράνη, λυσοσώματα, μιτοχόνδρια ή πυρήνα. Ο προορισμός ενός πρωτεϊνικού μορίου εξαρτάται από το εάν αυτό φέρει στην αλληλουχία των αμινοξέων του κάποιο σήμα διαλογής, το οποίο κατευθύνει την πρωτεΐνη στο οργανίδιο που πρέπει. Αυτές που δεν περιέχουν σήμα διαλογής παραμένουν στο κυτταροδιάλυμα, ενώ αυτές που πρόκειται να μετακινηθούν προς το ΕΔ και από εκεί να κατευθυνθούν προς τη συσκευή Golgi, τα λυσοσώματα, την κυτταροπλασματική, την πυρηνική μεμβράνη ή να εκκριθούν φέρουν στο αμινοτελικό τους άκρο ένα χαρακτηριστικό υδρόφοβο **πεπτίδιο οδηγό** (~15-30 αμινοξέα). Το πεπτίδιο οδηγός είναι διαφορετικό για κάθε προορισμό και συνήθως αποκόπτεται από την πρωτεΐνη μετά την εκπλήρωση του ρόλου του. Αναγνωρίζεται από ένα **σωμάτιο αναγνώρισης σήματος** (signal recognition particle, SRP), που βρίσκεται στο κυτταροδιάλυμα. Το SRP αλληλεπιδρά με τον υποδοχέα του πάνω στη μεμβράνη του ΕΔ, απελευθερώνεται, ενώ το σύμπλεγμα ριβόσωμα-νεοσυντιθέμενη πρωτεΐνη σύρεται από τις **ριβοφερίνες** και το μηχανισμό μετατόπισης διαμέσου της μεμβράνης του ΕΔ. Με την ολοκλήρωση της πρωτεϊνοσύνθεσης, το πεπτίδιο οδηγός αποκόπτεται με τη βοήθεια μιας μεμβρανικής πεπτιδάσης και το πολυπεπτίδιο απελευθερώνεται στον αυλό του ΕΔ.

Στα ευκαρυωτικά οι πρωτεΐνες που έχουν απελευθερωθεί στον αυλό του ΕΔ υφίστανται ορισμένες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις (αναδίπλωση, σύνδεση με άλλες πρωτεΐνες, σχηματισμός δισουλφυδικών δεσμών και γλυκοζυλίωση) και μεταφέρονται στη συσκευή Golgi, όπου ολοκληρώνεται η γλυκοζυλίωση. Τόσο αυτή η μετακίνηση, όσο και η περαιτέρω μεταφορά των πρωτεϊνών από τη συσκευή Golgi προς την κυτταρική μεμβράνη, τα λυσοσώματα και τα εκκριτικά κυστίδια πραγματοποιείται μέσω κυστιδίων μεταφοράς.

## ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΡΥΘΜΙΣΗΣ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ

Ο αριθμός των πρωτεϊνικών μορίων που παράγονται στη μονάδα του χρόνου από διαφορετικά γονίδια ενός κυττάρου διαφέρει. Αυτό συμβαίνει αφενός για να ικανοποιηθούν οι ανάγκες του κυττάρου και αφετέρου αποφεύγονται άσκοπες συνθέσεις. Η διαφορετική έκφραση οφείλεται, είτε στην διαφορετική αναγνώριση των προαγωγέων των γονιδίων από την RNA πολυμεράση, είτε σε διαφορές που σχετίζονται με την διαδικασία έναρξης της μετάφρασης. Υπάρχουν όμως και άλλοι μηχανισμοί που ρυθμίζουν

την έκφραση των γονιδίων ή ακόμη τη συγκέντρωση μίας πρωτεΐνης στο κύτταρο ανάλογα με τις ανάγκες που ορίζει το περιβάλλον. Όλοι αυτοί ονομάζονται **μηχανισμοί ρύθμισης έκφρασης των γονιδίων** και διαφέρουν σημαντικά μεταξύ προκαρυωτικών και ευκαρυωτικών κυττάρων. Η ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων στα ευκαρυωτικά δεν είναι απόλυτα γνωστή. Μπορούμε όμως να την διακρίνουμε σε δύο κατηγορίες: ρύθμιση μέσω εξωτερικών σημάτων όπως π.χ. μέσω ορμονών, και ρύθμιση σε συνάρτηση με το είδος του ιστού, αφού όλα τα γονίδια δεν εκφράζονται σε όλους του τύπους των ιστών. Στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης συμμετέχουν τόσο ειδικές αλληλουχίες του DNA (παράγοντες cis), όσο και πρωτεϊνικά μόρια που αλληλεπιδρούν με το DNA (παράγοντες trans).

### **ΠΡΟΚΛΗΣΗ ΒΛΑΒΩΝ ΚΑΙ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ ΣΤΟ DNA – ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΕΠΙΔΙΟΡΘΩΣΗΣ**

Το DNA του κυττάρου υφίσταται ένα σημαντικό αριθμό μεταλλάξεων, αποτέλεσμα λαθών κατά την αντιγραφή του ή αλλαγών στις βάσεις του εξαιτίας μικρών μεταβολών του pH ή της θερμοκρασίας (πίνακας 1). Οι περισσότερες από τις αλλαγές αυτές επιδιορθώνονται, είτε από τις DNA πολυμεράσες μέσω της 3'-5' δράσης εξωνουκλεάσης, είτε από τους διάφορους επιδιορθωτικούς μηχανισμούς του κυττάρου (post replicative repair), διατηρώντας έτσι την πιστότητα του DNA. Πολλές από τις μεταλλάξεις του DNA περνούν απαρατήρητες, όπως αυτές που εντοπίζονται σε αλληλουχίες εσωνίων, σε μη κωδικοποιούν γενετικό υλικό ή αυτές που αφορούν την 3<sup>η</sup> βάση του κωδικονίου, κατά τις οποίες το κωδικοποιούμενο αμινοξύ δεν αλλάζει. Μεταλλάξεις που μεταβάλλουν το αμινοξύ οδηγούν σε ελαττωματική πρωτεΐνη (π.χ πρόωρο κωδικό λήξης ή απαλοιφή κωδικού λήξης που οδηγεί σε πρωτεΐνη μικρότερου ή μεγαλύτερου μήκους αντιστοίχως) ή σε απώλεια της δραστικότητάς της (π.χ. μετάλλαξη σε αμινοξύ του ενεργού κέντρου ενός ενζύμου).

Οι κύριοι μεταλλαξογόνοι παράγοντες που προκαλούν αλλαγές στην νουκλεοτιδική αλληλουχία του DNA είναι οι **ακτινοβολίες** και οι **χημικές ουσίες**. Από τις χημικές ουσίες ισχυρή μεταλλαξογόνο δράση παρουσιάζουν οι **αζωτούχες ενώσεις**, οι **πολυκυκλικοί υδρογονάνθρακες** και οι **αρωματικές αμίνες**. Ο άνθρωπος είναι διαρκώς εκτεθειμένος σε πολλές χημικές ουσίες (κυρίως οξείδια του αζώτου), που βρίσκονται υπό μορφή ρύπων στο περιβάλλον. Χαρακτηριστικό αυτών των ουσιών είναι ότι η δράση τους είναι αθροιστική και έχουν έναν κοινό μηχανισμό δράσης. Δημιουργούν σύμπλοκα με το DNA, που αν δεν απομακρυνθούν από τους επιδιορθωτικούς μηχανισμούς του κυττάρου οδηγούν σε

μεταλλάξεις, πολλές από τις οποίες είναι καρκινογόνες.

Σημειακές μεταλλάξεις δημιουργούνται στο DNA και με άλλους μηχανισμούς, όπως μέσω **ταυτομερικής μετατροπής**, μέσω **αποπουρίνωσης** ή και **αποπυριμιδίνωσης**, καθώς και μέσω **απαμίνωσης**. Μεγαλύτερης έκτασης μεταλλάξεις δημιουργούνται στο DNA από γενετικούς ανασυνδυασμούς και ευνοούνται από την ύπαρξη ομόλογων περιοχών σε αυτό. Στις περιοχές αυτές παρατηρούνται χιάσματα και έλλειψη ή επέκταση γονιδίων, όπως π.χ. οι διπλασιασμοί στα γονίδια των αιμοσφαιρινών (γονίδια  $\alpha 1$  και  $\alpha 2$  και Gγ και Aγ).

## ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ

Η αποκρυπτογράφηση του ανθρωπίνου γονιδιώματος αποκάλυψε ότι, το μεγαλύτερο τμήμα του DNA (περίπου το 95%) δεν αποτελείται από κωδικοποιούσες περιοχές και ως εκ τούτου, με τα μέχρι τώρα δεδομένα, δεν υπόκειται σε ισχυρή επιλογή. Ο πιο σημαντικός λόγος που δεν μπορούμε να συσχετίσουμε το μέγεθος του ευκαρυωτικού γονιδιώματος με το ποσό της πληροφορίας που περιέχει είναι η ύπαρξη **επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών DNA**, το ποσό του οποίου και ο βαθμός επανάληψης διαφέρει από οργανισμό σε οργανισμό. Το γενετικό υλικό των ανθρώπων είναι παρόμοιο κατά 99,9% περίπου και διαφέρει μόνο κατά 0,1%. Η αποκάλυψη αυτή έδειξε ότι αυτή και μόνο η διαφορά είναι που μας καθιστά τον καθένα χωριστά μοναδικούς ως οντότητες. Αυτό το 0,1% καλύπτεται από τους λεγόμενους **πολυμορφισμούς**, οι οποίοι έχουν προκύψει μέσω του γενετικού ανασυνδυασμού (recombination) μεταξύ των ομόλογων χρωμοσωμάτων. Η μεγάλη ακρίβεια του ανασυνδυασμού διασφαλίζει ότι δεν προστίθεται, ούτε χάνεται κανένα ζεύγος βάσεων από τα ανασυνδυασμένα χρωμοσώματα. Οι διαδικασίες αυτές, οι οποίες βασίζονται στην ανταλλαγή γενετικού υλικού ανάμεσα σε δίκλινα μόρια DNA, είναι γνωστές ως **γενικός ή ομόλογος ανασυνδιασμός** (generalized ή homologous recombination) και ως **μετάθεση** (transposition).

Οι γνώσεις μας για την βιολογική σημασία των επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών DNA στο ευκαρυωτικό γονιδίωμα είναι περιορισμένες. Η απάντηση μπορεί να δοθεί από την μοριακή ανάλυση των γονιδιωμάτων. Ήδη από το 1990 έχει ξεκινήσει ένα φιλόδοξο παγκόσμιο πρόγραμμα γενετικής χαρτογράφησης και προσδιορισμού της πλήρους πρωτοδιάταξης του ανθρωπίνου γονιδιώματος (The Human Genome Project), ιδέα η οποία προτάθηκε για πρώτη φορά από τον Robert Sinsheimer το 1985 (Πανεπιστήμιο της California). Το εν'λόγω πρόγραμμα συνιστά την ανάγνωση του «γενετικού προσχεδίου» ή «βιβλίου της ζωής», που περιέχει όλη την απαιτούμενη πληροφορία για τη δημιουργία ενός

ανθρωπίνου όντος. Αυτό σημαίνει ότι έχουν ταυτοποιηθεί και τοποθετηθεί στη σωστή σειρά σχεδόν καθένα από τα 3 εκατομμύρια χημικά «γράμματα» (νουκλεοτιδικές βάσεις) κατά μήκος ενός δύο μέτρων μορίου DNA.

**Πίνακας 1.** Ταξινόμηση των μεταλλάξεων με βάση το φαινότυπο, τον τρόπο πρόκλησης, την φύση της αλλαγής και τις συνέπειες που προκαλεί η αλλαγή των βάσεων στην αμινοξική αλληλουχία της πρωτεΐνης.

Ταξινόμηση βλαβών	Χαρακτηριστικά
<b>Τοξικές Μεταλλαξογόνες</b>	Οδηγούν σε θάνατο το κύτταρο εμποδίζοντας την αντιγραφή του DNA Οδηγούν σε μεταβολή του γενετικού υλικού και συμβάλλουν στην ποικιλομορφία
<b>Ταξινόμηση μεταλλάξεων</b>	
<b>1. Με βάση το φαινότυπο</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Κυρίαρχες</li> <li>• Υποτελείς</li> <li>• Σιωπηλές</li> </ul>	Οδηγούν σε νέο γνώρισμα μεταβιβαζόμενο στην επόμενη γενιά Διαπίστωση στην επόμενη γενιά μόνο μετά το συνδυασμό δύο υποτελών μορφών (π.χ. φορείς μεσογειακής αναιμίας) Γίνονται αντιληπτές μόνο τυχαία. Δεν προσφέρουν πλεονέκτημα ή μειονέκτημα (π.χ. γεύση φαινυλθειουρίας)
<b>2. Με βάση τον τρόπο πρόκλησης Αυθόρμητες ή επαγόμενες</b>	Ανάλογα αν προκύπτουν αυθόρμητα ή με χρήση μεταλλαξογόνων παραγόντων
<b>3. Με βάση τη φύση της αλλαγής Σημειακές μεταλλάξεις</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Προσθήκη</li> <li>• Έλλειψη</li> <li>• Αντικατάσταση</li> </ul> <b>Μακρομεταλλάξεις (ατυπίες)</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Δομικές</li> <li>• Αριθμητικές</li> </ul>	Ένα ζεύγος βάσεων εμφανίζεται, απουσιάζει ή αντικαθίσταται από άλλο  Μετάπτωση: ζεύγος ρυ:ργ → ρυ:ργ* Μεταστροφή: ζεύγος ρυ:ργ → ργ:ρυ**  Αλλαγή δομής αλληλουχίας Αλλαγή αριθμού επανάληψης αλληλουχίας
<b>4. Με βάση τις συνέπειες που προκαλεί η αλλαγή των βάσεων στην αμινοξική αλληλουχία της πρωτεΐνης</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Παρερμηνεύσιμη (missense)</li> <li>• Μη νοηματική (nonsense)</li> <li>• Πλαισιοτροπική (frameshift)</li> </ul>	Αντικατάσταση αμινοξέος από άλλο στην πρωτεΐνη Εμφάνιση κωδικού λήξης Αλλαγή του πλαισίου ανάγνωσης των τριπλετών στο DNA λόγω προσθήκης ή απώλειας ενός νουκλεοτιδίου και λήψη πρωτεϊνών διαφορετικού μήκους
<b>5. Θερμοευαίσθητες</b>	Πρωτεΐνη δραστική στους 30° C και όχι στο 42° C

\*ρυ: πουρίνες, \*\*ργ: πυριμιδίνες

## ΕΝΔΕΙΚΤΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Lewin B. DNA is a double helix. In: Genes VIII, G.Carlson, ed. Pearson Education, Inc London 2004.
2. Lewin B. DNA replication is semiconservative. In: Genes VIII, G.Carlson, ed. Pearson Education Inc, London 2004.
3. Faustino NA, and Cooper TA. Pre-mRNA splicing and human disease. *Genes Dev* 2003;15:17:419-437.
4. Kim MY, Hur J, Jeong S. Emerging roles of RNA and RNA-binding protein network in cancer cells. *BMB Rep* 2009;42:125-130.
5. Pisarev AV, Unbehaun A, Hellen CU, Pestova TV. Assembly and analysis of eukaryotic translation initiation complexes. *Methods Enzymol* 2007;430:147-177.
6. Ramakrishnan V. Ribosome Structure and the Mechanism of Translation. *Cell* 2002;108:557-572.
7. Erlacher MD, Polacek N. Ribosomal catalysis: the evolution of mechanistic concepts for peptide bond formation and peptidyl-tRNA hydrolysis. *RNA Biol* 2008;5:5-12.
8. Goodman MF. Error-prone repair DNA polymerases in prokaryotes and eukaryotes. *Ann. Rev. Biochem* 2002;71:17-50.
9. Shcherbakova PV, Fijalkowska IJ. Translesion synthesis DNA polymerases and control of genome stability. *Front Biosci* 2006;11:2496-517.
10. Xuan Li, Wolf-Dietrich Heyer. Homologous recombination in DNA repair and DNA damage tolerance. *Cell Res* 2008;18:99-113.
11. International Human Genome Sequencing Consortium. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* 2004;431:931-945.

# ΑΝΑΛΥΣΗ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΩΝ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ ΤΟΥ DNA (DNA SEQUENCING)

**I. Κάκκας**

Διευθυντής ΕΣΥ, Τμήμα Ανοσολογίας-Ιστοσυμβατότητας, Γ.Ν.Α. «Ο ΕΥΑΓΓΕΛΙΣΜΟΣ»

*Στοιχεία επικοινωνίας:*

*Τηλ.: 213-2043172, 6937-106275*

*E-mail: ioankakkas@gmail.com*

Η ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας των γονιδίων αποσκοπώντας στην κατανόηση της δομής, της λειτουργίας και της έκφρασής τους, αποτελεί ένα απαραίτητο στάδιο για τη διεύρυνση των γνώσεών μας αναφορικά με τη γενετική βάση αρκετών νοσημάτων. Ειδικότερα, ο προσδιορισμός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας ενός γονιδίου (ολόκληρου ή τμήματός του) και η σύγκρισή της με την αλληλουχία αναφοράς οδηγούν στην ανίχνευση τυχόν αλλαγών (πολυμορφισμών ή μεταλλάξεων) της δομής του συγκεκριμένου γονιδίου με ποικίλη κλινική σημασία. Στη συνέχεια θα επιχειρηθεί να περιγραφεί συνοπτικά η αρχή της τεχνικής της ανάλυσης των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών, ενώ θα γίνει και μία σύντομη αναφορά στην εξέλιξή της. Τέλος, θα αναφερθούν επιγραμματικά οι κλινικές εφαρμογές της συγκεκριμένης τεχνικής.

Οι πρώτες προσπάθειες προσδιορισμού της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του DNA έγιναν στα τέλη της δεκαετίας του 1970 από τις ομάδες των Gilbert-Maxam και Sanger. Η μέθοδος κατά Sanger αποτελεί σήμερα την βάση των χρησιμοποιούμενων τεχνικών προσδιορισμού των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών. Η συγκεκριμένη μέθοδος αποκαλείται και dideoxy method διότι βασίζεται στη χρήση τριφωσφορικών διδεοξυριβονουκλεοτιδίων (dideoxyriboNucleoside TriPhosphate, ddNTP), τα οποία διαφέρουν από τις φυσιολογικές δομικές μονάδες του DNA (τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια, deoxyriboNucleoside TriPhosphate, dNTP) κατά το ότι στερούνται υδροξυλικής ομάδας στη θέση 3' της ριβόζης (Εικόνα 1). Δηλαδή χρησιμοποιούνται ddNTP's αδενίνης, θυμίνης, γουανίνης και κυτοσίνης (ddATP, ddTTP, ddGTP, ddCTP αντίστοιχα) καθώς και τα αντίστοιχα φυσιολογικά dNTP's αδενίνης, θυμίνης, γουανίνης και κυτοσίνης (dATP, dTTP, dGTP, dCTP αντίστοιχα). Δημιουργούνται τέσσερα διαφορετικά μείγματα, το καθένα από τα οποία έχει συγχρόνως χαμηλή συγκέντρωση ενός από τα ddNTP και υψηλή συγκέντρωση όλων των dNTP's (1:100). Η προς εξέταση αλληλουχία DNA προστίθεται σε καθένα από τα τέσσερα μείγματα και χρησιμεύει σαν εκμαγείο για τη σύνθεση συμπληρωματικών αλληλουχιών με τη δράση της DNA πολυμεράσης. Στα συγκεκριμένα μείγματα προστίθενται μικρές αλληλουχίες

ραδιοσημασμένων εκκινητών οι οποίες δεσμεύονται στο συμπληρωματικό τους 3' άκρο της αλληλουχίας η οποία πρόκειται να αναλυθεί και χρησιμεύουν για την εκκίνηση της σύνθεσης δίκλωνης αλυσίδας DNA με την προσθήκη των φυσιολογικών dNTP's (Εικόνα 2). Η σύνθεση της συμπληρωματικής αλυσίδας του DNA συνεχίζεται με τη προσθήκη των φυσιολογικών dNTP's που υπάρχουν στο μείγμα και τα οποία συνδέονται με την υδροξυλική ομάδα στη θέση 3' της ριβόζης. Επειδή όμως το κάθε μείγμα περιέχει και ddNTP's, συμβαίνει και αυτά να ενσωματώνονται σε τυχαίες θέσεις όπου κανονικά θα έπρεπε να τοποθετηθούν dNTP's. Όταν όμως σε μία θέση ενσωματωθεί ένα ddNTP αντί του αντίστοιχου dNTP, διακόπτεται η σύνθεση της συμπληρωματικής DNA αλληλουχίας διότι η έλλειψη υδροξυλικής ομάδας στη θέση 3' της ριβόζης του ενσωματωθέντος ddNTP εμποδίζει την συνέχεια της σύνθεσης με την προσθήκη ενός νέου νουκλεοτιδίου. Κατόπιν τούτου, δεν ολοκληρώνεται η σύνθεση δίκλωνων τμημάτων DNA και έτσι σε καθένα από τα τέσσερα μείγματα δημιουργούνται ραδιοσημασμένες λόγω του εκκινητή ασυμπλήρωτες αλληλουχίες οι οποίες έχουν σταματήσει όλες στα σημεία όπου έχουν ενσωματωθεί τα ddNTP's. Έτσι λοιπόν, οι ημιτελείς αυτές αλληλουχίες έχουν όλες ένα κοινό ραδιοσημασμένο 5' άκρο αποτελούμενο από το δίκλωνο τμήμα του εκκινητή και της συμπληρωματικής αλληλουχίας του προς εξέταση τμήματος του DNA και ένα 3' άκρο το οποίο σταματά στη βάση του ddNTP του κάθε μείγματος. Δηλαδή, το μείγμα που περιέχει ddATP's θα περιέχει ημιτελείς αλληλουχίες που όλες θα έχουν σταματήσει σε μία αδερίνη, αντίστοιχα το μείγμα που περιέχει ddGTP's θα περιέχει ημιτελείς αλληλουχίες που όλες θα έχουν σταματήσει σε μία γουανίνη και ούτω καθεξής. Στη συνέχεια, οι ημιτελείς αλληλουχίες και των τεσσάρων μειγμάτων υποβάλλονται σε παράλληλη ηλεκτροφόρηση (σε τέσσερις στήλες) σε gel ακρυλαμίδης προκειμένου να διαχωριστούν ανάλογα με το μήκος τους (Εικόνα 2). Έτσι, η μικρότερη αλληλουχία η οποία αποτελείται πέραν του υπό μελέτη μονόκλωνου DNA, από τον εκκινητή και ένα νουκλεοτίδιο στο οποίο σταμάτησε η σύνθεσή της λόγω προσθήκης του αντίστοιχου ddNTP καταλαμβάνει την τελευταία θέση στη βάση του gel. Η αμέσως μεγαλύτερη σε μέγεθος αλληλουχία διαφέρει από την προηγούμενη μόνο κατά ένα νουκλεοτίδιο (το δεύτερο μετά τον εκκινητή), και καταλαμβάνει μία θέση παραπάνω από την προηγούμενη στο gel και ούτω καθεξής. Η αυτοραδιογραφία του gel αποκαλύπτει τις ζώνες που αντιστοιχούν στις ραδιοσημασμένες ημιτελείς αλληλουχίες και η απόσταση μεταξύ τους είναι ανάλογη της θέσης που έχουν οι αντίστοιχες βάσεις στο υπό μελέτη τμήμα του DNA. Ολόκληρη η αλληλουχία μπορεί να «διαβαστεί» μέσω της σύγχρονης διαδοχικής καταγραφής των προαναφερθεισών ζωνών

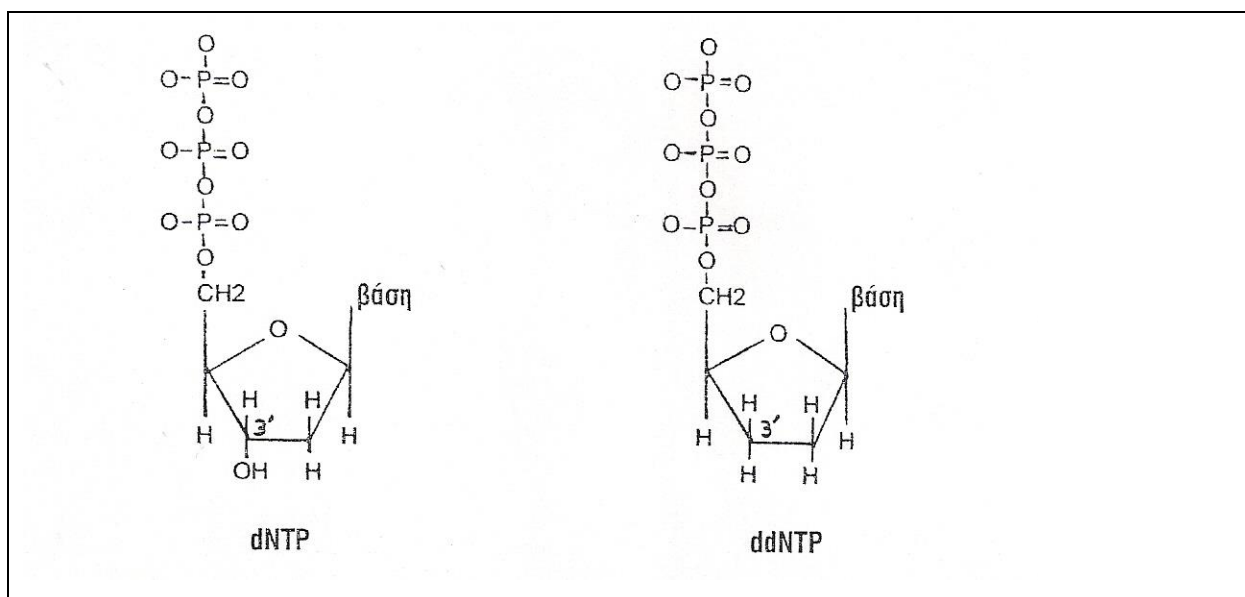
και από τις τέσσερις στήλες του αυτοραδιογραφήματος, από τις οποίες η κάθε μία αντιστοιχεί σε μία από τις γνωστές βάσεις (αδενίνη, θυμίνη, γουανίνη και κυτοσίνη). Το μήκος των αλληλουχιών οι οποίες είναι δυνατόν να «διαβαστούν» από ένα αυτοραδιογράφημα προσεγγίζει τις 300 βάσεις.

Η τεχνική αυτή έχει πλέον τροποποιηθεί, επιταχυνθεί και αυτοματοποιηθεί σε σημαντικό βαθμό. Πλέον δεν χρησιμοποιούνται ραδιοσημασμένοι εκκινητές, αντίθετα τα ddNTP's αδενίνης, θυμίνης, γουανίνης και κυτοσίνης (ddATP, ddTTP, ddGTP, ddCTP αντίστοιχα) σημαίνονται με ένα διαφορετικό φθοριόχρωμα το καθένα. Με αυτόν τον τρόπο πραγματοποιείται μόνο μία αντίδραση με την παρουσία της DNA πολυμεράσης, αντί των τεσσάρων με την κλασσική μέθοδο. Ακολουθεί ηλεκτροφόρηση σε gel ακρυλαμίδης και ένας ανιχνευτής laser «διαβάζει» μία προς μία τις βάσεις, καθώς οι ημιτελείς αλληλουχίες κινούνται με ταχύτητα ανάλογη του μεγέθους τους στο gel της ακρυλαμίδης (Εικόνα 3). Το αποτέλεσμα καταγράφεται σε συνάρτηση με τον χρόνο σαν μία σειρά σημάτων φθορισμού με τη μορφή κορυφών διαφόρων χρωμάτων, οι οποίες μεταφράζονται αυτόματα σε αλληλουχία βάσεων. Η πρόοδος προς την κατεύθυνση της βελτίωσης της τεχνικής συνεχίστηκε με την κατασκευή πλήρως αυτοματοποιημένων συσκευών, οι οποίες βασίζονται στη χρήση τριχοειδών για την ηλεκτροφόρηση αντί του gel της ακρυλαμίδης.

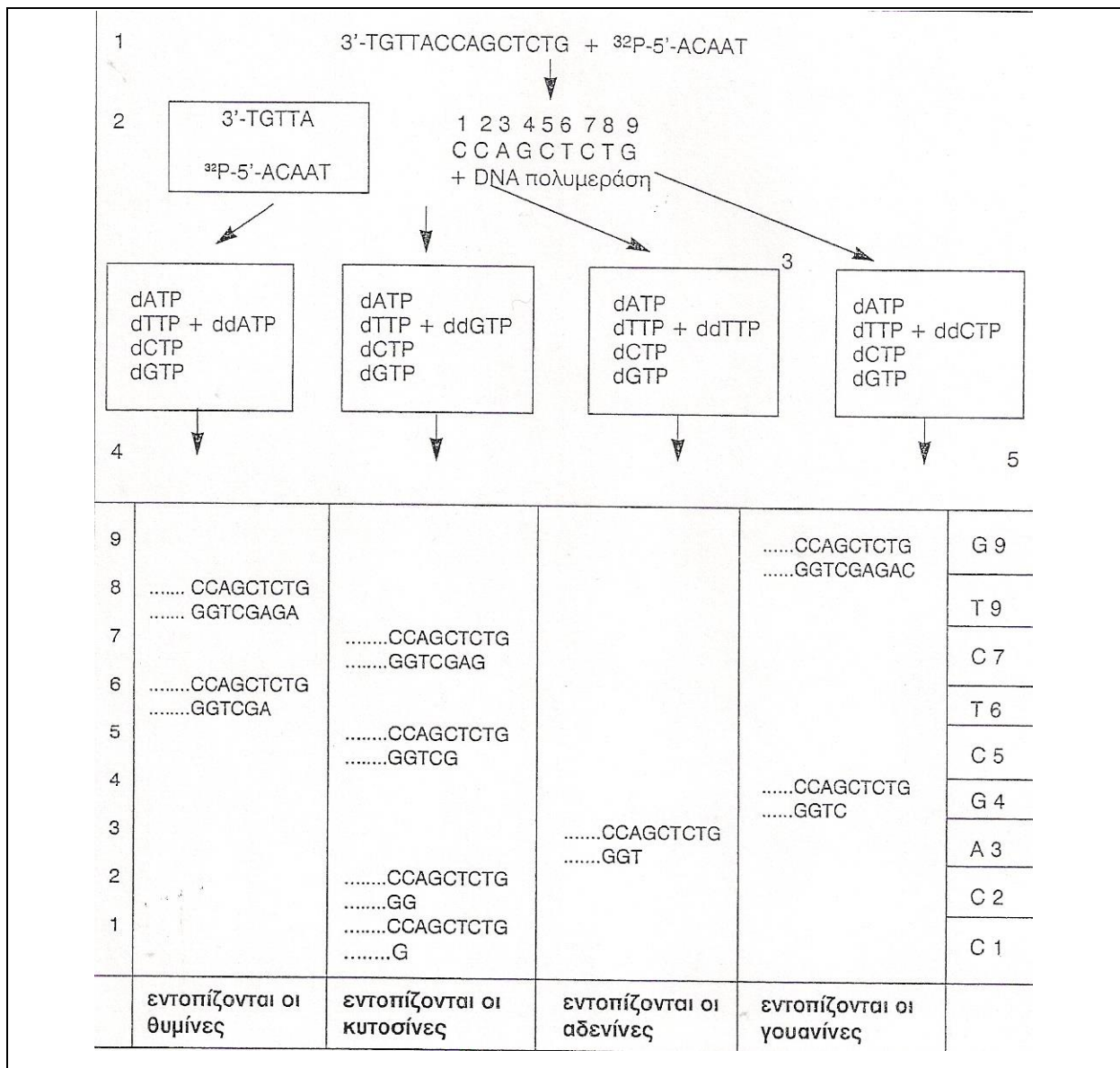
Το εύρος των εφαρμογών του προσδιορισμού των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών είναι σημαντικό. Πέραν του προφανούς, δηλαδή του προσδιορισμού της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας διαφόρων γονιδίων στα πλαίσια της χαρτογράφησης του γονιδιώματος του ανθρώπου και άλλων οργανισμών, η σύγκριση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας ενός γονιδίου (ολόκληρου ή τμήματός του) με την αλληλουχία αναφοράς οδηγούν στην ανίχνευση τυχόν αλλαγών (πολυμορφισμών ή μεταλλάξεων) της δομής του συγκεκριμένου γονιδίου με ποικίλη κλινική σημασία. Μεταλλάξεις και πολυμορφισμοί συγκεκριμένων γονιδίων έχουν συσχετισθεί αιτιοπαθογενετικά με αιματολογικές κακοήθειες, ενώ την τελευταία δεκαετία το ενδιαφέρον έχει μεταφερθεί στην προγνωστική τους αξία. Ιδιαίτερα σημειώνονται: α) Η προγνωστική αξία σημειακών μεταλλάξεων συγκεκριμένων γονιδίων όπως του CEBPA στην επιβίωση ασθενών με Οξεία Μυελογενή Λευχαιμία με φυσιολογικό καρυότυπο, β) Η προγνωστική αξία των μεταλλάξεων της μεταβλητής περιοχής του γονιδίου της βαριάς αλυσίδας του μορίου της ανοσοσφαιρίνης για την επιβίωση ασθενών πασχόντων από Χρόνια Λεμφογενή Λευχαιμία και γ) Η τυχόν προγνωστική αξία των πολυμορφισμών των γονιδίων προφλεγμονωδών κυτταροκινών όπως του TNF, στην εμφάνιση της οξείας Νόσου του Μοσχεύματος κατά του Ξενιστή σε αιματολογικούς



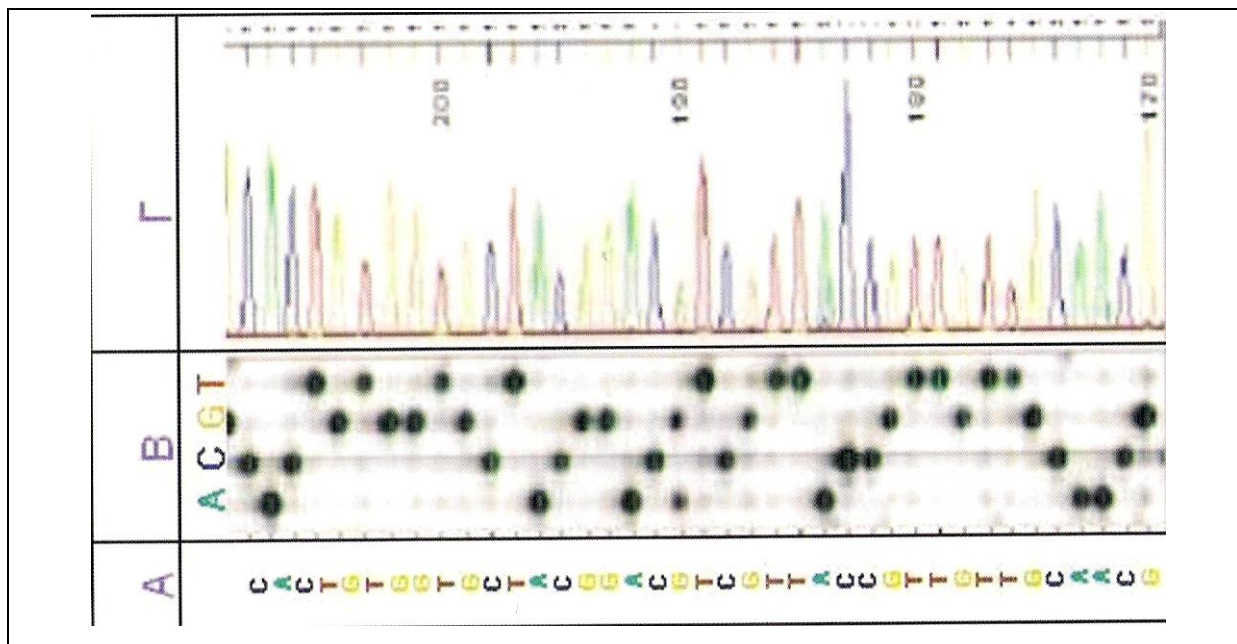
ασθενείς οι οποίοι υποβάλλονται σε Αλλογενή Μεταμόσχευση Αιμοποιητικών Κυττάρων. Αξιοσημείωτη επίσης είναι η βοήθεια που προσφέρει η ανάλυση των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών στη μοριακή τυποποίηση του Μείζονος Συστήματος Ιστοσυμβατότητας και στην ταυτοποίηση σπανίων στελεχών μικροβίων. Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι τα σύγχρονα αυτοματοποιημένα συστήματα ανάλυσης νουκλεοτιδικών αλληλουχιών τα οποία βασίζονται στη χρήση τριχοειδών μπορούν να χρησιμοποιηθούν για έλεγχο χιμαιρισμού σε ασθενείς οι οποίοι υποβάλλονται σε Αλλογενή Μεταμόσχευση Αιμοποιητικών Κυττάρων, για έλεγχο αμφισβητούμενης πατρότητας καθώς και για τον έλεγχο μη σημειακών μεταλλάξεων σε αιματολογικές κακοήθειες.



**Εικόνα 1.** Δομή dNTP και ddNTP.



**Εικόνα 2.** Δημιουργία ημιτελών αλληλουχιών, οι οποίες έχουν όλες ένα κοινό ραδιοσημασμένο 5' άκρο αποτελούμενο από το δίκλωνο τμήμα του εκκινητή και της συμπληρωματικής αλληλουχίας του προς εξέταση τμήματος του DNA και ένα 3' άκρο το οποίο σταματά στη βάση του ddNTP του κάθε μείγματος.



**Εικόνα 3.** Ηλεκτροφόρηση σε gel ακρυλαμίδης και «ανάγνωση» των βάσεων από έναν ανιχνευτή laser, καθώς οι ημιτελείς αλληλουχίες κινούνται με ταχύτητα ανάλογη του μεγέθους τους στο gel της ακρυλαμίδης.

#### ΕΝΔΕΙΚΤΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Watson J et al. Recombinant DNA. Scientific American Books, WH Freeman and Company, New York, 1992.
2. Craig VJ et al. The Sequence of the Human Genome, Science 2001;291:1304-1351.
3. Döhner K, Döhner H. Molecular characterization of acute myeloid leukaemia, Haematologica 2008;93:976-982.
4. T. Hamblin, Z. Davis, A. Gardiner et al: Unmutated IgVH genes are associated with a more aggressive form of CLL, Blood 1999;94:1848-1854.
5. Ishikawa Y et al. Polymorphisms in TNFA and TNFR2 affect outcome of unrelated bone marrow transplantation, Bone Marrow Transplantation 2002;29:569-575.

## ΑΝΟΣΟΑΠΟΤΥΠΩΣΗ ΣΤΗΝ ΑΥΤΟΑΝΟΣΙΑ

**Αλεξάνδρα Τσιρογιάννη**

Βιοπαθολόγος, Διευθύντρια ΕΣΥ, Επιστημονικά και Διοικητικά Υπεύθυνη  
του Τμήματος Ανοσολογίας-Ιστοσυμβατότητας, Γ.Ν.Α. «Ο ΕΥΑΓΓΕΛΙΣΜΟΣ»

*Στοιχεία επικοινωνίας:*

*Τηλ.: 213-2043175*

*E-mail: alextsir@gmail.com*

### ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η μέθοδος της αποτύπωσης αναπτύχθηκε αρχικά από τον Edwin Southern το 1975 και χρησιμοποιείται μέχρι σήμερα στη μοριακή βιολογία για την ανίχνευση μια συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA. Αναλυτικά η Southern blotting τεχνική συνδυάζει τη μεταφορά των διαχωρισμένων, μετά από ηλεκτροφόρηση, τμημάτων DNA σε μια διηθητική μεμβράνη και την ανίχνευση συγκεκριμένων αλληλουχιών μετά από υβριδισμό. Δύο χρόνια αργότερα, το 1977 ο James Alwine, χρησιμοποιεί μια τεχνική ανάλογη της Southern blotting, για την ανίχνευση RNA την οποία και ονομάζει northern blot. Τέλος, στις αρχές της δεκαετίας του '80 παρουσιάζεται η τεχνική Western blot (το όνομα δόθηκε από τον ερευνητή Neal Burnette - λογοπαίγνιο με το Southern) που χρησιμοποιείται για τον ποιοτικό προσδιορισμό και τον χαρακτηρισμό ειδικών πρωτεϊνών εκχυλίσματος καλλιεργούμενων κυττάρων ή ιστών.

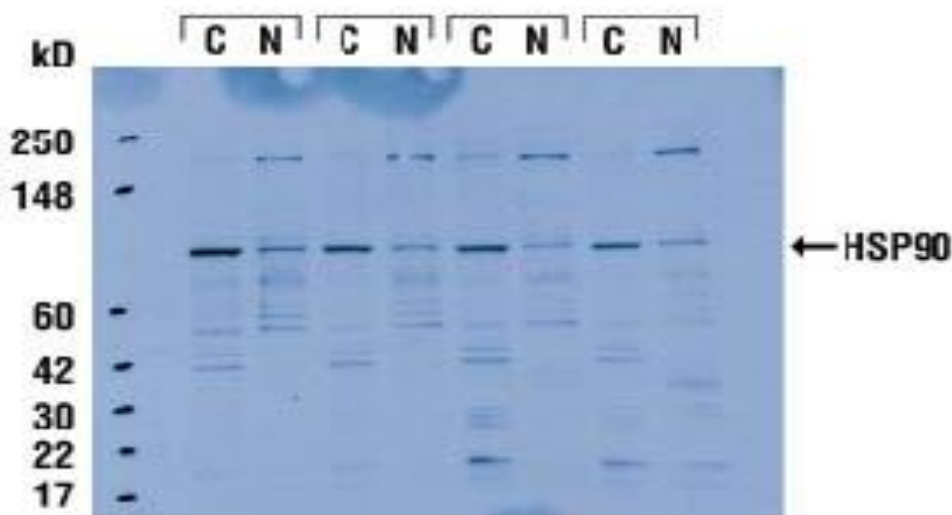
### ΑΝΟΣΟΑΠΟΤΥΠΩΣΗ (WESTERN BLOTTING)

Η μέθοδος βασίζεται στην ανίχνευση αντιγόνων/πρωτεϊνών, μετά από ακινητοποίησή τους σε κατάλληλες μεμβράνες, με τη βοήθεια σημασμένων αντισωμάτων (η σήμανση μπορεί να γίνει με ένζυμα, φθορίζουσα χρωστική, ραδιοϊσότοπο κ.α.). Για την ακινητοποίηση των πρωτεϊνών χρησιμοποιούνται ευρέως μεμβράνες νιτροκυτταρίνης (NK) που επιτρέπουν στα μόρια να διατηρούν ανέπαφες τις ιδιότητές τους.

Η ακινητοποίηση των αντιγόνων στις μεμβράνες μπορεί να γίνει είτε έμμεσα, με ηλεκτροφορητική μεταφορά τους στη μεμβράνη από το πήκτωμα όπου έχουν διαχωριστεί με ηλεκτροφόρηση (Western blotting), είτε άμεσα, με απλή εναπόθεση των αντιγόνων στις μεμβράνες (line/dot blotting). Μετά την ακινητοποίηση των αντιγόνων, ακολουθεί ανοσολογική αντίδραση (σύζευξη αντιγόνου -αντισώματος) άμεσα, με τη χρήση σημασμένων αντισωμάτων όταν πρόκειται για ανίχνευση αντιγόνου ή έμμεσα, πρώτα με τη

χρήση μη σημασμένου αντισώματος και στη συνέχεια σημασμένου αντι-αντισώματος (αντι-ανοσοσφαιρίνη) για την ανίχνευση αντισώματος.

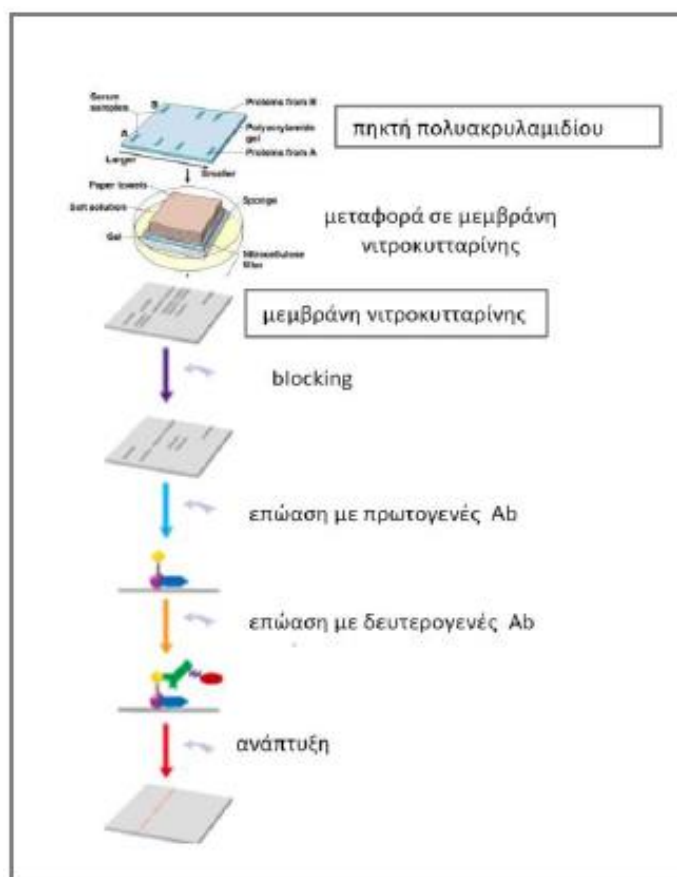
Η μετάφραση της ανοσολογικής αντίδρασης (ανάλογη της σήμανσης που έχει χρησιμοποιηθεί, έγχρωμη ζώνη, φθορισμός, αυτοραδιογραφία, χημειοφωταύγεια) αποτελεί και την τελική ανάλυση και αξιολόγηση του αποτελέσματος συγκρινόμενη πάντα με αυτή ενός πρότυπου υλικού αναφοράς που εξετάζεται ταυτόχρονα (Σχήμα 1).



Σχήμα 1. Παράδειγμα αποτελεσμάτων με ανοσοαποτύπωση.

#### Αναλυτικότερα η μέθοδος ολοκληρώνεται σε τρία στάδια:

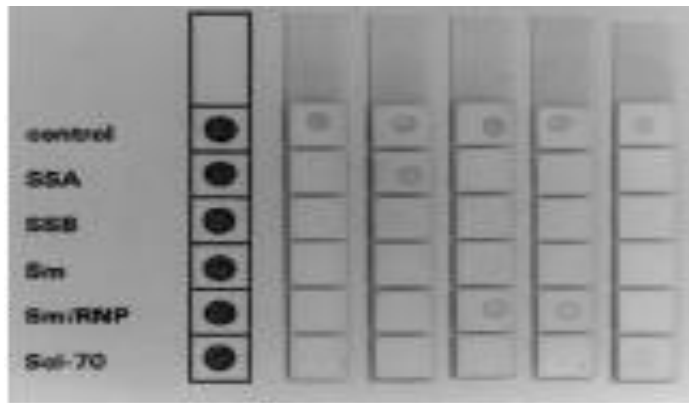
1. Διαχωρισμός των πρωτεϊνών ενός εκχυλίσματος με ηλεκτροφόρηση, σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης παρουσία SDS (SDS-PAGE). Το SDS είναι ένας αποδιατακτικός παράγοντας που καθιστά το φορτίο των πρωτεϊνών αρνητικό και έτσι το πρωτεϊνικό παρασκεύασμα διαχωρίζεται με βάση το μοριακό βάρος (η ταχύτητα μετακίνησής τους είναι αντιστρόφως ανάλογη του βάρους τους).
2. Ηλεκτροφορητική μεταφορά των πρωτεϊνών σε ταινίες νιτροκυτταρίνης. Μετά τον τέλος της ηλεκτροφόρησης το πήκτωμα τοποθετείται πάνω σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης όπου γίνεται η μεταφορά των πρωτεϊνών με την εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου.
3. Ανοσολογική αντίδραση- ταυτοποίηση αντιγόνου/αντισώματος. Οι ταινίες NK επωάζονται με τα υπό εξέταση δείγματα και στη συνέχεια με τη χρήση κυρίως σημασμένου με ένζυμο αντισώματος επιτυγχάνεται η ανάπτυξη έγχρωμου προϊόντος (ζώνη) εκεί όπου αναπτύσσεται αντίδραση (Σχήμα 2).



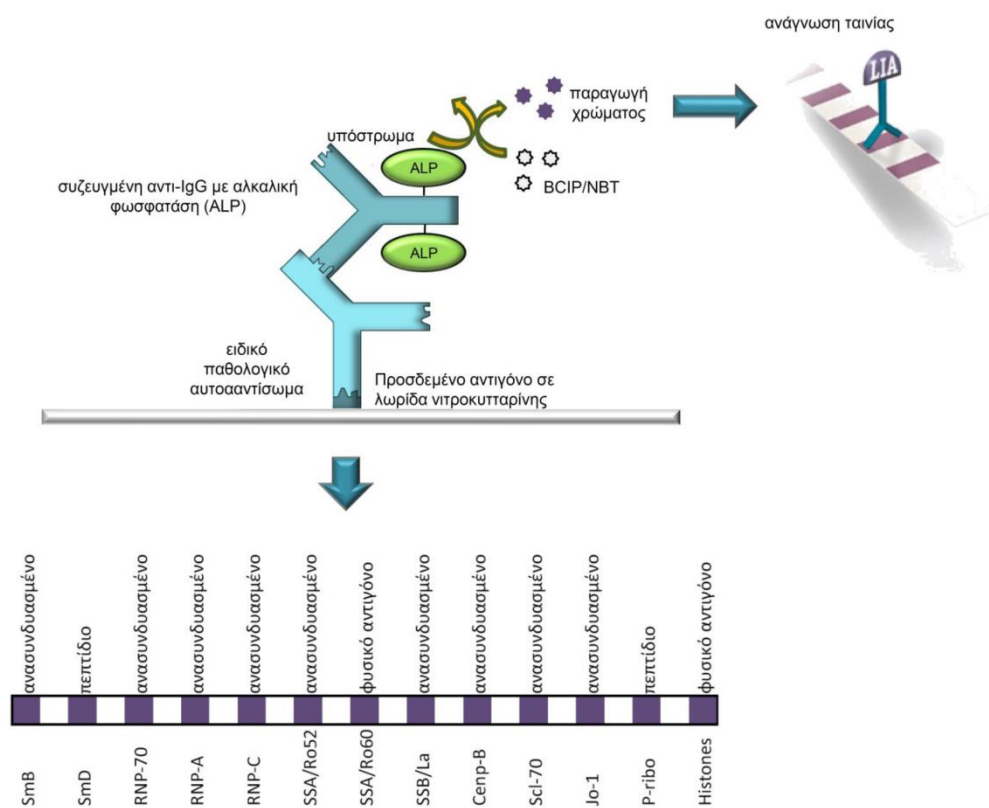
**Σχήμα 2.** Αρχή μεθόδου Western blotting.

Τα πλεονεκτήματα των τεχνικών ανοσοαποτύπωσης είναι ότι προσφέρουν την δυνατότητα ταυτόχρονης ανίχνευσης πολλών διαφορετικών πεπτιδίων/αντισωμάτων, ανάλυσης διαλυτών και αδιάλυτων αντιγόνων και δεν απαιτείται καθαρισμός του αντιγόνου καθώς τα εκχυλίσματα διαχωρίζονται ηλεκτροφορητικά. Από τα μειονεκτήματα της μεθόδου αξίζει να σημειωθεί η πολυπλοκότητα και η μη δυνατότητα ανίχνευσης διαμορφωτικών επιτόπων παρά μόνο γραμμικών.

Σχετικά πρόσφατα στην κλινική πρακτική έχουν εισαχθεί νέες εμπορικά διαθέσιμες μέθοδοι ανοσοαποτύπωσης όπως η line-blot και η dot-blot. Πρόκειται για μεθόδους ποιοτικού και ημιποσοτικού προσδιορισμού όπου κεκαθαμένο φυσικό ή ανασυνδυασμένο αντιγόνο ή συνθετικό πεπτίδιο τοποθετείται υπό μορφή κηλίδας (dot) ή γραμμής (line) σε λωρίδες νιτροκυτταρίνης. Εφαρμόζονται στην ανίχνευση πρωτεϊνών/πυρηνικών οξέων και γενικά συστατικών που βρίσκονται σε μικρές συγκεντρώσεις στο εξεταζόμενο δείγμα, είναι ταχείες και απλές στην εκτέλεσή τους, τα δε στάδια ολοκλήρωσής τους ακολουθούν αυτά της κλασικής ανοσοαποτύπωσης (Σχήμα 3, 4).



**Σχήμα 3.** Εφαρμογή της Dot blotting μεθόδου.



**Σχήμα 4.** Αρχή μεθόδου-εφαρμογή της Line blotting μεθόδου.

Η μέθοδος της ανοσοαποτύπωσης έχει ευρύτατο φάσμα εφαρμογών τόσο σε ερευνητικό επίπεδο όσο και στην καθημέρα κλινική πρακτική κυρίως στην Ιολογία (HIV, HCV, HBV) και στην Αυτοανοσία στα πλαίσια μελέτης των αυτοαντισωμάτων. Τα αυτοάνοσα νοσήματα χαρακτηρίζονται από την παρουσία ποικίλων αυτοαντισωμάτων, πολλά από τα οποία έχουν ιδιαίτερη διαγνωστική και προγνωστική αξία. Έτσι σήμερα έχουμε τη δυνατότητα στο Ανοσολογικό εργαστήριο να αναζητήσουμε αυτοαντισώματα καθώς και να προσδιορίσουμε το αντιγονικό πεπτίδιο-στόχο αυτών. Συγκεκριμένα με τη

μέθοδο αυτή ανιχνεύονται αντισώματα έναντι κυτταροπλασματικών και πυρηνικών αντιγόνων (dsDNA, RNPs, Sm, Ro, La, Jo1, P-ribo, scl-70, MPO, PR3, κ.α.) στα πλαίσια προσέγγισης τόσο συστηματικών όσο και οργανοειδικών αυτοανώσεων νοσημάτων (TPO, AGA, tTG, AMA,SLA,Υο, Ri, κ.α ).

Έτσι η ανίχνευση συγκεκριμένων πεπτιδίων-στόχων αυτών των αντισωμάτων αποτελεί χρήσιμο εργαλείο στα χέρια του θεράποντα ιατρού για τη διαγνωστική προσέγγιση, την παρακολούθηση και τη θεραπευτική παρέμβαση σε ποικίλα αυτοάνοσα νοσήματα.

#### **ΕΝΔΕΙΚΤΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

1. Elkon KB, Jankowski PW. Fine specificities of autoantibodies directed against the Ro, La, Sm, RNP, and Jo-1 proteins defined by two-dimensional gel electrophoresis and immunoblotting. *J Immunol* 1985;134:3819-3824.
2. Habets WJ, de Rooij DJ, Hoet MH, van de Putte LB, van Venrooij WJ. Quantitation of anti-RNP and anti-Sm antibodies in MCTD and SLE patients by immunoblotting. *Clin Exp Immunol* 1985;59:457-466.
3. Merryman P, Louie P. Comparison of assay systems for detecting antibodies to nuclear ribonucleoproteins. *J Clin Pathol* 1991;44:685-689.
4. Ermens AA, Bayens AJ, van Gemert AC, van Duijnhoven JL. Simple dot-blot method evaluated for detection of antibodies against extractable nuclear antigens. *Clin Chem* 1997;43:2420-22.
5. Π. Λυμπέρη. Ανοσοαποτύπωση. Πρωτεΐνες βιολογικών υλικών. Σεμινάριο Ανοσολογίας Αθήνα 2000;95-98.
6. Lock RJ, Unsworth DJ. Antibodies to extractable nuclear antigens. Has technological drift affected clinical interpretation? *J Clin Pathol* 2001;54:187-190.
7. Damoiseaux J, Boesten K, Giesen J, Austen J, Tervaert JW. Evaluation of a novel line-blot immunoassay for the detection of antibodies to extractable nuclear antigens. *Ann N Y Acad Sci* 2005;1050:340-347.



# PCR-SSP (POLYMERASE-CHAIN REACTION SPECIFIC- SEQUENCE PRIMERS)

Αικατερίνη Ταράση

Διευθύντρια ΕΣΥ, Τμήμα Ανοσολογίας-Ιστοσυμβατότητας, Γ. Ν. Α. «Ο ΕΥΑΓΓΕΛΙΣΜΟΣ»

Στοιχεία επικοινωνίας:

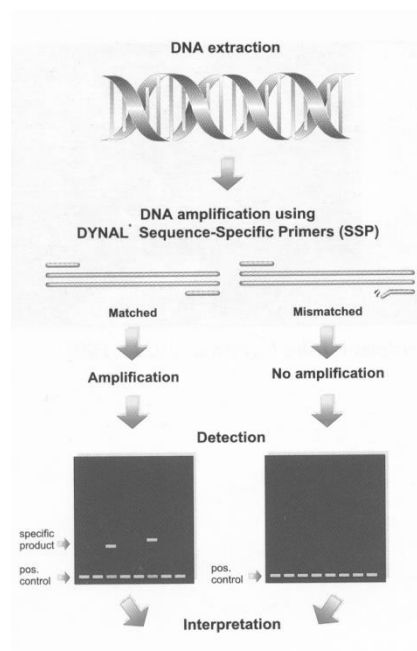
Τηλ.: 2132043175

E-mail: katerinatarassi@gmail.com

## ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η τεχνική αυτή βασίζεται στην αρχή σύμφωνα με την οποία, ένας εκκινητής με πλήρως συμπληρωματική αλληλουχία με το ένα από τα δύο τα άκρα της ειδικής περιοχής που θέλουμε να πολλαπλασιάσουμε χρησιμοποιείται πιο αποτελεσματικά σε μια PCR αντίδραση από άλλους εκκινητές που έχουν μία ή περισσότερες διαφορές (mismatches) στο 3' άκρο τους.

Έτσι και οι δύο εκκινητές που χρησιμοποιούνται σε κάθε PCR αντίδραση έχουν σχεδιασθεί με τέτοιο τρόπο ώστε να «ταιριάζουν» απόλυτα με τα 3' άκρα ενός μόνο αλληλίου ή ομάδας αλληλίων που θέλουμε να προσδιορίσουμε (Σχήμα 1).



Σχήμα 1. PCR-SSP (Αρχή της μεθόδου).

## ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η μέθοδος περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

### α) Πολλαπλασιασμός (amplification) του DNA

Επιτυγχάνεται με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR), χρησιμοποιώντας

πολλά ζεύγη εκκινητών, τα οποία είναι ειδικά για τον HLA γενετικό τόπο (π.χ. HLA-B) ή το αλληλίο (π.χ. HLA-B27), που θέλουμε να προσδιορίσουμε.

Συνήθως, ο ένας εκκινητής από κάθε ζεύγος είναι κοινός για πολλά αλληλία, ενώ ο δεύτερος εκκινητής εμφανίζει διαφορά 1 bp στο 3' άκρο του, το οποίο θα πρέπει να ταιριάζει απόλυτα με το 5' άκρο του στόχου, προκειμένου να επιτευχθεί πολλαπλασιασμός και επομένως να υπάρξει προϊόν με την PCR. Τα ζεύγη των εκκινητών επιλέγονται συνήθως κατά τέτοιο τρόπο, ώστε να πολλαπλασιάζονται υπό τις ίδιες συνθήκες PCR. Εάν αυτό δεν είναι απόλυτα εφικτό, χρησιμοποιούνται δύο σειρές κύκλων, με διαφορετικές συνθήκες η κάθε μια, στην PCR.

### **β) Ανίχνευση των προϊόντων με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης**

Τα πολλαπλασιασμένα τμήματα του DNA, που προκύπτουν μετά την PCR αντίδραση, διαχωρίζονται με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 2%, γίνονται ορατά ύστερα από έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία με την προσθήκη χρωστικής *Ethidium Bromide* και αποτυπώνονται σε φωτογραφικό χαρτί.

Αναζητείται δε η παρουσία ή η απουσία ειδικού προϊόντος πολλαπλασιασμού με τη χρήση κάθε ζεύγους εκκινητών. Είναι καλό επίσης να προσδιορίζεται το μέγεθος (μοριακό βάρος) του ειδικού προϊόντος πολλαπλασιασμού προκειμένου να γίνει διάκριση από ψευδώς θετικά προϊόντα πολλαπλασιασμού που οφείλονται σε διμερή εκκινητών (primer dimmers), μεταφορά υλικού (carry-over) από γειτονικά βοθρία ή σε προϊόντα μη-ειδικού πολλαπλασιασμού. Για τον λόγο αυτό, θα πρέπει σε κάθε σειρά ηλεκτροφόρησης να περιλαμβάνεται και το ανάλογο DNA ladder.

### **Κριτήρια που χαρακτηρίζουν τον πολλαπλασιασμό ως ανεπιτυχή μετά την ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης**

1. Απουσία προϊόντος PCR
2. Το προϊόν της PCR υπάρχει, αλλά είναι διαφορετικού μεγέθους από το αναμενόμενο
3. Ύπαρξη πολλαπλών προϊόντων PCR
4. Ύπαρξη προϊόντος PCR στον αρνητικό μάρτυρα
5. Ύπαρξη ασαφών ή δυσδιάκριτων ζωνών.

### **γ) Αξιολόγηση των αποτελεσμάτων**

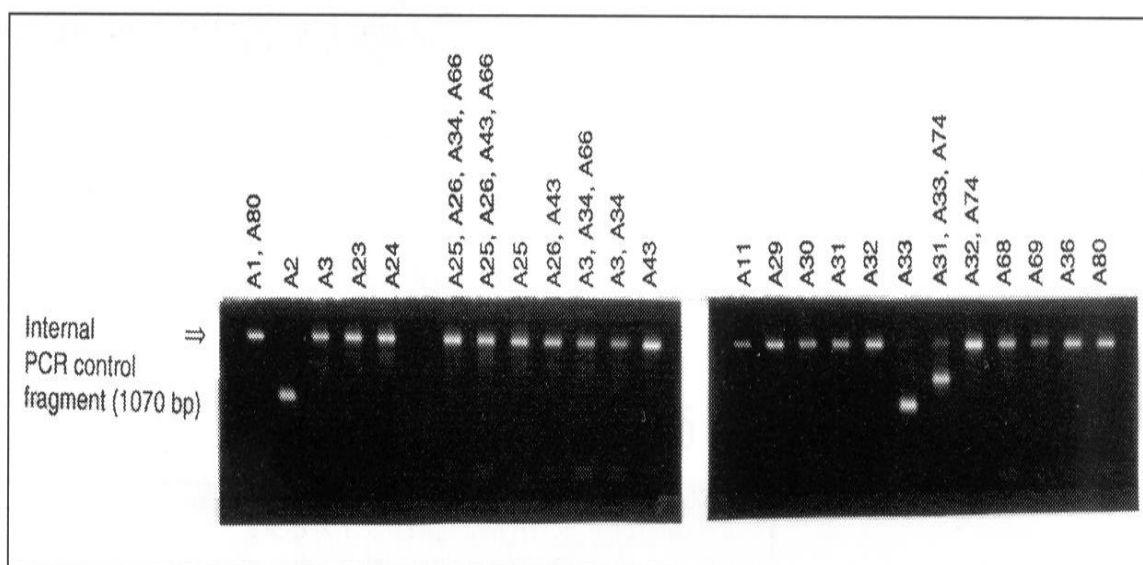
Λαμβάνονται υπόψη οι θετικές αντιδράσεις (δηλ. η παρουσία ειδικού προϊόντος) και με βάση ειδικούς πίνακες ανάγνωσης ή προγράμματα Η/Υ (*software*) εξάγεται το τελικό αποτέλεσμα δηλαδή η ειδικότητα του υπό εξέταση δείγματος (Σχήματα 2Α και 2Β).

Μολονότι, η τυποποίηση των αλληλίων καθορίζεται από την παρουσία του ειδικού προϊόντος, το μέγεθος (μοριακό βάρος) του μπορεί να βοηθήσει κατά την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων.

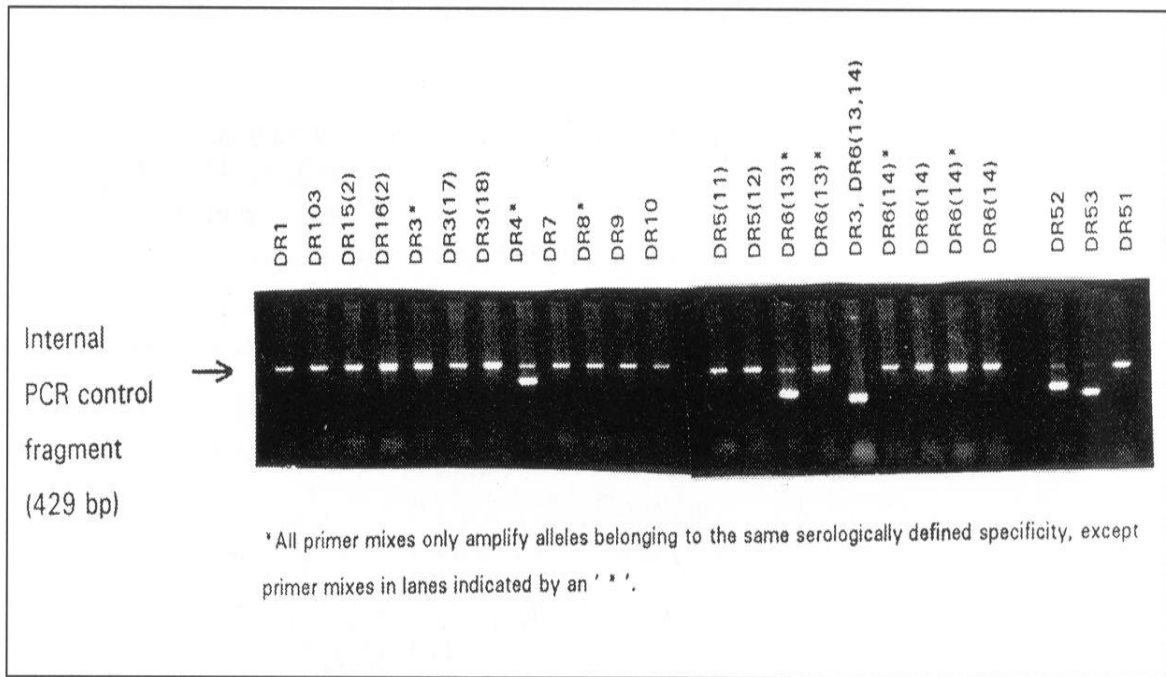
Επιπλέον, επειδή η απουσία ειδικού προϊόντος μπορεί να οφείλεται σε τεχνικά λάθη, σε κάθε PCR αντίδραση περιλαμβάνεται και ένα εσωτερικός μάρτυρας (*internal control*) δηλαδή ζεύγος εκκινητών που είναι ειδικό για τον πολλαπλασιασμό ενός γονιδίου που υπάρχει σε όλα τα ανθρώπινα κύτταρα όπως είναι η ανθρώπινη αυξητική ορμόνη (*human growth hormone*).

Πρέπει δε να επισημανθεί ότι σε περίπτωση που έχουμε παρουσία ειδικού προϊόντος, η ένταση της ζώνης που αντιστοιχεί στον εσωτερικό μάρτυρα μπορεί να είναι ασθενέστερη ή να ελλείπει τελείως.

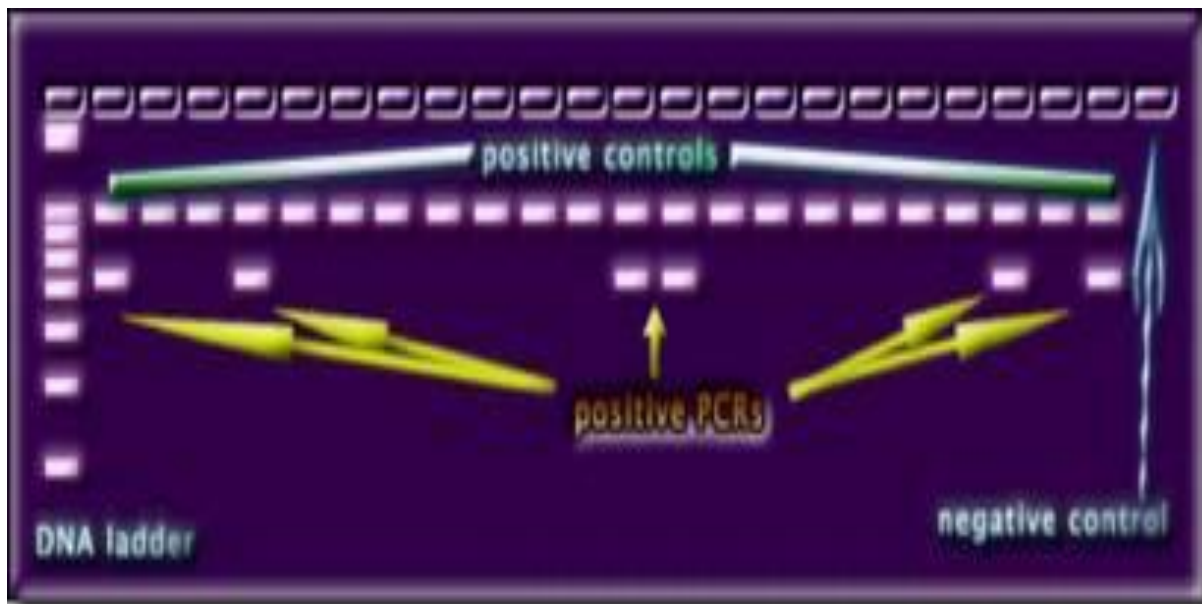
Επίσης ενδείκνυται η χρησιμοποίηση αρνητικού μάρτυρα (δηλ. δείγμα χωρίς DNA) για να γίνει αντιληπτή τυχόν επιμόλυνση του εξετασθέντος δείγματος (Σχήμα 3).



**Σχήμα 2A.** HLA-A τυποποίηση με PCR-SSP.



Σχήμα 2B. HLA-DR (low resolution) τυποποίηση με PCR-SSP.



Σχήμα 3. PCR-SSP.

## ΟΔΗΓΟΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΩΝ

ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΑ	ΠΙΘΑΝΕΣ ΑΙΤΙΕΣ	ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ ΕΠΙΛΥΣΗΣ
1. Ο εσωτερικός μάρτυρας και οι ζώνες ειδικού πολλαπλασιασμού είναι πολύ ασθενείς	α. Η συγκέντρωση του DNA στο δείγμα είναι πολύ χαμηλή β. Πιθανή αποικοδόμηση του DNA του δείγματος γ. Παρουσία αναστολέων της Ταq πολυμεράσης στο δείγμα DNA	α. Ελέγχουμε την ποιότητα και τη συγκέντρωση του DNA στο δείγμα και τη ρυθμίζουμε ανάλογα β. Επανακαθαρίζουμε το δείγμα DNA και το διαλύουμε σε dH <sub>2</sub> O ή TE buffer
2. Πτωχή απόδοση των προϊόντων μετά την PCR	Περίσσεια DNA	Ελέγχουμε τη συγκέντρωση του DNA στο δείγμα και τη ρυθμίζουμε ανάλογα
3. Οι ζώνες του εσωτερικού μάρτυρα δεν παρουσιάζονται σε μία ή περισσότερες σειρές		Επαναλαμβάνουμε την τυποποίηση με καλής ποιότητας DNA
4. Ψευδώς αρνητικός πολλαπλασιασμός ενός HLA αλληλίου ενώ ο εσωτερικός μάρτυρας φαίνεται φυσιολογικός		Επαναλαμβάνουμε την τυποποίηση του υπό εξέταση δείγματος μαζί με ένα δείγμα DNA, που φέρει το ίδιο HLA αλληλίο
5. Περισσότερα από δύο HLA αλληλία είναι θετικά	Επιμόλυνση του δείγματος κατά τη διάρκεια της εκχύλισης του DNA ή κατά την προετοιμασία της PCR	Καθαρίζουμε τους πάγκους εργασίας με διάλυμα χλωρίου 10%. Χρησιμοποιούμε γάντια μιας χρήσης και τα αλλάζουμε συχνά.
6. Ασαφείς ζώνες στην ηλεκτροφόρηση	α. Το ρυθμιστικό διάλυμα της ηλεκτροφόρησης μπορεί να είναι πολύ θερμό λόγω υψηλής τάσης β. Λανθασμένη σύνθεση του ρυθμιστικού διαλύματος της ηλεκτροφόρησης γ. Τα χρησιμοποιούμενα χτένια μπορεί να σχηματίζουν σχισμές μεγάλου πάχους στο πήκτωμα	α. Συνιστάται επανάληψη της ηλεκτροφόρησης σε χαμηλότερη τάση ρεύματος ( <i>Voltage</i> ) β. Επαναλαμβάνουμε την ηλεκτροφόρηση με την ενδεδειγμένη συγκέντρωση TBE ρυθμιστικού διαλύματος γ. Επαναλαμβάνουμε την ηλεκτροφόρηση με χτένια μικρότερου πάχους
7. Διφορούμενα αποτελέσματα		Επαναλαμβάνουμε την τυποποίηση με αντιδραστήρια άλλης εταιρείας ή με άλλη τεχνική

## ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ/ΜΕΙΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Ανάλογα με τον τρόπο σχεδίασης των εκκινητών που θα χρησιμοποιηθούν, η HLA τυποποίηση με PCR-SSP μέθοδο μπορεί να δώσει αποτελέσματα σε επίπεδο χαμηλής, μέσης ή υψηλής διακριτικότητας (low/medium/high-resolution).

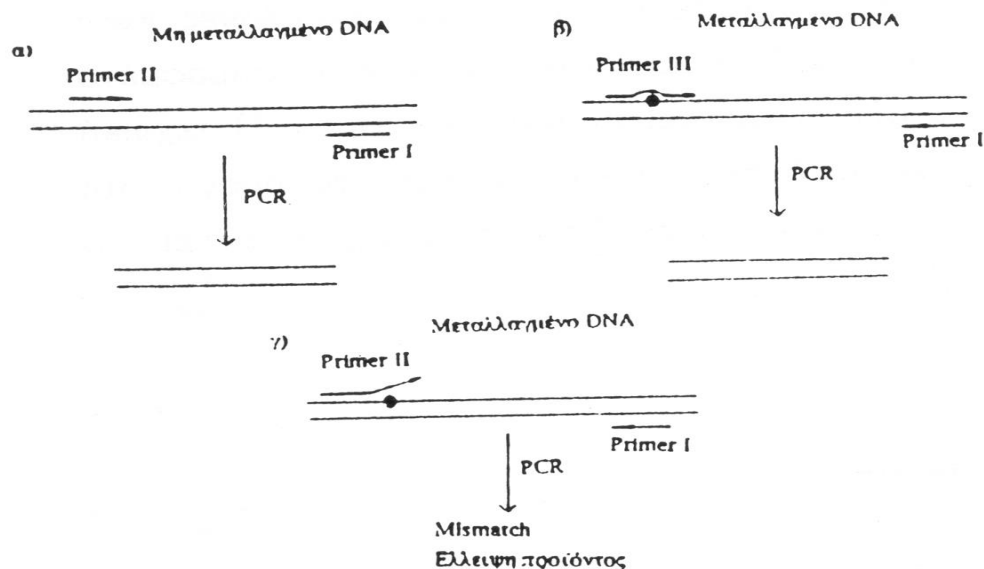
Επιπλέον, είναι ταχεία μέθοδος αφού δεν απαιτείται υβριδισμός μετά τη φάση του πολλαπλασιασμού με την PCR και η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης αποτελεί το τελικό στάδιο της ανάλυσης.

Μειονεκτήματα αποτελούν α) η έλλειψη αυτοματοποίησης, που την καθιστά ακατάλληλη για την τυποποίηση μεγάλου αριθμού δειγμάτων β) η σχετικά μεγάλη ποσότητα DNA που απαιτείται σε ορισμένες ομάδες αλληλίων και γ) το σχετικά μεγάλο κόστος λόγω της μεγάλης ποσότητας Taq πολυμεράσης που χρησιμοποιείται.

Από ορισμένα εργαστήρια χρησιμοποιήθηκε μια παραλλαγή της PCR-SSP, η οποία ονομάζεται ARMS-PCR, η οποία όμως δεν βρήκε ευρεία εφαρμογή στην HLA τυποποίηση, ενώ εφαρμόζεται κυρίως στην ανίχνευση μεταλλάξεων.

## ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Βασίζεται στην αρχή, ότι ένας εκκινητής επιμηκύνεται και δίδει προϊόν σε μια PCR αντίδραση μόνον εφόσον έχει 100% ομολογία βάσεων με το υπό μελέτη DNA. Η έλλειψη προϊόντος πολλαπλασιασμού αποδεικνύει την ύπαρξη κάποιας μετάλλαξης. Για την αναγνώριση λοιπόν σημειακών μεταλλάξεων απαιτούνται 2 αντιδράσεις PCR με τρεις διαφορετικούς εκκινητές. Ο εκκινητής I είναι κοινός. Ο εκκινητής II έχει 100% ομολογία με το φυσιολογικό γονίδιο και σε συνδυασμό με τον εκκινητή I, δίδει προϊόν PCR στην περίπτωση του μη μεταλλαγμένου DNA. Ο εκκινητής III (ειδικός για το μεταλλαγμένο γονίδιο) σε συνδυασμό με τον εκκινητή I δίδει προϊόν μόνο στην περίπτωση του μεταλλαγμένου DNA. Τέλος στην 2η αντίδραση PCR, ο εκκινητής I σε συνδυασμό με τον εκκινητή II και με στόχο μεταλλαγμένο DNA δεν δίδει προϊόν PCR (Σχήμα 3).



Σχήμα 3. Μέθοδος ARMS (Αρχή της μεθόδου).

## ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Στη συνέχεια περιγράφεται ένα ενδεικτικό πρωτόκολλο εργασίας που αφορά:

### Μοριακή Τυποποίηση HLA-A\*, -B\*, -C\*, -DRB, -DQB

με Μέθοδο PCR-SSP

(PEL-FREEZ UniTray™ SSP kits)

#### A. Πολλαπλασιασμός (amplification) των δειγμάτων

- Βγάζουμε από την κατάψυξη τα πλακίδια PCR (PCR Trays), τα τοποθετούμε σε στατώ και αφαιρούμε τα πώματα.
- Επειδή το πλακίδιο προορίζεται για περισσότερες της μίας τυποποιήσεις (2-4), κόβουμε προσεκτικά το τμήμα εκείνο του πλακιδίου που αντιστοιχεί στις τυποποιήσεις που θέλουμε να διενεργήσουμε.
- **Σημ.** Το κόψιμο πρέπει να γίνεται από δεξιά προς αριστερά, αποφεύγοντας το κόψιμο των γραμμάτων A-H στη αριστερά πλευρά, που διευκολύνουν το καθορισμό του σωστού προσανατολισμού του πλακιδίου.
- Αποψύχουμε το ρυθμιστικό διάλυμα (buffer), το ανακινούμε σε αναδευτήρα (Vortex) και διαμοιράζουμε σε ένα ξεχωριστό σωληνάριο τις κάτωθι ποσότητες ανάλογα με το είδος της εξέτασης που διενεργούμε:
  - **HLA-A: 135 μl**
  - **HLA-B: 270 μl**

- **HLA-C: 135  $\mu$ l**
- **HLA-DR (3 test/tray): 180  $\mu$ l**
- **HLA-DRB/DQB: 235  $\mu$ l**
- Προσθέτουμε με στο σωληνάριο με το ρυθμιστικό διάλυμα τις κάτωθι ποσότητες στείρου αποσταγμένου ύδατος:
  - **HLA-A: 62  $\mu$ l**
  - **HLA-B: 125  $\mu$ l**
  - **HLA-C: 62  $\mu$ l**
  - **HLA-DR (3 test/tray): 84  $\mu$ l**
  - **HLA-DRB/DQB: 94  $\mu$ l**
- Στη συνέχεια προσθέτουμε τις ανάλογες ποσότητες Ταq πολυμεράσης και ανακινούμε σε αναδευτήρα (Vortex):
  - **HLA-A: 2.2  $\mu$ l**
  - **HLA-B: 4.3  $\mu$ l**
  - **HLA-C: 2.2  $\mu$ l**
  - **HLA-DR (3 test/tray): 2.9  $\mu$ l**
  - **HLA-DRB/DQB: 3.8  $\mu$ l**
- Προετοιμάζουμε τον αρνητικό μάρτυρα, προσθέτοντας στο αντίστοιχο φρεάτιο (τελευταίο κάθε τυποποίηση) 8  $\mu$ l από το παραπάνω προετοιμασθέν μίγμα (δηλ. ρυθμιστικό διάλυμα + d H<sub>2</sub>O + Ταq πολυμεράση).
- Στη συνέχεια στο παραπάνω μίγμα προσθέτουμε τις απαιτούμενες (ανάλογα με το είδος της εξέτασης) ποσότητες DNA (περιεκτικότητα 75-100 ng/ $\mu$ l) και ανακινούμε σε αναδευτήρα (Vortex):
  - **HLA-A: 19  $\mu$ l**
  - **HLA-B: 37  $\mu$ l**
  - **HLA-C: 19  $\mu$ l**
  - **HLA-DR (3 test/tray): 25  $\mu$ l**
  - **HLA-DRB/DQB: 31  $\mu$ l**
- Διαμοιράζουμε το παραπάνω μίγμα, τοποθετώντας 8  $\mu$ l σε κάθε φρεάτιο του πλακιδίου, εκτός από τον αρνητικό μάρτυρα.
- Τοποθετούμε τα σωληνάρια στον θερμικό κυκλοποιητή, ο οποίος έχει ρυθμισθεί ως εξής:



Στάδιο	Θερμοκρασία	Χρόνος
1	96° C	1 min
2	96° C	25 sec
3	70° C	50 sec
4	72° C	45 sec
<b>τα στάδια 2-4 επαναλαμβάνονται 5 φορές</b>		
5	96° C	25 sec
6	65° C	50 sec
7	72° C	45 sec
<b>τα στάδια 5-7 επαναλαμβάνονται 21 φορές</b>		
8	96° C	25 sec
9	55° C	60 sec
10	72° C	120 sec
<b>τα στάδια 8-10 επαναλαμβάνονται 4 φορές</b>		

#### **B. Ανίχνευση των προϊόντων πολλαπλασιασμού με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα (gel) αγαρόζης**

- Προετοιμάζουμε 200ml διαλύματος αγαρόζης (2,5%) χρησιμοποιώντας 0,5XTBE ρυθμιστικό διάλυμα (δηλ. διαλύουμε 5 gr αγαρόζης σε 200 ml 0,5XTBE), στο οποίο προσθέτουμε 4 μl (10 mg/ ml) *ethidium bromide*.
- Αφήνουμε το πήκτωμα να σταθεροποιηθεί στον πάγκο τουλάχιστον για 30 min.
- Προσθέτουμε 8 μl *gel loading buffer* σε όλα τα φρεάτια του πλακιδίου. Αναμιγνύουμε καλά με την πιπέτα 2-3 φορές ώστε να αναμιχθεί με το προϊόν της PCR.
- Μεταφέρουμε το μίγμα (προϊόν PCR+ *gel loading buffer*) στο πήκτωμα αγαρόζης.
- Ηλεκτροφορούμε το πήκτωμα σε διάλυμα 0,5 XTBE στα 150 volts για 20-25 min.
- Φωτογραφίζουμε το ηλεκτροφόρημα με κάμερα τύπου Polaroid, αφού προηγουμένως έχει γίνει εμφανές πάνω στην Τράπεζα υπεριωδούς ακτινοβολίας (UV).

#### **Γ. Αξιολόγηση των αποτελεσμάτων**

Η αξιολόγηση γίνεται με βάση της PCR αντιδράσεις που έδωσαν θετική αντίδραση και σύμφωνα με τους ειδικούς πίνακες ανάγνωσης-αξιολόγησης που περιέχουν τα kits για κάθε γενετικό τόπο.

## ΕΝΔΕΙΚΤΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Bunce M, O' Neil C., Barnardo M., Morris P., Welsh K. Comprehensive DNA typing for HLA-A, B, C, DRB3, DRB4, DRB5 and DQB1 by PCR with 144 primer utilizing sequence-specific primers (PCR-SSP). *Tissue Antigens* 1995;46:355-367.
2. Olerup O. and Zetterquist H. HLA-DR typing by PCR amplification with sequence specific primers (PCR-SSP) in 2 hours: An alternative to serological DR typing in clinical practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantations. *Tissue Antigens* 1992;39:225-235.
3. Olerup O. and Zetterquist H. DR "Low resolution" PCR-SSP typing - a correction and an up-date. *Tissue Antigens* 1993;41:55-56.
4. Olerup O., Aldener A. and Fogdell A. HLA-DQB1 and -DQA1 typing by PCR amplification with sequence specific primers (PCR-SSP) in 2 hours. *Tissue Antigens* 1993;41:119-134.
5. Olerup O. et al. HLA-DRB\*01 subtyping by allele-specific PCR amplification: A sensitive, specific and rapid technique. *Tissue Antigens* 1991;37:197-204.
6. Zetterquist, H. et al. Identification of the HLA DRB1\*04, -DRB1\*07 and -DRB1\*09 alleles by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours. *Human Immunology* 1992;34:64-74.
7. Innis, M.A. et al. *PCR Protocols : A guide to methods and applications*. Academic Press, San Diego, CA. 1990.
8. Bunce, M. et al. Rapid HLA-DQB typing by eight polymerase chain reaction amplification with sequence specific primers (PCR-SSP). *Human Immunology* 1993;37:201-206.
9. Newton CR, Graham P, Heptinstall E. et al. Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic Acids Research* 1989;17:2503-2516.

## ΣΕΜΙΝΑΡΙΟ ΕΡΓΑΣΙΑΣ « Μοριακές Τεχνικές» - 27 Μαρτίου 2009

### ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

#### Μοριακή Τυποποίηση HLA-A\* (low-resolution) με μέθοδο PCR-SSP (αντιδραστήρια του οίκου Genovision)

##### A. Πολλαπλασιασμός (amplification) των δειγμάτων

- Βγάζουμε από την κατάψυξη τα PCR πλακίδια, τα οποία περιέχουν τους εκκινητές (σε λυοφιλοποιημένη μορφή) ακινητοποιημένους στον πυθμένα τους.
- Σε σωληνάριο (1,5ml ) παρασκευάζουμε το PCR mix ως εξής:

d H <sub>2</sub> O	157μl
*Master mix	84 μl
Taq polymerase	2,2 μl
DNA	30 μl (περιεκτικότητας 30ng/ μl)

\*Το Master mix περιέχει dNTPs, ιόντα Mg<sub>2+</sub>, ρυθμιστικό διάλυμα, χρωστική cresol red και γλυκερόλη.

- Διαμοιράζουμε 10 μl σε κάθε εμβάθυνση των PCR πλακιδίων.
- Πωματίζουμε ερμητικά.
- Τοποθετούμε τα έτοιμα πλακίδια στον θερμικό κυκλοποιητή, ο οποίος έχει ρυθμισθεί στις κατάλληλες συνθήκες (σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστικού οίκου).

##### B. Ανίχνευση των προϊόντων πολλαπλασιασμού με ηλεκτροφόρηση σε γέλη αгарόζης

- Προετοιμάζουμε 200ml διαλύματος αгарόζης (2%) χρησιμοποιώντας ρυθμιστικό διάλυμα 0,5XTBE (δηλ. διαλύουμε 4 gr αгарόζης σε 200 ml 0,5XTBE), στο οποίο προσθέτουμε 4 μl (10 mg/ ml) *ethidium bromide*.
- Βάζουμε τα χτενάκια για τη διάνοιξη των εμβάθυνσεων στη γέλη αгарόζης.
- Αφήνουμε τη γέλη αгарόζης να σταθεροποιηθεί στον πάγκο τουλάχιστον για 30 min.
- Μεταφέρουμε το προϊόν της PCR με οκτακάναλη πιπέτα στη γέλη αгарόζης.
- Ηλεκτροφορούμε τη γέλη αгарόζης αφού προσθέσουμε διάλυμα 0,5 XTBE στα 130 volts για 25 min.
- Φωτογραφίζουμε το ηλεκτροφόρημα, αφού προηγουμένως έχει γίνει εμφανές πάνω στην Τράπεζα υπεριωδούς ακτινοβολίας (UV).

##### Γ. Αξιολόγηση των αποτελεσμάτων

Η αξιολόγηση γίνεται με βάση της PCR αντιδράσεις που έδωσαν θετική αντίδραση και σύμφωνα με τους ειδικούς πίνακες ανάγνωσης-αξιολόγησης που παρέχει το kit.