

## Κεφάλαιο 8

# Τεχνικές μοριακής ιστοπαθολογίας στην Ογκολογία

Ν. Καπράνος

Δ. Ροντογιάννη

---

### ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η σύγχρονη ιατρική είναι άρρηκτα δεμένη με την επαναστατική εξέλιξη της μοριακής βιολογίας. Με την εφαρμογή των τεχνικών της, που πριν από λίγες δεκαετίες αποτελούσαν αποκλειστικό προνόμιο καλά οργανωμένων εργαστηρίων βασικής έρευνας, κάθε ιατρική ειδικότητα έχει διευρύνει και εμβαθύνει το γνωστικό της αντικείμενο και έχει δώσει σημαντικές απαντήσεις σε ερωτήματα αιώνων.

Η Μοριακή Ιστοπαθολογία (ΜΙΠ) έχει ως σκοπό τη μελέτη της παθογένειας και εξέλιξης των νόσων με βάση τις διαταραχές των γονιδίων και των προϊόντων τους. Αποτελεί τη «γέφυρα» μεταξύ βασικής έρευνας και κλινικοεργαστηριακής Ιατρικής. Η γεφύρωση αυτή επιτρέπει μια αμφίδρομη σχέση αφ' ενός της εφαρμογής των τεχνικών της μοριακής βιολογίας για τη λύση ιατρικών προβλημάτων και αφ' ετέρου της μεταφοράς της κλινικοεργαστηριακής εμπειρίας στο σχεδιασμό της βασικής έρευνας. Παρά το γεγονός ότι ο όρος «μοριακή» εννοιολογικά καλύπτει τη μελέτη σε ένα θεμελιώδες επίπεδο των μορίων γενικά, εν τούτοις η μοριακή ανάλυση έχει καταλήξει να αποτελεί την επιστήμη των νουκλεϊνικών οξέων. Ως εκ τούτου ο όρος μοριακή ιστοπαθολογία προσδιορίζεται αναγκαστικά ως η μελέτη των παθολογικών εξεργασιών

σε ένα θεμελιώδες επίπεδο που αφορά τις διαταραχές του DNA ή RNA με τη βοήθεια των κατάλληλων προς τούτο τεχνικών.

Η κλασική ανάλυση των ιστών στο Παθολογοανατομικό Εργαστήριο βασιζόταν μέχρι τώρα στην μακροσκοπική εξέταση των χειρουργικών ή βιοπτικών παρασκευασμάτων και ακολούθως, μετά από επεξεργασία, μικροτομή και χρώση αυτών, στη μικροσκοπική εξέταση. Με βάση τις διαφορές της αρχιτεκτονικής, του σχήματος και του χρώματος των ιστών ή κυττάρων, οι Παθολογοανατόμοι μπορούσαν, σε συνδυασμό με τις πληροφορίες από την κλινική εικόνα και τις υπόλοιπες εργαστηριακές αναλύσεις, να προτείνουν την πλέον κατάλληλη διάγνωση για την ασθένεια ενός ατόμου. Το γεγονός ότι η τεχνολογία αυτή παραμένει σε εφαρμογή για περισσότερα από 100 χρόνια δείχνει ότι συμβάλλει σημαντικά στη διάγνωση και θεραπευτική αντιμετώπιση των διάφορων παθολογικών καταστάσεων του ανθρώπου.

Η αναγνώριση και ταξινόμηση των νεοπλασματικών εξεργασιών από την κλασική ιστοπαθολογία βασίζεται επίσης σε αλλοιώσεις του σχήματος πυρήνος και κυττάρων και στη σχέση μεταξύ αυτών, στις διαφορές της αρχιτεκτονικής διάταξης (π.χ. αδενικοί σχηματισμοί, διάχυτη ανάπτυξη μονήρων κυτ-

τάρων κλπ), και στη διαπίστωση κυτταρικών προϊόντων (βλέννα, γλυκογόνο κλπ). Ο βαθμός δε της ομοιότητας με το μητρικό ιστό προέλευσης έχει χρησιμεύσει για την επιμέρους ταξινόμηση αυτών σε βαθμούς διαφοροποίησης. Μέχρι σήμερα η πιο εκτεταμένη «μοριακή» ανάλυση των ιστών υπήρξε η μελέτη πρωτεϊνικών αντιγόνων με αντισώματα με την εφαρμογή τεχνικών ανοσοϊστοχημείας. Οι ανοσοϊστοχημικές τεχνικές έχουν ήδη αποτελέσει τεχνικές καθημερινής πρακτικής στα παθολογοανατομικά τμήματα και έχουν συμβάλλει σημαντικά στην καλύτερη ταξινόμηση των νεοπλασματικών εξεργασιών χωρίς όμως σοβαρή επίπτωση σε τομείς που αφορούν την πρόγνωση.

## ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΙΣΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ

Παρά το ότι η αξία της κλασσικής ιστοπαθολογικής εξέτασης έγκειται στην παραδοχή ότι η μορφολογία των ιστών και κυττάρων αποτελεί την αντανάκλαση του συνόλου των μεταβολών σε μοριακό επίπεδο, αδυναμία της αποτελεί ότι δεν είναι σε θέση να προσδιορίσει ακριβώς τις αλλοιώσεις αυτές. Οι πρόσφατες όμως επαναστατικές εξελίξεις στους τομείς της μοριακής βιολογίας και βιοπληροφορικής, παρέχουν τη δυνατότητα στα σύγχρονα οργανωμένα εργαστήρια παθολογικής ανατομικής να εισχωρούν πέραν των ορίων της μικροσκοπικής μορφολογίας και να λαμβάνουν πληροφορίες για τη λειτουργία ή την κατάσταση του κυττάρου ή ενός άλλου υποκυτταρικού συστατικού. Η δυνατότητα αυτή παρέχεται από τις τεχνικές της ΜΠΠ, οι οποίες, ανάλογα με το μηχανισμό λειτουργίας τους, μπορούν να διακριθούν στις εξής κατηγορίες.

## ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΕΣ ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ

### In situ υβριδισμός

#### Εισαγωγή

Ο *in situ* υβριδισμός, ο οποίος εφαρμόστηκε για πρώτη φορά το 1969, αποτελεί πολύτιμη μέθοδο μοριακής βιολογίας για τον παθολογοανατόμο επειδή επιτρέπει τη μορφολογική εντόπιση της γενετικής πληροφορίας.

Ενώ οι κλασσικές τεχνικές της μοριακής βιολογίας, όπως η Southern blot και η Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR), πιστοποιούν απλώς την παρουσία μιας αλληλουχίας DNA ή RNA, ο *in situ* υβριδισμός προσδιορίζει επιπλέον σε ποια και πόσα κύτταρα υπάρχει η αλληλουχία αυτή και σε ποιο υποκυτταρικό διαμέρισμα (κυτταρόπλασμα, πυρήνας) εντοπίζεται. Επιπροσθέτως μας πληροφορεί αν η παρουσία της αλληλουχίας αυτής σχετίζεται με συγκεκριμένες ανωμαλίες σε κυτταρικό και ιστικό επίπεδο<sup>1,2</sup>.

#### Βασικές αρχές *in situ* υβριδισμού

Η τεχνική αυτή όπως και οι άλλες μέθοδοι υβριδισμού (Southern/Northern blot, Dot blot) βασίζεται στη θεμελιώδη ιδιότητα των πυρηνικών οξέων να σχηματίζουν, σύμφωνα με το νόμο της συμπληρωματικότητας των βάσεων, σταθερά διμερή που ονομάζονται υβρίδια. Τα τελευταία μπορεί να αποτελούνται από δύο αλύσους DNA ή συνδυασμό αλύσων RNA-DNA και RNA-RNA.

Αξιοποιώντας την αρχή αυτή μπορούμε με τη χρήση μίας κατάλληλα σημασμένης εξωγενούς, μονόκλωνης ή δίκλωνης αλληλουχίας που ονομάζεται δείκτης (probe), να ανιχνεύσουμε τη συμπληρωματική της εντός του κυττάρου που ευρίσκεται, δηλ. *in situ*. Το αποτέλε-

σμα της αντίδρασης υβριδισμού, με τις τεχνικές ανίχνευσης που ακολουθούν, καθίσταται τελικά ορατό στο επίπεδο του οπτικού μικροσκοπίου.

#### **Δείκτες DNA/RNA: Τα βασικά εργαλεία του *in situ* υβριδισμού**

Τα βασικά εργαλεία της τεχνικής ονομάζονται δείκτες (probes) και αποτελούν κατάλληλα σημασμένες δίκλωνες (DNA probes) ή μονόκλωνες (RNA probes) αλληλουχίες νουκλεοτιδίων, οι οποίες μπορούν να συνδεθούν σύμφωνα με την αρχή της συμπληρωματικότητας των βάσεων και επομένως να ανιχνεύσουν την αναζητούμενη αλληλουχία. Η επιλογή του κατάλληλου δείκτη εξαρτάται από το είδος της εφαρμογής. Αν αυτή αφορά την αναζήτηση DNA (όπως *in situ* DNA, αλληλουχίες γονιδίων ή χρωματωσμάτων) προτιμάται η χρήση δίκλωνων δεικτών DNA. Αν η εφαρμογή αφορά την ανίχνευση RNA, τότε προτιμάται η χρήση δεικτών RNA (riboprobes) δεδομένου ότι τα προκύπτοντα υβρίδια RNA-RNA είναι πιο σταθερά από τα υβρίδια DNA-RNA. Εναλλακτικά για την ανίχνευση αλληλουχιών σε αφθονία μπορούν να χρησιμοποιηθούν ολιγονουκλεοτίδια, μονήρη, ή μίγμα περισσοτέρων του ενός.

Οι δείκτες δίκλωνου DNA έχουν μήκος 100-400 βάσεις συνήθως, παράγονται με κλωνοποίηση σε πλασμίδια βακτηριδίων και σημαίνονται με την τεχνική nick translation. Για την παραγωγή και σήμανση των δεικτών RNA χρησιμοποιείται κυρίως η τεχνική *in vitro* transcription με τη βοήθεια κατάλληλα σημασμένων νουκλεοτιδίων. Τέλος τα ολιγονουκλεοτίδια έχουν μήκος 18-30 βάσεις, συντίθενται χημικά σε ειδική συσκευή και σημαίνονται στο 3' άκρο με τη βοήθεια του ενζύμου τελική τρανσφεράση.

Η σήμανση των δεικτών γινόταν αρχικά με ραδιοϊσότοπα (κυρίως <sup>35</sup>S), αλλά η χρήση αυτών έχει πλέον περιορισθεί και χρησιμοποιούνται μόνο σε ανίχνευση RNA, εφ' όσον δεν είναι επιτυχής η χρήση μη-ισοτοπικών δεικτών. Στα κλινικά εργαστήρια χρησιμοποιούνται σχεδόν αποκλειστικά οι μη-ισοτοπικοί δείκτες, λόγω των κινδύνων και της κακής ποιότητας του σήματος των ραδιενεργών δεικτών. Η σήμανση των μη-ισοτοπικών δεικτών γίνεται συνήθως με βιοτίνη, διγοξυγενίνη, ή φθορίζουσες χρωστικές.

Η παρουσία φθορίζουσας χρωστικής, είτε απ' ευθείας στο δείκτη είτε σε κάποιο αντιδραστήριο από τα επακόλουθα στάδια ανίχνευσης της αντίδρασης υβριδισμού, επιτρέπει την εφαρμογή της φθορίζουσας παραλλαγής της τεχνικής του *in situ* υβριδισμού, διεθνώς γνωστής ως *Fluorescent in situ Hybridization - FISH*. Η χρησιμοποίηση αντίθετα χρωμογόνου υποστρώματος κατά την τελική ανίχνευση της αντίδρασης υβριδισμού χαρακτηρίζει την τεχνική του χρωμογόνου *in situ* υβριδισμού (*chromogenic in situ hybridization - CISH*).

#### **Εφαρμογές του *in situ* υβριδισμού**

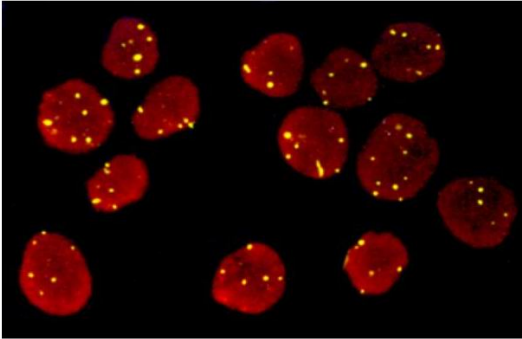
Η τεχνική του *in situ* υβριδισμού μπορεί να εφαρμοσθεί σε ιστικές τομές παραφίνης και κρουστάτου καθώς και σε κυτταρολογικά επιχρίσματα. Σημαντικότερες εφαρμογές της αποτελούν<sup>1-7</sup>.

- 1) Αριθμητικές μεταβολές -ενίσχυση ή απώλεια- γονιδίων (HER2, EGFR, Topo II)
- 2) Αριθμητικές μεταβολές χρωμοσωμάτων (πολυσωμία, μονοσωμία) (Εικόνα 1).
- 3) Δομικές μεταβολές χρωμοσωμάτων (π.χ. διαμετάθεση t(9;22)σε ΧΜΛ)
- 4) Μελέτη γονιδιακής έκφρασης σε επίπεδο mRNA.

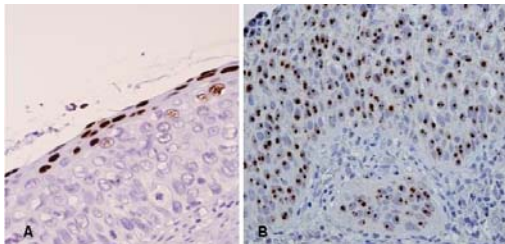
5) Ανίχνευση και τυποποίηση ιών (HPV, HCV, HBV, HSV, CMV, EBV).

6) Ανάλυση κατάστασης ιϊκού DNA (επισωματική ή ενσωματωμένη μορφή) (Εικόνα 2).

7) Ανίχνευση μικροβίων (χλαμύδια, ελικοβακτηρίδια).



Εικόνα 1. Ανίχνευση αριθμητικών ανωμαλιών χρωμοσώματος 7 σε καρκίνωμα μαστού με FISH. Όπως φαίνεται στην εικόνα τα καρκινωματώδη κύτταρα εμφανίζουν πολυσωμία (5-11 αντίγραφα) για το χρωμόσωμα 7, η οποία σύμφωνα με πρόσφατα δεδομένα σχετίζεται με χειρότερη πρόγνωση<sup>6</sup>



Εικόνα 2. Διάκριση επισωματικής και ενσωματωμένης μορφής HPV DNA σε βιοψίες τραχήλου μήτρας με *in situ* υβριδισμό. Α. HPV 16/18 σε CIN 2. Το σήμα υβριδισμού καταλαμβάνει όλο τον πυρήνα (καφέ χρώμα) και αντιστοιχεί σε επισωματική μορφή του ιού. (TSA/HRP/ DAB) Β. HPV 16/18 σε βιοψία τραχήλου με CIN 3 και μικροδιήθηση. Το σήμα υβριδισμού έχει την εικόνα μικρών ενδοπυρηνικών κηλίδων και αντιστοιχεί σε ενσωματωμένη στο ανθρώπινο DNA μορφή του ιού. (TSA/ HRP/DAB)

### ***In situ* PCR**

Η τεχνική αυτή αποτελεί παραλλαγή τεχνικής υβριδισμού *in situ*, κατά την οποία προηγείται αύξηση του αριθμού των αντιγράφων DNA ή RNA με τη βοήθεια ενδοκυττάρου αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης και ακολουθεί υβριδισμός των πολλαπλασιασθέντων αλληλουχιών με δείκτη (probe) έναντι του προϊόντος του ενδοκυττάρου πολλαπλασιασμού. Με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται σημαντική αύξηση της ευαισθησίας ανίχνευσης, η οποία μπορεί να φθάσει ακόμη και ένα αντίγραφο αλληλουχίας DNA ή RNA ανά κύτταρο<sup>8,9</sup>.

Η τεχνική *in situ* PCR λόγω της πολλαπλότητας των σταδίων της, του υψηλού κόστους και της σχετικά δύσκολης επαναληψιμότητας δεν έχει εφαρμοσθεί ευρέως στα κλινικά εργαστήρια και έχει περιορισθεί κυρίως στην ανίχνευση σπάνιων αντιγράφων νουκλεοτιδικών αλληλουχιών (π.χ. ιών σε λανθάνουσα φάση) σε ερευνητικά εργαστήρια.

Σε αυτό συνετέλεσε και η εφαρμογή τεχνικών ενίσχυσης της μεθυβριδικής ανίχνευσης σήματος του *in situ* υβριδισμού (π.χ. ενζυματικής εναπόθεσης τυραμιδίου) που έφθασαν σε παρόμοια επίπεδα ευαισθησίας με την τεχνική *in situ* PCR.

### **Δείκτης Απόπτωσης**

Ο προσδιορισμός του ποσοστού των κυττάρων που υφίστανται προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο σε άμεση σύγκριση με την κυτταρική μορφολογία μπορεί να γίνει με τη μέθοδο TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated d-UTP nick end labeling). Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην ενσωμάτωση, με τη χρήση της τελικής δεοξυνουκλεοτιδικής τρανσφεράσης (TdT), σημασμένων νουκλεοτιδίων στα 3'-OH άκρα

των διανουκλεοσωματικών περιοχών του DNA, τα οποία ακολούθως ανιχνεύονται με ανοσοενζυματική αντίδραση. Η ακριβής ποσοτικοποίηση του κλάσματος των κυττάρων που υφίστανται απόπτωση μπορεί να γίνει με σύστημα ανάλυσης εικόνας και να χρησιμοποιηθεί ως παράγοντας πρόγνωσης της βιολογικής συμπεριφοράς των όγκων, καθώς και της ανταπόκρισης στη θεραπεία<sup>10-12</sup>.

## **ΚΛΑΣΣΙΚΕΣ ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ**

### ***Απομόνωση DNA – RNA***

Οι «κλασσικές» μοριακές μέθοδοι ανάλυσης είναι αυτές που χρησιμοποιούν DNA ή RNA που έχει απομονωθεί από κύτταρα ή ιστούς και ευρίσκεται υπό μορφή διαλύματος. Η απομόνωση των νουκλεϊνικών οξέων έχει ως αποτέλεσμα την καταστροφή του ιστού και την αδυναμία ασφαλούς συσχέτισης με τους μορφολογικούς χαρακτήρες και τους επιμέρους κυτταρικούς τύπους του ιστού-στόχου<sup>13</sup>.

Η απομόνωση και διατήρηση του DNA είναι σχετικά εύκολη αφενός λόγω της φυσικοχημικής σταθερότητας του και αφετέρου λόγω της αποτελεσματικής καταστροφής των ενζύμων που το διασπούν (DNάσες) με θερμική επίδραση ή από την επαφή με χημικούς παράγοντες όπως π.χ. το EDTA. Η απομόνωση του RNA, αντίθετα, είναι πολύ πιο δύσκολη, δεδομένου ότι το RNA ως προσωρινό «μεταφορικό» μόριο, δεν έχει τη σταθερότητα του DNA. Επιπροσθέτως τα ένζυμα που διασπούν το RNA (RNAσες) υπάρχουν εν αφθονία στους ιστούς αλλά και στο περιβάλλον (π.χ. στο δάκτυλα των αναλυτών) είναι ιδιαίτερα ανθεκτικά και δεν μπορούν να αφαιρεθούν εύκολα κατά τη διαδικασία απομόνωσης του. Καλά αποτελέσματα στην αναστολή των RNAσων έχει η χρησιμοποίηση

διαλυμάτων (lysis buffers) που περιέχουν γουανιδίνιο, το οποίο όμως μπορεί να προκαλέσει σημαντικές βλάβες σε άλλα μόρια. Η επεξεργασία του RNA απαιτεί γενικά μεγάλη προσοχή (διαλύματα RNase-free, γάντια, χαμηλές θερμοκρασίες κλπ) και γίνεται κυρίως σε φρέσκους ή κατεψυγμένους ιστούς.

Από φρέσκους ή κατεψυγμένους ιστούς η απομόνωση ακόμη και μεγαλομοριακού DNA μπορεί εύκολα να επιτευχθεί, ενώ από ιστούς που έχουν μονιμοποιηθεί σε φορμόλη και εμποδωθεί σε παραφίνη η ποιότητα του DNA εξαρτάται από το χρόνο μονιμοποίησης και τις συνθήκες επεξεργασίας του ιστού. Ο κατακερματισμός του DNA από την επίδραση της φορμόλης δεν επιτρέπει την αξιόπιστη ανίχνευση αλληλουχιών μεγάλου μήκους (>400 bp). Η απομόνωση του RNA από ιστούς σε παραφίνη είναι ακόμη πιο δύσκολη και με ιδιαίτερη προσοχή είναι δυνατή η απομόνωση μικρών τμημάτων RNA κάτω από 200 bp<sup>14</sup>.

Η περαιτέρω μέτρηση της συγκέντρωσης και καθαρότητας των νουκλεϊνικών οξέων εφόσον απομονωθούν σε δοκιμαστικό σωλήνα βασίζεται κυρίως στη μέτρηση της οπτικής πυκνότητας τους στο υπεριώδες φάσμα τους φωτός. Τα νουκλεοτίδια απορροφούν στα 260 nm ενώ οι πρωτεΐνες εμφανίζουν απορρόφηση σε μήκος κύματος 280 nm.

### ***Υβριδισμός κατά Southern/Northern***

Οι τεχνικές αυτές επιτρέπουν την ανίχνευση με υβριδισμό DNA ή RNA που έχει διαχωρισθεί με ηλεκτροφόρηση και έχει μεταφερθεί σε μεμβράνη. Η μέθοδος αυτή απαιτεί αρκετό DNA (ή RNA) που είναι διαθέσιμο μόνο από φρέσκους ιστούς και δεν έχει μεγάλη ευαισθησία ανίχνευσης (περίπου 1 κύτταρο στα 100).

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

### Εισαγωγή – βασικές αρχές

Η μέθοδος PCR ανακοινώθηκε στην επιστημονική κοινότητα το 1985 από τον εφευρέτη της Karry Mullis, ο οποίος τιμήθηκε με το βραβείο Nobel το 1993. Σήμερα η PCR θεωρείται μια από τις πιο επαναστατικές επιστημονικές ανακαλύψεις του 20<sup>ου</sup> αιώνα η οποία συνέβαλε αποφασιστικά στην ευρεία εφαρμογή της μοριακής βιολογίας στην ιατρική έρευνα και διάγνωση.

Η PCR είναι μια σχετικά απλή και ταχεία μέθοδος πολλαπλασιασμού μιας νουκλεοτιδικής αλληλουχίας DNA με τη βοήθεια του ενζύμου πολυμεράση και επιτυγχάνεται με επαναλαμβανόμενους κύκλους τριών διαδοχικών αντιδράσεων που επιτελούνται σε διαφορετική θερμοκρασία.

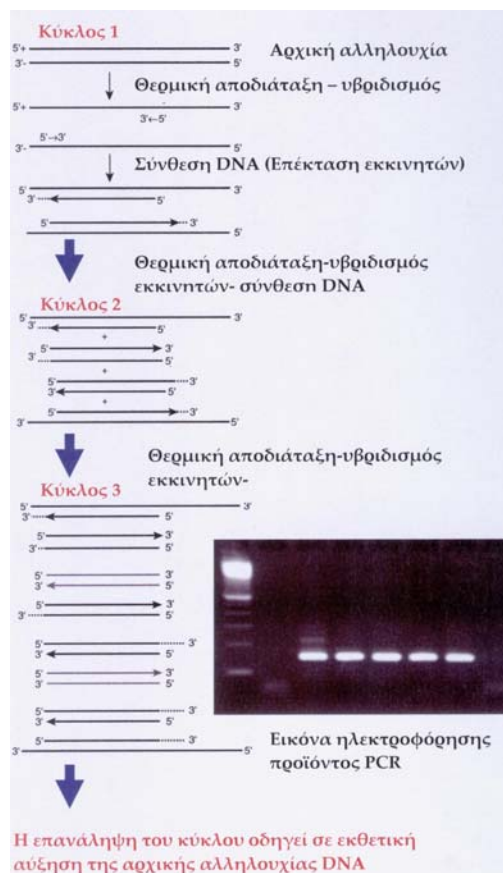
Κάθε κύκλος αποτελείται από τα εξής στάδια (Εικόνα 3):

1. αποδιάταξη του δίκλωνου DNA
2. υβριδισμός των εκκινητών με την αλληλουχία-στόχο (primer annealing)
3. σύνθεση συμπληρωματικών κλώνων του DNA με επέκταση του 3' άκρου των εκκινητών με τη βοήθεια της Taq πολυμεράσης (primer extension).

Στο πρώτο βήμα του κύκλου γίνεται αποδιάταξη του DNA που έχει απομονωθεί από το δείγμα, αυξάνοντας την θερμοκρασία της αντίδρασης συνήθως μεταξύ 92°C και 96°C. Με αυτό τον τρόπο οι συμπληρωματικοί κλώνοι του DNA απομακρύνονται.

Στο δεύτερο βήμα με μείωση της θερμοκρασίας της αντίδρασης (50<sup>ο</sup>-65<sup>ο</sup>C) επιτυγχάνεται ο υβριδισμός των εκκινητών με την αλληλουχία του DNA. Οι εκκινητές (primers) είναι συνθετικά ολιγο-

νουκλεοτίδια, μήκους 18-30 βάσεων, τα οποία αφορίζουν την αλληλουχία του DNA που πρόκειται να πολλαπλασιαστεί.



Εικόνα 3. Σχεδιαγραμματική απεικόνιση των επαναλαμβανόμενων σταδίων της PCR

Οι εκκινητές αποτελούνται από διαφορετικές, μη συμπληρωματικές αλληλουχίες, με αποτέλεσμα να μην υβριδίζονται μεταξύ τους αλλά με τις συμπληρωματικές αλληλουχίες του DNA.

Στο τρίτο και τελευταίο βήμα πραγματοποιείται η σύνθεση των συμπληρωματικών κλώνων του DNA σε θερμοκρασία 72°C. Αυτό το βήμα επιτυγχάνεται με την χρήση του ενζύμου DNA πολυμεράση που επιτρέπει τη σύνθεση του DNA σε κατεύθυνση 5' προς 3'. Μεγάλη

ώθηση στην τεχνική PCR έδωσε η ανακάλυψη του θερμοανθεκτικού ενζύμου πολυμεράσης του βακτηριδίου *Thermus Aquaticus* (Taq Polymerase). Η Taq Polymerase συνθέτει περίπου 2000 νουκλεοτίδια ανά λεπτό. Ο χρόνος που απαιτείται για την αντιγραφή του DNA-στόχου εξαρτάται από το μήκος του προϊόντος της PCR.

Η τεχνική PCR θεωρείται εξαιρετικά ευαίσθητη δεδομένου ότι το τελικό προϊόν της μετά από 30-40 κύκλους ανέρχεται στο ένα δισεκατομμύριο αντίγραφα της αρχικής αλληλουχίας. Με αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται η ανάλυση πολύ μικρών ακόμη και μικροσκοπικών δειγμάτων, ή ελάχιστων κυττάρων<sup>13,15</sup>.

Η ανίχνευση του προϊόντος της PCR γίνεται κατά κανόνα με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα (gel) αγαρόζης. Σε ορισμένες περιπτώσεις που απαιτείται πολύ ακριβής διαχωρισμός βραχέων μορίων DNA (π.χ. ανάλυση αλληλουχίας) προτιμάται ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης.

Με την εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου τα κλάσματα του DNA τα οποία διαθέτουν ένα συνολικό αρνητικό φορτίο κυρίως εκ του φωσφορικού σκελετού της αλυσίδας, μετακινούνται προς το θετικά φορτισμένο πόλο της ηλεκτροφορητικής συσκευής. Μεγαλύτερου μήκους τμήματα DNA μετακινούνται με μικρότερη ταχύτητα, επειδή συναντούν μεγαλύτερη αντίσταση κατά τη δίοδο τους από το τυχαίο, τρισδιάστατο δίκτυο που σχηματίζουν τα μόρια της αγαρόζης. Τα τμήματα αυτά του DNA καθίστανται εμφανή μετά από χρώση με ειδική φθορίζουσα χρωστική το βρωμιούχο εθίδιο. Μετά το διαχωρισμό των τμημάτων του DNA, το προϊόν της PCR μπορεί να ανιχνευθεί από το αναμενόμενο μέγεθος του, το

οποίο προσδιορίζεται από τη σύγκριση με τα τμήματα γνωστού μήκους του μάρτυρος DNA (DNA ladder) το οποίο ηλεκτροφορείται ταυτόχρονα.

### **Εφαρμογές PCR**

Η μοναδική ευαισθησία της τεχνικής επιτρέπει την ανίχνευση ελάχιστου ατόμου και κατακεραματισμένου DNA, όπως αυτό που λαμβάνεται από ιστούς μονιμοποιημένους σε φορμόλη και εμπυεδωμένους σε παραφίνη. Επιπροσθέτως εκτός από τις ιατρικές εφαρμογές, η τεχνική να χρησιμοποιείται στην εγκληματολογία (π.χ. ανάλυση ταυτότητας ατόμου από μία τρίχα ή μία κηλίδα αποξηραμένου αίματος) ή στην παλαιοντολογία (π.χ. για την ανάλυση υπολειμμάτων DNA σε υλικό απολιθωμάτων).

Η εξαιρετική ευαισθησία της τεχνικής PCR δημιουργεί και το μεγάλο μειονέκτημα της, δηλ. την εύκολη επιμόλυνση των δειγμάτων από προϊόν προηγηθείσας αντίδρασης PCR με τους ίδιους εκκινητές.

Κατωτέρω αναφέρονται εν συντομία οι σπουδαιότερες κλινικές εφαρμογές των τεχνικών που βασίζονται στην PCR<sup>13,15-17</sup>.

- 1) Ποιοτική και ποσοτική ανίχνευση ιών DNA και RNA (HPV, HCV, HBV, HSV, CMV, EBV)
- 2) Ανίχνευση βακτηριδίων (Μυκοβακτηρίδιο φυματίωσης, χλαμύδια, ουρεάπλασμα, μυκόπλασμα κλπ).
- 3) Ανίχνευση γονιδιακών μεταλλάξεων (BRCA1/2, p53, γονίδιο κυστικής ίνωσης).
- 4) Γονοτυπικός προσδιορισμός αντιγόνων ιστοσυμβατότητας (μεταμοσχεύσεις).
- 5) Προσδιορισμός δραστηριότητας της τελομεράσης (TRAP).
- 6) Αναζήτηση μονοκλωνικότητας Β και Τ

λεμφοκυττάρων μέσω του ανασυνδυασμού του γονιδίου του αντιγονικού των υποδοχέα.

### **ΕΙΔΙΚΟΙ ΤΥΠΟΙ PCR<sup>15-17</sup>**

#### **Αντίστροφης μεταγραφάσης PCR (Reverse Transcriptase PCR - RT PCR)**

Η εφαρμογή της τεχνικής αυτής αποσκοπεί στην μελέτη της γονιδιακής έκφρασης δεδομένου ότι επιτρέπει την ταχεία ανάλυση του αγγελιοφόρου RNA (mRNA). Σε μία τυπική αντίδραση RT-PCR το RNA απομονώνεται από τους ιστούς ή κύτταρα και το mRNA που βρίσκεται μέσα στο δείγμα μετατρέπεται στο συμπληρωματικό DNA (cDNA) με τη βοήθεια του ενζύμου αντίστροφη μεταγραφάσης. Το cDNA πολλαπλασιάζεται ακολούθως σε διάλυμα πολυμεράσης, δεοξυνουκλεοτιδίων και ειδικών εκκινητών.

Μία από τις σημαντικότερες εφαρμογές της μεθόδου είναι η ανίχνευση χημικών μεταγραφών που προκύπτουν από τις διαμεταθέσεις χρωμοσωμικών τμημάτων. Οι διαμεταθέσεις είναι γενετικά γεγονότα σημαντικά στην εξέλιξη νεοπλασμάτων συμπαγών οργάνων και αιματολογικών νοσημάτων. Αποτέλεσμα των διαμεταθέσεων αυτών είναι η δημιουργία γονιδίων από συγχώνευση με λειτουργικές ιδιότητες ογκογονιδίων, τα οποία δυνατόν να αποτελούν αρχικά ή πρώια γεγονότα στην εξέλιξη των όγκων αυτών.

Με τη βοήθεια της ανίχνευσης χημικών μεταγραφικών παραγώγων είναι δυνατή η πιστοποίηση τυχόν υπολειμματικής νόσου και επομένως η έγκαιρη διάγνωση τυχόν υποτροπής. Τέλος με την τεχνική RT-PCR είναι δυνατή η ανίχνευση RNA ιών (ρετροϊών) και η ποσοτικοποίηση του φορτίου αυτών (viral load) στα διάφορα βιολογικά υγρά, ώστε

να ελέγχεται η ανταπόκριση στη θεραπευτική αγωγή.

Σημαντικά μειονεκτήματα της μεθόδου είναι η μη δυνατότητα αναφοράς σε επιμέρους κυτταρικούς τύπους, λόγω καταστροφής της ιστικής μορφολογίας και η δυσκολία απομόνωσης mRNA σε ιστούς μονιμοποιημένους σε φορμόλη και εμπεδωμένους σε παραφίνη.

#### **Πολλαπλό PCR (Multiplex PCR)**

Η παραλλαγή αυτή της PCR χρησιμοποιείται για την ταυτόχρονη ανίχνευση δύο ή περισσότερων αλληλουχιών από ένα δείγμα DNA. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιούνται δύο ή περισσότερα ζεύγη εκκινητών, τα οποία απαραίτητως πρέπει να παράγουν διαφορετικού μήκους προϊόντα. Η επιτυχία της τεχνικής βασίζεται στη ρύθμιση των παραμέτρων της αντίδρασης, ώστε να αποφεύγεται ο επιλεκτικός πολλαπλασιασμός του ενός εκ των προϊόντων εις βάρος των άλλων.

#### **Φωλεακό PCR (nested PCR)**

Η μέθοδος αυτή θεωρείται ότι επαυξάνει την ευαισθησία και ειδικότητα της αντίδρασης PCR, γι' αυτό και χρησιμοποιείται κυρίως σε δείγματα που δεν έχουν καλή ποιότητα DNA (ή RNA). Η μέθοδος του φωλεακού PCR βασίζεται σε δύο διαδοχικές αντιδράσεις PCR. Η πρώτη αντίδραση PCR χρησιμοποιεί ένα εξωτερικό ζευγάρι εκκινητών (outer primers), ενώ η δεύτερη δύο φωλεακούς εκκινητές, οι οποίοι είναι εσωτερικοί στο πρώτο ζευγάρι (inner primers).

Το προϊόν της πρώτης αντίδρασης PCR χρησιμοποιείται ως δείγμα για την δεύτερη PCR που παράγει προϊόν μικρότερου μήκους από την πρώτη αντίδραση. Η αύξηση της ειδικότητας του φωλεακού PCR στηρίζεται στη διαδοχική χρήση δύο ζευγών εκκινητών, ενώ η μεγαλύτερη ευαισθησία προκύπτει από τον αυξημέ-



νο αριθμό κύκλων σε σχέση με τη συμβατική PCR.

#### **Ποσοτικό PCR (Quantitative PCR)**

Το ποσοτικό (ή διαφορικό) PCR βασίζεται στον παράλληλο πολλαπλασιασμό της αλληλουχίας στόχου συγχρόνως με μια γνωστή αλληλουχία αναφοράς. Η ικανότητα ποσοτικοποίησης του προϊόντος της PCR χρησιμοποιείται κυρίως για την εκτίμηση των του αριθμού των αντιγράφων ιών (ϊικό φορτίο), ώστε να αξιολογείται η θεραπευτική ανταπόκριση και η πρόγνωση ιογενών λοιμώξεων.

#### **PCR πραγματικού χρόνου (Real time PCR)**

Η τεχνική real time PCR, αντίθετα με την συμβατική PCR, δεν χρειάζεται περαιτέρω ανάλυση του προϊόντος της (π.χ. με ηλεκτροφόρηση). Ο λόγος είναι ότι η real time PCR χρησιμοποιεί φθορίζοντα μόρια μέσω των οποίων το προϊόν της αντίδρασης παρακολουθείται άμεσα κατά τη διάρκεια της σύνθεσης του. Τα πλεονεκτήματα της τεχνικής real time PCR είναι η μεγαλύτερη ευαισθησία ανίχνευσης, η υψηλή ταχύτητα της αντίδρασης, και η δυνατότητα ποσοτικοποίησης, ενώ μειονέκτημα αποτελεί το υψηλό κόστος συσκευής και αναλωσίμων.

### **ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ**

#### **Προσδιορισμός Αλληλουχίας (Sequencing)**

Η τεχνική προσδιορισμού της αλληλουχίας νουκλεοτιδίων αποτελεί τον πιο άμεσο τρόπο για τη μελέτη των μεταλλάξεων ή πολυμορφισμών ενός γονιδίου. Η τεχνική αυτή βασίζεται στον τερματισμό της επιμήκυνσης μιας αλληλουχίας με τη χρήση αποληκτικών διδοξυνουκλεοτιδίων.

Η PCR διευκόλυνε την εφαρμογή της τεχνικής σε κλινικά δείγματα χωρίς να είναι απαραίτητη προηγούμενη κλωνοποίηση ενός γονιδίου. Ο προσδιορισμός της αλληλουχίας των γονιδίων γίνεται σήμερα με μεγαλύτερη ευαισθησία και ταχύτητα με τη χρήση αυτοματοποιημένων τεχνολογιών που βασίζονται όμως πάντα στην κλασική μέθοδο του Sanger<sup>18,19</sup>.

#### **Πολυμορφισμός μήκους περιοριστικού κλάσματος (restriction fragment length polymorphism, RFLP)**

Η τεχνική αυτή χρησιμοποιεί περιοριστικά ένζυμα (περιοριστικές ενδοουκλεάσες) τα οποία κόβουν το DNA-στόχο, συνήθως προϊόν προηγούμενης PCR, σε κλάσματα διαφόρου μήκους, τα οποία μπορούν να διαχωριστούν ακολουθώντας με ηλεκτροφόρηση. Η τεχνική μας πληροφορεί για την παρουσία ή απουσία ενός στόχου για ένα περιοριστικό ένζυμο, συνήθως λόγω ενός πολυμορφισμού ή μιας συγκεκριμένης μετάλλαξης σε μια βάση.

Η πληροφορία που μας παρέχει η μέθοδος αυτή δεν είναι τόσο ακριβής όσο η ανάλυση της αλληλουχίας, αλλά είναι χρήσιμη για τον έλεγχο μιας γνωστής γενετικής ανωμαλίας (π.χ. γονίδιο κυστικής ίνωσης) ή την παρουσία μεταλλάξεων ή πολυμορφισμών (π.χ. ογκοκατασταλτικών γονιδίων) που μπορεί να έχουν προδιαθεσική επίδραση στην ανάπτυξη ενός τύπου καρκίνου. Τέλος, λόγω των διαφορών μεταξύ των ατόμων στην απόσταση μεταξύ των περιοριστικών θέσεων η μέθοδος RFLP χρησιμοποιείται και στις δοκιμασίες επιβεβαίωσης πατρότητας.

**Πολυμορφισμός διάταξης μονήρους αλυσίδας** (*Single strand conformation polymorphism, SSCP*)

Στην τεχνική αυτή το δείγμα DNA πολλαπλασιάζεται με PCR και το προϊόν αποδιατάσσεται σε μονήρεις αλύσους οι οποίες διαχωρίζονται με ηλεκτροφόρηση.

Η λογική της μεθόδου βασίζεται στο ότι η ταχύτητα ηλεκτροφόρησης των αλλοιωμένων μονόκλωνων αλύσεων είναι διαφορετική σε σχέση με την αντίστοιχη φυσιολογική αλληλουχία, λόγω των διαφορών στην τρισδιάστατη δομή του μορίου. Η τεχνική αυτή μπορεί να ανιχνεύσει ακόμη και διαφορές μίας βάσης με ευαισθησία που φθάνει το 99% και είναι ιδιαίτερα χρήσιμη για το αρχικό screening γονδιακών μεταβολών, ώστε να γίνει η κατάλληλη επιλογή του τμήματος για περαιτέρω λεπτομερή ανάλυση αλληλουχίας (sequencing).

**ARMS PCR** (*Amplification refractory mutation system*)

Η τεχνική αυτή απαιτεί την χρήση ειδικών μεταλλαγμένων και φυσιολογικών εκκινητών, οι οποίοι διαφέρουν μόνο κατά μια βάση στο 3' άκρο. Κάθε δείγμα πολλαπλασιάζεται και με τους δυο εκκινητές. Το φυσιολογικό δείγμα θα δώσει προϊόν με τον φυσιολογικό εκκινητή αλλά όχι με τον μεταλλαγμένο εκκινητή, ενώ το μεταλλαγμένο δείγμα το αντίθετο.

**Ανάλυση μικροσυστοιχιών** (*Microarrays, DNA chips*)

Η σπουδαιότερη επιστημονική επανάσταση των πρόσφατων χρόνων είναι η ανάπτυξη μικροσίπ εφοδιασμένων με νουκλεοτίδια, που επιτρέπουν ταχύτερες και ευρείας κλίμακας μελέτες γονιδίων. Τα συστήματα αυτά με βάση την αντίδραση υβριδισμού επιτρέπουν την

ανάλυση αλληλουχίας μεγάλου αριθμού επιλεγμένων γονιδίων και προσδιορισμό της έκφρασης αυτών σε επίπεδο mRNA. Η έκφραση και η αλληλεπίδραση επομένως χιλιάδων γονιδίων ταυτόχρονα μπορεί να μελετηθεί ποσοτικά και με ακρίβεια με τη βοήθεια ηλεκτρονικού υπολογιστή, εξασφαλίζοντας έτσι υψηλή ποιότητα και επαναληψιμότητα<sup>20,21</sup>.

Η τεχνολογία των μικροσυστοιχιών αναμένεται να αποτελέσει σύντομα πολύτιμο διαγνωστικό και ερευνητικό εργαλείο ιδιαίτερα στον τομέα της ογκολογίας. Στον τομέα των μικροσυστοιχιών έχουν αναπτυχθεί μέχρι σήμερα δύο βασικές εφαρμογές: 1) Ταυτοποίηση αλληλουχίας (γονίδια/μεταλλάξεις) και 2) Προσδιορισμός του επιπέδου έκφρασης των γονιδίων σε επίπεδο mRNA.

Από πλευράς τεχνικής υπάρχουν δυο παραλλαγές των μικροσυστοιχιών:

A) Το σύστημα που περιλαμβάνει δείκτες cDNA (500-5000 bp) εφαρμοσμένους σε μορφή μικροσκοπικών κηλίδων σε στερεά (γυάλινη) επιφάνεια με τη βοήθεια ρομπότ. Η μορφή αυτή αποτελεί το κλασικό σύστημα μικροσυστοιχιών DNA που αναπτύχθηκε από το πανεπιστήμιο Stanford<sup>22</sup>.

B) Το δεύτερο σύστημα περιλαμβάνει συστοιχίες ολιγονουκλεοτιδίων (20-80 βάσεις) ή δείκτες πεπτιδικών νουκλεϊνικών οξέων (PNAs) τα οποία είτε συντίθενται κατευθείαν επάνω στο τσιπ είτε συντίθενται πρώτα με το συμβατικό τρόπο και ακολούθως τοποθετούνται επάνω στο τσιπ. Το τσιπ των μικροσυστοιχιών εκτίθεται ακολούθως στο σημασμένο δείγμα DNA και μετά από υβριδισμό ανιχνεύεται ποσοτικά η έκφραση των συμπληρωματικών αλληλουχιών. Το σύστημα αυτό είναι το πα-

ραδοσιακό DNA chip που αναπτύχθηκε από την εταιρεία Affymetrix (*GeneChip*).

## **ΠΡΩΤΕΟΜΙΚΗ**

Οι περισσότερες από τις αναφερθείσες τεχνικές ασχολούνται με την αναζήτηση μεταλλάξεων σε επίπεδο DNA ή RNA. Θα πρέπει όμως να μην λησμονούμε ότι οι κυτταρικές λειτουργίες διενεργούνται μέσω των πρωτεϊνών. Οι μεταλλάξεις οι οποίες συμβαίνουν στα νουκλεϊικά οξέα οδηγούν συνήθως σε μεταλλαγμένες πρωτεΐνες. Όμως είναι δυνατόν μεταλλαγμένες πρωτεΐνες να προκύπτουν και σε μετα-μεταγραφικό στάδιο.

Ο στόχος της πρωτεομικής είναι να αναλύει μεγάλο αριθμό κυτταρικών πρωτεϊνών ταυτόχρονα και να προσδιορίζει αλλοιώσεις στο πρωτεϊνικό επίπεδο. Η πρωτεομική χρησιμοποιείται στον προσδιορισμό πρωτεϊνών οι οποίες εμφανίζουν μεταβολές στη λειτουργία ή τη δομή ανεξάρτητα από το αν οι αλλαγές αυτές προκύπτουν από βλάβη στο επίπεδο του DNA ή σε μετα-μεταγραφική τροποποίηση. Για παράδειγμα, αν ένα κύτταρο φέρει μία μετάλλαξη, η οποία καθιστά μία κινάση διαβιβαστή σήματος ανενεργό, η πρωτεομική χρησιμοποιείται για να προσδιορίσει όχι μόνον την κινάση αλλά και να και τις μη φωσφορυλιωμένες πρωτεΐνες της κατιούσας οδού μετάδοσης σήματος.

Οι περισσότερες μελέτες πρωτεομικής χρησιμοποιούν τη δύο διαστάσεων ηλεκτροφόρηση σε πολυακρυλαμίδη (2D-PAGE) και τη φασματομετρία μάζας. Περιληπτικά, η πρωτεΐνη απομονώνεται από τα κύτταρα ή τους ιστούς και διαμέσου συστημάτων 2D-PAGE σε συνδυασμό με φασματομετρικές τεχνικές διαχωρίζουν τις πρωτεΐνες βάσει του ισοηλεκτρικού τους σημείου και της μάζας τους. Τα αποτελέσματα συγκρίνω-

νται με αυτά των μαρτύρων ώστε να προσδιορισθούν οι πρωτεΐνες με αλωμένη ποσότητα ή θέση.

Άλλες σημαντικές τεχνικές της πρωτεομικής είναι η κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ και ο μαγνητικός πυρηνικός συντονισμός που χρησιμοποιούνται στον προσδιορισμό της τρισδιάστατης δομής πεπτιδίων ή πρωτεϊνών και η τομογραφία ακτίνων Χ που επιτυγχάνει την εντόπιση σημασμένων πρωτεϊνών ή πρωτεϊνικών συμπλεγμάτων εντός του ακέραιου κυττάρου.

Η πρωτεομική, αντίθετα με τη γονιδωματική της οποίας το αντικείμενο (γονιδίωμα) είναι σχετικά σταθερό, είναι περισσότερο περίπλοκη καθώς η πρωτεϊνική σύσταση διαφέρει από κύτταρο σε κύτταρο και μεταβάλλεται χρονικά συνεχώς ανάλογα με τις βιοχημικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ γονιδίων και περιβαλλοντικών παραγόντων. Σε επίπεδο οργανισμού δε η πρωτεϊνική έκφραση διαφέρει ριζικά ανάλογα με το στάδιο ανάπτυξης, τους επιμέρους ιστούς και όργανα και την παρουσία διαφορετικών περιβαλλοντικών επιδράσεων<sup>23</sup>.

## **ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΕΧΝΙΚΩΝ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΙΣΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ ΣΤΗΝ ΟΓΚΟΛΟΓΙΑ**

Στο κεφάλαιο αυτό θα προσπαθήσουμε να δώσουμε μια ιδέα για το πώς μπορούν να εφαρμοσθούν οι τεχνικές της ΜΠΠ για τη λύση προβλημάτων στους τομείς της ογκολογίας. Οι δυνατότητες των τεχνικών αυτών είναι εντυπωσιακές τόσο σε επίπεδο διερεύνησης των παθογενετικών μηχανισμών της καρκινογένεσης όσο και σε επίπεδο καθημερινής διαγνωστικής και θεραπευτικής αντιμετώπισης.

Η δυνατότης προσεγγίσεως των προβλημάτων της ογκολογίας με τη βοή-

θεια των τεχνικών της ΜΠΠ έχει πολλαπλά επίπεδα και επιτρέπει την αξιοποίηση κάθε υλικού για τη λήψη των απαραίτητων πληροφοριών. Ως παράδειγμα διαχείρισης αναφέρεται η πρωτεΐνη bcl-2 στο Β λέμφωμα.

Η πρωτεΐνη bcl-2, η οποία είναι αποφασιστικός παράγοντας αναστολής του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (απόπτωσης), αποτελεί τον πιο σημαντικό διαφοροδιαγνωστικό δείκτη για τη διάκριση καλοήθους λεμφοζιδιακής λεμφαδενικής υπερπλασίας και οζώδους Β λεμφώματος και επιπροσθέτως έχει σημαντική προγνωστική σημασία στα υψηλής κακοηθείας Β λεμφώματα. Δεδομένου ότι η υπερέκφραση της πρωτεΐνης bcl-2 είναι αποτέλεσμα της διαμετάθεσης t(14;18) η ανάλυση θα μπορούσε να γίνει σε επίπεδο DNA με PCR, εφόσον διαθέτουμε δείγμα φρέσκου ιστού εκ του λεμφώματος. Αν δεν διαθέτουμε φρέσκο ιστό μπορούμε να αναλύσουμε την έκφραση της πρωτεΐνης με ανοσοϊστοχημεία. Αν η μονιμοποίηση και επεξεργασία του υλικού δεν επιτρέπει την ορθή ανοσοϊστοχημική μελέτη λόγω της ιδιαίτερης ευαισθησίας των πρωτεϊνών, η ανάλυση του υλικού μπορεί να γίνει αποτελεσματικά σε επίπεδο διαμετάθεσης με πολυχρωματική τεχνική FISH, λόγω του καλλίτερα διατηρούμενου DNA.

Τέλος η ανάλυση μπορεί να γίνει παράλληλα τόσο σε επίπεδο πρωτεΐνης όσο και DNA με την εφαρμογή δύο η περισσότερων τεχνικών ανάλυσης, ώστε να ληφθούν λεπτομερέστερες και ασφαλέστερες πληροφορίες για τον σημαντικό αυτό παράγοντα.

## **ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΚΑΡΚΙΝΟΓΕΝΕΣΗΣ**

Η φυσιολογική ανάπτυξη των κυττάρων είναι αποτέλεσμα της αρμονικής

συνεργασίας τριών βασικών εξεργασιών, δηλ. του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, της κυταρικής διαφοροποίησης και του κυτταρικού θανάτου.

Ο καρκίνος προκαλείται από διαταραχή των ρυθμιστικών μηχανισμών του κυττάρου, η οποία έχει ως αποτέλεσμα τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό των νεοπλασματικών κυττάρων και ταυτόχρονα την αδυναμία ολοκλήρωσης του προγράμματος κυταρικής διαφοροποίησης. Λόγω των βασικών αυτών διαταραχών τα κύτταρα εμφανίζουν προϋούσα γονιδιακή αστάθεια, αδυναμία φυσιολογικής γήρανσης, και αποκτούν ικανότητα διήθησης στους γειτονικούς ιστούς. Η βιολογική συμπεριφορά των τροποποιημένων αυτών κυττάρων και η αντίδραση του ξενιστού είναι υπεύθυνες για το σύνολο των εκδηλώσεων της νεοπλασματικής νόσου.

Η κακοήθης εξαλλαγή, σύμφωνα με τα υπάρχοντα δεδομένα, οφείλεται σε σταδιακή συσσώρευση πολλαπλών αλλοιώσεων σε κρίσιμα γονίδια του κυττάρου. Οι αλλοιώσεις αυτές επισυμβαίνουν διαδοχικά για μακρό χρονικό διάστημα στα κύτταρα αλλά επιλεκτικά ένα συνήθως κύτταρο αποκτά ικανότητα ανεξέλεγκτου πολλαπλασιασμού και δημιουργεί μεγάλο αριθμό θυγατρικών κυττάρων με τα ίδια γενετικά χαρακτηριστικά.

Για το λόγο αυτό ο καρκίνος θεωρείται ότι έχει μονοκλωνική προέλευση. Οι σημαντικότερες γενετικές αλλοιώσεις για την κακοήθη εξαλλαγή των κυττάρων θεωρούνται οι μεταλλάξεις δύο βασικών ομάδων γονιδίων των ογκογονιδίων (π.χ. *ras*, *EGFR*, *erb-B*, *c-kit*) και των ογκοκατασταλτικών γονιδίων (π.χ. *p53*, *p21*, *retinoblastoma*).

Η σταδιακή συσσώρευση γενετικών

διαταραχών σε μορφολογικό επίπεδο αντιστοιχεί σε προκαρκινικές αλλοιώσεις διαφόρων οργάνων που χαρακτηρίζονται από τον όρο δυσπλασία. Η δυσπλασία αποτελεί ενδιάμεση κατάσταση μεταξύ του φυσιολογικού και του καρκινικού κυττάρου και ανάλογα με το βαθμό απόκλισης προς το τελευταίο ονομάζεται χαμηλόβαθμη ή υψηλόβαθμη.

Στο παχύ έντερο για παράδειγμα οι διάφοροι πολύποδες, οι οποίοι ιστολογικώς χαρακτηρίζονται ως αδενώματα, αποτελούν προκαρκινικές καταστάσεις, οι οποίες ανάλογα με το μέγεθος, τον τύπο και το βαθμό της δυσπλασίας έχουν μικρή ή μεγάλη πιθανότητα μετάπτωσης σε καρκίνωμα παχέος εντέρου, γι αυτό είναι προτιμότερο να αφαιρούνται έγκαιρα<sup>24</sup>.

## ΔΙΑΓΝΩΣΗ

Οι μοριακές τεχνικές μπορούν να συμβάλλουν αποφασιστικά στη διαγνωστική προσέγγιση ενός δείγματος, ιδίως σε περιπτώσεις όγκων με ασαφή μορφολογικά και ανοσοφαινοτυπικά χαρακτηριστικά. Μεταξύ των πλέον χρησιμών μοριακών δεικτών συγκαταλέγονται χρωμοσωματικές διαμεταθέσεις χαρακτηριστικές για ορισμένους όγκους, όπως το χρωματόσωμα της Φιλαδέλφειας που αποτελεί τη διαμετάθεση t(9;22) (q34;q11). Η διαμετάθεση αυτή ανιχνεύεται στο 95% των περιπτώσεων χρόνιας μυελογενούς λευχαιμίας με κυτταρογενετική, FISH, υβριδισμό κατά southern ή PCR. Επιπροσθέτως, ο δείκτης αυτός εκφράζεται σε ποσοστό 6-20% των παιδιών με οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία και σχετίζεται με χειρότερη πρόγνωση<sup>25</sup>.

Παρόμοια διαγνωστική προσέγγιση γίνεται για τη διάγνωση του λεμφώμα-

τος Burkitt, διάγνωση πολύ σημαντική καθ' όσον επιτρέπει την κατάλληλη θεραπευτική αντιμετώπιση αυτού του υψηλής κακοηθείας Β μη-Hodgkin λεμφώματος. Η ανάδειξη της διαμετάθεσης 8;14 σε ποσοστό 80-85% των περιπτώσεων ή των διαμεταθέσεων 2;8 και 8;22 σε ποσοστό 10% και 15% των περιπτώσεων αντίστοιχα, γίνεται με κυτταρογενετική, FISH, υβριδισμό κατά southern και PCR<sup>26,27</sup>.

Σε περιπτώσεις λεφοκυτταρικών αλλοιώσεων αμφίβολης ή οριακής σημασίας, η επιβεβαίωση της μονοκλωνικότητας του λεμφοκυτταρικού πληθυσμού με PCR είναι αποφασιστικής σημασίας για τη διάγνωση λεμφώματος. Στις περιπτώσεις αυτές η αναζήτηση της μονοκλωνικότητας γίνεται για τα Β λεμφοκύτταρα μέσω του ανασυνδυασμού του γονιδίου των βαρέων αλύσων των ανοσοσφαιρινών ενώ για τα Τ λεμφοκύτταρα μέσω του ανασυνδυασμού του γονιδίου του TCR<sup>28</sup>.

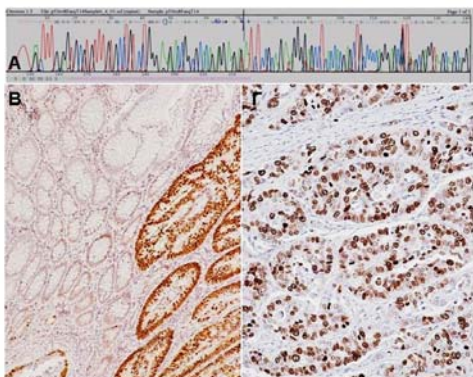
Οι όγκοι από μικρά σφαιροειδή κύτταρα αποτελούν μια ομάδα δυσδιάγνωστων νεοπλασμάτων της παιδικής ηλικίας. Ειδικές χρωματοσωματικές ανωμαλίες αποτελούν ιδιαίτερα χρήσιμα εργαλεία στη διαγνωστική προσέγγιση των όγκων αυτών. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η ισοσταθμισμένη διαμετάθεση t(11;22)(q24;q12), η οποία θεωρείται ειδική για το σάρκωμα Ewing και τους αρχέγονους νευροεξωδερματικούς όγκους (PNETs)<sup>29</sup>.

## ΣΤΑΔΙΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΠΡΟΓΝΩΣΗ

Ο ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών που σχετίζονται με τον κυτταρικό κύκλο, όπως η πρωτεΐνη Ki-67 χρησιμοποιείται ευρύτατα για τη μέτρηση του ποσοστού των νεοπλασματικών κυττάρων που πολλαπλασιάζονται. Στα λεμ-

φώματα αλλά και σε άλλους όγκους το υψηλό ποσοστό νεοπλασματικών κυττάρων σε φάση πολλαπλασιασμού αποτελεί παράγοντα κακής πρόγνωσης.

Γενετικές αλλοιώσεις του ογκοκατασταλτικού γονιδίου p53, που οδηγούν στην απώλεια της ρυθμιστικής του ικανότητας στον κυτταρικό κύκλο, σχετίζονται με φτωχότερη πρόγνωση σε καρκινώματα μαστού, παχέος εντέρου, προστάτου και ουροδόχου κύστεως (Εικόνα 4)<sup>30-32</sup>. Η ενίσχυση του ογκογονιδίου N-MYC, μαζί με τη πλοειδία και τη χρωμοσωματική απώλεια 1p, αποτελούν τις σπουδαιότερες προγνωστικές παραμέτρους στο νευροβλάστωμα<sup>33</sup>.



Εικόνα 4. Παράδειγμα ολοκληρωμένης ανάλυσης δεικτών πρόγνωσης p53 και Ki-67 σε καρκίνωμα παχέος εντέρου. Στην εικόνα Α παρίσταται η ανάλυση αλληλουχίας του γονιδίου p53 όπου βρέθηκε η παρουσία σημειακής μετάλλαξης στο κωδικόνιο 280. Αποτέλεσμα της σημειακής μετάλλαξης είναι η σταθεροποίηση της πρωτεΐνης p53 με αποτέλεσμα την έντονη ανίχνευση της σε υψηλό ποσοστό καρκινικών κυττάρων (δεξιό τμήμα της εικόνας Β) αντίθετα με το φυσιολογικό αδενικό επιθήλιο στο οποίο η ανοσοϊστοχημική χρώση δεν ανιχνεύεται. Λόγω της σημειακής μετάλλαξης η λειτουργικότης της πρωτεΐνης p53 αχρηστεύεται με αποτέλεσμα απώλεια της ρυθμιστικής της δράσης και επομένως υψηλό ποσοστό κυττάρων σε φάση πολλαπλασιασμού (Ki-67>80%, εικόνα Γ).

Η ανίχνευση με μοριακές τεχνικές κυκλοφορούντων νεοπλασματικών κυττάρων στο αίμα μπορεί να συμβάλλει αποφασιστικά στην πρόωπη ανίχνευση υποτροπής της νεοπλασματικής νόσου. Χαρακτηριστικά παραδείγματα τέτοιων εφαρμογών αποτελούν η ανίχνευση των mRNA της τυροσινάσης στο μελάνωμα, του PSA στο καρκίνωμα του προστάτου, της θυρεοσφαιρίνης στο καρκίνωμα θυρεοειδούς και του CEA σε καρκίνωμα στομάχου<sup>34-36</sup>.

Τέλος η αναζήτηση ελάχιστης υπολειπόμενης νόσου μετά θεραπεία λευχαιμιών και λεμφωμάτων (minimal residual disease) με τις μοριακές τεχνικές αποτελεί καθοριστικό στοιχείο για την στρατηγική αντιμετώπιση των αιματολογικών νοσημάτων<sup>27</sup>.

#### ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΠΡΟΔΙΑΘΕΣΗ ΚΑΙ ΠΡΩΙΜΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ

Κληρονομούμενες μεταλλάξεις σε κρίσιμα ογκοκατασταλτικά γονίδια έχουν ως συνέπεια τη γενετική προδιάθεση στην ανάπτυξη ορισμένων νεοπλασμάτων. Στον πίνακα 1 καταγράφονται τα σημαντικότερα γονίδια που σχετίζονται με κληρονομούμενη προδιάθεση για ανάπτυξη νεοπλασμάτων. Οι γενετικοί έλεγχοι για την ανίχνευση των κληρονομούμενων μεταλλάξεων επιτελούνται κατά κύριο λόγο σε άτομα υψηλού κινδύνου για ανάπτυξη των αντίστοιχων νεοπλασμάτων.

Τα πλεονεκτήματα τους είναι η ακριβέστερη εκτίμηση του κινδύνου νεοπλασίας για τα άτομα αυτά και τις οικογένειές τους και η μεγαλύτερη πιθανότητα ανίχνευσης του όγκου σε πρώιμο στάδιο. Τα μειονεκτήματα των γενετικών ελέγχων αποτελούν το υψηλό κόστος αυτών και της μετέπειτα παρακολούθησης των ασθενών, οι αβεβαιότητες όσον αφορά

την ανάπτυξη της νόσου, δηλ. σε ποιο όργανο και πότε θα εμφανισθεί και αν τελικά πράγματι θα αναπτυχθεί. Επιπροσθέτως υπάρχει προβληματισμός σχετικά με το ποια είναι η καλλίτερη μέθοδος για την πρόληψη του καρκίνου

σε φορείς μεταλλάξεων, τις αρνητικές ψυχολογικές συνέπειες, καθώς και πιθανές διακρίσεις σε βάρος του ατόμου όσον αφορά τα εργασιακά ή ασφαλιστικά του δικαιώματα<sup>37</sup>.

Πίνακας 1: Σημαντικότερα γονίδια που σχετίζονται με κληρονομική προδιάθεση για ανάπτυξη νεοπλασμάτων.

Νόσος	Νεόπλασμα	Γονίδιο
Κληρονομούμενος καρκίνος μαστού ή ωοθήκης	Μαστός, ωοθήκη, μήτρα προστάτης	BRCA1, BRCA2
Κληρονομούμενος μη πολυποειδής καρκίνος παχέος εντέρου	Παχύ έντερο, μήτρα	MLH1, MLH2
Πολλαπλή ενδοκρινική νεοπλασία 2 (MEN 2)	Μυελοειδές καρκίνωμα θυρεοειδούς, φαιοχρωμοκύτωμα	RET
Οικογενής πολυποδίαση παχέος εντέρου	Παχύ έντερο	APC
Σύνδρομο Li-Fraumeni	Εγκέφαλος, μαστός, σάρκωμα	p53
Οικογενές μελάνωμα	Μελάνωμα, πάγκρεας	p16

Αν και στο θέμα της κληρονομικής προδιάθεσης για ανάπτυξη νεοπλασματικών νόσων καταγράφεται σημαντικός προβληματισμός, η κατάσταση είναι διαφορετική όσον αφορά την πρόωμη διάγνωση σε κακοήθεις νεοπλασματικούς όγκους. Αφού είναι πλέον επιστημονικά αποδεδειγμένο ότι η δημιουργία και εξέλιξη της νεοπλασίας αποτελεί μια διαδικασία που αφορά το γονιδίωμα, είναι προφανές ότι η πρόωμη διάγνωση αυτής δεν μπορεί παρά να επιτευχθεί με τη βοήθεια τεχνικών μοριακής ανάλυσης του γενετικού υλικού.

Σημαντικά βήματα στην πρόωμη διάγνωση καρκινώματος ουροδόχου και παχέος εντέρου έχουν γίνει με την ανίχνευση διαταραχών των μικροδορυφορικών αλληλουχιών και της υπερέκφρασης της τελομεράσης σε αποπίπτοντα καρκινωμάτωδη κύτταρα στα ούρα και στα κόπρανα αντίστοιχα<sup>38,39</sup>. Δεδομένης της εύκολης διασποράς των καρκινωμα-

τωδών κυττάρων στα βιολογικά υγρά και των μέχρι τώρα ερευνητικών δεδομένων θεωρείται ιδιαίτερα πιθανό ότι οι τεχνικές της ΜΠΠ θα αποτελέσουν ένα πολύτιμο εργαλείο αναίμακτης πρόωμης διάγνωσης σε ένα σημαντικό αριθμό τύπων καρκίνου.

## ΑΝΤΑΠΟΚΡΙΣΗ ΣΤΗ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΗ ΑΓΩΓΗ

### Βιολογικές θεραπείες καρκίνου

Οι πρόσφατες εξελίξεις στον τομέα της μοριακής ογκολογίας οδήγησαν στην ανάπτυξη βιολογικών θεραπειών σε ορισμένους τύπους συμπαγών νεοπλασμάτων. Οι φαρμακευτικοί παράγοντες που χρησιμοποιούνται για το σκοπό αυτό τροποποιούν, αναστέλλουν ή παρεμβάλλονται στη λειτουργία ειδικών μοριακών στόχων καθοριστικής σημασίας για τη βιολογική κακοήθεια του όγκου και έτσι παράγουν το επιθυμητό κλινικό αποτέλεσμα. Τα σπουδαιότερα βιολογικά αντινεοπλασματικά φάρμακα

καταγράφονται στον πίνακα 2.

Η εφαρμογή στοχευμένης θεραπείας με trastuzumab (Herceptin) έναντι του υποδοχέα HER2 στον καρκίνο του μαστού, και μάλιστα υπό μορφήν επικουρικής αγωγής, έχει καταστήσει επιτακτική την

Πίνακας 2: Βιολογικά αντινεοπλασματικά φάρμακα εγκεκριμένα από τον Οργανισμό Φαρμάκων και τροφίμων των ΗΠΑ (FDA)

Όνομα	Τύπος	Στόχος	Ένδειξη (FDA)	Διαγνωστικό test
Trastuzumab (Herceptin)	Μονοκλωνικό αντίσωμα (IgG1)	HER2	Καρκίνωμα μαστού	<b>Ναι</b>
Cetuximab (Erbix)	Μονοκλωνικό αντίσωμα	EGFR	Καρκίνωμα παχέος εντέρου	<b>Ναι</b>
Bevacizumab (Avastin)	Anti-VEGF (ligand)	VEGF	Καρκίνωμα παχέος εντέρου	<b>Όχι</b>
Rituximab (Rituxan)	Μονοκλωνικό αντίσωμα (IgG1)	CD20	Μη-Hodgkin λέμφωμα	<b>Όχι</b>
Imatinib (Glivec)	2- phenylaminopyri-midine	c-Kit	Στρωματικά νεοπλασμάτα ΓΕΣ, ΧΜΛ	<b>Ναι</b>
Gefitinib (Iressa)	N-7-methoxy-6-quinazolin-4-amine	EGFR	Μη-μικροκυτταρικό καρκίνωμα πνεύμονα	<b>Ναι</b>
Erlotinib (Tarceva)	N-6,7-bis(2-methoxyethoxy)-4-quinazolinamine	EGFR	Μη-μικροκυτταρικό καρκίνωμα πνεύμονα	<b>Ναι</b>

Το 20-25% των γυναικών με καρκίνωμα μαστού υπολογίζεται ότι εμφανίζει πρωτεϊνική υπερέκφραση ή γονιδιακή ενίσχυση του HER2 και επομένως έχουν σημαντική πιθανότητα ανταπόκρισης στη βιολογική θεραπεία με Herceptin. Η ανοσοϊστοχημική ανίχνευση της υπερέκφρασης της πρωτεΐνης, αποτελεί μία χαμηλού κόστους ημιποσοτική μέθοδο η οποία δυστυχώς επηρεάζεται από πολλαπλές τεχνικές παραμέτρους (μονιμοποίηση και επεξεργασία ιστών, τεχνικές ανάκτησης αντιγονικότητας, ποικιλία αντισωμάτων) αλλά και από τις διαφορές στην αξιολόγηση των αποτελεσμάτων.

Σε προηγούμενες δημοσιεύσεις έχει βρεθεί ότι η υπερεισθησία του ευρέως χρησιμοποιούμενου πολυκλωνικού αντισώματος HercepTest–εγκεκριμένου από την επιτροπή τροφίμων και φαρμάκων

ανάγκη αναζήτησης της ιδανικής μεθοδολογίας για την ασφαλέστερη εξακρίβωση εκείνων των περιπτώσεων που πληρούν τις προϋποθέσεις για τη λήψη της θεραπευτικής αγωγής.

των ΗΠΑ (FDA) είχε ως συνέπεια ψευδώς θετικά αποτελέσματα σε ποσοστό μέχρι 50%.<sup>40,41</sup> Επιπροσθέτως, η μεταξύ των αξιολογητών διαφορά είναι ιδιαίτερα υψηλή σε ανοσοϊστοχημικές ομάδες 1+ ή 2+ με αποτέλεσμα η προβλεπτική αξία των να είναι ακατάλληλη για κλινική χρήση<sup>9</sup> και επομένως είναι επιβεβλημένη η παράλληλη αξιολόγηση του γονιδίου με την τεχνική του *in situ* υβριδισμού. Σε πρόσφατες μάλιστα μελέτες έχει βρεθεί ότι η ανάλυση του γονιδίου με *in situ* υβριδισμό υπερέχει της ανοσοϊστοχημείας στην επιλογή των ασθενών με καρκίνωμα μαστού που θα ωφεληθεί από τη θεραπεία με Herceptin<sup>42,43</sup>.

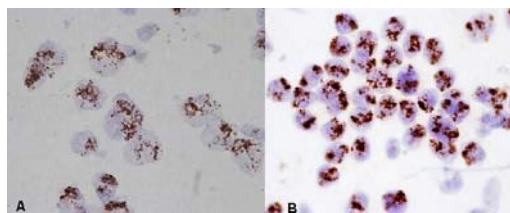
Ο έλεγχος της ενίσχυσης του γονιδίου HER2, υπεύθυνης σε ποσοστό >92% για την υπερέκφραση της πρωτεΐνης, με *in situ* υβριδισμό εφαρμόστηκε αρχικά με την φθορίζουσα παραλλαγή της μεθό-



δου, γνωστής ως FISH, και ακολούθως με την ενζυμική-χρωμογόνο μορφή (CISH).

Σε πολλές μελέτες παγκοσμίως έχει σήμερα άνευ αμφιβολίας καταδειχθεί ότι η τεχνική CISH έχει τουλάχιστον τον ίδιο βαθμό ευαισθησίας στην ανίχνευση της ενίσχυσης του γονιδίου<sup>44-48</sup>.

Επιπροσθέτως στις περισσότερες από τις παραπάνω δημοσιεύσεις έχουν σχολιασθεί τα σημαντικά πλεονεκτήματα της τεχνικής CISH έναντι της FISH και ειδικότερα της σαφούς υπεροχής στη διάκριση της μορφολογίας που επιτρέπει την συσχέτιση των ευρημάτων με τα ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά του όγκου και ειδικότερα αναφορικά με τη διάκριση του *in situ* από το διηθητικό καρκίνωμα, το μόνιμο σήμα, τη χρήση κοινού οπτικού μικροσκοπίου, το μικρότερο κόστος και την απλούστερη μεθοδολογία<sup>49</sup> (Εικόνα 5).



Εικόνα 5. Υψηλού βαθμού ενίσχυση γονιδίου HER2 σε καρκίνωμα μαστού με την τεχνική CISH. Α. Πολλαπλά αντίγραφα (20-40) ανά πυρήνα και Β. Μεγάλα γονιδιακά συμπλέγματα.

### Φαρμακογονιδιοματική

Με την τεχνολογία των μικροσυστοιχιών και με την επιλογή των κατάλληλων γονιδιακών *chips* μπορεί να προσδιορισθεί η πιθανότητα ανταπόκρισης του ασθενούς στην φαρμακευτική αγωγή σε σχέση με την έκφραση ομάδων γονιδίων. Τα γονίδια που χρησιμοποιούνται έχουν σχέση με το μεταβολισμό των φαρμάκων, τους μηχανισμούς πολυφαρμακευτικής αντίστασης, τους μη-

χανισμούς απόπτωσης κ.α. Το χρονικό αυτό διάστημα υπάρχουν 40 παραδείγματα ομάδων γονιδίων η έκφραση των οποίων σχετίζεται σε κλινικές δοκιμές με διάφορα θεραπευτικά πρωτόκολλα ώστε να διερευνηθεί η σημασία τους για πιθανή μελλοντική κλινική εφαρμογή.

Η φαρμακογονιδιοματική είναι το αποτέλεσμα της διασταύρωσης μεταξύ φαρμακευτικής και γενετικής και ασχολείται με τη μελέτη της επίδρασης του κληρονομούμενου γονιδιακού προφίλ κάθε ατόμου σε σχέση με την ανταπόκριση στα φάρμακα. Ο σκοπός της φαρμακογονιδιοματικής, η οποία ακόμα ευρίσκεται σε βρεφική φάση ανάπτυξης, είναι η εξατομίκευση της θεραπευτικής αγωγής ανάλογα με τη γενετική υποδομή του κάθε ατόμου ώστε να επιτευχθεί η μεγαλύτερη δυνατή αποτελεσματικότητα και η ελάχιστη τοξικότητα.

Ένα από τα μεγαλύτερα εμπόδια για την πρόοδο της φαρμακογονιδιοματικής είναι η ύπαρξη παραλλαγών της αλληλουχίας του DNA που ονομάζονται μονήρεις νουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί (Single nucleotide polymorphisms, SNPs). Δεδομένου ότι η συχνότητα των SNPs είναι 1 ανά 100-300 βάσεις, ο συνολικός αριθμός των SNPs που θα πρέπει να αναλυθεί στο DNA ενός ατόμου συνολικού μήκους 3 δισεκατομμυρίων βάσεων ανέρχεται σε μερικά εκατομμύρια. Επιπροσθέτως σημαντικό μειονέκτημα αποτελεί η περιορισμένη γνώση αναφορικά με το ποια γονίδια εμπλέκονται σε κάθε φαρμακευτική αντίδραση. Ο αριθμός των εμπλεκόμενων γονιδίων που πιθανόν να επηρεάζει τη φαρμακευτική ανταπόκριση ενός ατόμου είναι πιθανότατα μεγάλος και δεδομένης της ύπαρξης παραλλαγών της γονιδιακής αλληλουχίας, συμπεραίνεται ότι ο προσδιορι-

σμός της φαρμακευτικής ανταπόκρισης είναι μάλλον περίπλοκος και χρονοβόρος<sup>50</sup>.

### **Ιογενείς λοιμώξεις**

Οι περισσότεροι ιοί δεν ανιχνεύονται αξιόπιστα με ορολογικές μεθόδους ή καλλιέργειες. Η ανοσοϊστοχημική πιστοποίηση των αντιγόνων τους θεωρείται επίσης ανεπαρκής για διαφόρους λόγους, όπως η πλημμελής διατήρηση, ή απουσία του αντιγόνου, ιδιαίτερα σε περιπτώσεις λανθάνουσας ιογενούς λοίμωξης. Οι τεχνικές της ΜΙΠ, οι οποίες ανιχνεύουν άμεσα το γενετικό υλικό των ιών, θεωρούνται σήμερα ως οι πιο ευαίσθητες και αξιόπιστες για τη διάγνωση και τυποποίηση των ιογενών λοιμώξεων.

Η τεχνική που θα χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση του ιού θα εξαρτηθεί από το είδος του υλικού που είναι διαθέσιμο, την ευαισθησία που πιθανολογείται ότι απαιτείται και το είδος των πληροφοριών που θέλουμε συμπληρωματικά να συλλέξουμε. Ο *in situ* υβριδισμός, για παράδειγμα, θα είναι η τεχνική εκλογής για την ανίχνευση και τυποποίηση ιού ανθρώπινου θηλώματος (HPV) σε υπάρχουσα βιοψία με δυσπλασία τραχήλου ενώ η τεχνική PCR θα προτιμηθεί για τη γρήγορη ανίχνευση σε παρακέντηση εγκεφαλονωτιαίου υγρού ιών της ομάδας του έρπητος σε περίπτωση εγκεφαλίτιδας<sup>51</sup>.

Η εφαρμογή των μεθόδων υβριδισμού στην τυποποίηση των HPV συνέβαλε αποφασιστικά στην αναγνώριση της σημασίας ορισμένων τύπων (HPV υψηλού κινδύνου), στην ανάπτυξη υψηλού βαθμού ενδοεπιθηλιακής νεοπλασίας τραχήλου και διηθητικού καρκινώματος<sup>52-54</sup> και την πιθανή εμπλοκή τους στην παθογένεση προκαρκινικών αλ-

λοιώσεων και καρκινωμάτων πλακώδους επιθηλίου στο δέρμα και άλλα όργανα. Σημαντική υπήρξε επίσης η συμβολή των μοριακών τεχνικών στην ανάδειξη της σημασίας του EBV στην παθογένεση λεμφικών και επιθηλιακών νεοπλασμάτων<sup>55</sup>, καθώς και στον ποσοτικό προσδιορισμό του ιϊκού φορτίου (CMV, HCV, κλπ) στο αίμα ογκολογικών και συχνά ανοσοκατασταλμένων ασθενών.

### **ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ**

Το ευρύτατο φάσμα τεχνικών ανάλυσης που έχουν αναπτυχθεί τα τελευταία χρόνια έχει αυξήσει θεαματικά τις διαγνωστικές δυνατότητες της μοριακής ιστοπαθολογίας στην ογκολογία και της επιτρέπουν τη λύση των κλινικών προβλημάτων με πολλαπλούς εναλλακτικούς τρόπους. Οι τεχνικές της μοριακής βιολογίας μπορούν να θεωρηθούν ότι έχουν την ίδια βαρύτητα που είχε η ανακάλυψη του μικροσκοπίου τον 19ο αιώνα, με τη βοήθεια του οποίου ο Virchow εισήγαγε τη θεωρία ότι οι κυτταρικές αλλοιώσεις είναι υπεύθυνες για ανάπτυξη των νόσων. Με τις τεχνικές της μοριακής ανάλυσης η παθολογική ανατομική του 21ου αιώνα θα αξιοποιήσει τις γενετικές διαταραχές ως απαρχή για την ανάπτυξη των νεοπλασματικών παθήσεων, ώστε να θέσει τις βάσεις για μια ανανεωμένη και ευρύτερη θεώρηση των παθολογικών αλλοιώσεων.

Οι βελτιωμένες τεχνολογίες ανάλυσης προδιαθεσικών γονιδίων σε ομάδες ατόμων υψηλού κινδύνου θα συμβάλλουν στην ακριβέστερη εκτίμηση του κινδύνου ανάπτυξης κακοηθείας και στην πρόληψη, ή πρόωμη αντιμετώπιση της. Η περαιτέρω διάγνωση και τυποποίηση των νεοπλασμάτων θα γίνεται και με βάση το γενετικό προφίλ των νεοπλασμάτων, εκτός από την μορφολογική ε-

ξέταση. Το γενετικό προφίλ θα συμβάλει ουσιαστικά στην εφαρμογή μιας αναίμακτης πρώιμης διάγνωσης σε υλικό ελαχίστων νεοπλασματικών κυττάρων που θα αποπίπτουν στα βιολογικά υγρά του οργανισμού, η οποία θα ενσωματωθεί σταδιακά στις εξετάσεις check-up των ατόμων. Τέλος, η θεραπευτική προσέγγιση του ασθενούς θα είναι αδιανόητη χωρίς προηγούμενη ανάλυση της έκφρασης των γονιδίων που σχετίζονται με την ανταπόκριση στα αντινεοπλασματικά φάρμακα και επομένως θα εξατομικεύεται ανάλογα για τον καθένα.

Το μέλλον της ογκολογίας, με τη βοήθεια των τεχνικών μοριακής ανάλυσης, προβλέπεται συναρπαστικό και ιδιαίτερα αποτελεσματικό για την πρόληψη, πρώιμη διάγνωση, πρόγνωση και θεραπεία των νεοπλασματικών εξεργασιών. Απαραίτητος όμως όρος για την επιτυχία της εφαρμογής των τεχνικών αυτών είναι να χρησιμοποιούνται με αίσθημα ευθύνης, ειλικρινούς ενδιαφέροντος και προπαντός με ηθικά κριτήρια ώστε να υπηρετούν το ανθρωπινό πρόσωπο.

## **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

1. Herrington CS. In situ hybridization. *J Clin Pathol:Mol Pathol* 51:8-13,1998
2. Polak JM, McGee JO'D. In situ hybridization. Principles and practice. Oxford University Press, 1990
3. Καπράνος Ν. In situ υβριδισμός: Μια μοναδική μοροφολογική μέθοδος μοριακής βιολογίας με πολύτιμες κλινικές εφαρμογές. *Ιατρικό Βήμα* 76 (Ιούλ-Αυγ):16-22,2001
4. Kapranos NC. New methods of HPV identification. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 1992;1:145-152
5. Kontogeorgos G, Kapranos N, Orphanidis G, Rologis D, Kokka E. Molecular cytogenetics of chromosome 11 in pituitary adenomas: A comparison of fluorescence in

situ hybridization and DNA ploidy study. *Hum Pathol* 30:1377-1382,1999

6. Kapranos N, Kounelis S, Karantasis H, Kouri E. Numerical aberrations of chromosomes 1 and 7 by fluorescent in situ hybridization and DNA ploidy analysis in breast cancer. *Breast J* 11(6):448-53,2005.
7. Kontogeorgos G, Kapranos N, Thodou E. Practical Applications of the FISH Technique. In: *MORPHOLOGY METHODS: Cell and Molecular Biology Techniques*, Edited by Ricardo Lloyd, Humana Press, Totowa, New Jersey 2001
8. Komminoth P, Long AA. In situ polymerase chain reaction. An overview of methods, applications and limitations of a new molecular technique. *Virchows Arch [B]* 64: 67-73,1993.
9. Καπράνος Ν. In situ Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (In situ PCR). *Αρχαία Παθολογικής Ανατομικής*, Τόμος 11, (Παρ. 1):25-34,1997
10. Kapranos N, Kontogeorgos G, Horvath E, Kovacs K. Morphology, molecular regulation and significance of apoptosis in pituitary adenomas. *Front Horm Res* 32:217-34,2004
11. Καπράνος Ν. Απόπτωση. *Αρχαία Παθολογικής Ανατομικής*, Τόμος 11, (Παρ. 1): 65-76,1997
12. Corczyca W, Bedner E, Burfeind P, Darzynkiewicz Z, Melamed MR. Analysis of apoptosis in solid tumors by laser-scanning cytometry. *Mod Pathol* 11:1052-1058,1998
13. Mullis KB, Ferre F, Gibbs RA. The polymerase chain reaction. Birkhauser, 1994.
14. Stanta G, Schneider C. RNA extracted from paraffin-embedded human tissues is amenable to analysis by PCR amplification. *Biotechniques* 11:304-308,1991
15. Αναστασιάδου Κ, Καπράνος Ν. Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης και οι κλινικές της εφαρμογές. *Αρχαία Παθολογικής Ανατομικής* 12:100-108,1998
16. Denis Lo YM. Clinical Applications of PCR. Humana Press, 1998
17. Dieffenbach CW, Dveksler GS. PCR

- Primer: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Lab Press, 1995
18. Sudbery P. Human Molecular Genetics, Longman, 1998
  19. Nunnally BK. Analytical Techniques in DNA Sequencing. Taylor and Francis, 2005
  20. Basset DE Jr, Eisen MB, Boguski MS. Gene expression informatics—it's all in your mine. *Nat Genet* 21:51-55,1999
  21. Γιαννουλάτου Ε, Ροντογιάννη Δ. Μικροσυστοιχιές DNA. Διάγνωση και πρόγνωση νεοπλασιών βάσει της ανάλυσης δεδομένων. *Νοσοκομειακά Χρονικά* 2005; 67(2):259-71
  22. Ekins R, Chu FW. Microarrays: their origins and applications. *Trends in Biotechnology* 17: 217-218,1999
  23. Simpson RJ. Proteins and Proteomics: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Lab Press, 2002
  24. Coleman WB, Tsongalis GJ. Molecular diagnostics: for the clinical laboratorian. Humana Press, 2005
  25. Pasternak G, Hochhaus S, Schultheis B, Hehlmann R. Chronic myelogenous leukemia: molecular and cellular aspects. *J Cancer Res Clin Oncol* 124:643-660,1998
  26. Argyrakos T, Rontogianni D, Karmiris T, Kapsilamli V, Grigoriou E, Tsantekidou M, Naum C, Galani V, Pantelidaki C, Harhalakis N, Nikiforakis E. Blastic natural killer cell lymphoma. *Leuk Lymphoma* 2004 Oct 45(10):2127-33
  27. Sen F, Vega F, Medeiros LJ. Molecular Genetic methods in the diagnosis of Hematologic Neoplasms *Seminars in Diagnostic Pathology* 2002, 19(2):72-93
  28. Papiris SA, Kalomenidis I, Malagari K, Kapotsis GE, Harhalakis N, Manali ED, Rontogianni D, Roussos C, Moutsopoulos HM. Extranodal marginal zone B cell lymphoma of the lung in Sjogren's syndrome patients: Reappraisal of clinical, radiological and pathology findings *Respir Med* 2006 May 27(5):229-236
  29. Kumar S, Pack S, Kumar D, Walker R, Quezado M, Zhuang Z, Meltzer P, Tsokos M. Detection of EWS-FLI-1 fusion in Ewing's sarcoma/primitive neuroectodermal tumor by fluorescence in situ hybridization using formalin-fixed paraffin-embedded tissue. *Hum Pathol* 30:324-330,1999
  30. Esrig D, Elmajian D, Groshen S, Freeman JA, Stein JP, Chen SC, Nichols PW, Skinner DG, Jones PA, Cote RJ. Accumulation of nuclear p53 and tumor progression in bladder cancer. *N Engl J Med* 331(19):1259-64,1994
  31. Bergh J, Norberg T, Sjogren S, Lindgren A, Holmberg L. Complete zsequencing of the p53 gene provides prognostic information in breast cancer patients, particularly in relation to adjuvant systemic therapy and radiotherapy. *Nat Med* 1(10):1029-34,1995
  32. Kapranos N, Stathopoulos GP, Manolopoulos L, Kokka E, Papadimitriou C, Bibas A, Yiotakis J, Adamopoulos G. p53, p21 and p27 protein expression in head and neck cancer and their prognostic value. *Anticancer Res* 21:521-528,2001
  33. Gallego S, Parareda A, Munell F, Sanchez de Toledo J, Reventos J. Clinical relevance of molecular markers in neuroblastoma: results from a single institution. *Oncol Rep* 6(4):891-6,1999
  34. Ghossein RA, Osman I, Bhattacharya S, Ferrara J, Fazzari M, Cordon-Cardo C, Scher HI. Detection of prostatic specific membrane antigen messenger RNA using immunobead reverse transcriptase polymerase chain reaction. *Diagn Mol Pathol* 8(2):59-65,1999
  35. Ghossein RA, Coit D, Brennan M, Zhang ZF, Wang Y, Bhattacharya S, Houghton A, Rosai J. Prognostic significance of peripheral blood and bone marrow tyrosinase messenger RNA in malignant melanoma. *Clin Cancer Res* 4(2):419-28,1998
  36. Ringel MD, Balducci-Silano PL, Anderson JS, Spencer CA, Silverman J, Sparling YH, Francis GL, Burman KD, Wartofsky L, Ladenson PW, Levine MA, Tuttle RM. Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction of circulating thyroglobulin messenger ribonucleic acid for monitoring patients with thyroid carci-

- noma. *J Clin Endocrinol Metab* 84(11): 4037-42,1999
37. Ross J. Economic, regulatory and practice issues in molecular pathology and diagnostics. *Am J Clin Pathol* 112(Suppl.1): S7-S10,1999
  38. Schneider A, Borgnat S, Lang H, Regine O, Lindner V, Kassem M, Saussine C, Oudet P, Jacqmin D, Gaub MP. Evaluation of microsatellite analysis in urine sediment for diagnosis of bladder cancer. *Cancer Res* 15: 4617-22,2000
  39. Gelmini S, Crisci A, Salvadori B, Pazzagli M, Selli C, Orlando C. Comparison of telomerase activity in bladder carcinoma and exfoliated cells collected in urine and bladder washings, using a quantitative assay. *Clin Cancer Res* 6(7):2771-6,2000
  40. Jacobs TW, Gown AM, Yaziji H, Barnes MJ, Schnitt SJ. Specificity of HercepTest in determining Her-2/neu status of breast cancers using the United States Food and Drug Administration-approved scoring system. *J Clin Oncol* 17:1983-1987,1999
  41. Tubbs RR, Pettay JD, Roche PC, Stoler MH, Jenkins RB, Grogan TM. Discrepancies in clinical laboratory testing of eligibility for trastuzumab therapy; apparent immunohistochemical false-positive do not get the message. *J Clin Oncol* 19:2714-2721,2001.
  42. Seidman AD, Fournier MN, Esteva MJ, et al. Weekly trastuzumab and paclitaxel therapy for metastatic breast cancer with analysis of efficacy by HER 2 immunophenotype and gene amplification. *J Clin Oncol* 19:2578-95,2001
  43. Persons D, Tubbs R, Cooley L, Dewald G, Dowling P, Du E, Mascarello J, Rao K, Wilson K, Wolff D, Habegger-Vance G. HER-2 Fluorescence In Situ Hybridization. Results From the Survey Program of the College of American Pathologists. *Arch Pathol Lab Med* 130:325-331,2006
  44. Bilous M, Morey A, Armes J, Cummings M, Francis G. Chromogenic in situ hybridisation testing for HER2 gene amplification in breast cancer produces highly reproducible results concordant with fluorescence in situ hybridisation and immunohistochemistry. *Pathology* 38:120-124, 2006
  45. Gong Y, Gilcrease M, Sneige N. Reliability of chromogenic in situ hybridization for detecting HER-2 gene status in breast cancer: comparison with fluorescence in situ hybridization and assessment of interobserver reproducibility. *Mod Pathol* 1-7,2005
  46. Park K, Kim J, Lim S, et al. Comparing fluorescence in situ hybridization and chromogenic in situ hybridization methods to determine the HER2/neu status in primary breast carcinoma using tissue microarray. *Mod Pathol* 16:937-943,2003
  47. Arnould L, Denoux Y, McGrogan G, et al. Agreement between chromogenic in situ hybridization (CISH) and FISH in the determination of HER2 status in breast cancer. *Br J Cancer* 88:1587-1591,2003
  48. Gupta D, Middleton LP, Whitaker MJ, et al. Comparison of Fluorescence and Chromogenic In Situ Hybridization for Detection of HER-2/ neu Oncogene in Breast Cancer. *Am J Clin Pathol* 119:381-387,2003
  49. Kounelis S, Kapranos N, Malamos N, Kouri-Bairaktari E. Evaluation of HER2 gene status in breast cancer by chromogenic in situ hybridization: comparison with immunohistochemistry. *Anticancer Res* 25(2A):939-46,2005
  50. Evans WE, Johnson JA. Pharmacogenomics: the inherited basis for interindividual differences in drug response. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2: 9-39,2001.
  51. Kleinschmidt-DeMasters BK, Gilden DH. The expanding spectrum of herpesvirus infections of the nervous system. *Brain Pathol* 11:440-51,2001
  52. Lorincz AT, Reid R, Jenson A, Greenberg MD, Lancaster W, Kurman R. Human papillomavirus infection of the cervix: relative risk associations of 15 common anogenital types. *Obstet Gynecol* 79:328-37, 1992
  53. Koutsky LA, et al. A cohort study of the risk of cervical intraepithelial neoplasia grade 2 or 3 in relation to papillomavirus

infection. N Engl J Med 327:1272-1278,1992

54. Καπράνος Ν. Μαζικός έλεγχος HPV και καρκίνος τραχήλου μήτρας. Θέματα Μαιευτικής-Γυναικολογίας,2006,τ.1:26-33

55. Anagnostopoulos I, Hummel M. Epstein-Barr virus in tumors. Histopathology 29: 297-315,1996

## ΛΕΞΙΛΟΓΙΟ ΟΡΩΝ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΙΣΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ

**Αλληλουχία (Sequence).** Η σειρά εναλλαγής των τεσσάρων βάσεων του DNA η οποία καθορίζει και την γενετική πληροφορία.

**Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR).** Μέθοδος τεχνητής εκθετικής αύξησης του αριθμού γνωστής αλληλουχίας DNA με κυκλική εναλλαγή αποδιάταξης, προσκόλλησης των εκκινητών (primers) και σύνθεσης συμπληρωματικής αλληλουχίας με τη βοήθεια του ενζύμου DNA-πολυμεράση.

**Αλληλόμορφο (Allele).** Παραλλαγή ενός γονιδίου που εντοπίζεται στην ίδια θέση ενός χρωματοσώματος. Θεωρείται ότι προκύπτει από μετάλλαξη.

**Γονίδιο (Gene).** Η δομική και λειτουργική μονάδα της κληρονομικότητας. Καταλαμβάνει συγκεκριμένη θέση στο χρωματόσωμα και μπορεί να υπάρχει σε διάφορες αλληλομορφές.

**Γονιδίωμα (Genome).** Το σύνολο των γονιδίων ενός οργανισμού ή κυττάρου.

**Γονιδιωματική (Genomics).** Η συστηματική μελέτη του γονιδιώματος ενός οργανισμού και η λειτουργική σημασία των γονιδίων του. Η γονιδιωματική προσφέρει πολύτιμες λύσεις σε προβλήματα που αφορούν τη βιολογία, ιατρική και βιοτεχνολογία.

**Γονότυπος (Genotype).** Γενετική σύσταση ενός οργανισμού ή κυττάρου. Διάκριση από τα φαινομενικά χαρακτηριστικά (φαινότυπος)

**Δείκτης πυρηνικού οξέος (nucleic acid probe).** Γνωστή σημασμένη αλληλουχία DNA ή RNA που χρησιμοποιείται για να ανιχνεύει τη συμπληρωματική της με μεθόδους υβριδισμού.

**Δεσοξυριβοζονουκλεϊνικό οξύ (DNA).** Ένα πολυμερές νουκλεοτιδίων που συνιστά το γενετικό υλικό των κυττάρων και πολλών ιών. Αποτελείται από διπλή έλικα δύο αλυσίδων συνδεδεμένων με βάση τη συμπληρω-

ματικότητα των βάσεων: Η αδενίνη συνδέεται πάντα με τη θυμίνη και η γουανίνη πάντα με την κυτοσίνη. Η αλληλουχία των βάσεων καθορίζει και την πληροφορία.

**Δεσοξυριβοζονουκλεάση (DNase).** Ένζυμο της ομάδας των νουκλεασών, που καταλύει την υδρολυτική διάσπαση των φωσφοδιεστερικών δεσμών του DNA.

**Εκκινητής (primer).** Βραχεία αλληλουχία νουκλεοτιδίων που προσδιορίζει τη θέση ενίσχυσης του αριθμού αλληλουχιών DNA στην τεχνική PCR.

**In situ.** Λατινικός όρος που υποδηλώνει την εντόπιση ή θέση.

**Κλωνοποίηση (Cloning).** Η διαδικασία με την οποία δημιουργείται μεγάλος αριθμός πανομοιότυπων αντιγράφων τμήματος DNA (ή RNA) με τη βοήθεια μεθόδων ανασυνδυαζόμενου DNA (ή RNA).

**Μέθοδος Southern.** Ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός των τμημάτων του DNA που προκύπτουν από τη διάσπαση αυτού με περιοριστικές ενδονουκλεάσες, σε σταθερό υπόστρωμα. Τα κλάσματα του DNA μπορούν να μεταφερθούν σε μεμβράνη και να χρησιμοποιηθούν για υβριδισμό.

**Μετάλλαξη (Mutation).** Αλλαγή στη δομή του DNA ενός οργανισμού. Η αλλαγές αυτές είναι διαφόρων τύπων και συνήθως προκαλούν την παραγωγή πρωτεΐνης με διαφορές στη δομή και λειτουργία από την κανονική πρωτεΐνη.

**Μονήρεις νουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί (Single Nucleotide Polymorphisms, SNPs).**

Παραλλαγές της αλληλουχίας νουκλεοτιδίων του DNA που αφορούν διαφορά σε επίπεδο ενός νουκλεοτιδίου. Απαντούν σε συχνότητα μία SNP ανά 100-300 βάσεις, και αφορούν κωδικοποιούσες και μη κωδικοποιούσες περιοχές του DNA.

**Ογκογονίδιο (Oncogene).** Γονίδιο που συμβάλλει στην ανάπτυξη νεοπλασμάτων, συ-

νήθως με τη μετάλλαξη ή υπερέκφραση του. Η κανονική μορφή του γονιδίου επιτελεί φυσιολογική λειτουργία που σχετίζεται με τη ρύθμιση της αύξησης ή της διαφοροποίησης του κυττάρου.

**Ογκοκατασταλτικό γονίδιο (tumor suppressor gene, antioncogene).** Γονίδιο το οποίο συμμετέχει στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου. Μετάλλαξη ή γενικότερα αδρανοποίηση του γονιδίου αυτού συμβάλλει στον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό του κυττάρου και επομένως στην ανάπτυξη νεοπλασμάτων.

**Ογκοκατασταλτικές πρωτεΐνες (Oncosuppressor proteins).** Πρωτεΐνες των ογκοκατασταλτικών γονιδίων.

**Ογκοπρωτεΐνες (Oncoproteins).** Πρωτεΐνες των ογκογονιδίων.

**Πεπτιδικά νουκλεϊνικά οξέα (Peptide nucleic acids, PNAs).** Νουκλεϊνικά οξέα με χημική δόμη παρόμοια με το DNA ή το RNA αλλά με σκελετό αποτελούμενο από επαναλαμβανόμενες μονάδες N-(2-αμινοεθυλ)γλυκίνης συνδεδεμένες με πεπτιδικούς δεσμούς.

**Περιοριστικά ένζυμα (Restriction enzyme).** Ένζυμα της ομάδας των ενδονουκλεασών (περιοριστικές ενδονουκλεάσες) τα οποία κόβουν τους φωσφοδιεστερικούς δεσμούς του δίκλωνου DNA. Κάθε περιοριστικό ένζυμο αναγνωρίζει και κόβει μια συγκεκριμένη αλληλουχία 4-12 βάσεων μιας νουκλεοτιδικής αλληλουχίας η οποία ονομάζεται περιοριστική θέση (Restriction site).

**Περιοριστικά κλάσματα (Restriction fragments).** Τμήματα DNA που προκύπτουν από τη διάσπαση του από ένα περιοριστικό ένζυμο. Τα διαφόρου μήκους περιοριστικά κλάσματα μπορούν να αναλυθούν περαιτέρω με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.

**Πολυμορφισμός γονιδίου (Gene polymorphism).** Η παρουσία σε ένα πληθυσμό περισσότερων των δύο αλληλόμορφων ενός γονιδίου, εφ' όσον η συχνότητα των σπάνιων μορφών είναι μεγαλύτερη από αυτήν λόγω τυχαίας ανάπτυξη κάποιας μετάλλαξης (>1%).

**Πρωτεομική (Proteomics).** Ευρείας κλίμακας μελέτη των πρωτεϊνών αναφορικά με τη δο-

μή και τη λειτουργία τους.

**Ριβοζονουκλεϊνικό οξύ (RNA).** Πολυμερές μόριο με μονή αλυσίδα νουκλεοτιδίων που διαφέρει από το DNA στο ότι περιέχει ριβόζη αντί δεσοξυριβόζη και ουρακίλη αντί θυμίνη. Τα διάφορα μόρια RNA έχουν πολύπλευρη λειτουργία που μπορεί να είναι πληροφοριακή, δομική ή ενζυματική.

**Ριβοζονουκλεάση (RNase).** Ένζυμο της ομάδας των νουκλεασών που καταλύει τη διάσπαση του RNA σε μικρότερα τμήματα. Οι ριβοζονουκλεάσες είναι εξαιρετικά συχνές στο περιβάλλον με αποτέλεσμα βραχεία επιβίωση του RNA.

**Τελομεράση (Telomerase).** Ιδιαίτερος τύπος DNA-πολυμεράσης ο οποίος χρησιμεύει για την επιμήκυνση των άκρων των χρωματωσμάτων (τελομερών).

**Υβρίδιο (Hybrid).** Το προϊόν της αντίδρασης υβριδισμού.

**Υβριδισμός (Hybridization).** Η αλληλεπίδραση μεταξύ συμπληρωματικών βάσεων αλληλουχιών πυρηνικών οξέων προς σχηματισμό δίκλωνου μορίου.

**Υβριδισμός dot blot.** Μέθοδος υβριδισμού πυρηνικών οξέων σε σταθερό υπόστρωμα χωρίς προηγούμενη διάσπαση του DNA με περιοριστικά ένζυμα και ηλεκτροφόρηση.

**Υβριδισμός in situ (In situ hybridization).** Μέθοδος υβριδισμού πυρηνικών οξέων σε ακέραια κύτταρα ή ιστούς που επιτρέπει τη συσχέτιση των ευρημάτων με τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των κυττάρων.

**Φαινότυπος (Phenotype).** Τα φαινομενικά χαρακτηριστικά ενός κυττάρου (ή οργανισμού) σε ένα δεδομένο (μικρο)περιβάλλον.

**Φθορίζον in situ υβριδισμός (Fluorescent in situ hybridization, FISH).** Τεχνική υβριδισμού που εντοπίζει ένα γονίδιο ή ένα τμήμα χρωματώματος στο κύτταρο ή στο χρωματώσωμα που αντιστοιχεί. Η ανίχνευση του σήματος υβριδισμού γίνεται με μικροσκοπία φθορισμού. Υπάρχει σήμερα και παραλλαγή της τεχνικής που γίνεται σε κανονικό οπτικό μικροσκόπιο και ονομάζεται χρωμογόνο in situ υβριδισμός (CISH).

**Χρωμόσωμα (Chromosome).** Μορφολογικός όρος ο οποίος περιγράφει την οργάνωση του

DNA των ευκαρυωτικών οργανισμών. Κάθε χρωμόσωμα περιλαμβάνει μεγάλο αριθμό γονιδίων, και κάθε γονίδιο καταλαμβάνει

σταθερή θέση στο χρωμόσωμα. Η εμφάνιση των χρωμοσωμάτων μεταβάλλεται δραματικά στις διάφορες φάσεις του κύκλου του κυττάρου.