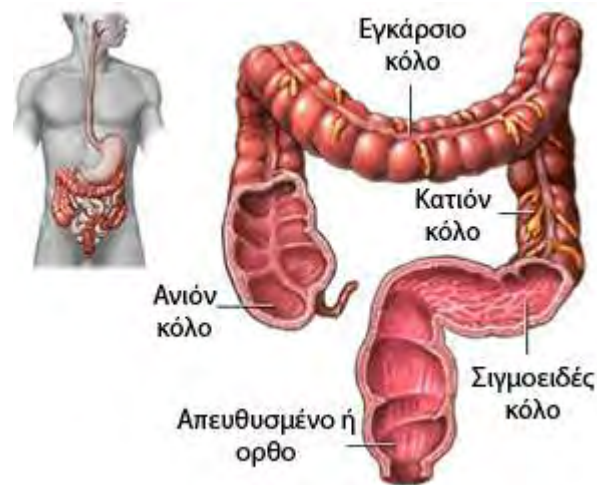




**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**



**ΤΙΤΛΟΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ
ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ ΤΟΥ
ΓΟΝΙΔΙΟΥ K-RAS ΜΕ ΤΗΝ ΧΡΗΣΗ ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΩΝ
ΤΟΜΩΝ ΚΑΙ ΙΣΤΙΚΩΝ ΜΙΚΡΟΣΥΣΤΟΙΧΕΙΩΝ ΜΕ
ΤΗΝ ΧΡΗΣΗ REAL TIME PCR ΚΑΙ SEQUENCING**

Ρόκα Αθανασία

Λάρισα 2011

Τριμελής Επιτροπή

κ. Κουρέτας Δημήτριος

κα Λιαδάκη Καλλίοπη

κ. Στάγκος Δημήτριος

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή μου κ. Κουρέτα για την ανάθεση της πτυχιακής αλλά και για την συγκατάθεση του ώστε η πτυχιακή αυτή να γίνει στον Ν.Ι.Μ.Τ.Σ. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον διευθυντή του παθολογοανατομικού τμήματος του Ν.Ι.Μ.Τ.Σ τον κ. Καραμέρη που με δέχτηκε στο τμήμα του και στο εργαστήριο του προκειμένου να μπορέσω να πραγματοποιήσω την διπλωματική μου εργασία, καθώς και για την πολύτιμη βοήθεια του και την καθοδήγηση του κατά τη διάρκεια αυτής. Θα ήθελα να ευχαριστήσω και τους δύο κυρίους για την πολύτιμη βοήθεια τους κατά την διόρθωση της.

Ακόμα, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κα Τζουμακάρη και τον κ. Βιλαρά, για την υπομονή τους, τις γνώσεις που μου προσέφεραν, τις συμβουλές τους και την πολύτιμη βοήθεια τους κατά τη διάρκεια του εργαστηριακού πειράματος.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλο το προσωπικό του τμήματος αυτού που με δέχτηκαν και με βοήθησαν προκειμένου να ολοκληρώσω την εργασία αυτή, έχοντας μια ευχάριστη συνεργασία.

Περιεχόμενα

ΣΚΟΠΟΣ.....	Σελ.3
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	Σελ.3-4
1.1 Πρωτεΐνες RAS.....	Σελ.4-5
1.2 Υποοικογένειες του γονιδίου Ras.....	Σελ.5-6
1.3 Δομή του γονιδίου K-Ras.....	Σελ.6-7
1.4 Ενεργοποίηση των πρωτεϊνών RAS.....	Σελ.8-9
1.5 Μονοπάτι μεταγωγής σήματος RAF/MEK/ERK σχετιζόμενο με την πρωτεΐνηRAS.....	Σελ.9-12
1.6 Μονοπάτι μεταγωγής σήματος RAS/RAL.....	Σελ.12-13
1.7 Μονοπάτι μεταγωγής σήματος PI3K.....	Σελ14-15
1.8 Τα μονοπάτια σηματοδότησης RAS/NORE1 και RAS/RASSF1....	Σελ.16-18
1.9 Δομή και κυτταρική εντόπιση των πρωτεϊνών RAS.....	Σελ.18-21
2. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ.....	Σελ.22
2.1 Τεχνική της Real – Time PCR.....	Σελ.22
2.1.1 Γενικά της τεχνικής αυτής.....	Σελ.22-23
2.1.2 Εισαγωγή στη Real- Time PCR.....	Σελ23-24
2.1.3 Real Time PCR: Η Διαδικασία.....	Σελ.25
2.1.4 Ανίχνευση με χρήση ειδικών στόχων με συγκεκριμένους ανιχνευτές.....	Σελ.26-29
2.1.5 Εφαρμογές της Real Time PCR.....	Σελ.30
2.1.6 Real Time PCR VS Παραδοσιακή PCR.....	Σελ.30
2.1.7 Περιορισμοί του τελικού σημείου PCR.....	Σελ.30-31
2.1.8 Χρήση της τεχνικής της K-Ras στο παχύ έντερο.....	Σελ31
2.1.9 Μεταλλάξεις K-Ras που ανιχνεύονται με την τεχνική αυτή..	Σελ31-32
2.1.10 Τεχνολογικές αρχές.....	Σελ.32-34
2.1.11 Παράμετροι Κύκλων.....	Σελ34
2.1.12 Παραστάσεις που παίρνουμε από την Real time PCR και η ανάλυση τους.....	Σελ.34-36
2.2 Τεχνική του Sequencing.....	Σελ37
2.2.1 Εισαγωγή.....	Σελ37
2.2.2 Χρήση της τεχνικής αυτής.....	Σελ.38
2.2.3. Δυσκολίες που παρουσιάστηκαν κατά την ανάπτυξη της τεχνικής αυτής.....	Σελ.38-40
2.2.4 Η αλληλούχιση συζευγμένων άκρων συμβάλλει στην αποφυγή λαθών κατά τη συναρμολόγηση των αναγνώσεων αλληλουχίας.....	Σελ.40-42

2.2.5 Για την αλληλούχιση ενός γονιδιώματος απαιτείται τεράστιος αριθμός αντιδράσεων.....	Σελ.42-44
2.2.6 Οι φθορίζουσες χρωστικές και η ηλεκτροφόρηση σε αυτόματους αναλυτές έφεραν επανάσταση στην αλληλούχιση του DNA.....	Σελ.44-46
2.2.7 Υπολογιστικοί αλγόριθμοι αναγνωρίζουν την ταυτότητα των βάσεων αναλύοντας τα δεδομένα που παράγει η συσκευή αλληλουχίας.....	Σελ.46-48
2.2.8 Είδη μεταλλάξεων που μπορεί να ανιχνεύσει η τεχνική.....	Σελ.48-49
3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	Σελ.50
3.1 Πρωτόκολλο.....	Σελ.50
3.2 Υλικά που χρησιμοποιήσαμε και για τις δυο τεχνικές.....	Σελ.50-51
3.3 Μηχανήματα που χρησιμοποιήσαμε.....	Σελ.51-52
3.4 Ανάλυση των δυο τεχνικών που χρησιμοποιήσαμε κατά το πείραμα μας.....	Σελ.52-53
3.5 Αναλυτικά τα βήματα της RT-PCR.....	Σελ.53-54
3.5.1 Ανάλυση δειγμάτων.....	Σελ.54
3.5.2 Χαρακτηριστικά απόδοσης ανάλυσης.....	Σελ.54-55
3.5.3 Ερμηνεία δεδομένων.....	Σελ.55
3.6 Αναλυτικά τα βήματα της Sequencing.....	Σελ.55-58
3.7 Ερμηνεία αποτελεσμάτων με την χρήση της Sequencing.....	Σελ.58-62
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	Σελ.63
4.1 Τα δείγματα μας.....	Σελ.63
4.2 Προβλήματα που αντιμετωπίσαμε.....	Σελ.63-64
4.3 Μετρήσεις των δειγμάτων μας και υπολογισμοί.....	Σελ.64-78
4.4 Συζήτηση αποτελεσμάτων.....	Σελ.78
Real Time PCR.....	Σελ.78-84
Sequencing.....	Σελ.84-86
Περίληψη.....	Σελ.87
Abstract.....	Σελ.88
BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	Σελ.89-90

ΣΚΟΠΟΣ

Στόχος μας στην εργασία αυτή είναι η μελέτη των μεταλλάξεων του γονιδίου της K-Ras με την χρήση τριών τεχνικών προκειμένου να επιλεγεί η πιο αξιόπιστη, γρήγορη και ταυτόχρονα πιο οικονομική διαδικασία. Χρησιμοποιούμε δυο ειδών υλικά: το πρώτο είναι ιστολογικές μικροσυστοιχίες (core) και το δεύτερο είναι ιστολογικές τομές. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται με τρεις τεχνικές: η πρώτη είναι η Αλυσιδωτή αντίδραση Πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (Real Time PCR), η δεύτερη είναι η αλληλούχιση του DNA (sequencing) και η τρίτη είναι το Medine Machine.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο καρκίνος είναι μια νόσος που μαστίζει στις μέρες μας. Αποτελεί έναν από τους πιο σοβαρούς λόγους που καθημερινά χάνονται αρκετοί άνθρωποι. Ωστόσο γίνονται συνεχώς έρευνες προκειμένου να καταφέρουν οι επιστήμονες να καταπολεμήσουν την νόσο αυτή. Μια μορφή καρκίνου την οποία θα μελετήσουμε εκτενέστερα σε αυτό το άρθρο είναι ο καρκίνος του παχέος εντέρου. Η μορφή αυτή καρκίνου θεωρείται από τα συχνότερα νεοπλάσματα στον άνθρωπο, αφού αποτελεί τον τρίτο τύπο καρκίνου στο Δυτικό κόσμο. Περίπου 1.000.000 νέες περιπτώσεις καρκίνου παχέος- ορθού εμφανίζονται, παγκοσμίως, κάθε χρόνο, ενώ περίπου 500.000 άνθρωποι πεθαίνουν, ετησίως, λόγω της συγκεκριμένης κακοήθειας. Επιπλέον, ο μεταναστευτικός τύπος χαρακτηρίζεται από μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων σε άλλα όργανα, όπως ήπαρ, πνεύμονες και ωοθήκες. Στους ασθενείς που πάσχουν από ορθοκολικό καρκίνο, περίπου το 19% εμφανίζει μεταστατική νόσο στη διάγνωση, ενώ περίπου το 50% θα αναπτύξει μεταστάσεις κατά τη διάρκεια της νόσου.

Βασικοί λόγοι που μπορούν να οδηγήσουν στην εμφάνιση αυτού του τύπου καρκίνου είναι πολλοί. Φυλετικές και εθνολογικές διαφορές καθώς και περιβαλλοντικές επιδράσεις σχετίζονται με διαφορές στην επίπτωση του νεοπλάσματος. Ο καρκίνος παχέος-ορθού είναι το επιφανόμενο μιας πολυδιάστατης διεργασίας. Η απενεργοποίηση του γονιδίου APC (Adenomatous Polyposis Coli), διαταραχές της μεθυλίωσης του DNA, η ενεργοποίηση των ογκογονιδίων RAS, η απώλεια του γονιδίου DCC (deleted in colon cancer), η αδρανοποίηση μέσω απόλειψης του p53, ο ρόλος των μεταλλακτικών γονιδίων

MMR αλλά και επιπρόσθετες μεταλλάξεις, είναι βήματα που επάγουν την καρκινογένεση και συνεισφέρουν στην κακοήθη συμπεριφορά.

Σύμφωνα με όλους τους παραπάνω λόγους εμφάνισης του καρκίνου του παχέος εντέρου, το άρθρο αυτό αναφέρεται σε έναν από τους λόγους αυτούς που είναι η ενεργοποίηση των ογκογονιδίων RAS.

1.1 Πρωτεΐνες RAS

Οι πρωτεΐνες Ras, συχνά αναφέρονται ως προϊόντα πρώτο-ογκογονιδίων, γιατί αρχικά είχαν ανακαλυφθεί ως τα μετασχηματισμένα προϊόντα¹⁻² μιας ομάδας συγγενικών ρετροϊών, συμπεριλαμβανομένων του ιού Harvey των τρωκτικών (H)³ και του ιού Kristen του σαρκώματος (K)⁴. Τα μετασχηματισμένα γονίδια των τρωκτικών, αποτελούν συγχώνευση του ιικού γονιδίου gag (glycosylated antigen: είναι το γονίδιο που κωδικοποιεί το εσωτερικό καψίδιο του ιικού μορίου crk: c10 ρυθμιστής της κινάσης) και ενός από τα γονίδια Ras που προέρχεται από ποντίκια, τα οποία έχουν μολυνθεί από τον ιό.

Η N-Ras, ανακαλύφθηκε σε μια κυτταρική σειρά νευροβλαστώματος ως προϊόν μετασχηματισμένου γονιδίου, που είχε ομόλογη αλληλουχία με αυτή των υπόλοιπων πρωτεϊνών Ras⁵⁻⁶. Οι πρωτεΐνες Ras είναι όλες μονομερείς πολυπεπτιδικές αλυσίδες, 189 αμινοξέων, οι οποίες δεσμεύονται στις πλασματικές μεμβράνες των κυττάρων με λιπιδικούς μεταμεταφραστικούς συνδέσμους στο C-άκρο (Πίνακας 1). Δεσμεύουν όλες νουκλεοτίδια γουανίνης (GTP και GDP) και είναι GTPάσες⁷⁻⁸. Στοιχεία για τη σύνδεση τους με τους ανθρώπινους όγκους, βρέθηκαν με την ανακάλυψη ότι ινοβλάστες σε καλλιέργεια, επιμολυσμένοι με DNA, το οποίο προέρχεται από μια κυτταρική σειρά ανθρώπινου όγκου, περιέχουν μια μεταλλαγμένη μορφή των Ras⁹. Επίσης εντοπίζονται στην κυτταρική μεμβράνη και σε ενδομεμβράνες και λειτουργούν ως μοριακοί διακόπτες για ποικίλα μεταγωγικά μονοπάτια. Κατ' αυτό τον τρόπο ρυθμίζουν διάφορες πλευρές της κυτταρικής συμπεριφοράς, όπως τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση, τη γήρανση, την κυτταρική κινητικότητα, την απόπτωση και την επιβίωση. Το τελικό αποτέλεσμα της RAS – εξαρτώμενης ενεργοποίησης μονοπατιών σηματοδότησης εξαρτάται από τον κυτταρικό τύπο και το βιολογικό περιεχόμενο του κυττάρου. Σε κάθε

περίπτωση το τελικό αποτέλεσμα καθορίζεται από το μέγεθος, τη διάρκεια και τον εντοπισμό της ενεργοποίησης της RAS, καθώς και από την ισορροπία των θετικών και αρνητικών μεταγωγικών σημάτων.⁽¹⁰⁾

Σε μια υψηλή αναλογία ανθρώπινων όγκων, μια μορφή των Ras τροποποιείται από σωματικές μεταλλάξεις, οι οποίες αναστέλλουν το ρυθμό υδρόλυσης του GTP⁽¹¹⁾. Αυτό επιβεβαιώνει ότι βρίσκονται σε μια διαρκώς ενεργοποιημένη κατάσταση.

GTPάση	Αλληλουχία Στόχος	Τροποποίηση
H-Ras	CVLS	Φαρνεσύλιο
N-Ras	CVVM	Παλμιτοϋλιο
K-Ras	CVIM	Φαρνεσύλιο
Rho,Rac	CXXL	Γεραυλογερανύλιο
Rab	CC/CxC	Γεραυλογερανύλιο
ARF	N-τελικό άκρο γλυκίνης	Μυριστούλιο

Πίνακας 1: Μετα-μεταφραστικές λιπιδιακές τροποποιήσεις μονομερών GTPασών

1.2 Υποικογένειες του γονιδίου Ras

Κάθε κύτταρο θηλαστικού περιέχει τρία πρώτο-ογκογονίδια RAS (H, K και N), τα οποία κωδικοποιούν τέσσερις συγγενείς αλλά όχι ταυτόσημες πρωτεΐνες, τις Ha-RAS, N-RAS, Ki-RAS4A και Ki-RAS4B. Το γονίδιο Ki-RAS υπόκειται στη διαδικασία εναλλακτικού ματίσματος, με αποτέλεσμα τη δημιουργία των πρωτεϊνών Ki-RAS4A και Ki-RAS4B. Μια από τις πιο σημαντικές πτυχές των πρωτεϊνών RAS είναι ότι εμπλέκονται σε περισσότερο από 30% των καρκίνων του ανθρώπου, ενώ στον καρκίνο του παχέος εντέρου φέρονται να έχουν ογκογόνες μεταλλάξεις στο 50% των περιπτώσεων. Μελέτες σε διαγονιδιακά ποντίκια αποκάλυψαν ότι η Ki-RAS έχει βιολογικές ιδιότητες που δεν μπορούν να αντισταθμιστούν από τις πρωτεΐνες Ha- και N-Ras παράλληλη την ύπαρξη ~85% ομολογίας μεταξύ των τριών αυτών πρωτεϊνών. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε ότι τα ποντίκια Ki-Ras^{-/-} δεν είναι βιώσιμα καθότι πεθαίνουν κατά τη διάρκεια της πρώιμης εμβρυϊκής ανάπτυξης⁽¹²⁾, σε αντίθεση με τα ποντίκια H-Ras^{-/-} και N-Ras^{-/-} που επιβιώνουν μέχρι την ενηλικίωση⁽¹³⁾. Αντίστοιχα,

διαγονιδιακά ποντίκια τα οποία εκφράζουν την ογκογόνο μορφή της Ki-Ras (Ki-RasV12) δεν είναι βιώσιμα, ενώ η έκφραση της H-RasV12 δίνει βιώσιμα ποντίκια που παρουσιάζουν προβλήματα στην ανάπτυξη και με αυξημένη συχνότητα διαφόρων τύπων νεοπλασιών.

Οι πρωτεΐνες Ras ανήκουν σε μια μεγάλη υπεροικογένεια που τα μέλη της παρουσιάζουν αρκετή ομολογία με την αλληλουχία της. Μέσα στην υπεροικογένεια αυτή χωρίζονται σε ξεχωριστές ομάδες, οι οποίες ονομάζονται Ras, Rho, Rab, Ran και Arf. Μέσα σε κάθε υποοικογένεια, οι ομολογίες είναι περισσότερο ισχυρές. Ωστόσο όμως, όλες οι πρωτεΐνες Ras μοιράζονται μερικές περιορισμένες ομόλογες αλληλουχίες με μικρά μοτίβα που συναντώνται σε βακτηριακούς παράγοντες επιμήκυνσης. Επιπλέον, η παρουσία των β-αλυσίδων δίπλα στα υψηλά συντηρημένα μοτίβα, αποτελεί μια αμετάβλητη δομή, που είτε πρόκειται για πρωτεΐνες συγγενικές με τις Ras, είτε για παράγοντες επιμήκυνσης είτε για α-υπομονάδες.

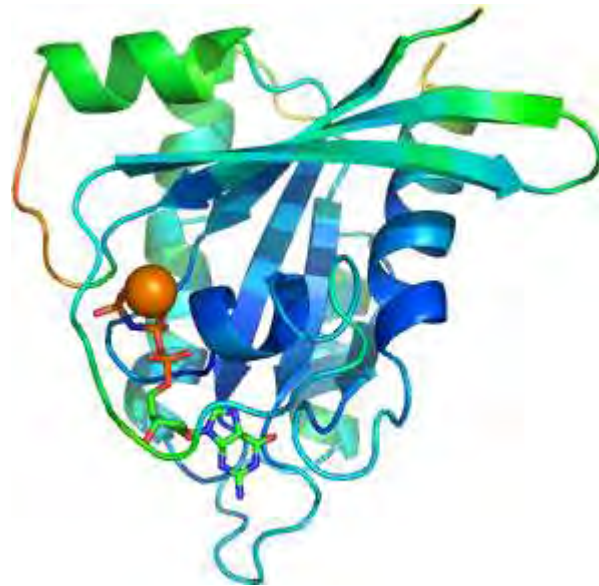
Η ικανότητα των πρωτεϊνών RAS να σηματοδοτούν για διαφορετικές κυτταρικές λειτουργίες, πολλές φορές ακόμα και αντικρουόμενες, εξαρτάται κυρίως από το εναρκτήριο σήμα (π.χ. παράγοντας αύξησης), τους μηχανισμούς ενεργοποίησης και απενεργοποίησής τους, τη συνομιλία τους με άλλα μονοπάτια σηματοδότησης και τον υποκυτταρικό εντοπισμό τους.

1.3 Δομή του γονιδίου K-Ras

Οι ογκοπρωτεΐνες K-Ras, H-Ras, EPA ήταν τα πρώτα ταυτοποιημένα και καλά μελετημένα μέλη της οικογένειας των μικρών GTPασων. Το γονίδιο K-Ras είναι η πιο μικρή μεταλλαγμένη GTPαση που εμπλέκεται σε πολλές μορφές καρκίνου και παρουσιάζονται πολλές ευκαιρίες για θεραπευτικές δοκιμές.⁽¹⁴⁾ Δύο ισομορφές του γονιδίου K-Ras είχαν αρχικά εντοπιστεί, K-Ras1 και K-Ras2. Το γονίδιο K-Ras1 αργότερα προσδιορίζεται ως ψευδογονίδιο.⁽¹⁵⁾ Εναλλακτικό μάτισμα του mRNA του γονιδίου K-Ras2 παρουσιάζει δύο ισομορφές KRASa και KRASb, οι οποίες διαφέρουν στην C-τελική περιοχή. Μετα-μεταφραστική τροποποίηση των δυο ισομορφών οδηγεί σε εναλλακτικές οδούς διακίνησης και εντοπισμού των πρωτεϊνών.⁽¹⁶⁾ Παρά το γεγονός ότι οι τέσσερις πρωτεΐνες Ras είναι εξαιρετικά ομόλογες μεταξύ τους, με ανάλογα πειράματα

φαίνεται ότι μόνο η KRASb είναι απαραίτητη για τη φυσιολογική εμβρυογένεση στο ποντίκι. ^(17,18) Με βάση διάφορα πειράματα φαίνεται ότι η KRasb έχει ένα μοναδικό ρόλο στην καρδιαγγειακή ομοιόσταση. ⁽¹⁹⁾

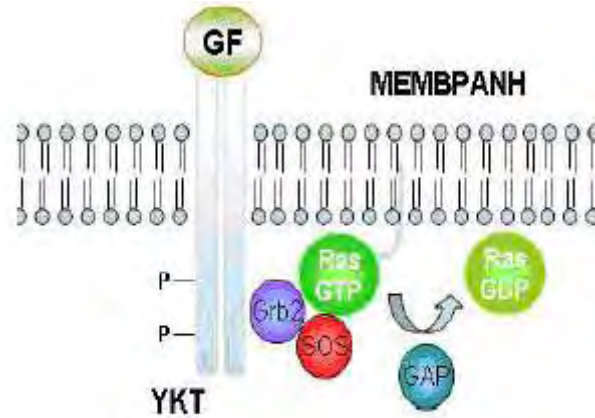
Το γονίδιο K-Rasb είναι δεσμευμένο με καλμοδουλίνη, μια ασβέστιο- δεσμευτική πρωτεΐνη και ρυθμίζει την σηματοδότηση του. Δεν συμβαίνει όμως το ίδιο και με τα γονίδια KRASa, HRAS, ή EPA. ⁽²⁰⁾ Με βάση πείραμα κυττάρων μετανάστευσης φαίνεται ότι τα αιμοπετάλια-οδηγοί του αυξητικού παράγοντα, που εξαρτώνται από την ενεργοποίηση της AKT απαιτεί K-Rasb και όχι με άλλες Ras ισομορφές. ^(21,22) Η κατανόηση της ιδιαιτερότητας του σηματοδοτικού μονοπατιού του Ras θα είναι κρίσιμη σημασία για τη στοχευμένη θεραπευτική στρατηγική του Ras που σχετίζονται με ανθρώπινες ασθένειες συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου. Έχει καθοριστεί η κρυσταλλική δομή του K-Rasb στην ενεργή, GppNHp, δεσμευμένη μορφή. Η συνολική δομή του K-Rasb μοιάζει με άλλες γνωστές δομές GTPασών, άλλωστε φαίνεται και στην εικόνα 1. Ένα ιόν Mg^{+} σταθεροποιεί τη δέσμευση μεταξύ των πρωτεϊνών και της GppNHp μέσω συντονισμού και οι β- και γ- φωσφορικές ομάδες. Αν και παρουσιάζονται αρκετές ομοιότητες μεταξύ των δομών των γονιδίων KRASb και HRAS, ωστόσο η διαφορά τους εντοπίζεται στον προσανατολισμό της αλυσίδας στον βρόγχο των δύο πρωτεϊνών.



Εικόνα1: Η συνολική δομή του γονιδίου K-Rasb.

1.4 Ενεργοποίηση των πρωτεϊνών RAS

Σε συνθήκες ηρεμίας οι πρωτεΐνες RAS βρίσκονται ως συμπλέγματα με GDP. Εξωκυτταρικά σήματα, όπως αυξητικοί παράγοντες, κυτοκίνες, ορμόνες, νευροδιαβιβαστές, ενεργοποιούν υποδοχείς της κυτταρικής μεμβράνης, όπως υποδοχείς κινάσης της τυροσίνης (YKT), υποδοχείς χωρίς δράση κινάσης τυροσίνης, καθώς και διαμεμβρανικούς υποδοχείς που συνδέονται με G πρωτεΐνες. Το καλύτερα μελετημένο μονοπάτι μεταγωγής σήματος περιλαμβάνει την ενεργοποίηση ενός YKT, όπως ο EGFR. Η πρόσδεση του παράγοντα EGFR στον υποδοχέα του έχει ως αποτέλεσμα το διμερισμό του υποδοχέα και την ενεργοποίηση της κινάσης της τυροσίνης. Ακολουθεί αυτό-φωσφορυλίωση συγκεκριμένων καταλοίπων τυροσίνης στο ενδοκυτταρικό τμήμα του υποδοχέα, με αποτέλεσμα τη δημιουργία θέσεων σύνδεσης SH2 και περιοχές PTB παραγόντων, όπως οι GRB2 και SHC. Ο παράγοντας SHC αυτό-φωσφορυλιώνεται συνδεδεμένος με τον ενεργοποιημένο υποδοχέα, με αποτέλεσμα τη δημιουργία θέσεων αναγνώρισης για την περιοχή SH2 του παράγοντα GRB2. Η πρωτεΐνη GRB2 βρίσκεται μονίμως συνδεδεμένη με την πρωτεΐνη SOS. Ως αποτέλεσμα της δημιουργίας κατάλληλων θέσεων αναγνώρισης στον υποδοχέα, η πρωτεΐνη SOS μετατοπίζεται από το κυτταρόπλασμα στην κυτταρική μεμβράνη μέσω των μορίων GRB2. Η μετατόπιση αυτή έχει ως αποτέλεσμα την αποσύνδεση της πρωτεΐνης RAS από το GDP και την πρόσδεση στο GTP. Μόρια με δράση ανάλογη της SOS ονομάζονται GEFs. Η ενεργή πρωτεΐνη RAS (RAS-GTP), στη συνέχεια, ρυθμίζει διάφορους τελεστές, οι οποίοι συνδέονται με μονοπάτια μεταγωγής σήματος, τα οποία καταλήγουν στη μεταγραφική ρύθμιση διαφόρων γονιδίων. Σε φυσιολογικές συνθήκες, η ενεργοποίηση των μονοπατιών μεταγωγής σήματος είναι παροδική, καθώς η πρωτεΐνη RAS επανέρχεται στην ανενεργή μορφή της μέσω της υδρόλυσης του προσδεδεμένου μορίου GTP, η οποία καταλύεται από τις πρωτεΐνες GAP. Το μονοπάτι αυτό φαίνεται στην ακόλουθη εικόνα 2:



Εικόνα 2: Ενεργοποίηση της Ras

1.5 Μονοπάτι μεταγωγής σήματος RAF/MEK/ERK σχετιζόμενο με την πρωτεΐνη RAS

Η ενεργοποίηση της πρωτεΐνης RAS έχει ως αποτέλεσμα τη μετατόπιση της κυτταροπλασματικής πρωτεΐνης RAF, η οποία είναι μια κινάση σερίνης/θρεονίνης, στην πλασματική μεμβράνη. Η κινάση RAF, στη συνέχεια, ενεργοποιεί μέσω φωσφορυλίωσης δύο MAPK κινάσες (MEK1 και MEK2), οι οποίες λειτουργούν ως κινάσες διπλής εξειδίκευσης, φωσφορυλιώνοντας κατάλοιπα θρεονίνης και τυροσίνης δύο MAP κινασών που αναφέρονται ως ERKs (p42MAPK/ERK-2, p44MAPK/ERK-1). Μετά την ενεργοποίησή τους, οι MAP κινάσες μεταφέρονται στον πυρήνα, όπου ενεργοποιούν ποικιλία τελεστών φωσφορυλιωντάς τους (Πίνακας 2), συμπεριλαμβανομένου του μεταγραφικού παράγοντα ELK1.

Πρωτεΐνη	Λειτουργία
ELK1, Sap1a	Ενεργοποίηση TCF μεταγραφικών παραγόντων
JUN, ATF2	Ενεργοποίηση και σταθεροποίηση μεταγραφικών παραγόντων του συμπλόκου AP1
BCL-3	Μεταγραφικός παράγοντας που εμπλέκεται στην ενεργοποίηση γονιδίων-στόχων του NFκB, ο ρόλος της φωσφορυλίωσης από την ERK1 είναι άγνωστος
GATA4	Ενεργοποίηση μεταγραφικού παράγοντα εμπλεκόμενου στην ρύθμιση γονιδίων του καρδιακού μυϊκού ιστού
STAT5A/5B	Ενεργοποίηση μεταγραφικών παραγόντων εμπλεκόμενων σε διάφορες βιολογικές διαδικασίες όπως διαφοροποίηση και απόπτωση
MYC	Ενεργοποίηση μεταγραφικού παράγοντα εμπλεκόμενου στην κυτταρική ανάπτυξη, την προώθηση του κυτταρικού κύκλου και την απόπτωση
Cyclin D1	Προώθηση του κυτταρικού κύκλου
HDAC4	Εμπλέκεται στην δομική αναδιαμόρφωση της χρωματίνης
DAPK1	Αύξηση της ενζυμικής δραστηριότητας (κινάση) που σχετίζεται με προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο.
BCL2	Μείωση της αντι-αποπτωτικής δραστηριότητας
Caspase 9	Απενεργοποίηση της προ-αποπτωτικής δραστηριότητας
DUSP1 (MKP1)	Ενεργοποίηση της ενζυμικής δραστηριότητας (φωσφατάση). Στους στόχους της DUSP1 συμπεριλαμβάνεται και η ERK2
RAF1	Απενεργοποίηση. Η κινάση RAF1 συμμετέχει στο μονοπάτι ενεργοποίησης των κινασών ERK

Πίνακας 2: Χαρακτηριστικά υποστρώματα κινασών ERK1/2

Οι παράγοντες αυτοί προσδένονται σε χαρακτηριστικές αλληλουχίες υποκινητών, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση μιας ομάδας γονιδίων. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί ο μεταγραφικός παράγοντας ELK-1, ο οποίος σχηματίζει σύμπλοκο με την SRF στο στοιχείο SRE, το οποίο αποτελεί συναινετική ακολουθία πολλών υποκινητών, συμπεριλαμβανομένου του υποκινητή του γονιδίου c-FOS. ⁽¹¹⁾

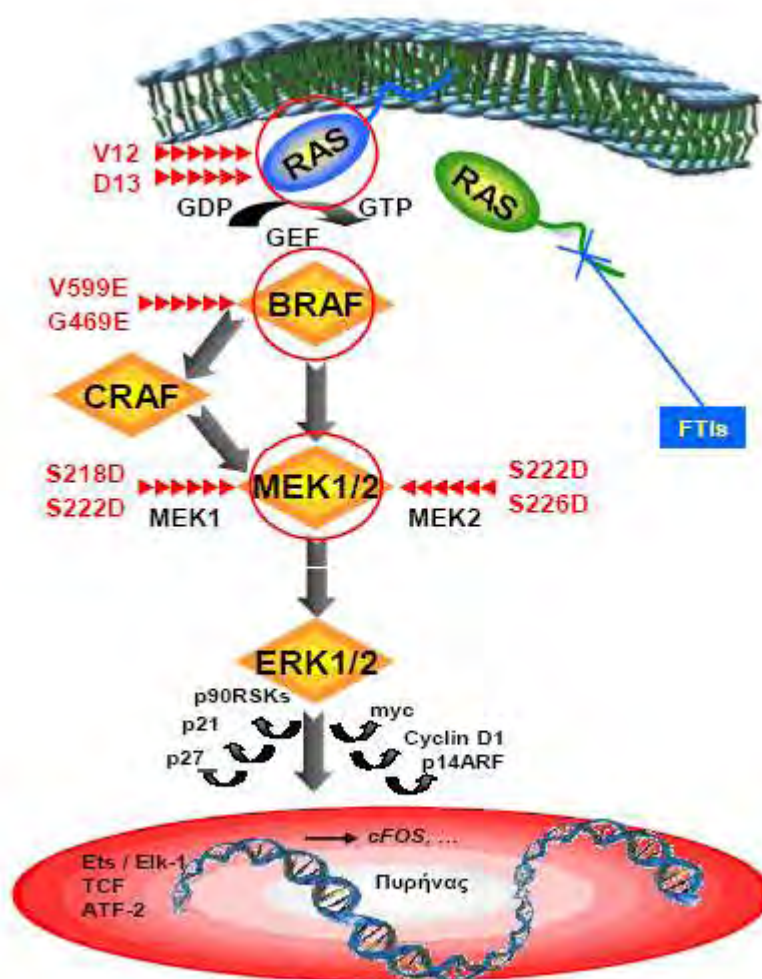
. Η κύρια λειτουργία της πρωτεΐνης RAS σε ότι αφορά τη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, είναι ο έλεγχος της μετάβασης από τη φάση G1 στη φάση S. Βασική προϋπόθεση είναι η αποτροπή της πρόσδεσης και καταστολής του μεταγραφικού

παράγοντα E2F από την πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος (pRb) μέσω κινασών εξαρτώμενων από κυκλίνες (CDKs). Οι κινάσες αυτές ενεργοποιούνται μέσω της αλληλεπίδρασης με μια κυκλίνη, της φωσφορυλίωσης σε ένα κεντρικό κατάλοιπο από ειδικές κινάσες, καθώς και με αποφωσφορυλίωση σε ανασταλτικές θέσεις στο αμινοτελικό άκρο από τις φωσφατάσες CDC25. Τα πλέον τυπικά σύμπλοκα κυκλίνης – κινάσης CDK είναι τα κυκλίνη D1/CDK4 ή 6 και κυκλίνη E/CDK2. Ειδικοί αναστολείς προσδένονται στα σύμπλοκα αυτά ρυθμίζοντας τη σταθερότητα και τη δράση τους. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η πρωτεΐνη RAS διεγείρει τη μεταγραφή ενός ενεργοποιητή (κυκλίνη D1), αλλά και αρνητικών ρυθμιστών (p21 και p16) των συμπλόκων κυκλίνης/CDK.⁽²³⁾ Η ρύθμιση των κυτταρικών επιπέδων της κυκλίνης D1 από την πρωτεΐνη RAS αποτελεί ένα εξαιρετο παράδειγμα της πολυπλοκότητας των σημάτων, που απαιτούνται για τον έλεγχο ενός μόνο μορίου, το οποίο εμπλέκεται στην μετάβαση από τη φάση G1 στη φάση S του κυτταρικού κύκλου. Η ενεργοποίηση των μορίων RAF, ERK και PI3-K διεγείρει την έκφραση του γονιδίου της κυκλίνης D1, αλλά για μέγιστη διέγερση απαιτείται η συνεργιστική δράση πολλαπλών τελεστών της RAS.

Η ενεργοποίηση της πρωτεΐνης RAS, υπό συγκεκριμένες συνθήκες, οδηγεί σε διακοπή του κυτταρικού κύκλου στο σημείο ελέγχου G1, μέσω επαγωγής των αναστολέων p21 και p16 των CDK. Η ενεργοποίηση του RAS-εξαρτώμενου μονοπατιού μεταγωγής σήματος RAF/MEK/ERK φαίνεται να συνδέεται με την αύξηση της έκφρασης του γονιδίου p21. Υπερέκφραση της πρωτεΐνης RAS οδηγεί σε επαγωγή του αναστολέα του CDK, p16, μέσω αδιευκρίνιστων μέχρι σήμερα μονοπατιών μεταγωγής σήματος. Οι δύο αυτοί αναστολείς της CDK φαίνεται να σχετίζονται με την αναστολή της κυτταρικής διαίρεσης και την επαγωγή της γήρανσης υπό συγκεκριμένες συνθήκες (κυτταρικός τύπος, βιολογικό περιεχόμενο).

Ο αναστολέας των CDK, p27 επάγει τη διακοπή του κυτταρικού κύκλου στο G1 σημείο ελέγχου. Σ' αντίθεση με τους αναστολείς p16 και p21, φαίνεται να ρυθμίζεται αρνητικά από την πρωτεΐνη RAS, μέσω των μονοπατιών μεταγωγής σήματος RAF/MEK/ERK και PI3K. Το γεγονός αυτό επιτυγχάνεται μειώνοντας τον ρυθμό μετάφρασης, καθώς και σε μειωμένη σταθερότητα της p27. Η κινάση ERK επάγει τη φωσφορυλίωση του αναστολέα, με αποτέλεσμα να καθίσταται ανίκανος να προσδεθεί και να καταστείλει την ενεργότητα κινάσης του συμπλόκου CDK2.⁽²⁴⁾ Στην Εικόνα 3

παρουσιάζεται διαγραμματικά το μονοπάτι σηματοδότησης RAS/RAF/MEK/ERK, όπου με τα κόκκινα βέλη αναφέρονται οι πιο συχνές μεταλλάξεις που εντοπίζονται σε αυτό το μονοπάτι. Στο μπλε πλαίσιο αναφέρονται οι αναστολείς της φαρνεσυλίωσης που εμποδίζουν την εντόπιση των πρωτεϊνών RAS στη μεμβράνη (FTIs).



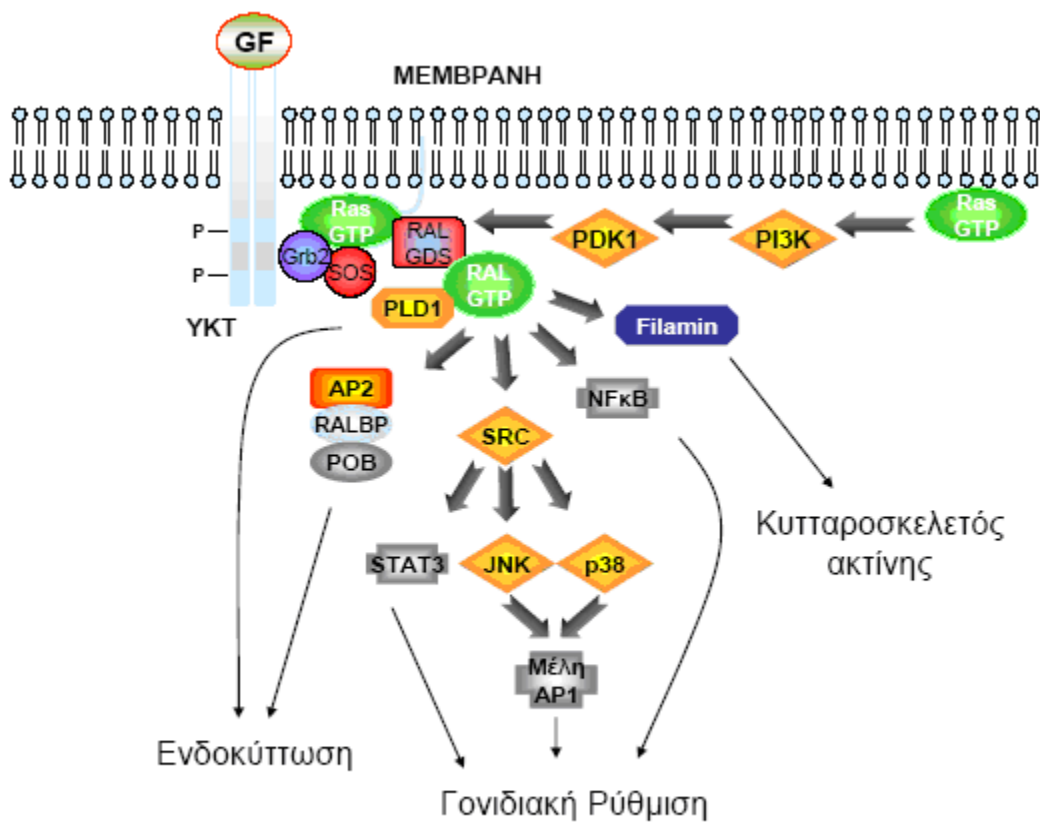
Εικόνα 3: Το μονοπάτι κυτταρικής σηματοδότησης RAF/MEK/ERK.

1.6 Μονοπάτι μεταγωγής σήματος RAS/RAL

Οι πρωτεΐνες RalA και RalB έχουν συγκεντρώσει αρκετή προσοχή τα τελευταία χρόνια ως τελεστές των πρωτεϊνών RAS που συμμετέχουν ενεργά στην έναρξη και τη διατήρηση της καρκινικής εξάλλαξης σε ανθρώπινα κύτταρα. Αρχικά απομονώθηκαν

βάσει της υψηλής ομοιολογία τους με τις πρωτεΐνες RAS. Οι πρώτες ενδείξεις για τη συμμετοχή τους στη διαδικασία της κακοήθους εξαλλαγής ήρθαν με την απομόνωση των πρώτων GEFs εξειδικευμένων για τις πρωτεΐνες RAL. ⁽²⁵⁾ Παρατηρήθηκε ότι οι παράγοντες ανταλλαγής νουκλεοτιδίων γουανίνης (GEFs) είναι άμεσοι τελεστές των πρωτεϊνών RAS και ότι παίζουν ρόλο στην καρκινική εξαλλαγή από τα ογκογονίδια RAS. ⁽²⁵⁾ Η ενεργοποίηση της RAL από παράγοντες αύξησης περιλαμβάνει την RAS-εξαρτώμενη εντόπιση της RAL-GDS (RAL GEF) στην κυτταρική μεμβράνη. Επιπλέον, δια του άξονα RAS/PI3K ενεργοποιείται η κινάση PDK1 η οποία φωσφορυλιώνει την RAL GDS επιτρέποντας την σύνδεσή της με την RAS. Αντίστοιχα, η φωσφορυλίωση της RAL-GDS από την PKC αναστέλλει τη συναρμογή της με την RAS. ⁽²⁶⁾

Οι κύριοι τελεστές των ενεργών πρωτεϊνών RAL είναι η RALBP1, η Filamin και το πρωτεϊνικό σύμπλοκο exocyst. Επιπλέον βρίσκονται σε συνεχή σύνδεση με την πρωτεΐνη PLD1, ενώ μπορούν να ενεργοποιήσουν την κινάση SRC μέσω κάποιου αδιευκρίνιστου, μέχρι σήμερα, τελεστή. Η RalBP1 είναι μια πρωτεΐνη GAP, η οποία λειτουργεί ως αρνητικός ρυθμιστής των πρωτεϊνών RAC και CDC42, ενώ εμπλέκεται σε μηχανισμούς ενδοκυττάρωσης διαμέσου της αλληλεπίδρασής της με τις πρωτεΐνες AP2, POB και REPS1. Η RAL συμμετέχει στον μηχανισμό της ενδοκυττάρωσης και μέσω της πρωτεΐνης PLD1, η οποία εμπλέκεται και στην προώθηση της κυτταρικής διαίρεσης. Η Filamin συνδέει την RAL με τη δημιουργία του κυτταροσκελετού ακτίνης και τον σχηματισμό φιλοποδίων. Η RAL- εξαρτώμενη ενεργοποίηση της κινάσης SRC σηματοδοτεί, μεταξύ άλλων, προς τις κινάσες p38, JNK, τον μεταγραφικό παράγοντα STAT3 ⁽²⁷⁾ και τον NFκB ⁽²⁸⁾ επηρεάζοντας κατά αυτόν τον τρόπο πολλές λειτουργίες του κυττάρου (Εικόνα 4).

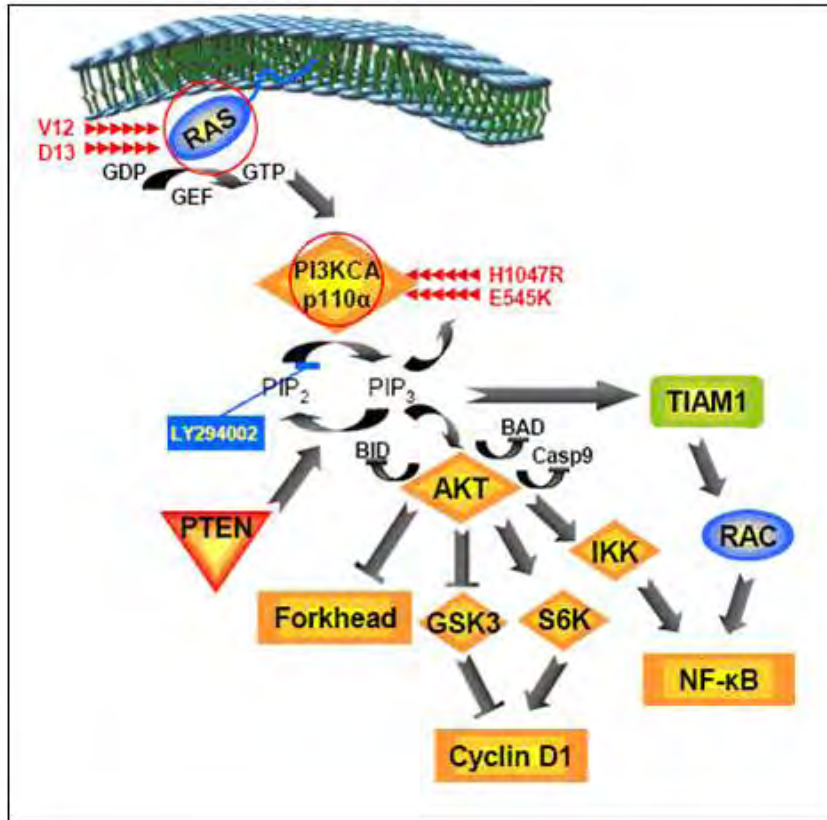


Εικόνα 4: Το μονοπάτι κυτταρικής σηματοδότησης RAS/RAL

1.7 Μονοπάτι μεταγωγής σήματος PI3K

Η πρωτεΐνη PI3K αποτελεί σύμπλοκο δύο υπομονάδων, της καταλυτικής υπομονάδας 110kDa (p110) και της ρυθμιστικής υπομονάδας 85kDa (p85). Το σύμπλοκο αυτό εμπλέκεται στη σηματοδότηση για επιβίωση και στη ρύθμιση του κυτταροσκελετού της ακτίνης. Η ενεργή πρωτεΐνη RAS-GTP συνδέεται με την καταλυτική υπομονάδα p110 του μορίου, γεγονός που οδηγεί σε αύξηση της ενεργότητας της κινάσης PI3K, με αποτέλεσμα την αύξηση της συγκέντρωσης 3'-φωσφορυλιωμένων ινοσιτολικών λιπιδίων. Ένα από τα προϊόντα αυτά, το PIP3 ενεργοποιεί την πρωτεΐνη RAC, με αποτέλεσμα την παραγωγή του προϊόντος PIP2, μέσω ενεργοποίησης των κινασών P14/P15. Τα γεγονότα αυτά οδηγούν στην αναδιοργάνωση των νηματίων ακτίνης και τελικά στην πύκνωση της μεμβράνης.

Η πρωτεΐνη PI3K εμπλέκεται στη ρύθμιση και άλλων λειτουργιών του κυττάρου, όπως αναστολή της απόπτωσης, αύξηση της κινητικότητας του κυττάρου και μετάσταση.



Εικόνα 5: Μονοπάτι κυτταρικής σηματοδότησης Ras - PI3

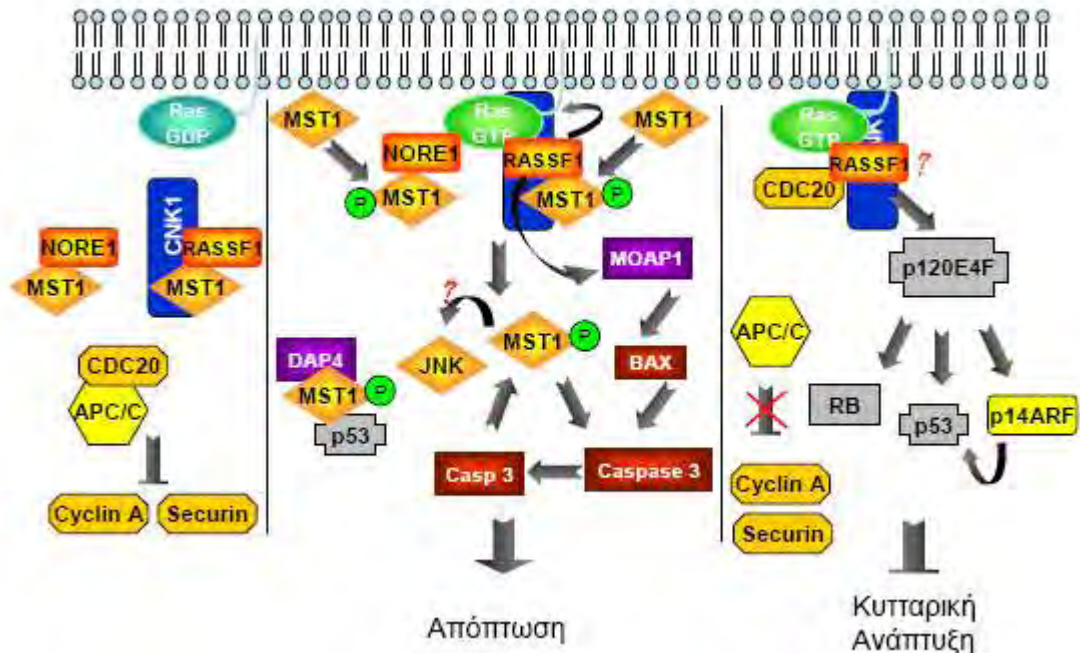
Ίσως ο πιο καλά χαρακτηρισμένος τελεστής της κινάσης PI3K είναι η κινάση AKT (PKB, πρωτεϊνική κινάση B). Οι στόχοι της κινάσης AKT περιλαμβάνουν παράγοντες επιβίωσης και θανάτου, όπως οι προ- αποπτωτικές πρωτεΐνες BAD, BID και κασπάση 9, των οποίων η έκφραση καταστέλλεται από την κινάση AKT. Στόχος της AKT αποτελεί και η κινάση mTOR, η οποία εμπλέκεται στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου ρυθμίζοντας τις πρωτεΐνες p70S6K και PHAS-1. ⁽²⁹⁾ Η πρωτεΐνη PI3K ρυθμίζει τη σταθερότητα της κυκλίνης D1 δια μέσου των μορίων PKB (AKT) και p70S6K. Φωσφορυλίωση της κυκλίνης D1 στη θέση T286 μέσω της κινάσης GSK3, οδηγεί σε αποικοδόμησή της. Η κινάση GSK3 απενεργοποιείται μέσω φωσφορυλίωσης από την πρωτεΐνη AKT με αποτέλεσμα να εμποδίζεται η φωσφορυλίωση της κυκλίνης D1 στο σημείο αυτό. Η πρωτεΐνη p70S6K ρυθμίζει θετικά την κυκλίνη D1 σε μεταγραφικό και μετά-μεταγραφικό επίπεδο. ⁽²⁹⁾ Το μονοπάτι μεταγωγής σήματος PI3K φαίνεται να παίζει

τον πιο σημαντικό ρόλο στην απενεργοποίηση του αναστολέα p27, κάτι το οποίο υποστηρίζεται από το γεγονός ότι το μέγιστο της δράσης της πρωτεΐνης RAS στο τέλος της φάσης G1, όπου παρατηρείται δραματική μείωση των επιπέδων του αναστολέα, δεν συμπίπτει με την ενεργοποίηση του μονοπατιού μεταγωγής σήματος RAF/MEK/ERK. Αυτό είναι πιθανώς το σημείο, όπου τα σήματα από αυξητικούς παράγοντες και γειτονικά κύτταρα συνεργάζονται και μεταβιβάζονται μέσω των πρωτεϊνών RAS και PI3K, για τον τελικό έλεγχο πριν τη μετάβαση στη φάση S του κυτταρικού κύκλου. ⁽³⁰⁾ Στην Εικόνα 5 παρουσιάζεται διαγραμματικά το μονοπάτι σηματοδότησης PI3K/AKT όπου με τα κόκκινα βέλη αναφέρονται οι πιο συχνές μεταλλάξεις που εντοπίζονται σε αυτό το μονοπάτι. Στο μπλε πλαίσιο σημειώνεται ο χημικός αναστολέας της PI3K, LY194002.

1.8 Τα μονοπάτια σηματοδότησης RAS/NORE1 και RAS/RASSF1

Ενώ η ενεργοποίηση του RAS–εξαρτώμενου μονοπατιού μεταγωγής σήματος PI3-K προωθεί την ογκογένεση μέσω καταστολής της απόπτωσης, το RAS–εξαρτώμενο μονοπάτι μεταγωγής σήματος NORE1/MST1 καταστέλλει την RAS–επαγόμενη ογκογένεση, εμποδίζοντας την επιβίωση των εξαλλαγμένων κυττάρων μέσω της διέγερσης του αποπτωτικού μηχανισμού. Η πρωτεΐνη NORE1 παρουσιάζει μεγάλη ομοιότητα με μια οικογένεια πρωτεϊνών, οι οποίες παράγονται από το εναλλακτικό μάτισμα ενός ογκοκατασταλτικού γονιδίου, του RASSF1. Οι πρωτεΐνες NORE1 και RASSF1 προσδέονται στην ενεργό RAS-GTP, μεταξύ τους και στην κινάση MST1, η οποία έχει δειχθεί ότι εμπλέκεται στη διαδικασία της απόπτωσης. ⁽³¹⁾ Η κινάση MST1 φέρει ένα μοτίβο αναγνώρισης από τις κασπάσες -3, -6, -7 και -9 (DEMD326) και ένα μοτίβο αναγνώρισης από τις κασπάσες -6 και -7 (TMTD349). ⁽³²⁾ Η διάσπαση της MST1 από την κασπάση 3 δίνει ένα θραύσμα περίπου 36kDa το οποίο εξ' αιτίας της έλλειψης κατασταλτικής περιοχής διμερισμού της πρωτεΐνης στο καρβοξυτελικό άκρο της, έχει κατά 10 φορές μεγαλύτερη καταλυτική ενεργότητα σε σύγκριση με την πλήρη MST1 ^(31,33). Οι πρωτεΐνες NORE1 και RASSF1 εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα ως ανενεργά σύμπλοκα, είτε μεταξύ τους είτε με την MST1 και στρατολογούνται από την ενεργή RAS

στη μεμβράνη ^(31,34). Η πρόσδεση των NORE1 και RASSF1 στην ενεργή RAS επιτρέπουν την αυτό-φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών MST1, η οποία και αποτελεί το πρώτο επίπεδο ενεργοποίησής της που οδηγεί σε προ-αποπτωτική σηματοδότηση ⁽³³⁾. Η ενεργοποιημένη MST1 οδηγεί στην ενεργοποίηση της κασπάσης 3, η οποία με τη σειρά της διασπά την MST1 αυξάνοντας την καταλυτική της δραστηριότητα. Επιπλέον, η MST1 μπορεί να προσδεθεί με την πρωτεΐνη DAP4 με αποτέλεσμα την συνεντόπισή τους με την p53 και την επαγωγή της απόπτωσης ⁽³⁵⁾. Διάφορες μελέτες έχουν συνδέσει την προ-αποπτωτική δραστηριότητα της MST1 με την ενεργοποίηση των κινασών JNK1 και p38 ^(32,36), όμως παραμένει αμφιλεγόμενη η άμεση συμμετοχή της στην ενεργοποίηση αυτών των κινασών ⁽³⁷⁾. Αξιοσημείωτες είναι οι παρατηρήσεις ότι η RASSF1 εμποδίζει την ενεργοποίηση της JNK1 από την ογκογόνο RAS ⁽³⁸⁾, αλλά ενεργοποιεί την κασπάση 3 μέσω του άξονα MOAP1/BAX ⁽³⁹⁾ (Εικόνα 6). Μια άλλη σημαντική λειτουργία της RASSF1 είναι η αναστολή του κυτταρικού κύκλου, όμως η συμμετοχή της RAS σε αυτή τη διαδικασία παραμένει αδιευκρίνιστη. Ο κυτταρικός κύκλος ελέγχεται από μια σειρά πρωτεϊνικών συμπλόκων απαραίτητων για την προώθηση μετά από σημεία ελέγχου. Για παράδειγμα, το «κυκλώσωμα» APC/C αλληλεπιδρά με ένζυμα που προσθέτουν μόρια ουβικιτίνης σε πρωτεΐνες που πρόκειται να αποικοδομηθούν ώστε να επιτραπεί η προώθηση του κυτταρικού κύκλου. ⁽⁴⁰⁾ Το APC/C ενεργοποιείται μέσω αλληλεπίδρασης με την CDC20 ή CDH1, οι οποίες επιτρέπουν την αλληλεπίδραση του APC/C με τους τελεστές του. Κατά τη διάρκεια της προ-μετάφρασης η RASSF1A στρατολογεί την CDC20 και δεν επιτρέπει την ενεργοποίηση του APC/C και την αποικοδόμηση της κυκλίνης A, της Securin και άλλων στόχων. ⁽⁴¹⁾ Επιπλέον, η RASSF1A έχει δειχθεί ότι αλληλεπιδρά με τον μεταγραφικό παράγοντα p120E4F, ο οποίος αλληλεπιδρά με πρωτεΐνες που ελέγχουν την προώθηση του κυτταρικού κύκλου (π.χ. p53, pRB) και επηρεάζει την έκφραση κυκλινών (π.χ. κυκλίνη A) ⁽⁴²⁾ (Εικόνα 6).



Εικόνα 6 : Μονοπάτια σηματοδότησης RAS/NORE1 και RAS/RASSF1

1.9 Δομή και κυτταρική εντόπιση των πρωτεϊνών RAS

Η βασική διαφορά των πρωτεϊνών RAS εστιάζεται στον τρόπο πρόσδεσής τους στην κυτταρική μεμβράνη και στις ενδομεμβράνες, όπου η πρωτεΐνη Ki-RAS4A προσδένεται δια μέσου παλμικών τμημάτων, ενώ η πρωτεΐνη Ki-RAS4B (το επικρατές προϊόν εναλλακτικού ματίσματος) μέσω καταλοίπων τυροσίνης. Η Ki-RAS είναι υψηλά συντηρημένη πρωτεΐνη και αποτελείται από περίπου 190 κατάλοιπα αμινοξέων. Οι περισσότερες διαφορές μεταξύ των πρωτεϊνών RAS εντοπίζονται σε μια περιοχή 25 αμινοξέων που εντοπίζονται στο καρβοξυτελικό (Hypervariable Region), η οποία πιστεύεται ότι είναι υπεύθυνη σε μεγάλο βαθμό για τις διαφορετικές λειτουργίες των πρωτεϊνών αυτών. Κρυσταλλογραφικές, μοριακές και βιοχημικές μελέτες της δομής των πρωτεϊνών RAS αποκάλυψαν τρεις σημαντικές περιοχές: ^(23,27,43)

α) οι περιοχές μεταξύ των καταλοίπων 5-22 και 109-180, οι οποίες απαιτούνται για την πρόσδεση νουκλεοτιδίων γουανίνης,

β) η περιοχή στο καρβοξυτελικό άκρο του μορίου (Hypervariable Region), η οποία είναι υπεύθυνη για την πρόσδεση στην κυτταρική μεμβράνη, και

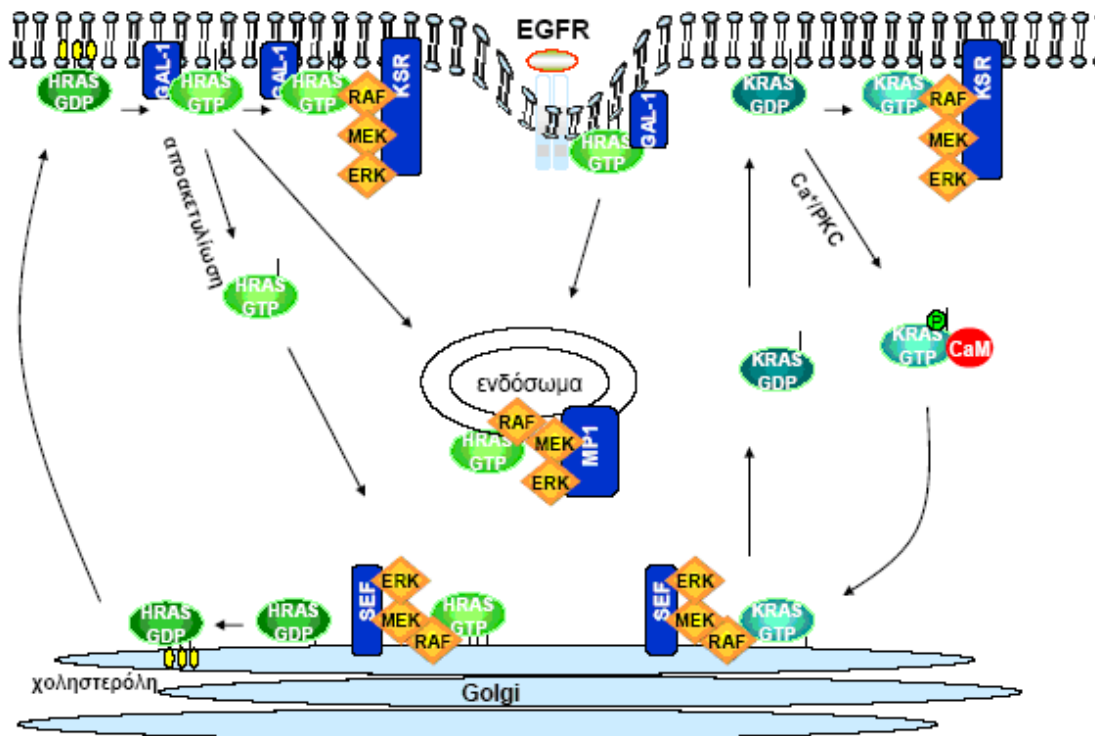
γ) η περιοχή 30-40 αμινοξέων η οποία απαιτείται για την αλληλεπίδραση με άλλες πρωτεΐνες.

Πιστεύεται ότι τόσο οι ιδιαίτερες λειτουργίες των πρωτεϊνών RAS όσο και η δυνατότητά τους να σηματοδοτούν, οφείλονται σε μεγάλο βαθμό στο καρβοξυτελικό άκρο τους. Η Ki-RAS4B φέρει μια σειρά από κατάλοιπα τυροσίνης στο καρβοξυτελικό άκρο της, τα οποία υπόκεινται σε φαρνεσυλίωση και ελέγχουν τον τρόπο με το οποίο μεταφέρεται η πρωτεΐνη στην κυτταρική μεμβράνη. Οι πρωτεΐνες Ha-RAS και N-RAS υπόκεινται σε μια επιπλέον μετά-μεταφραστική μετατροπή στο καρβοξυτελικό άκρο τους, την παλμιτουλίωση, υπεύθυνη για τη μεταφορά τους από το Golgi στις λιπιδικές πτυχώσεις της κυτταρικής μεμβράνης οι οποίες είναι πλούσιες σε χοληστερόλη. ⁽⁴⁴⁾ Η μεταγωγή σημάτων από τις διαφορετικές ισομορφές των πρωτεϊνών RAS διαμερίζεται μεταξύ της κυτταρικής μεμβράνης και των διάφορων ενδοκυττάρων μεμβρανών.

Η δυναμική φύση των μετατροπών παλμιτουλίωσης στις πρωτεΐνες Ha-RAS και N-RAS επιτρέπει την ακριβή ρύθμιση της μεταγωγής σημάτων ανάλογα με το είδος της διέγερσης. Η ενεργοποίηση στο επίπεδο της κυτταρικής μεμβράνης έχει ως αποτέλεσμα τη μεταγωγή σήματος μέσω του μονοπατιού μεταγωγής σήματος RAF/MEK/ERK με τη βοήθεια πρωτεϊνών, όπως η KSR. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός άμεσου πλην όμως σύντομου σήματος. Οι πρωτεΐνες Ha-RAS και N-RAS, μετά από προσθήκη ουβικιτίνης εντοπίζονται και στα πρώιμα ενδοσώματα ⁽⁴⁵⁾ όπου σηματοδοτούν μέσω RAF/MEK/ERK με τη βοήθεια πρωτεϊνών, όπως η p14/MP1. Στην κυτταρική μεμβράνη οι πρωτεΐνες Ha-RAS και N-RAS αποπαλμιτουλιώνονται και μεταφέρονται στο Golgi όπου, ενδεχομένως με τη βοήθεια συνοδών πρωτεϊνών ειδικών για το Golgi, ενεργοποιούν το μονοπάτι σηματοδότησης RAF/MEK/ERK. Η σηματοδότηση των RAS από το Golgi είναι λιγότερο άμεση, όμως έχει περισσότερη διάρκεια. ⁽⁴⁵⁾ Η N-RAS εντοπίζεται ταχύτερα στο Golgi καθότι δέχεται μια μόνο παλμιτουλίωση σε αντίθεση με την Ha-RAS που δέχεται δύο. Στη συνέχεια, οι πρωτεΐνες N-RAS και Ha-RAS παλμιτουλιώνονται εκ νέου στο Golgi και οδηγούνται στην κυτταρική μεμβράνη ⁽⁴⁶⁾. Παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον ότι μόνο η ανενεργή Ha-RAS εντοπίζεται στις

λιπιδικές πτυχώσεις, ενώ η Ha-RAS που προσδέεται σε GTP εντοπίζεται σε διαφορετικά σημεία της μεμβράνης. Η πρωτεΐνη galectin-1 (GAL-1) προσδέεται στην ενεργή Ha-RAS θεωρείται ότι είναι υπεύθυνη για τον εντοπισμό της ενεργής Ha-RAS εκτός των λιπιδικών πτυχώσεων.⁽⁴⁷⁾

Η μεταγωγή σημάτων από την Ki-RAS μπορεί επίσης να ρυθμιστεί από τον εντοπισμό της στα διάφορα ενδοκυττάρια τμήματα (Εικόνα 5). Η μεταγωγή σήματος από την κυτταρική μεμβράνη γίνεται με παρόμοιο τρόπο με αυτόν των πρωτεϊνών Ha-RAS και N-RAS. Εντούτοις, όταν υπάρχουν υψηλά επίπεδα Ca^{2+} και η Ki-RAS φωσφορυλιωθεί από την κινάση PKC, τότε προσδέεται με την πρωτεΐνη Calmodulin (CaM) και οδηγείται σε ενδομεμβράνες, συμπεριλαμβανομένου και του Golgi και σηματοδοτούν με τρόπο παρόμοιο με αυτό των πρωτεϊνών Ha-RAS και N-RAS. Όταν μειωθούν τα επίπεδα του Ca^{2+} η Ki-RAS επιστρέφει στην κυτταρική μεμβράνη (Εικόνα 7).⁽⁴⁷⁾



Εικόνα 7: Εντοπισμός πρωτεϊνών Ras

Η πολυπλοκότητα του μηχανισμού σηματοδότησης των πρωτεϊνών RAS, από τις διάφορες μεμβράνες του κυττάρου, αυξάνεται με την παρατήρηση ότι μετά από ενεργοποίηση του ΥΚΤ EGFR, και κατά τρόπο εξαρτώμενο από την PKC και την Calmodulin, οι πρωτεΐνες RAS μπορούν να οδηγηθούν στα λυσοσώματα και να αποικοδομηθούν. Συγκεκριμένα, ο υποδοχέας μαζί με την RAS ενσωματώνονται σε ένα κυστίδιο το οποίο περικλείεται από ένα πλέγμα πρωτεϊνών Clathrin. Στη συνέχεια, το κυστίδιο συγχωνεύεται με ένα λυσόσωμα και γίνεται αποικοδόμηση της RAS και του υποδοχέα.⁽⁴⁸⁾

2. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

2.1 Τεχνική της Real – Time PCR

2.1.1 Γενικά της τεχνικής αυτής

Συχνά είναι απαραίτητο να προσδιοριστεί η ποσότητα ενός συγκεκριμένου μορίου DNA ή RNA σε ένα δείγμα. Αυτό μπορεί να γίνει μετρώντας την ένταση των ζωνών στα στυπώματα κατά Southern και του τύπου Northern, αλλά οι παραπάνω μέθοδοι είναι σχετικά πολύπλοκες και δε διαθέτουν ιδιαίτερη ευαισθησία. Η τεχνική PCR είναι πολύ πιο απλή και ευέλικτη, ενώ παρέχει πολύ μεγαλύτερη ακρίβεια.

Σε γενικές γραμμές, όσο μεγαλύτερος είναι ο αριθμός των μορίων – στόχων στο αρχικό δείγμα, τόσο περισσότερα πολλαπλασιασμένα μόρια θα υπάρχουν σε κάθε βήμα της αντίδρασης. Μετρώντας την ποσότητα των τελικών προϊόντων της PCR σε ένα πήκτωμα, είναι δυνατόν να πάρουμε μια ιδέα σχετικά με την ποσότητα του μορίου – στόχου που υπήρχε στο μείγμα κατά την έναρξη της αντίδρασης. Αυτού του τύπου η προσέγγιση όμως δεν είναι αξιόπιστη. Αν οι ποσότητες των εκκινητών και των νουκλεοτιδίων είναι σχετικά χαμηλές ή αν γίνουν πάρα πολλοί κύκλοι PCR, οι εκκινητές και τα νουκλεοτίδια στην αντίδραση θα αρχίσουν να εξαντλούνται και η ποσότητα του προϊόντος σύντομα θα φτάσει σε ένα ανώτατο επίπεδο μετά από το οποίο δε θα μπορεί να γίνει περαιτέρω σύνθεση. Στο στάδιο αυτό, η ποσότητα του DNA που θα παραχθεί, δεν αντανακλά πλέον την ποσότητα του μορίου – στόχου που υπήρχε αρχικά. Μια πολύ καλύτερη στρατηγική είναι η χρήση ποσοτικοποιητικών μεθόδων PCR πραγματικού χρόνου (real time PCR), που επιτρέπουν τη μέτρηση της ποσότητας των προϊόντων, και κατ' επέκταση την παρακολούθηση του ρυθμού πολλαπλασιασμού ενός μορίου – στόχου, σε όλη τη διάρκεια της αντίδρασης PCR. Ύστερα από μια αρχική φάση κατά την οποία δεν είναι ανιχνεύσιμο το προϊόν της PCR λόγω του ότι βρίσκεται σε πολύ μικρή ποσότητα, ακολουθεί μια εκθετική φάση κατά την οποία η ποσότητα του προϊόντος σχεδόν διπλασιάζεται σε κάθε βήμα. Αν υπάρχουν περισσότερα μόρια – στόχοι στην αρχή, θα χρειαστούν λιγότεροι κύκλοι για να αρχίσει η εκθετική φάση. Συγκρίνοντας τον αριθμό των κύκλων που απαιτούνται για την έλευση της εκθετικής φάσης σε

διαφορετικές αντιδράσεις, μπορούμε να προσδιορίσουμε την αρχική ποσότητα των μορίων που χρησιμοποιήθηκαν ως μήτρα στις αντιδράσεις.

Στην μοριακή βιολογία, η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης Real Time, που ονομάζεται και ποσοτική αντίδραση πολυμεράσης Real Time (Q-PCR/ qPCR/ qrt-PCR) ή κινητική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (K-PCR), είναι μια τεχνική εργαστηρίου που βασίζεται στην PCR, η οποία χρησιμοποιείται για να ενισχύσει και ταυτόχρονα να ποσοτικοποιήσει ένα στοχευμένο μόριο DNA. Επιτρέπει τόσο την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό (ως απόλυτο αριθμό των αντιγράφων ή σχετικό ποσό, όταν ομαλοποιηθούν τα εισαχθέντα μόρια DNA ή επιπλέον γονίδια ομαλοποίησης) από μια ή περισσότερες ειδικές αλληλουχίες σε ένα δείγμα DNA.

Τα βασικά πλεονεκτήματα της μεθόδου αυτής είναι:

2. το χαμηλό κόστος
3. η άμεση παρατήρηση των αποτελεσμάτων
4. η δυνατότητα άμεσης ποσοτικοποίησης των δειγμάτων

2.1.2 Εισαγωγή στη Real- Time PCR

Υπάρχουν αρκετές διαφορετικές προσεγγίσεις για τον προσδιορισμό της ποσότητας του προϊόντος της PCR που υπάρχει στο τέλος κάθε κύκλου, αλλά όλες βασίζονται στην ανίχνευση μιας φθορίζουσας ετικέτας (tag), η οποία συνδέεται σε κάθε μόριο που συντίθεται. Οι πρώτες ετικέτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν βρωμιούχο αιθίδιο και το SYBR Green I.

Και τα δύο εισχωρούν στις αύλακες του δίκλωνου DNA. Μια προσέγγιση που χρησιμοποιήθηκε πιο πρόσφατα κάνει χρήση ολιγονουκλεοτιδικών ιχνηθετών οι οποίοι υβριδοποιούνται με μια εσωτερική αλληλουχία του μορίου – στόχου. Ένας τύπος ιχνηθέτη ονομάζεται μοριακός φάρος (molecular beacon) και συνίσταται σε ένα ολιγονουκλεοτίδιο που φέρει μια φθορίζουσα ομάδα στο ένα άκρο και μια ομάδα απορρόφησης φθορισμού στο άλλο. Ο μοριακός φάρος είναι σχεδιασμένος έτσι ώστε να σχηματίζει μια δομή στελέχους – βρόγχου (stem- loop structure) που φέρνει κοντά τη

φθορίζουσα ομάδα και την ομάδα απορρόφησης φθορισμού. Όταν φωτίζεται με UV ενώ βρίσκεται σε αυτή τη διαμόρφωση, η ενέργεια που εκπέμπεται από την φθορίζουσα ομάδα απορροφάται από την ομάδα απορρόφησης φθορισμού με μια διαδικασία που ονομάζεται FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer, μεταφορά ενέργειας μέσω αντανάκλασης φθορισμού) και έτσι δεν εκπέμπεται φως. Όταν όμως ο ιχνηθέτης θερμανθεί και υβριδοποιηθεί με την πολλαπλασιαζόμενη αλληλουχία του DNA, η διαμόρφωση του αλλάζει και η φθορίζουσα ομάδα απομακρύνεται από την ομάδα απορρόφησης φθορισμού, οπότε εκπέμπει φως όταν ακτινοβολείται. Ο αυξανόμενος φθορισμός, που μετριέται καθώς προχωρά η αντίδραση και αυξάνεται η ποσότητα του μορίου – στόχου, είναι ένα μέτρο της αύξησης του αριθμού των πολλαπλασιαζόμενων μορίων.

Η Real - Time PCR βασίζεται στην ανίχνευση φθορισμού που παράγεται όταν ένα μόριο αυξάνεται καθώς προχωρά η αντίδραση. Αυτό συμβαίνει λόγω της συσσώρευσης του προϊόντος PCR με κάθε κύκλο ενίσχυσης. Σε αυτά τα φθορίζοντα μόρια περιλαμβάνονται χρώσεις που συνδέονται με το double- standed DNA (δηλαδή SYBR Green) ή τη σειρά συγκεκριμένων ανιχνευτών (π.χ. Μοριακοί Φάροι ή Taqman Probes). Η Real Time PCR διευκολύνει την παρακολούθηση της αντίδρασης. Είναι δυνατόν να αρχίσουμε την αντίδραση με ελάχιστα ποσά νουκλεϊκών οξέων και να οδηγηθούμε σε ακριβή ποσοτικοποίηση του τελικού προϊόντος. Επιπλέον, δεν υπάρχει καμία ανάγκη για επεξεργασία της θέσης PCR και του χρόνου. Αυτά τα πλεονεκτήματα του φθορισμού που βασίζονται στην τεχνική της Real Time PCR έχουν συμβάλει στην προσέγγιση της ποσοτικοποίησης του DNA και του RNA. Οι δοκιμές της τεχνικής της Real Time PCR παρουσιάζουν υψηλή ευαισθησία, περισσότερη εξειδίκευση και παρέχει περιθώρια για αυτοματοποίηση. Η τεχνική αυτή έχει τον πρόσθετο κύκλο της αντίστροφης μεταγραφής που οδηγεί στο σχηματισμό ενός μορίου DNA από ένα μόριο RNA. Αυτό γίνεται επειδή το RNA είναι λιγότερο σταθερό σε σύγκριση με το DNA.

2.1.3 Real Time PCR: Η Διαδικασία

Στο πρωτόκολλο της Real Time PCR, ένα φθορίζον μόριο χρησιμοποιείται για την παρακολούθηση της PCR. Ο φθορισμός που εκπέμπεται από το μόριο καθώς το προϊόν της PCR συσσωρεύεται με κάθε κύκλο της ενίσχυσης. Με βάση το μόριο που χρησιμοποιείται για την ανίχνευση, μπορούμε να διακρίνουμε δύο κατηγορίες στην τεχνική της Real Time PCR:

1. Μη ειδική ανίχνευση με χρήση DNA δεσμευτικών χρώσεων
2. Ειδικοί στόχοι για την ανίχνευση ειδικών ανιχνευτών

Μη ειδική ανίχνευση με χρήση DNA δεσμευτικών χρώσεων:

Σε αυτή την περίπτωση οι δεσμευτικές, χρωστικές ύλες DNA χρησιμοποιούνται ως φθορισμός για την παρακολούθηση της αντίδρασης Real Time PCR. Ο φθορισμός αυξάνεται καθώς το προϊόν συσσωρεύεται με κάθε διαδοχικό κύκλο της ενίσχυσης. Με την εγγραφή του ποσού της εκπομπής φθορισμού σε κάθε κύκλο, είναι δυνατόν να παρακολουθήσει την αντίδραση της PCR κατά την διάρκεια της εκθετικής φάσης. Αν ένα γράφημα έχει δημιουργηθεί μεταξύ του κορμού του αρχικού ποσού του προτύπου και της αντίστοιχης αύξησης του φθορισμού κατά την διάρκεια της Real Time PCR, τότε παρατηρείται μια γραμμική σχέση.

Ανίχνευση με χρήση ειδικών στόχων με συγκεκριμένους ανιχνευτές:

Στην περίπτωση αυτή έχουμε συγκεκριμένη ανίχνευση με την χρήση ολιγονουκλεοτιδίων ελέγχου που επισημαίνονται τόσο με χρωστική ουσία φθορισμού όσο και με μια τερματική χρώση. Probes που είναι βασισμένα σε διαφορετικούς μηχανισμούς, είναι διαθέσιμα για την ανίχνευση στην Real Time PCR, αυτά περιλαμβάνουν:

1. Μοριακοί Φάροι
2. Taqman Probes
3. FRET Probes υβριδοποίησης
4. Scorpion Primers

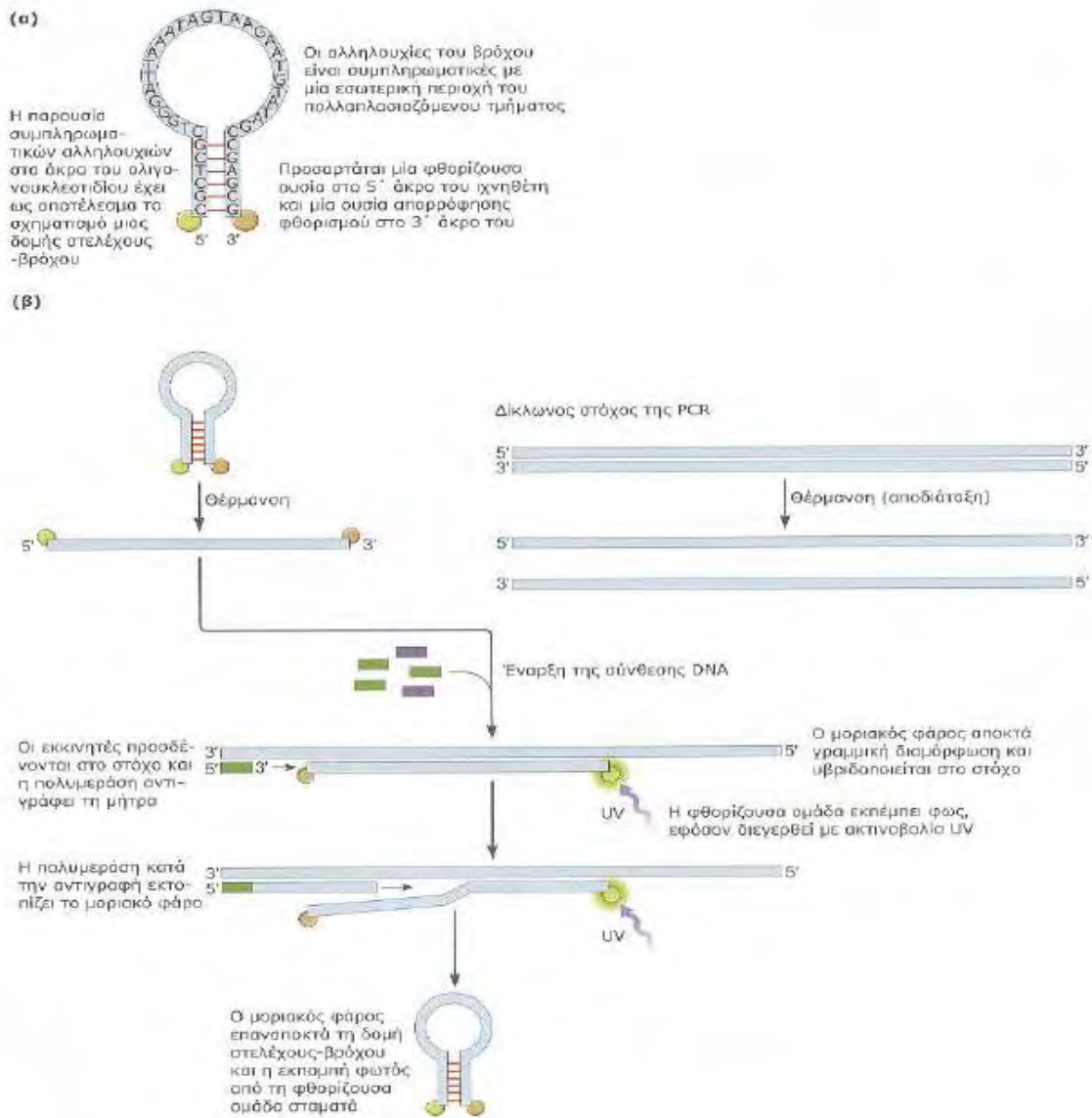
Στην δική μας περίπτωση η χρώση γίνεται με την χρήση των Scorpion Primers.

2.1.4 Ανίχνευση με χρήση ειδικών στόχων με συγκεκριμένους ανιχνευτές

A) Μοριακοί Φάροι

Ο μοριακός φάρος είναι ένα ολιγονουκλεοτίδιο μικρού μήκους (συνήθως 30-40 bp), που σε σχετικά χαμηλή θερμοκρασία υιοθετεί μια διαμόρφωση στελέχους – βρόγχου. Η αλληλουχία του βρόγχου είναι συμπληρωματική προς μια εσωτερική αλληλουχία του τμήματος που πρόκειται να πολλαπλασιαστεί. Ο μοριακός φάρος φέρει μια φθορίζουσα χρωστική αναφοράς συνδεδεμένη στο νουκλεοτίδιο που βρίσκεται στο 5' άκρο του και μια ομάδα απορρόφησης φθορισμού στο νουκλεοτίδιο που βρίσκεται στο 3' άκρο. Μερικά ολιγονουκλεοτίδια στα δυο άκρα τους (συνήθως έξι) είναι συμπληρωματικά μεταξύ τους, ώστε ο μοριακός φάρος να αναδιπλώνεται σχηματίζοντας τη δομή στελέχους – βρόγχου, η οποία φέρνει σε μικρή απόσταση μεταξύ τους τη φθορίζουσα χρωστική και την ομάδα απορρόφησης φθορισμού. Η γειτνίαση αυτή επιτρέπει τη μεταφορά ενέργειας από τη χρωστική αναφοράς στη χρωστική απορρόφησης και έτσι η δεύτερη απορροφά το φως που εκπέμπει η πρώτη όταν διεγείρεται με ακτινοβολία UV.

Στην εικόνα 8 παρατηρούμε τον τρόπο λειτουργίας του μοριακού φάρου (Molecular beacons).



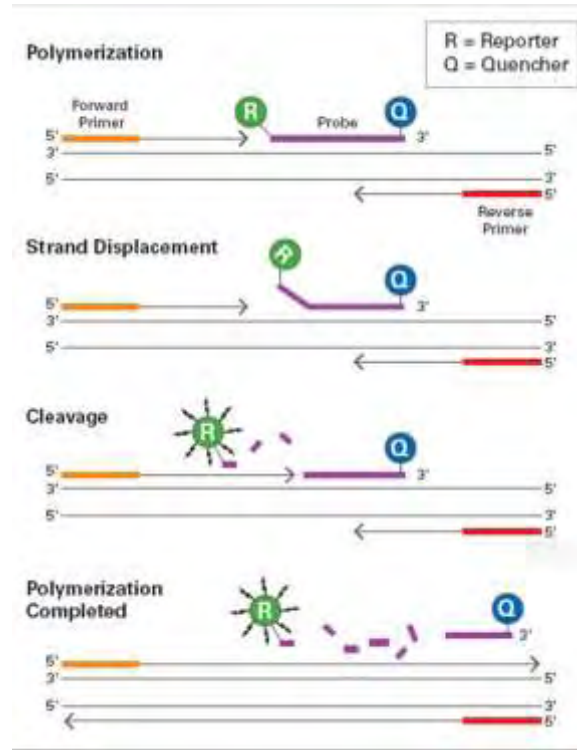
Εικόνα 8: Μοριακοί φάροι για την PCR πραγματικού χρόνου

B) Taqman Probes

Στη συγκεκριμένη περίπτωση, γίνεται χρήση τριών ολιγονουκλεοτιδίων: δύο εκκινητών και ενός ανιχνευτή που αναγνωρίζει και προσδένεται ειδικά σε εσωτερική αλληλουχία του πολλαπλασιαζόμενου προϊόντος της PCR. Οι Taqman Probes είναι μικρά ολιγονουκλεοτίδια τα οποία περιέχουν στο 5' άκρο τους μία χρωστική φθορισμού

αναφοράς (reporter dye) και στο 3' άκρο τους μία χρωστική σίγασης (quencher dye).

Στην εικόνα 9 παρουσιάζεται ο τρόπος δράσης των taqman probes.



Εικόνα 9: Ο τρόπος δράσεις των taqman probes

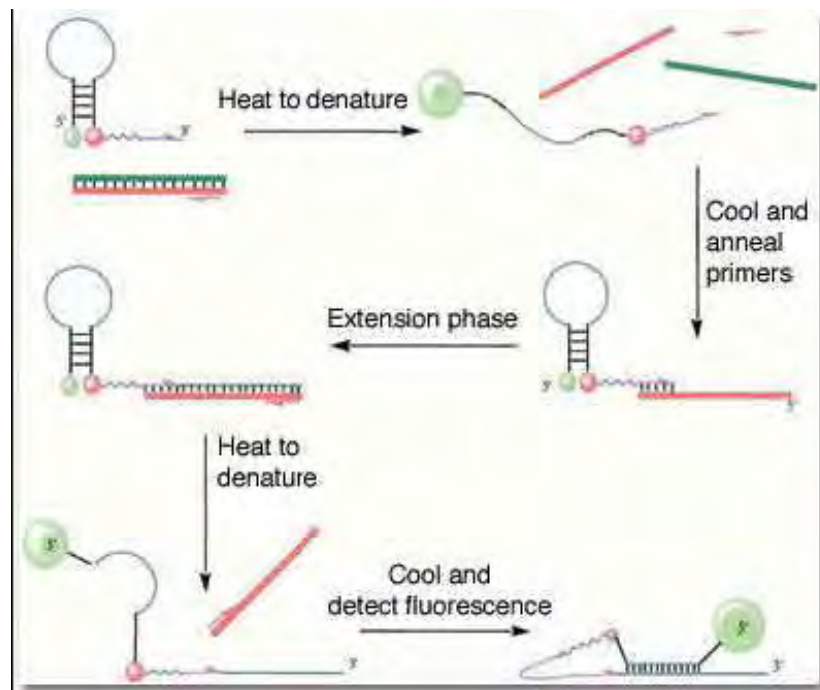
Γ) Scorpions

Στη μέθοδο αυτή γίνεται χρήση δύο ολιγονουκλεοτιδίων: ενός εκκινητή και ενός ολιγονουκλεοτιδίου, που χρησιμεύει τόσο ως εκκινητής όσο και ως ανιχνευτής. Το ολιγονουκλεοτίδιο αυτό αποτελείται από μία αλληλουχία που δρα ως εκκινητής, δίπλα από την οποία εκτείνεται ένα νουκλεοτιδικό τμήμα με δομή θηλιάς-μίσχου, το οποίο φέρει στο 5' άκρο ένα φθορίζον μόριο και στο 3' άκρο ένα μόριο χρωστικής. Το δεύτερο μόριο χρωστικής, εξουδετερώνει το σήμα από το πρώτο λόγω του φαινομένου FRET. Η δομή θηλιάς-μίσχου διαχωρίζεται από το τμήμα του εκκινητή μέσω μιας χημικά τροποποιημένης αλληλουχίας, η οποία παρεμποδίζει την αντιγραφή του σχηματισμού θηλιάς-μίσχου από την Taq πολυμεράση. Αυτό χρειάζεται γιατί αν επιτρεπόταν η

αντιγραφή του νουκλεοτιδικού τμήματος, αυτό θα οδηγούσε στη μη ειδική αποδιάταξη της δομής και συνεπώς στην παραγωγή μη ειδικού σήματος. Σημειώνεται ότι, όπως και στην περίπτωση των Molecular probes, η θηλιά είναι συμπληρωματική προς μια εσωτερική περιοχή της ενισχυμένης αλληλουχίας-στόχου. Μετά την αντίδραση ενίσχυσης, ο ανιχνευτής υβριδοποιείται μέσω της θηλιάς στον ίδιο κλώνο του προϊόντος της αντίδρασης. Η υβριδοποίηση αυτή έχει ως αποτέλεσμα την απομάκρυνση των δύο μορίων χρωστικής και την εμφάνιση φθορισμού.

Οι εκκινητές Scorpions χρησιμοποιούνται όπως και οι Molecular Beacon για την ανίχνευση μεταλλάξεων, καθώς και σε μελέτες ποσοτικοποίησης. Παρουσιάζουν, όμως, επιπλέον πλεονεκτήματα λόγω του γρηγορότερου μηχανισμού αντίδρασής τους και της εμφάνισης χαμηλότερου μη ειδικού σήματος (background).

Μετά τη φάση επιμήκυνσης της αντίδρασης, ο ανιχνευτής υβριδοποιείται, μέσω της θηλιάς, στον ίδιο κλώνο του προϊόντος που επιμήκυνε. Η υβριδοποίηση αυτή συνεπάγεται την απομάκρυνση των δύο χρωστικών και την παραγωγή φθορισμού.



Εικόνα 10: Αρχή της μεθόδου Scorpions. Μετά τη φάση επιμήκυνσης της αντίδρασης, ο ανιχνευτής υβριδοποιείται, μέσω της θηλιάς, στον ίδιο κλώνο του προϊόντος που επιμήκυνε. Η υβριδοποίηση αυτή συνεπάγεται την απομάκρυνση των δύο χρωστικών και την παραγωγή φθορισμού.

2.1.5 Εφαρμογές της Real Time PCR

Η τεχνική αυτή βρίσκει πολλές εφαρμογές ορισμένες από αυτές φαίνονται παρακάτω:

1. Ποσοτικές μελέτες έκφρασης mRNA.
2. DNA μετρήσεις του αριθμού αντιγράφων του γονιδιώματος ή ιογενών DNAs.
3. Αλληλόμορφων μετρήσεων διαφοροποίησης ή SNP γονοτυπικών αναλύσεων.
4. Έλεγχος αποτελεσμάτων microarray.
5. Αποτελεσματικότητα θεραπείας ναρκωτικών
6. Μέτρηση DNA βλάβης.

2.1.6 Real Time PCR VS Παραδοσιακή PCR

Η Real Time PCR επιτρέπει την ανίχνευση του προϊόντος PCR κατά τα πρώτα στάδια της αντίδρασης. Αυτή η δυνατότητα μέτρησης της κινητικής της αντίδρασης στα πρώτα στάδια της PCR παρέχει ένα σαφές πλεονέκτημα έναντι των παραδοσιακών ανιχνεύσεων PCR. Στις παραδοσιακές μεθόδους χρησιμοποιείται πήκτωμα αγαρόζης για την ανίχνευση της ενίσχυσης PCR σε τελική φάση ή σε τελικό σημείο της αντίδρασης PCR.

2.1.7 Περιορισμοί του τελικού σημείου PCR

Σε μια αντίδραση PCR, τα αντιδραστήρια είναι οι καταναλωτές ως αποτέλεσμα ενίσχυσης. Το προϊόν PCR δεν διπλασιάζεται σε κάθε κύκλο, λόγω αυτού του αντιδραστήριου πίεσης. Αυτή η εξάντληση θα συμβεί με διαφορετικούς ρυθμούς σε κάθε επανάληψη. Έτσι, τα δείγματα αρχίζουν να αποκλίνουν σε ποσότητες. Αυτή η μειωμένη ενίσχυση είναι η γραμμική φάση της αντίδρασης. Το όριο για κάθε σωλήνα θα διαφέρει λόγω της διαφορετικής κινητικής της αντίδρασης για κάθε δείγμα. Είναι σε αυτή τη φάση όπου οι παραδοσιακές PCR παίρνουν τη μέτρηση τους, γνωστό ως το τελικό σημείο. Αυτό το τελικό σημείο ωστόσο παρουσιάζει κάποια προβλήματα,

όπως χαμηλή ανάλυση, χαμηλή ακρίβεια, χαμηλή ευαισθησία και την ανάγκη για επεξεργασία PCR θέσης. Επίσης, στην εν λόγω ανίχνευση τα αποτελέσματα δεν εκφράζονται σε αριθμούς και δεν υπάρχει το περιθώριο για αυτοματοποίηση.

2.1.8 Χρήση της τεχνικής της K-Ras στο παχύ έντερο

Η τεχνική της K-Ras χρησιμοποιείται στην περίπτωση όπου έχουμε διαγνωσμένο καρκίνο και μας βοηθά να ελέγξουμε αν ο όγκος του ασθενούς οφείλεται σε μετάλλαξη του γονιδίου K-Ras και στη συνέχεια να είμαστε σε θέση να προσδιορίσουμε το είδος της θεραπείας που θα είναι αποτελεσματική για την αντιμετώπιση του καρκίνου.

Μεταλλάξεις του ογκογονιδίου K-Ras εντοπίζονται συχνά στους καρκίνους του παχέος εντέρου στον άνθρωπο. Η παρουσία τους συσχετίζεται με έλλειψη ανταπόκρισης σε ορισμένες θεραπείες με αναστολέα του υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR), όπως cetuximab και panitumumab, σε ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο. Ωστόσο η τεχνική αυτή μπορεί να ανιχνεύσει 7 μεταλλάξεις του K-Ras στα κωδικόνια 12 και 13.

2.1.9 Μεταλλάξεις K-Ras που ανιχνεύονται με την τεχνική αυτή

Η ανίχνευση των μεταλλάξεων μπορεί να γίνει σε αρχέγονου τύπου γονιδιακού DNA με RT-PCR. Η συγκεκριμένη μέθοδος μπορεί να συλλέξει πολλά δείγματα και ανάλογα με τη συνολική ποσότητα του DNA, μπορεί να ανιχνεύσει μετάλλαξη περίπου 1% στο αρχέγονο τύπο γονιδιακού DNA. Στο πίνακα 3 που ακολουθεί φαίνονται και οι 7 μεταλλάξεις που μπορούν να εμφανιστούν σε έναν ανθρώπινο όγκο καθώς και η κοσμική ταυτότητα τους.

Μετάλλαξη	Βασική Μεταβολή	Κοσμική Ταυτότητα
Gly12Ala	(GGT)>(GCT)	522
Gly12Asp	(GGT)>(GAT)	521
Gly12Arg	(GGT)>(CGT)	518
Gly12Cys	(GGT)>(TGT)	516
Gly12Ser	(GGT)>(AGT)	517
Gly12Val	(GGT)>(GTT)	520
Gly13Asp	(GGC)>(GAC)	532

Πίνακας 3: Μεταλλάξεις του γονιδίου K-Ras

2.1.10 Τεχνολογικές αρχές

Η μέθοδος αυτή συνδυάζει δύο τεχνολογίες, ARMS και Scorpions, για την ανίχνευση μεταλλάξεων μέσω αντιδράσεων RT-PCR.

Με την τεχνολογία ARMS επιτυγχάνεται επιλεκτική ενίσχυση αλληλόμορφων. Η πολυμεράση DNA Taq είναι ιδιαίτερα αποτελεσματική για την διάκριση μεταξύ σωστού και εσφαλμένου συνδυασμού στο 3' άκρο ενός εκκινητή PCR. Όταν ο εκκινητής συνδυαστεί πλήρως, η ενίσχυση συνεχίζεται με πλήρη αποτελεσματικότητα. Όταν η βάση στο 3' άκρο συνδυαστεί εσφαλμένα, δεν μπορεί να υπάρξει αποτελεσματική ενίσχυση. Με αυτόν τον τρόπο, συγκεκριμένες μεταλλαγμένες αλληλουχίες μπορούν επιλεκτικά να ενισχυθούν, ακόμα και σε δείγματα όπου η πλειοψηφία των αλληλουχιών δεν φέρει μετάλλαξη.

Τα Scorpions είναι δι-λειτουργικά μόρια που περιέχουν εκκινητή PCR ομοιοπολικά συνδεδεμένο με ανιχνευτή. Η φθορισμοφόρα ομάδα του ανιχνευτή αλληλεπιδρά με έναν αποσβέστη, ο οποίος μειώνει τον φθορισμό. Κατά την αντίδραση PCR, όταν ο ανιχνευτής συνδέεται με το αμπλικόνιο, η φθορισμοφόρα και ο αποσβέστης χωρίζουν. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα αύξηση του φθορισμού από τον σωλήνα αντίδρασης.

Συνδυάζοντας τις δύο αυτές τεχνολογίες αναπτύχθηκε μια ευαίσθητη και ειδική τεχνική ανίχνευσης των μεταλλάξεων του K-Ras στο υπόβαθρο του γονιδιακού DNA.

Παρέχονται 8 δοκιμές. Η ανάλυση ελέγχου, σημασμένη με FAM, χρησιμοποιείται για αξιολόγηση του συνόλου του DNA σε ένα δείγμα. Αυτή η ανάλυση Scorpions ενισχύει μια περιοχή του εξονίου 4 του γονιδίου K-Ras. Οι εκκινητές και ο ανιχνευτής έχουν σχεδιαστεί για να αποφεύγουν τους γνωστούς πολυμορφισμούς K-Ras.

Οι αναλύσεις μετάλλαξης είναι επίσης σημασμένες με FAM. Περιέχουν έναν εκκινητή Scorpion και έναν ARMS για να διακρίνουν το αρχέγονου τύπου DNA από το μεταλλαγμένο DNA που ανιχνεύουν. Όλες οι δοκιμές περιέχουν επίσης μια ανάλυση Scorpions για εξωγενή ελέγχου που παρακολουθείται από τον ανιχνευτή JOE. Έτσι ελέγχεται η παρουσία αναστολέων που μπορούν να οδηγήσουν σε ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα.

Οι δοκιμές Scorpions χρησιμοποιούν έναν αριθμό κύκλων RT-PCR, απαραίτητων για την ανίχνευση σήματος πάνω από ένα υπόστρωμα, ως μέτρο των μορίων-στόχων που είναι παρόντα κατά την έναρξη της αντίδρασης. Ο ουδός στον οποίο ανιχνεύεται το σήμα πάνω από τον φθορισμό υποστρώματος αποκαλείται ουδός κύκλου (Ct). Οι τιμές ΔCt του δείγματος υπολογίζονται ως η διαφορά μεταξύ του Ct της ανάλυσης μετάλλαξης και του Ct της ανάλυσης ελέγχου. Τα δείγματα κατατάσσονται ως θετικά αν η ΔCt είναι μικρότερη από την τιμή ΔCt 1% της δοκιμής. Αν είναι πάνω από 1%, το δείγμα ενδέχεται να περιέχει μετάλλαξη λιγότερη από 1% ή να είναι αρνητικό. Όταν χρησιμοποιούνται εκκινητές ARMS, μπορεί επίσης να συμβεί ανεπαρκής εκκίνηση, με πολύ αργό υπόβαθρο Ct, από DNA που δεν περιέχει την μετάλλαξη. Όλες οι τιμές ΔCt που υπολογίζονται με ενίσχυση υποστρώματος είναι μεγαλύτερες από τις τιμές ΔCt 1%.

Όπως αναφέραμε και πάνω, κάθε ανάλυση μπορεί να ανιχνεύει μετάλλαξη 1% στο υπόβαθρο του αρχέγονου τύπου DNA. Ωστόσο, χρειάζεται να υπάρχουν περίπου 2-3 ng DNA στην αντίδραση PCR για να μπορεί να ανιχνευτεί η μετάλλαξη. Έτσι, ο Ct ελέγχου είναι σχεδόν 29, έτσι οι αναλύσεις δεν θα μπορέσουν να ανιχνεύσουν μετάλλαξη σε δείγματα με τιμές Ct ελέγχου μικρότερες από 29.

Η συγκέντρωση DNA που απαιτείται για ανίχνευση της μετάλλαξης βασίζεται στο ποσοτικό προσδιορισμό της PCR και ενδέχεται να διαφέρει από τον ποσοτικό προσδιορισμό των μετρήσεων οπτικής πυκνότητας. Το επιπλέον μείγμα αντίδρασης ελέγχου παρέχεται για αξιολόγηση των δειγμάτων Ct προτού χρησιμοποιηθεί το kit, εάν χρειαστεί.

Αν το δείγμα δώσει θετικό αποτέλεσμα εκεί που η τιμή Ct της μετάλλαξης είναι μικρότερο από 38, η ανάλυση πρέπει να επαναληφθεί εις τριπλούν και όλες οι επαναλήψεις πρέπει να είναι θετικές, ώστε να ταξινομηθεί το δείγμα ως θετικό.

2.1.11 Παράμετροι Κύκλων

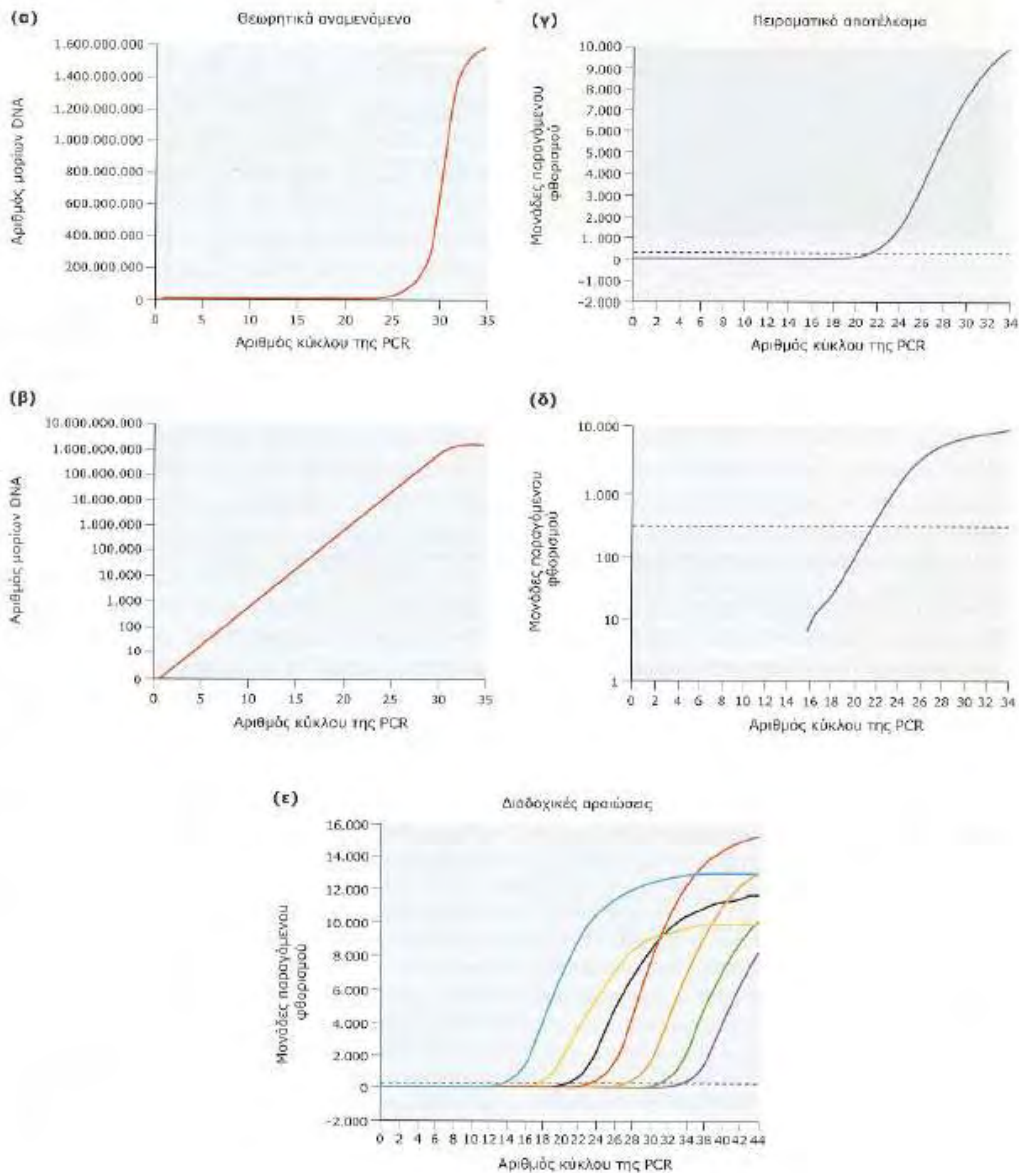
Όπως αναφέραμε παραπάνω προκειμένου να πραγματοποιηθεί η τεχνική ανίχνευσης μεταλλάξεων του γονιδίου K-Ras, απαιτούνται κάποιος αριθμός κύκλων κατά την διεξαγωγή της RT-PCR, συγκεκριμένοι χρόνοι και συγκεκριμένες θερμοκρασίες. Οι παράμετροι από απαιτούνται για την τεχνική αυτή φαίνονται στον πίνακα 4.

Θερμοκρασία	Χρόνος	Κύκλοι	Συλλογή δεδομένων
ΣΤΑΔΙΟ I			
95° C	4min	1	
ΣΤΑΔΙΟ II			
95° C	30sec		
60° C	1min	40	FAM, JOE

Πίνακας 4: Παράμετροι Κύκλων

2.1.12 Παραστάσεις που παίρνουμε από την Real time PCR και η ανάλυση τους

Στην εικόνα 11 που ακολουθεί παρουσιάζεται η χρήση της PCR πραγματικού χρόνου για την μέτρηση της ποσότητας των μορίων – στόχων που περιέχει ένα δείγμα.



Εικόνα 11: Η χρήση της PCR πραγματικού χρόνου για την μέτρηση της ποσότητας των μορίων – στόχων που περιέχει ένα δείγμα.

(α και β) Γραφικές παραστάσεις της θεωρητικής συσσώρευσης μορίων DNA κατά τη διάρκεια μιας αντίδρασης PCR. Στη γραφική παράσταση α, η κλίμακα είναι γραμμική και το πρώτο τμήμα της καμπύλης (μέχρι τον κύκλο 25) σχεδόν εφάπτεται στον οριζώντιο άξονα, γιατί ο αριθμός των μορίων είναι πολύ μικρός σε σχέση με τους επόμενους κύκλους. Στη γραφική παράσταση β, η συσσώρευση των μορίων παριστάνεται σε λογαριθμική κλίμακα. Προκύπτει έτσι μια ευθεία γραφική παράσταση εξαιτίας της εκθετικής αύξησης. Και στις δύο περιπτώσεις οι καμπύλες δείχνουν ότι η ποσότητα του προϊόντος μετά τον κύκλο 32 φτάνει σε ένα ανώτατο επίπεδο. (γ και δ) Γραφικές παραστάσεις πειραματικών δεδομένων. Τα προϊόντα της PCR ανιχνεύτηκαν με τη βοήθεια της χρωστικής SYBR Green. Η ποσότητα του

προϊόντος της PCR είναι τόσο χαμηλή κατά τους πρώτους κύκλους, που δεν μπορεί να προσδιοριστεί με βεβαιότητα, καθώς ο φθορισμός που παράγεται δεν υπερβαίνει αρκετά το χαμηλό ενδογενή φθορισμό (background fluorescence) των αντιδρώντων μορίων. Πρέπει να προσέξουμε ότι η καλύτερη αντιστοιχία των πειραματικών δεδομένων με τη γραφική παράσταση (β), που αναπαριστά σε λογαριθμική κλίμακα το θεωρητικά αναμενόμενο ρυθμό συσσώρευσης των προϊόντων, σημειώνεται κατά τους κύκλους 18 – 24. η περίοδος αυτή, στη διάρκεια της οποίας η αύξηση των προϊόντων της αντίδρασης είναι πραγματικά εκθετική συνιστά το κατάλληλο διάστημα για να γίνει η σύγκριση ανάμεσα στην πειραματική και τη θεωρητική συγκέντρωση των μορίων που λειτουργούν ως μήτρα. Πρέπει να προσέξουμε επίσης ότι το γραμμικό τμήμα της γραφικής παράστασης στο γ , μεταξύ των κύκλων 26-30, δεν είναι κατάλληλο χρονικό διάστημα για να γίνει ο ποσοτικός προσδιορισμός. (ϵ) Οι γραφικές παραστάσεις με τα διαφορετικά χρώματα έχουν γίνει σε γραμμική κλίμακα και αντιστοιχούν σε αντιδράσεις PCR πραγματικού χρόνου που πραγματοποιήθηκαν με διαφορετικές ποσότητες του μορίου- στόχου. Συγκεκριμένα, με διαδοχικές αραιώσεις η αρχική ποσότητα του μορίου- στόχου κάθε φορά υποδεκαπλασιάζεται. Όσο μεγαλύτερη είναι η αρχική ποσότητα του μορίου – στόχου, τόσο λιγότεροι κύκλοι απαιτούνται για να φτάσει η ποσότητα του προϊόντος σε ανιχνεύσιμα επίπεδα. Πρέπει ακόμα να προσέξουμε ότι, όταν οι αντιδράσεις φτάσουν σε ένα ανώτατο επίπεδο, οι διαφορές στην ποσότητα των προϊόντων δεν αντιπροσωπεύουν πλέον τις αρχικές διαφορές στην ποσότητα του μορίου – στόχου. Η αντίδραση που αντιστοιχεί στην καμπύλη η οποία έχει σχεδιαστεί με ανοιχτό μπλε χρώμα περιέχει 1000 φορές περισσότερα μόρια – στόχους απ' ότι η αντίδραση κόκκινου χρώματος. Παρ' όλα αυτά παράγει λιγότερο τελικό προϊόν. Φαίνεται λοιπόν από τα παραπάνω η επίδραση που έχουν, κατά τα αρχικά στάδια τη αντίδρασης, μικρές, τυχαίες πειραματικές αποκλίσεις από το θεωρητικά αναμενόμενο, οι οποίες πολλαπλασιάζονται κατά τα μετέπειτα στάδια, με αποτέλεσμα η τελική συμπεριφορά της αντίδρασης να μην είναι προβλέψιμη. Γίνεται επομένως αντιληπτό πόσο σημαντικό είναι να πραγματοποιηθεί η σύγκριση τη σωστή στιγμή.

2.2 Τεχνική του Sequencing

2.2.1 Εισαγωγή

Η επινόηση των τεχνικών αλληλούχισης του DNA στα μέσα της δεκαετίας του 1970 σήμανε την έναρξη μιας νέας εποχής που μας βοήθησε να γνωρίσουμε περισσότερα για τα γονίδια (για τη δομή, τη λειτουργία, τη ρύθμιση και την εξέλιξη τους). Αρχικά οι τεχνικές αλληλούχισης ήταν δύσχρηστες, ωστόσο στην συνέχεια υιοθετήθηκαν από τα περισσότερα εργαστήρια. Έτσι οι αλληλουχίες DNA που παρέχει η βάση δεδομένων GenBank αυξήθηκαν γρήγορα από $3,3 \cdot 10^6$ ζεύγη βάσεων σε $2,2 \cdot 10^8$ το 1994, για να ξεπεράσουν το 10^{11} ζεύγη βάσεων το 2006. Όλες αυτές οι αλληλουχίες DNA διευκόλυναν τον σχεδιασμό πειραμάτων γεγονός που οδήγησε στην διευκόλυνση των γνώσεων μας για τα γονίδια και τις μοριακές διαδικασίες του κυττάρου.

Αρχικά η αλληλούχιση DNA ήταν προσωπική υπόθεση ερευνητών που έπρεπε να ταυτοποιήσουν συγκεκριμένες αλληλουχίες προκειμένου να ελέγξουν κάποια υπόθεση τους ή για να διερευνήσουν τη λειτουργία ενός συγκεκριμένου γονιδίου. Ωστόσο ήταν μια δαπανηρή και επίπονη διαδικασία. Έτσι αλληλουχήθηκαν πλήρως μόνο γονιδιώματα μικρών πλασμιδίων και ιών. Όμως από τα μέσα της δεκαετίας του 1980 ως τις αρχές της δεκαετίας του 1990, ορισμένοι τολμηροί ερευνητές είχαν ταυτοποιήσει ολόκληρη την αλληλούχιση γονιδιωμάτων βακτηριοφάγων και ιών.

Πολλοί ερευνητές θεωρούσαν ότι η αλληλούχιση του DNA ολόκληρου του γονιδιώματος θα ήταν πολύ χρήσιμη. Όμως πολλά μέλη της ερευνητικής κοινότητας αντέδρασαν αρνητικά γιατί θεωρούσαν ότι θα σπαταληθούν άσκοπα τα διάφορα κονδύλια χωρίς κανένα όφελος. Παρ' όλα αυτά άρχισαν την αλληλούχιση των γονιδιωμάτων αρκετών οργανισμών, όπως της *Escherichia coli*, του *Caenorhabditis elegans* και του *Homo Sapiens*. Η επιτυχία των πειραμάτων αυτών οδήγησε στην καθιέρωση μιας νέας μεθόδου που έχει καθιερωθεί ως γονιδιωματική.

2.2.2 Χρήση της τεχνικής αυτής

Η γνώση της αλληλουχίας του DNA έχει καταστεί απαραίτητη για την βιολογική έρευνα αλλά και σε πολλούς άλλους κλάδους της έρευνας όπως στη διάγνωση, στην βιοτεχνολογία, στην εγκληματολογία αλλά και στην συστηματική (είναι η μελέτη της διαφοροποίησης της ζωής στον πλανήτη Γη, τόσο κατά το παρελθόν όσο και κατά το παρόν, και οι σχέσεις μεταξύ ζωντανών οργανισμών μέσα στο χρόνο).

Η ραγδαία ανάπτυξη της τεχνικής αυτής έχει συμβάλει στην ιεράρχηση του ανθρώπινου γονιδιώματος. Έτσι δημιουργήθηκε το Πρόγραμμα του Ανθρώπινου Γονιδιώματος, που είναι ένα διεθνές επιστημονικό ερευνητικό έργο, με στόχο τον προσδιορισμό της αλληλουχίας των ζευγών βασικών προϊόντων που συνθέτουν το DNA και για τον εντοπισμό και την χαρτογράφηση των περίπου 20.000 – 25.000 γονιδίων του ανθρώπινου, τόσο από φυσική όσο και από λειτουργική άποψη.

Πιο συγκεκριμένα η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται:

1. στην μεταλλαξιγένεση σημείου.
2. σε πειράματα μεταφοράς γονιδίων.
3. στην ανάλυση γονιδιακής ρύθμισης.
4. στην ανάλυση πρωτεϊνικής έκφρασης.

2.2.3. Δυσκολίες που παρουσιάστηκαν κατά την ανάπτυξη της τεχνικής αυτής

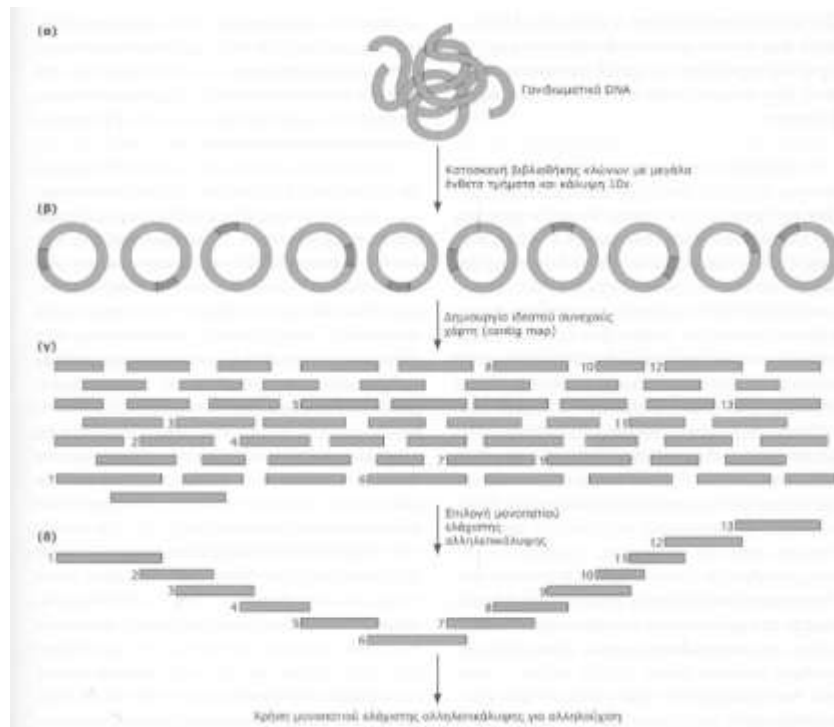
Ο προσδιορισμός της αλληλούχησης μιας ενιαίας περιοχής DNA μεγάλου μήκους είναι πιο περίπλοκος απ' ό,τι η αλληλούχηση ενός τμήματος DNA μήκους λίγων εκατοντάδων ζευγών βάσεων. Αυτό συμβαίνει για τους ακόλουθους λόγους:

1. Τα τμήματα DNA που μπορούν να αλληλουχηθούν με την μέθοδο Sanger, έχουν περιορισμένο μήκος (μέχρι μερικές εκατοντάδες νουκλεοτίδια).
2. Υπάρχει περιορισμένη δυνατότητα διαχωρισμού των τμημάτων κατά την ηλεκτροφόρηση σ' ένα πήκτωμα.

Όσον αφορά τον πρώτο λόγο, για να μεγιστοποιηθεί το πλήθος ζευγών βάσεων που «διαβάζονται» σε μια αντίδραση θα πρέπει οι συγκεντρώσεις των πρόωρα τερματισμένων τμημάτων DNA να εμφανίζουν σχετικά μικρή διακύμανση. Όμως είναι δύσκολο να επιτευχθεί ομοιομορφία, διότι στις αλυσίδες διαφορετικού μήκους απαιτούνται διαφορετικές συγκεντρώσεις των τριφωσφορικών διδεοξυνουκλεοτιδίων.

Όσον αφορά τον δεύτερο λόγο, τα πηκτώματα πολυακρυλαμιδίου που χρησιμοποιούνται για την αλληλούχιση, δεν έχουν ικανότητα ανάλυσης τμημάτων με μήκος μεγαλύτερο από 800 βάσεις περίπου. Έτσι είναι δύσκολο να διακριθεί ένα τμήμα με τόσο μεγάλο μήκος από άλλα τμήματα που διαφέρουν κατά μια βάση.

Μια επίσης δυσκολία που αντιμετώπισαν στην αλληλούχιση ήταν η συναρμολόγηση γονιδιωμάτων. Ένα γονιδίωμα αποτελείται από πολλές επαναλήψεις με αποτελέσματα να δυσκολεύονται στην συναρμολόγηση τους. Το πρόβλημα αυτό λύθηκε με την δημιουργία χαρτών που απεικόνιζαν τις θέσεις όσων κλώνων επρόκειτο να αλληλουχηθούν. Στην εικόνα 12 που ακολουθεί παρουσιάζεται η αλληλούχιση του γονιδιώματος με βάση ένα χάρτη αλληλοεπικαλυπτόμενων κλώνων.



Εικόνα 12: (α) Απομονώνουμε το γονιδιωματικό DNA που κόβεται συνήθως με την επίδραση υπερήχων σε τυχαίες θέσεις. Από τα τμήματα που δημιουργούνται όσα εμπίπτουν σε ένα επιθυμητό εύρος μεγέθους απομονώνονται με ηλεκτροφόρηση. (β) Τα τμήματα αυτά ενσωματώνονται σ' ένα φορέα κλωνοποίησης όπως ένα κοσμίδιο ή ένας φορέας BAC και χρησιμοποιούνται για να μετασχηματίσουν δεκτικά κύτταρα – ξενιστές. Αναπτύσσονται αρκετοί ανεξάρτητοι κλώνοι, ώστε τα ένθετα τμήματα να αντιστοιχούν σε συνολικό μήκος τουλάχιστον 10 φορές μεγαλύτερο από το μήκος του γονιδιώματος. Οι κλώνοι αυτοί αποτελούν τη βιβλιοθήκη κλώνων με μεγάλα ένθετα τμήματα. (γ) Στη συνέχεια οι κλώνοι της

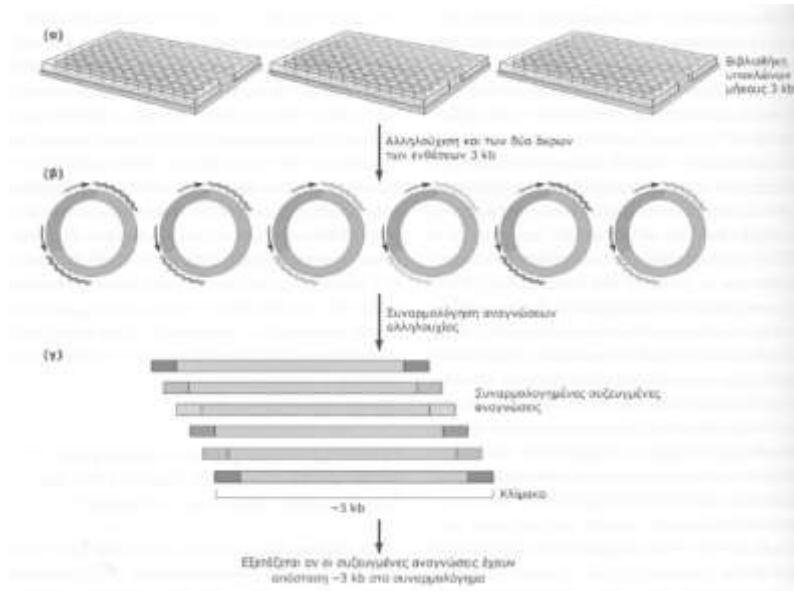
βιβλιοθήκης χαρτογραφήθηκαν, ώστε να εντοπιστούν αυτοί που αλληλεπικαλύπτονται. (δ) Από αυτόν τον ιδεατό συνεχή χάρτη επιλέγουν το μονοπάτι ελάχιστης αλληλοεπικάλυψης, δηλαδή ένα σύνολο κλώνων που καλύπτει όλο το γονιδίωμα με την ελάχιστη δυνατή αλληλοεπικάλυψη. Η ελάχιστη αυτή αλληλοεπικάλυψη είναι απαραίτητη, ώστε να μπορούν να συναρμολογηθούν οι επιμέρους αλληλουχίες με ενιαίο, συνεχή τρόπο. Το μονοπάτι ελάχιστης αλληλοεπικάλυψης προσδιορίζεται προκειμένου να ελαχιστοποιηθούν οι αντιδράσεις αλληλούχισης που θα πρέπει να πραγματοποιηθούν. Ωστόσο, οι επιλογές περιορίζονται στους κλώνους που είναι διαθέσιμοι στη βιβλιοθήκη, οι οποίοι ορισμένες φορές αλληλεπικαλύπτονται σε μεγαλύτερο βαθμό απ' ό,τι είναι επιθυμητό με μέση έκταση της αλληλεπικάλυψης των άκρων διαδοχικών τμημάτων στους κλώνους του μονοπατιού που ανέρχεται σε ποσοστό 15-20%.

2.2.4 Η αλληλούχιση συζευγμένων άκρων συμβάλλει στην αποφυγή λαθών κατά τη συναρμολόγηση των αναγνώσεων αλληλουχίας.

Κάθε ανάγνωση αλληλουχίας παρέχει πληροφορία που αντιστοιχεί σε ~500- 800 bp, συνήθως από υποκλωνοποιημένα πλασμίδια τα οποία φέρουν ένθετα τμήματα μήκους λίγων kb. Ο προσδιορισμός της αλληλουχίας και των δύο άκρων των ένθετων τμημάτων των υπόκλωνων διευκολύνει τη συναρμολόγηση των αναγνώσεων αλληλουχίας κατά τον προσδιορισμό της αλληλουχίας ενός γονιδιώματος. Όμως, για να είναι χρήσιμο αυτό το τέχνασμα, όλοι οι πλασμιδιακοί κλώνοι μιας βιβλιοθήκης υποκλωνοποίησης θα πρέπει να φέρουν ένθετα τμήματα με ίδιο περίπου μήκος, καθώς η απόσταση ανάμεσα σε δύο συζευγμένες αναγνώσεις είναι η πληροφορία που χρησιμοποιείται για την επαλήθευση της ακρίβειας της διαδικασίας συναρμολόγησης.

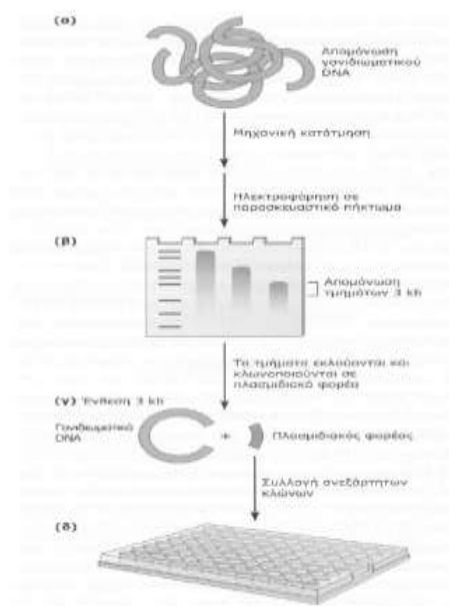
Τα στάδια είναι τα εξής: (α) στις στρατηγικές τυχαίας προσπέλασης αλληλουχίζονται και τα δύο άκρα του κλωνοποιημένου ένθετου τμήματος κάθε πλασμιδίου μιας βιβλιοθήκης με υποκλώνους 3 kb. (β) Η αλληλουχία που προκύπτει από κάθε πλασμίδιο συμβολίζεται με διαφορετικό χρώμα. (γ) Κατά τη συναρμολόγηση αυτών των αναγνώσεων αλληλουχίας, ο υπολογιστής ελέγχει αν οι συζευγμένες αναγνώσεις από το ίδιο πλασμίδιο εμφανίζονται σε θέσεις που απέχουν μεταξύ τους περίπου 3.000 bp. Η μη εκπλήρωση αυτής της προϋπόθεσης αποτελεί ένδειξη ότι έχει γίνει κάποιο λάθος κατά τη συναρμολόγηση και γίνονται οι απαραίτητες διορθώσεις. Τα περισσότερα σφάλματα κατά τη συναρμολόγηση οφείλονται στην παρουσία επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών σε ένα ή και στα δύο άκρα του πλασμιδιακού υποκλώνου, τα οποία επιτρέπουν την τοποθέτηση των

αναγνώσεων αλληλουχίας σε περισσότερες από μια πιθανές θέσεις κατά τη συναρμολόγηση. Όλα όσα αναφέρονται παρά πάνω παρουσιάζονται στην εικόνα 13 που ακολουθεί.



Εικόνα 13: Η αλληλούχιση συζευγμένων άκρων συμβάλλει στην αποφυγή λαθών κατά τη συναρμολόγηση των αναγνώσεων αλληλουχίας.

Έτσι, είναι δυνατόν ο αλγόριθμος συναρμολόγησης να έχει οδηγήσει σε λάθος αποτελέσματα, έτσι ώστε θα πρέπει να γίνει περαιτέρω ανάλυση και περαιτέρω πειράματα. Η λύση σε αυτό το πρόβλημα δόθηκε με την δημιουργία βιβλιοθηκών κλώνων. Στην πράξη έχει διαπιστωθεί ότι οι αναγνώσεις αλληλουχίας συναρμολογούνται ευκολότερα όταν χρησιμοποιούνται δύο ή τρεις ανεξάρτητες βιβλιοθήκες υποκλώνων, καθεμία με διαφορετικό αλλά αυστηρά περιορισμένο εύρος μεγέθους ένθετων τμημάτων. Η κατασκευή μιας τέτοιας βιβλιοθήκης φαίνεται στην εικόνα 14 που ακολουθεί.



Εικόνα 14: Δημιουργία πλασμιδιακής βιβλιοθήκης υποκλωνοποίησης για αλληλούχιση συζευγμένων άκρων

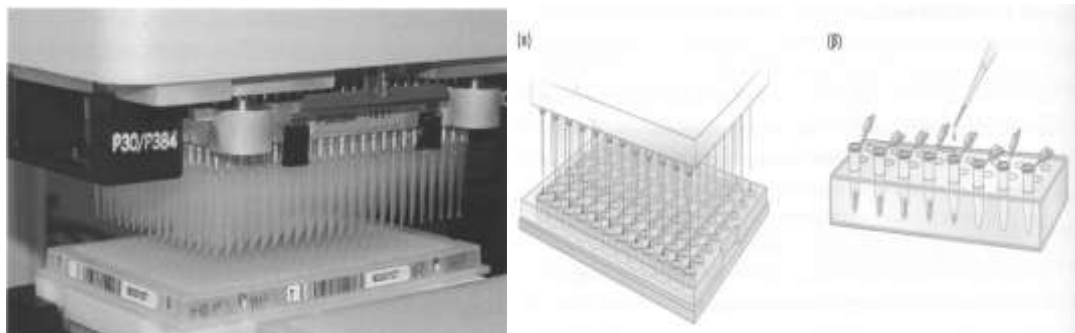
2.2.5 Για την αλληλούχιση ενός γονιδιώματος απαιτείται τεράστιος αριθμός αντιδράσεων

Τα πιο εργώδη και δαπανηρά βήματα της διαδικασίας αλληλούχισης είναι η σύνθεση των σημασμένων τμημάτων τερματισμού και στη συνέχεια η ηλεκτροφόρηση τους σε πήκτωμα ή σε τριχοειδή. Για κάθε αντίδραση αλληλούχισης απαιτείται η βέλτιστη σχετική συγκέντρωση των συστατικών: μονόκλωνο DNA – μήτρα, νουκλεοτίδια, διδεοξυνουκλεοτίδια, ολιγονουκλεοτιδικός εκκινητής και μια DNA πολυμεράση που επεκτείνει τον εκκινητή κατά μήκος του DNA – μήτρα. Όλα αυτά τα συστατικά είναι τροποποιημένα, ώστε να αυξάνεται η αξιοπιστία και η απόδοση της αντίδρασης αλληλούχισης. Αφού απαιτούνται δεκάδες εκατομμύρια τέτοιες αντιδράσεις, ακόμη και μια ελάχιστη βελτίωση μπορεί να μειώσει σημαντικά το χρόνο και το κόστος του προγράμματος αλληλούχισης. Μια από τις πιο ενδιαφέρουσες βελτιώσεις είναι η δημιουργία μιας νέας μορφής DNA πολυμεράσης που συνθέτει τμήματα μεγαλύτερου μήκους και η οποία εμφανίζει παρόμοια συγγένεια για όλα τα ddNTP που χρησιμοποιεί ως υπόστρωμα.

Οι Stanley Tabor και Charles Richardson μελετούσαν λεπτομερώς τους μηχανισμούς λειτουργίας των DNA πολυμερασών για πολλά χρόνια. Έτσι, γνώριζαν με λεπτομέρεια τη δομή του ενεργού κέντρου των ενζύμων αυτών και τον τρόπο με τον οποίο αλληλεπιδρά με τα εισερχόμενα πρόδρομα μόρια της σύνθεσης του DNA. Αξιοποιώντας λοιπόν τις γνώσεις τους αυτές, αποφάσισαν να τροποποιήσουν μια

DNA πολυμεράση, ώστε να δέχεται με μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα ddNTP, τα οποία δεν είναι φυσιολογικά υποστρώματα του ενζύμου. Οι Tabor και Richardson άλλαξαν ένα αμινοξύ της DNA πολυμεράσης και διαπίστωσαν ότι η τροποποίηση αυτή αύξησε την προτίμηση του ενζύμου για τα ddNTP (σε σχέση με τα ddNTP) κατά αρκετές χιλιάδες φορές. Αυτή η αυξημένη προτίμηση είχε ως συνέπεια την πολύ πιο αποτελεσματική και ομοιόμορφη ενσωμάτωση των νουκλεοτιδίων που προκαλούν τερματισμό της αλυσίδας κατά την αντίδραση αλληλούχησης του DNA. Επομένως, χρησιμοποιώντας την τροποποιημένη DNA πολυμεράση, απαιτείται λιγότερο DNA – μήτρα, η ερμηνεία της αλληλούχησης γίνεται πολύ πιο εύκολα και οι αναγνώσεις αλληλουχίας έχουν μεγαλύτερο μήκος και αυξημένη ακρίβεια – όλοι αυτοί οι παράγοντες είναι κρίσιμοι στα πειράματα προσδιορισμού της αλληλουχίας μεγάλων γονιδιωμάτων. Πρόκειται για ένα εξαιρετικό παράδειγμα επανασχεδιασμού μιας πρωτεΐνης μέσω της τεχνολογίας του ανασυνδυασμένου DNA και της κατευθυνόμενης μεταλλαξιγένεσης, με βάση τη γνώση της δομής και του μηχανισμού της ενζυμικής της δράσης.

Για την αλληλούχηση σε μεγάλη κλίμακα, οι βιολόγοι ακολούθησαν το παράδειγμα των κατασκευαστικών βιομηχανιών, προβαίνοντας σε εκτενή χρήση ρομπότ για αύξηση της απόδοσης και βελτίωση της αξιοπιστίας και της ακρίβειας. Τα ρομπότ αυτά χρησιμοποιούνται σε όλα τα στάδια της αλληλούχησης. Υπάρχουν ρομπότ που συλλέγουν τους βακτηριακούς υποκλώνους από τρυβλία Petri και απομονώνουν το DNA από κάθε κλώνο. Υπάρχουν ρομποτικές συσκευές με πιπέτες που χορηγούν εξαιρετικά μικρές ποσότητες από διάφορα διαλύματα με μεγάλη ακρίβεια, με αποτέλεσμα οι αντιδράσεις της αλληλούχησης να μπορούν να γίνουν σε πολύ μικρούς όγκους, εξοικονομώντας ακριβώς αντιδραστήρια. Τα μηχανήματα αλληλούχησης που παρουσιάζονται παρακάτω είναι ρομπότ που φορτώνουν τα δείγματα με αυτόματο τρόπο. Οι αντιδράσεις δε γίνονται πλέον σε μεμονωμένους δοκιμαστικούς σωλήνες αλλά στα πηγαδάκια πλαστικών δισκίων που ονομάζονται πολυκυβελιδικά πιάτα. Τα δισκία αυτά περιέχουν τυπικά 96 πηγαδάκια (ή πολλαπλάσια του 96) και για το χειρισμό τους έχουν σχεδιαστεί διάφορα ρομπότ.



Εικόνα 15 : Αριστερά → Η εισαγωγή ρομποτικών συσκευών αύξησε σημαντικά την παραγωγικότητα των προγραμμάτων αλληλούχισης γονιδιωμάτων. Δεξιά → (α) η πολυκυψελιδική πλάκα, (β) απλοί δοκιμαστικοί σωλήνες

2.2.6 Οι φθορίζουσες χρωστικές και η ηλεκτροφόρηση σε αυτόματους αναλυτές έφεραν επανάσταση στην αλληλούχιση του DNA

Όταν πρωτοαναπτύχθηκε η τεχνολογία αλληλούχισης του DNA, έπρεπε να πραγματοποιούνται τέσσερις αντιδράσεις για κάθε DNA – μήτρα. Καθεμία από τις αντιδράσεις αυτές περιείχε ένα μόνο από τα τέσσερα ddNTP και έπρεπε να ηλεκτροφορηθεί σε ξεχωριστή διαδρομή. Τα τμήματα του DNA που παράγονταν σημαίνονταν με ένα ραδιοϊσότοπο, συνήθως ^{32}P ή ^{35}S , ώστε να είναι δυνατός ο εντοπισμός των προϊόντων με έκθεση ακτινογραφικού φιλμ στο πήκτωμα. Η ανάγνωση της αλληλουχίας του DNA από την εικόνα γινόταν με βάση τις ζώνες που εμφανίζονταν στο ακτινογραφικό φιλμ, σημειώνοντας με το χέρι ποιες από τις διαδρομές (που αντιστοιχούσαν στις βάσεις A, G, C ή T) έφερε ζώνη σε κάθε θέση, καθώς αυξανόταν το μέγεθος των τμημάτων. Η μέθοδος αυτή ήταν πολύ χρονοβόρα και ιδιαίτερα επισφαλής. Δεν ήταν δυνατόν να διακριθούν περισσότερες από 100-150 bp από κάθε σετ τεσσάρων ραδιενεργών διαδρομών αλληλούχισης. Επίσης, η ακρίβεια ήταν τόσο χαμηλή, που σε πολλές περιπτώσεις ο προσδιορισμός ήταν αδύνατον ή γινόταν λανθασμένα σε ποσοστό μεγαλύτερο του 10% των βάσεων.

Σε ένα κρίσιμο σημείο στην ιστορία της γονιδιωματικής, όταν η ιδέα της αλληλούχισης σε μεγάλη κλίμακα άρχισε να απασχολεί τους επιστήμονες, στο California Institute of Technology οι Leroy Hood, Michael Hunkapiller και Lloyd Smith άρχισαν να αναπτύσσουν μια εναλλακτική μέθοδο σήμανσης που θα αντικαθιστούσε τη ραδιενέργεια. Χρησιμοποίησαν φθορίζουσες χημικές ομάδες για να σημάνουν τα ddNTP και τα συνδύασαν με μια ημι-αυτοματοποιημένη συσκευή

αλληλούχισης που διέθετε εμπορικά η Applied Biosystems, Inc. Η αλληλούχιση τεσσάρων χρωμάτων βασίζεται στην αρχή σήμανσης καθενός από τα τέσσερα ddNTP με διαφορετική φθορίζουσα ομάδα. Οι φθορίζουσες χρωστικές συνδέονται στα ddNTP με τρόπο που δεν εμποδίζει την DNA πολυμεράση να τα ζευγαρώνει με τη συμπληρωματική τους βάση στο DNA – μήτρα. Επειδή τα φωτεινά σήματα που εκπέμπονται από καθεμία από τις χρωστικές διακρίνονται μεταξύ τους, μπορούν να γίνουν και οι τέσσερις αντιδράσεις τερματισμού των αλυσίδων ταυτόχρονα στο ίδιο σωληνάκι και να διαχωριστούν σε μια μόνο διαδρομή ενός πηκτώματος ηλεκτροφόρησης και όχι σε τέσσερις, που απαιτούνται στην περίπτωση της σήμανσης με ραδιενέργεια. Τα φθοροσημασμένα τμήματα εντοπίζονται αυτόματα σε πραγματικό χρόνο κατά την ηλεκτροφόρηση, καθώς κάθε διαδοχικό τμήμα, μεγαλύτερο από το προηγούμενο κατά μια βάση, διέρχεται από το σύστημα ανίχνευσης του μηχανήματος αλληλούχισης που λειτουργεί με λέιζερ. Η χρωστική που έχει προσδεθεί σε κάθε ddNTP, στο άκρο κάθε τμήματος DNA, διεγείρεται από το λέιζερ και εκπέμπει ένα σήμα χαρακτηριστικό για τη χρωστική αυτή. Κάθε σήμα αντιστοιχεί σε μια από τις τέσσερις διαφορετικές βάσεις και η ανίχνευση του αποκαλύπτει την ταυτότητα της βάσης που υπάρχει στο άκρο όπου έχει τερματιστεί η σύνθεση της αλυσίδας. Ευαίσθητοι ανιχνευτές συλλέγουν τα σήματα αυτά, τα οποία στέλνονται σε έναν υπολογιστή για ανάλυση. Η αυτόματη συλλογή δεδομένων από τους ανιχνευτές εξαλείφει το πιο δύσκολο και επισφαλές βήμα της συμβατικής αλληλούχισης, αυτό της ερμηνείας της εικόνας του ραδιενεργού πηκτώματος, καθιστώντας τη διαδικασία της αλληλούχισης σημαντικά ευκολότερη και αποδοτικότερη.

Στις πρώτες συσκευές αυτόματης αλληλούχισης η ηλεκτροφόρηση γινόταν σε επίπεδα πηκτώματα όμοια με αυτά που χρησιμοποιούνταν για την αλληλούχιση στην περίπτωση ανίχνευσης με αυτοραδιογραφία, με τη διαφορά ότι είχαν περισσότερες διαδρομές και οι αναγνώσεις αλληλουχίας είχαν σχετικά μεγαλύτερο μήκος. Η χρήση των συσκευών αυτών εξακολουθούσε να απαιτεί τα χρονοβόρα βήματα της έγχυσης του πηκτώματος και της φόρτωσης των δειγμάτων. Επιπλέον, επειδή σε αυτές τις πρώτες συσκευές αλληλούχισης τα τμήματα DNA δεν κινούνταν σε ομοιόμορφες διαδρομές μέσα στο πήκτωμα, οι ερευνητές έπρεπε να αφιερώνουν πολύ χρόνο για την αναγνώριση και την οριοθέτηση των διαδρομών πριν από την «ανάγνωση» των βάσεων σε κάθε διαδρομή. Γι' αυτό, η εισαγωγή των συσκευών αλληλούχισης με τριχοειδή στα τέλη της δεκαετίας του 1990 αποτέλεσε ένα σημαντικό βήμα προόδου.

Στα μηχανήματα αυτά, τα φθοροσημασμένα προϊόντα αλληλούχισης του DNA ηλεκτροφορούνται μέσα σε τριχοειδή σωληνάρια μικρής διαμέτρου ($<0,5\text{mm}$), μήκους 48cm περίπου, τα οποία περιέχουν ένα υλικό παρόμοιο με το πολυακρυλαμίδιο που χρησιμοποιείται στα κοινά πηκτώματα. Τα συγκεκριμένα μηχανήματα έχουν πολύ μεγαλύτερο βαθμό αυτοματοποίησης απ' ό,τι τα μηχανήματα που χρησιμοποιούν επίπεδα πηκτώματα. Αντί για τη μεταφορά των προϊόντων των αντιδράσεων αλληλούχισης με μια πιπέτα στα πηγαδάκια του πηκτώματος, η συσκευή τριχοειδών «αναρροφά» αυτόματα έναν πολύ μικρό όγκο του δείγματος από κάθε πηγαδάκι ενός πολυκυψελιδικού πιάτου και το φορτώνει στο τριχοειδές. Το ίδιο τριχοειδές μπορεί να χρησιμοποιηθεί διαδοχικά πολλές φορές. Έτσι, μπορούν να στοιβαχτούν πολλά πιάτα με δείγματα σε μια συσκευή αλληλούχισης με τριχοειδή και, αφού αυτά φορτώνονται αυτόματα από ρομπότ, το μηχάνημα είναι σε θέση να αναλύσει μεγάλο αριθμό αντιδράσεων χωρίς επίβλεψη. Συνέπεια της προόδου αυτής είναι ότι τα μεγάλα εργαστήρια επιτυγχάνουν την αλληλούχιση δεκάδων εκατομμυρίων νουκλεοτιδίων ημερησίως.

2.2.7 Υπολογιστικοί αλγόριθμοι αναγνωρίζουν την ταυτότητα των βάσεων αναλύοντας τα δεδομένα που παράγει η συσκευή αλληλουχίας

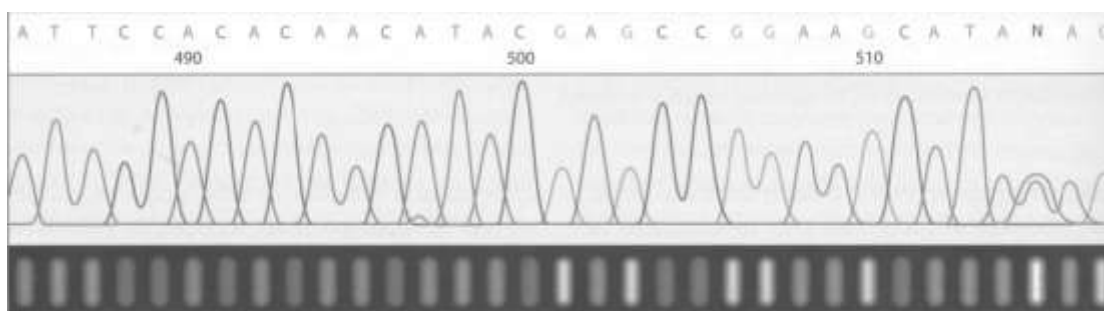
Το σήμα φθορισμού, που εκπέμπει κάθε τμήμα DNA καθώς διέρχεται από το λέιζερ ανίχνευσης και διεγείρεται από αυτό, στέλνεται σε έναν υπολογιστή που αναγνωρίζει, δηλαδή «διαβάζει», τη βάση που βρίσκεται στο 3' άκρο του τμήματος. Ωστόσο, η ταυτοποίηση των βάσεων A, G, C και T από τα αντίστοιχα σήματα φθορισμού δεν είναι απλή υπόθεση και δε γίνεται με άμεσο τρόπο κατά τη συλλογή των πρωτογενών δεδομένων. Η συμπεριφορά των τμημάτων DNA καθώς αυτά διέρχονται μέσα από ένα πηκτώμα ή ένα τριχοειδές, οι χημικές ιδιότητες και τα ιδιαίτερα φυσικά χαρακτηριστικά των φθορίζουσών χρωστικών, αλλά και οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των βάσεων που βρίσκονται σε γειτονικές θέσεις στην αλυσίδα του DNA περιπλέκουν τη διάκριση των σημάτων κατά τη συλλογή τους από τον ανιχνευτή. Για την επίλυση αυτού του προβλήματος αναπτύχθηκαν αλγόριθμοι οι οποίοι αναλύουν τα σήματα που συλλέγονται από τον ανιχνευτή και τα αντιστοιχίζουν σε μια από τις τέσσερις βάσεις κάθε φορά. Η ανάγνωση των βάσεων είναι επομένως η διαδικασία «μετάφρασης» των σημάτων φθορισμού σε αλληλουχία βάσεων.

Οι αλγόριθμοι αυτοί βελτιώνονται συνεχώς, αυξάνοντας την ακρίβεια της ανάγνωσης των βάσεων. Για παράδειγμα, το πρόγραμμα Phred, το οποίο ανέπτυξαν οι Phil Green και Brent Ewing, υπολογίζει ένα δέκτη εμπιστοσύνης για κάθε θέση της αλληλουχίας που ταυτοποιείται, δηλαδή παράγει ένα μέτρο της βεβαιότητας με την οποία γίνεται η ανάγνωση κάθε βάσης. Αρχικά, το πρόγραμμα προβλέπει τις ιδανικές θέσεις κορυφών στο γράφημα εκπομπής, δηλαδή προβλέπει τις θέσεις όπου είναι αναμενόμενο να ανιχνευτούν μέγιστες εκπομπές φωτός, έτσι ώστε οι κορυφές αυτές να έχουν ίσες αποστάσεις μεταξύ τους. Στο δεύτερο βήμα, ο αλγόριθμος εντοπίζει τις κορυφές που πράγματι υπάρχουν στο διάγραμμα, δηλαδή αυτές που δημιουργούνται από την απεικόνιση όσων δεδομένων συλλέγονται από τη διάταξη του ανιχνευτή. Ο αλγόριθμος αντιστοιχίζει τις παρατηρούμενες κορυφές με εκείνες του ιδανικού διαγράμματος και κατά τη διαδικασία αυτή παραλείπει ορισμένες από τις παρατηρούμενες κορυφές (αν βρίσκονται εξαιρετικά κοντά σε άλλες σε σύγκριση με την ιδανική κατανομή των κορυφών) και διχοτομεί άλλες (αν, για παράδειγμα, μια κορυφή βρίσκεται σε μεγάλη απόσταση από τις γειτονικές της σε σχέση με την ιδανική κατανομή και έχει σχετικά υψηλή ένταση, τότε πιθανόν να πρόκειται για «διπλή» κορυφή, οπότε ο αλγόριθμος τη διαχωρίζει σε δύο ή περισσότερες κορυφές). Τρίτον, το πρόγραμμα αναγνωρίζει τη βάση ανάλογα με το ποίος από τους τέσσερις ανιχνευτές έχει δώσει το σήμα. Τέλος, ο αλγόριθμος αναλύει τις παρατηρούμενες κορυφές που δεν έχουν αναγνωριστεί και προσπαθεί να τις ταιριάζει στην αλληλουχία. Αυτού του είδους οι αλγόριθμοι μπορούν, κατά την ανάγνωση, να εκτιμήσουν το βαθμό εμπιστοσύνης κάθε ταυτοποιημένης βάσης, παρέχοντας έναν άμεσο έλεγχο ποιότητας. Η συνεχής αξιολόγηση της πιστότητας κάθε ανάγνωσης επιτρέπει στους ερευνητές να παρακολουθούν τη διαδικασία και να προσαρμόζουν τις διάφορες παραμέτρους, ώστε να βελτιώνεται η ποιότητα της ανάλυσης. Τα δεδομένα που προκύπτουν από την ανάγνωση σε μια συσκευή αλληλούχισης DNA είναι ένα σύνολο από πίνακες που δείχνουν τη σειρά των βάσεων κατά μήκος του εξεταζόμενου τμήματος DNA, μαζί με στατιστικές βαθμολογίες που δείχνουν το βαθμό εμπιστοσύνης, δηλαδή το μέτρο της βεβαιότητας ότι η ανάγνωση κάθε βάσης έχει γίνει με ακρίβεια. Επιπλέον, ο υπολογιστής παράγει ένα αρχείο γραφήματος εκπομπής (sequence trace file), το οποίο αναπαριστά την ένταση καθενός από τα φθορίζοντα σήματα ως συνάρτηση του χρόνου ηλεκτροφόρησης.

Οι αυτόματοι αναλυτές και τα σχετικά ρομπότ για την προετοιμασία των δειγμάτων είναι πολύτιμα για την αλληλούχιση του γονιδιώματος. Ένα μεγάλο

κέντρο γονιδιοματικής αλληλούχισης μοιάζει με εργοστάσιο, με μεγάλες αίθουσες γεμάτες μηχανήματα. Παλιότερα, ένας ερευνητής που θα εργαζόταν με πολύ σταθερό ρυθμό θα κατάφερνε να κάνει ίσως 50 αντιδράσεις αλληλούχισης σε μια μέρα, ενώ σήμερα ένα άτομο μπορεί να επιβλέψει ρομπότ που πραγματοποιούν περισσότερες από 100.000 αντιδράσεις ημερησίως.

Η εικόνα που παίρνουμε από έναν γενετικό αναλυτή παρουσιάζεται στην εικόνα 16 που ακολουθεί:



Εικόνα 16 : Το αρχείο γραφήματος εκπομπής περιέχει την απεικόνιση των αποτελεσμάτων μιας αντίδρασης αλληλούχισης όπως παράγονται από ένα αυτόματο αναλυτή.

2.2.8 Είδη μεταλλάξεων που μπορεί να ανιχνεύσει η τεχνική

Η τεχνική της Sequencing παρέχει την δυνατότητα προσδιορισμού μεταλλάξεων σε δύο κωδικόνια, το ένα είναι το κωδικόνιο 12 και το άλλο το κωδικόνιο 13. Η διαφορά της τεχνικής αυτής σε σχέση με εκείνη της Real Time PCR είναι ότι με την Sequencing έχουμε την δυνατότητα να ανιχνεύσουμε περισσότερες μεταλλάξεις.

Η τεχνική αυτή επιτρέπει τον εντοπισμό χαμηλού επιπέδου σωματικών μεταλλάξεων από την μέτρηση του μετακινούμενου τερματισμού, την αντίδραση επέκτασης εκκινητών και την ηλεκτροφόρηση με τριχοειδή. Κατά την διάρκεια της αντίδρασης επέκτασης του εκκινητή, σχεδιασμένοι εκκινητές, μετατρέπόμενα ένζυμα, και ειδικά συντιθέμενα νουκλεοτίδια παράγουν προϊόντα επέκτασης εκκινητών για wild type και για μεταλλαγμένες αλληλουχίες- στόχους. Οι ενισχυμένες αντιδράσεις επέκτασης έχουν σαν αποτέλεσμα σε διαφορετικό σχέδιο να διαφοροποιούν σε wild type και μεταλλαγμένες αλληλουχίες, οι οποίες εντοπίζονται από την ανάλυση του μεγέθους του DNA χρησιμοποιώντας ηλεκτροφόρηση με τριχοειδή. Παρακάτω ακολουθεί η εικόνα 17 όπου φαίνεται τι συμβαίνει σε περίπτωση μετάλλαξης και τι συμβαίνει σε περίπτωση wild type.



Εικόνα17: Μετάλλαξη και wild type

Οι μεταλλάξεις που μπορούμε να εντοπίσουμε με την τεχνική αυτή φαίνονται στον πίνακα 5:

Codon 12	Βασική μεταβολή	Codon 13	Βασική μεταβολή
Gly12Ser	GGT>AGT	Gly13Ser	GGC>AGC
Gly12Arg	GGT>CGT	Gly13Arg	GGC>CGC
Gly12Cys	GGT>TGT	Gly13Cys	GGC>TGC
Gly12Asp	GGT>GAT	Gly13Asp	GGC>GAC
Gly12Ala	GGT>GCT	Gly13Ala	GGC>GCC
Gly12Val	GGT>GTT	Gly13Val	GGC>GTC

Πίνακας 5: Μεταλλάξεις της sequencing

3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

3.1 Πρωτόκολλο

Τα βασικά βήματα που ακολουθήσαμε είναι τα εξής:

1. Αποπαραφίνωση → Απομακρύνουμε από τον ιστό την παραφίνη η οποία χρησιμοποιείται προκειμένου να μονιμοποιηθεί ο ιστός.
2. Extraction DNA → Απο τον ιστό μας παίρνουμε μόνο το DNA από το οποίο θα ελέγξουμε αν υπάρχει μετάλλαξη στο γονίδιο K-Ras.
3. Φωτομέτρηση → Μετά την εξαγωγή DNA μετράμε την οπτική πυκνότητα του DNA προκειμένου να υπολογίσουμε την ποσότητα του DNA που θα χρησιμοποιήσουμε στην διαδικασία της RT-PCR. Όσον αφορά την τεχνική sequencing δεν ήταν απαραίτητη η μέτρηση της οπτικής πυκνότητας του DNA.
4. RT-PCR ή SEQUENCING → Ελέγχουμε αν υπάρχει κάποια από τις μεταλλάξεις στο γονίδιο K-Ras.

3.2 Υλικά που χρησιμοποιήσαμε και για τις δυο τεχνικές

Οι ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν κατά την αποπαραφίνωση του ιστού είναι:

1. Ξυλόλη: Ο ρόλος της είναι να καθαρίσει τον ιστό μας από την παραφίνη.
2. Αιθανόλη: Ο ρόλος της είναι να αφυδατωθεί ο ιστός μας και να απομακρυνθεί η ποσότητα της ξυλόλης που ενδεχομένως να έχει απομείνει.
3. Νερό: Ο ρόλος του είναι να ενυδατωθεί ο ιστός μας προκειμένου να ακολουθήσει η προετοιμασία του ιστού για Extraction DNA.

Οι ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν κατά την εξαγωγή DNA είναι:

1. Lysis Buffer: Ο ρόλος της είναι να προετοιμάσει τον ιστό προκειμένου να δεχτεί την Proteinase K.
2. RNase A (5 mg/ml σε 10mM Tris-HCl, pH 8,5, 10mM EDTA) : Ο ρόλος της είναι να απομακρύνει από τον ιστό κάθε κατάλοιπο RNA.
3. Proteinase K(στους 55° C, 20ng/ml σε 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 5mM CaCl₂, 50% glycerol): Ο ρόλος της είναι να επιταχύνει την διαδικασία της πέψης.

Οι ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν προκειμένου να πραγματοποιηθεί η διαδικασία της RT-PCR είναι:

1. Οι 7 μεταλλάξεις που μπορούμε να ανιχνεύσουμε στο γονίδιο K-Ras.
2. Ταq πολυμεράση που είναι το αναγκαίο ένζυμο για την πραγματοποίηση της RT-PCR.
3. Θετικός μάρτυρας που περιέχει όλες τις μεταλλάξεις μαζί.
4. Νερό που είναι απαραίτητο για την αραίωση του δείγματος μας.
5. Δείγμα μας που δεν είναι τίποτα άλλο από το DNA του ασθενούς.

Οι ουσίες και υλικά που χρησιμοποιήθηκαν προκειμένου να πραγματοποιηθεί η διαδικασία της Sequencing είναι:

1. DNA Amplification Master Mix (MM) που ενισχύει το δείγμα μας προκειμένου να ακολουθήσει η αλληλούχιση
2. K-Ras PCR Primers (PCR-P) που είναι απαραίτητοι για τον πολλαπλασιασμό του δείγματος
3. Clean-up Enzyme Mix (CI) που καθαρίζει τα δείγματα μας
4. K-Ras Enrichment Mix, Corbon 12 (EM) που ενισχύει το κωδικόνιο 12
5. K-Ras Enrichment Mix, Corbon 13 (EM) που ενισχύει το κωδικόνιο 13
6. K-Ras Detection Primers, Cordon 12 (DP) που είναι απαραίτητοι για τον πολλαπλασιασμό του κωδικονίου 12
7. K-Ras Detection Primers, Corbon 13 (DP) που είναι απαραίτητοι για τον πολλαπλασιασμό του κωδικονίου 13
8. K-Ras Mutation Controls, Cordon 12 (pre-mixed mutant and wild-type DNA)
9. K-Ras Mutation Controls, Cordon 13 (ore-mixed mutant and wild-type DNA)
10. Loading Buffer (loading buffer contains fluorescent-labelled size standards) χρησιμοποιείται προκειμένου να πραγματοποιηθεί η διαδικασία της Sequencing.
11. K-Ras TF-50 Filter Tips που φιλτράρουν τα υλικά μας.
12. Δείγμα μας που δεν είναι τίποτα άλλο από το DNA του ασθενούς.

3.3 Μηχανήματα που χρησιμοποιήσαμε

Τα μηχανήματα που χρησιμοποιήσαμε είναι τα εξής:

1. Medine Machine
2. Advanced Tissue Arrayer ATA-100

3. Φωτόμετρο
4. Extraction DNA iPrep™ invitrogen
5. 7500 Fast Real Time PCR System Applied Biosystem
6. Γενετικό Αναλυτή 3500 της Applied Biosystems (8-capillary DNA Sequencer).
7. PCR machine 9700.



Εικόνα 18: Στην εικόνα αυτή φαίνονται τα όργανα που χρησιμοποιήθηκαν. Στην πρώτη σειρά → Αριστερά: Advanced Tissue Arrayer ATA-100, στην μέση: Extraction DNA iPrep™ invitrogen, δεξιά: 7500 Fast Real Time PCR System Applied Biosystem, στην δεύτερη σειρά → Αριστερά: BD™ Medimachine system, δεξιά: Γενετικό Αναλυτή 3500 της Applied Biosystems (8-capillary DNA Sequencer). Στην τρίτη σειρά → 9700 PCR machine.

3.4 Ανάλυση των δυο τεχνικών που χρησιμοποιήσαμε κατά το πείραμα μας

Το πείραμα μας πραγματοποιήθηκε με τριών ειδών δειγμάτων: στο πρώτο χρησιμοποιώντας το μηχάνημα Advanced Tissue Arrayer ATA-100 παίρναμε τμήμα

του όγκου ή όλον τον όγκο (core). Με αυτό καταφέραμε να έχουμε μόνο καρκινικά κύτταρα, αποφεύγοντας νεκρώσεις, σημεία του ιστού που δεν έχουν όγκο κ.τ.λ. Στο δεύτερο χρησιμοποιώντας το μηχάνημα Medine Machine παίρναμε όλη την τομή του ιστού, η οποία τεμαχίζονταν στον μηχανήμα και στη συνέχεια φιλτράρονταν σε κατάλληλο φίλτρο παίρνοντας όσο το δυνατόν περισσότερα καρκινικά κύτταρα. Στο τρίτο χρησιμοποιήσαμε ολόκληρη την τομή του ιστού η οποία δεν τεμαχίστηκε με την χρήση του μηχανήματος Medine Machine.

Και οι τρεις διαδικασίες ακολουθούν τα ίδια βήματα, η διαφορά τους βρίσκεται στο γεγονός ότι στην πρώτη διαδικασία απομονώνουμε τον όγκο και τον επεξεργαζόμαστε, ενώ στην δεύτερη και στην τρίτη διαδικασία χρησιμοποιούμε όλη την τομή του ιστού, όπου η μια είναι επεξεργασμένη με το μηχάνημα του Medine Machine ενώ η άλλη όχι.

3.5 Αναλυτικά τα βήματα της RT-PCR

1. Αποψύχουμε τα μείγματα αντίδρασης και το μείγμα προτύπου. Κατά την απόψυξη, ανακατεύουμε κάθε διάλυμα ώστε να αποφύγουμε τις τοπικές συγκεντρώσεις αλάτων. Προετοιμάζουμε επαρκή μείγματα για τα δείγματα μας, το μεικτό πρότυπο και την αντίδραση NTC, καθώς και περίσσεια δύο αντιδράσεων για κάθε μείγμα. Οι όγκοι που χρειάζονται για κάθε αντίδραση φαίνονται στον πίνακα 6.

Ανάλυση	Μείγμα Αντίδρασης (μl)	Taq (μl)
Ελέγχου	19,8	0,2
Ανάλυση K-Ras	19,8	0,2

Πίνακας 6: Ρύθμιση αντίδρασης ανάλυσης. Όγκοι για μια αντίδραση

2. Προσθέτουμε 20μl δείγματος αντίδρασης ελέγχου σε κάθε κυψελίδα αντίδρασης. Προσθέτουμε 20μl μείγματος αντίδρασης μετάλλαξης σε κάθε κυψελίδα αντίδρασης. Κάθε δείγμα πρέπει να εξεταστεί με ανάλυση ελέγχου και ανάλυση K-Ras.

3. Προσθέτουμε 5μl δείγματος εξέτασης μεικτού πρότυπου ή νερού (για τις αντιδράσεις NTC) στις αντιδράσεις ελέγχου και στις αντιδράσεις μετάλλαξης. Δεν συνίσταται η προσθήκη περισσότερων από 20ng οδηγού ικανού προς ενίσχυση (βάσει του ποσοτικού προσδιορισμού της PCR) σε κάθε αντίδραση.

4. Περιστρέφουμε στιγμιαία τον δίσκο και τους σωλήνες PCR για να συγκεντρώσουμε τα αντιδραστήρια στον πυθμένα των κυψελίδων.

5. Σφραγίζουμε τον δίσκο και τους σωλήνες PCR και τα τοποθετούμε στον αναλυτή RT-PCR.

6. Διεξάγουμε την RT-PCR χρησιμοποιώντας τις παραμέτρους κύκλων που περιγράφονται στον Πίνακα 4.

3.5.1 Ανάλυση δειγμάτων

Η τιμή μεικτού προτύπου θα πρέπει να συμφωνεί με τις τιμές που παραθέτονται στον πίνακα 7, που ακολουθεί, με ενδεχόμενη απόκλιση ± 2 λόγω των διαφορετικών ρυθμίσεων ουδού στους διαφορετικούς αναλυτές.

Αν η ΔC_t δείγματος είναι μεγαλύτερη από την τιμή 1%, το δείγμα ταξινομείται ως αρνητικό ή ως κατώτερο των ορίων του kit. Αν όμως, η τιμή του δείγματος είναι μικρότερη από την τιμή 1%, το δείγμα ταξινομείται ως θετικό. Για τα δείγματα που εμφανίζουν ΔC_t κοντά στην τιμή 1%, θα πρέπει να επαναλάβουμε την ανάλυση εις τριπλούν και όλες οι επαναλήψεις θα πρέπει να είναι θετικές για να ταξινομηθεί το δείγμα ως θετικό. Για τα δείγματα με C_t μετάλλαξης μεγαλύτερης από 38 θα πρέπει επίσης να επαναλάβουμε την ανάλυση εις τριπλούν και όλες οι επαναλήψεις θα πρέπει να είναι θετικές για να ταξινομήσουμε το δείγμα ως θετικό.

3.5.2 Χαρακτηριστικά απόδοσης ανάλυσης

Ο θετικός έλεγχος για κάθε ανάλυση είναι ένα μεικτό πρότυπο που περιέχει 8 συνθετικά τμήματα (έναν θετικό έλεγχο για κάθε ανάλυση). Οι τιμές ΔC_t μεικτού προτύπου θα πρέπει να χρησιμοποιούνται για να επιβεβαιώσουμε ότι οι αναλύσεις λειτουργούν σωστά. Όπως ήδη έχουμε αναφέρει οι αναλύσεις ανιχνεύουν μετάλλαξη 1%. Έτσι με βάση αυτό η ΔC_t 1% προσδιορίστηκε σε εύρος συγκεντρώσεως DNA σε ποσότητα μικρότερη των 2ng ανά PCR. Τα χαρακτηριστικά απόδοσης ανάλυσης φαίνονται στον πίνακα 7.

Αναλύσεις	ΔCt μεικτού προτύπου	ΔCt 1%
12Ala	-0,1	6,5
12Asp	-0,65	8
12Arg	0,45	8
12Cys	-0,34	7
12Ser	0,49	9
12Val	0,44	6,5
13Asp	-1,26	9

Πίνακας 7: Χαρακτηριστικά απόδοσης ανάλυση

3.5.3 Ερμηνεία δεδομένων

Ενδέχεται να υπάρξει κάποια αυτοπαρεμβολή στις αντιδράσεις μετάλλαξης. Για παράδειγμα, αν παρατηρηθεί υψηλού επιπέδου μετάλλαξη 12Ala, κάποια από τις υπόλοιπες αντιδράσεις μετάλλαξης θα εμφανίσουν επίσης θετικό αποτέλεσμα. Αυτό οφείλεται στους εκκινητές ARMS που ανιχνεύουν διαφορετικές μεταλλάξεις στις ελάχιστες μεταξύ τους βάσεις. Στα συνθετικά υλικά ελέγχου η αυτοπαρεμβολή σχηματίζει έναν αναγνώσιμο τύπο που επιτρέπει τον προσδιορισμό των αληθώς θετικών αποτελεσμάτων από πολλά σήματα. Ωστόσο, ο τύπος μπορεί να είναι διαφορετικός σε δείγματα από διαφορετικές πηγές (π.χ. δείγματα PET).

3.6 Αναλυτικά τα βήματα της Sequencing

Η τεχνική αυτή αποτελείται από τρεις διαφορετικές PCR όπου η μια χρησιμοποιεί τα προϊόντα της άλλης. Έτσι για την PCR1:

1. Βγάζουμε από την συντήρηση τα αντιδραστήρια που είναι απαραίτητα για αυτήν την αντίδραση. Τα αντιδραστήρια αυτά είναι MM και PCR-P.
2. Υπολογίζουμε την ποσότητα που θα χρειαστούμε για τα δείγματα μας. Οι τύποι είναι: για το MM $\rightarrow 26 * 1,1^*$ (Αριθμό δειγμάτων + ένα αρνητικό + ένα θετικό για το κωδικόνιο 12 + ένα θετικό για το κωδικόνιο 13), για τους PCR-P $\rightarrow 1 * 1,1^*$ (Αριθμό δειγμάτων + ένα αρνητικό + ένα θετικό για το κωδικόνιο 12 + ένα θετικό για το κωδικόνιο 13). Και οι δύο αυτές ουσίες τοποθετούνται στο ίδιο tube και ανακατεύονται καλά
3. Ετοιμάζουμε τον κατάλληλο αριθμό tubes όσα είναι και τα δείγματα μας μαζί με τον αρνητικό μάρτυρα και τους δύο θετικούς μάρτυρες.
4. Σε κάθε tube προσθέτουμε τις εξής ποσότητες $\rightarrow 27\mu\text{l}$ από τα MM και PCR-P και $3\mu\text{l}$ αντίστοιχα από τα δείγματα μας. Όσον αφορά τον αρνητικό μάρτυρα

προσθέτουμε νερό, για τον θετικό μάρτυρα του κωδικονίου 12 προσθέτουμε 3μl από το C12 και για τον θετικό μάρτυρα του κωδικονίου 13 προσθέτουμε 3μl από το C13.

5. Τοποθετούμε τις αντιδράσεις που δημιουργήσαμε, στο μηχάνημα της PCR. Ο χρόνος εκτέλεσης είναι περίπου 2 ώρες.

Οι παράμετροι για την πραγματοποίηση της PCR 1 φαίνονται στον πίνακα 8

Αριθμός Κύκλων	Θερμοκρασία	Χρόνος
1	94° C	5 minutes
40	94° C	30 seconds
	52° C	45 seconds
	74° C	45 seconds
1	74° C	5 minutes
HOLD	4° C	N/A

Πίνακας 8: Παράμετροι για PCR 1

Για την PCR2:

1. Ετοιμάζουμε νέα tubes, ίσα σε αριθμό με τα δείγματα μου και επιπλέον έναν αρνητικό μάρτυρα και δυο θετικούς για τα κωδικόνια 12 και 13.
2. Στα νέα tubes προσθέτουμε 11μl από το C1.
3. Στην συνέχεια προσθέτουμε 4μl από τα προϊόντα της PCR1 στα νέα, αντίστοιχα tubes.
4. Τοποθετούμε τις νέες αντιδράσεις που δημιουργήσαμε στο μηχάνημα της PCR. Ο χρόνος εκτέλεσης είναι περίπου μια ώρα.

Οι παράμετροι για την πραγματοποίηση της PCR 2 φαίνονται στον πίνακα 9

Αριθμός Κύκλων	Θερμοκρασία	Χρόνος
1	37°C	45 minutes
1	90°C	15 minutes
HOLD	4°C	N/A

Πίνακας 9: Παράμετροι για PCR 2

Για την PCR3:

1. Σε αυτό το στάδιο τα δείγματα μας χωρίζονται στα 2. Η πρώτη ομάδα αφορά το κωδικόνιο 12, ενώ η δεύτερη ομάδα αφορά το κωδικόνιο 13.
2. Κάνουμε τους κατάλληλους υπολογισμούς προκειμένου να βρούμε τις ποσότητες που θα χρειαστούμε από το EM12, DP12, EM13 και DP13. Έπειτα βάζουμε τις ποσότητες αυτές σε δύο tube, το ένα για το κωδικόνιο 12 και το άλλο για το 13. Οι τύποι είναι:
για το EM12 $\rightarrow 11*1,1*$ (αριθμός δειγμάτων και ένας πλέον θετικός μάρτυρας για το κωδικόνιο 12)
DP12 $\rightarrow 2*1,1*$ (αριθμός δειγμάτων και ένας πλέον θετικός μάρτυρας για το κωδικόνιο 12)
Αντίστοιχα και για το κωδικόνιο 13.
3. Στην συνέχεια, σε κάθε tube προσθέτουμε τις εξής ποσότητες: 13 μl στα αντίστοιχα tubes για τα αντίστοιχα κωδικόνια.
4. Προσθέτουμε επίσης 2 μl από τα προϊόντα που πήραμε από την προηγούμενη αντίδραση στα αντίστοιχα tube.
5. Τέλος, οι νέες αντιδράσεις είναι έτοιμες. Τα βάζουμε στο μηχάνημα της PCR. Ο χρόνος εκτέλεσης είναι περίπου 50 λεπτά

Οι παράμετροι για την πραγματοποίηση της PCR 3 φαίνονται στον πίνακα 10

Αριθμός Κύκλων	Θερμοκρασία	Χρόνος
1	94°C	4 minutes
20	94°C	45 seconds
	60°C	20 seconds
	70°C	20 seconds
HOLD	4°C	N/A

Πίνακας 10: Παράμετροι για PCR 3

Ένα επιπλέον βήμα, εξίσου σημαντικό, πριν φορτώσουμε τα δείγματα μας στον γενετικό αναλυτή, είναι το φιλτράρισμα. Μαζί με τα αναλώσιμα υλικά παρέχονται και κατάλληλα φίλτρα προκειμένου να έχουμε ένα πιο καθαρό DNA για να ανιχνεύσουμε τις μεταλλάξεις του γονιδίου K-Ras. Σε αυτό το στάδιο

προετοιμάζουμε τα φίλτρα, κόβοντας το κάτω μέρος τους, στην συνέχεια φυγοκεντρούμε στα 33 rpm ή 1000 g για 2 λεπτά. Έπειτα τοποθετούμε τα φίλτρα αυτά σε νέα tube και προσθέτουμε 15 μl από τα προϊόντα που πήραμε από την τρίτη PCR. Ακολουθεί μια ακόμα φυγοκέντρωση στα 33 rpm ή 1000 g για 2 λεπτά.

Προσοχή!! Στην αρχή της διαδικασίας αυτής θα πρέπει να ελέγχουμε ώστε το φίλτρο να παραμείνει υγρό και να μην στεγνώσει. Σε περίπτωση όπου το φίλτρο δεν είναι υγρό, πρώτα προσθέτουμε νερό (100-150μL) και κάνουμε μετά την πρώτη φυγοκέντρωση.

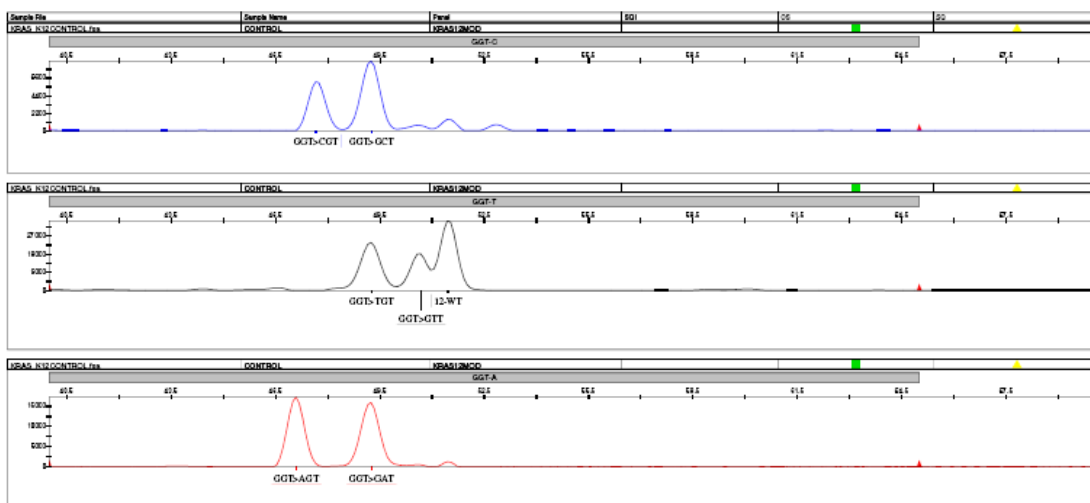
Σε αυτό το στάδιο είμαστε έτοιμοι να φορτώσουμε την πλάκα με τα δείγματα μας όπου θα επεξεργαστούν από τον γενετικό αναλυτή και θα μας δώσουν τα αποτελέσματα. Στην ειδική πλάκα του μηχανήματος προσθέτουμε 15 μl από το LB κάθετα και ίσα σε αριθμό με όλα τα προϊόντα από το φιλτράρισμα. Στην συνέχεια κάνουμε αραιώση στα δείγματα μας, εκτός από τον θετικό μάρτυρα των κωδικονίων 12 και 13. Η αραιώση που κάναμε εμείς ήταν 1/20. Έπειτα στις αντίστοιχες θέσεις τοποθετούμε 2μl από τα προϊόντα που πήραμε κατά το φιλτράρισμα.

Τέλος μετά από κατάλληλες ρυθμίσεις στον υπολογιστή, τοποθετούμε την πλάκα στο μηχάνημα και η επεξεργασία των δειγμάτων είναι έτοιμη να αρχίσει.

3.7 Ερμηνεία αποτελεσμάτων με την χρήση της Sequencing

Τα αποτελέσματα που παίρνουμε από την γενετικό αναλυτή είναι υπό την μορφή κορυφών με διαφορετικά χρώματα. Το μέγεθος της κάθε κορυφής είναι αντίστοιχο των 6 μεταλλάξεων στο κωδικόνιο 12 και των 6 μεταλλάξεων στο κωδικόνιο 13. Για να μπορέσουμε να αναλύσουμε τα αποτελέσματα των δειγμάτων μας θα πρέπει να συναντήσουμε κάποιες συγκεκριμένες κορυφές για τα δύο κωδικόνια αντίστοιχα.

Όσον αφορά το κωδικόνιο 12 θα πρέπει να συναντήσουμε 7 κορυφές, στη συνέχεια όποια επιπλέον κορυφή συναντήσουμε θα είναι η μετάλλαξη που έχει υποστεί το δείγμα μας. Στην εικόνα 19 που ακολουθεί παρουσιάζονται οι 7 κορυφές που θα πρέπει να συναντάμε σε κάθε δείγμα μας. Οι κορυφές αυτές μας δείχνουν ότι δούλεψε σωστά η αντίδραση μας. Σε περίπτωση που δεν υπάρχει άλλη κορυφή τότε το δείγμα μας είναι αρνητικό.



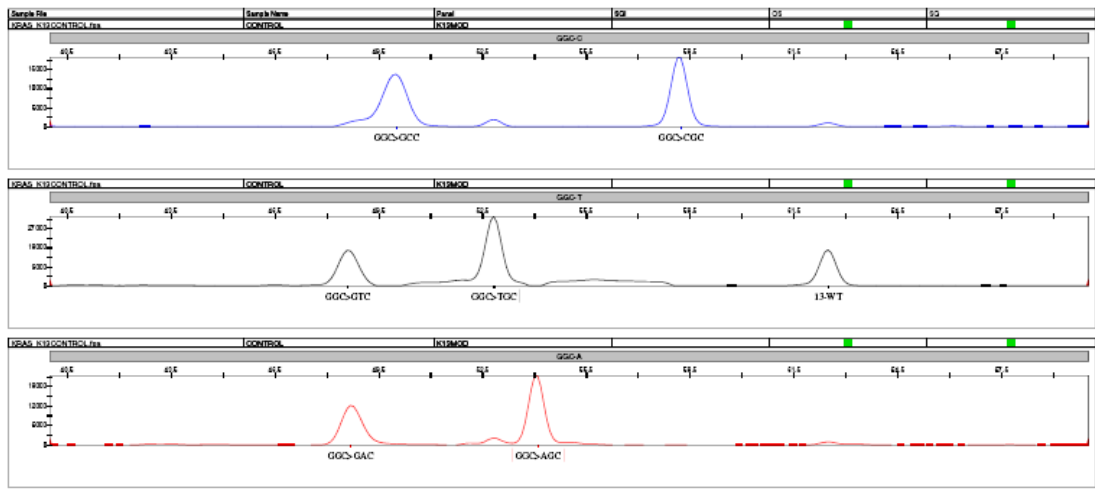
Εικόνα 19: Απαραίτητες κορυφές για το κωδικόνιο 12

Ακολουθεί ο πίνακας 11 όπου φαίνεται η αντιστοιχία χρωμάτων και μεταλλάξεων.

Αριθμός κορυφών	Χρώμα Κορυφών	Ερμηνεία
1	Black	Wild type
2	Black	GGT>GTT
3	Red	GGT>GAT
4	Blue	GGT>GCT
5	Black	GGT>TGT
6	Blue	GGT>CGT
7	Red	GGT>AGT

Πίνακας 11: Ερμηνείας αποτελεσμάτων

Όσον αφορά το κωδικόνιο 13 θα πρέπει να συναντήσουμε 7 κορυφές, διαφορετικές από αυτές του κωδικονίου 12, στη συνέχεια όποια επιπλέον κορυφή συναντήσουμε θα είναι η μετάλλαξη που έχει υποστεί το δείγμα μας. Στην εικόνα 20 που ακολουθεί παρουσιάζονται οι 7 κορυφές που θα πρέπει να συναντάμε σε κάθε δείγμα μας. Οι κορυφές αυτές μας δείχνουν ότι δούλεψε σωστά η αντίδραση μας. Σε περίπτωση όπου δεν υπάρχει άλλη κορυφή το δείγμα μας είναι αρνητικό.



Εικόνα 20: Απαραίτητες κορυφές για το κωδικόνιο 13

Ακολουθεί ο πίνακας 12 όπου φαίνεται η αντιστοιχία χρωμάτων και μεταλλάξεων.

Αριθμός Κορυφών	Χρώμα Κορυφών	Ερμηνεία
1	Black	Wild Type
2	Blue	GGC>CGC
3	Red	GGC>AGC
4	Black	GGC>TGC
5	Blue	GGC>GCC
6	Red	GGC>GAC
7	Black	GGC>GTC

Πίνακας 12: Ερμηνεία αποτελεσμάτων

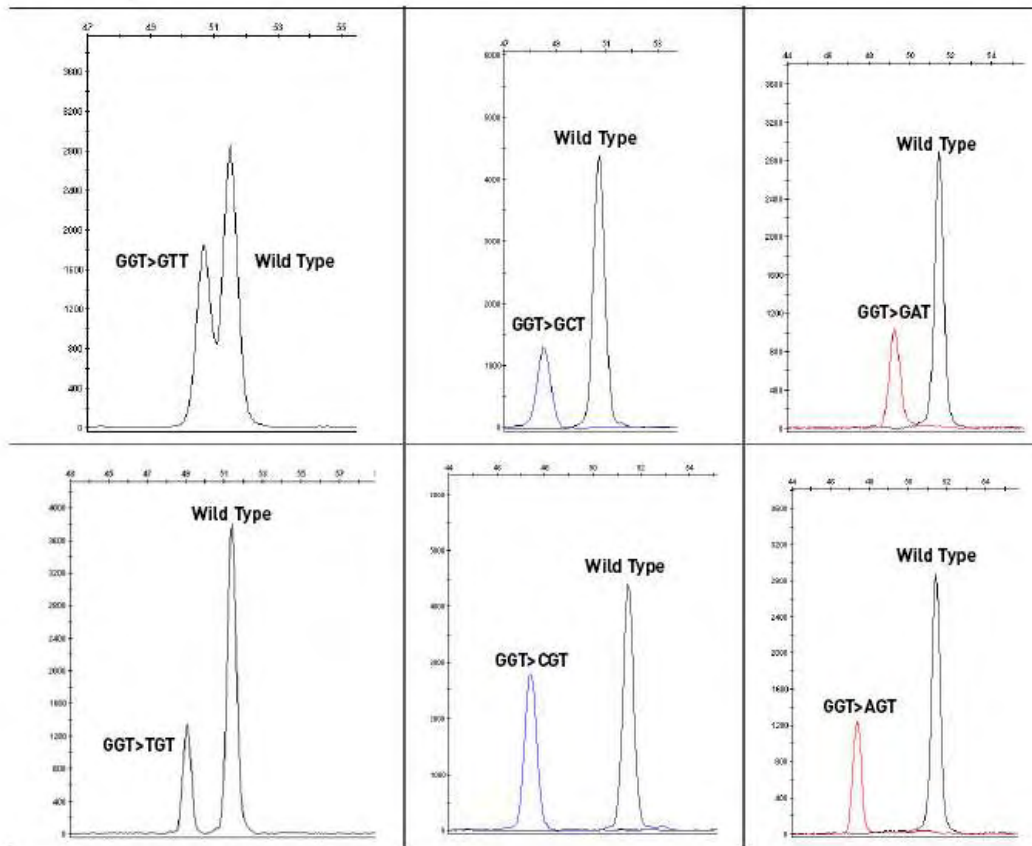
Για να μπορέσουμε να αναλύσουμε τα αποτελέσματα που παίρνουμε από τον γενετικό αναλυτή, θα πρέπει να έχουμε υπόψη τα εξής:

1. Η ανάγνωση των αποτελεσμάτων γίνεται από τα δεξιά προς τα αριστερά.
2. Η κορυφή Wild Type είναι μαύρη κορυφή στα δεξιά με το μεγαλύτερο μέγεθος κορυφής.
3. Όλες οι κορυφές μεταλλάξεων είναι μικρότερες από την κορυφή Wild Type.
4. Αγνοούμε κάθε κορυφή που δεν ταιριάζει με το χρώμα και το μέγεθος των κορυφών του control.
5. Το μέγεθος και η τοποθεσία της κορυφής ίσως εξαρτάται από τον γενετικό αναλυτή, το είδος του πολυμερούς και το μέγεθος του τριχοειδούς.

Χρησιμοποιούμε τις κορυφές που παράγονται από τα controls των μεταλλάξεων K-Ras για να επιβεβαιώσουμε το σωστό μέγεθος της κορυφής.

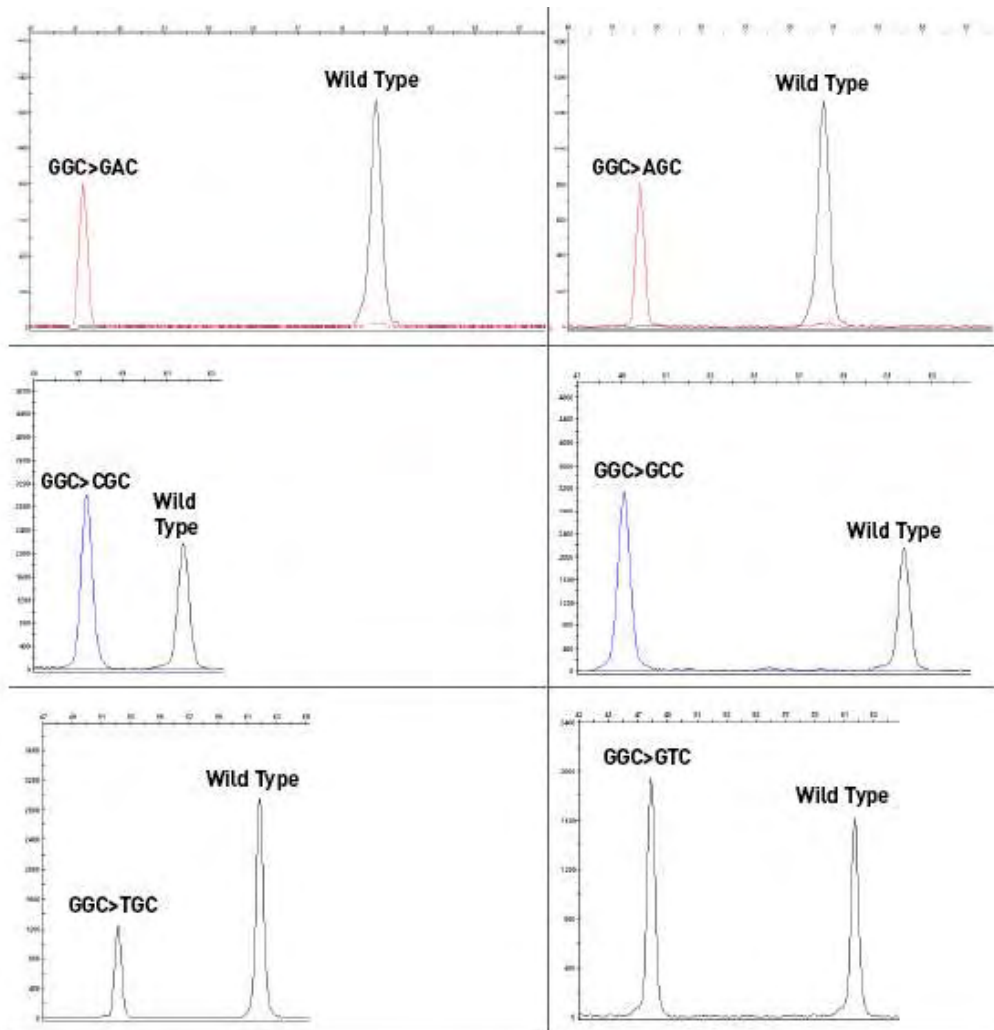
6. Η τοποθεσία της κορυφής ίσως διαφέρει ανάμεσα στα ατομικά τριχοειδή.

Στην εικόνα 21 που ακολουθεί, φαίνονται χωριστά κάθε κορυφή σε σχέση με την κορυφή του Wild Type:



Εικόνα 21: Αποτελέσματα για το κωδικόνιο 12

Ενώ στην εικόνα 22 που ακολουθεί φαίνονται χωριστά κάθε κορυφή σε σχέση με την κορυφή του Wild Type:

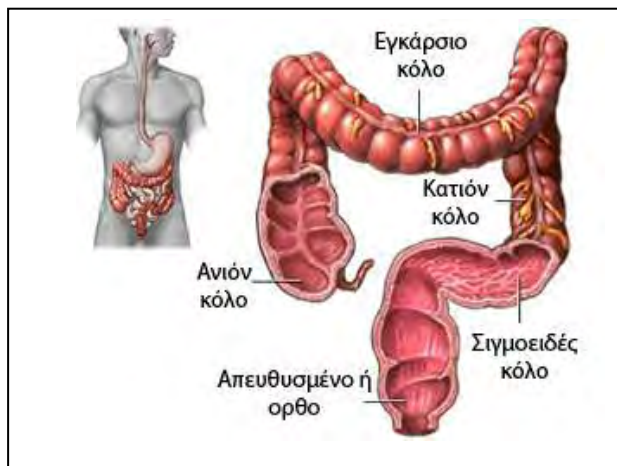


Εικόνα 22: Αποτελέσματα για το κωδικόνιο 13

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 Τα δείγματα μας

Τα δείγματα μας προήλθαν από διαγνωσμένο καρκίνο από άτομα που νοσηλεύτηκαν στο νοσοκομείο ΝΙΜΤΣ. Το σύνολο των δειγμάτων είναι 30 περιστατικά. Τα άτομα ήταν ηλικίας από 64 μέχρι 95. Σε αυτά τα περιστατικά τα 15 προέρχονται από γυναίκες και τα 15 από άνδρες. Τα δείγματα μας ήταν καρκίνος από κατιόν σιγμοειδούς, τμήμα ορθοσιγμοειδούς, τμήμα ορθού και τμήμα σιγμοειδούς.



Στην εικόνα 23 που ακολουθεί φαίνονται τα μέρη του παχέος εντέρου.

Τα δείγματα μας βρίσκονται κατά Astler Coller σε στάδιο διήθησης C1, C2 και C3. Σε όλα τα δείγματα μας εντοπίστηκαν λεμφαδένες όμως σε ορισμένα από αυτά τα υλικά δεν ήταν επαρκές για την περαιτέρω επεξεργασία.

4.2 Προβλήματα που αντιμετωπίσαμε

Όσον αφορά την πρώτη διαδικασία (core) δεν αντιμετωπίσαμε κάποιο πρόβλημα κατά την όλη διαδικασία. Το πείραμα μας πραγματοποιήθηκε ακολουθώντας το πρωτόκολλο που έχουμε ήδη αναφέρει.

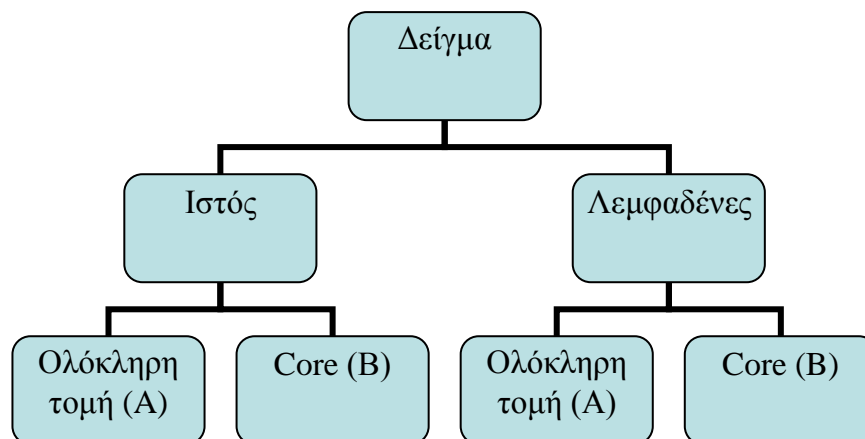
Όσον αφορά όμως την δεύτερη διαδικασία (Medine Machine), τα προβλήματα που αντιμετωπίσαμε ήταν δυο:

1. Αρχικά δεν γνωρίζαμε το buffer που έπρεπε να χρησιμοποιήσουμε. Έτσι ανατρέξαμε σε διάφορα πρωτόκολλα που αναφέρονταν σε αυτήν την διαδικασία και καταλήξαμε ότι το buffer που θα χρησιμοποιήσουμε είναι το Lysis Buffer.

2. Το δεύτερο πρόβλημα που αντιμετωπίσαμε ήταν η χρήση του φίλτρου. Κατά την διαδικασία του Medine Machine υπάρχουν 5 φίλτρα (10 μ m, 20 μ m, 30 μ m, 40 μ m και 50 μ m). Το πρόβλημα αυτό λύθηκε με τον εξής τρόπο: Είναι γνωστό ότι ένα καρκινικό κύτταρο έχει μέγεθος περίπου 3-4 φορές μεγαλύτερο από το μέγεθος ενός λεμφοκυττάρου (περίπου 8 μ m). Έτσι το μέγεθος ενός καρκινικού κυττάρου είναι περίπου 24- 32 μ m. Σε πρώτη φάση χρησιμοποιήσαμε το φίλτρο 30 μ m και στη συνέχεια με την χρήση ειδικής φυγόκεντρου ‘στρώσαμε’ τα κύτταρα σε πλακάκια όπου ακολούθησε η χρώση τους με ηωσίνη- αιματοξυλίνη. Τα αποτελέσματα από την όλη διαδικασία έδειξαν ότι το φίλτρο αυτό επιτρέπει ικανοποιητική ποσότητα καρκινικών κυττάρων να διέλθουν από αυτό. Με όλη αυτή την διαδικασία καταλήξαμε στο συμπέρασμα ότι το ιδανικό φίλτρο είναι εκείνο των 30 μ m.

4.3 Μετρήσεις των δειγμάτων μας και υπολογισμοί

Τα δείγματα μας χωρίζονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες: Η πρώτη είναι τμήμα του ιστού, ενώ η δεύτερη είναι οι λεμφαδένες που βρέθηκαν. Ωστόσο, κάθε μια από τις κατηγορίες αυτές χωρίζεται σε δύο άλλες μικρότερες κατηγορίες: Η πρώτη είναι ολόκληρη η τομή (A), ενώ η δεύτερη είναι μόνο το τμήμα του ιστού που έχει τον καρκίνο (core). Οι διάφορες κατηγορίες φαίνονται στην εικόνα 24.



Εικόνα 24: Σχεδιάγραμμα που φαίνονται οι κατηγορίες

A) Αποτελέσματα Real Time-PCR

Τα αποτελέσματα που πήραμε από την Real Time PCR για τον ιστό σε ολόκληρη την τομή (A) φαίνονται στον πίνακα 13 που ακολουθεί:

Αριθμός Δείγματος	Δείγματα	Μετάλλαξη
1	933/6	Asp12
	933/7	Asp12
2	2026/7	Asp13
3	2653/6	Val
4	1846/4	Val
5	4105/4	-
	4105/21	-
6	622/3	-
	622/5	-
7	2259/12	Arg
8	2290/3	Asp
9	1845/3	Asp12
10	746/2	-
	746/5	-
11	2673/2	-
	2673/5	Asp12
12	2038/1	-
	2038/3	-
13	392/3	-
	392/4	-
14	1300/4	-
15	1690/4	-
16	2581/4	-
	2581/5	-
17	3074/4	-
18	3254/4	Val
19	3876/5	-

20	2508/4	-
21	3874/3	-
22	1385/8	Asp12
	1385/9	Asp12
23	3201/3	Ser
24	1026/4	Asp12
25	1935/8	Val
26	4149/8	-
27	2200/5	Ser
28	2772/1	Arg
29	2641/4	Asp13
30	1023/3	-

Πίνακας 13: Τα αποτελέσματα από RT-PCR σε ολόκληρη τομή

Σημείωση! Στην δεύτερη στήλη, ο πρώτος αριθμός είναι ο αριθμός πρωτοκόλλου του ασθενή που καταχωρήθηκε στο νοσοκομείο NIMTS. Ενώ ο δεύτερος αριθμός είναι ο αριθμός του block που χρησιμοποιήσαμε.

Τα αποτελέσματα που πήραμε από την Real Time PCR για τον ιστό στο core (B) φαίνονται στον πίνακα 14 που ακολουθεί:

Αριθμός Δείγματος	Δείγματα	Μετάλλαξη
1	933/6	Asp12
	933/7	Asp12
2	2026/7	Asp13
3	2653/6	Val
4	1846/4	Val
5	4105/4	-
	4105/21	-
6	622/3	-
	622/5	-
7	2259/12	Arg

8	2290/3	Asp
9	1845/3	Asp12
10	746/2	-
	746/5	-
11	2673/2	-
	2673/5	Asp12
12	2038/1	-
	2038/3	-
13	392/3	-
	392/4	-
14	1300/4	-
15	1690/4	-
16	2581/4	-
	2581/5	-
17	3074/4	-
18	3254/4	Val
19	3876/5	-
20	2508/4	-
21	3874/3	-
22	1385/8	Asp12
	1385/9	Asp12
23	3201/3	Ser
24	1026/4	Asp12
25	1935/8	Val
26	4149/8	-
27	2200/5	Ser
28	2772/1	Arg
29	2641/4	Asp13
30	1023/3	-

Πίνακας 14: Τα αποτελέσματα από RT-PCR στο core

Τα αποτελέσματα που πήραμε από την Real Time PCR για τους λεμφαδένες σε ολόκληρη την τομή (A) φαίνονται στον πίνακα 15 που ακολουθεί:

Αριθμός Δείγματος	Δείγματα	Μετάλλαξη
1	933/10	-
2	2026/11	Asp13
3	2653	*
4	1846/10	-
5	4105/6	-
6	622/10	-
7	2259	*
8	2290/15	Asp
9	1845/7	-
10	746/7	-
11	2673/14	*
12	2038/1	-
13	392/7	-
14	1300/10	-
15	1690/11	-
16	2581/10	-
17	3074/9	-
18	3254/8	Val
19	3876/7	-
20	2508/18	-
21	3874/9	-
22	1385/10	Asp12
23	3201/5	Ser
24	1026/10	Asp12
25	1935/8	-
26	4149/9	-
27	2200/7	-
28	2772/8	-

29	2641/7	-
30	1023/10	-

Πίνακας 15: Τα αποτελέσματα από RT-PCR στους λεμφαδένες σε ολόκληρη τομή

Σημείωση! Στα τετράγωνα όπου υπάρχει αστεράκι το υλικό δεν ήταν επαρκές για να μπορέσουμε να πραγματοποιήσουμε την διαδικασία αυτή.

Τα αποτελέσματα που πήραμε από την Real Time PCR για τους λεμφαδένες στο core (B) φαίνονται στον πίνακα 16 που ακολουθεί:

Αριθμός Δείγματος	Δείγματα	Μετάλλαξη
1	933/10	-
2	2026/11	Asp13
3	2653	*
4	1846/10	-
5	4105/6	-
6	622/10	-
7	2259	*
8	2290/15	Asp
9	1845/7	-
10	746/7	-
11	2673/14	*
12	2038/1	-
13	392/7	-
14	1300/10	-
15	1690/11	-
16	2581/10	-
17	3074/9	-
18	3254/8	Val
19	3876/7	-
20	2508/18	-
21	3874/9	-
22	1385/10	Asp12

23	3201/5	Ser
24	1026/10	Asp12
25	1935/8	-
26	4149/9	-
27	2200/7	-
28	2772/8	-
29	2641/7	-
30	1023/10	-

Πίνακας 16: Τα αποτελέσματα από RT-PCR στους λεμφαδένες σε core

Πως τοποθετούμε το Threshold

Το είδος των γραφικών παραστάσεων που πήραμε μέσω της Real Time PCR, όπως ήδη έχουμε αναφέρει παραπάνω, είναι μια σιγμοειδής μορφή όπου η τιμή του Ct καθορίζεται από την τοποθέτηση του Threshold. Ο τρόπος με τον οποίο τοποθετούμε την βοηθητική αυτή γραμμή είναι ο εξής: κάθε καμπύλη αποτελείται από την εκθετική και την στατική φάση, το threshold τοποθετείται στην μέση της εκθετικής φάσης.

B) Αποτελέσματα Sequencing

Τα αποτελέσματα που πήραμε από την Sequencing είναι με την μορφή γραφικών παραστάσεων που μας δείχνουν εάν τα δείγματα μας είναι θετικά ή αρνητικά. Ωστόσο, στους πίνακες που ακολουθούν, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που πήραμε από την τεχνική αυτή.

Τα αποτελέσματα που πήραμε από την Sequencing για τον ιστό σε ολόκληρη την τομή (A) φαίνονται στον πίνακα 17 που ακολουθεί:

Αριθμός Δείγματος	Δείγματα	Μετάλλαξη
1	933/6	Asp12
	933/7	Asp12
2	2026/7	Asp13
3	2653/6	Val12

4	1846/4	Val12
5	4105/4	-
	4105/21	-
6	622/3	-
	622/5	-
7	2259/12	Arg12
8	2290/3	Asp12
9	1845/3	Asp12
10	746/2	-
	746/5	-
11	2673/2	-
	2673/5	Asp12
12	2038/1	Ala13
	2038/3	Ala13
13	392/3	-
	392/4	-
14	1300/4	Ala13
15	1690/4	-
16	2581/4	-
	2581/5	-
17	3074/4	-
18	3254/4	Val12
19	3876/5	-
20	2508/4	-
21	3874/3	-
22	1385/8	Asp12
	1385/9	Asp12
23	3201/3	Ser12
24	1026/4	Asp12
25	1935/8	Val12
26	4149/8	-
27	2200/5	Ser12

28	2772/1	Arg12
29	2641/4	Asp13
30	1023/3	-

Πίνακας 17: Τα αποτελέσματα από Sequencing σε ολόκληρη τομή

Τα αποτελέσματα που πήραμε από την Sequencing για τον ιστό στο core (B) φαίνονται στον πίνακα 18 που ακολουθεί:

Αριθμός Δείγματος	Δείγματα	Μετάλλαξη
1	933/6	Asp12
	933/7	Asp12
2	2026/7	Asp13
3	2653/6	Val12
4	1846/4	Val12
5	4105/4	-
	4105/21	-
6	622/3	-
	622/5	-
7	2259/12	Arg12
8	2290/3	Asp12
9	1845/3	Asp12
10	746/2	-
	746/5	-
11	2673/2	-
	2673/5	Asp12
12	2038/1	Ala13
	2038/3	Ala13
13	392/3	-
	392/4	-
14	1300/4	Ala13
15	1690/4	-
16	2581/4	-

	2581/5	-
17	3074/4	-
18	3254/4	Val12
19	3876/5	-
20	2508/4	-
21	3874/3	-
22	1385/8	Asp12
	1385/9	Asp12
23	3201/3	Ser12
24	1026/4	Asp12
25	1935/8	Val12
26	4149/8	-
27	2200/5	Ser12
28	2772/1	Arg12
29	2641/4	Asp13
30	1023/3	-

Πίνακας 18: Τα αποτελέσματα από Sequencing στο core

Τα αποτελέσματα που πήραμε από την Sequencing για τους λεμφαδένες σε ολόκληρη την τομή (A) φαίνονται στον πίνακα 19 που ακολουθεί:

Αριθμός Δείγματος	Δείγματα	Μετάλλαξη
1	933/10	-
2	2026/11	Asp13
3	2653	*
4	1846/10	-
5	4105/6	-
6	622/10	-
7	2259	*
8	2290/15	Asp12
9	1845/7	-
10	746/7	-

11	2673/14	*
12	2038/1	Ala13
13	392/7	-
14	1300/10	Ala13
15	1690/11	-
16	2581/10	-
17	3074/9	-
18	3254/8	Val12
19	3876/7	-
20	2508/18	-
21	3874/9	-
22	1385/10	Asp12
23	3201/5	Ser12
24	1026/10	Asp12
25	1935/8	-
26	4149/9	-
27	2200/7	-
28	2772/8	-
29	2641/7	-
30	1023/10	-

Πίνακας 19: Τα αποτελέσματα από Sequencing στους λεμφαδένες σε ολόκληρη τομή

Σημείωση! Στα τετράγωνα όπου υπάρχει αστεράκι το υλικό δεν ήταν επαρκές για να μπορέσουμε να πραγματοποιήσουμε την διαδικασία αυτή.

Τα αποτελέσματα που πήραμε από την Sequencing για τους λεμφαδένες στο core (B) φαίνονται στον πίνακα 20 που ακολουθεί:

Αριθμός Δείγματος	Δείγματα	Μετάλλαξη
1	933/10	-
2	2026/11	Asp13
3	2653	*
4	1846/10	-

5	4105/6	-
6	622/10	-
7	2259	*
8	2290/15	Asp12
9	1845/7	-
10	746/7	-
11	2673/14	*
12	2038/1	Ala13
13	392/7	-
14	1300/10	Ala13
15	1690/11	-
16	2581/10	-
17	3074/9	-
18	3254/8	Val12
19	3876/7	-
20	2508/18	-
21	3874/9	-
22	1385/10	Asp12
23	3201/5	Ser12
24	1026/10	Asp12
25	1935/8	-
26	4149/9	-
27	2200/7	-
28	2772/8	-
29	2641/7	-
30	1023/10	-

Πίνακας 20: Τα αποτελέσματα από Sequencing στους λεμφαδένες σε core

Στο σημείο αυτό παρουσιάζεται ένας συνοπτικός πίνακας 21 των αποτελεσμάτων και των τριών διαδικασιών (Medine Machine, RT-PCR, Sequencing) όσον αφορά την ολόκληρη τομή και το core του ιστού.

Περιστατικά	MedineMachine		RT-PCR		Sequencing	
	A	B	A	B	A	B
933/6	-	-	Asp12	Asp12	Asp12	Asp12
933/7	-	-	Asp12	Asp12	Asp12	Asp12
2026/7	-	-	Asp13	Asp13	Asp13	Asp13
2653/6	-	-	Val	Val	Val12	Val12
1846/4	-	-	Val	Val	Val12	Val12
4105/4	-	-	-	-	-	-
4105/21	-	-	-	-	-	-
622/3	-	-	-	-	-	-
622/5	-	-	-	-	-	-
2259/12	-	-	Arg	Arg	Arg12	Arg12
2290/3	-	-	Asp	Asp	Asp12	Asp12
1845/3	-	-	Asp12	Asp12	Asp12	Asp12
746/2	-	-	-	-	-	-
746/5	-	-	-	-	-	-
2673/2	-	-	-	-	-	-
2673/5	-	-	Asp12	Asp12	Asp12	Asp12
2038/1	-	-	-	-	Ala13	Ala13
2038/3	-	-	-	-	Ala13	Ala13
392/3	-	-	-	-	-	-
392/4	-	-	-	-	-	-
1300/4	-	-	-	-	Ala13	Ala13
1690/4	-	-	-	-	-	-
2581/4	-	-	-	-	-	-
2581/5	-	-	-	-	-	-
3074/4	-	-	-	-	-	-
3254/4	-	-	Val	Val	Val12	Val12
3876/5	-	-	-	-	-	-
2508/4	-	-	-	-	-	-
3874/3	-	-	-	-	-	-

1385/8	-	-	Asp12	Asp12	Asp12	Asp12
1385/9	-	-	Asp12	Asp12	Asp12	Asp12
3201/3	-	-	Ser	Ser	Ser12	Ser12
1026/4	-	-	Asp12	Asp12	Asp12	Asp12
1935/8	-	-	Val	Val	Val12	Val12
4149/8	-	-	-	-	-	-
2200/5	-	-	Ser	Ser	Ser12	Ser12
2772/1	-	-	Arg	Arg	Arg12	Arg12
2641/4	-	-	Asp13	Asp13	Asp13	Asp13
1023/3	-	-	-	-	-	-

Πίνακας 21: Συνοπτικός πίνακας αποτελεσμάτων

Στο σημείο αυτό παρουσιάζεται ένας συνοπτικός πίνακας 22 των αποτελεσμάτων και των τριών διαδικασιών όσον αφορά την ολόκληρη τομή και το core των λεμφαδένων.

Περιστατικά	MedineMachine		RT-PCR		Sequencing	
	A	B	A	B	A	B
933/10	-	-	-	-	-	-
2026/11	-	-	Asp13	Asp13	Asp13	Asp13
2653	-	-	*	*	*	*
1846/10	-	-	-	-	-	-
4105/6	-	-	-	-	-	-
622/10	-	-	-	-	-	-
2259	-	-	*	*	*	*
2290/15	-	-	Asp	Asp	Asp12	Asp12
1845/7	-	-	-	-	-	-
746/7	-	-	-	-	-	-
2673/14	-	-	*	*	*	*
2038/1	-	-	-	-	Ala13	Ala13
392/7	-	-	-	-	-	-
1300/10	-	-	-	-	Ala13	Ala13
1690/11	-	-	-	-	-	-

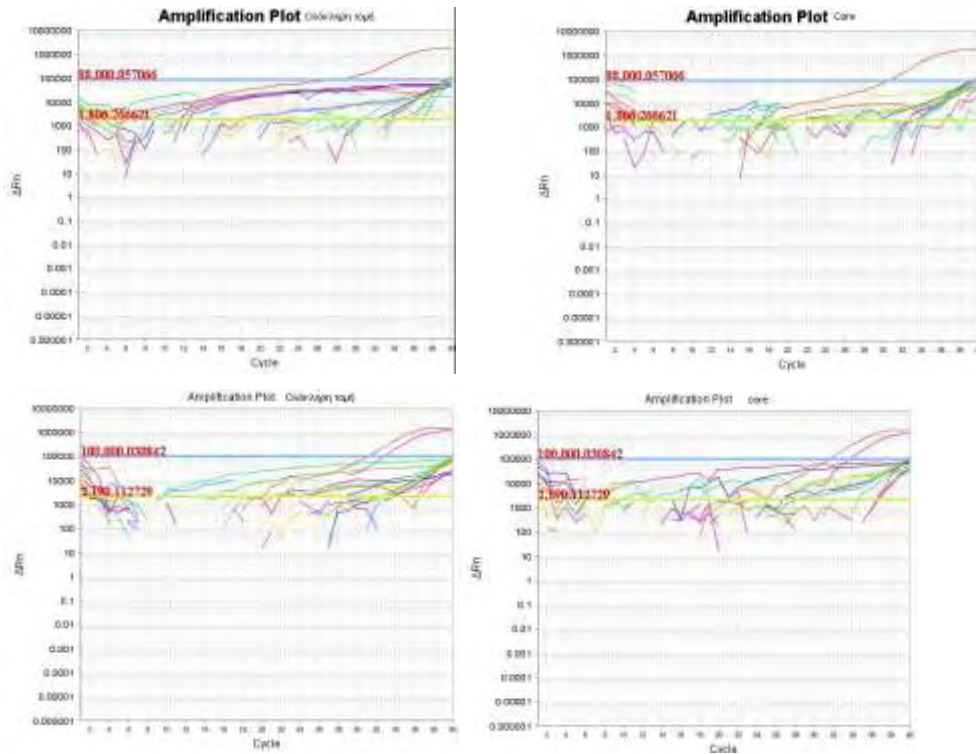
2581/10	-	-	-	-	-	-
3074/9	-	-	-	-	-	-
3254/8	-	-	Val	Val	Val12	Val12
3876/7	-	-	-	-	-	-
2508/18	-	-	-	-	-	-
3874/9	-	-	-	-	-	-
1385/10	-	-	Asp12	Asp12	Asp12	Asp12
3201/5	-	-	Ser	Ser	Ser12	Ser12
1026/10	-	-	Asp12	Asp12	Asp12	Asp12
1935/8	-	-	-	-	-	-
4149/9	-	-	-	-	-	-
2200/7	-	-	-	-	-	-
2772/8	-	-	-	-	-	-
2641/7	-	-	-	-	-	-
1023/10	-	-	-	-	-	-

Πίνακας 22: Συνοπτικός πίνακας των αποτελεσμάτων των λεμφαδένων

4.4 Συζήτηση αποτελεσμάτων

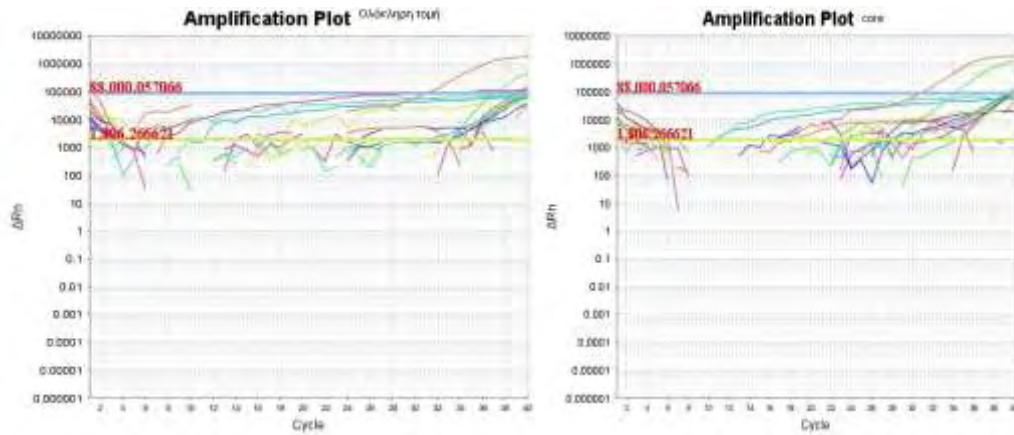
Real Time PCR

Στα δείγματα μας είχαμε αρκετά περιστατικά τα οποία είναι θετικά ως προς τις συγκεκριμένες μεταλλάξεις, ενώ άλλα είναι αρνητικά ως προς αυτές τις μεταλλάξεις. Εύκολα καταλαβαίνει κανείς ότι ο καρκίνος που παρουσιάζεται στα περιστατικά μας, αλλά τα περιστατικά αυτά είναι αρνητικά ως προς τις μεταλλάξεις του γονιδίου K-Ras, οφείλεται σε κάποια μετάλλαξη σε άλλο γονίδιο. Επομένως οποιαδήποτε προτεινόμενη θεραπεία και αν εφαρμόσουμε στον ασθενή δεν θα έχει θετικά αποτελέσματα στην αντιμετώπιση της νόσου.



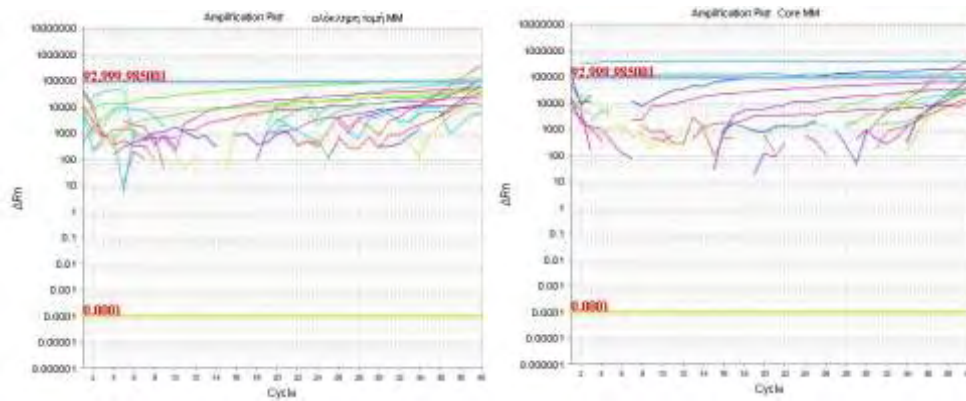
Εικόνα 25: Αποτελέσματα περιστατικών → Πάνω αριστερά παρουσιάζεται ένα περιστατικό το οποίο είναι αρνητικό και προέρχεται από ολόκληρη τομή. Πάνω δεξιά παρουσιάζεται ένα περιστατικό το οποίο είναι αρνητικό και προέρχεται από core. Κάτω αριστερά παρουσιάζεται ένα περιστατικό το οποίο είναι θετικό και προέρχεται από ολόκληρη την τομή. Κάτω δεξιά παρουσιάζεται ένα περιστατικό το οποίο είναι θετικό και προέρχεται από core.

Σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα συμπεραίνουμε ότι όταν πραγματοποιούμε την τεχνική της Real Time PCR στο core, στο τμήμα δηλαδή του ιστού όπου υπάρχει καρκίνος η διαδικασία είναι πιο αποτελεσματική. Τα αποτελέσματα του είναι πιο ακριβή και σε επιτρεπτούς κύκλους. Ενώ όταν πραγματοποιούμε Real Time PCR σε ολόκληρη τομή, τα αποτελέσματα δεν είναι τόσο ακριβή διότι παρουσιάζονται σε πολύ μεγαλύτερους κύκλους όπου δεν μπορούμε να τα θεωρήσουμε αποδεκτά. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι ολόκληρος ο ιστός αποτελείται από νεκρώσεις, από τμήματα που δεν παρουσιάζουν καρκίνο, από αλλοιώσεις, από αποστήματα με αποτέλεσμα να αλλοιώνουν τα αποτελέσματα της Real Time PCR. Όλα αυτά βέβαια αφορούν τα περιστατικά που δεν έγινε χρήση του μηχανήματος Medicine Machine.



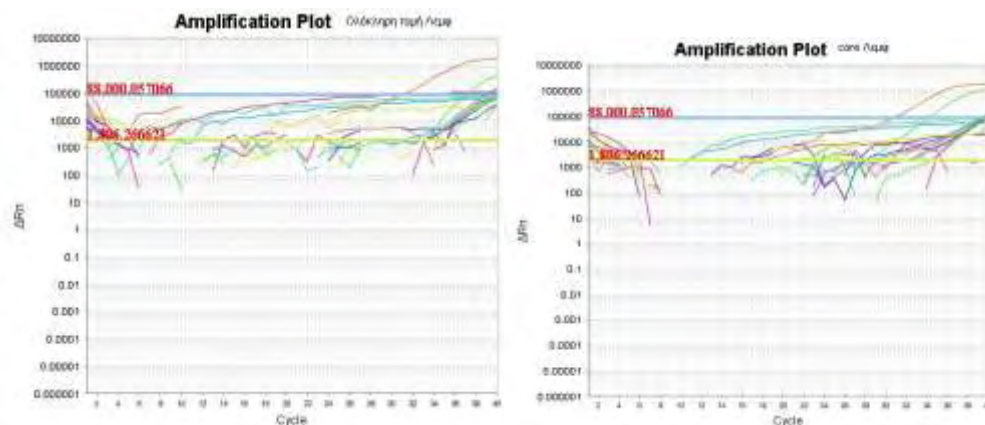
Εικόνα 26: Περιστατικά από ολόκληρη την τομή και από core → Αριστερά παρουσιάζεται η ολόκληρη τομή όπου υπάρχει μια μετάλλαξη αλλά δεν μπορούμε να πούμε με σιγουριά ότι είναι θετικό το περιστατικό. Δεξιά παρουσιάζεται το core όπου το περιστατικό είναι θετικό.

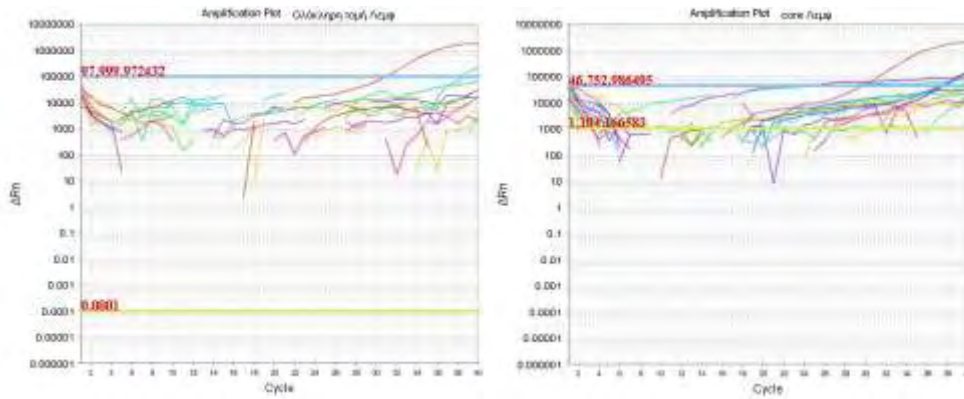
Όσον αφορά τα περιστατικά όπου έγινε χρήση του μηχανήματος Medine Machine, δεν πήραμε καθόλου αποτελέσματα. Χρησιμοποιώντας το περιστατικό 933/07 το οποίο είχε δουλευτεί με την προηγούμενη τεχνική και το οποίο ήταν θετικό ως προς μια μετάλλαξη της Ασπαραγίνης στο κωδικόνιο 12, η τεχνική αυτή μας έδειξε ότι ήταν αρνητικό. Οι λόγοι είναι προφανείς: αρκετή ποσότητα των καρκινικών τμημάτων χάνονται είτε κατά την επεξεργασία τους με το συγκεκριμένο μηχάνημα είτε κατά το φιλτράρισμα του υλικού με τα φίλτρα. Επίσης ένα άλλο γεγονός που μας οδηγεί στο να θεωρήσουμε την μέθοδο αυτή ανακριβής είναι ότι τα καρκινικά κύτταρα δεν έχουν ένα συγκεκριμένο μέγεθος, άλλα από αυτά είναι αρκετά μεγάλα και άλλα είναι αρκετά μικρά. Έτσι κανένα από τα φίλτρα που μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε, δεν μας καλύπτει επαρκώς ώστε να είμαστε σίγουροι ότι ικανοποιητική ποσότητα καρκινικών κυττάρων θα περάσουν από τα φίλτρα αυτά. Τα φίλτρα των 50μm θα επέτρεπαν την είσοδο σε πολλά άχρηστα προϊόντα ενώ τα φίλτρα των 20μm δεν θα επέτρεπαν στα καρκινικά κύτταρα να διέλθουν από τα φίλτρα.



Εικόνα 27: Real Time με την χρήση του Medicine Machine (MM) → Αριστερά παρουσιάζεται η ολόκληρη τομή με την χρήση του MM. Δεξιά παρουσιάζεται το core με την χρήση του MM.

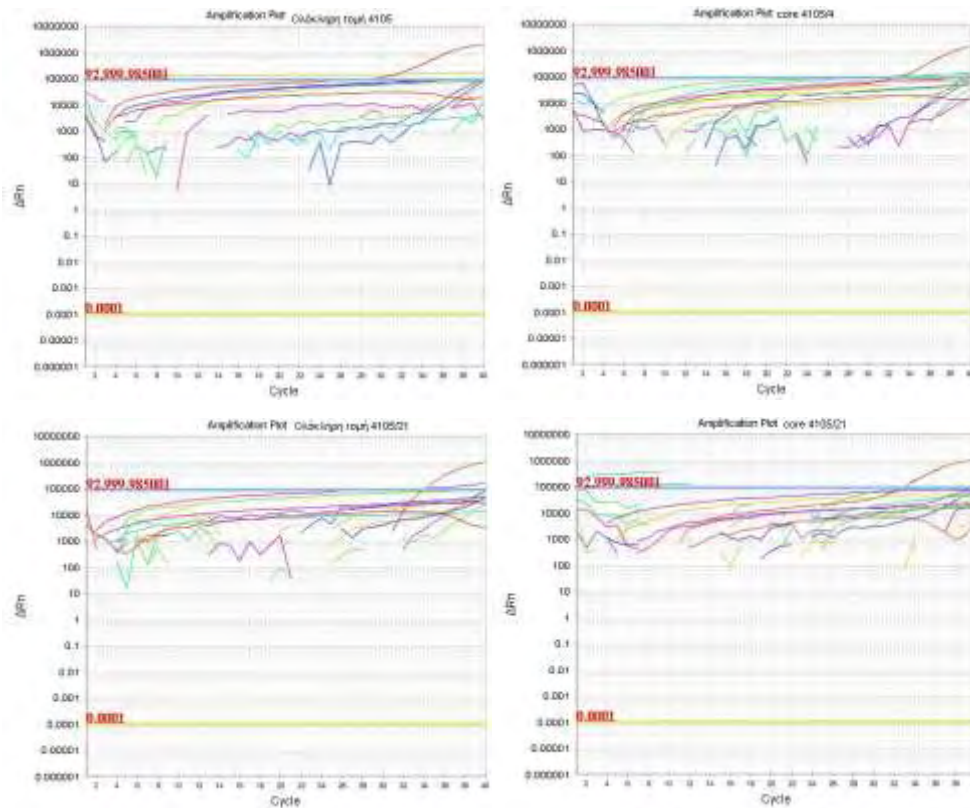
Ένα άλλο γεγονός που μας απασχόλησε, ήταν οι λεμφαδένες. Σε κάθε περιστατικό πέρα από την ολόκληρη τομή και το core ελέγξαμε αν υπάρχει η μετάλλαξη και στους λεμφαδένες. Η διαδικασία αυτή έγινε προκειμένου να ελέγξουμε το στάδιο του καρκίνου. Όπως άλλωστε είναι γνωστό όταν η νόσος αυτή έχει "χτυπήσει" τους λεμφαδένες, εκείνοι μεταφέρονται στην λέμφο και στη συνέχεια στο αίμα. Επομένως καρκινικά κύτταρα μεταφέρονται με την βοήθεια του αίματος που συνεπάγεται και την μετάσταση του καρκίνου. Η πιο πιθανή μετάσταση είναι αυτή του ήπατος. Επομένως οποιαδήποτε θεραπεία προτείνεται για την αντιμετώπιση του καρκίνου στο παχύ έντερο δεν θα είναι αποτελεσματική.





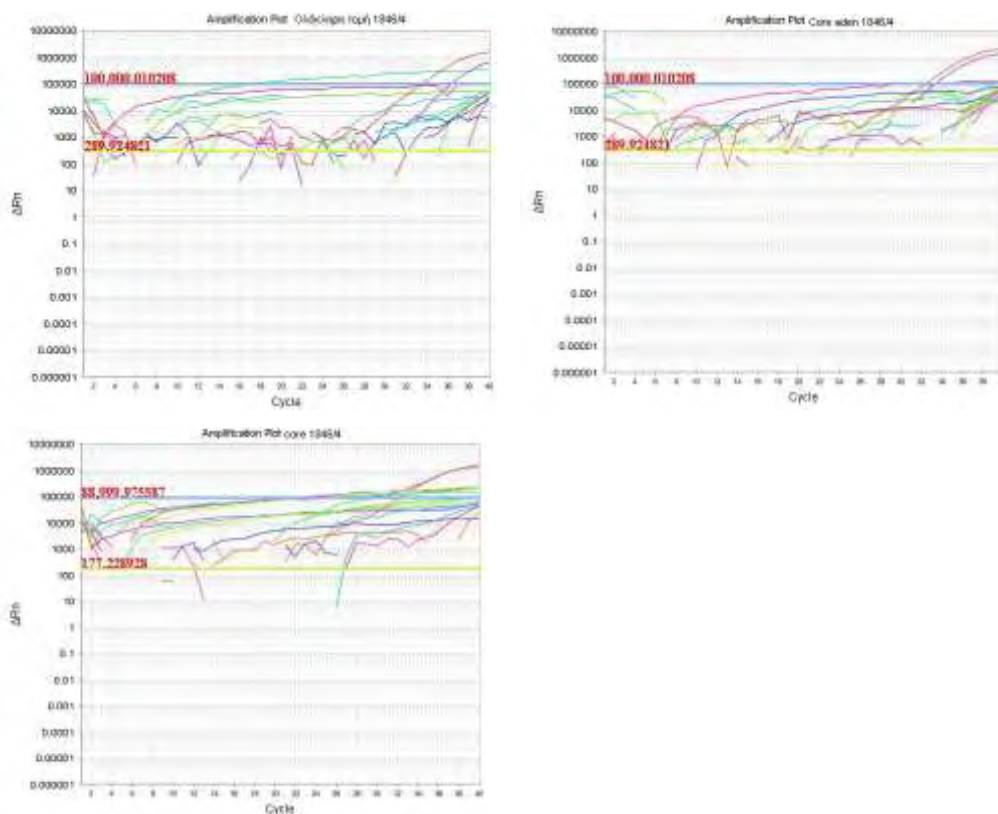
Εικόνα 28: Λεμφαδένες με ολόκληρη την τομή και με core, θετικοί και αρνητικοί ως προς τις μεταλλάξεις του γονιδίου K-Ras. → Πάνω αριστερά παρουσιάζεται η ολόκληρη τομή του λεμφαδένα που είναι θετικός ως προς κάποια μετάλλαξη. Πάνω δεξιά παρουσιάζεται το core του λεμφαδένα που είναι θετικός ως προς την μετάλλαξη αυτή. Κάτω αριστερά παρουσιάζεται η ολόκληρη τομή του λεμφαδένα που είναι αρνητικός. Κάτω δεξιά παρουσιάζεται το core του λεμφαδένα που είναι αρνητικός.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το περιστατικό 4105/09. Αυτό το περιστατικό παρουσίαζε καρκίνο σε δυο διαφορετικά σημεία του παχέος εντέρου, στο τυφλό και στο ανιόν. Σύμφωνα με το γεγονός αυτό, υπάρχουν δυο θεωρίες: Η πρώτη υποστηρίζει ότι ο καρκίνος εμφανίζεται αρχικά στο ανιόν και από εκεί καρκινικά κύτταρα μεταφέρονται στο τυφλό. Επειδή τα καρκινικά κύτταρα δεν έχουν που αλλού να πάνε εγκαθίστανται στο τυφλό με αποτέλεσμα να δημιουργείται και σε αυτό το σημείο καρκίνος. Η δεύτερη υποστηρίζει ότι δημιουργούνται δυο διαφορετικοί όγκοι που αναπτύσσονται στα δύο διαφορετικά σημεία. Έτσι σύμφωνα με τις δύο αυτές θεωρίες ελέγξαμε ποια από τις δύο ισχύει στο συγκεκριμένο περιστατικό. Όπως βλέπουμε στους πίνακες 13, 14, 15, 16, όπου συγκεντρώνονται όλα τα αποτελέσματα των περιστατικών, το περιστατικό αυτό είναι αρνητικό. Το γεγονός αυτό δεν μας επιτρέπει να δούμε ποια θεωρία ισχύει.



Εικόνα 23: Το περιστατικό 4105 → Πάνω αριστερά παρουσιάζεται η ολόκληρη τομή από το τυφλό. Πάνω δεξιά παρουσιάζεται το core από το τυφλό. Κάτω αριστερά παρουσιάζεται η ολόκληρη τομή από το ανιόν. Κάτω δεξιά παρουσιάζεται το core από το ανιόν.

Τέλος, το περιστατικό 1846/4, τόσο από την ολόκληρη τομή όσο και από το core του καρκίνου με βάση την Real Time PCR, αποδείχθηκε ότι ήταν θετικό στην μετάλλαξη της Βαλίνης στο κωδικόνιο 12. Όμως πέρα από αυτά τα δύο πήραμε και ένα core από μια περιοχή που παρουσίαζε αδένωμα.. Τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι και στο αδένωμα παρουσιάζεται η συγκεκριμένη μετάλλαξη. Αυτό μας βοηθά να κατανοήσουμε ότι και το αδένωμα συμπεριφέρεται όπως ακριβώς ο καρκίνος.



Εικόνα 24: Περιστατικό 1846/4 → Πάνω αριστερά παρουσιάζεται ολόκληρη η τομή του περιστατικού. Πάνω δεξιά παρουσιάζεται το core του περιστατικού. Κάτω αριστερά παρουσιάζεται το core του αδενώματος του περιστατικού.

Sequencing

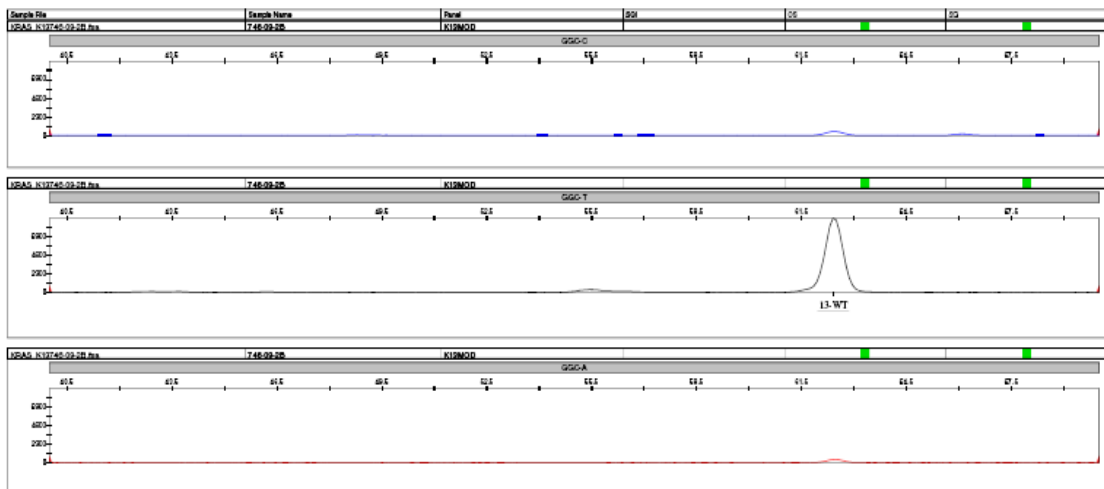
Όπως ήδη έχουμε αναφέρει, τα αποτελέσματα της τεχνικής αυτής είναι γραφικές παραστάσεις που μας δείχνουν εάν είναι αρνητικά ή θετικά τα δείγματα μας. Τα αποτελέσματα ήταν εκπληκτικά! Όπως είναι αναμενόμενο η τεχνική αυτή είναι σε θέση να προσδιορίσει περισσότερες μεταλλάξεις στο κωδικόνιο 13 απ' ότι η RT-PCR (μόνο μια).

Έντυπωσιακό ήταν, περιστατικά που με την RT-PCR παρουσιάζονταν αρνητικά, με την τεχνική sequencing παρουσιάζονταν θετικά ως προς κάποια μετάλλαξη που αφορούσε το κωδικόνιο 13. Έτσι, η τεχνική αυτή γίνεται πιο αποτελεσματική ως προς τον προσδιορισμό των μεταλλάξεων.

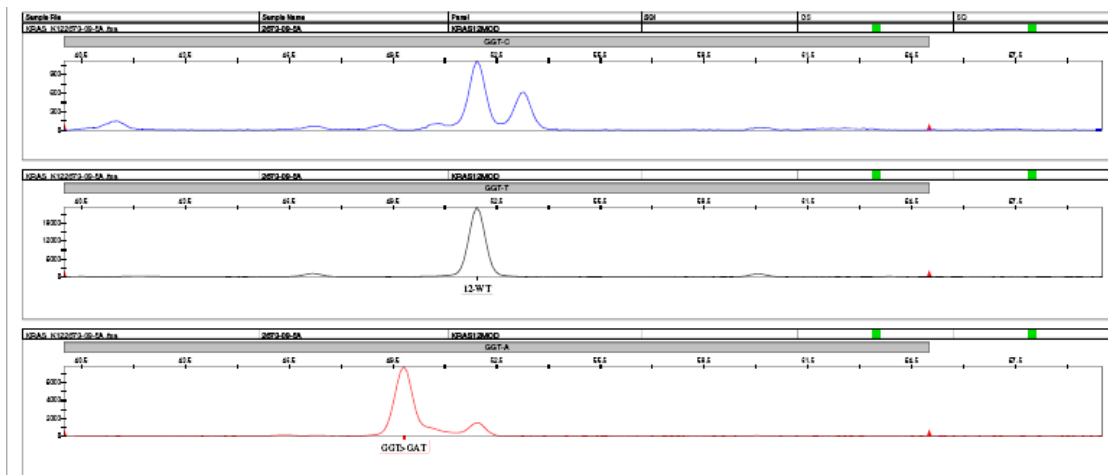
Ένα άλλο σημείο που είναι εξίσου σημαντικό είναι ότι, το core και η ολόκληρη τομή δεν παρουσίαζαν διαφορές. Έτσι, η τεχνική αυτή παρουσιάζει μεγαλύτερη ευαισθησία σε σχέση με την RT-PCR. Αυτό είναι θετικό διότι θα μπορούσαμε να βγάλουμε κάποιο συμπέρασμα ακόμα και για κάποιο δείγμα όπου έχουμε έναν μικρό

αριθμό καρκινικών κυττάρων. Έτσι τα αποτελέσματα αυτά είναι αξιόπιστα και η τεχνική αυτή είναι αποτελεσματικότερη και πιο ευαίσθητη σε σχέση με την Real Time PCR.

Παρακάτω παρουσιάζονται εικόνες από τα περιστατικά αυτά. Στην εικόνα 29 παρουσιάζονται δύο περιστατικά που είναι το ένα θετικό και το άλλο αρνητικό ως προς τις μεταλλάξεις της Sequencing.



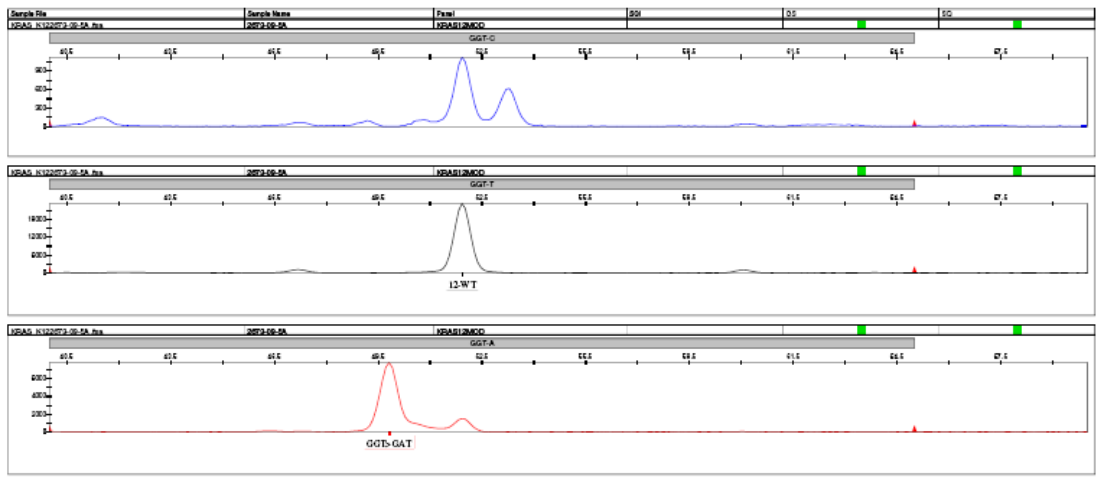
Αρνητικό Περιστατικό



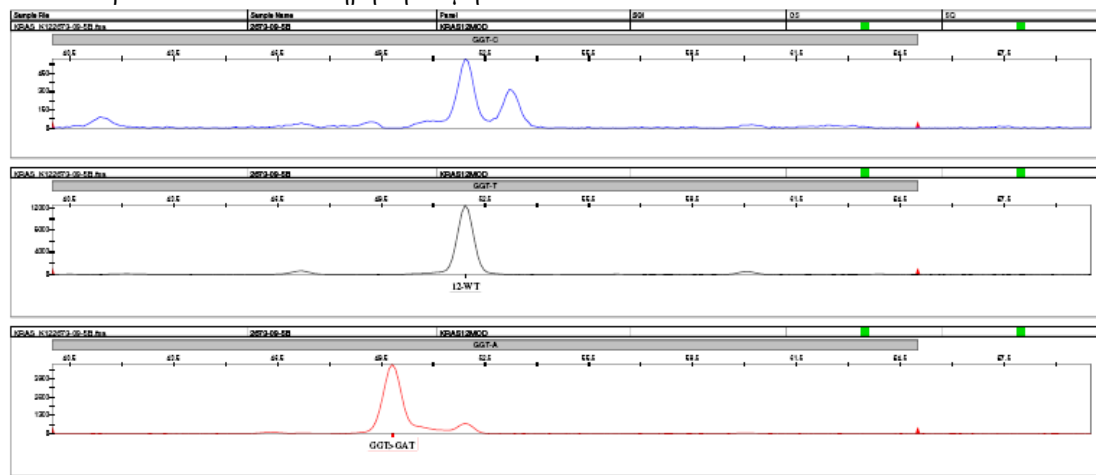
Θετικό Περιστατικό ως προς το κωδικόνιο 12

Εικόνα 29: Γραφικές παραστάσεις αρνητικού και θετικού περιστατικού

Στην εικόνα 30 παρουσιάζονται 2 περιστατικά όπου το ένα είναι η ολόκληρη τομή και το core.



Θετικό Περιστατικό από ολόκληρη την τομή



Θετικό περιστατικό από το core

Εικόνα 30: Περιστατικά από ολόκληρη τομή και core

Όσον αφορά το περιστατικό 4105/09, όπως έχουμε αναφέρει και παραπάνω, είναι αρνητικό και με την διαδικασία της Sequencing με αποτέλεσμα και πάλι να μην είμαστε σε θέση να προσδιορίσουμε ποια από τις δυο θεωρίες ισχύει.

Τέλος, το περιστατικό 1846/4, τόσο με την Real Time PCR όσο και με την Sequencing αποδείχθηκε ότι και το αδένωμα παρουσιάζει την συγκεκριμένη μετάλλαξη. Αυτό μας βοηθά να κατανοήσουμε ότι και το αδένωμα συμπεριφέρεται όπως ακριβώς ο καρκίνος.

Περίληψη

Το άρθρο αυτό αναφέρεται στο γονίδιο K-Ras και στις μεταλλάξεις του που οδηγούν στον καρκίνο του παχέος εντέρου. Το άρθρο αυτό παρουσιάζονται τα διάφορα μονοπάτια που συμμετέχει, ο ρόλος του και η δομή του. Στόχος μας είναι η σύγκριση 3 τεχνικών προκειμένου να ελέγξουμε ποια είναι η πιο αξιόπιστη, ευαίσθητη και ταυτόχρονα πιο γρήγορη τεχνική. Οι 3 αυτές τεχνικές είναι το Medine Machine, η Real Time PCR και η Sequencing (Γενετικός Αναλυτής). Στο άρθρο αυτό παρουσιάζονται όλα τα όργανα που χρησιμοποιήσαμε, τα αντιδραστήρια αλλά και τα πρωτόκολλα. Σύμφωνα με τα πρωτόκολλα, ελέγξαμε 30 περιστατικά από ασθενείς που έπασχαν από καρκίνο του παχέος εντέρου. Τα δείγματα αυτά εξετάστηκαν με 2 τρόπους: ο πρώτος είναι παίρνοντας ολόκληρη την τομή από τον ιστό και ο δεύτερος είναι παίρνοντας core από τον ιστό εστιάζοντας στα σημεία που υπάρχει ο καρκίνος. Με βάση το Medine Machine δεν μπορούσαμε να πάρουμε αξιόπιστα αποτελέσματα αφού θετικά αποτελέσματα παρουσιάζονταν ως αρνητικά. Το συμπέρασμα αυτό προέκυψε και με τους 2 τρόπους. Με βάση τη RT-PCR, όσον αφορά την ολόκληρη τομή τα αποτελέσματα δεν ήταν αποδεκτά ενώ με το core ήταν. Με βάση τη Sequencing παρουσιάζει μεγαλύτερη εξειδίκευση και ακρίβεια αφού τα αποτελέσματα ήταν ίδια είτε προέρχονταν από ολόκληρη τομή είτε από core. Επίσης με την τεχνική αυτή μας δίνεται η δυνατότητα να εντοπίσουμε περισσότερες μεταλλάξεις σε σχέση με την RT-PCR. Τέλος, έλεγχος πραγματοποιήθηκε και στους λεμφαδένες έτσι ώστε να εντοπίσουμε την ύπαρξη μετάστασης και κατ' επέκταση να συμπεράνουμε αν η θεραπεία είναι αποτελεσματική.

Abstract

This article refers to the gene K-Ras and to the mutations which cause the colon cancer. It also presents the various paths that this gene participates, its role and its structure. The target of the article is the comparison between the three methods in order to check which is the most reliable, sensitive and faster at the same time. These three methods are the following :

Medine machine

Real time PCR

Sequencing (genetic analysis)

All the organs, the protocols and the reagents, which were used, are presented. According to the protocols, 30 incidents of patients who suffered from colon cancer were checked. The samples were examined with two ways. The first one is by considering all the incision of the tissue and the second is by taking a core of the tissue, focusing at the points that cancer exists. According to the Medine Machine we could not extract safe conclusions because of the fact that positive incidents were presented as negative. This conclusion was extracted with both ways. According to RT-PCR, which refers to the whole incision, the results were not acceptable, in opposition with the core which gave acceptable results. According to Sequencing the results were the same in both cases, core and whole incision . This thing makes Sequencing the most exact and specialized method. Furthermore, this method gives us the opportunity to find out more mutations compared with the RT-PCR. For the end, a check in the lymph node took place so as to find out if a metastasis exists, add to check if the treatment is successful and effective.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Scher, C.D., Scolnick, E.m., Siegler, R. Induction of erythroid leukaemia by Hatvey and Kirsten sarcoma viruses. *Nature* 1975; 256:255-6.
2. Zheng, B., Vries, L. de, Farquhar, M.G. Divergence of RGS proteins: Evidence for the existence of six mammalian RGS subfamilies. *Trends Biochem. Sci.* 2001; 24:411-14.
3. Harvey, J.J. An unidentified virus which causes the rapid production of tumours in mice. *Nature* 1964; 204:1104-5.
4. Kirsten, W.H., Carter, R.E., Pierce, M.I. Studies on the relationship of viral infections to leukaemia in mice: The accelerating agent in AKR mice. *Cancer* 1962; 15:750-8.
5. Shimizu, K, Goldfarb, M., Suard, Y. et al. Three human transforming genes are related to the viral ras oncogenes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1983; 80:2112-16
6. Strathmann M.P., Simon, M.I. Ga12 and Ga13 subunits define a fourth class of G protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1991; 88:5582-6.
7. Shih, T.Y., Papageorge, A.G., Stokes, P.E., Weeks, M.O., Scolnick, E.M. Guanine nucleotide – bonding and autophosphorylating activities associated with the p21src protein of Hatvey murine sarcoma virus, *Nature* 1980; 287: 686-91.
8. Gibbs, J.B., Sigal, I.S., Poe, M., Scolnick, E.M. Intrinsic GTPase activity distinguishes normal and oncogenic ras p21 molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1984; 81: 5704-8.
9. Parada, L.F., Tabin, C.J., Shih, C., Weinberg, R.A. Human EJ bladder carcinoma oncogene is homologue of Harvey sarcomavirus ras gene. *Nature* 1982; 297:474-8
10. Campbell, S. L., R. Khosravi – Far, K. L. Rossman, G. J. Clark, and C. J. Der, 1998, Increasing complexity of Ras signalling: *Oncogene*, v. 17, no.11 Reviews, p.1395-1413.
11. Valencia, A., Chardin, P., Wittinghofer, A., Sander, C. The ras protein family: evolutionary tree and role of conserved amino acids. *Biochemistry* 1991; 30: 4637-48.
12. Johnson, L. Et al., 1997, K-Ras is an essential gene in the mouse with partial functional overlap with N-Ras: *Genes Dev.*, v.11, no.19, p.2468-2481.
13. Esteban, L. M. et al., 2001, Targeted genomic disruption of H-Ras and N-Ras, individually or in combination, reveals the dispensability of both loci for mouse growth and development: *Mol. Cell Biol.*, v.21, no>5, p.1444-1452.
14. Friday B.B. and Adjei A.A. (2005). K-ras as a target for cancer therapy. *Biochim. Biophys. Acta* 1756: 127-144.
15. McGrath J.P., Capon D.J., Smith D.H., Chen E.Y., Seeburg P.H., Goeddel D.V., and Levinson A.D. (1983). Structure and organization of the human K-ras proto-oncogene and a related processed pseudogene. *Nature* 304: 501-506.
16. Carta C., Pantaleoni F., Bocchinfuso G., Stella L., Vasta I., Sarkozy A., Digilio C., Palleschi A., Pizzuti A., Grammatico P. et al. (2006). Germline missense mutations affecting KRAS Isoform B are associated with a severe Noonan syndrome phenotype. *Am. J. Hum. Genet.* 79: 129-135.
17. Plowman S.J., Williamson D.J., O'Sullivan M.J., Doig J., Ritchie A.M., Harrison D.J., Melton D.W., Arends M.J., Hooper M.L., and Patek C.E.

- (2003). While K-ras is essential for mouse development, expression of the K-ras 4A splice variant is dispensable. *Mol. Cell Biol.* 23: 9245-9250.
18. Koera K., Nakamura K., Nakao K., Miyoshi J., Toyoshima K., Hatta T., Otani H., Aiba A., and Katsuki M. (1997). K-ras is essential for the development of the mouse embryo. *Oncogene* 15: 1151-1159.
 19. Potenza N., Vecchione C., Notte A., De R.A., Rosica A., Bauer L., Affuso A., De F.M., Russo T., Poulet R. et al. (2005). Replacement of K-Ras with H-Ras supports normal embryonic development despite inducing cardiovascular pathology in adult mice. *EMBO Rep.* 6: 432-437.
 20. Villalonga P., Lopez-Alcala C., Bosch M., Chiloeches A., Rocamora N., Gil J., Marais R., Marshall C.J., Bachs O., and Agell N. (2001). Calmodulin binds to K-Ras, but not to H- or N-Ras, and modulates its downstream signaling. *Mol. Cell Biol.* 21: 7345-7354.
 21. Liao J., Planchon S.M., Wolfman J.C., and Wolfman A. (2006). Growth factor-dependent AKT activation and cell migration requires the function of c-K(B)-Ras versus other cellular ras isoforms. *J. Biol. Chem.* 281: 29730-29738.
 22. Vos M.D., Ellis C.A., Elam C., Ulku A.S., Taylor B.J., and Clark G.J. (2003). RASSF2 is a novel K-Ras-specific effector and potential tumor suppressor. *J. Biol. Chem.* 278: 28045-28051.
 23. Halaban, R., 2005, Rb/E2F: a two-edged sword in the melanocytic system: *Cancer Metastasis Rev.*, v. 24, no. 2, p. 339-356).
 24. Alkarain, A., and J. Slingerland, 2004, Deregulation of p27 by oncogenic signaling and its prognostic significance in breast cancer: *Breast Cancer Res.*, v. 6, no. 1, p. 13-21.
 25. (Wolthuis, R. M., and J. L. Bos, 1999, Ras caught in another affair: the exchange factors for Ral: *Curr. Opin. Genet. Dev.*, v. 9 no.1, p. 112-117).
 26. (Feig, L. A., 2003, Ral-GTPases: approaching their 15 minutes of fame: *Trends Cell Biol.*, v.13, no.8, p. 419-425).
 27. Ouwens, D. M. et al., 2002, Growth factors can activate ATF2 via a two-step mechanism: phosphorylation of Thr71 through the Ras-MEK-ERK pathway and of Thr69 through RalGDS-Src-p38: *EMBO J.*, v.21, no.14, p. 3782-3793;
 28. Henry, D. O., S. A. Moskalenko, K. J. Kaur, M. Fu, R. G. Pestell, J. H. Camonis, and M. A. White, 2000, Ral GTPases contribute to regulation of cyclin D1 through activation of NF-kappaB: *Mol. Cell Biol.*, v. 20, no. 21, p.8084-8092.
 29. Garcia, Z., A. Kumar, M. Marques, I. Cortes, and A. C. Carrera, 2006b, Phosphoinositide 3-kinase controls early and late events in mammalian cell division: *EMBO J.*, v. 25, no. 4, p. 655-661.
 30. Frame, S., and A. Balmain, 2000, Integration of positive and negative growth signals during ras pathway activation in vivo: *Curr. Opin. Genet. Dev.*, v. 10, no. 1, p. 106-113.
 31. Feig, L. A., and R. J. Buchsbaum, 2002, Cell signaling: life or death decisions of ras proteins: *Curr. Biol.*, v. 12, no. 7, p. R259-R261.
 32. Graves, J. D., K. E. Draves, Y. Gotoh, E. G. Krebs, and E. A. Clark, 2001, Both phosphorylation and caspase-mediated cleavage contribute to regulation of the Ste20-like protein kinase Mst1 during CD95/Fas-induced apoptosis: *J. Biol. Chem.*, v. 276, no. 18, p. 14909-14915.
 33. Praskova, M., A. Khoklatchev, S. Ortiz-Vega, and J. Avruch, 2004, Regulation of the MST1 kinase by autophosphorylation, by the growth

- inhibitory proteins, RASSF1 and NORE1, and by Ras: *Biochem.J.*, v. 381, no. Pt 2, p. 453-462.
34. Rabizadeh, S. et al., 2004, The scaffold protein CNK1 interacts with the tumor suppressor RASSF1A and augments RASSF1A-induced cell death: *J.Biol.Chem.*, v. 279, no. 28, p. 29247-29254.
 35. Lin, Y., A. Khokhlatchev, D. Figeys, and J. Avruch, 2002, Death-associated protein 4 binds MST1 and augments MST1-induced apoptosis: *J.Biol.Chem.*, v. 277, no. 50, p. 47991-48001.
 36. Glantschnig, H., G. A. Rodan, and A. A. Reszka, 2002, Mapping of MST1 kinase sites of phosphorylation. Activation and autophosphorylation: *J.Biol.Chem.*, v. 277, no. 45, p. 42987-42996.
 37. Kakeya, H., R. Onose, and H. Osada, 1998, Caspase-mediated activation of a 36-kDa myelin basic protein kinase during anticancer drug-induced apoptosis: *Cancer Res.*, v. 58, no. 21, p. 4888-4894.
 38. Whang, Y. M., Y. H. Kim, J. S. Kim, and Y. D. Yoo, 2005, RASSF1A suppresses the c-Jun-NH2-kinase pathway and inhibits cell cycle progression: *Cancer Res.*, v. 65, no. 9, p. 3682-3690
 - Ura, S., N. Masuyama, J. D. Graves, and Y. Gotoh, 2001, MST1-JNK promotes apoptosis via caspase-dependent and independent pathways: *Genes Cells*, v. 6, no. 6, p. 519-530.
 39. Vos, M. D., A. Dallol, K. Eckfeld, N. P. Allen, H. Donninger, L. B. Hesson, D. Calvisi, F. Latif, and G. J. Clark, 2005, The RASSF1A tumor suppressor activates Bax via MOAP-1: *J.Biol.Chem.*
 40. Hansen, D. V., J. Y. Hsu, B. K. Kaiser, P. K. Jackson, and A. G. Eldridge, 2002, Control of the centriole and centrosome cycles by ubiquitination enzymes: *Oncogene*, v. 21, no. 40, p. 6209-6221.
 41. Song, M. S. et al., 2004, The tumour suppressor RASSF1A regulates mitosis by inhibiting the APC-Cdc20 complex: *Nat.Cell Biol.*, v. 6, no. 2, p. 129-137.
 42. Fenton, S. L. et al., 2004, Identification of the E1A-regulated transcription factor p120 E4F as an interacting partner of the RASSF1A candidate tumor suppressor gene: *Cancer Res.*, v. 64, no. 1, p. 102-107.
 43. Gutierrez, L., A. I. Magee, C. J. Marshall, and J. F. Hancock, 1989, Post-translational processing of p21ras is two-step and involves carboxyl-methylation and carboxy-terminal proteolysis: *EMBO J.*, v.8 no.4, p. 1093-1098 ; Apolloni, A., and I. A. Prior, M. Lindsay, R. G. Parton, and J. F. Hancock, 2000, H-ras but not K-ras traffics to the plasma membrane through the exocytic pathway: *Mol. Cell Biol.*, v.20, no.7, p. 2475-2487; Hancock, J. F., 2003, Ras proteins: different signals from different locations: *Nat. Rev.Mol. Cell Biol.*, v.4, no.5, p.373-384)
 44. Apolloni, A., and I. A. Prior, M. Lindsay, R. G. Parton, and J. F. Hancock, 2000, H-ras but not K-ras traffics to the plasma membrane through the exocytic pathway: *Mol. Cell Biol.*, v.20, no.7, p. 2475-2487; Hancock, J. F., 2003, Ras proteins: different signals from different locations: *Nat. Rev.Mol. Cell Biol.*, v.4, no.5, p.373-384).
 45. (Jura, N., E. Scotto-Lavino, A. Sobczyk, and D. Bar-Sagi, 2006, Differential modification of Ras proteins by ubiquitination: *Mol. Cell*, v. 21, no. 5, p. 679-687)
 46. (Rocks, O. et al., 2005, An acylation cycle regulates localization and activity of palmitoylated Ras isoforms: *Science*, v. 307, no. 5716, p. 1746-1752).

47. (Plowman, S. J., and J. F. Hancock, 2005, Ras signaling from plasma membrane and endomembrane microdomains: *Biochim. Biophys. Acta*, v. 1746, no. 3, p. 274-283).
48. (Jiang, X., and A. Sorkin, 2002, Coordinated traffic of Grb2 and Ras during epidermal growth factor receptor endocytosis visualized in living cells: *Mol. Biol. Cell*, v. 13, no. 5, p. 1522-1535).

Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης

49. Mullis K.B. 1990. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci. Am.* 262: 56-65.
50. Saiki R.K., Gelfand D.H., Stoffel S., Scharf S.J., Higuchi R., et al. 1988. Primer – directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491.
51. Mullis K. and Faloona F. 1987. Specific Synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 55: 335-350.
52. McCabe E.R.B., Huang S.Z., Seltzer W.K., and Law M.L. 1987. DNA microextraction from dried blood spots on filter paper blotters: Potential applications to newborn screening. *Hum. Genet.* 75: 213-216.
53. Higuchi R., von Beroldingen C.H., Sensabaugh G.F., and Erlich H.A. 1988. DNA typing from single hairs. *Nature* 332: 543-546.
54. Krings M., Stone A., Schmitz R.W., Krainitzki H., Stoneking M., and Paabo S. 1997. Neandertal DNA sequences and the origin of modern humans. *Cell* 90: 19 – 30.
55. Chien A., Edger D.B., and Trla I.M. 1976. Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophilic *Thermus aquaticus*. *J. Bacteriol.* 127: 1550-1557.
56. Saiki R.K., Scharf S.J., Faloona F., Mullis K.B., Horn G.T., Erlich H.A., and Arnheim N. 1985. Enzymatic amplification of beta-globin sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230: 1350-1354.
57. Kwok S. and Higuchi R. 1989. Avoiding false positives with PCR (review). *Nature* 339: 237-238.
58. Longo M.C., Berninger M.S., and Hartley J.L. 1990. Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions. *Gene* 93: 125-128.
59. Keohavong P. and Thilly W.G. 1989. Fidelity of DNA polymerases in DNA amplification. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86: 9253-9257.
60. Eckert K.A. and Kunkel T.A. 1990. High fidelity DNA synthesis by the *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Nucleic Acids Res.* 18: 3739-3744.
61. Hubert R., Weber J.L., Schmitt L., Zhang L., and Arnheim N. 1992. A new source of polymorphic DNA markers for sperm typing: Analysis of microsatellite repeats in single cells. *Am. J. Hum. Genet.* 51: 985-991.
62. Vet J.A. and Marras S.A. 2005. Design and optimization of molecular beacon real time polymerase chain reaction assays. *Methods Mol. Biol.* 288: 273-290.
63. Kramer R. and Tyagi S. 1996. Molecular beacons: Probes that fluoresce upon hybridization. *Nat. Biotechnol.* 14:303-308.
64. Vet J.A.M., Majitha A.R., Marras S.A., Tyagi S., Dube S., Poiesz B.J., and Kramer F.R. 1999. Multiplex detection of four pathogenic retroviruses using molecular beacons. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86: 6394-6399.

65. Higuchi, P., Dollinger, Γ., Walsh, Σελ. Το S., και Griffith, P. (1992). «Ταυτόχρονες ενίσχυση και ανίχνευση των συγκεκριμένων ακολουθιών DNA.» *Βιοτεχνολογία* 10:413417.
66. Higuchi, P., Fockler, Γ., Dollinger, Γ., και Watson, P. (1993). «Κινητικό PCR: Πραγματικός - χρονικός έλεγχος των αντιδράσεων ενίσχυσης DNA. « *Βιοτεχνολογία* 11:10261030.
67. Mackay, I. M. (2007). «Σε πραγματικό χρόνο PCR στη μικροβιολογία.» Ακαδημαϊκός Τύπος Caister.
68. Wawrik B, Paul JH, σε πραγματικό χρόνο PCR Tabita FR (2002) προσδιορισμός της ποσότητας *rbcL* (carboxylase/oxygenase ribulose - ribulose-1.5-bisphosphate) mRNA στα διάτομα και pelagophytes. *Appl.*
69. VanGuilder HD, KE Βρανά, WM Freeman (2008). "Είκοσι πέντε χρόνια της ποσοτικής PCR για την ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης". *Biotechniques* **44** (5): 619–626.
70. Udvardi MK, Czechowski T, Scheible WR (2008). "Έντεκα Χρυσοί Κανόνες Ποσοτικής RT-PCR». *Plant Cell* **20** (7): 1736–1737.
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?tool=pmcentrez&artid=2518243>.
71. Spackman E, Suarez DL (2008). «Τύπου A ανίχνευση του ιού της γρίπης και τον ποσοτικό προσδιορισμό σε πραγματικό χρόνο RT-PCR». *Μέθοδοι Mol Biol* **436**: 19–26.
72. Gertsch J, M Güttinger, Sticher O, Heilmann J. (2002). "Σχετική ποσοτικοποίηση των επιπέδων έκφρασης στα T κυττάρων Jurkat με RT-σε πραγματικό χρόνο-PCR (RT-RT-PCR): νέες δυνατότητες για την προβολή των αντιφλεγμονωδών και κυτταροτοξικές ενώσεις». *Pharm Res* **19**: 1236–1243.
73. Επεξεργασία από Julie Logan, Kirstin Edwards, και Nick Saunders. (2009). Logan J, K Edwards, Saunders N. ed. *Real-Time PCR: Τρέχουσα Τεχνολογίας και Εφαρμογών*. Caister Academic Press.
74. Nailis H, Coenye T, Van Nieuwerburgh F, Deforce Δ, Nelis HJ (2006). «Ανάπτυξη και αξιολόγηση των διαφορετικών στρατηγικών για εξομάλυνση των μελετών γονιδιακής έκφρασης σε *albicans* Candida βιοφίλμ σε πραγματικό χρόνο PCR». *BMC Mol Biol*. **7**: 25.
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?tool=pmcentrez&artid=1557526>.
75. Nolan T, Hands RE, Bustin A.E. (2006). "Ποσοτικοποίηση του mRNA χρησιμοποιώντας σε πραγματικό χρόνο RT-PCR.". *Nat. Πρωτόκολλο*. **1** (3): 1559–1582.
76. Boggy G, Γουλφ PJ (2010). "Μια μηχανιστική Υπόδειγμα της PCR για την ακριβή ποσοτικοποίηση των ποσοτικών δεδομένων PCR". *PLoS One* **5** (8): e12355
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?tool=pmcentrez&artid=2930010>.
77. Σ. Dhanasekaran, T. Mark Doherty, Kenneth Ιωάννη και της φυματίωσης ομάδας μελέτης δοκιμές. (2010 Mar). "Σύγκριση των διαφόρων προτύπων για real-time PCR με βάση απόλυτη ποσοτικοποίηση". *Immunol Μέθοδοι*. **354** (1-2): 34–9.
78. Πανιά AD (2009). "Εφαρμογές στην Κλινική Μικροβιολογία». *Real-Time PCR: Τρέχουσα Τεχνολογίας και Εφαρμογών*. Caister Academic Press.

Αλληλούχιση του DNA

79. Sanger F., Nicliden S., and Couison A.R.1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl. Acad. Sci* 74:5463-5467.
80. Maxan A.M. and Gilbert W. 1977. A new method for sequencing DNA. *Proc Natl. Acad Sci* 74:560-564.
81. Sanger F. 1988. Sequences, sequences, and sequences. *Arinu. Rev. Biochern.* 57: 1-29.
82. Tabor S. and Richardson C.C.1990. DNA sequence analysis with a modified bacteriophage T7 DNA polymerase. Effect of pyrophosphorolysis and metal ions. *J. Biol. Chem.* 265: 8322-8328.
83. Tabor S. and Richardson C.C.1995. A single residue in DNA polymerases of the Escherichia coli DNA polymerase I family is critical for distinguishing between deoxy- and dideoxy- ribonunleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci* 92:6339-6343.
84. Holley R.W., Apgar J., Everett G.A., Madison J.T., Marquisee M., et al. 1965. Structure of a ribonucleic acid. *Science* 147:1462-1465.
85. Fiers W., Contreras R., Duerinck F., Haegeman G., iserentant D., et al. 1976. Complete nucleotide sequence of bacteriophage MS2 RNA: Primary and secondary structure of the replicase gene. *Nature* 260:500-507.
86. Sanger F., Air G.M. Barrell B.G., Brown N.L., Couison A.R., et al. 1977. Nucleotide seqence of bacteriophage ΦX174 DNA. *Nature* 265:687.
87. Sanger F., Couison A.R., Hong G.F., Hill D.F., and Petersen G.B. 1982. Nucleotide sequence of bacteriophage λ DNA. *J. Mol. Biol.* 162:729-773.
88. Bankier A.T., Beck S., Bohni R. Brown C.M., Cerny R., et al. 1991. The ΔNA sequence of the human cytomegalo-virus genome. *DNA Seq.* 2:1-12.
89. Staden R. 1977. Sequence data handing by computer. *Nucleic Acids Res.* 4:4037-4051.
90. Dayhoff M.O., Eck R.V., Chang M.A., and Sochard M.R. 1965. Atlas of Protein Sequence and Structure. National Biomedical Research Foundation, Silver Spring, Maryland.
91. Dayhoff M.Q., Schawrtz R.M., and Orcutt B.C. 1978. Amodel of evolutionary change in proteins. In atlas of protein Sequence and Structure (ed. M.O. Dayhoff). Pp.345-352. National Biomedical Research Foundation, Washington, D.C.
92. Ewing B., Hillier L., Wendl M.C., and Green P. 1998. Base-calling of automated sequencer traces using Phred. I. Accuracy assessment. *Gnome Res.* 8:175-185.
93. Ewing B. and Green P. 1998. Base-calling of automared sequencer traces using Phred. II. Error probabillities. *Genome Res.* 8:186-194.
94. Bonfield J.K., Smith K.F., and Staden R. 1995. A new DNA sequence assembly program. *Nucleic Acids Res.* 23: 4992-4999.
95. Dear S. and Staden R. 1991. A sequence assembly and editing program for efficient management of large projects. *Nucleic Acids Res.* 19:3907-3911.
96. Hood L.E., Hunkapiller M.W., and Smith L.M. 1987. Automated DNA sequencing and analysis of the human genome. *Genomics* 1:201-212.
97. Horvath S.J., Firca J.R., Hunkappiler T., Hunkapiller M.W., and Hood L. 1987. An automated DNA synthesizer employing deoxynucleoside 3'-phosporamidites. *Methods Enzymol.*154:314-326.

98. Hunkappiler T., Kaiser R.J., Koop B.F., and Hood L. 1991. Large- scale and automated DNA sequence determination. *Science* 254:59-67.
99. Rosenblum B.B., Lee L.G., Spurgeon S.L., Khan S.H., Menchen S.M., Heiner C.R., and Chen S.M. 1997. New dye-labeled terminators for improved DNA sequencing patterns. *Nucleic Acids Res.* 25: 4500-4504.
100. Heiner C.R., Hunkapiller K.L., Chen S.M., Glass J.I., and Chen E.Y. 1998. Sequencing multimegababase template DNA with BigDye terminator chemistry. *Genome Res* 8: 557-561.
101. Chen E.Y., Schlessinger D., and Kere J. 1993. Ordered shotgun sequencing, a strategy for integrated mapping and sequencing of YAC clones. *Genomics* 17: 651-656.
102. Weber J.L. and Myers E.W. 1997. Human whole genome shotgun sequencing. *Genome Res.* 7:401-409.
103. Couison A., Sulston J., Brenner S., and Karn J. 1986. Toward a physical map of the genome of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Proc. Ntl. Acad. Sci.* 83: 7821-7825.
104. Oison M.V., Dutchik J.E., Graham M.Y., Brodeur G.M., Heims C., et al. 1986. Random-clone strategy for genomic restriction mapping in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83:7826-7830.
105. Link A.J. and Oison M.V. 1991. Physical map of the *Saccharomyces cerevisiae* genome at 110-kilobase resolution. *Genetics* 127:681-698.
106. Burke D.T. and Oison M.V. 1991. Preparation of clone libraries in yeast artificial- chromosome vectors. *Methods Enzymol.*194: 251-270.
107. Burke D.T., Carle G.F., and Oison M.V. 1987. Cloning of large segments of exogenous DNA into yeast by means of artificial chromosome vectors. *Science* 236: 806-812.
108. Oison M.V., Hood L., Cantor C., and Botstein D. 1989. A common language for physical mapping of the human genome. *Science* 245: 1434-1435.
109. Fleischmann R.D., Adams M.D., White O., Clayton R.A., Kirkness E.F., et al. 1995. Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science* 269: 496-512.
110. Fraser C.M., Gocayne J.D., White O., Adams M.D., Clayton R.A., et al. 1995. The minimal gene complement of *Mycoplasma genitalium*. *Science* 270:397-403.
111. Klenk H.P., Clayton R.A., Tomb J.F., White O., Nelson K.E., et al. 1997. The complete genome sequence of the hyper-thermophilic, sulphate-reducing archaeon *Archaeoglobus fulgidus*. *Nature* 390: 364-370.
112. Tomb J.F., White O., Kerlavage A.R., Clayton R.A., Sutton G.G., et al. 1997. The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* 388: 539-547.
113. Blattner F.R., Plunkett G., III, Bloch C.A., Perna N.T., Burland V., et al. 1997. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* 277:1453-1457.
114. Cole S.T., Brosch R., Parkhill J., Garnier T., Churcher C., et al. 1998. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* 393:537-544.
115. White O., Eisen J.A., Heidelberg J.F., Hickey E.K., Peterson J.D., et al. 1999. Genome sequence of the radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans* R1. *Science* 286:1571-1577.

116. Paterson J.D., Umayam L.A., Dickinson T.M., Hickey E.K., and White O. 2001. The comprehensive microbial resource. *Nucleic Acids Res.* 29: 123-125.
117. Fraser C.M., Eisen J.A., Neison K.E., Pausen I.T., and Salzberg S.L. 2002. The value of complete microbial genome sequencing (you get what you pay for). *J. Bacteriol.* 184: 6403-6405.
118. Liolios K., Tavernarakis N., Hugenholtz P., and Kyrpides N.C. 2006. The Genomes On Line Database (GOLD) v.2: A monitor of genome projects worldwide. *Nucleic Acids Res.* 34: D332-D334.