



ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΠΑΤΡΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΣΕΥΠ

ΤΜΗΜΑ ΝΟΣΗΛΕΥΤΙΚΗΣ

**ΚΑΡΚΙΝΟΓΕΝΕΣΗ
ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΔΙΑΓΝΩΣΗΣ
ΜΕ PROTEOMICS**



ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΣΠΟΥΔΑΣΤΡΙΕΣ:

Στεφίδου Ειρήνη

Στεφανίδου Κων/να

Τουμπανάκη Σοφία

ΥΠΕΥΘΥΝΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:

Δρ Κουτσογιάννης Κωνσταντίνος

Πάτρα 2007

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Πρόλογος	5
Ευχαριστίες	6
Εισαγωγή	7

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

1.1 - Γενικές πληροφορίες	9
1.2 - Προδιαθεσικοί παράγοντες	10
1.3 - Αιτιολογία	11
1.4 - Διασπορά των καρκινικών κυττάρων	12
1.5 - Ταξινόμηση νεοπλασμάτων	12
1.6 - Κλινικά σημεία και συμπτώματα	13
1.7 - Πραγματοποίηση της διάγνωσης	14
1.8 - Η κατάλληλη θεραπεία	14
1.9 - Είδη θεραπειών	15
1.9.1 - Χειρουργική θεραπεία	15
1.9.2 - Χημειοθεραπεία	15
1.9.3 - Ακτινοθεραπεία	15
1.9.4 - Βιολογική θεραπεία ή ανοσοθεραπεία	16
1.9.5 - Θεραπεία με Laser	16
1.9.6 - Θεραπεία με υπερθερμία	17

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

Πρωτεωμική (proteomics) και Γονιδιωματική (genomics)

2.1 - Εισαγωγή	19
2.2 - Πρωτεωμική	21
2.3 - Τεχνικές πρωτεωμικής	24
2.4 - Φασματογράφος μάζας	25
2.5 - Εκφραστική πρωτεωμική	28
2.5.1 - Δισδιάστατη ηλεκτροφόρηση (2D-PAGE) και ταυτοποίηση πρωτεϊνών και πεπτιδιακή αποτύπωση	28
2.5.2 - Διαχωρισμός των πρωτεϊνών με χρήση δισδιάστατης ηλεκτροφόρησης (2D-PAGE)	30
2.5.3 - Ανίχνευση πρωτεϊνών σε πηγμένα	31
2.5.4 - Πρωτεϊνολυτική πέψη	31
2.5.5 - Αναγνώριση πρωτεΐνης	32
2.5.6 - Επιβεβαίωση και επικύρωση της πρωτεΐνης του ενδιαφέροντος	34
2.5.7 - Περιορισμοί της δισδιάστατης ηλεκτροφόρησης	35

2.5.8 - Τεχνολογία πολύ-διαστατικής αναγνώρισης πρωτεϊνών	36
2.5.9 - Λειτουργικές πρωτεΐνες	38
2.5.10 - Ανίχνευση πρωτεϊνικής αλληλεπίδρασης	38
2.5.11 - Πρωτεϊνικές μικροσυστοιχίες	39
2.5.12 - Μέθοδος βασισμένη σε ανοσοκαθίζηση	40
2.5.13 - Διπλό υβριδικό σύστημα ζύμης	41
2.5.14 - Ανίχνευση των μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων	43
2.6 - Πρωτεωμική και μικροανατομική με Laser	45
2.7 - Ιστικές μικροσυστοιχίες	45
2.8 - Η κλινική εφαρμογή της πρωτεωμικής	48
2.9 - Η πρωτεωμική στην έγκαιρη ανίχνευση του καρκίνου	48
2.10 - Θεραπευτικοί στόχοι	50
2.11 - Συμπεράσματα	51

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

Στόχος της πρωτεωμικής

3.1 - Η γενετική στην κλινική πράξη	55
3.2 - Οι μοριακές γενετικές εξετάσεις στην αντιμετώπιση του κληρονομικού καρκίνου	57
3.3 - Η κλινική πρωτεωμική στην αντιμετώπιση του καρκίνου	60
3.4 - Καρκίνος των ωοθηκών	60
3.5 - Καρκίνος του προστάτη	61
3.6 - Καρκίνος του μαστού	62
3.7 - Πνεύμονας και κύστη	62
3.8 - Μελλοντική χρήση	62
3.9 - Τι πρωτεωμικές μελέτες βρίσκονται σε εξέλιξη στο NCL;	63
3.10 - Εξέταση αίματος για καρκίνο ωοθηκών	64
3.11 - Τεχνητή νοημοσύνη	64
3.12 - Βελτιώσεις στην εξέταση αίματος	65
3.13 - Ανακαλύπτοντας νέες πρωτεΐνες	66
3.14 - Άλλοι καρκίνοι	66
3.15 - Πρωτεΐνες σε ιστούς	66
3.16 - Ο ρόλος της αλβουμίνης	67
3.17 - Εξευγενίζοντας την τεχνολογία	67
3.18 - Υπάρχουν καθόλου κλινικές έρευνες που βρίσκονται σε εξέλιξη και που χρησιμοποιούν την «πρωτεωμική» ως διαγνωστική εξέταση;	67

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

Ανάλυση DNA

4.1 - Η μηχανή DNA μπορεί να δώσει την πρόοδο της γενετικής ακολουθίας για τις ασθένειες	71
4.2 - Πως μπορεί η μηχανή αποκρυπτογράφησης να ξέρει αν η βάση είναι μία A,C,G ή T	73
4.3 - Τι συμβαίνει μετά που οι DNA ακολουθίες βγαίνουν από την μηχανή αποκρυπτογράφησης	75
4.4 - Επιταχύνοντας το κυνήγι των γονιδίων υψηλής ταχύτητας αποκρυπτογράφησης του DNA	76
4.5 - Αποκρυπτογράφηση: Πως λειτουργεί	77
4.5.1 - Αύξηση στηλών	79
4.5.2 - Αύξηση της ταχύτητας	80
4.5.3 - Μείωση του χρόνου καθαρισμού	81
4.5.4 – Βάζοντας τα όλα μαζί	81
4.6 - Εργαστήρια Γενετικής	82
4.7 - Γενετική αποτύπωση	87
4.8 - Μηχανήματα ανάλυσης DNA	89
Επίλογος	97
Βιβλιογραφία	98

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η εισβολή των νέων τεχνολογιών της πληροφορικής και της ψηφιακής τεχνολογίας στη ζωή των ανθρώπων έχει επιδράσει θετικά στη βελτίωση της ποιότητας ζωής τους, στον τομέα της υγείας, καθώς η χρήση τους θεωρείται σημαντική στη διάγνωση, στην υποστήριξη και στη θεραπεία των ασθενών. Επομένως καθίσταται αναγκαίο ο υποψήφιος Νοσηλευτής να γνωρίζει πώς να χρησιμοποιεί όλα αυτά τα τεχνολογικά μέσα, αφού στο μέλλον θα είναι απαραίτητα για τη διεκπεραίωση της εργασίας του. Τα σύγχρονα εκπαιδευτικά προγράμματα σπουδών στη Νοσηλευτική παγκοσμίως περιλαμβάνουν μαθήματα ειδικά για τις εφαρμογές της πληροφορικής και της τεχνολογίας, γενικότερα, στην υγεία.

Στα πλαίσια της παραπάνω προσπάθειας αναλάβαμε να διερευνήσουμε τον τομέα των εφαρμογών της τεχνολογίας στην αντιμετώπιση του καρκίνου και πιο ειδικά στο ιδιαίτερα σημαντικό πεδίο της πρόληψης. Μέσα από την προσπάθεια αυτή μπορούν να αναδειχθούν οι τομείς εφαρμογών των νέων τεχνολογιών στους οποίους μπορούν να δραστηριοποιηθούν οι επαγγελματίες υγείας.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Ο φείλουμε να αναφέρουμε και να ευχαριστήσουμε τους Ιατρούς Μ.Μ Κωνσταντουλάκη και την ερευνητική του ομάδα, του Ιπποκράτειου νοσοκομείου Αθήνας, τον Σταθόπουλο Γεώργιο παθολόγο-ογκολόγο, τον Σταθόπουλο Ιωάννη παθολόγο-ογκολόγο του νοσοκομείου Ερρίκος Ντυνάν, τον Prof. Dr Rödiger Hain Βιολόγο της εταιρείας Bayer. Επίσης την Τουμπανάκη Δήμητρα Χημικό και την Μουρούνογλου Μαρία Ιατρό και τον καθηγητή μας Κουτσογιάννη Κωνσταντίνο για την πολύτιμη αρωγή τους στο σύγγραμμα μας. Τέλος ευχαριστούμε τις οικογένειες μας για την αφοσίωση και συμπαράσταση που επέδειξαν στην προσπάθεια μας.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η Ογκολογία αποτελεί ένα γρίφο για όσους ασχολούνται με αυτή. Μπορεί να παρομοιαστεί μόνο με λαβύρινθο, εξαιρετικά πολύπλοκη και ενδιαφέρουσα. Για τους Νοσηλευτές και τους άλλους επιστήμονες υγείας ο τομέας αυτός χαρακτηρίζεται ως πρόκληση και διαρκής αγώνας με στόχο τη νίκη κατά του καρκίνου.

Η προσφορά υπηρεσιών στον άνθρωπο που πάσχει από καρκίνο είναι το πρώτο μέλημα της Νοσηλευτικής Ογκολογίας, ενώ καθήκον κάθε Ογκολόγου Νοσηλευτή αποτελεί η πρόληψη, η διάγνωση, η θεραπεία και η κατάλληλη εξατομικευμένη νοσηλευτική φροντίδα του καρκινοπαθούς.

Παρά τη σοβαρότητα του νοσήματος, η εκτεταμένη έρευνα των τελευταίων δεκαετιών όσον αφορά την επιδημιολογία, την αιτιολογία, τη θεραπεία και την πρόληψη, είχε ως αποτέλεσμα τη βελτίωση της επιβίωσης των γυναικών που έχουν την ατυχία να προσβληθούν από τον καρκίνο.

Αν διαγνωστεί νωρίς, το 90% των ασθενών επιβιώνει.

Κεφάλαιο 1

1.1 Γενικές Πληροφορίες

Η σύγχρονη αντίληψη για τα νεοπλάσματα, σαν ανωμαλία της ανάπτυξης του κυττάρου δεν είναι παλαιότερη από 130 χρόνια περίπου. Ο Johannes Müller το 1838 ήταν ο πρώτος που έκανε την περιγραφή της κυτταρικής φύσης του καρκίνου.¹

Καρκίνος είναι ο γενικός όρος που περιγράφει την ανώμαλη ανάπτυξη των κυττάρων.² Κάθε μία κακοήθης νεοπλασία ξεχωριστά έχει τη δική της αιτιολογία, παθογένεια καθώς και φυσική ιστορία.³

Σήμερα γνωρίζουμε ότι ο πολλαπλασιασμός των φυσιολογικών κυττάρων είναι το αποτέλεσμα του αναδιπλασιασμού του DNA και της μίτωσης που ακολουθεί.³ Ο οργανισμός μας αποτελείται από τεράστια ποικιλία κυττάρων που το καθένα περιέχει 23 ζεύγη χρωμοσωμάτων. Ανάμεσα σε κάθε ζεύγος τυλίγεται η διπλή έλικα του DNA που αποτελεί τον γενετικό κώδικα της ζωής.

Τα χρωμοσώματά μας περιέχουν εκατομμύρια μηνύματα που υπαγορεύουν στον οργανισμό, πώς να αναπτυχθεί, πώς να λειτουργήσει και πώς να συμπεριφερθεί. Ένα γονίδιο λέει στο στομάχι πως θα παράγει γαστρικό υγρό, ενώ κάποιο άλλο λέει στους αδένες να το εκκρίνουν μόλις η τροφή φτάσει στο στομάχι. Άλλα γονίδια καθορίζουν το χρώμα των ματιών μας, ενώ άλλα λένε στους τραυματισμένους ιστούς να επουλωθούν. Τον περισσότερο χρόνο τα γονίδια λειτουργούν κανονικά, στέλνοντας τα σωστά μηνύματα, παραμένοντας έτσι ο οργανισμός σε καλή φυσική κατάσταση.²

Υπάρχει όμως απίστευτα μεγάλος αριθμός γονιδίων και τεράστιος αριθμός μηνυμάτων, και ενώ τα χρωμοσώματα αυτοαναπαράγονται κάθε στιγμή που το κύτταρο διαιρείται, υπάρχουν πολλά ενδεχόμενα να πάει κάτι στραβά. Διάφορες διαταραχές στη δομή ή στους ρυθμιστικούς

μηχανισμούς του DNA μπορούν να οδηγήσουν τα κύτταρα στον θάνατο ή σε παθολογικά θυγατρικά κύτταρα.^{2,3}

Στην πορεία, λοιπόν, της κυτταρικής διαίρεσης κάτι μπορεί να ακολουθήσει λανθασμένο δρόμο, όπως μια μετάλλαξη που αλλάζει ένα ή περισσότερα γονίδια. Τα μεταλλαχθέντα γονίδια αρχίζουν να στέλνουν λανθασμένα μηνύματα. Τότε ένα κύτταρο αρχίζει να αναπτύσσεται με μεγαλύτερη ταχύτητα. Πολλαπλασιάζεται συνεχώς ώσπου να σχηματίσει έναν όγκο, τον λεγόμενο κακοήθη όγκο ή καρκίνο.²

Ο κακοήθης όγκος χαρακτηρίζεται από ποικίλους βαθμούς διαφοροποίησης, ταχεία τις περισσότερες φορές ανάπτυξη, επέκταση στους γύρω ιστούς, εμφάνιση μεταστάσεων σε άλλα όργανα, με τελική κατάληξη τον θάνατο του ξενιστή. Αντιθέτως, ο καλοήθης όγκος, μικροσκοπικά είναι καλά διαφοροποιημένος με μικρό μειωτικό δείκτη και βραδεία ανάπτυξη, ενώ μακροσκοπικά είναι περιχαρακωμένος χωρίς διήθηση των γύρω ιστών και χωρίς δυνατότητα για μετάσταση.³

1.2 Προδιαθεσικοί παράγοντες¹

Οι συνεχείς μελέτες για την κατανόηση του καρκίνου έχουν αποδείξει ότι ευθύνονται ορισμένοι παράγοντες που κάνουν ένα άτομο περισσότερο ευαίσθητο στην εμφάνιση του καρκίνου από άλλα άτομα. Αυτοί είναι :

Ηλικία: Αν και κάθε ηλικία μπορεί να προσβληθεί από καρκίνο, πάνω από τα μισά άτομα με καρκίνο είναι ηλικίας 55 χρονών και άνω.

Φύλο: Οι γυναίκες φαίνεται να είναι πιο ευαίσθητες από τους άντρες σε ορισμένους καρκίνους και αντίστροφα.

Τόπος διαμονής: Οι κάτοικοι των πόλεων έχουν περισσότερες πιθανότητες να εμφανίσουν καρκίνο, από ό,τι οι κάτοικοι των αγροτικών περιοχών.

Γεωγραφική θέση: Στην Ιαπωνία οι περιπτώσεις καρκίνου του στομάχου είναι περισσότερες από ό,τι στις ΗΠΑ, ενώ ο καρκίνος του μαστού είναι σπάνιος στην Ιαπωνία. Αυτό μάλλον οφείλεται σε περιβαλλοντικούς παράγοντες.

Επάγγελμα: Ένα άτομο που εκτίθεται καθημερινά σε καρκινογόνες ουσίες, περισσότερο από ένα άλλο, έχει στατιστικά μεγαλύτερες πιθανότητες να εμφανίσει καρκίνο.

Οικογενειακή προδιάθεση: Κληρονομικότητα της νόσου στις επόμενες γενιές.

1.3 Αιτιολογία

- Φυσικοί παράγοντες
- Χημικοί παράγοντες
- Γενετικοί παράγοντες
- Ορμονικοί παράγοντες
- Διαιτητικοί παράγοντες
- Ιοί

1.4 Διασπορά των καρκινικών κυττάρων ^{2,4}

- Διήθηση των ιστών (απευθείας επέκταση)
- Αιματογενής διασπορά με διάβρωση των αιμοφόρων αγγείων
- Απόπτωση καρκινικών κυττάρων από τον όγκο σε ορογονικές κοιλότητες
- Μέσω των λεμφαγγείων

1.5 Ταξινόμηση νεοπλασμάτων

Καρκίνωμα *in situ*: Το καρκίνωμα *in situ* είναι μια καρκινική βλάβη με τα χαρακτηριστικά ενός κακοήθους όγκου, το οποίο μικροσκοπικά δε έχει διηθήσει τον φυσιολογικό ιστό που το περιβάλλει. Εξελίσσεται σε διηθητικό καρκίνο και το συναντάμε στο δέρμα, στους βρόγχους, στο φάρυγγα, στο στόμαχο, στο κόλον και στον τράχηλο της μήτρας.⁴

Καρκινώματα: Αναπτύσσονται στους ιστούς που καλύπτουν την επιφάνεια ή την εσωτερική μεμβράνη των οργάνων και το επιθήλιο. Επίσης αναπτύσσονται σε ένα όργανο που εκκρίνει κάποια ουσία π.χ. ο πνευμονικός ιστός εκκρίνει βλέννες, ο μαστός, γάλα και το πάγκρεας, παγκρεατικά υγρά.²

Σαρκώματα: Είναι όγκοι των μαλακών ιστών ή των οστών. Αναπτύσσονται σε κάθε τμήμα του υποστηρικτικού ή συνδετικού ιστού, στους μυς, στα οστά, στα νεύρα, στους τένοντες, στα αιμοφόρα αγγεία.

Στο ίδιο όργανο που θα αναπτυχθεί καρκίνωμα μπορεί να συνυπάρχει και σάρκωμα, εφόσον το όργανο έχει συνδετικό ιστό.²

Λεμφώματα και λευχαιμίες: Αναπτύσσονται στους λεμφαδένες ή στα αιμοποιητικά κύτταρα του μυελού των οστών.

Τα λεμφώματα (λεμφοσαρκώματα) είναι όγκοι που εμφανίζονται στους λεμφαδένες. Σχεδόν πάντοτε είναι κακοήθεις. Ένα είδος όγκου της κατηγορίας αυτής είναι η νόσος του Hodgkin.

Οι λευχαιμίες είναι καρκίνοι των λευκών αιμοσφαιρίων και παίρνουν το όνομά τους από τον τύπο των λευκών αιμοσφαιρίων που προσβάλλονται.²

1.6 Κλινικά σημεία και συμπτώματα

Πώς θα ανακαλύψουμε ότι υπάρχει καρκίνος; Το ερώτημα αυτό γίνεται πιο ουσιαστικό αν αναλογιστούμε ότι η έγκαιρη διάγνωση ίσως σημαίνει οριστική ίαση. Συνήθως θα εκδηλωθεί ως ενόχλημα του ασθενή ή παρατήρηση ενός σημείου από τον ίδιο ή κάποιον δικό του. Άλλες φορές αναγνωρίζεται από τον γιατρό, στα πλαίσια μιας κλινικής εξέτασης ή μέσω εργαστηριακών εξετάσεων.

Η Αμερικανική Αντικαρκινική Εταιρεία καθόρισε έναν κατάλογο με τα 7 επικίνδυνα σημεία του καρκίνου:

- Αλλαγή στις συνήθειες του εντέρου ή της ουροδόχου κύστης.
- Μια πληγή που δεν επουλώνεται ή μια φλεγμονή που επιμένει.
- Ασυνήθης αιμορραγία ή έκκριση από το στόμα, ορθό ή κόλπο.
- Σκληρία ή ψηλαφητή διόγκωση στο μαστό ή σε άλλο σημείο του σώματος.
- Δυσπεψία ή δυσκολία στην κατάποση.
- Αλλαγή στην κατάσταση ενός σπίλου ή μιας κρεατοελιάς.
- Επίμονος ξηρός βήχας ή βράγχος φωνής.⁵

1.7 Πραγματοποίηση της διάγνωσης ^{5,6}

Η διάγνωση της νεοπλασματικής νόσου μπορεί να πραγματοποιηθεί σύμφωνα με τις παρακάτω κλινικές-διαγνωστικές δοκιμασίες:

- Ιστορικό-Κλινική εξέταση
- Εργαστηριακός έλεγχος
- Ακτινογραφίες
- Αξονική-Μαγνητική τομογραφία
- Σπινθηρογράφημα
- Υπερηχογράφημα
- Ενδοσκόπηση
- Κυτταρολογική εξέταση-Βιοψία

1.8 Η κατάλληλη θεραπεία

Σήμερα, σχεδόν οι μισοί διαγνωσθέντες καρκίνοι είναι θεραπεύσιμοι. Ορισμένα είδη καρκίνου θεραπεύονται ολοκληρωτικά, ενώ άλλα μπορεί να υποτροπιάσουν ακόμη και μετά την πενταετή περίοδο που χρειάζεται για να χαρακτηριστούν πλήρως ιάσιμα.

Ακόμα όμως και σε περιπτώσεις που θεωρούνται ανίατες, η κατάλληλη θεραπεία προσφέρει αρκετά πλεονεκτήματα, όπως μια φυσιολογική ζωή για μήνες ή και χρόνια, βελτιώνοντας την ποιότητα ζωής. Παρόλα αυτά η ανάλυση της νόσου και η αναμενόμενη συμπεριφορά παίζουν σημαντικό ρόλο στη θεραπεία η οποία μπορεί να επιβραδύνει ή και να σταματήσει την εξέλιξη της νόσου.²

1.9 Είδη θεραπειών ²

1.9.1 Χειρουργική θεραπεία

Η χειρουργική θεραπεία είναι η παλαιότερη και η πιο επιτυχής θεραπευτική μέθοδος. Αν αφαιρεθεί ολόκληρος ο όγκος και δε μείνουν καρκινικά υπολείμματα, μπορεί να επιτευχθεί πλήρης ίαση. Για να θεωρηθεί η χειρουργική θεραπεία ως η καλύτερη επιλογή, η διάγνωση πρέπει να πληροί δύο αρχές.

- Ο όγκος πρέπει να εντοπίζεται σε ένα σημείο και να είναι συμπαγής.
- Η αφαίρεση του όγκου να μην προκαλέσει βλάβη σε ζωτικά όργανα.²

1.9.2 Χημειοθεραπεία

Ο όρος υποδηλώνει μία μέθοδο θεραπείας με χημικές ουσίες. Η θεραπεία του καρκίνου με 5-fluorouracil είναι χημειοθεραπεία.

Το είδος αυτό θεραπείας δεν το ανέχονται όλοι οι άνθρωποι, μερικοί δεν ανέχονται καθόλου τη θεραπεία με χημικές ουσίες, οι περισσότεροι την ανέχονται αρκετά καλά, ενώ άλλοι παρουσιάζουν μέτριες έως έντονες αντιδράσεις.

Η χημειοθεραπεία εφαρμόζεται σε καρκίνους που διασπείρονται σε πολλά σημεία του σώματος, μέσω του αίματος ή του λεμφικού συστήματος.²

1.9.3 Ακτινοθεραπεία

Στόχος της ακτινοθεραπείας είναι η υποχώρηση ή η εξαφάνιση του όγκου. Με την ακτινοθεραπεία καταστρέφεται η γενετική δομή των κυττάρων του όγκου και έτσι δεν αναπτύσσονται ούτε διαιρούνται. Αυτό

επιτυγχάνεται από μια δέσμη ραδιενεργών ακτινών και ηλεκτρονίων που κατευθύνονται πάνω στον όγκο από μηχανήματα υψηλής ενέργειας, ή ακόμα με ραδιενεργά υλικά τα οποία τοποθετούνται μέσα ή κοντά στον όγκο.²

1.9.4 Βιολογική θεραπεία ή ανοσοθεραπεία

Η βιολογική θεραπεία είναι ένας νέος τρόπος θεραπείας του καρκίνου. Αποδείχτηκε ότι το ανοσολογικό σύστημα μπορεί να παίξει σημαντικό ρόλο, προστατεύοντας τον οργανισμό εναντίον του καρκίνου. Βασίζεται στην αρχή ότι το ανοσολογικό σύστημα, το οποίο έχει διαμορφωθεί για να εξουδετερώνει οτιδήποτε «ξένο» παρουσιαστεί στο σώμα, θα μπορούσε να συντελέσει στην καταστροφή των καρκινικών κυττάρων. Ένα από τα σοβαρότερα προβλήματα είναι ότι το ανοσολογικό σύστημα δεν αντιμετωπίζει πάντα τα καρκινικά κύτταρα ως «ξένα».

Η βιολογική θεραπεία συνίσταται κυρίως στη χρήση μιας πρωτεΐνης υψηλής καθαρότητας, κυρίως ιντερφερόνη και ιντερλευκίνη-2, για να ενεργοποιηθεί το ανοσολογικό σύστημα. Με διαφορετικούς τρόπους πάλι ενισχύεται η ιδιότητα των λεμφοκυττάρων. Αυτό το είδος θεραπείας προσφέρεται μόνο μετά τη δοκιμή των συμβατικών μεθόδων θεραπείας.²

1.9.5 Θεραπεία με Laser

Η λέξη laser σημαίνει «ενίσχυση φωτός με εξαναγκασμένη εκπομπή ακτινοβολίας». Το φως παράγεται από συσκευές που μπορούν να διεγείρουν ουσίες όπως το διοξείδιο του άνθρακα, το αργόν και το νεοδύμιο, οδηγώντας τις σε υψηλότερη ενεργειακή κατάσταση. Όταν οι ουσίες επιστρέφουν σε κατάσταση «ηρεμίας», απελευθερώνουν την

ενέργειά τους υπό τη μορφή δραστικού φωτός, με τόση ενέργεια, ικανή να εξαερώνει ανθρώπινους ιστούς. Το μειονέκτημα του laser είναι ότι αφαιρεί μόνο τον ορατό όγκο, ενώ το κύριο μέρος παραμένει στη θέση του.²

1.9.6 Θεραπεία με Υπερθερμία

Υπερθερμία σημαίνει αύξηση της θερμοκρασίας και αναφέρεται στη χρήση θερμότητας για τη θεραπεία του καρκίνου.

Όταν η θερμοκρασία φτάσει τους 41°C, η θερμότητα αρχίζει να καταστρέφει τα κύτταρα. Η έκταση της καταστροφής εξαρτάται από τη διάρκεια της υπερθερμίας και το ύψος της θερμοκρασίας. Η θερμοκρασία που χρησιμοποιείται κυμαίνεται από 41°C έως 45°C.²

Κεφάλαιο 2

ΠΡΩΤΕΩΜΙΚΗ

ΠΡΩΤΕΩΜΙΚΗ (PROTEOMICS) ΚΑΙ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΙΚΗ (GENOMICS)

2.1 Εισαγωγή

Ο καρκίνος είναι αποτέλεσμα της συσσώρευσης μεταβολών – αριθμητικών και δομικών – που μπορεί να οδηγήσουν σε ατέλειες επισκευής του DNA, οι οποίες με τη σειρά τους οδηγούν σε γενετική αστάθεια σε ευρεία έκταση του γονιδιώματος. Προκειμένου να γίνουν κατανοητές τέτοιου είδους ατέλειες και να συσχετιστούν με τη διάγνωση, την πρόγνωση και τελικά τη θεραπεία του καρκίνου, απαιτείται σημαντική γνώση των μοριακών βιολογικών διαδικασιών που κυβερνούν τη λειτουργία του κυττάρου. Μέχρι σήμερα πολύ μικρός αριθμός των μοριακών γεγονότων που καθορίζουν ένα συγκεκριμένο καρκίνο έχει προσδιοριστεί. Εντούτοις, περισσότερο από 90% όλων των καρκίνων εμφανίζουν χαρακτηριστική ανευπλοειδία, πολλαπλές ενισχύσεις ή διαγραφές γονιδίων, γενετική αστάθεια κ.λ.π. Έτσι, ο κανόνας είναι μεγάλη ετερογένεια μεταξύ του ίδιου και διαφορετικών όγκων, καθιστώντας ιδιαίτερα δύσκολη την κατανόηση της πλειοψηφίας των όγκων, τόσο παθολογικά όσο και γενετικά.

Η μεταφραστική έρευνα, ιδιαίτερα στο γενετικό επίπεδο, παρέχει σημαντικές δυνατότητες για την ανάπτυξη νέων αποδοτικών και αξιόπιστων στρατηγικών τόσο για τη διάγνωση όσο και για την θεραπεία ποικίλων όγκων. Η πρόοδος στην έρευνα του καρκίνου βαδίζει παράλληλα με την τεράστια ανάπτυξη της τεχνολογίας, την ανακάλυψη και ευρύτερη χρήση τεχνικών, όπως οι DNA μικροσυστοιχίες (DNA

microarrays), η ανάλυση της ακολουθίας των βάσεων DNA μέσω υβριδισμού (sequencing by hybridization), η διαγραμματική αναγνώριση της έκφρασης cDNA (expression profiling), ο συγκριτικός γονιδιωματικός υβριδισμός (comparative genomic hybridization), καθώς και οι βελτιωμένες δισδιάστατες μέθοδοι ηλεκτροφόρησης σε συνδυασμό με διαδοχική φασματοσκοπία μάζας (tandem mass-spectroscopy) και υποστηριζόμενες από τεχνικές βιοπληροφορικής. Όλες οι παραπάνω και πολλές ακόμα τεχνολογίες υψηλής ακριβείας θα καταλήξουν σε μια σφαιρική αντιπροσώπευση, αλλά και βαθιά κατανόηση της έκφρασης των γονιδίων, των μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων, καθώς και της πρωτεϊνικής έκφρασης, οδηγώντας τελικά σε μια σαφέστερη κατανόηση των ποικίλων κυτταρικών διαδικασιών.

Τρία σημαντικά εργαλεία έχουν προκύψει για την ανάλυση των μοριακών γενετικών γεγονότων, κυρίως ως αποτέλεσμα των τεχνολογιών υψηλής απόδοσης (high-throughput technologies) και σε απόλυτη σύνδεση με την αποκωδικοποίηση του ανθρώπινου γονιδιώματος (Human Genome Project):

1. **Γονιδιωματική (Genomics):** η μελέτη του γονιδιώματος.
2. **Πρωτεωμική (Proteomics):** η ταυτοποίηση και η ανάλυση του συνόλου των πρωτεϊνών που κωδικοποιούνται από το ανθρώπινο γονιδίωμα, συμπεριλαμβανομένων και των μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων που αυτές υφίστανται.
3. **Μεταγραφωμική (Transcriptomics):** σκιαγράφηση της έκφρασης του RNA και των μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων, ο ‘μεσάζων’ μεταξύ του γονιδιώματος (genome) και του πρωτεϊνώματος (proteome).

Η διαθεσιμότητα και η δυνατότητα πρόσβασης σε πολύπλοκες βάσεις δεδομένων πληροφοριών, τόσο όσον αφορά τη λειτουργική γονιδιωματική (functional genomics), όσο και την πρωτεωμική,

προσφέρουν σημαντικά εργαλεία για την προσέγγιση όλων των νέων γνώσεων. Έτσι έχουμε σήμερα εύκολη πρόσβαση σε βάσεις δεδομένων που αφορούν σχεδιαγράμματα μεταγραφής και πρωτεϊνικής έκφρασης. Συνολικά η γονιδιωματική και η πρωτεωμική αποτελούν δύο απόλυτα συμπλεκόμενους χώρους (που ο καθένας περιλαμβάνει χωριστά ποικίλα συστατικά), οι οποίοι αναλύονται προοδευτικά με τη βοήθεια πολυάριθμων ερευνητικών μεθοδολογιών. Οι βασικότερες από αυτές τις μεθοδολογίες είναι: ο συγκριτικός γονιδιωματικός υβριδισμός (comparative genomic hybridization), η χρώση χρωμοσωμάτων για το γονιδίωμα (genome chromosome painting), η τμηματική ανάλυση της έκφρασης γονιδίων (Serial Analysis of Gene Expression - SAGE) και οι DNA μικροσυστοιχίες (microarrays) για το μεταγράφομα (Transcriptosome), καθώς και η δισδιάστατη ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών (2D-protein electrophoresis) και οι μικροσυστοιχίες αντισωμάτων για το πρωτεϊνωμα (Proteome). Εντούτοις, προκειμένου να διευκρινιστεί η σφαιρική βιολογική συμπεριφορά, τόσο τα φυσιολογικά όσο και τα ανώμαλα κύτταρα πρέπει να αναλυθούν για όλα τα γονίδια στο γονιδίωμα. Αυτό αφορά ανάλυση κυρίως στο επίπεδο του μεταγραφώματος για την έκφραση αγγελιοφόρου RNA (messenger RNA), αλλά και του πρωτεϊνώματος (proteome), για την έκφραση των λειτουργικών πρωτεϊνών, προκειμένου να προσδιοριστούν τα βασικά συστατικά στη διαδικασία της καρκινογένεσης.

2.2 Πρωτεωμική (PROTEOMICS)

Η πρωτεωμική ένας όρος που εισήχθηκε το 1994 από τον Mark Wilkins και τους συναδέλφους του στο πανεπιστήμιο Macquarie στο Σίδνεϊ της Αυστραλίας, αναφέρεται στην μελέτη της πρωτεΐνης.^{7,8} Αν και ο ακριβής ορισμός της πρωτεωμικής ποικίλλει ανάμεσα στους ερευνητές,

είναι κοινά αποδεκτό πως η πρωτεωμική αποτελεί ‘την μελέτη όλων των πρωτεϊνικών μορφών που εκφράζονται μέσα σε έναν οργανισμό σε συνάρτηση με τον χρόνο, την ηλικία, την κατάσταση, τους εξωτερικούς παράγοντες κτλ.⁹ Με άλλα λόγια, η πρωτεωμική χαρακτηρίζει τη συμπεριφορά του συστήματος παρά τη συμπεριφορά της κάθε συνιστώσας. Η πρωτεωμική αποτελεί μια νέα προσέγγιση που ενοποιεί κάποιες βασικές τεχνικές κλειδιά, όπως η μεγάλη σε ένταση διάσπαση και κατατομή πρωτεΐνης, η φασματομετρία μάζας, γονιδιωματικές και πρωτεϊνικές βάσεις δεδομένων και εργαλεία βιοπληροφορικής βασισμένα σε φυλλομέτρηση για την εξαγωγή πληροφοριών από αυτές τις βάσεις δεδομένων.

Γιατί η πρωτεωμική; Μετά την ολοκλήρωση του ερευνητικού έργου του ανθρώπινου γονιδιώματος, οι βιολόγοι παρατήρησαν πως οι πληροφορίες για τα γονιδιώματα που ερμήνευαν κυρίως την γενετική βάση του καρκίνου δεν μας επιτρέπανε μια ακριβή πρόβλεψη για το τι πραγματικά συμβαίνει οποιαδήποτε στιγμή στα επίπεδα πρωτεΐνης σε ένα δεδομένο κυτταρικό τύπο. Το πρόγραμμα γονιδιακής έκφρασης ενός δεδομένου κυττάρου, επηρεάζεται από πολυάριθμους παράγοντες στο περιβάλλον εντός του οργανισμού σαν αποτέλεσμα της πολυπλοκότητας του ιστού και της συμφωνίας του οργανικού συστήματος με τα κύτταρα που ενεργούν σε συντονισμό το ένα με το άλλο και που ανταποκρίνονται στις αλλαγές του μικροπεριβάλλοντος τους. Μιας και οι πρωτεΐνες αποτελούν τις λειτουργικές μονάδες ενός κυττάρου και σχηματίζουν ένα εγγενές κομμάτι του δυναμικού διαδικτύου του και μιας η έκφραση τους, η δραστηριότητα και η θέση τους μπορεί να μεταβληθεί οποιαδήποτε στιγμή μετά από διάφορα σήματα μέσω μετά-μεταφραστικών τροποποιήσεων, ένα καινούργιο βιολογικό παράδειγμα- η πρωτεωμική- κρίνεται απαραίτητο γι’ αυτόν το λόγο. Η πρωτεωμική μας παρέχει μια δυνατή προσέγγιση για την ανάλυση των κανονικών και

μετασχηματισμένων κυτταρικών λειτουργιών, με σύνθετους συνδυασμούς για την αναγνώριση περιπτώσεων με συγκεκριμένη πάθηση, την αποκάλυψη νέων τελικών σημείων για την αποτίμηση των προληπτικών χημικών δραστικών μέσων, και κατευθυνόμενα φάρμακα με βάση την πρωτεΐνη για καλύτερη θεραπεία.¹⁰

Η πρωτεωμική μπορεί να χωριστεί σε τρία κύρια πεδία:

1. Πρωτεϊνικός μικροχαρακτηρισμός στην αναγνώριση των πρωτεϊνών μεγάλης κλίμακας και των μετά-μεταφραστικών τροποποιήσεων τους.
2. ‘Διαφορική απεικόνιση’ Η πρωτεϊνική βιολογία για την σύγκριση των πρωτεϊνικών επιπέδων με ενδεχόμενη εφαρμογή σε ένα ευρύ φάσμα ασθενειών και
3. Μελέτες των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των πρωτεϊνών και των μετά-μεταφραστικών τροποποιήσεων.¹¹

Γενικά, τα κύρια ερωτήματα της πρωτεωμικής είναι τα εξής:

1. Ποίες πρωτεΐνες παρουσιάζονται και σε ποια κύτταρα;
2. Πως οι πρωτεΐνες αυτές συνεργάζονται στα σήματα πορείας;
3. Ποίες είναι οι αλλαγές στην έκφραση και δραστηριότητα των πρωτεϊνών που οδηγούν στην ανάπτυξη, την αποκατάσταση, την πρωτεόλυση και τον θάνατο ενός οργανισμού;

Στον τομέα της ογκολογίας, η πρωτεωμική θα συμβάλει σημαντικά στην κατανόηση της λειτουργίας των γονιδίων κατά την ανάπτυξη όγκων, απαντώντας σε αυτά τα βασικά ερωτήματα και παρέχοντας πληροφορίες για την χρήση στις κλινικές εφαρμογές.

Η πρωτεωμική του καρκίνου περιλαμβάνει δυο κατηγορίες: Την ‘εκφραστική’ και την ‘λειτουργική’ πρωτεωμική. Στην εκφραστική πρωτεωμική οι ερευνητές εξετάζουν τις πρωτεΐνες που εμφανίζονται με διαφορετικό τρόπο σε ένα δεδομένο ιστό, βιολογικό υγρό ή ορό αίματος. Αυτή η προσέγγιση υπόσχεται την διάκριση δεικτών ασθένειας (καρκινικών δεικτών) που θα μπορούσαν να είναι σημαντικοί στην

έγκαιρη ανίχνευση και διάγνωση, την παρακολούθηση της αποτελεσματικότητας μιας θεραπείας και τελικώς στην δημιουργία καινούργιων θεραπειών. Η λειτουργική πρωτεωμική περιλαμβάνει την ανάλυση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των πρωτεϊνών η μεταξύ πρωτεΐνης DNA/RNA και μετά-μεταφραστικές τροποποιήσεις. Οι τεχνικές αυτές θα βοηθήσουν τους ερευνητές να καθορίσουν το πώς οι πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν μεταξύ τους σε ένα ζωντανό σύστημα είτε σαν ζευγάρια είτε σαν κομμάτια μεγαλύτερων συμπλεγμάτων μέσα σε πολύπλοκες διαδρομές κύτταρων.

Επίσης πως τα ζωντανά κύτταρα αντιδρούν στα εξωτερικά και εσωτερικά ερεθίσματα. Η λειτουργική πρωτεωμική μπορεί να έχει μεγάλο αποτέλεσμα στην ιατρική κατά του καρκίνου αυξάνοντας την νόηση της βιολογικής διαδικασίας των καρκινικών κυττάρων και ίσως μας οδηγήσει στην αναγνώριση πρωτεϊνούχων στοχευόμενων ασθενειών.

2.3 Τεχνικές πρωτεωμικής

Στην κλινική έρευνα κατά του καρκίνου, οι τεχνικές που χρησιμοποιούνται στην πρωτεϊνική βιολογία κατατάσσονται σε δυο κατηγορίες. Σε αυτές που χρησιμοποιούνται στην εκφραστική πρωτεωμική όπως η 2D-PAGE, η πολυδιαστατική χρωματομετρία και τα πρωτεϊνικά τσιπς που χρησιμοποιούνται για την καταγραφή των πρωτεϊνών (παράδειγμα το SELDI, σύστημα πρωτεϊνικού τσιπ) και εκείνων που χρησιμοποιούνται στην λειτουργική πρωτεωμική όπως η ανοσοκαθίζιση, τα πρωτεϊνικά τσιπς,¹² προσεγγίσεις βασισμένες σε παρατάξεις,¹³ το διπλό υβριδικό^{14,15} σύστημα ζύμης για την κατευθείαν ανάλυση των λειτουργικών συμπλεγμάτων πρωτεϊνών και οι μετά-μεταφραστικές τροποποιήσεις. Καθώς αναφέρθηκαν στα παραπάνω, οι μεγάλες προκλήσεις στην κλινική πρωτεωμική είναι η διαθεσιμότητα

(ποσότητα δειγμάτων) και η σαφήνεια του κυρίως αντιπροσωπευτικού δείγματος. Έτσι τεχνικές όπως το LCM μπορούν κυρίως να βελτιώσουν την ποιότητα του δείγματος και γι' αυτό το λόγο να αποτελέσει ένα σημαντικό εργαλείο στην κλινική πρωτεωμική. Η ανασκόπηση αυτή, θα επικεντρωθεί στις τεχνικές που εφαρμόζονται συχνότερα στην κλινική ερευνά της πρωτεωμικής.

2.4 Φασματογράφος μάζας

Οι φασματογράφοι μάζας (MS) αποτελούνται από τέσσερα βασικά μέρη:

1. την πηγή ιόντων η οποία παράγει ιόντα από το μείγμα.
2. τον αναλυτή μάζας που διαχωρίζει τα ιόντα με βάση τη σχέση μάζας προς το φορτίο τους (m/z) και
3. τον ανιχνευτή που ανιχνεύει τα ιόντα που διακρίνονται από τον αναλυτή μάζας.

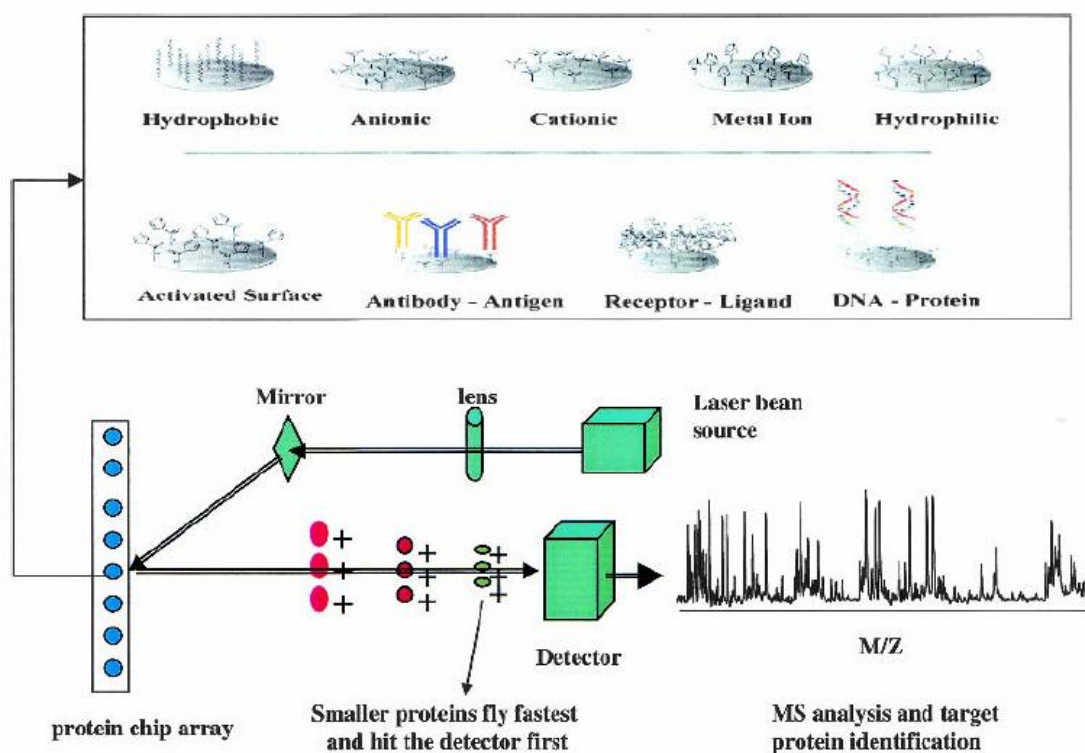
Ο φασματογράφος μάζας μετατρέπει τα συστατικά ενός δείγματος σε ιόντα και μετέπειτα τα αναλύει με βάση την σχέση μάζας προς το φορτίο τους. Σε πολλές μελέτες της πρωτεωμικής, η ποσότητα των πρωτεϊνών που προσφέρεται είναι περιορισμένη. Έτσι, ευαισθησία, διαχωρισμός, και ακρίβεια μάζας είναι σημαντικά για την σωστή αποτελεσματικότητα ενός φασματογράφου μάζας.

Δυο τύποι φασματομετρίας μάζας χρησιμοποιούνται για τις περισσότερες περιπτώσεις της πρωτεϊνικής βιολογίας. Η τεχνική φασματομετρίας μαζών κατάλληλη για δείγματα υψηλού μοριακού βάρους σε 'χρόνο πτήσης' (MALDI-TOF) και η συζευγμένη φασματομετρία μαζών ιονισμού μορίων με ηλεκτροψεκασμό (ESI-tandem MS). Με την τεχνική MALDI-TOF, το δείγμα που θα αναλυθεί ανακατεύεται με μια χημική εξωκυτταρική ουσία, η οποία τυπικά

περιέχει ένα μικρό οργανικό μόριο το οποίο απορροφά φως σε ένα συγκεκριμένο μήκος κύματος. Μετά το μείγμα τοποθετείται σε μια πλάκα ή ένα πλακίδιο (μικροσκοπίου) και μπορεί να εξατμιστεί στον αέρα. Αυτό το μόριο, στόχος, τοποθετείται στη πηγή όπου διαχέεται μια δέσμη από το φως του λέιζερ. Οι χημικές εξωκυτταρικές ουσίες αποσπών φωτόνια από την δέσμη και διεγείρονται ηλεκτρονικά. Η πλεονάζουσα αυτή ενέργεια μεταφέρεται στα πεπτίδια ή τις πρωτεΐνες μέσα στο δείγμα, τα οποία μετέπειτα αποβάλλονται από την στοχευόμενη επιφάνεια με αέρια φάση. Κάθε μόριο πεπτιδίου τείνει να αποσπά ένα μοναδικό πρωτόνιο. Με αυτόν τον τρόπο τα περισσότερα από τα ιόντα πεπτιδίων που προκύπτουν είναι φορτισμένα. Για ένα πεπτίδιο μάζας 2000, η πρόσθεση ενός πρωτονίου και του θετικού του φορτίου προκύπτει σε μια m/z εκτίμησης 2001 για το $[M+H]^+$ ιόν. Τα ιόντα που δημιουργούνται μέσα σε μια πηγή MALDI εξάγονται και κατευθύνονται σε TOF αναλυτή μαζών.

Η συζευγμένη φασματομετρία μάζας μπορεί να εκτελέσει ανάλυση μάζας ιόντων σε δυο στάδια ή σε πολλαπλά στάδια. Αρκετοί διαφορετικοί τύποι αναλυτών μάζας χρησιμοποιούνται στη συζευγμένη φασματομετρία μάζας με ιονισμό μορίων με ηλεκτροψεκασμό, συμπεριλαμβανόμενου του TOF, της παγίδευσης ιόντων και του τετράπολου. Η συζευγμένη φασματομετρία μαζών ιονισμένων μορίων με ηλεκτροψεκασμό είναι ιδανική για την ανάλυση και των βιομακρομορίων και των μικρών μορίων επειδή επιτρέπει λεπτές δομικές πληροφορίες να αποσπαστούν κατευθείαν από τα βιομόρια. Επιπλέον εξαιτίας της αναλυτικής ικανότητας να φορτίζονται πολλαπλά μετά από την ESI καθορίζεται ακριβές το μοριακό βάρος (10-100kDa) μεγάλων πρωτεϊνών. Οι δυο τύποι της φασματομετρίας μάζας δρουν με διαφορετικούς τρόπους και παρέχουν διαφορετικές μα συνάμα συμπληρωματικές πληροφορίες κατάλληλες για την ανάλυση της μάζας πεπτιδίων.^{16,17,18}

Το σύστημα πρωτεϊνικού τσιπ SELDI (Ciphergen Biosystem, Inc, Fremont, Ca) χρησιμοποιεί πατενταρισμένη τεχνολογία για την γρήγορη κατατομή, ανίχνευση και ανάλυση πρωτεϊνών σε φεμτομοριακό επίπεδο κατευθείαν από το βιολογικό δείγμα. (Διάγραμμα 1). Το σύστημα επιτρέπει τον εγκλωβισμό της πρωτεΐνης, τον καθαρισμό την ανάλυση και τις διαδικασίες από το περίπλοκο βιολογικό δείγμα ως την επιφάνεια συστοιχίας του πρωτεϊνικού τσιπ περιλαμβάνοντας χημικά (ιόντα, υδρόφοβα, υδρόφιλα κτλ) ή βιοχημικά (αντισώματα, υποδοχείς, DNA) για να εγκλωβίσουν τις πρωτεΐνες που μας ενδιαφέρουν. Αφού το πρωτογενές πρωτεϊνικό δείγμα μπει στην επιφάνεια του πρωτεϊνικού τσιπ μια γρήγορη πλύση αφαιρεί τις ελεύθερες πρωτεΐνες και τις παρεμβαλλόμενες ουσίες.^{12,19} Το δείγμα εισάγεται μετά στον σαρωτή του πρωτεϊνικού τσιπ (SELDI-TOF-MS) επιτρέποντας τον χαρακτηρισμό του μοριακού βάρους των πρωτεϊνών που παραμένουν δεσμευμένα στην επιφάνεια του πρωτεϊνικού τσιπ.²⁰



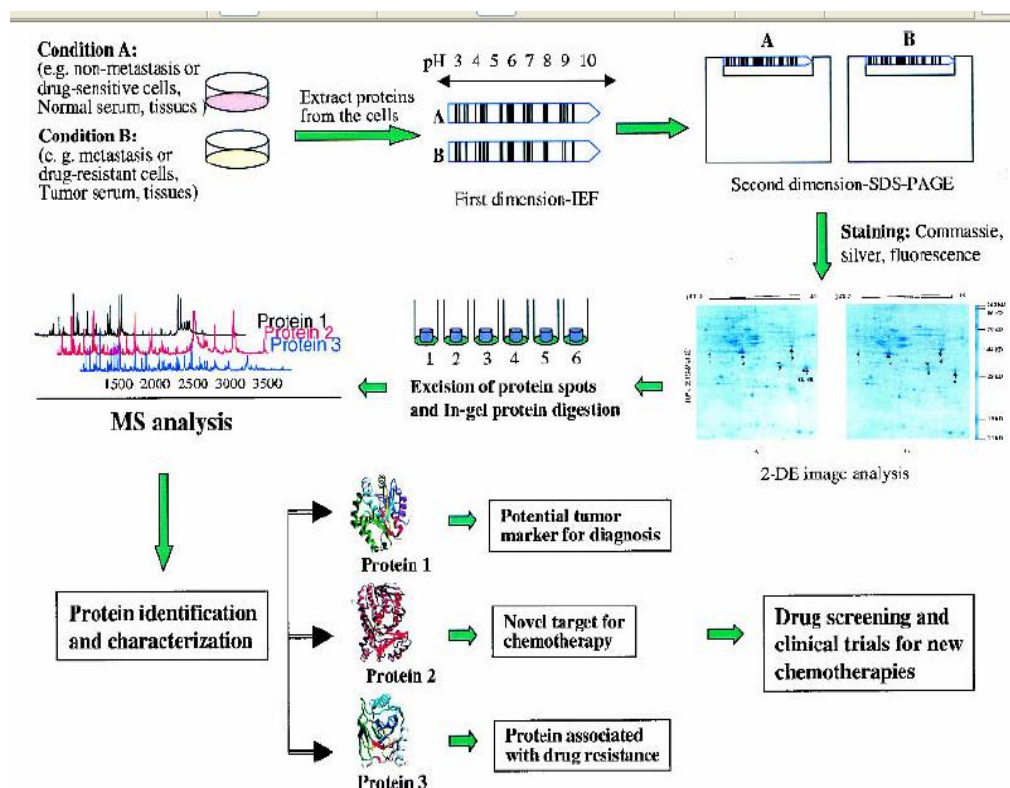
Διάγραμμα 1

2.5 Εκφραστική πρωτεωμική

2.5.1 Δισδιάστατη ηλεκτροφόρηση (2D-PAGE) και ταυτοποίηση πρωτεϊνών με πεπτιδική αποτύπωση

Οι πρωτεΐνες παρουσιάζουν μια ποικιλία σε βασικές λειτουργίες σε οργανισμούς θηλαστικών. Οι δυναμικές λειτουργίες περιλαμβάνουν την κατάλυση των χημικών μετασχηματισμών, την κυκλοφορία, τον έλεγχο μεταβολισμού και τις συρρικνώσεις. Μια σημαντική κατηγορία των δυναμικών πρωτεϊνών είναι τα ένζυμα τα οποία καταλύουν τις χημικές αντιδράσεις μετατρέποντας στο ενεργό μέρος του ενζύμου ένα υπόστρωμα σε προϊόν. Αρκετές γενετικές ασθένειες, συμπεριλαμβανομένων των κακοηθών όγκων, προκύπτουν από μεταλλαγμένα επίπεδα ενζυμικής παραγωγής ή συγκεκριμένες μεταλλάξεις στην αλληλουχία των αμινοξέων. Στην πρωτεωμική, οι πρωτεΐνες μπορούν να διαχωριστούν και να χαρακτηριστούν με βάση το pI, το pH στο κατά πόσο μια πρωτεΐνη είναι ηλεκτρικά ουδέτερη ή και σε μορφή διπολικού ιόντος και με τεχνικές όπως η 2D-PAGE και η χρωματογραφία (πχ. ανταλλαγή ιόντων η αντίστροφη φάση). Το διάγραμμα ροής για την 2-DE και την πρωτεϊνική αναγνώριση παρουσιάζεται στο διάγραμμα 2. Στον πίνακα ροής, δυο συγκρινόμενα δείγματα (κανονικού ιστού και καρκινικού ιστού, προτού και μετά της θεραπείας) διαχωρίστηκαν με μονοδιαστατική ηλεκτροφόρηση σύμφωνα με τα σημεία ηλεκτροεστίασης (pI) και με διπλή ηλεκτροφόρηση σύμφωνα με το μοριακό τους βάρος. Αυτό επιτρέπει την ανάλυση εκατοντάδων χιλιάδων πρωτεϊνών βασισμένη σε μεθόδους ανίχνευσης πρωτεϊνών. Οι διαφορετικές πρωτεΐνες που παρουσιάζονται μετατρέπονται σε πεπτίδια με πέψη εσωτερικής πηκτής με πεπτιδάση σε

συγκεκριμένη περιοχή (πχ θρυψίνη). Τα μείγματα των χωνευμένων πρωτεϊνών αναλύονται από φασματογράφο μάζας και το πεπτιδιακό φάσμα που παράγεται από αυτήν την ανάλυση χρησιμοποιείται για την εύρεση βάσης δεδομένων για αναγνώριση πρωτεϊνών.



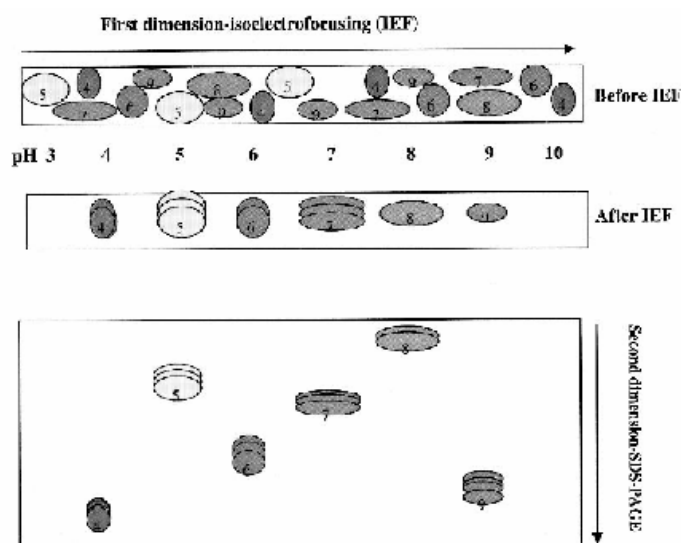
Διάγραμμα 2

Προετοιμασία δείγματος. Οι πρωτεΐνες μπορούν να αποσπαστούν από το αίμα, το κυτταρικό υγρό, ή από νέο ιστό με λύση ρυθμιστικών διαλυμάτων που περιλαμβάνει, αναστολείς πεπτιδάσης, καθαρκτικά, αναγωγικές ουσίες και αλλοιωμένης φύσεως αντιδραστήρες. Αυτά τα ρυθμιστικά διαλύματα διακόπτουν τις υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις, τους δεσμούς υδρογόνου και τους δισουλφιδικούς δεσμούς, τις ανεπιθύμητες συσσωρεύσεις και τον σχηματισμό δευτεροταγή δομών, τα οποία επηρεάζουν την κινητικότητα των πρωτεϊνών.^{21,22} Παράγοντες

όπως η διαλυτότητα, το μέγεθος, η φόρτιση και το pI των πρωτεϊνών λαμβάνονται υπόψη στην προετοιμασία του δείγματος. Η προετοιμασία δείγματος είναι σημαντική στην μείωση της πολυπλοκότητας του πρωτεϊνικού μίγματος.

2.5.2 Διαχωρισμός των πρωτεϊνών με χρήση δισδιάστατης ηλεκτροφόρησης (2D-PAGE)

Οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται από το διαφορετικό ισοηλεκτρικό σημείο (IEF) με διαφορετική βαθμωτή μεταβολή pH στην πρωτοδιάστατη και από ηλεκτροφόρηση πηγματος πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE) στην δισδιάστατη. Το πρωτοδιάστατο IEF πραγματοποιείται με την χρήση βαθμωτής μεταβολής pH διαχωρισμού πηγματος με μια στενή ή διευρυμένη διάταξη pH περιέχοντας ουρία, ακρυλαμίδιο/ βισακρυλαμίδιο, αμφολυτικό, CHAPS, και NP-40. Η πρωτεΐνη θα φτάσει στα επίπεδα μεταβολής ίσα με το PI (διάγραμμα 3). Μετά το IEF, τα διαχωρισμένα πηγματα. Ισορροπούνται άμεσα σε έναν ρυθμιστή διαλύματος περιέχοντας SDS, αλλάζουν και διαχωρίζονται χρησιμοποιώντας SDS-PAGE.



Διάγραμμα 3

2.5.3 Ανίχνευση πρωτεϊνών σε πηγματα.

Η ανίχνευση πρωτεΐνης αποτελεί ένα σημαντικό βήμα στην πρωτεωμική. Οι πρωτεΐνες συχνά απεικονίζονται σε πηγματα χρωματίζοντας τα με χρωστικά όπως το κολλοειδές λαμπρό κυανό G του coomassie, ασημένια χρώση και φθορίζων χρώση.²³ Η κολλοειδή χρώση με κυανό του Coomassie με χρήση G250 μπορεί να βελτιώσει την ευαισθησία ανίχνευσης συγκρινόμενη με την κανονική χρώση με κυανό του Coomassie.²⁴

2.5.4 Πρωτεϊνολυτική πέψη

Η φασματομετρία μάζας αναλύει άθικτες πρωτεΐνες και πεπτίδια. Ωστόσο μετρήσεις άθικτης μάζας χρησιμοποιούνται ελάχιστα στην αναγνώριση και τον χαρακτηρισμό των πρωτεϊνών. Οι άθικτες πρωτεΐνες πρέπει να χωνευτούν με τα ένζυμα πριν την φασματομετρική ανάλυση μάζας επειδή η ευαισθησία των μετρήσεων των άθικτων μαζών των

πρωτεϊνών δεν τόσο ακριβής όσο με τα πεπτίδια, και η διαφορετική μετά-μεταφραστική τροποποίηση περιπλέκει τον καθορισμό με βάση την μάζα. Ένας αριθμός πρωτεϊνάσεων, συμπεριλαμβανομένων της θρυψίνης, της χημοθρυψίνης, της ενδοπρωτεϊνάσης Glu C, της ενδοπρωτεϊνάσης Lys C και της ενδοπρωτεϊνάσης Asp N είναι κατάλληλος για πρωτεϊνολυτική πέψη με αρκετές διαφορετικές πρωτεϊνάσεις συγκεκριμένων θέσεων. Η θρυψίνη είναι η πρωτεϊνάση που χρησιμοποιείται συχνότερα στην πρωτεωμική ανάλυση και παρουσιάζει καλή ενεργητικότητα και στην πέψη με διάλυμα και στην πέψη μέσω πηκτής.

2.5.5 Αναγνώριση πρωτεΐνης

Η αναγνώριση της πρωτεΐνης αποτελεί το πιο σημαντικό βήμα στην εκφραστική πρωτεωμική. Στην πρωτεωμική έρευνα οι πρωτεΐνες μπορεί να αναγνωριστούν με πολλές μεθόδους, όπως η αποτύπωση της πεπτιδιακής μάζας και η συζευγμένη φασματομετρία μάζας.

Η αποτύπωση της πεπτιδιακής μάζας αποτελεί μια τεχνική αναγνώρισης πρωτεϊνών με την οποία ο φασματογράφος μάζας χρησιμοποιείται για την μέτρηση των μαζών των πρωτεϊνολυτικών πεπτιδιακών θραυσμάτων. (σχήμα 1). Η πρωτεΐνη ταυτοποιείται με το να ταιριάζει την πειραματική μάζα πεπτιδίων με την αντίστοιχη πεπτιδιακή αποτύπωση μάζας που βρίσκεται στις βάσεις δεδομένων της πρωτεΐνης ή της αλληλουχίας του νουκλεοτιδίου. Για παράδειγμα, η πέψη της θρυψίνης κάθε πρωτεΐνης αποδίδει ένα συγκεκριμένο αριθμό πεπτιδίων συγκεκριμένου μήκους, αλληλουχίας και μάζας. Οι βάσεις δεδομένων αλληλουχίας πρωτεϊνών που χρησιμοποιούνται συχνά περιλαμβάνουν τις SWISSPROT, OWL και NCBI nr βάσεις δεδομένων οι οποίες προσφέρονται και στο κοινό. Αρκετά προγράμματα λογισμικού για ταυτοποίηση πρωτεϊνών προσφέρονται στο διαδύκτιο, όπως τα:

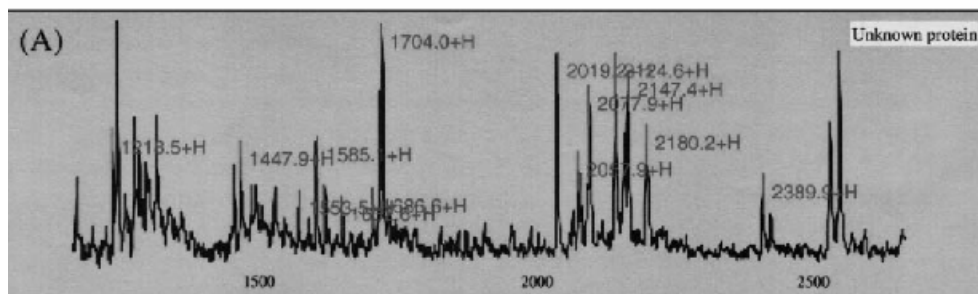
1. MOWSE (<http://srs.hgmp.mrc.ac.yk/cgi-bin/mowse>),
2. Mascot (<http://www.matrixscience.com>),
3. PeptIdent2, ProFound(<http://prowl.rockefeller.edu/cgi-bin/ProFound> or <http://www.proteometricw.com/prowl-cgi/ProFound.exe>).

ProFound, ένα ειδικό σύστημα για την αναγνώριση των πρωτεϊνών χρησιμοποιεί την Bayesian θεωρία για να κατατάξει την αλληλουχία των πρωτεϊνών στην βάση δεδομένων με βάση την πιθανότητα εμφάνισης. Λαμβάνει γνώση λεπτομερών πληροφοριών σχετικά με την κάθε πρωτεϊνική αλληλουχία και επιτρέπει την ενσωμάτωση επιπλέον πειραματικών πληροφοριών (πχ την σύσταση αμινοξέων ή την αλληλουχία πληροφοριών) όταν προσφέρονται. Ένα πλεονέκτημα της Bayesian προσέγγισης είναι, πως διαφορετικού τύπου πληροφορίες συμπεριλαμβάνονται με ένα φυσικό τρόπο, επιτρέποντας προαιρετική χρήση όλων των προσφερόμενων πληροφοριών και αυξάνει την ευαισθησία και την διαλογή του αλγόριθμου. Τα δικά μας κριτήρια για την αναγνώριση των πρωτεϊνών βασίζόμενα στο ProFound πρόγραμμα είναι τα εξής:

1. Θα πρέπει να υπάρχουν τουλάχιστον τέσσερα ζευγάρια πεπτιδιακής μάζας και η ακρίβεια της μάζας των πεπτιδίων θα πρέπει να βρίσκεται μεταξύ 1-2Da;
2. Η πιθανότητα μιας πρωτεΐνης στην βάση δεδομένων θα πρέπει να είναι 100% και Z-score γι' αυτήν την πρωτεΐνη θα πρέπει να είναι μεγαλύτερο από 1.65($P < 0.05$).⁹ Το μοριακό βάρος και το pI των ταυτοποιημένων πρωτεϊνών θα πρέπει να συμφωνεί με τις υπολογίσιμες άξιες που ανακτώνται από την ανάλυση εικόνας.

Παρόλ' αυτά, παραμένουν αρκετοί περιορισμοί για την αποτύπωση πεπτιδιακής μάζας, περιλαμβάνοντας την έλλειψη ολοκληρωμένου και ακριβή σχολιασμού γονιδιώματος- και βάσεις δεδομένων πρωτεϊνικής αλληλουχίας για μεγαλύτερο αριθμό πολύ

ομόλογων ανθρώπινων πρωτεϊνών. Πέρα από την αναγνώριση, την επιβεβαίωση και επικύρωση της πρωτεΐνης που μας ενδιαφέρει, υπάρχουν σημαντικά βήματα στις πρωτεωμικές προσεγγίσεις.



Σχήμα 1

2.5.6 Επιβεβαίωση και επικύρωση της πρωτεΐνης του ενδιαφέροντος

Η αξιόπιστη αναγνώριση της πρωτεΐνης βασίζεται σε αρκετές μεταβλητές, περιλαμβάνοντας την ακρίβεια του καθορισμού της μάζας θραυσμάτων, τον αριθμό των τιμών μάζας που υποβάλλονται για εξέταση της βάσης δεδομένων, της διάθεσης της μάζας από την εξεταζόμενη μάζα, τον αριθμό των μαζών που ταιριάζουν ανάμεσα στα δείγματα και στις πρωτεΐνες της βάσης δεδομένων και του αριθμού των τροποποιήσεων. Σε μερικές περιπτώσεις, τα δεδομένα που συλλέγονται με αποτύπωση της πεπτιδικής μάζας δεν επαρκούν για την αξιόπιστη αναγνώριση μιας πρωτεΐνης γι' αυτό το λόγο η επιβεβαίωση και η επικύρωση κρίνονται απαραίτητες. Υπάρχουν αρκετοί τρόποι να επιβεβαιώσεις την ταυτοποίηση των πρωτεϊνών, ενεργοποιώντας ένα επιπλέον αποτύπωμα πρωτεΐνης με μια πρωτεϊνάση διαφορετικής ειδικότητας, με αλληλουχία αμινοξέων με την μέθοδο Edmann, με τη σύσταση αμινοξέων, με ανάλυση ανοσοαποτύπωσης και ανοσο-ιστοχημικής ανάλυσης.

Στην μελέτη που γίνεται, επιβεβαιώνεται περαιτέρω η ταυτότητα των πρωτεϊνών με την ανάλυση ενός επιπλέον φάσματος αποτύπωσης πεπτιδιακής μάζας, για να αποφευχθεί η περίπτωση στην οποία θα διαλέξουμε μια λάθος αντιστοιχία. Όλες οι πρωτεΐνες που ταυτοποιούνται με πέψη θρυψίνης επιβεβαιώνονται ότι είναι οι ίδιες πρωτεΐνες από την πέψη Lys-C. Τα αποτελέσματα επικυρώνονται επίσης με την ανοσοαποτυπωτική ανάλυση.

2.5.7 Περιορισμοί της δισδιάστατης ηλεκτροφόρησης

Είναι φανερό, πως η δισδιάστατη ηλεκτροφόρηση παρουσιάζει εμπόδια όταν χρησιμοποιείται στην πρωτεωμική και αυτό οφείλεται κυρίως στην ίδια την δισδιάστατη ηλεκτροφόρηση ή στην σύζευξη με την φασματομετρία μάζας. Ένα από τα αδύνατα σημεία της δισδιάστατης ηλεκτροφόρησης είναι η δυσκολία στην αυτοματοποίηση της διαδικασίας και αυτό είναι κάτι που δεν είναι πιθανόν να αλλάξει στο προσεχές μέλλον αν και έχουν πραγματοποιηθεί αμέτρητες τεχνικές βελτιώσεις (πχ, η χρήση σταθερής μεταβολής pH). Επιπρόσθετα στο πρόβλημα παραγωγής, η δισδιάστατη μέθοδος δεν επιτρέπει επαρκή διακρισιμότητα για να χωρίσει πολλαπλά είδη που προέρχονται από μια μόνο πρωτεΐνη από μετά-μεταφραστικές τροποποιήσεις όπως εκείνες με υδατάνθρακες. Είναι μερικές φορές δύσκολο να ανιχνεύσεις πρωτεΐνες σε δισδιάστατη μέσω πηκτής με μοριακές μάζες μεγαλύτερες από 100 000 Da και εκείνες με αξία pI λιγότερο από 4 η υψηλότερο από 9. Επιπλέον, σε μελέτες της πρωτεωμικής, οι λιγότερα πλούσιες πρωτεΐνες μερικές φορές δεν παρουσιάζονται μέσω πηκτής και διαφορετικές πρωτεΐνες μπορούν να μεταφερθούν στο ίδιο σημείο.^{25,26} Ακόμη, η συμβατική δισδιάστατη ηλεκτροφόρηση μας δείχνει μόνο την έκφραση των πρωτεϊνών και δεν μπορεί να ανιχνεύσει τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πρωτεϊνών και την

λειτουργία των πρωτεϊνών χωρίς την χρήση συγκεκριμένων μεθόδων όπως η χημικής συγγένειας ηλεκτροφόρησης.²⁷

Όμως πιο σοβαρά είναι τα προβλήματα που συνδέονται με την απόσπαση των πρωτεϊνών και τη διαλυτότητα κατά τη διάρκεια της δισδιάστατης ηλεκτροφόρησης, κυρίως για τις πρωτεΐνες που δεν έχουν μεγάλη υδατοδιαλυτότητα όπως είναι οι μεμβρανικές και οι πυρηνικές πρωτεΐνες. Θα πρέπει να σημειωθεί πως αυτά τα προβλήματα συνδέονται με το στάδιο της ισοηλεκτρικής εστίασης της δισδιάστατης ηλεκτροφορησης και γι' αυτό το λόγο είναι λιγότερα σοβαρά σε προσεγγίσεις χωρίς ισοηλεκτρικό σημείο (IEF). Για την βελτίωση της απόδοσης της δισδιάστατης ηλεκτροφόρησης χρειάζονται στρατηγικές εμπλουτισμού ή προδιαχωρισμού ώστε να φτάσουν τις λιγότερο πλούσιες πρωτεΐνες κυρίως στα πιο περίπλοκα κύτταρα ή ιστούς και η χρήση εστιασμένης ή στενής περιοχής τιμών pH αυξάνει τη διαλυτότητα και μειώνει σε μεγάλο βαθμό την πιθανότητα πρωτεϊνικής μεταφοράς.²⁸ Άλλες προσεγγίσεις απαιτούν την ικανότητα μιας πλήρους κατανόησης των κυτταρικών μηχανισμών σε πρωτεϊνικό επίπεδο.

2.5.8 Τεχνολογία πολύ-διαστατικής αναγνώρισης πρωτεϊνών

Η τεχνολογία της πολύ-διαστατικής αναγνώρισης πρωτεϊνών (MUDPIT) εισήχθη στο εργαστήριο της Yate.²⁹⁻³¹ Με αυτήν την προσέγγιση το πρωτεϊνικό μίγμα χωρίζεται σε γνωστά κλάσματα ομογενούς δείγματος τα οποία πέπτονται με μια ή περισσότερες πρωτεϊνάσες. Μετά την απενεργοποίηση της πρωτεϊνάσης, τα γνωστά κλάσματα ομογενούς δείγματος συγχωνεύονται και οξεοποιούνται. Ύστερα το πεπτιδιακό μίγμα διαχωρίζεται από μια δυνατή δέσμη ανταλλαγής κατιόντων και μετά από μια δέσμη αντίστροφης φάσης (RP) σε σύζευξη με μια συσκευή νανοηλεκτροψεκασμού σε μια

φασματομετρία μάζας. Η δέσμη ανταλλαγής κατιόντων εκλύεται από ένα βήμα KCI με το φασματόμετρο μάζας εκτός λειτουργίας. Αυτό μεταφέρει έναν πληθυσμό πεπτιδίων μέσα στην δέσμη ανάστροφης φάσης, όπου προσαρτάται μέσα σ' αυτήν.

Μετά από ένα όξινο ξέπλυμα για την πλήρη αφαίρεση του KCI, η δέσμη αντίστροφης φάσης αναπτύσσεται με μια αιθανολική βαθμίδωση με το φασματόμετρο σε λειτουργία. Αυτό επιτρέπει την αναγνώριση των πεπτιδίων που εκλύονται από την έρευνα φασματομετρίας μάζας. Η διαδικασία αυτή προβλέπει την μεγιστοποίηση της πιθανότητας πως κάθε πρωτεΐνη θα αναπαραστάται από τουλάχιστον ένα πεπτίδιο στην επακολουθούμενη ανάλυση. Ο αριθμός των πρωτεϊνών που αναγνωρίζονται με αυτήν την μέθοδο φθάνει περίπου τις 1500,³² συγκρινόμενος με μόνο λίγων εκατοντάδων (περίπου 400 σημείων, αντίστοιχων σε περίπου 300 γονιδιακά προϊόντα) με μεθόδους βασισμένες σε δισδιάστατη ηλεκτροφόρηση. Πολλές κατηγορίες πρωτεϊνών παρουσιάζονται στην πρωτεωμική που προκύπτουν από την τεχνολογία πολύ-διάστατης αναγνώρισης πρωτεϊνών κάτι που δεν συμβαίνει στην πρωτεωμική που προκύπτει από ηλεκτροφόρηση. Με την βελτίωση της προετοιμασίας του δείγματος μαζί με τις διασπάσεις, η μέθοδος βελτιώνει την καθολική ανάλυση της πρωτεωμικής με την αναγνώριση πρωτεϊνών από όλες τις λειτουργικές και φυσικές κατηγορίες.

Ωστόσο, θα πρέπει να αναφερθεί πως σε αντίθεση με την πρωτεωμική που προκύπτει μέσω πηκτής για την οποία ποσοτικά δεδομένα είναι διαθέσιμα και ενδοπηκτής (πχ, προσφέροντας σχετικά άφθονα δεδομένα μέσα σε ένα κύτταρο) και διαπηκτής (προσφέροντας ποσοτικές διακυμάνσεις μεταξύ διαφορετικών συνθηκών), η πρωτεωμική που προκύπτει από πολύ-διάστατη αναγνώριση πρωτεϊνών δεν είναι

ικανή να ποσοτικοποιήσει επακριβώς τις πρωτεΐνες, μόνο μπορεί να καθορίσει εάν υπάρχουν ή όχι.

2.5.9 Λειτουργικές πρωτεΐνες

Οι πρωτεΐνες συγκεντρώνονται σε δίκτυα μέσω ποικιλίας πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων και μετά-μεταφραστικών τροποποιήσεων. Σε ένα καρκινικό κύτταρο το πρωτεϊνικό δίκτυο διαταράσσεται, αλλάζει διάταξη ή παρουσιάζει υπερκινητικότητα σε κάποιο σημείο σε σύγκριση με ένα κανονικό κύτταρο. Η αιτία της μη ομαλοποιημένης διαδικασίας μπορεί να είναι σε γενετικό επίπεδο, (πχ, ενεργοποίηση του (συστήματος ταχείας ειδοποίησης) Ras ή την απενεργοποίηση της p53 μέσω μεταλλάξεων η σε επιγενετικό επίπεδο (πχ, υπερμεθυλίωση DNA στην περιοχή του προωθητή). Ο κεντρικός ρόλος των πρωτεϊνικών δικτύων σε μια ασθένεια έχει ως αποτέλεσμα ευκαιρίες και στρατηγικές για θεραπευτική παρέμβαση. Η ανακάλυψη των πρωτεϊνών που παίζουν ρόλο στην ανάπτυξη του καρκίνου και η διασαφήνιση των ακριβών πρωτεϊνικών δεσμών των δικτύων πριν, κατά τη διάρκεια και μετά την θεραπεία έχουν μεγάλη σημασία για την ανάπτυξη φάρμακων, την σωστή στοχευόμενη διαλογή και την αποτίμηση και παρακολούθηση της κλινικής θεραπείας.

2.5.10 Ανίχνευση πρωτεϊνικής αλληλεπίδρασης

Μια από τις πιο αποτελεσματικές προσεγγίσεις για την πρωτεωμική έρευνα των αλληλεπιδράσεων των πρωτεϊνών είναι η κατευθείαν ανάλυση των πολυπρωτεϊνικών συμπλεγμάτων με τη χρήση παραδοσιακών τεχνικών από την βιοχημεία, την μοριακή βιολογία και της καινοτομικής πρωτεωμικής μεθοδολογίας. Η χρήση βιοχημικών

προσεγγίσεων ακολουθούμενων από πρωτεωμικών αναλύσεων μπορεί να χρησιμοποιηθεί όχι μόνο για την αναγνώριση των πρωτεϊνών που σχετίζονται με αλληλεπιδράσεις μιας προς μιας αλλά επίσης για την ανάλυση μεγάλων συμπλεγμάτων αποτελούμενων πολλών πρωτεϊνών.

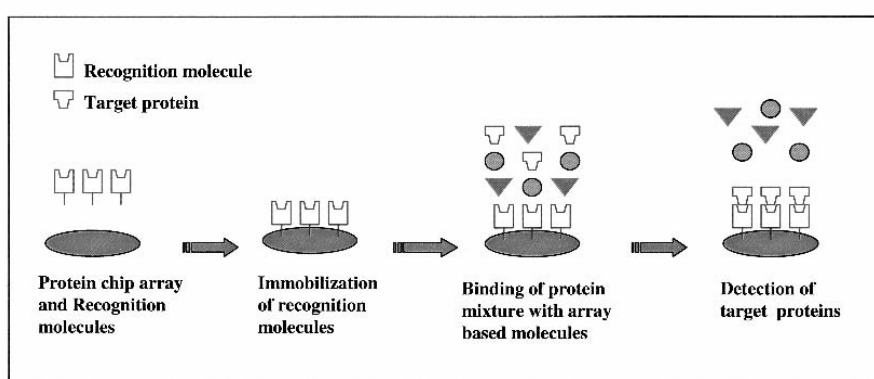
Αν και βρίσκεται ακόμη στο πρώιμο στάδιο της ανάπτυξης, υπάρχει μια ποικιλία από τεχνικές που περιλαμβάνουν την λειτουργική πρωτεωμική. Αυτές περιέχουν τις μικροσυστοιχίες πρωτεϊνών, μεθόδους βασισμένες σε ανοσοκαθίζηση και το διπλό υβριδικό σύστημα ζύμης.

2.5.11 Πρωτεϊνικές μικροσυστοιχίες

Τα τελευταία χρόνια, οι τεχνολογίες μικροσυστοιχιών εφαρμόζονται και στην γονιδιωματική βιολογία αλλά και στην πρωτεωμική βιολογία.³³ Η τεχνολογία του πρωτεϊνικού τσιπ παρουσίασε έναν υποσχόμενο τρόπο για την συστηματική ανάλυση πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων.³⁴ Χρησιμοποιώντας μικροσυστοιχίες πρωτεϊνικής ζύμης, μια ομάδα ερευνητών έδειξε πως τα πρωτεϊνικά τσιπς επιτρέπουν την διαλογή μεγάλης παραγωγής μοριακών αλληλεπιδράσεων (σχήμα 2).³⁵

Οι ερευνητές κλωνοποίησαν 5800 αλληλουχίες με ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης, υπερέκφρασαν και κατέστησαν καθαρές τις αντίστοιχες πρωτεΐνες. Οι πρωτεΐνες αποτυπώθηκαν σε αντικειμενοφόρες πλάκες υψηλής τοπικής πυκνότητας για να σχηματίσουν μια πρωτεϊνική μικροσυστοιχία ζύμης και μετά ανιχνεύονται για την ικανότητα τους να αλληλεπιδρούν με πρωτεΐνες και φωσφολιπίδια. Πολλές νέες πρωτεΐνες calmodulin και φωσφολιπιδιακής αλληλεπίδρασης ταυτοποιήθηκαν με την μέθοδο αυτή. Έτσι, μικροσυστοιχίες μιας ολόκληρης ευκαριωτικής πρωτεΐνης μπορούν να ετοιμαστούν και να διαπλεχθούν για διαφορετικές βιοχημικές δραστηριότητες.

Χρησιμοποιώντας την ίδια προσέγγιση, υποστρώματα κινάσης ανιχνεύθηκαν με την ίδια επιτυχία.³⁶ Μετά την επώαση των υποψηφίων του υποστρώματος στα πρωτεϊνικά τσιπς πάνω στα οποία 119 κινάσεις ζύμης αποτυπώθηκαν, ανιχνεύθηκε η ενσωμάτωση ραδιενεργού φωσφόρου μέσα σε τάξεις των κινάσεων. Τα πρωτεϊνικά τσιπς λοιπόν είναι χρήσιμα όχι μόνο για την ανάλυση της πρωτεϊνικής αλληλεπίδρασης αλλά και για την ανίχνευση της δραστηριότητας του πρωτεϊνικού ένζυμου.



Σχήμα 2

2.5.12 Μέθοδος βασισμένη σε ανοσοκαθίζηση

Η ανοσοκαθίζηση χρησιμοποιείται ευρέως για την αναγνώριση των πρωτεϊνών που συνεργάζονται σε ένα σύμπλεγμα πρωτεϊνών. Εάν η στοχευόμενη πρωτεΐνη είναι μια άγνωστη πρωτεΐνη, η αναγνώριση των πρωτεϊνών, που είναι το ίδιο καθαρές με την στοχευόμενη, αποτελεί μια κοινή στρατηγική για να συνεπάγουμε την λειτουργία της στοχευόμενης πρωτεΐνης.

Ένα παράδειγμα τέτοιας στρατηγικής είναι η ανοσοκαθίζηση των πρωτεϊνικών συμπλεγμάτων με ένα αντιεπίτοπο αντιβιοτικό σήμανσης από τα κύτταρα στα οποία εκφράζεται η στοχευόμενη πρωτεΐνη επίτοπης σήμανσης (πχ, η σήμανση FLAG). Χρησιμοποιώντας μια

πρωτεΐνη σήμανσης FLAG, μια ομάδα ερευνητών ερεύνησε την διαδικασία βιογένεσης ριβοσώματος.³⁷ Στην έρευνα τους, το προριβοσωμικό σύμπλεγμα βασισμένο σε ένα νουκλεόνιο σήμανσης FLAG υπέστη ανοσοκαθίζηση με ένα αντί-FLAG επίτοπο πεπτιδιακό αντίσωμα. Μετά τον διαχωρισμό με ηλεκτροφόρηση πήγματος πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE), κάθε πρωτεϊνική δέσμη υπόκειται σε πέψη θρυψίνης μέσω πήξης, σε ανάλυση φασματομετρίας μάζας κατάλληλη για δείγματα υψηλού μοριακού βάρους σε ‘χρόνο πτήσης’ και στην αναγνώριση με αποτύπωση πεπτιδιακής μάζας. Οι ερευνητές ταυτοποίησαν 40 ριβοσωμικές πρωτεΐνες και από μεγάλες και από μικρές ριβοσωμικές υπό ομάδες, και 19 μη ριβοσωμικές πρωτεΐνες.

Συμβατική ανοσοκαθίζηση με ένα αντινουκλεονικό αντίσωμα χρησιμοποιήθηκε επίσης για αυτήν την μελέτη για να καθαρίσει το νουκλεονικό δέσιμο προριβοσωματικού συμπλέγματος.³⁸ Αν και ένα πολυπρωτεϊνικό προριβοσωμικό σύμπλεγμα διασαφηνίστηκε επιτυχώς με αυτήν την μέθοδο, μόνο ένας περιορισμένος αριθμός πρωτεϊνικών συστατικών αναγνωρίστηκε από το σύμπλεγμα εξαιτίας της χαμηλής αναλυτικής δύναμης της συμβατικής πρωτεϊνικής χημείας.

Το παράδειγμα αυτό έδειξε πως η μέθοδος επίτοπης σήμανσης ακολουθούμενη από μια πρωτεωμική ανάλυση αποτελεί μια ισχυρή προσέγγιση για την αναγνώριση των πρωτεϊνικών συστατικών των πολυπρωτεϊνικών συμπλεγμάτων.

2.5.13 Διπλό υβριδικό σύστημα ζύμης

Η πρώτη χρήση διπλού υβριδικού συστήματος ζύμης αποδίδεται στους Song and Fields.³⁹ Αποτελεί ένα ισχυρό γενετικό εργαλείο στην ανάλυση της αλληλεπίδρασης μεταξύ πρωτεϊνών.⁴⁰ Σε αυτήν την μέθοδο που χρησιμοποιήθηκε από τους Ganin et al and Ho et al, δημιουργήθηκαν

εκατοντάδες πρωτεΐνες –δολώματα με την πρόσθεση ενός ‘συγγενικού ιχνηθέτη’ στις στοχευόμενες πρωτεΐνες. Οι εισηγητές σύστησαν κωδικοποιημένο DNA σε αυτές τις πρωτεΐνες- δολώματα μέσα σε ζύμη κυττάρων, επιτρέποντας στις τροποποιημένες πρωτεΐνες να εκφραστούν μέσα στα κύτταρα και να σχηματίσουν φυσιολογικά συμπλέγματα με άλλες πρωτεΐνες. Οι πρωτεΐνες- δολώματα συστηματικά καταβυθίζονται σε μια συγγενική σειρά μαζί με οποιεσδήποτε πρωτεΐνες που μπορεί να έχουν σχέση. Οι πρωτεΐνες που εκχειλίζονται με έναν ιχνηθέτη-δολώμα διαχωρίζονται με μόνο-διάστατη ηλεκτροφόρηση πήγματος πολυακρυλαμιδίου (SDS-MALDI), αποκόπτεται από το πήγμα, πέπτεται με θρυψίνη, αναλύεται με φασματομετρία μάζας και αναγνωρίζεται με συγκεκριμένη ανάλυση της φασματομετρίας μάζας.

Χρησιμοποιώντας αυτήν την προσέγγιση, ο Gavin¹⁴ et al, αναγνώρισε 1440 χαρακτηριστικές πρωτεΐνες μέσα σε 232 πολυπρωτεϊνικά συμπλέγματα σε ζύμη. Καθώς το 91% των συμπλεγμάτων αυτών περιέχει τουλάχιστον μια πρωτεΐνη με προηγούμενη άγνωστη λειτουργία, η μελέτη παρέχει καινούργιες πληροφορίες για 231 πρωτεΐνες ζύμης που δεν είχαν χαρακτηριστεί μέχρι τώρα. Περαιτέρω, ο Gavin et al. ανακάλυψε πως τα περισσότερα από αυτά τα συμπλέγματα έχουν ένα κοινό συστατικό με τουλάχιστον μια άλλη πολυπρωτεϊνική συγκέντρωση, υπονοώντας ένα μέσο με συγχρονισμένες κυτταρικές λειτουργίες μέσα σε ένα δίκτυο μεγαλύτερης διάταξης από συμπλέγματα αλληλεπιδρούντων πρωτεϊνών.

Χρησιμοποιώντας την ίδια μέθοδο, ο Ho¹⁵ et al παρήγαγε μια σειρά από 725 όμοιες πρωτεΐνες- δολώματα από τις οποίες αναγνωρίστηκαν 3617 αλληλεπιδράσεις περιλαμβάνοντας 1578 διαφορετικές πρωτεΐνες. Έδειξαν δίκτυα αλληλεπιδράσεων να συγκεντρώνονται γύρω από την πρωτεΐνη κινάση Kss1, ένα γνωστό συστατικό των διαδρόμων που περιλαμβάνεται στην νηματοειδή

ανάπτυξη και στην ανάπτυξη ζευγαριών. Και συμπλέγματα που σχετίζονται με κυκλοεξαρτώμενη κινάση Cdc28 και τους παράγοντες γονιδιακής εγγραφής Fkh1 και Fkh2. Επιπλέον, ο Ho και οι συνάδελφοι του χρησιμοποίησαν 86 πρωτεΐνες-δολώματα οι οποίες εμπλέκονται στην βλάβη απόκρισης του DNA επιτρέποντας σ' αυτές την να περιγράψουν το μεγαλύτερο μέρος της βλάβης απόκρισης ζύμης του δικτύου. Πιο συγκεκριμένα, αποκαλύπτουν πολλούς ρυθμιστές και στόχους της πρωτεϊνικής κινάσης Dun1 και έναν πιθανό ρόλο για την πρωτεΐνη αποκατάστασης DNA Rad7 στις διαδικασίες αποσύνθεσης στοχευόμενων πρωτεϊνών.

Μια μέθοδος γενετικής επιλογής βασισμένη σε βακτήρια παρόμοια με το διπλό υβριδικό σύστημα ζύμης περιγράφηκε από τον Joung JK και τους συναδέλφους του.⁴¹ Σε αυτό το βακτηριακό διπλό υβριδικό σύστημα επιλογής, ένα επιλεγμένο γονίδιο αναζήτησης εκφράζεται μόνο εάν μια επιθυμητή αλληλεπίδραση μεταξύ πρωτεϊνών ή πρωτεϊνών και DNA λάβει χώρα σε έναν έλεγχο κυττάρου. Ένα αξιοσημείωτο πλεονέκτημα της μεθόδου με βάση τα βακτήρια σχετικό με το σύστημα με βάση την ζύμη είναι η ικανότητα πρόσβασης σε μεγάλες βιβλιοθήκες πρωτεϊνών (10^8 σε μέγεθος για το βακτηριακό σύστημα συγκρινόμενο με 10^{6-7} για τη μέθοδο ζύμης).

2.5.14 Ανίχνευση των μετά-μεταφραστικών τροποποιήσεων

Η φωσφορυλίαση αποτελεί μια από τις πιο σημαντικές μετά-μεταφραστικές τροποποιήσεις των πρωτεϊνών. Η πρωτεϊνική φωσφορυλίαση και η αποφωσφορυλίαση κανονίζονται από κινάσεις και φωσφόρους αντιστοίχως και μαζί λειτουργούν σαν μια αναστρέψιμος μοριακός διακόπτης. Αρκετές προσεγγίσεις αναπτύχθηκαν για την ανάλυση της πρωτεϊνικής φωσφορυλίασης. Ανάμεσα σ' αυτές τις

προσεγγίσεις, η τεχνική προσέγγισης Western blot είναι συχνή και χρησιμοποιείται για την ανίχνευση φωσφορυλιακών πρωτεϊνών με τη χρήση αντισωμάτων που είναι συγκεκριμένα για τα φωσφορυλιακά αμινοξέα των πρωτεϊνών.^{42,43} Σε μια μελέτη,⁴² οι πρωτεΐνες προετοιμάστηκαν από ινοβλαστικά κύτταρα L929 ποντικού με και χωρίς διέγερση παράγοντα νέκρωσης όγκου α(TNF-α) και διαχωρίστηκαν με δισδιάστατη ηλεκτροφορηση 2-DE. Δυο πανομοιότυπα πηγματα ενεργούσαν παράλληλα. Το ένα πηγμα ήταν επιχρυσωμένο με άργυρο ενώ το άλλο ήταν αποτυπωμένο σε μεμβράνη φθοριούχου πολυβινυλιδενίου (PVDF) ακολουθούμενο από τεχνική Western blot με ένα αντίσωμα φωσφοροαμινοξέος. Οι πρωτεϊνικές κηλίδες πάνω στα μικρό- επιχρυσωμένα με άργυρο δισδιάστατα πηγματα σε αντιστοιχία με αυτές που ανιχνεύονται με τεχνική Western spot αποκόπονται και υποβάλλονται σε πέψη θρυψίνης μέσω πήξης. Η πεπτιδιακή αποτύπωση μάζας διεξήχθη με τεχνική φασματομετρίας μάζας μαζών κατάλληλη για δείγματα υψηλού μοριακού βάρους σε ‘χρόνο πτήσης’ MALDI-TOF. Περίπου 100 πρωτεϊνικές κηλίδες ανιχνεύθηκαν με αντίσωμα αντιφωσφοροαμινοξέος, με το οποίο 21 πρωτεΐνες ταυτοποιήθηκαν.

Άλλες ομάδες επεδίωξαν παρόμοιες προσεγγίσεις. Ο Pandey⁴⁴ et al. αναγνώρισε αρκετά συστατικά του επιδερμικού υποδοχέα αυξητικού παράγοντα σε σηματοδοτημένη διαδρομή με ένα μόνο βήμα κάνοντας χρήση ανοσοκαθίζησης με ένα αντιφωσφορυλιακό αντίσωμα σε συνδυασμό με MALDI και με ναοηλεκτροψεκασμό συζευγμένης φασματομετρίας μαζών. Αναγνώρισαν τον Vav-2, έναν παράγοντα ανταλλαγής νουκλεοτιδίων γουανοσίνης που πρόσφατα ανακαλύφθηκε και εκφράζεται ευρέως ως ένα υπόστρωμα του EGFR. Ανακάλυψαν, πως ο VAV-2 είχε φωσφορυλιαθεί σε υπολείμματα τυροσίνης σε αντίδραση του EGF και σχετίστηκε με τον EGFR σε εσωσωματική διαδικασία. Η στρατηγική, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την

αναγνώριση ρουτίνας των καθοδικών συστατικών των υποδοχέων της κυτταρικής επιφάνειας κυττάρων θηλαστικών.

Αν και υπάρχουν προβλήματα σε αυτές τις μελέτες, ψευδή θετικά ή αρνητικά, καταδεικνύεται καθαρά πως αυτού του είδους η μελέτη δημιουργήσε έναν τεράστιο όγκο πληροφοριών που είναι ανεκτίμητες για την κατανόηση ογκογονικών μεταλλαγών και αντικαρκινικής θεραπείας.

2.6 Πρωτεωμική και μικροανατομική με λέιζερ (LASER CAPTURE MICRODISSECTION – LCMD)

Η ανάπτυξη ενός καρκινικού δείκτη συγκεκριμένα για τον καρκίνο ή η ανάπτυξη νέων θεραπευτικών στόχων περιορίζεται συχνά από την περιορισμένη ποσότητα δείγματος και την ετερογένεια ιστού. Η τεχνική της LCMD επιτρέπει την επιλογή των κυττάρων με μια ακρίβεια 3-5 μm υπό άμεση μικροσκοπική απεικόνιση. Η τεχνική LCMD σε συνδυασμό με τη 2D-ηλεκτροφόρηση είναι ένα από τα συνηθέστερα χρησιμοποιούμενα πρωτεωμικά εργαλεία για την έρευνα νέων καρκινικών δεικτών και στόχων. Για την ανάλυση LCMD -2D-ηλεκτροφόρησης χρειάζονται περίπου 50.000 κύτταρα.^{45,46,47} Η τεχνική LCMD επίσης συνδυάζεται με τη SELDI μαζική φασματομετρία, προσφέροντας ένα πολύ χρήσιμο όπλο στην πρωτεωμική έρευνα.^{48,49,50}

2.7 Ιστικές μικροσυστοιχίες (TISSUE MICROARRAYS)

Οι πρωτεωμικές προσεγγίσεις μπορούν άμεσα να αναγνωρίσουν δεκάδες χιλιάδες πρωτεΐνες. Ωστόσο, είναι μια πρόκληση το να επιβεβαιώνεις, να θέτεις σε προτεραιότητα και να επιλεγείς τους καλύτερους στόχους από αυτές τις υποψήφιες πρωτεΐνες. Η ανάλυση των μοριακών στόχων *in situ* σε κυτταρικό επίπεδο κατά μήκος ενός πλαισίου

πρωτοταγών ιστών και η αποτίμηση της κλινικής τους σημασίας θα παρέχει σημαντικές πληροφορίες για διάγνωση, ελεγχόμενης χημειοθεραπείας και νέα επιλογή στόχων. Η τεχνολογία μικροσυστοιχίας ιστού (TMA) αναπτύχθηκε σαν μια νέα λύση μεγάλης παραγωγής στην ανάλυση δειγμάτων ιστού, επιτρέποντας την ταχεία απεικόνιση μοριακών στόχων σε χιλιάδες δείγματα ιστών κάθε φορά, είτε σε επίπεδο DNA, RNA ή πρωτεϊνικό.⁵¹ Οι συστοιχίες παράγονται από την ρομποτική διάτρηση μικρών κυλίνδρων (0.6 mm 3 3-4mm high) των ιστών από χιλιάδες μεμονωμένα δείγματα όγκου εγκλεισμένα σε παραφίνη και παρατάσσονται σε μια συστάδα παραφίνης. Τόσα πολλά όσο 600 δείγματα ιστών μπορούν να παρουσιαστούν σε μια ‘κυρίαρχη’ συστάδα παραφίνης. Οι περισσότερες από τις εφαρμογές της τεχνολογίας της συστοιχίας ιστού, προέρχονται από το πεδίο της έρευνας κατά του καρκίνου. Με τη χρήση διαδοχικών τομών της συστοιχίας ιστού, οι όγκοι μπορούν να αναλυθούν παράλληλα με ανοσοιστοχημεία, με μέθοδο FISH-φθορίζουσα σήμανση υβριδοποίησης in situ και υβριδοποίηση DNA-RNA in situ. Η συστοιχία ιστού, έχει χρησιμοποιηθεί εκτενώς για την επιβεβαίωση γονιδιακών στόχων που βρέθηκαν σε cDNA ανάλυση μικροσυστοιχιών για καρκίνο του στήθους, του προστάτη, της ουροδόχου κύστης και του εγκεφάλου.⁵² Για παράδειγμα, ο Barlund⁵³ et al βρήκε υπερέκφραση του γονιδιακού ριβοσώματος s6 κινάσης σε μια σειρά από μικροσυστοιχίες καρκινικού κυττάρου του μαστού και μετά επέδειξε χρησιμοποιώντας TMAs πως το 9-15% των καρκίνων του μαστού ενισχύει αυτό το γονίδιο ή υπερεκφράζει την κωδικοποιημένη πρωτεΐνη.

Οι Hedenfalk et al.⁵⁴ μελέτησαν περιπτώσεις καρκίνου του μαστού από ξενιστές BRCA1, BRCA2 χρησιμοποιώντας μικροσυστοιχίες cDNA. Ύστερα επιβεβαίωσε και ανέλυσε τα πρωτεϊνικά προϊόντα που κωδικοποιήθηκαν από αυτά τα γονίδια με ανοσοιστοχημεία πάνω στην συστοιχία του ιστού. Υπόσχεται επίσης να χρησιμοποιήσει την ανάλυση

συστοιχίας ιστού για να συσχετίσει τις μοριακές αλλαγές με ένα συγκεκριμένο στάδιο της προόδου όγκων. Οι Bubenndorf et al.^{55,56} και οι Bowen et al.⁵⁷ δημιούργησαν έναν καρκίνο του προστάτη ‘με πρόοδο μικροσυστοιχιών ιστού’ που περιέλαβε όλα τα στάδια της ανάπτυξης του καρκίνου του προστάτη από τον φυσιολογικό προστάτη, την καλοήγη υπερπλασία προστάτη, την ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία προστάτη, τον εντοπισμού του καρκίνου κλινικά στο μεταστατικό και ορμονοανερέθιστο τελικό στάδιο του καρκίνου. ‘Η μικροσυστοιχία ιστού πολύ-όγκου’ έχει χρησιμοποιηθεί για να μελετήσει τις ενισχύσεις συγκεκριμένων γονιδίων σε ένα φάσμα από 17 διαφορετικές κακοήθειες.⁵⁸ Η μελέτη αυτή, επεξήγησε την δύναμη της ανάλυσης της μικροσυστοιχίας ιστού με το να προσφέρει μια ολοκληρωμένη ανίχνευση των μοριακών αλλαγών σε όλες τις κοινές κακοήθειες. Έχει αναφερθεί πως ‘συστοιχία πολύ-όγκου’ περιλαμβάνοντας έως και 4700 όγκους παρουσιάζοντας 135 διαφορετικούς τύπους όγκων⁵⁹ είναι δυνατόν να παρασκευαστούν για αυτήν τη μελέτη. Σε συνάρτηση με έρευνες της πρωτεωμικής και γονιδιωματικής βιολογίας, οι μικροσυστοιχίες ιστών δεν μπορούν μόνο να διευκολύνουν στην γρήγορη επιβεβαίωση των νεοανακαλυφθέντων πρωτεϊνών και στην μετάφραση αυτών των μορίων στις κλινικές εφαρμογές αλλά επίσης παρέχουν μια ‘κατατομή ιστού’ για το νέο γονίδιο και στόχους πρωτεϊνών καθώς επίσης μια ‘κατατομή ιστού’ για τα δείγματα ιστού η των ασθενειών.

Οι μικροσυστοιχίες των ιστών έχουν έναν αριθμό προτερημάτων σε σύγκριση με την συμβατική ανάλυση τόμων. Η ταχύτητα του μοριακού αναλυτή είναι αρκετά μεγάλη και ένας πολύ μεγάλος αριθμός μοριακών στόχων μπορεί να αναλυθεί από διαδοχικές τομές μικροσυστοιχιών ιστού. Κατατομές έκφρασης μπορούν να συσχετιστούν με τα αποτελέσματα από μεγάλες ομάδες μέσα σε λίγες μόνο ημέρες. Η διαδικασία της παρασκευής και ανάλυσης της μικροσυστοιχίας ιστού

μπορεί να αυτοματοποιηθεί, αυξάνοντας ακόμα περαιτέρω την παραγωγή. Τα μειονεκτήματα αυτής της τεχνικής είναι ο ένας μόνο πυρήνας που δεν είναι αντιπροσωπευτικός εξαιτίας της ετερογένειας του όγκου και η αβεβαιότητα της σταθερότητας του αντιγόνου σε μεγάλης διάρκειας αποθήκευσης των συστοιχιών.⁶⁰

2.8 Η κλινική εφαρμογή της πρωτεωμικής

Η κλινική πρωτεωμική μπορεί να έχει σημαντικές εφαρμογές οι οποίες μπορούν κατευθείαν να αλλάξουν την κλινική εξάσκηση επηρεάζοντας τα σημαντικά στοιχεία της φροντίδας και διαχείρισης. Η πρωτεωμική μπορεί να διατηρήσει την υπόσχεση για έγκαιρη ανίχνευση της ασθένειας με την χρήση πρωτεϊνικών εκμαγείων από δείγματα βιολογικού υγρού, για διάγνωση βασισμένη σε πρωτεωμικές μελέτες σαν συμπλήρωμα στην ιστοπαθολογίας, για εξατομικευμένη επιλογή θεραπευτικών συνδυασμών που στοχεύουν καλύτερα σε ολόκληρο το ασθενικά προσδιορισμένο πρωτεϊνικό δίκτυο, για την αξιολόγηση σε αληθινό χρόνο της αποτελεσματικότητας και της τοξικότητας και για σύμμετρη διαμόρφωση της θεραπείας βασισμένη σε αλλαγές στο άρρωστο πρωτεϊνικό δίκτυο που σχετίζονται με την αντίσταση των φάρμακων.^{61,62,63}

2.9 Η πρωτεωμική στην έγκαιρη ανίχνευση του καρκίνου

Η έγκαιρη ανίχνευση είναι κρίσιμη για τον έλεγχο, την πρόληψη και την αντιμετώπιση του καρκίνου. Η πρωτεωμική για τον καρκίνο εμπεριέχει την αναγνώριση και την ποσοτική ανάλυση των διαφορετικά εκφρασμένων πρωτεϊνών από κανονικούς, προκαρκινικούς και καρκινικούς ιστούς.⁶⁴

Πρόσφατα, οι Petricoin et al. ανακάλυψαν πως οι παθολογικές αλλαγές μέσα σε ένα όργανο μπορούν να αποτυπωθούν σε πρωτεϊνικά διαγράμματα σε ορό. Ανέπτυξαν ένα βιοπληροφοριακό εργαλείο χρησιμοποιώντας ένα πρωτεϊνικό φάσμα παραγόμενο από φασματοσκόπια μάζας SELDI. Ανέλυσαν αυτό το φάσμα με έναν αλγόριθμο επαναληπτικής αναζήτησης ο οποίος αναγνώρισε ένα πρωτεωμικό διάγραμμα συμπλέγματος το οποίο ξεχωρίζει τελείως τον καρκίνο από τον μη καρκίνο. Το διάγραμμα διάκρισης αναγνωρίζει αλάνθαστα και τις 50 περιπτώσεις καρκίνου των ωοθηκών στο σύνολο επιλεκτικής κάλυψης περιλαμβάνοντας και τις 18 περιπτώσεις του σταδίου ένα. Από τις 66 περιπτώσεις των μη κακοηθειών ασθενειών, οι 63 αναγνωρίστηκαν ως μη καρκινικές. Το αποτέλεσμα αυτό απέδωσε μια ευαισθησία 100% (95% CI 93-100), επιλεκτικότητα 95% (87-99) και θετική διαγνωστική αξία 94% (84-99). Αλγόριθμοι τεχνικής νοημοσύνης, οι οποίοι μαθαίνουν πώς να ανιχνεύουν λεπτές υπογραφές της ασθένειας με πολύπλοκα μοριακά διαγράμματα, ίσως φανούν χρήσιμοι για ανίχνευση και πρόιμη διάγνωση όλων των σταδίων του καρκίνου των ωοθηκών σε υψηλού κινδύνου και γενικών πληθυσμών.

Το δίκτυο έρευνας πρόιμης διάγνωσης του εθνικού ινστιτούτου για τον καρκίνο επιστρατεύει την πρωτεωμική στην ανακάλυψη και εκτίμηση των βιοδεικτών για την ανίχνευση του καρκίνου και για την αναγνώριση θεμάτων υψηλού κινδύνου. Η LCM σε συνδυασμό με καθοδικές εφαρμογές της πρωτεωμικής όπως την 2D-PAGE και τον διαχωρισμό με SELDI (επιφάνεια ενισχυμένη με εκρόφηση ιονισμού με λέιζερ) ακολουθούμενα από φασματομετρική ανάλυση μαζών μπορεί να διευκολύνει αρκετά στον χαρακτηρισμό και την αναγνώριση των αλλαγών έκφρασης των πρωτεϊνών που ανιχνεύουν κανονικούς και ασθενικούς φαινοτύπους.

2.10 Θεραπευτικοί στόχοι

Η πρωτεωμική εφαρμόστηκε για την ανίχνευση στόχων με βάση την πρωτεΐνη για καλύτερη θεραπευτική αγωγή κατά του καρκίνου. Αρκετές μελέτες διεξήχθησαν για την άμεση αναγνώριση νέων στόχων σε διαφορετικούς καρκίνους από την πρωτεωμική προσέγγιση για θεραπευτικά φάρμακα. Οι Hanash et al.⁶⁵ αναφέρθηκαν στην ελπιδοφόρα εφαρμογή της πρωτεωμικής για γρήγορη αναγνώριση καινούργιων θεραπευτικών στόχων σε κύτταρα λευχαιμίας. Ανέλυσαν όλα τα 2-DE διαγράμματα από οξεία λεμφογενή λευχαιμία και μη λευχαιμικών αναπαυμένων ή παραγωγικών λεμφοκυττάρων. Ανακάλυψαν πως η ογκοπρωτεΐνη (OP18), ένας ρυθμιστής ευαίσθητος στην φωσφορυλίωση των δυναμικών μικροσωληνίσκων,⁶⁶ αυξάνεται εντυπωσιακά σε οξεία λεμφογενή λευχαιμικά κύτταρα σε σύγκριση με τα ελεγχόμενα. Η ανακάλυψη αυτή επιβεβαιώθηκε και από λειτουργικές μελέτες. Η αναστολή της έκφρασης της OP18 κατέληξε σε μια σημασμένη αναστολή της ογκογονιδιωματικής των λευχαιμικών κυττάρων *in vivo* σε πρότυπο ποντικού με σοβαρή περίπτωση συνδυασμένης ανοσοανεπάρκειας. Παρουσιάστηκε πως υψηλά επίπεδα OP18 έκφρασης σε λευχαιμικά κύτταρα κρίθηκαν απαραίτητα για την διατήρηση του αλλαγμένου φαινοτύπου και πως η OP18 ίσως είναι ένας δυναμικός στόχος για αντιλευχαιμικές επεμβάσεις.^{65,67-69} Ο Srinivas ανακάλυψε επίσης πως η 52 kDa FK506 σταθεροποιητική πρωτεΐνη, ο RhoG- αναστολέας διαχωρισμού πρωτεΐνης και η γλυοξάλη 1 είχαν υπερεκφραστεί σε επιθετικό καρκίνο ανθρώπινων ωοθηκών σε σύγκριση με την χαμηλής δυναμικής κακοήθους μορφής αυτού του καρκίνου.^{64,70}

Με τη χρήση πρωτεωμικής προσέγγισης αναγνωρίσαμε την πρωτεΐνη ψηλού ρυθμισμένου θερμικού σοκ 70 (HSP70), μια φορτισμένη επαγόμενη αντιπρωτεϊνική πρωτεΐνη σε 2774 ζωντανά

καρκινικά κύτταρα ωοθηκών μετά από την έκθεση σε FTI. Η αυξανόμενη έκφραση της HSP70 επιβεβαιώθηκε από την ELISA (ενζυμική δοκιμή ανοσοπροσφόρησης) και από αποτύπωμα Western. Υποθέτουμε πως η παρεμπόδιση της επαγωγίμης HSP70 θα μπορούσε να ενισχύσει το αντικαρκινικό αποτέλεσμα της FTI και πως η HSP70 μπορεί να παίζει ένα σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη της επίκτητης αντίστασης χημειοθεραπείας. Ανακαλύψαμε πως ο συνδυασμός των αναστολέων HSP και FTI αυξάνει γενικά την ανάπτυξη ανασταλτικού αποτελέσματος και απόπτωσης στον καρκίνο των ωοθηκών καθώς ανιχνεύθηκε από συστοιχία MTI και TUNEL. Η έκφραση της επαγωγίμης HSP 70 μετρήθηκε από την ELISA και βρέθηκε να είναι μειωμένη κατά 1.07 και 2.47 αναδιπλώσεις μετά την έκθεση της σε HSP αναστολέα σε 10 και 50 μ m αντιστοίχως.

Η εξουδετέρωση της HSP70 ίσως δημιουργήσει καινούργιες πιθανότητες για τη θεραπεία κατά των καρκίνων που έχουν δημιουργήσει αντίσταση σε θεραπείες που ενεργοποιούν την κλασσική διαδρομή απόπτωσης.⁷¹ Γι' αυτό το λόγο η ανακάλυψη των πρωτεϊνών που σχετίζονται με ανθρώπινη ασθένεια και η διασαφήνιση της ακριβής πρωτεϊνικής σύνδεσης γονιδιακών δικτύων (επικοινωνιακό ενημερωτικό περιεχόμενο) θα έχει μεγάλη σημασία για την ανάπτυξη φάρμακων, την σωστή επιλογή στόχων και την επιτυχημένη κλινική θεραπεία.

2.11 Συμπεράσματα

Η ανάπτυξη των τεχνολογιών υψηλής απόδοσης και οι διάφορες τεχνολογίες μικροσυστοιχιών έχουν φέρει επανάσταση στον τρόπο με τον οποίο προσεγγίζουμε πλέον τον σχεδιασμό των πειραματικών ερευνών. Ο συνδυασμός βιολογίας κλασικού εργαστηρίου και βιοπληροφορικής

οδηγεί όχι μόνο σε μία ταχύτερη διευκρίνιση των διαφόρων μοριακών και κυτταρικών γεγονότων, αλλά και επιτρέπει να τεθούν πολλά νέα ερωτήματα σχετικά με την κυτταρική λειτουργία, τους κανόνες που τη διέπουν, τις μεταλλάξεις κ.λ.π. Επίσης επιτρέπει να τεθούν ερωτήματα υποθετικά που στο παρελθόν θεωρούνταν δευτερεύοντα και εγκαταλείπονταν, έως ότου απαντηθούν τα κεντρικότερα δόγματα.

Αν και η εφαρμογή των ισχυρών αυτών τεχνολογιών της γονιδιωματικής και της πρωτεωμικής προσφέρει σημαντικές υποσχέσεις για τη διάγνωση και την πρόγνωση ασθενειών, η μεγάλη πλειοψηφία των τεχνολογιών δεν έχει ωριμάσει, για να παράγει με συνέπεια αξιόπιστα στοιχεία. Κατά τον ίδιο τρόπο η παραγωγή τεράστιων ποσών στοιχείων και δεδομένων είναι ένα σημαντικό φορτίο όσον αφορά τον χειρισμό και την ανάλυση τους. Τα προβλήματα επεκτείνονται επίσης και στις σημαντικές δυσκολίες στην ερμηνεία και την ενσωμάτωση των στοιχείων από διαφορετικά εργαστήρια ή λόγω χρησιμοποίησης διαφορετικών μέσων ή και τεχνικών υποστήριξης. Η επάρκεια, η ποιότητα αλλά και η ποσότητα ιστού και επακόλουθου RNA είναι σοβαρά προβλήματα, ενώ η συλλογή, η αποθήκευση και η σύνθεση cDNA προσθέτουν επίσης σημαντικές δυσκολίες από δείγμα σε δείγμα και από πείραμα σε πείραμα. Η ετερογένεια των ιστών και ειδικά των καρκινικών ιστών αποτελεί ένα επίσης μεγάλο και συχνό πρόβλημα, που οι σύγχρονες τεχνικές ‘σύλληψης με λείζερ’ έρχονται να βοηθήσουν στην υπερνίκησή του.

Γενικά οι τεχνολογίες της γονιδιωματικής και της πρωτεωμικής μπορούν να έχουν πληθώρα εφαρμογών, όπως:

1. Στη σφαιρική κατανόηση των ανωμαλιών έκφρασης γονιδίων που συμβάλλουν στην πρόοδο κακοηθειών.
2. Στην ανακάλυψη νέων διαγνωστικών και προγνωστικών δεικτών και δεικτών απάντησης σε θεραπείες.
3. Στον προσδιορισμό και στην επικύρωση μοριακών στόχων.

4. Στην ανάπτυξη νέων εξειδικευμένων φαρμάκων.
5. Στον προσδιορισμό και βελτιστοποίηση του σχεδιασμού δομής-δραστηριότητας και στην αξιολόγησή του.
6. Στην πρόβλεψη των παρενεργειών και της τοξικότητας διαφόρων θεραπειών.
7. Στην επιβεβαίωση του τρόπου δράσης διαφόρων φαρμάκων.
8. Στον προσδιορισμό των γονιδίων που εμπλέκονται στους μηχανισμούς αντίστασης και ευαισθησίας σε φάρμακα.
9. Και, το σημαντικότερο, στον προσδιορισμό των υποομάδων εκείνων που εντάσσονται ασθενείς που θα ωφεληθούν από επιλεγμένες θεραπείες.

Στη μετα-γονιδιωματική εποχή οι πρωτεωμικές προσεγγίσεις προσφέρουν τα ισχυρότερα εργαλεία στον τομέα της μοριακής Βιολογίας και πιο συγκεκριμένα στην μοριακή Ογκολογία. Οι τεχνικές επεκτείνονται καθημερινά, οι πιθανές εφαρμογές τους είναι τεράστιες, οι τεχνικοί και άλλοι περιορισμοί είναι ακόμα πολλοί, αλλά σίγουρα το μέλλον της έρευνας του καρκίνου φαίνεται φωτεινότερο κάθε ημέρα και μερικά από τα ερωτήματα μας βρίσκουν αργά αλλά αποτελεσματικά τις απαντήσεις τους.

Είναι βέβαια ακόμη πολύ νωρίς για να εξαχθούν οποιαδήποτε σαφή συμπεράσματα ή προβλέψεις σχετικά με την κλινική σημασία των πρωτεωμικών προσεγγίσεων στον καρκίνο. Εντούτοις, με δεδομένο ότι το πλήθος των προσεγγίσεων συνεχίζει να αυξάνεται, φαίνεται να μην υπάρχει κανένα όριο και επομένως υπάρχει μικρή αμφιβολία ότι η γονιδιωματική και η πρωτεωμική θα αναπτυχθούν ταχύτατα στον τομέα της Ογκολογίας για τη διάγνωση, τον έλεγχο και τη διευκρίνιση πολλών προκαρκινικών και καρκινικών καταστάσεων.

Κεφάλαιο 3

Ο ΣΤΟΧΟΣ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΩΜΙΚΗΣ

3.1 Η γενετική στην κλινική πράξη

Η γονιδιακή θεραπευτική σκοπεύει στην αντικατάσταση ή τροποποίηση των γονιδίων που εμφανίζουν καίρια βλάβη ή ελλείπουν με γονίδια που έχουν κανονική λειτουργία. Μερικά γονίδια μπορεί να έχουν ουσιαστική συμμετοχή στην ανάπτυξη του καρκίνου.

Η γονιδιακή θεραπεία είναι, προς το παρόν, σε πειραματικό στάδιο, παρατηρείται όμως σημαντική πρόοδος στις κλινικές μελέτες όπου εφαρμόζεται η μέθοδος της αντικατάστασης των γονιδίων που έχουν βλάβη ή ελλείπουν σε πολλούς καρκίνους, με υγιή γονίδια. Αυτό γίνεται κυρίως με το γονίδιο P53 που ελλείπει ή εμφανίζει βλάβη στο 50% όλων των καρκίνων. Τα υγιή γονίδια P53, P15 και P16 είναι γονίδια καταστολής του με αυτοκαταστροφή των κυττάρων που έχουν γίνει καρκινωματώδη ή βρίσκονται σε εξέλιξη κακοήθους εξαλλαγής.

Γονίδια που διεγείρουν το ανοσολογικό σύστημα παράγουν ουσίες που βοηθούν ανοσολογικά την αντιμετώπιση του καρκίνου. Τέτοιες ουσίες είναι η ιντερλευκίνη-2, ινερφερόνη, ο παράγων νέκρωσης του όγκου, το μόριο B7-1.

Ογκογονίδια που εμφανίζουν βλάβη, υπάρχουν πολλά αντίγραφα τους σε ένα κύτταρο ή έχουν αυξημένη δραστηριότητα, μπορούν να προκαλέσουν καρκίνο. Ουσίες που εμποδίζουν τη παραγωγή λειτουργικών πρωτεϊνών από τα ογκογονίδια έχουν τη δυνατότητα να αναστείλουν την καρκινογένεση και τα κύτταρα που είχαν πάρει το δρόμο της κακοήθειας να ξαναγίνουν φυσιολογικά.

Υπάρχουν γονίδια που εισερχόμενα στα κύτταρα του κακοήθους όγκου τα ευαισθητοποιούν πολύ στην επίδραση ενός φαρμάκου, ώστε με

αυτή τη χημειοευαισθητοποίηση να καταστρέφονται μόνο τα κακοήθη κύτταρα που έχουν αυτά τα γονίδια.

Γονιδιακή θεραπευτική αγωγή με καταστροφή των γονιδίων που παράγουν την αγγειογέννηση για την αιμοφόρο τροφοδοσία του όγκου έχει σαν αποτέλεσμα τη νέκρωση του όγκου.

Η χορήγηση των γονιδίων και η είσοδος αυτών σε ορισμένα κύτταρα του σώματος, συνήθως γίνεται *in vivo* και μερικές φορές *ex vivo* και βραδύτερα χορηγούνται στα ασθενούντα άτομα. Είναι η πρόκληση που αντιμετωπίζουν όλοι οι ερευνητές στη πρακτική εφαρμογή της γονιδιακής θεραπευτικής.

Οι συνηθέστεροι τρόποι χορήγησης των γονιδίων χρησιμοποιούν ως όχημα ιούς, λιποσώματα, νανοσφαίρες . Ένεση DNA που περιλαμβάνει όλα τα γονίδια από τον πυρήνα του κυττάρου, γίνεται κατευθείαν στους ιστούς. Στη περίπτωση αυτή η δράση των γονιδίων είναι βραχεία λόγω της αντιδράσεως του ανοσολογικού συστήματος που μπορεί να το θεωρήσει ως ξένο σώμα.

Μικροσκοπικές χάντρες χρυσού επικαλυμμένες με DNA ενίονται απευθείας στα κύτταρα. Με αυτόν τον τρόπο αποφεύγονται προβλήματα που δημιουργούνται όταν χρησιμοποιούνται ιοί ως φορείς γονιδίων, αλλά μπορεί η δράση αυτών να είναι βραχύτερη.

Η επιτυχημένη και σχετικά εύκολη μέθοδος, μέχρι τώρα, είναι η χορήγηση ιών που μεταφέρουν γονίδια στους όγκους. Βέβαια, μπορεί να προκληθούν συμπτώματα φλεγμονής ή να αντιμετωπιστεί αντίδραση του ανοσολογικού συστήματος. Άλλο πρόβλημα που πρέπει να αποφεύγεται είναι η είσοδος του χορηγούμενου γονιδίου στο DNA του κυττάρου σε λανθασμένη θέση από αυτή που εξητείτο. Αυτό μπορεί να προκαλέσει κατάσταση στο δέκτη της γονιδιακής θεραπείας που μοιάζει με λευχαιμία.

Η γονιδιακή θεραπεία μπορεί να είναι πιο αποτελεσματική σε συνδυασμό και με άλλες θεραπευτικές μεθόδους. Παρά τις δυσκολίες που αντιμετωπίζονται κατά τη γονιδιακή θεραπεία σε ανθρώπους για διάφορους καρκίνους, υπάρχουν ελπιδοφόρες ενδείξεις από τις υπάρχουσες κλινικές μελέτες.

Η γενετική θεραπευτική στη κλινική πράξη έχει συμπαρομαρτούντα προβλήματα ηθικά, νομικά, κοινωνικά, όπως διασφάλιση του απορρήτου της ιδιωτικής και επαγγελματικής ζωής, της οικογενειακής ηρεμίας, της αποφυγής διακρίσεων από ασφαλιστικούς φορείς.

Στον τομέα αυτόν το καθήκον και υποχρέωση κάθε ευνοούμενης Πολιτείας είναι νομική προστασία του πολίτη που αναζητά μέσω της γενετικής την πρόληψη έγκαιρη διάγνωση και θεραπεία του καρκίνου.

Πάντως η Ιατρική Κοινότητα προσδοκά την ουσιαστική αντιμετώπιση του καρκίνου με τη γονιδιακή θεραπευτική στη κλινική πράξη και την ερευνητική ώθηση στη δημιουργία νέων φαρμάκων που θα θεραπεύουν ριζικά τον καρκίνο στην αρχή του ή πριν εκδηλωθεί.

Η Παγκόσμια Έρευνα κατευθύνεται «πάσει δυνάμει» χωρίς να φείδεται χρόνου, κόπου, υλικών μέσων και συστρατεύεται στην ανακάλυψη φαρμάκων ή μεθόδων που θα πλήξουν ριζικά και για πάντα, όπως έχει γίνει και με άλλα νοσήματα, τον αδυσώπητο και ανελέητο εχθρό της μονάδας της ζωής μας, το κύτταρο.⁷²

3.2 Οι μοριακές γενετικές εξετάσεις στην αντιμετώπιση του κληρονομικού καρκίνου

Όλες οι μορφές καρκίνου σχετίζονται εμμέσως ή αμέσως με κάποιο γονίδιο, ανεξαρτήτως εάν οφείλονται σε περιβαλλοντικούς, ή κληρονομικούς παράγοντες. Από τις κοινές νόσους όπως ο καρκίνος των

πνευμόνων, του μαστού, του προστάτη και του παχέος εντέρου έως τις πιο σπάνιες όπως το ρετινοβλάστωμα ή το φαιοχρωμοκύτωμα, σε όλες τις περιπτώσεις η κατανόηση της νόσου προϋποθέτει την ανάλυση των βασικών μοριακών μηχανισμών που σχετίζονται με τη νόσο.

Η καρκινογένεση είναι μια διαδικασία που σχετίζεται με τη γήρανση. Το μεγαλύτερο μέρος των περιπτώσεων του καρκίνου εμφανίζεται μετά την ηλικία των 30 χρόνων. Υπάρχουν βέβαια και περιπτώσεις κυρίως κληρονομικού καρκίνου που εμφανίζονται σε ηλικίες κάτω των 30 χρόνων.

Η καρκινογένεση οφείλεται κυρίως σε δύο παράγοντες: το περιβάλλον και τη γενετική ταυτότητα του κάθε ανθρώπου. Και στις δύο περιπτώσεις πρέπει να συμβούν κάποιες αλλαγές στο γενετικό υλικό του ανθρώπου.

Όσον αφορά την κληρονομικότητα, διαδραματίζει πολύ σημαντικό ρόλο αλλά σε ένα σχετικά περιορισμένο ποσοστό περιπτώσεων καρκίνου. Υπολογίζεται ότι περίπου το 20% των περιστατικών καρκίνου οφείλεται σε κληρονομικά αίτια ενώ το 80% οφείλεται στο περιβάλλον. Η αλληλεπίδραση βέβαια περιβάλλοντος και γονιδίων είναι μια δυναμική αλληλεπίδραση και μπορεί ο ένας παράγων να επηρεάσει τον άλλο προς μια θετική ή αρνητική κατεύθυνση. Με άλλα λόγια ενώ η εμφάνιση σποραδικού καρκίνου συμβαίνει σε ηλικία κατά μέσον όρο 20 χρόνια αργότερα από τον κληρονομικό, ένας σποραδικός καρκίνος μπορεί να εμφανιστεί σε νεαρότερη ηλικία λόγω της έκθεσης σε χημικά καρκινογόνα ενώ αντίθετα ένας κληρονομικός καρκίνος μπορεί να εμφανιστεί σε μεγαλύτερη ηλικία λόγω «καλύτερης χρήσης του περιβάλλοντος».

Υπάρχουν δύο κατηγορίες γονιδίων που εμπλέκονται στην ογκογένεση, τα ογκογονίδια και τα ογκοκατασταλτικά γονίδια. Τα ογκογονίδια είναι γονίδια τα οποία έχουμε όλοι μας και τα οποία

συμμετέχουν στην κυτταρική διαφοροποίηση. Όταν αυτά τα γονίδια υποστούν κάποια μετάλλαξη λόγω εξωτερικών παραγόντων ή λόγω κληρονομικότητας τα κύτταρα αρχίζουν να πολλαπλασιάζονται με ανεξέλεγκτο τρόπο και αυτό το γεγονός αποτελεί ουσιαστικά την έναρξη της ογκογένεσης.

Αντίστοιχα όταν τα ογκοκατασταλτικά γονίδια συμμετέχουν στους μηχανισμούς επιδιόρθωσης του DNA, υποστούν κάποια μετάλλαξη το κύτταρο χάνει την ικανότητα επιδιόρθωσης των λαθών που συμβαίνουν κατά τη διάρκεια της μεταγραφής. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη συσσώρευση λαθών μέσα στο κύτταρο και την έναρξη της ογκογένεσης.

Η πιθανότητα εμφάνισης του καρκίνου ποικίλλει ανάλογα με το σύνδρομο αλλά κυμαίνεται γύρω στο 60-80% μέχρι την ηλικία των 70 χρόνων.

Το μεγαλύτερο μέρος των συνδρόμων αυτών έχουν χαρακτηριστεί σε πολύ μεγάλο βαθμό. Η κλωνοποίηση των αντίστοιχων γονιδίων έγινε τη τελευταία δεκαετία και στη συνέχεια έχει χαρακτηριστεί μεγάλος αριθμός κληρονομικών ή σωματικών μεταλλάξεων για όλα αυτά τα γονίδια. Το είδος της μετάλλαξης σχετίζεται συχνά και με τον τρόπο εμφάνισης της νόσου (φαινότυπος). Τα αποτελέσματα έχουν ενσωματωθεί στη πλειονότητα τους στη διαγνωστική κλινική πράξη σε διεθνές επίπεδο.

Ο χαρακτηρισμός των κληρονομικών αυτών καρκινικών συνδρόμων έχει οδηγήσει ήδη στη πρόωμη ανίχνευση των νεοπλασμάτων, την καλύτερη φαρμακευτική αγωγή και την ολοκληρωμένη διαχείριση των προβλημάτων που προκύπτουν τόσο όσον αφορά τον ίδιο τον ασθενή αλλά και την οικογένειά του.

Επιπλέον, προσφέρεται στις μέρες μας η δυνατότητα είτε μέσω προεμφυτευτικού ή προγεννητικού ελέγχου να αποφεύγεται η κληρονόμηση αυτής της προδιάθεσης στις επόμενες γενεές.

Η κλωνοποίηση του πρώτου γονιδίου που συνδέεται με τον κληρονομικό καρκίνο του μαστού, των ωοθηκών το 1994 δημιούργησε προσδοκίες τόσο σχετικά με την κατανόηση του κληρονομικού και του σποραδικού καρκίνου του μαστού αλλά και για την ανακάλυψη νέων θεραπευτικών και προφυλακτικών προσεγγίσεων.^{73,74}

3.3 Η κλινική πρωτεωμική στην αντιμετώπιση του καρκίνου

Ο στόχος της κλινικής πρωτεωμικής είναι να αναπτύξει την πρωτεωμική τεχνολογία προς όφελος της φροντίδας των ασθενών. Αυτή η νέα ερευνητική τεχνολογία χρησιμοποιείται επί του παρόντος σε μελέτες κλινικής έρευνας που κυμαίνονται από καρκινικές μέχρι και καρδιαγγειακές παθήσεις και μεταμοσχεύσεις οργάνων.

Οι ερευνητές ψάχνουν για πρωτεΐνες που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως αρχικά βιοσημάδια μιας ασθένειας, ή που μπορούν να προβλέψουν ανταπόκριση στην θεραπεία ή την πιθανότητα υποτροπιασμού μετά από θεραπεία στο αίμα, στα ούρα ή σε παθόντα ιστό.

3.4 Καρκίνος των ωοθηκών

Ο καρκίνος των ωοθηκών είναι πρωταρχικό επίκεντρο της πρώιμης βιοσημαδιακής ανακάλυψης επειδή συνήθως η διάγνωση του γίνεται σε προχωρημένο στάδιο με ένα ποσοστό πεντάχρονης επιβίωσης της τάξεως περίπου 20 τοις εκατό. Για την εκτίμηση πιθανής χρήσης της επιστήμης “proteomics” ως διαγνωστικό εργαλείο, μία ομάδα ερευνητών από το Εθνικό Καρκινικό Ινστιτούτο (NCI) στην Bethesda, Md., συνέλεξε ορό 50 ασθενών που έπασχαν από καρκίνο των ωοθηκών και 50 ανθρώπους που θα αποτελούσαν βάση συγκρίσεως στο πείραμα και χρησιμοποίησαν

έναν αλγόριθμο στον υπολογιστή για την διερεύνηση των πρωτεϊνικών σχηματισμών που ξεχώριζε τον καρκίνο από τον μη-καρκίνο.

Όταν εξέτασαν αυτόν τον σχηματισμό με μία ομάδα τυφλών δειγμάτων ορού, η διαγνωστική δοκιμασία σωστά αναγνώρισε όλους τους 50 ασθενείς που έπασχαν από καρκίνο, και ήταν ικανό να τους διαχωρίσει από 63 στους 66 ασθενείς οι οποίοι δεν είχαν προσβληθεί ή είχαν καλοήγη ασθένεια. Χρησιμοποιώντας την ίδια μέθοδο, δύο άλλες ομάδες ερευνητών ανέφεραν παρόμοια αποτελέσματα.

3.5 Καρκίνος του προστάτη

Μια παρόμοια πρωτεωμική ανάλυση ασθενών με καρκίνο του προστάτη σε σύγκριση με υγιείς ανθρώπους που αποτελούσαν βάση συγκρίσεως στο πείραμα διενεργήθηκε με σκοπό να εντοπίσει διάφορες σε πρωτεϊνικούς σχηματισμούς ανάμεσα σε δύο ομάδες.

Χρησιμοποιώντας δείγματα αίματος από 167 ασθενείς με καρκίνο του προστάτη, 77 ασθενείς με καλοήγη υπερπλασία προστάτη και 82 υγιείς άντρες, ο υπολογιστής κατάφερε να αναπτύξει ένα σύστημα ταξινόμησης το οποίο ταξινόμησε ορθά 96 τοις εκατό των δειγμάτων είτε ως καρκίνο του προστάτη είτε ως μη-καρκίνο (καλοήγη υπερπλασία του προστάτη/ υγιείς άντρες).

Μια άλλη πρωτεωμική μέθοδος έχει σκοπό να καθορίσει εάν οι αλλαγές σε συγκεκριμένες φωσφοπρωτεΐνες (πρωτεΐνες με προσκολλημένες ομάδες φωσφόρου) που πιστεύεται να είναι σημαντικές σε σημαίνοντα κυτταρικά γεγονότα και στην καρκινική εξέλιξη των ασθενών που πάσχουν από καρκίνο του προστάτη μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως βιοσημάδια πρόιμης ασθένειας.

3.6 Καρκίνος του μαστού

Ένας συνδυασμός τριών υποψηφίων πρωτεϊνών στο αίμα βρέθηκαν να είναι χρήσιμες στο διαχωρισμό ανάμεσα σε 109 ασθενείς σε διάφορα στάδια του καρκίνου του μαστού σε σύγκριση με γυναίκες με καλοήγη ασθένεια του μαστού και υγιείς ανθρώπους που χρησιμοποιήθηκαν ως βάση συγκρίσεως.

Σε τρεις άλλες μελέτες, το υγρό των ρωγών χρησιμοποιήθηκε για την αναγνώριση υποψηφίων με όγκο. Το υγρό των ρωγών έχει υψηλότερη συγκέντρωση πρωτεϊνών που βρίσκονται συγκεκριμένα στο στήθος απ' ότι το αίμα. Οι μαστικοί αδένες είναι λεπτοί σωλήνες που οδηγούν στις ρώγες και είναι το σημείο όπου εντοπίζεται ο καρκίνος του μαστού στο 70 με 80 τοις εκατό των περιπτώσεων.

3.7 Πνεύμονας και κύστη

Αρκετά εργαστήρια έχουν αναλύσει επιτυχώς ογκολογικό ιστό από ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα και κύστης και ανακάλυψαν πρωτεϊνιακούς σχηματισμούς οι οποίοι μπορούσαν να ξεχωρίσουν τον πάσχοντα από τον υγιή ιστό. Παρομοίως, προκαταρκτικά αποτελέσματα που χρησιμοποίησαν μία πρωτεωμική μέθοδο για τον εντοπισμό καρκίνου της κύστης υπήρξαν ελπιδοφόρα.

3.8 Μελλοντική χρήση

Σ' αυτό το σημείο, καμία από τις πρωτεωμικές αναλύσεις που περιγράφηκαν παραπάνω είναι αρκετά ώριμη για να χρησιμοποιηθεί στην κλινική ως ανιχνευτικό εργαλείο. Παρόλ' αυτά, αυτές οι διερευνητικές μελέτες καταδεικνύουν την υπόσχεση της πρωτεωμικής ως διαγνωστικό σημείο.

Η εγκυρότητα σε κλινικές δοκιμές με μεγάλες ομάδες ασθενών είναι απαραίτητη προτού χρησιμοποιηθούν τα πρωτεωμικά μοντέλα κατά κόρον στην κλινική ως βιοδείκτες για πρώιμες ασθένειες.

3.9 Τι πρωτεωμικές μελέτες βρίσκονται σε εξέλιξη στο NCI;

Το πρώην NCI-Food Drug Administration (FDA) Proteomics Program (Διατροφικό και Φαρμακολογικό Εφαρμοστικό Πρωτεωμικό Πρόγραμμα) προωθήθηκε το 1997 κάτω από την καθοδήγηση του(ή της) Lance Liotta, M.D., Ph.D., αρχικά του NCI's Κέντρο για την έρευνα του καρκίνου, και του Emanuel Petricion, Ph.D. αρχικά του FDA's Κέντρου για την Εκτίμηση και Έρευνα της Βιολογίας (CBER).

Η γενική στρατηγική του πρωτεωμικού προγράμματος ήταν να αποσπάσει πρωτεΐνες από το αίμα ή τον ιστό, να τις αναλύσει με τη μαζική φασματομετρία για να δημιουργήσει μοντέλα πρωτεϊνικών θραυσμάτων, να ξεχωρίσει τους σχηματισμούς με ένα τεχνητής νοημοσύνης πρόγραμμα υπολογιστή για να ανακαλύψει διαφορές οι οποίες διαχωρίζουν, για παράδειγμα, τους καρκινοπαθείς από τους υγιείς που υπόκεινται στο πείραμα, ή τους ασθενείς που ανταποκρίνονται.

Μία υψηλή προτεραιότητα του προγράμματος ήταν να αναπτύξει ερευνητικές ανακαλύψεις έτσι ώστε να μπορούν να εξεταστούν σε κλινικές δοκιμές και τελικά να εφαρμοστούν στην φροντίδα του ασθενούς. Τα πλεονεκτήματα για τους ασθενείς θα μπορούσαν να συμπεριλαμβάνουν:

- Ø Διάγνωση του καρκίνου νωρίτερα από ότι ήταν δυνατό,
- Ø Βελτίωση της κατανόησης των όγκων σε πρωτεϊνικό επίπεδο, οδηγώντας σε καλύτερες θεραπείες,
- Ø Ανάπτυξη εξειδικευμένων θεραπειών για κάθε ασθενή, και

- Ø Καθορισμό των τοξικών και ενεργητικών αποτελεσμάτων των θεραπειών πριν την εφαρμογή τους σε ασθενείς.

3.10 Εξέταση Αίματος για Καρκίνο Ωοθηκών

Ο / Η Liotta, ο/ η Petricion, και οι συνάδελφοί τους εφηύραν ή εξευγένισαν αρκετές σημαντικές τεχνολογίες που χρησιμοποιήθηκαν στην πρωτεωμική ανάλυση και κατά τη διάρκεια της διαδικασίας αναγνώρισαν εκατοντάδες πρωτεϊνών στο στήθος, στις ωοθήκες, στον προστάτη και στον ιστό του οισοφάγου που αλλάζουν σε ποσότητα καθώς τα κύτταρα σε αυτούς τους ιστούς αναπτύσσονται με ανώμαλο τρόπο.

Το 2002, ανακάλυψαν σχηματισμούς πρωτεϊνών που βρέθηκαν στο αίμα ασθενών με καρκίνο ωοθηκών που μπορεί να είναι χρήσιμοι ως ένα πρώιμο βιοσημάδι ασθένειας. Χρησιμοποιώντας τι αίμα του ασθενούς και μία ανάλυση που μπορεί να ολοκληρωθεί σε 30 λεπτά, οι ερευνητές κατάφεραν να ξεχωρίσουν ανάμεσα σε δείγματα ορού που πάρθηκαν από ασθενείς με καρκίνο των ωοθηκών και σε κείνα των μη προσβεβλημένων ατόμων.

3.11 Τεχνητή Νοημοσύνη

Η ανακάλυψη των πρωτεϊνιακών σχηματισμών που διαχώρισαν τους ασθενείς με καρκίνο των ωοθηκών από εκείνους χωρίς πάθηση βασίστηκε σε ένα εξειδικευμένο, τεχνητής νοημοσύνης πρόγραμμα υπολογιστή που αναπτύχθηκε από το Correlogic System, Inc., Bethesda, Md.

Οι επιστήμονες κατάφεραν να «εκπαιδεύσουν» τον υπολογιστή να αναγνωρίζει έναν σχηματισμό μονάχα λίγων μικρών πρωτεϊνών από

χιλιάδες υποψηφίων που βρέθηκαν στο αίμα που μπορούσε να διακρίνει μεταξύ καρκινοπαθών και δείγματα υγιών δειγμάτων. Απ' τη στιγμή που βρέθηκαν αυτοί οι σχηματισμοί, εξετάστηκαν πάνω σε άλλα τυφλά δείγματα από ασθενείς με και χωρίς καρκίνο. Πενήντα στα πενήντα δείγματα καρκίνου και 60 στα 63 δείγματα μη-καρκίνου αναγνωρίστηκαν ορθώς. Αυτά τα δείγματα υποδεικνυαν ότι η πρωτεωμική τεχνολογία ίσως και να μπορεί να βοηθήσει τους κλινικούς γιατρούς να διαγνώσουν την ασθένεια πολύ πιο νωρίς από ότι οι σύγχρονες μέθοδοι.

3.12 Βελτιώσεις στην εξέταση Αίματος

Μια έρευνα το 2002 από τη/ τον Lancet ανέφερε ότι η πρωτεωμική εξέταση εφαρμόστηκε με 100 τοις εκατό ευαισθησία και 95 τοις εκατό ακρίβεια γι' αυτή την ομάδα των δειγμάτων ορού. Η ευπάθεια μετρά αναλογία των ανθρώπων με την ασθένεια που εξετάζονται θετικοί, η ακρίβεια μετράει την αναλογία των ανθρώπων χωρίς την ασθένεια που εξετάζονται αρνητικοί. Η ακρίβεια του 95 τοις εκατό σημαίνει ότι το 5 τοις εκατό εκείνων που δεν είχαν καρκίνο θα εξετάζονταν θετικοί, το οποίο είναι ένα πολύ πιο υψηλό λανθασμένο-θετικό ποσοστό για εμπορική χρήση.

Σε μία άλλη μελέτη, που συμπεριλάμβανε μία μεγαλύτερη ομάδα ασθενών με καρκίνο των ωοθηκών και ανθρώπων που χρησιμοποιήθηκαν ως βάση συγκρίσεως, οι επιστήμονες εξέτασαν αρχειοθετημένα δείγματα αίματος με ένα υψηλότερης ευκρίνειας και ενός διαφορετικού πρωτεϊνικού σχηματισμού συγκριτικά με τη μελέτη του 2002. Παρά την αναφορά της 100 τοις εκατό ευαισθησίας και ακρίβειας, σ' αυτή τη μελέτη, η εγκυρότητα σε μία μεγάλη κλινική ομάδα είναι απαραίτητη

προτού μια εμπορική εξέταση για αυτήν την τεχνική να μπορεί να γίνει διαθέσιμη.

3.13 Ανακαλύπτοντας νέες πρωτεΐνες

Αν και δεν είναι απαραίτητο, στη θεωρία, να ξέρεις να αναγνωρίζεις την ταυτότητα των πρωτεϊνών που μπορεί να ανιχνεύσουν την πρόιμη ασθένεια ή ανταπόκριση σε θεραπεία, πολλές από αυτές τις πρωτεΐνες δεν έχουν αναγνωριστεί και οδηγούν σε μία κατανόηση των μοριακών μονοπατιών που σχετίζονται στην ασθένεια.

3.14 Άλλοι καρκίνοι

Εκτός από τον καρκίνο των ωθηκών, παρόμοιες τεχνικές εφαρμόζονται και σε άλλους καρκίνους. Οι ερευνητές ψάχνουν για πρωτεϊνικούς σχηματισμούς στο αίμα που είναι διαγνωστικοί για τα πρώτα στάδια του καρκίνου του προστάτη και του στήθους, καθώς επίσης και σχηματισμούς που μπορούν να προβλέψουν κίνδυνο για τον προστάτη, μελάνωμα, και καρκίνος του παγκρέατος.

3.15 Πρωτεΐνες σε ιστούς

Εκτός από το αναλύει πρωτεΐνες στο αίμα, μία άλλη ώθηση της πρωτεωμικής έρευνας έρχεται να συγκρίνει τις πρωτεΐνες του ιστού με όγκο σε αντιπαράθεση με τον υγιή ιστό. Χρησιμοποιώντας αυτή την μέθοδο, οι ερευνητές εξετάζουν προσεκτικά ιστούς για πρωτεΐνες φωσφορυλάσης που είναι γνωστές για τη σημαντικότητα τους στην καρκινογένεση και αναζητούν χρήσιμους διαγνωστικούς σχηματισμούς.

Η εργασία προσδίδει νέα στοιχεία για τα μοριακά μονοπάτια που τροποποιούνται στην εξέλιξη του καρκίνου.

3.16 Ο ρόλος της αλβουμίνης

Η NCI – FDA ομάδα επίσης ανακάλυψε ότι οι χαμηλά μοριακές πρωτεΐνες, χρήσιμες για την πρόιμη ανίχνευση του καρκίνου των ωοθηκών, συγκεντρώνονται στο αίμα που μεταφέρεται από μεγαλύτερες πρωτεΐνες όπως η αλβουμίνη. Αυτή η μεταφορά διασφαλίζει στις μικρότερες πρωτεΐνες μακρυζωΐα στο κυκλοφορών αίμα. Γνωρίζοντας αυτό, μπορούν να αποκτήσουν μία μεγαλύτερη συγκέντρωση πιθανών βιοσημασιακών πρωτεϊνών απομονώνοντας το πρωτεϊνιακό κλάσμα φορέα (διαχωρισμένη ουσία) από την αλβουμίνη. Μερικές ομάδες δουλεύουν με σκοπό να δημιουργήσουν έναν συνδετικό πρωτεϊνιακό φορέα που θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για την τυποποίηση των διαγνωστικών πρωτεϊνιακών σχηματισμών.

3.17 Εξευγενίζοντας την τεχνολογία

Οι ειδικοί συνεχίζουν να εξετάζουν τα επίπεδα εναλλακτικής μαζικής φασματομετρίας και τους ηλεκτρονικούς αλγόριθμους και ελπίζουν ότι έτσι θα προκύψουν κλινικά χρήσιμοι σχηματισμοί.

3.18 Υπάρχουν καθόλου κλινικές έρευνες που βρίσκονται σε εξέλιξη και που χρησιμοποιούν την «πρωτεωμική» ως διαγνωστική εξέταση?

Μία NCI – χρηματοδοτούμενη κλινική δοκιμή για τον καρκίνο των ωοθηκών, που περιλαμβάνει 10 τοποθεσίες, προγραμματίζεται να ξεκινήσει το φθινόπωρο του 2005. Επειδή πάνω από το 80 τοις εκατό των

ασθενών με επιθήλιο καρκίνο των ωοθηκών που βρίσκονται σε προχωρημένο στάδιο βλέπουν τον καρκίνο τους να επιστρέφει αφότου έχουν υποστεί σε θεραπευτική αγωγή χημειοθεραπείας, τα βιοσημάδια είναι απαραίτητα ως προάγγελοι έμμονης ασθένειας και υποτροπιασμού.

Το CA – 125, το μοναδικό FDA εγκεκριμένο υποτροπιακό σημάδι του καρκίνου των ωοθηκών, θα εξυψωθεί σε μερικούς, αλλά όχι σε όλους, από τους περίπου 80 τοις εκατό προχωρημένου σταδίου ασθενείας για τους οποίους αυξήθηκε σε αρχική διάγνωση. Η εξύψωση σε CA – 125 ίσως να προηγηθεί των κλινικών στοιχείων υποτροπιασμού κατά 6 μέχρι 10 μήνες ή να καθυστερήσει τον κλινικά υποτροπιασμό κατά τα ίδια χρονικά διαλείμματα, κάνοντας το και λιγότερο του ικανοποιητικού κλινικό εργαλείο.

Οι ερευνητές έχουν αναγνωρίσει έναν πρωτεϊνικό δοσολογικό σχηματισμό που αναγνωρίζει με ευαισθησία και σαφήνεια την παρουσία του καρκίνου των ωοθηκών (στάδια I – IV) στο αίμα από προσβεβλημένες γυναίκες. Επιπλέον, ο σχηματισμός μπορεί να διαχωρίσει μεταξύ των προσβεβλημένων γυναικών και των μη-προσβεβλημένων και εκείνων με την παρουσία καλοήθους ασθένειας. Οι ερευνητές υποθέτουν ότι σημαντικές αλλαγές στους πρωτεωμικούς δοσολογικούς σχηματισμούς μπορούν να προσδιοριστούν και ότι αυτοί θα είναι αξιοπίστως προαναγγελτικά υποτροπιασμού. Ακόμη, υποθέτουν ότι οι πρωτεϊνικές δοσολογικές αλλαγές σχηματισμού θα είναι τόσο καλές ή και ακόμα καλύτερες από το CA125 ως ένα μονάχα σημάδι ή σε συνδυασμό με την παρακολούθηση του CA125. Μία αποθήκευση ορού με δείγματα από γυναίκες με καρκίνο των ωοθηκών θα δημιουργηθεί με σκοπό να αναπτυχθούν και να επικυρωθούν τα πολλαπλά βιοσημάδια και οι πρωτεωμικές δοκιμές που δημιουργούνται για την παλινδρόμηση και έλεγχο του καρκίνου των ωοθηκών.

Ο σκοπός αυτής της δοκιμής είναι να καθορίσει την ευαισθησία και την ακρίβεια για την ανίχνευση του καρκίνου σε ασθενείς που βρίσκονται σε ραθυμία (νωθρότητα, αδράνεια, αμέλεια) για την ασθένειά τους. Αυτή η μελέτη είναι μία επέκταση των προσπαθειών που πρωτοξεκίνησαν το 2000 από την/ τον Elise Kohn, M.D., NCI, με την “Δοκιμαστική Μελέτη της Πρωτεωμικής Εκτίμησης των Ασθενών με Καρκίνο Επιθήλιων Ωοθηκών (Επιθήλιο Ωοθηκικό Καρκίνο) στην Πρώτη Κλινική Ραθυμία : Ανάπτυξη ενός Πρωτεϊνιακού Προφίλ Αποτυπώματος που σχετίζεται με τη Ραθυμία, NCI 00-C-0018”. Η προηγούμενη μελέτη κατέγραψε περίπου 25 ασθενείς που έτειναν προς τους 40. Τα αποτελέσματα της Έρευνας δεν είναι διαθέσιμα προς χρονολόγηση επειδή η πρωτεωμική δουλειά θα ξεκινήσει όταν οι ερευνητές θα έχουν έναν κατάλληλο αριθμό δειγμάτων για τη δημιουργία μιας εκπαιδευτικής ομάδας.⁷⁵

Κεφάλαιο 4

ΑΝΑΛΥΣΗ DNA

4.1 Η μηχανή DNA μπορεί να δώσει την πρόοδο της γενετικής ακολουθίας για τις ασθένειες

Ένα νέο είδος μηχανής για την αποκρυπτογράφηση του DNA μπορεί να βοηθήσει φέρνοντας τα έξοδα σε τόσο χαμηλό επίπεδο ώστε να είναι δυνατόν να αποκρυπτογραφηθεί το DNA ενός ατόμου για ιατρικούς λόγους. Η μηχανή που δημιουργήθηκε από το 454 Life Sciences of Branford Conn., χρησιμοποιήθηκε για την ανά – ακολουθία των γονιδίων ενός μικρού βακτηρίου σε τέσσερις ώρες, της οποίας εταιρείας οι επιστήμονες το ανέφεραν σε ένα άρθρο που δημοσιεύτηκε στο διαδίκτυο από το περιοδικό Nature.

Το 1995 όταν για το ίδιο βακτήριο πρώτη φορά βρέθηκε η ακολουθία από την Claire M. Fraser απαίτησε 24000 ανεξάρτητες διαδικασίες διάρκειας από 4 ως 6 μήνες. Η μηχανή χρησιμοποιεί τη χημεία πυγολαμπίδας για να παράγει ένα σπινθήρα φωτός κάθε φορά που μία μονάδα DNA αναλύεται σωστά. Οι σπινθήρες από περισσότερα από 1000000 πηγές που περιέχουν DNA, παρατεταγμένοι σε μία πλάκα με σχήμα πιστωτικής κάρτας, απεικονίζονται από ένα τσιπ ανίχνευσης φωτός, του είδους που χρησιμοποιείται στα τηλεσκόπια για να ανιχνεύσουν το πιο ασθενές φως από τα κοντινά αστέρια. Τότε στέλνουν σε ένα υπολογιστή που ανακατασκευάζει την ακολουθία των γονιδίων. Η αποκρυπτογράφηση ή ακολουθία των γονιδίων εξαρτιόταν για πολύ καιρό από μία χημική διαδικασία που ανακαλύφτηκε από το Frederic Sanger το 1977. Αλλά τα κέντρα των γονιδίων που βασίζονται σε αυτή την τεχνολογία είναι ακριβά να εξοπλιστούν και να χειριστούν.

Για αρκετά χρόνια οι βιολόγοι ψάχνουν για μία μέθοδο, που θα μειώσει και θα κάνει αρκετά φτηνό το ξεκίνημα ενός εύρους νέων

εφαρμογών. Ανάμεσα σε αρκετά υποσχόμενες προσεγγίσεις μία που ονομάζεται πυροακολουθία «πυροαποκρυπτογράφιση» αναπτύχθηκε από τον Pal Nyren και τον Mostafa Ronaghi στο βασιλικό ίδρυμα τεχνολογίας της Στοκχόλμης. Η τεχνική βασίζεται στο διαχωρισμό της διπλής έλικας του DNA σε μονές λωρίδες και η κατασκευή νέων λωρίδων για να συμπληρώσουν τις παλιές. Καθώς κάθε νέα βάση DNA προστίθεται σε μία επεκτεινόμενη λωρίδα προκύπτει μία χημική συνιστώσα γνωστή ως pyrophosphate.

Η ομάδα του Dr. Nyren ανέπτυξε τη χημεία να μετατρέπει το pyrophosphate σε έναν καταλύτη luciferase, το ένζυμο που οι πυγολαμπίδες χρησιμοποιούν για να παράγουν το φως τους. Επειδή οι χημικοί ήξεραν σε κάθε κύκλο πια από τις τέσσερις βάσεις του DNA είχαν προσθέσει ένας σπινθήρας φωτός δήλωνε την αλληλουχία σε εκείνο το σημείο. Ο Dr. Ronaghi ο οποίος τώρα είναι στο πανεπιστήμιο Stanford, είπε ότι ο ίδιος και ο Dr. Nyren είχαν αναπτύξει τη χημεία και έδειξαν ότι μπορούσε να μειωθεί και ότι η εταιρεία 454 Life sciences, έχοντας την άδεια για τις πατέντες τους, έκανε το σύστημα πρακτικό.

«Ότι έκαναν εδώ είναι πολύ σημαντικό» είπε ο Dr. Ronaghi, τονίζοντας ότι η εταιρεία είχε ήδη αποκρυπτογραφήσει τα συστήματα γονιδίων μικροβίων. «Αυτό είναι το πρώτο βήμα με 1000\$ της αποκρυπτογράφισης του ανθρώπινου συνόλου γονιδίων είπε. Το ίδρυμα ένωσης γονιδίων ένα ομοσπονδιακό κέντρο αποκρυπτογράφισης γονιδίων στο Walnut Creek Calif. παρήγγειλε μια από τις μηχανές αποκρυπτογράφισης 454 με 500000\$ αλλά ακόμη δεν την έχει εγκαταστήσει. Ο Paul Richardson ο διευθυντής ανάπτυξης τεχνολογίας του ιδρύματος είπε ότι η νέα προσέγγιση «φαίνεται πολύ υποσχόμενη» και μπορεί να μειώσει 4 φορές τα έξοδα της αποκρυπτογράφισης. Το πρόβλημα της μηχανής είναι ότι μπορεί να διαβάσει τμήματα DNA 100

μονάδων ενώ η παλιά μέθοδος 800 μονάδων ενώ για τα μικρόβια είναι εντάξει για τα θηλαστικά όχι γιατί είναι δύσκολο να μαζέψει το σύνολο.

Ο διευθυντής της εταιρίας 454 είπε ότι αποκρυπτογραφούν 400 μονάδες DNA με μηχανές δοκιμαστικές και ότι θα προσπαθήσουν να επεξεργαστούν και το ανθρώπινο γονίδιο. Αυτό θα βοηθούσε στην πρόγνωση ασθενειών. Στην νέα τεχνική κάθε τμήμα DNA συλλαμβάνεται σε μία ανεξάρτητη σταγόνα υγρού και μεγεθύνεται σε 10 εκατομμύρια αντίγραφα με μία καλά θεμελιωμένη μέθοδο γνωστή ως αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης. Αυτά τα αντίγραφα υφίστανται πυροαποκρυπτογράφιση.

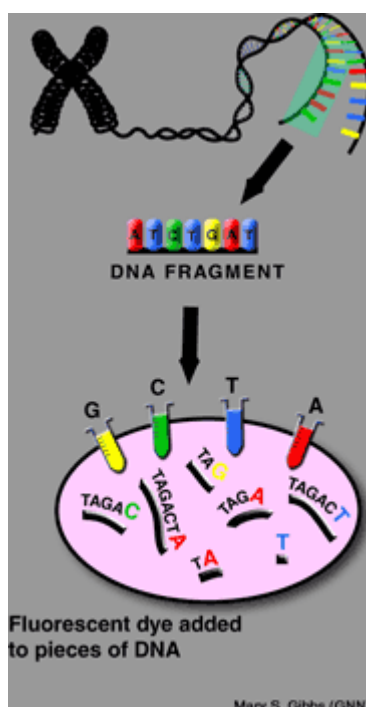
Η σωστή βάση κάθε φορά προστίθεται στα τμήματα DNA. Προκύπτει ένας σπινθήρας 10000 φωτονίων που συλλέγεται από τη βάση των πηγών από τον φωτοανιχνευτή τσιπ και ένας υπολογιστής μπορεί να ανασκευάσει την αλληλουχία των βάσεων που συνθέτουν και από αυτά όλα τα σύνολα των γονιδίων.⁷⁶

4.2 Πως μπορεί η μηχανή αποκρυπτογράφισης να ξέρει αν η βάση είναι μία A, C, G, ή T;

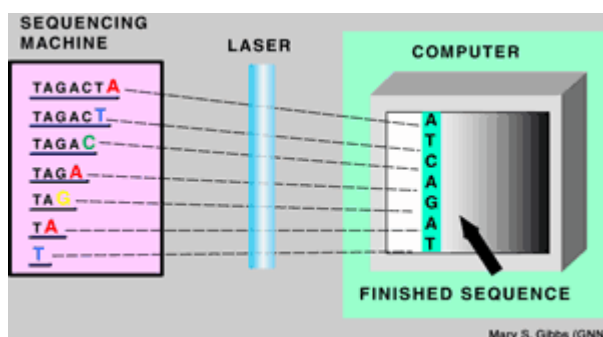
Οι μηχανές αποκρυπτογράφισης δεν βλέπουν το DNA άμεσα, έτσι χρησιμοποιούν ένα πολύπλοκο σύνολο διαδικασιών για να ετοιμαστεί το DNA για την αποκρυπτογράφιση. Όταν το DNA τελικά μορφοποιείται έτσι ώστε οι μηχανές να μπορούν να το διαβάσουν, κόβεται, αντιγράφεται, μορφοποιείται χημικά και βάφεται με φθορίζουσες βαφές που αντιστοιχούν στις 4 διαφορετικές βάσεις του DNA.

Πριν την αποκρυπτογράφιση, ένα τμήμα DNA αντιγράφεται πολλές φορές, μετά διαιρείται σε 4 δέσμες και προετοιμάζεται για έναν άλλο γύρο αντιγραφής. Σε αυτό το γύρο, μία μικρή ποσότητα χημικά τροποποιημένης βάσης προστίθεται σε κάθε δέσμη, A, σε ένα άλλο C και

λοιπά. Όταν μία από αυτές τις τροποποιημένες βάσεις ενσωματώνεται σε ένα μόριο DNA η αλυσίδα των βάσεων σταματά να αυξάνεται. Τα αποτελέσματα αυτού είναι ότι κάθε δέσμη DNA θα περιέχει μόνο κομμάτια που τελειώνουν σε T, άλλα μόνο κομμάτια που τελειώνουν σε A, C ή G αντίστοιχα. Στο δεύτερο γύρο της αντιγραφής, μία διαφορετική φθορίζουσα βαφή, προστίθεται επίσης σε κάθε δέσμη DNA. Επομένως κάθε τμήμα DNA που τελειώνει με T είναι μπλε, με A κόκκινο, με G κίτρινο και με C πράσινο.



Σε μια γραμμή ενός σωλήνα μιας μηχανής αποκρυπτογράφησης πηγαίνει μια μίξη DNA από όλες τις 4 δέσμες. Επειδή μικρότερα μόρια κινούνται μέσα στο ζελέ γρηγορότερα τα κομμάτια DNA διαπερνούν το ζελέ με αυξανόμενη τάξη μεγέθους, κάθε κομμάτι μία βάση μακρύτερο από το προηγούμενο.



Καθώς τα κομμάτια βγαίνουν από το ζελέ κινούνται περνώντας ένα λέιζερ που κάνει τα βαμμένα μόρια να φθορίζουν. Ένας ανιχνευτής διαβάζει τα χρώματα φθορισμού (μπλε, κόκκινο, κίτρινο, πράσινο) και ένα πρόγραμμα λογισμικού ταυτίζει το χρώμα με την αντίστοιχη βάση (T, A, G, C). Με αυτό τον τρόπο η ακολουθία μεγαλώνει βάση με βάση. Κάθε ακολουθία των βάσεων που η μηχανή παράγει είναι γνωστή ως read (ανάγνωση).

4.3 Τι συμβαίνει μετά που οι DNA ακολουθίες βγαίνουν από τη μηχανή αποκρυπτογράφησης

Σε μια αυτόματη μηχανή βγαίνει αυτό που ονομάζεται ωμή ακολουθία. Στην ακατέργαστη αυτή ακολουθία, οι αναγνώσεις, ή οι μικρές ακολουθίες DNA είναι μπερδεμένες σαν τα κομμάτια ενός παζλ. Αναπόφευκτα, η ακατέργαστη ακολουθία περιέχει κάποια κενά και λάθη. Η διαδικασία της επεξεργασίας της ακολουθίας δηλαδή η μετατροπή του ασύνδετου τμήματος καλείται τελείωμα.

Το τελείωμα περιλαμβάνει και τη συλλογή, στην οποία ανεξάρτητες μικρές ακολουθίες ενώνονται μαζί και στη σωστή σειρά και μία προσεκτική διαδικασία διπλού ελέγχου και καθαρισμού της ακολουθίας για να περιοριστούν τα λάθη και να κλείσουν τα κενά. Το τελείωμα συχνά παίρνει περισσότερο χρόνο από την ίδια την αποκρυπτογράφηση.⁷⁷

4.4 Επιταχύνοντας το κυνήγι των γονιδίων υψηλής ταχύτητας αποκρυπτογράφησης του DNA

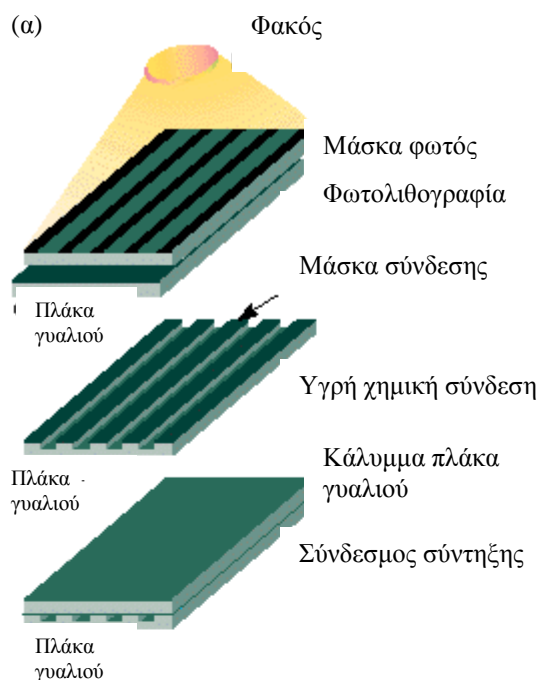
Τα γονίδια και οι πρωτεΐνες που παράγουν κρατούν το κλειδί που ξεκλειδώνει τα μυστήρια των γενετικών ασθενειών. Αν γίνει κατανοητός ο γενετικός κώδικας για μια ασθένεια, οι ερευνητές μπορούν να ξεκινήσουν να αναπτύξουν γονιδιακές και φαρμακευτικές θεραπείες για αυτή τη συγκεκριμένη ασθένεια. Ο τελικός τρόπος είναι να βρεθούν όλα τα γονίδια στην αλληλουχία DNA, να αναπτυχθούν τα εργαλεία για τη χρήση αυτής της πληροφορίας για τη μελέτη της ανθρώπινης βιολογίας και ιατρικής και η βελτίωση της ανθρώπινης υγείας.

Η αποκρυπτογράφηση περιλαμβάνει τον προσδιορισμό της ακριβούς σειράς των 4 ανεξάρτητων χημικών δομικών στοιχείων ή βάσεων, που συνιστούν το DNA. Το συνολικό DNA σε ένα απλό ανθρώπινο κύτταρο έχει περίπου 3 δισεκατομμύρια ζευγάρια των χημικών δομικών στοιχείων, αδερίνη, θυμίνη, γουανίνη και κυτοσίνη.

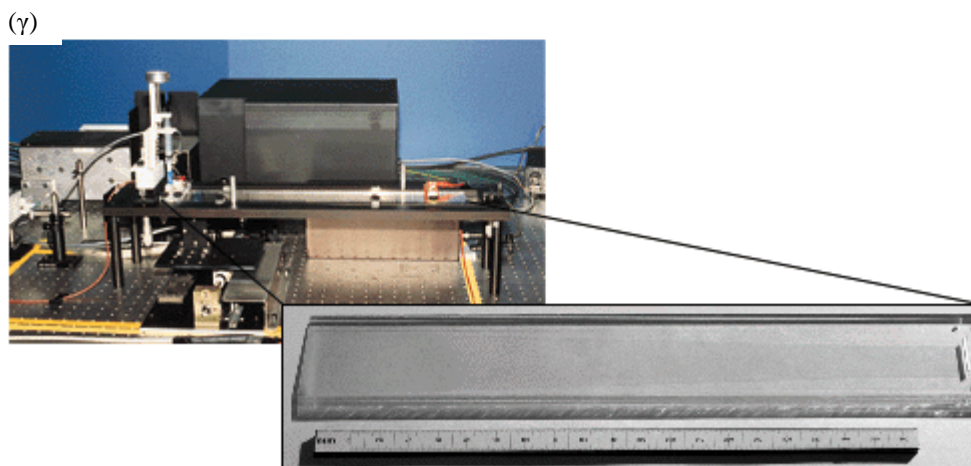
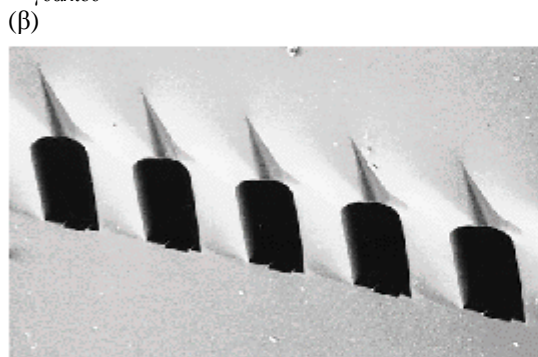
Στο Lawrence Livermore National Laboratory αναπτύσσουν ένα νέας γενιάς όργανο για την αποκρυπτογράφηση του DNA. Όταν δημιουργηθεί θα μπορεί τελικά να διαβάσει σχεδόν 600.000 βάσεων για μετατόπιση 8 ωρών, 12 φορές γρηγορότερα από τα σημερινά.

Η γρηγορότερη αποκρυπτογράφηση θα παρέχει επίσης άλλα προγράμματα του Livermore με γρηγορότερη πρόσβαση σε πληροφορίες για την ανίχνευση βιολογικών συγκεντρωμένων δειγμάτων για τη δράση μικροοργανισμών.

4.5 Αποκρυπτογράφιση: Πως λειτουργεί



Κατά τη διάρκεια της παραγωγής των νέων 96-στηλών μηχανών αποκρυπτογράφισης, το σχήμα των καναλιών πρώτα ορίζεται από (α) φωτολιθογραφική επεξεργασία σε ανθεκτική στο φως πλάκα. (β) Έπειτα, εκείνη η πλάκα χρησιμοποιείται για να προσαρμόσει χημικά το σχήμα στο γυαλί. (γ) Τελικά, το τμήμα της κορυφής του γυαλιού συνδέεται στην τροσαρμοσμένη πλάκα γυαλιού.



Όταν οι βιολόγοι θέλουν να αποκρυπτογραφήσουν ένα τμήμα DNA, κλωνοποιούν τμήματα αυτού του τμήματος και μετά τρέχουν 4 σχεδόν ταυτόσημων αντιδράσεων σε αυτά τα τμήματα. Σε αυτή οι 4 βάσεις σημαίνονται με 4 διαφορετικές φθορίζουσες βαφές.

Οι μηχανές αποκρυπτογράφησης που χρησιμοποιούνται τώρα στο εργαστήριο βασίζονται σε ένα σύστημα ηλεκτροφόρησης ζελέ, που δουλεύει ως εξής:

Τα δείγματα DNA φορτώνονται με το χέρι σε ένα 200-400 μm παχύ πολυακρυλαμίδικό ζελέ, που μπαίνει ανάμεσα σε γυάλινες πλάκες, 48 cm μακριές και 25 cm πλατιές. Οι πλάκες μπορούν να φέρουν 36 δείγματα τη φορά. Μια ηλεκτρική τάση εφαρμόζεται στο ζελέ, και επειδή το DNA είναι αρνητικά φορτισμένο, τα τμήματα μετακινούνται σε 36 στήλες από την κορυφή ως τη βάση της πλάκας. Τα τμήματα του DNA κινούνται σε διαφορετικούς ρυθμούς εξαρτώμενα από το μέγεθος τους. Τα μικρότερα μετακινούνται γρηγορότερα από τα μεγαλύτερα. Καθώς τα τμήματα μετακινούνται από ένα συγκεκριμένο σημείο στο ζελέ μια ακτίνα λέιζερ περνά κατά πλάτος της πλάκας, διεγείροντας τις βαφές στις βάσεις του DNA.

Καθώς τα τμήματα περνούν το λέιζερ, οι βάσεις διαχωρίζονται από μικρότερες σε μεγαλύτερες. Τα φθορίζοντα σημεία που παράγονται από το λέιζερ ανιχνεύονται από σωλήνες –φωτοπολλαπλασιαστές (ή άλλους ανιχνευτές) και ο υπολογιστής συλλέγει, αποθηκεύει, και τα προωθεί (σχήμα 1).

Όταν λαμβάνονται υπόψη οι χρόνοι καθαρισμού, φορτώματος και τρέξιματος, λαμβάνει ανάμεσα σε 5 ή 7 ώρες να ολοκληρωθεί ένα τρέξιμο. Κάθε δείγμα περιέχει περίπου 500 βάσεις, που σημαίνουν κάθε γύρος από 36 δείγματα τείνει σε όχι περισσότερο από 18.000 βάσεις. Αυτό αυξάνεται με τις ακόλουθες μεθόδους.



Σχήμα 1. Εικόνα παραγόμενη από υπολογιστή των φθορίζουσών δεσμών μετά από ανίχνευση των τμημάτων από laser.

Μπορεί να αυξηθεί ο αριθμός των στηλών σε κάθε γύρο. Μπορεί να αυξηθεί η ταχύτητα στη οποία κάνουμε ένα γύρο, δηλαδή εφαρμόζεται περισσότερη ηλεκτρική τάση στα τμήματα. Ακόμα μπορεί να μειωθούν οι χρόνοι φορτώματος και καθαρίσματος, που συχνά παίρνουν κάποιες ώρες.

4.5.1 Αύξηση στηλών

Στο παρόν σύστημα, παρόλο που τα δείγματα κινούνται σε στήλες, κανένα φυσικό φράγμα δεν διαχωρίζει μια στήλη από την επόμενη. Υπάρχει ένα ηλεκτρικό πεδίο που τραβά τα τμήματα στη βάση. Αν συμπτήξουμε περισσότερες στήλες, υπάρχει ένα πρόβλημα με τις στήλες που θα διαχέονται η μία στην άλλη.

Στο εργαστήριο κάνουν το εξής, φτιάχνουν μικρές, ακριβείς στήλες, μικροκανάλια, σε μεγάλες γυάλινες πλάκες μέσα στις οποίες το μέσο ζελέ ρέει (από το 1993).

Πέρσι, παρουσιάστηκε μια παράταξη 96 στηλών σε ένα κομμάτι γυαλιού 7.5 εκατοστά πλατύ και 55 εκατοστά μακρύ δηλαδή δύο φορές οι στήλες που μπορεί να έχει η παρούσα τεχνολογία στο 1/3 του χώρου. Αυτοί θα παράγουν 384 κανάλια. Αυτές οι υψηλής πυκνότητας πλάκες μικροκαναλιών γυαλιού είναι το καινούριο τμήμα του οργάνου.

Τα βήματα:

Το πρώτο βήμα είναι η φωτολιθογραφία, όταν το σχήμα των καναλιών ορίζεται σε μια καλυμμένη από φως πλάκα. Το δεύτερο περιλαμβάνει χρήση αυτής της πλάκας στη χημική πλάκα όπου είναι πολύ μικρό σχήμα πάνω στο γυαλί σε πολύ ακριβείς ειδικεύσεις. Το τελικό στάδιο είναι το δέσιμο στην κορυφή κομματιού του γυαλιού στην κολλημένη πλάκα του γυαλιού.

4.5.2 Αύξηση της ταχύτητας

Μια άλλη μέθοδος επιτάχυνσης της διαδικασίας είναι η αύξηση του ηλεκτρικού πεδίου. Η ταχύτητα του DNA αυξάνει ανάλογα. Στο παρόν σύστημα, όμως απλή αύξηση του πεδίου οδηγεί σε άλλα προβλήματα.

Ένα υψηλό ηλεκτρικό πεδίο αυξάνει την ισχύ, που αυξάνει τη θερμοκρασία. Και όταν θερμαίνεται το ζελέ και η θερμική διάχυση προκαλεί τις φθορίζουσες δέσμες να διαχέονται. Οι δέσμες τρέχουν η μία πάνω στην άλλη και δεν μπορούν πλέον να αναφέρονται ως ανεξάρτητες και διακριτές δέσμες. Αυτό το πρόβλημα μπορεί να μειωθεί σημαντικά με τη χρήση πολύ λεπτού ζελέ (περίπου 500nm παχύ) ή άλλα μέσα αντί για πολυακρυλαμίδη που χρησιμοποιείται τώρα. Το στενότερο ζελέ σημαίνει ότι η κλίση της θερμοκρασίας κατά πλάτος του ζελέ είναι μικρότερη, και η θερμική διάχυση των τμημάτων των δεσμών DNA είναι λιγότερη.

Με αυτό το μέσο, το όργανο μπορεί να τρέξει με ένα ηλεκτρικό πεδίο 3 ή 4 φορές υψηλότερης από αυτές που χρησιμοποιούνται σε συμβατικά μηχανήματα. Έτσι, η ταχύτητα της ροής αυξάνει με τον ίδιο παράγοντα.

4.5.3 Μείωση του χρόνου καθαρισμού

Μια άλλη βελτίωση περιλαμβάνει χρήση μικρών αντλιών – συρίγγων για να βάλει λεπτό μέσο τριβής μέσα στα μικροκανάλια του νέου οργάνου όταν η ροή ξεκινάει και τότε αυτόματα αντλώντας το έξω όταν η ροή ολοκληρώνεται. Αυτή η διαδικασία θα επιταχύνει σημαντικά το συνολικό χρόνο που απαιτείται για να ολοκληρωθεί μια ροή.

Με το ζελέ πολυακρυλαμίδης το ζελέ που χρησιμοποιείται τώρα, πρέπει να γίνει μέσω μίας μακράς προετοιμασίας στην αρχή μιας ροής για να γίνει καθαρό ζελέ. Τότε στο τέλος, πρέπει να απομακρυνθεί το παλιό ζελέ, και να καθαριστούν οι πλάκες για την επόμενη ροή.

Με αυτό το νέο μέσο, απλά το αντλούμε μέσα και έξω μέσα από κανάλια και σωλήνες, χωρίς να απομακρυνθούν οι πλάκες μικροκαναλιών από το όργανο. Τώρα χρειάζονται 2 ή 3 ώρες.

4.5.4 Βάζοντας τα όλα μαζί

Επειδή το νέο σύστημα έχει διαφορετικές λεπτομέρειες εκτέλεσης από ότι το παλιό, απλά η φόρτωση των νέων πλακών γυαλιού, με το νέο μέσο μέσα στην ίδια μηχανή δεν είναι η μόνη αλλαγή.

Για παράδειγμα, επειδή, τα τμήματα του DNA κινούνται με μια μεγαλύτερη ταχύτητα όταν έρχονται στο λέιζερ, το λέιζερ πρέπει να διαβάσει και το πλάτος των πλακών γρηγορότερα. Επιπρόσθετα, δεδομένων των 96 στηλών τώρα και των 384 που έρχονται στο μέλλον η ομάδα εξερευνά μερικές ιδέες της αυτόματης φόρτωσης του δείγματος. Άλλα συστήματα που αναπτύσσονται περιλαμβάνουν το σύστημα επαγόμενης από λέιζερ φθορίζουσας ανίχνευσης, το υγρό και αντλιακό σύστημα για το πολυμερές μέσο, το σύστημα ελέγχου της θερμοκρασίας, και το λογισμικό ανάλυσης. Αυτές συν τις ίδιες τις πλάκες -μικροκανάλια

προστίθενται στα 7 μεγαλύτερα μέρη του υψηλού αναλυτή DNA και πρέπει να ενωθούν μεταξύ τους.

4.6 Εργαστήριο Γενετικής



Το ίδρυμα κατέχει ότι είναι πιο πιθανό το υψηλά ανεπτυγμένο εργαστήριο για γενετικές σπουδές του θαλάσσιου πληθυσμού στην Μεσόγειο και ένα από τα πιο καλά εξοπλισμένα σε ευρωπαϊκό επίπεδο. Οι συσκευές του περιλαμβάνουν:



Υψηλός –κάθε φορά αυτοματοποιημένος γενετικός αναλυτής (αποκρυπτογράφησης) BASESTATION 100



Μηχανή θερμικού κύκλου πραγματικού χρόνου (μηχανή PCR) DNA οπτική μηχανή



Σαρωτής (scanner) μικροπαράταξης GENEPIX



Αυτοματοποιημένος γενετικός αναλυτής (αποκρυπτογράφησης) VISTRA 725, Amersham



Ρομποτικός χειριστής δείγματος (BIOMEK 2000, BECKMAN)



Μηχανές 7 θερμικών κύκλων (PCR μηχανές), AB, MJ Έρευνα, Stratagene



Συσκευές ηλεκτροφόρησης ζελέ



Συσκευές αναφοράς ζελέ



Φυγοκεντρικές, συσκευές αποστείρωσης, και τα λοιπά

2 βαθιά ψυγεία (-80°C)

4.7 Γενετική αποτύπωση

Η PCR (αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης) περιλαμβάνει την άμβλυνση ειδικών περιοχών του DNA με τη χρήση ενός κύκλου θερμοκρασιών και ένα θερμοστατικό ένζυμο πολυμεράσης κατά μήκος της ακολουθίας ειδικών τμημάτων DNA. Εμπορικά σύνολα που χρησιμοποιούν απλούς πολυμορφισμούς νουκλεοτιδίων (SNPs) για διάκριση έγιναν διαθέσιμα. Αυτά τα σύνολα χρησιμοποιούν PCR για να αμβλύνει συγκεκριμένες περιοχές με γνωστές παραλλαγές και να δημιουργήσει υβρίδια με αυτά σε κάρτες, που έχει σαν αποτέλεσμα σε μια χρωματισμένη τελεία που αντιστοιχεί σε μια συγκεκριμένη παραλλαγή ακολουθίας.



Ο γενετικός αναλυτής εφαρμοσμένων βιοσυστημάτων 3130 xl είναι ένα δημοφιλές όργανο το οποίο μπορεί να εκτελέσει ηλεκτροφόρηση σωλήνων για να τυπώσει DNA.

Η ηλεκτροφόρηση σωλήνων λειτουργεί με ηλεκτροκινητική (κίνηση μέσω της εφαρμογής ηλεκτρικού πεδίου) είσοδο των τμημάτων DNA μέσα σε ένα λεπτό γυάλινο σωλήνα (capillary) γεμάτο με πολυμερές. Το DNA τραβιέται μέσα από το σωλήνα με την εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου, διαχωρίζοντας τα τμήματα έτσι ώστε τα μικρότερα τμήματα ταξιδεύουν γρηγορότερα μέσα από το σωλήνα. Τα τμήματα τότε ανιχνεύονται με τη χρήση φθορίζουσών βαφών που προσαρμόζονται στα κομμάτια που χρησιμοποιούνται στο PCR.

Αυτό επιτρέπει πολλαπλά τμήματα που αμβλύνονται και ρέουν ταυτόχρονα, κάτι που είναι γνωστό ως multiplexing. Τα μεγέθη προσδιορίζονται με χρήση σημασμένου DNA. Με μεγέθη καθορισμένα που προστίθενται σε κάθε δείγμα, και ο αριθμός των επαναλήψεων καθορίζεται από τη σύγκριση του μεγέθους με μία κλίμακα, ένα δείγμα που περιέχει όλα τα κοινά δυνατά επαναλαμβανόμενα μεγέθη. Παρόλο που αυτή η μέθοδος είναι ακριβή, μηχανές μεγαλύτερης χωρητικότητας, με υψηλότερη διατομή χρησιμοποιούνται για να μειωθεί το κόστος ανά δείγμα.

Η ηλεκτροφόρηση με ζελέ δρα με χρήση παρόμοιων αρχών σαν την ηλεκτροφόρηση σωλήνων (CE), αλλά αντί για τη χρήση σωλήνων, ένα μεγάλο ζελέ πολυακρυλαμιδίου χρησιμοποιείται για να διαχωρίσει τα τμήματα DNA. Ένα ηλεκτρικό πεδίο εφαρμόζεται όπως στην CE, αλλά αντί για ροή όλων των δειγμάτων κοντά σε έναν ανιχνευτή τα μικρότερα τμήματα ρέουν κοντά στη βάση του ζελέ και όλο το ζελέ διαβάζεται μέσα σε έναν υπολογιστή. Αυτό παράγει μία απεικόνιση που δείχνει όλες τις δέσμες που αντιστοιχούν σε διαφορετικά επαναλαμβανόμενα μεγέθη και την σκάλα.

Αυτή η προσέγγιση δεν απαιτεί τη χρήση καθορισμένων μεγεθών εφόσον η σκάλα ρέει κατά μήκος των δειγμάτων και εξυπηρετεί αυτό το σκοπό. Η οπτική απεικόνιση μπορεί να γίνει είτε μέσω της χρήσης φθορίζουσών βαφών σήμανσης στα τμήματα του DNA ή από σήμανση με ασημί ζελέ πριν από την ανάγνωση (scanning).

Παρόλο που είναι το κόστος αποτελεσματικό και μπορεί να είναι μάλλον υψηλό, τα σύνολα με την ασημένια σήμανση για τα STRs είναι μη συνεχιζόμενα. Επιπρόσθετα, πολλά εργαστήρια αφήνουν το ζελέ υπέρ της CE καθώς το κόστος των μηχανημάτων γίνεται πιο προσιτό.⁷⁸

4.8 Μηχανήματα ανάλυσης DNA

PCR Μηχανή



Αναλυτική HPLC



Αναλυτική HPLC με θερμοστάτη και 2-μηκών κύματος UV Ανιχνευτής



Αναλυτική HPLC με UV Ανιχνευτή



Αναλυτική HPLC με θερμοστάτη και UV Ανιχνευτή, Ανιχνευτής φθορισμού επιλεκτικός

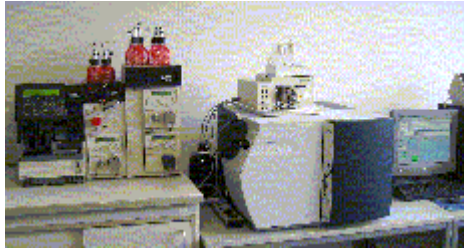


Αναλυτική HPLC με θερμοστάτη και παράταξη διόδων-ανιχνευτή



Αναλυτική και μικρού-διανοίγματος HPLC με UV-Ανιχνευτή

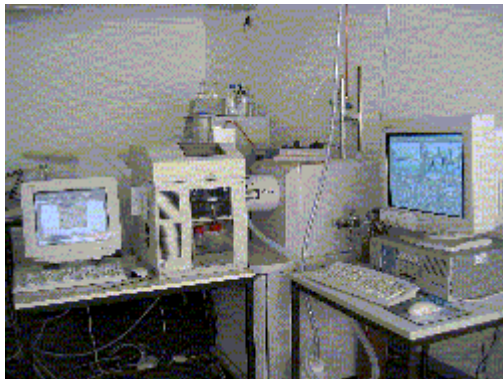
Χρωματογραφία υγρών-Φασματοσκοπία μάζας



Μονο- και δισδιάστατο Μικρο- και Νανο-HPLC Αυτοδείγμα, Σύνδεση, θερμοστάτη, UV-Ανιχνευτή και Φασματόμετρο μάζας πτώσης ιόντων



Μασκός Proteomic-Χρήστης τράπεζα δεδομένων

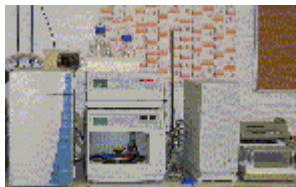


Ηλεκτροφόρηση σωλήνων συζευγμένος με Φασματόμετρο μάζας-με πτώση ιόντων



Ηλεκτροσπρέι-Χρόνου ροής Φασματοόμετρο μάζας

Προπαρασκευαστική HPLC

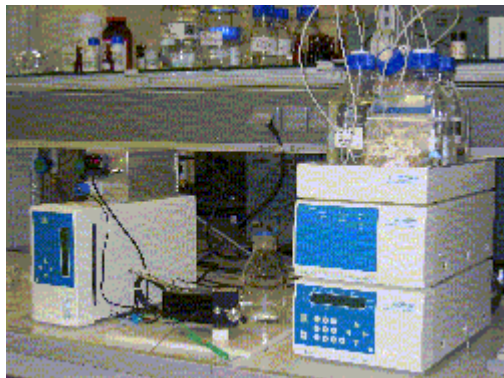


Προπαρασκευαστική Niederdruck-κλίσης HPLC με ανιχνευτή παράταξης δίοδων, Φασματοόμετρο μάζας και συλλέκτης κλασμάτων (Leihgerät των Fa. Dionex-Softron)

Μικρο-και Νανο-HPLC



Χαμηλής πίεσης-κλίσης Μικρο- και Νανο-HPLC με T-Αγκίδι, ίδιο χτίσιμο-Μινιθερμοστάτης και UV-Ανιχνευτής



Χαμηλής πίεσης-κλίση Μικρο- και Νανο-HPLC με T-αγκίδι, ίδιο χτίσιμο-Μινιθερμοστάτης και UV-Ανιχνευτής



Υψηλής πίεσης-Κλίσης Μικρο- και Νανο-HPLC με T-αγκίδι, ίδιο χτίσιμο-Μινιθερμοστάτης και UV-Ανιχνευτής.



Μικρο- και Νανο HPLC συμπιεσμένο σύστημα με Αυτόδειγμα



Μικρο- και Νανο HPLC Συμπιεσμένο σύστημα με αυτόδειγμα
(Leihgerät της Εταιρείας Dionex-LC Packings)

Ηλεκτροφόρηση σωλήνων, Ηλεκτροχρωματογραφία σωλήνων



Σύστημα ηλεκτροφόρησης σωλήνων με Ανιχνευτή παράταξης διόδων

Σύστημα ηλεκτροφόρησης σωλήνων με Ανιχνευτή παράταξης διόδων



Ισοκρατική Ηλεκτροφόρηση σωλήνων με Ανιχνευτή παράταξης διόδων

Κλίσης-Ηλεκτροχρωματογράφος σωλήνων με 50 KV μέρος δικτύου

Διάφορα Μηχανήματα



CHN-Στοιχειώδης αναλυτής



PCR Θερμικός κύκλος και Θερμικός αναμεικτήρας



Χρωματογράφος αερίων με Ανιχνευτή φλόγας



Χρωματογράφος αερίων με Επιλεκτικό Ανιχνευτή μάζας.⁷⁹

ΕΠΙΛΟΓΟΣ

Η ανατολή του 21^{ου} αιώνα έχει επιφέρει πολλές και σημαντικές αλλαγές στον τεχνολογικό, πολιτιστικό και επιστημονικό τομέα. Συγχρόνως όμως και πολλά ερωτήματα που μας απασχολούν. Ερωτήματα για τη χρησιμότητα, αναγκαιότητα αλλά και του αποτελέσματος του ό,τι καινούργιου. Πάντα δεν υπάρχει ο σκεπτικισμός και η επιφύλαξη απέναντι στο καινούριο; Εξάλλου τα παραδείγματα από το παρελθόν είναι πολλά. Οι πολέμοι της εξέλιξης θα αναφέρουν την ατομική ενέργεια με τα γνωστά της αποτελέσματα. Απ' την άλλη όμως η ανακάλυψη των εμβολίων ή των αντιβιοτικών δεν έσωσε ζωές; Η παρακάτω γελοιογραφική άποψη για τους εμβολιασμούς του Edward Jenner (Αμερικανός γιατρός που πραγματοποίησε τον πρώτο εμβολιασμό ενάντια της ευλογιάς) δίνει με χιούμορ τη δυσπιστία:



Η ευλογία όμως σήμερα δεν είναι μία ασθένεια που έχει εξαλειφθεί;

Ερωτήματα πάντα θα αναζητούν απαντήσεις. Μόνο η ειρηνική συνύπαρξη του ανθρώπινου παράγοντα και η συμφιλίωση του με τη ραγδαία εξέλιξη της επιστήμης, αποτελούν εγγύηση για τη διαίωνιση, τη βελτίωση των συνθηκών διαβίωσης και την εξάλειψη πολλών ανιάτων ως τώρα ασθενειών, όπως ο καρκίνος.

«περάσαμε κάβους πολλούς, πολλά νησιά, τη θάλασσα που φέρνει άλλη θάλασσα.....»

Γιώργος Σεφέρης

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Μ.Α. Μαλγαρινού – Σ.Φ. Κωνσταντινίδου: «Νοσηλευτική Παθολογική – Χειρουργική», Τόμος Β', Μέρος 2^ο – Έκδοση 19^η, Εκδόσεις «η Ταβιθά», Αθήνα 2000.
2. M. Rolinger – E. Rosenbaum – G. Gagle: «Ο Καρκίνος, διάγνωση και πρόληψη, θεραπεία και καθημερινή αντιμετώπιση, ένας οδηγός για όλους», Μετάφραση Παντελής Μπουκαλάς – Έκδοση 1^η, Εκδόσεις «Κάτοπτρο», Αθήνα 1992.
3. Χ.Μ. Μουτσόπουλος – Δ.Σ. Εμμανουήλ: «Βασικές Αρχές Παθοφυσιολογίας», Εκδόσεις «Λίτσας», Αθήνα 1998.
4. Ε. Καρπουχτή: «Ογκολογική Νοσηλευτική», Σημειώσεις για τους φοιτητές ΑΤΕΙ Πατρών, Πάτρα 2003.
5. Ι.Δ. Σπηλιώτης: «Καρκίνος, από την άγνοια... στο φόβο», Αχαϊκές Εκδόσεις, Πάτρα 1999.
6. Γ.Α. Κατράκης: «Πρόληψη, έγκαιρη διάγνωση και διαφυγή από τον καρκίνο», Βιβλίο 2^ο – Εκδόσεις «ΕΕΠΙ», Αθήνα 1980.
7. Wilkins MR, Sanchez JC, Gooley AA, Appel RD, Humphery-Smith I, Hochstrasser DF et al. Progress with proteome projects. Why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. *Biotechnol Genet Eng Rev* 1996;13:19-50.
8. Wilkins MR, Sanchez JC, Williams KL, Hochstrasser DF. Current challenges and future applications for protein maps and post-translational vector maps in proteome projects. *Electrophoresis* 1996;17:830-8.
9. Reynolds. T. For proteomics research, a new race has begun. *J Natl Cancer Inst* 2002;94:552-4.
10. Verma M, Wright GL Jr, Hanash SM, Gopal-Srivastava R, Srivastava S. Proteomic approaches within the NCL early detection research network for the discovery and identification of cancer biomarkers. *Ann N Y Acad Sci* 2001;945:103-15.
11. Pandey A. Proteomics to study genes and genomes. *Nature* 2000;405:837-46.
12. Wulfschuhle JD, McLean KC, Pawletz CP, Sgroi DC, Trock BJ, Steeg PS et al. New approaches to proteomic analysis of breast cancer. *Proteomics* 2001;1:1205-15.

13. Jenkins RE, Pennington SR. Arrays for protein expression profiling: towards a viable alternative to two-dimensional gel electrophoresis? *Proteomics* 2001;1:13-29.
14. Gavin AC, Bosche M, Krause R, Grandi P, Marzioch M, Bauer A et al. Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. *Nature* 2002;15:141-7.
15. Ho Y, Gruhler A, Heilbut A, Bader GD, Moore L, Adams SL et al. Systematic identification of protein complexes in *Saccharomyces cerevisiae* by mass spectrometry. *Nature* 2002;415:180-3.
16. Yates JR, 3rd , Carmack E, Hays L, Link AJ, Eng JK. Automated protein identification using microcolumn liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Meth Mol Biol* 1999;112:553-69.
17. Yates JR, 3rd , McCormack AL, Schieltz D, Carmack E, Link A. Direct analysis of protein mixtures by tandem mass spectrometry. *J Protein Chem* 1997;16:495-7.
18. Dongre AR, Eng JK, Yates JR, 3rd . Emerging tandem-mass-spectrometry techniques for the rapid identification of proteins. *Trends Biotechnol* 1997;15:418-25.
19. Issaq HJ, Veenstra TD, Conrads TP, Felschow D, The SELDI-TOF MS approach to proteomics: protein profiling biomarker identification. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;292:587-92.
20. Wu WGTX, Hu W, Lotan R, Hong WK, Mao L. Identification of metastasis-associated protein in head and neck cancer cell lines by two dimensional electrophoresis and mass spectrometry. *Clin Exp Metastasis* 2002;19:319-26.
21. Lisacek FC, Traini MD, Sexton D, Harry JL, Wilkins MR. Strategy for protein isoform identification from expressed sequence tags and its application to peptide mass fingerprinting. *Proteomics* 2001;1:186-93.
22. Harry JL, Wilkins MR, Herbert BR, Packer NH, Gooley AA, Williams KL. Proteomics: capacity versus utility. *Electrophoresis* 2000;21:1071-81.
23. Corthals GL, Wasinger VC, Hochstrasser DF, Sanchez JC. The dynamic range of protein expression: a challenge for proteomic research. *Electrophoresis* 2000;21:1104-15.
24. Neuhoff V, Arold N, Taube D, Ehrhardt W. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including iso-electric focusing gels with clear background at

- nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. Electrophoresis 1988;9:255-62.
25. Gypi SP, Corthals GL, Zhang Y, Rochon Y, Aebersold R. Evaluation of two-dimensional gel electrophoresis-based proteome analysis technology. Proc Natl Acad Sci USA 2000;97:9390-5.
 26. Vuong GL, Weiss SM, Kammer W, Priemer M, Vingron M, Nordheim A et al. Improved sensitivity proteomics by postharvest alkylation and radioactive labelling of proteins. Electrophoresis 2000;1:2594-605.
 27. Kameshita I, Ishida A, Fujisawa H. Analysis of protein-protein interaction by two-dimensional affinity electrophoresis. Anal Biochem 1998;262:90-2.
 28. Hoving S, Voshol H, van Oostrum J. Towards high performance two-dimensional gel electrophoresis using ultrazoom gels. Electrophoresis 2000;1:2617-21.
 29. Link AJ, Eng J, Schieltz DM, Carmack E, Mize GJ, Morris DR et al. Direct analysis of protein complexes using mass spectrometry. Nat Biotechnol 1999;17:676-82.
 30. Liu H, Lin D, Yates JR, 3rd. Multidimensional separations for protein/peptide analysis in the post-genomic era. Biotechniques 32:898,900,2 passim.
 31. Wolters DA, Washburn MP, Yates JR, 3rd. An automated multidimensional protein identification technology for shotgun proteomics. Anal Chem 2001;73:5683-90.
 32. Washburn MP, Wolters D, Yates JR, 3rd. Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. Nat Biotechnol 2001;9:242-7.
 33. Figeys D, Pinto D. Proteomics on a chip: promising developments. Electrophoresis 2001;22:208-16.
 34. MacBeath G, Schreiber SL. Printing proteins as microarrays for high-throughput function determination. Science 2000;289:1760-3.
 35. Zhu H, Bilgin M, Bangham R, Hall D, Casamayor A, Bertone P et al. Global analysis of protein activities using proteome chips. Science 2001;293:2101-5.
 36. Zhu H, Klemic JF, Chang S, Bertone P, Casamayor A, Klemic KG et al. Analysis of yeast protein kinases using protein chips. Nat Genet 2000;6:283-9.
 37. Yanagida M, Shimamoto A, Nishikawa K, Furuichi Y, Isobe T, Takahashi N. Isolation and proteomic characterization of the major proteins of the nucleolin-binding ribonucleoprotein complexes. Proteomics 2001;1:1390-404.

38. Pinol-Roma S. Association of nonribosomal nucleolar proteins in ribonucleoprotein complexes during inter-phase and mitosis. *Mol Biol Cell* 1999;10:77-90.
39. Fields S, Song O. A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 1989;340:245-6.
40. Oliver S. Guilt-by-association goes global. *Nature* 2000;403:601-3.
41. Joung JK, Ramm EI, Pabo CO. A bacterial two-hybrid selection system for studying protein-DNA and protein-protein interactions. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:7382-7.
42. Kaufmann H, Bailey JE, Fussenegger M. Use of antibodies for detection of phosphorylated proteins separated by two-dimensional gel electrophoresis. *Proteomics* 2001;1:194-9.
43. Yaanagida M, Miura Y, Yagasaki K, Taoka M, Isobe T, Takahashi N. Matrix assisted laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry analysis of proteins detected by anti-phosphotyrosine antibody on two-dimensional-gels of fibroblast cell lysates after tumor necrosis factor-alpha stimulation. *Electrophoresis* 2000;21:1890-8.
44. Pandey A, Podtelejnikov AV, Blagoev B, Bustelo XR, Mann M, Lodish HF. Analysis of receptor signaling pathways by mass spectrometry: identification of vav-2 as a substrate of the epidermal and platelet-derived growth factor receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:179-84.
45. Banks RE, Dunn MJ, Forbes MA, Stanley A, Pappin D, Naven T et al. The potential use of laser capture micro-dissection to selectively obtain distinct populations of cells for proteomic analysis-preliminary findings. *Electrophoresis* 1999;20:689-700.
46. Craven RA, Banks RE. Laser capture microdissection and proteomics: possibilities and limitation. *Proteomics* 2001;1:1200-4.
47. Craven RA, Totty N, Harnden P, Selby PJ, Banks RE. Laser capture microdissection and two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis: evaluation of tissue preparation and sample limitations. *Am J Pathol* 2002;160:815-22.
48. Petricoin EF, Ardekani AM, Hitt BA, Levine PJ, Fusaro VA, Steinberg SM et al. Use of proteomic patterns in serum to identify ovarian cancer. *Lancet* 2002;359:572-7.

49. Best CJ, Gillespie JW, Englert CR, Swalwell JI, Pfeifer J, Krizman DB et al. New approaches to molecular profiling of tissue samples. *Anal Cell Pathol* 2000;20:1-6.
50. Pawletz CP, Liotta LA, Petricoin EF, 3rd . New technologies for biomarker analysis of prostate cancer progression: Laser capture microdissection and tissue proteomics. *Urology* 2001;57:160-3.
51. Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Barlund M, Schraml P, Leighton S et al. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med* 1998;4:844-7.
52. Kallioniemi OP, Wagner U, Kononen J, Sauter G. Tissue microarray technology for high-throughput molecular profiling of cancer. *Hum Mol Genet* 2001;10:657-62.
53. Barlund M, Forozan F, Kononen J, Bubendorf L, Chen Y, Bittner ML et al. Detecting activation of ribosomal protein S6 kinase by complementary DNA and tissue microarray analysis. *J Nalt Cancer Inst* 2000;92:1252-9.
54. Hedenfalk I, Duggan D, Chen Y, Radmacher M, Bittner M, Simon R et al. Gene-expression profiles in hereditary breast cancer. *N Engl J Med* 2001;344:539-48.
55. Bubendorf L, Kononen J, Koivisto J, Schraml P, Moch H, Gasser TC et al. Survey of gene amplifications during prostate cancer progression by high-throughout fluorescence in situ hybridization on tissue microarrays. *Cancer Res* 1999;59:803-6.
56. Bubendorf L, Kolmer M, Kononen J, Koivisto P, Mousses S, Chen Y et al. Hormone therapy failure in human prostate cancer: analysis by complementary DNA and tissue microarrays. *J Nalt Cancer Inst* 1999;91:1758-64.
57. Bowen C, Bubendorf L, Voeller HJ, Slack R, Willi N, Sauter et al. Loss of NKX3.1 expression in human prostate cancers correlates with tumor progression. *Cancer res* 2000;60:6111-5.
58. Schraml P, Kononen J, Bubendorf L, Moch H, Bissig H, Nocito A et al. Tissue microarrays for gene amplification surveys in many different tumor types. *Clin Cancer Res* 1999, 1966-75.
59. Andersen CL, Monni OM, Kononen J, Barlund M, Bucher C, Hass P, Nocicito A, Bissig H, Sauter G, Kallioniemi OP. High-throughput gene copy number analysis in 4700 tumors: FISH analysis on tissue microarrays identifies multiple tumor

- types with amplification of the MB-174 gene, a novel amplified gene originally found in breast cancer. *Am J Hum Genet* 2000;67:448.
- 60.** Hoos A, Urist MJ, Stojadinovic A, Mastorides S, Dudas ME, Leung DH et al. Validation of tissue microarrays for immunohistochemical profiling of cancer specimens using the example of human fibroblastic tumors. *Am J Pathol* 2001;158:1245-51.
- 61.** Liotta LA, Kohn EC, Petricoin EF. Clinical proteomics: personalized molecular medicine. *JAMA* 2001;286:2211-4.
- 62.** Herrmann PC, Liotta LA, Petricoin EF, 3rd. Cancer proteomics: the state of the art. *Dis Markers* 2001;7:49-57.
- 63.** Jain KK. Applications of proteomics in oncology. *Pharmacogenomics* 2000;1:385-93.
- 64.** Srinivas PR, Srivastava S, Hanash S, Wright GL Jr. Proteomics in early detection of cancer. *Clin Chem* 2001;47:1901-11.
- 65.** Hanash SM, Madoz-Gurpide J, Misek DE. Identification of novel targets for cancer therapy using expression proteomics. *Leukemia* 2002;16:478-85.
- 66.** Marklund U, Larsson N, Gradin HM, Brattsand G, Gullberg M. Oncoprotein 18 is a phosphorylation-responsive regulator of microtubule dynamics. *Embo J* 1996;15:5290-8.
- 67.** Melhem R, Hailat N, Kuick R, Hanash SM. Quantitative analysis of Op18 phosphorylation in childhood acute leukemia. *Leukemia* 1997;11:1690-5.
- 68.** Iancu C, Mistry SJ, Arkin S, Atweh GF. Taxol and antistathmin therapy: a synergistic combination that targets the mitotic spindle. *Cancer Res* 2000;60:3537-41.
- 69.** Jeha S, Luo XN, Beran M, Kantarjian H, Atweh GF. Antisense RNA inhibition of phosphoprotein p18 expression abrogates the transformed phenotype of leukemic cells. *Cancer Res* 1996;56:1445-50.
- 70.** Jones MB, Krutzsch H, Shu H, Zhao Y, Liotta LA, Kohn EC et al. Proteomic analysis and identification of new biomarkers and therapeutic targets for invasive ovarian cancer. *Proteomics* 2002;2:76-84.
- 71.** Hu W, Wu WG, Yeung SCJ, Kavanagh JJ, Freedman RS, Mao L, Verschraegen CF. Increased expression of HSP 70 in ovarian cancer cell line following treatment with FTI. *Anticancer Res* 2002;22:665-72.

72. Σταύρος Σ. Μπεσμπέας, Καθηγητής Χειρουργικής, Πρόεδρος Ελληνικής Αντικαρκινικής Εταιρίας. Περιοδικό ΟΓΚΟΛΟΓΙΚΗ ΕΝΗΜΕΡΩΣΗ (τεύχος 3, τόμος 8) Γενετική του καρκίνου.
73. Narod SA, Foulkes WD. BRCA1 and BRCA2: 1994 and beyond. Nat Rev Cancer 2004.
74. King MC, Marks JB, New York Breast Cancer Study Group. Breast and ovarian cancer risks due to inherited mutations in BRCA1 and BRCA2. Science 2003.
75. <http://www.proteome.com/databases/index.html> [20/5/2006]
76. <http://www.nytimes.com> [20/5/2006]
77. <http://www.genomenewsnetwork.org> [18/12/2006]
78. <http://www.llnl.gov/ftt/balch.html> [1/3/2007]
79. http://www.uni-saarland.de/fak8/huber/gcms_2004.jpg [18/12/2006]