



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ  
ΠΑΤΡΩΝ  
UNIVERSITY OF PATRAS

# Μοριακές Τεχνικές Παιδιατρικής Ενδοκρινολογίας Και Ενδοκρινολογίας Αναπαραγωγής

Βίκη Κόικα  
Βιολόγος MSc, PhD

Πάτρα 2017

# Μοριακή διάγνωση

Η χρήση τεχνικών **μοριακής βιολογίας** για να επεκτείνει την επιστημονική γνώση της φυσικής ιστορίας των ασθενειών, στον εντοπισμό των ατόμων που βρίσκονται σε κίνδυνο για την απόκτηση συγκεκριμένων ασθενειών, και τη διάγνωση των ανθρώπινων νόσων σε επίπεδο νουκλεϊκών οξέων.

# Μοριακή διάγνωση

Μοριακή διαγνωστική συνδυάζει την *εργαστηριακή ιατρική* με τη γνώση και την τεχνολογία της μοριακής γενετικής και έχει φέρει επανάσταση κατά τη διάρκεια των τελευταίων δεκαετιών, που επωφελούνται από τις ανακαλύψεις στο πεδίο της μοριακής βιολογίας.

- Το ποσοστό της ανακάλυψης γονιδίων που προκαλούν νόσο αυξάνεται με γεωμετρική πρόοδο, η οποία διευκολύνει την κατανόηση των ασθενειών σε μοριακό επίπεδο
- Μοριακή κατανόηση της ασθένειας μεταφράζεται σε διαγνωστικές εξετάσεις, θεραπευτική, και τελικά προληπτικές θεραπείες

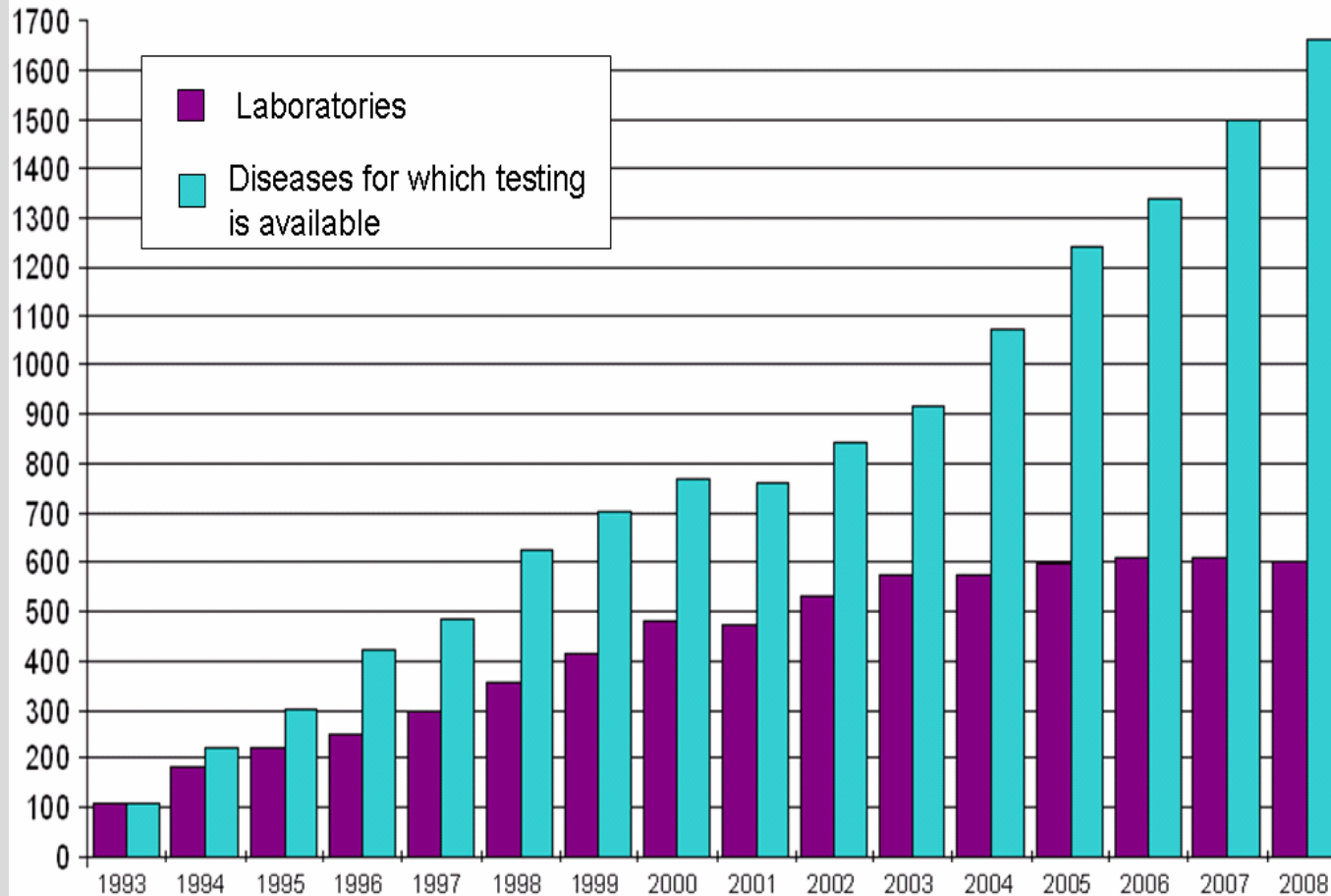
# Μοριακή διάγνωση

Μοριακή διάγνωση των ανθρώπινων διαταραχών αναφέρεται ως

- η ανίχνευση διαφόρων παθογόνων μεταλλάξεων στο DNA και / ή RNA
- η γονοτύπηση
- η παρουσία γενετικού υλικού εξωγενών παθογόνων παραγόντων

προκειμένου να διευκολυνθεί η ανίχνευση, η διάγνωση, υπο-ταξινόμηση, πρόγνωση, και παρακολούθηση της απόκρισης σε θεραπεία.

# Αύξηση του αριθμού των διαγνωστικών τεστ που σχετίζονται με νοσήματα



Data source: GeneTests database (2008) / [www.genetests.org](http://www.genetests.org)

# Τεχνικές

```
graph TD; A[Τεχνικές] --> B[DNA/RNA]; A --> C[Πρωτεΐνες]
```

## DNA/RNA

PCR (αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης)

Real time PCR

Sequencing

Μικροσυστοιχίες DNA (DNA arrays/microchips)

Fluorescent In situ hybridization (FISH)

RNA protection assay

*Southern blot*

*Northern blot*

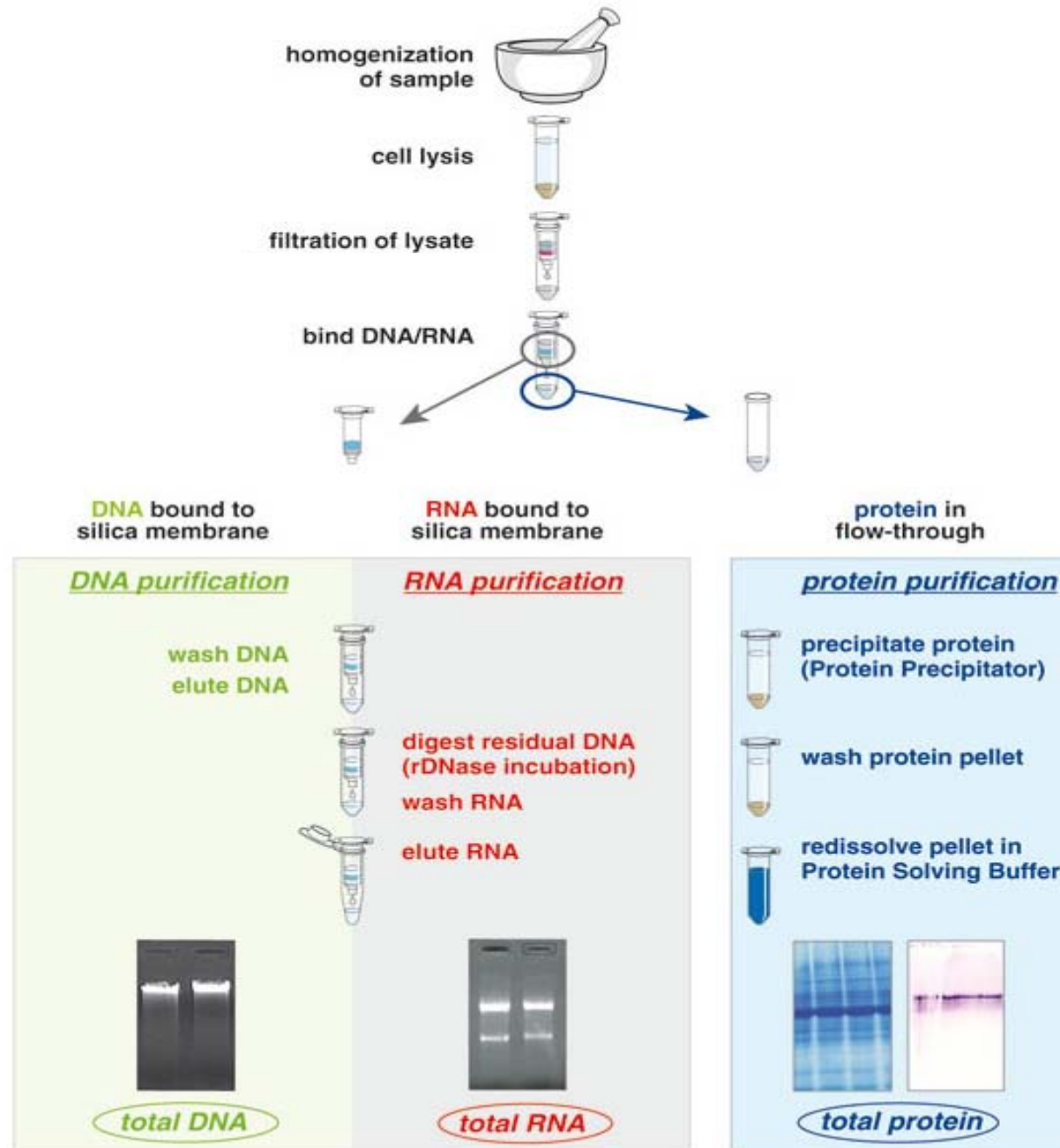
## Πρωτεΐνες

Western blot

ELISA

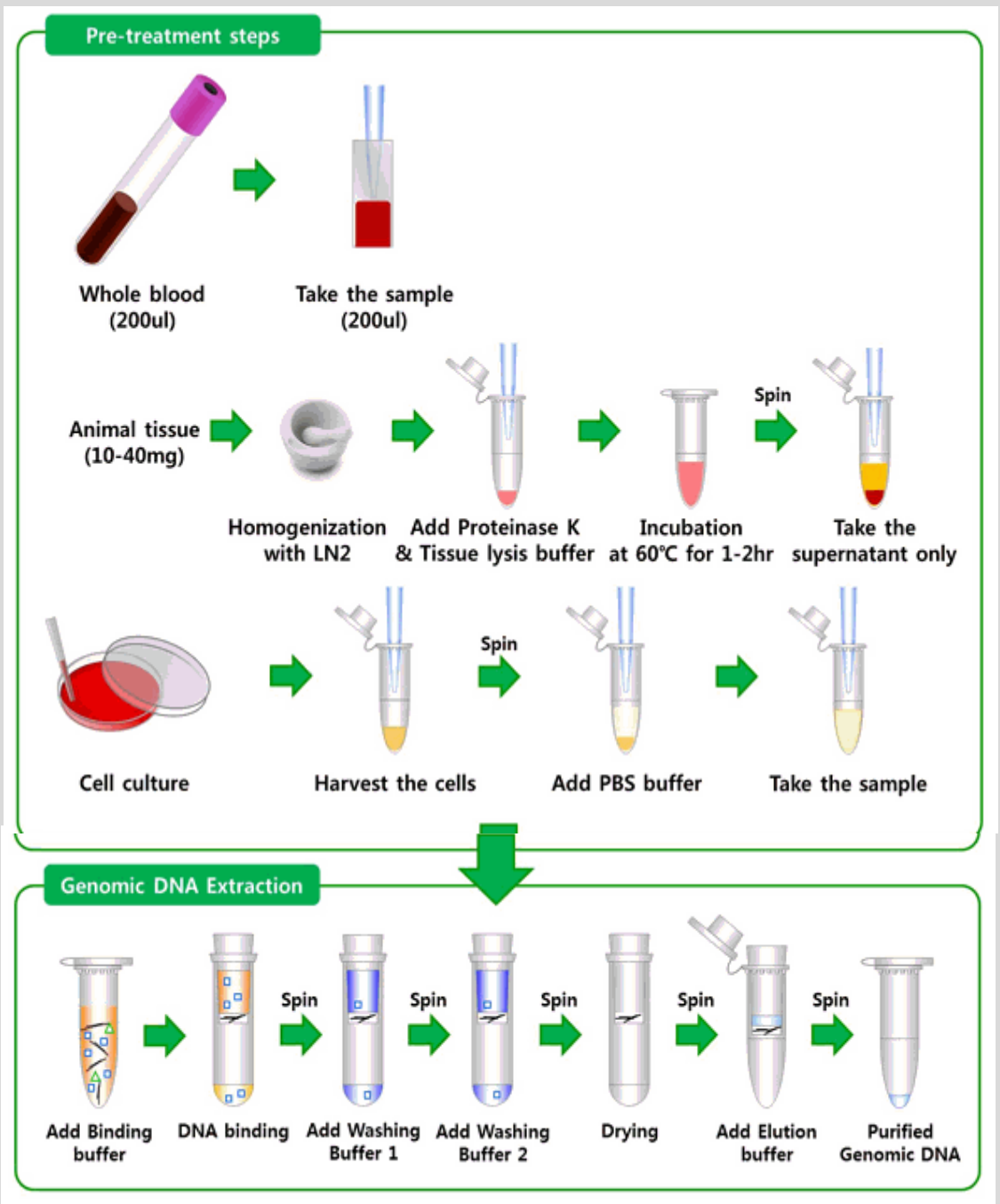
Immunocytochemistry

# Απομόνωση





# Απομόνωση DNA

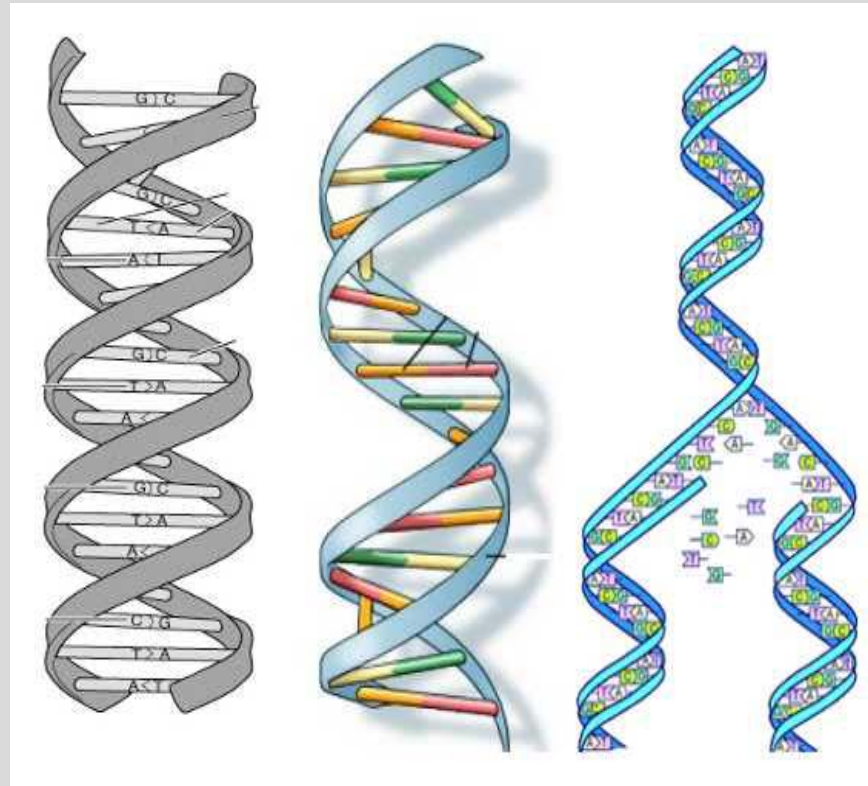


## PCR (polymerase chain reaction)



Επιλεκτικός  
πολλαπλασιασμός μιας  
γνωστής αλληλουχίας

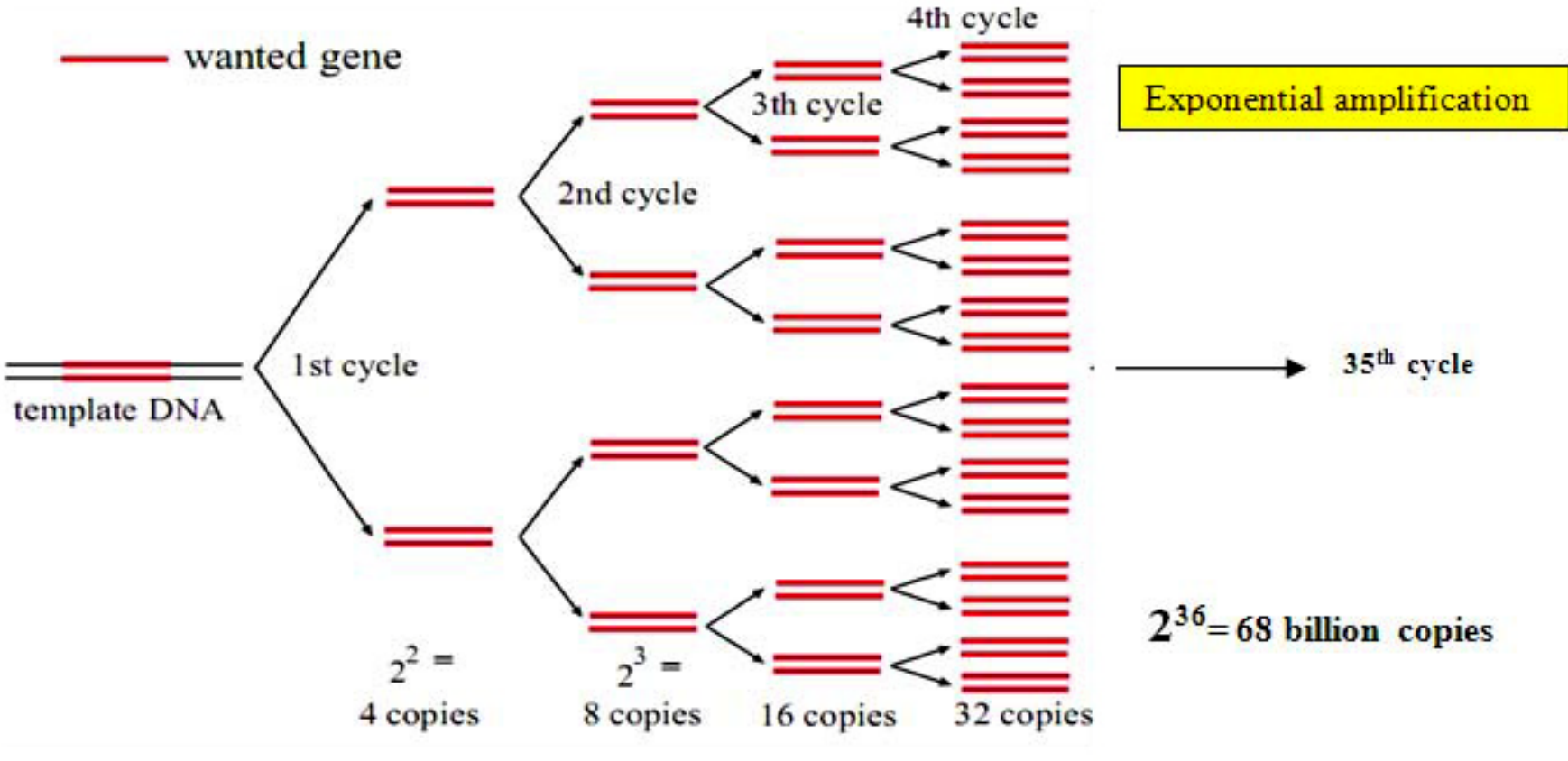
# Δομή DNA

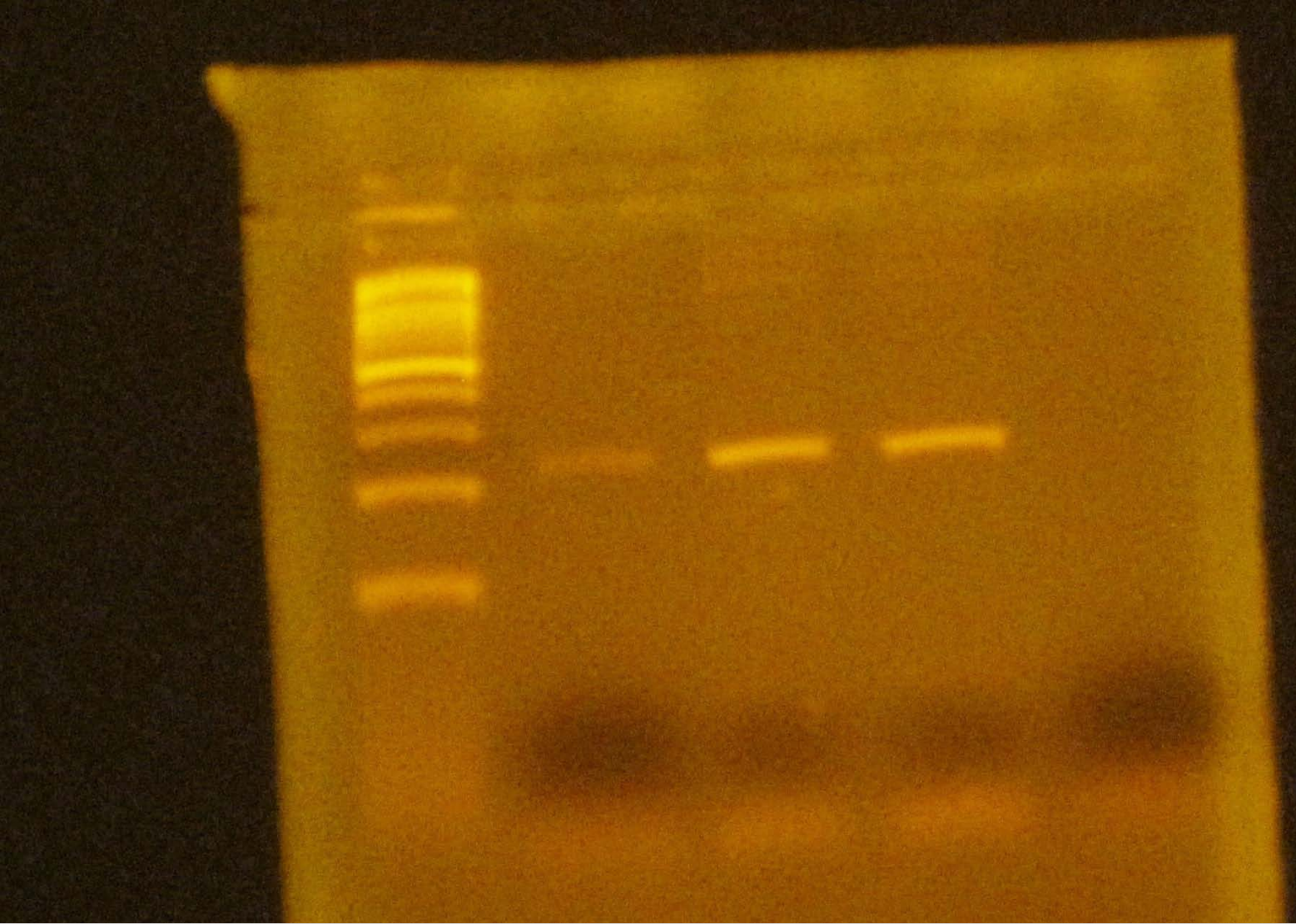


Adenine Thymine

Guanine Cytosine

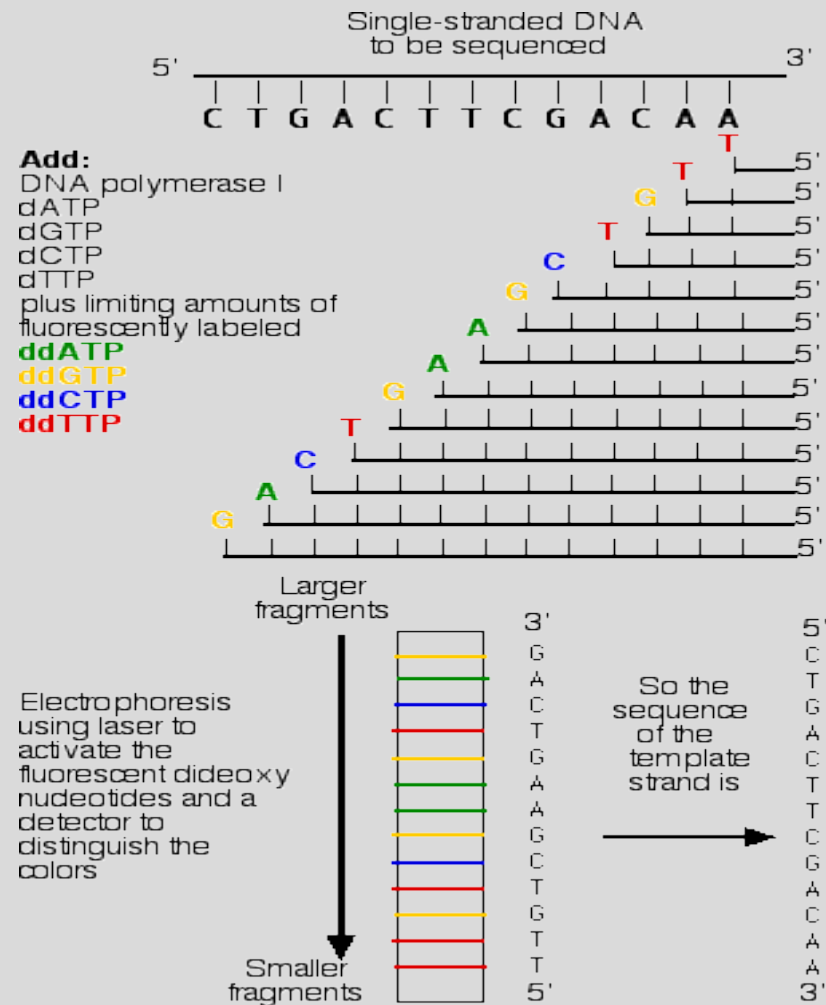
# Polymerase chain reaction - PCR







# Αλληλούχιση (Sequencing) για ανίχνευση άγνωστων μεταλλάξεων στο γενετικό υλικό

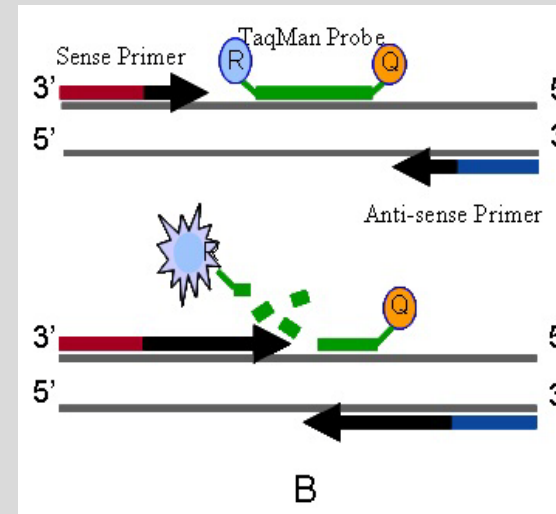
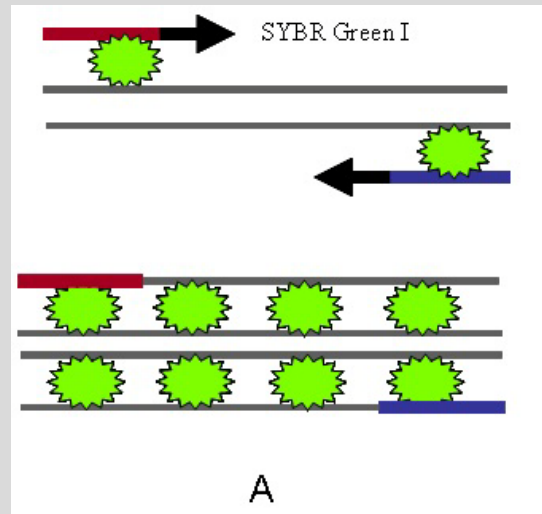


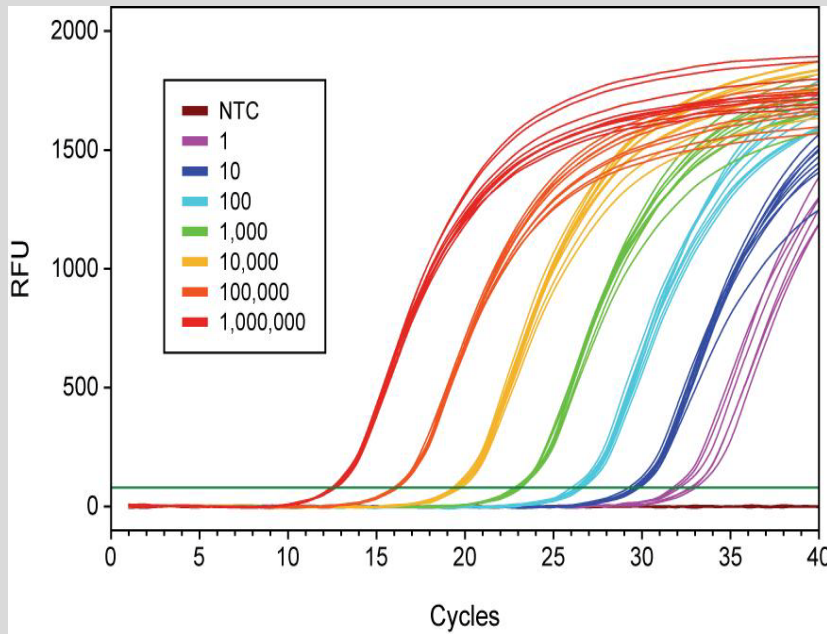


# Real time PCR

Βασίζεται στην ανίχνευση και ποσοτικοποίηση του φθορισμού που εκπέμπεται από ειδικά **φθοριοχρώματα**

Ένα **φθοροφόρο** (ή **φθοριόχρωμα**, παρόμοια με ένα χρωμοφόρο) είναι μία φθορίζουσα χημική ένωση που μπορεί να ξανα-εκπέμπει φως μετά από διέγερση με φως. Τα φθοροφόρα συνήθως περιέχουν αρκετές συνδυασμένες αρωματικές ομάδες, ή κυκλικά μόρια με πολλούς π δεσμούς.



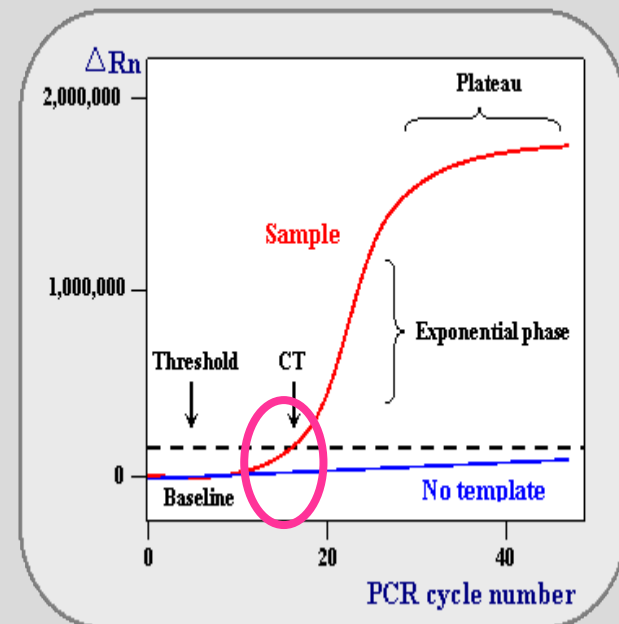


- ❖ Genotyping
- ❖ Presence or absence of a specific DNA

## Quantification

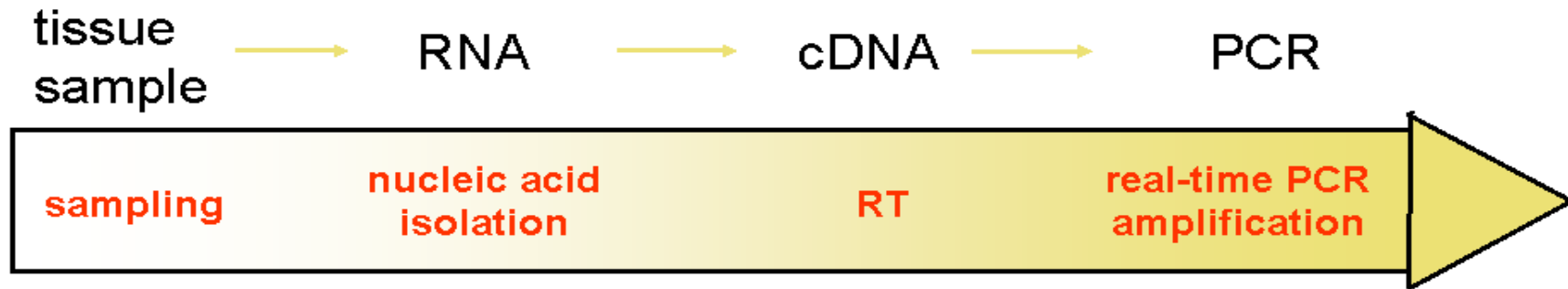
crossing points ( $C_p$ ) or cycle threshold values ( $C_t$ )

Model of real time quantitative PCR plot





## Steps and variables of a successful mRNA quantification using real-time RT-PCR (1)



### Sampling method:

- Biopsy
  - Fixed material
  - Fresh blood
  - Tissue storage
  - Liquid Nitrogen
  - RNA Later
  - 1<sup>st</sup> extraction buffer
  - RNA storage -80°C
- => **native RNA**

### Extraction method:

- total RNA
  - mRNA
  - microRNA
- liquid-liquid
- columns
- Robot vs. hand made
- **RNA integrity:**
  - Bioanalyzer 2100
  - Experion
  - Nano-Drop
  - mFold algorithm

### Efficiency of RT:

- RT enzyme type
- RT temperature
- **Primers:**
  - poly-T Primer
  - Random-hexamers
  - Specific primer
  - Primer mixtures
- **one-step qRT-PCR**
- **two-step RT-qPCR**

### PCR Efficiency / Specificity:

- Primer design
  - Primer specificity
  - Consensus Primer
- mRNA abundance
- RNA / cDNA input
- Polymerase types
- Polymerase Mixtures
- PCR Inhibitors & Enhancers
- Robot vs. hand made

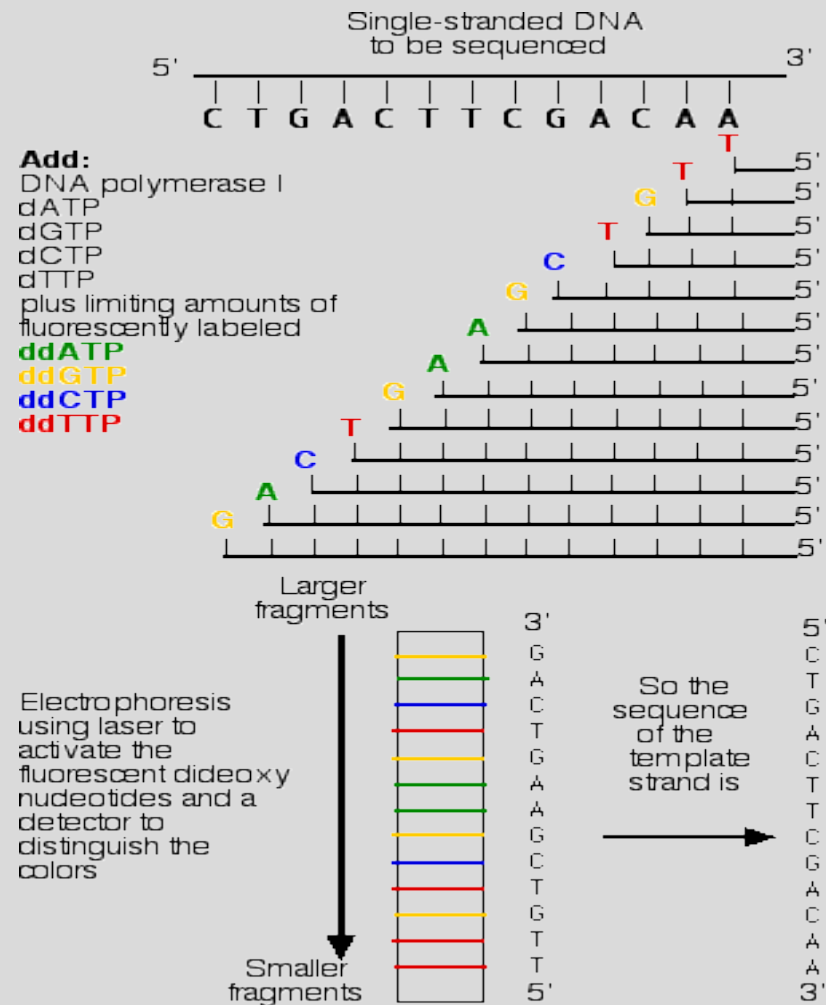
## Advantages of real-time PCR:

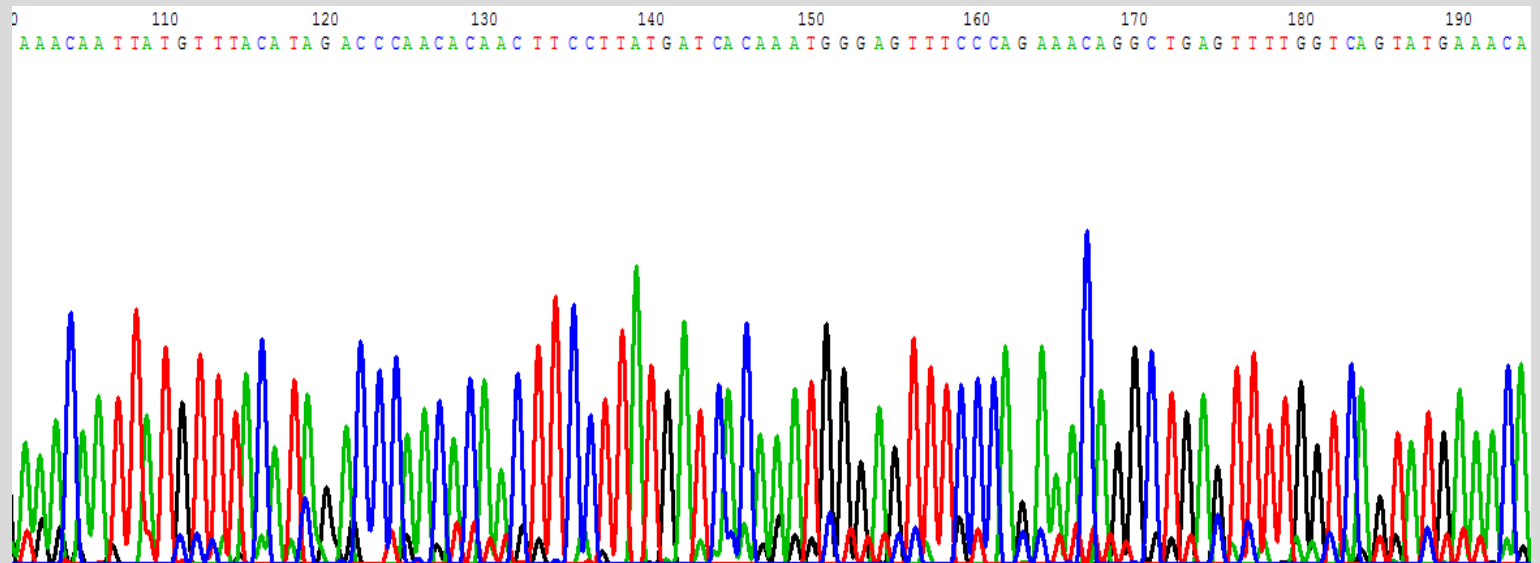
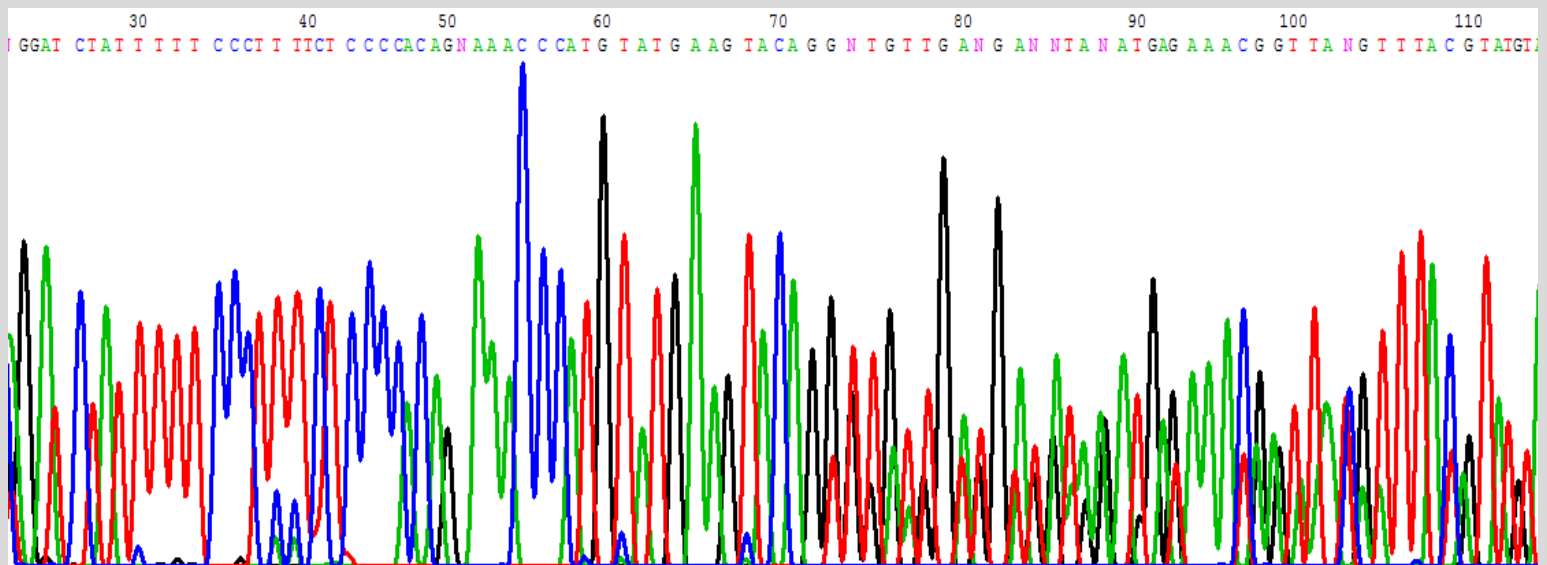
- Increased dynamic range of detection
- No post-PCR processing
- *Detection is capable down to a 2-fold change*
- Collects data in the exponential growth phase of PCR
- *An increase in reporter fluorescent signal is directly proportional to the number of amplicons generated*
- The cleaved probe provides a permanent record amplification of an amplicon

## Disadvantages of traditional PCR:

- Poor Precision
- *Low sensitivity*
- Short dynamic range < 2 logs
- Low resolution
- Non-automated
- Size-based discrimination only
- *Results are not expressed as numbers*
- Ethidium bromide for staining is not very quantitative
- Post-PCR processing

# Αλληλούχιση (Sequencing) για ανίχνευση άγνωστων μεταλλάξεων στο γενετικό υλικό





# P450 oxidoreductase deficiency

Cytochrome P450 oxidoreductase deficiency (PORD); (OMIM: 613571 and OMIM: 201750) is a form of congenital adrenal hyperplasia

a disorder in the electron donor for  $17\alpha$ -hydroxylase, 17,20 lyase, and 21-hydroxylase, called P450 oxidoreductase

- Ασθενής ♂ 36 ετών
- Προσήλθε στο εξωτερικό ιατρείο Ενδοκρινολογίας Αναπαραγωγής για έλεγχο **υπογονιμότητας**.
- Έγγαμος από 7 ετίας
- Ο τοκετός χωρίς επιπλοκές
- Χειρουργηθείσα **κρυπορχία** σε ηλικία 8 ετών.
- Ακολούθησε πολλαπλές θεραπείες με τεστοστερόνη.

# Οικογενειακό ιστορικό:

Ελεύθερο

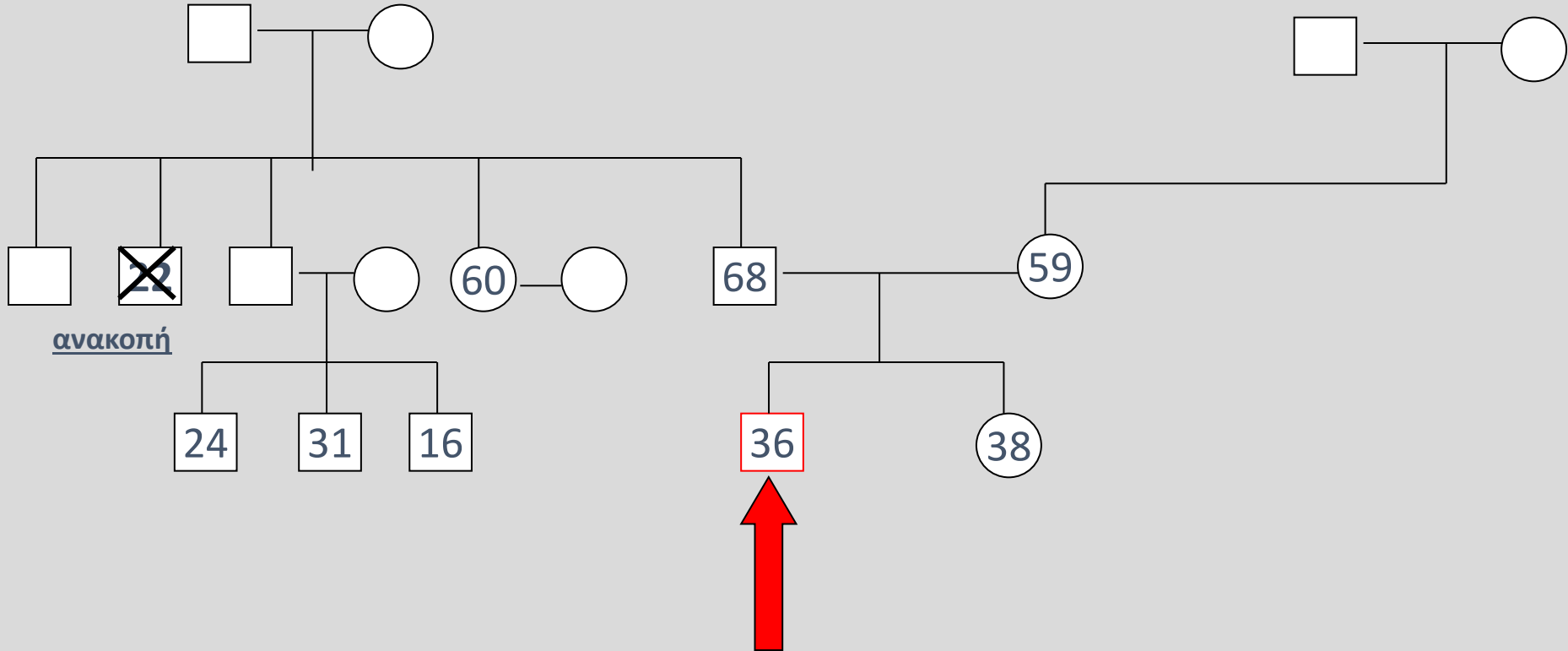
φυσιολογική εγκυμοσύνη

Μητέρα:

Πατέρας: υγιής

1 αδελφή: υγιής

Είναι ο δεύτερος απόγονος μιας οικογένειας **χωρίς αναφερόμενη ενδογαμία**



# Αντικειμενική εξέταση :

- Α.Π.: 120/ 80 mmHg αλλά σε συνεχείς μετρήσεις: **ήπια υπέρταση**
- ΣΦ.:80/min
- Ύψος: 180 cm
- Βάρος: 89 Kg
- BMI: 27
- **Ευθυρεοειδικός**
- **Χωρίς γυναικομαστία**
- **Τρίχωση:**
  - ✓ Μασχάλης: AIII
  - ✓ Τρίχωση στο υπόλοιπο σώμα (πρόσωπο, στήθος, θώρακας, άνω και κάτω ραχιαία χώρα, άνω και κάτω κοιλιακή χώρα, άνω άκρο, μηρός): κ.φ.
  - ✓ Τρίχωση του εφηβαίου: Tanner V



# 1) Έλεγχος υπέρτασης - ηλεκτρολυτών

**Αρτηριακή πίεση:** 155-100 (20:30)  
140-90 (21:10)  
150-90 (20:50)  
135-90 (09:45)

**Ηλεκτρολύτες:** Κ: 4.56, 4.18 (ΦΤ : 3.5-5.5)  
Να: 144.9, 134.6 (ΦΤ :135-145)

## 2) Εργαστηριακός έλεγχος:

	<u>Τιμές</u>	<u>Τιμές αναφοράς</u>
Δραστηριότητα ρενίνης σε όρθια θέση	1.7 ng/ml/h	1.5-5.7
Αλδοστερόνη σε όρθια θέση	135 pg/ml	40-310

### 3) Δοκιμασία Χοριακής Γοναδοτροπίνης:

- Εξωγενής χορήγηση **hCG**
  - **hCG** : Είναι ανάλογο της **LH**
  - Δρα στους όρχεις
  - Διεγείρει την παραγωγή **Τεστοστερόνης**

# Δοκιμασία Χοριακής Γοναδοτροπίνης:

(χορήγηση hCG 2500 U για 3-5 ημέρες)

	<u>ΠΡΙΝ</u>	<u>ΜΕΤΑ</u>	<u>ΤΙΜΕΣ</u> <u>ΑΝΑΦΟΡΑΣ</u>
Τεστοστερόνη (ng/ml)	0.4	0.3	2.6-12
Ανδροστενδιόνη (ng/ml)	0.4	0.6	0.8-3.6
DHEA-S (μg/ml)	0.64	0.7	1.5-5
<b>17-OH-prog (ng/ml)</b>	<b>6.1</b>	<b>12.05</b>	<b>0.2-2</b>
11-Δεοξυκορτιζόλη (ng/ml)	3.6	3.1	<8

## 4) ACTH test

- Εξωγενής χορήγηση ACTH
- Μέτρηση επιπέδων κορτιζόλης και 17-OH-προγεστερόνης
- Έλεγχος λειτουργίας φλοιού επινεφριδίων
- Αποκλεισμός συγγενούς υπερπλασίας των επινεφριδίων λόγω ανεπάρκειας 21-υδροξυλάσης.

## Τα αποτελέσματα του ACTH test:

<b>Χρόνος</b>	<b>0'</b>	<b>30'</b>	<b>60'</b>
<b><u>Cort</u></b>	μg/dl	18.0	40.0
<b><u>17-OH-Pr</u></b>	ng/ml	5.5	6.0

## 5) Καρυότυπος

46 XY, ουδεμία εμφανής αριθμητική η δομική χρωμοσωμική ανωμαλία παρατηρήθηκε.

# Συμπεράσματα

- Αμφίβολα έξω γεννητικά όργανα
- Ελαφρώς αυξημένη αρτηριακή πίεση
- Φυσιολογικοί ηλεκτρολύτες
- Μειωμένη παραγωγή ανδρογόνων
- Φυσιολογική απόκριση κορτιζόλης



# χοληστερόλη

20,22 δεσμολάση (P450scc)

πρεγνενολόνη

17-α  
υδροξυλάση  
P450c17

17-OH-πρεγνενολόνη

17,20  
δεσμολάση  
P450c17

DHEAS

3-β-υδροξυστεροειδική αφυδρογονάση

προγεστερόνη

17-α υδροξυλάση  
P450c17

17-OH-προγεστερόνη

17,20  
δεσμολάση  
P450c17

ανδροστενεδιόνη

21-υδροξυλάση

17β-υδροξυστεροειδική  
δεϋδρογονάση

δεοξυκορτικοστερόνη

11-δεοξυκορτιζόλη

**τεστοστερόνη**

11β-υδροξυλάση

5-α-αναγωγάση

κορτικοστερόνη

**κορτιζόλη**

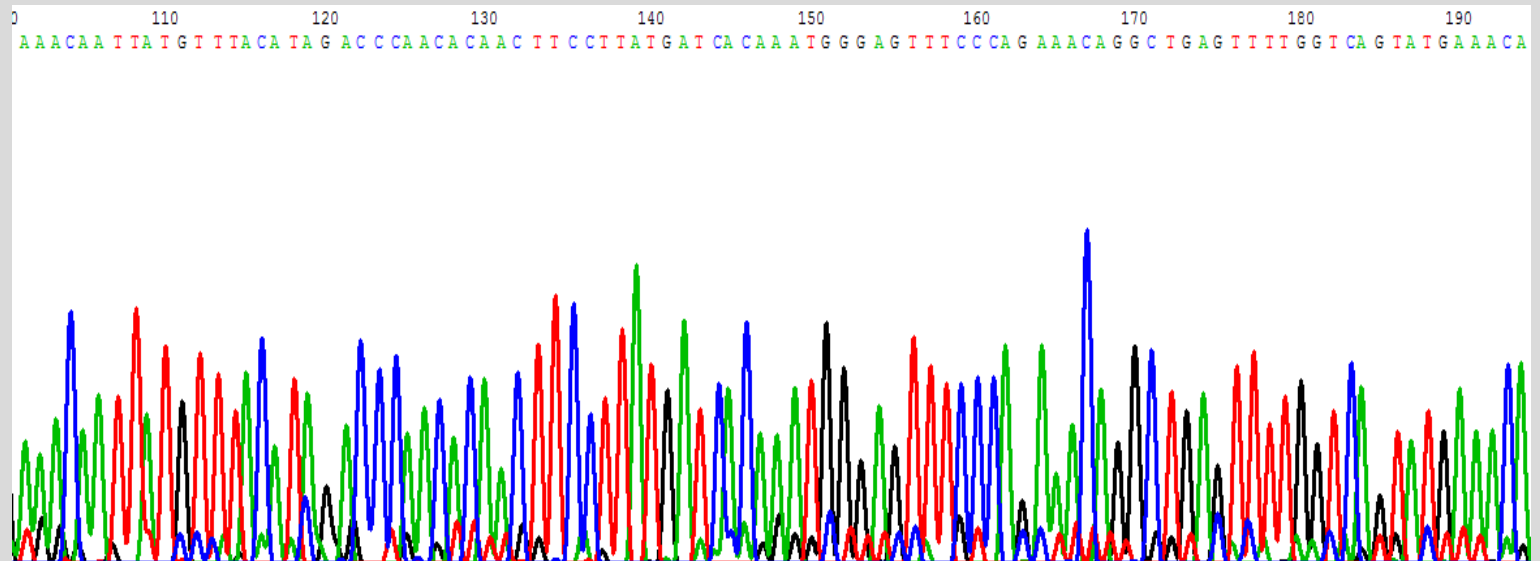
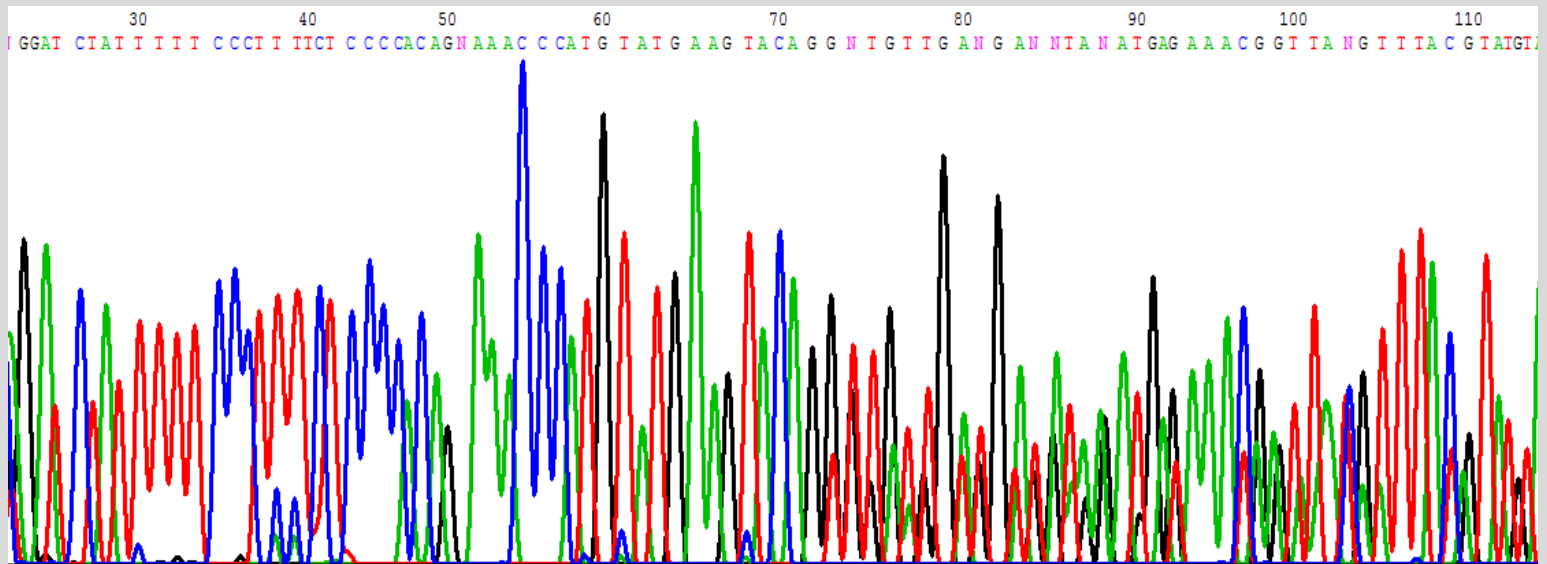
διυδροτεστοστερόνη

αλδοστερόνη

# Πιθανή διάγνωση

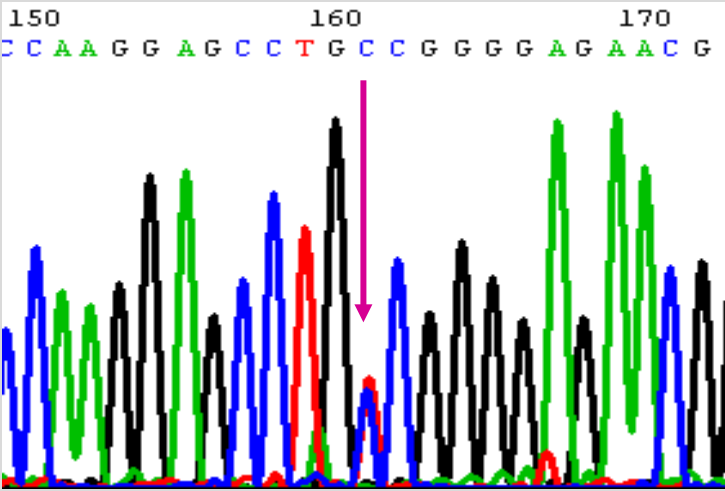
- **Μικτή μερική ανεπάρκεια** στη δράση 17-α-υδροξυλάσης και 17,20 δεσμολάσης **καθ' υπεροχήν ανεπάρκειας δεσμολάσης.**

# 17,20 δεσμολάση



# P450 oxidoreductase

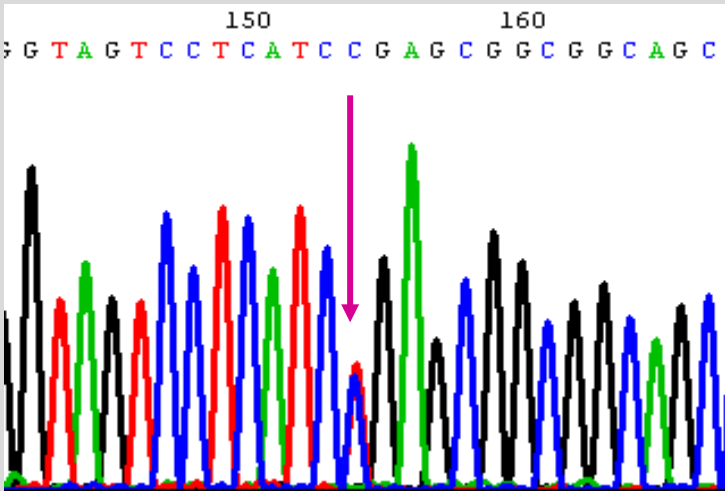
Forward sequencing



rs1057868 C/T

A503V Alanine>Valine  
1058 .....1590

Reverse sequencing

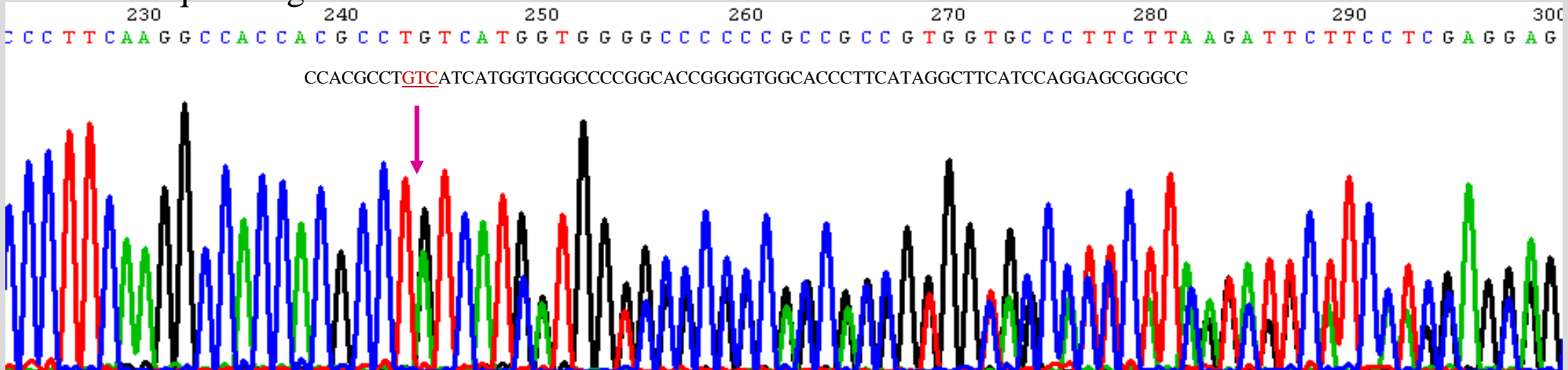


rs1057870 G/A

G1716 S601S Serine>Serine

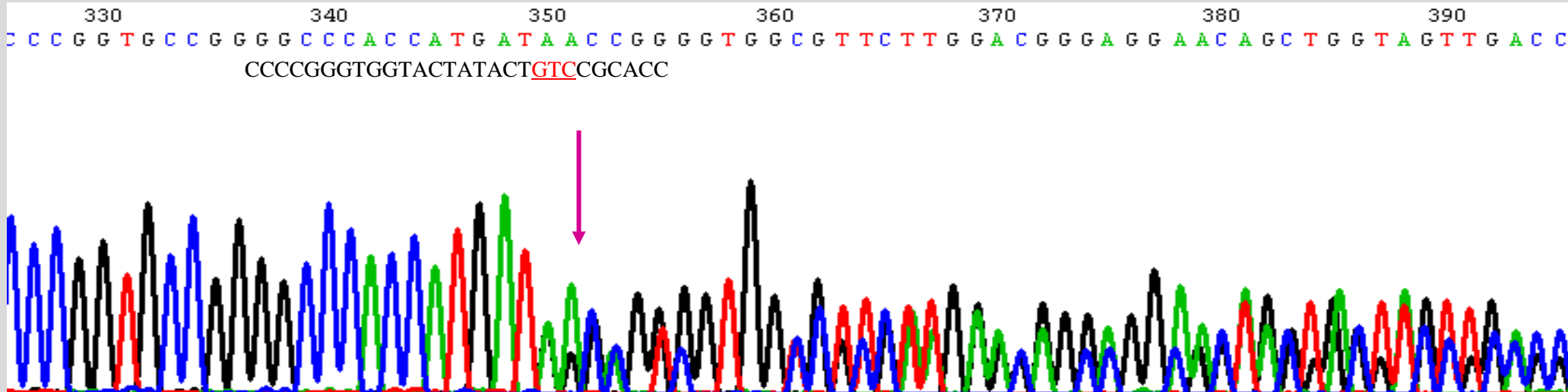
## Polymorphisms

## Forward sequencing



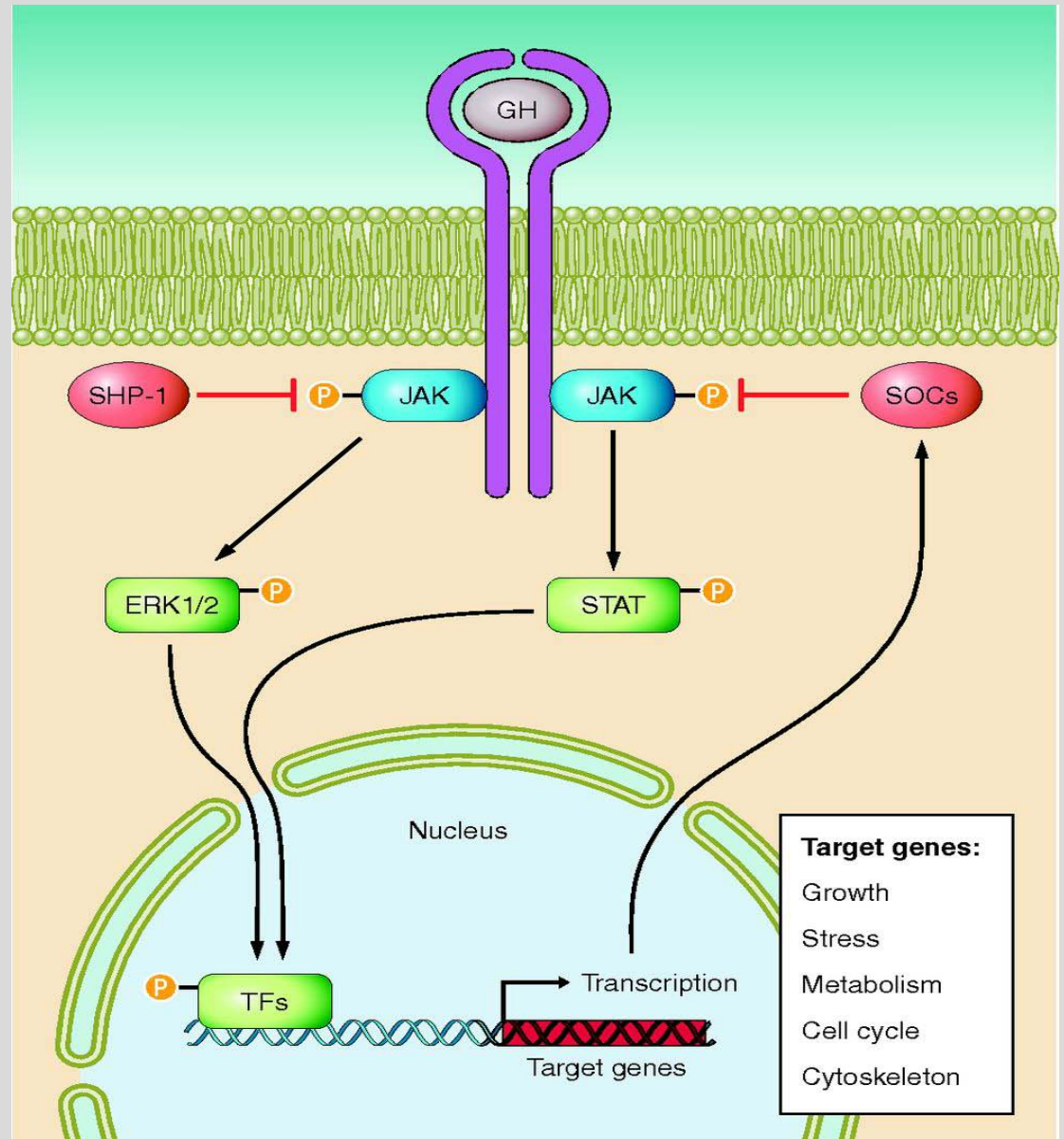
**Del 1658GTC1659 > del528Valine**

## Reverse sequencing

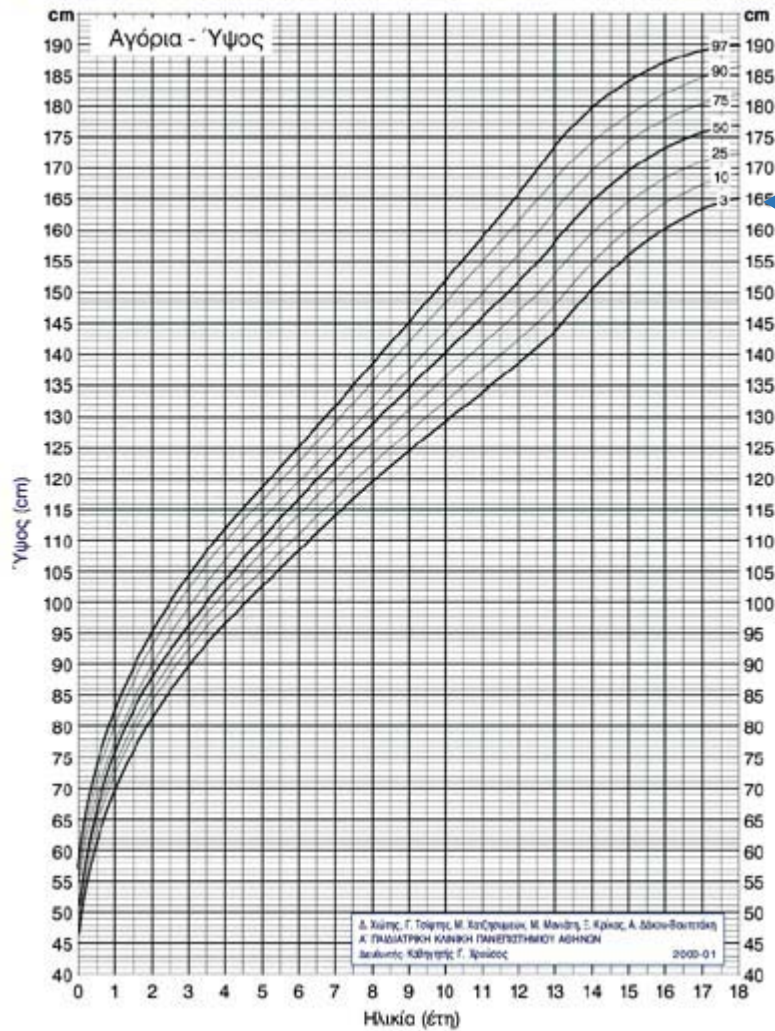


# GH INSENSITIVITY SYNDROME (GHIS) /Laron syndrome

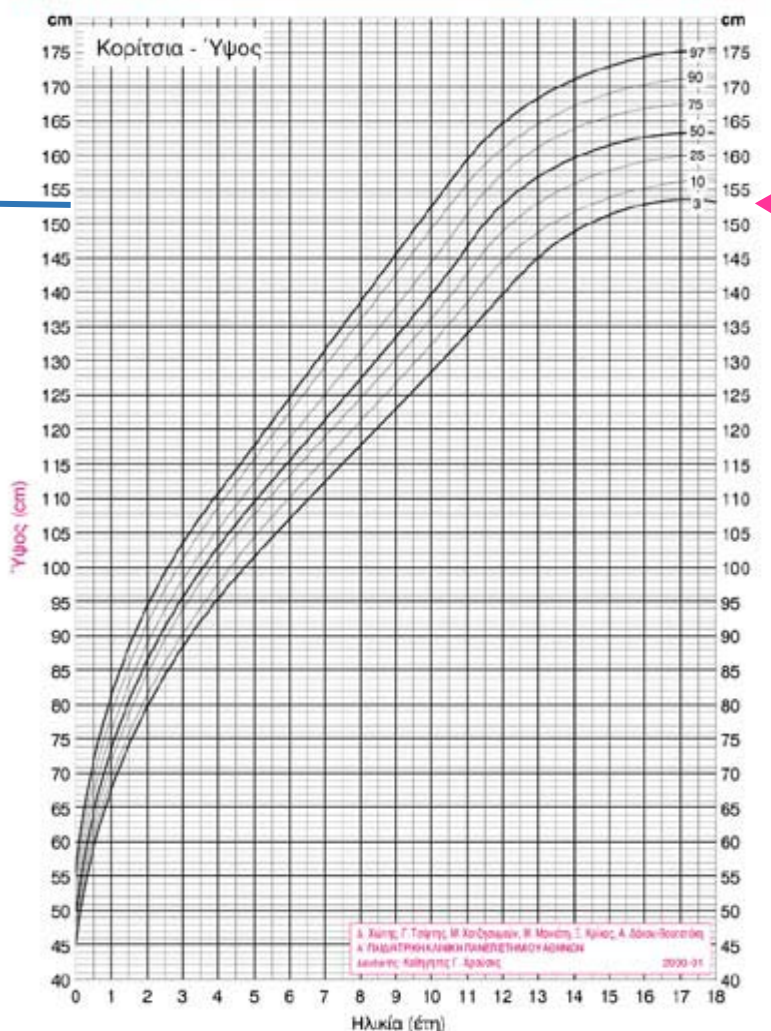
- Κοντό ανάστημα (ύψος < 3η % θέση)
- Φυσιολογικό βάρος σώματος
- Χαμηλό IGF-I
- Παθολογική τιμή GH μετά από φαρμακολογική πρόκληση: < 10 ng/ml (ΦΤ:  $\geq 10$  ng/ml)



Όνοματεπώνυμο: \_\_\_\_\_ Η. Γ.: \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_



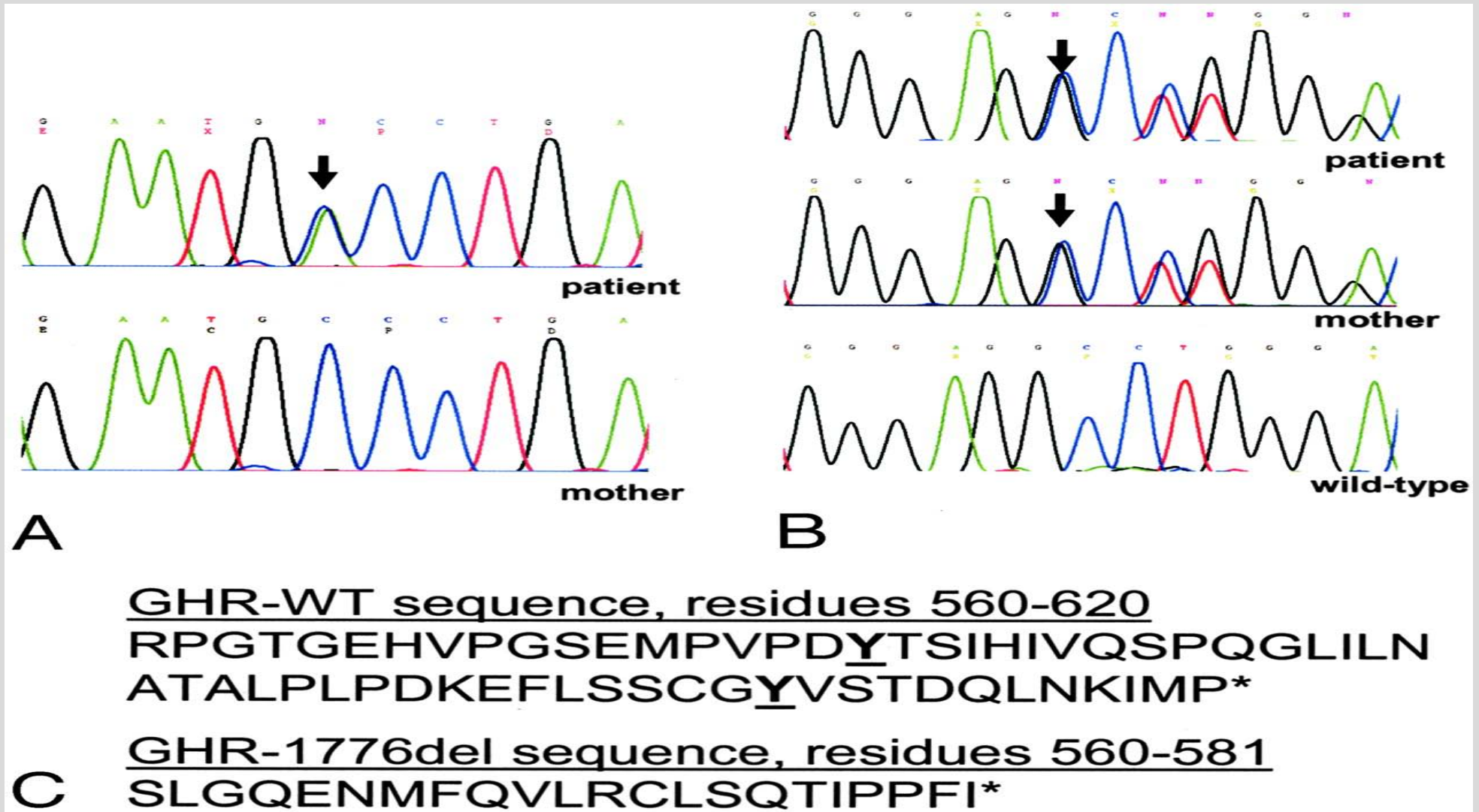
Όνοματεπώνυμο: \_\_\_\_\_ Η. Γ.: \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_





# GH INSENSITIVITY SYNDROME (GHIS) /Laron syndrome

## Growth Hormone Receptor (GHR) Mutation



A Novel C-Terminal Growth Hormone Receptor (GHR) Mutation Results in Impaired GHR-STAT5 But Normal STAT-3 Signaling J Clin Endocrinol Metab (2005) 90 (1): 542-547.



**Table 2A.** Standard and colloquial nomenclature for *GHR* mutations (Gross Deletion and Nonsense mutations).

Type of Mutation	DNA sequence change*	Site of mutation	Amino acid change	Colloquial nomenclature	Reference
<b>Deletion</b>					
	~ 1.2 kb deletion	Partial Exon 5 deletion			(15)
	~ 4 kb deletion	Exon 5			(16)
	~ 19 kb deletion	Exon 5-6			(17)
	del(5) p11-p13.1	Exon 4-10			(18)
<b>Nonsense</b>					
	c.12 G>A	Exon 2	p.W4X	W15X	(19)
	c.101 G>A	Exon 3	p.W34X	W16X	(20)
	c.168 C>A	Exon 4	p.C56X	C38X	(21)
	c.181 C>T	Exon 4	p.R61X	R43X	(21)
	c.247 C>T	Exon 4	p.Q83X	Q65X	(22)
	c.293 G>A	Exon 5	p.W98X	W80X	(22)
	c.303 C>A	Exon 5	p.C101X	C83X	(23)
	c.338 dupA	Exon 5	p.Y113X	Y97X	#
	c.476 T>A	Exon 6	p.L159X	L141X	(19)
	c.524 G>A	Exon 6	p.W175X	W157X	(22)
	c.601 G>T	Exon 6	p.E201X	E183X	(13)
	c.703 C>T	Exon 7	p.R235X	R217X	(24)
	c.724 G>T	Exon 7	p.E242X	E224X	(25)
	c.744 delT	Exon 7	p.Y248X	230delT	(26)

**Table 2B.** Standard and colloquial nomenclature for *GHR* mutations (Frameshift and splice site mutations).

<b>Frameshift</b>					
	c.162delC	Exon 4	p.K55fsX79	162delC	(22)
	c.192_193delTT	Exon 4	p.S65fsX70	46delTT	(9)
	c.421_422dupTT	Exon 5	p.L143fs147	422insTT	(6)
	c.743_744delAT	Exon 7	p.Y248fs259	230 del AT	(9)
	c.889_911del	Exon 9	p.I297fs299	889-911del	(27)
	c.981delC	Exon 10	p.I328fs348	981delC	(25)
	c.1324_1345del	Exon 10	p.A442fs478	GHR(1-499)	(28)
	c.1734delG	Exon 10	p.R578fs600	1776 del G	(23)
<b>Splice</b>					
	c.594 A>G	Exon 6	p.V199_M206del	E180Splice	(29)
	c.723 C>T	Exon 7		G236Splice	(22,30)
	c.875 G>C	Exon 8	p.R292T	R274T	(31)
	c.70+1 G>A	Intron 2		70+1 G>A	(22)
	c.266+1 G>A	Intron 4		71+1 G>A	(9)
	c.440-1 G>C	Intron 5		IVS5 -1 G>C	(24)
	c.618+1.8kb A>G	Intron 6		ψ6	(32)
	c.619-1 G>T	Intron 6		189-1G>T	(9)
	c.619-1 G>C	Intron 6		189-1G>C	(33)
	c.619-25 A>G	Intron 6		IVS 6 -25 A>G	(29)
	c.785-1 G>T	Intron 7		785-1 G>T	(34)
	c.876-1 C>G	Intron 8		GHR(1-277)	(35)
	c.945+1 G>A	Intron 9		GHR(1-277)	(36)

## Αλληλούχιση (sequencing) και καρκίνος

c-kit

BRCA1 και BRCA2

PTEN

PIK3CA

*KRas*, *HRas*

*EGFR*

# ΦΑΡΜΑΚΑ ΠΟΥ ΣΧΕΤΙΖΟΝΤΑΙ ΜΕ ΤΟΝ ΓΟΝΟΤΥΠΟ

➤ **Vemurafenib**

➤ **Cetuximab**

➤ **Gefitinib**

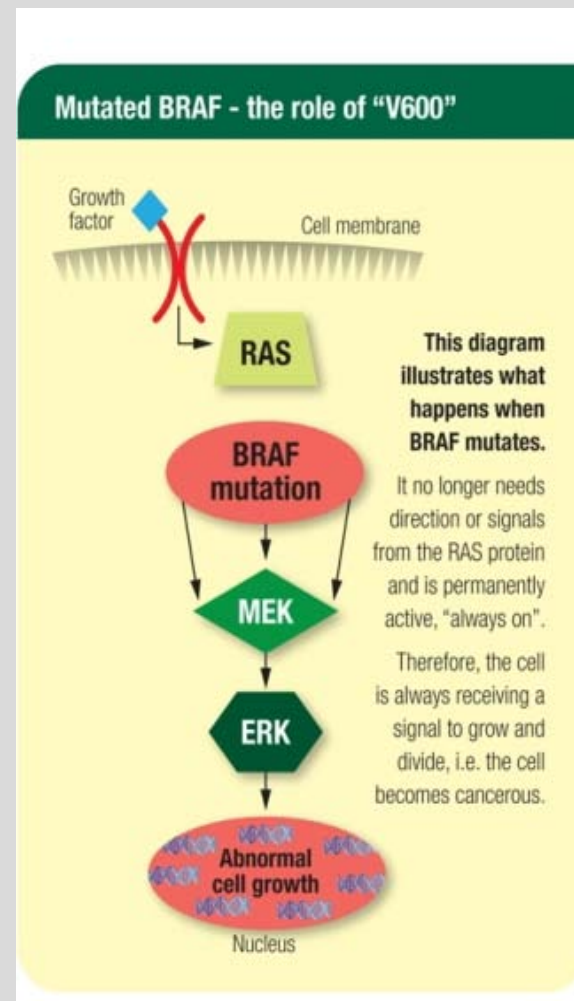
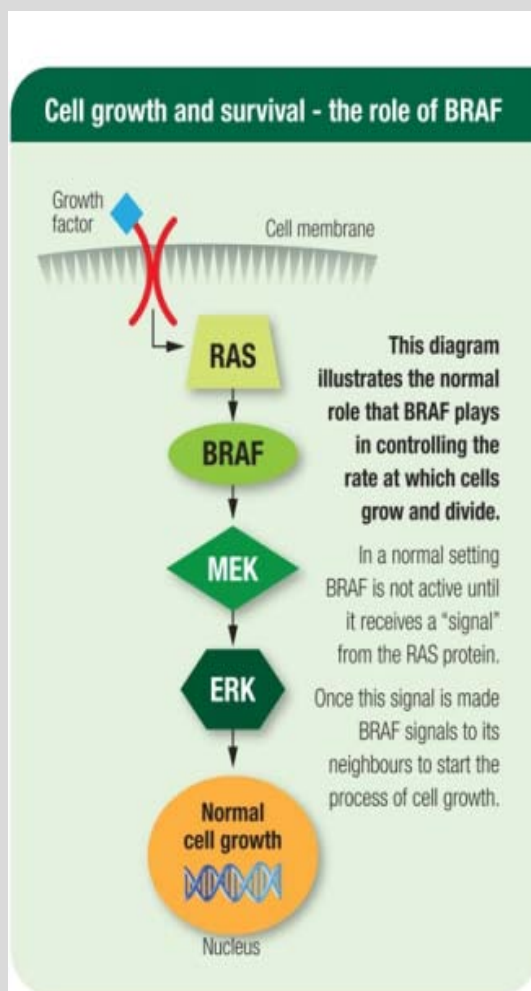
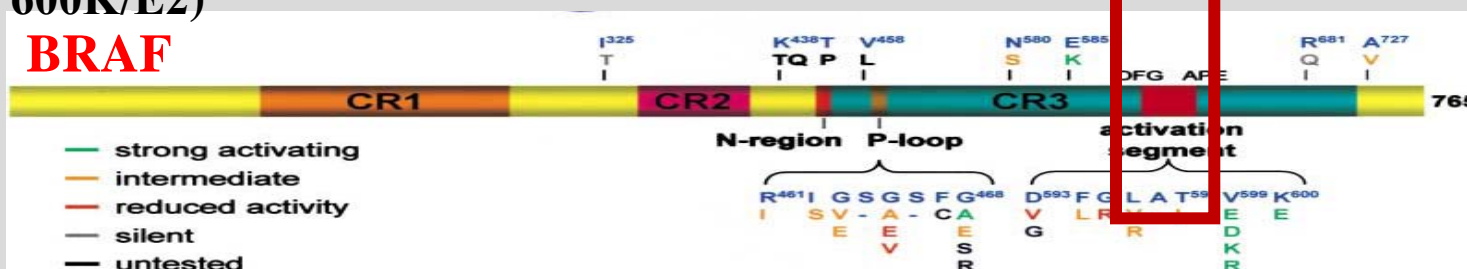
➤ **Fluorouracil**

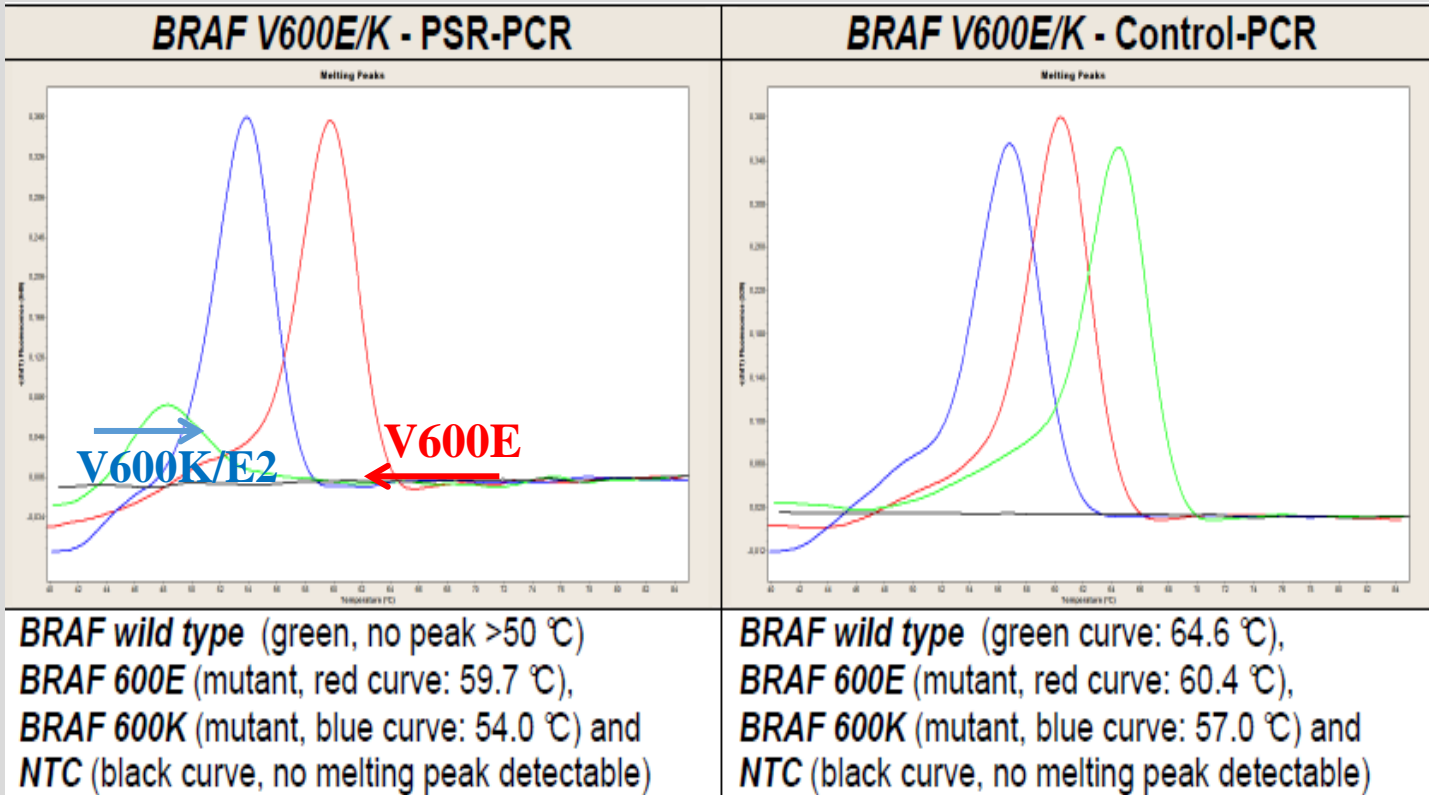
➤ **Leucovorin**

➤ **Irinotecan**

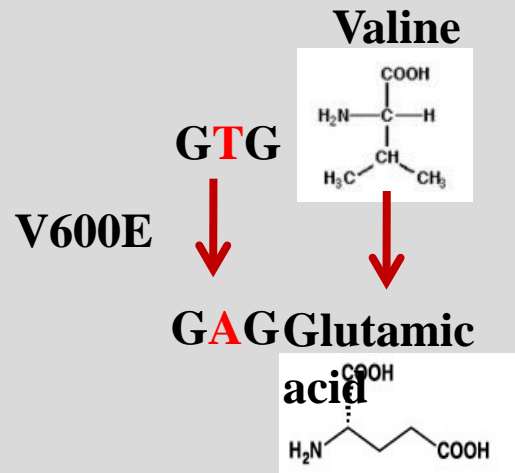
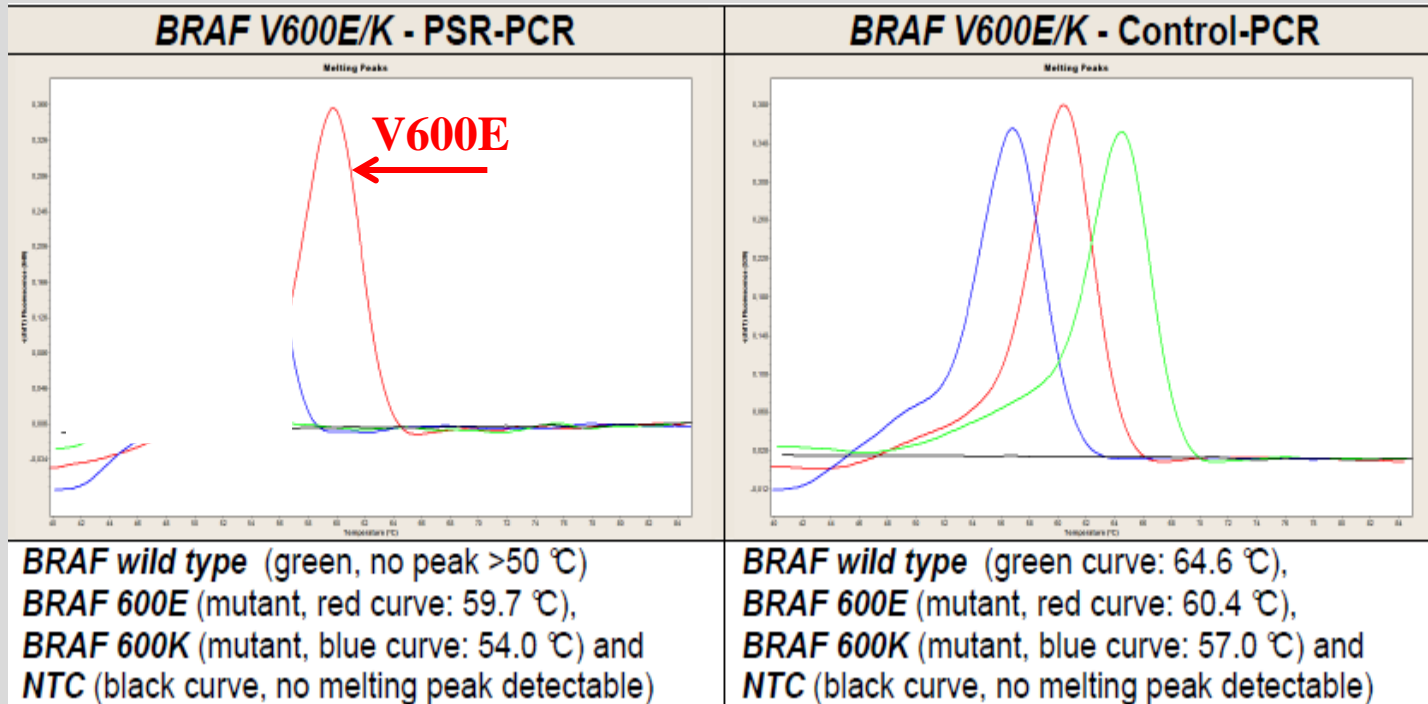
# ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΘΥΡΕΟΕΙΔΟΥΣ

## ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΜΕΤΑΛΛΑΞΗΣ ΣΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ της BRAF ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ (BRAF V600E και η BRAF V600K/E2)

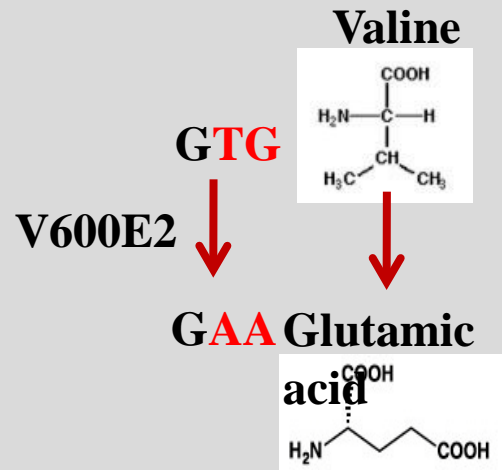
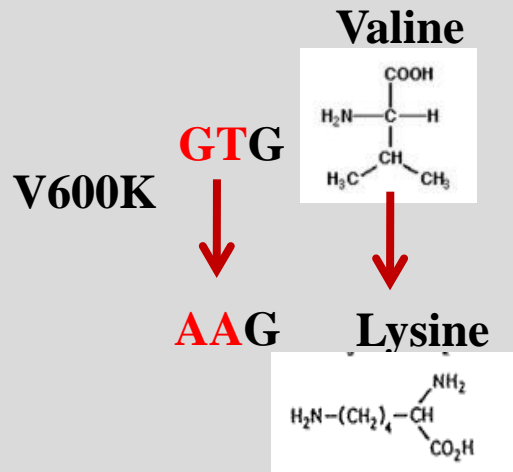
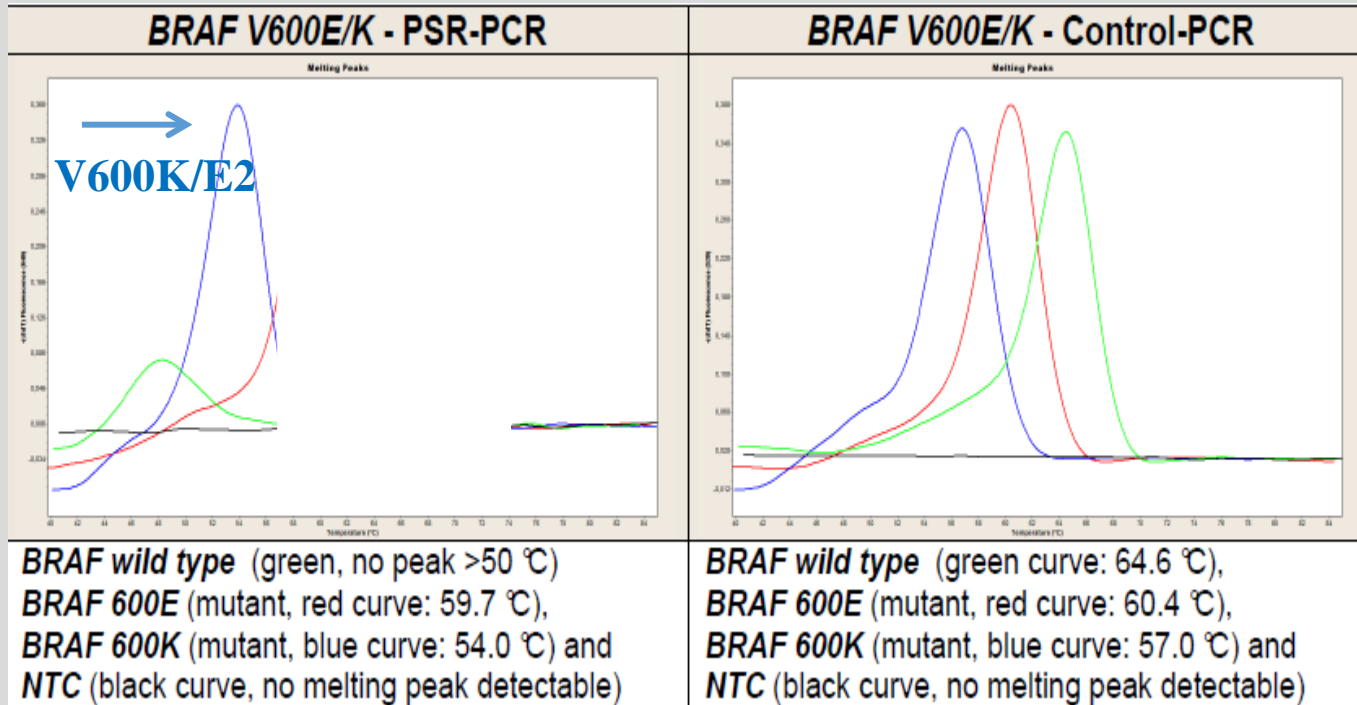




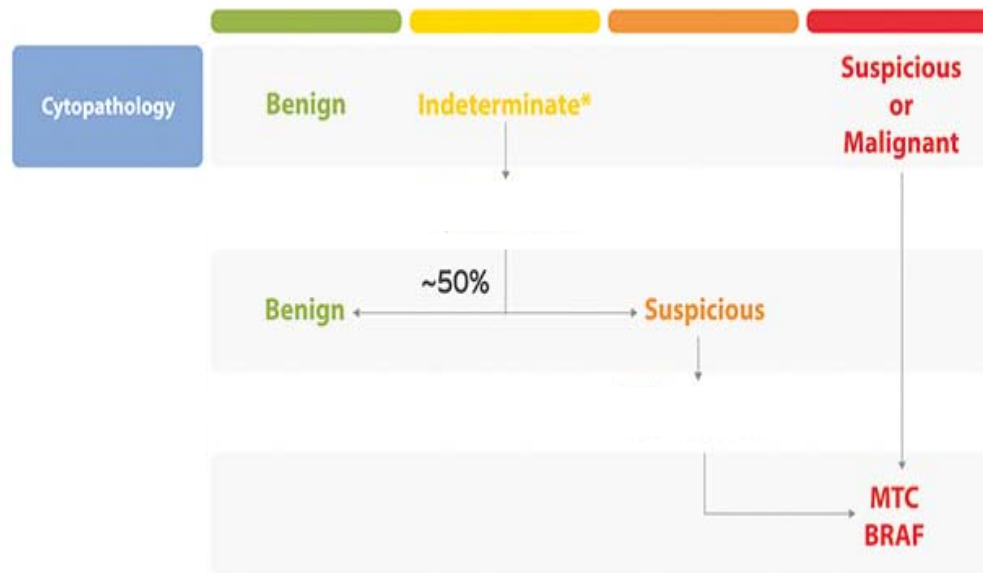
# REAL TIME kit BRAF V600E/K



# REAL TIME kit BRAF V600E/K



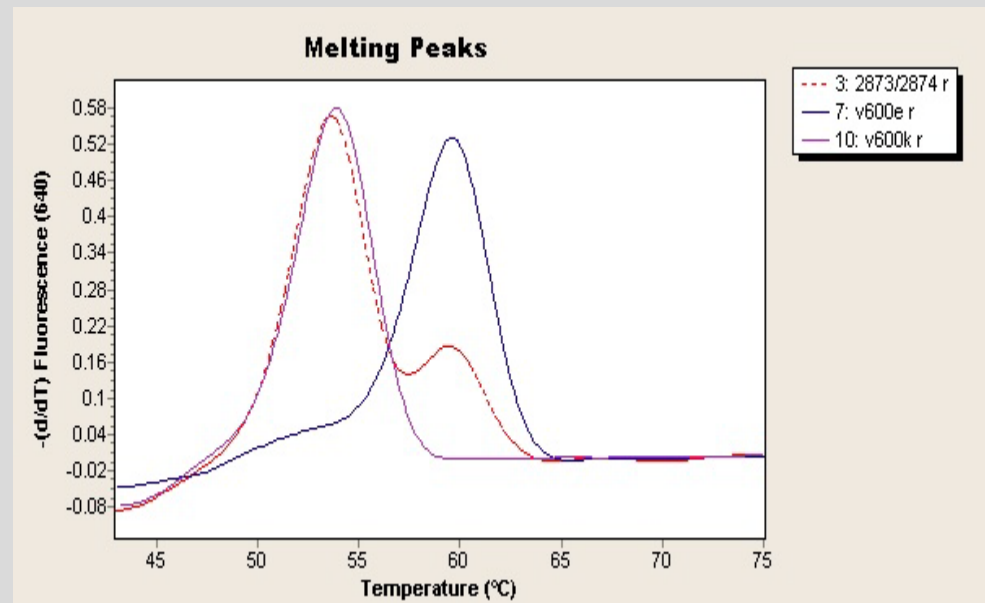
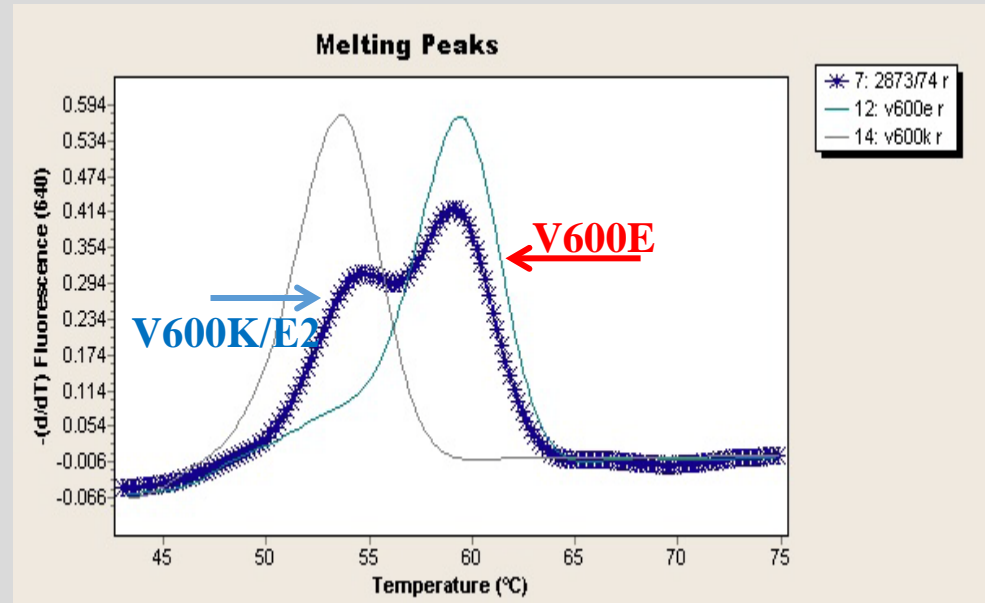
# FNA THYROID





# Αποτέλεσμα

Εντοπίστηκε η παρουσία διπλής μεταλλαγής, η BRAF V600E και η BRAF V600K/E2.



# Μοριακή διάγνωση στην γυναικολογία-μαιευτική

## HPV screening and genotyping

This cervical cancer screening test “specifically identifies types HPV 16 and HPV 18 while concurrently detecting the rest of the high risk types (31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 and 68)



In April 2011, the FDA ([Food and Drug Administration](#)) approved the cobas HPV Test, manufactured by [Roche](#).

Biorad: hybrid capture (FDA 2003)


# Μοριακή διάγνωση στην γυναικολογία-μαιευτική

## Ανίχνευση

Τοξόπλασμα (*Toxoplasma gondii*) ( test DNA/IgG avidity test) , CMV (αμνιακό υγρό),

EBV, Χλαμύδια (*Chlamydia Trachomatis*)/ Gonorrhoea / ερυθρά, ερπητοϊοί (HSV1+2), /μυκόπλασμα/ουρεάπλασμα

## Ερμηνεία μοριακών αποτελεσμάτων

**Ανίχνευση** νουκλεϊκού οξέος  **Παρουσία** ιού στον ασθενή

**Μη Ανίχνευση** νουκλεϊκού οξέος  **Απουσία** ιού από το κλινικό δείγμα

## Ποσοτική-Ποιοτική μέθοδος

(π.χ. Real time PCR για CMV, και bDNA για προσδιορισμό ιικού φορτίου HCV)

**Α. Όριο ανίχνευσης:** Ο μικρότερος αριθμός αντιγράφων που δύνανται να ανιχνευθούν

Ανίχνευση HCV RNA

πλάσμα: 135 αντίγραφα/mL

ορός: 162 αντίγραφα/mL

ποσοτική μέθοδος (3.200 αντίγραφα/mL)

**Αρνητικό αποτέλεσμα** σημαίνει είτε απουσία του μικροοργανισμού από το κλινικό δείγμα που ελέγχεται είτε παρουσία του ποσότητα κάτω από το όριο ανίχνευσης της μεθόδου.

**Β. Όριο ποσοτικοποίησης.** Ο μικρότερος αριθμός αντιγράφων που μετρούνται αξιόπιστα.

Όριο ποσοτικοποίησης HCV RNA

Το όριο ανίχνευσης είναι 3.200 αντίγραφα/mL, αλλά το όριο ποσοτικοποίησης είναι 7.000

**Ασθενής:** 39 χρονών

καπνιστής, κοινωνικός πότης , όχι φαρμακευτική αγωγή

### **Συμπτώματα**

- έντονη αδυναμία, καταβολή
- ανορεξία
- ναυτία, έμετοι, διάρροιες
- μυαλγίες
- αίσθημα βάρους στο δεξιό άνω τμήμα της κοιλιάς
- αρθραλγίες, πονοκέφαλος
- πυρετός
- ίκτερο
- σκούρα ούρα
- αποστροφή στο κάπνισμα

## **Βιοχημικός έλεγχος**

- ανεύρεση αυξημένης τιμής τρανσαμινάσες
- ανεύρεση αυξημένης τιμής χολερυθρίνης,

## **Ανοσολογικό έλεγχο**

Anti-HCV αρνητικό

## **Μοριακό έλεγχο**

HCV RNA 4000 αντίγραφα/ml

**ΔΙΑΓΝΩΣΗ ?**

# Μοριακή διάγνωση στην γυναικολογία-μαιευτική

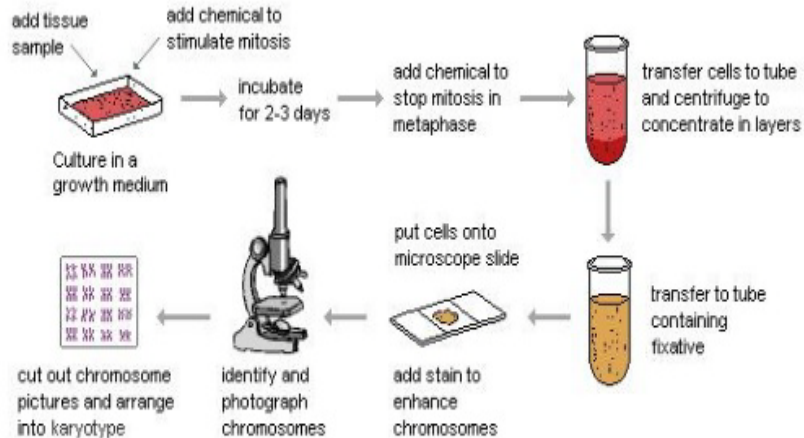
- ❖ Υπογονιμότητα
- ❖ Επαναλαμβανόμενες αποβολές
- ❖ Προσπάθεια αναπαραγωγής με αρνητική έκβαση: π.χ. τη γέννηση ενός παιδιού με γενετική ασθένεια ή τη διακοπή της κύησης μετά από προγεννητική διάγνωση
- ❖ Γνωστοί φορείς μιας γενετικής ασθένειας
- ❖ Αμνιοπαρακέντηση και Προγεννητικός έλεγχος

## Καρυότυπος

- Κλασσικός
- Μοριακός

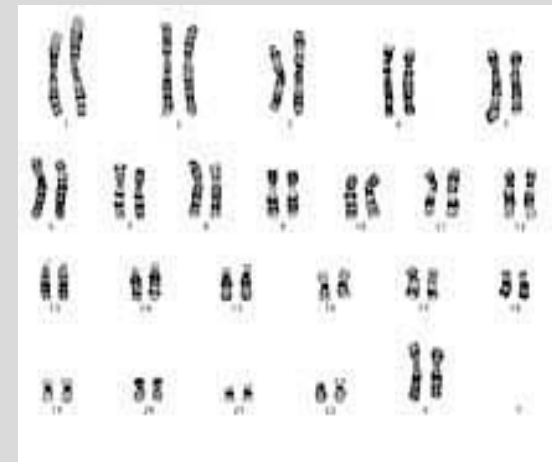


# Process of Karyotyping



- Blood, skin, tumors (for identifying cancer) are some of the tissue types used for diagnosis.
- Amniotic fluid or chorionic villus specimens are used for prenatal diagnosis.

Διακριτική ικανότητα του καρυότυπου κυμαίνεται μεταξύ 3-5Mb

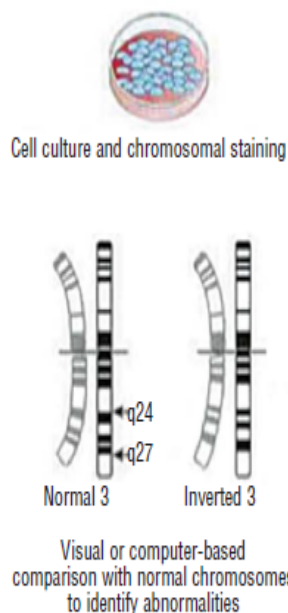


## ΠΡΟΓΕΝΝΗΤΙΚΟΣ ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΚΑΡΥΟΤΥΠΟΣ (array CGH)

Η πρόσφατη εισαγωγή μιας νέας τεχνικής, που ονομάζεται **συγκριτικός γενωμικός υβριδισμός σε μικροσυστοιχίες (array Comparative Genomic Hybridization-aCGH)**, γνωστή ευρέως και με το όνομα **‘μοριακός καρυότυπος’**, επιτρέπει τη ‘μικρο-ανάλυση’ του ανθρώπινου γονιδιώματος σε 10-100 φορές μεγαλύτερη λεπτομέρεια σε σχέση με τον κλασικό καρυότυπο. Αποκαλύπτει ανωμαλίες που αφορούν ολόκληρα χρωμοσώματα (π.χ. τρισωμία 21, κ.α.) αλλά κύρια υπο-μικροσκοπικές ανωμαλίες που αφορούν μικρές περιοχές χρωμοσωμάτων που λείπουν (ελλείψεις) ή που έχουν διπλασιαστεί (διπλασιασμοί) και που σχετίζονται με μεγάλο αριθμό γενετικών νοσημάτων και συνδρόμων.

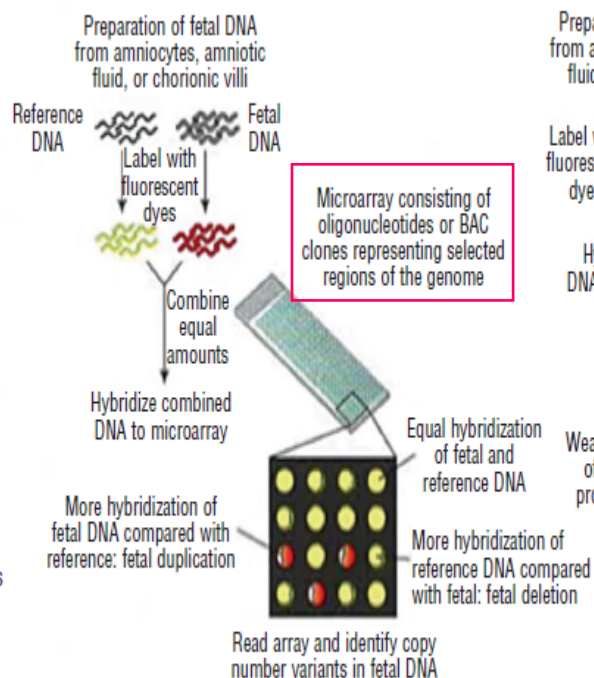
Οι ανωμαλίες του αριθμού των χρωμοσωμάτων (τρисωμίες, μονοσωμίες) είναι δυνατό να αποκαλυφθούν και με τον κλασικό καρυότυπο, ενώ οι υπο-μικροσκοπικές ανωμαλίες που αφορούν μικρές περιοχές χρωμοσωμάτων δεν ανιχνεύονται με τον κλασικό καρυότυπο και παραμένει αδιάγνωστες.

**a** Metaphase cytogenetics



Can detect  
 Whole-chromosome aneuploidy  
 Large deletions or duplications  
 Balanced translocations and inversions  
 Triploidy

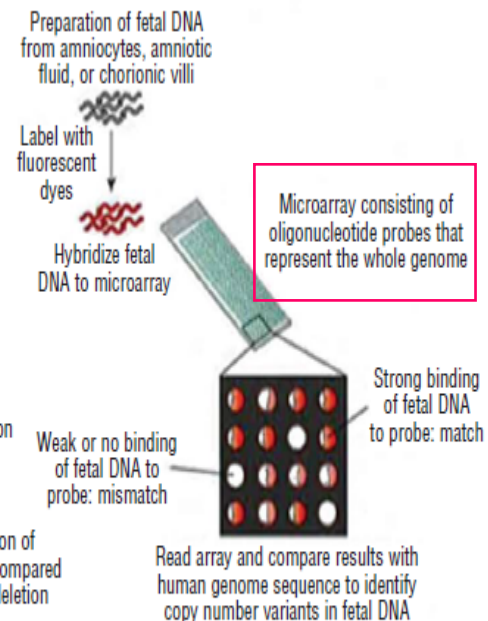
**b** Array cGH



Can detect  
 Whole-chromosome aneuploidy  
 Small deletions or duplications  
 Variants of unknown clinical relevance

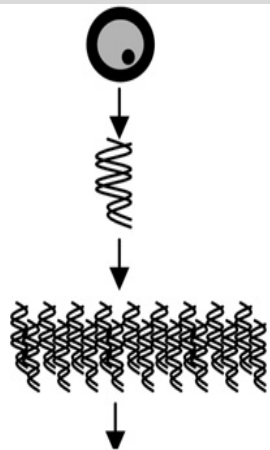
Cannot detect  
 Balanced translocations

**c** Whole genome microarray



Can detect  
 Whole-chromosome aneuploidy  
 Small deletions or duplications  
 Variants of unknown clinical relevance

Cannot detect  
 Balanced translocations



Κύτταρο(α) προς βιοψία  
 DNA  
 Κύτταρου(ων)  
 προς βιοψία  
 Πολλαπλασιασμός  
 όλου του γονιδιώματος

DNA  
 αναφοράς

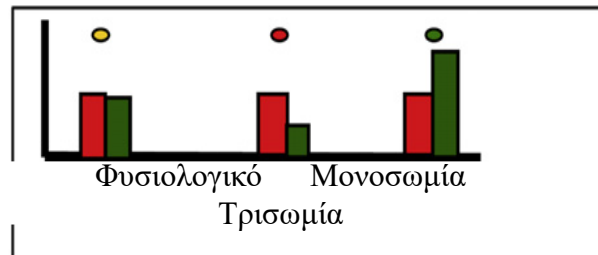
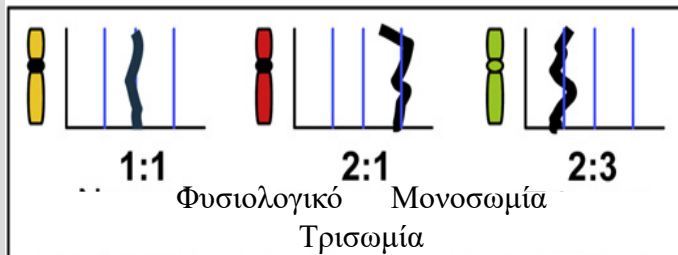
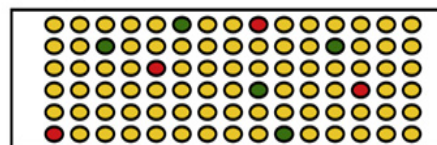
&  
 DNA  
 Κύτταρου(ων)  
 προς βιοψία

Συνδυασμός σημασμένου  
 DNA αναφοράς  
 και DNA Κύτταρου(ων)  
 προς βιοψία

**A**  
 Metaphase  
 CGH



**B**  
 Array  
 CGH



## Τι ανιχνεύει ο προγεννητικός μοριακός καρυότυπος

Ο προγεννητικός μοριακός καρυότυπος ανιχνεύει όλες τις ανωμαλίες που μέχρι σήμερα μπορούσαμε να διαγνώσουμε με τον κλασσικό προγεννητικό καρυότυπο (αμνιακού υγρού ή CVS) και επιπλέον την ύπαρξη πιθανών ελλείψεων ή/και διπλασιασμών περιοχών όλων των χρωμοσωμάτων σε **10 φορές μεγαλύτερη ανάλυση** σε σχέση με το κλασσικό καρυότυπο (**αναλυτικό επίπεδο μεγέθους 1Mb γενικά**). Ταυτόχρονα, ο ειδικός σχεδιασμός επιτρέπει τη στοχευμένη διερεύνηση για ελλείψεις ή διπλασιασμούς γενετικού υλικού που σχετίζονται με περίπου 120 σύνδρομα-νοσήματα, σε αναλυτικό επίπεδο  $\geq 200$  Kb. Επομένως, το τεστ είναι σε θέση να ανιχνεύσει γενετικές ανωμαλίες, που μέχρι σήμερα παρέμεναν αδιάγνωστες, τόσο από τον υπερηχογραφικό έλεγχο όσο και από τον κλασσικό προγεννητικό καρυότυπο.

## Ποιά είναι τα επιπλέον πλεονεκτήματα του προγεννητικού μοριακού καρυότυπου

Η εφαρμογή του τεστ **δεν απαιτεί τη χρονοβόρα καλλιέργεια του αμνιακού υγρού** ή του δείγματος τροφοβλάστης (CVS), με συνέπεια ο έλεγχος να ολοκληρώνεται σε 4-5 μέρες. Επιπλέον, **απαιτείται πολύ λιγότερη ποσότητα** δείγματος, για παράδειγμα 5-8 ml αμνιακού υγρού.

## Σε ποιες περιπτώσεις εφαρμόζεται

Το τεστ ανιχνεύει σύνδρομα και άλλες γενετικές ανωμαλίες που εμφανίζονται ξαφνικά σε μια κατά τ' άλλα φυσιολογική κύηση και χωρίς συνήθως να υπάρχει προηγούμενο ιστορικό ή υπερηχογραφικά ευρήματα. Επομένως, η εφαρμογή του μπορεί να γίνει σε όλα τα δείγματα που απαιτούν προγεννητικό έλεγχο.

## Ποιοι είναι οι περιορισμοί της εξέτασης

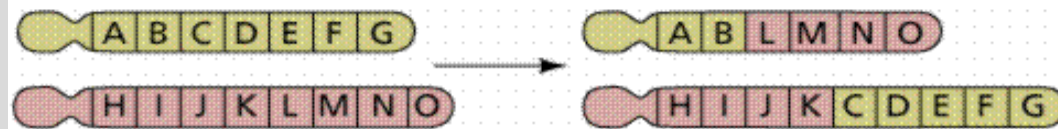
Σημειώνεται ότι η μέθοδος αποκαλύπτει μόνο ανισοζυγίες (ποσοτικές αλλαγές) του γενετικού υλικού. Επίσης, **δεν είναι σε θέση να ανιχνεύσει ισοζυγισμένες μετατοπίσεις ή μετατοπίσεις με ανισοζυγίες μεγέθους <1Mb, χρωμοσωματικούς μωσαϊκισμούς σε ποσοστό <15%, καθώς βέβαια και μεταλλάξεις βάσεων του DNA.**

## Inversion



Αμοιβαία μετάθεση

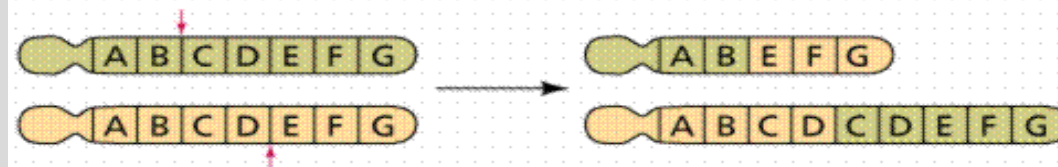
Reciprocal translocation between nonhomologous chromosomes



## Deletion



Duplication and deletion of homologous chromosomes

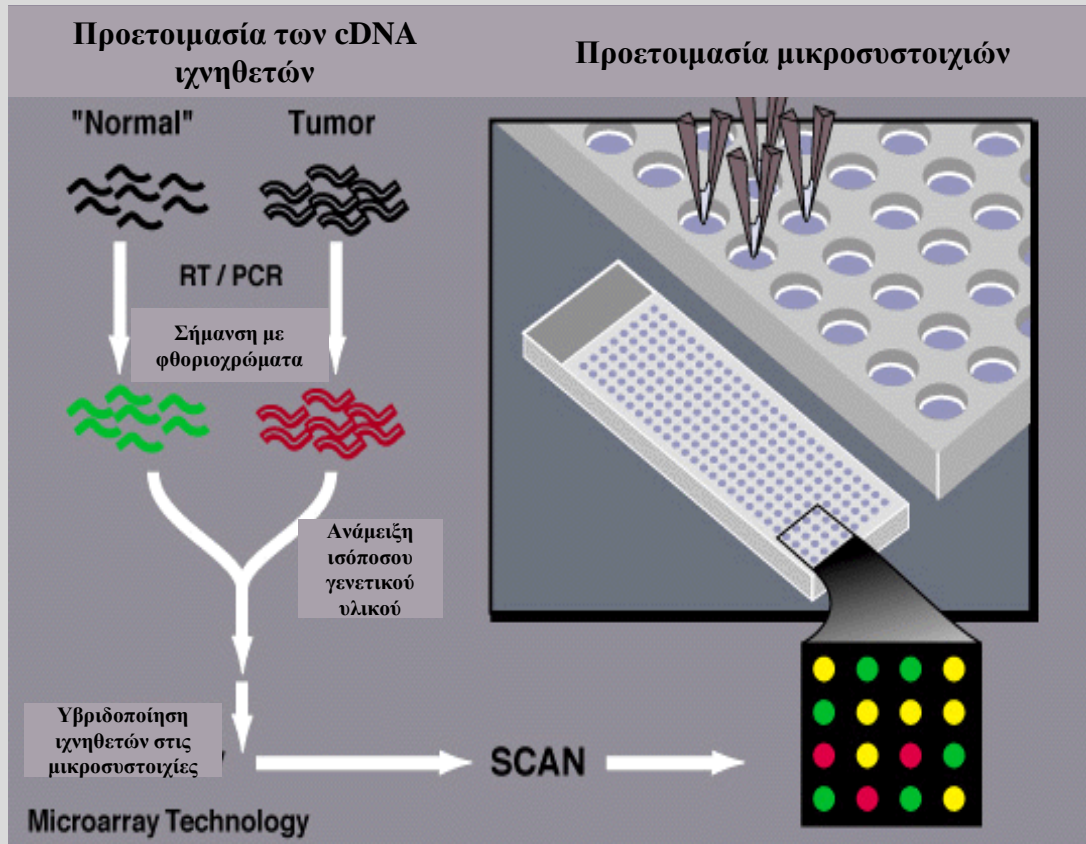




Η αντικατάσταση του συμβατικού καρυότυπου με το μοριακό κατά την **προγεννητική** διάγνωση αποτελεί ακόμη **θέμα συζήτησης** στην επιστημονική κοινότητα, ενώ είναι ευρέως αποδεκτή για τη διερεύνηση μεταγεννητικά. Η μεγαλύτερη δυσκολία που υπάρχει αυτήν τη στιγμή, πέραν του κόστους, αφορά στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

Υπάρχουν DNA αλληλουχίες διάσπαρτες στο ανθρώπινο γονιδίωμα, όπου ο αριθμός των επαναλήψεών τους διαφέρει από άτομο σε άτομο, **χωρίς κλινικές επιπτώσεις στο φαινότυπο (CNVs, copy number variations)**. Έχουν αναφερθεί μεγάλες ελλείψεις ή διπλασιασμοί ακόμη και της τάξης των 10 Mb, χωρίς κλινικές επιπτώσεις. Επίσης, είναι δυνατόν η ίδια χρωμοσωματική ανωμαλία να μην προκαλεί κανένα πρόβλημα στο γονέα, αλλά να δημιουργήσει σοβαρά προβλήματα στο έμβryo. Συνεπώς, πριν αρχίσει η εφαρμογή του μοριακού καρυότυπου στην προγεννητική διάγνωση σε επίπεδο ρουτίνας, θα πρέπει να υπάρχει η δυνατότητα να ερμηνευθούν τα αποτελέσματα και να συσχετιστούν με το φαινότυπο. Αυτό θα είναι εφικτό μόνο όταν θα έχουν καταγραφεί όλες οι χρωμοσωματικές ανωμαλίες και ο φαινότυπος ο οποίος προκύπτει από αυτές και εμπλουτισθούν οι διεθνείς βάσεις δεδομένων.

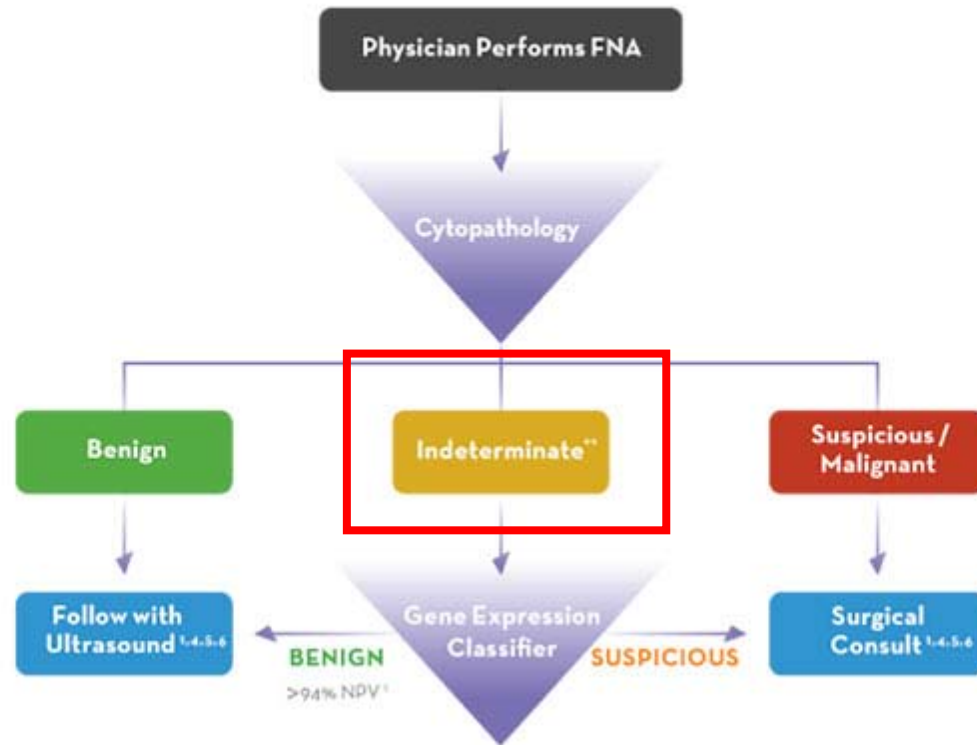
# Μικροσυστοιχίες (microarray) και Καρκινος





# Afirma Gene Expression Classifier (GEC)

Implementing Afirma Thyroid FNA Analysis into Practice  
(A Representative Schematic)



Afirma GEC measures the activity “expression” levels of more than 100 genes in a thyroid nodule FNA

## Φθορισμός

Ο **φθορισμός** είναι ένα φυσικοχημικό φαινόμενο κατά το οποίο ορισμένες ουσίες, μετά από διέγερση, εκπέμπουν ακτινοβολία με μήκος κύματος μεγαλύτερο από εκείνο της διεγείρουσας ακτινοβολίας. Υπάρχουν στη φύση ουσίες που εμφανίζουν "πρωτογενή φθορισμό" ή "αυτοφθορισμό".

**Φθοριοχρώματα:** Είναι ειδικές χημικές ουσίες που έχουν την ιδιότητα να φθορίζουν και χρησιμοποιούνται στον ανοσοφθορισμό για τη σήμανση των αντισωμάτων. Κάθε φθοριόχρωμα απελευθερώνει φθορίζον φως συγκεκριμένου μήκους κύματος το οποίο καθορίζεται από το ποσό της ενέργειας που καταναλώνεται κατά την διέγερση των ηλεκτρονίων του.

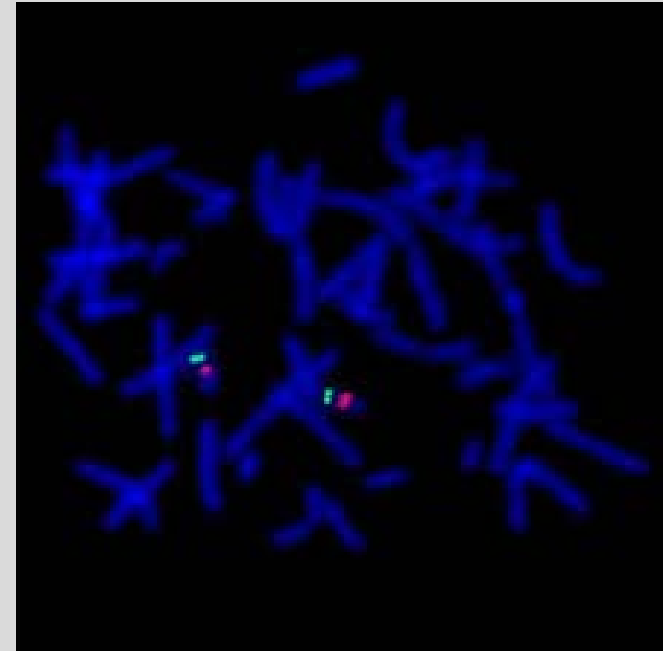
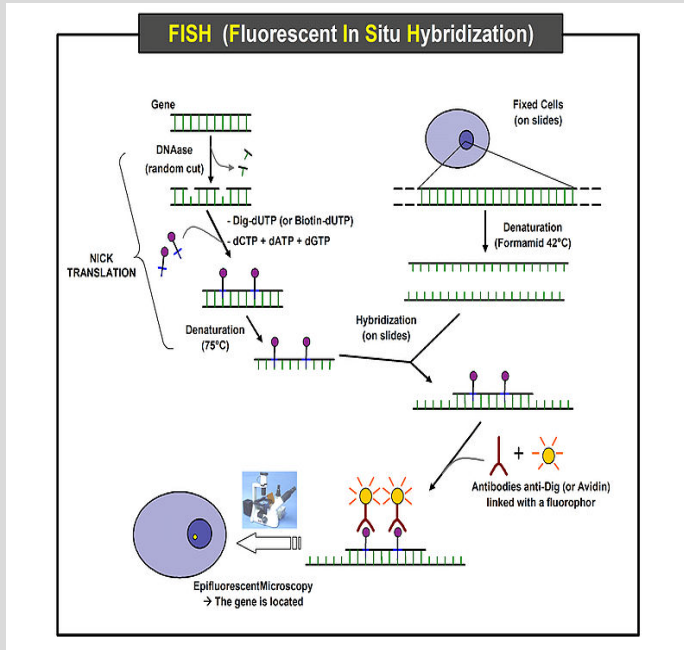
Τα σημαντικότερα φθοριοχρώματα που χρησιμοποιούνται στον ανοσοφθορισμό είναι τα:

1. Ισοθειοκυανική φλουορεσκεΐνη (FITC), εκπέμπει πράσινο χρώμα.
2. Ισοθειοκυανική τετραμεθυλοραδαμίνη (TMRITC), εκπέμπει κόκκινο χρώμα.
3. Φυκοερυθρίνη (RE), εκπέμπει πορτοκαλί χρώμα.

Μερικές από τις πιο σημαντικές εφαρμογές στη διάγνωση και στην έρευνα είναι ο **ανοσοσφορισμός** και *in situ* υβριδοποίηση με φθοριοχρώματα (**Fluorescent in situ Hybridization, FISH**).

# FISH φθορίζων υβριδισμός *in situ*

Η *in situ* υβριδοποίηση με φθοριοχρώματα (**Fluorescent in situ Hybridization, FISH**) έχει συμβάλει σε σημαντικές ερευνητικές εξελίξεις στη Μοριακή Κυτταρογενετική και έχει ενσωματωθεί στην κλινική πρακτική με διαρκώς αυξανόμενο αριθμό αναλύσεων. Με τη συγκεκριμένη τεχνική λύνονται προβλήματα που δεν μπορούν να αντιμετωπισθούν με την κλασική ανάλυση καρυότυπου, αλλά ούτε και με τις μοριακές τεχνικές. Είναι τεχνολογία εξαιρετικά ευαίσθητη και αξιόπιστη και βασίζεται στην υβριδοποίηση φθοριοχρωμασμένων ανιχνευτών με το υπό μελέτη γενετικό υλικό. Ως τεχνική διαθέτει μεγάλη διακριτική ικανότητα, καθώς έχει ως σημαντικό πλεονέκτημα την εφαρμογή της σε πυρήνες

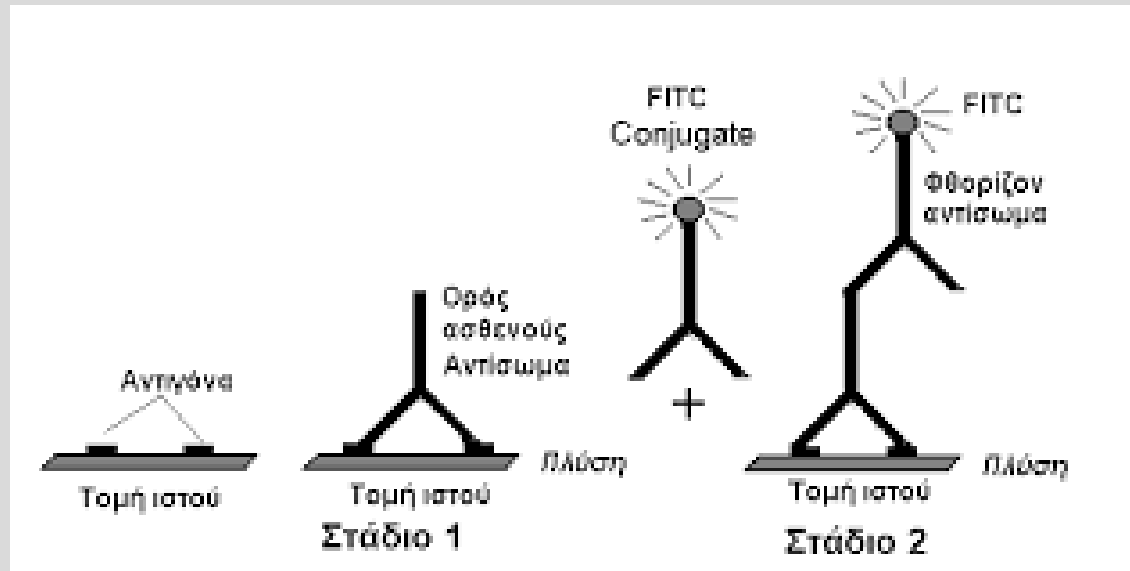


**Χρωμοσωματικές ανωμαλίες μη ανιχνεύσιμες με τον καρυότυπο** Μικρότερες χρωμοσωματικές ανωμαλίες, όπως μικροδιπλασιασμοί και μικροελλείμματα, οι οποίες είναι δυνατόν να προκαλέσουν σοβαρά σύνδρομα, δεν ανιχνεύονται.

**FISH (Fluorescent In Situ Hybridization, φθορίζουσα υβριδοποίηση *in situ*):** Η ανάπτυξη της μεθόδου έφερε μεγάλη πρόοδο στο χώρο της κυτταρογενετικής. Με τη FISH είναι δυνατόν να ανιχνευθούν **στοχευμένα** υπομικροσκοπικές χρωμοσωματικές ανωμαλίες που δε φαίνονται στον καρυότυπο, όπως είναι π.χ. το μικροέλλειμμα 22q11, το οποίο προκαλεί το σύνδρομο DiGeorge, με σοβαρές καρδιακές ανωμαλίες και συχνότητα 1/4.000 γεννήσεις.

# Τεχνικές Ανοσοφθορισμού

Ο ανοσοφθορισμός είναι η μέθοδος κατά την οποία χρησιμοποιούνται φθορίζοντα αντισώματα για την ανίχνευση και εντόπιση αντιγόνου ή αντισώματος σε ιστούς ή κύτταρα. Χρησιμοποιείται κυρίως για την ανίχνευση αυτοαντισωμάτων στα ανοσολογικά εργαστήρια



## **Υποστρώματα για δοκιμασίες ανοσοφθορισμού :**

- 1. Τομές ιστών.** Χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση αυτοαντισωμάτων και τη μελέτη υλικού βιοψίας.
- 2. Μονοστιβάδες κυτταροκαλλιεργημάτων.** Χρησιμοποιούνται κατά κύριο λόγο για την ανίχνευση αυτοαντισωμάτων. Πρόκειται για μονοστιβάδες νεοπλασματικών κυττάρων ανθρώπου ή ζώων (Hep-2, Hela, KB κ.α.). Αναπτύσσονται με μικροκαλλιέργεια σε πλάκες με πολλαπλά βυθίσματα. Μονοστιβάδες από μολυσμένο κυτταροκαλλιέργημα χρησιμοποιούνται για την μελέτη ιών.
- 3. Εναιωρήματα ζωντανών κυττάρων.** Εναιώρημα ζωντανών κυττάρων χρησιμοποιείται για την ανίχνευση επιφανειακών αντιγόνων μονοπύρηνων κυττάρων του αίματος ή μυελού των οστών και διαφόρων νεοπλασματικών κυττάρων ή αντισωμάτων έναντι αυτών.
- 4. Επιχρίσματα κυττάρων ή μικροοργανισμών.**

# Εφαρμογές ανοσοφθορισμού

- 1. Ανίχνευση μικροοργανισμών** Βακτήρια, παράσιτα, μύκητες, ρικέτσιες, ιοί ανιχνεύονται σε ιστούς, βιολογικά υγρά και καλλιέργειες με την μέθοδο του άμεσου ή του έμμεσου ανοσοφθορισμού.
- 2. Ανίχνευση αντισωμάτων έναντι μικροοργανισμών** Η ανίχνευση αυτή γίνεται στον ορό πασχόντων με την μέθοδο του έμμεσου ανοσοφθορισμού.
- 3. Ανίχνευση φυσικών αντιγόνων** *Τέτοια αντιγόνα είναι: ορμόνες, ένζυμα, οργανοειδικά αντιγόνα, εμβρυϊκά αντιγόνα, αντιγόνα όγκων, αντιγόνα λεμφοκυττάρων, μακροφάγων, ερυθρών αιμοσφαιρίων καθώς και τα αντιγόνα ιστοσυμβατότητας. Πραγματοποιείται σε ιστούς και μεμονωμένα κύτταρα με την μέθοδο του άμεσου και του έμμεσου ανοσοφθορισμού.*
- 4. Ανίχνευση μικροοργανισμών και συμπληρώματος στους ιστούς.** Χρησιμοποιείται για την διάγνωση των αυτοάνοσων νόσων. Πραγματοποιείται με άμμεσο ανοσοφθορισμό.
- 5. Ανίχνευση αυτοαντισωμάτων.** Χρησιμοποιείται για την διάγνωση των αυτοάνοσων νόσων. Πραγματοποιείται με έμμεσο ανοσοφθορισμό

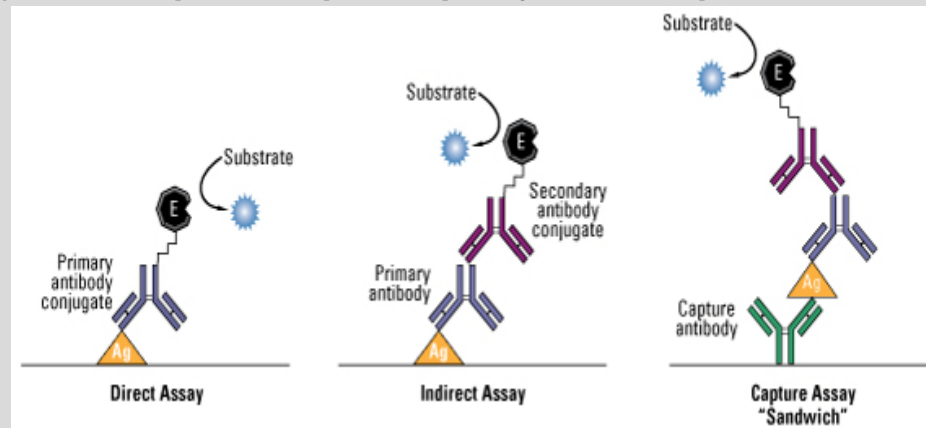
## ΑΝΟΣΟΕΝΖΥΜΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΙΑ (Enzyme-immuno-assay) ELISA (Enzyme - Linked - Immuno - Sorbent - Assay)



- Μέθοδοι που εφαρμόζονται ευρέως στην εργαστηριακή διάγνωση των λοιμώξεων.
- Αναζητούμε είτε άγνωστο Ag είτε άγνωστο Ab.
- Χρησιμοποιείται στη
  - ταχεία εργαστηριακή διάγνωση για την αναζήτηση μικροβιακών αντιγόνων (Ag) στα κλινικά δείγματα (αίμα, ΕΝΥ, υγρά και εκκρίματα των ασθενών) και
  - στην αναζήτηση στον ορό του ασθενούς αντισωμάτων (Abs) έναντι βακτηρίων, ιών, μυκήτων ή παρασίτων για διαγνωστικούς ή άλλους λόγους

## Αρχή της μεθόδου

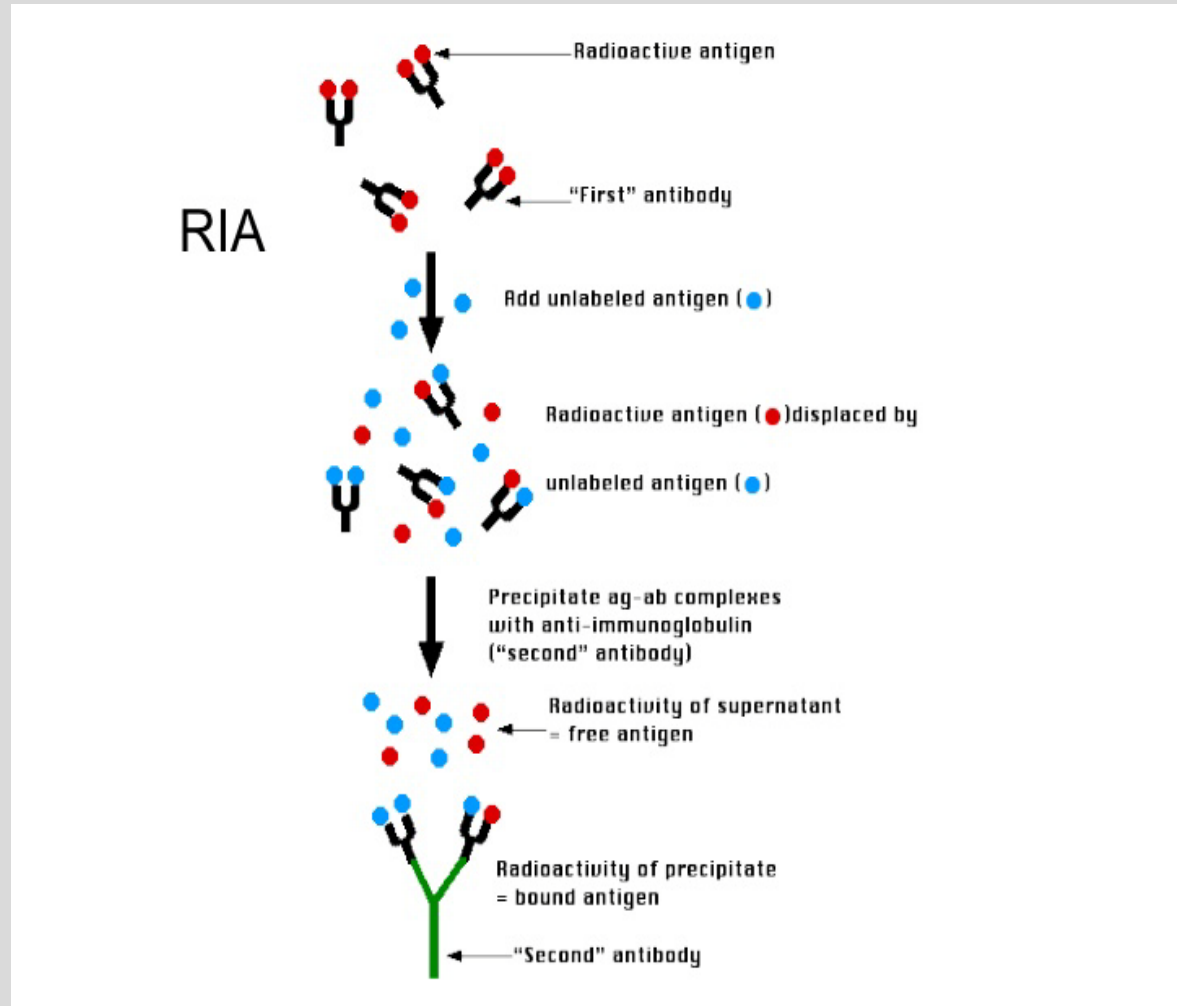
- 1. Σήμανση του Ag ή Ab γίνεται με ένζυμο
- 2. Η αντίδραση Ag-Ab διαπιστώνεται με ανίχνευση του ενζύμου, αφού προστεθεί το υπόστρωμα του ενζύμου
- 3. Τα ένζυμα που χρησιμοποιούνται συνήθως είναι η αλκαλική φωσφατάση και η υπεροξειδάση





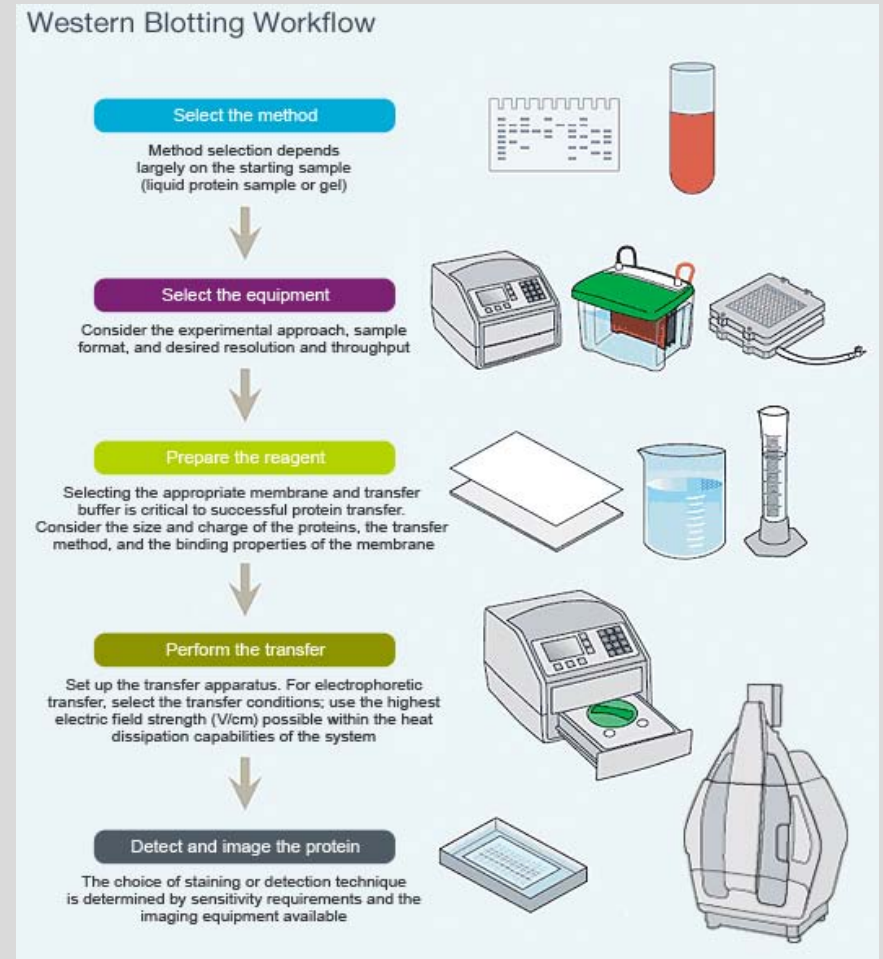
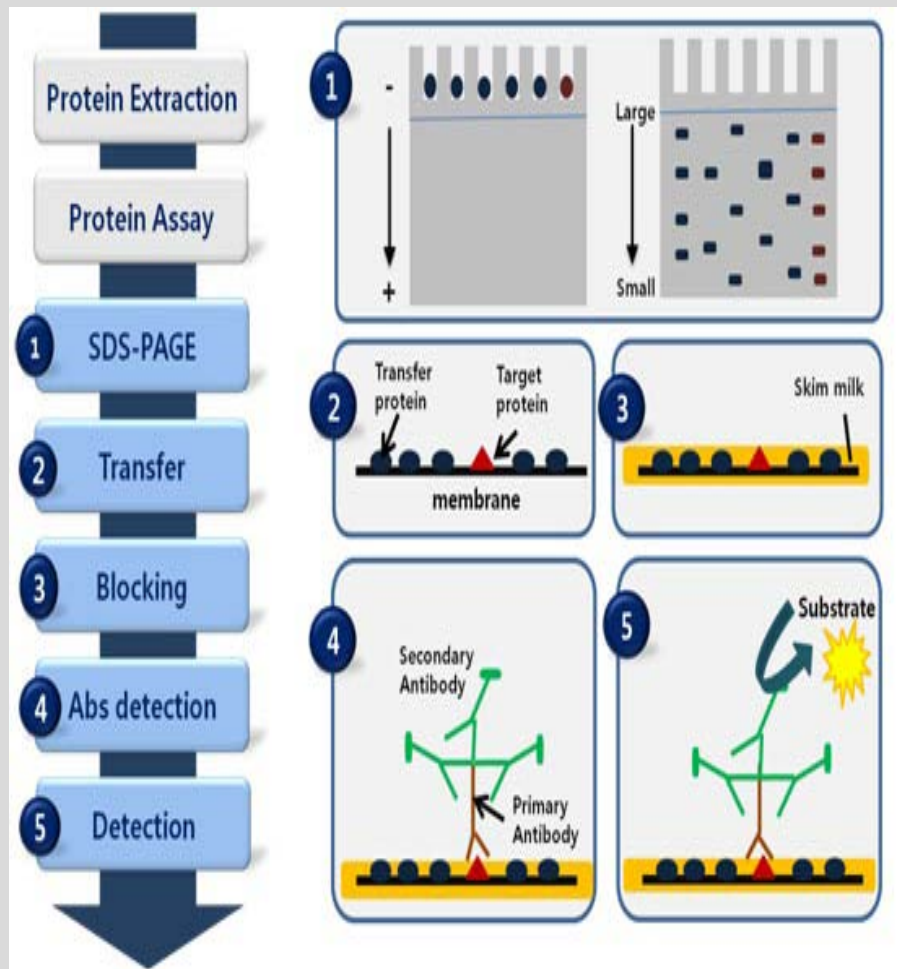
## ΡΑΔΙΟΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ (RIA)

**Radioimmunoassay (RIA)** is a very sensitive in vitro assay technique used to measure concentrations of antigens (for example, hormone levels in blood) by use of antibodies. As such, it can be seen as the inverse of a radiobinding assay, which quantifies an antibody by use of corresponding antigens.



# Ανοσοαποτύπωμα πρωτεϊνών κατά Western (Western Immunoblotting)

Το ανοσοαποτύπωμα (ή ανοσοστύπωμα) των πρωτεϊνών είναι μία αναλυτική μέθοδος που περιλαμβάνει τη μεταφορά των πρωτεϊνών που έχουν διαχωριστεί ηλεκτροφορητικά από το πήκτωμα σε ένα λεπτό και μεμβρανώδες υλικό στήριξης και την ανίχνευσή τους με μονοκλωνικά ή πολυκλωνικά αντισώματα.



# Western Immunoblotting και διάγνωση

- The **confirmatory HIV test** employs a western blot to detect anti-HIV antibody in a human serum sample. Proteins from known HIV-infected cells are separated and blotted on a membrane as above. Then, the serum to be tested is applied in the primary antibody incubation step; free antibody is washed away, and a secondary anti-human antibody linked to an enzyme signal is added. The stained bands then indicate the proteins to which the patient's serum contains antibody.
- A western blot is also used as the definitive test for **bovine spongiform encephalopathy** (BSE, commonly referred to as 'mad cow disease').
- Some forms of **Lyme disease** testing employ western blotting.
- A western blot can also be used as a **confirmatory test for Hepatitis B** infection and HSV-2 (Herpes Type 2) infection.
- Diagnosis of congenital syphilis by detecting **Treponema pallidum**
- In veterinary medicine, a western blot is sometimes used to confirm **FIV**+ status in cat

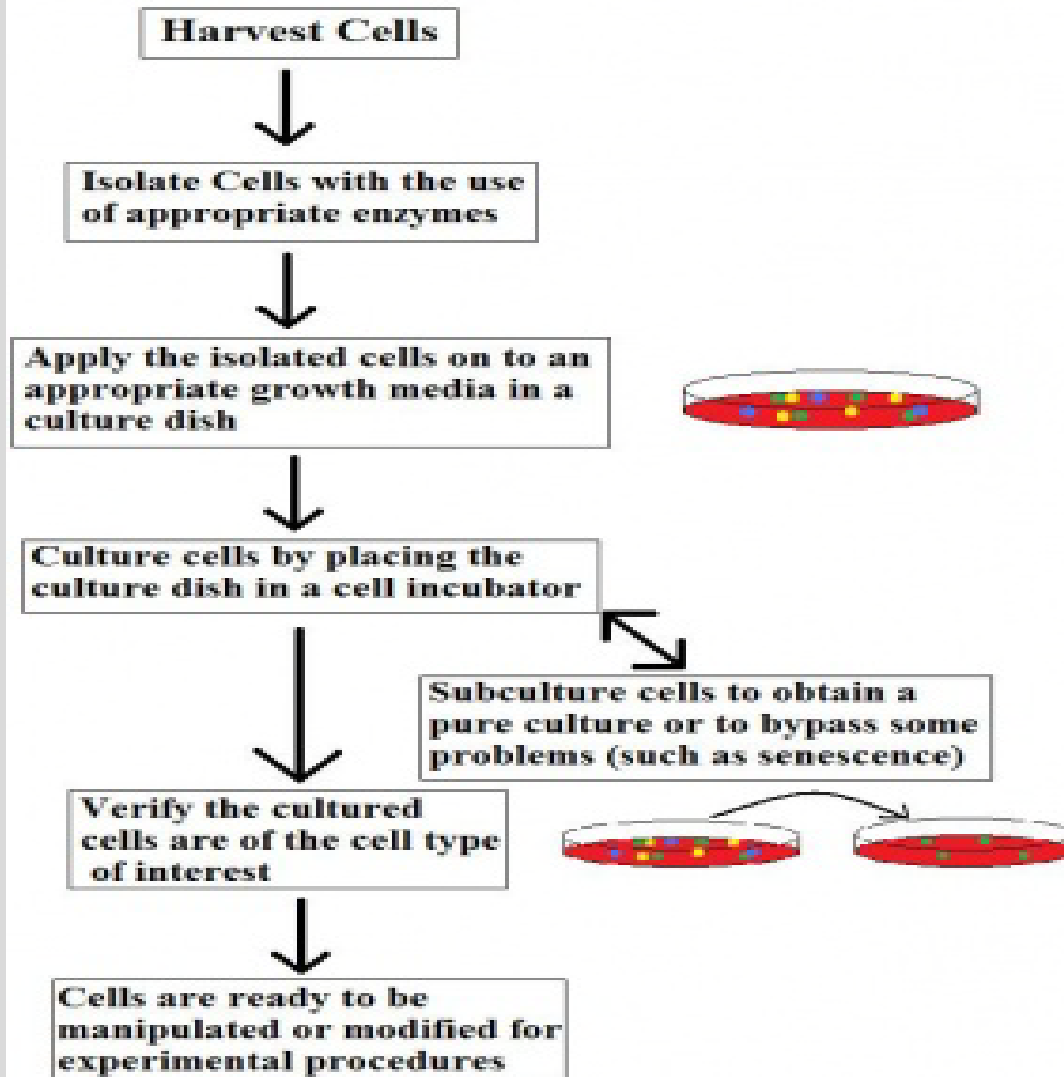
# Κυτταροκαλλιέργειες



Οι καλλιέργειες ιστών αναπτύχθηκαν αρχικά ως μια μέθοδος μελέτης της συμπεριφοράς των κυττάρων ελεύθερων από πιθανές *in vivo* επιδράσεις που συμβαίνουν στον οργανισμό.

Πλέον αποτελούν αναπόσπαστο κομμάτι της **φαρμακοβιομηχανίας**, της **βιομηχανίας τροφίμων** και της **βιοτεχνολογίας**. Οι ορίζοντες όμως και οι δυνατότητες των κυτταροκαλλιεργειών απέκτησαν νέες απρόβλεπτες διαστάσεις τις τελευταίες δεκαετίες με την καλλιέργεια και **διατήρηση ανθρώπινων βλαστικών κυττάρων**.

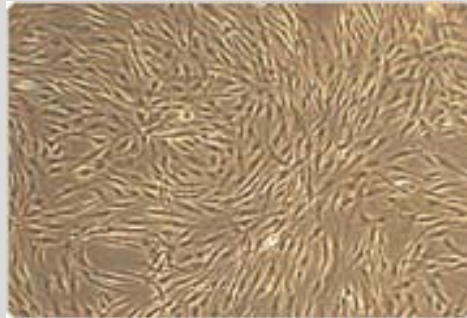
## The Process To Culture Cells



# Ιστοκαλλιέργειες Ινοβλαστών και Λιποκυττάρων



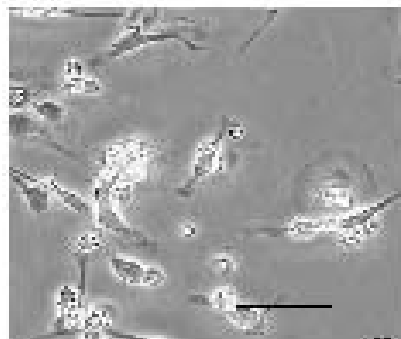
**Day 3 - HDFn**



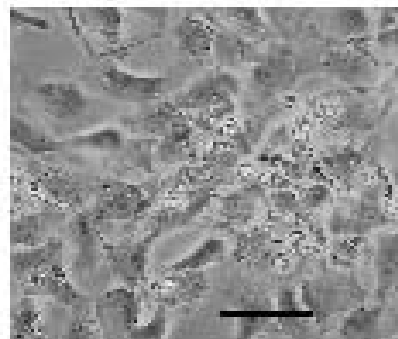
**Day 5 - HDFn**



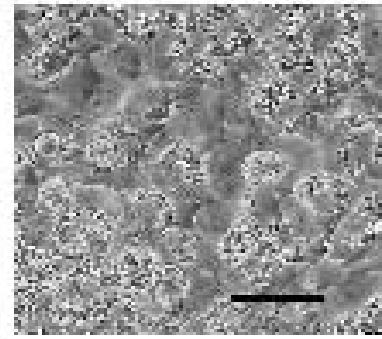
**Day 7 - HDFn**



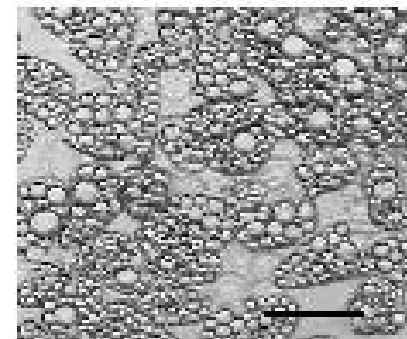
Day 1



Day 3



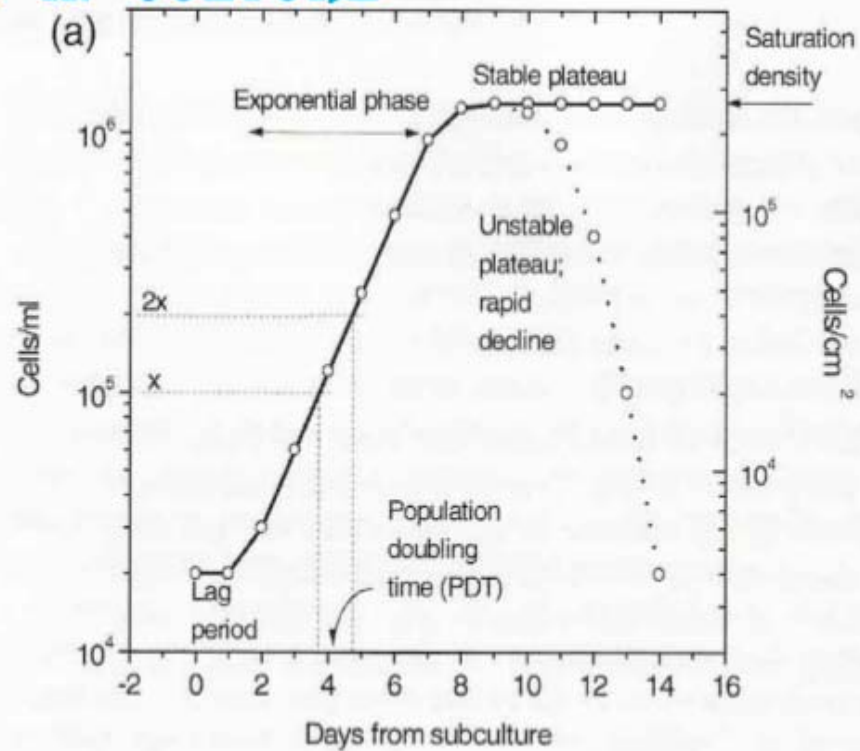
Day 5



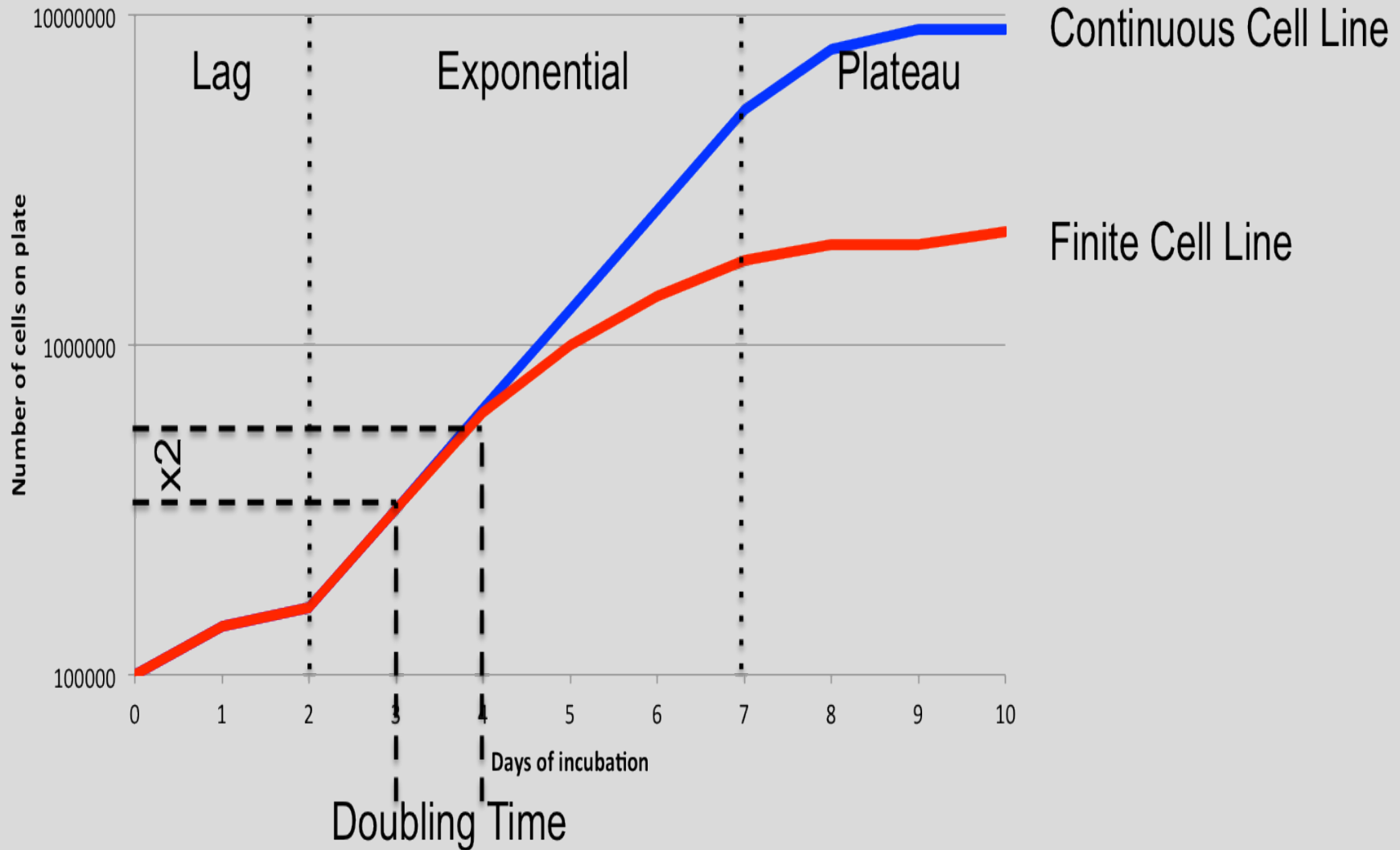
Day 9



## THE IDEAL GROWTH CURVE FOR CELLS IN CULTURE



# Καμπύλες ανάπτυξης κυττάρων





# Ενσωμάτωση BrDu

**Bromodeoxyuridine** (5-bromo-2'-deoxyuridine, **BrdU**, **BUdR**, **BrdUrd**) is a synthetic [nucleoside](#) that is an [analog](#) of [thymidine](#). BrdU is commonly used in the detection of **proliferating** cells in living tissues.

