*Αρχεία Παθολογικής Ανατομικής 1998, 12(3):100-108*
*Archives Hellenic Pathol 1998, 12(3):100-108*

**ΑΡΘΡΟ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗΣ**

# Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης και οι κλινικές της εφαρμογές

***Κ. Αναστασιάδου, Ν. Καπράνος***

---

***Polymerase chain reaction and its clinical applications***

*Anastasiadou C., Capranos N.*
*"Amalia Fleming" General Hospital, Athens. Unit of Molecular Pathology*

*Polymerase chain reaction (PCR) is a recent revolutionary discovery of molecular biology, which has obtained broad clinical and diagnostic applications. PCR is a simple method of amplification of a DNA region selected from specific primers with the use of DNA polymerase. This amplification is accomplished with repeated cycles of 3 sequential reactions which are occurred at different temperatures. PCR is considered as a very sensitive technique where the final product after 30-40 cycles arises to 1 billion copies of the initial DNA sequence. Variations of PCR technique have been developed and they indulge different laboratory requirements such as sensitivity, comparison, quantitation, specificity and accuracy of this technique. The applications of PCR include identification of pathogenic factors, especially viruses, detection of mutations in crucial genes, which are related with carcinogenesis or the inherited predisposition of diseases, gene expression, genotypic analysis of HLA antigens and telomerase activity. The broad range of applications of PCR and the ongoing knowledge on the structure and function of genetic material support that PCR will be an integral tool of diagnostic and research use in the future Pathology laboratory.*

***Key words:*** *Polymerase chain reaction*

*Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) αποτελεί μία πρόσφατη επαναστατική ανακάλυψη της Μοριακής Βιολογίας η οποία σταδιακά αποκτά συνεχώς διευρυνόμενες κλινικές και διαγνωστικές εφαρμογές. Η PCR είναι μια σχετικά απλή μέθοδος πολλαπλασιασμού μιας επιλεγμένης από τους εκκινητές αλληλουχίας DNA με τη βοήθεια του ενζύμου πολυμεράση και επιτυγχάνεται με επαναλαμβανόμενους κύκλους τριών διαδοχικών αντιδράσεων που επιτελούνται σε διαφορετική θερμοκρασία. Η τεχνική PCR θεωρείται εξαιρετικά ευαίσθη-*

---

*Μονάδα Μοριακής Παθολογικής Ανατομικής, ΝΓΝΜ Αμαλία Φλέμιγκ*

*Υποβλήθηκε: 14.3.2001*
*Εγκρίθηκε: 20.4.2001*

*τη δεδομένου ότι το τελικό προϊόν της μετά από 30-40 κύκλους ανέρχεται στο ένα δισεκατομμύριο αντίγραφα της αρχικής αλληλουχίας. Οι παραλλαγές της τεχνικής PCR που αναπτύχθηκαν σταδιακά ικανοποιούν διαφορετικές εργαστηριακές απαιτήσεις που σχετίζονται με την ευαισθησία, τη σύγκριση και ποσοτικοποίηση, την ειδικότητα και ακρίβεια της τεχνικής. Οι εφαρμογές της PCR εκτείνονται από την ανίχνευση και τυποποίηση παθογόνων παραγόντων με ιδιαίτερη έμφαση στους ιούς και την ανίχνευση μεταλλάξεων σε κρίσιμα γονίδια που σχετίζονται με την καρκινογένεση ή την κληρονομική προδιάθεση ασθενειών μέχρι την έκφραση γονιδίων, τη γονοτυπική ανάλυση αντιγόνων ιστοσυμβατότητας και τη δραστηριότητα της τελομεράσης. Το εύρος των εφαρμογών και οι αυξανόμενες γνώσεις της επιστημονικής κοινότητας για τη δομή και λειτουργικότητα του γενετικού υλικού τα τελευταία χρόνια συνηγορούν ότι η PCR θα αποτελεί αναπόσπαστο εργαλείο διαγνωστικής και ερευνητικής χρήσης στο αυριανό Παθολογοανατομικό εργαστήριο.*

***Λέξεις- κλειδιά:*** *Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, μοριακές τεχνικές*

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι πρόσφατες ανακαλύψεις της μοριακής βιολογίας επέδρασαν καταλυτικά στον τομέα της ιατρικής έρευνας και διάγνωσης. Τεχνικές της μοριακής βιολογίας όπως southern blot και in situ υβριδισμός χρησιμοποιούνται σε ορισμένα εργαστήρια ως διαγνωστικές τεχνικές εδώ και λίγα χρόνια. Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) αποτελεί την πιο πρόσφατη εξέλιξη η οποία διεύρυνε τις κλινικές και διαγνωστικές εφαρμογές της μοριακής βιολογίας. Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης είναι μια απλή μέθοδος πολλαπλασιασμού του DNA που προσφέρει μεγάλη ευαισθησία και ταχύτητα. Ο πολλαπλασιασμός αυτός είναι απαραίτητος διότι η ανάλυση των μεταλλάξεων ή πολυμορφισμών καθώς και η ανίχνευση εξωγενούς γενετικού υλικού σε μοριακό επίπεδο απαιτούν μεγάλο αριθμό αντιγράφων DNA[1].

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

## ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΤΕΧΝΙΚΗΣ PCR

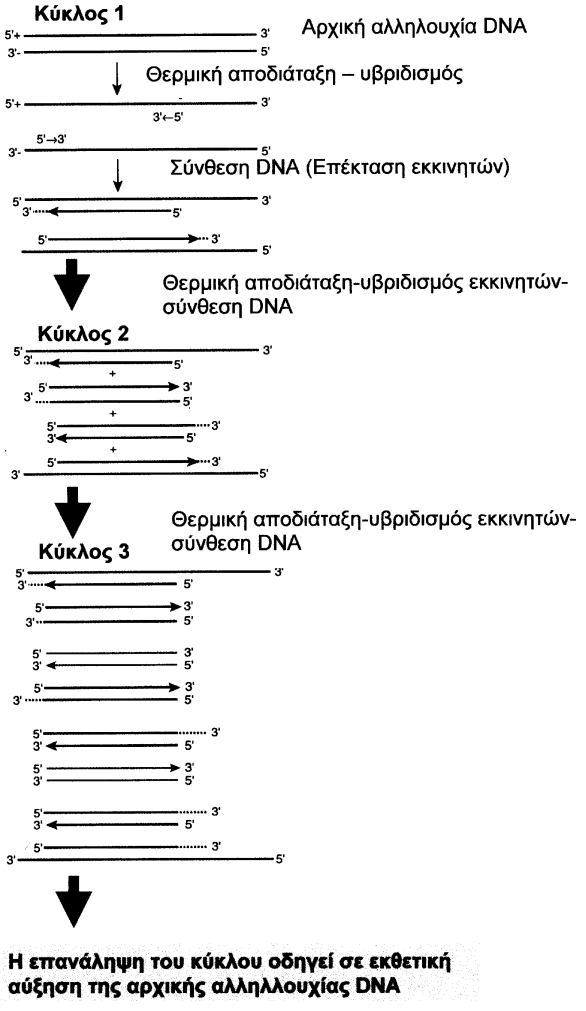
Η τεχνική PCR βασίζεται στον επαναλαμβανόμενο κύκλο τριών απλών αντιδράσεων, οι οποίες διαφέρουν στη θερμοκρασία και το χρόνο[1]. Κάθε κύκλος αποτελείται από τα εξής στάδια (εικόνα 1):

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

Στο πρώτο βήμα του κύκλου γίνεται αποδιάταξη του DNA που έχει απομονωθεί από το δείγμα, αυξάνοντας τη θερμοκρασία της αντίδρασης συνήθως μεταξύ 92°C και 96°C. Με αυτό τον τρόπο οι συμπληρωματικοί κλώνοι του DNA απομακρύνονται[1,2].

Στο δεύτερο βήμα με μείωση της θερμοκρασίας της αντίδρασης (50°-65°C) επιτυγχάνεται ο υβριδισμός των εκκινητών με την αλληλουχία του DNA. Οι εκκινητές (primers) είναι συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια, μήκους 18-30 βάσεων, τα οποία αφορίζουν την αλληλουχία του DNA που πρόκειται να πολλαπλασιαστεί. Οι εκκινητές αποτελούνται από διαφορετικές, μη συμπληρωματικές αλληλουχίες, με αποτέλεσμα να μην υβριδίζονται μεταξύ τους αλλά με τις συμπληρωματικές αλληλουχίες του DNA[1,2].

Στο τρίτο και τελευταίο βήμα πραγματοποιείται η σύνδεση των συμπληρωματικών κλώνων του DNA σε θερμοκρασία 72°C. Αυτό το βήμα επιτυγχάνεται με τη χρήση του ενζύμου DNA πολυμεράση που επιτρέπει τη σύνδεση του DNA σε κατεύθυνση 5′ προς 3′. Μεγάλη ώθηση στην τεχνική PCR έδωσε η ανακάλυψη του θερμοανθεκτικού ενζύμου πολυμεράσης του




**Εικονα 1.** Σχεδιαγραμματική απεικόνιση των επαναλαμβανόμενων σταδίων της PCR[39].

βακτηριδίου *Thermus Aquaticus* (Taq Polymerase). Η Taq Polymerase συνδέτει περίπου 2000 νουκλεοτίδια ανά λεπτό. Ο χρόνος που απαιτείται για την αντιγραφή του DNA-στόχου εξαρτάται από το μήκος του προϊόντος της PCR[1,2].

Σε μια τυπική ανάλυση PCR ο κύκλος αποδιάταξης, υβριδισμού και σύνδεσης νέου DNA μπορεί να επαναληφθεί πολλές φορές, συνήθως 30 ή 40, καταλήγοντας στο σχηματισμό περισσοτέρων από 1 δισεκατομμύριο, ακριβών αντιγράφων του αρχικού τμήματος του DNA[3].

Η αξιολόγηση του προϊόντος της PCR γίνεται συνήθως με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης ή πολυακρυλαμιδίου. Η πηκτή αγαρόζης χρησιμοποιείται πιο συχνά στο διαχωρισμό τμημάτων DNA μήκους από λίγες εκατοντάδες έως και 20.000 βάσεις. Το DNA γίνεται ορατό με τη βοήθεια του βρωμιούχου αιθιδίου. Το πολυακρυλαμίδιο χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό μικρότερων τμημάτων DNA. Το μήκος του προϊόντος συγκρίνεται με το μήκος γνωστού μάρτυρα (DNA Ladder) το οποίο ηλεκτροφορείται ταυτόχρονα. Η τεχνική PCR μπορεί να εφαρμοσθεί σε δείγματα πολλών ειδών όπως αίμα, βιοψίες ιστών, σπέρμα, τρίχα, φρέσκους ιστούς καθώς και σε ιστούς μονιμοποιημένους σε φορμόλη και εμπεδωμένους σε παραφίνη[3].

## ΕΙΔΗ PCR

### PCR μεγάλου μήκους (Long-Distance PCR)

Το PCR μεγάλου μήκους επιτρέπει τον πολλαπλασιασμό ευκαρυωτικού γενωμικού DNA το οποίο περιέχει διαφόρων μεγεθών ιντρόνια, επιτρέποντας έτσι τη σκιαγράφηση των ορίων των ιντρονίων και των εξονίων[3]. Οι σημαντικότερες εφαρμογές της τεχνικής αυτής είναι οι εξής:

α) Ανάλυση μεγαλομοριακών πολυμορφισμών μήκους περιοριστικών δραυσμάτων (restriction fragment length polymorphism, RFLP)[3].

β) Πολλαπλασιασμός και απομόνωση αγνώστων περιοχών του DNA που βρίσκονται μακριά από περιοχές γνωστής αλληλουχίας[3].

γ) Πολλαπλασιασμός μεγάλων περιοχών DNA που περιέχουν γονίδια με ποικίλο επαναλαμβανόμενο αριθμό τρινουκλεοτιδίων, όπως στη νόσο του Huntington, επιτρέποντας έτσι τη διάγνωση της ασθένειας αυτής[3].

### Πολλαπλό PCR (Multiplex PCR)

Το πολλαπλό PCR αποτελεί μια τεχνική η οποία μπορεί να πολλαπλασιάσει ταυτόχρονα 2-3 διαφορετικές αλληλουχίες γονιδιώματος σε μια αντίδραση χρησιμοποιώντας διαφορετικά ζευγάρια εκκινητών. Η εφαρμογή του πολλαπλού PCR έγινε πρώτα σε διάφορες περιοχές του γονιδίου της δυστροφίνης και από τότε άρχισε να χρησιμοποιείται ως γενική μέθοδος. Το πολλαπλό PCR χρησιμοποιείται ευρύτατα για την ανίχνευση διαφόρων παθογόνων, τον προσδιορισμό φύλλου για ιατροδικαστικές μελέτες και τη διάγνωση διαφόρων γενετικών ασθενειών όπως της μυϊκής δυστροφίας Duchenne (Duchenne muscular dystrophy)[3,4].

**RT-PCR (Reverse transcription PCR, PCR αντίστροφης μεταγραφής)**

Η εφαρμογή της RT-PCR έχει σκοπό τη μελέτη της γονιδιακής έκφρασης δεδομένου ότι επιτρέπει την ταχεία ανάλυση του αγγελιοφόρου RNA (mRNA). Σε μια τυπική αντίδραση RT-PCR το RNA απομονώνεται από ιστούς ή κύτταρα και το mRNA που βρίσκεται μέσα στο δείγμα μετατρέπεται στο συμπληρωματικό DNA (cDNA) από το ένζυμο αντίστροφη μεταγραφάση[5]. Το ένζυμο αυτό απαιτεί δίκλωνο DNA για την παραγωγή cDNA. Αυτό εξασφαλίζεται από τον ειδικό για κάθε περίπτωση εκκινητή ο οποίος θα υβριδιστεί με το συμπληρωματικό κομμάτι του mRNA κάτω από κατάλληλες συνθήκες. Το cDNA πολλαπλασιάζεται ακολούθως χρησιμοποιώντας DNA πολυμεράση και ειδικούς εκκινητές. Όπως σε όλες τις αντιδράσεις PCR έτσι και εδώ τα προϊόντα της PCR γίνονται ορατά σε πηκτή αγαρόζης με τη χρήση βρωμιούχου αιθιδίου[6]. Η τεχνική RT-PCR έχει σημαντικές εφαρμογές στο κλινικό εργαστήριο όπως η μελέτη της γονιδιακής έκφρασης, η κλωνοποίηση γονιδίων και η ανίχνευση RNA-ιών.

***In situ* PCR**

Η κλασική τεχνική PCR απαιτεί απομόνωση του DNA (ή RNA) υπό μορφή διαλύματος με αποτέλεσμα την καταστροφή του ιστού και επομένως καθιστά αδύνατη τη συσχέτιση των ευρημάτων της με τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των κυττάρων. Για το λόγο αυτό αναπτύχθηκε πρόσφατα από τους Haase και συν.[7] η τεχνική *in situ* PCR, στην οποία γίνεται επιλεκτική αύξηση του αριθμού μιας αλληλουχίας DNA εντός του ακέραιου κυττάρου, η οποία ακολούθως ανιχνεύεται με *in situ* υβριδισμό. Έτσι επιτυγχάνεται ιδεώδης συνδυασμός της υψηλής ευαισθησίας της PCR και της ακριβούς κυτταρικής εντόπισης του σήματος που παρέχει ο *in situ* υβριδισμός. Η τεχνική *in situ* PCR μπορεί να εφαρμοσθεί σε ακέραια κύτταρα σε εναιώρημα, σε επιχρίσματα κυττάρων, χρωμοσώματα σε μετάφαση και ιστικές τομές ψυκτικού ή παραφίνης[8α] και έχει το μοναδικό πλεονέκτημα να συνδυάζει την ανίχνευση μοριακών ευρημάτων με ταυτόχρονη διατήρηση της μορφολογίας επίπεδο χρωματοσώματος, κυττάρου ή ιστού. Η *in situ* PCR είναι η πλέον πολύτιμη και η περισσότερα υποσχόμενη μορφολογική τεχνική της μοριακής βιολογίας και αναμένεται να συμβάλει στη διερεύνηση σημαντικού αριθμού φυσιολογικών και παθολογικών μηχανισμών σε γονιδιακό επίπεδο. Οι σπουδαιότερες διαγνωστικές εφαρμογές της τεχνικής αφορούν την ανίχνευση ελαχίστου αριθμού αντιγράφων ιών, την έκφραση ογκογονιδίων και αυξητικών παραγόντων σε κυτταρικό επίπεδο και την ύπαρξη χρωμοσωμικών διαμεταθέσεων σε ορισμένους τύπους όγκων (λεμφώματα, PNET, σάρκωμα Ewing)[8β].

**Φωλεακό PCR (Nested PCR)**

Όταν η αναζητούμενη αλληλουχία DNA ή RNA βρίσκεται σε μικρό αριθμό αντιγράφων η απλή τεχνική PCR μπορεί να αποδειχθεί ανεπαρκής για την ανίχνευση της. Στην περίπτωση αυτή χρησιμοποιείται η τεχνική του φωλεακού PCR (ή RT-PCR), η οποία έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της ευαισθησίας και της ειδικότητας της. Η μέθοδος του φωλεακού PCR χρησιμοποιεί 2 διαδοχικές αντιδράσεις PCR[9-11]. Η πρώτη PCR χρησιμοποιεί ένα εξωτερικό ζευγάρι εκκινητών (outer primers) ενώ η δεύτερη δύο φωλεακούς εκκινητές οι οποίοι είναι εσωτερικοί στο πρώτο ζευγάρι (inner primers). Το προϊόν της πρώτης αντίδρασης PCR χρησιμοποιείται ως δείγμα για τη δεύτερη PCR. Το τελικό προϊόν από τη δεύτερη αντίδραση είναι αποτέλεσμα 50 ή περισσοτέρων κύκλων πολλαπλασιασμού[3].

Το φωλεακό PCR μπορεί να είναι 1000 φορές πιο ευαίσθητο από το απλό PCR. Αυτό οφείλεται στην πιο αποτελεσματική αποδιάταξη των μικρών τμημάτων DNA που προστέθηκαν στη δεύτερη αντίδραση από το προϊόν του πρώτου PCR[3]. Μια από τις σημαντικότερες εφαρμογές του φωλεακού PCR ήταν η ανίχνευση διαφόρων αλληλουχιών από αχαρακτήριστες περιοχές του γονιδιώματος του HIV-1 (1200 ή 700 ή 500 βάσεις της γονιδιακής περιοχής env), η οποία είχε ως αποτέλεσμα το χαρακτηρισμό διαφόρων υποτύπων του ιού HIV[12].

**Διαφορικό PCR (Differential PCR)**

Το διαφορικό PCR βασίζεται στην πιθανότητα πολλαπλασιασμού ενός γονιδίου συγχρόνως με μια αλληλουχία αναφοράς. Ο παράλληλος πολλαπλασιασμός μιας αλληλουχίας αναφοράς και ενός τμήματος με άγνωστο αριθμό αντιγράφων σε μια αντίδραση μπορεί να ενισχύσει τις ποσοτικές διαφορές σε σημαντικά επίπεδα[2,13]. Το διαφορικό PCR χρησιμοποι-

είται στην ανίχνευση μεταλλάξεων στα χρωματοσώματα που εμπλέκονται στη χρόνια μυελογενή και οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία[14].

**Τεχνικές PCR για την ανίχνευση μεταλλάξεων**

Οι ακόλουθες τεχνικές βασίζονται στην αντίδραση PCR και χρησιμεύουν στην ανίχνευση γονιδιακών μεταλλάξεων:

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

Η τεχνική αυτή απαιτεί τη χρήση ειδικών μεταλλαγμένων και φυσιολογικών εκκινητών οι οποίοι διαφέρουν μόνο κατά μια βάση στο 3′ άκρο. Κάθε δείγμα πολλαπλασιάζεται και με τους δυο εκκινητές. Το φυσιολογικό δείγμα θα δώσει αποτέλεσμα με τον φυσιολογικό εκκινητή αλλά όχι με τον μεταλλαγμένο εκκινητή ενώ το μεταλλαγμένο δείγμα το αντίθετο[4].

*β) RFLP (restriction fragment length polymorphism, πολυμορφισμός μήκους περιοριστικού θραύσματος)*

Η τεχνική αυτή βασίζεται στην παρουσία ή απουσία ενός στόχου για ένα περιοριστικό ένζυμο, συνήθως λόγω ενός πολυμορφισμού σε μια βάση. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση ελαττωματικών αλληλόμορφων στον προγεννητικό έλεγχο[4,15].

*γ) DGGE (ηλεκτροφόρηση σε κλίση αποδιατακτικού, denaturing gradient gel electrophoresis)*

Η τεχνική αυτή ξεκινά με αντίδραση PCR. Οι τυχόν μεταλλάξεις που μπορεί να υπάρχουν, ανιχνεύονται σε μια ειδική ηλεκτροφόρηση του DNA η οποία πραγματοποιείται σε σταδιακά αυξανόμενη συγκέντρωση αποδιατακτικής ουσίας. Οι μεταλλάξεις ανιχνεύονται από διαφορές στην κινητικότητα του μεταλλαγμένου DNA σε σχέση με αυτήν του DNA μάρτυρα χωρίς μετάλλαξη. Η τεχνική αυτή ανιχνεύει το 99% των μεταλλάξεων[4,15].

*δ) SSCP (πολυμορφισμός διάταξης μονήρους αλυσίδας, single strand conformation polymorphism)*

Στην τεχνική αυτή τα εξόνια ενός γονιδίου πολλαπλασιάζονται και τα μονόκλωνα προϊόντα γίνονται ορατά σε ειδικό αποδιατακτικό gel ηλεκτροφόρησης. Τα μονόκλωνα αυτά προϊόντα έχουν μια συγκεκριμένη διάταξη στο gel ηλεκτροφόρησης με αποτέλεσμα η αλλαγή έστω και μίας βάσης να είναι εύκολο να ανιχνευθεί. Η τεχνική αυτή μπορεί να ανιχνεύσει το 99% των σημειακών μεταλλάξεων σε τμήματα του DNA μέχρι 200 bp[4].

*ε) PTT (Τεστ ατελούς πρωτεΐνης, Protein truncation test)*

Μερικές γονιδιακές μεταλλάξεις οδηγούν στη δημιουργία μιας ακρωτηριασμένης πρωτεΐνης. Η παρουσία μιας τέτοιας μετάλλαξης μπορεί να ανιχνευθεί χρησιμοποιώντας το προϊόν από μια αντίδραση PCR ως μήτρα για in vitro μεταγραφή/μετάφραση (in vitro transcription/translation). Η ακρωτηριασμένη πρωτεΐνη ενός μεταλλαγμένου γονιδίου μπορεί να ανιχνευθεί με ηλεκτροφόρηση. Το πλεονέκτημα αυτής της τεχνικής σε σχέση με τις προηγούμενες είναι ότι μπορεί να ανιχνεύσει βιολογικά σημαντικές αλλαγές[4].

*στ) Προσδιορισμός αλληλουχίας (Sequencing)*

Ο προσδιορισμός της αλληλουχίας ενός γονιδίου αποτελεί τον πιο άμεσο τρόπο για τον προσδιορισμό μεταλλάξεων. Η αντίδραση PCR απλούστευσε κατά πολύ τον προσδιορισμό των αλληλουχιών με τη χρήση των αποληκτικών διδεοξυνουκλεοτιδίων με αποτέλεσμα να μην είναι απαραίτητο πλέον το πολύπλοκο στάδιο της κλωνοποίησης. Ο προσδιορισμός της αλληλουχίας μονόκλωνου DNA γίνεται πλέον αυτόματα με τη χρήση φθορίζουσων εκκινητών ή αποληκτικών διδεοξυνουκλεοτιδίων με βάση πάντα την κλασική μέθοδο του Sanger[4,15].

## ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΧΡΗΣΕΙΣ ΤΗΣ PCR

Από τη στιγμή που πρωτοεφαρμόσθηκε, η PCR κλήθηκε να απαντήσει σε πολλά ερωτήματα. Ένα από αυτά ήταν εάν μια συγκεκριμένη αλληλουχία του DNA ή RNA βρίσκεται σε οποιοδήποτε κλινικό δείγμα. Η PCR χρησιμοποιείται επίσης και στην ιατροδικαστική για την αναγνώριση και ταυτοποίηση μιας κηλίδας αίματος, σπέρματος ή μιας τρίχας. Δεδομένου ότι οι γενετικές και οι λοιμώδεις ασθένειες χαρακτηρίζονται από την παρουσία μεταλλαγμένου ή ξένου DNA, η PCR μπορεί να συμβάλει σημαντικά στη διάγνωση πολλών ασθενειών[17].

Με τη χρήση της PCR έχει ήδη γίνει πολύ μεγάλη πρόοδος στη διάγνωση λοιμωδών

ασθενειών, στον προσδιορισμό της πατρότητας, στον προγεννητικό έλεγχο και στην ανάλυση των αντιγόνων ιστοσυμβατότητας. Ένα πολύ καλό παράδειγμα εφαρμογής της PCR είναι η ανίχνευση του γονιδιώματος του HIV σε άτομα φορείς του ιού όπως έμβρυα από οροθετικές μητέρες και οροαρνητικά άτομα υψηλού κινδύνου.

## PCR και λοιμώδεις νόσοι

Η χρήση της PCR στις λοιμώδεις νόσους επικεντρώθηκε αρχικά στη διάγνωση των ιογενών λοιμώξεων. Η εφαρμογή αυτή είναι ιδιαίτερα χρήσιμη δεδομένου ότι οι καλλιέργειες ιών είναι χρονοβόρες και πολλές φορές ανεπιτυχείς. Αντίθετα η τεχνική PCR είναι ταχύτατη σε αντίθεση με τις κλασικές μεθόδους ανίχνευσης μετά από καλλιέργεια ενώ η ευαισθησία ανίχνευσης είναι μεγαλύτερη ακόμη και από αυτή των ανοσοενζυμικών μεθόδων (Elisa). Με τον τρόπο αυτό αποφεύγονται ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα δεδομένου ότι αρκεί ένα αντίγραφο του παθογόνου αιτίου για θετικό αποτέλεσμα. Επειδή η τεχνική PCR δεν στηρίζεται στην ανίχνευση αντισωμάτων κατά των παθογόνων αιτίων αλλά στην ανίχνευση του DNA του μικροοργανισμού, αφ'ενός μεν δεν παρουσιάζουν λανθάνοντα χρόνο ανίχνευσης, αφετέρου δε δεν επηρεάζονται από την ανοσολογική κατάσταση του ασθενούς[16]. Λόγω της απαράμιλλης ευαισθησίας της PCR, απαιτείται ιδιαίτερη προσοχή στην αξιολόγηση και κλινική ερμηνεία των ευρημάτων της, ιδιαίτερα σε περιπτώσεις ανίχνευσης ελάχιστων αντιγράφων μικροοργανισμών σε ασυμπτωματικούς ασθενείς. Με διάφορες μεθόδους PCR έχουν ανιχνευθεί ιοί όπως ο Epstein-Barr (EBV)[18], ο ιός θηλωμάτων ανθρώπου (human papilloma virus, HPV)[19], ο ιός ανοσοανεπάρκειας ανθρώπου (human immunodeficiency virus HIV)[20,21], ο κυτταρομεγαλοϊός (cytomegalovirus CMV)[22], ο ιός απλού έρπητος (herpes simplex virus HSV)[23,24] και οι ιοί της ηπατίτιδας Β και C[25,16].

Η τεχνική PCR έχει χρησιμοποιηθεί συχνά στην ανίχνευση ογκογόνων ιών όπως του EBV, ο οποίος σχετίζεται με το καρκίνωμα του ρινοφάρυγγα. Ο ιός αυτός μπορεί να χρησιμοποιηθεί σήμερα και ως διαγνωστικός καρκινικός δείκτης σε πρωτοπαθές ή και μεταστατικό καρκίνωμα. Σε περιπτώσεις μεταστατικού καρκινώματος ρινοφάρυγγα η απομόνωση του γονιδιώματος του ιού EBV στα καρκινικά κύτταρα μπορεί να βοηθήσει στην ταυτοποίηση της πρωτοπαθούς εστίας προέλευσης του καρκινώματος[26].

Ιδιαίτερα σημαντική είναι η συμβολή της τεχνικής PCR στη διάγνωση της φυματίωσης, η οποία προκαλείται από το μυκοβακτηρίδιο (Mycobacterium tuberculosis). Η διάγνωση αυτή η οποία κατά κανόνα είναι δύσκολη λόγω μικρής ποσότητας του μυκοβακτηριδίου σε παθολογικά δείγματα, μπορεί να επιτευχθεί με την τεχνική PCR. Η PCR αποτελεί ταχεία και ευαίσθητη τεχνική με δυνατότητα ανίχνευσης 10 βακίλους σε 106 ευκαρυοτικά κύτταρα[12].

## PCR και νεοπλασία

Με τη χρήση της PCR μπορούν να καθοριστούν διάφορες μεταλλάξεις γονιδίων που σχετίζονται με την ανάπτυξη του καρκίνου. Μερικές φορές μια μετάλλαξη μπορεί να εκφράζεται σε επίπεδο mRNA και στην περίπτωση αυτή η εξέταση του είναι ο καλύτερος τρόπος για την ανίχνευσή της. Σε μεγάλους συμπαγείς όγκους και σε βλαστική κρίση στις λευχαιμίες η λήψη δείγματος δεν αποτελεί πρόβλημα, σε αντίθεση με τις μικρές βιοψίες και τις βιοψίες με λεπτή βελόνα όπου το υλικό είναι λίγο[27]. Δεδομένου ότι η PCR μπορεί να ανιχνεύσει γονιδιακές διαταραχές ακόμη και σε ένα νεοπλασματικό κύτταρο είναι φανερό ότι η πρώιμη διάγνωση των καρκίνων μπορεί να γίνει πιο εύκολα[27,28].

Η PCR χρησιμοποιείται ευρέως στην ανίχνευση αλληλουχιών γονιδιώματος ιών που σχετίζονται με κακοήθεις όγκους όπως ο ιός ανθρώπινων θηλωμάτων (human papilloma virus, HPV-16, HPV-18) ορισμένοι τύποι του οποίου σχετίζονται με υψηλό κίνδυνο ανάπτυξης καρκινώματος του τραχήλου και της μήτρας[16,27], ο ανθρώπινος Τ-λεμφοτρόπος ιός (human T-leukocyte virus, HTLV-1) ο οποίος εμπλέκεται στην ανάπτυξη οξείας λευχαιμίας[27] και ο ιός Epstein-Barr ο οποίος έχει παθογενετική σημασία στην ανάπτυξη καρκινώματος του ρινοφάρυγγος και νόσου Hodgkin[16,29,30].

Η PCR χρησιμοποιείται παράλληλα και στην ανίχνευση μεταλλάξεων σε ογκογονίδια και ογκοκατασταλτικά γονίδια. Μερικά από τα πιο διαδεδομένα παραδείγματα είναι τα εξής:

α) BRCA-1 & BRCA-2

Τα ογκοκατασταλτικά γονίδια BRCA1 και BRCA2 (breast-associated cancer genes) ευθύνονται για την ανάπτυξη καρκίνου του μαστού.

Μεταλλάξεις του γονιδίου BRCA1 θεωρούνται υπεύθυνες για την κληρονομική προδιάθεση ανάπτυξης καρκινώματος μαστού και ωοθηκών. Επίσης το 70% των οικογενειών με κληρονομικό καρκίνου μαστού που δεν φέρουν μεταλλάξεις στο γονίδιο BRCA1 σχετίζονται με μεταλλάξεις στο γονίδιο BRCA2[31,32].

β) p53

Το ογκοκατασταλτικό γονίδιο p53 κωδικοποιεί μια πυρηνική πρωτεΐνη η οποία ρυθμίζει τη μεταγραφή γονιδίων υπευθύνων για την επιδιόρθωση του DNA, την κυτταρική διαίρεση και την απόπτωση. Οι μεταλλάξεις του γονιδίου p53 οι οποίες είναι πολύ συχνές σε πολλούς τύπους όγκων είναι κατά το πλείστον σημειακές και αφορούν τα εξόνια 5-8[33].

## PCR και τελομεράση

Η τελομεράση είναι ένα ριβονουκλεοπρωτεϊνικό ένζυμο που αποτελείται από RNA και την καταλυτική μονάδα hTERT. Το ένζυμο λειτουργεί ως αντίστροφη μεταγραφάση και προσθέτει εξανουκλεοτίδια (TTAGGG) στα άκρα των χρωμοσωμάτων, χρησιμοποιώντας ως συμπληρωματικό καλούπι το συστατικό της RNA. Με αυτόν τον τρόπο αντισταθμίζεται η σταδιακή απώλεια των επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών των τελομερών των χρωμοσωμάτων σε κάθε κυτταρική διαίρεση, η οποία όταν ολοκληρωθεί θα οδηγήσει στο θάνατο του κυττάρου[34]. Σε πειραματικές μελέτες έχει βρεθεί ότι η τελομεράση ενεργοποιείται στα αθάνατα κύτταρα (immortal cells) καθώς και σε κύτταρα της γενετικής σειράς (germline cells)[35]. Επίσης, πρόσφατα βρέθηκε ότι η τελομεράση έχει υψηλή δραστηριότητα σε νεοπλασματικά κύτταρα πολλών ειδών όπως αιματολογικών νόσων, καρκινώματος στομάχου, πνεύμονος, ήπατος, παχέος εντέρου, εγκεφάλου, προστάτη, δέρματος, ουροδόχου κύστεως μαστού και νευροβλαστώματος[36].

Η δραστηριότητα της τελομεράσης μπορεί εύκολα να ανιχνευθεί με μια ημι-ποσοτική αντίδραση PCR γνωστή ως TRAP (telomere-repeat amplification protocol)[37]. Σε μια έρευνα από διαφορετικές κυτταρικές σειρές έχει βρεθεί ότι η τελομεράση ενεργοποιείται στις 98 από τις 100 αθάνατες σειρές καρκινικών κυττάρων. Αντίθετα η τελομεράση δεν βρέθηκε να είναι ενεργοποιημένη σε καμία από τις 22 καλλιέργειες φυσιολογικών κυττάρων. Σε βιοψίες διαφόρων τύπων καρκίνου η τελομεράση βρέθηκε ενεργός στα 90 από τα 101 δείγματα 12 διαφορετικών τύπων καρκίνου. Αντίθετα κανένα από τα 50 δείγματα φυσιολογικών ιστών δεν βρέθηκε θετικό για την τελομεράση[37]. Τα ευρήματα αυτά δείχνουν ότι η τελομεράση μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης για την πρώιμη διάγνωση του καρκίνου[38].

## PCR και γενετικές παθήσεις

Στον τομέα των γενετικών ασθενειών, η PCR είναι η πιο διαδεδομένη μέθοδος ανίχνευσης μεταλλάξεων. Σε γενετικές ανωμαλίες μάλιστα, όπου τα προϊόντα των μεταλλαγμένων γονιδίων είναι πολύ δύσκολο να ανιχνευθούν, μόνο η ανάλυση του DNA μπορεί να φανεί χρήσιμη. Η αντίδραση PCR μπορεί να ανιχνεύσει τη μεταβολή ακόμη και μιας βάσης σε ένα γονίδιο και να διαχωρίσει μεταξύ ομόζυγης ή ετερόζυγης μεταβολής του. Ο προγεννητικός έλεγχος μπορεί να γίνει με τη χρήση δειγμάτων από τη χοριακή λάχνη[12]. Οι σπουδαιότερες γενετικές ανωμαλίες που μπορούν να ανιχνευθούν από την PCR είναι οι εξής: αιμοσφαιρινοπάθειες, μεσογειακή αναιμία, κυστική ίνωση, μυϊκή δυστροφία (πίνακας 1).

Η εφαρμογή της PCR συνέβαλε σημαντικά στη διάγνωση της κυστικής ίνωσης σε όλη την Ευρώπη. Η ασθένεια αυτή οφείλεται σε ένα αυτοσωματικό υπολειπόμενο γονίδιο και προσβάλει 1 στα 2000 νεογέννητα της Καυκάσιας φυλής. Η ανεύρεση και ταξινόμηση 60 περίπου μεταλλάξεων, οι οποίες είναι υπεύθυνες για το σχηματισμό μιας παθολογικής πρωτεΐνης, βοήθησε στην αναγνώριση των φορέων αυτής της νόσου. Έχει βρεθεί ότι το 85% περίπου των ατόμων στη Βόρεια Ευρώπη είναι φορείς του γονιδίου της κυστικής ίνωσης και η αναγνώριση αυτών μπορεί εύκολα να γίνει με την ανάλυση του DNA[12].

## PCR και μεταμόσχευση οργάνων

Τα τελευταία χρόνια μεγάλο μέρος της έρευνας έχει αφιερωθεί στα ανθρώπινα λευκοκυτταρικά αντιγόνα του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (major histocompatibility complex, MHC). Τα αντιγόνα HLA class II αποτελούν σημαντικούς παράγοντες οι οποίοι εμπλέκονται στην αντίδραση απορρίψεως μοσχεύματος. Με τη βοήθεια της ανάλυσης του DNA έχουν αναγνωρισθεί τα γονίδια DR, DQ και DP του συστήματος HLA. Η τεχνική PCR επομένως μπορεί να συμβάλλει σε γενετικό

**Πίνακας 1.** Γενετικές ασθένειες που μπορούν να διαγνωσθούν με την τεχνική PCR

| |
|---|
| *ΤΥΠΟΥ ΑΥΤΟΣΩΜΑΤΙΚΟΥ ΕΠΙΚΡΑΤΟΥΝΤΟΣ* |
| Πολυκυστικός νεφρός ενηλίκων |
| Νόσος του Huntington |
| Μυοτονική δυστροφία |
| Οζώδης σκλήρυνση |
| *ΤΥΠΟΥ ΑΥΤΟΣΩΜΑΤΙΚΟΥ ΥΠΟΛΕΙΠΟΜΕΝΟΥ* |
| β-μεσογειακή αναιμία |
| δ-μεσογειακή αναιμία |
| Κυστική ίνωση |
| Φαινυλοκετονουρία |
| Έλλειψη της α1-αντιθρυψίνης |
| Ρετινοβλάστομα |
| Έλλειψη της 21-υδροξυλάσης |
| *ΤΥΠΟΥ ΦΥΛΟΣΥΝΔΕΤΟΥ ΜΕ ΤΟ Χ* |
| Σύνδρομο του εύθραστου Χ (Fragile-X syndrome) |
| Αιμοφιλία Α |
| Αιμοφιλία Β |
| Μυϊκή δυστροφία Duchenne |
| Μελαγχρωστική αμφιβληστροειδοπάθεια (Retinitis Pigmentosa) |
| *ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΕΣ ΝΟΣΟΙ* |
| Υπερχολιστεριναιμία |
| Έλλειψη ορνιθίνης τρανσκαρβαμυλάσης |
| Έλλειψη γλυκόζης-6-φωσφατάσης αφυδρογονάσης |
| Νόσος του Gaucher |
| Σύνδρομο Lesch-Nyhan |

επίπεδο στη διάκριση συγγενικών αλληλουχιών από μη συγγενείς και να οδηγήσει σε πιο αποτελεσματική χρήση της μεταμόσχευσης στην ιατρική[27].

## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η εφαρμογή της PCR στην κλινική διάγνωση είναι ικανή να αλλάξει την κατεύθυνση ενός παθολογοανατομικού εργαστηρίου. Η PCR μπορεί να δώσει γρήγορα και εύκολα ακριβείς πληροφορίες και να συμβάλλει αποφασιστικά στην καλύτερη αντιμετώπιση των ασθενειών. Αν και η εφαρμογή της τεχνολογίας του ανασυνδυασμένου DNA στην ανατομική και κλινική παθολογία είναι ακόμη σε αρχικά στάδια, το μεγάλο βήμα έχει ήδη γίνει. Η εφαρμογή της PCR, με τους «ιδανικούς» εκκινητές για τον πολλαπλασιασμό ενός γονιδίου και των προϊόντων του, θα αποτελέσει ένα πολύ δυνατό διαγνωστικό όπλο στο παθολογοανατομικό εργαστήριο του μέλλοντος.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ


1. Mullis KB, Ferre F, Gibbs RA. The polymerase chain reaction. Birkhauser, 1994.
2. Rolfs A, Schuller I, Finckh U, Weber-Rolfs I. PCR: Clinical diagnostics and research, Springer Laboratory, 1992.
3. Dieffenbach CW, Dveksler GS. PCR Primer, A Laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995.
4. Sudbery P. Human Molecular Genetics, Longman, 1998.
5. Rappolee DA, Mark D, Banda MJ, Werb Z. Wound macrophages express TGF-α and other growth factors in vivo: analysis by mRNA phenotyping. Science 241:708-712, 1988.
6. Salomon RN. Introduction to reverse transcription polymerase chain reaction. Diagn Mol Pathol 4(1):2-3, 1995.
7. Haase At, Retzel EF, Staskus KA. Amplification and detection of lentivirus DNA inside cells. Proc Natl Acad Scie USA 87:4971-4975, 1990.

8α. Komminoth P, Long AA. In situ polymerase chain reaction. An overview of methods, applications and limitations of a new molecular technique. Virchows Arch [B] 64:67-73, 1993.

8β. Ν. Καπράνος. In situ Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης. Αρχεία Παθολογικής Ανατομικής, Τόμος 11, Παράρτημα 1: Μοριακή Παθολογική Ανατομική, σελ. 25-34, 1997.

9. Mullis K, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase chain reaction. Methods Enzymol 155:335-350, 1987.
10. Gibbs RA. DNA amplification by the polymerase chain reaction. Anal Chem 62:1202-1214, 1990.
11. Zhang X-Y, Ehrlich A. Detection and quantitation of low numbers of chromosomes containing bcl-2 oncogene translocations using semi-nested PCR. Bio techniques 16:502-507, 1994.
12. Watson JD, Gilman M, Witkowski J, Zoller M. Recombinant DNA. W.H Freeman & Company, Scientific American Books, 1994.
13. Frye RA, Benz CC, Liu E. Detection of amplified oncogenes by differential polymerase chain reaction. Oncogene 4:101-105, 1989.
14. Neubauer A, Neubauer B, Liu E. Polymerase chain reaction based assay to detect allelic loss in human DNA: loss of β-interferon gene in chronic myelogenous leukemia. Nucl Acids Res 18:993-998, 1990.
15. Loda M. Polymerase chain reaction-based methods for the detection of mutations in oncogenes and tumour suppressor genes. Hum Pathol 25:564-571, 1994.
16. Gazdar AF. Applications of molecular medicine to clinical oncology. Molecular Methods

in Oncology 185-189, 1997.
17. Desforges JF. The polymerase chain reaction: a new method of using molecular genetics for medical diagnosis. N Engl J Med 322:178-183, 1990.
18. Saito I, Servenius B, Compton T, Fox RI. Detection of Epstein-Barr virus DNA by polymerase chain reaction in blood and tissue biopsies from patients with Sjogren's syndrome. J Exp Med 169:2191-2198, 1989.
19. Shibata DK, Arnheim N, Martin WJ. Detection of human papilloma virus in paraffin-embedded tissue using the polymerase chain reaction. J exp Med 167:225-230, 1988.
20. Loche M, Mach B. Identification of HIV-infected seronegative individuals by a direct diagnostic test based on hybridization to amplified viral DNA. Lancet 2:418-421, 1988.
21. Hart C, Schochetman G, Spira T. Direct detection of HIV RNA expression in seropositive subjects. Lancet 2:596-599, 1988.
22. Cassol SA, Poon MC, Pal R. Primer-mediated enzymatic amplification of cytomegalovirus (CMV) DNA. Application to the early diagnosis of CMV infection in marrow transplant recipients. J Clin Invest 83:1109-115, 1989.
23. Johnson G, Nelson S, Petric M, Tellier R. Comprehensive PCR-based assay for detection & species identification of human herpesviruses. J Clin Microbiol 38:3274-3279, 2000.
24. Nogueira ML, Amorim JB, Oliveira JG, Bonjardim CA, Ferreira PC, Croon EG. Comparison of virus isolation and various polymerase chain reaction methods in the diagnosis of mucocutaneous herpesvirus infection. Acta Virol 44:61-5, 2000.
25. Sumazaki R, Motz M, Wolf H, Heinig J, Jilg W, Deinhardt F. Detection of hepatitis B virus in serum using amplification of viral DNA by means of the polymerase chain reaction. J Med Virol 27:304-308, 1989.
26. Feinmesser R, Miyazaki I, Cheung R. Diagnosis of nasopharyngeal carcinoma by DNA amplification of tissue obtained by fine-needle aspiration. N Engl J Med 326:17-21, 1992.
27. Madej R. Polymerase chain reaction: applications to the clinical laboratory. LabMedica 10-17, 1991.
28. Remick DG, Kunkel SL, Holbrook EA, Hanson CA. Theory and applications of the polymerase chain reaction. Am J Clin Pathol 93(S1):S49-S54, 1990.
29. Flavell KJ, Murray PG. Hodgkin's disease and the Epstein-barr virus. Mol Pathol 53:262-269, 2000.
30. Shotelersuk K, Khorprasert C, Sakdikul S, Pornthanakasem W, Voravud N, Mutirangura A. Epstein-Barr virus DNA in serum/plasma as a tumour marker for nasopharyngeal cancer. Clin Cancer Res 6:1046-1051, 2000.
31. Kamb A, Skolnick MH. Identification of the BRCA1 breast cancer gene and its clinical implications. Important Adv Oncol 23-35, 1996.
32. Καπράνος Ν, Κουνέλη Σ. Που κατευθύνεται η έρευνα στον καρκίνο του μαστού. Θέματα Μαιευτικής-Γυναικολογίας. Τόμος ΙΑ:391-400, 1997.
33. Oliver JD. The role of p53 in cancer development. Sci Am Sep/Oct: 16-25, 1994.
34. Blackburn EH. Telomerases. Annu Rev Biochem 61:113-129, 1992.
35. Blackburn EH: The molecular structure of centromeres and telomeres. Ann Rev Biochem 53:163-194, 1984.
36. Dhaene K, Van Marck EV, Parwaresch R. Telomeres, telomerase and cancer: an up-date. Virch Arch 437:1-16, 2000.
37. Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR et al: Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. Science 266:2011-2015, 1994.
38. Kim NW: Clinical implications of telomerase in cancer. Eur J Cancer 33:781-786, 1997.
39. Old RW, Primrose SB. Principles of gene manipulation, an introduction to genetic engineering, 5th edition, Blackwell science, 1994.

*Corresponding author*
*Kapranos N.*
*11 Megalou Spileou str.*
*11522 Athens Gr.*
*Tel. 8038121, Fax: 8041372*
*email: nkapran@otenet.gr*