

Θέματα Γονιδιωματικής, Πρωτεομικής και Βιοτεχνολογίας

Γονιδιώματα

Το γονιδίωμα περιλαμβάνει τόσο τα γονίδια όσο και τις μη κωδικοποιούσες ακολουθίες DNA. Ο όρος προτάθηκε το 1920 από τον καθηγητή Hans Winkler, του Πανεπιστημίου του Αμβούργου. Το αγγλικό λεξικό της Οξφόρδης παραθέτει ότι ο συγκεκριμένος όρος προκύπτει ως σύνθεση των λέξεων γονίδιο και χρωμόσωμα.

Η μελέτη των ιδιοτήτων των γονιδιωμάτων συγγενικών οργανισμών, αναφέρεται συνήθως ως γονιδιωματική (genomics) και διαφοροποιείται ως όρος από τη γενετική που μελετά τις ιδιότητες μεμονωμένων γονιδίων ή ομάδων γονιδίων.

Στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς όπως είναι τα φυτά, τα πρωτόζωα και τα ζώα, ο όρος «γονιδίωμα» υποδηλώνει μόνο τις πληροφορίες από το χρωμοσωμικό DNA. Έτσι αν και αυτοί οι οργανισμοί έχουν μιτοχόνδρια που περιέχουν το δικό τους DNA, γνωστό ως «μιτοχονδριακό γονιδίωμα», τα γονίδια σε αυτό το μιτοχονδριακό DNA δεν θεωρούνται μέρος του γονιδιώματος του οργανισμού.

Τα γονιδιώματα των διαφόρων οργανισμών παρουσιάζουν μια σημαντική ποικιλομορφία. Η ποικιλομορφία αφορά όχι μόνο το μέγεθος του γονιδιώματος, αλλά και τον τρόπο αποθήκευσης της πληροφορίας, είτε ως μονόκλωνο είτε ως δίκλωνο DNA ή RNA. Επιπλέον, μερικά γονιδιώματα είναι γραμμικά (π.χ. στα θηλαστικά), ενώ άλλα είναι κυκλικά (π.χ. στα περισσότερα βακτήρια). Τα κυκλικά γονιδιώματα αποτελούνται πάντα από DNA, ενώ τα γονιδιώματα ιών και φάγων δυνατόν να αποτελούνται από DNA ή RNA.

Ενώ το μέγεθος των βακτηριακών γονιδιωμάτων συσχετίζεται άμεσα με το επίπεδο γενετικής πολυπλοκότητας, στα ευκαρυωτικά γονιδιώματα ενδέχεται να υπάρχουν μεγάλες ακολουθίες που δεν σχετίζονται με την κωδικοποίηση πρωτεϊνών ή μορίων RNA. Οι οργανισμοί που χρειάζονται βασικά τις ίδιες λειτουργικές διεργασίες μπορούν να έχουν μια μεγάλη ποικιλία στα μεγέθη του γονιδιώματός τους. Για παράδειγμα, τα σπονδυλωτά έχουν πολύ διαφορετικά μεγέθη γονιδιώματος. Τα σπονδυλωτά με τη μεγαλύτερη ποσότητα DNA ανά κύτταρο είναι τα αμφίβια. Τα γονιδιώματά τους καλύπτουν μια τεράστια γκάμα, από 700Mbp (ζεύγη βάσεων, base-pairs,

bp) έως και περισσότερο από 80.000 Mbp. Εντούτοις, είναι σίγουρα λιγότερο σύνθετοι οργανισμοί σε σχέση με τον άνθρωπο ως προς τη δομή και τη λειτουργία τους.

Το Πρόγραμμα Αποκωδικοποίησης του Ανθρώπινου Γονιδιώματος (The Human Genome Project, HGP)

Το Πρόγραμμα Αποκωδικοποίησης του Ανθρώπινου Γονιδιώματος (HGP) είναι ένα διεθνές επιστημονικό – ερευνητικό πρόγραμμα που έθεσε ως πρωταρχικό στόχο τον καθορισμό της ακολουθίας των ζευγών βάσεων που αποτελούν το ανθρώπινο DNA καθώς επίσης και την εύρεση των γονιδίων του ανθρώπινου γονιδιώματος. Το HGP είναι ένα από τα μεγαλύτερα ερευνητικά προγράμματα της σύγχρονης επιστήμης.

Το πρόγραμμα ξεκίνησε το 1990. Μια πρώτη καταγραφή του γονιδιώματος δημοσιεύτηκε το 2000 και η επίσημη πλήρης δημοσίευση έγινε το 2003, ενώ τα αποτελέσματα περαιτέρω αναλύσεων συνεχίζουν να δημοσιεύονται. Ήταν το αποτέλεσμα της σύμπραξης εθνικών ιδρυμάτων και οργανισμών με ιδιωτικές εταιρίες. Το μεγαλύτερο μέρος της αλληλούχισης έλαβε χώρα σε πανεπιστημιακά και ερευνητικά ιδρύματα των Η.Π.Α, Καναδά και Μεγάλης Βρετανίας.

Στα πλαίσια του προγράμματος έγινε επίσης αλληλούχιση γονιδιωμάτων άλλων οργανισμών – μοντέλων, με στόχο την καλύτερη ερμηνεία του ανθρώπινου DNA, την εύρεση και διερεύνηση της λειτουργίας των γονιδίων .

Η νέα αναλυτική τεχνολογία που προέκυψε με στόχο την αποκωδικοποίηση αλλά πρωτίστως τα στοιχεία που προκύπτουν από το HGP δημιουργούν σύνθετα ηθικά και κοινωνικά ζητήματα για τα άτομα και την κοινωνία. Αυτές οι προκλήσεις περιλαμβάνουν τη μυστικότητα, τη δικαιοδοσία στην πρόσβαση και χρήση των γενετικών πληροφοριών, κ.α. Για το λόγο αυτό, προγράμματα που προσδιορίζουν και εξετάζουν τις επιπτώσεις από τέτοιου είδους στοιχεία, αποτελούν ένα αναπόσπαστο τμήμα του HGP ενώ έχουν γίνει πρότυπο για προγράμματα βιοηθικής παγκοσμίως.

Τα «αποτελέσματα» και επιτεύγματα του HGP

Οι πρώτες «πανοραμικές απόψεις» του ανθρώπινου γονιδιώματος έχουν αποκαλύψει μια πληθώρα πληροφοριών και κάποιες εκπλήξεις. Κάποια ενδεικτικά στοιχεία δίνονται στη συνέχεια.

1. Το ανθρώπινο γονιδίωμα περιέχει 3 δισεκατομμύρια νουκλεοτιδικές βάσεις (A, C, T, and G).
2. Το μέσο γονίδιο αποτελείται από 3.000 βάσεις, αλλά υπάρχει μεγάλη ποικιλία στα μεγέθη με το μεγαλύτερο γνωστό γονίδιο να αποτελείται από 2.400.000 βάσεις.
3. Πάνω από το 50% των γνωστών γονιδίων έχει ακόμα άγνωστες λειτουργίες.
4. Το ανθρώπινο γονιδίωμα είναι στη συντριπτική του πλειοψηφία (99.9%) ακριβώς το ίδιο σε όλους τους ανθρώπους.
5. Περίπου το 2% του γονιδιώματος κωδικοποιεί πρωτεΐνες.
6. Οι επαναλαμβανόμενες ακολουθίες, που δεν κωδικοποιούν πρωτεΐνες, αποτελούν πάνω από το 50% του ανθρώπινου γονιδιώματος.
7. Το ανθρώπινο γονιδίωμα έχει σημαντικά μεγαλύτερο ποσοστό επαναλαμβανόμενων ακολουθιών (50%) σε σχέση με άλλους οργανισμούς – μοντέλα όπως ο σκώληκας (7%) και η δροσόφιλα (3%).
8. Πάνω από το 40% των προβλεπόμενων ανθρώπινων πρωτεϊνών έχουν ομοιότητες με τις πρωτεΐνες στη δροσόφιλα ή στο σκώληκα.
9. Τα γονίδια εμφανίζονται να συγκεντρώνονται σε τυχαίες περιοχές του γονιδιώματος, με μεγάλα διαστήματα μη κωδικοποιουσών περιοχών μεταξύ τους. Το χρωμόσωμα 1 (το μεγαλύτερο ανθρώπινο χρωμόσωμα) έχει το μεγαλύτερο αριθμό γονιδίων (2968), και το χρωμόσωμα Y έχει το μικρότερο πλήθος (231).
10. Έχουν εντοπιστεί συγκεκριμένες ακολουθίες σε συγκεκριμένα γονίδια που έχουν συσχετιστεί με ασθένειες (π.χ καρκίνος του μαστού, μυασθένειες, κώφωση, κ.λ.π).
11. Έχουν ανακαλυφθεί περίπου 3.000.000 θέσεις όπου εντοπίζονται διαφοροποιήσεις μιας βάσης DNA μεταξύ διαφορετικών ανθρώπων. Οι θέσεις αυτές είναι ιδιαίτερα σημαντικές καθώς αναμένεται να βοηθήσουν σημαντικά στην εύρεση ακολουθιών που σχετίζονται με ασθένειες όπως οι καρδιοαγγειακές παθήσεις, ο διαβήτης, ο καρκίνος.

Τα δεδομένα που δημοσιεύονται από το HGP δεν αντιπροσωπεύουν την ακριβή ακολουθία γονιδιώματος κάθε ατόμου. Είναι το συνδυασμένο γονιδίωμα ενός μικρού αριθμού ανώνυμων δοτών.

Οι ακολουθίες του ανθρώπινου γονιδιώματος είναι αποθηκευμένες σε βάσεις δεδομένων που είναι ελεύθερα διαθέσιμες μέσω του διαδικτύου. Οι 3 μεγαλύτερες βάσεις νουκλεοτιδικών δεδομένων που είναι ελεύθερα διαθέσιμες είναι η DNA Data Bank of Japan (DDBJ, <http://www.ddbj.nig.ac.jp/>) στο Center for Information Biology (CIB), η GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>) στο National Center for Biotechnology Information (NCBI) και η EMBL_Bank (<http://www.ebi.ac.uk/embl/index.html>) στο European Bioinformatics Institute (EBI).

Η συνεργασία μεταξύ των βάσεων περιλαμβάνει τη δημιουργία κοινών κανόνων για την ταξινόμηση και το σχολιασμό των δεδομένων και την καθημερινή ανταλλαγή εγγραφών που κατατίθενται ανεξάρτητα σε κάθε βάση δεδομένων. Αν και οι γονιδιωματικές ακολουθίες αποτελούν καταχωρήσεις σε νουκλεοτιδικές βάσεις δεδομένων, για πολλά είδη έχουν αναπτυχθεί ειδικές βάσεις δεδομένων που συνδυάζουν τα δεδομένα γονιδιωματικών ακολουθιών και το σχολιασμό τους με άλλα στοιχεία για τα συγκεκριμένα είδη. Οι βάσεις δεδομένων αυτές παρουσιάζουν μια ποικιλομορφία όσον αφορά στο είδος και στον τρόπο αποθήκευσης των δεδομένων.

Ο Genomes Server (<http://www.ebi.ac.uk/genomes/>) παρέχει πρόσβαση σε εκατοντάδες γονιδιώματα από αρχαία, βακτήρια, ευκαρυωτικούς οργανισμούς, φάγους, πλασμίδια και ιούς.

Το πρόγραμμα Ensembl (<http://www.ebi.ac.uk/ensembl/index.html>), που αποτελεί συνεργασία του EBI και του Wellcome Trust Sanger Institute στοχεύει στην ανάπτυξη ενός συστήματος αυτόματου σχολιασμού μεγάλων ευκαρυωτικών γονιδιωμάτων.

Το Entrez Genomes (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Genome>) παρέχει πρόσβαση σε δεδομένα πλήθους γονιδιωμάτων.

Η διαδικασία εύρεσης των ορίων των γονιδίων και άλλων χαρακτηριστικών γνωρισμάτων καλείται σχολιασμός γονιδιώματος και είναι επιστημονικό πεδίο της βιοπληροφορικής. Ενώ ο σχολιασμός από ειδικούς βιολόγους είναι ο πιο ακριβής λόγω μεγάλου όγκου δεδομένων χρησιμοποιούνται όλο και περισσότερο προγράμματα υπολογιστών. Οι καλύτερες μεθοδολογίες για το σχολιασμό χρησιμοποιούν στατιστικά μοντέλα που αξιοποιούν συχετίσεις μεταξύ των

ακολουθιών DNA και της ανθρώπινης γλώσσας, χρησιμοποιώντας έννοιες από την πληροφορική οι οποίες εφαρμόζονται και στην ανάλυση κειμένων.

Οφέλη από το HGP

Η διαδικασία «ερμηνείας» του ανθρώπινου γονιδιώματος είναι ακόμα στα αρχικά της στάδια. Αναμένεται πάντως ότι η λεπτομερής γνώση του γονιδιώματος θα ανοίξει νέους ορίζοντες για την ιατρική και τη βιοτεχνολογία.

Ήδη πρακτικά αποτελέσματα προέκυψαν πριν ακόμα την ολοκλήρωση της αποκωδικοποίησης. Αφορούσαν στην πραγματοποίηση γενετικών τεστ που μπορούσαν να δείξουν προδιάθεση σε ένα πλήθος ασθενειών. Επίσης η πληροφορία από το γονιδίωμα αναμένεται να βοηθήσει στην καλύτερη κατανόηση ασθενειών όπως ο καρκίνος ή η νόσος του Alzheimer και μακροπρόθεσμα να βοηθήσει την καλύτερη αντιμετώπιση τους.

Υπάρχουν επίσης και πολλά οφέλη για την επιστημονική κοινότητα. Παραδείγματος χάριν, ένας ερευνητής που μελετά μια ορισμένη μορφή καρκίνου μπορεί να έχει εστιάσει την αναζήτηση σε ένα συγκεκριμένο γονίδιο. Με την αναζήτηση στη βάση δεδομένων του γονιδιώματος ο ερευνητής μπορεί να εξετάσει ποιοι άλλοι επιστήμονες έχουν μελετήσει αυτό το γονίδιο, σχετικά με τη λειτουργία του, τις εξελικτικές σχέσεις του με άλλα ανθρώπινα γονίδια, ή με γονίδια άλλων οργανισμών, σχετικά με πιθανές καταστρεπτικές μεταλλάξεις, ή σχετικά με ασθένειες με τις οποίες μπορεί να σχετίζεται.

Η ανάλυση των ομοιοτήτων μεταξύ ακολουθιών DNA διαφορετικών οργανισμών ανοίγει επίσης νέους ορίζοντες στη μελέτη της θεωρίας της Εξέλιξης. Πολλές ερωτήσεις σχετικά με τις ομοιότητες και τις διαφορές μεταξύ του ανθρώπου και άλλων συγγενών οργανισμών αναμένεται να αποσαφηνιστούν από τα αποτελέσματα του συγκεκριμένου προγράμματος.

Τεχνολογία DNA

Η τεχνολογική πρόοδος οδήγησε στην καλύτερη κατανόηση της δομής, της πληροφορίας αλλά και της διαχείρισης μορίων DNA, συμβάλλοντας στη ραγδαία, τα τελευταία χρόνια, εξέλιξη της Γενετικής Μηχανικής. Μερικές από τις αναμενόμενες ωφέλειες είναι:

- στην γεωργία και την κτηνοτροφία, για την παραγωγή γενετικά τροποποιημένων οργανισμών με βελτιωμένα χαρακτηριστικά.
- στην ανθρωπολογία, για την κατανόηση των μυστηρίων της εξέλιξης της ζωής πάνω στον πλανήτη.
- στην ιατρική, για την παραγωγή αντιβιοτικών, εμβολίων ή θεραπευτικών ορμονών, όπως η ινσουλίνη.

Βασικά θέματα που σχετίζονται με τη τεχνολογία DNA περιγράφονται στη συνέχεια

Υβριδισμός Νουκλεϊνικών Οξέων

Μία θεμελιώδης ιδιότητα του DNA, είναι η ικανότητα μιας νουκλεοτιδικής αλυσίδας να ενώνεται εξειδικευμένα με τη συμπληρωματική της, με τη δημιουργία ζευγών βάσεων τύπου Watson-Crick. Οι δύο αλυσίδες στη διπλή έλικα του DNA συγκρατούνται μέσω των σχετικά ασθενών δεσμών υδρογόνου, οι οποίοι μπορούν να σπάσουν αν το DNA θερμανθεί στους 90°C ή βρεθεί σε διάλυμα με ακραίες τιμές pH. Μ' αυτόν τον τρόπο διαχωρίζονται οι δύο αλυσίδες (αποδιάταξη του DNA), αλλά δεν σπάνε οι ομοιοπολικοί δεσμοί που ενώνουν τα νουκλεοτίδια σε κάθε αλυσίδα. Αν οι συνθήκες αντιστραφούν με τη βραδεία μείωση της θερμοκρασίας ή την επαναφορά του pH στην ουδέτερη τιμή, οι δεσμοί υδρογόνου αποκαθίστανται και οι συμπληρωματικές αλυσίδες επανασηματίζουν τη διπλή έλικα. Η διαδικασία αυτή ονομάζεται *επαναδιάταξη* (renaturation) ή *υβριδισμός* (hybridization). Παρόμοια αντίδραση υβριδισμού μπορεί να συμβεί και ανάμεσα σε μία αλυσίδα RNA και μία αλυσίδα DNA, εφόσον έχουν συμπληρωματικές ακολουθίες.

Ο υβριδισμός επιτρέπει την ανάπτυξη τεχνικών για την ανίχνευση συγκεκριμένων νουκλεοτιδικών ακολουθιών σε μόρια DNA και RNA.

Περιοριστικά Ένζυμα

Τα περιοριστικά ένζυμα αποτελούν μία ειδική κατηγορία πρωτεϊνών με την ιδιότητα να κόβουν τη διπλή έλικα του DNA μόνο σε σημεία με συγκεκριμένες αλληλουχίες βάσεων, σχηματίζοντας κολλώδη μονόκλιωνα άκρα (sticky ends) ή μη κολλώδη δίκλιωνα άκρα (blunt ends). Ανακαλύφθηκαν κατά τη μελέτη βακτηρίων που αντιμετωπίζουν την εισβολή ξένου DNA αποδομώντας το, ενώ προστατεύουν το δικό τους γονιδίωμα τροποποιώντας χημικά τις ακολουθίες που αναγνωρίζουν τα περιοριστικά τους ένζυμα.

Τα περιοριστικά ένζυμα που χρησιμοποιούνται στην τεχνολογία DNA προέρχονται κυρίως από βακτήρια και αναγνωρίζουν μικρές ακολουθίες – στόχους μήκους 4 – 8 bp.

Ηλεκτροφόρηση

Η ηλεκτροφόρηση είναι μια μέθοδος διαχωρισμού μακρομορίων όπως το DNA, το RNA και οι πρωτεΐνες βάσει του μεγέθους τους. Βασίζεται στο γεγονός ότι τα περισσότερα μακρομόρια είναι ηλεκτρικά φορτισμένα και όταν βρεθούν σε ηλεκτρικό πεδίο, κινούνται με ταχύτητα που εξαρτάται από το ηλεκτρικό φορτίο και τη μάζα τους.

Για το διαχωρισμό νουκλεϊκών οξέων, το μείγμα μορίων DNA τοποθετείται στο ένα άκρο ενός πηκτώματος αγαρόζης ή πολυακρυλαμίδης, που έχει ένα μικροσκοπικό πλέγμα πόρων και στο οποίο εφαρμόζεται μία διαφορά δυναμικού. Δεδομένου ότι το DNA είναι αρνητικά φορτισμένο, τα μόρια θα αρχίσουν να κινούνται προς το θετικό ηλεκτρόδιο με ταχύτητα που εξαρτάται από το μέγεθός τους. Έτσι, με την πάροδο του χρόνου θα σχηματιστούν στο πήκτωμα διακριτές ζώνες από μόρια DNA ίδιου μεγέθους. Προκειμένου να είναι ορατές οι ζώνες, το DNA επισημαίνεται με μια φθορίζουσα χρωστική ή με ένα ραδιενεργό ισότοπο. Πολλές φορές η απομόνωση ενός συγκεκριμένου τμήματος DNA γίνεται με τον τεμαχισμό του πηκτώματος στην περιοχή της αντίστοιχης ζώνης.

Ανασυνδυασμένο και Χιμαιρικό DNA

Ανασυνδυασμένο DNA (recombinant DNA) ονομάζεται ένα μόριο DNA που αποτελείται από ακολουθίες προερχόμενες από διαφορετικές πηγές.

Χιμαιρικό DNA ονομάζεται ένα ανασυνδυασμένο μόριο DNA που περιέχει ακολουθίες προερχόμενες από διαφορετικούς οργανισμούς.

Μοριακή κλωνοποίηση

Κλώνος ονομάζεται ένας πληθυσμός κυττάρων ή οργανισμών που έχουν προέλθει από επαναλαμβανόμενες μιτωτικές διαιρέσεις ενός κυττάρου ή οργανισμού.

Μοριακή κλωνοποίηση ονομάζεται ο βιολογικός πολλαπλασιασμός μίας συγκεκριμένης DNA αλληλουχίας μέσω μιτωτικών διαιρέσεων ενός κυττάρου ξενιστή π.χ. βακτήριο, που έχει μετασχηματισθεί με την συγκεκριμένη αλληλουχία. *Φορέας κλωνοποίησης* είναι ένα γενετικό στοιχείο, συνήθως ένα πλασμίδιο ή ένας βακτηριοφάγος, το οποίο χρησιμοποιείται για να δέχεται και να μεταφέρει ένα κομμάτι DNA (ένθεση) σε ένα κύτταρο αποδέκτη (ξενιστής), με σκοπό την κλωνοποίησή του.

Τα *πλασμίδια* είναι κυκλικά δίκλιωνα μόρια DNA, που ποικίλουν σε μέγεθος (από 1kbp έως 200kbp) και μπορούν να αντιγράφονται ανεξάρτητα από τα βακτηριακά χρωματοσώματα, αν και χρησιμοποιούν ένζυμα και πρωτεΐνες από τον ξενιστή τους. Για να είναι ένα πλασμίδιο χρήσιμο στην γενετική μηχανική πρέπει να έχει τις ακόλουθες ιδιότητες:

- Να μπορεί να πολλαπλασιάζεται αυτόνομα και ανεξάρτητα από το χρωματοσωμικό γονιδίωμα του βακτηρίου ξενιστή. Για τον λόγο αυτό τα πλασμίδια περιέχουν ένα σημείο έναρξης αντιγραφής (origin of replication-*ori*).
- Να υπάρχει ένα μοναδικό σημείο δράσης ενός ή περισσότερων περιοριστικών ενζύμων στο πλασμίδιο, όπου θα ενσωματωθεί η αλληλουχία DNA προς κλωνοποίηση.
- Να περιέχει δείκτες επιλογής, όπως γονίδια ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά, πρωτεΐνες που αδρανοποιούν τα αντιβιοτικά, ή γονίδια που ευθύνονται για την παραγωγή χρώσης όταν τα βακτήρια βρεθούν σε κατάλληλο υπόστρωμα, ώστε να είναι εφικτή η αναγνώριση των βακτηρίων στα οποία έχει εισέλθει το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο.

- Να μην μπορεί να μεταβιβάζεται ούτε να κινείται, για λόγους ασφάλειας.
- Το μοριακό του βάρος να είναι μικρό, γιατί η αποδοτικότητα μετασχηματισμού και ο αριθμός αντιγράφων μειώνεται όσο μεγαλώνει το μοριακό βάρος του πλασμιδίου.
- Να είναι δυνατή η εύκολη απομόνωση του πλασμιδίου από το βακτηριακό γονιδίωμα χωρίς να καταστρέφεται η δομή του πλασμιδίου.

Κατά τη διαδικασία της μοριακής κλωνοποίησης, το πλασμίδιο «κόβεται» με τη δράση ενός περιοριστικού ενζύμου και η ένθεση DNA ενσωματώνεται σε αυτό με τη χρήση της DNA λιγάσης. Το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο εισάγεται στο βακτήριο μέσω μετασχηματισμού και το βακτήριο αναπτύσσεται σ' ένα θρεπτικό υπόστρωμα, αναπαράγοντας και το ανασυνδυασμένο DNA. Τα αντίγραφα του πλασμιδίου απομονώνονται και καθαρίζονται μετά τη λύση των βακτηρίων, ενώ τα αντίγραφα της ένθεσης DNA ανακτώνται «κόβοντας» τα πλασμίδια με το κατάλληλο περιοριστικό ένζυμο και διαχωρίζοντας τα τμήματα DNA μέσω ηλεκτροφόρησης.

Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης είναι ο *in vitro* πολλαπλασιασμός αλληλουχιών DNA μήκους < 7kbp με ταυτόχρονη επέκταση των δύο συμπληρωματικών αλυσίδων. Η τεχνική αναπτύχθηκε στις αρχές της δεκαετίας του 1980 από τον Dr. Kary Mullis, στον οποίο απονεμήθηκε το βραβείο Nobel χημείας το 1993.

Τα απαραίτητα συστατικά μιας αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης είναι

- 1 ο στόχος DNA (template DNA), που πρόκειται να πολλαπλασιαστεί
- 2 οι εκκινητές (primers), δηλαδή αλληλουχίες DNA μήκους 18-30 bp που αντιπροσωπεύουν τα νουκλεοτιδικά άκρα του DNA στόχου και είναι απαραίτητες προκειμένου να προστεθούν τα υπόλοιπα νουκλεοτίδια της αλληλουχίας
- 3 τα τριφωσφορικά δεοξυνουκλεοτίδια (dNTPs)
- 4 η DNA πολυμεράση (DNA polymerase), ένζυμο με το οποίο επιτυγχάνεται η σύνθεση της συμπληρωματικής αλυσίδας του στόχου DNA

- 5 *ιόντα μαγνησίου* (Mg^{++}), που αποτελούν συνένζυμο της πολυμεράσης και είναι απαραίτητα για την λειτουργία της
- 6 το ισοτονικό διάλυμα της αντίδρασης (buffer)

Η διαδικασία αποτελείται από επαναλαμβανόμενους κύκλους σε διαφορετικές θερμοκρασίες, οι οποίοι περιλαμβάνουν τα ακόλουθα στάδια:

- Θέρμανση σε υψηλή θερμοκρασία για την αποδιάταξη (denaturation step) του DNA (93-95°C).
- Θερμοκρασία υβριδισμού ή αναδιάταξης (annealing step), κατά την διάρκεια της οποίας οι εκκινητές (primers) υβριδίζουν με το στόχο (template) DNA.
- Θερμοκρασία επιμήκυνσης ή πολυμερισμού (extension step), κατά την διάρκεια της οποίας η πολυμεράση συνθέτει την συμπληρωματική αλυσίδα του στόχου DNA, με κατεύθυνση από το 5' άκρο προς το 3' άκρο, με ταχύτητα επιμήκυνσης είναι 35-70 νουκλεοτίδια/δευτερόλεπτο.

Τα τρία στάδια επαναλαμβάνονται από 20 έως 40 φορές, με αποτέλεσμα η DNA αλληλουχία στόχος να πολλαπλασιάζεται εκθετικά.

Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης έχει πολλές εφαρμογές στη βιολογία, τη βιοτεχνολογία, την ιατρική κ.α.

Βιβλιοθήκες DNA

Η γονιδιωματική βιβλιοθήκη DNA ενός οργανισμού αποτελείται από βακτήρια μετασχηματισμένα με διαφορετικά τμήματα του χρωματοσωματικού DNA του συγκεκριμένου οργανισμού. Για τη δημιουργία μιας cDNA βιβλιοθήκης, εξάγεται το mRNA των κυττάρων, παράγονται οι συμπληρωματικές του DNA ακολουθίες (complementary DNA, cDNA) με τη βοήθεια του ενζύμου της αντίστροφης μεταγραφάσης και στη συνέχεια τα δίκλιωνα μόρια cDNA με τη βοήθεια του ενζύμου της DNA πολυμεράσης. Τέλος, τα μόρια cDNA κλωνοποιούνται για να δημιουργήσουν τη βιβλιοθήκη.

Οι γονιδιωματικές βιβλιοθήκες αποτελούν ένα τυχαίο δείγμα όλων των DNA ακολουθιών ενός οργανισμού και περιέχουν τις ίδιες ακολουθίες, ανεξαρτήτως από τα κύτταρα που

χρησιμοποιήθηκαν για τη δημιουργία τους (εκτός ελαχίστων εξαιρέσεων). Επίσης στην περίπτωση των ευκαρυωτικών οργανισμών, περιέχουν επαναληπτικές ακολουθίες, εσώνια, ρυθμιστικές περιοχές κ.α. Αντίθετα, οι cDNA βιβλιοθήκες περιλαμβάνουν μόνο κωδικοποιούσες ακολουθίες και μόνο εκείνα τα γονίδια που μεταγράφονται σε mRNA στο συγκεκριμένο στάδιο ανάπτυξης και στο συγκεκριμένο τύπο κυττάρων που χρησιμοποιήθηκε για τη δημιουργία τους. Οι cDNA βιβλιοθήκες είναι ιδιαίτερα χρήσιμες στην περίπτωση της έκφρασης των γονιδίων για την παραγωγή πρωτεϊνών.

Εφαρμογές Τεχνολογίας DNA

Η πρόοδος της τεχνολογίας DNA προσέφερε νέες μεθόδους για τη μελέτη των γονιδίων, του RNA και των πρωτεϊνών, καθώς και την παραγωγή προϊόντων βιοτεχνολογίας. Αναφέρονται μερικά χαρακτηριστικά παραδείγματα.

Τεχνολογία μικροσυστοιχιών (microarrays) (θα αναφερθεί εκτενώς στην επόμενη παράγραφο)

DNA fingerprinting: Σε διάφορες θέσεις του ανθρώπινου γονιδιώματος (loci) υπάρχουν μικρές επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες, ο αριθμός των οποίων διαφέρει μεταξύ ατόμων και κυμαίνεται από 4 έως 40 (Variable Number Tandem Repeats, VNTRs). Κάθε άτομο κληρονομεί τον αριθμό των επαναλήψεων για κάθε VNTR από τους γονείς του, και επομένως, το σχέδιο (pattern) που προκύπτει από την ανάλυση πολλών VNTRs δεν είναι όμοιο για δύο άτομα που δεν έχουν συγγένεια. Η μέθοδος του DNA fingerprinting μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ταυτοποίηση της πατρότητας ή της μητρότητας, στην εγκληματολογία και σε υποθέσεις που σχετίζονται με το μεταναστευτικό δίκαιο.

Παραγωγή πρωτεϊνών: Μία σημαντική εφαρμογή της τεχνολογίας του ανασυνδυασμένου DNA και της μοριακής κλωνοποίησης είναι η μαζική παραγωγή πρωτεϊνών σε κατάλληλα σχεδιασμένους φορείς έκφρασης. Σε αντίθεση με τους φορείς κλωνοποίησης, οι φορείς έκφρασης περιέχουν υποκινητές και ρυθμιστικές περιοχές για την αποδοτική μεταγραφή των γονιδίων της ένθεσης και την μετάφρασή τους σε πρωτεΐνες. Με αυτόν τον τρόπο είναι εφικτή η μελέτη της δομής και της λειτουργίας πρωτεϊνών που διαφορετικά είναι δύσκολο να απομονωθούν από τα κύτταρα σε μεγάλες ποσότητες, αλλά και η παραγωγή πρωτεϊνών με φαρμακολογικό ενδιαφέρον όπως η ινσουλίνη και η αυξητική ορμόνη, και η δημιουργία εμβολίων.

Διαγονιδιακά Ζώα: Η Γενετική Μηχανική δίνει σήμερα τη δυνατότητα της απευθείας προσθήκης νέων γονιδίων σ' έναν οργανισμό. Τα ζώα των οποίων το γενετικό υλικό έχει μετασχηματισθεί με τη βοήθεια γονιδίων που προέρχονται από άλλο είδος (exogenous DNA), ονομάζονται διαγονιδιακά (transgenic) ζώα. Η τεχνολογία των διαγονιδιακών ζώων έχει πολλές εφαρμογές στη δημιουργία ζώων με επιθυμητά χαρακτηριστικά (π.χ. αυξημένη παραγωγή γάλακτος, ανθεκτικότητα σε βακτηριακές νόσους κ.α.) και την παραγωγή πρωτεϊνών φαρμακευτικής σημασίας στο γάλα. Επίσης παίζει θεμελιώδη ρόλο στη μελέτη της έκφρασης των γονιδίων και της ανάπτυξης των θηλαστικών, καθώς και στη έρευνα σχετικά με πολλές ανθρώπινες ασθένειες.

Τεχνολογία Μικροσυστοιχιών

Η τεχνολογία μικροσυστοιχιών αποτελεί ένα ισχυρό εργαλείο για την ευρείας κλίμακας γρήγορη ανάλυση ενός μεγάλου αριθμού δειγμάτων και κατέχει σημαντική θέση στους τομείς της Γενωμικής, της Πρωτεομικής και της Βιοπληροφορικής με εφαρμογές στη δομική βιολογία, τη μελέτη της μοριακής βάσης των ασθενειών και το σχεδιασμό φαρμάκων.

Μικροσυστοιχίες DNA

Στο πλακίδιο μιας μικροσυστοιχίας DNA (DNA microarray), διατάσσονται κουκίδες (spots) μεγέθους από 5 έως 150 μm που ισαπέχουν μεταξύ τους. Στις κουκίδες αυτές προσκολλώνται τμήματα μονόκλωνου DNA μήκους από 20 έως 1000 bp, που αντιστοιχούν σε ακολουθίες DNA διαφόρων γονιδίων. Το mRNA ή το cDNA του υπό μελέτη δείγματος επισημαίνεται με φθορίζουσες χρωστικές και αφήνεται να υβριδοποιηθεί με τις ακινητοποιημένες ακολουθίες DNA του πλακιδίου. Ο φθορισμός από το πλακίδιο ανιχνεύεται και τα δεδομένα του πειράματος κανονικοποιούνται και αναλύονται.

Στη συνέχεια περιγράφονται οι δύο βασικές τεχνολογίες μικροσυστοιχιών DNA. Ωστόσο η έρευνα στον τομέα αυτό συνεχίζεται και προτείνονται νέες τεχνολογίες, όπως αναφέρεται στις ιστοσελίδες του **Πίνακα 1**.

Πίνακας 1: Ιστοσελίδες με συνδέσμους και δημοσιεύσεις για την τεχνολογία μικροσυστοιχιών

<http://brownlab.stanford.edu>
<http://www.microarray.org>
<http://resresources.nci.nih.gov/tarp>
www.rii.com/publications/default.htm
www.biologie.ens.fr/en/genetiqu/puces/links.html#news
<http://campus.queens.edu/faculty/jannr/molecular/>

Spotted Arrays

Τα βασικά βήματα ενός πειράματος μικροσυστοιχιών DNA της συγκεκριμένης τεχνολογίας είναι:

1. Εκτύπωση της μικροσυστοιχίας DNA. Με χρήση των δυνατοτήτων της ρομποτικής, μια μικρή ποσότητα DNA στόχου μεταφέρεται στην επιφάνεια του πλακιδίου, είτε με τεχνικές που στηρίζονται στην επαφή των ακίδων με το πλακίδιο, είτε με τεχνικές τύπου ink-jet.
2. Απομόνωση του mRNA από τα κύτταρα προς μελέτη καθώς και από κύτταρα αναφοράς (control) και πολλαπλασιασμός του με χρήση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR).
3. Μετατροπή του mRNA σε cDNA μέσω της αντίστροφης μεταγραφής.
4. Επισήμανση του cDNA του δείγματος προς μελέτη με κόκκινη φθορίζουσα χρωστική (Cy5) και του cDNA του δείγματος αναφοράς με πράσινη χρωστική (Cy3).
5. Ανάμειξη των δύο δειγμάτων cDNA και υβριδοποίηση του cDNA του μείγματος με τους DNA στόχους του πλακιδίου.
6. Πλύση του πλακιδίου για την απομάκρυνση του cDNA που δεν έχει υβριδοποιηθεί.
7. Σάρωση της μικροσυστοιχίας με σαρωτή laser ή συνεστιακό μικροσκόπιο.
8. Κανονικοποίηση και ανάλυση των δεδομένων.

Μετά τον καθορισμό της έντασης φθορισμού κάθε χρωστικής σε κάθε spot, σχηματίζονται οι λόγοι $\log(\text{Cy5}/\text{Cy3})$. Θετική τιμή του $\log(\text{Cy5}/\text{Cy3})$ υποδεικνύει ένα σχετικό πλεόνασμα των μετάγραφων (transcripts) του συγκεκριμένου γονιδίου στο υπό μελέτη δείγμα, ενώ αρνητική τιμή υποδεικνύει πλεόνασμα στο δείγμα αναφοράς. Τα δεδομένα ομαδοποιούνται με τη χρήση τεχνικών cluster analysis και παρουσιάζονται με τη μορφή πίνακα. Ο κατακόρυφος άξονας του πίνακα αντιστοιχεί σε διαφορετικά γονίδια και ο οριζόντιος σε διαφορετικά πειράματα, ενώ χρησιμοποιούνται διαφορετικά χρώματα για θετικό $\log(\text{Cy5}/\text{Cy3})$ (κόκκινο), αρνητικό $\log(\text{Cy5}/\text{Cy3})$ (πράσινο) και $\log(\text{Cy5}/\text{Cy3})$ ίσο με μηδέν (μαύρο).

Oligonucleotide Arrays

Η συγκεκριμένη τεχνολογία αφορά την *in situ* σύνθεση ολιγονουκλεοτιδίων μήκους έως 25 bp στη μικροσυστοιχία, συνδυάζοντας τεχνικές σύνθεσης DNA και φωτολιθογραφικές τεχνικές. Στο 5' ή 3' άκρο των νουκλεοτιδίων που χρησιμοποιούνται συνδέεται μία χημική ομάδα π.χ. MeNPOC η οποία εμποδίζει τον πολυμερισμό του DNA, αλλά είναι ευαίσθητη στην υπεριώδη ακτινοβολία. Με χρήση κατάλληλων φίλτρων και UV ακτινοβολία, είναι εφικτή η προσθήκη ενός νουκλεοτιδίου σε επιλεγμένες ακολουθίες. Η επανάληψη (~70 φορές) του κύκλου επιλογής φίλτρου, UV ακτινοβολίας και προσθήκης νουκλεοτιδίων επιτρέπει τη δημιουργία μιας μικροσυστοιχίας με χιλιάδες διαφορετικά ολιγονουκλεοτίδια μήκους 25 bp. Συνήθως, κάθε γονίδιο αντιπροσωπεύεται από 20 ζεύγη ολιγονουκλεοτιδίων, για καθένα από τα οποία η μία ακολουθία ταιριάζει απόλυτα με το γονίδιο (perfect match, PM), ενώ η άλλη διαφέρει μόνο σε ένα κεντρικό νουκλεοτίδιο (mismatch, MM). Τα MM ολιγονουκλεοτίδια βοηθούν στην ανίχνευση μη εξειδικευμένου υβριδισμού και την ποσοτικοποίηση m-RNAs που εκφράζονται ασθενώς στο δείγμα.

Το πλεονέκτημα της συγκεκριμένης τεχνολογίας είναι η δημιουργία εξαιρετικά ομοιόμορφων μικροσυστοιχιών. Ωστόσο, δεν είναι εφικτή η ταυτόχρονη χρήση δύο δειγμάτων επισημασμένων με διαφορετικές φθορίζουσες χρωστικές ουσίες. Συνεπώς απαιτούνται δύο μικροσυστοιχίες προκειμένου να συγκριθεί ένα δείγμα υπό μελέτη με το δείγμα αναφοράς.

Μικροσυστοιχίες Πρωτεϊνών

Η μελέτη των γονιδίων δεν μπορεί να προσφέρει πολλές πληροφορίες για τις ιδιότητες των πρωτεϊνών. Πράγματι περισσότεροι από 200 τύποι μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων (π.χ ακετυλίωση, φωσφορυλίωση, κ.λ.π) που επηρεάζουν την λειτουργία και τις ιδιότητες των πρωτεϊνών, δεν μπορούν να προβλεφθούν από την ακολουθία DNA.

Σε μία μικροσυστοιχία πρωτεϊνών, μετά την εκτύπωση των ιχνηθετών (protein probes), το πλακίδιο επωάζεται με το βιολογικό δείγμα και καταγράφεται κάθε αλληλεπίδραση πρωτεϊνών-ιχνηθετών. Οι διαφορές ωστόσο μεταξύ του DNA και των πρωτεϊνών δεν επιτρέπουν μια απλή επέκταση της τεχνολογίας από το ένα είδος μικροσυστοιχίας στο άλλο. Οι βασικότερες προκλήσεις για την τεχνολογία των μικροσυστοιχιών πρωτεϊνών αφορούν:

- *Ανάπτυξη κατάλληλων τεχνικών για το χειρισμό των πρωτεϊνών έτσι ώστε να διατηρούν τη βιολογικά ενεργή δευτεροταγή και τριτοταγή δομή τους.* Η λειτουργία των πρωτεϊνών εξαρτάται από τη δομή τους, που είναι εξαιρετικά ευαίσθητη στο περιβάλλον και μπορεί εύκολα να αποδιαταχθεί.
- *Αναγνώριση και απομόνωση κατάλληλων ιχνηθετών για την ανίχνευση κάθε πρωτεΐνης ενδιαφέροντος.* Η ανίχνευση των γονιδίων στις μικροσυστοιχίες DNA στηρίζεται στον εξειδικευμένο υβριδισμό μεταξύ συμπληρωματικών αλυσίδων DNA ή DNA και mRNA. Η ανίχνευση των πρωτεϊνών στηρίζεται συχνά στην ασθενή μη εξειδικευμένη αλληλεπίδραση με αντισώματα, που επηρεάζει την ποιότητα των αποτελεσμάτων του πειράματος.
- *Ανάπτυξη κατάλληλης μεθόδου ανίχνευσης με την επιθυμητή ευαισθησία και μεγάλο εύρος λειτουργίας για την καταγραφή πρωτεϊνών διαφορετικής συγκέντρωσης στο βιολογικό δείγμα.* Μία συχνά εφαρμοζόμενη μέθοδος αποτελεί η χρήση φθορισμού. Ωστόσο η φθορίζουσα ουσία που χρησιμοποιείται για την επισήμανση, μπορεί να αλλοιώσει την ικανότητα της πρωτεΐνης να αλληλεπιδρά με τον ιχνηθέτη που είναι ακινητοποιημένος στο πλακίδιο. Άλλες τεχνικές είναι η φασματοσκοπία μάζας και η surface Plasmon resonance technique.
- *Ανάπτυξη τεχνικών απομόνωσης των ανιχνευόμενων πρωτεϊνών από το πλακίδιο για την περαιτέρω ανάλυσή τους.*

Μπορούμε να διακρίνουμε 2 βασικούς τύπους πρωτεϊνικών μικροσυστοιχιών:

- *Αναλυτικές* μικροσυστοιχίες
με τη χρήση κατάλληλων μορίων στο πλακίδιο μπορούν να ποσοτικοποιήσουν την παρουσία πρωτεϊνών σε ένα δείγμα,
- *Λειτουργικές* μικροσυστοιχίες
ομάδες πρωτεϊνών διατάσσονται στο πλακίδιο για τη μελέτη διαφόρων βιοχημικών διεργασιών.

Μικροσυστοιχίες Κυττάρων και Ιστών

Για τη δημιουργία μιας μικροσυστοιχίας κυττάρων, ένα πλακίδιο με σύμπλοκα DNA-λιπιδίων τοποθετείται σε μια καλλιέργεια στην οποία προστίθενται ζωντανά κύτταρα με τη δυνατότητα διαμόλυνσης. Το DNA εισέρχεται στα κύτταρα, τα οποία παράγουν cDNA μέσω “αντίστροφης διαμόλυνσης” και διαιρούνται δύο ή τρεις φορές. Μετά την παραγωγή των πρωτεϊνών ενδιαφέροντος στα κύτταρα, το πλακίδιο απομακρύνεται από την καλλιέργεια, τα κύτταρα στερεοποιούνται και οι πρωτεΐνες αναλύονται, κατόπιν επώασης με αντισώματα επισημασμένα με φθορίζουσες ουσίες και ανίχνευσης του φθορισμού. Οι μικροσυστοιχίες κυττάρων μπορούν να παραχθούν μαζικά και να χρησιμοποιηθούν για τη μελέτη κυττάρων που έχουν διαμολυνθεί με si-RNAs ή ανήκουν σε διαφορετικές σειρές, καθώς και για τη μελέτη της ρύθμισης της μεταγραφής των γονιδίων.

Οι μικροσυστοιχίες ιστών παρασκευάζονται χρησιμοποιώντας δείγματα από μορφολογικά αντιπροσωπευτικές περιοχές βιοψιών. Προσφέρουν τη δυνατότητα ανάλυσης όλων των δειγμάτων ταυτόχρονα, υπό τις ίδιες συνθήκες, και χρησιμοποιούνται για μεγάλης κλίμακας επιδημιολογικές μελέτες με στόχο την αναγνώριση νέων διαγνωστικών και προγνωστικών δεικτών για καρκινικούς όγκους.

Εφαρμογές Μικροσυστοιχιών

Ογκολογία

Η τεχνολογία των μικροσυστοιχιών αποτελεί ένα ισχυρό διαγνωστικό εργαλείο για την αναγνώριση μοριακών υπογραφών στον καρκίνο και σε άλλες ασθένειες. Παρέχει τη δυνατότητα συστηματικής καταγραφής των αλλαγών στη γονιδιακή έκφραση κατά την εξέλιξη

της ασθένειας. Είναι ιδιαιτέρως χρήσιμη στην περίπτωση όγκων των οποίων οι υποκατηγορίες δεν μπορούν να διαχωρισθούν μορφολογικά. Η συγκεκριμένη τεχνική έχει χρησιμοποιηθεί σε διάφορους τύπους καρκίνου όπως ο καρκίνος του μαστού, η λευχαιμία, τα αδenoκαρκινώματα του παχέος εντέρου και ο καρκίνος των ωοθηκών.

Ειδικότερα, μπορούν να κατασκευασθούν προσαρμοσμένες (customized) μικροσυστοιχίες DNA με στόχο τη διάγνωση μιας ασθένειας για την οποία έχουν αναγνωρισθεί συγκεκριμένες γονιδιακές μεταλλάξεις ή ομάδες γονιδίων - βιοδεικτών (biomarkers), που η έκφρασή τους διαφέρει συστηματικά μεταξύ υγιών και ασθενών κυττάρων ή ιστών.

Ανάπτυξη Φαρμάκων

Η ύπαρξη εναλλακτικών μορφών γονιδίων ή μη τυπικής έκφρασης γονιδίων που εμπλέκονται στον μηχανισμό δράσης ή το μεταβολισμού ενός φαρμάκου, μπορεί να οδηγήσει σε αντίσταση ή σε μη τυπική απόκριση στη θεραπεία. Οι φαρμακογενομικές (pharmacogenomic) ή τοξικογενομικές (toxicogenomic) μελέτες συσχετίζουν το γονιδιακό προφίλ μεμονωμένων ασθενών με την απόκρισή τους σε ένα φάρμακο ή μία τοξίνη αντίστοιχα. Η πληροφορία που λαμβάνεται από αυτές τις μελέτες μπορεί να χρησιμοποιηθεί για το σχεδιασμό μικροσυστοιχιών με στόχο την εξατομικευμένη επιλογή φαρμακευτικής αγωγής..

Νευροβιολογία

Ένας από τους βασικότερους στόχους της νευροβιολογίας είναι η κατανόηση των διαφορών σε μοριακό επίπεδο μεταξύ διαφορετικών περιοχών του εγκεφάλου που σχετίζονται με συγκεκριμένες λειτουργίες. Οι μικροσυστοιχίες DNA μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ταυτόχρονη μελέτη της γονιδιακής έκφρασης σε διαφορετικές περιοχές του εγκεφάλου, αλλά και για τη μελέτη των αλλαγών της γονιδιακής έκφρασης σε διάφορες ασθένειες όπως η νοητική υστέρηση στο σύνδρομο εύθραυστου X.

Βιοχημικά Μονοπάτια

Η τεχνολογία των μικροσυστοιχιών μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη των αλλαγών στην έκφραση πολλών γονιδίων ως αποτέλεσμα ενός μοριακού σήματος ή της αλληλεπίδρασης ενός βακτηρίου με τον ξενιστή του. Δεδομένου ότι η χημική μεταβίβαση σήματος σχετίζεται με μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις και δημιουργία πρωτεϊνικών συμπλόκων, δεν ενδείκνυται η *in vitro* μελέτη των βιοχημικών μονοπατιών με μικροσυστοιχιές DNA, αλλά η χρήση μικροσυστοιχιών κυττάρων που παρέχουν πολύτιμες πληροφορίες.

Γενετικά Τροποποιημένες Τροφές

Μία σημαντική εφαρμογή των μικροσυστοιχιών είναι ο έλεγχος της ποιότητας των γενετικά τροποποιημένων τροφών. Μπορούν για παράδειγμα να χρησιμοποιηθούν για την ανίχνευση μη επιθυμητών αλλαγών στον τρόπο έκφρασης διαφόρων γονιδίων.

Βιβλιογραφία

1. B. Alberts, D. Bray, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter "Essential Cell Biology, An Introduction to the Molecular Biology of the Cell" Garland Publishing Inc (1997).
2. H. Lodish, A. Berk, P. Matsudaira, C.A. Kaiser, M. Krieger, M.P. Scott, L. Zipursky, J. Darnell "Molecular Cell Biology" W. H. Freeman (2003)
3. Human Genome Project Information
http://www.ornl.gov/sci/techresources/Human_Genome/home.shtml
4. Γ. Γουλιέλμος "Φορείς Κλωνοποίησης" Σημειώσεις για το *Μ.Δ.Ε ΒΙΟΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗ* (Ακ. Έτος 2003-2004).
5. Α. Κατσιώτης "Αλυσιδωτή Αντίδραση της Πολυμεράσης" Σημειώσεις για το *Μ.Δ.Ε ΒΙΟΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗ* (Ακ. Έτος 2003-2004).
6. Paras N. Prasad "Introduction To Biophotonics" Wiley-Interscience (2003).
7. S. Draghici "Data Analysis Tools for DNA Microarrays" Chapman and Hall/CRC (2003)

8. D.B. Allison, X. Cui, G.P. Page, M. Sabripour "Microarray data analysis: from disarray to consolidation and consensus" Nature Reviews - Genetics (2006)

Σχήματα

Σχήμα 2.1: Αυτόματη αλληλούχιση DNA.

Σχήμα 2.2: Εισαγωγή μιας ένθεσης DNA σ' ένα πλασμίδιο.

Σχήμα 2.3: Κλωνοποίηση μιας ένθεσης DNA.