

1

Η Τεχνική F.I.S.H. (Fluorescence In Situ Hybridization)

Ιστορία της FISH – Ορισμοί – Είδη ανιχνευτών

ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ

Δεν χρειάστηκαν παρά λίγες δεκαετίες μετά την πρώτη παρατήρηση χρωματοσωμάτων από τον Flemming το 1839, τη διατύπωση της θεωρίας της εξέλιξης από τον Darwin το 1859, των νόμων της κληρονομικότητας από τον Mendel το 1865 και την ονομασία τους ως “χρωματοσώματα” από τον Waldayer το 1988, για να αποδειχθεί μετά από μία έκρηξη ανακαλύψεων στις αρχές και τα μέσα του 20ου αιώνα, ότι τα χρωματοσώματα είναι εκείνες οι δομές, οι οποίες φέρουν τις γενετικές πληροφορίες του κάθε κυττάρου και του κάθε οργανισμού (Rous και Jones, 1916· Cremer, 1985).

Η χρωματοσωματική έρευνα κατά το γενετιστή Hsu (1979) θα μπορούσε να διακριθεί σε τέσσερα μέρη – περιόδους. Το πρώτο μέρος περιλαμβάνει τις “σκοτεινές” ημέρες της επιστήμης της Γενετικής, την “προϋποτονική” περίοδο, η οποία έληξε με την ανακάλυψη της χρήσης του υποτόνου διαλύματος (Hsu, 1952) που επέτρεψε την καλλίτερη παρατήρηση των μεταφασικών χρωματοσωμάτων σε θηλαστικά, μία επανανακάλυψη προηγούμενης μελέτης η οποία όμως είχε γίνει σε χρωματοσώματα ακρίδας (Slifer, 1934). Στο δεύτερο μέρος, δηλαδή στην “υποτονική” περίοδο, η μεγάλη προσπάθεια των ερευνητών οδήγησε στην ακριβή μέτρηση του αριθμού των ανθρώπινων χρωματοσωμάτων (Eagle, 1955· Tjio και Levan, 1956· Nowell, 1960). Το τρίτο μέρος, ή όπως καλλίτερα ονομάζεται η “τρισωμική” περίοδος, χαρακτηρίζεται από μεγάλο αριθμό εργασιών στις οποίες οι ερευνητές απέδειξαν την ύπαρξη χρωματοσωματικών ατυπιών και τη συσχέτισή τους με γενετικά νοσήματα (Lejeune, 1959· Patau 1960· Edwards 1960). Τέλος, η τέταρτη περίοδος της χρώσης κατά ζώνες (bandwagon period) η οποία

ίσως δεν έληξε ακόμη, άρχισε με την ανακάλυψη της χρώσης των χρωματοσωμάτων κατά ζώνες με φθορίζουσες χρωστικές αρχικά (fluorescence banding technique) από τον Caspersson και τους συνεργάτες του το 1969 και αργότερα με εφαρμογή της χρωστικής Giemsa μετά από χρήση του ενζύμου τρυψίνη (Popescu et al, 1985· Bickmore και Summer, 1989). Με τη μέθοδο αυτή επιτρέπεται στους γενετιστές όχι μόνο να διακρίνουν τα χρωματοσώματα ως ξεχωριστές μονάδες που διαφέρουν ελαφρώς στο μέγεθος, αλλά και να καθορίζουν συγκεκριμένα υποχρωματοσωματικά χαρακτηριστικά, τις χρωματοσωματικές ζώνες. Διευκολύνθηκε έτσι η ανακάλυψη και η θέση γονιδίων σε σχέση με διάφορες ασθένειες και φυσικά βρήκε μεγάλη εφαρμογή στους καρκινοπαθείς και στη μελέτη κληρονομικών χαρακτηριστικών. Σήμερα τριάντα και πλέον χρόνια μετά, η τεχνική κατά ζώνες συνεχίζει να προσφέρει τις σημαντικές της πληροφορίες και είναι στην ημερήσια διάταξη για τη διάγνωση χρωματοσωματικών ατυπιών και δεικτών (markers) σε ασθενείς π.χ. με καρκίνο, προληπτικά σε περιπτώσεις κληρονομικών νοσημάτων για τον έλεγχο π.χ. της ύπαρξης φορέα για μία ασθένεια υπολειπόμενου χαρακτήρα, αλλά και στον προγεννητικό έλεγχο παιδιών από μητέρες υψηλού κινδύνου (Cremer και Cremer, 1985· Cremer και συν., 1988· Gosden και συν., 1993· Holmquist, 1992).

Ο αναζητούμενος κρίκος για τη σύνδεση της κλασικής κυτταρογενετικής με τη μοριακή βιολογία ανακαλύφθηκε, όταν οι Gall και Pardue (1969) εφάρμοσαν την τεχνική *I.S.H.* (*in situ hybridization*) δηλαδή την εντοπισμένη υβριδοποίηση, που αποτελεί τον πιο άμεσο τρόπο μελέτης της θέσης των γονιδιακών ακολουθιών του DNA επάνω στα χρωματοσώματα. Σχεδόν ταυτόχρονα και ανεξάρτητα, το ίδιο αποτέλεσμα δημοσίευσαν και οι John και συν. (1969). Οι ερευνητές χρησιμοποίησαν ως στόχο χρωματοσώματα από τους σιελογόνους αδένες της *Drosophila*. Με τη βοήθεια rRNAs τα οποία ήταν επισημασμένα με ραδιενεργό ισότοπο, υβριδοποίησαν, φωτογράφησαν με ειδικό γαλάκτωμα και χαρτογράφησαν τα γονίδια των RNA αυτών στο 2ο χρωμόσωμα. Οι πιο πάνω αναφερόμενοι ερευνητές (Pardue και Gall, 1969) απέδειξαν επιπλέον ότι η πλειοψηφία των επαναλαμβανόμενων ακολουθιών συναντάται στις περικεντρικές περιοχές των χρωματοσωμάτων (Pinkel και συν., 1986· Lichter και συν., 1991· Buckle και Kearney, 1994). Βέβαια, η τεχνική του υβριδισμού εκείνη την εποχή ήταν πολύ περιορισμένη και οι μοριακές τεχνικές για την πραγματοποίησή της δεν υπήρχαν ακόμη.

Στη συνέχεια η μεθοδολογία αναπτύχθηκε πολύ, όταν από τα μέσα έως τα τέλη της δεκαετίας του '70, αναπτύχθηκαν με επιτυχία οι σημαντικές για την εποχή, αλλά και σήμερα, μέθοδοι σήμανσης του DNA και του RNA με την αντίχνευση της παρουσίας ή όχι ενός συγκεκριμένου τμήματος DNA ή RNA πάνω τους (οι γνωστές τεχνικές κατά Southern ή Northern), αλλά ακόμη περισσότερο

από την ανακάλυψη των μη ραδιενεργών συστημάτων σήμανσης και τη χρήση του χρωματομετρικού προσδιορισμού φθορίζουσών ουσιών (Rudkin και Stollar, 1977· Albertson και συν., 1995). Αρχικά δηλαδή, όπως μπορεί να συμπεράνει κανείς, για να επιτευχθεί η ανίχνευση ενός τμήματος DNA και επομένως ο υβριδισμός χρησιμοποιούνταν ανιχνευτές οι οποίοι είχαν επισημανθεί με τρίτιο. Έκτοτε παρασκευάστηκαν πολλοί ραδιενεργοί επισημαντές με αφθονία ισοτόπων και στοιχείων ανάλογα με τις ανάγκες των ερευνητών (Harper και συν., 1981· Rabin και συν., 1984· Schröder και συν., 1984), έως ότου εμφανίστηκαν οι φθορίζοντες, μη ραδιενεργοί, άρα και αβλαβείς για την υγεία των επιστημόνων, επισημαντές. Από τη στιγμή που αναπτύχθηκαν και εφαρμόστηκαν (Langer και συν., 1981· Landegeni και συν., 1984· Pinkel και συν., 1986· Hopman και συν., 1986· Pinkel και συν., 1988· Raap και συν., 1989), οι φθορίζοντες επισημαντές έχουν αντικαταστήσει σε πολύ μεγάλο βαθμό τη χρήση των ραδιενεργών ισοτόπων. Η τεχνική ονομάζεται πλέον *F.I.S.H.* (*Fluorescence In Situ Hybridization*) και εξαιτίας του φθορισμού παρουσιάζει αρκετά αξιοσημείωτα πλεονεκτήματα σε σχέση με τη σήμανση με ραδιενεργά ισότοπα. Σε αυτά περιλαμβάνονται η ταχύτητα της μικροσκοπικής ανάλυσης, η ευαισθησία και η σταθερότητα, η επαναληψιμότητα, η ασφάλεια, αλλά και ο μειωμένος χρόνος υβριδισμού, η ύπαρξη πολλαπλών επισημαντών με ποικίλα χρώματα και η μεγάλη ευκολία στη χρήση τους. Η εφαρμογή μεγάλης ποικιλίας από φθορίζουσες ουσίες έχει καταστήσει τον υβριδισμό τόσο συνήθη και εύκολο, ώστε σήμερα να είναι διαθέσιμα πολλά εμπορικά είδη αρκετών εταιρειών για τις διάφορες ιατρικές, και όχι μόνο, εφαρμογές, με μεγάλη ποικιλία χρωμάτων και βέλτιστων μηκών κύματος εκπομπής και απορρόφησης του φωτός (Ferguson-Smith, 1991· Mark, 1994· Cremer και συν., 1995· Raap, 1998· Haas, 1999· 1999b).

Από τη δεκαετία του '80 και μετά (Feinberg και Vogelstein, 1984), οι εξελίξεις και οι καινοτομίες στη μοριακή βιολογία και τη γενετική μηχανική έχουν αυξήσει το εύρος και τις εφαρμογές των μεθόδων υβριδισμού. Αυτές, λοιπόν, οι εξελίξεις συνέβαλαν στην ευρύτερη χρησιμοποίηση της F.I.S.H. (και ως CGH ή M-FISH) για την ανάλυση των διάφορων σωματικών και γενετικών ανευπλοειδικών κυττάρων, στην αρτιότερη μελέτη των χρωματοσωμάτων και των ατυπιών τους, στην ανίχνευση πολλών γονιδίων και την ανάλυση κοσμιδίων, αλλά και στην ειδική βαρύτητά της στις περιπτώσεις των διαγονιδιακών (transgenic) οργανισμών (Lichter και Cremer, 1992· Speicher και συν., 1993· Houseal και Klinger, 1994· Speel και συν., 1995· Lizardi και Ward, 1997· Siebert και Weber-Matthiesen, 1997). Η ευαισθησία, η δύναμη και η ταχύτητα της ανάλυσης επιβεβαιώνουν τη σημασία της μεθοδολογίας F.I.S.H., και την εφαρμογή της στις προαναφερθείσες, όσο και σε επόμενες εφαρμογές στο εγγύς μέλλον, όπως είναι π.χ. η ηλεκτρονική γενετική τε-

χνολογία ή οποία ονομάζεται “ακαδημαϊκά” πιο σωστά *DNA-chip technology* (Hoheisel, 1999· Ermanntraut, 1999· Haas, 1999· 1999b).

Πίνακας 1. Σταθμοί στην Επιστήμη της Γενετικής

<i>Χρονολογία</i>	<i>Ανακάλυψη</i>	<i>Ονόματα Εξευνητών</i>
1839	Κυτταρική θεωρία	Schleiden & Schwann
1859	Θεωρία της Εξέλιξης	Darwin
1865	Νόμοι κληρονομικότητας	Mendel
1877	Παρατήρηση χρωματοσωμάτων	Flemming
1888	Ονομασία “χρωματοσώματα”	Waldayer
1903	Τα χρωματοσώματα φορείς γονιδίων	Sutton, Boveri
1911	Ανακάλυψη του πρώτου ανθρώπινου γονιδίου	Wilson
1944	Ο ρόλος του DNA	Avery
1952	Εφαρμογή υπότονου διαλύματος	Hsu
1953	Η δομή του DNA	Watson & Crick
1956	Τα ανθρώπινα χρωματοσώματα είναι 46	Tjio & Levan
1959	Η πρώτη ατυπία στον άνθρωπο	Lejeune
1960	Προγεννητική διάγνωση φύλου	Riis & Fuchs
	Χρωματοσωματική ανάλυση από αίμα	Moorhead
1961	Αδρανοποίηση του X	Lyon
	Γενετικός κώδικας	Nirenberg
1967	Διάγνωση πρώτης αυτοσωματικής νόσου	Weiss & Green
1969	Σήμανση DNA με ανιχνευτές RNA	Gall & Pardue
1970	Χρώση χρωματοσωματικών ζωνών (bands)	Caspersson
	Ανακάλυψη περιοριστικών ενζύμων	Nathan, Smith
	Πρώτη σύνθεση γονιδίου in vitro	Khorana
1973	Συσχέτιση νόσων και συστήματος HLA	Terasaki
1974	Ενσωμάτωση BrdU (SCEs)	Latt
1976	Χρώση κατά ζώνες υψηλής ανάλυσης	Yunis
1977	Κλωνοποίηση πρώτου ανθρώπινου γονιδίου	Shine
	Μη ραδιενεργοί ανιχνευτές DNA	Rudkin & Stollar
1978	Εισαγωγή των RFLPs	Kan
	Πρώτη διάγνωση νόσου με χρήση DNA	Kan
1979	Εξωσωματική γονιμοποίηση	Edwards & Stepoe
	Παρασκευή ινσουλίνης με γενετική μηχανική	Goeddel
1981	Εφαρμογή μοριακής ανίχνευσης FISH	Langer
1985	Αποτύπωμα DNA	Jeffreys
	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)	Saiki
1987	Χαρτογράφηση γονιδίων στον άνθρωπο	Διάφοροι
1990	Προσπάθεια γονιδιακής θεραπείας	Rosenberg κ.ά.

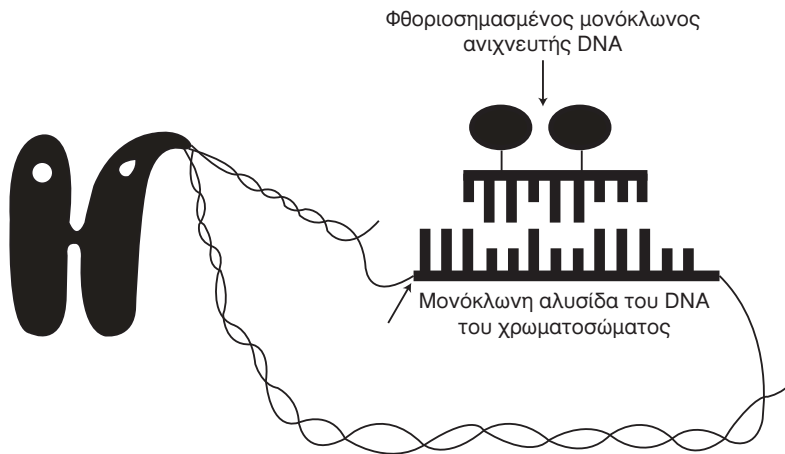
ΟΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η F.I.S.H. λοιπόν (ή καλύτερα η Fluorescence In Situ Hybridization που μεταφράζεται ως φθορίζουσα υβριδοποίηση *in situ*, δηλαδή εντοπισμένη), είναι μία κυτταρογενετική-μοριακή τεχνική, η οποία χρησιμοποιεί ανιχνευτές DNA ή RNA επισημασμένους με μόρια-αναφορές, τα οποία με τη σειρά τους φθορίζουν και μπορούν με τον τρόπο αυτό, να γίνονται ορατά σε παρατήρηση κάτω από ένα μικροσκόπιο φθορισμού. Η μέθοδος αυτή, όπως άλλωστε προαναφέρθηκε, επιτρέπει τον προσδιορισμό του αριθμού και της τοποθεσίας συγκεκριμένων ακολουθιών DNA στα ανθρώπινα κύτταρα. Με τη βοήθεια της FISH χρωματίζουμε και παρατηρούμε ολόκληρα χρωματοσώματα ή ακόμη και τμήματά τους ή κάποια άλλα χρωματοσώματα, που εξαιτίας της μορφολογίας τους ονομάζονται δείκτες (markers). Μπορούμε ακόμη να αποσαφηνίσουμε ισορροπημένες ή όχι μεταθέσεις (translocations), να αναγνωρίσουμε χρωματοσωματικές διπλοποιήσεις (π.χ. το φαινόμενο θέσης), να αναλύσουμε πολύπλοκους χρωματοσωματικούς ανασυνδυασμούς, ακόμη και μεμονωμένα γονίδια. Η εφαρμογή τους στην προγεννητική, αλλά και στη μετά τη γέννηση διάγνωση είναι πολύ σημαντική και θα αποκτήσει μεγαλύτερη σημασία στο άμεσο μέλλον (Cherif και συν., 1989. Adinolfi και Crolla, 1994).

Από την άλλη πλευρά βεβαίως, η ταυτοποίηση των δομικών και αριθμητικών ατυπιών του γενώματος με τις συνήθειες, αλλά και με τις υψηλής ανάλυσης κυτταρογενετικές μεθόδους, παραμένει σε αμείωτη ισχύ στην ιατρική διαγνωστική και έχει το σημαντικότερο μέχρι στιγμής ρόλο, όσον αφορά τη διάγνωση και την αντιμετώπιση των γενετικών, κληρονομικών και μη, νοσημάτων. Οποσδήποτε όμως αυτές οι αναλύσεις είναι αρκετά “χονδροειδείς” συγκριτικά με τη μεθοδολογία FISH και επιτρέπουν την οπτική παρατήρηση και διάγνωση ατυπιών από 350 απλές χρωματοσωματικές ζώνες το πολύ μέχρι 450-500 ζώνες, μέσα από το πλήθος των τριών και πλέον δισεκατομμυρίων ζευγών βάσεων από τα οποία αποτελείται ολόκληρο το ανθρώπινο γένωμα.

Η αρχή της μεθόδου FISH, που εφαρμόζεται πλέον παγκόσμια για τη διάγνωση των αριθμητικών και δομικών χρωματοσωματικών ατυπιών, στηρίζεται στο μοναδικό γεγονός της συμπληρωματικότητας ενός επισημασμένου μονόκλωνου κομματιού DNA (του DNA ανιχνευτή) με ένα μονόκλωνο – μετά από ειδική κατεργασία – DNA (τον DNA-στόχο) που βρίσκεται σ’ ένα χρωματοσώμα μίας μετάφασης ή ενός πυρήνα πάνω σε μία αντικειμενοφόρο. Αυτό πρέπει να είναι ένα φιξαρισμένο κυτταρικό υλικό (που σημαίνει να έχει περάσει πρώτα από υπότονο διάλυμα και στη συνέχεια να επεξεργασθεί με το οργανικό διάλυμα Fix, δηλαδή 3+1 μέρη μεθανόλης και οξικού οξέος). Τέτοιο υλικό

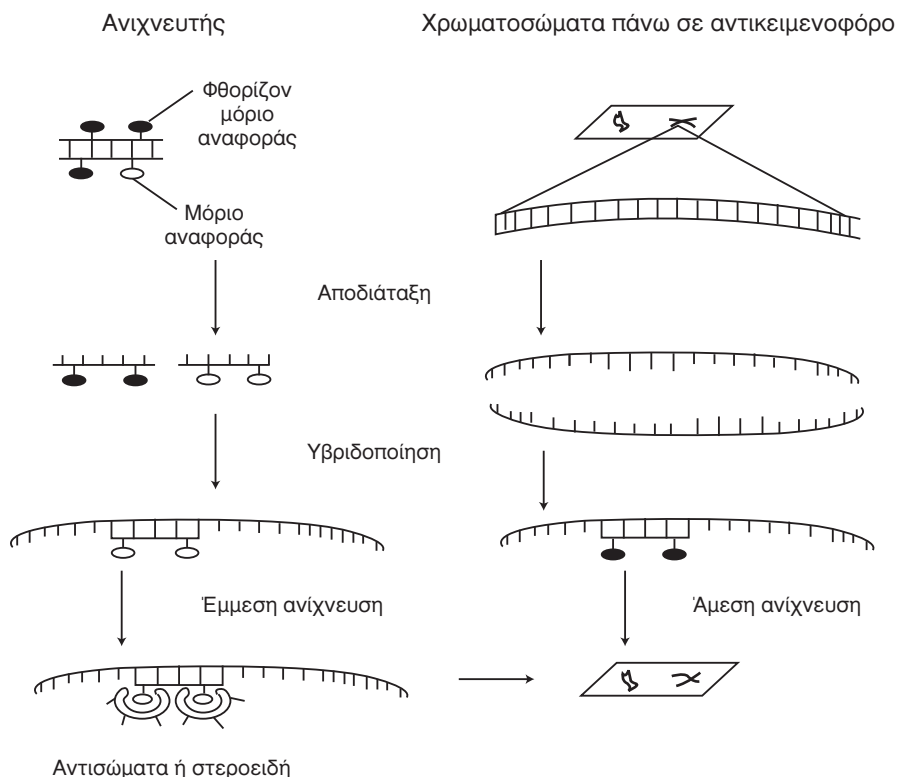
μπορεί να είναι π.χ. κάποια μεταφασικά χρωματοσώματα ή κάποιοι πυρήνες κυττάρων ή ακόμη-ακόμη κάποια τομή από ένα ιστοτεμάχιο παραφίνης). Για την εφαρμογή της συγκεκριμένης μεθόδου λοιπόν χρειαζόμαστε πάντα έναν DNA “ανιχνευτή” (δηλ. το DNA probe) που περιέχει μια συγκεκριμένη ακολουθία DNA, την συμπληρωματική της οποίας αναζητάμε στα χρωματοσώματα. Ένας ανιχνευτής μπορεί να είναι ένα συγκεκριμένο γονίδιο, ή μία σειρά συγκεκριμένων ακολουθιών νουκλεοτιδίων ή μία ακολουθία βάσεων που γνωρίζουμε ότι βρίσκεται σε ένα συγκεκριμένο μέρος του γενώματος, όπως για παράδειγμα στο κεντρομερίδιο ή τελομερίδιο κάποιου ή κάποιων χρωματοσωμάτων (Σχήμα 1). Τα χρωματοσώματα που εξετάζονται, προετοιμάζονται προηγουμένως καλά σε αντικειμενοφόρες πλάκες, όπως ακριβώς στην κυτταρογενετική ανάλυση και ακόμη πιο προσεκτικά. Ο ανιχνευτής και το χρωματοσωματικό υλικό αποδιατάσσονται με ειδική διαδικασία σε υψηλή θερμοκρασία και ο ανιχνευτής εφαρμόζεται στο υλικό της αντικειμενοφόρου πλάκας κάτω



Σχήμα 1. Απεικόνιση της τεχνικής F.I.S.H. Στις ομόλογες θέσεις και οι δύο αδελφές χρωματίδες του χρωματοσώματος φέρουν ένα ορατό σήμα φθορισμού (στο σχήμα είναι η άσπρη τελεία). Αυτό συνήθως είναι εύκολα αναγνωρίσιμο με τη βοήθεια υπεριώδους ακτινοβολίας από λάμπα υδραργύρου σε μεγέθυνση 1000X ή 400X με ειδικά φίλτρα σε ένα ερευνητικό οπτικό μικροσκόπιο φθορισμού. Για την κατανόηση του γεγονότος, τμήμα της μίας δίκλωνης αλυσίδας του DNA (ένας βρόγχος του DNA από τη μία χρωματίδη) έχει ξεδιπλωθεί και ένα μικρό τμήμα της έμεινε μονόκλωνο, πάνω στο οποίο έρχεται και υβριδοποιείται (δηλαδή επικολλάται) ο επισημασμένος με φθορίζουσα χρωστική ανιχνευτής, αναγνωρίζοντας την ακριβή συμπληρωματικότητα της ακολουθίας των βάσεων του με αυτές του συγκεκριμένου μονόκλωνου τμήματος του χρωματοσώματος, που ανιχνεύουμε και ζητούμε να επισημανθεί (άμεση μέθοδος).

από συνθήκες που επιτρέπουν τον υβριδισμό του δηλαδή τη συγκόλληση του ανιχνευτή με το προς εξέταση μονόκλωνο DNA στη συμπληρωματική του ακολουθία. Δημιουργείται έτσι ένα υβρίδιο δίκλωνο DNA, δηλαδή ένα νέο και ξένο προς το μητρικό DNA*, εξού και η λέξη υβριδισμός, που σημαίνει η διαδικασία δημιουργίας υβριδιακών DNA με τα οποία ασχολείται κυρίως η γενετική μηχανική (McNeil και συν., 1991· Michalet και συν., 1997).

Υπάρχουν δύο τύποι μη ραδιενεργού υβριδισμού: ο έμμεσος και ο άμεσος υβριδισμός (Σχήμα 2). Στον άμεσο η φθορίζουσα χρωστική (το φθοριόχρωμα) είναι ενωμένη απευθείας στον ανιχνευτή, ενώ στον έμμεσο τύπο ο ανιχνευτής φέρει ένα μόριο αναφοράς, το οποίο χημικά ή ενζυμικά μπορεί να σημανθεί με άλλο φθορίζον μόριο (το φθοριόχρωμα) μέσω μίας εξειδικευμένης ανοσοϊ-



Σχήμα 2. Πορεία της μεθόδου F.I.S.H.

* Υβρις = *hybris* που σημαίνει νόθο, άσχημο, βρισιά

στοχημικής αντίδρασης (Kievits και συν., 1995· Lovett, 1994).

Στην έμμεση μέθοδο, οι αντικειμενοφόρες πλάκες στη συνέχεια εκπλύνονται καλά και ο ανιχνευτής που έχει επισημανθεί με βιοτίνη ή διγοξιγενίνη, ανιχνεύεται με τη χρησιμοποίηση αντισωμάτων κατά της βιοτίνης ή αντίστοιχα κατά της διγοξιγενίνης, που και αυτά με τη σειρά τους έχουν επισημανθεί με φθορίζουσες χρωστικές (fluorochromes). Χρησιμοποιώντας λοιπόν ειδικές φθορίζουσες χρωστικές (όπως των εταιρειών Oncor και Vysis ή και άλλων ανεξάρτητων ερευνητών) για ανίχνευση, και επιπλέον τους ανιχνευτές DNA, που έχουν επισημανθεί με αυτές, παρατηρούμε κάποιες μοναδικές ή άλλες – όπως οι επαναλαμβανόμενες – ακολουθίες, να φθορίζουν σε συγκεκριμένα σημεία πάνω στα μεταφασικά χρωματοσώματα ή πάνω σε μεσοφασικούς πυρήνες. Έτσι μπορούν να ανιχνευθούν, λόγω χάριν: (α) οι αριθμητικές ατυπίες, όπως η τρισωμία 18, ο μωσαϊκισμός 45,XO/47,XXX είτε το σύνδρομο του υπερράρενου XYY, (β) οι μεταθέσεις και άλλες δομικές ατυπίες, όπως t(6;9), t(1;7) ή t(14;21) και (γ) οι ελλείψεις γονιδίων, όπως του γονιδίου της δυστροφίνης στους φορείς της μυικής δυστροφίας Duchenne (DMD carrier), ή του τμήματος 5p- (σύνδρομο cri-du-chat) (Σχήμα 2).

Η τεχνική F.I.S.H., όπως καταφαίνεται, αποτελεί μία πολυσταδιακή διαδικασία. Τα βήματά της απλοποιημένα μπορούν να συνοψισθούν ως εξής:

- A. Παρασκευή και σήμανση των ανιχνευτών DNA.
- B. Παρασκευή και προετοιμασία των κυτταρολογικών δειγμάτων (των μεταφασικών χρωματοσωμάτων, των κυτταρικών εναιωρημάτων ή των ιστικών τομών).
- Γ. Η αποδιάταξη των ανιχνευτών και των δειγμάτων (denaturation).
- Δ. Η επιτόπια υβριδοποίηση (in situ hybridization).
- Ε. Η ανίχνευση του ζητούμενου DNA από τους φθορίζοντες ανιχνευτές και
- Στ. Η μικροσκοπήση φθορισμού και η φωτογράφιση ή αντιγραφή των εικόνων σε κάποιο σκληρό δίσκο ή σε CD μέσω ενός συστήματος H/Y.

Έτσι λοιπόν:

A. Η σήμανση των ανιχνευτών DNA και RNA για την εφαρμογή τους στην τεχνική F.I.S.H. γίνεται κατά κανόνα ενζυμικά. Αν και υπάρχουν διαθέσιμες χημικές διαδικασίες, τα ενζυμικά πρωτόκολλα που χρησιμοποιούν την μεταγραφή δι' εγχοπής (nick translation), τυχαίους εκκνητές (random priming) και PCR ή ειδικές τελικές τρανσφεράσες (terminal transferases), αποδεικνύονται πιο απλά και αποδίδουν καλλίτερα αποτελέσματα σήμανσης. Κατά τη διάρκεια της αντίδρασης για τη σήμανση ενσωματώνονται στον ανιχνευτή τροποποιημένα ανάλογα νουκλεοτιδίων. Αυτά ήταν συνδεδεμένα αρχικά μόνο με απτίνες, όπως η βιοτίνη ή η διγοξιγενίνη, στις οποίες σε ένα επόμενο στάδιο προσδένονται ειδικές φθορίζουσες ενώσεις (τα φθοριοχρώματα). Στην πορεία

έγιναν διαθέσιμα νουκλεοτιδικά ανάλογα, που ήταν απευθείας συνδεδεμένα με φθοριοχρώματα, όπως η FITC-dUTP ή TRITC-dUTP (Wiegant και συν., 1991) και τελευταία παρασκευάστηκαν φθοριοχρώματα που είναι ορατά μόνον με τη CCD κάμερα, όπως τα Cy5, Cy3.5, Cy7 κλπ.

Β. Η παρασκευή των μεταφασικών ή προφασικών χρωματοσωμάτων για την FISH ακολουθεί κάποια σταθερά πρωτόκολλα (Verna και Babu, 1989), ενώ αντίθετα η προετοιμασία μεσοφασικών πυρήνων, π.χ. από αμνιακά κύτταρα, ινοβλάστες ή πυρήνων από συντηρημένα ή νωπά ιστοτεμάχια, απαιτεί μία ποικιλία βημάτων με σκοπό την αύξηση της πρόσδεσης του ανιχνευτή και τη μείωση του φθορισμού στο υπόστρωμα.

Γ. Τα μόρια του ανιχνευτή και του DNA στόχου αποδιατάσσονται πάντα σε αυξημένη θερμοκρασία. Στη διαδικασία όμως, προστίθεται φορμαμίδιο για να μειώσει τη θερμοκρασία βρασμού του δίκλωνου DNA. Εάν χρησιμοποιούνται σύμπλοκα μόρια DNA ως ανιχνευτές, τότε στα διαδικαστικά βήματα προστίθεται και ένα βήμα προϋβριδισμού (preannealing step) με περίσσεια μη επισημασμένου ολικού γένωματος DNA ή του κλάσματος cot1 ανθρώπινου DNA πριν από το βήμα του υβριδισμού προκαλώντας με τον τρόπο αυτό μία επιτόπια συμπιεστική χρωματοσωματική υβριδοποίηση (Chromosomal In Situ Suppression ή CISS hybridization)(Cremer και συν., 1988).

Δ. Η αντίδραση υβριδοποίησης συνήθως διεξάγεται σε θερμοκρασία 37°C για περίπου 12-16h. Μικρότερα χρονικά διαστήματα (λεπτά ή ώρες) είναι κατάλληλα για τους ανιχνευτές επαναλαμβανόμενων ακολουθιών, ενώ άλλοι ανιχνευτές απαιτούν αυξημένες θερμοκρασίες υβριδισμού για να επιτύχουν το στόχο τους. Όταν όμως πρόκειται να χρησιμοποιηθεί για τον υβριδισμό ολόκληρο γένωμα, τότε απαιτείται φυσικά χρονικό διάστημα μεγαλύτερο των δύο ημερών ή και περισσότερο.

Ε. Η αντίδραση ανίχνευσης γίνεται έμμεσα με φθοριοχρώματα που συνδέονται με τη βιοτίνη ή διγοξιγενίνη (δηλαδή με τις απτίνες) και αυτές με αβιδίνη-FITC ή με αντισώματα έναντι των μορίων-αναφοράς. Εάν οι ανιχνευτές που χρησιμοποιούνται είναι συνδεδεμένοι απευθείας με φθοριοχρώματα, τότε δεν απαιτούνται οι διαδικασίες της ανίχνευσης. Στο εμπόριο διατίθενται φθοριοχρώματα που εκπέμπουν στο κυανούν (AMCA, Cascade blue), στο πράσινο (FITC) και στο ερυθρό χρώμα (TRITC, Texas red, Rhodamine, Cy3) του ορατού φάσματος. Πρόσφατα, άρχισε η χρήση φθοριοχρωμάτων που εκπέμπουν στο υπέρυθρο φάσμα, όπως το Ultralit 680, το Cy5, Cy7 κά., και φυσικά είναι μη ορατά για τον ανθρώπινο οφθαλμό (ορατά μόνο για την CCD κάμερα).

Τέλος,

Στ. Τα σήματα των ανιχνευτών γίνονται ορατά με το μικροσκόπιο φθορι-

σιμού. Φίλτρα νέας γενιάς επιτρέπουν τον ακριβή διαχωρισμό τέτοιων φθοριοχρωμάτων (Ploem και Tanke, 1987· Marcus, 1988). Αναπτύχθηκαν επίσης και φίλτρα διπλής και τριπλής ζώνης διαπερατότητας για διαγνωστικά εργαστήρια ρουτίνας (Johnson και συν., 1991) με τα οποία μπορούμε να παρατηρήσουμε δύο ή και τρία φθοριοχρώματα μαζί. Ειδικές μηχανές λήψης οι CCD (Charge Coupled Device) cameras προσδίδουν στην τεχνική FISH τη μεγάλη ευαισθησία τους και τη δυνατότητα ποσοτικής μέτρησης των εικόνων φθορισμού, αλλά και τη δυνατότητα για ανίχνευση σε μήκη κύματος εκτός του ορατού φάσματος. Τελευταία, το μικροσκόπιο λέιζερ απείρου εστίασεως χρησιμοποιήθηκε για την παρατήρηση λεπτών οπτικών τομών σε τρισδιάστατα αντικείμενα, όπως είναι παραδείγματος χάριν, ένας μεσοφασικός πυρήνας (Cremer και Cremer, 1978· Lichter και Ried, 1993).

Συμπληρώνοντας η μία την άλλη, όλες οι ανωτέρω ανακαλύψεις και εφαρμογές συνέβαλαν σημαντικά στην αλματώδη χρήση της μοριακής αυτής κυτταρογενετικής μεθόδου, της FISH, με ειδική αναφορά στην ευαισθησία, στην ανάλυση και στη δυνατότητα επανάληψης των αποτελεσμάτων της. Το σήμα και η ανάλυση των φθοριοχρωμάτων είναι πλέον υψηλότερα αυτών των ραδιοϊσοτόπων και φθάνει στο εύρος των 5 Mbp, αλλά εάν επιθυμεί κανείς υψηλή διακριτική ικανότητα μεταξύ δύο σημάτων φθορισμού, τότε η πολύ καλή εστίαση μπορεί να αποδώσει ανάλυση διάκρισης σήματος μέχρι 1-5 kb (Tocharoentanaphol και συν., 1994).

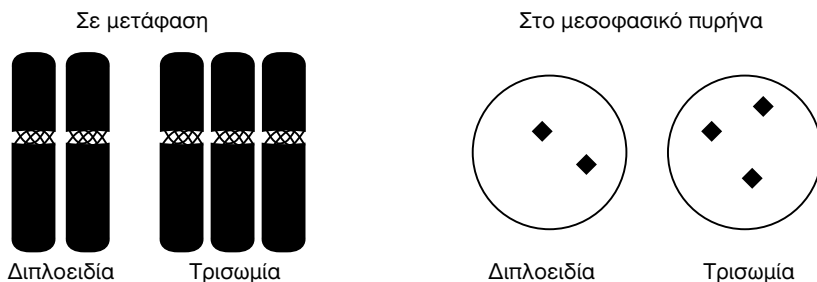
ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΣΤΟΙΧΕΙΩΝ ΤΗΣ F.I.S.H.

Απαραίτητη προϋπόθεση για τη μελέτη της F.I.S.H. και ειδικότερα του τρόπου λειτουργίας της, προβάλλει πρώτα η μελέτη καθενός από τα στοιχεία που την αποτελούν, όσο και η παράθεση ορισμένων χαρακτηριστικών που αυτά εμφανίζουν, όπως τα έμμεσα και άμεσα συνδεδεμένα στους ανιχνευτές φθοριοχρώματα, το pH, ο χρόνος υβριδισμού, τα μικροσκόπια φθορισμού με τα εξειδικευμένα φίλτρα τους — για τα συγκεκριμένα κάθε φορά χρησιμοποιούμενα φθοριοχρώματα —, το cDNA κ.ά. Το σημαντικότερο βέβαια όλων των στοιχείων είναι οι ανιχνευτές του DNA, γιατί από εκεί αρχίζουν και εκεί εστιάζονται όλα τα της FISH (Arnold και συν., 1992· Antonacci και συν., 1995· Collins και συν., 1995).

ΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΤΕΣ - ΕΙΔΗ ΑΝΙΧΝΕΥΤΩΝ

Όπως ήδη προαναφέρθηκε, οι “ανιχνευτές” αποτελούν το βασικότερο στοιχείο της μεθοδολογίας FISH. Διακρίνονται σε τρεις τύπους:

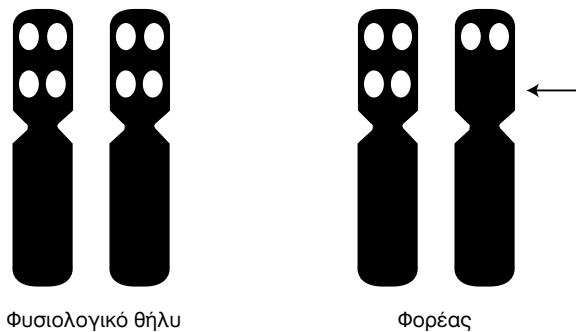
1. **Οι ανιχνευτές DNA επαναλαμβανόμενων ακολουθιών (repetitive DNA probes).** Ο πρώτος αυτός τύπος των ανιχνευτών είναι συνήθως μία επαναλαμβανόμενη ακολουθία βάσεων σε πολλά (μέχρι 102-105) αντίγραφα που προέρχεται από ένα κεντρομερίδιο ή συγκεκριμένο τελομερίδιο. Οι επαναλαμβανόμενες ακολουθίες είναι διασκορπισμένες στο γένωμα και υπάρχουν κατηγορίες επαναλαμβανόμενων ακολουθιών οι οποίες βρίσκονται σε συγκεκριμένες περιοχές του γενώματος. Παρατηρούνται έτσι μερικές ακολουθίες, που είναι μοναδικές για τα κεντρομερίδια, και, επομένως ο ενδιαφερόμενος ερευνητής μπορεί να αποκτήσει έναν ανιχνευτή, ο οποίος θα είναι δυνατό να επισημάνει όλα τα ανθρώπινα κεντρομερίδια. Υπάρχουν, επιπρόσθετα, άλλες ακολουθίες που κυριολεκτικά κυκλώνουν ένα κεντρομερίδιο, όχι σε όλα αλλά σε συγκεκριμένα χρωμοσώματα, έτσι ώστε οι χρησιμοποιούμενοι ανιχνευτές να επισημαίνουν, χαρακτηριστικά, συγκεκριμένα μόνον κεντρομερίδια (Σχήμα 3). Και επιπλέον, υπάρχουν ανιχνευτές που μπορούν να επισημάνουν όλα τα τελομερίδια ή μόνο μερικά χαρακτηριστικά τελομερίδια. Αξίζει δε να αναφερθεί, ότι οι ανωτέρω ανιχνευτές χρησιμοποιούνται σήμερα στην Κλινική Γενετική για τη διάγνωση, κατά κύριο λόγο, αριθμητικών ατυπιών. Παραδείγματα τέτοιων ανιχνευτών είναι οι pHY2.1, pXBr, L1.84, alhoid 14 που ανιχνεύουν τις κεντρομερικές περιοχές του Y, του X, του 1ου και του 14ου χρωμοσώματος αντίστοιχα (Gray και Pinkel., 1992· Goodwin και Mayne, 1993).



Σχήμα 3. Παρατήρηση τρισωμίας 18

2. **Σύμπλοκοι ανιχνευτές DNA (complex DNA probes).** Ο δεύτερος τύπος ανιχνευτών περιλαμβάνει όλους σχεδόν τους ανιχνευτές που προέρχονται από ένα και μόνον αντίγραφο DNA (single copy DNA) ή και από επαναλαμβανόμενες ακολουθίες DNA (όπως οι Alu-αλληλουχίες, οι οποίες σχεδόν μία φορά κάθε 4 kb εισχωρούν στο ανθρώπινο γένωμα). Συνήθως είναι cDNAs ή κλωνοποιημένα τμήματα DNA. Για την παρασκευή τους απαιτούνται φορείς ή ξενιστές. Τέτοιοι

μπορεί να είναι τα πλασμίδια (που μπορούν να μεταφέρουν τμήμα DNA 0,1-15kb), τα κοσμίδια (30-45 kb), τα PACs (100-150kb), τα BACs (100-150kb) και τα YACs (για μεταφορά τμημάτων 100kb-15Mb). Οι ανιχνευτές αυτοί ως εξειδικευμένα αντίγραφα γονιδίων παράγουν ένα φωτεινό φθορίζον σήμα σε μία μοναδική και συγκεκριμένη θέση μέσα στο γένωμα. Η FISH επιτυγχάνει τον εντοπισμό τους σ' ένα συγκεκριμένο ζεύγος χρωματοσωμάτων και αυτή η μέθοδος είναι συχνά η μέθοδος της επιλογής για τη χαρτογράφηση γονιδίων. Οι ανιχνευτές αυτοί είναι επίσης σημαντικοί στα κλινικά εργαστήρια κυτταρογενετικής, γιατί μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον καθορισμό της παρουσίας ή της απουσίας μιας συγκεκριμένης περιοχής του γενώματος. Υπάρχουν, επί παραδείγματι, μερικά γενετικά σύνδρομα που σχετίζονται άμεσα με την απώλεια συγκεκριμένων περιοχών του γενώματος (δηλαδή τμημάτων ή ολόκληρων χρωματοσωμάτων) και η διάγνωσή τους μπορεί να γίνει με τη βοήθεια της FISH σ' ένα τμήμα του DNA από τη διαγεγραμμένη περιοχή. Παραδείγματα τέτοιων ανιχνευτών είναι οι *pot54*, *cos519*, *100C10*, που ανιχνεύουν αντίστοιχα το γονίδιο το σχετικό με τη νόσο DiGeorge και το σύνδρομο Down οι δύο πρώτοι, ο δε τελευταίος ανιχνευτής το γονίδιο της δυστροφίνης (που σε ετεροζυγωτία καταδεικνύει τη γυναίκα-φορέα της φυλοσύνδετης μυϊκής δυστροφίας Duchenne) (Σχήμα 4). Το μειονέκτημά τους είναι το ότι στο εμπόριο δεν διατίθενται προς το παρόν αρκετοί ειδικοί ανιχνευτές μοναδικών ακολουθιών. Οι περισσότεροι από τους ανιχνευτές που χρησιμοποιούνται στην ιατρική διαγνωστική ευρίσκονται "ακόμη" σε πειραματικό επίπεδο (Trask και συν., 1989· Cherif και συν., 1989· Matsuyama και συν., 1994· 1996b).



Σχήμα 4. Ταυτοποίηση-διάγνωση φορέα DMD (μυϊκής δυστροφίας Duchenne). Γονιδιακά εξειδικευμένοι ανιχνευτές (*cosmid-DNA*) ανιχνεύουν την έλλειψη του ομόλογου γονιδιακού ζεύγους στους φορείς της DMD (βέλος). Αριστερά δύο φυσιολογικά X χρωματοσώματα, δεξιά ένα X φυσιολογικό και ένα X με έλλειψη του γονιδίου. Οι δύο άλλοι ανιχνευτές προστίθενται ως *control*.