



Τμήμα Φαρμακευτικής
Πανεπιστήμιο Αθηνών

Φαρμακογενετικοί έλεγχοι

Ιωάννης Ντότσικας

Επ. Καθηγητής

✓ Η πρόοδος των επιστημών της φαρμακολογίας και μοριακής βιολογίας επέτρεψε την καλύτερη κατανόηση των **ΜΗΧΑΝΙΣΜΩΝ ΔΡΑΣΗΣ** των φαρμάκων και των **ΑΝΕΠΙΘΥΜΗΤΩΝ ΕΝΕΡΓΕΙΩΝ (Α.Ε)** τους

✓ Ειδικά για τις Α.Ε. έγινε σαφές ότι η **ΑΤΟΜΙΚΗ ΙΔΙΟΣΥΓΚΡΑΣΙΑ** παίζει πολύ σημαντικό ρόλο

✓ 2.200.000 άνθρωποι στις Η.Π.Α νοσηλεύονται λόγω Α.Ε των φαρμάκων και ~ 100.000 εξ' αυτών χάνουν τη ζωή τους*

* Lazarou, et al., JAMA 279 (1998) 1200



Το κόστος για την «ρύθμιση» των προβλημάτων που σχετίζονται με τα φάρμακα είναι το ίδιο ή και μεγαλύτερο με το κόστος των ίδιων των φαρμάκων

1994: \$73 δισεκ. για φάρμακα, \$76 δισεκ. για ρύθμιση προβλημάτων που σχετίζονται με τη χρήση φαρμάκων

Drug-related morbidity and mortality: A cost of illness model Arch Intern Med 1995;155(18):1949-56

1997: Στις κλινικές, για κάθε δολλάριο \$1 φαρμακευτικής αγωγής; \$1.3 δολλάρια για ρύθμιση προβλημάτων που σχετίζονται με τη χρήση φαρμάκων

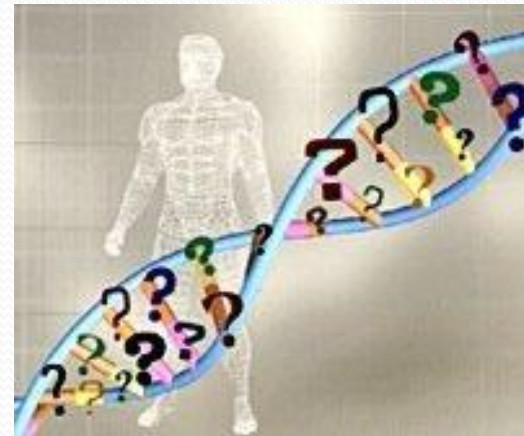
Healthcare cost of drug-related morbidity and mortality in nursing facilities. Arch Intern Med 1997;157(18):2089-96

2001: \$133 δισεκ. για φάρμακα; \$174 δισεκ. για ρύθμιση προβλημάτων που σχετίζονται με τη χρήση φαρμάκων

J Am Pharm Assoc 2001;41(2):192-97

✓ Το 59% των φαρμάκων που εμπλέκονται σε Α.Ε. μεταβολίζονται από ηπατικά ένζυμα για τα οποία έχουν περιγραφεί γενετικές διαφοροποιήσεις *

* Philips, et al., JAMA 286 (2001) 2270



➤ **Εξατομικευμένη φαρμακοθεραπεία:** Λήψη του πλέον αποτελεσματικού & ασφαλούς φαρμάκου για κάθε μεμονωμένο ασθενή, βάσει του γονιδιακού προφίλ του και άλλων παραμέτρων



➤ Τι σημαίνει **φαρμακογενετική (pharmacogenetics)**;

Η μελέτη της επίδρασης γενετικών διαφοροποιήσεων ενός ή λίγων γονιδίων στην απόκριση του φαρμάκου (αποτελεσματικότητα και Α.Ε.)

➤ Τι σημαίνει **φαρμακογενωμική ή φαρμακογονιδιωματική (pharmacogenomics)**;

Η μελέτη της επίδρασης των διαφοροποιήσεων του ανθρώπινου γονιδιώματος στην απόκριση των φαρμάκων (αποτελεσματικότητα και Α.Ε.) στον πληθυσμό (πρόβλεψη νέων δομών, μελέτη μηχανισμών, επαναξιολόγηση παλαιών φαρμάκων κτλ)

Η φαρμακογενωμική εμπεριέχει τη φαρμακογενετική (αν και πολλοί τις ταυτίζουν)

ΕΝΤΟΠΙΣΜΟΣ ΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΕΩΝ

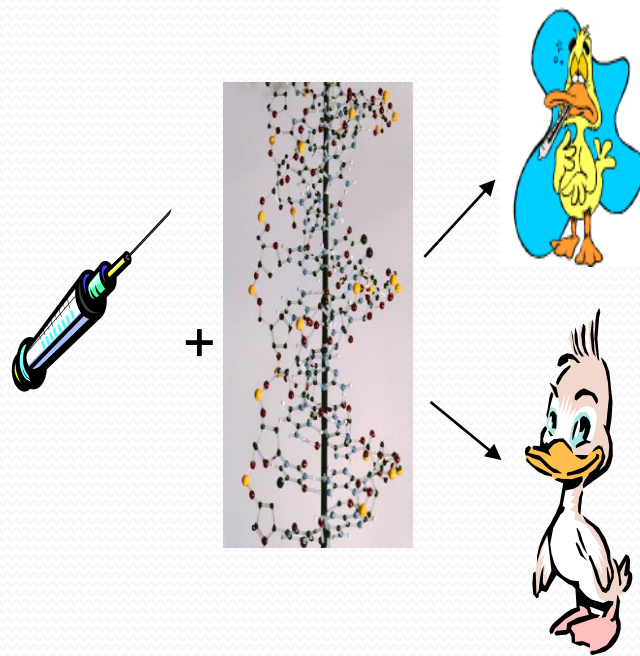
1. Φαρμακοκινητική

- Απορρόφηση
- Κατανομή
- **Μεταβολισμός**
- Απέκκριση

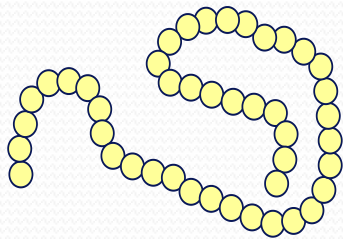
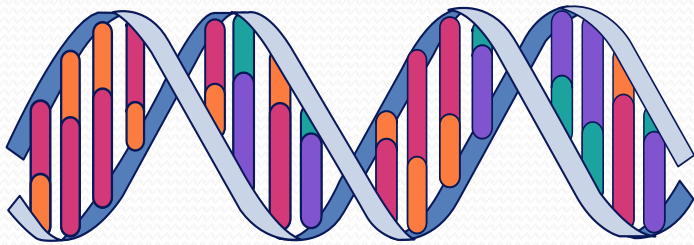


2. Φαρμακοδυναμική

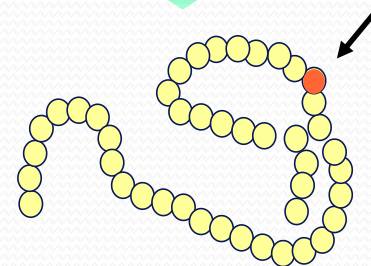
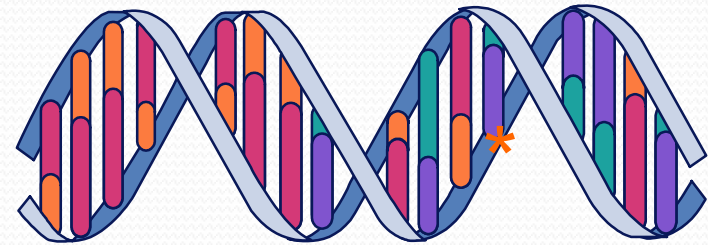
- Υποδοχείς
- Ένζυμα
- Κανάλια ιόντων



Οι γενετικές μεταλλάξεις σε ένα απλό νουκλεοτίδιο μπορεί να μεταβάλλουν τη λειτουργικότητα της κωδικοποιημένης πρωτεΐνης (**ενζύμου**)



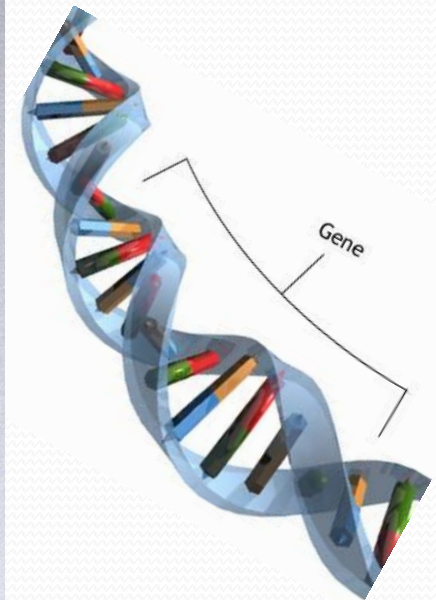
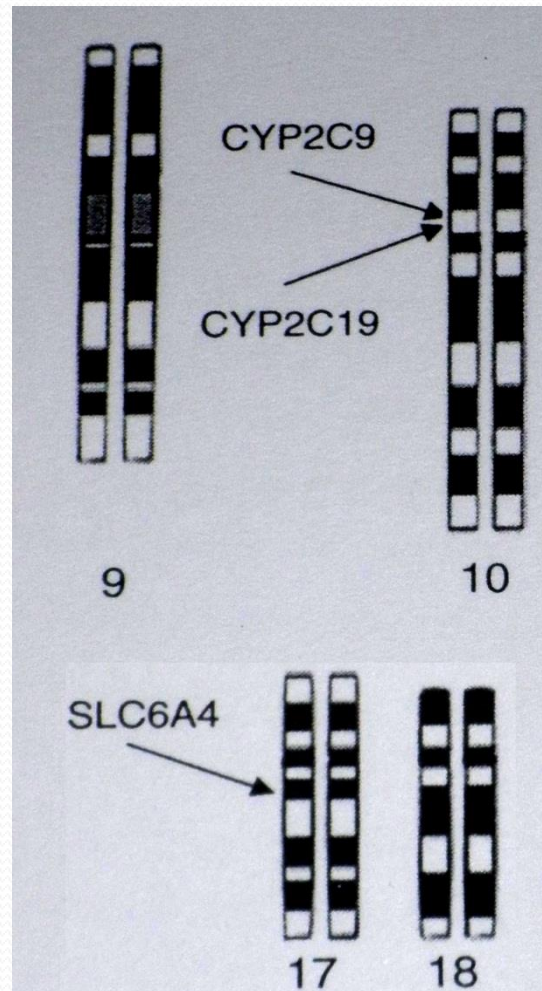
Λειτουργικό ένζυμο



**Τροποποιημένο ένζυμο –
Λειτουργικό ;**

Τα κυριότερα γονίδια που εξετάζονται σε φαρμακογενετικό έλεγχο

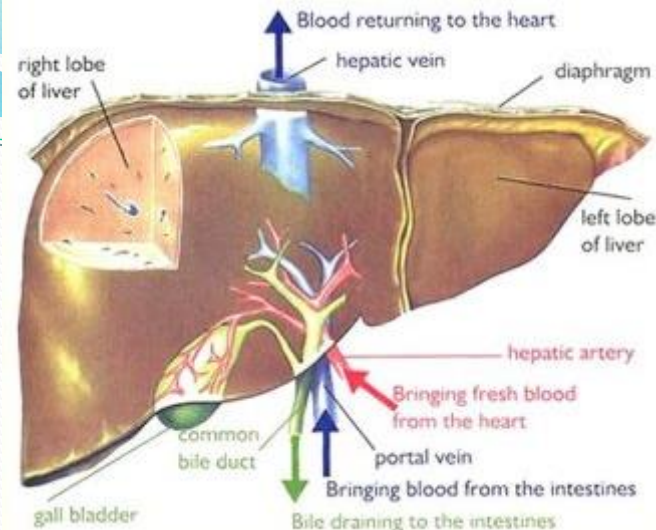
- CYP2D6
- VCORC1
- CYP2C9
- HTR1A
- CYP2C19
- HTR2A
- CYP3A4
- HTR2C
- CYP3A5
- SLCO1B1
- CYP1A2
- SLC6A2
- COMT
- SLC6A4



Φαρμακογενετική & Μεταβολισμός

Η συντριπτική πλειοψηφία των φαρμάκων μεταβολίζονται μέσω του ήπατος. Κύριος μηχανισμός του ήπατος για τον μεταβολισμό των φαρμάκων είναι η οικογένεια των ενζύμων **P-450** που περιλαμβάνει περισσότερα από 50 ισοένζυμα

❖ Συχνά, περισσότερα του ενός ενζύμου εμπλέκονται στο μεταβολισμό ενός φαρμάκου



Κυτόχρωμα CYP450 2 D 6 *4

Υπεροικογένεια

Οικογένεια

Υποοικογένεια

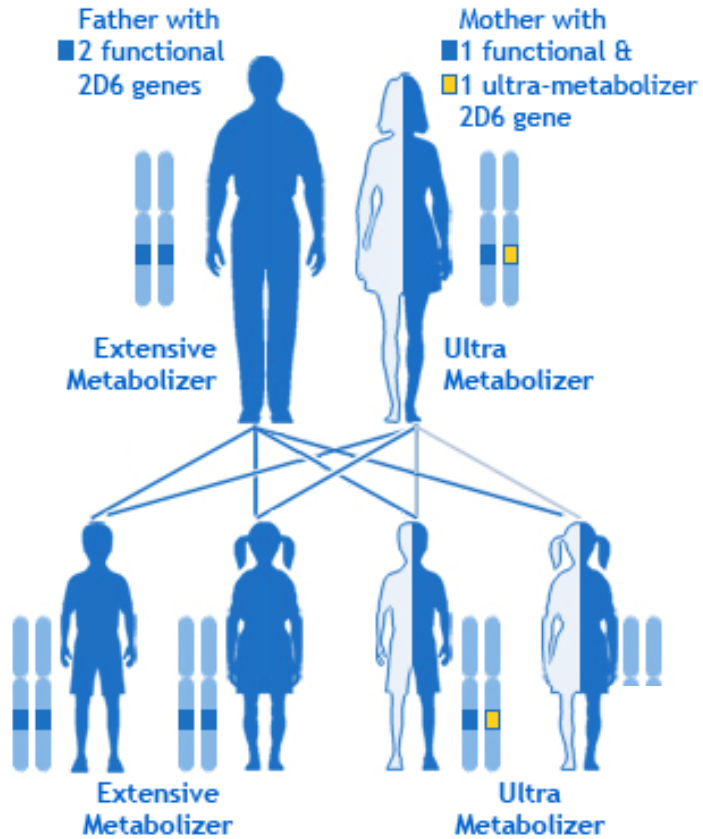
Ισοένζυμο

Αλληλόμορφο

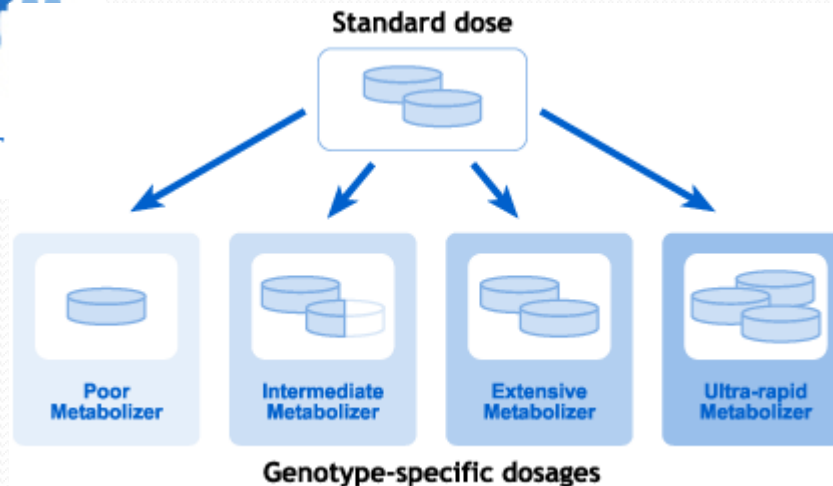
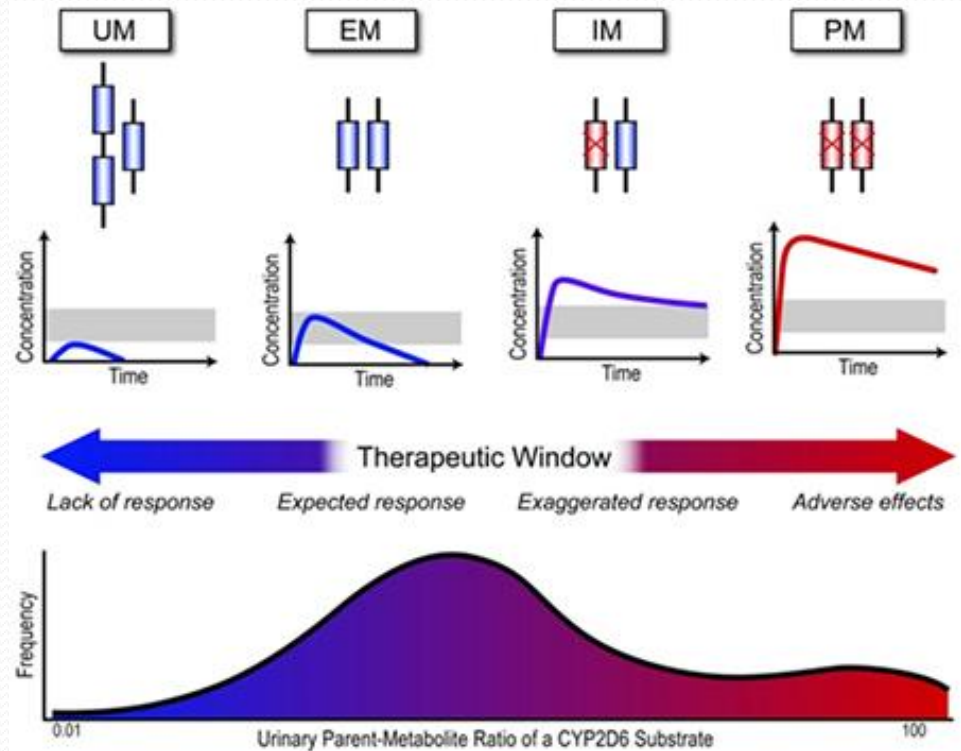


Φυσιολογικός Μεταβολισμός (EM)	Ο ασθενής μεταβολίζει φυσιολογικά τα φάρμακα στην συνταγογραφούμενη δόση
Μειωμένος Μεταβολισμός (IM)	Οι ασθενείς μεταβολίζουν τα φάρμακα πιο αργά. Αυτοί οι ασθενείς μπορεί να χρειαστούν χαμηλότερη δόση , και υπάρχει πιθανότητα συσσώρευσης φαρμάκου στον οργανισμό προκαλώντας δυσμενείς επιπτώσεις. Είναι ιδιαίτερα σημαντικό να παρακολουθείται η αποτελεσματικότητα των φαρμάκων της κατηγορίας αυτής.
Ελάχιστος Μεταβολισμός (PM)	Οι ασθενείς δεν μπορούν να μεταβολίζουν τα φάρμακα της κατηγορίας αυτής. Αυτός ο τύπος μεταβολισμού είναι εν δυνάμει πολύ επικίνδυνος, καθώς υπάρχει μεγάλη πιθανότητα συσσώρευσης των φαρμάκων στον οργανισμό του ασθενούς, με αποτέλεσμα να εμφανίζονται πολλές παρενέργειες.
Γρήγορος Μεταβολισμός (UM)	Οι ασθενείς που παίρνουν φάρμακα αυτής της κατηγορίας σε κανονική δοσολογία τα μεταβολίζουν τόσο γρήγορα ώστε έχουν μειωμένο θεραπευτικό όφελος .

Metabolizer Status and Heredity



adapted from US National Library of Medicine





Test Definition: 2C190

Cytochrome P450 2C19 Genotype by Sequence Analysis, Saliva

Reporting Title: CYP2C19 Genotype, Saliva

Performing Location: Rochester

Specimen Requirements:

Multiple drug metabolism genotype tests can be performed on a single specimen after a single extraction. See Multiple Drug Metabolism Genotype Tests in Special Instructions for a list of tests that can be ordered together.

Container/Tube: Oragene DNA Self-Collection Kit (Supply T651)

Specimen Volume: Full tube

Collection Instructions:

1. Fill to tube line.
2. Send specimen in original container per kit instructions.

Additional Information:

1. Cytochrome P450 Patient Education Brochure (Supply T526) is available upon request.
2. Liver transplants will interfere with testing. Call Mayo Medical Laboratories at 800-533-1710 or 507-266-5700 for instructions.

Forms: New York Clients-Informed consent is required. Please document on the request form or electronic order that a copy is on file. An Informed Consent for Genetic Testing (Supply T576) is available in Special Instructions.

Η παραλαβή DNA μπορεί να γίνει από ολικό αίμα ή προτιμότερα από σίελο.

Η συλλογή σιέλου αποτελεί μια **μη παρεμβατική** μέθοδο δειγματοληψίας, η οποία μπορεί να πραγματοποιηθεί από τον ίδιο τον ασθενή



Η περίπτωση της ΚΛΟΠΙΔΟΓΡΕΛΗΣ: Το FDA συνιστά φαρμακογενετικό έλεγχο στο γονίδιο CYP2C19 πριν την έναρξη αντιπηκτικής θεραπείας

Safety

[+](#) Share [✉](#) Email this Page [🖨](#) Print this page [⊞](#) Change Font Size

Home > Safety > MedWatch The FDA Safety Information and Adverse Event Reporting Program > Safety Information

MedWatch The FDA Safety Information and Adverse Event Reporting Program

Safety Information

Safety Alerts for Human Medical Products

Plavix (clopidogrel): Reduced effectiveness in patients who are poor metabolizers of the drug

Audience: Cardiology healthcare professionals, patients

[Posted 03/12/2010] FDA notified healthcare professionals and patients that a Boxed Warning has been added to the prescribing information for Plavix, an anti-blood clotting medication. The Boxed Warning in the drug label will include information to:



Clopidogrel: Black-Box Warning

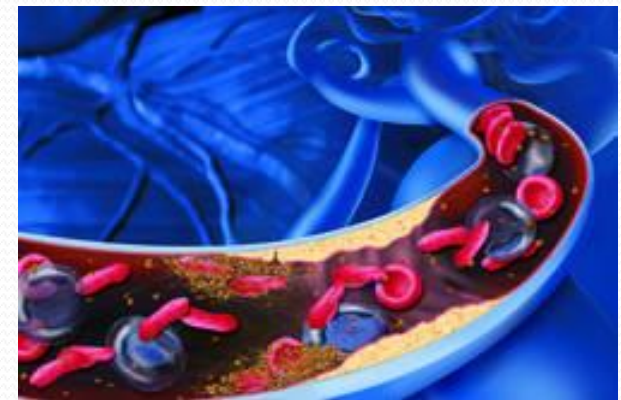
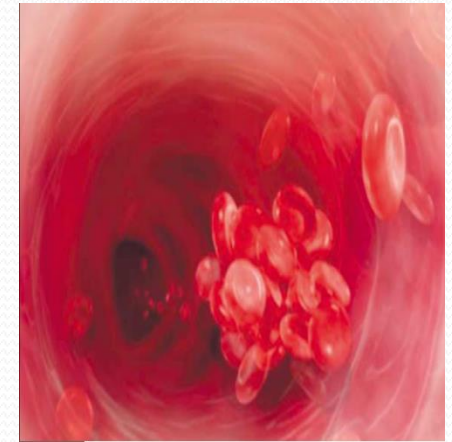
DIMINISHED EFFECTIVENESS IN POOR METABOLIZERS

- Effectiveness of clopidogrel depends on activation to an active metabolite by the cytochrome P450 (CYP) system, principally CYP2C19
- Poor metabolizers treated with clopidogrel at recommended doses exhibit higher cardiovascular event rates following ACS or PCI than patients with normal CYP2C19 function
- Tests are available to identify a patient's CYP2C19 genotype and can be used as an aid in determining therapeutic strategy
- Consider alternative treatment or treatment strategies in patients identified as CYP2C19 poor metabolizers

✓ Η κλοπιδογρέλη αποτελεί τη συνήθη αγωγή των οξέων στεφανιαίων συνδρόμων

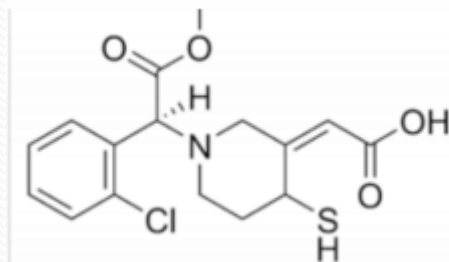
✓ Είναι αδρανής στη χορηγούμενη μορφή (προφάρμακο) και μετατρέπεται στον οργανισμό στο **δραστικό** μεταβολίτη της με αντιπηκτική δράση

✓ Οι πολυμορφισμοί του γονιδίου CYP2C19 επηρεάζουν την ενεργότητα του ενζύμου, οδηγώντας σε **διαφορετική απόκριση** στο φάρμακο



Clopidogrel
(a pro-drug)

CYP2C19
→



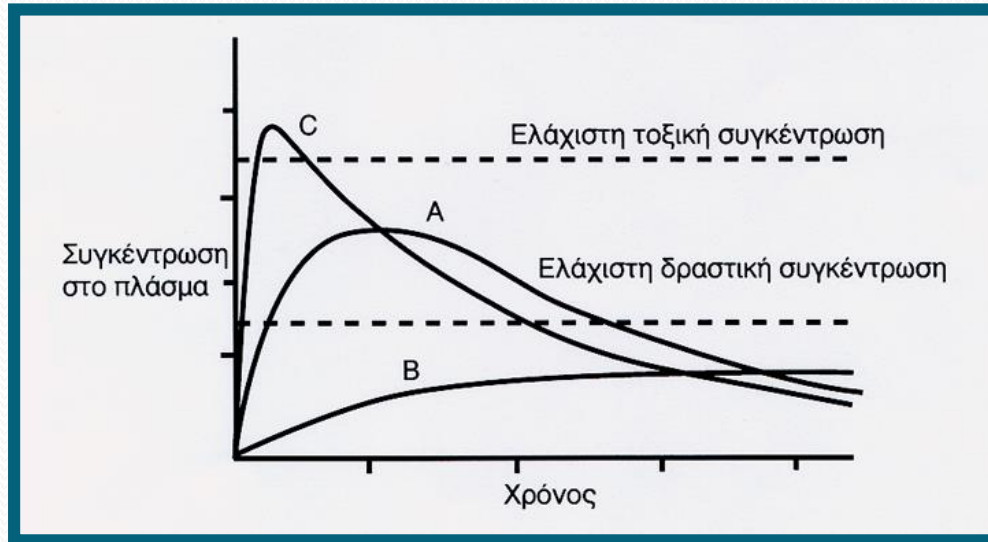
- ✓ Τα αλληλόμορφα **CYP2C19 *2 & *3** καθορίζουν την πλειοψηφία των **αργών μεταβολιστών** = ευθύνονται για την ατελή βιομετατροπή της κλοπιδογρέλης και την ανεπαρκή ανταπόκριση στη θεραπεία
- ✓ Το αλληλόμορφο **CYP2C19 *17** καθορίζει τον **υπερταχύ μεταβολιστή** = ευθύνεται για την πολύ γρήγορη βιομετατροπή της κλοπιδογρέλης και την εκδήλωση Α.Ε. (αιμορραγίες)

Η συχνότητα εμφάνισης των τροποποιημένων αλληλομόρφων μπορεί να φτάσει και το **30%!!!** στους Καυκάσιους πληθυσμούς

Classification	Caucasian	African Amer.	Asian
Normal (extensive)	70	40	50
Intermediate	5	30	45
Poor	7-10	15-20	1
Ultra Rapid	5-15	2-20	2



✓ Στις περιπτώσεις των ενζύμων με τροποποιημένη ενεργότητα η έννοια της **αλληλεπίδρασης** των φαρμάκων λαμβάνει πολύ μεγαλύτερη σημασία!



- Και άλλες κατηγορίες φαρμάκων αποτελούν υποστρώματα του ίδιου ενζύμου *CYP2C19* : αντικαταθλιπτικά, αγχολυτικά, αντιεπιληπτικά, αναστολείς αντλίας πρωτονίων (**υποστρώματα**)
- Άλλα φάρμακα δρουν ως **επαγωγείς** του ενζύμου *CYP2C19*
- Άλλα φάρμακα δρουν ως **αναστολείς** του ενζύμου *CYP2C19*

Φαρμακογενετικοί έλεγχοι & εξατομικευμένη Φαρμακοθεραπεία

Η συχνότητα των διαφορετικών τύπων του γονιδίου CYP2D6 στους διάφορους πληθυσμούς (το CYP2D6 γονίδιο μεταβολίζει το 30% όλων των φαρμάκων.)

Classification	Frequency of Allele SNPs by Race (%)		
	Caucasian	African Amer.	Asian
Normal (extensive)	70	40	50
Intermediate	5	30	45
Poor	7-10	15-20	1
Ultra Rapid	5-15	2-20	2

Φαρμακογενετικοί έλεγχοι & εξατομικευμένη Φαρμακοθεραπεία

Το παράδειγμα του Tamoxifen (για τον καρκίνο του μαστού)

Το Tamoxifen μεταβολίζεται με το ένζυμο **CYP2D6**. Το 30% της λευκής φυλής ανήκουν στην κατηγορία των ενδιάμεσων και φτωχών μεταβολιστών.

- ▶ **Breast cancer recurrence rates after 2 years of tamoxifen (Goetz)**
 - ❑ Extensive metabolizers (normal activity): 2%
 - ❑ Intermediate metabolizers (reduced activity): 8%
 - ❑ **Poor metabolizers (no activity): 32%**
- ▶ **Breast cancer recurrence rates at 9 years after 5 years of tamoxifen tx (Schroth)**
 - ❑ Extensive metabolizers (normal activity): 14.9%
 - ❑ Intermediate metabolizers (reduced activity): 20.9%
 - ❑ **Poor metabolizers (no activity): 29.0%**

▶ Sources: Goetz MP, et al. *Breast Cancer Res Treat.* 2007;101:113–121

▶ Schroth W, et al. *JAMA* 2009;302:1429-1436.

Κατηγορίες φαρμάκων για φαρμακογενετικό έλεγχο*

➤ Καρδιολογικά

- αντιπηκτικά
- αντιυπερτασικά
- αντιαρρυθμικά
- αντιστηθαγχικά

➤ Αντικαταθλιπτικά

➤ Αντιψυχωσικά

➤ Αντιεπιληπτικά

➤ Αγχολυτικά/ηρεμιστικά/υπνωτικά

➤ Αντιμικροβιακά



*Σχετική λίστα για όσα υπάρχει τεκμηριωμένη συσχέτιση

➤ Γαστρεντερολογικά

- αναστολείς αντλίας πρωτονίων

-Αντιεμετικά

➤ Μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη

➤ Αντιδιαβητικά

➤ Αντισταμινικά

➤ Για στυτική δυσλειτουργία

➤ Αντικαρκινικά

➤ Αντισυλληπτικά

➤ Καφεΐνη



Αντικαταθλιπτικά φάρμακα*

Χρησιμοποιούνται
όπως ενδείκνυνται

Bupropion
Desvenlafaxine
Selegiline

Χρησιμοποιούνται
με προσοχή

Amitriptyline
Citalopram
Clomipramine
Escitalopram
Imipramine
Sentriline
Trazodone

Χρησιμοποιούνται
με προσοχή και
συχνή
παρακολούθηση

Desipramine
Duloxetine
Fluoxetine
Fluvoxamine
Mirtazapine
Nortriptyline
Paroxetine
Venlafaxine

* Με βάση τα υπάρχοντα επιστημονικά δεδομένα

Τροποποίηση δοσολογίας με βάση το φαρμακογενετικό έλεγχο

mg ανά ημέρα**						
	VKORC1 GG		VKORC1 AG		VKORC1 AA	
Παραλλαγές <i>CYP2C9</i>	Αρχική δόση	% μείωση	Αρχική δόση	% μείωση	Αρχική δόση	% μείωση
Καμία	5,6		4,5	20	3,5	38
<i>Ετερόζυγο *2</i>	4,5	20	3,5	38	2,7	52
<i>Ετερόζυγο *3</i>	4,0	29	3,1	45	2,3	59
<i>Ομόζυγο *2</i>	3,5	38	2,7	52	2,0	64
<i>Σύνθετο Ετερόζυγο *2/*3</i>	3,1	45	2,3	59	1,6	71
<i>Ομόζυγο *3</i>	2,6	54	1,9	66	1,3	77

- Ο παραπάνω Πίνακας αποτελεί υπόδειγμα για ενημέρωση και δεν έχει το νόημα της επιβολής στον ιατρό.
- **Το ποσοστό της μείωσης σε κάθε στήλη αναφέρεται στη δόση των **5,6 mg**.

➤ **SOS**: Ένας φαρμακογενετικός έλεγχος δεν είναι το άπαν στον καθορισμό της θεραπείας.

➤ Πολλοί παράγοντες εμπλέκονται πέραν του γονοτύπου του ατόμου

- ηλικία
- φύλο
- σωματικό βάρος
- ύπαρξη ασθενειών όπως νεφρική/ηπατική ανεπάρκεια
- συγχωρηγούμενα φάρμακα
- Φ/Τ μορφή

➤ Ο φαρμακογενετικός έλεγχος μπορεί να αποτελέσει το συνδετικό κρίκο μεταξύ των κλινικών εργαστηρίων, των φαρμακοποιών και των γιατρών

Τι ισχύει σήμερα;



EUROPEAN MEDICINES AGENCY
SCIENCE MEDICINES HEALTH

12 December 2011
EMA/CHMP/37646/2009
Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP)

Guideline on the use of pharmacogenetic methodologies in the pharmacokinetic evaluation of medicinal products

Draft Agreed by Pharmacogenomics Working Party and EWP- PK	March 2010
Adoption by CHMP for release for consultation	22 April 2010
End of consultation (deadline for comments)	31 October 2010
Agreed by Pharmacogenomics Working Party	October 2011
Adoption by CHMP	19 January 2012
Date for coming into effect	1 August 2012

Σύσταση για διενέργεια φαρμακογενετικών ελέγχων σε διάφορα στάδια ανάπτυξης φαρμάκου

- Είτε ως **προαπαιτούμενου (required)**, είτε ως **συνιστώμενου (recommended)**

- In vitro & in vivo μελέτες (Φάσεις I-III)

- Δημιουργία υποομάδων με βάση το διαφορετικό γονότυπο

- Πληθυσμιακές μελέτες

Συνέπειες γενετικών διαφοροποιήσεων σε μία μελέτη βιοϊσοδυναμίας

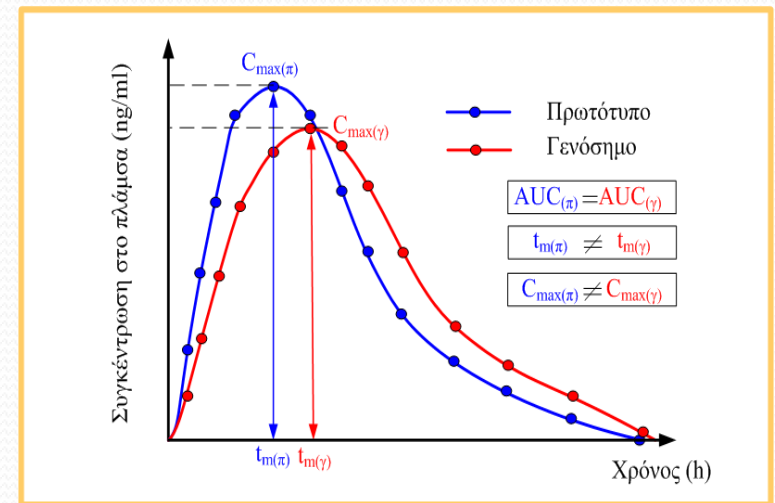
-Υπαρξη **υποομάδων** με διαφορετικά γενετικά χαρακτηριστικά (μικρό δείγμα)

-Μεγάλη **διατομική** μεταβλητότητα

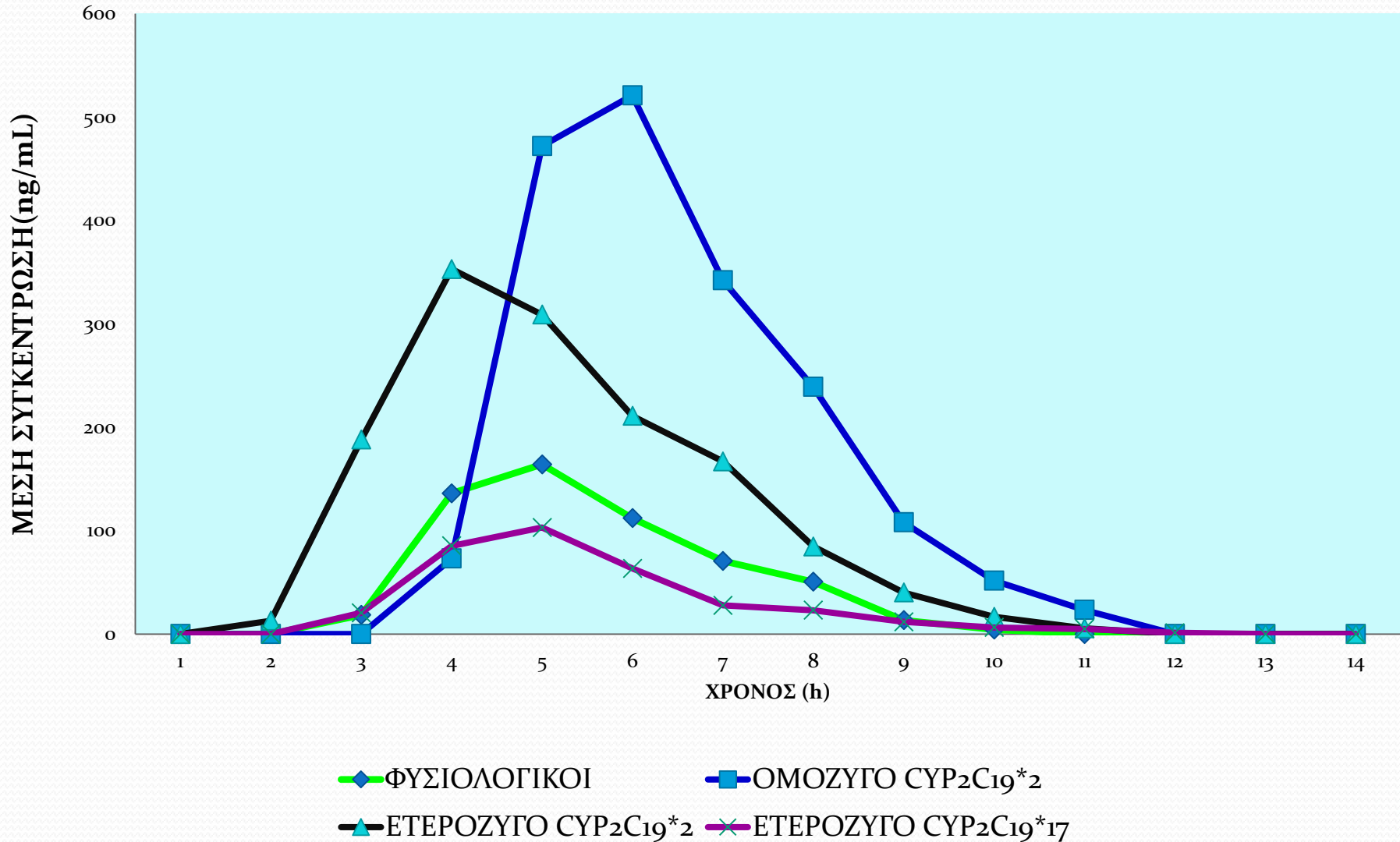
-Πιθανή εμφάνιση **ανεπιθύμητων ενεργειών** και **απομάκρυνση** εθελοντών

-Λανθασμένη δειγματοληψία

-Μη ικανοποιητική έκπλυση μεταξύ των περιόδων (carry over effect)



Γράφημα συγκέντρωσης-χρόνου ομεπραζόλης των εθελοντών.



Διενέργεια φαρμακογενετικού ελέγχου σε μία μελέτη βιοϊσοδυναμίας κατά τη στρατολόγηση των εθελοντών

Η περίπτωση της μिरταζαπίνης*

-Σκοπός: η μείωση του μεγέθους των εθελοντών σε φάρμακα με μεγάλη μεταβλητότητα $(CV_w) \geq 30\%$

-Μέθοδος: η διενέργεια κλινικής μελέτης σε 3 υποομάδες με διαφορετική δραστικότητα στο ένζυμο CYP2D6

-Αποτελέσματα: μείωση του μεγέθους του δείγματος της μελέτης από 15.3-29.2%!!

π.χ. Από **40** εθελοντές σε **28**!

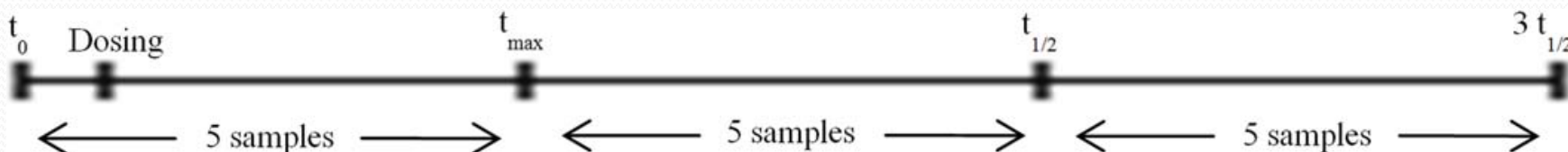


*Gonzalez-Vacarezza et al, Pharmacogenomics J, 2012

-Συμπεράσματα: η εισαγωγή του φαρμακογενετικού ελέγχου κατά το σχεδιασμό της μελέτης μπορεί να οδηγήσει σε:



1. Μείωση του **αριθμού** των εθελοντών
2. Μείωση του **κόστους**
3. Μικρότερη **διακύμανση** των Φ/Κ παραμέτρων
4. Μείωση των πιθανοτήτων για **ανεπιθύμητες ενέργειες** και **απομάκρυνση** εθελοντών
5. Πληροφόρηση του εθελοντή για το φαρμακογενετικό προφίλ του
6. Αποφυγή εκπλήξεων, π.χ. **πολύ υψηλές συγκεντρώσεις**, εκτός της καμπύλης αναφοράς
7. Αποφυγή **λαθών δειγματοληψίας** και **μη ικανοποιητικής έκπλυσης** (ασφαλέστερος σχεδιασμός)



Πιθανά προβλήματα

1. Το screening γίνεται πιο **χρονοβόρο** και **ακριβό**
2. η ανεύρεση εθελοντών γίνεται πιο **δύσκολη**
3. Κάποιοι εθελοντές μπορεί να **αρνηθούν** την ανάλυση DNA
4. Οι φαρμακογενετικοί έλεγχοι **δεν** έχουν εφαρμογή **σε όλες** τις δραστικές ουσίες
5. Ηθικά ζητήματα για την **αποθήκευση** γενετικού υλικού

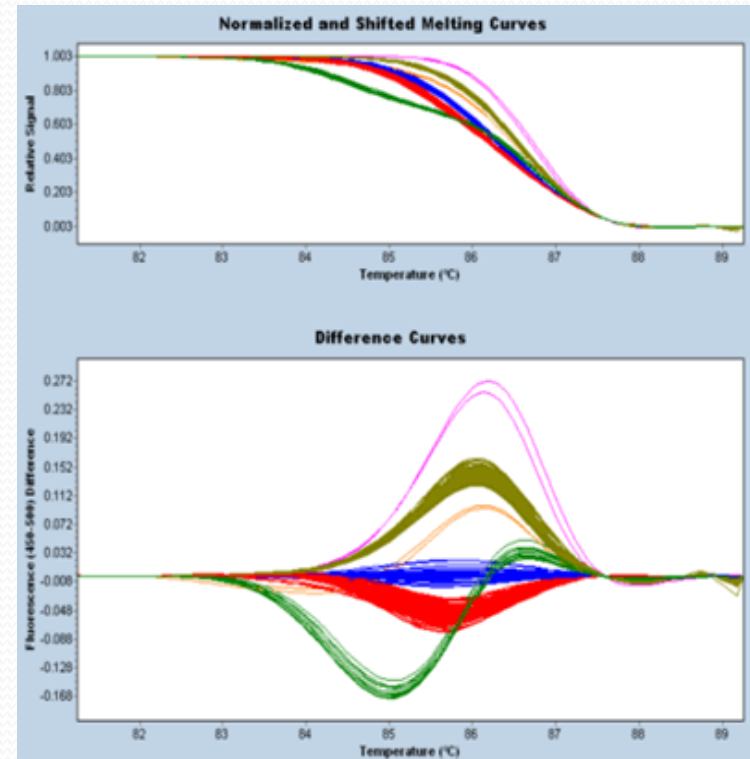




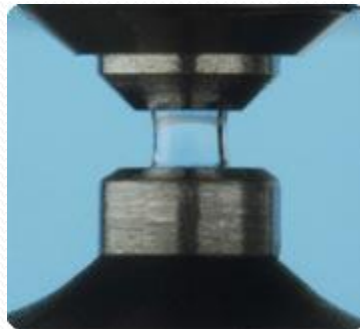
- Η διενέργεια φαρμακογενετικών ελέγχων πριν την έναρξη μελετών βιοϊσοδυναμίας αυξάνει το επιστημονικό τους κύρος και μειώνει τις πιθανότητες αποτυχίας
- Είναι πολύ πιθανό να αποτελέσουν προαπαιτούμενο για εκείνες τις περιπτώσεις των φαρμάκων που οι Φ/Κ παράμετροι επηρεάζονται πολύ από τις γενετικές διαφοροποιήσεις

Μοριακοί έλεγχοι

- Real Time PCR



- Προσδιορισμός συγκέντρωσης και καθαρότητας δειγμάτων (πριν την PCR και μετά την απομόνωση)
 - τοποθετείται 1,5 μ L του διαλύματος μετά την απομόνωση του DNA με μικροπιπέτα στη κεφαλή του Nanodrop.



Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR)*

Η Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης είναι μια μέθοδος που επιτρέπει την ενίσχυση συγκεκριμένων αλληλουχιών του DNA με αποτέλεσμα τη δημιουργία πολλών αντιγράφων σε σύντομο χρόνο. Με αυτόν τον τρόπο μπορεί να γίνει ανίχνευση μεταλλάξεων ή πολυμορφισμών, η οποία απαιτεί αρκετά μεγάλες ποσότητες DNA.

*βραβείο Νόμπελ το 1993

Αρχή της μεθόδου

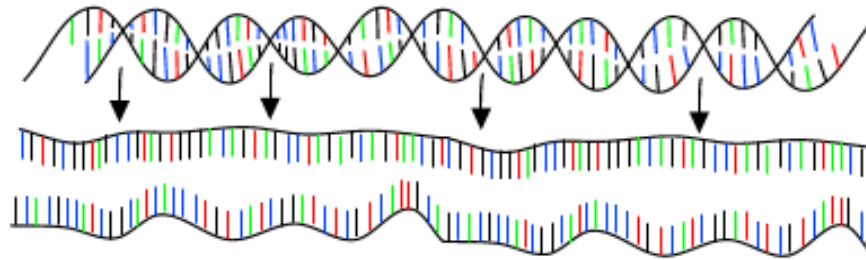
Αποτελεί τη **συνεχή επανάληψη ενός κύκλου** που αποτελείται από **τρία διαδοχικά στάδια**. Σε κάθε στάδιο γίνεται επώαση του δείγματος σε διαφορετική κάθε φορά θερμοκρασία, με την βοήθεια ενός ειδικού μηχανήματος, του **θερμικού κυκλοποιητή** (thermal cycler). Ο κυκλοποιητής έχει την δυνατότητα να θερμάνει και να ψύχει τα δείγματα σε σύντομο χρόνο.

Τα στάδια που αποτελούν τον επαναλαμβανόμενο κύκλο είναι τα εξής:

- 1) **Αποδιάταξη** του δίκλωνου DNA (denaturation)---- 94 °C
- 2) **Υβριδοποίηση** εκκινητών (primer annealing) στις αλληλουχίες του DNA-στόχου----- 50-60 °C. Οι εκκινητές συνήθως έχουν μέγεθος 20 έως 30 νουκλεοτίδια.
- 3) **Επιμήκυνση εκκινητών** (extension)-----72 °C. Με τη βοήθεια της DNA πολυμεράσης, που προσθέτει τα νουκλεοτίδια (dNTP's) στο 3' άκρο των εκκινητών, επιτυγχάνεται η σύνθεση των νέων συμπληρωματικών αλυσίδων DNA. Η σύνθεση των αντιγράφων γίνεται από την DNA πολυμεράση πάντα με κατεύθυνση 5' προς 3'. Με αυτόν τον τρόπο επιμηκώνει και τους δύο εκκινητές προς το μέρος του στόχου.

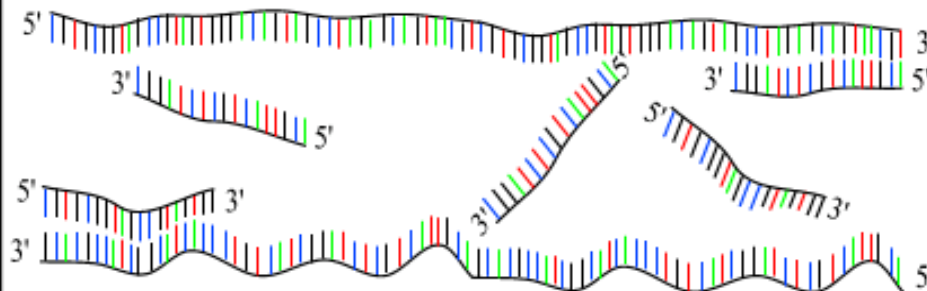
PCR : Polymerase Chain Reaction

30 - 40 cycles of 3 steps :



Step 1 : denaturation

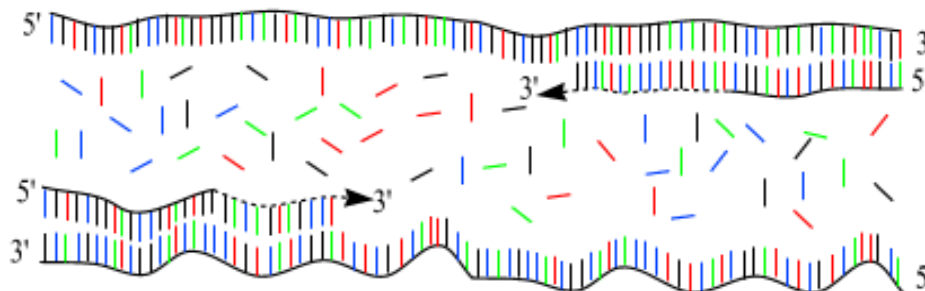
1 minut 94 °C



Step 2 : annealing

45 seconds 54 °C

forward and reverse primers !!!



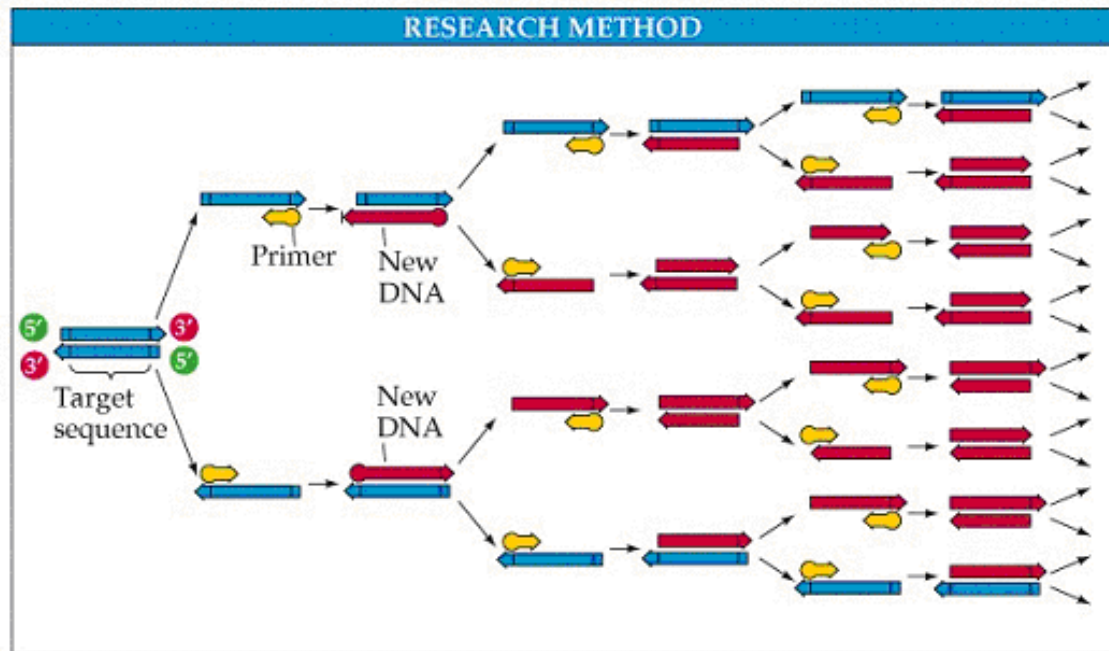
Step 3 : extension

2 minutes 72 °C

only dNTP's

(Andy Vierstraete 1999)

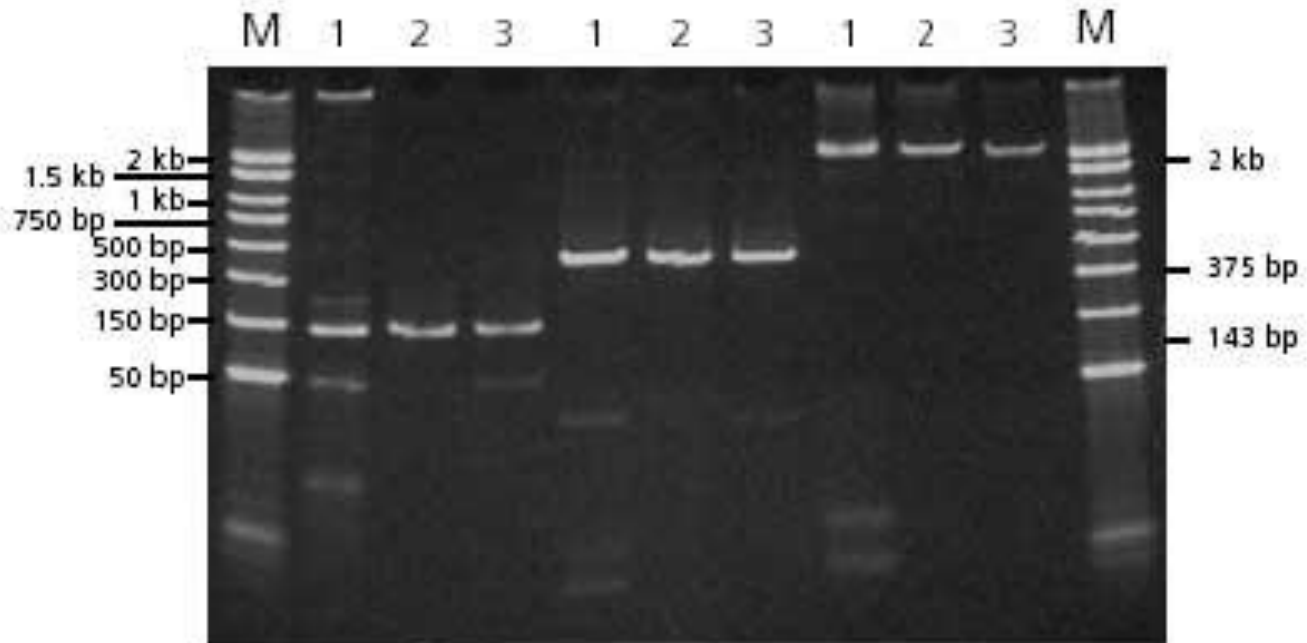
Στον επόμενο κύκλο δημιουργούνται **τέσσερις** διπλές έλικες και στο τέλος του **τρίτου κύκλου** έχουν δημιουργηθεί **δύο αλυσίδες** οι οποίες αντιστοιχούν στην αλληλουχία στόχο. Κατά τους επόμενους κύκλους ενισχύεται η αλληλουχία στόχος εκθετικά. Καθώς η διαδικασία επαναλαμβάνεται, οι νεοσύστατοι κλώνοι με τη σειρά τους χρησιμοποιούνται ως εκμαγεία για την *in vitro* σύνθεση του DNA. Μετά από μερικούς κύκλους, το επικρατές προϊόν είναι ένα DNA θραύσμα το μέγεθος του οποίου αντιστοιχεί στην μεταξύ των δύο αρχικών εκκινητών απόσταση.



Αντιδραστήρια PCR

1. η **DNA πολυμεράση** (Taq polymerase) είναι θερμοανθεκτικό ένζυμο
2. **ένα ρυθμιστικό διάλυμα** (buffer) για pH=7.5-8.0
3. **ιόντα μαγνησίου** (Mg^{++})
4. **τριφωσφορικά δεσοξυριβονουκλεοτίδια** (dNTPs), (ATP, TTP, CTP και GTP)
5. **ο εκκινητής** (primer) είναι ολιγονουκλεοτίδιο και έχει συνήθως μήκος 15-20 νουκλεοτιδίων. Σχεδιάζεται ώστε να είναι συμπληρωματικός ως προς την αλληλουχία των αλυσίδων του DNA, που επιθυμούμε να ενισχύσουμε. Αποτελούν το σημείο εκκίνησης της DNA πολυμεράσης για συγκεκριμένη θερμοκρασία αποδιάταξης

Για την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων της PCR, δηλαδή των προϊόντων, εφαρμόζεται η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης μαζί με **μοριακούς δείκτες** (molecular ladders) των οποίων τα μεγέθη θα είναι γνωστά. Έτσι μπορούμε να προσδιορίσουμε το μέγεθος και να διαπιστώσουμε αν το προϊόν της PCR έχει το αναμενόμενο μέγεθος. Τα προϊόντα της PCR γίνονται ορατά με την χρώση του **βρωμιούχου αιθιδίου** (Ethidium bromide) το οποίο φθορίζει έντονα κάτω από υπεριώδεις ακτίνες UV όταν συγκεντρώνεται στις περιοχές DNA προϊόντων της PCR, εφόσον παρεμβάλλεται μεταξύ των ζευγών των βάσεων του διπλόκλωνου



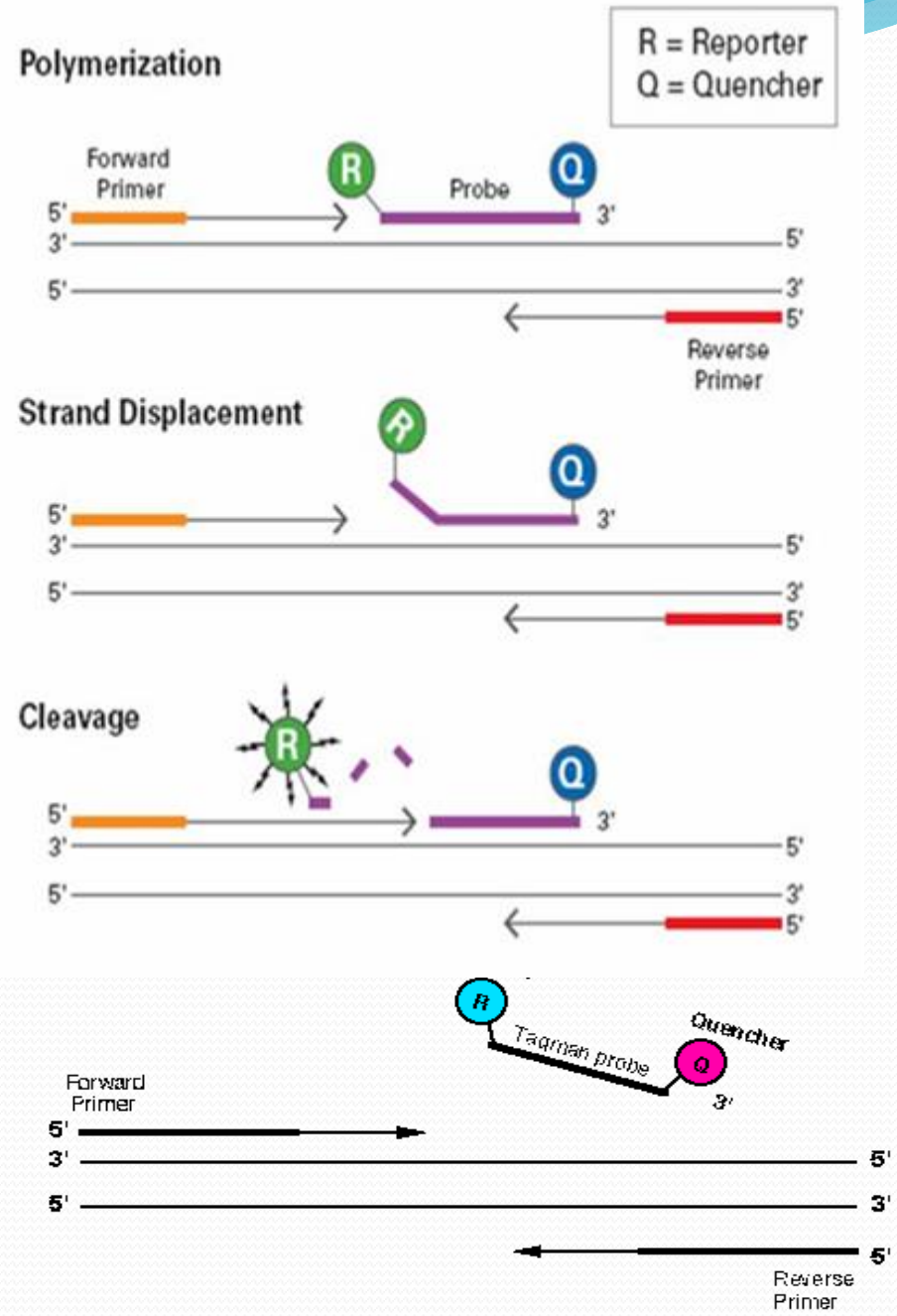
Αντίδραση αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (Real time PCR)

Η Real Time PCR αποτελεί παραλλαγή της συμβατικής PCR και χρησιμοποιείται για τον πολλαπλασιασμό, την ανίχνευση καθώς και την ποσοτικοποίηση ενός συγκεκριμένου τμήματος DNA **σε πραγματικό χρόνο**. Επιτρέπει τη λογαριθμική ενζυμική ενίσχυση αλληλουχιών DNA, χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα ένα μεγαλύτερο δίκλωνο μόριο DNA.

Το διάλυμα της αντίδρασης της Real Time PCR αποτελείται από **τα ίδια αντιδραστήρια** με αυτά της συμβατικής PCR εκτός από τους μηχανισμούς ανίχνευσης DNA που αφορούν την **προσθήκη συγκεκριμένων φθορισμοφόρων δεικτών**. Τα μόρια αυτά εκπέμπουν φθορισμό, ο οποίος μετράται σε κάθε κύκλο και βοηθάει στη ποσοτικοποίηση του προϊόντος.

Η ένταση του φθορισμού αυξάνεται σταδιακά σε συνάρτηση με την αύξηση των αντιγράφων που παράγονται σε κάθε κύκλο της αντίδρασης

- Η μέτρηση της ποσότητας των amplicons πραγματοποιείται καθ' όλη τη διάρκεια της αντίδρασης, μέσω της παρακολούθησης της αύξησης του φθορισμού κάποιας ουσίας .
- Ένας ανιχνευτής (**probe**) συμπληρωματικός ως προς τον στόχο DNA φέρει στα δυο άκρα του μια φθορίζουσα χρωστική (**reporter**) & μια 2^η (**quencher**) που απορροφά τον φθορισμό εξαιτίας της εγγύτητας των 2 μορίων.
- Μετά από την επιτυχή πρόσδεση των primers η αποδόμηση του probe από την πολυμεράση απομακρύνει τα δυο μέρη και ο φθορισμός αφού δεν μπορεί να εξουδετερωθεί πια εντοπίζεται από το μηχάνημα PCR



Καμπύλη ενίσχυσης

- Διακρίνεται σε τρεις φάσεις: εκθετική, γραμμική και φάση κορεσμού.
- **Εκθετική φάση:** σε κάθε κύκλο της αντίδρασης πραγματοποιείται ακριβής διπλασιασμός του προϊόντος.
- **Γραμμική φάση:** η αποδοτικότητα της PCR αρχίζει να μειώνεται σταδιακά καθώς τα αντιδραστήρια εξαντλούνται.
- **Φάση κορεσμού:** πλήρης εξάντληση των αντιδραστηρίων, η καμπύλη φθορισμού φτάνει σε plateau.
- Η σημαντικότερη παράμετρος ποσοτικοποίησης είναι η C_t (threshold cycle). Πρόκειται για τον αριθμό των κύκλων της PCR που απαιτούνται ώστε η τιμή του παρατηρούμενου φθορισμού να προσεγγίζει ένα συγκεκριμένο όριο .

