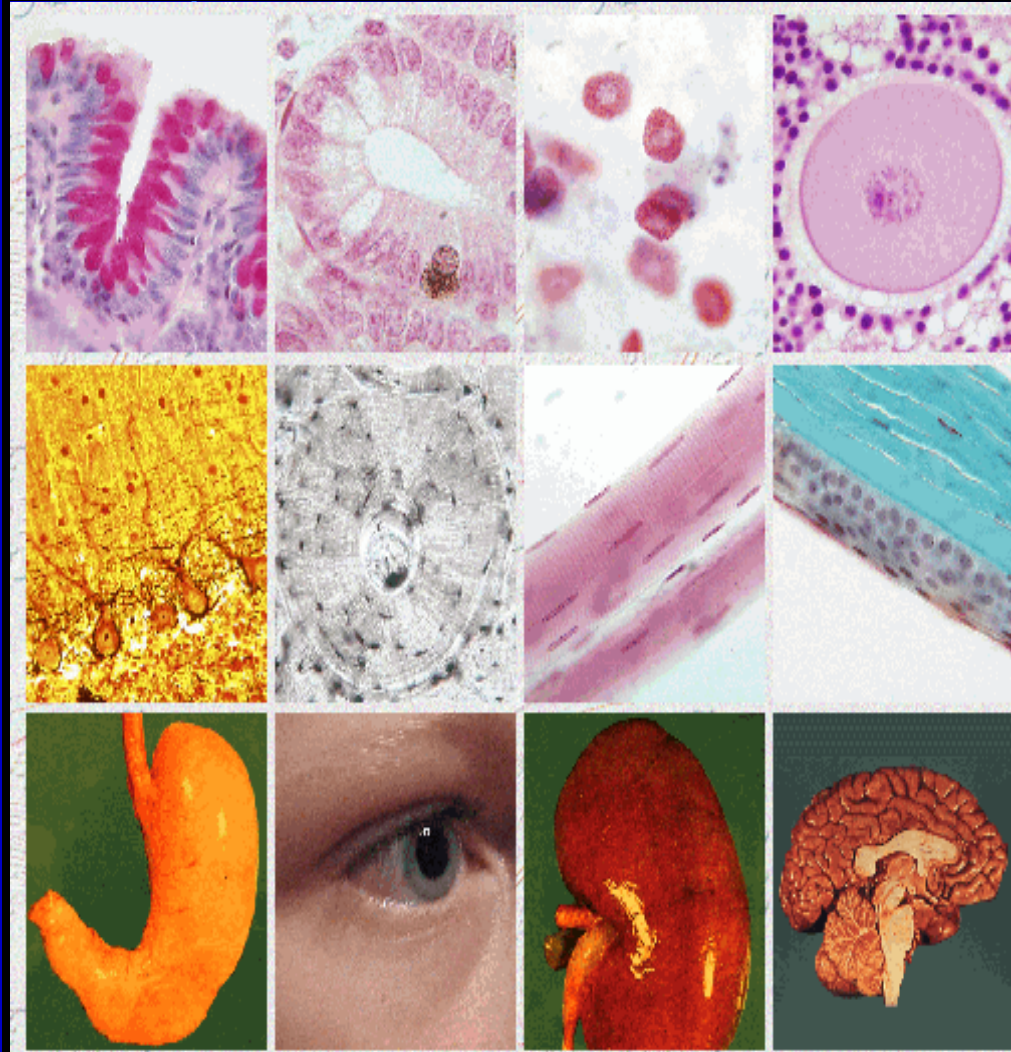
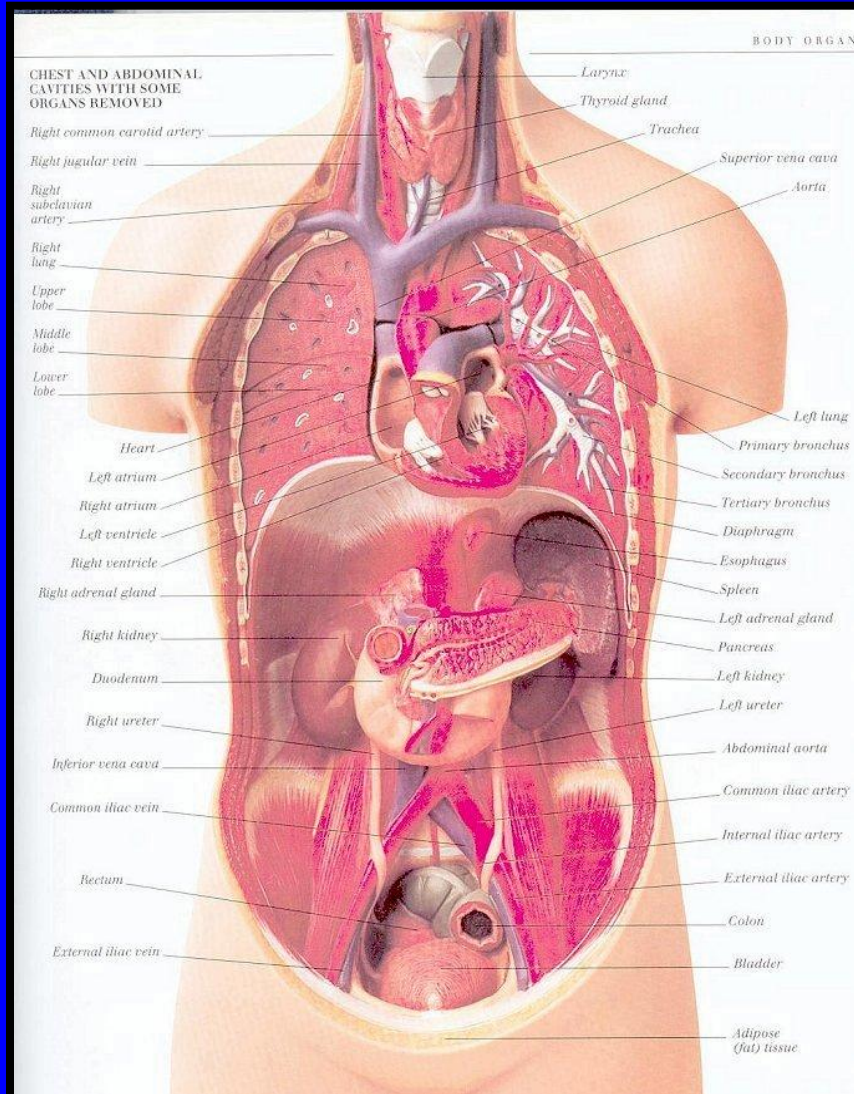


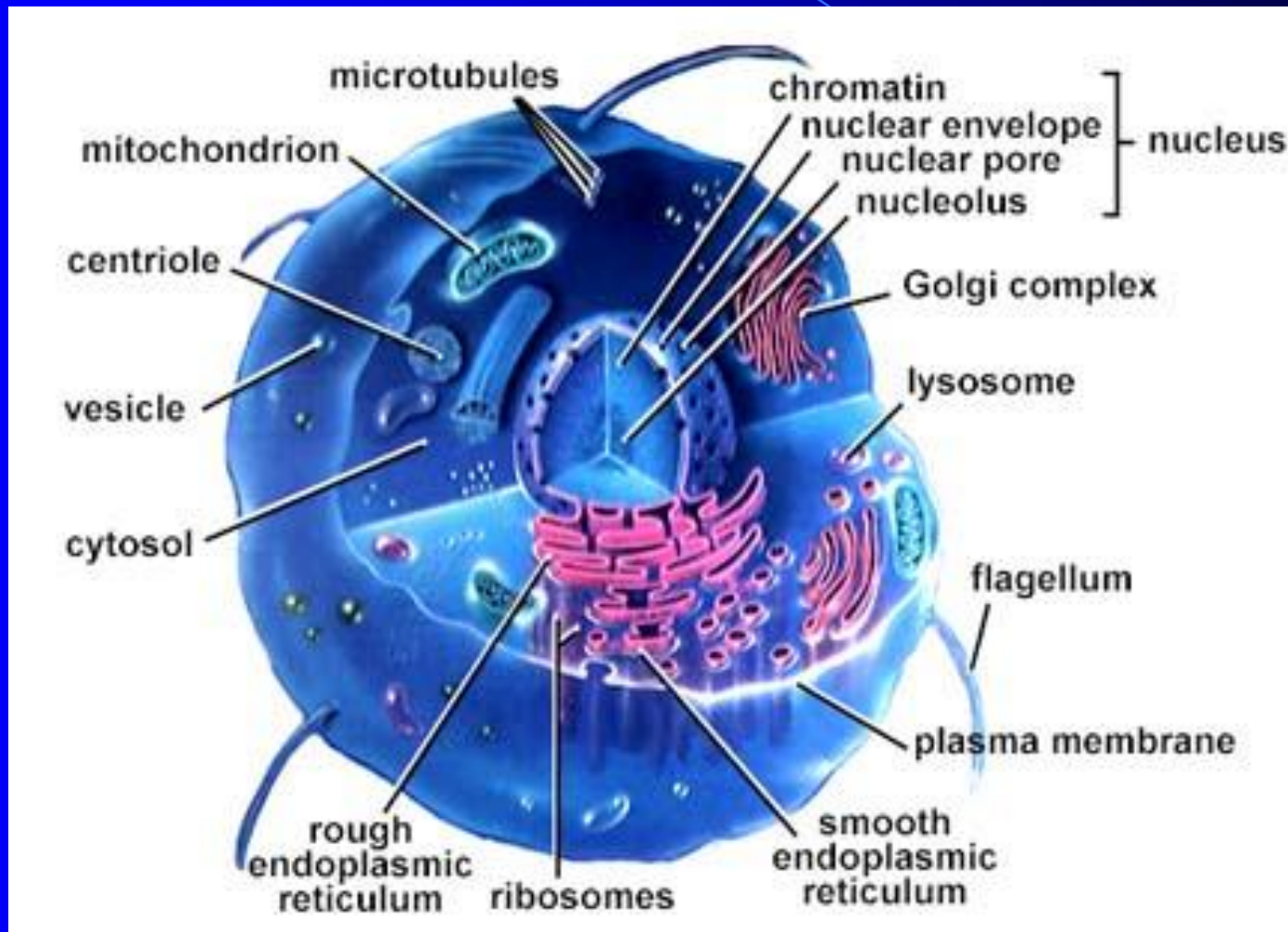
Πρακτικές εφαρμογές των μεθόδων μελέτης των ιστών

Παλιές και
Νέες τεχνολογίες

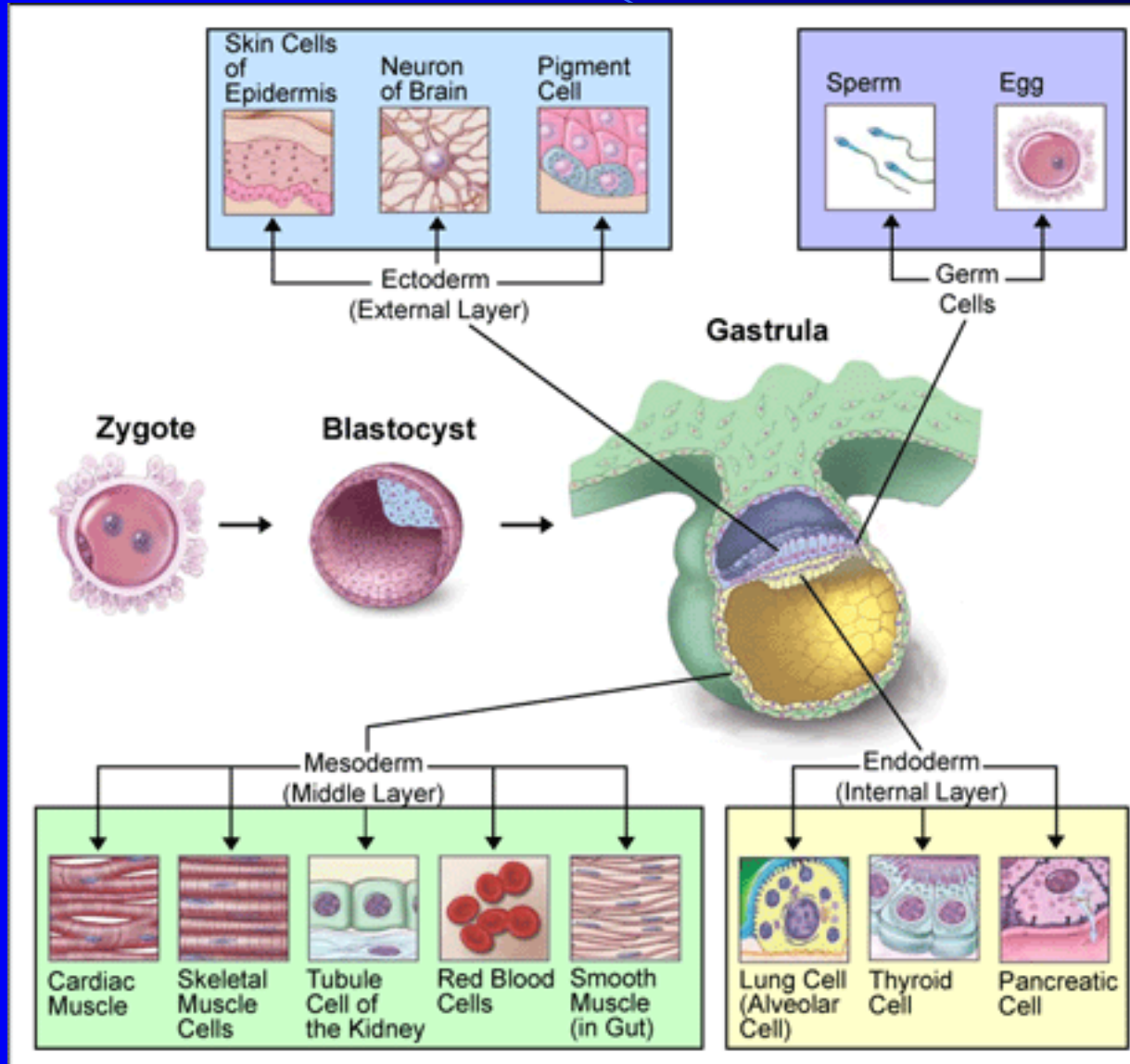
Η Ιστολογία συνδέει τον μακρόκοσμο με τον μικρόκοσμο



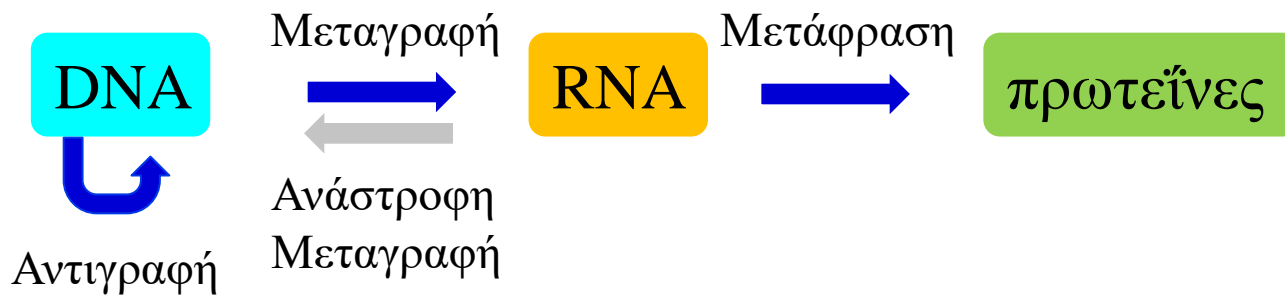
Η κλασική εικόνα του κυττάρου



Διάφοροι εξειδικευμένοι τύποι κυττάρων απαρτίζουν έναν οργανισμό

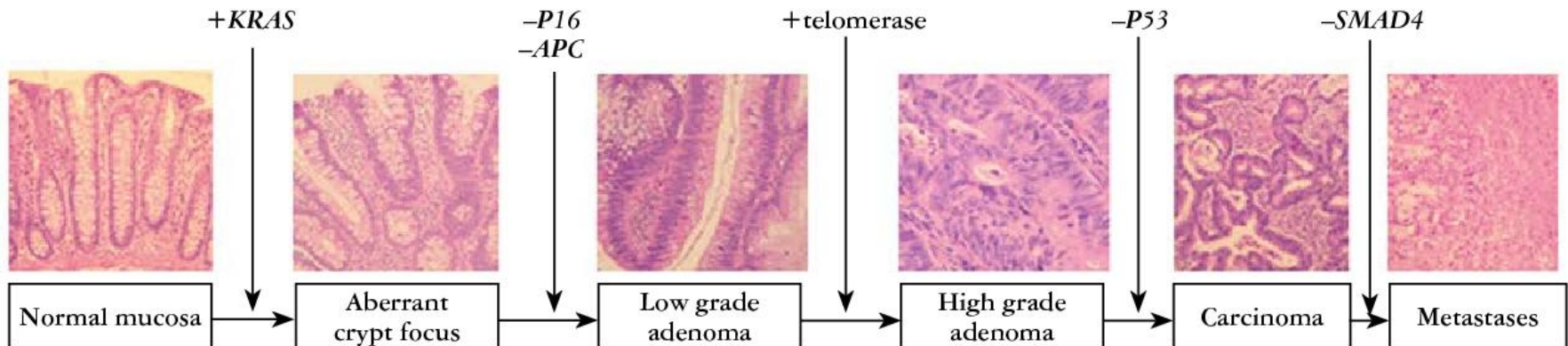


Κεντρικό δόγμα της μοριακής βιολογίας (ροή της γενετικής πληροφορίας)



Γενετική πληροφορία - φαινότυπος

The adenoma-carcinoma sequence in the CIN pathway (after Vogelstein)

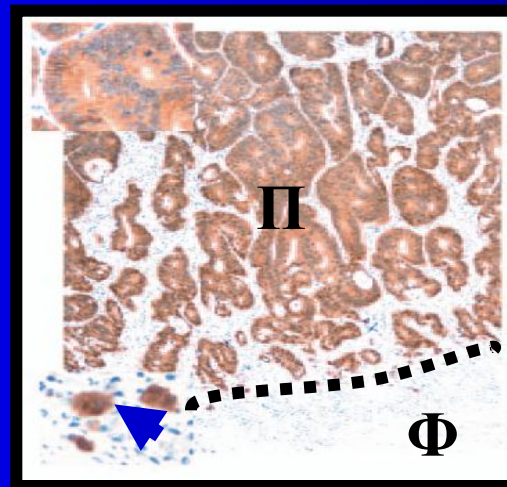


Βασικό εργαλείο της Ιστολογίας: Το μικροσκόπιο



Τι μας προσφέρει η μικροσκοπική (μορφολογική) παρατήρηση;

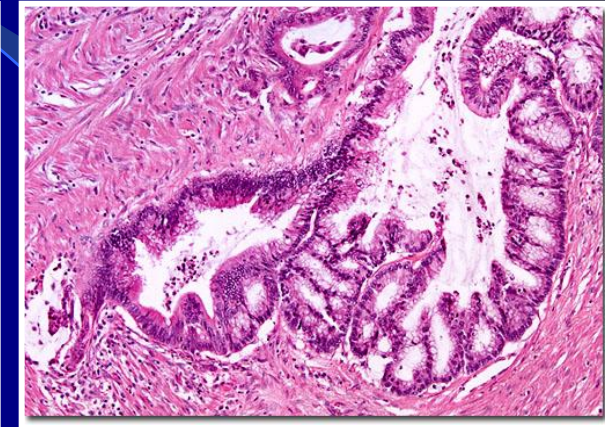
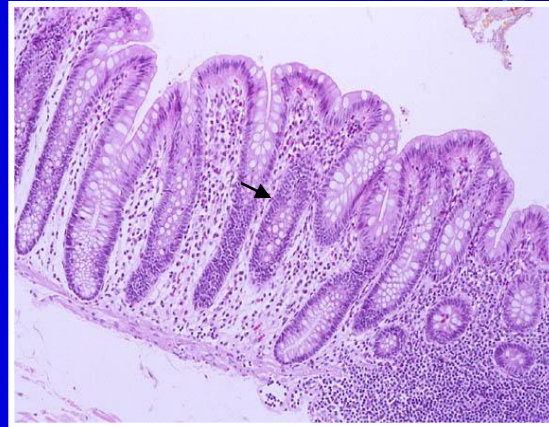
- Αναγνώριση φυσιολογικών ιστών
- Διάκριση παθολογικού ιστού από φυσιολογικό
- Προσδιορισμός των **ορίων** μεταξύ παθολογικών και φυσιολογικών ιστών και της **έκτασης** της νόσου



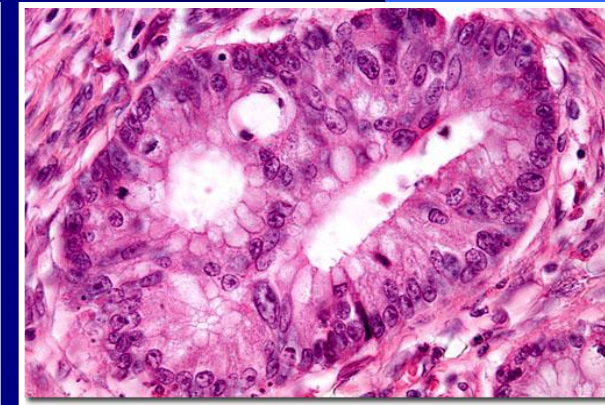
Είδος μικροσκοπίου: Φωτονικό μικροσκόπιο

Πληροφορία ➔

Ιστοί



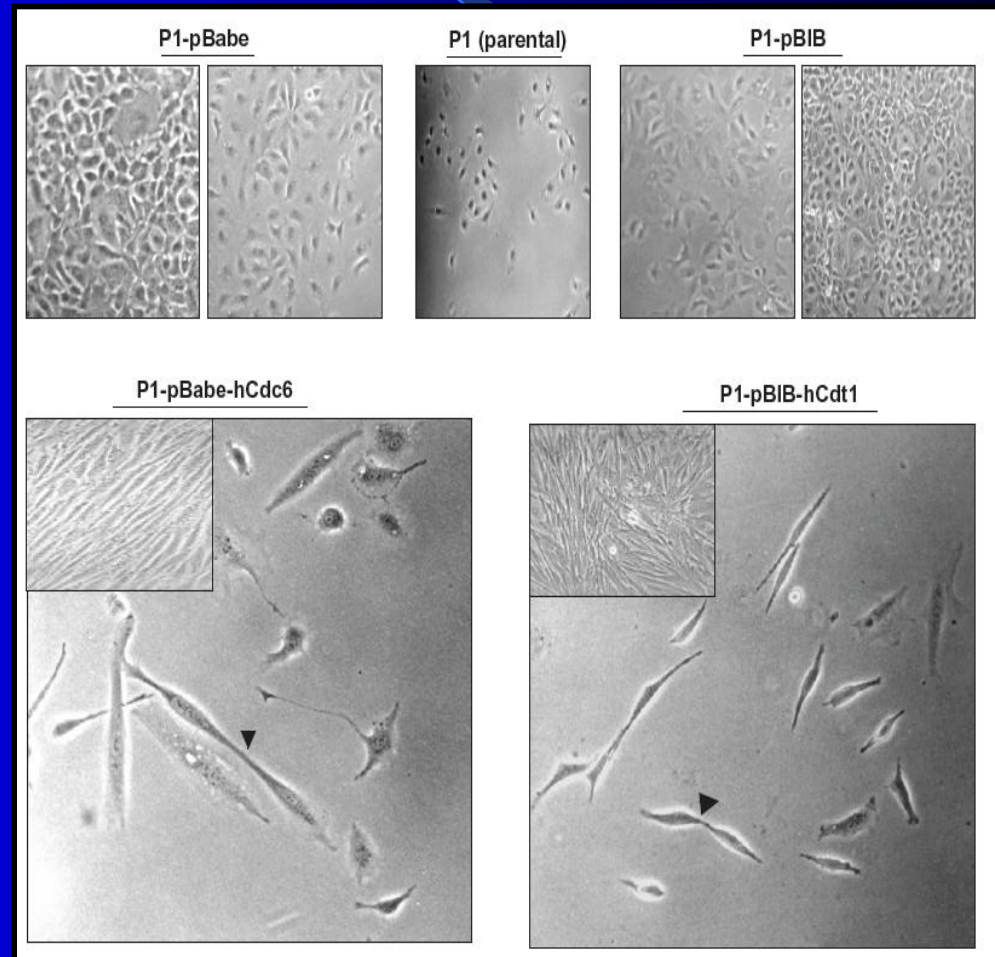
Κύτταρα



Είδος μικροσκοπίου: Ανάστροφο μικροσκόπιο

Πληροφορία ➔

Μορφολογία σε
συνδυασμό με συμπεριφορά



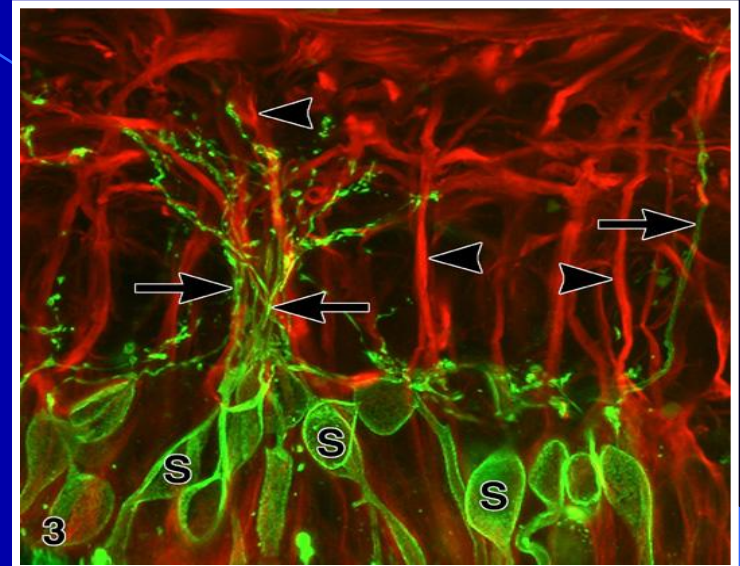
Είδος μικροσκοπίου: Συνεστιακό μικροσκόπιο

Πληροφορία ➔

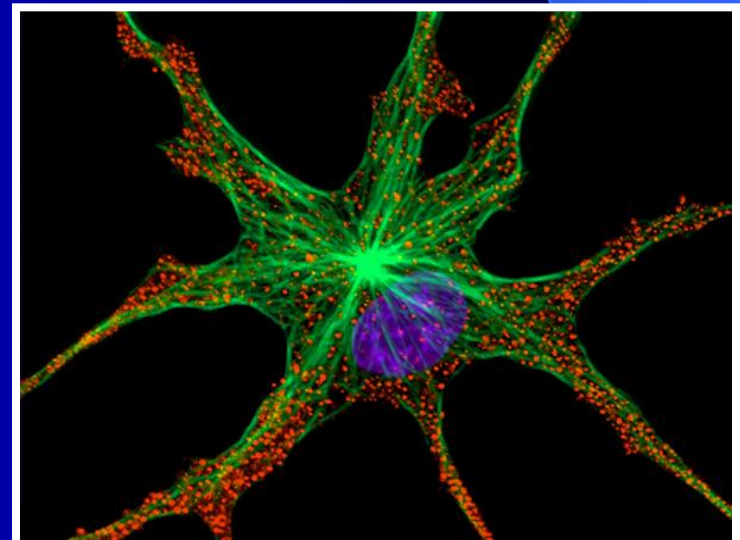
Ιστοί (3D) (1)
Κύτταρα (2)
Κυτταρικά οργανίδια (2)



1



2

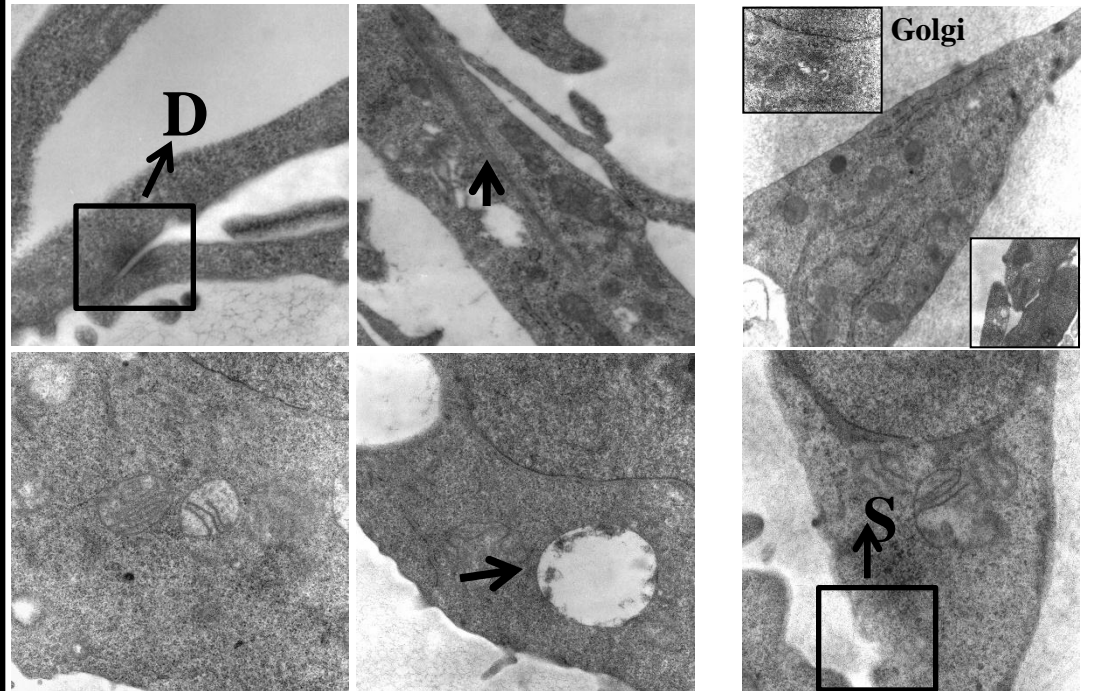


Είδος μικροσκοπίου: Ηλεκτρονικό μικροσκόπιο

Πληροφορία ➔

Κύτταρα
Κυτταρικά οργανίδια
Μακρομόρια - δομές

Epithelial phenotype → Transformed cells



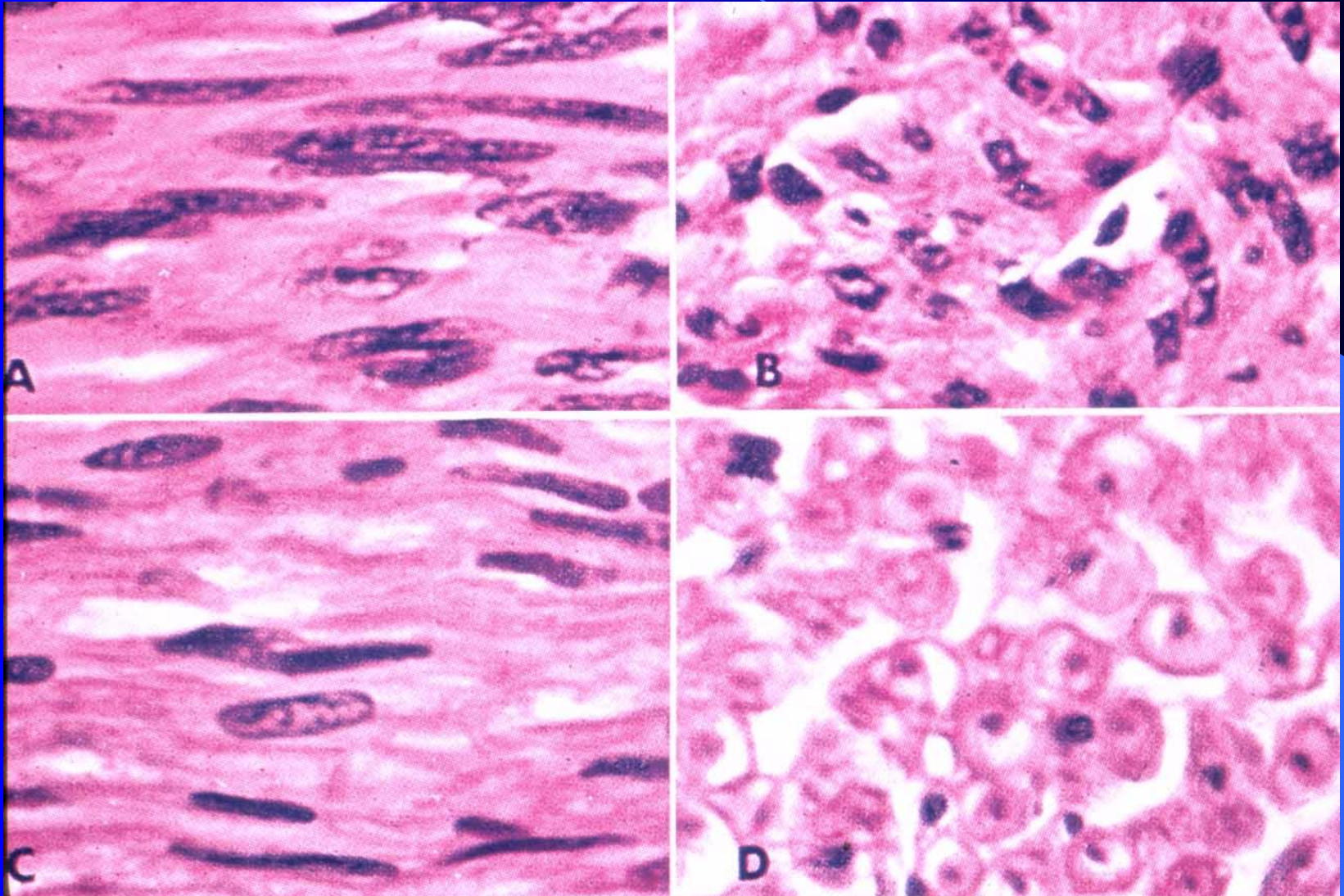
Χρώσεις – Σήμανση

(για μορφολογική παρατήρηση)

- Ιστοχημικές
 - Χρήση χημικών ουσιών
 - Βασεόφιλων (πχ αιματοξυλίνη, κυανό τολουϊδίνης)
 - Οξεόφιλων (πχ ηωσίνη, φουξίνη, orange G)
- Ισοτοπικές
 - Χρήση ραδιενεργών ισοτόπων (αυτοραδιογραφία)
- Μη ισοτοπικές
 - Άμεση σήμανση (φθορίζουσες ουσίες)
 - Έμμεση σήμανση (πρόσδεση ενζύμου που καταλύει αντίδραση η οποία παράγει αδιάλυτο χρωμογόνο)

Χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης

1. Πυρήνες: Κυανό (μπλέ),
2. Κυτταρόπλασμα: Ηωσινόφιλο (ροζέ)

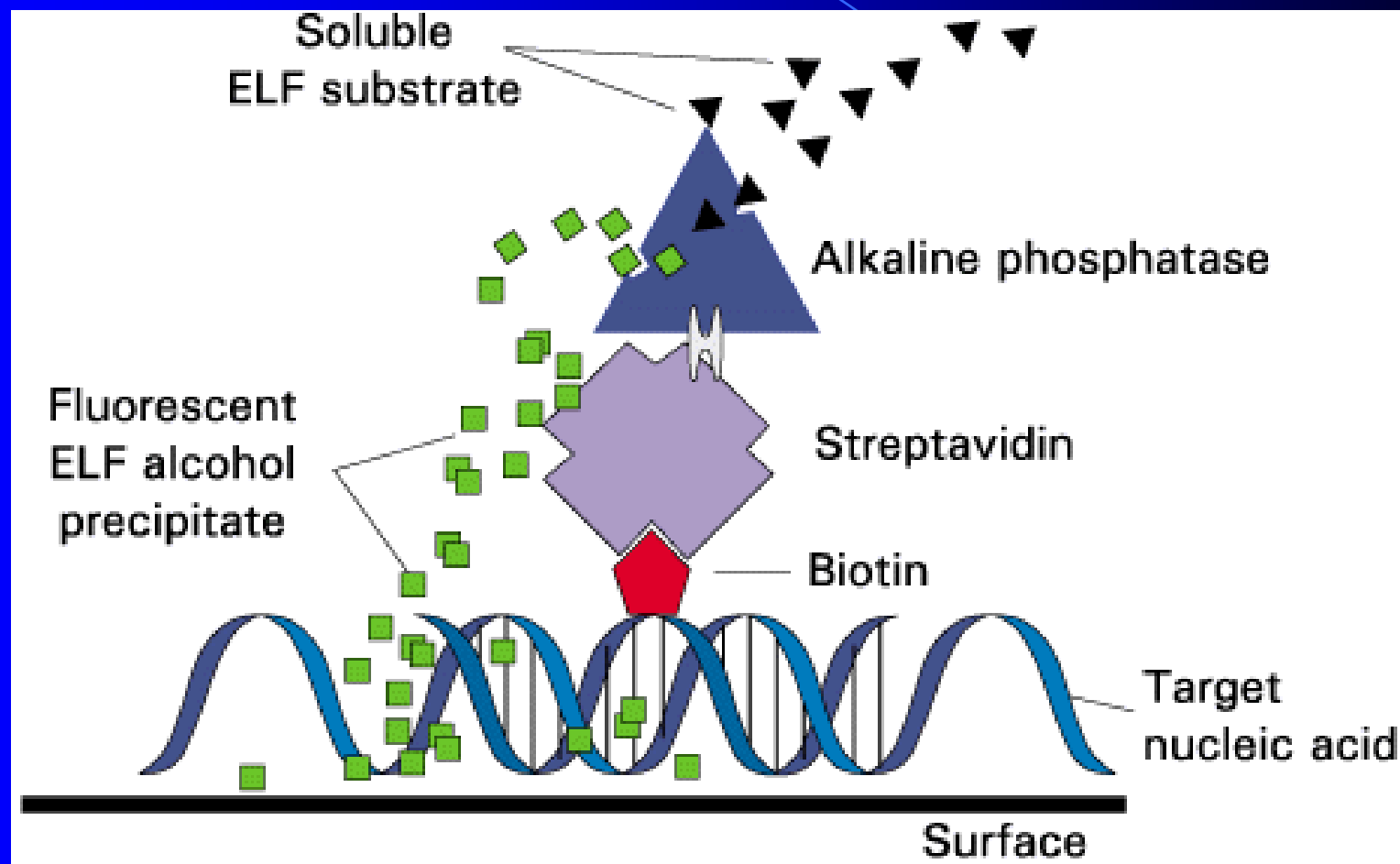


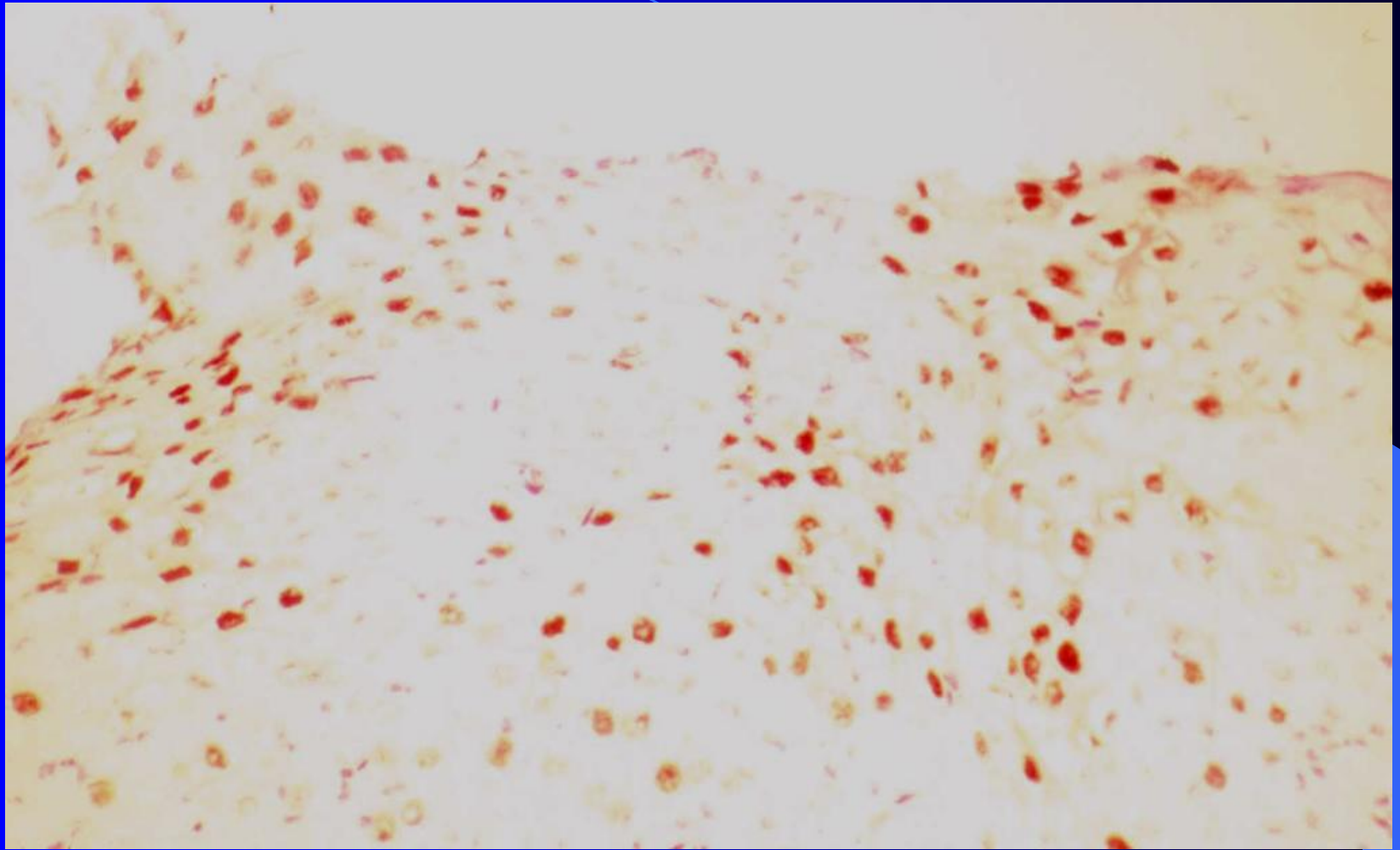
Ανάλυση μορίων

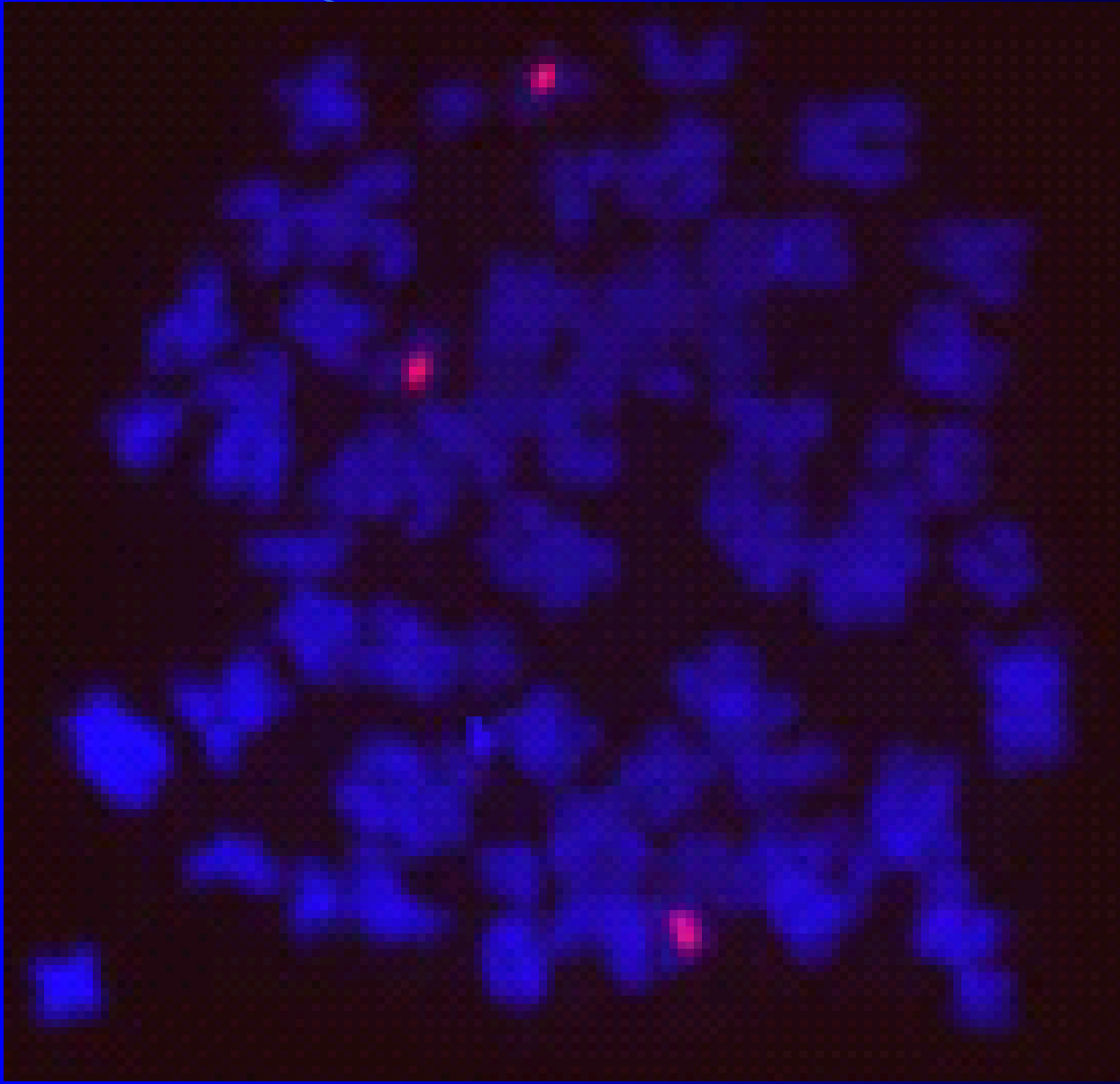
Κατηγορίες Τεχνικών

- *In situ* τεχνικές
 - διατηρείται η μορφολογία (ιστοί, κύτταρα, υποκυτταρικά οργανίδια)
- Τεχνικές ανάλυσης μορίων σε διαλύματα
 - καταστροφή της δομής και απομόνωση των μορίων
- Λειτουργικές δοκιμασίες

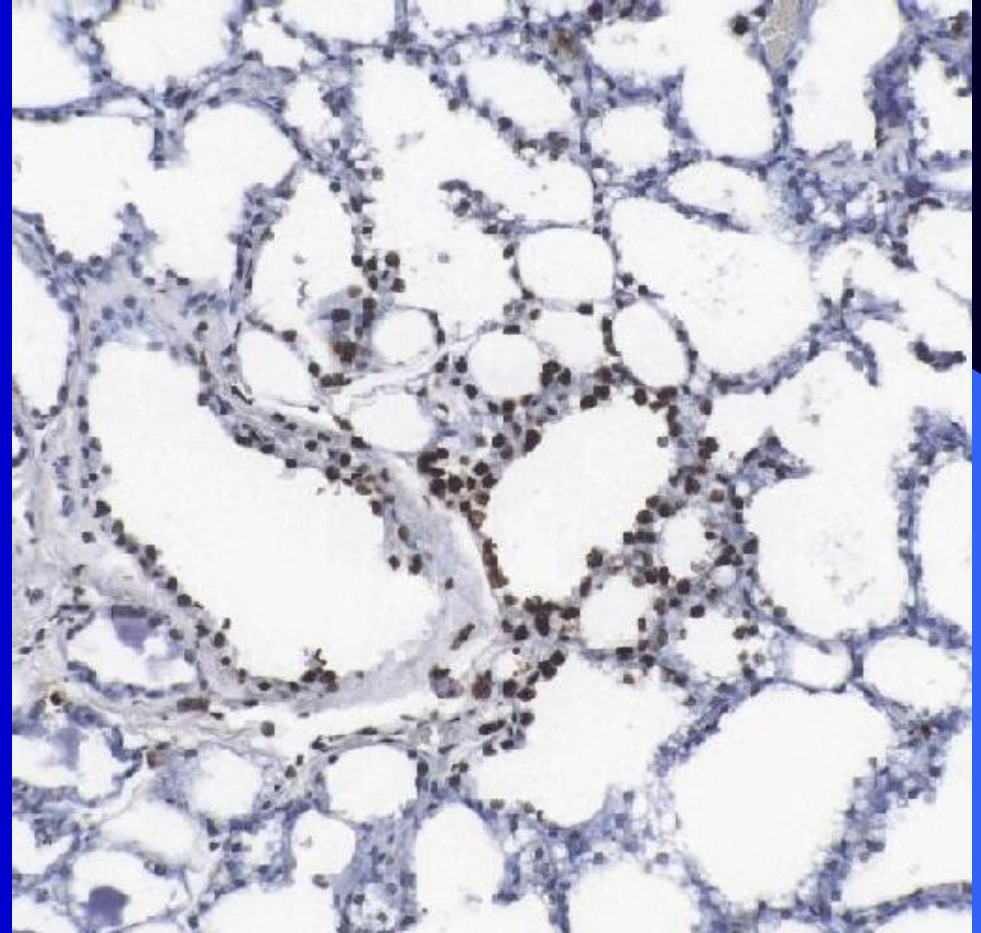
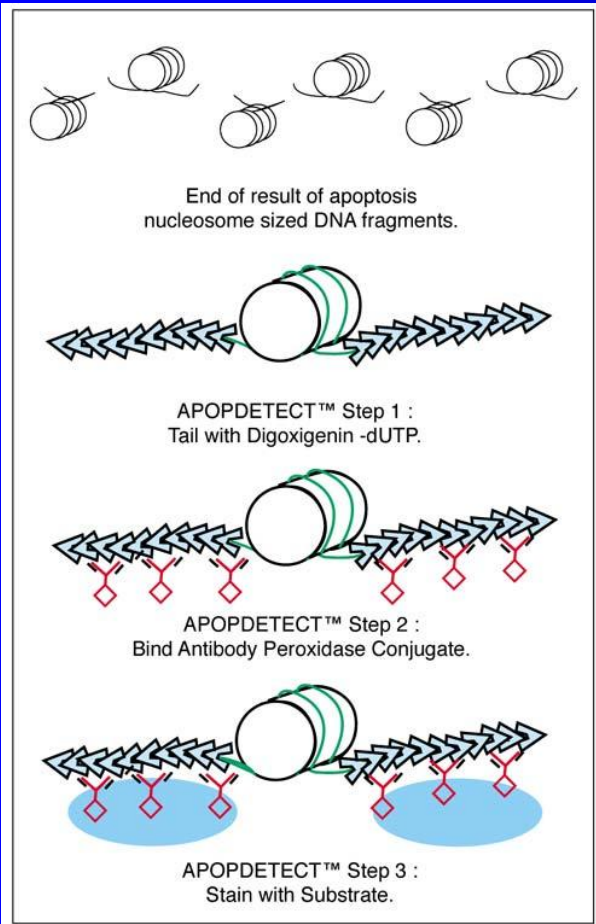
In situ υβριδισμός – ανίχνευση νουκλεϊκών οξέων



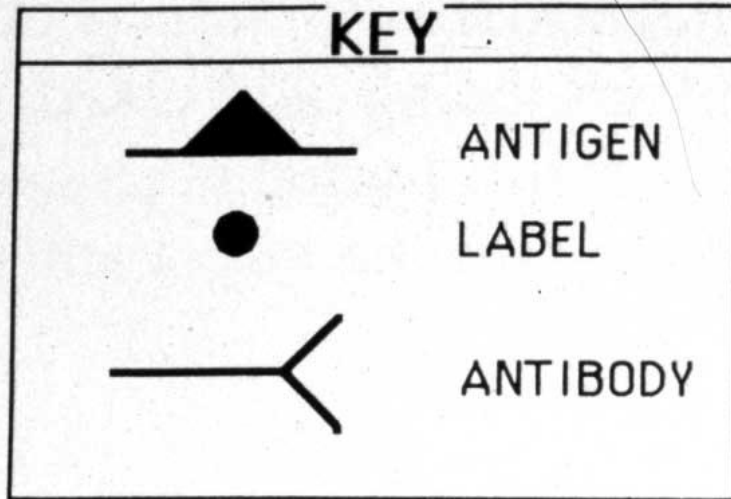




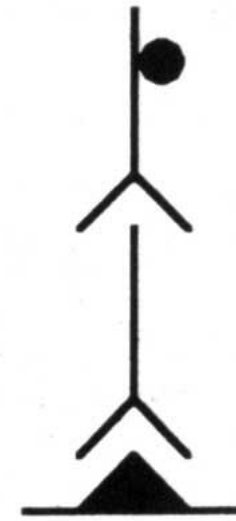
In situ απόπτωση – ανίχνευση κυττάρων σε απόπτωση



In situ ανίχνευση πρωτεϊνών – ανοσοϊστοχημεία



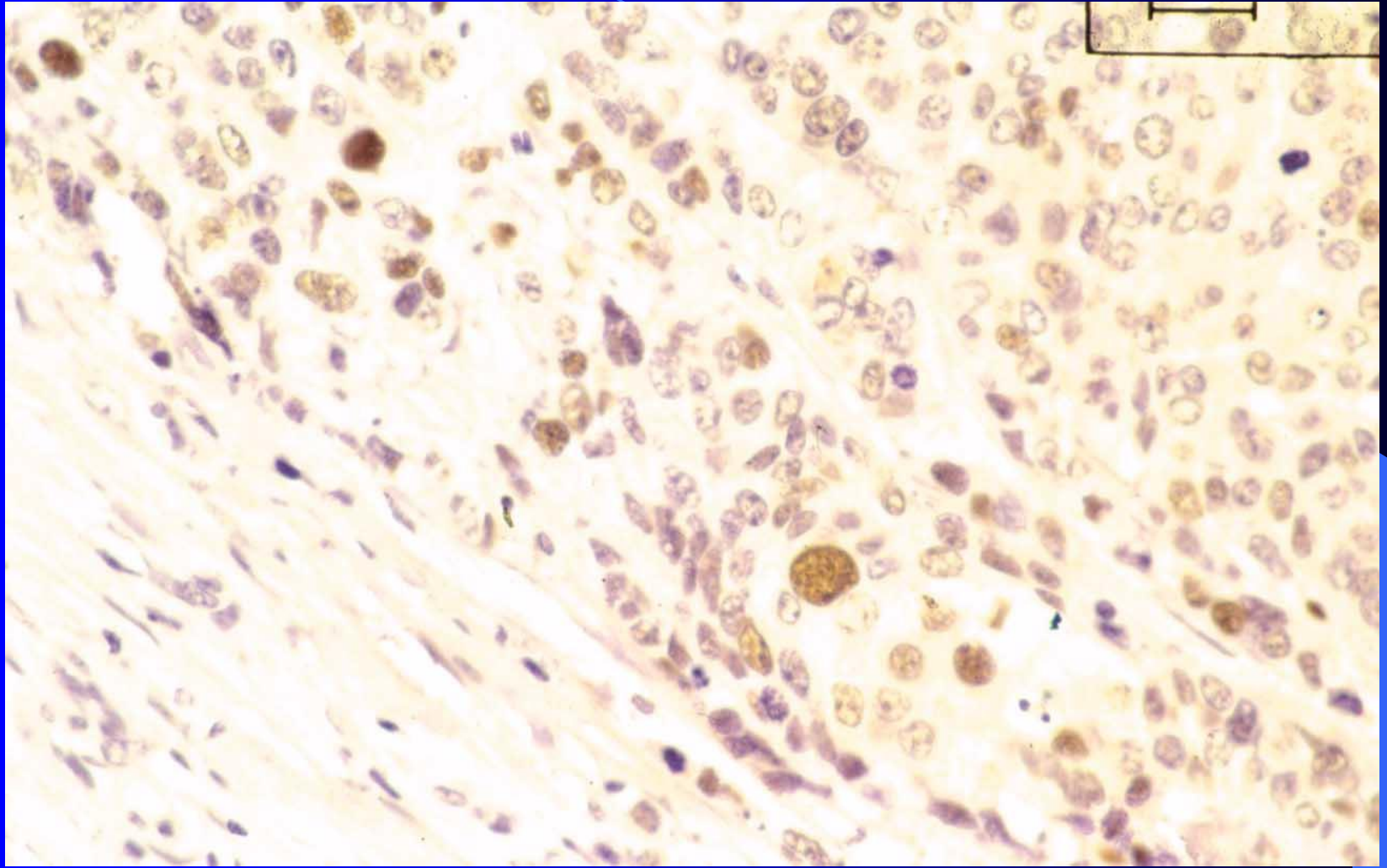
Direct

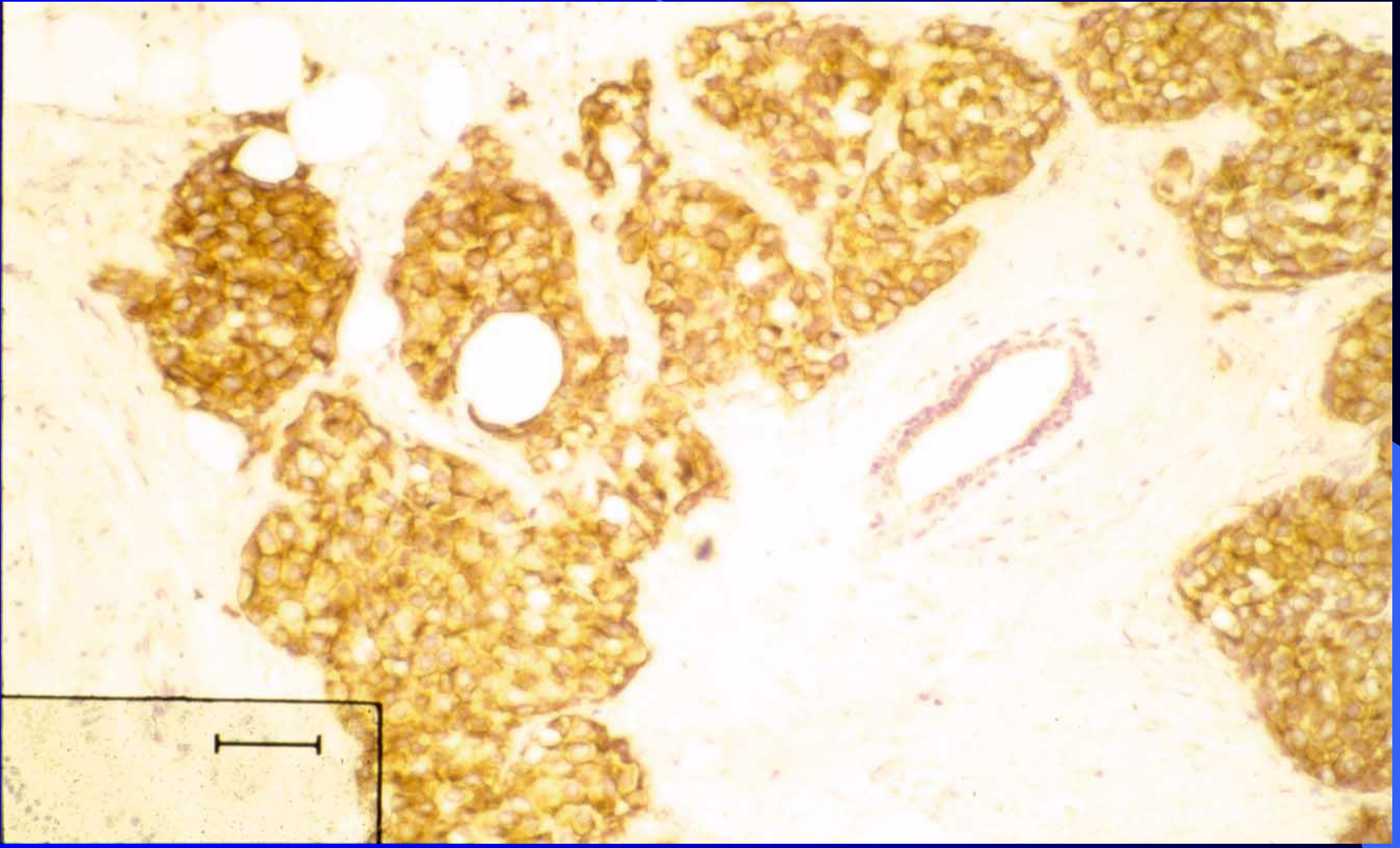


Indirect

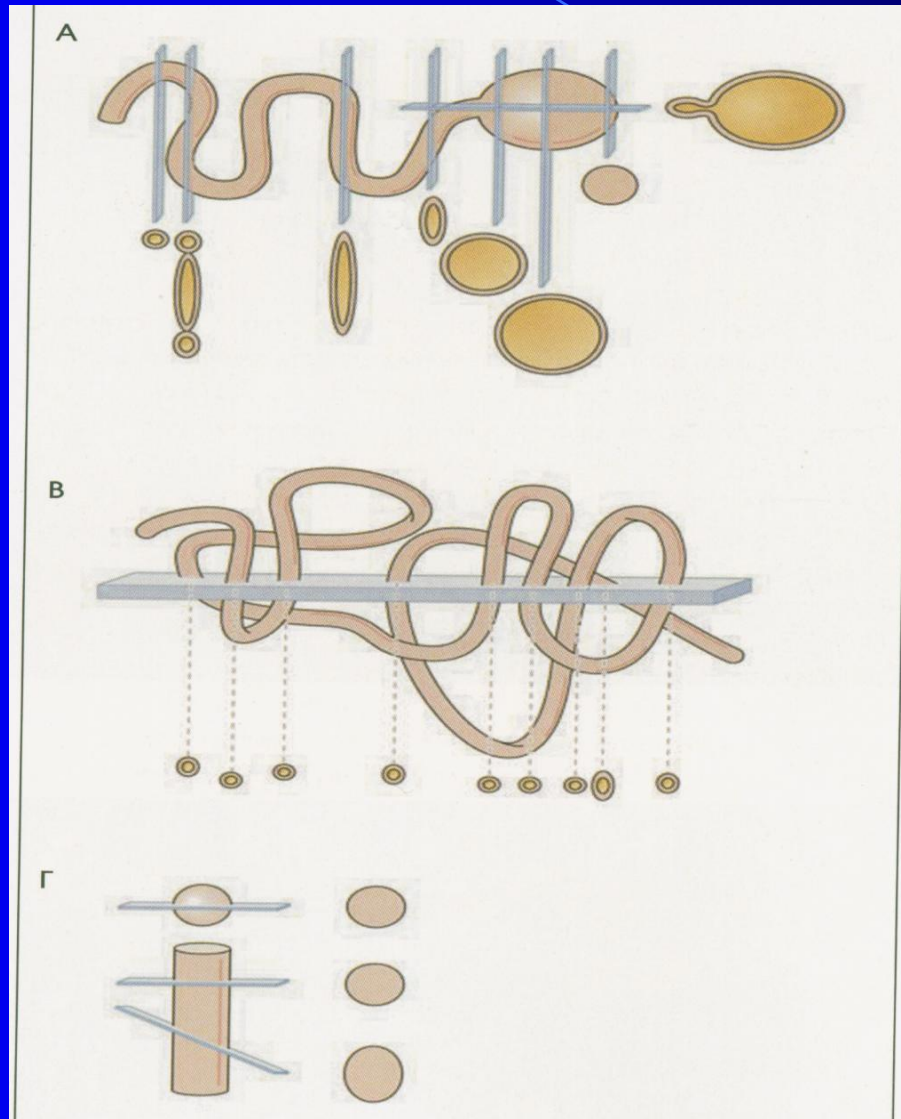


3-Stage
Indirect





Ιδιαιτερότητες των *in situ* τεχνικών: Η ολότητα του ιστού



Ερωτήματα που απαντώνται με τις *in situ* τεχνικές

Σε επίπεδο:

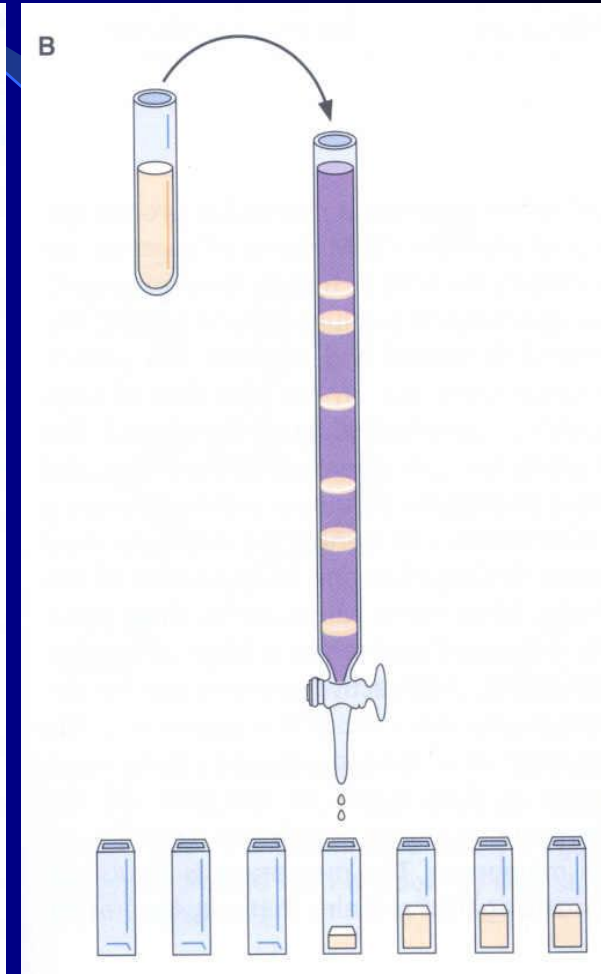
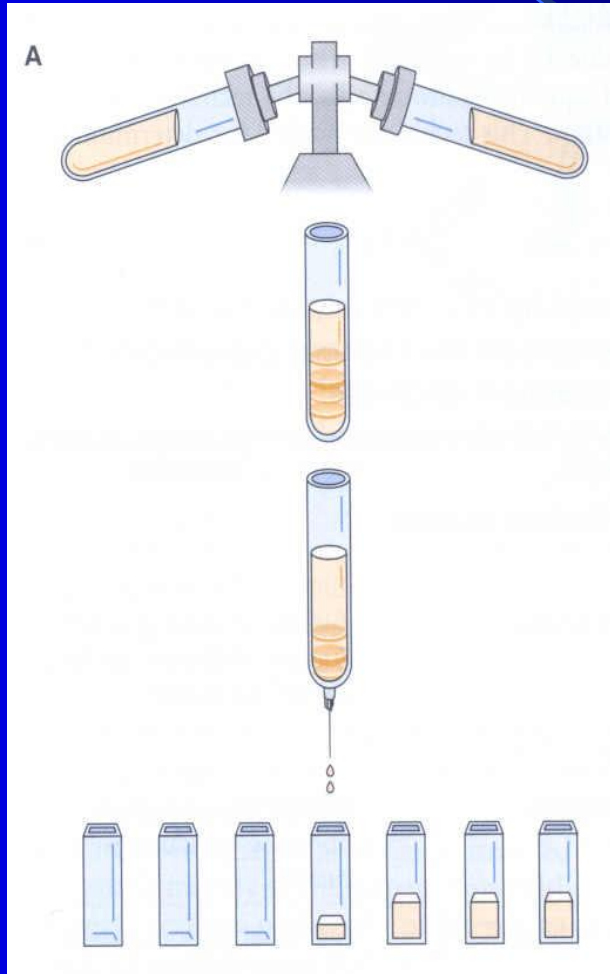
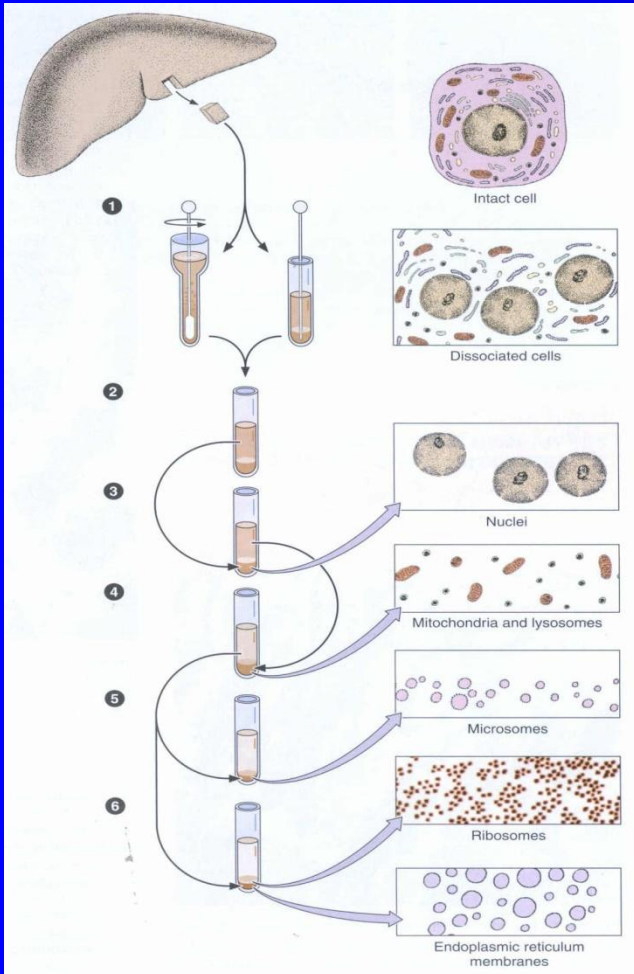
- DNA:
 - α. ακεραιότητα γονιδίου
 - β. χρωμοσωμική θέση
 - γ. αριθμός αντιγράφων
- RNA ή πρωτεΐνης: έκφραση
- Ιστικό ή κυτταρικό: «Τόπος» έκφρασης

Ερωτήματα που δεν απαντώνται με τις *in situ* τεχνικές

Εάν υπάρχει:

- «ποιοτική» διαταραχή
- «ποσοτική» διαταραχή

Απομόνωση: κυττάρων, οργανιδίων και μορίων



Μέθοδοι μελέτης της αλληλουχίας DNA-mRNA-Πρωτεΐνης σε διάλυμα εκχύλισης ιστών

Μέθοδοι:

1. Αποτυπώματος (Blotting)

- α. Southern
- β. Northern και παραλλαγές
- γ. Western

2. PCR και παραλλαγές

- α. PCR
- β. Ανάστροφη Μεταγραφή
(Reverse Transcription) RT-PCR
- γ. Διαφορική (Differential) D-PCR
- δ. Ανταγωνιστική (Competitive) PCR
- ε. Πολλαπλή (Multiplex) PCR

3. Αποκρυπτογράφηση νουκλεοτιδικής αλληλουχίας

4. Συγκριτικός γενωμικός υβριδισμός (Comparative Genomic Hybridization)

5. Ανάλυση διαφορικής έκφρασης πολλών γονιδίων

6. Next generation sequencing

Ερωτήματα που απαντώνται:

Ποιοτική και ποσοτική εκτίμηση DNA
Ποιοτική και ποσοτική εκτίμηση RNA
Ποιοτική και ποσοτική εκτίμηση πρωτεϊνών

Ανίχνευση και ποιοτική εκτίμηση DNA
Ανίχνευση και ποιοτική εκτίμηση RNA

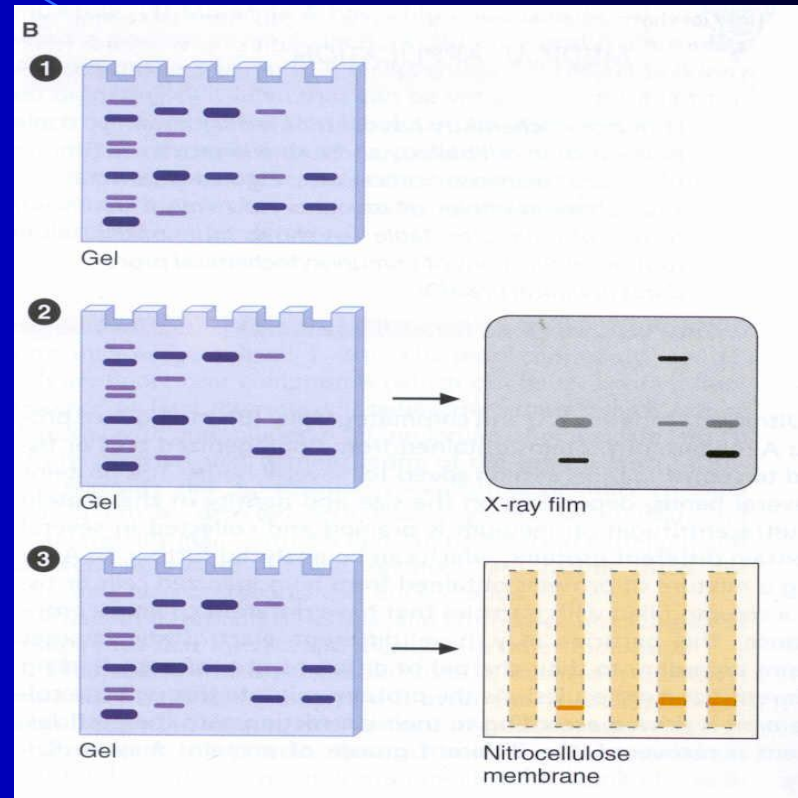
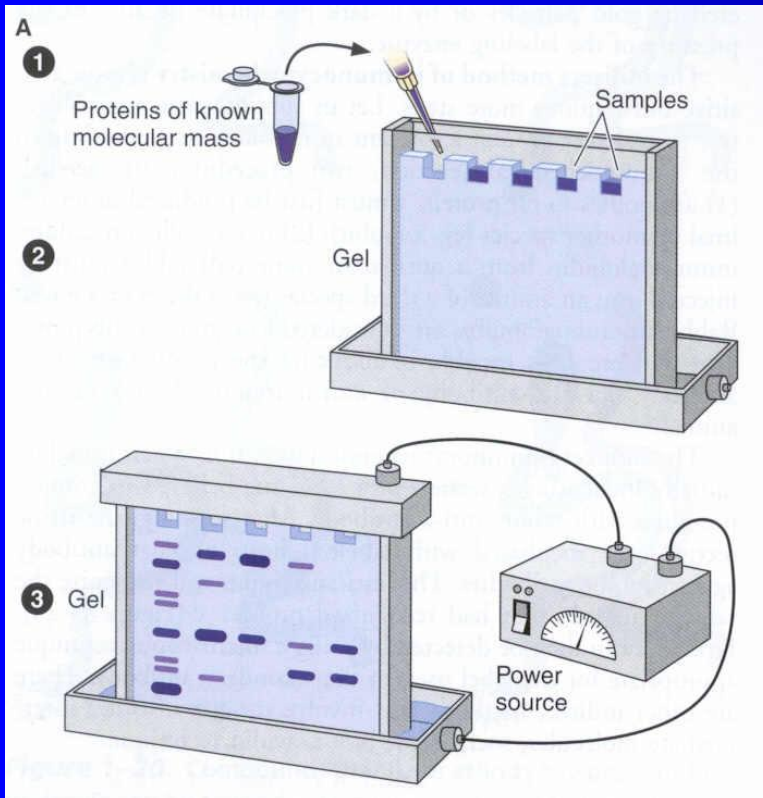
Ποσοτική εκτίμηση DNA
Ποσοτική εκτίμηση cDNA
Ποσοτική εκτίμηση πολλαπλών DNA

Προσδιορισμός νουκλεοτιδικών αλληλουχιών

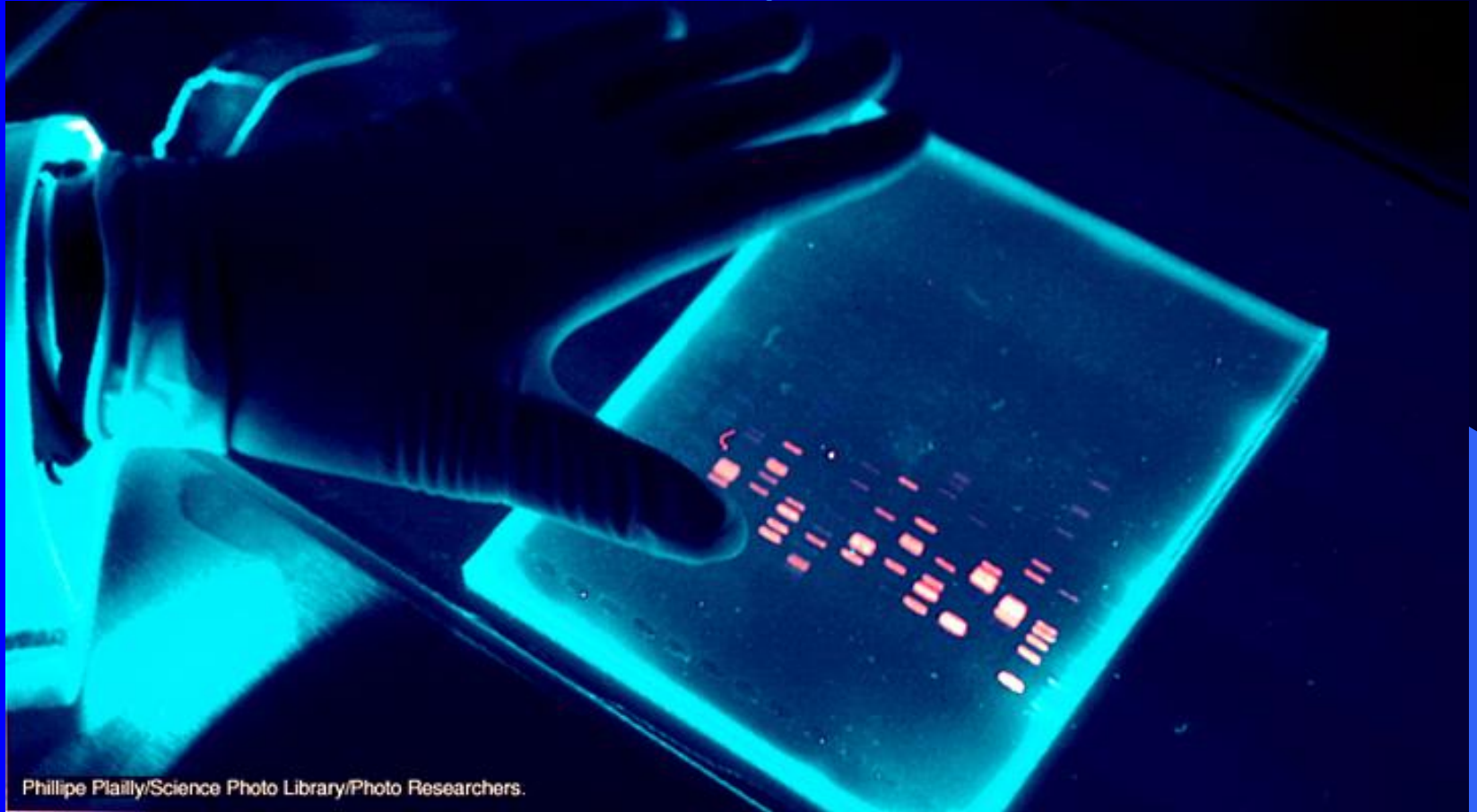
Ποιοτική και ποσοτική εκτίμηση DNA σε
χρωμοσωμικό επίπεδο

Ποιοτική και ποσοτική εκτίμηση έκφρασης
πολλαπλών mRNA

Μέθοδοι αποτυπώματος (Blotting)

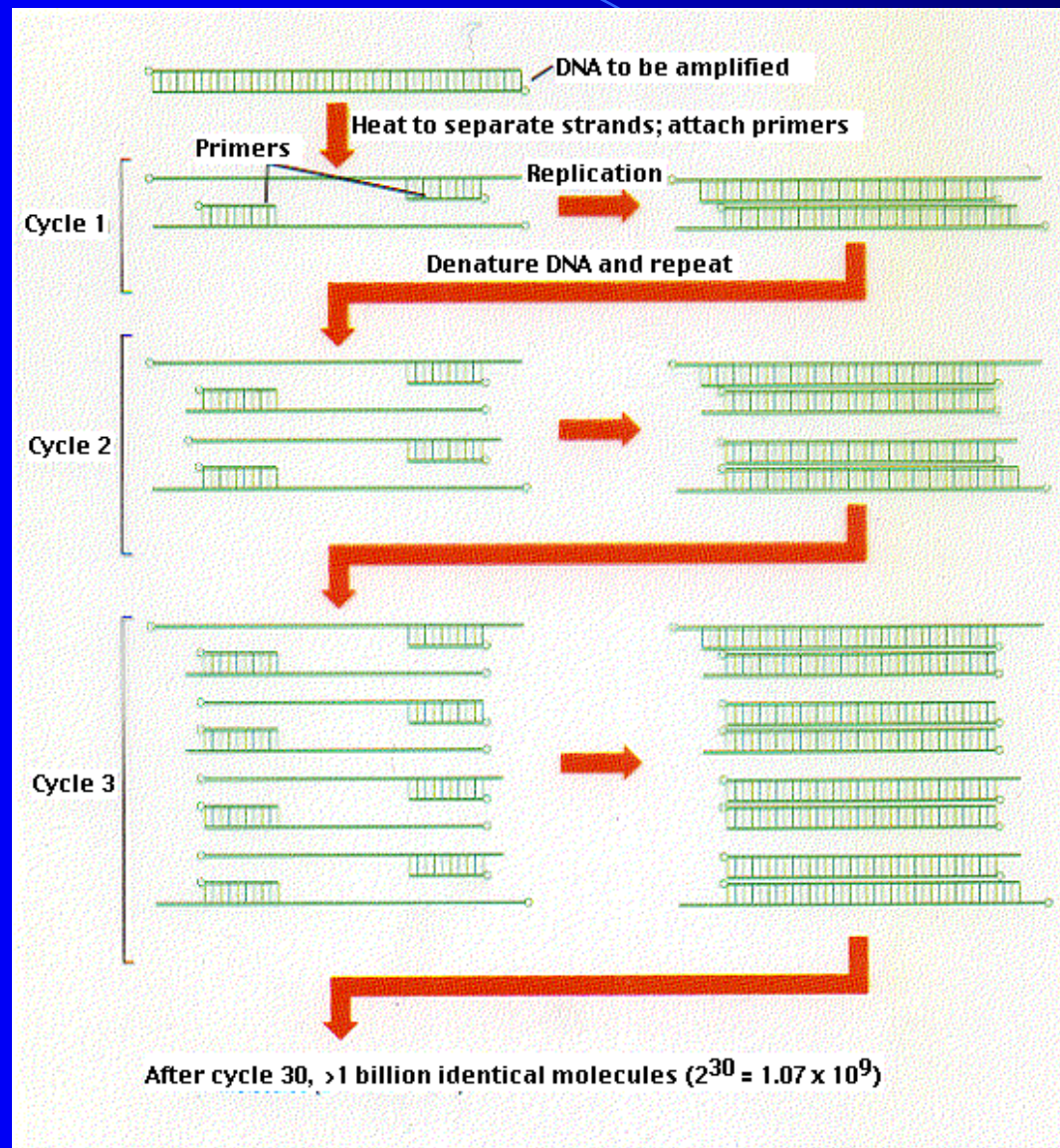


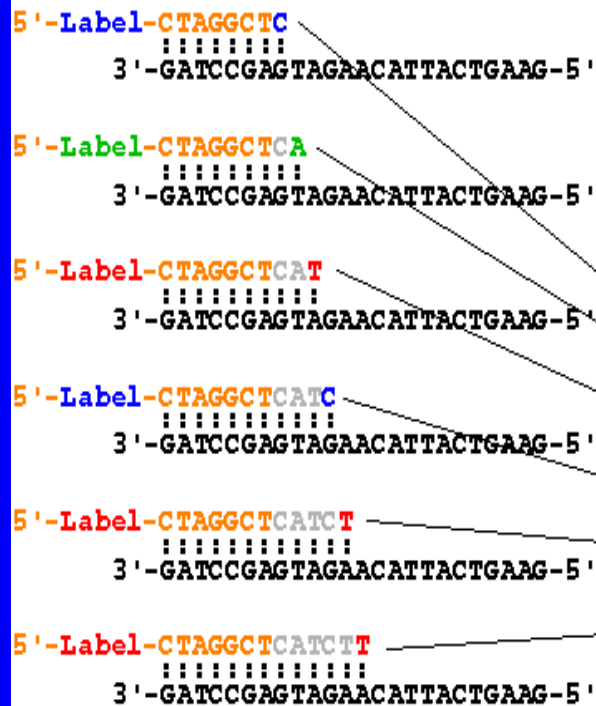
- Southern - DNA
- Northern - RNA
- Western – Πρωτεΐνες



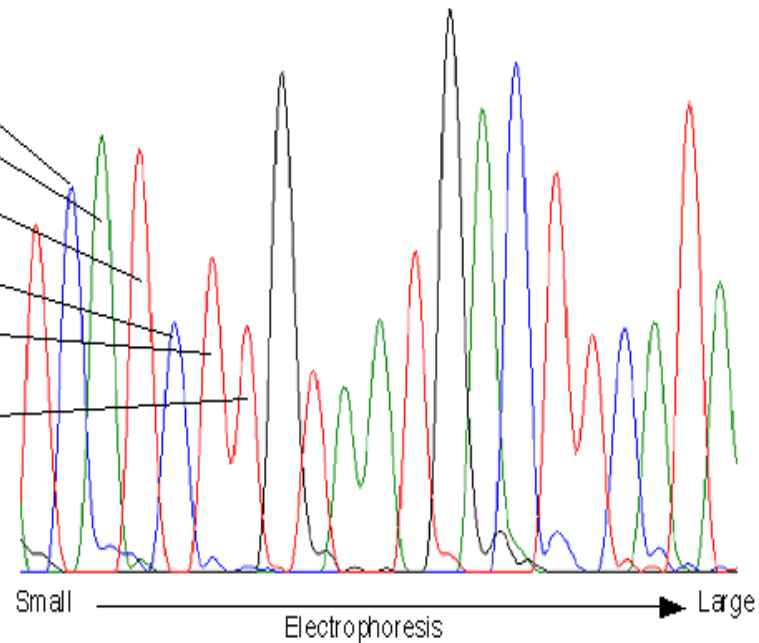
Phillipe Plailly/Science Photo Library/Photo Researchers.

Αλυσιδωτή Αντίδραση με Πολυμεράση - PCR





More typically now, sequencing reactions are denatured and the products are separated in a single gel lane or a single capillary tube. The products of the four reactions are labeled with a different fluorescent dye, and a single detector at the bottom of the apparatus detects the fluors as they emerge. The sequence can be read (automatically) from left to right.



Μέθοδοι ανάλυσης όλου του γονιδιώματος

Σε επίπεδο DNA:

Ο συγκριτικός γενωμικός υβριδισμός
(Comparative Genomic Hybridization – CGH)

Αλληλούχηση υψηλής διεκπεραίωσης
(Next Generation Sequencing)

Σε επίπεδο έκφρασης:

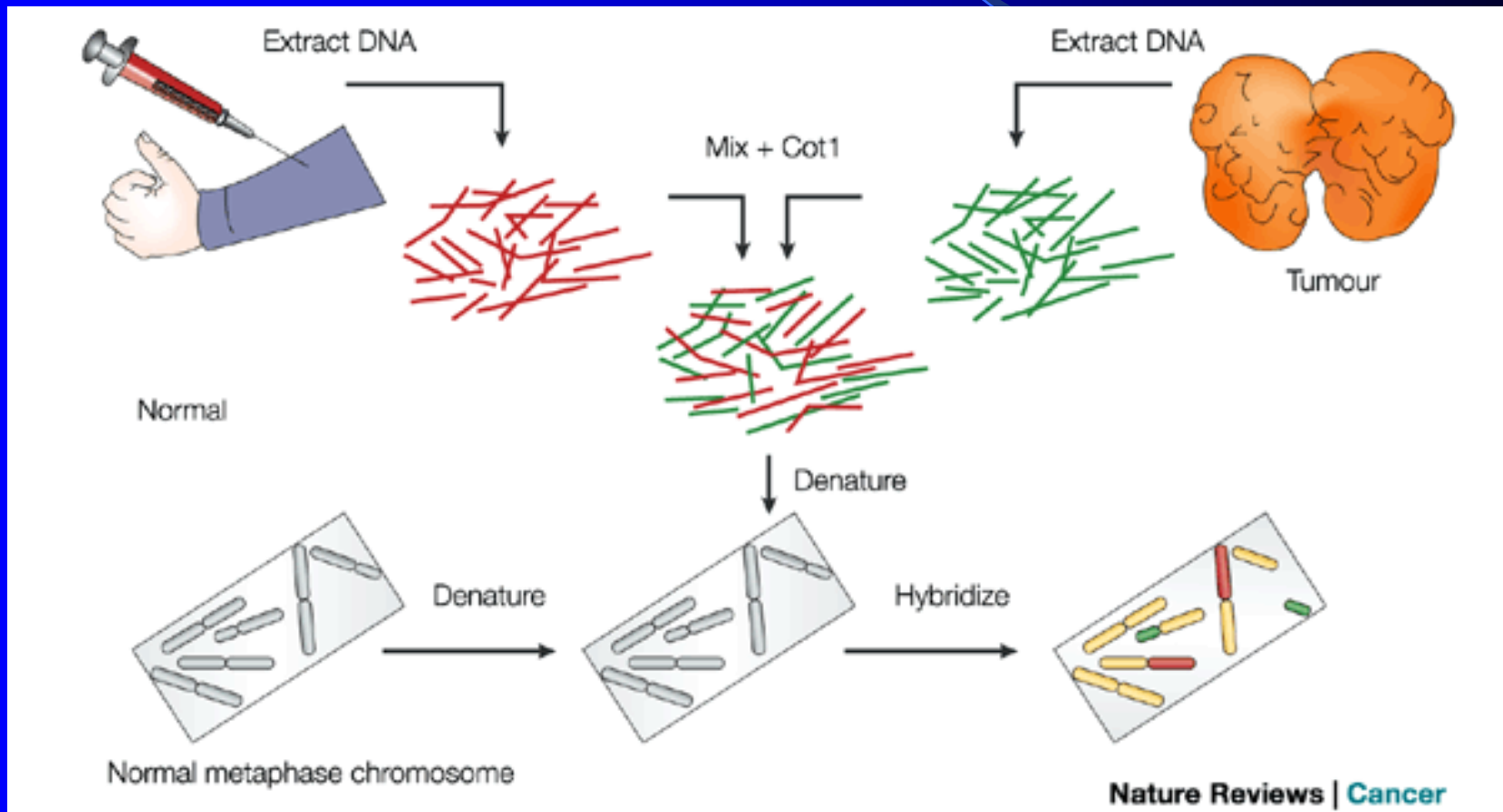
Μέθοδοι υψηλής ποσοτικής ανάλυσης διαφορικής γονιδιακής έκφρασης

(High throughput analysis of differential gene expression)

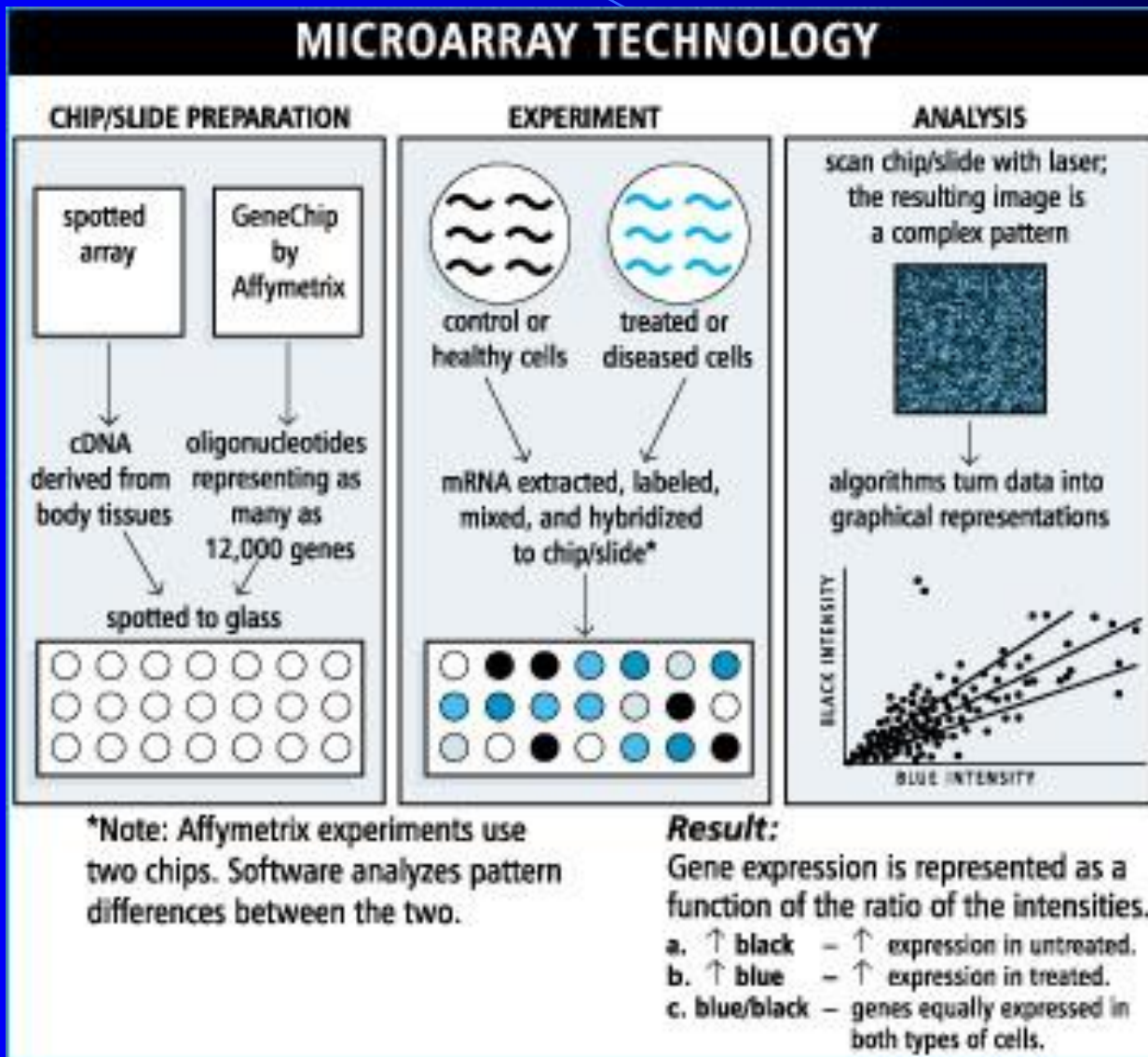
Αλληλούχηση υψηλής διεκπεραίωσης
(Next Generation Sequencing)

Συγκριτικός γενωμικός υβριδισμός

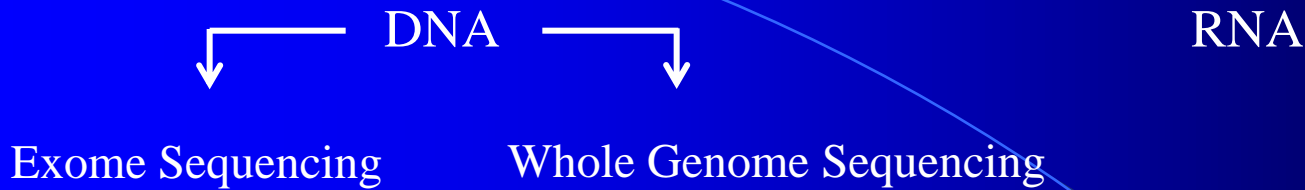
Comparative Genomic Hybridization



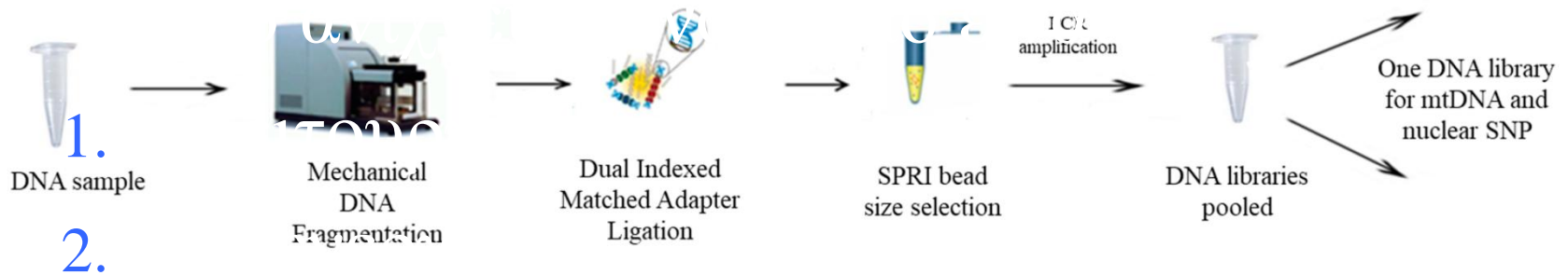
Ανάλυση διαφορικής έκφρασης πολλών γονιδίων



Next Generation Sequencing



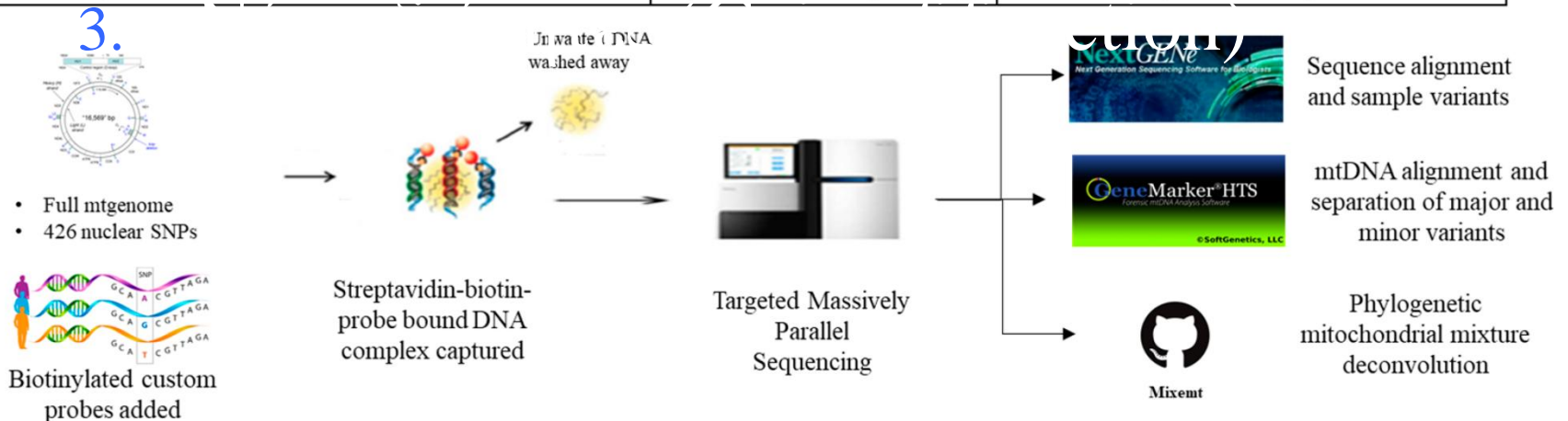
1) DNA Fragmentation and Library Preparation



2) Probe Capture and Enrichment

3) Next Gen Sequencing

4) Data Analysis



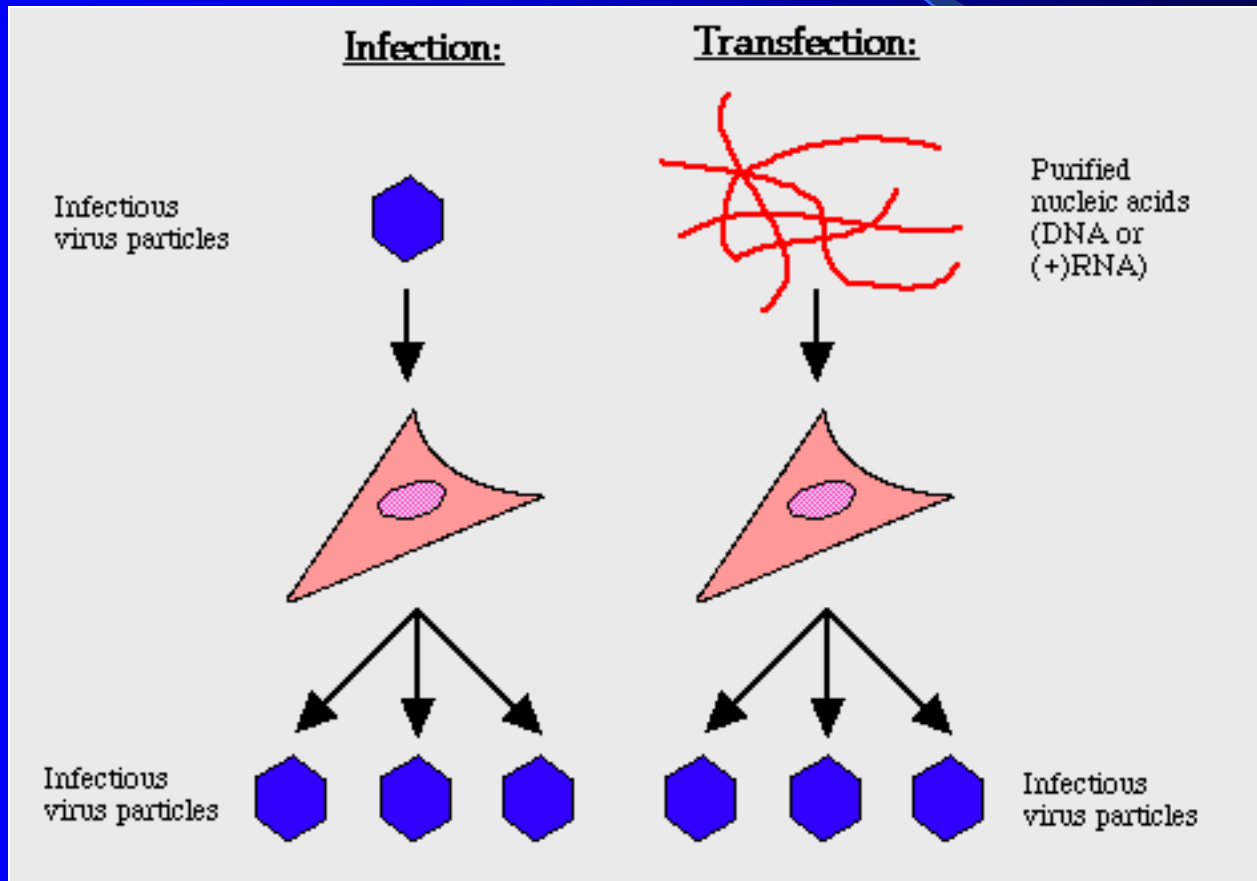
Αναπάντητα ερωτήματα με τις προηγούμενες μεθόδους

Εάν το ανιχνευόμενο μόριο είναι:

1. Λειτουργικό
2. Ανενεργό
3. Αποκτά νέες ιδιότητες (Gain of function)

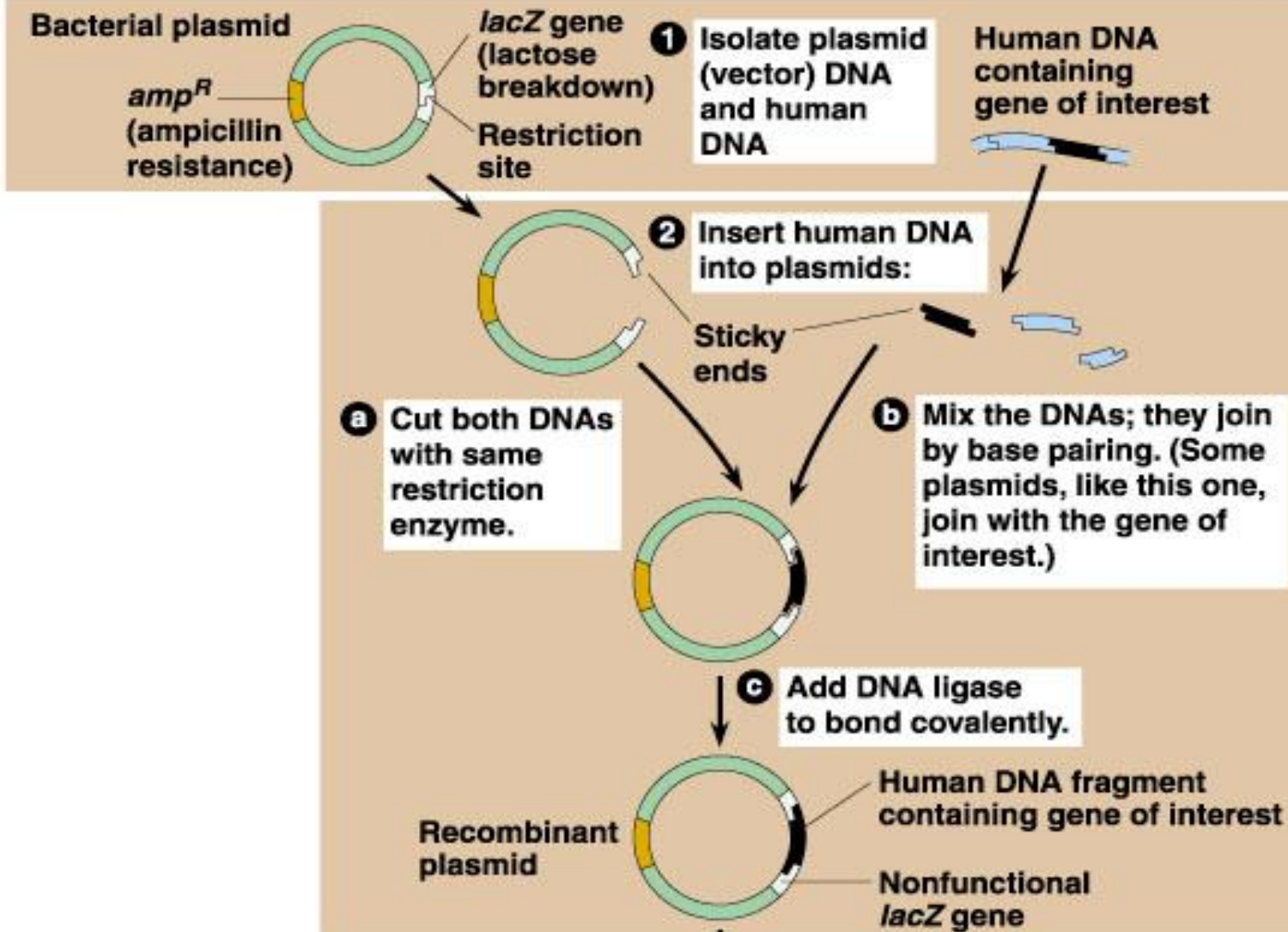
Λειτουργικές δοκιμασίες in vivo I

Εισαγωγή γονιδίων μέσω ιών

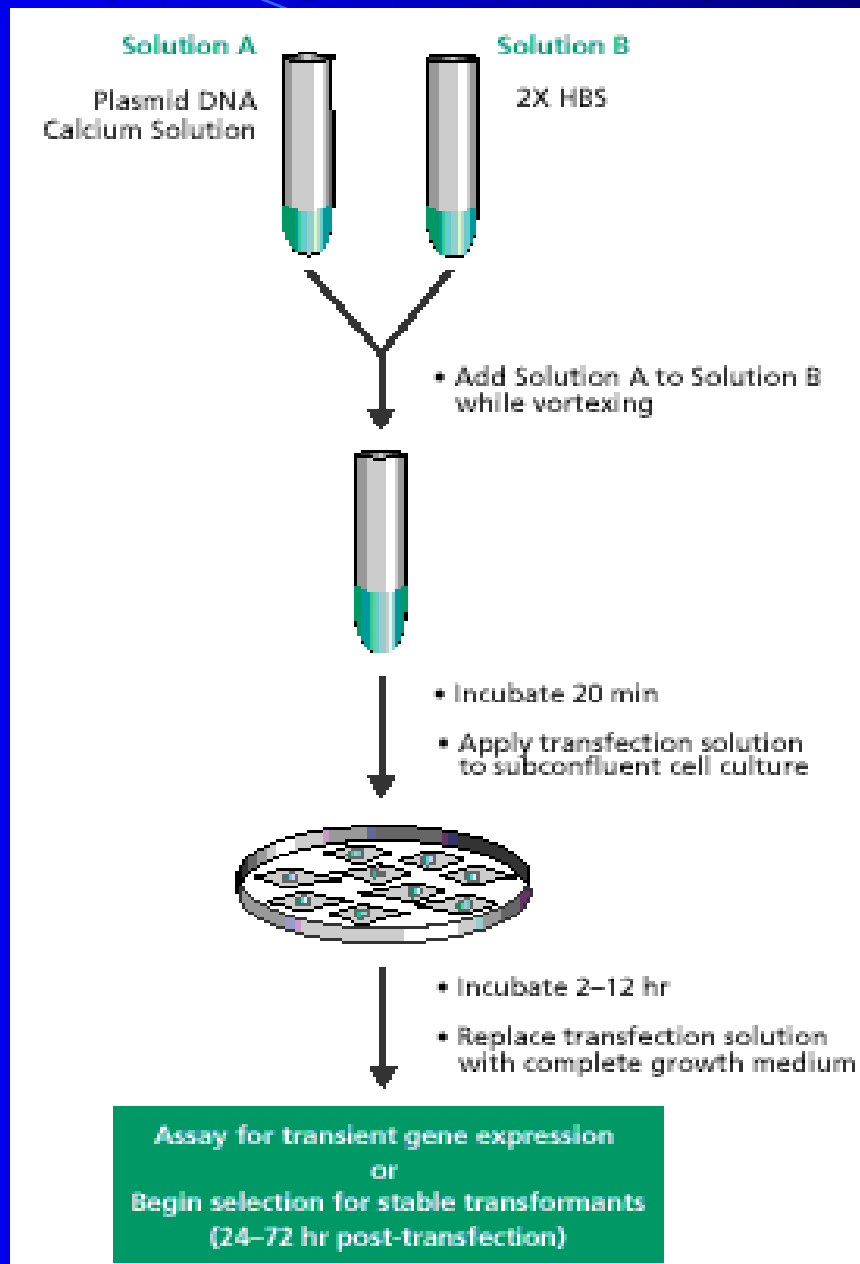


Λειτουργικές δοκιμασίες in vivo II

Εισαγωγή γονιδίων μέσω πλασμιδίων

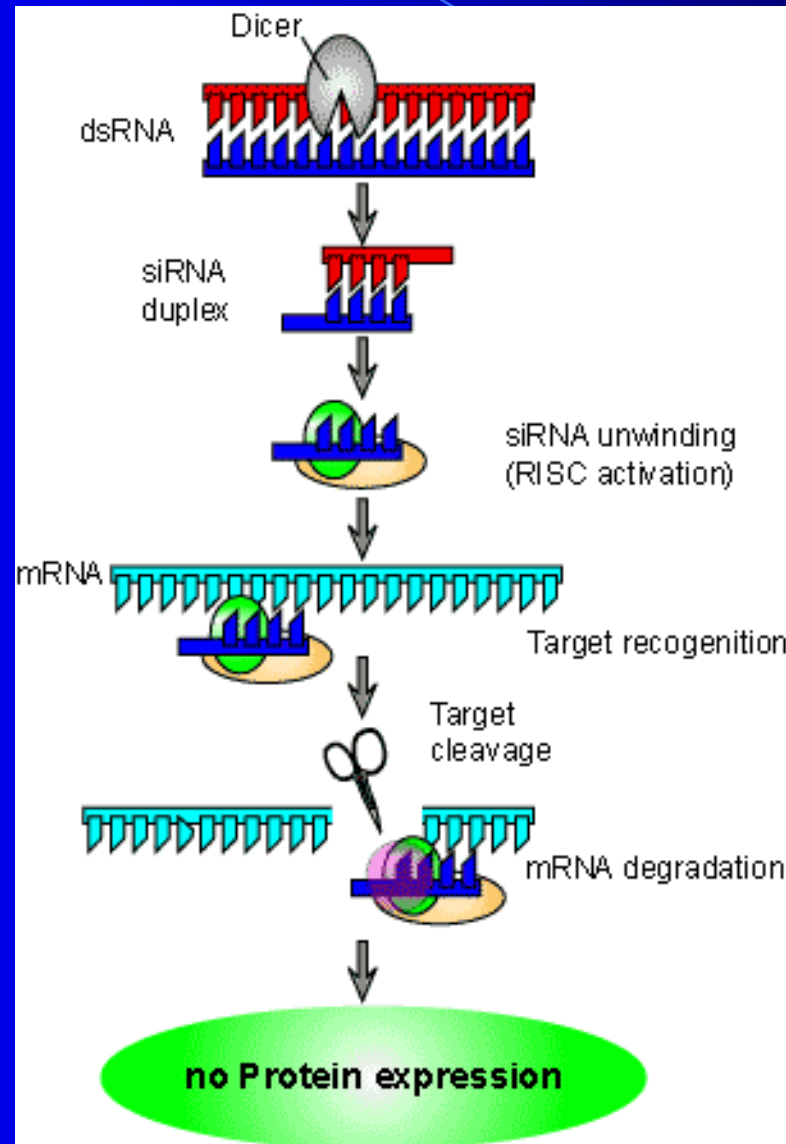


Λειτουργικές δοκιμασίες in vivo IV



Λειτουργικές δοκιμασίες *in vivo* III

Αποσιώπηση γονιδίων με siRNA



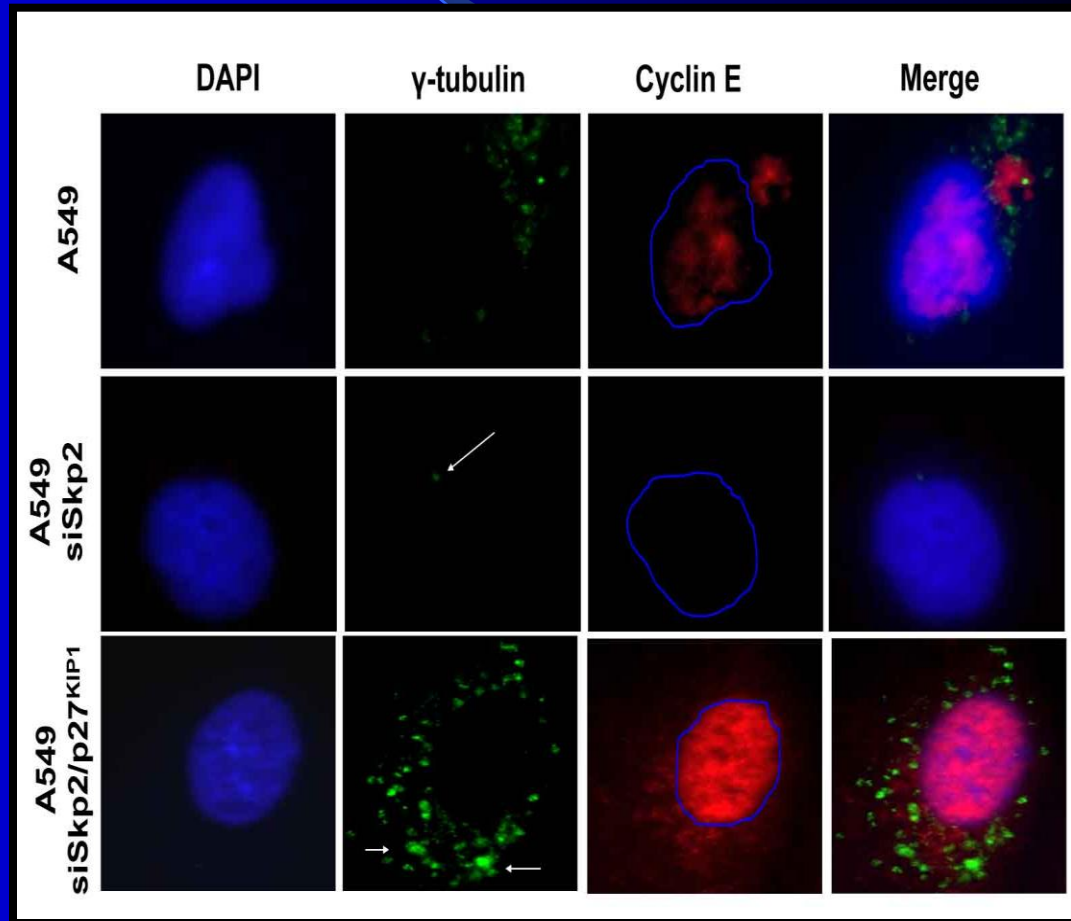
Μελέτη ζωντανών κυττάρων

- Μικροσκοπία
- Κυτταρομετρία ροής

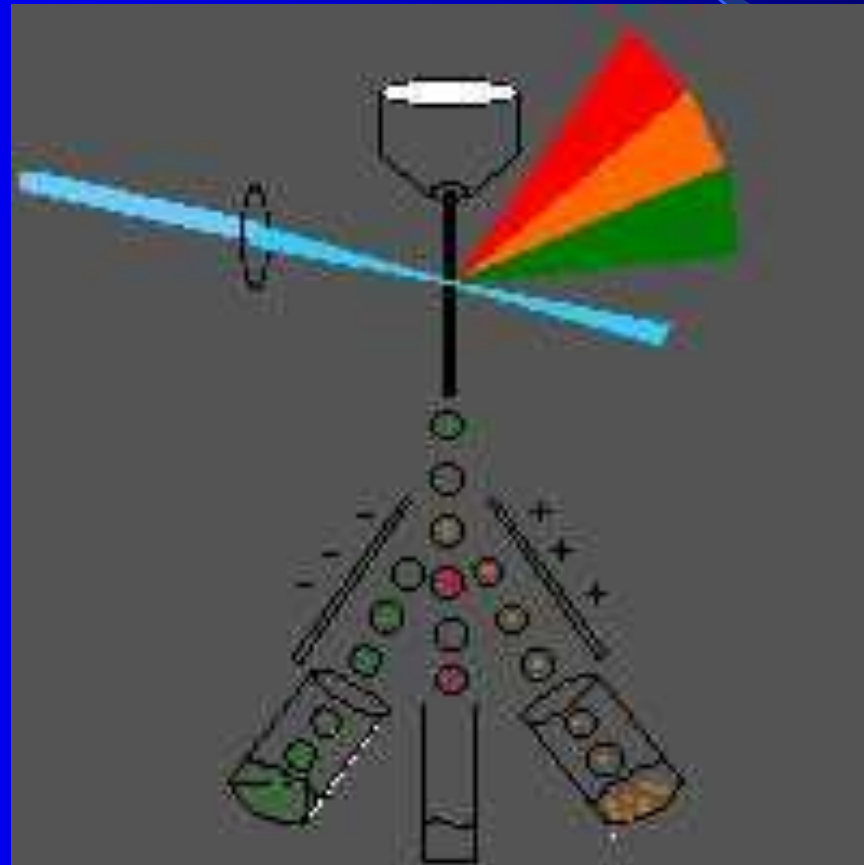
Συνδυασμός μορφολογίας με *in situ* μοριακές αναλύσεις και λειτουργικές δοκιμασίες

Πληροφορία ➔

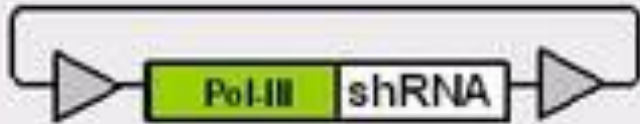
Μοριακές και κυτταρικές μεταβολές



Κυτταρομετρία ροής

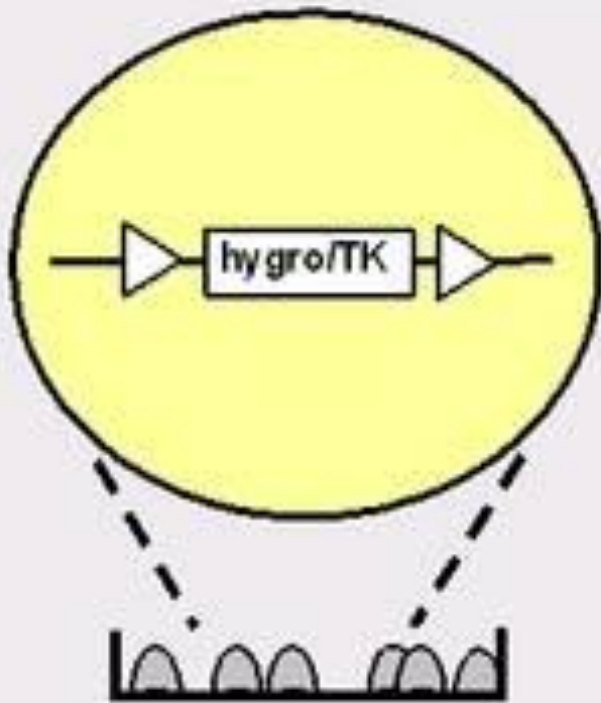


Διαγονιδιακά ζώα I

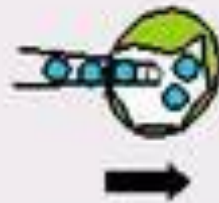


shRNA expression vector

↓ Site specific Integration



ES cell line
with docking site



Tetraploid
complementation

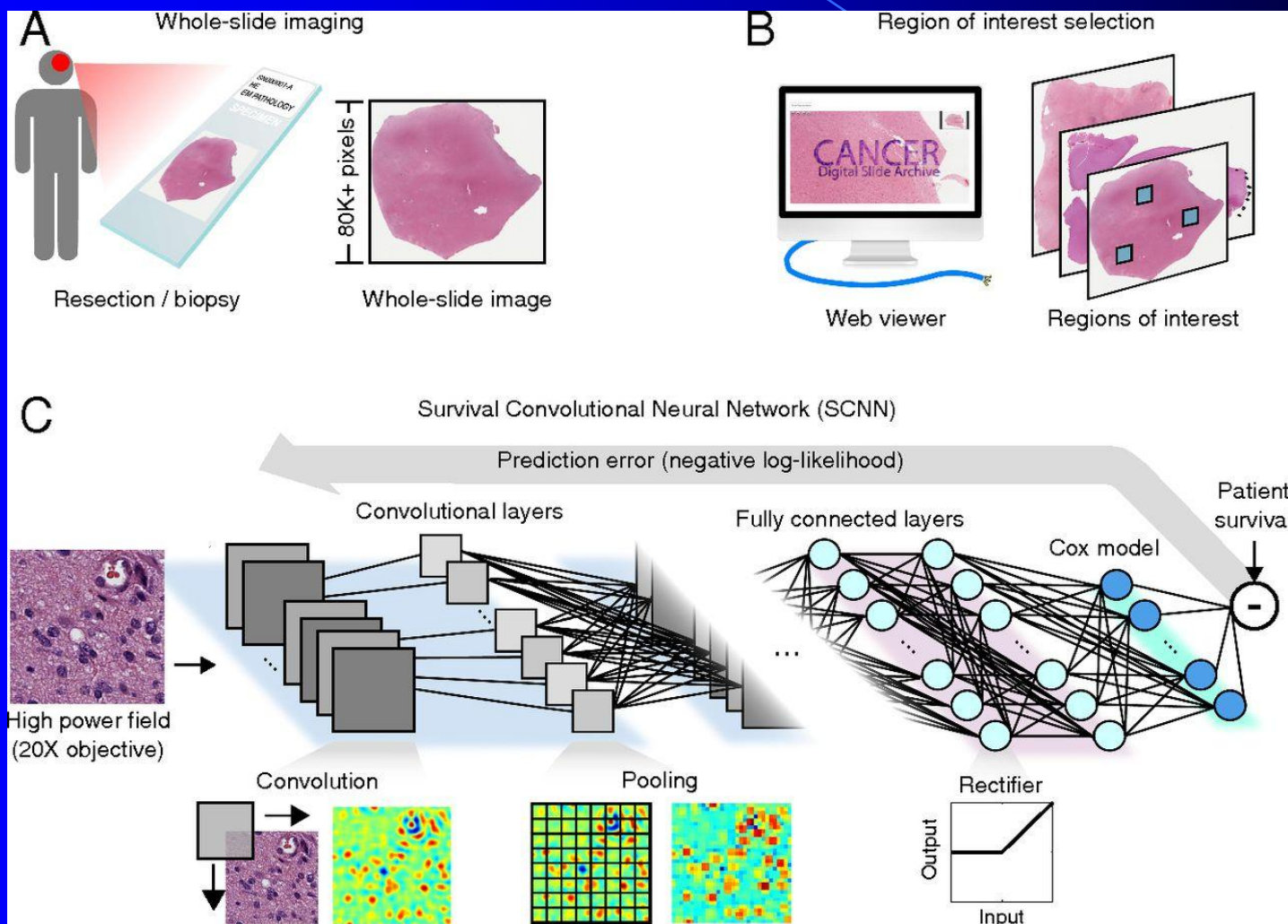


Knockdown mouse

Διαγωνιδιακά ζώα II



Τεχνητή νοημοσύνη στην πρόγνωση και θεραπεία (I)



Τεχνητή νοημοσύνη στην πρόγνωση και θεραπεία (II)

