

Ανάλυση γενετικού υλικού και γονιδιακής έκφρασης στον πολφό

A. ΚΟΚΚΑΣ¹, ΧΡ. ΣΤΑΥΡΙΑΝΟΣ²

Εργαστήριο Ενδοδοντολογίας, Οδοντιατρική Σχολή Α.Π.Θ.

Genetic material and gene expression analyses in pulp

A. KOKKAS¹, C. STAVRIANOS²

Dept of Endodontics, School of Dentistry, Aristotle University of Thessaloniki

Περίληψη

Στη μοριακή βιολογία η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) είναι μια τεχνική ποσοτικής ενίσχυσης ενός συγκεκριμένου τμήματος του DNA που μπορεί να είναι ένα απλό γονίδιο ή τμήμα του. Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης μετά από αντίστροφη μεταγραφή (RT-PCR) είναι μια ευαίσθητη μέθοδος για τον προσδιορισμό των επιπέδων της έκφρασης του mRNA. Η RT-PCR περιλαμβάνει δύο στάδια: την αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφής και την PCR ενίσχυση. Οι PCR και RT-PCR είναι συνήθεις τεχνικές που χρησιμοποιούνται στο πεδίο της ιατρικής και βιολογικής έρευνας με ποικιλία εφαρμογών. Σκοπός αυτής της εργασίας είναι η περιγραφή των δύο αυτών τεχνικών και η επισκόπηση της εφαρμογής τους στο πεδίο έρευνας του οδοντικού πολφού. Ο οδοντικός πολφός έχει προταθεί ως ιδανική πηγή DNA για την ανίχνευση παθολόγων μικροοργανισμών από αρχαίες περιόδους με σκοπό την αναδρομική διάγνωση επιδημικών ασθενειών, αλλά και στην Οδοντιατροδικαστική, για την ταυτοποίηση ή αποσυσχετισμό οστικών υπολειμμάτων ή απανθρακωμένων/αποτεφρωμένων πτωμάτων αγνώστου ταυτότητας σε διάφορες υποθέσεις στις οποίες εμπλέκεται η Οδοντιατροδικαστική (μαζικές καταστροφές, ατυχήματα όπου δεν είναι δυνατή η αναγνώριση, εγκληματικές ενέργειες, κ.λ.π.). Επίσης, στην Ενδοδοντολογία, η ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης έχει χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη των μηχανισμών που εμπλέκονται στη φλεγμονή, διαφοροποίηση, ανάπτυξη και γήρανση του οδοντικού πολφού.

Summary

In *molecular biology*, the polymerase chain reaction (PCR) is a technique to *amplify* a single or few copies of a piece of *DNA*. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) is a sensitive method for the detection of mRNA expression levels. RT-PCR involves two steps: the reverse transcription reaction and PCR amplification. PCR and RT-PCR are common techniques used in medical and biological research labs for a variety of applications. The aim of this study was to describe these two techniques and to review the applications in the dental pulp research field. Dental pulp has been proved to be an ideal DNA source of ancient septicemic microorganisms. Dental pulp has also been used as a source of host DNA for genotyping buried individuals. Gene expression analyses have been proposed as a useful tool for the study of mechanisms involved in inflammation, differentiation, growth and aging of dental pulp.

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: Πολφός, γενετικό υλικό, γονιδιακή έκφραση, RT-PCR, PCR.

KEY WORDS: Pulp, genetic material, gene expression, RT-PCR, PCR.

Στάλθηκε στις 15.1.2010. Εγκρίθηκε στις 20.2.2010.

¹ Διδάκτορας

² Αναπληρωτής Καθηγητής

Received on 15th Jan., 2009. Accepted on 20th Feb., 2010.

¹ Dr. Dentist

² Associate Professor

Εισαγωγή

Όπως είναι γνωστό στο DNA των κυττάρων αποθηκεύονται οι γενετικές πληροφορίες που καθορίζουν όλα τα χαρακτηριστικά ενός οργανισμού και οι οποίες οργανώνονται σε λειτουργικές μονάδες, τα γονίδια. Το σύνολο των γονιδίων ενός κυττάρου αποτελεί το γενετικό υλικό ή γονιδίωμα του. Τα τελευταία χρόνια η συνεχής ανάπτυξη ευαίσθητων και εξελιγμένων τεχνικών ανάλυσης γενετικού υλικού έχει διευρύνει το πεδίο, αλλά και τις δυνατότητες έρευνας της μοριακής βιολογίας.

Ο οδοντικός πολφός, που είναι χαλαρός συνδετικός ιστός που περιλαμβάνει αγγεία και νεύρα, αποτελεί ιδανικό βιολογικό δείγμα λήψεως γενετικού υλικού, καθώς το περιεχόμενο του περιβάλλεται και προστατεύεται από τα ανένδοτα τοιχώματα της οδοντίνης. Έτσι, έχει αναφερθεί η δυνατότητα ανάλυσης DNA από πολφικό ιστό, ακόμη και σε περίπτωση λήψεως του από εγκλείστους άνω γομφίους απανθρακωμένου πτώματος. Στην περίπτωση αυτή, η πολφική επιβίωση, παρά την ανάπτυξη τόσο υψηλής θερμοκρασίας κατά την απανθράκωση, οφείλονται στην προστασία που παρείχαν οι μαλακοί ιστοί και το οστικό πέταλο του γναθιαίου κυρτώματος¹. Βασικές τεχνικές της μοριακής βιολογίας, που έχουν χρησιμοποιηθεί και για την ανάλυση γενετικού υλικού από τον πολφό είναι η μέθοδος του πολυμορφισμού μήκους θραύσματος DNA από ένζυμα περιορισμού (*RFLP : Restriction Fragment Length Polymorphism*) και η μέθοδος της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (*PCR : Polymerase Chain Reaction*).

Γονιδιακή έκφραση (*gene expression*) είναι η διαδικασία κατά την οποία μια μεταβιβάσιμη πληροφορία ενός γονιδίου, όπως είναι η αλληλουχία του DNA, μετατρέπεται σε ένα λειτουργικό προϊόν, όπως είναι το RNA ή η πρωτεΐνη. Όπως είναι γνωστό, η γενετική πληροφορία των γονιδίων, που κωδικοποιεί τη σύνθεση των πρωτεϊνικών μορίων, αποτυπώνεται στο κυτταρικό επίπεδο με τη διαδικασία της μεταγραφής του mRNA. Ο προσδιορισμός, επομένως, του επιπέδου του mRNA, που μεταγράφεται μετά από τη διέγερση των αντίστοιχων γονιδίων, αντιπροσωπεύει και το επίπεδο της γονιδιακής έκφρασης. Ιδιαίτερη έμφαση έχει δοθεί τα τελευταία χρόνια στην ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης διαφόρων πρωτεϊνικών μορίων του πολφού (*κυτταροκινών, ενζύμων, υποδοχέων κ.λ.π.*), με σκοπό, κυρίως, την κατανόηση των πολύπλοκων μοριακών μηχανισμών που αναπτύσσονται κατά τις διάφορες φάσεις εξέλιξης της φλεγμονής του.

Βασική τεχνική ανάλυσης της γονιδιακής έκφρασης είναι η μέθοδος της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης μετά από αντίστροφη μεταγραφή (*RT-PCR : Reverse Transcription – Polymerase Chain*

Reaction). Αρχή της μεθόδου είναι η αντίστροφη μεταγραφή του mRNA σε μονόκλωνο συμπληρωματικό cDNA, που ακολουθείται από την αντιγραφή του σε δίκλωνο και την ενίσχυση του διαμέσου της PCR. Η αντίδραση RT-PCR αναφέρεται και ως ανταγωνιστική (*competitive*), όταν παράλληλα με την ανάλυση της έκφρασης του προς εξέταση γονιδίου, γίνεται στον ίδιο δοκιμαστικό σωλήνα και η ανάλυση του γονιδίου μιας ή περισσότερων ταυτόχρονα πρωτεϊνών, που χρησιμοποιούνται ως εσωτερικοί μάρτυρες, για να αντισταθμιστούν δειγματοληπτικά και εργαστηριακά σφάλματα, που οφείλονται στις διαφορές μεταβλητές. Η μέθοδος RT-PCR είναι περισσότερο ευαίσθητη και αξιόπιστη από τεχνικές όπως η Northern blotting και Ribonuclease protection assay, που έχουν χρησιμοποιηθεί, επίσης, για τον ίδιο σκοπό². Ωστόσο τα αποτελέσματα μιας γονιδιακής ανάλυσης είναι προτιμότερο να επιβεβαιώνονται πάντα και από μια δεύτερη τεχνική³.

Η μεγάλη τεχνολογική εξέλιξη προσφέρει, πλέον, σήμερα, πλήθος μεθόδων ανάλυσης στη μοριακή βιολογία που εξελίσσονται και παραλλάσσονται συνεχώς, ποικίλλοντας σε ότι αφορά το κόστος και την απαιτούμενη υλικοτεχνική υποδομή. Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η περιγραφή των μεθόδων RT-PCR και PCR, καθώς και η επισκόπηση των εφαρμογών τους στο πεδίο έρευνας του οδοντικού πολφού.

Μέθοδος RT-PCR

Η διαδικασία της ανάλυσης της γονιδιακής έκφρασης με τη μέθοδο RT-PCR ξεκινάει με τη συλλογή του δείγματος. Η μεταφορά όλων των δειγμάτων από το σημείο λήψεως στο χώρο της συντήρησης πρέπει να γίνεται με την άμεση τοποθέτησή τους σε αποστειρωμένους σωλήνες τύπου eppendorf και υπό ψύξη μέσα σε υγρό άζωτο (*σημείο ζέσεως : -195,8 °C*), το οποίο αποτρέπει τη διάσπαση που υφίσταται ταχύτατα το RNA στο εξωτερικό περιβάλλον από τη δράση των ριβονουκλεασών⁴. Η απομόνωση του RNA από τον πολφικό ιστό γίνεται με τη βοήθεια κάποιου εμπορικού kit και σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Ακολουθεί η αντίστροφη μεταγραφή του RNA σε αντίστοιχο μονόκλωνο cDNA που γίνεται με τη βοήθεια ενός ενζύμου που ανήκει στην ομάδα των αντίστροφων τρανσκριπτάσεων (*reverse transcriptases*) ή RNA εξαρτημένων DNA πολυμερασών (*RNA dependent DNA polymerases*). Τα ένζυμα αυτά χρησιμοποιούνται από διάφορους ιούς, που έχουν ως γενετικό υλικό το RNA (*ρετροϊοί*) για να επιτύχουν την αντίστροφη μεταγραφή του γονιδιώματός τους σε μονόκλωνο DNA, το οποίο κατόπιν θα ενσωματωθεί στο γονιδίωμα των κυττάρων του ξενιστή, μαζί με το οποίο και θα αντιγραφεί. Οι αντίστροφες τρανσκρι-

πτάσες που χρησιμοποιούνται ονομάζονται από τον ιό που απομονώθηκαν και είναι συνήθως η M-MuLV (*Moloney Murine Leukemia Virus*), η HIV-1 (*Human Immunodeficiency Virus type 1*), και η AMV (*Avian Myeloblastosis Virus*).

Η αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφής απαιτεί για την πραγματοποίησή της, την παρουσία αφετηριών ή εκκινητών αλύσων (*primers*) του εμπορίου που παρασκευάζονται σε ειδικές συσκευές και συνδέονται (*υβριδίζονται*) υπό τη δράση της αντίστροφης τρανσκριπτάσης με το RNA. Οι αφετηρίες μπορεί να είναι μη ειδικές, όταν η ακολουθία των βάσεων είναι τυχαία (*random primers*) ή ειδικές, όταν είναι ολιγονουκλεοτίδια με συμπληρωματική αλληλουχία προς το RNA στόχο. Η προτίμηση αφετηριών με τυχαία ακολουθία βάσεων διευκολύνει τον υβριδισμό με πλούσιο σε βάσεις αδενίνης (*poly-A-tail*) τελικό άκρο, που παρατηρείται στο mRNA².

Η αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφής πραγματοποιείται μέσα σε δοκιμαστικό σωλήνα που περιλαμβάνει ως αντιδραστήρια ολόκληρο το RNA που απομονώθηκε, τις αφετηρίες, που συνήθως είναι εξαμερή με τυχαία ακολουθία βάσεων (*random hexamer primers*), τα τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (*dATP, dCTP, dTTP, dGTP*) που αποτελούν το υπόστρωμα, τη διθειοτριτόλη, το ρυθμιστικό διάλυμα, τα ιόντα K^+ και Mg^{2+} και το ένζυμο της αντίστροφης τρανσκριπτάσης. Το μίγμα της αντίδρασης τοποθετείται, συνήθως, σε ειδικά προγραμματισμένη συσκευή, το θερμικό κυκλοποιητή (*thermocycler*), όπου επιτυγχάνονται οι απαραίτητες εναλλαγές της θερμοκρασίας (Εικ. 1). Οι συνθήκες της αντίδρασης περιλαμβάνουν, αρχικά, διαδοχικές θερμοκρασίες 23 °C επί 10 λεπτά και 42 °C επί 30 έως 60 λεπτά. Ακολουθεί θέρμανση στους 95 °C επί 5-10 λεπτά και κατόπιν άμεση ψύξη σε πάγο, ώστε να γίνει η μετου-

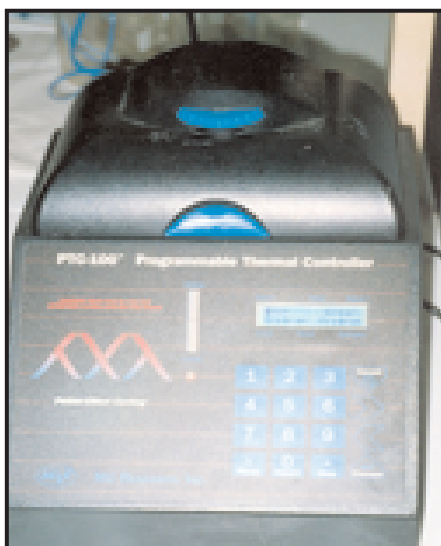
σίωση ή αποδιάταξη του υβριδίου RNA-cDNA και η αδρανοποίηση της περίσσειας της αντίστροφης τρανσκριπτάσης. Πριν από την προσθήκη του RNA στο μίγμα της αντίδρασης, συνίσταται η θέρμανση του στους 90 °C επί 5 λεπτά και η άμεση ψύξη του σε πάγο, ώστε να αποσυντεθούν αδρανή προϊόντα και κάποιες δευτεροταγείς δομές, που εμποδίζουν τον υβριδισμό του cDNA⁵.

Μετά το πέρας της αντίστροφης μεταγραφής, ακολουθεί η ενίσχυση του cDNA με την αντίδραση PCR.

Μέθοδος PCR

Η PCR είναι γενικά μια μέθοδος, που χρησιμοποιείται για την ποσοτική ενίσχυση ενός συγκεκριμένου τμήματος του DNA που μπορεί να είναι ένα απλό γονίδιο ή τμήμα του ή κάποια άλλη μη γενετικά κωδικοποιημένη αλληλουχία. Οι περισσότερες τεχνικές μπορούν να ενισχύσουν ζεύγη βάσεων μεγέθους μέχρι 10 Kb (*kilo base*), ενώ κάποιες έως 40 Kb⁶. Στην περίπτωση της ανάλυσης πολφικού ιστού, κατά την εξαίρεση του θα πρέπει να διασφαλίζονται συνθήκες ασηψίας, καθώς υπάρχει μεγάλη ευαισθησία της μεθόδου σε οποιαδήποτε επιμόλυνση του δείγματος⁷.

Αρχή της μεθόδου είναι η πολλαπλή αντιγραφή και ποσοτική μεγέθυνση μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας του DNA, μεγέθους από 50 έως περισσότερο από 2000 βάσεις, που επιτυγχάνεται *in vitro* με τη βοήθεια του ενζύμου της DNA πολυμεράσης. Οι DNA πολυμεράσες είναι γενικά μια ομάδα ενζύμων, που είναι υπεύθυνες για την αντιγραφή του DNA σε κάθε κύτταρο κατά τη διαίρεση του. Όπως ξετυλίγονται οι δύο κλώνοι του DNA, το ένζυμο πολυμεράση διαβάζει τον ένα κλώνο και έχοντας τον ως πρότυπο (*template*) συνθέτει συμπληρωματική άλυσο DNA με κατεύθυνση από το 5' προς 3' άκρο, έχοντας ως άλυσο αφετηρία την περιοχή του δίκλωνου DNA, παρουσία τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων και ιόντων Mg^{2+} . Στην περίπτωση της PCR, το ένζυμο που συνήθως προτιμάται είναι η Taq πολυμεράση που ονομάστηκε έτσι, επειδή απομονώθηκε αρχικά από το θερμόφιλο βακτήριο *Thermus aquaticus*⁸. Η Taq πολυμεράση παρουσιάζει αντοχή στις υψηλές θερμοκρασίες, που απαιτούνται κατά τη διάρκεια της PCR έχοντας ευνοϊκότερη θερμοκρασία δράσης τους 75-80 °C και χρόνο ημίσειας ζωής τα 9 λεπτά στους 97,5 °C⁹. Το γεγονός αυτό διευκολύνει τις εργαστηριακές συνθήκες της αντίδρασης, καθώς η αντίσταση της Taq πολυμεράσης κατά την επαναλαμβανόμενη έκθεσή της σε υψηλές θερμοκρασίες εξαλείφει την αναγκαιότητα της συνεχούς προσθήκης του ενζύμου σε κάθε κύκλο της αντίδρασης^{10,11}. Η συχνότητα του σφάλματος της Taq πολυμεράσης είναι, επίσης, χαμηλή και έχει υπολογιστεί στο 0,25%



Εικόνα 1. Θερμικός κυκλοποιητής (Εργ. Φαρμακολογίας Ιατρικής Σχολής, Α.Π.Θ).

μετά από 30 κύκλους της PCR¹².

Η PCR πραγματοποιείται, συνήθως, σε όγκο αντίδρασης 15-100 ml και το μίγμα της αντίδρασης περιλαμβάνει μια σειρά από συγκεκριμένα αντιδραστήρια^{13,14}. Το τμήμα που επιλέγεται να ενισχυθεί αναφέρεται ως στόχος (*target*) DNA και στην περίπτωση της RT-PCR είναι το cDNA, που δημιουργήθηκε κατά την αντίστροφη μεταγραφή του mRNA. Από το εμπόριο χρησιμοποιούνται δύο αφετηρίες, που είναι συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια, συνήθως, μήκους 20-30 βάσεων. Οι αφετηρίες έχουν δομή συμπληρωματική προς τις πλευρικές αλληλουχίες των 5' και 3' άκρων του DNA στόχου, η κάθε μία αντίστοιχα προς τον ένα κλώνο και με αντίθετη κατεύθυνση. Είναι προτιμότερο να έχουν τυχαία κατανομή βάσεων, από τις οποίες περίπου το 50% είναι να είναι ζεύγη γουανίνης – κυτοσίνης (GC). Επίσης, πρέπει να αποφεύγονται αφετηρίες με ασυνήθιστη αλληλουχία βάσεων ή έντονη δευτεροταγή δομή¹⁵. Οι αφετηρίες δεν πρέπει να είναι συμπληρωματικές με αλληλουχίες του DNA, που δεν αποτελούν στόχο και περιέχονται στο δείγμα. Επίσης, δεν πρέπει να είναι συμπληρωματικές και μεταξύ τους, κυρίως, στα 3' άκρα τους, επειδή μπορεί να αλληλο-υβριδιστούν και να επεκταθούν, ιδιαίτερα, όταν μικρές ποσότητες DNA στόχου, ενισχύονται με πολλούς κύκλους. Με τον τρόπο αυτό σχηματίζονται διμερείς αφετηρίες, που ανταγωνίζονται το κύριο προϊόν της αντίδρασης¹⁴. Τα τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (*dNTPs*) αποτελούν το απαιτούμενο δομικό υλικό για τη σύνθεση των νέων αλύσων του DNA υπό την επίδραση του ένζυμου της Taq πολυμεράσης του DNA, που, όπως έχει ήδη αναφερθεί, είναι αυτό, που προτιμάται. Συγκέντρωση του ενζύμου 1-2.5 units για 100 μl όγκου αντίδρασης είναι αυτή που συνιστάται, όταν είναι κατάλληλες και οι υπόλοιπες παράμετροι⁹. Η αντίδραση λαμβάνει χώρα σε ρυθμιστικό διάλυμα (Buffer) που παρέχει το απαραίτητο χημικό περιβάλλον για τη σταθερότητα, αλλά και την δράση της DNA πολυμεράσης, παρουσία δισθενών ιόντων, συνήθως Mg²⁺ και μονοθενών ιόντων K⁺.

Μετά το σχηματισμό του μονόκλωνου cDNA, αυτό αντιγράφεται σε δίκλωνο, που κατόπιν ενισχύεται με την PCR αντίδραση. Η PCR αντίδραση περιλαμβάνει επαναλαμβανόμενες μεταβολές της θερμοκρασίας στο μίγμα της αντίδρασης, που ονομάζονται κύκλοι. Κάθε κύκλος περιλαμβάνει 3 διαφορετικά στάδια, όπου εναλλάσσονται διαφορετικές θερμοκρασίες, που προγραμματίζονται από το θερμικό κυκλοποιητή. Οι παράμετροι που επηρεάζουν τις συνθήκες της αντίδρασης σε αυτά τα στάδια είναι η αλληλουχία και το μήκος του DNA στόχου, η αλληλουχία και το ποσοστό συμπληρωματικότητας των αφετηριών, καθώς και ο χρόνος που μεσολαβεί κατά την εναλλαγή των θερμοκρασιών (*ramp time*)¹⁴.

Το πρώτο στάδιο περιλαμβάνει την αποδιάταξη ή μετουσίωση (*denaturation*) του DNA, που επιτυγχάνεται σε υψηλή θερμοκρασία συνήθως 90-95 °C, επί 1-2 λεπτά. Με τη μετουσίωση διασπώνται οι έλικες του DNA, αλλάζει δηλαδή η δομή του με το χωρισμό των δύο ελίκων και τη μετατροπή του από δίκλωνο σε μονόκλωνο (*single strands*). Κατά τη μετουσίωση δεν προκαλείται διάσπαση των ομοιοπολικών δεσμών, αλλά διακοπή των δυνάμεων, που είναι υπεύθυνες για τη διατήρηση της δομής της διπλής έλικας του DNA όπως είναι οι δεσμοί υδρογόνου μεταξύ των βάσεων και οι δυνάμεις από την αλληλεπίδραση των αλληλοδιάδοχων βάσεων. Η διαδικασία αυτή είναι αντιστρεπτή και σε θερμοκρασία περίπου 25 °C μπορεί να γίνει επανασύνδεση (*renaturation*), δηλαδή διπλοελίκωση των δύο αλύσων. Το δεύτερο στάδιο περιλαμβάνει τη σύνδεση των αφετηριών με το μετουσιωμένο DNA, διαδικασία που αναφέρεται και ως σύνδεση ή υβριδισμός των αφετηριών (*annealing*) και που επιτυγχάνεται σε χαμηλότερη θερμοκρασία 40-60 °C σε χρόνο, συνήθως, λίγων δευτερολέπτων. Το τρίτο και τελικό στάδιο που αναφέρεται ως επέκταση (*extension / elongation*), επιτυγχάνεται, συνήθως, σε θερμοκρασίες 70-75 °C και περιλαμβάνει την προσθήκη υπό τη δράση της DNA πολυμεράσης των συμπληρωματικών dNTPs στο 3' άκρο κάθε αλύσου. Ακολουθεί η επέκταση προς το 5' άκρο και, έτσι, σχηματίζονται 2 καινούργιες άλυσοι (κλώνοι) DNA συμπληρωματικές προς αυτές των 2 κλώνων του προτύπου DNA και διπλασιάζεται η συγκεκριμένη περιοχή^{13,14,16}.

Καθώς εξελίσσεται η αντίδραση PCR, το τμήμα του DNA στόχου που αναπαράγεται αποτελεί μετά το τέλος του κάθε κύκλου και τη μήτρα αντιγραφής που θα προκαλεί την εκθετική του ενίσχυση (*amplification*) δια μέσου των αλυσιδωτών αντιδράσεων σε τελικό αριθμό ανατύπων 2ⁿ (*n = ο αριθμός των κύκλων*). Η αντίδραση PCR συνεχίζεται έως ότου εξαντληθεί κάποιο αντιδραστήριο ή η DNA πολυμεράση δεν μπορεί να συνθέσει νέο DNA αρκετά σύντομα. Σε κανονικές συνθήκες αντίδρασης το πόσο της Taq DNA πολυμεράσης ελαττώνεται μετά από 25-35 κύκλους. Ο αριθμός των κύκλων της αντίδρασης εξαρτάται από την απόδοση της αντίδρασης και από την ποσότητα του DNA στόχου στην αντίδραση. Έτσι, στους 30 κύκλους και στο 10% της αντίδρασης, ποσότητα 100 ng γονιδιώματος DNA θηλαστικών, που περιλαμβάνει περίπου 10000 κύτταρα, αποδίδει ευκρινώς ορατή ζώνη φωτεινότητας, μετά από ηλεκτροφόρηση σε πηκτή, που περιλαμβάνει βρωμιούχο εθίδιο¹⁴. Περισσότερη ποσότητα DNA πιθανώς απαιτεί λιγότερους κύκλους, σε πολύ μικρότερη, ωστόσο, ποσότητα είναι προτιμότερο η ενίσχυση να γίνεται με βελτίωση των συνθηκών της αντίδρασης, παρά με αύξηση των κύκλων (>40) η οποία εξαντλεί τα αντιδραστήρια και δε βελτιώνει την από-

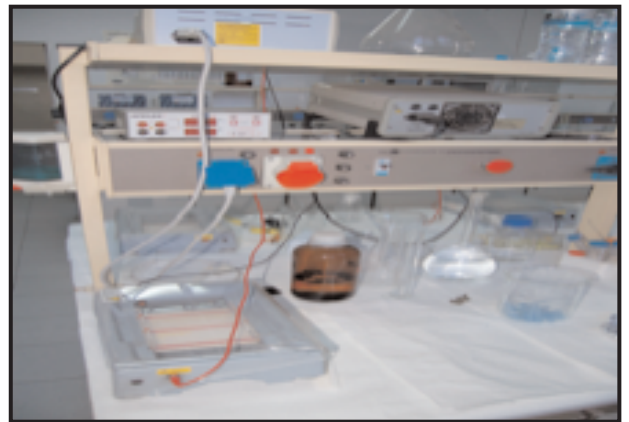
δοση της μεθόδου. Αύξηση των κύκλων μειώνει την ειδικότητα της DNA-πολυμεράσης, με αποτέλεσμα να σχηματιστούν πιθανώς μη ειδικά προϊόντα. Σε υψηλές συγκεντρώσεις DNA, επίσης, είναι δυνατόν αυτό να αυτοϋβριδίζεται με αποτέλεσμα να σταματήσει η αντίδραση ή να παραχθούν επίσης μη ειδικά προϊόντα. Μετά το τέλος του τελευταίου κύκλου συνήθως εφαρμόζεται ένα τελικό στάδιο επέκτασης (*final extension*), συνήθως, στους 72 °C, επί 5 λεπτά, ώστε να μεταπέσουν σε δίκλινα όλα τα μόρια DNA που έχουν παραχθεί.

Κατά την αντίδραση PCR το κύριο ή μικρό προϊόν (*short product*), που λαμβάνεται είναι δίκλινο DNA που περιλαμβάνεται μεταξύ των αφετηριών νουκλεοτιδίων. Τα άκρα του καθορίζονται από το 5' άκρο των αφετηριών και το μέγεθος του είναι ίσο με το άθροισμα των βάσεων των αφετηριών και της παρεμβαλλόμενης αλληλουχίας στόχου. Από τον πρώτο, όμως, κύκλο της αντίδρασης παράγονται και μακρύτερα μόρια DNA (*long products*), που το μέγεθος τους ξεπερνά το μεταξύ των αφετηριών τμήμα. Τα προϊόντα αυτά αυξάνονται γραμμικά με την πρόοδο των κύκλων, με αποτέλεσμα στο τέλος να αποτελούν ένα πολύ μικρό ποσοστό στο συνολικό προϊόν της PCR¹⁶.

Η εξέλιξη της μοριακής βιολογίας έχει προσφέρει πολλές παραλλαγές της αντίδρασης με στόχο την επίτευξη, όσο το δυνατόν περισσότερο αξιόπιστων αποτελεσμάτων. Έτσι, έχουν αναπτυχθεί ακόμη περισσότερο ευαίσθητες και αξιόπιστες τεχνικές όπως η PCR στον πραγματικό χρόνο (*real - time PCR*), που είναι μια ποσοτική μέθοδος, όπου η μεγέθυνση του DNA στόχου και η ανίχνευση του προϊόντος γίνονται ταυτόχρονα στο ίδιο σωληνάριο, επειδή το προϊόν που παράγεται συνδέεται με φθορίζουσα χρωστική που ανιχνεύεται από το οπτικό σύστημα ειδικού κυκλοποιητή.

Ο έλεγχος των αποτελεσμάτων της PCR γίνεται συνήθως με τη μέθοδο της ηλεκτροφόρησης μέσα σε υπόστρωμα πηκτής, όπου αναγνωρίζεται το μοριακό μέγεθος του ενισχυμένου DNA σε σύγκριση με DNA δείκτες γνωστού μοριακού βάρους. Η ηλεκτροφόρηση είναι γενικά μια μέθοδος με την οποία επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός βιολογικών μακρομορίων όπως είναι οι πρωτεΐνες και τα νουκλεϊκά οξέα με βάση το γεγονός ότι η δημιουργία ηλεκτρικού πεδίου, προκαλεί τη μετακίνηση των μορίων που φορτίζονται, ανάλογα με το μέγεθός τους. Με την ηλεκτροφόρηση διαχωρίζονται μεγάλες ποσότητες ακόμη και μικρών (<1000 bp) τμημάτων βάσεων DNA¹⁷. Η ηλεκτροφόρηση γίνεται σε ειδικές συσκευές και ανάλογα με την τοποθέτηση της γέλης διακρίνεται σε οριζόντια και κάθετη (Εικ. 2).

Στην περίπτωση των νουκλεϊκών οξέων οι φωσφορικές ομάδες, που περιέχουν αποκτούν σε όλη τους την έκταση αρνητικό ηλεκτρικό φορτίο,



Εικόνα 2. Συσκευή οριζόντιας ηλεκτροφόρησης. (Εργ. Φαρμακολογίας Ιατρικής Σχολής, Α.Π.Θ).

όταν τοποθετηθούν σε περιβάλλον με ουδέτερο ή αλκαλικό pH, όπως είναι η γέλη, που χρησιμοποιείται στην ηλεκτροφόρηση. Η δημιουργία ηλεκτρικού πεδίου, κατά τη διάρκεια της ηλεκτροφόρησης μετακινεί τα μόρια των νουκλεϊκών οξέων από την κάθοδο προς την άνοδο με μια δύναμη σταθερή και ανεξάρτητη, από τη νουκλεοτιδική τους σύσταση. Ο διαχωρισμός των τμημάτων των νουκλεϊκών οξέων προκύπτει από τη διαφορετική αντίσταση που εμφανίζεται κατά τη μετακίνηση τους διαμέσου των πόρων της γέλης. Έτσι, μεγαλύτερη ταχύτητα μετακίνησης έχουν τα μόρια με μικρότερο μέγεθος, ενώ το αντίστροφο συμβαίνει στα μόρια με μεγαλύτερο μέγεθος.

Η ηλεκτροφόρηση του DNA γίνεται συνήθως σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου ή αγαρόζης. Οι πηκτές πολυακρυλαμιδίου σχηματίζονται μετά από τον πολυμερισμό ακρυλαμιδίου, συνήθως, 3,5-20% παρουσία bis-ακρυλαμιδίου, TEMED (*N,N,N,N - tetramethylethylenediamine*) και υπερθειικού αμμωνίου, ενώ το μέγεθος των πόρων καθορίζεται από το μήκος των αλυσίδων και το βαθμό διασύνδεσης αυτών. Οι πηκτές πολυακρυλαμιδίου τρέχουν με σταθερή τάση, σε κάθετη συσκευή ηλεκτροφόρησης και έχουν μεγάλη ικανότητα διαχωρισμού τμημάτων DNA με μικρό μοριακό μέγεθος (5-500 bp) ακόμη και σε τμήματα που διαφέρουν κατά 1 bp. Οι πηκτές πολυακρυλαμιδίου μπορούν, επίσης, να δεχτούν μεγάλη ποσότητα DNA, ενώ είναι εξαιρετική και η καθαρότητα των τμημάτων που απομονώνονται από αυτές. Ωστόσο, σε σχέση με τις πηκτές της αγαρόζης, έχουν δυσκολότερη προετοιμασία και χειρισμό.

Η αγαρόζη είναι φυσικός πολυσακχαρίτης με ζελατινώδη υφή, που παράγεται από τα φύκια και η βασική αιτία χρήσης της είναι ότι, λόγω της χαμηλής της περιεκτικότητας σε θειικές ομάδες, έχει πολύ μικρό φορτίο και χαμηλή ηλεκτρο-ενδόσμωση. Οι πηκτές αγαρόζης έχουν μικρότερη ικανότητα διαχωρισμού, αλλά μεγαλύτερου εύρους σε σχέση με του πολυακρυλαμιδίου. Τμήματα DNA από 0,5 έως 25 Kb

μπορούν να διαχωριστούν σε διαφορετικές συγκεκριμένες πηκτικές αгарόζης, συνήθως, σε συσκευή οριζόντιας ηλεκτροφόρησης και υπό σταθερή τάση και ένταση¹⁸. Η εφαρμογή τα τελευταία χρόνια τεχνικών, όπου η ηλεκτροφόρηση της πηκτικής γίνεται μέσα σε εναλλασσόμενο ηλεκτρικό πεδίο (*pulse-field gel electrophoresis*), έχει βοηθήσει στο διαχωρισμό μεγαλύτερων τμημάτων DNA (>50 kb), που παρουσίαζε πολλές φορές προβλήματα, με τις προηγούμενες τεχνικές^{19,20}.

Η ανάλυση των τμημάτων του DNA που διαχωρίστηκε γίνεται με τη βοήθεια διαφόρων χρωστικών ουσιών, που προστίθενται στην πηκτή. Η πιο συνηθισμένη χρωστική είναι το βρωμιούχο εθίδιο (*EtBr*), το οποίο συγκρατείται μεταξύ των βάσεων του δίκλωνου DNA (*intercalation*) και φθορίζει υπό την έκθεση της υπεριώδους (UV) ακτινοβολίας. Υπάρχουν ωστόσο και άλλες χρωστικές, που χρησιμοποιούνται, πολλές από τις οποίες παρουσιάζουν μεγαλύτερη ευαισθησία από το βρωμιούχο εθίδιο²¹.

Η διαδικασία αυτή καταλήγει στην οπτική απεικόνιση ζωνών φωτεινότητας χρώματος μεταξύ ερυθρού και πορτοκαλί που αντιστοιχεί στα τμήματα του DNA. Η πηκτή κατόπιν φωτογραφίζεται με τη βοήθεια ψηφιακής κάμερας, συνήθως, σε ασπρόμαυρη απεικόνιση και η ανάλυση της έντασης των ζωνών φωτεινότητας γίνεται με τη βοήθεια κατάλληλων προγραμμάτων σε ηλεκτρονικό υπολογιστή (Εικ. 3).

Συζήτηση- Συμπεράσματα



Εικόνα 3. Συσκευή φωτογράφησης και ανάλυσης των ζωνών του ενισχυμένου DNA, μετά από ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης.

(Εργ. Φαρμακολογίας Ιατρικής Σχολής, Α.Π.Θ).

Ο οδοντικός πολφός έχει προταθεί ως κατάλληλο δείγμα ιστού για την ανίχνευση παθογόνων οργανισμών. Στους ανθρώπους η ανίχνευση του ιού HIV με τη μέθοδο PCR επιβεβαιώθηκε με τον *in situ* υβριδισμό του γονιδιώματος του HIV σε ινοβλάστες του οδοντικού πολφού^{22,23}. Με τη μέθοδο PCR και τη χρησιμοποίηση δύο ειδικών γονιδίων στόχων, έχει

ανιχνευτεί στον οδοντικό πολφό δοντιού το DNA του *Bartonella quintana* σε ασθενή, όπου είχε διαπιστωθεί πριν από 6 μήνες μικροβιαμία του συγκεκριμένου παθογόνου οργανισμού και η οποία υποχώρησε πλήρως κατά τη διάρκεια της λήψης του δείγματος²⁴.

Η ανάλυση γενετικού υλικού από τον πολφό, έχει αποδειχτεί ότι μπορεί να οδηγήσει ακόμη και στην αναδρομική διάγνωση αρχαίων μολυσματικών ασθενειών, δεδομένου ότι μετά το θάνατο του ανθρώπου, τα δόντια διατηρούνται αέριαι για πολύ μεγάλο χρονικό διάστημα, διατηρώντας το περιεχόμενο της πολφικής κοιλότητας αποξηραμένο, υπό την μορφή κόνιας, στεγανό και ανεπηρέαστο από εξωτερικές επιμολύνσεις²⁵. Έτσι, το γενετικό αυτό υλικό είναι το ιδανικό για την ανίχνευση παθογόνων παραγόντων σε ενταφιασμένους ανθρώπους, αλλά και σε ορισμένα ανώτερα θηλαστικά, που ήταν πιθανώς υπαίτιοι για την εκδήλωση θανατηφόρων επιδημιών κατά το ιστορικό παρελθόν. Σύμφωνα με τις αναφορές που υπάρχουν, έχει επιτυχώς ανιχνευτεί ο αιτιολογικός παράγοντας της πανώλης *Yersinia pestis*²⁶⁻²⁹ σε προϊστορικούς χρόνους³⁰ και η *Bartonella henselae* σε ανώτερα θηλαστικά του 13^{ου}-18^{ου} αιώνα³¹.

Σε έρευνα ομαδικού τάφου σε αρχαίο νεκροταφείο στην περιοχή του Κεραμικού της Αθήνας μελετήθηκε το DNA από τον πολφό τριών δοντιών που προέρχονταν από τρία κρανία. Στους πολφούς ανιχνεύτηκε ο μικροβιακός παράγοντας *Salmonella enterica* Typhi, ο οποίος τους είχε επιμολύνει διαμέσου της αιματικής κυκλοφορίας. Η ταυτοποίηση του συγκεκριμένου μικροβιακού παράγοντα συσχετίστηκε με την εκδήλωση θανατικής επιδημίας τυφοειδούς πυρετού στην Αθήνα το 431/430 π.Χ., παρά το γεγονός ότι μερικά συμπτώματα και ορισμένες συνέπειες της ασθένειας, όπως παρατίθενται από τον Θουκυδίδη, δε σχετίζονται με τη συγκεκριμένη νόσο, όπως τη γνωρίζουμε σήμερα. Έτσι, υπάρχει πιθανότητα ή να είχε ξεσπάσει στην Αθήνα, συγχρόνως, και άλλη μολυσματική ασθένεια ή ίσως είναι και το πιθανότερο, σήμερα, να γνωρίζουμε μια μεταλλαγμένη μορφή της ασθένειας, και το μικρόβιο που εντοπίστηκε στα δόντια των τριών νεκρών του ομαδικού τάφου να σχετίζεται με μια πρώιμη μορφή της³².

Σημαντική είναι, επίσης, η συμβολή της ανάλυσης του γενετικού υλικού από τον ανθρώπινο πολφό στη διαλεύκανση διαφόρων υποθέσεων, που αφορούν τον τομέα της Οδοντιατροδικαστικής έρευνας³³. Σύμφωνα με στοιχεία από έρευνες ο οδοντικός πολφός αποτελεί πολύτιμη πηγή ορολογικών και βιολογικών αποδεικτικών στοιχείων^{34,35}. Έτσι, έχει χρησιμοποιηθεί με επιτυχία για τη μεταθανάτια μοριακή διάγνωση κληρονομικών παθήσεων, όπως η μυική δυστροφία του Duchenne³⁶ και το σύνδρομο Rett³⁷.

Έχει αναφερθεί στην Οδοντιατροδικαστική, εξιχνίαση εγκληματικής ενέργειας μετά από την ανάλυση του DNA από τον οδοντικό πολφό απανθρακωμένου πτώματος και τη συγκριτική αξιολόγησή του με ανάλυση του DNA από κηλίδες αίματος που ανευρέθηκαν σε ρουχισμό στο σπίτι του φερόμενου ως υπόπτου. Τα αποδεικτικά αυτά στοιχεία αποτέλεσαν ισχυρό έρεισμα, ώστε ακόμα και ο συνήγορος της υπεράσπισης του κατηγορουμένου επέλεξε να μην αμφισβητήσει την αποδεικτική εγκυρότητα των Οδοντιατροδικαστικών στοιχείων¹.

Η ταυτοποίηση με βάση την ανάλυση του DNA στηρίζεται στο γεγονός ότι στο ανθρώπινο γονιδίωμα υπάρχουν επαναλαμβανόμενες περιοχές από συγκεκριμένες αλληλουχίες βάσεων, ξεχωριστές για το κάθε άτομο, που αναφέρονται ως αποτυπώματα του DNA (*DNA fingerprints*)³³. Η τεχνική των DNA αποτυπωμάτων φαίνεται να αντικαθιστά τις αποδείξεις που προέρχονται από τη μελέτη των ομάδων αίματος σε περιπτώσεις αμφισβητούμενων συγγενικών σχέσεων (*έλεγχος αποκλεισμού πατρότητας*). Άλλωστε, η μέθοδος της μελέτης των ομάδων αίματος δεν είναι αξιόπιστη μέθοδος, ειδικά, όταν το άτομο ανήκει στην ομάδα O αίματος (*το 40% περίπου πληθυσμιακά, έχει την ομάδα αυτή*)³³.

Ο οδοντικός πολφός έχει, επίσης, χρησιμοποιηθεί ως πηγή DNA του ξενιστή για τη γονιδιακή ταυτοποίηση ενταφιασμένων ανθρώπων με βάση την ακολουθία του γονιδίου DQA1 της περιοχής HLA του χρωμοσώματος 6³⁸, τις περιοχές STR (*Short Tandem Repeats*) των χρωμοσωμάτων³⁹ και τις υπερμεταβλητές περιοχές-1 (*Hypervariable Region 1: HVR-I*) του μιτοχονδριακού DNA⁴⁰. Ο προσδιορισμός του φύλου κατά την ταυτοποίηση ή αποσυσχετισμό οστικών υπολειμμάτων ή απανθρακωμένων/αποτεφρωμένων πτωμάτων αγνώστου ταυτότητας μπορεί να γίνει επίσης με βάση το γεγονός ότι στον πολφικό ιστό των δοντιών θηλέων ατόμων εντοπίζεται μικροσκοπικά το σωματίδιο του Barr ή X-χρωματίνη³³.

Ο προσδιορισμός της έκφρασης των γονιδίων διαφόρων βιολογικών μακρομορίων, που συσχετίζονται με τη φλεγμονώδη διαδικασία, επιχειρείται να χρησιμοποιηθεί τα τελευταία χρόνια ως εξειδικευμένος βιολογικός μοριακός δείκτης της φλεγμονής του πολφού. Παρότι στην περίπτωση της φλεγμονής του πολφού η χρησιμοποίηση ενός τέτοιου δείκτη δεν έχει κλινική χρησιμότητα στη διαγνωστική διαδικασία, επειδή προϋποθέτει την εξαίρεση του, η διαφαινόμενη συσχέτιση του επιπέδου της γονιδιακής έκφρασης αυτών των δεικτών με τα κλινικά ευρήματα και τα συμπτώματα της πολφίτιδας έχει αξία για τη βασική έρευνα στο αντικείμενο της βιολογίας του πολφού, καθώς παρέχει στοιχεία για την κατάσταση του μοριακού μηχανισμού εξέλιξης της πολφικής φλεγμονής. Έτσι, από έρευνες προκύπτουν στοιχεία ότι η αύξηση της γονιδιακής έκφρασης διαφόρων

πρωτεϊνικών μορίων μπορεί να συσχετιστεί με τα στάδια εξέλιξης της φλεγμονής του πολφού, όπως αυτά καθορίζονται από διάφορα κλινικά διαγνωστικά κριτήρια⁴¹⁻⁴³. Η ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης του πολφού έχει χρησιμοποιηθεί, επίσης, και για την κατανόηση των μηχανισμών που εμπλέκονται κατά τη διαφοροποίηση, ανάπτυξη και γήρανση του, υπό φυσιολογικές, αλλά και υπό παθολογικές συνθήκες⁴⁴.

Βιβλιογραφία

1. Sweet DJ, Sweet CH. DNA analysis of dental pulp to link incinerated remains of homicide victim to crime scene. *J Forensic Sci.* 1995; 40:310-4.
2. Gilliland G, Perrin S, Bunn HF. Competitive PCR for quantification of mRNA. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds) «PCR protocols. A guide to methods and applications». Academic press, San Diego 1990 pp 60-75.
3. Ding Y, Xu L, Jovanovich BD, Helenowski IB, Kelly DL, Catalona WJ, Yang XJ, Pins M, Bergan RC. The methodology used to measure differential gene expression affects the outcome. *J Biomol Tech* 2007; 18:321-30.
4. Mutter GL, Zahrieh D, Chunmei L, Neuberg D, Finkelstein D, Baker HE, Warrington J. Comparison of frozen and RNALater solid tissue storage methods for use in RNA expression microarrays. *BMC Genomics* 2004; 5:88-96.
5. Kawasaki ES. Amplification of genomic RNA. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds) «PCR protocols. A guide to methods and applications». Academic press, San Diego 1990 pp 21-7.
6. Cheng S, Fockler C, Barnes WM, Higuchi R. Effective amplification of long targets from cloned inserts and human genomic DNA. *Proc Natl Acad Sci* 1994; 91:5695-9.
7. Tran-Hung L, Tran-Thi N, Aboudharam G, Raoult D, Drancourt M. A new method to extract dental pulp DNA: application to universal detection of bacteria. *PLoS One.* 2007 Oct 24; 2(10):e1062
8. Chien A, Edgar DB, Trela JM. Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. *J Bacteriol* 1976; 174:1550-7.
9. Lawyer FC, Stoffel S, Saiki RK, Chang SY, Landre PA, Abramson RD, Gelfand DH. High-level expression, purification, and enzymatic characterization of full-length *Thermus aquaticus* DNA polymerase and a truncated form deficient in 5' to 3' exonuclease activity. *PCR Methods Appl.* 1993; 2:275-87.
10. Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 1987; 155:335-50.
11. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anaemia. *Science* 1985; 23:1350-4.
12. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R,

- Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988; 239:487-91.
13. Innis MA, Gelfand DH. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds) «PCR protocols. A guide to methods and applications». Academic press, San Diego 1990 pp 3-11.
 14. Kramer MF, Coen DM. Enzymatic amplification of DNA by PCR: standard procedures and optimization. *Curr Protoc Immunol.* 2001; Chapter 10: Unit 10.20.
 15. Saiki RK. Amplification of genomic DNA. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds) «PCR protocols. A guide to methods and applications». Academic press, San Diego 1990 pp 13-20.
 16. Βαβάτση – Χριστάκη Ν. PCR. *Μικροβιολογικά Χρονικά* 1998; 14:245-54.
 17. Chory J, Pollard JD Jr. Separation of small DNA fragments by conventional gel electrophoresis. *Curr Protoc Mol Biol* 2001; Chapter 2: Unit 2.7.
 18. Voytas D. Agarose gel electrophoresis. *Curr Protoc Immunol.* 2001; Chapter 2: Unit 2.5A.
 19. Cantor CR, Smith CL, Matthew MK. Pulse field electrophoresis of very large DNA molecules. *Ann Rev Biophys Chem* 1988; 17:41-72..
 20. Finney M. Pulsed-field gel electrophoresis. *Curr Protoc Mol Biol* 2001; Chapter 2: Unit 2.5B.
 21. Hital H, Taylor JA. Cyanine dyes for the detection of double stranded DNA. *J Biochem Biophys Methods.* 2008 ; 70:1104-8.
 22. Glick M, Trope M, Pliskin ME. Detection of HIV in the dental pulp of a patient with AIDS. *J Am Dent Assoc.* 1989; 119:649–50.
 23. Glick M, Trope M, Bagasra O, Pliskin ME. Human immunodeficiency virus infection of fibroblasts of dental pulp in seropositive patients. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1991; 71:733–6.
 24. Aboudharam G, Fournier PE, Drancourt M, Raoult D, Foucault C, et al. Molecular detection of Bartonella quintana DNA in the dental pulp of a homeless patient. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2004; 23:920–2.
 25. Drancourt M, Raoult D. Palaeomicrobiology: current issues and perspectives. *Nat Rev Microbiol.* 2005; 3:23–35.
 26. Drancourt M, Aboudharam G, Signoli M, Dutour O, Raoult D. Detection of 400-year-old Yersinia pestis DNA in human dental pulp : an approach to the diagnosis of ancient septicemia. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998; 95:12637–40.
 27. Raoult D, Aboudharam G, Crubezy E, Larrouy G, Ludes B, et al. Molecular identification by «suicide PCR» of Yersinia pestis as the agent of Medieval Black Death. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000; 97:12800–3.
 28. Drancourt M, Raoult D. Molecular detection of Yersinia pestis in dental pulp. *Microbiology.* 2004; 150:263–4.
 29. Wiechmann I, Grupe G. Detection of Yersinia pestis DNA in two early medieval skeletal finds from Aschheim (Upper Bavaria, 6th century A.D.). *Am J Phys Anthropol.* 2005; 126:48–55.
 30. Drancourt M, Tran-Hung L, Courtin J, Lumley H, Raoult D. Bartonella quintana in a 4000-year-old human tooth. *J Infect Dis.* 2005; 191:607–11.
 31. La VD, Clavel B, Lepetz S, Aboudharam G, Raoult D, et al. Molecular detection of Bartonella henselae DNA in the dental pulp of 800-year-old French cats. *Clin Infect Dis.* 2004; 39:1391–4.
 32. Papagrigoarakis MJ, Yapijakis C, Synodinos PN, Baziotopoulou-Valavani E. DNA examination of ancient dental pulp incriminates typhoid fever as a probable cause of the Plague of Athens. *Int J Infect Dis* 2006; 10:206-14.
 33. Σταυριανός Χ. Οδοντιατροδικαστική: Συμβολή στη διαλεύκανση υποθέσεων: Βασικά στοιχεία, εξελεκτική πορεία, εφαρμογές. University Studio Press, Θεσσαλονίκη 2009.
 34. Kido A, Komatsu N, Ose Y, Oya M. alpha-L-fucosidase phenotyping in human tissues, dental pulps and hair roots. *Forensic Sci Int* 1987; 33:53-9.
 35. Kido A, Kimura Y, Oya M. Transferrin subtyping in dental pulps. *J Forensic Sci* 1993; 38:1063-7.
 36. Restagno G, Ferrone M, Doriguzzi C, Palmucci L, Mongini T, et al. Carrier detection of Duchenne muscular dystrophy through analysis of DNA from deciduous teeth of a dead affected child. *Prenat Diagn.* 1995; 15:672–4.
 37. Leonard H, Davis MR, Turbett GR, Laing NG, Bower C, et al. Effectiveness of posthumous molecular diagnosis from a kept baby tooth. *Lancet.* 2005 ; 366:1584.
 38. Woodward SR, King MJ, Chiu NM, Kuchar MJ, Griggs CW. Amplification of ancient nuclear DNA from teeth and soft tissues. *PCR Methods Appl.* 1994; 3:244–7.
 39. Calvo F, Ricaut F, Keyser C, et al. Etude de l'ADN ancien au niveau de la pulpe dentaire de la série ostéologique de Saint Côme et Damien. *Anthropo.* 2001; 1:21–9.
 40. Rudbeck L, Gilbert MT, Willerslev E, Hansen AJ, Lynnerup N, et al. mtDNA analysis of human remains from an early Danish Christian cemetery. *Am J Phys Anthropol.* 2005; 128:424–9.
 41. Zehnder M, Delaleu N, Yunling Du, Bickel M. Cytokines mRNA gene expression – part of host defence in pulpitis. *Cytokin* 2003; 22:84-5.
 42. Bödör C, Matolcsy A, Bernáth M. Elevated expression of Cu, Zn-SOD and Mn-SOD mRNA in inflamed dental pulp tissue. *Int Endod J* 2007; 40: 128-32.
 43. Kokkas AB, Goulas A, Varsamidis K, Mirtsou V, Tziafas D. Irreversible but not reversible pulpitis is associated with up-regulation of tumour necrosis factor-alpha gene expression in human pulp. *Int Endod J* 2007; 40: 198-203.
 44. Tranasi M, Sberna MT, Zizzari V, D'Apolito G, Mastrangelo F, Salini L, Stuppia L, Tetè S. Microarray evaluation of age-related changes in human dental pulp. *J Endod.* 2009; 35:1211-7.