



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ & ΠΡΟΝΟΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΜΠΣ ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΣΤΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Σύγχρονες τεχνολογίες ως εργαλείο για την εξατομικευμένη
ιατρική του μέλλοντος**

POSTGRADUATE THESIS

**Modern technologies as a tool for personalized
medicine of the future**



ΟΝΟΜΑΤΑ ΦΟΙΤΗΤΩΝ/NAMES OF STUDENTS

Λιουντμίλα Μορόζικ /Liudmila Marozik

ΟΝΟΜΑΤΑ ΕΙΣΗΓΗΤΗ κ. ΕΠΙΒΛΕΠΟΝΤΑ/NAMES OF SUPERVISORS

Πέτρος Καρκαλούσος/Petros Karkalousos

ΑΙΓΑΛΕΩ/AIGALEO 2019

Δήλωση λογοκλοπής

Δηλώνω ρητά ότι, σύμφωνα με το άρθρο 8 του Ν.1599/1986, η παρούσα εργασία αποτελεί αποκλειστικά προϊόν προσωπικής μου εργασίας, δεν προσβάλλει κάθε μορφής δικαιώματα διανοητικής ιδιοκτησίας, προσωπικότητας και προσωπικών δεδομένων τρίτων, δεν περιέχει έργα/εισφορές τρίτων για τα οποία απαιτείται άδεια των δημιουργών/δικαιούχων και δεν είναι προϊόν μερικής ή ολικής αντιγραφής, οι πηγές δε που χρησιμοποιήθηκαν περιορίζονται στις βιβλιογραφικές αναφορές και μόνον και πληρούν τους κανόνες της επιστημονικής παράθεσης.

Λιουντμίλα Μορόζικ

Ευχαριστίες

Η ολοκλήρωση αυτής της διπλωματικής υλοποιήθηκε με την υποστήριξη ενός αριθμού ανθρώπων στους οποίους θα ήθελα να εκφράσω τις θερμότερες ευχαριστίες μου.

Ευχαριστώ ιδιαιτέρως τον καθηγητή μου τον Δρ. Καρκαλούσο Πέτρο, επίκουρο καθηγητή Κλινικής Χημείας και Μεθόδων Ελέγχου Ποιότητας του Πανεπιστήμιου Δυτικής Αττικής, ο οποίος με εμπιστεύτηκε, αναθέτοντάς μου την παρούσα διπλωματική εργασία και με καθοδήγησε καθ' όλη τη διάρκεια της συγγραφής της. Επίσης, ένα θερμό ευχαριστώ στον Αναπληρωτή Καθηγητή του Διεθνούς Κρατικού Πανεπιστημίου Οικολογίας στη Λευκορωσία, επιστημονικό συνεργάτη στο Πανεπιστήμιο Γενετικής και Κυτταρολογίας της Εθνικής Ακαδημίας Επιστημών στη Λευκορωσίας, Marozik Pavel, στην Επιστημονική Συνεργάτιδα Εθνικής Επιτροπής Βιοηθικής, Βασιλική Μολλάκη για την πολύτιμη βοήθεια τους στην εύρεση σχετικών πληροφοριών και την καθοδήγησή τους καθ' όλη την περίοδο προετοιμασίας της διπλωματικής μου εργασίας.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου για τη στήριξη, τη συμπαράσταση και την προσφορά της, όχι μόνο κατά το διάστημα πραγματοποίησης της παρούσας εργασίας, αλλά σε κάθε νέα μου προσπάθεια.

Περίληψη

Η ιατρική τεχνολογία αναπτύσσεται καθημερινά και παράλληλα με τις εξελίξεις σε όλους τους επιστημονικούς και τεχνολογικούς κλάδους. Ως εκ τούτου, προσφέρει διαρκώς νέα εργαλεία και εφαρμογές στην κλινική και εργαστηριακή ιατρική πράξη προς όφελος του ασθενούς πρωτίστως και προς διευκόλυνση του ιατρικού έργου. Η αποκρυπτογράφηση της πρωταρχικής αλληλουχίας του DNA και η ταυτοποίηση χιλιάδων γονιδίων με ακόλουθη κατανόηση της δομικής και λειτουργικής οργάνωσης του ανθρώπινου γονιδιώματος έχουν ανοίξει δρόμους για νέες ευκαιρίες στην ανακάλυψη αιτιολογίας εμφάνισης και της παθογένεσης των μονογονιδιακών και πολυπαραγοντικών ασθενειών. Με τη βελτίωση των μοριακών γενετικών μεθόδων η ιατρική τείνει να γίνεται όλο και περισσότερο «γονιδιωματική». Ένας από τους πιο σημαντικούς τομείς της σύγχρονης μοριακής ιατρικής είναι η προγνωστική ιατρική που ασχολείται με τον προσδιορισμό και την ανάλυση των παραγόντων γενετικού κινδύνου, οι οποίοι προδιαθέτουν στην ανάπτυξη των πιο κοινών πολυπαραγοντικών ασθενειών (MFD), δηλαδή το 90% της ανθρώπινης παθολογίας. Τα καθήκοντα της προγνωστικής ιατρικής περιλαμβάνουν την αναγνώριση των «γονιδιακών δικτύων», ειδικών για κάθε MFD, τις μελέτες των διαγονιδιακών αλληλεπιδράσεων και των αλληλεπιδράσεων γονιδίου-περιβάλλοντος και την ανάπτυξη ενός συνόλου προληπτικών και θεραπευτικών μέτρων, ατομικών για κάθε ασθενή. Οι παραπάνω προσεγγίσεις με τη σειρά τους αποτελούν στρατηγική βάση για την ταχέως αναπτυσσόμενη κατεύθυνση, εξατομικευμένη ιατρική ή πλέον «Ιατρική Ακρίβειας». Σε αυτή την κατεύθυνση διεξάγονται εκατοντάδες χιλιάδες μελέτες που σχετίζονται με την πλειοψηφία όλων των γνωστών ανθρώπινων ασθενειών.

Στην παρούσα εργασία αναφέρεται μια συνοπτική βιβλιογραφική ανασκόπηση ορισμένων καινοτόμων ιατροτεχνολογικών επιτευγμάτων προγνωστικής ιατρικής, τα οποία επέφεραν ή θα επιφέρουν μεγάλες αλλαγές στην ιατρική επιστήμη.

Abstract

Medical technology is being developed on a daily basis and in parallel with developments in all scientific and technological disciplines. Therefore, it continuously offers new tools and applications in clinical and laboratory medical practice for the benefit of the patient primarily and to facilitate medical work. Deciphering the primary DNA sequence and identifying thousands of genes with a subsequent understanding of the structural and functional organization of the human genome have opened up new opportunities for discovering the etiology and pathogenesis of monogenic and multifactorial diseases. By improving molecular genetic methods, medicine tends to become more and more "genomic". One of the most important areas of modern molecular medicine is predictive medicine that deals with the identification and analysis of genetic risk factors that predispose to the development of the most common multifactorial diseases (MFD), that is 90% of human pathology. The tasks of predictive medicine include the identification of "gene networks" specific for each MFD, studies of transgenic interactions and gene-environment interactions, and the development of a set of preventive and therapeutic measures, individual for each patient. The above approaches are, in turn, a strategic basis for the rapidly growing direction, personalized medicine or «Precision medicine». In this direction, hundreds of thousands of studies are conducted that relate to the majority of all known human diseases.

In this work, a brief bibliographic review of some innovative medical advances in predictive medicine, which has brought about or will bring about major changes in medical science, are presented.

Περιεχόμενα

.....	
Περίληψη	vi
Abstract.....	viii
Περιεχόμενα.....	ix
Συντομογραφίες.....	xii
Εισαγωγή	14
Κεφάλαιο 1. Ανθρώπινο γονιδίωμα και γενετικός πολυμορφισμός.....	20
1.1. Βασικά αποτελέσματα του Προγράμματος Ανθρώπινου Γονιδιώματος	22
1.2. Ανθρώπινο γονιδίωμα και άλλες κατευθύνσεις της γονιδιωματικής	26
1.2.1. Συγκριτική γονιδιωματική.....	27
1.2.2. Λειτουργική γονιδιωματική.....	28
1.2.3. Γενετικός πολυμορφισμός	31
1.3. Διεθνές Πρόγραμμα Χαρτογράφησης Απλοτύπων (HapMap Project)	35
1.4. Νέα προγράμματα μελέτης του ανθρώπινου γονιδιώματος.....	37
1.5. Ανθρώπινο γονιδίωμα και μοριακή ιατρική.....	38
Κεφάλαιο 2. Γονίδια, μεταλλάξεις, νοσήματα	40
2.1. Τι είναι το γονίδιο; Πόσα και τι γονίδια υπάρχουν;.....	40
2.2. Μεταλλάξεις και γενετικός πολυμορφισμός	44
2.2.1. Ταξινόμηση των μεταλλάξεων	46
2.3. Γενετικό φορτίο.....	49
2.4. Γονίδια και νοσήματα	51
Κεφάλαιο 3. Γονιδιακά δίκτυα και γονίδια προδιάθεσης	54
3.1. Στρατηγική αναζήτησης των γονιδίων προδιάθεσης	61
Κεφάλαιο 4. Μέθοδοι μελέτης γενετικών πολυμορφισμών.....	66

4.1. Βασικές μέθοδοι ανίχνευσης μεταλλάξεων	67
4.2. Αρχική ταυτοποίηση μεταλλάξεων (τεχνικές για screening)	71
4.3. Ταυτοποίηση γνωστών μεταλλάξεων	73
4.3.1. Μέθοδος κατευθυνόμενης μεταλλαξιγένεσης με PCR.....	74
4.3.2. Σύστημα ανίχνευσης μεταλλάξεων ανθεκτικών στην ενίσχυση	74
4.3.3. Πρόσδεση συνθετικών ολιγονουκλεοτιδικών ανιχνευτών (OLA)	75
4.3.4. Αλληλοειδικός ολιγονουκλεοτιδικός υβριδισμός (ASO)	76
4.3.5. PCR πραγματικού χρόνου (Real-Time PCR)	76
4.4. Νέες τεχνικές ανίχνευσης μεταλλάξεων και γενετικών πολυμορφισμών	78
4.4.1. Μέθοδος DHPLC	78
4.4.2. Μέθοδοι μικροσυστοιχίων	80
4.4.3. Μαζική φασματομετρία	89
4.4.4. Τεχνολογία X-map	90
4.4.5. Αλληλούχιση επόμενης γενιάς (NGS).....	92
Κεφάλαιο 5. Γενετικό προφίλ	99
5.1. Γενετικοί έλεγχοι.....	99
5.2. Γενετικό προφίλ ως ιατρικό εργαλείο του μέλλοντος.....	106
Κεφάλαιο 6. Προδιαθεσιακοί γονιδιακοί έλεγχοι για πολυπαραγοντικά νοσήματα.....	116
6.1. Αξιοπιστία στη συσχέτιση γονότυπος-φαινότυπος.....	117
6.2. Αξιολόγηση των αποτελεσμάτων γενετικών ελέγχων.....	121
6.3. Συστάσεις σχετικά με τα αποτελέσματα των γενετικών ελέγχων	126
Κεφάλαιο 7. Σύνθετα ηθικά και νομικά ζητήματα των γενετικών δοκιμασιών	129
Συμπέρασμα-Συζήτηση	137
Αναφορές.....	142

Συντομογραφίες

ACE Angiotensin-Converting Enzyme	Ένζυμο μετατροπής της αγγειοτενσίνης
APEX (arrayed primer extension)	Προστεθείσα επέκταση των εκκινητή
ASO - Allele-Specific Oligonucleotide	Αλληλοειδικός ολιγονουκλεοτιδικός υβριδισμός
ARMS Amplification Refractory Mutation System	Σύστημα ανίχνευσης μεταλλάξεων ανθεκτικών στην ενίσχυση
DHPLC Denaturation High Performance Liquid Chromatography	Αποδιατακτική υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης
DGGE Denaturing Gradient Gel Electrophoresis	Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα με αποδιατακτική βαθμίδωση
GWAS - Genome Wide Association Studies	Μελέτη συσχέτισης ολόκληρου του γονιδιώματος
RR (Relative Risk)	Σχετικός κίνδυνος
CMC Chemical Mismatch Cleavage)	Μέθοδος χημικής διάσπασης των μη συμπληρωματικών θέσεων
HA - Heteroduplex Analysis	Μέθοδος ανάλυσης ετερόδιπλων
MPS (Massive Parallel Sequencing)	μαζική παράλληλη αλληλούχιση
NGS (Next Generation Sequencing)	Αλληλούχιση Επόμενης Γενιάς
OLA oligonucleotide ligation assay	Πρόσδεση συνθετικών ολιγονουκλεοτιδικών ανιχνευτών
WGS (Whole Genome Sequencing)	
PTT (Protein Truncated Test)	Μέθοδος ανάλυσης «ελαττωματικής» πρωτεΐνης
PCR DS (Direct Sequencing)	PCR άμεσης αλληλούχισης
PCR	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης
SSCP Single Strand Conformation Polymorphism)	Μέθοδος διαμόρφωσης πολυμορφισμού μονής έλικας DNA
SBE (single base primer extension)	Μέθοδος επέκτασης του εκκινητή για μία βάση
SPR (Resonance Plasmon Surface)	Μέθοδος συντονισμού επιφανειακών πλάσμων
DNA (Deoxyribonucleic acid)	Δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ
dNTPs	Deoxynucleotide triphosphates
cDNA (complementary DNA)	Συμπληρωματικό DNA
mtDNA (Mitochondrial DNA)	Μιτοχονδριακό DNA
RNA (Ribonucleic acid)	Ριβονουκλεϊκό οξύ
mRNA (Messenger RNA)	Αγγελιαφόρο RNA
rRNA (Ribosomal RNA)	Ριβοσωμικό RNA
snRNA (small nuclear ribonucleic acid)	Μικρό πυρηνικό RNA
miRNA (microRNA))	Μικρό μη κωδικοποιητικό RNA
dsRNA(Double-strand RNA)	Δίκλωνο RNA
siRNA (Small interfering RNA)	Μικρό παρεμβαλλόμενο RNA

SNP (Single Nucleotide Polymorphism)	Υποκατάσταση ενός νουκλεοτιδίου
tagSNPs	SNPs σήμανσης
STR (Short Tandem Repeats)	Βραχείς εν σειρά επαναλήψεις
CNV (Copy Number Variation)	Πολυμορφισμός αριθμού αντιγράφων
VNTR (Variable Number Tandem Repeats)	Πολυμορφισμός ποικίλου αριθμού εν σειρά επαναλήψεων
HLA (Human leukocyte antigen)	Βασικό αντιγόνο του συστήματος ιστοσυμβατότητας
MFD	Πολυπαραγοντικές ασθένειες
b.p	Ζεύγη βάσεων
EBI	Ευρωπαϊκό Ινστιτούτο Βιοπληροφορικής
NCBI	Εθνικό Κέντρο Βιοτεχνολογικής πληροφορίας
NIH (National Institutes of Health)	Εθνική Σχολή Υγείας
NIHGR	National Institute of Human Genome Research
OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man)	Μεντελική Κληρονομικότητα του Ανθρώπου στο Διαδίκτυο
TIGR	Ινστιτούτο Γονιδιωματικών Μελετών
SZO RAMS (Russian Academy of Medical Sciences)	Ινστιτούτο Μαιευτικής και Γυναικολογίας Ρωσικής Ακαδημίας Ιατρικών Επιστημών
GMRH (Genetic Map of Reproductive Health)	Γενετικός χάρτης της αναπαραγωγικής υγείας
HapMap Project - Haploid Map	Πρόγραμμα Χαρτογράφησης Απλοτύπων
«ENCODE»	Εγκυκλοπαίδεια των στοιχείων DNA
G / C (guanine-cytosine content)	Περιεκτικότητα σε γουανίνη-κυτοσίνη
GT (Genetic test)	Γενετικός έλεγχος ή γενετικό τεστ
GA (Genetic assay)	Γενετική ανάλυση
FT (Transcription factors)	Μεταγραφικός παράγοντας
SF1	Steroidogenic factor 1
α -MEA	Ενζύμου μετατροπής αγγειοτενσίνης
ΓΠ	Γενετικός πολυμορφισμός
ΠΟΥ	Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας
ΚΝ	Κληρονομικά νοσήματα
ΠΘ	Πολυμορφικές θέσεις

Εισαγωγή

Η έννοια της εξατομικευμένης ιατρικής, παρότι έχει αποκτήσει έδαφος στην επιστημονική κοινότητα κυρίως τα τελευταία χρόνια με τις ραγδαίες τεχνολογικές εξελίξεις, είναι μια έννοια που χρονολογείται εκατοντάδες ή και χιλιάδες χρόνια πριν. Συγκεκριμένα ο Ιπποκράτης, πατέρας της ιατρικής, αναφέρθηκε στην «ατομικότητα» της ασθένειας λέγοντας: «Είναι πολύ πιο σημαντικό να γνωρίζουμε το άτομο το οποίο πάσχει από μια ασθένεια, παρά την ασθένεια από την οποία πάσχει ένα άτομο».

Στα πλαίσια ενός ευρύτερου ορισμού όμως, ο κλάδος της εξατομικευμένης ιατρικής περιλαμβάνει την εφαρμογή του συνόλου της ιατρικής πράξης από την πρόληψη έως την θεραπεία έχοντας ως κέντρο τον κάθε ασθενή χωριστά.

Στο 19^ο αιώνα, ακόμα και οι «κλασικοί» ιατροί επιστήμονες της Ρωσίας έδιναν μεγάλη σημασία στη πρόληψη: ο Matvei Mudron θεωρούσε ότι *«το μέλλον ανήκει στην προληπτική ιατρική»* [1], ο Nikolay Pirogov υποστήριζε ότι *«η νόσος είναι ευκολότερο να αποφευχθεί παρά να θεραπευθεί»* [2]. Ωστόσο, λόγω έλλειψης της γνώσης του μοριακού χαρακτήρα της ανθρώπινης κληρονομικότητας, η επιτυχία της πρόληψης των συχνών **πολυπαραγοντικών ασθενειών (MFD)** που προκαλούνται από τη δράση των αρνητικών περιβαλλοντικών παραγόντων στο πλαίσιο ενός κληρονομικά εξασθενημένου γονότυπου [3] ήταν συχνά εμπειρική, χωρίς αυστηρά επιστημονική βάση. Η αποκωδικοποίηση του ανθρώπινου γονιδιώματος, η οποία έλαβε χώρα τον Απρίλιο του 2003 ως αποτέλεσμα της επιτυχούς ολοκλήρωσης του Διεθνούς Επιστημονικού Προγράμματος «Ανθρώπινο Γονιδίωμα», σηματοδότησε την αρχή μιας νέας εποχής - εποχής της **εξατομικευμένης (μοριακής) ιατρικής** και της **προγνωστικής ιατρικής που είναι η θυγατρική κατεύθυνση της προληπτικής**.

Η σύγχρονη προγνωστική ιατρική ξεκίνησε να εφαρμόζεται πραγματικά μόνο το 1980. Η εμφάνισή της συνδέεται με το όνομα του Γάλλου επιστήμονα, Jean Dausset, που έλαβε το βραβείου Νόμπελ για την ανακάλυψη των κύριων τύπων HLA (αντιγόνα ιστοσυμβατότητας του ανθρώπου). Ο Jean Dausset ήταν πεπεισμένος ότι *«για να αποφευχθεί μια ασθένεια, πρέπει πρώτα να προγνωστεί»*, συνεπώς και πρότεινε τον όρο **«προγνωστική» ιατρική** [4]. Η ανάλυση των αντιγόνων, και στη συνέχεια των γονιδίων ιστοσυμβατότητας, δεν επέτρεψε μόνο να πραγματοποιηθεί η επαρκής επιλογή των ιστών από τον

δότη και δέκτη, αλλά επίσης σε κάποιο βαθμό, να υποδηλωθεί η προδιάθεση ενός ατόμου σε ορισμένες ασθένειες. Ο προγνωστικός ρόλος των τεστ HLA ήταν αρκετά μικρός. Τα ισχυρότερα επιχειρήματα υπέρ της προγνωστικής ιατρικής εμφανίστηκαν στη διαδικασία αποκωδικοποίησης του ανθρώπινου γονιδιώματος. Οι ιατρικές προοπτικές της **«προγνωστικής γενετικής δοκιμασίας»** (predictive genetic testing) έχουν επανειλημμένα τονιστεί από τον Francis Collins, διευθυντή του NIH (National Institutes of Health) και ιδρυτή του διεθνούς προγράμματος «Ανθρώπινο Γονιδίωμα», ο οποίος είπε : *«...το ιατρικό κοινό αντιμετωπίζει μια οξεία έλλειψη στην ανάπτυξη των πόρων και των μεθόδων της προγνωστικής ιατρικής ... »*. Στην ρωσική βιβλιογραφία, ο όρος **«προγνωστική ιατρική»** έχει χρησιμοποιηθεί από τα μέσα της δεκαετίας του 1990 [5, 6]. Οι κυριότερες διατάξεις της διατυπώθηκαν, συνοψίστηκαν και δημοσιεύθηκαν στη μονογραφία «The human genome and the genes of predisposition”: introduction to Predictive Medicine», που δημοσιεύθηκε το 2000 [7]. Η σύγχρονη προγνωστική ιατρική επιλύει τα προβλήματα διάγνωσης, πρόληψης και θεραπείας στο επίπεδο των νουκλεϊνικών οξέων (DNA, RNA) και των προϊόντων τους (πρωτεΐνες, ένζυμα). Τα κύρια διακριτικά χαρακτηριστικά της είναι ο μοναδικός χαρακτήρας και ο προληπτικός προσανατολισμός. Η προγνωστική ιατρική δεν μπορεί να μη είναι εξατομικευμένη, αφού το γονιδίωμα κάθε ατόμου είναι μοναδικό. Τα σχετικά δεδομένα για τα μεμονωμένα χαρακτηριστικά του γονιδιώματος μπορούν να ληφθούν σε οποιοδήποτε στάδιο ανάπτυξης του οργανισμού, πολύ πριν από την εκδήλωση της νόσου. Αυτό ανοίγει ευρείες ευκαιρίες για την προσυμπτωματική διάγνωση μιας κληρονομικής προδιάθεσης μιας ασθένειας και την πρόωρη πρόληψή της.

Η εξατομικευμένη ιατρική αναπτύσσεται παράλληλα με την αποκωδικοποίηση του ανθρώπινου γονιδιώματος. Μέχρι τον Απρίλιο του 2003, όταν ανακοινώθηκε επίσημα η επιτυχής ολοκλήρωση του Διεθνούς Προγράμματος Ανθρώπινου Γονιδιώματος, είχαν εντοπιστεί σχεδόν όλα τα γονίδια, οι μεταλλάξεις των οποίων οδηγούν σε **μονογονιδιακά** νοσήματα, έχουν χαρακτηριστεί τα φάσματα των μεταλλάξεων, εντοπίστηκαν οι μείζονες μεταλλάξεις των αντίστοιχων γονιδίων, αναπτύχθηκαν οι βέλτιστες μέθοδοι και οι αλγόριθμοι της μοριακής διάγνωσης [8].

Ιδιαίτερα εντυπωσιακές είναι οι πρόσφατες εξελίξεις στην γενετική που αφορούν τις μελέτες των **πολυπαραγοντικών γενετικών νοσημάτων** (MFD) και συγκεκριμένα οι μελέτες της φύσης και των φαινοτυπικών εκδηλώσεων του γενετικού πολυμορφισμού ως

μεμονωμένα χαρακτηριστικά της δομής του γονιδιώματος κάθε ατόμου. Είναι γνωστό ότι η αλληλούχηση των γονιδιωμάτων από εκπροσώπους διαφορετικών φυλών και εθνικών ομάδων αποκάλυψε μια εκπληκτική ομοιότητα της αρχικής δομής του DNA τους. Τα γονιδιώματα όλων των ανθρώπων αποδείχθηκαν σχεδόν 99,9% ταυτόσημα στη σύνθεση των νουκλεοτιδίων τους! Η μεταβολή του αριθμού και της κατανομής των επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών του DNA στα χρωμοσώματα και κυρίως των **υποκαταστάσεων ενός νουκλεοτιδίου (SNPs)** που εμφανίζονται περίπου στα 290 bp (ζεύγη βάσεων), αποτελούν τη **βάση της ποικιλομορφίας**. Ο αριθμός των ήδη αναγνωρισμένων SNPs αυξάνεται διαρκώς: από 4 εκατομμύρια το 2003 σε σχεδόν 9 εκατομμύρια το 2007. Οι πολυμορφικές θέσεις, ειδικά τα SNPs, εντοπίζονται συχνά σε σημασιολογικά τμήματα γονιδίων (**εξόνια**) που αλλάζουν τον γενετικό κώδικα, οδηγώντας στην αντικατάσταση των αντίστοιχων αμινοξέων στα πεπτίδια. Τα αποτελέσματα αυτού του γενετικού πολυμορφισμού είναι η παραγωγή πρωτεϊνών (ενζύμων) με διαφορετική λειτουργικότητα. Εξερευνώντας τη μοριακή δομή των πολυμορφικών τόπων, συμπεριλαμβανομένων των SNPs, λαμβάνονται οι σχετικές πληροφορίες για τα μοναδικά μοριακά χαρακτηριστικά κάθε ατόμου. **Ο γενετικός πολυμορφισμός είναι η βάση της ατομικής μεταβλητότητας, της βιοχημικής μοναδικότητας κάθε ατόμου καθώς και η αιτία των μεμονωμένων διαφορών στη προδιάθεση του για πολυπαραγοντικές ασθένειες.**

Ένα άλλο στοιχείο της σύγχρονης προγνωστικής ιατρικής είναι η **βιοπληροφορική**, η οποία κατέστησε δυνατή την αναγνώριση των γονιδιακών δικτύων του φυσιολογικού και παθολογικού μεταβολισμού. **Ένα γονιδιακό δίκτυο είναι μια ομάδα συντονισμένα εκφραζόμενων γονιδίων και των προϊόντων τους που ελέγχουν τις ορισμένες λειτουργίες του σώματος καθώς και τη διαδικασία μορφογένεσης [9].** Σημαντικό ρόλο στην πρόοδο της εξατομικευμένης ιατρικής διαδραμάτισε η ενσωμάτωση των γονιδιακών δικτύων, η φυσιολογία της μορφογένεσης, οι πολλαπλές μορφές MFD, ο προσδιορισμός των γονιδίων που αποτελούν αυτά τα δίκτυα και η ανάλυση του πολυμορφισμού τους. Από αυτή την άποψη η ιδέα της εντόπισης των **γονιδίων προδιάθεσης** αποδείχθηκε ιδιαίτερα γόνιμη. Η ανάπτυξη της οποιασδήποτε παθολογικής διεργασίας των πολυπαραγοντικών γενετικών νοσημάτων δεν καθορίζεται από ολόκληρο το γονιδίωμα, ή ακόμη και από όλα τα γονίδια ενός ξεχωριστού γονιδιακού δικτύου, αλλά μόνο **από τα γονίδια προδιάθεσης.**

Οι αλληλόμορφες παραλλαγές αυτών των γονιδίων είναι αρκετά συμβατές με την μεταγεννητική ανάπτυξη, αλλά υπό ορισμένες δυσμενείς συνθήκες μπορούν να συμβάλλουν στην ανάπτυξη μίας συγκεκριμένης ασθένειας. Οι αναλύσεις του πολυμορφισμού (αλληλόμορφες παραλλαγές) στα γονίδια προδιάθεσης είναι η μεθοδολογική βάση της εξατομικευμένης ιατρικής. Τα τυπικά γονίδια προδιάθεσης είναι τα γονίδια αποτοξίνωσης, πήξης αίματος, ενδοθηλιακής λειτουργίας, μεταβολισμού λιπιδίων, ανοσίας, οστεογένεσης, κλπ.

Λαμβάνοντας υπόψη τον ταχέως αυξανόμενο αριθμό των ήδη αναγνωρισμένων γονιδιακών δεικτών που σχετίζονται με τις διάφορες ασθένειες, όπως επίσης και την μεγάλη κλίμακα δοκιμών στην ανθρώπινη γενετική και στη μοριακή ιατρική, ιδιαίτερη σημασία έχει η ανάπτυξη και εισαγωγή νέων, ακριβών και εξαιρετικά αποτελεσματικών μεθόδων για την αναγνώριση των γονιδιακών δεικτών και την ανάλυση του πολυμορφισμού τους.

Οι πλέον γνωστοί γονιδιακοί δείκτες και οι λειτουργικά σημαντικές αλληλόμορφες παραλλαγές τους που παρέχουν τις μεταβολικές διεργασίες του σώματος (αποτοξίνωση των ξενοβιοτικών, μεταβολισμός λιπιδίων, ενεργειακός μεταβολισμός, ανοσοαπόκριση, φλεγμονώδεις αντιδράσεις κλπ.) ταξινομούνται σε ομάδες γονιδιακών δικτύων για διάφορα πολυπαραγοντικά νοσήματα (MFD).

Η λογική συνέπεια της μελέτης των γονιδιακών δεικτών είναι η δημιουργία μεμονωμένων βάσεων δεδομένων DNA (βιβλιοθήκες). Όσο περισσότερο αναλύονται τα αλληλόμορφα των γονιδίων προδιάθεσης, τόσο αυξάνεται και η πληροφορική αξία των παραπάνω βιβλιοθηκών.

Συνοψίζοντας τα σημαντικότερα επιτεύγματα της εξατομικευμένης ιατρικής των τελευταίων ετών, σημειώνεται ότι η κατεύθυνση αυτή βρίσκεται ακόμη στο στάδιο της ενεργούς συσσώρευσης πληροφοριών. Η χρησιμότητα των προ-συμπτωματικών γενετικών αναλύσεων εξακολουθεί να περιμένει την κλινική επιβεβαίωση των μακροπρόθεσμων αποτελεσμάτων. Μέχρι τώρα όλες οι μελέτες στη συντριπτική τους πλειοψηφία περιορίζονται στη σύγκριση των αλληλικών συχνοτήτων των γονιδίων προδιάθεσης σε ασθενείς και σε υγιείς δότες. Οι δυσκολίες στην αξιολόγηση των αποτελεσμάτων και ιδιαίτερα στην κλινική τους ερμηνεία, δημιουργούνται από:

- ✓ μη αντιπροσωπευτικά δείγματα ασθενών,

- ✓ μη επαρκώς επιλεγμένες περιπτώσεις για έλεγχο,
- ✓ έντονες πληθυσμιακές διαφορές στις συχνότητες των αλληλόμορφων πολυμορφικών δεικτών που μελετήθηκαν,
- ✓ έλλειψη της γενικευμένης μετά-ανάλυσης για τη μεγάλη πλειοψηφία των γονιδίων που μελετήθηκαν.

Δυστυχώς, οι προοπτικές μελέτες μεγάλης κλίμακας που αποδεικνύουν την πρακτική σημασία των προγνωστικών γενετικών δοκιμών δεν είναι ακόμη διαθέσιμες. Παρ' όλα αυτά, η εμπειρία αποκτάται γρήγορα και εμπνέει εμπιστοσύνη στην ορθότητα αυτής της προσέγγισης. Η ταχεία πρόοδος σε αυτόν τον τομέα αναμένεται από τη ευρεία εισαγωγή της τεχνολογίας ελέγχου γονιδιακών συσχετισμών (GWAS), η οποία συγκρίνει τα γονιδιωματικά προφίλ των ασθενών με υγιή άτομα ταυτόχρονα από πολλές χιλιάδες πολυμορφικές περιοχές και ταυτοποιεί με βεβαιότητα τους κύριους γονιδιακούς δείκτες. Δεν υπάρχει αμφιβολία ότι το μέλλον ανήκει στην εξατομικευμένη ιατρική που περιλαμβάνει την έγκαιρη διάγνωση, την πρωτογενή πρόληψη και θεραπεία πολλών ασθενειών. Δεν αμφισβητείται επίσης και η αποφασιστική συμβολή της στην επίλυση πολλών σημαντικών προβλημάτων της σύγχρονης ιατρικής όπως στη φαρμακευτική θεραπεία (φαρμακογενετική, φαρμακογονιδιωματική), στη πρόληψη των συχνών πολυπαραγοντικών νοσημάτων (καρδιογενετική, ογκογονιδιωματική, οστεογονιδιωματική κλπ.), στη γήρανση και ενεργητική μακροζωία (gerontogenomics, nutrigenomics, dermatogenomics, κ.λπ.). Είναι άξια προσοχής και πλήρους υποστήριξης η ιδέα του γενετικού προφίλ (**Genetic Passport**), η εισαγωγή του οποίου απαιτεί σημαντική κοινωνική και νομική προετοιμασία. Εν τέλει η επιτυχία της εξατομικευμένης ιατρικής εξαρτάται εξ ολοκλήρου από τη εισαγωγή των επιτευγμάτων της γενετικής στην πρακτική δημόσιας υγείας και από τη στενή συνεργασία των γενετιστών και των ιατρών άλλων ειδικοτήτων. Ήδη σήμερα, είναι πιο εμφανή τα πραγματικά περιγράμματα της μελλοντικής **συνδυαστικής ιατρικής**, που βασίζονται στη γνώση του ατομικού ανθρώπινου γονιδιώματος και στην κατανόηση των χαρακτηριστικών αλληλεπιδράσεων του με τους διάφορους επιβλαβείς παράγοντες, συμπεριλαμβανομένων των περιβαλλοντικών. Σύμφωνα με ορισμένους αξιόπιστους δυτικούς επιστήμονες (Leroy Hood, ΗΠΑ), η ιατρική του 21^{ου} αιώνα θα είναι **προγνωστική (predictive), προληπτική (preventive), εξατομικευμένη (personalized) και συμμετοχική (participatory)**, την αποκαλούμενη «**4P Medicine**» [10].

Το 2016 προτάθηκε ένας άλλος όρος για την ιατρική του μέλλοντος, η «**Ιατρική ακρίβειας**» (**precision**) [11] μια ολιστική προσέγγιση, η οποία περιλαμβάνει την ανάπτυξη των εξατομικευμένων διαγνωστικών και θεραπευτικών εργαλείων, βασισμένων στη γονιδιωματική, πρωτεϊνωματική και άλλα «omics», στα τεστ προδιάθεσης για ασθένειες, στη πρόληψη, στο συνδυασμό διάγνωσης με θεραπεία καθώς στη παρακολούθησή της. Έτσι, μπορεί να ειπωθεί ότι η ιατρική του 21^{ου} αιώνα πλέον είναι η ιατρική «P5». Το αριθμητικά αυξανόμενο «P» προσεγγίζεται από πολλούς διαφορετικούς κλάδους, διατηρώντας στα υπόψιν και την «**Προστασία**» (Protection), δηλαδή την επικαλούμενη ανάγκη να προστατευθεί ο ασθενής και να απολαμβάνει ισότητα στη διανομή πόρων έχοντας ελεύθερη πρόσβαση σε εξατομικευμένη ιατρική [12, 13].

Η ιατρική «5P» δεν αποτελεί ξεχωριστό κλάδο της ιατρικής, πρώτα απ'όλα είναι μια νέα αντίληψη στο επίκεντρο της οποίας υπάρχει μια εξατομικευμένη προσέγγιση του ασθενή. Ο στόχος της είναι η προ κλινική ανίχνευση των ασθενειών και η ανάπτυξη των προληπτικών μέτρων. Με άλλα λόγια, εάν η ιατρική, με την παραδοσιακή της έννοια, ασχολείται με τις εκδηλώσεις των νόσων (μολυσματικών, χρόνιων κ.α.), η «5P» ιατρική στοχεύει στον εντοπισμό των παραγόντων κινδύνου, στον προσδιορισμό της προδιάθεσης του ασθενούς σε ορισμένες ασθένειες και στην πρόληψή τους.

Το να μάθει ένας άνθρωπος να ζει σε αρμονία με τα γονίδια του είναι το πρώτο στάδιο της πρακτικής εφαρμογής της προγνωστικής ιατρικής, ο κύριος στρατηγικός στόχος της οποίας είναι να εξασφαλίσει την αποδοτικότερη χρήση της γονιδιωματικής για την ανθρώπινη υγεία.

Κεφάλαιο 1. Ανθρώπινο γονιδίωμα και γενετικός πολυμορφισμός

Ο όρος «γονιδίωμα» εμφανίστηκε το 1920 και προτάθηκε αρχικά από τον Γερμανό επιστήμονα Hans Winkler για τον προσδιορισμό των απλοειδών αλληλόμορφων χρωμοσωμάτων. Σήμερα, ο όρος χρησιμοποιείται ευρέως και αναφέρεται σε ολόκληρο το κληρονομικό υλικό ενός κυττάρου, δηλαδή περιλαμβάνει τις κωδικοποιημένες και μη κωδικοποιημένες περιοχές του DNA. Έτσι, το γονιδίωμα είναι μια κληρονομική κυτταρική συσκευή που περιέχει το σύνολο πληροφοριών, απαραίτητων για την ανάπτυξη του οργανισμού, την ύπαρξή του σε ορισμένες περιβαλλοντικές συνθήκες, την εξέλιξη και τη μετάδοση όλων των κληρονομικών ιδιοτήτων σε αρκετές γενιές. Η επιστήμη που μελετά τη μοριακή δομή και τις λειτουργίες των γονιδιωμάτων στους ζωντανούς οργανισμούς ονομάζεται **Γονιδιωματική** και διαφοροποιείται ως όρος από τη **Γενετική** που μελετά τις ιδιότητες μεμονωμένων γονιδίων ή ομάδων γονιδίων. Η βάση του ανθρώπινου γονιδιώματος είναι το μόριο DNA, το περίφημο «νήμα της ζωής». Η δομή της διπλής έλικας ήταν επιστημονικά τεκμηριωμένη στο έργο των βραβευθέντων με Νόμπελ James Watson και Francis Crick από το 1953. Η έλικα αποτελείται από 4 ζεύγη βάσεων (νουκλεοτίδια): δύο πουρίνες (αδενίνη, γουανίνη) και δύο πυριμιδίνες (θυμίνη, κυτοσίνη), διασυνδεδεμένες μεταξύ τους με τη δεοξυριβόζη και τα υπολείμματα του φωσφορικού οξέος σε μακρά χορδή. Στο σχηματισμό της διπλής έλικας, οι αμφότεροι DNA κλώνοι αλληλοσυνδέονται μεταξύ των νουκλεοτιδίων με τους δεσμούς υδρογόνου, έτσι ώστε η αδενίνη να συνδέεται πάντοτε με θυμίνη και η γουανίνη με κυτοσίνη. Η αναλογία των πουρινών (αδενίνη και γουανίνη) και των πυριμιδινών (θυμίνη και κυτοσίνη) στο μόριο του DNA είναι πάντοτε ίδια και ισούται με 1.

Σε αυτό το μοτίβο, ακόμη και πριν την ανακάλυψη της διπλής έλικας DNA, έδωσε την προσοχή του ο Αμερικανός επιστήμονας Erwin Chargaff (ο λεγόμενος κανόνας Chargaff). Αργότερα αποδείχθηκε, ότι σε αυτή τη εναλλαγή των ζευγών βάσεων στο μόριο DNA στηρίζεται ο γενετικός κώδικας, προκειμένου να σχηματιστούν όλες οι πρωτεΐνες του σώματος από τα 20 διαφορετικά βασικά αμινοξέα. Ο γενετικός κώδικας είναι τριών γραμμάτων, δηλαδή, κάθε αμινοξύ έχει τα δικά του τρία νουκλεοτίδια, τη δική του **τριπλέτα (κώδικας τριπλέτας)**. Το μήκος του μορίου DNA σε κάθε ανθρώπινο κύτταρο είναι

περίπου 1,5-1,7 μέτρα. Ο αριθμός των νουκλεοτιδίων ολόκληρου του μοναδικού «νήματος της ζωής» είναι περίπου 3,3 δισεκατομμύρια ζεύγη βάσεων (b.p.). Σύμφωνα με τα τελευταία στοιχεία είναι $3,1647 \times 10^6$ (b.p.) (Πίνακας 1.1). Τα θραύσματα DNA αυτού του νήματος είναι αυτά που ονομάζονται **γονίδια**, δηλαδή **οι περιοχές κωδικοποίησης του γονιδιώματος, οι οποίες καθορίζουν τη δομή των πεπτιδικών αλυσίδων που σχηματίζουν όλες τις πρωτεΐνες του σώματος**. Η λήψη ακριβών δεδομένων σχετικά με τη δομή του γονιδιώματος, δηλαδή την **πρωταρχική αλληλουχία** των νουκλεοτιδίων, τον αριθμό των γονιδίων στον άνθρωπο και την οργάνωσή τους στα χρωμοσώματα είναι τα ερωτήματα που έχουν προσελκύσει και συνεχίζουν να προσελκύουν την προσοχή των μοριακών βιολόγων και άλλων επιστημόνων. Ήδη το 1986, το Υπουργείο Ενέργειας των ΗΠΑ χορήγησε μεγάλα κεφάλαια για τη μελέτη του ανθρώπινου γονιδιώματος. Στο τιμόνι αυτής της έρευνας ήταν ο περίφημος βιοφυσικός Charles Contor. Το 1990, ο διάσημος James Watson έγινε υποκινητής και προπαγανδιστής του προγράμματος «Ανθρώπινου Γονιδιώματος». Ο κύριος διαχειριστής της χρηματοδότησης ήταν τα Εθνικά Ινστιτούτα Υγείας των ΗΠΑ, τα οποία το 1995 χρηματοδότησαν το Εθνικό Ινστιτούτο Ανθρώπινου Γονιδιώματος υπό την διεύθυνση του Francis Collins. Την ίδια χρονιά ο Francis Collins έγινε επικεφαλής του διεθνούς προγράμματος «Ανθρώπινο Γονιδίωμα». Στο πρόγραμμα συμμετείχαν τα κορυφαία μοριακά εργαστήρια του Ηνωμένου Βασιλείου, της Γαλλίας, της Γερμανίας, της Ιαπωνίας και της Ρωσίας. Ο αποφασιστικός ρόλος στη διαμόρφωση και ανάπτυξη υποπρογράμματος με το ίδιο όνομα στην Ρωσία ανήκει στον εξαιρετικό επιστήμονα ακαδημαϊκό Α. Α. Μπάεφ [14].

Ο βασικός στόχος του Προγράμματος Ανθρώπινου Γονιδιώματος, που διατυπώθηκε από τον Ch. Kontor, ήταν η δημιουργία των γενετικών, φυσικών και **αλληλουχικών χαρτών**. Η έννοια αλληλουχίας (sequence) έγινε κατανοητή ως η αποκωδικοποίηση της ακριβούς πρωτοταγούς αλληλουχίας νουκλεοτιδίων του ολόκληρου γιγαντιαίου (1,5-1,7 m) DNA μορίου. Για το σκοπό αυτό έχουν αναπτυχθεί ειδικές μέθοδοι προσδιορισμού αλληλουχίας του DNA. Το πρόγραμμα είχε αρχικά σχεδιαστεί για 15 χρόνια. Το κόστος του υπολογίστηκε σε 3 δισεκατομμύρια δολάρια, δηλαδή η καθιέρωση της θέσης ενός νουκλεοτιδίου στην αλυσίδα DNA, ήταν τότε \$ 1. Ωστόσο, οι σημαντικές τεχνικές και μεθοδολογικές βελτιώσεις επέτρεψαν την αυτοματοποίηση της διαδικασίας προσδιορισμού αλληλουχίας, που την έκανε αποτελεσματικότερη, ταχύτερη και οικονομικότερη. Ως

αποτελεσμα, ήδη τον Ιούνιο του 2000, ανακοινώθηκε η λήξη της πρώτης φάσης του προγράμματος, δηλαδή η δημιουργία μίας «πρόχειρης έκδοσης» του ανθρώπινου γονιδιώματος. Αξίζει να σημειωθεί ότι τα εύσημα αυτού του εποικοδομητικού επιτεύγματος της Παγκόσμιας Επιστήμης, εκτός από μια διεθνή ομάδα που περιλάμβανε περίπου 1.100 επιστήμονες από 160 επιστημονικά κέντρα διαφόρων χωρών, ανήκουν και στην ιδιωτική εταιρεία **Celera Genomics**, η οποία μετασχηματίστηκε το 1998 στο Ινστιτούτο Γονιδιωματικών Μελετών (TIGR) υπό την διεύθυνση του διάσημου Αμερικανού επιστήμονα Craig Venter. Η «πρόχειρη έκδοση» της αποκωδικοποίησης του ανθρώπινου γονιδιώματος δημοσιεύθηκε στα τεύχη του Φεβρουαρίου των κορυφαίων επιστημονικών περιοδικών «Nature» (Feb. 15, 2001) και «Science» (Feb. 16, 2001) που σε μεγάλο βαθμό συμπίπτουν, αν και έχουν κάποιες διαφορές. Τα αποτελέσματα των παραπάνω αναφερόμενων είναι διαθέσιμα στο κοινό στην ιστοσελίδα:

www.ornl.gov/hgmis/project/journals/journals.html.

Η πλήρης αλληλούχιση του ανθρώπινου γονιδιώματος ολοκληρώθηκε τον Απρίλιο του 2003 στην 50^ή επέτειο από την ανακάλυψη της διπλής έλικας από τους J. Watson και Fr. Scream. Οι πληροφορίες με όλες τις μελέτες σχετικά με το Πρόγραμμα Ανθρώπινου Γονιδιώματος και τις θυγατρικές του είναι ευρέως διαθέσιμες στο Διαδίκτυο (Πίνακας 1.1). Είναι επίσης ιδιαίτερα βολικές για εργασία οι ιστοσελίδες: **www.ensembl.org** ή **<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks>**, οι οποίες πηγαίνουν απευθείας στο ανθρώπινο γονιδίωμα και έχουν ελεύθερη πρόσβαση όπου μπορεί να δει κανείς εύκολα και κατανοητά την νουκλεοτιδική αλληλουχία οποιοδήποτε μέρους του γονιδιώματος.

1.1. Βασικά αποτελέσματα του Προγράμματος Ανθρώπινου Γονιδιώματος

Αξίζει να σημειωθεί για μια ακόμη φορά, ότι χάρη ενός άνευ προηγουμένου αγώνα για την πρωτιά της ανακάλυψης, η «πρόχειρη έκδοση» του ανθρώπινου γονιδιώματος δημοσιεύθηκε το 2001, η δεύτερη και τελευταία, τον Απρίλιο του 2003. Μετά, το πρόγραμμα έπαψε να υφίσταται επίσημα, αλλά συνεχίζεται ενεργά η περαιτέρω μελέτη της λεπτής μοριακής δομής του ανθρώπινου γονιδιώματος, της αλληλούχισης των γονιδιωμάτων διαφόρων ζώων, συμπεριλαμβανομένων των βιολογικών μοντέλων.

Πρόσβαση σε γενικές πληροφορίες	http://www.ornl.gov/hgmis
Εθνικό Ινστιτούτο για την Έρευνα Ανθρώπινου Γονιδιώματος	http://www.nhgri.nih.gov
Εθνικό Κέντρο Βιοτεχνολογικής πληροφορίας (National Center for Biotechnology Information NCBI) (OMIM)	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim
Γονιδιωματική - επιστήμη για τη ζωή	http://doegenomestolife.org
Πρόγραμμα «Ανθρώπινο γονιδίωμα» και οικο-λογία	http://www.niehs.nih.gov/envgenom/home.htm
Ανατομία του ανθρώπινου γονιδιώματος και καρκίνος	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ncicgap
SNPs Ένωση (consortium)	http://snp.cshl.org
Ιατρική και Νέα Γενετική	http://www.ornl.gov/medicine/medicine.html
Γονιδίωμα και προγνωστική ιατρική	http://www2.cdc.gov/nceh/genetics
Γονιδίωμα, Ιατρική και Κοινωνία (αναφορές)	http://www.ornl.gov/hgmis/launchpad
Ηθικές, νομικές και κοινωνικές πτυχές του Προγράμματος «Ανθρώπινο γονιδίωμα»	http://www.ornl.gov/hgmis/elsi/elsi.html
«Πρόχειρη έκδοση» του γονιδιώματος	http://www.ornl.gov/hgmis/project/journals/journals.html
Πρόγραμμα «Ανθρώπινο γονιδίωμα» για εκπαιδευτικούς	http://www.ornl.gov/hgmis/education/education.html
Πρόγραμμα «Ανθρώπινο γονιδίωμα» για φοιτητές	http://www.ornl.gov/hgmis/education/students.html

Πίνακας 1.1 Κύριες διευθύνσεις στο Διαδίκτυο για το πρόγραμμα «Ανθρώπινο Γονιδίωμα»

Μέχρι το 2003 είχε προσδιοριστεί το 90% της πρωταρχικής νουκλεοτιδιακής αλληλουχίας DNA των **ευχρωματικών χρωμοσωματικών περιοχών (ελάχιστα χρωματισμένων με τη χρωστική Giemsa ή με φθοροχρώματα)**. Στις περιοχές αυτές συγκεντρώνεται η πλειονότητα των γονιδίων. Το μέγεθος ευχρωματικού μέρους του γονιδιώματος είναι περίπου 2,9 δισεκατομμύρια ζεύγη βάσεων (b.p.). Τεχνικά, το πιο δύσκολο για την αλληλούχιση ήταν το δορυφορικό DNA **τελομερικών (τερματικών) και κεντρομερικών χρωμοσωματικών περιοχών**, των έντονα ελικοειδών περιοχών **εσωκλειστικής (ενδοχρωμοσωματικής) ετεροχρωματίνης** (περιοχών με έντονο χρώμα με βαφή Giemsa ή φθοροχρώματα), καθώς και των μικρών διασωληνωτών θραυσμάτων, αποκαλούμενων ως πληροφοριακά **«κενά» διαστήματα (gap)**. Αυτά τα τμήματα του γονιδιώματος (περίπου 400 θραύσματα) δεν είχαν αποκρυπτογραφηθεί μέχρι το 2003.

I. Γονιδιακοί δείκτες	
Συνολικό μήκος του μορίου DNA	1,5 - 1,7 m
Αριθμός νουκλεοτιδίων:	$3,1647 \times 10^9$
-στην ευχρωματίνη	$2,900 \times 10^6$
-σε ετεροχρωματίνη	$0,3 \times 10^6$
II. Κύρια αποτελέσματα αλληλούχισης	
Έχει γίνει η αλληλούχιση (καθιερώθηκε η πρωτογενής νουκλεοτιδική αλληλουχία)	99% ευχρωματίνης
Επιτρεπτό ποσοστό σφαλμάτων	1×10^4
Ποσοστό σφαλμάτων αλληλούχισης των χρωμοσωμάτων 1, 21, 22, X	1×10^6
Δεν έχει γίνει η αλληλούχιση	10 %
III. Η γενική δομή του DNA του γονιδιώματος	
Επαναληπτικές ακολουθίες	45 - 50%
Μεταγραφέν μέρος ολόκληρου του γονιδιώματος	28 - 30%
Συνολικά μεταγράφεται στο RNA	23 - 25%
Μεταφράζεται σε πρωτεΐνες (τμήμα εξωνίου του γονιδιώματος)	5%
Κωδικοποιεί τη σύνθεση όλων των πρωτεϊνών του σώματος	1,2% του συνόλου του DNA
"Προαιρετικό" DNA (LTR, SINE, LINE, Transposones)	50%
Μικροδορυφορικό DNA και Μινιδορυφορικό DNA	3%
IV. Γενετικός πολυμορφισμός	
Η ταυτοσημότητα των γονιδιωμάτων διαφορετικών ατόμων 2003/2006	99,9 / 99,0%
Ποικιλομορφία / ποικιλότητα	0,1/10%
Συνολικός αριθμός υποκαταστάσεων ενός νουκλεοτιδίου (SNPs)	$10 - 12 \times 10^6$
Αριθμός των SNPs των «σημασιολογικών» τμημάτων DNA	$3 - 5 \times 10^6$
Αριθμός χαρτογραφημένων SNPs στο HarMap 2006	$5,5 \times 10^6$
V. Αριθμός γονιδίων	
Σύνολο	22.000
Άγνωστες μεταγραφόμενες αλληλουχίες	5.286
Αναγνωρισμένα γονίδια	20.000
Χαρτογραφημένα γονίδια σε χρωμοσώματα Omim, 17 Αυγούστου 2007	10.336
Γονίδια μονογονιδιακών νοσημάτων	1.485
OMIM χρωμοσώματος 1 / άλλες πηγές	1000/3141
Χρωμόσωμα 21 OMIM / άλλες πηγές	133/225
Χρωμόσωμα 22 OMIM / άλλες πηγές	257/525
OMIM X χρωμόσωμα / άλλες πηγές	578/1098

Πίνακας 1.1^α Κύρια χαρακτηριστικά του ανθρώπινου γονιδιώματος (στοιχεία για το 2006).

Ο δεύτερος περιορισμός οφείλεται στο γεγονός ότι Μέχρι το 2001 έχουν αλληλουχηθεί μόνο τα γονιδιώματα μερικών ανθρώπων και η ακρίβεια της αλληλούχισης των μεμονωμένων τμημάτων ήταν κάτω από το «χρυσό πρότυπο» ποιότητας, δηλαδή ένα σφάλμα ανά 104 b.p. Αργότερα, έχουν αναλυθεί περισσότερα από 10 ανθρώπινα γονιδιώματα. Επίσης, το 30% του ανθρώπινου γονιδιώματος έχει αλληλουχηθεί 8-10 φορές με ακρίβεια 99,99% σε πλήρη συμμόρφωση με το «χρυσό πρότυπο». Τον Μάιο του 2007, ο πλήρης χάρτης του γονιδιώματος του δόθηκε επίσημα στον διάσημο James Watson.

Επίσης, λίγο αργότερα, έλαβαν τους πλήρεις χάρτες των γονιδιωμάτων τους ο Craig Wetter και ο John Church (βλ. Κεφάλαιο 5).

Το 2000, δύο μεγάλες διεθνείς ομάδες έχουν προσδιορίσει την αλληλουχία των χρωμοσωμάτων 21 και 22 με μεγαλύτερη ακρίβεια, ένα σφάλμα ανά 106 b.p., ενώ το 2006 έχει ολοκληρωθεί η αποκωδικοποίηση της μοριακής δομής των χρωμοσωμάτων 1 και X [15, 16].

Το σημαντικότερο αποτέλεσμα της δημιουργίας μιας «πρόχειρης έκδοσης» του ανθρώπινου γονιδιώματος ήταν ένας αρκετά ακριβής προσδιορισμός του συνολικού αριθμού των γονιδίων. Αρχικά, υπολογίστηκε σε 30 - 35.000 γονίδια. Σήμερα εκτιμάται ότι το ανθρώπινο γονιδίωμα περιέχει περίπου **22.000 γονίδια**. Τα περισσότερα από αυτά (περίπου 20.000) έχουν ταυτοποιηθεί ήδη και πάνω από 11.000 γονίδια έχουν χαρτογραφηθεί πάνω σε χρωμοσώματα. Οι καθημερινά ενημερωμένες πληροφορίες σχετικά με τα χαρτογραφημένα ανθρώπινα γονίδια μπορούν να ληφθούν στο Διαδίκτυο στην ιστοσελίδα του OMIM NCBI GenBank (Πίνακας 1.1). Μέχρι τις 16 Αυγούστου 2007, στον κατάλογο που αναφέρεται στην παραπάνω ιστοσελίδα, έχουν καταχωρηθεί συνολικά 17.848 χαρακτηριστικά, 16.736 εντοπισμένα σε αυτοσώματα, 993 στο χρωμόσωμα X και μόνο 56 στο χρωμόσωμα Y.

Σύμφωνα με τα τελευταία στοιχεία ο πρώτος ζεύγος ανθρώπινων χρωμοσωμάτων, περιέχει 3.141 γονίδια και 950 ψευδογονίδια (γονίδια που έχουν χάσει την ικανότητά τους να εκφράζονται ως αποτέλεσμα των μεταλλάξεων). Πάνω από 350 κληρονομικές ασθένειες και πολλά κακοήγη νεοπλασμάτα συσχετίζονται με τα γονίδια αυτά [15].

Ο αριθμός των γονιδίων σε ένα μεγάλο χρωμόσωμα X εκτιμάται ότι είναι 1098, εκ των οποίων 99 ελέγχουν την αναπαραγωγική λειτουργία ή σχετίζονται με τον καρκίνο [16].

Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι έως το 2001 έχουν μελετηθεί για την παρουσία των γονιδιακών μεταλλάξεων σχεδόν όλα τα πιο κοινά κληρονομικά νοσήματα (περίπου 320) και 170 γονίδια των πιο σπάνιων κληρονομικών ασθενειών [17]. Μέχρι το 2003 μελετήθηκαν για μεταλλάξεις παραπάνω από 1485 ανθρώπινες ασθένειες [18].

Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι στο ανθρώπινο γονιδίωμα, μαζί με τα συνηθισμένα δομικά γονίδια, αναγνωρίστηκαν και άλλες 5286 μεταγραφόμενες αλληλουχίες

DNA [19]. Το εάν τα θραύσματα αυτά είναι πραγματικά γονίδια και ποια είναι η λειτουργία τους, μέχρι τώρα παραμένει άγνωστο.

Είναι φανερό ότι στο εγγύς μέλλον προβλέπεται ταχεία αύξηση της ποσότητας πληροφοριών σχετικά με τη λεπτή μοριακή δομή του ανθρώπινου γονιδιώματος. Αυτό φαίνεται και από τη μεγάλη πρόοδο των μεθόδων προσδιορισμού αλληλουχίας του DNA. Το αρχικό κόστος του έργου «Ανθρώπινο γονιδίωμα» εκτιμήθηκε στα 3 δισεκατομμύρια δολάρια με τη χρήση της λεγόμενης πρώτης γενιάς αλληλούχισης, της μεθόδου Sanger [20]. Ωστόσο, για να καλύψει την υψηλή ζήτηση για φθηνότερη αλλά επίσης και ταχύτερη τεχνολογία αλληλούχισης, έχει αναπτυχθεί μια νέα τεχνολογία, η Αλληλούχιση Επόμενης Γενιάς (NGS: Next Generation Sequencing), η οποία πλέον επιτρέπει τον προσδιορισμό του πλήρους ανθρώπινου γονιδιώματος σε λιγότερο από μια ημέρα και το κόστος της διαδικασίας μειώθηκε στα 1000 ευρώ [21].

Το Πρόγραμμα Ανθρώπινου Γονιδιώματος έχει ολοκληρωθεί επίσημα, ωστόσο, η μελέτη του ανθρώπινου γονιδιώματος συνεχίζεται ενεργά. Παράλληλα, τα θέματα λειτουργικής οργάνωσης του γονιδιώματος και τα προβλήματα γενετικού πολυμορφισμού παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον.

1.2. Ανθρώπινο γονιδίωμα και άλλες κατευθύνσεις της γονιδιωματικής

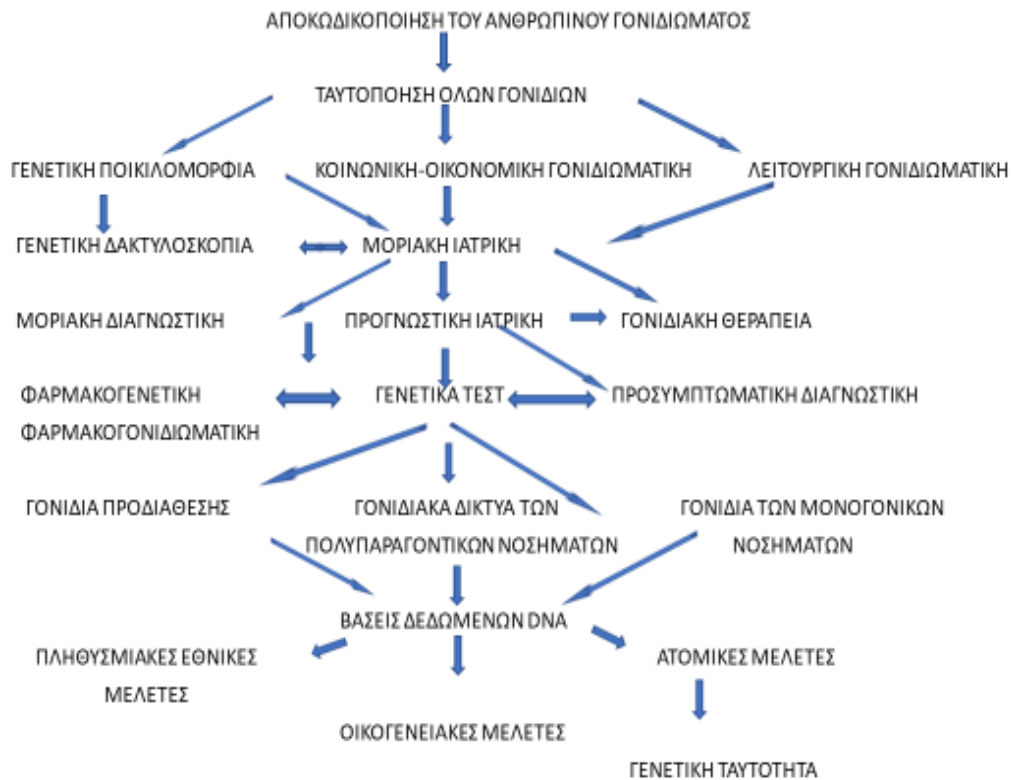
Η θριαμβευτική ολοκλήρωση του προγράμματος «Ανθρώπινο Γονιδίωμα» είχε τεράστια επιστημονική και δημόσια ανταπόκριση. Ήδη στα μέσα της δεκαετίας του '90 εμφανίστηκαν και αναπτύχθηκαν νέες επιστημονικές κατευθύνσεις:

- «Συγκριτική Γονιδιωματική»,
- «Λειτουργική γονιδιωματική»,
- «Ποικιλομορφία ανθρώπινων γονιδιωμάτων»,
- «Κοινωνικές, ηθικές και νομικές πτυχές του ανθρώπινου γονιδιώματος.

Οι αλληλεπιδράσεις τους παρουσιάζονται στο Σχήμα 1.2. [7, 23-29].

Οι νέες κατευθύνσεις της γονιδιωματικής διεισδύουν ενεργά σε όλες τις σφαίρες της ανθρώπινης ζωής. Ήδη σήμερα, υπάρχουν βάσεις ώστε να μπορούμε να δηλώσουμε την αρχή μιας νέας ιστορικής περιόδου στη ζωή της ανθρωπότητας, της εποχής του «Παγκόσμιου Γενετισμού». Οι κύριες αυτές κατευθύνσεις, καθώς και ορισμένα πολλά

υποσχόμενα νέα ερευνητικά έργα, που ήδη διεξάγονται ως συνέχεια της έρευνας, για το ανθρώπινο γονιδίωμα, θα αναφερθούν σε αυτή τη ενότητα της διπλωματικής εργασίας.



Σχήμα 1.2. Ανθρώπινο γονιδίωμα και γενετισμός της ανθρωπότητας στον 21^ο αιώνα (σχέδιο νέων επιστημονικών και εφαρμοσμένων τομέων που έχουν προκύψει κατά τη διαδικασία υλοποίησης του προγράμματος «Ανθρώπινο Γονιδίωμα»).

1.2.1. Συγκριτική γονιδιωματική

Μέχρι σήμερα, εκτός από τα ανθρώπινα γονιδιώματα, έχουν αναλυθεί και τα γονιδιώματα πολλών άλλων οργανισμών. Ο κατάλογος αυτός περιλαμβάνει περισσότερα από χιλιάδες βακτήρια, ζύμες, δροσόφιλα, ασκαρίδες, ιαπωνικά ψάρια, φυτά (μουστάρδα, ρύζι), πουλερικά και θηλαστικά (εργαστηριακό ποντίκι, αρουραίος, σκύλος, χιμπατζής, μαρσιποφόρο οπόσουμ). Τα κύρια χαρακτηριστικά των γονιδιωμάτων αυτών των οργανισμών δίνονται στην ιστοσελίδα www.genome.gov/10002154. Η διαθεσιμότητα τέτοιων πληροφοριών ανοίγει τις ευκαιρίες για συγκριτική ανάλυση των γονιδιωμάτων διαφόρων οργανισμών, η οποία είναι σημαντική για την κατανόηση των διεργασιών εξέλιξης, για τη χαρτογράφηση

των γονιδίων, για τη δημιουργία ενός καθολικού «γενωμικού» συστήματος ταξινόμησης ζωντανών οργανισμών. Η γονιδιακή ομοιότητα των ανθρώπων και των άλλων θηλαστικών υπερβαίνει το 90%. Επιπλέον, διαπιστώθηκε ότι σε ανθρώπους και στα *Drosophila*, περίπου το 60% όλων των γονιδίων είναι ομόλογα. Χρησιμοποιώντας τις μεθόδους συγκριτικής γονιδιωματικής, έχει τεκμηριωθεί η υψηλή ομολογία των ανθρώπων και των χιμπατζήδων (πάνω από 96% ομοιότητας). Κατά συνέπεια, τα ζητήματα της ανθρώπινης εξέλιξης ερμηνεύονται με νέο τρόπο. Επίσης, έχουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον τα πρόσφατα δεδομένα σχετικά με τη σύγκριση των γονιδιωμάτων του ανθρώπου και του φυλογενετικά αρχαίου μαρσιποφόρου θηλαστικού οπόσουμ (*Opossum*). Παρά το γεγονός ότι τα φυλογενετικά είδη αυτά χωρίζουν περισσότερα από 180 εκατομμύρια χρόνια, η διαφορά μεταξύ των γονιδιωμάτων τους σε κωδικοποιημένες περιοχές, δεν ξεπερνά το 1% και σε συντηρητικές, μη κωδικοποιημένες περιοχές, το 20%. Μια συγκριτική ανάλυση αυτών των γονιδιωμάτων αποδεικνύει τον σημαντικό ρόλο των τρानσποζονών (αλληλουχίες DNA που μοιάζουν με ιό και έχουν την ικανότητα να μεταφέρονται κατά μήκος του γονιδιώματος) στην εξέλιξη των θηλαστικών με πλακούντα [30]. Οι μέθοδοι συγκριτικής γονιδιωματικής έχουν αποκαλύψει γονίδια που παίζουν σημαντικό ρόλο στη γνωστική δραστηριότητα. Κάπως έτσι ανιχνεύθηκε ένα άγνωστο από πριν γονίδιο MGC8902 που εκφράζεται ενεργά στις εγκεφαλικές περιοχές, υπεύθυνες για τη γνωστική δραστηριότητα. Το γονίδιο αυτό αποτελείται από εκατοντάδες αντίγραφα (>200) στο ανθρώπινο γονιδίωμα, 37 αντίγραφα σε χιμπατζήδες και μεμονωμένα αντίγραφα σε αρουραίους και ποντίκια [31].

Υπάρχει λόγος να πιστεύουμε ότι με την πάροδο του χρόνου με τη συμβολή της συγκριτικής γονιδιωματικής ανάλυσης διαφόρων ζώων θα δημιουργηθεί Περιοδικό Σύστημα των Γονιδιωμάτων όλων των ζωντανών οργανισμών [6], και η ιδέα, καθώς και η δυνατότητα αυτή πλέον δεν φαίνεται να είναι εξωπραγματική [32]. Η εξέταση των θεμάτων της φυλογενέσεως και της συστηματικής συμπεριφοράς των ζωντανών οργανισμών, με βάση τη δομή των γονιδιωμάτων τους, ξεπερνά το πεδίο αυτής της εργασίας.

1.2.2. Λειτουργική γονιδιωματική

Τα κύρια καθήκοντα της γονιδιωματικής είναι οι μελέτες της δομής του γονιδιώματος, η ταυτοποίηση γονιδίων, οι αναλύσεις μεταλλάξεων και πολυμορφισμών και άλλων πτυχών «ανατομίας» του γονιδιώματος. Η λειτουργική γονιδιωματική, ωστόσο, επικεντρώνεται

στη μελέτη των λειτουργικών προβλημάτων του γονιδιώματος. Ως εκ τούτου, αυτές είναι οι νέες κατευθύνσεις γονιδιωματικής: [24]

- **Μεταγραφική** - μια μεγάλης κλίμακας ανάλυση του mRNA για να μάθουμε πότε, πού και υπό ποιες συνθήκες μεταγράφονται τα γονίδια.
- **Πρωτεομική** - μελέτη της πρωτεϊνικής σύνθεσης και λειτουργίας καθώς και της τρισδιάστατης δομής.

Όσο αυξάνεται ο αριθμός των γνωστών γονιδίων, τόσο περισσότερο φαίνεται η έλλειψη των διαθέσιμων δεδομένων για το πως λειτουργούν αυτά τα γονίδια και οι πρωτεΐνες τους. Από τα 20.000 ανθρώπινων γονιδιωμάτων που έχουν ήδη εντοπιστεί και χαρτογραφηθεί έως σήμερα, για τη λειτουργική τους σημασία έχουν μελετηθεί μόνο τα 10 - 11 χιλιάδες (Πίνακας 1.1^α). Τι κάνουν και ποιες είναι οι λειτουργίες των υπολοίπων γονιδίων είναι εντελώς άγνωστο.

Οι υπάρχουσες προσεγγίσεις για τον εντοπισμό των νέων γονιδίων καθώς και την αποσαφήνιση των λειτουργιών τους είναι οι εξής: [33-35]

- Οι μέθοδοι στοχευμένης μεταλλαξιογένεσης των εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων με σκοπό την απόκτηση των βιολογικών μοντέλων κληρονομικών ασθενειών (ποντικοί) [35].
- Η δημιουργία τραπεζών του cDNA διαφόρων ιστών και οργάνων σε διαφορετικά στάδια οντογένεσης.
- Η ανάπτυξη μεθόδων για τη μελέτη λειτουργιών των τμημάτων DNA που δεν κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες.
- Η ανάπτυξη νέων τεχνολογιών που επιτρέπουν μια συγκριτική ανάλυση της έκφρασης πολλών χιλιάδων γονιδίων.

Θεωρείται ότι κατά τη δημιουργία ενός πλήρους γονιδιακού ανθρώπινου «πορτρέτου», θα ταυτοποιηθούν περίπου 200 - 300 χιλιάδες πρωτεΐνες (ένα γονίδιο μπορεί να παρέχει σύνθεση αρκετών διαφορετικών πρωτεϊνών). Η ανακάλυψη της εμφάνισης τέτοιων πρωτεϊνών στην οντογένεση και η διερεύνηση του «**προφίλ έκφρασης**» των χιλιάδων γονιδίων για την παρακολούθηση των κυττάρων και ιστών υπό κανονικές και παθολογικές συνθήκες, είναι ο κεντρικός στόχος της **λειτουργικής γονιδιωματικής** στην επιστημονικά νέα, **μεταγονιδιωματική** εποχή [24].

Όπως είδαμε στον Πίνακα 1.1^α, μόνο το 1,2% της ολόκληρης αλληλουχίας DNA κωδικοποιεί τη δομή όλων των πρωτεϊνών του σώματος. Ένα άλλο 15 - 30% οφείλεται στο DNA που μεταγράφεται μέχρι το RNA. **Το τελευταίο ρυθμίζει τη δραστηριότητα γονιδίων και χρωμοσωμάτων, εξασφαλίζει τη διαδικασία της μετάφρασης, δηλαδή τη μεταφορά των πληροφοριών από το αγγελιαφόρο RNA στην αλληλουχία αμινοξέων των πολυπεπτιδικών αλυσίδων που συντίθενται στα ριβοσώματα.** Ταυτόχρονα, περίπου το 50% του DNA του γονιδιώματος αντιπροσωπεύεται από τις επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες DNA διαφορετικών μηκών. Αυτά είναι τα λεγόμενα «**προαιρετικά στοιχεία του γονιδιώματος**» [36]. Τα τελευταία περιλαμβάνουν επαναλαμβανόμενα θραύσματα ετεροχρωματίνης DNA, κινητά στοιχεία (τρανσποζόνες), που σε δομή μοιάζουν με τον ιό, βραχείες **μικροδορυφορικές (1 - 13 b.p.)** και πιο εκτεταμένες **μινιδορυφορικές (14-500 b.p.)** DNA επαναλήψεις. Οι λειτουργίες αυτού του «**προαιρετικού**» DNA δεν είναι εντελώς γνωστές. Στα τέλη του 2002 μια συγκριτική υπολογιστική ανάλυση των ανθρώπινων γονιδιωμάτων και ενός εργαστηριακού ποντικού έφερε στο φως μια εντυπωσιακή ανακάλυψη, η οποία υποδήλωνε ότι στις προαναφερόμενες επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες του DNA κωδικοποιούνται οι πληροφορίες που εξασφαλίζουν το πλήρες πρόγραμμα ατομικής ανάπτυξης. Είναι πιθανό ότι πολλά από αυτά τα «**προαιρετικά γονιδιωματικά στοιχεία**» είναι υπεύθυνα για τη σύνθεση μικρού «**πυρηνικού**» RNA, τα λεγόμενα miRNAs όπως dsRNS ή siRNA, τα οποία ρυθμίζουν το έργο πολλών γονιδίων [37, 38]. Ο σημαντικός ρόλος των τρανσποζονών στην εξέλιξη του γονιδιώματος και στην ρύθμιση της γονιδιακής λειτουργίας είναι το αντικείμενο της ενεργούς έρευνας [39]. Επί του παρόντος, έχει δημιουργηθεί εμπορική παραγωγή των μικρών μορίων RNA, κατάλληλων για την στοχευμένη «**διακοπή**» (απενεργοποίηση) της έκφρασης διαφόρων ανθρώπινων γονιδίων και των βιολογικών μοντέλων (ποντικοί, αρουραίοι). Τα εμπορικά σετ αυτά παίζουν σημαντικό ρόλο τόσο στην επιστημονική έρευνα, όσο και στη πρακτική ιατρική εφαρμογή, κυρίως στην ογκολογία, καθώς και στη θεραπεία ορισμένων κληρονομικών νόσων [SuperArray Bioscience - www.superarray.com].

Η δυνατότητα της κατευθυνόμενης ρύθμισης γονιδιακής λειτουργίας, χρησιμοποιώντας τα μικρού μήκους RNAs, είναι πολύ σημαντική στις ημέρες μας, εφόσον έχει αναπτυχθεί και χρησιμοποιείται ήδη η τεχνολογία των **βιοτσιπ (μικροσυστοιχιών)** η

οποία επιτρέπει να εκτιμηθεί ποσοτικά το προφίλ έκφρασης όλων των γονιδίων που λειτουργούν σε διαφορετικούς ιστούς και όργανα [34].

Οι άλλες σημαντικές καινοτομίες των τελευταίων ετών, που σχετίζονται άμεσα με τη λειτουργική γονιδιωματική, αφορούν την αποκωδικοποίηση του λειτουργικού (**επιγενετικού**) κώδικα για κάθε ιστό του αναπτυσσόμενου εμβρύου και οργάνου. Στο μοριακό επίπεδο, αυτό σημαίνει η μελέτη των χαρακτηριστικών της **μεθυλίωσης / απομεθυλίωσης** του DNA (αδρανοποίηση / ενεργοποίηση των γονιδίων) και τη δημιουργία κατάλληλων «**χαρτών έκφρασης γονιδίων**» για διαφορετικούς ιστούς σε διαφορετικά στάδια ανάπτυξης του οργανισμού. Το ερευνητικό αυτό έργο, που χρηματοδοτείται από την Ευρωπαϊκή Κοινότητα, βρίσκεται ήδη σε εξέλιξη (EU - funded Human Epigenome Project) [40].

Στον τομέα της λειτουργικής γονιδιωματικής, εκτός από τους ήδη γνωστούς γενετικούς και επιγενετικούς κώδικες, αξιοσημείωτη είναι η ανακάλυψη του αποκαλούμενου «**κώδικα ιστόνης**». Ο «κώδικας ιστόνης» καθορίζει την ενεργοποίηση και απενεργοποίηση των μεμονωμένων γονιδίων και των ολόκληρων τόπων του DNA, μεταβάλλοντας τη χημική δομή (φωσφορυλίωση, ακετυλίωση, μεθυλίωση) των ιστονών, (πρωτεϊνών χαμηλού μοριακού βάρους που εξασφαλίζουν τη συμπύκνωση, τη δομική και λειτουργική κατάσταση της αλυσίδας DNA) [41].

Έτσι, η αποκρυπτογράφηση της πρωταρχικής μοριακής δομής του ανθρώπινου γονιδιώματος επέκτεινε σημαντικά τη κατανόηση μας για τη φύση αυτού του καθολικού φορέα κληρονομικών πληροφοριών, καθώς οδήγησε σε νέες ανακαλύψεις που μετέβαλαν ουσιαστικά την κατανόηση της δομικής και λειτουργικής οργάνωσής του.

1.2.3. Γενετικός πολυμορφισμός

Τα γονιδιώματα όλων των ανθρώπων είναι διαφορετικά, με εξαίρεση τα πανομοιότυπα δίδυμα (δίδυμα που προέρχονται από το ίδιο ωάριο). Οι εκφραζόμενες πληθυσμιακές, εθνικές και κυρίως ατομικές διαφορές του γονιδιώματος τόσο στο **σημασιολογικό του μέρος (εξόνια)** όσο και στις **μη κωδικοποιητικές αλληλουχίες του (διαγονιδιακά κενά, ιντρόνια κλπ.)** οφείλονται στις διάφορες μεταλλάξεις που οδηγούν σε γενετικό πολυμορφισμό (ΓΠ). Όταν μια παραλλαγή είναι τόσο συχνή ώστε να παρατηρείται σε ποσοστό μεγαλύτερο του 1% των χρωμοσωμάτων στο γενικό πληθυσμό, **τότε καλείται γενετικός**

πολυμορφισμός. Αντίθετα, τα αλληλόμορφα που έχουν συχνότητα εμφάνισης μικρότερη από 1%, ονομάζονται, κατά σύμβαση, *σπάνιες παραλλαγές ή σπάνια αλληλόμορφα*.

Ο κύριος στόχος του προγράμματος «Γενετική Ποικιλομορφία στους ανθρώπους» είναι η μελέτη των γενετικών πολυμορφισμών (βλ. Πίνακα 1.1^α). Ο γενετικός πολυμορφισμός μπορεί να είναι **ποιοτικός**, όταν γίνονται οι υποκαταστάσεις των νουκλεοτιδίων ή **ποσοτικός**, όταν στο DNA ποικίλει ο αριθμός των νουκλεοτιδικών επαναλήψεων διαφορετικού μήκους. Και οι δύο τύποι του γενετικού πολυμορφισμού εντοπίζονται τόσο στις σημασιολογικές περιοχές (της κωδικοποίησης πρωτεΐνης) όσο και στις μη κωδικοποιητικές περιοχές της αλληλουχίας DNA [42].

Οι ποιοτικοί ΓΠ είναι οι πιο απλοί και οι πιο συχνοί πολυμορφισμοί, κυρίως οι υποκαταστάσεις **ενός νουκλεοτιδίου** (single nucleotide polymorphism, SNP) [43]. Η πρώτη συγκριτική γονιδιωματική μελέτη των εκπροσώπων διαφορετικών φυλών και εθνικών ομάδων ήδη έχει δείξει τη βαθιά γενετική συγγένεια όλων των ανθρώπων (η ομοιότητα των γονιδιωμάτων είναι 99,9%), καθώς και τις πολύτιμες πληροφορίες για την ανθρώπινη προέλευση, τις οδούς ανθρώπινης εξάπλωσης στον πλανήτη και τους τρόπους εθνογένεσης [44, 45, 46].

Ο ποσοτικός ΓΠ αντιπροσωπεύεται:

- **από το μικροδορυφορικό DNA** (μικροδορυφόροι) που είναι τμήματα DNA τα οποία αποτελούνται από μία έως και μερικές δεκάδες επαναλήψεις μίας (δι-, τρι-, ή τετρα-) νουκλεοτιδικής αλληλουχίας (μονάδας), όπως TGTG, CAACAACAA ή AAATAAAT....AAT. Τα διαφορετικά αλληλόμορφα ενός τέτοιου πολυμορφικού γενετικού τύπου οφείλονται στον διαφορετικό αριθμό των επαναλήψεων της νουκλεοτιδικής μονάδας και για αυτό οι μικροδορυφόροι συχνά αναφέρονται ως πολυμορφισμοί **βραχέων εν σειρά επαναλήψεων (STR ή Short Tandem Repeats)**. Οι μικροδορυφόροι συνήθως έχουν πολλαπλά αλληλόμορφα (διαφορετικός αριθμός επαναλήψεων) στον πληθυσμό, τα οποία μπορούν εύκολα να προσδιοριστούν βάσει του μεγέθους του προϊόντος μίας PCR με εκκινητές εκατέρωθεν του μικροδορυφόρου. Στο γονιδίωμα του ανθρώπου υπάρχουν πολλές δεκάδες χιλιάδες γνωστοί πολυμορφικοί μικροδορυφόροι.

- **από το μινιδορυφορικό DNA** (μινιδορυφόροι), μια κατηγορία πολυμορφισμού, που οφείλεται στην εν σειρά ένθεση ενός μεταβαλλόμενου αριθμού (συνήθως κυμαίνεται μεταξύ εκατοντάδων και χιλιάδων) αντιγράφων μιας αλληλουχίας DNA μήκους 10 - 100 b.p. Οι πολυμορφισμοί αυτοί χαρακτηρίζονται από την ύπαρξη πολλαπλών αλληλόμορφων, τα οποία διαφέρουν μεταξύ τους ως προς τον αριθμό των επαναλαμβανόμενων εν σειρά αντιγράφων του μινιδορυφόρου και συχνά αναφέρονται ως **πολυμορφισμός ποικίλου αριθμού εν σειρά επαναλήψεων** (VNTR ή Variable Number Tandem Repeats), δηλαδή οι επαναλήψεις του DNA μεγάλου μήκους και μια εσωτερική δομή που μεταβάλλεται στη σύνθεση νουκλεοτιδίων.

Κατά κανόνα, οι ποσοτικοί ΓΠ αφορούν μη-κωδικοποιητικά τμήματα του γονιδιώματος. Την μοναδική εξαίρεση αποτελούν οι τρινουκλεοτιδικές επαναλήψεις, η συχνότερη των οποίων είναι η τριπλέτα που κωδικοποιεί το γλουταμινικό οξύ (CAG, κιτοσίνη-αδενίνη-γουανίνη). Αυτές μπορούν να ανιχνευθούν και στις κωδικοποιητικές αλληλουχίες ορισμένων δομικών γονιδίων. Συγκεκριμένα, ένας τέτοιου είδους ΓΠ είναι χαρακτηριστικός στη νόσο επέκτασης ή νόσο Huntington (βλέπε Κεφάλαιο 3). Η μοριακή βάση της νόσου είναι η επέκταση των επαναλήψεων της τριάδας νουκλεοτιδίων CAG στο εξόνιο 1 του γονιδίου IT15 στο χρωμόσωμα 4p16.52. Σε αυτές τις περιπτώσεις, μετά την ολοκλήρωση ορισμένου αριθμού αντιγράφων μιας επανάληψης τρινουκλεοτιδίου (πολυνουκλεοτιδίου), ο ΓΠ παύει να είναι λειτουργικά ουδέτερος και εκδηλώνεται ως ειδικός τύπος των αποκαλούμενων «**δυναμικών μεταλλάξεων**». Οι τελευταίοι είναι ιδιαιτέρως χαρακτηριστικοί για μια μεγάλη ομάδα νευροεκφυλιστικών νοσημάτων (χορεία του Huntington, ασθένεια Kennedy, νωτιαιοπαρεγκεφαλική αταξία κλπ.). Τα κλινικά χαρακτηριστικά των παραπάνω παθήσεων είναι: η καθυστερημένη εκδήλωση, η αυξημένη σοβαρότητα της νόσου στις επόμενες γενιές, η έλλειψη των αποτελεσματικών μεθόδων θεραπείας [35, 47, 48].

Όλοι οι άνθρωποι που κατοικούν σήμερα στον πλανήτη μας, στη πραγματικότητα είναι γενετικά αδέρφια. Επιπλέον, ακόμα και με την ανάλυση του γονιδιακού προφίλ των εκπροσώπων διάφορων φυλών (λευκών, κίτρινων και μαύρων) η ποικιλομορφία δεν ξεπέρασε το 0,1% και οφείλεται κυρίως σε **υποκαταστάσεις ενός νουκλεοτιδίου, SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms)**. Τέτοιες υποκαταστάσεις είναι πολυάριθμες και

συμβαίνουν κάθε 250 - 400 b.p. Ο συνολικός τους αριθμός στο γονιδίωμα υπολογίζεται σε 10 - 13 εκατ. (Πίνακας 1.1α). Εκτιμάται ότι περίπου το μισό όλων των SNPs (5 εκατ.) βρίσκεται σε κωδικοποιητικό (sense) τμήμα του γονιδιώματος. Όπως αποδείχθηκε, αυτές οι υποκαταστάσεις είναι ιδιαίτερα σημαντικές για τη μοριακή διάγνωση των κληρονομικών νοσημάτων και παίζουν τον κύριο ρόλο στους γενετικούς πολυμορφισμούς του ανθρώπου [7, 35, 48, 49].

Ο πολυμορφισμός είναι χαρακτηριστικός σχεδόν για όλα τα ανθρώπινα γονίδια. Διαπιστώθηκε ότι η έντονη και η εθνοτική πληθυσμιακή ιδιαιτερότητα του είναι το χαρακτηριστικό που επιτρέπει την ευρεία χρήση των πολυμορφικών γονδιακών δεικτών σε εθνοτικές και πληθυσμιακές μελέτες [45]. Ο πολυμορφισμός, που επηρεάζει τις «σημαιολογικές» («sense») περιοχές των γονιδίων, οδηγεί συχνά στην αντικατάσταση των αμινοξέων και στην εμφάνιση πρωτεϊνών με νέες λειτουργικές ιδιότητες. Η αντικατάσταση ή η επανάληψη νουκλεοτιδίων στις ρυθμιστικές (υποκινητές, προαγωγείς) περιοχές γονιδίων επιδρά σημαντικά στη δραστικότητα της έκφρασης γονιδίων. Οι κληρονομικές πολυμορφικές αλλαγές των γονιδίων παίζουν τον καθοριστικό ρόλο στον προσδιορισμό του γενετικού προφίλ κάθε ατόμου, στην εκτίμηση της γενετικής προδιάθεσης του σε διάφορα συχνά πολυπαραγοντικά νοσήματα. Η μελέτη των ιατρικών πτυχών του ΓΠ είναι η εννοιολογική και μεθοδολογική βάση της εξατομικευμένης ιατρικής (βλ. 1.4.).

Οι πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι κυριαρχούν οι μονονουκλεοτιδικές υποκαταστάσεις (SNPs) και οι μικρές επαναλαμβανόμενες μονο-, δι-, τρινουκλεοτιδικές επαναλήψεις (STRs), ωστόσο, υπάρχουν και άλλες πολυμορφικές παραλλαγές στο ανθρώπινο γονιδίωμα. Το 12% όλων των ανθρώπινων γονιδίων βρίσκεται σε περισσότερα από τα δύο αντίγραφα. Συνεπώς, οι πραγματικές γονιδιωματικές διαφορές μεταξύ των διαφορετικών ανθρώπων πιθανόν να υπερβαίνουν σημαντικά το 0,1% της προηγούμενης υπόθεσης [50]. Με βάση αυτό, επί του παρόντος πιστεύεται ότι η εγγύτητα των μη σχετιζόμενων γονιδιωμάτων δεν είναι το 99,9%, αλλά το 99%. Στο γονιδίωμα μπορεί να ποικίλει ο αριθμός αντιγράφων των μεμονωμένων γονιδίων αλλά και των ολόκληρων χρωμοσωμικών τμημάτων του μεγέθους 0,65 - 1,3 **μεγαβάσεων** (**1 Mbp** = 10^6 bp). Τα τελευταία χρόνια, με τη βοήθεια της μεθόδου συγκριτικής γονιδιωματικής υβριδοποίησης πάνω σε βιοτσίπ (DNA ανιχνευτές, οι οποίοι αντιστοιχούν σε ένα ολόκληρο ανθρώπινο γονιδίωμα) έχουν αποκτηθεί δεδομένα για τον πολυμορφισμό των μεμονωμένων γονιδιωμάτων πάνω σε μεγάλα

θραύσματα DNA (5 - 20 Mbp). Αυτός ο πολυμορφισμός ονομάζεται «παραλλαγή αριθμού αντιγράφων» (**CNV ή Copy Number Variation**) και η συμβολή του στη ανθρώπινη παθολογία ερευνάται εκτεταμένα [51].

1.3. Διεθνές Πρόγραμμα Χαρτογράφησης Απλοτύπων (HapMap Project)

Όσον αφορά τη μελέτη του γενετικού πολυμορφισμού ο καθοριστικός ρόλος ανήκει στο Διεθνές Πρόγραμμα Χαρτογράφησης Απλοτύπων («Haplotype Map» ή HapMap) που ξεκίνησε τον Οκτώβριο του 2002 στην Ουάσιγκτον, με τη πρωτοβουλία του Ινστιτούτου Μελέτης Ανθρώπινου Γονιδιώματος (HPIA) και υλοποιήθηκε από 200 ερευνητές 6 χωρών (HPIA, Ηνωμένο Βασίλειο, Καναδά, Ιαπωνία, Κίνα, Νιγηρία), μια *διεθνής επιστημονική κοινοπραξία* (consortium). Ο στόχος του παραπάνω προγράμματος ήταν η απόκτηση του «γενωμικού χάρτη επόμενης γενιάς», ο οποίος θα βασίζεται στην κατανομή των μονονουκλεοτιδικών υποκαταστάσεων (SNPs) στο απλοειδές σύνολο και των 23 ανθρώπινων χρωμοσωμάτων, ο οποίος δηλαδή θα περιγράφει τα κοινά μοτίβα των ανθρώπινων γενετικών παραλλαγών [52].

Η ουσία της μελέτης είναι ότι τα γειτονικά ή κοντά τοποθετημένα SNPs στο DNA ενός χρωμοσώματος από γενιά σε γενιά κληρονομούνται με μπλοκ (μονάδα). Ένα τέτοιο μπλοκ SNPs λέγεται **απλότυπος** (μια αλληλόμορφη σειρά πολλών τόπων που βρίσκονται στο ίδιο χρωμόσωμα). Επιπλέον, κάθε μια από τις χαρτογραφημένες SNPs λειτουργεί ως ανεξάρτητος μοριακός δείκτης. Για τη δημιουργία ενός SNPs χάρτη ολόκληρου του γονιδιώματος, η γενετική σύνδεση των δύο γειτονικών SNPs με το εξεταζόμενο χαρακτηριστικό (ασθένεια, σύμπτωμα) πρέπει να είναι εξαιρετικά αξιόπιστη. Η σύνδεση αυτή βοηθάει στο να εντοπίζονται οι πιθανότερες θέσεις των υποψήφιων γονιδίων, οι μεταλλάξεις (πολυμορφισμοί) των οποίων σχετίζονται με μια πολυπαραγοντική ασθένεια. Για την χαρτογράφηση, συνήθως, επιλέγονται λίγες SNPs, οι οποίες είναι στενά συνδεδεμένες με το ήδη γνωστό κληρονομικό χαρακτηριστικό. Τέτοιες, καλά χαρακτηρισμένες SNPs με τη συχνότητα των σπάνιων αλληλόμορφων τουλάχιστον 5%, καλούνται **SNPs σήμανσης (tagSNPs)** [53].

Εκτιμάται, ότι τελικά κατά τη διάρκεια του προγράμματος, από τις περίπου 10 εκατομμύρια SNPs που υπάρχουν στο ανθρώπινο γονιδίωμα, θα επιλεγθούν μόνο 500.000 tagSNPs. Ωστόσο και αυτές οι SNPs είναι αρκετές για να «επισκιαστεί» ολόκληρο το

ανθρώπινο γονιδίωμα. Φυσικά, ο σταδιακός κορεσμός του γονιδιώματος με τέτοιους μοριακούς δείκτες, κατάλληλους για τη γενική ανάλυση ολοκλήρου του γονιδιώματος, ανοίγει μεγάλες προοπτικές για τη χαρτογράφηση πολλών ακόμη άγνωστων γονιδίων που η αλληλόμορφες παραλλαγές τους συνδέονται με διάφορες σοβαρές ασθένειες [53].

Το πρώτο στάδιο του έργου HarMap αξίας 138 εκατομμυρίων δολαρίων ολοκληρώθηκε τον Οκτώβριο του 2005. Διεξήχθη γονοτυποποίηση περισσότερων από ένα εκατομμύριο SNPs (1.007.329) σε 270 εκπροσώπους τεσσάρων πληθυσμών (90 Ευρωπαίων και Αμερικανών, 90 Νιγηριανών, 45 Κινέζων και 45 Ιαπώνων). Κατά την ολοκλήρωση του πρώτου σταδίου του προγράμματος HarMap δημιουργήθηκε ένας απλοειδής χάρτης των SNPs που περιέχει πληροφορίες για τη κατανομή και τις συχνότητες των SNPs δεικτών στους πληθυσμούς που είχαν μελετηθεί [52].

Κατά την υλοποίηση του δεύτερου σταδίου προγράμματος HarMap που ολοκληρώθηκε τον Δεκέμβριο του 2006 έχει γίνει η γονοτυποποίηση του ίδιου δείγματος, των 269 ατόμων για άλλα 4.600.000 SNPs. Στην τελική του έκδοσή, η οποία θα είναι διαθέσιμη στο εγγύς μέλλον, δεδομένου του αυξανόμενου ποσοστού της χαρτογράφησης SNPs, θα υπάρχουν πληροφορίες για 9.000.000 SNPs του απλοειδούς συνόλου χρωμοσωμάτων. Χάρη στο Πρόγραμμα HarMap, το οποίο περιλαμβάνει όχι μόνο τις SNPs των ήδη χαρτογραφημένων γονιδίων με γνωστούς φαινοτύπους, αλλά και τις SNPs γονιδίων που δεν έχουν ταυτοποιηθεί, στα χέρια των επιστημόνων φτάνει ένα ισχυρό «Παγκόσμιο Σύστημα Πλοήγησης» γονιδιώματος. Το εργαλείο αυτό είναι απαραίτητο για την ανάλυση εις βάθος του γονιδιώματος κάθε ατόμου, για την γρήγορη και αποτελεσματική χαρτογράφηση των γονιδίων, οι αλληλόμορφες παραλλαγές των οποίων προδιαθέτουν για διάφορες πολυπαραγοντικές ασθένειες, για την διεξαγωγή μελετών ευρείας κλίμακας, για τις φαρμακογενετικές αναλύσεις, συνεπώς και για την ανάπτυξη εξατομικευμένης ιατρικής [54].

Ο Francis Collins, διευθυντής του Εθνικού Ινστιτούτου Μελέτης του Ανθρώπινου Γονιδιώματος (HΠΑ) δήλωσε: «..όταν συζητούσαμε το Πρόγραμμα Ανθρώπινου Γονιδιώματος πριν από 20 χρόνια, ονειρευόμουν μια εποχή που η γονιδιωματική προσέγγιση θα γίνει ένα εργαλείο διάγνωσης, θεραπείας και πρόληψης σοβαρών κοινών νοσημάτων. Η επιτυχία του έργου HarMap οδηγεί προς τη πραγματοποίηση αυτού του ονείρου» [55].

Πράγματι, με τη τεχνική HarMap έχει επιτευχθεί η ταχεία χαρτογράφηση του γονιδίου, υπεύθυνου για την εκφύλιση της όχρας κηλίδας (macular degeneration), ο

εντοπισμός του κύριου γονιδίου και των αρκετών γονιδιακών δεικτών της καρδιακής νόσου, η αναγνώριση των χρωμοσωμικών περιοχών καθώς και των γονιδίων που σχετίζονται με την οστεοπόρωση, το άσθμα, τον διαβήτη τύπου 1, 2 και τον καρκίνο του προστάτη [56, 57]. Με τη τεχνολογία HarMap είναι δυνατές οι μελέτες ολοκλήρου του γονιδιώματος αλλά και μεμονωμένων περιοχών του (τμήματα χρωμοσωμάτων). Ο συνδυασμός της τεχνολογίας HarMap, τεχνολογίας των βιοτσιπ DNA υψηλής ανάλυσης και ενός ειδικού λογισμικού ανάλυσης αποτελεσμάτων κατέστησε δυνατή τη μελέτη συσχέτισης ολόκληρου του γονιδιώματος (GWAS). Το γεγονός αυτό έφερε την επανάσταση στην εξατομικευμένη ιατρική ότι αφορά την αναζήτηση και ταυτοποίηση των γονιδίων προδιάθεσης για διάφορα πολυπαραγοντικά νοσήματα (βλ. κεφάλαια 5 και 6).

Θεωρώντας ότι ο γενετικός πολυμορφισμός σε καμία περίπτωση δεν περιορίζεται στις SNPs καθώς και οι μοριακές παραλλαγές του γονιδιώματος είναι πολύ πιο ποικίλες, οι επιστήμονες και οι εκδότες του επιστημονικού περιοδικού «Human Mutation» ο Richard Cotton (Αυστραλία) και ο Haig Kazazian (ΗΠΑ) πήραν μια πρωτοβουλία για το πρόγραμμα **Human Variom Project**. Ο σκοπός του προγράμματος είναι η δημιουργία μιας καθολικής τράπεζας δεδομένων που θα περιλαμβάνει πληροφορίες για τις μεταλλάξεις που οδηγούν σε διάφορες μονογονικές ασθένειες, αλλά και για τον πολυμορφισμό που προδιαθέτει για πολυπαραγοντικές ασθένειες. Επειδή τα όρια μεταξύ του «πολυμορφισμού» και των «μεταλλάξεων» είναι αρκετά αυθαίρετα, η δημιουργία μιας Παγκόσμιας βιβλιοθήκης των γενετικών παραλλαγών είναι πολύ χρήσιμη [58].

1.4. Νέα προγράμματα μελέτης του ανθρώπινου γονιδιώματος

Το έργο HarMap δεν είναι μοναδικό, αν και είναι το πιο προχωρημένο στην εποχή μας σχετικά με τις μελέτες της δομικής και λειτουργικής οργάνωσης του ανθρώπινου γονιδιώματος. Ένα άλλο διεθνές έργο που ξεκίνησε από το Εθνικό Ινστιτούτο στην Έρευνα Ανθρώπινου Γονιδιώματος (ΗΠΑ) (National Institute of Human Genome Research ή NIHGR) είναι το πρόγραμμα «**ENCODE**» («Εγκυκλοπαίδεια των στοιχείων DNA»). Ο στόχος του είναι η ακριβής ταυτοποίηση και χαρτογράφηση όλων των γονιδίων που συμμετέχουν στη πρωτεϊνοσύνθεση, όπως επίσης και των λειτουργικά σημαντικών στοιχείων του ανθρώπινου γονιδιώματος [59].

Ένα άλλο έργο του NIHGR, «**Chemical Genomics**», στοχεύει στη δημιουργία μιας βιβλιοθήκης χημικών ουσιών, κυρίως των οργανικών ενώσεων, βολικών για τη μελέτη των κύριων μεταβολικών οδών του σώματος, άμεσα αλληλοεπιδρωμένων με το γονιδίωμα και πολλά υποσχόμενων για τη δημιουργία νέων φαρμάκων. Η παραπάνω βιβλιοθήκη θα έχει δημόσια πρόσβαση [60].

Επίσης το έργο «**Genome to Life**» επικεντρώνεται στις ιδιαιτερότητες του μεταβολισμού και στην γονιδιωματική οργάνωση των μονοκυττάρων, παθογόνων για τον άνθρωπο οργανισμών. Ως αποτέλεσμα της υλοποίησης του προγράμματος θεωρείται ότι θα είναι η δημιουργία των μηχανογραφικών μοντέλων αντίδρασης των μικροβίων σε εξωτερικές επιδράσεις. Η έρευνα θα επικεντρωθεί σε τέσσερις κύριους τομείς: **βακτήρια, πρωτεΐνες, ρυθμιστικοί μηχανισμοί των γονιδίων, μικροβιακοί συσχετισμοί** (συμβίωση) και αλληλεπιδράσεις με το ανθρώπινο σώμα [61].

Τέλος, η Κεντρική Οργάνωση για τη Χρηματοδότηση Επιστημονικών Προγραμμάτων στο Ηνωμένο Βασίλειο, το Wellcome Trust, έχει δημιουργήσει μια κοινοπραξία για τη γονιδιωματική μελέτη της τρισδιάστατης δομής των πρωτεϊνών (Structural Genomic Consortium). Ο σκοπός του προγράμματος είναι να αυξηθεί η αποτελεσματικότητα στην έρευνα και στη σύνθεση νέων φαρμάκων στοχευμένης δράσης, με βάση τα δεδομένα μελέτης του ανθρώπινου γονιδιώματος [62].

Το έργο «**Γονιδίωμα και Περιβάλλον**» (Environmental Genome Project), το οποίο αναπτύσσεται στις ΗΠΑ και στη Δυτική Ευρώπη, σχετίζεται επίσης άμεσα με την προγνωστική ιατρική και με τη φαρμακογενετική [63].

1.5. Ανθρώπινο γονιδίωμα και μοριακή ιατρική

Η αναγνώριση των πολλών χιλιάδων γονιδίων, η αποσαφήνιση των μοριακών μηχανισμών στα κληρονομικά και πολυπαραγοντικά νοσήματα, ο ρόλος των γενετικών παραγόντων στην αιτιολογία και παθογένεση πολλών μολύνσεων, η τεκμηρίωση της γενετικής μοναδικότητας κάθε ατόμου είναι τα κύρια επιτεύγματα που έδωσαν στη μοριακή ιατρική το σύγχρονο επιστημονικό υπόβαθρο. Δεν υπάρχει αμφιβολία ότι το μέλλον της ανήκει. Η μοριακή ιατρική είναι η ιατρική του 21^{ου} αιώνα [7, 25, 64, 68, 69, 70]. Τα κυριότερα επιτεύγματα της μοριακής ιατρικής και των ταχέως αναπτυσσόμενων κατευθύνσεων της (βλ. 1.1) είναι τα εξής:

- έχουν αναπτυχθεί οι ακριβείς, αποτελεσματικές και σε μεγάλο βαθμό καθολικές μέθοδοι διάγνωσης των κληρονομικών νόσων σε οποιοδήποτε στάδιο οντογένεσης, συμπεριλαμβανομένης της προγεννητικής διάγνωσης [26, 48, 71-73],
- έχουν αναπτυχθεί οι μοριακές προσεγγίσεις για την απόλυτα ακριβή ταυτοποίηση του ατόμου (γονιδιωματική αποτύπωση) [74],
- έχουν τεθεί οι πειραματικές και κλινικές βάσεις της γονιδιακής θεραπείας των κληρονομικών και μη κληρονομικών ασθενειών [75, 76, 77]
- με βάση τα δεδομένα της γενετικής μοναδικότητας κάθε ατόμου, έχει ξεκινήσει η μελέτη στη **φαρμακογενετική**, αναλύοντας τις αιτίες των χαμηλών ή αντιθέτως αυξημένων ευαισθησιών των ατόμων ή των μεμονωμένων πληθυσμών στις επιδράσεις των διαφόρων φαρμάκων ή χημικών ουσιών [7, 69, 70, 78-81]
- στη **φαρμακογονιδιωματική** αναπτύσσονται θεμέλια για την εξατομικευμένη θεραπεία και για τη δημιουργία νέων φαρμάκων που δρουν στοχευμένα σε ξεχωριστά μονοπάτια της παθολογικής διαδικασίας [80, 82, 83],
- αναπτύσσεται ενεργά η μοριακή προσέγγιση της προγνωστικής [7, 84-86] που βασίζεται στην ανάλυση των **γονιδίων προδιάθεσης**.

Έτσι, η μοριακή ιατρική και οι κύριοι τομείς της, η προγνωστική ιατρική, η φαρμακογενετική, η γονιδιακή θεραπεία υφίστανται ως αποτέλεσμα της ευρείας εισαγωγής της γενετικής γνώσης στην παραδοσιακή ιατρική μετά την αποκρυπτογράφηση του ανθρώπινου γονιδιώματος.

Το ιδιαίτερο γνώρισμα της **μοριακής ιατρικής** ως ιατρικής είναι ο **εξατομικευμένος χαρακτήρας της**. Ο σκοπός της είναι η διόρθωση της παθολογικής διαδικασίας σε ένα συγκεκριμένο άτομο, λαμβάνοντας υπόψη τα μοναδικά γενετικά χαρακτηριστικά του. Το άλλο κύριο χαρακτηριστικό της είναι μια προφανής **προληπτική προσέγγιση**. Οι πλήρεις πληροφορίες σχετικά με το γονιδίωμα μπορούν να ληφθούν πολύ πριν την εμφάνιση νόσου. Τα κατάλληλα προληπτικά μέτρα μπορούν να εμποδίσουν ή να εξαλείψουν εντελώς την ανάπτυξη μιας σοβαρής ασθένειας

Κεφάλαιο 2. Γονίδια, μεταλλάξεις, νοσήματα

Ένας από τους τελικούς στόχους του προγράμματος Ανθρώπινου Γονιδιώματος ήταν ο καθορισμός του αριθμού των γονιδίων. Σε μεγάλο βαθμό, ο στόχος αυτός έχει επιτευχθεί. Ωστόσο, πολλά ερωτήματα, σχετικά με την ακρίβεια ταυτοποίησης των γονιδίων για τα πολυπαραγοντικά νοσήματα, παραμένουν ανοιχτά λόγω της δυσκολίας αυτών των μελετών στον άνθρωπο. Επίσης, δεν είναι γνωστές οι λειτουργίες των νέων γονιδίων που έχουν βρεθεί. Η μελέτη των λειτουργιών τους και κυρίως, η αποσαφήνιση των σύνθετων τρόπων αλληλεπίδρασης των προϊόντων τους, ανήκει στα καθήκοντα της ταχέως αναπτυσσόμενης **λειτουργικής γονιδιωματικής** [87]. Οι διάφορες παραλλαγές στην πρωταρχική δομή του DNA που προκαλούνται από τις μεταλλάξεις (πολυμορφισμούς) αποτελούν τη βάση ενός μοναδικού γενετικού «πορτραίτου» του κάθε ατόμου, καθορίζουν το ειδικό μεταβολικό του προφίλ. Οι ακραίες εκφράσεις της ανθρώπινης κληρονομικής μεταβλητότητας είναι οι **κληρονομικές νόσοι** [72, 73]. Η συνέπεια του πολυμορφισμού, καθώς και η επιγενετική του μεταβλητότητα, είναι η κληρονομική προδιάθεση του καθενός από εμάς σε ορισμένες κοινές χρόνιες ασθένειες. Προκειμένου να διευκολυνθεί η γνωριμία του αναγνώστη με μεταγενέστερα και πιο ειδικά μέρη της εργασίας, σκόπιμα παρουσιάζονται σε αυτό το κεφάλαιο οι σχετικές πληροφορίες για τα γονίδια, τις μεταλλάξεις, τον γενετικό πολυμορφισμό και τις φαινοτυπικές τους εκδηλώσεις (**μονογονικές και πολυπαραγοντικές ασθένειες**).

2.1. Τι είναι το γονίδιο; Πόσα και τι γονίδια υπάρχουν;

Καμία άλλη έννοια της γενετικής δεν προκάλεσε τόσο έντονες συζητήσεις και τόσο συχνά δεν υποβλήθηκε σε αναθεώρηση όπως αυτή του «γονιδίου». Ο όρος προτάθηκε το 1909 από τον Ελβετό επιστήμονα V. Johannsen για να προσδιορίσει τη **στοιχειώδη μονάδα υλικού (παράγοντα) κληρονομικότητας**. Στη δεκαετία του 1950, μετά τα γνωστά έργα του Beadle και του Tatum, των Αμερικανών ερευνητών στη γενετική των μικροβίων, ο όρος «γονίδιο» άρχισε να δηλώνει ένα **θραύσμα του DNA, υπεύθυνο για τη σύνθεση μίας πρωτεΐνης («ένα γονίδιο - ένα ένζυμο»)**. Αργότερα διευκρινίστηκε ότι ένα γονίδιο είναι μία πολυπεπτιδική αλυσίδα. Σύντομα, όμως, ανακαλύφθηκε μια **«ασυνέχεια»** του γονιδίου. Αποδείχθηκε ότι σε όλους τους ευκαρυώτες, συμπεριλαμβανομένων των ανθρώπων, αντίθετα από τους ιούς, από τα βακτηρίδια, ακόμη και από το μιτοχονδριακό DNA,

τα γονίδια στο χρωμόσωμα είναι μια εναλλαγή των κωδικοποιημένων τμημάτων DNA (εξονίων) και των μη κωδικοποιημένων (εσωνίων). Το πρωτογενές προϊόν μεταγραφής (ετερογενές RNA) περιλαμβάνει επίσης τις κωδικοποιημένες και μη-περιοχές, δηλαδή, έχει ασυνεχή δομή του εξωνίου - εσωνίου. Μετά την μεταγραφή, **αυτό το πρωτογενές προϊόν RNA υποβάλλεται σε ματισμό (η διαδικασία αποκοπής σημασμένων μη-κωδικοποιημένων αλληλουχιών του DNA, εσωνίων, από το πρωτογενές μετάγραφο) και συρραφή των κωδικοποιημένων θραυσμάτων (εξονίων) μεταξύ τους.** Το προκύπτον προϊόν της δευτερογενούς μεταγραφής των εξονίων ονομάζεται **αγγελιαφόρο RNA (mRNA)**, το οποίο φθάνει από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα, όπου και εξασφαλίζει τη σύνθεση αντίστοιχης πρωτεΐνης [7]

Για να καταλάβουμε πόσο σύντομα περιπλέκεται η έννοια του «γονιδίου» στην εποχή μας, είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι για πολλά γονίδια ανακαλύφθηκε το φαινόμενο εναλλακτικού ματίσματος, όταν από ένα πρωτογενές μεταγραφικό RNA σε διαφορετικούς ιστούς, σχηματίζονται αρκετά μεταγραφήματα διαφορετικού μήκους (δευτερογενείς mRNA). Κατά συνέπεια, οι πρωτεΐνες (πολυπεπτίδια) που συντίθενται από αυτά τα μόρια είναι επίσης διαφορετικές. Έτσι, η ίδια αλληλουχία DNA κωδικοποιεί πολλά διαφορετικά πρωτεϊνικά προϊόντα. Είναι γνωστό ότι τα γονιδιώματα των ανθρώπων και των άλλων θηλαστικών που έχουν ήδη αναλυθεί, έχουν περίπου τον ίδιο αριθμό γονιδίων (περίπου 20 - 25.000) που είναι σχεδόν διπλάσιος από τον αριθμό γονιδίων της μύγας φρούτων, *Drosophila*. Πιστεύεται ότι χάρη στη συγκεκριμένη περίπλοκη διαδικασία της συρραφής και των μετά-μεταφραστικών τροποποιήσεων εξασφαλίζεται ο πραγματικός αριθμός πρωτεϊνών στο ανθρώπινο σώμα, που είναι σχεδόν **δεκαπλάσιος** (περίπου 200 - 250.000) από τον αριθμό των γονιδίων [24, 87].

Το γεγονός ότι έχουν βρεθεί γονίδια που βρίσκονται μέσα στα ιντρόνια ενός άλλου γονιδίου, δηλαδή **«ένα γονίδιο μέσα σε άλλο γονίδιο»** περιπλέκει περισσότερο τη κατάσταση για τον ορισμό ενός γονιδίου. Έτσι, το «σημασιολογικό» γονίδιο (sense) μιας άγνωστης λειτουργίας βρέθηκε μέσα στο ιντρόνιο 23 του γονιδίου παράγοντα VIII της πήξης. Εάν προσθέσουμε σε αυτό ότι το γονίδιο ως λειτουργική μονάδα κληρονομικότητας φέρει διαφορετικά ρυθμιστικά στοιχεία σε άμεση γειτνίαση με την αρχή της μεταγραφής (συνήθως στο 5' άκρο της αλυσίδας DNA) μέσα στο μεταγραφόμενο τμήμα DNA ή

βρίσκεται μακριά από το ίδιο το γονίδιο, γίνεται σαφές πόσο δύσκολο είναι να δώσουμε ένα τελικό ορισμό του γονιδίου στο παρόν στάδιο.

Σήμερα, ανάλογα με το σκοπό, χρησιμοποιούνται διάφοροι ορισμοί του γονιδίου. Έτσι, στην κλασική γενετική, είναι συνηθισμένο να ονομάζεται **ένας χαρτογραφημένος πάνω στο χρωμόσωμα τύπος ως υπεύθυνος για κάποιο φαινοτυπικό χαρακτηριστικό** [88]. Στη μοριακή βιολογία ένα γονίδιο είναι **ένα σχετιζόμενο με ρυθμιστικές αλληλουχίες τμήμα DNA, που αντιστοιχεί σε μια συγκεκριμένη μονάδα μεταγραφής** [89]. Κατά την εκτέλεση του προγράμματος «Ανθρώπινο γονιδίωμα» ένα γονίδιο αναφέρθηκε ως **μια μονάδα μεταγραφής, η οποία μπορεί να μεταφραστεί σε μία ή περισσότερες αμινοξικές αλληλουχίες** και ονομάστηκε ως «**γονίδιο καταμέτρησης**» (counting gene) [90]. Ωστόσο, όπως αναγνωρίζουν πολλοί ερευνητές, το έργο της ταυτοποίησης γονιδίων, ακόμη και με την παρουσία μιας γνωστής αλληλουχίας DNA στο κύτταρο, εξακολουθεί να είναι πολύ περίπλοκο. Η καταμέτρηση του αριθμού γονιδίων περιπλέκεται και από το γεγονός ότι μαζί με τα δομικά γονίδια που λειτουργούν, στο γονιδίωμα υπάρχουν και τα λεγόμενα «ψευδογονίδια» (περισσότερο από 19.000) που αντιπροσωπεύουν τα μεταλλαγμένα αντίγραφα των φυσιολογικών γονιδίων, τα οποία, ωστόσο, δεν είναι σε θέση να λειτουργήσουν λόγω της απώλειας ή βλάβης των ζωτικών στοιχείων. Σήμερα, ο αριθμός των ανθρώπινων γονιδίων που λειτουργούν, μπορεί να υπολογιστεί στο περίπου: κυμαίνεται από το 20.000 έως 25.000 και υπολογίζεται κατά μέσο όρο στα 22.000 [91].

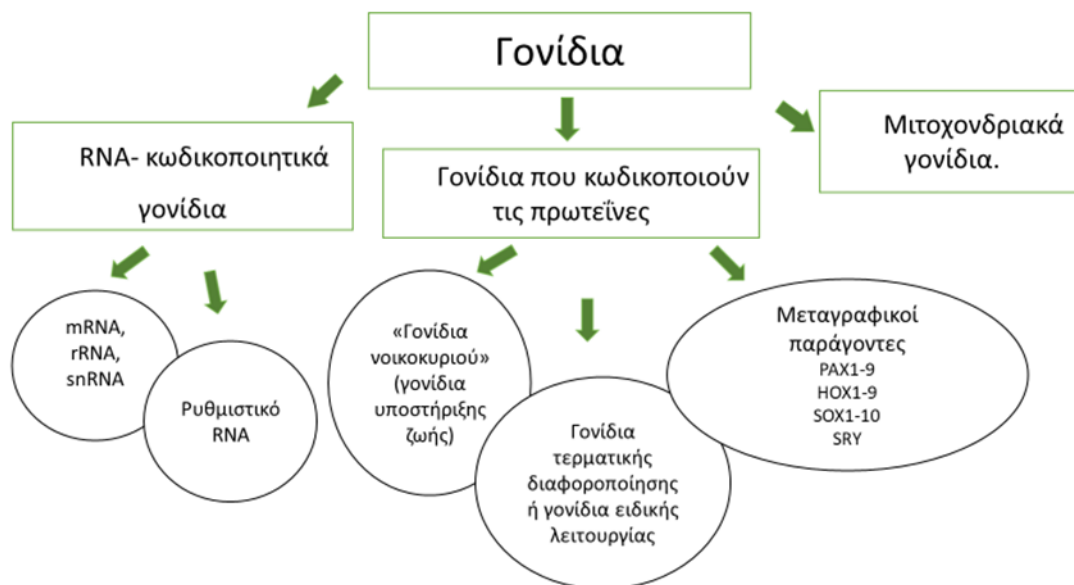
Τι γονίδια υπάρχουν; [35, 88, 92-94]

Όπως φαίνεται από το Σχήμα 2.1, υπάρχουν τουλάχιστον τρεις κύριες ομάδες γονιδίων:

- 1) RNA κωδικοποιητικά γονίδια
- 2) «Δομικά» γονίδια, γονίδια που κωδικοποιούν τις δομικές πρωτεΐνες
- 3) Μιτοχονδρικά γονίδια.

Τα RNA κωδικοποιητικά γονίδια είναι λειτουργικά ενεργά γονίδια ήδη στο στάδιο των προϊόντων του RNA. Αυτά είτε προσδιορίζουν τη σύνθεση του RNA, που είναι αναγκαία για τις διαδικασίες συναρμογής/ συρραφής, για τη σύνθεση των ριβοσωμάτων και για τις διαδικασίες μετάφρασης, είτε συνθέτουν τα μόρια RNA που έχουν τη ρυθμιστική επίδραση, δηλ. επηρεάζουν τις λειτουργίες άλλων γονιδίων (για παράδειγμα, γειτονικό δι- και μονόκλωνο παρεμβαλλόμενο RNA) (βλέπε κεφάλαιο 1).

Τα γονίδια που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες χωρίζονται σε «γονίδια νοικοκυριού» (γονίδια υποστήριξης ζωής) και γονίδια τερματικής διαφοροποίησης που ονομάζονται επίσης και ως γονίδια ειδικής λειτουργίας. Τα τελευταία κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες που χαρακτηρίζουν τον διαφοροποιημένο ιστό και καθορίζουν τις ειδικές λειτουργίες του. Για παράδειγμα, την αιμοσφαιρίνη σε ερυθρά αιμοσφαίρια, τις μυϊκές πρωτεΐνες, της εκκριντικές πρωτεΐνες των ενδοκρινών και πεπτικών αδένων και πολλά άλλα. Τέλος, σχετικά πρόσφατα, έχουν διακριθεί και αυξάνονται ραγδαία σε αριθμό, γονίδια ειδικών πυρηνικών πρωτεϊνών, που ονομάζονται **μεταγραφικοί παράγοντες – FT** (transcription factors).



Σχήμα 2.1 Ταξινόμηση γονιδίων, τροποποιημένο σχήμα [93]

Έχοντας συγκριτικά μικρά μεγέθη, τα γονίδια αυτά χαρακτηρίζονται από την παρουσία των καλά διατηρημένων αλληλουχιών του DNA, πρωτεϊνικά προϊόντα των οποίων είναι σε θέση να συνδεθούν με τις ρυθμιστικές περιοχές πολλών δομικών γονιδίων, προκαλώντας την καταστολή τους (διακοπή μεταγραφής) ή την ενεργοποίηση (έναρξη μεταγραφής). Τα προϊόντα των γονιδίων FT, που ρυθμίζουν τη λειτουργική κατάσταση πολλών δομικών γονιδίων, είναι ικανά να ελέγχουν μια ολόκληρη σειρά από μορφογενετικές αντιδράσεις ενός αναπτυσσόμενου οργανισμού. Δεν είναι τυχαίο ότι τα γονίδια FT αποκαλούνται μερικές φορές ως «γονίδια κύριοι» και τα δομικά γονίδια ως «γονίδια σκλάβοι».

Τα ανθρώπινα μιτοχόνδρια περιέχουν μόνο 37 γονίδια και χαρακτηρίζονται από την απουσία ιντρονίων. Τα 13 γονίδια **mtDNA** (Mitochondrial DNA) κωδικοποιούν τις μεμονωμένες υπομονάδες των μιτοχονδριακών συμπλεγμάτων αναπνευστικής αλυσίδας και 24 παρέχουν τη πρωτεϊνική μετάφραση στα μιτοχονδριακά ριβοσώματα [95].

2.2. Μεταλλάξεις και γενετικός πολυμορφισμός

Όπως αναφέρθηκε στο Κεφάλαιο 1, οι οποιοσδήποτε αλλαγές (μεταβολές) στις αλληλουχίες DNA, ονομάζονται μεταλλάξεις. Οι μεταλλάξεις μπορούν να είναι **λειτουργικά σιωπηλές** («ουδέτερες») όταν δεν επηρεάζουν τη δομή του ιδίου του γονιδίου και τις ρυθμιστικές του αλληλουχίες ή να οδηγούν σε νουκλεοτιδικές υποκαταστάσεις στις οποίες στο τελικό πολυπεπτίδιο διατηρείται το ίδιο αμινοξύ. Το τελευταίο μπορεί να είναι και το αποτέλεσμα «εκφυλισμού» του γενετικού κώδικα: κάθε αμινοξύ κωδικοποιείται από τις πολλές διαφορετικές τριπλέτες, για αυτό η αντικατάσταση ενός από τα τρία νουκλεοτίδια στο κωδικόνιο, δεν οδηγεί πάντοτε στην αντικατάσταση του αμινοξέος [35].

Η πιο συνηθισμένη παραλλαγή των **αυθόρμητων** μεταλλάξεων είναι οι υποκαταστάσεις ενός νουκλεοτιδίου (SNPs) (βλέπε Κεφάλαιο 1), οι οποίες εμφανίζονται στο DNA περίπου κάθε 200-300 ζεύγη βάσεων. Ο ακριβής εντοπισμός μιας συγκεκριμένης SNP στον γονιδιωματικό χάρτη μπορεί να γίνει με την ενίσχυση ενός τμήματος DNA που περιέχει τη θέση SNP, χρησιμοποιώντας μια **αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)** ακολουθούμενη από την επεξεργασία του «ενισχυμένου τμήματος» με ειδικά περιοριστικά ένζυμα (**ενδονουκλεάσες**). Τα τελευταία είναι ένζυμα βακτηριακής προέλευσης που αναγνωρίζουν τα συγκεκριμένα σύντομα θραύσματα DNA (4-8 b.p.). Ανάλογα με την παρουσία ή την απουσία της υπό μελέτη SNP, η επιλεγμένη ενδονουκλεάση θα αποκόψει ή όχι το DNA στη θέση του εντοπισμού της. Αυτό μπορεί να προσδιοριστεί με ηλεκτροφόρηση [96].

«Οι διαφορές μεταξύ των μεταλλάξεων και των ΓΠ είναι πιο πολύ ποσοτικές παρά ποιοτικές», υποστηρίζει ένας πολύ διάσημος γενετιστής, ο καθηγητής του Πανεπιστημίου στο Στάνφορντ (ΗΠΑ), ο L. Cavalli-Sforza [97]. Η διαφορά είναι ότι σε αντίθεση με τις μεταλλάξεις, ο ΓΠ είναι πιο συχνός και μπορεί να υπάρχει σε περισσότερο από το 1% του πληθυσμού [97]. Ωστόσο, υπάρχουν μεταλλάξεις, οι οποίες σχεδόν απενεργοποιούν πλήρως τα μεμονωμένα γονίδια, δηλαδή εμποδίζουν την έκφρασή τους και παρόλο

αυτά είναι πιο συχνές από το 1% σε έναν πληθυσμό. Έτσι, είναι γνωστό ότι σχεδόν το μισό του λευκού πληθυσμού δεν έχει ένα από τα ένζυμα της ξενοβιοτικής αποτοξίνωσης, την γλουταθειόνη-S-τρανσφεράση λόγω της εκτεταμένης διαγραφής στο γονίδιο GSTM1 (γονίδιο αποτοξίνωσης) (βλ. Κεφάλαιο 5). Αυτήν την μετάλλαξη, καθώς και την μετάλλαξη του δεύτερου γονιδίου της φάσης αποτοξίνωσης GSTT1 (η συχνότητα πληθυσμού των «μηδενικών» γονότυπων (0/0) είναι περίπου το 20%) μπορεί κανείς να αποκαλέσει και ως ΓΠ, λόγω ότι δεν προκαλούν άμεσα κληρονομικές ασθένειες, αν και σχετίζονται με πολλά πολυπαραγοντικά νοσήματα (βλέπε κεφάλαιο 5).

Οι μεταλλάξεις που προκαλούν τις κοινές κληρονομικές ασθένειες, συναντιούνται πιο σπάνια. Η συχνότητα τους δεν υπερβαίνει το 1% [98]. Για παράδειγμα, οι πληθυσμιακές συχνότητες των μεταλλάξεων που προκαλούν γονιδιακές ασθένειες όπως η αιμορροφιλία Α, η μυϊκή δυστροφία Duchenne ή φαινοκυκετονουρία είναι κάτω από 1% σε 2-5 χιλιάδες άτομα. Ταυτόχρονα, το 10-20% των λευκών της Δυτικής Ευρώπης και περίπου 2% των κατοίκων της Ρωσίας είναι οι ετερόζυγοι φορείς των μεταλλάξεων στο γονίδιο κυστικής ίνωσης (CFTR) και, κυρίως, στη μετάλλαξη delF508. Μόνο αυτή η μετάλλαξη αντιπροσωπεύει το 60-70% όλων των μεταλλάξεων του γονιδίου CFTR σε ασθενείς με κυστική ίνωση στη Δυτική Ευρώπη [99] και 45-50% στη Ρωσία [100]. Η πληθυσμιακή συχνότητα των ετερόζυγων φορέων της μετάλλαξης delF508 είναι περίπου 2-5%, πράγμα που μας επιτρέπει επίσημα να εκχωρήσουμε αυτή τη βαριά μετάλλαξη στον αριθμό των ΓΠ. Η κατάσταση είναι παρόμοια και με πολλές άλλες ενδημικές μεταλλάξεις, για παράδειγμα οι μεταλλάξεις των γονιδίων σφαιρίνης σε ασθενείς με δρεπανοκυτταρική αναιμία [101].

Μια άλλη, λιγότερο εμφανής διαφορά μεταξύ των μεταλλάξεων και ΓΠ είναι η επίδρασή τους στις γονιδιακές λειτουργίες. Συνήθως, ο ΓΠ δεν διαταράσσει την γονιδιακή έκφραση, αλλά οδηγεί στην εμφάνιση πρωτεϊνών με ελαφρώς αλλοιωμένες φυσικοχημικές ιδιότητες. Ένα παράδειγμα είναι τα ισοένζυμα, τα οποία σήμερα είναι γνωστά για πολλές πρωτεΐνες [94]. Αντίθετα, οι μεταλλάξεις, απενεργοποιούν ένα γονίδιο, οδηγούν σε σημαντική μείωση σύνθεσης του πρωτεϊνικού προϊόντος (**«μείον αποτέλεσμα»**), στην περίσσεια του (**«συν αποτέλεσμα»**) ή στην εμφάνιση των μη φυσιολογικών πρωτεϊνών, προκαλώντας ορισμένες μονογονιδιακές νόσους [102]. Σε αντίθεση με τον ΓΠ, η φαινοτυπική επίδραση των πιο γνωστών μεταλλάξεων φαίνεται σαφώς με τη μορφή της κληρονομικής

νόσου. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι τουλάχιστον μερικοί ΓΠ, ειδικά εκείνοι που βρίσκονται σε εξονία ή σε ρυθμιστικές αλληλουχίες (προαγωγείς, ενισχυτές κλπ.) [89], δεν είναι λειτουργικά ουδέτεροι και μπορούν να επηρεάσουν δυσμενώς τις πρωτεϊνικές λειτουργίες των αντίστοιχων πολυμορφικών παραλλαγών του γονιδίου. Σε μια τυπική περίπτωση, οι SNPs στα εξόνια μπορούν να οδηγήσουν στην αλλαγή του γενετικού κώδικα και, ως αποτέλεσμα, στην αντικατάσταση ενός αμινοξέος της πολυπεπτιδικής αλυσίδας. Κατά κανόνα, ένα νέο πρωτεϊνικό προϊόν ενός τέτοιου γονιδίου εκτελεί τις λειτουργίες του χειρότερα από την πρωταρχική του μορφή (αλλήλιο «άγριου τύπου»), το οποίο με την αλλαγή των περιβαλλοντικών συνθηκών μπορεί να συμβάλει στην ανάπτυξη διαφόρων ασθενειών.

Έτσι, ο γενετικός πολυμορφισμός και οι μεταλλάξεις είναι φαινόμενα της ίδιας τάξης. Η γραμμή μεταξύ αυτών των εννοιών είναι πολύ «λεπτή», όπως συχνά είναι «λεπτός» και ο διαχωρισμός της έννοιας της φυσιολογικότητας και της παθολογίας [103].

2.2.1. Ταξινόμηση των μεταλλάξεων

Η συντριπτική πλειοψηφία των μεταλλάξεων είναι το αποτέλεσμα της αντικατάστασης ενός νουκλεοτιδίου από ένα άλλο στο σημασιολογικό τμήμα (sense) γονίδιο. Αυτές οι αλλοιώσεις συμβαίνουν συνήθως κατά την αναπαραγωγή του DNA (διπλασιασμός) στη διάρκεια της προετοιμασίας των κυττάρων για διαίρεση. Αν και η διαδικασία αντιγραφής είναι εξαιρετικά ακριβής και υπάρχει ένα σύνθετο σύστημα ενζύμων που αναγνωρίζει και διορθώνει τα σφάλματα αντιγραφής (reparations), παρόλα αυτά, τέτοια σφάλματα εμφανίζονται κατά μέσο όρο με συχνότητα 10^{-9} - 10^{-11} ανά ένα περιλαμβανόμενο νουκλεοτίδιο. Μια άλλη σημαντική πηγή των σημειακών αλλαγών (ενός νουκλεοτιδίου) είναι η μεταλλαξιογόνος επίδραση της ακτινοβολίας και των χημικών ουσιών (μεταλλαξιογόνων παραγόντων). Επομένως, οι σημειακές μεταλλάξεις (υποκαταστάσεις ενός νουκλεοτιδίου) μπορεί να προκύπτουν από τις επιδράσεις των χημικών, φυσικών και βιοχημικών παραγόντων [104].

Οι σημειακές αντικαταστάσεις στις κωδικοποιούσες αλληλουχίες DNA μπορούν να προκαλέσουν τις διάφορες μεταλλάξεις, ο τύπος των οποίων καθορίζεται πλήρως από τη φύση της νουκλεοτιδικής υποκατάστασης, δηλαδή από τον κώδικα τριών γραμμάτων (κωδικόνιο) της νουκλεοτιδικής ακολουθίας του DNA μετά την αντικατάσταση.

Επομένως, στην περίπτωση της (non-sense) μετάλλαξης η αντικατάσταση ενός νουκλεοτιδίου στο κωδικοποιητικό τμήμα ενός γονιδίου οδηγεί στον σχηματισμό ενός «**κωδικόνιου λήξης**», μιας τριπλέτας, επί της οποίας σταματά η μετάφραση και, αντίστοιχα, η σύνθεση των πρωτεϊνών στα ριβοσώματα. Στην περίπτωση μιας «**λανθασμένου νοήματος**» μετάλλαξης (**missense**), εμφανίζεται η τριάδα που αντιστοιχεί στο κωδικόνιο ενός **άλλου αμινοξέος**, το οποίο και περιλαμβάνεται στην πολυπεπτιδική αλυσίδα της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης. Η διαφορά τους είναι ότι η (missense) μετάλλαξη υποκαθιστά ένα διαφορετικό αμινοξύ στην αμινοξική αλληλουχία ενώ η μετάλλαξη (non-sense) εισάγει ένα κωδικόνιο λήξης στην αλληλουχία mRNA. Μία σημειακή μετάλλαξη με την **απώλεια** ή **εισαγωγή** ενός ή δύο νουκλεοτιδίων μπορεί να οδηγήσει σε μετατόπιση του πλαισίου ανάγνωσης (**frameshift**) και στον τερματισμό της μετάφρασης. Τέλος, οι σημειακές νουκλεοτιδικές υποκαταστάσεις στη θέση της διασύνδεσης εξονίου - ιντρονίου (εσωνίου) μπορούν να διαταράξουν την διαδικασία αναγνώρισης των επισημασμένων αλληλουχιών του DNA από τα αντίστοιχα μόρια RNA (το λεγόμενο U-RNA) και να οδηγήσουν στη δυσλειτουργία της διαδικασίας συναρμογής/ ματίσματος. Οι παραπάνω μεταλλάξεις ονομάζονται μεταλλάξεις συναρμολόγησης. Με αυτές τις μεταλλάξεις υπάρχει απώλεια του αντίστοιχου εξονίου, ή αντίστροφα, διατήρηση του μεταγραφικού προϊόντος του γειτονικού ιντρονίου. Και στις δυο περιπτώσεις, η δομή του δευτερογενούς μεταγραφικού RNA και η σύνθεση της πρωτεΐνης που κωδικοποιείται από αυτό, είναι διαταραγμένες [89].

Θα πρέπει να σημειωθεί ότι οι σημειακές μεταλλάξεις δεν εντοπίζονται τυχαία στο γονιδίωμα και στα μεμονωμένα γονίδια. Συχνά αυτές συγκεντρώνονται σε περιορισμένες περιοχές των DNA αλληλουχιών. Πολύ συχνά οι νουκλεοτιδικές υποκαταστάσεις επηρεάζουν τις περιοχές των **νησίδων CpG**. Αυτές είναι οι DNA αλληλουχίες των 200-300 b.p. που βρίσκονται στην αρχή του μεταγραφόμενου σημασιολογικού (sense) μέρους πολλών δομικών γονιδίων (ειδικά των «γονιδίων νοικοκυριών») και είναι οι «**προωθητές**» αυτών των γονιδίων, δηλαδή οι ρυθμιστές της μεταγραφικής δράσης τους [104].

Οι άλλες κοινές μεταλλάξεις περιλαμβάνουν:

- ✓ τις διαγραφές (απώλεια των θραυσμάτων DNA διαφορετικών μηκών),
- ✓ τις αλληλοεπικαλύψεις (διπλασιασμός των θραυσμάτων DNA),
- ✓ τις προσθήκες (μετατοπισμένα θραύσματα DNA),

- ✓ τις μετατοπίσεις (ανταλλαγή των θραυσμάτων DNA μεταξύ των διαφορετικών γονιδίων ή χρωμοσωμάτων).

Μερικές από αυτές τις μεταλλάξεις (επικαλύψεις, διαγραφές, προσθήκες) μπορούν να προκαλέσουν μια γενετική ανισορροπία και να οδηγήσουν σε σοβαρές διαταραχές της πρωτεϊνικής σύνθεσης. Ενώ οι άλλες (αναστροφές, μετατοπίσεις) συνήθως δεν συνοδεύονται από την απώλεια ή την απόκτηση του γενετικού υλικού και δεν εμφανίζονται στον φαινότυπο, δηλαδή συμπεριφέρονται ως τυπικές «ουδέτερες» μεταλλάξεις [35].

Ένας ξεχωριστός τύπος μετάλλαξης είναι οι αποκαλούμενες «**δυναμικές**» μεταλλάξεις, δηλαδή οι αυθόρμητες αλλαγές στον αριθμό των διαδοχικών επαναλήψεων από ένα ή περισσότερα νουκλεοτίδια στο μεταγραφόμενο τμήμα ενός γονιδίου. Ιδιαίτερα συχνά αυτός ο τύπος μεταλλάξεων χαρακτηρίζεται από την αύξηση του αριθμού των τριπλών επαναλήψεων (σε ορισμένες περιπτώσεις και μεγαλύτερων) σε κωδικοποιητικές ή μη κωδικοποιητικές περιοχές των γονιδίων. Αυτός ο τύπος μετάλλαξης βρέθηκε να είναι χαρακτηριστικός για μια κλινικά πολυμορφική ομάδα των κληρονομικών ασθενειών, οι οποίες ονομάζονταν ασθένειες της «επέκτασης» ή νόσος του Huntington. Σε ορισμένες περιπτώσεις, η επέκταση των τριπλετών οδηγεί στη σύνθεση πεπτιδίων με ασυνήθιστα μακρές μονοτονικές οδούς ενός αμινοξέος, για παράδειγμα τη γλουταμίνη, στην περίπτωση των νευροεκφυλιστικών ασθενειών όπως η νόσος του Huntington, η νόσος Kennedy, η ασθένεια Joseph-Machado και η σπινοκερεγγελιακή αταξία. Σε άλλες περιπτώσεις, οι τριπλέτες επέκτασης οδηγούν σε δυσλειτουργία των γονιδίων και στην ανεπάρκεια των αντίστοιχων πρωτεϊνών (σύνδρομο ευθραυστού X, μυοτονική δυστροφία, αταξία Friedreich) [47].

Έχει αναπτυχθεί και βελτιώνεται συνεχώς ένα σύστημα καταγραφής των διαφόρων τύπων μεταλλάξεων, καθώς και των χρήσιμων για τη διάγνωση ΓΠ. Η τελευταία έκδοση μιας τέτοιας ονοματολογίας εγκρίθηκε από τη Διεθνή Επιτροπή Γενετικής, το 1996 [105]. Οι συστάσεις για την ενοποίηση του συστήματος καταγραφής πιο σύνθετων μεταλλάξεων (διπλασιασμοί, διαγραφές, αναστροφές κ.λπ.) προτάθηκαν το 2000 από τον J. Den Dunnen (Ολλανδία) και από τον Σ. Αντωνανάκη (Ελβετία) [106].

Επί του παρόντος, υπάρχει ταχεία συσσώρευση των δεδομένων σχετικά με τις μεταλλάξεις σε διάφορα γονίδια, οι οποίες οδηγούν στις πιο συχνές σοβαρές κληρονομικές ασθένειες. Για να ληφθούν οι πληροφορίες σχετικά με τις ήδη γνωστές μεταλλάξεις των αντίστοιχων γονιδίων και τις μεθόδους ανίχνευσής τους, δημιουργήθηκαν ειδικές βάσεις

δεδομένων DNA σε μεμονωμένες νοσολογίες. Στον πίνακα 4.3 συνοψίζονται οι διευθύνσεις του Διαδικτύου για την πρόσβαση στις τράπεζες δεδομένων των πιο συχνών μονογονιδιακών και ορισμένων πολυπαραγοντικών νοσημάτων. Για τις περισσότερες συχνές μονογονιδιακές ασθένειες η ακρίβεια της ταυτοποίησης μετάλλαξης είναι ήδη στο 90-100% (κυστική ίνωση, μυϊκή δυστροφία Duchenne, αιμοροφιλία, νόσος Huntington, σύνδρομο ευαίσθητου X, φαινυλκετονουρία). Ωστόσο, για τις περισσότερες πολυπαραγοντικές ασθένειες με έντονη γενετική συνιστώσα, η αποτελεσματικότητα της ανίχνευσης μετάλλαξης (πολυμορφισμού) στα αντίστοιχα γονίδια προδιάθεσης, ποικίλλει ευρέως (από το 10 έως το 90%), κατά μέσο όρο στο περίπου 40% [98]. Οι πληροφορίες σχετικά με τις μεταλλάξεις γονιδίων που είναι υπεύθυνες για τις ανθρώπινες κληρονομικές νόσους μπορούν να ληφθούν μέσω του Διαδικτύου από το Ευρωπαϊκό Ινστιτούτο Βιοπληροφορικής (EBI) στη Σουηδία, το οποίο περιλαμβάνει πληροφορίες από 40 βάσεις δεδομένων:

<http://srs6.ebi.ac.uk>

2.3. Γενετικό φορτίο

Σύμφωνα με τον κλασσικό ορισμό, το γενετικό φορτίο είναι το μέρος κληρονομικής μεταβλητότητας ενός πληθυσμού που καθορίζει την παρουσία των λιγότερο προσαρμοσμένων όντων τα οποία εμπίπτουν στην επιλεκτική δράση της φυσικής επιλογής» [107]. Φυσικά, το γενετικό φορτίο περιλαμβάνει τόσο τις μεταλλάξεις που κυκλοφορούν ήδη στον πληθυσμό και μεταδίδονται από γενιά σε γενιά, όσο και νέες μεταλλάξεις σε γαμέτες ή γεννητικά κύτταρα. Σύμφωνα με ορισμένες εκτιμήσεις [102], το γενετικό φορτίο στους ευρωπαϊκούς πληθυσμούς και στη Ρωσία είναι περίπου 5,5%, εκ των οποίων περίπου το 1% οφείλεται σε μονογονιδιακές ασθένειες (μεταλλάξεις ενός γονιδίου), το 0,5% σχετίζεται με τις χρωμοσωμικές ανωμαλίες και το 3-4% είναι οι πολυπαραγοντικές ασθένειες με έντονη γενετική συνιστώσα. Είναι σημαντικό να τονιστεί ότι το πρότυπο (φάσμα) και οι συχνότητες των διαφόρων μεταλλάξεων, καθώς και ο πολυμορφισμός, έχουν έντονη πληθυσμιακή εξειδίκευση. Αυτό σημαίνει ότι ο ΓΠ και οι μεταλλάξεις που χαρακτηρίζουν τον πληθυσμό μιας περιοχής ή μιας εθνοτικής ομάδας διαφέρουν σημαντικά από εκείνες σε άλλες γεωγραφικές περιοχές ή σε άλλες εθνοτικές ομάδες. Οι πληθυσμιακοί παράγοντες και μηχανισμοί που καθορίζουν τις φυσικές διακυμάνσεις στον αριθμό των ΓΠ και των μεταλλάξεων σε διάφορους πληθυσμούς και περιοχές του κόσμου είναι: [108]

- ✓ η οικολογική προσαρμογή,
- ✓ οι διαφορές στα τρόφιμα,
- ✓ οι σοβαρές λοιμώξεις (ανεμοβλογιά, πανώλη, χολέρα, AIDS),
- ✓ το επιλεκτικό πλεονέκτημα των ετερόζυγων («φαινόμενο ετερόζης» ή «φαινόμενο της ετερότητας)
- ✓ η επίδραση του «ιδρυτή» (ειδικά σε έναν κλειστό πληθυσμό),
- ✓ η γονιδιακή απόκλιση (τυχαίες διακυμάνσεις του αριθμού αλλήλων στον πληθυσμό).

Ένα κλασικό παράδειγμα των παραπάνω μπορεί να είναι η δρεπανοκυτταρική αναιμία λόγω των μεταλλάξεων στο γονίδιο β-σφαιρίνης. Η ασθένεια είναι συχνή στη λεκάνη της Μεσογείου, αλλά σπάνια συναντιέται και σε άλλα μέρη του κόσμου. Στην Ελλάδα ο επιπολασμός των φορέων Μεσογειακής Αναιμίας (ετερόζυγη ή ελάσσονα Θαλασσαιμία) είναι 70 ανά 1.000 άτομα του γενικού πληθυσμού, ενώ ο επιπολασμός των ασθενών με Μεσογειακή Αναιμία είναι 4.000 σε πληθυσμό 11 εκατομμυρίων. Η νεογενική νοσηρότητα στην Ελλάδα της ομόζυγης μορφής της Μεσογειακής αναιμίας εκτιμάται σε 120-130 άτομα ανά 100.000 γεννήσεις, ετησίως. Η ετερόζυγη Μεσογειακή αναιμία έχει επιπολασμό 74 ασθενείς ανά 1.000 κατοίκους (7,4%). Η γεωγραφική κατανομή των ασθενών με Μεσογειακή Αναιμία ποικίλει με συχνότητα εμφάνισης που ανέρχεται έως και 15% στις περιοχές της Θεσσαλίας, της Δυτικής Πελοποννήσου και Δυτικής Ηπείρου εν αντιθέσει με την Μακεδονία, όπου η συχνότητα είναι μειωμένη [109].

Είναι επίσης σημαντικό να αναφερθούμε στην ύπαρξη των γονιδιακών παθήσεων που χαρακτηρίζονται κυρίως από μια συγκεκριμένη εθνοτική ομάδα ή από ένα κλειστό πληθυσμό, π.χ. οι τυπικές «εβραϊκές ασθένειες» (νόσος Lesh - Nihan, Wilson - Koponavalon), οι «φινλανδικές ασθένειες» (ασπαρτυλογλυκοσαμινουρία). Η ανάλυση της επικράτησης των γονιδιακών νόσων σε διάφορους πληθυσμούς και σε διάφορες περιοχές οδήγησε σε μια νέα κατεύθυνση, **τη γενεαλογία**. Χρησιμοποιώντας τη γενετική του πληθυσμού, η επιστήμη αυτή μελετά τη γεωγραφία του επιπολασμού των διαφόρων γενετικών δεικτών, συμπεριλαμβανομένων των κληρονομούμενων ασθενειών [101,108].

2.4. Γονίδια και νοσήματα

Ο αριθμός των γνωστών κληρονομικών νόσων και συνδρόμων εκτιμάται στις 4.500 (OMIM, 2007). Θεωρείται ότι η αποκωδικοποίηση του γονιδιώματος και η ταυτοποίηση νέων γονιδίων δεν θα επηρεάσουν σε μεγάλο βαθμό αυτή την τιμή, αν και θα οδηγήσουν στην διευκρίνιση των υποψήφιων γονιδίων, υπεύθυνων για συγκεκριμένα κληρονομικά νοσήματα, καθώς και των γονιδίων-τροποποιητών, η παρουσία των οποίων σε οποιαδήποτε αλληλόμορφη παραλλαγή μπορεί να επηρεάσει σημαντικά τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά της ασθένειας.

Τα κληρονομικά νοσήματα (KN), που προκαλούνται από τις μεταλλάξεις σε ένα γονίδιο, ονομάζονται **μονογονιδιακά KN**. Παρά το μεγάλο αριθμό τους (3.000-4.000), η συμβολή τους στη συνολική νοσηρότητα και θνησιμότητα είναι μέτρια και ανέρχεται μόνο στο 1% [101, 102]. Ωστόσο, σχεδόν τα μισά από αυτά αντιστοιχούν στα πιο συχνά μονογονιδιακά νοσήματα, όπως η κυστική ίνωση, η αιμορροφιλία A, η μυοδυστροφία Duchenne, το σύνδρομο εύθραυστο χρωμοσώματος X, η φαινυλοκετονουρία [110].

Ωστόσο, τα πιο συχνά κληρονομικά νοσήματα είναι εκείνα στη παθογένεση των οποίων εμπλέκονται πολλά γονίδια. Έτσι, τουλάχιστον δύο γονίδια (BRCA1, BRCA2) μπορούν να καθορίσουν την ανάπτυξη των κληρονομικών μορφών καρκίνου του μαστού, τρία γονίδια (PS1, PS2, APOE) την ανάπτυξη οικογενειακών μορφών της νόσου του Αλτσχάιμερ και περισσότερα από 10 γονίδια είναι ύποπτα για την ανάπτυξη του διαβήτη, της σχιζοφρένειας, της μανιοκαταθλιπτικής ψύχωσης, της αθηροσκλήρωσης, δηλαδή, των λεγόμενων πολυγονιδιακών KN. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι η εκδήλωση αυτών των γονιδιακών μεταλλάξεων εξαρτάται πάντοτε από την παρουσία προκλητικών εξωτερικών παραγόντων. Ως εκ τούτου, αυτές είναι οι πιο σημαντικές παθολογίες στην ιατρική και ονομάζονται πολυπαραγοντικά KN. Η παχυσαρκία, η οστεοπόρωση, η ενδομητρίωση, το έμφραγμα του μυοκαρδίου, οι περισσότεροι όγκοι, οι ψυχικές και καρδιαγγειακές παθήσεις εμπίπτουν σε αυτή την κατηγορία, καθώς είναι το αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης των πολλών γονιδίων με δυσμενείς περιβαλλοντικούς παράγοντες [102].

Τα χαρακτηριστικά συσχέτισης των γενετικών παραγόντων με τους διαφορετικούς τύπους των ασθενειών είναι τα εξής:

- Στη πιο απλή περίπτωση, μια μετάλλαξη ενός γονιδίου, συνήθως σε ένα από τα **γονίδια τελικής διαφοροποίησης** (αιμοσφαιρίνη, δυστροφίνη, παράγοντες πήξης

του αίματος και άλλα) με υψηλό βαθμό πιθανότητας, κοντά στο 100%, προκαλεί την ασθένεια

- Σε «ήπιες» μεταλλάξεις των **γονιδίων τελικής διαφοροποίησης** ή των γονιδίων υπεύθυνων για νοσήματα με καθυστερημένη εκδήλωση, ενισχύεται σημαντικά η συμβολή των γονιδιακών τροποποιητών και των εξωτερικών παραγόντων. Δεν επηρεάζονται όλοι οι φορείς αυτών των μεταλλαγμένων γονιδίων, αλλά μόνο εκείνοι που έχουν τους λιγότερο ευνοϊκούς συνδυασμούς. Ο γενετικός έλεγχος στις οικογένειες υψηλού κινδύνου νοσημάτων με καθυστερημένη εκδήλωση («νόσος ενηλίκων»), όπως ο αδενοματώδης καρκίνος του παχέος εντέρου, ο οικογενειακός καρκίνος του μαστού και των ωοθηκών, η νόσος του Αλτσχάιμερ, η νόσος του Πάρκινσον, θεωρείται σήμερα ως μία από τις κατευθύνσεις της μοριακής ιατρικής, και συγκεκριμένα της **προληπτικής ιατρικής** (preventive) [111].
- Η εμφάνιση των περισσότερων πολυπαραγοντικών ασθενειών χαρακτηρίζεται από τις μεταλλάξεις ή από τον ΓΠ σε πολλά γονίδια. Οι μεταλλάξεις αυτές υφίστανται μόνο με την παρουσία των αντίστοιχων αρνητικών περιβαλλοντικών παραγόντων. Ο έλεγχος των γονιδιακών δεικτών και η πιθανή φαινοτυπική προσαρμογή των λειτουργιών τους, μπορεί να μειώσει σημαντικά τον αριθμό ατόμων στα οποία θα αναπτυχθεί η πολυπαραγοντική νόσος (αρτηριοσκλήρωση, διαβήτης, έμφραγμα του μυοκαρδίου, υπέρταση και άλλα).
- Ο προ-συμπτωματικός εντοπισμός των ατόμων με υψηλό κίνδυνο στη πολυπαραγοντική παθολογία και η πρωτογενής τους πρόληψη, είναι ο κύριος στόχος της εξατομικευμένης ιατρικής [7].

Ωστόσο, οι μοριακές μελέτες των τελευταίων ετών σχετικά με το πρόβλημα της φαινοτυπικής και γενετικής ετερογένειας των κληρονομικών ασθενειών δείχνουν ανεπάρκεια μίας «γενετικής» ταξινόμησης ανθρώπινων ασθενειών. Ορισμένοι διάσημοι μοριακοί βιολόγοι, για παράδειγμα, ο Καναδός επιστήμονας Lap-Chi Tsui, ο οποίος έχει ανακαλύψει το γονίδιο της κυστικής ίνωσης, θεωρούν πλέον απαρχαιωμένη την έννοια των «μονογονιδιακών ασθενειών», δεδομένου ότι οι κλινικές εκδηλώσεις, ακόμη και της ταυτόσημης μετάλλαξης του ίδιου γονιδίου (για παράδειγμα, delF508 του γονιδίου CFTR στην κυστική ίνωση) προσδιορίζονται σε μεγάλο βαθμό από τα μεμονωμένα χαρακτηριστικά των πολλών τροποποιητών γονιδίων που επηρεάζουν τη φαινοτυπική εκδήλωση του

μεταλλαγμένου γονιδίου. Επιπλέον, όπως διαπιστώθηκε πρόσφατα, πολλές κοινές ασθένειες, ανάλογα με τον τύπο της κληρονομικότητας (ασθένεια Parkinson, ασθένεια Alzheimer, διαβήτης και άλλες), μπορεί να έχουν τόσο τη μονογονιδιακή, πολυγονιδιακή όσο και τη πολυπαραγοντική αιτιολογία. Λαμβάνοντας υπόψη ότι όλες οι ασθένειες του ανθρώπου, συμπεριλαμβανομένων εκείνων που προκαλούνται από δυσμενείς εξωγενείς παράγοντες (φυσικές, χημικές, βιολογικές), πάντα συσχετίζονται με ένα πολύ συγκεκριμένο ατομικό γονιδίωμα. Συνεπώς, όλες οι ανθρώπινες ασθένειες, σε κάποιο βαθμό μπορούν να θεωρηθούν ως κληρονομικές. Είναι σημαντικό, ωστόσο, να σημειωθεί ότι μόνο οι μονογονιδιακές και ορισμένες πολυγονιδιακές ασθένειες κληρονομούνται. Στην περίπτωση της πολυπαραγοντικής παθολογίας κληρονομούνται μόνο τα λειτουργικά εξασθενημένα αλληλόμορφα, οι δυσμενείς συνδυασμοί των οποίων μπορούν να προκαλέσουν την ανάπτυξη μιας χρόνιας ασθένειας ή να καθορίσουν την αυξημένη ευαισθησία ενός ατόμου στη δράση διάφορων επιβλαβών περιβαλλοντικών παραγόντων [112].

Κεφάλαιο 3. Γονιδιακά δίκτυα και γονίδια προδιάθεσης

Σύμφωνα με το γνωστό αξίωμα της κλασικής (επίσημης) γενετικής «το οποιοδήποτε φαινοτυπικό χαρακτηριστικό είναι αποτέλεσμα της έκφρασης όλων των γονιδίων, ακόμα και αν η επίδραση τους πολύ μικρή». Συνεπώς, είναι δίκαιο να αληθεύει και το αντίστροφο: «το κάθε γονίδιο επιδρά στο οποιοδήποτε χαρακτηριστικό ενός οργανισμού, ακόμη και αν η φαινοτυπική του επίδραση είναι μικρή» [113]. Αναγνωρίζοντας την εγκυρότητα αυτής της διάταξης από εννοιολογικής και φιλοσοφικής απόψεως, είναι αδύνατο να μην σημειωθεί η μη εποικοδομητική της πρακτική. Πράγματι, όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως (βλέπε κεφάλαιο 2), στην γενετική ιατρική ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι πληροφορίες για τη συσχέτιση μιας συγκεκριμένης παθολογίας με τις μεταλλάξεις ενός γονιδίου (μονογονιδιακά νοσήματα), διαφορετικών γονιδίων (πολυγονιδιακές ασθένειες) ή η καθιέρωση της συσχέτισης μιας νόσου με τις αλληλόμορφες παραλλαγές ορισμένων γονιδίων (πολυπαραγοντικές ασθένειες). Η αποκρυπτογράφηση του ανθρώπινου γονιδιώματος, η επιτυχία της λειτουργικής γονιδιωματικής και των θυγατρικών της κατευθύνσεων (πρωτεϊνωματικής, μεταγραφικής, μεταβολομικής) μας επέτρεψαν να διευρύνουμε σημαντικά τις γνώσεις μας για τη λειτουργία ολόκληρου του γονιδιώματος και των γονιδίων του σε διαφορετικά στάδια οντογένεσης υπό φυσιολογικές και παθολογικές καταστάσεις. Σήμερα, αναδύεται μια νέα επιστήμη, η «γονιδιωματική ενσωμάτωσης» (**integrative genomics**), που συνδυάζει τη γονιδιωματική, την οικολογία, την εξέλιξη και τη φυσιολογία ώστε να κατανοήσουμε καλύτερα τις εξελικτικές δυνάμεις που διαμορφώνουν τους μηχανισμούς, σημαντικούς για τις αλληλεπιδράσεις των ειδών στο φυσικό τους περιβάλλον. Ο σκοπός της είναι να συνοψίσει όλες τις συσσωρευμένες γνώσεις για το «έργο» του γονιδιώματος, και να προσδιορίσει τους προοπτικούς τρόπους ανάπτυξης της γονιδιωματικής στον 21^ο αιώνα (βλ. Κεφάλαιο 1). Φυσικά, για να κατανοηθεί μια τόσο μεγάλη ποσότητα πραγματικού υλικού, απαιτείται μια νέα συστηματική προσέγγιση με την υποχρεωτική συμμετοχή των νέων τεχνολογιών και μεθόδων ανάλυσης. Όλες αυτές οι απαιτήσεις ικανοποιούνται από μια νέα τάση της γονιδιωματικής, τη **μεταγονιδιωματική πληροφορική**, βασιζόμενη στις ηλεκτρονικές βάσεις δεδομένων της δομικής και λειτουργικής οργάνωσης του ανθρώπινου γονιδιώματος. Οι σύγχρονες τεχνολογίες πληροφορικής και οι αποτελεσματικές μαθηματικές μέθοδοι ανάλυσης αποτελούν τα θεμέλια της μεταγονιδιωματικής πληροφορικής [9].

Γονιδιακά δίκτυα

Το σημαντικό μέρος στην μεταγονιδιωματική πληροφορική ανήκει στην έννοια του «**γονιδιακού δικτύου**». Σύμφωνα με τον ορισμό ενός κορυφαίου ερευνητή στον τομέα αυτό, του καθηγητή Ν. Α. Kolchanov (Novosibirsk), ένα «γονιδιακό δίκτυο» είναι μια ομάδα συντονισμένων λειτουργικών γονιδίων που εξασφαλίζει σχηματισμό των φαινοτυπικών χαρακτηριστικών ενός οργανισμού (μοριακών, βιοχημικών, φυσιολογικών) [9, 114]. Έχουν αναπτυχθεί και βελτιώνονται ταχέως οι μέθοδοι ανασυγκρότησης των γονιδιακών δικτύων διαφόρων μεταβολικών συστημάτων, σημαντικών για τη λειτουργία του οργανισμού. Με βάση την περίληψη των πολυάριθμων, κατά κανόνα, διαφορετικών πειραματικών δεδομένων που ληφθήκαν από τη δομική και λειτουργική γονιδιωματική, τη μεταγραφική, τη πρωτεϊνωματική και τη μεταβολική, έχει αναπτυχθεί ειδική τεχνολογία ανασυγκρότησης των γονιδιακών δικτύων για ανθρώπους, ζώα και φυτά. Χάρη στη παραπάνω τεχνολογία έχει δημιουργηθεί η βάση δεδομένων GenNet, η οποία περιέχει τις περιγραφές για 37 γονιδιακά δίκτυα, υπεύθυνα για διάφορες ζωτικές λειτουργίες του ανθρώπινου σώματος, καθώς και τις πληροφορίες για τα μεταβολικά και ρυθμιστικά σήματα που ελέγχουν, ολοκληρώνουν και κατευθύνουν το έργο αυτών των γονιδιακών δικτύων.

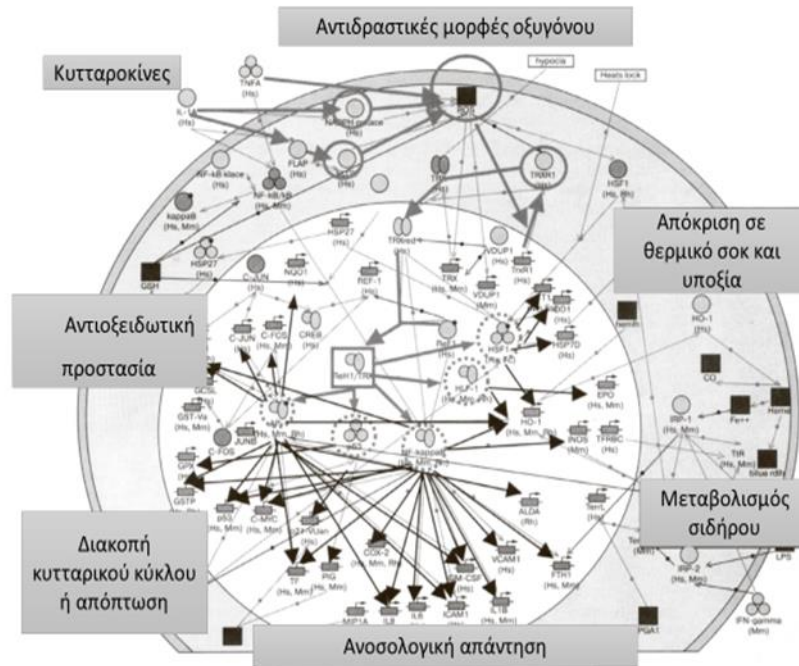
[GenNet: <http://www.mgs.bionet.nsc.ru/mgs/gnw/genenetworks.>]

Όλες οι ζωτικές διεργασίες ενός οργανισμού είναι αποτελέσματα των αλληλεπιδράσεων ή της ενσωμάτωσης (integration) των γονιδιακών δικτύων του. Ως διακριτές και λειτουργικά αυτόνομες κοινότητες των γονιδίων και των προϊόντων έκφρασής τους, τα **τοπικά γονιδιακά δίκτυα** ενσωματώνονται (ολοκληρώνονται) σε ένα «παγκόσμιο δίκτυο του οργανισμού». Έτσι, σύμφωνα με την βιοπληροφορική, το κάθε άτομο είναι ένα παγκόσμιο δίκτυο που αποτελείται από πολλά τοπικά γονιδιακά δίκτυα, δηλαδή το «**δίκτυο των δικτύων**».

Έχουν μελετηθεί λεπτομερώς οι μηχανισμοί της αλληλεπίδρασης και ενσωμάτωσης των γονιδιακών δικτύων που ρυθμίζουν το επίπεδο γλυκόζης στο σώμα, τη σύνθεση στεροειδών ορμονών, τη λειτουργία λιποκυττάρων (κύτταρα λιπώδους ιστού) [9], τους μηχανισμούς ερυθροποίησης [114] και τα γονιδιακά δίκτυα οξειδωτικού στρες (REDOX regulation) [9, 115]. Οι λεπτομερείς πληροφορίες σχετικά με τα γονιδιακά δίκτυα και τα γονίδια redox, η έκφραση των οποίων εξαρτάται από το δυναμικό της οξειδοαναγωγής του κυττάρου, διατίθεται στη διεύθυνση:

<http://www.mgs.bionet.nsc.ru/mgs/papers/stepanenkov/roster-trrd>.

Ένα σχηματικό διάγραμμα του γονιδιακού δικτύου της οξειδοαναγωγής, που εξασφαλίζει την προσαρμογή του σώματος στο οξειδωτικό στρες, παρουσιάζεται στο Σχήμα 3.



Σχήμα 3. Γονιδιακό δίκτυο ρύθμισης οξειδοαναγωγής, που εξασφαλίζει την προσαρμογή του οργανισμού στο οξειδωτικό στρες, ενσωματώνει τοπικά γονιδιακά δίκτυα μέσω βασικών μεταγραφικών παραγόντων, τροποποιημένο [115]

Στο Σχήμα 3 παρουσιάζεται πως ένα γονιδιακό δίκτυο της ρύθμισης οξειδοαναγωγής μέσω ενός συστήματος βασικών μεταγραφικών παραγόντων (κυρίων γονιδίων, γονιδίων ρυθμιστών (βλέπε κεφάλαιο 2) ενσωματώνει 6 τοπικά γονιδιακά δίκτυα: αντιοξειδωτικής προστασίας (1), ρύθμισης κυτταρικού κύκλου (2), ανοσολογικής απόκρισης (3), ενεργοποίησης μεταβολισμού σιδήρου που είναι τα γονίδια ερυθροποίησης (4), αντιδράσεων σε θερμικό σοκ και υποξία (5), απόπτωσης και διακοπής κυτταρικού κύκλου (6). Η γενική οξειδοαναγωγική ρύθμιση πραγματοποιείται με τις οξειδοαναγωγικές πρωτεΐνες, οι κυριότερες από τις οποίες είναι η θυρεοξίνη (TRX) και ο παράγοντας οξειδοαναγωγής (Ref-1) [115].



Σχήμα 3α Η ιεραρχία των τοπικών γονιδιακών δικτύων που ελέγχουν τις μεμονωμένες λειτουργίες σε ένα ενιαίο γονιδιακό δίκτυο του οργανισμού, τροποποιημένο [9, 114]

Η ενσωμάτωση (integration) των διαφόρων τοπικών γονιδιακών δικτύων του οργανισμού μπορεί να είναι **οριζόντια και κάθετη (ιεραρχική)**. Η ιεραρχία των τοπικών γονιδιακών δικτύων που ελέγχουν τις μεμονωμένες λειτουργίες ενός ενιαίου γονιδιακού δικτύου του οργανισμού παρουσιάζεται στο Σχήμα 3α. Τα γονιδιακά δίκτυα διαφορετικού επιπέδου αλληλεπιδρούν μεταξύ τους, συνεπώς, τα δίκτυα ενός επιπέδου ρυθμίζουν τη λειτουργία των δικτύων σε άλλα επίπεδα και ούτω καθεξής. Ταυτόχρονα, τα νευροχυμικά και μεταβολικά σήματα λειτουργούν ως ολοκληρωτές, όπως επίσης και τα ειδικά ολοκληρωτικά γονιδιακά δίκτυα (integrators). Η **οριζόντια ολοκλήρωση** είναι η ενοποίηση των γονιδιακών δικτύων ενός επιπέδου. Το παράδειγμα της παραπάνω ολοκλήρωσης είναι η παρακρινική ολοκλήρωση των γονιδιακών δικτύων ινσουλίνης και γλυκογόνου που ρυθμίζουν τη γλυκόζη του αίματος. Ένα παράδειγμα της **κάθετης ολοκλήρωσης** είναι το γονιδιακό δίκτυο για τη ρύθμιση της σύνθεσης των στεροειδών ορμονών, το οποίο έχει τρία επίπεδα ιεραρχίας: τον υποθάλαμο, την υπόφυση και τους περιφερειακούς ενδοκρινικούς αδένες. Αξίζει να σημειωθεί ότι ο έλεγχος της στεροειδογένεσης στις κυτταρικές δομές και

των τριών επιπέδων, πραγματοποιείται από τον ίδιο μεταγραφικό παράγοντα SF1 (steroidogenic factor 1) [9].

Στη μεταγονιδιακή πληροφορική υπάρχουν δύο βασικοί τύποι των ολοκληρωτών γονιδιακών δικτύων. Στην πρώτη περίπτωση, το ίδιο το γονιδιακό δίκτυο μπορεί να είναι ένας τέτοιος ολοκληρωτής. Για παράδειγμα, το γονιδιακό δίκτυο για την ρύθμιση του κερκαδιανού ρυθμού, όταν αντιλαμβάνεται τα αντίστοιχα εξωτερικά ερεθίσματα, ρυθμίζει ταυτόχρονα πολλά γονιδιακά δίκτυα: από τις μεταβολικές διεργασίες μέχρι και τους κυτταρικούς κύκλους. Επίσης, οι διάφοροι μεταβολίτες (γλυκόζη, μορφές ενεργού οξυγόνου κλπ.) και νευροχυμικά σήματα (ορμόνες, μεταγραφικοί παράγοντες (SF1) λειτουργούν ως ένας άλλος μηχανισμός ολοκλήρωσης των γονιδιακών δικτύων. Συνεπώς, η ολοκλήρωση των γονιδιακών δικτύων είναι ένας πολύ σημαντικός παράγοντας που προσδιορίζει την προσαρμοστική απόκριση ολόκληρου του οργανισμού και των ζωτικών συστημάτων του σε εξωτερικές επιδράσεις [114].

Γονιδιακά δίκτυα και νοσήματα

Η λειτουργία των τοπικών γονιδιακών δικτύων, καθώς και οι προσαρμοστικές ικανότητες ολόκληρου του οργανισμού στις μεταβαλλόμενες περιβαλλοντικές συνθήκες, θα εξαρτηθούν από τα μοναδικά χαρακτηριστικά των γονιδίων που ανήκουν στο αντίστοιχο δίκτυο. Δεν είναι τυχαίο ότι η σύγχρονη γενετική είναι επίσης και η «γενετική των αλληλεπιδράσεων» [85]. Πρόκειται για τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των γονιδίων εντός των τοπικών δικτύων (gene interactions ή γονιδιακές αλληλεπιδράσεις), μεταξύ των γονιδιακών δικτύων (integral interactions ή αλληλεπιδράσεις ολοκλήρωσης), καθώς και μεταξύ των γονιδιακών δικτύων και των περιβαλλοντικών παραγόντων (προσαρμοστικές αλληλεπιδράσεις).

Όλοι οι ζωντανοί οργανισμοί παρομοιάζονται με ανοιχτά συστήματα, τα οποία βρίσκονται σε συνεχή επαφή με το εξωτερικό περιβάλλον. Κάθε ερέθισμα που εισέρχεται στον οργανισμό, προκαλεί την απόκριση του συγκεκριμένου γονιδιακού δικτύου, το οποίο, με τη βοήθεια των κατάλληλων ολοκληρωτών, μεταδίδει το σήμα σε άλλα γονιδιακά δίκτυα. Οι βλάβες που προκαλούνται σε γονιδιακά δίκτυα από τις γονιδιακές μεταλλάξεις ή η λειτουργική τους ανεπάρκεια λόγω των αλληλομορφικών παραλλαγών, μπορούν να καταστρέψουν ή να διαστρεβλώσουν εντελώς το «έργο» του ολοκληρωμένου γονιδιακού

δικτύου, δηλαδή ολόκληρου του οργανισμού. Στη παθογένεια του κάθε νοσήματος εμπλέκονται πολλά, λειτουργικά συναφή γονίδια που προέρχονται από διαφορετικά **τοπικά** γονιδιακά δίκτυα. Μαζί με τα κύρια γονίδια που προκαλούν την εμφάνιση νόσου, υπάρχουν πάντα και τα δευτερεύοντα, συμπεριλαμβανομένων των πολυάριθμων τροποποιητικών γονιδίων, οι φαινοτυπικές επιδράσεις των οποίων καθορίζονται σε μεγάλο βαθμό από τους περιβαλλοντικούς παράγοντες. Η ταυτοποίηση αυτών των γονιδίων, η κατανόηση των λειτουργικών βλαβών στο επίπεδο τοπικών και των ενσωματωμένων γονιδιακών δικτύων, η διερεύνηση των αλληλεπιδράσεων γονιδίου-γονιδίου στα μονογονιδιακά και ιδιαίτερα στα πολυπαραγοντικά νοσήματα είναι ο κύριος στόχος της εξατομικευμένης ιατρικής. Δεν υπάρχει καμία αμφιβολία ότι στο εγγύς μέλλον, με τη χρήση των μεθόδων και τεχνολογιών της βιοπληροφορικής, για κάθε ασθένεια θα είναι δυνατή η μοντελοποίηση των γονιδιακών δικτύων, παρόμοιων με εκείνα, των φυσιολογικών διεργασιών του σώματος. (βλέπε 3.1). Όπως, επίσης, είναι αναμφίβολο ότι με τη βοήθεια της βιοπληροφορικής διεισδύουμε βαθύτερα στα μυστικά του λειτουργικού γονιδιώματος, κατανοούμε όλο και περισσότερο τους μοριακούς μηχανισμούς των ανθρώπινων ασθενειών. Προφανές είναι και το γεγονός ότι στο εγγύς μέλλον οι καθιερωμένες ιδέες για τις ασθένειες θα πρέπει να αναθεωρηθούν και να συμπληρωθούν, λαμβάνοντας υπόψη τα επιτεύγματα της λειτουργικής γονιδιωμικής, της βιοπληροφορικής και της μοριακής ιατρικής [9, 25, 114].

Γονίδια προδιάθεσης

Τα γονίδια που σχηματίζουν τον δομικό πυρήνα του κάθε γονιδιακού δικτύου είναι **πολυμορφικά**, συνεπώς οι αλληλόμορφες παραλλαγές τους είναι λειτουργικά διαφορετικές. Αυτό σημαίνει ότι και τα γονιδιακά δίκτυα κάθε ατόμου λειτουργούν επίσης διαφορετικά. Χάρη στο γενετικό πολυμορφισμό, κάθε άτομο έχει τα δικά του «βιοχημικά αποτυπώματα», το δικό του πρότυπο των λειτουργικών βιοχημικών αντιδράσεων, τις δικές του προσαρμοστικές ικανότητες στους επιβλαβείς περιβαλλοντικούς παράγοντες. Η γενετική ποικιλομορφία καθορίζει το γεγονός ότι όλοι οι άνθρωποι αντιδρούν διαφορετικά στους εξωτερικούς παράγοντες, στις λοιμώξεις, στα τρόφιμα, στις επιδράσεις των τοξινών και των ναρκωτικών. Τα παραδείγματα των διαπροσωπικών διαφορών είναι πολυάριθμα και περιλαμβάνουν τη συγγενή δυσανεξία στη λακτόζη (ανικανότητα απορρόφησης του φρέσκου γάλακτος), την αυξημένη ευαισθησία σε γλυκανίδιο σολανίνης (στη πράσινη πατάτα) που

αναστέλλει το ένζυμο ψευδοχολινεστεράση. Επίσης, στα άτομα κίτρινης φυλής προκαλούν έκπληξη και οι εθνικές διαφορές της ευαισθησίας στο αλκοόλ λόγω ενός υψηλού (έως και 50%) επιπέδου μεταλλάξεων στα γονίδια αλκοόλης της αλδεϋδης αφυδρογονάσης. Οι ιατροί γνωρίζουν τις πληροφορίες για οικογένειες με προδιάθεση στη αθηροσκλήρωση, στο διαβήτη, στις καρδιακές παθήσεις, στις παθήσεις πνευμόνων, νεφρών, στις διανοητικές διαταραχές, στις αλλεργικές παθήσεις και στον καρκίνο. Η ατομική δυσανεξία στα φάρμακα, η διαφορετική ευαισθησία στις τοξίνες και στους επιβλαβείς περιβαλλοντικούς παράγοντες, βασίζονται επίσης στα μοναδικά γενετικά χαρακτηριστικά του κάθε ατόμου[81]. Όλοι οι άνθρωποι διαφέρουν ο ένας από τον άλλον όχι μόνο στα εξωτερικά, αλλά και στα εσωτερικά βιοχημικά, φυσιολογικά και ψυχολογικά χαρακτηριστικά τους. Αυτά τα χαρακτηριστικά αποτελούν το φαινότυπο κάθε ατόμου, ο οποίος αντικατοπτρίζει τις ατομικές ιδιαιτερότητες του γονοτύπου του και υλοποιείται ως μέρος τοπικών και ενσωματωμένων γονιδιακών δικτύων υπό ορισμένες περιβαλλοντικές συνθήκες.

Τα διάφορα χαρακτηριστικά των φάσεων γενετικού πολυμορφισμού ανάλογα με τις γεωγραφικές συνθήκες, τη διατροφή, τη φυλετική (εθνοτική) ύπαρξη υποδηλώνουν την επίδραση φυσικής επιλογής. Σε ορισμένες περιπτώσεις, γενετικός πολυμορφισμός μπορεί να προκαλέσει, ή αντιθέτως, να αποτρέψει την εμφάνιση των διαφόρων ασθενειών. Γονίδια, οι αλληλόμορφες παραλλαγές των οποίων, υπό ορισμένες συνθήκες, προδιαθέτουν σε ορισμένες ασθένειες, ονομάζονται **γονίδια προδιάθεσης** [116]. Έτσι, τα γονίδια προδιάθεσης είναι τα μεταλλαγμένα γονίδια (αλληλόμορφα) που είναι συμβατά με τη γέννηση και τη ζωή στη μεταγεννητική περίοδο, αλλά υπό ορισμένες δυσμενείς συνθήκες συμβάλλουν στην ανάπτυξη μιας νόσου [8].

Ανάλογα με τα χαρακτηριστικά της δράσης και του ρόλου των γονιδίων στις μεταβολικές διεργασίες, διακρίνονται συνήθως ορισμένες ομάδες γονιδίων προδιάθεσης: **γονίδια «εξωτερικού περιβάλλοντος»**, **γονίδια «ενεργοποίησης»** (μεταβολικές απολήξεις) και **γονίδια των κυτταρικών υποδοχέων** [7, 69, 70], **γονίδια ανοσολογικής άμυνας**, **γονίδια «γήρανσης»**, **πολυάριθμα γονίδια προδιάθεσης σε πολυπαραγοντικές ασθένειες** [8]. Οι δυσμενείς συνδυασμοί των αλληλόμορφων παραλλαγών σε ένα ή σε πολλά γονιδιακά δίκτυα υποκρύπτουν τις ασθένειες όπως η αθηροσκλήρωση, η στεφανιαία νόσο, η οστεοπόρωση, ο διαβήτης, το βρογχικό άσθμα, οι όγκοι και οι διάφοροι τύποι μαιευτικής και γυναικολογικής παθολογίας. Για τη διάγνωση κληρονομικών νόσων στην

κλινική πρακτική ήδη εφαρμόζονται περίπου 1.000 γενετικές εξετάσεις και περίπου 300 βρίσκονται σε στάδιο προ-κλινικής δοκιμής [111]. Μια ομάδα γενετικών εξετάσεων για πολλές συχνές πολυπαραγοντικές ασθένειες αναπτύσσεται ενεργά και ήδη βρίσκει πρακτική εφαρμογή. Η ταυτοποίηση όλων των ανθρώπινων γονιδίων, η ανακάλυψη των νέων γονιδιακών δικτύων που τροφοδοτούν τις σημαντικότερες μεταβολικές οδούς του σώματος, αυξάνουν σημαντικά τις δυνατότητες γενετικού ελέγχου της γενετικής προδιάθεσης καθώς και τη σημασία της ιατρικής γενετικής συμβουλευτικής.

3.1. Στρατηγική αναζήτησης των γονιδίων προδιάθεσης

Η μεταγονιδιωματική πληροφορική έχει επιτύχει σημαντικά οφέλη στην ανασυγκρότηση των γονιδιακών δικτύων καθώς και στη μελέτη της ολοκλήρωσης/ενσωμάτωσης τους κατά την διάρκεια πολλών μεταβολικών διεργασιών υπό φυσιολογικές συνθήκες. Δυστυχώς, η έλλειψη πληροφοριών για τα γονίδια που σχετίζονται ακόμη και με τα πιο συχνά πολυπαραγοντικά νοσήματα, περιπλέκει σημαντικά και καθιστά αδύνατη την πλήρη ολοκλήρωση των αντίστοιχων γονιδιακών δικτύων. Στις μελέτες των διαφόρων επιστημόνων, η στρατηγική αναζήτησης των γονιδίων προδιάθεσης βασίστηκε στο ακόλουθο σχέδιο.

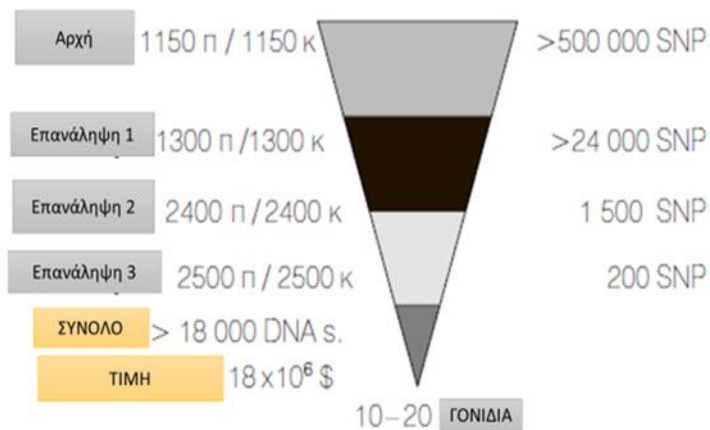
1. **Η επιλογή των πιθανότερων υποψήφιων γονιδίων** βάση των ήδη διαθέσιμων δεδομένων σχετικά με την αιτιολογία και την παθογένεια μιας συγκεκριμένης νόσου, τις κύριες μεταβολικές, βιοχημικές και λειτουργικές διαταραχές που προκαλούνται από την παθολογική διαδικασία.
2. **Η επιλογή των λειτουργικά σημαντικών αλληλόμορφων** των αντίστοιχων γονιδίων που βασίζονται σε ανάλυση της βιβλιογραφίας και του Διαδικτύου.
3. **Η πληθυσμιακή ανάλυση** των αλληλόμορφων συχνοτήτων και των γονότυπων για τα αντίστοιχα γονίδια.
4. **Η συγκριτική ανάλυση** των αλληλόμορφων συχνοτήτων και της κατανομής των γονότυπων για τα αντίστοιχα γονίδια σε ασθενείς με κλινικά επαληθευμένη διάγνωση της νόσου και σε υγιή άτομα του ίδιου πληθυσμού, που επιλέγονται σύμφωνα με τον τύπο «ασθενής- μάρτυρας».

Οι μελέτες πρέπει να διεξάγονται με αντιπροσωπευτικά δείγματα ασθενών και δοτών (τουλάχιστον 100 άτομα σε κάθε ομάδα).

Φυσικά, μια τέτοια μεγάλη, χρονοβόρα και δαπανηρή διαδικασία δεν εγγυάται ότι οι εντοπισμένες αλληλόμορφες διαφορές είναι σημαντικές στην παθογενετική αλυσίδα αυτής της ασθένειας. Όπως δεν αποκλείεται κατά τη διαδικασία αυτή να έχουν χαθεί κάποια σημαντικά γονίδια και οι πολυμορφισμοί του ίδιου ή και άλλου γονιδιακού δικτύου που εμπλέκονται στην ασθένεια. Δεν εγγυάται κανείς και το γεγονός ότι οι κλινικά διαφορετικές μορφές της εξεταζόμενης νόσου μπορούν να έχουν και διαφορετικό πρότυπο των υποψήφιων γονιδίων.

Η χαρτογράφηση και η ταυτοποίηση των υποψήφιων γονιδιακών δεικτών πραγματοποιείται είτε σε οικογένειες υψηλού κινδύνου που υπάρχει ένας ασθενής, είτε σε ομάδα μη σχετιζόμενων με αυτή την παθολογία ασθενών [80]. Η μελέτη περιλαμβάνει διάφορα στάδια:

1. Ταυτοποίηση των χρωμοσωμικών τόπων που εντοπίζουν μη τυχαία σύνδεση με τη νόσο.
2. Χαρτογράφηση με τη χρήση των SNPs των εξωγενών (εσώνια) και ενδογενών (εξώνια) περιοχών, συνδεδεμένων στενά με την ασθένεια.
3. Ταυτοποίηση υποψήφιου γονιδίου χρησιμοποιώντας βάσεις δεδομένων ή μεθόδους μοριακής (φυσικής) χαρτογράφησης («μετατόπιση», «άλμα» πάνω στο χρωμόσωμα) [35].
4. Διεξαγωγή της συγκριτικής ανάλυσης αλληλόμορφων συχνοτήτων και γονότυπων για τα αντίστοιχα γονίδια στον πληθυσμό γενικά και στους ασθενείς με αυτή τη νόσο.



Εικόνα 3.1 Αναζήτηση των γονιδίων προδιάθεσης για τον καρκίνο του προστάτη με εξέταση ολόκληρου του γονιδιώματος GWAS (II – ασθενής, K –μάρτυρας) [35].

Θεωρείται ότι τα επόμενα χρόνια, η χρήση της τεχνολογίας HarMap θα είναι σε θέση να εντοπίσει και να αξιολογήσει τη συμβολή μεμονωμένων γονιδίων και ολόκληρων γενετικών δικτύων στη γένεση όλων των συχνών πολυπαραγοντικών νοσημάτων. Ήδη, έχει πραγματοποιηθεί στον διαβήτη, στην οστεοπόρωση, σε ορισμένες μορφές καρκίνου, στις οφθαλμικές παθήσεις και σε άλλα ακόμη νοσήματα (βλ. Κεφάλαιο 1). Έτσι, σε μια μεγάλης κλίμακας μελέτη για την αναζήτηση των γονιδίων προδιάθεσης του καρκίνου του προστάτη, έχουν εξεταστεί δείγματα DNA από 1.150 ασθενείς και 1.150 μάρτυρες (ομάδα ελέγχου) (Εικόνα 3.4). Ξεκινώντας από την ανάλυση σύνδεσης 500.000 SNPs, σε διάρκεια τριών διαδοχικών σταδίων η περιοχή γονιδιωματικής αναζήτησης έχει μειωθεί σε 200 SNPs, και τελικά έχουν εντοπιστεί 15 υποψήφια γονίδια, η μελέτη των οποίων συνεχίζεται. (www.labo.lu). Με την ευκαιρία, όλη αυτή η εργασία κόστισε 18 εκατομμύρια δολάρια! [112]

Πιο αποτελεσματική και σύγχρονη στις σημερινή εποχή είναι ή **μελέτη συσχέτισης ολόκληρου του γονιδιώματος** (Genome Wide Association Studies - GWAS) βασισμένη στο πρόγραμμα HarMap σε συνδυασμό με την τεχνική των μικροβιοσιτίπ υψηλής ανάλυσης (βλέπε κεφάλαιο 4). Η μέθοδος επιτρέπει να εντοπίζονται ταυτόχρονα όλα τα SNPs που τεκμηριωμένα σχετίζονται με μια συγκεκριμένη ασθένεια. Γνωρίζοντας την ακριβή τοποθέτηση του κάθε SNP στον χάρτη του γονιδιώματος, μπορεί να αναγνωριστεί

ένα υποψήφιο γονίδιο, όπως επίσης και όλες οι αλληλόμορφες παραλλαγές που σχετίζονται με τη νόσο (βλέπε Κεφάλαια 5, 6). Μια σύντομη ανάλυση των επιστημονικών εργασιών που σχετίζονται με τον γενετικό έλεγχο, αποδεικνύει το γεγονός ότι η τεχνολογία GWAS με βεβαιότητα αποτελεί τη βασική τεχνική για την αναζήτηση των υποψήφιων γονιδίων σε όλα τα πολυπαραγοντικά νοσήματα.

Έτσι, η εκτεταμένη εισαγωγή του συστήματος υψηλής ανάλυσης HarMap και η ταχεία πρόοδος της βιοπληροφορικής και της μοριακής ιατρικής σε αυτόν τον τομέα άνοιξαν μεγάλες προοπτικές για τη χαρτογράφηση των υποψήφιων γονιδίων της πολυπαραγοντικής παθολογίας. Κατά την απόκτηση των αξιόπιστων αποτελεσμάτων ($p < 0,0005$), που αποδεικνύουν την ύπαρξη σαφούς συσχέτισης νοσολογίας με οποιοδήποτε αλληλόμορφο ή συνδυασμό αλληλόμορφων, τα επόμενα βήματα στην πρακτική εφαρμογή των γενετικών δοκιμών έχουν ως εξής:

1. Προ-συμπτωματικοί (προληπτικοί) γενετικοί έλεγχοι σε οικογένειες υψηλού κινδύνου.
2. Προοπτικοί γενετικοί έλεγχοι με υποχρεωτική παρακολούθηση των ατόμων υψηλού κινδύνου σύμφωνα με τα αποτελέσματα των δοκιμών.
3. Τυχαίοι προγνωστικοί έλεγχοι.

Οι τελευταίοι διεξάγονται ευρέως μόνο στις κληρονομικές ασθένειες καθυστερημένης εκδήλωσης (νόσος του Huntington, οικογενής (κληρονομικός) καρκίνος μαστού και ωοθηκών, καρκίνος παχέος εντέρου, οικογενείς μορφές της νόσου Parkinson και της ασθένειας Alzheimer [117-119]).

Ο πιθανολογικός χαρακτήρας των καθιερωμένων αλληλόμορφων συσχετισμών με πολυπαραγοντική παθολογία, η φτώχη και συχνά αδύναμη αναπαραγωγικότητα των αποτελεσμάτων σε διαφορετικά εργαστήρια, σε διαφορετικούς πληθυσμούς και σε διαφορετικά δείγματα ασθενών, δημιουργούν σοβαρές δυσκολίες στην ευρεία εισαγωγή των γενετικών δοκιμασιών της γενετικής προδιάθεσης σε κοινές σοβαρές ασθένειες. Αυτό θα μπορούσε να διευκολυνθεί με τις προοπτικές γενετικές μελέτες, στις οποίες τα αποτελέσματα θα αξιολογούνται μετά από πραγματικό γεγονός (post factum), δηλαδή σε μεγάλο χρονικό διάστημα μετά τη δοκιμή. Δυστυχώς, οι αντικειμενικές δυσκολίες στην οργάνωση και στην αξιολόγηση των μακροπρόθεσμων αποτελεσμάτων, καθιστούν περίπλοκη την υλοποίησή τους. Ως εκ τούτου, δεν υπάρχουν ακόμη αξιόπιστες προοπτικές μελέτες για τα

αποτελέσματα των γενετικών ελέγχων. Επί του παρόντος, οι παρόμοιες προσπάθειες πραγματοποιούνται σε ασθενείς με καρδιαγγειακή παθολογία, καθώς και με βρογχικό άσθμα [120].

Κεφάλαιο 4. Μέθοδοι μελέτης γενετικών πολυμορφισμών

Όπως ήδη έχει αναφερθεί, ο πολυμορφισμός και οι μεταλλάξεις είναι φαινόμενα της ίδιας τάξης, που προκαλούν τις δομικές αλλαγές του DNA. Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την ταυτοποίηση των αλληλόμορφων παραλλαγών, δηλαδή για τη μελέτη του γονιδιακού πολυμορφισμού, είναι οι ίδιες με εκείνες που χρησιμοποιούνται και για την αναζήτηση των μεταλλάξεων. Χάρη στις πολυάριθμες μελέτες του ανθρώπινου γονιδιώματος έχει γίνει σημαντική πρόοδος στην ανάπτυξη βολικών, ανέξοδων και αποτελεσματικών μεθόδων που χρησιμοποιούνται στην ανίχνευση των μεταλλάξεων, δηλαδή στον προσδιορισμό των ποσοτικών και ποιοτικών αλλαγών της πρωταρχικής δομής του μορίου DNA [7, 64, 121].

Έχουν αναπτυχθεί και χρησιμοποιούνται ευρέως για την αναζήτηση και ταυτοποίηση των μεταλλάξεων (πολυμορφισμών του DNA) πολλές διάφορες μέθοδοι, ο συνολικός αριθμός των οποίων προσεγγίζει τις εκατό. Η περίφημη αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) αποτελεί τη βάση της συντριπτικής πλειοψηφίας αυτών των μεθόδων. Η αποκάλυψη της PCR έγινε από τον Αμερικανό επιστήμονα, τον Kary Mullis που το 1992 του απονεμήθηκε το βραβείο Νόμπελ [122].

Στον Πίνακα 4^α δίνεται ένας κατάλογος των συχνά χρησιμοποιημένων στην πράξη μοριακών γενετικών μεθόδων.

ΜΕΘΟΔΟΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ
1. Πολυμορφισμός στο Μήκος των Ενισχυμένων Θραυσμάτων (AFLP - Amplified Fragment Length Polymorphism)
2. Πολυμορφισμός στο Μήκος των Θραυσμάτων Περιορισμού (RLFPs - Restriction Fragment Length Polymorphisms)
3. Διαχωρισμός με λύση - Απομόνωση (EMD)
4. Μέθοδοι αντίδρασης λιγάσης (LDL, LCR, Padlock)
5. Διεσδυτική διάσπαση των ολιγονουκλεοτιδίων (διάσπαση Cleavase I- Cleavase invader assay)
6. Τυχαία ενίσχυση του πολυμορφικού DNA (RAPD, AP-PCR)
7. PCR με άμεσο τερματισμό σύνθεσης (DT-PCR)
8. Ανάλυση Πολυμορφισμών Διαμόρφωσης Μονόκλωνου DNA (SSCP - Single strand Conformational Polymorphism)
9. Heteroduplex ανάλυση
10. Αλληλούχιση DNA (DNA sequencing)
11. Μίνι-αλληλούχιση
12. Αλλήλο ειδική PCR ή Μέθοδος αλληλόειδικών ολιγονουκλεοτιδίων (ASO)
13. Μαζικής φασματομετρία

- | |
|-----------------------------|
| 14. PCR πραγματικού χρόνου |
| 15. Μέθοδοι μικροσυστοιχιών |

Πίνακας 4^α Μέθοδοι μοριακής ταυτοποίησης των μεταλλάξεων

Ανάλογα με τον σκοπό που θα χρησιμοποιηθεί, όλες οι μοριακές γενετικές μέθοδοι διαχωρίζονται σε δύο ομάδες: οι μέθοδοι που στοχεύουν στην ανίχνευση των άγνωστων μεταλλάξεων και οι μέθοδοι ανάλυσης των γνωστών μεταλλάξεων. Στις μονογονιδιακές ασθένειες συχνά γίνεται λόγος για τη ταυτοποίηση μιας άγνωστης μετάλλαξης σε ένα γνωστό γονίδιο. Όταν μελετάμε τις αλληλεπιδράσεις στα πολυπαραγοντικά νοσήματα, το αντικείμενο της έρευνας είναι οι γνωστές πολυμορφικές θέσεις. Οι πληροφορίες για τις γνωστές αυτές μεταλλάξεις βρίσκονται στις αντίστοιχες βάσεις δεδομένων του DNA που δημοσιεύονται στο Διαδίκτυο (βλ. Κεφάλαια 1, 2).

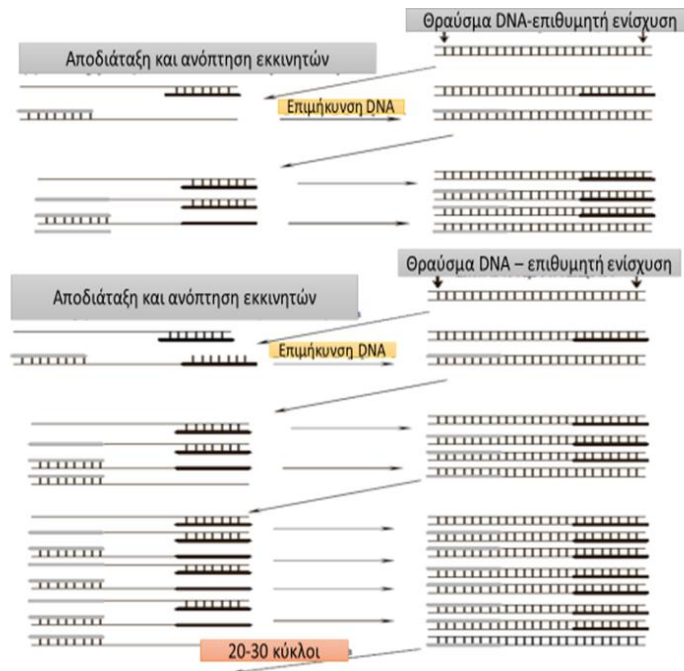
Ο βασικός σκοπός της παρούσας εργασίας είναι να δοθεί μεγαλύτερη προσοχή στις ελπιδοφόρες σύγχρονες μεθόδους της **μοριακής γενετικής ανάλυσης** των πολυμορφικών θέσεων και μεταλλάξεων. Όσον αφορά τις βασικές μεθόδους θα αναφερθούν με σύντομη περιγραφή.

4.1. Βασικές μέθοδοι ανίχνευσης μεταλλάξεων

Μία από τις κύριες και ιστορικά πρώτες μεθόδους ταυτοποίησης των μεταλλάξεων ήταν η μέθοδος υβριδισμού (**Southern blot**) που προτάθηκε το 1975 από τον Άγγλο επιστήμονα Edward Southern [123]. Για σχεδόν 10 χρόνια, αυτή η μέθοδος παρέμεινε η μόνη αξιόπιστη μέθοδος για την ανίχνευση μεταλλάξεων των διαφόρων γονιδίων. Η ουσία της μεθόδου είναι ο περιορισμός του γονιδιωματικού DNA από μία ή περισσότερες ενδονουκλεάσες, με τον επακόλουθο διαχωρισμό των θραυσμάτων DNA (ανάλογα του μοριακού τους βάρους) με ηλεκτροφόρηση στο πήκτωμα αгарόζης. Στη συνέχεια πραγματοποιείται η **αποτύπωση**: τα θραύσματα του DNA μεταφέρονται σε πυκνό φορέα (φίλτρο κυτταρίνης ή νάιλον μεμβράνη). Το στερεωμένο επί των φίλτρων DNA υβριδοποιείται με τους επισημασμένους ανιχνευτές του DNA, οι οποίοι καθιστούν δυνατή τον ακριβή προσδιορισμό του εντοπισμού και κατά συνέπεια, του μεγέθους του επιθυμητού γονιδιωματικού θραύσματος DNA. Η ανάγκη για τις αναλύσεις των καθαρών παρασκευασμάτων του DNA, η χρήση των ραδιενεργά επισημασμένων ανιχνευτών, η μεγάλη διάρκεια και η επίπονη διαδικασία, καθιστούν τη μέθοδο ανέφικτη και δαπανηρή για πρακτική χρήση. Παρόλα αυτά,

επί του παρόντος, οι διάφορες παραλλαγές αυτής της μεθόδου εξακολουθούν να χρησιμοποιούνται για επιστημονικούς και διαγνωστικούς σκοπούς. Πρόκειται για την υβριδοποίηση **DNA - ανιχνευτών** με τα ηλεκτροφορητικά διαχωρισμένα μόρια RNA (**Northern blot**), καθώς και για τις ηλεκτροφορητικά διαχωρισμένες **πρωτεΐνες**, στερεωμένες σε φίλτρα με επισημασμένα αντισώματα (**Western blot**). Σήμερα, η μέθοδος **Southern blot** χρησιμοποιείται για εντοπισμό των εκτεταμένων μεταλλάξεων που επηρεάζουν τη δομή του γονιδίου (μεγάλες διαγραφές, προσθήκες, επικαλύψεις). Η παρουσία των εκτεταμένων διαγραφών, προσθηκών, επαναλήψεων, καθώς και των σημειακών μεταλλάξεων σε σημεία περιορισμού, οδηγεί στις μεταβολές του μεγέθους των θραυσμάτων περιορισμού [35].

Σε αντίθεση με τη μέθοδο αποτύπωσης - υβριδοποίησης (Southern blot), η οποία δεν έχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον για τον έλεγχο του γενετικού πολυμορφισμού, η μέθοδος αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR), μπορεί δικαίως να θεωρηθεί ως η βασική μέθοδος της σύγχρονης DNA διάγνωσης. Με τη χρήση της PCR μέσα σε μία ώρα ο αριθμός ενός θραύσματος γονιδιωματικού DNA αυξάνεται εκατομμύρια φορές. Το γεγονός αυτό σε μεγάλο βαθμό διευκολύνει τη ταυτοποίηση της επιθυμητής μετάλλαξης ή του πολυμορφισμού. Ένα σχηματικό διάγραμμα της PCR παρουσιάζεται στο Σχήμα 4.1.



Σχήμα 4.1 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης [35]

Η αντίδραση διεξάγεται σε καθορισμένα διαδοχικά στάδια, με τη χρήση των θερμικών κυκλοποιητών, ειδικών μηχανημάτων τα οποία καθιστούν δυνατή τη ρύθμιση και διατήρηση μίας συγκεκριμένης θερμοκρασίας στην αντίδραση. Όλα τα συστατικά της αντίδρασης, DNA-μήτρα, ολιγοεκκινητές, ένα μείγμα δεοξυνουκλεοτιδίων και μια θερμοανθεκτική DNA πολυμεράση, προστίθενται σε ένα ειδικό ρυθμιστικό διάλυμα (buffer) λίγο πριν τοποθετηθεί ο σωλήνας με το μίγμα της αντίδρασης σε έναν θερμικό κυκλοποιητή. Στο πρώτο στάδιο (**στάδιο αποδιάταξης**), η υπό μελέτη δίκλωνη DNA-μήτρα μετατρέπεται σε μονόκλωνη μορφή με θέρμανση για λίγα λεπτά (30 sec – 1 min) σε θερμοκρασία 94 - 98° C. Η περαιτέρω διαδικασία είναι η εναλλαγή των κύκλων:

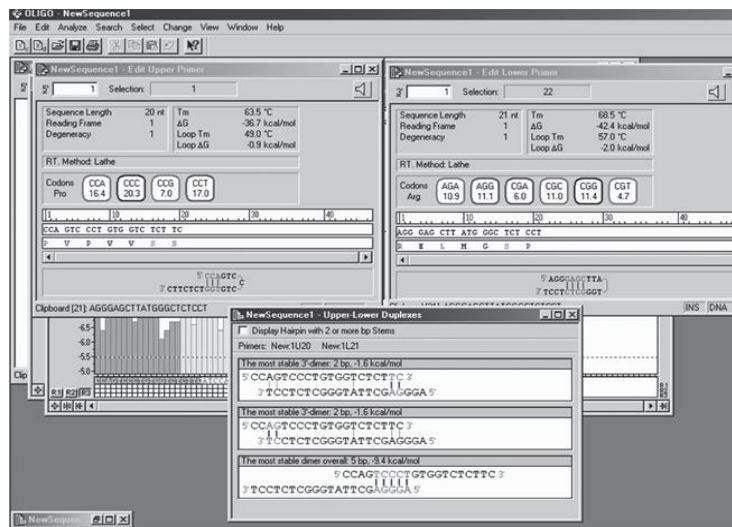
- ✓ **Υβριδισμός** (annealing) του DNA με εκκινητές
- ✓ **Επιμήκυνση ή** σύνθεση των αλληλουχιών συμπληρωματικών της μήτρας DNA
- ✓ **Αποδιάταξη** (μετουσίωση) των προκυπτουσών δομών διπλής έλικος.

Στο στάδιο υβριδοποίησης, η θερμοκρασία της αντίδρασης μειώνεται στους +50 - 65° C (για περίπου 30 sec - 1 min). Οι ολιγοεκκινητές υβριδοποιούνται με το μετουσιωμένο (μονόκλωνο) DNA που περιέχει συμπληρωματικές (αντιστοιχούσες σε αυτές) περιοχές. Μία αύξηση της θερμοκρασίας στους 65 - 72° C, βέλτιστης για τη λειτουργία της θερμοανθεκτικής DNA πολυμεράσης Taq1, πυροδοτεί τη σύνθεση του DNA με την κατεύθυνση από το 5 'προς το 3' άκρο της DNA μήτρας. Η πολυμεράση επιμηκώνει τους εκκινητές εισάγοντας τα τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (Deoxynucleotide triphosphates, dNTPs) χρησιμοποιώντας τη συμπληρωματική αλληλουχία DNA ως εκμαγείο (μήτρα). Η ταχύτητα σύνθεσης της νέας αλυσίδας είναι της τάξης των 1000 bp ανά λεπτό. Με τη περαιτέρω αύξηση της θερμοκρασίας στους 80 - 90° C, η σύνθεση του DNA σταματά, γίνεται αποδιάταξη με την απελευθέρωση από τη μήτρα των ήδη συντεθειμένων θραυσμάτων DNA, τα οποία, με τη σειρά τους, καθίστανται μήτρες για σύνθεση DNA κατά τη διάρκεια των επόμενων κύκλων ενίσχυσης.

Έτσι, σε κάθε κύκλο παρατηρείται μια αύξηση του αριθμού των αντιγράφων της θέσης ενίσχυσης, και το περιεχόμενο των προϊόντων ενίσχυσης αυξάνεται εκθετικά. Κατά μέσο όρο, ένας πλήρης κύκλος διαρκεί ένα έως τρία λεπτά. Σε 25-30 κύκλους, ο αριθμός των αντιγράφων DNA φτάνει σε αρκετά εκατομμύρια. Η επιλογή του βέλτιστου προγράμματος λειτουργίας καθορίζεται από το μήκος και την εξειδίκευση του τμήματος του DNA που πρόκειται να ενισχυθεί.

Με τη βοήθεια της PCR, μπορούμε να εντοπίσουμε πολλές μεταλλάξεις, καθώς και να εξερευνήσουμε τους πολυμορφικούς τύπους. Η επιλογή των ολιγοεκκινητών διεξάγεται με βάση την ανάλυση των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών στις περιοχές DNA που πλαισιώνουν τη μία ή την άλλη μετάλλαξη. Έχουν αναπτυχθεί διάφορα προγράμματα αυτόματης επιλογής των εκκινητών που είναι βέλτιστοι για την απόκτηση των διαφόρων ενισχύσεων (προγράμματα «Oligo 6», «Prime-3» και άλλα). Η επιλογή των εκκινητών πρέπει να γίνεται σύμφωνα με τα ακόλουθα κριτήρια:

- ✓ έλλειψη εσωτερικής δευτερογενούς δομής
- ✓ ισορροπημένη σύνθεση και ομοιόμορφη κατανομή των ζευγών G / C και A / T σε όλη την αλληλουχία
- ✓ έλλειψη της συμπληρωματικότητας μεταξύ των 3-άκρων (λόγω ύπαρξης κινδύνου σχηματισμού των διμερών εκκινητών)
- ✓ παρουσία των πλησιέστερων θερμοκρασιών τήξης των εκκινητών (η διαφορά μεταξύ τους να μην είναι μεγαλύτερη από 1 ° C της μέσης τιμής)
- ✓ έλλειψη της συμπληρωματικότητας των αλληλουχιών εκκινητών με τις αλληλουχίες των άλλων γονιδίων στο ανθρώπινο γονιδίωμα.



Σχήμα 4.1. Διασύνδεση του προγράμματος «Oligo 6» (το στάδιο της ανάλυσης που στοχεύει στην εύρεση της παρουσίας / απουσίας διμερών μεταξύ των εκκινητών) (εξηγείται στο κείμενο)[35]

Το Σχήμα 4.1 δείχνει τη διασύνδεση του προγράμματος «Oligo 6» που χρησιμοποιήθηκε για την επιλογή των εκκινητών του πρώτου γύρου για το γονίδιο MTHFR -

στάδιο ανάλυσης για την αναγνώριση της παρουσίας / απουσίας των διμερών μεταξύ των εκκινητών (F και R).

Σε πολλές περιπτώσεις, ειδικά στην ταυτοποίηση των διαφορετικών μεταλλάξεων στο ίδιο γονίδιο, διεξάγεται **ταυτόχρονη** ενίσχυση των διαφόρων τμημάτων DNA εκμαγείου. Αυτή η τροποποίηση της μεθόδου ονομάζεται **πολλαπλή PCR**. Η παραπάνω παραλλαγή της PCR χρησιμοποιείται ευρέως για την ταυτοποίηση των μεταλλάξεων στο γονίδιο CFTR (κυστική ίνωση), στο γονίδιο δυστροφίνης (μυοδυστροφία Duchenne), στην αναζήτηση των αλληλόμορφων συσχετισμών στα πολυπαραγοντικά νοσήματα.

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων της PCR διεξάγεται με τη ηλεκτροφόρηση των προϊόντων ενίσχυσης σε πήκτωμα αгарόζης, τα οποία σε περίπτωση ανάγκης, επεξεργάζονται με τις κατάλληλες **ενδονουκλεάσες**. Στη συνέχεια, τα πηκτώματα βάφονται με βρωμιούχο αιθίδιο και απεικονίζουν τα προϊόντα PCR στο μεταδιδόμενο υπεριώδες φως με μήκος κύματος 380 nm. Επίσης, τα προϊόντα ενίσχυσης μπορούν να ταυτοποιηθούν με τη τεχνική υβριδισμού – αποτύπωσης με ειδικούς ανιχνευτές DNA ή με άλλες χρωστικές μεθόδους. Λεπτομερέστερα η τεχνική PCR, οι πολυάριθμες τροποποιήσεις της, καθώς και οι μέθοδοι ανάλυσης DNA βασισμένες στη χρήση PCR βρίσκονται στις ακόλουθες μονογραφίες και κατευθυντήριες γραμμές [35, 96, 124, 125]. Κάποιες από αυτές τις μεθόδους θα συζητηθούν συνοπτικά στις επόμενες ενότητες αυτού του κεφαλαίου.

Θα πρέπει να σημειωθεί ότι η τεχνική PCR είναι η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη μοριακή μέθοδος που επιτρέπει ταυτοποίηση **γνωστών μεταλλάξεων** καθώς αποτελεί τη βάση για πιο σύνθετες σύγχρονες μεθόδους στη μελέτη του γονιδιώματος, για παράδειγμα η **μέθοδος των μικροβιοτσίπ (μικροσυστοιχιών)** στη διάγνωση (βλ. παρακάτω).

4.2. Αρχική ταυτοποίηση μεταλλάξεων (τεχνικές για screening)

Όπως έχει αναφερθεί ήδη, η ανίχνευση των άγνωστων μεταλλάξεων δεν παίζει σημαντικό ρόλο στις γονοτυπικές αναλύσεις των πολυπαραγοντικών νοσημάτων (**MFD**), ο στόχος των οποίων είναι η επιβεβαίωση ή η απόρριψη της συσχέτισης αλληλόμορφης παραλλαγής ενός συγκεκριμένου υποψήφιου γονιδίου με κάποια ασθένεια ή με μεμονωμένες κλινικές εκδηλώσεις. Ωστόσο, πολλές MFD (η οστεοπόρωση, η νόσος Αλτσχάιμερ, η νόσος Πάρκινσον, η ιδιοπαθή υπέρταση, η οικογενειακή υπερχοληστερολαιμία ή παχυσαρκία) μαζί με την κυρίαρχη πολυγονιδιακή παραλλαγή της κληρονομικότητας, μπορεί μερικές φορές

να είναι το αποτέλεσμα μεταλλάξεων μεμονωμένων γονιδίων, δηλαδή έχουν μονογονιδιακό χαρακτήρα. Σε αυτές τις σπάνιες περιπτώσεις, η ταυτοποίηση των μεταλλάξεων στα αντίστοιχα γονίδια είναι σημαντική. Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την αρχική ταυτοποίηση μεταλλάξεων, δηλαδή που επιτρέπουν τον **έλεγχο (screening)** για την παρουσία των DNA βλαβών στα μακρά θραύσματα γονιδίων, είναι οι εξής:

1. Μέθοδος διαμόρφωσης πολυμορφισμού μονής έλικας DNA (SSCP - Single Strand Conformation Polymorphism)
2. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα με αποδιατακτική βαθμίδωση (DGGE-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)
3. Μέθοδος ανάλυσης ετερόδιπλων (HA - Heteroduplex Analysis)
4. Μέθοδος χημικής διάσπασης των μη συμπληρωματικών θέσεων (CMC — Chemical Mismatch Cleavage)
5. Μέθοδος ανάλυσης «ελαττωματικής» πρωτεΐνης (PTT — Protein Truncated Test);
6. Μέθοδος φασματομετρίας μάζας και μέθοδος των μικροβιοτισίπ

Τα κύρια χαρακτηριστικά των ορισμένων μεθόδων παρουσιάζονται στον πίνακα 4.2.

Μέθοδος	Μέγεθος περιοχής DNA για ανάλυση, bp	Ευαισθησία μεθόδου, %	Θέση εντοπισμού μετάλλαξης	Τοξικότητα	Σάρωση εξόνων	Σάρωση mRNA
SSCP	250	80	Όχι	Όχι	+++	+
DGGE	600	95	Όχι	Φορμαμίδιο	++	++
CMC	1700	>95	Ναι	Ναι	+	+++
PCR DS	500	>95	Ναι	Όχι	++	++
HA	300	80	Όχι	Όχι	++	+

Πίνακας 4.2. Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα διαφόρων μεθόδων ανίχνευσης μεταλλάξεων [35, 96, 124, 125]

Η ταυτοποίηση των μεταλλάξεων με τις παραπάνω μεθόδους πρέπει να επιβεβαιωθεί με την άμεση αλληλούχιση του υπό εξέταση τμήματος DNA. Έτσι, οι περισσότερες από τις αναφερόμενες μεθόδους (με εξαίρεση τη φασματομετρία μάζας και τα βιοτισίπ) επιτρέπουν την ανίχνευση μόνο των υποπτών περιοχών DNA για παρουσία σημειακών και άλλων μεταλλάξεων, ωστόσο μόνο η μέθοδος αλληλούχισης παρέχει τις πλήρεις

πληροφορίες για το τύπο και τη φύση νουκλεοτιδικών αλλαγών. Συχνά, η αρχική ανίχνευση αλλοιώσεων στις περιοχές κωδικοποίησης ενός γονιδίου, πραγματοποιείται με αυτόν τον τρόπο. Αναπτυγμένες τα τελευταία χρόνια, οι τροποποιήσεις της μεθόδου PCR, διευκολύνουν σε μεγάλο βαθμό την αλληλούχιση των ενισχυμένων τμημάτων και αυξάνουν την αποτελεσματικότητά της. Οι λεπτομερείς πληροφορίες για τις δυνατότητες αυτών των μεθόδων μπορούν να αναζητηθούν σε ακόλουθα εγχειρίδια και ανασκοπήσεις [35, 96, 124, 125].

4.3. Ταυτοποίηση γνωστών μεταλλάξεων

Σήμερα, έχουν ταυτοποιηθεί εκατοντάδες γονίδια, οι μεταλλάξεις των οποίων συσχετίζονται με διάφορα μονογονιδιακά νοσήματα. Επίσης, τα γονίδια αυτά αναφέρονται και ως γονιδιακοί δείκτες για τα MFD. Για πολλούς από αυτούς τους δείκτες έχουν δημιουργηθεί τράπεζες δεδομένων (βλ. Πίνακα 4.3), ταυτοποιήθηκαν οι μείζονες (οι πιο κοινές) μεταλλάξεις, έχουν εντοπιστεί οι περιοχές αυξημένης **μεταλλαξιμότητας** («hot spots») καθώς και έχουν αναπτυχθεί οι αλγόριθμοι μοριακής διάγνωσης. Στην περίπτωση των συχνότερων κληρονομικών νοσημάτων (κυστική ίνωση, φαινυλοκετονουρία, μυϊκή δυστροφία Duchenne, δρεπανοκυτταρική αναιμία κλπ.) έχουν δημιουργηθεί τα εμπορικά κιτ που επιτρέπουν την αυτόματη ανίχνευση των διαγνωστικά σημαντικών μεταλλάξεων.

ΝΟΣΟΣ	ΙΣΤΟΣΕΛΙΔΑ ΔΙΑΔΙΚΤΥΟΥ
Κυστική ίνωση	http://www.genet.sickkids.on.ca.cft/
Μυϊκή δυστροφία Duchenne	http://www.dmd.nl
Αιμορροφιλία	http://europium/mrc.rpms.axc.ulc
Πολυκυστική νεφρική νόσος	http://medoc.gdb.org/pkd
Καρκίνος του μαστού και των ωοθηκών	http://www.nhgri.nih.gov/intramural_research/lab_transfer/bic.member/index.htm
Οικογενής καρκίνος παχέος εντέρου	http://perso.curie.fr/Thierry.Soussi/APC.htm
Κληρονομικός μη-πολυποειδής καρκίνος παχέος εντέρου	http://www.nfdht.nl/database/mdbchoice.htm
Οικογενής υπερχοληστερολαιμία	http://www.ucl.ac.uk/fh/

Πίνακας 4.3 Διαδικτυακές διευθύνσεις πρόσβασης στη βάση δεδομένων των πιο συχνών μονογονιδιακών και ορισμένων πολυπαραγοντικών κληρονομικών ασθενειών

Ότι αφορά τις σημειακές μεταλλάξεις και τους πολυμορφικούς τύπους, πιο εύκολα διαγιγνώσκονται οι νουκλεοτιδικές υποκαταστάσεις, που οδηγούν στην εξαφάνιση ή στον σχηματισμό της θέσης που αναγνωρίζεται από **τα ένζυμα περιορισμού (ενδονουκλεάσες)**. Για να ανιχνευτεί ο συγκεκριμένος τύπος των μεταλλάξεων, πρώτα γίνεται η

επεξεργασία του ενισχυμένου τμήματος DNA που περιέχει τη μετάλλαξη με τη αντίστοιχη ενδονουκλεάση. Αυτό αλλάζει την ποσότητα και το μοριακό βάρος των θραυσμάτων DNA. Για το λόγο αυτό, αμέσως μετά την ταυτοποίηση μιας νέας μετάλλαξης, διεξάγεται μια ηλεκτρονική αναζήτηση των πιθανών θέσεων περιορισμού στη θέση του εντοπισμού αντικατάστασης βάσης. Η πιθανότητα να συμβεί αυτό είναι μεγάλη, καθώς η καθεμία από τις αρκετές εκατοντάδες, γνωστές σήμερα, ενδονουκλεάσεις περιορισμού για τη θέση αναγνώρισης, έχει τη δική της ειδική αλληλουχία DNA του μέσου μεγέθους 5-6 νουκλεοτιδίων. Εάν οι θέσεις του φυσικού περιορισμού είναι αδύνατον να βρεθούν στη θέση της μετάλλαξης, τότε μπορούν να δημιουργηθούν τεχνητά [126].

Στη συνέχεια θα γίνει αναφορά σε μερικές από τις μεθόδους που έχουν σχεδιαστεί ειδικά για την ανίχνευση ορισμένων συχνών μεταλλάξεων και των πολυμορφισμών.

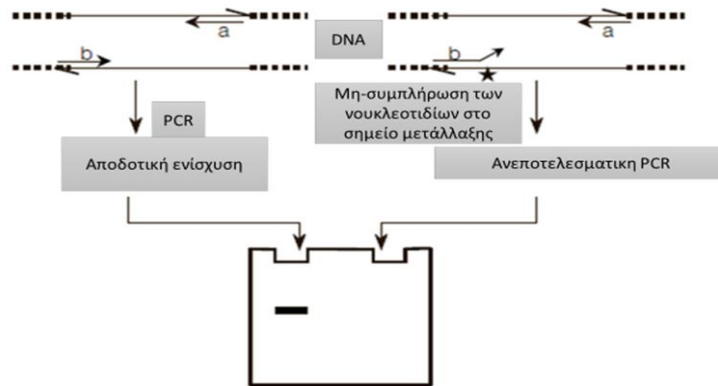
4.3.1. Μέθοδος κατευθυνόμενης μεταλλαξιογένεσης με PCR

Η περιοχή ενίσχυσης του DNA επιλέγεται έτσι ώστε το 3' άκρο του ενός από τους εκκινητές να γειτνιάζει άμεσα με τη θέση μετάλλαξης. Στο τμήμα της ενίσχυσης DNA η αλλαγή του ενός από τα νουκλεοτίδια του 3' άκρου γίνεται με τέτοιο τρόπο ώστε σε συνδυασμό με το νουκλεοτίδιο της μεταλλαγμένης θέσης στο σημείο αυτό θα σχηματιστεί ή θα εξαφανιστεί η θέση περιορισμού για κάποια από τις ενδονουκλεάσεις. Έτσι, τα προϊόντα της PCR με φυσιολογικά και μεταλλαγμένα αλληλόμορφα διαφέρουν στην παρουσία της επαγόμενης θέσης περιορισμού [126].

4.3.2. Σύστημα ανίχνευσης μεταλλάξεων ανθεκτικών στην ενίσχυση

Η ουσία της μεθόδου του συστήματος ανίχνευσης μεταλλάξεων ανθεκτικών στην ενίσχυση (Amplification Refractory Mutation System - ARMS) [127, 128] είναι η παράλληλη πραγματοποίηση των δύο PCR, τη κάθε μία από τις οποίες εξυπηρετεί ένας από τους εκκινητές, είτε η ειδική μεταλλαγμένη, είτε η φυσιολογική ολιγονουκλεοτιδική αλληλουχία, αντίστοιχα (Σχήμα 4.3.2). Την ίδια στιγμή, ως δεύτεροι εκκινητές επιλέγονται ίδιες ολιγονουκλεοτιδικές αλληλουχίες και στις δύο αντιδράσεις, έτσι ώστε και στις δύο περιπτώσεις να μπορούν να ενισχυθούν τα τμήματα DNA του ιδίου μήκους. Με τη παρουσία μίας μετάλλαξης στο εξεταζόμενο DNA, η ενίσχυση των τμημάτων DNA είναι εφικτή μόνο εάν

για τον ειδικό εκκινητή επιλέγεται η μεταλλαγμένη αλληλουχία, ενώ χρησιμοποιώντας τον φυσιολογικό ολιγονουκλεοτιδικό εκκινητή, η PCR μπλοκάρεται.



Σχήμα 4.3.2. Απεικόνιση της μεθόδου ARMS (εξηγείται στο κείμενο) [127]

Η μέθοδος χρησιμοποιείται ευρέως για την ανίχνευση των μεταλλάξεων στην φαινυλκετονουρία, στη β-θαλασσαιμία, στην κυστική ίνωση και στην τυποποίηση των γονιδίων του HLA- συστήματος. Ωστόσο, οι δυσκολίες στην επιλογή των εκκινητών και του βέλτιστου προγράμματος PCR περιορίζουν την ευρεία εφαρμογή αυτής της μεθόδου. Το αναμφισβήτητο πλεονέκτημά της είναι η δυνατότητα χρήσης της πλήρως αυτόματης σάρωσης.

4.3.3. Πρόσδεση συνθετικών ολιγονουκλεοτιδικών ανιχνευτών (OLA)

Το ίδιο πλεονέκτημα με PCR-ARMS έχουν και οι μέθοδοι ανίχνευσης μεταλλάξεων, βασιζόμενες στη πρόσδεση συνθετικών ολιγονουκλεοτιδικών ανιχνευτών (OLA - oligonucleotide ligation assay) [129]. Οι DNA ανιχνευτές πρόσδεσης επιλέγονται έτσι ώστε να είναι πλήρως συμπληρωματικοί προς το φυσιολογικό τμήμα του DNA στην περιοχή της μετάλλαξης, ωστόσο ίδια η νουκλεοτιδική υποκατάσταση (SNP) πρέπει να βρίσκεται στο σημείο ένωσης των δύο εκκινητών. Μετά τον υβριδισμό, οι συνθετημένες ολιγονουκλεοτιδικές αλληλουχίες συρράπτονται με τη χρήση των DNA λιγασών, απομονωμένων από τους θερμοφιλικούς μικροοργανισμούς. Με την παρουσία μίας μετάλλαξης στο εξεταζόμενο μόριο του DNA, στο άκρο ενός από τους ανιχνευτές, σχηματίζεται μια μη συμπληρωτική θέση, η οποία είναι άμεσα γειτονική προς τη θέση πρόσδεσης. Σε αυτή την

περίπτωση η συρραφή μεταξύ των ανιχνευτών δεν υφίσταται. Η μέθοδος περιλαμβάνει αρκετούς διαδοχικούς κύκλους υβριδισμού, πρόσδεσης και αποδιάταξης. Στη συνέχεια διεξάγεται η ηλεκτροφορητική ανάλυση των επισημασμένων μονόκλωνων θραυσμάτων DNA.

4.3.4. Αλληλοειδικός ολιγονουκλεοτιδικός υβριδισμός (ASO)

Μία καθολική μέθοδος ανίχνευσης των υποκαταστάσεων βάσεων είναι ο **αλληλοειδικός ολιγονουκλεοτιδικός υβριδισμός (Allele-Specific Oligonucleotide, ASO)** [130] η οποία περιλαμβάνει την ενίσχυση θραυσμάτων DNA και τον επακόλουθο υβριδισμό με τα επισημασμένα ολιγονουκλεοτίδια (ανιχνευτές), ειδικά για αλληλόμορφα. Συντίθενται δύο τύποι ολιγονουκλεοτιδικών ανιχνευτών, συνήθως του μεγέθους 19 b.p, στους οποίους η μεταλλαγμένη θέση καταλαμβάνει το κέντρο για τη μεγιστοποίηση της ειδικότητας τους. Ο κάθε ένας από αυτούς τους ανιχνευτές ολιγονουκλεοτιδίων είναι συμπληρωματικός προς το φυσιολογικό ή προς το μεταλλαγμένο τμήμα του DNA, αντίστοιχα. Οι συνθήκες του υβριδισμού επιλέγονται έτσι ώστε οι σταθερές δίκλωνες αλυσίδες να σχηματίζονται μόνο με τη πλήρη συμπληρωματικότητα των υβριδικών ζευγών. Κάτω από αυτές συνθήκες, τα ενισχυμένα θραύσματα DNA χωρίς μετάλλαξη θα υβριδοποιούνται μόνο με έναν ανιχνευτή φυσιολογικού γονιδίου, το DNA ομοζυγωτών για μετάλλαξη μόνο με ανιχνευτή μεταλλαγμένου γονιδίου και το DNA των ετεροζυγωτών και με τους δύο επισημασμένους ανιχνευτές. Έχουν αναπτυχθεί οι βολικές τροποποιήσεις αυτής της μεθόδου που χρησιμοποιούν τους αλληλοειδικούς ανιχνευτές DNA, σημασμένους με βιοτίνη ή με υπεροξειδάση του χρένου.

4.3.5. PCR πραγματικού χρόνου (Real-Time PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) πραγματικού χρόνου είναι μια διαδεδομένη μέθοδος για την **ανίχνευση** των **γνωστών** μεταλλάξεων. Πιο συχνά χρησιμοποιούν την αποκαλούμενη συντονισμένη απόσβεση του φθορισμού στο σύστημα TaqMan, η οποία επιτρέπει τον έλεγχο κινητικής ενίσχυσης PCR απευθείας κατά τη διάρκεια της αντίδρασης [131-133]. Για την ανίχνευση των μεταλλάξεων χρησιμοποιούνται οι ανιχνευτές που φέρουν διάφορα φθοροφόρα στα άκρα 5' και 3', «της φωταύγειας» και «της απόσβεσης» (quencher) αντίστοιχα. Τα τελευταία (quencher) πλησιάζοντας, καταστέλλουν τον

φθορισμό (Εικόνα 4.3.5). Οι ανιχνευτές αυτές πρέπει να είναι συμπληρωματικοί προς την αλληλουχία του DNA που πρόκειται να ενισχυθεί και να διαφέρουν μόνο σε **ένα χαρακτηριστικό νουκλεοτιδίο** του ενός ή του άλλου αλληλόμορφου.



Σχήμα 4.3.5. Προσδιορισμός αλληλόμορφου πολυμορφισμού χρησιμοποιώντας την ανάλυση 5' – νουκλεάση (TagMan) (εξηγείται στο κείμενο)[132]

Ο ανιχνευτής που περιέχει τη χρωστική FAM στο άκρο 3' είναι ο πλήρως συμπληρωματικός του αλληλόμορφου 1 και, όταν υβριδοποιηθεί, δίνει ένα σταθερό δίκλωνο. Όταν αυτός ο ανιχνευτής υβριδοποιείται με το αλληλόμορφο 2, θα λάβει χώρα η ατελής σύζευξη των νουκλεοτιδίων και θα εμφανιστεί μια αποκαλούμενη ασυμφωνία/αναντιστοιχία (mismatch). Ο ανιχνευτής με την ετικέτα TET είναι πλήρως συμπληρωματικός προς το αλληλόμορφο 2. Συνεπώς, όταν υβριδοποιείται με το αλληλόμορφο 1, το σταθερό δίκλωνο δεν παράγεται.

Οι ανιχνευτές που υβριδοποιούνται με τις συμπληρωματικές τους αλληλουχίες DNA προστίθενται στο μίγμα της PCR πριν την αντίδραση. Στην περίπτωση των ετεροζυγών, και οι δύο ανιχνευτές υβριδοποιούνται με τα εξεταζόμενα αλληλόμορφα.

Συμπληρώνοντας την αλληλουχία DNA, η Taq πολυμεράση ως εξωνουκλεάση, καταστρέφει μόνο τα σταθερά δίκλινα μόρια. Ταυτόχρονα γίνεται η αποκοπή του αντίστοιχου φθοροφόρου, το οποίο απομακρύνεται στο διάλυμα και χωρίς να είναι υπό την επίδραση του «αποσβέστη», δίνει το φθορίζον του σήμα εκεί. Ανάλογα με το σήμα της φωταύγειας, κρίνουμε ποιο αλληλόμορφο (αλληλόμορφα) αντιπροσωπεύει αυτό το δείγμα DNA. Η ένταση του σήματος φθορισμού εξαρτάται από τον αριθμό των κύκλων PCR. Το μέγεθος του ενισχυμένου τμήματος DNA συνήθως δεν υπερβαίνει τα 150 νουκλεοτίδια, πράγμα που περιορίζει σοβαρά την εφαρμογή αυτής της μεθόδου. Ωστόσο, η πρόοδος της

αντίδρασης μπορεί να παρακολουθηθεί σε πραγματικό χρόνο, αυτό είναι και το κύριο πλεονέκτημα της. Ορισμένες φορές, για να εντοπιστεί μια μετάλλαξη είναι αρκετοί και λιγότεροι από 25 κύκλους ενίσχυσης.

4.4. Νέες τεχνικές ανίχνευσης μεταλλάξεων και γενετικών πολυμορφισμών

Σήμερα, στην εποχή των «μεγάλων δεδομένων» ή αλλιώς «big data», είναι εφικτή η συλλογή ενός πολύ μεγάλου μεγέθους δεδομένων με τη βοήθεια εξελιγμένων τεχνολογιών υψηλής ανάλυσης (High-Throughput). Οι τεχνολογίες αυτές στοχεύουν στην επέκταση της έρευνας από τη μελέτη μεμονωμένων γονιδίων ή πρωτεϊνών στη μελέτη πολλών ή και όλων των γονιδίων ή πρωτεϊνών ταυτόχρονα. Στον τομέα της γενωμικής, οι τεχνολογίες υψηλής ανάλυσης έχουν συμβάλει σημαντικά στην απόκτηση ακόμα περισσότερων πληροφοριών σχετικά με τη γενετική ποικιλότητα μεταξύ ατόμων. Γενικά, ως «τεχνολογία υψηλής ανάλυσης» μπορεί να χαρακτηριστεί κάθε μέθοδος που στοχεύει στη ταυτόχρονη μέτρηση πολλαπλών παραγόντων. Παραδείγματα τέτοιων τεχνολογιών είναι η αλληλουχιστική επόμενης γενιάς (Next Generation Sequencing, NGS), η υγρή χρωματογραφία (Liquid Chromatography), η φασματομετρία μάζας (Mass Spectrometry) και οι μικροσυτοιχίες (Microarrays).

4.4.1. Μέθοδος DHPLC

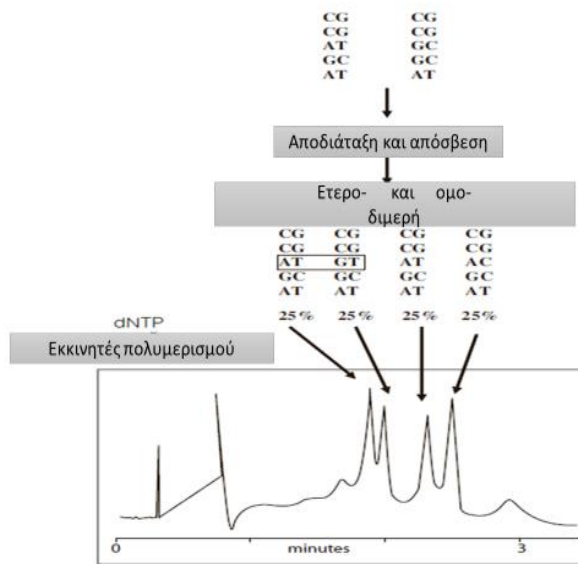
Με τη μέθοδο DHPLC που προτάθηκε το 1995 [134], μέσα σε 2-3 λεπτά ανιχνεύονται υποκαταστάσεις, διαγραφές και προσθήκες ενός νουκλεοτιδίου σε ενισχύσεις μεγέθους 1,5 χιλιάδων b.p. Η ευαισθησία και η ειδικότητα της μεθόδου είναι περίπου 95%. Η μέθοδος αυτή είναι μια τροποποιημένη έκδοση της ανάλυσης **ετεροδιμερών** (heteroduplex) με επακόλουθη αυτόματη καταγραφή των αποτελεσμάτων, χρησιμοποιώντας ένα υγρό χρωματογράφο. Σύμφωνα με τη μέθοδο DHPLC, τα προϊόντα PCR του εξεταζόμενου τμήματος DNA υφίστανται μερική θερμική αποδιάταξη (στους + 95 ° C) σε ένα διάλυμα μαζί με δείγματα ελέγχου του ίδιου τμήματος DNA (αναλογία 1:1), ακολουθούμενη από αργή ψύξη (επαναδιάταξη). Με την απουσία των μεταλλάξεων, στο εξεταζόμενο τμήμα DNA σχηματίζεται μόνο ένας τύπος **ομοδιμερών** (homoduplexes) ενώ με την παρουσία των μεταλλάξεων, σχηματίζονται αρκετοί τύποι **ετεροδιμερών** (heteroduplexes) και **ομοδιμερών** (Εικ. 4.4.1). Τα προκύπτοντα **ετεροδιμερή** είναι λιγότερο ανθεκτικά σε θερμικές

επιδράσεις σε σχέση με τα ομοδιμερή. Με τη βοήθεια της υγρής χρωματογραφίας εντοπίζονται οι παραπάνω διαφορές. Τα προϊόντα έκλουσης ανιχνεύονται με απορρόφηση της υπεριώδους ακτινοβολίας. Η μέθοδος αυτή μας επιτρέπει να ανιχνεύσουμε με αυτόματο πρόγραμμα την παρουσία των μη συμπληρωματικών θέσεων (μη σύζευξης) μεταξύ των εξεταζόμενων δειγμάτων DNA και των δειγμάτων ελέγχου. Η προκαταρκτική επιλογή των βέλτιστων σημείων τήξης των ομόζυγων ετεροδιμερών αυξάνει σημαντικά την ευαισθησία της μεθόδου DHPLC σε σύγκριση με τη μέθοδο SSCP ή την αρχική ανάλυση ετεροδιμερών (heteroduplexes) [135-138].

Η μέθοδος DHPLC δεν απαιτεί την επισήμανση ή τον καθαρισμό των προϊόντων PCR. Η DHPLC έχει υψηλή απόδοση (highthroughput) και χαμηλό κόστος. Το μειονέκτημα της μεθόδου αποτελεί το γεγονός, ότι για την επιλογή της κατάλληλης θερμοκρασίας αποδιάταξης απαιτείται η βελτιστοποίηση της θερμοκρασίας της στήλης για κάθε προϊόν που περιέχει διαφορετική μετάλλαξη. Η DHPLC χρησιμοποιείται για την ανίχνευση γνωστών, αλλά και αγνώστων μεταλλάξεων, είτε αυτές είναι ελλειμματικές είτε σημειακές. Η DHPLC χρησιμοποιείται ως τεχνική ανίχνευσης των μεταλλάξεων μετά την ενίσχυση των προϊόντων με PCR.

Η μέθοδος DHPLC χρησιμοποιείται ευρέως:

- ✓ για τον προσδιορισμό του γονότυπου των υποκαταστάσεων ενός νουκλεοτιδίου (SNPs),
- ✓ για την αρχική ανάλυση των πολυμορφικών θέσεων των υποψήφιων γονιδίων, σχετιζόμενων με πολυπαραγοντικά νοσήματα,
- ✓ για τις μελέτες των μοριακών δεικτών και των μεταλλάξεων στο χρωμόσωμα Y,
- ✓ για τη χαρτογράφηση των γονιδίων με τη βοήθεια τυποποίησης των SNPs δεικτών.



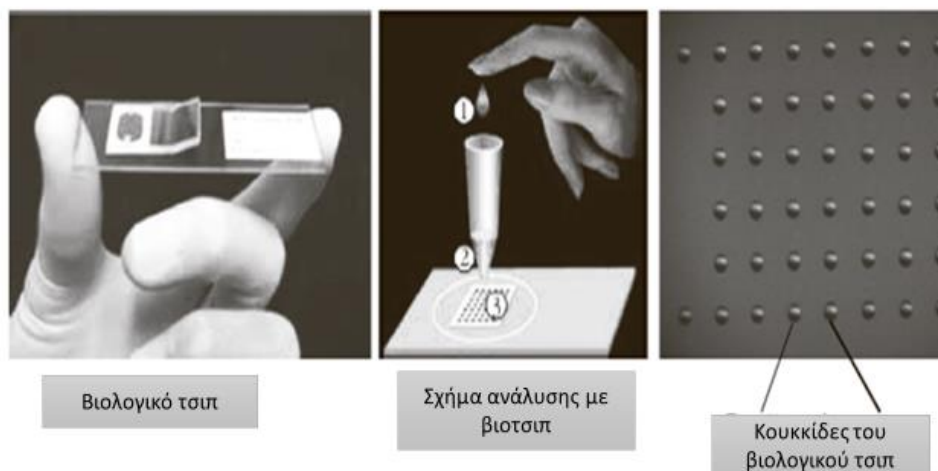
Σχήμα 4.4.1 Διεξαγωγή ανάλυσης DHPLC (εξήγηση στο κείμενο) [136]

4.4.2. Μέθοδοι μικροσυστοιχίων

Ως μια σημαντική καινοτομία στη μοριακή βιολογία θεωρείται η τεχνολογία των βιολογικών μικροτσίπ (μικροσυστοιχίων). Η τεχνολογία αυτή επιτρέπει την ανάλυση σε μικρές ποσότητες αρχικού υλικού, την διεξαγωγή της αντίδρασης σε μικρούς όγκους, τη πραγματοποίηση ταυτόχρονης ανάλυσης των πολλαπλών παραμέτρων για πολλά γονίδια στο ίδιο δείγμα βιολογικού υλικού. Οι μικροσυστοιχίες DNA είναι μια διάταξη των συστηματικά τοποθετημένων γονιδίων (ανιχνευτών) πάνω σε επίπεδη στερεή επιφάνεια. Η ονομασία προέρχεται από την ελληνική λέξη «μικρό» και την γαλλική λέξη «layer» (διάταξη). Άλλοι όροι που συναντώνται ευρέως στην βιβλιογραφία είναι: biochips, DNA chips και gene chips. Η ευαισθησία της μεθόδου είναι συγκρίσιμη με συνήθεις μεθόδους διάγνωσης του DNA ενίσχυσης και σε ορισμένες περιπτώσεις τις υπερβαίνει [140-143].

Ανάλογα με τη φύση των ακινητοποιημένων ανιχνευτών, διακρίνονται 4 κύριοι τύποι βιολογικών τσίπ:

- DNA μικροτσίπ
- RNA μικροτσίπ
- Μικροτσίπ πρωτεϊνών
- Μικροτσίπ κυττάρων



Εικόνα 4.4.2. Βιολογικό μικροτσίπ και DNA - ανάλυση (1 - εκχύλιση DNA από βιολογικό υλικό, 2 - PCR, 3 - υβριδισμός σε επιφάνεια βιοτσιπ) (εξηγείται στο κείμενο)[140]

Τα πιο διαδεδομένα βιοτσιπ στην έρευνα και κλινική πρακτική, ειδικά για την ανάλυση των διαφόρων γονιδιακών μεταλλάξεων ή των αλληλόμορφων παραλλαγών τους, **είναι οι μικροσυστοιχίες DNA**. Αυτές είναι μικροσκοπικές πλάκες πηκτής με πολυάριθμες κοιλότητες (κουκκίδες - spot) που περιέχουν τους διάφορους ανιχνευτές DNA (Εικ. 4.4.2), ακινητοποιημένους με ομοιοπολικούς δεσμούς σε μια στερεή επιφάνεια, ένα γυαλί ή μεμβράνη. Με άλλα λόγια, οι ανιχνευτές των γονιδίων έχουν ακινητοποιηθεί σε γυάλινο πλακάκι, διαστάσεων μικρότερων της ανθρώπινης παλάμης, με τεχνικές της σύγχρονης νανοτεχνολογίας, σε συγκεκριμένα σημεία. Η δομή αυτή αποτελεί μια μικροσυστοιχία. Στη θέση των ανιχνευτών των γονιδίων, όπως αναφέραμε και παραπάνω, μπορούν να μπου οι ανιχνευτές πρωτεϊνών, τμήματα ιστών, ανιχνευτές μεταβλητών κ.ά. Τα τελευταία δέκα χρόνια, η τεχνολογία μικροτσιπ εξελίχθηκε σε ένα ταχέως αναπτυσσόμενο εφαρμοσμένο πεδίο βιολογικών επιστημών. Δεκάδες εταιρείες αναπτύσσουν και προσφέρουν τα βιολογικά μικροτσιπ σε συστοιχίες κυμαινόμενες από μερικές έως εκατοντάδες χιλιάδες ανιχνευτών DNA [144]. Με τις τεχνολογίες των μικροσυστοιχιών αναλύονται οι μετατοπίσεις, οι διπλασιασμοί, οι παρατεταμένες διαγραφές, οι μικροαναπτύξεις (microduplications) καθώς και οι μικροδιαιρέσεις (microdeletions) του DNA [145-151].

Οι τεχνολογίες με τις οποίες παρασκευάζονται τα γονιδιακά βιοτσιπ εξαρτώνται από το μέγεθος των εφαρμοσμένων θραυσμάτων DNA, από τις μεθόδους ακινητοποίησης, από τις διαδικασίες του υβριδισμού καθώς και από τα συστήματα ανίχνευσης [144, 152].

Ως προς το τελικό στάδιο ανίχνευσης υπάρχουν τα **βιοτσίπ υβριδισμού και τα ενζυμικά βιοτσίπ**. Τα βιοτσίπ «**υβριδισμού**», ανάλογα με τη μέθοδο ανάγνωσης του σήματος, χωρίζονται σε **ηλεκτροχημικά** (εταιρία «Nanogen») και **φθορίζοντα** (εταιρίες «Affymetrix», «Illumina», «Biochip») κ.λπ.

«Biochip»: www.biochip.ru;

«Affymetrix»: www.affymetrix.com;

«Applied Biosystems»: www.europe.appliedbiosystems.com;

«Asper Biotech»: www.asperbio.com;

«Illumina»: www.illumina.com;

«Nanogen»: www.nanogen.com].

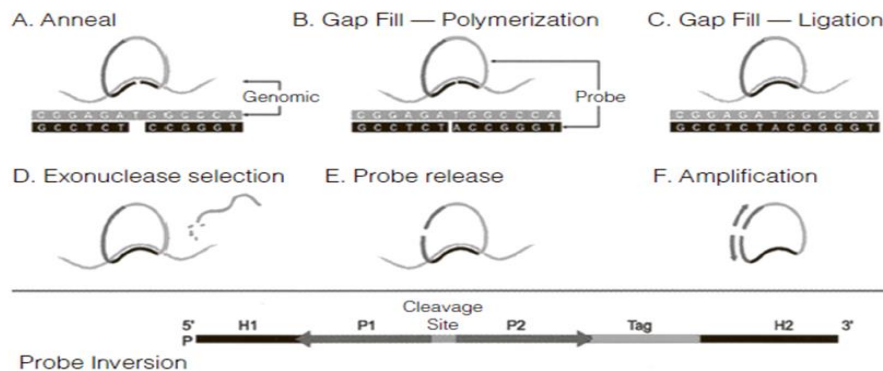
Επίσης, η διάκριση των μεταλλάξεων μπορεί να πραγματοποιηθεί και **πριν τον υβριδισμό**, δηλαδή στη διαδικασία της προετοιμασίας του δείγματος (εταιρίες «Applied Biosystems», «Affymetrix») όπως και **στη διαδικασία υβριδισμού** (εταιρία «Biochip»). Για παράδειγμα, στα παρακάτω σχήματα απεικονίζονται οι μέθοδοι ανάλυσης μεταλλάξεων με βιοτσίπ υβριδισμού, που χρησιμοποιούνται από την εταιρία «Biochip» (Σχ. 4.4.2.1) και την εταιρία «Affymetrix» (Σχ. 4.4.2.2).

1. Μικροβιοτσίπ αλληλο-ειδικού υβριδισμού (εταιρία «Biochip»)

Η τεχνολογία μικροσυστοιχιών που αναπτύχθηκε στο Ινστιτούτο Μοριακής Βιολογίας της Ρωσικής Ακαδημίας Επιστημών του V.A. Engelhardt (Engelhardt Institute of Molecular Biology of Russian Academy of Sciences) προτείνει μια προκαταρκτική **πολλαπλή ενίσχυση** των εξεταζόμενων τμημάτων DNA με χρήση των επισημασμένων φθορίζοντων εκκινητών (ή τριφωσφορικών δεοξυνουκλεοτιδίων) [142, 153, 154]. Με τη προσθήκη περισσειας του ενός από τους εκκινητές και με τη διεξαγωγή στη συνέχεια των δύο κύκλων αντιγραφής, επιτυγχάνεται μια μεγάλη ποσότητα επισημασμένου μονόκλωνου προϊόντος κυρίως, το οποίο τοποθετείται στη επιφάνεια βιοτσίπ, όπου υβριδοποιείται με τους ολιγονουκλεοτιδικούς ανιχνευτές ακινητοποιημένους στο πήκτωμα (Σχ. 4.4.2.1). Εάν η αλληλουχία του εξεταζόμενου DNA είναι πλήρως συμπληρωματική της αλληλουχίας του ανιχνευτή DNA, σχηματίζεται ένα σταθερό (δίκλωνο) διμερές, το οποίο ανιχνεύεται εύκολα λόγω της φθορίζουσας σήμανσης. Ωστόσο, αν δεν υπάρχει το επιθυμητό τμήμα ή υπάρχει η μη συμπληρωματική βάση σε αυτό, τότε δεν υφίσταται το σταθερό διμερές και δεν

- C. Ακολούθως διεξάγεται η αντίδραση λιγκάσης, στην οποία το 5'-άκρο της ενσωματωμένης βάσης συρράπτεται με το άκρο 3' του ανιχνευτή H2 (Σχ. 4.4.2.2 - C).
- D. Στο επόμενο στάδιο (Σχ. 4.4.2.2 - D), η εξωνουκλεάση καταστρέφει το υπολοίπο DNA του αρχικού δείγματος.
- E. Προκειμένου να ενισχυθεί περαιτέρω, το δακτυλικό μόριο ειδικού ανιχνευτή κόβεται με το ένζυμο διάσπασης (**cleavage enzyme**) (Σχ. 4.4.2.2 - E).
- F. Η ενίσχυση γίνεται με τη χρήση καθολικών (κοινών) εκκινητών P1 και P2 (Σχ. 4.4.2.2 - F).

Στη συνέχεια, τα δείγματα υβριδοποιούνται με ένα μικροτσιπ. Η ειδικότητα του υβριδισμού επιτυγχάνεται με μία ειδικά σχεδιασμένη **tag αλληλουχία**, η οποία, μαζί με τους καθολικούς (κοινούς) εκκινητές, είναι μία από τις τεχνογνωσίες (know-how) της εταιρείας «Affymetrix». Έτσι, στο υπό εξέταση δείγμα μπορούν να ανιχνευτούν έως και 1000 ή περισσότερα SNPs. Η ακρίβεια μεθόδου στην ανάλυση χιλιάδων SNPs είναι περίπου 90%.



Σχήμα 4.4.2.2 Προετοιμασία των ειδικών ανιχνευτών για την ανάλυση των σημειακών μεταλλάξεων με τεχνολογία «Affymetrix» (εξηγείται στο κείμενο)

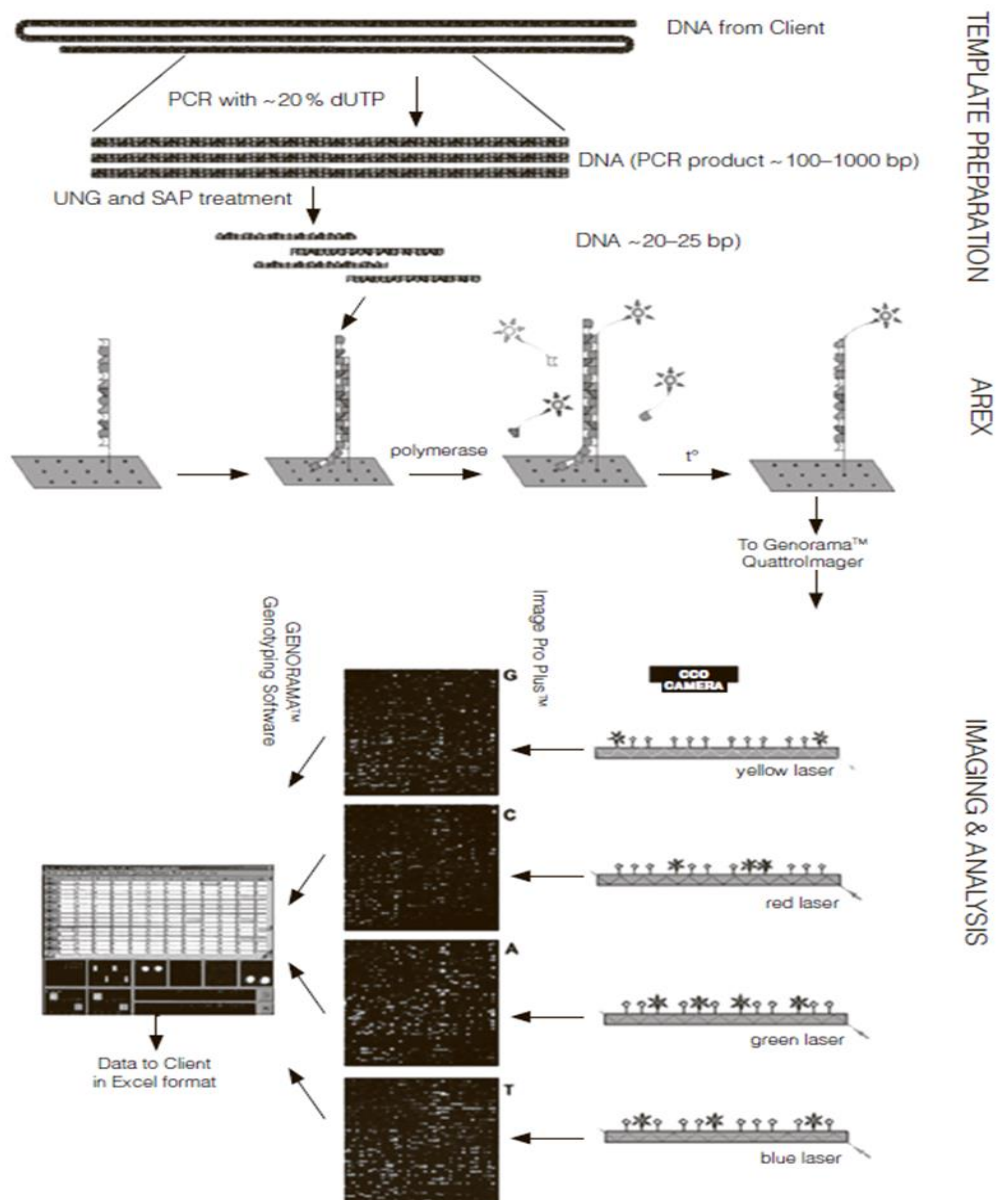
3. Μικροβιοτσιπ SBE

Μια άλλη, πολλά υποσχόμενη παραλλαγή της τεχνολογίας των μικροσυστοιχιών (βιοτσιπ) για ανάλυση του γενετικού πολυμορφισμού, έχει σχεδιαστεί με βάση την μέθοδο **SBE** (single base primer extension - επέκταση του εκκινητή για μία βάση), επιτρέποντας

την διάκριση υψηλού βαθμού των σημάτων υβριδισμού κατά μήκος των αλληλόμορφων «μεταλλαγμένου» και «άγριου» τύπου. Κατά την παρασκευή των ειδικών ανιχνευτών ενισχύεται προκαταρκτικά το εξεταζόμενο DNA-θραύσμα που περιέχει ένα δείκτη SNP και στη συνέχεια υβριδοποιείται σε επιφάνεια ενός βιοτσίπ. Η αλληλουχία του ανιχνευτή πρέπει να είναι συμπληρωματική προς την υπό διερεύνηση αλληλουχία DNA, συμπεριλαμβανομένης της τελευταίας βάσης της στο 3' άκρο, μετά την οποία ακολουθεί το μεταλλαγμένο νουκλεοτίδιο. **Η αρχή της ανίχνευσης είναι η ακόλουθη:** μετά την υβριδοποίηση του ανιχνευτή με το δείγμα, στην αντίδραση προστίθενται η DNA πολυμεράση και τα διδεοξυνουκλεοτίδια επισημασμένα με διαφορετικές φθορίζουσες χρωστικές. Ωστόσο στο 3' άκρο του ακινητοποιημένου ανιχνευτή μπορεί να προσαρτηθεί μόνο ένα νουκλεοτίδιο. Μετά την πλύση του βιοτσίπ, ο φθορισμός του εξεταζόμενου δείγματος προσδιορίζεται από αυτό το επισημασμένο διδεοξυνουκλεοτίδιο. Ότι αφορά τον βαθμό διάκρισης μεταξύ των ομόζυγων και των ετερόζυγων γονότυπων, η μέθοδος SBE κατά μέσον όρο υπερέχει την υβριδοποίηση με αλληλοειδικούς ανιχνευτές (Allele-Specific Oligonucleotide, ASO) [143]. Το μειονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι ότι χρήζει τη σύνθεση ολιγονουκλεοτιδίων, ακινητοποιημένων σε ένα βιοτσίπ με ελεύθερο 3' άκρο, πράγμα που περιορίζει τη χρήση της μεθόδου μικρυστοιχιών φωτολιθογραφίας που είναι ο πιο ελπιδοφόρος τύπος τους.

4. Μικροβιοτσίπ APEX (εταιρία «Asper Biotech»)

Εννοιολογικά παρόμοια με την τεχνολογία SBE είναι τα βιοτσίπ που βασίζονται στη μέθοδο **APEX (arrayed primer extension - προστεθείσα επέκταση των εκκινητή)**, δηλαδή η συμπλήρωση των εκκινητών, συντεθειμένων πάνω και στις δύο αλυσίδες του δίκλωνου DNA. Η διαφορά της μεθόδου είναι ότι στη APEX δεν αναλύεται μόνο μια, αλλά δύο αλυσίδες του DNA ταυτόχρονα και χρησιμοποιούνται πολλοί διάφοροι ακινητοποιημένοι ανιχνευτές για κάθε θέση. Η τεχνική αυτή δίνει τη δυνατότητα ταυτοποίησης νέων μεταλλάξεων και πολυμορφικών θέσεων με υψηλό βαθμό αξιοπιστίας. Η μέθοδος των μικρυστοιχιών APEX αναπτύχθηκε από την εσθονική εταιρεία «Asper Biotech» και παρουσιάζεται στο Σχήμα 4.4.2.4



Σχήμα. 4.4.2.4 Μίνι-αλληλούχιση σε μικροτσίπ («Asper Biotech») (εξηγείται στο κείμενο)

5. Μικροσυστοιχίες για φαρμακογενετική ανάλυση (Pharmacogenetic biochip)

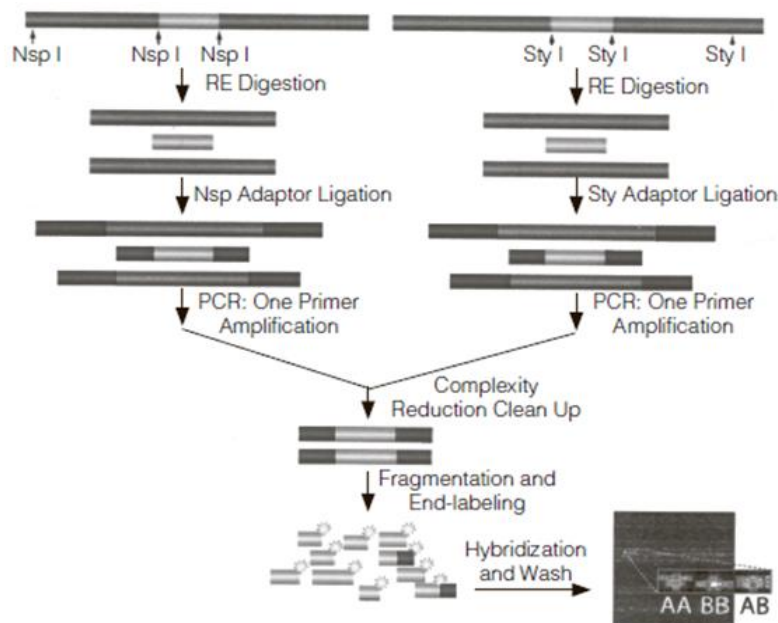
Στο Ινστιτούτο Επιστημονικών Ερευνών D.O. Ott της Ρωσικής Ακαδημίας Ιατρικών Επιστημών στην Άγια Πετρούπολη (FSBSI - The Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology named after D.O. Ott of the Ministry of Healthcare of the Russian

Federation) έχουν αναπτυχθεί πολλές διάφορες παραλλαγές των βιοτσίπ υβριδισμού. Με τη βοήθεια ενός από αυτά, του «**φαρμακογενετικού βιοτσίπ**», μπορεί να μελετηθεί η κληρονομική προδιάθεση στις συνεχόμενες αποβολές εγκυμοσύνης και στη παιδική λευχαιμία [147, 148]. Με το συγκεκριμένο βιοτσίπ γίνεται ανάλυση των 13 αλληλόμορφων πολυμορφικών θέσεων για 7 γονίδια αποτοξίνωσης.

Το «φαρμακογενετικό βιοτσίπ» (pharmacogenetic biochip) έχει ήδη περάσει τις κλινικές δοκιμές και έχει εισαχθεί στην πρακτική της εργαστηριακής διάγνωσης των πολλών ιατρικών κέντρων της Ρωσικής Ομοσπονδίας. Τα βιοτσίπ της κληρονομικής προδιάθεσης για θρομβοφιλία («Trombo-biochip») και για καρδιαγγειακές παθήσεις («Cardiochip») βρίσκονται στο στάδιο κλινικών δοκιμών [155]. Έχουν ξεκινήσει οι διενέργειες για τη κατασκευή των βιοτσίπ που ελέγχουν τις κύριες μεταλλάξεις του γονιδίου CFTR κυστικής ίνωσης, καθώς και τη κληρονομική προδιάθεση για άσθμα και για οστεοπόρωση [112].

6. Μικροβιοτσίπ GWAS

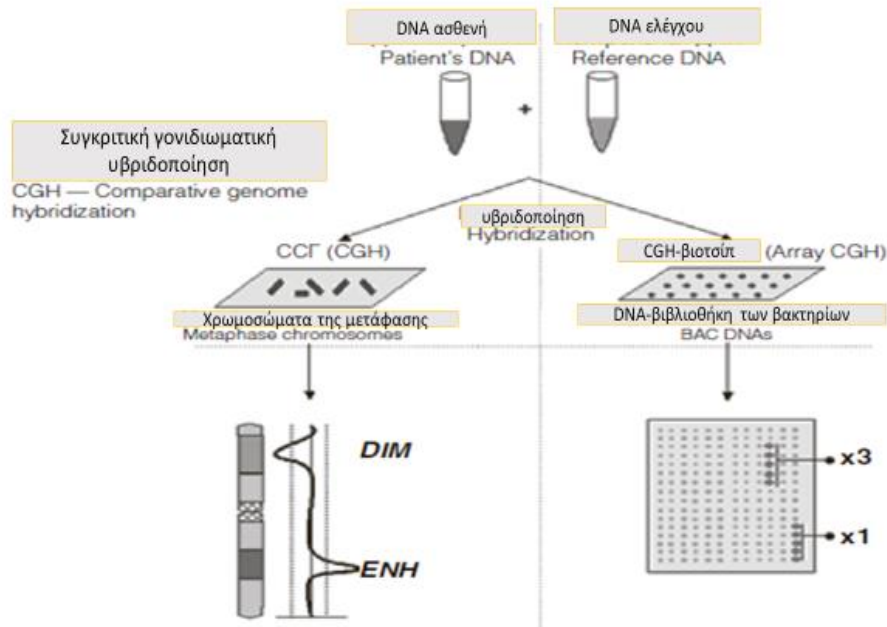
Την ιδιαίτερη προσοχή αξίζουν οι μικροσυστοιχίες που επιτρέπουν μελέτες συσχέτισης ολοκλήρου γονιδιώματος (Genome Wide Association Studies — GWAS) [www.affymetrix.com και www.illumina.com]. Η παραπάνω τεχνολογία καθιστά δυνατή τη ταυτοποίηση όλων των γονιδιακών δεικτών, των γενετικών τόπων και των μεμονωμένων SNPs δεικτών που σχετίζονται με διάφορες πολυπαραγοντικές ασθένειες, δηλαδή αναφέρεται στην παράλληλη εξέταση πολλών κοινών γενετικών πολυμορφισμών σε διαφορετικά άτομα για τον προσδιορισμό συσχέτισης συγκεκριμένων πολυμορφισμών με συγκεκριμένα χαρακτηριστικά.



Σχήμα 4.4.2.6. Τεχνολογία μικροσυστοιχιών που επιτρέπει τις μελέτες γενετικής συσχέτισης ολοκλήρου γονιδιώματος, εταιρίας «Affimetrix» (εξήγηση στο κείμενο)

Για το σκοπό αυτό, το εξεταζόμενο δείγμα DNA υποβάλλεται σε υδρόλυση από ορισμένες ενδονουκλεάσες. Τα προκύπτοντα θραύσματα συνδέονται (συρράπτονται) με τις **προσαρμοσμένες αλληλουχίες DNA** και ενισχύονται με έναν εκκινητή, ειδικό για το τμήμα του γονιδιώματος που μελετάται. Τα λαμβανόμενα θραύσματα, προϊόντα PCR επισημαίνονται με φθορίζουσες χρωστικές και υβριδοποιούνται με το σετ ανιχνευτών DNA που βρίσκονται πάνω στο βιοτσίπ (Σχ. 4.4.2.6). Σύμφωνα με την εικόνα υβριδισμού ενός βιοτσίπ, χρησιμοποιώντας ένα ειδικό πρόγραμμα υπολογιστή, κρίνεται, εάν υπάρχουν κάποιες παραλλαγές των αλληλόμορφων υποκαταστάσεων απλού νουκλεοτιδίου (SNPs) στο υπό μελέτη δείγμα (Σχ. 4.4.2.6^α). Η σύγκριση των συχνοτήτων των αντίστοιχων αλληλόμορφων των ασθενών με υγιή άτομα επιτρέπει την ταυτοποίηση όλων των SNPs και κατά συνέπεια, όλων των γονιδίων και των DNA τόπων που σχετίζονται με μια συγκεκριμένη νόσο, δηλαδή επιτρέπει τον προσδιορισμό του γενετικού προφίλ για συγκεκριμένο πολυπαραγοντικό νόσημα. Με τη συγκεκριμένη τεχνολογία, σε μια μόνο ανάλυση μπορούν να αναλυθούν δεκάδες ως και εκατοντάδες χιλιάδες δεικτών, ωστόσο η ακρίβειά της δεν υπερβαίνει το 90%. Για το λόγο αυτό, στο παρόν στάδιο, η μέθοδος αυτή πρέπει να θεωρείται ως μέθοδος **αναζήτησης**, παρά ως διαγνωστική. Η παραπάνω τεχνολογία χρησιμοποιείται με επιτυχία για τον έλεγχο *γενετικής συσχέτισης ολοκλήρου γονιδιώματος* στις

διάφορες πολυπαραγοντικές ασθένειες, συμπεριλαμβανομένου του διαβήτη τύπου 1 και τύπου 2, της στεφανιαίας νόσου, του βρογχικού άσθματος, της νόσου Crohn, της μανιοκαταθλιπτικής ψύχωσης κ.λπ. [112, 145, 156].



Σχήμα 4.4.2.6^α Αρχή μεθόδου της συγκριτικής γονιδιωματικής υβριδοποίησης (εξηγείται στο κείμενο) [112])

7. PCR πραγματικού χρόνου σε βιοτσίπ

Οι εξελίξεις των τελευταίων ετών που στοχεύουν στο συνδυασμό των αναμφισβήτητων πλεονεκτημάτων της PCR πραγματικού χρόνου με τις αρχές των διαγνωστικών βιοτσίπ έφεραν τη σημαντική πρόοδο στη βελτίωση της αποτελεσματικότητας, της ακρίβειας και του κόστους των ελέγχων των μεταλλάξεων. Έτσι, χρησιμοποιώντας το βιοτσίπ της εταιρείας «Fluidigm» [157], μπορεί κανείς να αναλύσει τις μεταλλάξεις ή να ελέγξει τους SNPs σε 9216 DNA τόπους ταυτόχρονα. Η μέθοδος αυτή έχει μεγαλύτερη **εξειδίκευση και ακρίβεια** από τη μέθοδο γενετικής συσχέτισης ολοκλήρου γονιδιώματος - GWAS.

4.4.3. Μαζική φασματομετρία

Η μέθοδος φασματομετρίας μάζας βασίζεται στη μέτρηση της αναλογίας μάζας των φορτισμένων σωματιδίων (ιόντων) προς το φορτίο τους (Εικ. 4.4.3). Η μήτρα της ανάλυσης (μόρια DNA) ακτινοβολείται με λέιζερ (MALDI). Η παρουσία των οποιοδήποτε

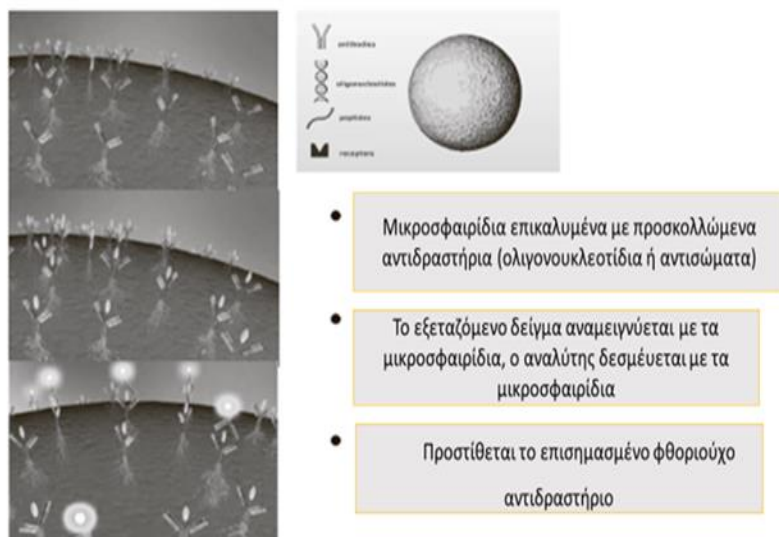
μεταβολών στο εξεταζόμενο δείγμα (μεταλλάξεις, αλληλόμορφες παραλλαγές) οδηγούν σε μεταβολή της μάζας. Η μέθοδος είναι αρκετά επίπονη και απαιτεί προσωπικό υψηλής εξειδίκευσης. Παράλληλα, η μέθοδος έχει πολλά αναμφισβήτητα πλεονεκτήματα: επιτρέπει την ανάλυση μεγάλου αριθμού δειγμάτων DNA με υψηλή ταχύτητα και απόδοση [112, 158].



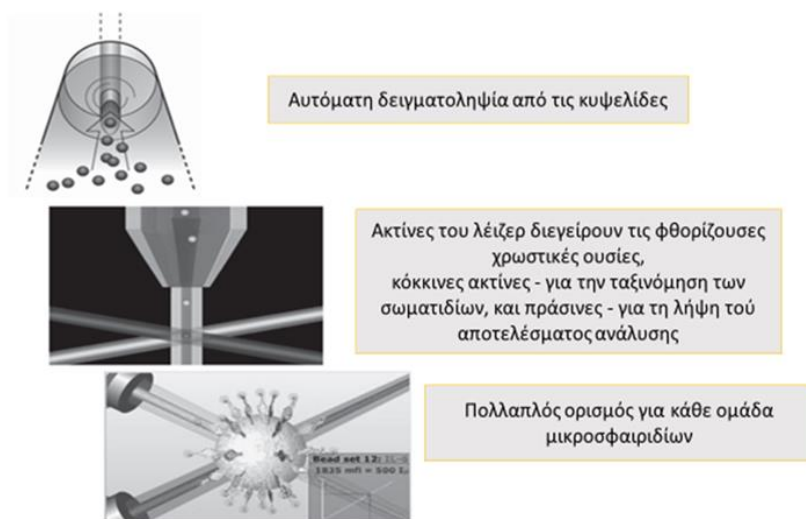
Εικόνα 4.4.3. Εξοπλισμός που απαιτείται για ανάλυση φασματομετρίας μάζας (<http://biophysics.uoguelph.ca/central/facilities.htm>) (εξηγείται στο κείμενο)[112]

4.4.4. Τεχνολογία X-map

Η τεχνολογία X-map ή τεχνολογία με βάση την κυτταρομετρία ροής μερικές φορές αποκαλείται και ως μέθοδος «υγρών βιοτσίπ» [112, 159]. Είναι ένα σύστημα που βασίζεται στη χρήση των μικροσφαιριδίων, τα οποία αναλύονται με τη κυτταρομετρία ροής (Εικ. 4.4.4; 4.4.4^α). Τα μικροσφαιρίδια επικαλύπτονται με προσκολλώμενα αντιδραστήρια/ανιχνευτές (ολιγονουκλεοτίδια ή αντισώματα). Με την ανάμειξη του εξεταζόμενου δείγματος με τα μικροσφαιρίδια, πραγματοποιείται η υβριδοποίηση του με τους ανιχνευτές (παρόμοια με τα βιοτσίπ υβριδισμού) (Εικ. 4.4.4). Το κάθε μικροσφαιρίδιο έχει τη δική του «διεύθυνση» (θέση), χάρη στην οποία μετά ανιχνεύεται (Εικ. 4.4.4^α). Στην περίπτωση που έχει γίνει η υβριδοποίηση, ένας τέτοιος ανιχνευτής μπορεί να απομονωθεί για περαιτέρω ανάλυση χάρη στην ανίχνευση ενός σήματος φθορισμού χρησιμοποιώντας δέσμη του λέιζερ.



Εικόνα 4.4.4. Υβριδοποίηση πάνω σε μικροσφαιρίδια (www.perkinelmer.com) (εξηγείται στο κείμενο)[112]



Εικόνα 4.4.4^α. Αρχή της ανίχνευσης μεταλλάξεων σε μικροσφαιρίδια (www.perkinelmer.com) (εξηγείται στο κείμενο)[112]

Το σύστημα που βασίζεται στη κυτταρομετρία ροής έχει αρκετά πλεονεκτήματα: η ταυτόχρονη ανάλυση των πολλών δειγμάτων DNA, η υψηλή απόδοση, το χαμηλό κόστος των αντιδραστηρίων και καμία εξάρτηση από το background παρασκήνιο (σε αντίθεση με

τα βιοτσίπ). Ότι αφορά τη μοριακή γονοτυπία των πολυπαραγοντικών νοσημάτων αυτή είναι μια από τις πιο ελκυστικές μεθόδους των επόμενων δεκαετιών.

4.4.5. Αλληλούχιση επόμενης γενιάς (NGS)

Παρά της διαρκείας βελτιώσεις στη μέθοδο της Sanger, οι περιορισμοί της μεθόδου συνέχισαν να υπάρχουν και αυτό οδήγησε στην ανάπτυξη νέων τεχνολογιών. Η τεχνολογία NGS αναπτύχθηκε για να λαμβάνουν χώρα περισσότερες αντιδράσεις ταυτόχρονα, μεγαλύτερων τμημάτων DNA σε μικρότερο χρονικό διάστημα και με μεγαλύτερη ταχύτητα (MPS: Massive Parallel Sequencing). Επιτρέπει την αλληλούχιση μεγάλου αριθμού βάσεων του DNA, παράγοντας εκατοντάδες gigabases (Gb) δεδομένων εντός ενός μόνο τρεξίματος (run) και αποτελεί ένα ισχυρό, ευέλικτο, απαραίτητο και καθολικό «βιολογικό εργαλείο» που διεισδύει σε αρκετούς τομείς της βιολογικής μελέτης μέσω των εφαρμογών της όπως π.χ. Whole Genome Sequencing (WGS), Exome Sequencing, Targeted Resequencing, Chromatin Immunoprecipitation Sequencing, RNA Sequencing. Οι ερευνητές μπορούν να αλληλουχίσουν ολόκληρο ένα μικρό γονιδίωμα σε μια ημέρα. Το κόστος αλληλούχισης ενός ανθρωπίνου γονιδιώματος έχει σπάσει το φράγμα των \$1000 (<https://www.veritasgenetics.com/mygenome>).

Λόγω της ευρείας αποδοχής της καινούριας αυτής τεχνολογίας πολλές εταιρείες ανέπτυξαν διαφορετικές πλατφόρμες του NGS. Η πρώτη τεχνολογία NGS κυκλοφόρησε το 2005, ήταν η μέθοδος της πυροαλληλούχισης από τη 454 Life Sciences. Ένα χρόνο αργότερα, κυκλοφόρησε η τρίτη πλατφόρμα NGS, αυτή της SOLID από την Applied Biosystems. Το 2007 κάνει την εμφάνιση της η Illumina. Τέλος, το 2011 η Ion Torrent κυκλοφόρησε το PGM. Αυτό το σύστημα αναπτύχθηκε από τον Jonathan Rothberg, ο οποίος είχε αναπτύξει και το σύστημα 454.

Η τελευταία λέξη της τεχνολογίας στον τομέα του Sequencing ήρθε το 2016 με την άφιξη της λεγόμενης τρίτης γενιάς τεχνολογιών αλληλούχισης (Third Generation Sequencing ή Single-Molecule Sequencing Technologies) [161] όπου εν αντιθέσει με της δευτέρας γενιάς αλληλουχητών που μπορούν να διαβάσουν μικρά τμήματα μήκους μερικών εκατοντάδων βάσεων, οι αλληλουχητές τρίτης γενιάς μπορούν να διαβάσουν πάνω

από 10.000 b.p η να χαρτογραφήσουν μόρια πάνω από 100.000 bp. Χαρακτηριστικοί εκπρόσωποι αυτής της γενιάς αποτελούν:

- Pacific Biosciences (PacBio) Single Molecule Real Time (SMRT) Sequencing
- Illumina Tru-seq Synthetic Long-Read Technology
- Oxford Nanopore Technologies Sequencing Platform

Στις κάτωθι παραπομπές αναφέρονται μερικές εκ των προοπτικών και εφαρμογών της τεχνολογίας NGS: [21,160-162]

- **Illumina Sequencing:** Η πλατφόρμα της Illumina αποτελεί μία από τις πιο διαδεδομένες πλατφόρμες που χρησιμοποιούνται στη NGS. Η συγκεκριμένη τεχνολογία παράγει διαβάσματα (reads) μήκους 50-100 b.p. Σχετικά μακρά τμήματα από τη βιβλιοθήκη των εκμαγείων συνδέονται μέσω λιγκασών (ligation) με γενικούς προσαρμογείς (adaptors). Έπειτα, αυτά τα τμήματα προσκολλούνται σε ένα γυάλινο πλακίδιο. Στο επόμενο στάδιο, διεξάγεται μια PCR με σκοπό την ενίσχυση (solid-phase bridge amplification) και τη δημιουργία πολλαπλών αντιγράφων μιας αλληλουχίας (reads). Αργότερα, τα ενισχυμένα αντίγραφα των αλληλουχιών διαχωρίζονται σε μονούς κλώνους, οι οποίοι και θα αλληλουχηθούν. Στη συνέχεια, το πλακίδιο «πλημμυρίζεται» με σημασμένα με φθορίζοντα μόρια νουκλεοτίδια και DNA πολυμεράση. Κάθε ένα νουκλεοτίδιο έχει ένα μοναδικό χρώμα το οποίο το καθορίζει. Η παρουσία μορίων τερματισμού (terminators) εξασφαλίζει ότι μόνο μια βάση προστίθεται κάθε φορά. Το φθορίζον σήμα καταγράφεται υπό μορφή εικόνας, δεικνύοντας ποια βάση έχει προστεθεί. Σε αυτό το στάδιο, το πλακίδιο ετοιμάζεται για τον επόμενο κύκλο. Οι terminators απομακρύνονται, επιτρέποντας στην επόμενη βάση να προστεθεί κατά την διαδικασία. Ταυτόχρονα, το φθορίζον σήμα αφαιρείται, προκειμένου να αποφευχθούν μελλοντικές επιμολύνσεις των σημάτων. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται με την προσθήκη ενός νουκλεοτιδίου την φορά και της διαδικασίας απεικόνισης στο ενδιαμέσο. Κάνοντας χρήση υπολογιστή, οι βάσεις ανιχνεύονται σε κάθε περιοχή και δομείται η εξεταζόμενη αλληλουχία.
- **454 Pyrosequencing (Roche):** Το πρώτο όργανο NGS το οποίο αναπτύχθηκε ήταν η συσκευή 454 Pyrosequencing. Έχει την ιδιότητα να αλληλουχεί αρκετά **μεγαλύτερα τμήματα** εν συγκρίσει με την Illumina. Η βασική αρχή της είναι ίδια με της

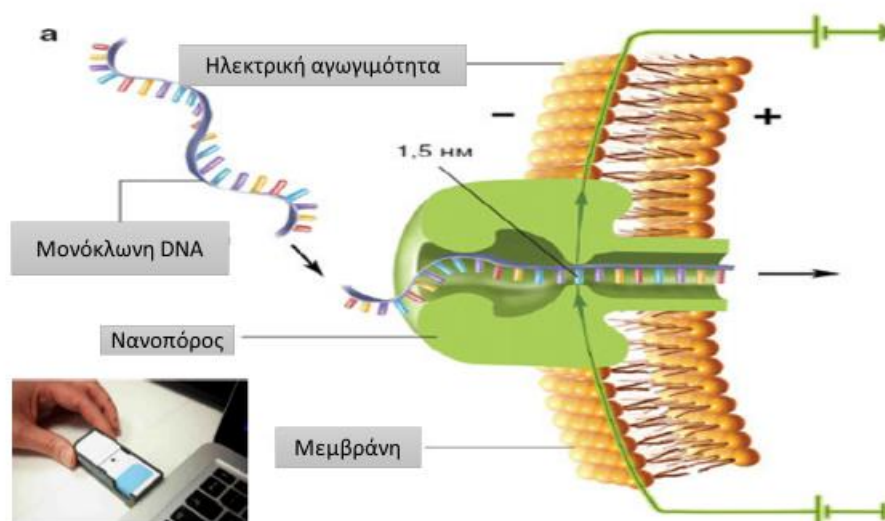
Illumina, όπου τα οπτικά σήματα διαβάζονται με την προσθήκη των βάσεων. Παρά το ότι η αλληλούχιση με τεχνολογία «454» εμπεριέχει την θραυσματοποίηση (fragmentation) του DNA ή RNA, σε αυτή την περίπτωση, η θραυσματοποίηση οδηγεί σε διαβάσματα (reads) 1 kb σε μήκος. Κατά την διαδικασία της ενίσχυσης της βιβλιοθήκης, τα τμήματα-θραύσματα προσδένονται σε μικροσφαιρίδια (microbeads). Με τη διαδικασία της PCR τα τμήματα αυτά ενισχύονται. Το δείγμα φορτώνεται σε πλακίδιο (PicoTiterPlate) με κελιά που υποδέχονται τα μικροσφαιρίδια, τα οποία περιέχουν επίσης DNA πολυμεράση και διαλύματα αλληλούχισης (sequencing buffers). Στο επόμενο στάδιο, το πλακίδιο «πλημμυρίζεται» με κάθε ένα από τα τέσσερα νουκλεοτίδια. Η προσθήκη ενός νουκλεοτιδίου παράγει ένα οπτικό σήμα. Οι θέσεις των σημάτων προσδιορίζουν το σφαιρίδιο στο οποίο προστίθενται τα νουκλεοτίδια. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται μετά την έκπλυση του mix. Η πλατφόρμα 454 παράγει γραφήματα για κάθε διάβασμα αλληλουχίας, το οποίο αντανακλά την πυκνότητα του σήματος για κάθε πλύση νουκλεοτιδίου. Μέσω υπολογιστικής προσέγγισης, η πυκνότητα των σημάτων σε κάθε πλύση οδηγεί στην ανάκτηση της αλληλουχίας.

- **Ion Torrent PGM:** Οι πλατφόρμες αλληλούχισης της Ion Torrent έκαναν το ντεμπούτο τους το 2011, ακολουθώντας μια τελείως διαφορετική φιλοσοφία αλληλούχισης από αυτή της Illumina και της 454 Pyrosequencing (Roche) καθώς δεν γίνεται χρήση οπτικών σημάτων. Γίνεται χρήση «φυσικής χημείας», όπου η προσθήκη ενός dNTP στο DNA πολυμερές απελευθερώνει ένα H^+ . Δημιουργούνται εκμαγεία που φέρουν ειδικούς προσαρμογείς (adaptors) και μοναδικούς κωδικούς για κάθε δείγμα. Το εκμαγείο του DNA ή RNA που χρησιμοποιείται είναι μεγέθους ~200 bp. Μέσω μιας PCR γαλακτώματος (emulsion PCR) πραγματοποιείται η ενίσχυση της βιβλιοθήκης των δημιουργημένων εκμαγείων. Η ενισχυμένη και εμπλουτισμένη βιβλιοθήκη, που αποτελείται από σφαιρίδια που ιδανικά φέρουν έναν κλώνο, φορτώνονται σε ένα ειδικό chip στο οποίο μέσω της πλατφόρμας θα πραγματοποιηθεί η αλληλούχιση εντός των πολυάριθμων κελιών που χαρακτηρίζουν κάθε τύπο chip. Για την πλατφόρμα Ion Torrent PGM είναι διαθέσιμα τρία chip (314, 316 και 318) με διαφορετικά τεχνικά χαρακτηριστικά, που προσδίδουν στον ερευνητή την δυνατότητα να επιλέξει το εύρος της δυναμικής της αλληλούχισης

που επιθυμεί, κάτι το οποίο εκφράζεται με την ρήση της εταιρείας: “The chip is the machine”. Κατά τη διαδικασία της αλληλούχισης, όπως στην περίπτωση του 454 Pyrosequencing (Roche), το chip «πλημμυρίζεται» με ένα τύπο dNTP, μαζί με ρυθμιστικά διαλύματα. Η πολυμεράση προσδένεται σε ξεχωριστό βήμα πριν την τοποθέτηση του chip στην πλατφόρμα. Το H⁺ που απελευθερώνεται με την προσθήκη του dNTP στο DNA πολυμερές οδηγεί στην μείωση του pH. Οι μεταβολές του pH ανιχνεύονται και καταγράφονται από κάθε κελί μέσω ενός ολοκληρωμένου CMOS (Complementary Metal-Oxide Semiconductor) και ενός ISFET (Ion Sensitive Field Effect Transistor), το οποίο επιτρέπει τον καθορισμό των βάσεων καθώς και τον αριθμό τους σε αυτό το κελί. Η μεταβολή του pH που ανιχνεύεται από τον αισθητήρα είναι ατελώς ανάλογη ως προς τον αριθμό των ανιχνευόμενων νουκλεοτιδίων, επιτρέποντας περιορισμένη ακρίβεια στις μετρήσεις μηκών ομοπολυμερών (homopolymers). Το πρόβλημα των ομοπολυμερών εντοπίζεται και στην 454 Pyrosequencing (Roche) και εκδηλώνεται ως ψευδείς προσθήκες ή ελλείψεις (indels). Η κατάλληλη υπολογιστική προσέγγιση μέσω της βελτίωσης των παρεχόμενων αλγορίθμων επεξεργασίας των δεδομένων, όπως αποτελεί το Torrent Suite, είναι ικανή να μεγιστοποιήσει τόσο την ευαισθησία όσο και την ειδικότητα στο επίπεδο της μιας βάσης, ανοίγοντας το δρόμο για τη χρήση της τεχνολογίας με ασφάλεια σε μελλοντικά κλινικά γενετικά τεστ.

- **Αλληλούχιση με τεχνολογία Nanopore.** Η ιδέα της αλληλούχισης, βασισμένη σε nanopores, προτάθηκε πριν από περίπου 20 χρόνια. Τα πρώτα πειράματα διεξήχθησαν το 1996, χρησιμοποιώντας ως πόρους την πρωτεΐνη α-αιμολυσίνη. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων δεν ήταν τα επιθυμητά καθώς η μέθοδος ήταν ατελής και η τεχνολογική γνώση δεν επαρκούσε. Σήμερα, η μέθοδος αυτή είναι πολλά υποσχόμενη, εξαιτίας της ανάπτυξης της τεχνολογίας, καθώς υπολογίζεται ότι θα είναι πιο φτηνή σε κόστος και πιο γρήγορη με ελάχιστη ποσότητα δείγματος. Ένα ακόμη πλεονέκτημα αυτής της μεθόδου, είναι η μη σήμανση του μορίου, χωρίς ενίσχυση του δείγματος, για την ανίχνευση των αζωτούχων βάσεων. Επίσης, αναμένεται να προσφέρει λύσεις στον περιορισμό των τεχνολογιών αλληλούχισης με short reads και να καταστήσει δυνατή την αλληλούχιση μεγάλων μορίων σε μερικά λεπτά, χωρίς την τροποποίηση ή την προετοιμασία δειγμάτων. Η τεχνολογία των nanopores

για την ανάλυση των νουκλεϊκών οξέων βασίζεται σε δύο διαφορετικές ιδέες: α) τα βιολογικά nanopores (Biological nanopores) όπως είναι η αιμολυσίνη και β) τα συνθετικά nanopores στερεής κατάστασης (Solid-state- Graphene) nanopore. Η κεντρική ιδέα κατά τη διαδικασία της αλληλούχισης με nanopore και στις δύο προσεγγίσεις είναι ίδια, με τη διαφορά ότι τα βιολογικά nanopores στηρίζονται σε μια λιπιδική διπλοστιβάδα ενώ τα συνθετικά nanopores στηρίζονται σε μία συνθετική μεμβράνη. Συγκεκριμένα, το μόριο του δίκλωνου DNA εισέρχεται σε ένα πρωτεϊνικό πόρο. Στον πρωτεϊνικό πόρο στηρίζεται μία άλλη πρωτεΐνη (πολυμεράση) η οποία κατά την διέλευση του δίκλωνου DNA, το ξετυλίγει και έτσι δημιουργούνται δύο αλυσίδες. Εσωτερικά του πόρου, καθώς ξετυλίγεται η μονόκλωνη αλυσίδα του DNA, περνούν ιόντα και εφαρμόζεται τάση ρεύματος στα άκρα της μεμβράνης. Το δυναμικό που εφαρμόζεται διαμέσου της μεμβράνης, δημιουργεί ιονικό ρεύμα. Στο δυναμικό που δημιουργείται, σε σχέση με την πολικότητα του μορίου, στηρίζεται ο εντοπισμός των βάσεων (A,T,G ή C) την κάθε χρονική στιγμή και ύστερα γίνεται η καταγραφή αυτών, όπως φαίνεται στην εικόνα 4.4.5 [162].



Εικόνα 4.4.5. Απεικόνιση ανάλυσης DNA αλληλουχίας με τεχνολογία Nanopore (εξηγείται στο κείμενο)

Ένα άρθρο, που δημοσιεύθηκε στο Nature Biotechnology το 2018, περιγράφει ένα ρεκόρ με χρήση του MinION (Εικ.4.4.5^α) για την ανάγνωση του μεγαλύτερου σε μήκος μορίου DNA της ανθρώπινης κυτταρικής σειράς GM12878. Ως αποτέλεσμα λήφθηκαν 91,2 gigabytes δεδομένων. Το μήκος των περισσότερων από τα μισά αναγνωσμένα θραύσματα DNA ήταν 100.000 bp. και παραπάνω. Επιπλέον, οι επιστήμονες έχουν δείξει ότι εάν βελτιστοποιηθεί το πρωτόκολλο είναι δυνατόν να προσδιοριστεί η ακολουθία του DNA μέχρι 882 χιλιάδες bp. Μετά από σύγκριση με το αντίστροφο γονιδίωμα της σειράς GM12878, το οποίο διαβάστηκε με παραδοσιακές μεθόδους πολλές φορές, αποδείχθηκε ότι η προκύπτουσα ακολουθία καλύπτει το 85,8% και η ακρίβεια της συναρμολόγησης της είναι κοντά στο 100%. Η ανάγνωση τέτοιων μακρών θραυσμάτων DNA κατά τη διάρκεια της διαδικασίας ανίχνευσης επέτρεψε τη συμπλήρωση των κενών στην αλληλουχία του ανθρώπινου γονιδιώματος και την απλούστευση της ανάλυσης πολλών από τα τμήματα του. Ο τύπος του κύριου συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (HLA) έχει σύνθετη δομή και πολλαπλές επαναλήψεις, επομένως η αλληλουχία του είναι δύσκολο να προσδιοριστεί. Η αλληλούχιση του ανθρώπινου γονιδιώματος είναι ένα σημείο αναφοράς για τον προσδιορισμό της αναπαραγωγικότητας της τεχνολογίας, συνεπώς για περαιτέρω απλούστευση και μείωση του κόστους όχι μόνο για τον προσδιορισμό της αλληλουχίας DNA αλλά και για την ανάλυσή της [163].



Εικόνα 4.4.5α Τεχνολογία MiniON της Oxford Nanopore Technologies

Κεφάλαιο 5. Γενετικό προφίλ

Η ταυτοποίηση χιλιάδων νέων γονιδίων, η αποσαφήνιση της γενετικής φύσης και των μοριακών μηχανισμών για πολλά κληρονομικά και πολυπαραγοντικά νοσήματα, ο ρόλος των γενετικών παραγόντων στην αιτιολογία και στη παθογένεια των διαφόρων παθολογικών καταστάσεων, η τεκμηρίωση της γενετικής μοναδικότητας του κάθε ατόμου συνιστούν την επιστημονική βάση της **μοριακής ιατρικής** και **προκαθορίζουν τις δύο ιδιαιτερότητες της όπως:**

1. **Ατομική προσέγγιση του ασθενούς** (πρόληψη, θεραπεία και διάγνωση της κάθε ασθένειας) βασίζεται στα γενετικά χαρακτηριστικά του κάθε «υποκειμένου», στη γενετική του μοναδικότητα .
2. **Προγνωστική κατεύθυνση:** η πρόληψη, μέχρι και η θεραπεία μπορεί να ξεκινήσει εκ των προτέρων, πριν εμφανιστεί η πραγματική εικόνα της παθολογικής διαδικασίας, δηλαδή στην προ-συμπτωματική περίοδο της νόσου [7, 69, 70].

Η εννοιολογική βάση της προγνωστικής ιατρικής αποτελείται από τη κατανόηση του γενετικού πολυμορφισμού που αναφέρεται στο Κεφάλαιο 1.

5.1. Γενετικοί έλεγχοι

Ο γενετικός έλεγχος κληρονομικών προδιαθέσεων εφαρμόζεται σε πολλά ιδιωτικά εργαστήρια και διαγνωστικά κέντρα της Δυτικής Ευρώπης και της Αμερικής. Ωστόσο, πρέπει να ληφθεί υπόψη ότι τα δεδομένα πολλών διαφορετικών εργαστηρίων που αφορούν τη ταυτοποίηση γονιδιακών δεικτών για την ίδια ασθένεια, ορισμένες φορές δεν συμπίπτουν. Στη βιβλιογραφία συνεχώς εμφανίζονται καινούρια στοιχεία που αφορούν τους νέους γονιδιακούς δείκτες για μια συγκεκριμένη ασθένεια ή για το παθολογικό φαινότυπο. Συνεπώς, μια γενετική ταυτότητα, στην πραγματικότητα, είναι ένα δυναμικό σύστημα των συνεχώς διευκρινιζόμενων και περιπλεκόμενων παραμέτρων στους γονιδιακούς δείκτες των διαφόρων νοσημάτων.

Ταυτόχρονα, είναι σημαντικό να υπογραμμιστεί ότι για την εκτίμηση της προγνωστικής αξίας, τα αποτελέσματα της μελέτης των γονιδιακών συσχετίσεων έχουν ιδιαίτερη σημασία στον συγκεκριμένο πληθυσμό και περιοχή όπου πρόκειται να διεξαχθεί ο γενετικός έλεγχος. Για παράδειγμα, οι γενετικές εξετάσεις στην Αγία Πετρούπολη

διεξάγονται μόνο για εκείνες τις ασθένειες, για τις οποίες, σε προκαταρκτικές μελέτες σε ασθενείς της Βορειοδυτικής περιοχής, έχει αποδειχθεί η μη τυχαία συσχέτιση ενός συγκεκριμένου αλληλόμορφου με την αντίστοιχη ασθένεια και έχει υπολογιστεί ο εμπειρικός κίνδυνος εμφάνισης αυτής της νόσου. Παράλληλα, η παρουσία ενός τέτοιου αλληλόμορφου δεν δίνει πληροφορίες ούτε για τον χρόνο έναρξης, ούτε για τη σοβαρότητα της νόσου. Είναι επίσης αδύνατο να ισχυριστεί κανείς ότι το εξεταζόμενο άτομο οπωσδήποτε στο μέλλον θα νοσήσει με αυτή τη συγκεκριμένη πάθηση. **Οι γενετικοί έλεγχοι στην προ-συμπτωματική περίοδο καθιστούν δυνατή την αναγνώριση των κληρονομικών τάσεων ανάπτυξης των μελλοντικών ασθενειών που υπάρχουν μόνο στο γονιδίωμα και με βάση τη σύγχρονη ιατρική εμπειρία, περιγράφουν τους τρόπους παρακολούθησης και έγκαιρης πρόληψής τους.**

Οι πληροφορίες που θα ληφθούν από τη γενετική εξέταση αποκαλύπτουν διαφορετικό βαθμό κινδύνου για την ανάπτυξη αυτών των ασθενειών. Συνεπώς, ο γιατρός, λαμβάνοντας υπόψη τα αποτελέσματα αυτά, μπορεί να αναπτύξει μια συγκεκριμένη τακτική παθογενετικά αιτιολογημένης προληπτικής θεραπείας, δηλαδή να κάνει την απαραίτητη ενέργεια με σκοπό να διορθωθεί ένα συγγενές μεταβολικό ελάττωμα.

Έτσι, η χορήγηση των αναστολέων του **ένζυμου μετατροπής αγγειοτενσίνης** (α-MEA) και των ανταγωνιστών του υποδοχέα αγγειοτασίνης II σε ασθενείς με DD-γονότυπο ACE (Angiotensin-Converting Enzyme, ένζυμο μετατροπής της αγγειοτενσίνης), με υπέρταση και με αρχικά σημάδια βλάβης των οργάνων στόχων, συνδέεται με την ικανότητα αυτών των φαρμάκων να εξουδετερώνουν τις πολλαπλασιαστικές και πιεστικές επιδράσεις της αγγειοτασίνης II στα κύτταρα του αγγειακού τοιχώματος, καθώς και στα καρδιομυοκύτταρα. Η παραπάνω προσέγγιση θεωρείται ως η καταλληλότερη ιατρική πρόληψη της δυσλειτουργίας και υπερτροφίας αριστερής κοιλίας, της υπέρτασης, της στεφανιαίας καρδιακής νόσου και της συμφορητικής καρδιακής ανεπάρκειας σε άτομα με DD-γονότυπο ACE. Για παράδειγμα, μπορεί να προγνωστεί η ανάπτυξη της στεφανιαίας νόσου λόγω της γενετικής προδιάθεσης στη δυσλιπιδαιμία με την ανάπτυξη της αγγειακής αθηροσκλήρωσης, στη διαταραχή του συστήματος πήξης αίματος και της ινωδόλυσης, στην ενδοθηλιακή δυσλειτουργία και αναδιαμόρφωση αγγειακού τοιχώματος, στην υπερτροφία και αναδιαμόρφωση μυοκαρδίου της αριστερής κοιλίας. Σε ορισμένες περιπτώσεις, ο ασθενής αναμένεται να έχει υψηλό κίνδυνο εμφάνισης εμφράγματος του μυοκαρδίου και πριν την

ηλικία των 40-50 ετών, επιπλέον η πιθανότητα ανάπτυξης αυτής της μορφής στεφανιαίας νόσου με ορισμένες αλληλόμορφες παραλλαγές των γονιδίων που μελετώνται, αυξάνεται δραματικά στην περίπτωση της υπερβολικής σωματικής άσκησης. Οι γενετικά εντοπισμένοι φλεβικοί θρομβοεμβολισμοί συχνά φέρουν τις επιπλοκές στις χειρουργικές επεμβάσεις, στα κατάγματα, στην λήψη των αντισυλληπτικών φαρμάκων κλπ.

Για τη πρόγνωση της υπέρτασης, λαμβάνεται υπόψη η πιθανή αύξηση τόνου των αντιστατικών αγγείων λόγω του αυξημένου σχηματισμού της αγγειοτενσίνης II που οφείλεται σε μια γενετικά αυξημένη σύνθεση της αγγειοτασίνης και αυξημένη δράση των α-MEA.

Είναι γνωστή η υψηλή συχνότητα του αλληλόμορφου E4 (γονιδίου απολιποπρωτεΐνης E) σε άτομα που πάσχουν από την νόσο Αλτσχάιμερ. Η παρουσία των ορισμένων αλληλόμορφων παραλλαγών αυτού του γονιδίου μπορεί να υποδεικνύει το αυξημένο, μέχρι και το πολύ υψηλό κίνδυνο ανάπτυξης της παραπάνω ασθένειας. Με το έλεγχο των γονιδίων 1^{ης} και 2^{ης} φάσης αποτοξίνωσης μπορούν να εντοπιστούν άτομα με προδιάθεση σε ασθένειες που προκαλούνται από δυσμενείς εξωγενείς παράγοντες. Πρέπει να σημειωθεί ότι ο προσυμπτωματικός εντοπισμός των ατόμων υψηλού κινδύνου εμφάνισης ασθένειας αποτελεί το θεμέλιο για την ορθή ιατρική και γενετική συμβουλευτική, ακολουθούμενη από την έγκαιρη και επαρκή προληπτική θεραπεία.

Για τους καπνιστές που έχουν διαγραφές στα γονίδια GSTM1 και GSTT1, συνεπώς τα ένζυμα αυτά απουσιάζουν, έχει διαπιστωθεί ότι ο κίνδυνος εμφάνισης καρκίνου του πνεύμονα είναι περίπου 3 φορές υψηλότερος σε σύγκριση με τους καπνιστές που έχουν τη φυσιολογική λειτουργία αυτών των ενζύμων. Στις καπνίζοντες γυναίκες με ανεπάρκεια GSTM1 και την αργή μορφή N-ακετυλοτρανσφεράσης (NAT2) ο κίνδυνος καρκίνου του μαστού είναι 20 φορές υψηλότερος σε σχέση με τις μη καπνίζοντες.

Η μελέτη του ογκογονιδίου MYCL1 έχει δείξει ότι ο πολυμορφισμός του συνδέεται με την ανάπτυξη των πολλαπλασιαστικών διεργασιών κυρίως στους πνεύμονες και στους μαστικούς αδένες, όπως επίσης και με την ταχεία εμπλοκή των λεμφαδένων στη διαδικασία της μετάστασης.

Το προϊόν του γονιδίου CYP19A1 είναι η αρωματάση. Το σύμπλοκο του ενζύμου αρωματάσης είναι υπεύθυνο για τη μετατροπή των C19 ανδρογόνων σε οιστρογόνα. Η

αλλαγή στη δραστηριότητα του γονιδίου CYP19A1 αποτελεί ένα σημαντικό μηχανισμό της αυτοκρινής ρύθμισης στην ανάπτυξη του όγκου. Η ανάλυση του αλληλόμορφου πολυμορφισμού των γονιδίων CYP17A1 και CYP19A1 επιτρέπει τη πρόγνωση κινδύνου ογκογένεσης κυρίως στους μαστικούς αδένες. Μελετώντας τον αλληλόμορφο πολυμορφισμό του γονιδίου p53 μπορεί να εκτιμηθεί η χρησιμότητα της κατασταλτικής του λειτουργίας σε περίπτωση των πολλαπλασιαστικών διεργασιών του οργανισμού. Η κατανομή των αλληλόμορφων στο γονίδιο του αδρενεργικού υποδοχέα συνδέεται με τη δραστηριότητα του, ωστόσο, η αυξημένη ανδρογόνος διέγερση του ευθύνεται για την ανάπτυξη καρκίνου του προστάτη και χαρακτηρίζεται από ταχεία μετάσταση του πρωτογενούς όγκου.

Ο πλήρης έλεγχος των γονιδίων μεταβολισμού εξωτερικού περιβάλλοντος και των γονιδίων υποδοχέων, συμπεριλαμβανομένων των γονιδίων μεταβολισμού των φαρμάκων, επιτρέπει τον εντοπισμό ατόμων με «γρήγορο» και «αργό» τύπο ξενοβιοτικού μεταβολισμού, αλλά και τον προσδιορισμό της ατομικής ευαισθησίας σε διάφορα φαρμακολογικά παρασκευάσματα. Με αυτόν τον τρόπο γίνεται επιλογή μιας ατομικής δόσης των διαφόρων φαρμάκων και προσεγγίζεται ένα ιδανικό σχήμα εξατομικευμένης θεραπείας, δηλαδή, επιτυγχάνεται ο κύριος στόχος της φαρμακογενετικής [78].

Για να εκτιμηθεί η ατομική προδιάθεση στις διάφορες πολυπαραγοντικές ασθένειες σημαντικό είναι να γίνει μια ανάλυση γονιδίων των μεταβολικών διακλαδώσεων (metabolic shunt). Τα προϊόντα τους διαδραματίζουν βασικό ρόλο στις μεταβολικές διεργασίες. Μελετώντας τον πολυμορφισμό αυτών των γονιδίων αναλύονται οι ιδιαιτερότητες της γενετικής προδιάθεσης στην οστεοπόρωση, στην ενδομητρίωση, στη λοίμωξη από τον ιό HIV, σε πολλούς καρκίνους. Ο αλληλόμορφος πολυμορφισμός πολλών άλλων γονιδιακών τόπων αποκαλύπτει μια αναμφισβήτητη συσχέτιση με διαβήτη, αθηροσκλήρωση, υπέρταση, στεφανιαία νόσο, ψυχική ασθένεια.

Επί του παρόντος, παίρνοντας υπόψιν μόνο τα διαθέσιμα δεδομένα, η ανάλυση των πολλών γονιδιακών δεικτών μπορεί να θεωρηθεί απολύτως δικαιολογημένη όπως και αποδεδειγμένη μπορεί να θεωρηθεί η συσχέτιση μεταξύ των γονιδιακών δεικτών και των σοβαρών νοσημάτων. Συνεπώς, στις σημερινές ημέρες οι δυνατότητες της **προγνωστικής** ιατρικής είναι σημαντικές.

Η ατομική προσέγγιση του ασθενούς, βασισμένη σε μια επαρκή ερμηνεία των αποτελεσμάτων της γενετικής ανάλυσης και η σύγκρισή τους με τα δεδομένα των κλινικών και εργαστηριακών μεθόδων ανάλυσης, επιτρέπει την έγκαιρη διάγνωση των γενετικά καθορισμένων ασθενειών και προσφέρει το πιο αποτελεσματικό σχήμα προληπτικών και θεραπευτικών μέτρων αντιμετώπισης της παθολογικής διαδικασίας.

Η μοριακή έρευνα εισέρχεται ενεργά στην ιατρική πρακτική. Κάθε άνθρωπος έχει την ευκαιρία να αποκτήσει τις ολοκληρωμένες πληροφορίες για τα μοναδικά χαρακτηριστικά του γονιδιωμάτος του, συμπεριλαμβανομένης της κατάστασης των γονιδίων προδιάθεσης.

Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι όλα τα παραπάνω αναφερόμενα έχουν να κάνουν με τους λεγόμενους **προγνωστικούς** γενετικούς δείκτες, βάσει των οποίων μπορεί να γίνει μια καθορισμένη διάγνωση μόνο στη περίπτωση της μονογονιδιακής παθολογίας. Σύμφωνα με τις σύγχρονες ιδέες, πρέπει να διαφοροποιηθεί η έννοια του «**γενετικού ελέγχου**» ή «**γενετικού τεστ**» (**genetic test, GT**) από τη έννοια της «**γενετικής (μοριακής) ανάλυσης**» (**genetic assay, GA**) [164, 165]. Η πρώτη αναφέρεται στους **διαγνωστικούς** δείκτες, που είναι ελάχιστοι οι γνωστοί για τις πολυπαραγοντικές ασθένειες, για παράδειγμα, το αλληλόμορφο APOE E4 (νευροεκφυλιστικές ασθένειες), η μετάλλαξη Leiden του παράγοντα V (θρομβοφιλία), MTHFR 677T (υπερομοκυστεϊναιμία) και κάποιοι άλλοι. Η συσχέτιση των λειτουργικά ανεπιθύμητων αλληλόμορφων αυτών των γονιδίων με τις εξασθενημένες αντίστοιχες μεταβολικές αλυσίδες όπως και με ορισμένες παθολογικές καταστάσεις, αντικατοπτρίζεται στις δημοσιεύσεις των διαφορετικών εργαστηρίων, σε διάφορους πληθυσμούς, συμπεριλαμβανομένων των δεδομένων μιας μετά-ανάλυσης των γενικευμένων αποτελεσμάτων της αρχικής έρευνας. Ωστόσο, αυτές οι γενετικές δοκιμές (GT) βρίσκονται ακόμα στο στάδιο κλινικών δοκιμών [164].

Τα αποτελέσματα των **GA**, σε αντίθεση με τις **GT**, από τη φύση τους έχουν **τον προγνωστικό χαρακτήρα και προτού αποκτήσουν το καθεστώς μιας γενετικής εξέτασης (GT) απαιτούν τη περαιτέρω επιβεβαίωση, τόσο από τις αναδρομικές όσο και από τις προοπτικές μελέτες**. Οι μοριακές αναλύσεις του πολυμορφισμού των επιμέρους γονιδίων που έχουν αποκτηθεί σε αρκετά μεγάλο δείγμα ασθενών και έχουν στηριχθεί σε έναν κατάλληλο αριθμό ομάδων ελέγχου, έστω σε ένα πληθυσμό ή στους κατοίκους μιας

περιοχής, πλησιάζουν τα κριτήρια που έχουν οριστεί για ένα **γενετικό τεστ**. Οι προϋποθέσεις που απαιτούνται για την πιστοποίηση της **GA** ως **GT** αναπτύσσονται επί του παρόντος από την Ευρωπαϊκή Επιτροπή για την Ανθρώπινη Γενετική [166]. Σύμφωνα με τις τελευταίες εξελίξεις της Υπηρεσίας Γενετικών Εξετάσεων του Ηνωμένου Βασιλείου (United Kingdom Genetic Testingnetwork), η ποιότητα του GT αξιολογείται βάσει των ακόλουθων τεσσάρων κανόνων: [164]

1. Αναλυτική καταλληλότητα
2. Κλινική αξιοπιστία
3. Κλινική χρησιμότητα
4. Ηθική, κοινωνική και νομική συμμόρφωση.

Στην Ελλάδα

Ο ερευνητικός τομέας της γονιδιωματικής είναι ιδιαίτερα απαιτητικός και ανταγωνιστικός. Απαιτούνται τεράστια επενδυτικά κεφάλαια στα οποία η Ελλάδα δεν μπορούσε να ανταπεξέλθει και κατά συνέπεια να εμπλακεί.

Το 2018 με πρωτοβουλία του Τομέα Έρευνας και Καινοτομίας του Υπουργείου Παιδείας και σε συνεργασία με το Υπουργείο Υγείας ξεκίνησε στην Ελλάδα η λειτουργία Δικτύου για στοχευμένη έρευνα και κλινικές εφαρμογές στο αναδυόμενο πεδίο της **Ιατρικής Ακρίβειας**. Στη πρώτη φάση, το Δίκτυο θα εστιάσει στην ογκολογία για την αξιοποίηση νέων φαρμάκων που μπορούν να περιορίσουν την ογκογένεση. Με χρηματοδότηση από εθνικούς πόρους μεγαλύτερη των 5,4 εκ. ευρώ το Εθνικό Δίκτυο Ιατρικής Ακρίβειας στην ογκολογία αποτελείται από τις τέσσερις Μονάδες Ιατρικής Ακρίβειας (ΜΙΑ), δύο στην Αθήνα, μια στην Θεσσαλονίκη και μια στην Κρήτη. Σταδιακά το Δίκτυο θα επεκτείνει την συνεργασία του με ογκολογικές κλινικές σε όλη την Ελλάδα, ώστε να προσφέρει υπηρεσίες έγκαιρης διάγνωσης και θεραπείας σε ογκολογικούς ασθενείς. Στο Δίκτυο αυτό έχουν ήδη κληθεί και μετέχουν σημαντικοί ερευνητικοί και ακαδημαϊκοί φορείς της χώρας που δραστηριοποιούνται στο χώρο της έρευνας και των κλινικών εφαρμογών της μοριακής βιολογίας, της ιατρικής και της πληροφορικής. Η Ιατρική Ακρίβειας υπόσχεται έναν κόσμο όπου:

- ✓ η διάγνωση μίας ασθένειας θα είναι τόσο απλή όσο η λήψη αίματος

- ✓ η επιλογή φαρμάκων θα γίνεται με εξαιρετική ακρίβεια
- ✓ η θεραπεία θα είναι απόλυτα προσαρμοσμένη στη γενετική σύσταση του κάθε ασθενή χωρίς ανεπιθύμητες ενέργειες [167].

Ωστόσο υπάρχουν δημόσια νοσοκομεία και ιδιωτικά κέντρα γενετικών αναλύσεων, χωρίς όμως να υπάρχει επίσημη πιστοποίηση για την ποιότητα των τεχνικών αναλύσεων που χρησιμοποιούνται. Σε συγκεκριμένα τμήματα δημόσιων νοσοκομείων πραγματοποιούνται εξετάσεις για συγκεκριμένα γενετικά νοσήματα, όπως η μεσογειακή αναιμία, η θρομβοφιλία, η κυστική ίνωση και κάποια είδη κληρονομικού καρκίνου.

Στο «Ιπποκράτειο» Νοσοκομείο καθώς και στο Τμήμα Χειρουργικής Έρευνας του Πανεπιστημίου Αθηνών πραγματοποιούνται τεστ με αιμοληψία για τα γονίδια BRCA1 και BRCA2 του οικογενούς καρκίνου του μαστού, για το γονίδιο FAP του οικογενούς καρκίνου παχέος εντέρου (οικογενής αδενωματοώδης πολυποδίαση) και για τα γονίδια hMLH1 και hMSH2 του οικογενούς καρκίνου του ορθού/παχέος εντέρου (μη πολυποδιακή νεοπλασία).

Στο Νοσοκομείο «Αλεξάνδρα», το Β' Ενδοκρινολογικό τμήμα διεξάγει γενετικό τεστ για το γονίδιο RET, που αφορά τον κληρονομούμενο καρκίνο του θυρεοειδούς. Το κόστος καλύπτεται από τα ασφαλιστικά ταμεία.

Στο Νοσοκομείο «Άγιος Σάββας», στο τμήμα Γενετικής πραγματοποιούνται διαγνωστικά, προγνωστικά και ανταπόκρισης στη θεραπεία, γονιδιακά τεστ για διάφορους τύπους «εγκατεστημένου καρκίνου», όπως λευχαιμία, πολλαπλά μυελώματα, λεμφώματα, μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα, σαρκώματα κλπ., όχι όμως τεστ προδιάθεσης γι' αυτούς τους τύπους καρκίνου. Το κόστος διαμορφώνεται ανάλογα με το είδος του τεστ. Επίσης, προσφέρονται υπηρεσίες γενετικής συμβουλευτικής μέσω γενετικών τεστ ανίχνευσης κληρονομούμενου καρκίνου.

Γενετικές εξετάσεις για ορισμένα νευρολογικά νοσήματα γίνονται στο «Αιγινήτειο» Νοσοκομείο. Επίσης, το σύνολο των Πανεπιστημίων και Ερευνητικών Ιδρυμάτων της χώρας δραστηριοποιείται παραγωγικά στις τεχνολογίες αιχμής.

Στον τομέα της μεταγονιδιωματικής και μοριακής διαγνωστικής εμπλέκονται ενεργά και διάφορες ελληνικές επιχειρήσεις όπως οι ακόλουθες:

- ✓ **BioGenomica**, <http://www.biogenomica.gr/en/>
- ✓ **Biomedcode**, <http://www.biomedcode.com/>
- ✓ **InterGenetics**, <http://www.intergenetics.eu/>
- ✓ **ProtATonce** , <http://hbio.gr/member/protatonce>
- ✓ **Micro²Gen**, <http://micro2gen.com/>
- ✓ **GeneKor**, <https://www.genekor.com/el>
- ✓ **Health Genomics**, info@healthgenomics.gr

5.2. Γενετικό προφίλ ως ιατρικό εργαλείο του μέλλοντος

Σε διάφορα διαγνωστικά κέντρα παγκοσμίως χρησιμοποιούνται ευρέως οι μοριακές μέθοδοι για τη διάγνωση γονιδιακών παθήσεων, για την αναγνώριση ετεροζυγωτικής μεταφοράς των παθολογικών μεταλλάξεων σε οικογένειες υψηλού κινδύνου, για την προσυμπτωματική διάγνωση των ασθενειών με καθυστερημένη εκδήλωση και για την ταυτοποίηση των ατόμων (γενετικά δακτυλικά αποτυπώματα). Σταδιακά ο γενετικός έλεγχος κερδίζει το έδαφος στα πλαίσια της προγνωστικής (εξατομικευμένης) ιατρικής. Είναι προφανές το γεγονός ότι οι μελέτες αυτές επιφέρουν μια συσσώρευση των δεδομένων για το γονιδίωμα τόσο των μεμονομένων ατόμων όσο και ολόκληρων οικογενειών, δηλαδή, οι ατομικές και οικογενειακές βάσεις δεδομένων του DNA διαμορφώνονται σταδιακά. Μια **βάση δεδομένων DNA ενός ατόμου είναι το «γενετικό προφίλ» του ή «γενετικός χάρτης».**

Έτσι, ένα γενετικό προφίλ είναι μια ατομική βάση δεδομένων του DNA που αντικατοπτρίζει τα μοναδικά γενετικά χαρακτηριστικά του κάθε ατόμου, τη προδιάθεση του σε ορισμένες κληρονομικές, πολυπαραγοντικές και άλλες ασθένειες [7, 8, 168].

Οι πληροφορίες που περιέχονται σε αυτό το «μοναδικό έγγραφο» (γενετικό προφίλ) μπορούν να βοηθήσουν στην αποφυγή των διαφόρων αντιφάσεων της ζωής που σχετίζονται με την αγνόηση των ατομικών χαρακτηριστικών του γονιδιώματος ενός ατόμου, δηλαδή των ειδικών χαρακτηριστικών της κληρονομικότητας του. Τα δεδομένα αυτά επιτρέπουν σε κάθε άνθρωπο την πλήρη συνειδητοποίηση των γενετικών του ικανοτήτων και αποτελούν αναμφισβήτητη αξία για τους απογόνους του.

Χάρη στη ευρεία εισαγωγή των μοριακών διαγνωστικών τεχνολογιών στη σύγχρονη ιατρική, η ιδέα της δημιουργίας ενός γενετικού χάρτη βρίσκεται ήδη στο στάδιο πραγματοποίησης και ο αριθμός των γενετικών ελέγχων που αποτελούν το θεμέλιο του, αυξάνεται ραγδαία. Ωστόσο, ο σχηματισμός και, ιδιαίτερα, η πρακτική χρήση ενός γενετικού προφίλ επιτρέπεται μόνο και εφόσον πληρούνται επαρκώς οι αυστηρές απαιτήσεις, οι οποίες περιλαμβάνουν: [7]

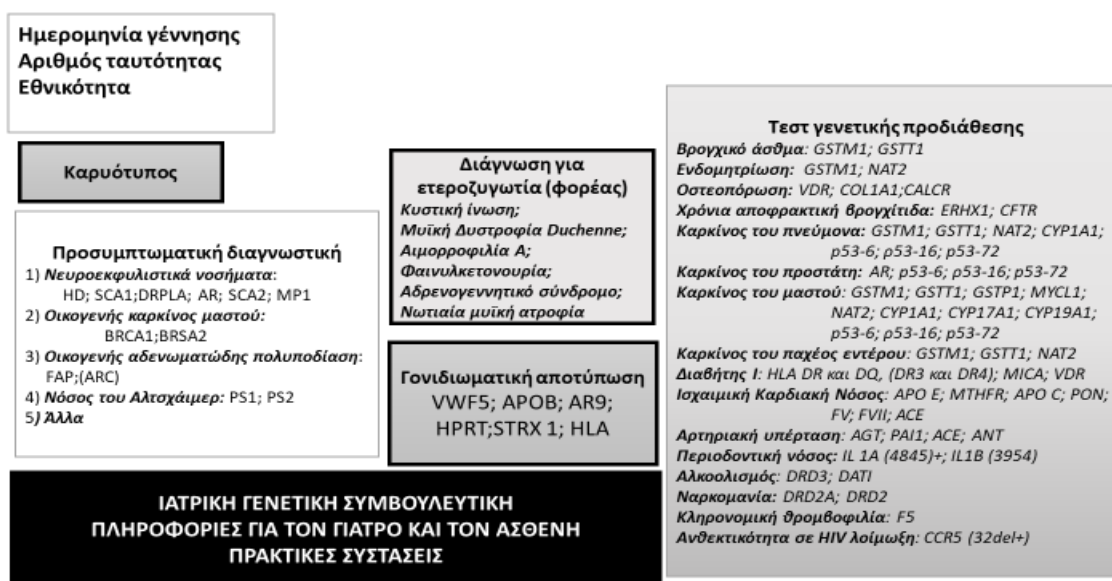
- ✓ το λεπτομερώς μελετημένο γονιδιακό δίκτυο της κάθε πολυπαραγοντικής νόσου,
- ✓ τα αξιόπιστα κλινικά και πληθυσμιακά δεδομένα που επιβεβαιώνουν τη συμβολή των αντίστοιχων γονιδιακών δεικτών στην παθογένεια της πολυπαραγοντικής νόσου,
- ✓ την διαθεσιμότητα των αντιπροσωπευτικών δεδομένων για τον πληθυσμό της περιοχής ή για ασθενείς της αντίστοιχης εθνοτικής ομάδας, που επιβεβαιώνουν τη συσχέτιση των γονιδιακών δεικτών του τεστ/ δοκιμής με την ασθένεια,
- ✓ την σταθμισμένη ερμηνεία αποτελεσμάτων των γενετικών τεστ της γενετικής προδιάθεσης,
- ✓ τις συστάσεις σχετικά με τα αποτελέσματα των γενετικών τεστ (δεδομένα γενετικού προφίλ),
- ✓ την παρακολούθηση των μακροπρόθεσμων αποτελεσμάτων της κατάστασης υγείας ενός ασθενούς μετά από τη γενετικές δοκιμές,
- ✓ την εμπιστευτικότητα, διαθεσιμότητα και νομική ασφάλεια.

Στην αρχική του έκδοση [169], ένας ατομικός γενετικός χάρτης (γενετικό προφίλ) περιλάμβανε τα ακόλουθα κύρια τμήματα:

- ✓ τα δεδομένα προσωπικού χαρακτήρα (ονοματεπώνυμο, έτος γέννησης, εθνικότητα),
- ✓ τον καρυότυπο του ασθενούς,
- ✓ τον δικό του γενετικά ταυτοποιημένο αριθμό που λαμβάνεται με τη μέθοδο της γονιδιωματικής δακτυλοσκόπησης και αντιπροσωπεύει τον 12- ψήφιο αριθμό,
- ✓ τα αποτελέσματα δοκιμών για τους ασυμπτωματικούς φορείς μεταλλάξεων των πιο συχνών μονογονιδιακών ασθενειών (βλ. παρακάτω),

- ✓ τη προ-συμπτωματική διάγνωση ασθενειών με καθυστερημένη εκδήλωση (βλ. παρακάτω),
- ✓ τα αποτελέσματα δοκιμών των γονιδιακών δεικτών στα συχνά πολυπαραγοντικά νοσήματα,
- ✓ την ιατρική, γενετική γνώμη / συμπέρασμα σχετικά με τα αποτελέσματα της γενετικής συμβουλής πριν και μετά το γενετικό τεστ,
- ✓ τις συστάσεις σχετικά με τα αποτελέσματα των γενετικών τεστ στον σύμβουλο και θεράποντα ιατρό.

Η πλήρης έκδοση του γενετικού χάρτη πρέπει να περιλαμβάνει τόσο τα αποτελέσματα της μελέτης των «προδιαθεσιακών» γονιδίων όσο και της μελέτης για τον ασυμπτωματικό φορέα των συχνών κληρονομικών ασθενειών (αιμορροφιλίας, κυστικής ίνωσης, φαινυλοκετονουρίας, κλπ.). Επί του παρόντος, οι διαγνωστικές δυνατότητες των υφιστάμενων μοριακών εργαστηρίων στη Ρωσία, συμπεριλαμβανομένης της Αγίας Πετρούπολης, παρέχουν ένα ολοκληρωμένο σύνολο απαραίτητων γενετικών εξετάσεων. Μία από τις πρώτες εκδόσεις του «γενετικού προφίλ» που προτάθηκε το 1997 και για παραπάνω από 10 χρόνια αναπτύσσεται στο Ινστιτούτο Ερευνών D.O. Ott της Ρωσικής Ακαδημίας Ιατρικών Επιστημών, φαίνεται στην Εικόνα 5.2.



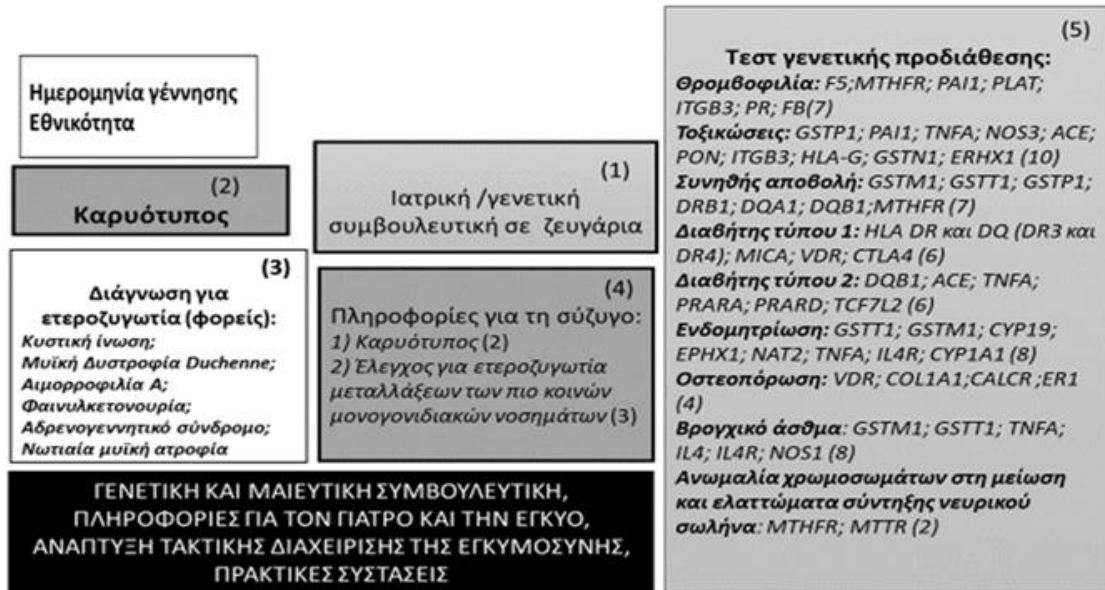
Εικόνα 5.2 Παράδειγμα γενετικού προφίλ (γενετικός χάρτης) [112]

Επί του παρόντος, μόνο ορισμένα στοιχεία ενός γενετικού χάρτη βρίσκουν τη χρήση τους στη πρακτική (δοκιμές στους ετεροζυγώτες (φορείς), γονιδιωματική δακτυλοσκοπία, καρυοτυπία). Πιο συχνά και μόνο σε οικογένειες υψηλού κινδύνου εξετάζεται η κληρονομική προδιάθεση για βρογχικό άσθμα, διαβήτη και οστεοπόρωση. Είναι εύκολο πλέον να προβλέψει κάποιος ότι στο εγγύς μέλλον ένας τέτοιος «γενετικός χάρτης» θα χρησιμοποιηθεί ευρέως στην κλινική πρακτική. Πολλά γενετικά διαγνωστικά τεστ θα γίνουν πλέον ρουτίνα, όπως για παράδειγμα οι συνήθεις εργαστηριακές εξετάσεις (εξετάσεις αίματος, ούρων, προσδιορισμός της ομάδας αίματος και του Rh, δοκιμές για λοιμώδη νοσήματα κλπ.). Το γενετικό προφίλ που παρουσιάζεται στην Εικόνα 5.2. αντικατοπτρίζει τους γονιδιακούς δείκτες και ορισμένα κοινά πολυπαραγοντικά νοσήματα που ήταν γνωστά πριν το 2000.

Σήμερα, στο εργαστήριο του Ινστιτούτο Ερευνών D.O. Ott της Ρωσικής Ακαδημίας Ιατρικών Επιστημών ανιχνεύονται περίπου 100 γονιδιακοί δείκτες που σχετίζονται με διάφορες πολυπαραγοντικές παθολογίες. Επιπλέον, περιζήτητη εξέταση είναι η εξέταση γενετικής προδιάθεσης για μια ή περισσότερες νοσολογίες, για τις οποίες, σύμφωνα με τα αποτελέσματα της προκαταρκτικής γενετικής συμβουλευτικής, ο ασθενής έχει πραγματικό κίνδυνο [170].

Πιο προηγμένος στην κλινική εφαρμογή είναι ο **γενετικός χάρτης αναπαραγωγικής υγείας**. Είναι το αποτέλεσμα των πολύχρονων ολοκληρωμένων μελετών της γυναικείας αναπαραγωγικής λειτουργίας στο Ινστιτούτο Μαιευτικής και Γυναικολογίας D.O. Ott SZO RAMS (Αγία Πετρούπολη). Ο παραπάνω χάρτης συνιστάται για τη χρήση στο Κέντρο Οικογενειακού Προγραμματισμού, στο Προγεννητικό Κέντρο και στα άλλα τμήματα του Ινστιτούτου. Χρησιμοποιείται ευρέως από τους γενετιστές και τους μαιευτήρες-γυναικολόγους του Ινστιτούτου για τις εξωτερικές συμβουλευτικές επισκέψεις. Για ένα ζευγάρι που σχεδιάζει παιδί, εκτός από την ανάλυση του καρυοτύπου και του ελέγχου της ετερωζυγωτίας στις μεταλλάξεις σοβαρών κληρονομικών νόσων, προγνωστική σημασία έχει η εξέταση της γυναίκας σε γονιδιακά πάνελ των νοσημάτων που «περιπλέκουν» την εγκυμοσύνη, την ανάπτυξη του εμβρύου, τον τοκετό και την περίοδο μετά τον τοκετό (χειρουργική επέμβαση, συνηθισμένη αποβολή, κιρσώδεις φλέβες, εμβρυϊκή ανεπάρκεια) (Εικόνα 5.2^α). Για τους γυναικολόγους και τους ενδοκρινολόγους μεγάλο ενδιαφέρον έχει η

εξέταση της κληρονομικής προδιάθεσης για την ενδομητρίωση, την αδενομύωση και την μετεμμηνοπαυσιακή οστεοπόρωση [170].



Εικόνα 5.2^α Γενετικός χάρτης της αναπαραγωγικής υγείας, GMRH (Genetic Map of Reproductive Health) [170]

Ιδιαίτερη προσοχή έχει δοθεί στη ανάλυση των κληρονομικών μορφών θρομβοφιλίας για τις οποίες έχει αναπτυχθεί ένα ειδικό μικροβιοτσίπ, **Fibrochip** [155]. Οι κλινικές δοκιμές του *γενετικού χάρτη αναπαραγωγικής υγείας* (Genetic Map of Reproductive Health, GMRH) επικεντρώνονται κυρίως στις μεμονωμένες νοσολογίες, όπως η ενδομητρίωση (πρόγνωση της νόσου και η επιλογή των βέλτιστων τακτικών της θεραπείας), η κληρονομική θρομβοφιλία, οι παράγοντες αποβολής και ανεπάρκειας του πλακούντα, η τοξίκωση και προεκλαμψία (πρόγνωση και πρόληψη). Οι πληροφορίες σχετικά με τους γενετικούς δείκτες της μαιευτικής παθολογίας που συσσωρεύονται κατά τη διάρκεια των προοπτικών δοκιμών αποτελούν τη βάση για μια πιο διαδεδομένη εισαγωγή του GMRH στην κλινική πρακτική. Οι ειδικές κατευθυντήριες γραμμές που δημοσιεύθηκαν το 2009 είναι αφιερωμένες στον γενετικό χάρτη αναπαραγωγικής υγείας (GMRH). Ένα σημαντικό μέρος αυτών των συστάσεων είναι η εκτίμηση των αποτελεσμάτων των γενετικών εξετάσεων και η πιθανή ερμηνεία τους [171].

Σύμφωνα με τις συστάσεις του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (ΠΟΥ) τα γενετικά τεστ θα πρέπει να διεξάγονται με την εθελοντική, συνειδητή συναίνεση του εξεταζόμενου προσώπου, δηλαδή κατά την ενηλικίωσή του. Από τυπική άποψη, αυτό σημαίνει ότι οι σημαντικές γενετικές πληροφορίες λαμβάνονται αργά, όταν τα οφέλη για το εξεταζόμενο άτομο και τους στενούς του συγγενείς έχουν χαθεί σε μεγάλο βαθμό. Λαμβάνοντας υπόψη τη σημασία αυτών των δεδομένων για την υγεία του παιδιού, την αρμονική διαμόρφωση της προσωπικότητάς του, την ορθολογική διατροφή, την αποτελεσματική εκπαίδευση, τις αθλητικές δραστηριότητες, τον βέλτιστο επαγγελματικό προσανατολισμό και την ικανότητα πρόληψης ορισμένων ασθενειών καθυστερημένης εκδήλωσης η απόκτηση ενός γενετικού χάρτη σε μικρή ηλικία φαίνεται δικαιολογημένη. Μία πιθανή παραλλαγή του γενετικού χάρτη παιδιού με βάση των αποτελεσμάτων μιας μελέτης γονιδιακών συσχετίσεων, παρουσιάζεται στην Εικόνα 5.2 ^β

Δεν μπορεί να αποκλειστεί το γεγονός ότι, καθώς επιλύονται τα ηθικά και κοινωνικά προβλήματα που συνδέονται με την έρευνα του ανθρώπινου γονιδιωμάτος (βλ. Κεφάλαιο 7), οι γενετικές δοκιμασίες θα διεξαχθούν ευρέως και σε προγενέστερη ηλικία από αυτήν που συνιστάται σήμερα. Σε κάθε περίπτωση, σε οικογένειες υψηλού κινδύνου για το διαβήτη τύπου 1, το βρογχικό άσθμα, το σύνδρομο αιφνίδιου θανάτου, τις διαταραχές καρδιακής αγωγής και ρυθμού, το μεταβολικό σύνδρομο και παχυσαρκία, καθώς και σε πολλές άλλες νοσολογίες, ο προληπτικός γενετικός έλεγχος είναι δικαιολογημένος σε μικρή ηλικία. Φυσικά, μπορεί να πραγματοποιηθεί μόνο με τη συγκατάθεση των γονέων, υπό την καθοδήγηση του παιδίατρου και σε συνεργασία της οικογένειας με τον ιατρό γενετιστή.

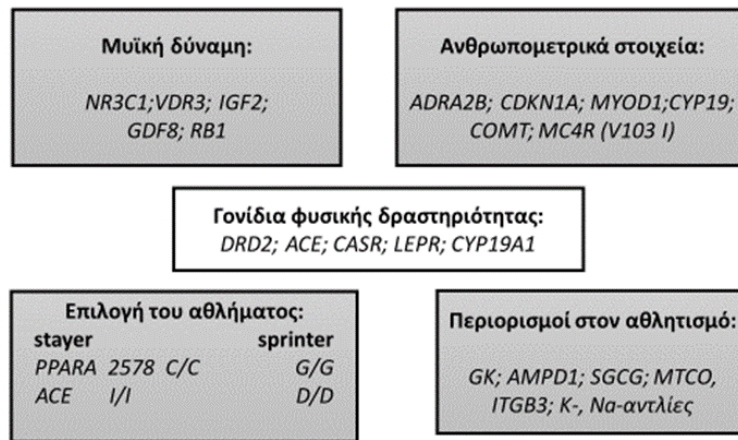


Εικόνα 5.2^β. Γενετικός χάρτης παιδικής υγείας [171]

Συσσωρεύονται ταχέως και οι πληροφορίες για τους γονδιακούς δείκτες βάση των οποίων μπορεί να εκτιμηθεί η καταλληλότητα του εφήβου για ένα συγκεκριμένο άθλημα. Επί του παρόντος, υπάρχουν πληροφορίες για σχεδόν 150 διαφορετικά γονίδια που ελέγχουν τη φυσική εξέλιξη ενός ατόμου, τα οποία είναι σημαντικά για την επιλογή της κατάλληλης γυμναστικής και των δυνητικά ελπιδοφόρων αθλητών [172]. Κάποια από αυτά τα γονίδια έχουν δοκιμαστεί σε ομάδες αθλητών και στο Ινστιτούτο Ερευνών D.O. Ott της Ρωσικής Ακαδημίας Ιατρικών Επιστημών (RAMS) [173]. Βάσει των προκύπτων αποτελεσμάτων σχηματίστηκε ο γενετικός χάρτης του αθλητή (εκδοχή της Russian Academy of Medical Sciences - RAMS), συμπεριλαμβανομένης της δοκιμής γονιδίων που καθορίζουν τα φυσικά χαρακτηριστικά ενός ατόμου (Εικ. 5.2 γ').

Έτσι στα άτομα με αυξημένη φυσική δραστηριότητα και αντοχή, δηλαδή γενετικά πιο κατάλληλα για αθλήματα, παρατηρείται ο γονότυπος C / C για πολυμορφισμό γονιδίου DRD2, η μειωμένη ποσότητα των τετρανουκλεοτιδικών επαναλήψεων TTTT στο γονίδιο αρωματάσης (CYP19A1), ο γονότυπος I / I του γονιδίου μετατρεπτικού ενζύμου της αγγειοτενσίνης ACE και η ομοζυγωτικότητα στη αλανίνη του προϊόντος γονιδίου για τον υποδοχέα CASR, ευαίσθητο σε ασβέστιο [172].

Έτσι, παρά τους γνωστούς νομικούς και ηθικούς περιορισμούς, την έλλειψη πληροφοριών για τα γονιδιακά δίκτυα των διαφόρων μεταβολικών διεργασιών και πολυπαραγοντικών ασθενειών, την έλλειψη πειστικών στατιστικών πληροφοριών και παρά την ατελή κλινική ερμηνεία των αποτελεσμάτων γενετικών τεστ (βλ. Κεφάλαιο 6) η δημιουργία ενός γενετικού χάρτη (αδιάφορου μεγέθους) για τα ταλαντούχα άτομα θα πρέπει να είναι καλοδεχούμενη. Το συγκεκριμένο ιατρικό έγγραφο μπορεί να παράσχει σημαντική βοήθεια κατά την εξέταση της κατάστασης υγείας και την εκτίμηση του δυνητικού κινδύνου για πολλές ασθένειες (οποιαδήποτε πολυπαραγοντική νόσος) σε μέλη οικογενειών υψηλού κινδύνου.



Εικόνα 5.2 ' Προαιρετικός γενετικός χάρτης του αθλητή [173]

Έτσι, παρά τις αναφερόμενες δυσκολίες και τη προφανή ατέλεια της σύγχρονης προγνωστικής ιατρικής η διεξαγωγή των γενετικών τεστ φαίνεται αρκετά ρεαλιστική στις οικογένειες υψηλού κινδύνου για σοβαρές πολυπαραγοντικές ασθένειες, στους επαγγελματίες αθλητές, στα άτομα των ακραίων επαγγελμάτων και γενικά, στους ανθρώπους που ενδιαφέρονται να μάθουν για το γονιδίωμα τους. Η μεγάλη πρακτική σημασία του γενετικού προφίλ για την αναπαραγωγική υγεία είναι επίσης προφανής.

Η ταχεία πρόοδος στις ερευνητικές τεχνολογίες του ανθρώπινου γονιδιώματος, η εμφάνιση των ριζικά νέων μεθόδων ανάλυσης του γονιδιώματος και των αυτοματοποιημένων DNA ανιχνευτών υψηλής απόδοσης που επιτρέπουν την αλληλούχιση του DNA δεκάδων εκατομμυρίων ζευγών βάσεων σε μια ημέρα, μειώνει ριζικά τον χρόνο και το

κόστος της διαδικασίας αλληλούχισης ανθρώπινου γονιδιώματος. Τον Μάιο του 2007, ο εκκινητής του Προγράμματος «Ανθρώπινο Γονιδίωμα» και εφευρέτης της διάσημης διπλής έλικας DNA, καθηγητής James Dewey Watson, έλαβε έναν πλήρη χάρτη του γονιδιώματός του ως βραβείο για τη συμβολή του στο Πρόγραμμα Ανθρώπινου Γονιδιώματος. Πολύ σύντομα, τους χάρτες του γονιδιώματός τους πήραν και ο διευθυντή του Ιδιωτικού Ερευνητικού Ινστιτούτου ανθρώπινου γονιδιώματος ο Craig Venter και ο George Church, ένα άλλο ενεργό μέλος του προγράμματος. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι και στις δύο περιπτώσεις υπήρχαν πληροφορίες για τη πρωταρχική νουκλεοτιδική ακολουθία και των δύο κλώνων DNA ταυτόχρονα, δηλαδή, θα μπορούσε κανείς να εκτιμήσει ρεαλιστικά την κατάσταση όλων των αλληλόμορφων παραλλαγών **του κάθε γονιδίου**. Και οι τρεις προαναφερόμενοι επιστήμονες έχουν συναινέσει στη τοποθέτηση των γονιδιωματικών τους χαρτών στο Διαδίκτυο χωρίς κανένα φόβο για την αποκάλυψη αυτών των εμπιστευτικών προσωπικών πληροφοριών σε παγκόσμιο επίπεδο. Σήμερα, το κόστος μιας τέτοιας ανάλυσης του μεμονωμένου γονιδιώματος έχει μειωθεί στα 1.000 δολάρια και είναι πλέον προσιτό σε εκατομμύρια ανθρώπους στον πλανήτη μας! [21]

Δεδομένης αυτής της περίπτωσης, ο ήδη αναφερόμενος Αμερικανός επιστήμονας George Church πρότεινε για το κοινό και τους παγκόσμιους επιστήμονες ένα νέο πρόγραμμα που ονομάζεται «**Εξατομικευμένο γονιδίωμα**» (Personified genome) [20]. Ο σκοπός του προγράμματος είναι η διεξαγωγή συγκριτικής ανάλυσης γονιδιωμάτων πλήρους μεγέθους των πολλών χιλιάδων ανθρώπων, προκειμένου να αποκτηθούν οι πληρέστερες πληροφορίες σχετικά με τη σχέση γονότυπου-φαινοτύπου, να βρεθούν τα χαρακτηριστικά γνωρίσματα της σύσχετισης δομής του γονιδιώματος, του πολυμορφισμού του, καθώς και τις αλληλόμορφες παραλλαγές των μεμονωμένων γονιδίων με συγκεκριμένη παθολογία, συμπεριλαμβανομένων των πολυπαραγοντικών ασθενειών. Στο πλαίσιο αυτού του έργου προτάθηκε δωρεάν αλληλούχιση του γονιδιώματος σε άτομα εθελοντές και μαζί με το ιατρικό τους αρχείο τοποθετήθηκε στο Διαδίκτυο για πιο λεπτομερή και ολοκληρωμένη έρευνα

Φυσικά, δεν θα φέρουν όλα τα γονίδια την ονομασία «γονιδίων προδιάθεσης». Ωστόσο, με τη βοήθεια των βιοπληροφορικών μεθόδων και του ελέγχου **γενετικής συσχέτισης** (Genome-Wide Association Screening) γονιδιώματος, όλα **τα κύρια γονίδια προδιάθεσης** θα εντοπιστούν γρήγορα, θα ταυτοποιηθούν οι αλληλόμορφες παραλλαγές τους

που συμβάλλουν ή, αντιθέτως, εμποδίζουν την ανάπτυξη μιας πολυπαραγοντικής ασθένειας θα αναγνωριστούν με ακρίβεια. Για το λόγο αυτό, παρά την ατέλεια των ήδη υφιστάμενων μεμονωμένων γενετικών χαρτών (γενετικών προφίλ), τον περιορισμό στα δεδομένα για τους κύριους γονιδιακούς δείκτες που σχετίζονται με ασθένειες, τις περιορισμένες προγνωστικές δυνατότητες της αντικειμενικής συμβουλής σχετικά με τα αποτελέσματα των γενετικών εξετάσεων, οι προσπάθειες προς την κατεύθυνση αυτή πρέπει να μεγιστοποιηθούν.

Κεφάλαιο 6. Προδιαθεσιακοί γονιδιακοί έλεγχοι για πολυπαραγοντικά νοσήματα

Όπως προκύπτει από την ανασκόπηση της βιβλιογραφίας και των παραπάνω δεδομένων, οι μελέτες γονιδιακών συσχετίσεων, δηλαδή οι αναζητήσεις των γονιδίων δεικτών που συσχετίζονται με διάφορες **πολυπαραγοντικές ασθένειες (MFD)** έχουν διαδοθεί σε όλο τον κόσμο, όπως επίσης παρουσιάζονται στις έρευνες των κορυφαίων εργαστηρίων και γενετικών κέντρων της Ρωσίας. Σύμφωνα με τα δεδομένα διεθνούς κλίμακας, χιλιάδες πολυμορφικές θέσεις δοκιμάζονται καθημερινά για να διαπιστωθεί η σύνδεσή τους με τις ασθένειες [174]. Για πολλές συχνές MFD έχουν εντοπιστεί ή βρίσκονται υπό μελέτη περίπου 100 υποψήφια γονίδια, στο καθένα από τα οποία παρουσιάζονται αρκετές πολυμορφικές θέσεις διαφορετικής λειτουργικής σημασίας.

Τα τελευταία χρόνια, με την εμφάνιση του **λεπτομερούς χάρτη μοριακών δεικτών (SNP - Κεφάλαιο 2)** και των **βιοτσίπ υψηλής ανάλυσης** (300-500 χιλιάδες σημεία), των γενετικών ελέγχων όλο και περισσότερο χρησιμοποιείται η μέθοδος **GWAS (Genome Wide Association Studies)** [175]. Με τη συγκεκριμένη μέθοδο έχουν ταυτοποιηθεί εκατοντάδες νέα υποψήφια γονίδια και ανώνυμοι πολυμορφισμοί, υπεύθυνα για τις δέκα συχνότερες μορφές MFD όπως ο διαβήτης τύπου 1 και τύπου 2, η νόσος του Crohn, ο καρκίνος του μαστού, ο καρκίνος του προστάτη, η νόσος του Πάρκινσον και άλλα [175]. Ο συνολικός αριθμός των ασθενειών που δοκιμάστηκαν με τη μέθοδο αυτή έχει φθάσει στις 176 και συνεχίζει να αυξάνεται με ταχύτερους ρυθμούς. Η συγκριτική μελέτη της χαρακτηριστικής κατανομής των αλληλομορφικών παραλλαγών σε ασθενείς με MFDs και σε υγιείς έχει δημιουργήσει μια νέα έννοια, το «γονιδιωματικό προφίλ των MFDs», δηλαδή μια κατανομή των αλληλόμορφων SNPs πάνω στο γονιδίωμα, χαρακτηριστική μιας συγκεκριμένης νόσου. Έχουν παρουσιαστεί και προωθούνται διάφορα εμπορικά γενετικά τεστ, συμπεριλαμβανομένων και των «ατομικών γονιδιωματικών προφίλ» από διάφορα διαγνωστικά κέντρα Αμερικής (Celera, Myriad genetics, Decode, Navigenics, 23andme) και Δυτικής Ευρώπης (Sciona, Gendia) [176]. Ωστόσο, οι συσχετισμοί των πολυάριθμων γονιδίων-δεικτών και πολυμορφικών τόπων με την ασθένεια παραμένουν ανεπίσημοι καθώς πάνω από το 5% των εντοπισμένων συσχετισμών έχουν αποδειχθεί ως τυχαίοι [174]. Σύμφωνα με πολλούς ειδικούς, στη μοριακή και γενετική ιατρική έχει προκύψει μια

αρκετά ανησυχητική κατάσταση όταν η εμπορευματοποίηση και οι επιχειρήσεις ξεπερνούν την επιστήμη [174].

Που πρέπει να δοθεί προσοχή ώστε να μη παρεμποδίζεται η ευρεία εισαγωγή των αναμφισβήτητων επιτευγμάτων της προγνωστικής ιατρικής στην κλινική πρακτική;

- ✓ Στην τεκμηριωμένη αξιοπιστία της συσχέτισης ενός συγκεκριμένου γονιδίου ή πολυμορφισμού με MFD
- ✓ Στην αξιολόγηση αποτελεσμάτων των προγνωστικών γενετικών τεστ.
- ✓ Στην αιτιολογημένη χρήση (όφελος) των προγνωστικών γενετικών τεστ για τον άνθρωπο.

Το επόμενο κεφάλαιο αναφέρεται στην ανάλυση αυτών των θεμάτων.

6.1. Αξιοπιστία στη συσχέτιση γονότυπος-φαινότυπος

Επί του παρόντος, υπάρχουν περίπου 1024 κλινικά γενετικά τεστ για MFD και περισσότερα από τα 300 τεστ που υποβλήθηκαν σε προ κλινικές και κλινικές δοκιμές [177]. Για πολλές πολυπαραγοντικές ασθένειες (MFDs) έχουν ήδη εντοπιστεί τα «κύρια» γονίδια, η συμμετοχή των οποίων σε μία ή άλλη παθολογία έχει επιβεβαιωθεί από την έρευνα πολλών εργαστηρίων σε αντιπροσωπευτικές ομάδες ασθενών. Αυτές περιλαμβάνουν, για παράδειγμα, τη νόσο Αλτσχάιμερ (APOE4), τον διαβήτη τύπου 2 (PPARG, TCF7L2, KCNJ11), τον γεροντικό εκφυλισμό της ώχρας αμφιβληστροειδούς (CFH), τον συστηματικό ερυθηματώδη λύκο (JRF5), τον καρκίνο του προστάτη (περιοχή JF1H), τον σακχαρώδη διαβήτη τύπου 1 (HLA, INS, IL2RA, PTPN22), την αυτοάνοση θυρεοειδίτιδα (CTLA4), την νόσο Hirschsprung ή συγγενές megacolon (πάθηση, κατά την οποία λείπει συγγενώς (εκ γενετής) η παρασυμπαθητική νεύρωση του περιφερικού εντέρου) (RET), την ασθένεια Crohn (CARD15), τη ρευματοειδή αρθρίτιδα (PTPN22) [120, 178]. Σήμερα, οι ηλεκτρονικές βάσεις δεδομένων των γενετικών συσχετισμών περιέχουν αποτελέσματα των 8.000 μελετών σε 70 ασθένειες, ταξινομημένες σε 10 διαφορετικές κατηγορίες. Παρ' όλα αυτά, η στάση πολλών επιστημόνων απέναντι σε αυτά τα αποτελέσματα είναι πολύ επιφυλακτική. Σε μεγάλο βαθμό η στάση αυτή οφείλεται στο ότι δεν υπάρχουν αυστηρά στατιστικά τεκμήρια για παρουσία τέτοιων συσχετισμών. Ένας από τους σημαντικούς λόγους αυτής της απόκλισης/διαφοράς είναι ότι στις μελέτες χρησιμοποιήθηκαν σχετικά μικρά δείγματα.

Στην καλύτερη περίπτωση, οι ομάδες περιορίζονται σε εκατοντάδες άτομα, ενώ για τη λήψη των στατιστικά αξιόπιστων δεδομένων απαιτείται η συγκριτική γενετική ανάλυση σε δείγματα πολλών χιλιάδων υγιών και ασθενών [174]. Δεν είναι τυχαίο ότι σε γενικό έλεγχο γονιδιωματικών συσχετισμών χρησιμοποιούνται ταυτόχρονα αρκετές χιλιάδες ασθενών με συγκεκριμένη νοσολογία και τουλάχιστον 3 000 άτομα ελέγχου (pair-matched control) [175, 179].

Ο δεύτερος σημαντικός λόγος της μεταβλητότητας των γονιδιακών συσχετίσεων είναι οι **πληθυσμιακές** διαφορές στις αλληλόμορφες συχνότητες. Δεν είναι τυχαίο ότι οι εντοπισμένες αλληλόμορφες παραλλάγες, που αποδεικνύουν τη σημασία μίας ή άλλης συσχέτισης, στην ομαδοποίηση των δεδομένων από διαφορετικές μελέτες, που έχουν γίνει σε ομάδες ασθενών από άλλους πληθυσμούς, συχνά υπολογίζονται κατά μέσον όρο και γίνονται στατιστικά αναξιόπιστες. Έτσι, η καθιερωμένη συσχέτιση πολυμορφισμού στο γονίδιο παράγοντα νέκρωσης όγκου (TNFA) με το έμφραγμα του μυοκαρδίου στους κάτοικους της Αγίας Πετρούπολης, σε μια μετά-ανάλυση με 19 άλλα έργα των Ρώσων επιστημόνων, κατέληξε αναξιόπιστη [180].

Η ανάγκη για μεγάλα δείγματα υπαγορεύεται από την χαμηλή συχνότητα του σχετικού κινδύνου (relative risk - RR) που δείχνει πόσο πιο συχνά παρατηρείται η υπό μελέτη ασθένεια σε άτομα που παρουσιάζουν *ένα συγκεκριμένο αλληλόμορφο* ή το αντίθετο, *πολλά διαφορετικά αλληλόμορφα* στα αντίστοιχα **γονίδια δείκτες** σε σύγκριση με άτομα που έχουν *διαφορετικό αλληλόμορφο* ή *αλληλόμορφο* στα αντίστοιχα **υποψήφια γονίδια** [101]. Συνήθως, για τους ήδη γνωστούς γονιδιακούς δείκτες που συσχετίζονται με MFD, η τιμή RR δεν υπερβαίνει το 1,5 και συχνότερα είναι εντός 1,16 - 1,2. Ως εκ τούτου, η συμβολή του κάθε γονιδιακού δείκτη στην ανάπτυξη των MFDs είναι σχετικά μικρή. Συνεπώς, για να τεκμηριωθεί αυστηρά η παρουσία μιας συσχέτισης, απαιτούνται εκτεταμένες γενετικές μελέτες. Έτσι, σύμφωνα με ορισμένες εκτιμήσεις, για να αποδειχθεί η μη τυχαία συσχέτιση του γονιδίου της μεθυλενο-τετραϋδροφυλλικής ρεδοουκτάσης (MTHFR) με τη στεφανιαία νόσο, χρειάζεται να διεξαχθεί έρευνα σε 11.162 ασθενείς IHD και σε 12.578 άτομα ομάδας ελέγχου [174]. Το ίδιο ισχύει και για τη συσχέτιση της στεφανιαίας νόσου με το γονίδιο ενζύμου μετατροπής της αγγειοτενσίνης (ACE), χρειάζεται να εξετασθούν τουλάχιστον 5.000 ασθενείς και 6.000 μάρτυρες. Δεδομένου ότι παρόμοιες μελέτες δεν έχουν διεξαχθεί για κανένα γνωστό γονιδιακό δείκτη, ορισμένοι επιστήμονες πιστεύουν ότι όλες οι

γνωστές συσχετίσεις των γονιδίων με τις MFDs δεν έχουν ακόμη τεκμηριωθεί [181]. Πιστεύεται ότι για να αποδειχθεί η πιθανότητα 90% κάποιου είδους συσχέτισης μεταξύ ενός γονιδίου και μιας νόσου με $RR = 1,25$, απαιτείται μια μελέτη με 5.000 ασθενείς και τουλάχιστον 5.000 άτομα ομάδας ελέγχου. Προτείνεται επίσης να αυξηθεί κατά συντελεστή 1000 το επίπεδο σπουδαιότητας, το $p < 0.00005$ αντί για το συνηθισμένο $p < 0.05$ [174]. Η παρουσία μίας μεθόδου όπως ο έλεγχος γονιδιακών συσχετισμών (GWAS βλ. Κεφάλαιο 4) λύνει ριζικά το ζήτημα αναξιοπιστίας στα προγνωστικά γενετικά τεστ. Έτσι, κατά την αξιολόγηση του κινδύνου εμφράγματος μυοκαρδίου με αυτή τη μέθοδο, κατά την ανάλυση των 85 SNPs, η αξιοπιστία των αναγνωρισμένων συσχετίσεων αντιστοιχήθηκε σε $p < 0.000.000$ 1! [182]

Ένας άλλος σημαντικός παράγοντας που αποδεικνύει τη βιωσιμότητα αναγνωρισμένης συσχέτισης είναι η αντιγραφή της, δηλαδή η αναπαραγωγιμότητα των παρόμοιων αποτελεσμάτων του τεστ στα έργα άλλων ερευνητών. Επί του παρόντος, για την ανάλυση αξιοπιστίας της συσχέτισης αλληλόμορφων παραλλαγών των διαφορετικών γονιδίων χρησιμοποιούνται ευρέως διάφορες στατιστικές μέθοδοι, ωστόσο, δεν έχει επιτευχθεί ακόμη κάποια συναίνεση επί του θέματος αυτού [183].

Ποια είναι η αιτία μιας τέτοιας μεταβλητότητας γενετικού πολυμορφισμού που εντοπίζεται κατά διάρκεια των γενετικών ελέγχων προδιάθεσης στα MFDs; Υπάρχουν πολλοί υπεύθυνοι παράμετροι όπως: [174]

- ✓ οι αλληλόμορφες που σχετίζονται με τα ίδια MFDs σε διάφορους πληθυσμούς μπορεί να είναι διαφορετικές,
- ✓ οι συχνότητες των αλληλόμορφων σε διάφορους πληθυσμούς είναι περίπου ίδιες, αλλά η συμβολή τους στη παθογένεια του υπό μελέτη MFD να είναι διαφορετική,
- ✓ οι παθογενετικές διαφορές των MFD μπορεί να οφείλονται στις ιδιαιτερότητες δράσης των εξωτερικών παραγόντων σε διαφορετικές γεωγραφικές συνθήκες,
- ✓ οι ανακρίβειες στη κλινική διάγνωση (σφάλματα στο σχηματισμό κλινικών ομάδων),
- ✓ η γενετική στρωματοποίηση του υπό μελέτη πληθυσμού (παρουσία των υποπληθυσμών με τη αρχικά διαφορετική συχνότητα των αναλυθέντων αλληλόμορφων).

Υπάρχουν και διάφοροι άλλοι παράγοντες που παρεμποδίζουν σημαντικά τη σωστή αξιολόγηση της παρατηρούμενης συσχέτισης γονότυπου - φαινοτύπου, ακόμη και αν η αξιολόγηση αυτή είναι στατιστικά αξιόπιστη:

- ✓ Η σημειούμενη συσχέτιση μπορεί να μη σχετίζεται με το ταυτοποιημένο γονίδιο - δείκτη ή με κάποιον τόπο (αλληλόμορφο), αλλά με ένα άλλο γονίδιο ή τόπο (αλληλόμορφο), στενά συνδεδεμένο με έναν άγνωστο μέχρι τώρα τόπο ή αλληλόμορφο, το προϊόν οποίου εμπλέκεται στην παθογένεια της MFD.
- ✓ Η εντοπισμένη συσχέτιση μπορεί, στην πραγματικότητα, να μην αφορά το ίδιο το υποψήφιο γονίδιο, αλλά ένα άλλο γονίδιο, το προϊόν του οποίου αντισταθμίζει λειτουργικά τη επίδραση του μεταλλαγμένου γονιδίου (**επιστατική αλληλεπίδραση των γονιδίων**).
- ✓ Πρακτικά ανεξερεύνητες παραμένουν οι αλληλεπιδράσεις γονιδίου-γονιδίου, καθώς και οι αλληλεπιδράσεις των υποψήφιων γονιδίων με περιβαλλοντικούς παράγοντες.
- ✓ Η παθογένεια κάποιας MFD μπορεί να είναι αποτέλεσμα δυσλειτουργίας των γονιδίων ενός συχνά διαφορετικού γονιδιακού δικτύου (βλ. Κεφάλαιο 3).
- ✓ Μαζί με τις τυπικές για MFD, πολυγονιδιακές μορφές, συχνά συναντιούνται και κοινές μονογονιδιακές μορφές (οστεοπόρωση, νόσος Parkinson, νόσος Alzheimer, διάφορες ογκολογικές παθήσεις) [101].

Φυσικά, όλοι αυτοί οι παράγοντες αλλοιώνουν σημαντικά την κλινική εικόνα της νόσου, περιπλέκουν σε μεγάλο βαθμό τη σωστή ταυτοποίηση των γονιδίων δεικτών και την αξιολόγησή τους στην μετά-ανάλυση των διαφόρων επιστημονικών έργων. Αναγνωρίζοντας αυτούς τους περιορισμούς και τις όλες τις δυσκολίες που αντιμετωπίζει ο γενετικός έλεγχος προκειμένου να αναγνωριστούν οι δείκτες των MFD, είναι σημαντικό να δοθεί η προσοχή στις ακόλουθες περιστάσεις:

- ✓ Για όλες τις MFDs οι σχέσεις γονότυπου-φαινοτύπου είναι πάντοτε πιθανολογικές και δεν είναι αυστηρά ντετερμινιστικές, δηλαδή η ακρίβεια της διάγνωσης του DNA των MFDs, σε αντίθεση με τις μονογονιδιακές, ποτέ δεν θα πλησιάσει το 100%.

- ✓ Οι ομάδες των ασθενών και υγιών ατόμων στις μελέτες γενικής γονιδιοματικής συσχέτισης, πράγματι, περιλαμβάνουν χιλιάδες άτομα, γεγονός που πρακτικά εγγυάται την αξιοπιστία των επιτευχθέντων αποτελεσμάτων.
- ✓ Οι αναγνωρισμένοι με τον έλεγχο γονιδιοματικής συσχέτισης, οι γονιδιακοί δείκτες και οι τόποι, περιλαμβάνουν πάντα τις συσχετίσεις που έχουν προσδιοριστεί πριν με άλλες μεθόδους (νόσος – έλεγχος κτλ.).

Φυσικά, αυτές οι διατάξεις χρειάζονται περαιτέρω βελτίωση και επαλήθευση, ωστόσο και σε αυτή μορφή δίνουν ώθηση για να γίνουν πιο εκτεταμένες προ-κλινικές και κλινικές δοκιμές των ήδη προσδιορισμένων υποψήφιων γονιδίων για πιο συχνές MFD.

Ιδιαίτερα «βολικοί» για γενετικές δοκιμές είναι οι MFD η μοριακή βάση των οποίων αποτελείται από γονίδια, κυρίως ενός γονιδιακού δικτύου, όπως η θρομβοφιλία (γονίδια της πήξης αίματος), η υπέρταση (γονίδια της σειράς ρενίνης-αγγειοτενσίνης), οι διαταχές μεταβολισμού των λιπιδίων (γονίδια του μεταβολισμού των λιπιδίων), η μεμονωμένη ευαισθησία στα φάρμακα (γονίδια του συστήματος αποτοξίνωσης) κλπ. Ελέγχοντας τις αλληλόμορφες παραλλαγές των παραπάνω γονιδίων, συγκεντρώνονται αρκετές πληροφορίες για την κατάσταση ενός συγκεκριμένου μεταβολικού συστήματος, αξιολογείται ο κίνδυνος της εμφάνισης νόσου και εφαρμόζονται κατάλληλα προληπτικά μέτρα.

Μία σημαντική δυσκολία στην αξιολόγηση των αποτελεσμάτων γενετικών τεστ παρουσιάζεται στα MFD με μια σύνθετη αιτιολογία, στην παθογένεια της οποίας εμπλέκονται διαφορετικά γονιδιακά δίκτυα, για παράδειγμα, το βρογχικό άσθμα, η οστεοπόρωση, η ενδομητρίωση, η προεκλαμψία, η συνηθισμένη αποβολή. Στον έλεγχο γονιδίων διαφορετικών μεταβολικών οδών συχνά δεν εντοπίζεται ο «αδύναμος κρίκος» που ενέχει κίνδυνο για την υγεία. Ωστόσο, και σε αυτή τη περίπτωση, με τη σύγκριση των κλινικών, εργαστηριακών και γενετικών δεδομένων μπορεί να καθοριστεί η διάγνωση και να δοθούν απαραίτητες συστάσεις για την θεραπεία. Το θέμα αυτό εξετάζεται λεπτομερέστερα στην επόμενη ενότητα.

6.2. Αξιολόγηση των αποτελεσμάτων γενετικών ελέγχων

Οι γενετικές δοκιμές εισάγονται ολοένα και περισσότερο στην κλινική πρακτική, γεγονός που ενθαρρύνεται από τις αυξανόμενες ανάγκες του πληθυσμού στην υγειονομική

περίθαλψη υψηλής τεχνολογίας. Παράλληλα, ο ασθενέστερος κρίκος της προγνωστικής ιατρικής παραμένει η αξιολόγηση των αποτελεσμάτων γενετικών ελέγχων, η οποία πρέπει να πραγματοποιείται λαμβάνοντας υπόψη τις ήδη συσσωρευμένες γνώσεις σχετικά με τα γονιδιακά δίκτυα των συγκεκριμένων MFD, τα πληθυσμιακά, φυλετικά και ηλικιακά χαρακτηριστικά των συχνοτήτων αλληλόμορφων πολυμορφισμών (βλέπε 6.1).

Λαμβάνοντας υπόψη τον πιθανοτικό χαρακτήρα των γενετικών προβλέψεων κατά τη δοκιμή της κληρονομικής προδιάθεσης στην MFD, μια αρκετά απλή μέθοδος βαθμολόγησης, η οποία χρησιμοποιείται σε ορισμένες δυτικές χώρες (π.χ. Harvard School of Public Health, Σχολή Δημόσιας Υγείας του Χάρβαρντ), μπορεί να βοηθήσει στην εκτίμηση του κινδύνου κληρονομικής προδιάθεσης. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται σε μερικά κέντρα της Ρωσίας που διεξάγουν γενετικές εξετάσεις (Ινστιτούτο Επιστημονικής Έρευνας της Ιατρικής Γενετικής, Ινστιτούτο Επιστημονικής Έρευνας D.O. Ott SZO RAMS) [155, 184, 185].

Η ουσία της μεθόδου είναι η εξής: η κάθε παραλλαγή του γονότυπου εκτιμάται σε υποθετικούς βαθμούς, ανάλογα με το αν τα αναγνωρισμένα αλληλόμορφα είναι προστατευτικά ή προδιάθετα στην ανάπτυξη της παθολογίας. Βάσει των γονιδίων που μελετήθηκαν, συνοψίζονται όλοι οι βαθμοί και εκτιμάται ο υπό όρους κίνδυνος της ασθένειας, ως μέσος, χαμηλός ή υψηλός. Ορισμένες από τις παραλλαγές της βαθμολόγησης, εκτός από τον υπολογισμό των βαθμών του γονότυπου, συμπεριλαμβάνουν και υποθετικούς βαθμούς για τους διάφορους εξωγενείς παράγοντες (δυσμενείς επιπτώσεις, συνήθειες, φαρμακευτική αγωγή κλπ.) τα ανθρωπομετρικά στοιχεία, την σωματική δραστηριότητα, το φύλο και το βάρος.

Μετά το γενετικό έλεγχο ο εξεταζόμενος λαμβάνει ένα πόρισμα που αναφέρει τα γονίδια που αναλύθηκαν και τις πολυμορφικές παραλλαγές τους. Σύμφωνα με τον γονότυπο, γίνεται μια εκτίμηση κινδύνου, υποδεικνύοντας την ανάγκη για περαιτέρω θεραπευτικά, διαγνωστικά και προληπτικά μέτρα. Οι παραπάνω πληροφορίες προετοιμάζονται από τον γενετιστή μαζί με τους ειδικούς που έχουν πραγματοποιήσει μοριακή ανάλυση και μεταβιβάζονται ξεχωριστά στον θεράποντα ιατρό και στον ασθενή. Η συνεκτίμηση αυτού του πορίσματος με κλινικά και εργαστηριακά αποτελέσματα επιτρέπει να εκτιμηθεί ο

κινδύνου ανάπτυξης μιας συγκεκριμένης MFD και κατά συνέπεια να προταθεί πιο αποτελεσματικό προληπτικό και θεραπευτικό πρόγραμμα.

Θα πρέπει να ληφθεί υπόψη ότι μια τέτοια απλοποιημένη **εκτίμηση ατομικού κινδύνου** (βλέπε παραπάνω) είναι κατάλληλη για γενετικά τεστ στο πλαίσιο ενός καλά καθορισμένου γονιδιακού δικτύου που ελέγχει μόνο μια μεταβολική αλυσίδα (π.χ. των συστημάτων αποτοξίνωσης, της πήξης αίματος, του αγγειακού τόνου, του μεταβολισμού λιπιδίων). Δεν έχει νόημα να συνοψίζει κανείς τους βαθμούς για τα γονίδια των διαφόρων δικτύων που συμμετέχουν από κοινού στην παθογένεια των περισσότερων MFDs (άσθμα, οστεοπόρωση, καρδιαγγειακές παθήσεις, ενδομητρίωση κλπ.). Σε αυτή την περίπτωση, καλύτερο είναι να υπολογιστούν ξεχωριστά οι βαθμοί για κάθε ένα γονιδιακό δίκτυο και στη συνέχεια, συγκρίνοντας τα αποτελέσματα που λαμβάνονται από τις εργαστηριακές και κλινικές μελέτες, να αποφασιστεί σε ποια ομάδα κινδύνου θα πρέπει να τοποθετεί ο εξεταζόμενος ασθενής.

Η απάντηση μπορεί να είναι πιο αντικειμενική στην περίπτωση που είναι δυνατή η σύγκριση των αποτελεσμάτων που προέκυψαν από τις γενετικές εξετάσεις ενός στενού συγγενή που πάσχει από την ίδια MFD. Σε κάθε περίπτωση, η απάντηση θα είναι καθαρά πιθανολογικής φύσεως.

Μία πολύ σημαντική βοήθεια στη σωστή ερμηνεία των αποτελεσμάτων μπορεί να παρέχεται από ένα ειδικό πρόγραμμα υπολογιστή. Μια παραλλαγή παρόμοιου προγράμματος έχει αναπτυχθεί στη Γαλλία και χρησιμοποιείται στην ιατρική πρακτική [85]. Το κύριο χαρακτηριστικό του είναι ο ορθολογικός συνδυασμός των αποτελεσμάτων ΓΤ με κλινικά και αναμνηστικά δεδομένα, βάσει των οποίων συνάγεται το συμπέρασμα, διατυπώνονται οι συγκεκριμένες συστάσεις διατήρησης υγείας και πρόληψης ασθενειών. Η κύρια έμφαση δίνεται στην εκτίμηση των αποτελεσμάτων των διαφόρων ΓΤ, πρώτα από όλα, των τεστ για αλληλόμορφο πολυμορφισμό των γονιδίων του συστήματος αποτοξίνωσης. Η ανάγκη για ένα τέτοιο πρόγραμμα προέρχεται βλέποντας όλη την πορεία προγνωστικής ιατρικής. Πράγματι, οι πληροφορίες για τις ιδιαιτερότητες του αλληλόμορφου μοντέλου των διαφόρων γονιδιακών πλαισίων (panels) επεξεργασμένες με ένα τέτοιο πρόγραμμα, επιτρέπουν στον γενετιστή να αποκτήσει επαρκώς αντικειμενικές πληροφορίες σχετικά με την προδιάθεση του ατόμου σε μια συγκεκριμένη ασθένεια, να εκτιμήσει πιο εύλογα την

ιατρική του πρόγνωση, να πραγματοποιήσει καλύτερα τη ιατρική και γενετική συμβουλευτική σχετικά με την ειδική εκπαίδευση, τις επιλογές σταδιοδρομίας, τον αθλητισμό, τη φυσική κατάσταση, τη διατροφική θεραπεία κλπ [7, 112].

Έχουν αναπτυχθεί και χρησιμοποιούνται ήδη ειδικά υπολογιστικά προγράμματα, επιτρέποντας τη σύγκριση των γονιδιωματικών προφίλ ασθενών με MFD, των ατόμων ομάδας ελέγχου με το συγκεκριμένο ασθενή, όπως επίσης και την εκτίμηση κινδύνου γενετικής προδιάθεσης ενός συγκεκριμένου ατόμου σε MFD [175]. Επιπλέον, από μια διεθνή ομάδα επιστημόνων έχει ολοκληρωθεί γενετικός χάρτης που περιέχει τους περισσότερους σημαντικούς συνδυασμούς πάνω στο ανθρώπινο γονιδίωμα. Ο χάρτης αυτός διευκολύνει τους ιατρούς στην ανάλυση των αποτελεσμάτων των τεστ, βοηθά να εντοπιστούν οι γονιδιακές παραλλαγές ορισμένων νόσων και να παρατηρηθεί η κληρονομική τους μεταφορά. Πιστεύεται ότι ένας τέτοιος χάρτης θα συμβάλει στη μείωση του κόστους αναζήτησης γονιδίων για προδιάθεση σε συγκεκριμένη MFD, καθώς και στην ρεαλιστική ανάπτυξη της εξατομικευμένης θεραπείας [186]. Δεν υπάρχει αμφιβολία ότι η δημιουργία ενός τέτοιου ηλεκτρονικού προγράμματος για την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων γενετικών δοκιμασιών και σε άλλες χώρες θα επιταχύνει σημαντικά την εισαγωγή της προγνωστικής ιατρικής στην κλινική πρακτική.

Σύμφωνα με διεθνείς πηγές, έχουν ήδη αναπτυχθεί και χρησιμοποιούνται ευρέως οι δοκιμασίες της κληρονομικής προδιάθεσης σε καρδιαγγειακές παθήσεις, φλεβική θρόμβωση, υπερλιπιδαιμία και αρτηριοσκλήρωση [186]. Αυξάνονται ταχέως οι δοκιμές για τον προσδιορισμό της ατομικής ευαισθησίας σε φάρμακα. Από τα ιδιωτικά εμπορικά κέντρα της Αμερικής και της Ευρώπης έχουν αναπτυχθεί και εφαρμόζονται ευρέως διάφορα εμπορικά πάνελ γονιδίων και **πολυμορφικών θέσεων (ΠΘ)**. Έτσι, το Διαγνωστικό Κέντρο Προγνωστικής Ιατρικής στο Λουξεμβούργο (Laboratoires Reunis) για την εξειδίκευση των ιατρών στον τομέα της αντιγηραντικής ιατρικής προσφέρει καθιερωμένα και ήδη αποδεδειγμένα στην πράξη, τα ακόλουθα γονιδιακά πάνελ: ειδικής φυσικής δραστηριότητας (25 γονίδια, 28 ΠΘ), καρδιαγγειακού κινδύνου και άγχους (19 γονίδια, 22 ΠΘ), μεταβολισμού ασβεστίου και οστεοπόρωσης (9 γονίδια, 11 ΠΘ), οδοντικό πάνελ (8 γονίδια, 10 ΠΘ), καρκίνου του προστάτη (1 τόπος, 10 ΠΘ), ειδικής δερματογενετικής (6 γονίδια, 7 ΠΘ), φαρμακογενετικό πάνελ (6 γονίδια, 17 ΠΘ), πάνελ αντιγήρανσης (19 γονίδια, 24 ΠΘ),

πάνελ της υγείας γυναικών (23 γονίδια, 28 ΠΘ), πάνελ της υγείας ανδρών (19 γονίδια, 23 ΠΘ) (www.iepp.org).

Φυσικά, οι γενετικές αναλύσεις αυτές **δεν είναι πιστοποιημένες** για κλινική χρήση, ωστόσο χρησιμοποιούνται ευρέως από τους επαγγελματίες, συμπεριλαμβανομένων των ιατρών που εργάζονται στον τομέα της αντιγηραντικής ιατρικής. Παρεμπιπτόντως, στο επίπεδο γενετικών αναλύσεων βρίσκονται ακόμα περισσότερά από 1.000 προγνωστικά γενετικά τεστ, πολλά από τα οποία έχουν υποβληθεί ήδη στις προκλινικές και κλινικές δοκιμές. Μεταξύ αυτών είναι και το γονίδιο APOE αλληλόμορφο e4, η ομοζυγωτία στον οποίο αυξάνει 14 φορές τον κίνδυνο της νόσου Alzheimer στους Ευρωπαίους, το γονίδιο Filaggrin, οι μεταλλάξεις του οποίου (R501X, 2282del14) αυξάνουν τον κίνδυνο ατοπικού εκζέματος και σοβαρών μορφών βρογχικού άσθματος, τα δυσμενή αλληλόμορφα του γονιδίου CDKN22a2b αυξάνουν 64% τον κίνδυνο εμφράγματος του μυοκαρδίου και το γονίδιο INK 4a / 4b που αυξάνει δύο φορές τον κίνδυνο του διαβήτη τύπου 2. Ωστόσο, η κλινική σημασία αυτών των γενετικών αναλύσεων παραμένει ασαφής. Η χρησιμότητά των παραπάνω αναλύσεων τόσο για τους ιατρούς όσο και για τους ασθενείς απαιτεί αυστηρότερες τεκμηριώσεις [182].

Την 16^η Αυγούστου 2007, πιστοποιήθηκε με επιτυχία και έλαβε την επίσημη έγκριση από την Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων των Ηνωμένων Πολιτειών (Food and Drug Administration) το πρώτο **προγνωστικό γενετικό τεστ** για τον υπολογισμό ατομικής δόσης της αντιπηκτικής βαρφαρίνης. Η δοκιμή περιλαμβάνει αποτελέσματα γενετικού ελέγχου των γονιδίων CYP2C9, VKORC1 + ηλικία + φύλο + βάρος ασθενούς. Συνεπώς, παρόλο που υπάρχει ήδη ένας μεγάλος όγκος δεδομένων, επίσημα εγκεκριμένη για κλινική χρήση επί του παρόντος υφίσταται μόνο η **δοκιμή ευαισθησίας στην βαρφαρίνη** [112].

Η Ευρωπαϊκή Επιτροπή «EuroGentest» έχει επίσης αναπτύξει μια ειδική διάταξη για την τυποποίηση των γενετικών δοκιμασιών και έχει ετοιμάσει τα απαραίτητα έγγραφα για την πιστοποίηση των γενετικών αναλύσεων που σύμφωνα με τα αποτελέσματα των κλινικών δοκιμών μπορούν ήδη να μεταβιβαστούν στην κατηγορία των **γενετικών τεστ** και συνεπώς μπορούν να συνιστώνται για ευρεία κλινική χρήση [166, 187].

6.3. Συστάσεις σχετικά με τα αποτελέσματα των γενετικών ελέγχων

Τα ρεαλιστικά οφέλη των γενετικών ελέγχων υφίστανται στη περίπτωση μόνο εάν αυτοί ολοκληρωθούν με πλήρη διαβούλευση και με την παροχή των κατάλληλων συστάσεων στον θεράποντα ιατρό και στον ασθενή από το εξειδικευμένο προσωπικό γενετικής ιατρικής. Τα αποτελέσματα των γενετικών τεστ μπορούν να έχουν πρακτική σημασία μόνο εάν βασίζονται στην εξέταση των γονιδίων που συσχετίζονται με την αντίστοιχη ασθένεια στον πληθυσμό συγκεκριμένης περιοχής (βλέπε 6.1), εάν το εξεταζόμενο άτομο είναι μέλος μιας οικογένειας υψηλού κινδύνου, εάν έχει διεξαχθεί η επαρκής στατιστική ανάλυση των ληφθέντων γενετικών δεδομένων (βλέπε 6.2). Η αποτελεσματική χρήση αυτών των πληροφοριών σε μεγάλο βαθμό εξαρτάται από το γνωστικό επίπεδο των ιατρών γενετιστών, από την ικανότητα εφαρμογής των ληφθέντων δεδομένων στη διάγνωση, από την πρόληψη και τη θεραπεία της νόσου, καθώς και από την προθυμία του ίδιου του ασθενούς να ακολουθεί τις ιατρικές συστάσεις που βασίζονται στα αποτελέσματα των τεστ [184]. Είναι σημαντικό, ωστόσο, να έχουμε στο νου μας ότι η ερμηνεία των αποτελεσμάτων γενετικής προδιάθεσης θα πρέπει να προσεγγίζεται με μεγάλη προσοχή, λόγω ότι τα γενετικά τεστ (ΓΤ) παρέχουν **κυρίως ενδεικτικά** αποτελέσματα. Επίσης, εάν είναι δυνατόν, θα πρέπει να συμπληρωθεί και με κατάλληλες βιοχημικές αναλύσεις για να εκτιμηθεί η λειτουργική δραστηριότητα των γονιδίων που μελετήθηκαν. Η σημαντική του (ΓΤ) συνιστώσα είναι η μακροπρόθεσμη παρακολούθηση του ασθενούς μετά από τη διαδικασία ελέγχου. Λαμβάνοντας υπόψη την πολύπλοκη παθογένεια των πολυπαραγοντικών ασθενειών, την αβεβαιότητα για το πρωταρχικό μονοπάτι στη παθολογική διαδικασία, οι αντικειμενικές πληροφορίες, όπως ήδη έχει αναφερθεί, μπορούν να επιτευχθούν με ανάλυση των γονιδίων που ελέγχουν μόνο μία μεταβολική διαδικασία, δηλαδή ανήκουν σε ένα γονιδιακό δίκτυο. Έτσι, επί του παρόντος, με βάση τους γενετικούς ελέγχους μπορεί να εκτιμηθεί η λειτουργική κατάσταση των συστημάτων αποτοξίνωσης, πήξης αίματος, μεταβολισμού λιπιδίων ή υδατανθράκων, ρενιγγανιοτασίνης και άλλων. Ένα σοβαρό εμπόδιο στην εφαρμογή των ήδη υπάρχοντων επιστημονικών τεχνολογιών που έχουν δοκιμαστεί προ κλινικά είναι η έλλειψη ευαισθητοποίησης των ιατρών στον τομέα της σύγχρονης ιατρικής γενετικής εν γένει, ειδικότερα στην προγνωστική ιατρική και στον γενετικό έλεγχο. Στο μεταξύ, στην πραγματοποίηση των γενετικών εξετάσεων, τους ασθενείς τους κατευθύνει ο ιατρός γενετιστής, ο οποίος εκ των προτέρων εξακριβώνει τα αναμνηστικά χαρακτηριστικά του

εξεταζόμενου και αν είναι δυνατόν, του συνιστά εξέταση μεταβολικού συστήματος, δυνητικά υπευθύνου για κληρονομική παθολογία.

Με βάση τα αποτελέσματα των γενετικών τεστ, των αναμνηστικών, κλινικών και εργαστηριακών δεδομένων, ο γενετιστής ή ο θεράπων ιατρός οφείλει να προσκομίσει στον ασθενή ένα πόρισμα που θα περιέχει την ανάλυση αποτελεσμάτων δοκιμασμένης γενετικής προδιάθεσης καθώς και συστάσεις, κρίσιμες για τη ζωή του. Σε περίπτωση που θα εντοπιστεί κληρονομική προδιάθεση για κάποια συγκεκριμένη νόσο, ιδιαίτερη σημασία έχει η ανάπτυξη μιας σειράς από ειδικές διαγνωστικές εξετάσεις, θεραπευτικές και προφυλακτικές συστάσεις που αποσκοπούν στην πρόληψη αυτής της νόσου σε έναν ασθενή [84, 188].

Είναι σημαντικό να δοθεί προσοχή στο πρόσφατο χάσμα μεταξύ των πραγματικών δυνατοτήτων του γενετικού ελέγχου ως ένα σύνολο μεθόδων μοριακής έρευνας και την προφανή έλλειψη κλινικών κατευθυντήριων γραμμών που ολοκληρώνουν τον κάθε γενετικό έλεγχο. Η ευρεία συμμετοχή των ειδικών ιατρικής γενετικής, αρμόδιων στα θέματα κλινικής εξέτασης και φαρμακοθεραπείας, καθώς και των κλινικών ιατρών (καρδιολόγων, ογκολόγων, πνευμονολόγων, μαιευτήρων, γυναικολόγων κλπ.) στη λύση των παραπάνω προβλημάτων, φαίνεται ιδιαίτερα σημαντική.

Πρέπει να υπογραμμιστεί εκ νέου ότι ο γενετικός έλεγχος στο πλαίσιο της προγνωστικής ιατρικής είναι δικαιολογημένος στην περίπτωση μόνο εάν τα αποτελέσματά του συνοδεύονται από σοβαρές ιατρικές συστάσεις. Μόνο αν υπάρχουν ειδικοί στην ιατρική γενετική, οι οποίοι παραπέμπουν έγκαιρα και ορθά τους ασθενείς σε γενετικούς ελέγχους και το σημαντικότερο, είναι σε θέση να δώσουν μια κατάλληλη εκτίμηση των αποτελεσμάτων, ο έλεγχος αυτός είναι δικαιολογημένος. Οι γενετικές δοκιμές, οι οποίες δεν υποστηρίζονται από την ειδική ιατρική γενετική συμβουλευτική και τις συστάσεις ειδικών, δεν έχουν νόημα και γενικά μπορούν να θεωρηθούν ως επιβλαβείς.

Οι γενετικοί έλεγχοι και η ερμηνεία των αποτελεσμάτων τους βελτιώνονται ραγδαία. Η ταχεία ανάπτυξη των πληροφοριών, σχετικών με την κατάσταση υγείας των εξετασμένων ατόμων, δηλαδή η μακροχρόνια παρακολούθηση τους από θεράποντες ιατρούς κατάλληλου προφίλ ή από ένα γενετιστή που τους κατευθύνει σε γενετικές δοκιμές, παρέχει όλο και πιο αντικειμενικά δεδομένα για τη κριτική αξιολόγηση και βαθιά κατανόηση

των αποτελεσμάτων προοπτικών γενετικών δοκιμών. Δεν υπάρχει αμφιβολία ότι με τη συσσώρευση των δεδομένων που αφορούν τους νέους γονιδιακούς δείκτες και με την εμφάνιση νέων, πιο προχωρημένων πάνελ γονιδιωματικού προφίλ (βλέπε 6.1), η εκτίμηση των αποτελεσμάτων γενετικών ελέγχων κληρονομικής προδιάθεσης θα γίνει πιο αντικειμενική καθώς οι προγνώσεις των ιατρών και ειδικών της προγνωστικής ιατρικής θα είναι πιο ουσιαστικές και περιζήτητες.

Φυσικά, μπορεί να υποστηριχθεί ότι μέχρι στιγμής σχεδόν όλα τα υπάρχοντα γενετικά τεστ σε MFDs δεν έχουν τεκμηριωμένη βάση, ωστόσο, η καταλληλότητα των ήδη υφιστάμενων γενετικών ελέγχων για τους ασθενείς και ιατρούς μπορεί να αξιολογηθεί μόνο σε συνθήκες κλινικών δοκιμών. Η διεξαγωγή τέτοιων δοκιμών, η προσεκτική παρακολούθηση των ασθενών ανάλογα με τα αποτελέσματα του ΓΤ και τα προληπτικά μέτρα, αποτελούν το σημαντικότερο στόχο της **σύγχρονης ιατρικής**.

Κεφάλαιο 7. Σύνθετα ηθικά και νομικά ζητήματα των γενετικών δοκιμασιών

Η πολυπλοκότητα στην εισαγωγή της προγνωστικής/ εξατομικευμένης ιατρικής στην κλινική πρακτική δημιουργείται από τις δυσκολίες αντικειμενικής αξιολόγησης των αποτελεσμάτων γενετικών ελέγχων, της ορθής ερμηνείας τους και των καλά ελεγμένων συστάσεων, αλλά και από την έλλειψη ενημέρωσης των ιατρών και ασθενών σχετικά με νομικά και κοινωνικά ζητήματα που προκύπτουν συχνά κατά τη διαδικασία των γενετικών δοκιμασιών κληρονομικής προδιάθεσης.

Παρά το γεγονός ότι οι επιστημονικές τεκμηριώσεις στον τομέα της προγνωστικής ιατρικής εξακολουθούν να είναι κερδοσκοπικές και στην καλύτερη περίπτωση πιθανολογικές, πολλοί άνθρωποι θέλουν να εξετάσουν το DNA τους για τα γονίδια προδιάθεσης, προκειμένου να διαπιστώσουν τη τάση τους στα ναρκωτικά, στην παχυσαρκία, σε διάφορες ιδιαιτερότητες συμπεριφοράς, όπως τάσεις για ριψοκίνδυνες ενέργειες, για εγκληματικές πράξεις και για εκδηλώσεις επιθετικότητας [189]. Η έλλειψη της συνειδητοποίησης των πραγματικών δυνατοτήτων, της σκοπιμότητας και των συνεπειών των προγνωστικών γενετικών ελέγχων, η άγνοια των εν ισχύ δεοντολογικών και νομικών αρχών της προγνωστικής ιατρικής επιδεινώνουν την κοινωνική κατάσταση και αποπροσανατολίζουν τους ιατρούς και το κοινό. Εν τω μεταξύ, τα παραπάνω ζητήματα έχουν ήδη εκπονηθεί με επαρκείς λεπτομέρειες σε Διεθνές και Ευρωπαϊκό επίπεδο ((Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας, UNESCO - Ευρωπαϊκό Κοινοβούλιο, Ειδικές Επιτροπές της Ευρωπαϊκής Ένωσης Ιατρών Γενετιστών). Οι πλήρεις πληροφορίες σχετικά με το περιεχόμενο αυτών των εγγράφων παρουσιάζονται σε σειρά δημοσιεύσεων που εκπονήθηκαν από το Επιστημονικό Κέντρο Ιατρικής Γενετικής της Ρωσικής Ακαδημίας Ιατρικών Επιστημών (Μόσχα) [65, 190, 191].

Έτσι, η σύγχρονη «εποχή της γονιδιωματικής» που χαρακτηρίζεται από τη γενικευμένη εισαγωγή των γενετικών δοκιμών στην ιατρική, δημιούργησε διάφορα ηθικά, νομικά και κοινωνικά ζητήματα που συνδέονται με την εμφάνιση νέων ευκαιριών και τρόπων παραβίασης των ανθρωπίνων δικαιωμάτων, τη διάκριση λόγω των γενετικών προβλημάτων και την εσφαλμένη χρήση των γενετικών πληροφοριών.

Παρακάτω γίνεται ανασκόπηση των βασικών διατάξεων των ήδη υφιστάμενων εγγράφων σχετικά με τις δεοντολογικές και νομικές πτυχές των προγνωστικών και προληπτικών γενετικών ελέγχων.

Οι εθελοντική συγκατάθεση, η πληροφόρηση και η εμπιστευτικότητα των εξεταζόμενων είναι οι σημαντικότερες ηθικές αρχές των γενετικών δοκιμασιών. Στα έγγραφα της Ανεξάρτητης ομάδας εμπειρογνομόνων της Ευρωπαϊκής Ένωσης, 19-20 Νοεμβρίου 1999, αναφέρεται ότι «η γενετική δοκιμασία είναι κάθε δοκιμή που αποκαλύπτει τα γενετικά δεδομένα». Σημειώνεται επίσης ότι οι κύριοι κίνδυνοι των γενετικών τεστ είναι η κοινωνικές και ψυχολογικές συνέπειες.

Οι βασικές διατάξεις της βιοηθικής διατυπωμένες στα έγγραφα της ΠΟΥ το 1999-2001 περιλαμβάνουν 13 βασικά σημεία (πρωτόκολλο) που κατευθύνουν τους γενετικούς ελέγχους [65].

1. Διανομή των δημόσιων πόρων υπέρ των πιο φτωχών (η αρχή της δικαιοσύνης).
2. Ελευθερία επιλογής σε σχέση με την επίλυση των γενετικών προβλημάτων του καθενός (αρχή της αυτονομίας του ατόμου).
3. Εθελοντική συγκατάθεση ασθενών στους γενετικούς ελέγχους και την θεραπεία, δηλαδή έλλειψη καταναγκασμού από την κυβέρνηση, την κοινωνία και τους επαγγελματίες στον τομέα υγείας (αυτονομία του ατόμου).
4. Σεβασμός των ανθρώπινων διαφορών και εκείνων, η γνώμη οποίων είναι στην μειοψηφία (αυτονομία, αρχή «μη βλάπτεις»).
5. Σεβασμός της νοημοσύνης, ανεξάρτητα από το επίπεδο της γνώσης του εξεταζόμενου (αυτονομία).
6. Επιμόρφωση της κοινωνίας, των ιατρών, των εκπαιδευτικών, των θρησκευτικών προσώπων στα ζητήματα της γενετικής (όφελος)
7. Στενή συνεργασία με τους ασθενείς και τους οργανισμούς απασχόλησης των ασθενών (αυτονομία).
8. Πρόληψη διακρίσεων ή προτιμήσεων βασισμένων σε γενετικές πληροφορίες, στην απασχόληση, στην ασφάλιση και στην εκπαίδευση («μη βλάπτεις»).
9. Συνεργασία με άλλους επαγγελματίες με στόχο τη προσέλκυση στην «ομάδα ασθενών» των οικογενειών τους (η «αρχή της αμοιβαιότητας» στις οικογένειες

- προβλέπει μια σειρά ηθικών υποχρεώσεων των συζύγων και των μελών της οικογένειάς τους όσον αφορά την ανταλλαγή πληροφοριών που αποκτώνται μέσω γενετικών δοκιμασιών).
10. Η επικοινωνία με τους ασθενείς και τους συγγενείς τους να γίνει σε κατανοητή γλώσσα, με σεβασμό για τον ασθενή ως άτομο (αυτονομία).
 11. Τακτική επικοινωνία με τον ασθενή στη περίπτωση υποστηρικτικής θεραπείας (αρχή «μη βλάψεις»).
 12. Μη διεξαγωγή των δοκιμών και διαδικασιών χωρίς τις ιατρικές ενδείξεις (η διάταξη αυτή δεν ισχύει για προληπτικά γενετικά τεστ).
 13. Συνεχής παρακολούθηση της ποιότητας υπηρεσιών, συμπεριλαμβανομένης της ποιότητας των γενετικών τεστ (αρχή «μη βλάψεις»).

Όλες αυτές οι αρχές της ιατρικής γενετικής έχουν διατυπωθεί από το 1997 και σχετίζονται τόσο με την γενετική υπηρεσία στο σύνολό της όσο και με τις επιμέρους κατευθύνσεις της: γενετική συμβουλευτική, γενετικός έλεγχος, προ-συμπτωματικοί (προγνωστικοί) έλεγχοι, λειτουργία των τραπεζών DNA, των βάσεων δεδομένων DNA κλπ.

Τα ηθικά προβλήματα που προκύπτουν από τις δοκιμασίες των γονιδίων προδιάθεσης σε κοινές ασθένειες έχουν τα δικά τους χαρακτηριστικά, κυρίως επειδή οι πληροφορίες αυτές είναι πιθανολογικής φύσεως. Η κατάσταση περιπλέκεται από το γεγονός ότι στην πολυγονιδιακή κληρονομιά των MFDs δεν εμπλέκεται ένα, αλλά πολλά γονίδια προδιάθεσης που το καθένα ξεχωριστά συμβάλλει ελάχιστα στην ανάπτυξη της νόσου, παράλληλα το σημαντικό ρόλο στη παθογένεια παίζει και το εξωτερικό περιβάλλον [112].

Προκαλεί το ενδιαφέρον και την προσοχή τα τελευταία χρόνια η εξέλιξη των απόψεων σχετικά με τις προγνωστικές γενετικές εξετάσεις. Σημειώνοντας ότι οι δοκιμές προδιάθεσης σε κοινές ασθένειες (ανάλυση γονιδίων με χαμηλή διείσδυση) ακόμα δεν φαίνεται να έχουν κλινική σημασία, η ΠΟΥ διευρύνει σταδιακά τις δυνατότητες χρήσης των δοκιμών αυτών, υπό την προϋπόθεση ότι θα τηρηθούν καθορισμένες ηθικές αρχές.

Συνεπώς, μέχρι το 2003, ο ΠΟΥ πρότεινε τη διεξαγωγή των δοκιμών αυτών μόνο σε περιπτώσεις όπου τα αποτελέσματά τους μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την πρόληψη ή θεραπεία μιας ασθένειας, υπό την προϋπόθεση, ότι ο ασθενής είναι πλήρως ενημερωμένος και δίδεται η εθελοντική συγκατάθεση του. Ότι αφορά τις συχνές MFDs

επιτρέπονται οι προ-εμφυτευτικοί γενετικοί έλεγχοι στα άτομα υψηλού κινδύνου για την εκτίμηση κινδύνου εμφάνισης ασθενειών και για τον προσδιορισμό των μεμονωμένων μέτρων πρόληψης [65].

Ο ΠΟΥ επιτρέπει αυτή τη στιγμή τη δοκιμή γενετικής προδιάθεσης, εφόσον πληρούνται οι ακόλουθες προϋποθέσεις: [191]

- ✓ Οι δοκιμές στα άτομα με συσσώρευση οικογενής φύσεως καρδιαγγειακών, ογκολογικών και άλλων ασθενειών, υπό την προϋπόθεση ότι οι πληροφορίες που λαμβάνονται μπορούν να χρησιμοποιηθούν αποτελεσματικά για την πρόληψη και τη θεραπεία τους.
- ✓ Στις «προδιαθεσιακές» δοκιμές πρέπει να προηγούνται κατάλληλες πληροφορίες που να εξηγούν στον εξεταζόμενο τις δυνατότητες και τους περιορισμούς γενετικής εξέτασης.
- ✓ Οι δοκιμές θα πρέπει να είναι εθελοντικές, με βάση την συνειδητή συναίνεση του ασθενούς.
- ✓ Δεν έχουν δικαίωμα πρόσβασης στα αποτελέσματα των γενετικών εξετάσεων οι εργοδότες, ασφαλιστικές εταιρείες, σχολεία, κυβερνητικές υπηρεσίες και άλλα τρίτα πρόσωπα.
- ✓ Οι προ συμπτωματικοί έλεγχοι θα πρέπει να είναι διαθέσιμοι σε ενήλικες υψηλού κινδύνου που επιθυμούν να δοκιμαστούν ακόμη και εάν δεν υπάρχει θεραπεία, μετά από κατάλληλη συμβουλευτική, ενημέρωση και εθελοντική συγκατάθεση.

Είναι σημαντικό να εκτιμηθεί η κατάρτιση των ιατρών και του πληθυσμού στον τομέα της γενετικής. Υπάρχει κίνδυνος σοβαρών ψυχολογικών επιπτώσεων.

Ο σεβασμός του δικαιώματος ενός ατόμου να λαμβάνει οποιοσδήποτε πληροφορίες σχετικά με το γονιδίωμα του σε όλα τα στάδια γενετικών δοκιμασιών, τονίστηκε επανειλημμένα στις σχετικές συστάσεις πολλών χωρών [66, 190, 192]. Οι πληροφορίες αυτές είναι ιδιαίτερα σημαντικές στην εύρεση εργασίας, στην ασφάλιση ή στις οικογενειακές σχέσεις. Το 1998, ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας εξέδωσε μια διάταξη σύμφωνα με την οποία «οι εργοδότες, οι ασφαλιστικές εταιρείες, τα σχολεία, τα κρατικά ή άλλα ιδρύματα καθώς και τα τρίτα πρόσωπα δεν έχουν δικαίωμα πρόσβασης στα αποτελέσματα γενετικών δοκιμασιών» [192]. Συνεπώς, όλες οι τράπεζες δεδομένων που περιέχουν τις

πληροφορίες γενετικών εξετάσεων υποχρεούνται να έχουν αξιόπιστη προστασία από κάθε ενδεχόμενη επέμβαση τρίτων. Για την αποφυγή των πιθανών διακρίσεων, ορισμένες χώρες έχουν υιοθετήσει ένα αντίστοιχο μορατόριουμ. Οι κύριες 13 αρχές δεοντολογίας που πρέπει να ακολουθούνται κατά τη συλλογή και αποθήκευση των δεδομένων DNA, σημαντικών για την κλινική έρευνα, συζητούνται σε ειδικό άρθρο, αφιερωμένο στην οργάνωση της Διεθνούς βάσης δεδομένων για το ειδικό τόπο (Locus-specific databases) [193]. Η βάση δεδομένων θα περιέχει όλες τις πληροφορίες, σχετικές με τις πολυμορφικές θέσεις και τις μεταλλάξεις που έχουν ήδη αναγνωριστεί στο ανθρώπινο γονιδίωμα. Διατίθεται στο Διαδίκτυο για το κοινό και προορίζεται για ευρεία χρήση από τους κλινικούς και επιστήμονες που εργάζονται στον τομέα λειτουργικής γονιδιωματικής. Η βάση δεδομένων εγγυάται την ανωνυμία πληροφοριών, την πλήρη εμπιστευτικότητα που παρέχεται από μια ειδική δεοντολογική επιτροπή. Τις πληροφορίες (βάσεις δεδομένων) σχετικές με τις παραλλαγές του ανθρώπινου γονιδιώματος μπορεί να τις βρει κανείς στην παρακάτω ηλεκτρονική διεύθυνση:

<http://www.humanvariomeproject.org/index.php?p=News>

Παρά τους πολυάριθμους κανονισμούς και αποφάσεις, οι προγνωστικοί γενετικοί έλεγχοι έχουν πολλά ακόμα δεοντολογικά προβλήματα που απαιτούν επείγουσες λύσεις. Συγκεκριμένα, σύμφωνα με τους ισχύοντες κανονισμούς, τα αποτελέσματα των γενετικών εξετάσεων θα πρέπει να εξηγούνται πλήρως από το γενετιστή στον εξεταζόμενο. Ωστόσο, παραμένει αρκετά λεπτό το ερώτημα, **πότε και πώς να παρέχονται στον εξεταζόμενο η δυσάρεστες πληροφορίες για την υγεία του;** Είναι επιθυμητό οι πληροφορίες αυτές να κοινοποιούνται στους εξεταζόμενους μετά από κατάλληλη ψυχολογική προετοιμασία. Ίσως σε ορισμένες περιπτώσεις η δυσάρεστη πληροφόρηση, λαμβάνοντας υπόψη τις ιδιαιτερότητες ψυχικής κατάστασης του ασθενούς, μπορεί να καθυστερήσει. Η δοκιμή των κληρονομικών ασθενειών με τη καθυστερημένη εκδήλωση, για τις οποίες δεν υπάρχουν αποτελεσματικές μέθοδοι θεραπείας (χορεία του Huntington και κάποιες άλλες νευροεκφυλιστικές ασθένειες), συνιστάται **μόνο αφού ο ασθενής φθάσει στην ενηλικίωση, όταν έχει το δικαίωμα και είναι σε θέση να αποφασίσει κατά πόσο χρειάζεται τις πληροφορίες αυτές.** Θα πρέπει, ωστόσο, να ληφθεί υπόψιν ότι τα δυσμενή αποτελέσματα των γενετικών εξετάσεων τέτοιων ασθενειών συχνά συνοδεύονται από βαθιά κατάθλιψη και ακόμη από απόπειρες αυτοκτονίας.

Είναι περισσότερο δικαιολογημένες οι δοκιμασίες διαφόρων ασθενειών, η γενετική φύση των οποίων έχει μελετηθεί καλά, για παράδειγμα, ο καρκίνος του μαστού, ο οικογενής πολυποδικός καρκίνος παχέος εντέρου, η νόσος Alzheimer και οι κακοήθεις όγκοι του θυρεοειδούς. Σε αυτές τις περιπτώσεις, η δοκιμή θα πρέπει να υποστηρίζεται και να συνιστάται, εφόσον η αναγνώριση της μετάλλαξης στα αντίστοιχα γονίδια καθιστά δυνατή την ταυτοποίηση ασυμπτωματικών φορέων στους οποίους μπορεί να συνταγογραφηθεί κατάλληλη προληπτική θεραπεία και συνιστώνται τα απαραίτητα προληπτικά μέτρα.

Τέτοιες καταστάσεις μπορεί να παρουσιαστούν μόνο με **προγνωστικές εξετάσεις**, δηλαδή με το έλεγχο μεταλλάξεων που ευθύνονται για την εμφάνιση ασθενειών με καθυστερημένη εκδήλωση (οικογενής καρκίνος παχέος εντέρου, χορεία Huntington, κάποιες μορφές καρκίνου του μαστού, κληρονομικές μορφές Alzheimer ή Parkinson, κλπ.).

Στην περίπτωση των **προγνωστικών γενετικών δοκιμών**, η παρουσία παρόμοιων καταστάσεων είναι σχεδόν αδύνατη. Δεδομένης της αμιγώς πιθανολογικής φύσεως της γενετικής πρόγνωσης, στην εξατομικευμένη ιατρική, γενικά πρέπει να αποφεύγονται οι έννοιες όπως «καλά» ή «κακά» γονίδια. Η ίδια η αναφορά των «κακών» γονιδίων από έναν ιατρό μπορεί να έχει τις δυσμενείς κοινωνικές και ψυχολογικές συνέπειες. Αντίθετα, σε μια συζήτηση με τον ασθενή, θα πρέπει να επικεντρωθεί η προσοχή στην έκκληση του για προληπτικούς ελέγχους, στη δυνατότητα διόρθωσης της λειτουργίας του γονιδιώματός του με δίαιτα, με συμπληρώματα διατροφής, στις αλλαγές του τρόπου ζωής, στην απομάκρυνση των «κακών» συνηθειών και εάν χρειαστεί, στη λήψη φαρμάκων [85]. Επιπλέον, είναι απαράδεκτες **οι διακρίσεις** εις βάρος προσώπων με θετικά αποτελέσματα των προ-συμπτωματικών τεστ, λαμβάνοντας υπόψη την κακή επίδραση των παραπάνω διακρίσεων στην ψυχολογική τους ευημερία. Τα άτομα αυτά αν μη τι άλλο κατά τη διάρκεια των δοκιμών και πριν λάβουν τα αποτελέσματα ήταν «υγιή», τουλάχιστον έτσι πίστευαν. Πρέπει να τονιστεί ότι η υπερβολική κατευθυντικότητα της γενετικής και ιατρικής συμβουλευτικής μπορεί να οδηγήσει στον **στιγματισμό** του ατόμου που δοκιμάζεται, δηλαδή να θεωρηθεί ότι συμπεριλαμβάνεται από τη προ-συμπτωματική περίοδο στην **ομάδα ασθενών** [65]. Είναι σημαντικό ο εξεταζόμενος να έχει πλήρη επίγνωση της ίδιας της δοκιμής, του σκοπού της, των δυνατοτήτων πρόβλεψης και των περιορισμών. Συγκεκριμένα, να είναι ενήμερος για την αδυναμία **ακριβούς** πρόγνωσης της νόσου, ακόμη περισσότερο για το χρόνο εμφάνισης της ή της σοβαρότητας της. Ο ιατρός δεν επιμένει στη διεξαγωγή των

γενετικών εξετάσεων, πρέπει να δείξει κατανόηση για την ελεύθερή επιλογή ενός εξεταζόμενου στη συμμετοχή του στη γενετική έρευνα, να σέβεται το δικαίωμά του **να γνωρίζει ή να μην γνωρίζει τα αποτελέσματα των γενετικών εξετάσεων** [194].

Ο εξεταζόμενος πρέπει ο ίδιος να ενδιαφέρεται για τη δοκιμή και για τα αποτελέσματά της. Ωστόσο, δεν απευθύνεται ο ίδιος στο εργαστήριο, **ο θεράπων ιατρός θα πρέπει να κατευθύνει την ανάλυση**, και ακόμη καλύτερα, ένας γενετιστής που είναι επαρκώς ενημερωμένος στον τομέα της προγνωστικής ιατρικής. Η επιθυμία των ασθενών να υποβάλλονται σε γενετικές εξετάσεις για καρδιακές παθήσεις, αγγειακές παθήσεις, καρκίνο, διαβήτη, μαιευτική παθολογία, για την οποία υπάρχει ήδη αρκετή εμπειρία, θα πρέπει να ενθαρρύνεται. Παρόμοιες επιθυμίες ιδιαίτερα παρουσιάζονται σε οικογένειες υψηλού κινδύνου, όπου υπάρχει ήδη ασθενής με γνωστές αλληλόμορφες παραλλαγές όλων των γονιδιακών δεικτών των αντίστοιχων πάνελ (θρομβοφιλία, ιδιοπαθής υπέρταση, υπερχοληστεραιμία κλπ.). Έχουν προσδιοριστεί με ακρίβεια τα γονίδια δείκτες και τα λειτουργικά ελαττωματικά τους αλληλόμορφα για συχνές ασθένειες όπως η οστεοπόρωση, το άσθμα, η ενδομητρίωση, η προεκλαμψία, οι καρδιαγγειακές παθήσεις, ο διαβήτης. Φυσικά, τα πιο πειστικά στοιχεία που αποδεικνύουν τη χρησιμότητα των προγνωστικών γενετικών εξετάσεων μπορούν να ληφθούν μόνο υπό συνθήκες προοπτικών γενετικών μελετών, αλλά παρόμοιες μελέτες είναι χρονοβόρες και περιορίζονται σε μερικές μόνο ασθένειες: τις καρδιαγγειακές [195] και το άσθμα [196].

Αυτές οι πληροφορίες είναι σημαντικές για την πρόληψη ή τη θεραπεία της νόσου τόσο για τον εξεταζόμενο, όσο και τους στενούς του συγγενείς. Συνεπώς, ορισμένες φορές, είναι απαραίτητο ο ιατρός να τον (την) βοηθήσει να πάρει τη σωστή απόφαση αποκάλυψης των γενετικών πληροφοριών στο οικογενειακό του (της) περιβάλλον, ειδικά εάν τα στοιχεία αυτά είναι σημαντικά για την υγεία τους. Παράλληλα, **η αρχή της μη κατευθυντικότητας της ιατρικής γενετικής συμβουλευτικής δεν επιτρέπει στον ιατρό να επιβάλλει τη γνώμη του**. Λόγω όλων αυτών των συνθηκών, εκφράζεται μια αρκετά λογική άποψη ότι αντί της συνηθισμένης «**ενημερωμένης εθελοντικής συναίνεσης**» για τον γενετικό έλεγχο, θα πρέπει να ζητηθεί από τον ασθενή να συνάψει μια «**ενημερωμένη σύμβαση**» που δημιουργεί μια πιο εμπιστευτική επαφή μεταξύ ενός ιατρού και ενός ασθενούς [194].

Σύμφωνα με τους διεθνείς κανόνες [66], σε ορισμένες περιπτώσεις όταν η υγεία των συγγενών του εξεταζόμενου απειλείται από ρεαλιστικό κίνδυνο που μπορεί να αποφευχθεί, οι πληροφορίες σχετικά με τον υψηλό γενετικό κίνδυνο μπορούν να δοθούν απευθείας σε συγγενείς.

Συμπέρασμα-Συζήτηση

Για την κατανόηση της φύσης οποιουδήποτε ποσοτικού γνωρίσματος, καθώς και των MFDs, δεν είναι αρκετό να εντοπιστούν τα «υπεύθυνα» γονίδια», είναι επίσης απαραίτητο να αναλυθεί η έκφρασή τους σε διαφορετικά στάδια ανάπτυξης, οι παράγοντες και οι επιγενετικοί μηχανισμοί ρύθμισης τους σε διάφορα επίπεδα: μοριακά, βιοχημικά, κυτταρικά και διακυτταρικά. Επίσης, για να κατανοήσουμε την παθογένεση των MFDs από τη σκοπιά της βιολογίας συστημάτων, είναι απαραίτητο να διασαφηνιστεί η δομή των γονιδιακών δικτύων MFD, η έκφρασή τους, οι ιδιότητες και αλληλεπιδράσεις των προϊόντων «υπεύθυνων» γονιδίων και η κατάσταση των μεταβολικών οδών [197].

Μια νέα πρόοδος στη προγνωστική ιατρική σημειώθηκε μετά το 2010 και συσχετίστηκε με την ταχεία εξέλιξη των τεχνολογιών και με τη μείωση του κόστους προσδιορισμού του πλήρους γονιδιώματος, της λεγόμενης αλληλούχισης επόμενης γενιάς (NGS). Η εφαρμογή αυτής της μεθόδου επέτρεψε σε ένα σχετικά σύντομο χρονικό διάστημα (1,5 έτη) να διεξαγάγει την αλληλούχιση των γονιδιωμάτων σχεδόν 2000 Ευρωπαίων (2013), να ξεκινήσει η αλληλούχιση γονιδιώματος 100.000 ιθαγενών στο Ηνωμένο Βασίλειο (2015) και 200.000 ατόμων στη Βόρεια Αμερική (2015).

Ένα σημαντικό γεγονός για προγνωστική ιατρική τα τελευταία χρόνια ήταν η δημιουργία Ευρωπαϊκού Συνδέσμου «4P Medicine» και η ανάπτυξη ενός πολυετούς στρατηγικού προγράμματος για την εφαρμογή του «4P» στην κλινική πράξη. Ο «οδικός χάρτης» από τη γονιδιωματική στην εξατομικευμένη ιατρική αποτελείται από 4 διαδοχικά στάδια, έχει σχεδιαστεί για 30 χρόνια και περιλαμβάνει τα ακόλουθα καθήκοντα:

- Λεπτομερής ανάλυση των πολυάριθμων αναλυθέντων γονιδιωμάτων διαφορετικών ατόμων και των κυττάρων διαφόρων ανθρώπινων ιστών,
- Ανάλυση των πληθυσμιακών και εθνικών ιδιοτήτων των γονιδιωμάτων, η ανάπτυξη των θεμελίων της «στρωματοποιημένης» ιατρικής,
- Ενσωμάτωση / ολοκλήρωση (integration) των μεμονωμένων γονιδιωμάτων με τις μεταγραφόμενες τους αλυσίδες, τις πρωτεΐνες και τους μεταβολίτες τους με σκοπό τη διαμόρφωση των εξατομικευμένων γενετικών δεδομένων (omics),

- Κλινικές δοκιμές: ο συνδυασμός δεδομένων των μεμονωμένων γονιδιωμάτων, των πλατφόρμων έκφρασης, των εργαστηριακών εξετάσεων, των κλινικών συμπτωμάτων και της γενετικής συμβουλευτικής,
- Εικονικά μοντέλα των ολοκληρωμένων (integrated) γονιδιακών δικτύων των πασχόντων οργάνων και συστημάτων,
- Ασθενείς και πολίτες ως δότες και παραλήπτες των δεδομένων εξατομικευμένης ιατρικής,
- Συνεργασία με τους ασθενείς στον «εικονικό κόσμο» (εννοείται ότι σε ένα συγκεκριμένο στάδιο ανάπτυξης «4P Medicine», δεν υπάρχει ανάγκη για έναν «πραγματικό» ασθενή, τα πάντα για ένα άτομο και τις μελλοντικές του ασθένειες μπορούν να αναγνωριστούν από το «ολοκληρωμένο γονιδίωμα» ή γενετικό προφίλ) [198].

Σχεδόν ταυτόχρονα με το Ευρωπαϊκό πρόγραμμα «4P Medicine» με πρωτοβουλία του επικεφαλής Διεθνούς Προγράμματος, τώρα διευθυντή του Εθνικού Ινστιτούτου Υγείας, Francis Collins δημιουργήθηκε το Patient-Centered Outcomes Research Institute (PCORI) (Ινστιτούτο Έρευνας για τα Αποτελέσματα των Ασθενών) για να συνδυάσει τα ιατρικά αρχεία των ασθενών με τα αποτελέσματα των εργαστηριακών εξετάσεών τους και με τα δεδομένα του προσωπικού γονιδιώματός τους για τη βελτίωση της ποιότητας διάγνωσης, πρόληψης και θεραπείας των συχνών ασθενειών. Τον Φεβρουάριο του 2015, η πρωτοβουλία αυτή υποστηρίχθηκε από τον Πρόεδρο των Ηνωμένων Πολιτειών, του οποίου η σειρά σηματοδότησε την έναρξη του προγράμματος Ιατρικής Ακρίβειας (Precision Medicine). Το κλειδί για την επιτυχή εφαρμογή του προγράμματος, σύμφωνα με τον γνωστό επιστήμονα στην ανθρώπινη γονιδιωματική, τον Eric Lander, είναι η ταχεία ανάπτυξη της υψηλής απόδοσης αλληλούχησης γονιδιώματος νέας γενιάς (NGS) και η παρουσία των αντιπροσωπευτικών βιοτραπεζών DNA που περιέχουν εκατομμύρια δείγματα DNA από υγιή και πάσχοντα άτομα [199]. Πράγματι, η αλληλούχηση ολόκληρου του γονιδιώματος στους 50.726 ενήλικους και ο συνδυασμός των ληφθέντων αποτελεσμάτων με τα δεδομένα των αντίστοιχων ιατρικών ηλεκτρονικών αρχείων, διαπίστωσαν ότι κάθε τριακοστό άτομο στο γονιδίωμα έχει επικίνδυνες γενετικές παραλλαγές που υποδηλώνουν τις σοβαρές πολυπαραγοντικές ασθένειες [200]. Με πλήρη αλληλούχηση των 950 φαινοτυπικά υγιών ατόμων ηλικίας 45-60 ετών, σε περίπου 100 δότες, εντοπίστηκαν επικίνδυνες μεταλλάξεις,

υποδηλώνοντας τις MFD. Επιπλέον, σε 34 συμμετέχοντες σε αυτές τις κλινικές μελέτες βρέθηκαν συμπτώματα ασθενειών που σχετίζονται με τα αντίστοιχα γονίδια [201].

Η μη επιλεκτική αλληλούχιση των γονιδιωμάτων του πληθυσμού και η σύγκριση των ληφθέντων αποτελεσμάτων με τα κλινικά δεδομένα, παρέχει σημαντικές πληροφορίες για τη προγνωστική ιατρική. Θεωρείται, ότι τα προσεχή χρόνια, το Πρόγραμμα «ιατρική Ακρίβειας» θα έχει στη διάθεση της εκατομμύρια ηλεκτρονικών χαρτών υγείας, συμπληρωμένων με αντίστοιχα γονιδιώματα που έχουν αναλυθεί, το λεγόμενο «γενετικό ηλεκτρονικό προφίλ υγείας». Για να επιταχυνθεί η συλλογή των δεδομένων βάση του προγράμματος, πρέπει να συμμετέχουν στην υλοποίηση του και οι εμπορικές εταιρείες που έχουν ασχοληθεί με τις γενετικές δοκιμές στο παρελθόν (23 and Me, Pathwaygenomics), καθώς και μέσω του συστήματος iPhone των ιδιοκτητών κινητών τηλεφώνων [202].

Μια λεπτομερής μελέτη των σταδίων εφαρμογής των κληρονομικών πληροφοριών επιτρέπει την εκτίμηση του κινδύνου της νόσου με μεγαλύτερη ακρίβεια [203]. Ένα από τα σημαντικά αποτελέσματα του Προγράμματος «Ιατρική Ακρίβειας» είναι η ταυτοποίηση των **μηχανισμών ενεργοποίησης (μοριακοί οδηγοί)**, γεγονός που ανοίγει τις νέες ευκαιρίες για αποτελεσματική πρόληψη και στοχευμένη θεραπεία των MFD.

Έτσι, για τα τελευταία 20 χρόνια, η ιατρική γενετική έχει περάσει μια δύσκολη διαδρομή, από την ανάλυση των γονιδίων ως τη μελέτη ολόκληρου του γονιδιώματος, από τον έλεγχο συσχετισμών ολόκληρου του γονιδιώματος ως τη βιολογία συστημάτων των MFD, από τη μεταφραστική ιατρική ως την ιατρική Ακρίβειας, από το γενετικό προφίλ ως τον ηλεκτρονικό γονιδιωματικό χάρτη υγείας [203]. Η προγνωστική ιατρική που εμφανίστηκε στις αρχές του 21^{ου} αιώνα ξεπέρασε με επιτυχία όλες τις δυσκολίες που συνδέονται με την ταχεία πρόοδο της έρευνας στο ανθρώπινο γονιδίωμα και χάρη στις νέες τεχνολογίες, στην εισαγωγή νέων προσεγγίσεων όπως βιολογία συστημάτων και βιοπληροφορική, έγινε κορυφαία επιστημονική και πρακτική κατεύθυνση της σύγχρονης ιατρικής επιστήμης.

Η αποκωδικοποίηση του ανθρώπινου γονιδιώματος οδήγησε στη μετάβαση της παραδοσιακής ιατρικής στο μοριακό (γονιδιωματικό) επίπεδο. Τα γενετικά τεστ χρησιμοποιούνται τόσο στην προγεννητική διάγνωση και στην ογκολογία, όσο και σε άλλους τομείς της ιατρικής. Η ταχεία ανάπτυξη γονιδιωματικής υποδηλώνει ότι στο εγγύς μέλλον,

ένας άνθρωπος, ήδη από τη γέννηση του, θα λάβει τα αποτελέσματα ανάλυσης του γονιδιώματός του, συνεπώς θα έχει τις πληροφορίες για τη υπάρχουσα ή δυνητική, μη εμφανής παθολογία, για την ατομική του προδιάθεση σε συχνές πολυπαραγοντικές ασθένειες καθώς και για τη μελλοντική του φαρμακοθεραπεία. Τα αποτελέσματα της αλληλούχισης του γονιδιώματος θα ενσωματώνονται στο ιατρικό αρχείο του νεογέννητου, γεγονός που θα σηματοδοτήσει την αρχή μιας ηλεκτρονικής κάρτας υγείας. Επί του παρόντος, η πλέον «5P» ιατρική βρίσκεται ακόμα στα αρχικά στάδια ανάπτυξης της. Τα γενετικά τεστ σήμερα δίνουν τη δυνατότητα να προσδιορίζεται για συγκεκριμένο άτομο μόνο η ομάδα κινδύνου των MFD αλλά με λίγες εξαιρέσεις, δεν επιτρέπει την πραγματοποίηση των μεμονωμένων προβλέψεων για μελλοντικές ασθένειες. Λαμβάνοντας υπόψη την ταχεία εξέλιξη της γενετικής, η εισαγωγή της γνώσης σχετικά με τις δυνατότητες και τις μεθόδους της «5P» ιατρικής στην υγειονομική περίθαλψη, στην κλινική σκέψη των ιατρών φαίνεται να είναι επίκαιρη και σήμερα. Αξίζει να υπογραμμιστεί ότι οι κλινικές μελέτες και οι αναλύσεις (βιοχημικές, λειτουργικές, ορολογικές κ.λπ.) καθιστούν δυνατή μόνο την αξιολόγηση της τρέχουσας κατάστασης του οργανισμού. Ωστόσο τα γενετικά τεστ που διεξάγονται μία φορά στη ζωή είναι αυτά που παρέχουν πληροφορίες για μοναδικά χαρακτηριστικά του «κληρονομικού προγράμματος» του κάθε ατόμου.

Η συγκριτική ανάλυση των αλληλεπιδράσεων γονιδίου-γονιδίου, των επιγενετικών και εκφραστικών προφίλ, των μεταβολικών διαταραχών που σχετίζονται με την λειτουργία των αντίστοιχων υποψηφίων γονιδίων, αποτελούν τη βάση της σύγχρονης έρευνας για MFD. Τα σημαντικά επιτεύγματα στη μελέτη του ανθρώπινου γονιδιώματος, η εμφάνιση νέων μοριακών γενετικών τεχνολογιών, η επιτυχία της βιολογίας συστημάτων και της βιοπληροφορικής, διεγείρουν τη μετάβαση της ιατρικής από την μελέτη της ανατομίας του γονιδιώματος στη έρευνα γονιδιωματικής λειτουργίας, από την ανάλυση του γονιδιώματος «ηρεμίας» στην κατανόηση του δυναμικού γονιδιώματος στο αναπτυσσόμενο οργανισμό, στη βιολογία των συστημάτων του.

Έτσι, η προγνωστική ιατρική που το 2000 έκανε την εμφάνισή της, έχει υποστεί σοβαρή εξέλιξη και εξακολουθεί να διατηρεί τη επικαιρότητά της. Έχει δώσει ώθηση στη δημιουργία της «5P» ιατρικής, η οποία στο εγγύς μέλλον, μαζί με τη βιοπληροφορική και τη γενετική των συστημάτων, θα αποτελέσει αναπόσπαστο μέρος της μεταφραστικής

(στοχευμένης) ιατρικής. Είναι φανερό ότι το ήδη αναφερθέν «γενετικό προφίλ» στη μια ή την άλλη μορφή θα μετατραπεί σε κάρτα ηλεκτρονικής υγείας που θα συνδυάζεται με ατομικά γονιδιωματικά δεδομένα. Η εισαγωγή των τεχνολογιών υψηλής απόδοσης και η δημιουργία γενικευμένων γενετικών και κλινικών βάσεων δεδομένων είναι μια πορεία προς τη «ιατρική Ακρίβειας» του μέλλοντος. Η ανάπτυξη και εφαρμογή των διεθνών προγραμμάτων μεγάλης κλίμακας όπως «5P Medicine» με στόχο την ανάλυση των συσχετίσεων μεταξύ των αλλαγών στο γονιδίωμα και των χαρακτηριστικών της φαινοτυπικής τους έκφρασης/εκδήλωσης, συμπεριλαμβανομένης της MFD υποδεικνύει τη συνάφεια / επικαιρότητα, την προοπτική και την πρακτική σημασία των μελετών που γίνονται σήμερα.

Ένα από τα διδάγματα του Προγράμματος Ανθρώπινου Γονιδιώματος και των άλλων «σημαντικών επιστημονικών ξεκινήματων» ήταν ότι τα δεοντολογικά, νομικά και κοινωνικά θέματα πρέπει να είναι στο επίκεντρο της κάθε προσπάθειας και τα όριά τους να τεθούν από την αρχή. Εκπληρώνοντας τις προσδοκίες του προγράμματος «Ιατρική Ακρίβειας», εκτός των άλλων επιτευγμάτων, μια σταθερή ηθική βάση για την κλινική και τη μεταγραφική γονιδιωματική θα απαιτηθεί, ειδικά στα θέματα ογκολογίας.

Αναφορές

1. Mudrov M. Selected Works. Moscow: Publishing House of the USSR Academy of Medical Sciences; 1949; p. 295.
2. Streich S. Comments on "Sevastopol Letters and Memories of NI Pirogov". Publishing House of the Academy of Sciences of the USSR; 1950; p. 551.
3. Bochkov N. Medical Genetics. Moscow: Academy; 2003; p. 192.
4. Dausset J. Biologic role of the HLA system. HLA complex in human biology in the light of associations with disease. *Transplant Proc* 9; 1977; pp. 523-529,
5. Nefedova Yu, Schwarz E. Molecular genetic mechanisms in the development of arterial hypertension. *Arterial hypertension*. 1998; Vol. 4 (1); pp. 63–71.
6. Baranov V, Ivaschenko T, Bakay B. [et al.] Proportion of the GSTM1 0/0 genotype in some Slavic populations and its correlation with cystic fibrosis and some multifactorial diseases. *Hum. Genet.* 1996; Vol. 97 (4); pp. 516–520.
7. Baranov V, Baranova E, Ivashchenko T, Aseev M. The human genome and the genes of “predisposition”: an introduction to predictive medicine. SPb.: *Intermedika*; 2000; p. 263.
8. Baranov V, Baranova E, Ivashchenko T. The human genome as a scientific basis for predictive medicine. *Genomics -medicine*; Moscow: *Academicbook*; 2005; pp. 361–379.
9. Kolchanov N, Podkolodnaya O, Ignatieva E. Integration of gene networks that control the physiological functions of the body. *VOGIS Bulletin*; 2005; Vol. 9 (2); pp. 179–199
10. Hood L, Galas D. P4 Medicine: Personalized, Predictive, Preventive, Participatory. 2008, December 12.
11. Juengst E, McGowan M, Fishman J, Settersten R. From “Personalized” to “Precision” Medicine: The Ethical and Social Implications of Rhetorical Reform in Genomic Medicine. *Hastings Cent Rep*; 2016; Vol. 46 (5): pp. 21-33.
12. Perlis R, Purcell S, Fava M, Fagerness J, Rush A, Trivedi M, Smoller J. Association between treatment emergent suicidal ideation with citalopram and polymorphisms near cyclic adenosine monophosphate response element binding protein in the STAR*D study. *Arch. Gen. Psychiatry*; 2007; 64(6): pp. 689-697.

13. Paddock S, Laje G, Charney D, Rush A, Wilson A, Sorant A. [et.al.] Association of GRIK4 with outcome of antidepressant treatment in the STAR*D cohort. *Am. J. Psychiatry*, 2007; 164(8): pp. 1181-1188.
14. Baev A. The program "Human Genome", its origin, content and development. *Human genome: Itogi nauki tekhniki*; 1990; Vol. 1: pp. 4–33.
15. Gregory S, Barlow K, McLay K. [et al.] The DNA sequence and biological annotation of human chromosome 1. *Nature*; 2006; Vol. 441: pp. 315–321.
16. Ross M. [et al.] The DNA sequence of the human X chromosome. *Nature*; 2005; Vol. 434: pp. 325–337.
17. Hamosh A, Scott A, Amberger J. [et al.] Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM). *Hum. Mutat.*; 2000; Vol. 15: pp. 57–61
18. National Human Genome Research Institute What's next? Turning Genomics Vision into Reality. 2003. April 24. Available from: www.nhgri.nih.gov. [14.01.2019].
19. Glusman G, Qin S, El-Gewely M. [et al.] A third approach to gene prediction suggests thousands of additionally transcribed regions. *PLoS Comput. Biol.*; 2006; Vol. 2 (3): p 18.
20. Sanger F, Nicklen S, Coulson A. "DNA sequencing with chain termination inhibitors". *Proc Natl Acad Sci USA*; 1977; Vol. 74: p. 5463.
21. Khalid R, Sabahuddin A. Principle, analysis, application and challenges of next-generation sequencing: a review. 2016; Cornell University Library: <https://arxiv.org/abs/1606.05254>
22. Church J. The Project "Personal Genome". In the World of Science. 2006; Vol. 4: pp. 30–39.
23. Ivanov V, Kiselev L. Genomics – Medicine. *Academicbook*; 2005; p. 392.
24. Kiselev L. The human genome and biology of the XXI century. *Vestn. RAS*; 2000; Vol. 70 (5): pp. 412–424.
25. Paltsev M. Introduction to molecular medicine. Moscow: *Medicine*; 2004; p. 499
26. Aylamazyan E, Baranov V. Prenatal diagnosis of hereditary and congenital diseases. *MED Press Inform*; 2006; p. 417.
27. Collins F. Shattuck Lecture Medical and Societal Consequences of the Human Genome Project. *New Engl. J. Med.*; 1999; Vol. 341 (1): pp. 28–37.

28. Collins F, Patrions A, Jordan E. [et al.] New goals for the US Human Genome Project: 1998–2003. *Science*; 1998; Vol. 282: pp. 682–689.
29. Ivanov V. Ethical-legal aspects of the program “Human Genome”. 1998; p. 189.
30. Mikkelsen T, Wakefield M, Aken B. Genome of the marsupial *Monodelphis domestica* reveals innovation in non-coding sequences. *Nature*; 2006; Vol. 447: pp. 167–177.
31. Popescu M, MacLaren E, Hopkins J. [et al.] Human-lineage specific amplification, Selection and Neuronal Expression of DUF1 220. *Science*; 2006; Vol. 313: pp. 1304 –1307.
32. Lander E. Array of Hope. *Nature Genet.*; 1999; Vol. 2 Suppl. 1: pp. 3–4.
33. Wright F, Lemon W, Zhao W. [et al.] A draft annotation and overview of the human genome. *Genome Biol.*; 2001; Vol. 2 (7): pp. 25–47.
34. Graham E, Rodwell J, Sonu R. [et al.] The transcriptional profile of aging in the human kidney. *PLOS Biology*; 2004; Vol. 2 (12): pp. 1–23.
35. Gorbunova V, Baranov V. Introduction to the molecular diagnosis and gene therapy of hereditary diseases. SPb .: *Special Literature*; 1997; p. 284.
36. Golubovsky M, Manton K. Genome organization and three kind of heritable changes: general description and stochastic factors. *Frontiers in Bioscience*; 2005; Vol. 10: pp. 335–344.
37. Katokhin A, Kuznetsova T, Omelyanchuk N. Mi-RNA - new regulators of gene activity in eukaryotes. *VOGIS Bulletin*; 2006; Vol. 10 (2): pp. 241– 273.
38. Echeverri Ch, Perrimon S. High-throughput RNA screening in cultured cells: a users guide. *Nature Rev.*; 2006; Vol. 7: pp. 373–384.
39. Tomolin N. Regulation of mammalian gene expression by retroelements and non-coding tandem repeats. *BioEssa*; 2008; Vol. 30: pp. 338–348.
40. Beck S. The human epigenome project. *Europ. J. Hum. Genet.* 2007; Suppl. 1: p. 47-67. (ESHG Conference: Nice Abstracts, 2007).
41. Maher B. Is it the code? The debate. *The Scientist*; 2006; Vol. 20 (5): p. 34.
42. Fogel F. Human genetics. Moscow: Mir; 1989; p. 306.
43. Wang Z. SNP’s, protein structure and disease. *Hum. Mutat.*; 2001; Vol. 17: pp. 263–270.

44. Ginter E. Medico-genetic description of the population of Adygea. Maykop: 1997; p. 223.
45. Limborskaya S. Ethnogenomics and Genogeography of the Peoples of Eastern Europe. Moscow: Nauka; 2002; p.281.
46. Khusnutdinova E. Molecular ethnogenetics of the peoples of the Volga-Ural region. Ufa: 1999; p. 237.
47. Illarioshkin S. DNA diagnostics and medical-genetic counseling in neurology. Moscow: MIA; 2002; p. 590.
48. Puzyrev V. Pathological Anatomy of the Human Genome. Novosibirsk: Science; 1997; p. 223.
49. Puzyrev V. Genomic medicine - present and future. Molecular-biological technologies in medical practice. Issue 3. Novosibirsk: Alpha Vista; 2003; pp. 3–26.
50. Connor S. Genetic breakthrough that reveals the differences between humans. 2006. Available from [http://news.independent.co.uk/world/science_technology / article2007490.ece](http://news.independent.co.uk/world/science_technology/article2007490.ece). (access date - 14. 01. 2019).
51. Barber J. K. Chromosomal copy number variation. E. C. A. Newsletter; 2008; Vol. 22: pp. 6–14.
52. International HapMap Consortium A haplotype map of the human genome. Nature; 2005; Vol. 437: pp.1299–1317.
53. Gabriel S, Schaffner S, Nguyen H. [et al.] The structure of haplotype blocks in the human genome. Science; 2002; Vol. 296 (5576): pp. 2225–2229.
54. International HapMap Consortium. A second-generation human haplotype map of over 3.1 million SNPs. Nature; 2007; Vol. 449 (7164): pp. 851-861.
55. Collins F. Delivering on the Dream. The Scientist. Magazine of Life Sciences; 2006. URL: [http: // class-sic.the-scientist.com/2006/2/1/46/1/](http://class-sic.the-scientist.com/2006/2/1/46/1/) (access date: 15.01.2019)
56. Kotulak R. Why do people get sick? Science close to answer. The Scientist; 2005; Vol. 20: p. 37.
57. Laird N. Family based design in the age of large scale gene-association. Nature; 2006; Vol. 7: pp. 385–394.

58. Cotton R. H. Towards the human variom project. *Hum. Mutat.*; 2005; Vol. 26 (6): p. 499.
59. Identification and analysis of functional elements in 1% of the human genome by the ENCODE pilot project. *Nature*; 2007; Vol. 447: pp. 799–816.
60. Kanehisa M, Goto S, Hattori M. [et.al.] From genomics to chemical genomics: new developments in KEGG. *Nucleic Acids Research*; 2006; Vol. 34 (1): pp. 354-357.
61. Kanehisa M, Goto S, Araki S. [et.al.] KEGG for linking genomes to life and the environment. *Nucleic Acids Research*; 2008; Vol.36 (1): pp. 480–484.
62. Williamson A. Creating a structural genomics consortium. *Nature Structural Biology*; 2000; Vol. 7: p. 953 (2000)
63. Guengerich F. The Environmental Genome Project: functional analysis of polymorphisms. *Environ. Health Perspect.*; 1998; Vol. 106(7): pp. 365–368.
64. Collins F. Implication of Human Genome Project for Medical Science. *JAMA*; 2001; Vol. 285 (5): pp.540–544.
65. Izhevskaya V. Medical genetics and genomics: ethical problems and approaches to their solution. *Molecular-biological technologies in medical practice*. Novosibirsk: 2003; Vol. 3: pp. 27–48.
66. EUROGAPP Project Population. *Genetics Screening Programs: Principles, Techniques, Practices and Policies*. 2000; p. 65.
67. ESHG Conference. *European J. Hum. Genet.* 2007; Vol. 15 (1).
68. Peltonen L. Dissecting Human Disease in the Postgenomic Era. *Genomics and Medicine*; 2002; Vol. 2: pp. 3–12.
69. Baranov V. *Molecular medicine - the basis of gene therapy*. 2000; Vol. 34 (4): pp. 684–695.
70. Baranov V. The program “Human Genome” as a scientific basis for preventive medicine. *Vestn. RAMS*; 2000; № 10: pp. 27–37.
71. Baranov V, Kuznetsova T, Ivashchenko T. [et.al.] Algorithms of prenatal diagnosis in St. Petersburg. *Molecular-biological technologies in medical practice* / ed. Maslennikov A. B..Novosibirsk: Alpha Vista; 2004; Vol. 5: pp. 29–80.
72. Bochkov N. The contribution of genetics to medicine. *Ros. medical messenger.*; 2001; Vol. 4: pp. 4–13.

73. Bochkov N. Human Genetics and Clinical Medicine. Vestn. RAMS ;2001; Vol.10: pp. 5–8.
74. Yankovsky N. Molecular genetic methods in the hands of a detective, or the experience of researching the remains of the family of the last Russian emperor. Soros. educate magazine.; 1996; Vol. 2: pp. 21–27.
75. Baranov V. Gene therapy: dreams, disappointments, perspectives. Med. Acad. magazine.; 2006; Vol. 6 (1): pp. 32–38.
76. Baranov V. Cytogenetics of human embryonic development. St. Petersburg: NL Publishing House; 2007; p. 640.
77. Sverdlov E. Essays on modern molecular genetics in the course of lectures for students of the biological faculty of Moscow State University. Sketch 6. Gene therapy and medicine of the XXI century. Mol. genet., mikrobiol., virusol.; 1996; Vol. 4: pp.3–32.
78. Kukes V. Metabolism of drugs: clinical and pharmacological aspects. Moscow: Refarm Publishing House; 2004; p.144.
79. Sychev D. Clinical pharmacogenetics. Moscow: GEOTAR-Media; 2007; p. 245.
80. Constans A. Making Medicine Personal.The Scientist; 2005; Vol. 16 (19): pp. 7–14.
81. Nebert D. Ecogenetics: from biology to health. Toxicol. Indust. Hlth.; 1997; Vol. 13: pp. 163–192.
82. Altman R. Challenges for biomedical informatics and pharmacogenomics. Ann. Rev. Toxicol. Pharmacol; 2001; Vol. 42: pp. 113–133.
83. Evans W. Pharmacogenomics: the inherited basis for individual differences in drug response. Ann. Rev. in Genet. Human Genomics; 2001; Vol. 2: pp. 9–39.
84. Baranov V. Determination of genetic susceptibility to some multifactorial diseases. Genetic passport. SPb: Foliant; 2001; p. 48.
85. Baranova E. DNA: acquaintance with yourself, or how to prolong youth. Moscow: AST; 2006; p. 222.
86. Caput, J. Nutritional Genomics. Discovering the path to personalized nutrition. Wiley-Interscience; 2006; p. 467.

87. Pennington S., Dunn M. Proteomics. From protein sequence to function. Trowbridge: The Cromwell Press; 2001; p. 313.
88. Inge-Vechtomov S. Genetics with the basics of selection. Moscow: *Higher School*; 1989; p. 591.
89. Singer M. Genes and genomes. Moscow: *Mir*; 1998; p. 373
90. Fields Ch. How many genes in the human genome? *Nature Genet.*; 1994; Vol. 7: pp. 345–346.
91. Gershtein M. The True Life of Pseudogenes. *In the World of Science*; 2006; Vol. 11: pp. 47–53.
92. Gaytskhoki V. Informational RNA of animal cells. Moscow: *Medicine*; 1980; p. 199.
93. Ivanov V, Baryshnikova N, Bileva J. [et.al]. Genetics. Moscow: *Akademkniga*; 2006; p. 638.
94. Korochkin L. Biology of Individual Development. Moscow: *Izdvo MU*; 2002; p. 263.
95. Vasiliev V. Genetic bases of mitochondrial diseases. SPb: 2006; p. 146 .
96. Gorbunova V. Molecular basis of medical genetics. SPb: *Intermedika*; 1999; p.213.
97. Cavalli-Sforza L. Inference of human evolution through cladistic analysis of nuclear DNA restriction polymorphisms. USA; *Proc Natl Acad Sci.*; 1994; Vol. 91 (14): pp. 6515-6519.
98. Van Ommen G. The Human Genome Project and the future of diagnostics, treatment and prevention. *Lancet*; 1999; Vol. 354 (1): pp. 5–10.
99. Estivill H, Bancells C, Ramos C. [et al.] Geographic distribution and regional origin of 272 cystic fibrosis mutations in european populations. *Human Mutation*; 1997; Vol. 10: pp. 135–154.
100. Ivaschenko T. Biochemical and molecular genetic basis of the pathogenesis of cystic fibrosis. SPb: *Intermedika*; 2002; p. 255.
101. Ginter E. Medical genetics. Moscow: *Medicine*; 2003; p. 447.
102. Bochkov N. Clinical genetics. Moscow: *GEOTAR-MED*; 2001; p.1447.
103. Cotton R. Proof of “Disease causing” mutations. *Hum. Mut.*; 1998; Vol. 12: pp. 1–3.
104. Krawczak M. Mutation process in pathology and evolution. Human Genome Evolution. N. Y.: *Bios Scient. Publ.*;1996; pp. 1–34.

105. Baudet A. The ad hoc Committee on Mutation Nomenclature. Update of nomenclature for human gene mutations. *Hum. Mutat.*; 1996; Vol. 8: pp. 197–202.
106. Den Dunnen J, Antonarakis S. Mutation Nomenclature Extensions and Suggestions to Describe Complex Mutations: A Discussion. *Human Mutation*; 2000; Vol. 15(1): pp. 7-12.
107. Arefev V. The English-Russian Explanatory Dictionary of Genetic Terms. Moscow: *VNIRO*; 1995; p. 406.
108. Rychkov Yu, Balanovskaya E, Zhukova O. [et. al.] Gene pool, genogeography and morbidity of the population. *Advances in modern genetics*. Moscow: *Nauka*; 1996; p. 205.
109. Loukopoulos D. Haemoglobinopathies in Greece: prevention programme over the past 35 years. *Indian J.Med Res.*; 2011; Vol.134(4): pp. 572–576.
110. Novikov P. Congenital and hereditary diseases: a guide to pediatrics. Moscow: *Dynasty*; 2007; p. 542.
111. Beery T. Risk reduction and health promotion behaviors following genetic testing for adult-onset disorders. *Genetic Testing*; 2000; Vol. 11 (2): pp. 111–117.
112. Baranov V. Genetic passport - the basis of individual and predictive medicine. SPb.: *Publishing House N-L*; 2009; p. 528.
113. Lobashev M. Genetics. *Leningrad: Publishing House of State University*; 1969; p. 761.
114. Kolchanov N, Ananko E, Kolpakov F. [et.al.] Gene networks. *Molecular Biology*. 2000; Vol. 34 (4): pp. 617–629.
115. Stepanenko I. Regulation of gene networks of the stress response by active forms of oxygen. *Ekol. genetics.*; 2004; Vol 2 (1): pp. 4–12.
116. Nebert D. Polymorphisms in drug metabolising enzymes: what is their clinical relevance and why do they exist? *A. J. Hum. Genet.*; 1997; Vol. 60: pp. 265–271.
117. Barnoy S. Genetic testing for late-onset diseases: effect of disease controllability, test predictivity, and gender on the decision to take the test. *Genetic testing*; 2007; Vol. 11 (2): pp. 187–193.

118. Funalot B, Nichols W, Perez-Tur J. [et al.] Genetic screening for two LRRK2 mutations in french patients with idiopathic Parkinson's disease. *Genet. Testing*; 2006; Vol. 10 (4): pp. 290–297.
119. Kay D, Bird T, Zabetlan C. [et al.] Validity and Utility of a LRRK2 G2019S mutation test for the diagnosis of Parkinson's disease . *Genet. Test.*; 2006; Vol. 10 (3): pp. 221–227.
120. Puzyrev V. Genetic Diversity of the Population and Human Diseases. Tomsk: *Printed Manufactory*; 2007; p. 320.
121. Baranov V, Gorbunova V, Vakharlovsky V. [et al.] Hereditary diseases. Medical laboratory diagnostics (programs and algorithms). SPb .: Intermedika; 1997; Vol. 3: pp. 180–202.
122. Anaible from: [accessed 12/04/2016] <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/1993/mullis/facts/>
123. Southern E. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.*; 1975; Vol. 98 (3): pp. 503–517.
124. Ivashchenko T. Methods of molecular diagnosis of gene diseases. Medical laboratory technologies: a reference book. SPb: Intermedika; 1999; Vol. 2: pp. 603–617.
125. Harrington S. Molecular Clinical Diagnostics .Moscow: Mir; 1999; p.558.
126. Eiken H, Odland E, Boman H. [et al.] Application of natural and amplification created restriction sites for the diagnosis of PKU mutations. *Nucleic Acids. Res*; 1991; Vol. 19 (7): pp.1427–1430.
127. Newton C, Summers C, Schwarz M. [et al.] Amplification refractory mutation system for prenatal diagnosis and carrier assessment in cystic fibrosis. *Lancet*; 1989; Vol. 30: pp. 1481–1482.
128. Eaker S, Johnson M, Jenkins J. [et al.] Detection of CFTR mutations using ARMS and low-density microarrays. *Biosens. Bioelectron*; 2005; Vol. 15 (21): pp. 933–999.
129. Landegren U. Ligation-based DNA diagnosis. *BioAssays*;1993; Vol. 15 (11): pp. 761–765.

130. Reiss J. Polymerase chain reaction and its potential role in clinical diagnostics and research. *J. Intern. Med*; 1991; Vol. 230: pp. 391–395.
131. Griadunov D. Development of polymerase chain reaction methods on oligonucleotide microchips for specific identification of microorganisms and determination of their drug sensitivity. Moscow: 2002.
132. Gibson U. A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome. Res*; 1996; Vol. 6 (10): pp. 995–1001.
133. Heid C. Real time quantitative PCR. *Genome. Res*; 1996; Vol. 6 (10): pp. 986–994.
134. Oefner P. Comparative DNA sequencing by denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC). *Am. J. Hum. Genet*; 1995; Vol. 57: p. 266.
135. Myers R. Detection of single nucleotide substitutions in DNA: cleavage by RNase and denaturing gradient gel electrophoresis. *Genome analysis: methods*. Moscow: Mir; 1990; pp. 123–175.
136. Lin D, Goldstein J, Mhatre A. [et al.] Assessment of denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC) in screening for mutations in Connexin 26 (GJB2). *Hum. Mutat*; 2001; Vol. 18: pp. 42–51.
137. Fodde R. Mutation detection by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). *Hum. Mutat*; 1994; Vol. 3 (2): pp. 83–94.
138. Lerman L. Computational simulation of DNA melting and its application to denaturing gradient gel electrophoresis. *Methods Enzymol*. 1987; Vol. 155: pp. 482–501.
139. Homola J. Present and future of surface plasmon resonance biosensors. *Anal Bioanal Chem*; 2003. Vol 377(3); pp. 528-539.
140. Kolchinsky A, Gryadunov D, Lysov Yu. [et al.] Microchips based on three-dimensional gel cells: history and prospects. *Molecular biology*; 2004; V. 38: pp. 5–16.
141. Case-Green S. Analysing genetic information with DNA arrays. *Curr. Opin. Chem. Biol*; 1998; Vol. 2: pp. 404–410.
142. Kolchinsky A. Analysis of SNPs and other genomic variations using gel-based chips. *Hum. Mutat*; 2002; Vol. 19 (4): pp. 343–360.

143. Pastinen T, Kurg A, Metspalu A. [et al.] Minisequencing: a specific tool for DNA analysis and diagnostics on oligonucleotide arrays. *Genome. Res*; 1997; Vol. 7: pp. 606–614.
144. Lipshutz R. High density synthetic oligonucleotide arrays. *Nat. Genet*; 1999; Vol. 21: pp. 20–24.
145. Mityaeva O, Nasedkina T, Zharinov V. [et al.] Analysis of chromosomal translocations involving the MLL gene by hybridization with oligonucleotide microchips. *Molecular biology*; 2004; Vol. 38 (3): pp. 1–8.
146. Glotov O. Genetic polymorphism and aging. *Successes gerontol*; 2007; Vol. 20 (2): pp. 35–55.
147. Gra O, Glotov A, Kozhekbaeva Zh. [et al.] Experience of using biochips to analyze polymorphic variants of the CYP1A1 gene in children with leukemia. *Medical genetics*; 2006; Vol. 4 (46): pp. 34–39.
148. Glotov A, Nasedkina T, Ivashchenko T. [et al.] Creating a biochip for analyzing polymorphism in the genes of the biotransformation system. *Molecular biology*; 2005; Vol. 39 (3): pp. 403–412.
149. Nasedkina T, Zharinov , Isaeva E. [et al.] Clinical screening of gene rearrangements in childhood leukemia using a multiplex PCR-microarray approach. *Clinical Cancer Research*; 2003; Vol. 9 (15): pp. 5620–5629.
150. Nasedkina T, Fedorova O, Glotov A. [et al.] Rapid genotyping of hypomorphic alleles of thiopurine S-methyltransferase for clinical applications using the DNA-microchip technique. *Eur. Hum. Genet*; 2006; Vol. 14 (9): pp. 991–998.
151. Wen S. Rapid detection of the known SNPs of CYP2C9 using oligonucleotide microarray. *World. J. Gastroenterol*; 2003; Vol. 9 (6): pp. 1342–1346.
152. Gerold D. DNA chips: promising toys have become powerful tools. *Trends. Biochem. Sci*; 1999; Vol. 24: pp. 168–173.
153. Fotin A, Drobyshev A, Proudnikov D. [et al.] Parallel thermodynamic analysis of duplexes on oligodeoxyribonucleotide microchips. *Nucleic Acids Res*; 1998; Vol. 26 (6): pp. 1515–1521.

154. Tillib S. Advances in the analysis of DNA sequence variations using oligonucleotide microchip technology. *Curr. Opin. Biotechnol*; 2001; Vol. 12 (1): pp. 53–58.
155. Glotov A, Ivashchenko T, Obraztsova G. [et al.] The relationship between the occurrence of stable arterial hypertension in children and the polymorphism of the genes of the renin-angiotensin and kinin-bradykinin systems. *Molecular biology*; 2007; Vol. 41 (1): pp. 18–25.
156. Hakonarson H, Grant S, Bradfield J. A genome-wide association study identifies KIAA0350 as a type 1 diabetes gene. *Nature*; 2007; Vol. 448: pp. 591–4.
157. Available from: www.Fliidm.com [accessed 12/01/2019]
158. Domon B, Aebersold R. Mass Spectrometry and Protein Analysis. *Science*; 2006; Vol. 312 (5771): pp. 212–217.
159. Available from: www.perkinelmer.com [accessed 12/01/2019]
160. Grada A and Weinbrecht K. Next-generation sequencing: methodology and application. *Journal of Investigative Dermatology*; 2013; Vol.133 (8): p. 11.
161. Lee H, Gurtowski J, Yoo S.[et al.] Third-generation sequencing and the future of genomics. 2016; Cornell University Library: <http://dx.doi.org/10.1101/048603> [accessed 12/01/2019]
162. Anselmetti D. Nanopores: Tiny holes with great promise. *Nat. Nanotechnol*; 2012; Vol. 7: pp. 81–82.
163. Jain M, Koren S, Miga K. [et al.] Nanopore sequencing and assembly of a human genome with ultra-long reads. *Nature Biotechnology*; 2018; Vol.36: pp. 338–345.
164. Zimmern R. The evaluation of genetic tests. *J. Publ. Health*; 2007; Vol. 1: pp. 1–5.
165. Zimmern R. The clinical use of genetics and molecular biomarkers: a public health perspectives. *Europ. J. Human Genetics*; 2008; Vol. 16 (2): p. 7.
166. Nippert I, Krisoffersson U, Schmidtke J [et al.] Capacity building of the transfer of the genetic /genomic knowledge into practice and prevention: the CAPABILITY international collaborative network. *Europ. J. Human Genetics*; 2008; Vol. 16 (2): p. 421.

167. Anaible from: <https://www.minedu.gov.gr/news/35255-15-06-18-ethniko-diktyo-iatrikis-akriveias-stin-ogkologia> [accessed 12/03/2019]
168. Baranov V. Genes of predisposition and "genetic passport". *Priroda*;1999; Vol. 3: pp. 17–27.
169. Fraser S. Ten years of life: is it the matter of choice? *Arch. Intern. Med*; 2001; Vol. 217: pp.113–117.
170. Baranov V. Molecular medicine - a new direction in the diagnosis, prevention and treatment of hereditary and multifactorial diseases. *Medical Acad. Journal*; 2001; Vol. 3: pp. 33–43.
171. Baranov V, Aylamazyan E. Determination of hereditary predisposition to some frequent diseases during pregnancy. *Genetic Map of Reproductive Health: guidelines*. 2009; p. 68.
172. Wolfarth B, Bray M, Hagberg J. [et al.] The human gene map for performance and health related fitness phenotype: the 2004 update. *Human Fitness Gene Map*; 2004; URL: <http://www.acsm-msse.org>. [accessed 12/01/2019]
173. Glotov A, Glotov O, Moskalenko M. [et al.] Analysis of the polymorphism of the genes of the renin-angiotensin system in the population of the Northwestern region of Russia, in athletes and long-livers. *Environmental genetics*; 2004; Issue 4: p. 40–43
174. Colhoun H. Problems of reporting genetic association with complex outcome. *Lancet*; 2003; Vol. 361: pp. 865–871.
175. Seng K. The success of the genome –wide association approach: a brief story of long struggle. *Europ. J. Hum. Genet*; 2008; Vol. 16: pp. 554–564.
176. Bouchie A. Genomics payoff? Is diagnostic the best for the companies such as Celera that once put its money on drug development. *The Scientist*; 2006; Vol. 20 (4): p. 78.
177. Berry T. Risk reduction and health promotion behaviors following genetic testing for adult-onset disorders. *Genetic Testing*; 2007; Vol. 11 (2): pp. 111–117.

178. Diego C, Alcantara M, Valle J. [et al.] Frequency of CARD15 polymorphisms in patients with Crohn's disease from Toledo, Spain: Genotype-Phenotype correlation. *Genet. Testing*; 2006; Vol. 10 (3): pp. 178–185.
179. Wadman M. Genome miners rush to stake claims. *Nature*; 2007; Vol. 447.
180. Plotkin V, Ivashchenko T, Voronel V. [et al.] Acute period of myocardial infarction and genetic predisposition. Polymorphism of tumor necrosis factor alpha gene (TNFA). *Vestnik SPb. university*; 2007; Vol. 3 (11): pp. 11–21.
181. Lucentini J. Gene association studies typically wrong. Reproducible gene-disease associations are few and far between. *The Scientist*; 2004; Vol. 18: p. 24.
182. Meltzer D, Hogarth St, Liddell K. [et al.] Genetic tests for common diseases: new insights, old concerns. *Brit. Med. J*; 2008; Vol. 336: pp. 590–593.
183. Bolding D. A tutorial on statistical methods for population association studies *Nature Reviews. Genetics*; 2006; Vol. 36: pp. 7781–7791.
184. Pogrebenkova V. Analysis of the demand for genetic testing services for diseases with hereditary predisposition among the population and doctors of the city of Tomsk. *Human genetics and pathology*; Tomsk: 2007; pp. 103–105.
185. Minaycheva L, Stepanov V, Puzyrev V. [et al.] Problems of introducing the achievements of genomic medicine into clinical practice. *Molecular biological technologies in medical practice*. Novosibirsk: Alpha Vista; 2004; Vol 5: pp. 115–120.
186. Humphries, S. E. Genetic testing for cardiovascular disease susceptibility: Clinical management tool or possible misinformation? *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*; 2004; Vol. 24: pp. 628—636.
187. Available from: <http://www.eurogentest.org/unit/workshops.xhtml> [accessed 12/03/2019]
188. Baranov V, Ivaschenko T, Baranova E. Scientific bases of predictive medicine. *Molecular biological technologies in medical practice*. Novosibirsk: Alpha Vista; 2003; Vol. 4.
189. Roche P. DNA testing, banking, genetic privacy. *N. E. J. Med*; 2006; Vol. 355 (6): pp. 546–554.

190. Ivanov V. Genomics and ethics. Genomics in medicine. Moscow: Academkniga; 2005; pp. 349–360.
191. Izhevskaya V. Ethical and legal aspects of genetic testing and screening. Molecular biological technologies in medical practice. Novosibirsk: Alfa Vista; 2006; Vol. 9: pp. 1–15.
192. Genomics and World Health: Report of WHO scientific group HLB: OZ 50. Geneva: 2002; p.125.
193. Cotton R. Locus-specific databases: from ethical principles to practice. Hum. Mut; 2005; Vol. 26 (5): pp. 489–493.
194. Brand A. The impact of genetics and genomics on public health. Europ. J. Hum. Genet; 2008; Vol. 16: pp. 5–13.
195. Bychkova O. Genes of candidate cardiovascular diseases: connection with life expectancy. Human genetics and pathology. Tomsk: Printed literature; 2007; pp. 61–66.
196. Fedoseev G. Bronchial asthma. SPb: Normedizdat; 2006; p. 308.
197. Golan D, Lander E. Rosset Sh. Measuring missing heritability: interfering the contribution of common variants PNAS. 2014.
198. Ritchi M. Andrade M, Kuivaniemi H. The foundation of precision medicine integration of electronic health records with genomics through basic, clinical and translational research. Foundation in Genet Doi; 2015.
199. Lander E. Cutting the Gordian Helix. Regulating of Genomic testing in the Era of Precision Medicine. New England J.Med. 2015; Vol. 13: pp. 1-7.
200. Azvolinsky A. By combining whole genome sequencing data with longitudinal electronic health record information for 50000 individuals. Researchers have identified novel disease association. The Scientist; 2016.
201. Keenar A. A large-scale genome sequencing effort identifies mutations with disease-causing potential at higher rate than expected. The Scientist; 2015.
202. Grant B. Will apple research kit change the Science? The Scientist; 2015;
203. Baranov V. Evolution of predictive medicine. Old ideas and new entities. Spb: Medical genetics; 2017; Vol. 5.

