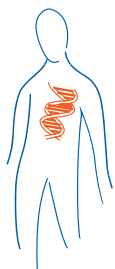


Εισαγωγή στη Μοριακή Ιατρική

01 Η Μοριακή Βάση των Ανθρώπινων Νοσημάτων

Ivor J. Benjamin



1

Ivor J. Benjamin

Οι Μοριακές Βάσεις των Ανθρώπινων Νοσημάτων

■ ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η ιατρική εξελίχθηκε δραματικά τον τελευταίο αιώνα. Από τέχνη της ίασης, όπου η εξάσκηση της βασιζόταν στην προσωπική εμπειρία, που μεταδίδονταν από τον ένα γιατρό στον επόμενο με μία αυστηρά πνευματική πειθαρχία, εξελίχθηκε σε επιστημονική μέθοδο. Αυτή η πρακτική δοκιμάζει την εγκυρότητα μιας υπόθεσης ή την πρόβλεψη μέσα από το πείραμα, τη βάση των σύγχρονων εξελίξεων στα επίπεδα της φυσιολογίας, μικροβιολογίας, βιοχημείας και φαρμακολογίας.

Αυτές οι εξελίξεις απετέλεσαν τη βάση για νέες διαγνωστικές και θεραπευτικές πρακτικές για την νόσο και την ασθένεια, μέχρις ότου πρωτοπόροι πάροχοι και επαγγελματίες υιοθετήσουν την χρήση τους με επιταχυνόμενο ρυθμό στη διάρκεια του 21ου αιώνα. Μέχρι τη δεκαετία του 1980 για παράδειγμα η κατανόηση της μοριακής βάσης της γενετικής είχε προχωρήσει δραματικά και η πρόοδος σε αυτό τον τομέα αποκάλυψε νέες και συναρπαστικές διαστάσεις για την κατανόηση των τυπικών γενετικών νοσημάτων (π.χ. δρεπανοκυτταρική αναιμία) αλλά και περίπλοκα γενετικά χαρακτηριστικά (π.χ. υπέρταση). Οι γνώσεις σχετικά με την αλληλεπίδραση μεταξύ γονιδίων και περιβάλλοντος, τα οποία ανεξάρτητα επηρεάζουν το μη-κωδικοποιητικό γονιδίωμα, έθεσαν τις βάσεις της επιγενετικής.

Οπλισμένη με μια ποικιλία από ευαίσθητες και ακριβείς μοριακές τεχνικές, η σύγχρονη ιατρική πράξη προσπαθεί να προσφέρει το μοριακό υπόστρωμα των πολύπλοκων παθοφυσιολογικών μηχανισμών και να αναγνωρίσει τον ανεξάρτητο ατομικό κίνδυνο για τα κοινά νοσήματα. Για την πλήρη κατανόηση της μοντέρνας ιατρικής, κλινικοί όροι βασίζονται ολοένα και περισσότερο στην λεπτομερή κατανόηση των κυτταρικών μηχανισμών και σε φάρμακα ακριβείας που διαταράσσουν τους δομικούς στόχους καθορίζοντας την μοριακή βάση της νόσου. Τα αποτελέσματα μεγάλων κλινικών ερευνών με μεγάλη ανταπόκριση στην θεραπεία θα εξελιχθούν πιθανώς σε προσωποποιημένη ιατρική, καθορίζοντας όσο πιο αποτελεσματική τη θεραπεία για συγκεκριμένους υποπληθυσμούς ασθενών. Αυτό το εισαγωγικό κεφάλαιο προσφέρει μια επισκόπηση αυτών των σύνθετων και ταχέως αναπτυσσόμενων θεμάτων και συνοψίζει τις αρχές της μοριακής ιατρικής που επισημαίνονται σε συγκεκριμένα σημεία στο κείμενο.

■ ΔΕΞΟΕΥΡΙΒΟΝΟΥΚΛΕΪΚΟ ΟΞΥ ΚΑΙ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑ

Όλοι οι οργανισμοί έχουν ένα πρότυπο μεταβίβασης των ζωτικών πληροφοριών που περιέχονται στο γονιδίωμα κάθε είδους, στις επόμενες γενεές. Τα ανθρώπινα κύτταρα έχουν 23 ζεύγη χρωμοσωμάτων και κάθε ζεύγος περιέχει μια μοναδική αλληλουχία γενετικής πληροφορίας. Στο ανθρώπινο γονιδίωμα, περίπου 6×10^9 νουκλεοτίδια- ή 3×10^9 ζεύγη νουκλεοτιδίων- σχηματίζουν μια διπλή έλικα. Η ειδικότητα του DNA καθορίζεται από την αλληλουχία των βάσεων που αποθηκεύονται με συμπληρωματική μορφή στη δομή της διπλής έλικας. Το γεγονός αυτό διευκολύνει την επιδιόρθωση λαθών της ακολουθίας και παρέχει ένα μηχανισμό για την αντιγραφή της γενετικής πληροφορίας κατά την κυτταρική διαίρεση. Κάθε αλυσίδα DNA παρέχει ένα πρότυπο αντιγραφής, που επιτυγχάνεται μέσω των DNA-εξαρτώμενων πολυμερασών, οι οποίες ξετυλίγουν το δίκλωνο DNA και αντιγράφουν κάθε μονόκλωνη αλυσίδα με αξιοσημείωτη ακρίβεια.

Με εξαίρεση τους γαμέτες, όλα τα κύτταρα είναι διπλοειδή, περιέχουν δηλαδή διπλό αριθμό γενετικών μονάδων, το ήμισυ των οποίων ονομάζονται απλοειδής αριθμός. Η γενετική πληροφορία που περιέχεται στα χρωμοσώματα είναι μοιρασμένη σε διακριτά λειτουργικά στοιχεία (λειτουργικές μονάδες), γνωστά ως γονίδια. Ένα γονίδιο είναι μια μονάδα αλληλουχίας βάσεων, η οποία (εκτός ελαχίστων εξαιρέσεων) κωδικοποιεί μια συγκεκριμένη πολυπεπτιδική αλληλουχία. Νεότερα δεδομένα δείχνουν ότι μικρά, μη κωδικοποιητικά μόρια RNA παίζουν καθοριστικό ρόλο στην έκφραση αυτής της ουσιώδους πληροφορίας. Ένα εκτιμώμενο μέγεθος της τάξης των 30.000 γονιδίων αποτελεί το ανθρώπινο γονιδίωμα, τα οποία είναι διάσπαρτα ανάμεσα σε περιοχές που δεν κωδικοποιούν πρωτεΐνες και των οποίων η λειτουργία δεν είναι ακόμα γνωστή. Για παράδειγμα, μη κωδικοποιητικά RNAs (π.χ. μεταφορικά RNAs –tRNAs, ριβοσωμικά RNAs-rRNAs, διάφορα άλλα μικρά RNAs) αποτελούν μέρη ενζυμικών συμπλόκων όπως του ριβοσώματος και του ματισματοσώματος (spliceosome). Ένα χρωμόσωμα περιέχει κατά μέσο όρο 3000 με 5000 γονίδια, τα οποία ποικίλουν σε μέγεθος από 1 χιλιοβάση (Kilobase-kb) μέχρι 2 μεγαβάσεις (megabases-Mb).

■ ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΟΥ ΡΙΒΟΝΟΥΚΛΕΪΚΟΥ ΟΞΕΟΣ

Η μεταγραφή ή σύνθεση του RNA, είναι η διαδικασία μεταβίβασης της πληροφορίας που περιέχεται στο πυρηνικό DNA σε ένα ενδιάμεσο μοριακό είδος γνωστό ως αγγελιοφόρο RNA (messenger RNA- mRNA). Δυο βιοχημικές διαφορές διακρίνουν το RNA από το DNA. Η πολυμερική αλυσίδα αποτελείται από σάκχαρα ριβόζης και όχι δεσοξυριβόζης συνδεδεμένων με δωσφοδιεστερικούς δεσμούς και η βάση της ουρακίλης αντικαθίσταται από τη βάση θυμίνης.

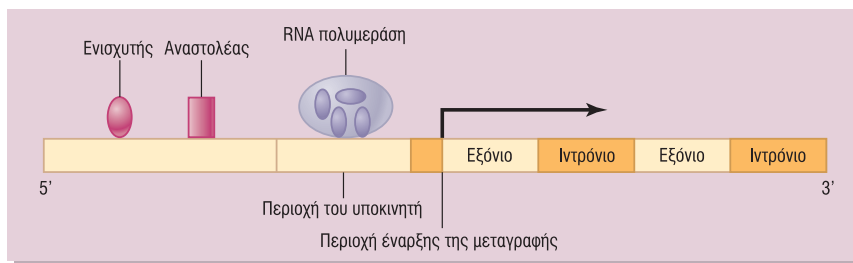
Η σύνθεση του RNA από το DNA μεσολαβείται από τρία διαφορετικά είδη RNA πολυμερασών εξαρτώμενων από το DNA, κάθε μία από τις οποίες είναι ένα σύμπλεγμα πολλών υπομονάδων με διακριτή πυρηνική εντόπιση και ειδικότητα υποστρώματος. Η RNA πολυμεράση I, εντοπίζεται στον πυρήνα και κατευθύνει τη μεταγραφή των γονιδίων που κωδικοποιούν τα 18S, 5.8S και 28S ριβοσωμικά RNAs, τα οποία σχηματίζουν ένα μοριακό σύμπλεγμα με καταλυτικές και δομικές λειτουργίες μέσα στο ριβόσωμα. Η RNA πολυμεράση II, εντοπίζεται μέσα στο πυρηνόπλάσμα και κυρίως μεταγράφει πρόδρομα μετάγραφα mRNA και μικρά μόρια RNA. Το καρβοξυτελικό άκρο της RNA πολυμεράσης II τροποποιείται μοναδικώς με μια πρωτεϊνική περιοχή 220-kD, η οποία είναι το σημείο της ενζυμικής κατάλυσης καταλοίπων σερίνης και θθειονίνης μέσω της φωσφορυλίωσής τους. Όλα τα πρόδρομα μόρια tRNAs καθώς και άλλα μόρια rRNA συντίθενται από την RNA πολυμεράση III στο πυρηνόπλάσμα.

Οι RNA πολυμεράσες προέρχονται από πρόδρομα μετάγραφα που πρέπει να χωριστούν σε υπομονάδες πριν υποστούν περαιτέρω διεργασία και συναρμολογηθούν με τις ριβοσωμικές πρωτεΐνες σε μακρομοριακά συμπλέγματα. Η ριβοσωμική αρχιτεκτονική και δομική ακεραιότητα προέρχονται από την δευτερογενή και τριτογενή δομή του rRNA, που ακολουθεί μια σειρά αναδιπλώσεων που περιλαμβάνουν μικρές δίκλωνες περιοχές. Τα πρόδρομα μόρια tRNA υφίστανται στον πυρήνα αφαίρεση του 5' άκρου, μάτισμα μιας εσωτερικής ιντρονικής αλληλουχίας και τροποποίηση των τελικών καταλοίπων.

Τα πρόδρομα μόρια mRNA παράγονται στον πυρήνα από την DNA-εξαρτώμενη RNA πολυμεράση II, η οποία αντιγράφει την αντι-νοσηματική αλυσίδα της διπλής έλικας του DNA για να συνθέσει μια μονόκλωνη αλυσίδα mRNA που είναι πανομοιότυπη της νοσηματικής αλυσίδας της διπλής έλικας του DNA με μια διαδικασία που λέγεται μεταγραφή (Εικόνα 1-1). Το αρχικό, ανώριμο mRNA πρώτα υποβάλλεται σε τροποποίηση στα 5' και 3' άκρα. Μια ειδική νουκλεοτιδική δομή που ονομάζεται καλύπτρα προστίθεται στο 5' άκρο, η οποία αυξάνει την πρόσδεση στο ριβόσωμα και ενισχύει την αποτελεσματικότητα της μετάφρασης. Το 3' άκρο τροποποιείται με την αφαίρεση περίπου 20 νουκλεοτιδίων, ακολουθούμενο από την προσθήκη μιας πολυνουκλεοτιδικής αλληλουχίας που περιέχει μια ομοιόμορφη σειρά από βάσεις αδενίνης, την επονομαζόμενη πολύ-A ουρά που σταθεροποιεί το mRNA.



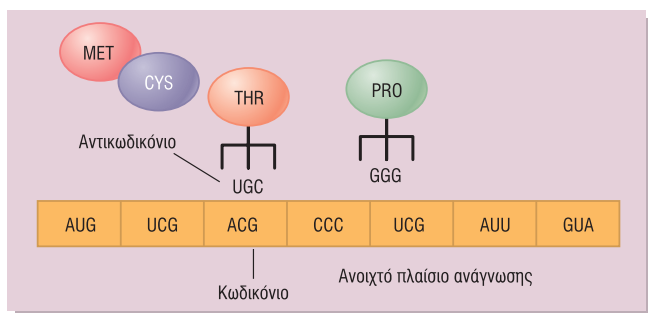
Εικόνα 1-1. Μεταγραφή. Το γενωμικό DNA απεικονίζεται με τις αλληλουχίες του ενισχυτή και του αναστολέα στην 5' περιοχή πριν την περιοχή του υποκινητή, στην οποία προσδένεται η RNA πολυμεράση. Η περιοχή έναρξης της μεταγραφής απεικονίζεται μετά την περιοχή του υποκινητή και αυτή η περιοχή ακολουθείται από αλληλουχίες εξονίων που διακόπτονται από αλληλουχίες ιντρονίων. Οι προηγούμενες αλληλουχίες μεταγράφονται ή μία με την άλλη από την RNA πολυμεράση.



Επιπρόσθετα με τις αλλαγές που συμβαίνουν σε όλα τα μόρια mRNA, μπορεί να συμβούν και περισσότερο εκλεκτικές τροποποιήσεις. Επειδή κάθε γονίδιο περιέχει εξόνια και ιντρόνια και το πρόδρομο μόριο mRNA μεταγράφεται χωρίς να διακρίνονται τα όρια εξονίων-ιντρονίων, αυτό το ανώριμο μήνυμα πρέπει να τροποποιηθεί ώστε όλα τα εξόνια να ενωθούν μαζί σε μία σωστή σειρά. Η διαδικασία του ματίσματος, ή η αφαίρεση των ιντρονικών αλληλουχιών για την παραγωγή του ώριμου mRNA, είναι μία εξαιρετικά πολύπλοκη διαδικασία που περιλαμβάνει τον ενδιάμεσο σχηματισμό του επανασυνδεοσώματος (spliceosome), το οποίο είναι ένα μεγάλο σύμπλεγμα αποτελούμενο από μικρά πυρηνικά RNAs και ειδικές πρωτεΐνες, που περιέχει ένα βρόγχο ή δομή "λάσου" που περιλαμβάνουν το ιντρόνιο που θα αφαιρεθεί. Μόνο μετά την ολοκλήρωση του ματίσματος, καταλυτική διαδικασία που απαιτεί την υδρόλυση τριφωσφορικής αδενοσίνης, το ώριμο mRNA είναι σε θέση να μετακινηθεί από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα, όπου η κωδικοποιημένη πληροφορία θα μεταφραστεί σε πρωτεΐνη.

Το εναλλακτικό μάτισμα είναι μια διαδικασία για την αποτελεσματική δημιουργία πολλαπλών γονιδιακών προϊόντων που συνήθως χαρακτηρίζονται από ιστική ειδικότητα, αναπτυξιακή έκφραση και παθολογική κατάσταση. Το γονιδιακό μάτισμα επιτρέπει την έκφραση πολλών ισομορφών, αυξάνοντας έτσι το ρεπερτόριο της μοριακής ποικιλίας. Με έναν πρόχειρο υπολογισμό, το 30% των ανθρώπινων γενετικών νοσημάτων προκύπτει από σφάλματα στο μάτισμα. Τα ώριμα μόρια mRNA εξέρχονται έπειτα από τον πυρήνα για να ξεκινήσει η μετάφραση ή η μετατροπή του μηνύματος βάσεων σε πολυπεπτιδίο (Εικόνα 1-2). Για ορισμένα γονίδια, μονοπάτια εναλλακτικού ματίσματος (π.χ. εναλλακτικά μονοπάτια συναρμολόγησης των εξονίων) λαμβάνουν χώρα και στο επίπεδο της μεταφραστικής ρύθμισης. Η ανακάλυψη του καταλυτικού RNA, που επιτρέπει αυτό-κατευθυνόμενο μάτισμα, πρόωθησε την άποψη ότι το RNA είναι εκμαγείο για την μεταγραφή του γενετικού κώδικα αλλά και ταυτόχρονα ένζυμο (βλέπε μεταγραφική ρύθμιση).

Η πρωτεϊνική σύνθεση, ή μετάφραση του mRNA, λαμβάνει χώρα στα ριβοσώματα, τα οποία είναι μακρομοριακά συμπλέγματα πρωτεϊνών και rRNA εντοπισμένα στο κυτταρόπλασμα. Η μετάφραση αφορά την μετατροπή του γραμμικού κώδικα των κωδικονίων σε αμινοξέα. Ένας κώδικας αποτελούμενος από 4 βάσεις παράγει 64 πιθανούς τριπλούς συνδυασμούς (4 x 4 x 4) που αντιστοιχούν σε 20 διαφορετικά αμινοξέα, πολλά από τα οποία κωδικοποιούνται από περισσότερες από μία τριπλές βάσεων. Για την αποκωδικοποίηση του mRNA ένα μόριο προσαρμογέας (tRNA) αναγνωρίζει το κωδικόνιο του mRNA μέσω των συμπληρωματικών βάσεων του αντι-κωδικονίου που περιέχει. Κάθε

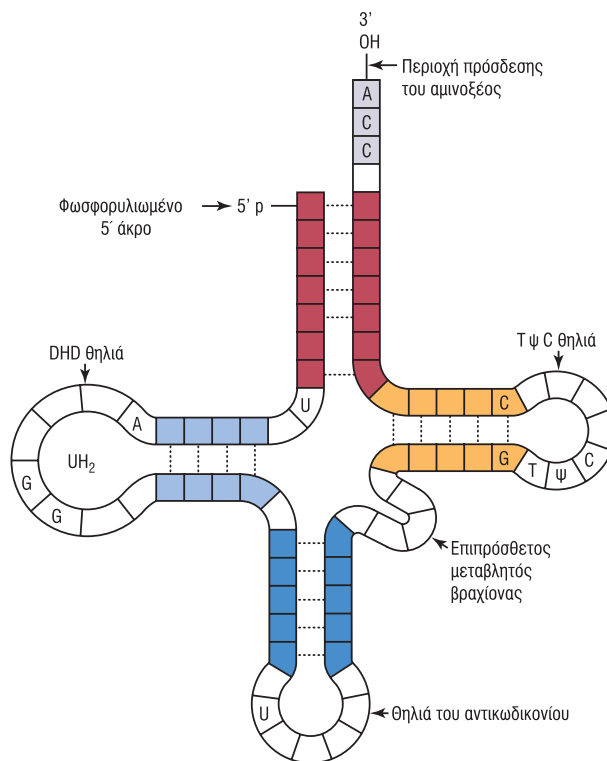


Εικόνα 1-2. Μετάφραση. Το ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης ενός ώριμου αγγελιοφόρου RNA απεικονίζεται με τα κωδικόνια του. Τα μεταφορικά RNA απεικονίζονται με τα συμπληρωματικά αντικωδικόνια και τα αμινοξέα τους. Μία μικρή, αναπτυσσόμενη πολυπεπτιδική αλυσίδα απεικονίζεται επίσης. A: αδενίνη, C: κυτοσίνη, U: ουρακίλη, G: γουανίνη, MET: μεθειονίνη, PRO: προλίνη, THR: θρεονίνη, U: ουρακίλη.

tRNA έχει ένα μοναδικό αμινοξύ που αντιστοιχεί στο αντι-κωδικόνιο (Εικόνα 1-3).

Η μετάφραση του εκμαγείου του mRNA προχωράει χωρίς την διακοπή του μη-επικαλυπτόμενου κώδικα, με τη βοήθεια του rRNA στη μηχανική συναρμολόγηση που ονομάζεται *ριβόσωμα*-ουσιαστικά μια πολυπεπτιδική πολυμεράση. Υπάρχει τουλάχιστον ένα tRNA για κάθε ένα από τα 20 αμινοξέα, μολονότι ο εκφυλισμός του γενετικού κώδικα αυξάνει τον αριθμό των διαθέσιμων tRNA μορίων και μετριάξει την πιθανότητα πρόωρης λήξης της αλυσίδας ενώ παράλληλα ελαττώνει την πιθανότητα καταστροφικών συνεπειών από τις σημειακές μεταλλάξεις. Με την κατάλληλη ενζυματική δραστηριότητα στο ριβόσωμα ενώνονται τα αμινοξέα μέσω της δημιουργίας πεπτιδικού δεσμού, ελευθερώνοντας στη συνέχεια το tRNA

Η πρόσδεση των αμινοξέων στην αναπτυσσόμενη πολυπεπτιδική αλυσίδα αντικατοπτρίζει το τελικό γεγονός στην μετατροπή της πληροφορίας που περιέχεται στην αλληλουχία του πυρηνικού DNA σε ώριμη πρωτεΐνη (DNA → RNA → πρωτεΐνη). Οι πρωτεΐνες είναι άμεσα υπεύθυ-



Εικόνα 1-3. Δευτερογενής δομή του μεταφορικού RNA (tRNA). Η δομή του κάθε tRNA εξυπηρετεί ως ένα προσαρμοστικό μόριο που αναγνωρίζει ένα συγκεκριμένο κωδικόνιο για κάθε αμινοξύ και το προσθέτει στην πολυπεπτιδική αλυσίδα. Περίπου οι μισές βάσεις της μονόκλωνης ριβονουκλεοτιδικής αλυσίδας σχηματίζουν υδρογονικούς δεσμούς και σχηματίζουν διπλή έλικα όπως ένα τριφύλλι. Το 5' άκρο είναι φωσφορυλιωμένο και το 3' άκρο περιέχει μια υδροξυλική ομάδα ενωμένο με ένα αμινοξύ. Η θηλιά του αντικωδικονίου βρίσκεται στο μέσον του μορίου του tRNA. C: κυτοσίνη, DHU: διυδροξουριδίνη, G: γουανίνη, UH₂, διυδροουριδίνη, Ψ: ψευδοουριδίνη, T: ριβοθυμιδίνη, U: ουρακίλη. (Δεδομένα από τους Berg JM, Tymoczko JL, Strayer JL: Berg, Tymoczko, and Strayer's biochemistry, ed 5, New York, 2006, WH Freeman.)



νες για το σχηματισμό και την λειτουργία ενός οργανισμού. Ανωμαλίες στην δομή της πρωτεΐνης ή τη λειτουργία της λόγω αλλαγών στην πρωτοταγή αμινοξική ακολουθία είναι το άμεσο αίτιο για μεταβολές στο φαινότυπο, διαφορετικές μορφές του οποίου ορίζουν τη νόσο.

Η αναστολή της σύνθεσης του RNA είναι ένας καλά αναγνωρισμένος μηχανισμός συγκεκριμένων τοξινών και αντιβιοτικών. Η τοξικότητα από την έγχυση του δηλητηριώδους μανιταριού (*Amanita phalloides*) για παράδειγμα, οδηγεί στην απελευθέρωση της τοξίνης α-αμανιτίνης, ενός κυκλικού οκταπεπτιδίου που αναστέλλει την RNA πολυμεράση II και εμποδίζει την επιμήκυνση του RNA. Το αντιβιοτικό ακτινομυκίνη D προσδέεται με μεγάλη συγγένεια στο δίκλωνο DNA και παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων, αποκλείοντας τις RNA πολυμεράσες-εξαρτώμενες από το DNA και την εκλεκτική αναστολή της μεταγραφής. Μερικά αντιβιοτικά αναστέλλουν την μετάφραση. Για παράδειγμα η αμονογλυκοσίδη παρεμβάλλεται στην αλληλεπίδραση mRNA-tRNA μεταξύ κωδικονίου-αντικωδικονίου ενώ η ερυθρομυκίνη και η χλωραμφαινικόλη αναστέλλει το σχηματισμό του πεπτιδικού δεσμού.

■ ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ

Επισκόπηση

Η στιγμή, η διάρκεια, η εντόπιση και το μέγεθος της γονιδιακής έκφρασης είναι όλα σημαντικά στοιχεία στην πολύπλοκη εικόνα της κυτταρικής μορφής και λειτουργίας που ελέγχεται από το γονιδίωμα. Η γονιδιακή έκφραση αντιπροσωπεύει τη ροή της γενετικής πληροφορίας από το εκμαγείο του DNA στα μεταγράφα του mRNA και την διαδικασία της μετάφρασης σε ώριμη πρωτεΐνη.

Τέσσερα επίπεδα οργάνωσης εμπλέκονται στην εντοπισμό της γονιδιακής έκφρασης στο γονιδίωμα των θηλαστικών. Αυτά είναι οι μεταγραφικοί παράγοντες, τα RNAs, η δομή της χρωματίνης και διάφοροι επιγενετικοί παράγοντες. Οι μεταγραφικοί παράγοντες προσδένονται σε συγκεκριμένες αλληλουχίες DNA και επιδρούν στην έκφραση γειτονικών γονιδίων είτε θετικά είτε αρνητικά. Η πληροφορία που περιέχεται στο γονιδίωμα πρέπει να μεταφερθεί σε λειτουργικές μονάδες RNA ή πρωτεϊνικών προϊόντων. Ο τρόπος που αναδιπλώνεται και τροποποιείται το DNA αποτελεί έναν επιπλέον τρόπο γονιδιακής ρύθμισης μέσω της διακοπής της πρόσβασης των μεταγραφικών παραγόντων από τα σημεία πρόσδεσης τους στο DNA.

Στην μεταγονιδιακή εποχή η πρόκληση είναι να κατανοηθεί ή αρχιτεκτονική με την οποία το γονιδίωμα είναι οργανωμένο, ελέγχεται και τροποποιείται. Οι μεταγραφικοί παράγοντες, η αρχιτεκτονική της χρωματίνης και οι τροποποιήσεις στην οργάνωση των νουκλεοσωμάτων συνθέτουν το κυριότερους μηχανισμούς της γονιδιακής ρύθμισης του γονιδιώματος.

Μεταγραφική Ρύθμιση

Το πρωταρχικό ρυθμιστικό βήμα στην γονιδιακή έκφραση λαμβάνει χώρα στο επίπεδο της μεταγραφής. Μια συγκεκριμένη RNA πολυμεράση-εξαρτώμενη από DNA πραγματοποιεί τη μεταγραφή της πληροφορίας που περιέχεται στο DNA σε μεταγράφα mRNA. Η μεταγραφή ξεκινά σε ένα εγγύς μεταγραφικό σημείο έναρξης που περιλαμβάνει νουκλεοτιδικές αλληλουχίες, οι οποίες επηρεάζουν το ρυθμό και την έκταση της διαδικασίας (βλέπε Εικ. 1-1). Αυτή η *περιοχή του υποκινητή του γονιδίου* συχνά περιλαμβάνει μια αλληλουχία πλούσια σε αδενίνη και θυμίνη (TA-TA box) μαζί με άλλες αλληλουχίες μέσα στις πρώτες 100 βάσεις από το σημείο εκκίνησης. Αυτές οι περιοχές του DNA που ρυθμίζουν την μεταγραφή λέγονται ρυθμιστικά στοιχεία με ομόπλευρη δράση (cis-acting regulatory elements). Ορισμένες από αυτές τις ρυθμιστικές περιοχές της αλληλουχίας του υποκινητή προσδένουν πρωτεΐνες γνωστές σαν παράγοντες με ετερόπλευρη δράση (π.χ. μεταγραφικοί παράγοντες), οι οποίες κωδικοποιούνται από διαφορετικά γονίδια. Οι ρυθμιστικές αλληλουχίες με ομόπλευρη δράση στις οποίες προσδένονται οι μεταγραφικοί παράγοντες συχνά ονομάζονται ρυθμιστικά στοιχεία (response elements). Οικογένειες μεταγραφικών παραγόντων έχουν αναγνωρισθεί και περιγράφονται από μοναδικά στοιχεία της προβλεπόμενης δευτερογενούς τους πρωτεϊνικής δομής, συμπεριλαμβανομένων μοτίβων έλικας-στροφής-έλικας, δακτυλίου ψευδαργύρου και φερμουάρ λευκίνης. Οι μεταγραφικοί παράγοντες εκτιμάται ότι αποτελούν το 3% με 5% των πρωτεϊνών που κωδικοποιούνται από το γονιδίωμα.

Επιπλέον των περιοχών των υποκινητών, υπάρχουν περιοχές ενισχυτών που είναι διαφορετικές από τις περιοχές των υποκινητών, λόγω του ότι μπορούν να βρίσκονται σε πολύ απομακρυσμένες περιοχές από το σημείο εκκίνησης, είτε ανοδικά είτε καθοδικά (π.χ. μετά το πέρασμα του 3' άκρου του γονιδίου) και χωρίς ξεκάθαρο προσανατολισμό. Παράγοντες με ετερόπλευρη δράση προσδένονται σε αυτές τις περιοχές και θεωρείται ότι αλλάζουν την τεταρτοταγή δομή και την αναδιαμόρφωση του DNA με τρόπο που διευκολύνει την πρόσδεση και τη συναρμολόγηση του συμπλέγματος έναρξης της μεταγραφής στην περιοχή του υποκινητή, ίσως με τον σχηματισμό μεγάλης θηλιάς DNA στην συνέχεια. Η βιοχημική τροποποίηση επιλεγμένων υποκινητών ή εκκινήτων, όπως η μεθυλίωση αλληλουχιών πλούσιων σε κυτοσίνη-φωσφορικό άλας-γουανίνη (νησίδα CpG) μπορεί να τροποποιήσει την μεταγραφή, καταστέλλοντάς την. Οι όροι *καταστολείς* και *στοιχεία καταστολής* αναφέρονται σε νουκλεοτιδικές αλληλουχίες με ομόπλευρη δράση που μειώνουν ή αισιώνουν την γονιδιακή μεταγραφή και το επιτυγχάνουν με την πρόσδεση σε παράγοντες με ετερόπλευρη δράση που αναγνωρίζουν αυτές τις αλληλουχίες.

Η ρύθμιση της μεταγραφής είναι μια περίπλοκη διαδικασία που λαμβάνει χώρα σε αρκετά επίπεδα. Η έκφραση ορισμένων γονιδίων είναι ρυθμισμένη σε υψηλά βασικά επίπεδα, τα οποία είναι γνωστά ως *γονίδια συντήρησης* ή *σταθερής έκφρασης* (housekeeping genes). Αυτά εκφράζουν πρωτεΐνες που είναι βασικές για τη φυσιολογική λειτουργία του κυττάρου ή την επιβίωση και πρέπει να διατηρούνται σε μια συγκεκριμένη σταθερή συγκέντρωση. Πολλά άλλα γονίδια δεν εκφράζονται ή εκφράζονται ελάχιστα και μόνο κάτω από ορισμένες συνθήκες. Ωστόσο σε περιπτώσεις στρες ή έκθεσης του κύτταρου σε έναν αγωνιστή που προκαλεί μια κυτταρική απάντηση διαφορετική από την βασική κατάσταση, προκαλείται ή ενισχύεται η έκφραση αυτών των γονιδίων. Για παράδειγμα, τα γονίδια που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες θερμικού σοκ και παράγουν *πρωτεΐνες στρες* επάγονται ταχέως από διάφορα παθοφυσιολογικά ερεθίσματα (π.χ. οξειδωτικό στρες, βαρέα μέταλλα, φλεγμονή) στα περισσότερα κύτταρα και οργανισμούς. Η αυξημένη έκφραση των πρωτεϊνών θερμικού σοκ είναι παράλληλη με τα βασικά επίπεδα των πρωτεϊνών θερμικού σοκ, οι οποίες είναι μοριακοί συνοδοί και παίζουν καθοριστικό ρόλο στην πρωτεϊνοσύνθεση με την αποτροπή λανθασμένης αναδίπλωσης, με την αυξημένη πρωτεϊνική μετακίνηση και την επιτάχυνση της πρωτεϊνικής αποδόμησης. Αυτές οι προσαρμοστικές απαντήσεις συχνά προκαλούν φαινοτυπικές αλλαγές που είναι προστατευτικές για το κύτταρο ή τον οργανισμό.

Micro-RNAs και Γονιδιακή Ρύθμιση

Οι καθοριστικοί παράγοντες της μεταφραστικής ρύθμισης είναι λιγότερο γνωστοί συγκριτικά με την ίδια τη μεταγραφική ρύθμιση. Η πρόσφατη ανακάλυψη και αναγνώριση των μικρών RNAs (21-μερή με 24-μερή συμπλέγματα), των ονομαζόμενων *micro-RNAs* (miRNAs), προσθέτει μεγαλύτερη πολυπλοκότητα στην ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης του ευκαρυωτικού γονιδιώματος. Αρχικά, αυτά εντοπίστηκαν στους σκύλους πριν 15 χρόνια. Τα microRNAs είναι συντηρημένες, μη κωδικοποιητικές, αλυσίδες RNA που προσδένονται μέσω ζευγαρώματος βάσεων κατά Watson και Crick στην 3'-αμετάφραστη περιοχή των mRNAs στόχων, επιτρέποντας τη γονιδιακή σίγαση της πρωτεϊνικής έκφρασης στο μεταφραστικό επίπεδο. Τα γονίδια που κωδικοποιούν miRNAs εμφανίζουν ιστοσελικότητα και είναι διάσπαρτα σε περιοχές του γονιδιώματος που δεν εκφράζουν γνωστά γονίδια.

Η μεταγραφή των miRNAs γίνεται σε πολλά επίπεδα από περιοχές υπό τον έλεγχο ενός mRNA υποκινητή. Η RNA πολυμεράση II μεταγράφει το πρόδρομο miRNA, που ονομάζεται *πρωταρχικό miRNA* (pri-miRNA) και περιέχει καλύπτρα στο 5' άκρο και πολυαδενυλωμένη ουρά στο 3'. Στον πυρήνα, το pri-miRNA με μήκος 70 νουκλεοτιδίων περιλαμβάνει περιοχή σε σχήμα φουρκέτας, που περιλαμβάνει τμήμα του miRNA που αναγνωρίζεται και αποκόπτεται από μια ειδική διπλής-έλικας RNA ριβοנוκλάση ονομαζόμενη *Drosha*. Η γονιδιακή έκφραση καταστέλλεται από την επίδραση του miRNA πάνω στα σημασμένα μόρια RNA για αποδόμηση.

Επειδή η μετάφραση γίνεται με αμετάβλητο ρυθμό στα διάφορα είδη mRNA, η σταθερότητα ή ο χρόνος ημίσειας ζωής ενός συγκεκριμένου mRNA χρησιμεύει σαν ένα ακόμα σημείο ελέγχου της ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης. Η 3'-αμετάφραση περιοχή των mRNAs περιέχει περιοχές που υποδηλώνουν την προδιάθεση για αποδόμηση από τις νου-



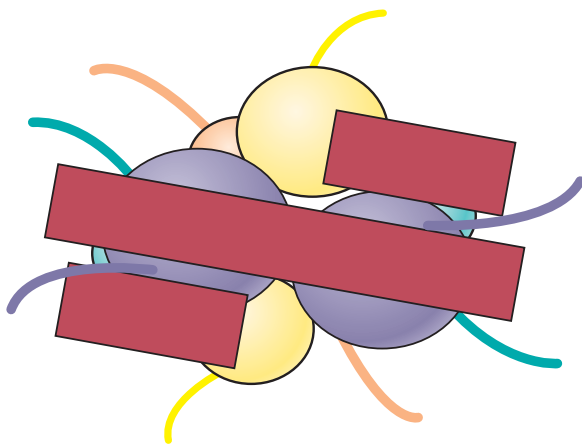
κλάσες. Η σταθερότητα φαίνεται να οφείλεται σε ειδικές αλληλουχίες και σε ορισμένες περιπτώσεις εξαρτάται από την πρόσδεση παραγόντων που δρουν ετερόπλευρα στο mRNA. Το ώριμο mRNA περιέχει αλληλουχίες στην 5' και 3' αμετάφραστη περιοχή που ρυθμίζουν την μετάφραση.

Στα πρώτα στάδια της ανάπτυξης ενός οργανισμού, τα miRNAs συμμετέχουν με πιο πολύπλοκους τρόπους στην ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης, όπως αποδείχθηκε στην παραγωγή της βλαστικής σειράς, της κυτταρικής διαφοροποίησης, του πολλαπλασιασμού και της οργανογένεσης. Επειδή μελέτες αναδεικνύουν την έκφραση των miRNAs κατά την ανάπτυξη του εγκεφάλου, της καρδιακής οργανογένεσης, της αναγέννησης του σκελετικού μυός, του αδενοκαρκινώματος στο κόλον και της ιϊκής αντιγραφής, αυτός ο νέος μηχανισμός σίγασης της γονιδιακής έκφρασης έχει πιθανούς θεραπευτικούς ρόλους στα συγγενή καρδιακά νοσήματα, τις ιώσεις, την νευροεκφύλιση, την αναγεννητική ιατρική και τον καρκίνο.

Αναδιαμόρφωση Χρωματίνης και Γονιδιακή Ρύθμιση

Το μέγεθος και η πολυπλοκότητα του ανθρώπινου γονιδιώματος με τα 23 χρωμοσώματα να ποικίλουν σε μέγεθος μεταξύ 50 με 250 Mb δημιουργούν τεράστιες προκλήσεις στους μεταγραφικούς παράγοντες, ώστε να ασκήσουν την ειδικότητα τους στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης μέσω της πρόσδεσής τους στο DNA. Ο έλεγχος της γονιδιακής έκφρασης λαμβάνει χώρα σε διαφορετικούς τύπους κυττάρων με εξαίρεση χωροχρονική ειδικότητα κατά τη διάρκεια της ζωής ενός οργανισμού. Στα ευκαρυωτικά κύτταρα το γονιδίωμα έχει υψηλού βαθμού οργάνωση σε πυκνά σωμάτια νουκλεϊνικού οξέως DNA- και RNA- πρωτεϊνικών δομών, που ονομάζονται χρωματίνη. Τα δομικά συστατικά της χρωματίνης ονομάζονται ιστόνες, μια οικογένεια μικρών πρωτεϊνών που αποτελούν τη μισή μάζα του χρωμοσώματος. Οι βασικές ιδιότητες των ιστονών προέρχονται από την υψηλή συγκέντρωση των βασικών αμινοξέων, αργινίνης και λυσίνης. Υπάρχουν πέντε βασικοί τύποι ιστονών –H1, H2A, H2B, H3 και H4- που σχηματίζουν συμπλέγματα με το DNA. Δύο ζεύγη από κάθε έναν από τους τέσσερις τύπους ιστονών σχηματίζουν έναν πρωτεϊνικό πυρήνα, το οκταμερές των ιστονών, το οποίο περιελίσσεται γύρω από 200 ζεύγη βάσεων DNA για να σχηματιστεί το νουκλεόσωμα (Εικόνα 1-4). Οι πρωτεΐνες του πυρήνα στο νουκλεόσωμα έχουν προεξέχοντα αμινοτελικά άκρα, αποκαλύπτοντας σημαντικά κατάλοιπα λυσίνης και αργινίνης για το σχηματισμό ομοιοπολικών δεσμών. Περαιτέρω συμπύκνωση του DNA επιτυγχάνεται με το σχηματισμό μεγαλύτερης δομικής τάξης. Τα νουκλεοσώματα συμπυκνώνονται περαιτέρω σε πολυεπίπεδες στοίβες με αριστερόστροφη υπερέλικα σχηματίζοντας αρνητικά υπερσπειράματα που παρέχουν την απαραίτητη ενέργεια για το διαχωρισμό του αλυσίδων DNA κατά την αντιγραφή.

Η συμπύκνωση του DNA στη χρωματίνη αποτρέπει την πρόσβαση των ρυθμιστικών μορίων όπως είναι οι μεταγραφικοί παράγοντες. Αναστροφή της συμπύκνωσης της χρωματίνης συμβαίνει κατά την απάντηση σε



Εικόνα 1-4. Σχηματική αναπαράσταση ενός νουκλεοσώματος. Το ορθογώνιο σχήμα αποτελεί την αλυσίδα DNA που τυλίγεται γύρω από τον πυρήνα που αποτελείται από οχτώ πρωτεΐνες ιστόνης. Κάθε ιστόνη έχει μια ουρά που προεξέχει και μπορεί να τροποποιείται για να εμπόδιζε ή να ενεργοποιεί την μεταγραφή.

περιβαλλοντικά ή αναπτυξιακά σήματα με ισοεξαρτώμενο τρόπο. Οι περιοχές υποκινητών που μεταγράφονται ενεργητικά και η χαλάρωση της δομής της χρωματίνης που γίνεται ευαίσθητη στην ενζυμική διάσπαση από μη ειδικές DNAάσες I λέγονται υπερευαίσθητες περιοχές. Ο μεταγραφικοί παράγοντες στις περιοχές που βρίσκονται υποκινητές μπορούν μέσω αλληλεπίδρασης πρωτεΐνης-πρωτεΐνης να έχουν πρόσβαση σε ενισχυτές που περιέχουν ιστο-ειδικές πρωτεΐνες σε απομακρυσμένες περιοχές (μερικές χιλιάδες βάσεις μακριά), προκαλώντας μεταγραφική ενεργοποίηση ή καταστολή.

Επιγενετικός Έλεγχος της Γονιδιακής Έκφρασης

Πολύπλοκα ρυθμιστικά μονοπάτια εμπλέκονται γύρω από τους μεταγραφικούς παράγοντες, τα νουκλεοσώματα, τη δομή της χρωματίνης και την επιγενετική σήμανση. Η επιγενετική αφορά στις κληρονομήσιμες αλλαγές τις γονιδιακής έκφρασης χωρίς αλλαγές στην αλληλουχία του DNA. Παραδείγματα επιγενετικής τροποποίησης είναι η μεθυλίωση του DNA, η γονιδιακή σίγαση, η αναδιαμόρφωση της χρωματίνης και η απενεργοποίηση του X-χρωμοσώματος. Αυτές οι μορφές κληρονομικότητας αφορούν αλλαγές στην γονιδιακή λειτουργία χωρίς αλλαγές στην αλληλουχία του DNA. Η χημική σήμανση του DNA με τη διαδικασία της μεθυλίωσης είναι κυτταροειδική και αναπτυξιακά ρυθμιζόμενη. Η μεθυλίωση του 5'-CpG διουκλεοτιδίου από εξειδικευμένες μεθυλοτρανσφεράσες, η οποία συμβαίνει στο 70% του γονιδιώματος των θηλαστικών, είναι ένας άλλος μηχανισμός γονιδιακής ρύθμισης. Η στερεοχημική παρεμπόδιση από την ογκώδη ομάδα της 5'-μεθυλ-κυτοσίνης απαγορεύει την πρόσδεση των μεταγραφικών παραγόντων που ενεργοποιούν ή μειώνουν την γονιδιακή έκφραση.

Με ανάλογο τρόπο η τροποποίηση της ιστόνης με τη διαδικασία της φωσφορυλίωσης, της μεθυλίωσης, της καθολικής διάδοσης και της ακετυλίωσης μεταδίδονται και εγκαθίστανται με κληρονομήσιμο τρόπο. Είναι δεδομένο ότι οι επιγενετικοί μηχανισμοί δεν περιλαμβάνουν γονιδιακές αλλαγές στο DNA. Παραδείγματος χάριν, η τροποποίηση των γονιδίου που κωδικοποιεί τον α-υποδοχέα των οιστρογόνων εμπλέκεται στην γονιδιακή σίγαση των περιοχών 5'-μεθυλ-κυτοσίνης (5mC) σε γονίδια στόχου, σε καρκινικά κύτταρα του μαστού. Δυναμικές προσεγγίσεις αναπτύσσονται για την μελέτη ανάδρομων και ορθόδρομων κυκλωμάτων στη μετάδοση των επιγενετικών σημάτων.

Το γεγονός των δυναμικών τροποποιήσεων (π.χ. μεθυλίωση και ακετυλίωση του DNA) των ιστονών ή η επιγενετική συνεισφορά στην ογκογένεση έχει ήδη μεταφραστεί σε ανάλογες θεραπείες. Οι ακετυλοτρανσφεράσες (HATs) και οι από-ακετυλοτρανσφεράσες (HDACs) έχουν αντίθετο ρόλο στην προσθήκη και αφαίρεση της ακετυλίωσης στο γονιδίωμα. Η ανάλυση του γονιδιώματος για τις HATs και HDACs έχει αναδείξει σύνθετους τρόπους ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης. Μερικοί αναστολείς των αποακετυλασών των ιστονών, με μια σειρά βιοχημικών και βιολογικών δραστηριοτήτων, έχουν αναπτυχθεί και ελεγχθεί ως αντικαρκινικοί παράγοντες σε κλινικές δοκιμές. Τα αποτελέσματα της φάσης I δείχνουν ότι αυτοί οι παράγοντες είναι καλά ανεκτοί. Η αναστολή της αποακετυλίωσης αναδιαμορφώνει την χρωματίνη και επανενεργοποιεί την μεταγραφή του γονιδιώματος. Λόγω του μηχανισμού δράσης των HDACs στην απόπτωση, τον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου και της κυτταρικής διαφοροποίησης, οι σύγχρονες κλινικές δοκιμές αναζητούν την αποτελεσματικότητα αυτών των νέων παραγόντων στην φαρμακευτική επιτομή των καρκίνων του ανθρώπου.

■ ΠΑΡΑΛΛΑΓΗ ΤΗΣ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ, ΠΟΙΚΙΛΟΜΟΡΦΙΑ ΠΛΗΘΥΣΜΟΥ ΚΑΙ ΓΕΝΕΤΙΚΟΙ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ

Μία σταθερά κληρονομούμενη αλλαγή στο DNA ορίζεται ως μεταλλαγή. Αυτός ο αυστηρός σύγχρονος ορισμός δεν σχετίζεται με την λειτουργική συνάφεια την αλλαγής της αλληλουχίας και αφορά μια αλλαγή στην πρωτοταγή αλληλουχία του DNA. Με βάση την ιστορία, οι μεταλλαγές προκαθορίστηκαν σαν ανιχνεύσιμες αλλαγές του κληρονομούμενου φαινότυπου ενός οργανισμού. Καθώς όμως ο βιοχημικός φαινότυπος έγινε πιο ακριβής στα μέσα του 20^{ου} αιώνα, οι ερευνητές απέδειξαν ότι πολλές πρωτεΐνες υπάρχουν σε περισσότερες από μια μορφή σε ένα πηθυσμό, και αυτές οι μορφές θεωρήθηκαν συνέπεια παραλλαγών στο γονίδιο που κωδικοποιεί αυτή την πρωτεΐνη (π.χ. αλληλόμορφα). Με την πρόοδο στις μεθόδους αλληλούχισης του DNA η έννοια της μεταλλαγής εξελίχθηκε από την αναγνώριση της ως διαφοροποίηση του φαινότυπου



σε αναγνωρίσιμη αλλαγή στο επίπεδο της δομής του DNA. Μολονότι οι περισσότερες μεταλλαγές σταθερά μεταδίδονται από τους γονείς στους απογόνους, μερικές είναι γενετικά θανατηφόρες και δεν μπορούν να μεταδοθούν. Η ανεύρεση στο γονιδίωμα περιοχών που περιλαμβάνουν αλληλουχίες που επαναλαμβάνονται σε σειρά με ιδιαίτερα ποικίλο αριθμό διαδοχικών επαναλήψεων υποδηλώνει ότι ορισμένες μεταλλαγές είναι λιγότερο σταθερές από άλλες. Αυτές οι διαδοχικά επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες περιγράφονται παρακάτω.

Η μοριακή φύση της μεταλλαγής ποικίλει (Πίνακας 1-1). Η μεταλλαγή μπορεί να περιλαμβάνει την διαγραφή, την προσθήκη ή την αντικατάσταση μία μόνο βάσης, οι οποίες ονομάζονται σημειακές μεταλλαγές. Οι αντικαταστάσεις αυτές μπορεί να ταξινομηθούν περαιτέρω ως σιωπηλή (silent) όταν το αμινοξύ που κωδικοποιείται από την μεταλλαγμένη τριπλέτα δεν αλλάζει, *παρερμηνευτική* (missense) όταν το αμινοξύ που κωδικοποιείται από την μεταλλαγμένη τριπλέτα αλλάζει και σαν *μη νοηματική* (nonsense) μεταλλαγή όταν οδηγεί σε πρόωρο τερματισμό της μετάφρασης (π.χ. κωδικόνιο λήξης). Επίσης οι σημειακές μεταλλαγές μπορούν να αλλάξουν την διαδικασία επεξεργασίας του πρόδρομου mRNA και να παραχθούν εναλλακτικά σημεία ματίσματος ή να εξαλειφθούν υπάρχοντα σημεία ματίσματος. Όταν μια σημειακή ή διπλή διαγραφή ή προσθήκη βάσης συμβαίνει σε ένα εξόνιο, σαν αποτέλεσμα προκύπτει μια μεταλλαγή αλλαγής πλαισίου (frameshift mutation) οδηγώντας σε πρόωρο τερματισμό της μετάφρασης σε ένα κωδικόνιο λήξης μέσα στην νέα αλληλουχία. Στο άλλο άκρο του φάσματος των μεταλλαγών βρίσκονται οι μεγάλες διαγραφές ενός ολόκληρου γονιδίου ή μιας σειράς γειτονικών γονιδίων, η διαγραφή, ο διπλασιασμός και η μετάθεση τμήματος ενός χρωμοσώματος σε άλλο, ή ο διπλασιασμός και διαγραφή ολόκληρου χρωμοσώματος. Αυτές οι χρωμοσωμικές μεταλλαγές παίζουν σημαντικό ρόλο στην εμφάνιση πολλών καρκίνων.

Κάθε άτομο έχει δυο αλληλόμορφα, ένα από κάθε γονίο για κάθε γενετικό τόπο. Ίδια αλληλόμορφα ορίζουν τον ομοζυγώτη και διαφορετικά αλληλόμορφα τον ετεροζυγώτη για κάθε γενετικό τόπο. Η κληρονομικότητα αυτών των αλληλόμορφων ακολουθεί τους τυπικούς μενδελικούς κανόνες κληρονομικότητας. Με την κατανόηση των μοριακών βάσεων των μεταλλαγών και της ποικιλίας των αλληλόμορφων, η κατανομή τους στον πληθυσμό μπορεί να αναλυθεί επακριβώς παρακολουθώντας συγκεκριμένες αλληλουχίες DNA. Διαφορές στην αλληλουχία του DNA που μελετώνται σε ένα πληθυσμό ονομάζονται γενετικοί πολυμορφισμοί και αυτοί είναι που υποδηλώνουν την ποικιλομορφία που παρατηρείται μέσα σε ένα είδος και ανάμεσα στα είδη.

Παρά την μεγάλη επικράτηση των καλοήθων πολυμορφισμών σε έναν πληθυσμό, η ύπαρξη κακοήθων μεταλλαγών είναι σπάνια λόγω της εκλεκτικής επιλογής που εξαλείφει τις πιο επιβλαβείς μεταλλαγές από

τον πληθυσμό (π.χ. θνησιμότητα) και την ποικιλομορφία μέσα στην αλληλουχία του γονιδιώματος, σε απάντηση στην πολυμορφική αλλαγή. Μερικές περιοχές του γονιδιώματος είναι αρκετά σταθερές και χωρίς πολυμορφικές παραλλαγές ενώ άλλες περιοχές έχουν μεγάλο βαθμό πολυμορφισμών όπου η ποικιλομορφία είναι συνέπεια της καλοήθους λειτουργικής αλλαγής στην αλληλουχία. Με άλλα λόγια, οι πολυμορφισμοί μεταξύ των ατόμων μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε αυτές που δεν προκαλούν αλλαγές στον φαινότυπο, αυτές που προκαλούν καλοήθεις αλλαγές στον φαινότυπο (π.χ. φυσιολογική γενετική παραλλαγή) και αυτές που προκαλούν δυσμενείς συνέπειες στον φαινότυπο (π.χ. μεταλλάξεις). Στην τελευταία ομάδα μπορούν να υποκατηγοριοποιηθούν στις πολυμορφικές μεταλλαγές που μπορούν να προκαλέσουν ένα λειτουργικά ανώμαλο φαινότυπο όπως οι μονογονιδιακές ασθένειες (π.χ. δρεπανοκυτταρική αναιμία) και αυτές που δεν μπορούν να προκαλέσουν βλάβη από μόνες τους και πρέπει να συνδράμουν και άλλες μεταλλαγές ώστε να παραχθεί λειτουργικά ανώμαλος φαινότυπος (π.χ. σύνθετα νοσήματα όπως η υπέρταση).

Οι *πολυμορφισμοί* είναι πιο συχνόι σε μη κωδικοποιητικές περιοχές του γονιδιώματος παρά σε κωδικοποιητικές και ένα κοινό χαρακτηριστικό είναι η επανάληψη σε σειρά μικρών αλληλουχιών DNA με ποικίλο αριθμό επαναλήψεων. Στην περίπτωση που αυτές οι επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες είναι μεγάλες ονομάζονται *πολυμορφισμός ποικίλου αριθμού διαδοχικών επαναλήψεων* (VNTRs) και αν είναι μικρές ονομάζονται *βραχείες διαδοχικές επαναλήψεις* ή *μικροδορυφορικές επαναλήψεις* (STRs). Κατά τη διάρκεια της μίτωσης ο αριθμός των διαδοχικών επαναλήψεων μπορεί να αλλάξει και η συχνότητα αυτού του λάθους της αντιγραφής είναι αρκετή να δημιουργήσει διαφορετικού μήκους πολυμορφισμούς διαδοχικών επαναλήψεων, κοινών σε ένα πληθυσμό. Ωστόσο ο βαθμός αλλαγής στο μήκος των διαδοχικών επαναλήψεων είναι μικρός για να κάνει το μέγεθος του πολυμορφισμού σταθερό γονοτυπικό χαρακτηριστικό στις οικογένειες. Οι πολυμορφικές διαδοχικές επαναλήψεις είναι χρήσιμες στον καθορισμό της κληρονομικότητας συγκεκριμένων γενετικών τόπων.

Οι πολυμορφισμοί διαδοχικών επαναλήψεων είναι επαρκώς παρόντες σε όλο το γονιδίωμα και μπορούν να χρησιμοποιηθούν σαν γενετικοί δείκτες συγκεκριμένων γονιδίων μέσω ανάλυσης της σύνδεσής τους με αυτά τα γονίδια κατά τη διαδικασία της ανταλλαγής και του ανασυνδυασμού. Η ανάλυση πολλών γενετικών πολυμορφισμών στο ανθρώπινο γονιδίωμα (genotyping) ανέδειξε μια αξιοσημείωτη ποικιλία μεταξύ των ατόμων στο επίπεδο της αλληλουχίας του DNA. Ο μονονουκλεοτιδικός πολυμορφισμός (SNP), η πιο συχνή παραλλαγή, διαφέρει κατά ένα νουκλεοτίδιο ανάμεσα στα χρωμοσώματα για μια συγκεκριμένη αλληλουχία (Εικόνα 1-5). Από την ανάλυση του γονιδιώματος αντιπροσωπευτικών πληθυσμών, εκτιμάται ότι 10 εκατομμύρια παραλλαγές (δλδ. μία για κάθε 100 βάσεις) αποτελούν το 90% των μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών στον πληθυσμό, με τις σπάνιες παραλλαγές να αποτελούν το υπολειπόμενο 10%. Σε κάθε γενιά ενός είδους, η συχνότητα των πολυμορφικών αλλαγών σε ένα γονίδιο είναι 10^{-4} με 10^{-7} . Με βάση τον αριθμό των γονιδίων στο ανθρώπινο γονιδίωμα, η αλληλουχία των βάσεων μεταξύ του 0,5% και 1,0% είναι πολυμορφική. Έτσι, η νέα παραλλαγή μπορεί να εντοπιστεί με βάση τα γειτονικά αλληλόμορφα που ήταν παρόντα στο χρωμόσωμα τη στιγμή της μεταλλαγής.

Ο απλότυπος είναι μια συγκεκριμένη ομάδα ή συνδυασμών αλληλόμορφων σε ένα χρωμόσωμα ή σε τμήμα του χρωμοσώματος (βλέπε Εικ. 1-5). Όταν τα γονικά χρωμοσώματα χιάζονται, δημιουργούνται νέοι απλότυποι-μωσαϊκά που περιέχουν περισσότερες μεταλλαγές λόγω του ανασυνδυασμού. Τα αλληλόμορφα με τους μονονουκλεοτιδικούς πολυμορφισμούς μέσα στον απλότυπο μπορούν επίσης να συν-κληρονομηθούν μαζί με άλλα αλληλόμορφα στον πληθυσμό, μηχανισμός που ονομάζεται *ανισσοροπία σύνδεσης* (linkage disequilibrium -LD). Η συσχέτιση μεταξύ δυο SNPs μειώνεται καθώς αυξάνεται η μεταξύ τους απόσταση, επιτρέποντας στα πρότυπα LD να αναγνωριστούν από την εγγύτητα των γειτονικών SNPs. Εναλλακτικά, μερικοί καλώς επιλεγμένοι SNPs είναι συχνά αρκετοί για να προβλεφθεί η εντόπιση άλλων κοινών παραλλαγών στην περιοχή.

Οι απλότυποι που σχετίζονται με μια μεταλλική αναμένεται να γίνουν συχνόι μέσω του ανασυνδυασμού στο γενικό πληθυσμό μετά από πολλές γενιές. Εν αντιθέσει, η γενετική αποτύπωση με LD αποκλίνει από τους παραδοσιακούς μενδελικούς νόμους με το να χρησιμοποιεί όλο τον ανθρώπινο πληθυσμό σαν ένα μεγάλο οικογενειακό δέντρο χωρίς

Πίνακας 1.1 Μοριακή βάση των μεταλλαγών

Τύπος	Παραδείγματα
ΣΗΜΕΙΑΚΗ ΜΕΤΑΛΛΑΓΗ	
Διαγραφή	α-θαλασσαιμία, πολυκυστική νόσος των νεφρών
ΑΝΤΙΚΑΤΑΣΤΑΣΕΙΣ	
Σιωπηλή	Κυστική ίνωση
Παρερμηνευτική	Δρεπανοκυτταρική αναιμία, πολυκυστική νόσος των νεφρών, συγγενές σύνδρομο μακρού QT
Μη νοηματική	Κυστική ίνωση, πολυκυστική νόσος των νεφρών
ΜΕΓΑΛΕΣ ΜΕΤΑΛΛΑΓΕΣ (ΓΟΝΙΔΙΟ Ή ΣΥΣΤΑΔΕΣ ΓΟΝΙΔΙΩΝ)	
Διαγραφή	Μυϊκή δυστροφία Duchenne
Προσθήκη	Ανεπάρκεια του παράγοντα VIII (αιμορροφιλία Α)
Διπλασιασμός	Μυϊκή δυστροφία Duchenne
Αναστροφή	Ανεπάρκεια του παράγοντα VIII
Τρινουκλεοτιδική επανάληψη	Νόσος του Huntington
ΠΟΛΥ ΜΕΓΑΛΕΣ ΜΕΤΑΛΛΑΓΕΣ (ΧΡΩΜΟΣΩΜΙΚΑ ΤΜΗΜΑΤΑ Ή ΧΡΩΜΟΣΩΜΑΤΑ)	
Διαγραφή	Σύνδρομο Turner (45, X)
Διπλασιασμός	Τρισωμία 21
Μετάθεση	XX αρρεν [46, X; t (X;Y)]*

*Μετάθεση πάνω στο χρωμόσωμα X ενός τμήματος του Y χρωμοσώματος που περιέχει το γενετικό τόπο για την διαφοροποίηση των όρχεων



τάσης συγκεκριμένων αλληλομόρφων να κληρονομούνται μαζί υποδηλώνει ότι η απόσταση του ανασυνδυασμού στο ανθρώπινο γονιδίωμα είναι 3000 cM.

Η αναγνώριση του γονιδίου ή των γονιδίων υπεύθυνων για τον φαινότυπο μιας συγκεκριμένης πολυγονιδιακής νόσου προϋποθέτει την κατανόηση της τοπογραφικής ανατομίας των ανθρώπινου γονιδιώματος, κάτι το οποίο είναι άρρηκτα συνδεδεμένο με τις περιβαλλοντικές επιδράσεις. Το πρόγραμμα του ανθρώπινου γονιδιώματος προτάθηκε πρώτη φορά το 1985 και αποτέλεσε την διεθνή προσπάθεια να καθοριστεί ολόκληρη η νουκλεοτιδική αλληλουχία του ανθρώπινου γονιδιώματος, συμπεριλαμβάνοντας και την κατασκευή αναλυτικών γενετικών, φυσικών και μεταγραφικών χαρτών, με την αναγνώριση και χαρακτηρισμό όλων των γονιδίων. Αυτή η επιδρομή στη βιολογία μεγάλης κλίμακας χαρακτηρίστηκε από τον νομπελίστα James Watson ως η καθοριστική στιγμή της ζωής του, να γίνει μάρτυρας του μονοπατιού από την διπλή έλικα στην «αλληλοχλοποίηση» 3 δισεκατομμυρίων βάσεων ανθρώπινου γονιδιώματος, ανοίγοντας το δρόμο για την κατανόηση της εξέλιξης του ανθρώπου και αξιοποιώντας τα οφέλη του για την ανθρώπινη υγεία.

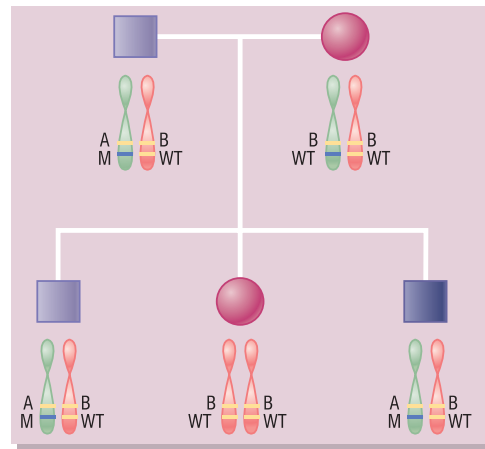
Ανάμεσα στα πρωιμότερα επιτεύγματα του προγράμματος του ανθρώπινου γονιδιώματος ήταν η ανάπτυξη χαρτών με ανάλυση 1-cM, έκαστος να περιέχει 3000 δείκτες και η αναγνώριση 52.000 αλληλοχλοποιημένων περιοχών. Για την λειτουργική ανάλυση σε κλίμακα γονιδιώματος, έγινε μεγάλη τεχνολογική πρόοδος, με μεθόδους υψηλής απόδοσης σύνθεσης ολιγονουκλεοτιδίων, βιβλιοθήκες συμπληρωματικού DNA (cDNA) και DNA μικροσυστοιχίες. Το 1998 η ιδιωτική επιχείρηση Celera πρότεινε ένα παρόμοιο εγχείρημα με το πρόγραμμα ανθρώπινου γονιδιώματος χρησιμοποιώντας μια επαναστατική προσέγγιση, την αλληλοχλοποίηση με βολή (shotgun sequencing) για τον καθορισμό της αλληλουχίας του ανθρώπινου γονιδιώματος (<http://www.dnai.org/c/index.html>). Η μέθοδος αλληλοχλοποίησης με βολή σχεδιάστηκε για τυχαία αλληλοχλοποίηση σε μεγάλη κλίμακα και την ακόλουθη ευθυγράμμιση των τμημάτων που αλληλοχλοποιήθηκαν με τη χρήση υπολογιστικών και μαθηματικών μοντέλων. Στο τέλος το πρόγραμμα ανθρώπινου γονιδιώματος και η ιδιωτική επιχείρηση Celera δημιούργησαν ένα εκλεπτυσμένο χάρτη όλου του ανθρώπινου γονιδιώματος το 2001.

Εξαιτίας των διαφορών στην αλληλουχία του γονιδιώματος που προκύπτουν ως συνέπεια φυσιολογικών βιολογικών παραλλαγών ή πολυμορφισμών, οι επακόλουθοι πολυμορφισμοί μήκους περιοριστικού θραύσματος (RFLPs) διαφέρουν ανάμεσα στα άτομα και κληρονομούνται ακολουθώντας τους μενδελικούς νόμους. Αυτοί οι πολυμορφισμοί εξυπηρετούν ως γενετικοί δείκτες για συγκεκριμένους γενετικούς τόπους στο γονιδίωμα. Ένας από τους πιο χρήσιμους τύπους RFLP για τον εντοπισμό γενετικών τόπων στο γονιδίωμα είναι αυτοί που προκύπτουν από διαδοχικές επαναλήψεις μιας ακολουθίας. Οι διαδοχικές επαναλήψεις προέρχονται από την ολίσηση της DNA πολυμεράσης κατά την αντιγραφή στην περίπτωση των βραχέων διαδοχικών επαναλήψεων (STRs) και από τον άνισο επιχρισμό στην περίπτωση των μεγαλύτερων παραλλαγών. Οι STRs είναι καταμετρημένοι σε όλο το γονιδίωμα και είναι ιδιαίτερα πολυμορφικοί. Αυτοί οι δείκτες έχουν δύο διαφορετικά αλληλόμορφα σε κάθε τόπο που προέρχονται ένα από κάθε γονέα και η προσέλευση των χρωμοσωμάτων μπορεί να διακριθεί με την ανάλυσή τους.

Η χρήση των ιδιαίτερα πολυμορφικών επαναλαμβανόμενων αλληλοχλοίων που βρίσκονται σε όλο το γονιδίωμα σαν γενετικοί δείκτες παρείχε τη βάση της χαρτογράφησης συγκεκριμένων γενετικών τόπων καθιερώνοντας την συσχέτιση ή την σύνδεση με επιλεγμένους δείκτες. Η ανάλυση σύνδεσης προβλέπεται από μια βασική αρχή: η πιθανότητα ότι ένας επιχρισμός θα συμβεί κατά τη μείωση μειώνεται από το κατά πόσο ο τόπος που μας ενδιαφέρει είναι κοντά σε έναν δεδομένο δείκτη. Η έκταση της γενετικής σύνδεσης μπορεί να εξακριβωθεί για κάθε ομάδα γενετικών τόπων, ένας από τους οποίους μπορεί να περιέχει μια μεταλλαγή που προκαλεί νόσο (Εικόνα 1-7).

■ ΕΝΤΟΠΙΣΜΟΣ ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΕΝΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ

Η αναγνώριση ενός συγκεκριμένου γονιδίου που πιστεύεται ότι προκαλεί μια συγκεκριμένη ανθρώπινη νόσο προϋποθέτει την αναγνώριση μεταλλαγών στο συγκεκριμένο γονίδιο. Αν το γονίδιο που είναι ύποπτο να προκαλεί τον παθολογικό φαινότυπο είναι γνωστό, η αλληλουχία του μπορεί να βρεθεί με συμβατικές μεθόδους κλωνοποίησης και αλληλο-



Εικόνα 1-7. Ανάλυση σύνδεσης. Η ανάλυση της συσχέτισης (π.χ. γενετική γεινιότητα) μίας μεταλλαγής (M) και ενός πολυμορφικού αλληλόμορφου δείκτη (A) που δείχνει στενή σύνδεση επειδή η μεταλλαγή διαχωρίζεται μαζί με το αλληλόμορφο A, ενώ ο φυσικός γενετικός τόπος (WT) σχετίζεται με το αλληλόμορφο B.

χισης και να αναγνωριστεί έτσι η μεταλλαγή. Μια ποικιλία τεχνικών είναι διαθέσιμη για την αναγνώριση των μεταλλαγών. Οι μεταλλαγές που αφορούν προσθήκη ή διαγραφή μεγάλων τμημάτων DNA μπορούν να ανιχνευτούν με την υβριδοποίηση κατά Southern, στην οποία το απομονωμένο DNA υβριδοποιείται με ένα ραδιενεργά σημασμένο τμήμα μίας αλληλουχίας cDNA. Ακολουθεί επώαση του DNA με μια συγκεκριμένη περιοριστική ενδονουκλεάση που διασπά την αλληλουχία DNA που μας ενδιαφέρει σε συγκεκριμένα σημεία για να παράγει μικρότερα τμήματα και αυτά να αποτυπωθούν με την ηλεκτροφόρηση στο πήκτωμα αгарόζης. Αλλαγές στην κινητικότητα του πήκτωματος συγκριτικά με την αλληλουχία του άγριου (φυσικού) τύπου μπορούν να καταστούν εμφανείς ως συνάρτηση των μεταβολών του μοριακού μεγέθους του τμήματος. Εναλλακτικά, η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον εντοπισμό μεταλλαγών.

Στη διαδικασία της PCR, μικρά ολιγονουκλεοτίδια (20 έως 40 βάσεις μέγεθος), που είναι συμπληρωματικά προς τις περιοχές του DNA που περιλαμβάνει την ακολουθία που μας ενδιαφέρει και συμπληρωματικά για κάθε κλώνο της διπλής έλικας του DNA, συντίθενται και χρησιμοποιούνται ως εκκινητές για τον πολλαπλασιασμό της συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA. Αυτοί οι εκκινητές προστίθενται στο διάλυμα του DNA. Η θερμοκρασία του διαλύματος αυξάνεται ώστε να αποχωριστούν οι αλυσίδες του DNA και μετά μειώνεται για να επιτραπεί η πρόσδεση-υβριδοποίηση των εκκινητών στις συμπληρωματικές τους αλληλουχίες-στόχους. Μια θερμοανθεκτική DNA πολυμεράση περιλαμβάνεται στην αντίδραση για να συνθέσει νέο DNA με κατεύθυνση 5' προς 3' από τους συνδεδεμένους εκκινητές. Στη συνέχεια η θερμοκρασία αυξάνεται ώστε να αποχωριστούν οι δίκλωνες δομές και μετά μειώνεται για να επιτραπεί έτσι ένας άλλος κύκλος σύνθεσης DNA. Αρκετοί κύκλοι εναλλαγής θερμοκρασίας (συνήθως 40) πραγματοποιούνται για να πολλαπλασιαστεί εκθετικά η συγκέντρωση της αλληλουχίας που μας ενδιαφέρει και να αναγνωριστεί σαν προϊόν PCR στο πήκτωμα αгарόζης κατά την ηλεκτροφόρηση με φθορίζουσα χρωστική. Το προϊόν μπορεί να απομονωθεί και να αλληλοχλοηθεί ώστε να αναγνωριστεί η μεταλλαγή.

Στην περίπτωση μεγάλου σε μέγεθος γονιδίου όπου η μεταλλαγή είναι άγνωστη (ειδικά αν είναι σημειακή μεταλλαγή), μπορούν να χρησιμοποιηθούν άλλοι μέθοδοι για να αναγνωριστεί η πιθανή μεταλλαγή στην αλληλουχία του εξονίου. Μία συνήθης προσέγγιση αποτελεί ο έλεγχος της γονιδιακής αλληλουχίας για μεταλλαγές που αλλάζουν τη δομική διαμόρφωση μικρών συμπλεγμάτων μεταξύ του μητρικού DNA και των προϊόντων της PCR, οδηγώντας σε αλλαγή της κινητικότητας σε πήκτωμα αгарόζης κάτω από μη αποδιατακτικές συνθήκες (π.χ. ανάλυση πολυμορφικού διαμόρφωσης μονόκλωνων αλυσίδων). Η αντικατάσταση μίας μόνο βάσης ή η διαγραφή της μπορεί να αλλάξει την διαμόρφωση του συμπλόκου όταν συγκρίνεται με τα συμπλέγματα άγριου τύπου έτσι ώστε να προσδώσει μια αλλαγή στην κινητικότητα. Η αλληλοχλοίση αυτής



της -συγκριτικά- μικρής περιοχής του γονιδίου διευκολύνει την ακριβή αναγνώριση της μεταλλαγής.

Όταν το γονίδιο που πιστεύεται ότι προκαλεί τον παθολογικό φαινότυπο είναι άγνωστο, όταν η πιθανή θέση του στο γονιδίωμα δεν έχει αναγνωριστεί ή όταν περιορισμένες πληροφορίες για την χαρτογράφηση του είναι διαθέσιμες, χρησιμοποιείται η προσέγγιση του «υποψήφιου γονιδίου» για να αναγνωριστεί το μεταλλαγμένο γονίδιο. Σε αυτή την προσέγγιση πιθανά υποψήφια γονίδια αναγνωρίζονται με βάση την αναλογία τους προς τα αντίστοιχα ζωικών μοντέλων ή με την ανάλυση γνωστών γονιδίων που βρίσκονται στην περιοχή του γονιδιώματος για το οποίο είναι διαθέσιμες περιορισμένες πληροφορίες. Τα υποψήφια γονίδια αναλύονται για πιθανές μεταλλαγές. Ασχέτως την προσέγγισης που χρησιμοποιείται, οι μεταλλαγές που αναγνωρίζονται σε υποψήφια γονίδια πρέπει πάντα να συσχετίζονται με λειτουργικές αλλαγές στο προϊόν του γονιδίου επειδή μερικές μεταλλαγές μπορεί να είναι σιωπηλές λειτουργικά, αντιπροσωπεύοντας έναν πολυμορφισμό χωρίς φαινοτυπικές επιπτώσεις. Οι λειτουργικές αλλαγές στο προϊόν του γονιδίου μπορούν να αξιολογηθούν με τη χρήση κυτταρικών καλλιεργειών ώστε να εκτιμηθεί η λειτουργία της πρωτεΐνης. Αυτό επιτυγχάνεται με την έκφραση της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης μέσω παραδοχικής επιμόλυνσης των κυττάρων με ένα φορέα που μεταφέρει το cDNA, που κωδικοποιεί το γονίδιο που μας ενδιαφέρει, ενσωματώνοντας έτσι την αντίστοιχη μεταλλαγή. Εναλλακτικά μοναδικά ζωικά μοντέλα μπορούν να παραχθούν, στα οποία το μεταλλαγμένο γονίδιο ενσωματώνεται στον αρσενικό προπυρηνα ωκυττάρων που λαμβάνονται από ένα γονιμοποιημένο θηλυκό σε υπερ-ωοθυλακιορρηξία. Αυτή η ένωση παράγει ένα ζώο που υπερεκφράζει το μεταλλαγμένο γονίδιο, ένα διαγονιδιακό ζώο, που έχει παραπάνω αριθμό αντιγράφων από το γονίδιο που μας ενδιαφέρει ή ένα ζώο στο οποίο το υπό μελέτη γονίδιο διακόπτεται και δεν συντίθεται το παραγωγό του (π.χ. ζώο με αποσιωπημένο γονίδιο- knockout gene, ή ζώο με μισό [ετεροζυγώτης] ή καθόλου [ομοζυγώτης] από τον συνήθη αριθμό του δεδομένου γονιδίου).

Μοριακή Διαγνωστική

Η δύναμη των μοριακών τεχνικών εκτείνεται πέρα από την χρήση τους στον καθορισμό της ακριβούς μοριακής βάσης μιας κληρονομούμενης νόσου. Εκμεταλλευόμενοι την εκπληκτική ευαισθησία της PCR για τον πολλαπλασιασμό σπανίων νουκλεϊνικών αλληλουχιών, είναι δυνατό να διαγνωστέι γρήγορα μια σειρά μολυσματικών ασθενειών των οποίων οι μοναδικές αλληλουχίες είναι διαθέσιμες. Συγκεκριμένα, μολύνσεις προκαλούμενες από απαιτητικούς ή αργά αναπτυσσόμενους οργανισμούς μπορούν να διαγνωστούν γρήγορα, όπως στην περίπτωση του *Mycobacterium tuberculosis*. Η παρουσία γονιδίων σε μικροοργανισμούς που προσφέρουν αντίσταση σε συγκεκριμένα αντιβιοτικά μπορούν επίσης να βρεθούν με την PCR. Η αλληλούχιση ολόκληρου του γονιδιώματος οργανισμών όπως η *Escherichia coli*, το *M. Tuberculosis* και το *Treponema pallidum* προσφέρει अपαρράμιλλες ευκαιρίες στην παρακολούθηση της επιδημιολογικής δομής των λοιμώξεων, στην πορεία επίκτητων μεταλλαγών, στην κατασκευή αντιβιοτικών θεραπειών και στην ανάπτυξη μοναδικών γονιδιακών θεραπειών (συζητείται παρακάτω) για μολυσματικούς παράγοντες για τους οποίους οι συνηθισμένες αντιβιοτικές θεραπείες είναι αναποτελεσματικές ή οριακά αποτελεσματικές.

Η εφαρμογή των μοριακών μεθόδων στην ανθρώπινη γενετική έφερε επανάσταση στον τομέα αυτόν. Μέσω της χρήσης μεθόδων που χρησιμοποιούν την ανάλυση σύνδεσης και την PCR, σημειακές μεταλλαγές μπορούν να εντοπιστούν και να χαρακτηριστούν. Στο άλλο άκρο του φάσματος των γενετικών αλλαγών που αφορούν σε μία νόσο, οι χρωμοσωμικές μεταποτίσεις, οι διαγραφές ή οι διπλασιασμοί μπορούν να αναγνωριστούν από συμβατικές μεθόδους κυτταρογενετικής. Μεγάλες διαγραφές που περιλαμβάνουν πολλά ζεύγη κλοβάσεων και πολλά γονίδια μπορούν να αποτυπωθούν με την φθορίζουσα υβριδοποίηση in situ (fluorescence in situ hybridization - FISH), μία τεχνική στην οποία ένα τμήμα κλωνοποιημένου DNA συνδέεται με μια φθορίζουσα ουσία και υβριδοποιείται με το χρωμοσωμικό DNA. Όταν υπάρχει διαγραφή των τμήματος που μας ενδιαφέρει από το γονιδίωμα, το χρωμοσωμικό DNA δεν φθορίζει στην αναμενόμενη χρωμοσωμική περιοχή.

Η πρόοδος στην μοριακή ιατρική ανέδειξε τους μηχανισμούς της καρκινогенσης και έφερε επανάσταση στην διάγνωση και αντιμετώπιση των νεοπλασματικών ασθενειών. Σύμφωνα με την σύγχρονη οπτική το νεόπλασμα προκύπτει από τον κλωνικό πολλαπλασιασμό ενός κυττάρου

που μεταπίπτει από μία οργανωμένη, ήρεμη κατάσταση σε μία ανώμαλη φάση ανάπτυξης. Η βλάβη του DNA αθροίζεται στο γονικό καρκινικό κύτταρο ως αποτέλεσμα εξωγενών παραγόντων (π.χ. ραδιενεργός έκθεση) ή κληρονομήσιμων παραγόντων. Στις αρχικές φάσεις της καρκινογένεσης, ορισμένες γονιδιωματικές αλλαγές μπορούν να προκαλέσουν μεγάλη γενετική αστάθεια που αυξάνει την πιθανότητα επιπρόσθετης βλάβης. Μία κατηγορία γονιδίων που ενεργοποιείται κατά την καρκινογένεση είναι τα ογκογονίδια, που είναι αρχέγονα γονίδια που υπάρχουν φυσιολογικά στο γονιδίωμα των θηλαστικών σε ανενεργή κατάσταση (πρώτο-ογκογονίδια), αλλά όταν ενεργοποιούνται προάγουν τον ανώμαλο κυτταρικό πολλαπλασιασμό μέσω συγκεκριμένων ενδοκυτταρικών σηματοδοτικών μονοπατιών.

Μοριακές μέθοδοι που βασίζονται στην απόκτηση συγκεκριμένων καρκινικών δεικτών και μοναδικών DNA αλληλουχιών που είναι αποτέλεσμα ογκογενετικών δεικτών από μεγάλες χρωμοσωμικές ανωμαλίες (π.χ. μεταποτίσεις ή διαγραφές που προκαλούν ογκογένεση) εφαρμόζονται ευρέως στην διάγνωση των κακοηθιών. Αυτές οι μέθοδοι μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να διαπιστωθεί η παρουσία συγκεκριμένων καρκινικών δεικτών και ογκογονιδίων σε δείγματα βιοψιών, για να επιβεβαιωθεί η παρουσία ή παραμονή κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων μετά την ολοκλήρωση ενός κύκλου χημειοθεραπείας και για να βρεθεί η ανάπτυξη γενετικής αντίστασης σε συγκεκριμένους χημειοθεραπευτικούς παράγοντες. Μέσω της χρήσης της ανάλυσης σύνδεσης και της μεθόδου «υποψήφιου γονιδίου», μελλοντικές μελέτες θα μπορούν να αναγνωρίσουν τα άτομα με κληρονομική προδιάθεση για κακοήγη εξαλλαγή. Πολλά από αυτά τα θέματα συζητούνται σε επόμενα κεφάλαια.

Η ανάπτυξη των *μικροσυτοιχιών έκφρασης* έφερε επανάσταση στην μοριακή διαγνωστική και άρχισε να ξεκαθαρίζει την παθοφυσιολογία σύνθετων νοσημάτων. Αυτές οι τεχνικές σηματοδοτούν το cDNA που παράγεται από το σύνολο του mRNA που απομονώνεται από ένα κύτταρο ή ιστικό παρασκεύασμα με μία ραδιενεργή ή φθορίζουσα ουσία και υβριδοποιείται σε ένα σταθερό υπόστρωμα στο οποίο είναι προσδεσμένες πολλές διαφορετικές πολυνουκλεοτιδικές αλληλουχίες με γνωσητή αλληλουχία. Το σήμα από τις σηματοδοτούμενες cDNA αλυσίδες που έχουν προσδεθεί σε συγκεκριμένες περιοχές της συστοιχίας παρακολουθείται και η σχετική πληθώρα συγκεκριμένων αλληλουχιών συγκρίνεται με αυτή ενός δείγματος αναφοράς. Με αυτήν την προσέγγιση οι μικροσυτοιχίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν σαν μοριακό αποτύπωμα για την διάγνωση μια συγκεκριμένης νόσου (π.χ. ο τύπος της κακοήθειας και η ευαισθησία του στην θεραπεία και την πρόγνωση) και να αναγνωριστούν τα γονίδια η έκφραση των οποίων αυξάνεται ή μειώνεται σε μία συγκεκριμένη κατάσταση (π.χ. αναγνώριση γονιδίων τροποποιητικής της νόσου).

Πολλές άλλες εφαρμογές των τεχνικών σηματοδοτικής ιατρικής είναι διαθέσιμες επιπροσθέτως αυτών για τις μολυσματικές νόσους και την ογκολογία. Οι μοριακές μέθοδοι μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να ξεδιαλύνουν γενετικές διαφορές στον μεταβολισμό που μπορεί να τροποποιεί την φαρμακευτική ανταπόκριση σε ένα πληθυσμό ατόμων (π.χ. φαρμακογενετική), να χρησιμοποιηθεί στην έγκριση όπως η πατρότητα ή η ποινική ενοχή και να επιτρέψει την επιδημιολογική ανάλυση σε μια γενετική βάση.

Γονίδια και Ανθρώπινη Νόσος

Οι ανθρώπινες γενετικές νόσοι μπορούν να διαιρεθούν σε τρεις μεγάλες κατηγορίες: αυτές που προκαλούνται από μία μεταλλαγή σε ένα μόνο γονίδιο (π.χ. μονογονιδιακές ανωμαλίες, μενδελικά χαρακτηριστικά), αυτές που προκαλούνται από μεταλλαγές σε περισσότερα από ένα γονίδια (π.χ. πολυγονιδιακές νόσοι, σύνθετα χαρακτηριστικά) και σε αυτές που προκαλούνται από χρωμοσωμικές ανωμαλίες (Πίνακας 1-2). Οι περιβαλλοντικοί παράγοντες μπορούν να συνεισφέρουν στον φαινότυπο της νόσου και στις τρεις κατηγορίες, μέσω της τροποποίησης της γονιδιακής έκφρασης ή αποκαλύπτοντας μια βιοχημική ανωμαλία που δεν έχει λειτουργικές συνέπειες όταν απουσιάζει κάποιο ερέθισμα ή κάποιος στρεσογόνος παράγοντας.

Οι κλασικές μονογονιδιακές ασθένειες είναι η δρεπανοκυτταρική αναιμία, η οικογενής υπερχοληστερολαιμία και η κυστική ίνωση. Αυτές οι γενετικές ασθένειες είναι αποτέλεσμα αποκλειστικά μιας σημειακής μεταλλαγής (π.χ. δρεπανοκυτταρική αναιμία) ή μίας από μερικές μεταλλαγές (π.χ. οικογενής υπερχοληστερολαιμία, κυστική ίνωση) σε μία οικογένεια (π.χ. Pauling paradigm). Κάποιες από αυτές τις μεταλλαγές εξελίχθηκαν



Πίνακας 1.2 Μοριακή βάση των μεταλλαγών

Τύπος	Παραδείγματα
ΜΟΝΟΓΟΝΙΔΙΑΚΕΣ ΝΟΣΟΙ	
Αυτοσωμικός επικρατής Αυτοσωμικός υπολειπόμενος Φυλοσύνδετος Μία από πολλές μεταλλαγές	Πολυκυστική νόσος των νεφρών 1, νευροϊνωμάτωση 1 β-θαλασσαιμία, Νόσος Gaucher Αιμορροφιλία Α, Μυϊκή δυστροφία Emery-Dreifuss Οικογενής υπερχοληστερολαμία, κυστική ίνωση
ΠΟΛΥΓΟΝΙΔΙΑΚΕΣ ΝΟΣΟΙ	
Σύνθετα χαρακτηριστικά	Σακχαρώδης διαβήτης τύπου 1 (ινσουλινοεξαρτώμενος), υπέρταση, αθηροσκληρωτική νόσος, καρκίνος
ΧΡΩΜΟΣΩΜΙΚΕΣ ΑΝΩΜΑΛΙΕΣ	
Διαγραφές, διπλασιασμοί	Σύνδρομο Turner (μονοσωμία), Σύνδρομο Down (τρισωμία)

για να προστατεύσουν τον Ξενοστή. Για παράδειγμα, η δρεπανοκυτταρική αναιμία παρείχε προστασία έναντι του πλασμοδίου της ελονοσίας (*Plasmodium falciparum*) και η κυστική ίνωση προστασία από την χολέρα. Παραδείγματα πολυγονιδιακών ασθενειών ή σύνθετων νοσημάτων είναι ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου 1 (ινσουλινο-εξαρτώμενος), η αθηροσκληρωτική καρδιαγγειακή νόσος και η υπέρταση. Ένα παράδειγμα χρωμοσωμικής ανωμαλίας είναι η παρουσία ενός επιπλέον χρωμοσώματος 21 (π.χ. τρισωμία 21).

Η συνολική συχνότητα των μονογονιδιακών νόσων είναι περίπου 1%. Το 60% αυτών περιλαμβάνουν πολυγονιδιακές νόσους, που αφορούν νοσήματα με γενετικό υπόβαθρο που εμφανίζεται αργότερα στη ζωή. Περίπου το 0,5% των μονογονιδιακών ασθενειών περιλαμβάνουν χρωμοσωμικές ανωμαλίες. Οι χρωμοσωμικές ανωμαλίες είναι συχνές αιτίες αυτόματης αποβολής και δυσπλασιών.

Σε αντίθεση με την επικρατούσα άποψη των πρώτων γενετιστών, λίγοι είναι οι φαινότυποι που καθορίζονται εξολοκλήρου από ένα μόνο γενετικό τόπο. Οι μονογονιδιακές ασθένειες είναι σχετικά σπάνιες, ωστόσο είναι χρήσιμες για την κατανόηση μερικών βασικών αρχών κληρονομικότητας. Τρεις τύποι μονογονιδιακών ασθενειών υπάρχουν: αυτοσωμική επικρατούσα, αυτοσωμική υπολειπόμενη και φυλοσύνδετη κληρονομικότητα. Η επικρατούσα και υπολειπόμενη κληρονομικότητα αναφέρεται στον τρόπο κληρονομής ενός γενετικού χαρακτηριστικού και έχει σχέση με τον αριθμό των μεταλλαγμένων αλληλομόρφων σε ένα γενετικό τόπο. Αν ο φαινότυπος καθορίζεται από την παρουσία της μεταλλαγής σε ένα μόνο αλληλόμορφο τότε η μεταλλαγή ονομάζεται επικρατούσα και η ετερόζυγος κατάσταση προσδίδει στο άτομο τον κλινικό φαινότυπο. Όταν η μεταλλαγή υπάρχει και στα δύο αλληλόμορφα, για να εμφανιστεί ο φαινότυπος η μεταλλαγή ονομάζεται υπολειπόμενη και μόνο στην ομόζυγο κατάσταση θα προσδώσει τον φαινότυπο στο άτομο. Οι επικρατούσες και οι υπολειπόμενες μεταλλαγές μπορεί να οδηγήσουν σε απώλεια ή απόκτηση μιας λειτουργίας του γονιδιακού προϊόντος. Όταν η μεταλλαγή είναι παρούσα στο χρωμόσωμα Χ, ορίζεται ως φυλοσύνδετη (στα άρρενα άτομα είναι εξ' ορισμού επικρατούσα) αλλιώς ονομάζεται αυτοσωμική.

Η σημασία της αναγνώρισης μιας πιθανής γενετικής νόσου ως κληρονομήσιμης με τον ένα από αυτούς τους τρεις μηχανισμούς είναι ότι η νόσος πρέπει να έχει μια μονήρη γενετική ανωμαλία που να οδηγεί σε μια ανωμαλία σε μία πρωτεΐνη. Οι τυπικές γενετικές ασθένειες προκαλούνται από μεταλλαγή σε κωδικοποιητική αλληλουχία (εξόνιο). Ωστόσο όταν συμβαίνουν μεταλλαγές σε ιντρονικές και άλλες μη μεταγραφικές περιοχές του γονιδιωματός, μπορεί να διαταράξουν την λειτουργία ή την έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων. Παραδείγματα νόσων με αυτού του είδους τις μεταλλαγές είναι η μυοτονική δυστροφία και η αταξία Friedreich.

Το άτομο με επικρατή μονογονιδιακή νόσο τυπικά έχει ένα προσβεβλημένο γονέα και πιθανότητα 50% να μεταδώσει την μεταλλαγή στους απογόνους του. Τα αρσενικά και τα θηλυκά άτομα έχουν ίσες πιθανότητες να προσβληθούν και ίδια πιθανότητα να μεταδώσουν το χαρακτηριστικό στους απογόνους τους. Το χαρακτηριστικό δεν μπορεί να μεταδοθεί στους απογόνους μη προσβεβλημένων γονέων. Αντιθέτως, το άτομο με υπολειπόμενη μονογονιδιακή νόσο τυπικά έχει γονείς που είναι κλινικά υγιείς. Οι προσβεβλημένοι ετεροζυγωτικοί γονείς για την μεταλλαγή έχουν 25% πιθανότητα να μεταδώσουν τον κλινικό φαινότυπο στους

απογόνους τους αλλά 50% πιθανότητα να μεταδώσουν την μεταλλαγή στους απογόνους τους (π.χ. από τους μη προσβεβλημένους φορείς-απογόνους).

Παρά την ξεκάθαρη κληρονομικότητα των συνηθέστερων μονογονιδιακών νόσων (π.χ. δρεπανοκυτταρική αναιμία), η κλινική έκφραση της νόσου σε ένα άτομο με τον αναμενόμενο φαινότυπο για την νόσο μπορεί να διαφέρει. Η *μεταβλητότητα της κλινικής έκφρασης* ορίζεται ως το εύρος των φαινοτυπικών αλλαγών που παρατηρείται σε άτομα που φέρουν μια συγκεκριμένη μεταλλαγή. Η *διεισδυτικότητα* αναφέρεται σε ένα μικρότερο υποσύνολο ατόμων με ποικίλη κλινική έκφραση μιας μεταλλαγής και ορίζεται ως η αναλογία των ατόμων με έναν συγκεκριμένο γονότυπο που εμφανίζουν οποιοδήποτε κλινικό φαινοτυπικό χαρακτηριστικό της νόσου.

Τρία κύρια χαρακτηριστικά καθορίζουν την μεταβλητότητα της κλινικής έκφρασης ή την ατελή διεισδυτικότητα μιας συγκεκριμένης γενετικής διαταραχής: οι περιβαλλοντικοί παράγοντες, η επίδραση άλλων γενετικών τόπων και η τυχαία επιλογή. Οι περιβαλλοντικοί παράγοντες μπορούν να τροποποιήσουν το φαινότυπο της νόσου με την αλλαγή της γονιδιακής έκφρασης με διάφορους τρόπους, όπως με την επίδραση στους μεταγραφικούς παράγοντες (π.χ. μεταγραφικούς παράγοντες που είναι ευαίσθητοι στην κυτταρική οξειδωτική, όπως ο παράγοντας nuclear factor-κΒ) ή στις cis-αλληλουχίες των εκκινητών (μεθυλίωση των CpG αλληλουχιών) και με την μετα-μεταφραστική τροποποίηση των πρωτεϊνών (π.χ. οξειδωτική της λυσίνης). Το γεγονός ότι άλλα γονίδια μπορεί να τροποποιήσουν τις επιδράσεις της νόσου είναι αντανάκλαση της επικάλυψης της γενετικής ποικιλότητας στον πρωτογενή φαινότυπο της νόσου. Πολλά παραδείγματα υπάρχουν για την επίδραση αυτών των τροποποιητικών της νόσου γονιδίων που προκαλούν φαινοτυπικές παραλλαγές ανάμεσα στα άτομα με την ίδια μεταλλαγή που προκαλεί την πρωτογενή νόσο (π.χ. γονίδιο-γονίδιο αλληλεπιδράσεις) και τις επιδράσεις των τροποποιητικών γονιδίων της νόσου που αλληλεπιδρούν με περιβαλλοντικούς παράγοντες για να αλλάξουν τον φαινότυπο ακόμα περισσότερο (π.χ. γονίδιο-περιβαλλοντικές επιδράσεις). Αυτές οι αλληλεπιδράσεις είναι σημαντικές στις πολυγονιδιακές νόσους, οι γονίδιο-γονίδιο και γονίδιο-περιβαλλοντικές αλληλεπιδράσεις μπορούν να τροποποιήσουν την φαινοτυπική έκφραση της νόσου. Ανάμεσα στους ασθενείς με δρεπανοκυτταρική αναιμία για παράδειγμα ορισμένοι βιώνουν επώδυνες κρίσεις, άλλοι κάνουν εξύ θωρακικό σύνδρομο και άλλοι παρουσιάζουν αιμολυτικές κρίσεις.

Γενετικές διαταραχές που επιδρούν στο μιτοχονδριακό DNA, έχουν πρόσφατα αναγνωρισθεί. Το μιτοχονδριακό DNA κληρονομείται μόνο από τη μητέρα. Οι μεταλλαγές στο μιτοχονδριακό DNA μπορεί να διαφέρουν ανάμεσα στα μιτοχόνδρια του ίδιου κυττάρου και του ίδιου ατόμου (π.χ. ετεροπλασμία). Παραδείγματα νόσων που προκαλούνται από μεταλλαγές στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα είναι το σύνδρομο Kearns-Sayre και η οπτική νευροπάθεια Leber. Η λίστα με τις γνωστές μιτοχονδριακές ασθένειες μεγαλώνει γρήγορα. Το μιτοχονδριακό DNA μπορεί επίσης να συνεισφέρει σε ένα μεγάλο αριθμό συχνών πολυγονιδιακών ασθενειών.

Μοριακή Ιατρική

Ο πρωταρχικός στόχος των μοριακών στρατηγικών είναι να αποκαταθεί η φυσιολογική γονιδιακή λειτουργία στα άτομα με γενετικές μεταλλαγές. Οι μέθοδοι για να επιτευχθεί αυτό είναι στην παρούσα φάση πρωτόγονοι και πρέπει να ξεπεραστεί ένας αριθμός εμποδίων για να είναι επιτυχής αυτή η προσέγγιση.

Η μεταφορά ενός ολόκληρου γονιδίου μέσα στο κύτταρο δεν είναι εύκολη και η συνεχής έκφραση του νέου γονιδίου δεν μπορεί να διασφαλιστεί λόγω της ποικιλότητας στην ενσωμάτωση του στο γονιδίωμα και την ποικιλότητα στη ρύθμιση της έκφρασής του. Πολλές προσεγγίσεις έχουν προταθεί αλλά καμία δεν ήταν απόλυτα επιτυχής. Αυτές περιλαμβάνουν τα εξής: (1) ενσωμάτωση του cDNA σε ένα ιικό φορέα, όπως εξασθενημένους αδενοϊούς και εκμετάλλευση της ικανότητας του κυττάρου να απορροφά τον ιό ως μέσο για να αποκτήσει πρόσβαση το cDNA στο κύτταρο, (2) μεταφορά του cDNA από την κυτταρική μεμβράνη μέσω μιας φωσφατάσης ασβεστίου και (3) εγκλεισμός του cDNA σε ένα λιπόσωμα που μπορεί να συντηχθεί με την κυτταρική μεμβράνη και να μεταφέρει το cDNA.

Μετά την επιτυχή μεταφορά του cDNA στο κύτταρο το μέγεθος και η αντοχή της έκφρασης του γονιδίου είναι σημαντικές μεταβλητές. Το μέγεθος της έκφρασης καθορίζεται από τον αριθμό των αντιγράφων του



cDNA που προσλήφθηκαν από ένα κύτταρο και την έκταση της ενσωμάτωσής του στο γονιδίωμα του κυττάρου. Η αντοχή της έκφρασης φαίνεται να εξαρτάται εν μέρει από την αντιγονικότητα της αλληλουχίας και του πρωτεϊνικού παραγώγου.

Παρά τους τεχνικούς περιορισμούς, η γονιδιακή θεραπεία έχει χρησιμοποιηθεί για την επιτυχή θεραπεία της ανεπάρκειας της απαμινάσης της αδενοσίνης, κάτι που υποδηλώνει ότι η βασική αρχή στην οποία η θεραπεία στηρίχτηκε είναι λογική. Οι κλινικές δοκιμές της γονιδιακής θεραπείας καθυστέρησαν αρκετά μετά από μη αναμενόμενους θανάτους που καταγράφηκαν στα επιστημονικά μέσα ενημέρωσης. Προσπάθειες για άλλες γενετικές νόσους βρίσκονται σε εξέλιξη και ως μέσο πρόκλησης της έκφρασης μιας θεραπευτικής πρωτεΐνης (π.χ. ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας που προκαλεί αγγειογένεση στον ισχαιμικό ιστό).

Η κατανόηση της μοριακής βάσης της νόσου οδηγεί σε αναγνώριση των στόχων της. Παραδείγματα αυτής της αρχής οδήγησαν στην ανάπτυξη νέων θεραπειών για ασθένειες που ήταν δύσκολο να θεραπευτούν. Η ιματινίμπη, ένας αναστολέας της τυροσινικής κίνησης που είναι ιδιαίτερα αποτελεσματική στην αναστολή της δράσης της BCR-ABL κινάσης, είναι αποτελεσματική στην θεραπεία της χρόνιας φάσης της χρόνιας μυελογενούς λευχαιμίας. Το μονοκλωνικό αντίσωμα για τον παράγοντα νέκρωσης των όγκων α (ινφλιξιμάμπη) και αυτό του διαλυτού υποδοχέα του παράγοντα νέκρωσης των όγκων α (ετανερσέπτη) είναι βασικά παραδείγματα βιολογικών τροποποιητών που είναι αποτελεσματικοί στην θεραπεία χρόνιων φλεγμονωδών νόσων, όπως οι φλεγμονώδεις νόσους του εντέρου και η ρευματοειδής αρθρίτιδα. Αυτή η προσέγγιση για τις μοριακές θεραπείες είναι ταχέως επεκτεινόμενη και πολλά υποσχόμενη στην βελτίωση του θεραπευτικού οπλοστασίου διαφόρων ασθενειών.

Πέρα από τις κατηγορίες που αφορούν τον καρκίνο (π.χ. DNA, επιδιόρθωση RNA) οι συστοιχίες γονιδιακής έκφρασης αποκάλυψαν επιπρόσθετες αλληλεπιδράσεις των ρυθμιστικών οδών με μεγάλο κλινικό ενδιαφέρον. Ο περιορισμός στην αναγνώριση του γονιδιακού προφίλ έκφρασης με τις μικροσυστοιχίες, που δεν περιλαμβάνει τις μετα-μεταγραφικές και μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις των παραγόμενων πρωτεϊνών, θα ξεπεραστούν από την πρόοδο στην πρωτεομική. Αυτές οι διαδικασίες των σηματοδοτικών μονοπατιών τείνουν να αυξάνουν ή να μειώνουν την γονιδιακή έκφραση σε κλίμακα χρόνου που διαρκεί από δευτερόλεπτα μέχρι εβδομάδες. Μεγάλο φόρτο εργασίας χρειάζεται για να ενισχυθεί η παρούσα γνώση για τα μονοπάτια που ξεκινούν και ευδοκούν τους όγκους. Τα βασικά μονοπάτια και τα κομβικά σημεία της ρύθμισης θα αναγνωριστούν για το σχεδιασμό φαρμάκων και οι στόχοι από τις μηχανιστικές γνώσεις θα αντληθούν από το προφίλ έκφρασης καλλιιεργημένων κυτταρικών σειρών από μικρά ζωικά μοντέλα ή από ανθρώπινα δείγματα. Παρά το γεγονός ότι αντιπροσωπεύουν ιστική ετερογένεια και ποικιλομορφία μεταξύ διαφορετικών τύπων κυττάρων, η προσέγγιση των νέων συστημάτων για την ενσωμάτωση της γονιδιωματικής και υπολογιστικής έρευνας εμφανίζεται ιδιαίτερα υποσχόμενη για την αποκρυπτογράφηση των μονοπατιών που προκαλούν ογκογένεση. Οι βιολόγοι και οι κλινικοί γιατροί θα χρησιμοποιούν τις πληροφορίες που προέρχονται από αυτά τα εργαλεία για να κατανοηθούν τα γεγονότα που προάγουν την επιβίωση, την αγγειογένεση και την ανοσοποιητική διαφυγή, τα οποία μπορεί να επιδρούν στο μεταστατικό δυναμικό και την πρόοδο της νόσου.

Ποια πιθανά διαγνωστικά μέσα είναι διαθέσιμα για να καθιερωθούν γενετικοί καθοριστικοί παράγοντες στην φαρμακευτική απάντηση; Γονδιακές προσεγγίσεις μέσω του προγράμματος ανθρώπινου γονιδιώματος σε συνδυασμό με τις μικροσυστοιχίες, την πρωτεομική ανάλυση και την βιοπληροφορική θα αποκαλύψουν πολλά γονίδια που κωδικοποιούν φαρμακευτικούς στόχους (υποδοχείς). Παρομοίως, υψηλής απόδοσης έλεγχος μπορεί να προσφέρει στοιχεία για την προδιάθεση για μείζονες επιπλοκές ή αποτελέσματα από την αγωγή που σχετίζεται με γενετικούς πολυμορφισμούς.

Γονιδιακή Επεξεργασία

Η πρόοδος στα εργαλεία γονιδιακής επιδιόρθωσης έφερε επανάσταση στην ικανότητα των ερευνητών να κάνουν ακριβείς αλλαγές στο γονιδίωμα των ανθρώπινων βλαστοκυττάρων, βοηθώντας την γρήγορη και οικονομική παραγωγή γενετικά ανασυνδυασμένων ζώων (π.χ. ποντίκι και αρουραίοι) και ανθρώπινων βλαστοκυττάρων. Το σύστημα CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats) πρωτοανευρέθη-

κε στα βακτήρια, στα οποία προσφέρει ανοσοολογική μνήμη προηγούμενων ιογενών μολύνσεων.

Μαζί με την CRISPR-σχετιζόμενη πρωτεΐνη 9 (Cas9) και το οδηγό RNA (guide RNA-gRNA) το σχετικά απλό πρωκαρυωτικό σύστημα λειτουργεί σαν μια αποτελεσματική νουκλεάση ειδικής θέσης, με μικρή επίδραση στην εκτός στόχου αναγνώριση αλληλουχιών στα κύτταρα των θηλαστικών. Από τους οδοντικούς ινοβλάστες ενός προσβεβλημένου οργανισμού ασθενούς μπορούν να παραχθούν πολυδύναμα βλαστοκύτταρα (iPSCs) και να χρησιμοποιηθούν για την διαφοροποίηση μυοκαρδιακών κυττάρων, σκελετικών μυών ή και των δύο. Η διόρθωση της μεταλλαγής αφορά μια στοχευμένη στρατηγική κατά την οποία μια κασέτα επιλογής ικανή για ομόλογο ανασυνδυασμό μέσω του δακτυλίου-ψευδαργύρου προσδένεται στην προσβεβλημένη περιοχή την ίδια στιγμή που διορθώνεται η μεταλλαγή. Το σύστημα CRISPR χρησιμοποιείται ολοένα και περισσότερο στην στόχευση μιας σειράς γενετικών τόπων στα βλαστοκύτταρα των θηλαστικών και η λειτουργικότητα αυτού του φορέα επιτρέπει στα βλαστοκύτταρα να διορθωθεί το γονίδιο 'χωρίς ίχνος'.

Φαρμακογενετική

Το μέλλον της φαρμακογενετικής είναι να αναγνωριστούν όλοι οι παράγοντες που επηρεάζουν τις ανεπιθύμητες ενέργειες του φαρμάκου. Με αυτόν τον τρόπο η πρόωμη εγκατάλειψη ορισμένων κατηγοριών φαρμάκων μπορεί να αποφευχθεί προς όφελος του ορθολογικού σχεδιασμού και της φαρμακευτικής αγωγής.

Πολλά εμπόδια πρέπει να ξεπεραστούν στην φαρμακογενετική ώστε αυτή να διαδοθεί και να ενσωματωθεί στην κλινική πράξη. Η σύγχρονη προσέγγιση της δοκιμής και του λάθους στην ιατρική πρακτική είναι πρακτικές βαθιά ριζωμένες, αλλά η γοητεία των πρωτοκλασάτων φαρμάκων που παράγονται από την φαρμακοβιομηχανία εγγυάται ένα νέο μοντέλο προσέγγισης εξατομικευμένων δόσεων. Η εκπαίδευση των ιατρών στην μοριακή βιολογία και τη γενετική πρέπει να συμπληρώνει τις κλινικές φαρμακογενετικές μελέτες που καθορίζουν την επίδραση στον τομέα της τεκμηριωμένης ιατρικής. Οι φαρμακογενετικοί πολυμορφισμοί αντίθετα με άλλες κλινικές μεταβλητές όπως η νεφρική λειτουργία, χρειάζεται μόνο ένα τεστ, ιδανικά στα νεογνά.

Πολυγονιδιακά μοντέλα θεραπευτικής βελτιστοποίησης ακόμα αντιμετώπιζον δυσκολίες στο να μειώσουν την πιθανότητα για κατάχρηση της γενετικής πληροφορίας και του επιπλέον κόστους. Ωστόσο, η ανεύρεση απλοτύπων SNP έχει τη δυνατότητα να αναγνωριστούν γενετικά παράμοιοι υποομάδες πληθυσμού και να τυχαιοποιηθούν οι θεραπείες, βασιζόμενοι πάνω σε περισσότερους γενετικούς δείκτες. Σε επίπεδο πληθυσμού η γενετική ποικιλότητα είναι πολύ μεγαλύτερη μέσα παρά ανάμεσα στις φυλές και τις εθνικές ομάδες.

Η θεραπευτική αποτελεσματικότητα και η τοξικότητα επηρεάζονται από ορισμένα χαρακτηριστικά του ασθενούς, όπως η νόσος, η ηλικία, η νεφρική λειτουργία, η διατροφική κατάσταση και άλλες συννοσηρότητες. Νέες προκλήσεις θα προταθούν για την επιλογή της φαρμακευτικής αγωγής για ασθενείς με καρκίνο, υπέρταση και διαβήτη. Η θεραπευτική πολυσυστηματικών νοσημάτων (π.χ. μεταβολικό σύνδρομο) μπορεί να προέλθει από νέες θεραπείες βασισμένες σε ατομικά, αλληλεπιδρώντα και συμπληρωματικά μοριακά μονοπάτια.

Αναγεννητική Ιατρική

Η αναγεννητική ιατρική περιλαμβάνει τη χρήση νέων εφαρμογών και προσεγγίσεων για την επιδιόρθωση ελαττωματικών κυττάρων ή ιστών με τη αναμενόμενη πλήρη αποκατάσταση της φυσιολογικής λειτουργίας. Με την αξιοποίηση της επιτομής της βιολογίας, των φαρμάκων, των ιατρικών συσκευών και των θεραπειών που βασίζονται στο κύτταρο, το ανερχόμενο πεδίο αντιπροσωπεύει την σύγκλιση πολλών κλάδων που ενσωματώνουν την ιστομηχανική, την βιολογία των βλαστοκυττάρων, βιολογικά και γονιδιακή θεραπεία. Για περισσότερο από 50 χρόνια η μεταμόσχευση ολόκληρων οργάνων όπως των κερατοειδών, της καρδιάς, των πνευμόνων, των νεφρών και του ήπατος είναι μια καθιερωμένη ιατρική-χειρουργική παρέμβαση, αλλά ο περιορισμός στην διαθεσιμότητα των οργάνων περιορίζει την ευρεία εφαρμογή τους. Μοσχεύματα παρασκευασμένα με την ιστομηχανική για την αποκατάσταση του δέρματος μετά από εγκαύματα και έλκη διαβητικών ποδιών είναι οι προγενέστερες στρατηγικές για τη χρήση των κυττάρων ενός ασθενούς που αναπτύσσονται εκτός του σώματος του, μέχρι τελευταία να επιτυγχάνεται αντικα-



τάσταση μιας κύστης ή ενός αγγειακού μωσχεύματος για χειρουργική επέμβαση παράκαμψης.

Μία νέα εποχή στην αναγεννητική ιατρική αναδύθηκε από την ανακάλυψη του James Thomson ότι τα εμβρυικά βλαστοκύτταρα μπορούν να καλλιεργηθούν σε τριβλία Petri και του Shiya Yamanaka ότι ενήλικα κύτταρα θηλαστικών μπορούν να επαναπρογραμματιστούν και να γίνουν iPSCs. Τα iPSCs μοιάζουν τα ίδια χαρακτηριστικά με τα σωματικά κύτταρα που επαναπρογραμματίστηκαν με την βοήθεια ενός μέχρι τεσσάρων μεταγραφικών παραγόντων. Τα εμβρυικά βλαστοκύτταρα έχουν τα ίδια χαρακτηριστικά της κλωνογενοποίησης, της αυτοανέωσης και της πολυδυναμικότητας, που είναι προαπαιτούμενα για την διαφοροποίηση σε διαφορετικές κυτταρικές σειρές των πολυκύτταρων ενήλικων οργανισμών. Τεχνικές και ηθικές ανησυχίες προώθησαν την αναζήτηση νέων πηγών, συμπεριλαμβανομένης της απομόνωσης των εμβρυικών βλαστοκυττάρων από ένα μόνο βλαστομερίδιο, η οποία παρακάμπτει την καταστροφή του εμβρύου, καθώς και τη χρήση των εμβρύων μετά την εμφύτευση ως δότες εμβρυικών βλαστοκυττάρων. Η πυρηνική μεταμόσχευση σε σωματικά κύτταρα (Somatic cell nuclear transplantation-SCNT) ή πυρηνική μεταφορά είναι μία τεχνική για την επιτυχή κλωνοποίηση και τον επαναπρογραμματισμό των πυρήνων ενήλικων ζωικών κυττάρων σε υγιή ωοκύτταρα. Η πυρηνική μεταφορά παρέχει μια πηγή βλαστοκυττάρων που είναι προσαρμοσμένα για τον οργανισμό δότη και υπόσχεται να επιταχύνει το ρυθμό για ανθρώπινη χρήση. Επειδή τα βλαστικά και πρόδρομα κύτταρα μπορούν να ληφθούν από μια ποικιλία πηγών (π.χ., έμβρυα, ενήλικους ιστούς), ο χειρισμός τους και η μεταμόσχευσή τους σε ζωικά μοντέλα και πιλοτικά σε ανθρώπινες μελέτες παρέχουν όλο και περισσότερο εναλλακτικές και συμπληρωματικές στρατηγικές για τη μεταμόσχευση συμπαγών οργάνων, επεκτείνοντας έτσι την πλατφόρμα για την αναγεννητική ιατρική.

Τα προηγούμενα δόγματα ότι τα μεταμιτωτικά, τελικά διαφοροποιημένα όργανα στερούνται αναγεννητικής ικανότητας ανατράπηκαν από στοιχεία για την κυτταρική πλαστικότητα και την αναγέννηση χαμηλού επιπέδου των ενήλικων συμπαγών οργάνων καθ' όλη την ενήλικη ζωή. Η ηλικία, το φύλο, η κατάσταση της νόσου, και άλλοι παράγοντες κινδύνου επηρεάζουν την κυτταρική αναγεννητική πλαστικότητα, τον πολλαπλασιασμό και τις κυτταρικές λειτουργίες.

Μπορεί προγονικά κύτταρα που προέρχονται από το μυελό των οστών ή του κυκλοφορούντος αίματος να χορηγηθούν με ασφάλεια και αποτελεσματικά; Κλινικοί ιατροί και επιστήμονες επιδιώκουν την ανάπτυξη κλινικών δοκιμών για να απαντηθεί το ερώτημα αν η θεραπεία με βλαστοκύτταρα έχει αποτελεσματικότητα στους ασθενείς με εγκεφαλικό επεισόδιο, καρδιακή προσβολή και βλάβη του νωτιαίου μυελού. Λαμβάνοντας υπ' όψιν τις μεγάλες επενδύσεις από ομοσπονδιακούς, πολιτειακούς και ιδιωτικούς φορείς, υπήρξαν ανησυχίες που εκφράστηκαν σχετικά με το κατά πόσο οι θεραπείες με βλαστοκύτταρα προκαλούν ψεύτικες ελπίδες. Παρά ταύτα, η μεταμόσχευση βλαστοκυττάρων μυελού των οστών έχει γίνει το πρότυπο αντιμετώπισης αρκετών αιματολογικών νοσημάτων και νέες συνδυαστικές στρατηγικές είναι σε κλινικές δοκιμές. Πέρα από θέματα σκοπιμότητας που σχετίζονται με τα οφέλη από τη μεταμόσχευση εμβρυικών, εμβρυακών ή ενήλικων βλαστικών κυτταρικών σειρών, η εποχή των κλινικών δοκιμών μεγάλης κλίμακας θα συζητείται όλο και περισσότερο ως θεραπεία-λύση που προσαρμόζει τη θεραπεία στο γονιδίωμα του ασθενούς και στο προφίλ της νόσου του από-μου που έρχεται στην κλινική.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Cheng H, Force T: Why do kinase inhibitors cause cardiotoxicity and what can be done about it? *Prog Cardiovasc Dis* 53: 114-120, 2010.
- Collins FS, Green ED, Guttacher AE: A vision for the future of genomics research, *Nature* 422:835-847, 2003.
- Evans WE, McLeod HL: Pharmacogenomics: drug disposition, drug targets, and side effects, *N Engl J Med* 348:538-549, 2003.
- Kim H, Kim JS: A guide to genome engineering with programmable nucleases, *Nat Rev Genet* 15: 321-334, 2014.
- Orlando G, Wood KJ, Stratt RJ, et al: Regenerative medicine and organ transplantation: past, present, and future, *Transplantation* 91: 1310-1317, 2011.
- Willard HF, Ginsburg GS, editors: *Genomic and personalized medicine*, New York, 2009, Elsevier.
- Zamore PD, Haley B: Ribo-gnome: the big world of small RNAs, *Science* 309:1519-1524, 2005.