

ΑΛΕΞΑΝΔΡΕΙΟ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΠΡΟΝΟΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΝΟΣΗΛΕΥΤΙΚΗΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ
**ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΟΣ
(SEQUENCING ANALYSIS) ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΣΤΗΝ ΙΑΤΡΙΚΗ**

ΤΣΟΥΡΕΚΟΥ ΓΙΩΡΓΟ
ΚΟΥΚΟΥΛΗΣ ΧΡΗΣΤΟΣ – ΑΘΑΝΑΣΙΟΣ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΜΙΝΟΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ

ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ 2018

**ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΟΣ
(SEQUENCING ANALYSIS) ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΣΤΗΝ ΙΑΤΡΙΚΗ**

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Μίνος Γεώργιος, Καθηγητής ΑΤΕΙΘ (επιβλέπων)

Καζάκος Κυριάκος, Καθηγητής ΑΤΕΙΘ

Δημητριάδου Αλεξάνδρα, Καθηγήτρια ΑΤΕΙΘ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΠΡΟΛΟΓΟΣ	6
2. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	8
2.1. Δομή DNA.....	8
2.2. Νουκλεοτίδια και Πολυνουκλεοτίδια.....	9
2.3. Αντιγραφή, Μεταγραφή, Μετάφραση.....	10
2.3.1 Αντιγραφή.....	10
2.3.2 Μεταγραφή.....	12
2.3.3 Μετάφραση.....	13
2.4. Γονίδια και Γονιδίωμα.....	14
2.5. Χρωμοσώματα και Χρωμοσωμικές ανωμαλίες.....	15
3. ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΓΕΝΕΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ	18
3.1. Ιστορική αναδρομή.....	18
3.2. Ένζυμα για πειραματισμό με το DNA.....	19
3.2.1 DNA Πολυμεράσες.....	19
3.2.2 Νουκλεάσες.....	20
3.2.3 Λιγκάσες.....	20
3.2.4 Ένζυμα τροποποίησης άκρων.....	21
3.2.5 Φορείς (Vectors).....	21
3.3. Μέθοδοι ελέγχου του DNA.....	21
3.3.1 Υβριδισμός.....	22
3.3.2 Ανάλυση κατά Southern (Southern Blotting).....	22
3.3.3 Πολλαπλασιασμός αλληλουχίας στόχου.....	23
3.3.4 PCR (Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης).....	24
3.4. Πρόγραμμα Ανθρώπινου γονιδιώματος (Human Genome Project).....	26
4. Μέθοδοι αλληλούχισης (sequencing) DNA	27
4.1. Μεθοδολογία αλληλούχισης DNA.....	27
4.2. Μέθοδος τερματισμού της αλυσίδας (chain termination method).....	27

4.3. Μέθοδος της χημικής αποδόμησης - μέθοδος Maxam – Gilbert	29
(chemical degradation method).....	
4.4. Μέθοδος pyrosequencing.....	31
4.5. Μέθοδος της τμηματικής κλωνοποίησης (shotgun method).....	33
4.6. Συναρμολόγηση αλληλουχίας με την μέθοδο των συνεχών κλώνων	34
(clone contig).....	
4.7. Τμηματική κλωνοποίηση ολικού γονιδιώματος (whole genome shotgun	35
sequencing).....	
4.8. Αλληλούχιση επόμενης γενιάς (Next Generation Sequencing, NGS)...	37
5. Εφαρμογές μεθόδων αλληλούχισης (sequencing) του DNA	39
στην Ιατρική	
5.1 Γενικά στοιχεία.....	39
5.2 Ανάλυση του γονιδιώματος (DNA Sequencing) και Νοσήματα.....	39
5.2.1 Ανάλυση του γονιδιώματος (DNA Sequencing) και καρκίνος.....	39
5.2.2 Ανάλυση αλληλουχίας του γονιδιώματος (DNA Sequencing) και η	40
στεφανιαία νόσος (CAD).....	
5.2.3 Ανάλυση αλληλουχίας του γονιδιώματος (DNA Sequencing) και	41
Διαβήτης.....	
5.2.4 Ανάλυση αλληλουχίας του γονιδιώματος (DNA Sequencing) και η	42
Νόσος Alzheimer.....	
5.2.5 Ανάλυση αλληλουχίας του γονιδιώματος (DNA Sequencing) και	42
παχυσαρκία.....	
5.3 Αλληλούχιση του DNA σε προγεννητικούς ελέγχους.....	43
5.4 Η αλληλούχιση DNA στην φαρμακογενομική και φαρμακογενετική.....	44
5.5 Η νοσηλευτική διεργασία στον τομέα της γενετικής σε προγράμματα	45
αλληλούχισης DNA.....	
6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ/ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ	45
7. ΠΕΡΙΛΗΨΗ	48
8. ABSTRACT	49
9. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	50

1. ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η ανάλυση της αλληλούχισης του (ανθρώπινου) γονιδιώματος έχει διαδραματίσει πολύ σημαντικό ρόλο στον τομέα της Υγείας, τόσο με την πληθώρα γενετικών πληροφοριών που έχει προσφέρει στους επιστήμονες και στους επαγγελματίες Υγείας, όσο και στην χρήση της σαν διαγνωστικό μέσο νοσημάτων αλλά και μέσο πρόληψης ασθενειών.

Με το πέρασμα του χρόνου και την εμβάθυνση της γνώσης στις τεχνικές της ανάλυσης, μαζί με την τεράστια εξέλιξη καινούριων μηχανημάτων ανάλυσης του γονιδιώματος, προέκυψαν πολλά οφέλη σχετικά με την διάγνωση και την θεραπεία των γενετικών νοσημάτων. Συγκεκριμένα μέσω της ανάλυσης και της χαρτογράφησης του γονιδιώματος κατέστη δυνατό για τους επαγγελματίες Υγείας όχι μόνο να είναι σε θέση να διαγνώσουν γενετικά νοσήματα, αλλά και να τα προλαμβάνουν. Η ανάλυση του γονιδιώματος συνέβαλε στην καλύτερη θεραπευτική αντιμετώπιση γενετικών νοσημάτων, καθώς μέσω του σχεδιασμού και της παραγωγής κατάλληλων, για το γενετικό υπόστρωμα του ασθενούς, φαρμάκων κατάφερε να περιορίσει σε μεγάλο βαθμό τις ανεπιθύμητες ενέργειες και να αυξήσει την αποτελεσματικότητα της δράσης των φαρμάκων. Μέσω των γενετικών τεστ χαράσσεται ο δρόμος για την ανάπτυξη και εφαρμογή της γονιδιακής θεραπείας του ασθενούς, η οποία αντιμετωπίζει ριζικά τα γενετικά νοσήματα με διάφορες πρωτοποριακές τεχνικές.

Στόχος της παρούσας πτυχιακής εργασίας είναι η περιγραφή των μεθόδων αλληλούχισης του DNA και η ανάδειξη της σημαντικότητας τους στην κλινική εφαρμογή. Αρχικά παρουσιάζονται μερικές βασικές έννοιες της βιολογίας και της φύσης του DNA, έπειτα γίνεται μια ιστορική αναδρομή του γενετικού υλικού για την κατανόηση του υπόβαθρου του θέματος. Στην συνέχεια αναλύονται οι μέθοδοι αλληλούχισης του DNA και γίνεται μια αναφορά στις τεχνικές αλληλούχισης επόμενης γενιάς. Στο τελευταίο κεφάλαιο αναφέρονται οι εφαρμογές της μεθόδου αλληλούχισης στον τομέα της Ιατρικής και κατά επέκταση στον τομέα της Νοσηλευτικής. Συνοψίζοντας δίνονται συμπεράσματα από την ανάλυση της βιβλιογραφίας και προβληματισμοί για μελλοντικά δεδομένα.

Σε αυτόν τον τομέα ο ρόλος του νοσηλευτή είναι πολύ σημαντικός, καθώς μέσω της νοσηλευτικής διεργασίας είναι ικανός ο νοσηλευτής να αξιολογεί τους ασθενείς, που κινδυνεύουν να εμφανίσουν μια γενετική διαταραχή και να χρησιμοποιεί τα αποτελέσματα της αξιολόγησης για τη διατύπωση διαγνώσεων και την εκτίμηση των αναμενόμενων αποτελεσμάτων. Έπειτα ο νοσηλευτής αναπτύσσει παρεμβάσεις για να επιτευχθούν τα αναμενόμενα αποτελέσματα, τις οποίες εφαρμόζει και εκτιμά την πορεία της εφαρμογής των παρεμβάσεων προς τους επιθυμητούς στόχους. Για την επίτευξη της παραπάνω νοσηλευτικής διεργασίας συντονίζονται όλες οι προσπάθειες από τον νοσηλευτή, καθώς

αυτός συνεργάζεται με τους ασθενείς, τις οικογένειες τους και όλους τους επαγγελματίες Υγείας που εμπλέκονται στην επίτευξη των στόχων του ασθενούς.

2. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ως DNA ορίζεται η γενετική πληροφορία του κυττάρου και κατ' επέκταση η βιοχημική ταυτότητα του οργανισμού. Είναι ένα νουκλεϊκό οξύ που περιέχει στοιχεία για την ανάπτυξη όλων των κυτταρικών μορφών ζωής και των ιών (Simon, 2016).

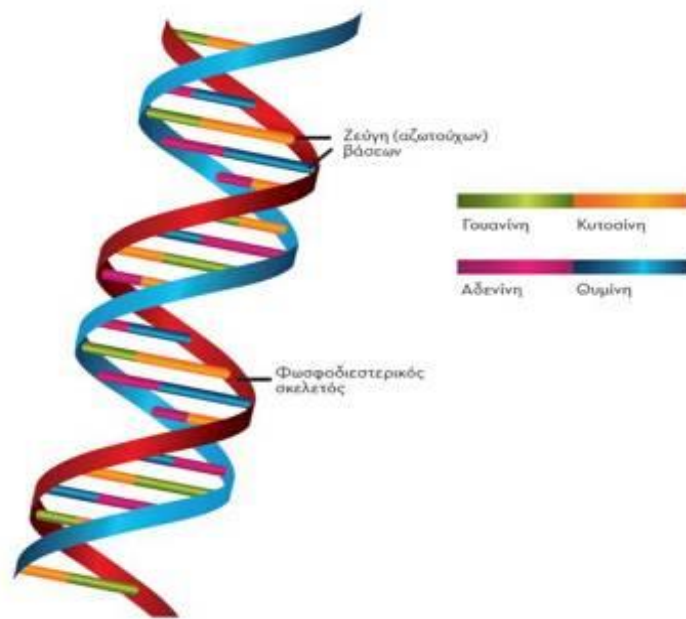
Η δομή του DNA είναι περίπλοκη. Έχει συνήθως την μορφή διπλής έλικας και ένα από τα δομικά του στοιχεία είναι το γονίδιο, το οποίο έχει οριστεί ως ένα τμήμα του DNA υπεύθυνο για την παραγωγή ενός ενζύμου ή μιας πρωτεΐνης που ενεργοποιεί μια χημική αντίδραση. Τα γονίδια συνεπώς είναι εκφραστές της γενετικής πληροφορίας από κύτταρο σε κύτταρο, από γενιά σε γενιά και το γονιδίωμα είναι το σύνολο των γονιδίων και των μηχανισμών αυτών, που βρίσκεται σε ένα κύτταρο ή φέρεται σε ένα άτομο.

Επιστήμονες Βιολογίας προσπάθησαν στα μέσα του προηγούμενου αιώνα να μελετήσουν την δομή του γονιδιώματος. Άρχισαν λοιπόν να προσδιορίσουν και να ταυτοποιούν την αλληλουχία του συνόλου των βάσεων στο DNA και να καταγράφουν της λειτουργίες – αντιδράσεις για τις οποίες ήταν υπεύθυνο κάθε γονίδιο.

Η πιο σημαντική μέθοδος στον προσδιορισμό της πρωτοταγούς δομής του DNA και στην χαρτογράφηση του γονιδιώματος αναδείχθηκε το DNA sequencing μαζί με τις υπομεθόδους του. Στην παρούσα εργασία περιγράφονται και αναλύονται οι μέθοδοι αλληλούχισης του γονιδιώματος και κατατάσσονται με βάση τη σημαντικότητά τους και την εφαρμογή τους στην ιατρική.

2.1. Δομή DNA

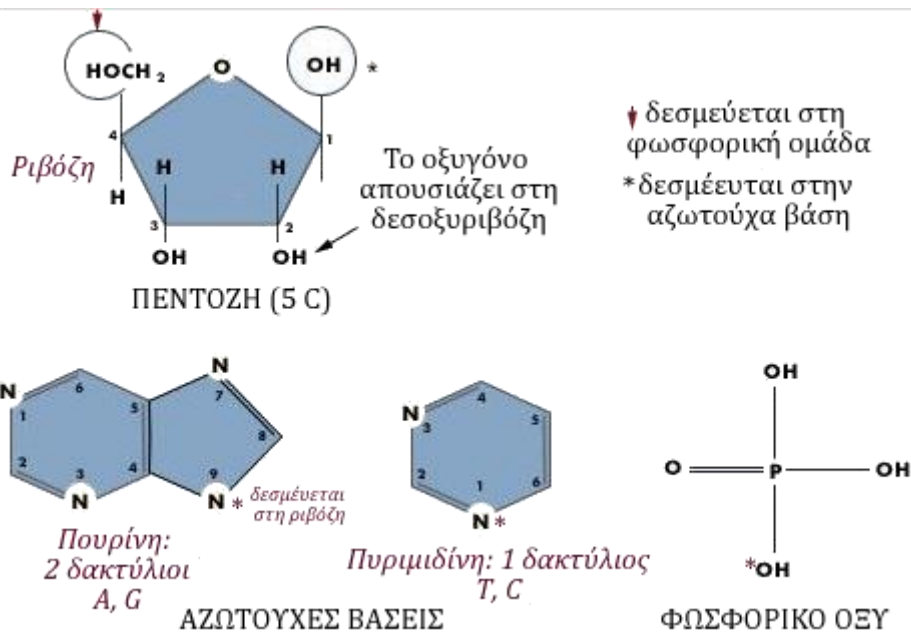
Έως και τις αρχές του 20^{ου} αιώνα οι επιστήμονες έκαναν υποθέσεις σχετικά με ένα συγκεκριμένο μόριο, το οποίο δρούσε ως η χημική βάση της κληρονομικότητας, χωρίς όμως να γνωρίζει κανείς ποιο ήταν αυτό. Περίπου το 1950, οι ειδικοί αναγνώρισαν το DNA (δεσοξυριβονουκλεϊκό οξύ) ως το κληρονομικό μόριο και προσδιόρισαν την κατασκευή του. Το DNA είναι ένα οξύ που αποτελείται από νουκλεοτίδια (θυμίνη, αδενίνη, γουανίνη, κυτοσίνη). Η δομή του DNA είναι η εξής: 2 κλώνοι που φέρουν πάνω τους νουκλεοτίδια, τα οποία τηρούν κανόνες συμπληρωματικότητας (γουανίνη – κυτοσίνη, θυμίνη - αδενίνη περιστρέφονται ενωμένοι με δεσμούς υδρογόνου σε ελικοειδή μορφή (Εικόνα 2.1). Κατά την διάρκεια του σταδίου S – Phase του κυτταρικού κύκλου το DNA είναι εύκολα ορατό διότι μέσω της διαδικασίας της αντιγραφής συμπυκνώνεται σε μορφή χρωμοσωμάτων, ενώ παρατηρώντας κανείς το κύτταρο σε ουδέτερη φάση, διαπιστώνει ότι το γενετικό υλικό βρίσκεται σε μορφή χαλαρών ινών ακανόνιστου σχήματος. Τα χρωμοσώματα είναι 'συσκευασμένα' τμήματα DNA, το οποίο περιστρέφεται γύρω από μία ομάδα πρωτεϊνών τις ιστώνες σαν ένα σχοινί γύρω από χάντρες (Simon, 2016).



Εικόνα 2.1. Δομή δίκλωνου μορίου DNA.

2.2. Νουκλεοτίδια και Πολυνουκλεοτίδια

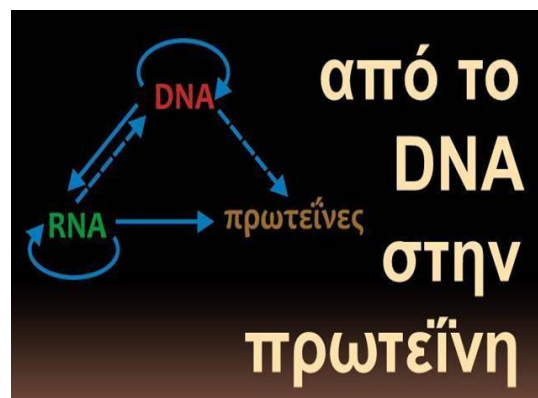
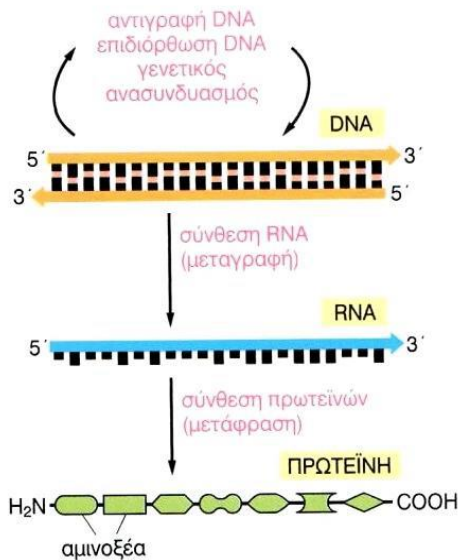
Κάθε μόριο DNA συντίθεται από μικρές δομικές μονάδες, τα νουκλεοτίδια. Ο βασικός άξωνας ενός νουκλεοτιδίου αρθρώνεται από μία πεντόζη (δεοξυριβόζη), ένα σάκχαρο με 5 άτομα άνθρακα, ένα μόριο φωσφορικού οξέος και μια οργανική αζωτούχα βάση (πουρίνη: αδερίνη, γουανίνη ή πυριμιδίνη: θυμίνη, κυτοσίνη) (Εικόνα 2.2). Η συμπληρωματικότητα που ακολουθούν οι βάσεις για την ένωση των δύο κλώνων είναι η εξής: η αδερίνη ενώνεται με θυμίνη ενώ η γουανίνη με κυτοσίνη και τα ζεύγη βάσεων που δημιουργούνται συγκρατούνται με δεσμούς υδρογόνου. Τα νουκλεοτίδια αποτελούν τις γενετικές πληροφορίες όταν αυτά εκφράζονται. Κάθε κλώνος φέρει πάνω του μεμονωμένα νουκλεοτίδια, τα οποία παραταγμένα στην σειρά συνιστούν ένα πολυνουκλεοτίδιο (Simon, 2016).



Εικόνα 2.2 Βασικά στοιχεία άξονα νουκλεοτιδίων.

2.3. Αντιγραφή, Μεταγραφή, Μετάφραση

Το κεντρικό δόγμα της Βιολογίας περιλαμβάνει την αντιγραφή του DNA, την μεταγραφή σε RNA και την μετάφραση σε πρωτεΐνη (Εικόνα 2.3).

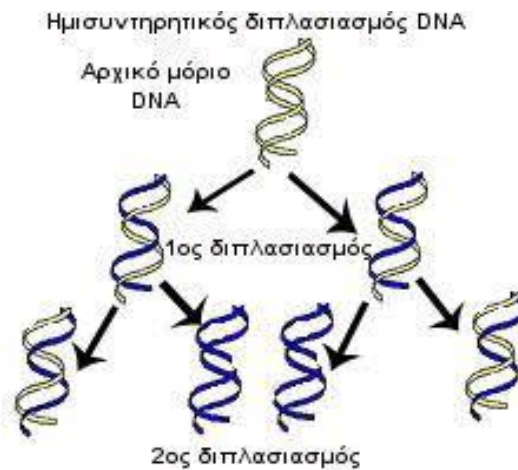


Εικόνα 2.3. Κεντρικό δόγμα της Βιολογίας.

2.3.1. ΑΝΤΙΓΡΑΦΗ

Για να επιτευχθεί η ανάπτυξη του οργανισμού και κατ' επέκταση η συνέχιση του είδους και η κληρονομικότητα βασικό στοιχείο είναι η μεταβίβαση του DNA από κύτταρο σε κύτταρο και από γενιά σε γενιά. Προϋπόθεση αυτής της διαδικασίας είναι η αντιγραφή του DNA.

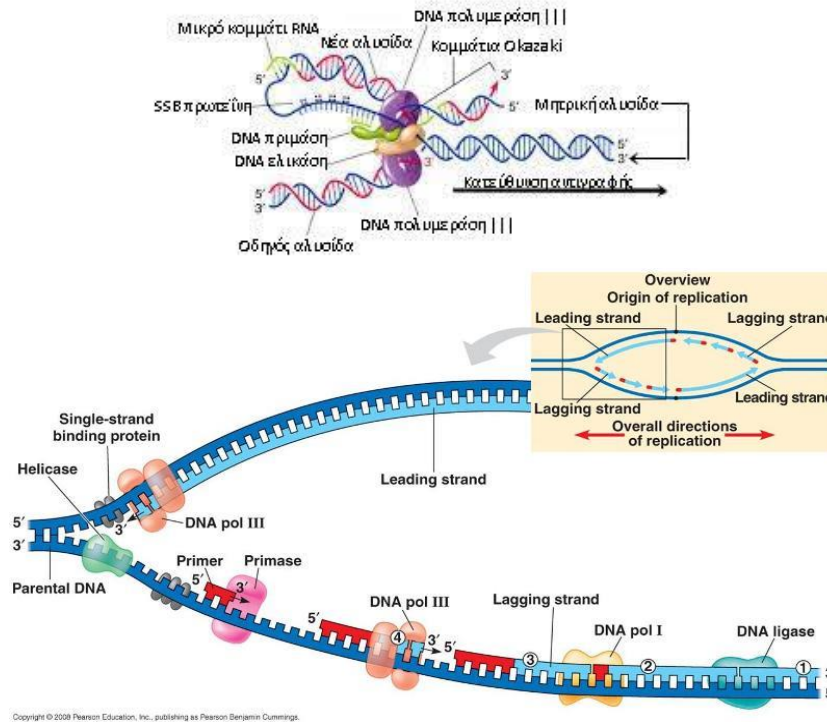
Η κατασκευή του DNA θέτει σε εφαρμογή αυτή τη λειτουργία επειδή κάθε κλώνος δύναται να αποτελέσει εκμαγείο ώστε να προσδιορίσει την δημιουργία ενός άλλου κλώνου. Στα πρώτα στάδια αντιγραφής του DNA, η πολυνουκλεοτιδική αλυσίδα διχάζεται, οι κλώνοι του αρχικού μορίου DNA απομακρύνονται ο ένας από τον άλλον ώστε κάθε κλώνος μεμονωμένα να αποτελέσει πρότυπο για την δημιουργία νέας αλυσίδας χάριν στην συμπληρωματικότητα των βάσεων που φέρει. Έτσι παράγονται δύο νέα μόρια DNA που το κάθε ένα περιέχει ένα νεοσυντιθέμενο κλώνο και έναν κλώνο του αρχικού μορίου, γι' αυτό και ονομάζεται **ημισυντηρητική** η διαδικασία της αντιγραφής του (Εικόνα 2.4).



Εικόνα 2.4 Ημισυντηρητική διαδικασία αντιγραφής του DNA.

Η διαδικασία της Αντιγραφής του DNA περιλαμβάνει 3 στάδια:

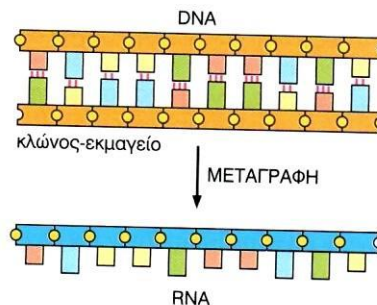
Αρχικά ένα ένζυμο, η *ελικάση*, διαχωρίζει την έλικα του DNA, απομακρύνοντας τους κλώνους τον έναν από τον άλλον. Κάθε ένας από τους δύο διαχωρισμένους κλώνους δέχεται ένα ένζυμο, την *DNA πολυμεράση*, η οποία δημιουργεί ένα νέο μόριο DNA που είναι συμπληρωματικό προς κάθε κλώνο. Προσθέτει δηλαδή συμπληρωματικά νουκλεοτίδια σε κάθε κλώνο με σκοπό την δημιουργία δύο νέων μορίων DNA. Την διαδικασία ολοκληρώνει το ένζυμο *λιγάση*, η οποία ενώνει τα προϊόντα αντιγραφής και τα επιμέρους θραύσματα (Εικόνα 2.5) (Simon, 2016).



Εικόνα 2.5 Διαδικασία αντιγραφής του DNA και δράση των ενζύμων.

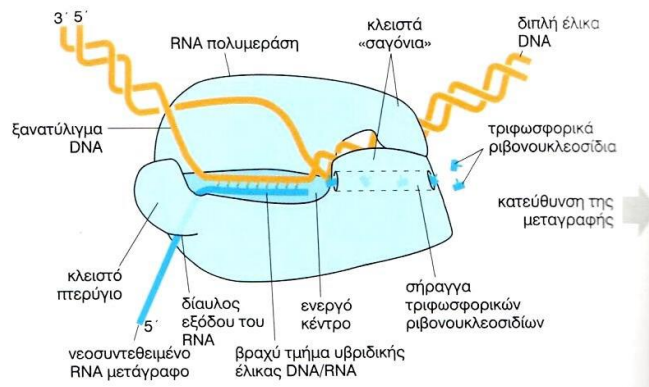
2.3.2. ΜΕΤΑΓΡΑΦΗ

Είναι το πρώτο στάδιο της έκφρασης των γονιδίων και αναλύει τον τρόπο με τον οποίο το DNA μετατρέπεται σε RNA (Εικόνα 2.6).



Εικόνα 2.6 Μεταγραφή του DNA σε RNA.

Αυτό επιτυγχάνεται με την συμβολή μίας αλυσίδας του DNA ως πρότυπου, υπό την βοήθεια της RNA πολυμεράσης, με τη διαφοροποίηση ότι η βάση ουρακίλη αντικαθιστά την θυμίνη για την δημιουργία ενός νέου μορίου RNA (Εικόνα 2.7).

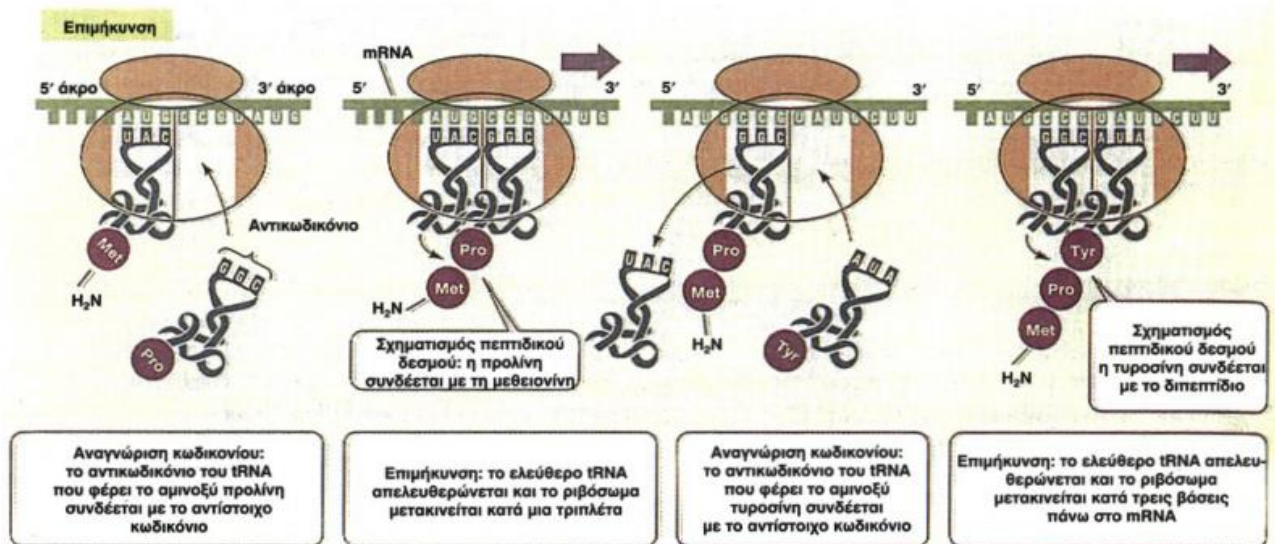


Εικόνα 2.7 Μορφή και λειτουργία της RNA πολυμεράσης.

Όλη αυτή η διαδικασία επιτελείται σε πυρηνικό επίπεδο και ο σκοπός είναι η γενετική πληροφορία να φτάσει στα ριβοσώματα για την έναρξη της πρωτεϊνοσύνθεσης. Η μεταγραφή τελειώνει όταν η RNA πολυμεράση συναντήσει μία ειδική αλληλουχία λήξης. Στη συνέχεια το RNA θα υποβληθεί σε ακόμη μία διαδικασία, προτού αφήσει τον πυρήνα, κατά την οποία οι μη κωδικοποιούσες περιοχές του (εσόνια) θα πρέπει να απομακρυνθούν. Οι περιοχές που θα κωδικοποιήσουν αμινοξέα (εξόνια) θα συρραφούν μεταξύ τους αφού απομακρυνθούν τα εσόνια (Simon, 2016).

2.3.3. ΜΕΤΑΦΡΑΣΗ

Ύστερα από την επεξεργασία, το τελειοποιημένο μόριο RNA ονομάζεται αγγελιοφόρο RNA και αυτό διότι εγκαταλείπει τον πυρήνα και φέρει μαζί του τις γενετικές πληροφορίες για την πρωτεϊνοσύνθεση. Η μετάφραση πραγματοποιείται στο κυτταρόπλασμα, σε κάποιες δομικές μονάδες που ονομάζονται ριβοσώματα. Η διαδικασία αρχίζει όταν ένα μόριο mRNA συνδέεται σε μία μικρή ριβοσωμική υπομονάδα. Στη συνέχεια ένα μόριο μεταφορικού (tRNA) συνδέεται με το κωδικόνιο έναρξης του mRNA και ονομάζεται μεταφορικό διότι φέρει ένα αμινοξύ. Έπειτα μια μεγάλη ριβοσωμική υπομονάδα συνδέεται με την μικρή δημιουργώντας ένα ολοκληρωμένο ριβόσωμα. Το πρώτο tRNA που θα φτάσει στο ριβόσωμα φέρει το αμινοξύ μεθειονίνη (Met) αλληλουχία του οποίου είναι το UAC και θα προσδεθεί στο κωδικόνιο έναρξης AUG. Για να ολοκληρωθεί η έναρξη το αντικωδικόνιο του μορίου tRNA προσδέεται με το κωδικόνιο του mRNA αφήνοντας το αμινοξύ του στην ριβοσωμική μονάδα. Η διαδικασία συνεχίζεται με τα υπόλοιπα μόρια tRNA, τα οποία θα προσθέτουν τα αμινοξέα τους με συνέπεια να δημιουργηθεί μια πολυπεπτιδική αλυσίδα. Ο τερματισμός της μετάφρασης ολοκληρώνεται όταν το ριβόσωμα αναγνωρίσει ένα κωδικόνιο λήξης (UAA, UAG, UGA) τα οποία θα σημάνουν την λήξη της μετάφρασης (Εικόνα 2.8) (Simon, 2016).



Εικόνα 2.8 Διαδικασία μετάφρασης.

2.4. Γονίδια και Γονιδίωμα.

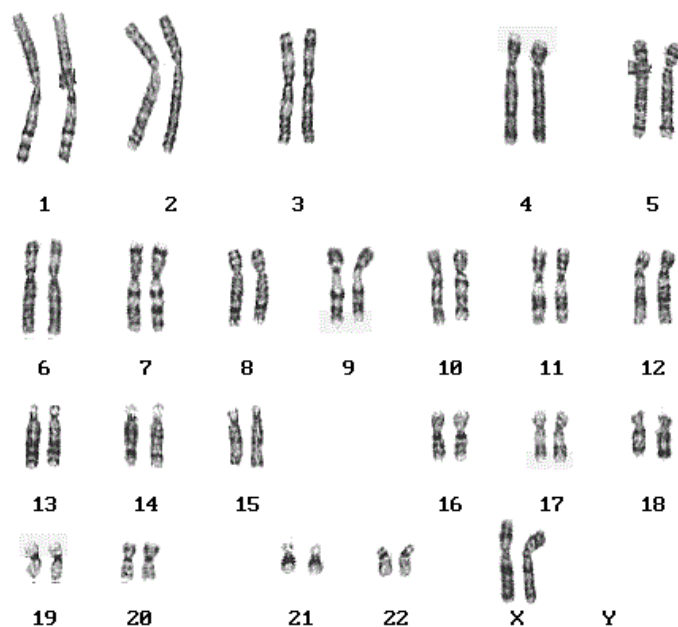
Κάθε ανθρώπινος οργανισμός είναι μοναδικός. Έτσι και τα είδη των κυττάρων από τα οποία αποτελείται διαφέρουν μεταξύ τους ως προς την μορφή και τη λειτουργία και αυτό γίνεται, διότι κάθε είδος κυττάρου είναι υπεύθυνο για την παράγωγη εξειδικευμένων πρωτεϊνών, γεγονός που οφείλεται στην γονιδιακή έκφραση. Τα γονίδια περιλαμβάνουν στοιχεία που είναι απαραίτητα για την σύνθεση πρωτεϊνών, επομένως, όταν τα γονίδια είναι ανενεργά, σημαίνει ότι η μετάβαση της γενετικής πληροφορίας από το DNA στο RNA και στη συνέχεια στην πρωτεΐνη, δηλαδή η γονιδιακή έκφραση, δεν έχει επιτευχθεί. Η απόσταση από το γονίδιο στην πρωτεΐνη είναι μεγάλη και περίπλοκη, ωστόσο υπάρχουν σημεία επιτάχυνσης ή επιβράδυνσης και ενεργοποίησης ή απενεργοποίησης της διαδικασίας. Επιπρόσθετα, ανάλογα τον τύπο των κυττάρων που φέρουν οι ιστοί, η έκφραση των γονιδίων γίνεται επιλεκτικά. Δηλαδή, σε ορισμένα κύτταρα λαμβάνει μέρος η έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων, τα οποία όμως δεν εκφράζονται σε άλλα κύτταρα.

Τα γονίδια παίζουν σημαντικό ρόλο στην διακυτταρική επικοινωνία αλλά και στην εσωκυτταρική. Παραδείγματος χάριν, η γενετική πληροφορία εξωθείται από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα με την συμβολή του RNA και ενεργοποιείται η λειτουργία ορισμένων οργανύλιων με σκοπό την πρωτεϊνοσύνθεση. Όσον αφορά τη διακυτταρική επικοινωνία οι πρωτεΐνες, που αποτελούν παράγωγα γονιδίων, συντελούν στην σηματοδότηση από κύτταρο σε κύτταρο. Το αποτέλεσμα αυτού του σήματος μπορεί να πυροδοτήσει την δημιουργία νέων πρωτεϊνών. Ένα τέτοιο παράδειγμα είναι η κυτταρική σηματοδότηση της ανάπτυξης ενός οργανισμού από έμβρυο σε ενήλικο. Συμπερασματικά, τα γονίδια αποτελούν συγκεκριμένες αλληλουχίες των νουκλεοτιδίων του DNA, στις οποίες συμβαίνουν μεταλλάξεις, όταν αυτές δεν πληρούν τους κανόνες συμπληρωματικότητας ή όταν αυτές διαφέρουν από τον τυπικό

πρότυπο μηχανισμό αντιγραφής DNA. Οι μεταλλάξεις ενδέχεται να είναι θετικές ή αρνητικές, όσων αφορά το αναπτυξιακό επίπεδο. Υπάρχει όμως και η περίπτωση να είναι επιβλαβείς οι μεταλλάξεις, γεγονός που γεννά θέματα βιοηθικής. Το είδος των μεταλλάξεων ποικίλλει ανάλογα με το εύρος των νουκλεοτιδίων, παραδείγματος χάριν όταν κάνουμε λόγο για σημειακή μετάλλαξη εννοείται η αντικατάσταση ενός νουκλεοτιδίου του DNA με ένα άλλο και οι παράγοντες μεταλλάξεων μπορεί να είναι περιβαλλοντικοί, φυσικοί ή χημικοί. Κατ' επέκταση ως γονιδίωμα ορίζεται το σύνολο των γονιδίων που υπάρχουν στο ανθρώπινο κύτταρο και η εργαστηριακή μελέτη του αναδεικνύεται ολοένα και πιο σημαντική (Simon, 2016).

2.5 Χρωμοσώματα και Χρωμοσωμικές ανωμαλίες

Σε ένα ανθρώπινο κύτταρο περιέχεται γενετικό υλικό μήκους 2 μέτρων. Υπάρχουν έξυπνοι μηχανισμοί στο εσωτερικό του κυττάρου που το συμπυκνώνουν σε μικρές δομές – πακέτα, τα χρωμοσώματα, ώστε να εξασφαλιστεί η ακριβής κατανομή του στα θυγατρικά κύτταρα με προκαθορισμένο τρόπο. Η κατανομή του γενετικού υλικού από τα αρχικό κύτταρο στα θυγατρικά γίνεται μέσω την διαδικασία της μίτωσης ή της μείωσης, όταν πρόκειται για διπλοειδές ή απλοειδές (γαμέτης) κύτταρο αντίστοιχα. Τα χρωμοσώματα δεν είναι πάντα ορατά στο εσωτερικό του κυττάρου. Το γενετικό υλικό συμπυκνώνεται μόνο όταν πρόκειται να αντιγραφεί με σκοπό την κυτταρική διαίρεση και η ιδανική κυτταρική περίοδος για να μελετηθεί είναι, κατά την διάρκεια του σταδίου S (S phase) του κυτταρικού κύκλου (Εικόνα 2.9) (Reed & Donnai, 2010).



Εικόνα 2.9 Φυσιολογικός καρυότυπος αρσενικού ανθρώπου.

Εκτός από την γνώση της φυσιολογικής δομής και λειτουργίας των χρωμοσωμάτων, η μελέτη των χρωμοσωμικών ανωμαλιών είναι εξίσου σημαντική σε αρκετές διαφορετικές κλινικές καταστάσεις:

- Οι χρωμοσωμικές ανωμαλίες αποτελούν αιτία στειρότητας και συχνών αποβολών σε μεγάλο ποσοστό.
- Αρκετές νεογνικές πολλαπλές συγγενείς ανωμαλίες οφείλονται σε χρωμοσωμικές ανωμαλίες και η συμβολή του προγεννητικού ελέγχου είναι καθοριστική στην ανίχνευση και πρόληψη μη φυσιολογικών κυήσεων.
- Επίκτητες χρωμοσωμικές ανωμαλίες που βρίσκονται στα σωματικά κύτταρα, εγκυμονούν κινδύνους ανάπτυξης καρκινικών κυττάρων και ορισμένες φορές έχουν ιδιαίτερη διαγνωστική και προγνωστική αξία (Reed & Donnai, 2010).

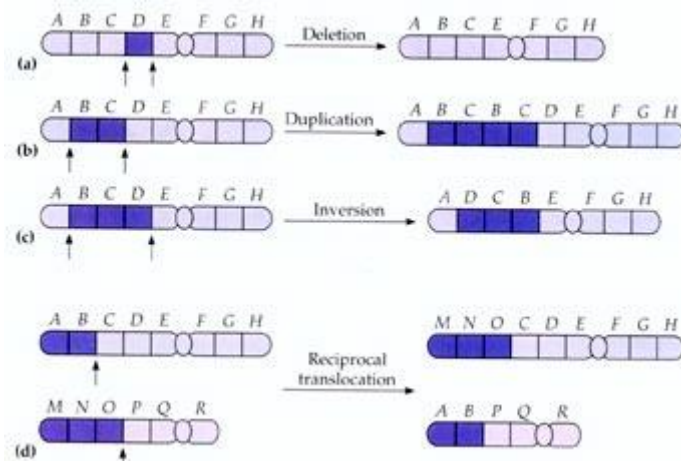
Οι χρωμοσωμικές ανωμαλίες μπορεί να είναι αριθμητικές ή δομικές. Δηλαδή, μπορεί να προκύπτουν είτε λόγω λανθασμένου αριθμού χρωμοσωμάτων είτε λόγω ενός ή περισσότερων χρωμοσωμάτων με δομικά λάθη. Αρκετές αριθμητικές χρωμοσωμικές ανωμαλίες, έχουν αυξημένη συχνότητα και προκαλούν κλινικά αναγνωρίσιμα σύνδρομα. Αυτές διακρίνονται σε 2 κατηγορίες:

- Λάθη στην πλοειδία, όταν δηλαδή υπάρχει λανθασμένος αριθμός όλης της σειράς χρωμοσωμάτων σύμφωνα με τον καρυότυπο. Π.χ. οι γαμέτες είναι απλοειδείς ($n=23$). Συχνά δύο σπερματοζωάρια μπορεί να γονιμοποιήσουν ένα ωάριο παράγοντας ένα τριπλοειδές ($3n=69$). Η τριπλοειδία είναι συχνό σφάλμα κατά την σύλληψη και τα κυήματα δεν επιβιώνουν ποτέ.
- Ανευπλοειδία: όταν τα κύτταρα έχουν μόνο ένα ή περισσότερα μεμονωμένα χρωμοσώματα σε μεγάλη περίσσεια ή απόντα. Κύτταρα ή άνθρωποι με ένα περισσότερο ή ένα χρωμόσωμα μείον εμφανίζουν τρισωμία ή μονοσωμία π.χ. σύνδρομο down με τρία αντίγραφα χρωμοσώματος 21 (Εικόνα 2.10) (Reed & Donnai, 2010).



Εικόνα 2.10 Καρύτυπος με τρισωμία 21 ($47, XY + 21$).

Δομικές ανωμαλίες μπορεί να είναι ανωμαλίες όπως, η αναστροφή (*inversion*), όπου τμήμα ενός χρωμοσώματος έχει διαφορετικό προσανατολισμό σε σχέση με το υπόλοιπο χρωμόσωμα, η μετάθεση (*translocation*), ανωμαλίας στην οποία δύο χρωμοσώματα ανταλλάσσουν μη ομόλογα τμήματα. Επιπρόσθετα ανωμαλίες, όπως οι ελλείψεις (*deletions*), οι οποίες παρουσιάζουν απώλεια κάποιου τμήματος του χρωμοσώματος. Τέλος, υπάρχουν και οι διπλασιασμοί (*duplications*), όπου τμήμα ορισμένων χρωμοσωμάτων είναι διπλό (Εικόνα 2.11) (Reed & Donnai, 2010).



Εικόνα 2.11 Δομικές ανωμαλίες χρωμοσωμάτων.

3. Μελέτη του γενετικού υλικού

3.1 Ιστορική αναδρομή

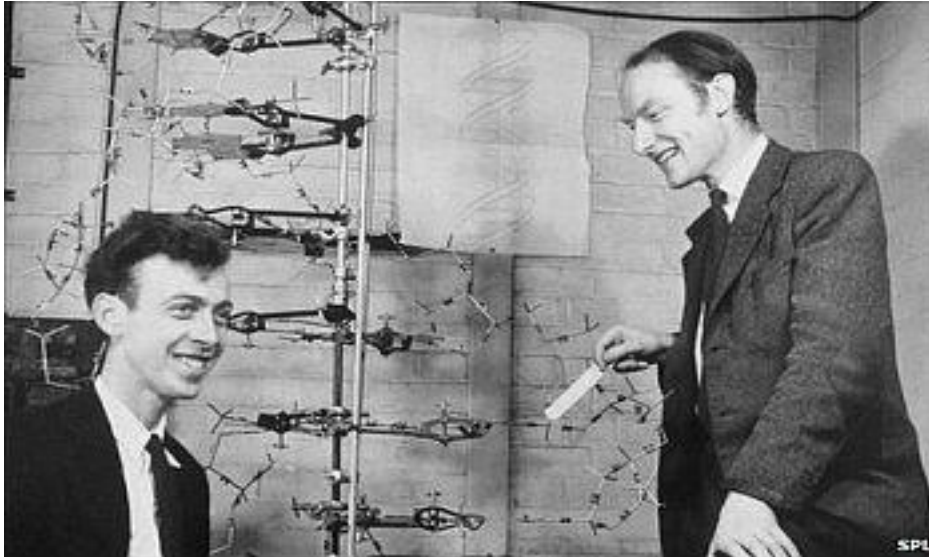
Η ανακάλυψη του DNA συνέβη το 1869 από τον Johann Friedrich Miescher, έναν Ελβετό Βιοχημικό, ο οποίος εργάζονταν στο Tübingen της Γερμανίας. Το πρώτο υλικό που έλαβε ήταν από ανθρώπινα λευκοκύτταρα και περιείχε ακατέργαστα μείγματα DNA και χρωμοσωμικών πρωτεϊνών. Ένα χρόνο αργότερα, αφού ο Miescher μετακόμισε στην Βασιλεία της Ελβετίας, πειραματίστηκε με σπέρμα σολωμού και παρασκεύασε ένα καθαρό δείγμα νουκλεϊκού οξέος. Οι μελέτες του έφεραν ως αποτέλεσμα ότι το DNA έχει όξινες ιδιότητες και είναι πλούσιο σε φώσφορο, όπως επίσης έδειξαν ότι τα μόρια του DNA ήταν πολύ μεγάλα (Εικόνα 3.1) (Brown, 2010).



Εικόνα 3.1 Johann Friedrich Miescher.

Σχεδόν έναν αιώνα αργότερα αναδείχθηκε ότι το DNA ήταν το γενετικό υλικό μέσω μιας σειράς πειραμάτων των Alfred Hershey και Martha Chase, καθώς έως τότε θεωρούνταν ότι οι πρωτεΐνες έφεραν τις πληροφορίες για την κληρονομικότητα (Wikipedia, 2018).

Όσον αφορά την δομή του DNA, δύο ονόματα είναι άρρηκτα συνδεδεμένα με αυτήν, συγκεκριμένα ο James Watson και Francis Crick ανακάλυψαν το 1953, ότι στα ζωντανά κύτταρα δύο αλυσίδες DNA περιστρέφονται η μία γύρω από την άλλη σχηματίζοντας την διπλή έλικα, γεγονός που την κατέστησε την πιο σημαντική ανακάλυψη του 20^{ου} αιώνα (Εικόνα 3.2) (Brown, 2010).



Εικόνα 3.2. Ο James Watson και Francis Crick.

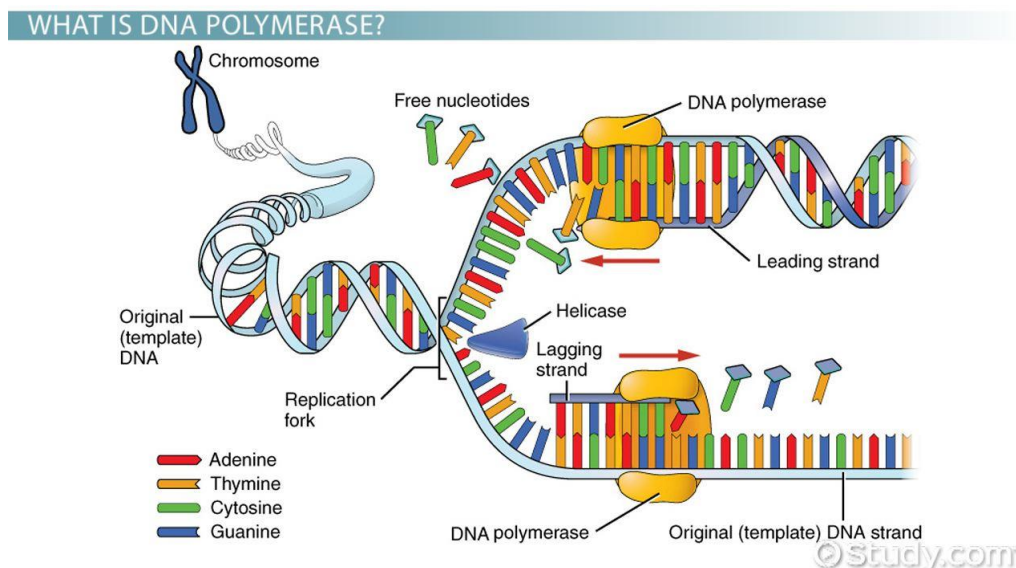
3.2 Ένζυμα για πειραματισμό με το DNA

Η θεωρητική γνώση γύρω από το DNA και το γονιδίωμα είναι σημαντική, ωστόσο εξίσου σημαντική είναι η εξέταση των τεχνικών και επιστημονικών προσεγγίσεων που έχουν χρησιμοποιηθεί για την μελέτη του γονιδιώματος, με σκοπό την καλύτερη κατανόηση του αντικειμένου. Οι τεχνικές αυτές που χρησιμοποιήθηκαν από Βιολόγους για την μελέτη μορίων του DNA αναπτύχθηκαν την δεκαετία του 70' και 80'. Αρχικά η μελέτη γονιδίων βασιζόταν σε μεθόδους κλασσικής γενετικής, στην πορεία όμως αναπτύχθηκαν αμεσότερες μέθοδοι, που αποτέλεσαν κομβικό σημείο και παρείχαν στους μοριακούς βιολόγους ένζυμα κατάλληλα για πειραματισμό με DNA. Για να καθοριστούν οι λειτουργίες πολλών τέτοιων ενζύμων, χρειάστηκε να απομονωθούν και να μελετηθούν οι αντιδράσεις τις οποίες καταλύουν και εν συνεχεία χρησιμοποιήθηκαν ως εργαλεία για τον πειραματισμό με μόρια του DNA, παραδείγματος χάριν για την αντιγραφή τμημάτων DNA, την περικοπή πολλών μικρών τμημάτων DNA και δημιουργία ανασυνδυασμών που δεν υπάρχουν στην φύση. Τα ευρέως χρησιμοποιούμενα ένζυμα διακρίνονται σε τέσσερις μεγάλες κατηγορίες: *DNA Πολυμεράσες, Νουκλεάσες, Λιγκάσες, Ένζυμα τροποποίησης των άκρων, φορείς (vectors)* (Brown, 2010).

3.2.1. DNA ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΕΣ

Ένα ένζυμο σύνθεσης DNA αναφέρεται ως *DNA πολυμεράση (DNA Polymerase)*. Ενώ ένα ένζυμο που αντιγράφει ένα μόριο που ήδη υπάρχει, αναφέρεται ως *DNA πολυμεράση εξαρτώμενη από εκμαγείο (template-dependent DNA polymerase)*. Η *DNA πολυμεράση* εξαρτώμενη από εκμαγείο συνθέτει ένα νέο πολυνουκλεοτίδιο DNA του οποίου η αλληλουχία οδηγείται από τους κανόνες συμπληρωματικότητας των βάσεων της αλληλουχίας του τμήματος DNA που αντιγράφεται. Προϋπόθεση για την εκκίνηση μίας αντίδρασης αντιγραφής

του DNA είναι η πρόσδεση της *DNA πολυμεράσης* στο εκμαγείο ενός βραχέος συνθετικού νουκλεοτιδίου, μήκους περίπου 20 νουκλεοτιδίων, που λειτουργεί ως εκκινήτης (primer) για τη σύνθεση DNA. Αξίζει να αναφερθεί ότι οι περισσότερες *DNA πολυμεράσες* που χρησιμοποιούνται στη μοριακή βιολογία είναι έκδοχα του ενζύμου DNA πολυμεράση I του *E. coli*, η οποία ήταν η πρώτη πολυμεράση που ανακαλύφτηκε από τον Arthur Kornberg το 1956 (Εικόνα 3.3) (Brown, 2010).



Εικόνα 3.3. Ορισμός και λειτουργία την DNA Πολυμεράσης.

3.2.2. ΝΟΥΚΛΕΑΣΕΣ

Υπάρχουν πολλά είδη της *Νουκλεάσης* που εφαρμόζονται στην τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA. Οι πιο σημαντικές από αυτές είναι οι *εξωνουκλεάσες* και οι *ενδονουκλεάσες*. Οι πρώτες απομακρύνουν νουκλεοτίδια του DNA ή του RNA και οι δεύτερες διασπούν εσωτερικούς φωσφοδιεστερικούς δεσμούς. Ιδιαίτερος είναι ο ρόλος των *ενδονουκλεασών*, οι οποίες παίζουν κεντρικό ρόλο στους τομείς της τεχνολογίας του ανασυνδυασμένου DNA. Οι *ενδονουκλεάσες περιορισμού* (*restriction endonucleases*) είναι ένα ένζυμο που συνδέεται σε μια ειδική αλληλουχία του τμήματος του DNA και προκαλεί μία διάνοιξη σε αυτήν ή κοντά της. Χάρην στην ειδικότητα της αλληλουχίας, αν η αλληλουχία του DNA είναι αναγνωρίσιμη, τότε η *ενδονουκλεάση περιορισμού* επιτρέπει την κοπή του DNA σε καθορισμένες θέσεις. Η συγκεκριμένη ικανότητα θεμελιώνει όχι μόνο την κλωνοποίηση των γονιδίων αλλά και των υπολοίπων τομέων της τεχνολογίας του ανασυνδυασμένου DNA (Brown, 2010).

3.2.3. ΛΙΓΚΑΣΕΣ

Τα τμήματα DNA που παράγονται από μια *ενδονουκλεάση περιορισμού* μπορεί να ξαναενωθούν μεταξύ τους ή να συνδεθούν με ένα νέο μόριο χάρη σε μια *DNA λιγκάση* μέσω μιας διαδικασίας η οποία καταναλώνει ενέργεια από το ATP ή NAD. Η πιο διαδεδομένη

λιγκάση λαμβάνεται από κύτταρα *E.coli* μολυσμένα από βακτηριοφάγο T4. Προϋπόθεση για την σύνδεση δύο κλασμάτων περιορισμού είναι η σύνδεση 2 φωσφοδιεστερικών δεσμών, έναν για κάθε κλώνο από την *λιγκάση* και για να συμβεί η αντίδραση απαιτείται στενή επαφή των άκρων που πρόκειται να συνδεθούν (Brown, 2010).

3.2.4. ENZYMA ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΩΝ ΑΚΡΩΝ

Παράδειγμα ενζύμου τροποποίησης των άκρων (end-modification enzyme) αποτελεί η *τελική δεοξυνουκλεοτιδική τρoσφεράση*, ένζυμο που προέρχεται από τον θύμο αδένα του βοδιού. Έχει την ικανότητα να συνθέτει ένα νέο πολυνουκλεοτίδιο χωρίς ζευγάρωμα βάσεων των προστιθέμενων νουκλεοτιδίων με μια προϋπάρχουσα αλυσίδα DNA. Βασικό ρόλος αυτού του ενζύμου είναι ο σχηματισμός ομοπολυμερούς ουράς στο ανασυνδυασμένο DNA. Δύο επιπλέον ένζυμα τροποποίησης των άκρων είναι η *αλκαλική φωσφατάση* και η T4 *πολυνουκλεοτιδική κινάση* (Brown, 2010).

3.2.5. ΦΟΡΕΙΣ (VECTORS)

Οι φορείς είναι τμήματα DNA που προέρχονται από φυσικούς ιούς ή πλασμίδια και χρησιμεύουν σε εργαστηριακές μελέτες μέσω της διαδικασίας της κλωνοποίησης. Η κλωνοποίηση αποτελούσε έως τα μέσα του 1980 τον παραδοσιακό τρόπο απομόνωσης τμημάτων DNA για μελέτη. Κεντρική ιδέα της είναι η εξής: εάν ένα τμήμα DNA εισαχθεί με κατάλληλο τρόπο σε ένα κύτταρο και το κύτταρο αυτό υποστεί καλλιέργεια, τότε κάθε θυγατρικό κύτταρο της αποικίας θα φέρει ένα αντίγραφο του τμήματος που εισήχθη αρχικά. Οι φορείς λοιπόν, είναι τμήματα που περιέχουν χαρακτηριστικά, τα οποία καθιστούν τα κύτταρα του ξενιστή (*E.coli*, *ζυμομύκητας*, *κύτταρα θηλαστικών*, κ.α.) ανεκτικά ως προς το εισαγόμενο τμήμα DNA και το αντιγράφουν. Το τμήμα προς αντιγραφή ενσωματώνεται στον φορέα, σχηματίζοντας έτσι ένα μοναδικό ανασυνδυασμένο μόριο DNA. Μερικοί από τους φορείς που χρησιμοποιούνται για την κλωνοποίηση τμημάτων του DNA είναι το πλασμίδιο, το κοσμίδιο, το βακτηριακό τεχνητό χρωμόσωμα (BAC) και το τεχνητό χρωμόσωμα ζυμομύκητα (YAC). Κάθε τύπος φορέα έχει ανώτατο όριο για το μέγεθος του τμήματος DNA που μπορεί να μεταφέρει (Reed & Donnai, 2010).

3.3 Μέθοδοι ελέγχου του DNA

Οι μέθοδοι ελέγχου του DNA χρησιμοποιούνται στην γενετική όχι μόνο για λόγους έρευνας αλλά και για τον εντοπισμό μεταλλάξεων (δυσμορφίες, παραμορφώσεις, δυσπλασίες, σύνδρομα). Οι εργαστηριακές μέθοδοι που εφαρμόζονται ακολουθούν δύο συγκεκριμένους τρόπους προσέγγισης, τον *υβριδισμό* της αλληλουχίας σε μία συμπληρωματική αλληλουχία

που έχει σημειωθεί (**probe**) και τον *πολλαπλασιασμό αλληλουχίας στόχου* (Reed & Donnai, 2010).

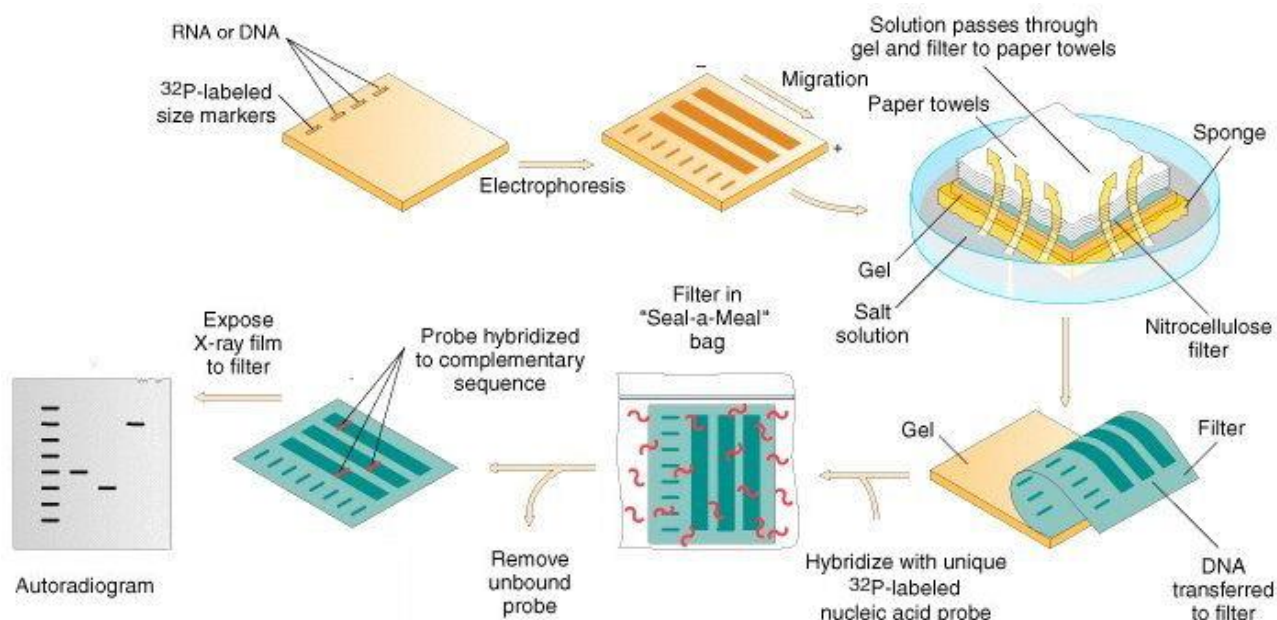
3.3.1. ΥΒΡΙΔΙΣΜΟΣ

Οι δύο αλυσίδες της έλικας DNA συγκρατούνται μέσω αδύναμων χημικών δεσμών υδρογόνου μεταξύ των συμπληρωματικών βάσεων. Οι δεσμοί αυτοί έπειτα από έκθεση σε υψηλή θερμοκρασία και υψηλό pH αποδιατάσσονται εύκολα (DNA denaturation). Τα συμπληρωματικά νουκλεϊκά οξέα όταν βρίσκονται σε μονή αλυσίδα μπορούν να υβριδιστούν, δηλαδή να συνδεθούν, ώστε να σχηματίσουν την διπλή έλικα, εφόσον αναμιχθούν σε διάλυμα μέτριας θερμοκρασίας (50-60 °C) και μέτριου pH. Η μοριακή βιολογία χρησιμοποιεί τον υβριδισμό ως βάση για τον έλεγχο DNA και οι έλεγχοι υβριδισμού που χρησιμοποιούνται διακρίνονται σε δύο κατηγορίες: πρώτον, τον εντοπισμό μιας σημειακής μετάλλαξης ή μιας μικρής μεταβολής στην αλληλουχία του DNA και δεύτερον, για τεστ υβριδισμού που λειτουργεί οπουδήποτε στο DNA ανεξαρτήτως του μεγέθους διαφορών ή μεταβολών μεταξύ του DNA διαφορετικών ανθρώπων. Παράδειγμα της πρώτης κατηγορίας αποτελεί ο έλεγχος εμβρυϊκού DNA για την μετάλλαξη της δρεπανοκυτταρικής αναιμίας. Σε αυτήν την περίπτωση ο έλεγχος αφορά την αλλαγή ενός μονάχα νουκλεοτιδίου ανάμεσα στα 3 δις. που υπάρχουν στο γονιδίωμα του. Στην διαδικασία του υβριδισμού απαραίτητη είναι η παρουσία ενός μικρού συνθετικού ολιγονουκλεοτιδίου, μήκους 15-20 νουκλεοτιδίων, το οποίο θα λειτουργήσει ως ανιχνευτής υβριδισμού. Ανεξάρτητα από την μέθοδο υβριδισμού που θα χρησιμοποιηθεί, είναι απαραίτητο να γίνει αντιληπτό αν ο ανιχνευτής έχει υβριδιστεί στο υπό εξέταση DNA. Για να γίνει αυτό αντιληπτό σημαίνεται ένας από τους δύο ανιχνευτές που συμμετέχουν στον υβριδισμό με φθορίζουσα χρωστική (labeling). Έπειτα ο χωρίς σήμανση ανιχνευτής απομονώνεται και μονιμοποιείται σε στερεή βάση (κομμάτι μεμβράνης νιτροκυτταρίνης) το οποίο βυθίζεται στη συνέχεια, σε διάλυμα που περιέχει τον σημασμένο ανιχνευτή. Ο υβριδισμός επιτυγχάνεται όταν η σήμανση θα αφήσει ίχνη στις περιοχές του στερεού μέσου. Υπάρχουν αρκετές μέθοδοι υβριδισμού ανάλογα με το είδος διερεύνησης που διεξάγεται (αποτύπωση κουκκίδας, ανάλυση κατά Southern, μέθοδος φθορίζουσας in situ υβριδοποίησης, μέθοδος μεσοφασικής φθορίζουσας in situ υβριδοποίησης και συγκριτικός γενομικός υβριδισμός). Ενδεικτικά αναλύεται ο έλεγχος DNA κατά Southern (Reed & Donnai, 2010).

3.3.2. ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΑΤΑ SOUTHERN (SOUTHERN BLOTTING)

Αρχικά, το υπό εξέταση DNA κόβεται σε συγκεκριμένα κομμάτια με την βοήθεια ενός ειδικού ενζύμου (*περιοριστική ενδονουκλεάση*), το οποίο κόβει το DNA με αναπαραγόμενο τρόπο, έτσι ώστε κάθε μόριο να δίνει τον ίδιο αριθμό θραυσμάτων. Το μείγμα των θραυσμάτων ηλεκτροφορείται σε ειδικό πήκτωμα αγαρόζης, μια διαδικασία που διατάσει τα

θραύσματα με βάση το μέγεθος τους. Έπειτα τα πλέον ταξινομημένα θραύσματα αποδιατάσσονται σε αλκαλικό διάλυμα, ώστε να γίνουν μονόκλινα και γίνεται η μεταφορά αυτών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, η οποία συμβάλλει στην κίνηση τους, με σκοπό να βρουν το ταίρι τους. Αυτό συνήθως επιτυγχάνεται τοποθετώντας την μεμβράνη νιτροκυτταρίνης πάνω στο πήκτωμα και στη συνέχεια βάζοντας στεγνό απορροφήσιμο χαρτί από πάνω, ασκείται προσεκτικά πίεση ώστε να γίνει η απορρόφηση υγρών πηκτώματος. Στην διάρκεια της μεταφοράς το αποδιαταγμένο DNA προσκολλάται στην μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Αξίζει να αναφερθεί πως αυτή προηγουμένως βυθίζεται σε διάλυμα που περιέχει ανιχνευτή με σήμανση, ο οποίος θα κολλήσει μόνο στο αντίστοιχο θραύσμα κάνοντας φανερή τη θέση του. Η σήμανση γίνεται, είτε με αυτοραδιογραφία ή με φθορισμό. Με αυτήν την τεχνική παρέχονται πληροφορίες για την παρουσία μιας συμπληρωματικής αλληλουχίας προς τον ανιχνευτή και σε περίπτωση που αυτή είναι παρούσα, σε ποιού μεγέθους περιοριστικό θραύσμα βρίσκεται (Εικόνα 3.4) (Reed & Donnai, 2010).



Εικόνα 3.4 Ανάλυση κατά Southern.

3.3.3. ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ ΣΤΟΧΟΥ

Μια εναλλακτική μελέτη ενός δείγματος DNA αποτελεί ο επιλεκτικός πολλαπλασιασμός (selective amplification). Η μέθοδος της κλωνοποίησης χρησιμοποιούταν ως ο παραδοσιακός τρόπος πολλαπλασιασμού της αλληλουχίας (in vivo), ώσπου ξεπεράστηκε από μια νέα μέθοδο, την PCR. Η PCR (αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης) σε αντίθεση με την τυπική κλωνοποίηση έχει αρκετά πλεονεκτήματα. Είναι ευκολότερη, πιο σύντομη και επιλεκτική ως προς την πολλαπλασιαζόμενη αλληλουχία. Αυτή η μέθοδος εκτελείται σε καλλιέργεια (in vitro) και η ενισχυμένη αλληλουχία που πολλαπλασιάζεται είναι παρούσα σε τέτοια περίσσεια, ώστε

ολόκληρο το προϊόν της αντίδρασης αποτελεί ένα ελάχιστα νοθευμένο παρασκεύασμα της αλληλουχίας στόχου (Reed & Donnai, 2010).

3.3.4. PCR (ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ)

Η PCR αποτέλεσε επανάσταση στον τομέα της μοριακής γενετικής. Πριν από αυτή την μέθοδο μόνο έμπειροι ερευνητές μπορούσαν να πολλαπλασιάσουν και να αναλύσουν το DNA. Στην δεκαετία του 1990 η βελτίωση στις μεθόδους PCR επέτρεψε, ώστε ο επιλεκτικός πολλαπλασιασμός αλληλουχιών από δείγματα ασθενών να γίνει ένα καθιερωμένο εργαλείο έρευνας και διάγνωσης στα εργαστήρια.

Τρία είναι τα κύρια χαρακτηριστικά αντιγραφής του DNA από τα οποία εξαρτάται η PCR:

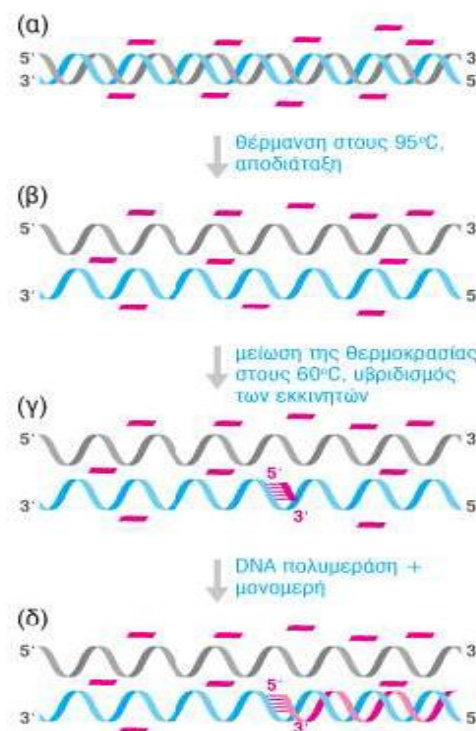
- Μια νέα αλυσίδα απαιτεί έναν **εκκινητή (primer)**. Το ένζυμο που αντιγράφει το DNA παράγοντας μια συμπληρωματική αλυσίδα στην αλυσίδα εκμαγείο (DNA πολυμεράση) δεν είναι ικανή από μόνη της να ξεκινήσει την σύνθεση μεμονωμένων νουκλεοτιδίων, Μπορεί να λειτουργήσει μόνο επιμηκύνοντας μια ήδη υπάρχουσα αλυσίδα. Οι εκκινητές στην διαδικασία PCR είναι χημικά συντεθειμένα νουκλεοτίδια μονής αλυσίδας, συνήθως μήκους 20 νουκλεοτιδίων, τα οποία αφού αναγνωριστούν από την DNA πολυμεράση, επιτρέπουν την έναρξη της αντιγραφής.
- Η επιμήκυνση της αλυσίδας μπορεί να πραγματοποιηθεί με φορά από το 5' άκρο προς το 3'.
- Δύο αλυσίδες της διπλής έλικας DNA θα πρέπει να αντιπαράλληλες (Εικόνα3.5) (Reed & Donnai, 2010).

Η αναγκαιότητα παρουσίας ενός εκκινητή χαρίζει την δυνατότητα στο να οδηγηθεί η DNA πολυμεράση, στην αντιγραφή μιας επιλεγμένης αλληλουχίας ενός δείγματος ανθρώπινου DNA. Με μία διαδικασία σύνθεσης παράγεται ένας μεγάλος αριθμός μορίων ενός συγκεκριμένου ολιγονουκλεοτιδίου, του οποίου η αλληλουχία μπορεί να υβριδίζεται σε μία μόνο συγκεκριμένη αλληλουχία στο ανθρώπινο DNA. Αρχικά, μεγάλη περίσσεια αυτού του εκκινητή τοποθετείται στο DNA. Έπειτα με σύντομη θέρμανση στους 95 °C ολόκληρο το δείγμα αποδιατάσσεται. Στη συνέχεια ψύχεται σε θερμοκρασία που επιτρέπει τον υβριδισμό, συνήθως 55 – 60 °C. Εφόσον υπάρχει μεγάλη περίσσεια των μορίων του εκκινητή, η αλληλουχία του DNA στόχου, συμπληρωματική ως προς την αλληλουχία του εκκινητή, θα υβριδιστεί με τον εκκινητή και όχι με την αρχική αντίστοιχη παράλληλη αλληλουχία. Κάποια μόρια ωστόσο θα υβριδιστούν ξανά στο αρχικό τους ταίρι λόγω παρουσίας δείγματος DNA από πολλά κύτταρα. Εάν η *DNA πολυμεράση* καταφέρει να βράσει στο μείγμα θα αρχίσει η πρόσθεση νουκλεοτιδίων στο 3' άκρο του εκκινητή για την σύνθεση συμπληρωματικής αλυσίδας στο υπό αντιγραφή τμήμα DNA. Κάθε κύκλος αποδιάταξης, υβριδισμού και σύνθεσης αντιγράφει εκτός από το αρχικό εκμαγείο και όλα τα αντίγραφα που έχουν παραχθεί σε προηγούμενους κύκλους. 20 κύκλοι μιας αντίδρασης PCR είναι επαρκείς ώστε να πολλαπλασιαστεί η αλληλουχία στόχος κατά 1 εκατομμύριο φορές. Οι κύκλοι της PCR

ελέγχονται από την μεταβολή της θερμοκρασίας. Μια σύντομη έκθεση του δείγματος στους 95 °C αρκεί για να αποδιαταχθούν όλα τα συστατικά. Στη συνέχεια λίγα δεύτερα στους 55-60 °C επιτρέπουν την σύνδεση των εκκινητών με κάθε πιθανό εκμαγείο. Τέλος μερικά δευτερόλεπτα στους 72 °C βαθμούς συντελούν στην έναρξη της διαδικασίας επιμήκυνσης των εκκινητών από την ειδική πολυμεράση. Στην όλη διαδικασία της PCR χρησιμοποιείται μια συσκευή ελεγχόμενης αυξομείωσης της θερμοκρασίας (κυκλοποιητής),(Εικόνα 3.6), η οποία θα διεξάγει 20 έως 25 κύκλους πολλαπλασιασμού με στάδια διάρκειας 30 έως 60 δευτερολέπτων και θα ολοκληρωθεί σε 2 ώρες (Reed & Donnai, 2010).



Εικόνα 3.6 Θερμικός κυκλοποιητής PCR



Εικόνα 4.9 - Χρήση συνθετικών εκκινητών προκειμένου η DNA πολυμεράση να σχηματίσει μόνο μια αλυσίδα συμπληρωματική στο τμήμα στόχο ενός μεγάλου μορίου DNA.

(α) Ο εκκινητής (κόκκινο) βρίσκεται σε μοριακή περίσσεια. (β) Υβριδίζεται μόνο σε μια συγκεκριμένη αλληλουχία. (γ) Μόνο η αλληλουχία καθοδικά του εκκινητή αντιγράφεται.

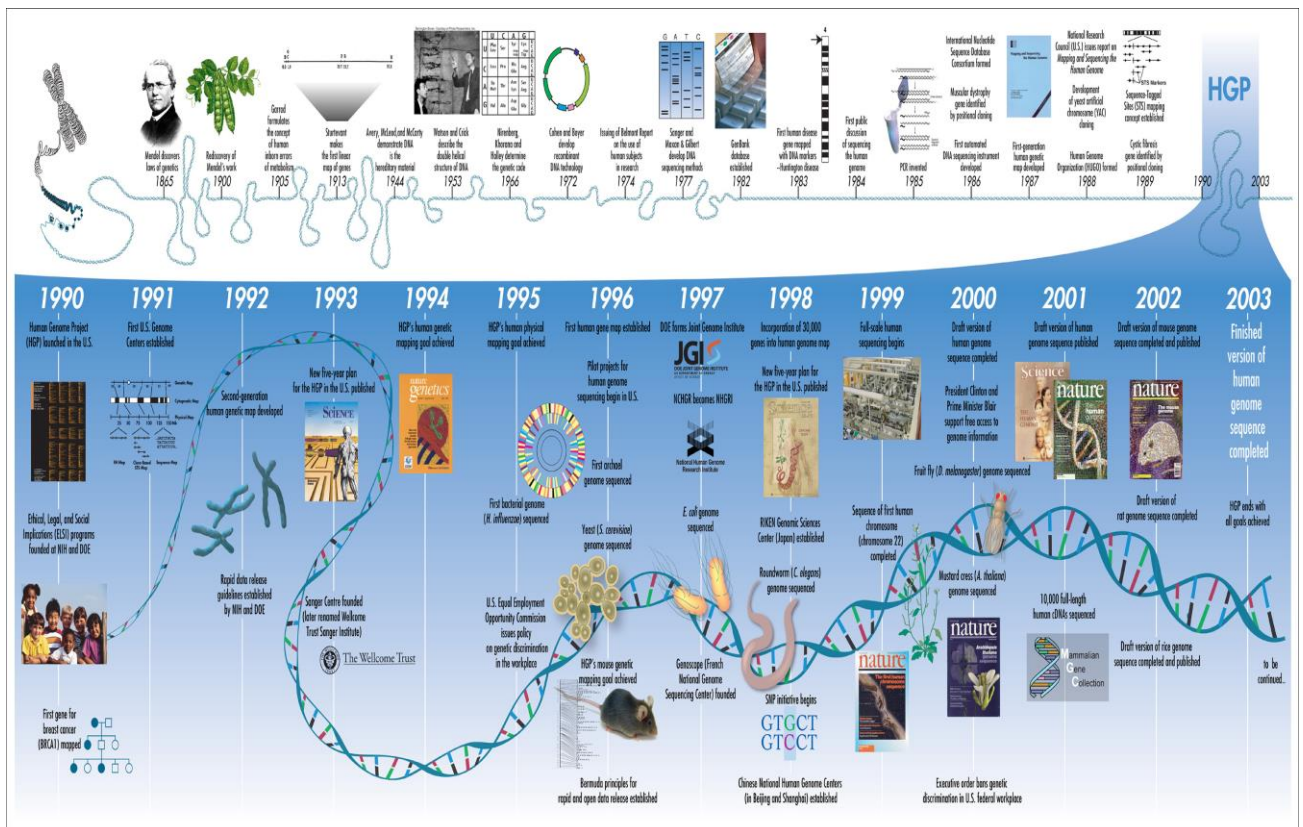
Εικόνα 3.5 μέθοδος PCR

Υπάρχουν ορισμένοι περιορισμοί στην όλη διαδικασία της PCR. Είναι απαραίτητο να υπάρχει γνώση αρκετών δεδομένων για την αλληλουχία στόχο, ώστε να σχεδιαστούν κατάλληλα οι ειδικοί εκκινητές. Επιπρόσθετα, η PCR λειτουργεί καλύτερα για αλληλουχίες στόχους 100 – 400 bp. Αλληλουχίες που ξεπερνούν τις 1 – 2 kb (κιλοβάσεις) είναι δύσκολο να πολλαπλασιαστούν ενώ αλληλουχίες μεγαλύτερες των 20 kb δεν πολλαπλασιάζονται

καθόλου. Συμπερασματικά η PCR μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον εντοπισμό παρουσίας ή απουσίας μιας αλληλουχίας ή για την μέτρηση του μεγέθους της όπως συμβαίνει και με την ανάλυση κατά Southern. Εν κατακλείδι, τα αποτελέσματα αντίδρασης της PCR είναι κατάλληλα για ανάλυση της δομής DNA (sequencing) και για έλεγχο σημειακών μεταλλάξεων (Reed & Donnai, 2010).

3.4 Πρόγραμμα ανθρώπινου γονιδιώματος (Human Genome Project)

Μία σημαντική εξέλιξη στον τομέα της βιολογίας ανακοινώθηκε από τους ερευνητές το 2003. Οι ερευνητές κατάφεραν να προσδιορίσουν την αλληλουχία σχεδόν όλων των γονιδίων του ανθρώπου. Συγκεκριμένα, το Human Genome Project κατέληξε στο συμπέρασμα ότι στα χρωμοσώματά μας (22 κοινά και τα χρωμοσώματα φυλετικής διαφοροποίησης X, Y) εντοπίζονται περίπου 21.000 γονίδια μέσα σε περίπου 3 δισεκατομμύρια νουκλεοτίδια DNA. Επιπρόσθετα, έγινε πρόσφατα ο προσδιορισμός των αλληλουχιών στα γονιδιώματα πολλών ανθρώπων, πράγμα που επιτρέπει συγκρίσεις μέσα στο ανθρώπινο είδος. Συγκρίσεις μεταξύ διαφορετικών ειδών μπορούν να επιτευχθούν, καθώς έχει γίνει και ο προσδιορισμός των αλληλουχιών των γονιδιωμάτων σε πολλούς άλλους οργανισμούς. Μάλιστα, μερικά από τα στοιχεία που ανέδειξαν οι γονιδιακές μελέτες είναι πολύ ενδιαφέροντα, καθώς αναδεικνύουν των αριθμό των νουκλεοτιδίων και των γονιδίων ανάμεσα σε διαφορετικά είδη. Παραδείγματος χάριν, ο άνθρωπος κατέχει 3,2 δις. νουκλεοτίδια, ο πίθηκος 3,1 δις, το ποντίκι 2,6, το ρύζι 430.000.000, η μαγιά 12.000.000 και το βακτήριο E.coli 4.600.000 (Εικόνα 3.7) (Simon, 2016).



Εικόνα 3.7 Χρονολόγιο προγράμματος ανθρώπινου γονιδιώματος.

4. Μέθοδοι αλληλούχισης του DNA (DNA sequencing)

4.1 Μεθοδολογία αλληλούχισης του DNA

Στον τομέα της Ιατρικής και της κλινικής Γενετικής είχε παρατηρηθεί πως για την εξέταση οποιουδήποτε μικρού τμήματος DNA σε ένα δείγμα , μπορούν να χρησιμοποιηθούν κάποιες μέθοδοι υβριδισμού ή η PCR. Ωστόσο συμβαίνει συχνά, αρκετές παθολογικές μεταλλάξεις να υπόκεινται σε μικροσκοπικές αλλαγές- τροποποιήσεις, όπου ένα συγκεκριμένο νουκλεοτίδιο ανάμεσα σε χιλιάδες, σε κάποιο σημείο ενός γονιδίου, να αντικαθίσταται από κάποιο άλλο. Τέτοιες αλλαγές αλλά και μεταλλάξεις πρόσθεσης ή διαγραφής ενός ή δύο νουκλεοτιδίων, είναι αντιληπτές στην ανάλυση κατά Southern ή σε προϊόντα της PCR (Reed & Donnai, 2010).

Μία διαθέσιμη μέθοδος, που καθιστά τον έλεγχο τέτοιων σημειακών μεταλλάξεων στο γονίδιο εφικτό, αποτελεί ο προσδιορισμός της πρωτοταγούς δομής του DNA (DNA Sequencing) – ο απόλυτος έλεγχος. Στην μεθοδολογία αλληλούχισης, σε ένα πρόγραμμα γονιδιώματος πρωταρχικό ρόλο έχουν οι μέθοδοι και οι τεχνικές που χρησιμοποιούνται. Ωστόσο αυτές δεν είναι τόσο σημαντικές, εάν οι επιμέρους τμηματικές αλληλουχίες, που προέρχονται από μεμονωμένα πειράματα , δεν ενωθούν με κατάλληλο τρόπο, ώστε να αποτυπώσουν τις πραγματικές-βασικές αλληλουχίες που αποτελούν το γονιδίωμα (Brown, 2010).

4.2 Μέθοδος τερματισμού αλυσίδας (chain termination method)

Οι μέθοδοι αλληλούχισης (sequencing DNA) είναι πολλοί και ποικίλουν, με την διαφορά ανάμεσά τους να κάνει η μέθοδος τερματισμού της αλυσίδας. Μια διαδικασία που επινόησε κατά την δεκαετία του 1970 ο Fred Sanger μαζί με τους συνεργάτες του (Brown, 2010).

Προϋπόθεση για την διεξαγωγή πειράματος αλληλούχισης μέσω της κατά Sanger μεθόδου, είναι ένα παρασκεύασμα ταυτόσημων μονόκλωνων μορίων DNA. Το πρώτο στάδιο λαμβάνει χώρα με τον υβριδισμό ενός μικρού νουκλεοτιδίου στην ίδια θέση κάθε μορίου. Η λειτουργία αυτού του νουκλεοτιδίου ως εκκινήτη , πραγματοποιεί την σύνθεση ενός νέου κλώνου DNA, ο οποίος είναι συμπληρωματικός με το εκμαγείο. Αυτή η αντίδραση σύνθεσης κλώνου καταλύεται από μια DNA πολυμεράση και τα βασικά υποστρώματα που χρειάζεται είναι τα τέσσερα τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (A, T, C, G). Κανονικά λόγω των κανόνων συμπληρωματικότητας ο υβριδισμός θα συνεχιζόταν έως ότου πολυμεριστούν αρκετές χιλιάδες νουκλεοτίδια, ωστόσο αυτό δεν συμβαίνει διότι σε ένα πείραμα αλληλούχισης με τερματισμό της αλυσίδας εκτός από τα τέσσερα μονομερή των βάσεων ,στην αντίδραση προστίθεται και μία μικρή ποσότητα καθενός από τα εξής τέσσερα τριφωσφορικά διδεοξυνουκλεοτίδια (dideoxynucleotide triphosphates), καθένα από τα οποία σημαίνεται με διαφορετικό φθορίζοντα δείκτη. Αν και η πολυμεράση δεν εντοπίζει διαφορές των δεοξυ - από

τα διδεοξυνουκλεοτίδια, ωστόσο η περαιτέρω επιμήκυνση της αλυσίδας αναστέλλεται σε κάθε ενσωμάτωση ενός διδεοξυνουκλεοτιδίου (Εικόνα 4.1) (Brown, 2010).

Sanger Sequencing (Dideoxy Sequencing)

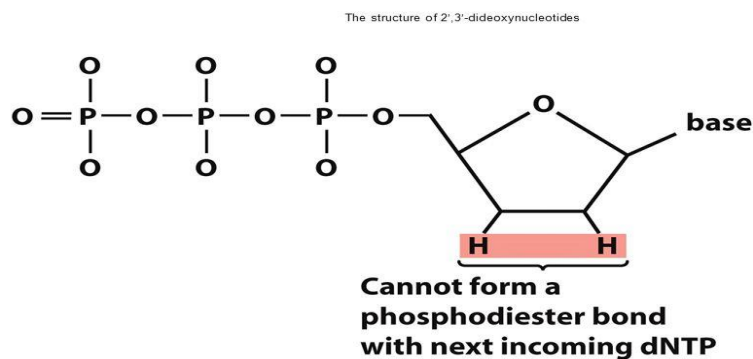
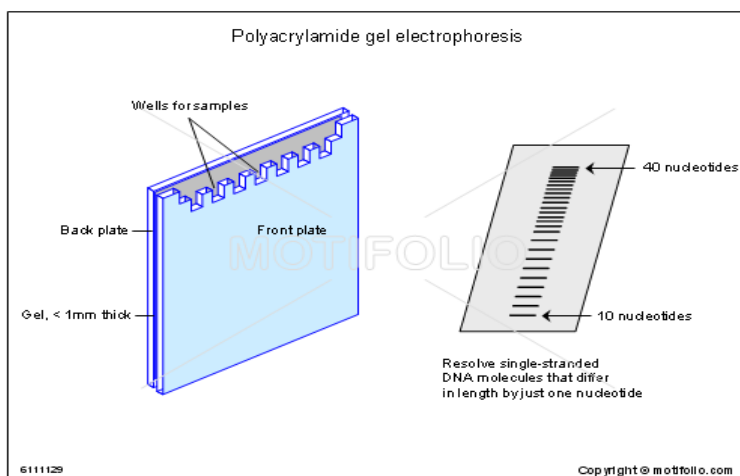


Figure 10-17
Introduction to Genetic Analysis, Tenth Edition
© 2012 W. H. Freeman and Company

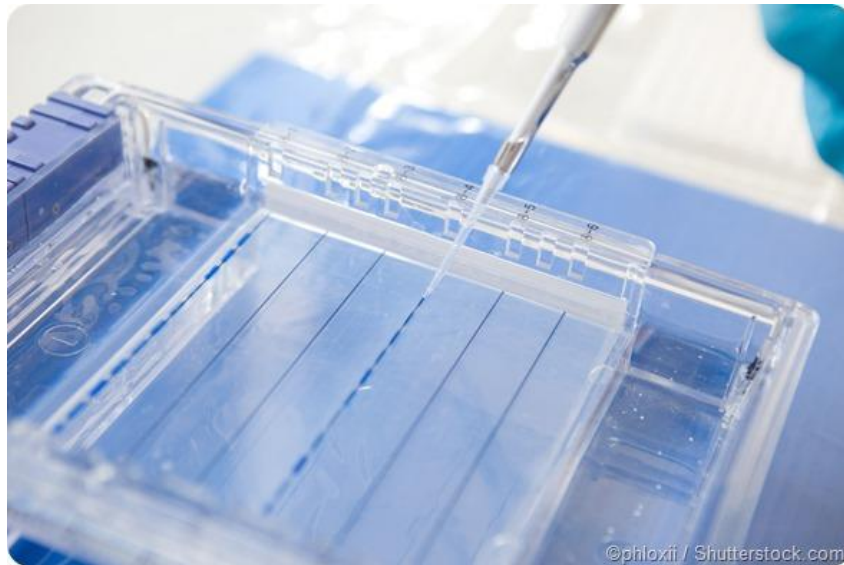
Εικόνα 4.1 Δομή Διδεοξυνουκλεοτιδίου.

Αυτό συμβαίνει επειδή ένα διδεοξυνουκλεοτίδιο δε διαθέτει την 3' - υδροξυλομάδα, η οποία είναι απαραίτητη για την σύνδεση ενός νουκλεοτιδίου με το επόμενο. Το αποτέλεσμα που θα προκύψει, θα είναι ένα σύνολο νέων μορίων, με διαφορετικό μέγεθος και καθένα θα τερματίζει σε ένα διδεοξυνουκλεοτίδιο του οποίου η ταυτότητα φανερώνει το νουκλεοτίδιο (A, C, G, T) που βρίσκεται στην αντίστοιχη θέση στο DNA εκμαγείο (Brown 2010).

Συνεπώς για να προσδιοριστεί η αλληλουχία DNA , είναι απαραίτητο να ταυτοποιηθεί το διδεοξυνουκλεοτίδιο που βρίσκεται στο τέλος κάθε μορίου που έχει προκύψει από τερματισμό της αλυσίδας. Για να επιτευχθεί ο προσδιορισμός το μείγμα το DNA εισάγεται σε ένα καλούπι μίας επίπεδης πηκτής πολυακρυλαμίδης η σε σωλήνα ενός συστήματος τριχοειδικής πηκτής και υποβάλλεται σε ηλεκτροφόρηση, μια διαδικασία που θα διαχωρίσει τα μόρια με βάση το μήκος τους (Εικόνα 4.2,4.3) (Brown, 2010).

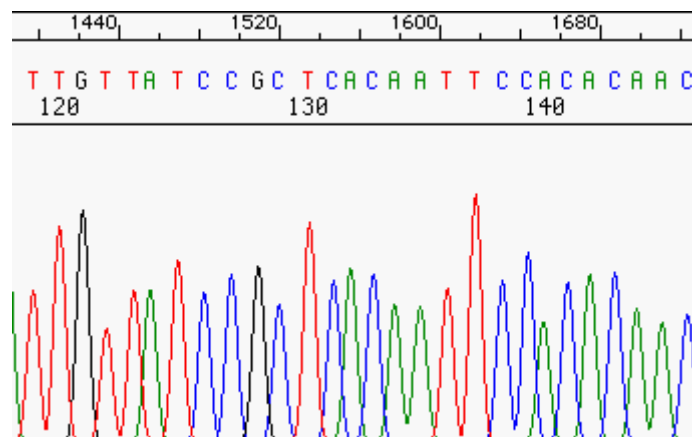


Εικόνα 4.2 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτική πολυακρυλαμίδης.



Εικόνα 4.3 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτη πολυακρυλαμίδης.

Μετά τον διαχωρισμό, τα μόρια περνούν από έναν ανιχνευτή φθορισμού, ο οποίος είναι ικανός να διακρίνει τους δείκτες σήμανσης που έχουν προσδεθεί στα διδεοξυνουκλεοτίδια. Έτσι ο ανιχνευτής προσδιορίζει αν ένα μόριο τελειώνει σε (A, C, G ή T). Τέλος η αλληλουχία εκτυπώνεται κι ελέγχεται από τον χειριστή ή αποθηκεύεται σ' έναν υπολογιστή για τυχόν ανάλυση στο μέλλον (Εικόνα 4.4) (Brown, 2010).



Εικόνα 4.4 Τυπικό αποτέλεσμα μεθόδου κατά Sanger

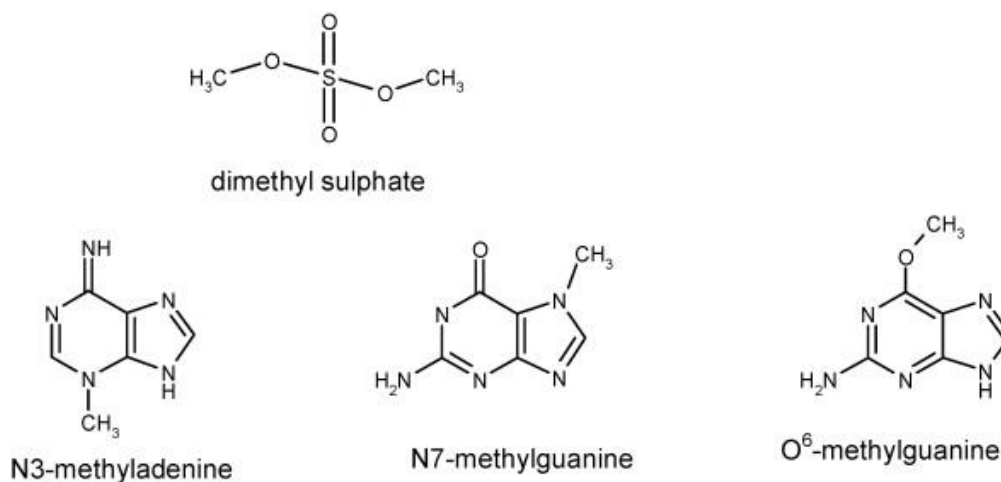
4.3 Μέθοδος της χημικής αποδόμησης - μέθοδος Maxam – Gilbert (chemical degradation method)

Σε αντίθεση με την μέθοδο του τερματισμού αλυσίδας, όπου συντίθεται η αλυσίδα του DNA, στην μέθοδο Maxam – Gilbert πραγματοποιείται αποδόμηση της αρχικής σύστασης του DNA (Maxam and Gilbert, 1980).

Στην μέθοδο χημικής αποδόμησης (Maxam and Gilbert 1980) ένα τμήμα DNA με ραδιοσήμανση στο ένα άκρο του, χωρίζεται σε 4 ξεχωριστές χημικές αντιδράσεις, κάθε μία από τις οποίες εξειδικεύεται για μία συγκεκριμένη βάση DNA. Με αυτόν τον τρόπο δημιουργούνται τέσσερις οικογένειες σημασμένων μορίων που ξεκινούν από ένα κοινό σημείο (το ραδιοσημασμένο άκρο), μέχρι το σημείο που θα συμβεί το κόψιμο. Κάθε οικογένεια περιλαμβάνει ένα μείγμα μορίων, το μήκος των οποίων εξαρτάται από την θέση των συγκεκριμένων βάσεων όπου θα κοπεί η αρχική αλυσίδα του DNA. Οι οικογένειες αυτές αναλύονται με αποδιάταξη σε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης και τα ραδιοσημασμένα μείγματα εμφανίζονται με αυτοραδιογραφία (Maxam and Gilbert, 1980).

Όσον αφορά το μέγεθος της ακολουθίας που μπορεί να αναλυθεί, η μέθοδος Maxam - Gilbert είναι λιγότερο αποδοτική. Στην δεκαετία όμως του 1970 όταν οι τεχνικές sequencing γνώριζαν ανάπτυξη, η μέθοδος Maxam - Gilbert ήταν πιο αποδοτική και εύκολη στην εφαρμογή της καθώς η τεχνική Sanger απαιτούσε μονόκλωνο δείγμα, εξειδικευμένους εκκινητές και μεγάλης διαυγείας ένζυμο, ενώ η πρώτη χρησιμοποιούσε χημικούς παράγοντες με εύκολη πρόσβαση στους ερευνητές (Maxam and Gilbert, 1980).

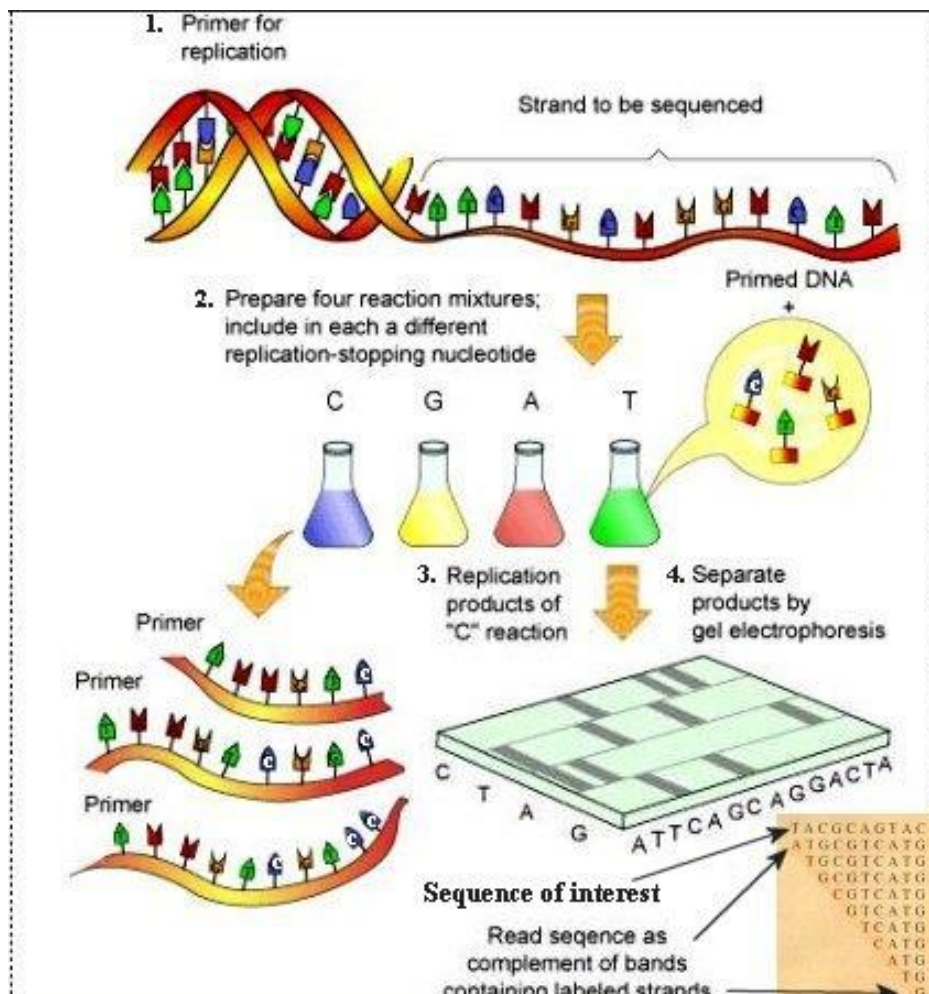
Η μέθοδος Maxam – Gilbert χρησιμοποιεί χημικές ουσίες βάσεων για να σπάσει το DNA σε συγκεκριμένες βάσεις. Δύο κοινές χημικές ουσίες, το θειικό διμεθύλιο και οι χημικές ουσίες υδραζίνης, προσβάλλουν επιλεκτικά πουρίνες και πυριμιδίνες αντίστοιχα. Συμπερασματικά στην αρχή γίνεται επισήμανση των άκρων των θραυσμάτων DNA με ραδιενεργά φωσφορικά (Εικόνα 4.5) (Maxam and Gilbert, 1980).



Εικόνα 4.5 Προσβολή βάσεων από θειικό διμεθύλιο.

Έπειτα τα σημασμένα σημεία καθαρίζονται και ηλεκτροφορούνται σε πήκτωμα. Το τελικό επισημασμένο DNA διαχωρίζεται σε 4 σωλήνες χωριστά και υποβάλλεται σε επεξεργασία με ειδικές χημικές ουσίες. Στη συνέχεια κάθε σωλήνας ηλεκτροφορείται ξεχωριστά σε γραμμές που περιέχουν γέλη και διατάσσονται ανάλογα με το μήκος τους. Τέλος

τα δείγματα υποβάλλονται σε αυτοραδιογραφία όπου και γίνεται η ανίχνευση των θραυσμάτων τους. (Εικόνα 4.6) (Maxam and Gilbert, 1980).



Εικόνα 4.6 Συνοπτική περιγραφή της μεθόδου sequencing κατά Maxam – Gilbert.

4.4 Μέθοδος Pyrosequencing

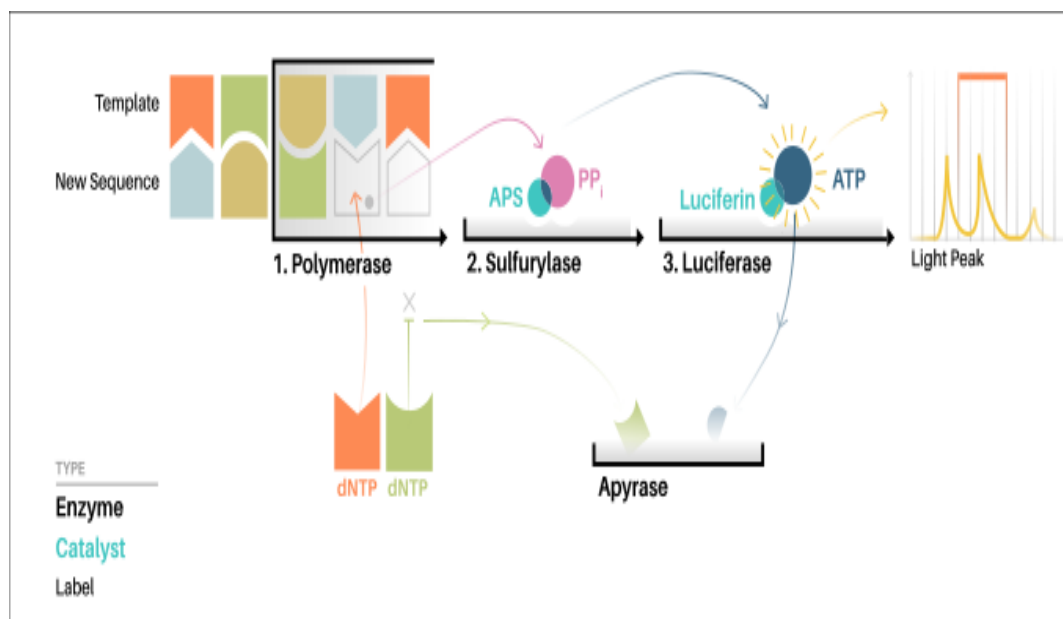
Στην μέθοδο pyrosequencing δεν είναι απαραίτητη η ηλεκτροφόρηση ή κάποια επεξεργασία για διαχωρισμό κλασμάτων, επομένως είναι πιο σύντομη από την αλληλούχιση μέσω τερματισμού της αλυσίδας και την μέθοδο της χημικής αποδόμησης. (Brown, 2010)

Μολονότι παράγει μόνο μερικές δεκάδες βάσεων σε κάθε πείραμα, η τεχνική αυτή έχει ιδιαίτερη σημασία σε περιπτώσεις όπου πολλές μικρές αλληλουχίες πρέπει να παραχθούν σε σύντομο χρονικό διάστημα (Brown, 2010).

Αναλυτικότερα, στη μέθοδο pyrosequencing το αρχικό εκμαγείο πολλαπλασιάζεται (αντιγράφεται) με άμεσο τρόπο, χωρίς την παρουσία διδεοξυνουκλεοτιδίων. Κατά την διάρκεια σύνθεσης του νέου κλώνου, καταγράφεται η σειρά με την οποία ενσωματώνονται τα διδεοξυνουκλεοτίδια, επομένως η αλληλουχία μπορεί να διαβαστεί ενώ η αντίδραση προχωράει. (Brown, 2010)

Η προσθήκη ενός διδεοξυνουκλεοτιδίου στο άκρο του αυξανόμενου κλώνου γίνεται αισθητή καθώς συνοδεύεται από την απελευθέρωση ενός μορίου πυροφωσφορικού, το οποίο μέσω ενός ενζύμου της σουλφουρυλάσης (sulfurylase) μπορεί να μετατραπεί σε λάμψη χημειοφωτάυγειας. Εάν προστίθονταν την ίδια χρονική στιγμή και τα τέσσερα διδεοξυνουκλεοτίδια, τότε θα παρατηρούνταν συνεχώς φωτεινές λάμπες και δεν θα προέκυπταν χρήσιμες πληροφορίες για την αλληλουχία. Εξαιτίας αυτού, κάθε προσθήκη διδεοξυνουκλεοτιδίου γίνεται ξεχωριστά η μία μετά την άλλη. Επιπλέον, στο μείγμα της αντίδρασης συμπεριέχεται και το ένζυμο νουκλεοτιδάση, η οποία θα συμβάλλει στην άμεση αποδόμηση κάποιου διδεοξυνουκλεοτιδίου αν αυτό δεν καταφέρει να προσδεθεί – ενσωματωθεί στο πολυνουκλεοτίδιο, προτού προστεθεί το επόμενο. Κατά αυτό τον τρόπο μπορεί να καταγραφεί η σειρά με την οποία ενσωματώνονται τα διδεοξυνουκλεοτίδια στον υπό αύξηση κλώνο. (Brown, 2010)

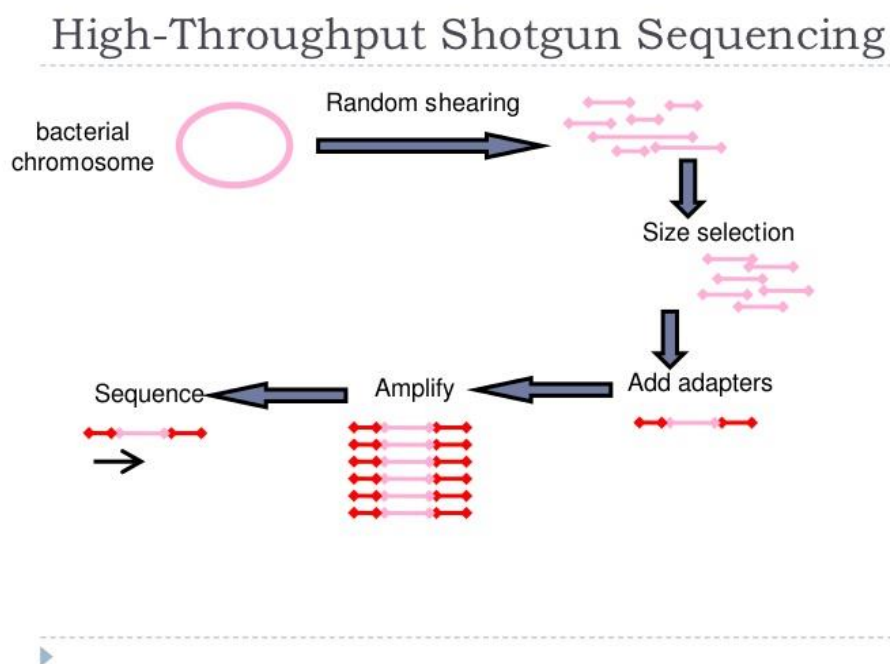
Η συγκεκριμένη μέθοδος μοιάζει μεν σύνθετη, αλλά απλώς στηρίζεται στην κατ' επανάληψη προσθήκη αντιδραστηρίων στο μείγμα της αντίδρασης με καθορισμένη σειρά και η διαδικασία εύκολα μπορεί να αυτοματοποιηθεί. Τέλος, όσων αφορά την εξέταση του πειράματος η ανίχνευση της χημειοφωτάυγειας είναι εξαιρετικά ευαίσθητη με τέτοιο τρόπο ώστε κάθε αντίδραση να πραγματοποιείται σε πολύ μικρό όγκο, ακόμα και ενός microlitre (λίτρο⁻¹²). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα σε μια αντικειμενοφόρο πλάκα τυπικού μεγέθους να διεξάγονται συγχρόνως έως 1,6 εκατομμύρια αντιδράσεις αποδίδοντας 25 εκατομμύρια νουκλεοτίδια σε 4 μόνο ώρες, ταχύτητα πολλαπλάσια από την αντίστοιχη της κατά Sanger μεθόδου. (Εικόνα 4.7) (Brown, 2010)



Εικόνα 4.7 Λειτουργία της μεθόδου Pyrosequencing.

4.5 Μέθοδος της τμηματικής κλωνοποίησης (shotgun method)

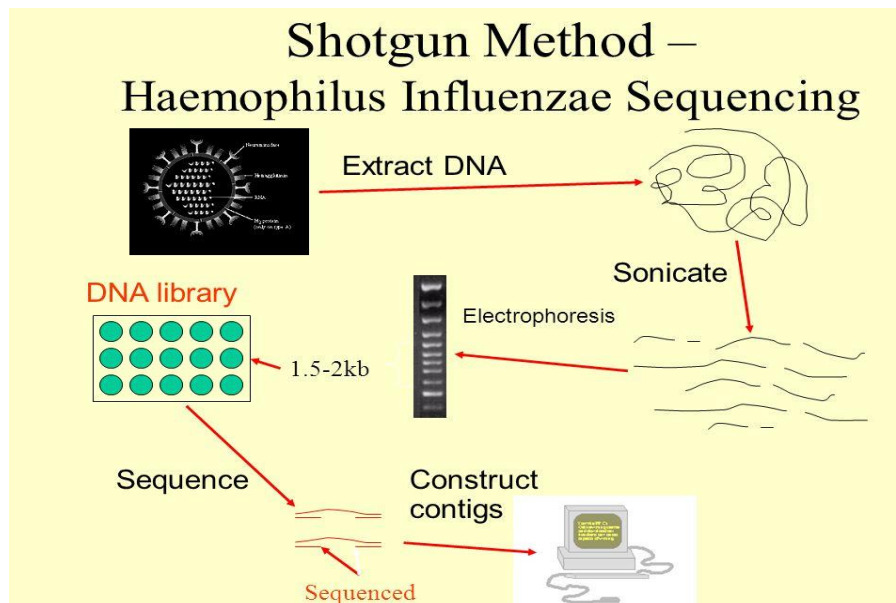
Στον έλεγχο της αλληλουχίας μεγάλων μορίων DNA χρησιμοποιείται συχνά η μέθοδος τυφλής ή τμηματικής αλληλούχισης (shotgun sequencing) μέθοδος που επινόησαν ο Sanger και οι συνεργάτες του την δεκαετία του 1980. Κατά την μέθοδο αυτή, αρχικά το DNA κόβεται σε τυχαία τμήματα. Αυτό μπορεί να γίνει με κάποιον φυσικό τρόπο, όπως για παράδειγμα περνώντας επανειλημμένα το διάλυμα του DNA μεγάλων μορίων που πρόκειται να ελεγχθεί ως προς την αλληλουχία του, από μία λεπτή βελόνα. Τα διάφορα μόρια που περιέχονται στο μείγμα, τέμνονται σε τυχαίες θέσεις και έτσι προκύπτουν άνισες οικογένειες από σχετικά μικρά τμήματα DNA που επικαλύπτονται μεταξύ τους. Τα περισσότερα από αυτά φέρουν μικρά προεξέχοντα 3' ή 5' άκρα τα οποία πρέπει να λειανθούν προκειμένου να προχωρήσει η μέθοδος ένα βήμα παρακάτω. Εξαιτίας αυτό υφίσταται επεξεργασία με μια DNA πολυμεράση η οποία ενεργεί από το 3' προς 5' άκρο, ως εξωνουκλεάση όπως συμβαίνει με την πολυμεράση του βακτηριοφάγου T4. Με την παρουσία των τεσσάρων τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοσιδίων, η πολυμεράση T4 συμπληρώνει τα υπολειπόμενα 3' άκρα ενώ λειτουργώντας ως 3' προς 5' εξωνουκλεάση αποικοδομεί τα προεξέχοντα 3' άκρα (Εικόνα 4.8) (Tropp, 2014).



Εικόνα 4.8. Μέθοδος Shotgun.

Έπειτα, τα τμήματα DNA εισάγονται σε έναν φορέα κλωνοποίησης και τα πλασμίδια χρησιμοποιούνται για τον μετασχηματισμό βακτηριακών κυττάρων. Το κλωνοποιημένο DNA απομονώνεται και πραγματοποιείται αλληλούχιση με τους εκκινητές που συνδέονται σε γνωστές ακολουθίες του φορέα κλωνοποίησης οι οποίες βρίσκονται κάτω από την θέση

κλωνοποίησης του. Τα αποτελέσματα της αλληλούχησης μίας γκάμας τυχαίων τμημάτων DNA που θα προκύψουν από το αρχικό μεγάλο μόριο, αποθηκεύονται σε ένα υπολογιστή και αναλύονται με ειδικό λογισμικό που εντοπίζει τις μεταξύ τους επικαλύψεις και με βάση αυτές τα παρουσιάζει σε σειρά. Με αυτόν τον τρόπο πραγματοποιείται η ανασύσταση της αλληλουχίας του DNA (Εικόνα 4.9) (Tropp, 2014).



Εικόνα 4.9. Συνοπτική περιγραφή της μεθόδου τμηματικής κλωνοποίησης.

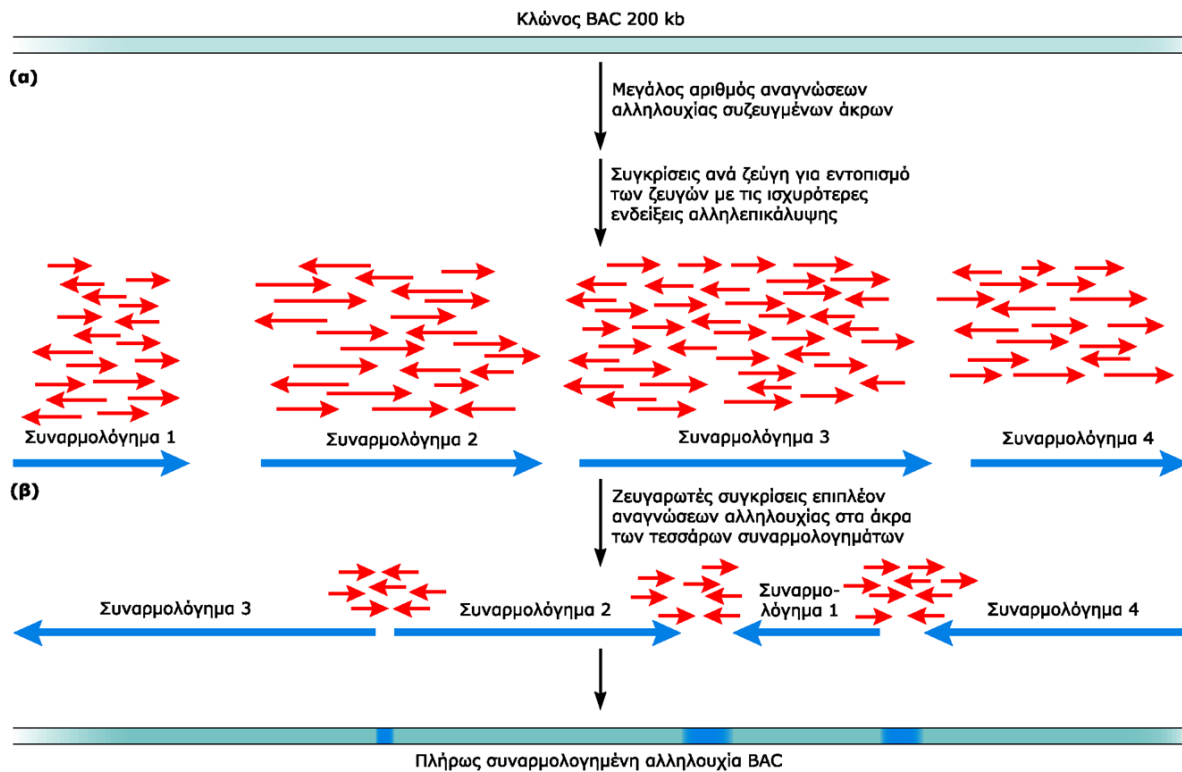
4.6 Συναρμολόγηση με την μέθοδο των συνεχών κλώνων

Η πιο συνηθισμένη μέθοδος για την αλληλούχηση ενός ευκαριωτικού γονιδιώματος έχει αναδειχθεί η μέθοδος των συνεχών κλώνων. Πέραν από την αλληλούχηση του ευκαριωτικού γονιδιώματος έχει χρησιμοποιηθεί και για την αλληλούχηση ήδη χαρτογραφημένων βακτηριακών γονιδιωμάτων. Συγκεκριμένα στη μέθοδο αυτή, το γονιδίωμα “κομματιάζεται” σε κλάσματα μήκους 1,5 Mb μέσω της τεχνικής του μερικού περιορισμού και από εκεί, τα κατακερματισμένα κλάσματα κλωνοποιούνται σε έναν φορέα μεγάλης χωρητικότητας (Brown, 2010).

Η συναρμολόγηση ενός συνεχούς κλώνων (clone contig) συμβαίνει όταν αναγνωρίζονται κλώνοι που κατέχουν επικαλυπτόμενα κλάσματα, οι αλληλουχίες των οποίων προσδιορίζονται με τη μέθοδο τμηματικής κλωνοποίησης (Brown, 2010).

Συγκεκριμένα, τα κλωνοποιημένα κλάσματα απεικονίζονται σε έναν γενετικό χάρτη γονιδιώματος, με σκοπό την ερμηνεία και τον έλεγχο των δεδομένων της αλληλουχίας μέσω χαρακτηριστικών ανιχνευτών (TS, SLP) που βρίσκονται σε συγκεκριμένες περιοχές. Στη συνέχεια πραγματοποιείται καθορισμός της αλληλουχίας των πιο μεγάλων κλασμάτων από

το σύνολο του υπό εξέταση υλικού, μέσω τυχαίας προσπέλασης χασμάτων και τα αναγνωσμένα συνεχή συναρμολογούνται (Εικόνα 4.10) (Brown, 2010).



Εικόνα 4.10 Συναρμολόγηση της αλληλουχίας μιας περιοχής μεγάλου μήκους από πολλές αναγνώσεις αλληλουχίας μικρού μήκους.

Αξίζει να αναφερθεί ότι κατά την συναρμολόγηση των αλληλουχιών μπορεί να παρουσιαστούν αρκετά προβλήματα, διότι λόγω της τυχαίας προσπέλασης παραμένουν αρκετά χάσματα στους κλώνους. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία αμφιβολίας για τον ακριβή προσανατολισμών υποκλώνων παρά την υψηλής ποιότητας συναρμολόγηση, γεγονός που καθιστά τη μέθοδο σε ορισμένες περιπτώσεις αναξιόπιστη (Brown, 2010).

4.7 Τμηματική κλωνοποίηση Ολικού γονιδιώματος (Whole Genome Shotgun Sequencing)

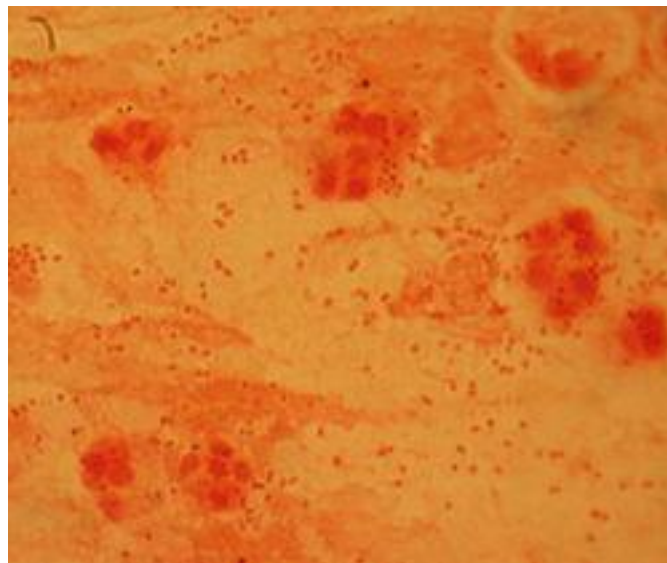
Η μέθοδος της τμηματικής κλωνοποίησης ολόκληρου του γονιδιώματος, εμφανίστηκε αρχικά από τους Craig Venter και συνεργάτες ως ένα πείραμα για την ανάλυση μεγάλων γονιδιωμάτων, π.χ του ανθρώπινου και άλλων ευκαρυωτών. Εμπειρικά συμπεράσματα έδειξαν ότι για την κάλυψη του γονιδιώματος ενός θηλαστικού (μέγεθος: 3000-35000 Mb) με τυχαία προσέγγιση θα χρειαζόταν 70 εκατομμύρια αλληλουχίες, μήκους περίπου 500 bp η καθεμία (συνολικά , 35,000Mb). Αυτό δεν είναι ανέφικτο. Πράγματι, με 60 αυτοματοποιημένες

συσκευές αλληλούχισης, που η κάθε μια προσδιορίζει 96 αλληλουχίες ανά δύο ώρες, η προσπάθεια θα μπορούσε να επιτευχθεί σε τρία χρόνια (Brown, 2010).

Φυσικά η συναρμολόγηση 70 εκατομμυρίων αλληλουχιών με σωστό τρόπο (και ακριβή) είναι απίθανη. Το εγχείρημα θα ήταν ανέφικτο. καθώς η αναγνώριση επικαλύψεων με την χρήση υπολογιστή θα ήταν χρονοβόρος, ενώ συγχρόνως θα παρουσιάζονταν λάθη, η ασάφειες εξαιτίας της μεγάλης ποσότητας επαναληπτικού DNA στο γονιδίωμα των περισσότερων ευκαρυωτών (Brown, 2010).

Κατά την δεκαετία του 1990, ο Craig Venter έθεσε μία νέα τεχνολογία αλληλούχισης στον πειραματισμό με τα βακτηριακά γονιδιώματα. Η μέθοδος της τμηματικής κλωνοποίησης ολικού γονιδιώματος, προϋποθέτει τη δημιουργία κλώνων πολλών χιλιάδων μικρών τμημάτων σε ισάριθμους φορείς – πλασμίδια. Η αλληλούχιση αυτών των τυχαίων κλώνων γινόταν μαζικά, με τη συναρμολόγηση τμημάτων DNA έπειτα από κάθε ανάγνωση χωρίς προϋπάρχουσα γνώση για την αρχική θέση τους στο γονιδίωμα (Brown, 2010).

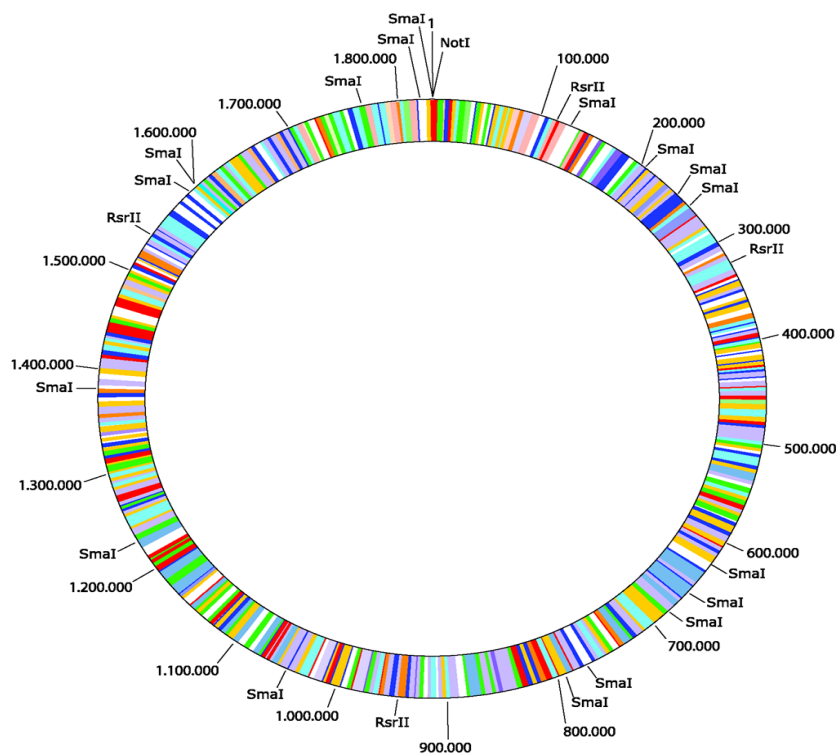
Αρχικό παράδειγμα της μεθόδου αποτέλεσε το γονιδίωμα του κυτταρομεγαλοϊού *Hemophilus influenzae*. Ένας σημαντικός για την ιατρική ιός με γονιδίωμα μεγέθους μόνο 1,8 Mbp και περιεχόμενο των βάσεων G και C σε ποσοστό περίπου 38% (όσο περίπου και στον άνθρωπο) (Εικόνα 4.11) (Brown, 2010).



Εικόνα 4.11 *Hemophilus influenzae*.

Τα βήματα που ακολούθησαν για την διεξαγωγή του πειράματος με το DNA του *H. influenzae*, ήταν τα εξής: αρχικά τμήματα του DNA κλασματοποιήθηκαν με τη βοήθεια υπερήχων (για τυχαία διάταξη) και απομονώθηκαν από αυτά τμήματα μήκους 1,6-2 Kb. Έπειτα διεξίχθει κλωνοποίηση που έφερε 19.687 κλώνους και αυτοί αλληλουχίστηκαν με τη χρήση 14 πρωτότυπων αυτόματων συσκευών αλληλούχισης. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε συναρμολόγηση των τμημάτων σε ένα υπολογιστή 512 Mbytes σε διάστημα 30 ωρών. Τα αποτελέσματα από το πείραμα αλληλούχισης του γονιδιώματος του

ιού έδειξαν 11.631.485 bp =6 x γονιδίωμα, 140 συνεχή, 50 χάσματα τα οποία προσπελάθηκαν με ιδιαίτερες στρατηγικές και εντοπίστηκαν 1743 περιοχές που κωδικοποιούν πρωτεΐνες (Εικόνα 4.12) (Brown, 2010).



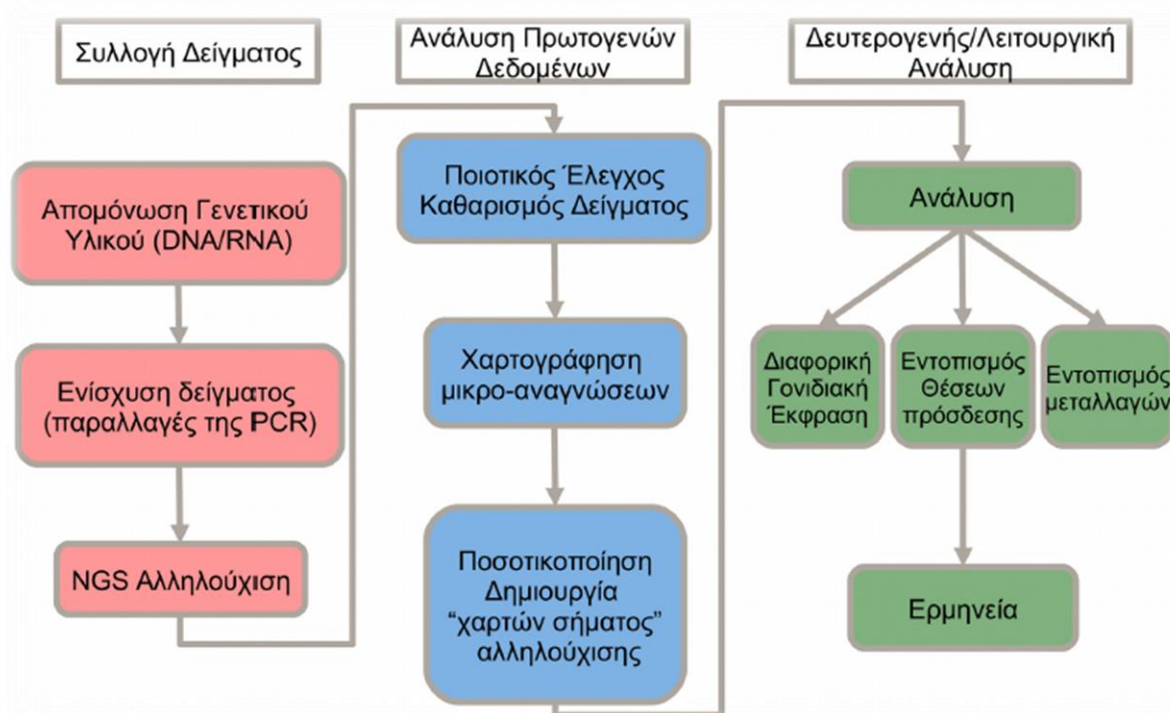
Εικόνα 4.12 Χάρτης της αλληλουχίας του γονιδιώματος του *Hemophilus influenzae*.

4.8. Αλληλούχιση επόμενης γενιάς (Next Generation Sequencing, NGS)

Στην εποχή μας έχει παρατηρηθεί τεράστια πρόοδος στις τεχνολογίες αλληλούχισης, πρόοδος που τείνει να αντικαταστήσει τις παλαιότερες τεχνολογίες αλληλούχισης της εποχής των βραβευμένων με Νόμπελ Fred Sanger, Walter Gilbert και Paul Berg. Βέβαια, η αλληλούχιση κατά Sanger παραμένει η δημοφιλέστερη και πολυχρησιμοποιούμενη μέθοδος αλληλούχισης σχετικά μικρών τμημάτων DNA, τα οποία προκύπτουν από την PCR. Ωστόσο, η παραπάνω μέθοδος θεωρείται ξεπερασμένη όσον αφορά την πλήρη αλληλούχιση ολόκληρων γονιδιωμάτων. Το κόστος και η απόδοση των συστημάτων που βασίζονται στην μέθοδο κατά Sanger υπολείπεται για την διεκπεραίωση των διαδικασιών ενός προγράμματος αλληλούχισης κάποιου μεγάλου γονιδιώματος, σε σχέση με τις νέες τεχνολογίες αλληλούχισης. Η ανάπτυξη μεθόδων εξατομικευμένης γονιδιωματικής και ο χαρακτηρισμός της γενετικής βάσης των ανθρώπινων ασθενειών είναι οι δύο πολλοί σημαντικοί στόχοι, για τους οποίους οφείλει να αυξηθεί η απόδοση των μεθόδων αλληλούχισης. Για την επίτευξη αυτών των στόχων χρειάζεται να γίνει αλληλούχιση των γονιδίων δεκάδων χιλιάδων ατόμων, πράγμα το οποίο μπορεί να γίνει εφικτό μέσω της ανάπτυξης των τεχνολογιών αλληλούχισης επόμενης γενιάς (NGS, Next-Generation Sequencing) (Klug et al., 2015).

Οι μέθοδοι NGS έχουν την ικανότητα να συνθέσουν ταυτόχρονα χιλιάδες ταυτόσημες αλυσίδες DNA και να κάνουν χρήση των πιο προηγμένων συστημάτων καταγραφής του φθορισμού για την εύρεση νεοσυντιθέμενων αλυσίδων και την εμφάνιση της αλληλουχίας του DNA. Αυτές οι πρωτοφανείς δυνατότητες ταχύτατης ανάγνωσης και αλληλούχισης γιγαντιαίου αριθμού βάσεων γίνονται με μειωμένο κόστος σε σχέση με τις συμβατικές και έχουν πολύ καλύτερα αποτελέσματα. Οι τεχνολογίες NGS έκαναν την εμφάνιση τους στην αγορά το 2005 και εταιρίες όπως η Applied Biosystems, η Roche 454 Life Sciences και η Illumina έπαιξαν μεγάλο ρόλο στην εμφάνιση των νέων τεχνολογιών. Συγκεκριμένα, τα μηχανήματα NGS έχουν την ικανότητα να κάνουν ανάγνωση σε έναν τεράστιο αριθμό αντιδράσεων με μικρό μήκος (200-400 ζεύγη βάσεων). Με αυτόν τον τρόπο παράγεται μεγάλος αριθμός μικρών επικαλυπτόμενων αλληλουχιών, που τοποθετούνται στη σειρά από τα προγράμματα λογισμικού των μηχανημάτων, για να συμβεί ολόκληρη η αλληλούχιση μεγάλων γονιδιωμάτων (Klug et al., 2015).

Η ανάμειξη πολλών εταιριών στην ανάπτυξη μηχανημάτων NGS οδήγησε στην διαφορετική προσέγγιση τεχνικής αλληλούχισης των γονιδιωμάτων, ωστόσο υπάρχουν κάποια κοινά χαρακτηριστικά βήματα τα οποία θεωρούνται κοινά για κάθε προσέγγιση και επεξηγούνται στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 4.13). Η περαιτέρω ανάλυση της μεθοδολογίας που χρησιμοποιείται πίσω από κάθε μηχανήμα ξεπερνά τα όρια και τον σκοπό της παρούσας εργασίας (Klug et al., 2015).



Εικόνα 4.13. Διαγραμματική απεικόνιση μιας γονιδιωματικής ανάλυσης με τις μεθόδους NGS.

5. Εφαρμογές μεθόδων αλληλούχισης (sequencing) του DNA στην Ιατρική

5.1 Γενικά στοιχεία

Από την ανακάλυψη των τεχνικών αλληλούχισης του γονιδιώματος μέχρι σήμερα έχει σημειωθεί δραματική πρόοδος όχι μόνο στο ερευνητικό κομμάτι αλλά και στην εφαρμογή αυτών των τεχνικών σε μικροβιολογικά εργαστήρια για την εύρεση εξατομικευμένων πληροφοριών που θα επωφελήσουν τον ασθενή στην υιοθέτηση ενός θεραπευτικού πλάνου ειδικά στοχευόμενου για τις ανάγκες του. Επιπρόσθετα, με την προοδευτικά αυξανόμενη εξέλιξη αυτών των τεχνικών διευρύνεται το φάσμα εφαρμογών τους σε τομείς όπως η κλινική διάγνωση, η εκτενέστερη και σε βάθος μελέτη και διαχείριση των γενετικών ασθενειών και η φαρμακογενετική.

5.2 Ανάλυση του γονιδιώματος (DNA Sequencing) και Νοσήματα

5.2.1 Ανάλυση του γονιδιώματος (DNA Sequencing) και καρκίνος

Ο καρκίνος είναι μια ομάδα νοσημάτων σε διάφορα μέρη του σώματος, με κάποια κοινά χαρακτηριστικά και έχει χαρακτηριστεί ως γενετική πάθηση. Συγκεκριμένα ο καρκίνος προκαλείται από αλλαγές σε ορισμένα γονίδια που ελέγχουν την λειτουργία των κυττάρων, ειδικά το πώς αναπτύσσονται και το πώς διαιρούνται. Τα γονίδια περιέχουν πληροφορίες πρωτεϊνοσύνθεσης, γεγονός που λαμβάνει χώρα στα κύτταρα. Σε περίπτωση γονιδιακών αλλαγών συμβαίνει το εξής φαινόμενο, τα κύτταρα αποκλίνουν από τον φυσιολογικό τρόπο λειτουργίας τους και μετατρέπονται σε καρκινικά κύτταρα. Τέτοιου είδους γενετικές αλλαγές συμβαίνουν, είτε λόγω κληρονομικής προδιάθεσης είτε λόγω αλλαγών στα σωματικά κύτταρα ενός ανθρώπου κατά την διάρκεια της ζωής του. Τα καρκινικά κύτταρα, αποτέλεσμα τέτοιων γονιδιακών αλλαγών, έχουν διαφορές στην λειτουργία τους σε σχέση με τα φυσιολογικά κύτταρα όπως π.χ. τα φυσιολογικά κύτταρα αναστέλλουν την ανάπτυξη και την διαίρεση τους μέσω της επαφής κυττάρου με κύτταρο ενώ τα καρκινικά κύτταρα δεν παρουσιάζουν την αναστολή της επαφής, με αποτέλεσμα να αναπτύσσονται και να διαιρούνται συνεχώς. Γενικά στα καρκινικά κύτταρα συμβαίνουν περισσότερες γενετικές αλλαγές σε σχέση με τα φυσιολογικά, οι οποίες διαφέρουν από άνθρωπο σε άνθρωπο και μπορεί να αναδεικνύονται ως αποτελέσματα του καρκίνου παρά ως η αιτία του. Καθώς εξελίσσεται ο καρκίνος στο σώμα του ασθενούς, εξελίσσονται και οι αλλαγές που συμβαίνουν σε κυτταρικό επίπεδο (NCI, 2017).

Ο κάθε τύπος καρκίνου που έχει προσβάλλει έναν άνθρωπο έχει έναν μοναδικό συνδυασμό γενετικών αλλαγών, για αυτόν τον λόγο χρησιμοποιείται το τεστ αλληλουχίας DNA του όγκου (Tumor DNA Sequencing), για να ταυτοποιήσει αυτές τις μοναδικές αλλαγές στο

DNA. Η εφαρμογή τέτοιου είδους τεστ συμβάλλουν σε πολλές περιπτώσεις στον καθορισμό ενός θεραπευτικού πλάνου. Το τεστ έχει την ικανότητα να αναγνωρίζει τις αλλαγές που έχουν υποστεί οι αλληλουχίες του DNA των καρκινικών κυττάρων και με βάση αυτές τις τροποποιήσεις, οι οποίες είναι υπεύθυνες για την ανεξέλεγκτη ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων, αναπτύσσονται από τους ιατρούς στοχευόμενες θεραπευτικές παρεμβάσεις. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα της παραπάνω προσέγγισης αποτελεί η θεραπεία με αναστολείς EFGR. Έχουν βρεθεί δηλαδή, σε καρκινικά πνευμονικά κύτταρα ορισμένων ανθρώπων μεταλλάξεις στο γονίδιο EFGR, οι οποίες έχουν ως επίπτωση την ταχύτερη διαίρεση των καρκινικών κυττάρων. Εάν βρεθεί κάποια τέτοια μετάλλαξη ή λανθάνουσα μετάλλαξη του γονιδίου EFGR τότε υπάρχουν δυνατότητες για τον ασθενή να ανταπεξέλθει στην θεραπεία με αναστολείς EFGR (NCI, 2017).

5.2.2 Ανάλυση αλληλουχίας του γονιδιώματος (DNA Sequencing) και η στεφανιαία νόσος (CAD).

Η στεφανιαία νόσος προκαλείται είτε από αθηροσκλήρωση είτε από το γεγονός ότι τα εσωτερικά τοιχώματα των αρτηριών παχύνουν και σκληραίνουν. Η σκλήρυνση των αρτηριών αποτελεί μια φυσιολογική διαδικασία του σώματος, όταν αυτό γερνάει. Όταν μιλάμε για αθηροσκλήρωση εννοούμε την εναπόθεση πλακών στις αρτηρίες. Αυτές οι πλάκες μπορεί να προέρχονται από το λίπος, το ασβέστιο, τη χοληστερόλη ή άλλα συστατικά του αίματος. Αυτή η εναπόθεση πλακών μπορεί να οδηγήσει στο φράξιμο των αρτηριών και την διακοπή της αιματικής ροής. Παρόμοιο ρόλο διαδραματίζουν και οι θρόμβοι του αίματος που οδηγούν στο ίδιο αποτέλεσμα με τις πλάκες. Υπάρχουν αρκετοί παράγοντες κινδύνου που επικρατούν στην στεφανιαία νόσο, όπως το οικογενειακό ιστορικό πρώιμης καρδιακής νόσου, η ηλικία, τα αυξημένα επίπεδα χοληστερόλης στο αίμα, το κάπνισμα, ο διαβήτης, η αυξημένη αρτηριακή πίεση, η παχυσαρκία και η έλλειψη άσκησης. Όλοι αυτοί οι παράγοντες εξαρτούνται από τον τρόπο ζωής και την συμπεριφορά του ασθενούς, εκτός από την ηλικία και το οικογενειακό ιστορικό (Graff & Cashion, 2016).

Σύμφωνα με την έρευνα των McPherson and Tybjaerg-Hansen (2016) οι γενετικοί παράγοντες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στο ρίσκο εμφάνισης CAD και την τελευταία δεκαετία έχει εξελιχθεί η πρόοδος σε αυτόν τον τομέα. Ένα από τα εργαλεία της έρευνας τους ήταν και η ανάλυση όλων των εξονίων του γονιδιώματος (Whole Exome Sequencing), η οποία παρείχε αξιόλογες πληροφορίες σχετικά με τα γονίδια που παίζουν σημαντικό ρόλο στον μεταβολισμό λιποπρωτεΐνης του πλάσματος. Η ανάλυση των εξονίων του γονιδιώματος οδήγησε επίσης στην καλύτερη κατανόηση της δομής της νόσου και απέδειξε ότι κατάγεται σε μεγάλο βαθμό από την αθροιστική συνέπεια πολλών αλληλόμορφων γονιδίων κοινού ρίσκου, τα οποία μάλιστα έχουν μικρού μεγέθους συνέπειες παρά σπάνιες μεταβλητές με μεγάλες συνέπειες στον κίνδυνο εμφάνισης CAD. Όλες αυτές οι πληροφορίες βοηθούν στην μελέτη

των παραγόντων κινδύνου εμφάνισης της ασθένειας από ιατρούς για την καλύτερη προετοιμασία ενός εξειδικευμένου θεραπευτικού πλάνου προς τον ασθενή με στεφανιαία νόσο (McPherson & Tybjaerg-Hansen, 2016).

5.2.3 Ανάλυση αλληλουχίας του γονιδιώματος (DNA Sequencing) και Διαβήτη

Ο διαβήτης αποτελεί μια ομάδα μεταβολικών ασθενειών. Χαρακτηριστικό της οποίας είναι η υπεργλυκαιμία έχοντας ως αποτέλεσμα την ελάττωση παραγωγής ινσουλίνης, την ελάττωση της δράσης της ινσουλίνης ή και τα δύο μαζί. Η κατάσταση της χρόνιας υπεργλυκαιμίας έχει συνδεθεί με μακροπρόθεσμη ζημιά, δυσλειτουργικότητα και αποτυχία λειτουργίας διάφορων οργάνων, ειδικότερα των ματιών, των νεφρών, των νεύρων, της καρδιάς και των αιμοφόρων αγγείων. Στην εξέλιξη του διαβήτη εμπεριέχονται πολλές παθολογικές καταστάσεις, που ποικίλουν από την αυτοάνοση καταστροφή των βήτα κυττάρων του παγκρέατος με συνεπή ανεπάρκεια ινσουλίνης έως και καταστάσεις όπου υπάρχει αντίσταση στην δράση της ινσουλίνης (American Diabetes Association, 2011).

Οι περισσότερες καταγεγραμμένες υποθέσεις διαβήτη εμπεριέχονται σε 2 κοινά αποδεκτές κατηγορίες. Στην κατηγορία διαβήτη τύπου 1 (Type 1 Diabetes, T1D) όπου δεν υπάρχει έκκριση ινσουλίνης και στην κατηγορία διαβήτη τύπου 2 (T2D), όπου υπάρχει ο συνδυασμός μεταξύ αντίδρασης στην δράση της ινσουλίνης και ανεπαρκούς αντίδρασης της εξισορροπητικής έκκρισης ινσουλίνης. Ωστόσο, μέσα από την πολυετή έρευνα γνωστοποιείται το γεγονός, πως θα έπρεπε να υπάρχουν και άλλες υποκατηγορίες λόγω της ετερογένειας του διαβήτη με σκοπό την εκτενέστερη έρευνα και την κατανόηση των υποκατηγοριών για την καλύτερη αντιμετώπιση της κάθε εξατομικευμένης περίπτωσης ασθενούς ξεχωριστά (Groop & Pociot, 2014).

Τα αποτελέσματα νέων ερευνών έχουν ανακαλύψει και αναγνωρίσει υποκατηγορίες του διαβήτη όπως ο λανθάνων αυτοάνοσος διαβήτης σε ενήλικες (LADA), όπου χαρακτηρίζεται από την παρουσία ενός θετικού αντισώματος του ενζύμου Γλουταμινικού οξέος Αποκαρβοξυλάσης (GAD). Η συμπεριφορά αυτού του αντισώματος, δηλαδή οι υψηλοί ή οι χαμηλοί τίτλοι αντισώματος χαρακτηρίζουν και την συμπεριφορά της συγκεκριμένης κατηγορίας. Συγκεκριμένα, όταν είναι υψηλοί οι τίτλοι αντισώματος τότε λέμε ότι η υποκατηγορία LADA είναι κοντινότερη ως προς την συμπεριφορά της στον διαβήτη, τύπου 1 (T1D). Όταν είναι χαμηλοί οι τίτλοι του αντισώματος τότε μιλάμε για συμπεριφορά παρόμοια με τον διαβήτη τύπου 2 (T2D). Όσον αφορά τον διαβήτη όψιμης έναρξης στους νέους αυτό τον τύπο διαβήτη τον χαρακτηρίζει η μονογονιδιακή μορφή του με καθορισμένες μεταλλάξεις σε 14 γονίδια MODY [HNF4A (MODY1), GCK (MODY2), HNF1A (MODY3), PDX1 (MODY4), HNF1B (MODY5), NEUROD1 (MODY6), KLF11 (MODY7), CEL (MODY8), PAX4 (MODY9), INS (MODY10), BLK (MODY11), ABCC8 (MODY12), KCNJ11 (MODY13), APPL1 (MODY14)], τα οποία είναι υπεύθυνα για συγκεκριμένες λειτουργίες που επηρεάζουν τον κίνδυνο

εμφάνισης της νόσου. Για την εύρεση των παραπάνω τύπων διαβήτη χρησιμοποιήθηκαν τεστ αλληλούχισης του γονιδιώματος όπως το Whole Exome Sequencing και γνωστοποιείται η ανάγκη για περαιτέρω έρευνα με γενετικά μέσα, έτσι ώστε να βοηθηθεί η καλύτερη κατανόηση τέτοιων νόσων αλλά και η ορθότερη θεραπευτική αντιμετώπιση με βάση τις γενετικές πληροφορίες του κάθε ασθενούς (Groop & Pociot, 2014; Naylor, et al, 2018).

5.2.4 Ανάλυση αλληλουχίας του γονιδιώματος (DNA Sequencing) και η Νόσος Alzheimer

Η νόσος Alzheimer (AD) αποτελεί μια νευροεκφυλιστική νόσο, ίσως την πιο κοινή ανάμεσα στις νόσους της άνοιας και χαρακτηρίζεται από σταδιακή απώλεια μνήμης και πνευματικών λειτουργιών σε βάθος χρόνου από την έναρξη των συμπτωμάτων. Η πλειονότητα των ανθρώπων που πάσχουν από αυτή είναι άνω των 65 ετών, αλλά υπάρχει και μια κατηγορία ανθρώπων κάτω των 65 ετών που είναι δυνητικά ευπαθείς ή έχει εμφανίσει συμπτώματα της νόσου. Μέχρι τώρα δεν έχει βρεθεί κάποια θεραπεία για τα συμπτώματα της νόσου παρά μόνο βήματα αντιμετώπισης για την επιβράδυνση της επιδείνωσης της νόσου και την βελτίωση της ποιότητας ζωής των ασθενών και των φροντιστών τους (Alzheimer's Association, 2018).

Παρά την ανυπαρξία θεραπειάς καταβάλλεται μεγάλη προσπάθεια από διάφορους κλάδους της επιστημονικής κοινότητας για να βρεθούν τρόποι αντιμετώπισης ή ακόμα και μέτρα πρόληψης της. Μια τέτοιου είδους καινοτόμα πρωτοβουλία λήφθηκε από τη Δράση Εθνικού Πρότζεκτ Αλτσχαιμερ (National Alzheimer's Project Act), η οποία ανακοίνωσε τον Φεβρουάριο του 2012 την διεξαγωγή ενός καινοτόμου πρότζεκτ αλληλούχισης της νόσου Αλτσχαιμερ (ADSP). Στόχος του συγκεκριμένου πρότζεκτ είναι η εύρεση καινούριων θεραπευτικών προσεγγίσεων και μέτρων πρόληψης μέσω αλληλούχισης και ανάλυσης γονιδιωμάτων ενός μεγάλου αριθμού ατόμων, οι οποίοι είτε έχουν εμφανίσει συμπτώματα της νόσου είτε έχουν προδιάθεση στην εμφάνιση της. Για την διεκπεραίωση του πρότζεκτ χρησιμοποιούνται τεστ ανάλυσης του γονιδιώματος, όπως η ανάλυση ολόκληρου του γονιδιώματος (Whole Genome Sequencing) και η ανάλυση ολόκληρων των εξονίων του γονιδιώματος (Whole Exome Sequencing), οι οποίες αναγνωρίζουν τις γενετικές αλλαγές και τις γενετικές πληροφορίες για την διαμόρφωση συμπερασμάτων από τους επιστήμονες και την πιθανή θετική επίδραση στον τομέα κλινικής εφαρμογής (NIAGADS, 2018).

5.2.5 Ανάλυση αλληλουχίας του γονιδιώματος (DNA Sequencing) και παχυσαρκία

Η παχυσαρκία είναι μία ακραία κατάσταση που αφορά το βάρος ενός ανθρώπου και χαρακτηρίζεται από την υπερβολική συσσώρευση λίπους στο αίμα. Αυτή η συσσώρευση έχει ως επακόλουθο την εμφάνιση άλλων χρόνιων νόσων όπως ο Διαβήτης, διάφορες καρδιακές

νόσοι και ο καρκίνος. Ο δείκτης μάζας σώματος (BMI) είναι μια χαρακτηριστική μονάδα μέτρησης που βοηθάει στην ακριβέστερη γνώση γύρω από θέματα παχυσαρκίας (WHO, 2018).

Η παχυσαρκία εξαρτάται στον μεγαλύτερο βαθμό από τον τρόπο ζωής και την συμπεριφορά του ασθενούς. Ωστόσο, παρά τις παλιότερες αποτυχημένες έρευνες συσχέτισης της παχυσαρκίας με γενετικούς παράγοντες, έρχεται στο προσκήνιο η συσχέτιση της παχυσαρκίας με συγκεκριμένα γονίδια, τα οποία έχουν υποστεί μεταλλάξεις και ευθύνονται για την παχυσαρκία σε μεγάλο βαθμό, ανεξαρτήτως περιβαλλοντικών παραγόντων (Gill, et al, 2014).

Συγκεκριμένα, σε μία μελέτη των Richard et al. (2013), όπου χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της ανάλυσης των εξονίων του γονιδιώματος (WES) μαζί με έντονη δειγματοληψία σε οικογένειες με συγγένεια εκ αίματος, αναγνωρίστηκαν δύο καινοτόμες μεταλλάξεις στους υποδοχείς λεππίνης (LEPR) σε έντονα παχύσαρκα παιδιά των οικογενειών (p. H160LfsX9) και (p.186AfsX27). Με την χρήση εργαλείων ανάλυσης γονιδιώματος, δίνεται η δυνατότητα εύρεσης τέτοιου είδους παθολογικών μεταλλάξεων που οδηγούν σε παχυσαρκία και η προσαρμογή του θεραπευτικού πλάνου για την σωστή καθοδήγηση του ασθενούς, έτσι ώστε να μπορέσει να επιτευχθεί ο επιθυμητός θεραπευτικός στόχος (Gill, et al, 2014).

5.3 Αλληλούχιση του DNA σε προγεννητικούς ελέγχους

Αρκετά σύνδρομα και νοσήματα οφείλονται σε γονιδιακές μεταλλάξεις, όπως είναι οι μικροελλείψεις και οι μικροδιπλασιασμοί. Έχει αποδειχθεί ότι ξεκινώντας από το πρώτο τρίμηνο της εγκυμοσύνης, υπάρχει ελεύθερο εμβρυικό DNA (cell free fetal DNA) στη κυκλοφορία του αίματος της μητέρας, το οποίο μπορεί να ανακτηθεί με μη επεμβατικό τρόπο και να μελετηθεί ως προς ορισμένες εμβρυικές παθολογικές καταστάσεις. Το cffDNA, μπορεί να συλλεχθεί από την 10^η εβδομάδα εγκυμοσύνης, όταν φτάνει σε επαρκείς ποσότητες για πιθανή κλινική χρήση. Στη 12^η εβδομάδα, όταν περίπου το 90% των θραυσμάτων DNA κυκλοφορούν στο πλάσμα, συμβαίνει απόπτωση του μητρικού επιθηλίου και δημιουργείται ένα μίγμα μητρικού και εμβρυικού DNA (BDMI, 2018)(GSB, 2018)(InterGenetics ΔΚΓ, 2018).

Κάποια από τα σύνδρομα για τα οποία διεξάγεται ένας προγεννητικός έλεγχος αποτελούν:

- Το Σύνδρομο Down (τρισωμία 21), το οποίο σχετίζεται με αναπτυξιακή και διανοητική καθυστέρηση που κυμαίνεται από ήπια έως σοβαρή.
- Το Σύνδρομο EDWARDS (τρισωμία 18), είναι μια διαταραχή που προκαλεί σοβαρή αναπτυξιακή καθυστέρηση και γενετικές ανωμαλίες.
- Το Σύνδρομο PATAU (τρισωμία 13), είναι μία παθολογική κατάσταση που προκαλεί σοβαρή διανοητική καθυστέρηση και σωματική δυσπλασία.

Ακόμα, εκτός από την ανίχνευση συνδρόμων ο προγεννητικός έλεγχος εντοπίζει και αρκετά φυλοσύνδετα νοσήματα όπως είναι η αιμορροφιλία, η μυϊκή δυστροφία DUCHENE, το Σύνδρομο εύθραυστου Χ κ.α. (BAMI, 2018; GSB, 2018| InterGenetics ΔΚΓ, 2018).

Στον μη επεμβατικό προγεννητικό έλεγχο (NIPT) η αλληλούχιση DNA έχει κυρίαρχο ρόλο. Το εμβρυικό DNA ελέγχεται και αλληλουχίζεται με μεθόδους αλληλούχισης όπως είναι το Whole genome Sequencing και το Next Generation Sequencing. Τα υποψήφια γονίδια για παθολογικές καταστάσεις καθώς και άλλα, σαρώνονται με ανιχνευτικές δοκιμασίες μαζικού ελέγχου και τα δεδομένα αλληλούχισης αναλύονται διεξοδικά με βελτιωμένη βιοπληροφορική, ώστε να αποδίδονται σαφή και αξιόπιστα αποτελέσματα (BAMI, 2018; GSB, 2018; InterGenetics ΔΚΓ, 2018).

5.4 Η αλληλούχιση DNA στην φαρμακογενετική και φαρμακογενετική

Η φαρμακογενετική είναι ο κλάδος εκείνος της ιατρικής, ο οποίος αναφέρεται στο πεδίο της γενετικής, που εστιάζει στην ποικιλία των αντιδράσεων σε φαρμακευτικά σκευάσματα, εξαιτίας της γενετικής ποικιλομορφίας (Graff & Cashion, 2016).

Αυτές οι γενετικές ποικιλομορφίες μπορούν να επηρεάσουν την ικανότητα του οργανισμού να απορροφά, να μεταφέρει, να μεταβολίζει ή να απομακρύνει τα φάρμακα ή τους μεταβολίτες τους. Καθώς προσδιορίζεται και καταγράφεται η επίδραση των φαρμάκων στις γενετικές ποικιλομορφίες του σώματος, μπορεί να αναπτυχθεί ένα μοντέλο ασθενούς που θα επιτρέψει στους επαγγελματίες υγείας να επιλέξουν το φάρμακο και την δόση που είναι γενετικά κατάλληλα για τον ασθενή. Μέθοδοι αλληλούχισης και τεχνικές έχουν συμβάλει σημαντικά στην φαρμακογενετική. Ένζυμα του ήπατος έχουν αλληλουχιστεί γονιδιακά και η γνώση γύρω από τις γενετικές τους συστάσεις καθοδήγησαν φαρμακευτικές μελέτες με σκοπό την παραγωγή φαρμακευτικών σκευασμάτων και τον καθορισμό του πόσο καλά μεταβολίζονται από τα ποικίλα σωματικά ένζυμα (Graff & Cashion, 2016).

Γενικά η σημασία του μεταβολισμού ουσιών σε πολλές παθοφυσιολογικές διεργασίες είναι σημαντική και χωρίς τις τεχνικές αλληλούχισης, οι γνώσεις μας γύρω από τις δυνατότητες του οργανισμού να ανταπεξέρχεται στις χημικές ουσίες των φαρμάκων θα ήταν ελλιπείς. Χαρακτηριστικό παράδειγμα των παραπάνω, αποτελεί η γενετική συσχέτιση ενός ενζύμου, της ψευδοχολινεστεράσης με το ταχείας δράσης αναισθητικό Σουκινυλοχολίνη, που προκαλεί μυοχάλαση. Περιπτώσεις από ασθενείς στους οποίους το ένζυμο αυτό δεν επαρκεί είτε απουσιάζει λόγω γενετικής μετάλλαξης, έχουν εξαιρετικά μειωμένο μεταβολισμό στα διάφορων τύπων μυοχαλαρωτικά και τα άτομα μπορεί να παρουσιάσουν κλινικά προβλήματα όπως κακοήθη υπερθερμία, συνεχή μυϊκή συστολή και συνοδό αυξημένο καταβολισμό. Οι περισσότερες περιπτώσεις αυτών των παθολογιών σχετίζονται με μεταλλάξεις σε ένα γονίδιο που ονομάζεται RYR1, το οποίο χαρτογραφείται στο χρωμόσωμα 19 και η επιστημονική

γνώση αυτής της πληροφορίας ήρθε έπειτα από συνεχόμενα πειράματα αλληλούχισης γενετικού υλικού στα ανθρώπινα ηπατικά κύτταρα (Graff & Cashion, 2016).

5.5 Η νοσηλευτική διεργασία στον τομέα της γενετικής σε προγράμματα αλληλούχισης DNA

Η συμβολή της Νοσηλευτικής στον τομέα της Γενετικής είναι αρκετά σημαντική και η βοήθεια που προσφέρει στην εργαστηριακή οργάνωση και την συλλογή επιστημονικών δεδομένων κρίνεται πολύτιμη. Η εισαγωγή της νοσηλευτικής πρακτικής σε εργαστηριακά προγράμματα και την διεξαγωγή πειραμάτων όπως είναι η αλληλούχιση του γονιδιώματος, έγκειται στην άμεση συνεργασία με επαγγελματίες υγείας , με ασθενείς που ενδεχομένως φέρουν κάποια γενετική διαταραχή και στην "γεφύρωση" σχέσεων αυτών των δυο (Graff & Cashion, 2016).

Ο νοσηλευτής επομένως θέτει σε αξιολόγηση τον ασθενή και την οικογένεια που βρίσκονται σε κίνδυνο ή φέρουν γενετικές διαταραχές, με σκοπό την αναγνώριση των παραγόντων κινδύνου και την εκτίμηση αναγκών του ασθενούς για πληροφόρηση. Σε αρκετές περιπτώσεις, παράλληλα με την τυπική φυσική εξέταση και τον εργαστηριακό έλεγχο ενδείκνυται και η φυσική εξέταση για δυσμορφία και ο γενετικός εργαστηριακός έλεγχος από νοσηλευτές. Επίσης σημαντικό στοιχείο στην αξιολόγηση από μέρος του Γενετικού νοσηλευτή είναι η λήψη οικογενειακού ιστορικού και η συναρμολόγηση γενεαλογικού δέντρου τα οποία θα μπορούσαν να καθοδηγήσουν ορισμένα μονοπάτια σε προγράμματα αλληλούχισης. Όσον αφορά τη διαδικασία της νοσηλευτικής διάγνωσης , ο νοσηλευτής αναλύει τα συλλεχθέντα δεδομένα που σχετίζονται με την πραγματική ή πιθανή γενετική διαταραχή και τις αντιδράσεις του ασθενούς και της οικογένειάς του. Σε θεραπευτικό επίπεδο , ο νοσηλευτής θα πρέπει να έχει πρόσφατη και ακριβή πληροφόρηση και γνώση των πηγών, των τεχνολογιών και των θεραπευτικών παρεμβάσεων , τόσο για τις γενικές όσο και για τις ειδικές γενετικές διαταραχές που θα μελετηθούν με τις ειδικές μεθόδους αλληλούχισης (Graff & Cashion, 2016).

6. Συμπεράσματα / Προτάσεις

Κοινώς ομολογουμένως η επιστήμη της γενετικής και της βιοτεχνολογίας, είναι η επιστήμη του μέλλοντος, ειδικά εκείνος ο τομέας της γενετικής που επικεντρώνεται στο γενετικό υλικό και το γονιδίωμα του ανθρώπου. Έχει αποδειχθεί πως στο εσωτερικό μέρος των κυττάρων μας υπάρχει ένας πλούσιος, περίπλοκος και αξιοθαύμαστος μικρόκοσμος κάθε λεπτομερής αλλαγή στον οποίο, είναι ικανή να αποδώσει έντονα εκτεταμένες αλλαγές στο σώμα, με μη αναστρέψιμες εκβάσεις. Το μεγαλύτερο έως τώρα εργαλείο που διαθέτει η

γενετική για την εξακρίβωση της σύστασης του γονιδιώματος είναι οι διάφορες εξειδικευμένες μέθοδοι ανάλυσης αλληλούχισης του DNA.

Σήμερα, τα προγράμματα ανάλυσης αλληλούχισης δεν χρησιμοποιούνται μόνο για την εξακρίβωση αλληλούχισης που φέρουν ορισμένα γονίδια ατόμων με προδιάθεση, κίνδυνο ή υπάρχουσες γενετικές διαταραχές. Η Ογκογενετική και η ογκολογία επιτάσσουν νέες βελτιωμένες εξελίξεις στην διαδικασία γονιδιακού ελέγχου νοσημάτων καθώς και ο κλάδος της φαρμακογενετικής, επεξεργάζεται νέα μοντέλα θεραπευτικών σχημάτων με στόχο την γενετική τροποποίηση ή εξάλειψη νοσημάτων.

Άξια αναφοράς είναι και η επίδραση της γενετικής και γονιδιακής τεχνολογίας σε πληθυσμούς με ευαίσθητα δογματικά στοιχεία. Κάθε πείραμα αλληλούχισης επομένως, οφείλει να προστατεύει τις διάφορες ψυχοκοινωνικές επιδράσεις ατόμων και οι επιστήμονες που τα διεξάγουν όπως (γενετιστές, βιολόγοι , ιατροί, νοσηλευτές) θα πρέπει να λαμβάνουν υπόψη τους, τα ηθικά, νομικά, πολιτισμικά, θρησκευτικά και κοινωνικά ζητήματα. Έχει παρατηρηθεί πως θρησκευτικές μειονότητες Ανατολικών χωρών φέρουν αντίσταση στις διάφορες ιατρικές επεμβάσεις που σαν στόχο έχουν την μετατροπή της γενετικής ιδιότητας του οργανισμού με απώτερο σκοπό την θεραπεία , την πρόληψη ή την βελτίωση οργανισμών. Ωστόσο δεν είναι λίγες οι φορές όπου η επιστήμη αγνοεί τα ηθικά ζητήματα με την δοκιμή πειραματικών μοντέλων που φέρουν αλάνθαστες αλληλουχίες στο γονιδίωμα τους και διάφορες από αυτές τις διαδικασίες τείνουν να νομιμοποιούνται.

Η χρήση των διάφορων τεχνικών αλληλούχισης έφερε στο φως έναν τεράστιο όγκο πληροφοριών ικανό να αλλάξει την ροή των δεδομένων της επιστημονικής κοινότητας. Συγκεκριμένα οι μέθοδοι αυτοί συνέβαλαν στην ανακάλυψη και στην αναγνώριση γονιδίων και μεταλλάξεων σε γονίδια, υπεύθυνα για την παθολογική κατάσταση των ανθρώπων. Γονίδια του καρκίνου που είναι υπεύθυνα για τις καρκινογόνες συμπεριφορές των σωματικών κυττάρων έχουν εντοπιστεί μέσω τεχνικών αλληλούχισης και με την πρόοδο της τεχνολογίας τείνουν να ανακαλυφθούν φαρμακευτικές ουσίες που θα ανταποκρίνονται στο εκάστοτε γενετικό υπόστρωμα του κάθε ασθενή (NCI, 2017). Εξελίξεις σε νευροεκφυλιστικές νόσους όπως η νόσος Alzheimer τείνουν να βρεθούν με αποτέλεσμα να μπορούν οι επαγγελματίες Υγείας να διαγιγνώσκουν την νόσου με ακριβέστερα κριτήρια και να μπορούν να χρησιμοποιούν αποτελεσματικότερα βήματα πρόληψης. Με αυτό τον τρόπο δίνεται ελπίδα στους ασθενείς της νόσου καθώς θα βελτιώνεται το θεραπευτικό πλαίσιο. Επιπρόσθετα, έχουν ανακαλυφθεί πολλά μοριακά μονοπάτια για κάθε νόσημα, τα οποία επιτρέπουν την ακριβέστερη απόδοση της δομής μιας νόσου, όπως συμβαίνει π.χ. στην ανάγνωση των εξονίων του γονιδιώματος με σκοπό την απόκτηση γνώσης στην λειτουργία της στεφανιαίας νόσου (McPherson & Tybjaerg-Hansen, 2016). Αυτές είναι μερικές από τις εφαρμογές που έχουν συνεισφέρει οι τεχνικές αλληλούχισης του γονιδιώματος, καθώς όμως εξελίσσονται δημιουργούνται οι προοπτικές για μελλοντικότερες οργανωμένες έρευνες.

Οι μέθοδοι αλληλούχισης του γονιδιώματος έχουν συνεισφέρει σε μεγάλο βαθμό στην γενετική χαρτογράφηση γενετικών νοσημάτων και στη διαφώτιση της δομής των ασθενειών, γεγονός που έγινε ένα αναγκαίο βήμα για την εξέλιξη της επιστήμης της μοριακής βιολογίας και της ιατρικής βιβλιογραφίας. Ωστόσο, η ανάπτυξη, χρήση και κατανόηση αυτών των τεχνικών έχει γίνει κατανοητή τα τελευταία χρόνια, γεγονός που εμπόδισε την ύπαρξη πληθώρας ερευνών και την πλήρη ανάπτυξη μακροπρόθεσμων μελετών. Ο κύριος λόγος για αυτό είναι η στοχευόμενη χρήση των παραδοσιακών τεχνικών αλληλούχισης και η περιορισμένη μέχρι τώρα έκβαση ερευνών οφείλεται εν μέρει και στην χρήση μη λειτουργικών εργαλείων για τις ανάγκες που θέτει το κάθε πείραμα. Τα τελευταία χρόνια αναπτύσσονται τεχνικές αλληλούχισης νέας γενιάς (**Next Generation Sequencing**), οι οποίες παρόλο που βασίζονται στις παραδοσιακές μεθόδους, τείνουν να τις αντικαταστήσουν σε μεγάλο βαθμό. Επιπλέον, οι παραδοσιακές τεχνικές αλληλούχισης κοστίζουν σημαντικά περισσότερο και εξάγουν συμπεράσματα σε μεγαλύτερο χρονικό διάστημα σε σχέση με τις νέες μεθόδους, πράγμα που τις καθιστά και χρονοβόρες και δαπανηρές.

Με την κατανόηση της χρήσης των μεθόδων αλληλούχισης του γονιδιώματος συνδυασμένη με την χρήση των εφαρμογών της νέας γενιάς, οι οποίες έχουν τεράστιες δυνατότητες, γίνεται σαφές το γεγονός για την ανάγκη της βαθύτερης μελέτης. Τομείς όπως οι μη κωδικοποιημένες περιοχές του γονιδιώματος θα μπορούσαν να αποδώσουν πληροφορίες για αυτόν τον τεράστιο μικρόκοσμο του γονιδιώματος. Επιπλέον, αναδύεται η ανάγκη για χαρτογράφηση των ασθενειών σε σύγκριση με χαρτογραφημένα υγιή γονιδιώματα για την εξαγωγή αποτελεσμάτων και την δημιουργία μιας βάσης δεδομένων. Έτσι ανοίγει ο δρόμος για την ευκολότερη διάγνωση αλλά και την μεγαλύτερη ποικιλομορφία σε θέματα ερευνών. Στα επόμενα χρόνια είναι πιθανόν η τεχνολογική πρόοδος να κάνει δυνατή την αλληλούχιση κάθε γονιδίου ή ακόμα και ολόκληρου του γονιδιώματος ενός οργανισμού, τόσο εύκολα και οικονομικά ώστε να γίνεται ως έλεγχος ρουτίνας. Ακόμα κι έτσι, γνωρίζοντας την αλληλουχία του γονιδιώματος κάποιου, είναι απίθανο οι γενετιστές να μπορούν να χαρακτηρίσουν όλες τις μεταλλάξεις πάντα ως υπεύθυνες για την δημιουργία παθήσεων. Τα περισσότερα ανθρώπινα χαρακτηριστικά εξαρτώνται από συνδυασμούς αρκετών, ίσως πολλών παραλλαγών. Ίσως στο σύντομο μέλλον οι επιστήμονες να είναι ικανοί να προβλέψουν τις συνέπειες κάθε συνδυασμού από τις εκατομμύρια διαφορετικές παραλλαγές που μπορεί να προκύψουν.

7. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το γενετικό υλικό (DNA), είναι η βασική κινητήρια και λειτουργική μονάδα του οργανισμού, που μαζί με τα δομικά στοιχεία της, τα γονίδια συντελούν στην βιοχημική ταυτότητα ολόκληρου του ανθρωπίνου σώματος.

Διαδικασίες για την εύκολη και γρήγορη ανάλυση της αλληλουχίας του γενετικού υλικού, ανακαλύφθηκαν την δεκαετία του 1970. Στις μέρες μας η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη μέθοδος αλληλούχισης ανάμεσα σε πολλές, είναι η μέθοδος τερματισμού της αλυσίδας η οποία έγινε δημοφιλής διότι αυτοματοποιείται με άνεση και παράγει μεγάλο αριθμό πειραμάτων σε σύντομο χρονικό διάστημα. Επομένως, για να προκύψει η αλληλουχία ενός ολόκληρου γονιδιώματος χρειάζεται να εκτελεστούν χιλιάδες ξεχωριστά πειράματα. Όταν προσδιορίζεται η αλληλουχία ενός γονιδιώματος, η μεγαλύτερη πρόκληση είναι η σωστή συναρμολόγηση όλων των μικρόαλληλουχησιών που προκύπτουν από τα πολλαπλά πειράματα αλληλούχισης καθώς και η σωστή χρήση βακτηρίων και βοηθητικών πειραματικών ενζύμων.

Άλλες μέθοδοι αλληλούχισης όπως η τμηματική κλωνοποίηση ενέπνευσαν τους επιστήμονες ώστε να προβούν στην μελέτη μεγαλύτερων αλληλουχιών όπως αυτή στο Πρόγραμμα του Ανθρωπίνου Γονιδιώματος. Οι πιο σύγχρονες μέθοδοι όπως Next Generation Sequencing συντέλεσαν στη γενετική αναγνώριση διαφόρων νοσημάτων και παθολογιών όπως είναι ο καρκίνος, ο διαβήτης και διάφορα γενετικά σύνδρομα και συνέβαλλαν στη φαρμακογενετική επιστήμη και στις κλινικές εφαρμογές των ευρημάτων τους με απώτερο σκοπό ένα στοχευόμενο και αποτελεσματικό θεραπευτικό πλαίσιο.

Εργαστηριακές έρευνες, συντρέχουν μέχρι και σήμερα με θέμα την ακριβέστερη ανάλυση αλληλουχίας γονιδιωμάτων ιών αλλά και οργανισμών με σκοπό την ευρύτερη χρήση τους σε διάφορους τομείς της ιατρικής.

Λέξεις κλειδιά: DNA, Ανάλυση αλληλουχίας του γενετικού υλικού, μέθοδοι αλληλούχισης, κλινικές εφαρμογές, θεραπευτικό πλαίσιο

8. ABSTRACT

The genetic material (DNA) is the fundamental driving and functional source of a living organism, which combined with its structural components, the genes, forms to the biochemical identity of the whole human entity.

Processes for quicker and easier sequencing analysis of the genetic material were discovered back in the decade of 1970s. Today the most commonly used method of sequence among many, is the chain method termination, which became very popular because of her ability to automate herself with great convenience and to conduct a big number of experiments in a brief amount of time. Therefore, in order to result in the sequence of a whole genome from the chain termination method, emerges the necessity of thousands of experiments that have to be done.

Different methods of sequencing such as the Shotgun Sequencing Method inspired scientists to proceed in surveying larger sequences such as the one that is utilized in the Human Genome Project. Modern methods like the Next Generation Sequencing platforms contributed to the genetic identification of different viruses and pathogenic conditions such as cancer, diabetes and many genetic diseases and syndromes. They also contributed in Pharmacogenetics sciences and clinical implementations of their findings, which is going to lead to a carefully designed therapeutic plan.

Laboratory studies evolve until today with a higher purpose of analyzing the sequencing of genomes from viruses and living organisms with more precise, in order for the enhanced methods to be utilized in fields of Medicine.

Key words: DNA, Sequencing analysis of the genetic material, Methods of Sequencing, Clinical Implementations, Therapeutic plan.

9. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ελληνική Βιβλιογραφία

- Brown, T.A. (2010). *Γονιδιώματα. Σύγχρονες Ερευνητικές Προσεγγίσεις*. Επιμέλεια Ελληνικής έκδοσης Α.Γ. Παπαβασιλείου, Κ. Σταματόπουλος, Ν.Δ. Ανάγνου, Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης, σελ.: 6, 9, 13, 42-50, 55-57, 140-147, 150-151, 156-164.
- Burton E. Tropp (2014). *Βασικές Αρχές Μοριακής Βιολογίας*. 1^η έκδοση. Επιμέλεια Ελληνικής έκδοσης Ακαδημαϊκές Εκδόσεις Ι. Μπάσδρα & ΣΙΑ Ο.Ε., σελ.: 189-190
- Genoma Swiss Biotechnology. (2018). *Ποιος είναι ο σκοπός της γενετικής στο προγεννητικό πεδίο*. [Online]. Available at : <https://genoma.com/blog/el/%CF%80%CE%BF%CE%B9%CE%BF%CF%82%CEB5%CE%AF%CE%BD%CE%B1%CE%B9-%CE%BF%CF%83%CE%BA%CE%BF%CF%80%CF%8C%CF%82%CF%84%CE%B7%CF%82%CE%B3%CE%B5%CE%BD%CE%B5%CF%84%CE%B9%CE%BA%CE%A%CF%82-%CF%83%CF%84%CE%BF/> [accessed 10 Oct 2018]
- Graff, C., Cashion, A. (2016). Γενετική. Στο: Osborn, K.S., Wraa, E.C., Watson, B.A., Holleran, B., εκδ. Παθολογική-Χειρουργική Νοσηλευτική. Nicosia, Cyprus, BROKEN HILL PUBLISHERS LTD, σελ: 165-182.
- InterGenetics Διαγνωστικό Κέντρο Γενετικής. (2018). *Ανάλυση όλων των γονιδίων του ανθρώπου (Clinical Whole Exome Sequencing, WES)*. [Online]. Available at: <http://intergenetics.eu/post/analysh-olwn-twn-gonidiwn-toy-an8rwroy-clinical-whole-exome-sequencing-wes> [accessed 10 Oct 2018]
- Reed, A & D. Donnai (2010). *Σύγχρονη Κλινική Γενετική*. Επιμέλεια Ελληνικής έκδοσης Εμμανουήλ Καναβάκης, Σοφία Κίτσιου – Τζέλη, Ιατρικές Εκδόσεις Π. Χ. Πασχαλίδης, σελ.: 32-33, 36, 47-48, 88-93, 95-96, 96-97, 98-99, 120, 444,
- Simon, E.J. (2016). *Βιολογία. Βασικές Έννοιες*. 1^η έκδοση. Επιμέλεια Ελληνικής έκδοσης Γ. Μίνος, Επιστημονικές Εκδόσεις ΠΑΡΙΣΙΑΝΟΥ Α.Ε. σελ.: 150, 410
- Wikipedia. (2018). *Πείραμα των Χέρσεϊ και Τσέις*. [Online]. Available at: https://el.wikipedia.org/wiki/%CE%A0%CE%B5%CE%AF%CF%81%CE%B1%CE%BC%CE%B1_%CF%84%CF%89%CE%BD_%CE%A7%CE%AD%CF%81%CF%83%CE%B5%CF%8A_%CE%BA%CE%B1%CE%B9_%CE%A4%CF%83%CE%AD%CE%B9%CF%82 [accessed 10 Oct 2018]
- ΒΙΟΠΑΘΟΛΟΓΙΚΟ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΙΑΤΡΕΙΟ. 2018. *ΜΗ ΕΠΕΜΒΑΤΙΚΟΣ ΠΡΟΓΓΕΝΗΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ (NIPT)*. [Online]. Available at: <https://microskopio.gr/%CE%BC%CE%B7%CE%B5%CF%80%CE%B5%CE%BCCE%B2%CE%B1%CF%84%CE%B9%CE%BA%CE%BF%CF%83%CF%80%CF%81%CE%BF%CE%B3%CE%B5%CE%BD%CE%BD%CE%B7%CF%84%CE%B9%CE%BA%CE>

%BF%CF%83-%CE%B5%CE%BB%CE%B5%CE%B3%CF%87%CE%BF/ [accessed 10 Oct 2018]

Ξενόγλωση Βιβλιογραφία

- Alzheimer's Association. (2018). *What is Alzheimer's?* [Online]. Available at: <https://www.alz.org/alzheimers-dementia/what-is-alzheimers> [accessed 12 Oct 2018].
- American Diabetes Association, (2011). Diagnosis and classification of Diabetes mellitus. *Diabetes care* 34 (Suppl. 1): 562-9
- Gill, R., Cheung, Y. H., Shen, Y., Lanzano, P., Mirza, N. M., Ten, S. , Maclaren, N. K., Motaghedi, R., Han, J. C., Yanovski, J. A., Leibel, R. L. and Chung, W. K. (2014). Whole-Exome sequencing identifies novel *LEPR* mutations in individuals with severe early onset obesity. *Obesity*, 22: 576-584.
- Groop, L., Pociot, F., (2014). Genetics of Diabetes –Are we missing the genes or the disease? *Molecular and cellular Endocrinology*, 382 (1): 726-739
- Maxam, A. M., & Gilbert, W. (1980). Sequencing end-labeled DNA with base-specific chemical cleavages. *Methods in Enzymology*, 65(1): 499.
- Mc Pherson, R., Tybjaerg-Hansen, A. (2016). Genetics of Coronary Artery Disease. *Circulation Research*, 118(4): 564-578.
- National Cancer Institute. (2017). *The Genetics of Cancer*. [Online]. (Updated 12 Oct 2017) Available at: <https://www.cancer.gov/about-cancer/causes-prevention/genetics> [accessed 11 Oct 2018].
- National Cancer Institute. (2017). *Tumor DNA Sequencing in Cancer treatment*. [Online] (Updated 5 Oct 2017) Available at: <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types/precision-medicine/tumor-dna-sequencing> [accessed 11 Oct 2018].
- Naylor, R., Knight Johnson, A., del Gaudio, D. (2018). Maturity-Onset Diabetes of the Young In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, et al., editors. GeneReviews® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2018. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/books/NBK500456/>
- The National Institute on Aging Genetics of Alzheimer's Disease Data Storage Site. (2018). *Alzheimer's Disease Sequencing Project (ADSP)*. [Online]. Available at: <https://dss.niagads.org/studies/alzheimers-disease-sequencing-project-adsp/> [accessed 12 Oct 2018].
- William S. Klug, Michael R. Cummings, Charlotte A. Spencer, Michael A. Palladino (2015). *Concepts of Genetics*, 11th Edition, Pearson Education, Inc. 630-633.
- World Health Organization. (2018). Obesity. [Online] Available at: (<http://www.who.int/topics/obesity/en/>) [accessed 14/10/2018].