

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

Μοριακή διαγνωστική: παρελθόν, παρόν και μέλλον

GEORGE P. PATRINOS¹ και WILHELM ANSORGE²

¹ Erasmus University Medical Center, Faculty of Medicine and Health Sciences, MGC Department of Cell Biology and Genetics, Rotterdam, Ολλανδία

² European Molecular Biology Laboratory, Biological Structures and Biocomputing Programme, Heidelberg, Γερμανία

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

- 1.1 Εισαγωγή
 - 1.2 Ιστορία της μοριακής διαγνωστικής: η ανακάλυψη του τροχού
 - 1.3 Η επανάσταση της PCR: εν τω πολλώ το ευ
 - 1.4 Η μοριακή διαγνωστική μετά την αποκρυπτογράφηση του γονιδιώματος
 - 1.5 Μελλοντικές προοπτικές: τι επιφυλάσσει το μέλλον
 - 1.5.1 Η εμπορευματοποίηση της μοριακής διαγνωστικής
 - 1.5.2 Εξατομικευμένη ιατρική
 - 1.5.3 Θεραπευτική διαγνωστική: η ενοποίηση της διάγνωσης και της θεραπείας
 - 1.6 Συμπεράσματα
- Βιβλιογραφία

1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η διάγνωση των παθήσεων του ανθρώπου η οποία βασίζεται στις μοριακές τεχνικές ή στα νουκλεϊκά οξέα, συνίσταται στην ανίχνευση των διάφορων παθογόνων μεταλλάξεων σε δείγματα DNA ή/και RNA, με στόχο την ανίχνευση, τη διάγνωση, την κατηγοριοποίηση, την πρόγνωση και την παρακολούθηση της ανταπόκρισης στη θεραπεία. Η μοριακή διαγνωστική συνδυάζει την εργαστηριακή ιατρική με τη γνώση και την τεχνολογία της μοριακής γενετικής, και έχει γνωρίσει πραγματική επανάσταση κατά τις τελευταίες δεκαετίες, καθώς αξιοποιεί τις ανακαλύψεις που έγιναν στο πέδιο της μοριακής βιολογίας (βλ. Εικ. 1.1). Η αναγνώριση και ο αναλυτικός χαρακτηρισμός της γενετικής βάσης των συγκεκριμένων νοσημάτων έχουν ζωτική σημασία για την ορθή διάγνωση. Η ανακάλυψη των σχετικών γονιδίων παρέχει πολύτιμες πληροφορίες για το μηχανισμό της νόσου, ενώ οι γενετικοί δείκτες επιτρέπουν στους ιατρούς όχι μόνο να αξιολογήσουν την προδιάθεση για τη νόσο, αλλά και να σχεδιάσουν και να εφαρμόσουν βελτιωμένες μεθόδους διάγνωσης. Οι τελευταίες είναι εξαιρετικά σημαντικές, καθώς η πληθώρα και η μεγάλη ποικιλία των μοριακών βλαβών επιβάλλουν τη χρήση μιας πλατφόρμας ανίχνευσης μεταλλάξεων

μαζικά και όχι μεμονωμένα. Η μοριακή διαγνωστική είναι σήμερα μέρος της κλινικής πραγματικότητας, με βαθιές ορίζες στη βασική μελέτη της έκφρασης και της λειτουργίας των γονιδίων.

1.2 ΙΣΤΟΡΙΑ ΤΗΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗΣ: Η ΑΝΑΚΑΛΥΨΗ ΤΟΥ ΤΡΟΧΟΥ

Το 1949, ο Pauling και οι συνεργάτες του εισήγαγαν τον δρο μοριακή νόσος στο ιατρικό λεξιλόγιο, μετά την ανακάλυψη πως μια αλλαγή σε ένα μοναδικό αιμονοξύ της αλυσίδας της β-σφαιρίνης προκαλεί δρεπανοκυτταρική αναιμία, νόσο που χαρακτηρίζεται κυρίως από επαναλαμβανόμενα επεισόδια οξείας πόνου λόγω απόφραξης των αγγείων. Τα ευρήματά τους έθεσαν τα θεμέλια της μοριακής διαγνωστικής, αλλά η μεγάλη επανάσταση στον τομέα αυτό συνέβη πολλά χρόνια αργότερα. Τότε, με τη πυρετώδη ανάπτυξη της μοριακής βιολογίας μόνο, η παροχή υπηρεσιών μοριακής διαγνωστικής ήταν αδιανόητη και τεχνικώς ανέφικτη.

Τα πρώτα σπέρματα της μοριακής διαγνωστικής φυτεύτηκαν τις πρώτες ημέρες της τεχνολογίας του ανασυνδυασμένου DNA, με τη συντονισμένη εργασία πολλών επιστημόνων από διάφορες ειδικότητες. Η κλωνοποίηση και ο προσδιορισμός της αλληλουχίας του cDNA ήταν πολύτιμα εργαλεία εκείνη την εποχή, για τον προσδιορισμό της πρωταγούς αλληλουχίας διάφορων γονιδίων. Αυτό επέτρεψε να παραχθούν πολλοί ανιχνευτές DNA για την ανάλυση γονιδιακών περιοχών μέσω αποτύπωσης κατά Southern, η οποία οδήγησε στην ανάπτυξη και στην εφαρμογή τεχνικών μελέτης των πολυμορφισμών μεγέθους θραυσμάτων (ή τημάτων) περιορισμού (ή δράσης περιοριστικών ενζύμων) (Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP), με τις οποίες είναι δυνατή η παρακολούθηση μεταλλαγμένων αλληλομόρφων από ετεροδιγούς γονείς, σε περιπτώσεις κυήσεων υψηλού κινδύνου. Το 1976, ο Kan και οι συνεργάτες του πραγματοποίησαν την πρώτη προγεννητική διάγνωση αμεσογειακής αναιμίας, με υβριδοποίηση στο DNA που απο-

μόνωσαν από εμβρύϊκούς ινοβλάστες. Ακόμη, το 1978 οι Kan και Dozy χρησιμοποίησαν την ανάλυση RFLP για να εντοπίσουν αλληλόμορφα δρεπανοκυτταρικής αναιμίας σε άτομα αφρικανικής καταγωγής. Αυτή η επαναστατική τεχνική επέτρεψε να αναπτυχθούν παρόμοιες διαγνωστικές προσεγγίσεις για το χαρακτηρισμό και άλλων γενετικών νοσημάτων, όπως η φαινυλκετονούρια (Woo και συν., 1983), η κυτική ίνωση (Farrall και συν., 1986) και άλλες.

Παράλληλα, δύος, έπρεπε να ξεπεραστεί μια σημαντική τεχνική στενωπός. Η ταυτοπόίηση της μεταλλάξεως που προκαλούσε τη νόσο μπορούσε να γίνει μόνο με την κατασκευή μιας γονιδιακής βιβλιοθήκης DNA από το προσβεβλημένο άτομο, προκειμένου να κλωνοποιηθεί το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο και, κατόπιν, να προσδιοριστεί η νουκλεοτιδική αλληλουχία του. Και πάλι, πολλές μεταλλάξεις του ανθρώπινου γονιδίου της β-σφαιρίνης των αιμοσφαιρινών ανιχνεύτηκαν σύντομα μέσω των τεχνικών αυτών (Busslinger και συν., 1981, Treisman και συν., 1983). Το 1982, ο Orkin και οι συνεργάτες του έδειξαν ότι αρκετοί πολυμορφισμοί της αλληλουχίας του συμπλέγματος των γονιδίων της β-σφαιρίνης συνδέονταν με συγκεκριμένες μεταλλάξεις του γονιδίου της β-σφαιρίνης. Αυτές οι ομάδες RFLP, που ονομάζονται απλότυποι (τόσο διαγονιδιακοί όσο και ενδογονιδιακοί), παρέχουν μια αρχική προσέγγιση διαλογής για τον εντοπισμό μεταλλάξεων που προκαλούν κάποια νόσο. Ενώ η προσέγγιση αυτή επέτρεψε στους ερευνητές να προβλέψουν ποιο γονίδιο β-σφαιρίνης περιέχει μια μεταλλάξη, γεγονός που

διευκόλυνε σημαντικά τις αναλύσεις διαλογής για τις μεταλλάξεις, κανείς δεν μπορούσε ακόμη να προσδιορίσει την ακριβή φύση της νοσογόνου μετάλλαξης, αφού πολλές διαφορετικές μεταλλάξεις στο γονίδιο της β-σφαιρίνης συνδέονται με κάποιον συγκεκριμένο απλότυπο σε διαφορετικούς πληθυσμούς (περισσότερες πληροφορίες είναι διαθέσιμες στο δικτυακό τόπο: <http://globin.cse.psu.edu/hbvar>, Hardison και συν., 2002, Patrinos και συν., 2004).

Παράλληλα αναπτύσσονταν διάφορες διερευνητικές μέθοδοι για τον εντοπισμό μεταλλάξεων στο DNA των ασθενών, οι οποίες προσέφεραν μια ταχύτερη εναλλακτική οδό σε σύγκριση με τον προσδιορισμό της αλληλουχίας του DNA. Οι πρώτες τέτοιες μέθοδοι ανήγνευαν την παρουσία αταίριαστων ζευγών βάσεων σε ετεροδιμερή DNA/DNA ή RNA/DNA (Myers και συν., 1985a, Myers και συν. 1985b) ή διαφοροποιήσεις στα αταίριαστα ετεροδιμερή DNA με χρήση ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα, ανάλογα με το πρότυπο τηξης τους (Myers και συν., 1987). Με αυτήν την επίπονη και χρονοβόρο μέθοδο αναγνωρίστηκαν αρκετές μεταλλάξεις ή πολυμορφικές παραλλαγές, γεγονός που επέτρεψε το σχεδιασμό μικρών συνθετικών ολιγονούκλεοτιδίων, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν ως ειδικοί ανιχνευτές για την ανίχνευση αλληλομόρφων σε αποτυπώματα του γονιδιώματος κατά Southern. Αυτή η πειραματική μέθοδος εφαρμόστηκε γρήγορα για την ανίχνευση μεταλλάξεων της β-μεσογειακής αναιμίας (Orkin και συν., 1983, Pirastu και συν., 1983).

Παρά τις εντατικές προσπάθειες διάφορων εργαστηρίων σε ολόκληρο τον κόσμο, η διάγνωση των κληρονομικών νοσημάτων στο επίπεδο του DNA παρέμενε ακόμα σε πρωτόγονο στάδιο και δεν ήταν δυνατόν να εφαρμοστεί σε κλινικά εργαστήρια για δοκιμασίες ρουτίνας σε πάσχοντες, λόγω της πολυπλοκότητας, του κόστους και του χρόνου που απαιτούνται η διαθέσιμη τεχνολογία. Η χρονική εποχή της μοριακής διαγνωστικής ξεκίνησε πριν από λίγα μόλις χρόνια, με την ανακάλυψη του πιο ισχυρού εργαλείου της μοριακής βιολογίας μετά την κλωνοποίηση και τον προσδιορισμό αλληλουχιών: της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR).

1.3 Η ΕΠΑΝΑΣΤΑΣΗ ΤΗΣ PCR: ΕΝ ΤΩ ΠΟΛΛΩ ΤΟ ΕΥ

Η ανακάλυψη της PCR (Saiki και συν., 1985, Mullis και Faloona, 1987) και η γρήγορη βελτιστοποίησή της με τη χρήση μιας θερμοσταθερής *Taq* DNA πολυμεράσης από το *Theretmus aquaticus* (Saiki και συν., 1988) έχει διευκολύνει σε τεράστιο βαθμό και έχει φέρει πραγματική επανάσταση στη μοριακή διαγνωστική. Το σημαντικότερο στοιχείο της PCR είναι ο μεγάλος αριθμός αντιγράφων της επιθυμητής αλληλουχίας που παράγεται με την εκθετική ενίσχυση της (βλ. Εικ. 1.2), γεγονός που επιτρέπει την ανίχνευση γνωστών μεταλλάξεων μέσα σε μία μόνον ημέρα, αντί για το διάστημα των μηνών που χρειαζόταν παλαιότερα. Επιπλέον, η PCR έχει μειώσει ή εξαλείψει πλήρως την ανάγκη για χρήση θαλα-

| ΕΤΟΣ | ΑΝΑΚΑΛΥΨΗ |
|------|--|
| 1949 | Χαρακτηρισμός της δρεπανοκυτταρικής αναιμίας ως μοριακής νόσου |
| 1953 | Ανακάλυψη της διπλής έλικας του DNA |
| 1958 | Απομόνωση των DNA πολυμερασών |
| 1960 | Πρώτες τεχνικές υβριδοποίησης |
| 1969 | Υβριδοποίηση <i>in situ</i> |
| 1970 | Ανακάλυψη των ενζύμων περιορισμού και της αντίστροφης μεταγραφάστης |
| 1975 | Αποτύπωση κατά Southern |
| 1977 | Προσδιορισμός αλληλουχίας του DNA |
| 1983 | Σύνθεση των πρώτων ολιγονούκλεοτιδίων |
| 1985 | Ανάλυση πολυμορφισμού μεγέθους θραυσμάτων δράσης περιοριστικών ενζύμων |
| 1985 | Ανακάλυψη της PCR |
| 1986 | Ανάπτυξη της φθορίζουσας <i>in situ</i> υβριδοποίησης (FISH) |
| 1988 | Ανακάλυψη της θερμοσταθερής DNA πολυμεράσης – Βελτιστοποίηση της PCR |
| 1992 | Εφεύρεση της PCR σε πραγματικό χρόνο |
| 1993 | Ανακάλυψη των ενδονούκλεασών ειδικών δομής, για δοκιμασίες διάστασης |
| 1996 | Πρώτη εφαρμογή των μικροσυστοιχών DNA |
| 2001 | Πρώτες εκδόσεις της αλληλουχίας του ανθρώπου γονιδιώματος |
| 2001 | Εφαρμογή των πληροφοριών από το πρωτεΐνικό προφίλ σε νόσους του ανθρώπου |

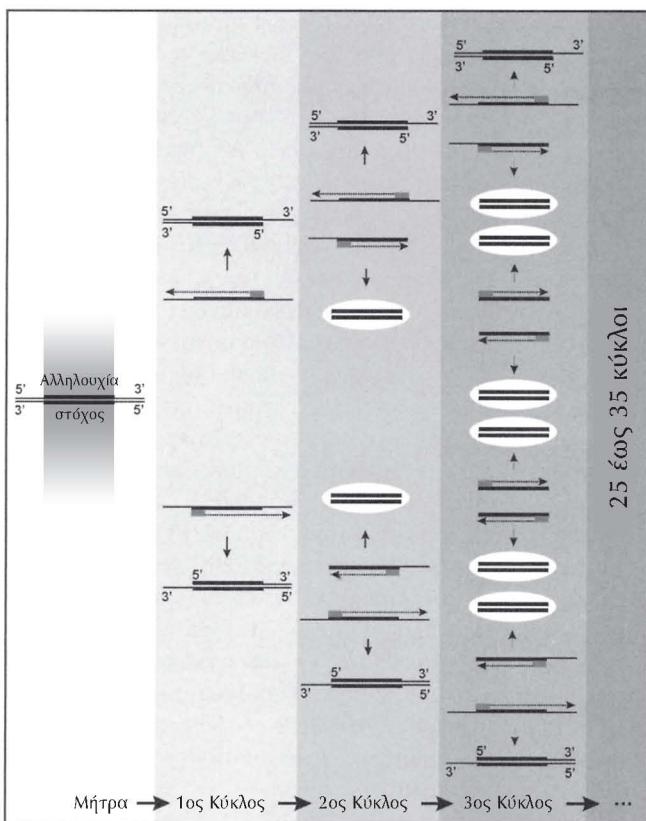
ΕΙΚΟΝΑ 1.1 Η χρονική σειρά των κυριότερων ανακαλύψεων στον τομέα της μοριακής βιολογίας, οι οποίες επηρέασαν την ανάπτυξη της μοριακής διαγνωστικής.

γές αυτές επέτρεψαν στη μοριακή διαγνωστική να μπει στο κλινικό εργαστήριο και να χρησιμοποιηθεί για γενετικές υπηρεσίες, όπως οι αναλύσεις διαλογής φορέων ή γενικού πληθυσμού για γνωστές μεταλλάξεις, η προγεννητική διαγνωση κληρονομικών ασθενειών και – τα τελευταία χρόνια – η ταυτοποίηση άγνωστων μεταλλάξεων, μετά από στενή συνεργασία με ερευνητικά εργαστήρια. Έτσι, με τη μετακίνηση της στο φυσικό της χώρο, το κλινικό εργαστήριο, η μοριακή διαγνωστική μπορεί να προσφέρει τις υπηρεσίες για τις οποίες αναπτύχθηκε.

Η ανακάλυψη της PCR έθεσε επίσης τα θεμέλια για το σχεδιασμό και την ανάπτυξη πολλών μεθόδων ανίχνευσης μεταλλάξεων, οι οποίες βασίζονται στην ενίσχυση του DNA. Κατά κανόνα, η PCR χρησιμοποιείται είτε για την παραγωγή των θραυσμάτων DNA που θα αναλυθούν, είτε ως μέρος της μεθόδου ανίχνευσης. Η πρώτη προσέγγιση αφορούσε τη χρήση ενζύμων περιορισμού (Saiki *και συν.*, 1985) ή ολιγονουκλεοτιδικών ανιχνευτών οι οποίοι είχαν καθηλωθεί πάνω σε μεμβράνες ή βρίσκονταν σε διάλυμα (Saiki *και συν.*, 1986), προκειμένου να προσδιοριστεί η υπάρχουσα γενετική ποικιλότητα, και συγκεκριμένα η μετάλλαξη που προκα-

λεί τη δρεπανοκυτταρική αναιμία. Τα επόμενα χρόνια αναπτύχθηκε και εφαρμόστηκε ένας ακόμα μεγαλύτερος αριθμός τεχνικών για την ανίχνευση των μεταλλάξεων. Οι τεχνικές αυτές μπορούν να χωριστούν γενικά σε τρεις κατηγορίες, ανάλογα με τη βάση διάκρισης των αλληλομορφιών παραλλαγών:

- Ενζυμικές μέθοδοι.** Η ανάλυση RFLP ήταν ιστορικά η πρώτη μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε ευρέως. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιεί τις μεταβολές στα σημεία πέψης από ένζυμα περιορισμού, οι οποίες οδηγούν σε εμφάνιση ή εξαφάνιση τέτοιων σημείων (Saiki *και συν.*, 1985). Στη συνέχεια σχεδιάστηκαν διάφορες άλλες ενζυμικές προσεγγίσεις στην ανίχνευση μεταλλάξεων, οι οποίες βασίζονται στην εξάρτηση της δευτερογενούς δομής του DNA από την πρωτοταγή αλληλουχία του. Οι μέθοδοι αυτοί χρησιμοποιούν τη δράση ρεσολβάσης των ενζύμων T4 ενδονουκλεάση VII και, πιο πρόσφατα, T7 ενδονουκλεάση I για να πέψουν το ετεροδιμερές DNA που σχηματίζεται από την υβριδοποίηση DNA, μεταλλαγμένου και άγριου τύπου (Mashal *και συν.*, 1995). Τα θραύσματα που προκύπτουν από την πέψη υποδεικνύουν την παρουσία και τη θέση τυχόν μεταλλάξεων. Μια παραλλαγή της μεθόδου αυτής χρησιμοποιεί χημικούς παραγόντες για τον ίδιο σκοπό (Saleeba *και συν.*, 1992, βλ. επίσης Κεφάλαιο 5). Μια άλλη ενζυμική προσέγγιση για την ανίχνευση των μεταλλάξεων είναι η μέθοδος συνένωσης ολιγονουκλεοτιδίων (Landegren *και συν.*, 1988, Κεφάλαιο 4). Στην τεχνική αυτή, δύο ολιγονουκλεοτίδια υβριδοποιούνται σε συμπληρωματικά τμήματα DNA, σε σημεία πιθανών μεταλλάξεων. Οι ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινητές σχεδιάζονται έτσι ώστε το 3' άκρο του πρώτου εκκινητή να βρίσκεται αριθμός δίπλα στο 5' άκρο του δεύτερου εκκινητή. Συνεπώς, εάν ο πρώτος εκκινητής είναι πλήρως συμπληρωματικός με το DNA-στόχο, τότε οι εκκινητές μπορούν να συνενώσουν από την DNA λιγάση. Εάν αντίθετα υπάρχει αισμόφωνία στο 3' άκρο του πρώτου εκκινητή, τότε δεν λαμβάνονται προϊόντα συνένωσης.
- Ηλεκτροφορητικές τεχνικές.** Η κατηγορία αυτή χαρακτηρίζεται από μια πληθώρα διαφορετικών προσεγγίσεων, που αποσκοπούν στην ανίχνευση γνωστών ή άγνωστων μεταλλάξεων με βάση τις διαφορές στην ηλεκτροφορητική κινητικότητα των μεταλλαγμένων αλληλομόρφων, υπό (ή κάτω από) αποδιατακτικές ή μη αποδιατακτικές συνθήκες. Οι αναλύσεις πολυμορφισμών διαμόρφωσης μονού κλώνου (Single Strand Conformation Polymorphism, SSCP) και ετεροδιμερούς (Heteroduplex, HDA) (Orita *και συν.*, 1989, βλ. Κεφ. 6) ήταν μερικές από τις πρώτες μεθόδους που αναπτύχθηκαν για την ανίχνευση μοριακών βλαβών σε γονιδιακούς τόπους. Σε συνδυασμό με την ηλεκτροφορόση σε τριχοειδή (βλ. Κεφάλαιο 7), οι αναλύσεις SSCP και HDA παρέχουν σήμερα ένα εξαιρετικό, απλό και ταχύ σύστημα ανίχνευσης μεταλλάξεων, με χαμηλό κόστος λειτουργίας και – ακόμα πιο ενδια-



ΕΙΚΟΝΑ 1.2 Η αρχή της μεθόδου PCR. Οι λεπτές και οι χονδρές μαύρες γραμμές αντιστοιχούν στην αλληλουχία-στόχο και στο γονιδιωματικό DNA αντίστοιχα, τα γκρίζα κουτιά αντιστοιχούν στους ολιγονουκλεοτιδικούς εκκινητές και τα προϊόντα PCR με το σωστό μέγεθος βρίσκονται μέσα στις λευκές ελλείψεις. Τα διακεκομμένα βέλη δείχνουν την επιμήκυνση του πρωτότυπου κλώνου.

φέρον – με δυνατότητα εύκολης αυτοματοποίησης, ώστε να είναι δυνατή η ανάλυση μεγάλου αριθμού δειγμάτων DNA ασθενών μέσα σε μικρό χρόνο. Παρομοίως, η ηλεκτροφρόνηση σε πήκτωμα με βαθμίδωση παράγοντα αποδιάταξης ή βαθμίδωση θερμοκρασίας (Denaturing and Temperature Gradient Gel Electrophoresis, DGGE και TGGE αντίστοιχα) μπορούν να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση μεταλλάξεων, με εξίσου μεγάλη επιτυχία (βλ. Κεφάλαιο 8). Στην περίπτωση αυτή, οι διαφορές στην ηλεκτροφρόνητη κινητικότητα ανάμεσα στο αλληλόμορφο άγριου τύπου και στο μεταλλαγμένο αλληλόμορφο μπορούν να «παρατηρηθούν» σε ένα πήκτωμα με βαθμίδωση αποδιατακτικών παραγόντων, όπως η ουρία και το φορμαμίδιο, ή σε ένα πήκτωμα με αυξανόμενη θερμοκρασία. Τέλος, μια τεχνική ανίχνευσης μεταλλάξεων που χρησιμοποιείται σε ολοένα μεγαλύτερο βαθμό είναι η διαδιάστατη σάρωση γονιδίων (βλ. Κεφάλαιο 9), η οποία βασίζεται στον ηλεκτροφρόνητικό διαχωρισμό θραυσμάτων DNA σε δύο διαστάσεις, ανάλογα με το μέγεθος και τη νουκλεοτιδική αλληλουχία τους. Η τεχνική αυτή περιλαμβάνει και τη χρήση της DGGE, μετά το βήμα διαχωρισμού τους κατά μέγεθος.

3. Τεχνικές στερεής φάσης. Αυτή η ομάδα τεχνικών αποτελεί τη βάση για τις περισσότερες από τις σημερινές τεχνολογίες ανίχνευσης μεταλλάξεων, αφού έχουν το πλεονέκτημα ότι αυτοματοποιούνται εύκολα και, συνεπώς, συνιστώνται για την ταχεία ανίχνευση μεταλλάξεων ή τη διαλογή μεγάλου αριθμού δειγμάτων. Μια ταχεία, ακριβής και εύχρηστη μέθοδος ανίχνευσης γνωστών μεταλλάξεων είναι η αντίστροφη αποτύπωση κηλίδας (reverse dot-blot), τεχνική που αναπτύχθηκε αρχικά από τους Saiki και συνεργάτες (1989) και εφαρμόστηκε στην ανίχνευση των μεταλλάξεων της β-μεσογειακής αναιμίας. Η βάση της μεθόδου αυτής είναι η χρήση ολιγονουκλεοτίδων καθηλωμένων σε μια μεμβράνη, ως στόχων υβριδοποίησης για ενισχυμένα τμήματα DNA. Κάποια από τα πλεονεκτήματα της τεχνικής αυτής είναι ότι μία λωρίδα μεμβράνης μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να ανιχνευθούν πολλές διαφορετικές γνωστές μεταλλάξεις σε ένα μόνο άτομο (μέθοδος του τύπου «μία ταινία-ένας ασθενής»), ότι μπορεί να αυτοματοποιηθεί και ότι τα αποτελέσματά της ερμηνεύονται εύκολα με χρήση ενός τυπικού συστήματος αβιδίνης-βιοτίνης. Η τεχνική αυτή δύναται μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση άγνωστων μεταλλάξεων. Η συνεχής ανάπτυξη των τεχνικών αυτών οδήγησε την ειδική υβριδοποίηση αλληλομόρφων ενισχυμένου DNA (PCR-ASO, Κεφάλαιο 2) πάνω σε φιλτρα, και πρόσφατα επεκτάθηκε στις μικροσυστοιχίες ολιγονουκλεοτίδων DNA (βλ. Κεφάλαιο 15) για ταχεία ανάλυση μεταλλάξεων σε μεγάλο αριθμό δειγμάτων (Gemigpani και συν., 2002, Chan και συν., 2004). Συγκεκριμένα, ολιγονουκλεοτίδια γνωστής αλληλουχίας ακινητοποιούνται πάνω σε κατάλληλες επιφάνειες και ανιχνεύεται η υβριδοποίηση των στόχων στη μικροσυστοιχία, κυρίως με χρήση φθορισμογόνων χρωστικών

Η επιλογή της μεθόδου ανίχνευσης μεταλλάξεων εξαρτάται από διάφορες μεταβλητές, μεταξύ των οποίων είναι το φάσμα μεταλλάξεων μιας δεδομένης κληρονομικής διαταραχής, η υπάρχουσα υποδομή και ο αριθμός των αναλύσεων που πραγματοποιούνται στο διαγνωστικό εργαστήριο, ενώ πρόσφατα προστέθηκαν και θέματα πνευματικών δικαιωμάτων (δείτε επίσης την Ενότητα 1.5.1 και το Κεφάλαιο 30). Τα περισσότερα εργαστήρια κλινικής διάγνωσης δεν έχουν επενδύσει σε υποδομή υψηλής τεχνολογίας και υψηλού κόστους, καθώς ο όγκος των αναλύσεων που αναμένεται να πραγματοποιηθούν, δεν είναι αρκετός ώστε να δικαιολογήσει τη δαπάνη τέτοιου κεφαλαίου. Κατά συνέπεια, οι απλές αναλύσεις διαλογής, όπως οι SSCP και HDA, ήταν και παραμένουν οι μέθοδοι εκλογής για πολλά κλινικά εργαστήρια, καθώς επιτρέπουν την ταχεία και τευτόχρονη ανίχνευση διάφορων νουκλεοτιδικών παραλλαγών, με ποσοστό ανίχνευσης που πλησιάζει το 100%. Παρά το γεγονός ότι η PCR διευκόλυνε σημαντικά τη διεύρυνση της μοριακής διαγνωστικής, έχει ωστόσο αρκετούς περιορισμούς. Πρώτον, η ενίσχυση περιοχών πλούσιων σε επαναλήψεις GC δυσκολεύει την Taq πολυμεράση, γεγονός που μερικές φορές οδηγεί στην κλασική εναλλακτική λύση της ανάλυσης αποτύπωσης κατά Southern. Επίσης, η Taq πολυμεράση πραγματοποιεί σφάλματα με συχνότητα 10^{-4} έως 10^{-5} ανά νουκλεοτίδιο, συχνότητα η οποία επηρεάζεται έντονα από τις συνθήκες της αντίδρασης πολλαπλασιασμού, όπως η συγκέντρωση μαγνησίου ή δεσοξυμιβονουκλεοτιδίων, το pH, η θερμοκρασία κ.ά. Τα σφάλματα της πολυμεράσης συνεισφέρουν στην αύξηση του μη ειδικού «θορύβου», ανάλογα με τη μέθοδο ανίχνευσης, με συνέπεια την ελάττωση του επιπέδου ανίχνευσης. Προκειμένου να αντιμετωπιστούν αυτά τα τεχνικά προβλήματα, τα θετικά αποτελέσματα πρέπει να επιβεβαιώνονται με εναλλακτικές μεθόδους ή με χρήση θερμοσταθερών πολυμερών υψηλής πιεστότητας.

Τέλος, πρέπει να τονιστεί το γεγονός ότι, παρά την πληθώρα των μεθόδων ανίχνευσης μεταλλάξεων, ο προσδιορισμός της αλληλουχίας του DNA παραμένει η πρότυπη μέθοδος και η πιο αξιόπιστη περιαματική διαδικασία για την ανίχνευση μεταλλάξεων. Ωστόσο, το κόστος της αρχικής επένδυσης και οι δυσκολίες τυποποίησης και εργαστήριας των διφορούμενων αποτελεσμάτων περιορίζει τη χρήση της μόνο στα εργαστήρια βασικής έρευνας.

1.4 Η ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΜΕΤΑΤΗΝ ΑΠΟΚΡΥΠΤΟΓΡΑΦΗΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΟΣ

Το Φεβρουάριο του 2001, μετά τη δημοσίευση της πρώτης, πρόσχειρης αλληλουχίας του ανθρώπινου γονιδιώματος (International Human Genome Sequencing Consortium, 2001, Venter και συν., 2001) και αργότερα της γονιδιώματικής αλληλουχίας άλλων οργανισμών, η μοριακή βιολογία εισήλθε σε μια νέα εποχή που χαρακτηρίζεται από πρωτοφανείς δυνατότητες και προκλήσεις. Αυτές οι σημαντικές εξελίξεις πιέζουν διάφορους επιστημονικούς τομείς να εντεί-

νουν τις προσπάθειές τους ώστε να βελτιώσουν, κατά πολλές τάξεις μεγέθους, τις υπάρχουσες μεθόδους ανίχνευσης μεταλλάξεων, προκειμένου να συγκεντρωθούν σύνολα δεδομένων για τις γονιδιακές παραλλαγές και να αναλυθούν οι παραλλαγές αυτές με ειδικό λογισμικό, να τυποποιηθούν και να εμπορευματοποιηθούν οι γενετικές δοκιμασίες για τη διάγνωση ρουτίνας, καθώς και να βελτιωθεί η υπάρχουσα τεχνολογία προκειμένου να σχεδιαστούν εξελιγμένα αυτοματοποιημένα συστήματα για γενετική ανάλυση σε μεγάλο όγκο δειγμάτων.

Μετά τη δημοσίευση της πρόχειρης αλληλουχίας του ανθρώπινου γονιδιώματος, η επόμενη μεγάλη πρόκληση ήταν η βελτίωση της υπάρχουσας τεχνολογίας ανίχνευσης μεταλλάξεων προκειμένου να επιτευχθεί ισχυρή, οικονομική, ταχεία και αποδοτική ανάλυση των γονιδιακών παραλλαγών. Τα τελευταία χρόνια, η τεχνολογία αναπτύσσεται γοηγόρα και προσφέρει νέες τεχνικές ανίχνευσης μεταλλάξεων, ενώ οι παλιές μέθοδοι εξελίχθηκαν και προσαρμόστηκαν στην αυξανόμενη έκτηση για αυτοματοποιημένες αναλύσεις διαλογής μεγάλου όγκου δειγμάτων. Η χρωματογραφική ανίχνευση πολυμορφικών αλλαγών στις νοσογόνους μεταλλάξεις, με χρήση αποδιατακτικής υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (Denaturing High Performance Liquid Chromatography, DHPLC – για μια ανασκόπηση, βλ. Xiao και Oefner, 2001) είναι μία από τις νέες τεχνολογίες που αναδύθηκαν. Η DHPLC αποκαλύπτει την παρουσία γενετικών παραλλαγών μέσω της διαφορετικής κατακράτησης του ομοδιμερούς και του ετεροδιμερούς DNA σε χρωματογραφία αντίστροφης φάσης, υπό μερική αποδιάταξη.

Οι αντικαταστάσεις μονής βάσης, τα ελλείμματα και οι ενθέσεις μπορούν να ανιχνευτούν με επιτυχία μέσω υπεριώδους ακτινοβολίας ή φθορισμού, μέσα σε δύο ή τρία λεπτά, σε μη κεκαθαριμένα προϊόντα PCR μεγέθους έως και 1,5 χιλιάδων βάσεων. Αυτά τα χαρακτηριστικά της DHPLC, σε συνδυασμό με το χαμηλό της κόστος, την καθιστούν ένα από τα ισχυρότερα εργαλεία για την ανάλυση μεταλλάξεων. Επίσης, ο προσδιορισμός αλληλουχίας με χρήση πυροφασφορικού (pyrosequencing), μια τεχνολογία που δε βασίζεται στη χρήση πηκτώματος, αποτελεί μια πολύ αξιόπιστη μέθοδο και καλή εναλλακτική λύση στην DHPLC (βλ. Κεφάλαιο 11). Η μέθοδος αυτή ανιχνεύει την *de novo* ενσωμάτωση νουκλεοτιδίων, με βάση την ειδική μήτρα. Η αντίδραση ενσωμάτωσης προκαλεί απελευθέρωση μιας πυροφασφορικής ομάδας που μετατρέπεται σε ATP, και ακολούθει η διέγερση του ενζύμου λουσιφερόση. Το φως που παράγεται ανιγνεύεται από μια κάμερα CCD (Charge Couple Device camera) και μεταφράζεται σε ένα «πυρόγραμμα», από το οποίο συμπεραίνεται η νουκλεοτιδική αλληλουχία (Rognaghi και συν., 1996).

Η PCR θεωρείται η πρότυπη μέθοδος για την ανίχνευση νουκλεϊκών οξέων στη μοριακή διαγνωστική και αποτελεί πλέον απαραίτητο εργαλείο στα ερευνητικά εργαστήρια. Η PCR σε πραγματικό χρόνο (Real-time PCR, Holland και συν., 1991) διεύρυνε την αποδοχή της PCR, χάρη στη βελτιωμένη ταχύτητα, ευαισθησία και επαναληψιμότητά της (βλ.

Κεφάλαιο 10). Η μέθοδος αυτή επιτρέπει την άμεση ανίχνευση του προϊόντος της PCR κατά την εκθετική φάση της αντίδρασης, ώστε η ενίσχυση και η ανίχνευση να πραγματοποιούνται στο ίδιο βήμα. Η αυξημένη ταχύτητα της PCR πραγματικού χρόνου οφείλεται σε μεγάλο βαθμό στη μείωση του αριθμού των κύκλων, στην κατάργηση των σταδίων ανίχνευσης μετά την PCR και στη χρήση φθορισμογόνων σημάνσεων και ευαισθητών μεθόδων ανίχνευσης των εκπομπών τους. Κατά συνέπεια, η PCR πραγματικού χρόνου είναι μια πολύ ακριβής και ευαισθητή μέθοδος με μεγάλη ποικιλία εφαρμογών στη μοριακή διαγνωστική, επιτρέπει την ταχεία επεξεργασία μεγάλου όγκου δειγμάτων, μπορεί να αυτοματοποιηθεί εύκολα και απαιτεί μικρή ποσότητα δειγματού. Για τους λόγους αυτούς, αποτελεί σήμερα τη μέθοδο εκλογής για πολλά σύγχρονα διαγνωστικά εργαστήρια.

Περισσότερο από οπιδήποτε άλλο, ο προσδιορισμός γονοτύπου με χρήση μικροσυστοιχιών DNA επιτρέπει την ταυτόχρονη ανάλυση πολλών πολυμορφισμών και μεταβολών στην αλληλουχία του DNA (βλ. Κεφάλαιο 15). Οι μικροσυστοιχίες βασίζονται σε μικρότερο ή μεγαλύτερο βαθμό στην αρχή της αντίστροφης αποτύπωσης κηλίδας και περιλαμβάνουν εκατοντάδες χιλιάδες ολιγονουκλεοτίδια, τοποθετημένα σε κανονική διάταξη και ακινητοποιημένα σε μια στερεή επιφάνεια. Το δεύγμα DNA υπό ανάλυση ενισχύεται με PCR και, κατόπιν, υβριδοποιείται στη μικροσυστοιχία. Κάθε ολιγονουκλεοτίδιο στη συστοιχία υψηλής πυκνότητας λειτουργεί ως ειδικός ανιχνευτής για ένα αλληλόμορφο και, συνεπώς, οι αλληλουχίες που συμφωνούν απόλυτα υβριδοποιούνται σε μεγαλύτερο ποσοστό απ' ότι τα αντίστοιχα ολιγονουκλεοτίδια στη συστοιχία. Τα σήματα υβριδοποίησης που λαμβάνονται με την τεχνική προέκτασης ειδικών διατεταγμένων εκκινητών (Allele-Specific Arrayed Primer Extension, AS-APEX) (Pastinen και συν., 2000) προσδιορίζονται ποσοτικά με σάρωση φθορισμού υψηλής διακριτικότητας και αναλύνονται ηλεκτρονικά, ώστε να αναγνωριστούν τυχόν μεταβολές στην αλληλουχία του DNA. Έτσι, η χρήση μικροσυστοιχιών υψηλής πυκνότητας επιτρέπει την ταυτόχρονη ανίχνευση ενός μεγάλου αριθμού τροποποιήσεων του DNA, διευκολύνοντας έτσι τις αναλύσεις διαλογής σε ολόκληρο το γονιδίωμα. Έχουν δημιουργηθεί αρκετές συστοιχίες που ανιχνεύουν παραλλαγές στο γονιδίωμα του ιού HIV (Kozal και συν., 1996, Wen και συν., 2000), μεταλλάξεις στα μιτοχόνδρια του ανθρώπου (Erdogan και συν., 2001), τη β-μεσογειακή αναιμία (Chan και συν., 2004), μεταλλάξεις έλλειψης της αφυδρογονάσης της β-φωσφορικής γλυκόζης (G-β-PD) (Gemignani και συν., 2002) και άλλες.

Τα τελευταία χρόνια παρατηρήθηκε σημαντική ανάπτυξη στην πρωτεΐνωματική, η οποία μπορεί να καταστεί απαραίτητο εργαλείο της μοριακής διαγνωστικής. Οι μοριακοί βιολόγοι διαθέτουν σήμερα ένα οπλοστάσιο χρήσιμων τεχνικών πρωτεΐνωματικής, οι οποίες πιθανόν να βελτιωθούν σημαντικά, προς την κατεύθυνση της αύξησης της ευαισθησίας και της ταχύτητας και μείωσης της απαιτούμενης ποσότητας δειγματού (βλ. Κεφάλαιο 18). Η βελτίωση των τεχνικών αυτών θα αποτελέσει σημαντικό βήμα για την κάλυ-