

Ενημερωτικά φυλλάδια

Από το DNA στη θεραπεία

Δραστηριότητα μέσω υπολογιστή για τη γονιδιωματική



Γονιδιωματική

Η γονιδιωματική είναι ο τομέας της βιολογίας που επικεντρώνεται στη μελέτη της δομής, της λειτουργίας και της εξέλιξης των γονιδιωμάτων. Το γονιδίωμα είναι το πλήρες σύνολο του γενετικού υλικού (DNA ή RNA) ενός οργανισμού. Η γονιδιωματική περιλαμβάνει την ανάλυση της αλληλουχίας, της οργάνωσης και της έκφρασης των γονιδίων μέσα στα γονιδιώματα, ώστε να γίνει κατανοητό πώς τα γονίδια επηρεάζουν διάφορα χαρακτηριστικά και διαδικασίες στους ζωντανούς οργανισμούς. Αυτό περιλαμβάνει τη μελέτη των σχέσεων μεταξύ των γονιδίων και τον εντοπισμό παραλλαγών στις αλληλουχίες του DNA που συμβάλλουν στις διαφορές μεταξύ ατόμων, ειδών και πληθυσμών. Η γονιδιωματική διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο σε τομείς όπως η ιατρική, η γεωργία και η εξελικτική βιολογία.



ΕΙΚΟΝΑ 1: Οι επιμέρους συνιστώσες της γονιδιωματικής.

- 1. Λειτουργική γονιδιωματική:** Η μελέτη του τρόπου λειτουργίας και αλληλεπίδρασης των γονιδίων, με έμφαση στη γονιδιακή έκφραση, τη ρύθμιση και το ρόλο τους στη βιολογία.
- 2. Συγκριτική γονιδιωματική:** Συγκρίνει τα γονίδια διαφορετικών ειδών για την κατανόηση των εξελικτικών σχέσεων, την εύρεση ομοιοτήτων και διαφορών και την ανακάλυψη μοναδικών γονιδίων.
- 3. Δομική γονιδιωματική:** Μελετά τη φυσική δομή του γενετικού υλικού, συμπεριλαμβανομένης της διάταξης των γονιδίων, των μη κωδικοποιητικών περιοχών και των παραλλαγών στη δομή του DNA.
- 4. Μοριακή γονιδιωματική:** Εστιάζει στις λεπτομέρειες των γονιδίων και του DNA, μελετώντας τη δομή τους, τη λειτουργία τους και τον τρόπο με τον οποίο ελέγχονται.
- 5. Γονιδιωματική πληθυσμών:** Μελετά τη γενετική ποικιλομορφία εντός και μεταξύ ομάδων οργανισμών για να κατανοήσει τα πρότυπα ποικιλομορφίας, τον τρόπο εξάπλωσης των γονιδίων και τον τρόπο με τον οποίο επηρεάζονται από παράγοντες όπως η φυσική επιλογή.

Γονιδιωματική – συνέχεια

6. **Ιατρική γονιδιωματική:** Στοχεύει στην κατανόηση του τρόπου με τον οποίο η γενετική επηρεάζει τη νόσο, στον εντοπισμό γενετικών παραγόντων κινδύνου και στην ανάπτυξη εξατομικευμένων θεραπειών και διαγνωστικών μεθόδων για την υγειονομική περίθαλψη.
7. **Γονιδιωματική του καρκίνου:** Διερευνά τις γενετικές αλλαγές που οδηγούν στον καρκίνο, τον τρόπο με τον οποίο οι όγκοι αναπτύσσονται και ανταποκρίνονται στη θεραπεία, καθώς και τη χρήση της γονιδιωματικής ανάλυσης για την καθοδήγηση της διάγνωσης και της θεραπείας.
8. **Επιγονιδιωματική:** Μελετά τις αλλαγές στη γονιδιακή δραστηριότητα που προκαλούνται από παράγοντες διαφορετικούς από την αλληλουχία του DNA, όπως οι χημικές τροποποιήσεις του DNA, οι οποίες μπορούν να επηρεάσουν την κληρονομικότητα και τη λειτουργία των γονιδίων.
9. **Μεταγονιδιωματική:** Μελετά γενετικό υλικό από περιβάλλοντα όπως το έδαφος ή το ανθρώπινο σώμα για την κατανόηση της ποικιλομορφίας και των λειτουργιών των μικροβιακών κοινοτήτων.
10. **Εξελικτική γονιδιωματική:** Μελετά τον τρόπο με τον οποίο τα γονίδια και τα γονιδιώματα αλλάζουν με την πάροδο του χρόνου, συμπεριλαμβανομένων των μηχανισμών της εξέλιξης, όπως η μετάλλαξη και η φυσική επιλογή, για την κατανόηση της ιστορίας και της ποικιλομορφίας της ζωής.

Η γονιδιωματική χρησιμοποιεί μια ποικιλία μεθόδων για τη μελέτη της δομής, της λειτουργίας και των αλληλεπιδράσεων των γονιδιωμάτων, μερικές από τις οποίες παρατίθενται παρακάτω.

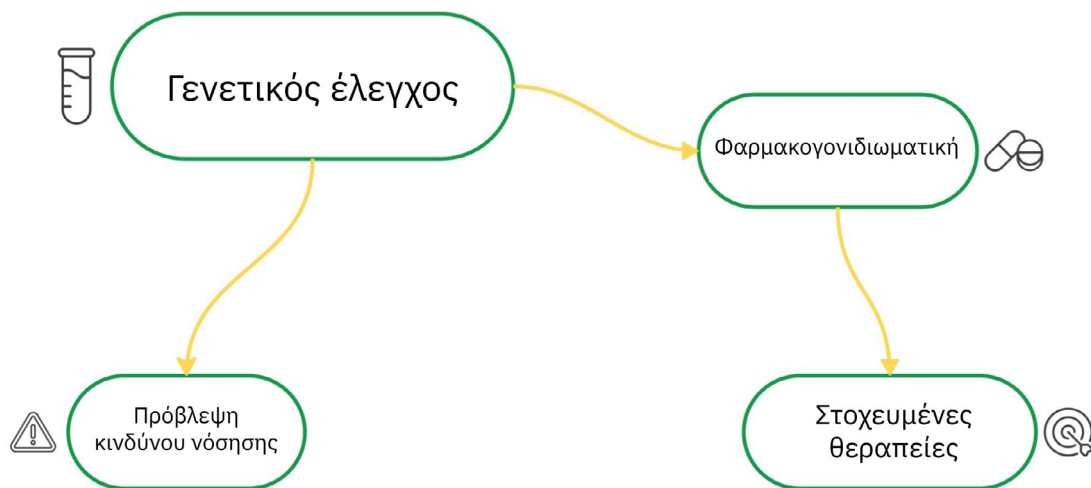
1. **Αλληλούχιση DNA:** Προσδιορίζει την ακριβή σειρά των νουκλεοτιδίων σε ένα μόριο DNA, επιτρέποντας στους ερευνητές να αναλύσουν τη γενετική πληροφορία.
2. **Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR):** Ενισχύει συγκεκριμένες αλληλουχίες DNA, επιτρέποντας την παραγωγή εκατομμυρίων αντιγράφων μιας περιοχής-στόχου για περαιτέρω ανάλυση.
3. **Μικροσυστοιχίες (DNA chips):** Αυτές επιτρέπουν στους επιστήμονες να εξετάζουν χιλιάδες έως εκατομμύρια κομμάτια DNA ταυτόχρονα σε ένα μόνο πείραμα. Χρησιμοποιώντας ειδικούς ανιχνευτές στο DNA, οι ερευνητές μπορούν εύκολα να εντοπίσουν συγκεκριμένες αλληλουχίες που ταιριάζουν με αυτό που ψάχνουν. Αυτό τους βοηθά να κατανοήσουν πώς τα γονίδια συνεργάζονται μεταξύ τους, τι κάνει κάθε άτομο μοναδικό και πώς αναπτύσσονται οι ασθένειες – όλα αυτά με απίστευτη λεπτομέρεια.
4. **Αλληλούχιση RNA (RNA-seq):** Προσδιορίζει την αλληλουχία και την ποσότητα των μορίων RNA σε ένα δείγμα, παρέχοντας πληροφορίες για την έκφραση και τη ρύθμιση των γονιδίων.
5. **CRISPR-Cas9 genome editing:** Επιτρέπει την ακριβή τροποποίηση αλληλουχιών DNA εντός του γονιδιώματος, διευκολύνοντας τις λειτουργικές μελέτες των γονιδίων και του ρόλου τους στις βιολογικές διαδικασίες.
6. **Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα (gel):** Διαχωρίζει θραύσματα DNA ή RNA ανάλογα με το μέγεθος χρησιμοποιώντας ένα ηλεκτρικό πεδίο, επιτρέποντας στους ερευνητές να απεικονίσουν και να αναλύσουν νουκλεϊκά οξέα.
7. **Βιοπληροφορική ανάλυση:** Χρησιμοποιεί υπολογιστικά εργαλεία και αλγόριθμους για την ανάλυση και ερμηνεία γονιδιωματικών δεδομένων.

Εξατομικευμένη ιατρική

Η εξατομικευμένη ιατρική είναι η δημιουργία ενός σχεδίου υγειονομικής περίθαλψης προσαρμοσμένου σε ένα άτομο, λαμβάνοντας υπόψη τις μοναδικές πτυχές των γονιδίων, του περιβάλλοντος και του τρόπου ζωής του.

Η γονιδιωματική διαδραματίζει κεντρικό ρόλο σε αυτή την προσέγγιση, καθώς περιλαμβάνει την εξέταση των γενετικών πληροφοριών για την ανάπτυξη στρατηγικών θεραπειών προσαρμοσμένων στη μοναδική γενετική σύνθεση και τις ειδικές ιατρικές ανάγκες ενός ατόμου. Αλλά η εξατομικευμένη ιατρική δεν σταματά στη γενετική. Λαμβάνει επίσης υπόψη άλλους σημαντικούς παράγοντες, όπως τον τρόπο με τον οποίο ένα άτομο ανταποκρίνεται στη φαρμακευτική αγωγή, τις διατροφικές του προτιμήσεις, το επίπεδο σωματικής του δραστηριότητας, ακόμη και τους μικροοργανισμούς που ζουν στο σώμα του.

Ο απώτερος στόχος της εξατομικευμένης ιατρικής είναι να δημιουργηθεί ένα σχέδιο υγειονομικής περίθαλψης που να ταιριάζει σε ένα άτομο τόσο τέλεια όσο ένα σχολαστικά προσαρμοσμένο ένδυμα. Προσαρμόζοντας τις θεραπείες στο γενετικό προφίλ και τους παράγοντες του τρόπου ζωής κάθε ατόμου, η εξατομικευμένη ιατρική όχι μόνο βελτιώνει την αποτελεσματικότητα της θεραπείας αλλά και ελαχιστοποιεί τον κίνδυνο ανεπιθύμητων ενεργειών. Αντί να εφαρμόζει γενικευμένα πρωτόκολλα θεραπειών, η εξατομικευμένη ιατρική στοχεύει στην παροχή φροντίδας που είναι τόσο μοναδική όσο το κάθε άτομο, σαν μια λύση κατά παραγγελία σχεδιασμένη ειδικά για την υγεία και την ευημερία του.



ΕΙΚΟΝΑ 1: Η συμβολή της γονιδιωματικής στην εξατομικευμένη ιατρική.

Εξατομικευμένη ιατρική – συνέχεια

Γενετικές εξετάσεις

Αποτελούν το θεμέλιο για την εξατομικευμένη ιατρική, παρέχοντας βασικές γενετικές πληροφορίες για την πρόβλεψη κινδύνου και τη φαρμακογονιδιωματική.

Φαρμακογονιδιωματική

Χρησιμοποιεί γενετικές πληροφορίες από τις γενετικές εξετάσεις για να προβλέψει τον τρόπο με τον οποίο ένας ασθενής θα μεταβολίσει και θα ανταποκριθεί σε διάφορα φάρμακα.

Βοηθά στην ελαχιστοποίηση των προσεγγίσεων δοκιμής και λάθους στην επιλογή φαρμάκων, μειώνοντας τον κίνδυνο ανεπιθύμητων φαρμακευτικών αντιδράσεων και βελτιώνοντας την ασφάλεια και την αποτελεσματικότητα των ασθενών.

Πρόβλεψη κινδύνου νόσησης

Χρησιμοποιούνται γενετικές πληροφορίες για να αξιολογήσει την ευαισθησία ενός ατόμου σε ορισμένες ασθένειες.

Στοχευμένες θεραπείες

Ανάπτυξη θεραπειών που στοχεύουν σε συγκεκριμένα γενετικά χαρακτηριστικά, ώστε οι πάροχοι υγειονομικής περίθαλψης να μπορούν να εξατομικεύουν την επιλογή και τη δοσολογία των φαρμάκων για τη βελτιστοποίηση των θεραπευτικών αποτελεσμάτων.

Προσαρμοσμένες θεραπείες

Ας ρίξουμε μια ματιά στη διαδικασία ανάπτυξης εξατομικευμένων φαρμάκων.



ΕΙΚΟΝΑ 2: Στάδια της διαδικασίας ανάπτυξης εξατομικευμένων ιατρικών θεραπειών.

- 1. Γονιδιωματικές πληροφορίες:** Οι γενετικές εξετάσεις χρησιμοποιούνται για την ανεύρεση συγκεκριμένων γενετικών διαφορών που επηρεάζουν τον τρόπο με τον οποίο ένα άτομο ανταποκρίνεται στα φάρμακα.
- 2. Προσδιορισμός στόχου:** Οι ερευνητές εντοπίζουν μόρια, όπως πρωτεΐνες ή ένζυμα, που σχετίζονται με την υπό θεραπεία ασθένεια, τα οποία μπορεί είτε να προκαλούν άμεσα την ασθένεια είτε να συμβάλλουν σε αυτήν μέσω της μη ορθής λειτουργίας.
- 3. Σχεδιασμός και ανάπτυξη φαρμάκων:** Οι επιστήμονες χρησιμοποιούν μοντελοποίηση σε υπολογιστή και χημικές τεχνικές για να σχεδιάσουν φάρμακα που αλληλεπιδρούν με αυτά τα μόρια για τη θεραπεία της νόσου.

Εξατομικευμένη ιατρική – συνέχεια

4. **Κλινικές μελέτες:** Αυτές οι μελέτες μπορεί να περιλαμβάνουν υποομάδες ασθενών με συγκεκριμένα γενετικά ή μοριακά χαρακτηριστικά για να αξιολογηθεί η απόδοση του φαρμάκου σε διαφορετικούς πληθυσμούς. Η διάρκεια των κλινικών μελετών μπορεί να ποικίλλει ανάλογα με παράγοντες όπως η πολυπλοκότητα της νόσου που μελετάται, η διαθεσιμότητα των συμμετεχόντων, οι απαιτήσεις του ρυθμιστικού πλαισίου και οι ειδικοί στόχοι της μελέτης. Για παράδειγμα, οι μελέτες Φάσης 1 συνήθως διαρκούν μερικούς μήνες έως ένα έτος και επικεντρώνονται στην ασφάλεια, ενώ οι μελέτες Φάσης 3, οι οποίες συγκρίνουν τις νέες θεραπείες με τα υφιστάμενα πρότυπα, μπορεί να διαρκέσουν αρκετά χρόνια.
5. **Ανάπτυξη βιοδεικτών:** Οι βιοδείκτες είναι μετρήσιμοι δείκτες που μπορούν να βοηθήσουν στην πρόβλεψη της ανταπόκρισης ενός ασθενούς σε μια συγκεκριμένη θεραπεία. Παίζουν καθοριστικό ρόλο στον εντοπισμό των ασθενών που είναι πιθανότερο να ωφεληθούν από ένα συγκεκριμένο φάρμακο και στην παρακολούθηση της ανταπόκρισής τους στη θεραπεία με την πάροδο του χρόνου. Στην κυστική ίνωση, για παράδειγμα, η ανάπτυξη βιοδεικτών επικεντρώνεται στον εντοπισμό δεικτών φλεγμονής των πνευμόνων και εξέλιξης της νόσου. Οι ερευνητές αναλύουν δείγματα πτυέλων για να μετρήσουν τα επίπεδα συγκεκριμένων φλεγμονωδών δεικτών που σχετίζονται με τη σοβαρότητα της κυστικής ίνωσης. Με την παρακολούθηση αυτών των βιοδεικτών με την πάροδο του χρόνου, οι κλινικοί γιατροί μπορούν να αξιολογούν τη δραστηριότητα της νόσου και να προσαρμόζουν τα θεραπευτικά σχήματα για τη βελτίωση των αποτελεσμάτων για τα άτομα με κυστική ίνωση.
6. **Συνταγογράφηση ακριβείας:** Οι γιατροί χρησιμοποιούν γενετικές και μοριακές πληροφορίες για να επιλέξουν το καλύτερο φάρμακο και τη βέλτιστη δόση για την αποφυγή παρενεργειών.
7. **Παρακολούθηση και προσαρμογή:** Τα σχέδια θεραπείας μεταβάλλονται με βάση τον τρόπο ανταπόκρισης των ασθενών και τυχόν αλλαγές στο γενετικό τους προφίλ.

Βιβλιογραφικές αναφορές:

- Goetz LH, Schork NJ. Personalized medicine: motivation, challenges, and progress. *Fertil Steril*. 2018 Jun;109(6):952-963. doi: 10.1016/j.fertnstert.2018.05.006. PMID: 29935653; PMCID: PMC6366451. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6366451/>
- Superchi C, Brion Bouvier F, Gerardi C, Carmona M, San Miguel L, Sánchez-Gómez LM, Imaz-Iglesia I, Garcia P, Demotes J, Banzi R, Porcher R; PERMIT Group. Study designs for clinical trials applied to personalised medicine: a scoping review. *BMJ Open*. 2022 May 6;12(5):e052926. doi: 10.1136/bmjopen-2021-052926. PMID: 35523482; PMCID: PMC9083424. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9083424/>

Αλληλούχιση γονιδιώματος

Η αλληλούχιση του γονιδιώματος είναι η διαδικασία προσδιορισμού της πλήρους αλληλουχίας του DNA (γονιδίωμα) ενός οργανισμού.

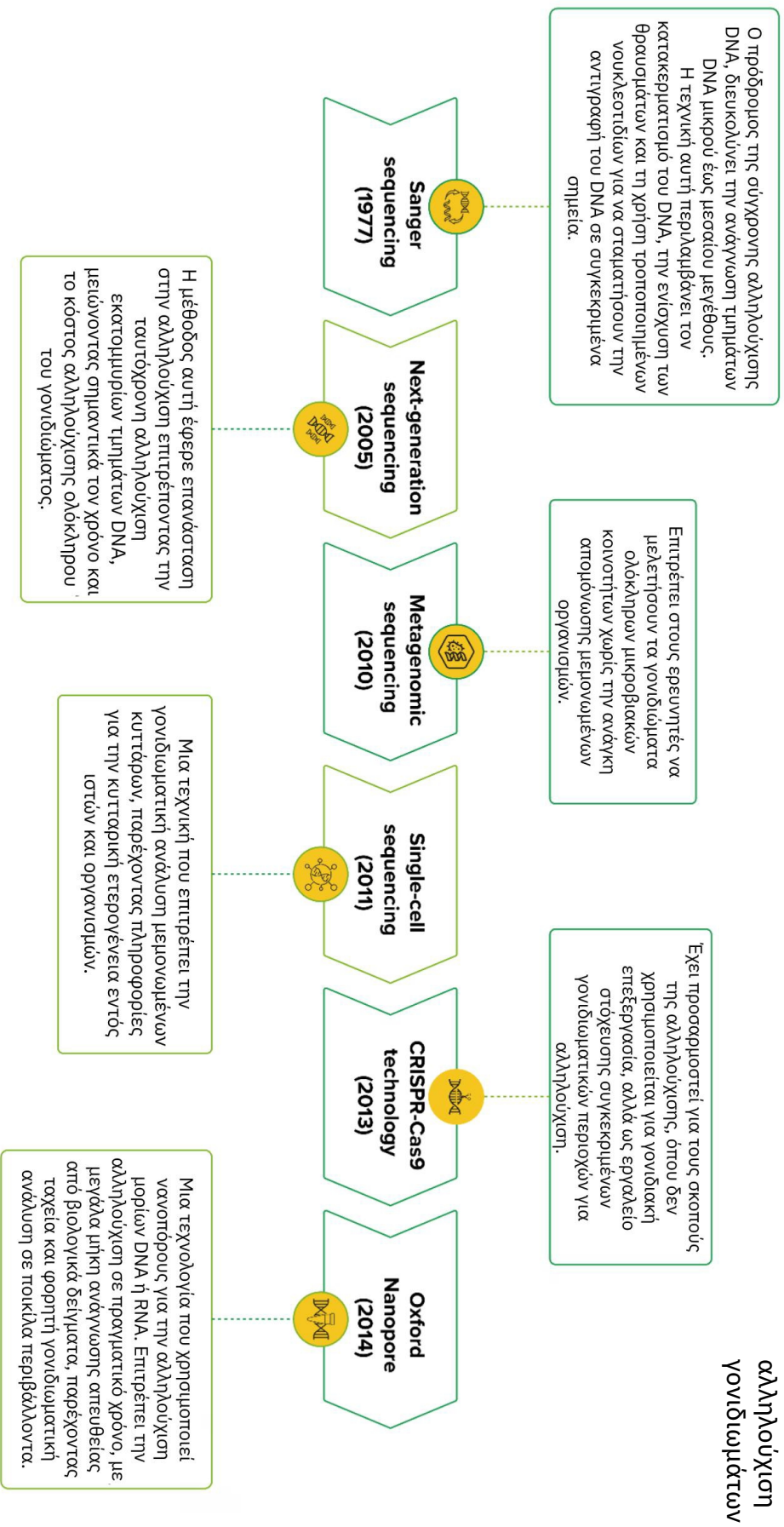
Ακολουθεί ένα γενικό περίγραμμα της διαδικασίας αλληλούχισης του γονιδιώματος:



ΕΙΚΟΝΑ 1: Στάδια της διαδικασίας αλληλούχισης του γονιδιώματος.

- 1. Συλλογή δείγματος:** Η διαδικασία αρχίζει με τη λήψη δείγματος από τον οργανισμό του οποίου το DNA πρόκειται να αλληλουχηθεί. Το δείγμα αυτό μπορεί να ληφθεί από αίμα, σάλιο, ιστό ή οποιαδήποτε άλλη πηγή που περιέχει DNA.
- 2. Εκχύλιση DNA:** Το DNA εξάγεται στη συνέχεια από το δείγμα χρησιμοποιώντας διάφορες βιοχημικές μεθόδους. Στο στάδιο αυτό διαχωρίζεται το DNA από άλλα κυτταρικά συστατικά.
- 3. Προετοιμασία βιβλιοθήκης:** Ακολουθεί η προετοιμασία του εξαχθέντος DNA σε βιβλιοθήκη αλληλούχισης. Αυτό περιλαμβάνει τον κατακερματισμό του DNA σε μικρότερα κομμάτια και την προσάρτηση ειδικών μικρών μορίων DNA που διευκολύνουν την προσκόλληση των τμημάτων DNA στην πλατφόρμα αλληλούχισης. Τα μικρά αυτά μόρια λειτουργούν ως εκκινητές για την ενίσχυση του DNA κατά την αλληλούχιση.
- 4. Αλληλούχιση:** Η παρασκευασμένη βιβλιοθήκη DNA υποβάλλεται στη συνέχεια σε τεχνολογία αλληλούχισης. Υπάρχουν διάφορες διαθέσιμες πλατφόρμες αλληλούχισης, όπως η Illumina, η PacBio και η Oxford Nanopore, η καθεμία με τα δικά της πλεονεκτήματα και περιορισμούς. Κατά την αλληλούχιση, οι βάσεις (A, T, C και G) των μορίων DNA διαβάζονται και καταγράφονται.
- 5. Ανάλυση δεδομένων:** Αφού ολοκληρωθεί η αλληλούχιση, τα δεδομένα που προκύπτουν, συνήθως με τη μορφή μη επεξεργασμένων αλληλουχιών, υποβάλλονται σε βιοπληροφορική ανάλυση. Αυτό περιλαμβάνει την ευθυγράμμιση των αναγνώσεων με ένα γονιδίωμα αναφοράς (εάν είναι διαθέσιμο) ή τη συναρμολόγησή τους de novo σε συνεχόμενες αλληλουχίες (contigs) για την ανακατασκευή της αρχικής αλληλουχίας του γονιδιώματος. Αυτές οι συνεχείς αλληλουχίες DNA αποτελούνται από αλληλεπικαλυπτόμενες αναγνώσεις και χρησιμεύουν ως δομικά στοιχεία για την ανακατασκευή του γονιδιώματος. Αυτό το βήμα περιλαμβάνει τη συναρμολόγηση επικαλυπτόμενων αναγνώσεων για να σχηματίσουν μια πληρέστερη γονιδιωματική εικόνα.
- 6. Ερμηνεία:** Τέλος, η συναρμολογημένη γονιδιωματική αλληλουχία ερμηνεύεται για τον εντοπισμό γονιδίων, ρυθμιστικών στοιχείων, παραλλαγών και άλλων χαρακτηριστικών ενδιαφέροντος. Αυτό το βήμα περιλαμβάνει συχνά τη σύγκριση του αλληλουξημένου γονιδιώματος με γονιδιώματα αναφοράς ή με υπάρχουσες βάσεις δεδομένων για τον χαρακτηρισμό γονιδίων και τον εντοπισμό παραλλαγών.

Αλληλούχιση γονιδιώματος – συνέχεια



ΕΙΚΟΝΑ 2:
Ορόσημα στην
αλληλούχιση
γονιδιωμάτων

Αλληλούχιση γονιδιώματος – συνέχεια

Παρακάτω παρατίθενται βίντεο για να μάθετε περισσότερα σχετικά με επιλεγμένες μεθόδους αλληλούχισης γονιδιώματος.

Επεξήγηση της αλληλούχισης Sanger

Βίντεο: [Sanger DNA Sequencing, From Then to Now.](#)

Επεξήγηση της αλληλούχισης «Επόμενης Γενιάς» (Next-generation)

Βίντεο: [Next Generation Sequencing - A Step-By-Step Guide to DNA Sequencing.](#)

Επεξήγηση της μεταγονιδιωματικής

Βίντεο: [Metagenomics principles and workflow](#)

Επεξήγηση της αλληλούχισης με τη χρήση του Oxford Nanopore

Βίντεο: [Nanopore Sequencing](#)

Βιβλιογραφικές αναφορές:

1. Burian AN, Zhao W, Lo TW, Thurtle-Schmidt DM. Genome sequencing guide: An introductory toolbox to whole-genome analysis methods. *Biochem Mol Biol Educ.* 2021 Sep;49(5):815-825. doi: 10.1002/bmb.21561. Epub 2021 Aug 11. PMID: 34378845; PMCID: PMC9291972. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9291972/>
2. Heather JM, Chain B. The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. *Genomics.* 2016 Jan;107(1):1-8. doi: 10.1016/j.ygeno.2015.11.003. Epub 2015 Nov 10. PMID: 26554401; PMCID: PMC4727787. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4727787/>
3. Durmaz AA, Karaca E, Demkow U, Toruner G, Schoumans J, Cogulu O. Evolution of genetic techniques: past, present, and beyond. *Biomed Res Int.* 2015;2015:461524. doi: 10.1155/2015/461524. Epub 2015 Mar 22. PMID: 25874212; PMCID: PMC4385642. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4385642/>

Κυστική ίνωση

Τι είναι η κυστική ίνωση;

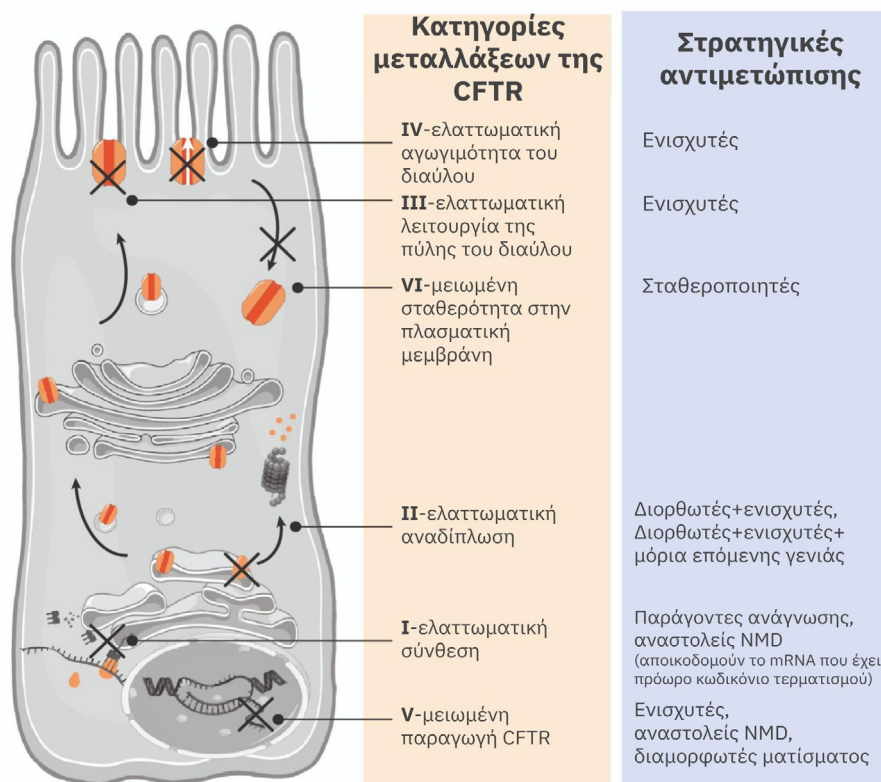
Η κυστική ίνωση (CF) είναι μια γενετική πάθηση που προσβάλλει 1 σε κάθε 2.500-3.500 μωρά που γεννιούνται στην Ευρώπη και τη Βόρεια Αμερική. Η νόσος χαρακτηρίζεται από τη συσσώρευση παχιάς βλέννας, ιδίως στους πνεύμονες και το πεπτικό σύστημα, η οποία μπορεί να προκαλέσει δυσκολίες στην αναπνοή και συχνές αναπνευστικές λοιμώξεις. Τα συμπτώματα αυτά εξελίσσονται σε χρόνια καθώς οι ασθενείς προχωρούν στη ζωή τους, απαιτώντας συνεχή διαχείριση και φροντίδα για την ανακούφισή τους και τη βελτίωση της ποιότητας ζωής.

Τι προκαλεί την κυστική ίνωση;

Η κυστική ίνωση είναι μια αυτοσωμική υπολειπόμενη γενετική διαταραχή που εκδηλώνεται μόνο όταν ένα άτομο κληρονομεί δύο αντίγραφα ενός μεταλλαγμένου γονιδίου, ένα από κάθε γονέα. Οι μεταλλάξεις που ευθύνονται για την κυστική ίνωση εμφανίζονται σε μια συγκεκριμένη θέση στο χρωμόσωμα 7, η οποία κωδικοποιεί το γονίδιο του ρυθμιστή της διαμεμβρανικής αγωγιμότητας της κυστικής ίνωσης (*CFTR*). Το γονίδιο κωδικοποιεί την πρωτεΐνη CFTR, μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη η οποία δρα ως δίαυλος που επιτρέπει στα ιόντα χλωρίου να ρέουν έξω από το κύτταρο. Οι μεταλλάξεις στο γονίδιο *CFTR* μπορεί να προκαλέσουν διαταραχές στη σύνθεση, τη δομή και τη λειτουργία της πρωτεΐνης, οδηγώντας σε μείωση της έκκρισης ιόντων χλωρίου και νερού. Ως αποτέλεσμα, παχιά βλέννα συσσωρεύεται στην επιφάνεια των εκκριτικών κυττάρων, προκαλώντας τα συμπτώματα της νόσου που περιγράφονται παραπάνω.

Ποιες μεταλλάξεις του *CFTR* προκαλούν κυστική ίνωση;

Οι μεταλλάξεις στο γονίδιο *CFTR* ομαδοποιούνται σε έξι κατηγορίες που αντικατοπτρίζουν τις λειτουργικές τους συνέπειες σε πρωτεϊνικό επίπεδο. Για λόγους απλότητας, ο παρακάτω πίνακας επικεντρώνεται μόνο σε τρεις από αυτές.



ΕΙΚΟΝΑ 1:

Ένα κύτταρο με διαφορετικά μεταλλαγμένες πρωτεΐνες CFTR.

Κυστική ίνωση – συνέχεια

ΠΙΝΑΚΑΣ 1: Κατηγορίες μεταλλάξεων *CFTR* και οι κυτταρικές βλάβες στις οποίες οδηγούν.

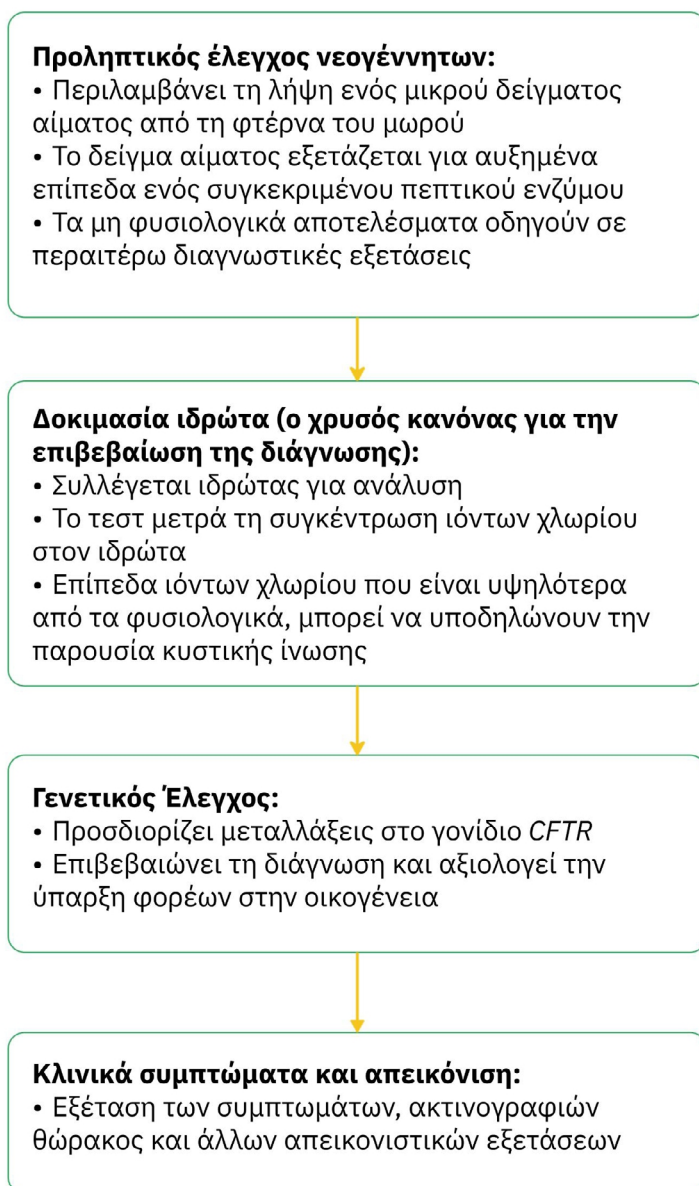
	Κατηγορία I	Κατηγορία II	Κατηγορία III
Παραδείγματα μεταλλάξεων	126995 G>T (G542X) R553X R1162X	192094 C>G (N1303K) F508del I507del	127023 G>A (G551D) G178R G551S
Επίδραση των μεταλλάξεων στο mRNA ή την πρωτεΐνη	Δημιουργεί ένα πρόωρο κωδικόνιο τερματισμού	Προκαλεί αλλαγή ενός αμινοξέος στην πολυπεπτιδική αλυσίδα	Προκαλεί αλλαγή ενός αμινοξέος στην πολυπεπτιδική αλυσίδα
Κυτταρική βλάβη	Μειωμένη μεταφορά ιόντων χλωρίου έξω από το κύτταρο	Μειωμένη μεταφορά ιόντων χλωρίου έξω από το κύτταρο	Μειωμένη μεταφορά ιόντων χλωρίου έξω από το κύτταρο
Αιτία κυτταρικής βλάβης	Πολύ λίγες έως καθόλου πρωτεΐνες <i>CFTR</i> στην κυτταρική μεμβράνη, επειδή το ριβόσωμα διακόπτει τη μετάφραση όταν συναντά ένα πρόωρο κωδικόνιο τερματισμού στο mRNA, εμποδίζοντας τη σύνθεση της πρωτεΐνης. Αυτό το πρόωρο κωδικόνιο τερματισμού προσελκύει επίσης ένα σύστημα επιτήρησης που εξαλείφει το <i>CFTR</i> mRNA.	Η πρωτεΐνη <i>CFTR</i> είναι λανθασμένα αναδιπλωμένη και δεν επιτυγχάνεται σταθερότητα δομής στο ενδοπλασματικό δίκτυο, όπου τα συστήματα επιτήρησης ανιχνεύουν την ελαττωματική πρωτεΐνη και εμποδίζουν τη μεταφορά της στην κυτταρική μεμβράνη. Σε περίπτωση που οι πρωτεΐνες φτάσουν στην κυτταρική μεμβράνη, δημιουργούνται σοβαρές βλάβες στους διαύλους.	Η πρωτεΐνη <i>CFTR</i> είναι παρούσα στην κυτταρική μεμβράνη, αν και έχει λειτουργικά ελαττώματα στο κανάλι της, επειδή μια αλλαγή αμινοξέος εμποδίζει το κανάλι <i>CFTR</i> να ανοίξει σωστά.

Κυστική ίνωση – συνέχεια

Πώς γίνεται η διάγνωση της κυστικής ίνωσης;

ΕΙΚΟΝΑ 2:

Τα βήματα διάγνωσης της κυστικής ίνωσης.



Πώς αντιμετωπίζεται η κυστική ίνωση;

Μέχρι πρόσφατα, οι θεραπείες για την κυστική ίνωση στόχευαν μόνο στα συμπτώματα της νόσου, αλλά πιο πρόσφατα, σημειώθηκε πρόοδος στην αποκατάσταση της λειτουργίας της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης. Έτσι, υπάρχουν σήμερα θεραπείες για την κυστική ίνωση που χορηγούνται ανάλογα με την κατηγορία της μετάλλαξης. Ορισμένα παραδείγματα παρατίθενται παρακάτω.

Κυστική ίνωση – συνέχεια

ΠΙΝΑΚΑΣ 2: Κατηγορίες μεταλλάξεων *CFTR* και πιθανές θεραπευτικές επιλογές.

Κατηγορία μεταλλάξης	Κατηγορία I	Κατηγορία II	Κατηγορία III
Θεραπεία	Οι ενώσεις «ανάγνωσης», όπως το μόριο ELX-02, προωθούν την ανάγνωση του mRNA με μεταλλάξεις χωρίς νόημα (nonsense), παρακάμπτοντας τα πρόωρα κωδικόνια τερματισμού και επιτρέποντας τη σύνθεση λειτουργικών πρωτεϊνών πλήρους μήκους και τη σωστή μεταφορά ιόντων χλωρίου.	Η συνδυαστική χρήση «διορθωτικών» ενώσεων όπως η lumacaftor που βοηθά τις λανθασμένα αναδιπλωμένες πρωτεΐνες να αποκτήσουν τη σωστή τους μορφή και «ενισχυτικών» ενώσεων όπως η ivacaftor, η οποία διατηρεί το κανάλι ανοικτό, βελτιώνει τη ροή των ιόντων χλωρίου έξω από το κύτταρο.	Το ivacaftor είναι φάρμακο γνωστό ως «ενισχυτής» επειδή συνδέεται με την ελαττωματική πρωτεΐνη CFTR στην κυτταρική μεμβράνη και βοηθά να διατηρηθεί το κανάλι ιόντων χλωρίου ανοικτό.

References:

- Jaques R, Shakeel A, Hoyle C. Novel therapeutic approaches for the management of cystic fibrosis. *Multidiscip Respir Med*. 2020 Nov 26;15(1):690. doi: 10.4081/mrm.2020.690. PMID: 33282281; PMCID: PMC7706361.
- Ratjen, F., Bell, S., Rowe, S. et al. Cystic fibrosis. *Nat Rev Dis Primers* 1, 15010 (2015). <https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.10>
- Amaral MD (University of Lisboa, Lisboa, Portugal). Novel personalized therapy for cystic fibrosis: treating the basic defect in all patients (Review). *J Intern Med* 2015; 277: 155–166.
- De Boeck K, Wilschanski M, Castellani C, Taylor C, Cuppens H, Dodge J, Sinaasappel M; Diagnostic Working Group. Cystic fibrosis: terminology and diagnostic algorithms. *Thorax*. 2006 Jul;61(7):627-35. doi: 10.1136/thx.2005.043539. Epub 2005 Dec 29. PMID: 16384879; PMCID: PMC2104676. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2104676/>
- Naehrig S, Chao CM, Naehrlich L. Cystic Fibrosis. *Dtsch Arztebl Int*. 2017 Aug 21;114(33-34):564-574. doi: 10.3238/arztebl.2017.0564. PMID: 28855057; PMCID: PMC5596161. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5596161/>
- Philip M. Farrell, Terry B. White, Clement L. Ren, Sarah E. Hempstead, Frank Accurso, Nico Derichs, Michelle Howenstine, Susanna A. McColley, Michael Rock, Margaret Rosenfeld, Isabelle Sermet-Gaudelus, Kevin W. Southern, Bruce C. Marshall, Patrick R. Sosnay, Diagnosis of Cystic Fibrosis: Consensus Guidelines from the Cystic Fibrosis Foundation, *The Journal of Pediatrics*, Volume 181, Supplement, 2017, Pages S4-S15.e1, ISSN 0022-3476, <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2016.09.064>.
- Eitan Kerem (2020) ELX-02: an investigational read-through agent for the treatment of nonsense mutation-related genetic disease, *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 29:12, 1347-1354, DOI: 10.1080/13543784.2020.1828862
- Condren ME, Bradshaw MD. Ivacaftor: a novel gene-based therapeutic approach for cystic fibrosis. *J Pediatr Pharmacol Ther*. 2013 Jan;18(1):8-13. doi: 10.5863/1551-6776-18.1.8. PMID: 23616732; PMCID: PMC3626070.
- <https://www.orkambi.com/how-orkambi-works>

Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η PCR είναι μια τεχνική που επιτρέπει την εκθετική ενίσχυση πολύ λίγων ή ακόμη και μεμονωμένων μορίων DNA. Για να επιτευχθεί αυτό, τα μόρια DNA υποβάλλονται σε αρκετούς κύκλους αποδιάταξης, υβριδοποίησης των εκκινητών στις μητρικές αλυσίδες και επιμήκυνσης των νέων αλυσίδων του DNA.

Το μείγμα αντιδραστηρίων για μια PCR απαιτεί τα ακόλουθα:

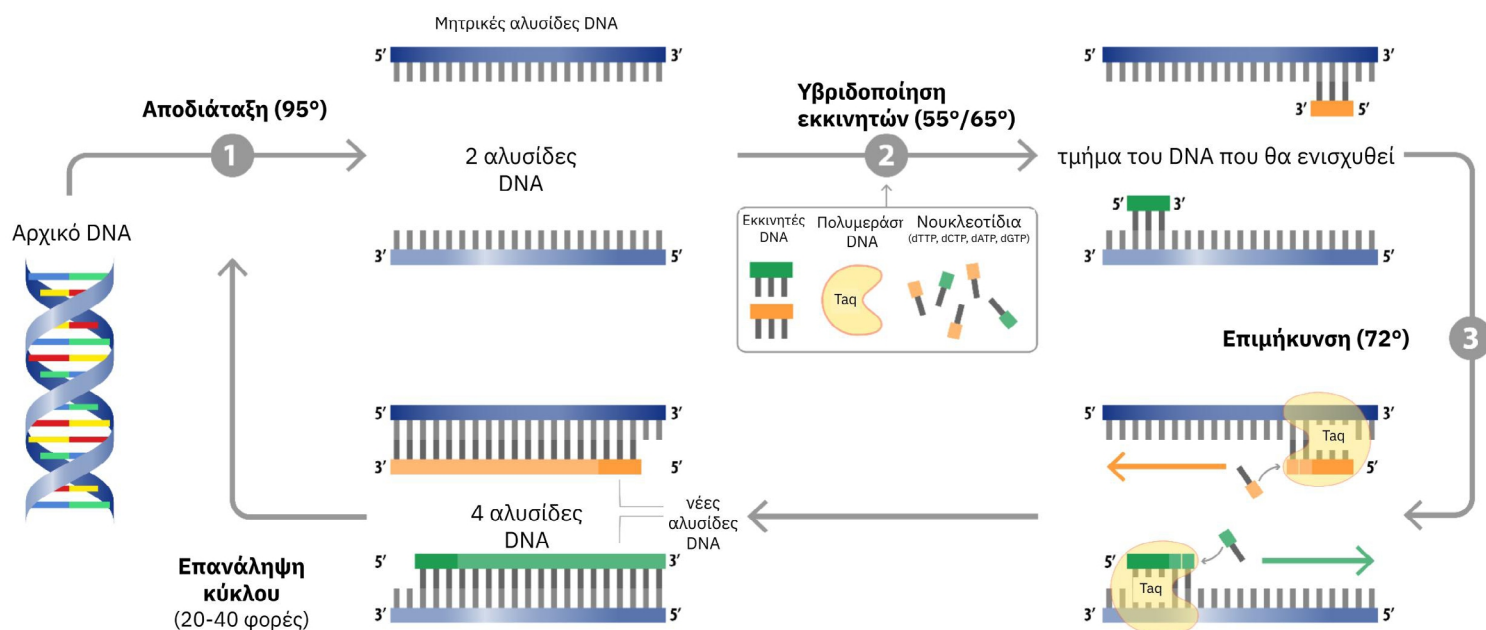
- Το DNA που θα ενισχυθεί (αρχικό DNA)
- Εκκινητές συμπληρωματικοί προς τις μητρικές αλυσίδες του αρχικού DNA
- Ένα ένζυμο που συνθέτει το DNA (DNA πολυμεράση)
- Ελεύθερα νουκλεοτίδια (dNTPs) που θα χρησιμοποιήσει η πολυμεράση DNA για να επιμηκύνει τη νέα αλυσίδα DNA.
- Ένα ρυθμιστικό διάλυμα που παρέχει τις βέλτιστες συνθήκες για την αντίδραση

Κάθε κύκλος ενίσχυσης περιλαμβάνει τρία διαφορετικά στάδια:

1. Κατά το στάδιο της **αποδιάταξης** το αρχικό δίκλωνο DNA διαχωρίζεται σε δύο μονόκλωνες αλυσίδες. Επομένως, η θερμοκρασία κατά τη διάρκεια αυτού του βήματος πρέπει να είναι αρκετά υψηλή ώστε να σπάσουν οι δεσμοί υδρογόνου μεταξύ των συμπληρωματικών αλυσίδων του DNA. Ωστόσο, οι πολυμεράσες που απαιτούνται για την ενίσχυση του DNA είναι ένζυμα και τα περισσότερα ένζυμα είναι πολύ ευαίσθητα στις υψηλές θερμοκρασίες. Ευτυχώς, έχουν απομονωθεί πολυμεράσες DNA από βακτήρια που ζουν σε ακραίες συνθήκες και έχει βρεθεί ότι αντέχουν τις υψηλές θερμοκρασίες που απαιτούνται για την αποδιάταξη. Επομένως, η θερμοκρασία πρέπει να προσαρμόζεται ανάλογα με την πολυμεράση DNA που χρησιμοποιείται (συνήθως 94-98°C).
2. Κατά τη διάρκεια του σταδίου **υβριδοποίησης των εκκινητών**, η θερμοκρασία της αντίδρασης μειώνεται ώστε να επιτραπεί στους ειδικά σχεδιασμένους εκκινητές να συνδεθούν με το μονόκλωνο DNA μέσω συμπληρωματικής σύζευξης βάσεων. Οι εκκινητές που χρησιμοποιούνται για τις συνήθεις εφαρμογές PCR αποτελούνται συνήθως από περίπου 20 νουκλεοτίδια (18-24) και έχουν περιεκτικότητα GC 40-60%. Η θερμοκρασία σε αυτό το στάδιο εξαρτάται από τη θερμοκρασία τήξης (T_m) των εκκινητών. Η T_m των εκκινητών ορίζεται ως η θερμοκρασία στην οποία το 50% των εκκινητών διαχωρίζεται από τις μητρικές αλυσίδες του αρχικού DNA, ενώ το άλλο 50% εξακολουθεί να σχηματίζει δίκλωνα τμήματα με αυτές. Η μείωση της θερμοκρασίας υβριδοποίησης (T_a) θα αυξήσει το ποσοστό των εκκινητών που δεσμεύονται στις ειδικές θέσεις πρόσδεσης, αλλά μπορεί επίσης να αυξήσει τη πρόσδεση σε μη ειδικές θέσεις. Η αύξηση της θερμοκρασίας μειώνει τη συνολική πρόσδεση των εκκινητών αλλά αυξάνει την ειδικότητα. Η T_a επιλέγεται γενικά να είναι 3°C έως 5°C κάτω από την T_m του ζεύγους εκκινητών, αν και εξαρτάται επίσης από τη χρησιμοποιούμενη πολυμεράση. Για τις περισσότερες αντιδράσεις κυμαίνεται μεταξύ 55°C και 65°C. Η (θεωρητικά) βέλτιστη T_a μπορεί να υπολογιστεί χρησιμοποιώντας έναν μαθηματικό τύπο, αλλά ακόμη και μετά τον προσεκτικό υπολογισμό της T_a για την PCR, οι επιστήμονες συχνά πρέπει να προσδιορίσουν τη βέλτιστη T_a εκτελώντας αντιδράσεις PCR με θερμοκρασιακή διαβάθμιση, όπου μπορούν να δοκιμάσουν παράλληλα διαφορετικές θερμοκρασίες υβριδοποίησης.

PCR – συνέχεια

3. Αφού γίνει η υβριδοποίηση των εκκινητών στις αλυσίδες του DNA, η θερμοκρασία αυξάνεται στη βέλτιστη θερμοκρασία λειτουργίας της πολυμεράσης στους 68°C-72°C. Κατά τη διάρκεια αυτού του βήματος **επιμήκυνσης**, η πολυμεράση, ξεκινώντας από τους εκκινητές, συνθέτει τη νέα αλυσίδα DNA προσθέτοντας διαδοχικά ελεύθερα νουκλεοτίδια (dNTPs) όπως αυτό καθορίζεται από την αρχική αλυσίδα DNA που χρησιμοποιείται ως μήτρα (καλούπι).



ΕΙΚΟΝΑ 1: Η μέθοδος PCR.

Το αρχικό DNA αποδιάσσεται (1), επιτρέποντας στους εκκινητές να συνδεθούν με τις συμπληρωματικές τους αλληλουχίες (2) προτού ακολουθήσει η επιμήκυνσή τους από την DNA πολυμεράση και τη σύνθεση των νέων αλυσίδων DNA (3). Με την επανάληψη αυτών των βημάτων, το DNA ενισχύεται περαιτέρω. Σημειώνεται ότι οι θερμοκρασίες που δίνονται σε αυτή την εικόνα είναι οι βέλτιστες για τη χρήση της Taq πολυμεράσης. Άλλες πολυμεράσες ενδέχεται να απαιτούν διαφορετικές θερμοκρασίες.

Η ακολουθία αποδιάταξης, υβριδοποίησης των εκκινητών και επιμήκυνσης επαναλαμβάνεται στη συνέχεια αρκετές φορές και κάθε φορά η ποσότητα του DNA διπλασιάζεται, οδηγώντας σε εκθετική αύξηση της ποσότητας του επιθυμητού προϊόντος PCR. Δυστυχώς, οι πολυμεράσες δεν είναι τέλειες και μπορεί να κάνουν λάθη, όπως η προσθήκη ενός λανθασμένου νουκλεοτιδίου. Κατά συνέπεια, κατά τη διάρκεια κάθε βήματος επιμήκυνσης, υπάρχει η πιθανότητα εισαγωγής μεταλλάξεων στο DNA. Επομένως, η απόφαση για τον αριθμό των επαναλήψεων της ακολουθίας (των κύκλων) βασίζεται στην ισορροπία μεταξύ της παραγωγής αρκετού DNA και της ελαχιστοποίησης του κινδύνου εισαγωγής ανεπιθύμητων μεταλλάξεων, ιδίως όταν το DNA πρόκειται να χρησιμοποιηθεί σε πειράματα κλωνοποίησης. Συνήθως, ο αριθμός των επαναλήψεων κυμαίνεται μεταξύ 20 και 35 κύκλων.

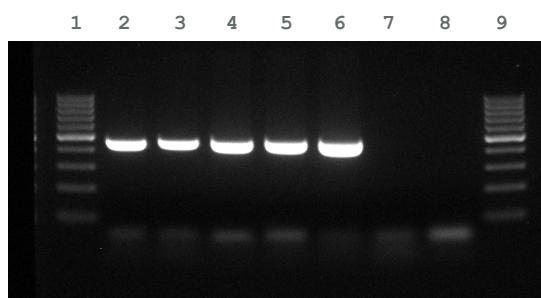
Η έναρξη και ο τερματισμός της ακολουθίας των κύκλων PCR πλαισιώνονται από μια αρχική αποδιάταξη 30 δευτερολέπτων έως 5 λεπτών σε θερμοκρασία αποδιάταξης και μια τελική επιμήκυνση 5-10 λεπτών σε θερμοκρασία επιμήκυνσης (και οι δύο εξαρτώνται από την πολυμεράση).

Οπτικοποίηση τμημάτων DNA με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα (gel)

Για τον έλεγχο του αποτελέσματος μιας PCR χρησιμοποιείται η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα (gel).

Στο τέλος της PCR, το μείγμα της αντίδρασης μπορεί να τοποθετηθεί σε ειδικές υποδοχές σε πήκτωμα αγαρόζης. Τα πηκτώματα αυτά περιέχουν πόρους διαφορετικού μεγέθους μέσα από τους οποίους τα μικρότερα τμήματα DNA μπορούν να κινηθούν ταχύτερα από τα μεγαλύτερα. Δεδομένου ότι τα μόρια DNA είναι αρνητικά φορτισμένα λόγω των φωσφορικών ομάδων στον σκελετό τους, θα κινηθούν προς το θετικά φορτισμένο άκρο όταν βρεθούν σε ηλεκτρικό πεδίο. Έτσι, με τα πηκτώματα, τα τμήματα DNA μπορούν να διαχωριστούν με βάση το μέγεθός τους.

Τα πηκτώματα αναλύονται σε μια τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας με αποτέλεσμα τα θραύσματα DNA να φαίνονται ως φωτεινές ζώνες λόγω μιας φθορίζουσας χρωστικής που προστίθεται στο μείγμα του πηκτώματος και προσδένεται στο DNA. Το πήκτωμα φωτογραφίζεται για μεταγενέστερη αναφορά.



ΕΙΚΟΝΑ1: Εικόνα ενός πηκτώματος αγαρόζης στο οποίο έχουν φορτωθεί και ηλεκτροφορηθεί δείγματα αντιδράσεων PCR.

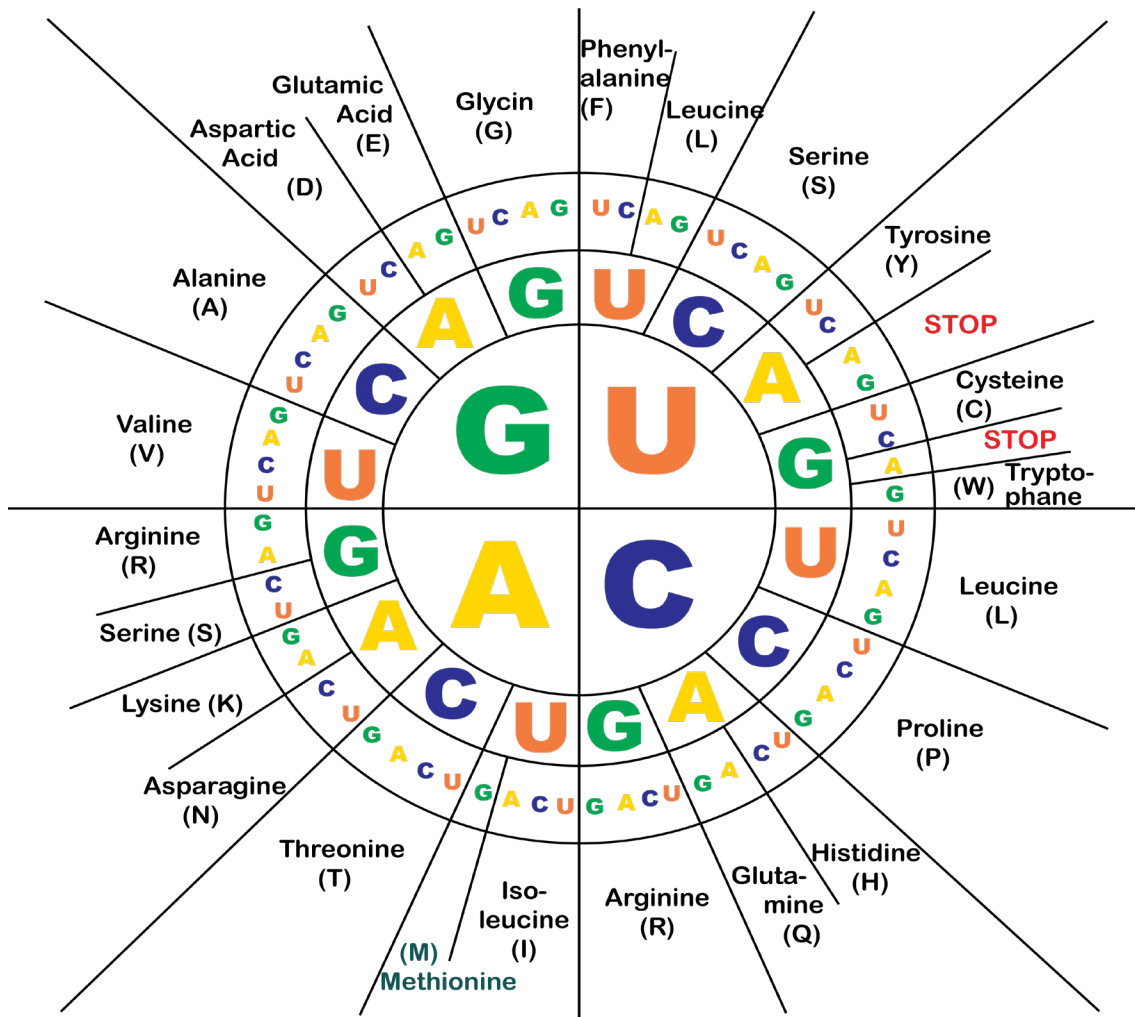
Η εικόνα δείχνει ένα πήκτωμα με 9 λωρίδες. Οι λωρίδες 1 και 9 δείχνουν ζώνες ενός μάρτυρα DNA με ζώνες γνωστού μοριακού βάρους (και συνεπώς μεγέθους) – ο μάρτυρας βοηθά στον προσδιορισμό του μεγέθους των ζωνών που είναι ορατές στις λωρίδες όπου έχουν τοποθετηθεί δείγματα. Στις λωρίδες 7 και 8, έχουν τοποθετηθεί δείγματα από αντιδράσεις PCR στις οποίες δεν προστέθηκε αρχικό DNA (λωρίδα 7) ή το ένζυμο πολυμεράση DNA (λωρίδα 8). Κατά συνέπεια, δεν παρατηρούνται ζώνες DNA σε αυτές τις λωρίδες (αρνητικοί μάρτυρες). Στις λωρίδες 2-6 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που προέκυψαν μετά την εκτέλεση PCR με 5 διαφορετικά δείγματα αρχικού DNA. Τα προϊόντα DNA εμφανίζονται ως ζώνες στο πήκτωμα. Και στα 5 δείγματα, η PCR ήταν επιτυχής. Οι αμυδρές ζώνες στο κάτω μέρος του πηκτώματος προκύπτουν από τους εκκινητές που είχαν προστεθεί σε περίσσεια στην αντίδραση PCR και δεν ήταν απαραίτητοι για την ενίσχυση.

Πόροι:

- **Βίντεο:** "Ένα 8-λεπτο βίντεο που εξηγεί τις αρχές της ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα και πώς τα διαφορετικού μεγέθους θραύσματα DNA θα είναι ορατά σε ένα πήκτωμα, <https://www.youtube.com/watch?v=afdP3eWFj3k>.
- **Βίντεο:** "Ένα 8-λεπτο βίντεο που εξηγεί την ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης, δίνοντας επίσης παραδείγματα για τις χρήσεις του. Εξηγεί επίσης τη χρήση των κλιμάκων DNA ως δείκτες μεγέθους <https://www.youtube.com/watch?v=ZDZUAleWX78>.

Ο τροχός των κωδικονίων (γενετικός κώδικας)

Προκειμένου να μεταφράσουμε το RNA σε μια αλληλουχία αμινοξέων, μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε έναν τροχό κωδικονίων (γενετικός κώδικας). Κάθε βάση μιας τριπλέτας, η οποία διαβάζεται από αριστερά προς τα δεξιά στην αλληλουχία του RNA, μπορεί να διαβαστεί και στον τροχό των κωδικονίων ξεκινώντας από τον εσωτερικό του κύκλο με κατεύθυνση προς τα έξω. Το όνομα του αμινοξέος που κωδικοποιείται από την εκάστοτε τριπλέτα εμφανίζεται στην περιφέρεια του τροχού. Για παράδειγμα, αν η τριπλέτα "AUG" εμφανίζεται στην αλληλουχία RNA, στον τροχό των κωδικονίων εντοπίζουμε πρώτα το "A" στον εσωτερικό κύκλο, στη συνέχεια το "U" στον μεσαίο κύκλο και τέλος το "G" στον εξωτερικό κύκλο του τροχού. Στην περιφέρεια του τροχού βρίσκουμε το αντίστοιχο αμινοξύ, τη "μεθειονίνη", που κωδικοποιείται από το κωδικόνιο AUG.



ΕΙΚΟΝΑ 1: Ο τροχός των κωδικονίων.

Ο τροχός των κωδικονίων επιτρέπει τη μετάφραση τριπλετών βάσεων σε αμινοξέα. Τα πλήρη ονόματα των αμινοξέων και το γράμμα που αντιπροσωπεύει το καθένα από αυτά βρίσκονται στην περιφέρεια του τροχού.