ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΗΛΕΚΤΡΟΛΟΓΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΚΑΙ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΩΝ

ΤΟΜΕΑΣ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ ΜΕΤΑΔΟΣΗΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΑΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΥΛΙΚΩΝ

Εργαλεία βιοπληροφορικής για την ανάλυση των φαρμακογενωμικών δεδομένων.

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΔΙΑΜΑΝΤΟΠΟΥΛΟΥ ΧΡΙΣΤΙΝΑ

Επιβλέπων : Δημήτριος Κουτσούρης

Καθηγητής Ε.Μ.Π

ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΗΛΕΚΤΡΟΛΟΓΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΚΑΙ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΩΝ

ΤΟΜΕΑΣ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ ΜΕΤΑΔΟΣΗΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΑΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΥΛΙΚΩΝ

Εργαλεία βιοπληροφορικής για την ανάλυση των φαρμακογενωμικών δεδομένων.

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΔΙΑΜΑΝΤΟΠΟΥΛΟΥ ΧΡΙΣΤΙΝΑ

Επιβλέπων : Δημήτριος Κουτσούρης

Καθηγητής Ε.Μ.Π

Εγκρίθηκε από τριμελή εξεταστική επιτροπή

……	……	……
Δ. Κουτσούρης	**Δ. Φωτιάδης**	**Γ. Ματσόπουλος**
Καθηγητής	**Καθηγητής**	**Επικ. Καθηγητής**

Αθήνα, Σεπτέμβριος 2014

……

Διαμαντοπούλου Χριστίνα

Διπλωματούχος Ηλεκτρολόγος Μηχανικός και Μηχανικός Υπολογιστών
Ε.Μ.Π.

Copyright © Διαμαντοπούλου Χριστίνα, 2014.

Με επιφύλαξη παντός δικαιώματος. All rights reserved.

Απαγορεύεται η αντιγραφή , αποθήκευση και διανομή της παρούσας εργασίας , εξ' ολοκλήρου ή τμήματος αυτής, για εμπορικό σκοπό. Επιτρέπεται η ανατύπωση, αποθήκευση και διανομή για σκοπό μη κερδοσκοπικό, εκπαιδευτικής ή ερευνητικής φύσης, υπό την προϋπόθεση να αναφέρεται η πηγή προέλευσης και να διατηρείται το παρόν μήνυμα. Ερωτήματα που αφορούν τη χρήση της εργασίας για κερδοσκοπικό σκοπό πρέπει να απευθύνονται προς το συγγραφές.

Οι απόψεις και τα συμπεράσματα που περιέχονται σε αυτό το έγγραφο εκφράζουν τον συγγραφέα και δεν πρέπει να ερμηνευτεί ότι αντιπροσωπεύουν τις επίσημες θέσεις του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου.

Περίληψη

Αντικείμενο της παρούσας διπλωματικής εργασίας αποτελεί η μελέτη των εργαλείων της βιοπληροφορικής τα οποία χρησιμοποιεί η επιστήμη της φαρμακογενωμικής με σκοπό τη δημιουργία πιο αποτελεσματικών φαρμάκων. Γενικότερα, προσεγγίζονται σε θεωρητικό επίπεδο οι γνώσεις της βιολογίας και της ιατρικής η οποίες σε συνδυασμό με την τεχνολογία στοχεύουν στην εξατομικευμένη ιατρική.

Στο κεφάλαιο 1, γίνεται μια γενική εισαγωγή στα βασικά στοιχεία βιολογίας όπως του DNA, των πρωτεϊνών, των ενζύμων και κυρίως οι αλλαγές που παρατηρούνται στις λειτουργίες τους όταν ο ανθρώπινος οργανισμός ασθενεί.

Στο κεφάλαιο 2, προσδιορίζονται έννοιες απαραίτητες για τη συνέχεια όπως αυτή της επιστήμης της φαρμακογενετικής και της φαρμακογενωμικής και με ποιον τρόπο αυτές οι επιστήμες θα οδηγήσουν στη δημιουργία των λεγόμενων «έξυπνων φαρμάκων» και γενικότερα στο μοντέλο της εξατομικευμένης ιατρικής. Παράλληλα, αναλύεται το Human Genome Project που ουσιαστικά αποτελεί την πρώτη σοβαρή προσπάθεια καταγραφής του ανθρώπινου γονιδιώματος.

Στο κεφάλαιο 3, εισάγονται τα εργαλεία λογισμικού που χρησιμοποιούνται στη βιοπληροφορική. Στη συνέχεια, αναπτύσσονται οι κυριότεροι αλγόριθμοι σύγκρισης ακολουθιών και οι βάσεις δεδομένων που αποθηκεύεται η όλο και αυξανόμενη πληροφορία η οποία αποτελεί αποτέλεσμα της βιολογικής έρευνας.

Στο κεφάλαιο 4, προσδιορίζονται οι μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί (SNP's) μέσω της κατανόησης των γονιδίων και των μεταλλάξεων αυτών. Ταυτόχρονα, περιγράφεται η ανάλυση, η καταγραφή και η καταχώρηση των βιολογικών δεδομένων και στη συνέχεια, παραθέτονται τα βήματα που ακολουθούνται με σκοπό το σχεδιασμό φαρμάκων με τη βοήθεια ηλεκτρονικού υπολογιστή.

Στο κεφάλαιο 5, δίνεται το παράδειγμα της νόσου Alzheimer και περιγράφονται αναλυτικά οι μεταλλάξεις των γονιδίων που την προκαλούν καθώς και η σύγχρονη μέθοδος για τη δημιουργία φαρμάκων με σκοπό την καταπολέμηση της νόσου.

Στο κεφάλαιο 6, αναλύονται οι προοπτικές της επιστήμης της φαρμακογενωμικής καθώς και οι στόχοι που προβλέπεται να επιτύχει στο μέλλον. Επίσης, παραθέτονται και οι καινούριες τεχνικές που πρόκειται να απασχολήσουν τον τομέα στο μέλλον.

Λέξεις Κλειδιά

Εργαλεία βιοπληροφορικής, φαρμακογενωμική, μεταλλάξεις γονιδίων, άνοια, σχεδιασμός φαρμάκων, βάσεις δεδομένων

Abstract

The objective of the present dissertation is the study of the implements of bioinformatics which are used by the science of Pharmacogenomics with the aim of developing more effective medicines. Generally, we make a theoretical approach of the knowledge of Biology and Medicine, which in combination with technology, aim an individualized Medicine.

Chapter 1 is a general introduction into the fundamental elements of Biology such as the DNA, proteins, enzymes and mainly the changes observed in their functions when the human organism diseased.

In Chapter 2, we define concepts, which are further necessary, such as the science of pharmacogenomics and pharmacogenetics and in which way these sciences will lead to the development of "smart medicines" and generally the model of individualized Medicine. In tandem, we analyze the Human Genome Project which actually is the first serious attempt to analyze the human genome.

In Chapter 3, we introduce the software tools which are used in bioinformatics. Then, we develop the most important algorithms of comparing sequences, and the databases where the ever-increasing data- which is a result of biological research- is stored.

In Chapter 4, the mononucleotide polymorphisms (SNP's) are defined through the understanding of genomes and their mutations. Simultaneously, the analysis, recording and storing of the biological data and then we analyze the procedure of which is followed so as to develop medicines with the aid of computers (CAD).

In Chapter 5, we give the example of the Alzheimer's disease and we elaborately describe the gene mutations which cause the disease as well as the contemporary method used for the development of medicines which will eradicate it.

In Chapter 6, we analyze the perspectives of the pharmacogenomics science as well as the goals which this science is predicted to achieve. In addition, we

report the new techniques which can be implemented in the field in the future.

Keywords

Implements of bioinformatics, pharmacogenomics, gene mutations, Alzheimer, drug design, databases

Ευχαριστίες

Επιθυμώ να ευχαριστήσω θερμά όλους εκείνους που συνέβαλαν με οποιονδήποτε τρόπο στην αποπεράτωση της εργασίας αυτής, εφόσον χωρίς την υποστήριξή τους η παρούσα εργασία δε θα είχε ολοκληρωθεί.

Θερμότερες ευχαριστίες εκφράζω:

Στα μέλη της τριμελούς επιτροπής , πρώτιστα στον καθηγητή και υπεύθυνο του εργαστηρίου Βιοϊαρικής Τεχνολογίας που μου εμπιστεύτηκε την ανάθεση της εργασίας και είχε την επίβλεψή της. Επίσης, θερμές ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω στο μεταδιδακτορικό συνεργάτη του εργαστηρίου Βιοϊατρικής Τεχνολογίας τον κ. Ιωάννη Μακρή ο οποίος, καθ’ όλη τη διάρκεια της συγγραφής, μου προσέφερε συνεχή βοήθεια και καθοδήγηση.

Τέλος, στην οικογένειά μου θα ήθελα να πω ένα μεγάλο ευχαριστώ για τη στήριξη που μου έχουν δείξει όλα αυτά τα χρόνια.

Πίνακας Περιεχομένων

Εισαγωγή……17

1 Στοιχεία Βιολογίας ……20

1.1 Η Δομή του DNA……..20

1.2 Η Δομή και Λειτουργία των Πρωτεϊνών…….22

1.3 Η Δράση των Ενζύμων και η Σημαντικότητά τους στην Κυτταρική Λειτουργία……26

1.4 Τι Αλλαγές παρατηρούνται στο DNA όταν Αρρωσταίνουμε ……30

Βιβλιογραφία……35

2 Η Επιστήμη της Φαρμακογενωμικής……38

2.1 Πως η Φαρμακογενωμική χρησιμοποιείται στη δημιουργία Φαρμάκων και Ποια η Σχέση της με την Εξατομικευμένη Ιατρική……38

2.2 Ορισμός των Εννοιών της Φαρμακογενετικής και της Φαρμακογενωμικής και ποιος ο Συσχετισμός τους……39

2.3 Human Genome Project: Η Πρώτη Οργανωμένη Απόπειρα Καταγραφής των Γονιδίων……41

Βιβλιογραφία ……49

3. Εισαγωγή στα Εργαλεία Λογισμικού……..49

3.1 Ακολουθιακές μέθοδοι……50

3.2 Αλγόριθμοι σύγκρισης ακολουθιών……..52

3.2.1 Αλγόριθμοι Ταιριάσματος Προτύπου……..53

3.2.2 Αλγόριθμοι Ευθυγράμμισης Ακολουθιών – Sequence Alignment Algorithms……56

3.3 Αλγόριθμοι Ευθυγράμμισης Πολλαπλών Ακολουθιών……62

3.3.1 Ο αλγόριθμος FASTA……58

3.3.2 BLAST - Basic Local Alignment Search Tool……..60

3.3.3 CLUSTALw ……..63

3.4 Βιολογικές Βάσεις Δεδομένων……64

3.4.1 Βάσεις Δεδομένων Νουκλεοτιδικών Ακολουθιών ……66

3.4.2 Βάσεις Δεδομένων Πρωτεϊνικών Ακολουθιών……..68

Βιβλιογραφία ……69

4. Τομείς Έρευνας στη Βιοπληροφορική……69

4.1 Περιγραφή των γονιδίων, των μεταλλάξεων αυτών και των γενετικών πολυμορφισμων……..72

4.1.1 Τα γονίδια……73

4.1.2 Οι μεταλλάξεις ……73

4.1.3. Οι μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί (SNP)……74

4.2 Υλοποίηση και Σχεδιασμός υπολογιστικών εργαλείων για αυτόματη ανάκτηση γνώσης από Βάσεις Βιολογικών Δεδομένων……..76

4.3 Ανάλυση ακολουθιών Βιολογικών Δεδομένων……76

4.4 Κατηγοριοποίηση Βιολογικών Δεδομένων……..77

4.5 Μοριακή Μοντελοποίηση……79

4.5.1 Η Θεωρητική Βάση του Μοριακού Σχεδιασμού……..81

4.5.2 Μοριακά Μοντέλα και Βιοχημική Πληροφορία……..82

4.6 Σχεδιασμός Φαρμάκων με τη βοήθεια ηλεκτρονικού υπολογιστή……83

4.6.1 Structure- Based Design…….90

4.6.2 Το πρόβλημα της πρωτεϊνικής προσάραξης- The Protein Docking Problem ……92

4.6.3 Η φιλοσοφία των αλγορίθμων του protein docking problem…….93

Βιβλιογραφία…….95

5. Περιγραφή της νόσου Alzheimer. Ποιες μεταλλάξεις γονιδίων την προκαλούν. Ποια είναι η σύγχρονη μέθοδος για τη δημιουργία φαρμάκων με σκοπό την καταπολέμησή της νόσου……97

5.1 Η νόσος Alzheimer…….97

5.2 Μορφές της νόσου Alzheimer ……106

5.3 Η νευροπαθολογία της νόσου Alzheimer και οι σύγχρονες θεραπευτικές προσεγγίσεις……107

Βιβλιογραφία……..117

6. Προοπτικές στον Τομέα της Φαρμακογενωμικής……121

6.1 Οι Στόχοι της Εξέλιξης της Φαρμακογενωμικής……121

6.2 Που Στοχεύει ο Σχεδιασμός Φαρμάκων με τη βοήθεια Ηλεκτρονικού Υπολογιστή……123

6.3 Νέες τεχνικές που εμφανίζονται στον Τομέα της Φαρμακογενωμικής...123

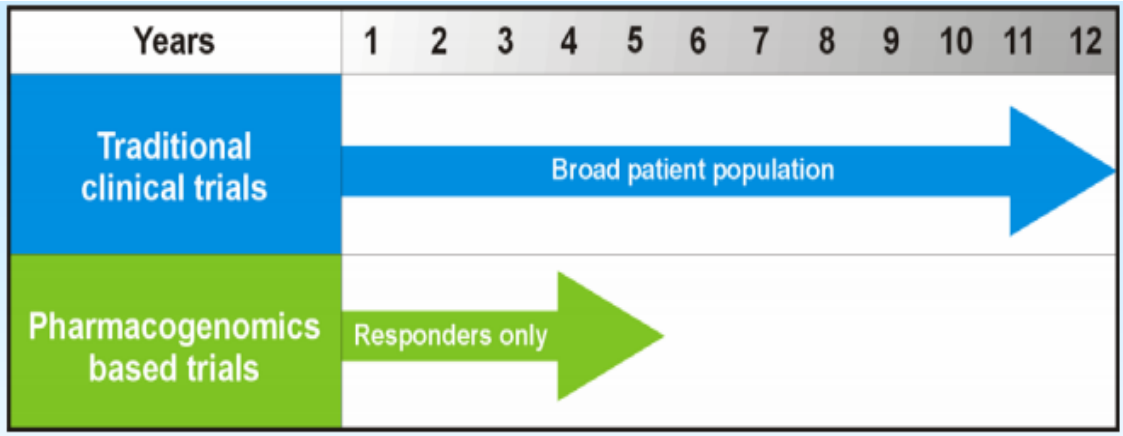
Βιβλιογραφία……128

Εισαγωγή

Στην παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιείται μια βιβλιογραφική αναφορά στα εργαλεία βιοπληροφορικής τα οποία χρησιμοποιούνται με σκοπό τον εντοπισμό των βασικών μοριακών μηχανισμών που εμπλέκονται στην ανάπτυξη των ανθρωπίνων ασθενειών έτσι ώστε να δημιουργηθούν συγκεκριμένες ερευνητικές κατευθύνσεις στη δημιουργία των λεγόμενων «έξυπνων φαρμάκων» . Με τον όρο «έξυπνα φάρμακα» αναφερόμαστε ουσιαστικά στα φάρμακα τα οποία μέσα από τη δράση τους αντιμετωπίζουν τις ασθένειες ελέγχοντας το DNA των ασθενών έτσι ώστε να είναι αποτελεσματικά μόνο σε αυτούς που το χρειάζονται. Στόχος της συγκεκριμένης έρευνας είναι η καλύτερη κατανόηση της αιτίας , της επίδρασης αλλά και του αποτελέσματος που αφορούν εκάστοτε ασθένειες μελετώντας τα εργαλεία βιοπληροφορικής που χρησιμοποιούνται στοχεύοντας στην καλύτερη υγειονομική περίθαλψη εστιάζοντας ακριβώς στην καταλληλότερη θεραπεία για κάθε μεμονωμένο ασθενή. Γι’ αυτό το σκοπό, αναλύεται η σύνθεση του DNA καθώς και οι αλλαγές που δημιουργούνται στη δομή αυτού όταν ο ανθρώπινος οργανισμός αρρωσταίνει . Η φαρμακογενωμική είναι η επιστήμη που μελετά την απόκριση στα φάρμακα ανάλογα με την παρουσία πολυμορφισμών και μεταλλάξεων στο γονιδίωμα. Η πληροφορική εφαρμόζεται ως εργαλείο για τη μοριακή βιολογία παρέχοντας της την υπολογιστική ισχύ και τις μηχανικές μεθόδους ακριβώς τη χρονική στιγμή που εκείνη τις χρειάζεται και έτσι γεννιέται μια νέα επιστήμη, που αναπτύσσεται γοργά φέρνοντας επανάσταση στην επιστημονική κοινότητα αλλά και στην ίδια την κοινωνία. Το Human Genome Project αποτελεί ουσιαστικά το πρώτο δείγμα σοβαρής προσπάθειας μελέτης των γονιδίων και δείχνει τη δύναμη που έχει η γνώση των γονιδίων και των πολυμορφισμών αυτών με σκοπό τη δημιουργία έξυπνων φαρμάκων για τη χορήγηση στους ασθενείς. Επιπρόσθετα,

αναφέρονται οι σημαντικότεροι αλγόριθμοι ακριβούς εύρεσης προτύπου – exact pattern matching, που χρησιμοποιούνται σε προγράμματα σύγκρισης και ανάλυσης ακολουθιών βιολογικών δεδομένων καθώς και διαδικτυακές πηγές δεδομένων στις οποίες ανατρέχουν οι επιστήμονες για να αντλούν πληροφορίες [Εικόνα 1]. Τόσο η κλινική πράξη όσο και η φαρμακευτική βιομηχανία επηρεάζονται από την επανάσταση της φαρμακογενωμικής. Όσο αυξάνονται οι ιατρικές γνώσεις μας σε συνδυασμό με την ανάπτυξη και εμπλοκή της τεχνολογίας στο κομμάτι της βιοϊατρικής, τόσο γίνεται σαφέστερο ότι στο μέλλον η αναζήτηση γενετικών πληροφοριών θα είναι μια συνήθης πρακτική[1.1]

δοκιμές βασισμένες στις παραδοσιακές κλινικές μεθόδους



δοκιμές βασισμένες στη φαρμακογενωμική

[Εικόνα. 1] Παρατηρείται λοιπόν με βάση τα στατιστικά η μείωση του χρόνου, του κόστους και της πιθανότητας αποτυχίας κλινικών δοκιμών επιτυγχάνοντας την έλευση ενός φαρμάκου στην αγορά.

Ο μεγάλος αριθμός δεδομένων που μεταφράζονται στην επιστήμη της μοριακής βιολογίας και ειδικότερα στον τομέα της ακολουθιοποίησης του γονιδιώματος (δηλαδή της αλληλουχίας του DNA), αποτελεί μεγάλη πρόκληση για τους επιστήμονες του σχεδιασμού και της ανάλυσης αλγορίθμων. Συγκεκριμένα, η ερμηνεία αυτών των δεδομένων μπορεί να διευκολύνει την αναζήτηση λύσεων αρκετών προβλημάτων όπως είναι η αναγνώριση γονιδίων, ο καθορισμός της δομής των κωδικοποιημένων πρωτεϊνών, η ανακάλυψη των μηχανισμών με τους οποίους οι πρωτεΐνες εκτελούν τη βιολογική λειτουργία τους, η απόκτηση γνώσης για το ρόλο των μη κωδικοποιημένων περιοχών του DNA στη μορφολογία και έκφραση γονιδίων. [1.2]

Η μεταγραφική βιοπληροφορική είναι μια ισχυρή μέθοδος για τη γεφύρωση του χάσματος μεταξύ της συστημικής βιολογίας και της πρακτικής εξατομικευμένης ιατρικής. Η βιοπληροφορική χρησιμοποιεί υπολογιστικές προσεγγίσεις για την επίλυση προβλημάτων και τη βελτίωση της επικοινωνίας , κατανόησης καθώς και την ανάλυση και διαχείριση των βιοϊατρικών πληροφοριών. Όπως ορίζεται από την Αμερικανική Ένωση Ιατρικής Πληροφορίας (AMIA), η μεταφραστική βιοπληροφορική είναι ένα νέο πεδίο βελτιστοποίησης και μετατροπής των όλο και πιο εκτενών βιοϊατρικών δεδομένων και δεδομένων γονιδιωματικής κυρίως σε δυναμική, έξυπνη, προληπτική και συμμετοχική υγεία.

Οι μελλοντικές επιδιώξεις εστιάζονται στο υπάρχον έλλειμμα υπολογιστικής ισχύος που δεν καλύπτει τη βιολογική πολυπλοκότητα. Είναι προφανές ότι η βιοπληροφορική αναπτύχθηκε σε στενή συνεργασία με άλλες τεχνολογικές προσπάθειες στις βιολογικές επιστήμες, κυρίως αυτές της παραγωγής και ανάλυσης δεδομένων. Στις πρώτες ημέρες, το κύριο επίκεντρο ήταν η ανάλυση μοριακών ακολουθιών και δομών, που ακολουθούνταν από την ανάλυση ολόκληρων γονιδίων και των μεταγραφικών προφίλ. Όλο και περισσότερα είδη δεδομένων ανακαλύπτονται σε μεγάλες κλίμακες, κυτταρικά μέρη, παραλλαγές με βάση τον ιστό, ανατομικές ιδιότητες και πληθυσμιακή ποικιλομορφία, οι προκλήσεις για υπολογιστική ανάλυση σε πολλαπλά επίπεδα και σύνθετη ολοκλήρωση αυτών των αναλύσεων είναι μεγαλύτερες από ποτέ. Παρά την αύξηση του αριθμού των δεδομένων και

των ταχύτερων υπολογιστών, η κυρίαρχη δύναμη προόδου, όπως και σε κάθε πνευματική δραστηριότητα εξάλλου, θα είναι η ύπαρξη νέων ιδεών και τρόπων σκέψης που θα επιτρέψουν την περαιτέρω ανάπτυξη του τομέα μέχρι και τη μελλοντική εγκαθίδρυση του ως το βασιλιά των βιολογικών επιστημών.

Βιβλιογραφία

[1.1] ‘‘Systems Biology in Drug Discovery and Development Methods And Protocols’’, Qing Yan PharmTao, Santa Clara, CA, USA

[1.2] ‘‘Drug Design and Discovery Methods and Protocols ’’ Seetharama D. Satyanarayanajois Department of Basic Pharmaceutical Sciences, College of Pharmacy, University of Louisiana at Monroe, Monroe, LA, USA

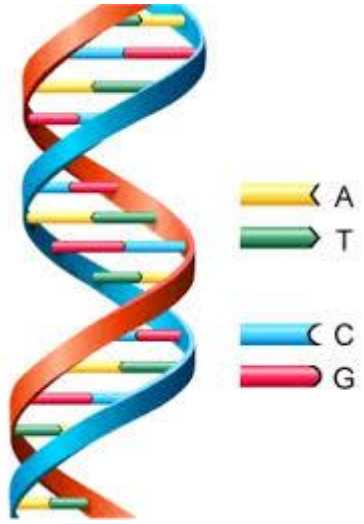
[1.3] N.M.Luscombe, D. Greenbaum, M. Gernstein, What is Bioinformatics: A Proposed Definition and Overview of the Field, Method Inform Med, Vol. 40, pp.346-358, 2001.

Κεφάλαιο 1^{ο}: Στοιχεία Βιολογίας

1.1 Η δομή του DNA

Το δε(σ)οξυριβο(ζο)νουκλεϊ(νι)κό οξύ (Deoxyribonucleic acid- DNA) είναι ένα νουκλεϊκό οξύ που περιέχει τις γενετικές πληροφορίες που καθορίζουν τη βιολογική ανάπτυξη όλων των κυτταρικών μορφών ζωής και των περισσότερων ιών. Το DNA συνήθως έχει τη μορφή διπλής έλικας . Η αποκωδικοποίηση του DNA καθορίζει συγκεκριμένες γενετικές επιλογές, επέτρεψε στους επιστήμονες να κατανοήσουν καλύτερα την γενετική της ζωής και την κληρονόμηση ορισμένων χαρακτηριστικών και νόσων.

Πρόκειται για μια μεγαλομοριακή ένωση που συγκροτείται από αζωτούχες-πρωτεϊνικές βάσεις , φωσφορικές ρίζες και ένα σάκχαρο με πέντε άτομα άνθρακα (πεντόζη), την δε(σ)οξυριβόζη) [Εικόνα 2].



[Εικόνα 2] Στην εικόνα παρατηρούμε τη διπλή έλικα του DNA όπου με διαφορετικά χρώματα απεικονίζονται οι πρωτεϊνικές βάσεις: αδενίνη, θυμίνη, γουανίνη, κυτοσίνη.

Το σύνολο των μορίων DNA που υπάρχουν σε ένα κύτταρο αποτελούν το γενετικό υλικό του. Το DNA είναι ο φορέας των γενετικών πληροφοριών του κυττάρου, όχι μόνο με την έννοια της μεταβίβασης χαρακτηριστικών, αναλλοίωτων από γενεά σε γενεά, αλλά και της ρύθμισης της φυσιογνωμίας εξειδίκευσης κάθε κυττάρου για την επιτέλεση των ιδιαίτερων λειτουργιών του. Τέλος, το DNA επιτρέπει τη δημιουργία γενετικής ποικιλότητας, υφιστάμενο μεταλλάξεις.

Η διαμόρφωση των μεγάλων μορίων του DNA στο χώρο έχει τη μορφή δύο επιμηκών αλύσεων, οι οποίες συστρέφονται ελικοειδώς μεταξύ τους. Οι αζωτούχες βάσεις στο DNA είναι τέσσερις :

Κυτοσίνη C

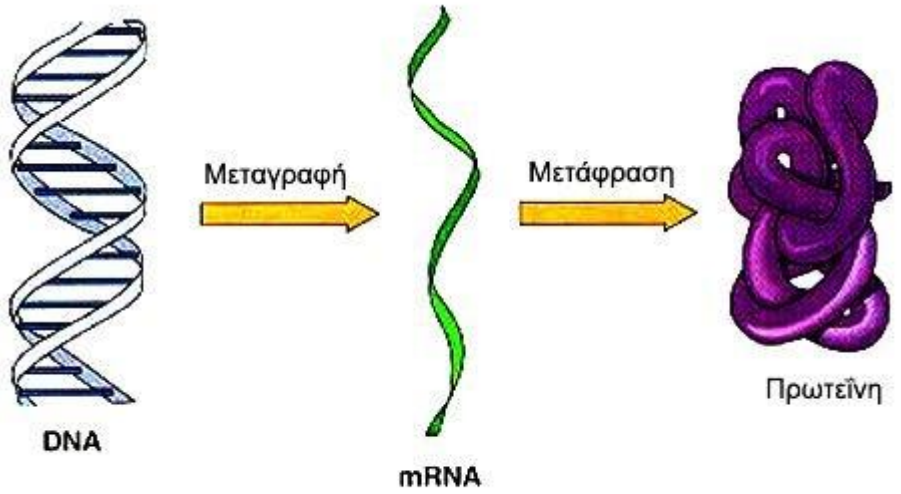
Γουανίνη G

Θυμίνη T

Αδενίνη A

Οι αζωτούχες βάσεις ανάλογα με τη σειρά αλληλουχίας τους σε τριάδες, κωδικοποιούν το μήνυμα για τη σύνθεση των αμινοξέων του κυττάρου στα ριβοσώματα. Εκεί τα αμινοξέα συνδυάζονται, με τη σειρά κατά την οποία μεταφέρθηκαν στο ριβόσωμα και συντίθενται έτσι οι διαφορετικές πρωτεΐνες [2.1].

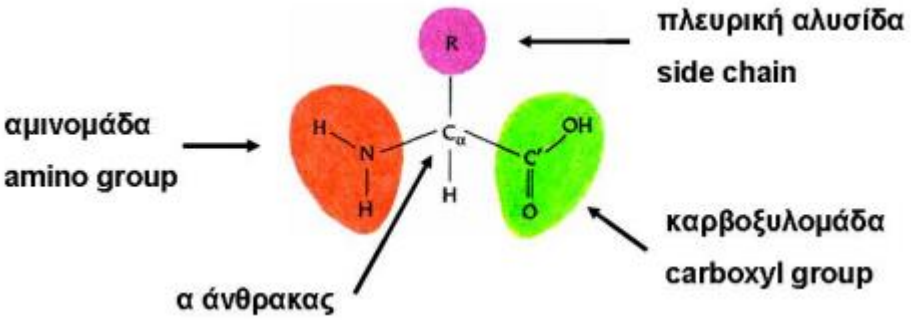
1.2 Η δομή και λειτουργία των πρωτεϊνών



[Εικόνα 3] Το mRNA που προκύπτει από τη μεταγραφή προσδένεται σε ένα ριβόσωμα, για να ξεκινήσει η διαδικασία της μετάφρασης (πρωτεϊνοσύνθεση), από την οποία θα προκύψει τελικά η πρωτεΐνη.

[Εικόνα 3] Οι πρωτεΐνες είναι μακρομόρια , πολυμερή, με σαφώς καθορισμένη δομή και παρουσιάζουν μεγάλη ποικιλία ιδιοτήτων και σχήματος. Οι πρωτεΐνες είναι απαραίτητες σε όλες σχεδόν τις βιολογικές λειτουργίες και η σημασία τους συνοψίζεται ως εξής: ενζυμική κατάλυση, μεταφορά, αποθήκευση, κίνηση, μηχανική στήριξη ανοσοπροστασία, δημιουργία και μετάδοση νευρικών παλμών και έλεγχος και ανάλυση της διαφοροποίησης.

Οι δομικές μονάδες των πρωτεϊνών είναι 20 διαφορετικά αμινοξέα.[Εικόνα 4] Τα αμινοξέα αποτελούνται από μία αμινομάδα (-NH2) και μία καρβοξυλομάδα (-COOH) συνδεδεμένες σε ένα άτομο άνθρακα C. Στο ίδιο άτομο ενώνεται και μία πλευρική αλυσίδα η οποία διαφέρει μεταξύ των αμινοξέων και καθορίζει τις ιδιότητές τους. Τα αμινοξέα ενώνονται μεταξύ τους με πεπτιδικούς δεσμούς για τη δημιουργία πεπτιδικών αλυσίδων-πρωτεϊνών. Τα πρωτεϊνικά μόρια από μία ή περισσότερες πολυπεπτιδικές αλυσίδες, που η κάθε μία τους μπορεί να αποτελείται από μερικές εκατοντάδες αμινοξέα σε μια συγκεκριμένη σειρά γνωστή σαν αμινοξική ακολουθία.



[Εικόνα 4] Αμινοξύ-δομική μονάδα πρωτεϊνών.

Στις πρωτεΐνες μπορούν να αναγνωριστούν 4 επίπεδα οργάνωσης :

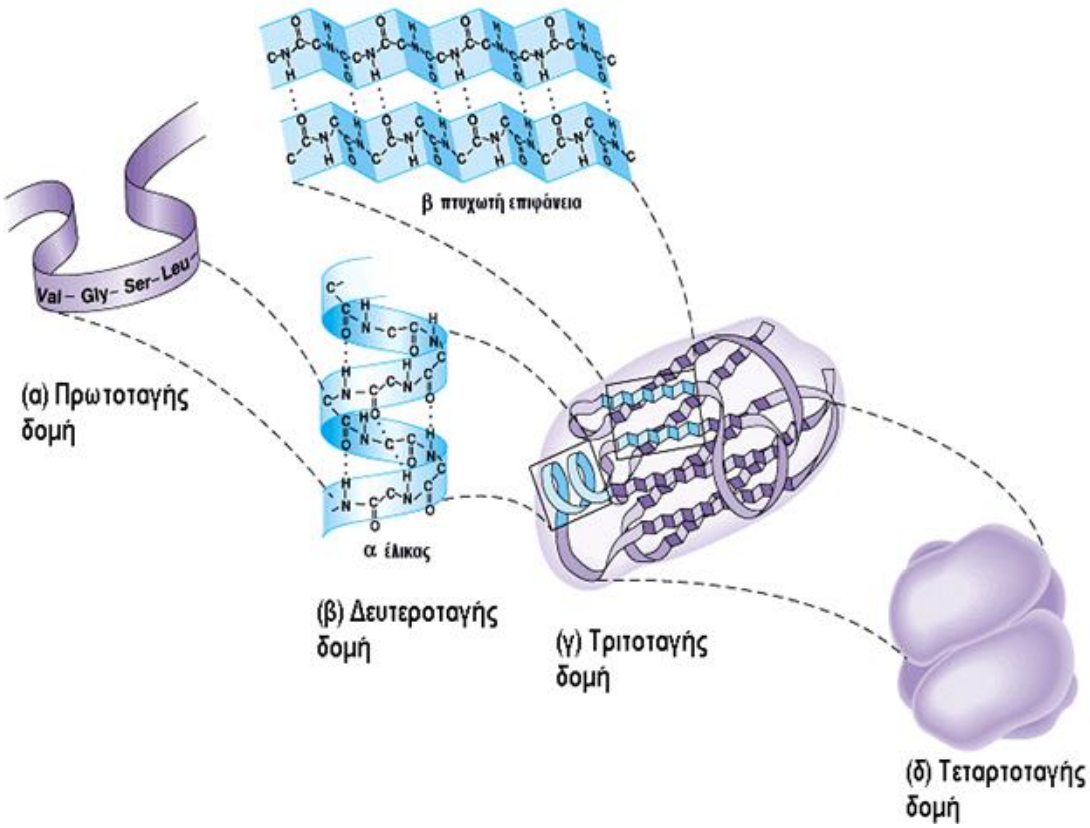
Πρωτοταγής δομή : αντιστοιχεί στην αμινοξική ακολουθία, δηλαδή στη διάταξη αμινοξέων σε μια πολυπεπτιδική αλυσίδα.

Δευτεροταγής δομή: αναφέρεται στην κανονική στερεοδιάταξη τμημάτων της πολυπεπτιδικής αλυσίδας.

Τριτοταγής δομή : αναφέρεται στην τρισδιάστατη δομή

Τεταρτοταγής δομή : η διάταξη στο χώρο των πολυπεπτιδικών αλυσίδων από τις οποίες αποτελείται. [Εικόνα 5]

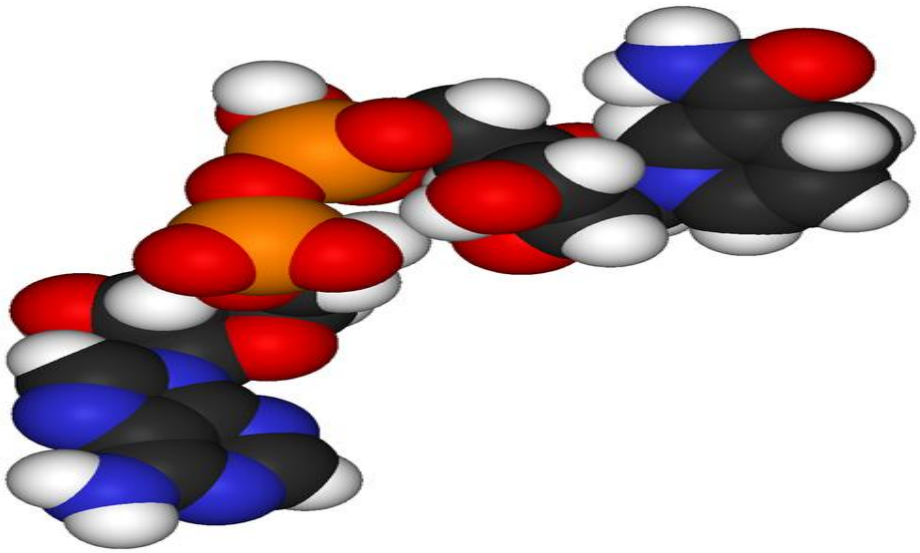
Η ακολουθία μιας πρωτεΐνης καθορίζει την τρισδιάστατη δομή της, η οποία με τη σειρά της καθορίζει τις αλληλεπιδράσεις της με άλλες πρωτεΐνες, με νουκλεϊκά οξέα και μικρά μόρια. Επομένως, η δομή μιας πρωτεΐνης καθορίζει τη λειτουργία της και οι ερευνητικές προσπάθειες κατευθύνονται τόσο στον καθορισμό των αμινοξικών ακολουθιών της κάθε πρωτεΐνης όσο και την εύρεση της τρισδιάστατης μορφής της. Καθώς ακόμα δεν έχει διασαφηνιστεί ο μηχανισμός με τον οποίο διπλώνονται οι αμινοξικές ακολουθίες δημιουργώντας τη 3D δομή των πρωτεϊνών, η βιοπληροφορική και τα εργαλεία τα οποία παρέχει διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην έρευνα που αφορά τις πρωτεΐνες. Μεταξύ των άλλων, μέσω της βιοπληροφορικής είναι δυνατή η αποθήκευση των μέχρι τώρα αποτελεσμάτων σε βιολογικές βάσεις δεδομένων. Οι βάσεις αυτές μπορούν να χρησιμοποιηθούν για άντληση πληροφορίας ενώ ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει και η χρήση τους για την εύρεση της δομής μιας νέας πρωτεΐνης μέσω της χρήσης νευρωνικών δικτύων. Στα τεχνικά αυτά νευρικά δίκτυα στην είσοδο δίνεται μια πρωτεϊνική ακολουθία αμινοξέων και στην έξοδο δίνεται μια πιθανή δομή η οποία εξάγεται μέσω κατάλληλων αλγορίθμων και την άντληση πληροφορίας από βάσεις δεδομένων. [2.2]



[Εικόνα 5] Τα 4 επίπεδα δομής των πρωτεϊνών.

1.3 Η δράση των ενζύμων και η σημαντικότητά τους στην κυτταρική λειτουργία.

Με την ελληνική, διεθνή σήμερα, ονομασία ένζυμα(στην ελληνική καλούνται και φυράματα) φέρονται ειδικές πρωτεΐνες ή πρωτεϊνικής βάσης πολύπλοκες οργανικές ενώσεις, που αποτελούνται από πολυμερή των αμινοξέων, οι οποίες δρουν ως καταλύτες στις χημικές αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα στον μεταβολισμό των οργανισμών, εξ ου και η συνώνυμη ονομασία τους βιοκαταλύτες.



[Εικόνα 6]. Τρισδιάστατη μορφή του ενζύμου έτσι όπως φαίνεται στην οθόνη του υπολογιστή.

Η πρωταρχική σημασία των ενζύμων είναι η σχέση τους με τη ζωή. Από όλες τις χημικές διεργασίες που γίνονται μέσα σε ένα ζωντανό κύτταρο, ελάχιστες είναι εκείνες που δεν εξαρτώνται από τη δράση των ενζύμων [Εικόνα 6]. Εύκολα λοιπόν γίνεται κατανοητό ότι δεν μπορεί να υπάρξει ζωή χωρίς ένζυμα, αλλά δεν μπορούν να υπάρξουν και άλλες μορφές ζωής, ιοί κλπ.

Η δράση ενός ενζύμου είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με την πρωτεϊνική φύση. Υπάρχουν καταλυτικά μόρια , που δεν είναι πρωτεϊνικά, όπως τα καταλυτικά

RNA (μπορούν να υδρολύουν ή να αποκαθιστούν φωσφοδιέστερικούς δεσμούς σε άλλα μόρια RNA ή στον εαυτό τους).

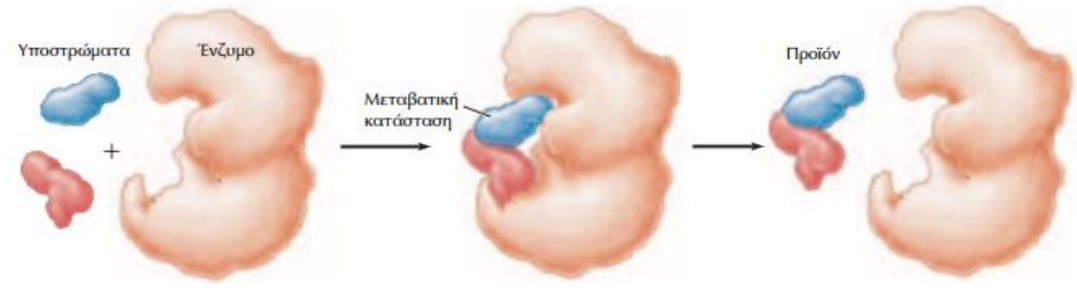
Υπερτερούν από τους υπόλοιπους καταλύτες λόγω :

1)Της μεγάλης διαδραστικότητάς τους.

2)Της ικανότητας τους να επιταχύνουν τις αντιδράσεις περισσότερο από τους άλλους καταλύτες (διάσπασης του υπεροξειδίου του υδρογόνου σε νερό και οξυγόνο, επιταχύνεται μερικές φορές με την παρουσία μικρής ποσότητας σκόνης σιδήρου, αλλά επιταχύνεται χιλιάδες φορές με την παρουσία ελάχιστης ποσότητας του ενζύμου καταλάση.

3)Της υψηλής τους εξειδίκευσης ως προς το υπόστρωμα.

Η κατανομή τους στα διάφορα υποκυτταρικά κλάσματα (ανάλογα με το βιολογικό τους ρόλο) παίζει σημαντικότατο ρόλο π.χ. στη ρύθμιση του μεταβολισμού.



[Εικόνα 7] Σύμπλοκο ενζύμου υποστρώματος.

Σχεδόν όλες οι χημικές αντιδράσεις στα κύτταρα απαιτούν τη ρυθμιστική δράση των ενζύμων [Εικόνα 7]. Όπως όλοι οι καταλύτες, έτσι και τα ένζυμα λειτουργούν αυξομειώνοντας την ενέργεια ενεργοποίησης μια αντίδρασης. Τα περισσότερα ένζυμα επιταχύνουν την αντίδραση εκατομμύρια φορές σε σχέση με την ταχύτητα της χωρίς αυτά. Ωστόσο, τα ένζυμα διαφέρουν από τους υπόλοιπους καταλύτες ως προς την εξειδίκευση, καθώς είναι πολύ πιο περιοριστικά εξειδικευμένα από αυτούς – κάθε ένζυμο μπορεί να καταλύσει μια συγκεκριμένη μόνο αντίδραση.

Παρόλο που σχεδόν όλα τα ένζυμα είναι πρωτεΐνες, δεν είναι όλοι οι βιοχημικοί καταλύτες ένζυμα. Παράδειγμα μη ενζύμου αποτελεί το καταλυτικό RNA . Η δράση των ενζύμων μπορεί να επηρεαστεί από άλλα μόρια : οι ανασταλτικοί παράγοντες μειώνουν τη δράση τους ενώ υπάρχουν μόρια που την αυξάνουν (παράγοντες ενεργοποίησης). Η ενζυμική δράση εξαρτάται επίσης από τη θερμοκρασία, το χημικό περιβάλλον (πχ το PH) και από τη συγκέντρωση του υποστρώματος στο ενεργό κέντρο του. Τα αλλοστερικά ένζυμα υπάρχουν σε ενεργές και αδρανείς μορφές, ενώ κάποια μπορεί να αναστέλλονται από μόρια που δεν ανήκουν στα υποστρώματα.

Σύγκριση των ενζύμων στα διάφορα όργανα ή στο ίδιο όργανο στα διαφορετικά στάδια ανάπτυξης ή στα ίδια όργανα σε διάφορα είδη οδηγεί σε σημαντικές παρατηρήσεις. Υπάρχουν αδιαμφισβήτητες διαφορές στο μεταβολισμό, στη χημική σύσταση και δομή ανάμεσα στους διαφορετικούς ιστούς και στα διάφορα είδη που όλες αντικατοπτρίζουν διαφορές στα ένζυμα. Σύγκριση πολλών κυττάρων από διαφορετικά είδη δείχνει ότι υπάρχουν αξιοσημείωτες ομοιότητες στα ένζυμα που περιέχουν.

Δε μετατοπίζουν το σύστημα από την κατάσταση ισορροπίας, αλλά επιταχύνουν την κατάσταση ισορροπίας (μέχρι 10^12 φορές).

Μια αντίδραση μπορεί να έχει χρόνο αντίδρασης:

Χωρίς ένζυμο t1/2 = 300 έτη,

Με ένζυμο t1/2 = 1 sec.

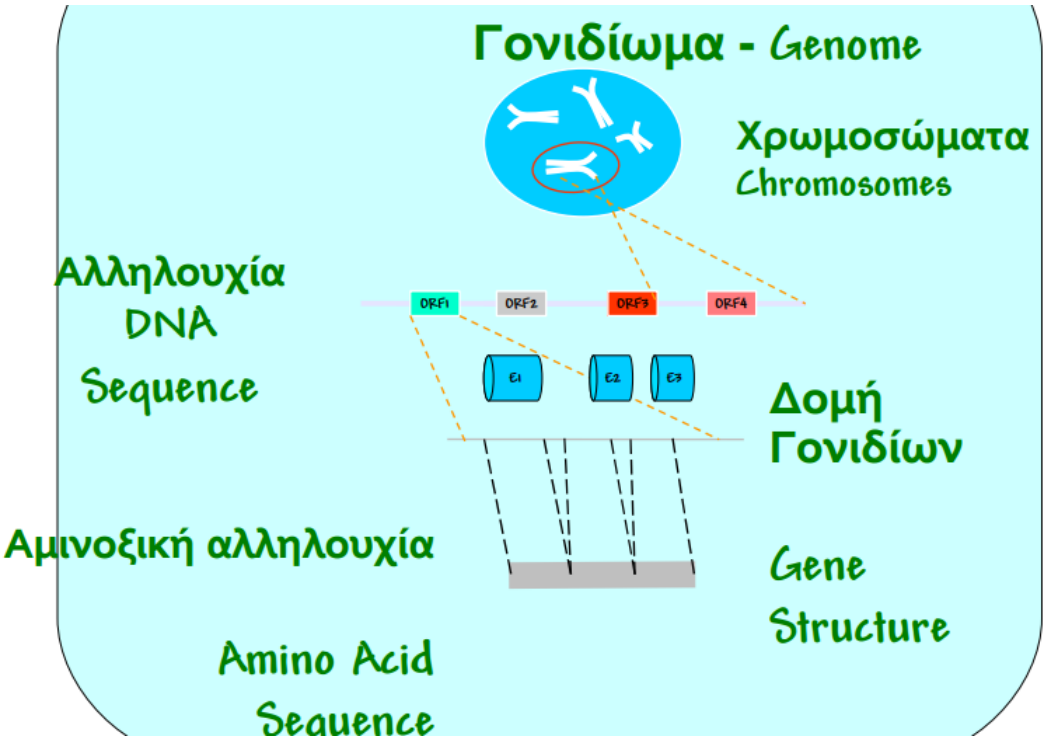
Κάποια ένζυμα χρησιμοποιούνται και εμπορικά, όπως για παράδειγμα για την παραγωγή αντιβιοτικών. [2.3]

1.4 Τι αλλαγές παρατηρούνται στο DNA όταν αρρωσταίνουμε.

Πολλοί οργανισμοί έχουν πολλαπλά χρωμοσώματα σε κάθε κύτταρο. Το πλήρες σύνολο όλου του γενετικού υλικού (όλα τα χρωμοσώματα μαζί) αποτελούν το γονιδίωμα (genome) του οργανισμού. Ο όρος γονιδίωμα αναφέρεται στο σύνολο των γονιδίων τα οποία περιέχονται σε αυτό.

Οι ενζυμικές δραστηριότητες πρέπει να είναι εξαιρετικά συντονισμένες για να μπορούν να αντιγράφουν ολόκληρα γονιδιώματα με ακρίβεια και ταχύτητα.

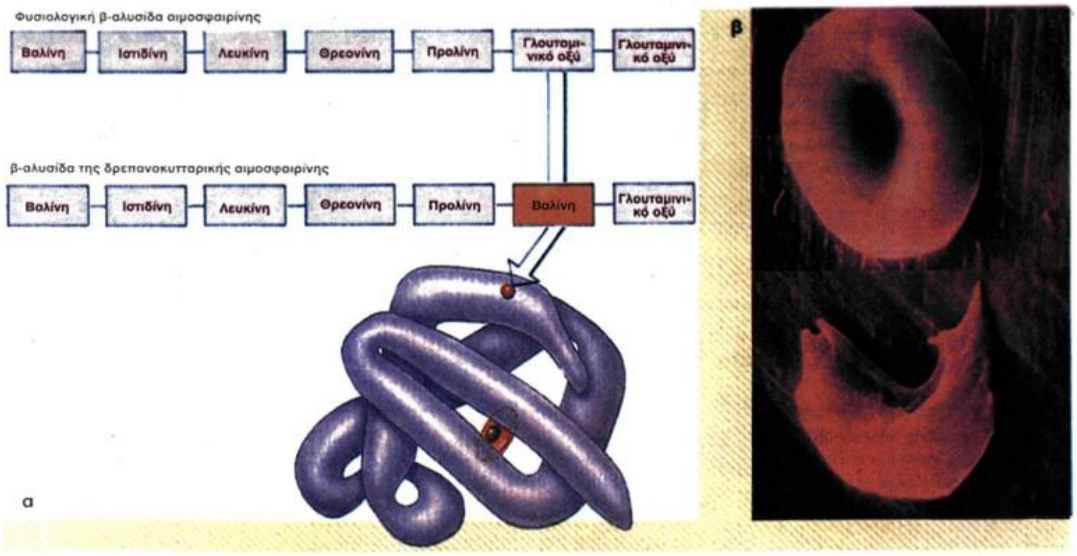
Μεταλλάξεις σε γονίδια που κωδικοποιούν ένζυμα δημιουργούν τις διαταραχές του μεταβολισμού. Το γενετικό υλικό μπορεί να υποστεί αλλαγές με πολλούς διαφορετικούς τρόπους. Το γεγονός αυτό δεν μπορεί να προκαλεί έκπληξη. Αρκεί να σκεφθούμε με πόσους τρόπους μπορεί να αλλάξουν οι λέξεις που υπάρχουν σ’ αυτή τη σελίδα. Οι αλλαγές στην αλληλουχία DNA, που ονομάζονται μεταλλάξεις, δημιουργούν συνήθως ένα διαφορετικό φαινότυπο χωρίς όμως αυτό να είναι πάντοτε απαραίτητο. Αυτό εξαρτάται από τον τρόπο με τον οποίο η αλλαγή επιδρά στο γονιδιακό προϊόν, δηλαδή στην πρωτεΐνη. [Εικόνα 8]



[Εικόνα 8] Γονίδιο/α: α)Περιοχή DNA που κωδικοποιεί λειτουργικά προϊόντα (Proteins, rRNA, tRNA, other RNA molecules) β) Μεταγραφή (Transcription) [2.5]

Οι γενετιστές κατατάσσουν τις μεταλλάξεις σε δύο μεγάλες κατηγορίες : τις γονιδιακές και τις χρωμοσωμικές. Ο τυπικός αυτός διαχωρισμός σχετίζεται με την έκταση της αλλαγής. Αν αυτή αφορά μικρό αριθμό βάσεων, στις οποίες συμβαίνει αντικατάσταση, προσθήκη ή έλλειψη , τότε ονομάζεται γονιδιακή μετάλλαξη. Αν αφορά αλλαγές σε μεγαλύτερο τμήμα του χρωμοσώματος, ονομάζεται χρωμοσωμική ανωμαλία.

Οι μεταλλάξεις συμβάλλουν στη δημιουργία γενετικής ποικιλότητας στον πληθυσμό και ευθύνονται για πολλές κληρονομικές ασθένειες, καθώς και για πολλές επιπτώσεις καρκίνου. Μεταλλάξεις μπορεί να συμβούν σε οποιοδήποτε γεννητικό ή σωματικό κύτταρο ενός οργανισμού. Μόνο οι μεταλλάξεις των γεννητικών κυττάρων , εν τούτοις, μπορεί να μεταβιβαστούν από τη μία γενιά στην επόμενη. Αυτό όμως δε σημαίνει ότι οι σωματικές μεταλλάξεις είναι λιγότερο σημαντικές για την υγεία. Η πρώτη γενετική ασθένεια που βρέθηκε ότι είναι αποτέλεσμα συγκεκριμένης γονιδιακής μετάλλαξης ήταν η δρεπανοκυτταρική αναιμία. Σήμερα γνωρίζουμε ότι η διαφορά εντοπίζεται στο έκτο αμινοξύ της β-πολυπεπτιδικής αλυσίδας, όπου το γλουταμινικό οξύ αντικαθίσταται από βαλίνη. Η μεταλλαγμένη αιμοσφαιρίνη συμβολίζεται ως HbS. Η αλλαγή στην ακολουθία των αμινοξέων είναι αποτέλεσμα μιας γονιδιακής μετάλλαξης στην τριπλέτα που κωδικοποιεί το γλουταμινικό οξύ. Στην κωδική αλυσίδα του DNA δηλαδή, αλλάζει μια βάση και το φυσιολογικό κωδικόνιο GAG, που κωδικοποιεί το γλουταμινικό οξύ, αντικαθίσταται από το GTG , που κωδικοποιεί τη βαλίνη. Αυτή η μετάλλαξη οδηγεί σε αλλαγή της στερεοδιάταξης της αιμοσφαιρίνης, η οποία έχει ως αποτέλεσμα την αλλαγή της μορφής των ερυθροκυττάρων, τα οποία σε συνθήκες έλλειψης οξυγόνου, παίρνουν χαρακτηριστικό δρεπανοειδές σχήμα. Τα δρεπανοκύτταρα εμποδίζουν τη φυσιολογική κυκλοφορία του αίματος στα τριχοειδή αγγεία δημιουργώντας προβλήματα σε διάφορα όργανα όπως στη σπλήνα και στους πνεύμονες. Τα δρεπανοκύτταρα καταστρέφονται ταχύτερα από τα φυσιολογικά με συνέπεια την εμφάνιση συμπτωμάτων αναιμίας.



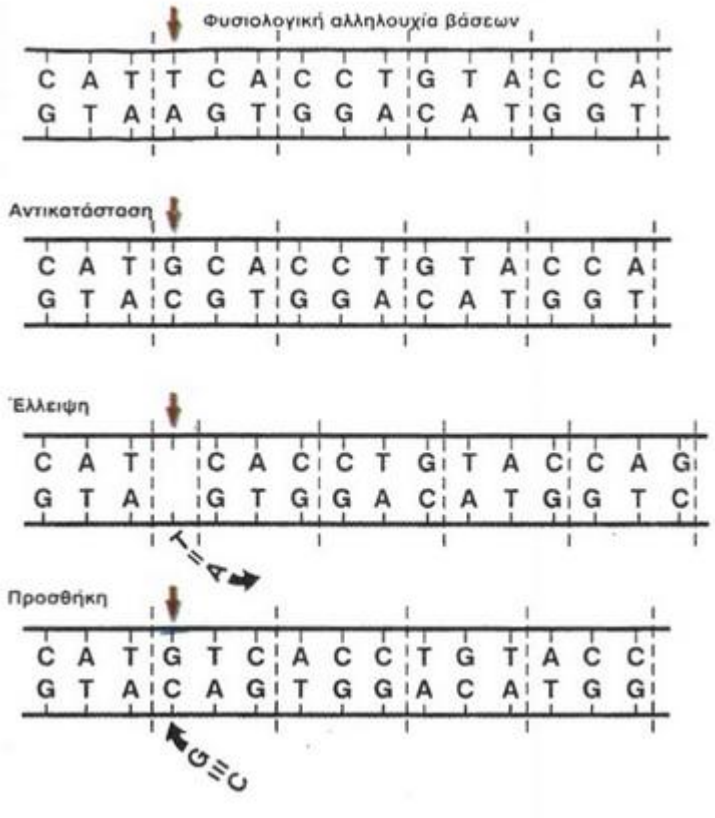
[Εικόνα 9] Η δραπανοκυτταρική αναιμία δημιουργείται από μια μετάλλαξη του γονιδίου που κωδικοποιεί τη β-πολυπεπτιδική αλυσίδα της αιμοσφαιρίνης α) στο μοντέλο του μορίου της αιμοσφαιρίνης φαίνεται η θέση της μετάλλαξης, β) φυσιολογικό ερυθροκύτταρο και δρεπανοειδές ερυθροκύτταρο.

Υπάρχουν πολλοί διαφορετικοί τύποι γονιδιακών μεταλλάξεων. Το παράδειγμα της δρεπανοκυτταρικής αναιμίας δείχνει ότι μια ασθένεια μπορεί να είναι το αποτέλεσμα αντικατάστασης μιας μόνο από τα δισεκατομμύρια βάσεων DNA! Αλλαγή αυτού του τύπου ονομάζεται αντικατάσταση βάσης και μπορεί να έχει ποικίλα αποτελέσματα στην πρωτεΐνη που παράγεται από το αντίστοιχο γονίδιο [Εικόνα 9]. Στην περίπτωση που η διαφορετική τριπλέτα που προέκυψε κωδικοποιεί το ίδιο αμινοξύ (συνώνυμο κωδικόνιο) δεν αλλάζει ακολουθία αμινοξέων στην παραγόμενη πρωτεΐνη .

Στις περισσότερες όμως περιπτώσεις , μια αντικατάσταση βάσης δημιουργεί μια τριπλέτα που κωδικοποιεί ένα διαφορετικό αμινοξύ και κατά συνέπεια μια αλλαγμένη πρωτεΐνη. Εάν το διαφορετικό αμινοξύ βρίσκεται στο ενεργό κέντρο ενός ενζύμου ή κοντά σε αυτό , τότε η ενεργητικότητά του, δηλαδή η

ικανότητα κατάλυσης αντιδράσεων, μπορεί να ελαττωθεί ή και να μηδενισθεί. Επίσης, σε άλλα είδη πρωτεϊνών η μετάλλαξη μπορεί να οδηγήσει σε αλλαγή της δομής τους και συνεπώς και της λειτουργίας τους, όπως σε περίπτωση της HbS στη δρεπανοκυτταρική αναιμία. Σε άλλες περιπτώσεις μία αντικατάσταση βάσης μπορεί να μετατρέψει ένα κωδικόνιο, που κωδικοποιεί κάποιο αμινοξύ , σε ένα κωδικόνιο λήξης, με αποτέλεσμα τον τερματισμό σύνθεσης της πολυπεπτιδικής αλυσίδας. Στις περισσότερες από αυτές τις περιπτώσεις καταστρέφεται η λειτουργικότητα της πρωτεΐνης.

Ένας άλλος σημαντικός τύπος γονιδιακών μεταλλάξεων περιλαμβάνει προσθήκη ή έλλειψη βάσεων [Εικόνα 10]. Αλλαγές στον αριθμοί των βάσεων έχουν ως αποτέλεσμα την εμφάνιση μεταλλαγμένων φαινοτύπων. Η προσθήκη ή η έλλειψη διαδοχικών βάσεων σε οποιοδήποτε αριθμό πολλαπλάσιο του τρία δημιουργεί, αντίστοιχα, προσθήκη ή έλλειψη ενός ή περισσοτέρων αμινοξέων στην πολυπεπτιδική αλυσίδα, που μπορεί να αλλάζει τη λειτουργικότητά της . Μεγάλος αριθμός ασθενειών στον άνθρωπο είναι αποτέλεσμα μεταλλάξεων. [2.4]



[Εικόνα 10] Οι κύριες κατηγορίες γονιδιακών μεταλλάξεων.

Βιβλιογραφία

[2.1] http://el.Wikipedia.org/wiki/DNA

[2.2]http://el.Wikipedia.org/wiki/%CE%A0%CF%81%CF%89%CF%84%CE%B5%CE%90%CE%BD%CE%B7

[2.3] "Μεγάλη Ελληνική Εγκυκλοπαίδεια" τομ.ΙΑ΄ σελ.168, τομ.Β΄ (συμπλήρωμα), σελ.855.

[2.4] http://ebooks.edu.gr/modules/ebook/show.php/DSGL-C112/52/390,1509

[2.5] http://troodos.biol.ucy.ac.cy/BRL/courses/BIO003/01.Intro.pdf

Κεφάλαιο 2^{ο}: Η Επιστήμη της Φαρμακογενωμικής.

2.1 Πως η φαρμακογενωμική χρησιμοποιείται στη δημιουργία φαρμάκων και ποια η σχέση της με την εξατομικευμένη ιατρική.

Τον τελευταίο αιώνα, η επιτυχημένη ανάπτυξη νέων φαρμάκων κι εμβολίων έχει συνεισφέρει στην αύξηση του προσδόκιμου επιβίωσης κατά 30 περίπου χρόνια. Σημαντικές όμως παραμένουν οι προκλήσεις που αντιμετωπίζουμε στο χώρο της φαρμακευτικής αγωγής με κύρια σημεία:

1)Στατιστικά στοιχεία στις ΗΠΑ δείχνουν 100.000 θανάτους και 2.000.000 εισαγωγές στα νοσοκομεία ετησίως λόγω ανεπιθύμητων ενεργειών των φαρμάκων με ετήσιο κόστος 4,5 δισεκατομμύρια δολάρια. (Στην Ελλάδα είναι 2.500 θάνατοι και 110 εκατ. Ευρώ κόστος).

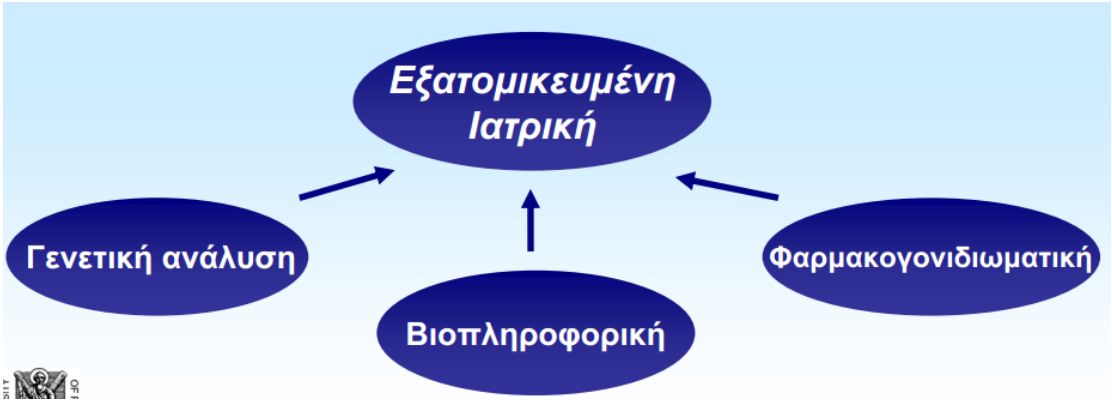
2) Τον προσδιορισμό της καταλληλότερης δόσης, αφού η αποτελεσματικότητα μιας συγκεκριμένης ποσότητας φαρμάκου διαφέρει σημαντικά ανάμεσα σε διαφορετικά άτομα, ενώ υπολογίζεται ότι περίπου 3.000.000 άνθρωποι ανά έτος στις ΗΠΑ λαμβάνουν αναποτελεσματικές ή επιβλαβείς συνταγογραφήσεις.

3) Το χρόνο μετάβασης νέων φαρμάκων από το εργαστήριο στην κλινική, καθώς ένα νέο φάρμακο χρειάζεται περίπου 10 χρόνια από την ανακάλυψή του μέχρι να φτάσει στον ασθενή. Προκειμένου να αντιμετωπιστούν αυτές οι προκλήσεις , οι προσπάθειες στρέφονται στο χώρο των βιοεπιστημών.

4)Η μεγάλη πλειοψηφία των φαρμακευτικών ουσιών δρα αποτελεσματικά σε περίπου 30-50% των ασθενών.

Τα τελευταία χρόνια , οι ταχύτατες εξελίξεις στο χώρο αυτό επέτρεψαν , μεταξύ άλλων, τη βαθύτερη κατανόηση του ανθρωπίνου γονιδιώματος (π.χ. με την αποκωδικοποίηση του το έτος 2000). Παράλληλα, οδήγησαν σε εντυπωσιακές ανακαλύψεις όπως νέα είδη πολυμορφισμών (μη παθολογικών αλλαγών στον αριθμό αντιγράφων συγκεκριμένων περιοχών του DNA, γνωστών ως copy number variants –CVNs) ή το νέο είδος των μορίων γνωστών ως micro-RNA . Οι γνώσεις αυτές σε συνδυασμό με προηγμένες τεχνολογίες (π.χ. οι μικροσυστοιχίες και η «βαθιά» αλληλουχία του DNA) αλλάζουν τον τρόπο που προσεγγίζουμε τη μελέτη της λειτουργίας των κυττάρων, των μοριακών μηχανισμών δράσης φαρμάκων, τη σχέση γονιδιώματος και φαρμακευτικής ανταπόκρισης αλλά και την αναζήτηση νέων θεραπευτικών στόχων.

Ένας αυξανόμενος αριθμός μελετών δείχνουν ότι η ανταπόκριση σε ένα φάρμακο μπορεί να επηρεαστεί από διάφορους γονιδιωματικούς παράγοντες που καθορίζουν τον μεταβολισμό, τη μεταφορά, την απορρόφηση ή την απόκριση ενός φαρμάκου . Η φαρμακογενωμική εστιάζεται στο χαρακτηρισμό των γονιδιωματικών διαφορών (π.χ. πολυμορφισμών ή διαφορών σε επίπεδα έκφρασης γονιδίων) ανάμεσα στους ανθρώπους και ευθύνεται για τη διαφορετική απόκρισή τους στα φάρμακα. Το πεδίο της φαρμακογενωμικής περιλαμβάνει στοιχεία από τη Φαρμακολογία, τη Γενετική και τη Γονιδιωματική και υπόσχεται να ανοίξει το δρόμο για την Εξατομικευμένη Θεραπεία. [3.1]



[Εικόνα 11]. Επιστήμες όπως αυτή της βιοπληροφορικής , της φαρμακογενωμικής και της γενετικής ανάλυσης συντελούν όλο και περισσότερο στην ανάπτυξη και εφαρμογή της εξατομικευμένης ιατρικής.

Η έννοια της φαρμακογενωμικής άνοιξε το δρόμο στην εξατομικευμένη ιατρική [Εικόνα 11], δηλαδή στη χρήση γονιδιωματικών δεδομένων ενός ασθενούς για την καλύτερη χορήγηση θεραπευτικής αγωγής, τον προσδιορισμό της προδιάθεσης κάποιου ασθενούς σε μια συγκεκριμένη γενετική νόσο, με απώτερο στόχο τη βελτίωση της ποιότητας ζωής και τη μείωση του κόστους της ιατροφαρμακευτικής περίθαλψης. Η φαρμακογενωμική έχει ήδη αρχίσει να εφαρμόζεται στην κλινική πράξη αλλά σε μικρό μόνο βαθμό. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι οι γενετικές εξετάσεις για το γονίδιο HER2/neu σε ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο του μαστού, που χρησιμοποιούνται σήμερα για να προσδιοριστεί αν ο ασθενής θα ανταποκριθεί σε θεραπεία με το φάρμακο Herceptin. [Εικόνα 12]

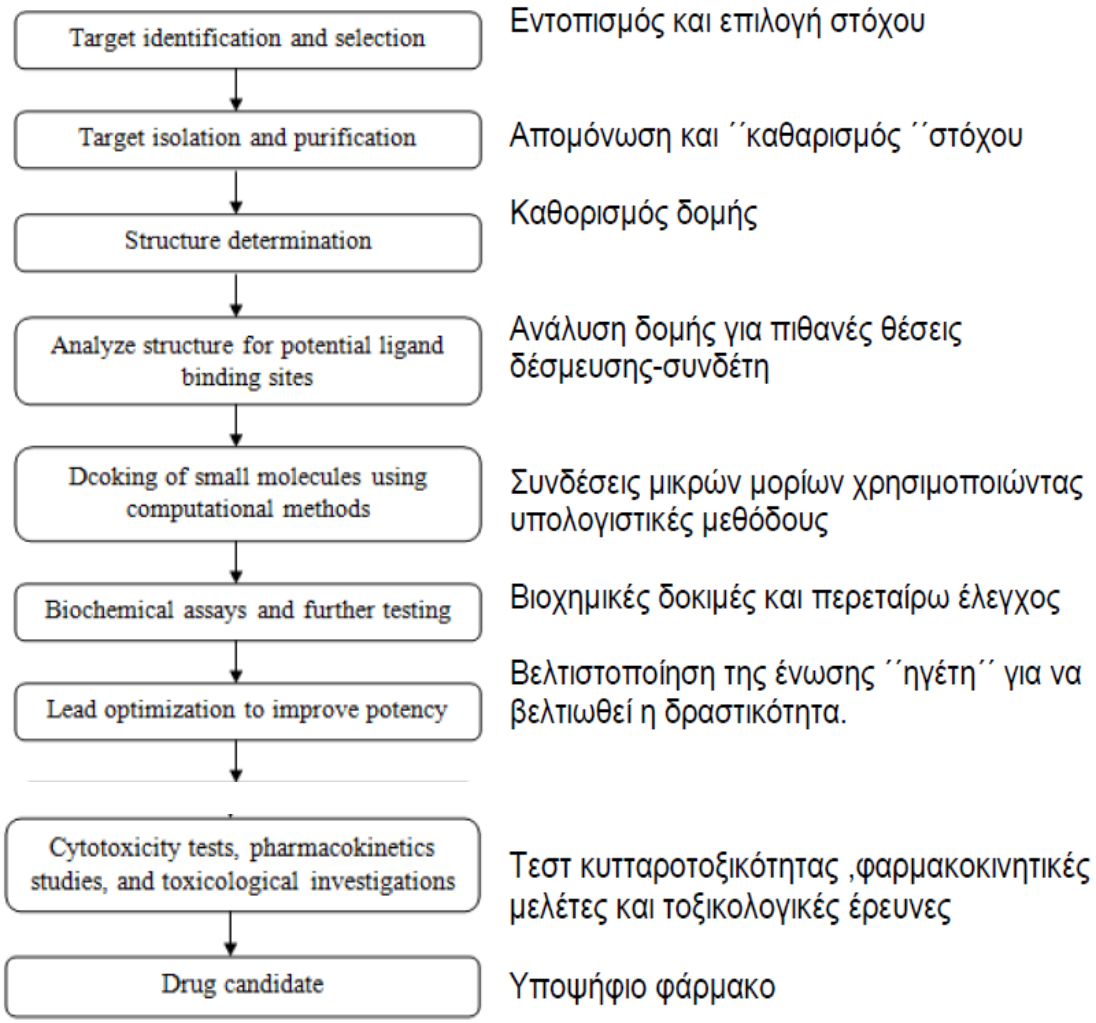
[Εικόνα 12]. Στόχος της φαρμακογενωμικής είναι η γενετική αιτιολογία της διαφορικής ανταπόκρισης ενός ατόμου/ ασθενούς σε μια συγκεκριμένη θεραπευτική αγωγή, με απώτερο σκοπό την επίτευξη εξατομικευμένης θεραπείας.

2.2 Ορισμός των εννοιών της φαρμακογενετικής και της φαρμακογενωμικής και ποιος ο συσχετισμός τους.

Το αντικείμενο της φαρμακογενετικής αφορά τη μελέτη της απόκρισης των ασθενών σε μια θεραπεία σε συνδυασμό με την ύπαρξη κάποιων μεταλλαγών – πολυμορφισμών στο γενετικό τους υλικό. Μέχρι σήμερα έχουν χαρακτηριστεί αρκετές μεταλλάξεις σε ανθρώπινα γονίδια που επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα και/ή την τοξικότητα κάποιων φαρμάκων, ενώ η αναζήτηση νέων αποτελεί ενεργό πεδίο έρευνας.

Τα άτομα φορείς αυτών των μεταλλάξεων μεταβολίζουν με διαφορετικό ρυθμό κάποια φάρμακα. Ασθενείς με αυξημένο μεταβολισμό ενός φαρμάκου χρειάζονται αυξημένη δοσολογία , ενώ αντίθετα οι ασθενείς με αργό μεταβολισμό του φαρμάκου χρειάζονται μικρότερη δοσολογία. Επιπλέον, υπάρχουν και άτομα με γενετική ανεπάρκεια κάποιου ενζύμου , με αποτέλεσμα τη συσσώρευση του φαρμάκου στον οργανισμό και τον κίνδυνο ανεπιθύμητων παρενεργειών όπως η τοξικότητα. Τέλος, στην εποχή μας υπάρχουν θεραπευτικά σκευάσματα τα οποία θεραπεύουν στοχευμένα και

προαπαιτούν τη γνώση της κατάστασης συγκεκριμένων γονιδίων προκειμένου να χορηγηθούν.



[Εικόνα 13].Βήματα της διαδικασίας ανακάλυψης φαρμάκων.

[Εικόνα 13] Η φαρμακογενωμική στοχεύει στην ανάπτυξη ενός ορθολογικού μέσου για τη βελτιστοποίηση της θεραπείας του φαρμάκου , σε σχέση με το γονότυπο των ασθενών , για να διασφαλιστεί η μέγιστη αποτελεσματικότητα με ελάχιστες ανεπιθύμητες ενέργειες. Τέτοιες προσεγγίσεις οδηγούν στην «εξατομικευμένη ιατρική», στην οποία τα φάρμακα και οι συνδυασμοί των φαρμάκων βελτιστοποιείται για το μοναδικό γενετικό κάθε ατόμου. Η αλληλουχία παρέχει πολλά περισσότερα σημεία δεδομένων,

συμπεριλαμβανομένης της ανίχνευσης των μεταλλάξεων που τερματίζουν πρόωρα τη σύνθεση πρωτεΐνης DNA.

Οι όροι φαρμακογενετική και φαρμακογενωμική χρησιμοποιούνται συχνά εναλλάξ και δεν έχουν ακριβώς το ίδιο εννοιολογικό περιεχόμενο. Ο όρος φαρμακογενετική είναι παλαιότερος και συνδέεται περισσότερο με τη μελέτη της συσχέτισης ενός ή περιορισμένου αριθμού γονιδιακών πολυμορφισμών με την ανταπόκριση ενός πληθυσμού ασθενών στη φαρμακοθεραπεία, με τη βοήθεια «κλασικών» τεχνικών μοριακής τεχνικής (π.χ. PCR, RFLP). Ο όρος φαρμακογενωμική είναι ένας νεολογισμός (όπως και άλλες «-ωμικές»), που προέκυψε μετά τη χαρτογράφηση του ανθρώπινου γονιδιώματος και την ανάπτυξη εργαστηριακών και αναλυτικών τεχνικών μεγάλου αριθμού δεδομένων (high through put analysis), π.χ. Microarrays, DNA chips κλπ. [3.2]

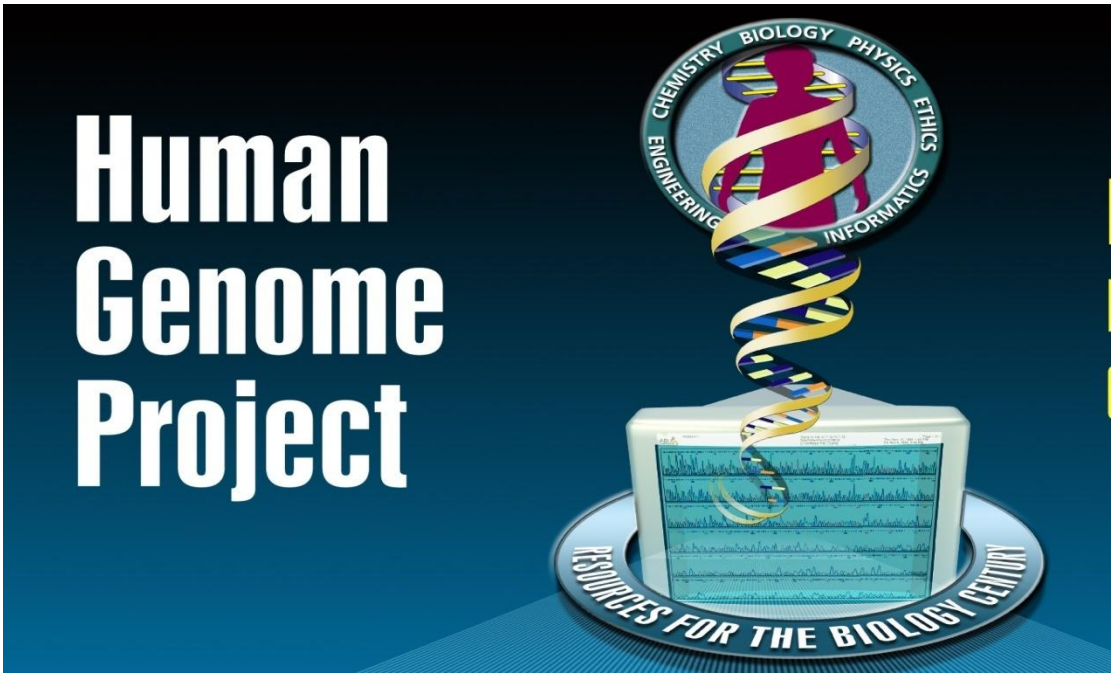
2.4 Human Genome Project : Η πρώτη οργανωμένη απόπειρα καταγραφής των γονιδίων.

Μόλις πριν μισό αιώνα , πολύ λίγα ήταν γνωστά για τους γενετικούς παράγοντες που συμβάλλουν στην ανθρώπινη ασθένεια. Το 1953, ο James Watson και Francis Crick περιέγραψε την δομή της διπλής έλικας του δεσοξυριβονουκλεϊκού οξέος (DNA) , η χημική ένωση που περιέχει τις γενετικές οδηγίες για την κατασκευή , τη λειτουργία και τη διατήρηση ζωντανών οργανισμών. Μέθοδοι για τον προσδιορισμό της παραγγελίας , ή αλληλουχίας, των χημικών γραμμάτων στο DNA αναπτύχθηκαν στα μέσα της δεκαετίας του 1970 . Το 1970 , τα Εθνικά Ινστιτούτα Υγείας (NIH) και το Υπουργείο Ενέργειας ενώνονται με τους διεθνής εταίρους σε μια προσπάθεια για την ακολουθία και τα 3 δισεκατομμύρια γράμματα ,ή ζεύγη βάσεων, στον ανθρώπινο γονιδίωμα, το οποίο είναι το πλήρες σύνολο του DNA στο ανθρώπινο σώμα. Αυτή η συντονισμένη, δημόσια προσπάθεια ήταν το Πρόγραμμα του Ανθρώπινου Γονιδιώματος. Στόχος της Human Genome Project ήταν να παρέχει στους ερευνητές ισχυρά εργαλεία για την κατανόηση

των γενετικών παραγόντων στην ανθρώπινη ασθένεια, ανοίγοντας το δρόμο για νέες στρατηγικές για τη διάγνωση , τη θεραπεία και την πρόληψη τους. Όλα τα δεδομένα που παράγονται από το Πρόγραμμα του Ανθρώπινου Γονιδιώματος έγιναν ελεύθερα και γρήγορα διαθέσιμα στο Διαδίκτυο, κάτι που εξυπηρέτησε στην επιτάχυνση του ρυθμού της ιατρικής ανακάλυψης σε όλο τον κόσμο. Το έργο του Ανθρώπινου Γονιδιώματος δημιούργησε μια επανάσταση στον τομέα της βιοτεχνολογίας και της καινοτομίας σε όλο τον κόσμο και έπαιξε καθοριστικό ρόλο στο να καταστεί η ΗΠΑ , ο παγκόσμιος ηγέτης στον τομέα της νέας βιοτεχνολογίας. Τον Απρίλιο του 2003 , οι ερευνητές ολοκλήρωσαν με επιτυχία το Πρόγραμμα του Ανθρωπίνου Γονιδιώματος, στο πλαίσιο του προϋπολογισμού δύο χρόνια πριν από το χρονοδιάγραμμα. [3.3]

Το Πρόγραμμα του Ανθρώπινου Γονιδιώματος αρχικά είχε ως στόχο να χαρτογραφήσει τα νουκλεοτίδια που περιέχονται σε ένα ανθρώπινο απλοειδές γονιδίωμα αναφοράς (πάνω από 3 δισεκατομμύρια). [Εικόνα 14]

Η νέα αναλυτική τεχνολογία που προέκυψε με στόχο την αποκωδικοποίηση αλλά πρωτίστως τα στοιχεία που προκύπτουν από το HPG δημιουργούν σύνθετα ηθικά και κοινωνικά ζητήματα για τα άτομα και την κοινωνία. Αυτές οι προκλήσεις περιλαμβάνουν τη μυστικότητα, τη δικαιοσύνη στην πρόσβαση και χρήση των γενετικών πληροφοριών κ.α. Για το λόγο αυτό, προγράμματα που προσδιορίζουν και εξετάζουν τις επιπτώσεις από τέτοιου είδους στοιχεία, αποτελούν ένα αναπόσπαστο τμήμα του HGP ενώ έχουν πρότυπο για προγράμματα βιοηθικής παγκοσμίως.



[Εικόνα 14] Το Human Genome Project αποτελεί μια διεθνής ερευνητική προσπάθεια χαρτογράφησης κάθε ανθρώπινου γονιδίου και αλληλουχίας των 3 δις βάσεων που συνιστούν το ανθρώπινο DNA .

Οι πρώτες «πανοραμικές απόψεις» του ανθρώπινου γονιδιώματος έχουν αποκαλύψει μια πληθώρα πληροφοριών και κάποιες εκπλήξεις. Κάποια ενδεικτικά στοιχεία δίνονται στη συνέχεια.

Το ανθρώπινο γονιδίωμα περιέχει 3 δισεκατομμύρια νουκλεοτιδικές βάσεις (A,C,T και G).

Το μέσο γονίδιο αποτελείται από 3.000 βάσεις , αλλά υπάρχει μεγάλη ποικιλία στα μεγέθη με το μεγαλύτερο γνωστό γονίδιο να αποτελείται από 2.400.000 βάσεις . Πάνω από το 50% των γνωστών γονιδίων έχει ακόμα άγνωστες λειτουργίες . Το ανθρώπινο γονιδίωμα είναι στη συντριπτική πλειοψηφία (99,9%) ακριβώς το ίδιο σε όλους τους ανθρώπους. Περίπου το 2% του γονιδιώματος κωδικοποιεί πρωτεΐνες. Οι επαναλαμβανόμενες

ακολουθίες, που δεν κωδικοποιούν πρωτεΐνες αποτελούν πάνω από 50% του ανθρώπινου γονιδιώματος.

Το ανθρώπινο γονιδίωμα έχει σημαντικά μεγαλύτερο ποσοστό επαναλαμβανομένων ακολουθιών (50%) σε σχέση με άλλους οργανισμούς-μοντέλα όπως ο σκώληκας (7%) και η δροσόφιλα (3%).

Πάνω από 40% των προβλεπόμενων ανθρώπινων πρωτεϊνών έχουν ομοιότητες με τις πρωτεΐνες στη δροσόφιλα ή στο σκώληκα.

Τα γονίδια εμφανίζονται να συγκεντρώνονται σε τυχαίες περιοχές του γονιδιώματος, με μεγάλα διαστήματα μη κωδικοποιημένων περιοχών μεταξύ τους. Το χρωμόσωμα 1 (το μεγαλύτερο ανθρώπινο χρωμόσωμα) έχει το μεγαλύτερο αριθμό γονιδίων (2968), και το χρωμόσωμα Y έχει το μικρότερο πλήθος (231).

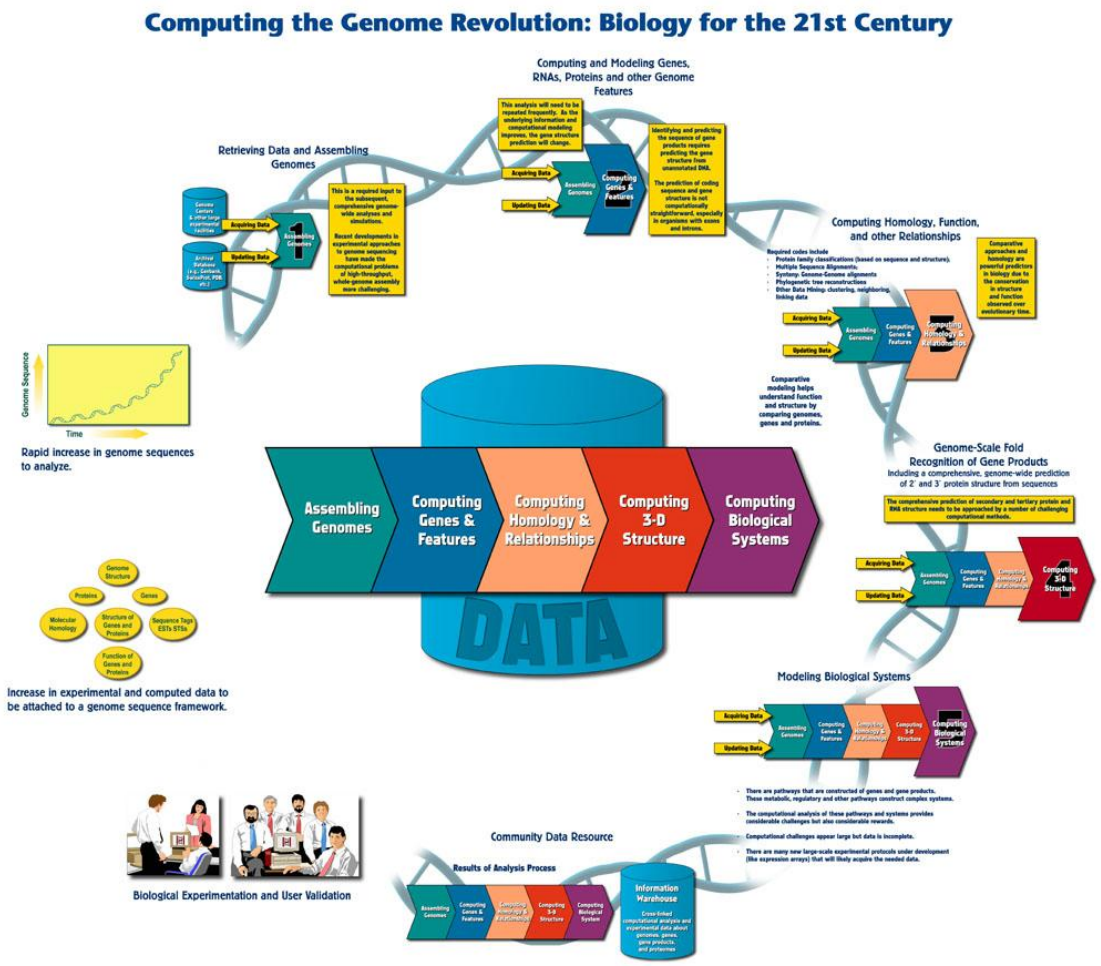
Έχουν εντοπιστεί συγκεκριμένες ακολουθίες σε συγκεκριμένα γονίδια που έχουν συσχετισθεί με ασθενείς (π.χ. καρκίνος του μαστού, μυασθένειες, κώφωση κ.τ.λ.).

Έχουν ανακαλυφθεί περίπου 3.000.000 θέσεις όπου εντοπίζονται διαφοροποιήσεις μιας βάσης DNA μεταξύ διαφορετικών ανθρώπων [Εικόνα 15]. Οι θέσεις αυτές είναι ιδιαίτερα σημαντικές καθώς αναμένεται να βοηθήσουν σημαντικά στην εύρεση ακολουθιών που σχετίζονται με ασθένειες όπως οι καρδιοαγγειακές παθήσεις, ο διαβήτης, ο καρκίνος.

Τα δεδομένα που δημοσιεύονται από το HGP δεν αντιπροσωπεύουν την ακριβή ακολουθία γονιδιώματος κάθε ατόμου. Είναι το συνδυασμένο γονιδίωμα ενός μικρού αριθμού ανωνύμων δοτών. Το IHGSC διεθνούς δημοσίου-τομέα Πρόγραμμα του Ανθρώπινου Γονιδιώματος (HGP) , οι ερευνητές συνέλεξαν αίμα (θηλυκό) ή σπέρμα (αρσενικό) για δείγματα από

έναν μεγάλο αριθμό δωρητών. Μόνο μερικά απλό τα πολλά δείγματα που συλλέχθηκαν χρησιμοποιήθηκαν ως πηγή DNA . Έτσι, οι ταυτότητες του δότη προστατεύονται ώστε ούτε ο δότης ούτε οι επιστήμονες θα μπορούσαν να γνωρίζουν το DNA του δότη ή την αλληλουχία αυτού.

Οι επιστήμονες της HGP χρησιμοποίησαν τα λευκά κύτταρα του αίματος από το αίμα δύο αντρών και δύο γυναικών δοτών (που επιλέγονται τυχαία από 20 άντρες και γυναίκες αντίστοιχα)-κάθε δότη δίνοντας μια ξεχωριστή βιβλιοθήκη DNA . Μία από αυτές τις βιβλιοθήκες (RP11) χρησιμοποιήθηκε πολύ περισσότερο από άλλους , λόγω των ζητημάτων της ποιότητας . Ένα μικρό τεχνικό ζήτημα είναι ότι τα αρσενικά δείγματα περιέχουν μόλις πάνω από το μισό DNA από τα φυλετικά χρωμοσώματα (ένα χρωμόσωμα X και ένα Y χρωμόσωμα) σε σύγκριση με δείγματα γυναικών (οι οποίες περιέχουν 2 χρωμοσώματα X). Τα υπόλοιπα 22 χρωμοσώματα (τα αυτοσωματικά) είναι ίδια και για τα δύο φύλλα.



[Εικόνα 15]. Καταγράφοντας την εξέλιξη του γονιδιώματος τον 21^{ο} αιώνα ξεκινάμε με τη συναρμολόγηση των γονιδιωμάτων , την καταγραφή των γονιδίων και των χαρακτηριστικών τους, τον υπολογισμό της ομολογίας και σχέσεις μεταξύ των γονιδιωμάτων ,στη συνέχεια τη 3D δομή των γονιδιωμάτων και τέλος τον υπολογισμό του βιολογικού συστήματος.

Οι ακολουθίες του ανθρώπινου γονιδιώματος είναι αποθηκευμένες σε βάσεις δεδομένων που είναι ελεύθερα διαθέσιμες μέσω διαδικτύου. Οι 3 μεγαλύτερες βάσεις νουκλεοτιδικών δεδομένων που είναι ελεύθερα διαθέσιμες είναι η DNA Data Bank of Japan (DDBJ) στο Center Information Biology (CIB) , η Gen Bank στο National Center for Biotechnology Information (NCBI) και η EMBL Bank στο European Bioinformatics Institute (EBI).

Η συνεργασία μεταξύ των βάσεων περιλαμβάνει τη δημιουργία κοινών κανόνων για την ταξινόμηση και το σχολιασμό των δεδομένων και την καθημερινή ανταλλαγή των εγγράφων που κατατίθενται ανεξάρτητα σε κάθε βάση δεδομένων. Αν και οι γονιδιωματικές ακολουθίες αποτελούν καταχωρήσεις σε νουκλεοτιδικές βάσεις δεδομένων, για πολλά είδη έχουν αναπτυχθεί ειδικές βάσεις δεδομένων που συνδυάζουν τα δεδομένα των γονιδιωματικών ακολουθιών και το σχολιασμό τους με άλλα στοιχεία για τα συγκεκριμένα είδη. Οι βάσεις δεδομένων αυτές παρουσιάζουν μια ποικιλομορφία όσον αφορά στο είδος και στον τρόπο αποθήκευσης των δεδομένων.

Ο Genomes Server παρέχει πρόσβαση σε εκατοντάδες γονιδιώματα από αρχαία, βακτήρια, ευκαρυώτικους οργανισμούς, φάγους, πλασμίδια και ιούς.

Το πρόγραμμα Ensembl , που αποτελεί συνεργασία του EBI και του Welcome Trust Sanger Institute, στοχεύει στην ανάπτυξη ενός συστήματος αυτόματου σχολιασμού μεγάλων ευκαρυώτικων γονιδιωμάτων.

Το Entrez Genomes παρέχει πρόσβαση σε δεδομένα πλήθους γονιδιωμάτων.

Η διαδικασία εύρεσης των ορίων των γονιδίων και άλλων χαρακτηριστικών γνωρισμάτων καλείται σχολιασμός γονιδιώματος και είναι επιστημονικό πεδίο της βιοπληροφορικής. Ενώ ο σχολιασμός από ειδικούς βιολόγους είναι ο πιο ακριβής λόγω μεγάλου όγκου δεδομένων χρησιμοποιούνται όλο και περισσότερο προγράμματα υπολογιστών. Οι καλύτερες μεθοδολογίες για το σχολιασμό χρησιμοποιούν στατιστικά μοντέλα που αξιοποιούν συσχετίσεις μεταξύ των ακολουθιών DNA και της ανθρώπινης γλώσσας, χρησιμοποιώντας έννοιες από την πληροφορική οι οποίες εφαρμόζονται και στην ανάλυση κειμένων.

Η διαδικασία της «ερμηνείας» του ανθρωπίνου γονιδιώματος είναι ακόμα στα αρχικά της στάδια. Αναμένεται πάντως ότι η λεπτομερής γνώση του γονιδιώματος θα ανοίξει νέους ορίζοντες για την ιατρική και τη βιοτεχνολογία.

Ήδη πρακτικά αποτελέσματα προέκυψαν πριν ακόμα την ολοκλήρωση της αποκωδικοποίησης. Αφορούσαν στην πραγματοποίηση γενετικών τεστ που μπορούσαν να δείξουν προδιάθεση για ένα πλήθος ασθενειών. Επίσης η πληροφορία από το γονιδίωμα αναμένεται να βοηθήσει στην καλύτερη κατανόηση ασθενειών όπως Alzheimer και μακροπρόθεσμα να βοηθήσει στην καλύτερη αντιμετώπισή τους.

Ο προσδιορισμός της αλληλουχίας του ανθρώπινου γονιδιώματος κατέχει οφέλη για πολλά πεδία, από το μοριακό φάρμακο για ανθρώπινη εξέλιξη. Το Πρόγραμμα του Ανθρώπινου Γονιδιώματος , μέσω της αλληλουχίας του DNA , μπορεί να μας βοηθήσει να κατανοήσουμε τις ασθένειες όπως οι εξής : ο προσδιορισμός του γονότυπου των συγκεκριμένων ιών για να κατευθύνουν την κατάλληλη θεραπεία, η ταυτοποίηση των ογκογονιδίων και οι μεταλλάξεις που συνδέονται με διάφορες μορφές καρκίνου, το σχεδιασμό των φαρμάκων , την πιο ακριβή πρόβλεψη των αποτελεσμάτων τους, την πρόοδο στην ιατροδικαστική, τις εφαρμοσμένες επιστήμες βιοκαυσίμων και άλλων εφαρμογών την ενέργειας, τη γεωργία, την κτηνοτροφία, την ανθρωπολογία. Με την αναζήτηση στη βάση δεδομένων του γονιδιώματος ο ερευνητής μπορεί να εξετάσει ποιοι άλλοι επιστήμονες έχουν μελετήσει αυτό το γονίδιο σχετικά με τη λειτουργία του, τις εξελικτικές σχέσεις του με άλλα ανθρώπινα γονίδια , ή με γονίδια άλλων ανθρώπινων οργανισμών , σχετικά με πιθανές καταστρεπτικές μεταλλάξεις, ή σχετικά με ασθένειες με τις οποίες σχετίζεται.

Ένα άλλο προτεινόμενο όφελος είναι η εμπορική ανάπτυξη της γονιδιωματικής έρευνας που σχετίζεται με τα προϊόντα με βάση το DNA, μια βιομηχανία πολλών δισεκατομμυρίων δολαρίων.

Η ανάλυση των ομοιοτήτων μεταξύ των ακολουθιών DNA διαφορετικών οργανισμών ανοίγει επίσης νέους ορίζοντες στη μελέτη της θεωρίας της Εξέλιξης.

Πολλές ερωτήσεις σχετικά με τις ομοιότητες και τις διαφορές μεταξύ του ανθρώπου και άλλων οργανισμών αναμένεται να αποσαφηνιστούν από τα αποτελέσματα του συγκεκριμένου προγράμματος.

Το «γονιδίωμα» οποιουδήποτε ατόμου είναι μοναδικό. Χαρτογραφώντας το «ανθρώπινο γονιδίωμα» περιλαμβάνει πολλαπλές παραλλαγές αλληλουχίας του κάθε γονιδίου. Η έρευνα δε μελέτησε το σύνολο του DNA που βρέθηκε σε ανθρώπινα κύτταρα, ορισμένες heterochromatic περιοχές (περίπου το 8% του συνολικού γονιδιώματος) παραμένουν απροσδιόριστες.

Η διαθεσιμότητα των προηγμένων γενότυπων τσιπ , που περιέχουν σύνολα του αριθμού των SNPs παρέχει καλή κάλυψη του ανθρώπινου γονιδιώματος , μπορεί να χρησιμοποιηθεί για χιλιάδες περιπτώσεις και μελέτες ελέγχου για την εξερεύνηση της βάσης των πολύπλοκων χαρακτηριστικών.

Αν και η κύρια φάση της αλληλουχίας του HGP έχει ολοκληρωθεί , οι μελέτες της μεταβολής του DNA συνεχίζονται και στο Διεθνές HapMap Project , του οποίου ο στόχος είναι να προσδιοριστούν τα πρότυπα του μονού-νουκλεοτιδίου πολυμορφικού (SNP) γκρουπ (που ονομάζονται απλότυπα, ή “haps”). [3.4]

Βιβλιογραφία

[3.1] http://www.pev.gr/index.php/2008-12-28-20-00-01/2009-03-06-06-56-27/101-2009-03-30-19-52-01

[3.2] http://www.med.auth.gr/depts/bpp/lessons/2013-2014/Goulas_22-1-2014.pdf

[3.3] http://report.nih.gov/nihfactsheets/ViewFactSheet.aspx?csid=45

[3.4] http://en.wikipedia.org/wiki/Human_Genome_Project

Κεφάλαιο 3^{ο} Εισαγωγή στα Εργαλεία Λογισμικού.

Με την ολοκλήρωση του Προγράμματος του Ανθρώπινου Γονιδιώματος ένα πλήθος δεδομένων έδωσε τροφή στην έρευνα και αποτέλεσε πηγή πληροφοριών. Ο όγκος των σημερινών δεδομένων που παράγονται στο χώρο της Μοριακής Βιολογίας και πρέπει να αναλυθούν και να επεξεργαστούν καθιστά απαραίτητη τη συνεργασία, σε πολλούς τομείς, με την επιστήμη της Πληροφορικής. Ο χώρος της ένωσης αυτών των πεδίων ονομάζεται

Βιοπληροφορική (Bioinformatics). Η Βιοπληροφορική λοιπόν μπορεί να οριστεί ως το επιστημονικό πεδίο το οποίο ασχολείται με την ανάπτυξη και την εφαρμογή υπολογιστικών τεχνικών για τη συλλογή και τη διαχείριση ιατρικών δεδομένων καθώς και τη χρήση τους στην πρόβλεψη και προσομοίωση ιολογικών διεργασιών. Η δημιουργία εξειδικευμένων ιολογικών άσεων δεδομένων , η ανάπτυξη εργαλείων πρόβλεψης της δομή γονιδίων και πρωτεϊνών , η υλογενετική ανάλυση και η σύνδεση με κλινικά δεδομένα είναι μερικοί από τους τομείς τους οποίους καλύπτει. Αντικείμενο της παρούσας εργασίας είναι η πολλαπλή στοίχιση ακολουθιών (multiple sequence alignment) σε ελεγχόμενης παραγωγής πρωτεϊνικά δεδομένα , η οποία αποτελεί σημαντικό πεδίο έρευνας της επιστήμης της Βιοπληροφορικής. Το πεδίο αυτό της έρευνας αναπτύχθηκε με στόχο τη στοίχιση ακολουθιών νουκλεϊκών οξέων ή πρωτεϊνών. Η στοίχιση ακολουθιών είναι η διαδικασία σύγκρισης δύο (pairwise alignment) ή περισσοτέρων (multiple alignment) ακολουθιών η οποία αναζητά χαρακτήρες που εμφανίζονται με την ίδια σειρά στις συγκρινόμενες ακολουθίες. Είναι πολύ σημαντικό η στοίχιση να είναι όσο το δυνατόν βέλτιστη προκειμένου να εξαχθούν συμπεράσματα για τη δομή, τη λειτουργικότητα και την εξέλιξη των ιολογικών ακολουθιών.

3.1 Ακολουθιακές μέθοδοι.

Η στοίχιση ακολουθιών είναι η διαδικασία σύγκρισης δύο ή περισσοτέρων ακολουθιών η οποία αναζητά χαρακτήρες που εμφανίζονται με τη ίδια σειρά στις συγκρινόμενες ακολουθίες. Ο λόγος για τον οποίο πραγματοποιείται η στοίχιση ακολουθιών είναι η εξαγωγή συμπερασμάτων για τη δομή, τη λειτουργικότητα και την εξέλιξη των ιολογικών ακολουθιών. Πιο συγκεκριμένα η ομοιότητα μεταξύ των ακολουθιών μπορεί να συνεπάγεται την ίδια λειτουργία ή τον ίδιο ρυθμιστικό ρόλο , στην περίπτωση των ακολουθιών νουκλεϊκών οξέων και την ίδια βιοχημική λειτουργία ή την ίδια τριτοταγή δομή , στην περίπτωση των πρωτεϊνών. Όταν οι συγκρινόμενες ακολουθίες προέρχονται από διαφορετικούς οργανισμούς η ενδεχόμενη ομοιότητά τους οδηγεί στο συμπέρασμα της κοινής καταγωγής τους, ενώ ο αριθμός ομοιότητάς τους καθορίζει τη θέση τους στο αντίστοιχο υλογενετικό δέντρο .[4.1] Έτσι λοιπόν με τη διαδικασία της στοίχισης επιδιώκεται η

εύρεση των θεμελιωδών αλλαγών που συνέβησαν κατά τη διάρκεια της απόκλισης από το κοινό προγονικό μόριο. Οι αλλαγές αυτές μπορούν να εμφανιστούν ως αντικαταστάσεις (substitutions) , προσθήκες (inserts), και εξαλείψεις (deletes). Στην ιδανική περίπτωση κατά την οποία μια στοίχιση απεικονίζει πραγματικά την εξελικτική ιστορία δύο ακολουθιών , τα κατάλοιπα (residues) που έχουν στοιχηθεί αλλά δεν είναι ταυτόσημα , αντιπροσωπεύουν τις αντικαταστάσεις. Οι περιοχές όπου τα κατάλοιπα μιας ακολουθίας δεν έχουν στοιχηθεί με κατάλοιπα της άλλης ερμηνεύονται είτε ως προσθήκη στη μία ακολουθία είτε ως εξάλειψη στην άλλη και εμφανίζονται ως κενά (gaps). Αυτά τα κενά παρουσιάζονται συνηθέστερα στις στοιχίσεις ως διαδοχικές παύλες στοιχισμένες με τους υπόλοιπους χαρακτήρες [Εικόνα 16]

```
G-G--GF-DAAKFSTS
G-GSTGVR---K-S-S
GAGSTGVRDTAK--TS
```

[Εικόνα 16] Πολλαπλή στοίχιση ακολουθιών.

Η απόφαση για το αν θα θεωρηθούν δύο χαρακτήρες ταυτόσημοι ή παρόμοιοι , ή για το αν θα πρέπει να τοποθετηθεί ένα κενό σε κάποια θέση λαμβάνεται με τη βοήθεια μιας μαθηματικής συνάρτησης η οποία ονομάζεται αντικειμενική συνάρτηση (objective function, OF). Ουσιαστικά η συνάρτηση αυτή καθορίζει τον τρόπο με τον οποίο θα πραγματοποιηθεί η στοίχιση . Ορίζεται με τέτοιο τρόπο ώστε να ενσωματώνει πληροφορίες για τις ακολουθίες, δηλαδή στοιχεία που αφορούν τη δομή τους, τη λειτουργία τους και κυρίως την εξελικτική τους ιστορία .[4.2] Η επιλογή μιας τέτοιας συνάρτησης έχει ως σκοπό μια βέλτιστη στοίχιση από μαθηματικής πλευράς να ανταποκρίνεται σε μια βέλτιστη στοίχιση ιολογικής πλευράς. Στην πραγματικότητα είναι δύσκολο να ενσωματώσει όλες τις παραπάνω πληροφορίες και περιορίζεται σε στοιχεία που αφορούν την ομοιότητα της

πρωτοταγούς δομής των ακολουθιών. Η πιο συνηθισμένη συνάρτηση ακολουθεί το μοντέλο σύμφωνα με το οποίο κάθε ζεύγος καταλοίπων . Έτσι σε συχνά παρατηρούμενες μεταλλάξεις που δε συμβαίνουν συχνά αποδίδονται αρνητικές τιμές. Οι πίνακες αντικατάστασης (substitution matrices) είναι αυτοί οι οποίοι περιέχουν αυτές τις τιμές . Η στοίχιση μπορεί να είναι τοπική ή ολική. Στην περίπτωση της τοπικής , η στοίχιση εκτείνεται μόνο στις περιοχές στις οποίες ο αριθμός ομοιότητας είναι μεγάλος αγνοώντας τις υπόλοιπες περιοχές . Αντίθετα αν η στοίχιση είναι ολική εκτείνεται σε όλο το μήκος των ακολουθιών προκειμένου να βρεθούν όσο το δυνατόν περισσότεροι ταυτόσημοι ή όμοιοι χαρακτήρες [Εικόνα 17] . Μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε σε δύο ακολουθίες είτε σε μια ομάδα ακολουθιών.

Ολική (Global)	Τοπική (Local)
FGK-GKG	---FGKGKG
FGKFGKG	FGKFGKG--

[Εικόνα 17] Παράδειγμα ολικής και τοπικής στοίχισης

3.2 Αλγόριθμοι σύγκρισης ακολουθιών

Ένα από τα βασικά εργαλεία που χρησιμοποιούν οι ακολουθιακές μέθοδοι είναι οι αλγόριθμοι σύγκρισης ακολουθιών.

3.2.1 Αλγόριθμοι ταιριάσματος προτύπου

Η απλοϊκή προσέγγιση αναζήτησης ενός προτύπου –pattern P μήκους n σε ένα κείμενο ή βιολογική ακολουθία X μήκους m , στοιχίζει το πρότυπο στην πρώτη θέση της ακολουθίας και εξετάζει έναν προς ένα ν τους χαρακτήρες του προτύπου. Σε περίπτωση μη ταιριάσματος-mismatch , η σύγκριση ξαναρχίζει με μετατόπιση του προτύπου κατά μία θέση. Η απλοϊκή αυτή προσέγγιση στοιχίζει O(n*m) χρόνο. Παραπάνω φαίνεται μια Απλοϊκή Προσέγγιση Αναζήτησης Προτύπου.

```
void Naïve-Method (char *x, int m, char *y, int n) {

int i,j;


for (j=0; j<=n-m; ++j) {

 for (i=0; i<m && x[i]==y[i+j]; ++i);

 if i>=m

 output(j);

}

}
```

Μια σχηματική απεικόνιση αυτής της απλοϊκής μεθόδου φαίνεται στο ακόλουθο σχήμα :

g c a t g c a g a g a g t a t a c a g t a c g

1 2 3 4

g c a g a g a g

Βήμα 1: Στο πρώτο βήμα παρατηρούμε ότι έχουμε διαφορετικό

χαρακτήρα στην 4η θέση οπότε και το πρότυπο μμεταφέρεται κατά 1 θέση δεξιά.

g c a t g c a g a g a g t a t a c a g t a c g

1

g c a g a g a g

Βήμα 2: Στο δεύτερο βήμα παρατηρούμε ότι έχουμε διαφορετικό

χαρακτήρα από την 1η θέση οπότε και το πρότυπο μμεταφέρεται κατά 1

θέση δεξιά. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται και για το 3ο, και 4ο βήμα.

g c a t g c a g a g a g t a t a c a g t a c g

1 2 3 4 5 6 7 8

g c a g a g a g

Βήμα 5: Στο πέμπτο βήμα παρατηρούμε ότι έχουμε ταίριασμα και των 8 χαρακτήρων του προτύπου. Οπότε η πρώτη εμφάνιση του προτύπου είναι στην θέση Χ5 . Στη συνέχεια η διαδικασία συνεχίζεται μετατοπίζοντας σε κάθε βήμα το πρότυπο κατά 1 θέση δεξιά.

Δοθείσης μιας συμβολοσειράς S n χαρακτήρων και ενός προτύπου αναγνώρισης P m χαρακτήρων , θέλουμε να δούμε αν το P περιέχεται μέσα στην S και αν αυτό συμβαίνει, σε ποια θέση.

Κριτήριο αποδοτικότητας είναι ο αριθμός των συγκρίσεων που πρέπει να γίνουν. Υπάρχουν δύο κατηγορίες τέτοιων αλγορίθμων: οι *Αλγόριθμοι Ακριβούς Ταιριάσματος Προτύπου* και οι *Αλγόριθμοι Προσεγγιστικού Ταιριάσματος Προτύπου.*

Στο ακριβές ταίριασμα προτύπου ενδιαφερόμαστε να εντοπίσουμε όλες τις εμφανίσεις ενός δοσμένου προτύπου (μοτίβου) P(«δομημένου» ή «μη δομημένου») σε μια συμβολοσειρά (βιολογική αλληλουχία) S. Ενώ

Κριτήριο αποδοτικότητας είναι ο αριθμός των συγκρίσεων που πρέπει να γίνουν. Υπάρχουν δύο κατηγορίες τέτοιων αλγορίθμων : οι Αλγόριθμοι Ακριβούς Ταιριάσματος Προτύπου και οι Αλγόριθμοι Προσεγγιστικού Ταιριάσματος Προτύπου .

Στο ακριβές ταίριασμα προτύπου ενδιαφερόμαστε να εντοπίσουμε όλες τις εμφανίσεις ενός δοσμένου προτύπου (μοτίβου) P («δομημένου» ή «μη δομημένου») σε μια συμβολοσειρά (βιολογική αλληλουχία S. Ενώ στο προσεγγιστικό ταίριασμα προτύπου έχουμε : Για ένα κείμενο S, ένα μοτίβο P, μια παράμετρο k και μια συνάρτηση ομοιότητας d( ), εντόπισε τις θέσεις i , j στο κείμενο, έτσι ώστε d(P,Si..j)<=k.

Αλγόριθμοι ακριβούς ταιριάσματος είναι η απλοϊκή μέθοδος (naive method), οι αλγόριθμοι Boyer-Moore, Knuth-Moris-Pratt, Brute-force, Shift Or/ Shift And και το αυτόματο Aho-Corasick.

3.2.2 Αλγόριθμοι Ευθυγράμμισης Ακολουθιών – Sequence Alignment Algorithms

Ευθυγράμμιση (ή στοίχιση) ακολουθιών είναι η διαδικασία σύγκρισης τους για εύρεση ατομικών χαρακτήρων ή προτύπων χαρακτήρων με την ίδια σειρά στις δύο (ή περισσότερες) ακολουθίες . Πανομοιότυποι χαρακτήρες τοποθετούνται στην ίδια στήλη ενώ μη όμοιοι χαρακτήρες μπορούν να τοποθετούνται στην ίδια στήλη δηλώνοντας mismatch ή απέναντι από κενό . Υπάρχουν παραπάνω από μία δυνατές ευθυγραμμίσεις. Η βέλτιστη λύση πρέπει να ελαχιστοποιεί τις διαφορές ανάμεσα στις ακολουθίες ή διαφορετικά να μεγιστοποιεί τη συνάρτηση ομοιότητας. Η διαδικασία αυτή στηρίζεται σε πίνακες που βαθμολογούν ομοιότητες (matches) και διαφορές(mismatches) μεταξύ διαδοχικών συμβόλων . Τέτοιου τύπου πίνακες είναι οι Dayhoff PAM, BLOSUM κτλ.

Για πολύ λίγες ακολουθίες γνωρίζουμε τη δομή και τη λειτουργία τους. Η ευθυγράμμιση μας παρέχει λειτουργικές, δομικές και εξελικτικές πληροφορίες . Μπορούμε να ευθυγραμμίσουμε δύο ακολουθίες και αν είναι αρκετά όμοιες πιθανόν να έχουν τον ίδιο πρόγονο , επίσης πιθανόν να έχουν την ίδια δομή και λειτουργία οι οργανισμοί. Αν για μία από τις ακολουθίες γνωρίζουμε δομή και λειτουργία και την έχουμε ευθυγραμμίσει με μια άγνωστη ακολουθία μπορούμε να εξάγουμε παρόμοια συμπεράσματα και για την άγνωστη. Με την ίδια λογική είναι δυνατός και ο εντοπισμός μεταλλάξεων στα γονίδια , πράγμα πολύ σημαντικό , ιδιαίτερα για τη νόσο του καρκίνου.

Μπορούμε να έχουμε ολική ευθυγράμμιση (global alignment) ή τοπική ευθυγράμμιση (local alignment). Στην ολική ευθυγράμμιση , η ευθυγράμμιση γίνεται σε όλο το πεδίο της ακολουθίας και συμπεριλαμβάνει όσα περισσότερα matching ζευγάρια μπορεί.

Περιοχές με υψηλή τοπική ομοιότητα αγνοούνται για να επιτευχθεί μεγαλύτερη ολική βαθμολογία. Χαρακτηριστικός αλγόριθμος ολικής ευθυγράμμισης είναι ο Needleman &Wunsch. Στην τοπική ευθυγράμμιση αναζητούμε περιοχές τοπικής ομοιότητας . Η ευθυγράμμιση αυτή σταματά στις περιοχές που είναι ταυτόσημες ή που έχουν μεγάλη ομοιότητα και δίδεται μεγαλύτερη προτεραιότητα στην εύρεση τέτοιων περιοχών δηλαδή προτύπων (patterns) χαρακτήρων παρά για την εύρεση ατομικών ταυτίσεων χαρακτήρων. Αλγόριθμος τοπικής ευθυγράμμισης είναι ο Smith-Waterman.

3.3 Αλγόριθμοι Ευθυγράμμισης Πολλαπλών Ακολουθιών

Η ιδέα της ευθυγράμμισης περισσοτέρων των 2 ακολουθιών οδήγησε στην ανάπτυξη αυτών των αλγορίθμων και αποτελεί φυσική γενίκευση της ευθυγράμμισης 2 ακολουθιών.[4.2]

Οι αλγόριθμοι FASTA , BLAST και CLUSTALw είναι οι χαρακτηριστικότεροι αλγόριθμοι ευθυγράμμισης πολλαπλών ακολουθιών. Η ταχύτητά τους (περίπου 50 φορές ταχύτεροι από τους αλγόριθμους ολικής ευθυγράμμισης που προαναφέραμε) τους καθιστά και ένα σπουδαίο εργαλείο ταχείας αναζήτησης βιολογικών βάσεων δεδομένων.

Γενικότερα η Ευθυγράμμιση Πολλαπλών Ακολουθιών χρησιμοποιείται για

1) την αναγνώριση και αναπαράσταση πρωτεϊνικών οικογενειών και υπεροικογενειών.

2) στην αναπαράσταση των χαρακτηριστικών που μεταφέρονται στις ακολουθίες DNA ή στις πρωτεϊνικές ακολουθίες και

3) στην αναπαράσταση την εξελικτικής ιστορίας (φυλογενετικά δέντρα) από ακολουθίες DNA ή πρωτεϊνών.

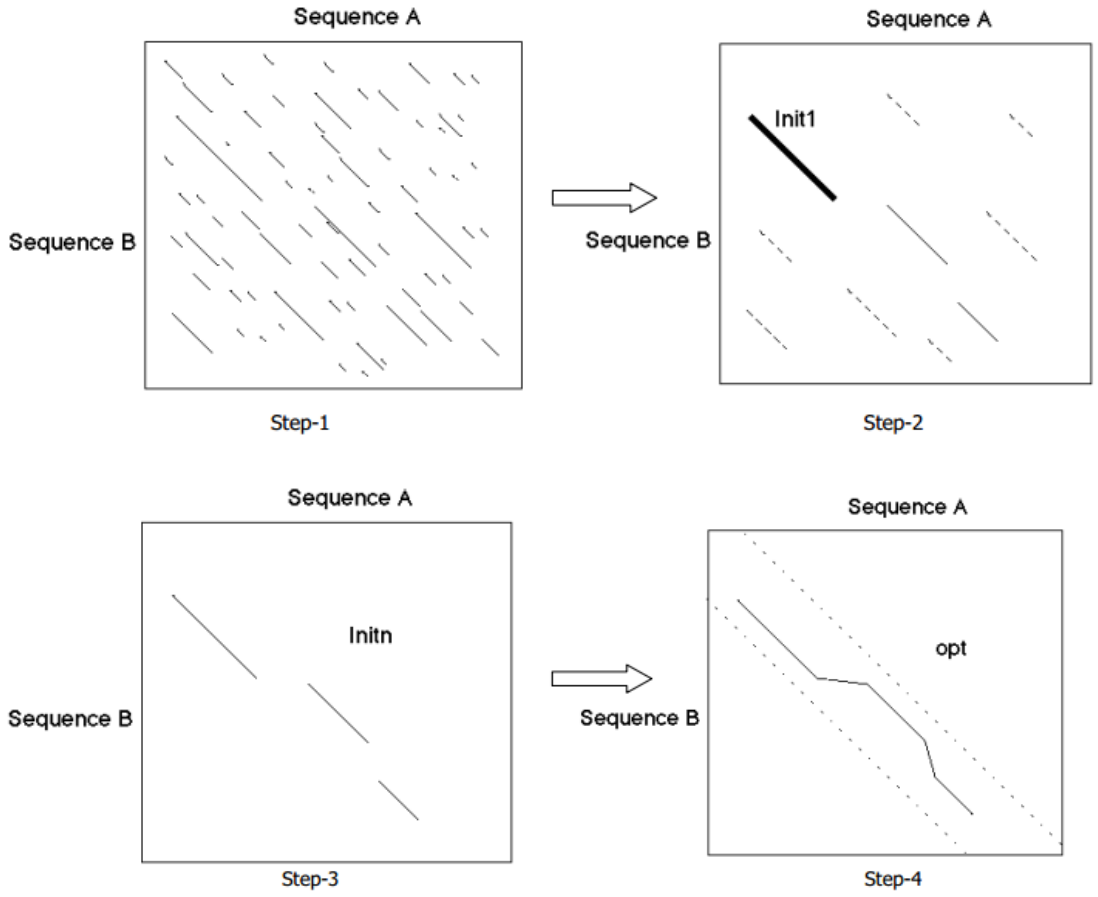
3.3.1 Ο αλγόριθμος FASTA

Ο αλγόριθμος FASTA δημιουργήθηκε από τους Lipman & Pearson το 1985 και βασίζεται στην κεντρική ιδέα της αναζήτησης μικρών λέξεων (words ή k-tuples) που εμφανίζονται και στις δύο ακολουθίες. Στην περίπτωση πρωτεϊνικών ακολουθιών το μήκος των λέξεων είναι 1-2 residues ενώ για ακολουθίες DNA το μήκος μιας λέξης μπορεί να φτάσει τις 6 βάσεις. Ο αλγόριθμος χρησιμοποιεί ευεργετικές μεθόδους για να δημιουργήσει περιοχές που περιέχουν κοινές λέξεις . Η στοίχιση που προκύπτει περιλαμβάνει διαφορές ανάμεσα σε κοινές λέξεις. Ο αλγόριθμος ολοκληρώνεται σε 4 βήματα. Στο πρώτο βήμα ο αλγόριθμος αναζητά λέξεις μήκους ktup στον πίνακα δυναμικού προγραμματισμού, που δημιουργείται για τη δοσμένη ακολουθία μικρού μήκους (input query sequence) και μια βιολογική ακολουθία με βάση έναν πίνακα αντικατάστασης χαρακτήρων . Το μήκος των λέξεων ktup αποτελεί βασική παράμετρο του αλγορίθμου και καθορίζεται από το χρήστη. Οι λέξεις που ο αλγόριθμος εντοπίζει ονομάζονται “hot-spots”, και αποτελούν ζεύγη δεικτών του πίνακα δυναμικού προγραμματισμού , (i,j) έτσι ώστε η υπο-συμβολοσειρά μήκους ktup που αρχίζει στη θέση i της συμβολοσειράς ερώτησης να ταιριάζει με την υπο-συμβολοσειρά ίδιου μήκους που ξεκινάει στη θέση j της ακολουθίας. Για μικρές τιμές της παραμέτρου ktup, τα “hot-spot” ταιριάσματα μπορούν να βρεθούν αποδοτικά εφαρμόζοντας τη μέθοδο του hashing στις λέξεις μήκους ktup(ή αλλιώς k-tuples) της συμβολοσειράς ερώτησης και/ή της συμβολοσειράς της ακολουθίας . Κάθε hot-spot (i,j), που ο αλγόριθμος εντοπίζει στο πρώτο βήμα, αποτελεί ένα διάστημα μήκους ktup στη διαγώνιο (i-j) του πίνακα δυναμικού προγραμματισμού. Θυμίζουμε ότι η κύρια διαγώνιος αριθμείται με το μηδέν, οι διαγώνιες πάνω από αυτή καθορίζονται με θετικούς αριθμούς και οι διαγώνιες κάτω από αυτή με αρνητικούς αριθμούς. Σε ένα δεύτερο βήμα ο αλγόριθμος εντοπίζει τις δέκα καλύτερες διαγώνιες τροχιές-diagonal runs από “hot-spots” στον πίνακα. Μια διαγώνιος τροχιά, αποτελεί μια ακολουθία από διαδοχικά “hot-spots” σε μια διαγώνιο. Μια τροχιά, δεν είναι απαραίτητο να περιέχει όλα τα “hot-spots” σε μια διαγώνιο. Ο αλγόριθμος FASTA , βαθμολογεί κάθε διαγώνιο τροχιά δίνοντας μια θετική τιμή σε κάθε “hot-spot” και μια αρνητική στο διάστημα μεταξύ δύο διαδοχικών “hot-spots” , η οποία μειώνεται καθώς αυξάνεται η απόσταση. Η συνολική βαθμολογία μιας διαγώνιας τροχιάς είναι το άθροισμα των τιμών των “hot-spots” και των ενδιάμεσων διαστημάτων. Ο

αλγόριθμος εντοπίζει τις δέκα καλύτερες διαγώνιες τροχιές. Κάθε διαγώνιος τροχιά αποτελεί και ένα ζεύγος στοιχισμένων υπο-συμβολοσειρών. Κάθε στοίχιση περιλαμβάνει ταιριάσματα (“hot-spots”) και μη ταιριάσματα (από τα ενδιάμεσα διαστήματα), αλλά δεν περιλαμβάνει κενά αφού προέρχεται από μια μοναδική διαγώνιο. Εξετάζοντας κάθε μια από αυτές τις δέκα στοιχίσεις υπο-συμβολοσειρών, ψάχνουμε αυτή με τη μέγιστη τιμή , όπως αυτή καθορίζεται από ένα πίνακα αντικατάστασης χαρακτήρων.

Στο τρίτο βήμα ο αλγόριθμος προσπαθεί να συνδυάσει ¨καλές υποστοιχίσεις¨ (υπο-στοιχίσεις που έχουν προκύψει από το δεύτερο βήμα των οποίων η τιμή βαθμολογίας είναι πάνω από κάποιο προκαθορισμένο όριο –cutoff) δημιουργώντας μια ολική στοίχιση η οποία ενδεχομένως να επιτρέπει μερικά κενά.

Για να εξηγούμε τη φιλοσοφία του αλγορίθμου, ας θεωρήσουμε ότι αναπαριστούμε καθεμία από τις δέκα καλύτερες υπο-στοιχίσεις ως ένα κόμβο ενός κατευθυνόμενου γράφου. Κάθε κόμβος αποκτά ένα βάρος το οποίο ισούται με την τιμή της υποστοίχισης που αναπαριστά. Έστω u ο κόμβος ο οποίος αναπαριστά μία από τις επιλεγμένες υπο-στοιχίσεις , που ξεκινά στη θέση (i,j) του πίνακα και τελειώνει στη θέση (i+d, j+d). Έστω v ο κόμβος που αναπαριστά μια άλλη από τις δέκα καλύτερες υπο-στοιχίσεις η οποία ξεκινάει στη θέση (i’, j’). Προσθέτουμε μια ακμή στον κατευθυνόμενο γράφο, από τον κόμβο u στον κόμβο v αν και μόνο αν i’>i+d. Αυτό σημαίνει ότι ο κόμβος v εκφράζει μια στοίχιση που ξεκινάει μια γραμμή χαμηλότερα από εκεί που τελειώνει η στοίχιση του κόμβου v στον πίνακα. Προσαρτούμε ένα βάρος σε αυτή την ακμή για να βαθμολογήσουμε αρνητικά τα κενά που δημιουργούνται ενώνοντας τις δύο επιμέρους υπο-στοιχίσεις.



[Εικόνα 18] Φιλοσοφία του αλγορίθμου FASTA.

Ο αλγόριθμος FASTA προσπαθεί να εντοπίσει το μονοπάτι με το μέγιστο βάρος σε αυτόν το γράφο , το οποίο και ονομάζεται initn. Το μονοπάτι αυτό, αναπαριστά μια πιθανή τοπική στοίχιση μεταξύ των δύο συμβολοσειρών. Αυτή η τοπική στοίχιση μπορεί να μην είναι η βέλτιστη τοπική στοίχιση την οποία θα έπρεπε να εξάγει ένας αλγόριθμος δυναμικού προγραμματισμού , αλλά η διαίσθηση πίσω από τον FASTA είναι πως αποδίδει καλές τιμές σε σύγκριση με το δυναμικό προγραμματισμό.[Εικόνα 18]

Στο τέταρτο και τελευταίο βήμα , ο αλγόριθμος FASTA υπολογίζει μια εναλλακτική τιμή τοπικής στοίχισης. Επιστρέφει στην init1 , την έξοδο του τελευταίου βήματος , και σχηματίζει μια ταινία στον πίνακα γύρω από τη διαγώνιο στην οποία περιέχει η init1. Για τις πρωτεΐνες , όπου η τιμή της ktup=2 , η ταινία αποτελεί από 16 διαγωνίους γύρω από τη διαγώνιο στην οποία περιέχει 32 διαγώνιους. Στη συνέχεια, αλγόριθμος χρησιμοποιεί τον

αλγόριθμο Smith-Waterman για να υπολογίσει τη βέλτιστη τοπική στοίχιση στον υποπίνακα που περιορίζεται σε αυτές τις 16 ή 32 διαγώνιους. Η έξοδος αυτού του βήματος αναφέρεται σαν opt.

3.3.2 Ο αλγόριθμος BLAST.

Ο αλγόριθμος BLAST (Basic Logic Alignment Search Tool) δημιουργήθηκε από τους Altschul etal το 1990 και βασίζεται στην κεντρική ιδέα της εύρεσης κοινών υπο-ακολουθιών ίδιου μήκους (segment pairs) που εμφανίζονται και στη δοσμένη ακολουθία μικρού μήκους (input query sequence) και στο σύνολο των ακολουθιών μιας βάσης δεδομένων με βάση μια συγκεκριμένη συνάρτηση ομοιότητας (scoring threshold).

Σε ένα πρώτο βήμα ο αλγόριθμος αναζητά λέξεις συγκεκριμένου μήκους “w” που εμφανίζονται στη ζητούμενη ακολουθία , χρησιμοποιώντας έναν δεδομένο πίνακα υποκαταστάσεων (substitution matrix) . Οι επιτυχείς λέξεις που έχουν score T ή μεγαλύτερο επεκτείνονται και προς τις δύο κατευθύνσεις σε μια απόπειρα να παραχθούν στοιχίσεις που να υπερβαίνουν το προκαθορισμένο κατώφλι (threshold) “S”. Οι περιοχές που ικανοποιούν αυτή τη συνθήκη ονομάζονται HSP (High-scoring Segment Pair). Η παράμετρος “T” καθορίζει την ταχύτητα και την ευαισθησία της αναζήτησης. Μια παραλλαγή του βασικού αλγορίθμου δημιουργήθηκε από τους Altschuletal το 1997 και επιτρέπει την εισαγωγή κενών (gaps) στις δημιουργούμενες ευθυγραμμίσεις. Μια πλήρης λίστα των παραλλαγών του αλγορίθμου φαίνονται στον ακόλουθο πίνακα .

Αλγόριθμος	Είδος query	Είδος sequence
BLASTP	Πρωτεΐνη	Πρωτεΐνη
BLASTN	Νουκλεοτίδιο	Νουκλεοτίδιο
BLASTX	Νουκλεοτίδιο	Πρωτεΐνη
TBLASTN	Πρωτεΐνη	Νουκλεοτίδιο
TBLASTX	Νουκλεοτίδιο	Νουκλεοτίδιο

Αν δούμε τον αλγόριθμο πιο αναλυτικά . Η δοσμένη ακολουθία –query sequence , χωρίζεται σε λέξεις μεγέθους w (w=3 για ακολουθίες πρωτεϊνών και w=11 για ακολουθίες νουκλεοτιδίων). Για μια δοσμένη ακολουθία μεγέθους n , υπάρχουν n-w+1 λέξεις. Χρησιμοποιώντας έναν πίνακα αντικατάστασης (όπως ο BLOSUM για αμινοξέα), καθορίζονται οι εμφανίσεις κάθε λέξης της δοσμένης ακολουθίας με υψηλό σκορ (high-scoring matching words) στο σύνολο των ακολουθιών σύγκρισης . Με αυτό τον τρόπο η λίστα εμφανίσεων μειώνεται χρησιμοποιώντας ένα κατώφλι που ονομάζεται neighborhood word-score threshold. [Εικόνα 19]

Σε ένα δεύτερο στάδιο ο BLAST , ψάχνει στη βάση δεδομένων γνωστών ακολουθιών για το ακριβές ταίριασμα της λίστας των λέξεων. Στο τρίτο βήμα ο αλγόριθμος προσπαθεί να επεκτείνει και προς τις δύο κατευθύνσεις τις εμφανίσεις των λέξεων , παράγοντας πιθανές συστοιχίσεις. Κάθε νέα στοίχιση ονομάζεται High Segment Pair-HSP. Τα High Segment Pairs που ξεπερνούν ένα όριο S, χαρακτηρίζονται ως Maximal Segment Pair. [4.3]

1° βήμα: τμηματοποίηση της δοσμένης ακολουθίας σε διαδοχικές υπο-λέξεις μεγέθους w=3																									
Query sequence:																									
a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k	l	m	n	o	p	q	r	s	t	u	v	w	x	y	z
Words																									
a	b	c																							
	b	c	d																						
		c	d	e																					
			d	e	f																				
2° βήμα: Εντοπισμός των υπο-λέξεων με μέγιστη τιμή στοίχισης για το όλες τις ακολουθίες																									
High-scoring matching words:																									
a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k	l	m	n	o	p	q	r	s	t	u	v	w	x	y	z
a	b	c																							
d	s	k	o	w	j	j	d	f	k	s	l	m	n	k	d	k	j	d	f	k	k	j	d	f	f
											l	m	n												
m	s	l	z	m	s	o	w	u	r	n	f	k	s	a	d	e	f	a	q	m	a	z	m	s	l
															d	e	f								
3° βήμα: επέκταση των high-scoring words																									
a	b	c	d	w	f	h	h	f	j	s	l	m	n	k	d	k	j	d	e	h	k	k	j	f	f
a	b	c	=							⇐	l	m	n	=											

[Εικόνα 19] Φιλοσοφία του αλγορίθμου BLAST.

3.3.3 CLUSTALw

Το CLUSTALW είναι το πιο διαδεδομένο πρόγραμμα ευθυγράμμισης πολλαπλών βιολογικών ακολουθιών . Το πρόγραμμα χρησιμοποιεί ένα ιδιαίτερα πολύπλοκο αλγόριθμο προοδευτικής ευθυγράμμισης (progressive alignment) για να κάνει σταδιακή ευθυγράμμιση πολλαπλών πρωτεϊνικών ή νουκλεοτιδικών (DNA) ακολουθιών. Όλες οι ακολουθίες πρέπει να είναι ένα αρχείο , η μία μετά την άλλη . Το πρόγραμμα CLUSTALW βρίσκεται στο EBI (European Bioinformatics Institute)[4.4]

Το πρόγραμμα CLUSTALW [4.5] ανήκει στην κατηγορία των προοδευτικών αλγορίθμων . Δημιουργήθηκε το 1994 αλλά ακόμα και σήμερα αποτελεί ένα σημαντικό εργαλείο όσον αφορά στη στοίχιση ακολουθιών . Η στοίχιση

ολοκληρώνεται σε τρία στάδια. Στο πρώτο στάδιο πραγματοποιείται στοίχιση ακολουθιών κατά ζεύγη χρησιμοποιώντας συνήθως κάποιον αλγόριθμο δυναμικού προγραμματισμού. Συγκεκριμένα πραγματοποιούνται n(n-1)/2 στοιχίσεις, όσοι είναι δηλαδή οι δυνατοί συνδυασμοί των ακολουθιών κατά δύο. Με τη βοήθεια αυτών των στοιχίσεων υπολογίζεται η απόσταση μεταξύ των ακολουθιών σε κάθε ζεύγος και συμπληρώνεται ο αντίστοιχος πίνακας (distance matrix) . Στο επόμενο στάδιο με τη βοήθεια της μεθόδου Neighbor-joining και χρησιμοποιώντας τον προηγούμενο πίνακα κατασκευάζεται ένα υλογενετικό δέντρο. Στο δέντρο αυτό η κάθε ακολουθία λαμβάνει ένα βάρος ένα βάρος ανάλογα με την απόσταση της από τη ρίζα του δέντρου . Στο τελευταίο στάδιο πραγματοποιείται σταδιακά η στοίχιση των ακολουθιών. Η στοίχιση ξεκινάει από τις δύο πιο κοντινές ακολουθίες και έπειτα ενσωματώνονται και οι υπόλοιπες όπως ορίζουν οι προοδευτικοί αλγόριθμοι. Και αυτή τη φορά η στοίχιση πραγματοποιείται χρησιμοποιώντας κάποιον αλγόριθμο δυναμικού προγραμματισμού. Στο σκορ που αποδίδεται σε κάθε ζεύγος ή σε κάθε ομάδα καταλοίπων , εκτός από τις τιμές που λαμβάνονται από τους πίνακες αντικατάστασης, συνυπολογίζονται και τα βάρη των αντίστοιχων ακολουθιών . Επίσης, προβλέπεται ένας ολόκληρος μηχανισμός υπολογισμού των ποινών προκειμένου να αποδίδονται στα κενά διαφορετικές τιμές ανάλογα με το που εμφανίζονται στη στοίχιση στις αντίστοιχες ακολουθίες. Το πρόγραμμα CLUSTALW βρίσκεται στο EBI (European Bioinformatics Institute) [4.6]

3.4 Βιολογικές Βάσεις Δεδομένων

Μια βιολογική βάση δεδομένων είναι ένα μεγάλο , οργανωμένο σύστημα δεδομένων , που συνδέεται συνήθως με κατάλληλο λογισμικό για την ενημέρωση, αναζήτηση και ανάκτηση στοιχείων των δεδομένων που έχουν αποθηκευθεί στο σύστημα . Οι τύποι δεδομένων που περιέχονται στις βάσεις δεδομένων παράγονται από τη βιολογική έρευνα και περιλαμβάνουν : νουκλεοτιδικές ακολουθίες , ακολουθίες πρωτεϊνών, 3D δομές πρωτεϊνών και

νουκλεονικών οξέων, δεδομένα γονιδιακής έκφρασης και δεδομένα γενετικής ποικιλότητας (πολυμορφισμοί). Η καταχώρηση των βιολογικών δεδομένων σε βάσεις δεδομένων επιτρέπει την κοινοποίηση των αποτελεσμάτων στην επιστημονική και ερευνητική κοινότητα, την επαναληψιμότητα συγκεκριμένων διεργασιών , τη σύγκριση με άλλα δεδομένα και την επίλυση προβλημάτων βασικής και εφαρμοσμένης έρευνας.

Οι βάσεις δεδομένων ακολουθιών και δομών DNA και πρωτεϊνών αποτελούν το χαρακτηριστικότερο δείγμα της αλματώδους εξέλιξης που έχει επιτελεστεί τα τελευταία χρόνια στη Βιολογία. Όταν πρωτοξεκίνησε η δημιουργία τους ο όγκος της πληροφορίας ήταν τόσο μικρός που και ένας μικρός αριθμός ερευνητών αρκούσε για τη συντήρηση και την ανανέωση των βάσεων αυτών. Αν κάποιος εξερευνητής ενδιαφερόταν να έχει πρόσβαση στις εγγραφές της βάσης επικοινωνούσε με τους επιστημονικούς υπευθύνους και εκείνοι του έστελναν με συμβατικό ταχυδρομείο όλη τη βάση η οποία αρκούσε να αποθηκευτεί ακόμη και σε μερικές δισκέτες ή μαγνητοταινία.

Την τελευταία δεκαετία όμως η τεχνολογική εξέλιξη βοήθησε στη διεκπεραίωση μεγάλου όγκου πειραματικής εργασίας η οποία σε συνάρτηση με τον διαρκή προσδιορισμό γονιδιωμάτων διαφόρων οργανισμών αύξησε τον όγκο της πληροφορίας στο επίπεδο ακολουθίας και όχι μόνο , σε δυσθεώρητα μεγέθη. Οι βάσεις πλέον δεν περιέχουν απλώς πολλά δεδομένα αλλά και η διαδικασία ανανέωσης τους είναι απαραίτητα καθημερινή υπόθεση. Πλέον η συντήρηση μιας βάσης απαιτεί ένα πολυάριθμο επιτελείο επιστημόνων οι οποίοι ασχολούνται αποκλειστικά με το σχολιασμό (annotation) των νεοεισερχόμενων δεδομένων καθώς και με τη διόρθωση λαθών των ήδη υπαρχόντων. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν η βάση πρωτεϊνικών ακολουθιών SWISS-PROT που περιέχει 104948 ακολουθίες (Rel. 40.9- Ιανουάριος 2002) ενώ η EMBL Nucleotide Sequence Database που περιέχει νουκλεοτιδικές αλληλουχίες έχει 14366182 εγγραφές (Rel. 69 – Δεκέμβριος 2001) . Η πρόσβαση στις βάσεις αυτές είναι πλέον εύκολη μέσω της χρήσης του Διαδικτύου. Ο χρήστης μπορεί να επισκεφθεί την ιστοσελίδα που διατηρείται από τους υπευθύνους της βάσης και να κάνει αναζητήσεις αποθηκεύοντας στον υπολογιστή του δεδομένα του άμεσου ενδιαφέροντός του. Παράλληλα, έχουν δημιουργηθεί και μια σειρά από βάσεις που αποσκοπούν στην ταξινόμηση της πληροφορίας στο επίπεδο της ακολουθίας και της δομής προκειμένου να οργανωθεί η πληροφορία και να εξαχθούν συμπεράσματα για τη βιολογική τους σημασία.

Παρακάτω παρατίθενται οι κυριότερες κατηγορίες βάσεων νουκλεϊνικών οξέων και πρωτεϊνών και οι κυριότεροι αντιπρόσωποί τους.

3.4.1 Βάσεις δεδομένων νουκλεοτιδικών αλληλουχιών.

Οι βάσεις δεδομένων νουκλεοτιδικών αλληλουχιών αποτελούν τις μεγαλύτερες βάσεις στο πεδίο της Βιολογίας τόσο από άποψη του όγκου της πληροφορίας που περιέχουν όσο και από την άποψη του εκθετικού ρυθμού συσσώρευσης δεδομένων που εμφανίζουν. Τα τελευταία χρόνια λόγω της εξέλιξης της τεχνολογίας στην εύρεση της αλληλουχίας (sequencing) πολυνουκλεοτιδίων έγινε εφικτός σε μικρό χρονικό διάστημα , ο προσδιορισμός της αλληλουχίας ολοκλήρων γονιδιωμάτων αρκετών οργανισμών όπως ο άνθρωπος. Σε αρκετές περιπτώσεις μάλιστα υπάρχουν εξειδικευμένες βάσεις δεδομένων που περιέχουν τις αλληλουχίες για ένα και μόνο οργανισμό (π.χ. Flybase a database of the Drosophila genome). [4.7]

Εδώ πρέπει να σημειώσουμε τις τρεις μεγαλύτερες βάσεις δεδομένων νουκλεοτιδικών αλληλουχιών που είναι ελεύθερα διαθέσιμες στην ακαδημαϊκή κοινότητα. Πρόκειται για τις GENBANK (NCBI), DNA Data Bank of Japan (DDBJ) και EMBL Nucleotide Sequence Database (EBI) οι οποίες σε συνεργασία έχουν δημιουργήσει της International Nucleotide Sequence Database Collaboration . Η συνεργασία μεταξύ των βάσεων περιλαμβάνει την ανταλλαγή σε καθημερινή βάση εγγράφων που κατατίθενται ανεξάρτητα σε κάθε βάση δεδομένων έχοντας θέσει παράλληλα και κοινούς κανόνες για την ταξινόμηση και το σχολιασμό των δεδομένων. Στο παρακάτω σχήμα παρουσιάζεται η ροή της πληροφορίας ανάμεσα στις βάσεις .

Λίγα λόγια για κάθε βάση δεδομένων που συμμετέχει στην International Nucleotide Sequence Database Collaboration :

GENBANK: Η GENBANK [4.8] αποτελεί μια βάση δεδομένων νουκλεοτιδικών αλληλουχιών που είναι ελεύθερα διαθέσιμη στην επιστημονική κοινότητα. Βρίσκεται υπό την αιγίδα του Εθνικού Ινστιτούτου Υγείας των Η.Π.Α. Η κύρια πηγή της πληροφορίας που περιέχεται στην GENBANK προέρχεται από απευθείας υποβολές δεδομένων όπως προκύπτουν από πειραματικές

διεργασίες διαφόρων ερευνητικών ομάδων . Τα νεοεισερχόμενα δεδομένα υφίστανται επεξεργασία και προστίθενται σχόλια (annotation) για τη διευκόλυνση των ερευνητών. Ανά τακτά χρονικά διαστήματα τα ήδη κατατεθειμένα δεδομένα επανεξετάζονται και γίνονται διορθώσεις αν προκύπτουν νέα δεδομένα σχετικά με τις εγγραφές. Η διαδικασία κατάθεσης των δεδομένων μπορεί να πραγματοποιηθεί πολύ γρήγορα μέσω του Διαδικτύου με τη συμπλήρωση κατάλληλης φόρμας και στη συνέχεια οι υπεύθυνοι της βάσης αναλαμβάνουν το σχολιασμό της εγγραφής και τη δημοσιοποίηση της στη βάση. Έχει διαπιστωθεί ότι κάθε 14 μήνες ο αριθμός των νουκλεοτιδικών βάσεων που περιέχονται στη GENBANK διπλασιάζεται με αποτέλεσμα η παρούσα έκδοση (Rel. 128 Φεβρουάριος 2002) να περιέχει 15465325 ακολουθίες με το συνολικό αριθμό βάσεων να φτάνει τις 17089143893.

EMBL-Bank: Η EMBL Nucleotide Sequence Database [4.9] αποτελεί τη μεγαλύτερη βάση νουκλεοτιδικών αλληλουχιών στην Ευρώπη και βρίσκεται υπό την αιγίδα του Ευρωπαϊκού Εργαστηρίου Μοριακής Βιολογίας (EMBL). Εδράζεται και συντηρείται στο Ευρωπαϊκό Ινστιτούτο Βιοπληροφορικής (EBI) στο Cambridge, UK. Τα δεδομένα προέρχονται από ανεξάρτητα ερευνητικά εργαστήρια καθώς και από ομάδες που ασχολούνται με τον προσδιορισμό των γονιδιωμάτων διαφόρων οργανισμών . Η κατάθεση ακολουθιών στην EMBL-Bank είναι μια διαδικασία απλή και πραγματοποιείται μέσω του διαδικτύου κατ' αντίστοιχο τρόπο με αυτό της GENBANK . Στη συνέχεια οι νεοεισερχόμενες ακολουθίες υφίστανται επεξεργασία και σχολιασμό από τους υπευθύνους της βάσης προτού γίνουν διαθέσιμες στην επιστημονική κοινότητα . Επιπλέον μέσω του διαδικτύου παρέχονται μια σειρά από εργαλεία ανάλυσης ακολουθιών (π.χ. FASTA, BLAST). Η τελευταία έκδοση της EMBL-Bank (Rel. 69- Μάρτιος 2002) περιέχει 15960527 εγγραφές ενώ ο συνολικός αριθμός των νουκλεοτιδίων φτάνει τα 17868806247.

DDJB : Η DNA Databank of Japan (DDJB- http://www.ddbj.nig.ac.jp/) ιδρύθηκε το 1986 στο Εθνικό Ινστιτούτο Γενετικής (NIG) το οποίο βρίσκεται υπό την αιγίδα του Υπουργείου Παιδείας , Επιστημών και Αθλητισμού της Ιαπωνίας. Αποτελεί τη μοναδική διεθνώς αναγνωρισμένη βάση νουκλεοτιδικών αλληλουχιών . Η παρούσα έκδοση της DDJB (Rel. 48, Ιανουάριος 2002) περιέχει 150161100 εγγραφές ενώ ο συνολικός αριθμός

των νουκλεοτιδικών βάσεων που περιέχονται στις ακολουθίες είναι 16197713855.

3.4.2 Βάσεις Δεδομένων Πρωτεϊνικών Ακολουθιών

Οι πρωτεϊνικές βάσεις δεδομένων περιλαμβάνουν πρωτεϊνικές ακολουθίες που συνάγονται με υπολογιστική μετάφραση ακολουθιών αποθηκευμένων στις νουκλεοτιδικές βάσεις δεδομένων ή από πειραματική αλληλούχηση πρωτεϊνών. Διακρίνονται σε πρωτογενείς, οι οποίες περιλαμβάνουν βιολογικά δεδομένα στην πρωτογενή τους μορφή (δηλαδή χωρίς περαιτέρω ανάλυση) και σε δευτερογενείς , οι οποίες περιέχουν τα αποτελέσματα της επεξεργασίας βιολογικών δεδομένων που είναι αποθηκευμένα στις πρωτογενείς βάσεις δεδομένων πρωτεϊνικών ακολουθιών. (Gautham , 2006).

Οι πιο σημαντικές βάσεις πρωτεϊνικών ακολουθιών είναι οι : SWISS-PROT, η Protein Information Resource (PIR) και η PROSITE.

Η SWISS-PROT [4.10] είναι μια βάση δεδομένων πρωτεϊνικών ακολουθιών που ιδρύθηκε το 1986 και στις μέρες μας συντηρείται από το Ελβετικό Ινστιτούτο Βιοπληροφορικής (European Bioinformatics Institute). Η παρούσα έκδοση της SWISS-PROT περιέχει 104948 καταχωρήσεις (Ιανουάριος 2002) στις οποίες εκτός από την ακολουθία να υπάρχουν και συμπληρωματικά σχόλια όπως οι βιβλιογραφικές αναφορές γενικά και στοιχεία δευτεροταγούς δομής , σύνδεσμοι σε άλλες βάσεις δεδομένων σχετικές με κάθε εγγραφή καθώς και σημειώσεις για τη βιολογική λειτουργία (αν είναι γνωστές) και άλλες χρήσιμες πληροφορίες.

Η Protein Information Resource [4.11] εδράζεται στο Πανεπιστήμιο του Georgetown και αποτελεί τμήμα του Εθνικού Ιδρύματος Βιοϊατρικής Έρευνας (NBRF) των Η.Π.Α. Η PIR περιλαμβάνει μια σειρά από βάσεις δεδομένων που σχετίζονται με τη μελέτη των πρωτεϊνών με κυριότερη από αυτές την PIR-International Protein Sequence Database (PSD) . Η PSD αποτελεί όπως και η SWISS-PROT μια βάση δεδομένων πρωτεϊνικών ακολουθιών συνοδευόμενη από συμπληρωματικά σχόλια. Τα δεδομένα της PSD προκύπτουν από τη

συνεργασία της PIR με το Munich Information Center for Protein Information Database (JIPID). Η τελευταία έκδοση της PSD (Rel. 71.03 , Φεβρουάριος 2002) περιλαμβάνει 283138 εγγραφές . Πρέπει να σημειωθεί ότι η PIR-PSD σε 4 υποενότητες τις PIR1, PIR2, PIR3 και PIR4. Μεταξύ των PIR1 και PIR2 δεν υπάρχει ουσιαστική διαφορά. Ο διαχωρισμός διατηρείται κυρίως για ιστορικούς λόγους . Οι ενότητες αυτές περιέχουν το 99% των εγγραφών της βάσης και τα κριτήρια ταξινόμησης και σχολιασμού είναι ακριβώς τα ίδια . Αντίθετα οι εγγραφές της PIR3 δεν έχουν ακόμα υποστεί έλεγχο και σχολιασμό . Τα περιεχόμενα της PIR4 είναι ακολουθίες οι οποίες είτε δεν συναντώνται στη φύση είτε δεν εκφράζονται υπό φυσιολογικές συνθήκες . Επίσης, μπορεί να περιέχει ακολουθίες που έχουν συντεθεί de nove σε εργαστήριο . Σε κάθε περίπτωση πάντως έχουν υποστεί έλεγχο και σχολιασμό από τους υπεύθυνους της βάσης.

Η PROSITE είναι μια βάση ταξινόμησης σε οικογένειες πρωτεϊνικών ακολουθιών και αυτοτελών περιοχών ακολουθιών (sequence domains).[4.12] Βασίζεται στη γενικότερη παρατήρηση ότι ενώ υπάρχει ένας τεράστιος αριθμός διαφορετικών πρωτεϊνών στη φύση , αυτές μπορούν να ομαδοποιηθούν με βάση την ομοιότητα στην ακολουθία τους σε ένα μικρό αριθμό οικογενειών . Οι πρωτεΐνες ή οι αυτοτελείς δομικές περιοχές που ανήκουν στην ίδια οικογένεια έχουν την ίδια λειτουργία και προέρχονται από κοινό πρόγονο. Είναι φανερό ότι οι πρωτεΐνες που ανήκουν στην ίδια οικογένεια έχουν τμήματα της ακολουθίας τους που είναι περισσότερο συντηρημένα στην πορεία της εξέλιξής τους. Αυτές οι περιοχές σχετίζονται άμεσα με τη λειτουργία τους και τη δομή των πρωτεϊνών στο χώρο. Αναλύοντας τις ακολουθίες των πρωτεϊνών που ανήκουν στην ίδια οικογένεια είναι δυνατό να προκύψει ένα «αποτύπωμα» χαρακτηριστικό για κάθε ομάδα , ικανό ώστε να διαχωρίζει από τις άλλες πρωτεϊνικές αλληλουχίες που δεν ανήκουν στην οικογένεια αυτή. Μια ανάλογη περίπτωση ακολουθεί η λήψη αποτυπωμάτων από την αστυνομία. Ένα αποτύπωμα είναι ικανό για να ταυτοποιήσει ένα άτομο. Παρόμοια και στις πρωτεΐνες η χρήση ενός τέτοιου αποτυπώματος μπορεί να χρησιμεύσει για να ταξινομηθεί μια άγνωστη πρωτεϊνική αλληλουχία σε μια γνωστή οικογένεια πρωτεϊνών δίνοντας μας ενδείξεις για την πιθανή λειτουργία τους . Αυτή τη στιγμή η PROSITE περιέχει “αποτυπώματα” για 1000 περίπου οικογένειες. Για κάθε οικογένεια υπάρχει λεπτομερής ανάλυση για τη δομή και τη λειτουργία των πρωτεϊνών αυτών.

Βιβλιογραφία

[4.1] D.Gusfield. “Algorithms on strings, trees and sequences”. Cambridge University Press, 1997.

[4.2] R. Baeza-Yates and G.H. Gonnet. A new approach to text searching. Communications of the ACM, Vol. 35, pp. 74-82, 1992.

[4.3] 2. S. Altschul, W. Gish, W. Miller, E. Myers, D. Lipman, Basic local alignment search tool, J. Mol. Biol., 1990, Vol.: 215, pp. 403-410.

[4.4]http://www.ebi.ac.uk/clustalw

[4.5] 3. D.J. Lipman and W.R. Pearson, Rapid and sensitive protein similarity searches, Science, Vol. 227, pp. 1435 1441, 1985.

[4.6] http://www.ebi.ac.uk/clustalw/

[4.7] http://flybase.bio.indiana.edu

[4.8] http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/

[4.9] http://www.ebi.ac.uk/ena/

[4.10] G. Stoesser et al., Nucl. Acids Res., (2002), 30:21-26.

[4.11] http://pir.georgetown.edu/

Κεφάλαιο 4^{ο} : Τομείς Έρευνας στη Βιοπληροφορική

Η επιστήμη της Βιοπληροφορικής θα μπορούσε να θεωρηθεί ότι συγκεντρώνει τις χρήσεις των μαθηματικών, στατιστικών και βιολογικών δεδομένων. Η γονιδιακή επανάσταση που συνέβη πριν μια δεκαετία περίπου δε θα μπορούσε να στεφθεί από επιτυχία (αυτή που την συνέδεσε με την πλήρη αποκωδικοποίηση του ανθρωπίνου γονιδιώματος) χωρίς την

υποβοήθηση που δέχτηκε ειδικά πριν το τέλος της ιδιαίτερα εξελιγμένων στατιστικών αλγορίθμων , μεταξύ των οποίων βρίσκεται η ανάλυση της ακολουθίας του DNA (DNA sewuencing), η γονιδιακή έκφραση σε συστοιχίες μικροδιατάξεων (microarray expression profiling) καθώς και η ακολουθιακή ανάλυση του γονιδιώματος (genomic sequence analysis). Παρότι η τέχνη της συλλογής των δεδομένων και η ένωση τους προς τη λύση ενός μόνο προβλήματος θεωρείται παραδοσιακά ως σημαντικό μέρος της επιστημονικής προσπάθειας, οι πρόσφατες εξελίξεις στο χώρο της Βιοπληροφορικής μας δείχνουν ότι η ανάλυση των δεδομένων και η ερμηνεία τους είναι βήματα που καθορίζουν το συνολικό ρυθμό απόκτησης της βιολογικής γνώσης και κατανόησης των θεραπευτικών διαδικασιών.

Οι στόχοι της Βιοπληροφορικής μπορούν να ταξινομηθούν σε τρεις ομάδες. Σε ένα πρώτο επίπεδο η Βιοπληροφορική επιτρέπει την αποδοτική οργάνωση των δεδομένων ώστε να είναι δυνατή η αποθήκευση, ανάκτηση και ενημέρωσή τους. Σημαντικό παράδειγμα αποτελεί η βάση δεδομένων της δομής τρισδιάστατων μορίων Prote in Data Bank . Σε ένα δεύτερο επίπεδο η Βιοπληροφορική περιλαμβάνει τα εργαλεία που επιτρέπουν την ανάλυση των βιολογικών δεδομένων . Για παράδειγμα, έχοντας προσδιορίσει την ακολουθία μιας πρωτεΐνης, οι επιστήμονες ενδιαφέρονται για να τη συγκρίνουν με ήδη γνωστές και ταυτοποιημένες ακολουθίες. Αυτή η διαδικασία απαιτεί τη χρήση πολύπλοκων εργαλείων όπως το πρόγραμμα FASTA1, που επιτρέπει την ανακάλυψη και αναζήτηση και αναζήτηση κοινών τμημάτων σε βιολογικές ακολουθίες. Τέλος, σε ένα τρίτο επίπεδο η Βιοπληροφορική θέτει ως στόχο την ανάπτυξη εργαλείων που επιτρέπουν την ερμηνεία των αποτελεσμάτων βιολογικής σημασίας. Ο πίνακας 1.2 παρουσιάζει μια ομαδοποίηση των τύπων των δεδομένων που αναλύει η Βιοπληροφορική και τις αντίστοιχες εφαρμογές . Οι ακολουθίες DNA αποτελούν συμβολοσειρές (strings) πάνω σε ένα αλφάβητο γραμμάτων – βάσεων . Κάθε ακολουθία μπορεί να έχει μήκος έως 1000 βάσεις. Η βάση δεδομένων GenBank2, περιέχει μέχρι στιγμής 11,5 εκατομμύρια εγγραφές. Αντίστοιχα, οι ακολουθίες πρωτεϊνών αποτελούν συμβολοσειρές (strings) πάνω σε ένα αλφάβητο 20 γραμμάτων –αμινοξέων . Μέχρι στιγμής υπάρχουν 400.000 γνωστές ακολουθίες πρωτεϊνών και μια τυπική πρωτεΐνη βακτηρίου περιέχει περίπου 300 αμινοξέα . Από την άλλη πλευρά, οι βάσεις δεδομένων των δομών των μακρομορίων αποτελούν μια πολύπλοκη δομή πληροφοριών. Τα τελευταία χρόνια οι επιστήμονες επικεντρώνονται και στην ανάλυση

ολόκληρων γονιδιωμάτων . Το μήκος των συμβολοσειρών των γονιδιωμάτων ποικίλλουν από 1,6 εκατομμύρια βάσεις έως 3 δισεκατομμύρια . Η βάση δεδομένων Entrez3 , περιλαμβάνει μέχρι στιγμής τα δεδομένα 300 βακτηρίων και ευκαρυώτικων οργανισμών.[Εικόνα 20]

Πηγή Δεδομένων	Μέγεθος Δεδομένων	Εφαρμογές Βιοπληροφορικής
Ακολουθίες DNA	11.5 εκατ. Ακολουθίες (12.5 δις. Βάσεις)	- Αναγνώριση intons και exons - Διαχωρισμός coding & non-coding περιοχών
Ακολουθίες Πρωτεϊνών	400.000 ακολουθίες (~300 αμινοξέα για καθεμιά)	- Αλγόριθμοι σύγκρισης ακολουθιών - Ανακάλυψη σημαντικών μοτίβων
Δομές Μακρομορίων	15.000 δομές (~1000 ατομικές συντεταγμένες η καθεμιά)	- Καθορισμός Δευτερεύουσας δομής - Αλγόριθμοι τρισδιάστατης προσάραξης μακρομορίων και γεωμετρικού ταιριάσματος πρωτεϊνών - Υπολογισμοί επιφανειών και όγκων - Προσομοιώσεις προσάραξης μακρομορίων (υπολογισμός εσωτερικών και εξωτερικών δυνάμεων, βέλτιστων στερεοδιαμορφώσεων)
Γονιδιώματα	300 πλήρη γονιδιώματα (1.6 εκατ-3 δις βάσεις το καθένα)	- Ανακάλυψη περιοδικοτήτων - Φυλογενετική Ανάλυση - Αντιστοίχηση γονιδίων σε αρρώστιες
Εκφράσεις Γονιδίων	~20 μετρήσεις σημείων για ~ 6000 γονίδια	- Σύγκριση εκφράσεων γονιδίων - Αντιστοίχηση εκφράσεων γονιδίων σε ακολουθιακά, δομικά και βιοχημικά δεδομένα.

Άλλα δεδομένα		
Βιβλιογραφία	11 εκατ. αναφορές	- Ψηφιακές βιβλιοθήκες για την αυτόματη ανάκτηση γνώσης - Text Mining Techniques για ανακάλυψη γνώσης
Μεταβολικά Μονοπάτια		Προσομοίωση μονοπατιών

[Εικόνα 20] Διαφοροποιήσεις στο είδος και το μέγεθος βιολογικών δεδομένων.

Επίσης, η έρευνα επικεντρώνεται και στις εκφράσεις γονιδίων (gene expressions). Μπορούμε να καθορίσουμε το επίπεδο έκφρασης κάθε

γονιδίου σε ένα κύτταρο, σε επίπεδο ενός πλήρους γονιδιώματος , αν και μέχρι στιγμής δεν υπάρχει κάποια κεντρική βάση δεδομένων για αυτά τα δεδομένα. Άλλου τύπου δεδομένα σε επίπεδο γονιδιωματικής έκφρασης περιλαμβάνουν βιοχημικές πληροφορίες σε μεταβολικά μονοπάτια (metabolic pathways) , ρυθμιστικά δίκτυα (regulatory networks), δεδομένα αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών από υβριδικά πειράματα και συστηματικών μελετών σε ανεξάρτητα γονίδια.

4.1 Περιγραφή των γονιδίων, των μεταλλάξεων αυτών και των μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών (SNP).

4.1.1 Τα γονίδια

Τα γονίδια, τα οποία περιέχονται στο κάθε χρωμόσωμα, αποτελούνται από DNA και είναι η κύρια φυσική και λειτουργική μονάδα κληρονομικότητας. Στους ανθρώπους, τα γονίδια διαφέρουν σε μέγεθος, αποτελούμενα από μερικές εκατοντάδες ως και 2 εκατομμύρια βάσεις DNA. Εκτιμάται ότι οι άνθρωποι έχουν 20.000 με 25.000 γονίδια. Κάθε άνθρωπος έχει δύο αντίγραφα κάθε γονιδίου, ένα από τον κάθε γονιό. Αν συγκρίνει κανείς το γονιδίωμα δύο διαφορετικών ατόμων, θα παρατηρήσει διαφορές μόλις στο 1% των DNA αλληλουχιών τους, από τις οποίες το 0.02 % είναι αυτές που συμβάλουν στην μοναδικότητα των φυσικών χαρακτηριστικών κάθε ανθρώπου.

4.1.2 Οι μεταλλάξεις.

Η μετάλλαξη είναι μια μόνιμη αλλαγή στην αλληλουχία του DNA που σχηματίζει ένα γονίδιο. Μια μετάλλαξη μπορεί να κληρονομείται από τους γονείς (κληρονομούμενες μεταλλάξεις) ή να προκληθεί σε κάποια στιγμή της ζωής ενός ατόμου (επίκτητες μεταλλάξεις) από εξωγενείς παράγοντες, όπως η ακτινοβολία και οι καρκινογόνες χημικές ουσίες, ή από ένα λάθος αντιγραφής του DNA κατά τη διαδικασία πολλαπλασιασμού των κυττάρων. Οι επίκτητες μεταλλάξεις δεν μεταβιβάζονται από τους γονείς στα παιδιά,

εκτός από τις περιπτώσεις που εντοπίζονται στο DNA των γαμετικών κυττάρων. Οι γονιδιακές αλλαγές είναι υπεύθυνες για ορισμένες φυσιολογικές διαφορές μεταξύ των ανθρώπων, όπως είναι το χρώμα των ματιών, το χρώμα των μαλλιών και η ομάδα αίματος. Όταν όμως μια μετάλλαξη μπορεί να επηρεάσει τη φυσιολογική λειτουργία του κυττάρου, τότε μπορεί να διαταράξει τη φυσιολογική ανάπτυξη του ατόμου ή να προκαλέσει μια ασθένεια. Μια τέτοια κατάσταση που οφείλεται σε μεταλλάξεις σε ένα ή περισσότερα γονίδια, ονομάζεται γενετική διαταραχή. Όταν λοιπόν λέμε ότι, κάποιος είναι φορέας για το «γονίδιο της κυστικής ίνωσης», σημαίνει πως έχει μετάλλαξη στο γονίδιο CFTR που προκαλεί την ασθένεια. Δύο γονείς φορείς του παθολογικού αντιγράφου του γονιδίου έχουν πιθανότητα 25% να φέρουν στον κόσμο ένα παιδί που θα πάσχει από κυστική ίνωση. [5.1]

4.1.3. Οι μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί (SNP)

Οι μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί (Singlenucleotide polymorphisms-SNPs) είναι μικρές αλλαγές στην αλληλουχία του DNA, δηλαδή σε ένα συγκεκριμένο τμήμα της αλυσίδας του DNA μια βάση υποκαθίσταται από μια άλλη. Τα SNPs είναι συνηθισμένες μεταλλάξεις και υπάρχουν φυσιολογικά στο DNA κάθε ατόμου. Υπολογίζεται πως υπάρχουν περίπου 10 εκατομμύρια SNPs στο σύνολο του ανθρώπινου γονιδιώματος. [5.2]

Οι περισσότεροι από αυτούς τους πολυμορφισμούς δεν επηρεάζουν άμεσα την υγεία ή την ανάπτυξη ενός οργανισμού, ορισμένοι από αυτούς όμως έχουν αποδειχθεί σημαντικοί για τη διερεύνηση της ανθρώπινης υγείας. Ένας ή περισσότεροι «μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί» (SNPs) μπορεί να καθορίζουν μια σειρά από χαρακτηριστικά όπως τον βαθμό απόκρισής μας σε μια φαρμακευτική αγωγή, τις πιθανότητες εκδήλωσης συγκεκριμένων ασθενειών, την ευαισθησία μας απέναντι σε εξωγενείς περιβαλλοντικούς παράγοντες (όπως είναι οι τοξίνες) και την επιρρέπειά μας σε μολύνσεις. Παράλληλα, διεξάγονται μελέτες σε μεγάλες πληθυσμιακές ομάδες, τα αποτελέσματα των οποίων συσχετίζουν τη σύγχρονη παρουσία πολλαπλών SNPs με την εκδήλωση των πολυπαραγοντικών παθήσεων, όπως είναι τα καρδιαγγειακά νοσήματα, ο σακχαρώδης διαβήτης και συγκεκριμένοι τύποι καρκίνου. [5.3]

Παραλλαγές νουκλεοτιδίων στην ίδια γενετική θέση της αλληλουχίας DNA είτε είναι σε γονίδιο (και ενδεχομένως και στην πρωτεΐνη που κωδικοποιεί) είτε σε άλλες θέσεις του γονιδιώματος. Η αλλαγή αυτή που προκαλεί αντικατάσταση μιας βάσης από μια άλλη μεταξύ της αδενίνης (A), κυτοσίνης (C), γουανίνης (G), και θυμίνης (T) στην αλληλουχία του DNA χρησιμοποιείται ευρέως στη μοριακή βιβλιογραφία για τον εντοπισμό του μητρικού από το πατρικό χρωμόσωμα για διάφορα γονίδια. Ευρεία είναι η χρήση κάποιων ιδιαίτερα πολυμορφικών στην ιατροδικαστική (ταυτοποίηση DNA μεταξύ θύματος και θύτη).

Για να θεωρηθεί μία μονονουκλεοτιδική αλλαγή πολυμορφική θα πρέπει να παρατηρείται σε συχνότητα >1% του γενικού πληθυσμού (κατά προτίμηση της ίδιας φυλής).

Τα τελευταία χρόνια φάνηκε ότι κάποια SNP's ενδεχομένως να μην είναι τυχαία απλές παραλλαγές από τυχαίες μεταλλάξεις (πολυμορφισμοί) αλλά να συνδέονται με επιβάρυνση ή προστασία από μια παθολογική κατάσταση επηρεάζοντας αλλά όχι αλλάζοντας τη δράση κάποιας σημαντικής πρωτεΐνης. Με τον τρόπο αυτό έχουν αρχίσει μεγάλες μελέτες όπου μελετώνται σχέση συγκεκριμένων SNP's με ομάδες ασθενών όπως ασθενείς με επιληψία ή σχιζοφρένεια. Επίσης επειδή τα SNP's δεν είναι επικίνδυνα για τη ζωή, κληρονομούνται με σταθερό τρόπο από γενιά σε γενιά από τη στιγμή που δημιουργούνται, με αποτέλεσμα να χρησιμοποιούνται και σε πληθυσμιακές μελέτες για την καταγωγή των ανθρώπων ιστορικά.

Μέχρι σήμερα έχουν καταγραφεί πάνω από 5 εκατομμύρια SNP's ενώ έχει ξεκινήσει μια προσπάθεια καταγραφής των διαφορετικών SNP'S (HapMap) από 4 διαφορετικούς πληθυσμούς (Ασία, Αφρική, Αμερική, Ευρώπη) ελέγχοντας όλο το γονιδίωμα και καταγράφοντας τα αποτελέσματα σε μια διεθνή τράπεζα δεδομένων http://snp.cshl.org/.

Σκοπός της καταγραφής των μονονεοκλουτιδικών πολυμορφισμών είναι η διεξαγωγή γονιδιακών ελέγχων οι οποίοι θα έχουν ως στόχο :

1. την πρόληψη (προγεννητικός έλεγχος) ασθενειών

2. τον έλεγχο γενετικής προδιάθεσης ασθενειών

3. τη βελτιστοποίηση της ποιότητας της φαρμακευτικής αγωγής (προφυλακτική αγωγή, φαρμακογενετικός έλεγχος). [5.4]

4.2 Υλοποίηση μοντέλων για αυτόματη ανάκτηση γνώσης βιολογικών δεδομένων.

Η ανάγκη επεξεργασίας και ανάλυσης βιολογικών δεδομένων μας οδηγεί στην ανάπτυξη κατάλληλων εργαλείων διαχείρισης και ανάλυσης των αποθηκευμένων πληροφοριών. Η διαχείριση δεδομένων της Μοριακής Βιολογίας παρουσιάζει αυξημένες απαιτήσεις και το μοντέλο της παραδοσιακής σχεσιακής Βάσης Δεδομένων δε φαίνεται ικανοποιητικό αφού εισάγει πολλούς περιορισμούς στην αναπαράσταση αυτών των δεδομένων. Στόχος είναι ο σχεδιασμός και η υλοποίηση ενός μοντέλου που να ικανοποιεί τις απαιτήσεις της έρευνας και κυρίως την αυτόματη ανάκτηση γνώσης (automated knowledge discovery) από μεγάλο πλήθος πληροφοριών χρησιμοποιώντας τεχνικές ομαδοποίησης των δεδομένων.

Πολλές είναι οι ερευνητικές περιοχές της Μοριακής Βιολογίας που βασίζονται στην αναγνώριση κοινών δομικών χαρακτηριστικών των μορίων, όχι μόνο σε επίπεδο ακολουθίας αλλά και σε δισδιάστατο (2D) ή τρισδιάστατο (3D) επίπεδο. Στόχος των σύγχρονων βιολογικών βάσεων δεδομένων είναι η χρήση αποδοτικών τεχνικών και μεθόδων που ανιχνεύουν την ομοιότητα μεταξύ 2D ή 3D σχημάτων. [5.5]

4.3 Ανάλυση Ακολουθιών Βιολογικών Δεδομένων.

Ένας ενδιαφέρον κλάδος της Μοριακής Βιολογίας θέτει στο επίκεντρο του ενδιαφέροντος τη διαχείριση και ανάλυση ακολουθιών βιολογικών δεδομένων , με σκοπό την αναγνώριση δομικών χαρακτηριστικών κρίσιμων για τη λειτουργία των ζωντανών οργανισμών . Κάθε μόριο του DNA, μπορεί να θεωρηθεί ως μια ακολουθία συμβόλων (συμβολοσειρά), από ένα

αλφάβητο τεσσάρων χαρακτήρων / γραμμάτων : A,C,G,T . Στις ακολουθίες του DNA παρατηρούνται περιοδικές επαναλήψεις συμβολοσειρών-μοτίβα (ως μοτίβο μπορούμε να ορίσουμε ένα σύνολο χαρακτήρων που εμφανίζεται παραπάνω από μια φορά σε μια ακολουθία). Ο εντοπισμός τέτοιων περιοδικοτήτων μπορεί να αποκαλύψει δομικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά του μορίου του DNA. Μπορούμε να διακρίνουμε δύο κατηγορίες προβλημάτων όσον αφορά την ανακάλυψη επαναλαμβανόμενων μοτίβων: α) ακριβή επανάληψη μοτίβων και β) προσεγγιστική επανάληψη μοτίβων.

Οι τεχνικές για την ανάλυση ακολουθιών εφαρμόζονται τόσο κατά το μήκος της ακολουθίας DNA, όσο και μεταξύ των ακολουθιών διαφορετικών οργανισμών. Για αυτό το σκοπό η σύγκριση μεταξύ ακολουθιών, συχνά μετατρέπεται σε εύρεση συχνά επαναλαμβανόμενων μοτίβων σε διαφορετικές ακολουθίες (Multiple Sequence Alignment). Σε αυτή την περίπτωση προσπαθούμε να υπολογίσουμε την ευθυγράμμιση των ακολουθιών που παρουσιάζει τη μέγιστη ομοιότητα.[5.6] Κεντρικό ρόλο σε αυτές τις τεχνικές παίζει η παρουσία/ εισαγωγή κενών (gaps) με σκοπό τη βέλτιστη διάταξη ακολουθιών με ήδη γνωστά βιολογικά μοντέλα και μοτίβα των οποίων η λειτουργία είναι εκ των προτέρων γνωστή .Η παρουσία κενών (ως ακολουθίες κενών χαρακτήρων), μεταφράζεται στην εισαγωγή/διαγραφή ενός βιολογικού μοτίβου ως το αποτέλεσμα μιας λειτουργίας μετάλλαξης (αντιγραφή ή διαγραφή μικρών τμημάτων του DNA).

4.4 Κατηγοριοποίηση βιολογικών δεδομένων.

Μια βιολογική βάση δεδομένων είναι ένα μεγάλο, οργανωμένο σύστημα δεδομένων, που συνδέεται συνήθως με κατάλληλο λογισμικό για την ενημέρωση, αναζήτηση και ανάκτηση στοιχείων των δεδομένων που έχουν αποθηκευτεί στο σύστημα. Οι τύποι δεδομένων που περιέχονται στις βάσεις δεδομένων παράγονται από την βιολογική έρευνα και περιλαμβάνουν: νουκλεοτιδικές ακολουθίες, ακολουθίες πρωτεϊνών , 3D δομές πρωτεϊνών και νουκλεοτιδικών οξέων, δεδομένα γονιδιακής έκφρασης και δεδομένα γενετικής ποικιλότητας (πολυμορφισμοί). Η καταχώρηση των βιολογικών

δεδομένων σε βάσεις δεδομένων επιτρέπει την κοινοποίηση των αποτελεσμάτων στην επιστημονική και ερευνητική κοινότητα, την επαναληψιμότητα συγκεκριμένων διεργασιών, τη σύγκριση με άλλα δεδομένα και την επίλυση προβλημάτων βασικής και εφαρμοσμένης έρευνας.

Μια βασική εφαρμογή στις περισσότερες ερευνητικές μεθόδους της Βιοπληροφορικής είναι η ομαδοποίηση –κατηγοριοποίηση βιολογικών δεδομένων βάσει κοινών ομοιοτήτων. Για παράδειγμα ορισμένα τμήματα ακολουθιών (μοτίβα) επαναλαμβάνονται σε ακολουθίες DNA . Επίσης, τα γονίδια μπορούν να κατηγοριοποιηθούν βάσει της δράσης που εμφανίζουν (π.χ. ενζυμική δράση) ή βάσει των μεταβολικών μονοπατιών στα οποία ανήκουν (αν και κάποια γονίδια μπορούν να εμφανίζουν ποικίλες δράσεις). Προχωρώντας , διαφορετικές πρωτεΐνες συχνά εμφανίζουν όμοια τμήματα, ενώ οι ζωντανοί οργανισμοί περιέχουν πολλαπλά αντίγραφα ενός γονιδίου μέσω του πολλαπλασιασμού, ενώ και διαφορετικά είδη έχουν τις ίδιες πρωτεΐνες που έχουν κληρονομήσει κατά τη διαδικασία της εξέλιξης. Σε επίπεδο δομών, αν και υπάρχουν διαφορετικές στερεοδιαμορφώσεις, αρκετές πρωτεΐνες διαθέτουν παρόμοια δομή αν και διαφέρουν σε επίπεδο ακολουθίας. Χαρακτηριστικά μπορούμε να αναφέρουμε ότι παρόλο που οι εγγραφές στην Protein Data Bank αυξάνονται με εκθετικό ρυθμό, η ανακάλυψη νέων διαμορφώσεων έχει μειωθεί.

Η σχέση μεταξύ των πρωτεϊνών ή γονιδίων ακολουθεί τους κανόνες : ανάλογες πρωτεΐνες έχουν σχετικές διαμορφώσεις αλλά διαφορετικές ακολουθίες , ενώ ομόλογες πρωτεΐνες παρουσιάζουν ομοιότητα σε επίπεδο δομών και ακολουθιών. Από την ομάδα των ομόλογων ακολουθιών μπορούμε να διακρίνουμε ορθόλογες πρωτεΐνες (αυτές που ανήκουν σε διαφορετικά είδη και προέρχονται από κάποιο κοινό πρόγονο) και τις παράλογες πρωτεΐνες (αυτές που σχετίζονται με το διπλασιασμό σε ένα γονιδίωμα). Σε βασικές γραμμές οι ορθόλογες πρωτεΐνες διατηρούν την ίδια δράση. Λαμβάνοντας υπόψη τις παραπάνω διαπιστώσεις μπορούμε να κατηγοριοποιήσουμε τις πρωτεΐνες με βάσει τις διαμορφώσεις που λαμβάνουν και να έχουμε μια απλουστευμένη παρουσίαση των περιεχομένων ενός γονιδιώματος. Σε αυτή τη διαδικασία βασικό στοιχείο

είναι οι αλγόριθμοι που χρησιμοποιούνται για την εύρεση των δομικών ομοιοτήτων μεταξύ μακρομορίων.

Ιδιαίτερη ανάπτυξη τα τελευταία χρόνια παρουσιάζουν και οι εφαρμογές ολοκλήρωσης διαφορετικών δεδομένων (data integration) από το χώρο της Βιολογίας. Για παράδειγμα, οι τρισδιάστατες συντεταγμένες μιας πρωτεΐνης είναι περισσότερο χρήσιμες αν συνδυάζονται με πληροφορίες που αφορούν τη λειτουργία των πρωτεϊνών, την εμφάνισή τους σε διαφορετικά γονιδιώματα και τις αλληλεπιδράσεις τους με άλλα μόρια. Δυστυχώς η πρόσβαση σε διαφορετικού τύπου δεδομένα δεν είναι πάντα εύκολη . Ένα σύστημα ανάκτησης διαφορετικού τύπου δεδομένων είναι το SRS-Sequence Retrieval System4, που επιτρέπει την εύκολη επικοινωνία μεταξύ διαφορετικών βάσεων βιολογικών δεδομένων. Ο χρήστης του συστήματος μπορεί να αναζητά ακολουθίες νουκλεϊκών οξέων, πρωτεϊνών, να ανακτά τα επαναλαμβανόμενα μοτίβα και τις δομές τους καθώς και αναφορές από τη διεθνή βιβλιογραφία. Παρόμοιες δυνατότητες προσφέρει το σύστημα Entrez.

4.5 Μοριακή Μοντελοποίηση.

Η Μοριακή Μοντελοποίηση , αποτελεί ένα νέο και ταυτόχρονα γοργά αναπτυσσόμενο επιστημονικό κλάδο που συνδυάζει σε μεγάλο βαθμό τις επιστήμες της Βιολογίας και της Πληροφορικής. Η Μοριακή Μοντελοποίηση προσπαθεί να μιμηθεί τη συμπεριφορά των μοριακών συστημάτων , βασιζόμενη σε μεγάλο βαθμό στη σχεδίαση μοντέλων μορίων με τη βοήθεια του ηλεκτρονικού υπολογιστή. Τα σύγχρονα πακέτα λογισμικού μοριακής σχεδίασης , αποτελούν χρήσιμα εργαλεία στα χέρια των ερευνητών , οι οποίοι έχουν τη δυνατότητα να συνδυάσουν τη θεωρία και το πείραμα. Το μόνο ίσως μειονέκτημα είναι ότι δεν υπάρχει ένα γενικότερο διευρυμένο εργαλείο μοριακής σχεδίασης. Το σύνολο των βιολογικών μορίων που μελετάμε στη μοριακή σχεδίαση ποικίλλει από μεμονωμένα μόρια και απλές ατομικές δομές σε πολυμερή και βιολογικά μακρομόρια όπως οι πρωτεΐνες και το DNA . Έτσι το επιλεγμένο κάθε φορά μοντέλο πρέπει σαφώς να καλύπτει τις ιδιαιτερότητες και τα χαρακτηριστικά του προς σχεδίαση συστήματος.

Η Μοριακή Μοντελοποίηση ακολουθεί τα εξής τρία βασικά βήματα :

α) επιλογή του κατάλληλου μοντέλου που περιγράφει ικανοποιητικά τις ενδομοριακές και εσωμοριακές συσχετίσεις του μορίου,

β) υπολογισμός της ενεργειακής κατάστασης του συστήματος και ελαχιστοποίηση της και

γ) ανάλυση των παραπάνω υπολογισμών και έλεγχος της τελικής διαμόρφωση ώστε να ικανοποιούνται όλες οι συνθήκες και περιορισμοί που ο σχεδιαστής έχει θέσει.

Αν και στη Μοριακή Σχεδίαση το σύνολο των συντεταγμένων παρέχει μια χρήσιμη απεικόνιση του μορίου σε δισδιάστατο και τρισδιάστατο επίπεδο, είναι αναγκαία και η χρήση συμπληρωματικών πληροφοριών που έχουμε στη διάθεσή μας προκειμένου να αναπαραστήσουμε και τις βιοχημικές ιδιότητες του μορίου. Σημαντική πρόκληση σε αυτήν την κατεύθυνση αποτελεί η ικανοποιητική απεικόνιση των επιφανειών των μορίων οι οποίες είναι υπεύθυνες για τη συμπεριφορά των μορίων και τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες.

Οι σύγχρονες τεχνικές των μοριακών γραφικών (molecular graphics) επιτρέπουν την απεικόνιση της τρισδιάστατης αρχιτεκτονικής των μορίων στην ενεργειακά ευνοϊκότερη διαμόρφωση. Στη δομή αυτή είναι δυνατόν να επέμβουμε απομονώνοντας τμήματα των μορίων, αλλάζοντας τον προσανατολισμό ορισμένων ομάδων ή ψάχνοντας για άλλες δυνατές διαμορφώσεις. Τα μοριακά αυτά μοντέλα επιτρέπουν επίσης την απεικόνιση φυσικοχημικών χαρακτηριστικών που επηρεάζουν τις αλληλεπιδράσεις ενός μορίου με άλλα μόρια.[5.7] Η κατασκευή μοριακών μοντέλων επιτρέπει εξάλλου τη σύγκριση ανάμεσα σε διαφορετικά μόρια προσδιορίζοντας περιοχές ομοιοτήτων και διαφορών. Παράλληλα είναι δυνατή η απεικόνιση της τρισδιάστατης προσαρμογής ενός μικρομορίου (φαρμάκου) σε ένα

μακρομόριο (υποδοχέα). Σε αυτή την κατεύθυνση είναι δυνατόν να σχεδιαστούν στην οθόνη του ηλεκτρονικού υπολογιστή νέα μόρια τα οποία με μιμούμενα το σχήμα μιας διαδραστικής ένωσης ή του φυσιολογικού υποστρώματος έχουν θεωρητικά τη δυνατότητα να καταλάβουν την ενεργό θέση ενός υποδοχέα.[5.8]

4.5.1 Η Θεωρητική Βάση του Μοριακού Σχεδιασμού.

Η πρωτοφανής ανάπτυξη μεθόδων μοριακού σχεδιασμού, βασίζεται σε ένα πλήθος θεωρημάτων της κβαντικής χημείας. Αρκετές θεωρητικές μέθοδοι, που είχαν ανακαλυφθεί δεκαετίες πριν, χωρίς όμως να έχουν εφαρμοστεί, μετατρέπονται σε υπολογιστικά προγράμματα και ολοκληρωμένα πακέτα λογισμικού μοριακής σχεδίασης, αποτελώντας χρήσιμα εργαλεία στα χέρια των ερευνητών, οι οποίοι έχουν τη δυνατότητα να συνδυάσουν τη θεωρία και το πείραμα. Το μόνο ίσως βασικό μειονέκτημα είναι ότι τα περισσότερα προγράμματα επικεντρώνονται σε συγκεκριμένα πεδία, παρέχοντας ικανοποιητική ερμηνεία και αξιολόγηση, και ότι δεν υπάρχει ένα γενικότερο εργαλείο μοριακής σχεδίασης. Έτσι υπάρχει ένα πλήθος υπολογιστικών μεθόδων οι οποίες είναι δύσκολο να συγκεραστούν και να εφαρμοστούν σε ένα ευρύτερο πεδίο φαρμακευτικών μορίων. Για παράδειγμα οι πρώτες υπολογιστικές μέθοδοι εφαρμόζονταν για τη μελέτη μικρών σε μέγεθος φαρμακοφόρων μορίων. Τα τελευταία όμως χρόνια οι μέθοδοι, διευρύνονται και προς την κατεύθυνση δραστικών μορίων μεσαίου ή μεγάλου μεγέθους αξιοποιώντας τις σύγχρονες μεθοδολογίες της υπολογιστικής κβαντικής χημείας. Αρκετές από τις χρησιμοποιούμενες τεχνικές βασίζονται στον προσδιορισμό της μοριακής συνάρτησης ηλεκρονιακής κατανομής (molecular wavefunction) η οποία προκύπτει από την επίλυση της θεμελιώδους εξίσωσης της κβαντικής χημείας (γνωστής και ως Schrodinger εξίσωσης): $H\Psi = E\Psi$.

Στην παραπάνω εξίσωση το Η αποτελεί τον τελεστή Hamilton και αντιπροσωπεύει ένα σύνολο πολύπλοκων μαθηματικών μετασχηματισμών που εφαρμόζονται πάνω στη συνάρτηση Ψ, προκειμένου να προκύψει η συνάρτηση ΕΨ που αντιπροσωπεύει την ενεργειακή κατανομή στο υπό εξέταση μόριο. Αυτή η απλή παρουσίαση της βασικής αυτής εξίσωσης, δεν αποκαλύπτει τη δύσκολη φύση αυτού του υπολογισμού που περιλαμβάνει

πολύπλοκους υπολογισμούς που απαιτούν μεγάλο υπολογιστικό χρόνο για να ολοκληρωθούν, αφού στην πραγματικότητα ο υπολογισμός λαμβάνει υπόψη του το σύνολο των τροχιών των επιμέρους ατόμων που συμβάλλουν στον προσδιορισμό της συνάρτησης ηλεκτρονιακής κατανομής Ψ. Εδώ θα κάνουμε και μια βασική παρατήρηση: αφού η δομή κάθε μορίου είναι στην πραγματικότητα η δομή του ηλεκτρονιακού νέφους που το περιβάλλει η συνάρτηση ηλεκτρονιακής πυκνότητας (της οποίας τον τύπο δώσαμε προηγουμένως) αποτελεί σημαντικό εργαλείο στον προσδιορισμό και σχεδιασμό των δομών των διαφόρων μορίων. Η παραπάνω μεθοδολογία εφαρμόζεται στις ονομαζόμενες Ab initio calculations τεχνικές οι οποίες επιτρέπουν τον ακριβή αν και προσεγγιστικό υπολογισμό της μοριακής συνάρτησης ηλεκτρονιακής κατανομής λαμβάνοντας υπόψη το σύνολο των ατόμων που μετέχουν σε ένα μόριο. Υπάρχει όμως ένας βασικός περιορισμός σε αυτές τις τεχνικές ο οποίος συνδέεται άμεσα με το μέγεθος του εξεταζόμενου μορίου. Καθώς το μέγεθος του μορίου αυξάνει ο απαιτούμενος υπολογιστικός χρόνος αυξάνεται εκθετικά σε σχέση με τον αριθμό των ηλεκτρονίων. Για παράδειγμα, ο υπολογιστικός χρόνος για ένα μόριο 5 φορές μεγαλύτερο των συνηθισμένων απαιτεί 54 = 625 περισσότερο χρόνο. Αυτό το γεγονός δεν επιτρέπει σε πρωτεΐνες ή άλλα μεγάλα μόρια να μελετηθούν με τις ήδη υπάρχουσες τεχνικές αφού ο υπολογιστικός χρόνος θα ξεπερνούσε τα δέκα χρόνια ακόμα και στα πιο γρήγορα μηχανήματα. Για αυτό το λόγο οι επιστήμονες ερευνούν άλλες μεθόδους με αποτέλεσμα όμως να οδηγούμαστε στο πρόβλημα που προαναφέραμε: της μη ύπαρξης ενός ενιαίου εργαλείου μοριακής σχεδίασης.

4.5.2 Μοριακά Μοντέλα και Βιοχημική Πληροφορία.

Στη σχεδίαση μοριακών δομών αποτελεί σημαντικό θέμα η πληροφορία που περιέχεται στα μοριακά μοντέλα. Για αυτό το λόγο η επιλογή του κατάλληλου μοντέλου αποτελεί κρίσιμο σημείο, προκειμένου το μοντέλο να συμπεριλαμβάνει τις χρήσιμες πληροφορίες και ταυτόχρονα να είναι κατανοητό στον ερευνητή. Ένα υπέρ-απλουστευμένο μοντέλο δεν καταφέρνει να συμπεριλάβει την απαιτούμενη πληροφορία. Για παράδειγμα, η στερεοχημική δομή των μορίων μπορεί να χαρακτηριστεί από 3N ατομικές συντεταγμένες-μιλώντας για ένα μόριο 3 ατόμων - και τίθεται το ερώτημα αν

ένας τέτοιος μικρός αριθμός συντεταγμένων μπορεί να αποδώσει τη πολύπλοκη φύση και συμπεριφορά των μορίων που εμφανίζουν φαρμακολογική δράση. Το σύνολο των συντεταγμένων παρέχουν μια χρήσιμη απεικόνιση του μορίου αλλά θα πρέπει να μπορούμε να αναπαραστήσουμε και την ηλεκτρονιακή πυκνότητα η οποία περιέχει την πλήρη πληροφορία για τις ιδιότητες ενός μορίου.

Όσον αφορά την απεικόνιση της μοριακής πληροφορίας, ένα σύγχρονο θέμα που τίθεται στις επιστημονικές κοινότητες είναι το κατά πόσο η αντιπροσωπευτική μελέτη ενός μόνο συγκεκριμένου τμήματος του μορίου μπορεί να δώσει επαρκείς και σωστές πληροφορίες για ολόκληρο το μόριο. Η απάντηση σε αυτό το ερώτημα έρχεται από το πρόσφατα διατυπωμένο θεώρημα: "Holographic Electron Density Theorem " [5.9], αρκετά πορίσματα του οποίου μπορούν να εφαρμοστούν στη μοριακή σχεδίαση. Σύμφωνα με αυτό το θεώρημα κάθε μικρή περιοχή ενός μη περιορισμένου ηλεκτρονιακού νέφους ενός μορίου περιέχει τη συνολική πληροφορία της ηλεκτρονιακής πυκνότητας , οπότε μπορεί να καθορίσει πλήρως τις ιδιότητες του μορίου. Αυτό το θεώρημα έρχεται να βελτιώσει το θεώρημα των Hohenberg- Kohn, αφού για να καθορίσουμε την ενέργεια και τις ιδιότητες ενός μορίου βάσει της ηλεκτρονιακής του πυκνότητας, αρκεί να γνωρίζουμε μια μικρή περιοχή του ηλεκτρονιακού νέφους που το περιβάλλει. Με άλλα λόγια τα άτομα που περιλαμβάνονται μέσα σε ένα μόριο, ομαδοποιούνται σε ξεχωριστές οντότητες, οι οποίες δεν παύουν να επηρεάζονται από ολόκληρο το μόριο και φέρουν τα χαρακτηριστικά και τις ιδιότητες του συγκεκριμένου μορίου κωδικοποιώντας στην περιοχή τους την πληροφορία του μορίου. Όσον αφορά τη σχεδίαση μοριακών δομών το παραπάνω θεώρημα, βρίσκει εφαρμογή σε μόρια που παρουσιάζουν παρόμοια φαρμακολογική δράση. Το θεώρημα επιτρέπει τη μελέτη συγκεκριμένων περιοχών μέσα σε ένα μόριο που αν και δεν συνδέονται άμεσα με τη φαρμακολογική δράση, για την οποία εμείς ενδιαφερόμαστε, μπορούμε να διερευνήσουμε τυχόν συσχετίσεις ανάμεσα σε δομές των ηλεκτρονιακών νεφών και να καθορίσουμε πειραματικά τις σχετικές φαρμακολογικές βιοχημικές διεργασίες .

4.6 Σχεδιασμός φαρμάκων με τη βοήθεια υπολογιστή.

Ο σχεδιασμός φαρμακευτικών ουσιών με τη βοήθεια ηλεκτρονικού υπολογιστή αποτελεί μία από τις βασικές μεθόδους ανακάλυψης νέων φαρμακοφόρων ουσιών. Πράγματι τα τελευταία χρόνια ο σχεδιασμός των φαρμάκων με τη βοήθεια ηλεκτρονικού υπολογιστή (computer aided drug design-CADD) έχει εξελιχθεί σε ένα αρκετά υποσχόμενο και παράλληλα αρκετά ενδιαφέροντα επιστημονικό τομέα , με αρκετές εφαρμογές και σε βιομηχανικό επίπεδο. Σε αυτή την κατεύθυνση βοήθησαν τόσο οι υπερσύγχρονοι με τεράστιες υπολογιστικές δυνατότητες ηλεκτρονικοί υπολογιστές όσο και η ανάπτυξη αρκετών πακέτων λογισμικών που υλοποιούν μια σειρά πειραματικών προσεγγίσεων πάνω στον τομέα της σύνθεσης χημικών ουσιών. Παρακάτω θα παρουσιάσουμε ορισμένες βασικές απόψεις για το σχεδιασμό φαρμάκων με τη βοήθεια ηλεκτρονικού υπολογιστή.

Το σύνολο των βιοχημικών διεργασιών που πραγματοποιούνται κατά την επίδραση ενός φαρμάκου σε ένα ζωντανό οργανισμό, καθώς και ο λεπτομερής μηχανισμός των διαμορφώσεων ενός φαρμακευτικού μορίου στην πορεία του μέσα στον οργανισμό είναι αρκετά πολύπλοκες και όχι απόλυτα γνωστές στους επιστήμονες. Αν και στόχος μας είναι ο λεπτομερής προσδιορισμός κινήσεων και μετασχηματισμών σε κάθε στάδιο της πορείας του φαρμάκου, περιοριζόμαστε στην αναζήτηση των ενεργών περιοχών και της στερεοχημικής δομής των φαρμακοφόρων μορίων. Εξάλλου η δομή του κάθε μορίου καθορίζει σε σημαντικό βαθμό την αλληλεπίδραση του με άλλα μόρια και τη βιοχημική του δράση. Σύμφωνα με τις σύγχρονες ανακαλύψεις στον τομέα της Βιοχημείας, οι ιδιότητες κάθε μορίου καθορίζονται πλήρως από την κατανομή των ηλεκτρονίων του ή πιο απλά από τα ηλεκτρικά φορτία που περιβάλλουν τον πυρήνα κάθε μορίου. Όπως γνωρίζουμε κάθε άτομο περιλαμβάνει το θετικά φορτισμένο πυρήνα του και το αρνητικά φορτισμένο ηλεκτρονιακό νέφος που τον περιβάλλει. Μάλιστα η διαμόρφωση του κάθε ηλεκτρονιακού νέφους κατά την επαφή δύο μορίων μας επιτρέπει να αναγνωρίσουμε το κάθε μόριο, αφού ολόκληρη η απαιτούμενη πληροφορία για τον τρόπο που ένα μόριο συμπεριφέρεται , βρίσκεται αποθηκευμένη στο σχήμα και τη μορφή του ηλεκτρονιακού νέφους και είναι μοναδική για κάθε μόριο.

Η παραπάνω διαπίστωση αποτελεί σημαντικό παράγοντα στην ανάπτυξη της φαρμακευτικής χημείας καθώς και στη μελέτη της δράσης των φαρμάκων . Παρουσιάζεται μέσα στα πλαίσια του θεωρήματος Hohenberh-Kohn που διατυπώθηκε στον τομέα της κβαντικής μηχανικής. Σύμφωνα με αυτό το θεώρημα η ηλεκτρονική κατανομή της πυκνότητας ενός μορίου καθορίζει πλήρως την ενέργειά του, καθώς και το σύνολο των ιδιοτήτων
του στην κατάσταση ελάχιστης ενέργειας, δηλαδή στη διαμόρφωση του που χαρακτηρίζεται ως η ενεργειακά ελάχιστη. Για αυτό το λόγο υπάρχει άμεση συσχέτιση των βιοχημικών διεργασιών και των ηλεκτρονιακών διαμορφώσεων των μορίων που συμμετέχουν σε αυτές.

Οι υπολογιστικές προσεγγίσεις στο σχεδιασμό φαρμάκων βασίζονται στις συσχετίσεις των ιδιοτήτων των μορίων είτε αυτές καθορίζονται πειραματικά είτε υπολογίζονται βάσει θεωρητικών μεθόδων. Μάλιστα οι ιδιότητες που προσδιορίζονται με θεωρητικές μεθόδους , όπως για παράδειγμα οι μέθοδοι που έχουν εισαχθεί στην κβαντική μηχανική , βρίσκονται πιο κοντά στις πραγματικές ιδιότητες των μορίων. Αν και οι περισσότερες θεωρητικές μέθοδοι αναφέρονται σε μικρού μεγέθους μόρια , οι πρόσφατες ανακαλύψεις της κβαντικής χημείας εφαρμόζονται τόσο σε μόρια μεσαίου όσο και σε μεγάλου μεγέθους δίνοντας νέα ώθηση στο σχεδιασμό μακρομορίων. Σε αυτές περιλαμβάνονται : οι υπολογιστικές μέθοδοι ab initio για τον υπολογισμό της ηλεκτρονιακής πυκνότητας των πρωτεϊνών , οι ADMA προσεγγιστικές μέθοδοι για τον υπολογισμό των δυνάμεων που ασκούνται μέσα στους πυρήνες των πρωτεϊνών κ.α.

Στις μέρες μας η παράλληλη ανάπτυξη υλικού και λογισμικού στον τομέα των υπολογιστών σε συνδυασμό με την ανάπτυξη του Διαδικτύου όσο και τη σχεδίαση και χρήση βάσεων δεδομένων που περιέχουν βιολογικά δεδομένα ανοίγει νέους ορίζοντες στο χώρο της μοριακής σχεδίασης . Ο σχεδιασμός φαρμάκων με τη βοήθεια ηλεκτρονικού υπολογιστή αποτελεί έναν ενδιαφέροντα τομέα της επιστήμης της Μοριακής Σχεδίασης.

Οι υψηλής τεχνολογίας ηλεκτρονικοί υπολογιστές αποτελούν σήμερα πολύτιμο εργαλείο στο σχεδιασμό των φαρμάκων παρέχοντας πολύτιμες πληροφορίες σχετικά με :

1) την τρισδιάστατη αρχιτεκτονική των μορίων

2) τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες

3) τη σύγκριση ενός μορίου με άλλα μόρια

4) τα σύμπλοκα μικρομορίων-μακρομορίων

5) τις προβλέψεις για νέα μόρια

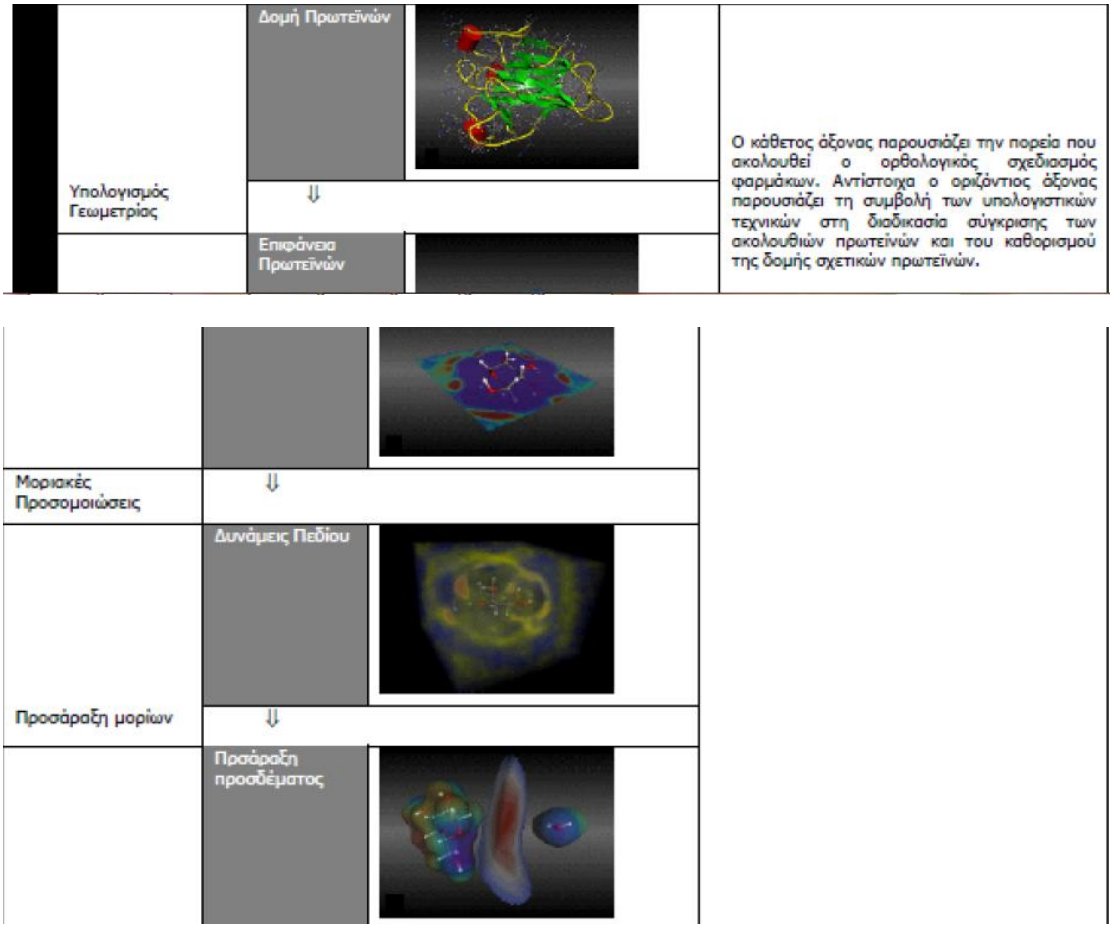
Παράλληλα, έχουν ωριμάσει οι συνθήκες για την επιλεκτική φαρμακευτική στόχευση και σύντομα αναμένεται η συνεισφορά της Βιοπληροφορικής και στο σχεδιασμό νέων φαρμάκων. Πιο συγκεκριμένα στόχος είναι να σχεδιαστεί ένα φάρμακο χτισμένο ειδικά πάνω στο γονιδιακό υπόστρωμα του κάθε ασθενούς, δηλαδή μια εξατομικευμένη φαρμακευτική αντιμετώπιση. Ως πρώτος στόχος των επιστημών που ασχολούνται με τη σχεδίαση των φαρμάκων με τη βοήθεια ηλεκτρονικού υπολογιστή τίθεται η αποτελεσματική απεικόνιση των δομών κανονικών και παθολογικών μορίων τα οποία στη συνέχεια συγκρίνονται με παθογενή ένζυμα και ενεργούς υποδοχείς υποδοχείς αντίστοιχα οπότε και καθορίζεται ο στόχος σχεδιασμού.

Έτσι αν γνωρίζουμε τη δομή μιας πρωτεΐνης και τον τρόπο που ο υποδοχέας ή η ενεργός περιοχή της δρα, μπορούμε να «χτίσουμε» και να προσομοιώσουμε την προσάραξή τους στην οθόνη του ηλεκτρονικού υπολογιστή εξοικονομώντας τον χρόνο και το κόστος που θα απαιτούσαν αντίστοιχες πειραματικές δοκιμές. Παράλληλα, μπορούμε να ανακαλύπτουμε νέες ενώσεις και να τις μοντελοποιούμε προκειμένου να διερευνούμε παραγόμενα συνθετικά ανάλογα και την πιθανή δραστικότητά τους. Και στις δύο περιπτώσεις η μοριακή σχεδίαση είναι ουσιώδης για την κατανόηση και τη διερεύνηση της σχέσης δομής-δράσης. Αυτό βέβαια δε σημαίνει ότι καταργούμε τα in-vitro πειράματα (πειράματα στο εργαστήριο), γιατί αρκετές φορές τα αποτελέσματα δεν είναι τα αναμενόμενα .

Ο κάθετος άξονας παρουσιάζει τα διαδοχικά βήματα στη διαδικασία στον ορθολογικό σχεδιασμό φαρμάκων (rational drug design): ξεκινώντας από ένα γονίδιο προσπαθούμε να ανακαλύψουμε την πρωτεΐνη που κωδικοποιεί . Έχοντας ως είσοδο την ακολουθία ενός γονιδίου μπορούμε να καθορίσουμε τις δυνάμεις που αναπτύσσονται γύρω από το μόριό της. Τέλος, χρησιμοποιώντας αλγόριθμους προσάραξης μπορούμε να αναγνωρίσουμε ή να σχεδιάσουμε προσδέματα που ενώνονται με την πρωτεΐνη, δημιουργώντας φάρμακα που επιδρούν στη λειτουργία της συγκεκριμένης πρωτεΐνης.

Ο οριζόντιος άξονας παρουσιάζει τα βήματα στη σύγκριση των ακολουθιών διαφορετικών γονιδίων και πρωτεϊνών . Με τη βοήθεια αλγορίθμων διαχείρισης συμβολοσειρών μπορούμε να δημιουργήσουμε φυλογενετικά δέντρα που απεικονίζουν τα εξελικτικά μονοπάτια των πρωτεϊνών. Σε αυτό το σημείο έχοντας ολοκληρώσει την περιγραφή των σημαντικότερων εφαρμογών στον τομέα της Βιοπληροφορικής θα συνεχίσουμε ειδικότερα με τον τομέα του σχεδιασμού φαρμάκων. Συγκεκριμένα, θα εισάγουμε την έννοια της πρωτεϊνικής προσάραξης , μιας μεθόδου που χρησιμοποιείται ευρέως σήμερα στον τομέα του σχεδιασμού φαρμάκων με τη βοήθεια του ηλεκτρονικού υπολογιστή. [Εικόνα 21]

Ορθολογικός Σχεδιασμός Φαρμάκων	Εύρεση Ομολόγων				
		1	Σύγκριση ζεύγους ακολουθιών 2	Αλγόριθμοι στοίχισης πολλαπλών ακολουθιών 3 -100	Εύρεση κοινών περιοδικοτήτων σε βάσεις δεδομένων ακολουθιών 100+
Εύρεση γονιδίων	Ακολουθίες Γονιδιωμάτων	atcgatcgatattgg	atcgatcgatattgg atcgatcgatattgg	atcgatcgatattgg atcgatcgatattgg atcgatcgatattgg	atcgatcgatattgg atcgatcgatattgg atcgatcgatattgg atcgatcgatattgg atcgatcgatattgg
	⇓				
Πρόβλεψη Δομής	Ακολουθίες Πρωτεϊνών	ALMNAKKKPQ	ALMNAKKKPQ ALMNAKKKPQ	ALMNAKKKPQ ALMNAKKKPQ ALMNAKKKPQ ALMNAKKKPQ	ALMNAKKKPQ ALMNAKKKPQ ALMNAKKKPQ ALMNAKKKPQ ALMNAKKKPQ ALMNAKKKPQ
	⇓				



[Εικόνα 21] Συνολική παρουσίαση των εφαρμογών ανάλυσης βιολογικών δεδομένων [5.6]

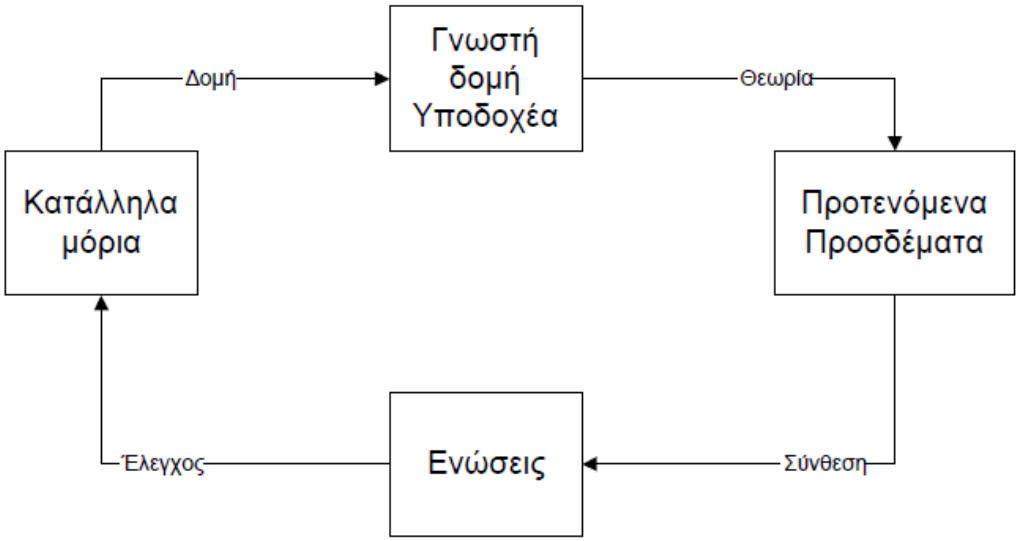
Το κρίσιμο ερώτημα που τίθεται στις μέρες μας στον τομέα του σχεδιασμού φαρμάκων, είναι το αν η ανακάλυψη νέων φαρμάκων στο μέλλον θα αποτελεί ένα συνδυασμό κρυσταλλογραφικών δεδομένων και υπολογιστικών μεθόδων. Η βασιζόμενη στη δομή σχεδίαση και ανακάλυψη φαρμακοφόρων μορίων γίνεται δεκτή με ενθουσιασμό στους περισσότερους επιστήμονες αφού αποτελεί μια αρκετά υποσχόμενη μέθοδο στην μακρά διαδικασία εύρεσης και ανάπτυξης θεραπευτικών μορίων (τα βήματα αυτής της διαδικασίας φαίνονται στον Πίνακα α). Αν και ο σχεδιασμός φαρμάκων που

βασίζεται αποκλειστικά στη δημιουργία μορίων συγκεκριμένης δομής και βιολογικής συμπεριφοράς δεν είναι βέβαιος, μπορούμε να υποβοηθούμε σημαντικά με αυτόν τον τρόπο τη σχεδίαση ειδικών ενζυμικών αναστολέων.

Βήματα στη σχεδίαση φαρμάκων
➢ Επιλογή της ένωσης οδηγού
➢ Βελτιστοποίηση της ένωσης οδηγού
➢ In vitro & in vivo δοκιμές
➢ Τοξικολογικές δοκιμές
➢ Δοκιμές στον άνθρωπο
➢ Έλεγχος απόδοσης

Πίνακας α: Τα βήματα που ακολουθούνται στη σχεδίαση φαρμάκων

Το πρώτο βήμα προς αυτή την κατεύθυνση έγινε πριν από 20 περίπου χρόνια με πρωτεργάτη τον Seymour Cohen, στην προσπάθεια ανάπτυξης φαρμάκων για μολυσματικές ασθένειες. Τα μολυσματικά μόρια, όπως οι ιοί, τα βακτήρια, τα μυκητοκτόνα κ.α., κωδικοποιούν στο μόριο τους τα κρίσιμα ένζυμα και νουκλεϊκά οξέα, τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πιθανοί στόχοι στην προσπάθεια καταπολέμησής τους. Στα χρόνια που ακολούθησαν η ικανότητα αναγνώρισης αρκετών πρωτεϊνών και νουκλεϊκών οξέων κατέστησε αρκετά εύκολες τις αντίστοιχες in vitro δοκιμές. Με αυτόν τον τρόπο αναπτύχθηκαν αρκετές αποτελεσματικές στρατηγικές στην ανακάλυψη μεγάλου αριθμού αναστολέων. Ταυτόχρονα τα δεδομένα που προκύπτουν από κρυσταλλογραφικές τεχνικές ή τεχνικές πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού βοηθούν στο βασιζόμενο στη δομή σχεδιασμό φαρμάκων. Σε αυτό το σημείο τα προγράμματα απεικόνισης των μοριακών δομών σε τρισδιάστατο επίπεδο με τη βοήθεια ηλεκτρονικού υπολογιστή βοηθούν σημαντικά τους επιστήμονες ώστε να αναπαραστήσουν τη δομή των μορίων και να ερμηνεύουν τη συμπεριφορά τους.



[Εικόνα 22] Βήματα για την ανακάλυψη ενώσεων οδηγών. Η επανάληψη της παραπάνω μεθόδου έχει συχνά οδηγήσει σε κλινικές δοκιμές μορίων.

Προηγουμένως αναφέραμε τις σημαντικότερες μεθόδους ανακάλυψης νέων φαρμακοφόρων μορίων. Εδώ θα πρέπει να προσθέσουμε ότι η αξιοποίηση των πληροφοριών που περιέχονται σε βάσεις δεδομένων φαρμακευτικών ουσιών αποτελεί επίσης μια μέθοδο ανακάλυψης νέων φαρμάκων, όταν παρατηρείται δομική και χημική ιδιότητα με δραστικές ενώσεις. Άλλωστε η κατανόηση του βιολογικού και βιοχημικού μηχανισμού μιας ασθένειας, καθορίζει τη μορφή των πιθανών φαρμάκων. Αν και σε ορισμένες περιπτώσεις, όπως η ανάπτυξη των αναστολέων πρωτεϊνασών (protease inhibitors), ο σχεδιασμός των αναστολέων μπορεί να επιτευχθεί χωρίς να έχουμε μια προτεινόμενη δομή - στόχο, στον πεπτιδικό-μιμητικό σχεδιασμό είναι απαραίτητη η γνώση μιας αρχικής δομής.

4.5.1 Structure- Based Design.

Η κεντρική ιδέα στο βασιζόμενο στη δομή σχεδιασμό φαρμάκων είναι ότι "οι πιθανοί αναστολείς πρέπει να χαρακτηρίζονται από δομική και χημική συμπληρωματικότητα ως προς τους υποδοχείς στόχους". Ένας κύκλος 4

βημάτων που συχνά ακολουθείται προκειμένου να συνδυαστούν οι δομικές πληροφορίες και οι υπολογιστικές μέθοδοι φαίνεται στην εικόνα 22.

Η γνώση της δομής του υποδοχέα (σε οποιαδήποτε μορφή) αποτελεί σημείο εκκίνησης για τη μοντελοποίηση. Ένα σύνολο υπολογιστικών προγραμμάτων και γραφικών πακέτων βοηθά στην αναπαράσταση των δομών των μορίων. Στο πίνακα β. αναφέρουμε ορισμένες από τις σημαντικότερες σύγχρονες υπολογιστικές μεθόδους. Τα τελευταία χρόνια όλο και περισσότερες φαρμακευτικές εταιρίες ενσωματώνουν στο ανθρώπινο δυναμικό τους ανθρώπους που ασχολούνται με τη τρισδιάστατη απεικόνιση φαρμακοφόρων μορίων προκειμένου να αναπτύξουν την έρευνά τους. Σημείο εκκίνησης αποτελούν τα δεδομένα από κρυσταλλογραφικές τεχνικές και μεθόδους πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού σε συνδυασμό με ένα κατάλληλο και αποδοτικό μοντέλο απεικόνισης της αντίστοιχης ένωσης (ανάλογα πάντα με το είδος της). Ως πρώτος στόχος είναι η απεικόνιση της επιφάνειας του μορίου και ο καθορισμός των ενεργών κέντρων ή άλλων κρίσιμων για τη λειτουργία του μορίου σημείων. Δεύτερο στόχο αποτελεί ο υπολογισμός των ενδοατομικών αποστάσεων και στη συνέχεια η παραγωγή γεωμετρικών διαμορφώσεων προκειμένου να εντοπίσουμε τη βέλτιστη (η βέλτιστη υστεροδιαμόρφωση ικανοποιεί κάθε φορά τις απαραίτητες συνθήκες που εμείς ορίζουμε) [5.10] . Αρκετά προγράμματα μάλιστα, συγκρίνουν τις παραγόμενες διαμορφώσεις με γνωστές δομές μορίων που παρουσιάζουν παρόμοια φυσικοχημική συμπεριφορά, ανατρέχοντας σε αντίστοιχες βάσεις [5.11]. Σημαντικό θέμα στην επιλογή της βέλτιστης διαμόρφωσης αποτελεί ο υπολογισμός της ενέργειας της αντίστοιχης στερεοδιαμόρφωσης, ο οποίος και πρέπει να είναι αρκετά ακριβής. Ο προσδιορισμός της δομής πιθανών ενεργών μορίων ενισχύεται σημαντικά από τους ηλεκτρονικούς υπολογιστές, ειδικότερα στην ανακάλυψη ενώσεων οδηγών, σε μια προσπάθεια ελαχιστοποίησης του συνολικού χρόνου σχεδιασμού φαρμάκων. Τα τελευταία χρόνια αυξάνεται και η συμβολή τους στη βελτιστοποίηση της ένωσης οδηγού όσον αφορά την τρισδιάστατη μορφή της . Στην επόμενη παράγραφο αναφερόμαστε στο πρόβλημα της πρωτεϊνικής προσάραξης-protein docking problem, το οποίο αποτελεί σημαντικό υπολογιστικό πρόβλημα στη Βιοπληροφορική και ειδικότερα στον τομέα μελέτης αλληλεπίδρασης DNA-πρωτεϊνών και συμπλεγμάτων πρωτεϊνών για το σχεδιασμό βιολογικών μικρομορίων με συγκεκριμένη δράση.

4.6.2 Το πρόβλημα της πρωτεϊνικής προσάραξης- The Protein Docking Problem

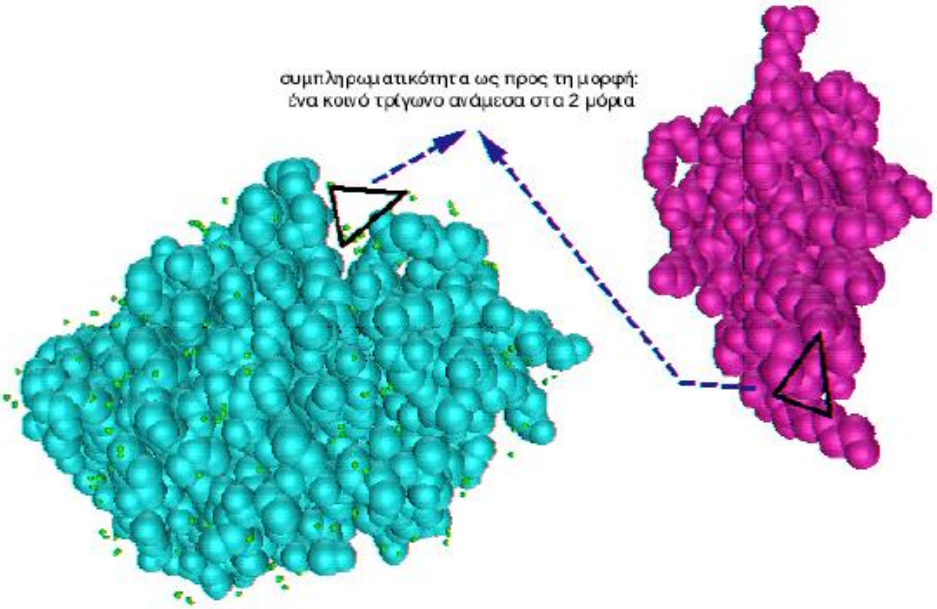
Όπως έχουμε ήδη αναφέρει οι πρωτεΐνες περιγράφονται πλήρως από την αμινοξεϊκή τους ακολουθία, όμως διακρίνονται για ειδικές λειτουργίες τους λόγω της τρισδιάστατης δομής τους, κυρίως από το σχήμα τους και το φυσικοχημικό τους περίβλημα. Αν και η δομή μιας πρωτεΐνης αποτελεί το κλειδί για τη βιολογική της λειτουργία, για πολλές πρωτεΐνες η επίλυση της δομής τους δεν είναι αρκετή για να καθοριστεί η λειτουργία τους. Πολλά ένζυμα εντείνουν την καταλυτική τους λειτουργία με βάση μια μικρή περιοχή στην πρωτεϊνική επιφάνεια που ονομάζεται ενεργός περιοχή (active site) ή ενεργό κέντρο του ενζύμου. Αυτή η περιοχή χαρακτηρίζεται από γεωμετρικά και φυσικοχημικά χαρακτηριστικά που είναι σχεδόν συμπληρωματικά ενός άλλου μορίου, του υποστρώματος. Έτσι το ενεργό κέντρο μιας πρωτεΐνης ενεργεί σαν υποδοχέας. Αυτή η διαδικασία πρόσδεσης υποδοχέα και υποστρώματος καλείται προσάραξη- docking. Η προσπάθεια εντοπισμού του ενεργού κέντρου και της κατανόησης με ακρίβεια της διαδικασίας προσάραξης αποτελεί ένα πολύ σημαντικό βήμα στην προσπάθεια αποκρυπτογράφησης των περισσότερων μεταβολικών αντιδράσεων. Με την κατανόηση της πρωτεϊνικής λειτουργίας ο σχεδιασμός φαρμάκων μπορεί να αναπτυχθεί σημαντικά. Εδώ πρέπει να συμπληρώσουμε ότι προκειμένου η πρωτεΐνη να βρεθεί σε μια ενεργειακή ισορροπία - ιδανική για την προσάραξή της- περνά από ένα σύνολο στερεοδιαμορφώσεων. Υπάρχουν εκατομμύρια διαμορφώσεις οι οποίες μπορούν να διαφέρουν σημαντικά. Ακριβώς η πρόβλεψη του τρόπου με τον οποίο δυο πρωτεΐνες έρχονται σε επαφή μεταξύ τους αποτελεί το πρόβλημα της πρωτεϊνικής προσάραξης (protein docking) και βοηθά στην κατανόηση της αλληλεπίδρασης μεταξύ δυο πρωτεϊνών. Εδώ ακριβώς εισάγεται ο ηλεκτρονικός υπολογιστής για να ελέγξει τον μεγάλο αριθμό πιθανών στεροδιαμορφώσεων και να μειώσει την υπολογιστική πολυπλοκότητα των πειραμάτων που πρέπει να πραγματοποιηθούν. Οι σύγχρονες τεχνικές των μοριακών γραφικών, επιτρέπουν την απεικόνιση της τρισδιάστατης αρχιτεκτονικής των μορίων των πρωτεϊνών στην ενεργειακά ευνοϊκότερη διαμόρφωση. Στη δομή αυτή είναι δυνατόν να επέμβουμε είτε απομονώνοντας τμήματα των μορίων, είτε αλλάζοντας τον προσανατολισμό ορισμένων ομάδων είτε ψάχνοντας για

άλλες δυνατές διαμορφώσεις. Τα μοριακά αυτά μοντέλα επιτρέπουν την απεικόνιση των διάφορων φυσικοχημικών χαρακτηριστικών, που επηρεάζουν τις αλληλεπιδράσεις ενός μορίου με άλλα μόρια, επιτρέπουν τη σύγκριση ανάμεσα σε διαφορετικά μόρια προσδιορίζοντας περιοχές ομοιοτήτων και διαφορών. Επιπλέον είναι δυνατή η απεικόνιση (σε τρισδιάστατο χώρο) της προσαρμογής ενός μικρομορίου (π.χ. φαρμάκου) σε ένα μακρομόριο (υποδοχέα).

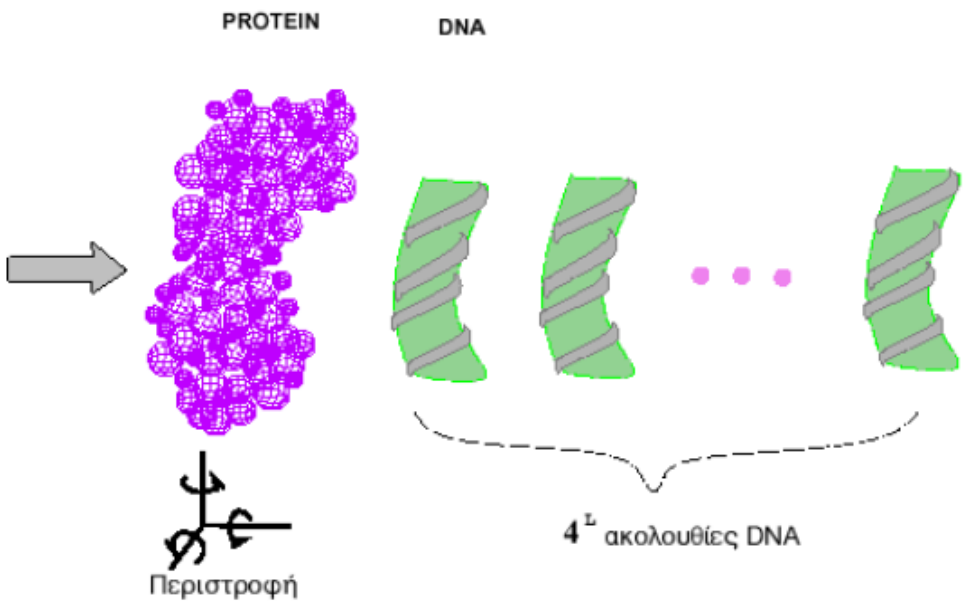
4.6.3 Η φιλοσοφία των αλγορίθμων του protein docking problem.

Όπως ήδη αναφέραμε, προκειμένου να ενωθούν δύο βιολογικά δραστικά μόρια πρέπει αρχικά να λάβουν την ενεργειακά ευνοϊκότερη διαμόρφωση. Αυτή η διαμόρφωση παίζει καθοριστικό ρόλο στην αλληλεπίδραση του δραστικού μέρους του υποδοχέα μιας πρωτεΐνης με το υπόστρωμα μιας άλλης (η αλληλεπίδραση επιτυγχάνεται όταν το βιολογικά δραστικό μόριο μεταβαίνει από μία ενεργειακά ευνοϊκή διαμόρφωση στην οποία βρίσκεται, σε μία διαμόρφωση συμπληρωματική της διαμόρφωσης του υποδοχέα). Άρα προκειμένου να εντοπίσουμε την ευνοϊκότερη διαμόρφωση απαιτείται να μελετήσουμε τις επιφάνειες επαφής με σκοπό να εξάγουμε χρήσιμα συμπεράσματα. Στη μελέτη αυτή οι περισσότεροι αλγόριθμοι λαμβάνουν υπόψη τους δύο βασικές αρχές, οι οποίες έχουν αναγνωριστεί ως σημαντικές τόσο για την αναγνώριση όσο και το ταίριασμα των δραστικών μορίων. Η πρώτη αρχή είναι γνωστή ως: “αρχή της συμπληρωματικότητας ως προς τη μορφή-στερεοχημεία”. Η μορφή των δραστικών μορίων (τουλάχιστον γεωμετρικά) είναι συμπληρωματική, και αυτό γιατί έχει παρατηρηθεί μεγάλο ταίριασμα ανάμεσα στα μόρια που έρχονται σε επαφή. Η δεύτερη αρχή είναι γνωστή ως: “αρχή της συμπληρωματικότητας ως προς την ηλεκτρονιακή διαμόρφωση”. Έχει επίσης αποδειχθεί ότι υπάρχει μεγάλη χημική συμπληρωματικότητα (δεσμοί υδρογόνου, ηλεκτροστατικές αντιδράσεις ,κ.τ.λ.) ανάμεσα στα μόρια που έρχονται σε επαφή. Παρόλο που η δεύτερη αρχή είναι η πιο σημαντική, υπάρχει η δυνατότητα αναγνώρισης πολλών μορίων ικανών να ενωθούν μόνο με τη βοήθεια της αρχής της συμπληρωματικότητας της μορφής. Προκειμένου να βρούμε τα συμπληρωματικά μόρια που ανήκουν σε δυο πρωτεΐνες A, B με n και m αντίστοιχα άτομα η καθεμιά (έστω από υπόθεση n>m) έχουμε σε τελική

ανάλυση να επιλύσουμε ένα 3D πρόβλημα ταιριάσματος [5.12]. Το πρόβλημα μπορεί να διατυπωθεί ως εξής: "καθόρισε όλες τις ευνοϊκές στερεοδιαμορφώσεις του Β έτσι ώστε να υπάρχει ένα μεγάλο ταίριασμα ανάμεσα στην επιφάνεια του Α και την επιφάνεια του Β χωρίς όμως να υπάρχει διείσδυση του Β στο εσωτερικό του Α". Στην εικόνα 23 και 24 μπορούμε να δούμε ένα παράδειγμα πρωτεϊνικής προσάραξης που βασίζεται στη συμπληρωματικότητα ως προς τη μορφή.



[Εικόνα 23] Παράδειγμα συμπληρωματικότητας ως προς τη μορφή 2 μορίων. Το τρίγωνο που φαίνεται στα 2 μόρια καθορίζει την πιθανή περιοχή της μοριακής τους προσάραξης.



[Εικόνα 24] Σχηματική αναπαράσταση της ακολουθούμενης μεθοδολογίας για την πρόβλεψη της πρόσδεσης των μορίων DNA και πρωτεΐνης.

Υπάρχουν 4^L διαφορετικοί συνδυασμοί ακολουθιών DNA όπου L είναι ο αριθμός των ζευγών βάσεων. Δοθείσης μιας πρωτεΐνης με P σημεία ανάπτυξης δεσμών υδρογόνου προσπαθούμε να προβλέψουμε την ακολουθία του DNA με την οποία μπορεί να προσδεθεί. Για παράδειγμα για το σύμπλοκο Zif268-DNA θεωρούμε 20 πιθανά σημεία πρόσδεσης πάνω στην πρωτεΐνη και 8 ζεύγη βάσεων του DNA. Για 8 ζεύγη με 4 πιθανές επιλογές στο καθένα έχουμε 4^8 = 65536 πιθανές ακολουθίες DNA. Υπάρχουν 32 υποθετικά σημεία ανάπτυξης δεσμών υδρογόνου, οπότε ψάχνουμε για 16 δεσμούς υδρογόνου. Άρα έχουμε να ερευνήσουμε 10^{28} πιθανά ταιριάσματα.

Βιβλιογραφία

[5.1]http://www.pharmamanage.gr/uploads/file/Microsoft%20PowerPoint%20-%20ALYSOS%20FINAL%2022-01-12%20%5BCompatibility%20Mode%5D.pdf

[5.1] S.P.Gardner, T.P.Flores, Integrating information technology with Pharmaceutical discovery and development, pharmainformatics, Elsevier Science Ltd, 1999.

[5.2] 1. Kruglyak L, Nickerson DA. Variation is the spice of life. Nat Genet. 2001;27(3):234–236. \

[5.3] *Carlson CS, Eberle MA, Rieder MJ, Smith JD, Kruglyak L, et al. Additional SNPs and linkage-disequilibrium analyses are necessary for whole-genome association studies in humans. Nat Genet. 2003;33(4):518–521.* \

[5.4] *Gonzalez-Neira A, Ke X, Lao O, Calafell F, Navarro A, et al. The portability of tagSNPs across populations: a worldwide survey. Genome Res. 2006;16(3):323–330.* \

[5.5] B.Rost, C.Sander, Structure prediction of proteins - where are we now? Current Opinion in Biotechnology, Vol. 5, pp. 372-380,1994.

[5.6] J.Brickmann, T.E.Exner, M. Keil, R.J. Marhofer, Molecular Graphics - Trends and Perspectives, J.Mol.Model., Vol 6, pp. 328-340, 2000.

[5.7] K. Perdikuri, A. Tsakalidis, Computer Graphics Applications on Drug Discovery and Drug Design, In the proceedings of the 3rd Hellenic Forum on Bioactive Peptides, 11-14 April 2002, Patras, Greece.

[5.8] 1. P.G. Mezey, "Computer Aided Drug Design: Some Fundamental Aspects", J.Mol.Model. 2000, Vol. 6, pp. 150-157.

[5.9]. P.G. Mezey, "Computer Aided Drug Design: Some Fundamental Aspects", J.Mol.Model. 2000, Vol. 6, pp. 150-157.

[5.10]. I.D. Kuntz, "Structure - Based Strategies for Drug Design and Discovery", Science, Vol. 257, 1992.

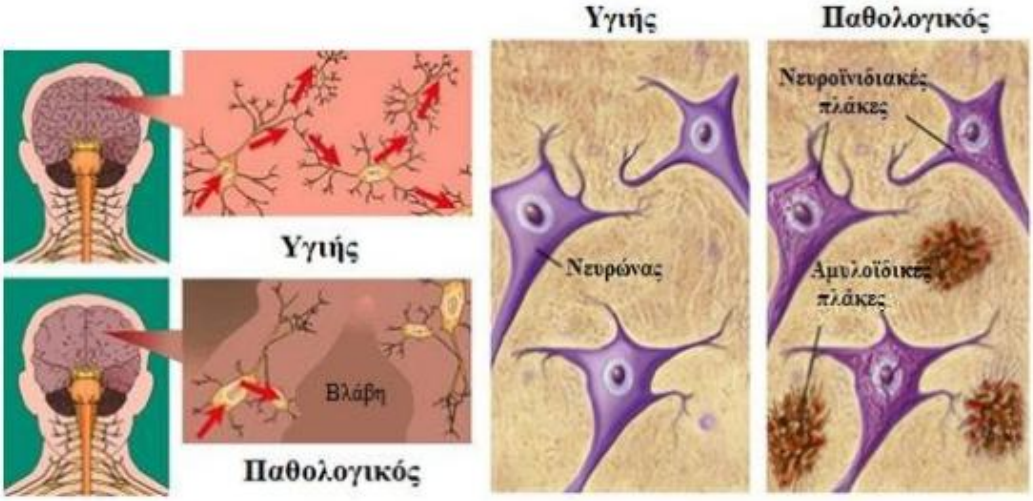
[5.11]. W.C.Guida, "Software for structure- based drug design", Current Opinion in StructuralBiology, 1994, Vol. 4, pp. 777-781.

[5.12] . H.P.Lenhof, "An algorithm for the protein docking problem", From Nucleic Acid and Proteins to Cell Metabolism, edited by D.Schomburg and U.Lessel, 1995, pp. 125-139.

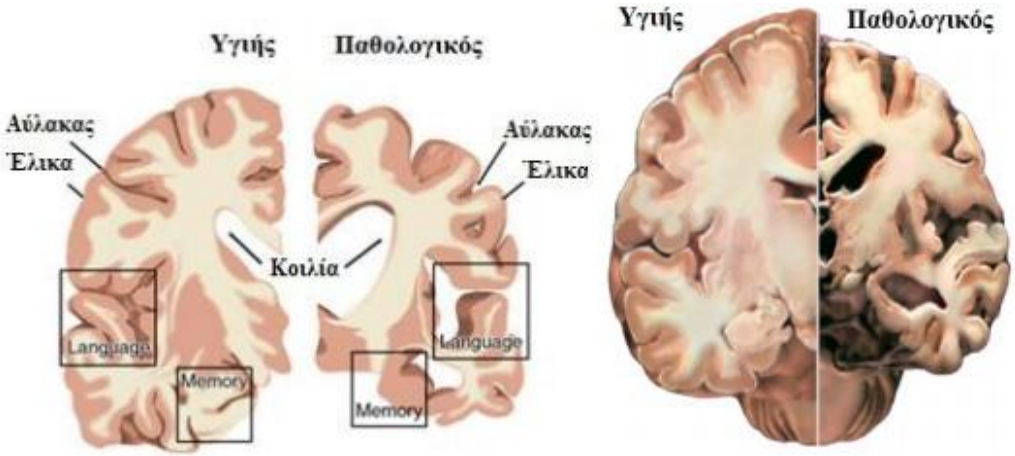
5. Περιγραφή της νόσου Alzheimer. Ποιες μεταλλάξεις γονιδίων την προκαλούν. Ποια είναι η σύγχρονη μέθοδος για τη δημιουργία φαρμάκων με σκοπό την καταπολέμησή της νόσου.

5.1 Η νόσος Alzheimer

Η νόσος Alzheimer (ΝΑ) είναι μια εκφυλιστική νόσος τους εγκεφάλου, η οποία αργά και προοδευτικά καταστρέφει εγκεφαλικά κύτταρα. Πήρε το όνομά της από τον Alois Alzheimer, Γερμανό νευρολόγο, ο οποίος το 1906 πρώτος περιέγραψε τα συμπτώματα και τα νευροπαθολογοανατομικά ευρήματα της νόσου, όπως είναι οι αμυλοειδικές γεροντικές πλάκες και οι νευροϊνιδιακές εκφυλίσεις στον εγκέφαλο, που εντοπίζονται σε συγκεκριμένες περιοχές υπεύθυνες για τη μνήμη και τη μάθηση [Εικόνα 25]. Η άνοια της νόσου Alzheimer κατατάσσεται ως ψυχική και συμπεριφορική διαταραχή σύμφωνα με το ICD-10 [6.1]. Χαρακτηρίζεται από προοδευτική έκπτωση των νοητικών λειτουργιών, όπως μνήμης, σκέψης, αντίληψης, υπολογισμού, ομιλίας, ικανότητας μάθησης και κρίσης, αλλά μπορεί επίσης να οδηγήσει και σε άλλα προβλήματα, όπως σε σύγχυση, αλλαγές στη διάθεση και αποπροσανατολισμό σε χρόνο και χώρο [Εικόνα 26] [6.2].



[Εικόνα 25] Μικροσκοπικά χαρακτηριστικά της νόσου Alzheimer [6.3]

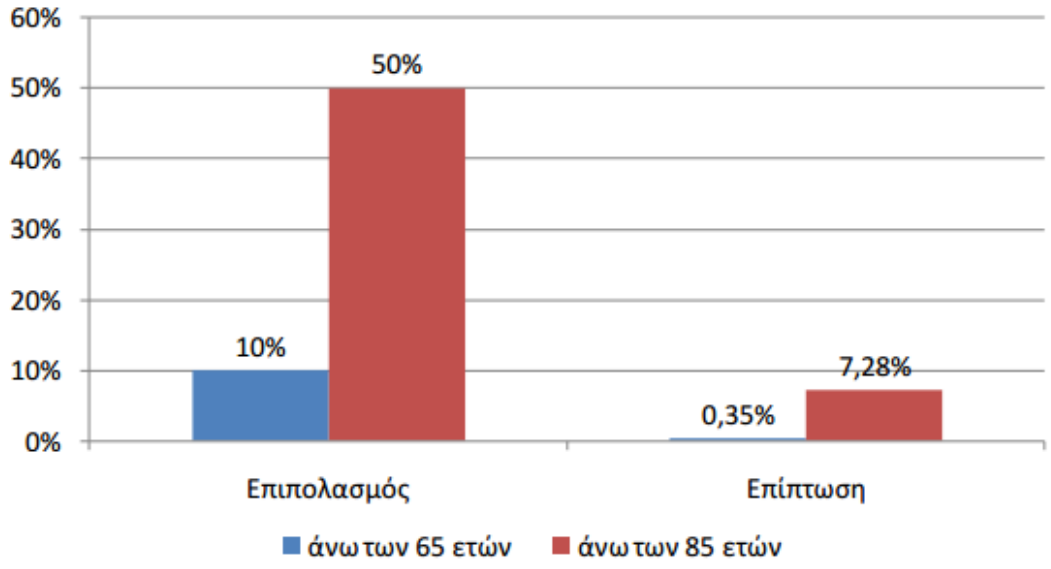


[Εικόνα 26] Μακροσκοπικά χαρακτηριστικά της νόσου Alzheimer [6.4,6.5].

Η ΝΑ έχει ύπουλη έναρξη και βραδεία επιδείνωση. Η ασθένεια πρέπει να διαφοροποιηθεί σαφώς από την φυσιολογική έκπτωση των νοητικών λειτουργιών λόγω ηλικίας. Η φυσιολογική έκπτωση είναι πολύ μικρότερη, πιο σταδιακή και προκαλεί μικρότερη αναπηρία. Η ΝΑ συχνά αρχίζει μετά τα 65

έτη, αλλά πολλές φορές και νωρίτερα. Στις μεγαλύτερες ηλικίες, η επίπτωση αυξάνεται ταχέως (διπλασιάζεται κάθε 5 έτη). Αυτό έχει προφανή επακόλουθα ως προς τον συνολικό αριθμό των ατόμων με αυτή τη διαταραχή, καθώς το προσδόκιμο ζωής του πληθυσμού μεγαλώνει [6.6].

Ο επιπολασμός της ΝΑ φθάνει σε ποσοστό 10% σε άτομα άνω των 65 ετών και 50% σε άτομα άνω των 85 ετών. Η επίπτωση της νόσου αυξάνει με την αύξηση της ηλικίας και είναι 3.5/1000/έτος στις ηλικίες 65-69 ετών και 72.8/1000/έτος στις ηλικίες 85-89 ετών [Εικόνα 27] [6.7].



[Εικόνα 27] Επίπτωση και επιπολασμός της νόσου Alzheimer.

Η ΝΑ είναι μια εκφυλιστική νόσος του εγκεφάλου από την οποία πάσχουν 150.000 άνθρωποι στην Ελλάδα, 6.000.000 στην Ευρώπη και 26.000.000 σε όλο τον κόσμο. Οι αριθμοί αυτοί αναμένεται να τετραπλασιαστούν μέχρι το 2040 [6.7, 6.8]. Στα αρχικά στάδια της νόσου, τα συμπτώματα, όπως η διαταραχή στη μνήμη και η απώλεια των νοητικών λειτουργιών, είναι ιδιαίτερα ελαφρά ώστε να περνούν απαρατήρητα, τόσο από το ίδιο το άτομο όσο και από την οικογένεια και τους φίλους του. Ωστόσο, καθώς η νόσος εξελίσσεται, τα συμπτώματα γίνονται ολοένα και πιο εμφανή [6.9].Η παθολογική διεργασία στον εγκέφαλο των ασθενών με τη ΝΑ αρχίζει δεκαετίες πριν από την εμφάνιση των κλινικών συμπτωμάτων. Η αιτιολογία της ασθένειας παραμένει άγνωστη, αν και έχει μελετηθεί ένας αριθμός

αιτιολογικών παραγόντων. Η φυλή, το επάγγελμα, το επίπεδο της μόρφωσης, το φύλλο, η γεωγραφική θέση, ο τρόπος ζωής, η κοινωνικο-οικονομική κατάσταση συμβάλλουν στην εμφάνιση της νόσου αλλά δεν θεωρούνται καθοριστικοί. Για παράδειγμα, υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις ότι τα άτομα με υψηλότερο μορφωτικό επίπεδο κινδυνεύουν λιγότερο, υπάρχουν περισσότερες γυναίκες με τη νόσο Alzheimer από ότι άνδρες [6.8, 6.10].Σημαντικοί παράγοντες εμφάνισης της νόσου θεωρούνται, η αυξημένη ηλικία, η οικογενειακή προδιάθεση, τα τραύματα στον εγκέφαλο, οι διαταραχές του μεταβολισμού και ρύθμισης της πρόδρομης αμυλοειδούς πρωτεΐνης και της tau πρωτεΐνης καθώς και οι γενετικές συνιστώσες [6.10, 6.11]. Την εμφάνιση της νόσου «πυροδοτεί» η επανατοποθέτηση στον εγκέφαλο της παθολογικής πρωτεΐνης β-αμυλοειδούς. Το β-αμυλοειδές τοποθετείται ανάμεσα στους νευρώνες, μέσα στα αγγεία και μέσα στα ίδια τα νευρικά κύτταρα και καταστρέφει τον εγκέφαλο, δημιουργώντας τις χαρακτηριστικές πλάκες που εμφανίζονται στον εγκέφαλο των ασθενών με τη ΝΑ. Παράλληλα, η τ-πρωτεΐνη αρχίζει να εμφανίζει υπερφωσφορυλίωση, να λαμβάνει δηλαδή παραπάνω μόρια φωσφόρου από όσα συνήθως έχει. Έτσι, ενώ αποτελεί πολύ χρήσιμη πρωτεΐνη προκειμένου να διατηρείται η δομή των νευρικών κυττάρων σε φυσιολογική κατάσταση, όταν υπερφωσφορυλιώνεται «χαλάει» τη δομή των μικροσωληναρίων που υπάρχουν εντός των νευρικών κυττάρων με αποτέλεσμα να μην υπάρχει δυνατότητα κίνησης των διαφόρων ιόντων και πρωτεϊνών μέσα στα κύτταρα και αυτά τελικά να πεθαίνουν [6.11-6.17].

Έχει ανακαλυφθεί ότι υπάρχει κληρονομική προδιάθεση για την εμφάνιση της ΝΑ. Όσοι έχουν οικογενειακό ιστορικό αντιμετωπίζουν τέσσερις φορές μεγαλύτερο κίνδυνο να παρουσιάσουν τη νόσο. Υπάρχουν περίπου 200 μεταλλάξεις που αν κάποιος φέρει μία από αυτές σε ένα από τα χρωμοσώματα 1, 14 ή 21 τότε είναι σίγουρο ότι θα εμφανίσει τη νόσο. Ωστόσο, αυτές οι περιπτώσεις δεν αποτελούν ποσοστό μεγαλύτερο του 5% επί του συνόλου των κρουσμάτων [6.11-6.17].

Το Αλτσχάιμερ μπορεί να εξηγηθεί κυρίως από μεταλλαγές σε τρία γονίδια, αλλά η πιο κοινή μορφή δεν μπορεί να εξηγηθεί ακόμα με κάποιο καθαρά γενετικό μοντέλο. Το γονίδιο απολιποπρωτεΐνης (APOE) είναι ο ισχυρότερος

γενετικός παράγοντας κινδύνου για Αλτσχάιμερ που ανακαλύφθηκε μέχρι τώρα, αλλά η παρουσία του δεν εξηγεί όλα τα περιστατικά της ασθένειας. Αυτές οι μεταλλαγές έχουν ανακαλυφθεί σε τρία διαφορετικά γονίδια: γονίδιο αμυλοειδούς πρωτεΐνης (APP) και πρεζενιλινών 1 και 2. Οι περισσότερες μεταλλαγές στα γονίδια APP και πρεζενιλινών αυξάνουν την παραγωγή μιας μικρής πρωτεΐνης αποκαλούμενης Abeta42, το οποίο είναι το κύριο συστατικό των πλακών γεροντικής άνοιας. Στις περισσότερες περιπτώσεις του Αλτσχάιμερ δεν αποδεικνύεται η κληρονομικότητα, αλλά τα γονίδια μπορούν να ενεργήσουν ως παράγοντες για την εκδήλωση της ασθένειας. Ο πιο γνωστός γενετικός παράγοντας είναι το αλληλόμορφο γονίδιο ε4 του APOE. Αυτό το γονίδιο εμπλέκεται σε μέχρι 50% των περιπτώσεων του Αλτσχάιμερ. Οι γενετιστές συμφωνούν ότι πολυάριθμα άλλα γονίδια ενεργούν επίσης ως παράγοντες κινδύνου ή παίζουν προστατευτικό ρόλο που επηρεάζει την ανάπτυξη του Αλτσχάιμερ. Πάνω από 400 γονίδια έχουν εξεταστεί για συσχέτιση με το σποραδικό Αλτσχάιμερ, τα περισσότερα με μηδενικά αποτελέσματα. Ένας υποψήφιος είναι μια παραλλαγή του γονιδίου της ρεελίνης, η οποία μπορεί να συμβάλλει στην ανάπτυξη Αλτσχάιμερ στις γυναίκες.

Από την ανακάλυψή της το 1973 [6.18] μέχρι σήμερα, η απολιποπρωτεϊνη Ε (Apo-E) έγινε αντικείμενο εκτεταμένης έρευνας, η οποία αποκάλυψε πολλές από τις ιδιότητες της και την εμπλοκή της στην παθογένεια διαφόρων νοσημάτων. Το αρχικό ενδιαφέρον εστιάσθηκε στην σχέση της Apo-E με την υπερλιπιδαιμία τύπου ΙΙΙ και με την ανάπτυξη καρδιαγγειακής νόσου [6.19-6.21]. Η σημασία της Apo-E για το ΚΝΣ έγινε αντιληπτή το 1993 μετά την ανακάλυψη της σχέσης του αλληλόμορφου γονιδίου της Apo-E με την όψιμη μορφή της οικογενούς και σποραδικής νόσου Alzheimer (ΝΑ) [6.22-6.23]. Στη συνέχεια, η έρευνα απεκάλυψε καινούργια στοιχεία για το ρόλο της Apo-E και σε άλλα νευροεκφυλιστικά νοσήματα.

Πρώτα απ’ όλα θα εξετάσουμε τη δομή, τη γενετική και τη λειτουργία της Apo-E με έμφαση στο ρόλο της στην φυσιολογία του εγκεφάλου και στη συμμετοχή της σε μηχανισμούς πρόκλησης νευρολογικών διαταραχών.

Πρόκειται για μια πρωτεΐνη που αποτελείται από 299 αμινοξέα (ΜΒ: 34.200 Da) και σχηματίζει μια πολυπεπτιδική αλυσίδα [6.24-6.26]. Η πρωτεΐνη αυτή παράγεται από μια πρόδρομη με 317 αμινοξέα, μετά από απόσπαση από το

αμινοτελικό της άκρο ενός πεπτιδίου 18 αμινοξέων. Η απολιποπρωτεϊνη Ε στον άνθρωπο παράγεται κυρίως στο ήπαρ και εκκρίνεται σαν Ο-γλυκοζυλιωμένη πρωτεΐνη [6.24-6.26].

Η απολιποπρωτεϊνη Ε κωδικοποιείται από ένα γονίδιο που εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 19, στην περιοχή 19q 13.2, το οποίο έχει μέγεθος 3.7 Kb (3597 νουκλεοτίδια) και περιέχει τέσσερα εξόνια και τρία ιντρόνια [6.24-6.28]. Η απολιποπρωτεϊνη Ε εκφράζεται με γενετικό πολυμορφισμό. Υπάρχουν 3 κύριες Apo-E ισομορφές, Ε2, Ε3 και Ε4 που κωδικοποιούνται από 3 αλληλόμορφα γονίδια ε2, ε3 και ε4. Σαν αποτέλεσμα προκύπτουν 6 πιθανοί γονότυποι (3 ομόζυγοι και 3 ετερόζυγοι): ε 2/2, ε 2/3, ε 2/4, ε 3/3, ε 3/4, ε 4/4. Το συχνότερο αλλήλιο είναι το ε3 (παρατηρείται στο 75% των ατόμων της λευκής φυλής) και χαρακτηρίζεται από την παρουσία κυστεΐνης στο κωδικόνιο 112 και αργινίνης στο κωδικόνιο 158. Δεύτερο σε σειρά συχνότητος (15%) είναι το ε4, στο οποίο η κυστεΐνη έχει αντικατασταθεί από αργινίνη. Το ε2 παρατηρείται σε συχνότητα 10% και χαρακτηρίζεται από την παρουσία κυστεΐνης στα κωδικόνια 112 και 157 [6.24].

Η κύρια λειτουργία της Apo-E συνίσταται στη συμμετοχή της στο μεταβολισμό των λιπιδίων. Πιο συγκεκριμένα η Apo-E αποτελεί δομικό στοιχείο των χυλομικρών, των VLDL (ειδικότερα των β-VLDL), των LDL και μιας υποομάδας των HDL λιποπρωτεϊνών (αναφέρονται σαν HDL1, HDLc ή HDL-με Apo-E) [6.24, 6.25, 6.28]. Η δράση της σχετίζεται με δύο μεταβολικές οδούς [6.24]: 1) Οδός ανακατανομής λιπιδίων μεταξύ κυττάρων διαφορετικών οργάνων. Η Apo-E συμμετέχει στη μεταφορά της χοληστερόλης και των άλλων λιπιδίων από τις περιοχές σύνθεσης ή απορρόφησης σε κύτταρα άλλων οργάνων. 2) Οδός ανακατανομής των λιπιδίων μεταξύ κυττάρων του ίδιου ιστού ή οργάνου. Κύτταρα κορεσμένα σε χοληστερόλη και άλλα λιπίδια μπορούν να απελευθερώσουν αυτές τις ουσίες ως σύμπλοκα με την Apo-E για να μεταφερθούν σε κύτταρα που χρειάζονται τα λιπίδια για τον πολλαπλασιασμό και την επούλωση.

Η δράση της Apo-E επιτυγχάνεται μέσω της σύνδεσής της με μια ποικιλία υποδοχέων που ανήκουν στην ευρύτερη οικογένεια των LDL υποδοχέων και συγκεκριμένα στον: LDL υποδοχέα (LDLR), στον LDL-συγγενικό υποδοχέα (LRP) και στον Apo-E2 υποδοχέα (Apo-E2 R) ή VLDL υποδοχέα (VLDLR) [6.24,

6.25, 6.28, 6.29]. Έχει διαπιστωθεί η παρουσία αυτών των υποδοχέων στον εγκέφαλο μέσω των οποίων εκδηλώνεται η δράση της Apo-E στο ΚΝΣ [6.29].

Η απολιποπρωτεϊνη Ε παρουσιάζει και λειτουργίες ανεξάρτητες από τον μεταβολισμό των λιπιδίων. Η Apo-E τροποποιεί την ανοσολογική απάντηση και σε μεγάλες ποσότητες αναστέλλει την μιτογόνο διέγερση των λεμφοκυττάρων συνδεόμενη σε συγκεκριμένους υποδοχείς της επιφάνειας των λεμφοκυττάρων [6.24, 6.29]. Έτσι, φαίνεται ότι αποκτά έναν ευρύτερο ρόλο στην ανοσολογία και ανοσορύθμιση. Επιπρόσθετα, η Apo-E, που παράγεται από τις λείες μυϊκές ίνες, φαίνεται ότι συμμετέχει στον πολλαπλασιασμό και στην κυτταρική διαφοροποίηση τους [6.24].

Ένα από τα πρώτα στοιχεία που υποδεικνύουν το ρόλο της Apo-E στο ΚΝΣ προέρχεται από μελέτη σχετικά με την έκφραση του m-RNA της Apo-E στους ιστούς. Βρέθηκε ότι ο εγκέφαλος είναι η δεύτερη κύρια θέση έκφρασης m-RNA στον άνθρωπο, όπου τα επίπεδα της Apo-E ανέρχονται στο ένα τρίτο αυτών που απαντώνται στο ήπαρ [6.33]. Το m-RNA της ApoE κατανέμεται σε όλες τις περιοχές του εγκεφάλου [6.33], ενώ συντίθεται και εκκρίνεται κυρίως από κύτταρα της νευρογλοίας, ειδικότερα τα αστροκύτταρα [6.28, 6.30, 6.34]. Ένας αριθμός πρόσφατων μελετών αναφέρει ότι η Apo-E βρίσκεται και στους νευρώνες [6.30]. Ενδονευρωνική Apo-E έχει αναγνωριστεί στον ανθρώπινο εγκέφαλο υγιών ατόμων και ατόμων με νόσο Alzheimer [6.30, 6.35]. Η Apo-E είναι η κύρια απολιποπρωτεϊνη στο ΕΝΥ, όπου κυκλοφορεί σαν μικρή σφαιρική και δισκοειδής λιποπρωτεΐνη, που μεταφέρει χοληστερόλη και φωσφολιπίδια μεταξύ των κυττάρων με στόχο τη διατήρηση της ομοιόστασης στο εγκεφαλικό περιβάλλον [6.24, 6.25, 6.36].

Η σημασία της Apo-E στο νευρικό σύστημα απέκτησε μια πρόσθετη διάσταση μετά την παρατήρηση ότι διεγείρεται η παραγωγή της ύστερα από τραυματισμό περιφερικού νεύρου [6.37-6.39]. Το στοιχείο αυτό υποδηλώνει το ρόλο της στη νευρωνική ανάπτυξη και πλαστικότητα. Η Apo-E φαίνεται ότι συμμετέχει στην απομάκρυνση των λιπιδίων από τους εκφυλισμένους νευράξονες και στην ανακατανομή τους μέσω των μακροφάγων, για την αναγέννηση των νευραξόνων αρχικά και στη συνέχεια, μέσω των κυττάρων του Schwann, για την επαναμυελίνωση.

Τέλος, ιδιαίτερης σημασίας είναι η αναφορά στις διαφορετικές επιδράσεις των ισομορφών της Apo-E στο ΚΝΣ, επειδή μπορεί να βοηθήσει στην ερμηνεία των μηχανισμών πρόκλησης διαφόρων νευροεκφυλιστικών

νοσημάτων. Πρόκειται για στοιχεία που αναδύονται τον τελευταίο καιρό μέσα από λεπτομερείς μελέτες της δομής και της λειτουργίας της πρωτεΐνης αυτής. Έτσι, έχουν πραγματοποιηθεί in vitro μελέτες σε καλλιέργειες κυττάρων, που αφορούν στην επίδραση των ισόμορφων της Apo-E στη νευρωνική ανάπτυξη. Φαίνεται ότι η Apo-E3 αυξάνει την ανάπτυξη του νευρίτη, ενώ η Apo E4 την αναστέλλει. Οι επιδράσεις αυτές πιθανολογείται ότι αντανακλούν τις ενδοκυττάριες λειτουργίες της Apo-E [6.28]. Η Apo-E3 διεγείρει τον πολυμερισμό της β-τουμπουλίνης και σταθεροποιεί το σχηματισμό των μικροσωληνίσκων, in vitro, σε αντίθεση με την Apo-E4 [6.28]. Οι Strittmatter διαπίστωσαν ότι, εκλεκτικά η Apo-E3 και όχι η Apo-E4, αλληλεπιδρά, με την tau πρωτεΐνη. Διατύπωσαν την υπόθεση ότι η Apo-E3 προστατεύει την tau πρωτεΐνη από την υπερφωσφορυλίωση η οποία συμβάλλει στο σχηματισμό των χαρακτηριστικών για την νόσο Alzheimer νευροϊνιδιακών αλλοιώσεων. Υπάρχει, επίσης, ένας διαρκώς αυξανόμενος όγκος στοιχείων, που δηλώνουν ότι η Apo-E μπορεί να επηρεάσει την επιβίωση των νευρώνων, μέσω συμμετοχής σε διαδικασίες οξειδωτικού stress. Ο μηχανισμός αυτός είναι ακόμη υπό διερεύνηση. Φαίνεται ότι η Apo-E έχει αντιοξειδωτικές ιδιότητες διαφορετικού βαθμού στις ισόμορφες της (η Apo E2 έχει την ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση και η Apo E4 την ασθενέστερη) [6.41].

Η πιο γνωστή και εκτενέστερα μελετημένη συσχέτιση της Apo-E με εκφυλιστικά νοσήματα του ΚΝΣ αφορά στη νόσο του Alzheimer [6.41, 6.42]. Ιδιαίτερο όμως ενδιαφέρον παρουσιάζουν πρόσφατες μελέτες που ερευνούν την εμπλοκή της Apo-E σε διάφορες παθήσεις με διαταραχή κινητικότητας όπως π.χ. η νόσος του Parkinson, η άνοια με σωμάτια του Lewy, η προϊούσα υπερπυρηνική παράλυση κ.α.

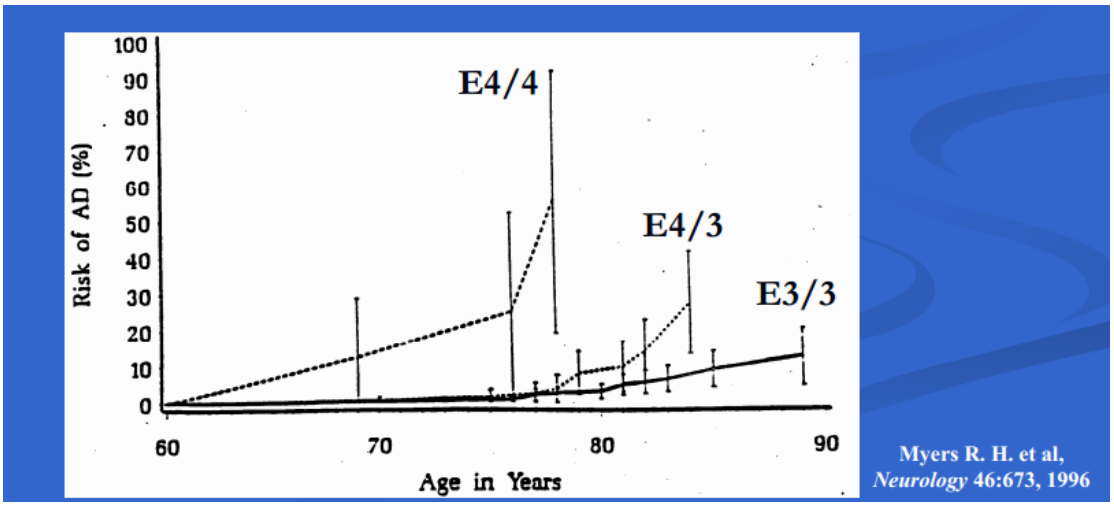
Η αποπολιτοπρωτεινη παίζει σημαντικό ρόλο στη νόσο του Alzheimer.

Η αποπολιτοπρωτεϊνη Ε (αποΕ) είναι μια κύρια πρωτεΐνη του συστήματος μεταφοράς λιπιδίων και παίζει σημαντικό ρόλο στη δυσλιπιδαιμία , την αθηροσκλήρωση και στην παθογένεση της νόσου του Alzheimer .

Η αποΕ εκφράζεται στο ήπαρ , τον εγκέφαλο και άλλους ιστούς.

ΑποΕ και νόσος του Alzheimer

Η αποΕ έχει τρεις κοινές ισόμορφες (αποΕ2, αποΕ3, αποΕ4) στο γενικό πληθυσμό. Η αποΕ4 είναι ο σημαντικότερος δείκτης κινδύνου της νόσου του Alzheimer . Η αποΕ4 μειώνει την ηλικία της εμφάνισης της νόσου του Alzheimer. [Εικόνα 28]



[Εικόνα 28]:Τα επίπεδα της χοληστερόλης είναι σημαντικά για την παθογένεση της νόσου του Alzheimer .

Επιδημιολογικές μελέτες έδειξαν ότι τα υψηλά επίπεδα χοληστερόλης στο αίμα μπορεί να συνεισφέρουν στη παθογένεση της νόσου του Alzheimer . Επίσης, ασθενείς με νόσο του Alzheimer έχει βρεθεί ότι έχουν υψηλά επίπεδα LDL-χοληστερόλης και χαμηλά επίπεδα HDL-χοληστερόλης . Πειραματόζωα που διατρέφονται με τροφή υψηλή σε χοληστερόλη είχαν αυξημένα επίπεδα Αβ. Η κατανομή και τα επίπεδα της χοληστερόλης στα εγκεφαλικά κύτταρα επηρεάζει το σχηματισμό και τον καταβολισμό του Αβ. Οι στατίνες είναι ευεργετικές για τη νόσο του Alzheimer. Κάποιες κλινικές μελέτες έδειξαν ότι οι στατίνες , που χορηγούνται για τη μείωση των επιπέδων χοληστερόλης του αίματος , προφυλάσσουν επίσης από τη νόσο του Alzheimer. Πειραματόζωα στα οποία χορηγήθηκαν στατίνες είχαν μειωμένα επίπεδα Αβ.

Ρόλος των λιπιδίων και πρωτεϊνών του μεταβολισμού των λιπιδίων σε παθολογικές καταστάσεις όπως η αθηροσκλήρωση και η νόσος του Alzheimer.

Μελέτη των μηχανισμών ομοιόστασης χοληστερόλης έχει δείξει ότι οι δράσεις των HDL εξαρτώνται περισσότερο από την ποιότητα των HDL παρά από την ποσότητα της HDL-χοληστερόλης. Συγκεκριμένες δυσ-λειτουργίες των HDL μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες για την εκτίμηση του καρδιαγγειακού κινδύνου ή /και την παρακολούθηση της θεραπείας της ΚΑΝ.

Δεδομένου ότι δομικές ανακατατάξεις στην αποΕ επηρεάζουν τη φυσιολογική της λειτουργία έγινε βιοφυσική ανάλυση διαδοχικών ελλειματικών στο C-τελικό άκρο των μορφών της αποΕ4.

Η απαλοιφή του C-τελικό άκρου της αποΕ4 οδηγεί σε απώλεια λειτουργικότητας όχι λόγω της αποσταθεροποίησης του μορίου αλλά λόγω απώλειας δοκιμής πλαστικότητας.

Η νόσος του Alzheimer χαρακτηρίζεται από την απώλεια των νευρώνων και συνάψεων στον εγκεφαλικό φλοιό . Η απώλεια στη δομή του εγκεφάλου είναι ιδιαίτερα εκφυλιστικές στον κροταφικό λοβό και το βρεγματικό λοβό (το τμήμα του εγκεφάλου που είναι υπεύθυνες για την ομιλία , την όραση και την ενσωμάτωση των αισθητηριακών πληροφοριών), καθώς και τμήματα του μετωπιαίου φλοιού (το τμήμα του εγκεφάλου που είναι υπεύθυνες για την προσοχή, μακροπρόθεσμη μνήμη, συνειδητό σχεδιασμό και άλλα ευαίσθητα ντοπαμίνης νευρώνες). Περαιτέρω, οι εγκέφαλοι των ασθενών με AD έχουν υψηλότερη συχνότητα εμφάνισης των πλακών αμυλοειδούς και νευροϊνιδιακές , η οποία μπορεί να σχετίζεται με την ασθένεια και την εξέλιξη της. [6.43]

5.2 Μορφές της νόσου Alzheimer

Υπάρχουν δύο μορφές της νόσου Alzheimer:

• Η σποραδική που αφορά το 95% των περιπτώσεων και

• Η κληρονομική ή γενετική που αφορά το 5% όλων των περιπτώσεων

Η σποραδική μορφή εμφανίζεται τυχαία στις οικογένειες και δεν έχουν, τουλάχιστον προς το παρόν, ανιχνευθεί μεταλλάξεις σε γονίδια (στο γενετικό υλικό, DNA) που είναι υπεύθυνες για την εμφάνισή της. Όμως, η κληρονόμηση του γονιδίου Ε4 που κωδικοποιεί για την απολιποπρωτεΐνη Ε, είναι ο σημαντικότερος γενετικός παράγοντας που προδιαθέτει για την εμφάνιση της νόσου Alzheimer σε ηλικίες άνω των 65 ετών. Επίσης, πολυμορφισμοί στα γονίδια CR1, PICALM και APOJ προδιαθέτουν για την εμφάνιση της σποραδικής μορφής της νόσου. Άλλοι, μη γονιδιακοί παράγοντες που προδιαθέτουν για την εμφάνιση της σποραδικής μορφής της νόσου είναι:

• Γήρανση

• Τα γονίδια μας

• Ορμονικές ανωμαλίες

• Φλεγμονή

• Τραυματισμός του εγκεφάλου

• Υψηλά επίπεδα χοληστερόλης

• Οξειδωτική βλάβη

• Έλλειψη βιταμινών

Η κληρονομική μορφή οφείλεται σε μεταλλάξεις στα γονίδια:

• Της πρόδρομης πρωτεΐνης του αμυλοειδούς

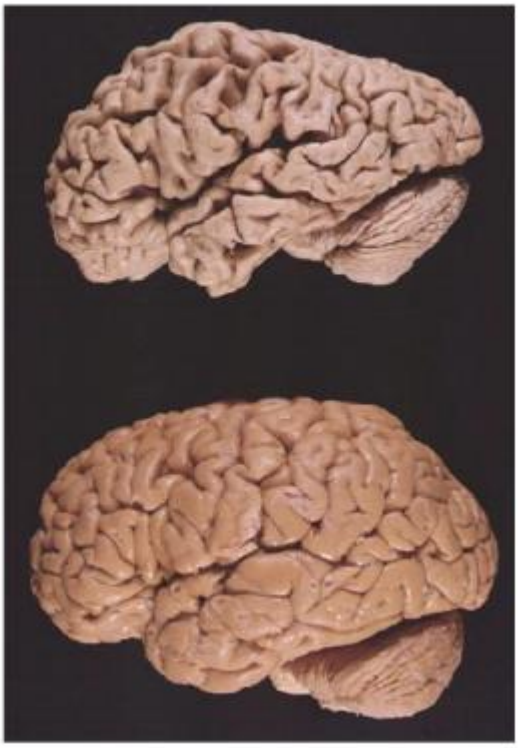
• Της πρεσινιλίνης 1 και

• Της πρεσενιλίνης 2

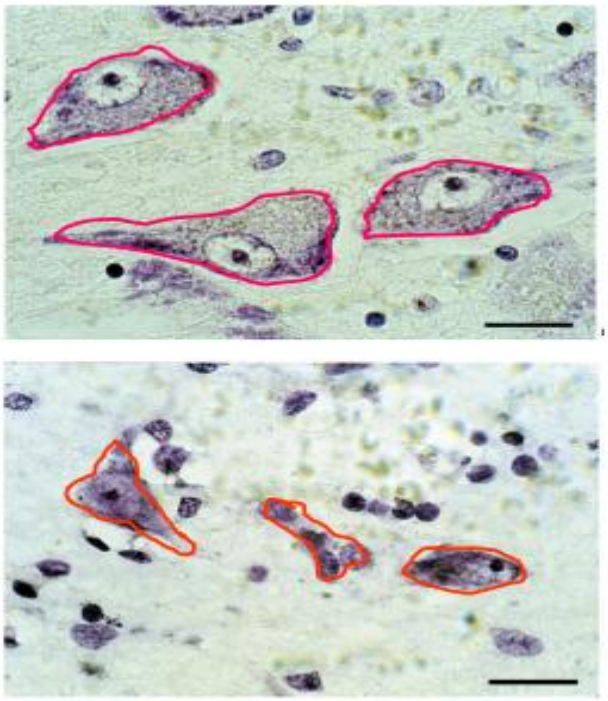
5.3 Η νευροπαθολογία της νόσου Alzheimer και οι σύγχρονες θεραπευτικές προσεγγίσεις.

Ο εγκέφαλος των ασθενών με Alzheimer είναι ατροφικός και συρρικνωμένος [Εικόνα 29]. Η παρατήρηση αυτή οδήγησε τους επιστήμονες να θέσουν την ερώτηση: Γιατί ο εγκέφαλος των ασθενών με Alzheimer είναι συρρικνωμένος; Ποια κύτταρα ατροφούν και πεθαίνουν; Οι σχετικές έρευνες έδειξαν ότι αρχικά στον βασικό πυρήνα του Meyenert του εγκεφάλου των ασθενών με Alzheimer οι νευρώνες είναι ατροφικοί και συρρικνωμένοι σε σχέση με τους νευρώνες των φυσιολογικών ηλικιωμένων ανθρώπων [Εικόνα 30]. Ο πυρήνας αυτός βρίσκεται στο κέντρο του εγκεφάλου και οι νευρώνες του στέλνουν πληροφορίες στην επιφάνεια (φλοιό) του εγκεφάλου που είναι υπεύθυνος για γνωστικές λειτουργίες. Οι νευρώνες του στέλνουν επίσης πληροφορίες σε μια άλλη δομή που ονομάζεται ιππόκαμπος και είναι υπεύθυνος για την μνήμη [Εικόνα 31]. Έτσι εξηγείται γιατί η προοδευτική ατροφία και ο προοδευτικός θάνατος των νευρώνων αυτών έχει σαν αποτέλεσμα την προοδευτική απώλεια των γνωστικών λειτουργιών και της μνήμης.

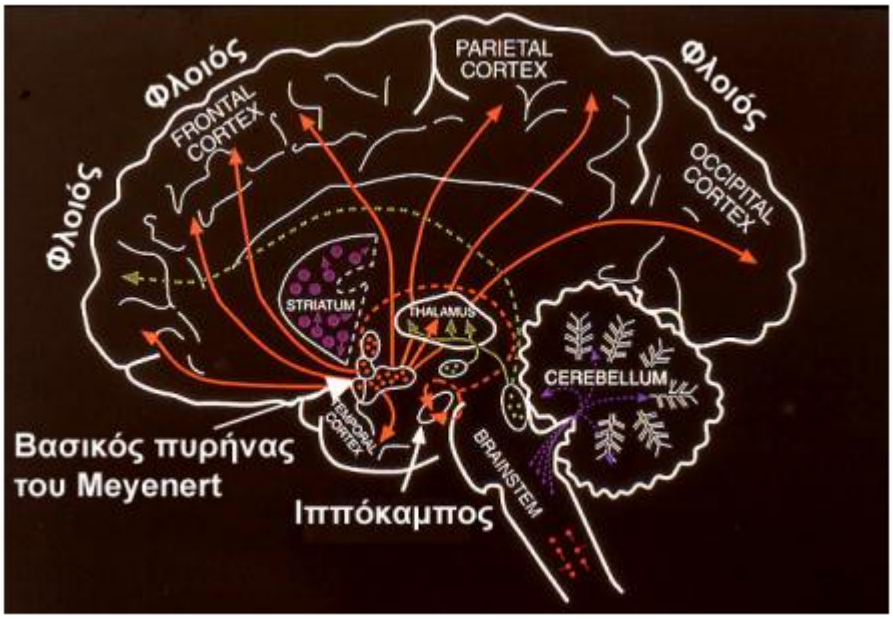
Οι νευρώνες του βασικού πυρήνα του Meyenert χρησιμοποιούν την ουσία ακετυλοχολίνη για να μεταβιβάζουν πληροφορίες σε άλλους νευρώνες. Κατά συνέπεια όταν αυτοί πεθαίνουν μειώνονται και τα επίπεδα της ακετυλοχολίνης στον εγκέφαλο. Οι επιστήμονες λοιπόν θεώρησαν ότι αν με κάποιο τρόπο διατηρήσουν τα επίπεδα της ακετυλοχολίνης στον εγκέφαλο θα μπορούσαν να αντιμετωπίσουν τα συμπτώματα της νόσου Alzheimer. Προς αυτή την κατεύθυνση συνέθεσαν ουσίες που εμποδίζουν τον καταβολισμό, την αποικοδόμηση, την καταστροφή της ακετυλοχολίνης. Αποδείχθηκε ότι αυτές οι ουσίες αντιμετωπίζουν τα συμπτώματα της ασθένειας και βελτιώνουν την ποιότητα ζωής των ασθενών για περίπου ένα χρόνο. Μετά την πάροδο αυτής της χρονικής περιόδου δεν προσφέρουν κάποιο όφελος γιατί το σύνολο των νευρώνων που παράγουν ακετυλοχολίνη έχει πεθάνει. Να σημειώσουμε ότι αυτά είναι τα μοναδικά φάρμακα που χορηγούνται σε όλες τις χώρες του κόσμου για την νόσο Alzheimer.



[Εικόνα 29]. Ο εγκέφαλος των ασθενών με Alzheimer (πάνω) είναι ατροφικός και συρρικνωμένος σε σχέση με τον εγκέφαλο φυσιολογικών ηλικιωμένων (κάτω).



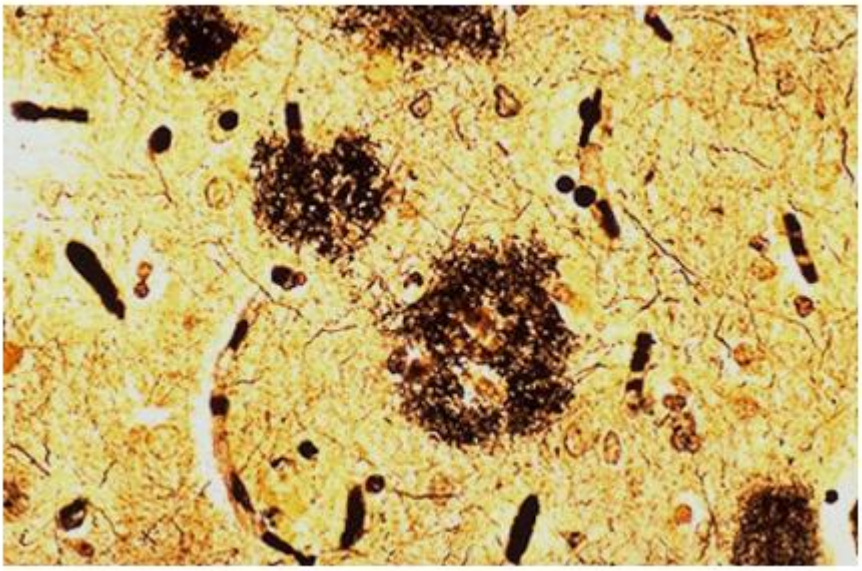
[Εικόνα 30]. Οι νευρώνες του βασικού πυρήνα του Meyenert του εγκεφάλου των ασθενών με Azlheimer (πάνω) είναι ατροφικοί και συρρικνωμένοι σε σχέση με τους νευρώνες του πυρήνα αυτού στον εγκέφαλο των φυσιολογικών ηλικιωμένων (κάτω)



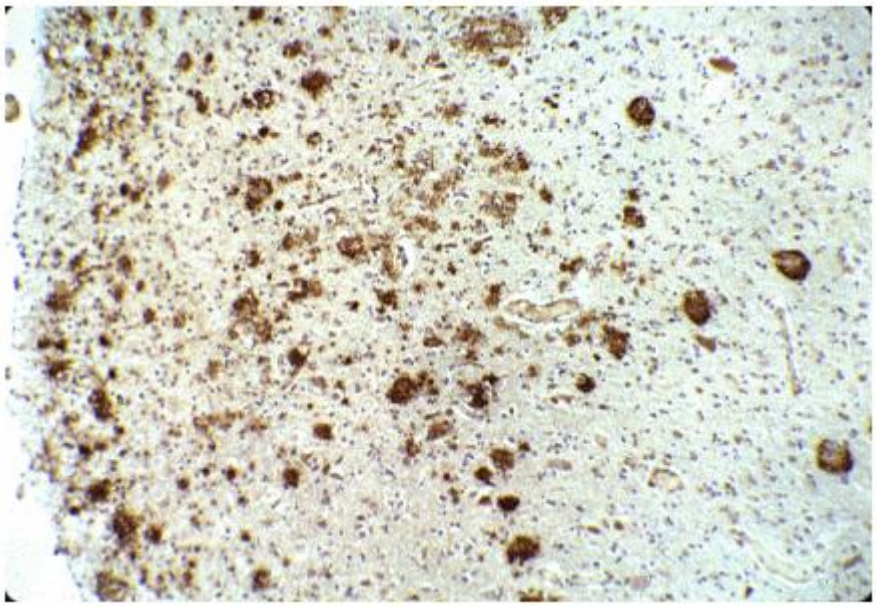
[Εικόνα 31]. Οι νευρώνες του βασικού πυρήνα του Meyenert στέλνουν άξονες στον φλοιό που είναι υπεύθυνος για τις γνωστικές λειτουργίες και στον ιππόκαμπο που είναι υπεύθυνος για την μνήμη.

Έγινε λοιπόν κατανοητό ότι η νόσος Alzheimer θα θεραπευτεί αν βρεθούν τρόποι για να εμποδιστεί ο θάνατος των νευρώνων. Προς αυτή την κατεύθυνση οι σχετικές έρευνες έχουν αποκαλύψει παράγοντες που προστατεύουν τους νευρώνες (αυξητικούς παράγοντες, βιταμίνες και αντι-οξειδωτικά). Τέτοιοι παράγοντες πιθανά να αποδειχτούν μελλοντικά χρήσιμα φάρμακα. Οι επιστήμονες διερευνούν επίσης την πιθανότητα να αντικαταστήσουν τα νευρικά κύτταρα που έχουν πεθάνει με μεταμόσχευση βλαστικών κυττάρων. Αυτή η προσέγγιση όμως βρίσκεται ακόμα σε πολύ πρώιμο στάδιο. Ανάμεσα στους νευρώνες του εγκεφάλου των ασθενών με Alzheimer παρατηρούνται νευριτικές πλάκες [Εικόνα 32]. Εγκεφαλικός φλοιός ασθενούς με Alzheimer είναι γεμάτος με νευριτικές πλάκες [Εικόνα 33]. Ο αριθμός τους μπορεί να είναι μεγαλύτερος από 50/mm2. Χρειάστηκαν

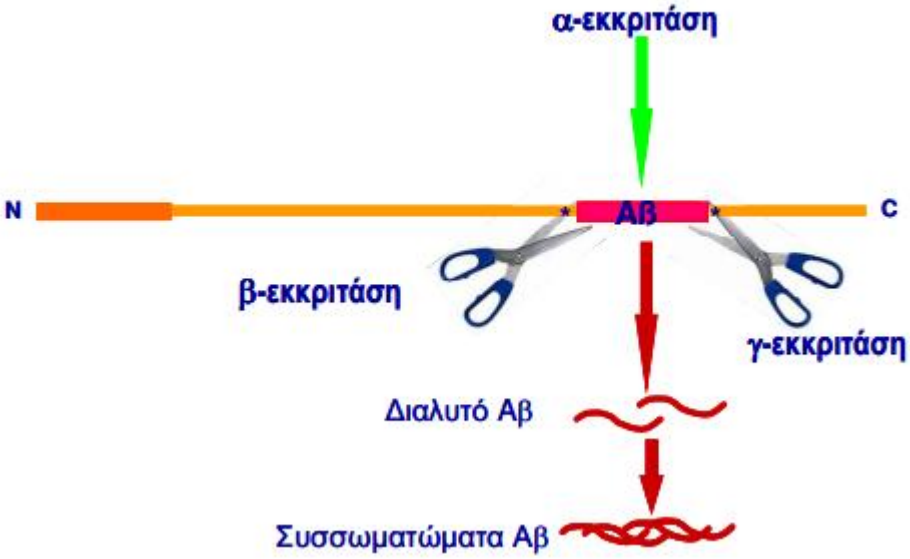
περισσότερα από 75 χρόνια μετά την αρχική τους περιγραφή από τον Γερμανό Ψυχίατρο Alois Alzheimer να διαλυτοποιηθούν οι νευριτικές πλάκες και να αναλυθεί η σύσταση τους. Η σχετική έρευνα έδειξε ότι αποτελούνται κυρίως από αμυλοειδική β πρωτεΐνη η οποία είναι κομμάτι μιας μεγαλύτερης πρωτεΐνης της πρόδρομης πρωτεΐνης του αμυλοειδούς. Η αμυλοειδική β πρωτεΐνη παράγεται από το κόψιμο της πρόδρομης πρωτεΐνης του αμυλοειδούς από δύο ένζυμα που σήμερα είναι γνωστά. Παράγεται σε όλους τους ανθρώπους από την γέννηση τους μέχρι το θάνατο τους και από όλα τα όργανα του σώματος. Παρόλα αυτά μόνο στον εγκέφαλο η αμυλοειδική β πρωτεΐνη συσσωματώνεται και κατακάθεται ανάμεσα στους νευρώνες και δημιουργεί τις νευριτικές πλάκες. Οι επιστήμονες σχεδιάζουν τρόπους για να εμποδίσουν το σχηματισμό των νευριτικών πλακών αφού θεωρούν ότι κάτι τέτοιο θα μπορούσε να αποδειχτεί ωφέλιμο για τους ασθενείς με Alzheimer. [Εικόνα 34] Εργαζόμενοι προς αυτή την κατεύθυνση έχουν ανακαλύψει ουσίες που αναστέλλουν την παραγωγή της αμυλοειδικής β πρωτεΐνης ή παρεμποδίζουν τη συσσωμάτωσή της και το



[Εικόνα 32]. Ανάμεσα στους νευρώνες του εγκεφάλου των ασθενών με Alzheimer παρατηρούνται νευριτικές πλάκες που αποτελούνται κυρίως από αμυλοειδική β πρωτεΐνη.

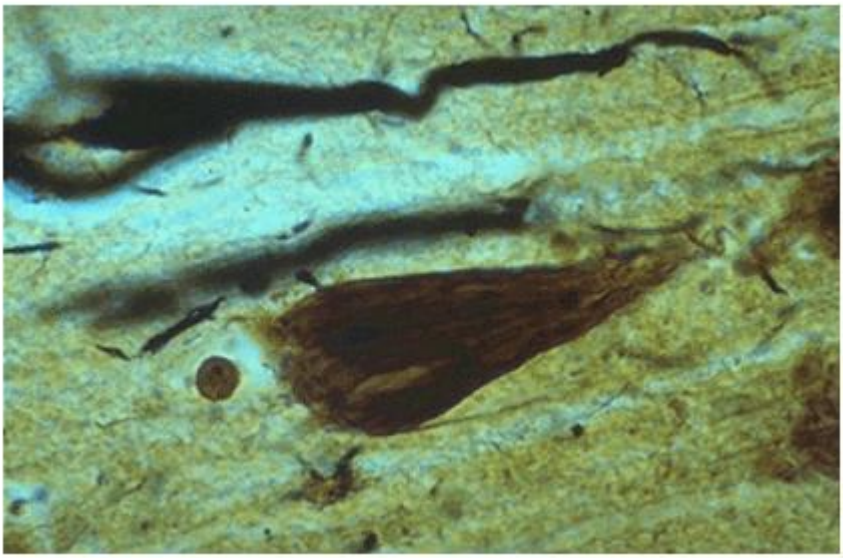


[Εικόνα 33]. Εγκεφαλικός φλοιός ασθενούς με Alzheimer γεμάτος με νευριτικές πλάκες (περισσότερες από 50/mm2).



[Εικόνα 34]. Η αμυλοειδική β πρωτεΐνη (Αβ) είναι κομμάτι μιας μεγαλύτερης πρωτεΐνης (της πρόδρομης πρωτεΐνης του Αμυλοειδούς) και παράγεται όταν αυτή κοπεί από δύο άλλες πρωτεΐνες-ένζυμα (την β-εκκριτάση και την γ-

εκκριτάση). Παράγεται και κυκλοφορεί σε όλα τα υγρά του σώματος διαλυτή.



[Εικόνα 35]. Μέσα στους νευρώνες και στα σημεία όπου εκφύεται ο άξονας καθιζάνει και δημιουργεί τα νευρο-ινιδιακά δεμάτια η πρωτεΐνη tau.

σχηματισμό νευριτικών πλακών. Επιπλέον, έχουν βρει τρόπους να απομακρύνουν γρήγορα την αμυλοειδική β πρωτεΐνη η και να αναστέλλουν την νευροτοξικότητά της. Πολλές από αυτές τις ουσίες και στρατηγικές αξιολογούνται σήμερα στην κλινική πράξη.

N C

γ-εκκριτάση

β-εκκριτάση

*

α-εκκριτάση

Διαλυτό Αβ

Συσσωματώματα Αβ

N * Αß C

γ-εκκριτάση

β-εκκριτάση

*

α-εκκριτάση

Διαλυτό Αβ

Συσσωματώματα Αβ

* Αß Μέσα στους νευρώνες του εγκεφάλου των ασθενών με Alzheimer εναποτίθεται η πρωτεΐνη tau και σχηματίζονται τα νεύρο-ινιδιακά δεμάτια [Εικόνα 35]. Έχουν την μορφή φλόγας γιατί η συσσωμάτωση και η κατακρήμνιση γίνεται στο σημείο του νευρώνα από όπου εκφύεται ο άξονας. Θεωρείται μάλιστα ότι αυτές οι δομές μπορεί να φράζουν τον άξονα και να εμποδίζουν τη μεταφορά ουσιών στις απομακρυσμένες απολήξεις του. Ως αποτέλεσμα ο νευρώνας δεν μπορεί να τις στηρίξει τροφικά και αυτές ατροφούν και στην συνέχεια ατροφεί και ο νευρώνας. Η ύπαρξη τους σημαίνει ότι ο νευρώνας θα πεθάνει. Οι επιστήμονες ερευνούν τρόπους για να εμποδίσουν το σχηματισμό των νευρο-ινιδιακών δεματίων.

Συνοψίζοντας η έρευνα για την νόσο Alzheimer αποκάλυψε

• Τις κατηγορίες των νευρώνων που πεθαίνουν

• Τις βλάβες που παρατηρούνται στον εγκέφαλο

• Την σύσταση των βλαβών

• Παράγοντες που προάγουν το σχηματισμό αυτών των βλαβών

• Τρόπους για να παρεμποδιστεί ο σχηματισμός των βλαβών

• Τρόπους για να προστατευθούν οι νευρώνες

Αποκάλυψε επίσης ότι τα υψηλά επίπεδα χοληστερόλης, η έλλειψη βιταμινών και οι ορμονικές ανωμαλίες μπορεί να αυξάνουν την πιθανότητα εμφάνισης της νόσου Alzheimer. Ως αποτέλεσμα πολλά φάρμακα βρίσκονται στο επίπεδο των κλινικών μελετών για να αξιολογηθεί η θεραπευτική τους αξία. [6.44]

Δεν υπάρχουν ακόμη θεραπείες που να αναχαιτίζουν την εξέλιξη της νόσου Alzheimer, αν και αναζητώνται με αγωνία-και γι' αυτό η προσφορά της έρευνας με πειραματόζωα είναι πολύτιμη. Είναι γνωστό ότι τα νευρικά κύτταρα που χρησιμοποιούν το χημικό διαβιβαστή ακετυλοχολίνη προσβάλλονται εύκολα από αυτήν την αρρώστια (μειώνονται). Φάρμακα που ενισχύουν τη δράση της ακετυλοχολίνης, που εναπομένει, αποκλείοντας τη δράση ενζύμων που φυσιολογικά διασπούν το νευροδιαβιβαστή, έχουν μέτριο θεραπευτικό αποτέλεσμα τόσο σε μοντέλα ζώων όσο και στη κλινική. Τα φάρμακα αυτά δεν μπορούν να καθυστερήσουν την εξέλιξη αυτής της ανυπόφορης αρρώστιας. Ο συνδυασμός των γνώσεων τόσο από τη γενετική, όσο και από τη μελέτη της σχέσης ανάμεσα στη χημεία του εγκεφάλου και στην ψυχολογική λειτουργία αλλά και η αναγνώριση των μηχανισμών που είναι ανάμεσα στη χημεία του εγκεφάλου και στην ψυχολογική λειτουργία αλλά και η αναγνώριση των μηχανισμών που είναι υπεύθυνοι για την καταστροφή των κυττάρων, φαίνεται ότι αποτελεί την καλύτερη μορφή προόδου όσον αφορά τη θεραπεία αυτής της διαταραχής. [6.45]

Η Αλτσχάιμερ συνδέεται με τον κατακερματισμό της πρωτεΐνης APP (πρόδρομη πρωτεΐνη του αμυλοειδούς) στον εγκέφαλο , καθώς και νευροϊνιδιακές .

Η ακριβής αιτία της Αϋ είναι άγνωστη , αν και ένας αριθμός από κλινικές δοκιμές έχουν βοηθήσει τους γιατρούς να κατανοήσουν την βιοχημεία της νόσου. Δύο προβλήματα στη λειτουργία του εγκεφάλου έχουν αναγνωριστεί ως πιθανές αιτίες για την ΑΧ. Πρώτον, η πρόδρομη πρωτεΐνη του αμυλοειδούς (APP) , η οποία είναι κρίσιμη για την ανάπτυξη νευρώνων και την επιβίωση , καθώς και την επισκευή μετά τον τραυματισμό , φαίνεται να είναι κάπως κατακερματισμένη σε ασθενείς με Αλτσχάιμερ σε μικρότερα κομμάτια , τα οποία σχηματίζουν συστάδες που ονομάζονται γεροντικές πλάκες που φαίνεται να συνδέονται με μ.Χ. . Δεύτερον, η διάσπαση της

πρωτεΐνης tau οδηγεί σε νευροϊνιδιακές και αποσυντίθεται συστήματα μεταφορών που είναι εγκατεστημένες νευρώνα.

Μια ποικιλία από φάρμακα μπορούν να συνταγογραφούνται για τη θεραπεία γνωστικών επιπτώσεις της νόσου του Alzheimer , αν και δεν υπάρχουν φάρμακα έχουν σήμερα τη δυνατότητα να παρατείνει την εξέλιξη της νόσου .

Τέσσερα φάρμακα σήμερα έχουν εγκριθεί για τη θεραπεία των γνωστικών εκδηλώσεων της AD τρεις είναι αναστολείς της ακετυλοχολινεστεράσης και ένας είναι ένας ανταγωνιστής των υποδοχέων NMDA . Αναστολείς της ακετυλοχολινεστεράσης (όπως donepexil , η γκαλανταμίνη και η ριβαστιγμίνη --- brand names Aricept , Razadyne και Exelon , αντίστοιχα) προσπαθούν να μειώσουν το ποσοστό στο οποίο ακετυλοχολίνη (ACh) είναι κατανεμημένες , καταπολέμηση της απώλειας της ACh και το θάνατο των νευρώνων που χρησιμοποιούν ACh . Ωστόσο, η χρήση αυτών των αναστολέων της ακετυλοχολινεστεράσης, δεν έχει δείξει καμία σημαντική επίδραση στην καθυστέρηση της εκδήλωσης των προηγμένων μ.Χ. και σοβαρή άνοια
εικόνων Pharamceutial Θεραπείες : . Μεμαντίνη και NDMA υποδοχείς
Η Μεμαντίνη , ένα τύπος ανταγωνιστή των υποδοχέων NMDA , μπορεί να είναι μετρίως αποτελεσματική στην αγωγή των επιπτώσεων της νόσου του Alzheimer .

Το τέταρτο φάρμακο που χρησιμοποιείται για την καταπολέμηση της AD είναι η μεμαντίνη (brand names Akatinol , Axura , Ebixa , Memox και Namenda) , ένας ανταγωνιστής των υποδοχέων NMDA . Περίσσεια επίπεδα του γλουταμινικού νευροδιαβιβαστή μπορεί να οδηγήσει σε κυτταρικό θάνατο μέσω της υπερ- δραστικότητας , μέσω μιας διαδικασίας που ονομάζεται διεγερτοτοξικότητα . Μπλοκ memantine NMDA υποδοχέων και αναστέλλει την υπερδιέγερσης τους από γλουταμικό και έχει αποδειχθεί ότι είναι μετρίως αποτελεσματικά στη θεραπεία της μέτριας έως σοβαρής AD . Χρήση τόσο της μεμαντίνης όσο και της δονεπεζίλης (ανωτέρω) έχει δείξει ότι είναι τουλάχιστον οριακά αποτελεσματική στη θεραπεία των γνωστικών εκδηλώσεις της AD. [6.46]

Οι υπάρχουσες φαρμακευτικές θεραπείες είναι οι κεντρικοί αναστολείς χολινεστεράσης και η Μεμαντίνη. Ειδικότερα οι αναστολείς χολινεστεράσης (Δονεπεζίλη, Ριβαστιγμίνη, Γκαλανταμίνη) χρησιμοποιούνται ευρύτατα στην καθημερινή κλινική πράξη από ετών για τη θεραπεία της νόσου Alzheimer αλλά και άλλων μορφών άνοιας (αγγειακή άνοια, άνοια με σωμάτια Lewy, άνοια νόσου Parkinson κ.ά.) . Αποτελούν θεραπείες με επίσημη ένδειξη την ήπια ως μέτρια νόσο Alzheimer και επιτρέπουν στους ασθενείς να παραμείνουν λειτουργικοί για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα, να διατηρούν κοινωνικές δεξιότητες και να απολαμβάνουν καλή ποιότητα ζωής μαζί με την οικογένειά τους. Οι αναστολείς χολινεστεράσης παρουσιάζουν μέτρια αποτελεσματικότητα, ιδίως αν χορηγηθούν στα αρχικά στάδια. [6.47]

Βιβλιογραφία

[6.1] International Classification of Diseases (ICD), http://www.who.int.

[6.2] Z.S. Zhachaturian, T.S. Radebaugh, “Alzheimer’s Disease: Cause(s), Diagnosis, Treatment and Care”, CRC Press, LLC, USA, 1996.

[6.3] American Health Assistant Foundation, http://www.ahaf.org.

[6.4] Alzheimer’s Association, http://www.alz.org.

[6.5] I.V. Smirnov, “Mechanism of possible biological effect of MRET water on patients suffering from Alzheimer’s disease”, http://www.mret.com.sg/publications.

[6.6] D.B. Carr, A. Goate, D. Phil, J.C. Morris, “Current concepts in the pathogenesis of Alzheimer’s disease”, Am J Med 103(suppl 3A), 3S–10S, 1997.

[6.7] Alzheimer’s disease International-Statistics, http://www.alz.co.uk.

[6.8] G.W. Small, P.V. Rabins, P.P. Barry, et al., “Diagnosis and treatment of

Alzheimer disease and related disorders: consensus statement of the American

Association for Geriatric Psychiatry, the Alzheimer's Association, and the

American Geriatrics Society", JAMA 278, 1363–1371, 1997.

[6.9] Z.S. Khachaturian, "Diagnosis of Alzheimer's disease", ArchNeurol 42, 1097–

1105, 1985.

[6.10] K. Jellinger, "Morphology of Alzheimer disease and related disorders", In:

Maurer K, Riederer P, Beckmann H, eds. Alzheimer disease: epidemiology,

Neuropathology and clinics. New York, NY: Springer-Verlag, 61–77, 1990.

[6.11] D.J. Selkoe, "Alzheimer's disease: genotypes, phenotypes, and treatments",

Science 275, 630–631, 1997.

[6.12] D.J. Selkoe, "The pathophysiology of Alzheimer's disease", In: Scinto LFM,

Daffner KR, eds. The early diagnosis of Alzheimer's disease. Totowa, NJ:

Humana, 83–104, 2000.

[6.13] S.M. Greenberg, G.W. Rebeck, J.P. Vonsattel, T. Gomez-Isla, B.T. Hyman,

"Apolipoprotein E epsilon 4 and cerebral hemorrhage associated with amyloid

angiopathy", Ann Neurol 38, 254–259, 1995.258

[6.14] L.M. Bierer, P.R. Hof, D.P. Purohit, et al., "Neocortical neurofibrillary tangles

correlate with dementia severity in Alzheimer's disease", Arch Neurol 52, 81–

88, 1995.

[6.15] P.V. Arriagada, J.H. Growdon, E.T. Hedley-Whyte, B.T. Hyman,

“Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer’s disease”, Neurology 42, 631–639, 1992.

[6.16] E.H. Corder, A.M. Saunders, W.J. Strittmatter, et al., “Gene dose of Apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer’s disease in late onset Families”, Science 261, 921–923, 1993.

[6.17] R. Mayeux, A.M. Saunders, S. Shea, et al., “Utility of the apolipoprotein E genotype in the diagnosis of Alzheimer’s disease: Alzheimer’s disease Centers Consortium on Apolipoprotein E and Alzheimer’s disease”, N Engl J Med 338, 506–511, 1998.

[6.18] Shore V, Shore B. Heterogeneity of human very low density lipoproteins. Separation of species differing in protein components. Biochemistry 1973; 12:502-7.

[6.19] Utermann G., Hees M., Steinmetz A. Polymorphism of apolipoprotein E and occurrence of dysbetalipoproteinemia in man. Nature 1997; 269:604-607.

[6.20] Davignon J., Gregg R., Sing C. Apolipoprotein E polymorphism and atherosclerosis. Atherosclerosis 1988; 8:1-21.

[6.21] Wilson PW, Myers RH, Larson MG et al. Apolipoprotein E alleles, dyslipidemia and coronary heart disease. The Framingham Offspring Study. JAMA 1994; 272:1666-1671.

[6.22] Corder EH, Saunders AM, Schmechel D. et al. Gene doze of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. Science 1993; 261:921-923.

[6.23] Saunders AM, Strittmater WJ, Schmechel D. et al: Association of apolipoprotein E allele epsilon 4 with late onset familial and sporadic Alzheimer’s disease. Neurology 1993; 43:1467-1472.

[6.24] Mahley RW. Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. Science 1988; 240:622-630.

[6.25] Weisgraber KH. Apolipoprotein E: structure function relationships. Adv Protein Chem 1994; 45:249-302.

[6.26] Siest G, Pillot T, Regis-Bailly A et al. Apolipoprotein E: an important gene and, protein to follow in laboratory medicine. Clin Chem 1995; 41:1068-1086.

[6.27] Hagberg JM, Wilund KR, Ferrell R. Apo E gene and gene-environment effects on plasma lipoproteins-lipid levels. Physiol Genomics 2000; 4:101-108.

[6.28] Mahley R., Huang Y: Apolipoprotein E: from atherosclerosis to Alzheimer's disease and beyond. Curr Opin Lipidol 1999; 10:207-217.

[6.29] Nimpf J., Schneider W. From cholesterol transport to signal transduction: low density lipoprotein receptor, very low density lipoprotein receptor, and apolipoprotein E receptor-2. Biochemical and Biophysical Act 2000; 1529:287-298.

[6.30] Beffert W., Danic M., Krzywkowski P. et al. The neurobiology of apolipoproteins and their receptors in the CNS and Alzheimer's disease. Brain Research Reviews 1998; 27:119-142.

[6.31] Cooper JA, Howell RW. Lipoprotein receptors: signaling functions in the brain; Cell 1999; 97:671-674.

[6.32] Dietschy J, Turley S. Cholesterol metabolism in the brain. Curr Opin Lipidol 2001;12:105-112.

[6.33] Elshourbagy NA, Liao WS, Mahley RW, Taylor JM. Apolipoprotein E mRNA is abundant in the brain and adrenals, as well as in the liver and is present in other peripheral tissues of rats and marmosets. Proc Natl Acad Sci 1985; 82:203-7.

[6.34] Pitas RE, Boyles JK, Lee SH et al. Astrocytes synthesize apolipoprotein E and metabolize apolipoprotein E containing lipoproteins. Biochem Biophys Acta 1987; 917:148-161.

[6.35] Horsburgh K, McCarron MO, White F, Nicoll JAR. The role of apolipoprotein E in Alzheimer's disease, acute brain injury and cerebrovascular disease: evidence of common mechanisms and utility of animal models. Neurobiol Aging 2000; 21:245-255.

[6.36] Weisgraber KH, Roses AD, Strittmatter WJ. The role of apolipoprotein E in the nervous system. Curr Opin Lipidol 1999; 10:207-217.

[6.37] Ignatius MJ, Gebicke-Harter JH, Skene JW et al. Expression of apolipoprotein E during nerve degeneration and regeneration. Proc Natl Acad Sci 1986; 83:1123-1129.

[6.38] Shipes GJ, McGuire CB, Norden JJ, Freeman JA. Nerve injury stimulates the secretion of apolipoprotein E by nonneuronal cells. Proc Natl Acad Sci 1986; 83:1130-1134.

[6.39] Boyles JK, Zoellner CD, Anderson LJ et al. A role for apolipoprotein E, apolipoprotein AI, and low density lipoprotein receptors in cholesterol transport during regeneration and remyelination of the rat sciatic nerve. J Clin Invest 1989; 83:1015-1031.

[6.40] Strittmatter WJ, Saunders AM, Goedert M et al. Isoform-specific interactions of apolipoprotein E with microtubule-associated protein tau: implications for Alzheimer's disease. Proc Natl Acad Sci 1994; 91:1183-1186.

[6.41] Miyata M., Smith JD. Apolipoprotein E allele-specific antioxidant activity and affects on cytotoxicity by oxidative insults and beta-amyloid peptides. Nat Genet 1996; 14:55-6.

[6.42] Blacker D, Haines J, Rodes L et al. Apo E-4 and age at onset of Alzheimer's disease: the NIMH Genetics Initiative. Neurology 1997; 48:139-147.

[6.43] http://www.certh.gr/dat/23C3AF6C/file.pdf?633868829886961213

[6.44]http://www.hsfn.gr/2011/images/stories/gia_to_koino_items/Member%20articles/alzheimer_disease_spiros_efthimiopoulos.pdf

[6.45] http://panacea.med.uoa.gr/topic.aspx?id=899

[6.46] http://el.265health.com/conditionstreatments/alzheimers/1013029856.html

[6.47] http://www.alzheimerathens.gr/index.php/alzheimer/farmakeftikes-therapeies

Κεφάλαιο 6^{ο} : Προοπτικές στον Τομέα της Φαρμακογενωμικής.

6.1 Οι Στόχοι της Εξέλιξης της Φαρμακογενωμικής.

Η φαρμακογονενωμική, συνδυάζοντας νέες τεχνολογίες και επιστημονικές γνώσεις, προσφέρει νέες ευκαιρίες ανάλυσης του μηχανισμού δράσης αλλά και των φαρμακολογικών ενεργειών των φαρμάκων σε μοριακό επίπεδο. [7.1] Στοχεύει έτσι στην ασφαλέστερη χορήγηση τους για την επίτευξη του μέγιστου φαρμακολογικού αποτελέσματος χωρίς τοξικά φαινόμενα. Ουσιαστικά, συνδέει τη φαρμακολογία με τους νέους τομείς της γονιδιωματικής, της βιοπληροφορικής, της λειτουργικής γονιδιωματικής, της πληθυσμιακής γονιδιωματικής και της πρωτεϊνωματικής. Η προσέγγιση αυτή έχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον αφού η γονιδιωματική αναφέρεται στην ανάπτυξη των τεχνολογιών ανάλυσης και επεξεργασίας των πληροφοριών που αφορούν το γενετικό υλικό, ενώ η πρωτεϊνωματική στη μελέτη όλων των παραγόμενων πρωτεϊνών στους διάφορους ιστούς και κάτω από διαφορετικές συνθήκες, (π.χ. ασθένειες). [7.2] Αντίστοιχα, η λειτουργική γονιδιωματική στοχεύει στη συστηματική ανάλυση και συσχέτιση της λειτουργίας των γονιδίων σε φυσιολογικές και παθοφυσιολογικές καταστάσεις. Τέλος, η πληθυσμιακή γονιδιωματική προσπαθεί να βρει πιθανή συσχέτιση ανάμεσα σε ασθένειες με τον γονότυπο μιας ομάδας ατόμων που εμφανίζουν την ίδια παθογένεια. Οι συγκεκριμένες κατευθύνσεις είναι σίγουρο ότι αναδεικνύουν νέους στόχους για την ανάπτυξη εξειδικευμένων φαρμάκων, παράλληλα με την κατανόηση της παθοφυσιολογίας ασθενειών που είναι δύσκολο να αναλυθούν με τις κλασικές επιστημονικές μεθόδους. Ακόμη, είναι αδιαμφισβήτητο ότι διευκολύνουν την ανάπτυξη νέων θεραπευτικών πρωτοκόλλων και δοσολογικών σχημάτων της φαρμακευτικής αγωγής. Με αυτό τον τρόπο παρέχεται η δυνατότητα αποσαφήνισης και διερεύνησης, σε μεγάλο Βαθμό, των μοριακών μηχανισμών που οδηγούν στην παθογένεια και στην εμφάνιση συγκεκριμένων νόσων, όπως όμως και στην κατανόηση της δράσης των φαρμάκων στον οργανισμό. [7.3]

Αποτέλεσμα αυτής της μεθοδολογίας αποτελεί ο τομέας της ανάπτυξης νέων φαρμάκων που έχει σημαντικά επηρεαστεί από αυτές τις εξελίξεις, ενώ ήδη έχουν αρχίσει να είναι ορατές οι εξελίξεις στη μοριακή διαγνωστική, καθώς και στη μελλοντική εξατομίκευση των δοσολογικών σχημάτων στην κλινική πράξη, που αναμφισβήτητα οδηγεί στη βελτίωση της φαρμακευτικής αγωγής. [7.4] Ο καλύτερος τρόπος για να γίνει αυτό είναι η πρόβλεψη για τη δημιουργία των κατάλληλων υποδομών και την εκπαίδευση του ανθρώπινου δυναμικού που θα διασφαλίσουν την αποτελεσματικότερη και ασφαλέστερη εφαρμογή τους στη θεραπευτική προς όφελος του κοινωνικού συνόλου.

Άλλωστε, μόνο η σωστή γνώση και το κατάλληλα εκπαιδευμένο έμψυχο δυναμικό μπορούν να αποτρέψουν στο ελάχιστο πιθανές αρνητικές συνέπειες εφαρμογής των γονιδιωματικών τεχνολογιών στην κλινική πράξη. [7.5]

6.2 Που Στοχεύει ο Σχεδιασμός Φαρμάκων με τη βοήθεια Ηλεκτρονικού Υπολογιστή.

Η σχεδίαση φαρμάκων με τη βοήθεια ηλεκτρονικού υπολογιστή περιλαμβάνει την ανακάλυψη νέων φαρμακοφόρων μορίων από αναζήτηση σε βάσεις χημικών πληροφοριών, τη βελτιστοποίηση των φαρμακοφόρων μορίων (με σκοπό την ελαχιστοποίηση των παρενεργειών όπως τοξικότητα), καθώς και τη σχεδίαση "εκ νέου" μορίων που μπορούν να προσδένονται σε συγκεκριμένους υποδοχείς για να λειτουργούν ως ανταγωνιστές ή αναστολείς.

Παράλληλα η μοριακή σχεδίαση επιτρέπει την τρισδιάστατη αναπαράσταση των φαρμακοφόρων μορίων και τη μελέτη των φυσικοχημικών τους ιδιοτήτων.

Η σχεδίαση φαρμάκων με τη βοήθεια ηλεκτρονικού υπολογιστή στοχεύει στην ανακάλυψη και βελτιστοποίηση νέων υποψήφιων φαρμακοφόρων μορίων. Ο κύκλος της ανακάλυψης νέων φαρμάκων μπορεί να διαιρεθεί όπως φαίνεται στο ακόλουθο σχήμα σε 6 φάσεις: ανακάλυψη νέων ενώσεων οδηγών (τυπικά 1-2 χρόνια), βελτιστοποίηση της ενώσεων οδηγού (1-2 χρόνια), in vitro & in vivo πειράματα (1-2 χρόνια), τοξικολογικές μελέτες (1-3 χρόνια), δοκιμές ασφάλειας στον ανθρώπινο οργανισμό (1 χρόνο) και δοκιμές απόδοσης-χρήσης στον άνθρωπο (1-2 χρόνια). Ο συνολικός χρόνος αγγίζει τους 6 μήνες έως 1 χρόνο και το κόστος κυμαίνεται στα 100-200 εκατ. Δολάρια. [7.6]

6.3 Νέες τεχνικές που εμφανίζονται στον Τομέα της Φαρμακογενωμικής.

Τα τελευταία χρόνια έχει γίνει σημαντική προόδος στην τεχνολογία και την ανάπτυξη της γονιδιωματικής πληροφορίας, ως υποπροϊόν του προγράμματος του ανθρώπινου γονιδιώματος.[7.7] Ως αποτέλεσμα, νέοι και

καινοτόμοι δείκτες της νόσου αποκαλύπτονται με πρωτοφανή ρυθμό. Στο επίπεδο του DNA, περισσότερες από 350 γενετικές εξετάσεις είναι σήμερα διαθέσιμες (http://www.genetests.org). Αν και τα περισσότερα τεστ είναι για σπάνιες, μονογονιδιακές διαταραχές, μερικά γίνονται διαθέσιμα για πιο κοινές, πολύπλοκες ασθένειες. Τα παραδείγματα περιλαμβάνουν τη δοκιμή APOE μεταξύ των ασθενών με άνοια στη διαφορική διάγνωση της νόσου του Alzheimer, και του παράγοντα V Leiden δοκιμών για προδιάθεση για φλεβική θρόμβωση.[7.8] Οι πρόοδοι στις τεχνολογίες ανακάλυψης SNP παρέχουν ευκαιρίες για μεγάλης κλίμακας μελέτες υποψηφίων γονιδίων. Πράγματι, μελέτες σύνδεσης σε ολόκληρο το γονιδίωμα είναι υπό μελέτη για την εύρεση δεικτών γενετικής προδιάθεσης για κοινές, σύνθετες ασθένειες . Τα επόμενα τρία έως πέντε χρόνια θα δούμε μια έκρηξη των νέων πληροφοριών σε αυτόν τον τομέα και την ανάπτυξη νέων τεστ πρόβλεψης για πολύπλοκες ασθένειες. Προσδιορισμός του RNA και δεικτών πρωτεϊνών για τον έλεγχο, τη διάγνωση, την πρόγνωση και παρακολούθηση είναι επίσης σε εξέλιξη, η οποία διευκολύνεται χάρη στις προόδους στην ανάλυση προφίλ και στην πρωτεωμική. Οι βασικές μέθοδοι έρευνας που χρησιμοποιούνται στην ανακάλυψη αυτών των δεικτών απαιτούν πρόσβαση σε σχετικούς ιστούς της νόσου. Επειδή τα δείγματα όγκων είναι συνήθως από βιοψία ή έχουν αφαιρεθεί, η πρώτη περιοχή της νόσου που πιθανόν να επωφεληθεί από τις τεχνολογίες αυτές είναι ο καρκίνος. Προόδους στην ικανότητά μας να ταξινομήσουμε τη νόσο απεικονίζονται καλύτερα στο έργο του Golub .Αυτή η εργασία ορόσημο απεικονίζει πώς προφίλ γονιδιακής έκφρασης μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ταξινόμηση δύο συναφών τύπων καρκίνου. Έκφραση μοτίβων 50 γονιδίων προσδιορίστηκαν για την ακριβή διάκριση μεταξύ οξείας λεμφοβλαστικής λευχαιμίας (ALL) και οξείας μυελογενούς λευχαιμίας (AML). Παρόμοιες προσεγγίσεις έχουν ληφθεί για τον εντοπισμό υποψήφιων προγνωστικών δεικτών για το μελάνωμα. Clark και Bittner χρησιμοποίησαν προφίλ μετεγγραφής για να συγκρίνουν μεταστατικές με μη μεταστατικές ανθρώπινες κυτταρικές γραμμές μελανώματος. Ως αποτέλεσμα, εντόπισαν αρκετά γονίδια τα οποία είναι επιλεκτικά άναρχα στις μεταστατικές γραμμές που θα μπορούσαν να έχουν χρήση στη θεραπεία του ασθενούς. Η αναγνώριση ότι η μετα-μεταγραφική τροποποίηση των πρωτεϊνών μπορεί να είναι ένας σημαντικός καθοριστικός παράγοντας της νόσου είναι ένας παράγοντας που οδηγεί στην χρήση των τεχνολογιών της πρωτεωμικής για την ανακάλυψη μοριακών δεικτών της νόσου. Οι τεχνολογίες αυτές περιλαμβάνουν την παραδοσιακή 2D ηλεκτροφόρηση γέλης σε συνδυασμό με πιο προηγμένες μεθόδους φασματομετρίας μάζας. Πρωτεωμική ανάλυση

θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί στην ιατρική μικροβιολογία στην οποία μπορεί να μελετηθεί το σύνολο πρωτεώματος ενός οργανισμού ή σε νόσους όπως η ρευματοειδής αρθρίτιδα ή διαταραχών του κεντρικού νευρικού συστήματος στα πλούσια σε πρωτεΐνες ρευστά στο σημείο της βλάβης, όπως αρθρικού συνδέσμου και το εγκεφαλονωτιαίο ρευστό, αντίστοιχα, που είναι διαθέσιμες για ανάλυση. Υπερκείμενη κυτταρική γραμμή ή μοσχεύματα από ιστούς όγκων έχουν ήδη χρησιμοποιηθεί σε πειράματα έκφρασης χαρακτηριστικών μεγάλης κλίμακας για τον εντοπισμό καρκινικών δεικτών. Με τη μέθοδο PAGE έγινε σύγκριση του πρωτεώματος καθαρισμένου φυσιολογικού ανθρώπινου αυλού (από το οποίο προέρχονται οι περισσότεροι καρκίνοι του μαστού) με εκείνη των μυοεπιθηλιακών κυττάρων του μαστού. Ανίχνευσαν 170 πρωτεΐνες που διέφεραν μεταξύ των δύο τύπων κυττάρων. Αυτά τα πειράματα θα μπορούσαν να ρίξουν φως πάνω στην διαδικασία της ανάπτυξης του καρκίνου και, τελικά, να βρει χρήση ως διάγνωση του καρκίνου ή ως δείκτες παρακολούθησης. Τα φαρμακογονιδιωματικά τεστ βρίσκουν το δρόμο τους στην πράξη σε διάφορους τομείς της νόσου. Τεστ γονοτυπικής αντοχής των απομονώσεων του HIV έχει αποδεδειγμένη κλινική χρησιμότητα και παρέχει έναν τρόπο για να βοηθήσει στη θεραπευτική διαδικασία λήψης αποφάσεων σε ασθενείς των οποίων τα επίπεδα του RNA του HIV αυξάνονται. Επιπλέον, δοκιμασίες είναι διαθέσιμες για την ανίχνευση του υποδοχέα ή αντίγραφα του γονιδίου HER2 αλληλουχίας πρωτεΐνης HER2 για να προσδιοριστεί η επιλογή για θεραπεία με Herceptin ή αδριαμυκίνη, αντίστοιχα, σε ασθενείς με καρκίνο μαστού με θετικούς λεμφαδένες . Η Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA ΗΠΑ) έδωσε την έγκρισή της στον φαρμακογονιδιωματικό HER2 δείκτη που συνδέεται με το Herceptin και αποτελεί σημαντικό προηγούμενο για τη ρυθμιστική έγκριση στα προϊόντα της εξατομικευμένης ιατρικής.
Προκλήσεις για την υλοποίηση της υπόσχεσης της εξατομικευμένης ιατρικής.
Παρά την επίτευξη πλήρους αλληλουχίας του ανθρώπινου γονιδιώματος, υπάρχουν πολλές προκλήσεις για την υλοποίηση της εξατομικευμένης ιατρικής (Πλαίσιο 3). Ο εντοπισμός γενετικών παραλλαγών που είναι δείκτες της νόσου ή της ανταπόκρισης του φαρμάκου απαιτεί ΄΄κοσκίνισμα΄΄ μέσω αρκετών εκατομμυρίων SNPs στο ανθρώπινο γονιδίωμα για να βρεθούν εκείνα που συμβάλλουν στην ασθένεια και στη συνέχεια να αποδείξουν ότι οι SNPs είναι κλινικά έγκυροι δείκτες και είναι χρήσιμοι για τη διαχείριση των ασθενών. [7.9] Για να αποκαλύψει τις παραλλαγές του DNA που προβλέπουν κοινές, πολύπλοκες ασθένειες που προκύπτουν από το συνδυασμό των γονιδίων και των περιβαλλοντικών παραγόντων θα απαιτήσει: οικονομικά

αποδοτική, υψηλής απόδοσης γονοτυπική, μεγάλους καλά σεσημασμένους πληθυσμούς ασθενών, εξελιγμένες υπολογιστικές μεθόδους και λεπτομερή κατανόηση του βιολογικού μονοπατιού της ασθένειας. Η αποκάλυψη δεικτών mRNA και πρωτεϊνών για χρήση σε έλεγχο, διάγνωση, πρόγνωση και την παρακολούθηση της νόσου θα έχει τις δικές τις προκλήσεις. Η πρόσβαση σε βέλτιστους σχετικούς ιστούς μπορεί να μην είναι δυνατή για πολλές ασθένειες. Πρωτεωμικές τεχνολογίες χρειάζονται περαιτέρω ανάπτυξη, όπως και οι υπολογιστικές προσεγγίσεις για την ανάλυση τεράστιων ποσοτήτων δεδομένων προφίλ γονιδίων και πρωτεϊνών . Για να πραγματοποιήσουμε το όραμα της εξατομικευμένης ιατρικής, η ατζέντα για την ιατρική και φαρμακευτική έρευνα πρέπει να περιλαμβάνει τη συναρμολόγηση και ενοποίηση δεδομένων από πολλές πηγές και από μεγάλο αριθμό ασθενών. Οι κλινικές έρευνες πρέπει να ενσωματώσουν τεχνολογίες γονοτυπικού μοριακού προφίλ , μαζί με παραδοσιακή συλλογή κλινικών δεδομένων και πρέπει να δημιουργήσει ,όπου είναι δυνατόν ένα αποθετήριο των δειγμάτων των ασθενών. [7.10]

Πλαίσιο 3. Προκλήσεις για την υλοποίηση της υπόσχεσης της

εξατομικευμένης ιατρικής

Ανακάλυψη δείκτη με βάση SNP ή DNA

Η πρόσβαση σε πληθυσμούς ασθενών

Κόστος Genotyping

Υπολογιστικές μεθοδολογίες

Ανακάλυψη δείκτη mRNA και πρωτεΐνης

Η πρόσβαση σε κλινικά δείγματα ιστού

Η τεχνολογική ανάπτυξη (πρωτεωμική)

Υπολογιστικές μεθοδολογίες

Χρησιμοποίηση Δείκτη στην πράξη

Δοκιμασία πλατφόρμα ανάπτυξης

Δεδομένων μεγάλης κλίμακας και η διαχείριση της γνώσης

Ηθικές, νομικές και κοινωνικές πτυχές

Ιατρός και εκπαίδευση των ασθενών

Νέοι μοριακοί δείκτες ενδέχεται να αντιμετωπίσουν πολλά εμπόδια, πριν να μπορέσουν να εφαρμοστούν στη φροντίδα των ασθενών. Τα θέματα που κυμαίνονται από τη ρύθμιση εθνικών οργανισμών φαρμάκων και την αποδοχή αυτών των νέων δεικτών, την ανάπτυξη πλατφόρμων δοκιμασίας, την επίλυση των ζητημάτων γύρω από τις ηθικές, νομικές και κοινωνικές επιπτώσεις της απόκτησης εξαιρετικά ευαίσθητων γενετικών πληροφοριών. Πρώτιστος μεταξύ αυτών είναι η εκπαίδευση και η συμμετοχή των γιατρών και των ασθενών στην παραδειγματική στροφή προς τον στόχο. Αν κατάλληλα συστήματα διαχείρισης ασθενών, ολοκληρωμένες βάσεις δεδομένων, εκπαιδευτικά εργαλεία και γενετική συμβουλευτική δεν είναι στη θέση τους, τότε θα είναι δύσκολο να συνειδητοποιήσουμε τα σημαντικά οφέλη που προβλέπεται από αυτή την προσέγγιση. Ευτυχώς, έχουμε ήδη μάθει πολύτιμα μαθήματα από παρελθούσες προσπάθειες για την εφαρμογή του γενετικού ελέγχου για την δρεπανοκυτταρική αναιμία, και από πιο πρόσφατες προσπάθειες για την εξέταση των μεταλλάξεων BRCA1 σε οικογένειες με καρκίνο του μαστού. Οι ηθικές, νομικές και κοινωνικές συνέπειες (ELSI) της ανθρώπινης γενετικής έρευνας αποτελούν το αντικείμενο ενός προγράμματος χρηματοδοτούμενο από την κυβέρνηση των ΗΠΑ (http://www.nhgri.nih.gov/ELSI/). Η κυβέρνηση των ΗΠΑ διαδραματίζει ενεργό ρόλο στην δημόσια ευαισθητοποίηση του κόσμου για τις γενετικές πληροφορίες, και μεταξύ άλλων, την κατάρτιση νομοθεσίας για την προστασία των ασθενών από τις διακρίσεις από τους εργοδότες και ασφαλιστικές εταιρείες . Ένα όραμα για την άσκηση της ιατρικής στον 21ο αιώνα. Κατά την επόμενη δεκαετία, η ιατρική περίθαλψη θα υποστεί επαναστατικές αλλαγές. Η ιατρική πρακτική δεν θα περιορίζεται στην εμπειρική παρέκταση της φροντίδας του ασθενούς από τα γενικευμένα αποτελέσματα των κλινικών δοκιμών. Η παραδοσιακή ιατρική πρακτική, η οποία βασίζεται στη δοκιμή και λάθους, οδηγεί σε υπερθεραπεία και υποθεραπεία, πολλαπλές επισκέψεις και στην ανάγκη για παρακολούθηση των φαρμακευτικών σκευασμάτων. Περισσότεροι από 100 000 θάνατοι ετησίως αποδίδονται σε ανεπιθύμητες ενέργειες του φαρμάκου . Μια εξατομικευμένη προσέγγιση προσαρμοσμένης φροντίδας για κάθε άτομο με βάση τη συγκεκριμένη, μοριακή νόσο τους θα γίνει το πρότυπο της περίθαλψης. Στην πρότυπη επίσκεψη, ο γιατρός θα εξετάζει το γενετικό προφίλ του ασθενούς (αποθηκευμένη σε CD-ROM ή παρόμοιο), τον τρόπο ζωής, και τα αποτελέσματα από αντικειμενικό μοριακό έλεγχο και τις δοκιμές

παρακολούθησης. Αλγόριθμοι, που θα προέρχονται από προηγούμενες ερευνητικές προσπάθειες, θα χρησιμοποιηθούν για να υπολογιστεί η πιθανότητα ένας ασθενής να αναπτύξει μια σειρά από χρόνιες ασθένειες. Το επίκεντρο της ιατρικής στην παρούσα συγκυρία θα είναι εντελώς προληπτικό. Αλλαγές στον τρόπο ζωής και χρήση της προφυλακτικής θεραπείας θα πρέπει να συνιστώνται με βάση το τι είναι καλύτερο για αυτόν τον ασθενή για την αποφυγή της χρόνιας ασθένειας από την οποία θα μπορούσε να είναι ευπρόσβλητος. Το «ιατρείο» του μέλλοντος θα μπορούσε να είναι εικονικό. Επισκέψεις στο ιατρείο του Διαδικτύου θα μπορούσε να αντικαταστήσει κάποια την άμεση επαφή ασθενή-γιατρού. Οι ασθενείς θα έχουν περισσότερες γνώσεις για τα δικά τους προφίλ υγείας και για τους κινδύνους και θα τους καθιστούσε πιο ενεργούς στην κατεύθυνση της υγειονομικής τους περίθαλψης.
[7.11]

Βιβλιογραφία

[7.1] Vizirianakis, LS. (2002). Pharmaceutical education in the wake of genomic

Technologies in drug development and personalized medicine. Eur. J. Pharm. Sci, 15:

243-250.

[7.2] Vizirianakis LS. (2004). Challenges in current drug delivery from the potential

Application of pharmacogenomics and personalized medicine in clinical practice. Curr.

DrugDeliv, 1: 73-80.

[7.3] Vizirianakis, LS. (2005). Improving pharmacotherapy outcomes by pharmaco-

genomics: from expectation to reality? Pharmacogenomics, 6: 701-711.

[7.4] Vizirianakis, LS. (2006). The transformation of pharmacogenetics into

pharmacogenomics reinforces personalized medicine towards pharmacotyping for

improved patient care. In: "New Research on Pharmacogenetics", Barnes L. (Ed.),

Nova Science Publishers, Inc.; New York. In press.

[7.5] Vizirianakis, LS. (2007). From defining bioinformatics and pharmacogenomics to

developing information based medicine and pharmacotyping in healthcare. In:

"Pharmaceutical Biotechnology Handbook", Gad S.C. (Ed.), John Wiley & Sons, Inc.,

New York. In press.
[7.6] http://www.ceid.upatras.gr/webpages/courses/cplusplus/bioinfo/Part-B-Kef1.pdf

[7.7] J.Martin. Η πρωτεωμική ως μια σημαντική νέα τεχνολογία για το φάρμακο

διαδικασία ανακάλυψης. Ανακάλυψη φαρμάκων

[7.8] Sweeny K. Τεχνολογικές τάσεις στην ανακάλυψη φαρμάκων και

ανάπτυξης: Συνέπειες για την ανάπτυξη των

φαρμακευτική βιομηχανία.

[7.9] Personalized medicine:revolutionizing drug discovery and patient care

Vol.19,No12 December 2001(article)

[7.10] Use of genomics and proteomics in pharmaceutical drug discovery and

development, Sharma Neha, Harikumar S.L.,2013 (article)

[7.11] Disease proteomics,Nature publishing group,2003 (article)