



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΗΛΕΚΤΡΟΛΟΓΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ
ΚΑΙ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΩΝ
ΤΟΜΕΑΣ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ ΜΕΤΑΔΟΣΗΣ
ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΑΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΥΛΙΚΩΝ

Αξιολόγηση μεθόδων κατηγοριοποίησης δεδομένων γονιδιακής έκφρασης cDNA μικροσυστοιχιών

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

της

ΑΘΑΝΑΣΙΑΣ-ΧΑΡΑΛΑΜΠΙΑΣ Δ. ΕΥΑΓΓΕΛΙΝΟΥ

Επιβλέπων: Κουτσούρης Δημήτριος
Καθηγητής ΕΜΠ

Αθήνα, Σεπτέμβριος 2012



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΗΛΕΚΤΡΟΛΟΓΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ
ΚΑΙ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΩΝ
ΤΟΜΕΑΣ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ ΜΕΤΑΔΟΣΗΣ
ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΑΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΥΛΙΚΩΝ

Αξιολόγηση μεθόδων κατηγοριοποίησης δεδομένων γονιδιακής έκφρασης cDNA μικροσυστοιχιών

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

της

ΑΘΑΝΑΣΙΑΣ-ΧΑΡΑΛΑΜΠΙΑΣ Δ. ΕΥΑΓΓΕΛΙΝΟΥ

Επιβλέπων: Κουτσούρης Δημήτριος
Καθηγητής ΕΜΠ

Εγκρίθηκε από την τριμελή εξεταστική επιτροπή

.....
Κουτσούρης Δημήτριος
Καθηγητής ΕΜΠ

.....
Ματσόπουλος Γιώργος
Επίκουρος Καθηγητής Ε.Μ.Π

.....
Πρέντζα Ανδριάννα
Επίκουρη Καθηγήτρια
Πανεπιστημίου Πειραιά

.....

Αθανασία-Χαραλαμπία Ευαγγελινού

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

Copyright © Αθανασία Ευαγγελινού - Ιούλιος 2012

Με επιφύλαξη παντός δικαιώματος. All rights reserved.

Απαγορεύεται η αντιγραφή, αποθήκευση και διανομή της παρούσας εργασίας, εξολοκλήρου 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 τον συγγραφέα. Οι απόψεις και τα συμπεράσματα που περιέχονται σε αυτό το έγγραφο εκφράζουν τον συγγραφέα και δεν πρέπει να ερμηνευθεί ότι αντιπροσωπεύουν τις επίσημες θέσεις του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα Καθηγητή, κ. Δημήτριο Κουτσούρη, και την κα. Ανδριάνα Πρέντζα, Επίκουρη Καθηγήτρια στο Πανεπιστήμιο Πειραιώς, για την ευκαιρία που μου έδωσαν να εκπονήσω την παρούσα διπλωματική εργασία σε έναν ενδιαφέροντα τομέα της Βιοϊατρικής, καθώς και για την πολύτιμη βοήθειά τους, τις συμβουλές και τον χρόνο που μου αφιέρωσαν κατά τη διάρκεια της εκπόνησης και συγγραφής της εργασίας αυτής. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά το Διδάκτορα κ. Εμμανουήλ Σηφάκη για την καθοδήγηση και τις πολύτιμες συμβουλές του, καθώς και την Δρ. Πετροπούλου Ράνια (Ph.D.), από το Εργαστήριο Βιοϊατρικής Τεχνολογίας του Ε.Μ.Π., που συνέβαλε καθοριστικά στην επίλυση διαδικαστικών προβλημάτων που προέκυψαν κατά τη διαδικασία ολοκλήρωσης της εργασίας μου.

Δε θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω την οικογένειά μου, και ιδιαίτερα την αδερφή μου Άννα, που με πολλή αγάπη με στήριξε, και συνεχίζει να με στηρίζει, καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών και της ζωής μου.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την φίλη και συμφοιτήτριά μου Κατερίνα Σκούτα, που χωρίς φειδώ του προσωπικού της χρόνου με βοήθησε κατά τη διάρκεια της φοίτησής μου και συνέβαλε και εκείνη με διάφορους τρόπους στη δημιουργία αυτής της διπλωματικής εργασίας.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα διπλωματική εργασία γίνεται αναφορά σε διαφορετικές μεθοδολογίες κατηγοριοποίησης δεδομένων γονιδιακής έκφρασης με τη χρήση cDNA μικροσυστοιχιών (microarrays). Η τεχνολογία μικροσυστοιχιών επιτρέπει τη μέτρηση των επιπέδων έκφρασης χιλιάδων γονιδίων μόνο σε ένα πείραμα, δημιουργώντας έτσι μια αφθονία δεδομένων. Τα δεδομένα προκύπτουν από έρευνες που πραγματοποιήθηκαν σε διαφορετικά ερευνητικά κέντρα και αφορούν σε δείγματα από τρία είδη καρκινικών όγκων.

Αρχικά, στην εισαγωγή της εργασίας, περιγράφεται όλο το σχετικό βιολογικό υπόβαθρο, και ακολουθεί εκτενής αναφορά στις τεχνικές με βάση τον προσδιορισμό αλληλουχίας για την παρακολούθηση των επιπέδων της γονιδιακής έκφρασης, καθώς και στις διαφορετικές τεχνολογίες μικροσυστοιχιών. Στη συνέχεια, γίνεται αναλυτική ταξινόμηση του καρκίνου του μαστού, της λευχαιμίας και του καρκίνου του πνεύμονα.

Παρουσιάζονται, επίσης, για κάθε μία κατηγορία καρκίνου, έρευνες που αναφέρονται στον προσδιορισμό γονιδίων ανιχνευτών, καθώς και στη χρήση τεχνολογιών και διάφορων αλγορίθμων. Απώτερος στόχος είναι η βελτίωση του τρόπου θεραπευτικής αντιμετώπισης των συγκεκριμένων καρκινικών τύπων, μέσω της ανακάλυψης νέων υποκατηγοριών και της καλύτερης ταξινόμησης των υπαρχόντων ειδών καρκίνου.

Λέξεις κλειδιά: γονιδιακή έκφραση, cDNA μικροσυστοιχίες, ταξινόμηση καρκίνου, καρκινικοί υπότυποι, αλγόριθμοι ταξινόμησης, καρκίνος του μαστού, καρκίνος του πνεύμονα, λευχαιμία.

ABSTRACT

This paper refers to different methods of gene expression data classification using cDNA microarrays. The microarray technology allows measuring the expression levels of thousands of genes in a single experiment, thus creating an abundance of data. The data is obtained from surveys conducted in different research centers on samples from three types of cancerous tumors.

More specifically, the introduction encompasses all the biological background necessary, followed by a comprehensive reference to techniques based on sequencing for monitoring the levels of gene expression, as well as a comprehensive reference to different microarray technologies.

Subsequently, there is a detailed classification of breast cancer, leukemia and lung cancer. Also presented is, for each category of cancer, research indicative of gene probes identification, as well as of the use of various technologies and algorithms. The ultimate goal is to improve the way of treating certain types of cancer through the discovery of new subtypes and the refinement of the classification of existing types of cancer.

Keywords: gene expression, cDNA microarrays, cancer clustering, cancer subtypes, classification algorithms, breast cancer, lung cancer, leukemia.

Στον Αποστόλη

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	4
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	5
ABSTRACT	6
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	8
ΠΙΝΑΚΕΣ	9
ΓΡΑΦΙΚΕΣ ΠΑΡΑΣΤΑΣΕΙΣ	10
ΕΙΚΟΝΕΣ	10
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	12
2. ΚΥΤΤΑΡΑ ΚΑΙ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ	15
2.1 ΓΟΝΙΔΙΩΜΑ.....	15
2.2 ΠΡΟΚΑΡΥΩΤΙΚΑ ΚΑΙ ΕΥΚΑΡΥΩΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ	16
2.3 ΓΟΝΙΔΙΑ	17
2.4 Η ΔΟΜΗ ΤΟΥ DNA	18
2.4.1 Νουκλεοτίδια	18
2.4.2 Χρωματίνη.....	20
2.5 Η ΔΟΜΗ ΤΟΥ RNA	21
2.6 ΚΕΝΤΡΙΚΟ ΔΟΓΜΑ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ	23
2.6.1 Γενετικός Κώδικας	24
2.6.2 Πρωτεΐνες.....	24
2.7 ΓΟΝΙΔΙΑΚΗ ΕΚΦΡΑΣΗ	26
3. Η ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΜΕΤΑ ΤΗΝ ΑΠΟΚΩΔΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΥ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΟΣ	31
3.1 ΣΥΣΤΗΜΙΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ.....	31
3.2 ΥΒΡΙΔΟΠΟΙΗΣΗ	32
3.2.1 Αποτύπωση κατά Southern και Northern	33
3.3 ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΙΚΟ DNA & cDNA ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΕΣ.....	34
3.4 ΑΛΙΣΥΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ PCR.....	35
3.5 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ	36
3.6 ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗ ΤΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΤΗΣ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ.....	37
4. ΜΙΚΡΟΣΥΣΤΟΙΧΙΕΣ.....	38
4.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	38
4.2 ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΕΣ ΜΙΚΡΟΣΥΣΤΟΙΧΙΩΝ	39
4.2.1 Τυπωμένες Μικροσυστοιχίες	40
4.2.2 Μικροσυστοιχίες με χρήση σφαιριδίων	42
4.2.3 Τεχνολογία επιτόπιας σύνθεσης μικροσυστοιχιών	43
5. ΚΑΡΚΙΝΟΣ	47
5.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	47
5.2 ΚΑΤΗΓΟΡΙΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ	48
6. ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ	50
6.1 ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΑΤΟΜΙΑ	50
6.2 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΓΙΑ ΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ	51
6.3 ΜΟΡΙΑΚΗ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΩΝ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ	52
6.3.1 Ο τριπλός αρνητικός καρκίνος του μαστού	52
6.4 ΚΑΤΗΓΟΡΙΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΚΑΡΚΙΝΩΝ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΜΙΚΡΟΣΥΣΤΟΙΧΙΩΝ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ	53
6.4.1 Έρευνα της Αμερικανικής Οργάνωσης Κλινικής Χημείας	53

6.4.2 Ανακάλυψη της υποκατηγορίας Claudin-low	54
6.4.3 Έρευνα & αποτελέσματα από το Ολλανδικό Καρκινικό Ερευνητικό Κέντρο	55
6.4.4 Η μοριακή δοκιμή Oncotype DX	56
6.4.5 Πρότυπο μοντέλο πρόβλεψης του καρκίνου του μαστού GENIUS.....	57
7. ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ	59
7.1 ΓΕΝΙΚΑ	59
7.2 ΤΥΠΟΙ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑΣ	60
7.2.1 Ταξινόμηση της οξείας λεμφοβλαστικής λευχαιμίας.....	61
7.3 Η ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΜΙΚΡΟΣΥΣΤΟΙΧΙΩΝ ΣΤΗΝ ΠΡΟΓΝΩΣΗ & ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΗΣ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑΣ	65
7.3.1 Οξεία Μυελοειδής Λευχαιμία (AML) & νέες υποκατηγορίες	65
7.3.3 Πανεπιστημιακό Ιατρικό Κέντρο Erasmus, Ολλανδία	66
7.3.4 Έρευνες για τις υποκατηγορίες της Οξείας Προμυελοκυτταρικής Λευχαιμίας (APL)	67
7.3.5 Αποτελέσματα του προγράμματος έρευνας MILE	67
7.3.5.1 Αλγόριθμος Εκπαίδευσης για Ανάλυση Ταξινόμησης της οξείας λευχαιμίας	70
7.3.5 Διάγνωση ALL & AML χρησιμοποιώντας την τεχνολογία ανάλυσης δεδομένων	70
8. ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ.....	74
8.1 ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΗ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ	74
8.1.2 Μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα (SCLC)	74
8.1.3 Πλακώδες καρκίνωμα	74
8.1.4 Αδενοκαρκίνωμα	75
8.1.5 Μεγαλοκυτταρικός καρκίνος.....	75
8.2 ΑΙΤΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ.....	75
8.2.1 Προδιαθεσικοί και αιτιολογικοί παράγοντες.....	75
8.3 ΤΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΣΤΑΔΙΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ	76
8.3.1 Η εξέλιξη της σταδιοποίησης του καρκίνου του πνεύμονα	76
8.3.2 Το διεθνές σύστημα σταδιοποίησης του καρκίνου του πνεύμονα	77
8.3.4 Η νέα σταδιοποίηση του μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα από την IASLC και τα κλινικά συμπεράσματα.....	77
8.4 Η ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΜΙΚΡΟΣΥΣΤΟΙΧΙΩΝ ΣΤΗΝ ΠΡΟΓΝΩΣΗ ΚΑΙ ΔΙΑΓΝΩΣΗ	78
8.4.1 Γονιδιακή υπογραφή 72 γονιδίων για το αδενοκαρκίνωμα & το πλακώδες καρκίνωμα	79
8.4.2 Μελέτη για την ταξινόμηση των NSCLC όγκων από το Πανεπιστημιακό Ιατρικό Κέντρο Erasmus, Rotterdam	82
8.4.3 Γονιδιακή υπογραφή 5 γονιδίων για την κατηγοριοποίηση του NSCLC καρκίνου.	83
9. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	85
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	90

ΠΙΝΑΚΕΣ

Πίνακας 1: Αξιολόγηση βάσει της έκτασης του όγκου T (American Joint Committee)	48
Πίνακας 2: Αξιολόγηση βάσει της διάδοσης του όγκου στους λεμφαδένες (American Joint Committee).....	48
Πίνακας 3: Αξιολόγηση βάση παρουσίασης μετάστασης M (American Joint Committee)	49
Πίνακας 4: Τα 5 στάδια της ταξινόμησης των TNM συνδυασμών	49
Πίνακας 5: Κυτταρογενετικές μετατοπίσεις συνδέονται με συγκεκριμένες μοριακές γενετικές ανωμαλίες στην ALL(Stams, den Boer et al. 2005, McWhirter, Neuteboom et al. 1999).....	62
Πίνακας 6: Σχέση της πρόγνωσης με την κυτταρογενετική αλλαγή που εμφανίζεται (Wikipedia 2012).	63
Πίνακας 7: Συσχετισμός της πρόγνωσης με τα κυτταρογενετικά ευρήματα στο μυελών των οστών στην οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία (Stams, den Boer et al. 2005)	63
Πίνακας 8: Οι AML υπότυποι του Γαλλο-Αμερικανο-Βρετανικού συστήματος (Wikipedia 2012).....	64

Πίνακας 9: Αποτελέσματα ταξινόμησης του αλγορίθμου Naïve Bayesian	71
Πίνακας 10: Αποτελέσματα ταξινόμησης του αλγορίθμου K Nearest Neighbor.....	72
Πίνακας 11: Αποτελέσματα ταξινόμησης του αλγορίθμου SVM	72
Πίνακας 12 : Διεξαγωγή αποτελεσμάτων από τις μελέτες των καρκινικών κυττάρων του μαστού.....	87
Πίνακας 13: Αποτελέσματα από τις μελέτες διαφόρων τύπων λευχαιμίας.....	88
Πίνακας 14: Αποτελέσματα από τις μελέτες διαφόρων τύπων καρκίνου του πνεύμονα.....	89

ΓΡΑΦΙΚΕΣ ΠΑΡΑΣΤΑΣΕΙΣ

Γραφική παράσταση 1: Σωστά ταξινομημένες περιπτώσεις για κάθε αλγόριθμο	73
Γραφική παράσταση 2: Λανθασμένα ταξινομημένες περιπτώσεις για κάθε αλγόριθμο	73
Γραφική παράσταση 3: Ακρίβεια για κάθε αλγόριθμο	73

ΕΙΚΟΝΕΣ

Εικόνα 2.1: Φυτικό και ζωικό κύτταρο.....	15
Εικόνα 2.2: Προκαρυωτικό κύτταρο (Wikipedia 2012)	16
Εικόνα 2.3: Ζωικό ευκαρυωτικό κύτταρο (Wikipedia 2012).....	17
Εικόνα 2.4: Γονίδιο (Wikipedia 2012).....	17
Εικόνα 2.5: Νουκλεοτίδιο του DNA (Life Sciences Cyberbridge2007).....	18
Εικόνα 2.7: Μοντέλο διπλής έλικας του DNA (Lodish, Darnell et al. 2003)	19
Εικόνα 2.6: Το βέλος δείχνει τον φωσφοδιεστερικό σκελετό με προσανατολισμό 5'->3' (Μαρμάρα Β., Λαμπροπούλου- Μαρμάρα Μ. 2005).....	19
Εικόνα 2.8: Το πακετάρισμα της χρωματίνης και ο σχηματισμός χρωμοσωμάτων (Ψηφιακό Σχολείο Βιολογία (Γ Γενικού Λυκείου - Θετικής Κατεύθυνσης)	21
Εικόνα 2.9: Δομή του RNA (Wikipedia 2012).....	22
Εικόνα 2.10: Κεντρικό δόγμα της βιολογίας (Wikipedia 2012).....	23
Εικόνα 2.11: Επισκόπηση των 4 βασικών μοριακών γενετικών διαδικασιών (Lodish, Darnell et al. 2003)	24
Εικόνα 2.12: Το αμινοξύ ως δομική μονάδα των πρωτεϊνών και ο πεπτιδικός δεσμός. (α) Ένα αμινοξύ περιέχει μία αμινομάδα (-NH ₂), μία καρβοξυλομάδα (-COOH), ένα άτομο υδρογόνου, και μία πλευρική αλυσίδα (-R). Η πλευρική αλυσίδα ποικίλει ανάλογα με το αμινοξύ. (β) Ο πεπτιδικός δεσμός σχηματίζεται, όταν η αμινομάδα του ενός αμινοξέος ενωθεί με ομοιοπολικό δεσμό με την καρβοξυλομάδα του άλλου, με ταυτόχρονη απελευθέρωση ενός μορίου νερού. (Johnson, Raven P., 2001).....	25
Εικόνα 2.13: Οι τρεις ρόλοι του RNA στην πρωτεϊνοσύνθεση (Lodish, Darnell et al. 2003).....	26
Εικόνα 2.14: Ενισχυτής (Βικιπαίδεια 2012)	27
Εικόνα 2.15: Η RNA pol II περιέχει επαναλήψεις tyr-ser-pro-thr-ser-pro-ser στο CTD (C-terminal domain) που αποτελούν στόχο για φωσφορυλίωση. Η TFIIH είναι μια από τις κινάσες που φωσφορυλιώνουν την RNA pol II.(Βικιπαίδεια 2012)	28
Εικόνα 2.16: Τρισδιάστατη δομή της TBP (tATA-δεσμευτική πρωτεΐνη) που δεσμεύεται στο DNA. Η TBP είναι μία ενιαία πολυπεπτιδική αλυσίδα που είναι διπλωμένη σε δύο πολύ παρόμοιες περιοχές (μπλε και πράσινη) (Alberts 2002)	29

Εικόνα 3.1: Οργάνωση επιπέδων στη συστημική βιολογία.....	32
Εικόνα 3.2: Αποτύπωση κατά Southern	33
Εικόνα 3.3: Αποτύπωση κατά Northern	34
Εικόνα 3.4: cDNA βιβλιοθήκη (Alberts 2002)	35
Εικόνα 3.5: Δημιουργία cDNA βιβλιοθήκης σε κατάλληλο φορέα.....	36
Εικόνα 4.1: Σχηματοποιημένη πειραματική διαδικασία ενός πειράματος μικροσυστοιχιών	40
Εικόνα 4.2: Τυπωμένες cDNA μικροσυστοιχίες (Lee 2004).	42
Εικόνα 4.3: Τεχνολογία Affymetrix GeneChip. 1) Επιλογή ολιγονουκλεοτιδίου PM & MM. 2) Προετοιμασία δείγματος και υβριδοποίηση. 3) Σάρωση & εξαγωγή εικόνας. 4) Δεδομένα που προκύπτουν προς επεξεργασία.	45
Εικόνα 6.1: Από τα αδενικά λόβια (κόκκινα) που παράγουν το γάλα προέρχεται ο λοβιακός καρκίνος (μπλε) και από τους πόρους που μεταφέρουν το γάλα (πράσινο) ο πορογενής (μπλε) (Φύσσας Γ.).	50
Εικόνα 6.2: Διάγραμμα που απεικονίζει την επικάλυψη μεταξύ του TNBC, του BLBC και των γυναικών με καρκίνο του μαστού που παρουσιάζουν μεταλλάξεις στο γονίδιο BRCA (ΦΥΣΣΑΣ, Γ., Είδη Καρκίνου του μαστού).	53
Εικόνα 6.3: Το λογισμικό Adjuvant! (Screenshot of the Adjuvant! software program)	56
Εικόνα 7.1: Κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης, τα ευκαρυωτικά κύτταρα συνεχώς περνούν από τις 4 φάσεις του κυτταρικού κύκλου, δημιουργώντας νέα θυγατρικά κύτταρα (Lodish, Darnell et al. 2003).	59
Εικόνα 7.2: Πραγματικοί ανοσοφαινότυποι για 1.292 δείγματα οξείας λευχαιμίας από το στάδιο I	69
Εικόνα 7.3: Εξερευνητική ανάλυση του Margin Tree. Η ταξινόμηση με Margin Tree είναι μία SVM μέθοδος ταξινόμησης με επίβλεψη	69
Εικόνα 8.1: Επικύρωση του προγνωστικού προφίλ των 72 γονιδίων στα ανεξάρτητα δείγματα. Κάθε σειρά αντιπροσωπεύει ένα δείγμα και κάθε στήλη αντιπροσωπεύει ένα γονίδιο	79
Εικόνα 8.2: Προσδιορισμός κατωτάτου ορίου για το χαμηλό κίνδυνο που προκύπτει από συνημιτονικούς συσχετισμούς.....	81
Εικόνα 8.3: Εκτιμήσεις επιβίωσης OS και RFS με τη μέθοδο Kaplan-Meier των 103 δειγμάτων με τη χρήση των 72 γονιδίων ανιχνευτών υψηλού και χαμηλού κινδύνου.....	81
Εικόνα 8.4: Διάκριση των φυσιολογικών ιστών από τους καρκινικούς όγκους με τη χρήση της ιεραρχικής ταξινόμησης.....	83
Εικόνα 8.5: Συσχετιστικό δενδρόγραμμα παραγόμενο από την συσσωρευτική ιεραρχική ταξινόμηση των 91 NSCLC δειγμάτων με τη χρήση 518 ανιχνευτών γονιδιακής υπογραφής.	83

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η ανάπτυξη της τεχνολογίας των cDNA μικροσυστοιχιών επιτρέπει σήμερα στους επιστήμονες να καθορίσουν - με ένα μόνο πείραμα - τα επίπεδα έκφρασης χιλιάδων γονιδίων μέσα σε ένα κύτταρο. Εφαρμόζοντας τη μεθοδολογία της υβριδοποίησης σε κλινικά δείγματα, μπορεί κανείς να λάβει συγκεκριμένες πληροφορίες για την παθογένεια μιας ασθένειας και να τις ομαδοποιήσει σε λογικές και λειτουργικές κατηγορίες στην έκφραση του γονιδιώματος.

Ο καρκίνος είναι αποδεδειγμένα η νόσος που έχει προσελκύσει το μεγαλύτερο ενδιαφέρον, κυρίως για δύο σημαντικούς λόγους:

- Υπάρχει η δυνατότητα λήψης δείγματος ιστού από τον όγκο, ώστε να γίνει μέτρηση της έκφρασης των γονιδίων με τη χρήση της DNA μικροσυστοιχίας.
- Με την υβριδοποίηση του DNA μπορούν να ξεχωρίσουν τα διαφορετικά αλληλόμορφα γονίδια (μεταλλάξεις) στο DNA, μερικά από τα οποία έχουν επιπτώσεις στον καρκίνο.

Η τεχνολογία των μικροσυστοιχιών έχει χρησιμοποιηθεί αρκετά στη διάγνωση κακοηθειών, στην ταυτοποίηση αιματολογικών νεοπλασιών, στον προσδιορισμό γονιδίων ανιχνευτών, αλλά και στην εύρεση νέων καρκινικών υποτύπων.

Διάφορες είναι οι τεχνικές που χρησιμοποιούνται στην ανάλυση των δεδομένων, καθώς ο προσδιορισμός προτύπων γονιδιακής έκφρασης και η ταξινόμηση των γονιδίων σε ομάδες έκφρασης παρέχει καλύτερη κατανόηση του βιολογικού τους ρόλου και της μεταξύ τους σχέσης.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία γίνεται αναλυτική επισκόπηση και αξιολόγηση διαφορετικών μεθοδολογιών κατηγοριοποίησης δεδομένων, όπως η ιεραρχική ομαδοποίηση (hierarchical clustering), η ομαδοποίηση k-μέσων (k-means clustering), οι αλγόριθμοι Microarray Innovations in Leukemia (MILE) και Naïve Bayesian, καθώς και οι μηχανές υποστήριξης διανυσμάτων (SVM-Support Vector Machines), που βασίζονται στην τεχνολογία των νευρωνικών δικτύων, για τρεις κατηγορίες καρκίνου, καρκίνου του μαστού, λευχαιμίας και καρκίνου του πνεύμονα.

Η διπλωματική εργασία περιλαμβάνει τα ακόλουθα κεφάλαια:

Το κεφάλαιο 1, περιλαμβάνει μία εισαγωγή στο ερευνητικό πρόβλημα, το στόχο της διπλωματικής εργασίας και τη δομή της εργασίας.

Στο κεφάλαιο 2 της εργασίας, περιγράφεται όλο το σχετικό βιολογικό υπόβαθρο. Συγκεκριμένα, γίνεται αναφορά στη δομή του DNA και του RNA, στο σχηματισμό των χρωμοσωμάτων, στο κεντρικό δόγμα της Μοριακής Βιολογίας, στην πρωτεϊνοσύνθεση και τη γονιδιακή έκφραση.

Στο κεφάλαιο 3, γίνεται αναφορά στις θεμελιώδεις τεχνικές της Μοριακής Βιολογίας, όπως η υβριδοποίηση (που αποτελεί τη θεμελιώδη βάση των DNA μικροσυστοιχιών), η αποτύπωση κατά Northern, η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης PCR, ο σχηματισμός cDNA βιβλιοθηκών, και η μέθοδος SAGE, που χρησιμοποιείται στη μέτρηση της γονιδιακής έκφρασης.

Στο κεφάλαιο 4, αναλύονται οι βασικές αρχές της τεχνολογίας των μικροσυστοιχιών. Ανάλογα με το βιολογικό σύστημα που μελετάται, επιλέγονται κατάλληλα δείγματα RNA (δείγμα αναφοράς και προς εξέταση δείγμα) και μετατρέπονται σε cDNA με παράλληλη σήμανσή τους με χρωστικές ουσίες που έχουν διαφορετικά μήκη κύματος διέγερσης και εκπομπής. Στη συνέχεια τα δείγματα αυτά τυπώνονται στις μικροσυστοιχίες, σε κουκίδες που κάθε μία αντιστοιχεί συνήθως σε ένα γονίδιο. Σε όλες τις τεχνικές των μικροσυστοιχιών που χρησιμοποιούνται υπάρχουν μερικά κοινά σημεία. Όλες οι τεχνικές είναι βασισμένες στην καταγραφή των mRNA ποσοτήτων έχοντας ως στόχο τη μέτρηση του επιπέδου έκφρασης ενός μεγάλου συνόλου γονιδίων.

Στο κεφάλαιο 5, παρουσιάζονται οι λόγοι της καρκινογένεσης που στηρίζεται στην ύπαρξη δύο τύπων γονιδίων, στα ογκογονίδια και στα ογκοκατοσταλτικά γονίδια καθώς και η κατηγοριοποίηση του καρκίνου που ουσιαστικά περιγράφει τη σοβαρότητά του και στηρίζεται στην έκταση του αρχικού όγκου. Ένα από τα ευρύτερα γνωστά συστήματα ταξινόμησης είναι το TNM. Το σύστημα αυτό έχει γίνει αποδεκτό τόσο από τη διεθνή ένωση κατά του καρκίνου (Union for International Cancer Control – UICC) όσο και από την αμερικάνικη (American Joint Committee on Cancer – AJCC). Στηρίζεται στην έκταση του όγκου (T=tumor), στην έκταση της διάδοσης στους λεμφαδένες (N=node) και στην παρουσίαση μετάστασης (M=metastasis).

Στα κεφάλαια 6, 7 και 8, γίνεται εκτενής αναφορά και παρουσίαση ερευνών που πραγματοποιήθηκαν σε διαφορετικά ερευνητικά κέντρα και αφορούν σε δείγματα από τρία είδη καρκινικών όγκων, καρκίνου του μαστού, λευχαιμία και καρκίνο του πνεύμονα αντίστοιχα εστιάζοντας στις μεθοδολογίες κατηγοριοποίησης δεδομένων που χρησιμοποιήθηκαν και στα αποτελέσματά τους.

Στο κεφάλαιο 6, παρουσιάζεται η κατηγοριοποίηση των καρκίνων του μαστού με τη χρήση γονιδιακής έκφρασης, όπου σημαντική είναι η ανακάλυψη της υποκατηγορίας Claudin-low της οποίας η ονομασία προκύπτει από τις αντίστοιχες πρωτεΐνες και για τον προσδιορισμό της οποίας χρησιμοποιήθηκαν μικροσυστοιχίες Affymetrix. Ακολουθεί η έρευνα από το Ολλανδικό Καρκινικό Ερευνητικό Κέντρο που ανέπτυξαν μια γονιδιακή υπογραφή η οποία μετρά την έκφραση 70 γονιδίων και ένα προγνωστικό αποτέλεσμα το οποίο κατηγοριοποιεί τους ασθενείς σε γκρουπ υψηλού και χαμηλού κινδύνου. Στη συνέχεια παρουσιάζεται η ανάλυση της μοριακής δοκιμής Oncotype DX, η οποία αναλύει το ρόλο του υποψήφιου γονιδίου στην έκβαση του αποτελέσματος. Τέλος παρουσιάζεται το πρότυπο GeniUS με υψηλά ποσοστά πρόβλεψης, μιας και είναι σε θέση να κατηγοριοποιεί ασαφείς μοριακές υποκατηγορίες στον ολικό πληθυσμό και στους υποτύπους του καρκίνου του μαστού.

Στο κεφάλαιο 7, αναφέρονται οι 4 συνήθεις τύποι λευχαιμίας, Οξεία Λεμφοβλαστική Λευχαιμία (Acute Lymphoblastic Leukaemia – ALL) με δύο τύπους λευχαιμίας B & T (B-ALL και T-ALL), Χρόνια Λεμφοβλαστική Λευχαιμία (Chronic Lymphoblastic Leukaemia - CLL), Οξεία Μυελοειδής Λευχαιμία (Acute Myeloid Leukaemia - AML) και Χρόνια Μυελοειδής Λευχαιμία (Chronic Myeloid Leukaemia - CML).

Σημαντική στις έρευνες για τη λευχαιμία είναι η χρήση της τεχνολογίας GEP, όπου το προφίλ της γονιδιακής έκφρασης GEP(gene expression profile) είναι μία από τις τεχνολογίες στην οποία οι cDNA ή οι ολιγονουκλεοτιδικοί ανιχνευτές των DNA μικροσυστοιχιών χρησιμοποιούνται ταυτόχρονα τα επίπεδα πολλών διαφορετικών mRNA-μεταγραφών. Σε μία πρώτη μελέτη το 1999 ο Golub και οι συνεργάτες του μπόρεσαν να χρησιμοποιήσουν τη μέθοδο GEP ώστε να ξεχωρίσουν το λευχαιμικό τύπο AML από τον ALL. Η έρευνά τους πρότεινε 3 σημαντικές εφαρμογές της τεχνολογίας GEP: ανακάλυψη κατηγορίας, πρόβλεψη και σύγκριση. Σημαντικό επίσης είναι το πρόγραμμα έρευνας MILE, που είχε ως σκοπό να αξιολογηθεί η κλινική ακρίβεια των

προφίλ γονιδιακής έκφρασης (συγκριτικά με την τρέχουσα στερεότυπη διαγνωστική διαδικασία) 16 υποτύπων οξείας και χρόνιας λευχαιμίας, συνδρόμων μυελοδυσπλασίας (MDSs) και ενός γκρουπ ελέγχου που ονομαζόταν «none of the target classes», που περιελάμβανε καλοήθεις δυσλειτουργίες και φυσιολογικό μυελό των οστών. Στο συγκεκριμένο ερευνητικό πρόγραμμα προσδιορίστηκαν 18 ερευνητικές κατηγορίες (C1 έως C18) στις οποίες ταξινομήθηκαν 2.096 δείγματα. Τέλος ενδιαφέρον παρουσιάζει η τεχνολογία ανάσχυσης δεδομένων για τη διάγνωση ALL και AML λευχαιμιών, όπου χρησιμοποιήθηκαν τρεις αλγόριθμοι Naïve Bayesian, K Nearest Neighbors και SVM από τους οποίους ακριβέστερα αποτελέσματα έδωσε ο πρώτος.

Το κεφάλαιο 8, παρουσιάζει και αξιολογεί αλγόριθμους που χρησιμοποιήθηκαν για την ιστολογική ταξινόμηση του καρκίνου του πνεύμονα στους τέσσερις βασικούς τύπους: μικροκυτταρικό καρκίνο, πλακώδες καρκίνωμα, αδενοκαρκίνωμα και μεγαλοκυτταρικό καρκίνο.

Ο μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα αναφέρεται ως μια κατηγορία και οι άλλοι τρεις τύποι: το πλακώδες καρκίνωμα, το αδενοκαρκίνωμα και ο μεγαλοκυτταρικός καρκίνος αναφέρονται ως μη-μικροκυτταρικοί καρκίνοι του πνεύμονα (NSCLC). Για τον καρκίνο του πνεύμονα, που είναι μία από τις κυριότερες αιτίες καρκίνου η έρευνα στρέφεται κυρίως στον προσδιορισμό γονιδίων-ανιχνευτών που συμβάλλουν στην καλύτερη ταξινόμηση των καρκινικών υποτύπων. Σημαντική είναι η επίτευξη μιας αλάνθαστης γονιδιακής υπογραφής 72 γονιδίων για το πρόωρο στάδιο NSCLC καρκίνου. Με τη συνεργασία του European Lung Cancer Microarray Consortium αναπτύχθηκε και επικυρώθηκε ένα σύνολο 72 γονιδίων ταξινομητών για το πρόωρο στάδιο NSCLC που είναι βασισμένο σε ένα απλό πρότυπο ανιχνευτών. Τέλος ενδιαφέρον παρουσιάζουν η γονιδιακή υπογραφή 5 γονιδίων-ανιχνευτών καθώς και η υπογραφή 75 γονιδίων-ανιχνευτών που διακρίνουν με ακρίβεια NSCLC καρκίνους από υγιή ιστό του πνεύμονα. Τα αποτελέσματα προτείνουν ότι το σύνολο των 75 ανιχνευτών και των 5 ανιχνευτών ιστολογικής υπογραφής μπορούν να βοηθήσουν στη σωστή ιστολογική ταξινόμηση σε διφορούμενες περιπτώσεις NSCLC.

Στο κεφάλαιο 9, παρουσιάζονται τα συμπεράσματα από την εκτενή μελέτη και παρουσίαση αλγορίθμων κατηγοριοποίησης δεδομένων στους τρεις καρκίνους. Για κάθε τύπο καρκίνου, παρουσιάζονται σε μορφή πίνακα, το όνομα της μελέτης που παρουσιάστηκε, ο στόχος, ο τύπος καρκίνου, τα δεδομένα που χρησιμοποιήθηκαν, η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για την επεξεργασία των δεδομένων, ο αλγόριθμος κατηγοριοποίησης και τα ευρήματα/αποτελέσματα.

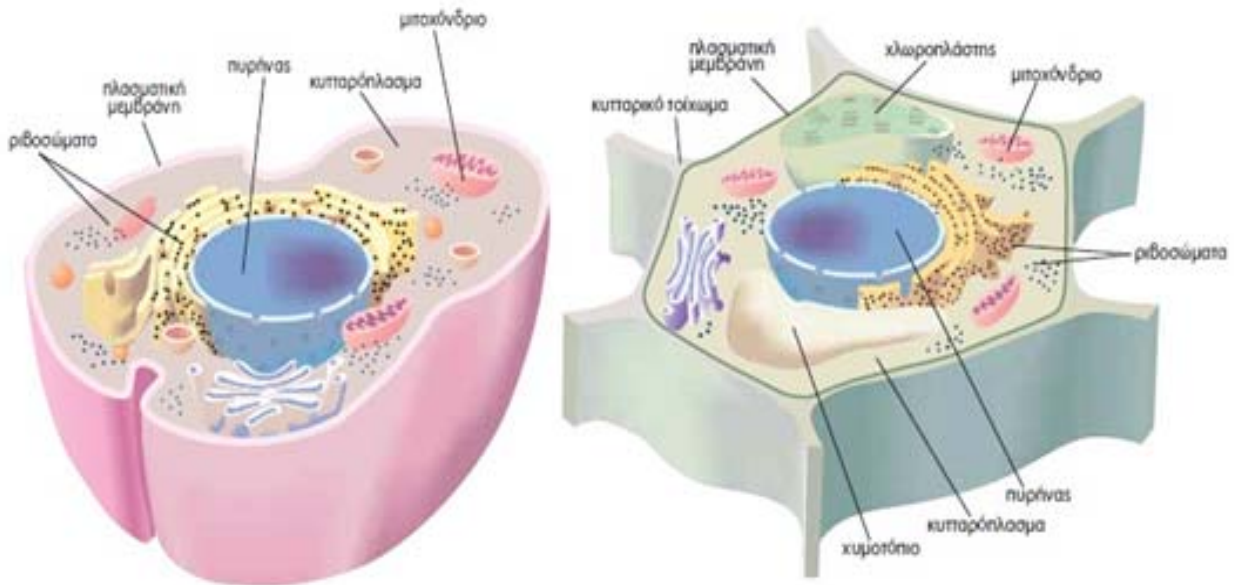
Συνοψίζοντας, απώτερος στόχος της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η παρουσίαση και αξιολόγηση αλγορίθμων κατηγοριοποίησης δεδομένων και των αποτελεσμάτων που προκύπτουν από διάφορες μελέτες σε 3 τύπους καρκίνου, καρκίνο του μαστού, λευχαιμία και καρκίνο του πνεύμονα. Για κάθε μία κατηγορία καρκίνου γίνεται αναφορά στη χρήση διάφορων τεχνολογιών και αλγορίθμων καθώς και στην ανακάλυψη γονιδίων ανιχνευτών.

Στηριζόμενοι στις μελέτες αυτές, μελλοντικά είναι πολύ πιθανό νέες έρευνες να οδηγηθούν σε συμπεράσματα που σχετίζονται με την:

- πρόγνωση των ασθενών με μεγαλύτερη ακρίβεια
- αναγνώριση ομάδων ασθενών που θα επωφεληθούν από συγκεκριμένες επιλεγμένες θεραπείες
- ανάπτυξη και παραγωγή νέων φαρμάκων
- αναγνώριση και ταυτοποίηση γονιδίων που εμπλέκονται στη φαρμακευτική αντίσταση και ευαισθησία

2. ΚΥΤΤΑΡΑ ΚΑΙ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ

Τα κύτταρα είναι οι βασικές μονάδες της ζωής. Όλοι οι οργανισμοί αποτελούνται από ένα ή περισσότερα κύτταρα τα οποία αποτελούνται από τα ίδια είδη μορίων που συμμετέχουν στους ίδιους τύπους χημικών αντιδράσεων. Σε όλα τα έμβια όντα, οι γενετικές οδηγίες (τα γονίδια) αποθηκεύονται σε μόρια DNA που γράφονται με τον ίδιο χημικό μηχανισμό και διπλασιάζονται κατά τον ίδιο τρόπο προκειμένου να επιτρέψουν σ' έναν οργανισμό να αναπαραχθεί.



Εικόνα 2.1: Φυτικό και ζωικό κύτταρο
[Ψηφιακό Σχολείο Βιολογία (Γ Γενικού Λυκείου - Θετικής Κατεύθυνσης)]

2.1 ΓΟΝΙΔΙΩΜΑ

Το **γονιδίωμα** ενός κυττάρου, δηλαδή το σύνολο των γενετικών πληροφοριών στο DNA του, παρέχει ένα γενετικό πρόγραμμα που καθοδηγεί το κύτταρο πως να λειτουργήσει και, στα φυτικά και ζωικά κύτταρα, πως να αναπτυχθεί σ' έναν οργανισμό με εκατοντάδες διαφορετικά είδη κυττάρων. Σε ένα φυτό ή ένα ζώο τα κύτταρα αυτά μπορεί να εμφανίζουν εντυπωσιακή ποικιλότητα. Τα λιποκύτταρα, τα δερματικά κύτταρα, τα οστεοκύτταρα και τα νευρικά κύτταρα δημιουργούνται κατά την εμβρυική ανάπτυξη από ένα μόνο γονιμοποιημένο ωάριο και όλα περιέχουν ταυτόσημα αντίγραφα του DNA του συγκεκριμένου είδους. Τα διαφορετικά χαρακτηριστικά τους απορρέουν από τον τρόπο με τον οποίο χρησιμοποιούν τις γενετικές οδηγίες.

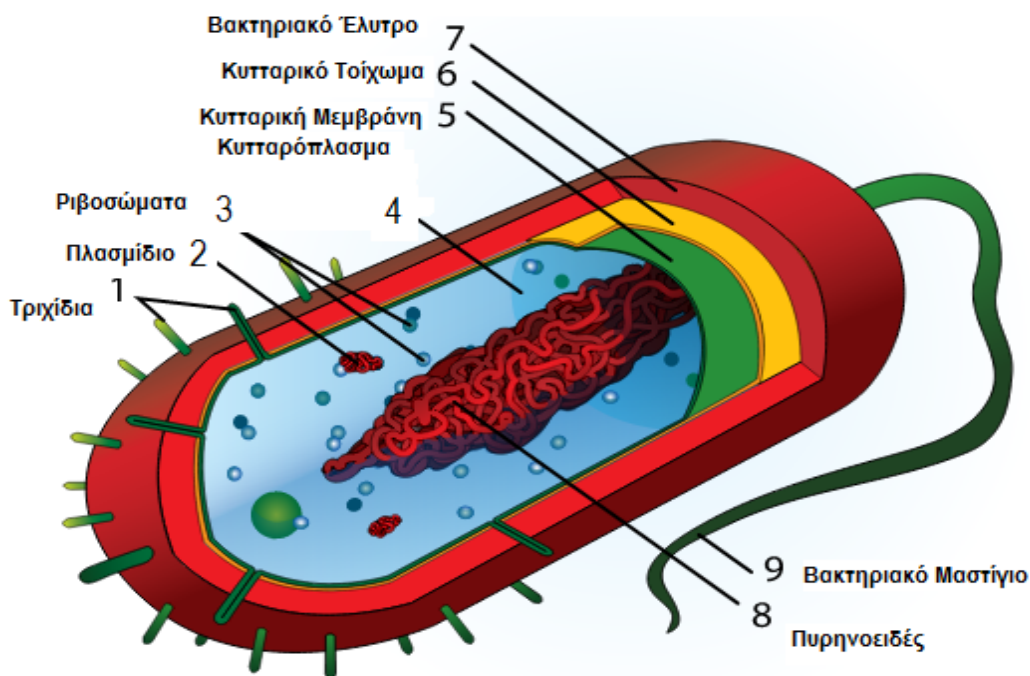
Διαφορετικά κύτταρα εκφράζουν διαφορετικά γονίδια. Αυτό σημαίνει ότι ενεργοποιούν επιλεκτικά την παραγωγή ορισμένων μόνο πρωτεϊνών, ανάλογα με τις ενδείξεις που παρέλαβαν τόσο τα ίδια όσο και οι πρόγονοί τους από το περιβάλλον. Κάθε κύτταρο είναι σε θέση να επιτελεί ποικίλες βιολογικές λειτουργίες, ανάλογα με το περιβάλλον και την ιστορία του, χρησιμοποιώντας τις πληροφορίες που κωδικοποιούνται στο DNA του σαν κατευθυντήριο άξονα των δραστηριοτήτων του.

2.2 ΠΡΟΚΑΡΥΩΤΙΚΑ ΚΑΙ ΕΥΚΑΡΥΩΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

Υπάρχουν δύο σημαντικές κατηγορίες κυττάρων: τα **προκαρυωτικά** και τα **ευκαρυωτικά**. Οι οργανισμοί των οποίων τα κύτταρα έχουν πυρήνα αποκαλούνται **ευκαρυώτες**, ενώ εκείνοι που αποτελούνται από κύτταρα χωρίς πυρήνα αποκαλούνται **προκαρυώτες**.

Οι περισσότεροι προκαρυώτες όπως τα βακτήρια διαβιούν ως μονοκύτταροι οργανισμοί, ενώ οι ευκαρυώτες μπορούν να διαμορφώσουν τους πολυκύτταρους οργανισμούς. Απ' όλα τα είδη κυττάρων που αποκαλύπτονται με το μικροσκόπιο, τα βακτήρια έχουν την απλούστερη δομή.

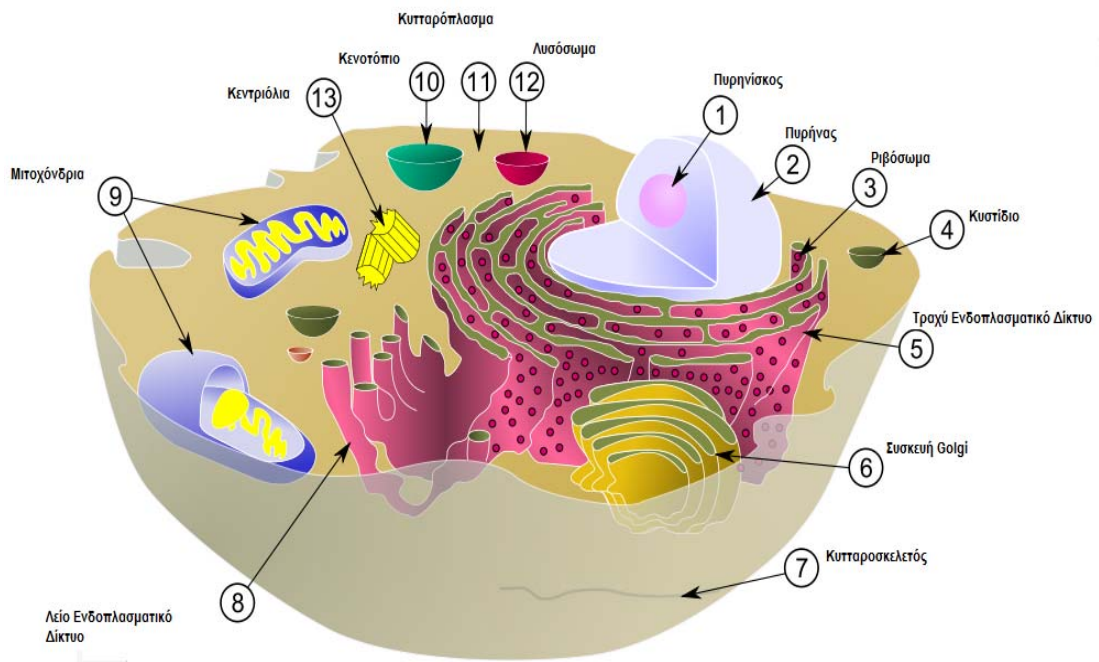
Οι όροι βακτήρια και προκαρυώτες θεωρούνται ισοδύναμοι. Τα βακτήρια συνήθως είναι σφαιρικά, ραβδόμηχα ή σπειροειδή κύτταρα μήκους λίγων μικρόμετρων. Συχνά φέρουν ένα αδρό προστατευτικό περίβλημα, γνωστό ως κυτταρικό τοίχωμα κάτω από το οποίο βρίσκεται η κυτταρική μεμβράνη που περικλείει ένα μοναδικό χώρο ο οποίος περιέχει το κυτταρόπλασμα, συμπεριλαμβανομένου και του DNA.



Εικόνα 2.2: Προκαρυωτικό κύτταρο (Wikipedia 2012)

Τα ευκαρυωτικά κύτταρα είναι γενικά μεγαλύτερα και πιο περίτεχνα. Η ιδιότητα του πυρήνα συμβαδίζει με την κατοχή ποικίλων άλλων οργανιδίων, τα περισσότερα από τα οποία είναι κοινά σε όλους τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς.

Ο πυρήνας συνήθως είναι το πιο εμφανές οργανίδιο του ευκαρυωτικού κυττάρου. Περικλείεται από δύο ομόκεντρες μεμβράνες που συνιστούν το πυρηνικό περίβλημα και περιέχει μόρια DNA (Alberts 2002).



Εικόνα 2.3: Ζωικό ευκαρυωτικό κύτταρο (Wikipedia 2012)

2.3 ΓΟΝΙΔΙΑ

Γονίδια ονομάζονται οι αλληλουχίες νουκλεοτιδίων τμήματος του DNA, οι οποίες ελέγχουν τα κληρονομικά γνωρίσματα ενός οργανισμού. Ένα γονίδιο αποτελεί πρότυπο για τη σύνθεση ενός λειτουργικού μορίου RNA. Το γενετικό υλικό ενός κυττάρου αποτελεί το γονιδίωμά του.



Εικόνα 2.4: Γονίδιο (Wikipedia 2012)

Το γονιδίωμα καθορίζει τη γενετική κατασκευή ενός οργανισμού ή ενός κυττάρου, το γονότυπο του. Ο φαινότυπος, είναι το σύνολο των χαρακτηριστικών που εμφανίζει ένας οργανισμός υπό την επιρροή ενός συνόλου περιβαλλοντικών παραγόντων (Lee 2004).

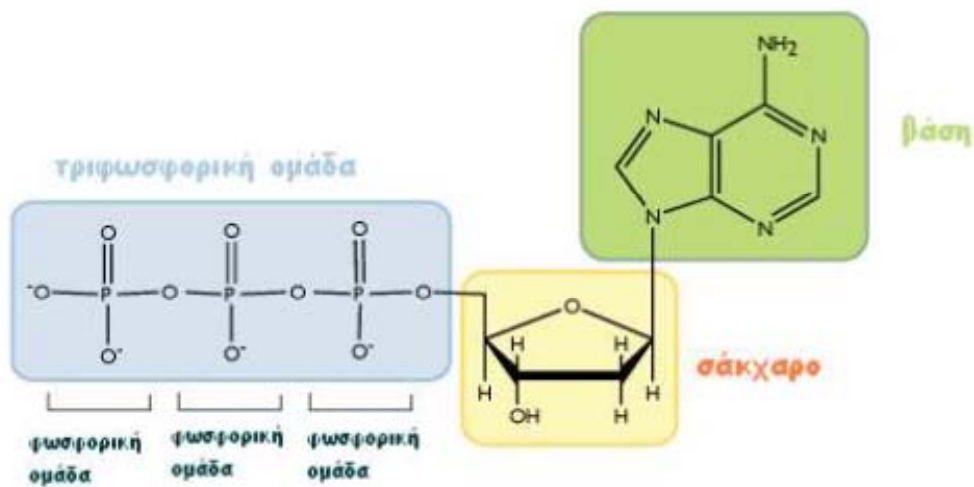
2.4 Η ΔΟΜΗ ΤΟΥ DNA

Η διαδικασία της ζωής περιλαμβάνει μια ποικιλία μορίων, από το νερό ως τις μικρές οργανικές ενώσεις (π.χ., λιπαρά οξέα και σάκχαρα), και τα μακρομόρια (DNA, πρωτεΐνες, και πολυσακχαρίτες) που καθορίζουν τη δομή των κυττάρων. Τα μακρομόρια ελέγχουν και κυβερνούν τις περισσότερες από τις δραστηριότητες της ζωής. Το DNA ενός οργανισμού είναι το μοριακό πρόγραμμα που περιέχει ακριβείς οδηγίες, οι οποίες καθορίζουν τη δομή και τη λειτουργία του κυττάρου.

Ένα μόριο DNA συνίσταται από δύο μακριές πολυνουκλεοτιδικές αλυσίδες οι οποίες αποτελούνται από τέσσερα είδη νουκλεοτιδίων. Καθεμία από αυτές τις αλυσίδες αναφέρεται ως αλυσίδα ή κλώνος DNA. Οι δύο αλυσίδες συγκροτούνται με δεσμούς υδρογόνου μεταξύ των βάσεων των νουκλεοτιδίων.

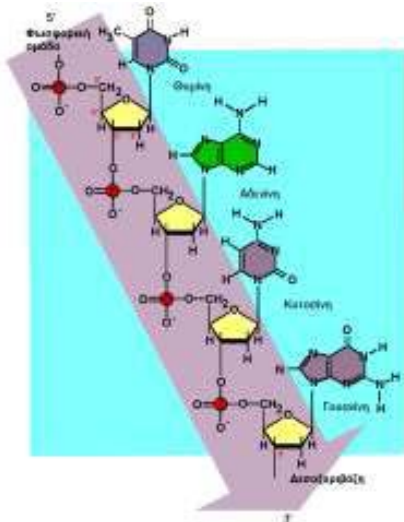
2.4.1 Νουκλεοτίδια

Τα νουκλεοτίδια αποτελούνται από μία πεντόζη, με την οποία συνδέονται μία ή περισσότερες φωσφορικές ομάδες, και μια αζωτούχος βάση. Στην περίπτωση του DNA, η πεντόζη είναι δεοξυριβόζη που συνδέεται με μια φωσφορική ομάδα, ενώ η βάση μπορεί να είναι αδερίνη(A), κυτοσίνη(C), γουανίνη(G) ή θυμίνη(T). Τα νουκλεοτίδια συνδέονται ομοιοπολικά μεταξύ τους σε μια αλυσίδα μέσω των σακχάρων και των φωσφορικών ομάδων τους, που σχηματίζουν έτσι ένα «σκελετό» εναλλασσόμενων μονάδων σακχάρου-φωσφορικής ομάδας-σακχάρου-φωσφορικής ομάδας.



Εικόνα 2.5: Νουκλεοτίδιο του DNA (Life Sciences Cyberbridge2007)

Ο τρόπος με τον οποίο συνδέονται μεταξύ τους τα νουκλεοτίδια προσδίδει σε έναν κλώνο DNA χημική πολικότητα. Η πολικότητα μιας αλυσίδας DNA υποδεικνύεται ορίζοντας το ένα άκρο ως 3' και το άλλο ως 5'. Οι δύο πολυνουκλεοτιδικές αλυσίδες στη διπλή έλικα του DNA συγκροτούνται με δεσμούς υδρογόνου μεταξύ των βάσεων των διαφορετικών κλώνων. Οι βάσεις δε ζευγαρώνουν στην τύχη: η A πάντα ζευγαρώνει με την T και η G με την C. Το ζευγάρι ανάμεσα στις συμπληρωματικές βάσεις επιτρέπει στα ζεύγη των βάσεων να συσχευάζονται στο εσωτερικό της διπλής έλικας στην πιο ευνοϊκή, από ενεργειακή άποψη, διάταξη.

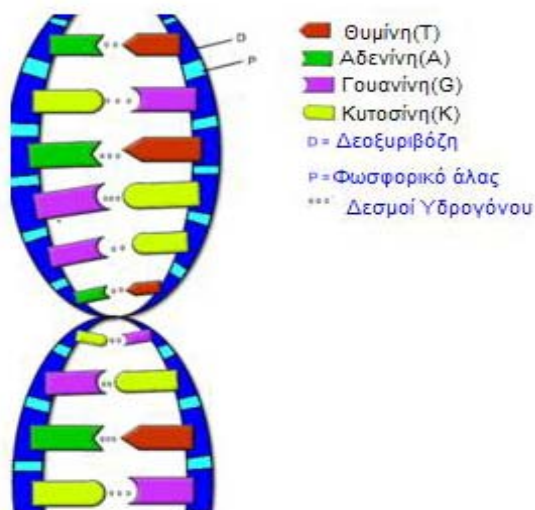


Εικόνα 2.6: Το βέλος δείχνει τον φωσφοδιεστερικό σκελετό με προσανατολισμό 5'->3' (Μαρμάρα Β., Λαμπροπούλου- Μαρμάρα Μ. 2005).

Σε αυτή τη διάταξη, κάθε ζεύγος βάσεων έχει παρόμοιο εύρος, ώστε να διατηρεί τον σακχαρο-φωσφορικό σκελετό σε ίση απόσταση κατά μήκος του μορίου του DNA, ενώ, επιπρόσθετα, οι σακχαρο-φωσφορικοί σκελετοί περιελίσσονται ο ένας γύρω από τον άλλο για να σχηματίσουν μια διπλή έλικα, που περιέχει 10 βάσεις ανά στροφή. Αυτή η περιέλιξη επίσης συνεισφέρει στην ενεργειακά ευνοϊκή διαμόρφωση της διπλής έλικας του DNA.

Τα μέλη κάθε ζεύγους βάσεων προσαρμόζεται μέσα στη διπλή έλικα μόνο όταν η πολικότητα του ενός κλώνου έχει αντίθετο προσανατολισμό από την πολικότητα του άλλου. Για αυτό το λόγο ο κάθε κλώνος ενός μορίου DNA περιέχει μια αλληλουχία νουκλεοτιδίων η οποία είναι ακριβώς συμπληρωματική προς την αλληλουχία των νουκλεοτιδίων του άλλου κλώνου.

Τέλος άλλη μια σημαντική λειτουργία του DNA είναι ότι περιέχει την πληροφορία για τον αυτοδιπλασιασμό του, εξασφαλίζοντας έτσι τη μεταβίβαση των γενετικών πληροφοριών από το μητρικό στα θυγατρικά κύτταρα και από τον οργανισμό στους απογόνους του μέσω της διαδικασίας της αντιγραφής (replication). Οι εντολές που λαμβάνει το κύτταρο για να εκτελέσει ορισμένες διαδικασίες δίδονται μέσω των παραγομένων πρωτεϊνών.



Εικόνα 2.7: Μοντέλο διπλής έλικας του DNA (Lodish, Darnell et al. 2003)

2.4.2. Χρωματίνη

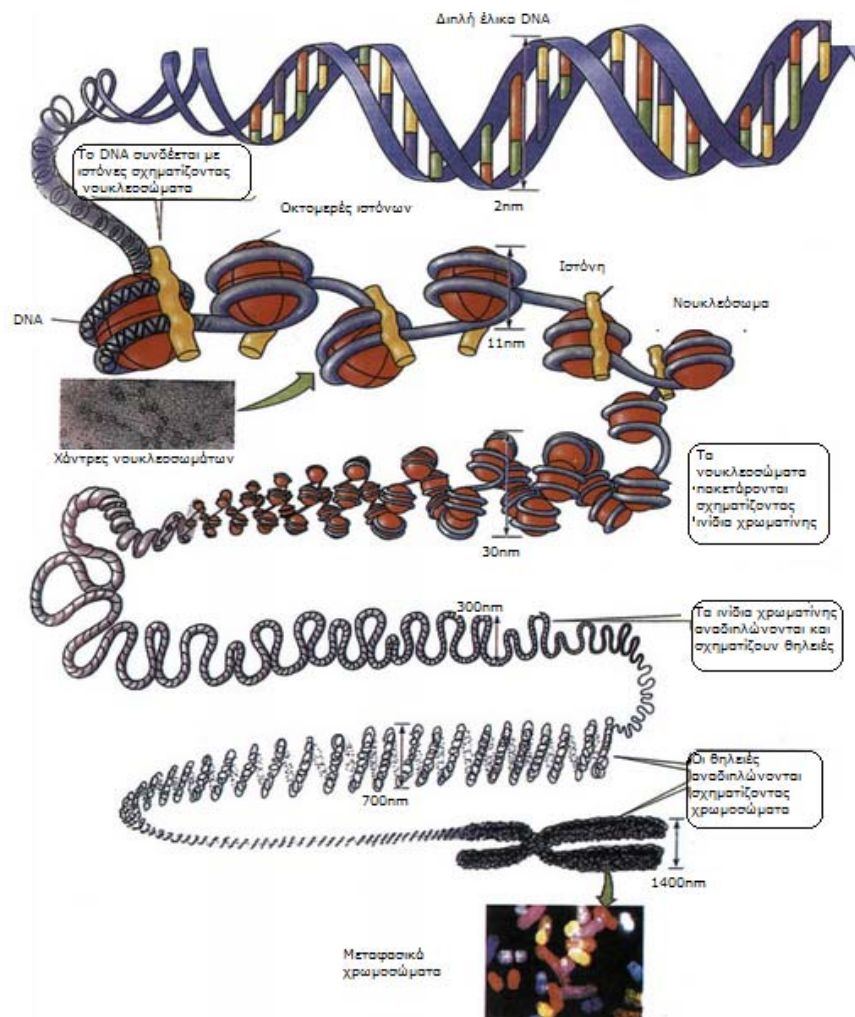
Ήδη από τις αρχές του εικοστού αιώνα οι βιολόγοι είχαν αναγνωρίσει ότι τα γονίδια βρίσκονται στα **χρωμοσώματα**, τα οποία τότε ήταν γνωστά ως νηματοειδείς δομές στον πυρήνα των ευκαρυωτικών κυττάρων, που γίνονται ορατά καθώς το κύτταρο αρχίζει να διαιρείται. Αργότερα, με την εφαρμογή βιοχημικών αναλύσεων, βρέθηκε ότι τα χρωμοσώματα αποτελούνται από **DNA** και **πρωτεΐνες**. Στους ευκαρυώτες τα τεράστια δίκλινα μόρια DNA συσκευάζονται σε μια ομάδα διαφορετικών χρωμοσωμάτων που χωρούν στον πυρήνα και κατανέμονται εύκολα στα δύο θυγατρικά κύτταρα κατά την κυτταρική διαίρεση. Το δύσκολο έργο της συσκευασίας του DNA διεκπεριώνεται από πρωτεΐνες που διασυνδέονται με το DNA στα χρωμοσώματα, εμπλέκονται στη συσκευασία του DNA και εξασφαλίζουν όλο και ανώτερα επίπεδα οργάνωσης. Στον άνθρωπο το DNA του πυρήνα κατανέμεται σε μια ομάδα διαφορετικών χρωμοσωμάτων. Το ανθρώπινο γονιδίωμα περιέχει περίπου 3.2×10^9 νουκλεοτίδια που κατανέμονται σε 24 χρωμοσώματα. Κάθε χρωμοσώμα αποτελείται από ένα μοναδικό, εξαιρετικά μακρύ γραμμικό μόριο που αλληλεπιδρά με πρωτεΐνες οι οποίες διπλώνουν και συσκευάζουν τη λεπτή ίνα του DNA σε μια πιο συμπαγή δομή.

Το σύμπλοκο του DNA και των πρωτεϊνών αποκαλείται χρωματίνη. Η χρωματίνη έχει σκοπό το πακετάρισμα του γενετικού υλικού σε μικρό όγκο για να χωράει στον πυρήνα, την ενδυνάμωσή του κατά τη μείωση και τη μίτωση, όπως επίσης δρα ως μηχανισμός ελέγχου της γονιδιακής έκφρασης. Η χρωματινική δομή επηρεάζεται κυρίως από τη μεθυλίωση (DNA και πρωτεΐνες) και την ακετυλίωση (πρωτεΐνες).

Η οργάνωση της **χρωματίνης** μπορεί να χωριστεί σε τρία επίπεδα:

- **Η βασική επαναλαμβανόμενη μονάδα**, ονομάζεται **νουκλεόσωμα**. Το νουκλεόσωμα αποτελείται από 1.67 υπερελικωμένες στροφές DNA, συνολικού μήκους 147bp, συνδεδεμένο με ένα οκταμερές ιστονών. Το οκταμερές σχηματίζεται από δύο ετεροδιμερή των ιστονών H2A-H2B και ένα σταθερό τετραμερές των ιστονών H3-H4. Τα άκρα των ιστονών είναι ιδιαίτερα ευέλικτα και προεξέχουν από τη συμπαγή δομή του νουκλεοσώματος, συμβάλλοντας στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των νουκλεοσωμάτων και στη δημιουργία των δευτερευόντων χρωματινικών δομών. Και οι τέσσερις πυρηνικές ιστόνες εμφανίζουν δομή ίδιου τύπου, στην οποία τρεις α-έλικες συνδέονται με δύο ενδιάμεσα (συνδετικά) τμήματα. Αυτή η δομή ονομάζεται **αναδίπλωση ιστονών** (histone fold).
Το τμήμα αυτό περιλαμβάνει θέσεις για αλληλεπιδράσεις με το DNA αλλά και μεταξύ των ιστονών κατά το διμερισμό τους. Το κάθε νουκλεόσωμα συνδέεται με το διπλανό του με 10 - 60bp DNA που ονομάζεται συνδετικό (linker), και η συστοιχία των νουκλεοσωμάτων διαμορφώνει μια χρωματινική ίνα διαμέτρου 10nm. Σε αυτό εντοπίζονται συνδετικές ιστόνες όπως η H1 ή τα ανάλογά της, πρωτεΐνες HMG (high mobility group) και SIR (silent information regulator). Η ιστόνη συνδέσμου, όπως έχει ονομαστεί η H1, βρίσκεται σε περιοχές linker DNA ανάμεσα στα νουκλεοσώματα και συντελεί στην περαιτέρω συμπύκνωση της συστοιχίας των νουκλεοσωμάτων στο δεύτερο επίπεδο.
- **Το δεύτερο επίπεδο** είναι η 30nm χρωματινική ίνα. Πρόκειται για ελικοειδή δομή, διαμέτρου 30nm, που προκύπτει από την περιέλιξη των νουκλεοσωμάτων. Αυτή η αναδίπλωση αυξάνει το βαθμό συμπύκνωσης του DNA κατά σαράντα φορές, ενώ η ακριβής δομή της δεν είναι γνωστή. Με μελέτες ηλεκτρονικής μικροσκοπίας έχει δειχθεί να είναι πολύ δυναμική και να μπορεί να ξεδιπλώσει γρήγορα σε ίνα των 10nm παρουσία RNA πολυμεράσης.
- **Ο τελικός βαθμός συμπύκνωσης της χρωματίνης** καθορίζεται στο τρίτο επίπεδο οργάνωσης, την περαιτέρω αναδίπλωση του ίδιου του ινιδίου 30nm σε ανώτερες δομές όπως η μεσοφασική χρωματίνη και

τα μιτωτικά χρωμοσώματα. Η παραπάνω οργάνωση της χρωματίνης μπορεί εύκολα να παρατηρηθεί με χρώση, απ' όπου πήρε και το όνομά της. Διακρίνονται δύο κατηγορίες: η ευχρωματίνη (πρώτο και δεύτερο επίπεδο), όπου τα ινίδια είναι συσκευασμένα πιο χαλαρά από ότι στο μιτωτικό χρωμόσωμα και η ετεροχρωματίνη (τρίτο επίπεδο), η οποία είναι πυκνά πακεταρισμένη. Η ετεροχρωματίνη θα μπορούσε να θεωρηθεί ένα αφιλόξενο περιβάλλον για τους μοριακούς μηχανισμούς που χρησιμοποιούν το DNA ως υπόστρωμα για την επιτέλεση κυτταρικών διεργασιών, όπως η μεταγραφή.



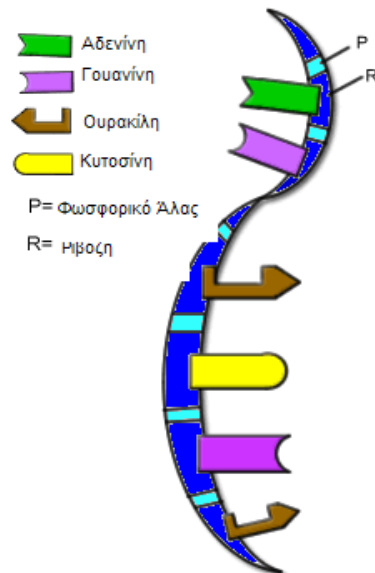
Εικόνα 2.8: Το πακετάρισμα της χρωματίνης και ο σχηματισμός χρωμοσωμάτων (Ψηφιακό Σχολείο Βιολογία (Γ Γενικού Λυκείου - Θετικής Κατεύθυνσης))

2.5 Η ΔΟΜΗ ΤΟΥ RNA

Το **RNA** ή **Ριβονουκλεϊκό οξύ** είναι ένα πολυμερές νουκλεϊκό οξύ που αποτελείται από μονομερή νουκλεοτίδια που παίζουν σημαντικό ρόλο στη διαδικασία της μετάφρασης από το δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ (DNA) σε πρωτεϊνικά προϊόντα. Το RNA λειτουργεί ως ο αγγελιοφόρος του DNA (**Αγγελιοφόρο RNA ή mRNA**). Επιπλέον αποτελεί δομικό συστατικό των ριβοσωμάτων (**rRNA**) καθώς και σημαντικό μεταφορέα αμινοξέων (**tRNA** - διαθέτει ειδικούς υποδοχείς για την πρόσδεση αμινοξέων και μια περιοχή αντικωδικονίου

για την αναγνώριση του κωδικονίου που δεσμεύεται με την ειδική ακολουθία του αγγελιοφόρου RNA με ισχυρούς δεσμούς υδρογόνου) που προορίζονται για την διαδικασία της πρωτεϊνσύνθεσης.

Το RNA έχει δομή παρόμοια με το DNA, αλλά διαφέρει σε ορισμένα δομικά στοιχεία: τα μόρια RNA περιέχουν **ριβόζη** αντί για **δεοξυριβόζη** σαν το κύριο σάκχαρο και επίσης περιέχει τη βάση ουρακίλη(U) αντί για τη θυμίνη(T) που απαντάται στο DNA.



Εικόνα 2.9: Δομή του RNA
(Wikipedia 2012)

Το RNA μεταγράφεται από το DNA με τη βοήθεια κυρίως ενός ενζύμου που ονομάζεται **RNA πολυμεράση** και στη συνέχεια επεξεργάζεται με έναν αριθμό άλλων δευτερευόντων ενζύμων. Στη συνέχεια χρησιμοποιείται σαν βάση για τη μετάφραση των γονιδίων σε πρωτεΐνες, μεταφέροντας αμινοξέα στα **ριβοσώματα** για να δημιουργηθούν πρωτεΐνες (πάντα βάσει της αρχής της συμπληρωματικότητας).

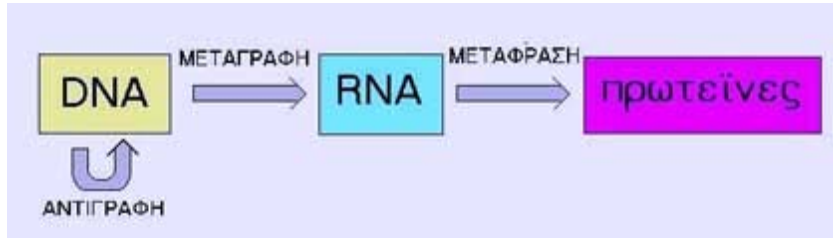
Στους **ευκαρυωτικούς οργανισμούς** το mRNA που παράγεται με τη μεταγραφή υφίσταται μια **διαδικασία ωρίμανσης** προτού να είναι έτοιμο να προχωρήσει στα ριβοσώματα για τη μετάφραση. Αυτό γίνεται γιατί τα περισσότερα γονίδια είναι ασυνεχή και εκτός των αλληλουχιών που μεταφράζονται υπάρχουν αλληλουχίες οι οποίες δε μεταφράζονται σε αμινοξέα.

Οι αλληλουχίες που μεταφράζονται είναι τα **εξώνια** και εκείνες που δε μεταφράζονται είναι τα **εσώνια**. Έτσι, το mRNA που μόλις έχει σχηματιστεί από τη μεταγραφή ενός γονιδίου ονομάζεται πρόδρομο mRNA και περιέχει εσώνια και εξώνια.

Το **πρόδρομο mRNA** μετατρέπεται σε mRNA με τη διαδικασία της ωρίμανσης κατά την οποία τα εσώνια κόβονται από μικρά ριβοζονουκλεοπρωτεϊνικά σωματίδια (**snRNPs**), που λειτουργούν ως ένζυμα. Τα εξώνια που απομένουν συρράπτονται μεταξύ τους και με αυτό τον τρόπο σχηματίζεται το ώριμο mRNA που μεταφέρεται στα ριβοσώματα για την **πρωτεϊνσύνθεση**. Δύο περιοχές του ώριμου mRNA δε μεταφράζονται σε αμινοξέα, η μια βρίσκεται στο άκρο 5' και η άλλη στο άκρο 3' (Lodish, Darnell et al. 2003).

2.6 ΚΕΝΤΡΙΚΟ ΔΟΓΜΑ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

Η διαδικασία της γενετικής ροής πληροφοριών στα ζωντανά κύτταρα από το **DNA** στο **RNA** και έπειτα στις **πρωτεΐνες** είναι γνωστή ως κεντρικό δόγμα της μοριακής βιολογίας (Crick, 1970). Το DNA μεταγράφεται στο RNA, το οποίο έπειτα μεταφράζεται στις πρωτεΐνες.



Εικόνα 2.10: Κεντρικό δόγμα της βιολογίας (Wikipedia 2012)

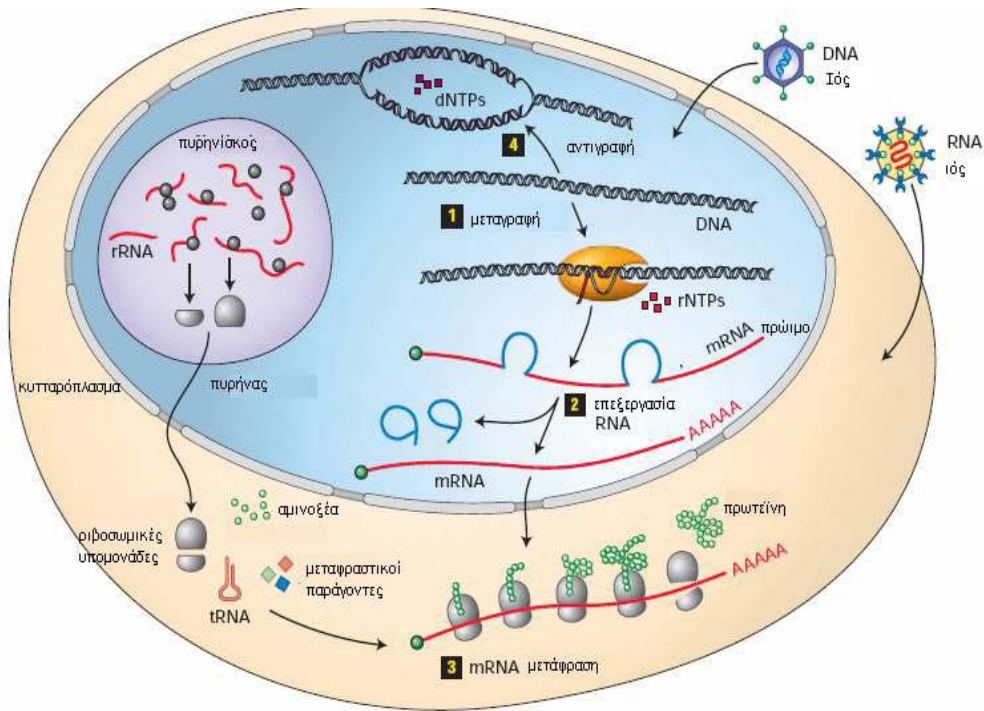
Το πρώτο βήμα για την έκφραση της πληροφορίας που υπάρχει στο DNA είναι η μεταφορά της στο RNA με τη διαδικασία της **μεταγραφής** (transcription). Το RNA μεταφέρει με τη σειρά του, μέσω της διαδικασίας της **μετάφρασης** (translation), την πληροφορία στις πρωτεΐνες που είναι υπεύθυνες για τη δομή και λειτουργία των κυττάρων και κατ' επέκταση και των οργανισμών.

Η **γενετική πληροφορία** είναι η καθορισμένη σειρά των αζωτούχων βάσεων των νουκλεοτιδίων. Η πληροφορία υπάρχει σε τμήματα του DNA με συγκεκριμένη ακολουθία, τα γονίδια. Αυτά, διαμέσου της μεταγραφής και της μετάφρασης, καθορίζουν τη σειρά των αμινοξέων στις πολυπεπτιδικές αλυσίδες. Οι πορείες της μεταγραφής και της μετάφρασης των γονιδίων αποτελούν τη γονιδιακή έκφραση (Lee 2004).

Στους **ευκαρυωτικούς οργανισμούς** το mRNA που παράγεται με τη μεταγραφή υφίσταται μια διαδικασία ωρίμανσης προτού να είναι έτοιμο να προχωρήσει στα ριβοσώματα για τη μετάφραση. Αυτό γίνεται γιατί τα περισσότερα γονίδια είναι ασυνεχή και εκτός των αλληλουχιών που μεταφράζονται υπάρχουν αλληλουχίες οι οποίες δε μεταφράζονται σε αμινοξέα.

Οι αλληλουχίες που μεταφράζονται είναι τα **εξώνια** και εκείνες που δε μεταφράζονται είναι τα **εσώνια**. Έτσι, το mRNA που μόλις έχει σχηματιστεί από τη μεταγραφή ενός γονιδίου ονομάζεται πρόδρομο mRNA και περιέχει εσώνια και εξώνια. Το πρόδρομο mRNA μετατρέπεται σε mRNA με τη διαδικασία της ωρίμανσης κατά την οποία τα εσώνια κόβονται από μικρά ριβοζονουκλεοπρωτεϊνικά σωματίδια (snRNPs), που λειτουργούν ως ένζυμα.

Τα εξώνια που απομένουν συρράπτονται μεταξύ τους και με αυτό τον τρόπο σχηματίζεται το ώριμο mRNA που μεταφέρεται στα ριβοσώματα για την πρωτεϊνοσύνθεση. Δύο περιοχές του ώριμου mRNA δε μεταφράζονται σε αμινοξέα, η μια βρίσκεται στο άκρο 5' και η άλλη στο άκρο 3'.



Εικόνα 2.11: Επισκόπηση των 4 βασικών μοριακών γενετικών διαδικασιών (Lodish, Darnell et al. 2003)

2.6.1 Γενετικός Κώδικας

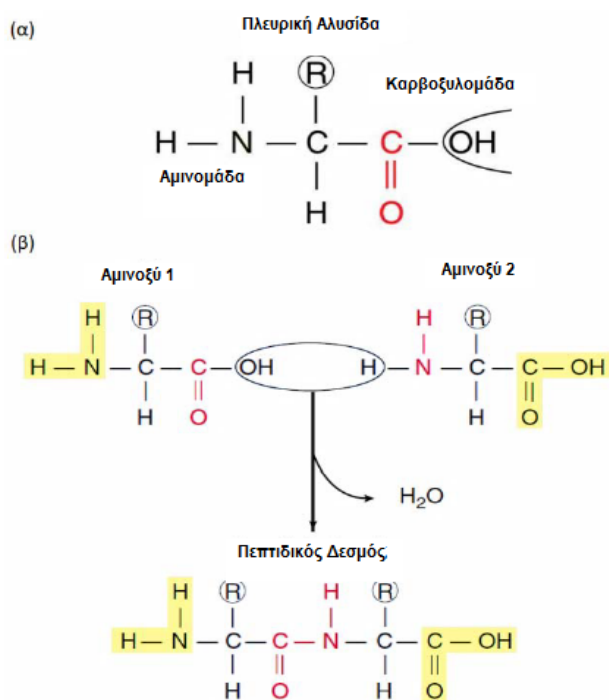
Η αλληλουχία των βάσεων του **mRNA** καθορίζει την αλληλουχία των αμινοξέων στις πρωτεΐνες με βάση ένα κώδικα αντιστοίχισης νουκλεοτιδίων RNA με αμινοξέα πρωτεϊνών ο οποίος ονομάζεται γενετικός κώδικας.

Ο **γενετικός κώδικας** είναι κώδικας τριπλέτας, δηλαδή μια τριάδα νουκλεοτιδίων του mRNA, κωδικόνιο, κωδικοποιεί ένα αμινοξύ (συνολικά είκοσι αμινοξέα). Επίσης είναι μη επικαλυπτόμενος, δηλαδή κάθε νουκλεοτίδιο ανήκει σε ένα μόνο κωδικόνιο. Η αλληλουχία βάσεων ενός γονιδίου, και του mRNA του, που κωδικοποιεί μια πολυπεπτιδική αλυσίδα, αρχίζει με το κωδικόνιο έναρξης (το AUG και κωδικοποιεί το αμινοξύ μεθειονίνη) και τελειώνει με το κωδικόνιο λήξης (ένα από τα UAG, UGA και UAA).

Η διαδρομή με βήμα τριπλέτας από το κωδικόνιο έναρξης μέχρι το κωδικόνιο λήξης ορίζεται ως ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης (το κωδικόνιο έναρξης περιλαμβάνεται στο πλαίσιο ανάγνωσης ενώ το κωδικόνιο λήξης όχι)(Lee 2004).

2.6.2 Πρωτεΐνες

Οι **πρωτεΐνες** είναι μεγάλα σύνθετα βιομόρια, αποτελούμενα από **αμινοξέα**, τα οποία ενώνονται μεταξύ τους με πεπτιδικούς δεσμούς σχηματίζοντας μια γραμμική αλυσίδα, καλούμενη αλυσίδα πολυπεπτιδίων. Ένας πεπτιδικός δεσμός δημιουργείται μέσω αντίδρασης κατά τη διάρκεια της οποίας ένα μόριο νερού αφαιρείται. Λόγω του τρόπου με τον οποίο ο πεπτιδικός δεσμός δημιουργείται, μια πολυπεπτιδική αλυσίδα έχει πάντα ένα άμινο (NH₂) και ένα καρβοξυλικό (COOH) άκρο.

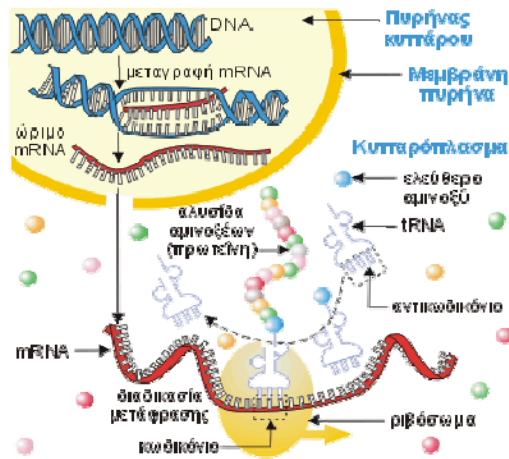


Εικόνα 2.12: Το αμινοξύ ως δομική μονάδα των πρωτεϊνών και ο πεπτιδικός δεσμός. (α) Ένα αμινοξύ περιέχει μία αμινομάδα (-NH₂), μία καρβοξυλομάδα (-COOH), ένα άτομο υδρογόνου, και μία πλευρική αλυσίδα (-R). Η πλευρική αλυσίδα ποικίλει ανάλογα με το αμινοξύ. (β) Ο πεπτιδικός δεσμός σχηματίζεται, όταν η αμινομάδα του ενός αμινοξέος ενωθεί με ομοιοπολικό δεσμό με την καρβοξυλομάδα του άλλου, με ταυτόχρονη απελευθέρωση ενός μορίου νερού. (Johnson, Raven P., 2001)

Η ακολουθία αμινοξέων σε μια πρωτεΐνη καθορίζεται από ένα γονίδιο και κωδικοποιείται κατά τον γενετικό κώδικα DNA. Παρόλο που ο γενετικός κώδικας κωδικοποιεί 20 αμινοξέα, τα αμινοξέα που συνιστούν την πρωτεΐνη συχνά υφίστανται χημικές αλλαγές κατά τη μετα-μεταγραφική τροποποίηση: είτε προτού να μπορέσει η πρωτεΐνη να λειτουργήσει στο κύτταρο, είτε ως τμήμα των μηχανισμών ελέγχου. Οι πρωτεΐνες αποτελούν είτε το δομικό συστατικό του κυττάρου είτε συνεργούν σε κάποια συγκεκριμένη λειτουργία. Ο δε βιολογικός τους ρόλος καθορίζεται κάθε φορά από την τρισδιάστατη δομή τους που είναι συνέπεια της αλληλουχίας των αμινοξέων, η οποία και ξεκινά από την πρωτοταγή δομή.

Η **μετάφραση** του mRNA, δηλαδή η αντιστοίχιση των κωδικονίων σε αμινοξέα και η σύνδεση των αμινοξέων σε πολυπεπτιδική αλυσίδα, πραγματοποιείται στα ριβοσώματα με τη βοήθεια των tRNA, αρκετών πρωτεϊνών και ενέργειας.

Η **πρωτεΐνοσύνθεση** διακρίνεται σε τρία στάδια: την **έναρξη**, την **επιμήκυνση** και τη **λήξη**. Κάθε ριβόσωμα αποτελείται από δύο υπομονάδες, μια μικρή και μια μεγάλη και έχει μια θέση πρόσδεσης του mRNA στη μικρή υπομονάδα και δύο θέσεις εισδοχής των tRNA στη μεγάλη υπομονάδα. Κάθε μόριο tRNA έχει μια ειδική τριπλέτα νουκλεοτιδίων, το αντικωδικόνιο με την οποία προσδένεται, λόγω συμπληρωματικότητας, με το αντίστοιχο κωδικόνιο του mRNA. Επιπλέον, κάθε tRNA διαθέτει μια ειδική θέση σύνδεσης με ένα συγκεκριμένο αμινοξύ.



Εικόνα 2.13: Οι τρεις ρόλοι του RNA στην πρωτεϊνοσύνθεση (Lodish, Darnell et al. 2003)

Κατά την **έναρξη** της μετάφρασης το mRNA συνδέεται μέσω μιας αλληλουχίας που υπάρχει στην 5' αμετάφραστη περιοχή του, με το ριβοσωμικό RNA της μικρής υπομονάδας του ριβοσώματος, σύμφωνα με τους κανόνες της συμπληρωματικότητας των βάσεων.

Κατά την **επιμήκυνση** ένα δεύτερο μόριο tRNA με **αντικωδικόνιο** συμπληρωματικό του δεύτερου κωδικονίου του mRNA τοποθετείται στην κατάλληλη εισδοχή του ριβοσώματος, μεταφέροντας το δεύτερο αμινοξύ. Μεταξύ της μεθειονίνης και του δεύτερου αμινοξέος σχηματίζεται πεπτιδικός δεσμός. Η πολυπεπτιδική αλυσίδα συνεχίζει να επιμηκύνεται, καθώς νέα tRNA φέρουν αμινοξέα τα οποία προσδένονται μεταξύ τους.

Η επιμήκυνση σταματά σε ένα κωδικίο λήξης (UGA, UAG ή UAA), επειδή δεν υπάρχουν tRNA που να αντιστοιχούν σε αυτά. Το κωδικόνιο λήξης αναγνωρίζεται από τον παράγοντα απελευθέρωσης ο οποίος προκαλεί τη λήξη και την απελευθέρωση της πολυπεπτιδικής αλυσίδας καθώς και τον αποχωρισμό των δύο υπομονάδων του ριβοσώματος (Lodish, Darnell et al. 2003, Alberts 2002)

2.7 ΓΟΝΙΔΙΑΚΗ ΕΚΦΡΑΣΗ

Ένα γονίδιο εκφράζεται μέσω των μηχανισμών της μεταγραφής και της μετάφρασης, με αποτέλεσμα την παραγωγή ενός μοριακού προϊόντος. Η μέτρηση αυτής της γονιδιακής έκφρασης, δηλαδή η ποσοτικοποίηση του επιπέδου έκφρασης ενός γονιδίου μέσα σε ένα κύτταρο, αποτελεί μία τεράστια ποσότητα πληροφορίας.

Η πληροφορία αυτή κυρίως αφορά είτε (α) στον καθορισμό των ιστών εκείνων που εκφράζουν ένα συγκεκριμένο γονίδιο και που με τη σειρά του είναι δυνατό να δώσει κάποια ένδειξη για τη φυσιολογική λειτουργία της κωδικοποιούσας πρωτεΐνης, είτε (β) στον καθορισμό των παραγόντων εκείνων που ρυθμίζουν την έκφραση ενός συγκεκριμένου γονιδίου, οι οποίοι μπορεί να είναι διατροφικοί, ορμονικοί, ή περιβαλλοντικοί (Trayhurn 1996). Έτσι, για παράδειγμα, είναι δυνατό να καθοριστεί, εάν ένα άτομο είναι επιρρεπές σε κάποια μορφή καρκίνου ή να βρεθεί εάν κάποια κύτταρα παρουσιάζουν ανθεκτικότητα σε κάποιους φαρμακευτικούς παράγοντες.

Ο όρος γονιδιακή έκφραση αναφέρεται συνήθως σε όλη τη διαδικασία με την οποία ένα γονίδιο ενεργοποιείται, για να παραγάγει μια πρωτεΐνη. Όμως σε κάθε κύτταρο δεν παράγονται όλες οι πρωτεΐνες σε

κάθε χρονική στιγμή. Επιπλέον, επειδή το κύτταρο χρειάζεται κάθε πρωτεΐνη σε συγκεκριμένη ποσότητα, οι πρωτεΐνες ενός κυττάρου δεν παράγονται σε ίσες ποσότητες. Έτσι, είναι απαραίτητη η ύπαρξη και η λειτουργία ενός προγράμματος ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης, που παρέχει τις οδηγίες για το είδος και την ποσότητα των πρωτεϊνών οι οποίες πρέπει να παραχθούν σε κάθε συγκεκριμένη χρονική στιγμή.

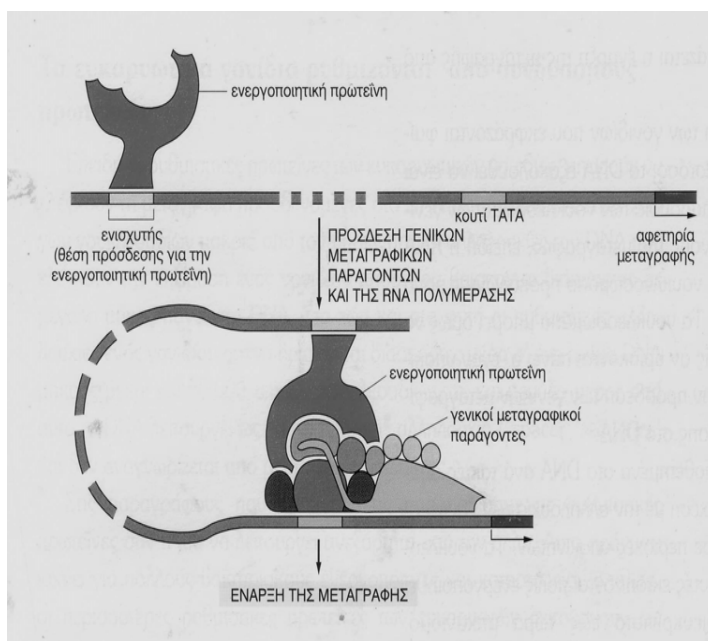
Στα ευκαρυωτικά κύτταρα η γονιδιακή έκφραση ρυθμίζεται σε **τέσσερα επίπεδα**:

- **Στο επίπεδο της μεταγραφής:** Η ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης καθορίζει ένα μεγάλο φάσμα αναπτυξιακών αλλαγών και περιβαλλοντικών αποκρίσεων με ένα σύνθετο μηχανισμό, ιδιαίτερα στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Η ρύθμιση επιτελείται κατά κύριο λόγο στο επίπεδο της μεταγραφής. Η μεταγραφή περιλαμβάνει τη μεταφορά της γενετικής πληροφορίας από το DNA μέσω ενζυματικής σύνθεσης μιας συμπληρωματικής αλυσίδας RNA που καταλύεται από το ένζυμο της RNA πολυμεράσης. Διακρίνουμε τρεις τύπους **RNA πολυμεράσης** στα ευκαρυωτικά κύτταρα. Αυτή που ευθύνεται για τη μεταγραφή του μεγαλύτερου ποσοστού του DNA και κωδικοποιεί τις πρωτεΐνες είναι η **RNA πολυμεράση II**. Προϊόν της αποτελεί το αγγελιοφόρο RNA (messenger ή mRNA).

Κατά τη **μεταγραφική ρύθμιση** επιτελείται διαδοχική στρατολόγηση πολύ-πρωτεϊνικών συμπλόκων στις ρυθμιστικές περιοχές των γονιδίων, οι οποίες περιλαμβάνουν δύο τύπους αλληλουχιών, τους **ενισχυτές** (enhancers) και τους **υποκινητές** (promoters) που αποτελούνται από πολλαπλές θέσεις πρόσδεσης παραγόντων της μεταγραφικής μηχανής. Η τελευταία «συλλέγει» και ενοποιεί τη ρυθμιστική πληροφορία, η οποία μεταβιβάζεται από κάθε στοιχείο των ρυθμιστικών αλληλουχιών, προσδίδοντας σε κάθε γονίδιο το ξεχωριστό πρότυπο μεταγραφικής ρύθμισης που το χαρακτηρίζει .

Ο **υποκινητής** ενός γονιδίου περιλαμβάνει τις ρυθμιστικές αλληλουχίες εκείνες οι οποίες είναι συγκεντρωμένες γύρω από το σημείο έναρξης της μεταγραφής της RNA πολυμεράσης. Αποτελείται από λειτουργικά διακριτά τμήματα, μήκους 7-20 νουκλεοτιδίων, τα οποία περιέχουν θέσεις αναγνώρισης μεταγραφικών παραγόντων (ενεργοποιητών ή καταστολέων).

Οι **ενισχυτές** ανακαλύφθηκαν αρχικά ως γενετικά στοιχεία, τα οποία οδηγούσαν σε αύξηση της μεταγραφής από έναν υποκινητή στο ίδιο μόριο DNA, όμως τοπολογικά απομακρυσμένο από αυτόν.

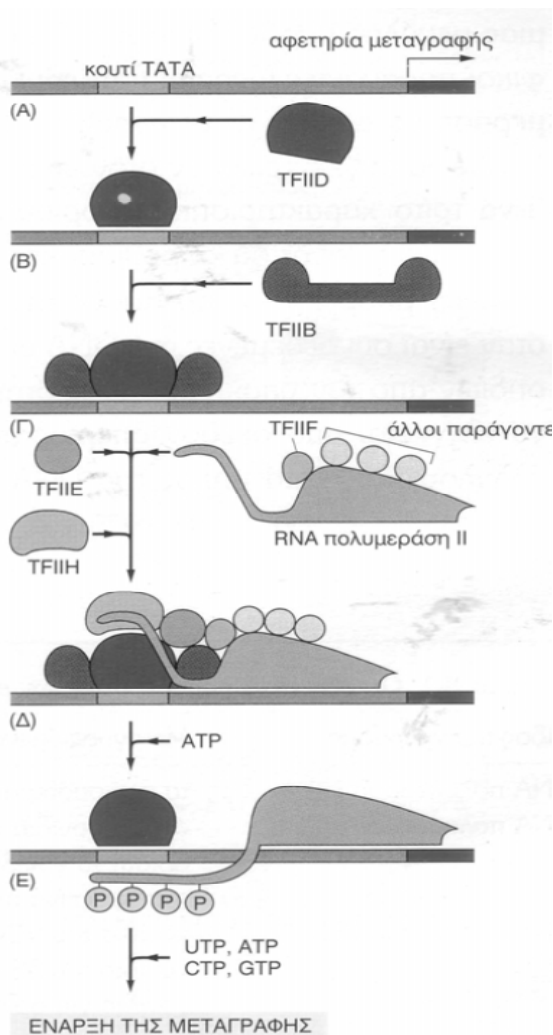


Εικόνα 2.14: Ενισχυτής (Βικιπαίδεια 2012)

Ένα γονίδιο μπορεί να ρυθμίζεται από πολλούς τέτοιους διαφορετικούς ενισχυτές, οι οποίοι μπορεί να ποικίλουν σε μέγεθος, τυπικά από 50bp μέχρι και 1,5kb, να είναι εντοπισμένοι και από τις δύο πλευρές του αντίστοιχου υποκινητή και να απέχουν μεγάλες αποστάσεις από αυτόν (ακόμα και της τάξης των εκατοντάδων χιλιάδων νουκλεοτιδίων). Οι ενισχυτές φαίνεται να είναι σχεδιασμένοι για να επιτελούν μία συγκεκριμένη λειτουργία, όπως την ενεργοποίηση του σύστοιχου υποκινητή σε έναν συγκεκριμένο κυτταρικό τύπο ή σε ένα συγκεκριμένο στάδιο της ανάπτυξης, συχνά αθροιστικά.

Για την έναρξη της μεταγραφής απαιτούνται επιπλέον παράγοντες. Αυτοί είναι κατά κύριο λόγο υπεύθυνοι για την πρόσδεση της RNA πολυμεράσης στον υποκινητή. Διακρίνονται σε **γενικούς μεταγραφικούς παράγοντες (GTFs), ενεργοποιητές** και **συν-ενεργοποιητές**.

Οι γενικοί μεταγραφικοί παράγοντες απαιτούνται για το μηχανισμό έναρξης της μεταγραφής σε όλους τους υποκινητές. Συνδέονται με την RNA πολυμεράση για το σχηματισμό συμπλόκου, που περιβάλλει το σημείο έναρξης και καθορίζουν την περιοχή εκκίνησης. Σε συνδυασμό με την RNA πολυμεράση συνιστούν τη βασική μεταγραφική μηχανή.



Εικόνα 2.15: Η RNA pol II περιέχει επαναλήψεις tyr-ser-pro-thr-ser-pro-ser στο CTD (C-terminal domain) που αποτελούν στόχο για φωσφορυλίωση. Η TFIIH είναι μια από τις κινάσες που φωσφορυλιώνουν την RNA pol II. (Βικιπαίδεια 2012)

Ένας **υποκινητής**, που περιέχει μόνο στοιχεία αναγνωρίσιμα από γενικούς μεταγραφικούς παράγοντες, θα πρέπει να εκφράζεται σε κάθε κύτταρο και αποτελεί ένα **γενικό υποκινητή**. Συνιστά την ελάχιστη αλληλουχία, που απαιτείται, ώστε οι γενικοί μεταγραφικοί παράγοντες να συναρμολογηθούν στο σημείο

έναρξης της μεταγραφής. Τέτοιοι υποκινητές μπορεί να ευθύνονται για την έκφραση συστατικά εκφραζόμενων γονιδίων (**housekeeping genes**) και δεν εξαρτώνται από αλληλουχίες των οποίων η χρήση βρίσκεται κάτω από ειδικό έλεγχο. Σε ένα γενικό υποκινητή διακρίνουμε μια **αλληλουχία TATA** (συνήθως περίπου 25 ζεύγη βάσεων πριν από την περιοχή έναρξης) και το σημείο έναρξης. Στην αλληλουχία TATA και συγκεκριμένα στη μικρή αύλακα του DNA προσδέεται η **TBP** (TATA-binding protein), μια πρωτεΐνη που συμμετέχει στη στρατολόγηση άλλων γενικών μεταγραφικών παραγόντων και τελικά της RNA πολυμεράσης. Με φωσφορυλίωση της καρβοξυτελικής περιοχής (CTD) της RNA πολυμεράσης από τον TFIIF ξεκινά η μεταγραφή.



Εικόνα 2.16: Τρισδιάστατη δομή της TBP (tATA-δεσμευτική πρωτεΐνη) που δεσμεύεται στο DNA. Η TBP είναι μία ενιαία πολυπεπτιδική αλυσίδα που είναι διπλωμένη σε δύο πολύ παρόμοιες περιοχές (μπλε και πράσινη) (Alberts 2002)

Η μεταγραφική ενεργοποίηση γονιδίων μη συστατικά εκφραζόμενων ελέγχεται από τους **ενεργοποιητές**. Οι ενεργοποιητές είναι μεταγραφικοί παράγοντες που αναγνωρίζουν με ειδικότητα, σύντομες αλληλουχίες, οι οποίες εντοπίζονται στον υποκινητή ή στον ενισχυτή. Οι ενεργοποιητές αυξάνουν την αποδοτικότητα της πρόσδεσης της βασικής συσκευής στον υποκινητή αλλάζοντας τη θέση ή τη δομή των νουκλεοσωμάτων ή στρατολογώντας γενικούς μεταγραφικούς παράγοντες (**GTFs**), την **πρωτεΐνη** που συνδέεται με το **TATA (TBP)** ή / και την **RNA πολυμεράση** στον υποκινητή των γονιδίων και συνεπώς αυξάνουν τη συχνότητα της μεταγραφής του συγκεκριμένου γονιδίου. Όλες αυτές οι αλλαγές δεν γίνονται με την άμεση επίδραση των μεταγραφικών ενεργοποιητών, αλλά έμμεσα, με τη στρατολόγηση συμπλόκων, που γενικά ονομάζονται **συν-ενεργοποιητές**.

Οι μεταγραφικοί ενεργοποιητές χρησιμοποιούνται ευρύτατα από τα κύτταρα για απόκριση σε καταστάσεις περιβαλλοντικών αλλαγών – στρες. Ένας μεταγραφικός ενεργοποιητής ή συν-ενεργοποιητής δεν μπορεί από μόνος του να δημιουργήσει την τεράστια πολυπλοκότητα στη ρύθμιση της μεταγραφής των ευκαρυωτικών γονιδίων. Καθένας από αυτούς, όμως, μπορεί να είναι ο καθοριστικός ρυθμιστής των επιπέδων έκφρασης ενός δεδομένου γονιδίου (Alberts 2002).

- **Στο επίπεδο μετά τη μεταγραφή:** Περιλαμβάνονται οι μηχανισμοί με τους οποίους γίνεται η ωρίμανση του πρόδρομου mRNA και επίσης η ταχύτητα με την οποία το ώριμο mRNA αφήνει τον πυρήνα και εισέρχεται στο κυτταρόπλασμα.
- **Στο επίπεδο της μετάφρασης:** Ο χρόνος που "ζουν" τα μόρια mRNA στο κυτταρόπλασμα δεν είναι ο ίδιος για όλα τα είδη RNA, επειδή μετά από κάποιο χρονικό διάστημα αποικοδομούνται. Επίσης, ποικίλλει και η ικανότητα πρόσδεσης του mRNA στα ριβοσώματα.

- **Στο επίπεδο μετά τη μετάφραση:** Ακόμη και όταν γίνει η πρωτεϊνοσύνθεση και παραχθεί η κατάλληλη πρωτεΐνη, μπορεί να πρέπει να υποστεί τροποποιήσεις, για να γίνει βιολογικά λειτουργική.

Μερικά γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες μεταγράφονται λιγότερο ή περισσότερο συχνά, και ονομάζονται «housekeeping» γονίδια και απαιτούνται πάντα για τις βασικές αντιδράσεις. Άλλα γονίδια δεν μεταγράφονται ή, μεταγράφονται για συγκεκριμένες λειτουργίες του οργανισμού, μόνο σε ιδιαίτερες στιγμές και κάτω από ιδιαίτερες εξωτερικές συνθήκες. Το σήμα που «καλύπτει» ή «αποκαλύπτει» ένα γονίδιο μπορεί να προέλθει από το εξωτερικό του κυττάρου, όπως μια θρεπτική ουσία ή μια ορμόνη. Πρόσθετες ρυθμιστικές ακολουθίες στο DNA υπαγορεύουν εάν ένα γονίδιο θα ανταποκριθεί στα σήματα και στη συνέχεια επηρεάζουν την μεταγραφή του γονιδίου που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη (*Lodish, Darnell et al. 2003*).

Η αποκωδικοποίηση του ανθρώπινου γονιδιώματος (**Human Genome Project**) αλλά και άλλων σημαντικών οργανισμών αποτέλεσε σταθμό στη Βιολογία, μεταβάλλοντας ριζικά τις πρακτικές της και την οπτική της έρευνας.

3. Η ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΜΕΤΑ ΤΗΝ ΑΠΟΚΩΔΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΥ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΟΣ

3.1 ΣΥΣΤΗΜΙΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ

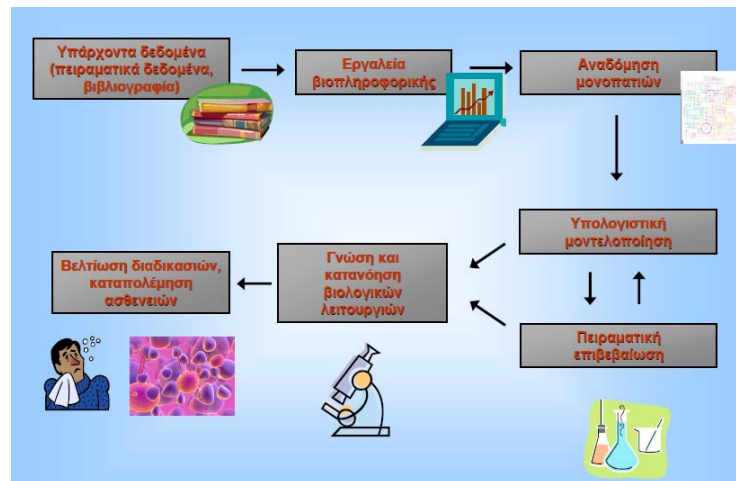
Η πλήρης αλληλούχηση ολόκληρου του γονιδιώματος και ο επακόλουθος προσδιορισμός όλων των γονιδίων του οργανισμού έθεσε τις βάσεις μιας νέας εποχής έρευνας των βιολογικών συστημάτων. Η γνώση ολόκληρης της αλληλούχησης του γονιδιώματος αποτέλεσε το κίνητρο ανάπτυξης τεχνολογιών που ενδυνάμωσαν πειραματικές προσεγγίσεις υψηλής απόδοσης. Η ανάπτυξη των μικροσυστοιχιών που επιτρέπει την ταυτόχρονη εξέταση της έκφρασης κάθε γονιδίου του γονιδιώματος αποτέλεσε την απαρχή μιας **«βιολογικής επανάστασης»**, κατά την οποία υπήρχε για πρώτη φορά η δυνατότητα ταυτόχρονης μελέτης όλων των γονιδίων ενός βιολογικού συστήματος στις ίδιες συνθήκες.

Σε αντίθεση με τη συμβατική βιολογία που μελετά μεμονωμένα μόρια κάθε φορά προκειμένου να διερευνήσει μια υπόθεση που σχετίζεται με το βιολογικό ερώτημα, τέτοιες ολοκληρωτικές στρατηγικές διερεύνησης δε στηρίζονται στην ύπαρξη προϋπάρχουσας γνώσης ή υπόθεσης. Η ολιστική εξέταση όλων των μορίων του κυττάρου επιτρέπει τη δημιουργία νέων υποθέσεων, προάγοντας νέες ερευνητικές κατευθύνσεις. Επιπρόσθετα, ο προσδιορισμός της έκφρασης όλων των γονιδίων του κυττάρου, πέραν του ότι αποτελεί ένα λειτουργικό μοριακό αποτύπωμα της φυσιολογίας του, επιτρέπει και την ανίχνευση των ρυθμιστικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ τους, βοηθώντας έτσι στη χαρτογράφηση των πολύπλοκων ρυθμιστικών δικτύων που χαρακτηρίζουν το γονιδίωμα.

Η βιολογική πληροφορία, αν και περιέχεται στο γονιδίωμα, είναι οργανωμένη σε πολλά διαφορετικά επίπεδα που περιλαμβάνουν το DNA, το RNA, τις πρωτεΐνες και τις αλληλεπιδράσεις τους. Η αποκωδικοποίηση του ανθρώπινου γονιδιώματος απλά χαρτογράφησε τα γονίδια πάνω στο γονιδίωμα χωρίς όμως να χαρακτηρίζει τις ρυθμιστικές σχέσεις μεταξύ τους.

Η πολυπλοκότητα των βιολογικών συστημάτων προϋποθέτει τη διερεύνηση όλων των επιπέδων που προαναφέρθηκαν προκειμένου να προσδιοριστεί η φυσιολογία τους. Η σύγκλιση της πληροφορίας από τα διαφορετικά επίπεδα οργάνωσης του κυττάρου και η ενσωμάτωση της σε ένα κοινό πλαίσιο ερμηνείας των μοριακών συσχετισμών που χαρακτηρίζουν τις φυσιολογικές αποκρίσεις των κυττάρων στα φυσιολογικά ή μη ερεθίσματα του περιβάλλοντος τους αποτελεί αντικείμενο έρευνας της συστημικής βιολογίας [Henry and Washington, 2003]. Η συστημική βιολογία ουσιαστικά πραγματεύεται τη μελέτη της συμπεριφοράς όλων των στοιχείων ενός συστήματος και το συσχετισμό αυτής της συμπεριφοράς με τις ιδιότητες του συστήματος. Αποτελεί το συνδυαστικό κρίκο μεταξύ της κλασσικής μοριακής βιολογίας που μελετά τη συμπεριφορά των μορίων και της φυσιολογίας που μελετά τις ιδιότητες του συστήματος. Στόχος της συστημικής βιολογίας είναι ο προσδιορισμός των πρωτογενών και δευτερογενών σχέσεων μεταξύ των γονιδίων και των πρωτεϊνών και πως αυτές καθορίζουν το φαινότυπο του κυττάρου και τους μηχανισμούς της λειτουργίας του. Σε επίπεδο εφαρμογής, η συστημική βιολογία συνίσταται στις πειραματικές μετρήσεις όλων των παραμέτρων ενός βιολογικού συστήματος, στην εξόρυξη υποθέσεων σχετικά με τους μηχανισμούς που χαρακτηρίζουν τη φυσιολογία του, στη μοντελοποίηση στη συνέχεια του συστήματος και τέλος στην πειραματική αξιολόγηση του μοντέλου ως προς την εγκυρότητα της υπόθεσης. Αναμφισβήτητα σήμερα, οι τελευταίες τεχνολογίες και η συστημική βιολογία σηματοδοτούν μια νέα εποχή στη βιολογία και την έρευνα. Αν και βρίσκεται ακόμα στην αρχή της, η συστημική βιολογία και η δυναμική της αναμένεται να έχει μεγάλο αντίκτυπο στην εξέλιξη της γνώσης μας γύρω από τη φυσιολογία των μοριακών συστημάτων σε μοριακό επίπεδο. Ένας από τους κατ'

εξοχήν τομείς που η συστημική βιολογία αναμένεται να καθορίσει τις εξελίξεις είναι ο σχεδιασμός φαρμάκων έναντι ασθενειών.



Εικόνα 17: Οργάνωση επιπέδων στη συστημική βιολογία (Αρχές Συστημικής και Συνθετικής Βιολογίας-Πρωτεϊνικής Μηχανικής 2010)

Πολλές ασθένειες θεωρούνται πολυπαραγοντικές και δεν καταπολεμούνται αποτελεσματικά μόνο με ένα φάρμακο. Στις περιπτώσεις αυτές, η σάρωση όλων των παραμέτρων των παθολογικών κυττάρων ή ιστού, όχι μόνο θα προσδιορίσει τους πιθανούς μοριακούς στόχους παθογένειας, αλλά και τη βιολογία των κυτταρικών μηχανισμών στους οποίους εμπλέκονται. Πέρα από τη μοριακή στόχευση, η συστημική βιολογία πιστεύεται ότι δημιουργεί τη βάση μιας εξατομικευμένης ιατρικής. Αυτή η νέα διαφανόμενη πραγματικότητα και η κατηγοριοποίηση των ασθενών με βάση την απόκριση τους στο φάρμακο θα προσδιορίσει την ατομική ταυτότητα παθοφυσιολογίας και μεταβολισμού, βάση της οποίας η αγωγή και τα θεραπευτικά αποτελέσματα θα βελτιστοποιούνται για τον κάθε ασθενή ξεχωριστά (Σπάθης 2007).

3.2 ΥΒΡΙΔΟΠΟΙΗΣΗ

Η θεμελιώδης βάση των DNA μικροσυστοιχιών είναι η διαδικασία της **υβριδοποίησης**. Δύο DNA κλώνοι υβριδοποιούνται εάν συμπληρώνουν ο ένας τον άλλο. Η συμπληρωματικότητα απεικονίζει τον κανόνα των Watson-Crick σύμφωνα με τον οποίο η αδενίνη(A) συνδέεται με την θυμίνη(T) και η κυτοσίνη(C) με τη γουανίνη(G). Ο ένας ή και οι δύο κλώνοι του υβριδοποιημένου DNA μπορούν να αντικατασταθούν από το RNA και η υβριδοποίηση μπορεί να πραγματοποιηθεί εφόσον υπάρχει συμπληρωματικότητα.

Οι δύο κλώνοι μιας διπλής έλικας DNA συγκρατούνται από σχετικά ασθενείς δεσμούς υδρογόνου, που διασπώνται με θέρμανση του DNA γύρω στους 90° C ή έκθεσή του σε διαλύματα με ακραίες τιμές pH. Οι χειρισμοί αυτοί διαχωρίζουν τους δύο κλώνους χωρίς να διασπών τους ομοιοπολικούς δεσμούς που συνδέουν τα νουκλεοτίδια μεταξύ τους σε κάθε κλώνο. Αν η όλη διεργασία αναστραφεί οι συμπληρωματικοί κλώνοι θα ξανασχηματίσουν εύκολα διπλές έλικες. Αυτό το φαινόμενο αποκαλείται αναδιάταξη ή υβριδοποίηση και προκύπτει από την αποκατάσταση των συμπληρωματικών δεσμών υδρογόνου.

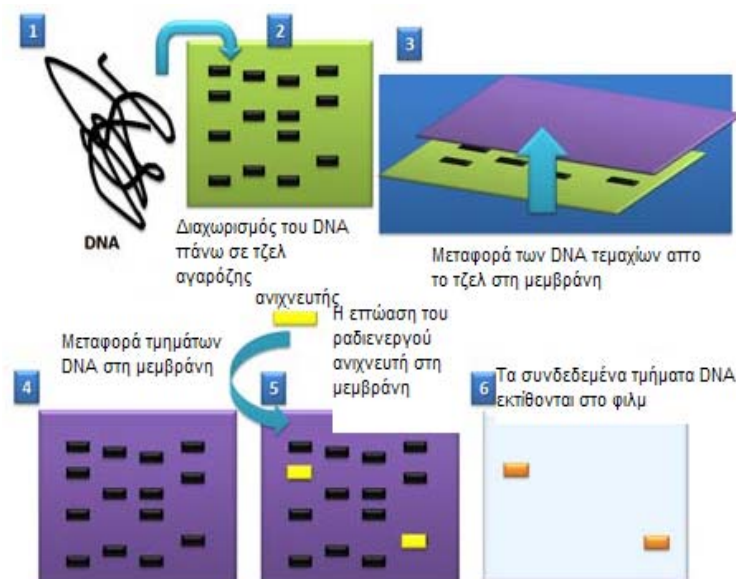
Η αναζήτηση μιας αλληλουχίας νουκλεοτιδίων με την τεχνική της υβριδοποίησης προϋποθέτει την ύπαρξη ενός ειδικού νουκλεϊνικού οξέος που αποκαλείται **ανιχνευτής (probe)**. Ένας DNA ανιχνευτής είναι ένα βραχύ, μονόκλωνο μόριο DNA με μήκος που κυμαίνεται συνήθως από 10 έως 1000 νουκλεοτίδια, το οποίο χρησιμοποιείται σε αντιδράσεις υβριδισμού για την ανίχνευση μορίων νουκλεϊνικών οξέων με συμπληρωματική αλληλουχία. Σήμερα με την πρόοδο που έχει σημειωθεί στη χημεία των νουκλεοτιδίων,

μικρά μόρια DNA με οποιαδήποτε αλληλουχία μπορούν να συντεθούν στο εργαστήριο με ενζυματικές μεθόδους. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιούνται ειδικά μηχανήματα που παρασκευάζουν μονόκλωνες αλυσίδες DNA οποιασδήποτε αλληλουχίας και μήκους αρκετών εκατοντάδων νουκλεοτιδίων.

3.2.1 Αποτύπωση κατά Southern και Northern

Η υβριδοποίηση έχει χρησιμοποιηθεί για δεκαετίες στη μοριακή βιολογία ως βάση σε τεχνικές όπως την αποτύπωση κατά Southern και Northern. Στην αποτύπωση Southern, μία μικρή ακολουθία DNA, το ολιγονουκλεοτίδιο, χρησιμοποιείται για να υβριδοποιήσει στα συμπληρωματικά τους τεμάχια του DNA που έχουν χωριστεί σύμφωνα με το μέγεθος με τη μέθοδο της ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα. Εάν το ολιγονουκλεοτίδιο έχει σημανθεί ραδιενεργά, η υβριδοποίηση μπορεί να απεικονιστεί σε ένα φωτογραφικό φιλμ που είναι ευαίσθητο στην ακτινοβολία.

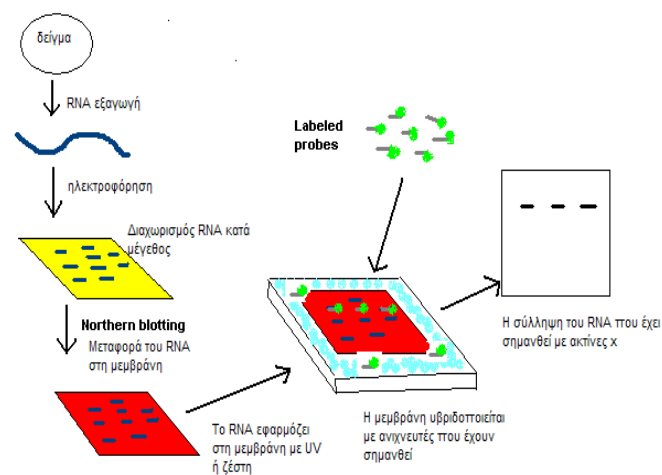
Η αποτύπωση northern αποτελεί μία ιδιαίτερος ευαίσθητη τεχνική της μοριακής βιολογίας για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας RNA σε κάποιο δείγμα. Η αποτύπωση northern αναπτύχθηκε το 1977 από και έχει πάρει το όνομά της λόγω της συγγενούς ομοιότητάς της με την πρώτη τεχνική αποτύπωσης, την αποτύπωση του Southern. Η αποτύπωση northern αποτελεί μέχρι τις μέρες μας μία καθιερωμένη τεχνική που χρησιμοποιείται για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση των επιπέδων mRNA, επειδή επιτρέπει την άμεση σύγκριση της ποσότητας του mRNA ανάμεσα σε διαφορετικά δείγματα πάνω στην ίδια μεμβράνη. Εντούτοις, εφαρμόζεται συνήθως, όταν ο αριθμός των γονιδίων των οποίων το επίπεδο έκφρασης πρέπει να προσδιοριστεί είναι μικρός.



Εικόνα 18: Αποτύπωση κατά Southern

Στην αποτύπωση κατά Northern, χρησιμοποιείται ένα ολιγονουκλεοτίδιο που έχει σημανθεί ραδιενεργά για να υβριδοποιήσει το αγγελιοφόρο RNA (mRNA) που έχει οργανωθεί μέσω ενός τζελ. Εάν το ολιγονουκλεοτίδιο είναι συγκεκριμένο για ένα μοναδικό mRNA, τότε θα δεσμεύσει τη θέση εκείνου του αγγελιοφόρου RNA στο τζελ. Το ποσό ακτινοβολίας που συλλαμβάνεται σε ένα φωτογραφικό φιλμ εξαρτάται ως ένα ορισμένο βαθμό από το ποσό ραδιενεργού ανιχνευτή που παρίσταται στη θέση αυτή, η οποία εξαρτάται πάλι από το ποσό

αγγελιοφόρου RNA. Έτσι αυτή η μέθοδος επιτρέπει την ημιποσοτική ανίχνευση των μεμονωμένων mRNA(Σηφάκης 2011).



Εικόνα 19: Αποτύπωση κατά Northern

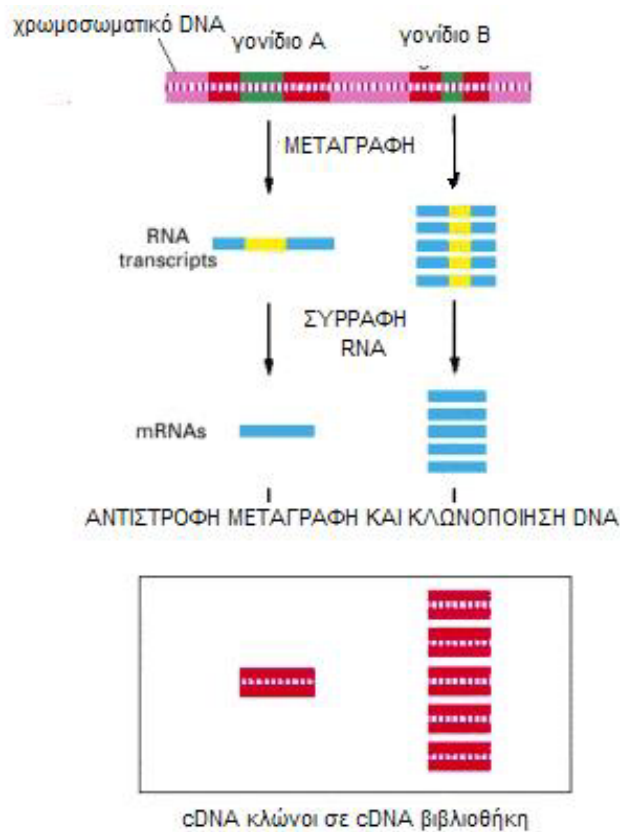
3.3 ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΙΚΟ DNA & cDNA ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΕΣ

Το συμπληρωματικό DNA (complementary DNA – cDNA) αναφέρεται σε DNA το οποίο συντίθεται εργαστηριακά χρησιμοποιώντας ως μήτρα mRNA και τη βοήθεια ενός ενζύμου (Solomon, Berg & Martin 2004). Πιο συγκεκριμένα, για την παρασκευή cDNA, αρχικά ολικό mRNA απομονώνεται από τα κύτταρα ενός ιστού. Χρησιμοποιώντας ένα ολιγονουκλεοτίδιο συμπληρωματικό της ουράς πολυ-A του 3' άκρου του mRNA που δρα ως εκκινήτης, το ένζυμο αντίστροφη μεταγραφάση συνθέτει μία – συμπληρωματική του mRNA – αλυσίδα DNA, μία αλυσίδα cDNA. Έτσι σχηματίζεται μία υβριδική έλικα DNA/RNA, η έκθεση της οποίας σε κατάλληλο ένζυμο, τη ριβονουκλεάση H, έχει ως αποτέλεσμα την εκλεκτική αποδόμηση του RNA κλώνου της. Εν συνεχεία, το μονόκλωνο cDNA αντιγράφεται σε δίκλωνο cDNA με τη βοήθεια ενός άλλου ενζύμου, της DNA πολυμεράσης.

Μία ανθρώπινη cDNA βιβλιοθήκη περιλαμβάνει πολυάριθμους κλώνους που περιέχουν πολλές διαφορετικές αλληλουχίες DNA του ανθρώπου. Το DNA που εισάγεται σε μια cDNA βιβλιοθήκη δεν είναι γενωμικό (χρωμοσωματικό) DNA αλλά DNA που έχει αντιγραφεί από τα μόρια των mRNA που υπάρχουν σ' έναν συγκεκριμένο ιστό ή σε μία κυτταρική καλλιέργεια.

Το σημαντικότερο πλεονέκτημα των cDNA κλώνων είναι ότι περιέχουν τη διακοπτόμενη κωδικοποιητική αλληλουχία του γονιδίου. Έτσι, αν η κλωνοποίηση ενός γονιδίου αποσκοπεί στην εξακρίβωση της αλληλουχίας των αμονοξέων της πρωτεΐνης από το DNA ή στην παραγωγή της πρωτεΐνης σε μεγάλη ποσότητα, μέσω της έκφρασης του κλωνοποιημένου γονιδίου σ' ένα βακτηριακό κύτταρο ή σ' ένα σακχαρομύκητα επιβάλλεται να ξεκινήσει κανείς από το cDNA.

Για την παρασκευή μιας cDNA βιβλιοθήκης, απομονώνεται ολικό mRNA από τα κύτταρα και κατόπιν, χρησιμοποιώντας το ένζυμο αντίστροφη μεταγραφάση, συντίθενται DNA αντίγραφα των μορίων των mRNA. Στη συνέχεια, τα μόρια του cDNA κλωνοποιούνται και έτσι παράγεται η cDNA βιβλιοθήκη.

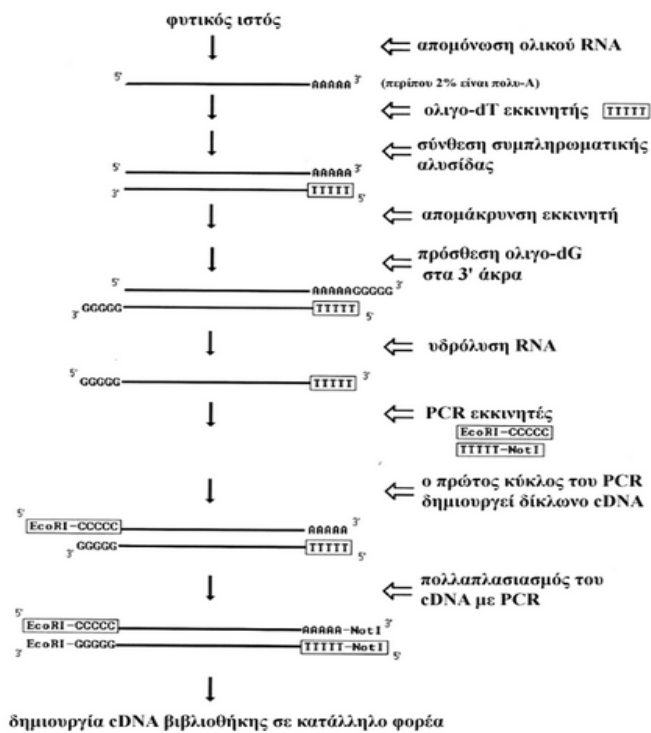


Εικόνα 20: cDNA βιβλιοθήκη (Alberts 2002)

Οι cDNA κλώνοι περιέχουν μόνο κωδικοποιητικές αλληλουχίες και μάλιστα μόνο εκείνες τις αλληλουχίες που αντιστοιχούν στα γονίδια τα οποία έχουν μεταγραφεί σε mRNA στον ιστό από τον οποίο απομονώθηκε το RNA. Επειδή τα κύτταρα διαφόρων ιστών παράγουν χαρακτηριστικές ομάδες μορίων mRNA, από κάθε ιστό δημιουργείται μια διαφορετική βιβλιοθήκη cDNA. Τα πρότυπα της έκφρασης των γονιδίων μεταβάλλονται κατά την ανάπτυξη και οι μεταβολές αυτές αντικατοπτρίζονται στις cDNA βιβλιοθήκες οι οποίες παρασκευάζονται από κύτταρα που βρίσκονται σε διαφορετικά στάδια ανάπτυξης.

3.4 ΑΛΙΣΥΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ PCR

Στα τέλη της δεκαετίας του 1980 επινοήθηκε μια νέα μέθοδος η οποία αποτελεί μια ταχύτερη και φθηνότερη εναλλακτική λύση τόσο για την κλωνοποίηση όσο και για πολλές άλλες εφαρμογές της τεχνολογίας του DNA. Η νέα τεχνική, γνωστή ως αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης διεκπεραιώνεται *in vitro* χωρίς να χρειάζονται κύτταρα. Με την τεχνική PCR, μια ορισμένη αλληλουχία νουκλεοτιδίων μπορεί ν' αντιγραφεί σε μεγάλες ποσότητες γρήγορα και εκλεκτικά από οποιοδήποτε δείγμα DNA που την περιέχει.



Εικόνα 21: Δημιουργία cDNA βιβλιοθήκης σε κατάλληλο φορέα

Για παράδειγμα, η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης χρησιμοποιείται ευρέως δε διαγνωστικές δοκιμασίες για την ανίχνευση παθολογικών γονιδίων όπως επίσης και για την παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων μιας γενετικής αλληλουχίας από ένα μικρό δείγμα ανθρώπινου DNA.

Η τεχνική PCR βασίζεται στη χρησιμοποίηση της DNA πολυμεράσης για τον πολλαπλασιασμό ενός εκμαγείου DNA σ' επανειλημμένους κύκλους αντιγραφής. Το ένζυμο καθοδηγείται στην αλληλουχία που επιδιώκεται ν' αντιγραφεί από βραχέα ολιγονουκλεοτίδια που δρουν ως εκκινητές (primers), τα οποία υβριδίζονται με την αρχή και το τέλος του εκμαγείου της επιθυμητής αλληλουχίας του DNA. Οι εκκινητές σχεδιάζονται έτσι ώστε να υποβοηθούν την εκκίνηση της αντιγραφής του DNA σε κάθε κλώνο του αρχικού δίκλωνου DNA. Οι εκκινητές παρασκευάζονται με χημική σύνθεση και γι' αυτό η τεχνική PCR χρησιμοποιείται μόνο για την κλωνοποίηση κλασμάτων DNA με γνωστή αλληλουχία των δύο άκρων τους. Υπό την καθοδήγηση των εκκινητών, η DNA πολυμεράση παράγει πολλά αντίγραφα (συνήθως δισεκατομμύρια) της επιλεγμένης αλληλουχίας. Η τεχνική PCR είναι εξαιρετικά ευαίσθητη: μπορεί να ανιχνεύσει έστω και ένα αντίγραφο μιας αλληλουχίας DNA σ' ένα δείγμα, επαυξάνοντάς το τόσο πολύ ώστε να μπορεί να ανιχνευθεί με κατάλληλη χρώση μετά από διαχωρισμό με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα.

3.5 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ

Η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα είναι μία τεχνική που χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό μορίων DNA, RNA ή πρωτεΐνης. Η τεχνική είναι σχετικά απλή και βασίζεται στην εφαρμογή ενός ηλεκτρικού πεδίου σε πήκτωμα. Πιο αναλυτικά, το διάλυμα που περιέχει τα προς διαχωρισμό μόρια τοποθετείται σε κατάλληλο πήκτωμα, και στα άκρα του πηκτώματος εφαρμόζεται ένα ηλεκτρικό πεδίο (για πρωτεΐνες και μικρού μήκους νουκλεϊκά οξέα χρησιμοποιείται συνήθως πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου, ενώ για μεγαλύτερου μήκους νουκλεϊκά οξέα χρησιμοποιείται συνήθως πήκτωμα αγαρόζης).

Κατά την εφαρμογή του πεδίου, τα μόρια μεταναστεύουν κατά μήκος του ηλεκτρικού πεδίου με ταχύτητα ανάλογη με το μέγεθος και το καθαρό τους φορτίο. Έτσι, τα μεγαλύτερα μόρια θα μεταναστεύσουν βραδύτερα, επειδή η πορεία τους παρακωλύεται από το στρώμα του ηλεκτρικού πεδίου. Μέσα σε λίγες ώρες, τα μόρια θα έχουν μετακινηθεί μέσα στο ηλεκτρικό πεδίο σύμφωνα με το μέγεθός τους, σχηματίζοντας ξεχωριστές ζώνες, η καθεμία από τις οποίες αποτελείται από ένα σύνολο μορίων ταυτόσημου μεγέθους (Σηφάκης 2011).

3.6 ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗ ΤΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΤΗΣ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ

Κατά τη χρήση DNA μικροσυστοιχιών για τη μέτρηση της συγκέντρωσης του mRNA στα ζωντανά κύτταρα, χρησιμοποιείται ένας ανιχνευτής μονόκλωνου DNA που ταιριάζει με ένα συγκεκριμένο mRNA στο κύτταρο. Η συγκέντρωση ενός συγκεκριμένου mRNA είναι αποτέλεσμα της έκφρασης του αντίστοιχου γονιδίου του, επομένως αυτή η εφαρμογή αναφέρεται συχνά ως ανάλυση έκφρασης.

Όταν χρησιμοποιούνται διαφορετικοί ανιχνευτές που ταιριάζουν με όλα τα mRNA σε ένα κύτταρο, μπορεί να ληφθεί ένα στιγμιότυπο του συνολικού mRNA ενός ζωντανού κυττάρου ή ενός ιστού. Αυτό αναφέρεται συχνά ως προφίλ έκφρασης επειδή απεικονίζει την έκφραση κάθε μετρημένου γονιδίου σε εκείνη τη συγκεκριμένη στιγμή. Το προφίλ έκφρασης μερικές φορές χρησιμοποιείται επίσης για να περιγράψει την έκφραση ενός γονιδίου κάτω από διάφορες συνθήκες.

Για την μέτρηση της γονιδιακής έκφρασης υπάρχουν διάφορες προσεγγίσεις υψηλού ρυθμού απόδοσης. Μερικές από τις τεχνικές αυτές είναι η μέθοδος **SAGE** (τμηματική ανάλυση γονιδιακής έκφρασης), η **διαφορική απεικόνιση**, η **MPSS** (massive parallel signature sequencing) και η **αφαιρετική υβριδοποίηση** (Li *et al.*, 1994).

Η **SAGE** είναι μία τεχνική που χρησιμοποιείται από τους μοριακούς βιολόγους για να παράγει μία λίστα από μικρές ακολουθίες ετικέτας καθώς και τον αριθμό των φορών που η λίστα αυτή παρατηρείται. Ένας ερευνητής χρησιμοποιώντας τις βάσεις δεδομένων ακολουθίας μπορεί συνήθως να καθορίσει ανεπιφύλακτα, το αρχικό mRNA (και επομένως το γονίδιο) που η ετικέτα εξήχθη. Οι στατιστικές μέθοδοι μπορούν να εφαρμοστούν στις ετικέτες και να μετρήσουν τις λίστες από τα διαφορετικά δείγματα προκειμένου να καθοριστεί ποια γονίδια εκφράζονται περισσότερο. Ωστόσο, η δημοφιλέστερη και ευρέως χρησιμοποιούμενη τεχνολογία υψηλού ρυθμού απόδοσης για τον σχεδιασμό του προφίλ της γονιδιακής έκφρασης είναι η τεχνολογία των DNA μικροσυστοιχιών. Αυτό οφείλεται τόσο στην συστηματική και περιεκτική δυνατότητα εξερεύνησης του γονιδιώματος όσο και στη σχετικά χαμηλή τιμή της παραγωγής τους. Η δύναμή της ως πειραματικό εργαλείο προέρχεται από την της έξοχη ιδιομορφία και τη σχέση της συμπληρωματικότητας των βάσεων (Σηφάκης 2011).

4. ΜΙΚΡΟΣΥΣΤΟΙΧΙΕΣ

4.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Μία από τις σημαντικότερες εφαρμογές του υβριδισμού των νουκλεϊνικών οξέων είναι ο καθορισμός των γονιδίων που μεταγράφονται σ' έναν κυτταρικό πληθυσμό, κατ' αντιδιαστολή προς τα γονίδια που είναι «σιωπηρά» από μεταγραφική άποψη. Για πολλά χρόνια, η μελέτη της έκφρασης των γονιδίων γινόταν με ρυθμό ένα τη φορά. Η ανάπτυξη των DNA μικροσυστοιχιών κατά την προηγούμενη δεκαετία επέφερε επανάσταση στην ανάλυση των γονιδίων, καθώς επέτρεψε την ταυτόχρονη καταγραφή των RNA μεταγραφών χιλιάδων γονιδίων.

Ουσιαστικά, οι **DNA μικροσυστοιχίες** είναι μια μαζική παραπλήσια έκδοση του Northern and Southern blotting. Η διαφορά τους είναι πως αντί για καταμετρημένους ανιχνευτές ολιγονουκλεοτιδίων πάνω σε ένα τζελ που περιέχει δείγματα RNA ή DNA, στις μικροσυστοιχίες οι ανιχνευτές ολιγονουκλεοτιδίων είναι συνδεδεμένοι σε μία επιφάνεια. Επιπλέον οι ανιχνευτές που μπορεί να είναι και διαφορετικοί, έχουν μεταξύ τους απόσταση λίγων μικρόμετρων και καλύπτουν μία επιφάνεια ενός τετραγωνικού εκατοστόμετρου.

Όσο για το δείγμα αφού σημανθεί με φθορίζουσα ουσία τοποθετείται στη μικροσυστοιχία. Μετά την απομάκρυνση του παραπανήσιου μη υβριδοποιημένου υλικού, το υβριδοποιημένο υλικό διεγείρεται από ένα λέιζερ και ανιχνεύεται από ένα σκάνερ το οποίο ανιχνεύει την επιφάνεια του τσιπ. Επειδή η θέση του κάθε ανιχνευτή ολιγονουκλεοτιδίων είναι γνωστή, είναι δυνατόν να υπολογιστεί το ποσό του δείγματος που υβριδοποιείται μέσω της εικόνας που παράγεται από την ανίχνευση.

Ενώ πρώτα σε μια μέρα μπορούσαν να πραγματοποιούνται μόνο μερικές συτυώσεις Northern ή Southern, τώρα πλέον με τις μικροσυστοιχίες DNA είναι δυνατόν να «τρέχουν» υβριδοποιήσεις δεκάδων χιλιάδων ανιχνευτών. Αντί λοιπόν της μελέτης ενός γονιδίου και ενός mRNA τη φορά, οι ερευνητές μελετούν τώρα πολλά γονίδια και πολλά mRNA συγχρόνως. Στην πραγματικότητα, οι DNA μικροσυστοιχίες χρησιμοποιούνται συχνά για να μελετήσουν όλα τα γνωστά mRNA του οργανισμού. Αυτό έχει δώσει τη δυνατότητα μιας εξ ολοκλήρου νέας, συστηματικής άποψης για το πώς τα κύτταρα αντιδρούν σε ορισμένα ερεθίσματα.

Με την εφαρμογή του DNA μικροσυστοιχιών στον ανθρώπινο οργανισμό ή τα ανθρώπινα κύτταρα, μπορούμε να μάθουμε και να χαρακτηρίσουμε μια ασθένεια σε πιο λεπτομερές επίπεδο από τι ήταν προηγουμένως δυνατό. Ο καρκίνος έχει αποδειχθεί η ασθένεια που έχει προσελκύσει την περισσότερη εστίαση. Ένας λόγος είναι ότι είναι δυνατό να ληφθεί ένα δείγμα ιστού από τον όγκο κατά τη διάρκεια της χειρουργικής επέμβασης και έπειτα να χρησιμοποιηθεί ώστε να γίνει μέτρηση της έκφρασης γονιδίων με μία DNA μικροσυστοιχία. Οι DNA μικροσυστοιχίες μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν για να υβριδοποιήσουν το DNA. Σε εκείνη την περίπτωση μπορούν να ξεχωρίσουν τα διαφορετικά αλληλόμορφα γονίδια (μεταλλάξεις) στο DNA, μερικά από το οποίο έχουν επιπτώσεις στον καρκίνο.

4.2 ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΕΣ ΜΙΚΡΟΣΥΣΤΟΙΧΙΩΝ

Σε όλες τις τεχνικές των μικροσυστοιχιών που χρησιμοποιούνται υπάρχουν μερικά κοινά σημεία. Όλες οι τεχνικές είναι βασισμένες στην καταγραφή των mRNA ποσοτήτων έχοντας ως στόχο τη μέτρηση του επιπέδου έκφρασης ενός μεγάλου συνόλου γονιδίων. Κυρίως χρησιμοποιούνται δύο κοινές πλατφόρμες μικροσυστοιχιών : οι συμπληρωματικές DNA πλατφόρμες(cDNA) (Schena *et al.*, 1995) και οι ολιγονουκλεοτιδικές (oligonucleotide) (Fodor, 1995). Οι δύο πλατφόρμες διαφέρουν στα πειραματικά πρωτόκολλα, στα μήκη των ανιχνευτών, στον αριθμό των ιστών που μετριοούνται σε κάθε μικροσυστοιχία αλλά κυρίως στην απόθεση των ανιχνευτών στην σκληρή επιφάνεια.

Η επεξεργασία των cDNA μικροσυστοιχιών περιλαμβάνει την απόθεση των cDNA κλώνων που έχουν ενισχυθεί με τη μέθοδο PCR και την επισήμανση των ήδη συντεθειμένων νουκλεοτιδίων. Όσο για τις μικροσυστοιχίες ολιγονουκλεοτιδίων στηρίζονται στην *in situ* σύνθεση των ολιγονουκλεοτιδίων και μπορούν να διαιρεθούν περαιτέρω σε τρεις ομάδες(σύμφωνα με τη μέθοδο σύνθεσης που χρησιμοποιείται): α) **στις μικροσυστοιχίες που κατασκευάζονται με τη χρήση της φωτολιθογραφίας**, β) **στην inkjet τύπωση** και γ) **στην ηλεκτροχημική σύνθεση μικροσυστοιχιών**. Παρ' όλο που από τις μικροσυστοιχίες ολιγονουκλεοτιδίων αυτές που χρησιμοποιούνται περισσότερο είναι εκείνες που στηρίζονται στη φωτολιθογραφική επεξεργασία (γνωστές επίσης ως *gene-chips* και με εμπορικά αναγνωρισμένο σήμα ως Affymetrix, Santa Clara, CA) οι cDNA μικροσυστοιχίες χρησιμοποιούνται συχνότερα από την ερευνητική κοινότητα λόγω της χαμηλότερης τιμής και της αυτόνομης διαθεσιμότητάς τους. Οποιαδήποτε τεχνολογία μικροσυστοιχιών και να χρησιμοποιηθεί η γενική πειραματική διαδικασία μπορεί να περιγραφεί με τα εξής πέντε βήματα (Kohane *et al.*, 2003):

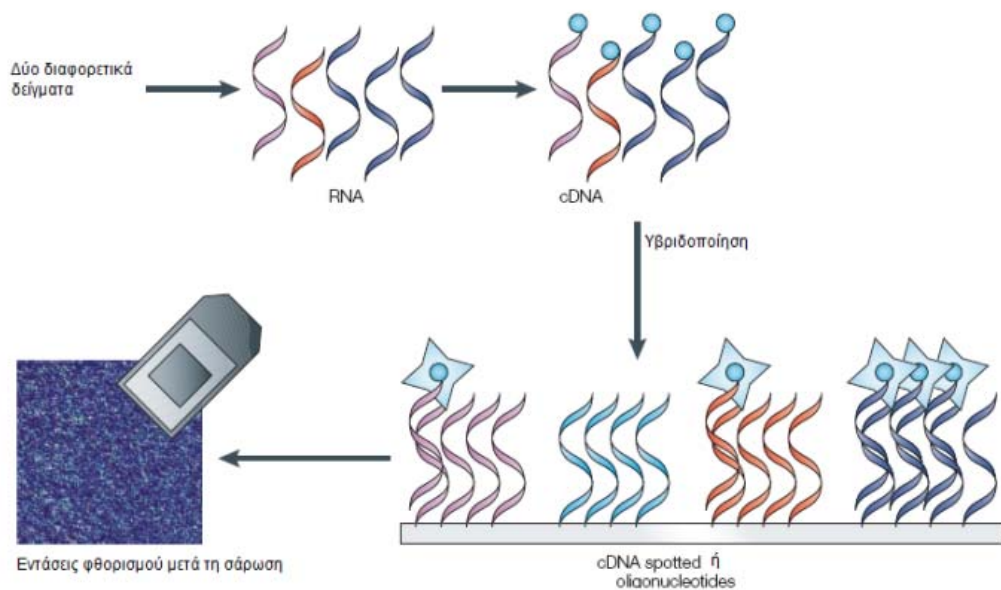
Επιλογή ανιχνευτών: Ένας ανιχνευτής θα μπορούσε να είναι ένας βιοχημικός παράγοντας που βρίσκει ή συμπληρώνει μια συγκεκριμένη ακολουθία DNA ή RNA ενός δείγματος δοκιμής. Ακόμη θα μπορούσε να περιλαμβάνει cDNA κλώνους ενισχυμένους με τη μέθοδο PCR, από ολιγονουκλεοτίδια που συντέθηκαν σε ένα ρευστό ή που στηρίχτηκαν σε μια στερεή πλάκα ανά ζευγάρι βάσεων.

Κατασκευή μικροσυστοιχιών: Είναι η μέθοδος με την οποία τοποθετούνται οι ανιχνευτές σε ένα στερεό μέσο ή μια πλατφόρμα. Οι τρέχουσες τεχνικές περιλαμβάνουν τη ρομποτική επισήμανση, τη φωτολιθογραφία, τον πιεζοηλεκτρισμό ή και τα μικροϊνίδια (microbeads). Αυτό το βήμα περιλαμβάνει ακόμη τον προσδιορισμό του τύπου του μέσου που περιλαμβάνεται, όπως οι φωτογραφικές διαφάνειες γυαλιού, το νάυλον, οι γκοφρέτες πυριτίου, οι μεμβράνες, τα τζελ και τα ινίδια.

Ανίχνευση δείγματος: Είναι ο μηχανισμός προετοιμασίας του RNA από τα δοκιμαστικά δείγματα. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί αποκλειστικά RNA, ή να επιλεγεί mRNA. Εναλλακτικά, μπορεί να αντιγραφεί mRNA σε cDNA, χρησιμοποιώντας νουκλεοτίδια που έχουν σημανθεί .

Ανάλυση: Αυτό το βήμα περιγράφει τη διαδικασία που χρησιμοποιείται ώστε το σήμα της γονιδιακής έκφρασης να μετατρέπεται σε ευκολότερα μετρήσιμο. Η κοινή διαδικασία που εφαρμόζεται είναι η μετατροπή της γονιδιακής έκφρασης σε υβριδοποίηση.

Ανάγνωση: Αυτό το στάδιο διευκρινίζει πώς το τροποποιημένο σήμα πρόκειται να μετρηθεί και με ποιον τρόπο θα απεικονιστεί η πληροφορία του. Στις μικροσυστοιχίες που χρησιμοποιούνται η υβριδοποίηση μετριέται τυπικά είτε χρησιμοποιώντας ένα ή δύο χρωστικές ουσίες ,είτε ραδιενεργές ετικέτες.



Εικόνα 22: Σχηματοποιημένη πειραματική διαδικασία ενός πειράματος μικροσυστοιχιών

4.2.1 Τυπωμένες Μικροσυστοιχίες

Όταν οι ανιχνευτές δε συντίθενται απευθείας πάνω στο πλακίδιο, αλλά εκτυπώνονται στην επιφάνεια μετά την ετοιμασία τους, τότε κάνουμε λόγο για **τυπωμένες μικροσυστοιχίες**. Σε αυτή τη σημαντική τεχνολογία, χρησιμοποιείται ένα ρομπότ για να μετακινήσει μικρές ποσότητες από τον ανιχνευτή σε μία γυάλινη επιφάνεια. Ο **ανιχνευτής** μπορεί να αποτελείται από **cDNA**, από προϊόν **PCR** ή από **ολιγονουκλεοτίδια** και προέρχεται από το mRNA των βιολογικών δειγμάτων που εξετάζονται. Καθένας είναι συμπληρωματικός ως προς ένα μοναδικό γονίδιο και μπορεί να τοποθετηθεί στην επιφάνεια με διάφορους τρόπους. Η ανάπτυξη της νανοτεχνολογίας είναι που έδωσε τη δυνατότητα να τυπώνουμε σε επίπεδο μορίου, χιλιάδες μόρια σε εξαιρετικά περιορισμένο χώρο. Οι τεχνολογίες εκτύπωσης διακρίνονται σε **δύο** κύριες κατηγορίες: την **εκτύπωση επαφής** (contact printing) και την **εκτύπωσης χωρίς επαφή** (non – contact printing).

Οι μέθοδοι της κατασκευής μικροσυστοιχιών γνωστές σαν **τυπωμένες μικροσυστοιχίες**, συμπεριλαμβάνουν κάθε τεχνολογία που εμπλέκει απευθείας επαφή του εκτυπωτικού οργάνου ή του δείγματος που εμπεριέχεται στο εκτυπωτικό όργανο με την επιφάνεια της μικροσυστοιχίας. Οι συσκευές εκτύπωσης επαφής συμπεριλαμβάνουν μια μεγάλη οικογένεια οργάνων μεταφοράς, όπως μικροτοποθετικές ακίδες (microspotting pins), τσιμπίδες και ακίδες σχισμών, τριχοειδή και άλλες παρόμοιες συσκευές. Κατά τη διάρκεια της εκτύπωσης επαφής, το δείγμα βρίσκεται στο εσωτερικό της ακίδας και συγκρατείται από **δυνάμεις συνάφειας** και από **επιφανειακή τάση**. Φαίνεται σα σταγόνα έτοιμη να πέσει από ένα καλαμάκι. Οι δυνάμεις συνάφειας είναι αυτές που ασκούνται στο δείγμα από το υλικό της ακίδας (συνήθως ανοξειδωτο αστάλι) και η επιφανειακή τάση αφορά σε δυνάμεις που ασκούνται από το ίδιο το υγρό υλικό στα μόρια της επιφάνειας. Όταν η σταγόνα αγγίξει την επιφάνεια εκτύπωσης, η επιφάνεια ασκεί μια, αντίθετη στις προηγούμενες δυνάμεις, δύναμη, η οποία αν είναι μεγαλύτερη από τις άλλες, θα κάνει τη σταγόνα να μείνει στη επιφάνεια.

Στην τεχνολογία κατασκευής μικροσυστοιχιών, οι τεχνικές εκτύπωσης επαφής είναι αυτές που χρησιμοποιούνται περισσότερο.

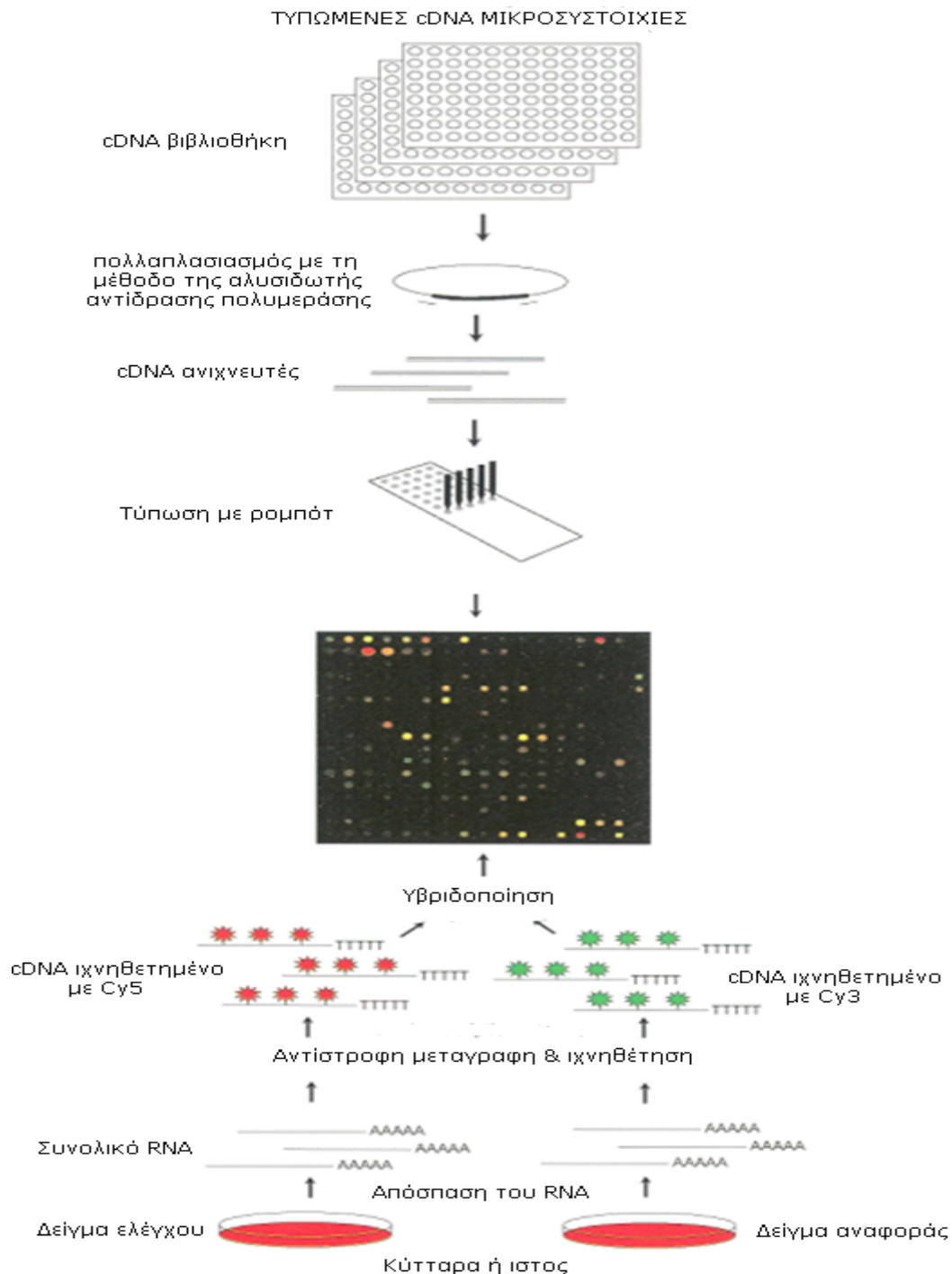
Όταν γίνεται λόγος για **εκτύπωση χωρίς επαφή**, εννοείται η τεχνολογία που επιτρέπει εκτύπωση των ανιχνευτών χωρίς άμεση επαφή του εκτυπωτικού οργάνου στην επιφάνεια της μικροσυστοιχίας, δηλαδή μιλάμε για συσκευές εκτόξευσης «μελάνης» με χρήση πιεζοηλεκτρικών κρυστάλλων και μικροσωληνοειδών. Είναι η πιο γρήγορη τεχνική εκτύπωσης και γενικότερα κατασκευής μικροσυστοιχιών, αλλά παραμένει δύσκολη και απαιτητική σε κόστος και χρησιμοποιείται λιγότερο.

Πριν, όμως, αποφασίσει κανείς πως θα τυπώσει στην επιφάνεια της μικροσυστοιχίας τους ανιχνευτές, απαιτείται επεξεργασία του δείγματος των ανιχνευτών σε **κατάλληλο διάλυμα προστασίας**. Τα διαλύματα εκτύπωσης διαφόρων τύπων που χρησιμοποιούνται έχουν σα σκοπό να αυξήσουν την αποτελεσματικότητα εκτύπωσης, να μειώσουν τη διασπορά του δείγματος, να εξασφαλίσουν ομοιόμορφη μεταφορά, να σταθεροποιήσουν τα δείγματα των ανιχνευτών, να απενεργοποιήσουν τους ανιχνευτές, να μειώσουν την ξήρανση του υλικού και να αυξήσουν την ορατότητα των σημείων που εκτυπώνονται.

Ακόμα, πρέπει να έχουμε κατά νου, ότι η **επιφάνεια εκτύπωσης** της μικροσυστοιχίας έχει υποστεί ειδική χημική επεξεργασία, ώστε οι ανιχνευτές να τοποθετηθούν με τον κατάλληλο προσανατολισμό στη μικροσυστοιχία. Η ανάλυση με μικροσυστοιχίες απαιτεί επιφάνεια υψηλής ποιότητας. Η ετοιμασία της μικροσυστοιχίας είναι μια απαιτητική διαδικασία. Η επιφάνεια παίζει σημαντικό ρόλο στην προσκόλληση των μορίων, στην απόδοση των αντιδράσεων, στην ακρίβεια κατά την ανίχνευση και στην ποιότητα των δεδομένων που προκύπτουν. Κατά πολλούς ένα πείραμα μικροσυστοιχιών είναι καλό όσο καλή είναι η επιφάνεια στην οποία λαμβάνει χώρα. Όσο προχωράει η τεχνολογία, η ποιότητα των επιφανειών των μικροσυστοιχιών εξελίσσεται και βελτιώνεται. Μια επιφάνεια πρέπει να είναι σωστών διαστάσεων, λεία, επίπεδη, μεγάλης αντοχής, αποτελεσματική και προσβάσιμη.

Το πιο κοινό υλικό που χρησιμοποιείται για τις μικροσυστοιχίες είναι το **γυαλί**. Το κυρίαρχο συστατικό του γυαλιού είναι το **διοξείδιο του πυριτίου (SiO₂)**. Συχνά προστίθενται στο υλικό οξειδία μετάλλων για να αυξήσουν το σημείο τήξης του γυαλιού και να προσδώσουν άλλα επιθυμητά χαρακτηριστικά. Επίσης το γυαλί επικαλύπτεται με **αμινικές και αλδεϋδικές ομάδες** που επιτρέπουν πιο σταθερές προσκολλήσεις των ολιγονουκλεοτιδίων και των cDNAs.

Ο δεσμός προσκόλλησης στην επιφάνεια μπορεί να είναι **ομοιοπολικός ή μη ομοιοπολικός**. Για την ομοιοπολική πρόσδεση προστίθεται αλειφατική αμινομάδα (NH₂) στο DNA στόχο και αυτό στη συνέχεια, προσκολλάται στην επιφάνεια, αλληλεπιδρώντας με προσδέτες του γυαλιού. Για cDNA στόχους, η αμινομάδα προστίθεται στο 5' άκρο της αλυσίδας του εκκινήτη PCR από τον οποίο παράγεται ο ανιχνευτής. Έτσι η προσκόλληση γίνεται πάντα με το 5' άκρο. Ο μη – ομοιοπολικός τρόπος πρόσδεσης αφορά μόνο σε cDNA στόχους και δεν έχει ευρεία χρήση. Οι μικροσυστοιχίες εκτύπωσης, διακρίνονται, ανάλογα με το είδος των ανιχνευτών σε ολιγονουκλεοτιδικές και cDNA μικροσυστοιχίες (Schena 2003).



Εικόνα 23: Τυπωμένες cDNA μικροσυστοιχίες (Lee 2004).

4.2.2 Μικροσυστοιχίες με χρήση σφαιριδίων

Μία μοναδική στο είδος της τεχνολογία κατασκευής μικροσυστοιχιών DNA αποτελεί η τεχνολογία, που εφαρμόζει η εταιρεία Illumina (Illumina, Inc., USA). Η τεχνολογία αυτή (BeadArray®) – η οποία εφευρέθηκε από (Michael et al. 1998) – βασίζεται σε σφαιρίδια πυριτίου μεγέθους 3 μm, που αυτο-συναρμολογούνται πάνω σε στερεό φορέα, ο οποίος μπορεί να είναι είτε δέσμη οπτικών ινών, είτε πλακίδιο πυριτίου.

Στα σφαιρίδια προσδένονται μέσω ομοιοπολικών δεσμών ολιγονουκλεοτίδια μήκους 79 νουκλεοτιδίων, όσον αφορά τις μικροσυστοιχίες ανάλυσης της γονιδιακής έκφρασης. Σε κάθε σφαιρίδιο προσδένονται αρκετές εκατοντάδες χιλιάδες αντίγραφα ενός συγκεκριμένου ολιγονουκλεοτιδίου (Oliphant et al. 2002). Κάθε ολιγονουκλεοτίδιο αποτελείται από μία αλληλουχία 50 νουκλεοτιδίων για το υπό μελέτη γονίδιο, και από μία αλληλουχία 29 νουκλεοτιδίων, αλληλουχίας διευθυνσιοδότησης, για τον εντοπισμό της θέσης του σφαιριδίου πάνω στη μικροσυστοιχία. Το σύνολο των σφαιριδίων, πάνω στα οποία είναι προσδεμένα τα ολιγονουκλεοτίδια, συγχωνεύεται και τοποθετείται πάνω στο φορέα. Ο φορέας έχει διαμορφωθεί κατάλληλα, ώστε να φέρει εγχαραγμένες μικροκυψελίδες, ενώ οι τελευταίες έχουν κατάλληλο μέγεθος, ώστε να μπορεί να τοποθετηθεί σε αυτές ένα μοναδικό σφαιρίδιο. Τα σφαιρίδια του συγχωνευμένου δείγματος βρίσκουν τις θέσεις τους μέσα στις μικροκυψελίδες με τυχαίο τρόπο (Scherer 2009). Λόγω του τυχαίου τρόπου κατανομής των αναφορών πάνω στο φορέα, κάθε μικροσυστοιχία που κατασκευάζεται είναι μοναδική τόσο ως προς τις θέσεις όσο και ως προς τον αριθμό των αναφορών.

Συνεπώς, απαιτείται ο χωρικός προσδιορισμός των αναφορών της μικροσυστοιχίας προτού η τελευταία να είναι έτοιμη προς χρήση. Ο προσδιορισμός αυτός λαμβάνει χώρα με μία σειρά από αντιδράσεις υβριδοποίησης, που αποκωδικοποιούν τη χωρική κατανομή των αναφορών, και βασίζεται στον αλγόριθμο που αναπτύχθηκε από (Gunderson et al. 2004). Οι υβριδοποιήσεις αυτές πραγματοποιούνται με κατάλληλα εκχυλίσματα επισημασθεισών αλληλουχιών συμπληρωματικών της αλληλουχίας διευθυνσιοδότησης (Scherer 2009).

4.2.3 Τεχνολογία επιτόπιας σύνθεσης μικροσυστοιχιών

Η δημιουργία αυτού του είδους μικροσυστοιχιών πραγματοποιείται με την επιτόπια σύνθεσή τους πάνω σε ένα στερεό φορέα. Η σύνθεση αυτή δημιουργείται μέσω ομοιοπολικού δεσμού μεταξύ του υδροξυλίου του 5' άνθρακα του σακχάρου του τελευταίου συνδεδεμένου νουκλεοτιδίου και της φωσφορικής ομάδας του επόμενου νουκλεοτιδίου. Σε κάθε νουκλεοτίδιο που προστίθεται έχει προσδεθεί μία προστατευτική ομάδα – διαδικασία γνωστή ως προστασία – στο 5' άκρο του, για την αποφυγή σύνδεσης περισσότερων της μίας βάσης σε κάθε κύκλο σύνθεσης.

Εν συνεχεία, και προτού ξεκινήσει ο επόμενος κύκλος σύνθεσης, η προστατευτική ομάδα μετατρέπεται σε ομάδα υδροξυλίου – διαδικασία γνωστή ως αποπροστασία – είτε μέσω κάποιου οξέως (χημική αποπροστασία), είτε μέσω φωτός (φωτολιθογραφία). Αναλόγως της μεθόδου αποπροστασίας που ακολουθείται, μπορούμε να διακρίνουμε 3 βασικές τεχνολογίες για τις επιτόπιας σύνθεσης μικροσυστοιχίες DNA:

- (α) φωτολιθογραφία με χρήση μασκών (τεχνολογία που εφάρμοσε για πρώτη φορά η εταιρεία Affymetrix για την κατασκευή μικροσυστοιχιών DNA),
- (β) φωτολιθογραφία χωρίς τη χρήση μασκών (τεχνολογία που χρησιμοποιεί η εταιρεία Roche NimbleGen, Inc., USA), και
- (γ) χημική αποπροστασία με χρήση τεχνολογίας εκτύπωσης ψεκασμού (τεχνολογία που χρησιμοποιεί η εταιρεία Agilent, Inc., USA) (Stekel 2003).

4.2.3.1 GeneChip Affymetrix

Η τεχνολογία αυτή χρησιμοποιεί εξοπλισμό παρόμοιο με αυτόν που χρησιμοποιείται για την κατασκευή των **τσιπ πυριτίου** των υπολογιστών και αυτό επιτρέπει έτσι τη μαζική παραγωγή των μεγάλων τσιπ σε λογικό

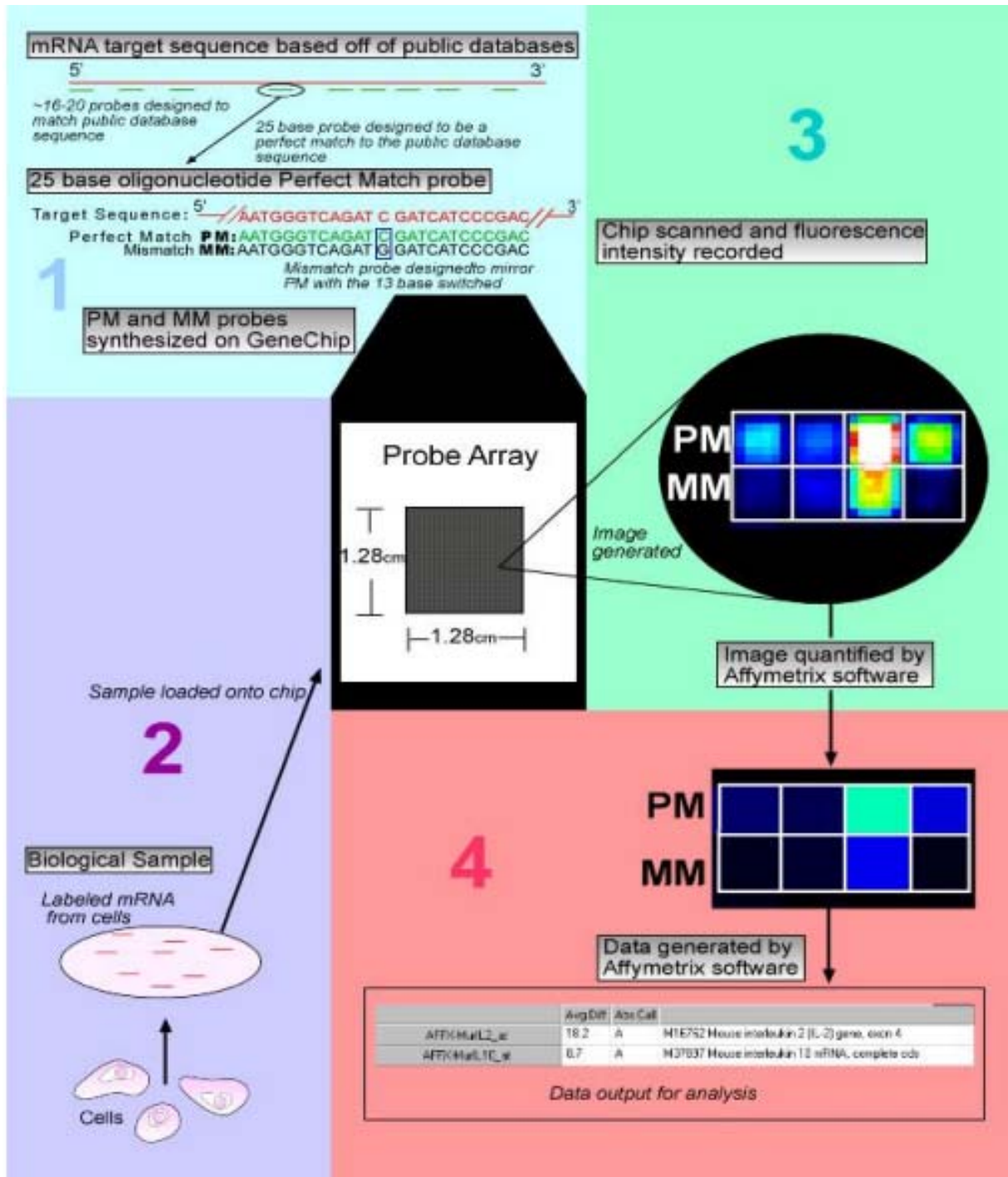
κόστος. Τα τσιπ των υπολογιστών γίνονται με τη δημιουργία масκών που ελέγχουν μια φωτολιθογραφική διαδικασία κατά την οποία αφαιρείται ή τοποθετείται πυρίτιο στην επιφάνεια του τσιπ. Με παρόμοιο τρόπο τα Affymetrix χρησιμοποιούν μάσκες για να ελέγξουν τη σύνθεση των ολιγονουκλεοτιδίων στην επιφάνεια του τσιπ. Η τυποποιημένη μέθοδος phosphoramidite που χρησιμοποιείται για τη σύνθεση των ολιγονουκλεοτιδίων έχει τροποποιηθεί ώστε να επιτρέπει τον έλεγχο των μεμονομένων βημάτων. Οι μάσκες ελέγχουν αρκετές εκατοντάδες χιλιάδες τετράγωνα καθένα από τα οποία περιέχει αρκετά αντίγραφα ενός ολιγονουκλεοτιδίου.

Έτσι τα αποτελέσματα είναι αρκετές εκατοντάδες χιλιάδες διαφορετικά ολιγονουκλεοτίδια καθένα από τα οποία παρουσιάζεται σε εκατομμύρια αντίγραφα. Αυτός ο μεγάλος αριθμός των ολιγονουκλεοτιδίων, μήκους μέχρι 25 ολιγονουκλεοτιδίων, έχει αποδειχθεί πολύ χρήσιμος ως πειραματικό εργαλείο που μπορεί να αντικαταστήσει όλες τις πειραματικές διαδικασίες ανίχνευσης που στο παρελθόν στηρίχτηκαν στη χρήση ολιγονουκλεοτιδίων όπως: Southern, Northern, Dot blotting καθώς επίσης η ακολουθιακή συγκεκριμένη ανίχνευση (sequence specific probing) και η ανίχνευση μετάλλαξης.

Για την ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης χρησιμοποιούνται μέχρι 40 ολιγονουκλεοτίδια για την ανίχνευση κάθε γονιδίου. Η Affymetrix έχει επιλέξει μια περιοχή κάθε γονιδίου που (πιθανώς) έχει τη λιγότερη ομοιότητα με τα άλλα γονίδια. Από αυτήν την περιοχή 11 έως 20 ολιγονουκλεοτίδια επιλέγονται ως τέλεια (PM: Perfect Match) (δηλ., τέλεια συμπληρωματικά του mRNA σε εκείνο το γονίδιο). Επιπλέον, έχουν παραχθεί 11 έως 20 ολιγονουκλεοτίδια κακού συνδυασμού MM (mismatch), τα οποία είναι ίδια με τα τέλεια ολιγονουκλεοτίδια εκτός από την κεντρική θέση 13 όπου ένα νουκλεοτίδιο έχει αλλάξει με το συμπληρωματικό του.

Η Affymetrix υποστηρίζει ότι τα MM ολιγονουκλεοτίδια θα είναι σε θέση να ανιχνεύουν τη μη συγκεκριμένη υβριδοποίηση υπόβαθρου η οποία είναι σημαντική για τον προσδιορισμό της ποσότητας των ασθενώς εκφρασμένων mRNAs. Για τα mRNAs αυτά η αναλογία σήματος προς θόρυβο είναι ελάχιστη ενώ η αφαίρεση MM από PM προσθέτει αρκετό θόρυβο στα στοιχεία. Αυτό συμβαίνει επειδή η αφαίρεση ενός θορυβώδους σήματος από ένα άλλο θορυβώδες σήμα παράγει ένα τρίτο σήμα με ακόμα περισσότερο θόρυβο.

Η υβριδοποίηση κάθε ολιγονουκλεοτιδίου με το στόχο του εξαρτάται από την αλληλουχία του. Όλα τα PM ολιγονουκλεοτίδια από το 11^ο έως το 20^ο έχουν διαφορετική αλληλουχία για το κάθε γονίδιο, επομένως η υβριδοποίηση δεν είναι ομοιόμορφη.



Εικόνα 24: Τεχνολογία Affymetrix GeneChip. 1) Επιλογή ολιγονουκλεοτιδίου PM & MM. 2) Προετοιμασία δείγματος και υβριδοποίηση. 3) Σάρωση & εξαγωγή εικόνας. 4) Δεδομένα που προκύπτουν προς επεξεργασία.

Για να ανιχνεύσουμε την υβριδοποίηση ενός στόχου mRNA από έναν ανιχνευτή στο τσιπ, πρέπει να «χρωματίσουμε» το στόχο mRNA με φθοριούχο χρώμο. Τα βήματα από το κύτταρο εως το τσιπ είναι συνήθως τα ακόλουθα:

- Εξαγωγή του συνολικού RNA από το κύτταρο.
- Διαχωρισμός του mRNA από το υπόλοιπο RNA χρησιμοποιώντας τα ολιγονουκλεοτίδια Poly-T (προαιρετικά).
- Μετατροπή του mRNA σε cDNA χρησιμοποιώντας την αντίστροφη μεταγραφάση & έναν εγχυτήρα Poly-T.
- Ενίσχυση του cDNA χρησιμοποιώντας την T7 RNA πολυμεράση παρουσία βιοτίνης-UTP και βιοτίνης-CTP, έτσι ώστε το κάθε cDNA να παράγει 50 έως 100 αντίγραφα cRNA με βιοτίνη.
- Επώαση του cRNA στους 94 βαθμούς Κελσίου στον απομονωτή ώστε να παραχθούν cRNA τμήματα μήκους 35 έως 200 νουκλεοτιδίων.
- Υβριδοποίηση του τσιπ και απομάκρυνση του μη υβριδοποιημένου υλικού.
- Χρωματισμός του υβριδοποιημένου cRNA με βιοτίνη με streptavidin-phycoerythrin και έπειτα πλύσιμο. Ανίχνευση του τσιπ στον ομοεστιακό ανιχνευτή (προαιρετικό).

Συνήθως, απαιτούνται για τη διαδικασία 5 έως 10 μg του συνολικού RNA. Ωστόσο, οι νέες βελτιώσεις στα πρωτόκολλα σύνθεσης cDNA μειώνουν το απαραίτητο ποσό σε 100 ng (*Knudsen 2004*).

5. ΚΑΡΚΙΝΟΣ

5.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο **καρκίνος** προκαλείται από μεταλλάξεις γονιδίων που ελέγχουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και χαρακτηρίζεται από τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό των κυττάρων ενός ιστού. Αυτά σχηματίζουν μάζες κυττάρων (καρκινικοί όγκοι) ή μεταναστεύουν στο αίμα, όπως στις διάφορες μορφές λευχαιμίας .

Υπάρχουν δύο τύποι γονιδίων που σχετίζονται με την καρκινογένεση. Τα **ογκογονίδια** και τα **ογκοκατασταλτικά γονίδια**. Τα ογκογονίδια "προέρχονται" από γονίδια που υπάρχουν φυσιολογικά στο ανθρώπινο γονιδίωμα και ονομάζονται **πρωτο-ογκογονίδια**. Στα φυσιολογικά κύτταρα, τα πρωτο-ογκογονίδια κωδικοποιούν πρωτεΐνες οι οποίες εμπλέκονται στον έλεγχο της αύξησης. Η ακολουθία των γεγονότων που οδηγούν σε αύξηση του κυττάρου, αρχίζει με την αλληλεπίδραση σηματοδοτικών μορίων (π.χ. αυξητικών παραγόντων, ορμονών, νευροδιαβιβαστών) με ειδικούς υποδοχείς, είτε στην επιφάνεια είτε στο εσωτερικό του κυττάρου. Το κύτταρο ερμηνεύει το σήμα και παράγει μεταγωγικά μόρια (transducers), ή, αλλιώς, δεύτερους αγγελιοφόρους (second messengers), τα οποία τροποποιούν τη μεταγραφή των γονιδίων στον πυρήνα ή επιδρούν με άμεσο τρόπο σε διάφορες κυτταρικές πρωτεΐνες, με αποτέλεσμα να επέρχονται καθορισμένες φαινοτυπικές μεταβολές.

Όμως διάφορα είδη μεταλλάξεων, που μπορεί να προκληθούν από μεταλλαξογόνους παράγοντες, μετατρέπουν τα πρωτο-ογκογονίδια σε ογκογονίδια, τα οποία υπερλειτουργούν και οδηγούν το κύτταρο σε ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό και στη δημιουργία καρκίνου. Η μετατροπή ενός πρωτο-ογκογονιδίου σε ογκογονίδιο μπορεί να είναι το αποτέλεσμα μιας **σημειακής μετάλλαξης** ή μιας **χρωμοσωμικής ανωμαλίας**, συνηθέστερα μετατόπισης.

Τα ογκοκατασταλτικά γονίδια είναι γονίδια που ελέγχουν την κυτταρική διαίρεση, καταστέλλοντας την, όποτε είναι απαραίτητο. Η αναστολή της δράσης τους που είναι συνήθως αποτέλεσμα μετάλλαξης, κυρίως έλλειψης, αφαιρεί από το κύτταρο τη δυνατότητα ελέγχου του πολλαπλασιασμού και οδηγεί σε καρκινογένεση.

Σε γενετικό επίπεδο, ο καρκίνος είναι το αποτέλεσμα:

- Μετατροπής πρωτο-ογκογονιδίων σε ογκογονίδια
- Απουσίας λειτουργικότητας ογκοκατασταλτικών γονιδίων, και
- Αδρανοποίησης των μηχανισμών επιδιόρθωσης του DNA.

Τα καρκινικά κύτταρα ταξιδεύουν συχνά μέσω της κυκλοφορίας του αίματος ή μέσω του συστήματος λέμφων σε άλλα μέρη του σώματος, όπου αρχίζουν να μεγαλώνουν και να αντικαθιστούν τους φυσιολογικούς ιστούς. Αυτή η διαδικασία εξάπλωσης ονομάζεται **μετάσταση**. Οι καλοήθεις (μη-καρκινοειδείς) όγκοι δεν εξαπλώνονται σε άλλα μέρη του σώματος (μεταστατικοί) και είναι πολύ σπάνια απειλητικοί για τη ζωή.

5.2 ΚΑΤΗΓΟΡΙΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ

Η κατηγοριοποίηση περιγράφει τη σοβαρότητα του καρκίνου και στηρίζεται στην έκταση του αρχικού όγκου αλλά και στο αν έχει γίνει μετάσταση. Είναι σημαντική για διάφορους λόγους, όπως στο να γίνει σωστή διάγνωση αλλά κυρίως στο να βοηθήσει τους γιατρούς να οργανώσουν την κατάλληλη θεραπεία. Γνωρίζοντας το στάδιο του καρκίνου μπορούν να προσδιοριστούν οι κλινικές δοκιμές που είναι κατάλληλες για ένα συγκεκριμένο ασθενή.

Τα συστήματα κατηγοριοποίησης του καρκίνου έχουν εξελιχθεί με την πάροδο του χρόνου και συνεχίζουν να αλλάζουν δεδομένου ότι οι επιστήμονες μαθαίνουν περισσότερα για τη νόσο αυτή. Μερικά από αυτά καλύπτουν πολλούς τύπους καρκίνου ενώ άλλα εστιάζουν σε έναν ιδιαίτερο τύπο. Τα κοινά στοιχεία που εξετάζονται περισσότερο στη δημιουργία συστημάτων ταξινόμησης είναι τα ακόλουθα:

- Περιοχή του αρχικού όγκου
- Μέγεθος όγκων και αριθμός όγκων
- Συμμετοχή των λεμφαδένων
- Τύπος κυττάρων & βαθμός όγκου (κατά πόσο τα καρκινικά κύτταρα μοιάζουν με τα κανονικά κύτταρα του ιστού)
- Η παρουσία ή η απουσία μετάστασης

Ένα από τα ευρύτερα γνωστά συστήματα ταξινόμησης είναι το **TNM**. Το σύστημα αυτό έχει γίνει αποδεκτό από τη διεθνή ένωση κατά του καρκίνου (**UICC**) και την American Joint Committee on Cancer (AJCC). Στηρίζεται στην έκταση του όγκου (**T**=tumor), στην έκταση της διάδοσης στους λεμφαδένες (**N**=node) και στην παρουσίαση μετάστασης (**M**=metastasis).

Αρχικός όγκος (T)	
TX	Ο αρχικός όγκος δε μπορεί να αξιολογηθεί
T0	Κανένα στοιχείο του αρχικού όγκου
Tis	<u>Καρκίνωμα in situ</u> (CIS, Παρουσίαση μη ομαλών κυττάρων τα οποία δεν έχουν διαδοθεί σε γειτονικό ιστό, αν και δεν είναι καρκίνος τα CIS μπορεί να εξελιχθούν σε καρκίνο που ονομάζεται preinvasive cancer = σύμπλεγμα από κακοήθη κύτταρα που δεν έχουν εισβάλει βαθύτερα στον επιθηλιακό ιστό.)
T1, T2, T3, T4	Μέγεθος ή/και επέκταση του αρχικού όγκου

Πίνακας 1: Αξιολόγηση βάσει της έκτασης του όγκου T (American Joint Committee)

Περιφερειακοί λεμφαδένες (N)	
NX	Οι περιφερειακοί λεμφαδένες δεν μπορούν να αξιολογηθούν
N0	Καμία συμμετοχή περιφερειακών λεμφαδένων
N1, N2, N3	Συμμετοχή των περιφερειακών λεμφαδένων (αριθμός λεμφαδένων ή/και έκταση της διάδοσης)

Πίνακας 2: Αξιολόγηση βάσει της διάδοσης του όγκου στους λεμφαδένες (American Joint Committee)

Μετάσταση (M)	
MX	Η μετάσταση δεν μπορεί να αξιολογηθεί
M0	Δεν υπάρχει μετάσταση
M1	Παρουσίαση μετάστασης

Πίνακας 3: Αξιολόγηση βάση παρουσίασης μετάστασης M (American Joint Committee)

Για πολλούς καρκίνους οι **TNM** συνδυασμοί αντιστοιχούν σε ένα από τα πέντε στάδια. Τα κριτήρια για τα στάδια διαφέρουν για τους διαφορετικούς τύπους καρκίνου. Για παράδειγμα **ο καρκίνος της ουροδόχου κύστης (T3 N0 M0) είναι στάδιο III**, ενώ ο καρκίνος του παχύ εντέρου **(T3 N0 M0) είναι στάδιο II**.

Στάδιο	Προσδιορισμός
Stage 0	Καρκίνωμα in situ
Stage I, Stage II, and Stage III	Οι υψηλότεροι αριθμοί δείχνουν πιο εκτενή ασθένεια. Μεγαλύτερο μέγεθος όγκων ή/και εξάπλωση του καρκίνου στους κοντινούς λεμφαδένες, πέρα από το όργανο στο οποίο αναπτύχθηκε αρχικά ή/και σε γειτονικά όργανα.
Stage IV	Ο καρκίνος έχει επεκταθεί σε γειτονικά όργανα.

Πίνακας 4: Τα 5 στάδια της ταξινόμησης των TNM συνδυασμών

Ένα άλλο σύστημα που χρησιμοποιείται από τις **NCI's Surveillance, Epidemiology, και το End Results Program (SEER)** είναι αυτό της συνοπτικής κατηγοριοποίησης. Αυτό το σύστημα χρησιμοποιείται για όλους τους τύπους καρκίνου και τους χωρίζει σε πέντε κύριες κατηγορίες:

- ➔ **In situ:** Τα μη ομαλά κύτταρα είναι παρόντα μόνο στο στρώμα των κυττάρων στο οποίο αναπτύχθηκαν.
- ➔ **Localized:** Ο καρκίνος περιορίζεται στο όργανο στο οποίο ξεκίνησε χωρίς στοιχεία εξάπλωσης.
- ➔ **Regional:** Ο καρκίνος έχει διαδοθεί εκτός από την αρχική περιοχή στους κοντινούς λεμφαδένες ή στα όργανα και στους ιστούς.
- ➔ **Distant:** Ο καρκίνος έχει διαδοθεί από την αρχική περιοχή στα απόμακρα όργανα ή στους απόμακρους λεμφαδένες.
- ➔ **Unknown:** Δεν υπάρχουν αρκετές πληροφορίες για να καθοριστεί το στάδιο.

6. ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ

6.1 ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΑΤΟΜΙΑ

Οι παρακάτω καρκινικές ασθένειες αποτελούν μικρό δείγμα των προκαρκινικών και καρκινικών νόσων που προσβάλλουν τον μαστό.

Λοβιακό καρκίνωμα in situ: Μολονότι η κατάσταση αυτή συνοδεύεται από τον χαρακτηρισμό «καρκίνωμα» στην πραγματικότητα αποτελεί έναν δείκτη για καρκίνο. Οι αλλοιώσεις στα κύτταρα των λοβίων υποδηλώνει ότι ο καρκίνος μπορεί να εκδηλωθεί στο μέλλον.

Πορογενές καρκίνωμα in situ (DCIS): Ενώ το λοβιακό καρκίνωμα in situ είναι δείκτης για μελλοντικό καρκίνο σε έναν από τους δύο μαστούς, το πορογενές καρκίνωμα in situ σημαίνει ότι ο καρκίνος αναπτύσσεται στο σημείο όπου εντοπίζονται τα καρκινικά κύτταρα. Αυτή η μορφή καρκίνου σπανίως εντοπιζόταν πριν από την εισαγωγή της μαστογραφίας ενώ - καθώς γίνεται πιο ακριβής η ανίχνευση - οι γιατροί αρχίζουν να βρίσκουν τέτοια καρκινώματα με ολοένα αυξανόμενη συχνότητα. Τα κύτταρα είναι μεν καρκινικά, αλλά είναι μη διηθητικά και απομονωμένα. Όταν κάποια στιγμή τα κύτταρα αυτά «ξυπνήσουν» και αρχίσουν να εξαπλώνονται, μετατρέπονται σε πορογενές διηθητικό καρκίνωμα.



Εικόνα 25: Από τα αδενικά λόβια (κόκκινα) που παράγουν το γάλα προέρχεται ο λοβιακός καρκίνος (μπλε) και από τους πόρους που μεταφέρουν το γάλα (πράσινο) ο πορογενής (μπλε) (Φύσσας Γ.).

Τα πορογενή καρκινώματα in situ έχουν εγείρει πολλές διαμάχες μεταξύ των ειδικών για το ποιος είναι ο καλύτερος τρόπος θεραπείας τους. Έως τις αρχές της δεκαετίας των '90, οι γιατροί εκτελούσαν μαστεκτομές για να τα αφαιρέσουν, αλλά μελέτες έδειξαν ότι οι απλές ογκοεκτομές σε συνδυασμό με μετεγχειρητική ακτινοθεραπεία είναι η καλύτερη θεραπεία.

Πορογενές διηθητικό καρκίνωμα (NOS): Αυτή η μορφή καρκίνου του μαστού αποτελεί το 80% έως 95% όλων των κρουσμάτων της νόσου. Με τον όρο «διηθητικό» οι γιατροί αναφέρονται στην εξάπλωση του καρκίνου από τον πόρο στον οποίο αρχικά εκδηλώθηκε προς τους σύστοιχους υγιείς ιστούς. Αυτό συνεπάγεται ότι ο όγκος μπορεί να έχει διηθήσει έναν ή περισσότερους από τους σύστοιχους λεμφαδένες. Έτσι, το πορογενές διηθητικό καρκίνωμα μπορεί να κυμαίνεται από καρκίνωμα σταδίου I (δεν υπάρχουν ενδείξεις

διηθήσεως στους σύστοιχους λεμφαδένες) έως καρκίνωμα σταδίου IV (πολλαπλοί προσβεβλημένοι λεμφαδένες και μεταστάσεις σε απομακρυσμένα σημεία του σώματος). Η θεραπεία φυσιολογικά συμπεριλαμβάνει εγχείρηση, ακτινοθεραπεία και χημειοθεραπεία.

Λοβιακό διηθητικό καρκίνωμα: Το καρκίνωμα αυτό αρχίζει στα λόβια και είναι λιγότερο συχνό απ' όσο τα πορογενή καρκινώματα. Η διαφορά μεταξύ των δύο μορφών είναι ότι τα λοβιακά συνήθως είναι πιο διάχυτα στον μαστό. Επιπλέον, όταν εντοπιστεί λοβιακό διηθητικό καρκίνωμα στον έναν μαστό, είναι πιθανόν να εκδηλωθεί ανάλογο καρκίνωμα και στον άλλο.

Φλεγμονώδης καρκίνος του μαστού: Αυτή είναι μια ακόμα πιο σπάνια μορφή καρκίνου του μαστού που εμφανίζεται σε ποσοστό 1 – 5% των περιπτώσεων. Συνήθως γίνεται αντιληπτή όταν αναπτύσσεται μια ερυθρότητα στο στήθος. Πρόκειται για μια ιδιαίτερα επιθετική μορφή καρκίνου.

Νόσος του Paget: Αυτή η μορφή καρκίνου του μαστού συνήθως γίνεται εμφανής στην περιοχή της θηλής του μαστού. Ένα αίσθημα κνησμού και η δημιουργία φολιδών είναι τα χαρακτηριστικά της γνωρίσματα, τα οποία μπορεί να εκληφθούν λανθασμένα ως έκζεμα. Η νόσος του Paget στον μαστό είναι πολύ σπάνια. Ο καρκίνος μπορεί να είναι περιορισμένος στην περιοχή της θηλής ή να είναι πιο εκτεταμένος μέσα στον μαστό - σε τέτοια περίπτωση μπορεί να σχετίζεται με ένα πορογενές καρκίνωμα το οποίο εξελίσσεται προς τα έξω. Η νόσος του Paget, όταν είναι περιορισμένη στην θηλή, έχει καλλίτερη πρόγνωση απ' ότι η πιο εκτεταμένη νόσος, καθώς όταν είναι περιορισμένη τείνει να μην είναι ιδιαίτερα επιθετική.

Φυλλοειδές κυστεοσάρκωμα: Αυτή είναι μια άλλη μορφή καρκίνου του μαστού, η οποία τείνει να είναι λιγότερο επιθετική, αν και ο όγκος που αναπτύσσεται είναι αρκετά μεγάλος. Το φυλλοειδές κυστεοσάρκωμα διαφέρει απ' όλες σχεδόν τις άλλες μορφές καρκίνου του μαστού, διότι δεν αναπτύσσεται στον επιθηλιακό ιστό και σπανίως δίνει μεταστάσεις.

6.2 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΓΙΑ ΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ

Νέα κρούσματα καρκίνου: Εκτιμάται ότι κατά τη διάρκεια του 2012 θα νοσήσουν από καρκίνο του στήθους στις Ηνωμένες Πολιτείες 226.870 γυναίκες και 2.190 άνδρες. Εξαιρώντας τους καρκίνους του δέρματος ο καρκίνος του στήθους είναι ο πιο συχνός καρκίνος που εμφανίζεται στις γυναίκες. Το ποσοστό του καρκίνου άρχισε να μειώνεται το 2000 μετά την κορύφωσή του που έφτασε τις 142 στις 100.000 γυναίκες το 1999. Η δραματική μείωση περίπου 7% από το 2002 ως το 2003 οφείλεται στη μείωση της χρήσης ορμονών για τη θεραπεία της εμμηνόπαυσης (menopausal hormone therapy MHT), έρευνα της οποίας τα αποτελέσματα δημοσιεύτηκαν από το Women's Health. Η μελέτη αυτή διαπίστωσε ότι ο συνδυασμός οιστρογόνου με προγεστερόνη MHT σχετιζόταν με την αύξηση του ρίσκου για την εμφάνιση καρκίνου του στήθους καθώς και με τις στεφανιαίες καρδιακές παθήσεις. Από το 2004 ως το 2008 τα ποσοστά για τον καρκίνο του μαστού είναι σταθερά.

Επιπλέον 63.300 γυναίκες μέσα στο 2012 θα νοσήσουν από in situ καρκίνο. Από αυτές τις περιπτώσεις σχεδόν το 85% θα ανήκει στην κατηγορία του πορογενούς καρκινώματος in situ (DCIS). Από το 2004 τα ποσοστά των in situ καρκίνων του μαστού παραμένουν σταθερά στις λευκές γυναίκες ενώ αυξάνονται στις Αφροαμερικανές κατά 2% κάθε χρόνο.

Θάνατοι: Εκτιμάται ότι οι θάνατοι από καρκίνο του μαστού το 2012 θα είναι περίπου 39.920 (39.510 γυναίκες και 410 άνδρες). Ο καρκίνος του μαστού ταξινομείται ως η δεύτερη αιτία θανάτου στις γυναίκες μετά τον καρκίνο του πνεύμονα. Τα ποσοστά θανάτου για τον καρκίνο του μαστού έχουν μειωθεί σταθερά στις γυναίκες από το 1990 με μεγαλύτερη μείωση στις νεώτερες γυναίκες. Από το 2004 ως το 2008 τα ποσοστά μειώθηκαν κατά 3.1% το χρόνο στις γυναίκες μικρότερες από 50 ετών και κατά 2.1% στις μεγαλύτερες από 50 ετών. Η μείωση στους θανάτους από καρκίνο του μαστού οφείλεται στην έγκαιρη διάγνωση, στις προηγμένες μεθόδους θεραπείας και πιθανόν στην μείωση των περιστατικών (Cancer Facts & Figures. 2010).

6.3 ΜΟΡΙΑΚΗ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΩΝ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ

Η μεγάλη πρόοδος, που έχει συντελεστεί τα τελευταία χρόνια στο πεδίο της γενετικής και μοριακής ιατρικής, έχει επιτρέψει τη γονιδιακή μελέτη του καρκίνου του μαστού και έχει προσφέρει στοιχεία για έναν εναλλακτικό τρόπο ταξινόμησης της νόσου, σε βιολογικά και κλινικά ευδιάκριτες ομάδες, με βάση πρότυπα γονιδιακής έκφρασης. Τα τελευταία έτη, προτείνεται η ταξινόμηση των καρκινωμάτων του μαστού σε αυλικού τύπου (luminal cell), βασικού τύπου (basal cell) και HER2 υπότυπου που χαρακτηρίζονται από ειδικό ανοσοφαινότυπο και συνδέονται με δεδομένη πρόγνωση και ανταπόκριση στις θεραπείες.

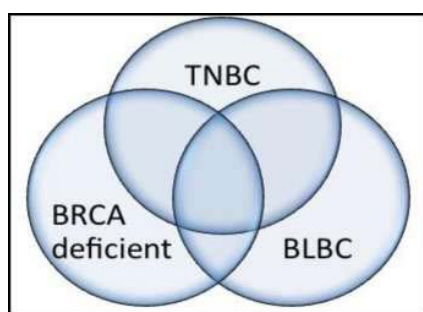
α) Αυλικού τύπου καρκινώματα του μαστού: Εκφράζουν θετικά τους ορμονικούς υποδοχείς και έχουν μορφές έκφρασης παρόμοιες με αυτές των αυλικών επιθηλιακών κυττάρων του μαστού. Λιγότεροι από 20% των αυλικών όγκων έχουν μετάλλαξη στο TP53 και βαθμό διαφοροποίησης 1. Στην ομάδα αυτή περιλαμβάνονται δύο υπότυποι, τα αυλικά Α και τα αυλικά Β καρκινώματα του μαστού. Τα αυλικά Α εμφανίζουν γενικά εντονότερη έκφραση των ER γονιδίων και μικρότερη έκφραση των γονιδίων του κυτταρικού πολλαπλασιασμού απ' ό,τι τα αυλικά Β.

β) Βασικού τύπου καρκινώματα του μαστού: Στην πλειονότητά τους οι όγκοι αυτοί έχουν τριπλό αρνητικό φαινότυπο (απουσία ER, PR, HER2). Ιστολογικά είναι διηθητικά καρκινώματα των πόρων του μαστού χωρίς ειδικούς χαρακτήρες (86%) με υψηλό βαθμό κακοήθειας. Επιπλέον, δεν υπάρχει ακόμη καθολικά αποδεκτός ορισμός για τα βασικού τύπου καρκινώματα και ο χαρακτηρισμός τους προκύπτει από τη μελέτη ενός συνδυασμού δεικτών. Αν και ανήκουν στην κατηγορία των σποραδικών καρκινωμάτων, εντούτοις μοιράζονται κοινά χαρακτηριστικά με τον κληρονομικό καρκίνο, που σχετίζεται με μεταλλάξεις του γονιδίου BRCA1. Παρόλο που δεν έχουν βρεθεί σωματικές μεταλλάξεις του BRCA1 στα καρκινώματα βασικού τύπου, φαίνεται πως κάποιες επιγενετικές αλλαγές (π.χ. μεθυλίωση του υποκινητή του γονιδίου BRCA1) επάγουν την παρεκκλίνουσα, από τη φυσιολογική, λειτουργία του μονοπατιού που ρυθμίζεται από το BRCA1, δίνοντας γένεση σε καρκινώματα με βασικό φαινότυπο.

γ) HER2 υπότυπος: Περιλαμβάνονται τα θετικά στο HER2 καρκινώματα τα οποία εμφανίζουν αρνητικούς ορμονικούς υποδοχείς. Είναι συνήθως βαθμού κακοήθειας 3 και εμφανίζουν υψηλή αναλογία μετάλλαξης του TP53 (40-80%). Στην πλειονότητά τους είναι όγκοι χαμηλής διαφοροποίησης με μεγάλο μέγεθος που εμφανίζουν απομακρυσμένες μεταστάσεις και μεταστάσεις στους λεμφαδένες σε διπλάσιο ποσοστό απ' ό,τι τα αυλικά καρκινώματα.

6.3.1 Ο τριπλός αρνητικός καρκίνος του μαστού

Ο τριπλά αρνητικός καρκίνος μαστού (triple negative breast cancer, TNBC) χαρακτηρίζεται από την απουσία οιστρογονικών υποδοχέων (estrogen receptors, ER), υποδοχέων προγεστερόνης (progesterone receptors, PR) και έκφρασης του HER2. Αν και ο TNBC δεν είναι η πλέον συχνή μορφή καρκίνου του μαστού στις γυναίκες (15-20%), χαρακτηρίζεται από φτωχή πρόγνωση, ευθύνεται για δυσανάλογα πολλές περιπτώσεις μεταστατικής νόσου και θανάτου. Ο όρος TNBC συσχετίζεται με το βασικού τύπου καρκίνωμα του μαστού (basal-like breast cancer, BLBC), αν και αποτελεί ξεχωριστή οντότητα από τον τελευταίο. Παράλληλα, πρόσφατες μελέτες έχουν αναδείξει συσχέτιση μεταξύ γυναικών με καρκίνο του μαστού που παρουσιάζουν μεταλλάξεις στο γονίδιο BRCA και του TNBC. Το BRCA εμπλέκεται στους μηχανισμούς επισκευής του DNA, με αποτέλεσμα ασθενείς με μετάλλαξη στο γονίδιο να εμφανίζουν μεγαλύτερη προδιάθεση εμφάνισης καρκίνου. Η πλειοψηφία των TNBC εμφανίζεται σε γυναίκες με μεταλλάξεις στο BRCA και σε ποσοστό 80-90% γυναικών με BLBC



Εικόνα 26: Διάγραμμα που απεικονίζει την επικάλυψη μεταξύ του TNBC, του BLBC και των γυναικών με καρκίνο του μαστού που παρουσιάζουν μεταλλάξεις στο γονίδιο BRCA (ΦΥΣΣΑΣ, Γ., Είδη Καρκίνου του μαστού).

6.4 ΚΑΤΗΓΟΡΙΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΚΑΡΚΙΝΩΝ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΜΙΚΡΟΣΥΣΤΟΙΧΙΩΝ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ

6.4.1 Έρευνα της Αμερικανικής Οργάνωσης Κλινικής Χημείας

Οι μελέτες μικροσυστοιχιών έχουν προσδιορίσει τους διαφορετικούς μοριακούς υπότυπους του καρκίνου του μαστού. Για τη μετάβαση αυτών των ταξινομήσεων πραγματοποιήθηκε στο κλινικό εργαστήριο της Αμερικανικής Οργάνωσης Κλινικής Χημείας το 2007, σε πραγματικό χρόνο δοκιμή με τη μέθοδο της ποσοτικής αντίστροφης μεταγραφής (qRT)-PCR (**Real Time quantitative Reverse Transcription PCR**) σε δείγματα ιστών που ήταν νωπά-παγωμένα (Fresh-Frozen), ή σε ιστούς μέσα στη φορμόλη που είχαν ενσωματωμένη παραφίνη. (**F**ormalin-**F**ixed, **P**araffin-**E**mbedded, FFPE). Χρησιμοποιήθηκαν δεδομένα από μικροσυστοιχίες συνολικά από 124 δείγματα στήθους ώστε να γίνει ταξινόμηση των όγκων σε 4 καθορισμένους μοριακούς υποτύπους: τα καρκινώματα μαστού αυλικού τύπου, τύπου φυσιολογικού μαστού, HER2 και βασικού τύπου.

Τα δεδομένα χρησιμοποιήθηκαν σε 2 διαφορετικούς αλγόριθμους βασισμένους στο κέντρο βάρους ώστε να ταξινομηθούν 35 όγκοι μαστού (35 δείγματα FF και 35 FFPE) Οι δύο αλγόριθμοι ήταν ο PAM (prediction analysis of microarray) ο οποίος μπορεί να ταξινομήσει τα δείγματα με τόση ακρίβεια όπως οι στατιστικές προσεγγίσεις τα τεχνητά νευρωνικά δίκτυα και ο SSP (single sample predictor). Τα δείγματα ταξινομήθηκαν

βάσει του μεγάλου και του ελαχιστοποιημένου συνόλου γονιδίων. Χρησιμοποιήθηκε το ελαχιστοποιημένο σύνολο γονιδίων σε δοκιμή πραγματικού χρόνου qRT-PCR ώστε να προκύψει κάποιος υπότυπος από τα δείγματα FF και FFPE ιστών. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι δύο αλγόριθμοι ήταν σε πλήρη συμφωνία για την ταξινόμηση των FFPE ιστών με τη χρήση της μεθόδου qRT-PCR και του ελαχιστοποιημένου εγγενούς γονιδιακού συνόλου. Υπήρξε συμφωνία 94% (33 από τα 35) μεταξύ των διαγνωστικών αλγορίθμων κατά τη σύγκριση της ταξινόμησης του FF ιστού με τη χρήση των μικροσυστοιχιών (μεγάλο και ελαχιστοποιημένο γονιδιακό σύνολο) και της μεθόδου qRT-PCR. Διαπιστώθηκε ότι η αναλογία της διαγώνιου SD (standard deviation=τυπική απόκλιση) στη δυναμική περιοχή ήταν η καλύτερη μέθοδος σε μια βάση gene-by-gene επομένως οι αλγόριθμοι που χρησιμοποιήθηκαν θεωρούνται ισχυροί ταξινομητές των υποτύπων του καρκίνου του στήθους (Mullins, Perreard et al. 2007).

6.4.2 Ανακάλυψη της υποκατηγορίας Claudin-low

Ο **Herschkowitz et al. (2007)** σχεδίασε τα πρότυπα έκφρασης των καρκίνων του μαστού στις γυναίκες και τα σύγκρινε με τους όγκους που προήλθαν από ποικίλα πρότυπα καρκίνου του μαστού από ποντίκια. Κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας, ανακαλύφθηκε ένας νέος, σπάνιος, και ενδεχομένως επικίνδυνος υπότυπος. Αυτός ο νέος υπότυπος χαρακτηρίστηκε από τη χαμηλή έκφραση των γονιδίων που περιλαμβάνονται στις στεγανές συνδέσεις και στην προσκόλληση δύο κυττάρων (Herschkowitz et al., 2007). Η υποκατηγορία ονομάζεται **Claudin-low** επειδή ανάμεσα στην ομάδα γονιδίων χαμηλής έκφρασης ανιχνεύθηκαν αρκετά μέλη της οικογένειας Claudin. Ο υπότυπος αυτός μπορεί να θεωρηθεί και τριπλός αρνητικός καρκίνος αφού χαρακτηρίζεται από την απουσία ER, PR και έκφρασης του HER2.

Οι **πρωτεΐνες Claudin** διαμορφώνουν τις μεσοκυττάριας στεγανές συνδέσεις μεταξύ των κυττάρων, οι οποίες ελέγχουν την παρακυτταρική ροή των μορίων. Οι ελαττωματικές στεγανές συνδέσεις μπορούν να προκαλέσουν τον αφύσικο πολλαπλασιασμό των κυττάρων και μπορούν να αυξήσουν την πιθανότητα μετάστασης του καρκίνου. Εντούτοις, ο claudin-low υπότυπος προσδιορίστηκε μόνο στο 6% των μικροσυστοιχιών που χρησιμοποιήθηκαν στην έρευνα (Herschkowitz, 2007).

Προκειμένου να επιβεβαιωθεί ο υπότυπος claudin-low και να ανακαλύψουν ενδεχομένως περισσότερους όγκους που καταδεικνύουν τον υπότυπο αυτό, αναλύθηκε ένα μεγαλύτερο σύνολο στοιχείων χρησιμοποιώντας μια παρόμοια προσέγγιση. Χρησιμοποιήθηκαν δεδομένα από μικροσυστοιχίες όγκων στήθους από την καθολική βάση δεδομένων έκφρασης γονιδίων **NCBI** τα οποία και αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας τις διάφορες τεχνικές ανάλυσης δεδομένων. Οι μικροσυστοιχίες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τύπου Affymetrix. Πρόκειται για έναν τύπο μικροσυστοιχίας ενός χρώματος που δημιουργείται σε ένα βιοτσιπ το οποίο κατασκευάζεται με τη μέθοδο της φωτολιθογραφίας. Τα cDNAs που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτά τα βιοτσιπ είναι ολιγονουκλεοτίδια 25 βάσεων που τακτοποιούνται είτε σε αποτυχημένο είτε σε τέλειο συνδυασμό ζευγαριών (Freeman, 2005). Η διαφορά μεταξύ των τέλειων και των αποτυχημένων γονιδίων είναι στο 13^ο νουκλεοτίδιο. Ωστόσο έχει αποδειχθεί ότι η πληροφορία που κερδίζεται από τον αποτυχημένο συνδυασμό ζευγαριών είναι ελάχιστη. Οι μικροσυστοιχίες Affymetrix μετριοούνται χρησιμοποιώντας τα ομοεστιακά μικροσκόπια ανίχνευσης και έχουν πλέον αυτοματοποιηθεί. Με την αυτοματοποίηση αυτή υπάρχει λιγότερη ανάγκη για κανονικοποίηση, που μπορεί να διαστρέψει τα στοιχεία, ειδικά για τα χαμηλά επίπεδα σημάτων.

Η ταξινόμηση που εφαρμόστηκε για τον ορισμό του υπότυπου Claudin-low, έχει τροποποιηθεί από την αρχική η οποία είχε δημιουργηθεί από τον **Michael Eisen του πανεπιστημίου Stanford**. Η συγκεκριμένη cluster

3.0 είναι σε θέση να τρέχει διάφορους αλγόριθμους σε δύο διαστάσεων σύνολα δεδομένων. Οι αλγόριθμοι είναι οι **hierarchical, k-means, self-organizing maps, and principal component analysis** (Hoon, 2002). Ωστόσο στην συγκεκριμένη αναφορά χρησιμοποιήθηκε μόνο ο ιεραρχικός αλγόριθμος ταξινόμησης. Το αποτέλεσμα του αρχικού ιεραρχικού αλγόριθμου ταξινόμησης βάσει των διαφορετικών προτύπων έκφρασης που προέκυψαν ήταν η **ανακάλυψη 9 υποτύπων**. Επιπλέον, ανακαλύφθηκε μια ιδιαίτερα συσχετισμένη ομάδα μικροσυστοιχιών που προήλθαν από ένα σύνολο κυττάρων (MDA-MB-231) που προήλθε αρχικά από την πλευρική διάχυση μιας ασθενούς με καρκίνο του μαστού, και χρησιμοποιήθηκε ευρέως στην έρευνα του καρκίνου του μαστού ως τεχνητό πρότυπο κυτταροκαλλιέργειας για τον ιδιαίτερα επιθετικό και εξαπλωτικό καρκίνο του μαστού. Επειδή αυτές οι κυτταρικές σειρές παρουσιάζουν παρόμοιο πρότυπο έκφρασης με τους claudin-low όγκους, χρησιμοποιήσαμε τα προφίλ τους για την έκφραση των όγκων Claudin-low. Οι μικροσυστοιχίες για αυτές τις κυτταρικές σειρές ομαδοποιήθηκαν και χαρακτηρίστηκαν ως συστάδα 1 και έπειτα τα υπόλοιπα δείγματα συγκρίθηκαν με το κέντρο της συστάδας αυτής με επίβλεψη και χωρίς επίβλεψη.

Τα τελικά αποτελέσματα ήταν η ανακάλυψη δύο μικροσυστοιχιών που ήταν παρόμοιες με τις κυτταρικές σειρές, και 12 μικροσυστοιχιών που βρέθηκαν να είναι παρόμοιες με τις κυτταρικές σειρές σε κάποια μόνο σημεία, αλλά ταυτόχρονα να διαφέρουν πολύ από τους χαρακτηριστικούς όγκους Claudin-Low.

Ουσιαστικά η μελέτη αυτή βοήθησε στην προκαταρκτική ταξινόμηση των εννέα συστάδων που προέκυψαν. Η συστάδα 1 δημιουργήθηκε χρησιμοποιώντας μικροσυστοιχίες δεδομένων από κυτταρικές σειρές Minp. Το κέντρο της συστάδας 1 χρησιμοποιήθηκε ως σημείο σύγκρισης στην προσπάθεια να βρεθούν μικροσυστοιχίες όγκων που παρουσιάζουν παρόμοιες εκφράσεις με αυτές του όγκου Claudin-Low. Οι συστάδες 2 και 3 καταδεικνύουν την επάνω από τη μέση έκφραση των κερατινών, οι οποίες αναμένεται να είναι αυξορυθμιζόμενες στους βασικούς όγκους ενώ σε άλλες ομάδες γονιδίων έχουν διαφορετικά επίπεδα έκφρασης.

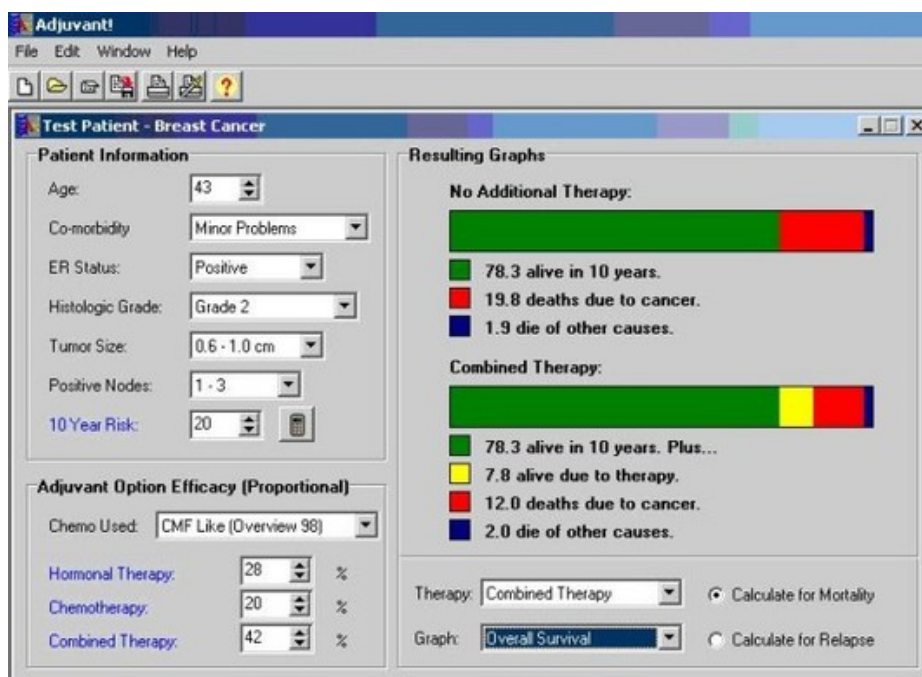
Η συστάδα 4 παρουσιάζει έκφραση του HER2 πάνω από τη μέση. Οι συστάδες 5 και 6 από τις εκφρασμένες κερατίνες του αυλού. Η συστάδα 7 δεν έδειξε κανένα προσδιορισμένο γονίδιο ούτε υπερ ούτε υπό εκφρασμένο. Οι συστάδες 8 και 9 εκθέτουν την κανονική έκφραση του ιστού του στήθους. Αυτά τα δείγματα θα μπορούσαν να έχουν προκύψει από όγκους που περιέχουν μισά κύτταρα από καρκίνο βασικού τύπου και μισά από κύτταρα καρκίνου του αυλού. Εναλλακτικά, το δείγμα θα μπορούσε να έχει ληφθεί εσφαλμένα, και μπορεί πραγματικά να περιέχει κανονικά κύτταρα από ιστό υγιούς στήθους και όχι από ιστό που έχει προσβληθεί από καρκίνο.

6.4.3 Έρευνα & αποτελέσματα από το Ολλανδικό Καρκινικό Ερευνητικό Κέντρο

Χρησιμοποιώντας την προσεγγιστική μέθοδο top-down οι ερευνητές από το Ολλανδικό Καρκινικό Ερευνητικό Κέντρο ανέπτυξαν μια γονιδιακή υπογραφή από επιλεγμένες αναδρομικές σειρές από 78 ασθενείς με μη διηθητικό καρκίνο του μαστού που δεν είχαν δεχτεί συστηματική βοηθητική θεραπεία.

Η δοκιμή αυτή, η οποία μετρά την έκφραση 70 γονιδίων και υπολογίζει ένα προγνωστικό αποτέλεσμα το οποίο κατηγοριοποιεί τους ασθενείς σε γκρουπ υψηλού και χαμηλού κινδύνου εγκρίθηκε από τον Οργανισμό Φαρμάκων και Τροφίμων (FDA) ώστε να βοηθήσει στην πρόγνωση του μη διηθητικού καρκίνου του μαστού σταδίου I ή II σε άτομα ηλικίας κάτω των 61 ετών και μέγεθος όγκου έως 5cm.

Οι Ολλανδοί ερευνητές έπειτα παρουσίασαν και μια μελέτη ώστε να επικυρώσουν τα αποτελέσματά τους, χρησιμοποιώντας αναδρομικά διαδοχικές σειρές όγκων του μαστού που συμπεριλάμβανε διηθητικούς και μη διηθητικούς καρκίνους. Σε αυτή τη δοκιμή οι 130 ασθενείς είχαν λάβει συστηματική βοηθητική χημειοθεραπεία ή ορμονική θεραπεία και 61 από αυτούς είχαν πάρει μέρος στην αρχική έρευνα. Για να μην επηρεαστούν τα αποτελέσματά τους οι Ολλανδικές έρευνες επιβεβαίωσαν μία δεύτερη πιο κατάλληλη μελέτη επικύρωσης που περιελάμβανε 307 ασθενείς που δεν είχαν λάβει συστηματική θεραπεία.



Εικόνα 27: Το λογισμικό Adjuvant! (Screenshot of the Adjuvant! software program)

Η παραπάνω γονιδιακή μελέτη συγκρίθηκε με το online πρόγραμμα **Adjuvant!**, το οποίο προσδιορίζει πόσο επικίνδυνη είναι η κάθε μορφή καρκίνου σύμφωνα με κάποια συμβατικά κριτήρια, όπως το μέγεθος των όγκων, της θέσης διήθησης, του βαθμού και της θέσης του ER γονιδίου, και έδειξε πως σε 87 ασθενείς από τους 307 (29%) τα αποτελέσματα δε συμφωνούσαν. Από τους 87 αυτούς ασθενείς οι 59 (68%) είχαν όγκους που χαρακτηρίστηκαν ως υψηλού κινδύνου σύμφωνα με τα συμβατικά κριτήρια αλλά χαμηλού κινδύνου σύμφωνα με τη γονιδιακή μελέτη. Επιπλέον 28 (32%) από τους 87 είχαν όγκους που εκτιμήθηκαν κλινικά ως χαμηλού κινδύνου αλλά ως υψηλού κινδύνου με βάση τη γονιδιακή τους μελέτη. Σε αυτές τις ασύμφωνες περιπτώσεις το γενομικό τεστ φάνηκε πως προβλέπει τα αποτελέσματα με μεγαλύτερη ακρίβεια. Οι ασθενείς με κλινικά χαμηλού κινδύνου όγκους που εκτιμήθηκαν ως υψηλού κινδύνου στη γενομική δοκιμή είχαν ένα γενικό ποσοστό επιβίωσης 69% στη διάρκεια μιας δεκαετίας, ενώ οι ασθενείς με κλινικά υψηλού κινδύνου όγκους αλλά στη γενομική δοκιμή χαμηλού κινδύνου το αντίστοιχο ποσοστό επιβίωσης ήταν 89% (Ishitobi, Goranova et al. 2010).

6.4.4 Η μοριακή δοκιμή Oncotype DX

Η **Oncotype DX** αποτελεί μια μοριακή δοκιμή, που έχει κατασκευαστεί από την Genomic Health, η οποία αναλύει το ρόλο του υποψήφιου γονιδίου στην έκβαση του αποτελέσματος. Ουσιαστικά μετρά την έκφραση

των ER, HER2 καθώς και των ER ρυθμισμένων μεταγραφών καθώς και αρκετά γονίδια που σχετίζονται με τον πολλαπλασιασμό με τη χρήση της μεθόδου RT-PCR.

Το **Oncotype DX** σύστημα συνδυάζει αυτά τα αποτελέσματα σε ένα ποσοτικό «αποτέλεσμα επανάληψης» το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μια συνεχής μεταβλητή ώστε να υπολογιστεί η πιθανότητα επανάληψης σε 10 χρόνια ή να κατηγοριοποιήσει τους ασθενείς σε χαμηλού, μεσαίου και υψηλού κινδύνου κατηγορίες. Η σχέση μεταξύ του αποτελέσματος επανάληψης και της απόμακρης υποτροπής εξετάστηκε αναδρομικά σε 668 ασθενείς με ER θετικούς επικεντρωμένους καρκίνους που αντιμετωπίζονται με ταξιφαίνη και που έχουν εγγραφεί στο National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project (NSABP) B-14 κλινική δοκιμή. Τα ποσοστά επανάληψης για μια δεκαετία ήταν 7%, 14% και 30% για χαμηλού, μεσαίου και υψηλού κινδύνου κατηγορίες αντίστοιχα.

Παρόμοια αποτελέσματα βρέθηκαν σε ένα κοινοτικό επίπεδο πληθυσμού ασθενών. Η δοκιμή **Oncotype DX** προσδιορίζει τους όγκους που είναι πιθανό να αποκριθούν στη βοηθητική χημειοθεραπεία. Η συσχέτιση του αποτελέσματος της επανάληψης με το όφελος από τη βοηθητική χημειοθεραπεία εξετάστηκε σε 651 ασθενείς που ήταν εγγεγραμμένοι στο NSABP B-20 τυχαία κλινική δοκιμή. Υψηλότερα αποτελέσματα επανάληψης συνδέθηκαν με μεγαλύτερο όφελος από τη βοηθητική χημειοθεραπεία και αυστηρότερα τα χαμηλότερα αποτελέσματα (Weigelt, Baehner et al. 2010) επανάληψης συνδέθηκαν με την έλλειψη χημειοθεραπείας. Παρόμοια αποτελέσματα παρουσιάστηκαν στην ανάλυση μια υποομάδας του Southeast Oncology Group (SWOG) Intergroup 0100 δοκιμή μιας τυχαίας μελέτης με ή χωρίς anthracycline-based χημειοθεραπεία σε γυναίκες στην μετεμμηνόπαυση με επικεντρωμένο ER +καρκίνο του στήθους.(Weigelt, Baehner et al. 2010)

6.4.5 Πρότυπο μοντέλο πρόβλεψης του καρκίνου του μαστού GENIUS

Πα' όλο που η κατηγοριοποίηση του καρκίνου του μαστού άλλαξε τον τρόπο με τον οποίο οι γιατροί αντιλαμβάνονται την ασθένεια αυτή, είναι δύσκολο να χρησιμοποιηθούν οι αρχικές μικροσυστοιχίες σαν πρότυπα ταξινόμησης στις κλινικές πρακτικές. Ο λόγος είναι πως τα πρότυπα αυτά αντιμετωπίζουν τα μειονεκτήματα της ιεραρχικής ταξινόμησης, όπως η αστάθεια και η δυσκολία στο να χρησιμοποιηθούν για την επεξεργασία νέων δεδομένων. Γι' αυτό πρόσφατα χρησιμοποιήθηκε ένα εναλλακτικό πρότυπο ικανό να προσδιορίζει διαφορετικούς μοριακούς υποτύπους και να πραγματοποιεί «ασαφή» κατηγοριοποίηση.

Για παράδειγμα, ο όγκος ενός ασθενούς μπορεί να ανήκει ταυτόχρονα σε περισσότερους από έναν μοριακούς υποτύπους διότι κλινικά μπορεί να συσχετίζεται με μοριακούς υποτύπους που εντοπίζονται σε αρκετές δημόσιες βάσεις δεδομένων που χρησιμοποιούν διαφορετικούς πληθυσμούς από ασθενείς με καρκίνο του μαστού αλλά και διαφορετικές τεχνολογίες μικροσυστοιχιών. Εντούτοις, παρατηρήθηκε ότι ένα σημαντικό ποσοστό των όγκων είναι αόριστο όσον αφορά την υποκατηγορία και πως ο φαινότυπός τους βρίσκεται μεταξύ διάφορων μοριακών υποκατηγοριών. Κατά την διάρκεια των τελευταίων χρόνων οι ερευνητές έχουν χρησιμοποιήσει την τεχνολογία της γονιδιακής έκφρασης για να δημιουργήσουν προγνωστικά χαρακτηριστικά. Με αυτόν τον τρόπο δίνουν έξτρα πληροφορίες στα κλινικοπαθολογικά κριτήρια και συνεπώς βοηθούν στο να εντοπιστούν ποιοι πραγματικά θα επωφεληθούν από τις θεραπείες. Σε μια πρόσφατη ανάλυση, σε κλινικά δεδομένα γονιδιακής έκφρασης, τα οποία συλλέχτηκαν από 3000 ασθενείς με καρκίνο του μαστού, διαπιστώθηκε πως στην πλειοψηφία τους τα προγνωστικά γονιδιακά χαρακτηριστικά (prognostic signatures) παρουσίασαν παρόμοια συμπεριφορά παρά την περιορισμένη επικάλυψη των γονιδίων. Επιπλέον πολύ σημαντική ήταν η χρήση των προγνωστικών υπογραφών στο να προσδιορίσουν κατά πόσο οι ασθενείς με καρκίνο ER+/HER2- είχαν υψηλό ή χαμηλό ρίσκο στο να υποτροπιάσουν. Ωστόσο για τον τριπλό αρνητικό καρκίνο (ER-/HER2-) και για τον HER2+ οι πληροφορίες που έδιναν δεν ήταν σαφείς.

Η πρωτότυπη ασαφής υπολογιστική προσέγγιση που χρησιμοποιήθηκε για την πρόβλεψη του καρκίνου του μαστού οδήγησε στη δημιουργία ενός ριψοκίνδυνου προτύπου πρόβλεψης τριών βημάτων το οποίο ονομάστηκε **GENIUS** (Gene Expression progNostic Index Using Subtypes). Βασικά, το πρώτο βήμα που πραγματοποιήθηκε ήταν ο ασαφής προσδιορισμός του υποτύπου, καθορίζοντας την πιθανότητα να ανήκει ο ασθενής με καρκίνο του μαστού σε έναν από τους παρακάτω μοριακούς υποτύπους (ER-/HER2-, HER2+ and ER+/HER2-). Το δεύτερο βήμα περιελάμβανε τον προσδιορισμό των προγνωστικών γονιδίων μέσω μιας επιλεκτικής διαδικασίας που λάμβανε υπ' όψιν τις πιθανότητες που έχει ο ασθενής να ανήκει σε διάφορους μοριακούς υποτύπους. Το τρίτο βήμα περιελάμβανε τις πιθανότητες να ανήκει ο ασθενής σε διαφορετικούς υποτύπους σε συνδυασμό με τον αντίστοιχο χαρακτηριστικό υπότυπο πρόβλεψης με σκοπό να διαμορφωθεί ένα τελικό GENIUS σκορ πρόβλεψης.

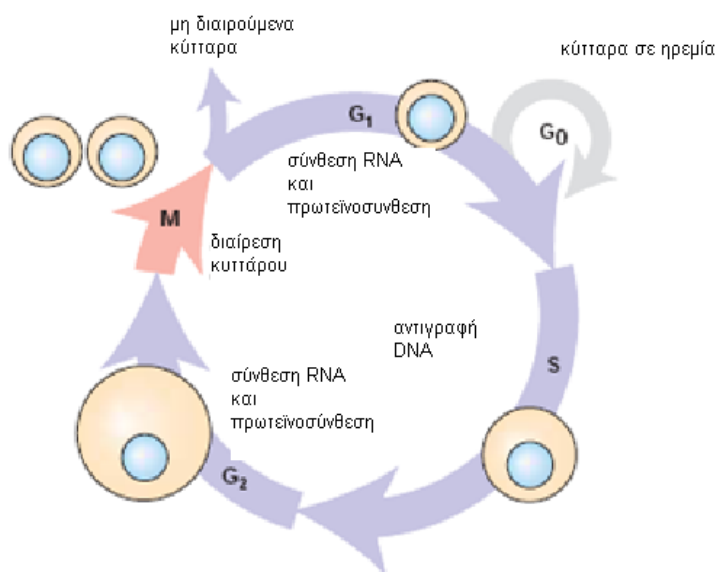
Αποδείχτηκε ότι η προσέγγιση GENIUS είχε υψηλά ποσοστά πρόβλεψης στον ολικό πληθυσμό και στους υποτύπους του καρκίνου του μαστού και στην περίπτωση που θεωρήσαμε την προσέγγιση ως συνεχή αλλά και ως δυαδική μεταβλητή. Η GENIUS μπόρεσε να προσδιορίσει μια σημαντική αναλογία ασθενών με χαμηλό ρίσκο μέσα σε υψηλού ρίσκο καρκινικούς υποτύπους. Ωστόσο αν και η GENIUS επικυρώθηκε με ένα μεγάλο σύνολο δεδομένων, συμμετείχαν 745 ασθενείς, απαιτείται και κλινική δοκιμή όπως η MINDACT, ώστε να αξιολογηθεί κατάλληλα το όφελος από τη χρήση της GENIUS προσέγγισης. (Haibe-Kains, Desmedt et al. 2010)

7. ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ

7.1 ΓΕΝΙΚΑ

Η λευχαιμία εμφανίζεται όταν το σώμα αρχίζει να συσσωρεύει εμφανώς μη φυσιολογικά λευκά αιμοσφαίρια. Τα «ανώμαλα» αυτά λευχαιμικά κύτταρα, επειδή δεν μπορούν να ωριμάσουν κανονικά, συσσωρεύονται στο μυελό των οστών. Τελικά όλα τα φυσιολογικά λευκά και ερυθρά αιμοσφαίρια και αιμοπετάλια εξωθούνται ή δεν αντικαθίστανται. Ο υγιής μυελός των οστών αντικαθίσταται από τα ανώριμα κύτταρα που εισέρχονται τελικά στο αίμα και μεταφέρονται σ' όλο το σώμα. Έτσι, ενώ ο αριθμός ανώριμων κυττάρων στο αίμα αυξάνεται, ο αριθμός φυσιολογικών ερυθρών και λευκών αιμοσφαιρίων και αιμοπεταλίων μειώνεται.

Οι λευχαιμίες και τα λεμφώματα αποτελούν παραδείγματα ελαττωματικής διαφοροποίησης που οδηγεί σε ανάπτυξη κακοήθων όγκων. Δεδομένου ότι όλοι οι διαφορετικοί τύποι κυττάρων αίματος προέρχονται από ένα κοινό αρχέγονο κύτταρο στο μυελό των οστών, οι απόγονοι αυτών των κυττάρων δημιουργούν τις διάφορες λεμφικές σειρές κυττάρων, με τη δέσμευση τους σε συγκεκριμένες διαδικασίες διαφοροποίησης. Τα κύτταρα κάθε τύπου υποβάλλονται σε διαφορετικούς κύκλους διαίρεσης καθώς διαφοροποιούνται, αλλά μόλις διαφοροποιηθούν πλήρως, η κυτταρική διαίρεση παύει.



Εικόνα 28: Κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης, τα ευκαρυωτικά κύτταρα συνεχώς περνούν από τις 4 φάσεις του κυτταρικού κύκλου, δημιουργώντας νέα θυγατρικά κύτταρα (Lodish, Darnell et al. 2003).

Αντίθετα, τα λευχαιμικά κύτταρα ή τα κύτταρα λεμφωμάτων αποτυγχάνουν να υποβληθούν στην τελική διαφοροποίηση. Αντί αυτού, σταματούν στα πρώτα στάδια της ωρίμανσης, και διατηρούν την ικανότητά τους για πολλαπλασιασμό, συνεχίζουν να αναπαράγονται και συσσωρεύονται. Έτσι, με την πάροδο του χρόνου, αυτά τα κύτταρα εισέρχονται στην κυκλοφορία του αίματος και διαδίδονται σε άλλα όργανα, όπου μπορούν να αποτρέπουν άλλα κύτταρα του σώματος από τη φυσιολογική τους λειτουργία. Οποιοδήποτε αιμοποιητικό κύτταρο ή λεμφοκύτταρο από το μυελό των οστών μπορεί να μετατραπεί σε λευχαιμικό κύτταρο.

Κάθε ένα από αυτά τα κύτταρα έχει τη λειτουργία του, διαφέρει μορφολογικά από τα άλλα και έχει μια διάρκεια ζωής χαρακτηριστική για εκείνο τον ιδιαίτερο τύπο κυττάρων. Στους υγιείς ανθρώπους η καταστροφή και η παραγωγή των λεμφοκυττάρων είναι ισορροπημένες και, επομένως, ο αριθμός κυττάρων που υπάρχουν στο αίμα σε μια συγκεκριμένη χρονική στιγμή είναι σχετικά σταθερός. Σε ένα υγιές άτομο, μόνο τα ώριμα ενήλικα κύτταρα βρίσκονται στο περιφερειακό αίμα, ενώ σε πολλές ασθένειες, μπορεί να υπάρχουν ανώριμες και μη φυσιολογικές μορφές των κυττάρων.

Κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης και της ωρίμανσης των αιματοποιητικών αρχέγονων κυττάρων, τα κύτταρα υφίστανται αξιοσημείωτες αλλαγές στη δομή, το μέγεθος και τη μορφή τους. Η μετάβαση από το ένα στάδιο στο άλλο δεν εμφανίζεται να έχει σαφή όρια, αλλά η έκφραση διαφορετικών μορίων στην επιφάνεια των κυττάρων επιτρέπει τη διάκριση των διαφορετικών προδρόμων σταδίων. Επιπλέον, οι μεταβολικές οδοί, το κυτταροπλασματικό περιεχόμενο και η δομή χρωματίνης του πυρήνα διαφέρουν μεταξύ των διαφορετικών σταδίων και εξαρτώνται από τη οικογένεια στην οποία ανήκουν.

Η αιμοποίηση ελέγχεται στενά από πολυάριθμες κυτταροκίνες και αυξητικούς παράγοντες. Στις αιματολογικές κακοήθειες τα πρωτεύοντα και δευτερεύοντα όργανα της αιμοποίησης (περιοχές της εξωμυελικής αιμοποίησης) μπορούν να δεισδυθούν από τα κακοήθη κύτταρα, με συνέπεια την απώλεια της αιμοποιητικής τους δυνατότητας.

Η διαφοροποίηση των αιματοποιητικών κυττάρων σε μια συγκεκριμένη κατηγορία καθορίζεται σε μεγάλο βαθμό από ειδικούς αιμοποιητικούς παράγοντες αύξησης και των κυτταρικών τους υποδοχέων. Μόλις αυτοί οι αιμοποιητικοί αυξητικοί παράγοντες προσδεθούν στους υποδοχείς τους, η ιδιαιτερότητα τους επιτυγχάνεται με την ενεργοποίηση συγκεκριμένων ενδοκυτταρικών σημάτων.

Αυτό επιτρέπει μόνο έναν περιορισμένο αριθμό κυττάρων που βρίσκεται σε ένα συγκεκριμένο στάδιο διαφοροποίησης, να ανταποκριθεί στον αυξητικό παράγοντα στον κυτταρικό περιβάλλον. Ο έλεγχος της αιμοποίησης απαιτεί και αυστηρούς κανονισμούς για τον περιορισμό του πολλαπλασιασμού τους. Η μίτωση μπορεί να περιοριστεί από διάφορους ανασταλτικούς παράγοντες, όπως ο μετασχηματισμένος παράγοντας αύξησης -/3 (TGF- β 3) (Κεχαγιόγλου 2011).

7.2 ΤΥΠΟΙ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑΣ

Οι τέσσερις συνήθεις τύποι λευχαιμίας είναι:

- **Οξεία Λεμφοβλαστική Λευχαιμία** (*Acute Lymphoblastic Leukaemia* - **ALL**). Αντίστοιχα υπάρχουν δύο τύποι λευχαιμίας **B & T (B-ALL και T-ALL)**
- **Χρόνια Λεμφοβλαστική Λευχαιμία** (*Chronic Lymphoblastic Leukaemia* - **CLL**)
- **Οξεία Μυελοειδής Λευχαιμία** (*Acute Myeloid Leukaemia* - **AML**)
- **Χρόνια Μυελοειδής Λευχαιμία** (*Chronic Myeloid Leukaemia* - **CML**)

Άλλες μορφές λευχαιμίας και αιματολογικές ασθένειες:

- Οξεία Προμυελοκυτταρική Λευχαιμία - *Acute Promyelocytic Leukemia*.
- Τριχωτή Κυτταρική Λευχαιμία - *Hairy cell leukemia (HCL)*.
- *Ataxia Telangiectasia (AT)*.
- Ασθένεια Χότσκιν - *Hodgkin Disease (HD)*.
- Ασθένεια Non-Hodgkin Λέμφωμα - *Non-Hodgkin Lymphoma (NHL)*.

- Μυέλωμα - Myeloma (MS).
- Μυελοδυσπλασία - Myelodysplasia(MDS).

Ο πρώτος παράγοντας που εξετάζεται για την ταξινόμηση της λευχαιμίας ενός ασθενή είναι εάν τα περισσότερα από τα ανώμαλα κύτταρα είναι ώριμα (μοιάζουν με κανονικά λευκά αιμοσφαίρια) ή ανώριμα (μοιάζουν περισσότερο με αρχέγονα κύτταρα).

Στην **οξεία λευχαιμία** (Acute leukaemia), τα κύτταρα του μυελού των οστών δεν μπορούν να ωριμάσουν κατάλληλα. Τα ανώριμα κύτταρα λευχαιμίας συνεχίζουν να αναπαράγονται και να αναπτύσσονται. Μερικοί τύποι οξείων λευχαιμιών αποκρίνονται καλά στην θεραπεία, και πολλοί ασθενείς μπορούν να θεραπευτούν. Άλλοι τύποι οξείων λευχαιμιών έχουν μια λιγότερο ευνοϊκή προοπτική.

Στην **χρόνια λευχαιμία** (Chronic leukaemia), τα κύτταρα μπορούν να ωριμάσουν εν μέρει αλλά όχι εντελώς. Αυτά τα κύτταρα δεν είναι πραγματικά κανονικά. Γενικά δεν αντιμετωπίζουν τη μόλυνση τόσο καλά όσο τα κανονικά λευκά αιμοσφαίρια. Και, φυσικά, επιζούν περισσότερο, αναπτύσσονται, και υπερνικούν τα κανονικά κύτταρα. Οι χρόνιες λευχαιμίες εξελίσσονται με το πέρασμα του χρόνου, και οι περισσότεροι ασθενείς μπορούν να ζήσουν για πολλά έτη. Ωστόσο, είναι γενικά πιο δύσκολο να θεραπευτούν από τις οξείες.

Οι λευχαιμίες είναι είτε **μυελοειδείς** είτε **λεμφοειδείς**. Έτσι όταν η λευχαιμία προσβάλλει τα κύτταρα, που πρόκειται να σχηματίσουν τελικά αιμοπετάλια, ερυθρά αιμοσφαίρια, κοκκιοκύτταρα και μονοκύτταρα, αποκαλείται μυελοειδής (myeloid), μυελοκυτταρική (myelocytic), μυελογενής (myelogenous), ή κοκκιοκυτταρική (granulocytic) λευχαιμία. Αντιθέτως όταν η λευχαιμία προσβάλλει τα κύτταρα που πρόκειται να γίνουν λεμφοκύτταρα αποκαλείται λεμφοβλαστική (lymphoblastic), λεμφοειδής (lymphoid), λεμφοκυτταρική (lymphocytic), ή λεμφική (lymphatic) λευχαιμία.

Η λευχαιμία σχετίζεται με τη μετάλλαξη ενός μονού γονιδίου (π.χ NPMc, FLT3-ITD, C/EBP) ή μια γονιδιακή συγχώνευση που προέρχεται από μια χρωμοσωμική μετατόπιση (π.χ BCR-ABL, AML1-ETO, X-RAR). Με τη χρήση των τεχνικών της ανάλυσης της γονιδιακής έκφρασης δίνεται η δυνατότητα να κατανοηθούν σε βάθος οι συνέπειες μιας ασθένειας συνολικά αλλά και σε κυτταρικό επίπεδο.

Η τεχνολογία μικροσυστοιχιών γονιδιακής έκφρασης έχει αρχίσει να χρησιμοποιείται ευρέως στην πρόγνωση και διάγνωση της AML αλλά και στον πλήρη προσδιορισμό της.

7.2.1 Ταξινόμηση της οξείας λεμφοβλαστικής λευχαιμίας

Η παθολογική εξέταση, η κυτταρογενετική (ιδιαίτερα η παρουσία του χρωμοσώματος της Φιλαδέλφειας) και η ανοσοφαινοτυποποίηση καθορίζουν εάν τα λεμφοβλαστικά λευχαιμικά κύτταρα ξεκίνησαν από B-λεμφοκύτταρα ή T-λεμφοκύτταρα. Το τεστ DNA μπορεί να πιστοποιήσει πόσο επιθετική είναι η ασθένεια, διαφορετικές μεταλλάξεις έχουν συνδεθεί με την σύντομη ή μακροχρόνια επιβίωση.

Η μορφολογική μελέτη των βλαστικών κυττάρων και η ταξινόμηση τους με μια από τις σήμερα χρησιμοποιούμενες ταξινομήσεις έχει ουσιαστική αξία, αφού σχετίζεται με την πρόγνωση και την εξέλιξη της νόσου.

7.2.1.1 Ταξινόμηση βάσει του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας

Η κατάταξη του WHO είναι περισσότερο κατατοπιστική με τις περισσότερες υποκατηγορίες βλαστικών κυττάρων. Σύμφωνα με την κατάταξη αυτή:

→ Οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία: Προηγούμενοι τύποι κατά FAB L1/L2.

- Οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία των προδρόμων Β κυττάρων.

Κυτταρογενετικές υποκατηγορίες:

- i) t(12;21)(p12,q22) TEL/AML-1
- ii) t(1;19)(q23;p13) PBX/E2A
- iii) t(9;22)(q34;q11) ABL/BCR
- iv) T(V,11)(V;q23) V/MLL

- Οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία των προδρόμων Τ κυττάρων.

→ Οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία: Προηγούμενοι τύποι κατά FAB L3.

→ Οξεία λευχαιμία Biphenootypic

Η κυτταρογενετική ανάλυση αποτελεί ανεξάρτητο προγνωστικό δείκτη, συμβάλλοντας στη διάγνωση και τυποποίηση της νόσου, στην επιλογή της θεραπείας και στον έλεγχο του θεραπευτικού αποτελέσματος. Ο προσδιορισμός των ειδικών, κλωνικών χρωμοσωματικών αλλοιώσεων συμβάλει στη διερεύνηση της παθογένεσης, στην ταυτοποίηση των γονιδίων που εμπλέκονται στη λευχαιμογένεση και στην ακριβή ταυτοποίηση ομάδων ασθενών υψηλού κινδύνου .

Κυτταρογενετική μετατόπιση	Μοριακή γενετική ανωμαλία
t(12;21)CRYPTIC	TEL-AML1 fusion
t(1;19)(q23;p13)	E2A-PBX (PBX1) fusion
t(9;22)(q34;q11)	BCR-ABL fusion(P185)
t(4;11)(q21;q23)	MLL-AF4 fusion
t(8;14)(q24;q32)	IGH-MYC fusion
t(11;14)(p13;q11)	TCR-RBTN2 fusion

Πίνακας 5: Κυτταρογενετικές μετατοπίσεις συνδέονται με συγκεκριμένες μοριακές γενετικές ανωμαλίες στην ALL (Stams, den Boer et al. 2005, McWhirter, Neuteboom et al. 1999).

Η κλασική κυτταρογενετική ανάλυση (καρυότυπος: απεικόνιση των χρωμοσωμάτων σε ζεύγη και κατά ελαττούμενο μέγεθος) αποτελεί την κύρια μέθοδο μελέτης της ύπαρξης χρωμοσωματικών ανωμαλιών (Moorman et al. 2007).

Μερικές κυτταρογενετικές υποκατηγορίες έχουν χειρότερη πρόγνωση από άλλες.

Αυτές περιλαμβάνουν:

- Μια μετατόπιση μεταξύ των χρωμοσωμάτων 9 και 22, γνωστή ως χρωμόσωμα της Φιλαδέλφειας, που εμφανίζεται σε περίπου 20% των ενηλίκων και 5% των παιδιατρικών περιπτώσεων της ALL.
- Μια μετατόπιση μεταξύ των χρωμοσωμάτων 4 και 11 που εμφανίζεται σε περίπου 4% των περιπτώσεων και είναι η πιο κοινή σε παιδιά μικρότερα των 12 μηνών.
- Δεν έχουν όλες οι περιπτώσεις μετατοπίσεων των χρωμοσωμάτων ανεπαρκή πρόγνωση. Μερικές μετατοπίσεις είναι σχετικά πιο ευνοϊκές. Για παράδειγμα, ο υπερδιπλοειδισμός (>50 χρωμοσώματα) είναι ένας καλός προγνωστικός παράγοντας.

Κυτταρογενετική αλλαγή	Κατηγορία επικινδυνότητας
Χρωμόσωμα Φιλαδέλφειας	Κακή πρόγνωση
t(4;11)(q21;q23)	Κακή πρόγνωση
t(8;14)(q24.1;q32)	Κακή πρόγνωση
Σύνθετος καρυότυπος (περισσότερες από 4 ανωμαλίες)	Κακή πρόγνωση
Χαμηλός Υπερδιπλοειδισμός ή σχεδόν τριπλοειδισμός	Κακή πρόγνωση
Υψηλός Υπερδιπλοειδισμός	Κακή πρόγνωση
απαλοιφή (9p)	Κακή πρόγνωση

Πίνακας 6: Σχέση της πρόγνωσης με την κυτταρογενετική αλλαγή που εμφανίζεται (Wikipedia 2012).

Πρόγνωση	Κυτταρογενετικά ευρήματα
Ευνοϊκή	Υπερδιπλοειδισμός > 50, t (12;21)
Ενδιάμεση	Υπερδιπλοειδισμός 47 -50, φυσιολογικά (διπλοειδής), del (6q), Αναδιάταξη του 8q24
Μη ευνοϊκή	Υποδιπλοειδισμός – σχεδόν απλοειδής, σχεδόν τετραπλοειδισμός, απαλοιφή (17p), t (9;22), t (11q23)

Πίνακας 7: Συσχετισμός της πρόγνωσης με τα κυτταρογενετικά ευρήματα στο μυελών των οστών στην οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία (Stams, den Boer et al. 2005)

Ορισμένοι παράγοντες που επηρεάζουν την πρόγνωση (πιθανότητα αποκατάστασης) και τη θεραπεία είναι οι:

- Η ηλικία και ο αριθμός των λευκών κυττάρων κατά τη διάγνωση.
- Πόσο γρήγορα και πόσο χαμηλά μειώνεται ο αριθμός των λευχαιμικών κυττάρων, μετά από την αρχική θεραπεία.
- Το φύλο και η φυλή.
- Εάν τα λευχαιμικά κύτταρα ξεκίνησαν από τα Β-λεμφοκύτταρα ή τα Τ-λεμφοκύτταρα.
- Εάν υπάρχουν ορισμένες αλλαγές στα χρωμοσώματα των λεμφοκυττάρων.

- Εάν η λευχαιμία έχει κάνει μετάσταση στον εγκέφαλο και στη σπονδυλική στήλη.
- Εάν το παιδί έχει σύνδρομο Down.

7.2.1.2 Ταξινόμηση βάσει του Γαλλο-Αμερικανο-Βρετανικού Συστήματος (FAB)

Το παλαιότερο αυτό σύστημα χωρίζει την **AML** σε 8 υποτύπους M0 έως M7, βασιζόμενο στον τύπο του κυττάρου από το οποίο αναπτύσσεται η λευχαιμία και στο στάδιο της ασθένειας. Αυτό γίνεται με την εξέταση της εμφάνισης των κακοθών κυττάρων κάτω από οπτικό μικροσκόπιο ή χρησιμοποιώντας κυτταρογενετική ώστε να προσδιοριστεί η πιθανή χρωμοσωμική ανωμαλία. Οι τύποι έχουν ποικίλες προγνώσεις και συμπεριφορές στη θεραπευτική αγωγή. Παρόλο που η κατηγοριοποίηση του WHO μπορεί να είναι πιο χρήσιμη, το παλαιότερο σύστημα χρησιμοποιείται ακόμα ευρέως.

Οι 8 τύποι του Γαλλο-Αμερικανο-Βρετανικού συστήματος:

Τύπος	Ονομασία	Κυτταρογενετική	Ποσοστό ενηλίκων ασθενών με AML
M0	ελάχιστα διαφοροποιημένη οξεία μυελογενής λευχαιμία		5%
M1	οξεία μυελογενής λευχαιμία χωρίς ωρίμανση		15%
M2	οξεία μυελογενής λευχαιμία με κοκκιοκυτταρική ωρίμανση	t(8;21)(q22;q22), t(6;9)	25%
M3	προμυελοκυτταρική ή οξεία προμυελοκυτταρική λευχαιμία (ΟΠΛ)	t(15;17)	10%
M4	οξεία μυελομονοκυτταρική λευχαιμία	inv(16)(p13q22), del(16q)	20%
M4eo	μυελομονοκυτταρική μαζί με ηωσινοφιλία του μυελού των οστών	inv(16), t(16;16)	5%
M5	οξεία μονοβλαστική λευχαιμία (M5a) ή οξεία μονοκυτταρική λευχαιμία (M5b)	del(11q), t(9;11), t(11;19)	10%
M6	οξεία ερυθροειδής λευχαιμία, που περιλαμβάνει την ερυθρολευχαιμία (M6a) και την πολύ σπάνια αμιγή ερυθροειδή λευχαιμία (M6b)		5%
M7	οξεία μεγακαρυωκυτταροβλαστική λευχαιμία	t(1;22)	5%
M8	οξεία βασεοφιλική λευχαιμία		Ασυνήθεις

Πίνακας 8: Οι AML υπότυποι του Γαλλο-Αμερικανο-Βρετανικού συστήματος (Wikipedia 2012)

7.3 Η ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΜΙΚΡΟΣΥΣΤΟΙΧΙΩΝ ΣΤΗΝ ΠΡΟΓΝΩΣΗ & ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΗΣ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑΣ

7.3.1 Οξεία Μυελοειδής Λευχαιμία (AML) & νέες υποκατηγορίες

Η οξεία μυελοειδής λευχαιμία προσβάλλει τη μυελοειδή κατηγορία κυττάρων. Η μυελοειδής οικογένεια αποτελείται από τέσσερις τύπους αιμοσφαιρίων:

- **Κοκκιοκύτταρα**
- **Μονοκύτταρα**
- **Ερυθρά αιμοσφαίρια**
- **Αιμοπετάλια**

Σ' αυτό τον τύπο λευχαιμίας προσβάλλονται κυρίως τα κοκκιοκύτταρα. Τα μυελοειδή κύτταρα κυκλοφορούν στο αίμα. Η εργασία τους είναι να ψάχνουν για λοιμώδεις εισβολείς στο αίμα και στο γύρω ιστό. Τα κοκκιοκύτταρα αντιδρούν γρήγορα σ' όλους τους τύπους εισβολέων ενώ τα λεμφοειδή κύτταρα χρειάζονται περισσότερο χρόνο να αντιδράσουν και ο ρόλος τους στην καταπολέμηση της λοίμωξης είναι πιο ειδικευμένος. Όταν τα μονοκύτταρα της μυελοειδούς οικογένειας ανακαλύπτουν εισβολείς, τους «τρώνε» ή τους απορροφούν και τους καταστρέφουν. Η AML εμφανίζεται όταν υπάρχει έλλειψη ώριμων μυελοειδών κυττάρων λόγω συσσώρευσης ανώριμων ή «βρεφικών» μυελοειδών κυττάρων. Όταν συσσωρεύονται πάρα πολλά νεαρά μυελοειδή κύτταρα στο αίμα μπορούν να προκαλέσουν αποφράξεις των αιμοφόρων αγγείων. Αυτός ο τύπος λευχαιμίας μπορεί να εμφανιστεί σε παιδιά και εφήβους αλλά προσβάλλει συνήθως ενήλικες.

Ο προσδιορισμός **των νέων υποκατηγοριών AML** έχει πραγματοποιηθεί με τη χρήση της τεχνολογίας των μικροσυστοιχιών. Η ομάδα του Bullinger(2004) χρησιμοποίησε cDNA μικροσυστοιχίες για να προσδιορίσει τη γονιδιακή έκφραση στο αίμα και στο μυελό των οστών μελετώντας δείγματα από 116 ασθενείς με AML συμπεριλαμβανομένων 45 ασθενών με φυσιολογικούς καρυότυπους AML.

Αρχικά εφαρμόστηκε η **ιεραρχική συσταδοποίηση** χωρίς επίβλεψη στα αποτελέσματα ενός τεστ που συμμετείχαν 59 ασθενείς με αποτέλεσμα να ληφθεί ένα σύνολο από μοριακές υποομάδες με ευκρινείς υπογραφές γονιδιακής έκφρασης και να δημιουργηθεί ένας αλγόριθμος επιβλεπόμενης εκμάθησης. Αυτός ο αλγόριθμος απέσπασε πληροφορίες από ένα σύνολο 133 γονιδίων-δεικτών που εντοπίστηκαν στους υπόλοιπους 57 ασθενείς ώστε να προγνωσθεί η συνολική επιβίωση σε αυτό το σύνολο. Οι δείκτες γονιδιακής έκφρασης αποτέλεσαν έναν δυνατό ανεξάρτητο προγνωστικό παράγοντα στην ανάλυση πολλών μεταβλητών.(Bullinger et al. 2004)

Σε **μια δεύτερη έρευνα** που διεξήχθη από την **ομάδα του Valk** (2004) καθορίστηκαν τα προφίλ της γονιδιακής έκφρασης σε δείγματα από αίμα ή μυελό των οστών από 285 ασθενείς με **AML**. Προσδιορίστηκαν δεκαέξι σύνολα ασθενών με ξεχωριστές μοριακές υπογραφές με τη μέθοδο συσταδοποίησης χωρίς επίβλεψη. Η συσταδοποίηση οδηγήθηκε κυρίως από χρωμοσωμικές ανωμαλίες, [π.χ t(8; 21), inv(16), t(15;17), 11q23, -7q)], γενετικές μεταλλάξεις (π.χ FLT3ITD, FLT3TKD, N-RAS, K-RAS, CEBPA), ανώμαλες ογκογονιδιακές εκφράσεις(EVI1).Πρόέκυψαν νέες υποκατηγορίες AML που περιείχαν δείγματα με φυσιολογικό καρυότυπο και επιπλέον μια νέα συστάδα με ευκρινή γονιδιακή έκφραση που συνδέεται με «φτωχικά» αποτελέσματα (Valk et al. 2004).Αυτή η συστάδα περιείχε μια ετερογενή ομάδα δειγμάτων με γνωστούς δείκτες χαμηλού κινδύνου. Οι ερευνητές πρότειναν ότι η ομάδα αυτή μπορεί να παρουσιάσει ένα ακόμα άγνωστο βιοχημικό μονοπάτι που

οδηγεί σε μια φτωχική πρόγνωση και μπορεί να έχει παρόμοια κυτταρική «υπογραφή» με εκείνη των αιμοποιητικών αρχέγονων κυττάρων (Valk et al. 2004).

Μία τρίτη ομάδα προσπάθησε να επικυρώσει με διαφορετικό τρόπο τα αποτελέσματα της ομάδας Bullinger(2004). Παρ' όλο που η ομάδα χρησιμοποίησε μια διαφορετική πλατφόρμα μικροσυστοιχίας το αποτέλεσμα ήταν να επιβεβαιώσουν και οι ίδιοι την προγνωστική χρησιμότητα της γονιδιακής έκφρασης που εντόπισε η ομάδα του Bullinger et al. (2004) (Radmacher et al.2006).

Κατά συνέπεια η τεχνολογία των μικροσυστοιχιών μπορεί να αποδειχθεί ένα σημαντικό εργαλείο για να γίνει υποκατηγοριοποίηση της ασθένειας, να βοηθήσει στην έγκαιρη πρόγνωση και να επιτρέψει την θεραπεία μεμονωμένων ασθενών.

7.3.3 Πανεπιστημιακό Ιατρικό Κέντρο Erasmus, Ολλανδία

Τα τελευταία χρόνια οι DNA μικροσυστοιχίες μαζί με τη διαθεσιμότητα της πλήρης νουκλεοτιδικής ακολουθίας του ανθρώπινου γονιδιώματος έχει κεντρίσει την έρευνα για τον εντοπισμό των ανωμαλιών στον καρκίνο και συγκεκριμένα της **AML** λευχαιμίας.

Τα εργαλεία αυτά επιτρέπουν την αξιολόγηση των ανωμαλιών και των παραλλαγών σε μία ευρεία γονιδιακή βάση καλύπτοντας διάφορα μοριακά επίπεδα. Το προφίλ της γονιδιακής έκφρασης **GEP**(gene expression profile) είναι μία από αυτές τις **τεχνολογίες** στην οποία οι cDNA ή οι ολιγονουκλεοτιδικοί ανιχνευτές των DNA μικροσυστοιχιών χρησιμοποιούνται ταυτόχρονα τα επίπεδα πολλών διαφορετικών mRNA-μεταγραφών.

Σε μία πρώτη μελέτη το 1999 ο **Golub** και οι συνεργάτες του μπόρεσαν να χρησιμοποιήσουν τη μέθοδο **GEP** ώστε να ξεχωρίσουν το λευχαιμικό τύπο **AML** από τον **ALL**. Η έρευνα τους πρότεινε 3 σημαντικές εφαρμογές της τεχνολογίας **GEP: ανακάλυψη κατηγορίας , πρόβλεψη και σύγκριση**.

Η **ανακάλυψη κατηγορίας** αναφέρεται στον προσδιορισμό νέων υποομάδων ενώ η πρόβλεψη κατηγορίας αναφέρεται στη χρήση των δεδομένων γονιδιακής έκφρασης ώστε να προβλέψει τις ήδη καθορισμένες υποομάδες. Αυτές λοιπόν οι δύο εφαρμογές έχουν διαγνωστικές επιπτώσεις. Η τρίτη προτεινόμενη εφαρμογή αναφέρεται στον προσδιορισμό των γονιδίων που απαριθμούνται σε ορισμένες υποομάδες.

Το αντικείμενο της έρευνας που πραγματοποιείται τα τελευταία χρόνια είναι για το αν η μέθοδος **GEP** μπορεί να ανακαλύψει νέους υποτύπους της **AML**. Σε πολλές από αυτές διακρίθηκαν νέοι υπότυποι. Σε μια ομάδα 166 περιπτώσεων με AML ανακαλύφθηκαν 2 υπότυποι με φυσιολογικούς καρυότυπους με διακριτά προφίλ έκφρασης που σχετίζονται με τους εξής γνωστούς παράγοντες: internal tandem duplications (ITDs), FLT3, FAB-M4 και M5 παράγοντες μονοκυτταρικής λευχαιμίας. Σε μία άλλη ομάδα με 285 AML αναγνωρίστηκαν 16 υπότυποι αρκετοί από τους οποίους στερήθηκαν τους προηγούμενους παράγοντες.

Μια **διαφορετική μελέτη** με 170 περιπτώσεις **AML** που αφορούσε κυρίως ηλικιωμένους ασθενείς οι οποίοι τα κυτταρογενετικά χαρακτηριστικά γνωρίσματα εντόπισε 6 υποομάδες από τις οποίες μερικές εμφανίστηκαν για πρώτη φορά.

Σε μία από τις παραπάνω μελέτες η τεχνολογία **GEP** αποκάλυψε την **ετερογένεια της AML**. Ωστόσο καθώς οι αλγόριθμοι συσταδοποίησης επικεντρώνονται στις ομοιότητες μεταξύ των διαφόρων περιπτώσεων διαπιστώθηκε μια νέα ομάδα λευχαιμίας AML που δεν παρουσιάζει βιολογική ή κλινική σημασία. Τελικά τα στοιχεία παρουσίασαν την ανίχνευση ενός διακριτού υποτύπου γονιδιακής έκφρασης που οδήγησε σε μια

βιολογικά και κλινικά σημαντική υποκατηγορία λευχαιμίας που χαρακτηρίζεται από την κατασίγαση του επιγενετικού μεταγραφικού παράγοντα CEBPA και ενός ανώριμου μυελοειδούς/T λεμφικού φαινότυπου. Αυτά τα συμπεράσματα θα μπορούσαν να επιβεβαιωθούν και σε μία ανεξάρτητη ομάδα ανθρώπων με AML.

7.3.4 Έρευνες για τις υποκατηγορίες της Οξείας Προμυελοκυτταρικής Λευχαιμίας (APL)

Πολλές μελέτες έχουν αναφερθεί στην οξεία προμυελοκυτταρική λευχαιμία (APL) (Acute Promyelocytic Leukemia) της οποίας η κυτταρική υπογραφή σχετίζεται με την παρουσία της γονιδιακής συγχώνευσης PML-RARa και διαφέρει από τις εκφράσεις των λευχαιμιών τύπου AML. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το προφίλ της APL και μικροκοκκιδώδους παραλλαγής της (AMLM3 και M3v) που καταδεικνύει ότι υπάρχουν ευδιάκριτες διαφορές ανάμεσα σ' αυτές τις δύο μορφές προμυελοκυτταρικής λευχαιμίας (Haferlach et al.2005). Επιπλέον, ο FLT3-ITD (υποδοχέας της κυτοσίνης Fit3) σχετίζεται με 147 εμφανείς γονιδιακές αλλαγές έκφρασης στην APL λευχαιμία. Τα διαφορετικά εκφρασμένα γονίδια σχετίζονται με μονοπάτια που σχετίζονται με την κυττοσκελετική οργάνωση, την προσκόλληση των κυττάρων το διαχωρισμό, την πήξη, τη φλεγμονή τη διαφοροποίηση και τους μυελοειδείς κόκκους (Marasca et al.2006).

Η παρουσία ή η απουσία των FLT3 μεταλλάξεων μπορεί να βοηθήσει στην πρόγνωση των APL ασθενών. Παρ' όλο που έχουν εντοπιστεί πολλές μεταλλάξεις η πλειοψηφία αντιπροσωπεύει το 25% είναι οι ασθενείς ITDs(internal tandem duplications). Άλλες λιγότερο συχνές μεταλλάξεις σχετίζονται με την περιοχή που κωδικοποιεί το βρόγχο κωδικοποίησης και πιο συχνά επηρεάζουν τα κωδικόνια ασπαρτάμη 835 και την ισολευκίνη 836(D835)/I836). Αυτές οι μεταλλάξεις έχουν αναφερθεί σε περίπου 8% των ασθενών με AML (Gilliland and Griffi n, 2002; Kottaridis et al. 2003; Levis and Small, 2003; Stirewalt and Radich, 2003).

Μία μελέτη σε 203 ασθενείς με οξεία μυελοειδή λευχαιμία τύπου PML-RARa θετικό κατέδειξε ότι οι ασθενείς με FLT3 ITDs ή με μεταλλάξεις είχαν συσχετιστεί με φτωχικούς προγνωστικούς δείκτες ή οι βρόγχοι ενεργοποίησης της μετάλλαξης είχαν υψηλότερες αριθμήσεις λευκών αιμοσφαιρίων, συνήθως 10×10^9 cells/L ή περισσότερο(Gate et al.2005). Η ίδια μελέτη ανακάλυψε πως οι FLT3 ITDs σχετίζονται με τον υπότυπο M3v, το σημείο παύσης bcr3 PML και με τις εκφράσεις των αμοιβαίων μεταγραφών RARA-PML. Οι ασθενείς με μεταλλαγμένο FLT3 είχαν υψηλότερα ποσοστά θανάτου, αλλά δεν υπήρχε καμία ενδεικτική διαφορά σχετικά με την υποτροπή ή την επιβίωση τους κατά τη διάρκεια μιας 5 ετίας.

Η ανάλυση των μικροσυστοιχιών εμφάνισε διαφορές στις εκφράσεις των προφίλ των ασθενών με FLT3/ITD, D835/I836, καθώς και με τον επικίνδυνο τύπο FLT3 (Gate et al.2005). Το πόρισμα από τις μικροσυστοιχίες ήταν πως οι γονιδιακές εκφράσεις των δειγμάτων με τον επικίνδυνο τύπο FLT3 και τη μετάλλαξη είχαν αρκετές διαφορές και μπορούσαν τα δείγματα να χωριστούν σε δύο διαφορετικούς υποτύπους.

7.3.5 Αποτελέσματα του προγράμματος έρευνας MILE

Στην συγκεκριμένη αναφορά παρουσιάζονται αποτελέσματα από 3.334 ασθενείς, που αναλύθηκαν για μία διεθνή μελέτη που οργανώθηκε το 2005 από το European LeukemiaNet σε 11 εργαστήρια σε 3 ηπείρους (7 από το ELN, 3 από τις Ηνωμένες Πολιτείες και 1 στη Σιγκαπούρη). Σε συνεργασία με το ELN σχεδιάστηκε και το πρόγραμμα έρευνας, Microarray Innovations in Leukemia (MILE), που είχε ως σκοπό να αξιολογηθεί η

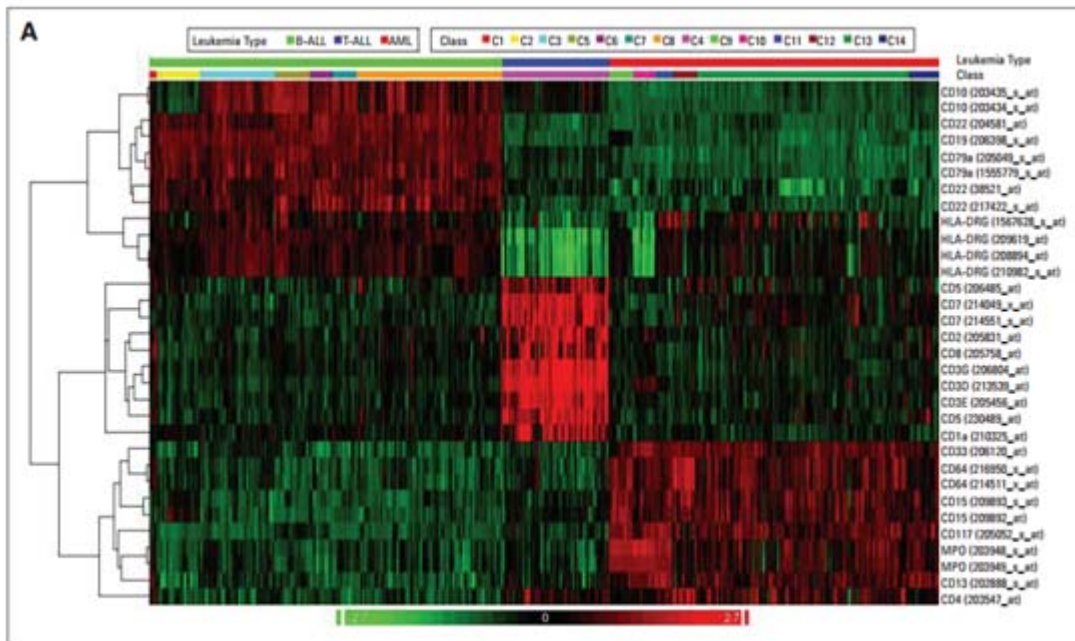
κλινική ακρίβεια των προφίλ γονιδιακής έκφρασης (συγκριτικά με την τρέχουσα στερεότυπη διαγνωστική διαδικασία) 16 υποτύπων οξείας και χρόνιας λευχαιμίας, συνδρόμων μυελοδυσπλασίας (MDSs) και ενός γκρουπ ελέγχου που ονομαζόταν «none of the target classes» που περιελάμβανε καλοήθεις δυσλειτουργίες και φυσιολογικό μυελό των οστών.

Κατά τη διάρκεια του σταδίου I, εκτελέστηκαν 2.143 αναλύσεις ολόκληρων γενομικών μικροσυστοιχιών. Κάθε κέντρο είχε εντοπίσει προηγουμένως δείγματα σαν κομμάτι από την καθημερινή διαγνωστική ρουτίνα εργασίας του χρησιμοποιώντας τις τοπικές καλύτερες διαγνωστικές του μεθόδους συμπεριλαμβανομένου της κυτταρομορφολογίας, της κυτταρογενετικής, και άλλων μοριακών γενετικών δοκιμών. Έπειτα κάθε δείγμα ορίστηκε βασισμένο σε αυτές τις προηγούμενες εκθέσεις διαγνωστικής δοκιμής σε μία από τις 18 κατηγορίες έρευνας του MILE (C1 έως C18) για ανάλυση με μικροσυστοιχίες. Επιλέχτηκαν 17 κατηγορίες οι οποίες αντιπροσώπευαν τις τυποποιημένες υποκατηγορίες της οξείας και της χρόνιας λευχαιμίας όπως και της μυελοδυσπλασίας. Η κατηγορία 18 περιλάμβανε τα υγιή δείγματα μυελού των οστών καθώς και τις συνθήκες της nonleukemia όπως αιμόλυση, μεγαλοβλαστική αναιμία, σιδηροπενική αναιμία ή ιδιοπαθή θρομβοπενική πορφύρα και θεωρήθηκε ως κατηγορία «none of the target classes».

Παρ' όλο τα αυστηρά κριτήρια ποιότητας 47 δείγματα (2.2%) έπρεπε να αποκλειστού ως αποτέλεσμα χαμηλής ποιότητας στην τεχνική των προφίλ της γονιδιακής έκφρασης. Τα υπόλοιπα 2.096 δείγματα δεν διανεμήθηκαν εξίσου μεταξύ των εργαστηρίων που συμμετείχαν αλλά ανάλογα με την πείρα του κάθε κέντρου.(π.χ το κέντρο 11 ανέλυσε τις CLL, ενώ το 7 ανέλυσε τις παιδιατρικές λευχαιμίες.

Για κάποιους συγκεκριμένους μη κοινούς υποτύπους αναλύθηκε μικρότερος αριθμός δειγμάτων όπως για την οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία B ώριμων κυττάρων με t(8;14)(C1) και AML με inv(16)/t(16;16)(C11). Όλες οι υπόλοιπες κατηγορίες συμπεριελάμβαναν περισσότερα από 30 δείγματα.(Από 36 έως 448 δείγματα).Για να γίνει διερεύνηση των στοιχείων αρχικά ιεραρχική ταξινόμηση με επίβλεψη ώστε να διαπιστωθεί εάν όντως οι συγκεκριμένες πρόκειται για κατηγορίες (classes) αποτελούσαν ευδιάκριτες υπογραφές γονιδιακής έκφρασης για τα 2.096 προφίλ γονιδιακής έκφρασης.

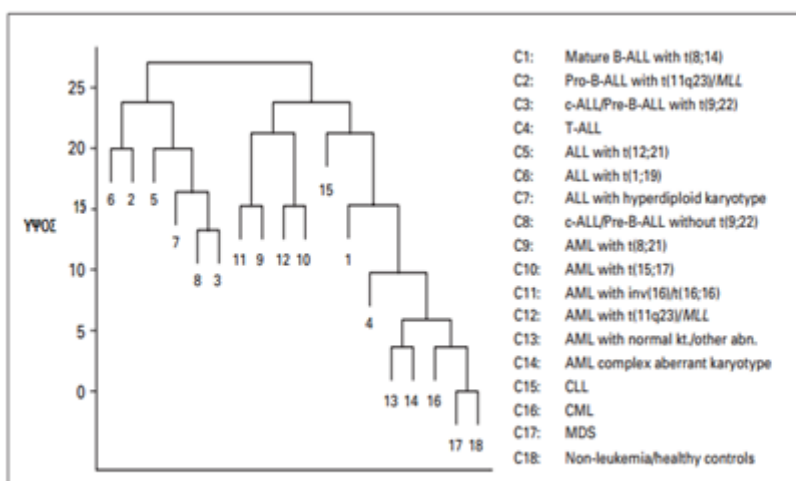
Όπως φαίνεται και στην παρακάτω εικόνα, παρατηρήθηκαν μεγάλες διαφορές για τις αντίστοιχες υπογραφές στις κατηγορίες C1 έως C18.



Εικόνα 29: Πραγματικοί ανοσοφαινότυποι για 1.292 δείγματα οξείας λευχαιμίας από το στάδιο I

Έπειτα εφαρμόστηκε μία μέθοδος, η οποία αναπτύχθηκε από τους Tibshirani και Hastie και εδραιώθηκε για την ταξινόμηση μεγάλων διαστάσεων δεδομένων από καρκινικές μικροσυστοιχίες. Αυτή η μέθοδος εκτός από την παραγωγή ενός τρόπου ταξινόμησης δίνει και ως αποτέλεσμα και γραφικές παραστάσεις οι οποίες ονομάζονται margin trees και δείχνουν τη συγγένεια των ασθενειών των διαφορετικών οντοτήτων.

Η παρακάτω εικόνα δείχνει ένα margin tree όπου διακρίνονται δύο κυρίαρχα κλαδιά, το ένα περιέχει κυρίως B-ALL κατηγορίες και το δεύτερο, που είναι και το μεγαλύτερο περιέχει τις μυελοειδείς και τις χρόνιες λευχαιμίες. Οι μυελοδυσπλασίες και τα nonleukemia δείγματα τοποθετήθηκαν και αυτά στο μεγάλο κλαδί του δέντρου.



Εικόνα 30: Εξερευνητική ανάλυση του Margin Tree. Η ταξινόμηση με Margin Tree είναι μία SVM μέθοδος ταξινόμησης με επίβλεψη

Οι σειρές 1292 δειγμάτων οξείας λευχαιμίας που συμμετείχαν στο στάδιο I αξιολογήθηκαν περαιτέρω ώστε να χρησιμοποιηθούν αργότερα ως εικονικοί ανοσοφαινότυποι. Για την οξεία λευχαιμία παρουσιάστηκαν 14 ευδιάκριτοι τύποι (C1 έως C14) σ' ένα θερμοκοίτη πίνακα γονιδίων που κωδικοποιούν 21 αντιγόνα που συνήθως χρησιμοποιούνται στη ροή της κυτταρομετρίας. Όσον αφορά στις 3 κλασικές κατηγορίες που σχετίζονται με τη λευχαιμία (B-κυττάρων, T-κυττάρων και μυελοειδών κυττάρων) παρατηρήθηκαν ευδιάκριτες κατηγορίες που βασίστηκαν στις υπογραφές της γονιδιακής έκφρασης των αντιγόνων που ανταποκρίθηκαν (Haferlach, Kohlmann et al. 2010).

7.3.5.1 Αλγόριθμος Εκπαίδευσης για Ανάλυση Ταξινόμησης της οξείας λευχαιμίας

Τα αποτελέσματα του σταδίου I ερευνήθηκαν έπειτα από την ανάπτυξη ενός αλγορίθμου πρόβλεψης που βασίζεται στην γραμμική διακριτή ταξινόμηση. Για να υπολογιστεί η απόδοση των κατηγοριών χρησιμοποιήθηκαν 30 διασταυρωμένες επικυρώσεις (cross-validations). Για κάθε πιθανό ζευγάρι συγκρίσεων μεταξύ των 18 ευδιάκριτων κατηγοριών επιλέγονταν τα 100 ανώτατα σύνολα ανιχνευτών με τις μεγαλύτερες απόλυτες τιμές. Η ένωση όλων αυτών των επιλεγμένων συνόλων χρησιμοποιήθηκε έπειτα για την επόμενη κατηγοριοποίηση όλων των ζευγαριών.

Η ακρίβεια του αλγορίθμου για τις 18 κατηγορίες ήταν 92.2%. Σε 7 από τις 18 κατηγορίες η συνταύτιση ήταν $\geq 94.6\%$. Ακόμη παρατηρήθηκε μία πρόβλεψη υψηλής ακριβείας με ποσοστό 100% για το γκρουπ της οξείας λευχαιμίας με συγκεκριμένες χρωμοσωμικές μεταλλάξεις. Μικρότερη ακρίβεια διαπιστώθηκε σε οντότητες με βιολογικές ετερογένειες μέσα στην ίδια κατηγορία (π.χ AML με σύνθετο παρεκκλίνον καρυότυπο). Αξιοσημείωτο είναι πάντως το γεγονός ότι όλες οι αναλυθείσες κατηγορίες παρουσίασαν ποσοστό μεγαλύτερο από 98.1% ως προς την ειδικότητα (specificity), καθώς και ότι οι 18 κατηγορίες εμφανίζονται με μέσο όρο ευαισθησίας 92.1% και 99.7%. Στο στάδιο II επικυρώθηκε η πιθανή κλινική χρησιμότητα των διαγνωστικών που βασίζονται στη χρήση των μικροσυστοιχιών. Σε αυτό το στάδιο συμμετείχαν ακόμη 1152 ασθενείς που αντιπροσώπευαν ένα ανεξάρτητο και άγνωστο σύνολο για τον αλγόριθμο ταξινόμησης που αναπτύχθηκε στο στάδιο I. Συνολικά, στο στάδιο II η παρατηρηθείσα ακρίβεια της πρόβλεψης και για τις 18 κατηγορίες πρόβλεψης ήταν 88.1%. Ωστόσο, η ακρίβεια αυξήθηκε σε 91.5% (και για τις 14 κατηγορίες) όταν έγινε επικέντρωση στην οξεία λευχαιμία (Haferlach, Kohlmann et al. 2010).

7.3.5 Διάγνωση ALL & AML χρησιμοποιώντας την τεχνολογία ανάσυρσης δεδομένων

7.3.5.1 Εισαγωγή

Στη μελέτη αυτή χρησιμοποιήθηκαν 72 δείγματα μυελού των οστών από ασθενείς με ALL και AML. Αρχικά αναλύθηκαν 38 δείγματα από τα οποία τα πρώτα 27 ήταν περιπτώσεις ALL λευχαιμίας και τα υπόλοιπα 11 AML. Επιπλέον τα 8 από τα 27 δείγματα ήταν ALL-B και τα υπόλοιπα 19 τύπου ALL-T. Τα άλλα 34 από τα 72 δείγματα της ανάλυσης ήταν 20 ALL και 14 AML. Τέλος, από τα ALL δείγματα τα 19 ήταν ALL-B και το ένα ήταν τύπου ALL-T. Κάθε δείγμα περιείχε 7129 γονιδιακές εκφράσεις τοποθετημένες σε μία DNA μικροσυστοιχία εκτύπωσης.

Τα δεδομένα μετατράπηκαν με τη βοήθεια του Matlab από ένα ενιαίο φάκελο δεδομένων(.dat) σε φάκελο με ξεχωριστές τιμές (.csv). Έπειτα, για περαιτέρω ανάλυση χρησιμοποιήθηκε ένα εργαλείο ανάλυσης δεδομένων που ονομάζεται Rapid miner. Κάθε αρχείο είχε τις ιδιότητες της κατηγορίας του και οι κατηγορίες ήταν τρεις:

- AML
- ALL-B κυττάρων
- ALL-T κυττάρων

Στο αρχικό σύνολο δεδομένων η ALL-B κυττάρων αντιπροσωπεύθηκε από την τιμή 1 & η AML από την τιμή 2. Η διεξαγωγή των αποτελεσμάτων στηρίχτηκε στη χρήση τριών αλγορίθμων ταξινόμησης των Naïve Bayesian, K Nearest Neighbors και SVM(Shahbaz, Faruq et al. 2012).

7.3.5.2 Αλγόριθμος ταξινόμησης Naïve Bayesian

Στον παρακάτω πίνακα η πρώτη στήλη αναπαριστά την προβλεφθείσα κατηγορία και οι επόμενες στήλες αναπαριστούν τον πραγματικό αριθμό περιστατικών σε κάθε κατηγορία. Για παράδειγμα η τιμή 37 δείχνει ότι υπήρχαν 37 δείγματα ALL-B κατηγορίας τα οποία ταξινομήθηκαν σωστά από τον αλγόριθμο Naïve Bayesian. Για την τιμή 4 που εμφανίζεται στον πίνακα σημαίνει πως 4 δείγματα δεν έχουν ταξινομηθεί σωστά. Η τιμή 0 δείχνει πως δεν υπάρχει κανένα δείγμα AML που να μην έχει ταξινομηθεί σωστά.

Για να δούμε τις σωστά κατηγοριοποιημένες περιπτώσεις πρέπει να παρατηρήσουμε τη μεσαία τιμή από τις τιμές της διαγωνίου (37,5,25). Σημαίνει δηλαδή ότι υπάρχουν 5 δείγματα που δεν κατηγοριοποιούνται σωστά και ουσιαστικά το 5 είναι το άθροισμα που προκύπτει από την τιμή 4 από τη 2^η σειρά και 3^η στήλη και η τιμή 1 από την 4^η σειρά και 2^η στήλη.

Η ακρίβεια του αλγορίθμου προκύπτει με την απλή μέθοδο ότι υπάρχουν συνολικά 72 δείγματα με ανακρίβεια σε 5 δείγματα άρα το ποσοστό ακριβείας είναι 95%. Η τελευταία στήλη στον πίνακα παρουσιάζει την ακρίβεια για κάθε προβλεφθείσα κατηγορία. Η ακρίβεια για την κατηγορία ALL είναι 90.24% για την ALL-T είναι 100% και για την AML είναι 96.15% με τη χρήση του αλγορίθμου ταξινόμησης Naïve Bayesian(Shahbaz, Faruq et al. 2012).

	Actual ALL-B	Actual ALL-T	Actual AML	Class Precision
Predicted ALL-B	37	4	0	90.24%
Predicted ALL-T	0	5	0	100 %
Predicted AML	1	0	25	96.15%

Πίνακας 9: Αποτελέσματα ταξινόμησης του αλγορίθμου Naïve Bayesian

7.3.5.3 Αλγόριθμος K Nearest Neighbor

Σύμφωνα με τον αλγόριθμο K Nearest Neighbor, υπάρχουν 38 περιπτώσεις όπως φαίνεται από τον πίνακα (2,2), που είναι ταξινομημένες σωστά.

Η τιμή 2 στη θέση (2,3) δηλώνει πως υπάρχουν 2 δείγματα που έχουν ταξινομηθεί λανθασμένα ως ALL-T. Η τιμή 5 στη θέση (2,4) δείχνει πως 5 δείγματα έχουν κατηγοριοποιηθεί λανθασμένα ως AML. Στην περίπτωση της ALL-T λευχαιμίας από την τιμή 7 στη διαγώνιο συμπεραίνουμε πως έχουν ταξινομηθεί σωστά 7 περιπτώσεις με τη χρήση του αλγορίθμου KNN καθώς και άλλες 20 περιπτώσεις AML.

Η ακρίβεια γι' αυτόν τον αλγόριθμο υπολογίζεται εάν λάβουμε υπ' όψη ότι από τα 72 δείγματα, τα 7 δεν είχαν κατηγοριοποιηθεί σωστά επομένως η ακρίβεια του αλγορίθμου είναι 90.72%. Επομένως, η ακρίβεια του συγκεκριμένου αλγορίθμου για την ALL-B είναι 84.44% για την ALL-T και για την AML είναι 100% (Shahbaz, Faruq et al. 2012).

	Actual ALL-B	Actual ALL-T	Actual AML	Class Precision
Predicted ALL-B	38	2	5	84.44 %
Predicted ALL-T	0	7	0	100 %
Predicted AML	0	0	20	100 %

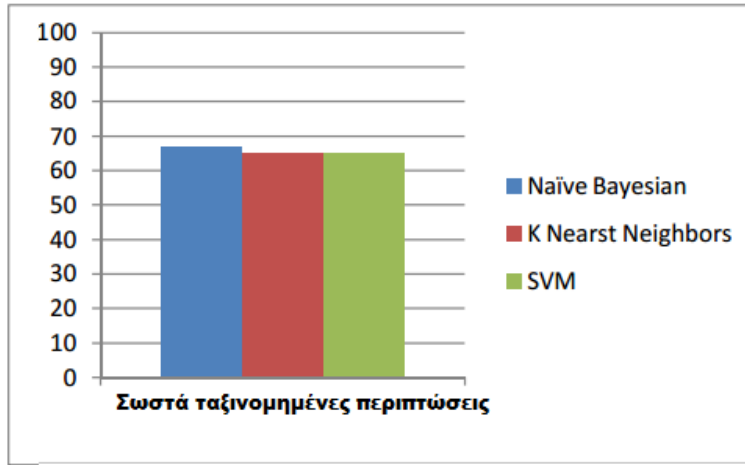
Πίνακας 10: Αποτελέσματα ταξινόμησης του αλγορίθμου K Nearest Neighbor

7.3.5.4 Αλγόριθμος SVM

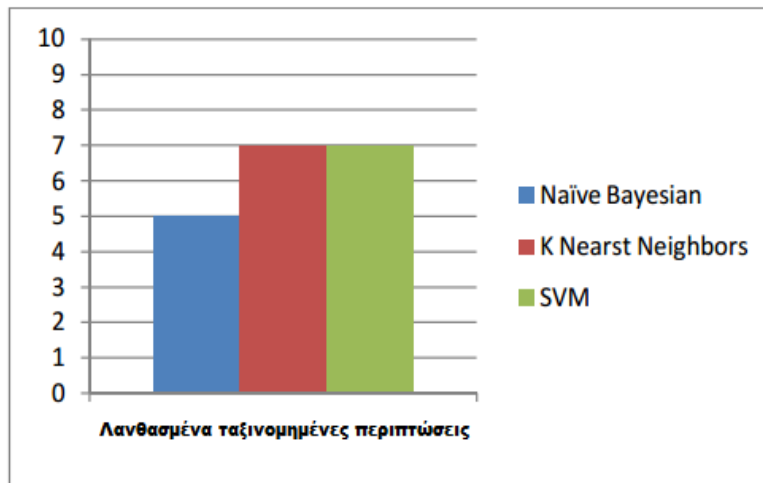
Για τον τελευταίο αλγόριθμο από τον πίνακα συμπεραίνουμε πως έχουμε 4 δείγματα τα οποία έχουν ταξινομηθεί λανθασμένα ως ALL-T και 3 δείγματα ως AML. Συνολικά είναι 7 τα δείγματα που δεν έχουν ταξινομηθεί σωστά από τον αλγόριθμο SVM. Η ακρίβεια σ' αυτή τη μέθοδο είναι 90.27%. Στην τελευταία στήλη φαίνεται πως η ακρίβεια για την κατηγορία ALL-B είναι 84.44% για την ALL-T είναι και για την AML είναι 100% (Shahbaz, Faruq et al. 2012).

	Actual ALL-B	Actual ALL-T	Actual AML	Class Precision
Predicted ALL-B	38	4	3	84.44 %
Predicted ALL-T	0	5	0	100 %
Predicted AML	0	0	22	100 %

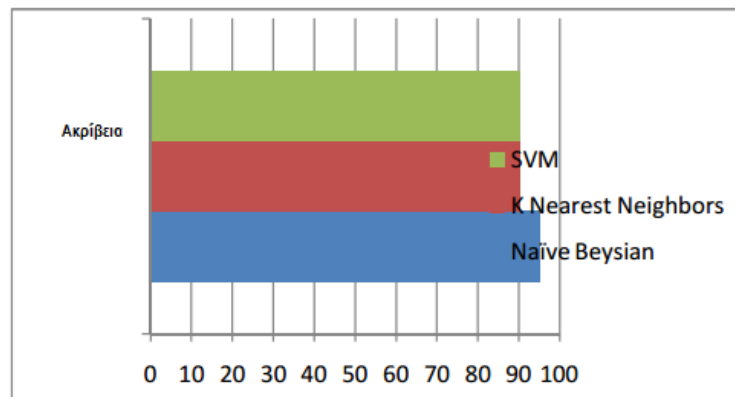
Πίνακας 11: Αποτελέσματα ταξινόμησης του αλγορίθμου SVM



Γραφική παράσταση 1: Σωστά ταξινομημένες περιπτώσεις για κάθε αλγόριθμο



Γραφική παράσταση 2: Λανθασμένα ταξινομημένες περιπτώσεις για κάθε αλγόριθμο



Γραφική παράσταση 3: Ακρίβεια για κάθε αλγόριθμο

8. ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ

8.1 ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΗ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ

Οι καρκίνοι του πνεύμονα προέρχονται από τον επιθηλιακό ιστό του κεντρικού και του περιφερειακού πνεύμονα αλλά αντιπροσωπεύει μάλλον μια ετερογενή συλλογή όγκων.

Υπάρχουν **τέσσερις** βασικοί τύποι καρκίνου του πνεύμονα: **ο μικροκυτταρικός καρκίνος(SCLC), το πλακώδες καρκίνωμα (SCC), το αδενοκαρκίνωμα (ADC) και ο μεγαλοκυτταρικός καρκίνος.**

Ο μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα αναφέρεται ως μια κατηγορία και οι άλλοι τρεις τύποι: το πλακώδες καρκίνωμα, το αδενοκαρκίνωμα και ο μεγαλοκυτταρικός καρκίνος αναφέρονται ως μη-μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα (NSCLC). Ο τύπος του καρκίνου του πνεύμονα καθορίζεται από την παρουσία των καρκινικών κυττάρων στην ιστολογική εξέταση (Knoyf 2005). Η πιο συχνή γενετική αλλαγή στον καρκίνο του πνεύμονα είναι η μετάλλαξη του ογκοκατασταλτικού γονιδίου p53.

Πειραματικά δεδομένα αποδεικνύουν ότι οι μεταλλάξεις αυτές συμβαίνουν στα αρχικά στάδια της καρκινογένεσης και η συχνότητά τους κυμαίνεται περί το 50% για τον μη μικροκυτταρικό και περί το 80% για τον μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα.

Η δεύτερη συχνότερη γενετική αλλαγή αφορά το ογκοκατασταλτικό γονίδιο του ρετινοβλαστώματος (Rb1), το οποίο βρίσκεται μεταλλαγμένο σε 80-90% των περιπτώσεων μικροκυτταρικού και σε 20-30% των περιπτώσεων του μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα.

Η τρίτη κατά σειρά συχνότητας γενετική αλλαγή που παρατηρείται στον καρκίνο του πνεύμονα είναι η απώλεια τμήματος του χρωμοσώματος 3 και παρατηρείται στο 80% των περιπτώσεων του καρκίνου του πνεύμονα, ανεξαρτήτως τύπου.

8.1.2 Μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα (SCLC)

Ο μικροκυτταρικός τύπος καρκίνου του πνεύμονα έχει άμεση σχέση με το κάπνισμα, βρίσκεται κατά κύριο λόγο σε άτομα που είναι βαρείς καπνιστές, αναπτύσσεται και διασπείρεται ταχέως και για το λόγο αυτό θεωρείται ότι δεν αντιμετωπίζεται με επέμβαση. Εντοπίζεται συχνότερα κεντρικά, χωρίς συνήθως ενδοβρογχική μάζα. Θεωρητικά έχει 20 κάνει μεταστάσεις την ώρα της διάγνωσης ακόμα και αν ο εργαστηριακός έλεγχος δεν έχει διαπιστώσει κάποια μετάσταση. Αυτός ο τύπος καρκίνου του πνεύμονα αποτελεί περίπου 20% με 25% όλων των περιπτώσεων. Ο τύπος αυτός ανταποκρίνεται πολύ καλά στη χημειοθεραπεία και την ακτινοθεραπεία(Μπανκουσλί 2008).

8.1.3 Πλακώδες καρκίνωμα

Αφορά κυρίως άνδρες, αποτελεί το 25% με 30% όλων των περιπτώσεων καρκίνου του πνεύμονα. Όταν προβάλλονται στο μικροσκόπιο, τα πλακώδη κύτταρα μοιάζουν με λέπια ψαριών. Αυτός ο τύπος καρκίνου του πνεύμονα αναπτύσσεται συνήθως σε μεγάλους βρόγχους, ενδοβρογχικά ή συνηθέστερα με ενδοπαραεγχυματική επέκταση και μπορεί να παραμείνει στο στήθος χωρίς εξάπλωση για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα από ό, τι άλλες μορφές καρκίνου. Συχνά εμφανίζει κεντρική νεκρωτική κοιλότητα.

8.1.4 Αδενοκαρκίνωμα

Αντιπροσωπεύει περίπου το 25% με 30% όλων των καρκίνων του πνεύμονα. Όταν προβάλλονται στο μικροσκόπιο, τα καρκινικά κύτταρα έχουν σχήμα κύβου ή κυλίνδρου. Αναπτύσσεται συνήθως κατά μήκος των εξωτερικών άκρων των πνευμόνων και κάτω από τον ιστό επένδυσης των βρόγχων. Αυτός είναι ο πιο κοινός τύπος καρκίνου του πνεύμονα. Οι μη καπνιστές που παθαίνουν καρκίνο του πνεύμονα σχεδόν πάντα αναπτύσσουν αδενοκαρκίνωμα. Υπάρχει ένας υπότυπος του αδενοκαρκινώματος που ονομάζεται βρογχοκυψελιδικός, ο οποίος τα τελευταία χρόνια εμφανίζει μεγάλη αύξηση.

8.1.5 Μεγαλοκυτταρικός καρκίνος

Αποτελούν περίπου το 10% με 20% του συνόλου των περιπτώσεων καρκίνου του πνεύμονα. Τα κύτταρα που δεν έχουν διαγνωστεί ως πλακώδη, αδενοκαρκινώματα ή SCLC, βρίσκονται σε αυτή την κατηγορία. Αυτοί οι τύποι καρκίνου βρίσκονται συνήθως στους μικρούς βρόγχους. Υπάρχουν 2 υποκατηγορίες των μεγαλοκυτταρικών καρκίνων του πνεύμονα: το γιγαντοκυτταρικό καρκίνωμα και το καρκίνωμα από διαυγή κύτταρα. Το γιγαντοκυτταρικό καρκίνωμα έχει μια ταχέως εξελισσόμενη πορεία και ένα πολύ μικρό ποσοστό επιβίωσης.

8.2 ΑΙΤΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ

8.2.1 Προδιαθεσικοί και αιτιολογικοί παράγοντες

Τουλάχιστον το 80% των καρκίνων παγκοσμίως δημιουργούνται από συνήθειες όπως κάπνισμα, αλκοόλ αλλά και από περιβαλλοντικά καρκινογόνα. Ωστόσο και ο τρόπος ζωής που επιλέγουμε αλλά και οι γενετικοί παράγοντες, παίζουν σημαντικό ρόλο για το αν στο μέλλον προσβληθούμε από την αρρώστια- μάστιγα. Οι καρκινογόνοι παράγοντες διακρίνονται στους ατομικούς, οι οποίοι μπορούν να αποφευχθούν διότι σχετίζονται με τις καθημερινές συνήθειες και τον τρόπο ζωής των ανθρώπων, στους περιβαλλοντικούς, στους οποίους εκτίθεται κάποιο άτομο χωρίς να το γνωρίζει, ή χωρίς να μπορεί να το αποφύγει και στους, μέχρι σήμερα, αναπόδεικτους.

8.2.1.1 Οικογενειακό ιστορικό

Το οικογενειακό ιστορικό υγείας επηρεάζει τις πιθανότητες που έχει ένα άτομο να νοσήσει από καρκίνο του πνεύμονα. Ο κίνδυνος για καρκίνο του πνεύμονα είναι υψηλότερος εάν οιγονείς ενός ατόμου, τα αδέρφια, ή τα παιδιά είχαν καρκίνο του πνεύμονα. Αυτός ο αυξημένος κίνδυνος θα μπορούσε να προέλθει από ένα ή περισσότερα πράγματα. Μπορεί να έχουν τις ίδιες συμπεριφορές, όπως το κάπνισμα. Μπορεί να ζουν στον ίδιο χώρο όπου υπάρχουν καρκινογόνες ουσίες όπως το ραδόνιο. Μπορεί επίσης να έχουν κληρονομήσει αυξημένο κίνδυνο στα γονίδια τους. Ο κίνδυνος είναι μεγαλύτερος για τις γυναίκες και μικρότερος για τους άνδρες και ισχυρότερος σε μη καπνιστές, από ότι σε καπνιστές. Φύλο και ηλικία Ο καρκίνος του πνεύμονα προσβάλλει τόσο τους άνδρες όσο και τις γυναίκες. Ενώ παλαιότερα ο καρκίνος του πνεύμονα ήταν ένα θλιβερό προνόμιο των ανδρών, σήμερα λόγω της δραματικής αύξησης της συχνότητας του καπνίσματος που

σημειώνεται στις γυναίκες, ο καρκίνος αυτός προσβάλλει ένα μεγάλο και συνεχώς αυξανόμενο αριθμό γυναικών. Ο κίνδυνος προσβολής από τον καρκίνο του πνεύμονα αυξάνεται με την πρόοδο της ηλικίας. Άτομα ηλικίας άνω των 70 ετών έχουν 300 φορές μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης της νόσου από άτομα ηλικίας μικρότερης των 30 ετών, ενώ η μέση ηλικία εμφάνισης είναι τα 60 έτη(Δοριάκη, Κόλλια 2010).

8.2.1.2 Φυλή και Εθνότητα

Διαφορετικές εθνοτικές ομάδες και φυλές έχουν πολύ διαφορετικά ποσοστά ανάπτυξης καρκίνου του πνεύμονα. Αυτό θα μπορούσε να είναι το αποτέλεσμα των βιολογικών και γενετικών διαφορών σε διαφορετικές εθνοτικές ομάδες, οι οποίες επηρεάζουν το πώς τα άτομα αντιδρούν στις τοξίνες, στα φάρμακα και στη θεραπεία. Σε μία μελέτη, οι Αμερικανοί, οι Ιάπωνες και οι Λατίνοι είχαν τις μισές πιθανότητες να αναπτύξουν καρκίνο του πνεύμονα από ότι οι Καυκάσιοι με παρόμοιες καπνιστικές συνήθειες. Ωστόσο, οι Αφροαμερικανοί και οι κάτοικοι της Χαβάης με παρόμοιες καπνιστικές συνήθειες, είχαν διπλάσιες πιθανότητες από ότι τους Καυκάσιους να αναπτύξουν καρκίνο του πνεύμονα.

8.2.1.3 Κάπνισμα

Το κάπνισμα είναι ο πιο σημαντικός παράγοντας κινδύνου για την ανάπτυξη καρκίνου του πνεύμονα. Περισσότερο από το 85% των καρκίνων του πνεύμονα προκύπτουν από το κάπνισμα. Κατά το κάπνισμα χημικές καρκινογόνες ουσίες (βενζόλιο, μονοξειδίο του άνθρακα, υδροκυάνιο κ.α.) που βρίσκονται στο καπνό του τσιγάρου εισέρχονται στους πνεύμονες και προκαλούν βλάβες στο γενετικό υλικό (DNA) των κυττάρων των πνευμόνων μεταβάλλοντας σημαντικά γονίδια. Με τον καιρό, τα κύτταρα που έχουν υποστεί βλάβη, χάνουν τον έλεγχο του πολλαπλασιασμού και της ανάπτυξής τους και καθίστανται καρκινικά. Εάν όμως ένα άτομο σταματήσει να καπνίζει πριν αναπτύξει καρκίνο, ο κατεστραμμένος πνευμονικός ιστός αρχίζει σταδιακά να επιστρέφει στο φυσιολογικό. Ακόμα και μετά από δέκα χρόνια όμως, που κάποιος έχει σταματήσει το κάπνισμα, συνεχίζει να έχει περισσότερες πιθανότητες να αναπτύξει καρκίνο σε σχέση με κάποιον που δεν κάπνισε ποτέ. Συγκριτικά με τους μη καπνιστές, ο κίνδυνος για καρκίνο του πνεύμονα εκτιμάται ότι είναι 22 φορές πιο υψηλός για τους άνδρες καπνιστές και 12 φορές πιο υψηλός για τις γυναίκες καπνίστριες.

8.3 ΤΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΣΤΑΔΙΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ

Η σταδιοποίηση του καρκίνου του πνεύμονα έχει πολύπλευρη σημασία. Η επιλογή και ο σχεδιασμός της θεραπείας, η εκτίμηση της πρόγνωσης της νόσου καθώς και η σύγκριση ερευνητικών δεδομένων και αποτελεσμάτων κλινικών μελετών, έχουν ως βάση τη σταδιοποίηση της νόσου. Ο κοινός τρόπος σταδιοποίησης του καρκίνου του πνεύμονα προσφέρει μια παγκόσμια κοινή γλώσσα επικοινωνίας μεταξύ των λειτουργών υγείας.

8.3.1 Η εξέλιξη της σταδιοποίησης του καρκίνου του πνεύμονα

Η σταδιοποίηση του καρκίνου του πνεύμονα, δηλαδή η εκτίμηση της ανατομικής έκτασης της νόσου, σύμφωνα με τα χαρακτηριστικά του πρωτοπαθούς όγκου, την προσβολή των περιοχικών λεμφαδένων και την

παρουσία απομακρυσμένων μεταστάσεων, αναπτύχθηκε από τον Dr. Pierre Denoix από το 1943 έως το 1952. Η Διεθνής Ένωση κατά του Καρκίνου (Union Internationale Contre le Cancer Committee on Tumor Nomenclature and Statistics, UICC) αποδέχτηκε τις προτάσεις του Dr. Pierre Denoix και το 1968 συμπεριλήφθηκαν στην πρώτη έκδοση του εγχειριδίου από την UICC με θέμα «Σταδιοποίηση Κακοηθών Όγκων κατά TNM».

Οι πέντε αναθεωρήσεις των σταδιοποιήσεων που ακολούθησαν προτάθηκαν από τον Dr. Clifton Mountain ο οποίος βασίστηκε σε σχετικά περιορισμένη βάση δεδομένων, αρχικά 2.155 ασθενείς, καταλήγοντας το 2002 σε 5.319 ασθενείς του Νοσοκομείου M.D. Anderson Cancer Center.

Το 2007 προτάθηκε από τη Διεθνή Εταιρία Μελέτης του Πνευμονικού Καρκίνου (International Association for the Study of Lung Cancer-IASLC) νέα αναθεώρηση βασισμένη σε 68.463 περιπτώσεις ασθενών από διάφορα κέντρα παγκοσμίως, με μη μι-κροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (ΜΜΚΠ), οι οποίοι υποβλήθηκαν σε διάφορους θεραπευτικούς συνδυασμούς. Η πρόταση της IASLC έγινε επίσημα αποδεκτή από την American Joint Committee on Cancer (AJCC) και τη UICC κατά τη διάρκεια του 2009 κι έτσι η 7η αναθεώρηση τίθεται σε ισχύ, βασισμένη σε 100.869 περιπτώσεις ασθενών (16% με μικροκυτταρικό και 84% με μη μικροκυτταρικό) από 45 κέντρα σε 20 χώρες.

8.3.2 Το διεθνές σύστημα σταδιοποίησης του καρκίνου του πνεύμονα

Το σύστημα σταδιοποίησης του καρκίνου του πνεύμονα βασίζεται στην κλινική ταξινόμηση των παραγόντων TNM (T-primary tumor/πρωτοπαθής όγκος, N-regional nodes/επιχώριοι λεμφαδένες, M-distant metastasis/απομακρυσμένες μεταστάσεις). Η κλινική σταδιοποίηση (cTNM, cStage) βασίζεται στις πληροφορίες που συλλέγονται για την κλινική κατάσταση του ασθενούς πριν τη λήψη απόφασης για την επιλογή της θεραπείας. Η παθολογοανατομική σταδιοποίηση (pTNM, pStage) βασίζεται στα αποτελέσματα της παθολογοανατομικής εξέτασης των ιστών που αφαιρέθηκαν από τον ασθενή κατά τη διάρκεια της χειρουργικής επέμβασης. Είναι ακριβέστερη όσον αφορά τον προσδιορισμό της έκτασης του όγκου και της προσβολής επιχώριων λεμφαδένων. Η σταδιοποίηση για την επανέναρξη θεραπείας (rTNM, rStage) (retreatment staging) έχει ως στόχο την εκτίμηση της έκτασης της νόσου μετά από την αρχική θεραπεία και είναι χρήσιμη για το σχεδιασμό των επόμενων θεραπευτικών χειρισμών.

8.3.4 Η νέα σταδιοποίηση του μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα από την IASLC και τα κλινικά συμπεράσματα

Η IASLC, μελετώντας τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την τελευταία αναθεώρηση το 2002, διαπίστωσε μειονεκτήματα που κυρίως εντοπίστηκαν στην περιορισμένη βάση δεδομένων (μικρός αριθμός ασθενών), στο γεγονός ότι η απεικονιστική σταδιοποίηση έγινε με ακτινογραφία θώρακα και στο ότι οι περισσότεροι ασθενείς που μελετήθηκαν είχαν χειρουργηθεί. Επιπλέον, η στατιστική επεξεργασία, δεν προσέφερε τη δυνατότητα τα αποτελέσματα να αναχθούν σε ευρύτερους πληθυσμούς από αυτόν της μελέτης. Διαφοροποιώντας τον τρόπο μελέτης των ασθενών για τη νέα σταδιοποίηση προέκυψαν κάποιες προτεινόμενες αλλαγές αφορούν τους παράγοντες T και M.

Οι κύριες τροποποιήσεις για τον παράγοντα T είναι:

- το στάδιο T1 υποδιαιρείται σε T1a και T1b αναλόγως του μεγέθους του πρωτοπαθούς όγκου.
- τα όρια των 3, 5 και 7cm διαχωρίζουν τον πρωτοπαθή όγκο σε T1, T2 και T3 αντίστοιχα.

- η παρουσία κακοήθους δορυφορικού όζου ή όζων στον ίδιο λοβό του πνεύμονα κατηγοριοποιείται σε T3.
- η παρουσία κακοήθους όζου ή όζων σε διαφορετικούς ομόπλευρους λοβούς κατηγοριοποιείται σε T4.

Όσον αφορά στον παράγοντα M:

- Η παρουσία κακοήθους υπεζωκοτικής και περικαρδιακής συλλογής καθώς και διακριτών υπεζωκοτικών εμφυτεύσεων συνιστά μεταστατική νόσο και με την παρουσία κακοηθών όζων στον ετερόπλευρο πνεύμονα δημιουργούν το στάδιο M1a.
- Το στάδιο M1b αναφέρεται σε οποιαδήποτε άλλη απομακρυσμένη μετάσταση. Αξίζει να τονιστεί ότι για πρώτη φορά και οι καρκινοειδείς όγκοι σταδιοποιούνται σύμφωνα με το σύστημα TNM.

Η διάκριση των σταδίων του καρκίνου του πνεύμονα στην τροποποιημένη σταδιοποίηση κατά TNM-IASLC του MMKP συντελεί στην πιο αξιόπιστη διαχείριση του ογκολογικού ασθενή. Η νέα σταδιοποίηση διακρίνει το στάδιο IIa από το Ib και IIb διαθέτοντας πλέον διακριτή συνολική επιβίωση και ικανοποιητικό αριθμό ασθενών. Πρόκειται για μια από τις αδυναμίες της 6ης αναθεώρησης του TNM (UICC 2002) η οποία πλέον διορθώνεται.

Μετά την ανακοίνωση των νέων προτάσεων για τη σταδιοποίηση του MMKP, ακολούθησαν αναδρομικές συγκριτικές μελέτες οι οποίες σύγκριναν τη επιβίωση των ασθενών ανάλογα με το στάδιο της νόσου σύμφωνα με την 6η αναθεώρηση (2002) και σύμφωνα με τις νέες προτάσεις. Οι μελέτες επιβεβαίωσαν τα αποτελέσματα των προτάσεων της IASLC με μικρές διαφοροποιήσεις, όπως για παράδειγμα το γεγονός ότι η κακοήθης περικαρδιακή συλλογή εμφάνισε παρόμοια επιβίωση με τις απομακρυσμένες μεταστάσεις (JTO, 2008). Προβληματισμός προκύπτει από τις περιπτώσεις ασθενών με στάδιο Ib (T2N0M0), σύμφωνα με την προηγούμενη σταδιοποίηση και στάδιο IIa αντίστοιχα, σύμφωνα με τη νέα σταδιοποίηση. Το ερώτημα που προκύπτει είναι εάν οι ασθενείς μετά τη χειρουργική εξαίρεση του όγκου θα λάβουν ή όχι και χημειοθεραπεία (adjuvant). Στο στάδιο Ib δεν απαιτείται επικουρική χημειοθεραπεία, όμως στο στάδιο IIa απαιτείται. Μεγάλες τυχαίοποιημένες μελέτες θα απαντήσουν στα ερωτήματα αυτά, όμως η καθημερινή κλινική εμπειρία προτείνει την αναγκαιότητα της επικουρικής χημειοθεραπείας (adjuvant).

Η σταδιοποίηση του μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα αντανακλά μόνο την εντόπιση της νόσου. Κλινικές παράμετροι, όπως η ταχύτητα ανάπτυξης του όγκου, το πρότυπο διασποράς του και η συμπεριφορά του σε μοριακό-κυτταρικό επίπεδο (γονιδιακή ρύθμιση, μεταβολικοί παράγοντες) δεν είναι δυνατό να καθοριστούν. Με τη χαρτογράφηση ολόκληρου του ανθρώπινου γονιδιώματος μελέτες δείχνουν ότι οι όγκοι δε ταξινομούνται χρησιμοποιώντας μόνο ορατά χαρακτηριστικά κατά TNM. Με τη βοήθεια πολλών δεικτών όπως η ενεργοποίηση ή η απώλεια ογκογονιδίου και η ανεύρεση γονιδίων απόπτωσης και αντιαπόπτωσης, θα προταθεί και η μοριακή σταδιοποίηση. Η σταδιοποίηση και η αντιμετώπιση του καρκίνου του πνεύμονα αποτελούν αλληλένδετες έννοιες. Η καλύτερη και ακριβέστερη σταδιοποίηση προσβλέπει στην καλύτερη θεραπεία και επιβίωση των ασθενών (Σαγρής Κ.)

8.4 Η ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΜΙΚΡΟΣΥΣΤΟΙΧΙΩΝ ΣΤΗΝ ΠΡΟΓΝΩΣΗ ΚΑΙ ΔΙΑΓΝΩΣΗ

Τα τελευταία χρόνια είναι προφανές ότι ο καρκίνος του πνεύμονα οφείλεται σε πολλαπλές σωματικές μεταλλάξεις καθώς και σε αλλαγές της γονιδιακής έκφρασης.

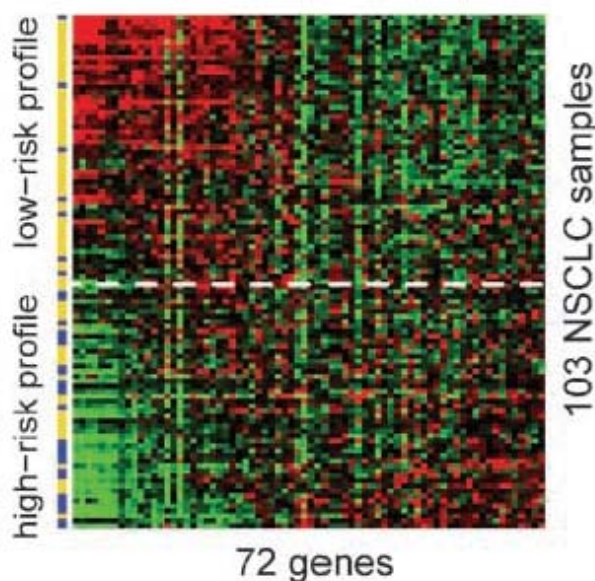
Η πρόοδος στην ανάπτυξη της ανάλυσης με τη χρήση μικροσυστοιχιών έχει υποκινήσει την έρευνα στον προσδιορισμό μοριακών υπογραφών που μπορούν να βοηθήσουν στην καλύτερη ταξινόμηση και στη πρόγνωση των καρκίνων στον άνθρωπο.

8.4.1 Γονιδιακή υπογραφή 72 γονιδίων για το αδενοκαρκίνωμα & το πλακώδες καρκίνωμα

Μέχρι πρόσφατα οι μέθοδοι ταξινόμησης που χρησιμοποιούνταν για τον καρκίνο NSCLC ήταν ανακριβείς διότι η επικύρωση και η αξιοποίηση των προσδιορισμένων γονιδίων έκφρασης που χρησιμοποιούνται ως ανιχνευτές παραμένει δύσκολη, εξαιτίας τόσο των περίπλοκων προτύπων ταξινόμησης όσο και της αρχικής υπερεκτίμησης της απόδοσης των ανιχνευτών.

Η έρευνα αυτή στοχεύει στην ανάπτυξη ενός γονιδιακού προφίλ για το στάδιο I και το στάδιο II του NSCLC επιτρέποντας τον προσδιορισμό των ασθενών με υψηλό κίνδυνο επανεμφάνισης της νόσου μέσα σε διάστημα 2 έως 3 ετών μετά την αρχική διάγνωση.

Με την συνεργασία του European Lung Cancer Microarray Consortium αναπτύχθηκε και επικυρώθηκε ένα σύνολο 72 γονιδίων ταξινομητών για το πρόωρο στάδιο NSCLC που είναι βασισμένο σε ένα απλό πρότυπο ανιχνευτών. Το πρότυπο αυτό είναι σχεδόν ίδιο με το πρότυπο που χρησιμοποιείται στην καθιερωμένη γονιδιακή υπογραφή των 70 γονιδίων του καρκίνου του μαστού.



Εικόνα 31: Επικύρωση του προγνωστικού προφίλ των 72 γονιδίων στα ανεξάρτητα δείγματα. Κάθε σειρά αντιπροσωπεύει ένα δείγμα και κάθε στήλη αντιπροσωπεύει ένα γονίδιο

Επιλογή των ασθενών: Η επιλογή των ασθενών πραγματοποιήθηκε με την κοινοπραξία των ευρωπαϊκών ακαδημαϊκών κέντρων τα οποία συνέλεξαν ιστούς με καρκίνο του πνεύμονα κατά τη διάρκεια χειρουργικών επεμβάσεων. Η συλλογή των ιστών πραγματοποιήθηκε από το 1991 έως το 2005 και τα δείγματα καταχωρήθηκαν από το κάθε κέντρο. Για την έρευνα αυτή οι ασθενείς έπρεπε να συμπληρώνουν τα εξής κριτήρια: πλήρης εκτομή του όγκου, καμία ανάμειξη λεμφαδένων μεσοθωρακίου, στάδιο NSCLC I ή II, καμία βοηθητική χημειοθεραπεία, καθώς και διαθεσιμότητα του δείγματος που χρησιμοποιήθηκε. Τα δείγματα έπρεπε να περιέχουν τουλάχιστον 50% καρκινικά κύτταρα ώστε να είναι επιλέξιμα για ανάλυση με μικροσυστοιχίες.

Ανάλυση δεδομένων: Όλα τα κατάλληλα δείγματα αναλύθηκαν με τον πίνακα Agilent 44K. Η ανάλυση με DNA μικροσυστοιχίες χρησιμοποιήθηκε για να προσδιορίσει ένα προφίλ γονιδιακής έκφρασης για επιβίωση χωρίς υποτροπή (RFS) για τους ασθενείς με πρόωρο στάδιο NSCLC.

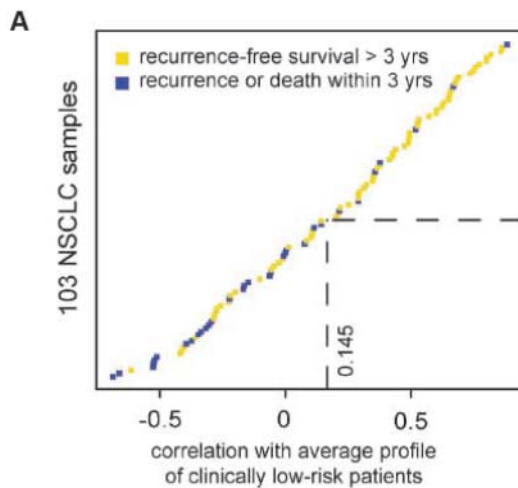
Μια πολλαπλή διαδικασία δειγματοληψίας χρησιμοποιήθηκε για την ανάπτυξη ενός ισχυρού κοντινότερου μέσου ταξινομητή (robust nearest mean classifier). Για να χωριστούν οι κατάλληλοι από τους μη κατάλληλους ασθενείς που θα χρησίμευαν στην πρόγνωση του καρκίνου επιλέχτηκε αυθαίρετα μια περίοδος 3 ετών ώστε να μην επανεμφανιστεί η νόσος στους ασθενείς. Με βάση ένα βρόχο επανάληψης διασταυρωμένης επικύρωσης (10-fold cross validation) προσδιορίστηκαν γονίδια με ποσοστά έκφρασης που σχετίζονταν με την επιβίωση χωρίς υποτροπή (RFS) και την συνολική επιβίωση (overall survival) των ασθενών με NSCLC. Τα 103 δείγματα χωρίστηκαν τυχαία σε πολλαπλά σύνολα εκπαίδευσης (n=93) καθώς και σε σύνολα δοκιμής (n=10). Το κάθε σύνολο εκπαίδευσης χρησιμοποιήθηκε ώστε να προσδιοριστεί ποιο από τα γονίδια σχετίζεται καλύτερα με την RFS και την OS. Η διαδικασία στηρίχτηκε σε 3 στατιστικές μεθόδους (Welsht test, logrank test και Cox proportional hazard ratio). Στη συνέχεια, τα 100 καλύτερα γονίδια χρησιμοποιήθηκαν ώστε να δημιουργηθεί ο κοντινότερος μέσος ταξινομητής που βασιζόταν στο σύνολο εκπαίδευσης.

Τα αποτελέσματα για τα δείγματα δοκιμής του κοντινότερου μέσου ταξινομητή καθορίστηκαν από τον υπολογισμό του συνημιτονικού συσχετισμού του μέσου προφίλ του χαμηλού και του υψηλού κινδύνου των εκπαιδευτικών δειγμάτων. Η επανάληψη αυτής της διαδικασίας για όλα τα σύνολα εκπαίδευσης καθώς και για τα σύνολα δοκιμής (500 φορές) οδήγησε στη σύνταξη των πολλαπλών γονιδίων υπογραφής τα οποία αποτελούνταν από ελαφρώς διαφορετικά γονιδιακά σύνολα πρόγνωσης. Τέλος το βέλτιστο σύνολο γονιδίων καθορίστηκε από τον συνδυασμό των γονιδίων στα οποία οφειλόταν η RFS και η OS καθώς και από την επιλογή των γονιδίων που επιλέγονταν πιο συχνά. Το βέλτιστο σύνολο των 72 γονιδίων επικυρώθηκε σε ένα σύνολο 69 δειγμάτων όπου χρησιμοποιήθηκαν οι ίδιοι κανόνες ταξινόμησης καθώς και το ίδιο κατώτερο όριο που χρησιμοποιήθηκε και για την ομάδα εκπαίδευσης.

Οι πιο κοινοί τύποι όγκων ήταν τα αδενοκαρκίνωμα και το πλακώδες καρκίνωμα. Η ομάδα των 172 ασθενών επανεξετάστηκαν μετά από 89 μήνες κατά μέσο όρο και οι 64 ασθενείς επανεμφάνισαν τη νόσο. Με τα αποτελέσματα που προέκυψαν πραγματοποιήθηκε η ανάπτυξη ταξινομητών για τον προσδιορισμό των υποτύπων του πρόωρου σταδίου NSCLC.

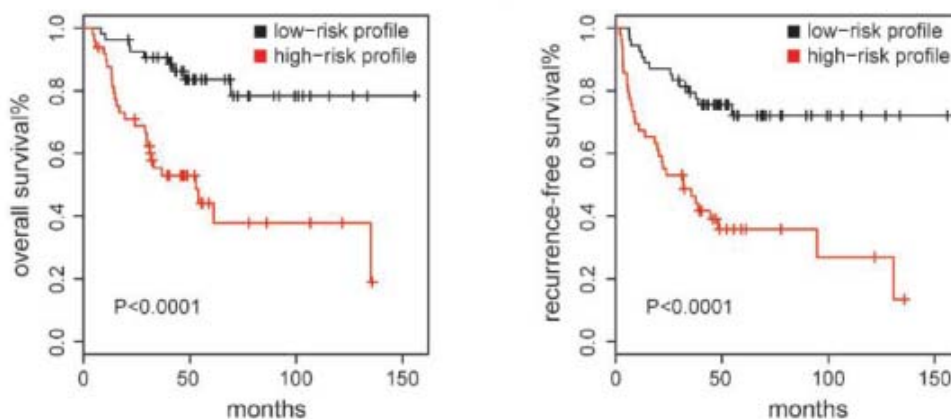
Διαπιστώθηκε πως η καλύτερη προγνωστική μέθοδος ώστε να σχηματιστεί μία αλάνθαστη υπογραφή γονιδιακής έκφρασης επιτεύχθηκε χρησιμοποιώντας ένα σύνολο 72 γονιδίων.

Η έρευνα για τον κοντινότερο μέσο ανιχνεύτη των 72-γονιδίων έδειξε ότι η βέλτιστη ταξινόμηση των εκπαιδευτικών δειγμάτων επιτεύχθηκε από τη σύγκριση κάθε προφίλ καρκίνου με το μέσο όρο των προφίλ των ασθενών χαμηλού κινδύνου. Για τον καθορισμό ενός κατωτάτου ορίου για τον χαμηλό κίνδυνο ορίστηκε η τιμή 0.145 η οποία προκύπτει από τους συνημιτονικούς συσχετισμούς σε συνδυασμό με μία 3ετή RFS ταξινόμηση 72 γονιδίων εκπαίδευσης από τα συνολικά 103 με μία αρνητική τιμή πρόβλεψης 87%. Τα δείγματα εκπαίδευσης υψηλού και χαμηλού κινδύνου έδειξαν πως τα 72 αυτά γονίδια παρουσίαζαν συγκριτικά με τα υπόλοιπα μια ξεκάθαρη διαφορά στην έκφραση προτύπων τους.



Εικόνα 32: Προσδιορισμός κατωτάτου ορίου για το χαμηλό κίνδυνο που προκύπτει από συνημιτονικούς συσχετισμούς

Η έρευνα έδειξε πως οι ασθενείς με γονιδιακό προφίλ χαμηλού κινδύνου παρουσίασαν περισσότερο χρόνο επιβίωσης (OS και RFS) συγκριτικά με τους ασθενείς με υψηλού κινδύνου γονιδιακό προφίλ. Περαιτέρω έρευνα για την απόδοση των ανιχνευτών έδειξε ότι ο κίνδυνος σε πρόωρο στάδιο με αρνητική τιμή πρόβλεψης ήταν 93% για RFS. Ο μέσος όρος για OS και RFS που προέκυψε έδειξε ότι ο ταξινομητής των 72 γονιδίων για NSCLC ήταν ακριβέστερος για την πρόβλεψη των ασθενών χαμηλού σε σχέση με τους ασθενείς υψηλού κινδύνου.



Εικόνα 33: Εκτιμήσεις επιβίωσης OS και RFS με τη μέθοδο Kaplan-Meier των 103 δειγμάτων με τη χρήση των 72 γονιδίων ανιχνευτών υψηλού και χαμηλού κινδύνου

Ο ανιχνευτής ήταν σε θέση να προσδιορίσει τους ασθενείς χαμηλού κινδύνου και για τα δύο στάδια I και II. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι οι ασθενείς σταδίου II χαμηλού κινδύνου παρουσιάζουν εξίσου καλό ποσοστό επιβίωσης όπως οι ασθενείς με στάδιο I. Ο ανιχνευτής που προσδιορίστηκε μπόρεσε να αντιπροσωπεύσει μια γενική υπογραφή επιβίωσης για το πρόωρο στάδιο με NSCLC, διότι τα υψηλού ή χαμηλού κινδύνου σύνολα ασθενών μπόρεσαν να προσδιοριστούν με ακρίβεια τόσο για τα αδενοκαρκινώματα όσο και τα πλακώδη καρκινώματα (Roerman, Jassem et al. 2009).

8.4.2 Μελέτη για την ταξινόμηση των NSCLC όγκων από το Πανεπιστημιακό Ιατρικό Κέντρο Erasmus, Rotterdam

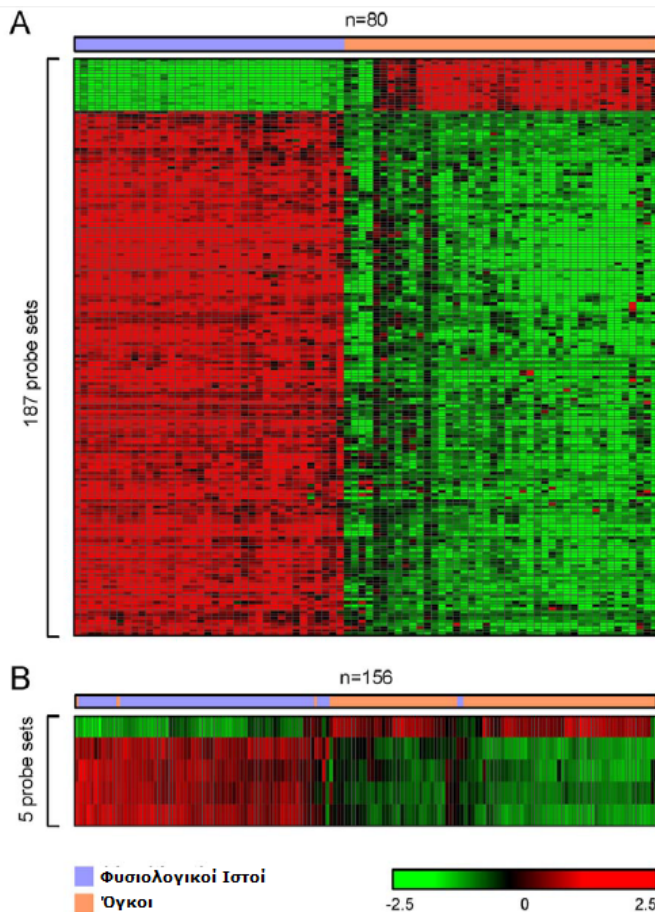
Η μελέτη σχετίζεται με την ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης που πραγματοποιήθηκε σε μία ομάδα 91 ασθενών που υποβλήθηκαν σε αφαίρεση όγκου στο Πανεπιστημιακό Ιατρικό Κέντρο Erasmus μεταξύ 1992 έως 2004. Χρησιμοποιήθηκαν 91 καρκινικοί όγκοι και 65 γειτονικά φυσιολογικά δείγματα από ιστό του πνεύμονα. Ο προσδιορισμός του συνόλου των γονιδίων ανιχνευτών αξιολογήθηκε χρησιμοποιώντας μια ανεξάρτητη ομάδα 96 NSCLC καρκίνων από το Πανεπιστήμιο Duke και 6 φυσιολογικά δείγματα από ιστό του πνεύμονα από τη βάση GSE3526. Ακόμη προσδιορίστηκε μια ιστολογική υπογραφή 75 γονιδίων η οποία κατηγοριοποιεί τα δείγματα σε βασικές υποκατηγορίες του NSCLC. Τα δείγματα από τους όγκους και από τους φυσιολογικούς ιστούς τοποθετήθηκαν σε υγρό αζώτου αφού ψύχθηκαν άμεσα. Για την επεξεργασία τους και την ανάλυσή τους χρησιμοποιήθηκαν μικροσυστοιχίες Affymetrix U133 plus 2.0.

Για τον προσδιορισμό της γονιδιακής υπογραφής των NSCLC όγκων συγκρίθηκαν τα προφίλ γονιδιακής έκφρασης 44 όγκων με 36 υγιείς ιστούς του πνεύμονα. Η ανάλυση συνολικά 415 κοινών συνόλων ανιχνευτών παρουσίασε διαφορετική έκφραση σε 3 κύριους τύπους NSCLC. Για την εύρεση γονιδίων που είχαν εκφραστεί σε όλες τις περιπτώσεις των NSCLC καρκίνων χρησιμοποιήθηκε ανάλυση με επίβλεψη ώστε τελικά ο αριθμός των ανιχνευτών περιορίστηκε στους 187.

Ένα σύνολο 5 ανιχνευτών από τους 187 ήταν σε θέση να ανιχνεύσει μη καρκινικούς ιστούς από κακοήθειες NSCLC με ακρίβεια 98% χρησιμοποιώντας την Prediction Analysis of Microarrays. Δύο όγκοι και 3 μη καρκινοειδείς ιστοί ταξινομήθηκαν λανθασμένα από την βελτιστοποιημένη γονιδιακή υπογραφή. Ένα από αυτά τα δείγματα παρουσίασε αβέβαιη ιστολογική διάγνωση και 2 ήταν από ασθενείς που είχαν αναπτύξει πολλαπλούς αρχικούς όγκους.

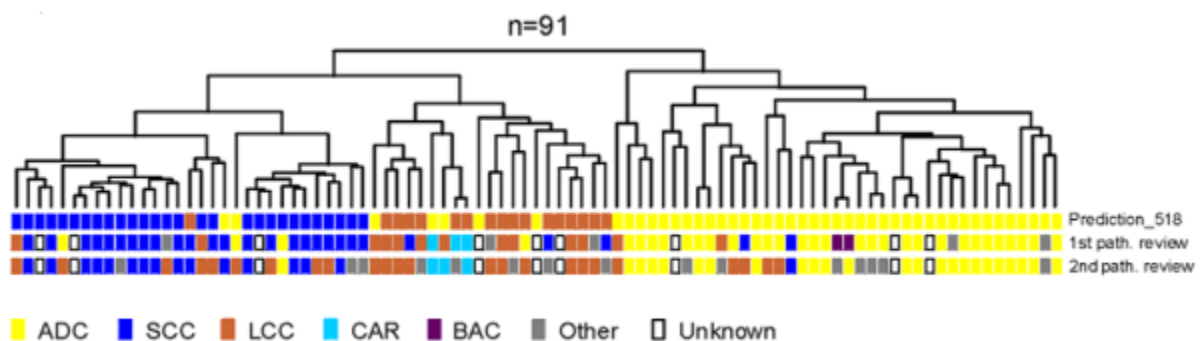
Συμπερασματικά διαπιστώνεται πως η γονιδιακή υπογραφή των 5 ανιχνευτών διακρίνει με ακρίβεια τους NSCLC όγκων από τον υγιή ιστό του πνεύμονα.

Δεδομένου ότι οι NSCLC είναι όγκοι με υψηλό βαθμό ετερογένειας εντοπίστηκαν γονίδια που προσδιορίζαν τα ιστολογικά χαρακτηριστικά έπειτα από την αυστηρή χρήση επιλεγμένων δειγμάτων όγκων. Συγκρίνοντας τα προφίλ της γονιδιακής έκφρασης προσδιορίστηκαν 518 σύνολα ανιχνευτών που αντιπροσώπευαν τους 3 κύριους υπότυπους NSCLC-ADC (adenocarcinoma), SCC (squamous cell carcinoma) και LCC. Με τη χρήση της leave-one-out προσέγγιση απόδοσης διαπιστώθηκε πως το ποσοστό της σωστής κατηγοριοποίησης από την Prediction Analysis of Microarrays είναι 96% (22 από τα 23 εκπαιδευόμενα δείγματα). Όταν η γονιδιακή υπογραφή εφαρμόστηκε ώστε να ταξινομήσει τα δείγματα της leave-one-out προσέγγισης διαπιστώθηκε ότι τα 3 καρκινικά δείγματα (CAR) τα οποία δεν συμπεριλήφθηκαν στον προσδιορισμό της γονιδιακής υπογραφής καθώς και ένα LCC δείγμα αποτέλεσαν μία ξεχωριστή ομάδα. Ακόμη, προσδιορίστηκε μια ιστολογική υπογραφή 75 γονιδίων η οποία ταξινομεί τα δείγματα στους σημαντικότερους ιστολογικούς υποτύπους του NSCLC. Εκτός από 3 εξαιρέσεις όλα τα διαφορούμενα ταξινομημένα LCCs (n=11) καθορίστηκαν ως ADC ή SCC. Από τα 18 δείγματα ένα είχε διαφορούμενη διάγνωση λόγω της ανεπαρκούς ιστολογίας και 3 από αυτά είχαν περιεκτικότητα καρκινικών κυττάρων λιγότερη από 20%. Πάνω από το 60 % (n=11) των 18 δειγμάτων παρουσίασαν προφανή ετερογενή καρκινικό κυτταρικό τύπο. Τα αποτελέσματα προτείνουν ότι το σύνολο των 75 ανιχνευτών ιστολογικής υπογραφής μπορούν να βοηθήσουν στη σωστή ιστολογική ταξινόμηση σε διαφορούμενες περιπτώσεις NSCLC (Hou, Aerts et al. 2010).



Εικόνα 34: Διάκριση των φυσιολογικών ιστών από τους καρκινικούς όγκους με τη χρήση της ιεραρχικής ταξινόμησης.

A: Δισδιάστατη ιεραρχική ταξινόμηση 80 εκπαιδευτικών δειγμάτων που περιλαμβάνουν όγκους και υγιή δείγματα πνεύμονα ταξινομήθηκαν με τη χρήση 187 γονιδίων ανιχνευτών. **B:** Η ιεραρχική ταξινόμηση 156 ιστών με τη χρήση 5 γονιδίων ανιχνευτών δημιουργεί δύο σύνολα, όγκου και φυσιολογικού ιστού.



Εικόνα 35: Συσχετιστικό δενδρόγραμμα παραγόμενο από την συσσωρευτική ιεραρχική ταξινόμηση των 91 NSCLC δειγμάτων με τη χρήση 518 ανιχνευτών γονιδιακής υπογραφής.

8.4.3 Γονιδιακή υπογραφή 5 γονιδίων για την κατηγοριοποίηση του NSCLC καρκίνου.

Στη μελέτη αυτή χρησιμοποιήθηκαν 185 παγωμένα δείγματα στα οποία εφαρμόστηκαν η RT-PCR και οι μικροσυστοιχίες ως μέθοδος ανάλυσης. Συμμετείχαν 125 τυχαία επιλεγμένοι ασθενείς που υποβλήθηκαν σε χειρουργική αφαίρεση NSCLC όγκου στο Γενικό Νοσοκομείο Taichung Veterans μεταξύ του Δεκεμβρίου του 1999 και του Δεκεμβρίου του 2003. Από αυτά τα δείγματα τα 60 ήταν αδενοκαρκινώματα, τα 52 SCC και υπόλοιπα 13 άλλοι τύποι καρκίνου. Η επικύρωση της γονιδιακής υπογραφής των 5 γονιδίων

πραγματοποιήθηκε με τη χρήση μιας ανεξάρτητης ομάδας 60 τυχαία επιλεγμένων ασθενών που χειρουργήθηκαν στο ίδιο νοσοκομείο την ίδια περίοδο. Οι ασθενείς δεν είχαν λάβει βοηθητική χημειοθεραπεία. Ακόμη χρησιμοποιήθηκε το πολυπαραγοντικό μοντέλο αναλογικών κινδύνων COX ώστε να καθοριστούν ποια γονίδια είναι συνδεδεμένα με το θάνατο από οποιαδήποτε αιτία ή από επανεμφάνιση καρκίνου. Προσδιορίστηκαν τα προστατευτικά γονίδια και τα επικίνδυνα γονίδια που συνδέθηκαν με το θάνατο, με αναλογία μικρότερη του 1 και μεγαλύτερη του 1 αντίστοιχα.

Για τα γονίδια που σχετίστηκαν με την επιβίωση χρησιμοποιήθηκε ένας γραμμικός συνδυασμός κωδικοποίησης μέσης τιμής γονιδιακής έκφρασης ώστε να υπολογιστεί το αποτέλεσμα κινδύνου για κάθε ασθενή.

Από την ανάλυση των μικροσυστοιχιών προέκυψε στους 125 ασθενείς ότι 485 από τα 672 γονίδια είχαν συντελεστή απόκλισης μεγαλύτερο του 3% και πα'όλα αυτά συμπεριλήφθηκαν στην ανάλυση. Το COX προσδιόρισε μια γονιδιακή υπογραφή 16 γονιδίων που σχετίζονται με το θάνατο από οποιαδήποτε αιτία. Τα 4 γονίδια ήταν προστατευτικά ενώ τα υπόλοιπα 2 ήταν επικίνδυνα. Μεταξύ των 62 ασθενών εκείνοι με όγκο υψηλού κινδύνου εξέφρασαν επικίνδυνα γονίδια ενώ ασθενείς με χαμηλά αποτελέσματα εξέφρασαν προστατευτικά γονίδια. Οι ασθενείς με υψηλού κινδύνου γονιδιακή υπογραφή 16 γονιδίων είχαν ένα χαμηλότερο μέσο όρο γενικής επιβίωσης συγκριτικά με εκείνους που είχαν χαμηλό κίνδυνο. Οι όγκοι με υψηλού κινδύνου γονιδιακή υπογραφή σχετίστηκαν με χαμηλότερο μέσο όρο ελεύθερης υποτροπής επιβίωσης συγκριτικά με τους ασθενείς με χαμηλού κινδύνου γονιδιακή υπογραφή. Ο μέσος όρος διάρκειας της επανάληψης της έρευνας ήταν περίπου 18 μήνες.

Από τα 16 γονίδια έγινε επιλογή 5 γονιδίων (DUSP6, MMD, STAT1, ERBB3 και LCK) που χρησιμοποιήθηκαν στην RT-PCR και στην decision-tree ανάλυση. Στη μελέτη της γονιδιακής έκφρασης 5 γονιδίων αναλύθηκαν μαζί ή ξεχωριστά 60 ασθενείς με στάδιο καρκίνου I και II. Ανάμεσα στους ασθενείς με στάδιο καρκίνου I και II αυτοί με υψηλότερο κίνδυνο γονιδιακής υπογραφής είχαν μικρότερη συνολική επιβίωση από αυτούς με χαμηλότερο κίνδυνο γονιδιακής υπογραφής. Ανάμεσα στους ασθενείς με καρκίνο σταδίου I οι χαμηλού κινδύνου γονιδιακές υπογραφές σχετίστηκαν με μεγαλύτερη συνολική επιβίωση συγκριτικά με τους ασθενείς με υψηλότερο κίνδυνο. Στους ασθενείς με στάδιο καρκίνου II η συνολική επιβίωση δε διέφερε καθόλου ανάμεσα στις δύο κατηγορίες πιθανότατα λόγω μικρού αριθμού ασθενών (Chen, Yu et al. 2007).

9. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα εργασία έγινε αναφορά σε διαφορετικές μεθοδολογίες κατηγοριοποίησης δεδομένων γονιδιακής έκφρασης, που προέρχονται από καρκινικά δείγματα, με τη χρήση cDNA μικροσυστοιχιών. Συγκεκριμένα οι τρεις κατηγορίες από τις οποίες προέρχονται τα καρκινικά δείγματα είναι οι εξής: καρκίνος του μαστού, λευχαιμία και καρκίνος του πνεύμονα.

Αναλυτικότερα όσον αφορά στον καρκίνο του μαστού σημαντικός είναι ο προσδιορισμός της υποκατηγορίας Claudin-low με τη χρήση του ιεραρχικού αλγορίθμου. Ακόμη η εύρεση της γονιδιακής υπογραφής 70 γονιδίων αλλά και η εφαρμογή της μοριακής εφαρμογής Oncotype DX συμβάλλουν στην κατηγοριοποίηση των ασθενών σε χαμηλού, μεσαίου και υψηλού κινδύνου κατηγορίες. Ωστόσο το πρότυπο Genius με υψηλά ποσοστά πρόβλεψης ανατρέπει τον τρόπο με τον οποίο οι γιατροί αντιλαμβάνονται την ασθένεια, μιας και είναι σε θέση να κατηγοριοποιεί ασαφείς μοριακές υποκατηγορίες.

Όσον αφορά στην λευχαιμία σημαντική είναι η χρήση της τεχνολογίας GEP που δίνει τη δυνατότητα διαχωρισμού του λευχαιμικού τύπου AML από τον ALL τύπο. Ακόμη το πρόγραμμα έρευνας MILE προσδιόρισε 18 ερευνητικές κατηγορίες (C1 έως C18) στις οποίες ταξινόμησε 2.096 δείγματα από τις οποίες αυτές κατηγορίες οι 4 ήταν ευδιάκριτοι τύποι οξείας λευχαιμίας. Ολοκληρώνοντας ενδιαφέρον παρουσιάζει η τεχνολογία ανάσχυσης δεδομένων για τη διάγνωση ALL και AML λευχαιμιών, όπου χρησιμοποιήθηκαν τρεις αλγόριθμοι Naïve Bayesian, K Nearest Neighbors και SVM από τους οποίους ακριβέστερα αποτελέσματα έδωσε ο πρώτος.

Για τον καρκίνο του πνεύμονα, που είναι μία από τις κυριότερες αιτίες καρκίνου η έρευνα στρέφεται κυρίως στον προσδιορισμό γονιδίων-ανιχνευτών που συμβάλλουν στην καλύτερη ταξινόμηση των καρκινικών υποτύπων. Σημαντική είναι η επίτευξη μιας αλάνθαστης γονιδιακής υπογραφής 72 γονιδίων για το πρόωρο στάδιο NSCLC καρκίνου, που ουσιαστικά βασίζεται στην γονιδιακή υπογραφή των 70 γονιδίων του καρκίνου του μαστού. Ενδιαφέρον παρουσιάζουν η γονιδιακή υπογραφή 5 γονιδίων-ανιχνευτών, που διακρίνει με ακρίβεια NSCLC καρκίνους από υγιή ιστό του πνεύμονα, αλλά και η γονιδιακή υπογραφή 75 γονιδίων-ανιχνευτών που μπορεί να βοηθήσει στη σωστή ιστολογική ταξινόμηση σε διαφορούμενες περιπτώσεις NSCLC. Τέλος με τη χρήση του πολυπαραγοντικού μοντέλου αναλογικών κινδύνων COX προσδιορίστηκε η γονιδιακή υπογραφή 5 γονιδίων (DUSP6, MMD, STAT1, ERBB3 και LCK) που σχετίζονται με την επανεμφάνιση του καρκίνου.

Παρακάτω συνοψίζονται τα αποτελέσματα των προηγούμενων μελετών, οι οποίες μπορούν να αποτελέσουν βάση για μελλοντικές έρευνες που θα εστιάσουν κυρίως στην αξιολόγηση της πρόγνωσης των ασθενών με μεγαλύτερη ακρίβεια.

Όνομα Μελέτης	Στόχος	Τύποι Καρκίνου	Δεδομένα	Μέθοδος	Ευρήματα Αποτελέσματα	Αλγόριθμος ή διαδικασία
Αμερικανική οργάνωση Κλινικής Χημείας 2007	Κατηγοριοποίηση καρκινικών δειγμάτων με τη χρήση 2 αλγορίθμων	Μαστού αυλικού τύπου, τύπου φυσιολογικού μαστού, HER2 & βασικού τύπου	35 δείγματα FF (Formalized Frozen) και 35 (FFPE-Fixed, Paraffin-Embedded)	(qRT)-PCR	94% συμφωνία των 2 αλγορίθμων	PAM, SSP
Herschkowitz et al. (2007)	Προσδιορισμός νέων υποτύπων που σχετίζονται με την υποκατηγορία Claudin-Low	Claudin-low	Καθολική βάση δεδομένων έκφρασης γονιδίων NCBI από 52 δείγματα καρκινικών κυττάρων	Affymetrix	Ανακάλυψη 9 υποτύπων και μιας συσχετισμένης ομάδα μικροσυστοιχιών από κύτταρα (MDA-MB-231)	Ιεραρχικός αλγόριθμος ταξινόμησης με και χωρίς επίβλεψη
Ολλανδικό Καρκινικό Ερευνητικό Κέντρο	Μέτρηση της έκφρασης 70 γονιδίων και κατηγοριοποίηση ασθενών σε γκρουπ υψηλού και χαμηλού κινδύνου	Μη διηθητικός καρκίνος του μαστού σταδίου I ή II κάτω των 61 ετών	78 ασθενείς με μη διηθητικό καρκίνο του μαστού χωρίς συστηματική βοηθητική θεραπεία	Προσεγγιστική μέθοδος top-down	Προσδιορισμός μέτρησης της έκφρασης 70 γονιδίων	
Ολλανδικό Καρκινικό Ερευνητικό Κέντρο	Επικύρωση της μέτρησης 70 γονιδίων για την κατηγοριοποίηση των ασθενών	Διηθητικούς και μη διηθητικούς καρκίνους	307 ασθενείς που δεν είχαν λάβει συστηματική θεραπεία	Χρήση επιλεγμένων αναδρομικών σειρών	Ασύμφωνες περιπτώσεις όπου το γενομικό τεστ φάνηκε πως προβλέπει τα αποτελέσματα με μεγαλύτερη ακρίβεια	Σύγκριση της γονιδιακής μελέτης με το online πρόγραμμα Adjuvant!
Η μοριακή δοκιμή Oncotype DX	Υπολογισμός της πιθανότητας επανάληψης σε 10 χρόνια ή κατηγοριοποίηση των ασθενών σε χαμηλού, μεσαίου και	Μέτρηση της έκφρασης των ER, HER2 καθώς και των ER ρυθμισμένων μεταγραφών	668 ασθενείς με ER θετικούς επικεντρωμένους καρκίνους	RT-PCR	Τα ποσοστά επανάληψης για μια δεκαετία ήταν 7%, 14% και 30% για χαμηλού, μεσαίου και υψηλού κινδύνου κατηγορίες αντίστοιχα	

	υψηλού κινδύνου κατηγορίες.					
Haibe-Kains et al. Genome Biology 2010	Προσδιορισμός της πιθανότητας ο ασθενής να ανήκει σε διαφορετικούς υπότυπους	ER-/HER2-, HER2+ και ER+/HER2-	745 ασθενείς με καρκίνο του μαστού	Affymetrix και Agilent	Υψηλά ποσοστά πρόβλεψης στον ολικό πληθυσμό και στους υποτύπους του καρκίνου του μαστού τόσο στην περίπτωση που θεωρήσαμε την προσέγγιση ως συνεχή αλλά και ως δυαδική μεταβλητή	Η πρωτότυπη ασαφής υπολογιστική προσέγγιση Genius

Πίνακας 12 : Διεξαγωγή αποτελεσμάτων από τις μελέτες των καρκινικών κυττάρων του μαστού

Όνομα Μελέτης	Στόχος	Τύποι Καρκίνου	Δεδομένα	Μέθοδος	Ευρήματα Αποτελέσματα	Αλγόριθμος ή διαδικασία
Bullinger (2004)	Δημιουργία ενός αλγορίθμου επιβλεπόμενης εκμάθησης	AML	116 ασθενείς με AML συμπεριλαμβανομένων 45 ασθενών με φυσιολογικούς καρυότυπους AML	cDNA μικροσυστοιχίες	133 γονίδια-δείκτες και πρόγνωση της συνολικής επιβίωσης του σε αυτό το σύνολο	Η ιεραρχική συσταδοποίηση χωρίς επίβλεψη
Την ομάδα του Valk (2004)	Προσδιορισμός γονιδιακών δεικτών	AML	285 ασθενείς με AML	cDNA μικροσυστοιχίες	Νέες υποκατηγορίες AML με φυσιολογικό καρυότυπο και μια νέα συστάδα με γνωστούς δείκτες χαμηλού κινδύνου	Συσταδοποίηση χωρίς επίβλεψη
Πανεπιστημιακό Ιατρικό Κέντρο Erasmus	Προσδιορισμός νέων υποτύπων AML	AML	166 περιπτώσεων με AML	cDNA μικροσυστοιχίες	2 υπότυποι που σχετίζονται με τους παράγοντες ITDs, FLT3, FAB-M4, M5	GEP
Πανεπιστημιακό Ιατρικό Κέντρο Erasmus	Προσδιορισμός νέων υποτύπων AML	AML	285 AML	cDNA μικροσυστοιχίες	16 υπότυποι που δεν σχετίζονται με τους παράγοντες ITDs, FLT3, FAB-M4, M5	GEP

Πανεπιστημιακό Ιατρικό Κέντρο Erasmus	Προσδιορισμός νέων υποτύπων AML	AML	170 περιπτώσεις AML	cDNA μικροσυστοιχίες	6 υπότυποι κάποιου από τους οποίους δεν είχαν ξαναεμφανιστεί	GEP
European LeukemiaNet 2005-2008	Αξιολόγηση της κλινικής ακρίβειας των προφίλ γονιδιακής έκφρασης	AML-ALL-MDSs	2.096 ασθενείς	cDNA μικροσυστοιχίες	17 υπότυποι οξείας & χρόνιας λευχαιμίας, 1 κατηγορία με υγιή δείγματα καθώς & συνθήκες nonleukemia	Microarray Innovations in Leukemia (MILE)
European LeukemiaNet 2005	Επαλήθευση των αποτελεσμάτων από το I στάδιο για τις κατηγορίες C1-C18	AML-ALL-MDSs	2.096 ασθενείς	cDNA μικροσυστοιχίες	Ακρίβεια του αλγορίθμου για τις 18 κατηγορίες ήταν 92.2%	Αλγόριθμος πρόβλεψης που βασίζεται στην γραμμική διακριτή ταξινόμηση
Department of Engineering Management, EME College 2012	Ταξινόμηση υποκατηγοριών λευχαιμίας με χρήση 3 αλγορίθμων	ALL, AML ALL-B ,ALL-T	72 δείγματα μυελού των οστών	DNA τυπωμένες μικροσυστοιχίες	Ο αλγόριθμος Naïve Bayesian παρουσίασε την μεγαλύτερη ακρίβεια	Naïve Bayesian, K Nearest Neighbors και SVM

Πίνακας 13: Αποτελέσματα από τις μελέτες διαφόρων τύπων λευχαιμίας

Όνομα Μελέτης	Στόχος	Τύποι Καρκίνου	Δεδομένα	Μέθοδος	Ευρήματα Αποτελέσματα	Αλγόριθμος ή διαδικασία
European Lung Cancer Microarray Consortium	Προσδιορισμός μεθόδου 72 γονιδίων για το για την πρόγνωση πρώιμου NSCLC	ADC και SCC	172 ασθενείς	cDNA μικροσυστοιχίες	Ο ταξινομητής που προσδιορίστηκε μπόρεσε να αντιπροσωπεύσει μια γενική υπογραφή επιβίωσης για το πρόωρο στάδιο με NSCLC	Πίνακας Agilent 44K
Πανεπιστημιακό Ιατρικό Κέντρο Erasmus μεταξύ 1992 έως 2004	Προσδιορισμός ενός συνόλου 5 ανιχνευτών	NSCLC	91 καρκινικοί όγκοι και 65 γειτονικά φυσιολογικά δείγματα	Affymetrix U133 plus 2.0	Ανίχνευση μη καρκινικών ιστών από κακοήθειες NSCLC με ακρίβεια 98%	Prediction Analysis of Microarrays
Πανεπιστημιακό Ιατρικό Κέντρο	Προσδιορισμός 75 ανιχνευτών	NSCLC	18 δείγματα	Affymetrix U133 plus	Χρήση για ιστολογική ταξινόμηση σε	Leave-one-out προσέγγιση

Erasmus μεταξύ 1992 έως 2004	για την ταξινόμηση NSCLC			2.0	διφορούμενες περιπτώσεις NSCLC	απόδοσης
National Taiwan University College of Public Health, National Taiwan University College of Medicine	Προσδιορισμός 5 ανιχνευτών γονιδίων που βοηθούν στον υπολογισμό της συνολικής επιβίωσης των ασθενών	NSCLC σταδίου I και II	125 τυχαία επιλεγμένοι ασθενείς από Το Γενικό Νοσοκομείο Taichung Veterans	RT-PCR και οι μικροσυστοιχίες	Συνολική επιβίωση ανάλογα με το στάδιο του καρκίνου και τον υψηλό ή χαμηλό κίνδυνο γονιδιακής υπογραφής	COX, decision-tree

Πίνακας 14: Αποτελέσματα από τις μελέτες διάφορων τύπων καρκίνου του πνεύμονα

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ALBERTS, B., 2002. *Molecular biology of the cell* 5th edn. New York: Garland Science.

AZUAJE, F. and DOPAZO, J., *Data analysis and visualization in genomics and proteomics* Chichester, West Sussex, England; John Wiley, c2005.

BROWN, M.P., GRUNDY, W.N., LIN, D., CRISTIANINI, N., SUGNET, C.W., FUREY, T.S., ARES, M.,JR and HAUSSLER, D., 2000. Knowledge-based analysis of microarray gene expression data by using support vector machines *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **97**(1), pp. 262-267.

Cancer Facts & Figures 2010.

Available: <http://www.cancer.org/Research/CancerFactsFigures/CancerFactsFigures/cancer-facts-and-figures-2010> [9/6/2012, 2012].

CASLINI, C., SERNA, A., ROSSI, V., INTRONA, M. and BIONDI, A., 2004. Modulation of cell cycle by graded expression of MLL-AF4 fusion oncoprotein *Leukemia: official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K.*, **18**(6), pp. 1064-1071.

CAUSTON, H.C., QUACKENBUSH, J. and BRAZMA, A., *Microarray Gene Expression Data Analysis: A Beginner's Guide* Blackwell Publishers.

CHEN, H.Y., YU, S.L., CHEN, C.H., CHANG, G.C., CHEN, C.Y., YUAN, A., CHENG, C.L., WANG, C.H., TERNG, H.J., KAO, S.F., CHAN, W.K., LI, H.N., LIU, C.C., SINGH, S., CHEN, W.J., CHEN, J.J. and YANG, P.C., 2007. A five-gene signature and clinical outcome in non-small-cell lung cancer *The New England journal of medicine*, **356**(1), pp. 11-20.

COLOMBO, P., MILANEZI, F., WEIGELT, B. and REIS-FILHO, J., 2011. Microarrays in the 2010s: the contribution of microarray-based gene expression profiling to breast cancer classification, prognostication and prediction *Breast Cancer Research*, **13**, pp. 212.

Comprehensive Cancer Information - National Cancer Institute. Available: <http://www.cancer.gov/> [9/3/2012, 2012].

EISEN, M.B., SPELLMAN, P.T., BROWN, P.O. and BOTSTEIN, D., 1998. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **95**(25), pp. 14863-14868.

HAFERLACH, T., KOHLMANN, A., WIECZOREK, L., BASSO, G., KRONNIE, G.T., BENE, M.C., DE VOS, J., HERNANDEZ, J.M., HOFMANN, W.K., MILLS, K.I., GILKES, A., CHIARETTI, S., SHURTLEFF, S.A., KIPPS, T.J., RASSENTI, L.Z., YEOH, A.E., PAPENHAUSEN, P.R., LIU, W.M., WILLIAMS, P.M. and FOA, R., 2010. Clinical utility of microarray-based gene expression profiling in the diagnosis and subclassification of leukemia:

report from the International Microarray Innovations in Leukemia Study Group. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, **28**(15), pp. 2529-2537.

HAIBE-KAINS, B., DESMEDT, C., ROTHE, F., PICCART, M., SOTIRIOU, C. and BONTEMPI, G., 2010. A fuzzy gene expression-based computational approach improves breast cancer prognostication *Genome biology*, **11**(2), pp. R18.

HOU, J., AERTS, J., DEN HAMER, B., VAN IJCKEN, W., DEN BAKKER, M., RIEGMAN, P., VAN, D.L., VAN, D.S., FOEKENS, J.A., HOOGSTEDEN, H.C., GROSVELD, F. and PHILIPSEN, S., 2010. Gene Expression-Based Classification of Non-Small Cell Lung Carcinomas and Survival Prediction. *PLoS ONE*, **5**(4), pp. e10312.

ISHITOBI, M., GORANOVA, T.E., KOMOIKE, Y., MOTOMURA, K., KOYAMA, H., GLAS, A.M., VAN LIENEN, E., INAJI, H., VAN'T VEER, L.J. and KATO, K., 2010. Clinical utility of the 70-gene MammaPrint profile in a Japanese population *Japanese journal of clinical oncology*, **40**(6), pp. 508-512.

JOHNSON, G. and RAVEN P., 2001. *Biology*. sixth edition edn. The McGraw-Hill Companies.

KNUDSEN, S., 2006; 2005. *Cancer Diagnostics with DNA Microarrays*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.

KNUDSEN, S., 2004. *Guide to Analysis of DNA Microarray Data* 2nd Edition. edn. John Wiley & Sons.

LEE, M., 2004. *Analysis of Microarray Gene Expression Data*. Springer.

Life Sciences Cyberbridge. Available: http://cyberbridge.mcb.harvard.edu/dna_1.html [9/6/2012, 2012].

LODISH, H., DARNELL, J.E. and & ETC., 2003. *Molecular Cell Biology*. 5th Revised edition edn edn. W.H.Freeman & Co Ltd.

MACKAY, A., WEIGELT, B., GRIGORIADIS, A., KREIKE, B., NATRAJAN, R., A'HERN, R., TAN, D.S., DOWSETT, M., ASHWORTH, A. and REIS-FILHO, J.S., 2011. Microarray-based class discovery for molecular classification of breast cancer: analysis of interobserver agreement *Journal of the National Cancer Institute*, **103**(8), pp. 662-673.

MARTÍN-SUBERO, J.I., ODERO, M.D., HERNANDEZ, R., CIGUDOSA, J.C., AGIRRE, X., SAEZ, B., SANZ-GARCÍA, E., ARDANAZ, M.T., NOVO, F.J., GASCOYNE, R.D., CALASANZ, M.J. and SIEBERT, R., 2005. Amplification of IGH/MYC fusion in clinically aggressive IGH/BCL2-positive germinal center B-cell lymphomas. *Genes, Chromosomes and Cancer*, **43**(4), pp. 414-423.

MCWHIRTER, J.R., NEUTEBOOM, S.T., WANCEWICZ, E.V., MONIA, B.P., DOWNING, J.R. and MURRE, C., 1999. Oncogenic homeodomain transcription factor E2A-Pbx1 activates a novel WNT gene in pre-B acute lymphoblastoid leukemia *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **96**(20), pp. 11464-11469.

MULLINS, M., PERREARD, L., QUACKENBUSH, J.F., GAUTHIER, N., BAYER, S., ELLIS, M., PARKER, J., PEROU, C.M., SZABO, A. and BERNARD, P.S., 2007. Agreement in Breast Cancer Classification between Microarray and Quantitative Reverse Transcription PCR from Fresh-Frozen and Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Tissues. *Clinical chemistry*, **53**(7), pp. 1273-1279.

ROEPMAN, P., JASSEM, J., SMIT, E.F., MULEY, T., NIKLINSKI, J., VAN DE VELDE, T., WITTEVEEN, A.T., RZYMAN, W., FLOORE, A., BURGERS, S., GIACCONE, G., MEISTER, M., DIENEMANN, H., SKRZYPSKI, M., KOZLOWSKI, M., MOOI, W.J. and VAN ZANDWIJK, N., 2009. An immune response enriched 72-gene prognostic profile for early-stage non-small-cell lung cancer *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, **15**(1), pp. 284-290.

SCHENA, M., 2003. *Microarray Analysis*. New York: Wiley-Liss, John Wiley & Sons.

Screenshot of the Adjuvant! software program *Springer Images*.

SHAHBAZ, M., FARUQ, S., SHAHEEN, M. and MASOOD, S.A., 2012. Cancer Diagnosis Using Data Mining Technology. *Life Science Journal*, 2012.

STAMS, W.A., DEN BOER, M.L., BEVERLOO, H.B., MEIJERINK, J.P., VAN WERING, E.R., JANKA-SCHAUB, G.E. and PIETERS, R., 2005. Expression levels of TEL, AML1, and the fusion products TEL-AML1 and AML1-TEL versus drug sensitivity and clinical outcome in t(12;21)-positive pediatric acute lymphoblastic leukemia *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, **11**(8), pp. 2974-2980.

STEKEL, D., 2003. *Microarray Bioinformatics*. Cambridge University Press.

Understanding Leukaemias, Lymphomas and Myeloma - Booklet leukaemia greek.pdf (application/pdf Object). Available: http://www.leukaemia.org.au/web/resources/pdf/booklet_leukaemia_greek.pdf [7/21/2012, 2012].

WEIGELT, B., BAEHNER, F.L. and REIS-FILHO, J.S., 2010. The contribution of gene expression profiling to breast cancer classification, prognostication and prediction: a retrospective of the last decade. *The Journal of pathology*, **220**(2), pp. 263-280.

WIKIPEDIA, T.F.E., 2012-last update, Ευκαρυωτικά κύτταρα [Homepage of Wikipedia, The Free Encyclopedia], [Online]. Available: el.wikipedia.org/wiki/ευκαρυωτικά2012.

WIKIPEDIA, THE FREE ENCYCLOPEDIA, 2012-last update, Δομή του RNA the free encyclopedia [Homepage of Wikipedia, The Free Encyclopedia], [Online]. Available: <http://el.wikipedia.org/wiki/RNA2012>.

WIKIPEDIA, T.F.E., 2012-last update, Γονίδιο [Homepage of Wikipedia, The Free Encyclopedia], [Online]. Available: el.wikipedia.org/wiki/γονίδιο2012.

WIKIPEDIA, T.F.E., 2012-last update, Προκαρυωτικά κύτταρα [Homepage of Wikipedia, The Free Encyclopedia], [Online]2012].

WIKIPEDIA, T.F.E., Acute lymphoblastic leukemia [Homepage of Wikipedia, The Free Encyclopedia], [Online]2012].

WIKIPEDIA, T.F.E., 2012-last update, Κεντρικό δόγμα Μοριακής Βιολογίας. Available: http://el.wikipedia.org/wiki/Κεντρικό_δόγμα_Μοριακής_Βιολογίας_2012].

Αρχές Συστημικής και Συνθετικής Βιολογίας-Πρωτεϊνικής Μηχανικής 2010-last update. Available: <http://m-biotech.biol.uoa.gr/MATHIMATAPMS/M3/>.

ΔΟΡΙΑΚΗ, Α. & ΚΟΛΛΙΑ, Μ., 2010. Προδιαθεσικοί παράγοντες και διαγνωστικές εξετάσεις σε ασθενείς που πάσχουν από Καρκίνο Πνεύμονα, Α.Τ.Ε.Ι Κρήτης Τμήμα Νοσηλευτικής.

ΘΕΟΧΑΡΗ Ε., Ν.Λ., 2008. Καρκινώματα μαστού βασικού τύπου. *Hellenic Archives Pathol*, **22**(1-3), pp. 7-14.

ΚΕΧΑΓΙΟΓΛΟΥ, Π., 2011. Μελέτη της ετεροζυγωτίας του γονιδίου φωσφατάσης ομόλογης της τενσίνης (PTEN) σε ασθενείς με οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία, Α.Π.Θ Σχολή Θετικών Επιστημών Τμήμα Χημείας.

ΜΑΡΜΑΡΑΣ, Β., and ΛΑΜΠΡΟΠΟΥΛΟΥ - ΜΑΡΜΑΡΑ, Μ., 2005. Βιολογία κυττάρου-Μοριακή Προσέγγιση. 4η έκδοση edn. Πάτρα: Τυπόραμα.

ΜΠΑΝΚΟΥΣΛΙ, Ι., 2008. Πρακτική Προσέγγιση στην Κλινική Ογκολογία

ΣΑΓΡΗΣ Κ., Χ.Γ., Το νέο σύστημα σταδιοποίησης του καρκίνου του πνεύμονα. Available: http://www.iatrikionline.gr/Respiratory_55/05.pdf [8/30/2012, 2012].

ΣΗΦΑΚΗΣ, Ε., 2011. Ανάπτυξη Μεθοδολογιών Υπολογιστικής Νοημοσύνης για την Επεξεργασία και Ανάλυση Δεδομένων Γονιδιακής Έκφρασης Μικροσυστοιχιών cDNA. Διδακτορική Διατριβή edn. Αθήνα: Πανεπιστήμιο Πατρών, Τμήμα Ιατρικής, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, Σχολή Ηλεκτρολόγων Μηχανικών και Μηχανικών Υπολογιστών.

ΣΙΕΜΠΗ, Χ., 2010. Το Herceptin (trastuzumab) στη θεραπεία του μεταστατικού καρκίνου του μαστού. Διδακτορική Διατριβή edn. Ιωάννινα: Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων. Σχολή Ιατρικής. Τμήμα Ιατρικής. Τομέας Μορφολογικός - Κλινικοεργαστηριακός. Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής.

ΣΠΑΘΗΣ, Δ.Α., 2007. Μελέτη γονιδίων που εμπλέκονται σε μηχανισμούς νευροεκφύλισης στο γενετικό μοντέλο ντοπαμινεργικής απονεύρωσης μυός weaver και σε λεμφοκύτταρα παρκινσονικών ασθενών, Πανεπιστήμιο Πατρών Σχολή Θετικών Επιστημών Τμήμα Βιολογίας.

ΦΥΣΣΑΣ, Γ., mastology. Available: <http://www.mastology.gr/> [9/3/2012, 2012].

ΦΥΣΣΑΣ, Γ., Είδη Καρκίνου του μαστού. Available: http://www.mastology.gr/gr/kar_mastou_b.asp [7/21/2012, 2012].

Ψηφιακό Σχολείο Βιολογία (Γ Γενικού Λυκείου - Θετικής Κατεύθυνσης).

Available: <http://digitalschool.minedu.gov.gr/courses/DSGL-C112/> [9/3/2012, 2012].