ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ ΝΟΣ.ΑΛΕΞΑΝΔΡΑ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

<<ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ: ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΚΑΙ ΕΚΤΕΛΕΣΗ>>

MSc: "Clinical Trials: Design and Conduct"

Διευθυντής

Ευάγγελος Τέρπος Καθηγητής Ιατρικής σχολής ΕΚΠΑ

<<Κλινικές δοκιμές γενετικών θεραπειών με αντιπληροφοριακό RNA και φορείς DNA>>

<<Clinical trials of genetics therapies with anti-sense RNA and DNA carry genes>>

ΛΕΚΚΑ ΒΑΣΙΛΙΚΗ

20190065

ΝΟΣΗΛΕΥΤΡΙΑ

Τρουγκάκος Ιωάννης ,Καθηγητής Βιολογίας Ζωικού Κυττάρου και ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας.

ΑΘΗΝΑ 2022

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ ΝΟΣ.ΑΛΕΞΑΝΔΡΑ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
<<ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ: ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΚΑΙ ΕΚΤΕΛΕΣΗ>>
MSc: "Clinical Trials: Design and Conduct"

Διευθυντής
Ευάγγελος Τέρπος Καθηγητής Ιατρικής σχολής ΕΚΠΑ
<<Κλινικές δοκιμές γενετικών θεραπειών με αντιπληροφοριακό RNA και φορείς DNA>>
<<Clinical trials of genetics therapies with anti-sense RNA and DNA carry genes>>

ΛΕΚΚΑ ΒΑΣΙΛΙΚΗ
20190065
ΝΟΣΗΛΕΥΤΡΙΑ

Τα Μέλη της Εξεταστικής Επιτροπής:

Τρουγκάκος Ιωάννης ,Καθηγητής Βιολογίας Ζωικού Κυττάρου και ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας.

Τσιτσιλώνη Ουρανία, MD,PhD Τμήμα Βιολογίας ΕΚΠΑ

Τέρπος Ευάγγελος , Καθηγητής Παθολογίας-θεραπευτική/Αιματολογία, Θεραπευτική Κλινική « Αλεξάνδρα».

ΑΘΗΝΑ 2022

ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΔΟΚΙΜΕΣ ΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΘΕΡΑΠΕΙΩΝ ΜΕ ΑΝΤΙΠΛΗΡΟΦΟΡΙΑΚΟ RNA ΚΑΙ ΦΟΡΕΙΣ DNA

Περιεχόμενα

ΕΙΣΑΓΩΓΗ 6

1. Γενετική Ιατρική 6

1.1 Ορισμός Γενετικής 6

1.2 Ιστορική ανασκόπηση 6

1.3 Η θέση της γενετικής ιατρικής 9

1.4. Γενετική σύνδεση και γενετική συσχέτιση 11

1.4 Κλινικές εφαρμογές της γενετικής 15

2. Αναπτυξιακή Βιολογία 19

2.1 Γονίδιο 19

2.2. DNA και χρωμόσωμα 21

2.2 Χαρτογράφηση του ανθρώπινου γονιδιώματος 23

2.3 Χαρακτηριστικά κληρονομικότητας 27

2.4.1 Μενδελική κληρονομικότητα 27

2.4.2. Αυτοσωμική υπολειπόμενη κληρονομικότητα 30

2.4.3 Αυτοσωμική επικρατής κληρονομικότητα 31

2.4.4 Φυλοσύνδετη κληρονομικότητα 33

3. Γονιδιακή Έκφραση 36

3.1 Γονιδιακή Ρύθμιση 37

3.1.1 Γονιδιακή ρύθμιση του ευκαρυωτικούς οργανισμούς. 38

3.1.2 Γονιδιακή ρύθμιση στους προκαρυωτικούς οργανισμούς 39

3.2 Γενετικός κώδικας 39

3.3 Μεταλλάξεις 40

4. Γονιδιακή θεραπεία 41

4.1 Ορισμός 41

4.2 Στόχοι της γονιδιακής θεραπείας 42

4.3 Φορείς Γονιδιακής θεραπείας 42

4.4 Απομόνωση Γονιδίων 43

4.5 Εξωσωματική γονιδιακή μεταφορά 44

4.6 Ενδοσωματική γονιδιακή μεταφορά 45

4.7 Γονιδιακή θεραπεία και ασθένειες. 46
5. Κλινικές δοκιμές 48
5.2 Στάδια ανάπτυξης φαρμάκου 50
5.3 Χορήγηση άδειας κυκλοφορίας. 52
5.4 Κλινικές δοκιμές και ζητήματα ηθικής 52
5.5 Παρασκευή και εφαρμογή δοκιμασμένων φαρμάκων – κανόνες ορθής παρασκευαστικής πρακτικής 54
Β Μέρος 55
1. Υλικά και Μέθοδοι 55
2. Αποτελέσματα 56
2.1 Αντιπληροφοριακό RNA 57
2.2 Σχηματισμός και ρυθμιστικοί μηχανισμοί 57
2.2.1 mi-RNAs 57
2.2.2 siRNAs 58
2.2.3. LncRNAs 58
2.2.4 piRNAs 59
2.3 Εφαρμογές αντιπληροφοριακού RNA σε θεραπείες. 59
2.4 Φαρμακολογία των φαρμάκων με τεχνολογία αντι-πληροφοριακού RNA 60
2.5 Θεραπείες αντι-πληροφοριακού RNA για την αντιμετώπιση του καρκίνου 61
2.6 Θεραπείες αντι-πληροφοριακού RNA για την αντιμετώπιση του καρδιαγγειακών ασθενειών 62
2.7 Θεραπείες αντι-πληροφοριακού RNA για την αντιμετώπιση του καρδιαγγειακών ασθενειών 63
2.8 Θεραπείες αντι-πληροφοριακού RNA για την αντιμετώπιση νευρολογικών παθήσεων. 64
2.9 Θεραπείες αντι-πληροφοριακού RNA για την αντιμετώπιση μολυσματικών ασθενειών (ιοί). 66
3. Στρατηγικές ιικών φορέων γενετικού υλικού για γενετικές θεραπείες 66
3.1 Αδενο-συσχετιζόμενοι ιοί 68
3.2 Αδενοιοί 68
3.3 Λεντοιοί 69
3.4 Βακτηριοφάγοι 69
4. Μη ιικοί φορείς DNA 69
4.1 Λιποσώματα 71
4.2 Κατιονικά πολυμερή 71

4.3 Ανόργανα νανοσωματίδια 71
4.3 Εξωσώματα 72
5. Συμπεράσματα 72
Βιβλιογραφία 76

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι γενετικές ασθένειες απειλούν την ανθρώπινη υγεία και έχουν παρουσιάσει αυξημένη συχνότητα στον γενικό πληθυσμό τα τελευταία χρόνια. Σήμερα, γονιδιακές θεραπείες όπως είναι τα siRNA, shRNA, ολιγονουκλεοτίδια αντιπληροφοριακού RNA, αλλά και φορείς γενετικού υλικού, έχουν δείξει καλές προοπτικές στην εφαρμογή τους στην κλινική πρακτική. Οι τελευταίες εξελίξεις που αφορούν τις χημικές μετατροπές των αντι-πληροφοριακών νουκλεοτιδίων, καθώς και η ανάπτυξη συστημάτων μεταφοράς DNA (φορέων) προκειμένου να αποφευχθεί η διάσπαση των φαρμάκων γονιδιακής θεραπείας στον οργανισμό, είναι ιδιαίτερης σημασίας στην εξέλιξη των γονιδιακών θεραπειών και την εφαρμογή τους με μεγαλύτερη συχνότητα στην κλινική πρακτική. Στην παρούσα μελέτη, γίνεται μια συστηματική ανασκόπηση της βιβλιογραφίας με σκοπό την παρουσίαση των πιο πρόσφατων εξελίξεων σε σχέση με τις κλινικές δοκιμές γενετικών θεραπειών με αντιπληροφοριακό RNA και με φορείς DNA.

Λέξεις κλειδιά: φάρμακα γονιδιακής θεραπείας, αντι-πληροφοριακό RNA, φορείς DNA,γενετικές ασθένειες, αντι-πληροφοριακά ολιγονουκελοτίδια, αντι-πληροφοριακά φάρμακα, γονιδιακή θεραπεία

ABSTRACT

Genetic diseases threaten general population health and occur with increased frequency in the general population in the latest decades. Currently, gene therapies such as siRNA, shRNA, antisense RNA oligonucleotides and DNA carriers, have shown promising potential in clinical application. The latest research towards the chemical modification of anti-sense nucleotides and the development of DNA carrier systems (vectors) to prevent the degradation of gene therapy drugs in the body is of the utmost importance in the development of gene therapies and their application in clinical practice. In the current thesis, a systematic review of the latest literature is performed in order to assess the latest developments regarding the clinical trials of genetic therapies of anti-sense RNA and DNA carriers

Keywords: Gene therapy drugs, genetic diseases, delivery systems, antisense oligonucleotides, antisense drug, gene therapy

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Γενετική Ιατρική

1.1 Ορισμός Γενετικής

Η γενετική είναι ο κλάδος των ιατρικών επιστημών ο οποίος μελετά τα χαρακτηριστικά της κληρονομικότητας, τα γονίδια, αλλά και την βιοποικιλότητα που παρατηρείται στους διάφορους οργανισμούς. Θεωρείται συγγενής επιστήμη με την επιστήμη της Βιολογίας, αφού οι παράμετροι οι οποίοι εξετάζονται επηρεάζουν το σύνολο της δομής και της λειτουργίας των κυττάρων, την αναπαραγωγή αλλά και όλες τις υπόλοιπες διεργασίες των ζωής (Grifiths et al., 2013). Ωστόσο, η συμβολή της γενετικής είναι σημαντική και σε άλλες επιστήμες όπως για παράδειγμα η βιοτεχνολογία, η ιατρική και η γεωπονία. Ο όρος «γενετική/genetics» χρησιμοποιήθηκε αρχικά το 1905, στο σύγγραμμα του μοναχού Gregor johan Mendel, οποίος είναι ο πρώτος επιστήμονας στην ιστορία που μελέτησε με καταγραφή τον τρόπο κληρονόμησης συγκεκριμένων χαρακτηριστικών από γενιά σε γενιά (Harper et al., 2008).

1.2 Ιστορική ανασκόπηση

Η επιστήμη της γενετικής άνθισε από τις αρχές του ανθρώπινου πολιτισμού και αυτός είναι και ο κύριος λόγος που δεν υπάρχει ακριβής ημερομηνία για την πρωταρχική ανακάλυψη των χαρακτηριστικών που μπορούν να κληρονομηθούν. Η αρχαιολογία, έχει ανακαλύψει ότι εδώ και χιλιάδες χρόνια, οι άνθρωποι επέλεγαν άγριους πληθυσμούς ζώων και φυτών και με βάση την τεχνητή επιλογή, τους έδιναν ένα σύνολο επιθυμητών χαρακτηριστικών ώστε να εξημερωθούν ή να καλλιεργηθούν αντίστοιχα. Κατά τη χρονική περίοδο ανάμεσα στο 8000-1000 π.Χ. έγινε εξημέρωση πολλών ζωικών ειδών και στη συνέχεια έγινε επιλεκτική διασταύρωση ζώων με συγκεκριμένα χαρακτηριστικά ώστε να παραχθούν απόγονοι με τα χαρακτηριστικά αυτά. Η καλλιέργεια των φυτών, χρονολογείται περίπου το 5000 π.Χ. και καθιστά σαφή

την αξιοποίηση της φυτικής γενετικής ποικιλομορφίας από τους προγόνους των σημερινών ανθρώπων (Acquaah et al., 2009).

Ο Ιπποκράτης, τον 5^{ο} αιώνα π.Χ. κυκλοφορεί το σύγγραμμά του «περί σπέρματος», στο οποίο αναφέρει ότι χυμοί, που προέρχονται από όλα τα σημεία του σώματος, καταλήγουν στο σπέρμα και περιέχουν κληρονομικά χαρακτηριστικά που μεταδίδονται από στους απογόνους. Κατά τη γονιμοποίηση συμβαίνει μίξη των «χυμών» των δύο φύλων, μεταβιβάζοντας έτσι κάποια από τα χαρακτηριστικά των γονέων στα παιδιά. Επιπλέον, στο ίδιο κείμενο υποστηρίζεται ότι τα χαρακτηριστικά που περιέχονται στους «χυμούς» μπορεί να αλλοιωθούν από περιβαλλοντικούς παράγοντες προσφέροντας χαρακτηριστικά τα οποία δεν παρατηρούνται στους προγόνους (Klug et al., 2019).

Τους μεταγενέστερους αιώνες δεν σημειώθηκε κάποια σημαντική πρόοδος στην επιστήμη της γενετικής, μέχρι περίπου τη χρονική περίοδο 1600-1850 μ.Χ., όταν και έγινε ένα σύνολο ανακαλύψεων που έθεσαν τις βάσεις της σύγχρονης μορφής της επιστήμης. Πιο συγκεκριμένα, ο Harvey, ανέπτυξε τη θεωρία της επιγένεσης το 17^{ο} αιώνα, σύμφωνα με την οποία ένα γονιμοποιημένο ωάριο αποτελεί τον πρόγονο από τον οποίο αναπτύσσονται όλα τα κύτταρα ενός νέου οργανισμού, που εξελίσσονται και τελικά δίνουν ένα νέο και ώριμο άτομο. Υπήρχε ωστόσο και μια διαφορετική θεωρία, η οποία ονομάζονταν θεωρία του προσχηματισμού (preformation) και εξέφραζε την άποψη ότι στο ωάριο που γονιμοποιείται υπάρχει σχηματισμένο ένα μη ορατό αντίγραφο του ενήλικου ατόμου και στο οποίο είχε δοθεί η ονομασία «ανθρωπάριο» (humonculus) (Klug et al., 2019).

Το 1838 διατυπώθηκε η κυτταρική θεωρία, σύμφωνα με την οποία τα κύτταρα είναι η βασική μονάδα όλων των ζώντων οργανισμών και ότι κάθε κύτταρα προέρχεται από άλλο κύτταρο. Οι εκφραστές της συγκεκριμένης θεωρίας ήταν οι Schleiden και Schwann και η άποψή τους εδραιώθηκε τις επόμενες δεκαετίες, αφού απορρίφθηκε η θεωρία της αυτόματης γένεσης (δημιουργία οργανισμών από μη έμβια ύλη) (Καψάλης και συν., 2013).

Οι σημαντικότερες βάσεις της γενετικής επιστήμης τέθηκαν από τον Charles Darwin και τον Gregor Johan Mendel προς τα μέσα του 18^{ου} αιώνα. Ο πρώτος ανέπτυξε τη θεωρία για την εξέλιξη των ειδών και την κατέγραψε στη δημοσίευση «η καταγωγή

των ειδών» . Σύμφωνα με τη θεωρία αυτή, η φυσική επιλογή επιτρέπει στους οργανισμούς που είναι περισσότερο προσαρμοσμένοι στο περιβάλλον τους να αναπαράγονται σε μεγαλύτερο βαθμό με επακόλουθο την επικράτηση των κληρονομικών χαρακτηριστικών που προσφέρουν περισσότερες δυνατότητες επιβίωσης. Με βάση τη συγκεκριμένη θεωρία, όλα τα είδη είναι αποτέλεσμα γενετικής τροποποίησης προυπάρχοντων ειδών (Wichler et al., 2013).

Μερικά χρόνια αργότερα, και πιο συγκεκριμένα το 1866 ο Gregor Johan Mendel κατέγραψε τον τρόπο μεταβίβασης χαρακτηριστικών από γενιά σε γενιά στα μπιζέλια και διατύπωσε μετά από παρατηρήσεις τους νόμους της κληρονομικότητας σχετικά με τα επικρατόντα και υπολοιπόμενα χαρακτηριστικά. Το 1910 διατυπώθηκε η θεωρία της χρωμοσωμικής κληρονομικότητας, από τον Thomas Morgan, με βάση πειράματα στον οργανισμό Drosophila melanogaster, η οποία όρισε τις μεταλλάξεις, σαν οποιαδήποτε κληρονομική αλλαγή η οποία συμβαίνει στην αλληλουχία του DNA και κατέληξε στο συμπέρασμα ότι τα κληρονομικά χαρακτηριστικά σχετίζονται με γονίδια τα οποία βρίσκονται στα χρομοσώματα, μεταβιβάζονται από γενιά σε γενιά και αποτελούν ξεχωριστές οντότητες (Portin et al., 2014).

Η θεωρία της γενετικής κληρονομικότητας εμπλουτίστηκε το 1909 από τη θεωρία του γονότυπου και του φαινότυπου, η οποία διατυπώθηκε για πρώτη φορά από τον Willhelm Johansen. Η θεωρία ορίζει σαν γονότυπο το σύνολο των γενετικών χαρακτηριστικών κάθε οργανισμού και σαν φαινότυπο τα χαρακτηριστικά που εκδηλώνονται σε κάθε οργανισμό και τα οποία επηρεάζονται από το περιβάλλον (Harman et al., 2015).

Το επόμενο βήμα στην εξέλιξη της γενετικής ήταν η ανακάλυψη του DNA από τον Griffith το 1928, σαν το χημικό μόριο το οποίο περιέχει τα γενετικά χαρακτηριστικά, αφού αποκλείστηκε η θεωρία ότι το μόριο αυτό είναι οι πρωτεϊνες, λόγω της απλής δομής τους. Η δομή του DNA ανακαλύφθηκε από τους Watson και Crick και θεωρείται σαν μια από τις μεγαλύτερες ανακαλύψεις των ιατρικών επιστημών του 20^{ου} αιώνα (Harman et al., 2015).

Η γενετική άλλαξε ριζικά με την εισαγωγή του κλάδου της μοριακής γενετικής ο οποίος άνθισε τη δεκαετία του 1970 και επικεντρώνονταν στην κατασκευή ανασυνδυασμένου DNA, το οποίοι εισάγεται σε μόρια βακτηρίων , πολλαπλασιάζεται

και κατασκευάζει γονιδιακές βιβλιοθήκες που περιέχουν αντίγραφα του πλήρους γονιδιώματος ενός οργανισμού. Η τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA χρησιμοποιήθηκε για την τροποποίηση οργανισμών ή κυττάρων και ονομάστηκε γενετική μηχανική (Russel et al., 2009).

Η τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA αλλά και η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (polymerase chain reaction – PCR) οδήγησαν στη προσπάθεια της χαρτογράφησης του ανθρώπινου γονιδιώματος, το οποίο ήταν μια διεθνής προσπάθεια η οποία ξεκίνησε το 1990 και ολοκληρώθηκε το 2003 (McElheny et al., 2012). Οι πολυάριθμες ανακαλύψεις της γενετικής τις τελευταίες δεκαετίες οδήγησαν στην μεγάλη επίδραση που έχει σήμερα στην κοινωνία και την ιατρική επιστήμη σε τομείς όπως η θεραπεία, η πρόληψη και η οικονομία.

1.3 Η θέση της γενετικής ιατρικής

Η Γενετική Ιατρική (ΓΙ) είναι ο κλάδος της ιατρικής ο οποίος περιλαμβάνει την διάγνωση και τη διαχείριση κληρονομικών ασθενειών. Η γενετική ιατρική διαφέρει από την τυπική ιατρική από το γεγονός ότι στην τυπική γενετική οι ανακαλύψεις μπορεί να έχουν εφαρμογή στην ιατρική ή μπορεί και όχι, ενώ αντίθετα, οι ανακαλύψεις της γενετικής ιατρικής είναι εξειδικευμένες για να εφαρμοστούν στην ιατρική πρακτική. Για παράδειγμα οι έρευνες που γίνονται πάνω στις αιτίες και στην κληρονομικότητα συγγενών παθήσεων αφορούν και τους δύο κλάδους της γενετικής, ωστόσο οι μελέτες που αφορούν την διάγνωση, θεραπεία και την συμβουλή των ατόμων που πάσχουν από κάποια συγγενή πάθηση, είναι τμήμα της γενετικής ιατρικής. Η γενετική ιατρική είναι μια πιο πρόσφατη επιστήμη σε σύγκριση με την κλασική γενετική και ο όρος χρησιμοποιείται τις τελευταίες δεκαετίες για να περιγράψει πεδία όπως η γενετική θεραπεία, η προσωποποιημένη ιατρική, και την προληπτική ιατρική, ένα νέο και πολλά υποσχόμενο κλάδο της ιατρικής (Jorde et al., 2019).

Επίσης, περιλαμβάνει πολλά επιμέρους επιστημονικά πεδία, όπως την κλινική πρακτική των γιατρών, την γενετική συμβουλευτική, την διατροφολογία, τις διαγνωστικές εργαστηριακές εξετάσεις, και την μελέτη των κληρονομήσιμων γενετικών διαταραχών. Παραδείγματα παθολογιών που εμπίπτουν στην κατηγορία της είναι οι συγγενείς ανωμαλίες, οι νοητικές αναπηρίες, ο αυτισμός, οι μιτοχονδριακές

ανωμαλίες, οι σκελετικές δυσπλασίες, οι ανωμαλίες του συνδετικού ιστού, οι γενετικές ανωμαλίες του καρκίνου, και ο προγεννητική διάγνωση. Επιπλέον, τις τελευταίες δεκαετίες, έχει συσχετιστεί με πολλές κοινές ασθένειες όπως αφού αποκαλύπτονται αιτιολογίες για δερματολογικές, καρδιαγγειακές, πνευμονολογικές, ενδοκρινολογικές και μορφολογικές παθήσεις (Tumpenny et al., 2020, Jorde et al., 2019).

Στη βιβλιογραφία υποστηρίζεται ότι πολλά από τα επιμέρους πεδία της είναι συνδυασμός της κλινικής φροντίδας και της έρευνας. Αυτό οφείλεται στις πρόσφατες ανακαλύψεις, οι οποίες έχουν επιτρέψει μια άνευ προηγουμένη κατανόηση των γενετικών ανωμαλιών (Rabanni et al., 2014). Οι επιμέρους κλάδοι της συμπεριλαμβάνουν:

- Την κλινική γενετική η οποία είναι η πρακτική της κλινικής ιατρικής με ιδιαίτερη έμφαση στις κληρονομικές ασθένειες. Τα γενετικά σύνδρομα με τα οποία ασχολείται η κλινική γενετική είναι ως επί το πλείστων χρωμοσωμικές ανωμαλίες (σύνδρομο Down, σύνδρομο DiGeorge, σύνδρομο ευαίσθητου X, σύνδρομο Marfan, σύνδρομο Turner κλπ).
- Γενετική της βιοχημείας/μεταβολισμού: εμπλέκεται στη διάγνωση και τη διαχείριση εγγενών λαθών του μεταβολισμού, σε ασθενείς με ελλείψεις ενζύμων, που έχουν σαν αποτέλεσμα τη διαταραχή του μεταβολισμού των υδατανθράκων, λιπιδίων ή αμινοξέων.
- Κυτταρογενετική: η μελέτη των χρωμοσωμάτων και των χρομοσωμικών ανωμαλιών μέσω νέων μοριακών τεχνικών όπως είναι η συγκριτική γενωμική υβριδοποίηση
- Μοριακή γενετική: η οποία περιλαμβάνει την ανακάλυψη και την εργαστηριακή μελέτη των μεταλλάξεων του DNA, που εμπλέκονται σε πολλές μονογονιδιακές διαταραχές (αχονδροπλασία, κυστική ίνωση, κληρονομικός καρκίνος του στήθους, σύνδρομο Marfan, σύνδρομο Rett κλπ).
- Μιτοχονδριακή γενετική, η οποία σχετίζεται με τη διάγνωση και θεραπεία των μιτοχονδριακών διαταραχών που έχουν γενετική βάση και έχουν σαν αποτέλεσμα βιοχημικές ανωμαλίες λόγω ανεπαρκούς παραγωγής ενέργειας (Rabbani et al., 2014, Manning et al., 2010).

Στη γενετική ιατρική , πραγματοποιείται διάγνωση για κάθε ασθενή, ανάλογα με τα συμπτώματα που παρουσιάζει και το οικογενειακό του ιστορικό. Ο γενετιστής στη συνέχεια εκφέρει μια διαφορική διάγνωση και προτείνει περαιτέρω εξετάσεις. Οι εξετάσεις αυτές, πιθανόν να εκτιμούν την πιθανότητα συγκεκριμένων χρωμοσωμικών ανωμαλιών, συγγενών προβλημάτων του μεταβολισμού και μονογονιδιακών διαταραχών (Jorde et al., 2019).

1.4. Γενετική σύνδεση και γενετική συσχέτιση

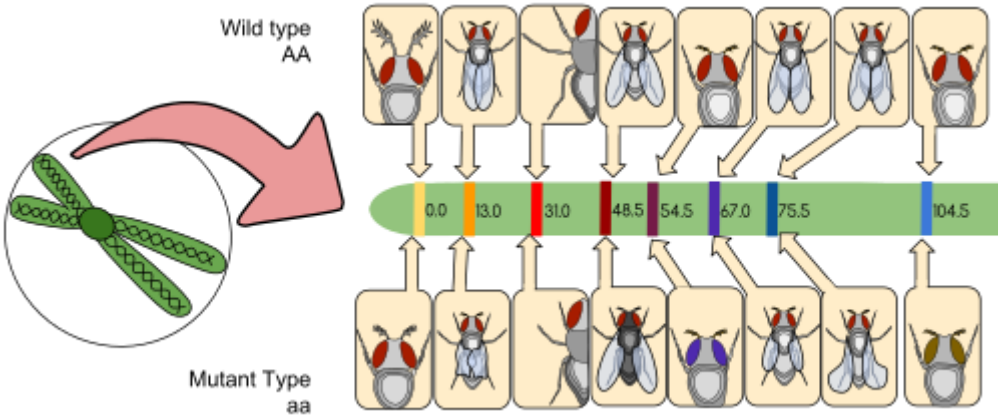
Ο ορισμός της γενετικής σύνδεσης αναφέρει ότι είναι τάση ορισμένων θέσεων σε συγκεκριμένα αλληλόμορφα γονίδια ή σε συγκεκριμένα χρωμοσώματα να κληρονομούνται μαζί. Οι γενετικές θέσεις οι οποίες βρίσκονται στο ίδιο χρωμόσωμα και δεν απέχουν πολύ η μία από την άλλη στην επιφάνεια του χρωμοσώματος, τείνουν να μη διαχωρίζονται κατά τη μείωση και να θεωρούνται γενετικά συνδεδεμένες (Teare et al., 2005).

Κατά τα πρώτα στάδια της μείωσης, όταν αυτή γίνεται με φυσιολογικό τρόπο, ένα ζευγάρι χρωμοσωμάτων (μητρικό και πατρικό) διασταυρώνονται και ανταλλάσσουν τμήματα γενετικού υλικού. Τα ζευγάρι αυτό στα επόμενα στάδια της μίτωσης διασπάται και δίνει ένα νέο συνδυασμό γενετικού υλικού – γονιδίων ο οποίος σχετίζεται με το γενετικό υλικό που προέρχεται από τους γονείς. Η διαδικασία αυτή είναι γνωστή σαν επιχιασμός και μπορεί να απομονώσει αλληλόμορφα τα οποία πριν τον επιχιασμό βρίσκονται στο ίδιο χρωμόσωμα. Ο επιχιασμός είναι ανάλογος με την απόσταση των αλληλόμορφων γονιδίων στο χρωμόσωμα και πιο συγκεκριμένα, όσο πιο μεγάλη είναι αυτή η απόσταση, τόσο μεγαλύτερη είναι και η πιθανότητα να απομονωθούν (Ott et al., 1999).

Η γενετική σύνδεση είναι η πιο σημαντική εξαίρεση του νόμου της ανεξάρτητης μεταβίβασης των γονιδίων, όπως έχει διατυπωθεί από τον Mendel. Τα πρώτα πειράματα για την απόδειξη της γενετικής σύνδεσης έγιναν το 1905 από τους William Bateson., Edith Rebecca και Reginald Punnet. Μέχρι και εκείνη την περίοδο ο λόγος που ορισμένα χαρακτηριστικά μεταβιβάζονταν μαζί ήταν άγνωστος (Ott et al., 1999). Η τυπική μονάδα μέτρησης της γενετικής σύνδεσης είναι το centimorgan (cM). 1 cM είναι η απόσταση μεταξύ δύο θέσεων οι οποίες διαχωρίζονται σε διαφορετικά

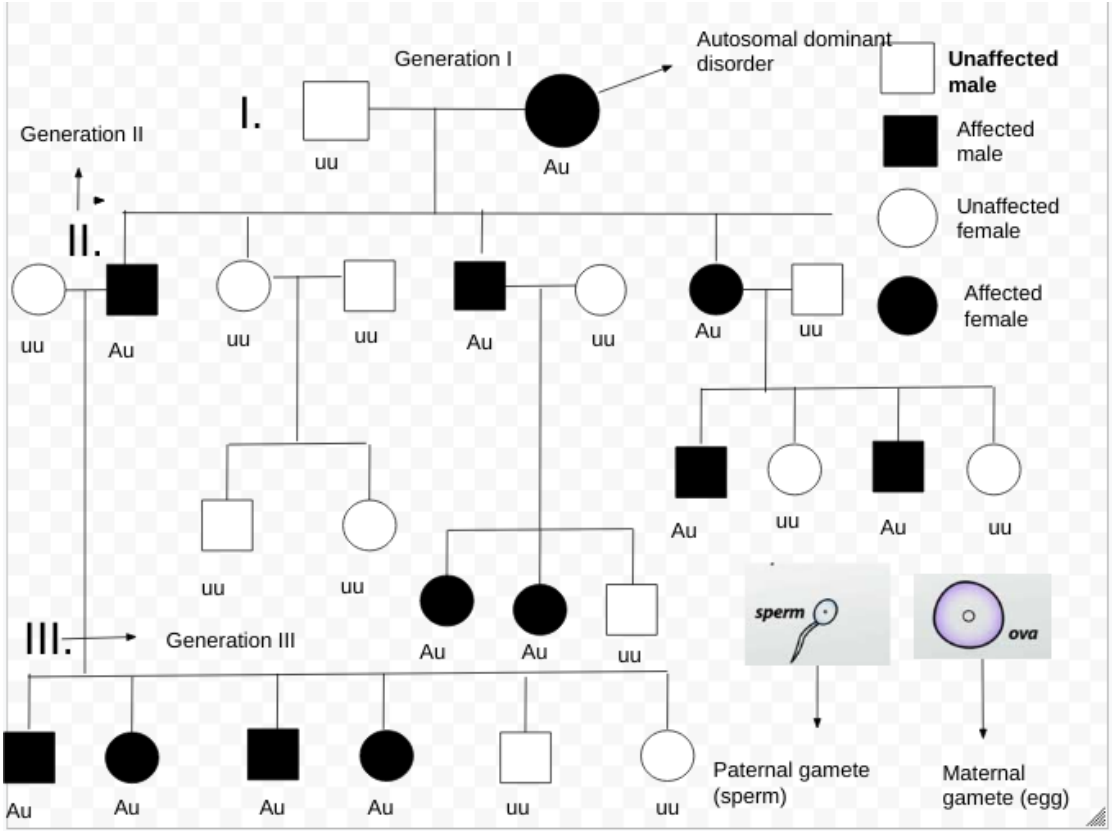
χρωμοσώματα κατά μέσο όρο μία φορά ανά 100 μειωτικά προϊόντα, ή διαφορετικά μία φορά κάθε 50 μειώσεις (Taylor et al., 2017).

Ο χάρτης της γενετικής σύνδεσης, ο οποίος είναι γνωστός και με τον όρο «γενετικός χάρτης» είναι ένας πίνακας που επικεντρώνεται σε ένα συγκεκριμένο είδος ή σε έναν πειραματικό πληθυσμό, και έχει σκοπό να δείξει τις θέσεις του γνωστών γονιδίων ή των γνωστών γενετικών δεικτών, ανάλογα με τη συχνότητα ανασυνδυασμού και όχι ανάλογα με την φυσική απόστασή του πάνω στο χρωμόσωμα. Οι γενετικοί χάρτες αναπτύχθηκαν για πρώτη φορά από τους Sturtevant και Morgan και είναι ουσιαστικά χάρτες που βασίζονται στις συχνότητες ανασυνδυασμού ανάμεσα σε γενετικούς δείκτες κατά τη διασταύρωση ομόλογων χρωμοσωμάτων. Η μεγαλύτερη συχνότητα ανασυνδυασμού σημαίνει μεγαλύτερη απόσταση σε σχέση με την αρχικά θεωρούμενη. Ιστορικά, σαν γενετικοί δείκτες για τη δημιουργία γενετικών χαρτών χρησιμοποιούνταν ανιχνεύσιμοι φαινότυποι (προϊόντα ενζύμων, χρώμα ματιών κλπ), ενώ αργότερα χρησιμοποιούνταν ταυτοποιημένες αλληλουχίες DNA που δεν κωδικοποιούν γονίδια όπως μικρο-δορυφόροι και αλληλουχίες που δημιουργούν χαρακτηριστικούς πολυμορφισμούς μήκους θραύσματος εκ περιορισμού (Restriction Fragment Length Polymorphisms – RFLPs) (Εικόνα 1).



Εικόνα 1. Ο αρχικός γενετικός χάρτης ο οποίος προτάθηκε από τον Morgan, και επικεντρώνεται στην Drosophila Melanogaster. Ο χάρτης δείχνει τις σχετικές θέσεις ανάμεσα στα αλληλόμορφα του δεύτερου χρωμοσώματος της Drosophila. Οι αποστάσεις μεταξύ των γονιδίων (cM) είναι ίσες με τα ποσοστά των γεγονότων χρωμοσωμικής διασταύρωσης μεταξύ διαφορετικών αλληλόμορφων.

Οι γενετικοί χάρτες διευκολύνουν τους ερευνητές να εντοπίσουν γενετικούς δείκτες, όπως καινούρια γονίδια, δοκιμάζοντας την γενετική σύνδεση ανάμεσα στους ήδη γνωστούς γενετικούς δείκτες. Καθώς η γνώση αυξάνεται μέσω των πειραμάτων γενετικών χαρτών, προστίθενται περισσότεροι γενετικοί δείκτες σε μια ομάδα μέχρι να γίνει γνωστή η σύσταση ολόκληρου του χρωμοσώματος. Οι γενετικοί χάρτες είναι το κυριότερο εργαλείο για την ανάλυση γενετικής σύνδεσης, μια μέθοδο η οποία αναζητά χρωμοσωμικά τμήματα που μεταβιβάζονται μαζί σε έναν παθολογικό φαινότυπο μέσω κληρονομικότητας και είναι η κυριότερη μέθοδος μελέτης του μεγαλύτερου ποσοστού των γονιδίων των λιποδυστροφιών (Lanktree er al., 2010, Cantor et al., 2019). Η ανάλυση της γενετικής σύνδεσης μπορεί να είναι είτε παραμετρική (αν είναι γνωστή η σχέση ανάμεσα στον φαινότυπο και τη γενετική ομοιότητα) ή μη παραμετρική. Η παραμετρική συσχέτιση είναι και η τυπική προσέγγιση, όπου υπολογίζεται η πιθανότητα να είναι ένα γονίδιο σημαντικό για μια ασθένεια. Η πιθανότητα αυτή υπολογίζεται μέσω μιας βαθμολογίας (LOD score – logarithm of odds). Αντίστοιχα, η μη παραμετρική ανάλυση υπολογίζει την πιθανότητα να είναι ένα αλληλόμορφο ίδιο με τον εαυτό του μέσω κληρονομικότητας (Εικόνα 2) (Liu et al., 2014).



Εικόνα 2. Σχηματική απεικόνιση μιας παραμετρικής ανάλυσης γενετικής σύνδεσης

Στην πολυπαραγοντική ποσοτική γενετική, η γενετική συσχέτιση (αναφέρεται στη βιβλιογραφία σαν r_g ή r_a) είναι η αναλογία της διακύμανσης ανάμεσα σε δύο συγκεκριμένα χαρακτηριστικά. Μια γενετική συσχέτιση ίση με το 0 σημαίνει ότι οι γενετικές επιδράσεις σε ένα χαρακτηριστικό είναι ανεξάρτητες σε σχέση με τις γενετικές επιδράσεις σε ένα άλλο χαρακτηριστικό. Αντίθετα, μια γενετική συσχέτιση που ισούται με το 1, σημαίνει ότι η γενετική επίδραση στα δύο χαρακτηριστικά είναι πανομοιότυπη. Η γενετική συσχέτιση χρησιμοποιείται κυρίως στις συνδυαστικές πανγονιδιωματικές μελέτες (genome-wide association study – GWAS), όπου μελετώνται η διασταυρώσεις, γίνεται πρόληψη χαρακτηριστικών και ανακαλύπτονται αιτιολογίες ασθενειών και φαινοτυπικών χαρακτηριστικών (Bulik-Sullivan et al., 2015, Canela-Xandri et al., 2018).

Η γενετική συσχέτιση δεν έχει την ίδια έννοια με την κληρονομικότητα ,αφού εξετάζει ουσιαστικά την αλληλεπικάλυψη μεταξύ δύο επιρροών και όχι το μέγεθός τους. Δύο χαρακτηριστικά μπορεί να έχουν μεγάλο βαθμό κληρονομικότητας,

ωστόσο να μην είναι γενετικά συσχετιζόμενα ή να έχουν χαμηλή κληρονομικότητα και να είναι πλήρως συσχετιζόμενα. Μια γενετική συσχέτιση μεταξύ δύο χαρακτηριστικών τείνει να παράγει φαινοτυπικές συσχετίσεις. Για παράδειγμα μια γενετική συσχέτιση μεταξύ της νοημοσύνης και των δημογραφικών χαρακτηριστικών υπονοεί ότι η νοημοσύνη και τα δημογραφικά χαρακτηριστικά συσχετίζονται και φαινοτυπικά. Η φαινοτυπική αυτή συσχέτιση περιορίζεται από τον βαθμό γενετικής συσχέτισης αλλά και από την κληρονομικότητα του κάθε χαρακτηριστικού(Krapohl et al., 2016).

Οι γενετικές συσχετίσεις μπορεί να δημιουργηθούν λόγω:

- ανισορροπίας σύνδεσης (δύο γειτονικά γονίδια τείνουν να κληρονομούνται μαζί, και κάθε ένα από αυτά επηρεάζει ένα διαφορετικό χαρακτηριστικό).
- βιολογική πλειοτροπία (ένα γονίδιο έχει πολλαπλές και μη συσχετιζόμενες βιολογικές επιδράσεις)
- μεροληψία: διαστρωμάτωση πληθυσμού όπως γενεαλογία ή συνδυαστικό ζευγάρωμα (Munafo et al., 2018)

Οι γενετικές συσχετίσεις είναι επιστημονικά χρήσιμες λόγω της ιδιότητας που έχουν να μπορούν να αναλυθούν με διαμήκη τρόπο. Για παράδειγμα η νοημοσύνη είναι σταθερή εφ όρου ζωής λόγω συγκεκριμένων περιβαλλοντικών επιρροών. Επίσης μπορεί να χρησιμεύσει στην μελέτη χαρακτηριστικών ανάμεσα σε πληθυσμούς ή σε φυλές ή σε διαγνώσεις, επιτρέποντας την διερεύνηση της επιρροής διαφορετικών γονιδίων σε ένα χαρακτηριστικό με το πέρασμα του χρόνου (Deary et al., 2012).

1.4 Κλινικές εφαρμογές της γενετικής

Οι διαγνωστικές πτυχές της γενετικής συμπεριλαμβάνουν την χρωμοσωμική ανάλυση, την ανάλυση του DNA και RNA, αλλά και την ανάλυση συγκεκριμένων μεταβολιτών ώστε να διερευνηθούν παραλλαγές που σχετίζονται είτε με κάποια ασθένεια είτε με κάποια φαρμακολογική απόκριση. Η άμεση διάγνωση αναφέρεται σε συγκεκριμένες εκτιμήσεις ενός δείγματος DNA ή/και RNA. Η έμμεση διάγνωση ή διάγνωση συσχετίσεων αναφέρεται στο διαχωρισμό των γενετικών δεικτών οι οποίοι βρίσκονται κοντά στη δομή του χρωμοσώματος ή γενετικών δεικτών που βρίσκονται

μέσα σε γονίδια υπεύθυνα για ασθένεια. Η βιοχημική γενετική περιλαμβάνει την αναλύσεις μεταβολιτών προκειμένου να αναλυθούν ανωμαλίες σε συγκεκριμένα μεταβολικά μονοπάτια. Τέλος, η κυταρρογενετική εξετάζει χρωμοσωμικές ανωμαλίες μεγάλης έκτασης, όπως διαγραφές, αντίγραφα και μετατοπίσεις (Guay-Woodford et al., 2009).

Υπάρχουν τρεις βασικές εφαρμογές που προκύπτουν από τις γενετικές διαγνώσεις:

- η προ-συμπτωματική εκτίμηση
- η εκτίμηση της επικινδυνότητας για την εκδήλωση ασθένειας
- η φαρμακογενετική ανάλυση (Alford et al., 2014).

Οι διαγνωστικές εξετάσεις εφαρμόζονται σε άτομα τα οποία εκδηλώνουν συμπτώματα ή/και σημάδια κάποιας ασθένειας. Σε αυτό το πλαίσιο, η γενετική διάγνωση προσφέρει ακρίβεια στη διάγνωση, χωρίς να υπάρχει ανάγκη για επεμβατικές τεχνικές ή πολύπλοκες αναλύσεις. Η διαγνωστική αυτή ακρίβεια, μπορεί με τη σειρά της να αποτελέσει τη βάση για την εφαρμογή συγκεκριμένων θεραπευτικών παρεμβάσεων, γενετικής καθοδήγησης και την χάραξη κατευθυντήριων γραμμών (Korf et al., 2001).

Η προ-συμπτωματική διάγνωση χρησιμοποιείται για την ταυτοποίηση μεταλλάξεων οι οποίες είναι υπεύθυνες για την εκδήλωση ασθενειών σε μέλη οικογένειας υψηλής επικινδυνότητας πριν την εμφάνιση συμπτωμάτων. Η κύρια χρησιμότητα των εξετάσεων αυτών είναι η εκτίμηση του ρίσκου εκδήλωσης μιας ασθένειας, η οποία επιτρέπει την μείωση της θνησιμότητας μέσω της εφαρμογής πρώιμων θεραπευτικών παρεμβάσεων. Ωστόσο, η ταυτοποίηση μεταλλάξεων που προκαλούν κάποια ασθένεια δεν έχει πάντα τη δυνατότητα να προβλέψει, αν το άτομο στις οποίες ανιχνεύτηκαν θα εκδηλώσει τελικά τη νόσο ή όχι, ενώ δεν είναι πάντα δυνατή η εφαρμογή θεραπευτικών παρεμβάσεων (Godino et al., 2016).

Οι εξετάσεις προδιάθεσης επικεντρώνονται σε πολυγονιδιακές διαταραχές, στις οποίες η εκδήλωση της νόσου εξαρτάται από την αλληλεπίδραση γονιδιακών και περιβαλλοντικών παραγόντων. Τέλος, οι εξετάσεις φαρμακογενετικής εντοπίζουν γενετικές παραλλαγές οι οποίες είναι υπεύθυνες για την απόκριση σε φάρμακα ή άλλες ξενοβιοτικές ουσίες. Τις τελευταίες δεκαετίες η φαρμακογενετική έχει εξελιχτεί σε

μεγάλο βαθμό και είναι μια σημαντική κινητήρια δύναμη της κλινικής φαρμακολογίας, ενώ στο μέλλον θα έχει μεγαλύτερο αντίκτυπο στην λήψη αποφάσεων για τη θεραπεία στην κλινική νεφρολογία, αυξάνοντας την αποτελεσματικότητα των φαρμάκων και μειώνοντας ταυτόχρονα τις παρενέργειες (Spear et al,. 2001).

Αν και οι διαγνωστικές εξετάσεις που έχουν γενετική βάση συνεχίζουν να αυξάνονται, η διαθεσιμότητα δεν αποτελεί τον σημαντικότερο παράγοντα για την εφαρμογή τους στην κλινική πρακτική. Πιο συγκεκριμένα, οι κλινικοί πρέπει να εκτιμήσουν την κλινική εγκυρότητα κάθε εξέτασης, δηλαδή την ακρίβεια με την οποία μια συγκεκριμένη εξέταση μπορεί να διαγνώσει μια ασθένεια. Για παράδειγμα στις μονογονιδιακές γενετικές ανωμαλίες, οι γενετικές διαγνώσεις μπορεί να αποκαλύψουν παραλλαγές της αλληλουχίας οι οποίες έχουν αμφίβολη σημασία (ψευδώς θετικά αποτελέσματα), ενώ αρκετές φορές δεν αναγνωρίζουν το πλήρες εύρος των μεταλλάξεων που συμβαίνουν με φυσικό τρόπο (ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα) (ACMG, 2015, Torkamani et al., 2018).

Σε ένα εργαστήριο κλινικής γενετικής, δείγματα ασθενών εξετάζονται και τα αποτελέσματα αναφέρονται στους αντίστοιχους επαγγελματίες υγείας, ώστε να προσφέρουν τη βάση για κλινική λήψη αποφάσεων και συμβουλευτική στον αντίστοιχο ασθενή. Οι ιδιότητες ενός ερευνητικού εργαστηρίου είναι διαφορετικές, αφού συλλέγει και εξετάζει δείγματα ασθενών προκειμένω να κατανοήσει καλύτερα την παθογένεια μιας ασθένειας ή προκειμένου να αναπτύξει γενετικές διαγνωστικές εξετάσεις (ACMG, 2015).

Περισσότερα από 2000 ανθρώπινα γονίδια που εμπλέκονται σε Μεντελικές ασθένειες έχουν ανακαλυφθεί. Η κλινική γενετική μπορεί να θέσει το πλαίσιο για την πρόληψη και αντιμετώπισή τους σε 4 βήματα:

- την διάγνωση
- την επιλογή θεραπείας
- το αποτέλεσμα της θεραπείας στον ασθενή και
- τον κοινωνικό αντίκτυπο

Από τα παραπάνω γίνεται αντιληπτό ότι η γενετική διάγνωση χρησιμοποιείται για την διάγνωση πολλών ανωμαλιών. Η διάγνωση μιας γενετικής ανωμαλίας σημαίνει ότι οι

συγγενείς του ασθενή θα πρέπει να εξεταστούν για την ύπαρξη της συγκεκριμένης γενετικής ανωμαλίας ή για το αν είναι φορείς. Υπάρχει ένας εκτενής κατάλογος πολλών γενετικών ασθενειών με προτεινόμενες διαγνωστικές στρατηγικές, αλλά και συστάσεις για παροχή συμβουλευτικής υποστήριξης στον Genetic Testing Registry (Rubinstein et al., 2012).

Επιπρόσθετα, η γενετική διάγνωση μπορεί να έχει πλεονεκτήματα στην κλινική πρακτική, ειδικά όταν εφαρμόζεται σε πληθυσμούς αυξημένου κινδύνου για την εκδήλωση γενετικών ανωμαλιών. Τα συνήθη κριτήρια για την γενετική διάγνωση είναι:

- γνωστά μοτίβα κληρονομικότητας
- ύπαρξη αποτελεσματικής θεραπείας
- διαγνωστικές εξετάσεις οι οποίες είναι επαρκώς έγκυρες, αξιόπιστες, ευαίσθητες, μη επεμβατικές και ασφαλείς.

Ο επιπολασμός της νόσου σε έναν συγκεκριμένο πληθυσμό, θα πρέπει να είναι αρκετά μεγάλος ώστε να δικαιολογεί το κόστος των διαγνωστικών μεθόδων.

Ένας από τους στόχους του προγεννητικού ελέγχου είναι να αναγνωρίσει ασυμπτωματικούς, ετερόζυγους γονείς οι οποίοι έχουν γονίδια για κάποια υπολειπόμενη διαταραχή. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι ο γενετικός έλεγχος των Ασκενάζι, μια φυλή η οποία ελέγχονται με συστηματικό τρόπο για την ασθένεια Tay-Sachs, όπως και αρκετές φυλές που ελέγχονται συστηματικά για την ύπαρξη θαλασσαιμιών. Αν ο σύντροφος ενός ετεροζυγώτη είναι επίσης ετεροζυγώτης, υπάρχει αυξημένη πιθανότητα να κληρονομήσουν την ασθένεια στο παιδί τους. Εάν η πιθανότητα είναι αρκετά μεγάλη γίνονται επιπλέον προγενετικές διαγνωστικές εξετάσεις όπως αμνιοκέντηση, δειγματοληψία χοριακών λαχνών, αιμοληψία από τον ομφάλιο λώρο, μητρική αιμοληψία και απεικονιστικές εξετάσεις του εμβρύου (Norwitz et al., 2013). Σε αρκετές περιπτώσεις, οι γενετικές εξετάσεις οι οποίες διαγιγνώσκονται σε εμβρυακό στάδιο, μπορούν να αντιμετωπιστούν εγκαίρως, αποφεύγοντας με τον τρόπο αυτό τις επιπλοκές. Για παράδειγμα, ειδική διατροφή ή θεραπεία αποκατάστασης μπορεί να ελαχιστοποιήσει ή να εξαλείψει τα δυσμενή αποτελέσματα της γαλακτοσαιμίας, της φαινυλκετονουρίας και του υποθυρεοειδισμού. Ένα άλλο χαρακτηριστικό παράδειγμα έγκαιρης παρέμβασης βάσει προγενητικού ελέγχου είναι η λήψη κορτικοστεροειδών από τη μητέρα πριν τη γέννηση η οποία μπορεί να μειώσει

την σοβαρότητα της επινεφρικής υποπλασίας (McCorvie et al., 2020, Kurtoglu et al., 2011).

Με τον όρο γονιδιακή θεραπεία μπορεί να περιγραφεί οποιαδήποτε θεραπεία αλλάζει τη λειτουργία ενός ή περισσοτέρων γονιδίων. Ωστόσο, τις περισσότερες φορές, η γονιδιακή θεραπεία είναι η εισαγωγή φυσιολογικών γονιδίων στα κύτταρα ενός ατόμου το οποίο δεν έχει φυσιολογικά γονίδια λόγω γενετικής ανωμαλίας. Τα φυσιολογικά γονίδια συνήθως κατασκευάζονται τεχνητά μέσω PCR, ή από φυσιολογικό DNA που προέρχεται από δότη. Προς το παρόν, τέτοιες θεραπείες εισαγωγής γονιδίων είναι περισσότερο πιθανές να είναι αποτελεσματικές για την πρόληψη ή τη θεραπεία μονογονιδιακών ασθενειών, όπως είναι η κυστική ίνωση (Verna et al, 2000, Naldini et al., 2005).

Ακόμη ένας τρόπος για την προσθήκη γενετικού υλικού στα κύτταρα είναι η ιογενής επιμόλυνση. Το φυσιολογικό DNA προστίθεται στο γενετικό υλικό ενός ιού ο οποίος προσβάλει τα κύτταρα του ξενιστή και μεταβιβάζει το επιθυμητό DNA στον πυρήνα των κυττάρων αυτών (Daya et al., 2008). Τέλος, με την τεχνολογία των αντιαγγελιοφόρων αντί να γίνει εισαγωγή φυσιολογικού DNA, τροποποιείται η γονιδιακή έκφραση, όπως για παράδειγμα στην περίπτωση φαρμάκων τα οποία συνδυάζονται με συγκεκριμένα τμήματα του DNA, αποτρέποντας με τον τρόπο αυτό την μείωση της έκφρασης κάποιου γονιδίου. Η τεχνολογία αντι-αγγελιοφόρων βρίσκεται σε δοκιμαστική φάση για τη θεραπεία μορφών καρκίνου αλλά είναι σε πρώιμο στάδιο. Ωστόσο φαίνεται να είναι πολλά υποσχόμενη σε σχέση με την προσθήκη γονιδίων λόγω των μεγαλύτερων ποσοστών επιτυχίας και των λιγότερων επιπλοκών που δημιουργεί (Crook et al, 2007).

2. Αναπτυξιακή Βιολογία

2.1 Γονίδιο

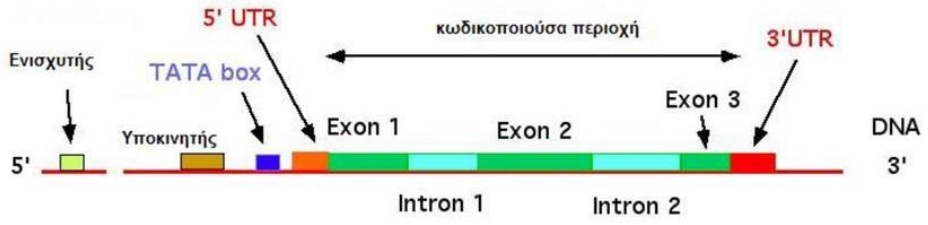
Στη βιολογία, ο όρος γονίδιο, ο οποίος προέρχεται από την Ελληνική λέξη «γόνος», χρησιμοποιείται για να περιγράψει την βασική μονάδα κληρονομικότητας, ένα σύνολο δηλαδή νουκλεοτιδίων που κωδικοποιεί τη σύνθεση ενός προϊόντος, είτε αυτό είναι RNA είτε είναι πρωτεΐνη. Κατά τη διαδικασία της γονιδιακής έκφρασης, το

DNA αντιγράφεται αρχικά σε RNA. Το RNA μπορεί να είναι είτε απευθείας λειτουργικό, είτε μπορεί να δρα σαν ενδιάμεσο καλούπι για τη δημιουργία μιας πρωτεΐνης που έχει μια συγκεκριμένη λειτουργία στον οργανισμό. Η μεταφορά των γονιδίων στον απόγονο ενός οργανισμού, αποτελεί την βάση της κληρονόμησης των φαινοτυπικών χαρακτηριστικών. Τα γονίδια δημιουργούν διαφορετικές αλληλουχίες DNA, που ονομάζονται γονότυποι. Ο γονότυπος, σε συνδυασμό με περιβαλλοντικούς και αναπτυξιακούς παράγοντες, δημιουργούν το φαινότυπο ενός οργανισμού. Τα περισσότερα βιολογικά χαρακτηριστικά ενός φαινότυπου επηρεάζονται από πολλαπλά γονίδια αλλά και από αλληλεπιδράσεις μεταξύ των γονιδίων και του περιβάλλοντος (Bidanel et al, 2011, Guthrie et al, 2002).

Τα γονίδια είναι πιθανόν να αποκτήσουν μεταλλάξεις στην αλληλουχία τους, οι οποίες οδηγούν σε διαφορετικές παραλλαγές στον πληθυσμό, τα αλληλόμορφα. Τα αλληλόμορφα κωδικοποιούν πρωτεΐνες με μικρές διαφορές, οι οποίες προκαλούν διαφορετικά φαινοτυπικά χαρακτηριστικά. Η έννοια του γονιδίου συνεχίζει να εξελίσσεται μέχρι και σήμερα, αφού συνεχίζουν να γίνονται καινούριες ανακαλύψεις, όπως για παράδειγμα ότι οι ρυθμιστικές περιοχές βρίσκονται μακριά από τις περιοχές που κωδικοποιούνται και ότι οι περιοχές κωδικοποίησης μπορεί να διαχωριστούν σε περισσότερα από εξόνια. Κάποιοι ιοί, αποθηκεύουν τις γενετικές τους πληροφορίες σε RNA αντί για DNA, και τα κάποια γονιδιακά προϊόντα τους είναι λειτουργικά μη-κωδικοποιημένα RNA. Επομένως, ένας πιο ευρύς και επίκαιρος ορισμός του γονιδίου είναι ότι ένα συγκεκριμένο τμήμα κληρονομήσιμου γενετικού υλικού το οποίο επηρεάζει το φαινότυπο ενός οργανισμού μέσω έκφρασής τους σαν λειτουργικό προϊόν ή μέσω ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης. Ο όρος γονίδιο προτάθηκε για πρώτη φορά από τον Δανό βοτανολόγο και γενετιστή Wilhelm Johansen το 1909 (Γουρνάρη και συν., 2016).

Η δομή ενός γονιδίου αποτελείται από πολλά διαφορετικά στοιχεία, εκ των οποίων λίγα μόνο είναι υπεύθυνα για την κωδικοποίηση μιας πρωτεΐνης. Τα γονίδια έχουν ένα κεντρικό σημείο το οποίο ονομάζεται ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης (Open Reading Frame - ORF), εκατέρωθεν του οποίου υπάρχει μια ρυθμιστική αλληλουχία από την οποία εξαρτάται ο ρυθμός έκφρασής του. Επιπλέον τα γονίδια χρειάζονται μια περιοχή που δρα σαν εκκινητής μέσω προσέλκυσης της RNA πολυμεράσης. Τα γονίδια μπορεί να περιέχουν ρυθμιστικές περιοχές που έχουν μήκος αρκετές χιλιάδες βάσεις,

και μπορεί να βρίσκονται σε μία ή και στις δύο πλευρές του ORF, και μπορεί να αλλοιώσουν την έκφρασή τους (Εικόνα 3) (Pennacchio et al., 2103).



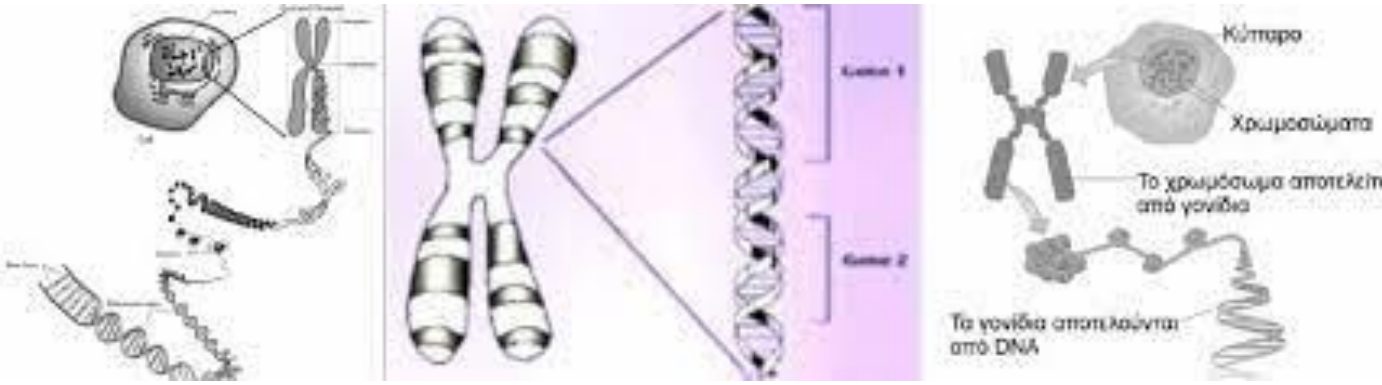
Εικόνα 3. Δομή ενός γονιδίου ευκαρυωτικού κυττάρου.

Το m-RNA, πριν την μεταγραφή περιέχει αμετάφραστες περιοχές και στα δύο άκρα του οι οποίες περιέχουν τμήματα πρόσδεσης για τα ριβοσώματα, πρωτεΐνες πρόσδεσης RNA καθώς και κωδικόνια έναρξης και τερματισμού. Επιπλέον, η πλειοψηφία των ευκαρυωτικών ORF, περιέχουν μη κωδικοποιούμενες αλληλουχίες τα ιντρόνια, που αφαιρούνται αλλά και εξόνια, που σχετίζονται με τη διαδικασία του ματίσματος του RNA (Bicknell et al., 2012).

Η αντιγραφή και η μετάδοση του γενετικού υλικού από τη μια γενιά κυττάρων στην άλλη, αποτελεί τη βάση για την μοριακή κληρονομικότητα και είναι ο συνδετικός κρίκος ανάμεσα στην κλασσική και μοριακή θεώρηση των γονιδίων στη γενετική. Οι οργανισμοί, κληρονομούν τα χαρακτηριστικά των γονιών τους, επειδή τα κύτταρα τους περιέχουν γενετικό υλικό από τα κύτταρα των γονέων. Σε οργανισμούς που η αναπαραγωγή είναι αγενής, ο απόγονος είναι πανομοιότυπος γενετικά με τον πρόγονο (κλώνος). Αντίθετα, σε οργανισμούς που αναπαράγονται εγγενώς, μέσω της μείωσης παράγεται μια ειδική κατηγορία κυττάρων, οι γαμέτες, οι οποίες περιέχουν απλοειδή κύτταρα και περιέχουν ένα από τα δύο αντίγραφα του οργανισμού. Ο απόγονος προκύπτει από την ένωση των γαμετών των δύο φύλλων και έχει ένα αντίγραφο γονιδίου από κάθε γονέα (Alberts et al., 2002).

2.2. DNA και χρωμόσωμα

Το χρωμόσωμα αποτελεί μια δομή στην οποία οργανώνεται το DNA και αποτελείται από νουκλεοτίδια και πρωτεΐνες. Στη δομή του χρωμοσώματος υπάρχει ένα τμήμα DNA το οποίο περιελίσσεται και περιλαμβάνει αρκετές ακολουθίες νουκλεοτιδίων αλλά και γονίδια. Στα χρωμοσώματα περιέχονται και οι συνδεδεμένες πρωτεΐνες, που έχουν σαν κύριο ρόλο τη δομική οργάνωση του DNA, καθώς επίσης και τον έλεγχο των λειτουργιών του (Εικόνα 4). Η ετυμολογία της λέξης χρωμόσωμα έχει τη βάση της στην ιδιότητα του χρωματισμού του από χρωστικές ουσίες που χρησιμοποιούνται εργαστηριακά με μεγάλη ένταση (Αυγενάκη και συν., 2020).



Εικόνα 4. Η δομή ενός χρωμοσώματος.

Σε κάθε υγιές σωματικό κύτταρο περιέχονται 23 ζεύγη χρωμοσωμάτων, με εξαίρεση τα κύτταρα των γαμετών, στα οποία περιέχονται 23 χρωμοσώματα (τα μισά σε σύγκριση με τα σωματικά κύτταρα). Κατά την αναπαραγωγή όταν γίνεται η σύλληψη, ενώνονται οι δύο γαμέτες, το ωάριο και το σπερματοζωάριο και δημιουργείται ένα καινούριο κύτταρο, το ζυγωτό με 23 ζεύγη χρωμοσωμάτων τα οποία προέρχονται κατά το ήμισυ από κάθε γονέα. Το ζυγωτό αυτό κύτταρο αποτελεί το πρώτο κύτταρο από το οποίο μετά από διαδοχικές μιτώσεις θα προέλθουν τα κύτταρα όλων των συστημάτων ενός νέου οργανισμού. Η ονομασία των χρωμοσωμάτων γίνεται με βάση το μέγεθός τους, και πιο αναλυτικά το χρωμόσωμα με τον αριθμό 1 είναι το μεγαλύτερο, ενώ το χρωμόσωμα με τον αριθμό 22 το μικρότερο σε μέγεθος. Τα πρώτα 22 ζεύγη χρωμοσωμάτων ονομάζονται αυτοσωμικά και είναι τα ίδια τόσο στις γυναίκες όσο και στους άντρες, ενώ το εικοστό τρίτο ζευγάρι είναι τα φυλετικά χρωμοσώματα

και διαφέρουν ανάμεσα στα δύο φύλλα. Τα φυλετικά χρωμοσώματα καθορίζουν το φύλο του οργανισμού και το θηλυκό φύλλο έχει τα χρωμοσώματα XX, σε αντίθεση με το αρσενικό που έχει τα χρωμοσώματα X και Y (Kuppers et al., 2001, Page et al., 2003). Σε περίπτωση εμφάνισης πρόσθετου χρωμοσώματος ή απουσίας χρωμοσώματος σε ένα συγκεκριμένο ζεύγος χρωμοσωμάτων, υπάρχει χρωμοσωμική ανωμαλία, μια παθολογική κατάσταση που είναι γνωστή και με τον όρο ανευπλοειδία (MacLennan et al., 2015).

Για την ομαλή λειτουργία του οργανισμού αλλά και τη φυσιολογική αναπαραγωγή, είναι απαραίτητο να υπάρχει η κατάλληλη ποσότητα γενετικού υλικού, το οποίο βρίσκεται αποθηκευμένο στον πυρήνα των κυττάρων με τη μορφή των χρωμοσωμάτων. Οποιαδήποτε αλλαγή συμβαίνει στην δομή ή στο μέγεθος των χρωμοσωμάτων σημαίνει κατά πάσα πιθανότητα αλλαγή στην ποσότητα του DNA ή στον τρόπο με τον οποίο διατάσσεται η γενετική πληροφορία. Μια τέτοιου είδους αλλαγή πιθανότατα έχει σημαντικές συνέπειες στην ομαλή ανάπτυξη και στην υγεία του οργανισμού (Gianaroly et al., 2002).

Οι χρωμοσωμικές αλλαγές, υπάρχει μεγάλη πιθανότητα να κληρονομούνται από τους γονείς, ενώ συμβαίνουν είτε κατά τη διάρκεια της σύλληψης, είτε κατά τη διάρκεια του σχηματισμού των γαμετών. Επιπρόσθετα, οι αλλαγές αυτές συμβαίνουν χωρίς να υπάρχει η δυνατότητα να γίνει κάποιος έλεγχος στη διαδικασία (Gianaroli et al., 2002).

2.2 Χαρτογράφηση του ανθρώπινου γονιδιώματος

Ο πρωταρχικός στόχος της προγράμματος Χαρτογράφησης του Ανθρώπινου Γονιδιώματος (Human Genome Project –HGP) ορίστηκε αρχικά από τον Ch. Kontor και ήταν η δημιουργία χαρτών με αλληλουχίες ανθρώπινου γενετικού υλικού με φυσικό τρόπο. Με τον όρο αλληλουχία, θεωρούμε την αποκωδικοποίηση της αλληλουχίας των βάσεων (πρωτοταγής μορφή), ενός μορίου DNA σε ολόκληρη τη μορφή του, με μέγεθος που κυμαίνεται περίπου 1.5-17 μέτρα. Ο αρχικός προγραμματισμός του HGP

είχε χρονικό ορίζονται 15ετίας, ωστόσο η βελτίωση στις τεχνικές προσδιορισμού του DNA, επέτρεψαν αυτοματισμούς στη διαδικασία που τελικά έγινε οικονομικότερη, ταχύτερη και αποτελεσματικότερη. Αυτό είχε σαν αποτέλεσμα να δημιουργηθεί μια πρόχειρη έκδοση του ανθρώπινου γονιδιώματος, μέχρι τον Ιούνιο του 2000, κατά το τέλος δηλαδή της πρώτης φάσης του HGP (Collins et al., 2001, Bentley et al., 2000).

Η πλήρης αλληλούχιση του ανθρώπινου γονιδιώματος έγινε τον Απρίλιο του 2003, και οι πληροφορίες βρίσκονται αναρτημένες στο διαδίκτυο. Με τον τρόπο αυτό, όλοι οι ερευνητές και οι ενδιαφερόμενοι, σε παγκόσμια κλίμακα έχουν πρόσβαση στο σύνολο της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας, σε οποιοδήποτε τμήμα του ανθρώπινου γονιδιώματος θέλουν να επικεντρωθούν(Collins et al., 2001, Bentley et al., 2000).

Μέχρι και το 2003 είχε ταυτοποιηθεί η πρωταρχική νουκλεοτιδική αλληλουχία του γενετικού υλικού στις ευχρωματικές χρωμοσωμικές περιοχές σε ποσοστό 90%. Οι περιοχές αυτές χρωματίζονται ελάχιστα είτε με φθοροχρώματα είτε με την εξειδικευμένη χρωστική Giemsa και εκεί συγκεντρώνεται και η πλειοψηφία των ανθρώπινων γονιδίων. Τα μέγεθος του ευχρωματικού μέρους του γονιδιώματος φτάνει τα 2,9 δισεκατομμύρια βάσεις (bp), ενώ από τεχνικής απόψεως είναι το πιο εύκολο να προσδιοριστεί. Αντίθετα, οι κεντρομερικές χρωμοσωμικές περιοχές, τα τελομερή, οι έντονα ελικοειδείς περιοχές της ετεροχρωματίνης, βάφοντα εντονότερα με τη χρωστική Giemsa ή με φθοροχρώματα και είναι δυσκολότερο να προσδιοριστούν (Gates et al., 2021).

Το αποτέλεσμα της ολοκλήρωσης του HGP ήταν ο ακριβής υπολογισμός του συνολικού αριθμού των γονιδίων, ο οποίος υπολογίζεται σε 22.0000 γονίδια. Το μεγαλύτερο ποσοστό από αυτά, έχουν ταυτοποιηθεί και η θέση τους πάνω στα χρωμοσώματα έχει χαρτογραφηθεί. Μέχρι και σήμερα, στη βάση δεδομένων OMIN NCBI GeneBank έχουν γίνει συνολικά 17.848 γονιδιακά χαρακτηριστικά, εκ των οποίων τα 16.736 εντοπίζονται σε αυτοσωμικά χρωμοσώματα, 993 έχουν εντοπιστεί στο χρωμόσωμα X και 56 στο χρωμόσωμα Y (Πίνακας 1).

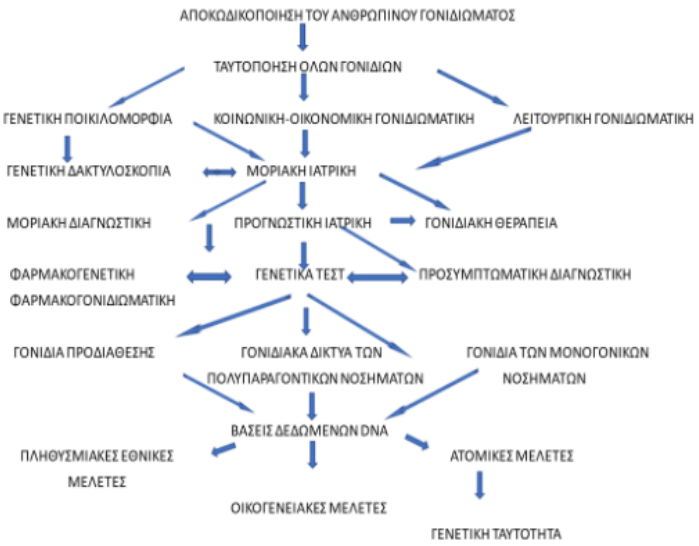
Πίνακας 1. Κύρια χαρακτηριστικά του ανθρώπινου γονιδιώματος, όπως έχουν καθοριστεί μέχρι το 2021.

Γονιδιακοί Δείκτες	
Συνολικό μήκος DNA	Περίπου 1,5-1,7 m
Συνολικός αριθμός νουκλεοτιδίων	$3,1647 \times 10^9$
Συνολικός αριθμός νουκλεοτιδίων στην ευχρωματίνη:	$2,900 \times 10^6$
Συνολικός αριθμός νουκλεοτιδίων στην ετεροχρωματίνη	$0,3 \times 10^6$
Σημαντικότερα αποτελέσματα αλληλούχισης	
Αλληλούχιση	99% της ευχρωματίνης
Σφάλμα	1×10^4
Δεν έχει γίνει αλληλούχιση	1%
Γενική δομή DNA στο ανθρώπινο γονιδίωμα	
Επαναληπτικές ακολουθίες	45-50%
Μέρος του συνολικού γονιδιώματος που μεταγράφεται	28-30%
Μέρος που μεταγράφεται σε RNA	23-25%
Τμήμα του γονιδιώματος που μεταφράζεται σε πρωτεΐνες	5%
Ποσοστό του γενετικού υλικού που κωδικοποιεί τη σύνθεση των πρωτεϊνών	1,2%
LTR, LINE, SINE, Transposones (προαιρετικό DNA)	50%
Μικροδορυφορικό και μινιδορυφορικό DNA	3%
Γενετικοί Πολυμορφισμοί	
Ποικιλομορφία	10%
Συνολικός αριθμός SNPs (Single Nuclear Polymorphisms)	10-12 x 10-6
Αριθμός των SNPs στα σημασιολογικά τμήματα του DNA	$3\text{-}5 \times 10^6$

Αριθμός χαρτογραφημένων SNPs	5,5 x 10-6
Αριθμός Γονιδίων	
Σύνολο	22.000
Μεταγραφόμενες αλληλουχίες άγνωστης λειτουργίας	5.286
Ταυτοποιημένα γονίδια	20.000
Γονίδια υπεύθυνα για μονογονιδιακά νοσήματα	1.485
OMIM χρωμοσώματος 1/άλλες πηγές	1000/3141
OMIM χρωμόσωμα 21/ άλλες πηγές	133/225
OMIM χρωμόσωμα 22/ άλλες πηγές	257/525
OMIM X χρωμοσώματος	578/1098

Στις επόμενες δεκαετίες, η ποσότητα των πληροφοριών σχετικά με τη λεπτή μοριακή δομή του ανθρώπινου γονιδιώματος προβλέπεται να αυξηθεί, κυρίως λόγω της συνεχής προόδου στις μεθόδους προσδιορισμού αλληλουχίας του DNA. Αρχικά, η κυριότερη μέθοδος προσδιορισμού ήταν η μέθοδος Sanger, η οποία είχε αρκετά μεγάλο κόστος, συνεπώς το κόστος του HGP εκτιμήθηκε αρχικά στα 3 δισεκατομμύρια δολάρια, ωστόσο η μέθοδος πρώτης γενιάς αντικαταστάθηκε από τις μεθόδους επόμενης γενιάς (Next Generation Sequencing – NGS) οι οποίες ήταν ταχύτερες και οικονομικότερες. Αν και το HGP έχει επισήμως ολοκληρωθεί, η μελέτη του συνόλου του ανθρώπινου γονιδιώματος συνεχίζεται ενεργά και σήμερα, ενώ ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα προβλήματα γενετικών πολυμορφισμών και τα θέματα λειτουργικής οργάνωσής του (Rood et al., 2021, Schloss et al., 2020).

Η ολοκλήρωση του HGP είχε σαν αποτέλεσμα την ανάπτυξη νέων επιστημονικών κατευθύνσεων όπως για παράδειγμα η λειτουργική γονιδιωματική, η συγκριτική γονιδιωματική, η ποικιλομορφία των ανθρώπινων γονιδιωμάτων και οι επιστήμες οι οποίες επικεντρώνονται στις κοινωνικές, ηθικές και νομικές πτυχές της εκμετάλλευσης των πληροφοριών του ανθρώπινου γονιδιώματος. Οι αλληλεπιδράσεις των επιστημών αυτών απεικονίζονται στην Εικόνα 5.



Εικόνα 5. Αλληλεπίδραση των επιστημονικών κλάδων που έχουν προκύψει από την ολοκλήρωση του HGP.

2.3 Χαρακτηριστικά κληρονομικότητας

Στην επιστήμη της γενετικής με τον όρο κληρονομικότητα εννοούμε τη μεταβίβαση μιας σειράς χαρακτηριστικών από τους γονείς στους απογόνους. Τα χαρακτηριστικά αυτά ονομάζονται κληρονομικά χαρακτηριστικά και σε μοριακό επίπεδο μεταδίδονται μέσω του DNA, το οποίο δρα σαν φορείς της κωδικοποιημένης γενετικής πληροφορίας. Η κληρονομικότητα είναι ένας από τους βασικότερους μηχανισμούς της βιολογικής εξέλιξης των οργανισμών αφού σε βάθος χρόνου τα χαρακτηριστικά που είναι εξέχοντα σε κάθε είδος κληρονομούνται στους απογόνους (Bateson et al., 2013).

2.4.1 Μενδελική κληρονομικότητα

Η Μενδελική κληρονομικότητα είναι ένας τύπος κληρονομικότητας ο οποίος ακολουθεί τις αρχές που προτάθηκαν από τον Gregor Mendel, το 1865 και επανεκτιμήθηκαν το 1900 από τον William Bateson, που έκανε το συγκεκριμένο τρόπο κληρονομικότητας περισσότερο αποδεκτό στην επιστημονική κοινότητα της εποχής. Οι αρχές οι οποίες προτάθηκαν από τον Mendel, δεν είχαν αρχικά μεγάλη απήχηση,

αφού και ο ίδιος πίστευε ότι εφαρμόζονται μόνο σε μερικά είδη. Ωστόσο, η ανακάλυψη των όρων γονίδιο και αλληλόμορφα από τον Bateson, επέτρεψαν την εφαρμογή των νόμων κληρονομικότητας του Mendel σε όλα τα είδη, ενώ έδωσαν το έναυσμα σε μεταγενέστερους επιστήμονες όπως οι Fisher και Haldane να προβλέψουν την εμφάνιση χαρακτηριστικών χρησιμοποιώντας μαθηματικές πιθανότητες (Amberger et al., 2009).

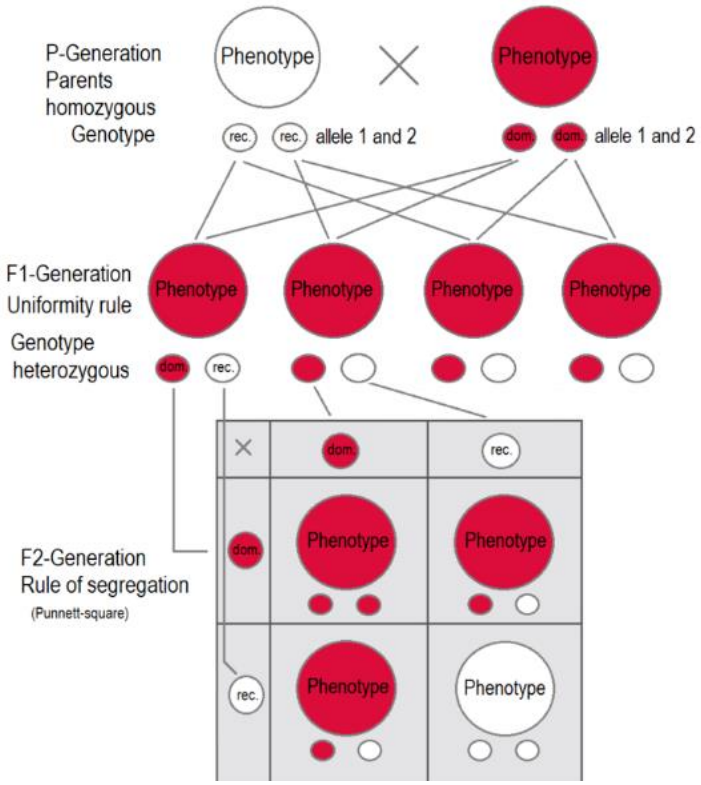
Η Μεντελική κληρονομικότητα στηρίζεται σε πέντε βασικούς νόμους:

- τα χαρακτηριστικά είναι μοναδιαία και είναι διακριτά: δηλαδή μωβ αντί για άσπρο, ψηλό αντί για κοντό. Δεν υπάρχει φυτό το οποίο να είναι μετρίου αναστήματος ή να έχει ανοικτό μωβ χρώμα
- τα γενετικά χαρακτηριστικά έχουν εναλλακτικές μορφές, κάθε μία από τις οποίες έχει κληρονομηθεί από τους γονείς. Σήμερα οι εναλλακτικές αυτές μορφές των γενετικών χαρακτηριστικών είναι γνωστές σαν αλληλόμορφα.
- Ένα αλληλόμορφο είναι επικρατέστερο σε σχέση με το άλλο. Ο φαινότυπος του οργανισμού αντανακλά το πιο επικρατές αλληλόμορφο.
- Οι γαμέτες δημιουργούνται μέσω τυχαίου διαχωρισμού. Οι ετεροζυγώτες παράγουν γαμέτες που έχουν ίση συχνότητα των δύο αλληλόμορφων.
- Διαφορετικά χαρακτηριστικά έχουν ανεξάρτητη ταξινόμηση, ή με σύγχρονους όρους τα γονίδια δεν είναι συνδεδεμένα (Ganikhodjaev et al., 2013).

Οι παραπάνω παρατηρήσεις, σήμερα αποτυπώνονται σαν νόμοι της Μενδελικής κληρονομικότητας.

1ο νόμος ή νόμος της κυριαρχίας και της ομοιομορφίας: αν δύο οργανισμοί ζευγαρώσουν και διαφέρουν ως προς ένα γενετικό χαρακτηριστικό για το οποίο είναι ομόζυγοι, οι απόγονοι της πρώτης γενιάς (F1) είναι ισότιμοι ως προς τα χαρακτηριστικό αυτό ως προς το γενότυπο, ενώ ο φαινότυπος δείχνει το επικρατές χαρακτηριστικό. Ο 1ος νόμος της ομοιομορφίας, εφαρμόζεται σε όλους τους απογόνους της γενιάς F1. Η αρχή της επικρατούσας κληρονομικότητας δείχνει ότι σε

έναν ετεροζυγώτη, το επικρατές χαρακτηριστικό προκαλεί την επικάλυψη του υπολειπόμενου στον φαινότυπο (Εικόνα 6).



Εικόνα 6. Στην γενιά F1, όλοι οι απόγονοι έχουν τον ίδιο γονότυπο και τον ίδιο φαινότυπο, ο οποίος εκφράζει το επικρατές χαρακτηριστικό.

2ος νόμος ή νόμος διαχωρισμού των γονιδίων: Ο 2ος νόμος του Μέντελ, εφαρμόζεται στην περίπτωση όπου δύο άτομα τα οποία είναι ετερόζυγα για κάποιο χαρακτηριστικό, διασταυρώνονται (για παράδειγμα οι απόγονοι της F1 γενιάς). Οι απόγονοι της F2 γενιάς, διαφέρουν τόσο ως προς το γονότυπο όσο και ως προς το φαινότυπο, έτσι ώστε τα χαρακτηριστικά της γενιάς P (παππούδες) να εμφανίζονται με συγκεκριμένη συχνότητα. Σε περίπτωση κυρίαρχης και υπολειπόμενης κληρονομικότητας η αναλογία των γονότυπων είναι 1:2:1 και η αναλογία των φαινότυπων είναι 3:1. Η μοριακή απόδειξη του 2ου νόμου του Μέντελ προήλθε αργότερα με την παρατήρηση της μείωσης (Hamosh et al., 2021).

3ος Νόμος ή νόμος ανεξάρτητης μεταβίβασης, ο οποίος δηλώνει ότι τα αλληλόμορφα που είναι υπεύθυνα για διαφορετικά χαρακτηριστικά, μεταβιβάζονται ανεξάρτητα το ένα σε σχέση με το άλλο. Η ανεξάρτητη μεταβίβαση συμβαίνει στους

ευκαρωτικούς οργανισμούς κατά τη διάρκεια της μειωτικής μετάφασης Ι, και παράγει γαμέτες με ένα μείγμα των χρωμοσωμάτων ενός οργανισμού. Υπάρχουν αρκετές αποκλίσεις από την αρχή της ανεξάρτητης μεταβίβασης λόγω γενετικής σύνδεσης. Κατά την ανεξάρτητη μεταβίβαση, τα χρωμοσώματα τα οποία προκύπτουν από την διασταύρωση δύο γονέων, σχηματίζονται μέσω τυχαίας διασταύρωσης όλων των πιθανών μητρικών και πατρικών χρωμοσωμάτων. Επομένως, ένα ζυγωτικό κύτταρο περιέχει ένα συνδυασμό μητρικών και πατρικών χρωμοσωμάτων. Για τους ανθρώπους, οι οποίοι έχουν 23 χρωμοσώματα, ο συνδυασμός αυτός είναι 2^{23} ή 8.388.608 πιθανοί συνδυασμοί. Αυτό συνεισφέρει σε μεγάλο βαθμό στην γενετική ποικιλότητα (Hamosh et al., 2021).

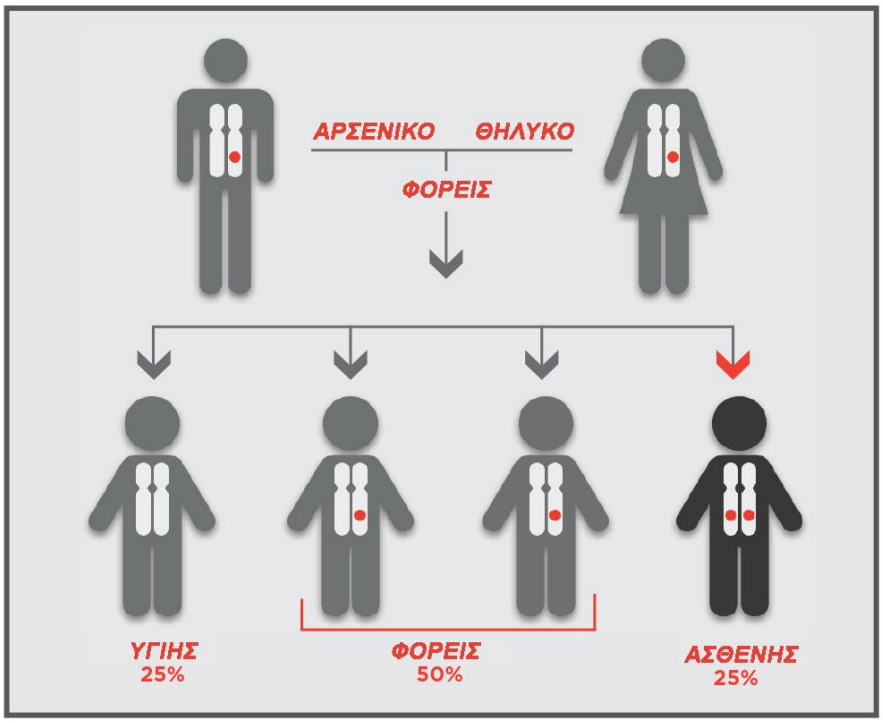
Οι γενετικές διαταραχές είναι παθολογικές καταστάσεις οι οποίες προκαλούνται από μία ή περισσότερες μεταλλάξεις στο γονιδίωμα. Οι διαταραχές αυτές εμφανίζονται με μικρή συχνότητα στον πληθυσμό ενός είδους, περίπου σε ένα άτομο ανά χιλιάδες ή εκατομμύρια. Οι μεταλλάξεις οι οποίες προκαλούν τις γενετικές αυτές διαταραχές μπορεί να είναι κληρονομικές, δηλαδή τα γονίδια μεταβιβάζονται από τους γονείς στους απογόνους τους. Οι γενετικές διαταραχές, ανάλογα με το αν προκαλούνται από μεταλλάξεις σε ένα ή περισσότερα γονίδια, μπορεί να είναι πολυπαραγοντικές ή χρωμοσομικές ή μονογονιδιακές (Fitzpatrick et al., 2007).

Οι μονογονιδιακές διαταραχές προκαλούνται από μεταλλάξεις σε ένα μόνο γονίδιο, ενώ έχουν εντοπιστεί πάνω από 6.000 ανθρώπινες διαταραχές οι οποίες προκαλούνται από μονογονιδιακές μεταλλάξεις. Μία τέτοιου είδους διαταραχή μπορεί να περάσει από τους γονείς στους απογόνους με πολλούς τρόπους, οι σημαντικότεροι από τους οποίους είναι η αυτοσωμική και η υπολειπόμενη κληρονομικότητα (Garte et al., 2001).

2.4.2. Αυτοσωμική υπολειπόμενη κληρονομικότητα

Στην αυτοσωμική υπολειπόμενη κληρονομικότητα, απαιτούνται να υπάρχουν δύο αντίγραφα του μεταλλαγμένου γονιδίου προκειμένου να προσβληθεί το άτομο από

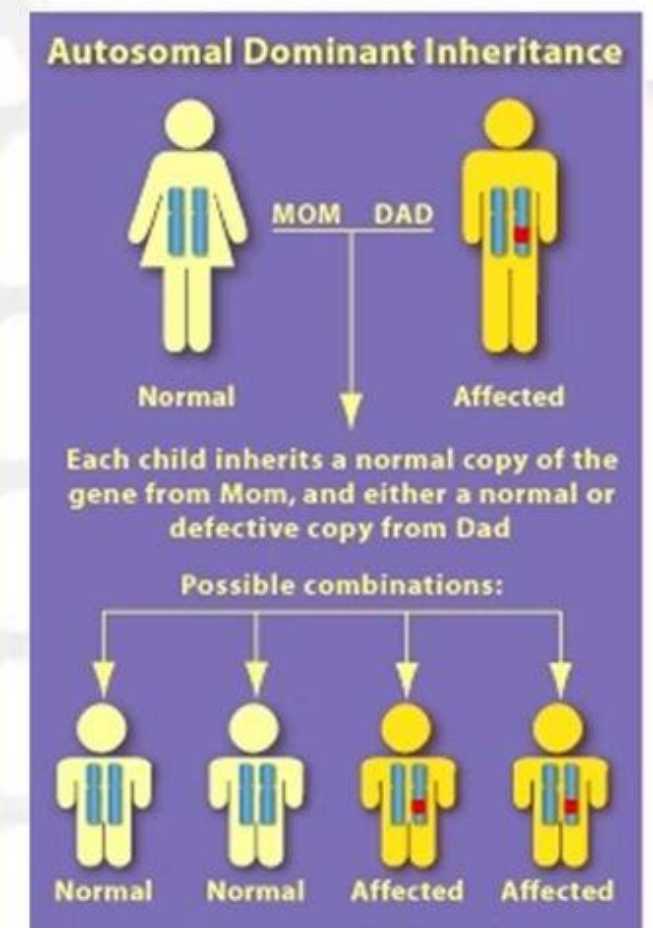
μια διαταραχή που κληρονομείται με το συγκεκριμένο τρόπο. Οι μεγαλύτερες πιθανότητες, είναι ένα προσβεβλημένο από τη διαταραχή άτομο να έχει γονείς οι οποίοι δεν είναι προσβεβλημένοι, ωστόσο φέρουν από ένα αντίγραφο του γονιδίου υπεύθυνου για την διαταραχή. Τα άτομα που έχουν ένα αντίγραφο του γονιδίου υπεύθυνου για τη διαταραχή ονομάζονται φορείς. Οι φορείς δεν εκδηλώνουν τα συμπτώματα της νόσου, ενώ έχουν 25% πιθανότητα να μεταδώσουν ένα αντίγραφο του μεταλλαγμένου γονιδίου σε κάθε εγκυμοσύνη (Εικόνα 7) (Chial et al., 2008). Χαρακτηριστικά παραδείγματα διαταραχών που κληρονομούνται με τον τρόπο της αυτοσωμικής υπολειπόμενης κληρονομικότητας είναι η κυστική ίνωση, ο αλφισμός, το σύνδρομο Tay-Sachs, η δρεπανοκυτταρική αναιμία, τα σύνδρομα Roberts και Nieman-Pick και η νωτιαία μυϊκή δυστροφία (Beudet et al., 2016).



Εικόνα 7. Αυτοσωμική υπολειπόμενη κληρονομικότητα

2.4.3 Αυτοσωμική επικρατής κληρονομικότητα

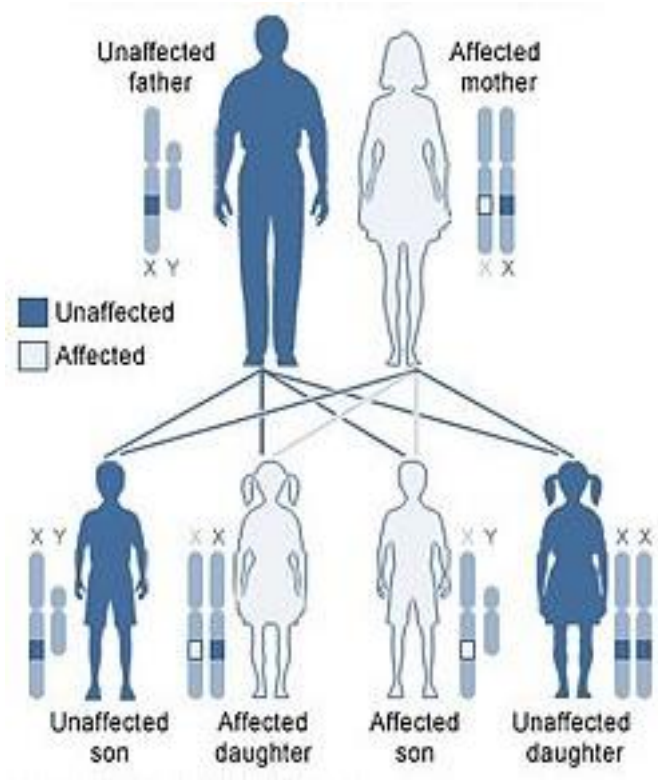
Στην αυτοσωμική επικρατής κληρονομικότητα, χρειάζεται η ύπαρξη μόνο ενός αντίγραφου του μεταλλαγμένου γονιδίου, προκειμένου να εκδηλωθεί η ασθένεια από ένα άτομο. Τα προσβεβλημένα άτομα κληρονομούν τις περισσότερες φορές το γονίδιο από έναν από τους δύο γονείς, και στις περιπτώσεις αυτές, οι πιθανότητες να κληρονομήσει ένα παιδί το γονίδιο από ένα γονέα είναι 50%, Οι κληρονομικές ασθένειες οι οποίες κληρονομούνται με το συγκεκριμένο τρόπο έχουν χαμηλή εκδηλωτικότητα (διεισδυτικότητα), γεγονός που σημαίνει ότι απαιτείται μόνο ένα μεταλλαγμένο γονίδιο για να εκδηλωθεί η ασθένεια στο σύνολο των ατόμων που κληρονομούν το μεταλλαγμένο γονίδιο (Grifiths et al., 2013). Χαρακτηριστικά παραδείγματα ασθενειών που κληρονομούνται μέσω αυτοσωμικής επικρατούσας κληρονομικότητας αποτελούν η οζώδης σκλήρυνση, τα σύνδρομα Marfan και Von Willebrand, η νόσος του Χάντιγκτον, η οζώδης σκλήρυνση, η οξεία διακοπτόμενη πορφυρία και η νευροϊμάτωση τύπου 1 και 2 (Weatherall et al., 2000).



Εικόνα 8. Αυτοσωμική επικρατής κληρονομικότητα

2.4.4 Φυλοσύνδετη κληρονομικότητα

Η φυλοσύνδετη κληρονομικότητα αφορά διαταραχές που οφείλονται σε γονίδια που βρίσκονται στα φυλετικά και όχι στα αυτοσωμικά χρωμοσώματα, ή πιο συγκεκριμένα στα χρωμοσώματα Χ και Ψ. Οι επικρατείς διαταραχές οι οποίες είναι συνδεδεμένες με το χρωμόσωμα Χ, προέρχονται από μεταλλάξεις στα γονίδια του Χ χρωμοσώματος. Η συχνότητα των διαταραχών που ακολουθούν το συγκεκριμένο μοτίβο κληρονομικότητας είναι ιδιαίτερα μικρή, με χαρακτηριστικό παράδειγμα την πάθηση υποφωσφαταιμική ραχίτιδα, που εμφανίζεται σε συχνότητα μικρότερη του 1 ατόμου ανά 1.000.000 (Simm et al, 2020). Οι συνδεδεμένες με το Χ χρωμόσωμα επικρατούσες διαταραχές επηρεάζουν και τα δύο φύλλα, ωστόσο εκδηλώνονται σοβαρότερα στους άντρες. Για παράδειγμα διαταραχές όπως η ακράτεια μελανίνης, τύπου 2, το σύνδρομο Aicardi και το σύνδρομο Ρετ, είναι θανατηφόρες στους άντρες ενώ στις γυναίκες προκαλούν σοβαρές συνέπειες για το υπόλοιπο της ζωής , ωστόσο δεν προκαλούν την κατάληξή τους. Λόγω της διαφοράς των φυλετικών χρωμοσωμάτων ανάμεσα στα δύο φύλλα, οι πιθανότητες μεταβίβασης μιας τέτοιου είδους διαταραχής διαφέρει στα δύο φύλα. Οι άντρες απόγονοι ενός πατέρα με τη διαταραχή δεν προσβάλλονται αφού λαμβάνουν από αυτόν το Υ χρωμόσωμα, ενώ αντίθετα, όλες οι κόρες θα προσβληθούν από τη νόσο αφού θα κληρονομήσουν το Χ χρωμόσωμα. Μια γυναίκα που έχει επικρατούσα διαταραχή συνδεδεμένη με το Χ χρωμόσωμα, έχει 50% πιθανότητες να γεννήσει ένα παιδί με τη διαταραχή σε κάθε εγκυμοσύνη, ανάλογα με το αν μεταβιβάσει το Χ χρωμόσωμα με το μεταλλαγμένο γονίδιο (Εικόνα 9) (Bobins et al., 2004).



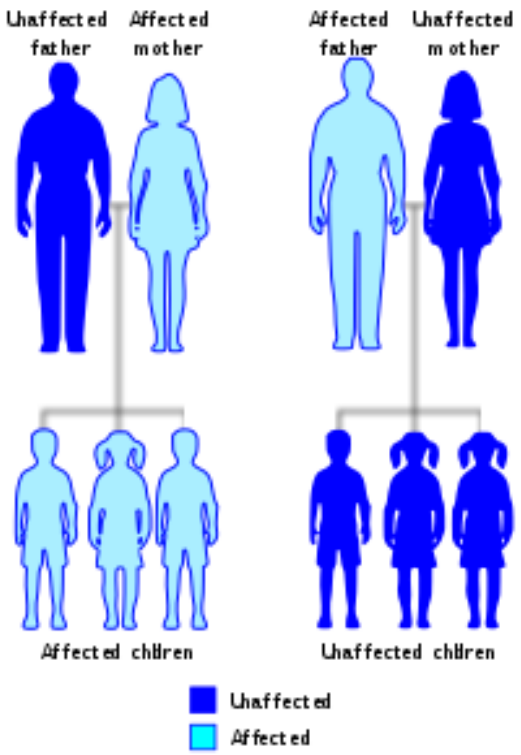
Εικόνα 9. Επικρατής διαταραχή συνδεδεμένη με το Χ χρωμόσωμα, στην εικόνα η μητέρα είναι ο φορέας του Χ χρωμοσώματος με το μεταλλαγμένο γονίδιο, ενώ ο πατέρας είναι υγιής.

Στις παθήσεις που ακολουθούν την υπολειπόμενη κληρονομικότητα που είναι συνδεδεμένη με το Χ χρωμόσωμα, το γονίδιο βρίσκεται και στην περίπτωση αυτή στο Χ φυλετικό χρωμόσωμα, ωστόσο διαφέρει η πιθανότητα μεταβίβασής του από τους γονείς στους απογόνους και πιο συγκεκριμένα, η πιθανότητα μεταβίβασης είναι μεγαλύτερη στους άντρες σε σχέση με τις γυναίκες. Ένας πατέρας με υπολειπόμενη διαταραχή, συνδεδεμένη με το Χ χρωμόσωμα, δεν προσβάλει τους άντρες απογόνους, αφού λαμβάνουν το Χ χρωμόσωμα από τη μητέρα, ενώ οι κόρες φέρουν στο σύνολό τους ένα αντίγραφο του μεταλλαγμένου γονιδίου. Αντίστοιχα, μια μητέρα που είναι φορέας μια τέτοιου είδους διαταραχής, έχει 50% να γεννήσει γιούς που είναι προσβεβλημένοι και 50% κόρες που είναι φορείς (φέρουν ένα αντίγραφο του μεταλλαγμένου γονιδίου). Παραδείγματα ασθενειών που κληρονομούνται με τον τρόπο αυτό είναι η μυϊκή δυστροφία Duchene, η αιμοφιλία Α, το σύνδρομο Lesch-Nyhan, αλλά και άλλες λιγότερο σοβαρές όπως η αχρωματοψία και η ανδρογενής αλωπεκία. Οι υπολειπόμενες παθήσεις συνδεδεμένες με το Χ χρωμόσωμα μπορεί να

εκδηλωθούν στις γυναίκες λόγω μονοσωμίας (σύνδρομο Turner), ή λόγω ασύμμετρης αδρανοποίησης του Χ χρωμοσώματος (Gregg et al., 2021, Dobyns et al., 2004).

Οι διαταραχές οι οποίες συνδέονται με το χρωμόσωμα Υ, προκαλούνται από γονίδια που βρίσκονται στο συγκεκριμένο χρωμόσωμα και μεταβιβάζονται μόνο από το ετερογαμετικό φύλο σε απογόνους του ίδιου φύλου. Με διαφορετική διατύπωση, οι διαταραχές αυτές μπορούν να μεταβιβαστούν από άντρες στους γιούς τους, ενώ οι κόρες δεν επηρεάζονται αφού δεν έχουν το Υ χρωμόσωμα. Οι διαταραχές αυτού του τύπου είναι ιδιαίτερα σπάνιες στον πληθυσμό και στην σπανιότητα τους συνεισφέρει και το γεγονός ότι προκαλούν στειρότητα (Mahdieh et al., 2013).

Οι μιτοχονδριακές διαταραχές αναφέρονται σε έναν τύπο διαταραχών που εμφανίζεται στη βιβλιογραφία και με τον όρο μητρική κληρονομικότητα και παρατηρείται σε γονίδια τα οποία κωδικοποιούνται από το μιτοχονδριακό DNA. Στο αναπτυσσόμενο έμβρυο, μόνο τα ωάρια συνεισφέρουν στα μιτοχόνδρια, επομένως το DNA αυτό μπορεί να κληρονομηθεί μόνο από τις μητέρες στα παιδιά τους. Χαρακτηριστικό παράδειγμα τέτοιου είδους διαταραχή αποτελεί η κληρονομική οπτική νευροπάθεια του Laber. Σημαντικό είναι επίσης το γεγονός ότι η μεγαλύτερη πλειοψηφία των ασθενειών που κληρονομούνται μέσω του μιτοχονδριακού DNA προκαλούνται από υποκείμενο ελαττώματα των γονιδίων του πυρήνα και αυτός είναι και ο κύριος λόγος που ακολουθούν την αυτοσωμική υπολειπόμενη κληρονομικότητα (Εικόνα 10).



Εικόνα 10. Παράδειγμα μιτοχονδριακής κληρονομικότητας στο οποίο φαίνεται ο διαφορετικός τρόπος κληρονόμησης γονιδίων από τη μητέρα (αριστερά) και τον πατέρα (δεξιά) στου απογόνους.

3. Γονιδιακή Έκφραση

Το γενετικό υλικό το οποίο περιέχεται στα κύτταρα ενός οργανισμού είναι η «αποθήκη» των γενετικών πληροφοριών του, οι οποίες θα καθορίσουν σε απόλυτο βαθμό τη δομή και τη λειτουργία του. Στο γενετικό υλικό, περιέχεται επίσης και η πληροφορία για τον αυτοδιπλασιασμό του, προκειμένου να διασφαλίσει τη μεταβίβαση των πληροφοριών του στα θυγατρικά κύτταρα. Η έκφραση της γενετικής πληροφορίας η οποία είναι αποθηκευμένη στο DNA, μεταφέρεται αρχικά στο RNA μέσω της μεταγραφής και στη συνέχεια μέσω της μετάφρασης στις πρωτεΐνες που καθορίζουν τη δομή και τη λειτουργία των κυττάρων και του οργανισμού. Η διαδικασία αυτή είναι ευρέως γνωστή και σαν κεντρικό δόγμα της γενετικής. Μέσω της αντιγραφής του DNA, πετυχαίνετε η διαιώνιση της γενετικής πληροφορίας και μέσω της μετάφρασης η πληροφορία αυτή χρησιμοποιείται για να κατασκευαστούν πολυπεπτιδικές αλυσίδες

(Li et al., 2015). Αν και το σύνολο των κυττάρων του οργανισμού έχουν το ίδιο DNA σε διαφορετικές ομάδες κυττάρων εκφράζονται και διαφορετικά γονίδια. Επιπλέον τα γονίδια μπορούν να διαχωριστούν σε δύο βασικές κατηγορίες: τα γονίδια που μεταγράφονται σε mRNA και στη συνέχεια μεταφράζονται σε πρωτεΐνες και τα γονίδια τα οποία μεταγράφονται και παράγουν tRNA, snRNA και rRNA (Li et al., 2011).

3.1 Γονιδιακή Ρύθμιση

Η γονιδιακή ρύθμιση περιλαμβάνει ένα μεγάλο αριθμό μηχανισμών που χρησιμοποιούνται από τα κύτταρα προκειμένου να αυξήσουν ή να μειώσουν την παραγωγή γονιδιακών προϊόντων, δηλαδή πρωτεϊνών ή RNA, ανάλογα με τις ανάγκες του κυττάρου ή του οργανισμού. Οι τρόποι της γονιδιακής ρύθμισης είναι αντικείμενο ευρείας μελέτης στην επιστήμη της βιολογίας, και με σκοπό τη πυροδότηση νέων μονοπατιών ανάπτυξης, τη μελέτη της απόκρισης των κυττάρων σε εξωτερικά ερεθίσματα ή την προσαρμογή των οργανισμών σε νέα ερεθίσματα. Σχεδόν όλα τα στάδια της γονιδιακής έκφρασης ενός κυττάρου μπορούν να ρυθμιστούν, από την έναρξη της μεταγραφής, μέχρι την επεξεργασία του RNA και την μετα-μεταφραστική τροποποίηση μιας πρωτεΐνης (Rosenfeld et al., 2005).

Η γονιδιακή ρύθμιση είναι απαραίτητη διαδικασία για τα προκαρυωτικά, τα ευκαρυωτικά κύτταρα και τους ιούς, αφού μπορεί επηρεάζει θετικά στην προσαρμοστικότητα ενός οργανισμού, επιτρέποντας στα κύτταρά του να εκφράζουν πρωτεΐνες, όταν αυτές χρειάζονται. Στους πολυκύτταρους οργανισμούς, η γονιδιακή ρύθμιση επιτρέπει την κυτταρική διαφοροποίηση και την εμβρυακή μορφογένεση, οδηγώντας στη δημιουργία διαφορετικών κυτταρικών τύπων που έχουν διαφορετικά μοτίβα γονιδιακής έκφρασης, ενώ προέρχονται από την ίδια γονιδιακή αλληλουχία. Αν και το γεγονός αυτό δεν εξηγεί την προέλευση της γονιδιακής έκφρασης, οι εξελικτικοί βιολόγοι την συμπεριλαμβάνουν στις θεωρίες της εξέλιξης σε μοριακό επίπεδο (Mack et al., 2017).

Κάθε στάδιο της γονιδιακής έκφρασης μπορεί να ρυθμιστεί από την μεταγραφή του DNA σε RNA μέχρι και την μετα-μεταγραφική ρύθμιση μια πρωτεΐνης.

Τα ακόλουθα στάδια είναι τα στάδια της γονιδιακής έκφρασης στα οποία γίνεται συχνότερα ρύθμιση:

- Χρωματίνη
- Μεταγραφή
- Μετα-μεταγραφική ρύθμιση
- Μετάφραση
- αποδόμηση του mRNA.

3.1.1 Γονιδιακή ρύθμιση του ευκαρυωτικούς οργανισμούς.

Η γονιδιακή ρύθμιση στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς είναι ένας συνδυασμός της επίδρασης δομικών πρωτεϊνών και της αλληλεπίδρασής τους με τους μεταγραφικούς παράγοντες (επίσης πρωτεΐνες). Οι μεταγραφικοί παράγοντες είναι πρωτεΐνες που έχουν σαν κύρια λειτουργία την ενεργοποίηση ή συχνότερα την αναστολή της μεταγραφής ενός τμήματος DNA, η οποία προκαλείται με την πρόσδεσή τους σε συγκεκριμένες αλληλουχίες DNA. Οι παράγοντες αυτοί έχουν συγκεκριμένα τμήματα DNA στα οποία προσδένονται, και κατηγοριοποιούνταν σε διάφορες οικογένειες (MADS – Mother Against Dpp, SOX, POU). Οι ρυθμιστικοί μεταγραφικοί παράγοντες μπορούν επίσης να κατηγοριοποιηθούν με βάση την τρισδιάστατη πρωτεϊνική δομή τους, η οποία καθορίζει την αλληλουχία πρόσδεσης (Remenyi et al., 2004).

Οι ρυθμιστικοί παράγοντες οι οποίοι δεσμεύονται σε εξειδικευμένες αλληλουχίες – στόχους θεωρούνται ότι είναι οι πιο σημαντικοί και οι περισσότεροι διαφοροποιημένοι μηχανισμοί στα ευκαρυωτικά αλλά και στα προκαρυωτικά κύτταρα. Στα ευκαρυωτικά κύτταρα η ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης θεωρείται ότι γίνεται συνδυαστικά μέσω της αλληλεπίδρασης πολλών πρωτεϊνών (Remenyi et al., 2004).

Ακόμη όμως και στις περιπτώσεις που οι μεταγραφικοί παράγοντες είναι παρόντες σε ένα κύτταρο, η μεταγραφή δεν πραγματοποιείται πάντα, αφού συχνά οι παράγοντες αυτοί δεν μπορούν να φτάσουν τις αλληλουχίες-στόχους. Στις περιπτώσεις αυτές, η συσχέτιση του μορίου του DNA με τις πρωτεΐνες είναι συνήθως ο πρωταρχικός τρόπος ρύθμισης. Το σύνολο του μορίου DNA και των ιστονών καλείται χρωματίνη

και το σύμπλεγμα σχηματίζεται μέσω της προσέλκυσης του αρνητικά φορτισμένου μορίου DNA στις θετικά φορτισμένες ιστόνες. Η κατάσταση της χρωματίνης, μπορεί να περιορίσει την πρόσβαση των παραγόντων μεταγραφής και της RNA πολυμεράσης στους εκκινητές DNA, συνεισφέροντας με τον τρόπο αυτό στην περιοριστική του ρύθμιση (Li et al., 2011).

Η δομή της χρωματίνης συνεισφέρει σε διαφορετικό βαθμό στη γονιδιακή ρύθμιση. Επιτρέπει την ταυτόχρονη ρύθμιση γονιδίων που είναι υπεύθυνα για τη δομή τη λειτουργία του κυττάρου και τα οποία βρίσκονται σε συγκεκριμένες ομάδες στο ευκαρυωτικό DNA. Η αλληλεπίδραση της χρωματίνης με ενεργοποιητές και καταστολείς έχει επίδραση στο αν συγκεκριμένες δομές χρωματίνης είναι κλειστές, ανοικτές ή έτοιμες προς ενεργοποίηση. Η συγκεκριμένη ενεργοποίηση συμβαίνει μόνο στα ευκαρυωτικά κύτταρα και χρησιμεύει για τη γονιδιακή ρύθμιση σε διάφορα στάδια της ανάπτυξης των οργανισμών κατά τη διάρκεια του κύκλου κυτταρικής διαίρεσης μέσω επιγενετικής μνήμης (White et al., 2002).

3.1.2 Γονιδιακή ρύθμιση στους προκαρυωτικούς οργανισμούς

Η γονιδιδιακή ρύθμιση των προκαρυωτικών οργανισμών συμβαίνει σε επίπεδο μεταγραφής και προκαλείται από δύο βασικές κατηγορίες πρωτεϊνών: τις πρωτεΐνες ενεργοποίησης και τις πρωτεΐνες καταστολής. Οι αναστολείς προσδένονται σε μια λειτουργική αλληλουχία προκειμένου να εμποδίσουν τη δράση της RNA πολυμεράσης. Αντίστοιχα, οι ενεργοποιητές προσδένονται στον εκκινητή για να αυξήσουν την ενεργοποίηση της RNA πολυμεράσης (Munch et al., 2003).

Στους προκαρυωτικούς υπάρχουν επιπλέον και μόρια τα οποία μπορεί να αυξήσουν την μεταγραφή είτε απενεργοποιώντας καταστολείς είτε ενεργοποιώντας πρωτεΐνες – ενεργοποιητές. Για παράδειγμα στο οπερόνιο trp, ο καταστολέας trp ενεργοποιείται μέσω πρόσδεσης στην ίδια την τρυπτοφάνη. Επομένως, αν δεν χρειάζεται η τρυπτοφάνη, ο αναστολέας προσδένεται στην αλληλουχία και η μεταγραφή παραμένει απενεργοποιημένη (Latchman et al., 2007).

3.2 Γενετικός κώδικας

Με τον όρο γενετικό κώδικα εννοούμε στη βιβλιογραφία την αντιστοιχία των αζωτούχων βάσεων που υπάρχουν στο DNA με αντίστοιχα αμινοξέα, με σκοπό το σχηματισμό μιας πολυπεπτιδικής αλυσίδας. Υπάρχουν στη φύση 20 αμινοξέα τα οποία αποτελούν τη βάση για το σχηματισμό των πρωτεϊνών ενώ το RNA έχει 4 διαφορετικές βάσεις στην αλληλουχία του, τις A, U, G και C. Ο συνδυασμός των 4 αυτών βάσεων ανά 3 δίνει συνολικά 64 διαφορετικές τριπλέτες, ενώ είναι γνωστό ότι κάθε αμινοξύ κωδικοποιείται από μια τριάδα νουκλεοτιδίων RNA που ονομάζεται κωδικόνιο. Το κωδικόνιο χρησιμοποιείται πολλές φορές και για να περιγράψει τα γονίδια από τα οποία, προέρχεται το RNA (Parker et al., 2011).
Το σημαντικότερο χαρακτηριστικό του γενετικού κώδικα είναι ότι είναι κώδικας τριπλετών, δηλαδή ότι μια τριάδα βάσεων του RNA κωδικοποιεί ένα συγκεκριμένο αμινοξύ. Επιπλέον, ο γενετικός κώδικας είναι συνεχής, γεγονός που σημαίνει ότι το RNA διαβάζεται στο σύνολό του χωρίς να παραλείπεται κάποιο νουκλεοτίδιο και εκφυλισμένος, δηλαδή υπάρχουν διαφορετικά κωδικόνια που ενεργοποιούν το ίδιο αμινοξύ (εκφυλισμένα). Άλλα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά του γενετικού κώδικα είναι η καθολικότητά, αφού είναι ο ίδιος σε όλους σχεδόν τους οργανισμούς και ότι έχει ένα συγκεκριμένο κωδικόνιο έναρξης (AUG) και τρία συγκεκριμένα κωδικόνια λήξης (UAG, UAA και UGA) (Shu et al., 2017).

3.3 Μεταλλάξεις

Οι μεταλλάξεις είναι αλλαγές στην γενετική αλληλουχία και είναι ο βασικότερος τρόπος ποικιλομορφίας ανάμεσα στους οργανισμούς. Οι αλλαγές αυτές επιτελούνται σε διάφορα επίπεδα και μπορεί να έχουν πολλές συνέπειες στους οργανισμούς. Στα βιολογικά συστήματα τα οποία αναπαράγονται, η μεγαλύτερη σημασία δίνεται στο αν οι μεταλλάξεις είναι κληρονομίσιμες, αν δηλαδή επηρεάζουν μόνο το άτομο που τις έχει στο γενετικό του υλικό αν περνάνε και στους απογόνους του. Προκειμένου οι μεταλλάξεις να επηρεάζουν τους απόγονους, πρέπει:

- να συμβαίνουν σε κύτταρα τα οποία παίζουν ρόλο στη δημιουργία της νέας γενιάς
- να επηρεάζουν το κληρονομικό υλικό.

Συνολικά, η ποικιλομορφία των ειδών επιτυγχάνεται μέσω των μεταλλάξεων και των περιβαλλοντικών παραγόντων. Αν και υπάρχουν διάφοροι τύποι μοριακών αλλαγών, ο λέξη «μετάλλαξη» χρησιμοποιείται στη γενετική για να περιγράψει τυπικά αλλαγές που επηρεάζουν τα νουκλεϊκά οξέα (Rossi et al., 2015, Hutcheon et al., 2012).

Η πεποίθηση ότι οι μεταλλάξεις είναι τυχαία γεγονότα είναι λανθασμένη αφού πρέπει να λάβουμε υπόψιν το γεγονός ότι δεν συμβαίνουν όλες οι μεταλλάξεις με την ίδια πιθανότητα. Αντίθετα, κάποιες μεταλλάξεις συμβαίνουν με μεγαλύτερη συχνότητα σε σύγκριση με άλλες, αφού ευνοούνται από βιοχημικές αντιδράσεις μικρής τάξεως. Η συχνότητα με την οποία συμβαίνουν μεταλλάξεις είναι αρκετά μικρή και τα βιολογικά συστήματα προσπαθούν να διασφαλίσουν την ελαχιστοποίηση της συχνότητας αυτής, αφού η πλειοψηφία των μεταλλάξεων έχει δυσμενή αποτελέσματα για το βιολογικό σύστημα. Ωστόσο, η συχνότητά τους δεν μπορεί να είναι ποτέ μηδενική, παρά τους προστατευτικούς μηχανισμούς (επιδιόρθωση DNA, διόρθωση κατά τη διάρκεια της αντιγραφής ή εναπόθεση μελανίνης στο δέρμα για αποφυγή μεταλλάξεων από την ακτινοβολία). Οι μεταλλάξεις αποτελούν μία από τις σημαντικότερες κινητήριες δυνάμεις της εξέλιξης (Lynch et al., 2010, Galhardo et al., 2007).

Οι μεταλλάξεις ανάλογα με τον τύπο της βλάβης που πραγματοποιούν στο γενετικό υλικό μπορεί να κατηγοριοποιηθούν σε:

- εσφαλμένο διαχωρισμό χρωμοσωμάτων με συχνότητα 10^{-2} ανά κυτταρική διαίρεση
- χρωμοσωμική ανακατάταξη, με συχνότητα 6×10^{-4} ανά κυτταρική διαίρεση και
- μεταλλάξεις σε ζεύγη βάσεων με συχνότητα 10^{-10} ανά ζεύγος βάσεων/κυτταρική διαίρεση.

Επιπλέον, ανάλογα με την αιτιολογία πρόκλησής τους μπορεί να διαχωριστούν σε φυσικές μεταλλάξεις, που γίνονται τυχαία μέσω βιοχημικών αντιδράσεων (αντικατάσταση ζεύγους βάσεων, προσθήκη ή έλλειψη ζεύγους βάσεων) ή σε τεχνητές οι οποίες οφείλονται σε περιβαλλοντικούς παράγοντες (έκθεση σε ακτινοβολία όπως ακτίνες X, UV, ακτίνες γ, έκθεση σε χημικές ουσίες (Lynch et al., 2010).

4. Γονιδιακή θεραπεία

4.1 Ορισμός

Με τον όρο γονιδιακή θεραπεία ορίζουμε τη στοχευμένη μετάβαση DNA από ανθρώπινα κύτταρα με σκοπό το γενετικό αυτό υλικό να βοηθήσει στην καταπολέμηση μιας παθολογικής κατάστασης. Επομένως, γονιδιακή θεραπεία είναι ένας τομέας της ιατρικής επιστήμης οποίος επικεντρώνεται στην γενετική τροποποίηση των κυττάρων προκειμένου να παράγει ένα θεραπευτικό αποτέλεσμα, να αντιμετωπίσει μια ασθένεια ή να επισκευάσει το λανθασμένο γενετικό υλικό. Η πρώτη προσπάθεια για τροποποίηση του ανθρώπινου γενετικού υλικού έγινε το 1980 από τον Matrine Cline, ωστόσο η πρώτη επιτυχημένη μεταφορά γονιδίου πραγματοποιήθηκε το 1989 (Kaji et al., 2001).

4.2 Στόχοι της γονιδιακής θεραπείας

Η βοήθεια αυτή μπορεί να πραγματοποιηθεί με διάφορους τρόπους όπως για παράδειγμα μέσω της αναστολής μιας πρωτεΐνης που έχει παθολογική δράση, μέσω τροποποίησης της δομής μιας τέτοιας πρωτεΐνης ή μέσω της ενσωμάτωσης στο γενετικό υλικό του οργανισμού ενός άλλου γονιδίου που παράγει ένα πρωτεϊνικό προϊόν που απουσιάζει (Bagley et al., 2003). Προκειμένου να κατανοήσουμε όμως την έννοια της γονιδιακής θεραπείας, πρέπει να αποτυπωθούν πρώτα οι στόχοι της οι οποίοι είναι:

- η μεταφορά ενός γονιδίου σε όσο μεγαλύτερο αριθμό κυττάρων-στόχων είναι δυνατό
- η διατήρηση της έκφρασης του μεταφερόμενου γονιδίου για όσο το δυνατό μεγαλύτερο χρονικό διάστημα
- η αποφυγή εκδήλωσης οποιασδήποτε μορφής ανεπιθύμητων παρενεργειών από την εισαγωγή πρόσθετου γενετικού υλικού στο γενετικό υλικό του κυττάρου.

Οι στόχοι αυτοί δημιούργησαν μια σειρά προβλημάτων, τα οποία αντιμετωπίστηκαν μετά από μια επίπονη και σταδιακή προσπάθεια που διήρκησε αρκετές δεκαετίες και επικεντρώθηκε περισσότερο στην ανάπτυξη κατάλληλων φορέων για την μεταφορά της αλληλουχίας του γενετικού υλικού αλλά και στη χρήση ρυθμιστικών αλληλουχιών οι οποίες ελέγχουν τη λειτουργική δραστηριότητα των γονιδίων που προστίθενται (Dunbar et al., 2018).

4.3 Φορείς Γονιδιακής θεραπείας

Η μεταφορά γενετικού υλικού στα κύτταρα μπορεί να επιτευχθεί με διάφορες μεθόδους. Οι δύο βασικότεροι τρόποι μεταφοράς είναι οι ανασυνδυασμένοι ιοί (οι οποίοι ονομάζονται και βιολογικά νανοσωματίδια ή ιικοί φορείς), απλό DNA ή σύμπλοκα DNA (μη ιικοί τρόποι).

Προκειμένου να αναπαραχθούν, οι ιοί εισάγουν το γενετικό τους υλικό σε αυτό του ξενιστή, χρησιμοποιώντας τους μηχανισμούς μετάφρασης και μεταγραφής του ξενιστή προκειμένου να παράγουν τις ιικές πρωτεΐνες. Οι ρετροιοί έχουν τη δυνατότητα να αντιγράψουν το γενετικό τους υλικό στο DNA του ξενιστή, μέσω μιας πιο εξελιγμένης διαδικασίας. Η επιστήμη της γονιδιακής θεραπείας εκμεταλλεύεται τη συγκεκριμένη δυνατότητα των ιών για να αντικαταστήσει το γενετικό υλικό του ιού με θεραπευτικό DNA ή RNA. Για τη γονιδιακή θεραπεία στους ανθρώπους έχουν χρησιμοποιηθεί αρκετοί ιοί όπως είναι οι αδενοιοί, οι ρετροιοί, ο ιός του έρπη, παραλλαγές του ιού της δαμαλίτιδας, και αδενο-συνδεόμενοι ιοί. Όπως ακριβώς συμβαίνει και με το γενετικό υλικό των ιών, το θεραπευτικό DNA μπορεί να σχεδιαστεί για να δράσει σαν ένα προσωρινό εκμαγείο που διασπάται σταδιακά με φυσικό τρόπο ή (τουλάχιστον σε θεωρητικό επίπεδο) τμήμα γενετικού υλικού που έχει τη δυνατότητα να ενσωματωθεί μόνιμα στο DNA του ξενιστή (Young et al., 2006, Kotterman et al., 2015).

Οι μη ιικοί φορείς του γενετικού υλικού έχουν ορισμένα πλεονεκτήματα σε σχέση με του ιικούς, όπως είναι η παραγωγή σε μεγαλύτερη κλίμακα, αλλά και η μικρή ανοσογονικότητα που προκαλούν στον ξενιστή. Ωστόσο, οι μη ιικές μέθοδοι προκαλούν αρχικά μικρότερα επίπεδα γονιδιακής έκφρασης και επομένως μικρότερη θεραπευτική αποτελεσματικότητα. Οι μη ιικοί φορείς γονιδιακής θεραπείας συμπεριλαμβάνουν την έγχυση γυμνού DNA, την ηλεκτροδιάτηρηση (electroporation), το όπλο γονιδίων, την χρήση νουκλεοτιδίων, μοριακών συμπλεγμάτων λιπιδίων, δενδριμερών και ανόργανων νανοσωματιδίων (Ramammorth et al., 2015, Schmidt – Wolf et al., 2003).

4.4 Απομόνωση Γονιδίων

Στην τεχνολογία της γονιδιακής θεραπείας ένας βασικός στόχος πριν την ενσωμάτωση γενετικού υλικού για θεραπεία είναι η απομόνωση, ο χαρακτηρισμός και η διαχείριση των τμημάτων – στόχων του γενετικού υλικού. Αν και η απομόνωση ενός

συγκεκριμένου τμήματος γενετικού υλικού είναι εύκολη διαδικασία η εύρεση κάποιου συγκεκριμένου γονιδίου μέσα στο τμήμα αυτό είναι αρκετά δύσκολη διαδικασία, ειδικά αν λάβουμε υπόψιν το γεγονός ότι κάθε ανθρώπινο κύτταρο περιέχει περίπου 2 μέτρα DNA. Επομένως, ένα μικρό δείγμα γενετικού υλικού μπορεί να περιέχει πολλά χιλιόμετρα γενετικού υλικού. Αρχικά πραγματοποιείται η διαδικασία της κλωνοποίησης, προκειμένου να ληφθεί η πανομοιότυπη αλληλουχία (κλώνος) της αλληλουχίας στόχου. Το επόμενο βήμα μετά την κλωνοποίηση είναι η εύρεση και απομόνωση του κλώνου ανάμεσα σε όλα τα μέλη της βιβλιοθήκης του γενετικού υλικού. Αν η βιβλιοθήκη του γενετικού υλικού περιλαμβάνει ολόκληρο το γονιδίωμα ενός οργανισμού, μέσα στο σύνολο αυτό των νουκλεοτιδίων θα βρίσκεται και το τμήμα – στόχος (Schmitt et al., 2009).

Υπάρχουν αρκετοί τρόποι απομόνωσης της αλληλουχίας – στόχου, ανάλογα με το συγκεκριμένο γονίδιο το οποίο πρέπει να μεταφερθεί στον ξενιστή. Η πιο κοινή μέθοδος, χρησιμοποιεί ένα τμήμα του κλωνοποιημένου DNA το οποίο είναι ομόλογο στο επιθυμητό γονίδιο σαν ανιχνευτή (probe). Για παράδειγμα, αν ένα γονίδιο ποντικού έχει ήδη κλωνοποιηθεί, τότε ο συγκεκριμένος κλώνος μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν ανιχνευτής, προκειμένου να βρεθεί η ισοδύναμη αλληλουχία μέσα σε μια ανθρώπινη γενομική αλληλουχία. Βακτηριακές αποικίες οι οποίες αποτελούν μια γονιδιακή βιβλιοθήκη, αναπτύσσονται σε τριβλία και στη συνέχεια μια πορώδης μεμβράνη εναποτίθεται στην επιφάνεια κάθε τριβλίου και τα κύτταρα προσκολλώνται σε αυτή. Στη συνέχει ακολουθεί η λύση των κυττάρων και η αποδόμηση του σε μονούς κλώνους, το σύνολο των οποίων βρίσκεται πάνω στη μεμβράνη. Ένα διάλυμα το οποίο περιέχει τον σημασμένο με φώσφορο ανιχνευτή εμβαπτίζεται στη μεμβράνη και υβριδοποιείται με τις μονές αλυσίδες του DNA. Στη συνέχεια ακολουθεί η αποξήρανση της μεμβράνης και η τοποθέτησή της σε ένα φιλμ στο οποίο στις περιοχές υβριδισμού εμφανίζει μαύρο χρώμα (Wu et al., 2006, Schmitt et al., 2009).

4.5 Εξωσωματική γονιδιακή μεταφορά

Κατά την εξωσωματική γονιδιακή μεταφορά, αρχικά συλλέγονται και στη συνέχεια αναπτύσσονται εκτός του οργανισμού. Στη συνέχεια, το θεραπευτικό γονίδιο εισάγεται στα απομονωμένα κύτταρα και τελικά τα γενετικά επιδιορθωμένα κύτταρα επιλέγονται, ελέγχονται και πολλαπλασιάζονται. Μετά το πέρας των διαδικασιών

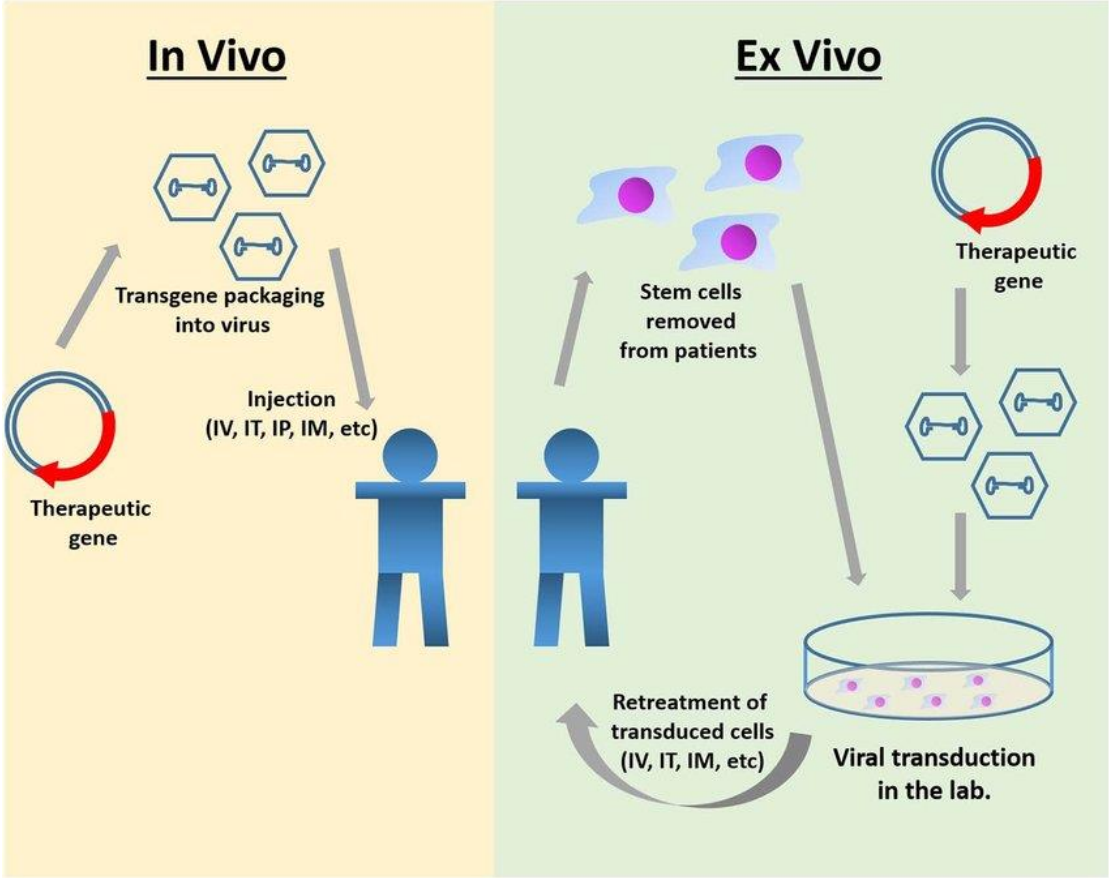
αυτών, τα γενετικά επιδιορθωμένα κύτταρα μπορούν να επανεισαχθούν στον οργανισμό στον οποίο γίνεται η γονιδιακή θεραπεία. Ένα από τα σημαντικότερα πλεονεκτήματα της εξωσωματικής γονιδιακής μεταφοράς (ex vivo) είναι ότι οι συνθήκες έκθεσης των κυττάρων του ασθενή σε κατάλληλη συγκέντρωση του φορέα, μπορούν να ελεγχθούν με ακρίβεια. Ο ακριβής αυτός έλεγχος, αυξάνει την αποτελεσματικότητα της μεθόδου της εξωσωματικής γονιδιακής μεταφοράς (Εικόνα 11) (Naldini et al., 2011).

4.6 Ενδοσωματική γονιδιακή μεταφορά

Στην ενδοσωματική γονιδιακή μεταφορά (in-vivo), ο φορέας εισάγεται στο ασθενή μέσω της ένεσης στον ιστό-στόχο ή μέσω ενδοαγγειακής ένεσης. Η συγκεκριμένη μορφή ενδοσωματικής γονιδιακής μεταφοράς απαιτεί την ανάπτυξη ειδικών φορέων μεταφοράς του γονιδίου θεραπείας, το οποίο μπορεί να εντοπίσει μέσα στον οργανισμό τα κύτταρα-στόχους και επιπλέον, έχει τη δυνατότητα εισαγωγή του θεραπευτικού γονιδίου στα κύτταρα αυτά. Αντίθετα με την εξωσωματική γονιδιακή μεταφορά, οι συνθήκες έκθεσης των κυττάρων του ασθενή στο φορέα δεν είναι εύκολο να ελεγχθούν πλήρως, ενώ το βασικότερο μειονέκτημα της μεθόδου είναι ο κίνδυνος μη αντιστρεπτής μόλυνσης των σωματικών κυττάρων που δημιουργούν τους γαμέτες (Εικόνα 11) (Oakes et al., 2000).

Τόσο στην ενδοσωματική όσο και στην εξωσωματική γονιδιακή μεταφορά απαραίτητη προϋπόθεση για την αποτελεσματικότητά τους είναι η χρήση κατάλληλου μέσου μεταφοράς (φορέας) του θεραπευτικού γονιδίου Οι φορείς αυτοί, όπως αναφέρθηκε και σε προηγούμενη παράγραφο μπορεί να είναι είτε ιικοί είτε μη ιικοί

(Droz-Georget et al., 2015).



Εικόνα 11. Οι τεχνικές της εξωσωματικής και ενδοσωματικής γονιδιακής μεταφοράς

4.7 Γονιδιακή θεραπεία και ασθένειες.

Οι θεραπευτικές εφαρμογές της γονιδιακής θεραπείας αφορούν κυρίως ασθένειες οι οποίες ανήκουν στην κατηγορία των κληρονομήσιμων νοσημάτων, ανεξάρτητα από το αν ο τρόπος κληρονομικότητας είναι οι υπολειπόμενες ή οι επικρατείς μεταλλάξεις. Επιπλέον χρησιμοποιούνται και στην αντιμετώπιση του καρκίνου αλλά και σε διάφορες μεταβολικές διαταραχές. Οι σημαντικότερες θεραπευτικές προσεγγίσεις της γονιδιακής θεραπείας συμπεριλαμβάνουν:

- Αναστολή έκφρασης γονιδίων ή γονιδίου που είναι υπεύθυνα για μια συγκεκριμένη παθολογία. Η συγκεκριμένη μεθοδολογία είναι γνωστή στη βιβλιογραφία και με τον όρο “gene knock down” και πραγματοποιείται μέσω της χρήσης ροβοενζύμων, τα οποία τροποποιούνται ώστε να κόβουν το

γενετικό υλικό σε συγκεκριμένες αλληλουχίες, καθιστώντας με τον τρόπο αυτό αδρανές ένα τμήμα RNA-στόχου. Η αδρανοποίηση γίνεται μέσω ολιγονουκλεοτιδίων συμπληρωματικού νοήματος (antisense RNAs) ή μέσω siRNAs (small interfering RNAs) που έχουν την ιδιότητα να μπλοκάρουν συγκεκριμένες περιοχές στο μόριο του RNA που αλληλεπιδρούν με άλλα μόρια (Moulton et al., 2007).

- Προσθήκη ή αντικατάσταση ενός γονιδίου (gene addition ή gene replacement), όπου το φυσιολογικό γονίδιο προστίθεται στα κύτταρα του ασθενή. Η συγκεκριμένη παραλλαγή της γονιδιακής θεραπείας βρίσκει εφαρμογή σε μονογονιδιακές ασθένειες που κληρονομούνται μέσω υπολειπόμενων γονιδίων, ενώ το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο είναι παρόν και μετά την προσθήκη του φυσιολογικού γονιδίου (Ossevoort et al., 2006).
- Διόρθωση μεταλλάξεων μέσω τροποποίησης του γενότυπου (gene editing). Η συγκεκριμένη προσέγγιση γονιδιακής θεραπείας είναι από τις πιο πρόσφατες και αφορά την στοχευμένη θραύση της αλυσίδας του DNA, στο σημείο της μετάλλαξης. Η θραύση αυτή γίνεται μέσω μεταφοράς γονιδίων νουκλεασών με τη βοήθεια δομής δακτυλίων ψευδαργύρου (ZNFs). Η προσέγγιση του gene editing βρίσκει επίσης εφαρμογή σε μονογονιδιακές ασθένειες (Lombardo et al., 2007).
- Έκφραση τοξίνης στο κύτταρο-στόχο. Στην προσέγγιση της έκφρασης τοξίνης, το κύτταρο στόχος είναι ως επί το πλείστων καρκινικό κύτταρο. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η έκφραση της θυμιδιλικής κινάσης μέσω του ιού του απλού έρπητα, η οποία μπορεί να μετατρέπει ένα μη τοξικό φάρμακο (ganciglovir) σε παράγοντα που έχει τοξική δράση στα κύτταρα των θηλαστικών. Συνεπώς, η μεταφορά και η ενσωμάτωση του γονιδίου της θυμιδιλικής κινάσης σε καρκινικά κύτταρα καθιστά το κύτταρο πιο ευαίσθητο στη χρήση ganciglovir (Deng et al., 2006).
- Ανάπτυξη τεχνητού μεταγραφικού παράγοντα. Η συγκεκριμένη προσέγγιση είναι μια από τις νεότερες προσεγγίσεις της γονιδιακής θεραπείας η οποία στοχεύει μια συγκεκριμένη περιοχή του DNA, τον υποκινητή του γονιδίου στα κύτταρα που είναι υπεύθυνα για την εκδήλωση της παθολογίας. Με την ανάπτυξη του τεχνητού μεταγραφικού παράγοντα, ενεργοποιείται ένα

συγκεκριμένο γονίδιο για τη θεραπευτική αντιμετώπιση της νόσου (Graslund et al., 2005).

Η εφαρμογή της προσέγγισης γονιδιακής θεραπείας εξαρτάται κατά κύριο λόγο από την ασθένεια που αντιμετωπίζεται (Graslund et al., 2005).

5. Κλινικές δοκιμές

Οι κλινικές δοκιμές είναι πειραματικές μελέτες που εφαρμόζονται στις ιατρικές επιστήμες προκειμένου να εξεταστούν διεξοδικά νέες θεραπείες ή νέα φάρμακα τα οποίες έχουν δείξει ότι είναι πολλά υποσχόμενες στο εργαστηριακό στάδιο των δοκιμών. Οι κλινικές δοκιμές επικεντρώνονται στους εξής παράγοντες:

- ***την επικινδυνότητα και την αιτιολογία***: πως οι γενετικοί παράγοντες, ο τρόπος ζωής και άλλοι περιβαλλοντικοί και σωματικοί παράγοντες αυξάνουν τις πιθανότητες εμφάνισης παρενεργειών
- ***Πρόληψη ασθενειών***
- ***Διαγνωστικές εξετάσεις***, οι οποίες στοχεύουν πληθυσμιακές ομάδες με αυξημένο ρίσκο εμφάνισης ασθενειών.
- ***Θεραπείες:*** καινούρια φάρμακα ή συνδυασμό φαρμάκων, καινούργιες δοσολογίες σε θεραπευτικά σχήματα, νέου είδους θεραπείες.
- ***Έλεγχο των συμπτωμάτων αλλά και των παρενεργειών σε σχέση με νέα φάρμακα ή συμπληρωματικές θεραπείες.***
- ***Υποστήριξη και παροχή πληροφοριών στους ασθενείς*** (Meinert et al., 2006).

Αρκετές κλινικές μελέτες δείχνουν από τα αποτελέσματα αν μια νέα θεραπεία λειτουργεί καλύτερα από μια ήδη υπάρχουσα θεραπεία ενώ άλλες παρέχουν πληροφορίες σχετικά με τις παρενέργειες φαρμάκων και θεραπειών. Ωστόσο, δεν καταλήγουν όλες οι κλινικές μελέτες σε νέες θεραπείες, μερικές από αυτές μπορεί να καταλήξουν στην αναποτελεσματικότητα τους ή στην εμφάνιση παρενεργειών πιο σοβαρών σε σχέση με αυτές που εμφανίζονται στις υπάρχουσες θεραπείες (Edelstein et al., 2014, Meinert et al., 2006).

Υπάρχουν δύο βασικοί τύποι κλινικών δοκιμών: ***οι δοκιμές παρέμβασης και οι δοκιμές παρατήρησης.*** **Στις δοκιμές παρέμβασης** ο σκοπός είναι η διερεύνηση μιας συγκεκριμένης παρεμβατικής θεραπευτικής μεθόδου ή ενός νέου φαρμάκου. Οι συμμετέχοντες των δοκιμών παρέμβασης χωρίζονται σε διαφορετικές κατηγορίες ώστε η επιστημονική ομάδα να έχει τη δυνατότητα να συγκρίνει τα αποτελέσματα. Αντίθετα, **στις μελέτες παρατήρησης**, ο σκοπός είναι η διερεύνηση των συνεπειών σε ασθενείς κάτω από διαφορετικές συνθήκες. Η επιστημονική ομάδα παρατηρεί τους συμμετέχοντες, ωστόσο δεν επηρεάζει τις θεραπείες τους, ενώ οι συμμετέχοντες δεν διαχωρίζονται σε ομάδες.

5.1 Φάσεις κλινικών δοκιμών

Οι κλινικές δοκιμές έχουν διαφορετικές φάσεις ανάπτυξης. Οι πιο πρώιμες φάσεις διερευνούν την ασφάλεια μιας θεραπείας ή ενός φαρμάκου καθώς και της παρενέργειες τους, ενώ οι μεταγενέστερες φάσεις στοχεύουν στη διερεύνηση της αποτελεσματικότητας και στη σύγκριση νέων θεραπειών/φαρμάκων με ήδη υπάρχουσες. Υπάρχουν ***3 κύριες φάσεις*** κλινικών δοκιμών , με την φάση 1 να είναι η πιο πρώιμη και τη φάση 3 να είναι η μεταγενέστερη. Κάποιες μελέτες έχουν και φάση 0, και μερικές και φάση 4, η οποία πραγματοποιείται μετά την έγκριση και κυκλοφορία του φαρμάκου. Στον Πίνακα 2, αναγράφονται οι φάσεις των κλινικών δοκιμών, καθώς και οι κύριοι στόχοι της κάθε φάσης.

Πίνακας 2. Φάσεις κλινικών δοκιμών

Φάση	Αριθμός συμμετεχόντων	Κύριο στόχοι	Τυχαιοποίηση

0	Μικρός (10-20)	Διερεύνηση χαμηλής δοσολογίας με σκοπό τη διερεύνηση της τοξικότητας	Όχι
1	Μικρός (10-50)	Διερεύνηση παρενεργειών και αποτελεσμάτων της θεραπείας στο σώμα	Όχι
2	Μέτριος (μερικές φορές πάνω από 100)	Διερεύνηση περισσότερων παρενεργειών και αποτελεσματικότητας της θεραπείας	Μερικές φορές
3	Μεγάλος (εκατοντάδες ή χιλιάδες)	Σύγκριση νέας θεραπείας με υπάρχουσες θεραπείες	Συνήθως
4	Μέτριος προς ελάχιστος	Διερεύνηση μακροχρόνιων παρενεργειών και ωφελειών	Όχι

5.2 Στάδια ανάπτυξης φαρμάκου

Η πολυπλοκότητα της ανάπτυξης ενός νέου φαρμάκου έχει αυξηθεί τις τελευταίες δεκαετίες, αφού απαιτεί προ-κλινικές δοκιμές, διερεύνηση των πιθανών εφαρμογών του και ολοκληρωμένες κλινικές δοκιμές πριν τελικά λάβει την έγκρισή για την κυκλοφορία από την αντίστοιχη αρχή (Οργανισμός Φαρμάκων). Υπάρχουν 5 βασικά στάδια ανάπτυξης ενός φαρμάκου:

- ***η ανακάλυψη και ανάπτυξη του φαρμάκου***
- ***η προ-κλινικές δοκιμές***

- ***η κλινική ανάπτυξη***
- ***η αξιολόγηση από τους Οργανισμούς Φαρμάκων και***
- ***η παρακολούθηση της ασφάλειας του φαρμάκου μετά την κυκλοφορία του από τους Οργανισμούς Φαρμάκων.***

Κατά το πρώτο βήμα αρχικά γίνεται η στοχοποίηση ενός γονιδίου ή μιας πρωτεΐνης (θεραπευτικός παράγοντας), με ιδιότητες όπως υψηλή αποτελεσματικότητα, ασφάλεια, και ικανότητα να είναι εντός προδιαγραφών. Οι ερευνητές χρησιμοποιούν συσχετίσεις ασθενειών, βιοενεργά μόρια, πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις, ανάλυση σηματοδοτικών μονοπατιών και λειτουργική ανάλυση γονιδίων, προκειμένου να ταυτοποιήσουν στόχους. Στη συνέχεια, ανακαλύπτονται φαρμακευτικά συστατικά ή βιολογικά ενεργοί παράγοντες οι οποίοι μεταφέρουν τον θεραπευτικό παράγοντα και αξιολογούνται ως προς την τοξικότητά τους, την φαρμακολογική τους αποτελεσματικότητα που εξαρτάται από τη δόση. Η διαδικασία ανακάλυψης ενός φαρμάκου τελειώνει όταν βρεθεί μια βασική ένωση για ένα υποψήφιο φάρμακο και ξεκινήσει η ανάπτυξή του (Frank et al., 2003).

Στο στάδιο των **προ-κλινικών δοκιμών**, ξεκινάει η ανάπτυξη του νέου φαρμάκου με τη διερεύνηση παραγόντων όπως η απορρόφηση, η κατανομή, ο μεταβολισμός, η ανακάλυψη των μηχανισμών δράσης, η βέλτιστη δοσολογία, η επίδραση της ηλικίας, του φύλου και της εθνικότητας, οι αλληλεπιδράσεις με άλλες φαρμακευτικές ουσίες και η αποτελεσματικότητα σε σχέση με παρόμοια φάρμακα (Hughes et a., 2011).

Η τρίτη φάση, η φάση της κλινικής ανάπτυξης περιλαμβάνει τις κλινικές δοκιμές οι οποίες αναλύθηκαν στην αντίστοιχη παράγραφο. Κατά **την τέταρτη φάση** ακολουθεί η αξιολόγηση του φαρμάκου από αρμόδιους οργανισμούς σε σχέση με την αποτελεσματικότητα και την ασφάλειά του, όταν τα δεδομένα των κλινικών δοκιμών είναι διαθέσιμα. Κατά την τελευταία φάση, οι οργανισμοί φαρμάκων συνεχίζουν την παρακολούθηση της αποτελεσματικότητας και της ασφάλειας του νέου φαρμάκου μετά την κυκλοφορία του. Στο στάδιο αυτό γίνεται εκμετάλλευση βάσεων δεδομένων στις οποίες καταγράφονται παρενέργειες από επαγγελματίες υγείας, τον κατασκευαστή του φαρμάκου και τους καταναλωτές (Hauser et al., 2017, Lesko et al,. 2003).

5.3 Χορήγηση άδειας κυκλοφορίας.

Η χορήγηση άδειας κυκλοφορίας ενός φαρμάκου αφορά το τέταρτο στάδιο της παραγωγής του. Επιτελείται από ειδικές επιτροπές αξιολόγησης, ενώ στη Ελλάδα υπεύθυνος είναι ο Οργανισμός Φαρμάκων (Επιτροπή Αξιολόγησης). Τα βασικά κριτήρια για την αξιολόγηση και αδειοδότηση ενός καινούριου σκευάσματος είναι:

- ***το κλινικό όφελος***
- ***η σύγκριση με άλλα φάρμακα που έχουν την ίδια ή παρόμοια δράση***
- ***η αξιοπιστία των δεδομένων που προκύπτουν από τις κλινικές δοκιμές***
- ***η σχέση κόστους/οφέλους***
- ***η αξιοποίηση του φαρμάκου με βάση τον προϋπολογισμό.***

Η τελική γνωμοδότηση από την επιτροπή αξιολόγησης περιλαμβάνει επίσης τα υποχρεωτικά πρωτόκολλα στα οποία εντάσσεται αλλά και ειδικές θεραπευτικές ενδείξεις. Η διαδικασία αξιολόγησης για ένα φαρμακευτικό σκεύασμα που κυκλοφορεί για πρώτη φορά στην αγορά συσχετίζεται με απαιτήσεις της τρέχουσας αγοράς φαρμάκων στην εκάστοτε χώρα και συνοδεύεται από τη σύσταση ενός πλήρους φακέλου. Η θετική αξιολόγηση ενός τέτοιου σκευάσματος λαμβάνει υπόψιν και το αντίκτυπο στο συνολικό προϋπολογισμό, ενώ τελικά η επιτροπή αξιολόγησης προωθεί μια τελική εισήγηση στο Υπουργείο Υγείας, για την τελική αδειοδότηση του φαρμάκου (Economou et al., 2015, Economou et al., 2015).

5.4 Κλινικές δοκιμές και ζητήματα ηθικής

Ο πρωταρχικός σκοπός της ιατρικής έρευνας, όπως αυτός καθορίζεται από την Διακήρυξη του Ελσίνκι είναι η διερεύνηση των αιτιολογιών, της ανάπτυξης και των επιδράσεων των παθήσεων αλλά και η βελτίωση των ήδη υπαρχόντων διαγνωστικών θεραπευτικών ή προληπτικών παρεμβάσεων. Το σύνολο των θεραπειών που εφαρμόζονται, ακόμη και οι πιο αποτελεσματικές θεραπείες των οποίων η αποτελεσματικότητα και η ασφάλεια είναι αποδεδειγμένες, πρέπει να αξιολογούνται συνεχώς μέσω αξιόπιστων ερευνητικών εργαλείων για την ποιότητα, την προσβασιμότητα αλλά και την αποτελεσματικότητά τους σε βάθος χρόνου. Οι κλινικές δοκιμές διέπονται από ένα σύνολο κανόνων που διασφαλίζουν και προάγουν τα

ανθρώπινα δικαιώματα και ο απώτερος σκοπός τους είναι η δημιουργία γνώσης η οποία σε καμία περίπτωση δεν πρέπει να έχει προτεραιότητα σε σχέση με τα δικαιώματα των συμμετεχόντων στις έρευνες ή των ασθενών που ενδιαφέρονται για τα αποτελέσματά τους (World Medical Association Declaration of Helsinki, 2013).

Η Παγκόσμια Οργάνωση Υγείας αναφέρει ότι η κλινική μελέτη, είναι παρεμβάσεις που έχουν ερευνητικό σκοπό και σκόπιμα, εκθέτουν ομάδες συμμετεχόντων ή μεμονωμένους ανθρώπους σε παρεμβάσεις σχετικές με την υγεία, προκειμένου να αξιολογήσουν τις επιδράσεις στην ανθρώπινη υγεία τους. Οι παρεμβάσεις αυτές πιθανόν να περιλαμβάνουν φαρμακολογικές ουσίες, ιστούς ή άλλα βιολογικά προϊόντα, συσκευές, θεραπείες συμπεριφοράς, χειρουργικές επεμβάσεις ή προληπτική φροντίδα (WHO, 2017).

Στην ίδια διακήρυξη αναφέρεται ότι οι διεθνείς κλινικές μελέτες έχουν επιστημονική και κλινική ευθύνη αφού πρέπει να διασφαλίζεται ότι οι αποφάσεις που σχετίζονται με τη φροντίδα υγείας βασίζονται σε υπάρχουσες αποδείξεις, ενώ η δημοσίευση των αποτελεσμάτων πρέπει να διέπεται από αντικειμενικότητα και να μην έχει μεροληψία. Η περιγραφή κλινικών μελετών που συνεχίζουν βρίσκονται υπό διεξαγωγή μπορεί να υποδείξει κενά ή ελλείψεις στην έρευνα άλλων κλινικών μελετών. Η αναγνώριση κλινικών μελετών από τους αντίστοιχους επαγγελματίες υγείας και η σωστή αξιολόγηση των αποτελεσμάτων, θα μπορούσε να έχει σαν αποτέλεσμα τη βελτίωση της συνεργασίας μεταξύ διαφορετικών επιστημονικών ομάδων. Πριν τη συμμετοχή των εθελοντών, πρέπει να πληροφορούνται σχετικά με τους πιθανούς κινδύνους της κλινικής δοκιμής και να λαμβάνεται η συγκατάθεσή τους (γραπτή) πριν την συμπερίληψή της στην ομάδα των συμμετεχόντων. Τέλος, απαραίτητο τμήμα της διαδικασίας των εθελοντών ή των συμμετεχόντων σε μια κλινική μελέτη είναι ο έλεγχος των δεδομένων, αφού με τον τρόπο αυτό βελτιώνεται η ποιότητά τους και γίνεται εφικτή η αναγνώριση πιθανών προβλημάτων (π.χ. μεροληψία κατά τη δειγματοληψία, λανθασμένες μέθοδοι τυχαιοποίησης) στα αρχικά στάδια της διεξαγωγής της μελέτης (WHO, 2017).

5.5 Παρασκευή και εφαρμογή δοκιμασμένων φαρμάκων – κανόνες ορθής παρασκευαστικής πρακτικής

Η οδηγία 2003/94/ΕΚ αφορά στην ορθή πρακτική σε σχέση με την ορθή παρασκευαστική πρακτική και την ορθή εφαρμογή των δοκιμασμένων φαρμάκων που προορίζονται για ανθρώπινη χρήση. Η οδηγία καθορίζει τις κατευθυντήριες γραμμές και τις αρχές σύμφωνα με τις οποίες οι εθνικές αρχές που είναι υπεύθυνες για την αδειοδότηση και την κυκλοφορία νέων φαρμάκων πρέπει να διασφαλίζουν μέσω οργανωμένων επιθεωρήσεων, ότι οι κατασκευαστές φαρμάκων συμμορφώνονται με την υπάρχουσα νομοθεσία. Η νομοθεσία σχετικά με την ορθή παρασκευή φαρμάκων εφαρμόστηκε για πρώτη φορά τις 3 Νοεμβρίου του 2003 και οι χώρες τις ΕΕ την ενσωμάτωσαν στο εθνικό τους δίκαιο τον Απρίλιο του 2004 (Gorog et al., 2015).

Αντίστοιχα, οι παρασκευαστές φαρμάκων πρέπει να διασφαλίζουν τη σωστή αδειοδότηση και να σέβονται τους κανόνες της ορθής παρασκευαστικής πρακτικής. Αρχικά, οι μέθοδοι παραγωγής φαρμάκων πρέπει να εξετάζονται ανά τακτά χρονικά διαστήματα με βάση τα νέα επιστημονικά δεδομένα που προκύπτουν. Εξίσου σημαντική είναι και η δημιουργία ενός συστήματος που εξασφαλίζει την ποιότητα των φαρμακευτικών προϊόντων και στο οποίο συμμετέχει τόσο η διοίκηση όσο και το προσωπικό. Η εκπαίδευση του προσωπικού είναι ένας ακόμη τομέας στον οποίο πρέπει να δοθεί η απαραίτητη έμφαση, προκειμένου να είναι αρκετά εξειδικευμένο με καλά καθορισμένα τα καθήκοντά του. Οι παρασκευαστές φαρμάκων είναι υποχρεωμένοι να διατηρούν αρχεία τεκμηρίωσης του συστήματος ποιότητας και να διενεργούν επιθεωρήσεις σε τακτά χρονικά διαστήματα, λαμβάνοντας, όπου είναι απαραίτητο, τις αναγκαίες διορθωτικές δράσεις (Gowen et al., 2008).

Στην οδηγία αναφέρεται επίσης και η σημασία της κατάλληλης σχεδίασης, κατασκευής και προσαρμογής του εξοπλισμού και των χώρων παραγωγής ώστε να ελαχιστοποιούνται οι κίνδυνοι για σφάλμα. Το σύστημα τεκμηρίωσης της παραγωγής πρέπει να περιέχει αναλυτικές περιγραφές κάθε παρτίδας προϊόντων και να φυλάσσεται για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα (συνήθως 1 έτος) μετά την ημερομηνία λήξεων των φαρμάκων που βρίσκονται σε δοκιμαστικό στάδιο. Το χρονικό διάστημα είναι μεγαλύτερο (5 έτη) για τα φάρμακα που χρησιμοποιήθηκαν σε κλινικές δοκιμές. Τέλος το σύστημα ελέγχου ποιότητας πρέπει να περιλαμβάνει εργαστήρια ελέγχου ποιότητας

των φαρμάκων και να φυλάσσει δείγματα από κάθε παρτίδα φαρμάκων που ελέγχει επί ένα έτος μετά από την ημερομηνία λήξης τους (Gowen et al., 2008, National Research Foundation, 2019).

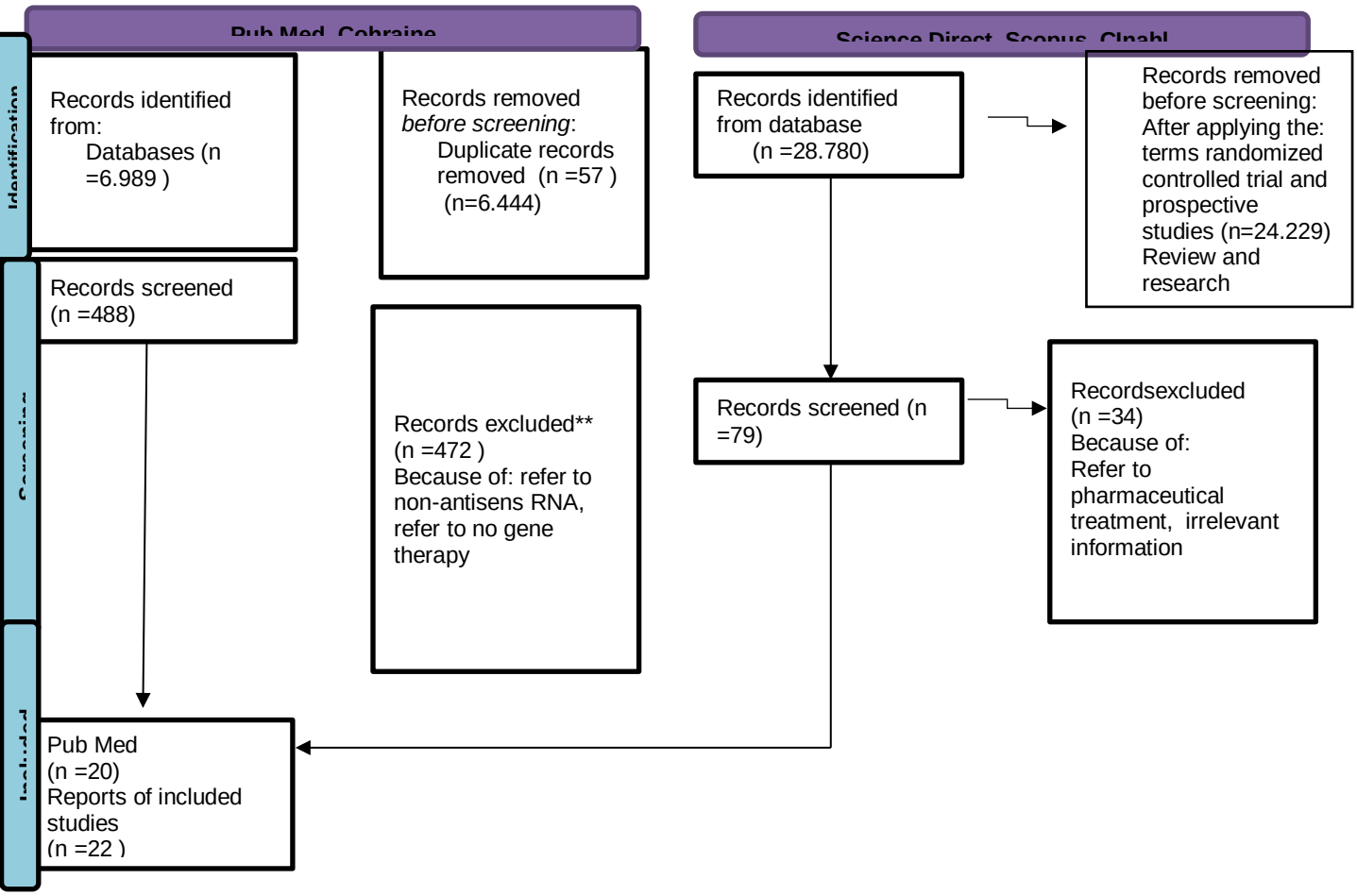
Β Μέρος

1. **Υλικά και Μέθοδοι**

Για τη συστηματική ανασκόπηση της βιβλιογραφίας στην παρούσα πτυχιακή πραγματοποιήθηκε αναζήτηση στις διαδικτυακές βάσεις δεδομένων Pubmed, ScienceDirect, Scopus και Cinahl. Χρησιμοποιήθηκε ο ακόλουθος αλγόριθμος αναζήτησης: “Antisense DNA” OR “DNA Carriers” OR “Regulatory mechanism” OR “DNA” OR “Viral Vectors” OR “Non-Viral Vectors” AND “Application Field” OR “Genetic Research” OR “Gene Therapy”.

Τα κριτήρια ένταξης των μελετών ήταν μελέτες οι οποίες έχουν δημοσιευτεί τα τελευταία 10 έτη, η γλώσσα δημοσίευσης (Αγγλικά), και μελέτες οι οποίες σχετίζονται με τις θεραπευτικές εφαρμογές των τεχνολογιών του αντι-πληροφοριακού RNA και των φορέων DNA. Από την αρχική αναζήτηση προέκυψαν 79 μελέτες που είναι σχετικές με τους φορείς DNA και το αντι-πληροφοριακό RNA, των οποίων μελετήθηκε η περίληψη για να γίνει η επιλογή συνολικά 45 μελετών οι οποίες αναφέρονταν σε θεραπείες σε ανθρώπους και δεν ήταν συστηματικές ανασκοπήσεις. Στις μελέτες αυτές αναλύθηκε το πλήρες κείμενο και τα συμπεράσματα της ανασκόπησης παρουσιάζονται στην παράγραφο των Αποτελεσμάτων.

Η διαδικασία αναζήτησης απεικονίζεται στο διάγραμμα ροής τύπου PRISMA του σχήματος 1.



2. Αποτελέσματα

2.1 Αντιπληροφοριακό RNA

Τα αντιπληροφοριακά RNA (anti-sense RNA), είναι μικρές, μη κωδικοποιούσες αλληλουχίες, οι οποίες περιέχουν 19-23 νουκλεοτίδια που συμπληρώνουν το mRNA. Αποτελεί ειδικό τύπο του ncRNA και χρησιμοποιείται από το κύτταρα για την ρύθμιση της γονιδιακής δραστηριότητας σε πολλαπλά επίπεδα εντός του κυττάρου, όπως για παράδειγμα σε επίπεδο DNA, RNA και χρωμοσωμικής δομής. Με την κατασκευή του αντιπληροφοριακού RNA, οι εφαρμογές του έχουν σκοπό τη σταδιακή αντικατάσταση στις μέχρι σήμερα τεχνολογίες που χρησιμοποιούνται για την καταστολή συγκεκριμένων γονιδίων. Επομένως, ένα μόριο το οποίο αρχικά θεωρούνταν ασήμαντο υπο-προϊόν της μετάφρασης, έχει αναγνωριστεί σαν μια σημαντική ανακάλυψη που βοηθάει στην ενδοκυτταρική ρύθμιση των γονιδίων (Rusk et al., 2015).

2.2 Σχηματισμός και ρυθμιστικοί μηχανισμοί

Οι πρόσφατες μελέτες σχετικά με τα miRNAs, siRNAS, lncRNAs και τα piRNAs, αποτελούν έρευνες κλειδιά για την κατανόηση της τεχνολογίας του αντιπληροφοριακού RNA. Για το λόγο αυτό αναλύονται στις παρακάτω παραγράφους η δημιουργία και οι ρυθμιστικοί μηχανισμοί των συγκεκριμένων παραμέτρων του αντιπληροφοριακού RNA.

2.2.1 mi-RNAs

Τα mi-RNAs είναι μονοκλωνικές αλυσίδες RNA που έχουν μήκος 18-25 νουκλεοτίδια. Αν και θεωρούνται προϊόντα μεταγραφής που προκύπτουν από το DNA, δεν μπορούν να μεταφραστούν σε πρωτεΐνες. Αντίθετα, ο κύριος ρόλος τους είναι η καταστολή της έκφρασης συγκεκριμένων γονιδίων (Mohr et al., 2015). Τα mi-RNA ρυθμίζουν την έκφραση μέσω της συμπληρωματικότητας ανάμεσα στις αλυσίδες mi-RNA και mRNA και όχι μέσω της αποδόμησης του mRNA. Ωστόσο, σε ορισμένες περιπτώσεις, ο συνδυασμός RNA διπλής έλικας RNA και mi-RNA πυροδοτεί την αποδόμηση του mRNA (Mohr et al., 2015). Συνεπώς, αφού τα miRNA μπορούν να ρυθμίσουν τη γονιδιακή έκφραση μέσω της συμπληρωματικότητας των βάσεων, μπορούμε να συμπεράνουμε ότι ένα miRNA έχει τη δυνατότητα να ρυθμίσει

τουλάχιστον ένα mRNA, ωστόσο, ένα mRNA μπορεί να ρυθμίζεται από πολλαπλά miRNA.

2.2.2 siRNAs

Τα siRNA είναι μικρά τμήματα εξωγενούς dsRNA (περιέχουν περίπου 20 νουκλεοτίδια) τα οποία συνθέτονται τεχνητά μέσω της διαδικασίας της παρεμβολής RNA σε in vitro διαδικασία ή εναλλακτικά μεταφέρονται από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα μέσω ειδικών μορίων μεταφορέων (Valiunas et al., 2015). Τα siRNAs συνδέονται σε μικρά τμήματα αντι-πληροφοριακού RNA (si-RISC) και ξετυλίγονται μέσω της ελικάσης ενεργοποιώντας το. Το si-RISC σχετίζεται με ένα mRNA στόχο μέσω της συμπληρωματικότητας της αλληλουχίας και έχει τη δυνατότητα να αποδομήσει το συγκεκριμένο τμήμα του αναστέλλοντας την μεταφραστική διαδικασία (Saurabh et al., 2014).

Η διερεύνηση της σχέσεων των miRNAs με τα siRNA είναι ιδιαίτερα δύσκολο εγχείρημα, αφού και τα δύο είναι μικρά μόρια και προέρχονται από τα dsRNAs. Επιπλέον, τόσο τα μονοπάτια βιοσύνθεσης,, όσο και οι μηχανισμοί με τους οποίους ρυθμίζουν τη γονιδιακή έκφραση είναι παρόμοιοι. Αν και ο συνδυασμός τους πυροδοτεί την αποδόμηση του mRNA και συνεπώς αποτρέπει τη μεταγραφή του σε πρωτεΐνη, η αναστολή της μεταγραφής οφείλεται κυρίως στην ιδιότητα του miRNA να αναστέλλει το μηχανισμό της μετάφρασης (Valiunas et al., 2015).

2.2.3. LncRNAs

Τα lncRNAs είναι μικρά αντίγραφα που μοιάζουν με το mRNA με αριθμό βάσεων που κυμαίνεται ανάμεσα σε 200 και 1000 bp, και είναι τα λιγότερο προστατευμένα μόρια RNA, αφού δεν παίρνουν μέρος στην πρωτεϊνοσύνθεση. Ανάλογα με την τοποθεσία τους στο γονιδίωμα, μπορούν να διαχωριστούν σε 5 τύπους: πληροφοριακά, αντι-πληροφοριακά, αμφίδρομα, ιντρονικά και διαγονιδιακά. Τα αντι-πληροφοριακά lncRNAs ρυθμίζουν τη γονιδιακή έκφραση είτε σε μεταγραφικό είτε σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο μέσω παρεμβολής στη μεταγραφή, αλληλεπίδρασης RNA-DNA ή αλληλεπίδρασης RNA-RNA στον πυρήνα και το κυτταρόπλασμα (Villegas et al., 2015).

2.2.4 piRNAs

Τα piRNA ανιχνεύτηκαν για πρώτη φορά σε θηλαστικά και έχουν μήκος 26-32 νουκλεοτίδια. Η συγκεκριμένη μορφή αντι-πληροφοριακού RNA παίζει ρυθμιστικό ρόλο στα γονίδια σε συνδυασμό με την οικογένεια πρωτεϊνών PIWI. Αναλυτικότερα, τα piRNA συνδυάζονται με την οικογένεια πρωτεϊνών PIWI προκειμένου να δημιουργήσουν συμπλέγματα PIWI-piRNA τα οποία ρυθμίζουν κατασταλτικά μονοπάτια γονιδιακής ρύθμισης. Σε σχέση με τις λειτουργίες τους οι πιθανοί μηχανισμοί με τους οποίους τα σύμπλοκα PIWI-piRNA καταστέλλουν τη γονιδιακή ρύθμιση είναι οι εξής:

- ***καταστολή της γονιδιακής μεταγραφής***
- ***διατήρηση των λειτουργιών των πολυδύναμων κυττάρων και***
- ***ρύθμιση της σταθερότητας του mRNA και της γονιδιακής μετάφρασης*** (Ross et al., 2014, Rajan et al., 2014).

2.3 Εφαρμογές αντιπληροφοριακού RNA σε θεραπείες.

Οι γονιδιακές θεραπείες οι οποίες βασίζονται στο αντιπληροφοριακό RNA, έχουν εξελιχθεί πρόσφατα και αποτελούν ένα πολύτιμο εργαλείο στην αντιμετώπιση αρκετών ασθενειών, ενώ αρκετά φάρμακα που βασίζονται στην τεχνολογία αυτή έχουν ήδη λάβει έκτιση από οργανισμούς φαρμάκων. Η αρχή της θεραπείας βασίζεται στην είσοδο ολιγονουκλεοτιδίων, τα οποία είναι συμπληρωματικά με το mRNA σε κύτταρα με σκοπό την αναστολή παραγωγής κάποιας πρωτεΐνης. Τα φάρμακα της τεχνολογίας αντι-πληροφοριακού RNA μπορεί να είναι ιδιαίτερα χρήσιμα στην αντιμετώπιση ιικών ασθενειών, γενετικών/κληρονομικών παθήσεων καθώς και του καρκίνου (Rusk et al., 2015).

Τα ολιγονουκλεοτίδια που παράγονται με φυσικό τρόπο είναι χημικά ασταθή, έχουν πολύ μικρή εξειδίκευση και αρκετές παρενέργειες που εκδηλώνονται in vivo. Η θεραπευτική τους χρήση επιτυγχάνεται αυξάνοντας την σταθερότητα, την εξειδίκευση και μειώνοντας τις παρενέργειες μέσω χημικής τροποποίησης. Η χημική τροποποίηση μπορεί να βελτιώσει την ιδιότητα του αντιπληροφοριακού RNA να εισέρχεται στα κύτταρα και την πρόσδεσή τους σε συγκεκριμένες αλληλουχίες mRNA με σκοπό την διάσπαση της γονιδιακής λειτουργίας. Για τη μεταφορά του αντιπληροφοριακού RNA

στο κυτταρόπλασμα και τον πυρήνα χρησιμοποιούνται συνήθως ιικοί φορείς (ρετροιοί, αδενοιοί) και λιποσώματα (Adams et a., 2017). Οι κύριες μέθοδοι θεραπειών που επικεντρώνονται στο RNA είναι μέσω του αντι-πληροφοριακού RNA, κυρίως λόγω της υψηλής συγγένειας, επιλεκτικότητας και ευκολίας με την οποία επιτελεί χημικές τροποποιήσεις αλλά και λόγω της χαμηλής του τοξικότητας (Chery et al., 2016).

2.4 Φαρμακολογία των φαρμάκων με τεχνολογία αντι-πληροφοριακού RNA

Τα αντι-πληροφοριακά νουκελοτίδια, έχουν τη δυνατότητα να διαχειρίζονται τη γονιδιακή έκφραση, γεγονός που έχει προάγει την θεραπευτική τους εφαρμογή και την αναγνώριση της αξίας τους σαν πιθανά φάρμακα για συγκεκριμένες πρωτεϊνες-στόχους. Η θεραπευτικές ιδιότητες και η δυναμική των γονιδιακών θεραπειών με την εφαρμογή της τεχνολογίας αντι-πληροφοριακού RNA έχουν ήδη μεταφερθεί από το εργαστήριο στην πράξη, ενώ αρκετά φάρμακα αυτής της κατηγορίας έχουν φτάσει σε επίπεδο κλινικών δοκιμών. Το πρώτο φάρμακο αντι-πληροφοριακού RNA το οποίο έλαβε αδειοδότηση από τον FDA το 1992 ήταν ένα νουκλεοτίδιο φωσφοροθειοάτης, του E2 γονιδίου που σχετίζεται με την αντγραφή και μεταγραφή του ανθρώπινου ιού των θηλωμάτων (Ling et al., 2016). Αργότερα σχεδιάστηκε ακόμη ένα νουκελοτίδιο φωσφοροθειοάτης με σκοπό την στόχευση της πρωτεΐνης Bcl-2 για την αντιμετώπιση του μελανώματος και ορισμένων μορφών λευχαιμίας. Και οι δύο αυτές θεραπείες δεν πέρασαν το στάδιο των κλινικών δοκιμών λόγω έλλειψης αποτελεσματικότητας και σχέσης δόσης/τοξικότητας (Cherry et al., 2016).

Η σημαντικότερη δυσκολία κατά το σχεδιασμό των συγκεκριμένων τεχνολογιών είναι η αποτελεσματική και ασφαλής μεταφορά του αντιπληροφοριακού RNA στα νουκλεοτίδια-στόχο. Σήμερα, οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για τη μεταφορά αυτή χρησιμοποιούν ιικούς και μη ιικούς φορείς. Από τις δύο κατηγορίες μεθόδων μεταφοράς τα περισσότερα πλεονεκτήματα παρουσιάζουν οι μέθοδοι ιικής μεταφοράς λόγω της μεγάλης αποτελεσματικότητας της επιμόλυνσης (Farooqi et al., 2014).

Από την πρώτη γενιά φαρμάκων τεχνολογίας αντι-πληροφοριακού RNA έχει εγκριθεί για χρήση το fomivirsen, το οποίο στοχεύει τον κυτταρομεγαλοιό και έχει εγκριθεί για την θεραπεία της κυτταρομεγαλοϊίτιδας (Grillone et al,. 2017). Από τη δεύτερη γενιά φαρμάκων τεχνολογίας αντι-πληροφοριακού RNA, αρκετά έδειξαν

αποτελεσματικότητα, ωστόσο δεν πήραν τελική έγκριση μετά τα αποτελέσματα κλινικών δοκιμών. Μέχρι και σήμερα υπάρχουν 6 φάρμακα τα οποία βασίζονται στην τεχνολογία μελέτης τα οποία έχουν λάβει έγκριση:

- **fomivirsen για την αντιμετώπιση της ρετινίτιδας CMV σε ασθενείς με AIDS**
- **mipomersen για την αντιμετώπιση της συγγενούς υπερχοληστερολαιμίας**
- **defribotide για την αντιμετώπιση της ηπατικής φλεβο-αποφρακτικής νόσου**
- **eteplirsen για την αντιμετώπιση της μυϊκής δυστροφίας Duchenne**
- **pegaptanib για την αντιμετώπιση της εκφύλισης της ωχράς κηλίδος**
- **nusinersen για την αντιμετώπιση της σπονδυλικής μυϊκής ατροφίας** (Stein et al, 2017, Krishna et al., 2017).

2.5 Θεραπείες αντι-πληροφοριακού RNA για την αντιμετώπιση του καρκίνου

Η ιδιότητα του αντι-πληροφοριακού RNA να αναγνωρίσει την ακριβή τοποθεσία του DNA σε ένα γονίδιο αποτελεί σημαντικό πλεονέκτημα στη αντι-καρκινική γονιδιακή θεραπεία, αφού μπορεί να ξεχωρίσει τα φυσιολογικά από τα μεταλλαγμένα ογκογονίδια στα καρκινικά κύτταρα. Υπάρχουν μελέτες οι οποίες επιβεβαιώνουν ότι στους καρκινικούς ασθενείς, αυτό μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την καταστολή έκφρασης συγκεκριμένων γονιδίων και μπορεί να αναστείλει την ανάπτυξη του όγκου. Μειώνοντας την έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων, επάγοντας τον εκφυλισμό του mRNA και προάγοντας την πρώιμη αναστολή της μεταγραφής, η τεχνολογία αντι-πληροφοριακού RNA μπορεί να μειώσει ή να εξαλείψει την έκφραση κυτταρικών γονιδίων και μεταλλάξεων στο καρκινικό κύτταρο. Οι σημαντικότερες δυσκολίες στην ανάπτυξη αντικαρκινικών φαρμάκων με τη τεχνολογία αυτή, είναι η μεταφορά των αντι-πληροφοριακών νουκλεοτιδίων σε απομακρυσμένους ή συγκεκριμένους όγκους και για το λόγο αυτό δίνεται βάση στην ανάπτυξη εξελιγμένων τεχνολογιών διανομής.

Τα τελευταία χρόνια, ο καρκίνος είναι μία πάθηση στην οποία επικεντρώνεται η ανάπτυξη φαρμάκων αντι-πληροφοριακού RNA σε μεγάλο βαθμό. Το curtisen, ένα χιμαιρικό 2’MOE φάρμακο το οποίο στοχεύει την κλαστερίνη είναι στη φάση III των

κλινικών δοκιμών για την αντιμετώπιση των καρκίνων του πνεύμονα και του προστάτη (Zielinski et al., 2012). Επιπλέον, πολλά υποσχόμενα είναι τα αποτελέσματα των κλινικών δοκιμών του AZD9150, ένα φάρμακο που ενεργοποιεί την μεταγραφή 3 (STAT3) σε αρκετές μορφές καρκίνου. Το τροποποιημένο αυτό ολιγονουκλεοτίδιο με βάση τα αποτελέσματα των κλινικών δοκιμών μπορεί να αποτελέσει μια πολλά υποσχόμενη θεραπεία για την αντιμετώπιση του καρκίνου του προστάτη (Yamamoto et al., 2015).

2.6 Θεραπείες αντι-πληροφοριακού RNA για την αντιμετώπιση του καρδιαγγειακών ασθενειών

Το πρώτο φάρμακο που αναπτύχθηκε με την τεχνολογία του αντι-πληροφοριακού RNA,και εγκρίθηκε ήταν το mipomersen, το οποίο χρησιμοποιείται και σήμερα σε ορισμένες περιπτώσεις ασθενών με συγγενή υπερχοληστερολαιμία, και πετυχαίνει τη μείωση των επιπέδων mRNA που οδηγούν στην παραγωγή B απολιποπρωτεϊνης (Rader et al., 2014). Η απολιποπρωτεϊνη C τύπου III (apoCIII), παίζει σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό των λιποπρωτεϊνών οι οποίες έχουν μεγάλη περιεκτικότητα σε τριγλυκερίδια, και έχει αποδειχτεί ότι η μειωμένη έκφρασή τους μειώνει το ρίσκο για καρδιαγγειακές ασθένειες (Rader et al., 2014, Won et al., 2017).

Επιπλέον, στα στάδιο των κλινικών δοκιμών βρίσκεται το volanesorsen, ένα αντι-πληροφοριακό φάρμακο που επίσης έχει σχεδιαστεί να μειώνει τα επίπεδα mRNA της apoCIII,. Το volanesorsen είναι σχεδιασμένο για την αντιμετώπιση του συνδρόμου της συγγενούς χυλομικροναιμίας και της συγγενής μερικής λιποδυστροφίας. Έχει αποδειχτεί ότι η σοβαρή έλλειψη του παράγοντα XI, προκαλεί προστασία ενάντια στις εν τω βάθη φλεβικές θρομβώσεις και επομένως μειώνει τη νοσηρότητα και την θνησιμότητα λόγω καρδιαγγειακών νοσημάτων (Bennet et al., 2017). Αντίστοιχα, το φάρμακο αντι-πληροφοριακού RNA IONIS – FXIRx, μπορεί να μειώσει τα επίπεδα του παράγοντα XI και έχει τη δυνατότητα ισχυρότερης αντιθρομβωτικής δράσης σε σχέση με τα τυπικά αντιθρομβωτικά φάρμακα. Μια κλινική δοκιμή φάσης II είναι σε εξέλιξη, προκειμένου να διερευνήσει την επίδραση του φαρμάκου IONIS-FXIRx/BAY 2306001 σε ασθενείς με νεφρική ανεπάρκεια τελικού σταδίου οι οποίοι υφίστανται αιμοκάθαρση (Bennet et al., 2017).

2.7 Θεραπείες αντι-πληροφοριακού RNA για την αντιμετώπιση γαστρεντερικών ασθενειών

Τα φάρμακα με τεχνολογία αντι-πληροφοριακού RNA διερευνούνται επίσης και για την αντιμετώπιση αρκετών φλεγμονωδών παθήσεων, όπως για παράδειγμα την ιδιοπαθή φλεγμονώδη εντερική νόσο. Το φάρμακο που λαμβάνεται από το στόμα με την επιστημονική ονομασία mongersen στοχεύει στην SMAD7 mRNA, και έχει δείξει υποσχόμενα αποτελέσματα στην θεραπεία ασθενών με ελκώδη κολίτιδα. Επίσης, το φάρμακο alicaforsen, έχει σα στόχο το διακυτταρικό μόρια προσκόλησης CD54 και έχει διερευνηθεί σχετικά με την επίδρασή του σε ασθενείς με την ασθένεια του Crohn, καθώς επίσης και σε μορφή μικροκλύσματος, σε ασθενείς με ελκώδη κολίτιδα ή φλεγμονή του θυλάκου από τελικό ειλεό (Greuter et al., 2016, Feagan et al., 2018).

2.8 Θεραπείες αντι-πληροφοριακού RNA για την αντιμετώπιση νευρολογικών παθήσεων.

Τα φάρμακα αντι-πληροφοριακού RNA μπορούν επίσης να χορηγηθούν και μέσω εγκεφαλονωτιαίου υγρού για ην αντιμετώπιση αρκετών νευρολογικών παθήσεων. Ο λόγος της χορήγησής τους μέσω έγχυσης στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό είναι η αδυναμία τους να διέλθουν του αιματοεγκεφαλικού φραγμού. Οι θεραπευτικές προσεγγίσεις για την αντιμετώπιση νευρολογικών παθήσεων επικεντρώνονται στη χρήση ολιγονουκλεοτιδίων ή μικρών μονών αλυσίδων αντι-πληροφοριακού mRNA και siRNA, που χρησιμοποιούνται για την εντοπισμένες θεραπείες (Rader et al, 2014).

Η μυική δυστροφία Duchenne, είναι μια βαθμιαία εξελισσόμενη νευρομυϊκή νόσος που προκαλεί αναπηρία σοβαρού τύπου στους πάσχοντες και τελικά τον θάνατο. Η νόσος προκαλείται από σημειακές μεταλλάξεις ή χρωμοσωμικές ανακατατάξεις στο γονίδιο της δυστροφίνης. Οι μεταλλάξεις αυτές έχουν σαν αποτέλεσμα την παραγωγή λανθασμένου πρωτεϊνικού προϊόντος ή απώλειά της μέσω της διαμεσολάβησης αντιπληροφοριακού DNA κατά τη μεταγραφή. Λόγω των πολλαπλών γενομικών αλλαγών που συμβαίνουν στο γενετικό υλικό των ασθενών, δεν υπάρχει κάποιο μοναδικό νουκλεοτίδιο που να θεραπεύει όλες τις μορφές της νόσου (Flanigan et al., 2014).

Οι πιο πρόσφατες κλινικές μελέτες που σχετίζονται με την αντιμετώπιση της μυϊκής δυστροφίας Duchenne μέσω της χρήσης τεχνολογιών αντι-πληροφοριακού RNA, επικεντρώνονται στην απαλοιφή της μετάφρασης του εξωνίου 51, ενώ το φάρμακο που έχει σχεδιαστεί για το σκοπό αυτό έχει την επιστημονική ονομασίας eteplirsen (τροποποιημένο ολιγονουκλεοτίδιο φωσφοροθειοάτης) (Osorio et al., 2019). Επιπρόσθετα, και άλλα φάρμακα αντι-πληροφοριακού χαρακτήρα είναι υπό κατασκευή για την αντιμετώπιση της μυϊκής δυστροφίας Duchenne, που θα μπορέσουν να δώσουν μελλοντικά τη δυνατότητα θεραπείας αρκετών διαφορετικών ασθενών. Η μυοτονική δυστροφία τύπου 1(Myotonic Dystrophy type 1 – DM1) είναι μια πολυσυστεμική νόσος που προκαλείται από μια επαναλαμβανόμενη αντιγραφή της τριπλέτας CTG στην 3’ περιοχή του γονιδίου της κινάσης της μυοτονικής δυστροφίας (DMPK). Το φάρμακο IONIS-DMPK-2.5RX είναι ένα χιμαιρικό αντι-πληροφοριακό

ολιγονουκελοτίδιο το οποίο έχει δώσει πολλά υποσχόμενα αποτελέσματα σε κλινικές δοκιμές σε ασθενείς που έχουν διαγνωστεί με DM1 (Nguygen et al., 2020).

Η αμυλοείδωση τρανσθυρετίνης είναι μια μορφή συστεμικής αμυλοείδωσης η οποία προκαλείται από μια βλάβη στην αναδίπλωση της πρωτεΐνης τρανσθυρετίνης σε πολλαπλούς ιστούς, συμπεριλαμβανομένων ιστών του περιφερικού νευρικού συστήματος, του γαστρεντερικού σωλήνα και της καρδιάς. Σήμερα υπάρχουν τρία διαφορετικά φάρμακα με την τεχνολογία του αντι-πληροφορριακού που χρησιμοποιούνται στην αντιμετώπιση της νόσου, τα IONS-TTRRx, RNase εξαρτώμενη από Η και το patisiran. Τα φάρμακα αυτά χρησιμοποιούνται επίσης και στην αντιμετώπιση της συγγενούς αμυλοειδούς πολυνευροπάθειας και της καρδιομυοπάθειας (Ackerman et al., 2016, Benson et al., 2017).

Η νωτιαία μυϊκή δυστροφία είναι μια προοδευτική νόσος των κινητικών νευρώνων η οποία συμβαίνει στο βρέφος κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης ή κατά την διάρκεια της νεογνικής ηλικίας και προκαλείται από απαλοιφές ή μεταλλάξεις νουκελοτιδίων στο γονίδιο του κινητικού νευρώνα 1 (SMN1). Το nusinersen είναι ένα νέο φάρμακο αντι-πληροφοριακού RNA, που προσδένεται σε μια συγκεκριμένη αλληλουχία στο ιντρόνιο 7 της SMN1 και σε 2 pre-mRNA με αποτέλεσμα την αύξηση της παραγωγής της πρωτεΐνης SMN και βοηθάει στην αντιμετώπιση της νόσου (Hoy et al., 2017).

Η νόσος του Huntington είναι αυτοσωμική επικρατούμενη νευροεκφυλιστική νόσος που προκύπτει από μια εκτεταμένη επανάληψη του CAG, στο γονίδιο της χαντικτίνης, που προκαλεί τοξική δράση της παραγόμενης πρωτεΐνης. Η ανάπτυξη ολιγονουκελοτιδίων αντι-πληροφοριακού RNA, τα οποία μειώνουν την έκφραση του γονιδίου της χαντικτίνης, έχει δείξει ότι μπορεί να προκαλέσει μια μακροχρόνια βελτίωση στην ποιότητα ζωής των ασθενών που πάσχουν από τη νόσο του Huntigton (Aslesh et al., 2020).

2.9 Θεραπείες αντι-πληροφοριακού RNA για την αντιμετώπιση μολυσματικών ασθενειών (ιοί).

Αρκετοί μηχανισμοί του αντι-πληροφοριακού RNA, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ώστε να περιορίσουν την αντιγραφή των ιών στον ξενιστή, όπως για παράδειγμα η πρόσδεση τους στο ιικό mRNA, μέσω ενός μηχανισμού RNAάσης ή μέσω της αναστολής της λειτουργίας των micro-RNA του ξενιστή που υποστηρίζουν την αναπαραγωγή του ιού. Ο HIV είναι ένας λεντοϊός, ο οποίος προκαλεί μακροχρόνια λοίμωξη και οδηγεί στην απόπτωση των ρυθμιστικών κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος, εμποδίζοντας μέσω της δράσης του την ανάπτυξη αποτελεσματικών φαρμάκων και εμβολίων για την αντιμετώπισή του. Για την αντιμετώπισή του έχει προταθεί η χρήση αντι-πληροφοριακού RNA, το οποίο αναστέλλει τη μετάφραση του RNA του HIV-1 στους ανθρώπους (Rizzuti et al., 2015).

Για την αντιμετώπιση του HCV (ιού ηπατίτιδας C), έχει χρησιμοποιηθεί με επιτυχία η τεχνολογία του αντι-πληροφοριακού RNA για την αναστολή της έκφρασης του RNA του ιού στα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα εισάγοντας αντι-πληροφριακό RNA στην 5’ – περιοχή του γονιδιώματος του HCV, στις γενετικές περιοχές 1-402 (deJong et al., 2014).

3. Στρατηγικές ιικών φορέων γενετικού υλικού για γενετικές θεραπείες

Τα τελευταία χρόνια, έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως αρκετές στρατηγικές ιικών φορέων για την μεταφορά γενετικού υλικού σε θεραπείες, οι οποίες χρησιμοποιούνται τόσο in vivo όσο και in vitro, κυρίως λόγω της εύκολης επιμόλυνσης και τις σταθερής διαγονιδιακής έκφρασης. Οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενες μέθοδοι είναι η μεταφορά γενετικού υλικού μέσω αδενοσυσχετιζόμενων ιών (μέσω αδενοϊών, μέσω λεντοϊών και μέσω βακτηριοφάγων. Η πιο πρόσφατες εξελίξεις στον τομέα αυτό αναφέρονται στον Πίνακα 3.

Πίνακας 3. ιικές στρατηγικές μεταφοράς γενετικού υλικού σε φάρμακα γονιδιακής θεραπείας.

Φορέας	Φάρμακο	Ασθένεια	Δράση
Αδενο-συσχετιζόμενος ιός	CRISPR/CA9	Γενετικές ασθένειες, μυϊκή δυστροφία Duchenne	Δεν απαιτείται μακροχρόνια διαδικασίας εμβυρϊκής απομόνωσης, μικροένεση, καλλιέργεια εμβρύων
Αδενο-συσχετιζόμενος ιός	Mir-221-Zip	Καρκίνος	Ξεπερνά την αντίσταση στο TRAIL
Λεντοιοί	MNs	Νευροεκφυλιστικές ασθένειες που εκδηλώνονται κατά την παιδική ηλικία	Υψηλή αποτελεσματικότητα επιμόλυνσης
Λεντοιοί	SaCas9mRNA	Καρκίνος	Υψηλή αποτελεσματικότητα ενθυλάκωσης
Αδενο-συσχετιζόμενος ιός	Διαγονιδιακό	Καρκίνος	Εξουδετερώνει τα αντισώματα, αποφεύγει την αποδόμηση μέσω λυσοσωμάτων
Αδενο-συσχετιζόμενος ιός	Grp78	Γλοιβλάστωμα	Θεραπεία διπλού στόχου.

3.1 Αδενο-συσχετιζόμενοι ιοί

Η γενετική τροποποίηση, είναι ο συνηθέστερος τρόπος με βάση τον οποίο επηρεάζεται η δυνατότητα στόχευσης συγκεκριμένων γονιδίων από τους αδενο-συσχετιζόμενους ιούς. Η γενετική θεραπεία χρησιμοποιώντας σαν μεταφορείς γενετικού υλικού αυτή την ομάδα ιών έχει μεγάλες δυνατότητες στην θεραπεία της μυϊκής δυστροφίας Duchene. Οι Bengtson et al., χρησιμοποίησαν αδενο-συσχετιζόμενους ιούς για να κατασκευάσουν ένα σύστημα sgRNA το οποίο μεταφέρει γονίδια που στοχεύουν μύες, τροποποιεί μεταλλάξεις σε μοντέλα ζώων. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η τροποποίηση των γονιδίων που σχετίζονται με τη μυϊκή λειτουργία με βάση το πειραματικό μοντέλο είναι πολλά υποσχόμενη θεραπεία για τις νευρομυϊκές ασθένειες (Bengtson et al., 2017). Οι Ma et al., μελέτησαν τη γονιδιακή θεραπεία με το miR-221-Zip, η οποία κάμπτει την ανθεκτικότητα των ηπατικών καρκινικών κυττάρων στο φάρμακο το μόριο TRAIL (TNF-related Apoptosis Inducing Ligand). Η μέθοδος αυτή αποτελεί μία από τις πιο σύγχρονες θεραπείες που εφαρμόζονται για την θεραπευτική αντιμετώπιση του ηπατικού καρκίνου (Ma et al., 2017).

3.2 Αδενοιοί

Λόγω της μεγάλης ποικιλομορφίας των αδενοιών, της ευκολίας απομόνωσης, της γενετικής τους σταθερότητας, αλλά και την μεγάλη χωρητικότητα του γενετικού τους υλικού για ξένα γονίδια, το 25% των ιικών φορέων στις γονιδιακές θεραπείες είναι αδενοιοί. Οι Schulz et al., χρησιμοποίησαν αδενοιούς μεγάλης χωρητικότητας γενετικού υλικού οι οποίοι δεν εξέφραζαν ιικά γονίδια που μείωναν την ανοσογονικότητα του ξενιστή. Η ερευνητική ομάδα κατασκεύασε ιούς οι οποίοι αναστέλλουν την έκφραση γονιδίων του HPV, του HIV και του γονιδίου που σχετίζεται με την δυστροφίνη. Η μεγαλύτερη γονιδιακή καταστολή μετά την είσοδο γενετικού υλικού μέσω του αδενοιού μπορεί να φτάσει το 93%, ωστόσο η μέθοδος δεν έχει εφαρμοστεί in vivo (Ehrke – Schulz et al., 2017).

Οι Tan et al., ανοσοποίησαν διαγονιδιακά ποντίκια κατασκευάζοντας ένα στέλεχος ανασυνδυασμένου αδενοιού, που περιείχε το βασικό αντιγόνο της ηπατίτιδας Β (HBcAg) και των γονιδίων (TPPII), προκειμένου να διερευνήσουν την ανοσολογική απόκριση που προκαλούν. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το στέλεχος διασπάσει την ανοσοαπόκριση και να ενεργοποιήσει τη δραστηριότητα του εξειδικευμένων στο HBV Τ λεμφοκυττάρων (Tan et a., 2017).

3.3 Λεντοιοί

Οι Zhao et al., μελέτησαν την έκφραση απενεργοποιημένων γονιδίων σε δύο καρκινικά κύτταρα (MDA-MDB-231 και MCF7), μέσω παρεμβολής RNA από λεντοιούς. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η παρεμβολή RNA που γίνεται μέσω λεντιιών μπορεί να ελέγξει την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων, γεγονός που είναι θετική προοπτική στη θεραπεία του καρκίνου του στήθους (Zhao et a., 2015).

3.4 Βακτηριοφάγοι

Λόγω της μικρής επιλεκτικότητας του ξενιστή και της μειωμένης ικανότητας μεταφοράς γονιδίων, οι βακτηριοφάγοι βρίσκουν σχετικά μικρή εφαρμογή σε έρευνες γενετικών θεραπειών. Οι Suwan et al., έχουν τροποποιήσει την δομή του καψιδίου βακτηριοφάγων και έχουν συνθέσει έναν πολυλειτουργικό ιό που αποτελεί συνδυασμό βακτηριοφάγου και αδενο-συσχετιζόμενου ιού. Αυτό μπορεί να δώσει την ικανότητα στους μελλοντικούς φορείς γενετικού υλικού να αποφύγουν την αποδόμηση μέσω λυσοσωμάτων και να ανοίξουν το δρόμο για γονιδιακές θεραπείες του γλοιοβλαστώματος και του πολύμορφου γλοιβλαστώματος (Suwan et al., 2019).4.

4. Μη ιικοί φορείς DNA

Τα μειονεκτήματα των ιικών φορέων συμπεριλαμβάνουν την ανοσογένεια και την υψηλή πιθανότητα μεταλλάξεων λόγω μικρής ποσότητας γενετικού υλικού. Για να ξεπεραστούν τα προβλήματα αυτά, αλλά και για να αυξηθεί η αποτελεσματικότητα της μεταφοράς DNA, σχεδιάστηκαν οι μη ιικοί φορείς για τη βέλτιστη γονιδιακή θεραπεία. Σε σχέση με τους ιικού, οι μη ιικοί φορείς είναι περισσότερο προσαρμόσιμοι και έχουν μεγαλύτερο εύρος εφαρμογών. Οι σημαντικότεροι μη ιικοί φορείς και οι εφαρμογές

τους που χρησιμοποιούνται στη σύγχρονη γονιδιακή θεραπεία αναφέρονται στον Πίνακα 4.

Πίνακας 4. μη ιικοί φορείς DNA

Μη ιικός φορέας	Φάρμακο γονιδιακής θεραπείας	Θεραπεία
E-cRGD-ND και P-cRGD-Nd	siRNA	Διαχωρίζει το DNA-στόχο και τα πεδία siRNA, μεγιστοποιώντας τις αντίστοιχες λειτουργίες τους
Strodium Sulfite Nanoparticles (SSN)	siRNA	Σημαντικές αντι-ογκολογικές ιδιότητες
Folate-poly(esteranmite) πολυμερές	DNA	Το 90% του φαρμάκου απελευθερώνεται τις 10 πρώτες ώρες
ArgNPs	ΨΡΙΣΠ/Ψας9Εν	Το σύμπλοκο παρέχει αποτελεσματική γονιδιακή επεξεργασία
H – αποφερριτίνη	SiRNA	81% νοκντάουν του mRNA της λουσιφεράσης
GO-PAMAM	siPNA πλασμίδιο	Καλύτερη μεταφορά DNA όταν συνδυάζεται με άλλα φάρμακα
RGD	pDNAs (γονίδια)	Κάνει τον ξενιστή να έχει συγκεκριμένες ιδιότητες πρόσδεσης σε πολυδύναμα κύτταρα

R6dGR πολυαιθυλαμίνη	PPR/pTRAIL	Αυξάνει την διεισδυτικότητα του BBB κατά 97,9%

4.1 Λιποσώματα

Οι Li et al., ανέπτυξαν αποτελεσματικά νανοσωματίδια λιποσωμάτων, τα οποία όταν μεταφέρουν CRISP/Cas9 αυξάνουν της δυνατότητες απενεργοποίησης των γονιδίων-στόχων και μειώνουν την τοξικότητα των φαρμάκων. Αυτό το σύστημα κατιονικών λιποσωμάτων παρέχει ένα νέο τρόπο για την μεταφορά εργαλείων γονιδιακής επεξεργασίας για την μοντελοποίηση και θεραπεία ασθενειών (Li et al., 2019).

4.2 Κατιονικά πολυμερή

Τα κατιονικά πολυμερή σχηματίζονται από των πολυμερισμό επαναλαμβανόμενων μικρών αλληλουχιών που έχουν καλά ελεγχόμενη δομή και μπορεί να σχεδιαστούν ανάλογα με τις ανάγκες του φαρμάκου που περιέχουν. Έχουν καλή βιοσυμβατότητα, βιοδιασπασιμότητα και χρησιμοποιούνται ευρέως σαν φορείς γονιδιακών φαρμάκων. Οι Wang et al., χρησιμοποίησαν κατιονικά πολυμερή για τη μεταφορά ενός συμπλόκου που κωδικοποιεί παράγοντα νέκρωσης όγκου (PPR/p TRAIL), για τη θεραπεία μεταστάσεων καρκίνου του στήθους (Wang et al., 2020).

Επιπλέον, οι Duan et al., χρησιμοποίησαν κατιονικά πολυμερή για να αυξήσουν την προσδετική ικανότητα (προσδένεται σε μεγαλύτερα ολιγονουκλεοτίδια) των BPAR-NB, παράγοντες που υπάρχουν στα φάρμακα PEI 25k και Lipofectamine 2000 (Duan et al., 2020).

4.3 Ανόργανα νανοσωματίδια

Τα ανόργανα νανοσωματίδια έχουν μεγάλες προοπτικές εφαρμογής στη γονιδιακή θεραπεία λόγω της ευκολίας στη διαδικασία προετοιμασίας τους, μεγάλης επιφάνειας, καλής σταθερότητας και χαρακτηριστικά που είναι εύκολο να τροποποιηθούν. Τα νανοσωματίδια χρυσού χρησιμοποιήθηκαν από τους King et al., για να κατασκευαστεί ένα πεπτίδιο (Arg-Gly-Asp), προκειμένου να μεταφερθεί πλασμιδικό DNA και γονίδια λουσιφεράσης τα οποία έχουν εμπλουτιστεί με

φθορίζουσα χρωστική. Η αποτελεσματικότητα της μεταφοράς των γονιδίων αυξήθηκε κατά 104%, ενώ τα νανοσωματίδια χρυσού επέτρεψαν τον σχεδιασμένο φορέα να προσδεθεί σε συγκεκριμένα βλαστοκύτταρα (Kong et al., 2015).

Οι Karim et al., κατασκέυασαν νανοσωματίδια από θειικό στρόντιο, σαν ένα νέο τρόπο μεταφοράς γενετικού υλικού που εξαρτάται από τις αλλαγές στο pH. Ο σκοπός ήταν η αποτελεσματική μεταφορά siRNA σε καρκινικά κύτταρα που εντοπίζονται στον καρκίνο του στήθους. Η μελέτη έδειξε η σημαντικά αυξημένη προσδετική ικανότητα (91-94%) ως προς το siRNA (Karim et al., 2019).

4.3 Εξωσώματα

Τα εξωσώματα είναι ένα είδος κυστιδίων τα οποία εκκρίνονται από τα κύτταρα σε επίπεδο νανοσωματιδίων (40-100nm) και παίζουν σημαντικό ρόλο στην μεταφορά υλικών και την σηματοδοτική επικοινωνία μεταξύ των κυττάρων. Έχουν το πλεονέκτημα ότι έχουν παρόμοιο μέγεθος με την κυτταρική μεμβράνη, είναι μικρά σε μέγεθος, αρνητικά φορτισμένα, αποφεύγουν τη φαγοκυττάρωση, έχουν αυξημένο χρόνο κυκλοφορίας στον οργανισμό και μπορούν να διεισδύουν σε βαθύτερους ιστούς. Οι Gyorgy et al., κατασκεύασαν ένα φορέα DNA με τον συνδυασμό εξωσωμάτων και αδενο-συσχετιζόμενων ιών. Ο φορέας exo-AAV9 μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην θεραπεία της κώφωσης, αφού μετατρέπει τα γονίδια των τριχοκυττάρων του έσω και έξω ωτός (Gyorgy et al., 2017).

Οι Ye et al., σχεδίασαν ένα τροποποιημένο εξώσωμα συνδυάζοντας την μεμβρανική πρωτεΐνη CD63 με τον GFP, για την μεταφορά του γενετικού υλικού των Cas9 πρωτεϊνών (Ye et al., 2020).

5. Συμπεράσματα

Συμπερασματικά, αναφορικά με το αντιπληροφοριακό RNA, πρέπει να τονιστεί ότι είναι ουσιαστικά μικρά σε μέγεθος ολιγονουκλεοτίδια, τα οποία μπορούν να αλλοιώσουν το RNA, αλλά και να τροποποιήσουν ή να αναστείλουν την πρωτεϊνική έκφραση μέσω ενός συνόλου μηχανισμών, ενώ αυξάνουν τις πιθανότητες επιτυχίας των γονιδιακών θεραπειών. Η τελευταίες εξελίξεις στις τεχνολογίες του αντι-

πληροφοριακού RNA έχουν προωθήσει τη χρήση της τεχνολογίας στην κλινική πρακτική. Ωστόσο, περαιτέρω μελέτη χρειάζεται για τη βελτιστοποίηση της μεταφοράς του αντι-πλροφοριακού RNA, της ασφάλειας των φαρμάκων και της εξειδίκευσης στο στόχο τους. Η συγκεκριμένη τεχνολογία έχει την ικανότητα να αλλάξει την αντιμετώπιση πολλών ασθενειών στο μέλλον, ενώ έχουν ήδη μελετηθεί για τη θεραπεία ασθενειών όπως διάφορες μορφές καρκίνου, ιικές μολύνσεις, γενετικές ανωμαλίες και καρδιαγγειακές ασθένειες.

Το πιο σημαντικό από τα πλεονεκτήματα του αντι-πληροφοριακού RNA είναι η ικανότητα που έχει να στοχεύει οποιοδήποτε γονίδιο, το οποίο δεν μπορεί να στοχευτεί με μικρά μόρια ή μέσω φαρμάκων που βασίζονται στις πρωτεΐνες. Αν και η θεραπευτικές δυνατότητες των μορίων αυτών έχουν αποδειχτεί in vivo, θα πρέπει να ξεπεραστούν ορισμένες τεχνικές δυσκολίες ώστε να μπορούν να χρησιμοποιηθούν με μεγαλύτερη συχνότητα στην κλινική πρακτική. Πιο συγκεκριμένα, απαιτείται ο προσεκτικός σχεδιασμός των αλληλουχιών του αντι-πληρορφοριακού RNA, προκειμένου να μην υπάρχουν παρενέργειες ή ανεπιθύμητες αντιδράσεις από το ανοσοποιητικό σύστημα. Η μετάβαση από την έρευνα στην κλινική πρακτική, εξαρτάται επίσης κατά μεγάλο βαθμό από ένα ασφαλές, σύστημα μεταφοράς γενετικού υλικού που μπορεί να διευκολύνει την κυτταρική τους απορρόφηση και προσφέρει προστασία από την διάσπασή του μέσω νουκλεασών.

Μέχρι σήμερα, ο βασικός στόχος των θεραπειών που χρησιμοποιούν την τεχνολογία του αντι-πληροφοριακού RNA είναι ο καρκίνος. Αν και έχει ανιχνευτεί ένας μεγάλος αριθμός γονιδίων που σχετίζονται με τον καρκίνο και μπορούν να αποτελέσουν στόχους της γονιδιακής θεραπείας, χρειάζεται επιπλέον μελέτη για να διερευνηθούν η διάρκεια της καταστολής της γονιδιακής έκφρασης, καθώς μπορεί να επηρεάσει τη δόση και τη διάρκεια της θεραπείας. Η διάρκεια της καταστολής της γονιδιακής έκφρασης μετά από γονιδιακή θεραπεία με αντι-πληροφοριακό RNA, μπορεί να εξαρτάται από ένα μεγάλο αριθμό παραγόντων όπως είναι η σταθερότητα των μορίων RNA, ο ρυθμός απελευθέρωσης του RNA από το σύστημα μεταφοράς του, τον τύπο του ιστού-στόχου και την ημίσεια ζωή των πρωτεϊνών – στόχων. Αποτελεσματική γονιδιακή αποσιώπηση μπορεί επίσης να γίνει και μέσω γυμνού RNA, αλλά αυτό μπορεί να περιοριστεί σε τοπική χορήγηση σε όργανα όπως τα μάτια και οι πνεύμονες. Η μέχρι τώρα πορεία των ερευνών δείχνει ότι τα μειονεκτήματα της

αστάθειας απέναντι στην δραστηριότητα των νουκλεασών, καθώς και η καλύτερη κατανόηση της διάρκειας και των αποτελεσμάτων της γονιδιακής απενεργοποίησης, θα αυξήσουν την κλινική εφαρμογή των γονιδιακών θεραπειών με αντι-πληροφοριακό RNA στο μέλλον.

Ο σημαντικότερος παράγοντας της γονιδιακής θεραπείας είναι η επιλογή συγκεκριμένων γονιδίων τα οποία έχουν θεραπευτικές ιδιότητες στην ασθένεια που πρέπει να αντιμετωπιστεί, σε σχέση με το μοριακό υπόβαθρο της

ασθένειας. Η επιλογή του φορέα του γενετικού υλικού είναι επίσης σημαντική στην διαδικασία της γονιδιακής θεραπείας. Το βασικό πρόβλημα με τα γονιδιακά φάρμακα είναι η διαδικασία μεταφοράς τους, ένα πρόβλημα που μπορεί να επιλυθεί μέσω των νέων τεχνολογιών φορέων γενετικού υλικού. Αν και οι ιικοί μεταφορείς έχουν υψηλή αποτελεσματικότητα και μπορεί να ενσωματωθούν με ευκολία στα κύτταρα του ξενιστή, υπάρχει πάντα ο κίνδυνος παρενεργειών λόγω του και το πρόβλημα αστοχίας σε σχέση με την αλληλουχία – στόχο. Επιπλέον, λόγω του μεγάλου κόστος των γονιδιακών θεραπειών, αντίστοιχα μεγάλο κόστος έχουν και η έρευνα και η ανάπτυξη των μεθόδων μεταφοράς γενετικού υλικού. Η μείωση του κόστους είναι ένας από τους σημαντικότερους παράγοντες για να περάσουν οι θεραπείες αυτές από την έρευνα στην κλινική πρακτική.

Αν λάβουμε υπόψιν την πολυπλοκότητα του ανθρώπινου γενετικού υλικού, καταλαβαίνουμε ότι τα φάρμακα γονιδιακής θεραπείας μπορεί να έχουν απρόβλεπτες συνέπειες. Σήμερα, δεν υπάρχουν εγγυήσεις ότι οι αλλαγές στη δομή του γενετικού υλικού δε θα φέρουν απώλειες σε άγνωστες λειτουργίες. Επομένως, η γονιδιακή θεραπεία είναι μια ιατρική πρακτική η οποία έχει και ηθικές προεκτάσεις. Συνεπώς, με την ανάπτυξη της μοριακής βιολογίας, της μοριακής γενετικής και της κλινικής ιατρικής αλλά και με την ανάπτυξη καινούριων νανοϋλικών, η γονιδιακή θεραπεία θα συνεχίσει να εξελίσσεται και να χρησιμοποιείται ευρέως στην κλινική πρακτική.

Βιβλιογραφία

·Acquaah, G. (2009). *Principles of plant genetics and breeding*. John Wiley & Sons.

·Ackermann, E. J., Guo, S., Benson, M. D., Booten, S., Freier, S., Hughes, S. G., ... & Monia, B. P. (2016). Suppressing transthyretin production in mice, monkeys and humans using 2nd-Generation antisense oligonucleotides. *Amyloid*, *23*(3), 148-157.

·ACMG Board of Directors. (2015). Clinical utility of genetic and genomic services: a position statement of the American College of Medical Genetics and Genomics. *Genetics in Medicine*, *17*(6), 505-507.

·Adams, B. D., Parsons, C., Walker, L., Zhang, W. C., & Slack, F. J. (2017). Targeting noncoding RNAs in disease. *The Journal of clinical investigation*, *127*(3), 761-771.

·Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2002). Molecular biology of the cell. Garland Science. *New York*, *1*.

·Alford, R. L., Arnos, K. S., Fox, M., Lin, J. W., Palmer, C. G., Pandya, A., ... & Yoshinaga-Itano, C. (2014). American College of Medical Genetics and Genomics guideline for the clinical evaluation and etiologic diagnosis of hearing loss. *Genetics in medicine*, *16*(4), 347-355.

·Amberger, J., Bocchini, C. A., Scott, A. F., & Hamosh, A. (2009). McKusick's online Mendelian inheritance in man (OMIM®). *Nucleic acids research*, *37*(suppl_1), D793-D796.

·Aslesh, T., & Yokota, T. (2020). Development of antisense oligonucleotide gapmers for the treatment of Huntington’s disease. In *Gapmers* (pp. 57-67). Humana, New York, NY.

·Αυγενάκη, Ε., & Ντρουμπογιάννη, Α. (2020). Γονιδιακές μεταλλάξεις και εξέλιξη. *Open Schools Journal for Open Science*, *3*(8).

·Bagley, J., & Iacomini, J. (2003). Gene therapy progress and prospects: gene therapy in organ transplantation. *Gene therapy*, *10*(8), 605-611.

·Beaudet, A. L., & Meng, L. (2016). Gene-targeting pharmaceuticals for single-gene disorders. *Human molecular genetics*, *25*(R1), R18-R26.

·Bengtsson, N. E., Hall, J. K., Odom, G. L., Phelps, M. P., Andrus, C. R., Hawkins, R. D., ... & Chamberlain, J. S. (2017). Muscle-specific CRISPR/Cas9 dystrophin gene editing ameliorates pathophysiology in a mouse model for Duchenne muscular dystrophy. *Nature communications*, *8*(1), 1-10.

·Bennett, C. F., Baker, B. F., Pham, N., Swayze, E., & Geary, R. S. (2017). Pharmacology of antisense drugs. *Annual review of pharmacology and toxicology*, *57*, 81-105.

·Benson, M. D., Dasgupta, N. R., Rissing, S. M., Smith, J., & Feigenbaum, H. (2017). Safety and efficacy of a TTR specific antisense oligonucleotide in patients with transthyretin amyloid cardiomyopathy. *Amyloid*, *24*(4), 217-223.

Bentley, D. R. (2000). The human genome project—an overview. *Medicinal research reviews*, *20*(3), 189-196.

·Bicknell, A. A., Cenik, C., Chua, H. N., Roth, F. P., & Moore, M. J. (2012). Introns in UTRs: why we should stop ignoring them. *Bioessays*, *34*(12), 1025-1034.

·Bidanel, J. P. (2011). Biology and genetics of reproduction. *The genetics of the pig*, *2*, 222-232.

·Bulik-Sullivan, B., Finucane, H. K., Anttila, V., Gusev, A., Day, F. R., Loh, P. R., ... & Neale, B. M. (2015). An atlas of genetic correlations across human diseases and traits. *Nature genetics*, *47*(11), 1236-1241.

·Canela-Xandri, O., Rawlik, K., & Tenesa, A. (2018). An atlas of genetic associations in UK Biobank. *Nature genetics*, *50*(11), 1593-1599.

·Cantor, R. M. (2019). Analysis of genetic linkage. In *Emery and Rimoin's Principles and Practice of Medical Genetics and Genomics* (pp. 227-236). Academic Press.

·Chery, J. (2016). RNA therapeutics: RNAi and antisense mechanisms and clinical applications. *Postdoc journal: a journal of postdoctoral research and postdoctoral affairs*, *4*(7), 35.

·Chial, H. (2008). Mendelian genetics: patterns of inheritance and single-gene disorders. *Nature Education*, *1*(1), 63.

·Collins, F. S., & McKusick, V. A. (2001). Implications of the Human Genome Project for medical science. *Jama*, *285*(5), 540-544.

·Γουρνάρη, Β. (2016). Αλγόριθμοι στη μοριακή και γενετική βιολογία.

·Crooke, S. T. (Ed.). (2007). *Antisense drug technology: principles, strategies, and applications*. CRC press.

·Daya, S., & Berns, K. I. (2008). Gene therapy using adeno-associated virus vectors. *Clinical microbiology reviews*, *21*(4), 583-593.

·Deary, I. J., Yang, J., Davies, G., Harris, S. E., Tenesa, A., Liewald, D., ... & Visscher, P. M. (2012). Genetic contributions to stability and change in intelligence from childhood to old age. *Nature*, *482*(7384), 212-215.

·Deng, W. P., Wu, C. C., Lee, C. C., Yang, W. K., Wang, H. E., Liu, R. S., ... & Wu, C. W. (2006). Serial in vivo imaging of the lung metastases model and gene therapy using HSV1-tk and ganciclovir. *Journal of Nuclear Medicine*, *47*(5), 877-884.

·de Jong, Y. P., & Jacobson, I. M. (2014). Antisense therapy for hepatitis C virus infection. *Journal of hepatology*, *60*(1), 227-228.

·Dobyns, W. B., Filauro, A., Tomson, B. N., Chan, A. S., Ho, A. W., Ting, N. T., ... & Ober, C. (2004). Inheritance of most X-linked traits is not dominant or recessive, just X-linked. *American journal of medical genetics Part A*, *129*(2), 136-143.

·Droz-Georget Lathion, S., Rochat, A., Knott, G., Recchia, A., Martinet, D., Benmohammed, S., ... & Barrandon, Y. (2015). A single epidermal stem cell strategy for safe ex vivo gene therapy. *EMBO molecular medicine*, *7*(4), 380-393.

·Duan, S., Cao, D., Li, X., Zhu, H., Lan, M., Tan, Z., ... & Chen, Y. (2020). Topology-assisted, photo-strengthened DNA/siRNA delivery mediated by branched poly (β-amino ester) s via synchronized intracellular kinetics. *Biomaterials science*, *8*(1), 290-301.

·Dunbar, C. E., High, K. A., Joung, J. K., Kohn, D. B., Ozawa, K., & Sadelain, M. (2018). Gene therapy comes of age. *Science*, *359*(6372).

·Economou, C. (2015). Barriers and facilitating factors in access to health services in Greece. *Copenhagen: WHO Regional Office for Europe*.

·Economou, C., Kaitelidou, D., Kentikelenis, A., Maresso, A., & Sissouras, A. (2015). The impact of the crisis on the health system and health in Greece. ·In *Economic crisis, health systems and health in Europe: Country experience [Internet]*. European Observatory on Health Systems and Policies.

·Edelstein, M. L., Abedi, M. R., Wixon, J., & Edelstein, R. M. (2004). Gene therapy clinical trials worldwide 1989–2004—an overview. *The Journal of Gene Medicine: A cross-disciplinary journal for research on the science of gene transfer and its clinical applications*, *6*(6), 597-602.

·Ehrke-Schulz, E., Schiwon, M., Leitner, T., Dávid, S., Bergmann, T., Liu, J., & Ehrhardt, A. (2017). CRISPR/Cas9 delivery with one single adenoviral vector devoid of all viral genes. *Scientific reports*, *7*(1), 1-11.

·Farooqi, A. A., ur Rehman, Z., & Muntane, J. (2014). Antisense therapeutics in oncology: current status. *OncoTargets and therapy*, *7*, 2035.

·Feagan, B. G., Sands, B. E., Rossiter, G., Li, X., Usiskin, K., Zhan, X., & Colombel, J. F. (2018). Effects of mongersen (GED-0301) on endoscopic and clinical outcomes in patients with active Crohn's disease. *Gastroenterology*, *154*(1), 61-64.

·Fitzpatrick, M. J., Feder, E., Rowe, L., & Sokolowski, M. B. (2007). Maintaining a behaviour polymorphism by frequency-dependent selection on a single gene. *Nature*, *447*(7141), 210-212.

·Flanigan, K. M. (2014). Duchenne and Becker muscular dystrophies. *Neurologic clinics*, *32*(3), 671-688.

·Frank, R., & Hargreaves, R. (2003). Clinical biomarkers in drug discovery and development. *Nature reviews Drug discovery*, *2*(7), 566-580.

·Galhardo, R. S., Hastings, P. J., & Rosenberg, S. M. (2007). Mutation as a stress response and the regulation of evolvability. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, *42*(5), 399-435.

·Ganikhodjaev, N., Saburov, M., & Jamilov, U. (2013). Mendelian and non-Mendelian quadratic operators. *arXiv preprint arXiv:1304.5471*.

·Garte, S., Gaspari, L., Alexandrie, A. K., Ambrosone, C., Autrup, H., Autrup, J. L., ... & Taioli, E. (2001). Metabolic gene polymorphism frequencies in control populations. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*, *10*(12), 1239-1248.

·Gates, A. J., Gysi, D. M., Kellis, M., & Barabási, A. L. (2021). A wealth of discovery built on the human genome project—by the numbers.

·Gianaroli, L., Magli, M. C., Ferraretti, A. P., Munne, S., Balicchia, B., Escudero, T., & Crippa, A. (2002). Possible interchromosomal effect in embryos generated by gametes from translocation carriers. *Human Reproduction*, *17*(12), 3201-3207.

·Godino, L., Turchetti, D., Jackson, L., Hennessy, C., & Skirton, H. (2016). Impact of presymptomatic genetic testing on young adults: a systematic review. *European Journal of Human Genetics*, *24*(4), 496-503.

·Görög, S. (2015). Identification in drug quality control and drug research. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, *69*, 114-122.

·Gowen, A. A., O'donnell, C. P., Cullen, P. J., & Bell, S. E. J. (2008). Recent applications of chemical imaging to pharmaceutical process monitoring and quality control. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics*, *69*(1), 10-22.

·Gräslund, T., Li, X., Magnenat, L., Popkov, M., & Barbas, C. F. (2005). Exploring strategies for the design of artificial transcription factors: targeting sites proximal to known regulatory regions for the induction of γ-globin expression and the treatment of sickle cell disease. *Journal of Biological Chemistry*, *280*(5), 3707-3714.

·Gregg, A. R., Aarabi, M., Klugman, S., Leach, N. T., Bashford, M. T., Goldwaser, T., ... & Dungan, J. S. (2021). Screening for autosomal recessive and X-linked conditions during pregnancy and preconception: a practice resource of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG). *Genetics in Medicine*, *23*(10), 1793-1806.

·Greuter, T., Biedermann, L., Rogler, G., Sauter, B., & Seibold, F. (2016). ·Alicaforsen, an antisense inhibitor of ICAM-1, as treatment for chronic refractory pouchitis after proctocolectomy: a case series. *United European gastroenterology journal*, *4*(1), 97-104.

·Griffiths, P., & Stotz, K. (2013). *Genetics and philosophy: An introduction*. Cambridge University Press.

·Grillone, L., & Lieberman, R. (2017). Fomivirsen. In *Kucers' The Use of Antibiotics* (pp. 3647-3651). CRC Press.

·Guay-Woodford, L. M., & Knoers, N. V. (2009). Clinical applications of genetics. In *Genetic diseases of the kidney* (pp. 25-36). Academic Press.

·Guthrie, C., & Fink, G. R. (Eds.). (2002). *Guide to yeast genetics and molecular and cell biology, Part C* (Vol. 351). Gulf Professional Publishing.

·György, B., Sage, C., Indzhykulian, A. A., Scheffer, D. I., Brisson, A. R., Tan, S., ... & Maguire, C. A. (2017). Rescue of hearing by gene delivery to inner-ear hair cells using exosome-associated AAV. *Molecular Therapy*, *25*(2), 379-391.

·Hamosh, A., Amberger, J. S., Bocchini, C., Scott, A. F., & Rasmussen, S. A. (2021). Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM®): Victor McKusick's magnum opus. *American Journal of Medical Genetics Part A*.

·Harman, O., & Lamm, E. (2015). History of classical genetics. *eLS*, 1-6.

·Hauser, A. S., Attwood, M. M., Rask-Andersen, M., Schiöth, H. B., & Gloriam, D. E. (2017). Trends in GPCR drug discovery: new agents, targets and indications. *Nature reviews Drug discovery*, *16*(12), 829-842.

·Hong, D., Kurzrock, R., Kim, Y., Woessner, R., Younes, A., Nemunaitis, J., ... & MacLeod, A. R. (2015). AZD9150, a next-generation antisense oligonucleotide inhibitor of STAT3 with early evidence of clinical activity in lymphoma and lung cancer. *Science translational medicine*, *7*(314), 314ra185-314ra185.

·Hughes, J. P., Rees, S., Kalindjian, S. B., & Philpott, K. L. (2011). Principles of early drug discovery. *British journal of pharmacology*, *162*(6), 1239-1249.

Hutcheon, L. (2012). *A theory of adaptation*. Routledge.

·Jorde, L. B., Carey, J. C., & Bamshad, M. J. (2019). *Medical genetics e-Book*. Elsevier Health Sciences.

·Kaji, E. H., & Leiden, J. M. (2001). Gene and stem cell therapies. *Jama*, *285*(5), 545-550.

·Karim, M., Shetty, J., Islam, R. A., Kaiser, A., Bakhtiar, A., & Chowdhury, E. H. (2019). Strontium Sulfite: A New pH-Responsive Inorganic Nanocarrier to Deliver Therapeutic siRNAs to Cancer Cells. *Pharmaceutics*, *11*(2), 89.

Καψάλης A., et al., (2013) Βιολογία. ΙΤΥΕ - ΔΙΟΦΑΝΤΟΣ

·Klug, W. S., Cummings, M. R., Spencer, C. A., Palladino, M. A., & Killian, D. (2019). *Concepts of genetics*.

·Kong, L., Alves, C. S., Hou, W., Qiu, J., Möhwald, H., Tomás, H., & Shi, X. (2015). RGD peptide-modified dendrimer-entrapped gold nanoparticles enable highly efficient and specific gene delivery to stem cells. *ACS applied materials & interfaces*, *7*(8), 4833-4843.

Korf, B. (2012). Genetic and genomic competency in medical practice. *AMA Journal of Ethics*, *14*(8), 622-626.

Kotterman, M. A., Chalberg, T. W., & Schaffer, D. V. (2015). Viral vectors for gene therapy: translational and clinical outlook. *Annual review of biomedical engineering*, *17*, 63-89.

Krapohl, E., & Plomin, R. (2016). Genetic link between family socioeconomic status and children's educational achievement estimated from genome-wide SNPs. *Molecular psychiatry*, *21*(3), 437-443.

Krishna M. Epigenet, O. T. J. C. (2017). From petunias to the present-a review of oligonucleotide therapy. *Journal of Clinical Epigenetics*, *3*(4), 38.

Küppers, R., & Dalla-Favera, R. (2001). Mechanisms of chromosomal translocations in B cell lymphomas. *Oncogene*, *20*(40), 5580-5594.

Kurtoğlu, S., Sarıcı, D., Akın, M. A., Daar, G., Korkmaz, L., & Memur, Ş. (2011). Fetal adrenal suppression due to maternal corticosteroid use: case report. *Journal of clinical research in pediatric endocrinology*, *3*(3), 160.

Lanktree, M. B., & Hegele, R. A. (2017). Metabolic syndrome. In *Genomic and Precision Medicine* (pp. 283-299). Academic Press.

Latchman, D. (2007). *Gene regulation*. Taylor & Francis.

Lesko, L. J., Salerno, R. A., Spear, B. B., Anderson, D. C., Anderson, T., Brazell, C., ... & Worobec, A. (2003). Pharmacogenetics and pharmacogenomics in drug development and regulatory decision making: Report of the first FDA-PWG-PhRMA-DruSafe Workshop. *The Journal of Clinical Pharmacology*, *43*(4), 342-358.

Li, G., & Reinberg, D. (2011). Chromatin higher-order structures and gene regulation. *Current opinion in genetics & development*, *21*(2), 175-186.

Li, J. J., & Biggin, M. D. (2015). Gene expression. Statistics requantitates the central dogma. *Science (New York, NY)*, *347*(6226), 1066-1067.

Li, G. W., & Xie, X. S. (2011). Central dogma at the single-molecule level in living cells. *Nature*, *475*(7356), 308-315.

·Li, Y., Bolinger, J., Yu, Y., Glass, Z., Shi, N., Yang, L., ... & Xu, Q. (2019). Intracellular delivery and biodistribution study of CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein loaded bioreducible lipidoid nanoparticles. *Biomaterials science*, *7*(2), 596-606.

·Ling, H. (2016). Non-coding RNAs: therapeutic strategies and delivery systems. *Non-coding RNAs in Colorectal Cancer*, 229-237.

·Liu, D., Ma, C., Hong, W., Huang, L., Liu, M., Liu, H., ... & Zheng, H. (2014). Construction and analysis of high-density linkage map using high-throughput sequencing data. *Plos one*, *9*(6), e98855.

·Lombardo, A., Genovese, P., Beausejour, C. M., Colleoni, S., Lee, Y. L., Kim, K. A., ... & Naldini, L. (2007). Gene editing in human stem cells using zinc finger nucleases and integrase-defective lentiviral vector delivery. *Nature biotechnology*, *25*(11), 1298-1306.

·Lynch, M. (2010). Evolution of the mutation rate. *TRENDS in Genetics*, *26*(8), 345-352.

·Ma, S., Sun, J., Guo, Y., Zhang, P., Liu, Y., Zheng, D., & Shi, J. (2017). Combination of AAV-TRAIL with miR-221-Zip therapeutic strategy overcomes the resistance to TRAIL induced apoptosis in liver cancer. *Theranostics*, *7*(13), 3228.

·MacLennan, M., Crichton, J. H., Playfoot, C. J., & Adams, I. R. (2015, September). Oocyte development, meiosis and aneuploidy. In *Seminars in cell & developmental biology* (Vol. 45, pp. 68-76). Academic Press.

·Mack, K. L., & Nachman, M. W. (2017). Gene regulation and speciation. *Trends in Genetics*, *33*(1), 68-80.

·Mahdieh, N., & Rabbani, B. (2013). An overview of mutation detection methods in genetic disorders. *Iranian journal of pediatrics*, *23*(4), 375.

·McCorvie, T. J., & Timson, D. J. (2020). Galactosemia: opportunities for novel therapies. In *Protein Homeostasis Diseases* (pp. 221-245). Academic Press.

·McElheny, V. K. (2012). *Drawing the map of life: Inside the Human Genome Project*. Hachette UK.

·Meinert, C. L. (2006). Clinical trials, overview. *Wiley Handbook of Current and Emerging Drug Therapies*.

·Mohr, A. M., & Mott, J. L. (2015, February). Overview of microRNA biology. In *Seminars in liver disease* (Vol. 35, No. 01, pp. 003-011). Thieme Medical Publishers.

·Moulton, J. D., & Yan, Y. L. (2008). Using Morpholinos to control gene expression. *Current protocols in molecular biology*, *83*(1), 26-8.

·Munafò, M. R., Tilling, K., Taylor, A. E., Evans, D. M., & Davey Smith, G. (2018). Collider scope: when selection bias can substantially influence observed associations. *International journal of epidemiology*, *47*(1), 226-235.

·Münch, R., Hiller, K., Barg, H., Heldt, D., Linz, S., Wingender, E., & Jahn, D. (2003). PRODORIC: prokaryotic database of gene regulation. *Nucleic acids research*, *31*(1), 266-269.

·Naldini, L. (2015). Gene therapy returns to centre stage. *Nature*, *526*(7573), 351-360.

·Naldini, L. (2011). Ex vivo gene transfer and correction for cell-based therapies. *Nature Reviews Genetics*, *12*(5), 301-315.

·National Research Foundation (2019). «Κανόνες ορθής βιομηχανικής πρακτικής για την παραγωγή ασφαλών και αποτελεσματικών φαρμάκων». Από διαδίκτυο «Http://helios-eie-ekt.gr, ανάκτηση την 17/11/2021.

·Norwitz, E. R., & Levy, B. (2013). Noninvasive prenatal testing: the future is now. *Reviews in obstetrics and gynecology*, *6*(2), 48.

·Oakes, D. A., & Lieberman, J. R. (2000). Osteoinductive applications of regional gene therapy: ex vivo gene transfer. *Clinical Orthopaedics and Related Research®*, *379*, S101-S112.

·Ossevoort, M., Zaldumbide, A., Cramer, S. J., van der Voort, E. I. H., Toes, R. E. M., & Hoeben, R. C. (2006). Characterization of an immuno ‘stealth’derivative of the herpes simplex virus thymidine-kinase gene. *Cancer gene therapy*, *13*(6), 584-591.

·Osorio, A. N., Cantillo, J. M., Salas, A. C., Garrido, M. M., & Padilla, J. V. (2019). Consensus on the diagnosis, treatment and follow-up of patients with ·Duchenne muscular dystrophy. *Neurología (English Edition), 34*(7), 469-481.
Ott, J. (1999). *Analysis of human genetic linkage*. JHU Press.

·Page, S. L., & Hawley, R. S. (2003). Chromosome choreography: the meiotic ballet. *Science, 301*(5634), 785-789.

·Parker, S. C., & Tullius, T. D. (2011). DNA shape, genetic codes, and evolution. *Current opinion in structural biology, 21*(3), 342-347.

·Pennacchio, L. A., Bickmore, W., Dean, A., Nobrega, M. A., & Bejerano, G. (2013). Enhancers: five essential questions. *Nature Reviews Genetics, 14*(4), 288-295.

·Portin, P. (2014). The birth and development of the DNA theory of inheritance: sixty years since the discovery of the structure of DNA. *Journal of genetics, 93*(1), 293-302.

·Rabbani, B., Tekin, M., & Mahdieh, N. (2014). The promise of whole-exome sequencing in medical genetics. *Journal of human genetics, 59*(1), 5-15.

·Rader, D. J., & Kastelein, J. J. (2014). Lomitapide and mipomersen: two first-in-class drugs for reducing low-density lipoprotein cholesterol in patients with homozygous familial hypercholesterolemia. *Circulation, 129*(9), 1022-1032.

·Rajan, K. S., & Ramasamy, S. (2014). Retrotransposons and piRNA: the missing link in central nervous system. *Neurochemistry international, 77*, 94-102.

·Ramamoorth, M., & Narvekar, A. (2015). Non viral vectors in gene therapy-an overview. *Journal of clinical and diagnostic research: JCDR, 9*(1), GE01.

·Reményi, A., Schöler, H. R., & Wilmanns, M. (2004). Combinatorial control of gene expression. *Nature structural & molecular biology, 11*(9), 812-815.

·Rizzuti, M., Nizzardo, M., Zanetta, C., Ramirez, A., & Corti, S. (2015). Therapeutic applications of the cell-penetrating HIV-1 Tat peptide. *Drug discovery today, 20*(1), 76-85.

·Rood, J. E., & Regev, A. (2021). The legacy of the Human Genome Project. *Science*, *373*(6562), 1442-1443.

·Rosenfeld, N., Young, J. W., Alon, U., Swain, P. S., & Elowitz, M. B. (2005). Gene regulation at the single-cell level. *science*, *307*(5717), 1962-1965.

·Ross, R. J., Weiner, M. M., & Lin, H. (2014). PIWI proteins and PIWI-interacting RNAs in the soma. *Nature*, *505*(7483), 353-359.

·Rossi, A., Kontarakis, Z., Gerri, C., Nolte, H., Hölper, S., Krüger, M., & Stainier, D. Y. (2015). Genetic compensation induced by deleterious mutations but not gene knockdowns. *Nature*, *524*(7564), 230-233.

·Rubinstein, W. S., Maglott, D. R., Lee, J. M., Kattman, B. L., Malheiro, A. J., Ovetsky, M., ... & Ostell, J. M. (2012). The NIH genetic testing registry: a new, centralized database of genetic tests to enable access to comprehensive information and improve transparency. *Nucleic acids research*, *41*(D1), D925-D935.

·Rusk, N. (2015). Understanding noncoding RNAs. *Nature Methods*, *12*(1), 35-35.

·Russell, P. J. (2009). iGenetics-Μια Μεντελική Προσέγγιση. *Ακαδημαϊκές Εκδόσεις*.

·Saurabh, S., Vidyarthi, A. S., & Prasad, D. (2014). RNA interference: concept to reality in crop improvement. *Planta*, *239*(3), 543-564.

·Schloss, J. A., Gibbs, R. A., Makhijani, V. B., & Marziali, A. (2020). Cultivating DNA sequencing technology after the human genome project. *Annual review of genomics and human genetics*, *21*, 117-138.

·Schmidt-Wolf, G. D., & Schmidt-Wolf, I. G. (2003). Non-viral and hybrid vectors in human gene therapy: an update. *Trends in molecular medicine*, *9*(2), 67-72.

·Schmitt, T. M., Ragnarsson, G. B., & Greenberg, P. D. (2009). T cell receptor gene therapy for cancer. *Human gene therapy*, *20*(11), 1240-1248.

·Shu, J. J. (2017). A new integrated symmetrical table for genetic codes. *Biosystems*, *151*, 21-26.

· Simm, P. J., Munns, C. F., Jefferies, C. A., & Wheeler, B. J. (2020). Childhood Rickets—New Developments in Epidemiology, Prevention, and Treatment. *Frontiers in Endocrinology*, *11*.

·Stein, C. A., & Castanotto, D. (2017). FDA-approved oligonucleotide therapies in 2017. *Molecular Therapy*, *25*(5), 1069-1075.

· Suwan, K., Yata, T., Waramit, S., Przystal, J. M., Stoneham, C. A., Bentayebi, K., ... & Hajitou, A. (2019). Next-generation of targeted AAVP vectors for systemic transgene delivery against cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *116*(37), 18571-18577.

· Tan, Q., Ma, S., Hu, J., Chen, X., Yu, Y., Zang, G., & Tang, Z. (2017). Adenovirus vector harboring the HBcAg and tripeptidyl peptidase II genes induces potent cellular immune responses in vivo. *Cellular Physiology and Biochemistry*, *41*(2), 423-438.

· Teare, M. D., & Barrett, J. H. (2005). Genetic linkage studies. *The Lancet*, *366*(9490), 1036-1044.

·Torkamani, A., Wineinger, N. E., & Topol, E. J. (2018). The personal and clinical utility of polygenic risk scores. *Nature Reviews Genetics*, *19*(9), 581-590.

· Turnpenny, P. D., Ellard, S., & Cleaver, R. (2020). *Emery's Elements of Medical Genetics E-Book*. Elsevier Health Sciences.

· Valiunas, V., Wang, H. Z., Li, L., Gordon, C., Valiuniene, L., Cohen, I. S., & Brink, P. R. (2015). A comparison of two cellular delivery mechanisms for small interfering RNA. *Physiological reports*, *3*(2), e12286.

·Verma, I. M., Naldini, L., Kafri, T., Miyoshi, H., Takahashi, M., Blömer, U., ... & Gage, F. H. (2000). Gene therapy: promises, problems and prospects. In *Genes and Resistance to Disease* (pp. 147-157). Springer, Berlin, Heidelberg.

· Villegas, V. E., & Zaphiropoulos, P. G. (2015). Neighboring gene regulation by antisense long non-coding RNAs. *International journal of molecular sciences*, *16*(2), 3251-3266.

· Ye, Y., Zhang, X., Xie, F., Xu, B., Xie, P., Yang, T., ... & Li, J. (2020). An engineered exosome for delivering sgRNA: Cas9 ribonucleoprotein complex and genome editing in recipient cells. *Biomaterials science*, *8*(10), 2966-2976.

·Young, L. S., Searle, P. F., Onion, D., & Mautner, V. (2006). Viral gene therapy strategies: from basic science to clinical application. *The Journal of*

Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland, *208*(2), 299-318.

·Wang, X., Yin, S., Li, M., Rao, J., Wan, D., Qiu, Y., ... & He, Q. (2020). Autophagy inhibition changes the disposition of non-viral gene carriers during blood-brain barrier penetration and enhances TRAIL-induced apoptosis in brain metastatic tumor. *Journal of Controlled Release*, *321*, 497-508.

· White, R. J. (2002). Fundamentals of transcription. *Trends in Biochemical Sciences*, *27*(11), 590.

· WHO (2017). International Clinical Trials Registry Platform (ICTRP). http://www.who.int/cictrp/en/. (Ανάκτηση την 16/11/2021).

· Wichler, G. (2013). *Charles Darwin: the founder of the theory of evolution and natural selection*. Elsevier.

·Won, J. I., Zhang, J., Tecson, K. M., & McCullough, P. A. (2017). Balancing low-density lipoprotein cholesterol reduction and hepatotoxicity with lomitapide mesylate and mipomersen in patients with homozygous familial hypercholesterolemia. *Reviews in cardiovascular medicine*, *18*(1), 21-28.

·World Medical Association. (2013). World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects. *Jama*, *310*(20), 2191-2194.

· Wu, Z., Asokan, A., & Samulski, R. J. (2006). Adeno-associated virus serotypes: vector toolkit for human gene therapy. *Molecular therapy*, *14*(3), 316-327.

·Zhao, X., Zou, Y., Gu, Q., Zhao, G., Gray, H., Pfeffer, L. M., & Yue, J. (2015). Lentiviral vector mediated claudin1 silencing inhibits epithelial to mesenchymal transition in breast cancer cells. *Viruses*, *7*(6), 2965-2979.

·Yamamoto, Y., Loriot, Y., Beraldi, E., Zhang, F., Wyatt, A. W., Al Nakouzi, N., ... & Gleave, M. (2015). Generation 2.5 antisense oligonucleotides targeting the androgen receptor and its splice variants suppress enzalutamide-resistant prostate cancer cell growth. *Clinical cancer research*, *21*(7), 1675-1687.