

Η επομένη μέρα στην γενετική ανάλυση

Του Παντελή Κωνσταντουλάκη

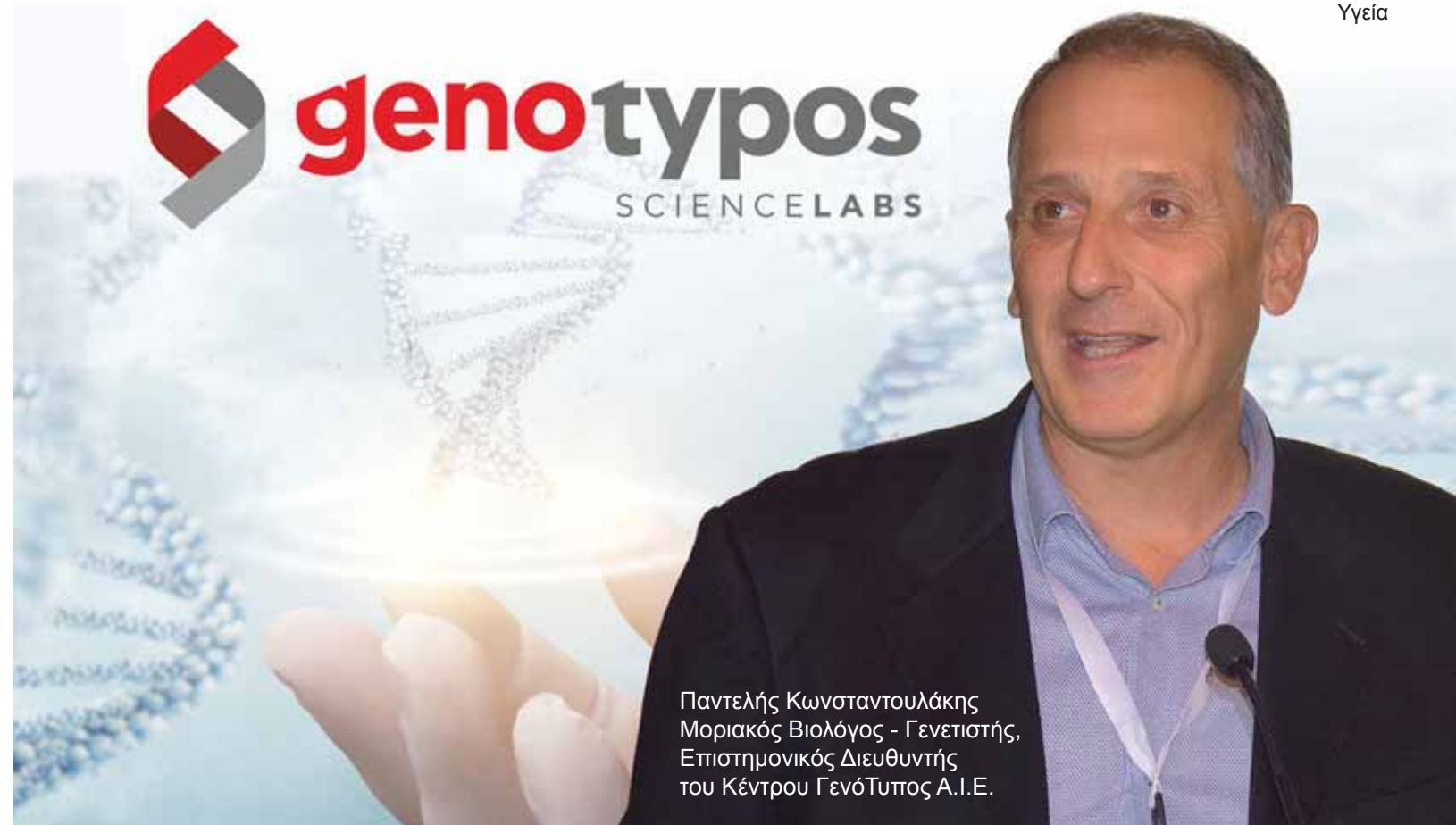
Ο αιώνας που διανύουμε έχει χαρακτηριστεί «Αιώνας της Βιολογίας» και όχι άδικα. Καθημερινά βρισκόμαστε σε καταιγισμό πληροφοριών σχετικά με τη Βιολογία και τη Γενετική και πλέον κάθε άνθρωπος, οποιασδήποτε ηλικίας γνωρίζει τι σημαίνει DNA και τι Μοριακή Εξέταση. Σε αυτό συνέβαλε σε μεγάλο βαθμό η πανδημία του Κορωνοϊού, αλλά και πριν από αυτή, η εκπληκτική πρόοδος του τομέα στην Διαγνωστική Ακρίβειας στον Καρκίνο και σε σπάνια νοσήματα.

Τα δύο μεγάλα βήματα που προσέφεραν τα απαραίτητα εργαλεία για τις εξελίξεις ήταν φυσικά η εισαγωγή της μεθόδου της PCR (αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης) πριν από μερικές δεκαετίες και της μεθόδου NGS (αλληλούχισης νέας γενιάς) πριν από λίγα χρόνια. Αυτές οι δύο τεχνικές συνετέλεσαν στην εκπληκτική αύξηση της διαγνωστικής μας ικανότητας σε όλα τα επίπεδα, ακόμα και στο πλέον δύσκολο και ανεξερεύνητο μέχρι τώρα πεδίο των γενετικών (κληρονομικών) νόσων. Σήμερα, με την εφαρμογή των δύο αυτών τεχνικών είμαστε σε θέση να προσεγγίσουμε με μεγάλη ακρίβεια τη βλάβη στο DNA που ευθύνεται για τη δημιουργία πολλών ειδών καρκίνου, αλλά και

τη γέννηση παιδιών με σοβαρές γενετικές παθήσεις που τα καθιστούν ανήμπορα να ζήσουν μια φυσιολογική ζωή. Μπορούμε μάλιστα να παρέμβουμε σε προσυλληπτικά στάδια και να ελέγξουμε το DNA του ζευγαριού για υπολειπόμενες κληρονομικές παθήσεις, ώστε να επιλέξουμε τα έμβρυα που θα γεννηθούν να είναι φυσιολογικά και να αποφύγουμε την τραυματική για όλους διακοπή μιας εγκυμοσύνης ή τη γέννηση ενός παιδιού με σοβαρά προβλήματα υγείας. Αυτού τους είδους το Pre-DNA test (από το Preconceptual) βασίζεται εξ' ολοκλήρου στην επαναστατική τεχνική του NGS.

Όμως, παρά την πραγματική «επανάσταση» που έφεραν οι τεχνολογίες της PCR και του NGS στην έρευνα και διάγνωση των γενετικών παθήσεων, η συνολική διαγνωστική μας ικανότητα φτάνει μετά δυσκολίας στο περίπου 50%, κι αυτό «διαβάζοντας» νουκλεοτίδιο-νουκλεοτίδιο όλο το εκφραζόμενο γονιδίωμα του ανθρώπου με την τεχνική Whole Exome Sequencing. Ο λόγος είναι ότι το NGS αναγνωρίζει κι αποκαλύπτει μονονουκλεοτιδικές παραλλαγές (μεταλλάξεις) μαζί με μικρού μεγέθους ελλείψεις ή προσθήκες (<150 νουκλεοτίδια) και έτσι ξεφεύγουν οι περισσότερες μεγάλες ελλείψεις, προσθήκες και παραλλαγές αριθμού αντιγράφων σε περιοχές με επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες του γονιδιώματος. Επιπλέον, το NGS αδυνατεί να αποκαλύψει ισορροπημένες δομικές παραλλαγές όπως οι αναστροφές και οι μεταθέσεις, ενώ βασίζεται σε μικρού μεγέθους αλληλουχίες οι οποίες ταυτίζονται με κάποιο γονιδίωμα αναφοράς εισάγοντας

genotypos
SCIENCE LABS



Παντελής Κωνσταντουλάκης
Μοριακός Βιολόγος - Γενετιστής,
Επιστημονικός Διευθυντής
του Κέντρου Γενότυπος Α.Ι.Ε.

έτσι συγκεκριμένες "προτιμήσεις" όταν εντοπίζονται δομικές παραλλαγές. Τέλος, ένα ακόμα αδύνατο σημείο του NGS είναι οι επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες, τις οποίες δεν μπορεί να διαλευκάνει και οι οποίες αποτελούν περισσότερα από τα 2/3 του γονιδιώματος! Αυτοί οι περιορισμοί κάνουν την άμεση οπτικοποίηση του DNA, την πιο ελκυστική

και αξιόπιστη προσέγγιση για την αποκάλυψη δομικών παραλλαγών σήμερα.

Ο τρόπος και οι τεχνικές αποκάλυψης δομικών παραλλαγών σε κλινικά δείγματα έχει εξελιχθεί ελάχιστα τις τελευταίες δεκαετίες και βασίζεται κυρίως σε παραδοσιακές μεθόδους κυτταρογενετικής, όπως είναι ο καρυότυπος (εικόνα 1).



Εικόνα 1

Οι μέχρι σήμερα εξελίξεις της χρωμοσωματικής ανάλυσης, από τον κλασικό καρυότυπο στον φθορίζοντα υβριδισμό (FISH) και το μοριακό καρυότυπο (arrCGH) δεν κατάφεραν να προσθέσουν πολλά στην διαγνωστική αποκάλυψη δομικών παραλλαγών λόγω τεχνικών περιορισμών, αλλά και της ανάγκης να συμπληρώνονται πάντοτε με άλλες μοριακές τεχνικές όπως MLPA, qPCR, RNAseq, ώστε να παρέχουν μια πληρέστερη θεραπευτική και προγνωστική αξιολόγηση της νόσου ή του όγκου.

Η νέα τεχνολογία του OGM (Optical Genome Mapping) σπικτοποιεί άμεσα ολόκληρο το γονιδίωμα με την άμεση εμφάνιση σημείων σήμανσης πάνω σε ολόκληρα μόρια DNA. Η διαφορά είναι ότι η τεχνική αυτή αξιοποιεί τουλάχιστον 500.000

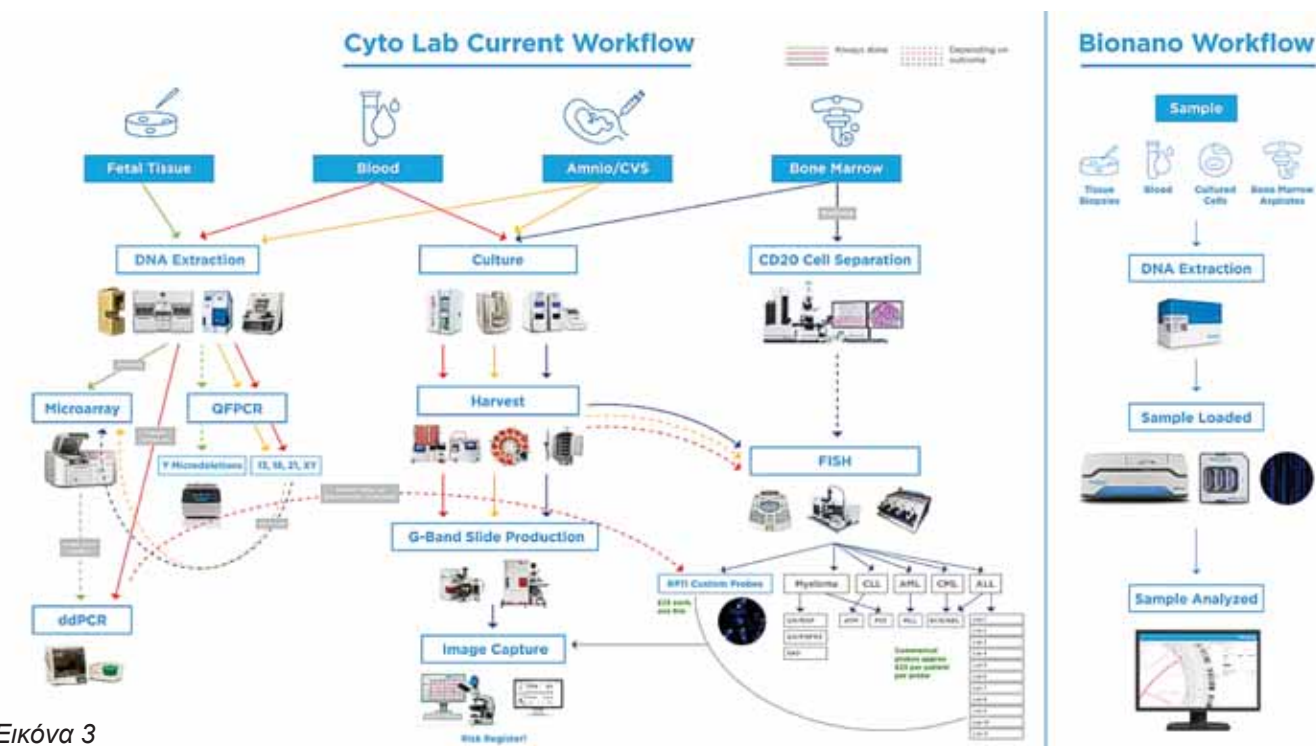
τέτοιου είδους σημεία σήμανσης στο γονιδίωμα με αποτέλεσμα την εξαιρετικά μεγάλη διακριτική ικανότητα σε συνδυασμό με την αυτοματοποίηση που προσφέρει η νανοτεχνολογία και οι έξυπνοι αλγόριθμοι ανάλυσης. Αυτά μας επιτρέπουν να δούμε πλέον με 10.000X μεγαλύτερη ανάλυση από τον καρυότυπο: προσθήκες και ελλείψεις σε επίπεδο 500 νουκλεοτιδίων, σε σχέση με τα 5.000.000 νουκλεοτίδια που προσφέρει ο κλασικός καρυότυπος ή ακόμα τα 50.000-200.000 νουκλεοτίδια του μοριακού καρυότυπου (arrCGH). Με κάλυψη του γονιδιώματος σε επίπεδο έως 1.600X ανά δείγμα με την τεχνολογία του OGM, δίνεται η δυνατότητα αποκάλυψης δομικών παραλλαγών με συχνότητα έως και 1% (εικόνα 2).



Εικόνα 2

Σε μεγάλη πολυκεντρική μελέτη υπό την καθοδήγηση του Πανεπιστημίου Columbia στις ΗΠΑ, έγινε σύγκριση των αποτελεσμάτων του OGM με εκείνα από τις τεχνικές ρουτίνας για αιματολογικές νεοπλασίες, τα οποία παρουσιάστηκαν στο Cancer Genomics Consortium κι έδειξε ότι υπήρχε 100% συμφωνία με τον κλασικό καρυότυπο, το FISH και το arrCGH και στα 91 δείγματα που αναλύθηκαν. Επίσης μεγάλη μελέτη στο MD Anderson Cancer Center στις ΗΠΑ, στην οποία έγινε σύγκριση των αποτελεσμάτων του OGM με εκείνα των κλασικών τεχνικών ανάλυσης περιστατικών με μυελοδυσπλαστικό σύνδρομο, αποκάλυψε 100% συμφωνία σε αυτά, ενώ η τεχνική OGM αποκάλυψε επιπλέον παραλλαγές και πολυπλοκότητες που είχαν ξεφύ-

γει στην από την ανάλυση με κλασικές τεχνικές κυτταρογενετικής. Παρόμοια αποτελέσματα είχε και συγκριτική μελέτη σε περιστατικά λεμφογούς και μυελογούς λευχαιμίας που αναλύθηκαν στο Radboud University στην Ολλανδία, ενώ καθημερινά ο κατάλογος αυτός των εργασιών μεγαλώνει. Η επαναστατική αυτή μεθοδολογία του OGM παρέχει μια πλήρη και πολύ λεπτομερή εικόνα της δομής του γονιδιώματος, αποκαλύπτοντας έτσι προγνωστικούς δείκτες που δεν μπορούσαν να ανιχνευτούν προσφέροντας ολοκληρωμένο χαρακτηρισμό του όγκου ή της γενετικής νόσου με μια μόνο εξέταση, αντικαθιστώντας πολλαπλές κυτταρογενετικές εξετάσεις που μέχρι σήμερα ήταν το gold standard (Εικόνα 3).



Εικόνα 3

Η αναλυτική ευαισθησία του OGM για δομικές παραλλαγές του γονιδιώματος έχει υπολογιστεί ότι φτάνει το 99% με θετική προγνωστική αξία (PPV) περισσότερο από 97%. Αυτό σημαίνει ότι τα επόμενα χρόνια θα λειτουργήσει ως συμπληρωματική εξέταση στην ήδη πολύ υψηλής αναλυτικής ευαισθησίας τεχνική του NGS και θα καλύψει το διαγνωστικό κενό του περίπου 50% των περιπτώσεων που

παραμένουν αδιάγνωστες στα περιστατικά που υπάρχει φανερή γενετική βάση στη συγκεκριμένη παθολογία.

Ως ΓΕΝΟΤΥΠΟΣ, είμαστε πολύ ενθουσιασμένοι που αποτελούμε ήδη μέλος της οικογένειας του OGM του κόσμου και πιστεύουμε ότι σύντομα θα αποκτήσει τη θέση που του ανήκει στο διαγνωστικό φαρέτρα κάθε υπεύθυνου εργαστηρίου Γενετικής.

