حسین سیمایی، دکتر طاهره ناجی*
*دانشیارو مدیرگروه علوم پایه داروسازی، دانشگاه آزاد،تهران

مروری بر ژنومیکس

ژنومیکس بررسی کل ژنوم است و شامل شناخت توالی ،نو ترکیبی، عملکرد و ساختار است.(۱) بررسی یک ژن منفرد زمانی ژنومیکس نام می گیرد که تاثیر آن بر کل ژنوم (پاسخ که به ژنوم می دهد) وتاثیری که از ژنوم می گیرد، بررسی شود.(۲)

کاربردها و ابعاد مختلف ژنومیکس

کاریوتایپ

کاریوتایپ، بررسی کروموزوم های یک سلول است که در مرحله متافاز متوقف شده، و با یک رنگ خاص رنگ آمیزی و قابل دیدن شود. با پیشرفت های تکنیک های tissue culture و بکارگیری روش های رنگ آمیزی کروموزوم ها ، و ارایه کاریوگرام ها، در سال های بین ۱۹۵۰ تا ۱۹۶۰ (۳) ابزار اصلی پژوهش شده بود.

Multiflour FISH (Spectral Karyotyping)

برای تشخیص بازآرایی های کروموزومی و بررسی سریع مجموعه کروموزوم ها می توان از این تکنیک استفاده کرد.نتیجه حاصل از Multifluor FISH در واقع کاریوتیپی است که در آن کروموزوم ها با رنگ های متفاوتی رنگ آمیزی شده اند.هر رنگ در واقع مجموعه ای از پروب هاست که به نواحی مختلف کروموزوم اتصال یافته اند. یک کروموزوم طبیعی در تمام طول خود به یک رنگ دیده می شود اما کروموزوم های غیر طبیعی مانند کروموزوم های سلول های سرطانی ،ظاهری راه راه با رنگ های دیگر را نشان می دهند.(۴)

Microarray

ایده ومتدولوژی Microarray برای اولین بار با Antibodymicroarray ها معرفی شد(۵). DNAMicroarray ها شامل پروب های DNA می باشند که به یک سطح جامد مانند شیشه یا سیلیکون چسبیده شده اند.هر نقطه بر روی این سطح جامد دارای تعداد زیادی پروب است که تکه ها ی DNA می توانند به آنها پیوند شوند.تکه ها ی DNA که با یک ماده فلورسانس نشاندار شده اند، به قطعه پروبی که مکمل آنها است می چسبند. سپس نقاطی که تکه ها ی DNA به آنها پیوسته شده و یا متصل نشده اند، بررسی می شود.این تکنیک همسان تکنیک های قدیمی ساترن بلات و نورترن بلات بوده، و تفاوتش با این روش ها در این است که در Microarray تعداد زیادی ژن بطور همزمان مورد بررسی قرار می گیرند.(۶)

Array comparative genomic hybridization (aCGH)

زمانی که اصطلاح Array comparative genomic hybridization برای اولین مورد استفاده قرار گرفت، این تکنیک بیشتر به تکنیک FISH شبیه بود و شباهت کمتری به تکنولوژی Arrayداشت(۱،۲) aCGHدرواقع ترکیبی از اصول تکنولوژی CGH (شکل ۷) و Array است. برخلاف روش CGH که درآن از کروموزوم های متافاز استفاده می شد، درaCGH نیازی به کروموزوم های متافازی نیست و آنالیز کروموزوم بااستفاده از تکه ها ی DNA امکان پذیر است. پروب های DNAباتوالی مشخص برروی یک ماتریکس جامد مانند شیشه فیکس می شوند. به دلیل اینکه توالی پروب های استفاده شده کوتاه است، قدرت تفکیک aCGH از روش های CGHقدیمی بسیار بیشتر است. قدرت تفکیک به طول پروب ها و فاصله ژنومی بین آن ها بستگی دارد.(۳)

Illumina sequencing

این روش بر پایه پایان یابی رنگی برگشت پذیر (Revers-ible dye-termination)استوار است، که به ما این امکان را می دهد تا تک تک بازها را در هنگام سنتز DNAشناسایی کنیم. مولکول DNA تکه تکه شده، با پرایمرهایی که به یک

سطح جامد چسبیده اند تکثیر شده و کلنی هایی از تکه ها ی مختلف ، پیوسته به صفحه جامد ایجاد می شود. پس از این مرحله نوکلئوتیدهای G,A,T و C که انتهای آنها بلاک شده و با رنگ های مختلف نشاندار شده اند،اضافه می شوند.نوکلئوتیدی که مکمل اولین باز است پیوند می شود، و سایر نوکلئوتیدها شسته می شوند. پس از هر بار سنتز،پرتوهای لیزر تابانده می شوند و گروه بلاک کننده آزاد شده و رنگ فلورسانس مخصوص هر باز قابل تشخیص می شود.این رنگ ثبت می گردد و چرخه بعدی بااضافه کردن مجدد نوکلئوتیدها آغاز می گردد.(۴)

Assembling

تکنولوژی توالی یابی DNA نمی تواند کل ژنوم را بصورت پیوسته توالی یابی کند.Assembling در واقع ردیف کردن و و یکی کردن تکه ها ی توالی یابی شده برای یافتن توالی اصلی DNA است۵). فرآیند Assembling به دو دسته تقسیم می شود: ۱- De novo برای ژنوم هایی که مشابه هیچکدام از توالی هایی شناخته شده ی گذشته نمی باشد. ۲-Comparative: توالی هدف مشابه توالی هایی است که قبلا تعیین شده اند(۶)پس از انجام این مرحله،توالی یک رشته ی پیوسته بدست می آید.(۷)

Genome annotation

تفسیر ژنوم فرآیندی است که در چند گام اساسی اطلاعات بیولوژیکی ژنومی که توالی یابی شده را فراهم می نماید(۸) این گام ها شامل موارد زیراست:

۱-مشخص کردن قسمت هایی از ژنوم که پروتئین ها را کد نمی کنند.

۲-Gene prediction که مشخص کردن قسمت هایی است که ژن ها را کد می کنند.

۳-افزودن اطلاعات بیولوژیکی قسمت های کد کننده ژن(۹)

تفسیر ژنوم توالی یابی شده به دلیل گزارش ها و نتایج کمی که تاکنون از ان وجود دارد محدود و مشکل است(۱۰).

انتخاب یک تست ژنتیکی

تست های ژنتیکی به دو دسته مستقیم (Direct genetic testing) و غیر مستقیم (Indirect genetic testing) تقسیم بندی می شوند.در تست مستقیم،آزمایشگاه به دنبال واریانت های ژنتیکی که بطور مستقیم با بیماری پیوسته هستند،می باشد،اما تست غیر مستقیم به بررسی آن دسته از مارکرهای DNA می پردازد که با شرایط ایجاد شده وابستگی دارند،اما دلیل اصلی ایجاد آن حالت ژنتیکی نمی باشند.(۱۱)

در انتخاب یک تست ژنتیکی شرایط فردی همانند سن بیمار،سابقه خانوادگی و موارد دیگری مورد توجه قرار می گیرند. جدول ۳ به فاکتورهایی که در انتخاب یک تست ژنتیکی موثر هستند ، اشاره می کند(۱۲).

تقسیم بندی واریانت های ژنتیکی حاصل از تست های تشخیصی

در تست های تشخیصی ژنتیک بالینی واریانت ها را در یکی از این ۶ گروه دسته بندی می کنند:

۱-Disease causing تغییر توالی که ازپیش گزارش شده و مشخص شده که علت ایجاد یک اختلال می باشد(حذف F508در ctfr)

۲-likely disease causing تغییر توالی که در قبلا گزارش نشده اما از انواعی که انتظار می رود مسئول ایجاد یک اختلال باشد(مانند جهش خاموش در یک ژن که انواع مشابه این جهش قبلا گزارش شده است.)

۳-Possibly disease causing تغییر توالی که قبلا گزارش نشده و ممکن است باعث ایجاد یک اختلال باشد و یا نباشد.

۴-likely not disease causing تغییر توالی که قبلا گزارش شده و مشخص شده که واریانت معمول می باشد.

۶-variant of unknown clinical significance تغییر توالی که مشخص نشده و یا انتظار نمی رود که علت ایجاد یک اختلال باشد اما همراه با یک تظاهر بالینی مشاهده شده است(۱۳)

کاربرد ژنومیکس در تعدادی از سرطان ها

تکمیل پروژه ژنوم انسانی سبب جهش در استفاده از فناوری های ژنومی و پروتئومی برای شناسایی مارکرها به منظور تشخیص زودهنگام سرطان با هدف مولکولی شده است.تعداد ژن های انسانی شناخته شده و توالی های بیان شونده همچنان در حال رشد است و ابزارهای تازه ای برای تحلیل این داده ها به وجود آمده است.تفاوت در بیان ژن ها در بافت های سالم و بدخیم امکان شناسایی ژن ها و مسیرهایی که در سرطان های انسانی تغییر می کنند را فراهم می کند.(۱۶-۱۴)

تمامی تکنیک های ژنومیکس در شناسایی اهداف ناشناخته در ژنوم و پروتئوم تومور نقش دارند. شناسایی تغییرات اختصاصی در RNA,DNA و پروتئین های تومور مستلزم دانستن اتفاقاتی است که در داخل و اطراف تومور رخ می دهد. در گذشته توانایی

محققین در تعیین جایگاه دقیق این تغییرات به دلیل ضعف در جداسازی انواع خاص سلولی از نمونه پاتولوژی دچار اختلال بود. cell-scrapingخالص سازی با ستون میل ترکیبی (۱۷)کشت سلول های نامیرا در محیط کشت(۱۸)کشت همزمان سلولی(۱۹)و تشریح دستی بافت هات همگی از روش های مورد استفاده ای هستند که هریک فواید ایرادات خاص خود را دارند. با وجود اینکه این تکنیک ها سبب پیشرفت پژوهشگران در تهیه رده های سلولی خالص برای ارزیابی جریانات داخل سلول شده اند،اما بخشی از اطلاعات که تعیین کننده فنوتیپ یک نوع تومور خاص می شوند از دست خواهد رفت.مثلا محیط اطراف تومور سرطانی نه تنها شامل اجزاء بدخیم اپیتلیالی است بلکه استرومای در برگیرنده و بافت سالم اطراف را نیز شامل می شود.این اجزاء میکروسکوپی با استفاده ازد گیرنده ها ،اتصالات سلولی،مولکول های سیگنال داخل و بین سلولی به سلول های توموری امکان برقراری ارتباط با محیط اطراف را می دهند و نیز نقش فعالی در کنترل و یا پیشرفت آنها دارند.(۱۹)

ژنومیکس سرطان پروستات

غده پروستات یکی از غدد سیستم تولیدمثلی مرد است. درکشورهای پیشرفته سرطان پروستات شایع ترین سرطان غیرپوستی است و عوامل بسیار زیادی از جمله سن، نژاد وسابقه خانوادگی در بروز آن موثر هستند. اغلب سرطان های پروستات دارای رشد کم می باشند، اما موارد تهاجمی آن نیز دیده می شود. (20)سلول های سرطانی پروستات ممکن است متاستاز داده و به سایر قسمت های بدن از جمله استخوان ها وغدد لنفاوی منتقل شوند.سرطان پروستات می تواند منجر به درد به هنگام دفع ادرار، مشکلات جنسی وحتی مرگ شود. معمولا در سنین بالای ۵۰سال بروز پیدا می کند و ششمین عامل مرگ ومیر وابسته به سرطان جهان درمردان است. درکشورهای توسعه یافته شایع ترین سرطان بوده و شیوع آن در کشورهای درحال توسعه روبه افزایش است(21.22).

بررسی های تازه ژنومیکس سرطان پروستات به روشن شدن اساس ژنتیکی این بیماری رایج وپیچیده کمک فراوانی کرده است. مطالعات گسترده ژنومیکس واریانت های ژنی بی شمار مرتبط با بیماری و همچنین ویژگی های بیان ژنی در تومورهای پروستات آشکار کرده اند.بر اساس این نتایج غربالگری فردی ژنی سرطان پروستات می تواند در تشخیص بیماری ارزشمند باشد.(۲۳)

ژنومیکس سرطان سینه

یافته های Microarray در تحقیقات سرطان سینه به طور عمده به دو موضوع اشاره می کنند: اولا تومورهای جداگانه که از یک عضو منشاء می گیرند ممکن است بر اساس الگوییبان ژنی و مستقل از مرحله و درجه پیشرفت در گروه های متفاوتی طبقه بندی می شوند.ثانیا از یافته های بیولوژیکی ناشی از اینگونه طبقه بندی ها می توان جهت تشخیص استفاده کرد.مطالعات نشان داده اتست که تکنولوزی Microarray امکان بررسی رفتار تومور در بافت زنده را فراهم و ارزیابی روش تشخیص و مقاومت دارویی را امکان پذیر می سازد. بررسی بیان هزاران ژن نشان می دهد که تفاوت زیادی در بین تومورهایی که از یک عضو منشاء می گیرند وجود دارد.(۲۵-۲۴)

به نظر می رسد که مهمترین چالش کنونی استفاده از DNA microarray در ارزیابی بیان ژن و تغییرات تعداد رونوشت ها در ماده توموری باشد.با وجود اینکه تکنولوژی DNA microarray در آنالیز بیان ژن ها پیشرفتی در درمان کلینیکی بیماران سرطان سینه ایجاد نکرده است،اما اطلاعات درباره مسیرها و مکانیسم های مولکولی در فعالیت های بیولوژیکی فراهم می کند(۲۶)

نگاهی به آینده

با توجه به کاهش روز افزون هزینه های توالی یابی و بررسی ژنوم، افزایش کارایی روش های موجود پییشرفت های علم شیمی و ورود نسل های جدید توالی یابی، در آینده بیمارانی که به مراکز درمانی مراجعه می کنند، پیش از معاینه می توانند توالی ژنی خود را به همراه داشته باشند. با این وجود این روند انقلابی نیست که در یک شب اتفاق بیفتد چون پیش بینی فنوتیپ بر اساس یافته های ژنوتیپی همچنان با محدودیت های فراوان روبرو است و همچنین زمان زیادی تا ظهور تکنولوژی های ژنومیکی با کیفیت مناسب و هزینه کم باقی مانده است.(۲۷)

منابع

1.sonoda G, palazzo j, do manoir s, Godwin AK,Feder M,Yakushiji M,et al

2.McCutchan TF ,singer MF. DNA sequences similar to those

3

4.Meyer M,kircher M .Illumina sequencing library preparation for highly multiplexed target capture