

## 5. Φαρμακογενωμική

Πώς ξεκίνησε η φαρμακογενωμική

Εργαλεία έρευνας

Μελέτες γενοτύπου

Μελέτες του φαινότυπου

Φαρμακογενωμική και ένζυμα που εμπλέκονται στο μεταβολισμό φαρμάκων

Τα κυτοχρώματα P450

Θειοπυρινο-μεθυλοτρανσφεράση (TPMT)

N-ακετυλοτρανσφεράση-2 (NAT-2)

Φαρμακογενωμική και Κεντρικό Νευρικό Σύστημα

Πολυμορφισμός μεταβολικών αντιδράσεων

Πολυμορφισμός του μεταφορέα της σεροτονίνης και αντικαταθλιπτικά

Πολυμορφισμός ντοπαμινεργικών υποδοχέων και νευροληπτικά

Φαρμακογενωμική και Καρδιακό Σύστημα

Πολυμορφισμός μεταβολικών ενζύμων

Πολυμορφισμός μεταφορέων

Πολυμορφισμός καναλιών

Φαρμακογενωμική και Καρκίνος

Φαρμακογενωμική και Εθισμός

Φαρμακογενωμική και Ανάπτυξη φαρμάκων

Προκλινική έρευνα

Κλινικές δοκιμές

Φαρμακογενωμική και ανάπτυξη νέων φαρμάκων

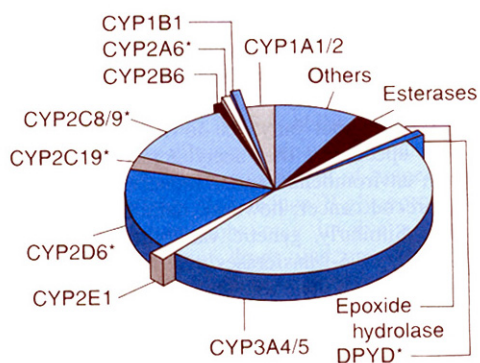
Φαρμακογενωμική και διαλεύκανση του μηχανισμού δράσης γνωστών φαρμάκων

Διαλογή (screening) φαρμάκων που έχουν στόχο το DNA

Διαλογή φαρμάκων ή παραγόντων των οποίων ο μηχανισμός δράσης δεν έχει αποσαφηνιστεί τελείως

Γενετικά τροποποιημένα ζώα για φαρμακογενωμική έρευνα

50 χρόνια Φαρμακογενωμική: πώς η γενετική ποικιλομορφία εφαρμόζεται στην κλινική θεραπεία



5.

## Φαρμακογενωμική

Η φαρμακογενωμική είναι ένα επαναστατικό κεφάλαιο στην ιστορία της φαρμακολογίας. Ξεκίνησε εδώ και 50 χρόνια προσπαθώντας να συνδέσει τις ποικίλες αποκρίσεις που εμφανίζουν τα άτομα ενός πληθυσμού στα φάρμακα, με τον πολυμορφισμό των γονιδίων στον πληθυσμό.

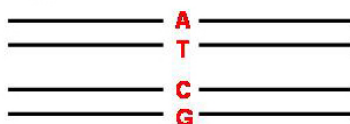
### ■ Πώς ξεκίνησε η φαρμακογενωμική

Στις αρχές του 1950, η ανακάλυψη της δράσης της δεϋδρογονάσης της 6-φωσφορικής γλυκόζης (G6PD) έθεσε τις βάσεις της φαρμακογενωμικής. Η G6PD καταλύει το μονοπάτι των φωσφορικών πεντοζών, που έχει σαν αποτέλεσμα την παραγωγή NADPH. Το NADPH βοηθάει το κύτταρο να αντιμετωπίσει το οξειδωτικό shock. Βρέθηκε λοιπόν ότι άτομα, τα οποία παρουσίαζαν χαμηλή δραστηριότητα G6PD ήταν ανθεκτικά στην ελονοσία. Αυτό συμβαίνει γιατί όταν το τρυπανόσωμα εισβάλλει στο κύτταρο, προκαλεί οξειδωτικό shock, το οποίο δεν μπορεί να αντιμετωπίσει το κύτταρο. Έτσι το κύτταρο αιμολύεται και το τρυπανόσωμα αποβάλλεται από τον οργανισμό. Βλέπουμε λοιπόν ότι μια μετάλλαξη στο γονίδιο που κωδικοποιεί για την G6PD, έχει ως αποτέλεσμα την αλλαγή της συμπεριφοράς των ατόμων απέναντι σε μια ασθένεια. Σήμερα γνωρίζουμε ότι το *G6PD* είναι από τα πιο πολυμορφικά γονίδια, και πάνω από 400 εκατομμύρια άτομα φέρουν ένα από τα 135 χαμηλής δραστηριότητας αλληλόμορφα που μεταβάλλουν το μεταβολισμό των ερυθροκυττάρων.

Η φαρμακογενωμική συσχετίζοντας τον πολυμορφισμό των γονιδίων με την ποικιλία των αποκρίσεων σε μία θεραπεία, προσπαθεί να εξηγήσει γιατί ένας μικρός αριθμός ατόμων ενός συγκεκριμένου πληθυσμού που εκτίθεται σ' ένα συγκεκριμένο φάρμακο δεν μπορεί να αποκριθεί στο φάρμακο ή ακόμα παρουσιάζει αποτελέσματα αντίθετα από τα επιθυμητά. Ένα γονίδιο θεωρείται λειτουργικά **πολυμορφικό** όταν παραλλαγές του, που μεταβάλλουν τη δραστηριότητα της πρωτεΐνης, βρίσκονται σε έναν πληθυσμό με μια συχνότητα >1%.

### Polymorphism

*Part of DNA sequence that exists as multiple variants*



Όταν τα αλληλόμορφα διαφέρουν μόνο σε ένα νουκλεοτίδιο, το φαινόμενο καλείται **πολυμορφισμός μονού νουκλεοτιδίου** (SNP: single nucleotide polymorphism). Η συχνότητα τέτοιων αλλαγών στο ανθρώπινο γονιδίωμα είναι περίπου 1 ανά 1.330 βάσεις. Κάθε άνθρωπος χαρακτηρίζεται από ένα διαφορετικό πρότυπο SNP. Με βάση την παρατηρούμενη συχνότητα των SNP ανά γονιδίωμα, υπολογίζεται ότι το σύνολο του ανθρώπινου πληθυσμού

(δηλαδή το άθροισμα όλων των γονιδιωμάτων όλων των ανθρώπων) θα πρέπει να περιέχει >10 εκατομμύρια SNP, που απαντώνται με συχνότητα >1%. Ήδη έχουν αναγνωρισθεί > 1 εκατομμύριο τέτοιοι πολυμορφισμοί.

Η αναγνώριση δύο τύπων φαρμακολογικών ατυχημάτων θεμελίωσε την ύπαρξη σύνδεσης ανάμεσα στον πολυμορφισμό και τη φαρμακολογική απόκριση.

- Το πρώτο ατύχημα οφείλονταν στα ανεπιθύμητα αποτελέσματα που έχει η παράλληλη χορήγηση συμβαστατίνης και μιβεφραδίλης. Η συμβαστατίνη είναι μια στατίνη που έχει την ικανότητα να μειώνει τη βιοσύνθεση της χοληστερόλης, συνεπώς είναι αποτελεσματική στο να μειώνει τον κίνδυνο των στεφανιαίων ατυχημάτων. Η συμβαστατίνη μεταβολίζεται στο συκώτι από το κυτόχρωμα CYP3A4. Όταν σε ασθενείς με καρδιακό πρόβλημα και υπέρταση χορηγούνται συμβαστατίνη και μιβεφραδίλη, ένα αντι-υπερτασικό συστατικό, αναστολέας των καναλιών  $Ca^{2+}$ , ο οποίος ταυτόχρονα παρεμποδίζει και τη δράση του κυτοχρώματος CYP3A4, προκαλείται ένα είδος μυοπάθειας, η ραβδομυόλυση. Κατ' επέκταση, όταν υπάρχει ένα πρόβλημα στο κυτόχρωμα που καταβολίζει το φάρμακο μπορεί να έχουμε ανεπιθύμητες παρενέργειες.

- Το δεύτερο ατύχημα αφορούσε μια ηλικιωμένη γυναίκα που παρουσίασε ταχυκαρδία, η οποία προκλήθηκε από τη συνδυασμένη χρήση κλαριθρομυκίνης και δισοπυραμιδίνης. Η δισοπυραμιδίνη χορηγήθηκε για την αρρυθμία και η κλαριθρομυκίνη για μόλυνση της αναπνευστικής οδού. Η δισοπυραμιδίνη μεταβολίζεται στο συκώτι από το κυτόχρωμα CYP3A4, ενώ η κλαριθρομυκίνη παρεμποδίζει ανταγωνιστικά αυτό το ένζυμο. Το αποτέλεσμα ήταν η συσσώρευση στο πλάσμα της δισοπυριμιδίνης και η πρόκληση της ταχυκαρδίας.

Έκτοτε, όλο και περισσότερες μελέτες παρατήρησαν μια σύνδεση ανάμεσα στο γενότυπο και στη δράση ενός φαρμάκου. Σήμερα η ανάπτυξη της μοριακής βιοτεχνολογίας και ειδικά τα microarrays (DNA chips) έδωσαν νέα ώθηση στη φαρμακογενωμική, η οποία θα έχει σύντομα τη δυνατότητα να παράγει φάρμακα σύμφωνα με το γενότυπο του κάθε ασθενούς, με σκοπό τη βέλτιστη απόκριση του ατόμου στη θεραπεία.

## ■ Εργαλεία έρευνας

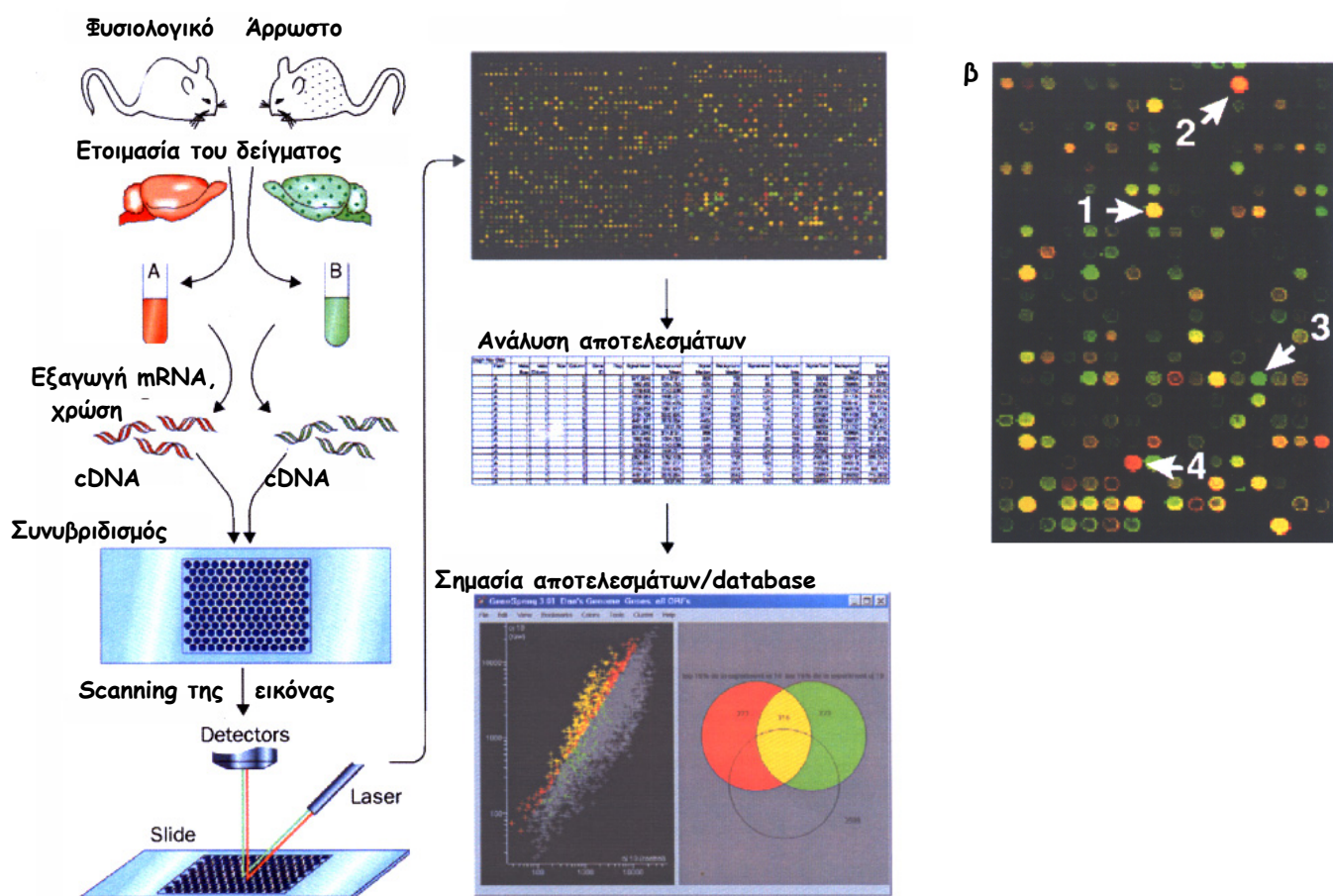
### Μελέτες του γενότυπου

Τα εργαλεία που χρησιμοποιούνται σήμερα για τις γενοτυπικές μελέτες έχουν αναπτυχθεί για τη μοριακή βιολογία. Βασικής σημασίας τεχνικές είναι η PCR (Polymerase Chain Reaction) σε συνδυασμό με την RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), όπως επίσης το SSCP (Single-Stranded Conformation Polymorphism) και το TGGE/DGGE (Temperature or Denaturing Gradient Gel Electrophoresis). Επίσης, η αλληλούχιση γονιδίων έχει μια πολύ σημαντική συνεισφορά.

Τα **DNA chips** (ή **DNA microarrays** ή **gene chips**) είναι μια κυρίαρχη τεχνολογική ανακάλυψη. Προήλθαν από τα Northern και Southern blots και παρέχουν την τεχνική υποστήριξη που χρειάζεται η ανάπτυξη της φαρμακογενωμικής. Είναι τμήματα διαφορετικών ολιγονουκλεοτιδίων στερεωμένα πάνω σε ένα γυάλινο υπόστρωμα, με τα οποία υβριδίζουμε σημασμένα φθορίζοντα τμήματα του mRNA ή του cDNA από τον προς ανάλυση οργανισμό. Αυτά τα chips επιτρέπουν σε ευρεία κλίμακα τον προσδιορισμό πολυμορφισμών / μεταλλάξεων, την αναγνώριση στο γονιδίωμα διαφορών τόσο μικρών όπως τα SNPs (Single-nucleotide Polymorphism), αλλά τη μελέτη της έκφρασης των γονιδίων.

Δύο κύριες τεχνικές έχουν περιγραφεί, τα **cdNA microarrays** (που αναπτύχθηκαν από εργαστήριο του Brown στο Πανεπιστήμιο Stanford, βλπ Shena et al, 1995) και τα **arrays ολιγονουκλεοτιδίων** (που αναπτύχθηκαν με βάση την τεχνολογία GeneChip® από την Affymetrix, Inc, Santa Clara, CA, USA, και από την Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA):

Τα cDNA microarrays είναι κηλίδες cDNA γονιδίων ενός οργανισμού, ενισχυμένων με PCR, οι οποίες τοποθετούνται με τη βοήθεια ρομποτικής σε ένα γυάλινο υπόβαθρο (chip) 30mm x 15mm. Η κάθε κηλίδα έχει διάμετρο 50-150μm, και το κάθε chip μπορεί να δεχτεί 30.000 κηλίδες, αριθμός που προσεγγίζει το σύνολο των ανθρώπινων γονιδίων. Ο σκοπός ενός τυπικού πειράματος είναι να μετρήσουμε το ποσοστό έκφρασης των γονιδίων (την ποσότητα του mRNA) σε έναν ιστό ή κυτταρικό τύπο. Από το προς ανάλυση δείγμα (πχ. εγκεφαλικός ιστός από ασθενείς με Alzheimer και φυσιολογικά άτομα) απομονώνουμε το mRNA (600ng mRNA για ένα chip 10.000 κηλίδων), το οποίο όμως μετατρέπουμε με αντίστροφη μεταγραφή στο συμπληρωματικό του DNA (complementary DNA - cDNA), που είναι πιο σταθερό. Στη συνέχεια, το cDNA από κάθε δείγμα σημαίνεται με μια φθορίζουσα ουσία διαφορετικού χρώματος (πχ. πράσινη για τους Alzheimer, κόκκινη για τους φυσιολογικούς). Τα δυο δείγματα (φυσιολογικό και Alzheimer) συνυβριδίζουν σε ένα chip, οι χρωστικές διεγείρονται από ένα laser και το φως που ανακλάται συλλέγεται και αναλύεται. Η μέτρηση της έντασης των διαφόρων χρωμάτων αντιστοιχεί στην έκφραση των γονιδίων, κόκκινο: υπερέχει η έκφραση του γονιδίου στο φυσιολογικό, κίτρινο: ισόρροπη έκφραση στο φυσιολογικό και στο άρρωστο, πράσινο: υπερέχει η έκφραση στον άρρωστο (Εικόνα 5.1β).



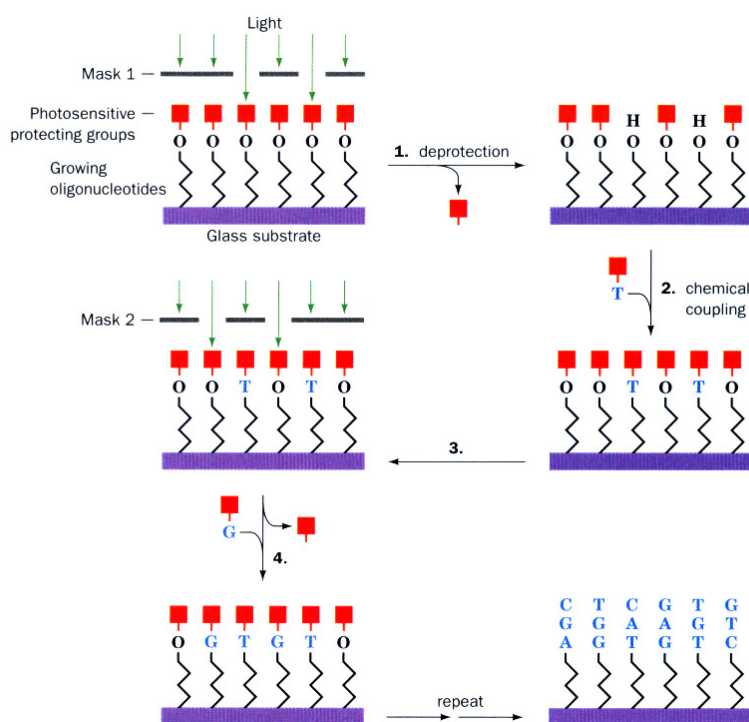
**Εικόνα 5.1** Τα στάδια ενός τυπικού πειράματος cDNA microarray.

1. Το RNA εξάγεται από τα δύο δείγματα (φυσιολογικό και άρρωστο - με βούλες). 2. Το RNA κάθε δείγματος σημαίνεται με διαφορετικού χρώματος χρωστική και 3. Μεταγράφεται αντίστροφα σε cDNA. 4. Τα δυο cDNA συνυβριδίζουν σε ένα chip. 5. Οι χρωστικές διεγείρονται από ένα laser και το φως που ανακλάται συλλέγεται και αναλύεται. Από *D. Geschwind, DNA microarrays: translation of the genome from laboratory to clinic, The Lancet, 2, 275-282, 2003.*



Η ποσότητα και η πολυπλοκότητα των σημάτων απαιτούν ανάλυση μέσω υπολογιστή. Με αυτού του είδους τα chips μπορούμε να ανιχνεύσουμε την υπερ- ή υπο-έκφραση γονιδίων σε ασθένειες ή μετά από επίδραση κάποιου φαρμάκου.

1. Στο εμπόριο κυκλοφορούν chips μικρών ολιγονουκλεοτιδίων (περίπου 25 ζευγαριών βάσεων) που συνθέτονται *in situ* χρησιμοποιώντας την τεχνολογία της φωτολιθογραφίας (GeneChip®), και chips μεγάλων ολιγονουκλεοτιδίων που παράγονται χρησιμοποιώντας την τεχνολογία εκτύπωσης ink-jet (Agilent Technologies). Κατά τη σύνθεση ολιγονουκλεοτιδίων με την τεχνική της φωτολιθογραφίας, που αναπτύχθηκε από τον Stephen Fodor το 1994, καθένα από τα νουκλεοτίδια από τα οποία συνθέτονται τα ολιγονουκλεοτίδια έχουν στο 5' άκρο τους μια φωτοευαίσθητη ομάδα, την οποία μπορούμε να απομακρύνουμε με φωτοχημική αντίδραση. Σε ένα δεδομένο στάδιο της συνθετικής διαδικασίας, από τα ολιγονουκλεοτίδια, τα οποία για παράδειγμα χρειάζονται μια θυμίνη (T) στην επόμενη θέση τους, απομακρύνουμε την προστατευτική ομάδα τους ρίχνοντας φως, ενώ τα υπόλοιπα ολιγονουκλεοτίδια που χρειάζονται μια διαφορετική βάση, καλύπτονται με μια μάσκα που εμποδίζει το φως. Το chip στη συνέχεια επωάζεται με θυμίνη (T), η οποία συνδέεται μόνο στα νουκλεοτίδια από τα οποία απομακρύνθηκε η προσθετική ομάδα. Μετά από ξέπλυμα για να φύγει η ελεύθερη θυμίνη, η διαδικασία επαναλαμβάνεται χρησιμοποιώντας διαφορετικές μάσκες για τις υπόλοιπες τρεις βάσεις. Επαναλαμβάνοντας το κάθε βήμα  $4 \times 25$  φορές συντίθεται ένα πλήρες σετ  $4^{25}$  25νουκλεοτίδια.

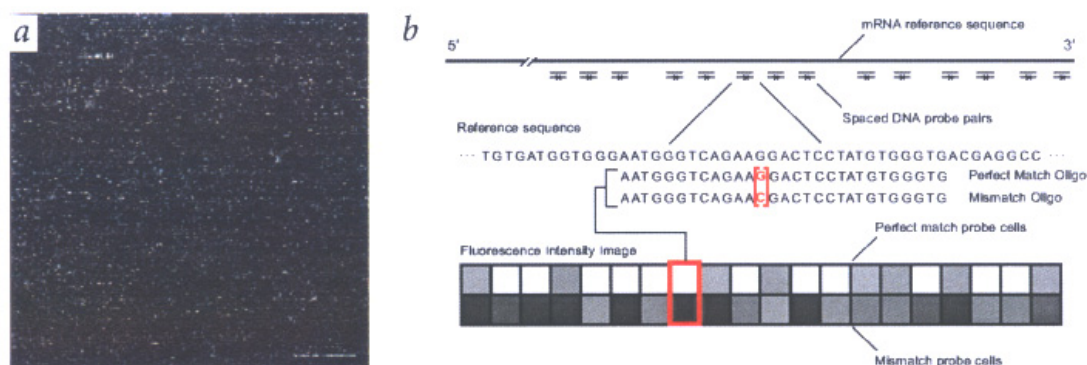


**Εικόνα 5.2** Σύνθεση ολιγονουκλεοτιδίων πάνω σε ένα chip με τη μέθοδο της φωτολιθογραφίας.

Τα ολιγονουκλεοτίδια που είναι αγκυροβολημένα πάνω σε ένα γυάλινο υπόστρωμα έχουν στο 5' άκρο τους μια φωτοευαίσθητη προστατευτική ομάδα (κόκκινο τετράγωνο), την οποία απομακρύνουμε φωτίζοντας κάθε φορά συγκεκριμένα ολιγονουκλεοτίδια (αυτά πχ στα οποία πρέπει να προστεθεί θυμίνη (T) ενώ τα υπόλοιπα προστατεύονται από μάσκες. Στη συνέχεια επωάζουμε με θυμίνη (T), η οποία θα προστεθεί μόνο στα ολιγονουκλεοτίδια από τα οποία απουσιάζει η προστατευτική ομάδα. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται και για τα υπόλοιπα τρία νουκλεοτίδια (G, A, C) μέχρι να ολοκληρωθεί η σύνθεση όλων των ολιγονουκλεοτιδίων. Επιφάνεια  $1,6 \text{ cm}^2$  είναι αρκετή για 65.000 - 400.000 ολιγονουκλεοτίδια. Από *Biochemistry, Voet and Voet, 2004.*

Σε αυτού του είδους τα chips μπορούν να συντεθούν 65.000 - 400.000 ολιγονουκλεοτίδια. Ανάλογα με το πού θα χρησιμοποιηθεί, το chip σχεδιάζεται με διαφορετικό τρόπο.

- Αν πρόκειται να χρησιμοποιηθεί για τη **μελέτη της έκφρασης των γονιδίων** (αν πχ η έκφραση ενός γονιδίου αυξάνεται ή ελαττώνεται σε συγκεκριμένες ασθένειες ή μετά τη χορήγηση κάποιου φαρμάκου), τότε σε ένα chip 1,6cm<sup>2</sup> αποτυπώνονται μέχρι 9.000 γονίδια. Το κάθε γονίδιο αντιπροσωπεύεται από 20 ολιγονουκλεοτίδια (συνήθως 25νουκλεοτίδια), από χαρακτηριστικές περιοχές του γονιδίου, αποφεύγοντας τις περιοχές του γονιδίου που επαναλαμβάνονται ή είναι ομόλογες με άλλα γονίδια. Σε αυτή την περίπτωση, για το κάθε ολιγονουκλεοτίδιο χρησιμοποιείται και ένα ομόλόγο του, το οποίο όμως διαφέρει στο κεντρικό νουκλεοτίδιο, ελέγχοντας με αυτόν τον τρόπο κάθε πλαστό υβριδισμό.

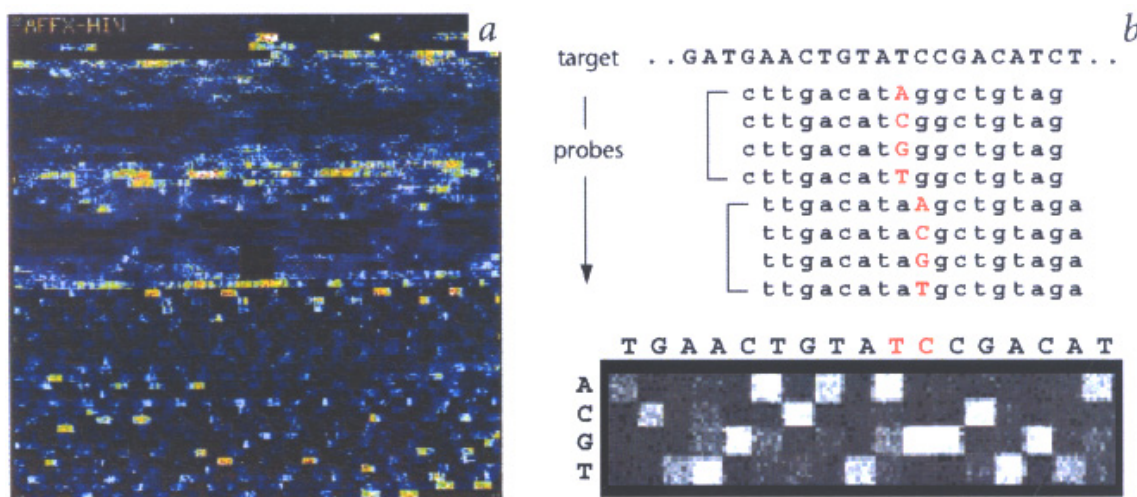


**Εικόνα 5.3** (α) Ένα chip που χρησιμοποιείται για τη μελέτη έκφρασης γονιδίων έχει αποτυπωμένα 9.000 γονίδια. Το κάθε γονίδιο αντιπροσωπεύεται από 20 25-νουκλεοτίδια. Για το καθένα από τα 25νουκλεοτίδια χρησιμοποιείται και ένα ομόλόγο του, το οποίο διαφέρει μόνο στο κεντρικό νουκλεοτίδιο, για να αποφευχθεί ο πλαστός υβριδισμός. Δηλαδή για το κάθε γονίδιο χρησιμοποιούνται 40 ολιγονουκλεοτίδια (για τα 9.000 γονίδια 360.000 ολιγονουκλεοτίδια).

(β) Στο κάθε ζευγάρι 25νουκλεοτιδίου, με λευκό συμβολίζεται ο πλήρης υβριδισμός με το cRNA του δείγματος (perfect match), ενώ με σκούρο γκρι η αδυναμία υβριδισμού (mismatch). Στην εικόνα φαίνονται 20 ζευγάρια κουκίδων, δηλαδή 20 ζευγάρια ολιγονουκλεοτιδίων, που αναπαριστούν ένα γονίδιο.

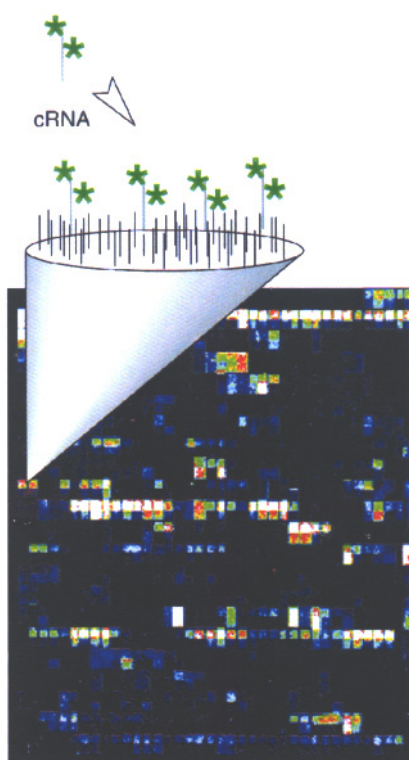
Από *Lipshutz R.J., Fodor S.A., Gingeras T.R., and Lockhart D.J., High density synthetic oligonucleotide arrays, Nature Genetics, 21: 20-24 (1999).*

- Αν πρόκειται να χρησιμοποιηθεί για τη **μελέτη πολυμορφισμών / μεταλλάξεων** τότε το chip περιέχει ένα ή δυο γονίδια, ανάλογα με το μέγεθός τους. Τα 350.000 ολιγονουκλεοτίδια αναπαριστούν μέχρι 40.000 bp γονιδιακής αλληλουχίας, περιλαμβάνοντας και τις δυο αλυσίδες του DNA με κάθε δυνατό πολυμορφισμό ενός νουκλεοτιδίου. Για το κάθε ολιγονουκλεοτίδιο (25μερές ή 17μερές), χρησιμοποιείται και ένα σετ από άλλα τρία ομόλογα ολιγονουκλεοτίδια στα οποία διαφέρει η κεντρική βάση (αν η κεντρική βάση του 1<sup>ου</sup> είναι η T, του 2<sup>ου</sup> είναι η A, του 3<sup>ου</sup> η G, και του 4<sup>ου</sup> η C). Υβριδίζοντας με το cRNA του γονιδίου στόχου ενός ασθενούς και συγκρίνοντας με την ένταση του υβριδισμού ενός φυσιολογικού ατόμου μπορούμε να διακρίνουμε ακόμα και σημειακές μεταλλάξεις. Με αυτά τα εξειδικευμένα chips έχουν αναλυθεί το γονίδιο της κυστικής ίνωσης, τα γονίδια του κυτοχρώματος P450, ενζύμων που εμπλέκονται στο μεταβολισμό φαρμάκων κλπ.

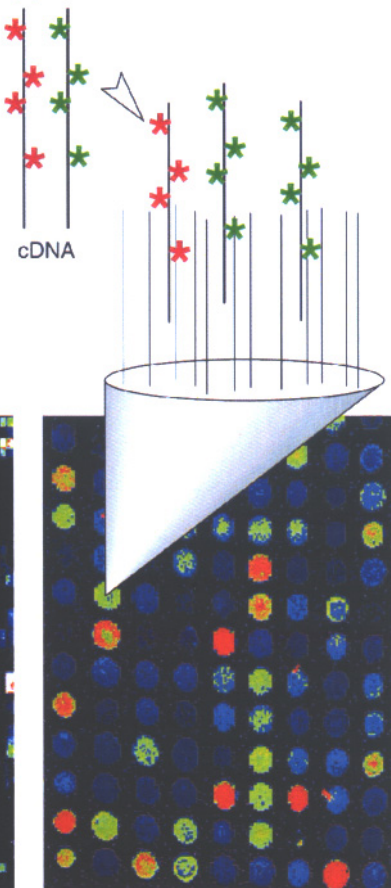


**Εικόνα 5.4** α. Ένα chip που χρησιμοποιείται για τη μελέτη πολυμορφισμών/μεταλλάξεων έχει αποτυπωμένα 1 ή 2 γονίδια. Στο chip αυτό (0.8 x 0.8 cm) αναπαριστούνται το γονίδιο της πρωτεάσης του HIV (HIV PR) και της αντίστροφης μεταγραφάσης (HIV RT).  $15^{15}$  ζεύγη βάσεων έχουν αναλυθεί για πιθανές μεταλλάξεις και στα δυο γονίδια. β. Για να εξασφαλίσουμε την ανίχνευση ακόμη και γειτονικών σημειακών μεταλλάξεων χρησιμοποιούμε τη στρατηγική «τοποθέτησης κεραμιδιών». Για κάθε ολιγονουκλεοτίδιο χρησιμοποιείται μια ομάδα τεσσάρων ολιγονουκλεοτιδίων με διαφορετική την κεντρική τους βάση. Η κηλίδα (ολιγονουκλεοτίδιο) με τον ισχυρότερο υβριδισμό είναι άσπρη. Από *Lipshutz R.J., Fodor S.A., Gingeras T.R., and Lockhart D.J., High density synthetic oligonucleotide arrays, Nature Genetics, 21: 20-24 (1999).*

(a) Affymetrix



(b) Synteni



**Εικόνα 5.5** Σύγκριση των δυο ειδών chips. (α) Chip ολιγονουκλεοτιδίων της Affymetrix και (β) chip cDNA. Τα προς υβριδισμό δείγματα είναι στην πρώτη περίπτωση cRNA και στη δεύτερη cDNA. Με πράσινα και κόκκινα αστεράκια συμβολίζονται τα φθορίζοντα νουκλεοτίδια που θα οδηγήσουν στην ποσοτικοποίηση του υβριδισμένου RNA ή DNA. Η αύξηση της έντασης του υβριδισμού αναπαριστάται με ένα ψευδο-χρώμα (στο chip της Affymetrix σκούρο μπλε = χαμηλή ένταση, άσπρο = υψηλή ένταση). Από *Gerhold D., Rushmore T., and Caskey C.T., DNA chips: promising toys have become powerful tools, TiBS 24: 168-175 (1999).*

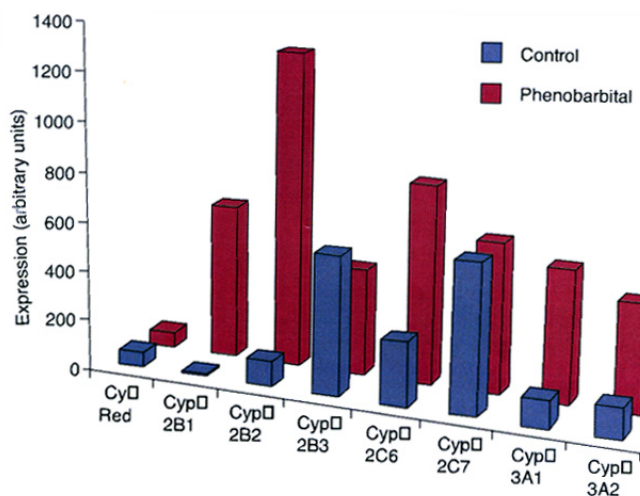


**ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΤΟΥ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ.** Από τη στιγμή που έχουμε στα χέρια μας το ειδικά σχεδιασμένο chip πρέπει να ετοιμάσουμε το προς ανάλυση δείγμα.

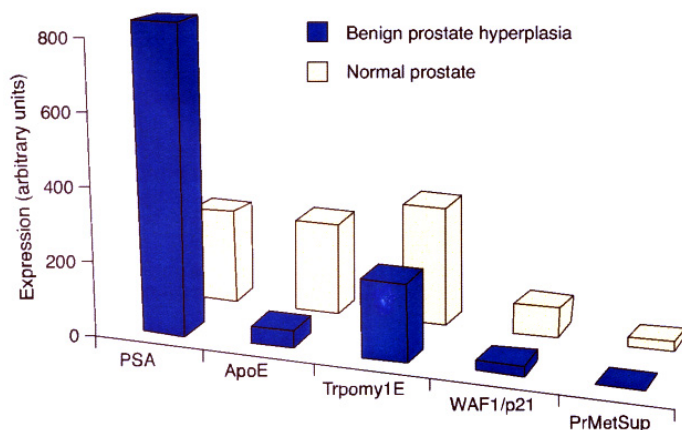
Για τη μελέτη της γονιδιακής έκφρασης χρησιμοποιούμε 3-5μg mRNA, το οποίο με μια αντίστροφη μεταγραφή μετατρέπουμε σε cDNA. Μετά τη σύνθεση της διπλής αλυσίδας του cDNA, χρησιμοποιούμε μια T7 ή μια SP6 mRNA πολυμεράση για να πάρουμε πολλαπλά αντίγραφα του cDNA ως cRNA. Σημασμένα με βιοτίνη ριβονουκλεοτίδια ενσωματώνονται στο cRNA για να μας επιτρέψουν να το ανιχνεύσουμε. Αυτός ο πληθυσμός cRNA-βιοτίνης τεμαχίζεται με θερμότητα και στη συνέχεια υβριδίζεται στο DNA chip και βάφεται με μια φθορίζουσα χρωστική.

Για τη μελέτη των πολυμορφισμών/μεταλλάξεων τα δείγματα αποτελούνται από εξόνια γενομικού DNA ή μεγαλύτερες αλληλουχίες γονιδίων από cDNA, ενισχυμένα με PCR. Το ενισχυμένο DNA τεμαχίζεται και στη συνέχεια σημαίνεται χρησιμοποιώντας βιοτινωμένα νουκλεοτίδια.

Αν και το υψηλό κόστος αυτών των πολυσύνθετων και πολύ προχωρημένων chips καθώς και η ανάγκη εξοπλισμού υψηλής εξειδίκευσης για την υλοποίησή τους (σύνολο 175.000\$) βάζει ένα ακόμη όριο στην ευρεία χρήση των chips, πολλά συστήματα βρίσκονται ήδη στην αγορά και έχουν πολλές εφαρμογές στη φαρμακογενωμική, επιτρέποντας τον προσδιορισμό πολυμορφισμών / μεταλλάξεων γονιδίων, αλλά τη μελέτη της έκφρασης των γονιδίων σε φυσιολογικά/ασθενή άτομα ή υπό την επίδραση κάποιου φαρμάκου, σε ευρεία κλίμακα. Για παράδειγμα, χρησιμοποιώντας chips της Affymetrix μελετήθηκε η επίδραση της φαινοβαρβιτάλης στην έκφραση των γονιδίων που κωδικοποιούν κυτοχρώματα P450 (βλπ Εικόνα 5.6) καθώς και η επίδραση της υπερπλασίας του προστάτη στα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων (βλπ Εικόνα 5.7).



**Εικόνα 5.6** Με τη βοήθεια ενός chip Affymetrix βρέθηκε ότι η φαινοβαρβιτάλη μεταβολίζεται από συγκεκριμένα κυτοχρώματα (Cyp) αυξάνοντας την έκφρασή τους. Από Gerhold D., Rushmore T., and Caskey C. T., *DNA chips: promising toys have become powerful tools*, *TiBS* 24: 168-175 (1999).



**Εικόνα 5.7** Με τη βοήθεια ενός chip Affymetrix βρέθηκε ότι σε ασθενείς με υπερπλασία προστάτη επηρεάζεται η έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων: της Απολιποπρωτεΐνης E (ApoE), της PSA (prostate specific antigen), της Trpomy1E (trpomyosin 1E) κλπ. Από Gerhold D., et al., *DNA chips: promising toys have become powerful tools*, *TiBS* 24: 168-175 (1999).

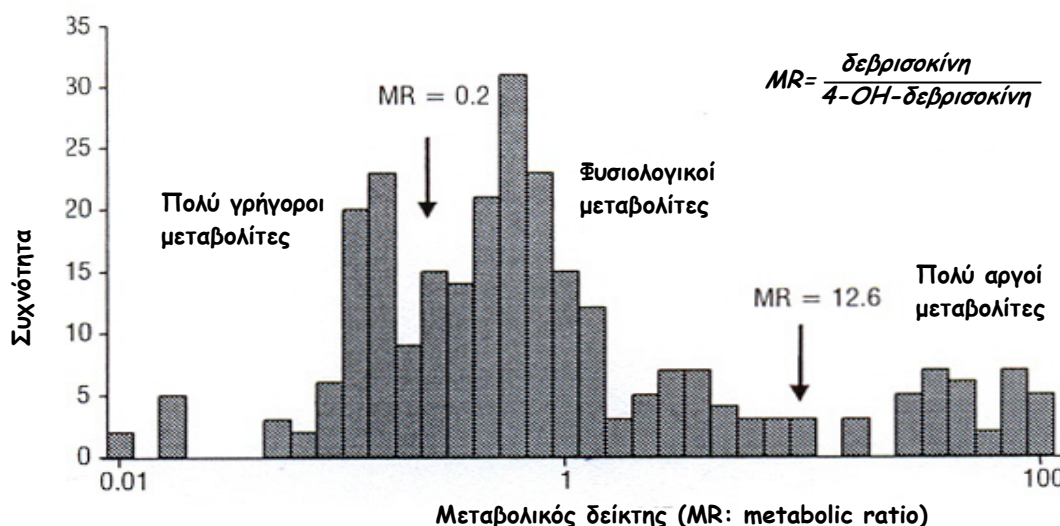


## Μελέτες του φαινότυπου

Ως φαινότυπος ορίζεται η ορατή έκφραση του γενότυπου. Οι φαινότυποι που καθορίζονται από περισσότερα από ένα γονίδια ονομάζονται πολυγονιδιακοί ή πολυπαραγοντικοί. Η μελέτη του φαινότυπου προσφέρει ποσοτικές και ποιοτικές πληροφορίες. Στη φαρμακογενωμική, η μελέτη του φαινότυπου χρησιμοποιείται σαν **μια λειτουργική δοκιμή** για να αποτιμήσουμε, για παράδειγμα, το επίπεδο δραστηριότητας ενός συγκεκριμένου ενζύμου, το οποίο εμπλέκεται στο μεταβολισμό μιας ομάδας φαρμάκων. Για να εφαρμόσουμε αυτήν την τεχνική, να μελετήσουμε δηλαδή το επίπεδο δραστηριότητας ενός ενζύμου, πρέπει να χορηγήσουμε το φάρμακο και στη συνέχεια να προσδιορίσουμε τη συγκέντρωση του φαρμάκου ή του κύριου μεταβολίτη του στην κυκλοφορία και τη συγκέντρωση που απεκκρίνεται. Στη συνέχεια υπολογίζουμε το ρυθμό μεταβολισμού, ο οποίος θα μας δώσει το επίπεδο δραστηριότητας του ενζύμου που καταβολίζει το φάρμακο.

Ο περιορισμός αυτής της προσέγγισης είναι ότι προσφέρει μόνο μια «παροδική στιγμή» της φαινοτυπικής έκφρασης, μια διαδικασία που μπορεί να μεταβληθεί από έναν άλλο παράγοντα, όπως η παροδική έκφραση ενός επαγωγέα.

Το παράδειγμα του πολυμορφισμού του κυτοχρώματος CYP2D6 περιγράφει πολύ καλά τη δυναμική αυτής της τεχνικής. Το CYP2D6 υδροξυλιώνει γύρω στα 40 διαφορετικά φάρμακα. Έχουν σχεδιαστεί διάφορα tests για να προσδιοριστεί η δραστηριότητα του ενζύμου, από τα οποία το πιο ευρέως διαδεδομένο είναι το test της δεβρισκοκίνης, ενός αντι-υπερτασικού παράγοντα, ο οποίος χορηγείται από το στόμα σε άτομα που πρόκειται να προσδιοριστεί ο φαινότυπός τους. Τα ούρα συλλέγονται σε καθορισμένα διαστήματα μετά τη χορήγηση του φαρμάκου. Ο λόγος της συγκέντρωσης στα ούρα της δεβρισκοκίνης προς τον κύριο μεταβολίτη της, την 4-υδροξυ-δεβρισκοκίνη χρησιμοποιείται για να προσδιοριστεί ο μεταβολικός δείκτης που προσδιορίζει τον φαινότυπο του ενζύμου. Ο λόγος αυτός ποικίλλει από 0.2 - 12.6 για τα άτομα που θεωρούνται φυσιολογικοί μεταβολίτες. Χαμηλότερος λόγος αντιστοιχεί σε πολύ γρήγορο μεταβολισμό που παρατηρείται σε ασθενείς που δεν ανταποκρίνονται στη θεραπεία με φάρμακα που μεταβολίζονται με αυτόν τον τρόπο. Υψηλότερος λόγος αντιστοιχεί σε αργούς μεταβολίτες που συχνά εμφανίζουν παρενέργειες σαν να του χορηγήθηκε πολύ μεγάλη δόση (over-dose). Η κατανομή των διαφορετικών φαινοτύπων απεικονίζεται στην Εικόνα 5.8.



**Εικόνα 5.8** Κατανομή του μεταβολικού δείκτη του κυτοχρώματος CYP2D6 σε πληθυσμό Σουηδών.

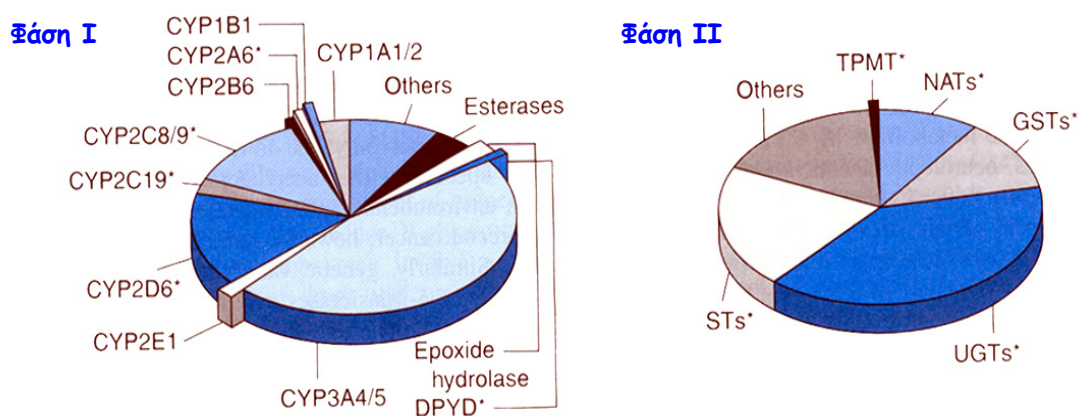
Η μελέτη του γενότυπου του ίδιου ενζύμου μπορεί να γίνει χρησιμοποιώντας RFLP-PCR. Περισσότερα από 70 αλληλόμορφα έχουν χαρακτηριστεί. Η πιο συχνή μετάλλαξη του

κυτοχρώματος CYP2D6\*4 είναι μια αντικατάσταση αδενοσίνης με γουανίνη στη θέση 1934, στα όρια μεταξύ του ιντρόνιου 3 και του εξόνιου 4. Αυτή η μετάλλαξη οδηγεί στη σύνθεση μια κολοβής ανενεργής πρωτεΐνης 181 αμινοξέων αντί για 457 που έχει ο άγριος τύπος. Τα άτομα που μεταβολίζουν πάρα πολύ γρήγορα έχουν σε αντίθεση ένα διπλασιασμό του CYP2D6\*2. Ο μεγάλος αριθμός αναγνωρισμένων ποικίλων αλληλόμορφων εύκολα εξηγεί τη μεγάλη ποικιλομορφία του μεταβολικού ρυθμού.

Η μελέτη του γενότυπου μπορεί συνεπώς να χρησιμοποιηθεί για να προσδιορίσει τη μοριακή βάση ενός παρατηρούμενου φαινότυπου.

### ■ Φαρμακογενωμική και ένζυμα που εμπλέκονται στο μεταβολισμό φαρμάκων

Τα ένζυμα που εμπλέκονται στο μεταβολισμό των φαρμάκων ταξινομούνται σε κατηγορίες ανάλογα αν συμμετέχουν στη Φάση I ή στη Φάση II. Τα φάρμακα στον οργανισμό μεταβολίζονται κυρίως από τα κυτοχρώματα P450, τις δεϋδρογονάσες, τις τρανσφεράσες κ.ά (Βλπ Εικόνα 5.9). Τα γονίδια, που κωδικοποιούν αυτά τα ένζυμα χαρακτηρίζονται από δομικό πολυμορφισμό, με αποτέλεσμα να σημειώνεται μεταξύ των ασθενών μία ποικιλία αποκρίσεων σε θεραπείες.



**Εικόνα 5.9** Τα κύρια ένζυμα που μεταβολίζουν τα φάρμακα.

Στη Φάση I ανήκουν το κυτόχρωμα P450 (CYP), η δεϋδρογονάση της διϋδροπυριμιδίνης (DPYD) κλπ, ενώ στη Φάση II ανήκουν οι γλυκουρονυλο-τρανσφεράσες (UGTs), οι γλουταθειο-*S*-τρανσφεράσες (GST), οι *N*-ακετυλο-τρανσφεράσες (NATs) και η θειοπυρινο-τρανσφεράση (TPMT).

### Τα Κυτοχρώματα P450

Τα κυτοχρώματα P450 παίζουν ένα ρόλο κλειδί στους μηχανισμούς πολυμορφισμού που τροποποιούν τις φαρμακοκινητικές ιδιότητες ενός δεδομένου φαρμάκου. Τα κυτοχρώματα P450 είναι ένζυμα - αιμοπρωτεΐνες που συνδέονται με φλαβοπρωτεΐνες, οι οποίες συμμετέχουν στα βιοσυνθετικά μονοπάτια και στον οξειδωτικό μεταβολισμό των φαρμάκων. Επίσης συμμετέχουν στην ενεργοποίηση των προ-καρκινογόνων. Αυτές οι μονο-οξυγενάσες βρίσκονται κυρίως στο συκώτι, αλλά συναντώνται και στο έντερο. Σε υποκυτταρικό επίπεδο, τα κυτοχρώματα P450 βρίσκονται στη μεμβράνη του ενδοπλασματικού δικτύου.

**Πίνακας 5.1** Κατανομή των κύριων μεταλλάξεων 4 ανθρώπινων κυτοχρωμάτων

Enzyme	Predominant allelic variant	Mutation	Consequences for enzyme function	Allelic Frequency (%)			
				Caucasians	Asians	Africans	Ethiopians and Saudis
CYP2A6	CYP2A6*2	Leu160His	Inactive enzyme	1-3	0	ND	ND
	CYP2A6del	Deletion	No enzyme	1	15	ND	ND
CYP2C9	CYP2C9*2	Arg144Cys	Reduced affinity for P450	8-13	0	ND	ND
	CYP2C9*3	Ile359Leu	Specificity for the substrate altered	6-9	2-3	ND	ND
CYP2C19	CYP2C19*2	Aberrant splicing site	Inactive enzyme	13	23-32	13	14-15
	CYP2C19*3	Premature stop codon	Inactive enzyme	0	6-10	ND	0-2
CYP2D6	CYP2D6*2xN	Gene duplication or multiduplication	Increased enzyme activity	1-5	0-2	2	10-16
	CYP2D6*4	Defective splicing	Inactive enzyme	12-21			
	CYP2D6*5	Deletion	No enzyme	2-7	1	2	1-4
	CYP2D6*10	Pro34Ser, Ser486Thr	Unstable enzyme	1-2	6	4	1-3
	CYP2D6*17	Thr107Ile, Arg296Cys	Reduced affinity for substrates	0	51	6	3-9
		Ser486Thr			ND	34	3-9

ND – not determined

Τα κυτοχρώματα (CYP) ταξινομούνται σε τέσσερις οικογένειες (CYP1-CYP4), σε έξι υποοικογένειες (πχ CYP2A, CYP2B, CYP2C, CYP2D, CYP2E, CYP2F) και στη συνέχεια ένας αριθμός από το 1-20 προσδιορίζει το ισοένζυμο (πχ. CYP2C9). Αν στη συνέχεια υπάρχει αστερίσκος και ένας αριθμός προσδιορίζει το μετάλλαγμα (CYP2C19\*3). Τα πιο σημαντικά κυτοχρώματα είναι: το CYP3A4, CYP2D6, CYP2C9, CYP2C19 και CYP2A6. Οι κύριες μεταλλάξεις τους καθώς και οι συχνότητες με οποίες εμφανίζονται, δίνονται στον Πίνακα 5.1. Στον Πίνακα 5.2 αναφέρονται τρία κυτοχρώματα και οι κύριοι στόχοι τους, των οποίων η απομάκρυνση από τον οργανισμό είναι ελαττωμένη σε άτομα που είναι αργοί μεταβολίτες. Όλα αυτά τα κυτοχρώματα, εκτός από το CYP2D6, επάγονται. Η επαγωγή (induction) είναι δόσο-εξαρτώμενη και αντιστρεπτή. Πολλές ουσίες συναγωνίζονται για την ίδια θέση σύνδεσης προκαλώντας ένα ανασταλτικό αποτέλεσμα. Ο κατάλογος όλων των αναστολέων και των ενεργοποιητών όλων των κυτοχρωμάτων είναι διαθέσιμος στο internet.

**Πίνακας 5.2** Θεραπευτικές συνέπειες του φαινότυπου ενός αργού μεταβολίτη.

Ένζυμο	Ελαττωμένη απομάκρυνση του φαρμάκου	Ανεπιθύμητα αποτελέσματα
CYP2C9	Φαινυτοΐνη	Αταξία
	Τολβουταμίδη	Υπογλυκαιμία
	NSAID (non-Steroidal anti-inflammatory drugs)	Αιμορραγία πεπτικού
CYP2C19	Διαζεπάμη	Υπνηλία
CYP2D6	Τρικυκλικά αντικαταθλιπτικά	Καρδιοτοξικότητα
	Αλοπεριδόλη	Παρκινσονισμός
	Αντιαρρυθμικά φάρμακα	Αρρυθμία
	Αναστολείς επαναπρόσληψης της σεροτονίνης	Ναυτία



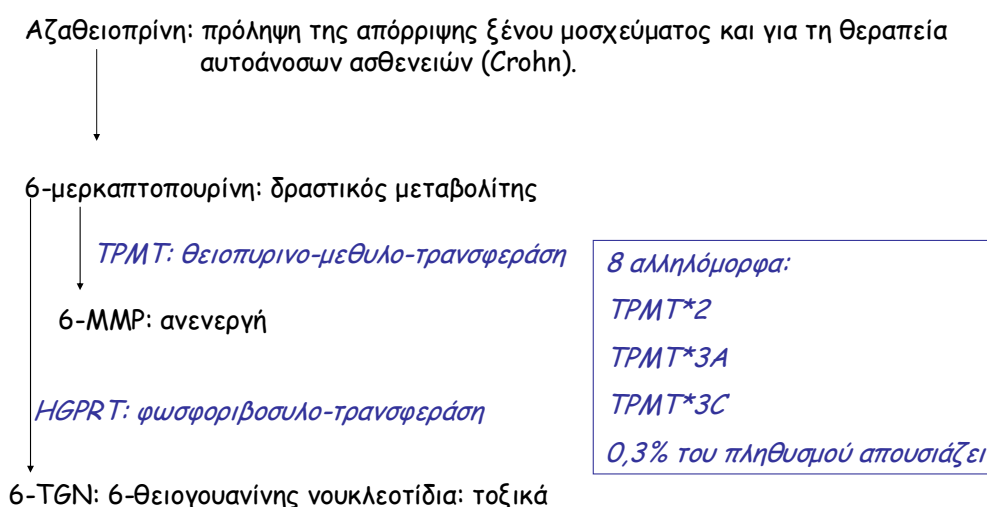
### Θειοπυρινο-μεθυλοτρανσφεράση (TPMT)

Η αζαθειοπρίνη χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με άλλα φάρμακα για την πρόληψη της οξείας απόρριψης ξένου μοσχεύματος και για τη θεραπεία ορισμένων αυτοάνοσων ασθενειών, όπως η νόσος του Crohn. Ο δραστικός μεταβολίτης της αζαθειοπρίνης, η 6-μερκαπτοπουρίνη (6-MP) δημιουργείται στο συκώτι. Το φάρμακο αυτό χρησιμοποιείται απευθείας για τη θεραπεία της οξείας λεμφοβλαστικής λευχαιμίας στα παιδιά.

Υπάρχουν τρεις μεταβολικοί οδοί για την 6-MP. Η φωσφοριβοσυλο-τρανσφεράση (HGPRT) μετατρέπει την 6-MP σε 6-TGN (6-θειογουανίνης νουκλεοτίδια) υπεύθυνα για τη δραστηριότητα αλλά και την τοξικότητα του φαρμάκου. Η οξειδάση της ξανθίνης απενεργοποιεί την 6-MP σε θειουρικό οξύ. Η TPMT, η οποία βρίσκεται κυρίως στο συκώτι αλλά και στα ερυθροκύτταρα, μετατρέπει την ενεργή 6-MP σε ανενεργή 6-MMP. Η TPMT εμφανίζει γενετικό πολυμορφισμό. Το γονίδιο της βρίσκεται στο χρωμόσωμα 6.

Έχουν βρεθεί 8 μεταλλαγμένα αλληλόμορφα TPMT με ασθενή ενζυμική δράση. Τα πιο κοινά είναι η TPMT\*2, η TPMT\*3A και η TPMT\*3C. Επίσης η TPMT απουσιάζει στο 0,3 % του πληθυσμού (ομόζυγα άτομα). Σε παιδιά που πάσχουν από λεμφοβλαστική λευχαιμία και από τα οποία απουσιάζει η TPMT, η 6-MP πρέπει να χορηγείται σε δόσεις 10-15% των φυσιολογικών δόσεων. Σε αντίθετη περίπτωση, η 6-MP συσσωρεύεται με αποτέλεσμα να συσσωρεύονται τοξικά παράγωγα νουκλεοτιδίων (6-TGN) με μοιραία αιματολογική τοξική αντίδραση.

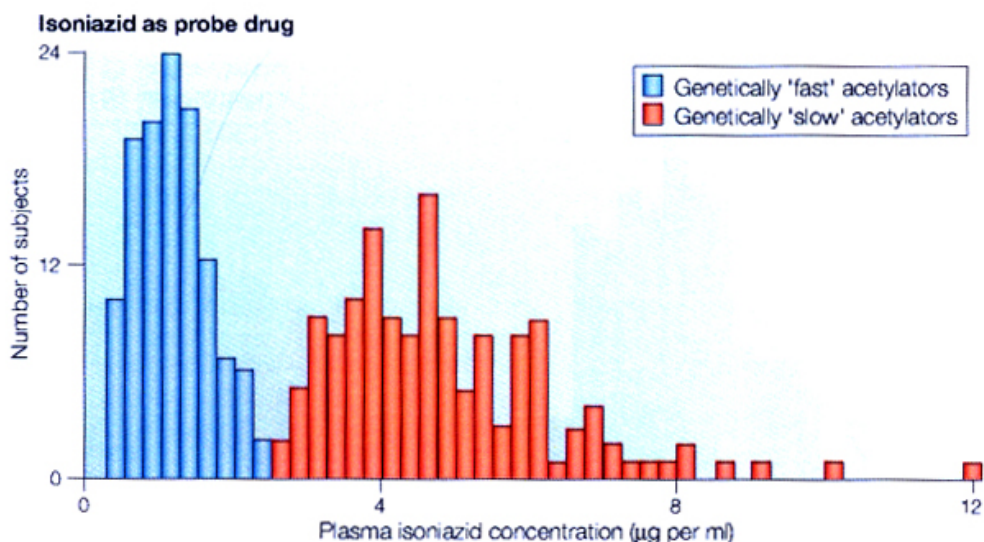
#### TPMT: Θειοπυρινο-μεθυλο-τρανσφεράση



Ο γενετικός πολυμορφισμός της δραστηριότητας της TPMT είναι ένα παράδειγμα του πώς η χρήση της φαρμακογενωμικής μπορεί να προσδιορίσει τη θεραπεία ενός ατόμου αυξάνοντας τη δραστηριότητα και ελαττώνοντας την τοξικότητα. Η φαινοτυπική δραστηριότητα της TPMT μπορεί να μετρηθεί ως εξής: τα ερυθροκύτταρα επωάζονται με 6-MP και στη συνέχεια η 6-MPP προσδιορίζεται με HPLC. Ο λόγος του καταβολίτη προς το φάρμακο προσδιορίζει τη δραστηριότητα του ενζύμου.

## N-ακετυλοτρανσφεράση-2 (NAT-2)

Πολλά φάρμακα ακετυλιώνονται από το ηπατικό ένζυμο N-ακετυλοτρανσφεράση. Η ισονιαζίδη ήταν το πρώτο αποτελεσματικό φάρμακο στη θεραπεία της φυματίωσης το 1952. Το 1953 παρατηρήθηκε ότι υπήρχαν μεγάλες διαφορές ανάμεσα στα άτομα, στην ποσότητα ισονιαζίδης που απεκκρίνονταν στα ούρα. Στη συνέχεια ανακαλύφθηκε ότι αυτές οι διαφορές οφείλονταν στη διαφορετική ικανότητα των ατόμων να μετατρέπουν την ισονιαζίνη σε ακετυλο-ισονιαζίδη. Οι αργοί ακετυλιωτές υπέφεραν από τα τοξικά αποτελέσματα της ισονιαζίδης και συχνά εμφάνιζαν περιφερειακή νευροπάθεια. Η κατανομή του ρυθμού ακετυλίωσης σε ένα γενικό πληθυσμό έχει δύο κορυφές (βλπ Εικόνα 5.10).

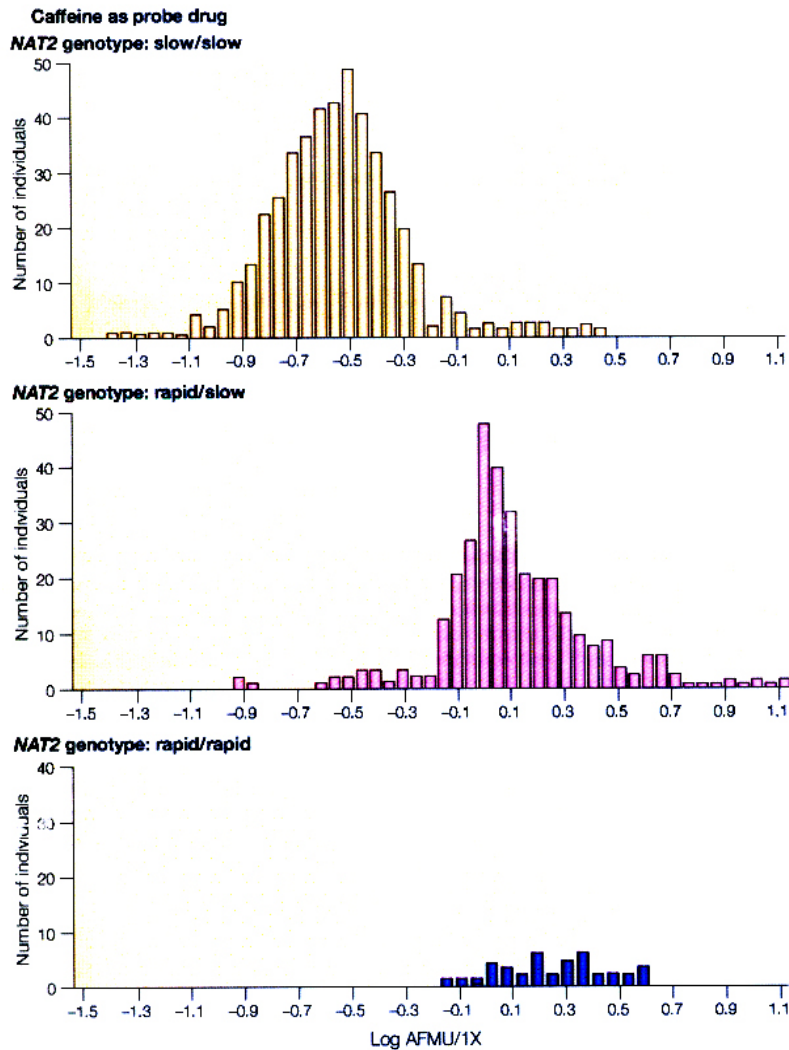


**Εικόνα 5.10** Για τη μελέτη πολυμορφισμού του NAT χρησιμοποιήθηκε σαν εργαλείο ο αντιφυματικός παράγοντας ισονιαζίνη, η οποία ακετυλιώνεται από το NAT. Έξι ώρες μετά την από το στόμα χορήγηση ισονιαζίδης, μετρήθηκε η συγκέντρωσή της στο αίμα. Τα 267 άτομα που συμμετείχαν στην έρευνα χωρίστηκαν σε δυο κατηγορίες, ανάλογα με το ρυθμό με τον οποίο ακετυλιώνουν την ισονιαζίδη: σε γρήγορους (χαμηλή συγκέντρωση του φαρμάκου στο πλάσμα) και αργούς ακετυλιωτές (υψηλή συγκέντρωση του φαρμάκου στο πλάσμα). Από *Weinshilboum R, and Wang L., Pharmacogenomics: Bench to bedside, Nature Reviews Drug Discovery 3, 739-748 (2004).*

Σήμερα είναι γνωστό ότι η ταχεία ακετυλίωση κληρονομείται ως αυτοσωμικός επικρατής χαρακτήρας, ενώ η βραδεία ακετυλίωση ως υπολειπόμενος. Το 1991, η κλωνοποίηση του cDNA που κωδικοποιεί το κυτταροπλασματικό ένζυμο N-ακετυλοτρανσφεράση-2, οδήγησε στην αναγνώριση δυο πολυμορφικών αλληλόμορφων, NAT2\*5 και NAT2\*6. Αυτά τα αλληλόμορφα είναι υπεύθυνα για το 90% των αργών ακετυλιωτών. Μέχρι τον Ιούνιο του 2003, περιγράφηκαν 14 μεταλλάξεις στο γονιδιακό τόπο που κωδικοποιεί για το NAT-2, οι οποίες μόνες ή με διάφορους συνδυασμούς παράγουν 36 διαφορετικά αλληλόμορφα.

Η αναλογία ταχέων και βραδέων ακετυλιωτών έχει φυλετικό υπόστρωμα και είναι 40:60 για την Ευρώπη, 85:15 για την Ιαπωνία και 95:5 για τους Εσκιμώους της Β. Αμερικής. Οι κλινικές συνέπειες αυτών των διαφορών είναι ότι στους βραδείς ακετυλιωτές μπορεί να υπάρξει ενισχυμένη αντίδραση στην αγωγή και αυξημένος κίνδυνος τοξικότητας. Έτσι έχει αναφερθεί ότι οι βραδείς ακετυλιωτές απαιτούν μικρότερες δόσεις ισονιαζίδης από ότι οι ταχείς.

Όταν ο φαινότυπος της NAT-2 προσδιορίστηκε με την καφεΐνη, μετρώντας το λόγο δύο μεταβολιτών της AFMU/1-μεθυλοξανθίνη, βρέθηκε ότι ο γενότυπος δεν ταυτίζεται πάντα με το φαινότυπο. Φαινοτυπικά βρέθηκαν 45,3% γρήγοροι ακετυλιωτές και 54,6% αργοί. Από αυτούς οι 55,8% είχαν γενότυπο αργού/αργού, 39,2% αργού/γρήγορου και 4,9% γρήγορου/γρήγορου. Συνεπώς ένα 5,7% των ατόμων εμφάνιζαν ασυμφωνία γενότυπου-φαινότυπου (Εικόνα 5.11).



**Εικόνα 5.11** Η ακετυλίωση από τη NAT-2 υπολογίστηκε από το λόγο δύο μεταβολιτών της καφεΐνης (AFMU/1-μεθυλοξανθίνη), και ταυτόχρονα έγινε η σύγκριση γενότυπου - φαινότυπου. Από *Weinshilboum R, and Wang L., Pharmacogenomics: Bench to bedside, Nature Reviews Drug Discovery 3, 739-748 (2004).*

## ■ Φαρμακογενωμική και Κεντρικό Νευρικό Σύστημα

### Πολυμορφισμός Μεταβολικών αντιδράσεων

Σε πολλούς ασθενείς με βαριά κατάθλιψη χορηγείται χλωριμιπραμίνη. Οι ασθενείς που μεταβολίζουν αργά χρειάζονται 10 φορές χαμηλότερη δόση για να πετύχουν την επιθυμητή θεραπευτική συγκέντρωση στο πλάσμα. Χωρίς σωστή διαλογή, αυτοί οι αργοί μεταβολίτες



θα ήταν εκτεθειμένοι σε ανεπιθύμητα τοξικά αποτελέσματα του φαρμάκου. Αντίθετα, οι γρήγοροι μεταβολίτες εμφανίζουν ανθεκτικότητα στο φάρμακο (Balant-Gorgia et al, 1990).

Η ποικιλομορφία όμως της απόκρισης των ασθενών σε μία θεραπεία δεν οφείλεται μόνο στο δομικό πολυμορφισμό των γονιδίων που κωδικοποιούν τα ένζυμα μεταβολισμού των φαρμάκων, αλλά και στον πολυμορφισμό των γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες στόχους του φαρμάκου, όπως οι μεταφορείς ή οι υποδοχείς των νευροδιαβιβαστών.

### **Πολυμορφισμός του Μεταφορέα της Σεροτονίνης και Αντικαταθλιπτικά**

Αν και η φαρμακευτική θεραπεία της κατάθλιψης είναι μια αναμφισβήτη επιτυχία της σύγχρονης ψυχιατρικής, η μη ανταπόκριση πολλών ασθενών σε φαρμακευτική θεραπεία αποτελεί ένα μεγάλο και άλυτο πρόβλημα. Ο μεταφορέας της σεροτονίνης είναι μια πρωτεΐνη που επαναπροσλαμβάνει στον προσυναπτικό νευρώνα τη σεροτονίνη που έχει απελευθερωθεί στη συναπτική σχισμή. Ο μεταφορέας αυτός είναι στόχος μιας κύριας ομάδας αντικαταθλιπτικών φαρμάκων, των SSRIs (specific serotonin reuptake inhibitors: ειδικοί αναστολείς της επαναπρόσληψης της σεροτονίνης), οι οποίοι αναστέλλουν τη δράση του με αποτέλεσμα την αύξηση της σεροτονίνης στη σύναψη.

Έχουν βρεθεί δυο ενδιαφέροντες πολυμορφισμοί στο γονίδιο του ανθρώπινου μεταφορέα της σεροτονίνης που βρίσκεται στο χρωμόσωμα 17q11.1-q12.

- Ο πρώτος πολυμορφισμός χαρακτηρίζεται από έναν ποικίλο αριθμό επαναλήψεων στην περιοχή του προαγωγέα που επηρεάζει με διάφορους τρόπους την έκφραση του γονιδίου. Εκφράζονται κυρίως δυο αλληλόμορφα: ένα κοντό, με 14 επαναλήψεις μιας περιοχής 23 ζευγαριών βάσεων, και ένα μακρύ με 16 επαναλήψεις. Το μακρύ αλληλόμορφο οδηγεί στη σύνθεση διπλάσιας ποσότητας mRNA του μεταφορέα. Έχει δε βρεθεί ότι ακόμη και μια κόπια αυτού του αλληλόμορφου συνδέεται με ευνοϊκή απόκριση στους SSRIs.
- Ένας δεύτερος πολυμορφισμός έχει βρεθεί μέσα στο ιντρόνιο 2 και συνίσταται από 9, 10 ή 12 επαναλήψεις μιας περιοχής 17 ζευγαριών βάσεων που έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση της μεταγραφής. Χρειάζονται όμως επιπλέον μελέτες ώστε να γίνει η σύνδεση των ασθενών που έχουν κάποιο από αυτά τα αλληλόμορφα με την απόκρισή τους στη θεραπεία με SSRIs.

### **Πολυμορφισμός Ντοπαμινεργικών υποδοχέων και Νευροληπτικά**

Τα νευροληπτικά είναι μια κατηγορία ουσιών που χορηγούνται σε ασθενείς με ψυχωτικές ασθένειες, και κυρίως για τη σχιζοφρένεια. Τα σημαντικότερα νευροληπτικά είναι οι ανταγωνιστές των υποδοχέων D<sub>2</sub>. Μπορούν να ταξινομηθούν σε δυο κατηγορίες: τα τυπικά και τα άτυπα. Κλινικά, τα άτυπα χαρακτηρίζονται από μια διπλή δράση στα θετικά και στα αρνητικά συμπτώματα της σχιζοφρένειας και από την απουσία ανεπιθύμητων εξωπυραμιδικών δράσεων. Η κλοζαπίνη, το πρότυπο αυτής της κατηγορίας αν και έχει πολύ ενδιαφέρουσα δράση έχει ένα σοβαρό ανεπιθύμητο αποτέλεσμα, ξαφνική απώλεια λευκοκυττάρων (agranulocytosis). Φαρμακολογικά, η συγγένειά της για τον υποδοχέα D<sub>4</sub> είναι μεγαλύτερη από ότι για τον D<sub>2</sub>. Η κλοζαπίνη είναι επίσης ανταγωνιστής του υποδοχέα 5-HT<sub>2</sub>.

Το γονίδιο για τον D<sub>4</sub> εμφανίζει μεγάλο πολυμορφισμό, με την τρίτη ενδοκυτταρική θηλιά του υποδοχέα να έχει μια περιοχή μεγάλης ποικιλομορφίας με επαναλήψεις μιας σειράς 48 ζευγαριών βάσεων. Αυτά τα αλληλόμορφα χαρακτηρίζονται ως D<sub>4x</sub>, όπου χ ο αριθμός των επαναλήψεων. Από τις διάφορες μελέτες που έψαχναν να συσχετίσουν αυτά τα αλληλόμορφα με τη θεραπευτική απόκριση στην κλοζαπίνη, μόνο μία έδειξε μια σύνδεση ανάμεσα σε ασθενείς ομόζυγους για 4 τύπους αλληλόμορφων και την απόκριση στην κλοζαπίνη. Επίσης, μια μετα-ανάλυση έδειξε μια σύνδεση ανάμεσα στον πολυμορφισμό του υποδοχέα 5-HT<sub>2A</sub> και στην απόκριση στην κλοζαπίνη.

Ένας συνδυασμός έξι πολυμορφισμών που εμπλέκουν διάφορους υποδοχείς εμφανίζει μια σταθερή σύνδεση με την κλινική αποτελεσματικότητα της κλοζαπίνης. Αυτή η προσέγγιση είναι πιο εστιασμένη και φαίνεται να αποδίδει καλύτερα την πολυπλοκότητα της ασθένειας. Η ξαφνική απώλεια των λευκοκυττάρων που προκαλεί η κλοζαπίνη, λόγω της οποίας περιορίζεται κατά πολύ η χρήση της θα μπορούσε να συνδεθεί με ένα κυρίαρχο γονίδιο του κύριου συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας. Η καθυστερημένη δυσκινησία είναι ένα σοβαρό ανεπιθύμητο αποτέλεσμα που παρατηρείται στο 50% των ασθενών που βρίσκονται σε μακρόχρονη θεραπεία με τυπικά αντιψυχωτικά, και συνδέεται με τον πολυμορφισμό Ser9Gly του γονιδίου που κωδικοποιεί για τον υποδοχέα D<sub>3</sub>.

### ■ Φαρμακογενωμική και Καρδιακό Σύστημα

Η φαρμακογενωμική έχει μεγάλη δράση στον τομέα των καρδιαγγειακών ασθενειών, την κύρια αιτία θανάτου στις ανεπτυγμένες χώρες. Τα οικονομικά οφέλη σε αυτήν την περίπτωση είναι τεράστια. Οι καρδιαγγειακές ασθένειες περιλαμβάνουν μεταξύ άλλων την αθηροσκλήρωση, την υπέρταση, τη θρόμβωση του μυοκαρδίου, την καρδιακή ανεπάρκεια και τις αρρυθμίες.

Εκτός από τους εξωτερικούς παράγοντες που συνδέονται με τον τρόπο ζωής και τις μολύνσεις, η εσωτερική γενετική προδιάθεση παίζει σημαντικό ρόλο. Οι σημαντικότερες θεραπευτικές προέρχονται από τον πολυμορφισμό ενζύμων που εμπλέκονται στο μεταβολισμό των φαρμάκων: τρανσφεράσες, κυτοχρώματα και άλλες οξειδοοδουκτάσες. Όπως και στις άλλες ασθένειες, η επίδραση του γενετικού πολυμορφισμού των μεμβρανικών μεταφορέων στην φαρμακοκινητική και φαρμακοδυναμική δεν είναι ακόμη γνωστή στις καρδιαγγειακές ασθένειες. Τελικά, ο γενετικός πολυμορφισμός πρωτεϊνών-θεραπευτικών στόχων, πχ. υποδοχέων και ενζύμων των σηματοδοτικών οδών, σίγουρα συνεισφέρει στην ποικιλομορφία της αποτελεσματικότητας και της τοξικότητας των καρδιαγγειακών θεραπειών.

### **Πολυμορφισμός Μεταβολικών Ενζύμων**

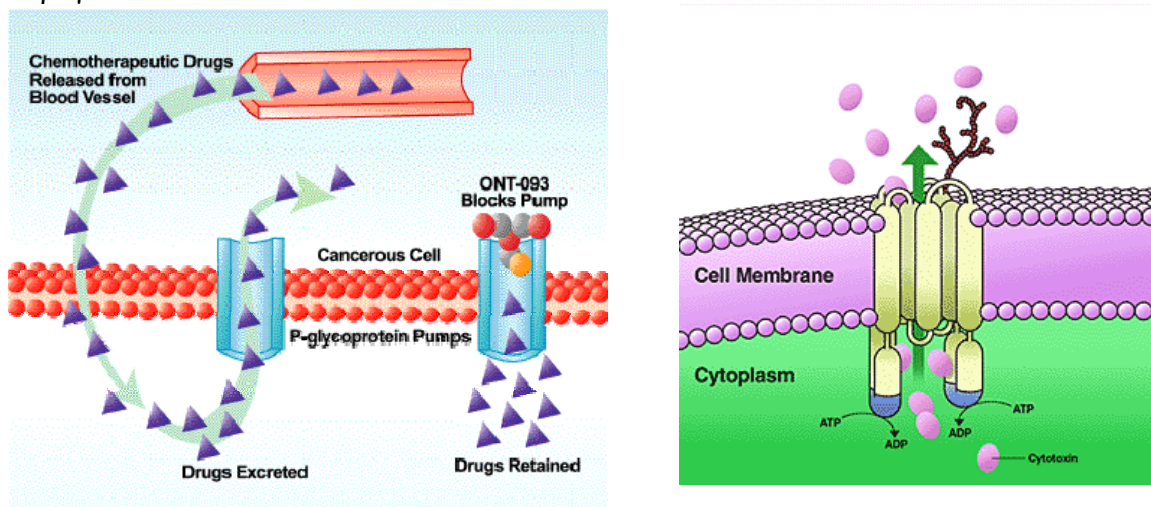
Το 1990, ο Lee et al υπέθεσαν ότι το ισχυρό β-ανταγωνιστικό αποτέλεσμα της προπαφενόνης σε χαμηλές δόσεις, που παρατηρείται στους αργούς μεταβολίτες μπορεί να εξηγηθεί από τη γενετικά καθορισμένη ελάττωση της μετατροπής αυτού του αντι-αρρυθμικού παράγοντα στον λιγότερο δραστικό μεταβολίτη του. Τώρα γνωρίζουμε ότι το ένζυμο που μεταβολίζει την προπαφενόνη είναι το CYP2D6, ένα κυτόχρωμα με μεγάλο πολυμορφισμό (όπως ήδη αναφέραμε).

Τα \*2 και \*3 μεταλλαγμένα αλληλόμορφα του CYP2C9 οδηγούν σε μεγάλη ποικιλομορφία του μεταβολισμού των φαρμάκων. Όταν ένας ασθενής έχει ένα από αυτά τα αλληλόμορφα, γεγονός συχνό στους Καυκάσιους, ο μεταβολισμός πολλών φαρμάκων που χορηγούνται σε καρδιαγγειακές παθήσεις (πχ. βαρφαρίνη) ελαττώνεται. Όμως τα μεταβολικά ένζυμα δεν επηρεάζονται μόνο από το γενετικό πολυμορφισμό. Η συν-χορήγηση αντι-υπερτασικών ή αντι-αρρυθμικών ή αντι-ισχαιμικών παραγόντων με αμιοδαρόνη αναστέλλει το CYP2C9.

### **Πολυμορφισμός μεταφορέων**

Λίγα είναι γνωστά σε αυτόν τον τομέα. Η Ρ-γλυκοπρωτεΐνη είναι μια διαμεμβρανική ATP-εξαρτώμενη αντλία που προστατεύει το κύτταρο από τα τοξικά αποτελέσματα συσσωρευμένων προϊόντων μεταφέροντας αυτά ή τους μεταβολίτες τους έξω από το κύτταρο. Ο ρυθμός έκφρασης και λειτουργίας της εντερικής Ρ-γλυκοπρωτεΐνης συνδέεται με μια μετάλλαξη στο εξόνιο 26 (C345T) του γονιδίου MDR1C. Αυτός ο πολυμορφισμός μπορεί να έχει μεγάλη σημασία στη ρύθμιση της δόσης ορισμένων φαρμάκων σε ασθενείς με αυτήν τη

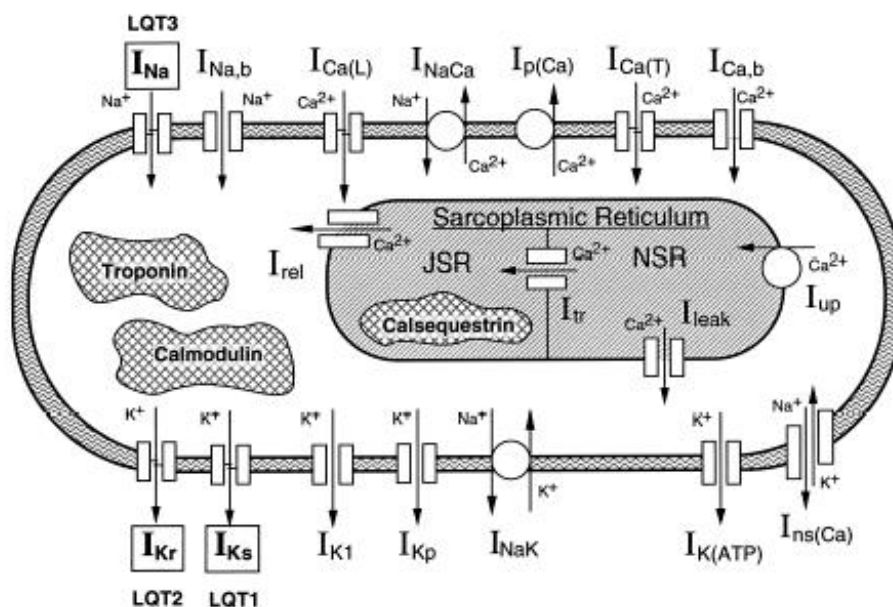
μετάλλαξη. Άτομα ομόζυγα για το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο (το 24% του Γερμανικού πληθυσμού) έχουν συγκέντρωση διγοξίνης (καρδιακός γλυκοζίτης) στο πλάσμα 4 φορές μεγαλύτερη από τα φυσιολογικά άτομα μετά από μια δόση χορηγούμενη από το στόμα. Η Ρ-γλυκοπρωτεΐνη είναι επίσης ο μεταφορέας της βεραπαμίλης και πολλών άλλων θεραπευτικών παραγόντων.



**Εικόνα 5.12** Η Ρ-γλυκοπρωτεΐνη είναι μια διαμεμβρανική ΑΤΡ-εξαρτώμενη αντλία που προστατεύει το κύτταρο από τα τοξικά αποτελέσματα συσσωρευμένων προϊόντων μεταφέροντας αυτά ή τους μεταβολίτες τους έξω από το κύτταρο.

### Πολυμορφισμός καναλιών

Οι πιο συχνοί πρωτεϊνικοί στόχοι φαρμάκων των καρδιακών παθήσεων είναι κανάλια ιόντων. Διάφορες μεταλλάξεις των καρδιακών καναλιών νατρίου και καλίου οδηγούν στο σύνδρομο LQTS (long QT syndrome) που χαρακτηρίζεται από ανώμαλη καρδιακή επαναπόλωση με αποτέλεσμα ταχυκαρδία. Η μελέτη αυτών των μεταλλάξεων θα συνεισφέρει στην ανάπτυξη αντι-αρρυθμικών φαρμάκων.



**Εικόνα 5.13** Διάφορες μεταλλάξεις των καρδιακών καναλιών νατρίου ( $I_{Na}$ ) και καλίου ( $I_{Kr}$  και  $I_{Ks}$ ) οδηγούν στο σύνδρομο LQT (long QT syndrome) που χαρακτηρίζεται από ανώμαλη καρδιακή επαναπόλωση με αποτέλεσμα ταχυκαρδία.



### ■ Φαρμακογενωμική και Καρκίνος

Παρόμοια προβλήματα ποικιλομορφίας στην απόκριση ασθενών σε θεραπείες έχει να αντιμετωπίσει η φαρμακογενωμική και στην περίπτωση καταπολέμησης του καρκίνου. Τα φάρμακα που κυρίως χρησιμοποιούνται για την καταπολέμηση του καρκίνου είναι προ-φάρμακα, τα οποία μεταβολίζονται στον οργανισμό παράγοντας ενεργούς μεταβολίτες. Η δομική όμως ποικιλομορφία των γονιδίων που κωδικοποιούν τα ένζυμα για τον καταβολισμό των προ-φαρμάκων, προκαλεί μία ποικιλία αποκρίσεων μεταξύ των ασθενών στην χορήγηση των συγκεκριμένων φαρμάκων.

Για παράδειγμα, η ιρινοτεκάνη, ένα παράγωγο της καμπτοθεκίνης που χρησιμοποιείται για τον καρκίνο του ορθού, συνδέεται με τον πολυμορφισμό *UGT1A1*. Η ιρινοτεκάνη είναι ένα προ-φάρμακο που μετατρέπεται από καρβοξυεστεράσες σε SN-38, στο ενεργό συστατικό που αναστέλλει την τοποϊσομεράση I. Ασθενείς με χαμηλό ρυθμό γλυκουρονιδίωσης συσσωρεύουν SN-38 και αναπτύσσουν τοξικές αντιδράσεις που εκδηλώνονται με σοβαρή διάρροια. Η ελαττωμένη ικανότητα για γλυκουρονιδίωση σχετίζεται με τις επαναλήψεις (A[TA]nTAA) στην περιοχή του επαγωγέα του γονιδίου *UGT1A1*, ενώ η δραστηριότητα της μεταγραφής ελαττώνεται όσο αυξάνεται το n.

### ■ Φαρμακογενωμική και Εθισμός

Ένα άλλο ευρύ πεδίο της φαρμακογενωμικής είναι η έρευνα γενετικού προκαθορισμού της συμπεριφοράς του εθισμού. Πολλές εργασίες έχουν εστιάσει στην έρευνα της «βιολογικής μοίρας». Ως εθισμός μπορεί να οριστεί η καταναγκαστική αναζήτηση και λήψη ουσιών (όπως το όπιο, η νικοτίνη, το αλκοόλ κλπ.) παρά τις αναγνωρισμένες ανεπιθύμητες και σοβαρές συνέπειες που συνδέονται με την κατανάλωσή τους. Δυο αντικρουόμενες θεωρίες έχουν αναπτυχθεί για να εξηγήσουν την προέλευση του εθισμού. Σύμφωνα με την πρώτη η λήψη εθιστικής ουσίας προκαλεί βιολογικές και λειτουργικές αλλαγές στον εγκέφαλο, οδηγώντας σε ένα επίπεδο εξάρτησης. Σύμφωνα με τη δεύτερη θεωρία, ο εθισμός είναι μια παθολογική κατάσταση που προέρχεται από μια αλληλεπίδραση ανάμεσα σε έναν ευαίσθητο φαινότυπο και την ουσία που προκαλεί τον εθισμό. Για την πρώτη θεωρία, η ουσία είναι ο καθοριστικός παράγοντας, για τη δεύτερη τα ατομικά χαρακτηριστικά. Σε νευροβιολογικό επίπεδο, η διαδικασία ανταμοιβής και η υποκειμενική αίσθηση της ευχαρίστησης μεσολαβούνται από τους ντοπαμινεργικούς νευρώνες που κατευθύνονται στον επικλινή πυρήνα (nucleus accumbens). Η ντοπαμινεργική υπερδραστηριότητα φαίνεται να είναι ένα κοινό μονοπάτι απάντησης στην επαναπρόσληψη της ουσίας.

Ο μεταβολισμός της **αλκοόλης** χρειάζεται δυο ενζυμικά βήματα που καταλύονται από: 1/ 5 τύπων αλκοολικές αφυδρογονάσες (ADH) που παράγουν ακεταλδεΐδη, και 2/ αλδεϋδικές αφυδρογονάσες που μετατρέπουν την ακεταλδεΐδη σε οξικό. Αυτά τα δυο ένζυμα εμφανίζουν πολυμορφισμό. Η συσσώρευση της ακεταλδεΐδης προκαλεί αυτό που ονομάζεται αντίδραση αντι-κατάχρησης που φανερώνεται με δυσάρεστα ή επικίνδυνα συμπτώματα (πονοκέφαλος, ναυτία, υπόταση, υπεραιμία...). Αυτή η αντίδραση μπορεί να επαχθεί από τη λήψη ουσιών που μπλοκάρουν την ενζυμική δραστηριότητα. Η παρουσία του αλληλόμορφου *ADH2 His47* αυξάνει το ρυθμό δημιουργίας ακεταλδεΐδης, ενώ το αλληλόμορφο *ALDH2 Lys487* ελαττώνει την απομάκρυνσή του, οδηγώντας και στις δυο περιπτώσεις στη συσσώρευση ακεταλδεΐδης. Αυτά τα δύο αλληλόμορφα είναι πολύ συχνά στους Ασιατικούς πληθυσμούς. Είναι πλέον καλά τεκμηριωμένο ότι τα άτομα με ένα γενότυπο που ευνοεί την ανώμαλη συγκέντρωση ακεταλδεΐδης (πχ *ALDH2\*2*) έχουν ένα προστατευτικό αποτέλεσμα κατά της ανάπτυξης εξάρτησης στο αλκοόλ. Η εμπλοκή του ντοπαμινεργικού συστήματος στην ανάπτυξη εθισμού χρειάζεται επιπλέον έρευνα για τη σύνδεση γονιδίων που κωδικοποιούν τους ντοπαμινεργικούς υποδοχείς και τον αλκοολισμό. Τα αποτελέσματα προκαταρκτικών μελετών είναι μάλλον αντικρουόμενα, αλλά πολλές μετα-αναλύσεις έχουν

δείξει μια συσχέτιση του αλληλόμορφου *DRD2* A1 με τον αλκοολισμό, μια συσχέτιση που είναι πιο ισχυρή όσο πιο σοβαρός είναι ο αλκοολισμός. Η παρουσία του αλληλόμορφου A1 συνδέεται με ελαττωμένη δραστηριότητα της ντοπαμινεργικής διαβίβασης, λόγω ελαττωμένης συγκέντρωσης των υποδοχέων D<sub>2</sub>.

Πολλές μελέτες, ειδικά με ομόζυγους διδύμους, έδειξαν τη σημασία του γενετικού παράγοντα στην ανάπτυξη εθισμού στον **καπνό**, αν και τα υπεύθυνα γονίδια δεν έχουν ακόμη αναγνωρισθεί. Η κύρια θέση σύνδεσης της νικοτίνης είναι ο νικοτινικός υποδοχέας της ακετυλοχολίνης, αλλά όπως και όλες οι ουσίες που προκαλούν εθισμό, η νικοτίνη επίσης ενεργοποιεί τη ντοπαμινεργική διαβίβαση στον επικληνή πυρήνα. Έχει προταθεί ένας μεγάλος αριθμός υποψήφιων γονιδίων που εμπλέκονται στη συμπεριφορά καπνίσματος, τα οποία ρυθμίζουν διαφορετικά βήματα του μεταβολισμού της ντοπαμίνης και τη δομή των ντοπαμινεργικών υποδοχέων. Αλλά δυστυχώς είναι ακόμη νωρίς για να βγάλουμε σίγουρα συμπεράσματα, γιατί τα αποτελέσματα είναι αντιφατικά. Για παράδειγμα, ο *Batra et al* (2000) δεν βρήκαν κανένα συσχετισμό ανάμεσα στους «σκληρούς καπνιστές» και το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο *DRD2* ενώ ο *Noble et al* (1994) και ο *Comings et al* (1996) βρήκαν μια θετική σύνδεση.

Η εξάρτηση από τα οπιοειδή είναι το τελευταίο παράδειγμα. Στις Ηνωμένες πολιτείες Αμερικής, βρέθηκε ότι από τα 3 εκατομμύρια άτομα που έκαναν χρήση ηρωίνης, μόνο τα μισά θα εθίζονταν, θέτοντας την ερώτηση του γενετικού προκαθορισμού. Αν και τα υποψήφια γονίδια είναι πολλά δεν έχει βρεθεί όμως ακόμη το εξειδικευμένο γονίδιο που θα συνδέεται με την εξάρτηση στα οπιοειδή. Όλα τα υποψήφια γονίδια κωδικοποιούν για πρωτεΐνες που εμπλέκονται στη διαβίβαση των οπιοειδών (μ, κ, δ υποδοχείς, προ-οπιομελανοκορτίνη, εγκεφαλίνες και δυνορφίνη). Πολλά SNPs έχουν βρεθεί για καθένα από αυτά τα γονίδια. Εμπλέκεται επίσης και η ντοπαμινεργική διαβίβαση, εφόσον η σύνδεση των οπιοειδών στους μ υποδοχείς εστιάζεται στους Gaba-εργικούς νευρώνες της κοιλιακής καλυπτρικής περιοχής που οδηγεί σε αύξηση της ντοπαμίνης στον επικληνή πυρήνα. Δυστυχώς όμως οι έρευνες που εξετάζουν τη σύνδεση των υποψήφιων γονιδίων με την εξάρτηση στα οπιοειδή είναι αντικρουόμενες. Πχ. η μετάλλαξη A118G του μ υποδοχέα, που αναγνωρίζεται στο 10% του πληθυσμού, παράγει μια πρωτεΐνη με μεγαλύτερη συγγένεια για τις β-ενδορφίνες δεν εμφανίζει καμία σύνδεση με τον εθισμό στα οπιοειδή.

## ■ Φαρμακογενωμική και Ανάπτυξη Φαρμάκων

### Προκλινική έρευνα

Η ανάπτυξη φαρμάκων είναι μια χρονοβόρα και ακριβή διαδικασία. Η προκλινική έρευνα πρέπει οπωσδήποτε να αναγνωρίσει κάθε απαγορευτική ιδιότητα της υποψήφιας ουσίας που θα μπορούσε να οδηγήσει στην απόσυρση του φαρμάκου, μετά την αρχική της αποδοχή, λόγω σοβαρών ανεπιθύμητων αποτελεσμάτων του. Για κάθε ουσία που μεταβολίζεται από ένα κυτόχρωμα που εμφανίζει πολυμορφισμό υπάρχει υψηλό ρίσκο δημιουργίας ανεπιθύμητων αποτελεσμάτων σε άτομα με δυσμενείς πολυμορφισμούς. Δυσάρεστες φαρμακοκινητικές ιδιότητες οδήγησαν στο σταμάτημα των κλινικών δοκιμών για το 30-40% των φαρμάκων. Πολλές μέθοδοι αναπτύχθηκαν για να μελετήσουν *in vitro* το μεταβολισμό των φαρμάκων: ανασυνδυασμένο ανθρώπινο κυτόχρωμα P450, καλλιέργειες ανθρώπινων ηπατοκυττάρων, λεπτές φέτες ήπατος κλπ.

### Κλινικές δοκιμές

Όταν σχεδιάζονται οι κλινικές δοκιμές, ο γενότυπος μπορεί να χρησιμοποιείται *a priori* ως ένα απαγορευτικό κριτήριο. Με αυτήν τη μεθοδολογία, η υπό μελέτη ομάδα μπορεί να είναι μικρότερη και πιο ομοιογενής, και άρα λιγότερο αντιπροσωπευτική. Χρησιμοποιώντας

αυτή τη μέθοδο ο Murphy et al (2000) προσδιόρισαν τη δράση του CYP2D6 σε ασθενείς με σοβαρή κατάθλιψη στους οποίους χορηγούνταν αντικαταθλιπτικά, αποκλείοντας από την έρευνά του τους αργούς μεταβολίτες. Εναλλακτικά, ο γενότυπος μπορεί να χρησιμοποιηθεί *a posteriori* σαν ένας παράγοντας ποικιλομορφίας. Ορισμένοι συγγραφείς συνηγορούν στη χρήση ενός «διαβατηρίου CYP» για εθελοντές που συμμετέχουν συστηματικά σε κλινικές δοκιμές. Μπορούμε επίσης να χρησιμοποιήσουμε και την έννοια της εθνότητας, πχ. Καυκάσιοι, η οποία εμφανίζει συγκεκριμένα αλληλόμορφα.

Τελικά, η συνεισφορά της φαρμακογενωμικής δεν περιορίζεται μονάχα στην ανάπτυξη ενός φαρμάκου. Η φαρμακογενωμική μπορεί να αλλάξει την πορεία της ανακάλυψης νέων φαρμάκων φέρνοντας μια επανάσταση στο σχεδιασμό των φαρμάκων, που βασίζεται σε μια νέα προσέγγιση της έρευνας και της διαλογής νέων μοριακών στόχων.

#### ■ Φαρμακογενωμική και ανάπτυξη νέων φαρμάκων

Από τα υπολογιζόμενα 35.000 γονίδια του ανθρώπινου γονιδιώματος, μόνο 43 από τις κωδικοποιημένες πρωτεΐνες στοχεύονται από τα 100 πρώτα σε πωλήσεις φάρμακα. Όλες οι τάξεις των πρωτεϊνών δεν είναι εξίσου εύκολοι στόχοι φαρμάκων. Ιστορικά, οι GPCRs υποδοχείς αποτελούσαν τον κυρίαρχο στόχο της φαρμακευτικής βιομηχανίας με τα ιοντικά κανάλια, τους πυρηνικούς ορμονικούς υποδοχείς, τις πρωτεάσες, τις φωσφοδιεστεράσες, τις κινάσες, τις φωσφατάσες και άλλα ένζυμα κλειδιά να ακολουθούν. Η εύρεση της αλληλουχίας του ανθρώπινου γονιδιώματος βοήθησε στον καθορισμό και την ταξινόμηση των γονιδίων που κωδικοποιούν αυτές τις πρωτεΐνες αποκαλύπτοντας επιπλέον νέα μέλη με δυναμική στόχου. Υπάρχουν συνεπώς πολλοί πιθανοί νέοι στόχοι φαρμάκων, αλλά η επιβεβαίωση τους ως στόχοι (target validation) είναι ακόμη μια επίπονη διαδικασία που απαιτεί κατανόηση του ρόλου του γονιδίου ή της πρωτεΐνης στην πορεία της νόσου.

Παράλληλα με το ανθρώπινο γονιδίωμα έχουν αποκρυπτογραφηθεί μικροβιακά γονιδιώματα προκειμένου να χρησιμοποιηθούν ως αντιβακτηριδιακοί και αντικοί στόχοι και γονίδια που προκαλούν ανοσολογική απόκριση για δημιουργία εμβολίων. Η διαθεσιμότητα των αλληλουχιών του παρασίτου της ελονοσίας (*Plasmodium falciparum*), του φορέα του (*Anopheles gambiae*) και του τελικού του ξενιστή (*Homo sapiens*) προσφέρει μεγάλες δυνατότητες για την ανάπτυξη νέων ανθελονοσιακών φαρμάκων.

Επιπλέον, η ύπαρξη γενωμικών βάσεων δεδομένων βοηθά στη διαλεύκανση του μέχρι τώρα άγνωστου μηχανισμού δράσης ήδη κυκλοφορούντων φαρμάκων.

#### ■ Φαρμακογενωμική και διαλεύκανση του μηχανισμού δράσης γνωστών φαρμάκων

Βασικό στοιχείο ενός φαρμάκου αποτελεί ο προσδιορισμός του ακριβούς μηχανισμού δράσης του. Για να συσχετιστούν κυτταρικοί φαινότυποι με μοριακούς μηχανισμούς απαιτείται μία μέθοδος που θα μπορεί να συγκρίνει ταυτόχρονα βιοχημικά και μοριακά δεδομένα. Μία τέτοια μέθοδος είναι η συλλογή στελεχών(-/-) ζυμομυκήτων (collection of yeast deletion strains). Ο ζυμομύκητας χρησιμοποιήθηκε ως μοντέλο εξ' αιτίας του εύκολου γενετικού χειρισμού του και της μεγάλης ομολογίας που παρουσιάζουν τα γονίδια του με αυτά του ανθρώπου.

Η μέθοδος αυτή δημιουργεί στελέχη σακχαρομύκητα, από τα οποία αφαιρείται κάθε φορά ένα διαφορετικό γονίδιο (6000 γονίδια σύνολο). Το γονίδιο αυτό αντικαθίσταται με μία γνωστή αλληλουχία ονόματι «αναπληρωματική κασέτα» (replacement cassette), η οποία περιέχει στα άκρα της δύο αλληλουχίες TAG (αλληλουχίες που αποτελούνται από επαναλαμβανόμενες T), που μας βοηθούν να επιβεβαιώσουμε ότι η κασέτα εισήχθη στη



σωστή θέση μέσα στο γονιδίωμα. Ανάμεσα στις δυο TAG αλληλουχίες υπάρχει μία γνωστή αλληλουχία είκοσι νουκλεοτιδίων (barcode), μοναδική για κάθε γονίδιο που αντικαθιστάται.



**Εικόνα 5.14** Σχηματική απεικόνιση της αναπληρωματικής κασέτας. Περιέχει το ολιγονουκλεοτίδιο-barcode και τις δυο TAG περιοχές.

Αυτή η μέθοδος χρησιμοποιήθηκε για να αναγνωριστούν τα γονίδια τα οποία είναι ευαίσθητα σε διάφορα φάρμακα. Τα πειράματα χωρίστηκαν σε δύο κατηγορίες:

- Όταν οι παράγοντες που εξετάζονται έχουν γνωστό στόχο, το DNA. Πολλά αντικαρκινικά φάρμακα στοχεύουν στο DNA. Η κατανόηση των μοριακών αλλαγών που αυξάνουν την ευαισθησία σε χημειοθεραπευτικούς παράγοντες θα βοηθήσει στην ανάπτυξη νέων θεραπειών και στον καθορισμό συγκεκριμένης θεραπείας για συγκεκριμένους καρκίνους.
- Όταν οι παράγοντες που εξετάζονται έχουν ένα σηματοδοτικό μονοπάτι που δεν έχει διαλευκανθεί πλήρως.

### Διαλογή (screening) φαρμάκων που έχουν στόχο το DNA

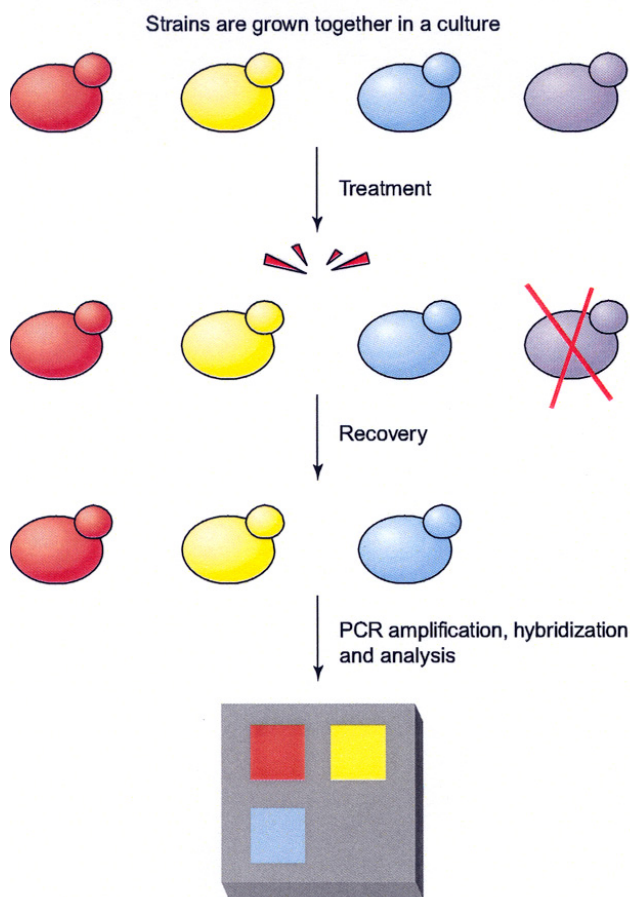
Η μεθοτρεξάτη είναι ένα αντικαρκινικό φάρμακο, το οποίο αναστέλλει το ένζυμο διυδροφολλική αναγωγή που μετατρέπει το φολλικό οξύ σε τετραϋδροφολλικό, απαραίτητο για τη δημιουργία πουρινών και πυριμιδινών, που είναι με τη σειρά τους απαραίτητα για τη σύνθεση του DNA, στα ταχέως διαιρούμενα καρκινικά κύτταρα. Η δράση όμως της μεθοτρεξάτης δεν περιορίζεται μόνο στα κακοήθη κύτταρα. Τα αρχέγονα κύτταρα στο μυελό των οστών, τα επιθηλιακά κύτταρα του εντερικού δικτύου και του θύλακα των τριχών είναι επίσης ευαίσθητα στη δράση του φαρμάκου.

Συνεπώς, η κατανόηση των μοριακών αλλαγών που αυξάνουν την ευαισθησία των καρκινικών κυττάρων στη μεθοτρεξάτη θα βοηθήσει στην εφαρμογή νέων θεραπειών, πιθανότατα χωρίς παρενέργειες. Ένα βήμα προσέγγισης είναι το παρακάτω πείραμα: Εξετάστηκαν ομόζυγα deletion strains. Αφαιρούνταν κάθε φορά και τα δύο αλληλόμορφα ώστε να αποκλειστεί κάθε περίπτωση έκφρασης του γονιδίου, χωρίς να αντικατασταθούν με κασέτες γιατί το κάθε στέλεχος ζύμης ήταν καθηλωμένο σε ειδικές πλάκες αγαρόζης και το μελετούσαν μεμονωμένα. Κάθε πλάκα είχε 96 θέσεις στις οποίες τοποθετούνταν από ένα στέλεχος. Τα στελέχη εκτέθηκαν στην μεθοτρεξάτη και στη συνέχεια, σε όποια θέση δεν παρατηρούσαν αποικία καταλάβαιναν ότι το γονίδιο αυτό που έλειπε από το συγκεκριμένο στέλεχος προσέδιδε ανθεκτικότητα στη μεθοτρεξάτη. Η παρατήρηση γινόταν οπτικά. Αποτελέσματα αυτού του πειράματος ήταν η ταυτοποίηση 130 γονιδίων που προσέδιδαν ανθεκτικότητα. Σημαντικό είναι ότι 107 από αυτά δεν ήταν μέχρι τότε γνωστά γι' αυτήν τους τη λειτουργία. Από αυτά τα πειράματα αποκαλύφθηκαν γονίδια που ήταν ήδη γνωστό ότι συμμετείχαν σ' αυτές τις λειτουργίες αλλά και άλλα που μέχρι τότε τα θεωρούσαν άσχετα.

Άλλες ερευνητικές ομάδες, ακολούθησαν παρόμοιο πρωτόκολλο κάνοντας παράλληλη σύγκριση ομόλογων deletion strains. Όλα τα στελέχη αναπτύχθηκαν σε μία, κοινή καλλιέργεια σε περίπου ίδια συγκέντρωση. Κάθε στέλεχος είχε ενσωματωμένο διαφορετικό barcode, μέσω του οποίου θα αναγνωρίζονταν. Η καλλιέργεια εκτέθηκε σε μεθοτρεξάτη και αυτά που ήταν ευαίσθητα πέθαναν. Οι ερευνητές άφησαν κάποιο χρόνο στα κύτταρα για να «ηρεμήσουν» πριν αρχίζουν την λήψη δειγμάτων ανά τακτά χρονικά διαστήματα κατά τη διάρκεια είκοσι γενεών. Μετά τη λήψη των δειγμάτων έκαναν PCR (χρησιμοποιώντας primers σημασμένους με φθορίζουσα ουσία) για ενίσχυση της αλληλουχίας των barcodes και τα υβριδοποίησαν με συμπληρωματικές αλληλουχίες, οι οποίες ήταν προσκολλημένες σε

συγκεκριμένες θέσεις πάνω σε μία πλάκα, ώστε να μπορέσουν να ποσοτικοποιήσουν τα αποτελέσματά τους. Στις θέσεις στις οποίες υπάρχει λίγος ή καθόλου φθορισμός τα αντίστοιχα στελέχη δεν έχουν επιζήσει μετά την έκθεση σε μεθοτρεξάτη. Απ' αυτά τα στελέχη δηλαδή λείπει κάποιο γονίδιο, το οποίο προσδίδει ανθεκτικότητα στη μεθοτρεξάτη.

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων αυτών, αν και είχαν παρόμοιο πρωτόκολλο, δεν έδωσαν τα ίδια ακριβώς αποτελέσματα, δηλαδή όλα τα γονίδια που βρήκε η μία ομάδα δεν τα βρήκε και η άλλη. Είχαν μια αλληλοεπικάλυψη μόνο 35%.

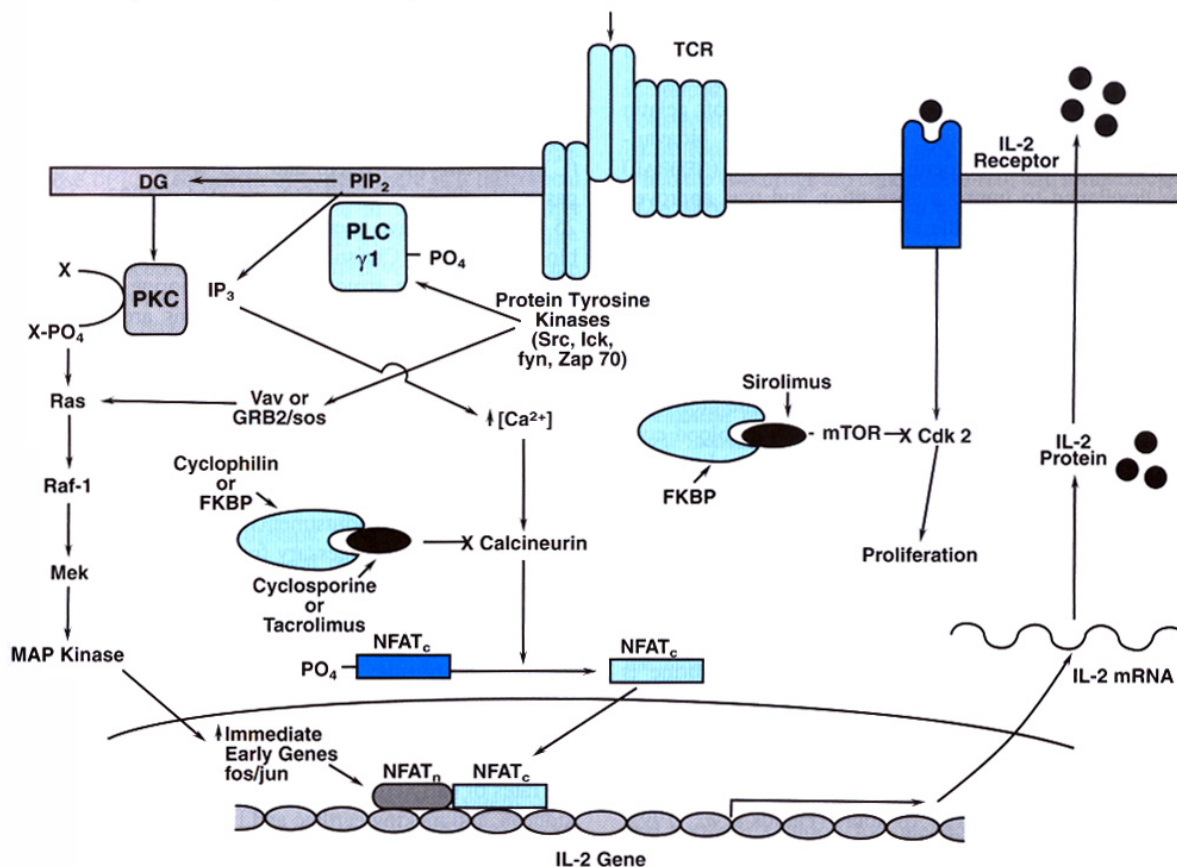


**Εικόνα 5.15** Αναγνώριση των γονιδίων που απαιτούνται για την επιβίωση του ζυμομύκητα μετά την επίδραση της μεθοτρεξάτης. Τα στελέχη<sup>(-/-)</sup> της ζύμης καλλιεργούνται μαζί σε μια πλάκα, και στη συνέχεια επωάζονται με μεθοτρεξάτη. Τα στελέχη που επιβίωσαν πολλαπλασιάζονται με PCR και το κάθε γονίδιο αναγνωρίζεται από το διαφορετικού χρώματος barcode.

### Διαλογή φαρμάκων ή παραγόντων των οποίων ο μηχανισμός δράσης δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως

Στη δεύτερη κατηγορία πειραμάτων, οι ερευνητές είχαν να ασχοληθούν με κάτι πιο δύσκολο, αφού το να χαρακτηρίσει κανείς ουσίες για τις οποίες δεν είναι γνωστός ο πλήρης μηχανισμός δράσης ή ο στόχος, είναι πολύ μεγαλύτερη πρόκληση.

Στο πρώτο πείραμα, εξετάστηκαν οι επιδράσεις της **ραπαμυκίνης** (rapamycin ή sirolimus) με τη μέθοδο yeast deletion collection. Σε αυτή τη περίπτωση, αν και ο στόχος είναι γνωστός, δεν είναι πολύ κατανοητά τα καθοδικά (downstream) σηματοδοτικά του μονοπάτια. Η **ραπαμυκίνη** είναι ένα ανοσοκατασταλτικό αντιβιοτικό. Προϋπόθεση για την ανοσοκατασταλτική της δράση είναι να συνδεθεί με μία κυτταροπλασματική πρωτεΐνη, την ανοσοφιλίνη FKBP12. Το σύμπλεγμα ραπαμυκίνη-FKBP12 αδρανοποιεί τις πρωτεϊνικές κινάσες Tor1p και Tor2p στον σακχαρομύκητα και τις ομόλογες στον άνθρωπο FRAP/RAFT/mTOR, οι οποίες μεσολαβούν στη μεταβίβαση του μηνύματος της ιντερλευκίνης (IL-2) στα T-λεμφοκύτταρα, επάγοντας τον πολλαπλασιασμό των T-λεμφοκυττάρων. Η αναστολή της δράσης των κινασών Tor/FRAP αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των T λεμφοκυττάρων.



**Εικόνα 5.16** Μονοπάτι δράσης της ραπαμυκίνης (Sirolimus). Σταματάει τον πολλαπλασιασμό (proliferation) των Τ-λεμφοκυττάρων. Από *Goodman & Gilman's Pharmacological Basis of Therapeutics, McGraw-Hill, 2001*.

Αποτέλεσμα του πειράματος ήταν να βρεθούν γονίδια, τα οποία προσδίδουν αντοχή ή ευαισθησία στη ραπαμυκίνη, ενώ μέχρι τότε ήταν γνωστές διαφορετικές λειτουργίες τους (π.χ. πρωτεϊνική σύνθεση, μεταβολική σύνθεση, ουβικουτινίωση ή μεταγραφή). Άρα υπέθεσαν ότι ο Tor εμπλέκεται στα μονοπάτια με τα οποία σχετίζονται αυτά τα γονίδια.

Στο δεύτερο πείραμα, εξετάστηκε η δράση του φυσικού προϊόντος **γουοτμαννίνη** (wortmannin), ένα μικρομοριακό φυσικό προϊόν που παράγεται από τον μύκητα *Talaromyces wortmanni*. Χρησιμοποιείται κλινικά σαν ανοσοκαταστολέας και αντι-φλεγμονώδης παράγοντας. Η φυσιολογική της λειτουργία είναι να αναστέλλει την κινάση PIK (PI kinase), που μετατρέπει τη φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη (PI) σε 4,5 διφωσφορική φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη (PIP<sub>2</sub>), η οποία στη συνέχεια μετατρέπεται είτε σε διακυλογλυκερόλη (η οποία ενεργοποιεί την PKC), είτε σε τριφωσφορική φωσφατιδυλο-ινοσιτόλη (η οποία είναι υπεύθυνη για την έξοδο ασβεστίου από το ΕΔ). Η ανοσοκατασταλτική δράση της γουορτμαννίνης οφείλεται στο ότι δεν επιτρέπει την ενεργοποίηση της PKC, η οποία φωσφορυλιώνει αρκετές μεμβρανικές πρωτεΐνες των Τ-λεμφοκυττάρων, οδηγώντας σε επαγωγή μεταγραφικών παραγόντων και επακόλουθη έκφραση ειδικών γονιδίων. Έτσι σύντομα μετά τη σύνδεση των Τ-λεμφοκυττάρων με το αντιγόνο, εκφράζεται ένας αριθμός μορίων επιφανείας καθώς και υποδοχείς κυτταροκινών, όπως η ιντερλευκίνη 2. Η αλληλεπίδραση με αυτές τις κυτταροκίνες έχει ως αποτέλεσμα τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των λεμφοκυττάρων. Επίσης πιθανολογείται ότι η ανοσοκατασταλτική δράση οφείλεται και στη ρύθμιση της έκκρισης ασβεστίου (από την IP<sub>3</sub>), καθώς αύξηση του ενδοκυττάρου, ελεύθερου ασβεστίου προκαλεί

αναστολή της μεταγραφικής ενεργότητας των κυτταροκινών και άλλων γονιδίων, που παίζουν ουσιαστικό ρόλο στον πολλαπλασιασμό και τη λειτουργία των T-λεμφοκυττάρων.

Αποτέλεσμα του πειράματος ήταν να βρεθούν γονίδια που προσδίδουν ανθεκτικότητα ή ευαισθησία στην γουορτμαννίνη, τα οποία ήταν γνωστό ότι συμμετείχαν στην αντιγραφή και επιδιόρθωση του DNA. Το γεγονός όμως ότι βρέθηκαν περίπου 1000 γονίδια να εμπλέκονται στην κυτταρική απάντηση της γουορτμαννίνης θεωρείται μάλλον αφύσικο, και συνεπώς οφείλουμε να προσδιορίσουμε τη σημασία του προϊόντος του κάθε γονιδίου.

Τα παραπάνω πειράματα έγιναν τον Σεπτέμβριο του 2003. Αποτελούν τα πρώτα βήματα στην έρευνα για ένα πρωτόκολλο με το οποίο γρήγορα και σίγουρα να ελέγχεται η δράση ενός φαρμάκου σε πολλά γονίδια ταυτόχρονα (6000 γονίδια στη ζύμη) (high-throughput screening). Θα υπάρχει έτσι κέρδος σε χρόνο και χρήματα για πιο αποτελεσματική και χρήσιμη έρευνα.

Βρίσκοντας τα γονίδια που προσδίδουν ανθεκτικότητα σε ένα φαρμακευτικό παράγοντα και ενεργοποιώντας ή απενεργοποιώντας τα, ανάλογα με την περίπτωση, μπορούν να παρασκευαστούν φάρμακα ή να συνδυαστούν στην κατάλληλη θεραπεία, ώστε να δρουν σε συγκεκριμένα κύτταρα. Θα μειωθούν, ουσιαστικά, οι παρενέργειες. Για να γίνει αυτό πιο κατανοητό θα φέρουμε σαν παράδειγμα αυτό με την μεθοτρεξάτη που αναφέρθηκε στην αρχή. Αν βρεθούν τα γονίδια που προσδίδουν ευαισθησία στη μεθοτρεξάτη θα τα απενεργοποιήσουμε από τα επιθηλιακά κύτταρα του θύλακα των τριχών κι έτσι δεν θα τα επηρεάζει η δράση της μεθοτρεξάτης. Μ' αυτόν τον τρόπο, η μεθοτρεξάτη θα δρα μόνο στα καρκινικά κύτταρα χωρίς να εμφανίζεται η παρενέργεια της τριχόπτωσης σε όποιον ασθενή χορηγείται θεραπεία με μεθοτρεξάτη.

#### ■ Γενετικά τροποποιημένα ζώα για φαρμακογενωμική έρευνα

Η χρήση πειραματοζώων στα οποία έχουμε εισάγει ανθρώπινους πολυμορφισμούς εμφανίζει πλεονεκτήματα έναντι των κλινικών ελέγχων σε ανθρώπους.

Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η υπερέκφραση των δυο ανθρώπινων αλληλόμορφων του **β<sub>1</sub>-αδρενοϋποδοχέα** σε ποντίκι. Αυτός ο υποδοχέας εκφράζεται σε καρδιομυοκύτταρα, και είναι ο κύριος υποδοχέας μέσω του οποίου οι κατεχολαμίνες, αδρεναλίνη και νοραδρεναλίνη, διεγείρουν την καρδιακή σύσπαση. Αγωνιστές όπως η δοβουταμίνη χρησιμοποιούνται για την αύξηση του καρδιακού ρυθμού σε περιπτώσεις συμφοριτικής ανεπάρκειας. Παραδόξως, οι β-ανταγωνιστές χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία της χρόνιας συμφοριτικής ανεπάρκειας. Αυτή η προσέγγιση βασίζεται στο γεγονός ότι κατά τη συμφοριτική ανεπάρκεια παρατηρείται αύξηση των κατεχολαμινών, οι οποίες οδηγούν σε παρατεταμένη ενεργοποίηση των β<sub>1</sub> υποδοχέων και κατά συνέπεια διέγερση της καρδιάς με μειωμένη μεταβολική και φυσιολογική ικανότητα.

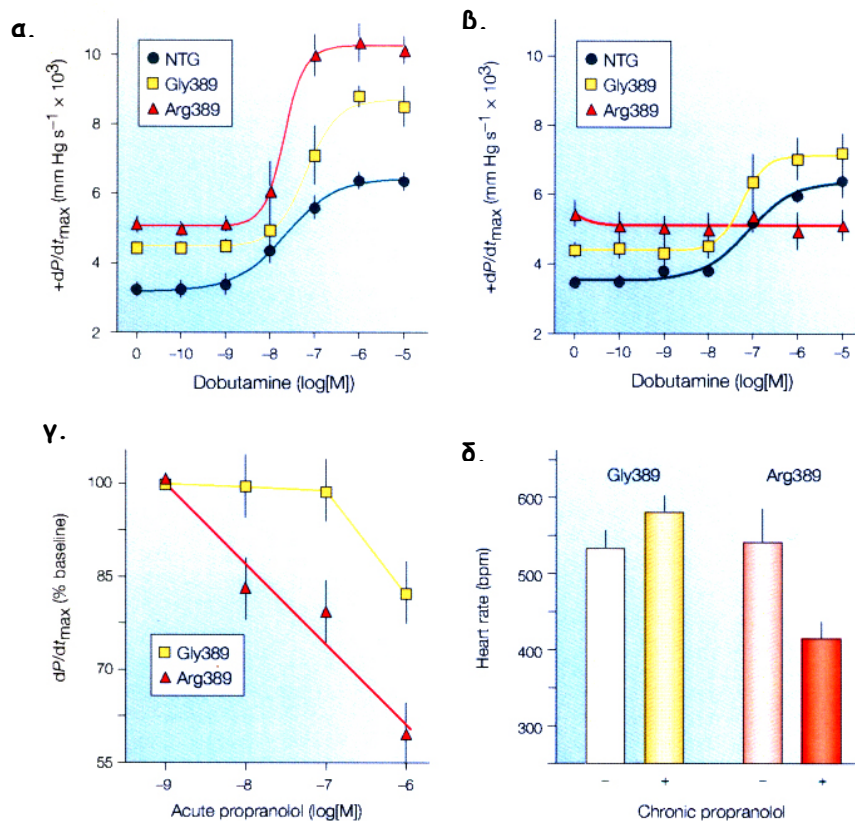
Ωστόσο, υπάρχει ένας μεγάλος βαθμός ποικιλομορφίας στην απάντηση των β-αναστολέων μέσα στον πληθυσμό. Πολυμορφισμός του γονιδίου του β<sub>1</sub>AR έχει σαν αποτέλεσμα την ύπαρξη δυο αλληλομόρφων Arg389β<sub>1</sub>AR και Gly389β<sub>1</sub>AR. Αυτό το γονίδιο αναγνωρίστηκε ως πιθανός παράγοντας υπεύθυνος για την ποικιλομορφία απαντήσεων στους β-αδρενεργικούς ανταγωνιστές. Μελέτες με διαμολυσμένα κύτταρα έδειξαν ότι ο Arg389β<sub>1</sub>AR παρουσίαζε αυξημένη σύνδεση με την πρωτεΐνη Gs και συνεπώς σε αυξημένη ενεργοποίηση της αδενυλοκυκλάσης σε σχέση με τον Gly υποδοχέα.

Για να μελετηθεί το εξειδικευμένο αποτέλεσμα του κάθε αλληλόμορφου στον κίνδυνο δημιουργία συμφορητικής καρδιακής ανεπάρκειας και στην απάντηση σε β<sub>1</sub> αγωνιστές ή ανταγωνιστές, οι δυο υποδοχείς Arg389β<sub>1</sub>AR και Gly389β<sub>1</sub>AR, υπερεκφράστηκαν διαγονιδιακά σε καρδιά ποντικού χρησιμοποιώντας τον προαγωγέα της βαριάς αλυσίδας της μυοσίνης. Τα αποτελέσματα ήταν πολύ ενδιαφέροντα:



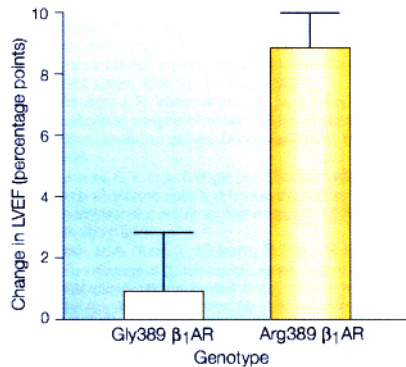
- Τα νεαρά (3 μηνών) Arg389β<sub>1</sub>AR ποντίκια είχαν μεγαλύτερη βασική αλλά και μετά από διέγερση με αγωνιστή, συσταλτικότητα, σε σύγκριση με τα Gly389β<sub>1</sub>AR ποντίκια, γεγονός που επιβεβαιώνει τη σημασία αυτού του πολυμορφισμού στην απάντηση του φαρμάκου (Εικόνα 5.15α).
- Παραδόξως, τα Arg389β<sub>1</sub>AR ποντίκια 6 μηνών, δεν εμφάνιζαν καμία απάντηση σύσπασης στον αγωνιστή (Εικόνα 5.15β). Επιπλέον μελέτες σε επίπεδο ιστού έδειξαν ότι με τον καιρό ο Arg389β<sub>1</sub>AR εμφάνιζε το φαινόμενο της προσαρμογής.
- Όταν στα νεαρά (3 μηνών) ποντίκια χορηγούσαν ενδοφλέβια β-αναστολείς, οι συσπάσεις της καρδιάς μειώνονταν γραμμικά στα Arg389β<sub>1</sub>AR ποντίκια, ενώ τα Gly389β<sub>1</sub>AR ποντίκια δεν απαντούσαν ακόμη και σε υψηλότερες δόσεις (Εικόνα 5.15γ).
- Όταν στα νεαρά (3 μηνών) ποντίκια χορηγούσαν από το στόμα β-αναστολείς (προπρανολόλη), ο καρδιακός ρυθμός ελαττώθηκε μετά από 5 εβδομάδες μόνο στα Arg389β<sub>1</sub>AR ποντίκια, ενώ στα Gly389β<sub>1</sub>AR ποντίκια δεν είχε καμία επίδραση (Εικόνα 5.15δ).

Σαν συμπέρασμα θα μπορούσαμε να πούμε ότι το αλληλόμορφο Arg389β<sub>1</sub>AR δίνει μια θετική απάντηση στα β-αδρενεργικά φάρμακα σε αντίθεση με το Gly389β<sub>1</sub>AR.



**Εικόνα 5.17** Πολυμορφισμός του β<sub>1</sub> αδρενεργικού υποδοχέα (Arg389β<sub>1</sub>AR και Gly389β<sub>1</sub>AR): η επίδρασή του στο κίνδυνο δημιουργίας συμφορητικής καρδιακής ανεπάρκειας και στην απάντηση σε β-αγωνιστές ή ανταγωνιστές. **α.** Σε νεαρά (3 μηνών) Arg389β<sub>1</sub>AR ποντίκια η σύσπαση της καρδιάς εμφανίζεται αυξημένη μετά από διέγερση με τον β-αγωνιστή δοβουταμίνη, σε σχέση με τα Gly389β<sub>1</sub>AR ποντίκια. **β.** Σε 6 μηνών Arg389β<sub>1</sub>AR ποντίκια η καρδιά δεν απαντά στη δοβουταμίνη. **γ.** Ενδοφλέβια χορήγηση προπρανολόλης σε 3 μηνών Arg389β<sub>1</sub>AR ποντίκια ελαττώνει γραμμικά τις συσπάσεις της καρδιάς. **δ.** Χρόνια από το στόμα χορήγηση προπρανολόλης σε 4 μηνών Arg389β<sub>1</sub>AR ποντίκια ελαττώνει τις συσπάσεις της καρδιάς, μετά από ένα μήνα, ενώ δεν έχει καμιά δράση σε ποντίκια Gly389β<sub>1</sub>AR. Από Ligget S.B., *Genetically modified mouse models for pharmacogenomic research*, *Nature Reviews Genetics* 5, 657-663, 2004.

Στη συνέχεια, έρευνες με ασθενείς ομόζυγους ως προς το γενότυπο Arg389β<sub>1</sub>AR ή Gly389β<sub>1</sub>AR, που εμφάνιζαν καρδιακή ανεπάρκεια επιβεβαίωσαν τα πειράματα στα διαγονιδιακά ποντίκια. Δηλαδή, χορήγηση ενός β-αναστολέα είχε θετικά αποτελέσματα στους Arg389β<sub>1</sub>AR ασθενείς, ενώ δεν είχε καμία δράση στους ασθενείς Gly389β<sub>1</sub>AR.

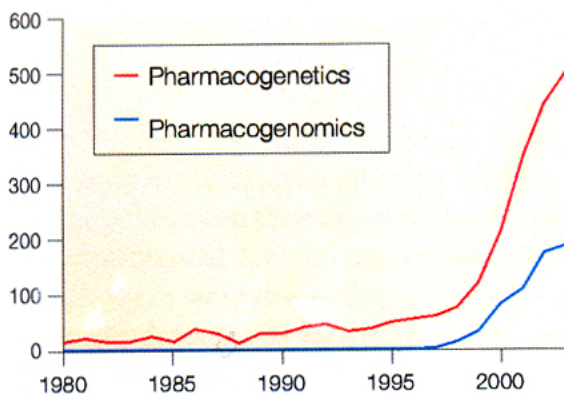


**Εικόνα 5.18** Η επίδραση του πολυμορφισμού του β<sub>1</sub> αδρενεργικού υποδοχέα (Arg389β<sub>1</sub>AR και Gly389β<sub>1</sub>AR) στις απαντήσεις ασθενών σε β-αναστολείς. Σε άτομα ομόζυγα ως προς τους Arg389β<sub>1</sub>AR και Gly389β<sub>1</sub>AR, που είναι ασθενείς με καρδιακή ανεπάρκεια χορηγήθηκε καρβεδιλόλη (β-αναστολέας): στα ομόζυγα Gly389β<sub>1</sub>AR άτομα δεν παρατηρήθηκε καμιά βελτίωση, ενώ στα ομόζυγα Arg389β<sub>1</sub>AR παρατηρήθηκε αισθητή βελτίωση.

Από Liggett S.B., *Genetically modified mouse models for pharmacogenomic research*, *Nature Reviews Genetics* 5, 657-663, 2004.

#### ■ 50 χρόνια Φαρμακογενωμική: πώς η γενετική ποικιλομορφία εφαρμόζεται στην κλινική θεραπεία

Είδαμε πώς οι πρόσφατες ανακαλύψεις στον τομέα της γενωμικής και οι συναφείς τεχνολογικές καινοτομίες έδωσαν μια ώθηση στον τομέα της φαρμακογενωμικής. Αυτό φαίνεται και από τον αριθμό των δημοσιεύσεων που περιέχουν τις λέξεις φαρμακογενετική και φαρμακογενωμική.



**Εικόνα 5.19** Παρουσία του όρου φαρμακογενετική και φαρμακογενωμική σε άρθρα που εμφανίζονται στο PUBMED (National Library of Medicine). Πρώτος ο Vogel χρησιμοποίησε τον όρο φαρμακογενετική το 1959, ενώ ο όρος φαρμακογενωμική εμφανίστηκε το 1998. Από τότε μόλις τα τελευταία 5 χρόνια έχουμε μια ραγδαία αύξηση της χρήσης των όρων. Από Meyer U.S., *Pharmacogenetics - five decades of therapeutic lessons from genetic diversity*, *Nature Reviews Genetics* 5, 669-676 (2004).

**Ο βασικός σκοπός της φαρμακογενωμικής** είναι ο περιορισμός της ποικιλομορφίας στην απόκριση των ασθενών στις θεραπείες λόγω του δομικού πολυμορφισμού των γονιδίων και η παραγωγή ασφαλών και αποτελεσματικών φαρμάκων, προσαρμοσμένα σε γενετικά προσδιορισμένους υποπληθυσμούς, με σαφείς ενδείξεις και αντενδείξεις. Η «εξατομικευμένη ιατρική» είναι ένας από τους στόχους της μοντέρνας φαρμακοθεραπείας. Για το σκοπό αυτό τα στάδια έρευνας της φαρμακογενωμικής είναι:

- 1) Η αναγνώριση του μηχανισμού δράσης του φαρμάκου.
- 2) Η αναγνώριση των πρωτεϊνών που εμπλέκονται στον μηχανισμό δράσης του φαρμάκου.

- 3) Η αναγνώριση των υποψήφιων γονιδίων, που κωδικοποιούν για τις πρωτεΐνες στόχους του φαρμάκου.
- 4) Η αναγνώριση των αλληλομόρφων γονιδίων.
- 5) Η κλινική μελέτη της σχέσης μεταξύ των γονιδιακών αλληλομόρφων και της απόκρισης στο φάρμακο.
- 6) Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων της παραπάνω κλινικής μελέτης.
- 7) Η κλινική εφαρμογή του φαρμάκου σε ομάδες ατόμων με συγκεκριμένο γενότυπο η κάθε ομάδα.

Η φαρμακογενωμική είναι ένα νέο επαναστατικό κεφάλαιο στην ιστορία της φαρμακολογίας. Θα αντικαταστήσει την έννοια απόκρισης/μη απόκριση στα φάρμακα με την έννοια της ιδιοσυγκρασίας. Σε μερικά χρόνια, τα φάρμακα θα πουλιούνται με ένα kit δοκιμής ή με μια επικυρωμένη μέθοδο για τη μέτρηση της συγκέντρωσης στο αίμα και μια ατομική ποσοτική ανάλυση. Ο κύριος περιορισμός στην εφαρμογή των φαρμακογενωμικών τεχνικών είναι καθαρά θεωρητικός και προέρχεται από το γεγονός ότι η παρούσα γνώση για το συσχετισμό γενοτύπου-φαινοτύπου βασίζεται σε στατιστικές παρατηρήσεις όχι πλήρως επαληθεύσιμες σε ατομικό επίπεδο.

Το 1892, ο Sir William Osler είπε

*« Εάν δεν υπήρχε τόσο μεγάλη ποικιλομορφία ανάμεσα στα άτομα, η εξάσκηση της ιατρικής θα μπορούσε να είναι μια επιστήμη και όχι μια τέχνη».*

Η ανάπτυξη και η εφαρμογή της φαρμακογενωμικής, η οποία θα οδηγήσει σε αποτελεσματικότερες θεραπείες προσαρμοσμένες στις εξειδικευμένες ανάγκες πληθυσμιακών ομάδων πιθανώς να συντελέσει προς αυτή την κατεύθυνση. Ένα τελευταίο παράδειγμα της δύναμης της φαρμακογενωμικής στην ανάπτυξη νέων φαρμάκων αφορά ένα νέο αντικαρκινικό φάρμακο, το gefitinib, έναν αναστολέα του υποδοχέα αυξητικού παράγοντα EGF. Στη φάση προέγκρισης του φαρμάκου, μόνο το 10% των ασθενών με αδενοκαρκίνωμα είχαν μια θετική απάντηση στο φάρμακο. Στη συνέχεια, οι κλινικές έρευνες έδειξαν ότι το φάρμακο αυτό δρα εξαιρετικά γρήγορα και με εντυπωσιακή αποτελεσματικότητα σε ορισμένους ασθενείς. Επιπλέον, έχουν σημειωθεί πολύ σημαντικότεροι ρυθμοί απάντησης στους Γιαπωνέζους. Χάρη στη φαρμακογενωμική έχουμε μια πιθανή εξήγηση στο γεγονός αυτό: όλα τα άτομα που απαντούσαν θετικά στο gefitinib, είχαν μια μετάλλαξη στον υποδοχέα του EGF, ενώ οι υπόλοιποι όχι. Με διαλογή αυτών των μεταλλάξεων σε ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα θα μπορούσαν εκ των προτέρων να αναγνωριστούν τα άτομα που θα απαντούσαν θετικά και να επιλεγεί η κατάλληλη θεραπευτική αγωγή τους.



## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Barrett C.J., and Kawasaki E.S., Microarrays: the use of oligonucleotides and cDNA for the analysis of gene expression, *Drug Discovery Today*, 8: 134-143 (2003)
- Birrell, G.W. et al, A genome-wide screen in *Saccharomyces cerevisiae* for genes affecting UV radiation sensitivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98: 12608-12613 (2001)
- Birrell, G.W. et al., Transcriptional response of *Saccharomyces cerevisiae* to DNA-damaging agents does not identify the genes that protect against these agents. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99: 8778-8783(2002)

- Chan, T.F. et al, A chemical genomics approach toward understanding the global functions of the target of rapamycin protein (TOR). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97: 13227-13232 (2000)
- Chanda S.K., and Caldwell J.S., Fulfilling the promise: drug discovery in the post-genomic era, *Drug Discovery Today*, 8: 168-176 (2003)
- Dudda-Subramanya R., Lucchese G., Kanduc D., and Sindha A.A., Clinical applications of DNA microarray analysis, *J. Exper. Therap. Oncology*, 3: 297-304 (2003)
- Eschrich S., and Yeatman T.J., DNA microarrays and data analysis: An overview, *Surgery*, 136: 501-505 (2004)
- Evans WE., and Relling M, Moving towards individualized medicine with pharmacogenomics, *Nature* 429, 464-468 (2004)
- Franklin W.A., and Carbone D.P., Molecular staging and pharmacogenomics. Clinical implications: from lab to patients and back, *Lung Cancer*, 41: S147-S154 (2003)
- Gerhold D., Rushmore T., and Caskey C.T., DNA chips: promising toys have become powerful tools, *TiBS* 24: 168-175 (1999)
- Geschwind D.H., DNA microarrays: translation of the genome from laboratory to clinic, *The Lancet Neurology*, 2: 275-82 (2003)
- Giaever, G. et al., Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Nature* 418: 387-391(2002)
- Goldstein DB, Tate S, Sisodiya S., Pharmacogenetics goes genomic, *Nature Reviews Genetics* 4, 937-947 (2003)
- Hanway, D. et al., Previously uncharacterized genes in the UV- and MMS-induced DNA damage response in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99: 10605-10610 (2002)
- Howbrook D.N., van der Valk A.M., O'Shaughnessy M.C., Sarker D.K., Baker S.C., and Lloyd A.W., Developments in microarray technologies, *Drug Discovery Today*, 8: 642-653 (2003)
- Huels C., Muellner S., Meyer H.E., and Cahill D.J., The impact of protein biochips and microarrays on the drug development process, *Drug Discovery Today*, 7: S119-S126 (2002)
- Lesch K.P., and Gutknecht L., Pharmacogenetics of the serotonin transporter, *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 29: 1062-1073 (2005)
- Lesko LJ., and Woodcock J., Translation of pharmacogenomics and Pharmacogenetics: a regulatory perspective, *Nature Reviews Drug discovery* 3, 763-769 (2004)
- Leung Y.F., and Cavalieri D., Fundamentals of cDNA microarray data analysis, *Trends in Genetics*, 19: 649-659 (2003)
- Lichtermann D., Franke P., Maier W., and Rao ML., Pharmacogenomics and addiction to opiates, *Eur. J. Pharmacol.*, 410:269-279 (2000)
- Liggett S.B., Genetically modified mouse models for pharmacogenomic research, *Nature Reviews Genetics* 5, 657-663 (2004)
- Lipshutz R.J., Fodor S.A., Gingeras T.R., and Lockhart D.J., High density synthetic oligonucleotide arrays, *Nature Genetics*, 21: 20-24 (1999)
- Marcotte E.R, Srivastava L.K., and Quirion R., cDNA microarray and proteomic approaches in the study of brain diseases: focus on schizophrenia and Alzheimer's disease, *Pharmacology & Therapeutic*, 100: 63 – 74 (2003)
- Meyer U.S., Pharmacogenetics – five decades of therapeutic lessons from genetic diversity, *Nature Reviews Genetics* 5, 669-676 (2004)
- Moreau Y., Aerts S., De Moor B., De Strooper B., and Dabrowski M., Comparison and meta-analysis of microarray data: from the bench to the computer desk, *Trends in Genetics*, 19: 570-578 (2003)



- Paez-Pereda M., New targets in the signaling pathways activated by antidepressants, *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 29: 1010-1016 (2005)
- Sadée W. and Dai Z., Pharmacogenetics/pharmacogenomics and personalized medicine, *Human Molecular Genetics*, 14: R207-R214 (2005)
- Schena M., Shalon D., Davis RW., and Brown PO., Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray, *Science*, 270:467-470 (1995)
- Shaw K.J., and Morrow B.J., Transcriptional profiling and drug discovery, *Current Opinion in Pharmacology* 3:508–512 (2003)
- Suarez-Kurtz G., Pharmacogenomics in admixed populations, *Trends in Pharmacological Sciences*, 26: 196-201 (2005)
- Templin M.F., Stoll D., Schrenk M., Traub P.C., Vöhringer C.F, and Joos T.O., Protein microarray technology, *Drug Discovery Today* 7: 815-824 (2002)
- Tribut O., Lessard Y., Reymann J-M., Allain H. and Bentué-Ferrer D., Pharmacogenomics, *Med. Sci. Monit.*, 8: RA152-163 (2002)
- Veenstra-VanderWeele J. Anderson G.M, and Cook Jr E.H, Pharmacogenetics and the serotonin system: initial studies and future directions, *Eur. J. Pharmacol.*, 410: 165-181 (2000)
- Weinshilboum R, and Wang L., Pharmacogenomics: Bench to bedside, *Nature Reviews Drug Discovery* 3, 739-748 (2004)
- Whittaker P.A., What is the relevance of bioinformatics to pharmacology?, *Trends in Pharmacological Sciences*, 24, (2003)
- Williams M., Target validation, *Current Opinion in Pharmacology*, 3:571–577 (2003)
- Winzeler, E.A et al., Functional characterization of the *S. cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis. *Science* 285: 901-906 (1999)
- Yamada M., Yamada M., Higuchi T., Antidepressant-elicited changes in gene expression. Remodeling of neuronal circuits as a new hypothesis of drug efficacy, *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 29: 999-1009 (2005)
- Zewail, A. et al., Novel functions of the phosphatidylinositol metabolic pathway discovered by a chemical genomics screen with wortmannin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100: 3345-3350 (2003)