



**ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΚΡΗΤΗΣ**  
**ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΦΑΡΜΟΓΩΝ**



**ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΤΗΣ ΣΠΟΥΔΑΣΤΡΙΑΣ ΜΟΣΧΟΒΗ ΑΝΑΣΤΑΣΙΑΣ**

**«ΜΕΛΕΤΗ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΛΟΓΙΣΜΙΚΟΥ  
ΓΙΑ ΣΥΣΚΕΥΕΣ MICROARRAYS ΣΤΗ  
ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ»**

**Εισηγητής:** Κορνάρος Γεώργιος



## **ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ**

<b>ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ.....</b>	<b>2</b>
<b>ΛΙΣΤΑ ΕΙΚΟΝΩΝ .....</b>	<b>4</b>
<b>ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....</b>	<b>6</b>
<b>ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....</b>	<b>7</b>
<b>ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟ ΤΗΣ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ .....</b>	<b>8</b>
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1Ο :ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΩΝ ΤΩΝ MICROARRAYS .....</b>	<b>9</b>
1.1 Τι είναι τα microarrays και πως δουλεύουν.....	9
1.2 Που χρησιμοποιούνται τα microarrays .....	13
1.3 Ποιοι είναι οι στόχοι των microarrays - προϋποθέσεις ανάπτυξής τους .....	15
1.4 Τα microarrays (DNA chips) και κατά πόσο συμβάλλουν στην εξέλιξη της ζωής μας .....	16
1.5 Τα microarrays στην αγορά .....	17
1.6 Εταιρίες των DNA chips και τα κόστη τους .....	18
1.7 Μεγέθη των DNA chips .....	18
1.8 Χωρητικότητα των DNA chips .....	19
1.9 Τα DNA chips στην Ελλάδα .....	19
<b>2. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΕΙΤΑΙ ΣΤΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΜΕ MICROARRAYS-ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ. ....</b>	<b>20</b>
2.1 Σύστημα.....	20
2.2 Διάγραμμα ακολουθίας των βημάτων ενός πειράματος με microarrays. .....	22
2.3 Περιγραφή του πειράματος.....	23
2.3.1 Ερμηνεία αποτελεσμάτων- Ερμηνεία εικόνας.....	26
<b>3. Η ΕΦΑΡΜΟΓΗ –SCREENSHOTS ΤΟΥ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΟΣ.....</b>	<b>29</b>
3.1 Αντικείμενο της εφαρμογής – Παρόμοια λογισμικά .....	29
3.2 Η Εφαρμογή.....	30
3.3 Screenshots του προγράμματος .....	32



3.3.1 Παρουσίαση κεντρικής φόρμας. ....	32
3.3.2 Παρουσίαση της φόρμας για την αλλαγή των γονιδίων .....	34
3.3.3 Παρουσίαση της φόρμας για την δημιουργία και καταχώρηση νέων γονιδίων .....	35
<b>4.ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ .....</b>	<b>36</b>
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α: ΚΩΔΙΚΑΣ ΚΕΝΤΡΙΚΗΣ ΦΟΡΜΑΣ .....	36
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β: ΚΩΔΙΚΑΣ ΤΗΣ ΦΟΡΜΑΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΛΛΑΓΗ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ .....	49
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Γ: ΚΩΔΙΚΑΣ ΤΗΣ ΦΟΡΜΑΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΝΕΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ .....	52
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....</b>	<b>54</b>



## **ΛΙΣΤΑ ΕΙΚΟΝΩΝ**

<b>Εικόνα 1:</b> Αρχική εικόνα (microarray) ==>Επεξεργασμένη εικόνα ==> Στατιστική Ανάλυση. ....	7
<b>Εικόνα 2:</b> Ένα DNA chip. ....	9
<b>Εικόνα 3:</b> Probes ενός DNA chip. ....	10
<b>Εικόνα 4:</b> Δίκλωνο μόριο DNA. ....	11
<b>Εικόνα 5:</b> Πως δουλεύουν τα DNA chips.....	12
<b>Εικόνα 6:</b> Δύο από τα DNA chips της <b>Affymetrix</b> . ....	17
<b>Εικόνα 7:</b> Το σύστημα της Affymetrix. ....	20
<b>Εικόνα 8:</b> Παράδειγμα ενός πειράματος με microarray.....	21
<b>Εικόνα 9:</b> Διάταξη συστατικών ενός microarray.....	23
<b>Εικόνα 10:</b> Αρχή πειράματος-Συλλογή δειγμάτων.....	23
<b>Εικόνα 11:</b> Διαδικασία Υβριδοποίησης. ....	24
<b>Εικόνα 12:</b> Σάρωση δεδομένων του microarray.....	25
<b>Εικόνα 13:</b> Αποτέλεσμα πειράματος ενός microarray. ....	26
<b>Εικόνα 14α:</b> Αποτέλεσμα της εικόνας πειραμάτων με microarray. ....	27
<b>Εικόνα 14β:</b> Αποτέλεσμα της εικόνας πειραμάτων με microarray. ....	28
<b>Εικόνα 15:</b> Κεντρική φόρμα της εφαρμογής. ....	32
<b>Εικόνα 16:</b> Φόρμα της αλλαγής των γονιδίων. ....	34
<b>Εικόνα 17:</b> Φόρμα της δημιουργίας και καταχώρησης νέων γονιδίων. ....	35



## **ΛΙΣΤΑ ΠΙΝΑΚΩΝ**

**Πίνακας 1:** Αποτελέσματα ενός πειράματος με microarray .....26



## **ΠΡΟΛΟΓΟΣ**

Η συγκεκριμένη πτυχιακή εργασία βασίστηκε στην ανάγκη που έχει δημιουργηθεί τα τελευταία χρόνια της αποκρυπτογράφησης του ανθρώπινου γονιδιώματος και της κατανόησης των θετικών συνεπειών της αποκρυπτογράφησης αυτής για την ανθρωπότητα. Σε αυτό το πεδίο σημαντικότερη συμβολή έχει η τεχνολογία των μικροσυστοιχιών (**microarrays**).

Θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον Εισηγητή μου, Κ. Κορνάρο Γεώργιο για τη βοήθεια που μου πρόσφερε και με οδήγησε στην ολοκλήρωση αυτής της πτυχιακής εργασίας.

Ακόμη θέλω να ευχαριστήσω όλους εκείνους που με βοήθησαν κατά τη φοίτηση μου στο Τεχνολογικό Ίδρυμα Κρήτης το οποίο με εξόπλισε με τις απαραίτητες γνώσεις, πολύτιμες για την είσοδο μου στον στίβο της εργασιακής μου θητείας.

Τέλος, εκφράζω τις ευχαριστίες μου στους γονείς μου, στους συγγενείς και φίλους που μου στάθηκαν όλα αυτά τα χρόνια κατά τη φοίτηση μου στη σχολή, στις όμορφες αλλά και στις δύσκολες στιγμές που έζησα εκεί.

**Μοσχόβη Αναστασία**

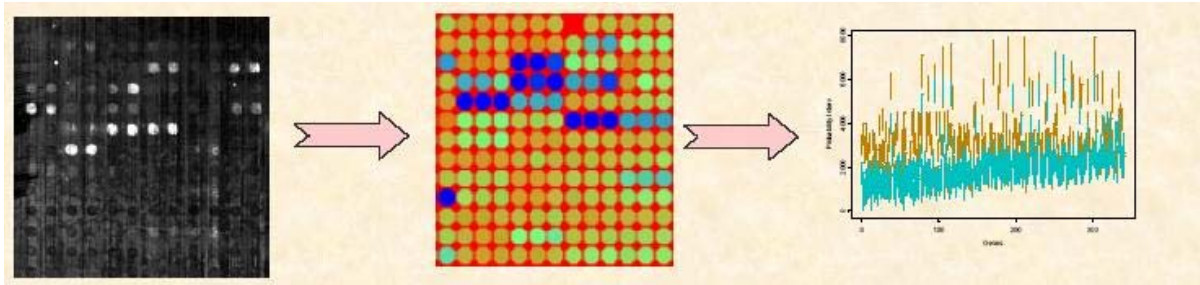
**Ηράκλειο Νοέμβριος 2007**



## **ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

Η ολοκλήρωση της καταγραφής του ανθρωπίνου γονιδιώματος, αλλά και πολλών άλλων οργανισμών έχουν δημιουργήσει μία πληθώρα πληροφοριών. Οι βιολόγοι έχουν τώρα να λύσουν το πρόβλημα της εύρεσης του ρόλου όλων των γονιδίων που έχουν καταγραφεί. Σε αυτό το πεδίο σημαντικότερη συμβολή έχει η τεχνολογία των μικροσυστοιχιών (**microarrays ή DNA chips**). Οι μικροσυστοιχίες DNA χρησιμοποιούνται ευρύτατα για την μελέτη της συμπεριφοράς χιλιάδων γονιδίων ταυτόχρονα, δηλαδή μπορεί να δειχθεί ο ρόλος τους κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες.

Τα πειράματα μικροσυστοιχιών δημιουργούν ένα τεράστιο όγκο δεδομένων ο οποίος πρέπει να αναλυθεί προκειμένου να εξαχθούν συμπεράσματα για την αλληλεπίδραση γονιδίων, που έχουν μεγάλη σημασία σε πολύπλοκες λειτουργίες, όπως είναι η ανάπτυξη ενός οργανισμού ή η αιτία κάποιας ασθένειας. Αρχικά το αποτέλεσμα ενός τέτοιου πειράματος είναι μία σειρά από εικόνες. Στη συνέχεια οι εικόνες μετατρέπονται σε δεδομένα προκειμένου να αναλυθούν. Έχουν χρησιμοποιηθεί πολλοί αλγόριθμοι για την ανάλυσή τους από τον τομέα της στατιστικής, υπολογιστικής νοημοσύνης κτλ.



**Εικόνα 1:** Αρχική εικόνα (microarray) ==>Επεξεργασμένη εικόνα ==> Στατιστική Ανάλυση.



## **ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟ ΤΗΣ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ**

Τα **microarrays** ή **αλλιώς DNA chips** στην βιοτεχνολογία είναι διατάξεις μικροσταγονιδίων που έχουν τοποθετηθεί πάνω σε ένα πλακίδιο για να χρησιμοποιηθούν στην ανίχνευση της ύπαρξης μεταλλάξεων σε γενετικό υλικό.

Το κάθε μικροσταγονίδιο περιέχει σε διάλυμα μόρια με ακολουθία βάσεων (oligos) που αντιστοιχούν στην μετάλλαξη που θέλουμε να ανιχνευτεί στο γενετικό υλικό προς εξέταση. Επίσης κάποια μικροσταγονίδια περιέχουν oligos χωρίς μεταλλάξεις (υγιή), ή και ανύπαρκτες στο ανθρώπινο γονιδίωμα ακολουθίες για να ελεγχθεί η σωστή λειτουργία του microarray. Ο σχεδιασμός του microarray και το τι είδους υλικό (oligo) θα τοποθετηθεί σε κάθε σημείο του microarray (τοποθέτηση του μικροσταγονιδίου με ειδική συσκευή -spotter-), είναι μία σημαντική διαδικασία που γίνεται από τους βιολόγους που σχεδιάζουν το πείραμα και απαιτείται η χρήση εξειδικευμένου λογισμικού.

Στα πλαίσια της συγκεκριμένης πτυχιακής σχεδιάστηκε ένα κατάλληλο λογισμικό όπου στόχο έχει να βοηθήσει τους βιολόγους να εκτελέσουν ένα μεγάλο φάσμα πειραμάτων μικροσυστοιχιών τα χαρακτηριστικά του οποίου θα παρουσιαστούν εκτενέστερα στις παρακάτω ενότητες.

Στα επόμενα κεφάλαια ο αναγνώστης έχει τη δυνατότητα να περιηγηθεί στον κόσμο των microarrays και να λάβει γνώση για τον χώρο στον οποίο δραστηριοποιούνται και τις δυνατότητες που προσφέρουν στους χρήστες τους καθώς επίσης να δει την ανάπτυξη ενός υποτυπώδους λογισμικού για πειράματα με microarrays.



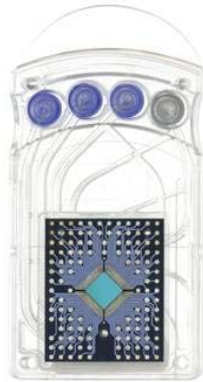


## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1ο :ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΩΝ ΤΩΝ MICROARRAYS

### 1.1 Τι είναι τα microarrays και πως δουλεύουν

Παραπάνω δόθηκε μία αρκετά κατατοπιστική ερμηνεία για το τι περίπου είναι ένα **microarray** ή αλλιώς ένα **DNA chip**.

Στην ενότητα αυτή παρατίθεται μία εκτενέστερη αναφορά για το αντικείμενο αυτό έτσι ώστε να γίνει περισσότερο κατανοητό σε κάποιον ο οποίος έρχεται πρώτη φορά σε επαφή με τον θαυμαστό αυτό κόσμο των μικροσκοπικών DNA chips.



**Εικόνα 2:** Ένα DNA chip.

Θα ήταν μεγάλο επίτευγμα αν είχαμε τη δυνατότητα να γνωρίζουμε από την ηλικία των δεκαοχτώ ετών ποιές ασθένειες ενδέχεται να μας χτυπήσουν την "πόρτα" στα πενήντα μας, κι έτσι να είχαμε την ευκαιρία να αποφύγουμε ότι θα επιβάρυνε την κατάσταση. Εξίσου σημαντικό θα ήταν εάν μπορούσαμε ανα πάσα στιγμή να ελέγχουμε αν η φαρμακευτική αγωγή που ακολουθούμε είναι πράγματι αποτελεσματική κι αν όχι να είχαμε τη δυνατότητα αναπροσαρμογής της.

Για όλα τα παραπάνω είναι υπεύθυνα τα **DNA chips!** Κι αν τα ηλεκτρονικά τσιπάκια έφεραν επανάσταση στον χώρο της πληροφορικής στον αιώνα που "σβήνει", στο "χάραμα" της νέας χιλιετίας τα "γονιδιακά τσιπ" έρχονται ν' αλλάξουν τα πάντα (ή σχεδόν τα πάντα) στο χώρο της γενετικής, της έρευνας, της διάγνωσης και της θεραπείας! **Ερχονται να αλλάξουν δηλαδή την ζωή μας.** Πρόκειται για μια από τις τελευταίες ανακαλύψεις (συνδυασμού γενετικής και τεχνολογίας) των τελευταίων χρόνων που αναμένεται να παίξει έναν από τους πρωταγωνιστικούς ρόλους στον χώρο της ιατρικής γενετικής (και γενικότερα της επιστήμης) στα αμέσως επόμενα χρόνια. Ο γενετικός κώδικας μπαίνει στο scanner του ηλεκτρονικού υπολογιστή και "αποκαλύπτει" μέσα σε ελάχιστο χρόνο στην οθόνη, το παρόν, το παρελθόν και το μέλλον μας: Τις ενδεχόμενες "προδιαθέσεις" κάθε οργανισμού για χιλιάδες γενετικές νόσους από την ημέρα της δημιουργίας του. Τις μεταλλάξεις διαφόρων γονιδίων με τις οποίες γεννιόμαστε ή αποκτούμε κατά την διάρκεια της ζωής μας. Την εξέλιξη (βήμα-βήμα) της



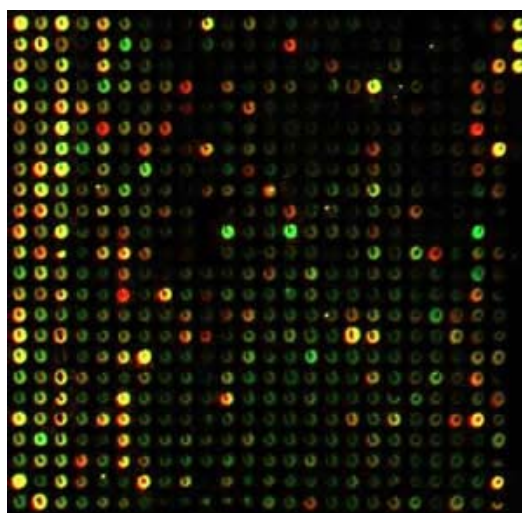
ασθένειας. Τις πιθανές θεραπευτικές προσεγγίσεις αλλά και τις φαρμακευτικές ουσίες που χρειάζεται ξεχωριστά κάθε άνθρωπος για αποτελεσματική αντιμετώπιση χωρίς παρενέργειες!

Το τελευταίο καιρό λοιπόν, γίνεται πολύς λόγος για τα DNA chips, μια τεχνολογία που χρησιμοποιεί στοιχεία από διάφορες επιστήμες όπως η ιατρική, η φυσική, η βιολογία και η πληροφορική και στόχο έχει να βοηθήσει τον άνθρωπο να διαγνώσει διάφορες ασθένειες και όχι μόνο.

Συγκεκριμένα η τεχνική προσπαθεί να διαγνώσει πολύ γρήγορα πιθανές μεταλλάξεις σε κάποιο γονίδιο. Όπως έχει βρεθεί μέχρι σήμερα πολλές από τις ασθένειες που ταλαιπωρούν σήμερα τον άνθρωπο, όπως ο καρκίνος, οφείλονται σε μεταλλάξεις κάποιων γονιδίων. Οι μεταλλάξεις δεν είναι τίποτα άλλο από αλλαγές στον κώδικα του DNA, στις βάσεις που το αποτελούν, η σειρά των οποίων αποτελεί την πληροφορία για την κωδικοποίηση της σωστής πρωτεΐνης η οποία με την σειρά της εκτελεί σωστά την λειτουργία της.

Αντίθετα η μεταλλαγμένη πρωτεΐνη δεν εκτελεί σωστά την λειτουργία της και πολλές φορές όταν ο ρόλος της είναι πολύ σημαντικός προκαλεί το θάνατο. Για τον καρκίνο του μαστού π.χ. έχουν βρεθεί πάνω από 500 μεταλλάξεις σε ένα συγκεκριμένο γονίδιο που προκαλούν τον καρκίνο. Ειδικά σε γονίδια μεγάλου μεγέθους (4000 βάσεων) είναι πολύ δύσκολο ή μάλλον ήταν πολύ δύσκολο να ανιχνεύονται μεταλλάξεις. Τώρα με την τεχνολογία των DNA chips η διαδικασία έχει απλοποιηθεί.

Το chip είναι μια μικρή πλάκα από υλικό παρόμοιο με αυτό των chips των υπολογιστών και έχει στην επιφάνεια της πάρα πολλές μικρές τρύπες ή αλλιώς αισθητήρες (probes).



**Εικόνα 3:** Probes ενός DNA chip.



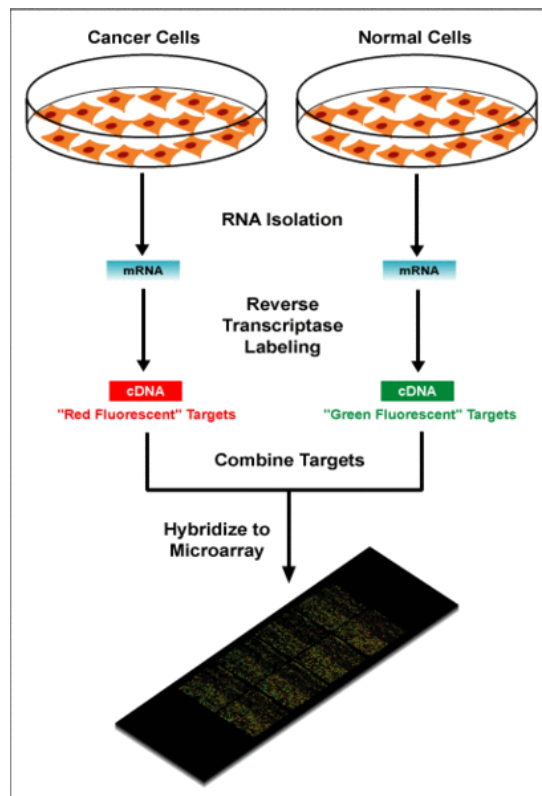
Μέσα σε αυτές τις τρύπες (probes) τοποθετείται καταρχήν το DNA του γονιδίου που θέλουμε να ανιχνεύσουμε. (Χρειάζεται δηλαδή οπωσδήποτε δείγμα αίματος ή δείγμα οποιουδήποτε άλλου ιστού από το οποίο μπορεί να γίνει εξαγωγή του γενετικού υλικού ( DNA ή RNA).)

Συγκεκριμένα τοποθετείται μονόκλωνο DNA του φυσιολογικού γονιδίου (DNA που γνωρίζουμε ότι δεν φέρει μεταλλάξεις) το οποίο προσδένεται στην επιφάνεια του chip με κάποιες τεχνικές (το DNA κανονικά είναι δίκλωνο μόριο δηλαδή αποτελείται από δύο συμπληρωματικές αλυσίδες).



**Εικόνα 4:** Δίκλωνο μόριο DNA.

Στις τρύπες του chip τοποθετούμε από πάνω, αυτόματα με ειδικά μηχανήματα DNA (του συγκεκριμένου γονιδίου σε πολλά μικρά κομματάκια) του ασθενή (αυτού που θέλουμε να δούμε αν φέρει μεταλλάξεις στο συγκεκριμένο γονίδιο) το οποίο έχουμε κάνει και αυτό μονόκλωνο και το έχουμε χρωματίσει κόκκινο. Εκτός από του ασθενή τοποθετούμε και DNA φυσιολογικού ατόμου το οποίο έχουμε χρωματίσει πράσινο.



**Εικόνα 5:** Πως δουλεύουν τα DNA chips.

Στην συνέχεια αφήνουμε τα DNA να υβριδοποιηθούν (να ενωθούν οι βάσεις μεταξύ τους με συγκεκριμένο τρόπο) σε κατάλληλες συνθήκες (να κολλήσουν μεταξύ τους αφού όπως είπαμε οι αλυσίδες είναι συμπληρωματικές).

Ανάλογα με το χρώμα που θα προκύψει από την υβριδοποίηση των κομματιών DNA μπορούμε να ανιχνεύσουμε πιθανές μεταλλάξεις στο γονίδιο που μελετούμε.

Όλη η παραπάνω διαδικασία γίνεται αυτόματα από μηχανήματα και το μόνο που χρειάζεται να κάνουμε είναι να ετοιμάσουμε τα δείγματα και να επεξεργαστούμε τα αποτελέσματα. Η συγκεκριμένη εξέταση μπορεί να γίνει σε οποιαδήποτε ηλικία ακόμη και προγενετικά. Η τεχνική αυτή είναι πολύ σημαντική γιατί μπορεί να ανιχνεύσει μεταλλάξεις σε πολύ μικρό χρονικό διάστημα ενώ μέχρι σήμερα χρειαζόνταν μήνες για να καταλήξουμε σε παρόμοια αποτελέσματα. Ωστόσο η τεχνική μέχρι σήμερα (στην Ελλάδα κυρίως) χρησιμοποιείται περισσότερο στην έρευνα παρά στην κλινική πρακτική εξαιτίας αφενός του μεγάλου κόστους, αφετέρου λόγω της ανάγκης να διαδοθεί στην καθημερινή διαγνωστική των νοσοκομείων.



## **1.2 Που χρησιμοποιούνται τα microarrays**

Το γονιδιακό chip, αποτελεί ένα πολύτιμο εργαλείο με απίστευτες δυνατότητες που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για διαγνωστικούς, θεραπευτικούς και ερευνητικούς σκοπούς. Από το να διαπιστώσουμε αν ένα άτομο είναι φορέας μιας γενετικής ασθένειας κι αν είναι να δούμε ακριβώς σε ποιο στάδιο βρίσκεται (όπως για παράδειγμα είναι ο καρκίνος του μαστού ή του εντέρου όπου ήδη έχουν αρχίσει οι αναλύσεις), να κάνουμε μαζικό έλεγχο του πληθυσμού για να δούμε την ύπαρξη ενός συγκεκριμένου γονιδίου έως και να δημιουργούμε απόλυτα εξατομικευμένα θεραπευτικά σχήματα και δόσεις φάρμακων (δηλαδή αγωγή που θα απευθύνεται αποκλειστικά και μόνο σε ένα συγκεκριμένο ασθενή ανάλογα με την ατομική κλινική εικόνα, το στάδιο που βρίσκεται και τις ιδιαίτερες ανάγκες αυτού του οργανισμού.

Επιπλέον θα αλλάξει άρδην το "τοπίο" στο στάδιο της θεραπείας: Έστω για παράδειγμα ότι ένας άνθρωπος πάσχει από κάποια μορφή καρκίνου. Μπορούμε ανά πάσα στιγμή (ακόμη και μέσα στο χρονικό διάστημα κάποιων ωρών αν αυτό είναι ανάγκη) να "βλέπουμε" σε πιο στάδιο βρίσκεται, πως τροποποιείται η λειτουργία των γονιδίων που παίζουν ρόλο στην εξέλιξη της νόσου και να τροποποιούμε ανάλογα και να προσαρμόζουμε άμεσα την θεραπεία στα καινούργια δεδομένα. Σε περιπτώσεις μολυσματικών ασθενειών, όπως είναι το aids ή η φυματίωση, μπορούμε να βλέπουμε τους συγκεκριμένους τύπους των μολυσματικών παραγόντων και αν πράγματι ο ασθενής ανταποκρίνεται στην θεραπεία που του δίνουμε, οπότε και να την τροποποιούμε ανάλογα.

Με τις ως τώρα συνηθισμένες τεχνικές ρουτίνας της μοριακής γενετικής μπορούμε να ελέγξουμε έναν περιορισμένο αριθμό γενετικών ασθενειών, κάτι που χρειάζεται πολύ χρόνο αλλά και που έχει υψηλό κόστος. Με το DNA chip θα έχουμε την δυνατότητα να βλέπουμε ολόκληρο το γενετικό προφίλ ενός ανθρώπου πάρα πολύ γρήγορα και με πάρα πολύ χαμηλό κόστος.

Μέχρι πρόσφατα οι βιολόγοι είχαν στη διάθεση τους τεχνικές που τους επέτρεπαν να μετρούν την έκφραση περιορισμένου αριθμού γονιδίων και για κάθε γονίδιο έπρεπε να πραγματοποιηθεί διαφορετικό πείραμα. Η τεχνολογία των DNA chips (DNA microarrays) επέτρεψε για πρώτη φορά την παράλληλη μέτρηση της γονιδιακής έκφρασης εκατοντάδων έως και χιλιάδων γονιδίων με την εκτέλεση ενός και μόνο πειράματος. Κάτι τέτοιο παλαιότερα ήταν ανέφικτο και εξαιρετικά χρονοβόρο καθώς η μελέτη γινόταν για κάθε γονίδιο ξεχωριστά!

Η τεχνολογία των DNA chips έχει μελετηθεί αρκετά για τη διάγνωση κακοηθειών, για την ταυτοποίηση αιματολογικών νεοπλασιών, αλλά και για συμπαγείς όγκους.



Ακόμη σημαντική είναι η συμβολή τους στη μελέτη γενετικά βασισμένων ασθενειών όπως το AIDS, το Alzheimer, ο διαβήτης, το Parkinson, η κυστική ίνωση, η οστεοπόρωση καθώς και διάφορων μορφών καρκίνου. Μερικές από αυτές είναι ο καρκίνος του μαστού, καρκίνος του εντέρου, καρκίνος του αίματος κτλ.

Άλλα πειράματα μπορούν να αφορούν διάφορες μολυσματικές ασθένειες, ενώ και στον τομέα των μεταμοσχεύσεων ειδικεύονται τα DNA chips.

**Γενικά οι τεχνολογίες των DNA chips μπορούν να εφαρμοστούν:**

- ◆ Για την διάγνωση και πρόβλεψη ασθενειών.
- ◆ Για την ανάπτυξη και παραγωγή νέων φαρμάκων.
- ◆ Για την πρόληψη παρενεργειών και τοξικότητας.
- ◆ Για την αναγνώριση και ταυτοποίηση γονιδίων που εμπλέκονται στην φαρμακευτική αντίσταση και ευαισθησία,
- ◆ και τέλος και πιο σημαντικό στην αναγνώριση υποομάδων ασθενών που θα επωφεληθούν από συγκεκριμένες επιλεγμένες θεραπείες.



### **1.3 Ποιοι είναι οι στόχοι των microarrays - προϋποθέσεις ανάπτυξής τους**

Η γονιδιακή θεραπεία χρησιμοποιεί πειραματικές τεχνικές με σκοπό τη «διόρθωση» γενετικής βλάβης που προκαλείται από ένα μεταλλαγμένο γονίδιο σε έναν οργανισμό. Αυτή επιτυγχάνεται με εισαγωγή του φυσιολογικού γονιδίου στα κύτταρα στα οποία προκαλείται η βλάβη.

Στο μέλλον λοιπόν με την αποκρυπτογράφηση του ανθρωπίνου γονιδιώματος **ο στόχος των DNA chips είναι**, οι γενετικές αυτές ανωμαλίες αφενός θα μπορούν να εντοπιστούν πριν ακόμα εμφανιστούν στον οργανισμό του ασθενή, αφετέρου εφόσον εμφανιστούν η θεραπεία τους θα είναι γονιδιακά βασισμένα και ακόμα και χωρίς τη χορήγηση φαρμάκων!

Για παράδειγμα οι καρκινοπαθείς θα έχουν τη δυνατότητα να θεραπεύονται χωρίς τις κλασσικές μεθόδους θεραπείας που εφαρμόζονται για τον καρκίνο, όπως χημειοθεραπείες, ακτινοβολίες και τη χρήση φαρμάκων!

Έτσι εάν βρεθούν τα γονίδια τα οποία είναι υπεύθυνα για πολλές σημαντικές ασθένειες τότε η γονιδιακή θεραπεία θα είναι μεγάλο γεγονός. Σήμερα, το πρόγραμμα για την αποκωδικοποίηση του ανθρωπίνου γονιδιώματος προχωράει με αστραπιαίους ρυθμούς και ο αριθμός των γονιδίων που γίνεται γνωστός, αυξάνεται ημέρα με την ημέρα. Αν αυτή τη στιγμή γνωρίζουμε μερικές χιλιάδες γονίδια, σε πολύ σύντομο χρονικό διάστημα είναι πολύ πιθανό να ξέρουμε και τα περίπου 100.000 γονίδια που πιστεύουμε ότι συνθέτουν το γονιδιώμα μας. Τότε, ο συνδυασμός των τεχνολογιών, του DNA chip και της αποκωδικοποίησης του ανθρωπίνου γονιδιώματος, θα φέρουν μια επανάσταση πάνω στο θέμα της διάγνωσης. Δηλαδή θα έχουμε και τα δεδομένα για πολύ περισσότερες ασθένειες (ή την προδιάθεση για ασθένειες) για να διαγνώσουμε, ενώ ήδη διαθέτουμε την τεχνολογία που μπορεί να μας δώσει τις "απαντήσεις" που θέλουμε σε πολύ γρήγορο χρόνο.

Για να επιτευχθούν όλα τα παραπάνω θα πρέπει τα πειράματα τα οποία θα γίνονται με τη βοήθεια των microarrays να εκπληρώνουν κάποιες προϋποθέσεις για να είναι δυνατή η συμβολή τους στο τομέα της γονιδιακής θεραπείας. **Αυτές είναι οι εξής:**

- ◆ Τα δεδομένα τα οποία θα λαμβάνονται από τα πειράματα των micro arrays θα πρέπει να είναι ακριβή, καθώς παρουσιάζονται σε μεγάλη κλίμακα πληθυσμών.
- ◆ Τα πειράματα θα πρέπει να είναι εύκολα στην ερμηνεία τους.
- ◆ Τα πειράματα θα πρέπει να είναι γρήγορα.



- ◆ Τα πειράματα θα πρέπει να είναι διαθέσιμα για κάποιο συγκεκριμένο και κατευθυνόμενο κόστος,
- ◆ και τέλος αν γίνει εφικτό να μειωθεί η εργασία του κάθε ατόμου που συμμετέχει στο πείραμα θα επιτευχθεί μεγαλύτερο κόστος αποδοτικότητας.

#### **1.4 Τα microarrays (DNA chips) και κατά πόσο συμβάλλουν στην εξέλιξη της ζωής μας**

Το DNA chip μπορεί να μας δώσει όλες τις γενετικές δυνατότητες ενός οργανισμού, δηλαδή πληροφορίες για την κατάσταση των γονιδίων. Τα γονίδια όμως (με εξαίρεση ίσως ελάχιστες περιπτώσεις) δεν είναι το μέλλον μας, συμβάλλουν σε αυτό. Υπάρχουν γονίδια για τα οποία κάποια μετάλλαξη είναι σίγουρο πως θα καταλήξει σε κάποια ασθένεια όπως για παράδειγμα αν κάποιος έχει μεταλλάξεις στο γονίδιο της μεσογειακής αναιμίας και είναι ομοζυγώτης, τότε θα πάσχει από μεσογειακή αναιμία. Υπάρχουν όμως κι άλλες περιπτώσεις όπου μπορεί να έχουμε μετάλλαξη σε ένα γονίδιο, αλλά αυτό δείχνει μόνο την πιθανότητα να εμφανίσουμε μια ασθένεια και όχι τη βεβαιότητα.

Δηλαδή η κατάσταση ενός γονιδίου δείχνει ουσιαστικά ένα εύρος δυνατοτήτων και την πιθανότητα να εκδηλωθεί μια ασθένεια. Το αν τελικά θα εκδηλωθεί ή όχι, εξαρτάται από πληθώρα παραγόντων, όπως το περιβάλλον, η ψυχολογία, ή θέματα συνηθειών π.χ κάπνισμα, αλκοόλ, σωματική άσκηση κτλ. Έτσι μπορούμε να πούμε ότι το DNA-Chip μπορεί να μας δείξει κινδύνους, αλλά τελικά αν θα ασθενήσουμε ή όχι, είναι αποτέλεσμα πολλών αλληλεπιδράσεων. Οπότε, ναι, το DNA chip, είναι ένα πάρα πολύ σημαντικό εργαλείο αλλά το DNA δεν είναι η "μοίρα" μας.





## **1.5 Τα microarrays στην αγορά**

Η ιδέα για τα microarrays γεννήθηκε περίπου δέκα χρόνια πριν όταν τρεις εταιρίες τηλεφωνίας, η Motorola, η Corning και η Agilent αποφάσισαν να μπουν στη διαδικασία να τα κατασκευάσουν.

Τα σχέδια τους όμως δεν πήγαν καλά με αποτέλεσμα η εταιρία **Affymetrix** από την Santa Clara της Καλιφόρνιας να πάρει εκείνη τα σκήπτρα και να μπει δυναμικά στον χώρο των DNA chips με την παραγωγή του πρώτου εμπορικού μέχρι τότε microchip με την ονομασία **GeneChip**. Το κατασκευαστικό αυτό πρότυπο είναι ικανό να παράγει σειρές με την μεγαλύτερη πυκνότητα πληροφορίας στην αγορά, δημιουργώντας την δυνατότητα μελέτης ολόκληρου του γονιδιώματος για πρώτη φορά.

Ενδεικτικό είναι το γεγονός ότι κατάφερε να πουλήσει περίπου 80% των ήδη εμπορικά διαθέσιμων chip!



**Εικόνα 6:** Δύο από τα DNA chips της **Affymetrix**.

Αξιοσημείωτο είναι και το γεγονός ότι ο κύριος λόγος για τον οποίο ξεκίνησαν οι πρώτες απόπειρες κατασκευής των DNA chips ήταν για την κατασκευή φαρμάκων. Για τον σκοπό αυτό κυβερνήσεις, πολλές φαρμακοβιομηχανίες και αρκετά πανεπιστήμια διέθεταν υπέρογκα χρηματικά ποσά για την χορήγησή τους.



## **1.6 Εταιρίες των DNA chips και τα κόστη τους**

Πολλές και αρκετά αξιόλογες εταιρείες ανά χώρα (Αμερική, Ιαπωνία, Γερμανία, Ηνωμένο Βασίλειο, Γαλλία κτλ) διέπουν στον κόσμο των DNA chips η καθεμία με τα δικά της χαρακτηριστικά και το δικό της κατασκευαστικό κόστος. Λογικό όμως είναι πως όσο οι τεχνολογίες θα αναπτύσσονται τόσο το κόστος θα μειώνεται καθώς ο ανταγωνισμός θα μεγαλώνει. Το κόστος πώλησης για τα DNA chips ποικίλει ανάλογα με την στρατηγική της κάθε κατασκευαστικής εταιρίας και τον ανταγωνισμό φυσικά που θα υπάρχει στην κάθε αγορά. Ενδεικτικά μερικές από αυτές είναι οι εξής: **Applied Biosystems, Applied Microarrays, Agilent Technologies, Combimatrix, GE Healthcare and Roche, IBM Corporation, GenometrixI, HitachiSoft, Nanogen, Illumina, Inc, Orchid BioComputer Inc, Combion, Rosetta, ProtoGene Laboratories** και πάρα πολλές άλλες.

## **1.7 Μεγέθη των DNA chips**

Η χωρητικότητα των microarrays έχει να κάνει με το ποσό της πληροφορίας που μπορούν να επεξεργαστούν. Η πληροφορία αυτή όπως είναι γνωστό είναι τα γονίδια.

Η τεχνολογία των DNA chips για την εκτέλεση των πειραμάτων περιλαμβάνει την τοποθέτηση των δειγμάτων αίματος (DNA-Γονίδια) στους αισθητήρες (probes). Από τότε που πρωτοεμφανίστηκαν οι μακροσειρές στην αγορά μέχρι τώρα που η τεχνολογία έχει εξελιχθεί έχουν βγει σε διάφορα μεγέθη ανάλογα φυσικά και με το πείραμα για το οποίο προορίζονταν κάθε φορά.

Το κύριο πλεονέκτημα της τεχνολογίας των πινάκων είναι ότι συγκεκριμένος αριθμός χαρακτηριστικών μπορούν να τοποθετηθούν πάνω σε αυτούς. Αυτός ο αριθμός καθορίζεται από το μέγεθος των χαρακτηριστικών αυτών και την αποδοτικότητα των υπόλοιπων συσκευών που συμμετέχουν στο πείραμα. Έχει παρατηρηθεί ότι κάθε 2 χρόνια το μέγεθος των χαρακτηριστικών μειώνεται κατά 50%.



## **1.8 Χωρητικότητα των DNA chips**

Όπως ήδη αναφέρθηκε και σε προηγούμενη παράγραφο πολλές είναι οι εταιρίες εκείνες οι οποίες έχουν μπει δυναμικά στον χώρο της βιοτεχνολογίας κατασκευάζοντας DNA chips με τις ανάλογες χωρητικότητες. Η πιο δυνατά εξελισσόμενη από αυτές είναι η **Affymetrix** με μεγάλη παραγωγή μακροσειρών DNA οι χωρητικότητες των οποίων ποικίλουν. Ξεκινούν από 3k (παλαιότερα) και μπορούν να φτάσουν στα 500k. Τι εννοούμε όμως με τους όρους 3k, 5k, 9k, 10k, 20k, 25k, 50k, 250k, 500k κτλ; Εννοούμε 3000, 5000, 9000, 10000, 20000, 25000, 50000, 250000, 500000 κτλ αισθητήρες (probes) αντίστοιχα ανά chip. Όσο μεγαλύτερη είναι η χωρητικότητα του chip τα επίπεδα ανάλυσης είναι υψηλότερα.

Άλλο ένα πλεονέκτημα των χωρητικά μεγάλων chip είναι ότι χρησιμοποιούν σχετικά μικρά δείγματα αίματος.

## **1.9 Τα DNA chips στην Ελλάδα**

Ο κλάδος των microarrays γνωρίζει μεγάλη ανάπτυξη στις χώρες του εξωτερικού κυρίως. (Αμερική, Ιαπωνία και άλλες). Ωστόσο και εδώ στην Ελλάδα εφαρμόζεται για ερευνητικούς κυρίως σκοπούς προς το παρόν.

Στην Κρήτη και συγκεκριμένα στο Ηράκλειο στο Ίδρυμα Τεχνολογίας και Έρευνας γνωστό στους περισσότερους ως ΙΤΕ υπάρχει το εργαστήριο πληροφοριακών συστημάτων όπου εκεί αναπτύσσεται ένα πρόγραμμα με την επωνυμία **PROGNOCHIP** και το οποίο αφορά την ανάπτυξη της τεχνολογίας των μικροσυστοιχιών στην Ελλάδα, στην κατεύθυνση της αναγνώρισης και της αξιολόγησης μοριακών δεικτών για την κατηγοριοποίηση και πρόγνωση του καρκίνου του μαστού. Πιο συγκεκριμένα, το πρόγραμμα PROGNOCHIP επιδιώκει να καθορίσει τα προφίλ της γονιδιακής έκφρασης για 200 τουλάχιστον καρκινώματα μαστού, αναλύοντας όσο είναι δυνατόν περισσότερα ανθρώπινα γονίδια σε μια μικροσυστοιχία, με σκοπό να ταυτοποιηθούν και να αναδειχθούν νέοι προγνωστικοί δείκτες για τον καρκίνο του μαστού, ενώ ταυτόχρονα έχει ως στόχο και την αξιολόγηση των δυνατοτήτων εφαρμογής των δεικτών αυτών.



## **2. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΕΙΤΑΙ ΣΤΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΜΕ MICROARRAYS-ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ.**

### **2.1 Σύστημα**

Στα πλαίσια της επίτευξης ενός πειράματος με microarrays κάθε εταιρία θα πρέπει να είναι εφοδιασμένη με ένα κατάλληλο σύστημα το οποίο θα περιλαμβάνει όλες εκείνες τις συσκευές που είναι απαραίτητες για την επίτευξη αυτού του στόχου.

Επειδή η εταιρία **Affymetrix** είναι η πιο γνωστή στο χώρο της, στις παρακάτω ενότητες παρατίθεται μία εκτενέστερη αναφορά η οποία παρουσιάζει το σύστημα το οποίο εκείνη διαχειρίζεται στα πειράματα της, τα βήματα τα οποία ακολουθούνται στα πειράματα αυτά καθώς επίσης και τις συσκευές οι οποίες περιστοιχίζουν το συγκεκριμένο σύστημα.

Το σύστημα της Affymetrix, όπως φαίνεται και στη παρακάτω εικόνα (με τη σειρά που εμφανίζονται) περιλαμβάνει τις εξής συσκευές:

- ◆ Έναν "φούρνο" υβριδοποίησης (hybridization oven),
- ◆ ένα σταθμό "υγρών" (fluidics station),
- ◆ έναν υπολογιστή,
- ◆ και ένα scanner.

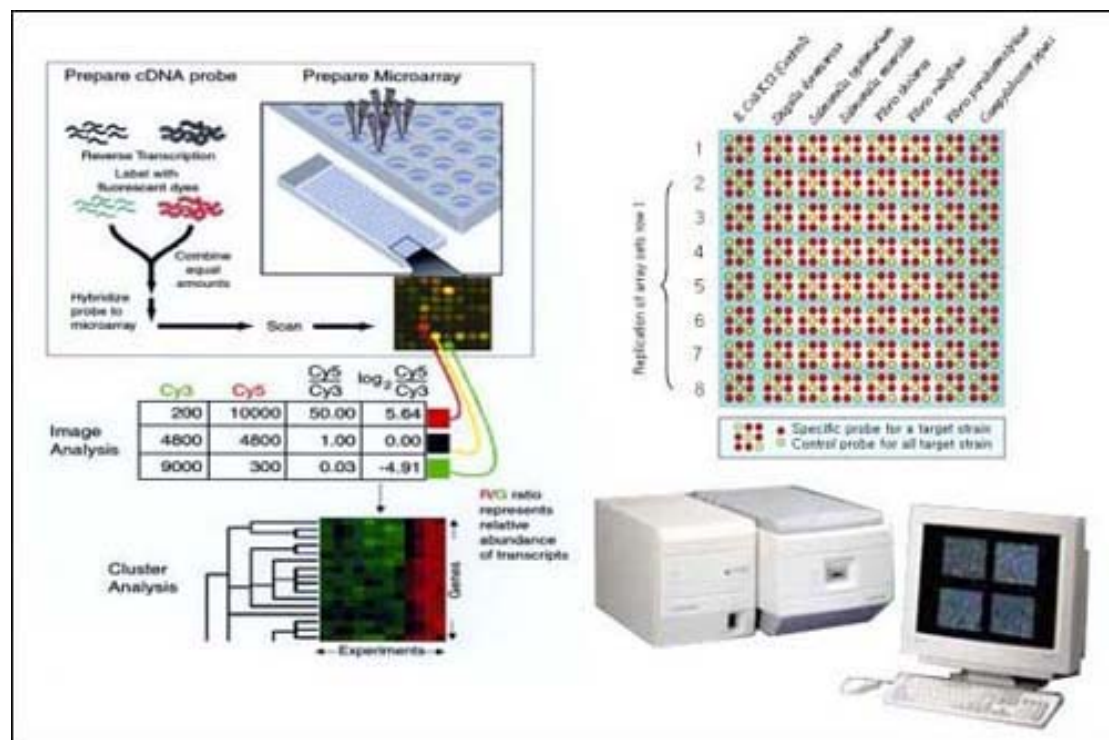


**Εικόνα 7:** Το σύστημα της Affymetrix.



Ένα χαρακτηριστικό πείραμα έκφρασης γονιδίων περιλαμβάνει ενδεικτικά τα ακόλουθα βήματα:

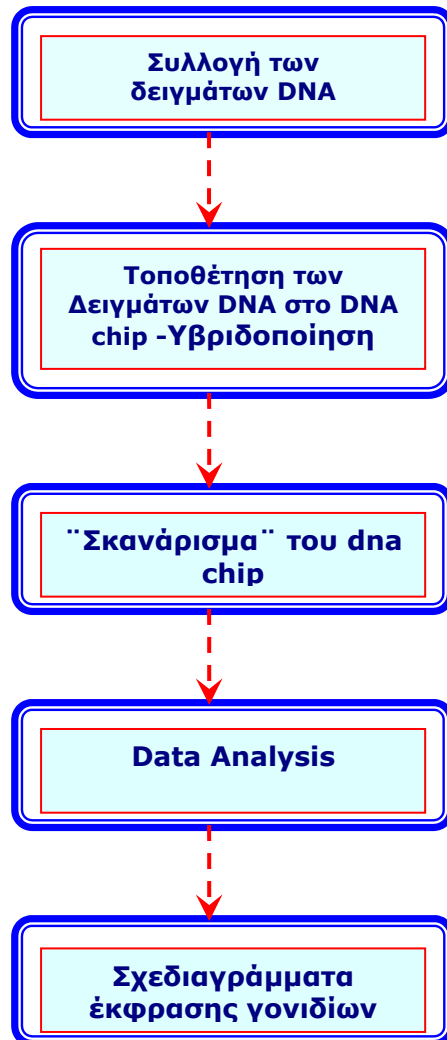
- ◆ Συλλογή των δειγμάτων (μονόκλωνου DNA του φυσιολογικού
- ◆ Τοποθέτηση μονόκλωνου DNA του φυσιολογικού γονιδίου και του μεταλλαγμένου. (Υβριδοποίηση των γονιδίων στον microarray )
- ◆ Πλύσιμο, λέκιασμα, και ανίχνευση (scanning) της σειράς
- ◆ Ανάλυση της ανιχνευμένης εικόνας
- ◆ Παραγωγή των σχεδιαγραμμάτων έκφρασης γονιδίων



**Εικόνα 8:** Παράδειγμα ενός πειράματος με microarray.



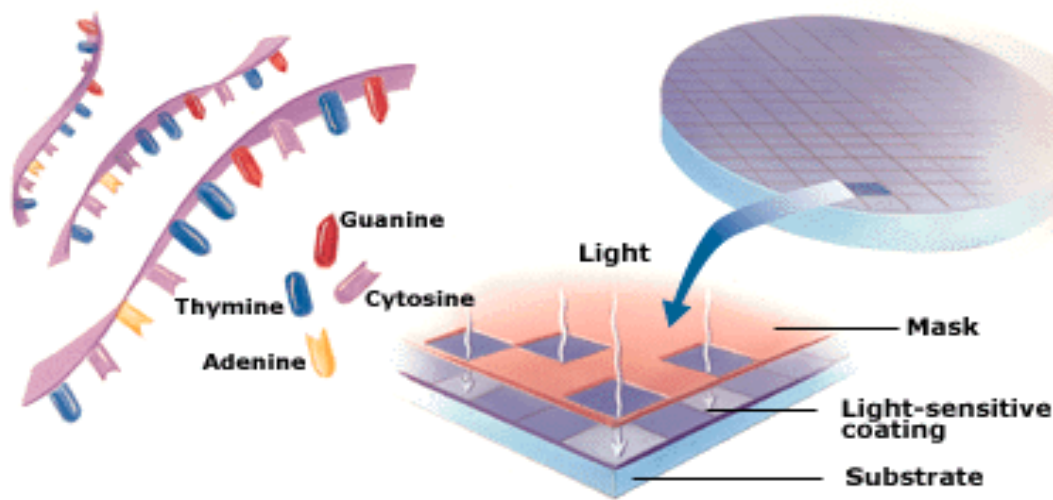
## **2.2 Διάγραμμα ακολουθίας των βημάτων ενός πειράματος με microarrays.**





### 2.3 Περιγραφή του πειράματος

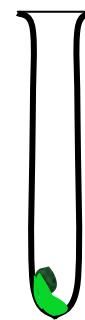
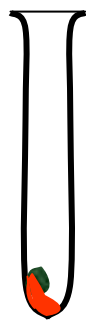
Μια μικροσυστοιχία DNA είναι ένα πλακίδιο κατασκευασμένο από ειδικό γυαλί (ή από το υλικό όπου κατασκευάζονται τα chips των ηλεκτρονικών υπολογιστών ) πάνω στο οποίο παρατάσσονται ιχνηθέτες (αισθητήρες ή probes) σε συγκεκριμένες θέσεις, το πλήθος των οποίων μπορεί να κυμανθεί από μερικές εκατοντάδες έως πολλές χιλιάδες.



**Εικόνα 9:** Διάταξη συστατικών ενός Macroarray.

Κάθε ιχνηθέτης αποτελείται από το συμπληρωματικό DNA (cDNA) του mRNA του γονιδίου που θέλουμε να μετρηθεί. Το προς εξέταση δείγμα DNA «χρωματίζεται» με κατάλληλη χρωστική και μετά από ειδική επεξεργασία τοποθετείται πάνω στο πλακίδιο.

**Δείγματα**  
cDNA **κόκκινο/πράσινο**



**Rna μελέτης (κόκκινο, ασθενής) Rna αναφοράς (πράσινο, φυσιολογικός)**

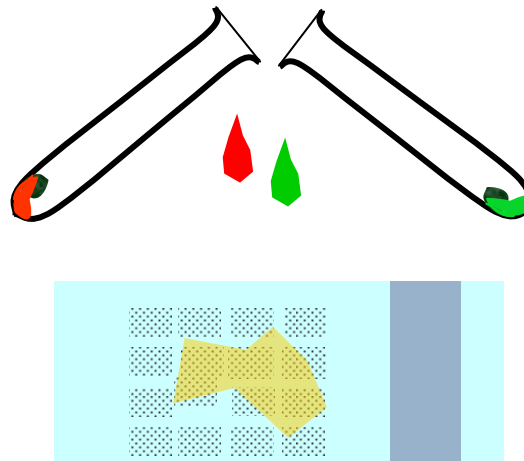
**Εικόνα 10:** Αρχή πειράματος-Συλλογή δειγμάτων.



Τα γονίδια του αντιδρούν χημικά με τους αντίστοιχους ιχνηθέτες **(υβριδισμός)** και ελευθερώνουν στην αντίστοιχη θέση του ιχνηθέτη την χρωστική ουσία. Η ποσότητα της χρωστικής που ελευθερώνεται στην θέση ενός ιχνηθέτη είναι ανάλογη της έκφρασης του αντίστοιχου γονιδίου.

## **ΥΒΡΙΔΟΠΟΙΗΣΗ**

**Βάλε ίσες ποσότητες  
κατηγοριοποιημένου δειγμάτων cDNA στην μικροσυστοιχία**

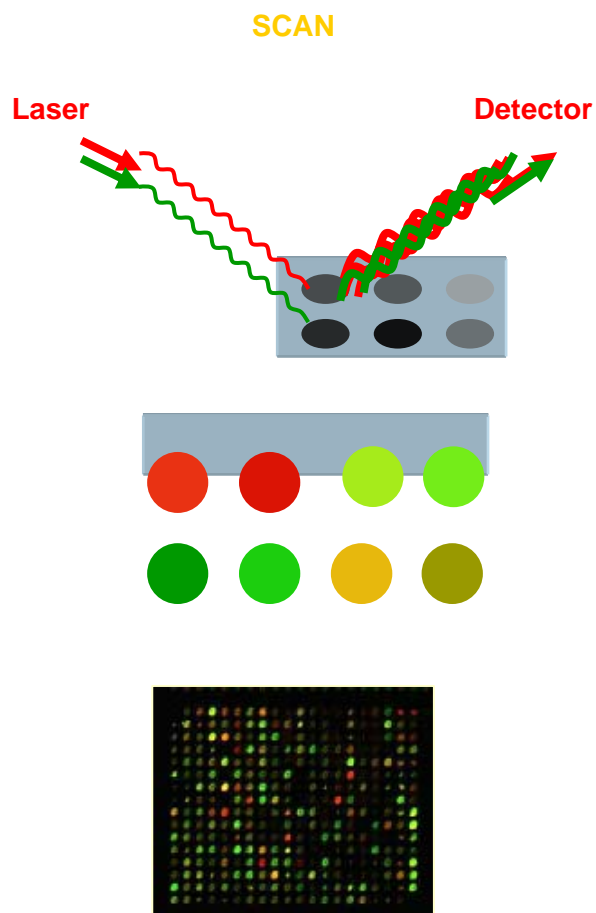


**Εικόνα 11:** Διαδικασία Υβριδοποίησης.





Στην συνέχεια ένας οπτικός σαρωτής σαρώνει το πλακίδιο και στην έξοδό του παράγεται μία ψηφιακή εικόνα η οποία αποτελείται από ένα πλήθος κουκκίδων. Κάθε κουκκίδα αντιστοιχεί σε ένα διαφορετικό γονίδιο και η έντασή της αντιστοιχεί στο επίπεδο έκφρασης του.

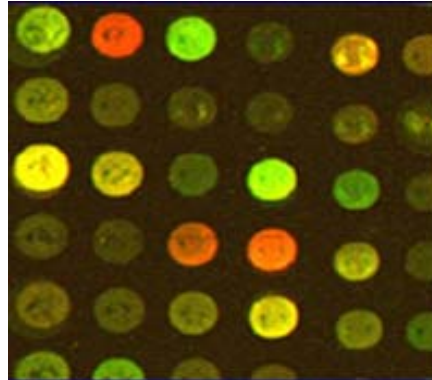


**Εικόνα 12:** Σάρωση δεδομένων του microarray.

Μετά από αυτή τη διαδικασία το αποτέλεσμα που βγαίνει είναι ένα σχεδιάγραμμα έκφρασης γονιδίων η ερμηνεία του οποίου εκθέτεται παρακάτω.



### 2.3.1 Ερμηνεία αποτελεσμάτων- Ερμηνεία εικόνας



**Εικόνα 13:** Αποτέλεσμα ενός πειράματος με microarray.

<b>Κόκκινο</b>	<b>Υπερβάλλουσα έκφραση</b> (Αυτό σημαίνει πως το συγκεκριμένο γονίδιο έχει μεγάλες πιθανότητες να είναι υπεύθυνο για την εκδήλωση της ασθένειας για την οποία πραγματοποιήθηκε το πείραμα.)
<b>Πράσινο</b>	<b>Χαμηλή έκφραση</b> (Αυτό σημαίνει πως το συγκεκριμένο γονίδιο έχει μικρές πιθανότητες να είναι υπεύθυνο για την εκδήλωση της ασθένειας για την οποία πραγματοποιήθηκε το πείραμα.)
<b>Κίτρινο</b>	<b>Ίση έκφραση</b> (Αυτό σημαίνει πως το συγκεκριμένο γονίδιο έχει ουδέτερες πιθανότητες να είναι υπεύθυνο για την εκδήλωση της ασθένειας για την οποία πραγματοποιήθηκε το πείραμα.)
<b>Μαύρες περιοχές</b>	δεν χρησιμοποιήθηκαν

**Πίνακας 1:** Αποτελέσματα ενός πειράματος με microarray.

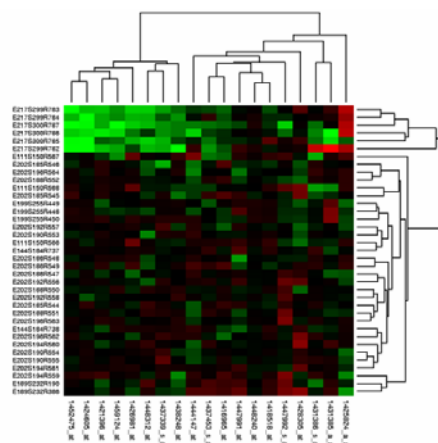


Η εικόνα αυτή προέρχεται πραγματοποιώντας μια σειρά από πειράματα όπως αυτό που περιγράφηκε παραπάνω, με διαφορετικά δείγματα DNA και το όνομα της είναι: πίνακας γονιδιακής έκφρασης ή αλλιώς δέντρογραμμα ή tree map. Οι στήλες του πίνακα αντιστοιχούν σε διαφορετικά γονίδια ενώ οι γραμμές σε διαφορετικά δείγματα.

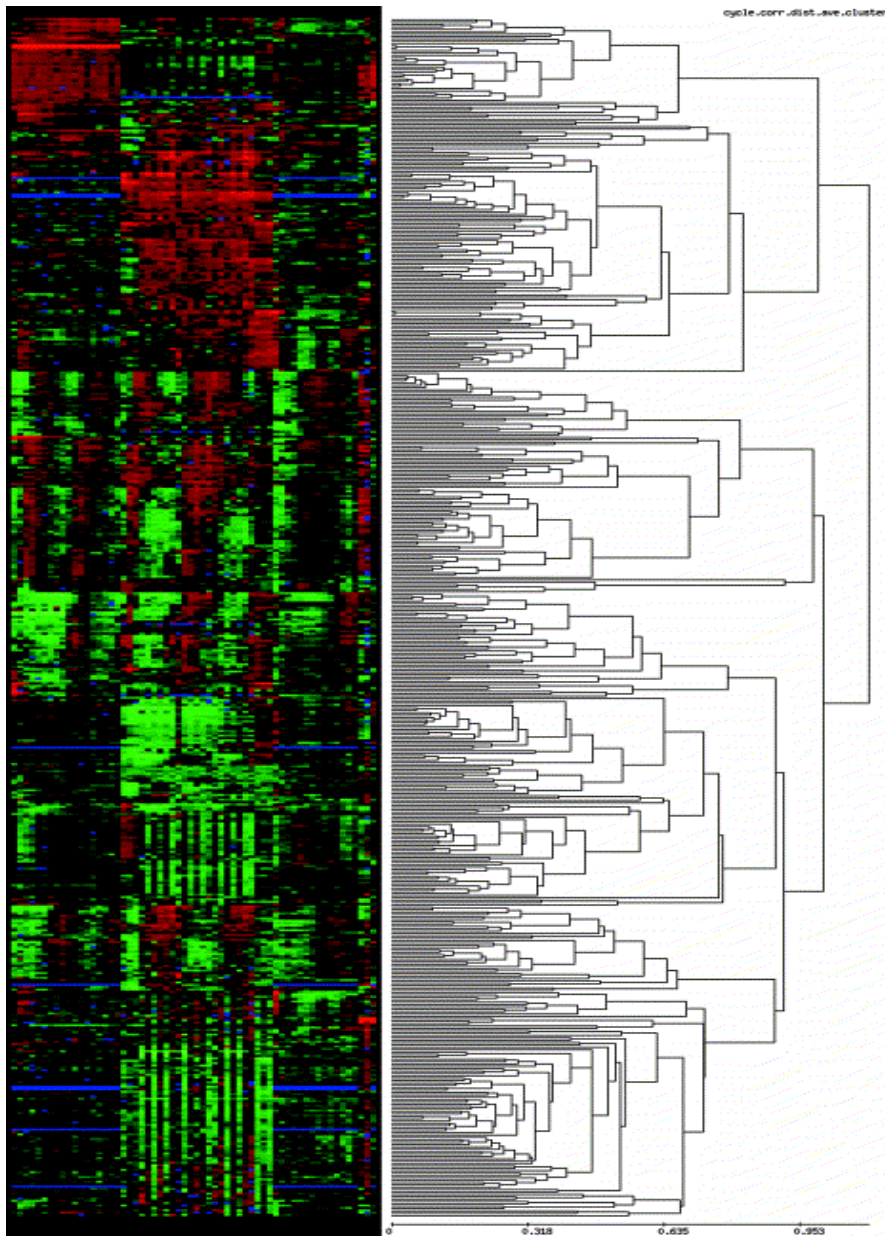
Για να παραχθεί ένας τέτοιος πίνακας, του οποίου οι μεταβλητές είναι μετρήσεις γονιδιακής έκφρασης των γονιδίων που είχαν επιλεγεί προς μέτρηση μέσω των κατάλληλων ιχνηθετών, είναι απαραίτητα τα λογισμικά τα οποία τους κατασκευάζουν και τους διαχειρίζονται. Γιατί είναι απαραίτητα; Διότι ο όγκος των πληροφοριών που προκύπτει μέσα από τα πολλαπλά πειράματα με microarrays είναι τόσο μεγάλος που μόνο τα ανάλογα λογισμικά θα μπορούσαν να τον διαχειριστούν. Οι επιστήμονες οι οποίοι ασχολούνται με την τεχνολογία των DNA chips και επιθυμούν να κάνουν την ανάλυση των αποτελεσμάτων των πειραμάτων τους δουλεύουν πολλές ώρες με τα συγκεκριμένα λογισμικά. Σημαντικό είναι και το γεγονός πως υπάρχουν δημόσιες βάσεις δεδομένων που τους επιτρέπουν να μοιράζονται τα αποτελέσματα της δουλειάς τους με άλλους επιστήμονες με τη βοήθεια του διαδικτύου .

Υπάρχουν πολλές εταιρίες στον χώρο της βιοτεχνολογίας που κατασκευάζουν λογισμικά ανάλυσης αποτελεσμάτων των εικόνων των DNA chips και τα διαθέτουν στην αγορά όπως για παράδειγμα η Affymetrix, η Biodiscovery με το ImageGene και πολλές άλλες. Στην αγορά υπάρχει μία τεράστια γκάμα τέτοιων λογισμικών το καθένα με το δικό τους user interface και πάντα όσο πιο απλό γίνεται έτσι ώστε να επιτυγχάνεται η εύκολη χρήση τους. Ενδεικτικά αναφέρουμε τα GenePix Pro 6, το Acuity 4.0 και πολλά άλλα.

Η μελέτη του πίνακα γονιδιακής έκφρασης μπορεί να αποκαλύψει πια γονίδια επηρεάζονται από μία ασθένεια ή είναι υπεύθυνα για την εκδήλωση της.



**Εικόνα 14α:** Αποτέλεσμα της εικόνας πειραμάτων με microarray.



**Εικόνα 14β:** Αποτέλεσμα της εικόνας πειραμάτων με microarray.



## **3. Η ΕΦΑΡΜΟΓΗ -SCREENSHOTS ΤΟΥ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΟΣ**

### **3.1 Αντικείμενο της εφαρμογής – Παρόμοια λογισμικά**

Αντικείμενο της εφαρμογής η οποία πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια της συγκεκριμένης πτυχιακής είναι η προετοιμασία των microarrays για την τοποθέτηση των δειγμάτων DNA πάνω σε αυτά. Με το συγκεκριμένο αντικείμενο έχουν ασχοληθεί κατά καιρούς πολλές καταξιωμένες εταιρίες στον χώρο των DNA chips. Έχουν δημιουργήσει και αυτές ανάλογα λογισμικά για την προετοιμασία των DNA chips για να δεχτούν το γενετικό υλικό όπως για παράδειγμα η Clontech Genpak (a part of British Company Genetix Group PLC) η SchLeicher & Shuell, η Brinkmann, η Eppendorf, η Millpore, η Promega και άλλες. Για την συλλογή των δειγμάτων DNA οι εταιρίες BD Biosciences and QUAGEN ανέπτυξαν μία δική τους μέθοδο (παλαιότερα). Έκαναν συλλογή αίματος και το σταθεροποιούσαν σε ένα Container. Μία διαφορετική εκδοχή είναι ότι αγοράζαν oligos από άλλες εταιρίες (MWG – Biotech , QUIGEN Operon, Sigma Genosys) από καταλόγους που περιλάμβαναν λίστες από γονίδια και τα χρησιμοποιούσαν στα πειράματα τους. Ακόμη μπορούσαν να δεχτούν παραγγελίες από πελάτες που ήθελαν συγκεκριμένους καταλόγους με γονίδια. Στη συνέχεια έπαιρναν τις παραγγελίες τις έφερναν εις πέρας και επέστρεφαν πίσω τους καταλόγους με τα κατά παραγγελία γονίδια. Η συγκεκριμένη πτυχιακή διαθέτει μία λίστα από ανάλογα γονίδια.

Στο κομμάτι τώρα της τοποθέτησης των δειγμάτων DNA πάνω στα microarrays έχει ασχοληθεί και η συγκεκριμένη πτυχιακή αλλά και πολλές εταιρίες. Η πτυχιακή αυτό που κάνει είναι να τοποθετεί τα δείγματα επάνω στα microarrays είτε χειροκίνητα είτε αυτόματα. Μόνο που αυτό δε γίνεται πάνω στο μηχάνημα (chip). Απλά βοηθάει το βιολόγο που κάνει το πείραμα να τοποθετήσει τα δείγματα πάνω στο chip μέσω αυτού που εκτυπώνεται. Υπάρχουν αρκετές τεχνικές που γίνεται αυτό. Σε μία από αυτές (όπου χρησιμοποιεί και η εταιρία Affymetrix) τοποθετούνται τα δείγματα αίματος (mechanical spotting – ρομποτικό σύστημα) με βοήθεια των pins (καρφίτσες) και οι οποίες τα εφαρμόζουν πάνω στην επιφάνεια των chips. Οι προμηθευτές τέτοιων ρομποτικών συστημάτων είναι πολλοί όπως για παράδειγμα οι: BioRobotics Ltd, Cartesian Technologies, GeneMachines MiraiBio (Hitachi Genetic Systems), Packard BioSence και άλλοι.



### **3.2 Η Εφαρμογή**

Στα πλαίσια της συγκεκριμένης πτυχιακής δημιουργήθηκε ένα λογισμικό κατάλληλο για την επιτέλεση μίας μεγάλης γκάμας πειραμάτων μακροσυστοιχιών, τα χαρακτηριστικά του οποίου είναι τα εξής:

- 1.** Ορισμός της ακολουθίας των βάσεων (γονίδια).  
(Δυνατότητα επιλογής από προκαθορισμένες ακολουθίες που αντιστοιχούν σε συγκεκριμένες μεταλλάξεις και τροποποίησή τους ή δημιουργία νέας ακολουθίας βάσεων).
- 2.** Επιλογή τύπου (μέγεθος-διαστάσεις) microarray.
- 3.** Επιλογή των βάσεων (γονίδια) που θα τοποθετηθούν στο microarray.
- 4.** Αυτόματη τοποθέτηση των βάσεων (γονίδια) στο επιλεγθέν microarray (γραφικός τρόπος) με δυνατότητα κατόπιν τροποποίησης.
- 5.** Χειροκίνητη (manual) τοποθέτηση των βάσεων (γονίδια) στο επιλεγθέν microarray (γραφικός τρόπος).
- 6.** Δυνατότητα εκτύπωσης των microarrays (spotters) που οριστήκαν από τον χρήστη.

Ενδεικτικά είναι μία εφαρμογή όπου ο χρήστης θα έχει τη δυνατότητα να επιλέξει μέσα από μία λίστα από microarrays κάθε φορά εκείνον όπου θα είναι ο κατάλληλος για το πείραμά που θα εκτελέσει. Στη συνέχεια με τα κατάλληλα εργαλεία και με δύο διαφορετικούς τρόπους θα μπορεί να τοποθετήσει τα ανάλογα γονίδια στις ανάλογες θέσεις του πίνακα ενώ παράλληλα θα του δίνεται η δυνατότητα εκτύπωσης του microarray για την περαιτέρω χρήση του στο πείραμα. Αυτό που εκτυπώνεται ο χρήστης θα έχει τη δυνατότητα να το αξιοποιήσει στη συνέχεια του πειράματος.

Η εφαρμογή αυτή γίνεται για να απλοποιήσει τη δουλειά των βιολόγων. Επειδή όπως αναφέρθηκε και σε προηγούμενες ενότητες για να γίνει ένα πείραμα με microarrays είναι μία αρκετά χρονοβόρα διαδικασία , δηλαδή μπορεί να κρατήσει μέχρι και δύο εβδομάδες , αυτό που κάνει η συγκεκριμένη εφαρμογή είναι να επιταχύνει όσο γίνεται την εν λόγω διαδικασία. Αυτό γίνεται ως εξής: Μέχρι στιγμής έχουμε δει τα βήματα τα οποία ακολουθούνται για την εκτέλεση ενός πειράματος με microarrays .

Τα δείγματα αίματος τοποθετούνται πάνω σε συγκεκριμένες θέσεις του πίνακα τις οποίες τις καθορίζει αυτός που επιτελεί το πείραμα. Στη συνέχεια γίνεται η διαδικασία της υβριδοποίησης , έπειτα περνά το φως που σαρώνει



τον πίνακα και τέλος παίρνουμε την τελική εικόνα. Αυτό που κάνει η συγκεκριμένη εφαρμογή είναι να προσφέρει τη δυνατότητα αυτόματης τοποθέτησης των γονιδίων στις θέσεις του πίνακα εξοικονομώντας έτσι πολύτιμο χρόνο ενώ παράλληλα εάν χρειαστεί να γίνει ξανά κάποιο πείραμα να μη χρειαστεί να γίνουν οι διαδικασίες του πειράματος ξανά από την αρχή. **Καθορίζει δηλαδή τις θέσεις στις οποίες θα τοποθετηθούν τα δείγματα και πως θα τοποθετηθούν.** Αυτό που θα εκτυπώνεται θα μπαίνει επάνω στην συσκευή-microarray και σε συνδυασμό με τα δείγματα DNA που έχουν μπει από πριν συνεχίζεται η διαδικασία. Έτσι αυτοματοποιείται η δουλειά των βιολόγων. Ως γνωστόν οι υπολογιστές έχουν μπει πλέον σε πολλούς τομείς της καθημερινότητας. Άπειρα προγράμματα υλοποιούνται καθημερινά για να αυτοματοποιούν πολλές διαδικασίες. Έτσι και στη βιοτεχνολογία (Bioinformatics).

Το λογισμικό αυτό έγινε με χρήση της γλώσσας C# dotnet ενώ για την αποθήκευση των δεδομένων του (γονίδια-microarrays) χρειάστηκε και μία βάση δεδομένων η οποία δημιουργήθηκε από την Access. Με ανάλογες εντολές οι οποίες βρίσκονται στον κώδικα του προγράμματος και με τα κατάλληλα εργαλεία έγινε η σύνδεση της βάσης με το πρόγραμμα. Στην βάση αυτή αποθηκεύονται τα γονίδια και οι πίνακες (microarrays) που θα χρησιμοποιηθούν στα πειράματα.

Στη συνέχεια παρατίθενται κάποια screenshots του προγράμματος καθώς επίσης και μία σύντομη περιήγηση στη λειτουργία των components που το συντελούν.



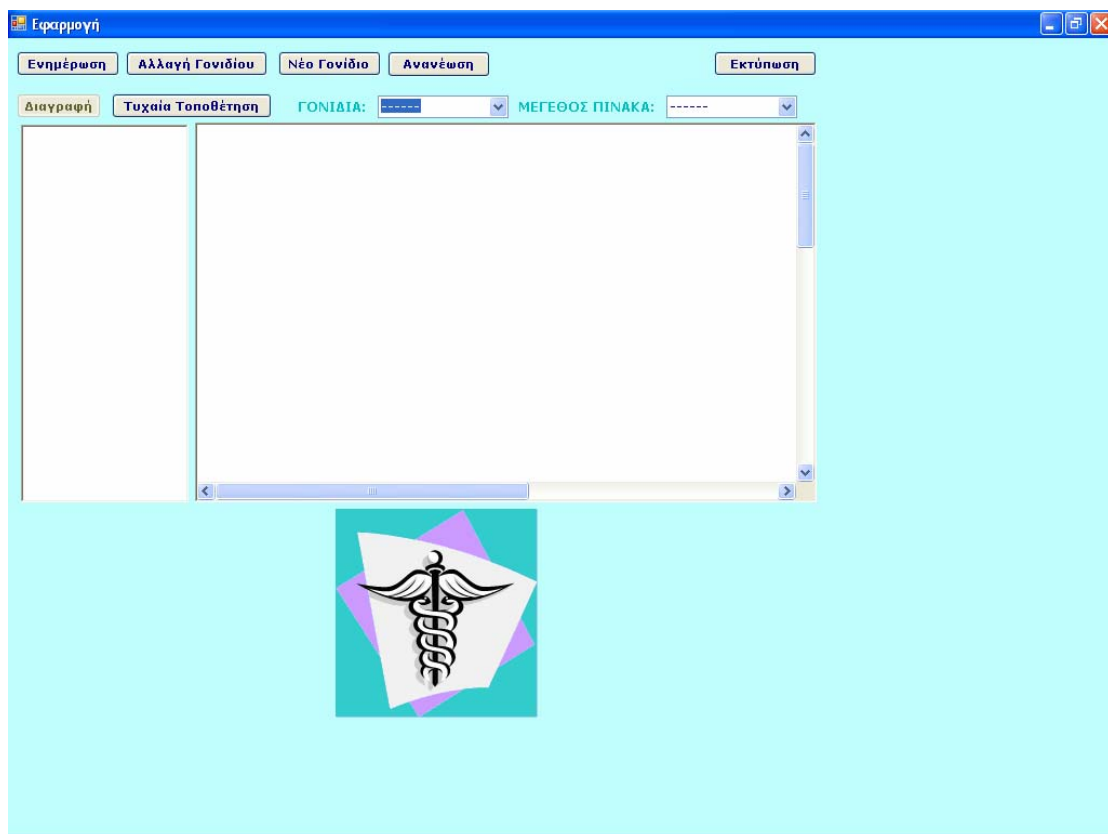


### **3.3 Screenshots του προγράμματος**

#### **3.3.1 Παρουσίαση κεντρικής φόρμας.**

Κάνοντας μία γρήγορη επισκόπηση στο πρόγραμμα μπορεί κανείς να διαπιστώσει ότι αποτελείται από τρεις φόρμες. Την κεντρική και δύο δευτερεύουσες. Από την κεντρική φόρμα, που είναι η μεγαλύτερη και με το πάτημα των κατάλληλων κουμπιών μπορεί ο καθένας να οδηγηθεί στις δευτερεύουσες φόρμες ανάλογα με την εργασία που θέλει να επιτελέσει κάθε φορά.

Όπως φαίνεται στην παρακάτω εικόνα η κεντρική φόρμα του προγράμματος αποτελείται από διάφορα components κατάλληλα για την σωστή λειτουργία του. Αυτά είναι για παράδειγμα τα buttons, τα panels, τα comboboxes, τα labels κτλ. Όλα αυτά για να λειτουργήσουν χρειάζονται τις κατάλληλες βιβλιοθήκες τις οποίες τις δηλώνουμε στον κώδικα του προγράμματος και στην αρχή του.



**Εικόνα 15:** Κεντρική φόρμα της εφαρμογής.





Η κεντρική φόρμα αποτελείται από δύο panels. Ένα μικρότερο, το οποίο βρίσκεται στα αριστερά της και ένα μεγαλύτερο το οποίο βρίσκεται στα δεξιά της.

Όταν ο χρήστης επιλέξει από το combobox που περιλαμβάνει τα γονίδια κάποιο από αυτά τότε εκείνο εμφανίζεται αυτόματα στο αριστερό panel. Μπορεί να επιλέξει όσα γονίδια θέλει και αυτό εξαρτάται από το είδος του πειράματος που πρόκειται να επιτευχθεί. Παράλληλα όταν επιλέξει από το combobox που περιλαμβάνει τους πίνακες κάποιον από αυτούς τότε εκείνος εμφανίζεται αυτόματα στο δεξί και μεγαλύτερο panel. Μπορεί να επιλέξει έναν πίνακα κάθε φορά και αυτό εξαρτάται πάλι από το είδος του πειράματος που πρόκειται να επιτευχθεί. Υπάρχουν διάφορα μεγέθη. Στο panel αυτό υπάρχουν και δύο scrollbars έτσι ώστε να είναι ορατός ο κάθε πίνακας όποιο μέγεθος και να έχει.

Στη παραπάνω φόρμα υπάρχουν και κάποια buttons. Το καθένα έχει και μία συγκεκριμένη λειτουργία η οποία και αναγράφεται σε καθένα από αυτά.

Τα buttons **«Αλλαγή γονιδίου»** και **«Νέο γονίδιο»** αφού πατηθούν ανοίγουν οι δευτερεύουσες φόρμες ανάλογα με το τι θα επιλεγθεί κάθε φορά.

Το button **«Διαγραφή»** διαγράφει τα γονίδια τα οποία έχουν τοποθετηθεί στο αριστερό και μικρότερο panel και τα οποία για κάποιο λόγο δε χρειάζονται.

Το button **«Ενημέρωση»** χρησιμεύει ως εξής: Όταν είμαστε στη φόρμα όπου γίνεται η δημιουργία και η καταχώρηση ενός νέου γονιδίου (οπού έχουμε οδηγηθεί εκεί πατώντας το button **«Νέο γονίδιο»**) εφόσον δημιουργήσαμε το νέο γονίδιο, πατήσαμε αποθήκευση και κλείσει η φόρμα θα πρέπει να πατηθεί και το button της ενημέρωσης που βρίσκεται στην κεντρική φόρμα για να καταχωρηθεί το νέο γονίδιο.

Το button **«Ανανέωση»** σβήνει τα περιεχόμενα και των δύο panels, ενώ το button **«Τυχαία τοποθέτηση»** τοποθετεί τυχαία τα γονίδια που έχουν επιλεγθεί από το δεξί panel σε τυχαίες θέσεις του πίνακα που βρίσκεται στο αριστερό panel.

Τέλος το button **«Εκτύπωση»** με το πάτημα του εκτυπώνει τον πίνακα στη τελικά του μορφή όποτε του ζητηθεί.



### 3.3.2 Παρουσίαση της φόρμας για την αλλαγή των γονιδίων

**Εικόνα 16:** Φόρμα της αλλαγής των γονιδίων.

Στη φόρμα αυτή ο χρήστης οδηγείται αφού έχει πατηθεί το button της αλλαγής γονιδίου το οποίο βρίσκεται στην κεντρική μας φόρμα.

Εδώ του δίνεται η δυνατότητα να επιλέξει κάποιο από τα γονίδια τα οποία υπάρχουν στο Combobox (που υπάρχει στη φόρμα) και αφού το επιλέξει να το τροποποιήσει στο panel το οποίο υπάρχει ακριβώς κάτω από αυτό.

Στη συνέχεια πατάει αποθήκευση για να καταχωρηθεί η αλλαγή ή ακύρωση σε περίπτωση που δε θέλει να κάνει κάποια αλλαγή.



### **3.3.3 Παρουσίαση της φόρμας για την δημιουργία και καταχώρηση νέων γονιδίων**

Νέο Γονίδιο

ΟΝΟΜΑ ΓΟΝΙΔΙΟΥ:

ΕΓΓΡΑΦΗ ΣΕΙΡΑΣ:

Αποθήκευση

Άκυρο

**Εικόνα 17:** Φόρμα της δημιουργίας και καταχώρησης νέων γονιδίων.

Στη φόρμα αυτή ο χρήστης οδηγείται αφού έχει πατηθεί το button του νέου γονιδίου το οποίο και αυτό βρίσκεται στην κεντρική μας φόρμα.

Εδώ του δίνεται η δυνατότητα να προσθέσει ένα νέο γονίδιο γράφοντας το όνομα του στο μικρότερο panel και στη συνέχεια την αλληλουχία των νουκλεοτιδίων του ( **Αδενίνη, (A) Θυμίνη, (T) Γουανίνη, (G) Κυτοσίνη (C)** ) στο μεγαλύτερο panel.

Στη συνέχεια πατάει αποθήκευση για να καταχωρηθεί το νέο γονίδιο ή ακύρωση σε περίπτωση που δε θέλει να προσθέσει κάποιο νέο γονίδιο.

Εφόσον πατήσει αποθήκευση και κλείσει η φόρμα θα πρέπει να πατήσει και το button της ενημέρωσης που βρίσκεται στην κεντρική φόρμα για να καταχωρηθεί το νέο γονίδιο.



## 4. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ

### ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α: ΚΩΔΙΚΑΣ ΚΕΝΤΡΙΚΗΣ ΦΟΡΜΑΣ

// Το πρόγραμμα για να δουλέψει χρειάζεται κάποιες βιβλιοθήκες οι οποίες είτε υπάρχουν έτοιμες είτε τις προσθέτουμε εμείς. Για παράδειγμα η βιβλιοθήκη System.Data.OleDb χρειάζεται για την σύνδεση με τη βάση, για την προσθήκη, την διαγραφή, την αλλαγή και την καταχώρηση των δεδομένων.

```
using System;
using System.Collections.Generic;
using System.ComponentModel;
using System.Data;
using System.Data.OleDb;
using System.Drawing.Printing;
using System.Drawing;
using System.Collections.Specialized;
using System.Configuration;
using System.Windows.Forms;

using LAND.ClassLib.DragDrop;
```

// Εδώ γίνεται η δήλωση των εξωτερικών μεταβλητών του προγράμματος. Με αυτό τον τρόπο οι μεταβλητές αυτές είναι γνωστές σε όλοκληρο το πρόγραμμα κατά διάρκεια που αυτό τρέχει.

```
namespace AnastTest
{
    public partial class Form1 : Form
    {
        OleDbDataReader r;
        int y = 10;
        int b, n;
        Label delLabel = null;
        Point[,] DataPoints = new Point[0, 0];
        public Form1()
        {
            InitializeComponent(); // Η συνάρτηση αυτή χρειάζεται για να
            // μπορούν να τρέξουν κάποια έτοιμα components (π.χ buttons) , που
            // υπάρχουν σε κάθε φόρμα.
        }
    }
}
```



```
private void Form1_Load(object sender, EventArgs e) // Το μέρος αυτό
του προγράμματος τρέχει με το που ανοίγει η κεντρική μας φόρμα.

{

    LoadComboboxes(); // Κλήση της συνάρτησης LoadComboboxes η
οποία υπάρχει παρακάτω.

}

private void button1_Click(object sender, EventArgs e) // Το
button1 είναι το κουμπί της «ενημέρωσης».
{

    LoadComboboxes();

}

private void button2_Click(object sender, EventArgs e) // Το
button2 είναι το κουμπί της «αλλαγής γονιδίου». Όταν αυτό πατηθεί
ανοίγει η φόρμα 2 , οπού εκεί θα υλοποιηθεί η αλλαγή.

{
    Form2 frm2 = new Form2();
    frm2.Show();
}

public void LoadComboboxes() // Η συνάρτηση αυτή γεμίζει τα
Comboboxes.

{

    // Οι εντολές αυτές "καθαρίζουν" τα Comboboxes έτσι ώστε κάθε
φορά που τρέχει το πρόγραμμα να μην έχουν τίποτα πριν το γέμισμα τους.

    comboBox2.Items.Clear();
    comboBox1.Items.Clear();
}
```



// Στο παρακάτω κομμάτι του προγράμματος αρχίζει η σύνδεση με τη βάση. Ο constructor είναι μία μεταβλητή τύπου συμβολοσειρας οπου εκεί δηλώνουμε το μονοπάτι που βρίσκεται η βάση μας , δηλώνουμε τι είδους βάση χρησιμοποιούμε και τέλος δηλώνουμε τον provider με τον οποίο θα ανοίξουμε τη βάση. Ανάλογα με την βάση μπαίνει και ο ανάλογος provider. Αυτός χρειάζεται για να ανοίξει η Access για να μπορέσει να λαμβάνει και να δίνει δεδομένα.

```
string constr = @"Provider=Microsoft.Jet.OLEDB.4.0;Data  
Source=C:\Anastasia.mdb";
```

// Είναι μία συμβολοσειρά όπου καταχωρείται το select που χρειάζεται για να τραβήξουμε δεδομένα από τον πίνακα με τους πίνακες (microarrays).

```
string cmdstring = @"SELECT PINAKES.ID, PINAKES.DESCRPTION FROM  
PINAKES";
```

// Είναι μία συμβολοσειρά όπου καταχωρείται το select που χρειάζεται για να τραβήξουμε δεδομένα από τον πίνακα με τα γονίδια.

```
string cmdstring2 = @"SELECT * FROM SEIRA_NOYKLEOTIDIWN";
```

```
// Γίνεται η σύνδεση με τη βάση  
OleDbConnection con = new OleDbConnection(constr);
```

```
// Γίνεται η σύνδεση με τη βάση με τη βοήθεια του string σε  
συγκεκριμένο πίνακα (microarray).  
OleDbCommand cmd = new OleDbCommand(cmdstring, con);
```

```
// Γίνεται η σύνδεση με τη βάση με τη βοήθεια του string σε  
συγκεκριμένο γονίδιο.  
OleDbCommand cmd2 = new OleDbCommand(cmdstring2, con);
```

```
// Μπαίνουν κάποια δεδομένα στο Combobox με τους πίνακες, δηλαδή  
«-----»  
comboBox2.Items.Insert(0, "-----");
```

```
// Με αυτό τον τρόπο του λέμε να έχει επιλέξει το πρώτο.  
comboBox2.SelectedIndex = 0;
```

```
// Μπαίνουν κάποια δεδομένα στο Combobox με τα γονίδια, δηλαδή «-  
-----»  
comboBox1.Items.Insert(0, "-----");
```

```
// Με αυτό τον τρόπο του λέμε να έχει επιλέξει το πρώτο.  
comboBox1.SelectedIndex = 0;
```



// Με αυτή τη διαδικασία γεμίζουν τα Comboboxes με τους πίνακες (microarrays) και τα γονίδια αντίστοιχα.

```
        try
        {
            con.Open();
            r = cmd.ExecuteReader();
            while (r.Read())
            {

                comboBox2.Items.Insert(Convert.ToInt16(r["ID"]),
r["DESCRIPTION"].ToString());

            }
            r.Close();
            r = cmd2.ExecuteReader();
            while (r.Read())
            {

                comboBox1.Items.Insert(Convert.ToInt16(r["ID"]),
r["ONOMA_NOYKLEOTIDION"].ToString());
            }
            r.Close();

        }
    }
```

// Αν για οποιοδήποτε λόγο γίνει κάποιο λάθος κατά την σύνδεση και το γέμισμα των Comboboxes βγαίνει το λάθος και σταματάει η διαδικασία.

```
        catch (Exception E)
        {
            label1.Text = E.ToString();
            con.Close();

        }
        finally
        {

            con.Close();// Κλείνει η σύνδεση.

        }
    }
```



// Το button3 είναι το κουμπί του «Νέου γονιδίου». Όταν αυτό θα πατηθεί ανοίγει η φόρμα 3 , όπου εκεί θα γίνει η εγγραφή και η καταχώρηση του νέου γονιδίου.

```
private void button3_Click(object sender, EventArgs e)
{
    NeaSeira frm3 = new NeaSeira();
    frm3.ShowDialog();
}
```

// Συνάρτηση που συμβαίνει όταν επιλέξουμε έναν συγκεκριμένο πίνακα (microarray) από το Combobox που περιέχει τους πίνακες (microarrays) και γεμίζει το panel με αυτόν.

```
private void comboBox2_SelectedIndexChanged(object sender,
EventArgs e)
{
    // Αρχίζει η σύνδεση με τη βάση .

    string constr = @"Provider=Microsoft.Jet.OLEDB.4.0;Data
Source=C:\\Anastasia.mdb";

    // Είναι μία συμβολοσειρά όπου καταχωρούνται οι γραμμές και οι
στήλες του πίνακα (microarray) που επιλέξαμε μέσω της εντολής select .

    string cmdstring = @"SELECT    ROWS_NUMBER,
COLS_NUMBER, ID FROM PINAKES WHERE
(ID =" + Convert.ToInt16(comboBox2.SelectedIndex.ToString())
+ ")";

    // Σύνδεση με τη βάση.
OleDbConnection con = new OleDbConnection(constr);
    // Γίνεται η σύνδεση με τη βάση με τη βοήθεια του string σε
συγκεκριμένο πίνακα (microarray).
OleDbCommand cmd = new OleDbCommand(cmdstring, con);
```





// Έτσι καταχωρούμε σε μια μεταβλητή x τον αριθμό των σειρών και σε μία μεταβλητή y τον αριθμό των στηλών του πίνακα (microarray) που έχουμε επιλέξει.

```
int x = 0;
int y = 0;
try
{
    con.Open();
    r = cmd.ExecuteReader();
    while (r.Read())
    {
        x = Convert.ToInt16(r["ROWS_NUMBER"].ToString());
        y = Convert.ToInt16(r["COLS_NUMBER"].ToString());
        b = x;
        n = y;
    }
}
catch
{
    con.Close()
}
// Κλείνει η σύνδεση. con.Close();

// Κλήση της συνάρτησης. CreateChildControls(x, y);

}
```

// Φτιάχνουμε τον πίνακα (microarray) πάνω σε έναν bitmap λέγοντας του να ζωγραφίσει ορθογώνια σε ανάλογες γραμμές και στήλες ανάλογα με τα x και τα y που του δώσαμε. Στη συνέχεια τον bitmap το τοποθετούμε πάνω σε ένα image και το image πάνω στο panel1.

```
protected void CreateChildControls(int grammes, int sthles)
{
    if (grammes == 0)
        return;
    Bitmap bmp = new Bitmap(sthles * 70 + 10, grammes * 30 +
10);
    Graphics g = Graphics.FromImage(bmp);

    int x = 0;
    int y = 0;
    DataPoints = new Point[grammes, sthles];
    for (int i = 0; i < grammes; i++)
    {
        y = 10 + i * 22;
```



```
for (int j = 0; j < sthles; j++)  
{  
    x = 10 + 70 * j;  
    g.DrawRectangle(new Pen(Color.Red), x, y, 60, 20);  
}  
}
```

```
this.pictureBox1.Width = bmp.Width;  
this.pictureBox1.Height = bmp.Height;  
this.pictureBox1.Image = bmp;
```

```
}  
// Συνάρτηση που συμβαίνει όταν επιλέγουμε ένα συγκεκριμένο  
γονίδιο από το ComboBox που περιέχει τα γονίδια.
```

```
private void comboBox1_SelectedIndexChanged(object sender,  
EventArgs e)  
{
```

```
    // Αρχίζει η σύνδεση με τη βάση .
```

```
    string constr = @"Provider=Microsoft.Jet.OLEDB.4.0;Data  
Source=C:\Anastasia.mdb";
```

```
    // Είναι μία συμβολοσειρά όπου καταχωρούνται τα γονίδια που  
επιλέξαμε μέσω της εντολής select .
```

```
    string cmdstring2 = @"SELECT SEIRA_NOYKLEOTIDIWN.ID,  
SEIRA_NOYKLEOTIDIWN.ONOMA_NOYKLEOTIDION FROM  
SEIRA_NOYKLEOTIDIWN WHERE  
(ID = " + Convert.ToInt16(comboBox1.SelectedIndex.ToString())  
+ ")";
```

```
    // Σύνδεση με τη βάση.
```

```
    OleDbConnection con = new OleDbConnection(constr);
```

```
    // Γίνεται η σύνδεση με τη βάση με τη βοήθεια του string σε  
συγκεκριμένο γονίδιο.
```

```
    OleDbCommand cmd2 = new OleDbCommand(cmdstring2, con);
```



// Σε αυτό το σημείο αφού έχουμε επιλέξει κάποιο γονίδιο κατασκευάζεται ένα label στο panel2. Το label αυτό έχει το όνομα του γονιδίου που έχουμε επιλέξει και τοποθετείται σε μία συγκεκριμένη θέση στην αρχή του panel. Παράλληλα του λέμε να αφήνει κάθε φορά και ένα κένο έτσι ώστε να μην πέφτουν το ένα πάνω στο άλλο τα γονίδια.

```
try
{
    con.Open();
    r = cmd2.ExecuteReader();

    while (r.Read())
    {

        string st = r["ONOMA_NOYKLEOTIDION"].ToString();
        Label l = new Label();

        l.Name = st;
        l.Text = st;
        l.Location = new Point(1, 10 + y);
        y += 22;
        l.MouseDown += new
MouseEventHandler(label_MouseDown); // Με αυτές τις εντολές μας
δίνεται η δυνατότητα να κάνουμε drag κάποιο από τα labels στο panel2.
        panel2.Controls.Add(l);

    }

}
catch
{
    con.Close()
// Κλείνει η σύνδεση.
}
finally
{
    con.Close();
// Κλείνει η σύνδεση.
}

}
```



// Με αυτή τη συνάρτηση επιτρέπεται να γίνει το drop.

```
private void panel1_DragEnter(object sender, DragEventArgs e)
{
    // Με αυτή την εντολή μπορούμε να αφήσουμε το label που έχουμε
    κάνει drag από το panel2 στο panel1.
```

```
    if (e.Data.GetDataPresent("Text"))
    {
        //Το όνομα του γονιδίου καταγράφεται προσωρινά σε ένα effect .
```

```
        e.Effect = DragDropEffects.Copy;
    }
    else
        e.Effect = DragDropEffects.None;
}
```

// Συνάρτηση η οποία παίρνει το όνομα του γονιδίου και το καταχωρεί σε μία συμβολοσειρά. Παίρνει ένα ορθογώνιο σύμφωνα με τις συντεταγμένες, φτιάχνει το κίτρινο φόντο του ορθογωνίου, φτιάχνει το χρώμα με το οποίο θα γραφτεί το γονίδιο (μαύρο), τη συμβολοσειρά με την οποία θα γραφτεί, βρίσκει το σημείο με τον μαθηματικό τύπο και τις συντεταγμένες, ζωγραφίζει το νέο ορθογώνιο το γεμίζει με κίτρινο χρώμα και τοποθετεί το γονίδιο στο κέντρο.

```
private void panel1_DragDrop(object sender, DragEventArgs e)
{
    string s1 = e.Data.GetData("Text", true) as string;
    Graphics g = Graphics.FromImage(pictureBox1.Image);
```

```
    Pen redPen = new Pen(Color.Yellow);
    Font drawFont = new Font("Verdana", 6);
    SolidBrush drawBrush = new SolidBrush(Color.Black);
    Point pt = pictureBox1.PointToClient(new Point(e.X, e.Y));
```

```
    int j = (pt.X - 10) / 70;
    int i = (pt.Y - 10) / 22;
```

```
    Point drawPoint = new Point(10 + j * 70, 10 + i * 22);
```

```
    Rectangle r = new Rectangle(drawPoint, new Size(60, 20));
    g.FillRectangle(new SolidBrush(Color.Yellow), r);
    g.DrawRectangle(new Pen(Color.Red), r);
```

```
    // Set format of string.
    StringFormat drawFormat = new StringFormat();
    drawFormat.Alignment = StringAlignment.Center;
```



```
g.DrawString(s1, drawFont, drawBrush, r);
```

```
pictureBox1.Invalidate();
```

```
delLabel.BackColor = Color.White;
```

```
delLabel = null;
```

```
delnoukl.Enabled = false;
```

```
}
```

// Είναι η drag που τοποθετεί ένα γονίδιο σε ένα προσωρινό text για να το τοποθετήσει στο προσωρινό effect του drop .

```
private void label_MouseDown(object sender, MouseEventArgs e)
```

```
{
```

```
    if (delLabel != null)
```

```
    {
```

```
        delLabel.BackColor = Color.White;
```

```
    }
```

```
    delLabel = ((Label)sender);
```

```
    delLabel.BackColor = Color.Red;
```

```
    delnoukl.Enabled = true;
```

```
    string koko = ((Label)sender).Text;
```

```
    DoDragDrop(koko, DragDropEffects.Copy);
```

```
}
```

// Με την παρακάτω συνάρτηση πάμε στο panel2 που είναι τοποθετημένο πάνω σε ένα PictureBox και που πάνω σε αυτό είναι τα labels με τα γονίδια. Μπορούμε να μαρκάρουμε με κόκκινο χρώμα κάθε ένα από αυτά τα γονίδια και στη συνέχεια πατώντας το button της «διαγραφής» να διαγράψουμε όποιο από αυτά τα γονίδια θέλουμε . Στην ουσία το βάζει σε ένα κόκκινο ορθογώνιο. Καταλαβαίνει πιο label είναι αφού διαβάσει τη θέση του κέρσορα.

```
private void pictureBox1_DoubleClick(object sender, EventArgs e)
```

```
{
```

```
    Graphics g = Graphics.FromImage(pictureBox1.Image);
```

```
    Point pt = pictureBox1.PointToClient(new Point(MousePosition.X, MousePosition.Y));
```

```
    int j = (pt.X - 10) / 70;
```

```
    int i = (pt.Y - 10) / 22;
```

```
    Point drawPoint = new Point(10 + j * 70, 10 + i * 22);
```

```
    Rectangle r = new Rectangle(drawPoint, new Size(60, 20));
```



```
g.FillRectangle(new SolidBrush(Color.White), r);  
g.DrawRectangle(new Pen(Color.Red), r);  
pictureBox1.Invalidate();
```

```
}
```

// Εκτύπωση. Η συνάρτηση είναι έτοιμη μέσα στις βιβλιοθήκες της C# .net. Απλώς αυτό που λέμε είναι να πάρει το image που έχει τον πίνακα με τα γονίδια και να το βάλει μέσα σε ένα PrintPage και μετά σε ένα Document. Τέλος ανοίγει τον διάλογο για την επιλογή του εκτυπωτή.

```
private void button4_Click_2(object sender, EventArgs e)  
{  
  
    if (pictureBox1.Image != null)  
    {  
  
        PrintDocument TmpPrntPicDoc = new PrintDocument();  
        TmpPrntPicDoc.DefaultPageSettings.Landscape = true;  
        TmpPrntPicDoc.PrintPage += new  
PrintPageEventHandler(TmpPrntPicDoc_PrintPage);  
        PrintPreviewDialog TempPPD = new PrintPreviewDialog();  
        TempPPD.Document = TmpPrntPicDoc;  
        TempPPD.ShowDialog();  
  
    }  
  
}
```

// Η συνάρτηση που βάζει το image στο PrintPage.

```
private void TmpPrntPicDoc_PrintPage(object sender,  
System.Drawing.Printing.PrintPageEventArgs e)  
{  
  
    e.Graphics.DrawImage(pictureBox1.Image, 0, 0);  
  
}
```



// Button της « τυχαίας τοποθέτησης». Η συνάρτηση αυτή εκτελείται όταν οι θέσεις του πίνακα που έχουμε επιλέξει είναι περισσότερες από τα γονίδια που έχουν επιλεγεί και τοποθετηθεί στο panel2. Η παρακάτω διαδικασία εκτελείται για κάθε γονίδιο που υπάρχει στο panel2. Γίνονται τα ίδια ακριβώς βήματα με εκείνα που εκτελούνται στη χειροκίνητη τοποθέτηση.

```
private void button5_Click(object sender, EventArgs e)
{
    if (pictureBox1.Image == null)
    {
        return;
    }
    int count = n * b;
    if (count >= panel2.Controls.Count)
    {
        System.Random kkk = new System.Random();
        for (int k = 0; k < panel2.Controls.Count; k++)
        {

            string s1 = panel2.Controls[k].Text.ToString();
            Graphics g = Graphics.FromImage(pictureBox1.Image);

            Pen redPen = new Pen(Color.Yellow);
            Font drawFont = new Font("verdana", 6);
            SolidBrush drawBrush = new SolidBrush(Color.Black);

            int j = Convert.ToInt32(kkk.NextDouble() * (b - 1));
            int i = Convert.ToInt32(kkk.NextDouble() * (n - 1));
            Point drawPoint = new Point(10 + j * 70, 10 + i * 22);
            Rectangle r = new Rectangle(drawPoint, new Size(60, 20));
            g.FillRectangle(new SolidBrush(Color.Yellow), r);
            g.DrawRectangle(new Pen(Color.Red), r);

            // Set format of string.
            StringFormat drawFormat = new StringFormat();
            drawFormat.Alignment = StringAlignment.Center;

            g.DrawString(s1, drawFont, drawBrush, r);

            pictureBox1.Invalidate();

        }
        panel2.Controls.Clear();
        y = 10;
    }
    else
    {
```



```
        MessageBox.Show("Οι σειρές είναι περισσότερες από τα κουτιά  
του πίνακα. Διαλέξτε μεγαλύτερο πίνακα.");  
    }  
}  
  
// Button της ανανέωσης.  
private void button6_Click(object sender, EventArgs e)  
{  
    panel2.Controls.Clear();  
    y = 0;  
    pictureBox1.Image = null;  
}  
// Button της διαγραφής.  
  
private void delnoukl_Click(object sender, EventArgs e)  
{  
    panel2.Controls.Remove(delLabel);  
    delnoukl.Enabled = false;  
    if (panel2.Controls.Count == 0)  
    {  
        y = 0;  
    }  
}  
  
}  
  
private void panel2_Paint(object sender, PaintEventArgs e)  
{  
  
}}}
```





## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β: ΚΩΔΙΚΑΣ ΤΗΣ ΦΟΡΜΑΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΛΛΑΓΗ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ

```
// Βιβλιοθήκες.  
  
using System;  
using System.Collections.Generic;  
using System.ComponentModel;  
using System.Data;  
using System.Data.OleDb;  
using System.Drawing;  
using System.Text;  
using System.Windows.Forms;  
  
namespace AnastTest  
{  
    public partial class Form2 : Form  
    {  
        public int IDnoukl;  
        public Form2()  
        {  
            InitializeComponent();  
  
            private void Form2_Load(object sender, EventArgs e)  
            {  
                LoadComboboxes(); // Χρειάζεται για να τρέξουν τα Components  
του προγράμματος.  
            }  
        }  
  
        // Button της «αποθήκευσης».  
  
        private void button1_Click(object sender, EventArgs e)  
        {  
            // Σύνδεση με τον constructor.  
            string constr = @"Provider=Microsoft.Jet.OLEDB.4.0;Data  
Source=C:\\Anastasia.mdb";  
            // Βάζει το νέο όνομα στο αντίστοιχο string που έχουμε επιλέξει  
σύμφωνα με το ID του  
            string cmdstring = @" UPDATE SEIRA_NOYKLEOTIDIWN SET  
SEIRA_NOYKLEOTIDIWN = @TEXT WHERE ID = @ID";  
            // Σύνδεση και εκτέλεση του string.  
            OleDbConnection con = new OleDbConnection(constr);  
            OleDbCommand cmd = new OleDbCommand(cmdstring, con);
```



```
// Το text που λέμε στο string έχει το όνομα του textbox.  
cmd.Parameters.AddWithValue("@TEXT",  
textBox1.Text.ToString());  
// Το ID είναι το ID του γονιδίου που έχουμε επιλέξει.  
cmd.Parameters.AddWithValue("@IDnoukl",  
comboBox1.SelectedIndex );  
con.Open();  
// Καταχώρηση της αλλαγής.  
cmd.ExecuteNonQuery();  
con.Close();  
// Ανανεώνει και το Combobox με τα γονίδια στην φόρμα 1 (Form1) -  
κλείσιμο της φόρμας.  
Form1 f1 = new Form1();  
f1.LoadComboboxes();  
Close();
```

```
}
```

```
private void button2_Click(object sender, EventArgs e)
```

```
{
```

```
    Close();
```

```
}
```

// Όταν ανοίγει η φόρμα τρέχει η LoadComboboxes όπου εκτελείται η ίδια ακριβώς διαδικασία με εκείνη που περιγράφεται στη φόρμα 1 (Form1). Ουσιαστικά γεμίζει το Combobox με τα γονίδια.

```
public void LoadComboboxes()  
{  
  
    comboBox1.Items.Clear();  
    string constr = @"Provider=Microsoft.Jet.OLEDB.4.0;Data  
Source=C:\Anastasia.mdb";  
    string cmdstring2 = @"SELECT SEIRA_NOYKLEOTIDIWN.ID,  
SEIRA_NOYKLEOTIDIWN.ONOMA_NOYKLEOTIDION FROM  
SEIRA_NOYKLEOTIDIWN";  
  
    OleDbConnection con = new OleDbConnection(constr);  
  
    OleDbCommand cmd2 = new OleDbCommand(cmdstring2, con);  
  
    comboBox1.Items.Insert(0, "-----");  
    comboBox1.SelectedIndex = 0;  
    try  
    {  
        con.Open();
```



```
OleDbDataReader r = cmd2.ExecuteReader();
while (r.Read())
{
    comboBox1.Items.Insert(Convert.ToInt16(r["ID"]),
r["ONOMA_NOYKLEOTIDIION"].ToString());
}
r.Close();
}
catch (Exception)
{

}
finally
{
    con.Close();
}
}
```

// Αφού επιλεγθεί το ανάλογο γονίδιο για το οποίο θα γίνει η αλλαγή και αφού έχει διαβαστεί πρώτα από τη βάση τοποθετείται στο Textbox1.

```
private void comboBox1_SelectedIndexChanged(object sender,
EventArgs e)
{
    OleDbDataReader r;
    string constr = @"Provider=Microsoft.Jet.OLEDB.4.0;Data
Source=C:\\Anastasia.mdb";
    string cmdstring = @" SELECT SEIRA_NOYKLEOTIDIWN.ID,
SEIRA_NOYKLEOTIDIWN.SEIRA_NOYKLEOTIDIWN
FROM SEIRA_NOYKLEOTIDIWN
WHERE (((SEIRA_NOYKLEOTIDIWN.ID)=" +
Convert.ToInt16(comboBox1.SelectedIndex) + ")";
    OleDbConnection con = new OleDbConnection(constr);
    OleDbCommand cmd = new OleDbCommand(cmdstring, con);
    con.Open();
    r = cmd.ExecuteReader();
    if (r.Read())
    {
        textBox1.Text = r["SEIRA_NOYKLEOTIDIWN"].ToString();
    }
    r.Close();
    con.Close();
    //textBox1.Text = IDnoukl.ToString();*/
}}}
```



## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Γ: ΚΩΔΙΚΑΣ ΤΗΣ ΦΟΡΜΑΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΚΑΙ ΚΑΤΑΧΩΡΗΣΗ ΝΕΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ

```
// Βιβλιοθήκες

using System;
using System.Collections.Generic;
using System.ComponentModel;
using System.Data;
using System.Data.OleDb;
using System.Drawing;
using System.Text;
using System.Windows.Forms;

namespace AnastTest
{
    public partial class NeaSeira : Form
    {
        public NeaSeira()
        {
            InitializeComponent(); // Χρειάζεται για να τρέξουν τα
            Components του προγράμματος.
        }

        private void button1_Click(object sender, EventArgs e)
        {
            // Σύνδεση με τον constructor.
            string constr = @"Provider=Microsoft.Jet.OLEDB.4.0;Data
            Source=C:\Anastasia.mdb";

            // Φτιάχνει ένα string οπου με αυτό θα τοποθετηθεί το νέο γονίδιο
            στον πίνακα με τα γονίδια σύμφωνα πάντα με αυτά που έχουμε γράψει στο
            textbox1 και textbox2 αντίστοιχα.
            string cmdstring = @"INSERT INTO SEIRA_NOYKLEOTIDIWN
            (SEIRA_NOYKLEOTIDIWN,ΟΝΟΜΑ_NOYKLEOTIDION)
            VALUES('" + textBox1.Text.ToString() + "','"
            + textBox2.Text.ToString() + "') ";

            // Σύνδεση και εκτέλεση του string.
            OleDbConnection con = new OleDbConnection(constr);
            OleDbCommand cmd = new OleDbCommand(cmdstring, con);
            con.Open();
            // Καταχώρηση της αλλαγής.
            cmd.ExecuteNonQuery();
            con.Close();
        }
    }
}
```



// Ανανεώνει και το Combobox με τα γονίδια στην φόρμα 1 (Form1) και κλείσιμο της φόρμας. Για να γίνει αυτό θα πρέπει να πατηθεί και το button της ενημέρωσης στη κεντρική φόρμα.

```
Form1 f1 = new Form1();
f1.LoadComboboxes();

Close();
}

private void button2_Click(object sender, EventArgs e)
{
    Close();
}

private void textBox2_TextChanged(object sender, EventArgs e)
{
}

private void textBox1_TextChanged(object sender, EventArgs e)
{
}

private void NeaSeira_Load(object sender, EventArgs e)
{
}
}
}
```



## **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

- [1] Διαδικτυακός τόπος που ασχολείται με θέματα των επιστημών (<http://www.sciencenews.gr> )
- [2] Πληροφορικό Σύστημα Υποβοήθησης Ιατρικής Διάγνωσης Βάσει δεδομένων μικροσυστοιχιών DNA (Ηλίας Ν. Φλαούντας, Δημήτρης Ε. Μαρούλης, Δημήτρης Ε. Ιακωβίδης, Σταύρος Α. Καρκάνης )
- [3] Διαδικτυακός τόπος που ασχολείται με θέματα των επιστημών (<http://www.sciencedaily.com>)
- [4] Εταιρία κατασκευής των DNA chips (<http://www.affymetrix.com>)
- [5] Εταιρία κατασκευής των DNA chips (<http://www.agilent.com/>)
- [6] Εταιρία κατασκευής των DNA chips (<http://www.illumina.com/>)
- [7] Διαδικτυακός τόπος που ασχολείται με θέματα των επιστημών (<http://www.perfectdisplay.com>)
- [8] Διαδικτυακός τόπος εφημερίδας που περιλαμβάνει άρθρα που αφορούν τα DNA chips (<http://www.berkeleydailyplanet.com>)
- [9] Διαδικτυακός τόπος που ασχολείται με θέματα των επιστημών (<http://www.forbes.com>)
- [10] Διαδικτυακός τόπος που ασχολείται με τα DNA chips (<http://www.gene-chips.com>)
- [11] Διαδικτυακός τόπος που ασχολείται με τα επιτεύγματα της γενετικής (<http://www.pharmacogenomics.com>)
- [12] Διαδικτυακός τόπος περιοδικού που ασχολείται με θέματα των επιστημών (<http://www.devicelink.com>)
- [13] Εγκυκλοπαίδεια διαδυσκίου ([http://en.wikipedia.org/wiki/DNA\\_microarray](http://en.wikipedia.org/wiki/DNA_microarray))
- [14] Άρθρο ("New Chips On The Block") από εφημερίδα (<http://www.economist.com>)
- [15] DNA Chips (Miikka Jokelainen TKK Systeemitekniikan laboratorio, Otaniementie 17, 02150 Espoo P. (09) 451 5201, telefax (09) 451 5208, e-mail [mjokelai@cc.hut.fi](mailto:mjokelai@cc.hut.fi))



- [16] The Microrevolution: Applications and impacts of microarray technology on molecular biology and medicine (ZACHARIAH G.GOLDSMITH and N. DHANASEKARAN Fels Institute for Cancer Research and Molecular Biology, Temple University School of Medicine, Philadelphia, PA 19140, USA)
- [17] Η τεχνολογία των "μικροδιατάξεων" (microarrays) και εφαρμογές στην ογκολογία. (*Samuel Murray*)
- [18] Affymetrix GeneChip system: moving from research to the clinic. (Giannis Ragoussis and Gareth Elvidge)
- [19] Pro .NET 2.0 Windows Forms and Custom Controls in C# (Matthew MacDonald)
- [20] Διαδικτυακός τόπος για τα επιτεύγματα της γενετικής.  
([http://www.ivf.gr/pressroom\\_19.html](http://www.ivf.gr/pressroom_19.html))
- [21] Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. (Laura J. van 't Veer, Hongyue Dai , Marc J. van de Vijver , Yudong D. He, Augustinus A. M. Hart , Mao Mao, Hans L. Peterse, Karin van der Kooy , Matthiew J. Marton, Anke T. Witteveen ,George J. Schreiber, Ron M. Kerkhoven, Chris Roberts ,Peter S. Linsley, Rene Bernards & Stephen H. Friend )
- [22] Διαδικτυακός τόπος περιοδικού επιστημών.  
(<http://www.sciencemag.org/products/dnachips.dtl>)