

Φύλλο απαντήσεων

Από το DNA στη θεραπεία

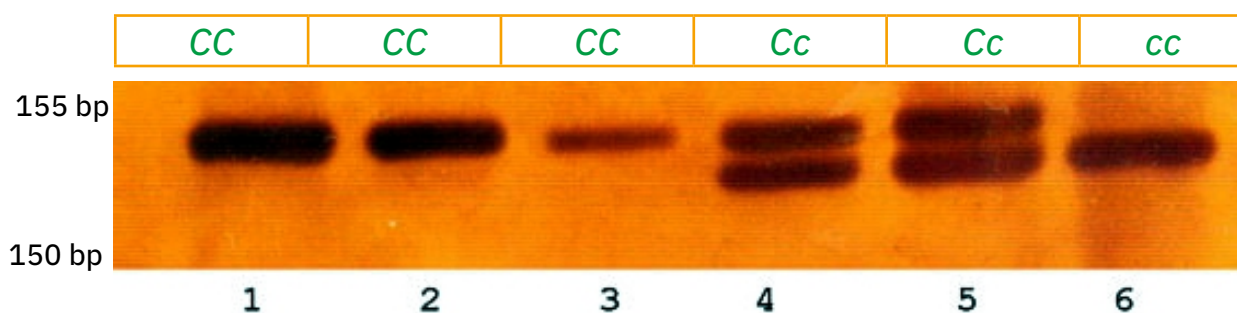
Δραστηριότητα μέσω υπολογιστή για τη γονιδιωματική



ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ 1

1 Α. Εξετάστε σε κάθε στήλη, τις ζώνες DNA που αντιπροσωπεύουν γονιδιακά τμήματα από έξι διαφορετικά έμβρυα. Προσδιορίστε και σημειώστε κάθε στήλη ως εξής:

- Σημειώστε "CC" στις στήλες από έμβρυα με ομόζυγο γονίδιο CFTR φυσικού τύπου.
- Σημειώστε "Cc" στις στήλες από έμβρυα με ετερόζυγο γονίδιο CFTR.
- Σημειώστε "cc" στις στήλες από έμβρυα με ομόζυγο γονίδιο CFTR που φέρουν τη μετάλλαξη delF508.



1 Β. Εξηγήστε γιατί τα έμβρυα 4 και 5 είναι απίθανο να αναπτύξουν κυστική ίνωση.

Καθώς η κυστική ίνωση είναι μια αυτοσωμική υπολειπόμενη γενετική διαταραχή, η νόσος εκδηλώνεται μόνο όταν μεταλλάσσονται και τα δύο αλληλόμορφα γονίδια (ένα από τη μητέρα και ένα από τον πατέρα). Τα άτομα 4 και 5 έχουν ένα από τα αλληλόμορφα τους μεταλλαγμένο, ενώ το άλλο είναι φυσικού τύπου, όπως φαίνεται από τις δύο διακριτές ζώνες στο πήκτωμα – η κάτω είναι το κατά 3 βάσεις (bp) μικρότερο μεταλλαγμένο αλληλόμορφο και η πάνω είναι το αλληλόμορφο φυσικού τύπου, το οποίο έχει μήκος 154 bp. Δεδομένου ότι ένα λειτουργικό αλληλόμορφο είναι ικανό να παράξει αρκετή λειτουργική πρωτεΐνη CFTR για να εξασφαλίσει τη μεταφορά ιόντων χλωρίου και την παραγωγή βλέννας, οι ασθενείς 4 και 5 είναι απίθανο να αναπτύξουν κυστική ίνωση.

ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ 2

2 Α. Χρησιμοποιήστε το BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) για να εξετάσετε τις αλληλουχίες DNA των τριών ασθενών με κυστική ίνωση που ακολουθούν και να προσδιορίσετε ποια μετάλλαξη φέρουν.

Ασθενής 1

Θέση της μετάλλαξης και αλλαγή νουκλεοτιδίου: **127023G>A**

Τύπος: **αντικατάσταση**

Όνομα μετάλλαξης σύμφωνα με τους κανόνες σύνταξης: **NG_016465.4:g.127023G>A**

Ασθενής 2

Θέση της μετάλλαξης και αλλαγή νουκλεοτιδίου: **126995G>T**

Τύπος: **αντικατάσταση**

Όνομα μετάλλαξης σύμφωνα με τους κανόνες σύνταξης: **NG_016465.4:g.126995G>T**

Ασθενής 3

Θέση της μετάλλαξης και αλλαγή νουκλεοτιδίου: **192094C>G**

Τύπος: **αντικατάσταση**

Όνομα μετάλλαξης σύμφωνα με τους κανόνες σύνταξης: **NG_016465.4:g.192094C>G**

2 Β. Διερευνήστε τις επιπτώσεις των μεταλλάξεων με τη χρήση του ClinVar.

Ασθενής 1

Αντικατάσταση αμινοξέος: **G551D (Gly551Asp)**

Παθογόνο: **Ναι**

Ασθενής 2

Αντικατάσταση αμινοξέος: **G542* (Gly542Ter)**

Παθογόνο: **Ναι**

Ασθενής 3

Αντικατάσταση αμινοξέος: **N1303K (Asn1303Lys)**

Παθογόνο: **Ναι**

ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ 3

3 Α. Ανατρέξτε στον ΠΙΝΑΚΑ 1 του ενημερωτικού φυλλαδίου για την κυστική ίνωση, όπου θα βρείτε πληροφορίες σχετικά με τις μεταλλάξεις που σχετίζονται με τη νόσο και τον τρόπο με τον οποίο επηρεάζουν τις κυτταρικές διεργασίες. Στη συνέχεια απαντήστε στις ερωτήσεις που ακολουθούν.

Προσδιορίστε και καταχωρίστε στον πίνακα ποια κατηγορία μετάλλαξης αντιστοιχεί σε ποιον ασθενή.

Κατηγορία κυστικής ίνωσης	Κατηγορία 1	Κατηγορία 2	Κατηγορία 3
Μετάλλαξη σε επίπεδο DNA	126995 G>T	192094 C>G	127023 G>A
Ασθενής με κυστική ίνωση	Ασθενής 2	Ασθενής 3	Ασθενής 1

3 Β. Ανατρέξτε ξανά στον πίνακα και εξηγήστε ποιες από τις κυτταρικές διεργασίες που αναφέρονται στο παρακάτω πλαίσιο είναι διαταραγμένες στους εξεταζόμενους ασθενείς.

Μεταγραφή, Μετάφραση, Μεταφορά πρωτεϊνών, Μεταφορά ιόντων χλωρίου

Ασθενής 1

Η μετάλλαξη αντικατάστασης βάσης από γουανίνη σε αδενίνη στο DNA του Ασθενούς 1 οδηγεί στην αντικατάσταση ενός αμινοξέος από ένα άλλο. Η μετάλλαξη δεν επηρεάζει τη φυσιολογική μεταγραφή και μετάφραση της πρωτεΐνης ή τη μεταφορά της στη μεμβράνη. Ωστόσο, η μετάλλαξη παρεμβαίνει στην ικανότητα της πρωτεΐνης να ανοίγει σωστά, επηρεάζοντας έτσι τη μεταφορά ιόντων χλωρίου προς την επιφάνεια του κυττάρου.

Ασθενής 2

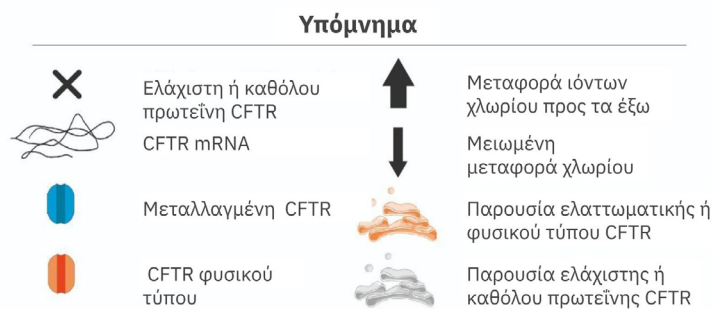
Η μετάλλαξη αντικατάστασης βάσης της γουανίνης σε θυμίνη στο DNA του Ασθενούς 2 δημιουργεί ένα πρόωρο κωδικόνιο λήξης στο mRNA του CFTR, προκαλώντας τη διακοπή της μετάφρασης της πρωτεΐνης πριν από την ολοκλήρωση της πλήρους σύνθεσης της, με αποτέλεσμα να παραχθεί ένα μικρότερο πρωτεϊνικό προϊόν. Σημειώνεται, πως ένα σύστημα επιτήρησης στο κύτταρο έχει τη δυνατότητα να εντοπίζει και να αποικοδομεί τέτοια mRNA με πρόωρα κωδικόνια λήξης, αποτρέποντας τη μετάφραση του mRNA. Συνεπώς, η μετάφραση της πρωτεΐνης CFTR δεν ολοκληρώνεται επιτυχώς. Δεδομένου ότι υπάρχει ελάχιστη έως καθόλου πρωτεΐνη CFTR στην κυτταρική μεμβράνη, η μεταφορά ιόντων προς το εξωτερικό του κυττάρου διαταράσσεται.

Ασθενής 3

Η μετάλλαξη αντικατάστασης βάσης της κυτοσίνης σε γουανίνη στο DNA αυτού του ασθενούς έχει ως αποτέλεσμα την αντικατάσταση ενός αμινοξέος από ένα άλλο, οδηγώντας σε διαταραχή της πρωτεϊνικής αναδίπλωσης στο χώρο και της λειτουργίας της ως κανάλι μεταφοράς ιόντων. Η ελαττωματική αναδίπλωση της πρωτεΐνης εμποδίζει τη μεταφορά της πρωτεΐνης προς την κυτταρική μεμβράνη, επηρεάζοντας έτσι και τη μεταφορά ιόντων προς το εξωτερικό του κυττάρου.

ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ 3 - ΣΥΝΕΧΕΙΑ

3 Γ. Παρακάτω παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικά κύτταρα από ένα υγιές άτομο και άτομα με κυστική ίνωση. Εξετάστε την επίδραση που έχουν ορισμένες μεταλλάξεις στην παραγωγή της πρωτεΐνης CFTR και αντιστοιχίστε τα κύτταρα με τους ασθενείς που τις φέρουν.



3 Δ. Παρακάτω παρουσιάζεται σχηματικά ένα τμήμα του κωδικοποιητικού πλαισίου του γονιδίου CFTR και των αντίστοιχων αμινοξέων του. Σε αυτό εμφανίζεται η μετάλλαξη deltaF508 η οποία οφείλεται σε έλλειψη 3 νουκλεοτιδίων από το αρχικό DNA του αλληλομόρφου φυσικού τύπου. Κοιτάζοντας το παρακάτω σχήμα και τον τροχό των κωδικονίων στα ενημερωτικά φυλλάδια, προβλέψτε αν το αμινοξύ στη θέση 507 θα επηρεαζόταν με οποιονδήποτε τρόπο.



Μετά την έλλειψη της νουκλεοτιδικής τριπλέτας CTT από την κωδικοποιούσα περιοχή, ο γενετικός κώδικας (TTT) για τη φαινυλαλανίνη (F) χάνεται/διαταράσσεται εμποδίζοντας τη μεταγραφή και τη μετάφραση αυτής της πληροφορίας. Αυτή η διαγραφή τριών νουκλεοτιδίων οδηγεί επίσης σε αλλαγή του γενετικού κώδικα για το αμινοξύ στη θέση 507. Μετά τη διαγραφή του κωδικονίου CTT, το κωδικόνιο ACT για την ισολευκίνη αλλάζει σε ATT. Ωστόσο, αυτό το κωδικόνιο κωδικοποιεί επίσης το ίδιο αμινοξύ, αποτρέποντας την απώλεια πληροφοριών για την ισολευκίνη στη θέση 507.

ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ 4

4 Α. Γνωρίζοντας την επίδραση που έχουν οι διάφορες μεταλλάξεις του *CFTR* στην πρωτεΐνη, προσδιορίστε τις πιθανές θεραπευτικές επιλογές από τον παρακάτω κατάλογο που είναι οι πλέον κατάλληλες για κάθε ασθενή. Εξηγήστε το σκεπτικό σας.

Κατάλογος φαρμάκων:

- ELX-02/θεραπεία "ανάγνωσης" – προάγει την ανάγνωση των mRNAs με μεταλλάξεις χωρίς νόημα, παρακάμπτοντας τα πρόωρα κωδικόνια λήξης και επιτρέποντας τη σύνθεση λειτουργικών πρωτεϊνών πλήρους μήκους και τη σωστή μεταφορά ιόντων χλωρίου.
- Ivacaftor/θεραπεία με "ενισχυτή" - συνδέεται με την ελαττωματική πρωτεΐνη CFTR στην κυτταρική μεμβράνη και βοηθά να διατηρηθούν ανοιχτοί οι διάλυτοι χλωρίου.
- Lumacaftor/θεραπεία "διορθωτή" - βοηθά τις λανθασμένα αναδιπλωμένες πρωτεΐνες να αποκτήσουν τη σωστή τους μορφή.
- Orkambi- εμπορικό φάρμακο που περιέχει lumacaftor και ivacaftor.

Ασθενής 1

Ο Ασθενής 1 φέρει μια μετάλλαξη που εμποδίζει το σωστό άνοιγμα της πρωτεΐνης-διαύλου, οδηγώντας σε μειωμένη μεταφορά ιόντων χλωρίου μέσω αυτής. Αυτό το ελάττωμα στη λειτουργία της πρωτεΐνης μπορεί να αμβλυνθεί με τη χρήση ενός φαρμάκου που βοηθά την πρωτεΐνη να διατηρεί το κανάλι των ιόντων χλωρίου ανοιχτό. Σε αυτή την περίπτωση, η θεραπεία θα ήταν δυνατή με ivacaftor.

Ασθενής 2

Ο Ασθενής 2 φέρει μια μετάλλαξη που οδηγεί στο σχηματισμό ενός πρόωρου κωδικονίου λήξης στο mRNA του CFTR. Αυτό εμποδίζει τη μετάφραση του mRNA του CFTR σε πρωτεϊνικό προϊόν πλήρους μήκους. Για την αντιστάθμιση αυτού του κυτταρικού ελλείμματος, μια προσέγγιση "ανάγνωσης" με το σκεύασμα ELX-02 συνιστάται στη θεραπεία αυτού του ασθενούς.

Ασθενής 3

Αυτός ο ασθενής φέρει μια μετάλλαξη που προκαλεί την αντικατάσταση ενός αμινοξέος, η οποία οδηγεί σε λανθασμένη αναδίπλωση της πρωτεΐνης CFTR και ακατάλληλη λειτουργία του διαύλου ιόντων. Για τη θεραπεία των ασθενών με αυτή τη μετάλλαξη, θα χρειαζόταν ένα μείγμα φαρμακευτικών σκευασμάτων, που θα επέτρεπε πρώτον, τη σωστή αναδίπλωση της πολυπεπτιδικής αλυσίδας CFTR και δεύτερον - μόλις η πρωτεΐνη φτάσει στην κυτταρική μεμβράνη - την διατήρηση της ορθής λειτουργίας του διαύλου. Ως εκ τούτου, μια αγωγή με lumacaftor και ivacaftor (Orkambi) θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για τη θεραπεία αυτού του ασθενούς.

ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ 4 - ΣΥΝΕΧΕΙΑ

4 Β. Σας παραπέμφθηκε ένας νέος ασθενής με συμπτώματα κυστικής ίνωσης. Μετά την αλληλούχιση του γονιδιώματος του ασθενούς, ανακαλύπτετε ότι το άτομο φέρει δύο διαφορετικές μεταλλάξεις στο γονίδιο *CFTR*. Ενώ το ένα αλληλόμορφο περιέχει τη μετάλλαξη N1303K, το άλλο αλληλόμορφο περιέχει τη μετάλλαξη G542X. Έχοντας κατά νου αυτές τις πληροφορίες, να προβλέψετε εάν μια θεραπεία με συνδυασμό lumacaftor και ivacaftor θα ήταν επαρκής για να ανακουφίσει το ελάττωμα που προκαλείται από τις μεταλλάξεις.

Αν και το lumacaftor μπορεί να βοηθήσει στην επιδιόρθωση των λανθασμένα αναδιπλωμένων πρωτεϊνών που δημιουργούνται από τη μετάλλαξη N1303K και το ivacaftor διατηρεί τους ανοικτούς τους διαύλους ιόντων χλωρίου, η παραγωγή της CFTR σε επίπεδο μετάφρασης από το mRNA θα εξακολουθήσει να είναι μειωμένη. Εκτός από αυτά τα δύο φαρμακευτικά σκευάσματα, για να διορθωθούν οι κυτταρικές διεργασίες που διαταράσσονται από τις δύο μεταλλάξεις, θα χρειαζόταν ένα επιπλέον σκευάσμα, όπως η ELX-02 που θα εμποδίζει τον πρόωρο τερματισμό της μετάφρασης της πρωτεΐνης CFTR και θα βοηθούσε στην παραγωγή περισσότερης CFTR.

4 Γ. Στο τέλος της εργάσιμης ημέρας σας, συντάξτε μια σύντομη έκθεση που να συνοψίζει την εργασία σας σχετικά με τα τελευταία περιστατικά κυστικής ίνωσης, συμπληρώνοντας τα κενά που ακολουθούν.

πρωτεϊνών, ClinVar, αλληλούχιση, BLAST, παθογόνου, DNA, θεραπεία, μετάλλαξη

DNA από κάθε ασθενή απομονώθηκε και υποβλήθηκε σε **αλληλούχιση**. Οι αλληλουχίες που αποκτήθηκαν ευθυγραμμίστηκαν με μια αλληλουχία γονιδιώματος αναφοράς με το εργαλείο **BLAST**, και προσδιορίστηκε το προφίλ μεταλλάξεων του γονιδιώματος κάθε ασθενούς. Στη συνέχεια, ένας γρήγορος έλεγχος στη βάση δεδομένων **ClinVar** αποκάλυψε την επίδραση των μεταλλάξεων του ασθενούς σε επίπεδο **πρωτεϊνών** και επέτρεψε την κατηγοριοποίηση της μετάλλαξης ως **παθογόνου**. Με βάση τις διαθέσιμες πληροφορίες σχετικά με τις πιθανές θεραπευτικές επιλογές για κάθε **μετάλλαξη**, συνταγογραφήθηκε η καλύτερη **θεραπεία** για κάθε ασθενή.