

Φύλλο εργασίας μαθητή

Από το DNA στη θεραπεία

Δραστηριότητα μέσω υπολογιστή για τη γονιδιωματική



Προετοιμασία εκτός τάξης

Εξοικειωθείτε με το αντικείμενο του διδακτικού πόρου παρακολουθώντας δύο βίντεο και διαβάστε τις πληροφορίες που παρέχονται στα [ενημερωτικά φυλλάδια](#).

Βίντεο για να παρακολουθήσετε:

(5 λεπτά και 10 δευτερόλεπτα): [Exploring the genome](#)

(2 λεπτά και 30 δευτερόλεπτα): [Cystic Fibrosis Mechanism and Treatment | HHMI BioInteractive Video](#)

Αξιολογήστε τι έχετε μάθει μέχρι στιγμής απαντώντας στις παρακάτω ερωτήσεις.

Αναφέρετε τον ρόλο της πρωτεΐνης CFTR στα κύτταρα που παράγουν βλέννα.

.....

.....

Εξηγήστε πώς συντίθεται η πρωτεΐνη CFTR από το γονίδιο *CFTR*.

.....

.....

Αναφέρετε σε ποιο τμήμα του κυττάρου βρίσκεται η πρωτεΐνη CFTR.

.....

.....

Περιγράψτε τη μοριακή βάση της κυστικής ίνωσης.

.....

.....

Αντιστοιχίστε τις παρακάτω γνωστές μεταλλάξεις της κυστικής ίνωσης με την περιγραφή του τρόπου μέσω του οποίου παρεμποδίζουν τη σωστή λειτουργία της πρωτεΐνης CFTR.

Αποτέλεσμα
Η συντιθέμενη πρωτεΐνη φτάνει στην κυτταρική μεμβράνη αλλά έχει ελαττωματικό κανάλι.
Η σύνθεση της πρωτεΐνης CFTR διακόπτεται πρόωρα στο mRNA και η πρωτεΐνη CFTR της μεμβράνης είναι λίγο έως καθόλου λειτουργική.
Η πρωτεΐνη CFTR δεν είναι σωστά διπλωμένη και επομένως δεν μπορεί να μεταφερθεί στην κυτταρική μεμβράνη.

Μετάλλαξη
126995 G>T (G542X)
192094 C>G (N1303K)
127023 G>A (G551D)

Περιγράψτε πώς μπορεί να χρησιμοποιηθεί η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα για την ταυτοποίηση ατόμων/εμβρύων με κυστική ίνωση που φέρουν τη μετάλλαξη delF508.

.....

.....

Αναφέρετε τον τρόπο κληρονόμησης που χαρακτηρίζει την κυστική ίνωση.

.....

.....

Δραστηριότητα 1

Ανάγνωση πηκτώματος αγαρόζης για την ταυτοποίηση εμβρύων με τη μετάλλαξη CFTR delF508 (15 λεπτά)

Στην Ευρώπη, ένα σε κάθε 2.500 έως 3.500 μωρά που γεννιούνται κινδυνεύει να αναπτύξει κυστική ίνωση. Τα άτομα με κυστική ίνωση φέρουν διάφορες μεταλλάξεις στο γονίδιο *CFTR* (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator), οι οποίες όταν μεταλλάσσονται, μπορούν να οδηγήσουν σε ελαττωματική παραγωγή βλέννας σε διάφορα όργανα, όπως οι πνεύμονες και το πεπτικό σύστημα. Μια τέτοια μετάλλαξη που προκαλεί κυστική ίνωση είναι η έλλειψη 3 νουκλεοτιδίων σε μια συγκεκριμένη θέση στο εξώνιο 10 του γονιδίου *CFTR*. Αυτή η μετάλλαξη, επίσης γνωστή ως delF508, εισάγει ένα πρόωρο κωδικόνιο λήξης στο αγγελιαφόρο RNA (mRNA). Η εισαγωγή του κωδικονίου λήξης έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή μιας ατελούς πρωτεΐνης. Αυτή η ατελής πρωτεΐνη είναι λανθασμένα διπλωμένη και αποικοδομείται. Μεταξύ περισσότερων από 300 μεταλλάξεων στο γονίδιο *CFTR*, η συγκεκριμένη μετάλλαξη είναι η πιο συχνή στους ασθενείς με κυστική ίνωση.

Η κυστική ίνωση είναι μια διαδεδομένη γενετική πάθηση που εκδηλώνεται όταν ένα μεταλλαγμένο γονίδιο *CFTR*, τόσο από τη μητέρα όσο και από τον πατέρα, μεταβιβάζεται στο μωρό τους. Στα κέντρα εξωσωματικής γονιμοποίησης (IVF) ελέγχονται τα **γενετικά αποτυπώματα DNA (DNA fingerprints)** των εμβρύων για να εξακριβωθεί αν τα γονίδια *CFTR* φέρουν τη μετάλλαξη delF508. Παρακάτω απεικονίζεται **ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης** από μια κλινική εξωσωματικής γονιμοποίησης που πραγματοποιεί γενετικό έλεγχο σε έμβρυα. Σε αυτή τη συγκεκριμένη ανάλυση, ένα μικρό τμήμα μεγέθους 154 ζευγών βάσεων (bp) του εξωνίου 10 του *CFTR* ενισχύεται με τη χρήση **αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR)** και απεικονίζεται σε πήκτωμα αγαρόζης ως μια ζώνη των 154 bp για το αλληλόμορφο φυσικού τύπου του γονιδίου και ως μια ζώνη των 151 bp, κατά 3 bp μικρότερη, για το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο (μετάλλαξη delF508).

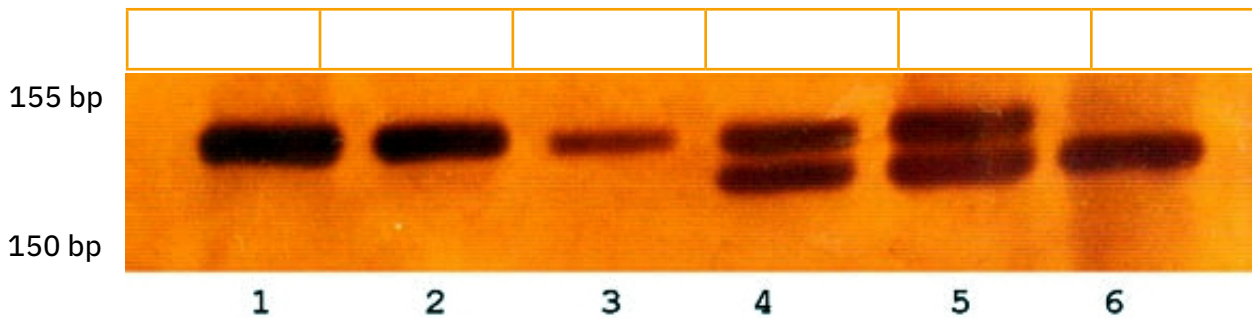
Απαντήστε στις ερωτήσεις που ακολουθούν και βοηθήστε το προσωπικό του κέντρου IVF, να εντοπίσει τα έμβρυα που φέρουν μεταλλαγμένα γονίδια *CFTR*, ώστε να τα επιλέξει πριν από την εξωσωματική γονιμοποίηση.

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.

ΥΠΟΔΕΙΞΗ! Όλοι οι όροι με **έντονη γραφή** βρίσκονται στο [Γλωσσάριο](#).

Δραστηριότητα 1 - συνέχεια



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

Δραστηριότητα 2

Προσδιορισμός μεταλλάξεων σε ασθενείς με κυστική ίνωση (30 λεπτά)

Παραδοσιακά, η διάγνωση της κυστικής ίνωσης βασίζεται σε κλινικά συμπτώματα που υποδηλώνουν τη νόσο ή/και σε θετικό οικογενειακό ιστορικό. Τα συμπτώματα επηρεάζουν συνήθως τους αεραγωγούς, το γαστρεντερικό σύστημα και άλλα συστήματα.

Υποθέστε ότι είστε γενετικός σύμβουλος σε νοσοκομείο που ειδικεύεται στις αναπνευστικές και γαστρεντερικές διαταραχές και ότι σας έχουν παραπεμφθεί τρεις ασθενείς επειδή έχουν συμπτώματα που υποδηλώνουν κυστική ίνωση, αλλά δεν έχουν γνωστό οικογενειακό ιστορικό. Γνωρίζοντας ότι η κυστική ίνωση είναι γενετική διαταραχή, για να την επιβεβαιώσετε πρέπει να γνωρίζετε αν οι ασθενείς φέρουν μεταλλάξεις στο γονίδιο *CFTR*. Αφού απομονώθηκε το DNA των ασθενών και στάλθηκε στη συνέχεια για αλληλούχιση, έχετε τώρα τα δεδομένα της αλληλούχισης για να τα αναλύσετε.

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.

Δραστηριότητα 2 – συνέχεια

Το BLAST είναι ένα ευρέως χρησιμοποιούμενο εργαλείο βιοπληροφορικής για τη σύγκριση αλληλουχιών από πρωτογενή βιολογικά δεδομένα, όπως οι αλληλουχίες αμινοξέων των πρωτεϊνών ή τα νουκλεοτίδια των αλληλουχιών DNA, με μια βάση δεδομένων παρόμοιων αλληλουχιών. Ως εκ τούτου, το BLAST είναι χρήσιμο για τον εντοπισμό μεταλλάξεων σε ένα δεδομένο δείγμα σε σύγκριση με μια αλληλουχία αναφοράς.

1. Μεταβείτε στον ιστότοπο [BLAST](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) στη διεύθυνση <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
2. Ακολουθήστε τις οδηγίες που παρέχονται στον [Οδηγό για το BLAST και το ClinVar](#) σχετικά με τη χρήση των εργαλείων. Για να δείτε ένα σύντομο επεξηγηματικό βίντεο σχετικά με τη χρήση του BLAST και του ClinVar, [πατήστε εδώ](#).
3. Εισάγετε τις γενετικές αλληλουχίες κάθε ασθενούς στο εργαλείο BLAST για να τις αναλύσετε.

>Ασθενής 1

CTAAAATTTTCAGCAATGTTGTTTTTGACCACTAAATAAATTGCATTTGAAATAATG-
GAGATGCAATGTTCAAAATTTCAACTGTGGTTAAAGCAATAGTGTGATATATGATTACATT-
AGAAGGAAGATGTGCCTTTCAAATTCAGATTGAGCATACTAAAAGTGACTCTCTAATTTTC-
TATTTTTGGTAATAGGACATCTCCAAGTTTGCAGAGAAAGACAATATAGTTCTTTGGAGAA-
GGTGAATCACAACGAGTGGAGATCAACGAGCAAGAATTTCTTTAGCAAGGTGAATAAC-
TAATTATTGGTCTAGCAAGCATTTGCTGTAAATGTCATTTCATGTAAAAAAAT

>Ασθενής 2

CTAAAATTTTCAGCAATGTTGTTTTTGACCACTAAATAAATTGCATTTGAAATAATG-
GAGATGCAATGTTCAAAATTTCAACTGTGGTTAAAGCAATAGTGTGATATATGATTACATT-
AGAAGGAAGATGTGCCTTTCAAATTCAGATTGAGCATACTAAAAGTGACTCTCTAATTTTC-
TATTTTTGGTAATAGGACATCTCCAAGTTTGCAGAGAAAGACAATATAGTTCTTTGAGAA-
GGTGAATCACAACGAGTGGAGGTCAACGAGCAAGAATTTCTTTAGCAAGGTGAATAAC-
TAATTATTGGTCTAGCAAGCATTTGCTGTAAATGTCATTTCATGTAAAAAAAT

>Ασθενής 3

TGTTTCTTATTTTAAAATAATTTTCTACTTGAAATATTTTACAATACAATAAGG-
GAAAAATAAAAAGTTATTTAAGTTATTCATACTTTCTTCTTTCTTTTCTTTTCTTTTCT-
AGAAAGTATTTATTTTCTGGAACATTTAGAAAAAAGTTGGATCCCTATGAACAGTG-
GAGTGATCAAGAAATATGGAAAGTTGCAGATGAGGTAAGGCTGCTAACTGAAATGATTTT-
GAAAGGGGTAACATACCAACACAAATGGCTGATATAGCTGACATCAT

Κρατήστε σημειώσεις για τα παρακάτω:

- Την ακριβή θέση της μετάλλαξης και την αλλαγή του νουκλεοτιδίου
- Τον τύπο της μετάλλαξης (προσθήκη, έλλειψη, αντικατάσταση, αναστροφή ή διπλασιασμός).
- Ακολουθήστε τις οδηγίες σχετικά με τους **Κανόνες σύνταξης** γονιδιώματος [Οδηγό για το BLAST και το ClinVar](#), για να δώσετε στη μετάλλαξη DNA κάθε ασθενούς ένα όνομα που να συμμορφώνεται με τους Κανόνες σύνταξης γονιδιώματος.

Δραστηριότητα 2 – συνέχεια

ΣΗΜΕΙΩΣΗ! Οι Κανόνες σύνταξης που αναμένεται να ακολουθήσετε αποτελούν μέρος της ονοματολογίας HGVS η οποία είναι ένα διεθνώς αναγνωρισμένο πρότυπο για την περιγραφή των μεταλλάξεων σε αλληλουχίες DNA, RNA και πρωτεϊνικές αλληλουχίες.

ΥΠΟΔΕΙΞΗ! Σύνδεσμος σε σύντομο επεξηγηματικό βίντεο με οδηγίες για τη χρήση του BLAST και του ClinVar: https://youtu.be/J4JkH_VD59k.

Ασθενής 1

Θέση μετάλλαξης και νουκλεοτιδική αλλαγή:.....
 Τύπος:
 Όνομα μετάλλαξης σύμφωνα με τους κανόνες σύνταξης:

Ασθενής 2

Θέση μετάλλαξης και νουκλεοτιδική αλλαγή:.....
 Τύπος:
 Όνομα μετάλλαξης σύμφωνα με τους κανόνες σύνταξης:

Ασθενής 3

Θέση μετάλλαξης και νουκλεοτιδική αλλαγή:.....
 Τύπος:
 Όνομα μετάλλαξης σύμφωνα με τους κανόνες σύνταξης:

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

Τώρα που έχετε εντοπίσει την ακριβή αλλαγή σε επίπεδο DNA που υπάρχει στα δείγματα των ασθενών και έχετε σημειώσει τα ονόματα των μεταλλάξεων για κάθε μία από αυτές, επισκεφθείτε τον ιστότοπο [ClinVar](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/) για να μάθετε περισσότερα για αυτές τις γενετικές παραλλαγές και τις συσχετίσεις τους με την κυστική ίνωση.

Το ClinVar είναι μια ελεύθερα προσβάσιμη, δημόσια βάση δεδομένων που περιέχει αναφορές για τη συσχέτιση ανθρώπινων γενετικών παραλλαγών και φαινοτύπων με την ανθρώπινη υγεία, συνοδευόμενες από υποστηρικτικά στοιχεία. Διατηρείται από το Εθνικό Κέντρο Βιοτεχνολογικών Πληροφοριών (NCBI), το οποίο αποτελεί μέρος της Εθνικής Βιβλιοθήκης Ιατρικής των Ηνωμένων Πολιτειών (NLM).

1. Επισκεφθείτε τον ιστότοπο της ClinVar στη διεύθυνση <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>.
2. Χρησιμοποιήστε τη λειτουργία αναζήτησης στον δικτυακό τόπο ClinVar για να εισαγάγετε τις αναγνωρισμένες μεταλλάξεις χρησιμοποιώντας τα ονόματά τους.
3. Για κάθε μετάλλαξη, σημειώστε ποια αλλαγή προκαλεί σε επίπεδο αμινοξέων.
4. Σημειώστε αν οι μεταλλάξεις που εντοπίσατε ταξινομούνται ως παθογόνες για την κυστική ίνωση.

Δραστηριότητα 2 – συνέχεια

Ασθενής 1

.....

.....

.....

Ασθενής 2

.....

.....

.....

Ασθενής 3

.....

.....

.....

Δραστηριότητα 3

Επιπτώσεις των μεταλλάξεων στις κυτταρικές διεργασίες (30 λεπτά)

Οι μεταλλάξεις του *CFTR* που προκαλούν κυστική ίνωση ταξινομούνται σε έξι διαφορετικές ομάδες. Κάθε κατηγορία μετάλλαξης επηρεάζει την παραγωγή της πρωτεΐνης CFTR με διαφορετικό τρόπο, με αποτέλεσμα να προκύπτουν πρωτεΐνες με διαφορετικό βαθμό δυσλειτουργίας. Αυτό σημαίνει ότι οι ασθενείς με κυστική ίνωση που οφείλεται σε διαφορετικούς τύπους δυσλειτουργικών πρωτεϊνών CFTR μπορεί να χρειαστεί να λάβουν εξατομικευμένη θεραπεία προκειμένου να αντισταθμίσουν τη μειωμένη λειτουργία της πρωτεΐνης και να έχουν το καλύτερο θεραπευτικό αποτέλεσμα.

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			

Δραστηριότητα 3 – συνέχεια

3 B. 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

.....

.....

.....

.....

.....

.....

Ασθενής 2

.....

.....

.....

.....

.....

.....

Ασθενής 3

.....

.....

.....

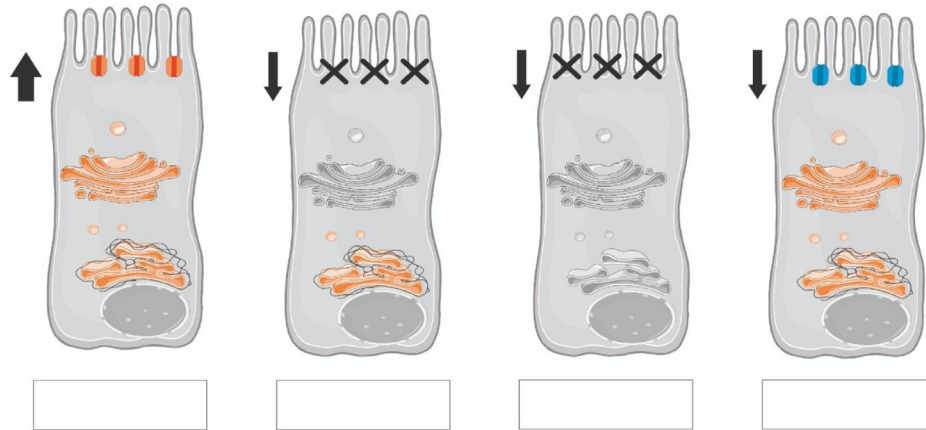
.....

.....

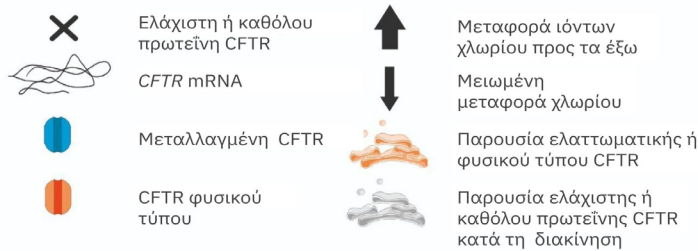
.....

Δραστηριότητα 3 – συνέχεια

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.



Υπόμνημα



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.



Δραστηριότητα 4

Εύρεση πιθανών θεραπευτικών επιλογών για την κυστική ίνωση (15 λεπτά)

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 δίαυλοι 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

.....

.....

.....

.....

.....

.....

Ασθενής 2

.....

.....

.....

.....

.....

.....

Ασθενής 3

.....

.....

.....

.....

.....

.....

Δραστηριότητα 4 – συνέχεια

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.

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

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