

## Η ασθένεια Gaucher

Η νόσος Gaucher είναι μια σπάνια γενετική διαταραχή, με την υψηλότερη συχνότητα εμφάνισης να παρατηρείται μεταξύ των Εβραίων της φυλής Ασkenάζι (καταγωγή από Ανατολική Ευρώπη). Τα προσβεβλημένα άτομα δε μπορούν να μεταβολίσουν συγκεκριμένα λιπίδια, κυρίως εξαιτίας έλλειψης του ενζύμου *γλυκοκερεβροσιδάση* (GCA), με αποτέλεσμα τη συσσώρευση των γλυκοκερεβροσιδίων στο αίμα και άλλους ιστούς του σώματος. Η έλλειψη του ενζύμου προκαλείται από μια μετάλλαξη στο γονίδιο που κωδικοποιεί το ένζυμο GCA.

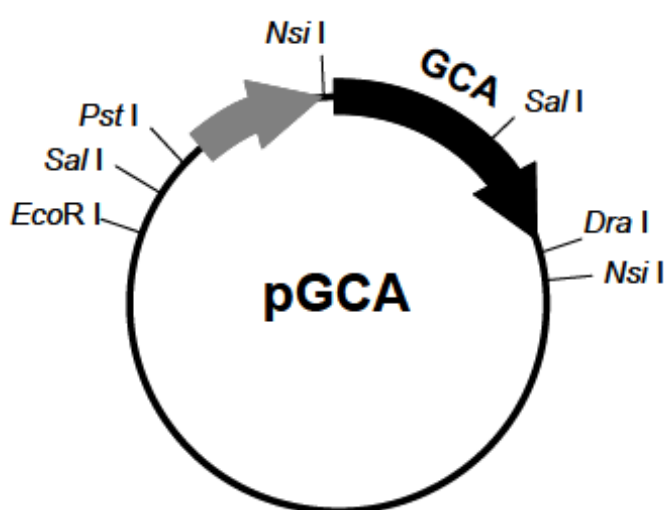
Σε μια προσπάθεια να αναπτύξετε γονιδιακή θεραπεία για τη νόσο, έχετε κατά νου να ακολουθήσετε την παρακάτω «φιλόδοξη» στρατηγική:

- θα δημιουργήσετε ένα αντίγραφο του φυσιολογικού αλληλόμορφου που κωδικοποιεί το ένζυμο GCA και εκφράζεται μόνο στα ηπατικά κύτταρα,
- θα εισαγάγετε το γονίδιο σε ανθρώπινα ηπατικά κύτταρα, χρησιμοποιώντας ως φορέα τον μη παθογόνο ιό HEP-RC, ο οποίος προσβάλλει μόνο ηπατικά κύτταρα, και
- θα μεταμοσχεύσετε τα γενετικά τροποποιημένα ηπατικά κύτταρα στο συκώτι του ασθενούς, ελπίζοντας ότι με τον τρόπο αυτό ο/η ασθενής θα είναι σε θέση να μεταβολίσει τα γλυκοκερεβροσίδια.

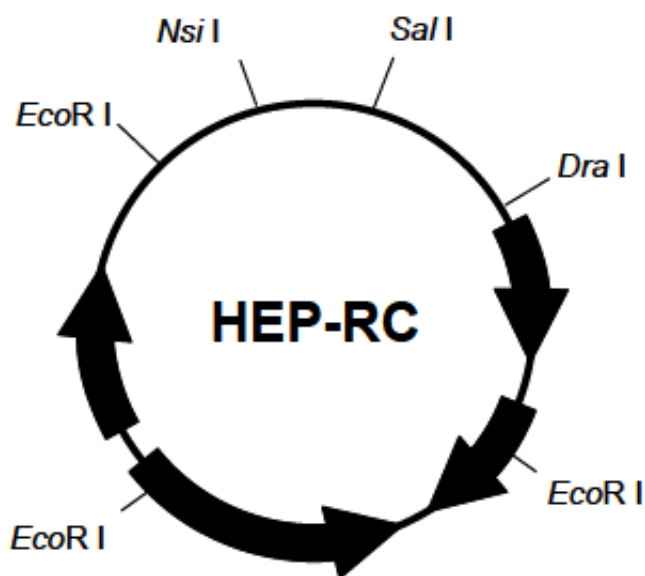
Στόχος σας είναι να κατασκευάσετε ένα ανασυνδυασμένο μόριο ιικού DNA που να περιέχει το γονίδιο που κωδικοποιεί το ένζυμο GCA και τον υποκινητή του από το πλασμίδιο pGCA με το σωστό προσανατολισμό.

Στην Εικόνα 1 φαίνεται ο χάρτης του πλασμιδίου pGCA, που περιλαμβάνει: (α) το φυσιολογικό αλληλόμορφο που κωδικοποιεί το ένζυμο GCA (μεγάλο μαύρο βέλος), (β) τον υποκινητή (γκρι βέλος), και (γ) τις θέσεις αναγνώρισης των περιοριστικών ενδονουκλεασών που κόβουν σε αυτό.

Στην Εικόνα 2, επίσης, μπορείτε να δείτε το δίκλωνο κυκλικό μόριο DNA του ιού HEP-RC, που περιλαμβάνει: (α) αρκετά γονίδια (μαύρα βέλη), και (β) τις θέσεις αναγνώρισης των περιοριστικών ενδονουκλεασών που κόβουν σε αυτό. Σημειώστε ότι τα γονίδια του ιού δεν πρέπει να κοπούν, αν πρόκειται να διατηρηθεί το DNA του ιού εντός του ηπατικού κυττάρου.



Εικόνα 1



Εικόνα 2

|        |                                |
|--------|--------------------------------|
| EcoR I | 5' ...G <u>A A T T C</u> ...3' |
|        | 3' ...C T T A A <u>G</u> ...5' |
| Sal I  | 5' ...G <u>T C G A C</u> ...3' |
|        | 3' ...C A G C T <u>G</u> ...5' |
| Pst I  | 5' ...C T G C A <u>G</u> ...3' |
|        | 3' ...G <u>A C G T C</u> ...5' |
| Nsi I  | 5' ...A T G C A <u>T</u> ...3' |
|        | 3' ...T <u>A C G T A</u> ...5' |
| Dra I  | 5' ...T T T <u>A A A</u> ...3' |
|        | 3' ...A A A <u>T T T</u> ...5' |

Πίνακας 1

Στον Πίνακα 1 βλέπετε τις αλληλουχίες αναγνώρισης των ενδονουκλεασών. Με κόκκινη γραμμή σημειώνονται τα σημεία δράσης κάθε ενδονουκλεάσης μέσα στην αλληλουχία αναγνώρισης.

- 1 Ποια/ποιες περιοριστική/ές ενδονουκλεάση/ες θα χρησιμοποιήσετε για να αποκόψετε την περιοχή του πλασμιδίου «υποκινητής-γονίδιο GCA», ώστε να την εισαγάγετε αργότερα στο DNA του ιού HEP-RC;

- 2 Ποια/ποιες περιοριστική/ές ενδονουκλεάση/ες θα χρησιμοποιήσετε για να κόψετε το DNA του ιού HEP-RC, ώστε να ενσωματώσει το θραύσμα «υποκινητής-γονίδιο GCA»;

3. Σύμφωνα με τις απαντήσεις που δώσατε στα ερωτήματα 3. και 4, πώς θα πραγματοποιηθεί η εισαγωγή του θραύσματος «υποκινητής-γονίδιο GCA» στο ιικό DNA; Εξηγήστε.