

#### 4.1

α. Κατά την εφαρμογή της γονιδιακής θεραπείας με το *ex vivo* πρωτόκολλο, τα κύτταρα παραλαμβάνονται από τον ασθενή και πολλαπλασιάζονται σε κυτταροκαλλιέργειες. Το φυσιολογικό γονίδιο ενσωματώνεται σε έναν ιό-φορέα (ο οποίος έχει καταστεί αβλαβής) με τις τεχνικές του ανασυνδυασμένου DNA και ο γενετικά τροποποιημένος ιός εισάγεται στα κύτταρα της καλλιέργειας. Στην περίπτωση που τα πάσχοντα κύτταρα δεν μπορούν να απομονωθούν από τον οργανισμό του ασθενή (όπως π.χ. στην περίπτωση των νευρικών κυττάρων) ή/και που η τροποποίησή τους μέσα στο σώμα του ασθενούς είναι ευκολότερη από την απομόνωσή τους (π.χ. κύτταρα του αναπνευστικού επιθηλίου) καταφεύγουμε σε εφαρμογή γονιδιακής θεραπείας *in vivo*. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η θεραπεία της κυστικής ίνωσης, όπου στα πάσχοντα κύτταρα του αναπνευστικού επιθηλίου εισάγεται, με τη βοήθεια βρογχοσκοπίου, *in vivo* το φυσιολογικό γονίδιο.

β. Τα γενετικά τροποποιημένα ευκαρυωτικά κύτταρα είναι ικανά να ζουν και να αναπαράγονται μεταφέροντας στα θυγατρικά κύτταρα τις καινούργιες ιδιότητες. Επομένως, το νέο χαρακτηριστικό αναμένεται να διατηρείται στα τροποποιημένα κύτταρα, ενόσω αυτά βρίσκονται σε καλλιέργεια. Στη συνέχεια τα γενετικά τροποποιημένα κύτταρα εισάγονται στον ασθενή, προκειμένου να αποκατασταθεί ο παθολογικός φαινότυπος. Βέβαια, τα τροποποιημένα κύτταρα, όταν πρόκειται για κύτταρα αίματος, δεν ζουν εφ' όρους ζωής μέσα στον οργανισμό του ασθενούς -δηλαδή η θεραπεία δεν είναι μόνιμη- και χρειάζεται συνεχής έγχυση τέτοιων κυττάρων. Επίσης, δεν γίνεται αντικατάσταση του μεταλλαγμένου γονιδίου στα κύτταρα του οργανισμού, αλλά ενσωμάτωση του φυσιολογικού αντιγράφου του, στο γονιδίωμά συγκεκριμένων σωματικών κυττάρων, και όχι των άωρων γεννητικών κυττάρων ή των γαμετών. Συνεπώς, το νέο χαρακτηριστικό δεν μεταβιβάζεται στους απογόνους του ατόμου που υφίσταται την γονιδιακή θεραπεία.

#### 4.2

α. Από την παρουσία ελεύθερης φωσφορικής ομάδας στο ένα άκρο διαπιστώνουμε ότι θα αποτελεί το 5' ελεύθερο άκρο του, ενώ το άλλο άκρο θα είναι, αντίστοιχα, το 3' ελεύθερο άκρο του κλώνου DNA. Οπότε η αλληλουχία έχει προσανατολισμό 5'--TTTCAA-ATG-AGT-AAA-AAA-AAA-ACG-TAA-GTATGGGTT--3'. Για να διαπιστώσουμε αν η δοθείσα αλυσίδα DNA είναι η κωδική αλυσίδα του γονιδίου, αναζητούμε την τριπλέτα νουκλεοτιδίων ATG διαβάζοντας το μόριο με κατεύθυνση 5'-->3', έτσι ώστε να προκύψει ένα μόριο mRNA με

το κωδικόνιο έναρξης της μετάφρασης 5' AUG 3', όταν η RNA πολυμεράση τοποθετήσει συμπληρωματικά ριβονουκλεοτίδια ως προς τη μη κωδική (μεταγραφόμενη) αλυσίδα. Επίσης, αναζητούμε και μία τριπλέτα που να αντιστοιχεί, κατά τον ίδιο τρόπο σε ένα από τα τρία κωδικόνια λήξης της μετάφρασης δηλ. UGA, UAG ή UAA με προσανατολισμό 5'→3'. Διαπιστώνουμε ότι στη δοθείσα αλυσίδα υπάρχει η τριπλέτα 5' ATG 3' στην αρχή του μορίου και μετά από 6 συνεχόμενες, μη επικαλυπτόμενες τριπλέτες νουκλεοτιδίων υπάρχει και η τριπλέτα 5' TAA 3' που αντιστοιχεί στο κωδικόνιο λήξης 5' UAA 3'. Αντίθετα, τα κωδικόνια αυτά δεν εντοπίζονται στη συμπληρωματική της. Άρα η δοθείσα αλυσίδα DNA είναι η κωδική και η αλληλουχία του μορίου mRNA που θα προκύψει θα είναι: 5'--UUUCCAA-AUG-AGU-AAA-AAA-AAA-ACG-UAA-GUAUGGGUU--3'. Έτσι, από τη μετάφραση του παραπάνω μορίου προκύπτει ένα ολιγοπεπτίδιο με 6 αμινοξέα καθώς από τις 7 τριπλέτες νουκλεοτιδίων που αντιστοιχούν στα 7 κωδικόνια, το τελευταίο κωδικόνιο λήξης της μετάφρασης 5' UAA 3' δεν αντιστοιχεί σε αμινοξύ.

β. Για να απαντήσουμε αν το συγκεκριμένο πλασμίδιο είναι κατάλληλο πρέπει να ελέγξουμε αν θα κοπεί από την περιοριστική ενδονουκλεάση EcoRI, μέσα στο γονίδιο ανθεκτικότητας. Το δίκλωνο τμήμα:

5'TTTCCAA-ATG-AGT-AAA-AAA-AAA-ACG-TAA-GTATGGGT3'

3'AAAGGTT-TAC-TCA-TTT-TTT-TTT-TGC-ATT-CATACCCAA5'

δεν φέρει την δίκλωνη αλληλουχία αναγνώρισης του ενζύμου, δηλαδή την αλληλουχία 5'GAATTC3' και τη συμπληρωματική της. Επομένως, μετά την πέψη με την περιοριστική ενδονουκλεάση EcoRI, δεν θα κοπεί το γονίδιο που κωδικοποιεί το πεπτίδιο αντοχής στο αντιβιοτικό αμπικιλίνη, το οποίο αποτελεί και το μοναδικό γονίδιο ανθεκτικότητας του πλασμιδίου. Άρα, τα πλασμίδια είναι κατάλληλα ως φορείς κλωνοποίησης, ως προς την προϋπόθεση αυτή. Ωστόσο, θα πρέπει επιπρόσθετα να ελεγχθεί αν το πλασμίδιο κόβεται από την EcoRI σε άλλη σημαντική θέση όπως είναι η θέση έναρξης της αντιγραφής, καθώς και αν, με τον τρόπο που κόβει, επιτρέπει την επιλογή των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων από τα μη ανασυνδυασμένα, στα μετασχηματισμένα βακτήρια.