

ΒΙΟΛΟΓΙΑ

ΘΕΤΙΚΗΣ ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗΣ

ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΜΕΝΟ DNA – ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΕΣ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΘΕΩΡΙΑ ΚΑΙ ΣΥΝΔΥΑΣΤΙΚΑ ΘΕΜΑΤΑ

Στο γονιδίωμα ενός ανώτερου ευκαρυωτικού οργανισμού εντοπίζεται ένα γονίδιο που κωδικοποιεί πρωτεΐνη με φαρμακευτικές εφαρμογές. Το γονίδιο απομονώνεται από τον οργανισμό και στη συνέχεια κλωνοποιείται.

A. Για ποιους λόγους πραγματοποιείται η κλωνοποίηση των γονιδίων των οργανισμών; Με ποιους τρόπους είναι σήμερα εφικτή η κλωνοποίηση αλληλουχιών του DNA των οργανισμών;

B. Να περιγράψετε τη μέθοδο με την οποία είναι εφικτή η κλωνοποίηση του συγκεκριμένου γονιδίου με σκοπό την παραγωγή της φαρμακευτικής πρωτεΐνης.

Γ. Να περιγράψετε τον ρόλο καθενός εκ των ενζύμων που χρησιμοποιούνται στη μέθοδο που αναφέρατε στο προηγούμενο ερώτημα.

Δ. Σε ποιους λόγους οφείλεται η δυνατότητα παραγωγής των φαρμακευτικών πρωτεϊνών ανώτερων οργανισμών σε βακτήρια;

E. Ένας ανιχνευτής υβριδοποιεί την κωδική αλυσίδα του γονιδίου της εν λόγω φαρμακευτικής πρωτεΐνης. Από 100 βακτήρια που το καθένα περιέχει 10 ανασυνδυασμένα πλασμίδια με το συγκεκριμένο γονίδιο απομονώθηκε το πλήρες γενετικό τους υλικό και μετά την αποδιάταξή τους προστέθηκαν 2.000 μόρια του ανιχνευτή. Πόσα μόρια του ανιχνευτή θα συνδεθούν με τις αλυσίδες που προέκυψαν από την αποδιάταξη; Να αιτιολογήσετε την απάντησή σας.

ΑΠΑΝΤΗΣΕΙΣ

A. Απαραίτητη προϋπόθεση για τη μελέτη ενός συγκεκριμένου γονιδίου (τη μελέτη δηλαδή της αλληλουχίας των βάσεων του γονιδίου) καθώς και για την παραγωγή της πρωτεΐνης που αυτό κωδικοποιεί αποτελεί η δημιουργία πολλών αντιγράφων του γονιδίου.

Η κλωνοποίηση αλληλουχιών του DNA των οργανισμών είναι σήμερα εφικτή με την:

- κατασκευή γονιδιωματικής βιβλιοθήκης,
- κατασκευή cDNA βιβλιοθήκης,
- αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).

Από τη δημιουργία των βιβλιοθηκών προκύπτουν κλώνοι βακτηρίων, στους οποίους περιλαμβάνεται και εκείνος που περιέχει το επιθυμητό γονίδιο. Μετά την απομόνωση του κλώνου αυτού και τον πολλαπλασιασμό των βακτηρίων του κλώνου, δημιουργούνται πολλά αντίγραφα του γονιδίου που περιέχει.

Η μέθοδος της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης επιτρέπει την επιλεκτική αντιγραφή, επί εκατομμύρια φορές, ειδικών αλληλουχιών DNA από ένα μίγμα μορίων DNA, χωρίς τη μεσολάβηση ζωντανού κυττάρου, δηλαδή χωρίς την επίπονη διαδικασία της κλωνοποίησης σε βακτήρια. ▶



εκδόσεις
ΠΟΥΚΑΜΙΣΑΣ

κυκλοφορούν

Βιολογία
Γ' Λυκείου
Γενικής Παιδείας
Ν. Λαζαράκη,
Ι. Σαράντος



Βιολογία
Γ' Λυκείου
Θετική Κατεύθυνση
Ν. Λαζαράκη



ΘΕΤΙΚΗΣ
ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗΣΕΠΙΜΕΛΕΙΑ:
ΝΟΤΑ ΛΑΖΑΡΑΚΗ
ΙΩΑΝΝΑ ΚΑΛΛΙΩΡΑ
ΙΟΥΛΙΑ ΜΕΝΤΗ

Μεταξύ των φαρμακευτικών πρωτεϊνών που έχουν παραχθεί με την τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA αποτελούν η καλσιτονίνη που χρησιμοποιείται στη θεραπεία της οστεοπόρωσης και η αυξητική ορμόνη για τη θεραπεία δυσλειτουργιών της σωματικής ανάπτυξης.

ΒΙΟΓΡΑΦΙΕΣ

Τζο Χιν Τζιο
(1916-2001)

Αμερικανός γενετιστής, γεννημένος από Κινέζους γονείς στην Ιάβα της Ινδονησίας. Αρχικά έκανε σπουδές αγρονομίας στην Ιαπωνία. Μετά τον Β' Παγκόσμιο Πόλεμο εγκαταστάθηκε στην Ολλανδία, η κυβέρνηση της οποίας του ανέθεσε έρευνες γύρω από τα ανθρώπινα γονίδια. Οι έρευνες του Τζιο επεκτάθηκαν στη Δανία, την Ισπανία και τη Σουηδία. Ο επιστημονικός μελέτες του γύρω από τα ανθρώπινα χρωμοσώματα ξεκίνησαν στη Σαραγόσα το 1948. Σε ένα επιστημονικό ταξίδι στη Σουηδία τον Δεκέμβριο του 1955, ο Τζιο μπήκε στο Ινστιτούτο Γενετικής του Πανεπιστημίου του Λουντ ως επιστημονικός επισκέπτης και μαζί με τον Σουηδό πανεπιστημιακό Άλμπερτ Λέβαν έβαλαν στο μικροσκόπιο τα διπλοειδή κύτταρα του ανθρώπου. Σαν σήμερα 26 Ιανουαρίου του 1956 στη σκανδιναβική εφημερίδα «Hereditas» ο Τζιο δημοσιοποίησε την ανακάλυψη ότι τα διπλοειδή κύτταρα του ανθρώπου περιέχουν 46 χρωμοσώματα και όχι 48, όπως μέχρι τότε πιστευόταν. Δύο χρόνια αργότερα ο Τζιο κλήθηκε στις ΗΠΑ, όπου του δόθηκε διευθυντική θέση στο Εθνικό Ινστιτούτο Υγείας του Μέριλαντ. Από αυτό το πόστο συνέχισε και διεύρυνε τις επιστημονικές του έρευνες.

Β. Η παραγωγή βιολογικά ενεργών πρωτεϊνών σε βακτήρια επιτυγχάνεται σήμερα με τη cDNA βιβλιοθήκη. Η κατασκευή της cDNA βιβλιοθήκης περιλαμβάνει τα ακόλουθα στάδια:

- Απομόνωση ολικού ώριμου mRNA από το κυτταρόπλασμα.
- Σύνθεση του συμπληρωματικού DNA (cDNA) με τη βοήθεια της αντίστροφης μεταγραφάσης και δημιουργία των υβριδικών μορίων cDNA-mRNA.
- Αποδιάταξη και απομάκρυνση του mRNA από τα υβριδικά μόρια με χρήση χημικών ουσιών, οι οποίες διασπών το mRNA, και αποδιάταξη του mRNA από το cDNA με θέρμανση.
- Σύνθεση της συμπληρωματικής DNA αλυσίδας με καλούπτι το μονόκλωνο cDNA.
- Κατασκευή ανασυνδυασμένων πλασμιδίων (όπως στη γονιδιωματική βιβλιοθήκη).
- Μετασχηματισμός βακτηρίων με τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια.
- Επιλογή των βακτηρίων που έχουν προσλάβει το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο με αντιβιοτικό, όπως συμβαίνει και στη γονιδιωματική βιβλιοθήκη.
- Κλωνοποίηση και επιλογή των μετασχηματισμένων κυττάρων-ξενιστών.
- Επιλογή του βακτηριακού κλώνου που περιέχει το επιθυμητό τμήμα DNA.
- Καλλιέργεια του μικροβίου και απομόνωση της πρωτεΐνης.

Γ. Τα ένζυμα που απαιτούνται για την κατασκευή μίας cDNA βιβλιοθήκης είναι:

■ Η **αντίστροφη μεταγραφάση** χρησιμοποιείται για τη σύνθεση των cDNA αλυσίδων και τον σχηματισμό των υβριδικών μορίων cDNA-mRNA μετά την απομόνωση του συνολικού ώριμου mRNA από το κυτταρόπλασμα του κυττάρου που εκφράζει το συγκεκριμένο γονίδιο. Πρόκειται για ένζυμο που υπάρχει σε ορισμένους RNA ιούς, περισσότερο συγκεκριμένα του ρετροϊούς, η οποία χρησιμοποιεί ως καλούπτι το RNA για να συνθέσει DNA.

■ Η **DNA πολυμεράση** είναι το ένζυμο που συνθέτει τις θυγατρικές αλυσίδες DNA απέναντι από τις μητρικές και ο ρόλος του είναι γνωστός από τον αυτοδιπλασιασμό του DNA. Κατά την κατασκευή της cDNA βιβλιοθήκης, η DNA πολυμεράση χρησιμοποιείται μετά την αποδιάταξη του υβριδικού mRNA-cDNA, οπότε οι αλυσίδες cDNA χρησιμεύουν ως καλούπτι για τη σύνθεση συμπληρωματικών αλυσίδων DNA και τη δημιουργία δίκλωνων τμημάτων DNA. Όλοι οι οργανισμοί διαθέτουν DNA πολυμεράση, αλλά η απομόνωσή τους είναι πρόσφορη κυρίως από τα βακτήρια.

■ Οι **περιοριστικές ενδονουκλεάσες** είναι ένζυμα που παράγονται από τα βακτήρια, από όπου και συνεπώς απομονώνονται, και ο φυσιολογικός τους ρόλος είναι να τα προστατεύουν από την εισβολή «ξένου» DNA, καθώς αναγνωρίζουν ειδικές αλληλουχίες βάσεων τις οποίες και κόβουν σε καθορισμένες θέσεις. Κατά τον σχηματισμό μίας cDNA βιβλιοθήκης, οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες κόβουν το πλασμίδιο (δηλαδή τον φορέα κλωνοποίησης, που μπορεί να είναι επίσης DNA φάγου) σε μία θέση και προκαλούν τον σχηματισμό σε αυτό μονόκλωνων άκρων από αζευγάρωτες βάσεις στα κομμένα άκρα. Με ειδική τεχνική (που δεν αναφέρεται στη διδακτέα ύλη του σχολικού βιβλίου) τα δίκλωνα DNA αποκτούν επίσης μονόκλωνα άκρα και συνδέονται με τα πλασμίδια.

■ Η σύνδεση αυτή επιτελείται με τη μεσολάβηση ενός ακόμη ενζύμου, της **DNA δεσμάσης**, που είναι γνωστό από τον αυτοδιπλασιασμό του DNA ότι συνδέει τμήματα DNA με φωσφοδιεστερικό δεσμό.

Δ. Η δυνατότητα παραγωγής φαρμακευτικών πρωτεϊνών σε βακτήρια οφείλεται στους ακόλουθους λόγους:

- Τα ριβοσώματα αποτελούν θέσεις μετάφρασης οποιοδήποτε mRNA.
- Ο γενετικός κώδικας μετάφρασης των αλληλουχιών του mRNA σε αμινοξέα είναι σχεδόν καθολικός. Αυτό πρακτικά σημαίνει ότι το mRNA οποιοδήποτε ανώτερου οργανισμού μπορεί να μεταφραστεί και να συντεθεί *in vitro* η ίδια πρωτεΐνη σε εκχυλίσματα φυτικών, ζωικών ή προκαρυωτικών κυττάρων.
- Η γενετική πληροφορία για τη σύνθεση της πρωτεΐνης εισάγεται στα προκαρυωτικά κύτταρα απαλλαγμένη από τα εσώνιά της, δεδομένου ότι ακολουθείται η τεχνική της cDNA βιβλιοθήκης.

Ε. Ο ανιχνευτής είναι ιχνηθετημένο μονόκλωνο μόριο DNA ή RNA συμπληρωματικό της αλληλουχίας που επιθυμούμε να απομονώσουμε. Υβριδοποίηση ονομάζεται η σύνδεσή του με τη συμπληρωματική αλληλουχία. Προκειμένου να επιτευχθεί η υβριδοποίηση, το DNA που απομονώνεται από τα κύτταρα ξενιστές αποδιάσεται με θέρμανση ή και χημικές ουσίες, οπότε απομακρύνονται οι δύο συμπληρωματικές αλυσίδες. Τα πλασμίδια που απομονώθηκαν από τα βακτήρια είναι συνολικά $10 \times 100 = 1.000$ και μετά την αποδιάταξή τους προκύπτουν 2.000 μονόκλωνες αλυσίδες DNA. Όμως από αυτές μόνον οι 1.000 θα συνδεθούν με 1.000 από τους 2.000 ανιχνευτές καθώς μόνον οι 1.000 από αυτές είναι συμπληρωματικές με τον ανιχνευτή.



φροντιστήρια
ΠΟΥΚΑΜΙΣΑΣ

Η επιτυχία έρχεται πιο κοντά!