

ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗΣ

ΕΠΙΜΕΛΕΙΑ:
ΝΟΤΑ ΛΑΖΑΡΑΚΗ
ΒΑΓΓΕΛΗΣ ΚΑΡΟΥΣΗΣ
ΜΑΤΙΝΑ ΜΑΝΙΑΤΗ



Η σύγχρονη βιοτεχνολογία έχει επιτύχει την παραγωγή καινοτόμων φαρμάκων που εξασφαλίζουν σημαντικά οφέλη για τους ασθενείς ενάντια στη μάχη κατά του καρκίνου.

ΒΙΟΛΟΓΙΑ

Η ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΣΤΗΝ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ

Από εκχύλισμα σπλήνα ανθρώπου απομονώθηκε μια πρωτεΐνη, από τη μελέτη της δράσης της οποίας αποδεικνύεται ότι έχει εκλεκτική κυτταροτοξική δράση έναντι καρκινικών κυττάρων, δηλαδή περιορίζει την ανάπτυξη καρκινικών όγκων στον οργανισμό. Το γονίδιο που είναι υπεύθυνο για την παραγωγή της πρωτεΐνης εκφράζεται αποκλειστικά στα κύτταρα του σπλήνα. Το γονίδιο κλωνοποιήθηκε και μελετήθηκε η αλληλουχία του.

Να απαντήσετε στις ερωτήσεις που ακολουθούν:

1. Ποια διαδικασία ακολουθήθηκε προκειμένου να κλωνοποιηθούν τα γονίδια εκείνα που εκφράζονται στον σπλήνα του θηλαστικού;
 2. Με ποιο τρόπο εντοπίστηκε το γονίδιο που είναι υπεύθυνο για την παραγωγή της κυτταροτοξικής πρωτεΐνης;
 3. Με ποια διαδικασία είναι δυνατό να αντιγραφεί επιλεκτικά πολλές φορές αποκλειστικά το γονίδιο ή ένα τμήμα DNA που μας ενδιαφέρει; Ποια είναι τα πλεονεκτήματα της διαδικασίας αυτής;
- Αφού μελετήθηκαν οι βιοχημικές ιδιότητες της φαρμακευτικής πρωτεΐνης, προτάθηκε η παραγωγή της από κύτταρα μαστικών αδένων προβάτων ώστε να είναι δυνατή η συλλογή της στο γάλα των ζώων.
4. Ποια βήματα απαιτούνται για την παραγωγή της φαρμακευτικής πρωτεΐνης από διαγονιδιακό ζώο;
 5. Με ποιο τρόπο θα επιτευχθεί η έναρξη της μεταγραφής από την RNA πολυμεράση στα μαστικά κύτταρα του διαγονιδιακού ζώου;
 6. Ποιες άλλες σύγχρονες μέθοδοι της βιοτεχνολογίας γνωρίζετε ότι είναι δυνατό να συμβάλλουν στην αντιμετώπιση καρκινικών κυττάρων στον ανθρώπινο οργανισμό;

ΑΠΑΝΤΗΣΕΙΣ

1. Μία cDNA βιβλιοθήκη αποτελεί ένα σύνολο από βακτηριακούς κλώνους, οι οποίοι περιέχουν αντίγραφα των mRNA όλων των γονιδίων που εκφράζονται σε ένα συγκεκριμένο κυτταρικό τύπο ενός οργανισμού. Η cDNA βιβλιοθήκη χαρακτηρίζεται από το πλεονέκτημα ότι περιέχει μόνο τις αλληλουχίες των γονιδίων που μεταφράζονται σε αμινοξέα, δηλ. περιέχει μόνο τα εξώνια. Μια βιβλιοθήκη τέτοιου είδους είναι χρήσιμη για τη μελέτη γονιδίων τα οποία εκφράζονται σε κάποιο συγκεκριμένο κυτταρικό τύπο του οργανισμού αλλά και την παραγωγή πρωτεϊνών από βακτήρια.



- ✓ 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 διασπούν το mRNA
 - αποδιάταξη του mRNA από το cDNA με θέρμανση
- ✓ Σύνθεση της συμπληρωματικής DNA αλυσίδας με καλούπι το μονόκλωνο cDNA.
- ✓ Κατασκευή ανασυνδυσασμένων πλασμιδίων (όπως στη γονιδιωματική βιβλιοθήκη).
- ✓ Μετασχηματισμός βακτηρίων με τα ανασυνδυσασμένα πλασμίδια.
- ✓ Επιλογή των βακτηρίων που έχουν προσλάβει το ανασυνδυσασμένο πλασμίδιο (με αντιβιοτικό, ομοίως όπως στη γονιδιωματική βιβλιοθήκη).
- ✓ Κλωνοποίηση και επιλογή των μετασχηματισμένων κυττάρων-ξενιστών.
- ✓ Επιλογή του βακτηριακού κλώνου που περιέχει το επιθυμητό τμήμα DNA.

2. Τεχνική απομόνωσης ενός γονιδίου ή ενός τμήματος DNA από ένα μείγμα μορίων αποτελεί η υβριδοποίηση. Υβριδοποίηση ονομάζεται η σύνδεση δυο μονόκλωνων συμπληρωματικών αλληλουχιών (DNA-DNA ή DNA-RNA), η μία εκ των οποίων αλληλουχιών είναι συνήθως ιχνηθετημένη και αποτελεί τον ανιχνευτή.

Η τεχνική της υβριδοποίησης μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση κλώνων σε μια cDNA βιβλιοθήκη. Στην περίπτωση αυτή οι ανιχνευτές συνδέονται με τις συμπληρωματικές, αποδιαταγμένες αλυσίδες των ανασυνδυσασμένων πλασμιδίων.

Προκειμένου να εντοπισθεί ο κλώνος που περιέχει την αλληλουχία του γονιδίου που επιθυμούμε να απομονώσουμε, κατασκευάζουμε έναν ανιχνευτή, η αλληλουχία του οποίου είναι συμπληρωματική προς τμήμα του γονιδίου που μας ενδιαφέρει. Αφού εντοπισθεί ο επιθυμητός κλώνος, είναι εφικτή η απομόνωσή του και η μελέτη της αλληλουχίας του.

3. Η μέθοδος της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR) αποτελεί τεχνική με την οποία πολλαπλασιάζονται επιλεκτικά, εκατομμύρια φορές, συγκεκριμένες αλληλουχίες DNA από ένα σύνθετο μείγμα μορίων DNA, χωρίς τη μεσολάβηση ζωντανού κυττάρου.

Με τη μέθοδο αυτή είναι δυνατό από το σύνολο του χρωμοσωμικού DNA ενός οργανισμού να πολλαπλασιάσουμε

 φροντιστήρια
ΠΟΥΚΑΜΙΣΑΣ

ΚΕΝΤΡΙΚΑ ΓΡΑΦΕΙΑ FRANCHISE

ΠΕΙΡΑΙΑΣ

Σωτήρος & Αλκιβιάδου 132

Τηλ.: 210 4112507, e-mail: info@poukamisas.gr



ΑΓ. ΒΑΡΒΑΡΑ: Εθ. Βενιζέλου & Μεγ. Αλεξάνδρου 161, Τηλ.: 210 5616810, **ΑΓ. ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ:** Ηλείου 37, Τηλ.: 210 9312700, **ΑΓ. Ι. ΡΕΝΤΗΣ:** Μπιχάκη 5, Τηλ.: 210 4832446, **ΑΙΓΑΛΕΟ:** Θηβών 425 & Αδριανουπόλεως 10, Τηλ.: 210 5319805, **ΑΜΦΙΑΛΗ:** Κεφαλληνίας 8, Τηλ.: 210 4004200, **ΓΑΛΑΤΣΙ:** Εθ. Βενιζέλου 16, Τηλ.: 210 2224000, **ΓΛΥΦΑΔΑ:** Γούναρη 44 & Πόντου 87, Τηλ.: 210 9647806, **ΔΡΑΠΕΤΣΩΝΑ:** Εθ. Βενιζέλου 72, Τηλ.: 210 4622920, **ΗΡΑΚΛΕΙΟ ΚΡΗΤΗΣ:** Μινωταύρου 14, Τηλ.: 2810 245300, **ΚΑΛΛΙΘΕΑ:** Εθ. Βενιζέλου 188, Τηλ.: 210 9588891, **ΚΟΡΥΔΑΛΛΟΣ:** Δημοπρακοπούλου & Σπετσών 38, Τηλ.: 210 4978027, **ΛΑΡΙΣΑ:** Ρούσβεητ & Καποδιστρίου 1, Τηλ.: 2410 612660, **ΜΕΓΑΡΑ:** 28ης Οκτωβρίου 148, Τηλ.: 22960 24248, **ΜΟΣΧΑΤΟ:** Χρυσοστόμου Σμύρνης 124, Τηλ.: 210 9401137, **ΝΕΑ ΣΜΥΡΝΗ:** Εθ. Βενιζέλου 233 & Μάρκου Μπότσαρη 30, Τηλ.: 210 9883771, **ΝΙΚΑΙΑ:** Απαθείας & Διαμαντίδη 71, Τηλ.: 210 4975777, **ΠΕΙΡΑΙΑΣ:** Σωτήρος & Αλκιβιάδου 132, Τηλ.: 210 4112506, **ΠΕΡΑΜΑ:** Λ. Ειρήνης 177, Τηλ.: 210 4416454, **ΠΕΡΙΣΤΕΡΙ:** Τζων Κέννεντυ & Γιαννιστών 122, Τηλ.: 210 5987116

κάθε φορά μόνο το επιθυμητό τμήμα DNA (π.χ. ένα συγκεκριμένο γονίδιο). Πρόκειται για μια in vitro διαδικασία, η οποία μιμείται την αντιγραφή του DNA που πραγματοποιείται μέσα στα ζωντανά κύτταρα. Κατά τη διαδικασία αυτή χρησιμοποιείται το ένζυμο DNA πολυμεράση.

4. Τα βήματα που απαιτούνται για την παραγωγή μιας φαρμακευτικής πρωτεΐνης από διαγονιδιακό ζώο είναι τα εξής:

- ✓ Απομόνωση του ανθρώπινου γονιδίου που κωδικοποιεί την φαρμακευτική πρωτεΐνη που μας ενδιαφέρει.
- ✓ Μικροέγχυση του γονιδίου στον πυρήνα ενός γονιμοποιημένου ωαρίου του ζώου.
- ✓ Τοποθέτηση του γενετικής τροποποιημένου ζυγωτού στη μήτρα ενήλικου ζώου για κυοφορία.
- ✓ Γέννηση του διαγονιδιακού ζώου.
- ✓ Διασταυρώσεις με σκοπό τη μεταβίβαση της τροποποιημένης γενετικής πληροφορίας στους απογόνους.
- ✓ Παραγωγή, απομόνωση και καθαρισμός της φαρμακευτικής πρωτεΐνης.

5. Η μεταγραφή καταλύεται από ένα ένζυμο, την RNA πολυμεράση. Στα ευκαρυωτικά κύτταρα υπάρχουν τρία είδη RNA πολυμερασών. Τα ρυθμιστικά στοιχεία της μεταγραφής είναι οι υποκινητές και οι μεταγραφικοί παράγοντες. Οι υποκινητές βρίσκονται πάντοτε πριν την αρχή κάθε γονιδίου. Οι μεταγραφικοί παράγοντες είναι ειδικές πρωτεΐνες που βοηθούν την RNA πολυμεράση να προσδεθεί στον υποκινητή κάθε γονιδίου που πρόκειται να μεταγραφεί, ώστε να αρχίσει σωστά η μεταγραφή.

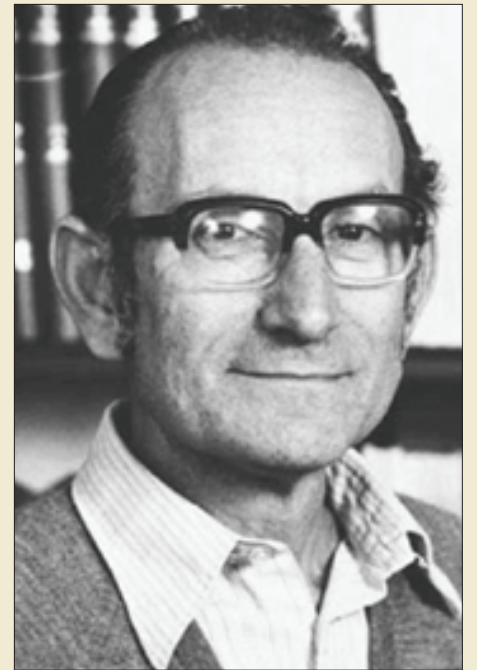
Κατά τη μεταγραφή ένας αριθμός μηχανισμών καθορίζει ποια γονίδια θα μεταγραφούν ή/και με ποια ταχύτητα θα γίνει η μεταγραφή των γονιδίων. Στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς κάθε γονίδιο έχει το δικό του υποκινητή και μεταγράφεται αυτόνομα. Η RNA πολυμεράση λειτουργεί όπως και στους προκαρυωτικούς οργανισμούς με τη βοήθεια μεταγραφικών παραγόντων. Όμως στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς οι μεταγραφικοί παράγοντες παρουσιάζουν τεράστια ποικιλία. Κάθε κυτταρικός τύπος έχει διαφορετικά είδη μεταγραφικών παραγόντων. Διαφορετικός συνδυασμός μεταγραφικών παραγόντων ρυθμίζει τη μεταγραφή κάθε γονιδίου. Μόνο όταν ο σωστός συνδυασμός των μεταγραφικών παραγόντων προσδεθεί στον υποκινητή ενός γονιδίου, αρχίζει η RNA πολυμεράση τη μεταγραφή του γονιδίου.

Συνεπώς, για να επιτευχθεί η μεταγραφή του «ξένου» γονιδίου στα μαστικά κύτταρα του διαγονιδιακού ζώου, θα πρέπει πριν από την αλληλουχία του γονιδίου να προηγηθεί ένας **κατάλληλος υποκινητής** η αλληλουχία του οποίου θα αναγνωρίζεται από τους μεταγραφικούς παράγοντες που εντοπίζονται στα κύτταρα των μαστικών αδένων του ζώου. Με τον τρόπο αυτό, η RNA πολυμεράση θα είναι ικανή να αρχίσει τη μεταγραφή του γονιδίου που μας ενδιαφέρει.

6. Στην αντιμετώπιση των καρκινικών κυττάρων είναι σήμερα δυνατό να συμβάλλει η χορήγηση ιντερφερονών στον ασθενή καθώς και η χορήγηση ειδικών μονοκλωνικών αντισωμάτων που παράγονται προς αυτό τον σκοπό. Ειδικότερα:

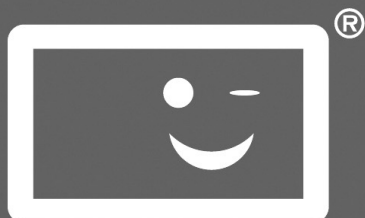
✓ **Ιντερφερόνες:** Πρόκειται για πρωτεΐνες που δρουν εναντίον των ιών. Παράγονται από κύτταρα που έχουν μολυνθεί από ιούς και δρουν έμμεσα στην καταπολέμησή τους καθώς επάγουν την παραγωγή άλλων πρωτεϊνών σε γειτονικά υγιή κύτταρα, οι οποίες παρεμποδίζουν τον πολλαπλασιασμό των ιών σε αυτά. Ωστόσο, η παραγωγή των ιντερφερονών σε μεγάλες ποσότητες με τις μεθόδους της Βιοτεχνολογίας είναι σημαντική μεταξύ άλλων διότι έχουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον πιθανόν και ως **αντικαρκινικοί** παράγοντες. Η παραγωγή των ιντερφερονών είναι σήμερα εφικτή με τη μέθοδο της cDNA βιβλιοθήκης.

✓ **Μονοκλωνικά αντισώματα:** Τα μονοκλωνικά αντισώματα χρησιμοποιούνται ως **εξειδικευμένα** φάρμακα εναντίον παθογόνων μικροοργανισμών. Όμως μία πολύ ενδιαφέρουσα εφαρμογή τους αφορά τη **θεραπεία του καρκίνου**. Προς το σκοπό αυτό, κατασκευάζονται μονοκλωνικά αντισώματα για αντιγονικούς καθοριστές οι οποίοι βρίσκονται μόνο στην επιφάνεια των καρκινικών κυττάρων και λέγονται **καρκινικά αντιγόνα**. Τα αντισώματα συνδέονται με αντικαρκινικά φάρμακα, εισάγονται στον οργανισμό και προσβάλλουν μόνο τα καρκινικά κύτταρα-στόχους τα οποία και καταστρέφουν. Κατά αυτόν τον τρόπο αποφεύγονται οι δυσμενείς συνέπειες της χημειοθεραπείας και των χειρουργικών επεμβάσεων. Τα μονοκλωνικά αντισώματα παράγονται με τη μέθοδο της δημιουργίας υβριδωμάτων, δηλαδή υβριδικών κυττάρων που προκύπτουν από τη σύντηξη καρκινικών κυττάρων με Β λεμφοκύτταρα που προέρχονται από σπλήνα ποντικού.



ΣΖΣΑΡ ΜΙΛΣΤΑΪΝ
(1927-2002)

Αργεντινός γιατρός και πολυβραβευμένος ερευνητής, που αφιέρωσε τη ζωή του στη μελέτη της δομής και το μηχανισμό της δημιουργίας των αντισωμάτων. Εργαστηριακά επιδόθηκε στην τεχνική παραγωγή μονοκλωνικών αντισωμάτων και υβριδικών κυττάρων (υβριδωμάτων). Οι εργασίες εκείνες, που τις έκανε μαζί με τον γερμανικής καταγωγής υπότροφο φοιτητή του Τζορτζ Κόλερ, υπήρξαν αποδοτικές το 1975 και το 1984 χάρισαν και στους δυο το βραβείο Νόμπελ Ιατρικής (το μοιράστηκαν με τον Δανό Νιλς Γιέρνε). Πεδίο δράσης του Μιλστάιν ήταν η Μεγάλη Βρετανία και τα εργαστήρια Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας του Κέιμπριτζ, όπου από το 1963 είχε εγκατασταθεί ως καθηγητής-ερευνητής παίρνοντας ταυτόχρονα και τη βρετανική υπηκοότητα. Στην τεχνική παραγωγή των υβριδικών κυττάρων έφτασε σταδιακά, αφού πρώτα μαζί με τη σύζυγό του Σέλια είχε δώσει κατεύθυνση των ερευνών από την επισταμένη μελέτη των αμινοξέων στην κωδικοποίηση των mRNA αντισωμάτων. Η παράλληλη ανάπτυξη της τεχνολογίας επέτρεψε στον Μιλστάιν να καταδείξει τη σημασία των σωματικών hypermutation γονιδίων της ανοσοσφαιρίνης V και να καταγράψει το γράφημα της αλληλουχίας των νουκλεϊνικών οξέων και της μετάλλαξης των γονιδίων ανοσογλοβουλίνης, μετά την επαφή με το αντιγόνο-οδηγό. Οι ανακαλύψεις του Μιλστάιν όπως και πλήθους άλλων επιστημόνων οδήγησαν σε διαγνωστικές ανιχνεύσεις αλλά και φαρμακευτικές προσβολές παθογόνων μικροοργανισμών, ακόμα και νεοπλασματικών κυττάρων.



Φροντιστήρια
ΠΟΥΚΑΜΙΣΑΣ