

ΘΕΤΙΚΗΣ
ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗΣΕΠΙΜΕΛΕΙΑ:
ΝΟΤΑ ΛΑΖΑΡΑΚΗ
ΜΑΤΙΝΑ ΜΑΝΙΑΤΗ
ΜΑΡΙΑ ΚΙΤΡΙΛΑΚΗ

ΒΙΟΛΟΓΙΑ

ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΝ



Η κλωνοποίηση των γονιδίων ενός οργανισμού αποσκοπεί στη δημιουργία πολλών αντιγράφων τους ώστε να επιτευχθεί η μελέτη τους ή/και η παραγωγή βιολογικά ενεργών πρωτεϊνών.

Στο γενετικό υλικό ενός σπάνιου φυτικού είδους εντοπίζεται ένα γονίδιο που κωδικοποιεί πρωτεΐνη με σημαντικές φαρμακευτικές εφαρμογές. Το γονίδιο πρόκειται να απομονωθεί προκειμένου να δημιουργηθεί ένας κλώνος με σκοπό αφενός τη μελέτη της αλληλουχίας των βάσεων του και αφετέρου την παραγωγή της πρωτεΐνης που κωδικοποιεί.

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 εξηγήσετε ποια από τις μεθόδους κλωνοποίησης είναι καταλληλότερη για την επίτευξη αμφοτέρων των στόχων.

Γ. Να αναφέρετε τα ένζυμα που γνωρίζετε ότι είναι απαραίτητα να διαθέτουν οι ερευνητές στο εργαστήριο προκειμένου να οδηγηθούν στην κλωνοποίηση του γονιδίου και την παραγωγή της πρωτεΐνης. Ποιος είναι ο ρόλος καθενός εκ των ενζύμων αυτών και από ποιους οργανισμούς είναι δυνατό να εξασφαλίσουν οι ερευνητές τα ένζυμα για να επιτύχουν την εργαστηριακή τους χρήση;

Δ. Η αλληλουχία 3' AAAAAUCCCGCGUAGUUGUUUCC... 5' αποτελεί τμήμα από το mRNA που απομονώθηκε από το φυτικό είδος και κωδικοποιεί τη φαρμακευτική πρωτεΐνη και κωδικοποιεί τα 5 τελευταία αμινοξέα της πρωτεΐνης αυτής.

i) Να γράψετε τα αντικωδικόνια των tRNA που συμμετέχουν στη μετάφραση του συγκεκριμένου τμήματος και να δικαιολογήσετε την απάντησή σας.

ii) Το δίκλωνο τμήμα που σχηματίστηκε από το mRNA αυτό συνδέθηκε στο πλασμίδιο με τρόπο ώστε οι αλληλουχίες λήξης του γονιδίου να συνδεθούν με τη θέση έναρξης της αντιγραφής του πλασμιδίου. Ποια από τις δύο αλυσίδες του γονιδίου, κωδική και μη κωδική, θα αντιγραφεί με ασυνεχή τρόπο, όταν το πλασμίδιο θα αυτοδιπλασιαστεί;

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 έναν εκ των εξής τρόπων:

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

Από τη δημιουργία των βιβλιοθηκών προκύπτουν κλώνοι βακτηρίων, στους οποίους περιλαμβάνεται 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.

B. Οι φυτικοί οργανισμοί αποτελούν ευκαρυωτικούς οργανισμούς και συνεπώς χαρακτηρίζονται από ασυνεχή ή διακεκομμένα γονίδια, δηλαδή γονίδια στο εσωτερικό των οποίων υπάρχουν ενδιάμεσες αλληλουχίες που δεν μεταφράζονται σε αμινοξέα (εσωνία).

Μία γονιδιωματική βιβλιοθήκη περιέχει έναν τεράστιο αριθμό από κλωνοποιημένα τμήματα χρωμοσωμικού DNA που έχουν παραχθεί με τη δράση κάποιας περιοριστικής ενδονουκλεάσης, η οποία τέμνει το DNA σε θέσεις που βρίσκονται σε τυχαία σημεία του. Ορισμένα από τα τμήματα αυτά περιέχουν ολόκληρα γονίδια –συμπεριλαμβανομένων των εσωνίων τους, εάν πρόκειται για DNA ευκαρυωτικού οργανισμού- άλλα περιέχουν τμήματα γονιδίων και άλλα τμήματα DNA που δεν αποτελούν γονίδια. Λόγω της κατασκευής της βιβλιοθήκης αυτής καθίσταται συνεπώς δυσχερής έως και αδύνατη η απομόνωση του γονιδίου που κωδικοποιεί μία συγκεκριμένη πρωτεΐνη. Επιπλέον ακόμη και εάν υποθεθεί ότι απομονώνεται κάποιος βακτηριακός κλώνος που περιέχει το επιθυμητό γονίδιο, η παραγωγή της πρωτεΐνης που αυτό κωδικοποιεί είναι ανέφικτη δεδομένου ότι τα βακτήρια δεν διαθέτουν μηχανισμούς ωρίμανσης των mRNA τους, δηλαδή απομάκρυνσης των εσωνίων τους. Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης εξάλλου παρέχει τη δυνατότητα κλωνοποίησης των αλληλουχιών του γονιδίου όπως αυτό βρίσκεται στο χρωμοσωμικό DNA του φυτικού οργανισμού, αλλά δεδομένου ότι πραγματοποιείται in vitro καθίσταται αδύνατη η σύνθεση της πρωτεΐνης που κωδικοποιεί.

Αντίθετα οι cDNA βιβλιοθήκες αποτελούν μέθοδο κλωνοποίησης των γονιδίων που εκφράζονται σε συγκεκριμένα κύτταρα και επειδή περιέχουν αντίγραφα των mRNA όλων των γονιδίων που εκφράζονται στα κύτταρα αυτά, χαρακτηρίζονται από το πλεονέκτημα της απομόνωσης μόνον των αλληλουχιών που είναι χρήσιμες για τη μετάφραση σε αμινοξέα, δηλαδή των εξωνίων. Κατά αυτόν τον τρόπο, οι cDNA βιβλιοθήκες παρέχουν τη δυνατότητα σύνθεσης της πρωτεΐνης ενός συγκεκριμένου γονιδίου στο βακτηριακό κύτταρο-ξενιστή.

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

- αντίστροφη μεταγραφή
- DNA πολυμεράση
- περιοριστικές ενδονουκλεάσες
- DNA δεσμάση

Η **αντίστροφη μεταγραφή** χρησιμοποιείται για τη σύνθεση των cDNA αλυσίδων και το σχηματισμό των υβριδικών μορίων cDNA-mRNA μετά την απομόνωση του συνολικού ώριμου mRNA από

κυκλοφορεί...

ΑΡΧΑΙΑ
ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΓΛΩΣΣΑ
Α' ΓΥΜΝΑΣΙΟΥ

Κ. ΚΟΝΤΟΜΗΝΑ – Σ. ΜΑΧΑΙΡΑ
Π. ΜΠΕΡΤΣΟΣ



εκδόσεις
ΠΟΥΚΑΜΙΣΑΣ



ΜΑΘΙΟΥ ΣΤΑΝΛΕΪ
ΜΕΣΕΛΣΟΝ
(1930)

Ένας από τους κορυφαίους εν Ζωή Αμερικανούς γενετιστές, που έχει συμβάλει καθοριστικά στις πολυετείς μελέτες για την αντιγραφή του DNA. Το 1957 οι Γουότσον και Κρικ μετά τη δημοσίευση της μελέτης τους για την ελικοειδή δομή του DNA πρότειναν ως κυρίαρχο δόγμα της βιολογίας ότι η ροή των γενετικών πληροφοριών έχει κατεύθυνση από το DNA προς τις πρωτεΐνες μέσω RNA. Ο Μέσελσον αξιοποίησε πειραματικά αυτή την πρόταση. Εργαστηριακό πείραμα που έκανε στο California Institute of Technology με τον μεταπτυχιακό φοιτητή Φράνκλιν Σταλ πάνω σε βακτήρια εμπλουτισμένα με το βαρύ ισότοπο ^{15}N κατέδειξε ότι μοναδικός πιθανός τρόπος αντιγραφής του DNA είναι ο ημισυντηρητικός. Ότι δηλαδή κατά τον αναδιπλασιασμό του DNA η διπλή έλικα σπάει και κάθε μια αλυσίδα γίνεται η μήτρα που γεννά μια νέα. Έτσι κάθε νέα διπλή έλικα αποτελείται από μια παλιά και μια καινούργια αλυσίδα. Ως βαθύς γνώστης των κινδύνων από τη χρήση βιολογικών και χημικών όπλων εντάχθηκε στο παγκόσμιο κίνημα αφοπλισμού και έπεισε μάλιστα το 1972 τον Πρόεδρο των ΗΠΑ Ρ. Νίξον να υπογράψει σχετική συνθήκη. Αν και λίγο αργότερα κατηγορήθηκε γι αυτό από τον ίδιο τον Πρόεδρο και την ηγεσία του πανεπιστημιακού του χώρου (Harvard), ως «εχθρός» των ΗΠΑ, συνέχισε να πρωτοστατεί σε ενέργειες κατά των όπλων μαζικής καταστροφής (απότοκός της το διαπανεπιστημιακό σχέδιο συνθήκης Harvard-Sussex). Τα τελευταία χρόνια επικέντρωσε τις έρευνές του στην ελαχιστοποίηση των «γενετικών παρασίτων» ώστε να περιορίζονται οι γενετικές βλάβες. Για την προσφορά του στην επιστήμη ο Μέσελσον τιμήθηκε το 2004 με το βραβείο Lasker Ιατρικής, που οι Αμερικανοί θεωρούν ισότιμο του Νομπέλ.

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 καλούπι 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 καλούπι για τη σύνθεση συμπληρωματικών αλυσίδων DNA και τη δημιουργία δίκλωνων τμημάτων DNA. Όλοι οι οργανισμοί διαθέτουν DNA πολυμεράση, αλλά η απομόνωση 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 το 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 το σχηματισμό σε αυτό μονόκλωνων άκρων από αζευγάρωτες βάσεις στα κομμένα άκρα. Με ειδική τεχνική (που δεν αναφέρεται στη διδακτέα ύλη του σχολικού βιβλίου) τα δίκλινα DNA αποκτούν επίσης μονόκλινα 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. i) Η αλληλουχία του mRNA μεταφράζεται από το 5' προς το 3' άκρο του μορίου. Συνεπώς η αλληλουχία πρέπει να «διαβαστεί» ως:

5'.....CCUUUGUUGAUGCGCCCUAAAAA 3'

Δεδομένου ότι αποτελεί το τμήμα που μεταφράζει τα 5 τελευταία αμινοξέα, αναζητούμε σε αυτήν ένα από τα κωδικόνια λήξης και στη συνέχεια τα 5 κωδικόνια που προηγούνται του κωδικονίου λήξης.

Το κωδικόνιο λήξης στην συγκεκριμένη αλληλουχία είναι το UAA και τα κωδικόνια που κωδικοποιούν τα 5 τελευταία αμινοξέα είναι:

5'.....CC UUU GUU GAU GCG CCC UAA AAAA 3'

Τα αντικωδικόνια είναι τριπλέτες των tRNA συμπληρωματικές των κωδικονίων, ενώ δεν υπάρχει αντικωδικόνιο συμπληρωματικό των κωδικονίων λήξης. Συνεπώς τα αντικωδικόνια με τη σειρά που συμμετέχουν στη μετάφραση του τμήματος αυτού είναι τα εξής:

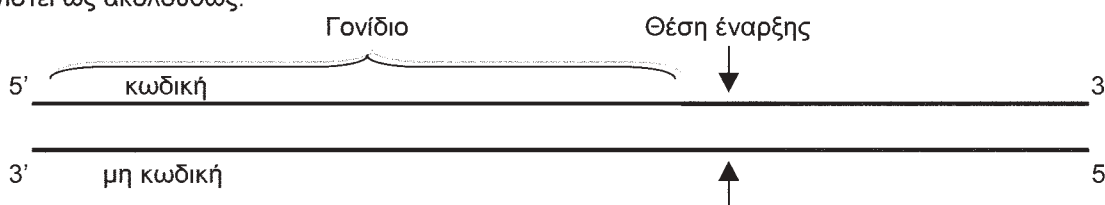
AAA, CAA, CUA, CGC, GGG

ii) Το δίκλινο τμήμα που προκύπτει κατά τη cDNA βιβλιοθήκη από το τμήμα αυτού του mRNA είναι:

5'.....CCTTTGTTGATGCGCCCTAAAAA 3' κωδική
3' ...GGAAACAACACTACGCGGGATTTTTT 5' μη κωδική

Οι αλληλουχίες λήξης της μεταγραφής του γονιδίου βρίσκονται στο τέλος του γονιδίου, καθώς αυτές αναγνωρίζει η RNA πολυμεράση και σταματά τη μεταγραφή του. Οι αλληλουχίες λήξης βρίσκονται συνεπώς στο 5' άκρο της μη κωδικής (και συνεπώς στο 3' άκρο της κωδικής) δεδομένου ότι το mRNA συντίθεται συμπληρωματικά ως προς αυτήν.

Μετά τον ανασυνδυασμό, το τμήμα του πλασμιδίου που περιέχει το γονίδιο είναι δυνατό να απεικονιστεί ως ακολούθως:



Οι DNA πολυμεράσες λειτουργούν μόνο προς καθορισμένη κατεύθυνση και τοποθετούν νουκλεοτίδια στο ελεύθερο 3' άκρο της δεοξυριβόζης του τελευταίου νουκλεοτιδίου κάθε αναπτυσσόμενης αλυσίδας. Κατ' αυτόν τον τρόπο η αντιγραφή γίνεται με προσανατολισμό 5' → 3' ενώ σε κάθε διπλή έλικα που παράγεται οι δύο αλυσίδες είναι αντιπαράλληλες. Επιπλέον η θηλιά που δημιουργείται ανοίγει σταδιακά και προς τις δύο κατευθύνσεις. Για τους λόγους αυτούς σε κάθε τμήμα DNA που αντιγράφεται, η σύνθεση του DNA είναι συνεχής στη μία αλυσίδα και ασυνεχής στην άλλη. Συνεπώς η κωδική αλυσίδα του γονιδίου αντιγράφεται με τρόπο συνεχή και η μη κωδική με τρόπο ασυνεχή.

