

## Β' Τεύχος

### 4ο Κεφάλαιο

#### 2<sup>ο</sup> ΘΕΜΑ

**14.** Τα τελευταία χρόνια, οι επιστήμονες έχουν αναπτύξει εργαστηριακές μεθόδους για τη κλωνοποίηση τμημάτων DNA, που τους δίνουν τη δυνατότητα για νέες και εξαιρετικά ενδιαφέρουσες ερευνητικές και παραγωγικές δυνατότητες. Η κλωνοποίηση ενός τμήματος DNA μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε *in vitro*, είτε με τη βοήθεια κυττάρων-ξενιστών, π.χ. βακτηρίων, που δημιουργούν κλώνους κυττάρων.

α. Να δώσετε τη σημασία των όρων «κλώνος» και «κλωνοποίηση» (μονάδες 6).

β. Να ονομάσετε τη μέθοδο που χρησιμοποιείται για την *in vitro* κλωνοποίηση τμημάτων DNA με συγκεκριμένη αλληλουχία βάσεων (μονάδα 1), να εξηγήσετε το σκοπό της μεθόδου αυτής (μονάδες 3) και να αναφέρετε τρεις πρακτικές εφαρμογές της (μονάδες 3).

Μονάδες 13

α. Ο όρος κλώνος αναφέρεται σε μια ομάδα πανομοιότυπων μορίων, κυττάρων ή οργανισμών, ενώ ο όρος κλωνοποίηση αναφέρεται στη διαδικασία κατασκευής, κατά προτίμηση μεγάλου αριθμού, πανομοιότυπων μορίων, κυττάρων ή οργανισμών.

β. Η μέθοδος που χρησιμοποιείται για την *in vitro* κλωνοποίηση τμημάτων DNA είναι η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR). Η μέθοδος αυτή μας επιτρέπει να αντιγράψουμε επιλεκτικά, εκατομμύρια φορές, ειδικές αλληλουχίες DNA από ένα σύνθετο μείγμα μορίων DNA, χωρίς τη μεσολάβηση ζωντανού κυττάρου. Τρεις πρακτικές εφαρμογές της είναι: για τη διάγνωση τόσο διάφορων μολυσματικών ασθενειών, όπως του AIDS, COVID-19, όσο και γενετικών ασθενειών (που οφείλονται σε μεταλλαγμένα γονίδια), για τη διαλεύκανση υποθέσεων στην εγκληματολογία και για τη μελέτη DNA από απολιθώματα.

**16.** Οι βιβλιοθήκες βοηθούν τους επιστήμονες να «αποθηκεύουν» κλωνοποιημένα θραύσματα DNA σε πληθυσμούς μικροοργανισμών. Υπάρχουν δύο είδη βιβλιοθηκών, η γονιδιωματική και η cDNA, καθεμία από τις οποίες έχει τα δικά της πλεονεκτήματα και οι επιστήμονες τις χρησιμοποιούν ανάλογα το τι θέλουν να μελετήσουν κάθε φορά.

α. Να αναφέρετε ποιο/α από τα παρακάτω ένζυμα χρειάζονται κατά τη διαδικασία κατασκευής μιας γονιδιωματικής και ποιο/α για μια cDNA βιβλιοθήκη:

- I. αντίστροφη μεταγραφάση,
- II. DNA πολυμεράση,
- III. DNA δεσμάση και
- IV. περιοριστικές ενδονουκλεάσες (μονάδες 4).

Να αιτιολογήσετε την απάντησή σας (μονάδες 3).

β. Να αναφέρετε το είδος της βιβλιοθήκης που θα κατασκευάζατε προκειμένου να κλωνοποιήσετε: I. το γονίδιο της β-αλυσίδας της αιμοσφαιρίνης του ανθρώπου για να παράξετε τη β-αλυσίδα, II. τον υποκινητή του γονιδίου της ινσουλίνης του ανθρώπου και III. ένα γονίδιο rRNA (μονάδες 6).

Μονάδες 13

α. Κατά τη κατασκευή μιας γονιδιωματικής και cDNA βιβλιοθήκης χρειάζονται τα ένζυμα DNA δεσμάση και περιοριστικές ενδονουκλεάσες για τη δημιουργία του ανασυνδυασμένου DNA. Εκτός από αυτά τα ένζυμα, για τη κατασκευή μιας cDNA βιβλιοθήκης χρειάζονται επιπλέον και τα ένζυμα αντίστροφη μεταγραφάση και DNA πολυμεράση. Η αντίστροφη μεταγραφάση χρησιμοποιείται για τη σύνθεση αλυσίδων cDNA με καλούπι τα “ώριμα” μόρια mRNA που έχουν απομονωθεί από το κύτταρο-δότη. Η DNA πολυμεράση συνθέτει μια συμπληρωματική αλυσίδα DNA με καλούπι το cDNA.

β. Για τη περίπτωση I θα κατασκευάζαμε μόνο cDNA βιβλιοθήκη, ενώ για τις II και III θα κατασκευάζαμε αποκλειστικά γονιδιωματική βιβλιοθήκη.

---

**21.** Η απομόνωση των περιοριστικών ενδονουκλεασών, καθώς και ειδικών φορέων κλωνοποίησης επέτρεψε την ανάπτυξη της τεχνολογίας του ανασυνδυασμένου DNA και έδωσε στον άνθρωπο την ικανότητα όχι μόνο να ερευνά, αλλά να επεμβαίνει και να τροποποιεί το γενετικό υλικό των οργανισμών.

α. Να αναφέρετε τι εννοούμε, στα πλαίσια της τεχνολογίας του ανασυνδυασμένου DNA, με τον όρο “ανασυνδυασμένο μόριο DNA” (μονάδες 2) και να εξηγήσετε τι είναι ένας φορέας κλωνοποίησης (μονάδες 4).

β. Να εξηγήσετε τι είναι οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες (μονάδες 2), να αναφέρετε από πού απομονώνονται (μονάδες 2) και να γράψετε το φυσιολογικό τους ρόλο (μονάδες 2).

Μονάδες 12

α. Ανασυνδυασμένο μόριο DNA είναι ένα τεχνητό μόριο DNA που περιέχει γονίδια από δύο ή και περισσότερους οργανισμούς.

Ο φορέας κλωνοποίησης είναι ένα μόριο DNA, π.χ. πλασμίδιο ή DNA φάγων, το οποίο μπορεί να ενσωματώνει ξένο DNA, να το μεταφέρει σε ένα κύτταρο-ξενιστή, όπως ένα βακτήριο και να αυτοδιπλασιάζεται ανεξάρτητα μέσα στο κύτταρο-ξενιστή.

β. Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες είναι ένζυμα που αναγνωρίζουν ειδικές αλληλουχίες 4-8 ζευγών νουκλεοτιδίων στο δίκλωνο DNA και έτσι, κόβουν το DNA σε κομμάτια με καθορισμένη αλληλουχία βάσεων. Απομονώνονται από βακτήρια στα οποία παράγονται και ο φυσιολογικός τους ρόλος είναι να τα προστατεύουν από την εισβολή «ξένου» DNA.

---

**28.** Η τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA συνέβαλε στη δυνατότητα μεταφοράς τμημάτων γενετικού υλικού από ένα οργανισμό σε έναν άλλο, ώστε να επιτυγχάνεται η κλωνοποίησή τους. Με τη συμβολή των βακτηρίων μπορεί να κλωνοποιηθεί ξένο DNA με την κατασκευή της γονιδιωματικής και της cDNA βιβλιοθήκης, οι οποίες περιέχουν ένα σύνολο μετασηματισμένων βακτηριακών κλώνων.

α. Να αναφέρετε τα ένζυμα που χρησιμοποιούνται για κάθε μία από τις δύο βιβλιοθήκες (μονάδες

4) και να γράψετε ποιο από αυτά απομονώνεται από βακτηριακά κύτταρα και ποιο από ιούς (μονάδες 2).

β. Να εξηγήσετε ποια από τις δυο βιβλιοθήκες περιέχει γονίδια (ή τμήματά τους) που κωδικοποιούν για μόρια tRNA ενός οργανισμού δότη (μονάδες 4) και ποια περιέχει τους υποκινητές (ή τμήματά τους) γονιδίων (μονάδες 3).

Μονάδες 13

α. Για την κατασκευή της γονιδιωματικής βιβλιοθήκης χρειάζονται τα εξής ένζυμα: Περιοριστική ενδονουκλεάση, DNA δεσμάση. Για την κατασκευή της cDNA βιβλιοθήκης χρειάζονται τα

ένζυμα : αντίστροφη μεταγραφάση, DNA πολυμεράση, περιοριστική ενδονουκλεάση, DNA δεσμάση. Το ένζυμο περιοριστική ενδονουκλεάση απομονώνεται από βακτηριακό κύτταρο και η αντίστροφη μεταγραφάση από ιό (επίσης από βακτήρια απομονώνονται τόσο η δεσμάση όσο και η πολυμεράση).

β. Γονίδια μορίων tRNA (ή τμήματά τους) περιέχονται μόνοι σε βακτηριακούς κλώνους μιας γονιδιωματικής βιβλιοθήκης καθώς εκεί περιέχεται το συνολικό DNA ενός οργανισμού δότη, άρα και όλα τα γονίδια του. Η cDNA βιβλιοθήκη αποτελείται από κλώνους που περιέχουν γονίδια που δημιουργήθηκαν από τα ώριμα μόρια mRNA που απομονώθηκαν από ένα συγκεκριμένο κύτταρο. Για τους παραπάνω λόγους και η αλληλουχία των υποκινητών των γονιδίων (ή τμήματα των υποκινητών) υπάρχει μόνο στην γονιδιωματική βιβλιοθήκη του οργανισμού δότη καθώς στα ώριμα mRNA δεν περιέχεται η αλληλουχία του υποκινητή.

---

**42.** Στην τεχνολογία του ανασυνδυσμένου DNA χρησιμοποιούνται πολλές διαδικασίες. Ανάμεσα τους είναι η αποδιάταξη και η υβριδοποίηση μορίων ή τμημάτων

DNA - DNA, RNA- RNA ή DNA - RNA.

α. Να δώσετε τους ορισμούς των εννοιών “αποδιάταξη” και “υβριδοποίηση”(μοναδες 6). β. Τόσο κατά την κατασκευή όσο και κατά την χρήση της γονιδιωματικής ή της cDNA βιβλιοθήκης εφαρμόζεται η διαδικασία της υβριδοποίησης. Να περιγράψετε το ρόλο της υβριδοποίησης στις δύο διαδικασίες (μονάδες 7).

Μονάδες 13

α. Αν επιδράσουμε σε ένα δίκλωνο μόριο DNA (ή DNA-RNA ή RNA - RNA) με κατάλληλες χημικές ουσίες ή αυξήσουμε τη θερμοκρασία, τότε σπάζουν οι δεσμοί υδρογόνου μεταξύ των δύο συμπληρωματικών αλυσίδων και οι δύο αλυσίδες αποχωρίζονται η μία από την άλλη. Η διαδικασία αυτή λέγεται αποδιάταξη. Υβριδοποίηση είναι η σύνδεση δύο μονόκλωνων αλυσίδων DNA (ή DNA-RNA ή RNA - RNA) με δεσμούς υδρογόνου σύμφωνα με τον κανόνα της συμπληρωματικότητας των βάσεων υπό κατάλληλες συνθήκες.

β. Η υβριδοποίηση είναι μια πολύ σημαντική ιδιότητα του DNA που εφαρμόζεται, καταρχάς, κατά την κατασκευή των βιβλιοθηκών, αφού η σύνδεση των επιμέρους DNA τμημάτων με τους φορείς κλωνοποίησης, μέσω της DNA δεσμάσης, προϋποθέτει την υβριδοποίηση των μονόκλωνων άκρων από τις συμπληρωματικές αζευγάρωτες βάσεις που έχουν προκύψει από τη χρήση των κατάλληλων περιοριστικών ενδονουκλεασών, στα τμήματα DNA και στο φορέα κλωνοποίησης. Επίσης, δίνει τη δυνατότητα αν έχουμε ένα γνωστό μόριο DNA, να το χρησιμοποιήσουμε ως ανιχνευτή για τον εντοπισμό του συμπληρωματικού του, όταν το τελευταίο βρίσκεται μαζί με χιλιάδες άλλα κομμάτια. Έτσι, μετά την κατασκευή μιας γονιδιωματικής ή cDNA βιβλιοθήκης, η υβριδοποίηση μπορεί να αξιοποιηθεί για τον εντοπισμό του κλώνου που περιέχει το επιθυμητό τμήμα DNA, με τη χρήση κατάλληλων ιχνηθετημένων μονόκλωνων μορίων DNA ή RNA, τα οποία υβριδοποιούνται με το συγκεκριμένο τμήμα, αφού αυτό έχει προηγουμένως αποδιαταχθεί.

---

**60.** Η ανακάλυψη των περιοριστικών ενδονουκλεασών, δηλαδή των ενζύμων που αναγνωρίζουν στο DNA συγκεκριμένη αλληλουχία βάσεων και το «κόβουν» σε συγκεκριμένα σημεία, καθώς και των ειδικών φορέων κλωνοποίησης, που μεταφέρουν DNA από κύτταρο σε κύτταρο, επέτρεψε την ανάπτυξη της τεχνολογίας του ανασυνδυσμένου DNA. Έτσι, μπορούμε πλέον να κατασκευάζουμε και να πολλαπλασιάζουμε *in vitro* «ανασυνδυσμένα» μόρια DNA και στη συνέχεια να τα μεταφέρουμε σε *in vivo* περιβάλλον. Με αυτόν το τρόπο προκύπτουν γενετικά τροποποιημένα βακτήρια ή ευκαρυωτικά κύτταρα που μπορούν να πολλαπλασιάζονται μετα-

βιβάζοντας στους απογόνους τους τις νέες τους ιδιότητες.

α. Να αποδώσετε τις έννοιες του ανασυνδυασμού και του μετασχηματισμού, όπως αυτές χρησιμοποιούνται στα πλαίσια της γενετικής μηχανικής (μονάδες 6).

β. Να περιγράψετε συνοπτικά δύο τρόπους με τους οποίους μπορούμε να επιτύχουμε την κλωνοποίηση μορίων DNA (μονάδες 5), χαρακτηρίζοντας παράλληλα αυτές τις διαδικασίες ως *in vivo* ή *in vitro* (μονάδες 2).

Μονάδες 13

α. Ο ανασυνδυασμός αναφέρεται στην κατασκευή στο δοκιμαστικό σωλήνα ενός «ανασυνδυασμένου» μορίου DNA, δηλαδή ενός τεχνητού μορίου DNA, που περιέχει γονίδια από δύο ή και περισσότερους οργανισμούς. Η μεταφορά και εισαγωγή του ανασυνδυασμένου μορίου DNA σε ένα κύτταρο-ξενιστή, βακτηριακό ή ευκαρυωτικό, ονομάζεται μετασχηματισμός. Τα γενετικά τροποποιημένα βακτήρια ή ευκαρυωτικά κύτταρα, που προκύπτουν με τον μετασχηματισμό, είναι ικανά να ζουν και να αναπαράγονται μεταφέροντας στους απογόνους τους τις καινούργιες ιδιότητες.

β. Κάθε βακτήριο, που προσλαμβάνει ένα μόνο μόριο ανασυνδυασμένου DNA αφήνεται να πολλαπλασιαστεί με κυτταρικές διαιρέσεις και να παράγει μια αποικία βακτηριακών κλώνων. Είναι φανερό ότι με την παραπάνω διαδικασία παράγονται *in vivo* χιλιάδες κλώνοι ανασυνδυασμένων μορίων DNA. Η δημιουργία πολλών αντιγράφων DNA μπορεί να γίνει όμως και *in vitro* με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR: Polymerase Chain Reaction), που μας επιτρέπει να αντιγράψουμε επιλεκτικά, εκατομμύρια φορές, ειδικές αλληλουχίες DNA από ένα σύνθετο μείγμα μορίων DNA, χωρίς τη μεσολάβηση ζωντανού κυττάρου.

68. Σήμερα ο άνθρωπος μέσω της γενετικής μηχανικής και της τεχνολογίας του ανασυνδυασμένου DNA όχι μόνο ερευνά, αλλά και επεμβαίνει και τροποποιεί κατά βούληση το γενετικό υλικό των οργανισμών. Οι κύριες εφαρμογές της γενετικής μηχανικής αφορούν στην αντιμετώπιση ασθενειών και στην αύξηση της γεωργικής και κτηνοτροφικής παραγωγής.

α. Να εξηγήσετε τι περιλαμβάνει η γενετική μηχανική (μονάδες 3) καθώς και ποιες τεχνικές συνολικά ανήκουν στην τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA (μονάδες 3).

β. Να αναφέρετε τους θεμελιώδεις στόχους του ανθρώπου που επιτυγχάνονται μέσω της γενετικής μηχανικής (μονάδες 3) και να περιγράψετε τους δύο βασικούς τρόπους, με τους οποίους μπορούν σήμερα να παραχθούν φαρμακευτικές πρωτεΐνες με τη βοήθεια των σύγχρονων τεχνολογιών που περιλαμβάνει η γενετική μηχανική (μονάδες 4).

Μονάδες 13

α. Οι τεχνικές με τις οποίες ο άνθρωπος επεμβαίνει στο γενετικό υλικό αποτελούν τη γενετική μηχανική. Η τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA περιλαμβάνει όλες τις τεχνικές που οδηγούν σε μεταφορά του γενετικού υλικού από ένα οργανισμό σε έναν άλλο.

β. Μέσω της γενετικής μηχανικής μπορούν να κατανοηθούν το μυστήριο της ζωής και η εξέλιξη πάνω στη Γη. Επιπλέον, βελτιώνεται η υγεία και ο τρόπος διαβίωσης του ανθρώπου, μέσω εφαρμογών της γενετικής μηχανικής στην ιατρική, στη γεωργία και στην κτηνοτροφία. Φαρμακευτικές πρωτεΐνες παράγονται μέσω cDNA βιβλιοθηκών σε βακτήρια που αναπτύσσονται σε βιοαντιδραστήρες και μέσω των διαγονιδιακών οργανισμών.

73. Οι φαρμακευτικές πρωτεΐνες είναι πρωτεΐνες που χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία διαφόρων ασθενειών. Η ανάπτυξη της τεχνολογίας του ανασυνδυασμένου DNA έδωσε τη δυνατότητα παραγωγής τους σε μεγάλες ποσότητες. Μεταξύ των πρώτων μορίων που παρασκευάστη-

καν είναι η ινσουλίνη και οι ιντερφερόνες.

α. Να αναφέρετε το βιολογικό ρόλο των ιντερφερονών (μονάδες 2) και να εξηγήσετε πώς αξιοποιούνται ως φαρμακευτικές πρωτεΐνες (μονάδες 4).

β. Να περιγράψετε τα στάδια παραγωγής μιας φαρμακευτικής πρωτεΐνης σε μεγάλες ποσότητες, όπως είναι οι ιντερφερόνες, μέσω της χρήσης βακτηρίων (μονάδες 6).

Μονάδες 12

α. Οι ιντερφερόνες είναι αντιϊκές πρωτεΐνες που παράγονται και εκκρίνονται από κύτταρα που έχουν μολυνθεί από ιούς. Οι πρωτεΐνες αυτές, μετά την συνδεσή τους στην μεμβράνη των γειτονικών υγιών κυττάρων, επάγουν την παραγωγή άλλων πρωτεϊνών στα κύτταρα αυτά, οι οποίες εμποδίζουν τον πολλαπλασιασμό των ιών σε αυτά. Οι ιντερφερόνες είναι οικογένεια συγγενών πρωτεϊνών που ταξινομούνται ανάλογα με τη χημική και βιολογική ενεργότητά τους σε τρεις ομάδες: τις α, β και γ. Οι ιντερφερόνες παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον ως αντιϊκοί και πιθανόν ως αντικαρκινικοί παράγοντες.

β. Η παραγωγή των ιντερφερονών στα βακτήρια περιλαμβάνει την κατασκευή cDNA βιβλιοθήκης από ανθρώπινα κύτταρα. Συγκεκριμένα γίνεται απομόνωση συνολικού ώριμου mRNA (από κατάλληλα κύτταρα που έχουν μολυνθεί από ιό), κατασκευή αρχικά μονόκλωνων cDNA με τη διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής, τα οποία στη συνέχεια, με τη βοήθεια μιας DNA πολυμεράσης, θα μετατραπούν σε δίκλινα DNA. Αυτά ανασυνδυάζονται με κατάλληλα επιλεγμένα πλασμίδια που μπορεί να χρησιμοποιηθούν ως φορείς κλωνοποίησης. Ακολουθεί μετασχηματισμός επιλεγμένων βακτηρίων με τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια και πολλαπλασιασμός τους σε υγρό θρεπτικό υλικό. Στη συνέχεια, γίνεται η επιλογή των μετασχηματισμένων βακτηρίων που περιέχουν το cDNA του γονιδίου το οποίο κωδικοποιεί την ιντερφερόνη. Τέλος, τα βακτήρια αυτά αναπτύσσονται σε βιοαντιδραστήρα για παραγωγή της ιντερφερόνης σε καλλιέργεια μεγάλης κλίμακας και με κατάλληλες φυσικο-χημικές μεθόδους διαχωρισμού συστατικών μίγματος γίνεται η απομόνωσή της και ο καθαρισμός της.

---

**75.** Οι τεχνικές με τις οποίες ο άνθρωπος επεμβαίνει στο γενετικό υλικό των οργανισμών αποτελούν τη Γενετική Μηχανική, ενώ όλες οι τεχνικές που οδηγούν σε μεταφορά του γενετικού υλικού από έναν οργανισμό σε κάποιον άλλο, αποτελούν την τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA. Η Γενετική Μηχανική έχει ανοίξει νέους δρόμους σχετικά με την επίτευξη δύο θεμελιωδών στόχων του ανθρώπου που αφορούν στην κατανόηση του φαινομένου της ζωής, και τη βελτίωση της υγείας και του βιοτικού του επιπέδου.

α. Να αναφέρετε τους παράγοντες που οδήγησαν στην ανάπτυξη της τεχνολογίας του ανασυνδυασμένου DNA (μονάδες 6).

β. Να περιγράψετε τις δυνατότητες που έδωσε η τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA στον τομέα παρασκευής εμβολίων για τον άνθρωπο (μονάδες 2) και από τα εμβόλια νέας γενιάς, να περιγράψετε τα εμβόλια υπομονάδων (μονάδες 4).

Μονάδες 12

α. Η ανάπτυξη της τεχνολογίας του ανασυνδυασμένου DNA, έγινε εφικτή λόγω της απομόνωσης και χρήσης πολυάριθμων ενζύμων που έδωσαν στους επιστήμονες τη δυνατότητα “αναπαραγωγής” των διαδικασιών της αντιγραφής, της αντίστροφης μεταγραφής, μεταγραφής και μετάφρασης in vitro. Επιπρόσθετα, σε αυτό συνέβαλε η απομόνωση των περιοριστικών ενδονουκλεασών, ενζύμων που κόβουν το DNA σε κομμάτια όταν συναντήσουν συγκεκριμένη αλληλουχία βάσεων, καθώς και ειδικών φορέων που μεταφέρουν το DNA από κύτταρο σε κύτταρο (π.χ. πλασμίδια, DNA φάγων).

β. Η τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA, έδωσε τη δυνατότητα ανάπτυξης μιας νέας γενιάς



εμβολίων που υπερνικούν τα μειονεκτήματα των παραδοσιακών. Η κλωνοποίηση των γονιδίων έδωσε τη δυνατότητα ανάπτυξης νέων στρατηγικών για την πρόκληση ισχυρής ενεργητικής ανοσίας εναντίον του παθογόνου παράγοντα. Η παραγωγή των εμβολίων-υπομονάδων στηρίχθηκε στο γεγονός ότι όλα τα συστατικά ενός παθογόνου μικροοργανισμού δεν είναι απαραίτητα για την πρόκληση της ανοσολογικής αντίδρασης στον οργανισμό που θα προσβάλουν. Συνήθως, μόνο ορισμένες πρωτεΐνες επιφάνειας έχουν αντιγονική ιδιότητα. Τα εμβόλια-υπομονάδες στηρίζονται στην παραγωγή μόνο αυτών των συστατικών. Έτσι, γονίδια του παθογόνου μικροοργανισμού που κωδικοποιούν την πρωτεΐνη με την αντιγονική δράση, εισάγονται σε κύτταρα που αναπτύσσονται σε κυτταροκαλλιέργειες και παράγουν την πρωτεΐνη αυτή σε μεγάλες ποσότητες. Στη συνέχεια, η πρωτεΐνη καθαρίζεται και χρησιμοποιείται ως εμβόλιο.

---

**103.** Πολλά είδη ενζύμων δρουν έχοντας ως υπόστρωμα τα νουκλεϊκά οξέα. Μια συγκεκριμένη κατηγορία αυτών αποτελούν οι νουκλεάσες, οι οποίες δρουν καταλύοντας την υδρόλυση των φωσφοδιεστερικών δεσμών. Ορισμένες νουκλεάσες δρουν μόνο πάνω στο DNA, ενώ άλλες μόνο στο RNA. Κάποιες απ' αυτές δρουν μόνο στα ελεύθερα άκρα του DNA (εξωνουκλεάσες) ενώ άλλες δρουν στο εσωτερικό της αλυσίδας και ονομάζονται ενδονουκλεάσες.

α. Να αναφέρετε τις κατηγορίες στις οποίες διακρίνονται τα ένζυμα ανάλογα με τον τόπο δράσης τους στον οργανισμό (μονάδες 3) και να εξηγήσετε τον τρόπο ονοματολογίας των ενζύμων (μονάδες 3).

β. Να αναφέρετε τρία ένζυμα του κυττάρου που μπορούν να χαρακτηριστούν ως νουκλεάσες, σύμφωνα με τη δράση τους, εξηγώντας επιγραμματικά το ρόλο τους (μονάδες 6).

Μονάδες 12

α. Τα ένζυμα, ανάλογα με το αν δρουν μέσα στα κύτταρα του οργανισμού ή εκκρίνονται και δρουν έξω από αυτά, σε κοιλότητες όπως το στομάχι, διακρίνονται σε ενδοκυτταρικά και εξωκυτταρικά αντίστοιχα. Τα ένζυμα παίρνουν συνήθως το όνομά τους είτε με προσθήκη της κατάληξης "-άση" στο όνομα του υποστρώματος στο οποίο δρουν, είτε από τον τύπο της αντίδρασης που καταλύουν. Για παράδειγμα, οι λιπάσες καταλύουν αντιδράσεις διάσπασης λιπιδίων.

β. Παραδείγματα νουκλεασών:

1. DNA πολυμεράση: λειτουργεί διασπώντας φωσφοδιεστερικούς δεσμούς κατά την αφαίρεση των πρωταρχικών τμημάτων και κατά την επιδιόρθωση λαθών.

2. Επιδιορθωτικά ένζυμα της αντιγραφής: Τα λάθη που δεν επιδιορθώνονται από τις DNA πολυμεράσες, επιδιορθώνονται σε μεγάλο ποσοστό από ειδικά επιδιορθωτικά ένζυμα. Έτσι ο αριθμός των λαθών περιορίζεται στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς στο ένα στα  $10^{10}$ .

3. Περιοριστικές ενδονουκλεάσες: Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες παράγονται από βακτήρια και ο φυσιολογικός τους ρόλος είναι να τα προστατεύουν από την εισβολή «ξένου» DNA. Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες αναγνωρίζουν ειδικές αλληλουχίες 4-8 νουκλεοτιδίων στο δίκλωνο DNA. [Μία από τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες που χρησιμοποιείται ευρέως είναι η EcoRI που απομονώθηκε από το βακτήριο *Escherichia coli*. Το ένζυμο αυτό όποτε συναντά την αλληλουχία: 5'-G A A T T C-3'

3'-C T T A A G-5' στο γονιδίωμα, κόβει κάθε αλυσίδα μεταξύ του νουκλεοτιδίου G και του A (με κατεύθυνση 5'  $\leftrightarrow$  3').

(εναλλακτικά: Μπορεί να γίνει αναφορά και στα μικρά ριβονουκλεοπρωτεϊνικά σωματίδια, τα οποία αποτελούνται από snRNA και από πρωτεΐνες και λειτουργούν ως ένζυμα: κόβουν τα εσώνια και συρράπτουν τα εξώνια, μετατρέποντας το πρόδρομο mRNA σε ώριμο).

---

**109.** Η cDNA βιβλιοθήκη αποτελεί μια βιβλιοθήκη έκφρασης με την οποία μπορεί να παραχθεί το προϊόν ενός κλωνοποιημένου γονιδίου σε μεγάλη ποσότητα με τη βοήθεια βακτηριακών καλλιιεργειών.

α. Να δώσετε τον ορισμό αυτής της βιβλιοθήκης (μονάδες 3) και να γράψετε ποιες περιπτώσεις γονιδίων (που κωδικοποιούν πρωτεΐνες) μπορούν να εκφραστούν σε αυτή (μονάδες 3).

β. Να εξηγήσετε γιατί οι επιστήμονες ανέπτυξαν τη cDNA βιβλιοθήκη για την έκφραση κλωνοποιημένων γονιδίων σε βακτήρια και δεν χρησιμοποίησαν την γονιδιωματική βιβλιοθήκη για τον ίδιο σκοπό (μονάδες 6).

Μονάδες 12

α. Το σύνολο των βακτηριακών κλώνων που περιέχει αντίγραφα των ώριμων mRNA (και συγκεκριμένα μόνο των εξωνίων αυτών) όλων των γονιδίων που εκφράζονται σε συγκεκριμένα είδη κυττάρων αποτελεί μια cDNA βιβλιοθήκη. Σε αυτή, μπορούν να περιλαμβάνονται όλα τα γονίδια που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες (όχι τα γονίδια rRNA, tRNA, snRNA) που εκφράζονται σε έναν κυτταρικό τύπο, μία δεδομένη χρονική στιγμή ή/και σε ένα κατάλληλο αναπτυξιακό στάδιο, τα οποία θεωρητικά μπορούν όλα να εκφραστούν. Ωστόσο, στα βακτηριακά κύτταρα δεν μπορούν να γίνουν οι πρωτεϊνικές τροποποιήσεις των ευκαρυωτικών κυττάρων. Στην περίπτωση της ινσουλίνης, για παράδειγμα, το λειτουργικό μόριο παράγεται με κατάλληλη ενζυμική κατεργασία *in vitro*, όμως για να επιτευχθούν πιο σύνθετες τροποποιήσεις, η έκφραση των πρωτεϊνών πρέπει να γίνει σε ευκαρυωτικά και όχι βακτηριακά κύτταρα (π.χ. διαγονιδιακά ζώα ή καλλιέργειες ευκαρυωτικών κυττάρων).

β. Οι κλώνοι μιας cDNA βιβλιοθήκης περιέχουν ολόκληρα γονίδια (χωρίς εσώνια) που εκφράζονται σε πρωτεΐνες, ενώ μια γονιδιωματική βιβλιοθήκη περιέχει έναν τεράστιο αριθμό από κλωνοποιημένα κομμάτια χρωμοσωμικού DNA. Ορισμένα από τα κομμάτια αυτά περιέχουν ολόκληρα γονίδια, άλλα περιέχουν κομμάτια γονιδίων και άλλα τμήματα DNA που δεν κωδικοποιούν πρωτεΐνες. Συνεπώς δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί το κλωνοποιημένο DNA μια γονιδιωματικής βιβλιοθήκης για την παραγωγή πρωτεϊνών.

**113.** Αναμφίβολα, η παγκόσμια χρήση των αντιβιοτικών για την καταπολέμηση των μικροβίων έχει βελτιώσει σημαντικά την υγεία των ανθρώπων και έχει σώσει εκατομμύρια ανθρώπινες ζωές. Σήμερα ορισμένα από αυτά παράγονται βιοτεχνολογικά σε βιοαντιδραστήρες.

α. Να εξηγήσετε την δράση των αντιβιοτικών (μονάδες 3) και να αναφέρετε τις κυριότερες πηγές παραγωγής αντιβιοτικών με φυσικό τρόπο (μονάδες 3).

β. Να αναφέρετε πώς η τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA μπορεί να συμβάλλει στη βελτίωση της παραγωγής αντιβιοτικών (μονάδες 6).

Μονάδες 12

α. Τα αντιβιοτικά είναι χημικές ουσίες που θανατώνουν παθογόνους μικροοργανισμούς ή αναστέλλουν την ανάπτυξή τους. Παράγονται κυρίως από μικροοργανισμούς (μύκητες και βακτήρια -δευτερευόντως και από κάποια φυτά) ως προϊόντα του μεταβολισμού τους. Η πλειονότητα των πιο σημαντικών αντιβιοτικών έχουν απομονωθεί από το βακτήριο του εδάφους του γένους *Streptomyces*.

β. Η αποτελεσματική θεραπεία μιας ασθένειας προϋποθέτει την κατανόηση των βιοχημικών μηχανισμών και του γενετικού υπόβαθρου της, προκειμένου να εφαρμοστεί η κατάλληλη θεραπεία, είτε με φαρμακευτική αγωγή, είτε ακόμη και με «γενετική διόρθωση» της βλάβης. Η τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA άρχισε πρόσφατα να εφαρμόζεται στα πλαίσια της παραγωγής αντιβιοτικών με στόχο:

1. Την κλωνοποίηση όλων των γονιδίων που κωδικοποιούν ένζυμα απαραίτητα για τη βιο-

σύνθεση ενός αντιβιοτικού,

2. Την ανάπτυξη αντιβιοτικών με ισχυρότερη δράση εναντίον ορισμένων μικροβίων και με λιγότερες παρενέργειες,

3. Την κατασκευή γενετικά τροποποιημένων μικροοργανισμών με στόχο τη μεγαλύτερη απόδοση στην παραγωγή αντιβιοτικών.

---